

2023 年 3 月 9 日

新聞社  
支社 御中

上武大学准教授 渡辺 正哉

## 筋痛症に対する新たな治療ターゲット

### 概要

上武大学医学生理学研究所の渡辺正哉准教授（上武大学ビジネス情報学部スポーツ健康マネジメント学科准教授）、名古屋市立大学大学院機能組織学の植田高史准教授、三輪陽子研究員、鵜川眞也教授らは、筋痛モデル動物（マウス）、及び、TRPV1 ノックアウトマウスで血管内皮増殖因子<sup>\*1</sup>-A（Vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A）の遺伝子解析、タンパク解析を行い、その成果を報告しました。この研究は、アスリートだけでなく、多くのスポーツ愛好家にも生じる筋痛症の発症メカニズムの解明につながり、VEGF レセプター 1（VEGFR1<sup>\*2</sup> 上武大・澁谷正史学長が 1990 年に初めて見出し、Flt1 と命名して世界に報告した遺伝子）が新規治療ターゲットになりうることを示唆するものです。

筋膜性疼痛症候群（myofascial pain syndrome, MPS）や筋線維症、炎症性筋痛症は、競技者のみならず高齢者にいたる多くの患者を有し、発症原因の解明や治療法の確立が急務となっています。また、これら筋痛症では、従来の鎮痛薬（NSAIDs, 非ステロイド抗炎症薬）の効果が見られないことが多いことも知られています。本研究グループは、炎症性筋痛の発症メカニズムと関連シグナルの伝達経路の同定を目的に筋痛症モデル動物を作出し、その疼痛回避行動分析と薬理的解析を行いました。VEGF-A は、血管新生と疼痛において主要な役割を果たし癌性疼痛や慢性疼痛における疼痛過敏症に関与するとされます、そして VEGF-A は、組織における虚血状態によって誘発されるだけでなく痛覚誘発性サイトカインとも強く相関していて、しかも、炎症性筋痛症では、局所の虚血状態も疼痛誘発性サイトカインの発現は顕著にみられます。しかし、筋痛症における VEGF-A の関与とその分子基盤は不明です。

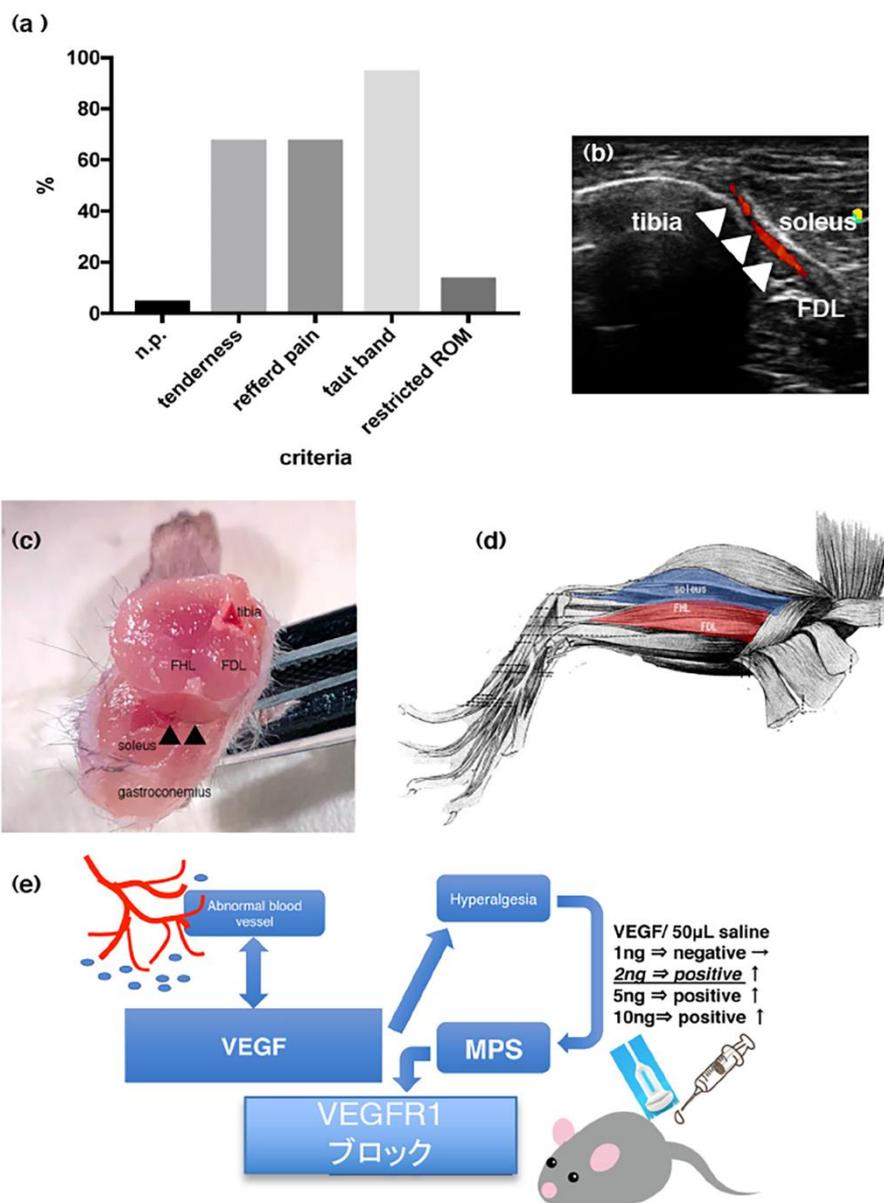
本研究では、マウスのヒラメ筋膜と深層筋の筋膜間に起炎剤（carrageenan）、あるいは VEGF-A165 遺伝子組換えタンパクを注射し急性期、および亜急性期筋痛モデル動物を作出し、局所における VEGF-A 遺伝子発現を解析しました。解析の結果、局所における VEGF-A 遺伝子発現が増加することがわかりました。そこで、同じ部位に VEGFR1 抗体を投与したところ疼痛過敏が著しく改善し、一方で VEGFR2<sup>\*3</sup> 中和抗体、拮抗剤では効果は限定的でした。そこで、TRPV1<sup>\*4</sup> 拮抗剤（capsazepine）を事前投与したところ VEGF-A によって誘発された疼痛過敏が抑制されました。これらの結果は、筋痛症において VEGFR1 と TRPV1 を介した侵害受容経路があることがわかり、VEGFR1 を抑制することで炎症性筋痛症における疼痛過敏が緩和されることがわかりました。

VEGFR1 は、癌性疼痛だけでなく筋痛症の治療ターゲットとして、そして新規の鎮痛剤開発の

候補としての期待がもたれます。

本研究成果は、令和5年2月に Lippincott Williams&Wilkins 発行の科学誌『 Neuroreport 』（2023年，34号，238–248頁）に掲載されました。

[https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2023/03010/Vascular\\_endothelial\\_growth\\_factor\\_A\\_is\\_involved.8.aspx](https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2023/03010/Vascular_endothelial_growth_factor_A_is_involved.8.aspx)



(a) 大学エリートランナーにおける MPS (MPS 診断基準である圧痛 tenderness, 関連痛 refferd pain, 筋硬結 taut band) の有病率を示すグラフ. (b) 脛骨内側ストレス症候群 (シンスプリント) 訴えた代表的症例における超音波エコー画像 白矢頭は炎症が疑われる部位 (下腿深部筋とヒラメ筋間) を示す. (c) マウス下腿部の横断面, 黒矢頭は VEGF-A165, あるいは起炎材 carrageenan を注射した部位, (d) マウス下腿部の縦断面, soleus : ヒラメ筋, FHL : 長母趾屈筋, FDL : 長趾屈筋, (e) 筋痛モデルマウスは, 起炎材, あるいは VEGF-A165 (血管内皮増殖因子, 2ng 以上で筋痛を誘発) を局所に注射することで作出し, 疼痛回避行動を示すことを確認した後, VEGFR1

ブロックを試みた。

**研究に関するお問い合わせ：**

上武大学医学生理学研究所 准教授 渡辺正哉

TEL: 0270-32-1011, FAX: 0270-32-1126, E-mail:

watanabe@ic.jobu.ac.jp

**取材に関するお問い合わせ：**

学校法人学文館上武大学

法人本部 〒370-1393 群馬県高崎市新町 270-1

TEL：0274-42-1183 FAX：0274-42-5202

**【ポイント】**

- 1) 起炎剤(carrageenan), あるいは, VEGF-A をマウス下腿筋に投与し筋痛症モデル動物作出を試みた.
- 2) 起炎剤誘導による筋痛モデルにおいて VEGF は関与するのか?
- 3) 筋痛症における VEGFR と TRPV1 の役割とは?
- 4) VEGFR1 をブロックすることで多くのスポーツ愛好家を悩ませる筋痛症の緩和に役立つ創薬につながることで期待される.

**【研究の背景】**

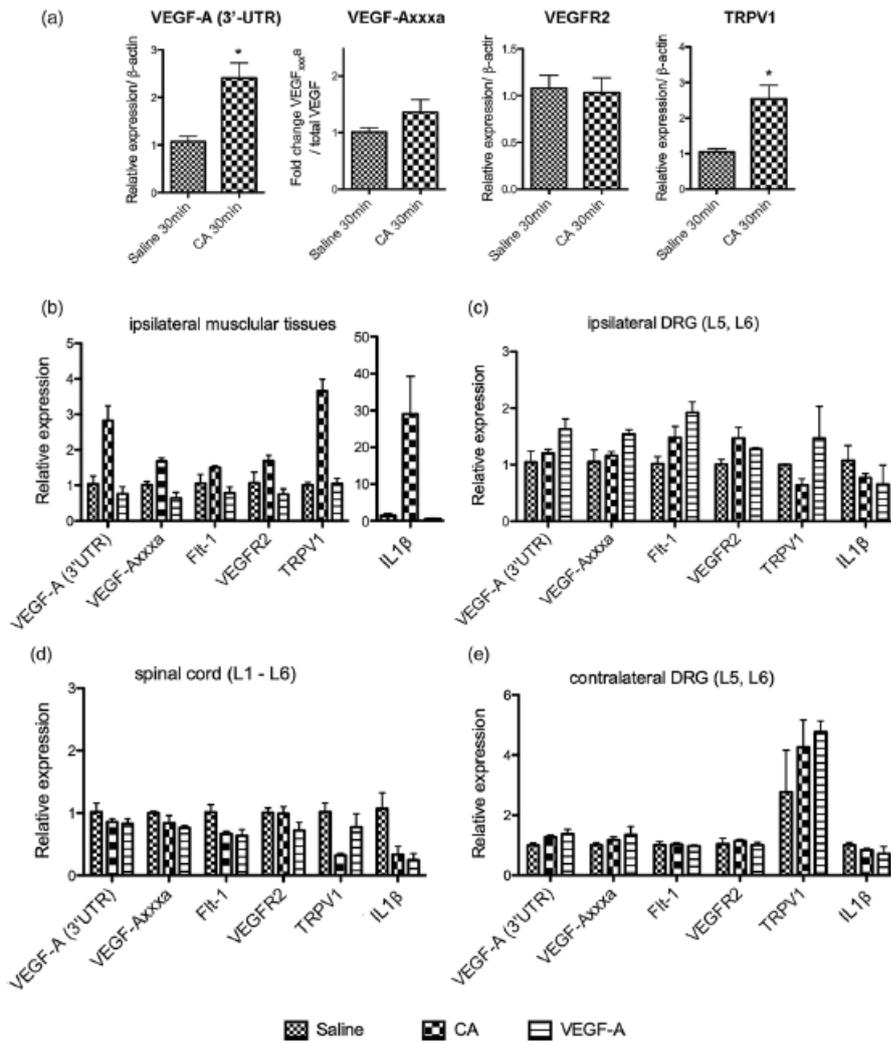
MPS, fibromyalgia は、筋肉痛を主な症状とする筋肉/筋膜にみられる筋痛症であり、taut band(筋硬結)と呼ばれる患部に筋の硬さを伴い、TP(trigger point, トリガーポイント)と呼ばれる特徴的な関連痛を生じます。これら筋痛症は、多くの競技者において、突然の運動競技パフォーマンスを失う原因となっているだけでなく、一般のスポーツ愛好家において、高齢者はもとより学童まで多く罹患していると推定されます。筋痛症に対しては多くの治療方法(鎮痛剤, 麻酔, 徒手治療など)が報告されていますが筋痛症そのものの疼痛メカニズムも不明な点が多く、その疼痛緩和の生理学的メカニズムについては依然不明であり、taut band をともなう TP の軽減については言及されていません。

VEGF-A は、血管新生と疼痛において主要な役割を果たし癌性疼痛や慢性疼痛における痛覚過敏症に関与するとされます、そして VEGF-A は、組織における虚血状態によって誘発されるだけでなく痛覚誘発性サイトカインとも強く相関していて、炎症性筋痛症では、局所の虚血状態も疼痛誘発性サイトカインの発現は顕著にみられます。しかし、筋痛症における VEGF-A の関与とその分子基盤は不明です。

**【研究の方法と結果】**

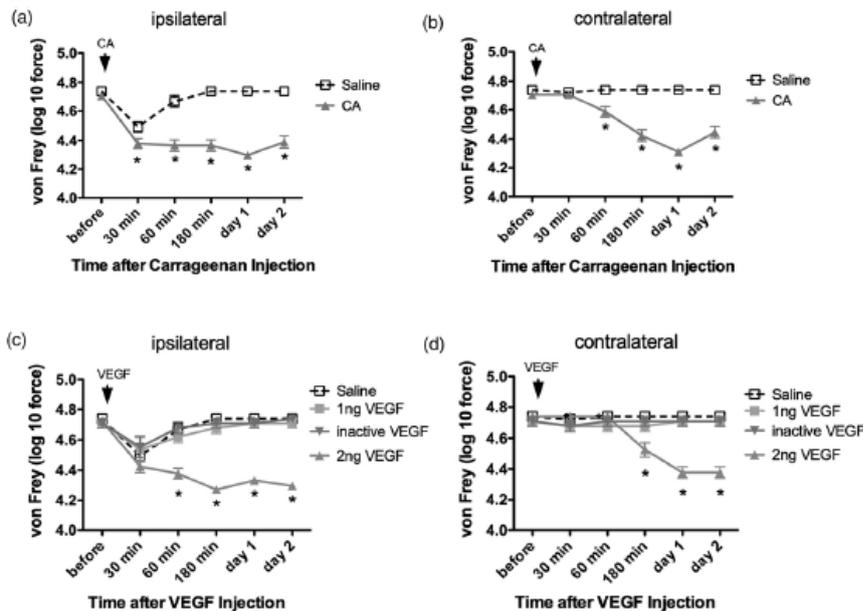
本研究では、マウスのヒラメ筋膜と深層筋の筋膜間に起炎剤(carrageenan), あるいは VEGF-A165 組換えタンパクを注射し急性期, および亜急性期筋痛モデル動物を作出し、局所における VEGF-A 遺伝子発現を解析しました。解析の結果、局所における VEGF-A 遺伝子発現が増加することがわかりました。そこで、同じ部位に VEGFR1 抗体を投与したところ疼痛過敏が著しく改善し、一方で VEGFR2<sup>\*3</sup> 中和抗体, 拮抗剤では効果は限定的でした。そこで、TRPV1<sup>\*4</sup> 拮抗剤(capsazepine)を事前投与したところ VEGF-A によって誘発された疼痛過敏が抑制されました。これらの結果は、筋痛症において VEGFR1 と TRPV1 を介した侵害受容経路があることが示唆され、VEGFR1 を抑制することで炎症性筋痛症における疼痛過敏が緩和されることがわかりました。

Fig. 1



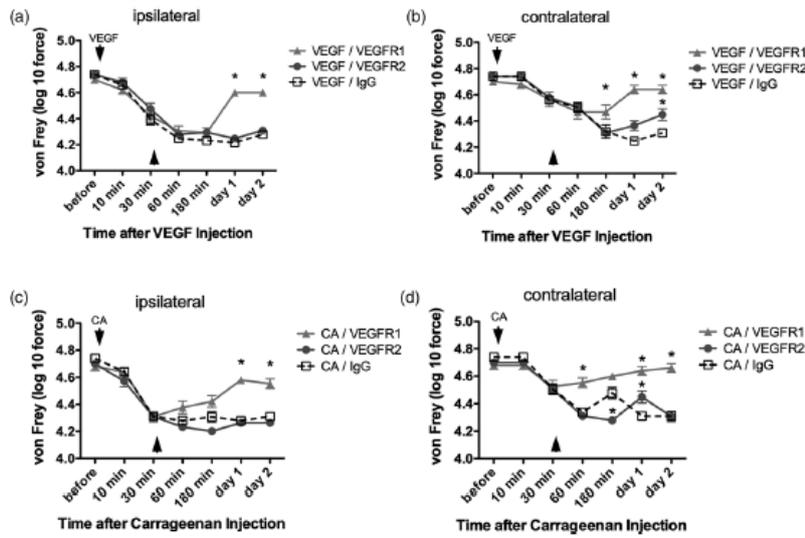
Relative local gene expression in the injection site (ipsilateral muscular tissues) at 30 min (a) and 60 min (b), L5 and L6 ipsilateral dorsal root ganglia (DRG) (c), L1-L6 spinal cord (d) and L5 and L6 contralateral DRG (e) at 60 min after unilateral intramuscular injection of saline, carrageenan (CA) or VEGF-A<sub>165</sub>.  $n=10$  each (a) and  $n=3$  each (b-e). \* $P < 0.05$  compared with saline-treated mice (one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test). ANOVA, analysis of variance; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig. 2



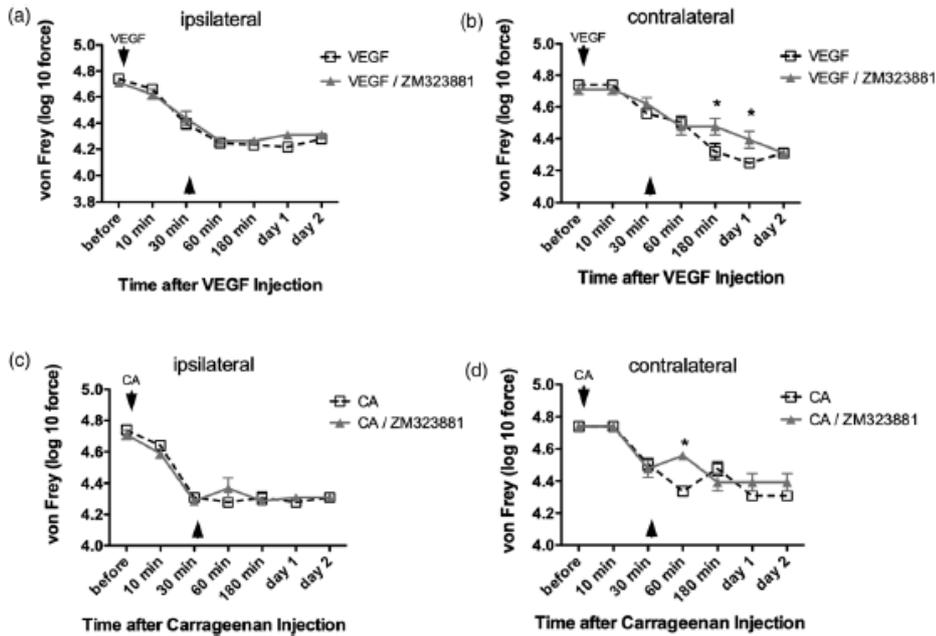
(a,b) Time course of intramuscular carrageenan (CA)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (a) and contralateral (b) sides. The paw withdrawal threshold after CA injection was measured using the von Frey test ( $n=11$  mice for the saline group and  $n=10$  mice for the CA group). (c,d) Time course of intramuscular VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (c) and contralateral (d) sides. The paw withdrawal threshold after VEGF injection was measured using the von Frey test ( $n=11$  mice for the saline group,  $n=11$  mice for the 2 ng VEGF group,  $n=6$  mice for the 1 ng VEGF group and  $n=6$  mice for inactive VEGF). \* $P < 0.05$  compared with saline-treated mice (two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test). ANOVA, analysis of variance; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig. 3



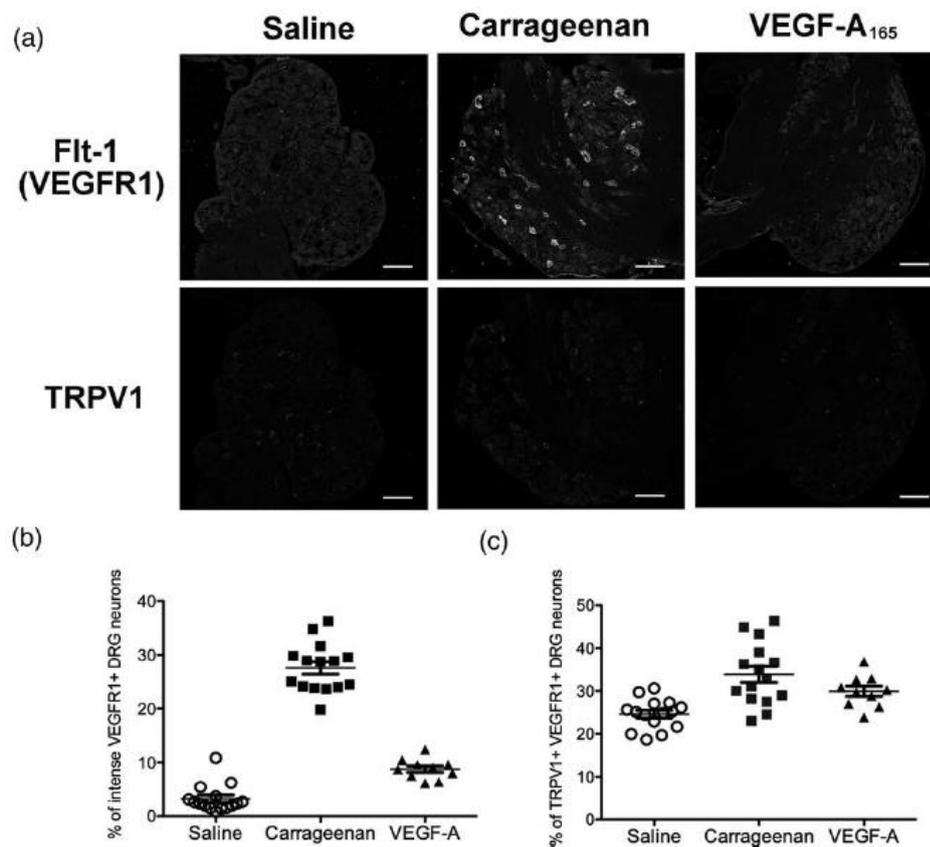
(a,b) Time course of the effects of post-treatment with intramuscular anti-VEGFR1 antibody (VEGFR1), anti-VEGFR2 antibody (VEGFR2) or IgG control at the injection site (arrowhead) on intramuscular VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (a) and contralateral (b) sides. The paw withdrawal threshold after VEGF injection was measured using the von Frey test ( $n=9$  mice for the VEGF/IgG group,  $n=9$  mice for the VEGF/VEGFR1 group and  $n=9$  mice for the VEGF/VEGFR2 group). (c,d) Time course of the effects of post-treatment with intramuscular VEGFR1, VEGFR2 or IgG control at the injection site (arrowhead) on intramuscular carrageenan (CA)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (c) and contralateral (d) sides. The paw withdrawal threshold after CA injection was measured using the von Frey test ( $n=9$  mice for the CA/IgG group,  $n=9$  mice for the CA/VEGFR1 group and  $n=9$  mice for the CA/VEGFR2 group). \* $P < 0.05$  compared with IgG control mice (two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test). ANOVA, analysis of variance; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR1, vascular endothelial growth factor-1 receptor.

Fig. 4



(a,b) Time course of the effects of post-treatment with an intramuscular VEGFR2 inhibitor (ZM323881) or control at the injection site (arrowhead) on intramuscular VEGF-A<sub>165</sub> (VEGF)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (a) and contralateral (b) sides. The paw withdrawal threshold after VEGF injection was measured using the von Frey test ( $n=9$  mice for the VEGF group and  $n=6$  mice for the VEGF/ZM323881 group). (c,d) Time course of the effects of post-treatment with an intramuscular VEGFR2 inhibitor (ZM323881) or control at the injection site (arrowhead) on intramuscular carrageenan (CA)-induced cutaneous mechanical hyperalgesia on the ipsilateral (c) and contralateral (d) sides. The paw withdrawal threshold after CA injection was measured using the von Frey test ( $n=9$  mice for the CA group and  $n=6$  mice for the CA/ZM323881 group). \* $P < 0.05$  compared with control mice (two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test). ANOVA, analysis of variance; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig. 6



Immunohistochemical analysis of the expression of Flt-1 (VEGFR1) and TRPV1 in the ipsilateral dorsal root ganglia (DRG) of mice after saline, carrageenan or VEGF-A<sub>165</sub> administration ( $n=3$  each). (a) Representative confocal microscopy images. VEGFR1-immunoreactivity (IR) was found in almost all DRG neurons with varying intensity, whereas TRPV1-IR was detected in a subset of DRG neurons. Bar=100  $\mu$ m. (b) The ratio of neurons with intense VEGFR1-IR to the total number of VEGFR1-IR neurons was determined. (c) The ratio of TRPV1-IR neurons to the total number of VEGFR1-IR neurons was determined. TRPV1-KO, transient receptor potential vanilloid type 1 knockout; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fig.1

生理食塩水、カラギーナン (CA)、または VEGF-A165 を同側筋組織に注射し、(a) 30 分後、(b) 60 分後の相対的局所遺伝子発現、(c) 30 分後の L5 および L6 (人の場合は腰椎は L5 までだがマウスでは L6 までである) 同側後根神経節 (DRG) と (d) 60 分後の DRG、および (e) 反対側 DRG における VEGF 遺伝子発現。各  $n = 10$  (a) および各  $n = 3$  (b-e)。\*  $P < 0.05$  生理食塩水で処理したマウスと比較 (VEGF に対する ANOVA 分散分析と双方向ボンフェローニ事後検定)

Fig.2

(a) 同側 および (b) 対側側での筋肉内カラゲナン (CA) 誘発皮膚機械的痛覚過敏の時間経過。CA 注射後のマウス疼痛回避行動閾値は、von Frey 試験を用いて測定した(生理食塩水群では  $n=11$  マウス, CA では  $n=10$  マウス)。 (c) 同側、および (d) 対側の筋肉内 VEGF-A165 (VEGF) 誘発皮膚機械的痛覚過敏の時間経過。 VEGF に対する疼痛回避行動閾値は、von Frey テストを使用して測定しました (生理食塩水群では  $n = 11$  マウス, 生理食塩水群では  $n = 11$ ), 2 ng VEGF グループ, 1 ng VEGF グループでは  $n = 6$ , 不活性 VEGF では  $n = 6$ ). \*生理食塩水で処理したマウスと比較して  $P < 0.05$  (VEGF に対する ANOVA 分散分析と双方向ボンフェローニ事後検定)。

Fig.3

(a) 同側、および(b) での筋肉内カラゲナン (CA) 誘発皮膚機械的痛覚過敏の時間経過。

CA 注射後の疼痛回避行動閾値は von Frey 試験を用いて測定した(生理食塩水群では n=11, CA では n=10). (c) 同側, および (d) 対側の筋肉内 VEGF-A165 (VEGF) 誘発皮膚機械的痛覚過敏の時間経過. VEGF 注射後の疼痛回避行動閾値は, von Frey テストを使用して測定しました(生理食塩水群では n = 11, 生理食塩水群では n = 11, 2 ng VEGF グループ, 1 ng VEGF グループでは n = 6 マウス, 不活性 VEGF では n = 6). \*生理食塩水で処理したマウスと比較して  $P < 0.05$  (VEGF に対する ANOVA 分散分析と双方向ボンフェローニ事後検定). (a, b) 筋肉内抗 VEGFR1 抗体(VEGFR1), 抗 VEGFR2 抗体(VEGFR2)または IgG による後処理の効果の経時変化, (a) 同側の筋肉内 VEGF-A165 (VEGF) 誘発皮膚機械的痛覚過敏の注射部位 (矢印) でのコントロールおよび, (b) 反対側. VEGF 注射後の疼痛回避行動閾値は, von Frey 検定を使用して測定しました (VEGF/IgG については n = 9, VEGF/VEGFR1 グループ n=9 VEGF/VEGFR2 グループ n=9). (c, d) による筋肉内カラゲナン (CA)処理の効果の経時変化, (c) 同側, (d) 反対側における痛覚過敏. CA 注射後の疼痛回避閾値は, von Frey 試験を用いて測定した. (CA/IgG グループでは n = 9, CA/VEGFR1 グループでは n = 9, CA/VEGFR2 グループでは n = 9). \*IgG と比較して  $P < 0.05$  (VEGF に対する ANOVA 分散分析と双方向ボンフェローニ事後検定).

#### Fig.4

(a, b) 筋肉内 VEGFR2 阻害剤 (ZM323881) または注射部位での対照 (矢印) による後治療の効果の時間経過. (a) 同側および (b) 対側の筋肉内 VEGF-A165 (VEGF) 誘発皮膚機械的痛覚過敏. VEGF 注射後の疼痛回避行動閾値は, von Frey テストを使用して測定されました (VEGF グループでは n = 9, VEGF/ZM323881 では n = 6). (c, d) 筋肉内 VEGFR2 阻害剤 (ZM323881) または注射部位での対照 (矢印) による後治療の効果の時間経過. (c) 同側および (d) 反対側の筋肉内カラゲナン (CA) 誘発皮膚機械的痛覚過敏. CA 注射後の疼痛回避行動閾値は, von Frey テストを使用して測定されました (CA グループの場合は n = 9, CA/ZM323881 の場合は n = 6). \* $P < 0.05$  対照マウスと比較 (ANOVA 分散分析と双方向ボンフェローニ事後検定).

#### Fig.5

免疫組織科学分析による同側交感神経節 (DRG) における Flt-1 (VEGFR1) と TRPV1 の発現 (a) 代表的な共焦点顕微鏡画像. VEGFR1 免疫反応 (IR) はほぼすべての DRG ニューロンで観察されたが, TRPV1-IR は DRG ニューロンの一部で検出された. (b) ニューロンの比率, VEGFR1-IR の総数に対し強い反応を示した VEGFR1-IR の比率. (c) VEGFR1-IR の総数に対する強い反応を示した TRPV1-IR の比率.

TRPV1KO : TRPV1 ノックアウトマウス, VEGF : 血管内皮成長因子

## 【研究成果の意義と今後の展望】

VEGFR1 は、癌性疼痛だけでなく筋痛症の治療ターゲットとして、そして、新規の鎮痛剤開発の候補としての期待がもたれます。

## 【論文情報】

掲載誌：NeuroReport 2023, 34:238–248. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001885

論文タイトル：Vascular endothelial growth factor-A is involved in intramuscular carrageenan-induced cutaneous mechanical hyperalgesia through the vascular endothelial growth factor-A receptor 1 and transient receptor potential vanilloid 1 pathways

著者：Masaya Watanabe, Takashi Ueda, Youko Miwa, Yasuhiro Shibata, Natsuko Kumamoto, Shinya Ugawa

(和訳)

掲載誌：NeuroReport 誌 2023 年 2 月

論文タイトル：血管内皮成長因子 A は、血管内皮成長因子レセプター 1 とカプサイシン作動性レセプター 1 を介した侵害受容経路を通し炎症性筋痛過敏に関係する

著者：渡辺正哉\*, 植田高史\*, 三輪陽子, 柴田泰弘, 熊本奈都子, 鶴川眞也

(\*：この 2 人の著者は本研究に等しく貢献しました)

## 【用語解説】

※1 VEGF：血管内皮増殖因子 (VEGF) は、血管新生やリンパ管新生、胚形成期の脈管形成に関与する糖蛋白のサイトカインです。乳癌、肺癌、大腸癌などの固形腫瘍では組織中 VEGF 高発現症例は予後が悪いということが報告されています。上武大・澁谷正史学長が 1990 年に初めて見出し、Flt1 と命名して世界に報告した遺伝子です。

※2 VEGFR1：VEGFR-1 (Flt-1:Fms-like Tyrosine Kinase) は VEGF-A および B との結合能を有する。VEGFR-1 のノックアウトマウスは血管網の形成に異常をきたして胎生致死となるが、これは血管新生の抑制によるものではないと考えられており、むしろ VEGFR1 は胎生期における血管新生に対して抑制的に働く。また、in vitro の実験ではあるが VEGFR-1 の細胞の増殖やアポトーシスの過程への関与を否定する報告がされています。VEGFR-1 依存性のシグナルは関節リウマチやアテローム性動脈硬化症の進行に関与しています。

※3 VEGFR2：VEGFR2 は VEGFR1 と比較してリガンドに対する結合能は弱いですが酵素活性は強く、総合的に見て細胞内シグナル伝達に対する寄与が大きいのはこちらのアイソフォームであり、血管内皮細胞に発現して血管新生の過程に大きく関与していると考えられています。VEGFR2 は VEGF-A, C, D および E との結合能を有しており、VEGF-C, D は VEGFR3 に対しても結合可能であります。マウスの発生の過程においては中胚葉で受精後 7.5 日 (E7.5) から VEGFR-2 の発現が認められます。VEGFR2 からのシグナルは自己リン酸化部位であるチロシン残基のリン酸化から始まり、ホスホリパーゼ C $\gamma$  の活性化に引き続く MAP キナーゼの活性化を引き起こします。また、近年

VEGFR2 の刺激により活性化された PI3 キナーゼが細胞増殖・生存延長に関与していることが報告されています。

※4 TRPV1：一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーV メンバー

1 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 TrpV1, カプサイシン受容体およびバニロイド受容体 1 としても知られる) はタンパクであり, (ヒトでは) *TRPV1* 遺伝子によってコードされます。これは, 一過性受容体電位バニロイド受容体タンパク質の最初の単離されたメンバーであり, 同様に一過性受容体電位タンパク質グループのサブファミリーです。このタンパク質は, イオンチャネルの一過性受容体電位ファミリーの TRPV(en) グループのメンバーです。TRPV1 の機能は, 体温の検出と調節です。加えて, TRPV1 はヤケドのような熱と痛みの感覚を提供します。一次求心性感覚ニューロンは, TRPA1(en) グループ(化学刺激受容体)と協力し有害な環境刺激の検出を仲介します。