

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08313

研究課題名(和文) 糖尿病性神経障害性疼痛の解明と新規治療法の開発：脊髄アンジオテンシン系からの検討

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying diabetic neuropathic pain and development of its new therapy: Examination from the viewpoint of spinal angiotensin system

研究代表者

丹野 孝一 (Tan-No, Koichi)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20207260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトゾトシン誘発性1型糖尿病マウス及び2型糖尿病マウスのob/obマウスの脊髄後角においてアンジオテンシン(Ang) IIからAng(1-7)を生成するAng変換酵素2(ACE2)及びAng(1-7)が作用するMas受容体の発現量が低下していた。両マウスで観察された疼痛閾値の低下はAng(1-7)の脊髄内投与によって抑制され、この効果はMas受容体遮断薬によって拮抗された。以上の結果より、脊髄のACE2の発現量低下が糖尿病性神経障害性疼痛に関与していることが明らかとなった。また、Mas受容体刺激薬が糖尿病性神経障害性疼痛に対する新規治療薬になり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性神経障害の機序は非常に複雑であるため治療に難渋し、臨床上大きな問題となっている。新たな治療薬や治療法の開発は社会的に急務であるが、これらの開発に向けては糖尿病性神経障害性疼痛の発症・維持に関わる新たな分子メカニズムを明らかにし、新規標的分子を同定する必要がある。

本研究において脊髄後角のACE2の発現量低下が糖尿病性神経障害性疼痛に関与していることを明らかとした。また、Mas受容体刺激薬が糖尿病性神経障害性疼痛に対する新規治療薬になり得る可能性を示唆した。これらの知見は糖尿病性神経障害性疼痛の新規治療薬の開発を目指す上で貴重な情報提供になると考える。

研究成果の概要(英文)：The decrease of pain threshold was observed concurrently with an increase in blood glucose levels in both streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetic mice and leptin deficient ob/ob mice, a well-known model for type 2 diabetes. The expression of angiotensin (Ang) converting enzyme 2 (ACE2), which produces Ang (1-7) from Ang II, and Mas receptors, the receptors for Ang (1-7), in the plasma membrane fraction of the lumbar dorsal spinal cord were decreased in both STZ and ob/ob mice. The intrathecal administration of Ang (1-7) into STZ and ob/ob mice reduced the decrease of pain threshold, and the reduction was prevented by a Mas receptor antagonist. These results indicate that the downregulation of spinal ACE2 is involved in diabetic neuropathic pain, and suggest that the Mas receptor agonists may be the promising novel therapeutic agents for the relief of neuropathic pain in diabetic patients.

研究分野：神経薬理学

キーワード：糖尿病性神経障害性疼痛 アンジオテンシン変換酵素2 アンジオテンシン(1-7) Mas受容体 脊髄 p38 MAPK ストレプトゾトシン ob/obマウス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における慢性疼痛保有患者数は全人口の約 20%と報告されており、これらの患者の中で治療に満足している者は僅か 25%に過ぎないのが現状である。慢性疼痛保有患者の quality of life (QOL) 向上を目指す上でも、「痛みとその治療」に関する研究は社会的にも最重要課題の一つになっている。このような状況下、世界中の多くの研究者達が未だ原因が明らかにされていない慢性疼痛の発症機構の解明とその治療法の確立のため精力的に研究に取り組んでいる。

### (1) アンジオテンシン (Ang) II と痛み

我々は Ang II が脊髄の神経細胞とアストロサイトに存在する AT<sub>1</sub> 受容体の活性化とそれに伴う p38 MAPK のリン酸化を介して疼痛関連行動（後肢による下腹部への引っ掻き行動、後肢や尾部への噛みつき・舐め行動）を引き起こすことを明らかにしている [*Mol. Pain*, **9**, 38 (2013); *Neuropharmacology*, **99**, 221-231 (2015)]。さらに、2%ホルマリン液をマウスの足蹠内へ投与することにより脊髄後角において Ang II 含量が増加し、AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬のロサルタンは Ang II 増加に伴う p38 MAPK の活性化を抑制することで鎮痛作用を示すことを明らかにしている [*Neurosci. Lett.*, **585**, 17-22 (2015)]。これらの知見から、血圧や体液バランスの調節因子として考えられてきた Ang II が脊髄における痛みの伝達物質あるいは調節物質である可能性が示唆される。

### (2) 糖尿病の合併症と Ang 系

糖尿病には腎症、網膜症および神経障害といった三大合併症が知られている。糖尿病など高血糖状態では、Ang II 産生系が亢進しており、糖尿病性腎症および網膜症などの合併症の原因となっている。一方、糖尿病性神経障害は比較的早期から認められ、糖尿病患者の約 50%に引き起こされる発症頻度の高い合併症で、その多くの場合、神経障害性疼痛を伴い、これが患者の QOL 低下を招く一因となっている。糖尿病性神経障害性疼痛の主要因として高血糖により生じる末梢神経の代謝障害や血流障害が考えられているが、その詳細については十分に解明されていないのが現状である。このような背景の基、我々は糖尿病性神経障害性疼痛のメカニズムを脊髄 Ang 系から検討を行った結果、1) ストレプトゾトシン (STZ) 誘発性 1 型糖尿病モデルマウスで認められるアロディニア (通常痛みを引き起こさない刺激によって生じる痛み) がロサルタンの脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) 投与によって抑制されること、2) STZ 誘発性 1 型糖尿病マウスでは脊髄後角の神経細胞における Ang 変換酵素 (ACE) の発現量増加に起因し、Ang II の産生が促進されていること、3) 脊髄後角において産生量が増加した Ang II は AT<sub>1</sub> 受容体に作用し p38 MAPK をリン酸化することで、糖尿病性神経障害性疼痛に関与していることを明らかにしている [*Mol. Pharmacol.*, **90**, 205-213 (2016)]。また、Ang II は AT<sub>1</sub> 受容体を介してインスリン抵抗性を示すが、インスリン抵抗性改善薬として 2 型糖尿病の治療に用いられているピオグルタゾン<sup>®</sup>はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$ を活性化して神経障害性疼痛を軽減する [*J. Pharmacol. Sci.*, **108**, 341-347 (2008)]。これらのことから、糖尿病性神経障害疼痛の治療を考える上で、Ang 系が有用な標的になり得る可能性が推察される。

### (3) ACE-Ang II-AT<sub>1</sub> 受容体系と ACE2-Ang (1-7)-Mas 受容体系間の調節機構

Ang II はカルボキシペプチダーゼである ACE2 によって 8 位の Phe を遊離して Ang (1-7) に代謝される。興味深いことに、Ang (1-7) は単に Ang II の不活性代謝物ではなく、Ang II の生理作用をモジュレートすることが心血管系や腎で明らかにされている [*Hypertens. Res.*, **34**, 154-160 (2011)]。すなわち、Ang (1-7) は G タンパク質共役型オーファン受容体の Mas 受容体に作用し、Ang II の AT<sub>1</sub> 受容体を介する作用に拮抗する。我々は脊髄疼痛伝達機構においても、極めて低用量の Ang (1-7) は Mas 受容体を介して Ang II 誘発性疼痛関連行動を抑制することを明らかにしている [*Eur. J. Pain*, **18**, 1471-1479 (2014)]。従って、脊髄においても Ang 系は相反する ACE-Ang II-AT<sub>1</sub> 受容体系と ACE2-Ang (1-7)-Mas 受容体系が構成されており、前者の機能が亢進すると後者はそれに拮抗するようバランスがとられて疼痛伝達を制御している可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性神経障害疼痛は脊髄内 ACE-Ang II-AT<sub>1</sub> 受容体系と ACE2-Ang (1-7)-Mas 受容体系に不均衡が生じ、それに伴い p38 MAPK シグナル経路の活性化に起因して発症するのではないかとの仮説を立て、この可能性について 1 型糖尿病モデルマウスとして STZ マウスを、2 型糖尿病モデルマウスとしてレプチン欠損 ob/ob マウスを使用し、行動・分子薬理学的および神経科学的手法を駆使して解明を試みた。さらに、STZ および ob/ob マウスが示す機械的アロディニアや熱性痛覚過敏と脊髄 p38 MAPK のリン酸化に対する Ang (1-7) i.t. 投与の効果について検討を行った。

## 3. 研究の方法

1 型糖尿病モデルマウスは STZ (200 mg/kg) を ddY 系雄性マウスの尾静脈内へ投与して作製し、2 型糖尿病モデルマウスは ob/ob マウスを購入して使用した。機械的アロディニアおよび熱性痛覚過敏は、それぞれ von Frey テストおよび Plantar テストにより測定した。また、Ang 関連タンパク質および p38 MAPK などの各種 MAPK の発現量はウエスタン・ブロッティング法を用い、ACE2 活性は市販の測定キットを使用して解析した。さらに、脊髄後角における Mas 受容体および ACE2 の局在については灌流固定後マウスの脊髄標本を作製し、神経細胞、アストロサイトやミクログリアに対する細胞マーカーと Mas 受容体あるいは ACE2 との免疫二重染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて解析した。

## 4. 研究成果

STZ 投与 2 週間後に認められる機械的アロディニアおよび熱性痛覚過敏は Ang (1-7) (3 および 30 pmol) の i.t. 投与によって抑制された。STZ マウスの脊髄背側部では ERK、JNK のリン酸化も観察されたが、p38 MAPK のリン酸化が顕著であり、Ang (1-7) は p38 MAPK のリン酸化のみを有意に抑制した。また、Ang (1-7) による機械的アロディニア、熱性痛覚過敏および p38 MAPK

のリン酸化に対する抑制作用は、いずれも Mas 受容体遮断薬 A779 (1 nmol) によって消失した。さらに、脊髄後角において Mas 受容体および ACE2 は NeuN 陽性細胞である神経細胞や Iba-1 陽性細胞であるミクログリアに発現していたが、アストロサイトには存在していなかった。加えて、STZ マウスの脊髄背側部では Mas 受容体および ACE2 の発現量ならびに ACE2 活性が有意に低下していた。

以上の結果から、STZ マウスの脊髄後角では Ang (1-7) 産生系が抑制されており、Ang (1-7) を i.t.投与することにより神経細胞やミクログリアに発現している Mas 受容体を介して p38 MAPK のリン酸化が抑制され、STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルマウスで認められる神経障害性疼痛が抑制されることが明らかとなった。

野生型マウスと比較して ob/ob マウス (2 型糖尿病モデルマウス) の血糖値は生後 5 - 15 週において増加していた。血糖値の上昇に伴い、ob/ob マウスでは機械的アロデニアが生後 11 - 14 週、熱性痛覚過敏が生後 10 - 16 週において観察され、これらの痛覚異状は中時間型インスリン製剤 (ヒューマリン N) の 1 日 2 回皮下投与により改善された。また、野生型マウスと比較して ob/ob マウス (12 週齢) の脊髄背側部で、ACE2 発現量の有意な低下、Mas 受容体発現量の低下傾向と p38 MAPK の著しいリン酸化が認められたが、アンジオテンシノーゲン、ACE および AT<sub>1</sub> 受容体の発現量には違いは認められなかった。さらに、ob/ob マウスの脊髄後角における ACE2 陽性神経細胞が減少していた。加えて、Ang (1-7) (0.3 - 30pmol) の i.t.投与は ob/ob マウスで認められる痛覚異状および脊髄内 p38 MAPK のリン酸化を抑制し、この抑制作用は A779 によりほぼ完全に消失した。

以上の結果から、ob/ob マウスで認められる神経障害性疼痛は脊髄後角における ACE2 陽性神経細胞の減少に伴う Ang (1-7) 産生系の抑制と、これに起因した p38 MAPK の活性化が関与していることを明らかにした。さらに、Ang (1-7) は Mas 受容体を介して p38 MAPK のリン酸化を抑制することで 2 型糖尿病に起因した神経障害性疼痛を抑制することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagata R, Nemoto W, Nakagawasai O, Takahashi K, Tan-No K	4. 巻 174
2. 論文標題 Downregulation of spinal angiotensin converting enzyme 2 is involved in neuropathic pain associated with type 2 diabetes mellitus in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 113825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2020.113825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nemoto W, Yamagata R, Nakagawasai O, Nakagawa K, Hung WY, Fujita M, Tadano T, Tan-No K	4. 巻 872
2. 論文標題 Effect of spinal angiotensin-converting enzyme 2 activation on the formalin-induced nociceptive response in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 172950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamagata R, Nemoto W, Nakagawasai O, Hung WY, Shima K, Endo Y, Tan-No K	4. 巻 392
2. 論文標題 Etidronate attenuates tactile allodynia by spinal ATP release inhibition in mice with partial sciatic nerve ligation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 349-357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00210-018-1593-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogata Y, Nemoto W, Yamagata R, Nakagawasai O, Shimoyama S, Furukawa T, UenoS, Tan-No K	4. 巻 23
2. 論文標題 Anti-hypersensitive effect of angiotensin (1-7) on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Pain	6. 最初と最後の頁 739-749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ejp.1341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto W, Yamada K, Nakagawasai O, Ogata Y, Chiba M, Yamagata R, Sakurai H, Tan-No K	4. 巻 137
2. 論文標題 Effect of repeated oral administration of chondroitin sulfate on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci.	6. 最初と最後の頁 403-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto W, Yamagata R, Ogata Y, Nakagawasai O, Tadano T, Tan-No K	4. 巻 65
2. 論文標題 Inhibitory effect of angiotensin (1-7) on angiotensin III-induced nociceptive behaviour in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.npep.2017.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 レプチン欠損マウスの接触性痛覚過敏に対するアンジオテンシン (1-7) の抑制効果
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 レプチン欠損マウスの神経障害性疼痛に対するアンジオテンシン (1-7) の効果
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hung WY、根本 互、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 絞扼性神経損傷マウスにおけるdiminazene aceturateの抗痛覚過敏作用
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根本 互、山縣涼太、丹野孝一
2. 発表標題 2型糖尿病マウスの神経障害性疼痛における脊髄アンジオテンシン系の関与
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹野孝一、小湊佳輝、山縣涼太、根本 互
2. 発表標題 糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄アンジオテンシン系の関与の解明 新たな治療戦略を目指して
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nemoto W, Yamagata R, Nakagawasai O, Michimata S, Nakagawa K, Tan-No K
2. 発表標題 Antinociceptive effect of diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme 2 activator, in the mouse formalin test
3. 学会等名 2019 International Society for Neurochemistry Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、小瀧佳輝、中川西修、八百板富紀枝、丹野孝一
2. 発表標題 脊髄Angiotensin 系の不均衡が糖尿病性神経障害性疼痛に寄与する
3. 学会等名 平成31年度東北医科薬科大学創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、小瀧佳輝、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘発性糖尿病性神経障害性疼痛に対するアンジオテンシン (1-7) の抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根本 互、山縣涼太、中川西修、Hung WY、島 和弘、遠藤康男、丹野孝一
2. 発表標題 坐骨神経部分結紮マウスにおけるエチドロン酸の抗痛覚過敏作用について
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nemoto W, Ogata Y, Yamagata R, Nakagawasai O, Tan-No K
2. 発表標題 Angiotensin (1-7) prevents streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in mice
3. 学会等名 31th European College of Neuropsychopharmacology Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 2型糖尿病モデルマウスにおけるアンジオテンシン (1-7) の抗痛覚過敏作用
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamagata R, Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Tan-No K
2. 発表標題 Anti-allodynic effect of angiotensin (1-7) on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nemoto W, Yamada K, Nakagawasai O, Ogata Y, Sakurai H, Tan-No K
2. 発表標題 Inhibitory effect of repeated oral administration of chondroitin sulfate on the formalin-induced tactile allodynia in mice
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根本 互、山田耕太郎、中川西修、小瀧佳輝、千葉聖斗、山縣涼太、櫻井英知、丹野孝一
2. 発表標題 神経障害性疼痛に対するコンドロイチン硫酸の抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根本 互
2. 発表標題 脊髄疼痛伝達機構におけるAngiotensin IIの役割に関する行動および分子薬理学的研究
3. 学会等名 第39回東北薬学セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、小瀧佳輝、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘発性1型糖尿病マウスにおけるアンジオテンシン (1-7) の抗アロディニア作用
3. 学会等名 第68回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、小瀧佳輝、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 1型糖尿病モデルマウスにおける神経障害性疼痛に対するアンジオテンシン (1-7) の抑制効果
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 根本 互、小瀧佳輝、山縣涼太、中川西修、八百板富紀枝、丹野孝一
2. 発表標題 脊髄Angiotensin系は糖尿病性神経障害性疼痛の治療標的になり得るか？
3. 学会等名 平成29年度東北医科薬科大学創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山縣涼太、根本 互、小瀧佳輝、中川西修、八百板富紀枝、丹野孝一
2. 発表標題 糖尿病性神経障害性疼痛に対するアンジオテンシン (1-7) の抑制効果
3. 学会等名 平成29年度東北医科薬科大学創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北医科薬科大学・薬学部・薬理学教室ホームページ  <a href="http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html">http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川西 修  (Nakagawasai Osamu)  (50296018)	東北医科薬科大学・薬学部・准教授   (31305)	
研究分担者	根本 互  (Nemoto Wataru)  (80635136)	東北医科薬科大学・薬学部・助教   (31305)	