



Title	変形性膝関節症疼痛におけるTransient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) の役割
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13336
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73916
Type	doctoral thesis
File Information	Mikie_Hinata.pdf



博士学位論文

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

日向 美紀枝

北海道大学 大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬理学研究室

平成 30 年 9 月

目次

略語表	4
-----	---

序論	7
----	---

本論

第 1 章 TRPV4 アンタゴニストの OA モデルに対する効果

1-1 緒言	8
1-2 実験材料と実験方法	9
1-2-1 実験材料	9
1-2-2 MIA モデル作製	9
1-2-3 Grip strength 法と薬効評価	9
1-2-4 統計処理	10
1-1 実験結果	11
1-3-1 TRPV4 アンタゴニストの鎮痛効果	11
1-4 考察	12

第 2 章 OA 疼痛時の TRPV4 受容体の感作とリン酸化

2-1 緒言	13
--------	----

2-2	実験材料と実験方法	14
2-2-1	実験材料	14
2-2-2	TRPV4 アゴニスト投与による疼痛関連行動評価	15
2-2-3	タンパク質サンプル調整	15
2-2-4	total TRPV4 /リン酸化 TRPV4 に対する サンドイッチ ELISA	15
2-2-5	TRPV4-CHO を用いたカルシウム流入試験	16
2-2-6	統計処理	16
2-3	実験結果	17
2-3-1	TRPV4 アゴニスト投与による疼痛関連行動誘発	17
2-3-2	total TRPV4 およびリン酸化 TRPV4 に対する サンドイッチ ELISA 系構築	18
2-3-3	MIA モデル動物の DRG における total TRPV4 およびリン酸化 TRPV4 量	20
2-3-4	リン酸化による TRPV4 アゴニストに対する 応答性の変化	20
2-4	考察	21

第 3 章 OA 疼痛時の TRPV4 リガンド 5,6-EET 量の変化

3-1	緒言	23
3-2	実験材料と実験方法	24
3-2-1	実験材料	24
3-2-2	半月板切除モデル (MNx) の作製	24
3-2-3	OA モデルの膝関節洗浄液の回収	24
3-2-4	OA 患者の膝関節液の回収	24
3-2-5	液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS)による脂質量測定	24
3-2-6	統計処理	25

3-3 実験結果	26
3-3-1 OA モデル関節洗浄液中の 5,6-EET および 他のアラキドン酸代謝物量	26
3-3-2 OA 患者関節液中の 5,6-EET と 5,6-DHET および 他のアラキドン酸代謝物量	29
3-4 考察	29
総括	31
引用文献	33
謝辞	39

略語表

20OH-LTB ₄	20-hydroxy-LTB ₄
AA	Arachidonic acid
AMP	Adenosine monophosphate
CHO	Chinese Hamster Ovary
COX	Cyclooxygenase
DHET	Dihydroxyeicosatrienoic acid
dhk-PG	13,14-dihydro-15-keto prostaglandin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DRG	Dorsal root ganglion
EC ₅₀	Effective concentration
EET	Epoxyeicosatrienoic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HETE	Hydroxyeicosatrienoic acid
HRP	Horseradish Peroxidase
IBS	Irritable bowel syndrome
IL-6	Interleukin-6
KLH	Keyhole limpet hemocyanin

LC-MS/MS	Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry
LT	Leukotriene
LXA4	Lipoxin A4
MIA	Monoiodoacetate
MNx	Meniscectomy
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NGF	Nerve growth factor
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoarthritis
oxo-ETE	Oxoeicosatetraenoic acid
PAR2	Protease-activated receptor 2
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	0.05% Tween-20 / PBS
PG	Prostaglandin
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
QOL	Quality of life
SD	Sprague-Dawley
SEM	Standard error of the mean
TMB	Tetramethylbenzidine

TRPV	Transient receptor potential vanilloid
TX	Thromboxane

序論

変形性膝関節症（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る。このような軟骨組織の破壊に加え、軟骨組織破壊に伴い産生される組織片や代謝物が関節内組織の炎症を引き起こし、膝のこわばりや慢性的な疼痛の原因となる。これらの症状は歩行や運動に影響を及ぼすことにより、日常生活に支障をきたし、さらには抑うつ状態や睡眠障害にもつながり、著しく QOL を低下させる。また OA は、80 歳以上の高齢者においては、女性では 53%、男性では 33% が罹患しているとの報告もあり、高齢者において罹患率が非常に高い。しかしながら、OA の発症メカニズムは不明であり、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。現在 OA 疼痛に使用される薬物は、主に非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）であり、近年はセロトニン/ノルアドレナリン取り込み阻害剤が OA 疼痛に対して適用を取得し、さらに抗 NGF 抗体の開発も注目されている。一方で、これらの薬物には薬効やコスト、副作用の面で課題があり、これらを克服するために新たなメカニズムの OA 疼痛治療薬が望まれている [1,2]。

TRPV4 は TRPV ファミリーに属する非選択的カチオンチャネルであり、機械刺激[3]や温度刺激[4]、低浸透圧刺激[5]、5,6-EET[6] などのアラキドン酸代謝物によって活性化することが知られている。また発現分布は比較的広範にわたり、後根神経節（DRG）や腎臓、膀胱、血管内皮細胞などに分布している[7-10]。DRG に発現していることから、TRPV4 の疼痛における役割も研究されており、非臨床研究において、顎関節症による疼痛[11]や内臓痛[12]、抗がん剤や糖尿病による神経障害性疼痛[13]などへの関与が示唆されている。しかしながら、これらの疾患と同様、もしくはそれ以上に患者数の多い OA 疼痛における TRPV4 の役割については未だ報告されていない。

そこで本研究においては、TRPV4 の OA 疼痛に対する治療薬ターゲットとしての可能性を探索するため、TRPV4 の OA 疼痛への関与や、そのメカニズムについて解析を行った。主に MIA により軟骨を特異的に破壊した動物モデルである MIA モデルを用いて、TRPV4 の OA 疼痛への関与について検討するとともに、そのメカニズムとして、TRPV4 受容体の感作状態とリン酸化、TRPV4 の内在性リガンドである 5,6-EET 量の二つの側面から解析を行った。

第1章 TRPV4 アンタゴニストの OA モデルに対する効果

1-1 緒言

いくつかの疼痛モデルにおいて TRPV4 の機能抑制によって痛みが抑制されることが報告されているにもかかわらず[11-13]、慢性疼痛疾患の中でも患者数の多い OA 疼痛における TRPV4 の役割についてはこれまで報告されていない。そこで、まず、OA モデル動物の疼痛に対する TRPV4 アンタゴニストの効果について検討することにより、OA 疼痛への TRPV4 の関与について検討した。

本研究においては、OA 疼痛モデルとして主に MIA モデルを用いた。本モデルでは MIA を関節腔内に局所投与することにより軟骨を特異的に破壊した。本モデル動物の関節においては、軟骨組織が破壊されるだけでなく、NGF や IL-6 といった成長因子・サイトカイン類の増加が認められ[14]、さらに **weight bearing** 法や **grip strength** 法といった複数の疼痛評価系において疼痛様行動が報告されている[15,16]。これらの特徴は OA 患者のものと類似しており、臨床の少なくとも一部を反映したモデルであると考えられる。また、臨床において、安静時疼痛と体動時疼痛に対してそれぞれ薬効プロファイルが異なることが報告されており、疼痛のメカニズムに違いがあることが示唆されている [17]。TRPV4 は機械刺激に応答することが知られていることから、体動時痛に特に有効性を示す可能性が考えられる。以上の背景から、体動時痛の評価に適しているとされている **grip strength** 法[16]を用いて疼痛評価を実施した。

1-2 実験材料と実験方法

1-2-1 実験材料

1) 実験動物

SD ラット（クレア）の雄を 5 週齢で購入し、8 週齢（250–350 g）で薬効評価に用いた。動物は 3 匹ずつケージに入れ、湿度 $50 \pm 20\%$ 、室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ に保たれた環境にて、午前 8 時から午後 8 時までを明期、午後 8 時から午前 8 時までを暗期とした明暗サイクル下で飼育した。本研究における動物実験は塩野義製薬動物実験適正運用委員会にて承認を得て実施した。

2) 使用薬物

TRPV4 アンタゴニストである HC067047 および GSK2193874 は塩野義製薬・医薬研究センターにて合成したものを用いた。

1-2-2 MIA モデル作製

イソフルラン麻酔下にて、6 週齢 SD ラットの右後肢膝付近を剃毛し、生理食塩水に溶解した MIA (2mg/50 μL) を 27G 注射針を用いて関節腔内に注入した。Sham 動物には MIA ではなく同量の生理食塩水のみを注入した。MIA 注入後約 2 週間の時点で実験に用いた。

1-2-3 Grip strength 法と薬効評価

疼痛評価は grip strength meter (San Diego Instruments) を用いて実施した。ラットの首の部分と尾の根本の部分を保定し、ラットの両後足で grip strength meter のメッシュ部分をつかませ、ラットを尾の方向に向けてゆっくりとどちらかの足を離すまで平行に動かした。その際の最大握力 (g) を記録した。この測定を 1 個体に対して 3 回実施し、その平均値をそれぞれの体重 (kg) で除した値 (grip strength (g) / body weight (kg)) をデータとして用いた。Fig. 2 以後の実験には 950 grip strength (g) / body weight (kg) 以下の動物のみを MIA モデルとして使用した。基準を満たした動物のみを grip strength (g) / body weight (kg) の値 (pre 値) に基づいて群分けし、50 μL の vehicle (30% DMSO / 生理食塩水)、HC067047 (300 μM) あるいは GSK2193874 (3 μM) をイソフルラン麻酔下にて患部膝関節内に注入した。その 30 分後に grip strength 法による評価を実施した (post 値)。

薬効は、各 MIA モデル動物のデータから下記の数式で表される回復率 (Reversal (%)) を算出し、その平均値で示した。

$$\frac{\text{MIA post値} - \text{MIA pre値}}{\text{Sham pre値平均} - \text{MIA pre値}} \times 100$$

1-2-4 統計処理

結果は全て平均値±標準誤差（SEM）にて表した。有意差検定はF検定後にunpaired *t*testを用いて行った。P<0.05（両側）を有意差ありとした。

1-3 実験結果

1-3-1 TRPV4 アンタゴニストの鎮痛効果

まず、既報[18]と同様に grip strength 法において、MIA モデルにおいて grip strength が低下していることを確認した (Fig.1)。

Vehicle、HC067047 あるいは GSK2193874 を MIA モデルの患部関節内に投与し、30 分後に grip strength 法による評価を実施したところ、TRPV4 アンタゴニストである HC067047 あるいは GSK2193874 を投与した群では、vehicle 投与群と比較して有意な回復を示した (Fig.2)。

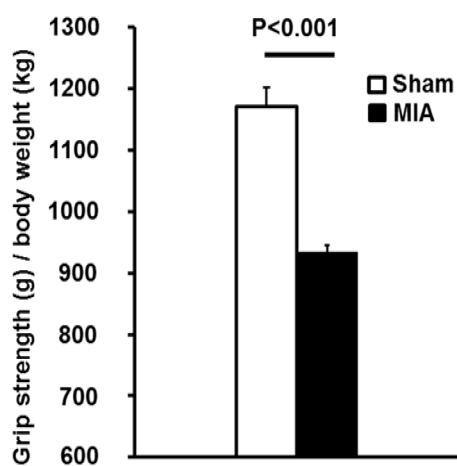


Fig.1 Grip strength 法を用いた MIA モデルの疼痛評価
N=9-12

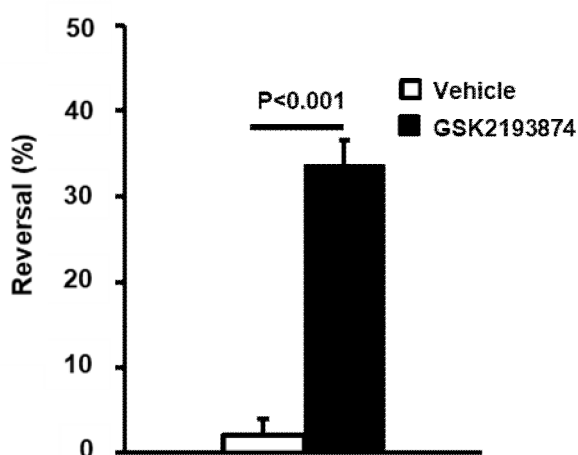
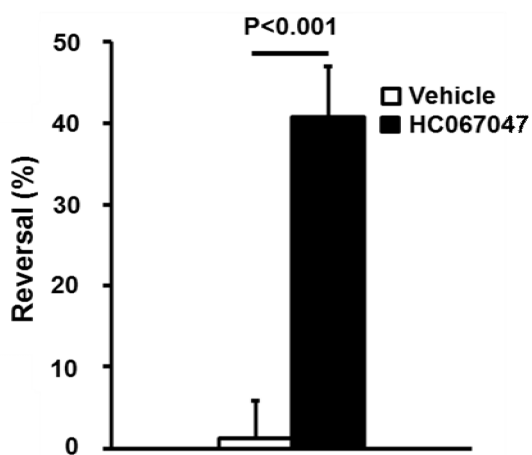


Fig.2 MIA モデルにおける TRPV4 アンタゴニストの疼痛抑制効果
HC067047: N=14-15, GSK2193874: N=16-17

1-4 考察

Grip strength 法による MIA モデルの疼痛評価は既報[16]を参考に実施した。この報告において、MIA モデル（作製後 14 日）では、grip strength (g) / body weight (kg)の値はおよそ 700 となっているが、本研究においてはおよそ 900 であった。この疼痛発現の差は、既報においては、MIA モデル作製に用いている MIA の濃度は 3mg/50 μ L であり、本研究では 2mg/50 μ L であることによると考えられる。しかしながら、本研究においても sham 動物に比較して有意な grip strength (g) / body weight (kg)の低下を確認しており、さらに我々のこれまでの研究から[18]、膝軟骨組織の破壊は十分に起きていることから、本研究で用いた MIA 濃度は適切であったと考えられる。

以上の結果から、MIA モデルにおける疼痛を grip strength 法により評価できること、さらには、TRPV4 アンタゴニストが MIA モデルにおける疼痛を有意に抑制することが示された。

以上の結果から、TRPV4 が OA 疼痛に関与していることが示唆された。そのメカニズムを解析するため、第 2 章においては OA 疼痛時の TRPV4 受容体機能変化に関する解析を、第 3 章においては OA 疼痛時の TRPV4 内在性リガンドである 5,6-EET 量変化に関する解析を実施した。

第2章 OA 疼痛時の TRPV4 受容体の感作とリン酸化

2-1 緒言

TRPV4 KO マウスと野生型マウスを比較した場合、naïve な状態では温度に対する疼痛閾値は変わらないが、炎症を起こした際の疼痛閾値は野生型に比べ TRPV4 KO マウスで上昇することが報告されている[19]。また、*in vitro* の研究においても、炎症に関与している PAR2 を刺激した条件下でアゴニストを用いて TRPV4 を活性化させるとその応答性が増大するといった報告がなされている[12]。これらの報告から、TRPV4 は正常状態では疼痛には大きく関与しないが、炎症時には TRPV4 の疼痛への関与が大きくなっていることが考えられた[20]。また、TRPV4 と同じファミリーである TRPV1 はリン酸化によって機能調節されていることが報告されており[21-23]、TRPV4 についてもいくつかのリン酸化部位が示唆されている[24,25]。特に Ser824 のリン酸化は機能亢進に寄与していることが示唆されている[26,27]。これまでの我々の研究から、MIA モデルの DRG において、PKC が活性化状態にあることが示されている[18]。さらに、先述の PAR2 はその下流で PKC などのキナーゼを活性化することが報告されている[28]。しかしながら、疾患モデル動物の組織において TRPV4 のリン酸化を検出し、定量的に比較した報告はない。以上のような背景から、OA 疼痛時に TRPV4 が感作されているか、さらに、Ser824 のリン酸化が OA 疼痛時に増加しているかについて検討を行った。

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 実験材料

1) 実験動物

1-2-1 1) と同様のものを用いた。

2) 使用細胞

CHO 細胞を親細胞として、TRPV4 安定発現細胞 (TRPV4-CHO) を樹立した。TRPV4 cDNA (GenBank accession number NM_023970.1) を組み込んだ pcDNA3.1(-) ベクター (Invitrogen) を CHO 細胞に遺伝子導入した。細胞は、下記組成の培地で維持した。

培地組成	メーカー
DMEM(high-glucose) with GlutaMAX™	Sigma
10% fetal bovine serum	Invitrogen
0.1mM MEM Non-Essential Amino Acid Solution	Gibco
25mM HEPES	Sigma
1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution	Nacalai Tesque
10µg/mL Blastcidin	Gibco

3) 使用薬物

TRPV4 アゴニストとして GSK1016790A (Sigma-Aldrich) を用い、PKC 活性化剤として PMA (Invitrogen) を用いた。

4) 使用抗体

Ser824 リン酸化 TRPV4 に対する抗体 (anti-pS824-TRPV4 antibody) は、抗原としてペプチド CGRLRRDRWS(pS)VVPRVVE を KLH に結合させたものを用い、ウサギに免疫した。ウサギから採取した血清はリン酸化ペプチド抗原と非リン酸化ペプチドを用いてカラム精製した。以上の抗原ペプチド合成から抗体精製までは Sigma-Aldrich に委託した。Ser824 リン酸化 TRPV4 に対する抗体以外に使用した抗体は以下の通りである。

抗体	本研究における用途	メーカー
Rabbit anti-total-TRPV4 middle region antibody	ELISA (固相)	Aviva Systems Biology Corporation CatNo.ARP35416_P050
Rabbit anti-total-TRPV4-C terminal region antibody	ELISA (液相)	Enzo Life Sciences CatNo.BML-SA565

2-2-2 TRPV4 アゴニスト投与による疼痛関連行動評価

覚醒下において、Sham ラットあるいは MIA モデルラットの患部膝関節内(右後肢膝関節内)に GSK1016790A 1.5 μ g/50 μ L (10%DMSO / 生理食塩水)を投与した。投与後すぐに行動観察筒にいれ、足を引っ込める、あるいは上げる行動をした時間を 5 分間計測した。

2-2-3 タンパク質サンプル調製

ラットを麻酔下にて断頭、放血後、右側 L3 と L4 の DRG を採取し、タンパク質抽出まで -80 $^{\circ}$ C にて保存した。Complete Mini EDTA-free tablet and PhosSTOP tablet (Roche) を含む Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology) にてホモジナイズし、15000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、その上清を回収した。TRPV4-CHO は、PMA 処置後 (2-2-5 参照) PBS にて洗浄し、DRG と同様に溶解、遠心し、上清を回収した。タンパク質濃度は BCA Protein Assay-Reducing Agent Compatible Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

2-2-4 total TRPV4 / リン酸化 TRPV4 に対するサンドイッチ ELISA

96 穴プレートに anti-pS824-TRPV4 antibody (5 μ g/mL) もしくは anti-total-TRPV4 middle region antibody (5 μ g/mL) を 4 $^{\circ}$ C で終夜インキュベートすることによりコーティングし、1% Block Ace (DS Pharma Biomedical) にて室温で 2 時間ブロッキングした。PBST にて洗浄し、50 μ L のタンパク質サンプルを加え、4 $^{\circ}$ C で終夜インキュベートした。PBST で洗浄した後、50 μ L の Streptavidin-Poly-HRP (500 ng/mL; Thermo Scientific) と NHS-PEG4-Biotin (Thermo Scientific) を用いてビオチン化した anti-total-TRPV4 C terminal region antibody を加え、室温で 2 時間インキュベートした。PBST にて洗浄した後、50 μ L の TMB (Dako) 基質溶液を加え、0.5N の硫酸で反応を止めた。その後 450nm の吸光度を Envision 2102

Multilabel Reader (PerkinElmer)を用いて測定した。

2-2-5 TRPV4-CHO を用いたカルシウム流入試験

96 穴プレートに播種した TRPV4-CHO 細胞に、0.1% Pluronic F-127 (Molecular Probes) を含んだ assay buffer (pH 7.4)にカルシウム指示薬である 5 μ M Fluo-4 AM (Dojindo) を加えた溶液を加え、37°Cで1時間インキュベートすることにより、指示薬を細胞内に取り込ませた。Assay buffer にて洗浄後、3 μ M PMA を含んだ assay buffer を加え、37°Cで1時間インキュベートした。assay buffer で洗浄後、assay buffer 中にて 30°Cで10 分間インキュベートした。その後、FDSS 7000 functional drug screening system (Hamamatsu Photonics) を用いて 480nm の励起光で励起し、540nm の波長を検出することによりカルシウム流入を測定した。ベースライン測定後、TRPV4 アゴニストである GSK1016790A を 1%DMSO に溶解し 10 分の 1 の容量で加えた (最終濃度 0.1%DMSO)。GSK1016790A によって誘発されたカルシウム流入を計測、GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software) にて用量反応曲線を作成し、EC50 を算出した。なお、assay buffer の組成は下記の通りである。

Assay buffer 組成	メーカー
Hanks' balanced salt solution	Nissui Pharmaceutical
20 mM HEPES	Sigma-Aldrich
2.5 mM probenecid	Sigma

2-2-6 統計処理

結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) にて表わした。TRPV4 アゴニスト投与による疼痛関連行動試験については Dunnett's test を用いて検定を行った。それ以外については、1-2-4 と同様に処理した。P<0.05 (両側) を有意差ありとした。

2-3 実験結果

2-3-1 TRPV4 アゴニスト投与による疼痛関連行動誘発

はじめに MIA モデルにおいて TRPV4 が感作されているかどうかを検証するため、MIA モデルおよび sham 動物の膝関節内に TRPV4 アゴニストである GSK1016790A を投与し、それによって誘発される疼痛関連行動を計測した。Sham 動物では GSK1016790A を関節内投与しても、vehicle 投与と比較して有意な疼痛関連行動の増加は認められなかったが、MIA モデルにおいては vehicle 投与と比較して疼痛関連行動が有意に増加した (Fig.3)。以上の結果から、MIA モデルにおいては TRPV4 が感作されており、sham 動物と比較し、疼痛への寄与が大きくなっていることが示唆された。

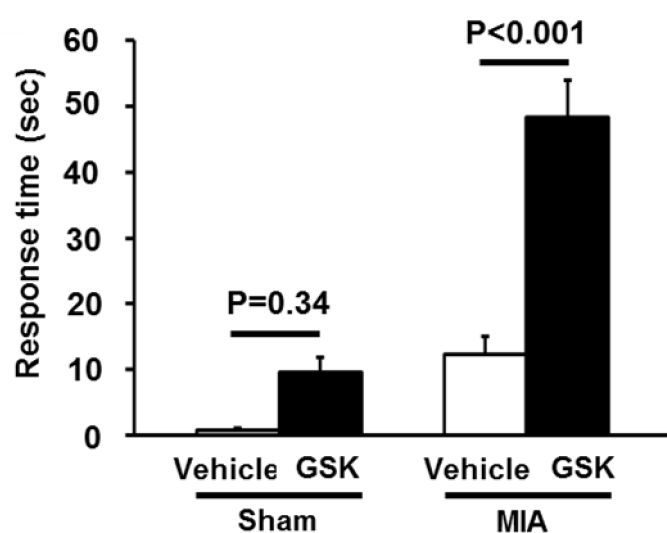


Fig.3 MIA モデル関節内への GSK1016790A 投与後の疼痛関連行動
N=8-11

2-3-2 total TRPV4 およびリン酸化 TRPV4 に対するサンドイッチ ELISA 系構築

次に、感作のメカニズムについて解析を行った。感作のメカニズムとして、1) 感覚神経における TRPV4 発現増加と、2) TRPV4 機能の亢進の2つが考えられた。後者については、TRPV4 は TRPV1 などと同様にリン酸化による機能調節を受けることが知られている[24-27]。特に、Ser824 のリン酸化については複数の報告がなされており、Ser824 のリン酸化によってアゴニストに対する応答性が亢進することが示唆されていることから、Ser824 のリン酸化に着目した[26,27]。

Total TRPV4 と Ser824 pTRPV4 に対するサンドイッチ ELISA 系の構築を行った。Total TRPV4 に対する ELISA 系では、TRPV4-CHO サンプルにおいてタンパク量依存的なシグナルが検出され、親細胞からは全くシグナルは検出されなかった (Fig.4A)。さらに、ラット DRG サンプルにおいてもタンパク量依存的なシグナルが確認された (Fig.4B)。以上の結果から、Total TRPV4 に対する ELISA 系が TRPV4 特異的なシグナルを検出できていることが確認された。

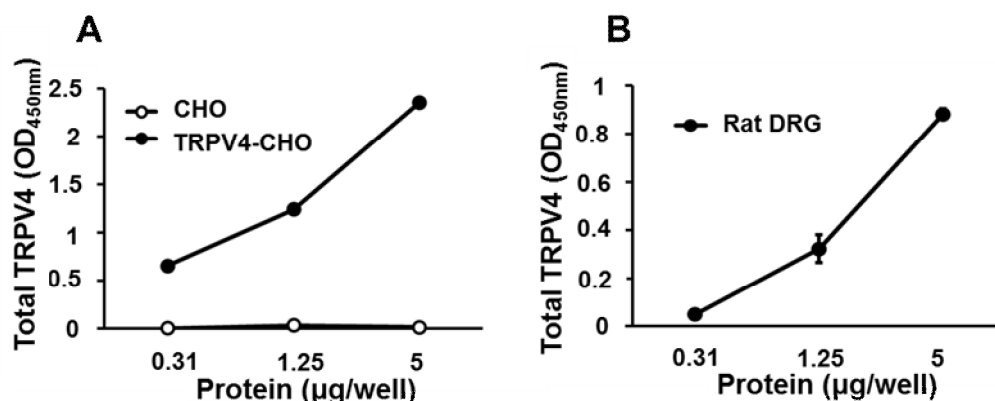


Fig.4 Total TRPV4 ELISA 系の構築

A: TRPV4-CHO サンプルを用いたタンパク量依存的シグナル

N=1 (duplicate)

B: ラット DRG サンプルを用いたタンパク量依存的シグナル

N=3 (duplicate)

一方、Ser824 pTRPV4 に対する ELISA 系では、PKC 活性化剤である PMA を処置した TRPV4-CHO サンプルにおいて検出されたシグナルが、リン酸化 Ser824 抗原ペプチドによってペプチド濃度依存的に拮抗されたが、Ser824 抗原ペプチドでは全く拮抗されなかった (Fig.5A)。同様の結果が MIA モデル DRG

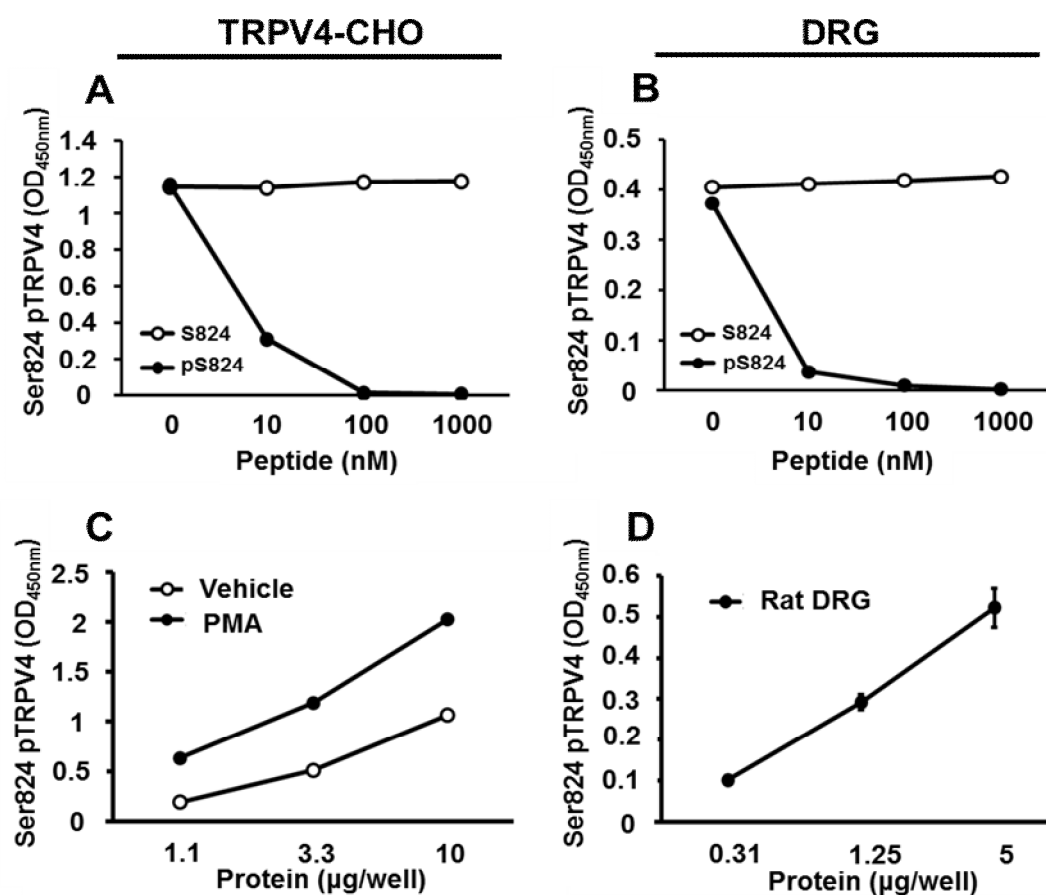


Fig.5 Ser824 pTRPV4 ELISA 系の構築

A: PMA 処置 TRPV4-CHO サンプルを用いた抗原ペプチドによる拮抗試験

N=1 (duplicate)

B: MIA モデル DRG サンプルを用いた抗原ペプチドによる拮抗試験

N=1 (duplicate)

C: PMA または vehicle 処置 TRPV4-CHO サンプルを用いたタンパク量依存的シグナル N=2 (duplicate)

D: MIA モデル DRG サンプルを用いたタンパク量依存的シグナル

N=3 (duplicate)

サンプルにおいても確認された (Fig.5B)。さらに、vehicle を処置した TRPV4-CHO サンプルよりも PMA を処置したほうがシグナルは強く検出された (Fig.5C)。また、MIA モデルの DRG サンプルにおいても、タンパク量依存的なシグナルの増大が確認された (Fig.5D)。以上の結果から、Ser824 pTRPV4 に対する ELISA 系が特異的なシグナルを検出しており、組織由来のサンプルにおいてもシグナルを検出できることが確認された。

2-3-3 MIA モデル動物の DRG における total TRPV4 およびリン酸化 TRPV4 量

上述の通り構築したサンドイッチ ELISA 系を用いて、Sham および MIA モデル動物の DRG における total TRPV4 量と Ser824 pTRPV4 量について検討を行った。Total TRPV4 量については、sham 動物と MIA モデルとで差は認められなかったが、Ser824 pTRPV4 量は MIA モデルのほうが有意に増加していた (Fig.6)。

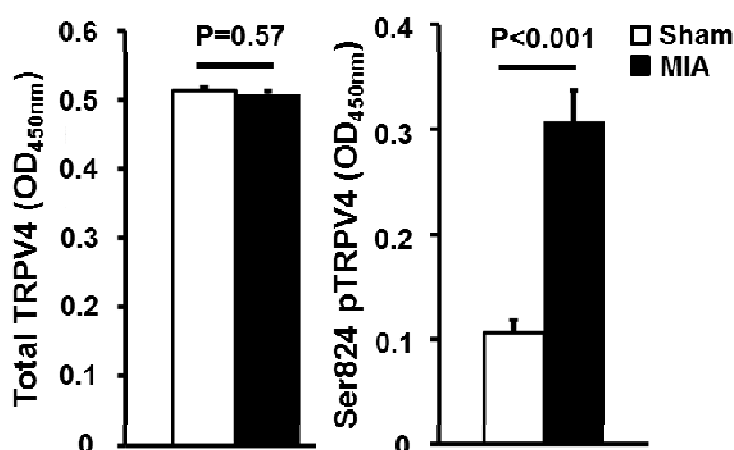


Fig.6 MIA モデル動物 DRG における total TRPV4 およびリン酸化 TRPV4 量
N=6
タンパク量
10µg/well

2-3-4 リン酸化による TRPV4 アゴニストに対する応答性の変化

PMA 処置した TRPV4 強制発現細胞において、TRPV4 アゴニストである GSK1016790A に対する応答性が亢進した (Fig.7; PMA 処置群 EC₅₀ : 0.064±0.010 µM vs. control 群 EC₅₀ : 0.15±0.02 µM)。

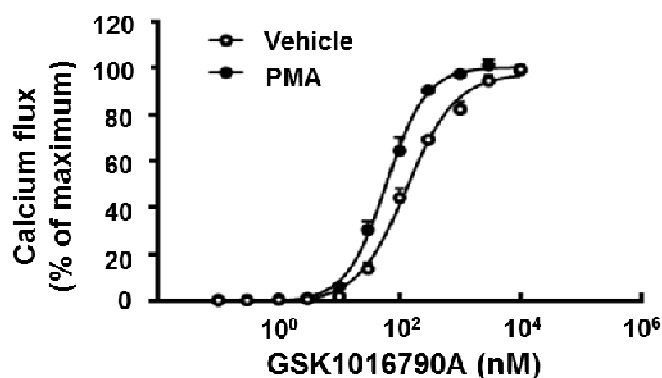


Fig.7 PMA 処置による
TRPV4-CHO のアゴニスト
に対する応答性の変化
N=4 (triplicate)

2-4 考察

以前の我々の研究において、MIA モデル動物の DRG において活性化型 PKC が増加していることを明らかにした[18]。本研究において認められた TRPV4 リン酸化の少なくとも一部は PKC を介したものであることが考えられる。TRPV4 のリン酸化に関する研究は点変異を導入した TRPV4 を用いた *in vitro* 実験による解析がほとんどであった[26,27]。本研究において、新たに Ser824 pTRPV4 を定量的に検出できるサンドイッチ ELISA 系を構築し、病態モデル動物組織における解析を実施し、TRPV4 のリン酸化を解析する上で新たな研究ツールを構築することができた。

TRPV4 強制発現細胞を用いた実験において、PMA 処置をすることによって TRPV4 アゴニストの用量反応曲線が低用量側にシフトした。この結果はリン酸化によってアゴニストに対する応答性が亢進していることを示唆しているが、 E_{max} は control 処置群と変わらなかった。一方で、MIA モデル患部関節内アゴニスト投与による疼痛関連行動評価においては、sham 動物にアゴニストを投与しても有意な疼痛関連行動を起こさず、MIA モデルにおいてのみ顕著な疼痛関連行動の増加を認めた。TRPV4 アゴニストによる疼痛関連行動の惹起にはカルシウム流入の増大だけでなく、他のメカニズムも関与していると考えられる。既報においても、炎症スープやカラゲニンによって炎症を起こさせた動物においてのみ TRPV4 アゴニスト刺激に対する疼痛関連行動が惹起されており、そのメカニズムとして、サイクリック AMP の蓄積が示唆されている[29]。さらに、PAR2 は PKC や PKA、ERK を介して TRPV4 活性化による疼痛惹起に関与していることが報告されており[12]、実際に OA 関節内において PAR2 を活性化させる酵素が存在していることも知られている[30]。TRPV4 依存的な疼痛関連行動の惹起には PAR2 を介したキナーゼ類の活性化が関与していることが考えられる。

以上より、OA 疼痛モデルである MIA モデル動物において、TRPV4 は感作状態にあり、そのメカニズムは発現量の亢進ではなく、TRPV4 のリン酸化による機能亢進が関与している可能性が示唆された。

第3章 OA 疼痛時の TRPV4 リガンド 5,6-EET 量の変化

3-1 緒言

OA 疼痛惹起に関わる内因性の TRPV4 リガンドとして、例えば、体動時には機械刺激がリガンドとなる可能性が考えられ、OA 患者においては関節液の浸透圧が低下しているとの報告もあることから[31]、低浸透圧がリガンドとなっている可能性もある。一方で、TRPV4 の内在性リガンドの一つである 5,6-EET はアラキドン酸から P450 を介して産生される代謝物であり、近年 5,6-EET が過敏性腸症候群患者の大腸生検において、痛み強度と相関して増加していることが報告され、疼痛を惹起する内因性 TRPV4 リガンドとしての可能性が示唆された[32]。しかしながら、OA モデル動物や OA 患者の患部関節液において 5,6-EET を測定し、定量的に評価したものはない。以上の背景から、機械刺激や浸透圧刺激に加えて 5,6-EET が OA 疼痛時の TRPV4 活性化に関与している可能性を検討するため、OA 疼痛モデル動物関節洗浄液、および、OA 患者関節液サンプル中の 5,6-EET 量を計測した。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 実験材料

1) 実験動物

1-2-1 1) と同様のものを用いた。

2) OA 患者

患者（12 名）のリクルートは Asterand Bioscience（Detroit）を通して行った。被験者に対してはヘルシンキ宣言に基づき、インフォームド・コンセントを得た。対象患者は、3 カ月間で週に 5 日以上慢性疼痛があり、7 日間以内に NSAIDs や COX2 阻害剤、パラセタモールを服用しておらず、感染性疾患を有していないことを主たる条件とした。なお、本研究は塩野義製薬研究倫理委員会の承認を得て実施した。

3-2-2 半月板切除モデル（MNx）の作製

イソフルラン麻酔下、右後肢膝関節周辺を剃毛し、皮膚を切開した。内側側副靱帯を切断し、関節腔内の内側半月板を完全に切除した。その後、切開した筋肉と皮膚を縫合した。関節洗浄液の回収は、手術後 6 週間で実施した。

3-2-3 OA モデルの膝関節洗浄液の回収

ラットを麻酔下、断頭、放血後、後肢膝関節付近を剃毛した。皮膚を切開し、膝蓋靱帯を切断し、関節腔を露出させた。関節腔に 10 μ L の氷冷メタノールを入れて関節液とともに氷冷メタノール中に回収した。この作業を 4 回繰り返すことによって、関節洗浄液を回収した。脂質量測定まで、-80°C で保存した。コントロールとして反対側の後肢膝関節洗浄液を同様に回収した。

3-2-4 OA 患者の膝関節液の回収

OA 患者の関節液の回収は Asterand Bioscience（Detroit）を通して行った。関節浮腫緩和のため、関節液を抜き取る処置の際に回収された関節液を、すぐに等量のメタノールに混和し、測定までは -20°C 以下で保存した。

3-2-5 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析（LC-MS/MS）による脂質量測定

既報と同様にサンプル調製と測定を行った[33]。ラット関節洗浄液サンプル、もしくはヒト関節液サンプルに内部標準を加え、10°C で 10 分間攪拌し、9000 $\times$ g、4°C で 5 分間遠心した。上清をシリコンチューブに回収し、40°C で窒素乾固を行い、100 μ L のメタノールに再溶解した。20mM リン酸カリウム（pH7）

300 μ L 加え、MonoSpin[®] C18-AX column (GL Sciences Inc.) にロードした。9000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心し、5%塩化ナトリウムにて洗浄した。300 μ L の 2%ギ酸/メタノールでカラムに吸着した脂質を抽出した。この抽出は 2 回繰り返した。この抽出物に対して 40 $^{\circ}$ C で窒素乾固を行い、100 μ L のメタノールに再溶解した。

脂質サンプルは Acquity UPLC[®] system (Waters Corp.) にて Acquity UPLC[®] BEH C18 column (100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 1.7 μ m; Waters Corp.) を用いて分離した。オートサンプラーとカラムはそれぞれ 4 $^{\circ}$ C および 60 $^{\circ}$ C に維持した。移動相 A は水/5mM リン酸/酢酸 (1000/1/1, v/v/v)、移動相 B はアセトニトリル/イソプロパノール/酢酸 (500/500/1, v/v/v) で構成され、流速は 0.4mL/min とした。グラディエント溶出は以下の通りに実施した；0.00 $\ddot{}$ 15.00 min : from 25% to 80% B、15.01 $\ddot{}$ 17.50 min : 100% B、17.51 $\ddot{}$ 20.00 min : 25% B。質量分析は API5000^Ê Mass Spectrometer (AB SCIEX) を用いて負イオンモードでエレクトロスプレーイオン化し、衝突ガスとして窒素を用いて、多重反応モニタリング (MRM) 法で検出した。データの取得と解析は Analyst v1.6.2 (AB Sciex) にて行った。

3-2-6 統計処理

結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) にて表わした。OA モデルラットの関節洗浄液中の脂質量に関する試験においては、paired *t*-test を用いて検定を行った。P<0.05 (両側) を有意差ありとした。

3-3 実験結果

3-3-1 OA モデル関節洗浄液中の 5,6-EET および他のアラキドン酸代謝物量

MIA モデルの患部関節洗浄液サンプルについて LC-MS/MS によりアラキドン酸代謝物を網羅的に解析した。5,6-EET 量が有意に増加するとともに、炎症やそれに伴う疼痛に関与するアラキドン酸と PGE₂ も有意に増加していた (Fig.9A-C)。さらに、MIA モデルと同様に OA モデルとして知られている半月板切除モデル (MNx モデル) においても同様の結果が得られた (Fig.9A-C)。以上の結果から、OA モデルの患部膝関節内において 5,6-EET が増加し、OA 疼痛時に TRPV4 を刺激している可能性が示唆された。

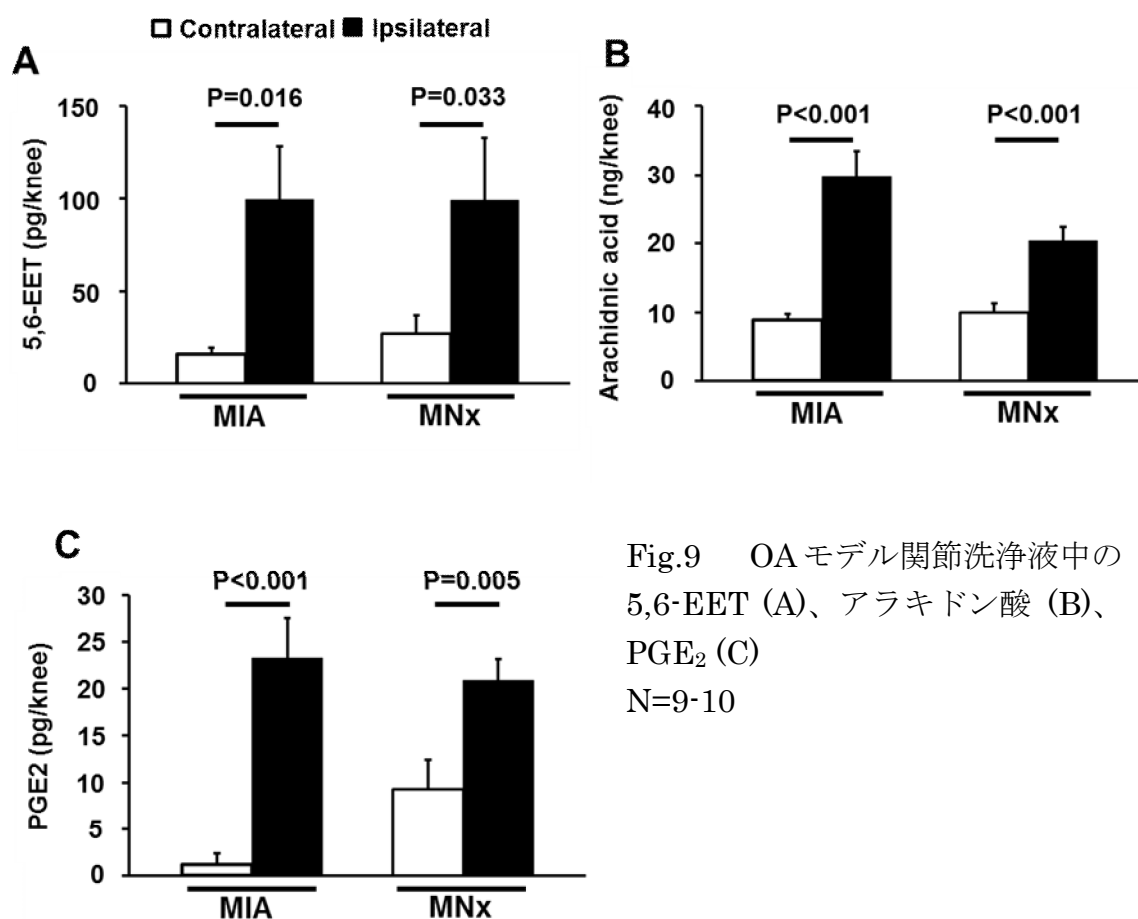


Fig.9 OA モデル関節洗浄液中の 5,6-EET (A)、アラキドン酸 (B)、PGE₂ (C)
N=9-10

その他のアラキドン酸代謝物については、2 種類の OA モデル間で概ね類似した増減の傾向を示していた。また、アラキドン酸や PGE₂、5,6-EET と同様に増加傾向にある分子もある一方で、ほとんど変化しない代謝物もあった (Table.1, 2)。

Table.1 MIA モデル関節洗浄液中のアラキドン酸代謝物

Total amount of extracts in lavage fluids of knee joint (pg/knee)					
Analytes	Untreated knee		MIA-treated knee		P value
	mean	SEM	mean	SEM	
14,15-LTC4	ND	-	ND	-	-
LXA4	ND	-	ND	-	-
PGD2	17.96	3.08	21.77	4.44	0.363
PGE2	1.20	1.20	23.24	4.25	<0.001
PGF2 α	ND	-	ND	-	-
6-ketoPGF1 α	3.66	1.33	17.26	4.49	0.018
TXB2	8.19	3.45	15.99	3.44	0.088
dhk-PGD2	ND	-	ND	-	-
dhk-PGE2	ND	-	ND	-	-
LTB4	ND	-	ND	-	-
LTC4	ND	-	2.54	2.09	0.260
LTD4	ND	-	ND	-	-
LTE4	ND	-	ND	-	-
14,15-LTE4	ND	-	ND	-	-
5-HETE	1.33	1.33	17.87	5.13	0.009
8-HETE	ND	-	ND	-	-
9-HETE	ND	-	ND	-	-
11-HETE	9.46	2.17	24.33	3.40	0.005
12-HETE	ND	-	ND	-	-
15-HETE	ND	-	6.72	2.67	0.036
16-HETE	ND	-	ND	-	-
17-HETE	ND	-	ND	-	-
18-HETE	ND	-	ND	-	-
5,6-EET	15.83	4.04	99.49	28.79	0.016
8,9-EET	ND	-	27.69	20.15	0.207
11,12-EET	ND	-	21.32	13.31	0.148
14,15-EET	ND	-	19.13	12.77	0.173
5,6-DHET	ND	-	ND	-	-
8,9-DHET	ND	-	ND	-	-
11,12-DHET	ND	-	ND	-	-
14,15-DHET	ND	-	ND	-	-
AA	8922.22	889.02	29811.11	3592.65	<0.001
15-deoxyPGJ2	ND	-	ND	-	-

Table.2 MNx モデル関節洗浄液中のアラキドン酸代謝物

Total amount of extracts in lavage fluids of knee joint (pg/knee)					
Analytes	Untreated knee		MNx-treated knee		P value
	mean	SEM	mean	SEM	
14,15-LTC4	ND	-	ND	-	-
LXA4	ND	-	ND	-	-
PGD2	47.42	7.48	56.94	9.07	0.345
PGE2	9.24	3.19	20.90	2.25	0.005
PGF2 α	0.90	0.90	0.60	0.60	0.796
6-ketoPGF1 α	10.34	3.48	19.52	3.39	0.086
TXB2	24.58	3.37	59.61	9.52	0.002
dhk-PGD2	ND	-	ND	-	-
dhk-PGE2	ND	-	ND	-	-
LTB4	ND	-	ND	-	-
LTC4	3.97	3.16	3.73	2.70	0.949
LTD4	0.64	0.64	ND	-	0.343
LTE4	ND	-	ND	-	-
14,15-LTE4	ND	-	ND	-	-
5-HETE	6.06	2.71	22.80	7.68	0.067
8-HETE	ND	-	ND	-	-
9-HETE	ND	-	ND	-	-
11-HETE	23.92	3.89	41.31	3.37	0.005
12-HETE	ND	-	ND	-	-
15-HETE	3.48	1.59	10.65	2.06	0.010
16-HETE	ND	-	ND	-	-
17-HETE	ND	-	ND	-	-
18-HETE	ND	-	ND	-	-
5,6-EET	27.23	9.89	99.31	33.72	0.033
8,9-EET	4.73	3.17	22.24	9.98	0.102
11,12-EET	ND	-	9.78	3.57	0.023
14,15-EET	4.79	1.98	19.85	6.08	0.048
5,6-DHET	ND	-	ND	-	-
8,9-DHET	ND	-	ND	-	-
11,12-DHET	ND	-	ND	-	-
14,15-DHET	ND	-	ND	-	-
AA	10015.00	1300.62	20395.00	2034.66	<0.001
15-deoxyPGJ2	ND	-	ND	-	-

3-3-2 OA 患者関節液中の 5,6-EET と 5,6-DHET および他のアラキドン酸代謝物量

OA 患者 12 名の関節液サンプルについて LC-MS/MS によりアラキドン酸代謝物を網羅的に解析した。アラキドン酸は全検体において、PGE₂ は 3 検体において検出された。5,6-EET は 4 検体において検出され、その代謝物である 5,6-DHET は 9 検体において検出された (Fig.10A-D)。以上の結果から、OA 患者の一部では 5,6-EET 自体、あるいはその代謝物が確認された。

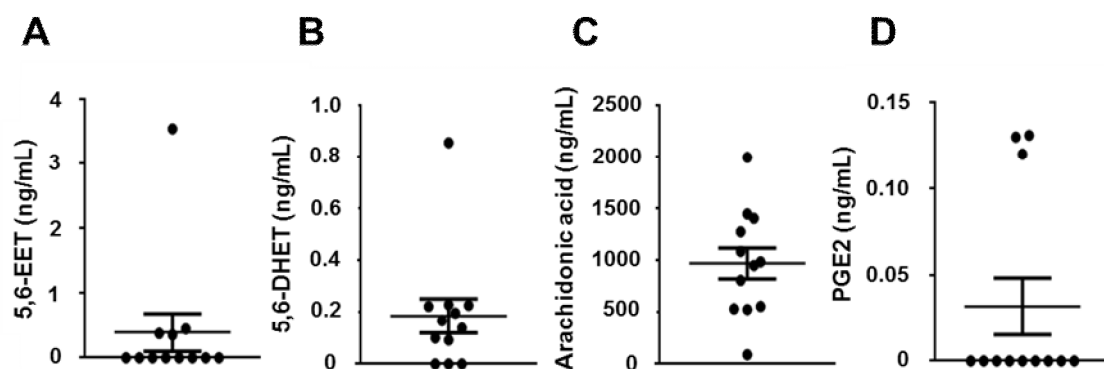


Fig.10 OA 患者関節液中の 5,6-EET (A)、5,6-DHET (B)、アラキドン酸 (C) および PGE₂ (D) 量

3-4 考察

本研究において、MIA モデルと MNx モデルの 2 種類の OA モデル患部関節内において 5,6-EET が増加していることを初めて示した。さらに、5,6-EET に加え、他のアラキドン酸代謝物量についても同一サンプルから網羅的に解析した。興味深いことに、MIA モデルと MNx モデルは OA を誘導する方法が異なるにもかかわらず、アラキドン酸代謝物のプロファイルは概ね類似した結果であった。また、アラキドン酸や PGE₂ に加え、11-HETE や 15-HETE といったリポキシゲナーゼによる代謝物の増加傾向も認められたが、一方でロイコトリエン類はどちらのモデルにおいても増加していなかった。このことから、単に基質であるアラキドン酸が増加した結果として代謝物が増加しているのではなく、それぞれの酵素によりコントロールされた結果であることが考えられる。近年、MIA モデルの患部膝サンプルにおいて同様にアラキドン酸代謝物解析を実施した報告がなされた[34]。その報告においては、EET 類が検出されていないなど、本研究結果と異なる傾向が認められている。本研究では関節腔内に放出された分子を解析する目的で膝関節内を洗浄することによってサンプルを得ているが、既報では膝関節全体から脂質を抽出している点が異なっており、結果の相違につながっていると考えられる。

OA モデル関節洗浄液にて認められた 5,6-EET の増加について、その産生や放出に関するメカニズムは不明であるが、血管内皮細胞[35]やマクロファージ[36]、感覚神経[37]が 5,6-EET 産生能をもち、OA 病態においては炎症状態があることから、これらの細胞が膝関節内において増加あるいは活性化することによって 5,6-EET が増加している可能性が考えられる。最近、IBS 患者の大腸生検中の 5,6-EET 量が疼痛強度と正の相関をすることが報告されていることから、OA においても 5,6-EET が疼痛に関与していることが考えられる。

さらに、本研究では OA 患者の関節液において 5,6-EET やその代謝物の存在を初めて示した。しかしながら、動物モデルとは異なり、一部のサンプルでのみ 5,6-EET やその代謝物である 5,6-DHET の存在が認められた。動物モデルにおける関節洗浄液の採取では、関節腔を露出させてすぐにタンパク質を固定するためメタノールにて洗浄したが、患者サンプルの場合は膝関節から関節液の一部を抜き取りメタノールと混和した。動物モデルではアラキドン酸代謝物の産生源の 1 つと考えられる滑膜組織周辺に存在する分子まで回収できているが、ヒト関節液では産生源から放出され時間が経過した関節液を回収しているため、比較的不安定な 5,6-EET[38]は代謝されることによって患者サンプルでは一部のサンプルでのみの検出となった可能性が考えられる。また、PGE₂が一部の患者においてのみ認められた原因としても同様のことが考えられる。本研究の限界として、倫理的な側面から健常者の関節液解析ができなかったこと、また疼痛強度との相関性についての解析を実施できなかったことが挙げられ、臨床研究におけるエビデンスをさらに積み増すことが必要である。

以上の結果より、OA 動物モデルの関節内において、TRPV4 の内在性アゴニストである 5,6-EET が増加していることが示された。さらに一部の OA 患者関節液中において 5,6-EET やその代謝物が検出された。これらの結果は、5,6-EET が内因性 TRPV4 リガンドとして OA 疼痛に関与している可能性を示唆している。

総括

本研究において、TRPV4 を阻害することによって MIA モデルの OA 疼痛が有意に抑制されることが示された。さらに、TRPV4 アゴニスト患部関節内投与後の疼痛関連行動観察実験から MIA モデルにおいては TRPV4 が感作されている状態にあることが示唆され、その 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 が増加していた。また、OA 疼痛モデルの患部膝関節内においては、TRPV4 内在性リガンドの一つである 5,6-EET 量の増加が認められ、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を認めた。以上の結果から、TRPV4 が OA 疼痛に関与し、そのメカニズムとして、リン酸化による TRPV4 の感作や患部における内在性リガンドの増加が関与していることが示唆された。

TRPV4 の変異によって多様な疾患が引き起こされることが報告されている[39]。この一因としてリガンドが複数存在することが考えられる。この特徴は、創薬を行うにあたり、薬効や副作用回避を考えるうえで考慮されるべきものである。OA の体動時痛を反映していると予想される機械刺激に加え、本研究においては、5,6-EET も OA 疼痛に寄与している可能性を示した。一方で、TRPV4 は比較的広範な発現分布を示すことから、アンタゴニストの全身投与の場合に副作用が発現する可能性がある。薬効や副作用に寄与するリガンドを予測・同定することによって、現状の OA 疼痛薬の課題を克服したより良い治療薬の開発につながる可能性が考えられる。

TRPV4 は軟骨や骨組織の恒常性に関与していることが報告されており[40]、オスの TRPV4 ノックアウトマウスは老化によって発症する OA の進行が速いとの報告がある[41]。しかしながら最近の論文では、軟骨組織特異的な TRPV4 ノックダウンによって、むしろ OA の進行を抑制することが報告されている[42]。TRPV4 は軟骨組織や骨組織において発達段階によって異なった役割があり、成体となった後の TRPV4 の阻害は OA 病態に対して改善効果をもたらす可能性がある。TRPV4 アンタゴニストの創製は、OA の痛みだけでなく、進行の抑制にも効果を示す薬の創出につながる可能性がある。

MIA モデルにおいて、DRG におけるリン酸化 TRPV4 の増加とともに、患部膝関節内の TRPV4 が感作されていることを明らかにし、OA モデル動物の患部膝関節洗浄液中で 5,6-EET が増加し、さらに OA 患者の関節液中において

5,6-EET の存在を認めた。また、MIA モデルの患部膝関節内への TRPV4 アンタゴニスト投与によって疼痛が抑制された。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。

引用文献

1. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lefeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377:2115-26.
2. Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:1465-9.
3. Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 2003;278:22664–22668.
4. Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:47044–47051.
5. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 2000;103:525–535.
6. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 2003;424:434-438.
7. Facer P, Casula MA, Smith GD, Benham CD, Chessell IP, Bountra C, Sinisi M, Birch R, Anand P. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC Neurol* 2007;7:11.
8. Tian W, Salanova M, Xu H, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S, Bachmann S, Cohen DM. Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F17–F24.

9. Birder L, Kullmann FA, Lee H, Barrick S, de Groat W, Kanai A, Caterina M. Activation of urothelial transient receptor potential vanilloid 4 by 4-phorbol 12,13-didecanoate contributes to altered bladder reflexes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:227–235.
10. Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, Wilcox DA, Bubolz AH, Li R, Suzuki M, Zhang DX. TRPV4-mediated endothelial Ca^{2+} influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H466–H476.
11. Chen Y, Williams SH, McNulty AL, Hong JH, Lee SH, Rothfus NE, Parekh PK, Moore C, Gereau RW 4th, Taylor AB, Wang F, Guilak F, Liedtke W. Temporomandibular joint pain: A critical role for Trpv4 in the trigeminal ganglion. *Pain* 2013;154:1295–1304.
12. Sipe WE, Brierley SM, Martin CM, Phillis BD, Cruz FB, Grady EF, Liedtke W, Cohen DM, Vanner S, Blackshaw LA, Bunnett NW. Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G1288–G1298.
13. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB, Levine JD. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4 integrin, and Src tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *J Neurosci* 2008;28:1046–1057.
14. Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, Ochiai M, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Toyone T, Aoki Y, Kubo T, Takahashi K, Ohtori S. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:134.
15. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*.

2003;11:821–830.

16. Chandran P, Pai M, Blomme EA, Hsieh GC, Decker MW, Honore P. Pharmacological modulation of movement-evoked pain in a rat model of osteoarthritis. *Eur J Pharmacol* 2009;613:39–45.

17. Petrella RJ, DiSilvestro MD, Hildebrand C. Effects of hyaluronate sodium on pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Intern Med*. 2002;162:292-8.

18. Koda K, Hyakkoku K, Ogawa K, Takasu K, Imai S, Sakurai Y, Fujita M, Ono H, Yamamoto M, Fukuda I, Yamane S, Morita A, Asaki T, Kanemasa T, Sakaguchi G, Morioka Y. Sensitization of TRPV1 by protein kinase C in rats with mono-iodoacetate-induced joint pain. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24:1254-1262.

19. Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem*. 2004;279:35133-8.

20. Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling D, Levine JD. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci* 2006;26:3864–3874.

21. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. 2005;280:618-27.

22. Pan HL, Zhang YQ, Zhao ZQ. Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKC ϵ pathway in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain*. 2010;6:85.

23. Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J*. 2005;24:4211-23.

24. Wegierski T, Lewandrowski U, Müller B, Sickmann A, Walz G. Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli. *J Biol Chem.* 2009;284:2923-33.
25. Xu H, Zhao H, Tian W, Yoshida K, Roullet JB, Cohen DM. Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *J Biol Chem.* 2003;278:11520-7.
26. Peng H, Lewandrowski U, Müller B, Sickmann A, Walz G, Wegierski T. Identification of a protein kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1721–1725.
27. Shin SH, Lee EJ, Hyun S, Chun J, Kim Y, Kang SS. Phosphorylation on the Ser 824 residue of TRPV4 prefers to bind with F-actin than with microtubules to expand the cell surface area. *Cell Signal.* 2012;24:641-51.
28. Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N & Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol.* 2006;575:555–571.
29. Zhao P, Lieu T, Barlow N, Sostegni S, Haerteis S, Korbmacher C, Liedtke W, Jimenez-Vargas NN, Vanner SJ, Bunnett NW. Neutrophil elastase activates protease-activated receptor-2 (PAR2) and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) to cause inflammation and pain. *J Biol Chem* 2015;290:13875–13887.
30. Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, Takata Y, Goto T, Egawa H, Yasuoka S, Furouchi H, Hirasaka K, Nikawa T, Yasui N. Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:1284–1292.

31. Bertram KL, Krawetz RJ. Osmolarity regulates chondrogenic differentiation potential of synovial fluid derived mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;422:455–461.
32. Cenac N, Bautzova T, Faouder PL, Veldhuis NA, Poole DP, Rolland C, Bertrand J, Liedtke W, Dubourdeau M, Bertrand-Michel J, Zecchi L, Stanghellini V, Bunnett NW, Barbara G, Vergnolle N. Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2015;149:433–444.
33. Sanaki T, Fujihara T, Iwamoto R, Yoshioka T, Higashino K, Nakano T, Numata Y. Improvements in the high-performance liquid chromatography and extraction conditions for the analysis of oxidized fatty acids using a mixed-mode spin column. *Mod Chem Appl* 2015;3:3.
34. Wong A, Sagar DR, Ortori CA, Kendall DA, Chapman V, Barrett DA. Simultaneous tissue profiling of eicosanoid and endocannabinoid lipid families in a rat model of osteoarthritis. *J Lipid Res* 2014;55:1902-1913.
35. Pfister SL, Gauthier KM, Campbell WB. Vascular pharmacology of epoxyeicosatrienoic acids. *Adv Pharmacol*. 2010;60:27–59.
36. Bystrom J, Wray JA, Sugden MC, Holness MJ, Swales KE, Warner TD, Edin ML, Zeldin DC, Gilroy DW, Bishop-Bailey D. Endogenous epoxygenases are modulators of monocyte/macrophage activity. *PLoS One* 2011;6:e26591
37. Brenneis C, Sisignano M, Coste O, Altenrath K, Fischer MJ, Angioni C, Fleming I, Brandes RP, Reeh PW, Woolf CJ, Geisslinger G, Scholich K. Soluble epoxide hydrolase limits mechanical hyperalgesia during inflammation. *Mol Pain* 2011;7:78.
38. Fulton D, Falck JR, McGiff JC, Carroll MA, Quilley J A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol. *J Lipid Res*. 1998;39:1713-21

39. Nilius B, Voets T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Rep* 2013;14:152-163.
40. McNulty AL, Leddy HA, Liedtke W, Guilak F. TRPV4 as a therapeutic target for joint diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2015;388:437-450.
41. Clark AL, Votta BJ, Kumar S, Liedtke W, Guilak F. Chondroprotective role of the osmotically sensitive ion channel transient receptor potential vanilloid 4: age- and sex-dependent progression of osteoarthritis in Trpv4-deficient mice. *Arthritis Rheum* 2010;62:2973–2983.
42. O'Connor CJ, Ramalingam S, Zelenski NA, Benefield HC, Rigo I, Little D, Wu CL, Chen D, Liedtke W, McNulty AL, Guilak F. Cartilage-specific knockout of the mechanosensory ion channel TRPV4 decreases age-related osteoarthritis. *Sci Rep* 2016;6:29053.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院
薬学研究院 薬理学研究室 南雅文教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、試験計画の立案から試験の実施、データ解析に至
るまで、すべてにおいてご指導、ご助言、ご助力を賜りました、塩野義製薬株
式会社 森岡靖英博士をはじめ研究メンバーの皆様に深く感謝いたします。