

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	急性術後疼痛の治療標的としてのテトラヒドロビオプテリンの研究
Title(English)	Study of tetrahydrobiopterin as a therapeutic target for acute post-surgical pain
著者(和文)	新井宏和
Author(English)	Hirokazu Arai
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11575号, 授与年月日:2020年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:一瀬 宏,長田 俊哉,林 宣宏,加藤 明,中村 信大
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11575号, Conferred date:2020/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 新井 宏和
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 一瀬 宏
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

“痛み”は、生体における防御機構として必須な感覚であるが、“過度な痛み”や“慢性化した痛み”は、生活の質を維持するために鎮痛薬を処方するなど適切にコントロールする必要がある。急性術後疼痛に対する薬剤治療については、その治療効果からオピオイドが主に使用されているが、一方でオピオイドには呼吸抑制など重篤な副作用が認められる。最近ではオピオイドの乱用や過剰摂取などが原因による死亡例が増加しており社会問題となっていることから、急性術後疼痛に対する新規な非オピオイド治療薬が医療現場で求められている。

テトラヒドロビオプテリン (BH4) は、ドーパミンやセロトニンなどといった神経伝達物質や、一酸化窒素などの生合成に必須な補因子である。近年、BH4 はこれら生合成の補因子としての役割だけではなく、組織損傷や炎症により過剰に産生されると疼痛を惹起することが報告されている。特に神経障害性疼痛の発症に関与するエビデンスが取得されていることから、BH4 は神経障害性疼痛の創薬ターゲットとして着目されてきた。しかしながら、術後痛の発症における BH4 の関与については未だに明らかとなっていない。そこで本研究は、手術後痛の基礎研究に一般的に用いられている齧歯類の足底切開(Brennan)モデルを用いて、急性術後疼痛発症への BH4 の関与およびその発症メカニズムについて検討を行った。

ラット足底切開モデルの損傷皮膚、足底筋などを用いて RT-qPCR による遺伝子発現解析、また Western blotting 法によるタンパク質量変化解析を実施し、切開していない健側組織との比較を行った。切開した皮膚および足底筋組織において足底切開数時間後から 7 日間にわたり、BH4 産生酵素である GTP cyclohydrolase 1(GTPCH)および sepiapterin reductase (SPR) さらに一酸化窒素合成酵素の一つである inducible NOS (iNOS) の mRNA レベルが健側と比較して有意に上昇していた。一方、皮膚組織中の GTPCH および iNOS タンパク質量の変化を検討した結果、切開してから 24 時間後のみ上昇していた。ラット足底切開モデルの損傷組織において BH4 産生酵素の発現上昇が認められたことから、足底切開後の損傷皮膚中 BH4 濃度について健側と比較を行った。足底切開 1 日後から 7 日後まで、健側皮膚と比較して有意な BH4 濃度の上昇が確認された。

これらの結果から、足底切開による損傷組織において BH4 産生酵素の発現が上昇し、さらに BH4 の産生が亢進されることが明らかとなった。そこで、産生された BH4 が術後痛に寄与しているのかを明らかにするため、動物を用いた行動試験を実施した。組織中の BH4 濃度低下が報告されている *Spr* ノックアウトマウスを用いて足底切開モデルを作製し、切開してから 6 時間、1,2,3,4 および 7 日後に von Frey フィラメントアッセイを実施した。*Spr* ノックアウトマウス

群は、野生型および *Spr*ヘテロ接合型群と比較して、切開 6 時間後から 7 日後まで有意に疼痛閾値は高く、足底切開に対して抗侵害受容の表現型を示すことが明らかとなった。損傷組織中の BH4 濃度と疼痛との関連についてさらに明らかにするため、ラット足底切開モデルに対して末梢選択的な SPR 阻害剤 QM385 を投与し、検討を行った。QM385 を 1 日 1 回、3 日間経口投与し、2 回目と 3 回目の投与が終了してから 1,2,4 時間後に von Frey フィラメントアッセイを実施した。QM385 投与により、各測定時点において用量依存的な抗侵害受容作用が観察され、その作用は陽性対象として投与したオピオイド系鎮痛薬トラマドール 20mg/kg (i.p.)と同等であった。また、QM385 投与による明らかな行動異常などの変化は認められなかった。抗侵害受容作用が認められた QM385 投与 2 時間後と 4 時間後において、QM385 投与群と溶媒投与群の損傷皮膚組織中 BH4 濃度を比較した結果、QM385 投与群は有意に BH4 濃度が低下していた。これら動物試験結果より、BH4 が足底切開モデルの機械的刺激に対する痛覚過敏発症に寄与していることが示された。

BH4 の急性術後疼痛における疼痛発症メカニズムを明らかにするため、免疫染色法を用いて足底切開モデルの損傷組織における GTPCH 発現細胞の同定を試みた。その結果、GTPCH タンパク質は 2 つのマクロファージマーカー CD11b および CD68 について、ほぼ全ての CD11b および CD68 陽性細胞で GTPCH が共発現していることが明らかとなった。一方で、肥満細胞マーカー mast cell tryptase(MCT) および avidin との共局在を確認したところ、一部の MCT に対して GTPCH が共局在を示したのに対して avidin とは共局在は確認されなかった。これらの結果より、ラット足底切開モデルの損傷部位においてマクロファージが BH4 を産生している主な細胞であると考えられた。

本研究結果から、BH4 が急性術後疼痛モデルの機械痛覚過敏発症に寄与する重要な物質であることが明らかとなり、さらに、マクロファージ細胞がその疼痛発症メカニズムに関与している可能性が示唆された。末梢組織中の BH4 産生経路を阻害する手段および薬物は、オピオイドに代わる新たな急性術後疼痛治療法へと繋がることが期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	新井 宏和		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	一瀬 宏	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

As treatment for postsurgical pain (PSP) remains a major unmet medical need, the emergence of safe and innovative non-opioid drugs has been strongly coveted. Tetrahydrobiopterin (BH4) is an interesting molecule for gaining a better understanding the pathological mechanism of neuropathic pain and inflammatory pain. However, whether BH4 and its pathway are involved in the pathogenesis of PSP remains unclear. In this study, we shed light on the function of BH4 associated with PSP using a rodent paw incision model. We found that early in a rat paw incision model, the gene expression of GTP cyclohydrolase 1 (GTPCH), sepiapterin reductase (SPR), BH4-producing enzymes in the de novo pathway, and inducible NOS (iNOS) were significantly increased in incised compared with naïve paw skin. Although a significant increase in GTPCH protein levels was observed in incised paw skin until only 1 day after incision by western blot analysis, a significant increase in BH4 levels was observed until 7 days after incision. In vivo, *Spr*-knockout mice showed an antinociceptive phenotype in the hind paw incision compared with the wild-type and *Spr* heterozygote groups. Furthermore, QM385, the SPR inhibitor, showed a significant dose-dependent, antinociceptive effect, which was supported by a reduction in BH4 levels in incised skin tissues, with no apparent adverse effects. Immunohistochemical analysis demonstrated that macrophages expressing GTPCH protein were increased around the injury site in the rat paw incision model. These results indicate that BH4 is involved in the pathogenesis of mechanical hypersensitivity and macrophages may play a role for producing BH4 around the injury site in the paw incision model. Furthermore, our finding may suggest that inhibition of the BH4 pathway could provide a new strategy for the non-opioid treatment of acute PSP.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).