

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600010

研究課題名（和文） 脊髄疼痛伝達機構におけるアンジオテンシンⅡの役割の解明

研究課題名（英文） The role of angiotensin Ⅱ in nociceptive transmission in the spinal cord.

研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI OSAMU)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50296018

研究成果の概要（和文）：本研究では脊髄疼痛伝達機構における angiotensin Ⅱ（Ang Ⅱ）の役割を解明することを目的に、Ang Ⅱをマウスの脊髄クモ膜下腔内へ投与し、行動及び分子薬理学的見地から検討を行った。その結果、Ang Ⅱ（3 pmol）により scratching、biting、lickingなどの疼痛関連行動が誘発された。Ang Ⅱタイプ2（AT<sub>2</sub>）受容体拮抗薬 PD123319はこのAng Ⅱ誘発性疼痛関連行動を抑制しなかったものの、AT<sub>1</sub>受容体拮抗薬 losartanは用量依存的な抑制効果を示した。次いで、Ang Ⅱ誘発性疼痛関連行動に対する各種 MAPKの関与を検討したところ、p38 MAPK阻害薬 SB203580は疼痛関連行動を有意に抑制した。また、脊髄背側部においてAng Ⅱはp38 MAPKのリン酸化を引き起こしたが、このリン酸化もまた losartanにより抑制された。以上より、Ang ⅡはAT<sub>1</sub>受容体を介し、p38 MAPKを活性化して疼痛関連行動を引き起こしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Though the spinal cord is an important area for the modulation of nociception, the role of spinal angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) in nociceptive transmission remains unclear. Therefore, in order to elucidate the role of Ang Ⅱ in nociceptive transmission in the spinal cord, we examined the effect of intrathecal (i.t.) administration of Ang Ⅱ into mice. I.t. administration of Ang Ⅱ produced a behavioral response consisting of scratching, biting and licking. The behavior induced by Ang Ⅱ was dose-dependently inhibited by intraperitoneal injection of morphine, suggesting that the behavioral response is related to nociception. The nociceptive behavior was also inhibited dose-dependently by i.t. co-administration of losartan, an Ang Ⅱ type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor antagonist, and SB203580, a p38 MAPK inhibitor. However, AT<sub>2</sub> receptor antagonist PD123319, the upstream inhibitor of ERK1/2 phosphorylation U0126, and the JNK inhibitor SP600125 had no effect on Ang Ⅱ-induced nociceptive behavior. Western blot analysis showed that the i.t. injection of Ang Ⅱ induced phosphorylation of p38 MAPK in the lumbar dorsal spinal cord, which was inhibited by losartan, without affecting ERK1/2 and JNK. Our data show that i.t. administration of Ang Ⅱ induces nociceptive behavior accompanied by the activation of p38 MAPK signaling mediated through AT<sub>1</sub> receptors. This observation indicates that Ang Ⅱ may act as a neurotransmitter and/or neuromodulator in the spinal transmission of nociceptive information.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：疼痛学

キーワード：アンジオテンシンⅡ・脊髄・疼痛関連行動

### 1. 研究開始当初の背景

(1) AngⅡは血圧上昇に加え、心血管系組織障害をもたらす生理活性ペプチドである。AngⅡ産生機構には古くから知られている循環系レニン-アンジオテンシン系 (RA 系) の他に、組織 RA 系がある。組織 RA 系は血管、腎や脳などの局所で産生されたアンジオテンシノーゲンが、局所で産生されたレニンにより AngⅠに変換され、次いで局所の ACE あるいはキマーゼによって生理活性を有する AngⅡを産生する。AngⅡが作用する受容体として AngⅡタイプ 1 (AT1) 受容体および AT2 受容体の他に AT3 や AT4 受容体が存在する。

(2) AngⅡはカルボキシペプチダーゼであるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 2 によって 8 位の Phe を遊離して AngⅡ (1-7) に代謝される。興味深いことに、AngⅡ (1-7) は単に AngⅡの不活性化代謝物ではなく、AngⅡの生理作用をモジュレートする。すなわち、AngⅡ (1-7) は G タンパク質共役型オーファン受容体の Mas に作用し、AngⅡの AT1 受容体を介する作用に拮抗する。なお、AngⅡ (1-7) は ACE によって AngⅡ (1-5) に代謝され不活性化される。

(3) AngⅡの疼痛伝達機構における役割についても若干ながら報告されている。すなわち、AngⅡの脳室内投与 [*Pharmacol. Biochem. Behav.*, **62**, 229-232 (1999)] あるいは中脳水道周囲灰白質への微量投与 [*Neuroscience*, **132**, 453-463 (2005)] により鎮痛作用が発現されることや、自然発症性高血圧ラットで認められる痛覚閾値の上昇が ACE 阻害薬や AT1 受容体拮抗薬で抑制される [*Life Sci.*, **56**, 1073-1078 (1995)] ことから AngⅡは疼痛伝達系において抑制的な役割を担っていると推察される。しかしながら、最近、AngⅡの尾側延髄腹外側野 (CVLM) への微量投与により AT1 受容体を介して痛覚過敏を誘発する [*Neuroscience*, **158**, 1301-1310 (2009)] ことが報告され、疼痛伝達機構において AngⅡは脳領域の違いによって相反する役割を担っている可能性が示唆される。一方、疼痛伝達・制御において重要な役割を担っている脊髄背側部にも AngⅡは高濃度に分布しているが、AngⅡの脊髄疼痛伝達機構における役割については全く解明されていないのが現状である。さらに、AngⅡは AT1 受容体を介してインスリン抵抗性を示すが、インスリン抵抗性改善薬として臨床で用いられているピオグルタゾンとペルオ

キシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  を活性化して神経因性疼痛を軽減する [*J. Pharmacol. Sci.*, **108**, 341-347 (2008)] ことが報告されており、このことを加味すると ACE 阻害薬や AT1 受容体拮抗薬が神経因性疼痛に対して有効な効果を示す可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

このような背景を基に、本研究では脊髄疼痛伝達機構における AngⅡの役割について行動、分子薬理学および免疫組織学的観点から解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 使用動物；実験には、体重 22-24g の ddY 系雄性マウスを用いた。

(2) 脊髄クモ膜下腔内 (i. t.) 投与；マウスへの i. t. 投与は Hylden と Wilcox の方法に準じて腰椎の 5 番と 6 番の間の髄腔内へ薬液を 5  $\mu$ L/mouse の割合で無麻酔下にて直接投与した。

(3) 行動観察；行動の測定項目は、両後肢による下腹部への引っ掻き (Scratching) 行動、両後肢や尾部への噛付き (Biting) 行動及び舐め (Licking) 行動を SBL 行動とし、SBL 行動の持続時間を薬液 i. t. 投与直後から 40 分間測定した。

(4) ウェスタンブロッティング；AngⅡ (3 pmol) i. t. 投与 15 分後にマウスを断頭にて屠殺後、摘出した脊髄から L4-L6 の背側部を切り出し、CellLytic MT Lysis Reagent 中で十分にホモジナイズした。遠心分離後、上清を取り出し、タンパク質量を一定にし、サンプルバッファーを加え、加熱処理後、サンプルとした。10%SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、1 次抗体と反応させた。タンパク質の発現レベルは ECL Plus Western blotting detection system により化学発光を増強することで解析した。

(5) 免疫染色；マウスに対して麻酔を施し、灌流脱血直後、4% paraformaldehyde (0.2% glutaraldehyde 含有) により組織固定を行った。脊髄切片はクリオスタットにより 20  $\mu$ m の凍結切片を作製した。二抗体法による免疫組織化学的染色は、須藤らの方法に準じ、一次抗体には AT1 receptor antibody、二次抗体には Anti-rabbit IgG-goat serum labeled with FITC を用い、得られたサン

ルは MapAnalyzer によって分析を行った。

#### 4. 研究成果

Ang II (3 pmol) を i. t. 投与することにより scratching, biting, licking (SBL) 行動が誘発され、これらの行動は投与後 25 分にはほぼ完全に消失した (図. 1)。

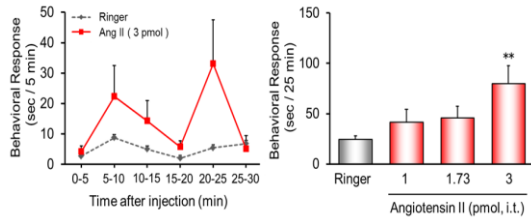


図. 1 Ang II 誘発性 SBL 行動

Ang II 誘発性 SBL 行動は、モルヒネ (0.3 mg/kg) 投与により抑制されたことから、Ang II 誘発性 SBL 行動は疼痛関連行動であることが証明された。AT2 受容体拮抗薬 PD123319 はこの Ang II 誘発性疼痛関連行動を抑制しなかったものの、AT1 受容体拮抗薬 losartan は用量依存的な抑制効果を示し、Ang II 誘発性疼痛関連行動における AT1 受容体の関与が示唆された。MapAnalyzer を用いてマウス脊髄 (L5) 領域における AT1 受容体の発現分布を免疫組織学的に解析したところ、灰白質における発現が認められ、特に疼痛伝達において重要な役割を担っている脊髄背側部 (laminae I 及び II) において比較的高発現していることが判明した (図. 1)。

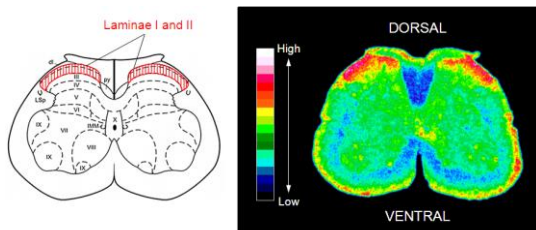


図. 2 マウス脊髄 (L5) 領域における AT1 受容体分布

Ang II は AT1 受容体を介して mitogen-activated protein kinase (MAPK) の強力なアクチベーターとして働くことが知られている (図. 3)。

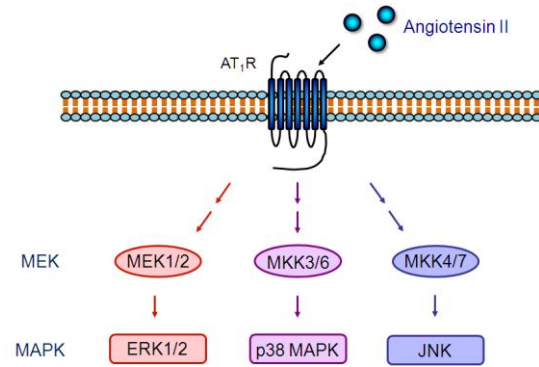


図. 3 AT1 受容体を介した MAPK シグナル伝達経路

この MAPK は MAPKkinase (MEK) により Thr-X-Tyr 配列の Tyr 及び Tyr 残基がリン酸化されることで活性化する。そこで、MAPK ファミリーを構成している extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase (JNK) 及び p38 MAPK の Ang II 誘発性疼痛関連行動に対する関与について各種阻害薬を用いて検討を行った。ERK1/2 の上流活性化因子である MEK1/2 の阻害薬 U0126 及び JNK の阻害薬 SP600125 は Ang II 誘発性疼痛関連行動に影響を与えなかったものの、p38 MAPK の阻害薬 SB203580 は用量依存的な抑制作用を示した (図. 4)。

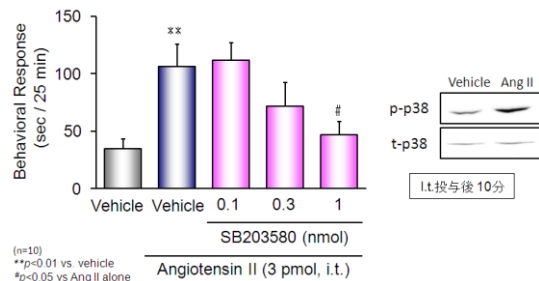


図. 4 Ang II 誘発性疼痛関連行動に対する p-38 MAPK の関与

また、Ang II i. t. 投与後の脊髄背側部における各種 MAPK のリン酸化をウエスタンブロット法により解析したところ、ERK1/2 及び JNK に関してはリン酸化が認められなかったが、p38 MAPK のリン酸化が有意に亢進していた。さらに、この p38 MAPK のリン酸化は PD123319 ではなく、losartan 併用により完全に抑制された。これらの結果より、Ang II は脊髄背側部の AT1 受容体を介し p38 MAPK を活性化して疼痛関連行動を引き起こすことが示唆された (図. 5)。

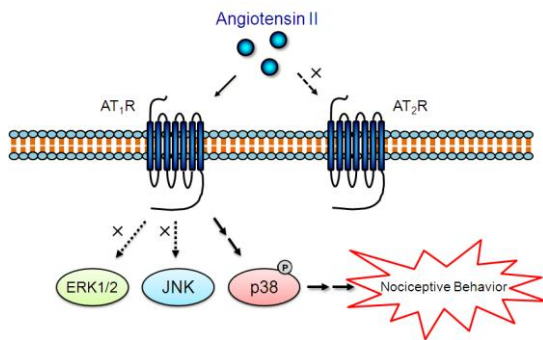


図. 5 Ang II 誘発性疼痛関連行動  
の作用機序

Ang II の脊髄疼痛伝達機構を世界で初めて明らかにしたことから、今後、ACE 阻害薬や AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬がどのような疼痛に対して効果を有するか解明していく予定である。

#### 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 4 件)

①Tan-No K, Sato T, Shimoda M, Nakagawasai O, Niijima F, Kawamura S, Furuta S, Sato T, Satoh S, Silberring J, Terenius L, Tadano T, Suppressive effects by cysteine protease inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice, *Neuropeptides*, 査読有, 44巻, 2010, 279-283  
DOI: 10.1016/j.npep.2010.02.001

②Onogi H, Nakagawasai O, Sato A, Mitazaki S, Nakaya K, Watanabe K, Niijima-Yaoita F, Tan-No K, Arai Y, Kikuchi T, Tadano T, p-Hydroxyamphetamine causes prepulse inhibition disruption in mice: contribution of serotonin neurotransmission, *Behav Brain Res*, 査読有, 224巻, 2011, 159-165  
DOI: 10.1016/j.bbr.2011.06.002

③Nakagawasai O, Taniguchi R, Tan-No K, Yamadera F, Nemoto W, Yaoita F, Tadano T, Pharmacological evaluation of catalepsy in low calcium and/or magnesium deficient feeding mice, *Health*, 査読有, 4巻, 2012, 1138-1144  
DOI: 10.4236/health.2012.431172

④Oba A, Nakagawasai O, Onogi H, Nemoto W, Yaoita F, Arai Y, Tan-No K, Tadano T, Chronic fluvoxamine treatment changes 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor-mediated behavior in olfactory bulbectomized mice, *Life Sci*, 査読有, 92巻, 2012, 119-124  
DOI: 10.1016/j.lfs.2012.11.005

[学会発表] (計 4 件)

①鈴木 義紀、丹野 孝一、中川西 修、新島 富紀枝、菅野 秀一、蓬田 伸、石川 正明、只野 武、アンジオテンシン II 脊髄クモ膜下腔内投与による ERK の活性化を介した疼痛関連行動、第 61 回日本薬理学会北部会、2010 年 9 月 10 日、札幌

②鈴木 義紀、丹野 孝一、中川西 修、新島 富紀枝、菅野 秀一、蓬田 伸、石川 正明、只野 武、アンジオテンシン II 脊髄クモ膜下腔内投与による疼痛関連行動、第 49 回日本薬学会東北支部大会、2010 年 10 月 24 日、郡山

③根本 互、中川西 修、八百板 富紀枝、菅野 秀一、蓬田 伸、石川 正明、只野 武、丹野 孝一、アンジオテンシン II 誘発性疼痛関連行動における p38 MAPK の関与、第 63 回日本薬理学会北部会、2012 年 9 月 14 日、新潟

④Nemoto W, Nakagawasai O, Yaoita F, Kanno S, Yomogida S, Ishikawa M, Tadano T, Tan-No K, Angiotensin II induces nociceptive behavior accompanied by p38 MAPK phosphorylation mediated through spinal AT<sub>1</sub> receptors, *International Symposium for Neurosciences 2013*, 2013 年 2 月 26 日、仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中川西 修 (NAKAGAWASAI OSAMU)  
東北薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：50296018

##### (2) 研究分担者

丹野 孝一 (TAN-NO KOICHI)  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：20207260