

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07074

研究課題名(和文) 2型糖尿病に伴う神経障害性疼痛の解明：脊髄アンジオテンシン系の関与と治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of neuropathic pain associated with type 2 diabetes mellitus: Involvement of spinal angiotensin system and development of the novel therapeutic agents

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では2型糖尿病モデルマウスとしてレプチン欠損 (ob/ob) マウスを用い、糖尿病性神経障害性疼痛のメカニズムを脊髄アンジオテンシン (Ang) 系から検討を行った。ob/obマウスでは血糖値の上昇に伴い痛覚過敏および脊髄背側部におけるAng (1-7) 産生酵素であるAng変換酵素 (ACE) 2発現量の低下が認められた。また、ob/obマウスで認められる痛覚過敏はAng (1-7) の脊髄グモ膜下腔内投与によって抑制された。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内Ang (1-7) 産生系の抑制が関与していることを明らかにした。

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。こ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)：In the present study, using the leptin deficient ob/ob mouse as a type 2 diabetic model, we examined whether the spinal angiotensin (Ang) system was involved in naturally occurring diabetic neuropathic pain. Following the hyperglycemia, persistent hyperalgesia was observed. At 12 weeks of age, the expression of Ang-converting enzyme (ACE) 2 in the dorsal spinal cord was decreased in ob/ob mice. Moreover, the intrathecal administration of Ang (1-7) attenuated hyperalgesia in ob/ob mice. The phosphorylation of spinal p38 MAPK was also attenuated by Ang (1-7) in ob/ob mice. In conclusion, we revealed that the neuropathic pain observed in ob/ob mice involved p38 MAPK phosphorylation accompanied by the downregulation of Ang (1-7)-generating system in the spinal cord.

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) p38 MAPK 脊髄 ob/obマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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。この様な状況下、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 AT1 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、AT1 受容体遮断薬のロサルタンは 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) 糖尿病性神経障害性疼痛と 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、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は脊髄後角神経細胞における Ang II 産生系の亢進とそれに伴う AT1 受容体を介した p38 MAPK のリン酸化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にしている [*Mol. Pharmacol.*, **90**, 205-213 (2016)]。

一方、Ang II は Ang 変換酵素 (ACE) 2 により、Ang (1-7) へと代謝される。興味深いことに、Ang (1-7) は Mas 受容体に作用することで Ang II の AT1 受容体を介する生理作用に拮抗する。すなわち、Ang 系は、相反する ACE/Ang II/ AT1 受容体系と ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系で構成されている。我々は STZ 誘発性 1 型糖尿病マウスの脊髄後角において、ACE の活性化と ACE2 の活性低下に起因した ACE/Ang II/AT1 受容体系と ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系のバランスの不均衡が p38 MAPK の活性化を引き起こし、神経障害性疼痛の形成に関与していることを見出している。さらに、Ang (1-7) の脊髄クモ膜下腔内投与により、上記のバランスの不均衡が解消され神経障害性疼痛が抑制されることを明らかにしている [*Eur. J. Pain*, **23**, 739-749 (2019)]。

2. 研究の目的

糖尿病患者の約 90%は 2 型糖尿病であり、1 型糖尿病の場合と同様に 2 型糖尿病に伴う神経障

害性疼痛も脊髄 Ang が関与しているかは不明である。従って、2 型糖尿病に伴う神経障害性疼痛における脊髄 Ang 系の関与とその分子メカニズムについて解明できれば糖尿病性神経障害性疼痛に対する新規治療薬の開発に繋がると考え、本研究に着手した。本研究では 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・分子薬理的および神経科学的手法を駆使して脊髄 Ang 系の関与について解明を試みた。さらに、ob/ob マウスが示す機械的および熱性痛覚過敏と脊髄 p38 MAPK のリン酸化に対する Ang (1-7) 脊髄クモ膜下腔内投与の効果について検討を行った。

3．研究の方法

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 の発現量はウエスタン・ブロッティング法を用いて解析した。さらに、脊髄後角における 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 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

野生型マウスと比較して ob/ob 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ィニアが生後 11 - 14 週、熱性痛覚過敏が生後 10 - 16 週において観察され、これらの痛覚過敏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 AT1 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 - 30 pmol) の脊髄クモ膜下腔内投与は ob/ob マウスで認められる痛覚過敏および脊髄内 p38 MAPK のリン酸化を抑制し、この抑制作用は Mas 受容体遮断薬の 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。

育薬研究(エコファーマ)の観点から ob/ob マウスで認められる糖尿病性神経障害性疼痛に対する AT1 受容体遮断薬のテルミサルタンおよび ACE 阻害薬のペリンドプリルエルブミン皮下投与による有効性について検討を行なった結果、糖尿病性神経障害性疼痛の発症を有意に抑制することを明らかにした。従って、2 型糖尿病患者において AT1 受容体遮断薬や ACE 阻害薬の使用は糖尿病性腎症の予防に有効とされているが、糖尿病性神経障害性疼痛の発症予防の観点からも奨励されるべきものであることが示唆された。

脊髄 ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系の疼痛制御における役割について解明する目的で検討を行なった結果、ACE2 活性化作用を有するジミナゼンをマウスの脊髄クモ膜下腔内に投与した際、ホルマリン誘発性侵害刺激行動に対して鎮痛作用を示すことを見出した。また、マウス脊髄後角において Mas 受容体はそれぞれサブスタンス P およびグルタミン酸が結合するニューロキニン-1 受容体および NMDA 受容体 GluN1 サブユニットと共存しており、Ang (1-7) は Mas 受容体を介してサブスタンス P および NMDA 誘発性疼痛関連行動を抑制することを明らかにした。以上の結

果から、脊髄 ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系は疼痛制御において重要な役割を担っており、糖尿病性神経障害性疼痛のみならず他の多くの難治性疼痛の治療を考える上で、脊髄 ACE2/Ang (1-7)/Mas 受容体系が有用な標的になり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wataru Nemoto, Ryota Yamagata, Osamu Nakagawasai, Koichi Tan-No	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiotensin-Related Peptides and Their Role in Pain Regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology12050755	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 Shiori Iwane, Wataru Nemoto, Tomoyoshi Miyamoto, Tomonori Hayashi, Masayuki Tanaka, Kazuki Uchitani, Tatsuya Muranaka, Masanori Fujitani, Yuichi Koizumi, Atsushi Hirata, Maho Tsubota, Fumiko Sekiguchi, Koichi Tan-No, Atsufumi Kawabata	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical and preclinical evidence that angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers prevent diabetic peripheral neuropathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-51572-z	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 Ryota Yamagata, Wataru Nemoto, Maho Fujita, Osamu Nakagawasai, Koichi Tan-No	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 Wataru Nemoto, Ryota Yamagata, Osamu Nakagawasai, Koharu Nakagawa, Wan-Yi Hung, Maho Fujita, Takeshi Tadano, Koichi Tan-No	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
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 Ryota Yamagata, Wataru Nemoto, Osamu Nakagawasai, Kohei Takahashi, Koichi Tan-No	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
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10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Wataru Nemoto, Ryota Yamagata, Osamu Nakagawasai, Koichi Tan-No
2. 発表標題 Upregulation of spinal ADAM17 contributes to neuropathic pain associated with type 2 diabetes mellitus in mice.
3. 学会等名 NEURO 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田詩織、宮本朋佳、田中雅幸、打谷和記、小泉祐一、村中達也、根本 互、丹野孝一、坪田真帆、関口富美子、川畑篤史
2. 発表標題 アンギオテンシン変換酵素阻害薬とアンギオテンシンII受容体拮抗薬は糖尿病性末梢神経障害の発症を抑制する：臨床・基礎融合研究によるエビデンス
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田詩織、根本互、宮本朋佳、林友典、田中雅幸、打谷和記、村中達也、小泉祐一、平田敦士、坪田真帆、関口富美子、丹野孝一、川畑篤史
2. 発表標題 高血圧を合併する糖尿病患者における末梢神経障害の発症に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬または受容体拮抗薬の抑制効果：3病院での臨床知見と基礎研究による検証
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023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 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 Wataru Nemoto, Ryota Yamagata, Osamu Nakagawasai, Koharu Nakagawa, Wan-Yi Hung, Maho Fujita, Koichi Tan-No
2. 発表標題 Analgesic mechanisms for inflammatory pain by spinal angiotensin (1-7)-generating system
3. 学会等名 34th CINP World Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩根詩織、根本 互、宮本朋佳、林 友典、田中雅幸、打谷和記、小泉祐一、平田敦士、坪田真帆、関口富美子、丹野孝一、川畑篤史
2. 発表標題 レニン・アンジオテンシン系阻害薬は糖尿病性末梢神経障害の発症を抑制する：3病院での後ろ向きコホート研究と基礎研究での検証
3. 学会等名 第33回日本医療薬学会
4. 発表年 2023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は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 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本卓資、岩根詩織、宮本朋佳、坪田真帆、関口富美子、榊原幹夫、根本 互、丹野孝一、川畑篤史
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素阻害薬とAT1受容体拮抗薬による有痛性糖尿病性神経障害の抑制：保険薬局のレセプトデータ解析による検証
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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	根本 互 (Nemoto Wataru) (80635136)	東北医科薬科大学・薬学部・講師 (31305)	

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