

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16376

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるアンジオテンシン変換酵素2の役割の解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Role of angiotensin-converting enzyme 2 in neuropathic pain and development of novel therapeutic agents

研究代表者

根本 互 (Nemoto, Wataru)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80635136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアンジオテンシン(Ang) IIの代謝酵素の一つであるAng変換酵素2(ACE2)の脊髄疼痛伝達機構における役割について検討した。神経障害性疼痛モデルである坐骨神経絞扼マウスにおいて認められる痛覚過敏やホルマリン足蹠内投与により引き起こされる侵害刺激行動はいずれもACE2活性化薬であるdiminazene aceturate(DIZE)により抑制されることが明らかとなった。このDIZEによる鎮痛作用はMAS1受容体拮抗薬A779により消失したことから、脊髄内ACE2/Ang(1-7)/MAS1受容体系の機能亢進は疼痛に対する新規治療標的となる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンジオテンシン(Ang)系は生体内の血圧維持に関わる重要なシステムであり高血圧症治療における重要なターゲットとなっている。2000年代に入り、Ang(1-7)受容体であるMAS1受容体や産生酵素であるACE2が発見されて以降、ACE2/Ang(1-7)/Mas受容体系に着目した研究が幅広く行われている。一方、この系の脊髄疼痛伝達機構における役割に関しては全く研究が行われていなかった。このような背景の基、ACE2が脊髄疼痛伝達機構に寄与することを見出した本研究は、Ang(1-7)産生系が神経障害性疼痛をはじめとする難治性疼痛に対する新規治療標的となり得ることを示したものである。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin(Ang)-generating system is localized in the spinal cord and has been suggested to contribute to pain transmission. In this study, we investigated the role of Ang-converting enzyme 2(ACE2), a metabolic enzyme of Ang II, in spinal pain transmission. We found that diminazene aceturate(DIZE), an ACE2 activator, suppressed hyperalgesia observed in chronic constriction injury(CCI) mice, a model of neuropathic pain, and nociceptive behavior induced by intraplantar formalin injection. In addition, these analgesic effects of DIZE were abolished by the MAS1 receptor antagonist A779. These results suggest that enhancement of the ACE2/Ang(1-7)/MAS1 receptor system in the spinal cord may be a novel therapeutic target for pain.

研究分野：薬理学

キーワード：アンジオテンシン アンジオテンシン変換酵素2 脊髄 疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン (Ang) 産生系は Ang 変換酵素 (ACE)/Ang II/AT1 受容体系とそれを負に調節する ACE2/Ang (1-7)/MAS1 受容体系により構成されている。これらの Ang 産生系構成因子は各臓器・組織においても存在し、脊髄においては痛みの調節因子として機能している。我々はこれまでの研究において、Ang II の N 末端代謝物である Ang (1-7) が脊髄内の MAS1 受容体を介して 1 型糖尿病に起因した糖尿病性神経障害性疼痛を改善することを見出している。この知見は、脊髄内における Ang (1-7) 産生系の活性化が疼痛治療における新たな治療標的となり得ることを示唆している。しかしながら、脊髄疼痛伝達機構における ACE2/Ang (1-7)/MAS1 受容体系の役割に関してはほとんど検討されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛および炎症性疼痛モデルマウスを用いて、脊髄疼痛伝達機構における Ang (1-7) 産生系の役割の解明を試みるとともに、Ang (1-7) 産生酵素である ACE2 を標的とした新規治療薬の可能性を検討することである。

## 3. 研究の方法

本研究におけるすべての実験には雄性 ddY 系マウス (22-24 g) を用いた。

(1) 坐骨神経絞扼 (CCI) マウスの神経障害性疼痛における脊髄内 ACE2 の関与について：CCI マウスは坐骨神経 2 カ所を 5-0 絹糸で緩く結紮することにより作製した。実験には CCI 手術後 7 日後のマウスを使用した。接触性および熱性痛覚過敏の測定には、それぞれ von Frey filament 法および Hargreaves 法を用いた。

(2) ホルマリン誘発性侵害刺激行動に対する脊髄内 ACE2 の関与について：2%ホルマリン液 20  $\mu$ L をマウスの足蹠内へ投与することで炎症性疼痛モデルマウスを作製した。ホルマリンを足蹠内へ投与されたマウスは投与直後から 30 分間にわたり侵害刺激行動 (投与部位への舐め/噛み行動) を引き起こす。この反応は 2 相性の反応を示すことから、投与直後から最初の 5 分間を phase I、投与後 10-30 分後の反応を phase II として評価した。また、ACE2 活性化薬である diminazene aceturate (DIZE) および Ang (1-7) は脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) へ投与した。

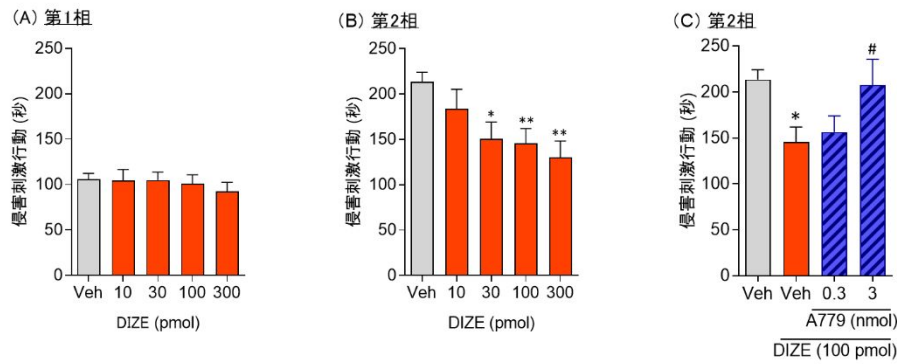
## 4. 研究成果

(1) 坐骨神経絞扼 (CCI) マウスの神経障害性疼痛における脊髄内 ACE2 の関与について：CCI マウスで認められる接触性および熱性痛覚過敏は DIZE (1-100 pmol) の i.t. 投与により用量依存的に抑制された。DIZE (100 pmol) による抗痛覚過敏作用は MAS1 受容体拮抗薬 A779 (3 nmol) により拮抗された。DIZE 投与後の ACE2 活性を測定したところ、DIZE は脊髄後根神経節 (DRG) に影響を与えることなく脊髄内の ACE2 のみを特異的に活性化していた。これらの結果より、DIZE は脊髄内 Ang (1-7) 産生系の機能亢進を介した MAS1 受容体の活性化に起因した抗痛覚過敏作用を示すことが明らかとなった。

脊髄内において Ang (1-7) が抗痛覚過敏作用を示す際の詳細な機構を明らかにする目的で、Ang (1-7) の神経系における標的分子の 1 つとされている ATP 依存性 K イオンチャネル (KATP) の関与について検討した。Naïve マウスへ KATP チャネル遮断薬であるグリベンクラミド (50  $\mu$ g) を i.t. 投与すると顕著な接触性および熱性痛覚過敏を示すが、これらの反応は DIZE (100 pmol) により有意に抑制された。さらに、この DIZE による抗痛覚過敏作用は A779 (3 nmol) により消失したことから、脊髄内で産生された Ang (1-7) は MAS1 受容体を介して KATP を活性化させる可能性が示された。これらの結果に加えて、CCI マウスにおいて認められる痛覚過敏が KATP 活性化薬であるジアゾキシド (100  $\mu$ g, i.t.) により有意に抑制されることを見出した。従って、CCI マウスの痛みには脊髄内 KATP の関与が考えられる。

以上の結果より、DIZE は脊髄内 ACE2 の活性化を介して MAS1 受容体の機能亢進を引き起こし、その結果として CCI マウスの痛覚過敏を抑制することが明らかとなった。この DIZE の抗痛覚過敏作用には MAS1 受容体を介した KATP の活性化が寄与することが示唆された。

(2) ホルマリン誘発性侵害刺激行動脊髄内 ACE2 の関与について：DIZE が神経障害性疼痛を改善することが見出されたことから、脊髄内 ACE2 の炎症性疼痛への関与についても併せて解析した。まず始めに、ホルマリンを足蹠内へ投与することにより炎症性疼痛モデルマウスを作製し、その侵害刺激行動に対する DIZE の効果を検討した。その結果、DIZE (10-300 pmol) はホルマリンによる第 1 相目の反応に影響を与えることなく、第 2 相目の反応のみを用量依存的に抑制した (図 1A および B)。この抗侵害刺激作用は A779 (3 nmol) により消失したことから (図 1C)、Ang (1-7) 産生系の機能亢進を介した脊髄内 MAS1 受容体の活性化が抗侵害刺激作用に関与することが明らかとなった。

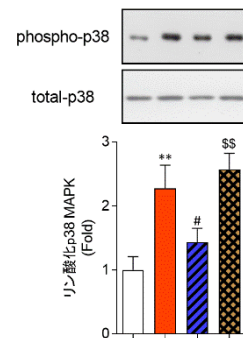


**図 1. DIZE の抗侵害刺激効果と MAS1 受容体の関与 .** (A, B) DIZE (10-300 pmol) を i.t. 投与した 1 時間後にホルマリンを右後肢足蹠内へ投与し、その後引き起こされる (A) 第 1 相および (B) 第 2 相の侵害刺激行動時間を測定した . (C) DIZE (100 pmol) に A779 (0.3 もしくは 3 nmol) を混合したカクテルをホルマリン投与 1 時間前に i.t. 投与し、第 2 相目の侵害刺激行動を測定した .

Ang (1-7) は脊髄において p38 MAPK の活性を抑制することにより鎮痛作用を示すことが知られていることから、ホルマリン投与後の p38 MAPK の活性化に対する DIZE の効果を検討した .ホルマリン投与 1 時間前に DIZE を i.t. 投与したところ、ホルマリンにより引き起こされる p38 MAPK の活性化は DIZE により有意に抑制された .また、この反応は A779 の i.t. 同時投与により顕著に拮抗されることが明らかとなった (図 2) .

さらに、脊髄後角における ACE2 の発現分布を解析したところ、ACE2 は NeuN 陽性神経細胞や Iba1 陽性ミクログリアに存在しており、GFAP 陽性細胞であるアストロサイトには発現していなかった .

以上の結果より、DIZE は ACE2 陽性細胞である神経細胞やミクログリアにおける Ang (1-7) 産生系を活性化することにより、脊髄内 MAS1 受容体を介して p38 MAPK のリン酸化を抑制し、その結果として抗侵害刺激作用を示すことが明らかとなった .



**図 2. 脊髄内 p38 MAPK の活性化に対する DIZE の効果 .**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ryota, Nemoto Wataru, Fujita Maho, Nakagawasai Osamu, Tan-No Koichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Angiotensin (1-7) attenuates the nociceptive behavior induced by substance P and NMDA via spinal MAS1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 742～746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-01004	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 Wataru, Yamagata Ryota, Nakagawasai Osamu, Nakagawa Koharu, Hung Wan-Yi, Fujita Maho, Tadano Takeshi, Tan-No Koichi	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 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172950～172950
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 Ryota, Nemoto Wataru, Nakagawasai Osamu, Takahashi Kohei, Tan-No Koichi	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 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 113825～113825
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 根本互
2. 発表標題 脊髄ACE2による疼痛制御機構の解明
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本互、山縣涼太、中川西修、丹野孝一
2. 発表標題 脊髄内ADAM17のアップレギュレーションが2型糖尿病に伴う神経障害性疼痛に関与する
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本互、山縣涼太、小湊佳輝、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の解明：アンジオテンシン（1-7）系からの検討
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会（招待講演）
4. 発表年 2020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 糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄内 ADAM17 の関与
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山縣涼太、根本互、小湊佳輝、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 令和元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 Wataru Nemoto, Ryota Yamagata, Osamu Nakagawasai, Shota Michimata, Koharu Nakagawa, Koichi Tan-No
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 丹野孝一、小瀧佳輝、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 生体機能と創薬ポジウム2019 (招待講演)
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 生体機能と創薬ポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hung Wan-Yi、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 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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関