

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07770

研究課題名(和文) エネルギー代謝異常による疼痛受容の変調

研究課題名(英文) Modulation of pain perception by energy metabolism

研究代表者

戴 毅 (Dai, Yi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20330441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肥満・糖尿病などの代謝性疾患における「痛覚閾値の低下」と「細胞内エネルギーセンサーであるAMPKの活性低下」に着目し、細胞エネルギー代謝異常による感覚受容の変調の分子機序を解析した。具体的な研究成果として、1)疼痛過敏に伴う代謝異常病態モデル動物の確立した。2)動物モデルにおけるエネルギー代謝関連遺伝子およびその下流シグナルによる疼痛受容関連受容体への調節機構を解析し、AMPK-Nedd4-2シグナルによるTRPA1の膜発現調整の分子機構を解明した。3)糖尿病性ニューロパシーの知覚過敏発症に密接に関連する遺伝子の同定を成功し、さらなる病態解明の切っ掛けとなる分子を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体のエネルギー代謝異常は肥満や糖尿病をはじめ、様々な病気をもたらす。本研究はエネルギー代謝異常の感覚受容にもたらす影響とその分子機序を探求した。得られた研究成果はAMPK-Nedd4-2シグナルによる疼痛受容体タンパクの調節が疼痛過敏の発症に寄与することが示唆された。

本研究成果は、先行臨床研究で示されたAMPK活性化薬剤の鎮痛効果の薬理機序を解明し、今後こうした薬剤を鎮痛薬として活用される科学的根拠を提供した。特に、II型糖尿病患者の治療に使われるmetformin(メトフォルミン)は、糖尿病性ニューロパシーへの積極的に使用すべきことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the study, by focusing on the interaction between pain and AMP-activated protein kinase (AMPK), a cell energy sensor in the metabolic disease, we investigate the molecular mechanisms of how cell energy disorder contributes the sensory dysfunction. The following achievements were reached. 1) we have successfully established metabolic disordered animal models which accompanied with hypersensation. 2) We demonstrated a functional link between AMPK-Nedd4-2 signaling and TRPA1 channels, in which AMPK negatively regulates TRPA1 in dorsal root ganglion neurons through the Nedd4-2-mediated ubiquitination of TRPA1. This ubiquitination leads downregulating TRPA1 plasma membrane expression. This results could represent an underlying mechanism and potential therapeutic molecular target in painful diabetic neuropathy. 3) we have identified several genes which are involved in the diabetic neuropathy, giving the molecule candidates for further elucidating its pathophysiology.

研究分野：疼痛研究

キーワード：糖尿病性ニューロパシー TRPA1 AMPK Nedd4-2 ユビキチンリガーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体のエネルギー代謝異常は肥満や糖尿病をはじめ様々な病気をもたらす。臨床経験的に、肥満などエネルギー代謝過剰の状態にある患者は疼痛閾値が低下し、痛みの訴えが多いことが知られている(1)。一方、運動やサウナ、温泉療法などは体内のエネルギー代謝を活性化し、肥満・糖尿病への治療効果のみならず、慢性疼痛の改善効果が確認されている(2、3)。しかしながら、エネルギー代謝と疼痛受容との関連について科学的に解析した研究は少なく、その分子メカニズムは解明されていない。

一方、AMPKは細胞内のエネルギー恒常性の最上位の調節因子として知られており、細胞内ATPレベルの低下に反応して、エネルギー生産経路を活性化し、エネルギー消費経路を阻害する。AMPKは細胞のエネルギーセンサーとして、グルコースや脂肪酸の利用、遺伝子発現、タンパク合成など多様な生理機能に関与する。肥満や糖尿病などの代謝性疾患において肝臓や筋肉におけるAMPK活性の低下が注目されているが、感覚神経系におけるAMPK活性の変化およびその生理的意義が無視されてきた。一方、AMPK活性を上げる薬物は疼痛モデル動物に対して鎮痛効果を示すことが、申請者らを含めていくつかの研究グループより報告された(4)。

我々は肥満・糖尿病モデル動物における一次感覚ニューロンにおけるAMPK活性の低下、さらにこのAMPKの活性低下は疼痛関連受容体TRPA1の細胞膜発現を増加させ、疼痛過敏の発症に寄与することを明らかにした(5)。この成果は代謝性疾患の感覚神経機能に与える可能性を提示し、そのメカニズムを細胞レベルで初めて解明したことで、AMPKシグナルによる疼痛制御の先駆的研究として評価され、大きな注目を集めている。

### 2. 研究の目的

生体内におけるエネルギー代謝は、人間が生命を維持するための最も基本的な機能である。本研究は、肥満・糖尿病などの代謝性疾患における「痛覚閾値の低下」と「細胞内エネルギーセンサーであるAMPKの活性低下」に着目し、我々が解明を進めてきたAMPKシグナルによるTRPチャネル制御の成果(5)を発展させ、細胞エネルギー代謝異常による感覚受容の変調の分子機序を解明することを目的とする。エネルギー代謝異常の痛み受容にもたらす影響と分子機序への探求は、本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

### 3. 研究の方法

- (1) 肥満モデル動物(db/dbマウス、Zucker-fa/faラット)を用いて、疼痛過敏・感覚異常の発生時期、血糖値の経時変化、TRPA1チャネル発現・機能変化、AMPKの下流シグナルであるNedd4-2を確認し、その相互関係を明らかにする。(行動薬理学実験法と組織形態学的実験法)
- (2) 肥満病態モデル動物(db/dbマウス、Zucker-fa/faラット)を用いて、TRPチャネルを介したNedd4-2シグナルによる疼痛制御のメカニズムを細胞・分子レベルで解明する。(電気生理学、分子生物学、遺伝子工学実験法)
- (3) 肥満病態モデル動物(db/dbマウス)の後根神経節(DRG)ニューロンにおける遺伝子変動の網羅的解析。(RNAシーケンス)

#### 4. 研究成果

(1) db/db 肥満モデルマウスの機械刺激に対する疼痛過敏には、ユビキチンリガーゼの Nedd4-2 が関与することが、薬理行動学的解析によって示唆された。(図1)

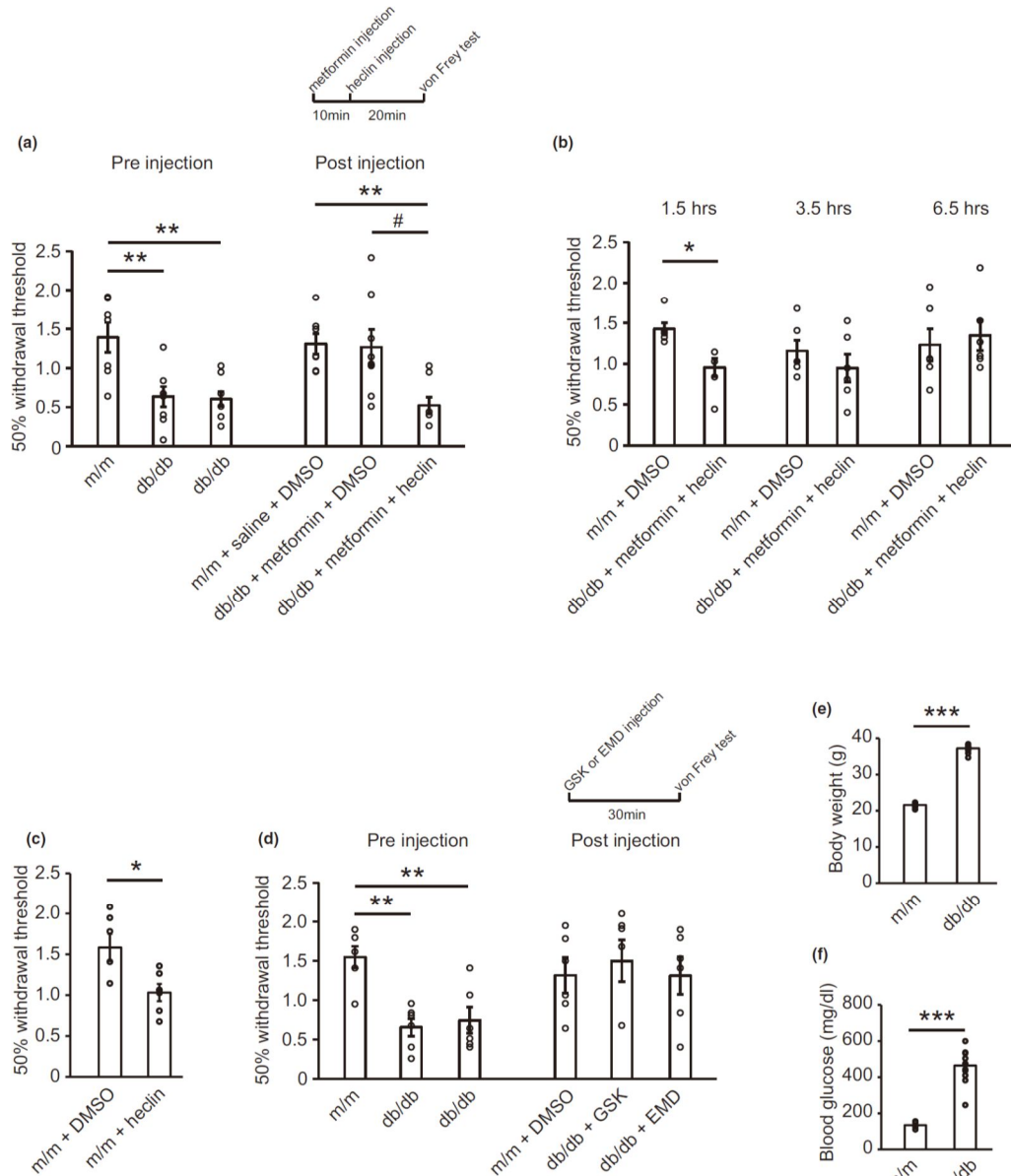


図 1

(2) マウス DRG ニューロンにおいて、Nedd4-2 は TRPA1 チャネル蛋白と共存し、TRPA1 の機能を調節することが証明された。(図2)

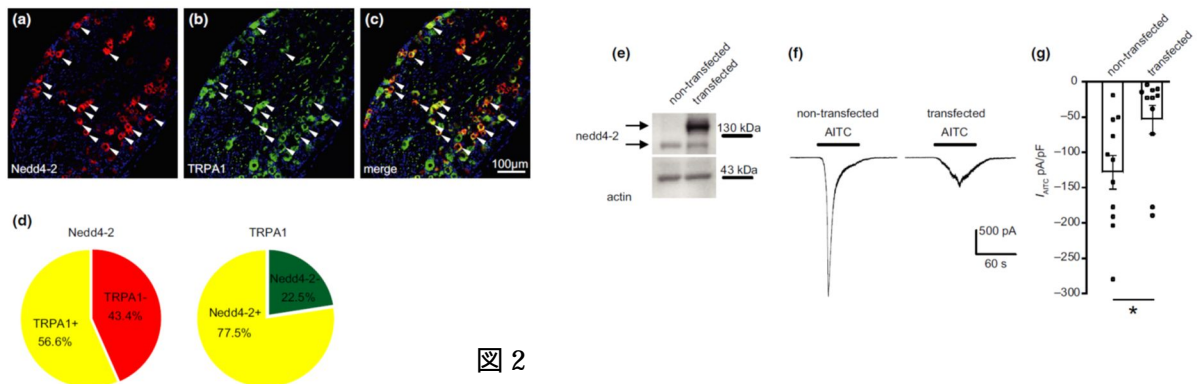


図 2

(3) コントロールマウスに比べて、db\_db マウスにおいて Nedd4-2 の細胞膜上発現が変化しないものの、細胞質内における発現の有意な減少が示唆された。また、この現象は TRPA1 のユビキチン化の減弱に伴うことが明らかとなった。(図3)

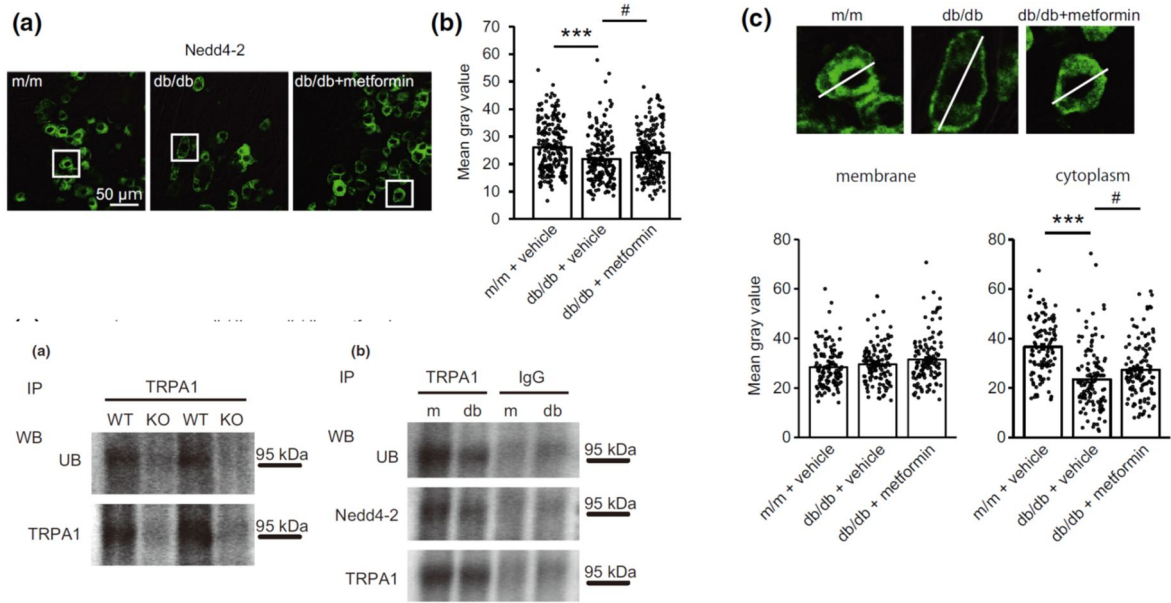


図 3

(4) 培養 DRG ニューロンにおいて、高グルコースの培養液は DRG ニューロンにおける Nedd4-2 の発現パターンを変え、細胞膜での発現を増加させることが示唆された。(図4)

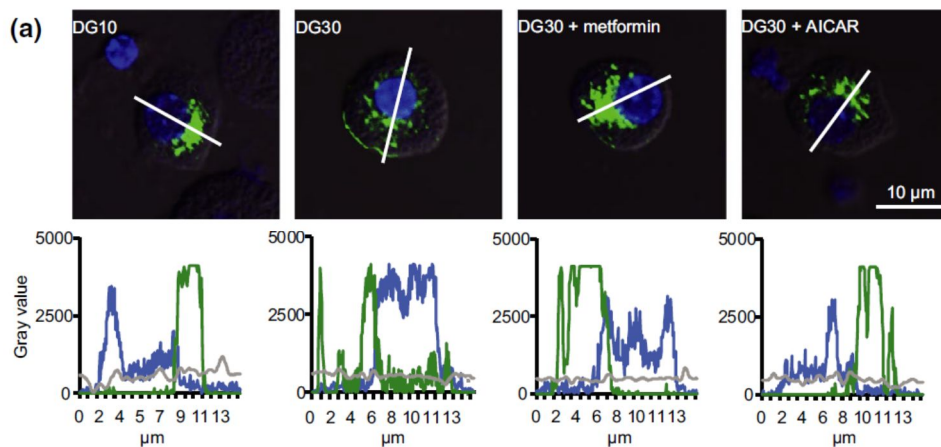


図 4

(5) コントロールマウス(7週齢)、db\_dbマウスの7週齢、25週齢のDRGニューロンにおけるトータルRNAを解析した。コントロールマウスに比べて、7週齢のdb\_dbマウス(疼痛過敏発症)のDRGニューロンにおいて複数の遺伝子がアップレギュレートされることが明らかとなった。また、25週齢db\_dbマウス(感覚鈍麻発症)が7週齢db\_dbマウスと比較すると、複数の遺伝子がダウンレギュレートされたことが明らかとなった。双方のデータを照らし合わせて、db\_dbマウス肥満症マウスにおける疼痛過敏の発症に重要な役割を担う責任遺伝子の候補が示された。(図5)

## RNA Seq analysis of dorsal root ganglion

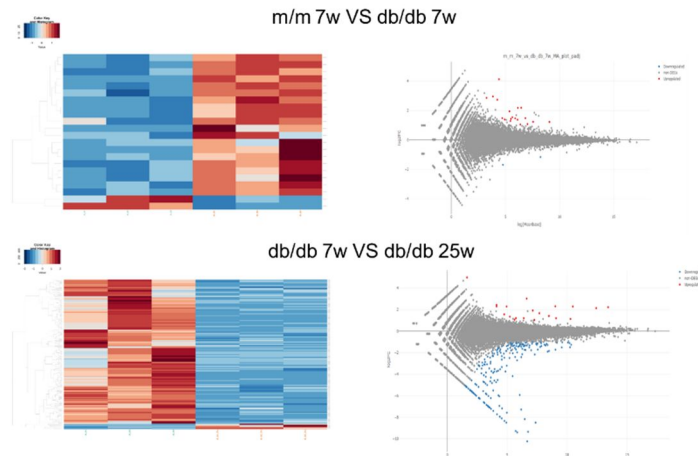


図 5

(6) 我々はまた、肥満症モデル動物における虚血性心疾患の関連痛発症について検討した。肥満症動物では神経活動マーカであるリン酸化 ERK の脊髄後角での発現誘導が減弱されている傾向が確認された。

以上の結果で示したように、本研究はエネルギー代謝異常をもたらす知覚神経系の変調を疼痛制御の観点から解明した。ユビキチンリガーゼの Nedd4-2 が AMPK の下流分子として、疼痛センサータンパクの TRPA1 の発現に対してネガティブフィードバック調節の役割を担うことが示唆された。また、TRPA1 のみならず他の複数遺伝子が肥満症における知覚感受性の変化に寄与する可能性が示唆された。

### < 引用文献 >

1. Reg Anesth Pain Med 2015; 40(2) 91-111
2. J Nippon Med Sch. 2018;85(4):196-203;
3. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2015 18(4):374-80
4. Curr Drug Targets. 2016;17(8):908-20
5. Diabetes 2018; 67(1): 98-109

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Shenglan, Dai Yi	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles of AMPK and Its Downstream Signals in Pain Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 836 ~ 836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11080836	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Xiaohang, Kanda Hiroshiro, Tsujino Takeshi, Kogure Yoko, Zhu Feng, Yamamoto Satoshi, Sakaguchi Taichi, Noguchi Koichi, Dai Yi	4. 巻 23
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species Cause Exercise-Induced Angina in a Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2820 ~ 2820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanda Hiroshiro, Yang Yanjing, Duan Shaoqi, Kogure Yoko, Wang Shenglan, Iwaoka Emiko, Ishikawa Miku, Takeda Saki, Sonoda Hidemi, Mizuta Kyoka, Aoki Shunji, Yamamoto Satoshi, Noguchi Koichi, Dai Yi	4. 巻 22
2. 論文標題 Atractylodin Produces Antinociceptive Effect through a Long-Lasting TRPA1 Channel Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3614 ~ 3614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wang Shenglan, Qi Simin, Kogure Yoko, Kanda Hiroshiro, Tian Lin, Yamamoto Satoshi, Noguchi Koichi, Dai Yi	4. 巻 53
2. 論文標題 The ubiquitin E3 ligase Nedd4 2 relieves mechanical allodynia through the ubiquitination of TRPA1 channel in db/db mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1691 ~ 1704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Duan Shaoqi, Kondo Takashi, Miwa Hiroto, Yang Yanjing, Wang Shenglan, Kanda Hirosato, Kogure Yoko, Imamura Nobuko, Fujimura Tadahiro, Kono Tomoaki, Fukushima Masashi, Tozawa Katsuyuki, Tomita Toshihiko, Oshima Tadayuki, Fukui Hirokazu, Yamamoto Satoshi, Noguchi Koichi, Dai Yi	4. 巻 320
2. 論文標題 Eosinophil-associated microinflammation in the gastroduodenal tract contributes to gastric hypersensitivity in a rat model of early-life adversity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G206 ~ G216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00313.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 王 曉航, 神田 浩里, 坂口 太一, 野口 光一, 戴 毅
2. 発表標題 過酸化水素によるTRPA1チャネルの活性化はPCI後狭心症の発症に関与する(The activation of TRPA1 by cardiac hydrogen peroxide is involved in angina after PCI of a rodent model)(英語)
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 浩里, 野口 光一, 戴 毅
2. 発表標題 痛み研究に関する電気生理学的実験手技 Whole-mount DRG・TG標本を用いた疼痛へのアプローチ法
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirosato Kanda, Yoko Kogure, Satoshi Yamamoto, Koichi Noguchi, Yi Dai
2. 発表標題 Atractylodin possesses an anti-nociceptive effect through a long-lasting activation of TRPA1
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戴 毅
2. 発表標題 漢方薬の鎮痛作用とTRPチャネルの関与
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戴 毅、野口 光一
2. 発表標題 痛覚におけるワサビ受容体TRPA1の役割とその調節機構
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	神田 浩里  (Kanda Hirosato)  (80842088)	兵庫医科大学・薬学部・助教    (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------