

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2007~2009

課題番号: 19590265

研究課題名(和文) 糖尿病における神経因性疼痛発症のしくみ: 新規治療薬への挑戦

研究課題名(英文) The mechanism of diabetic the neuropathic pain : Approach to novel drugs

研究代表者

高野 行夫 (TAKANO YUKIO)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号: 5011324

研究成果の概要(和文): 本研究では、①種々のタイプの糖尿病による神経変性と、それに伴う神経因性疼痛発症の仕組みを詳細に研究しました。特に、神経因性疼痛発症に脊髄のムスカリン受容体や ATP 受容体がどのように関与しているかを明らかにしました。また、ミノサイクリンは、抗アロディニア効果を発現することを証明しました。②インスリン抵抗性糖尿病に焦点を合わせ、2 型糖尿病モデルである ob/ob マウスの重篤な脂肪肝とインスリン抵抗性との関連を調べました。

研究成果の概要(英文): ① In this study, therefore, we examined the mechanism of diabetic neuropathic pain in detail. Especially, we demonstrated how the spinal muscarinic receptors and the ATP receptors involve in neuropathic pain. In addition, pre-administrations of microglia inhibitor minocycline inhibited the allodynia. ② Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) is induced in leptin-deficient (ob/ob) mouse liver and is critical for the development of hepatic steatosis. We examined that fat-specific protein 27 (Fsp27) in ob/ob liver is a direct target gene of PPARgamma and can elevate hepatic triglyceride levels.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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: 神経因性疼痛、糖尿病、ムスカリン受容体、グリア細胞、インスリン抵抗性、peroxisome proliferator-activated receptor gamma

1. 研究開始当初の背景

生活の欧米化や運動習慣の減少により、

生活習慣病の中でも 2 型糖尿病は爆発的に増加しています。とりわけ、糖尿病によ

る脳血管障害や神経障害による疼痛、脳機能障害などは社会問題となっています。さらに、血糖降下剤では改善できない糖尿病、すなわちインスリン抵抗性糖尿病の存在も明らかになり、治療抵抗性患者の数は増えています。

2. 研究の目的

本研究では、①種々のタイプの糖尿病による神経変性と、それに伴う神経因性疼痛発症の仕組みを詳細に研究しました。②インスリン抵抗性糖尿病に焦点を合わせ、2型糖尿病モデルである ob/ob マウスの重篤な脂肪肝とインスリン抵抗性の関連を調べました。この研究成果を治療・予防へ適用します。

(1) 神経因性疼痛と脊髄内の疼痛経路：

1型・2型糖尿病モデル動物を作製し、糖尿病による神経障害と、その結果生じる神経因性疼痛の発症の仕組みを解明します。特に、種々のタイプの糖尿病動物モデルを用いて、痛みの主な伝達経路である脊髄のムスカリン受容体 (M1 or M3) の痛みとの関連を明らかにします。また、脊髄のATP受容体との関連をも検討します。

(2) 神経因性疼痛におけるグリア細胞：

糖尿病などによる神経因性疼痛の発症に、サイトカイン・ケモカインが関与していることが報告されています。そこで、グリア細胞の機能を抑制する抗生物質のミノサイクリンを用いて、神経損傷により、炎症性サイトカインやケモカインとの関連を明らかにします。この研究により、ミノサイクリンの疼痛における臨床応用の可能性を検討します。

(3) 神経因性疼痛とモルヒネ：

神経因性疼痛におけるモルヒネ鎮痛に、脊髄のムスカリン受容体や中枢バソプレシン受容体との関連を調べます。そこで、本研究では、バソプレシン受容体欠損動物

や(1)の動物を用いて、モルヒネ単独で得ることのできない鎮痛効果に対して、他の神経伝達物質等がどのようにその効果を回復させることができるかを詳細に研究します。

(4) 脂肪肝とインスリン抵抗性：

2型糖尿病モデルである ob/ob マウスの肝臓は、重篤な脂肪肝とインスリン抵抗性を示します。脂肪肝発症による肝脂質の蓄積は、インスリン抵抗性の増悪を引き起こすことが知られています。すでに、私たちは核内転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ)が肝臓の脂質蓄積に関与していることを明らかにしています。そこで、PPAR γ の標的遺伝子産物が、どのようにインスリン抵抗性の発現に寄与しているのかを検討します。そのために、肝 PPAR γ によって制御されるインスリン抵抗性関連遺伝子の単離し、得られた遺伝子産物の機能解析から、インスリン抵抗性の創薬の展開を目指します。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデル動物の作製：

マウスおよびラットを用い streptozotocin (STZ) を投与し、1型糖尿病モデル動物を作製しました。2型糖尿病モデル動物としては、GKラットを用いました。

(2) 末梢神経障害と疼痛：

(1)作製された糖尿病モデル動物に加え、坐骨神経部分結紮モデル動物を作製しました。これらのモデル動物を用いて、末梢神経障害による神経因性疼痛発症の仕組みを調べました。神経因性疼痛は、機械的刺激あるいは熱刺激に対する鎮痛反応から、痛覚過敏 (allodynia) や知覚鈍麻の効果で評価しました。

(3) 神経因性疼痛における薬理学的実験：痛覚過敏・触圧過敏に対するアセチルコリン

(ACh) 受容体 (ムスカリン性)、ATP 受容体およびバソプレシン受容体の効果を検討するために、拮抗薬および作動薬を用いて鎮痛効果を調べました。薬物は主に脊髄クモ膜下腔内および脳室内に投与しました。

(4) 神経因性疼痛におけるサイトカイン・ケモカインの関与：

糖尿病などによる神経因性疼痛に、サイトカイン・ケモカインがどのように関与しているかを調べました。そのために、マウス脊髄のサイトカイン・ケモカインを形態的また定量的に検討しました。抗生物質のミノサイクリンが神経因性疼痛に有効であることを明らかにする目的で、ミノサイクリン腹腔投与し、疼痛やサイトカイン・ケモカインの動態を調べました。

(5) 脂肪肝とインスリン抵抗性：

Wild ob/ob マウスと ob/ob-PPARg LKO マウスから常法に従って RNA を抽出し、サブトラクショナルスクリーニングを用いて両肝臓の遺伝子発現を比較しました。さらに単離された個々の候補遺伝子・タンパクの機能解析を行ないました。

4. 研究成果

(1) ムスカリン受容体と痛覚伝達：

すでに私たちは糖尿病と脊髄ムスカリン受容体との関連を報告しています (Eur. J. Pharmacol. 505, 75-82, 2004)。本研究では、脊髄でのムスカリン受容体がどのように痛覚伝達に関与しているかを検討しました。

糖尿病や、坐骨神経部分結紮による神経障害での神経因性疼痛 (非侵害的機械性刺激による異痛症；アロディニア) に対して、脊髄内ムスカリン受容体刺激は、抗侵害作用を示しました。これらの抗侵害作用には、脊髄内ムスカリン M₁ 受容体とムスカリン M₄ 受容体に関与していました。さらに、脊髄ムスカリン M₁ 受容体による抗侵害作用には GABA_A 受容体の活性化が一部関与していました (雑誌論

文④、⑥、⑧)。この結果は、脊髄での電気生理学的実験からも支持されます。

以上の結果から、図 1 に示すように、GABA 作動性神経終末に存在する Gq タンパク質共役型ムスカリン M₁ 受容体が活性化されると、細胞内 Ca²⁺ の上昇し、GABA 作動性神経からの GABA の遊離を引き起こします。その結果、GABA_A 受容体が活性化し、痛覚伝達を抑制すると考えられます。一方、Gi タンパク質共役型ムスカリン M₄ 受容体の活性化は Gi タンパク質共役型受容体にみられる伝達物質の遊離抑制や K⁺ チャンネルの開口を介し、痛覚伝達を直接的に抑制すると思われる。

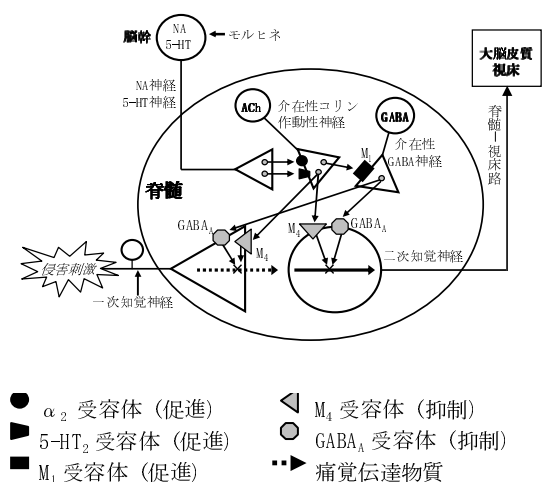


図 1 痛覚伝達系における脊髄ムスカリン受容体の調節様式

(2) 糖尿病と神経因性疼痛と ATP 受容体：

糖尿病による神経因性疼痛に ATP 受容体がどのように関与しているかを調べました。

ATP 受容体は大きく P2X 受容体と P2Y 受容体とに分類されます。さらに P2X 受容体は P2X-P2X7 受容体サブタイプが存在します。本研究では、STZ による糖尿病マウスを用いました。このモデルマウスに生じた神経因性疼痛は、P2X 受容体の拮抗薬の脊髄内に投与で有意に抑制されました。また、糖尿病マウスの脊髄の後根節で、P2X2 と P2X3 受容体 mRNA が有意に増加していました。以上の結果から、

糖尿病による神経因性疼痛に P2X2 と P2X3 受容体が関与しているという最初の報告をすることができました (雑誌論文③)。

(3) 神経因性疼痛におけるサイトカイン・ケモカインの関与:

末梢神経障害の発症の仕組みを脊髄のグリア細胞に注目し、研究しました。坐骨神経部分結紮による神経因性疼痛は、ミノサイクリンで抑制されました。さらに、免疫組織学的に調べた結果、脊髄のミクログリアとアストロサイトは坐骨神経部分結紮マウスの結紮側で著しく増加していました。この増加はミクログリア活性抑制剤のミノサイクリンで有意に抑制されました。以上の結果は、末梢神経障害の発症に脊髄ミクログリアとアストロサイトが関与していることを示唆しています。

また、次のような興味深い考察を発表することができました。神経損傷により、炎症性サイトカインが遊離され、ミクログリアを活性化します。その際に、Chemotactic Cytokine Ligand (CCL) が産生され、CCL はグルタミン酸を介して、痛覚路の 2 次ニューロンを刺激します。その過程で、ミノサイクリンは、CCL-1 の産生を抑制して、抗アロディニア効果を発現すると考えられ、ミノサイクリンの疼痛における臨床応用の可能性が期待できます (雑誌論文投稿中、2010)。

(4) モルヒネの耐性や依存:

私たちは、脳のバソプレシン受容体拮抗薬 (V1a・V1b 受容体) がモルヒネの耐性や依存を抑制するという興味深い現象を見出し、一部報告しました。その画期的な成果を基に、『痛みからの解放を目指して』で平成 22 年度の科学研究費に採択されましたので、さらにこの研究を続けます (雑誌論文④)。

(5) 脂肪肝とインスリン抵抗性:

2 型糖尿病モデルである ob/ob マウスの

肝臓は、重篤な脂肪肝とインスリン抵抗性を示します。肝細胞における脂質蓄積(脂肪肝の形成)は、肝臓のインスリン抵抗性を悪化させます。

本研究の成果として、脂肪肝に発現している fat specific protein 27(fsp27) の単離に成功しました。fsp27 をノックダウンすることで、fsp27 の肝脂質蓄積に対する影響を確かめました。Fsp27 を肝臓に強制発現させると肝細胞に明らかな脂肪滴の増加を示し、肝トリグリセリドの著しい増加を示しました。すなわち、fsp27 遺伝子産物は脂肪肝発症の原因因子である可能性が強く示唆されました (雑誌論文②、⑤、⑦)。

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 11 件)

- ① Masuda T, Hirabara Y, Nakamura Y, Chishaki A, Tsuruhisa M, Miyakawa M, Honda K, Saito R, Sakamoto H, Kawata M, Takano Y, Aldosterone-sensitive NTS neurons regulate sensitivity of the baroreceptor reflex in high-sodium loaded rats, J. Pharmacol. Sci. 査読有, 112, 2010, 482-486.
- ② Goto K, Chiba Y, Matsusue K, Hattori Y, Maitani Y, Sakai H, Kimura S, Misawa M, The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. Pharmacol Res. 査読有, 61, 2010, 466-472.
- ③ Migita K, Moriyama T, Koguchi M, Honda K, Katsuragi T, Takano Y, Ueno S, Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy. Neurosci. Letters, 査読有, 452, 2009, 200-203.
- ④ Honda K., Takano Y. Involvement of vasopressin V1a and V1b receptors in nociceptive responses and morphine-induced effects. J. Pharmacol. Sci. 査読有, 109, 2009, 38-43.
- ⑤ 松末公彦, 核内受容体 PPAR γ による肝脂質蓄積の制御. 実験医学, 査読無, 27, 2009, 1153-1160.
- ⑥ 本多健治, 高野行夫, 脊髄内痛覚伝達系の

ムスカリン受容体, 生体の科学, 査読無, 60, 2009, 404-405.

- ⑦ Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, Gonzalez FJ, Hepatic Steatosis in Leptin-Deficient Mice Is Promoted by the PPARgamma Target Gene Fsp27, Cell Metabolism, 査読有, 7, 2008, 302-311.
- ⑧ Honda K, Horikawa, Ando S., Koga, Kawata S, Migita K., Takano Y., The Spinal Muscarinic M1 Receptors and GABAA Receptors Contribute to the McN-A-343? Induced Antinociceptive Effects During Thermal Stimulation of Mice, J. Pharmacol. Sci. 査読有, 108, 2008, 472-478.
- ⑨ Gang Zhu, M Okada, Yoshida S, Ueno S, Mori F, Takahara T, Saito R, Miura Y, Kishi A, Tomiyama M, Sato A, Kojima T, Fukuma G, Wakabayashi K, Hase K, Ohno H, Kijima H, Takano Y, Mitsudome A, Kaneko S, Hirose S, Rats harboring S284L *Chrna4* mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype, J. Neuroscience, 査読有, 28, 2008, 12465-12476.
- ⑩ Honda K, Koguchi M, Koga K, Nakajima K, Kobayashi F, Migita K, Ogata S, Hirabara Y, Takano Y, Contribution of Ca²⁺-dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice, Biol. Pharma. Bull., 査読有, 301, 2007, 990-993.
- ⑪ Hirabara Y, Araki M, Fukuda M, Katafuchi S, Honda K, Saito R, Takano Y, A high-sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation, J. Pharmacol. Sci., 査読有, 2007, 402-405.

[学会発表] (計 25 件)

1. 松崎雄, 本多健治, 中島茂人, 秋元望, 牛島悠一, 斎藤亮, 高野行夫, 帯状回ムスカリン M1 受容体は神経因性疼痛による機械性アロディニアを抑制する, 第 83 回日本薬理学会, 2010 年 3 月、国際会議場 (大阪)
2. 宮川雅行, 増田大治, 樗木晃子, 鶴久麻衣, 平原康寿, 本多健治, 斎藤亮, 高野行夫, 2 型糖尿病一高食塩負荷モデルラットにおいて内皮細胞由来の弛緩反応は減弱する, 第 83 回日本薬理学会, 2010 年 3 月、国際会議場 (大阪)
3. 秋元望, 本多健治, 牛島悠一, 松

崎雄, 中島茂人, 斎藤亮, 高野行夫, CCL1 の神経因性疼痛への関与, 2010 年 3 月、国際会議場 (大阪)

4. 岡由美子, 松末公彦, 瀧口総一, 山野茂, チアゾリジン化合物により誘導される機能未知遺伝子の発現解析; alternative splicing variants の同定と発現パターン の検討, 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009 年 12 月、福岡
5. 増田大治, 宮川雅行, 樗木晃子, 鶴久麻衣, 平原康寿, 本多健治, 斎藤亮, 高野行夫, 食塩負荷は動脈圧受容器反射の感受性を減弱させる, 第 62 回日本薬理学西南部会, 2009 年 11 月、(松山)
6. N. Akimto, K. Honda, E. Matsumoto, Y. Ushijima, Y. Matsuzaki, S. Nakajima, R. Saito, Y. Takano, The effect of minocycline on neuropathic pain model in mice, International Student Symposium, Kyusyu Brain Days, 2009 年 11 月、九州大学 (福岡)
7. K. Migita, K. Honda, J. Yamada, Y. Takano and S. Ueno, The association with P2X2 and P2X3 receptors in dorsal root ganglion on streptozotocin-induced diabetic neuropathy, Neuroscience 2009, 2009 年 10 月、Chicago, USA
8. 本多健治, 秋元望, 松本恵理子, 松崎雄, 斎藤亮, 高野行夫, 神経因性疼痛モデルにおけるミノサイクリンの抗アロディニア作用, 日本ペインクリニック学会 43 回大会, 2009 年 7 月名古屋国際会議場 (名古屋)
9. Y. Takano, Mechanism of neuropathic pain in the spinal cord, Invited Lecture in Medical School Pamukkale University, 2009 年 5 月, Denizil, Turkey
10. 右田啓介, 本多健治, 高野行夫, 山田順子, 上野伸哉, 神経因性疼痛モデルマウスの大脳皮質 II/III 層錐体細胞におけるシナプス応答, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月, (横浜)
11. 松本恵理子, 秋元望, 松崎雄, 本多健治, 右田啓介, 斎藤亮, 上野伸哉, 高野行夫, ミノサイクリンによる神経因性疼痛抑制効果, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月, (横浜)
12. 増田大治, 中村祐介, 宮川雅行, 平原康寿, 本多健治, 斎藤亮, 有森和彦, 中川裕之, 坂本浩隆, 河田光博, 高野行夫, 糖尿病・食塩負荷モデルラットにおいて動脈圧受容器反射は減弱する; 弧束核におけるアルドステロン感受性神経, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月, (横浜)
13. 平原康寿, 中村祐介, 増田大治, 宮川雅行, 岩切智美, 奥村学, 本多健治, 斎藤亮, 有森和彦, 高野行夫, 糖尿病・食塩負荷高血圧ラットにおいて動脈圧受容器反射は減弱す

- る、薬学会九州支部大会、2008年12月（宮崎）
14. 仙波哲朗、松末公彦、瀧口総一 Frank J Gonzalez、山野茂、インスリン抵抗性改善薬チアゾリジン誘導体による脂肪肝特異的遺伝子の発現調節機構、第25回日本薬学会九州支部大会、2008年12月（宮崎）
 15. 岡由美子、松末公彦、仙波哲朗、瀧口総一、Frank J Gonzalez、山野茂、2型糖尿病モデルマウス肝におけるC/EBP β の機能解明;GeneChipを用いた網羅的遺伝子解析、薬学会九州支部大会、2008年12月（宮崎）
 16. 中村祐介、平原康寿、増田大治、宮川雅行、本多健治、斎藤亮、有森和彦、高野行夫、食塩負荷糖尿病モデルラットにおける動脈圧受容器反射の減弱に対するレニン-アンギオテンシン系の関与、第61回日本薬理学会西南部会2008年11月（米子）
 17. E. MATSUMOTO, K. HONDA, N. AKIMOTO, Y. MATSUZAKI, S. KAWATA, K. MIGITA, S. UENO, R. SAITO, Y. TAKANO, The spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain in mice, Neuroscience 2008, 2008年11月、Washington D.C., USA
 18. E. Matsumoto, S. Kawata, N. Akimoto, K. Honda, K. Migita, Y. Matsuzaki, S. Ueno, R. Saito, Y. Takano, Involvement of spinal glial cells in neuropathic pain, 3rd Asian Pain Symposium, 2008年7月（Fukuoka）
 19. 本多健治、西村亜紀子、松本恵理子、松崎雄、秋本望、斎藤亮、高野行夫、神経因性疼痛における脳内ムスカリン受容体とGABA作動性神経の役割、第30回日本疼痛学会、2008年7月（福岡）
 20. 川田哲史、松本恵理子、本多健治、右田啓介、斎藤亮、上野伸哉、高野行夫、神経因性疼痛に対する脊髄グリア細胞の関与、日本薬学会第128年会2008年3月、横浜
 21. 本多健治、高野行夫、モルヒネ鎮痛、耐性、依存におけるバツプレシン受容体の関与、第81回日本薬理学会年会シンポジウム2008年3月、（横浜）
 22. 片渕史織、平原康寿、福田未音、中村祐介、本多健治、斎藤亮、高野行夫、高食塩負荷糖尿病モデルラットにおいて動脈圧受容器反射機能は減弱する、第81回日本薬理学会年会2008年3月、（横浜）
 23. 本多健治、西村亜紀子、松本恵理子、川田哲史、斎藤亮、高野行夫、神経因性疼痛に対するMcN-A-343の鎮痛効果における脊髄上位GABA A 受容体の関与、第81回日本薬理学会年会2008年3月、（横浜）
 24. 福田未音、平原康寿、片渕史織、中村祐介、本多健治、斎藤亮、高野行夫、糖尿病ラットに食塩を負荷すると腸間膜動脈の弛緩反応が減弱する、第60回日本薬理

学会西南部会 2007年11月（宮崎）

25. Y. Hirabara, S. Katafuji, M. Fukuda, A. Araki, A. Nishimura, E. Matsumoto, K. Honda, R. Saito, Y. Takano, A high sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats impairs cardiovascular regulation and EDHF-mediated vasodilation, Neuroscience 2007 2007年11月 Sun Diego, USA

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 行夫 (TAKANO YUKIO)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50113246

(2) 研究分担者

本多 健治 (HONDA KENJI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：60140761

斎藤 亮 (SAITO RYO)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：80122696

松末 公彦 (MATSUSUE KIMIHIKO)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10389364

(3) 連携研究者

なし