

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700328

研究課題名(和文) 糖尿病性神経因性疼痛における上位中枢プリン受容体の役割

研究課題名(英文) The role of central purinergic receptors on mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice

研究代表者

右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10352262

研究成果の概要(和文)：本研究では、坐骨神経結紮(PSNL)マウスおよびストレプトゾトシン誘発性糖尿病(STZ)マウスを用いて、中枢に生じる変化を比較し疼痛発症メカニズムの解明を試みた。脊髄では、PSNLマウス(2週モデル)ではミクログリアの顕著な増加が認められたが、STZマウス(2週モデル)ではミクログリア明らかな増加は検出できなかった。PSNLマウスの結紮側脊髄後角では、アストロサイトの増加傾向も観察された。PSNLマウスに生じる脊髄でのミクログリアの増加およびアロディニアは、ミノサイクリンを結紮前から7日間反復投与することにより抑制された。しかしながら、ミノサイクリンを結紮後から反復投与した場合は、ミクログリアの増加およびアロディニアの抑制は見られなかった。このことから、ミクログリアの増殖を結紮後に抑制できれば神経障害性疼痛を治癒できる可能性が示唆された。一方、PSNLマウスおよびSTZマウスの大脳皮質帯状回II-III層およびV層錐体型細胞において、自発性抑制性シナプス後電流および微小抑制性シナプス後電流の特性に大きな差は見られなかった。以上の結果から、疼痛発症時における帯状回の抑制系はほとんど変化していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the change of glial cells and neurons in spinal cord (SC) using two neuropathic pain models, partial sciatic nerve ligation (PSNL) mice and streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice. In PSNL mice, microglia increased on the ligation side of the SC, but not neurons. Astrocytes also tended to increase on the ligation side of the SC. In diabetic mice, microglia, astrocytes and neurons were not changed in the SC. Next, Minocycline, a microglial inhibitor, was administrated daily before and after PSNL, or only after PSNL in PSNL mice. The administration of Minocycline before and after PSNL prevented not only the increase of microglia and astrocytes, also allodynia induced by nerve ligation at 7 days. The results suggest that spinal microglia and astrocytes contribute to the development in neuropathic pain in PSNL model, but not diabetic model. It is highly possible the cure of PSNL-induced allodynia if we are able to inhibited microglial proliferation in SC after PSNL. In PSNL model, there was no significant difference the amplitude and the frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC) between the ipsilateral and the contralateral side of II/III and V layer of the anterior cingulate cortex (ACC). In diabetic mice, the frequency of mIPSC tended to decrease in II/III layer of ACC compared with vehicle group, but not significantly change. These results show that it may have a little influence on inhibitory responses in ACC in PSNL model and STZ model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学，神経化学・神経薬理学

キーワード：中枢・末梢神経薬理学

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病やガンが原因で生じる神経因性疼痛は，慢性かつ難治性であり，現在使用されている非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬などの鎮痛薬の効果が低く，早急に治療効果の高い新薬の開発が必要とされている。神経因性疼痛の主症状であるアロデニア（異痛症）の発現には，痛覚伝達の中継点である脊髄後根神経節と脊髄レベルでの機能異常が示唆されている。痛覚伝達には，刺激を受けた皮膚から脊髄後根神経節あるいは脊髄後根神経節から脊髄神経への伝達に，プリン受容体の一つであるアデノシン三リン酸（ATP）受容体の関与が報告されている。ATP受容体は，イオンチャネル型受容体のP2XタイプとGタンパク質共役型受容体のP2Yタイプに分類され，それぞれ7種類と9種類のサブタイプが薬理的および分子生物学的に同定されている。

申請者は，糖尿病が原因で生じる神経因性疼痛に対する脊髄内ATPについて検討を試みた。その結果，糖尿病モデル動物の脊髄では，細胞膜でのカルシウムに依存したプロテインキナーゼC活性が増強することを報告した。また，脊髄後根神経細胞のP2X<sub>2</sub>およびP2X<sub>3</sub>受容体mRNAの発現量の増加を見出し，それらの受容体拮抗薬を髄腔内に投与することにより，糖尿病により生じるアロデニアが消失することを見出した。最近国内では，第5腰髄脊髄神経結紮による神経因性疼痛モデル動物において，アロデニアの発症程度に比例して脊髄後角のミクログリアが活性化し，そのミクログリアに発現しているP2X<sub>4</sub>受容体刺激が，神経因性疼痛の発症と維持に関与しているという発見がなされた。しかしながら，神経障害時に生じる脊髄でのミクログリアの増加を抑制する方法や，疼痛の慢性化に伴う上位中枢への影響については明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛や糖尿病性疼痛による脊髄での機能的変化を抑制する方法や，痛覚伝達に関係が深い大脳皮質前帯状回における神経活動を検討し，脊髄および上位中枢における神経障害性疼痛および糖尿病性神経因性疼痛の発症機序あるいは症状の進行過程を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ストレプトゾトシン（STZ）誘発性糖尿

病マウスおよび坐骨神経部分結紮（PSNL）マウスの作製

体重約30gのddY系雄性マウスに，200mg/kgのSTZを腹腔内投与し糖尿病を発症させる。糖尿病発症の確認は，体重および血中グルコース濃度測定により行う。

PSNLマウスは，体重約30gのddY系およびC57雄性マウスを用いて，大腿部の坐骨神経約1/3を8-0絹糸で強く結紮し作製する。

#### (2) 各モデル動物の疼痛評価

アロデニアの評価は，von Freyテストを後肢足底部に適応し検討する。また，ATP受容体拮抗薬を髄腔内に投与し，疼痛への効果を検討する。さらに，ミノサイクリンによる影響も検討する。

#### (3) 免疫染色法を用いた脊髄内グリア細胞変化の検討

上記に従い作製したモデル動物を4%パラホルムアルデヒドで心臓灌流し全身を固定する。その後，脳を取り出し，厚さ20～50μmの脊髄スライスを作製する。GFAP抗体（アストロサイトのマーカー），Iba-1抗体（ミクログリアのマーカー），NeuN抗体（神経細胞のマーカー）を用いて，アストロサイト，ミクログリアおよび神経細胞の発現数および分布の変化について比較検討を行う。また，ミノサイクリンによる影響についても9検討する。

#### (4) スライスパッチクランプ法を用いたモデル動物の脳内神経伝達の解析

モデル動物の大脳皮質帯状回を含むスライスを作製し，ホールセルパッチクランプ法により興奮性および抑制性シナプス電流を記録する。

### 4. 研究成果

#### (1) PSNLマウスに対する疼痛評価

坐骨神経結紮後3日目からアロデニアが現れ，14日目でも持続していた（図1）。

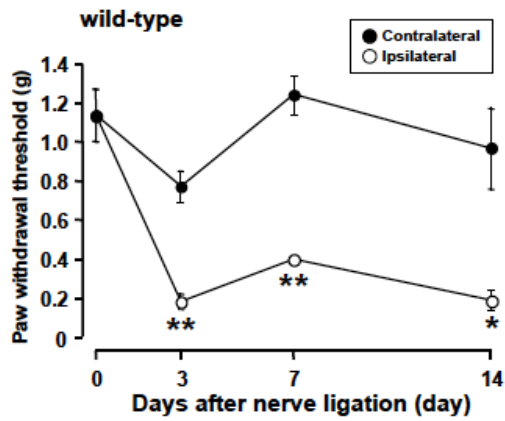


図 1. PSNL マウスにおけるアロディニア

(2) STZ マウスの血糖値および疼痛反応

血糖値は、STZ 投与後 3 日目から有為な上昇が認められ、投与後 14 日目でも高血糖状態が確認された (図 2)。また、図 3 に示すように、アロディニアは STZ 投与後 5 日目から 14 日目まで持続して発現していた。

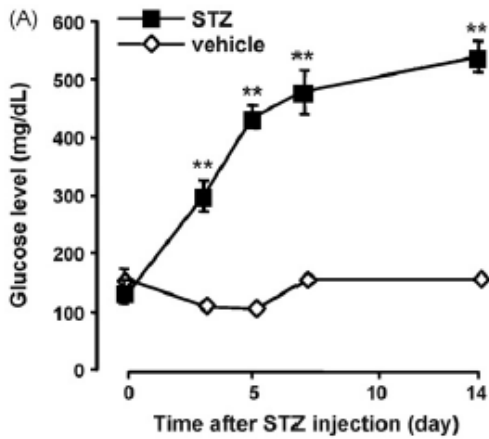


図 2. STZ 投与後の血糖値変化

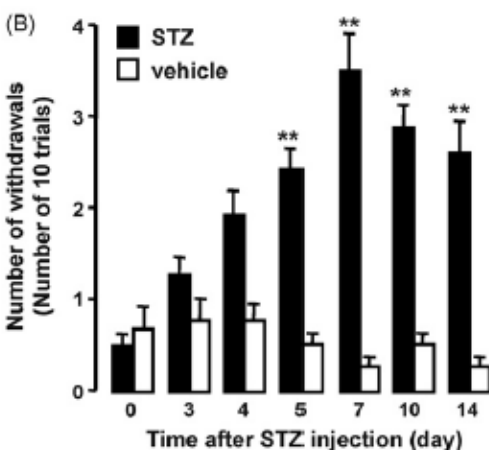


図 3. STZ によるアロディニア

(3) PSNL および STZ マウス脊髄での形態変化  
坐骨神経結紮後 14 日目の脊髄後角では、

明らかなミクログリアの増加が見られ、アストロサイトは増加傾向が見られた。神経細胞については変化が見られなかった。しかしながら、STZ 投与後 14 日目の脊髄ではミクログリア、アストロサイト、神経細胞の明らかな変化は認められなかった (図 4)。

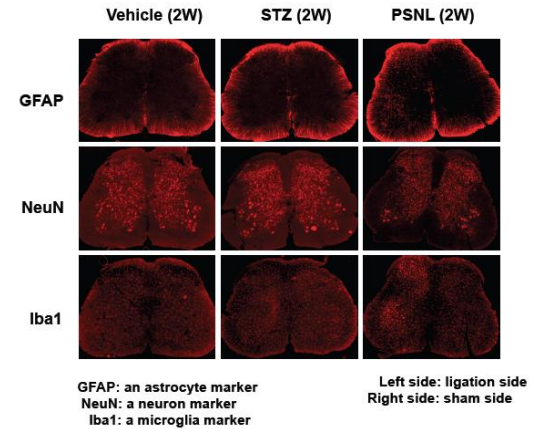


図 4. PSNL および STZ マウスの脊髄に生じる形態変化

(4) PSNL マウスに生じるアロディニアおよびミクログリアの増加に対するミノサイクリンの効果

坐骨神経結紮前からミノサイクリンを投与したグループでは、アロディニアおよびミクログリアの増加が有意に抑制されていた (図 5, 6)。しかしながら、結紮後からミノサイクリンを投与した群ではアロディニアおよびミクログリアの増加の抑制は認められなかった (図 5, 6)。

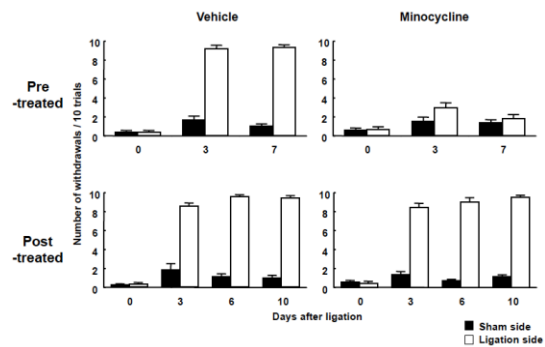


図 5. PSNL により生じるアロディニアに対するミノサイクリンの効果

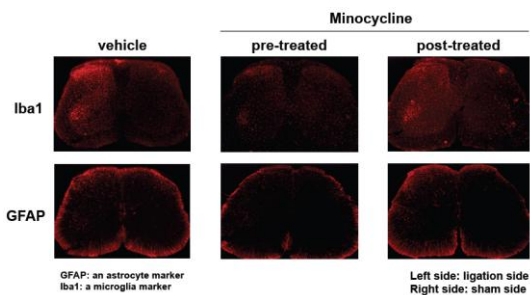


図 6. PSNL による脊髄内ミクログリアの増加に対するミノサイクリンの効果

(5) PSNL および STZ マウス大脳皮質前帯状回錐体細胞の神経活動

PSNL マウスの前帯状回 V 層錐体細胞における自発性 IPSC は、結紮側と非結紮側で電流の大きさ、頻度、各電流の立ち上がりおよび時定数に明らかな違いは見られなかった (図 7)。また、II-III 層錐体細胞においても変化は見られなかった。一方、STZ マウスの前帯状回 V 層錐体細胞の自発性 IPSC は、対照群と比較してピーク電流が増強していたが、II-III 層錐体細胞では明らかな違いは見られなかった (図 8)。

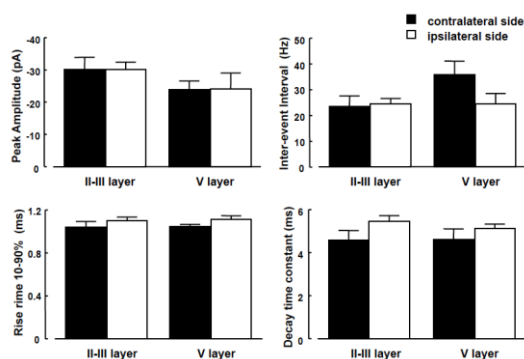


図 7. PSNL マウス前帯状回における自発性 IPSC

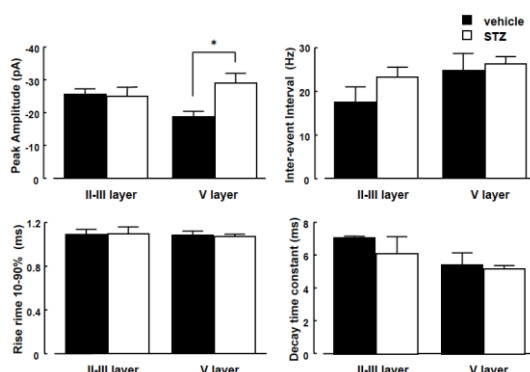


図 8. STZ マウス前帯状回における自発性 IPSC

以上のように、神経障害性疼痛および糖尿

病性疼痛では脊髄内で生じる形態変化が明らかに異なっており、発症メカニズムの違いが示唆された。特に、PSNL モデルに対して結紮前からミノサイクリンを投与することでミクログリアの増加およびアロディニアが抑制されることから、神経障害性疼痛を治療するには脊髄内ミクログリアの増加を抑制しなければならないことが明らかとなった。また、神経障害性疼痛に対する前帯状回の自発性抑制性シナプス伝達は障害されていないことから、前帯状回での可塑的变化は抑制性シナプス伝達の異常によるものではないことが示唆された。

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 8 件)

(すべて査読あり)

① Samways DS, Migita K, Li Z, Egan TM. On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X<sub>2</sub> receptor. *J Biol Chem.* 2008 283:5110-5117.

② Katsuragi T, Sato C, Usune S, Ueno S, Segawa M, Migita K. Caffeine-inducible ATP release is mediated by Ca<sup>2+</sup>-signal transducing system from the endoplasmic reticulum to mitochondria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008 378:93-101.

③ Honda K, Horikawa K, Ando S, Koga K, Kawata S, Migita K, Takano Y. The spinal muscarinic M1 receptors and GABA<sub>A</sub> receptors contribute to the McN-A-343-induced antinociceptive effects during thermal stimulation of mice. *J Pharmacol Sci.* 2008 108:472-479.

④ 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. Lett.* 2009 452: 200-203.

⑤ Zhao Y, Migita K, Sun J, Katsuragi T. MRP transporters as membrane machinery in the bradykinin-inducible export of ATP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010 381:315-320.

⑥ Sun J, Usune S, Zhao Y, Migita K, Katsuragi T. Multidrug resistance protein transporter and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>-signaling involved in adenosine triphosphate export via Gq protein-coupled NK2-receptor stimulation with neurokinin A. *J Pharmacol Sci.* 2010 114:92-98.

⑦ Akimoto N, Honda K, Matsumoto E, Kawata S, Migita K, Ushijima Y, Takano Y. Anti-allodynic effects of minocycline in a mouse neuropathic pain model. Journal of Japan Society of Pain Clinicians 2010 17: 478-484.

⑧ Migita K, Honda K, Yamada J, Takano Y, Ueno S. Involvement of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy. Hirosaki Med J. 2010 61(Suppl.): S255-S261.

〔学会発表〕 (計 9 件)

① Changes of spinal glial cells and development of allodynia in neuropathic pain models, Keisuke Migita, Tetsusi Kawata, Eriko Matsumoto, Kenji Honda, Yukio Takano, Junko Yamada and Shinya Ueno, 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日, 東京国際フォーラム

② Matsumoto E., Kawata S., Akimoto N., Honda K., Matsuzaki Y., Migita K., Ueno S., Saito R., Takano Y., Involvement of spinal glial cells in neuropathic pain, 3rd Asian Pain Symposium, 2008 年 7 月

③ Junko Yamada Keisuke Migita and Shinya Ueno, PRIP-1 is involved in GABA<sub>A</sub> receptor-mediated tonic inhibition in basolateral amygdala, NEUROSCIENCE 2008, 2008 年 11 月

④ Keisuke Migita, Kenji Honda, Yukio Takano, Junko Yamada and Shinya Ueno, Synaptic activity in layer II/III pyramidal neurons of anterior cingulate cortex in neuropathic mice, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日, パシフィコ横浜

⑤ Keisuke Migita, Kenji Honda, Junko Yamada, Yukio Takano and Shinya Ueno, Involvement of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy, 第 11 回弘前医学国際フォーラム, 2009 年 3 月 28 日, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター

⑥ Keisuke Migita, Kenji Honda, Junko Yamada, Masahiko Tomiyama, Yukio Takano and Shinya Ueno, The association with P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors in dorsal root ganglion on streptozotocin-induced diabetic neuropathy, NEUROSCIENCE 2009, 2009 年 10 月 21 日, McCormick Place convention center

⑦ Keisuke Migita, Junko Yamada, Takashi Kanematsu, Masato Hirata and Shinya Ueno, Phenotype analysis of pain behaviors in PRIP-1 KO mice, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪国際会議場

⑧ Keisuke Migita, Terrance M Egan, Junko Yamada, Masahiko Tomiyama, Shinya Ueno, The regulatory site of pore dilation and current facilitation in P2X<sub>7</sub> receptor, 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸国際会議場

⑨ Keisuke Migita, Terrance M Egan, Junko Yamada, Masahiko Tomiyama, Shinya Ueno, The property of pore dilation in P2X<sub>7</sub> receptor, 第 12 回弘前医学国際フォーラム, 2010 年 10 月 29 日, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター

〔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

右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 1 0 3 5 2 2 6 2

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :