

機関番号：32676

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790253

研究課題名（和文） 脳内における痛覚伝達の糖尿病による修飾

研究課題名（英文） Modifications of supraspinal pain pathway by diabetes in mice

研究代表者

大澤 匡弘（OHSAWA MASAHIRO）

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80369173

研究成果の概要（和文）：

糖尿病時にみられる感覚異常の発生原因を明らかにし、その治療薬の開発を目的として研究を行った。糖尿病があると脳内で痛みを受け取る神経（グルタミン酸神経）の感受性が亢進しており、痛みを中継する脳の場所（視床）で神経を過敏にする細胞（ミクログリア細胞）が活性化していた。また、痛みの情報を受け取る受容体の機能を健常動物で亢進させると感覚異常が生じた。これらのことから、糖尿病の状態では、脳内における痛覚伝達神経回路は過剰な興奮状態にあり、感覚異常の原因の一つとなる可能性がわかった。

研究成果の概要（英文）：

Abnormal sensory perception in diabetes mellitus is very severe complications, which make patient life very inconvenient. The curative regimen for this complication does not established so far. The present study was investigate the novel mechanisms underlying in the diabetic sensory abnormal perception in the experimentally (streptozotocin-treated) induced diabetic mouse model. Intra-thalamic treatment with glutamate NMDA and AMPA receptor antagonist reduced the thermal and mechanical hypersensitivity in diabetic mice. This treatment did not affect the thermal and mechanical threshold in non-diabetic mice. Intra-thalamic treatment with glutamate, NMDA receptor agonist and AMPA receptor agonist produced mechanical and thermal hypersensitivity in mice. Moreover, the expression of microglial marker Iba1 immunoreactivity was increased in diabetic mouse thalamus. These results suggested that abnormal sensory perception in diabetes mellitus may be due, in part, to the sensitization of pain pathway in the supraspinal site.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：糖尿病、痛覚過敏、インスリン、グルタミン酸、神経科学、中枢神経系、薬理学、グルタミン酸神経

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 糖尿病とその合併症

糖尿病に罹患しても、特段の症状が見られないために、放置されることも少なくなく、進行して種々の合併症を抱えてから、日常生活に支障を来す。特に、感覚異常を伴う神経障害は日常生活を送るにあたり、身体的のみならず精神的苦痛をも強いる。一方、基礎的、臨床的研究が多数行われているにも拘らず、その治療は満足のものになっていない。

### (2) 糖尿病による脳機能障害

糖尿病が脳機能を障害することは、最近になって広く知られるようになった。申請者は、この仮説を 15 年前より実験的に検証しており、糖尿病動物において、認知機能障害や心理的ストレスに対する脆弱性が認められることを明らかにしてきた。痛覚や感覚は脳で認識されることから、中枢神経系の機能が障害されている糖尿病では、脳機能障害が感覚異常の原因になると想像できるが、そのような視点から研究を行ったものはない。

### (3) インスリンによる脳機能の調節

糖尿病における中枢神経系の変化に関して、これまでに明らかにされていることは、海馬における神経新生の低下やアストロサイトの機能抑制や活性化、脊髄におけるミクログリアの活性化、前頭前皮質や海馬でのアミロイドβタンパク質の蓄積やリン酸化τタンパク質の増加など、加齢的变化の加速である。これら中枢神経系の変化の詳細な機序は未だ明らかにされていない。一方、アルツハイマー病の際に脳内インスリン受容体を介した情報伝達が減弱していることが報告され、インスリンは中枢神経系機能維持に対して重要な役割を果たしていることが注目されている。すなわち、脳内のインスリンによる作用減弱の正常化により糖尿病における上位中枢の機能障害が改善される可能性が極めて高く、その機序解明は神経変性疾患の治療に対しても光明を見出すきっかけになるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

これらのことから、脳内におけるインスリンの作用不足が糖尿病時に生じる脳機能障害の主要な原因である可能性が高い。そこで、本研究では、糖尿病時の感覚異常の原因を明らかにするために

(1) 糖尿病時の脳内における痛覚伝達経路の機能亢進の有無、

(2) 糖尿病時における痛覚伝達経路の神経系細胞の形態学的変化、(3) 痛覚伝達経路におけるグルタミン酸受容体の遺伝子発現の変化、について研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

実験には 4 週齢の ICR 系雄性マウスを使用した。飼育環境は  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$  に維持しており、12 時間の明暗サイクル（点灯 8:00、消灯 20:00）に設定した。

### (2) 糖尿病の誘発

エーテル麻酔下にてストレプトゾトシン (200 mg/kg) を尾側静脈から処置した。この処置の 2 週間後から実験を開始し、血糖値が 400 mg/dl 以上の動物を糖尿病マウスとして用いた。なお、溶媒であるクエン酸緩衝生理食塩液 (pH6.3) を同様に処置した動物を対照群とした。

### (3) 脳室内ストレプトゾトシン処置

脳内のインスリン受容体機能を低下するために、ストレプトゾトシンを脳室内へ処置した。この処置の 2 週間後より実験を開始した。なお、溶媒であるクエン酸緩衝生理食塩液を処置したものを対照群として使用した。また、ストレプトゾトシン脳室内処置 4 日後からインスリンを脳室内へ慢性的に持続注入するために、オスモティックミニポンプを用いて、脳室内へ留置したカニューレからインスリン処置を行った。

### (4) 脳内微量注入

マウスをペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下にて脳定位固定し、歯科用ドリルを用いて片側視床直上または大脳皮質体性感覚野 S1 領域の頭蓋骨に開けた。インジェクション用ガイドカニューレを挿入し、歯科用セメントにて頭蓋骨に固定した。4 日間の回復期間の後に、実験に用いた。

NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 および AMPA 受容体拮抗薬である NBQX を視床および大脳皮質体性感覚野 S1 領域へ微量投与した。薬物処置後、行動解析を行った。

### (5) 行動解析

圧刺激に対する反応閾値は、von Frey filament を用いて測定した。マウスの足蹠へ太さの異なるフィラメントを押し当て、逃避行動が認められる重さ (g) から評価を行った。

### (6) 生化学的解析

マウスの視床もしくは大脳皮質体性感覚野 S1 領域を摘出し、RNA 抽出キット (Takara bio) を用いて、RNA を抽出した。逆転写酵素を用いて cDNA を作製後、NMDA 受容体および AMPA 受容体の各サブユニット特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行った。βアクチン遺伝子を内標準遺伝子として、それぞれの遺伝子の発現量の比率として算出し、解析し

た。

#### 4. 研究成果

(1) 糖尿病マウスにみられる痛覚閾値の変化に対するグルタミン酸受容体拮抗薬の効果

糖尿病マウスの圧刺激に対する反応閾値は、対照群マウスと比較して、有意に低下していた。この糖尿病マウスにみられる圧刺激の反応閾値は、NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 を視床へ処置することで上昇した (Fig. 1A)。一方、対照群マウスにおける圧刺激に対する反応閾値は、MK-801 を視床へ処置しても有意な影響を受けなかった。

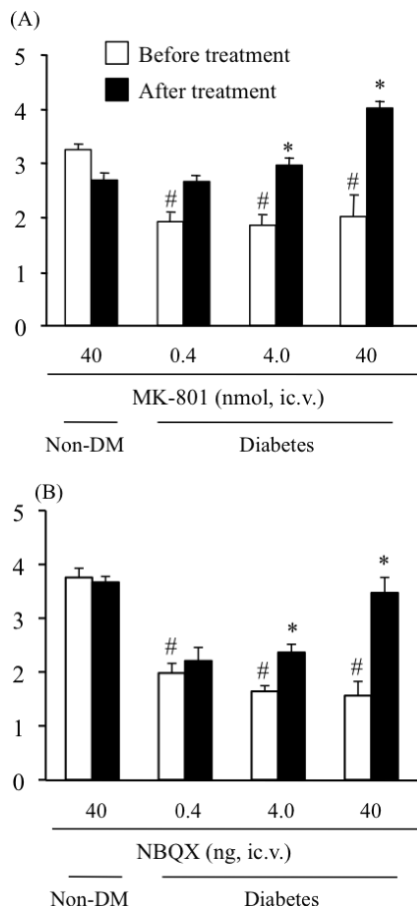


Figure 1. Effect of intra-thalamic microinjection of NMDA receptor antagonist MK-801 (A) and AMPA receptor antagonist NBQX (B) on the mechanical threshold in diabetic and non-diabetic mice. The mechanical threshold was measured at 30 or 10 min after the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of MK-801 or NBQX, respectively. The column represents the mean S.E. of 10 mice. \* $P < 0.05$  vs. before treatment. # $P < 0.05$  vs. non-diabetic mice (Non-DM).

次に、AMPA 受容体の関与を検討するために、NBQX を用いて検討を行った。糖尿病マウスにおける圧刺激に対する反応閾値は、NBQX を視床へ処置することで上昇した (Fig. 1B)。対照群マウスの反応閾値は NBQX により有意な

影響を受けていなかった。

これらの結果より、視床における NMDA 受容体および AMPA 受容体の機能亢進が糖尿病マウスにみられる圧刺激に対する反応閾値の低下、すなわちアロディニア (通常の触刺激が痛みとして認識される状態) の発現に一部関与していることが示唆された。

次に視床からの入力を受ける部位である大脳皮質体性感覚野 S1 領域でのグルタミン酸神経系の関与について検討を行った。糖尿病マウスの S1 領域へ NMDA 受容体拮抗薬を微量注入することにより、圧刺激に対する反応閾値の低下が認められなくなった。また、NBQX の S1 領域への微量注入によっても、糖尿病マウスの圧刺激に対する反応閾値の低下が認められなくなった。一方、同様の処置を対照群マウスに行っても、圧刺激に対する反応閾値に対して、有意な影響は認められなかった。

(2) 痛覚閾値に対するグルタミン酸受容体作動薬の影響

これまでの結果から、視床ならびに大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸受容体の機能亢進が圧刺激に対する反応閾値の低下を引き起こすことが明らかになったことから、次にグルタミン酸受容体活性化の影響について検討を行った。

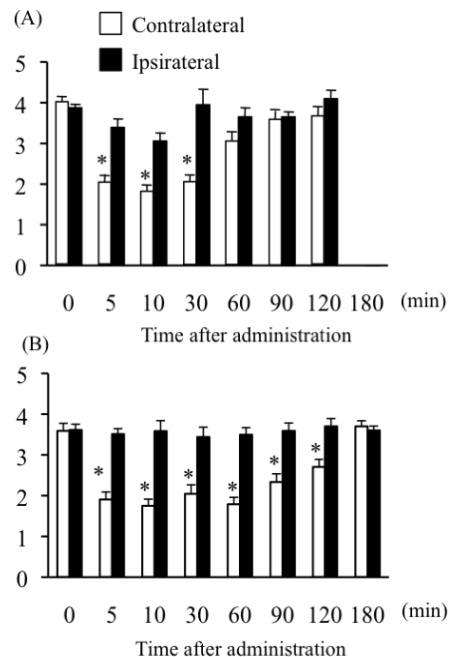


Figure 2. Effect of intra-thalamic (A) and intra-S1 (B) microinjection of glutamate (40 pmol) on the mechanical threshold in diabetic and non-diabetic mice. The column represents the mean S.E. of 10 mice. \* $P < 0.05$  vs. ipsilateral side of the paw.

対照群マウスの視床へグルタミン酸を処置すると、圧刺激に対する反応閾値の著しい

低下が認められた (Fig. 2A)。また、大脳皮質体性感覚野 S1 領域へ処置することによっても、圧刺激に対する反応閾値の低下が認められた (Fig. 2B)。

次に、対照群マウスの視床へ NMDA および AMPA を処置した際の圧刺激に対する反応閾値について検討を行った結果、NMDA および AMPA のいずれの処置によっても圧刺激に対する反応閾値の低下が認められ、アロディニアが出現した。

これらの結果から、視床において NMDA 受容体ならびに AMPA 受容体を活性化すると、圧刺激に対する閾値が低下することが明らかになり、糖尿病時においては、グルタミン酸神経の亢進によりグルタミン酸の作用が認められない可能性が示唆された。

### (3) ストレプトゾトシン脳室内投与による圧刺激に対する反応閾値への影響

ストレプトゾトシンを脳室内へ処置した動物の圧刺激に対する反応閾値は、溶媒処置群と比較して有意に低下していた (Fig. 3)。このストレプトゾトシンの効果は、インスリンを脳室内へ持続的に処置することで認められなくなった。これらのことから、脳内でのインスリン受容体機能の障害により、圧刺激に対する感受性の亢進が引き起こされることが明らかになった。

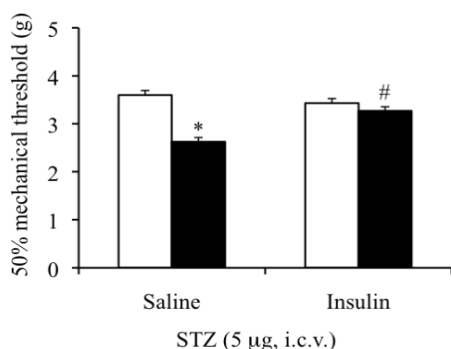


Figure 3. Effect of intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of insulin on i.c.v. administered streptozotocin (STZ)-induced lowering mechanical threshold in mice. The mechanical threshold was measured before and 7 days after the i.c.v. administration of STZ. Insulin infusion was started one day after the STZ treatment. \* $p < 0.05$  vs. before STZ treatment (open column), # $p < 0.05$  vs. saline-infused group.

### (4) 視床および大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸 NMDA 受容体および AMPA 受容体遺伝子発現に対する糖尿病の影響

行動解析の結果から、糖尿病マウスの視床および大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸受容体の機能亢進が、圧刺激に対する反応性の亢進に一部関与していることが示唆されたことから、次に、NMDA 受容体および AMPA 受容体の遺伝子発現の変化につ

いて検討を加えた。

NMDA 受容体 NR1 および NR2A、NR2B サブユニットの mRNA 発現量を RT-PCR 法により測定を行ったところ、糖尿病マウスにおける NMDA 受容体各サブユニットの発現量は、対照群マウスと比べ、有意な変化は認められなかった。また、AMPA 受容体に関しても同様に検討を行った結果、GluA1、GluA2、GluA3 および GluA4 サブユニットのいずれも、対照群マウスとの間に有意な変化は認められなかった。

### (5) 糖尿病マウスの視床における神経系細胞の発現

上記 (1) ~ (3) の検討結果より、糖尿病マウスの視床において興奮性神経伝達が亢進していることが示唆された。次に、神経伝達の亢進に影響を与える神経系細胞の機能変化について、免疫組織化学的に検討を行った。

糖尿病マウスの視床において、ミクログリア細胞の発現量が上昇しており、活性化を示しているアメボイド型のミクログリア細胞が認められた。対照群マウスにおいても視床においてミクログリア細胞の発現は認められたが、不活性型であるラミファイド型の細胞が多く発現していた (Fig. 4)。

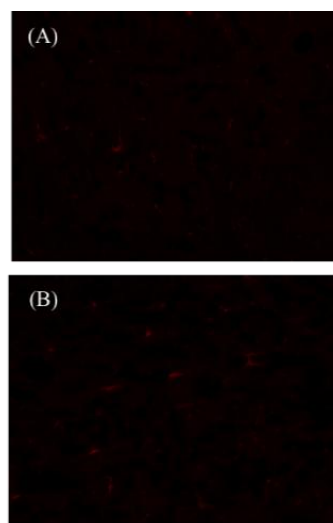


Figure 4. Expression of microglial marker Iba-1 in the thalamus of non-diabetic (A) and diabetic (B) mice. Iba-1 immunoreactivity was increased in the thalamus of diabetic mice.

### (6) 考察

本申請による研究結果より、糖尿病マウスにみられる圧刺激に対する反応閾値の低下 (アロディニア) には、脳内における神経伝達の亢進が関与していることが明らかになった。特に、痛覚伝達経路の中継点である視床ならびに感覚受容部位である大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸 NMDA 受容体および AMPA 受容体の機能亢進が一部関与していることが明らかになった。さらに、痛覚

伝達の亢進には、脳内のインスリン受容体を介した情報伝達系の減弱が一部関与することも明らかになった。また、神経系における炎症性細胞であるミクログリア細胞が糖尿病マウスの視床において活性化していることが明らかになった。

本研究の結果から、視床ならびに大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸神経系の機能亢進が、糖尿病マウスの圧刺激に対するアロディニアに関与していることが初めて明らかになった。過去、視床におけるグルタミン酸受容体は、痛みの情緒的側面に関与していることが明らかにされている (Harte SE et al., Neuroscience, 2011)。今回、圧刺激に対する反応閾値の低下に関してもグルタミン酸受容体の関与が明らかになったことから、視床へ入力する感覚情報の亢進が、身体的な疼痛を引き起こす可能性が示された。また、糖尿病マウスのアロディニアに関しても、NMDA 受容体ならびに AMPA 受容体の機能亢進が関与していたことから、糖尿病が脳内の神経系機能、特に視床や大脳皮質体性感覚野 S1 領域の興奮性神経の活性を上昇すると、アロディニアを惹起する可能性が明らかになった。このことは、糖尿病患者の感覚異常の治療を困難にする原因の一つとして、中枢における痛覚伝達亢進の可塑的变化が糖尿病により生じることを示唆している。

次に、糖尿病時にみられる中枢神経系での痛覚伝達経路の亢進発現の機序を明らかにするために脳内へストレプトゾトシンを処置して、脳内のインスリン受容体機能を障害した際の、圧刺激に対するアロディニア発現を検討した。ストレプトゾトシンの脳室内処置により、圧刺激に対するアロディニアが出現した。さらに、このストレプトゾトシンによるアロディニアは、インスリンの脳室内への持続注入により完全に改善したことから、インスリン受容体機能の低下により引き起こされている可能性が示唆された。また、ストレプトゾトシンによるアロディニアが NMDA 受容体拮抗薬ならびに AMPA 受容体拮抗薬により改善することから、糖尿病時における脳内でのグルタミン酸神経系の機能亢進は、インスリンの作用不足に起因する可能性が高い。

最後に、神経系細胞の機能変化について、受容体の遺伝子発現の変化と神経系細胞の形態学的変化について検討を行った。圧刺激に対する行動解析の結果から、視床および大脳皮質体性感覚野 S1 領域におけるグルタミン酸 NMDA 受容体および AMPA 受容体の遺伝子発現には変化が認められなかったことから、これらタンパク質の転写の亢進が関与していないと思われた。このことは、NMDA 受容体および AMPA 受容体の転写後修飾による機能

亢進が関与していることを示唆しており、今後、これら受容体のリン酸化量の測定など、タンパク質発現について検討を行う必要がある。また、免疫組織化学的検討の結果から、視床におけるミクログリア細胞の活性化が糖尿病マウスにおいて認められたことから、圧刺激に対するアロディニア発現に対し、この変化が一部関与している可能性が考えられる。ミクログリアは、神経障害性疼痛モデルの脊髄において活性化が認められる細胞であり、その抑制は神経障害による痛覚過敏を改善するため、視床においても同様に、ミクログリア細胞の機能抑制が糖尿病マウスにみられるアロディニアを改善することが考えられる。

これらの検討結果から、糖尿病マウスにみられるアロディニアは、これまでに提唱されている末梢神経や脊髄における神経伝達機構の亢進に加え、中枢神経系における痛覚伝達経路の機能亢進も一部が関与していることが明らかになった。また、脳内のインスリン作用不足が、糖尿病マウスにみられるアロディニアの原因である可能性が高いことから、炎症性細胞の活性化に伴う各種疾患（アルツハイマー病やパーキンソン病、多発性硬化症など）の改善にインスリン受容体やその細胞内情報伝達に関わるタンパク質の機能を調節する化合物が有効である可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ohsawa M, Asato M, Hayashi SS, Kamei J: RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of thermal hyperalgesia in diabetic mice. *Pain*. 152, 114-122, 2011. 査読有り

Ohsawa M, Carlsson A, Asato M, Koizumi T, Nakanishi Y, Fransson R, Sandström A, Hallberg M, Nyberg F, Kamei J: The effect of substance P1-7 amide on nociceptive threshold in diabetic mice. *Peptides*. 32, 93-98, 2011. 査読有り

Ohsawa M, Kamei J: RhoA/Rho kinase signaling in the spinal cord and diabetic painful neuropathy. *Eur J Pharmacol*. 644, 1-4, 2011. 査読有り

〔学会発表〕(計8件)

大澤匡弘、小泉貴之、大橋隆博、朝戸めぐみ、亀井淳三：糖尿病マウスに見られるアロディニアに対するタンパク質イソプレニル化の関与。Neuro 2010, 2010年9月2-4日, 神戸

大澤匡弘、Anna Carlsson、小泉貴之、朝戸めぐみ、Rebecca Fransson、Anja Sandstrom、Mathias Hallberg、Fred Nyberg、亀井淳三：糖尿病有痛性神経障害に対する substance P フラグメントの効果，第 31 回日本鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム，2010 年 8 月 26-27 日，名古屋

Masahiro Ohsawa、Anna CarlssonTakayuki Koizumi、Megumi Asato、M. Hallberg、Fred Neberg、Junzo Kamei：Changes of opioidergic systems in diabetic painful neuropathy. International narcotic research conference 2010, 2010 年 7 月 11-16 日、Malmo (Sweden)

Megumi Asato、Masahiro Ohsawa、Takayuki Koizumi、Junzo Kamei：Involvement of spinal CB2 receptor on the neuropathic pain in diabetic mice. International narcotic research conference 2010, 2010 年 7 月 11-16 日、Malmo (Sweden)

Masahiro Ohsawa、Megumi Asato、Takayuki Koizumi、Junzo Kamei：RhoA/Rho kinase pathway contributes to the pathogenesis of mechanical allodynia in diabetic mice. American Diabetic Association 70th scientific sessions, 2010 年 6 月 25-29 日、Orlando (FL; USA)

大澤匡弘、阿部裕紀、朝戸めぐみ、亀井淳三：ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにみられるアロディニアに対するシンバスタチンによる改善作用. 日本薬学会 第 130 年会, 2010 年 3 月 28-30 日、岡山

大澤匡弘、朝戸めぐみ、亀井淳三：糖尿病および肥満における中枢神経系機能障害. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16-18 日、大阪

Masahiro Ohsawa、Anna Carlsson、Megumi Asato、Fred Nyberg、Junzo Kamei：Interaction with naloxone and substance P pathways in neuropathic pain. The 7th Global College of Neuroprotection & Neuroregeneration (GCNN) meeting, 2010 年 3 月 3-6 日、Uppsala (Sweden)

[その他]

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyousitsu/chiryu/gyouseki/main.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 匡弘 (Ohsawa Masahiro)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80369173