



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                     |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 変形性膝関節症疼痛におけるTransient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) の役割 [論文内容及び審査の要旨]                                     |
| Author(s)           | 日向, 美紀枝                                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                               |
| Degree Name         | 博士(薬科学)                                                                                                             |
| Dissertation Number | 甲第13336号                                                                                                            |
| Issue Date          | 2018-09-25                                                                                                          |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/71878">https://hdl.handle.net/2115/71878</a>                                   |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                     |
| File Information    | Mikie_Hinata_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                  |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 日向 美紀枝

### 学 位 論 文 題 名

変形性膝関節症疼痛における Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) の役割

変形性膝関節症 (Osteoarthritis; OA) は加齢などに伴い、膝関節軟骨組織の修復機能が低下し、軟骨組織の破壊が進行する疾患であり、高齢者においては高い罹患率を示す。OA はこわばりや慢性的な痛みを伴い、著しい Quality of life (QOL) の低下を引き起こすが、根治を指向した治療法はなく、疼痛管理が主な治療方針となっている。OA 疼痛に対して、既存の承認薬や注目される開発品はあるものの、薬効やコスト、副作用面で課題があり、これらを克服した OA 疼痛治療薬が望まれている。

Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) は機械刺激や温度、アラキドン酸代謝物など複数のリガンドによって活性化するカチオンチャネルである。後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) にも発現が見られることから、各種疼痛における役割についての非臨床研究がなされているものの、OA 疼痛に関する報告はない。以上のような背景から TRPV4 の OA 疼痛への関与とそのメカニズムについて解析を行った。

Monoiodoacetate (MIA) を関節腔内に注入し OA 動物モデルを作製し (MIA モデル)、grip strength 法により疼痛評価を行った。TRPV4 アンタゴニストである HC067047 (300 $\mu$ M) あるいは GSK2193874 (3 $\mu$ M) を 50 $\mu$ L の容量で患部関節内に投与したところ、OA 疼痛は有意に抑制された。このことから、TRPV4 が OA 疼痛に関与していることが示唆された。

TRPV4 が OA 疼痛に関与するメカニズムを明らかにするため、まず、MIA モデル動物における TRPV4 の機能亢進について検討した。MIA モデル患部膝関節内に TRPV4 アゴニストである GSK1016790A (1.5 $\mu$ g/50 $\mu$ L) を投与したところ、vehicle 投与群と比較して有意に疼痛関連行動時間が増加した。しかし、Sham 動物においては GSK1016790A 投与によって有意な疼痛関連行動時間の増加は観察されなかった。この結果から、MIA モデルにおいては TRPV4 が感作された状態にあることが示唆された。

TRPV4 はリン酸化によってその機能が調節されることが報告されていることから、Ser824 リン酸化 TRPV4 (Ser824 pTRPV4) に対する ELISA 系を新たに構築し、MIA モデル動物の DRG におけるリン酸化 TRPV4 量について検討したところ、Total TRPV4 量に変化はなかったが、Ser824 pTRPV4 は有意に増加していた。また、TRPV4 強制発現細胞に PKC 活性化剤を処置したところ、GSK1016790A に対する応答性が有意に増加していた。以上の結果から、TRPV4 は、発現増加ではなく機能亢進により OA 疼痛に関与している可能性が示唆された。

次に、TRPV4 内在性リガンド量の変化について、TRPV4 の内在性リガンドの 1 つである 5,6-epoxyeicosatrienoic acid (5,6-EET) に着目して検討した。本実験では、MIA モデルに加え、別の OA 動物モデルである半月板切除 (Meniscectomy; MNx) モデルを用いた。これらモデル動物の膝関節洗浄液中の 5,6-EET を含むアラキドン酸代謝物を、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて定量した。どちらのモデルにおいても、5,6-EET はコントロールと比較して有意に増加しており、炎症に深く関与するアラ

キドン酸や PGE<sub>2</sub> も有意に増加していた。さらに、OA 患者の関節液サンプルの分析も同様に行ったところ、一部の検体において 5,6-EET やその代謝物である 5,6-dihydroxyeicosatrienoic acid (5,6-DHET) の存在を認めた。以上の結果から、OA 疼痛に 5,6-EET の増加が関与している可能性が示唆された。

本研究において、1) TRPV4 阻害より OA 疼痛が有意に抑制されること、2) OA 疼痛モデルでは TRPV4 が感作されている状態にあること、3) OA 疼痛モデルの DRG においては受容体機能亢進に関与するリン酸化された TRPV4 が増加していること、4) OA 疼痛モデルの患部膝関節内において TRPV4 内在性リガンドである 5,6-EET 量が増加していること、5) OA 患者の関節液中においても 5,6-EET あるいはその代謝物が増加していることを明らかにした。これらの知見は OA 疼痛における TRPV4 の関与について理解を深めるとともに、OA 疼痛治療薬の新たなターゲットとしての可能性を示した。