

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592023

研究課題名（和文）肥満および前糖尿病状態における神経障害性疼痛モデルの解析

研究課題名（英文）Study on neuropathic pain associated with pre-diabetes and obese

研究代表者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50271010

研究成果の概要（和文）：前糖尿病状態および肥満に伴う神経障害性疼痛モデルの作製を試み、その解析を行った。高脂肪食を負荷することにより、肥満および前糖尿病状態の病態を示すマウスは、それに伴い触アロディニアおよび熱痛覚過敏を示した。さらに、坐骨神経組織において慢性炎症に関わるマーカー分子の発現や組織学的変化がみとめられた。以上の結果より、生活習慣病と共通する慢性炎症の病態が末梢神経でも成立し、神経障害性疼痛の形成に寄与する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We established a model for pre-diabetes with neuropathic pain (PDN). The model showed peripheral neuropathy, characterized by allodynia and histopathology associated with chronic inflammation. The model is useful for development of therapeutic treatment for PDN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学、生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷モデルを用いて、アディポカインの神経障害性疼痛形成への寄与を示唆する成果を得た。これは、神経障害性疼痛における基盤分子として、新たなカテゴリーが形成されたことを、単に意味するのではない。従来から焦点が当てられてきた免疫細胞やグリア細胞に加えて、単なる結合・支持組織と考えられてきた脂肪細胞が、疼痛形成を制御することを示唆する。さらに、この知見は疼痛と生活習慣病との緊密な関係を示すも

のであり、共通基盤の存在を窺わせる。肥満を成因の一つとする2型糖尿病は有痛性末梢神経障害を合併する。しかし、耐糖能障害を呈するものの、顕性糖尿病には至らない段階で（prediabetes；前糖尿病状態）、末梢神経障害が形成されるという新たな知見が報告されている。単純性肥満症の多くは遺伝子異常が想定されておらず、生活習慣の乱れが主因とされている。それを考慮すると、正常な遺伝的背景を有する動物に異常な食餌性栄養的条件に曝すことにより、末梢神経障害

を示す動物こそが理想のモデルである。しかし、その末梢神経障害に対する動物モデルの作成、ならびに病理学的メカニズムと治療薬創製を目的とする基礎研究は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究では仮説『アディポカインは肥満と前糖尿病状態に随伴する神経障害性疼痛の成因である』を提唱し、動物を用いた実験により、これを検証する。

(1) 神経障害性疼痛を随伴する食事性肥満症ならびに前糖尿病状態モデルの確立

第一に、前糖尿病状態における末梢神経障害に対するモデルを作成する。マウスに高脂肪食を負荷することにより肥満症様の病態を惹起させる。臨床検査に倣い、インスリン抵抗性と末梢神経機能異常を経日的に検索する。そして、前糖尿病状態から糖尿病発現に移行する臨界期と末梢神経機能との関係を精査する。

(2) 前糖尿病状態モデルにおけるアディポカインの動態とその末梢神経障害におよぼす影響

前糖尿病状態における、アディポカインの動態は明らかにされていない。前項で作製したモデルマウスにおけるアディポカインの血中濃度ならびに末梢神経系における発現変動と分布を、経日的に検索する。さらに、神経障害の形成におけるアディポカインの果たす機能的役割を遺伝子学的に解明する。遺伝子改変による Gain of function ならびに Loss of function の双方の視点により、行動的および神経生理学的手法を用いて検討する。さらに、脂肪細胞のアディポカイン産生を調節する主要分子、peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) について、遺伝子改変動物あるいは薬剤を用いてその機能を制御し、神経機能障害におよぼす PPAR γ の影響を検討する。食事療法の有効性を検討するために、高脂肪食から通常食への切替が神経機能障害に及ぼす影響を検討する。

(3) アディポカイン標的細胞の同定とその神経障害性疼痛形成への関与

アディポカインによる神経障害性疼痛形成の制御機構を解明するために、それを産生する脂肪細胞と標的細胞を同定する。同定された標的細胞種を単離し、培養下でアディポカインによる刺激を行い、その遺伝子欠損動物に移植して、神経障害性疼痛形成への影響を調べる。これにより、アディポカイン標的細胞の機能的役割が明白になる。さらに、標的細胞の培養実験を行い、アディポカイン刺激時の、1) 遊走性と形態、2) 活性化される細胞内シグナル経路と疼痛制御分子の発現、3) 感覚神経細胞活動への影響を検討し、標的細胞

の作用機作を精査する。

3. 研究の方法

(1) 食事性肥満症ならびに前糖尿病状態モデル動物の作成とその末梢神経障害評価

C57/B16 マウスを通常食 (10 kcal%) あるいは高脂肪食 (60 kcal%) 飼料にて 12-16 週間飼育し、血糖値 (空腹時血糖値、随時血糖値、経口糖負荷試験、インスリン負荷試験) を経日的にモニターし、前糖尿病状態の期間を決定する。すなわち、随時ならびに空腹時血糖値が高値を示すことなく、耐糖能ならびにインスリン抵抗性を呈し、通常食群体重よりも 30% 以上の高値を示す状態を前糖尿病状態とする。さらに下記について、定期的検査を行い、体重ならびに血糖値との相関を明らかにする。①血液生化学的検査: インスリン; ②行動試験: 熱刺激応答潜時 (Hargreaves 法)、触刺激反応閾値 (von Frey filament); ④組織化学的試験: 神経特異的タンパク protein gene product9.5 に対する抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、足底表皮内における感覚神経線維の密度 (ミエリン形成線維の直径および厚さ、C 線維終末の密度) を評価する。

(2) 前糖尿病状態モデルにおけるアディポカインの動態

末梢神経障害モデルにおけるアディポカインの血中動態、内臓脂肪組織および痛覚伝達神経系における分布とその発現変化を調べる。対象とするアディポカインはレプチン、アディポネクチン、TNF α である。使用する手技は、ELISA 法、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロットリング法、免疫組織化学的染色法である。組織化学的法では多重染色を行い、共焦点顕微鏡による観察によりアディポカイン産生細胞の同定とその発現変化を検討する。

(3) 前糖尿病状態モデルの神経障害に及ぼすアディポカインの関与

各種アディポカインタンパク質に対する中和抗体あるいは組換え体アディポカインを、前糖尿病状態神経障害モデルの痛覚伝達神経路あるいは内臓脂肪組織に投与し、行動学的試験を行う。さらに、遺伝的 loss of function としてノックダウン、すなわちアディポカイン遺伝子に対する siRNA を野生型マウスの産生細胞に導入する、あるいはノックアウトマウスを使用して、同様の検査を行う。神経機能的検査で陽性が見られたアディポカインについては、レスキュー法、すなわちノックアウトマウスに、アディポカインの 1) 組換え体投与、2) アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子導入により神経機能障害の回復を確認する。これにより、アディポカイン産生細胞のうち、内臓脂肪あるいは神経周囲脂肪細胞のいずれが疼痛形成におけ

る責任部位であるかが明確になる。また、特定のアディポカイン産生を直接制御する薬剤である PPAR γ および PPAR α アゴニスト、ならびにスタチン系の薬物を投与し、末梢神経機能障害に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) アディポカインのアロディニア形成における役割

マウス坐骨神経 (SCN) 部分結紮 (PSL) により、結紮側 SCN におけるレプチンの発現が増加した。レプチン中和抗体の SCN 周囲投与はアロディニアを減弱し、またレプチン遺伝子欠損動物 *ob/ob* マウスはアロディニアの不形成を示した (図 1)。レプチン受容体細胞内シグナルである Jak-STAT 経路の PSL による活性化は、アロディニア形成の基盤分子とされている COX-2, iNOS ならびに MMP-9 の mRNA 発現を結紮側 SCN において増大させた。さらに、PSL により SCN に集積するマクロファージにおいて、レプチン受容体細胞内シグナルが活性化されることが示された。以上の結果から、レプチンは結紮による触アロディニアの形成を促進性に調節すること、そして結紮側 SCN が作用部位の一つであることが示唆された。

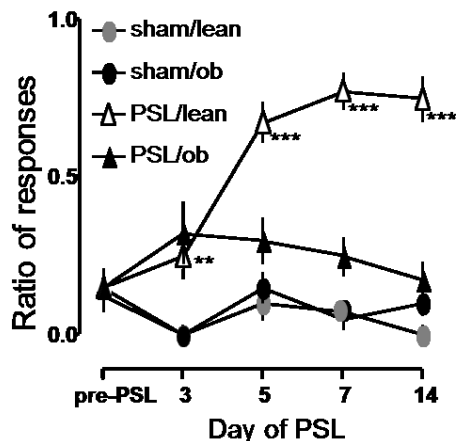


図1. *ob/ob* マウスにおけるアロディニアの不形成
Pre-PSL: the day before PSL. $n=7$ or 8 .
** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs. sham/lean.

(2) 高脂肪食負荷マウスの神経障害性疼痛の評価

通常食を負荷したマウスに比べて、高脂肪食群ではインスリン抵抗性と高レプチン血症を示した (表 1)。

表1. 血清アディポカイン値および脂肪組織量

	RD群	HFD群
アディポネクチン ($\mu\text{g/mL}$)	93.9 \pm 3.85	88.2 \pm 3.10
インスリン (ng/mL)	0.58 \pm 0.20	8.63 \pm 1.85**
レプチン (ng/mL)	6.02 \pm 1.59	93.6 \pm 9.97***
脂肪組織量 (%体重)	1.85 \pm 0.08	4.09 \pm 0.17***

採血および組織採取はHFD負荷11週目に行った。
** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs. RD.

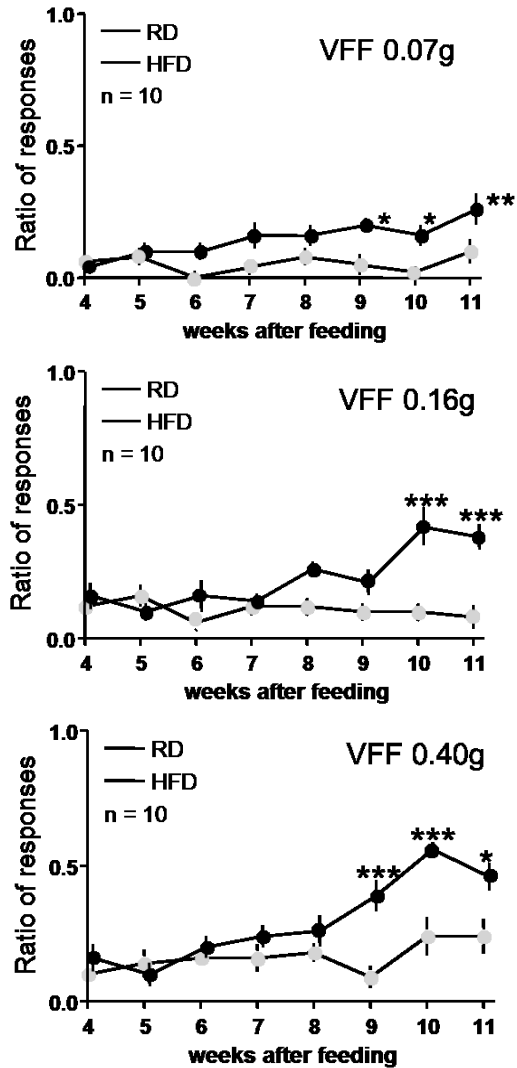


図2. 高脂肪食負荷による触アロディニア形成
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs. RD.

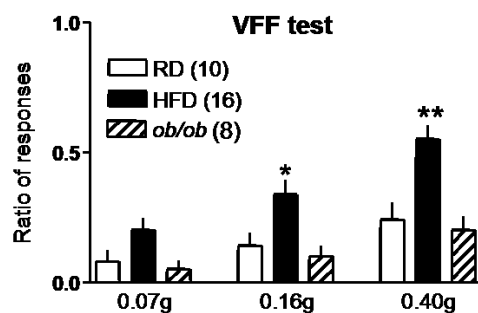


図3. *ob/ob* マウスにおける触アロディニア不形成
全ての実験においてHFD負荷11週目を使用した。
ob/ob マウスは8週齢を使用した。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs. RD.

高脂肪食負荷マウスにおいて触アロディニアが惹起されたが(図2)、肥満と耐糖能障害を呈するものの、レプチン遺伝子を欠損する ob/ob マウスは、触アロディニアを示さなかった。高脂肪食負荷マウスに対して給餌を通常食に交換すると、形成された触アロディニアは消失した。以上の結果は、高脂肪食負荷マウスは前糖尿病状態の末梢神経障害における疼痛モデルとしての可能性とその疼痛に対する食事的介入の可能性を示唆するものであり、高脂肪食負荷により発現が上昇するレプチンがその疼痛形成を仲介することを示唆する。

(3) 神経障害性疼痛におよぼす末梢神経周囲脂肪細胞増殖分化の影響

高脂肪食負荷マウスの坐骨神経あるいは下肢足底皮内の周囲における脂肪細胞について、その数(増殖の指標)とサイズ(分化の指標)の経日的変化を組織学的に検討した。その結果、高脂肪食負荷により、脂肪細胞の肥大化が認められた。さらに、上記検討により神経機能障害との関与が特定されたアディポカインの神経周囲脂肪細胞における変動を、RT-PCR法により評価した。その結果、レプチンのアップレギュレーションがみられた。同様に、脂肪細胞の分化のマーカーである C/EBP- α 、肥大のマーカーである *mest*、炎症反応を示す COX-2 の発現増加がみとめられた。また、全 T 細胞のマーカーである CD3 γ 、樹状細胞/M1 型マクロファージのマーカーである CD11c の mRNA 発現増加が認められた。これら免疫系細胞の増加は、免疫組織化学的検討においても、その細胞数の増加が確認された。以上の結果は、高脂肪食負荷により、脂肪細胞の分化と肥大ならびに、M1 型マクロファージがそれらに集積し、炎症巣を形成している可能性が示唆された。これらの成果により、高脂肪食負荷により生じる末梢神経障害性疼痛の病態に、坐骨神経周囲における慢性炎症が関与する可能性が得られた。効果的治療が存在しなかった肥満症における神経障害性疼痛に対して、治療標的分子を提示すること、ならびにその食事療法と薬物治療のアプローチ開発が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① 前田武彦: レプチンと神経障害性疼痛, 医学のあゆみ, 査読無, 233(7), pp. 565, 2010.
- ② Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y,

Fukazawa Y, Kishioka S., Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation, *Pain*, 査読有, 149, 2010, 305-315, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2010.02.025>

- ③ Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ikuta T, Ozaki M, Kishioka S., Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有, 106, 2009. 13076-13081, doi: 10.1073/pnas.0903524106

[学会発表] (計 20 件)

- ① 前田武彦、緩和医療における臨床研究・基礎研究とは、第 61 回 日本薬学会近畿支部総会、2011 年 10 月 22 日、神戸
- ② 前田武彦、木口倫一、小林悠佳、岸岡史郎、レプチンの神経障害性疼痛における役割、第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2010 年 8 月 25 日、吹田
- ③ 前田武彦、岸岡史郎: アディポカインは神経障害性疼痛の形成を調節する. 第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 19 日、横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50271010

(2) 研究分担者

岸岡 史郎 (KISHIOKA SHIROH)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60137255

木口 倫一 (KIGUCHI NORIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90433341

小林 悠佳 (KOBAYASHI YUKA)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20511562