

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10983

研究課題名(和文) 糖尿病患者における術後痛増強への酸感受性イオンチャネルの関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of the involvement of Acid-sensing ion channels in post-operative pain enhancement in diabetic patients

研究代表者

草間 宣好 (Kusama, Nobuyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60336691

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)：CHO cellに発現したASICでは、細胞外陰イオンの変化により脱感作速度が変化した。さらに、チャネル活性のpH依存性にも変化が認められた。この変化はチャネル組成によって違いを認めた。Clイオン結合部位のアミノ酸残基を変異させた場合、陰イオンによるチャネル機能の変化は消失した。ラットの脊髄後根神経節細胞に発現したASICにおいても同様の変化を認めた。陰イオンはASICチャネルの組成に応じた機能変化をもたらすと考えられる。このようなASICの特性から、糖尿病の合併症としての微小血管障害によって生じた虚血は、細胞外protonと陰イオンの変化を介してチャネル活性を調整している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸感受性イオンチャネルには、虚血を感知し痛み信号として脳へ伝えるセンサーの役割がある。この特性は周囲の存在する陰イオンによって影響される。糖尿病の合併症として微小血管障害を生じるが、これによって発生する虚血は、細胞外虚血によるpHと陰イオンの変化を介してチャネル機能を調整している可能性がある。この特徴を利用することで、糖尿病患者における術後痛を軽減する治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In acid-sensing ion channels (ASICs) expressed in CHO cells, the rate of desensitization was altered by changes in extracellular anions. Furthermore, the PH dependence of channel activity was also altered. These changes were different depending on the channel composition. When the amino acid residue at the Cl ion binding site was mutated, the change in channel function by the anion has disappeared. Similar changes were observed in ASICs expressed in rat dorsal root ganglion cells. Anions seems to cause the functional changes depending on the composition of the ASIC channel. Such properties of ASICs suggest that ischemia caused by microangiopathy as a complication of diabetes may modulate the channel activity through changes in extracellular proton and anions.

研究分野：麻酔科学

キーワード：Acid-sensing ion channel 術後痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ASICs は、細胞外 H^+ によって活性化される電位非依存性の陽イオンチャネルで 6 種類のアイソフォーム (ASIC1a, -1b, -2a, -2b, -3, -4) が存在する。ASICs は主に中枢神経と末梢知覚神経に発現している。中枢神経ではシナプス可塑性や虚血性神経細胞障害などに関与している。一方、末梢知覚神経における ASICs は、侵害受容や機械刺激受容による痛みの知覚に関わっている。

痛みのなかでも術後痛は臨床における重要な問題である。末梢性メカニズムとして、組織損傷により産生されるケミカルメディエーターや TRPV1 受容体の関与が知られているが、術後痛のメカニズムは完全には解明されていない。術前合併症として糖尿病を有する患者が手術を受けたとき、術後痛に対するオピオイド必要量が増加することや、遷延性術後痛の発症率が高くなることが報告されているが、その機序も不明である。近年、ラット足底切開モデルにおいて、脊髄後根神経節での ASIC3 発現が増加すること、および ASIC3 阻害薬により術後痛が抑制されることが報告され、術後痛と ASICs の関連が示唆された (Deval E et al. J Neurosci. 2011)。また、糖尿病モデルマウスにおいて、脊髄後根神経節における ASICs の発現が変化していることが報告されているが、これが術後痛の変化と関連しているのかは不明である。

2. 研究の目的

糖尿病患者では、術後痛に対するオピオイド必要量が増加することや、遷延性術後痛の発症率が高くなることが報告されている。しかし、そのメカニズムは明らかにされていない。また糖尿病モデルマウスでは、脊髄後根神経節における酸感受性イオンチャネル: Acid-sensing ion channels (ASICs) の発現が変化することが報告されている。しかし、これが糖尿病患者における術後痛の変化と関連しているかは不明である。

本研究では、糖尿病における術後痛の増強と ASICs の関連を明らかにすることで、新たな術後痛の治療方法を展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ラット脊髄後根神経細胞および CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞

脊髄後根神経節培養細胞、CHO 細胞を用いて、細胞外液の pH を 7.4 から酸性 (5.0-7.0) に変化させたときに生じる ASIC 電流を電気生理学的手法 (Whole-cell patch-clamp 法) を用いて、そのチャネル特性を解析する。ASIC チャネルはアイソフォームの 3 量体 (homomultimer) もしくは heteromultimer) として構成され、その組み合わせによりチャネル特性は変化する。

上記の方法により脊髄後根神経節に発現する ASIC チャネルの構成について明らかにする。

(2) 糖尿病ラットにおける ASIC チャネルの変化について

2 型糖尿病ラットとコントロールのラットを用いる。

後肢の筋肉内にカルボシアニン色素 (DiI) を注入し、脊髄後根神経節細胞を逆行性に標識する。標識された脊髄後根神経節細胞を分離培養し、電気生理学的手法 (Whole-cell patch-clamp 法) を用いて ASICs のチャネル特性を測定する。

免疫組織染色法により、脊髄後根神経節細胞における ASIC アイソフォームの発現を測定する。

上記の結果を 2 型糖尿病ラットとコントロールのラットで比較検討し、糖尿病が ASICs の発現に及ぼす影響について解析を行う。

(3)糖尿病が術後痛と ASICs にもたらす影響について

2 型糖尿病ラットとコントロールのラットで Brennan の足底切開モデルを作製する。

刺激誘発痛み行動のテストを行い、逃避閾値の違いを糖尿病ラットとコントロールのラットで比較する。

DiI で標識された脊髄後根神経節細胞を分離培養し、電気生理学的手法 (Whole-cell patch-clamp 法) を用いて ASICs のチャネル特性を測定する。

免疫組織染色法により、脊髄後根神経節細胞における ASIC アイソフォームの発現を測定する。

2 型糖尿病ラットとコントロールのラット、それぞれの術後痛モデルで上記の結果を比較検討し、糖尿病が術後痛や ASICs 発現の変化に及ぼす効果について解析を行う。

(4)術後痛モデルにおける ASIC 阻害薬の効果

(2)(3)において、足底切開モデルで ASICs の発現が増加すること、とくに糖尿病ラットでは ASICs がより多く発現し術後痛も強いことが確認できた場合、ASIC 阻害薬が術後痛を抑制する作用を有するかどうかを、刺激誘発痛み行動のテストによって評価する。

4 . 研究成果

ラット後根神経節細胞に発現した ASICs は pH 依存性に活性化し、細胞外から細胞内への電流を生じた。細胞外液中の Cl イオンを MeSO₃ イオンに置換した場合、pH 5.0 によって生じる ASIC 電流の最大振幅や脱感作速度には有意な変化は認められなかった。しかし、pH 7.0 によって生じる ASIC 電流は、Cl イオンを MeSO₃ イオンに置換した場合、有意な増加が認められた。Cl イオンをより疎水性の陰イオンである SCN イオンに置換した場合、ASIC 電流の脱感作速度に促進が認められた。また、最大電流の減少が認められた。Cl イオンを SCN イオンに置換しても、ASIC 電流の pH-電流反応曲線には変化が認められなかった。これらの現象は、過去に報告された ASIC1a や海馬神経細胞に発現した ASIC チャネルにおける陰イオン置換の効果に関する結果と異なっている。このことから、ASIC サブユニットの違いによって、陰イオン置換によるチャネル機能の修飾が異なっていることが示唆された。

ラット後根神経節細胞に発現した ASIC チャネルでは、多くの場合 ASIC3 サブユニットが含まれている。CHO 細胞に発現させた ASIC3 チャネルを用いて、細胞外の陰イオンを置換した場合の機能変化を検討した。Cl イオンと比較して、MeSO₃ イオンでは pH5.0 によって生じる ASIC 電流の脱感作速度がわずかに抑制された。一方、SCN イオンや Br イオンは pH5.0 によって生じる ASIC 電流の脱感作速度を著明に促進した。ASIC3 チャネルは不完全な脱感作によって持続電流を生じるが、Cl イオンを他の陰イオンに置換してもこの持続電流は有意な変化を認めなかった。この結果から、陰イオンは ASIC3 チャネルにおけるプロトン依存性の開口を修飾するが、その様式は以前報告された ASIC1a の場合とは異なることが明らかとなった。各種陰イオンを用いて検討した結果、陰イオンによる ASIC3 を修飾する能力は、SCN>Br>Cl>MeSO₃>Gluconate の順であった。

ASIC1a チャネルにおいて Cl イオン結合部位のアミノ酸を変化させると陰イオンによるチャネル機能修飾作用は消失することが明らかにされている。ASIC3 における Cl イオン結合部位のアミノ酸残基を変異させた場合の効果を CHO 細胞で検討した。ASIC3(K204A)では変化を認めなかった。一方、ASIC3(E322A)、ASIC3(K204A、E322A)では、wild type と比較して ASIC 電流が減弱化した。変異チャネルにおける脱感作速度は、wild type と比較して促進を認めた。これ

は、wild type における MeSO₃ や Gluconate の作用と反対の効果であった。また変異チャンネルでは、多くの場合、ASIC 電流の pH-電流反応曲線に左方偏位を認めた。変異チャンネルにおいて細胞外液中の陰イオンを置換した場合、wild type の場合と同様な脱感作速度の変化が認められた。これは、ASIC1a チャンネルにおいて Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸残基を変異させた場合に陰イオンによる ASIC チャンネル機能修飾作用が消失するのとは異なる結果である。これらの結果から、Cl⁻ イオン結合部位は ASIC1a 同様、ASIC3 のチャンネル開口を修飾しているが、陰イオン置換による ASIC3 のチャンネル修飾には必須でないと考えられた。ASIC3 では、Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸残基変異は、脱感作速度に対しては陰イオン置換による修飾を消失させず、wild type における陰イオン置換とは逆の効果を生じさせた。

ASIC2a チャンネルに関して、細胞外液中の陰イオン置換は ASIC2 電流を大きく変化させた。Gluconate イオンによって、ASIC2a チャンネルの pH 感受性は低下し、さらに pH3.5 による最大電流も減弱化を認めた。また Gluconate イオンによって ASIC2a の脱感作速度は著明な低下を示した。引き続き、ASIC2a チャンネルにおける Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸を変異させて、その効果について検討を行った。ASIC2a(R308A)、ASIC2a(E312A)、ASIC2a(R308A/E312A)において、ASIC 電流の脱感作速度は wild type の場合と比較して促進が認められた。また ASIC2a(R308A/E312A)では pH 感受性の著明な増加が認められた。しかし ASIC2a(K211A)では ASIC 電流が生じなかった。ASIC2a(E312A)では細胞外陰イオンを置換した場合の脱感作速度の減少効果が残存していたが、一方で ASIC2a(R308A/E312A)では陰イオン置換による脱感作速度の減少効果は消失していた。Wild type で認められた Gluconate イオン置換による pH 感受性の低下は、ASIC2a(R308A) においては認められなかった。この変化は ASIC2a (R308A/E312A)でよりはっきり認められた。また ASIC2a (R308A/E312A)では脱感作速度への Gluconate イオン置換の効果はわずかに認められるのみであった。さらに ASIC2a(R308A/E312A)では陰イオン置換による pH 感受性の変化も wild type とは異なっていた。一方で、SCN⁻ イオンによって ASIC2a チャンネルの pH 感受性は増加を認めた。また SCN⁻ イオンによって ASIC2a の脱感作速度は著明な促進を認めた。ASIC2a の最大電流は Cl⁻ イオンの場合と比較して減弱化を認めた。Cl⁻ イオン結合部位のアミノ酸変異させた場合でも、SCN⁻ イオン置換によるこれらの修飾効果は残存していた。このことから、細胞外陰イオンによって ASIC2a の開口様式は修飾されること、この修飾作用の一部は Cl⁻ イオン結合部位を介して生じていること、SCN⁻ イオンによるチャンネル機能の修飾は Cl⁻ イオン結合部位とは独立した機序であると考えられた。

ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャンネルの電気生理学的性質を、pH-電流反応曲線、脱感作速度で調べた。その結果、ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャンネルの電気生理学的性質は、CHO 細胞に発現した ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャンネルと類似した電気生理学的性質を示すことが明らかとなった。ラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャンネルにおいて、MeSO₃ イオンは pH 5.0 による最大電流や脱感作速度には変化を生じないが、pH7.0 による電流には有意な増加が認められた。また SCN⁻ イオンは脱感作速度を促進するとともに、pH5.0 による最大電流には減少が認められた。CHO細胞に発現した ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャンネルに対する細胞外陰イオン置換の効果は、ASIC1a や ASIC3 などのホモマルチマーチャンネルの場合とは一致しない。一方でラット脊髄後根神経節細胞に発現した ASIC チャンネルに対する陰イオンの効果は、CHO細胞に発現した ASIC1a/3 ヘテロマルチマーチャンネルに対する細胞外陰イオン置換の効果と同様の効果を示している。

ASICs は筋肉、心筋、脳など代謝活性の高い組織に高率に発現している。ASICs は細胞外 proton によって開口するだけでなく、虚血などによって産生・放出される種々の化学物質によっても修飾される。陰イオンは ASIC チャンネルの組成に応じた機能変化をもたらすと考えられる。このような

ASICの特性は、糖尿病の合併症としての微小血管障害によって生じた虚血は、細胞外protonと陰イオンの変化を介してチャネル活性を調整している可能性が示唆される。今回、糖尿病モデルにおける術後痛モデルの作成で困難をきたし解析を行うことができなかったため、モデルを用いた解析が今後の課題である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

- (1)上村友二、平手博之、伊藤遙、小笠原治、藤掛数馬、仙頭佳起、佐野文昭、井口広靖、草間宣好、祖父江和哉

瞳孔記録計は集中治療室で発症したせん妄を検出できる可能性がある。

第46回日本集中治療医学界学術集会 2019年

- (2)Kusama N, Sobue K.

Sciatic nerve block as a treatment of lymphedema-induced leg pain.

American Society of Anesthesiologists Annual meeting 2017年

- (3)永井梓、吉澤佐也、大矢真、井上雅史、衣笠梨絵、加藤利奈、太田晴子、平手博之、草間宣好、祖父江和哉

SGLT2 阻害薬により糖尿病性ケトアシドーシスを発症した2型糖尿病の1例

第44回日本集中治療医学会学術集会 2017年

6．研究組織

- (1)研究分担者

研究分担者氏名：祖父江和哉

ローマ字氏名：SOBUE Kazuya

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 90264738

- (2)研究協力者

なし

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、研究者個人に帰属されます。