

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 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790818  
 研究課題名（和文）  
 有痛性糖尿病性神経障害発症における中枢神経系疼痛抑制経路の役割  
 研究課題名（英文）  
 The pathophysiological role of descending analgesia system in diabetic painful neuropathy  
 研究代表者  
 真田 充（SANADA MITSURU）  
 滋賀医科大学・医学部・客員講師  
 研究者番号：10418759

研究成果の概要（和文）：

本研究では有痛性糖尿病性神経障害の中枢神経系の新規発症機序の解明を目的とし、下行性疼痛抑制経路に位置している中脳水道周囲灰白質（periaqueductal grey; PAG）の役割について電気生理学的に検討した。その結果、PAG における G 蛋白連関型内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル電流の検出は可能であり、糖尿病ラットにおいて同電流が減弱する傾向を確認されたが、正常モデルラット間の差異を検出することは困難であった。ラット中脳スライス標本が不安定かつ限定していることが原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the pathophysiological role of descending analgesia system in diabetic painful neuropathy, we performed whole-cell patch clamp recordings from rat periaqueductal grey (PAG) neurons. Although the presence of the G protein-coupled, inwardly rectifying potassium current was detected in rat PAG neurons, there was no significant difference in current density between control and diabetic rats. This might be caused by the unstableness of the rat midbrain slice samples, and we need a further arrangement for the improvement of the electrophysiological recording system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：内科系臨床医学、神経内科学、臨床神経生理学

キーワード：糖尿病性神経障害、疼痛、内向き整流性 K<sup>+</sup>チャネル、中脳水道周囲灰白質

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性神経障害は糖尿病性細小血管症の中で早期に発症し、頻度も高く全糖尿病患者の約 4 割に認められている。その症状は多岐にわたるが、自発疼痛や知覚過敏といった

神経興奮性の亢進を示唆する症状に実地臨床の場で多く遭遇する。有痛性糖尿病神経障害と呼ばれるこれらの病態を説明するものとして、痛覚閾値の低下、刺激に対する活動電位発生の増加および自発興奮の亢進などが報告されているが、詳細は未だ明らかにさ

れていない。

有痛性糖尿病性神経障害は疼痛分類の中では神経因性疼痛と呼ばれる慢性痛に相当する。神経因性疼痛は、国際疼痛学会で「神経系の一次的障害か機能障害により起こる疼痛」と定義されており、その発生には末梢神経に起因するものと、脊髄や上位中枢など中枢神経の変化に起因するものがある。

末梢神経系の検討は、研究代表者を含め、一定の研究成果を認めているが、もう一方の成因である中枢神経系由来の検討は殆ど報告されていない。その中でも下行性疼痛抑制経路に位置し、オピオイド受容体およびアセチルコリン受容体が存在している中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal grey; PAG) は、痛覚の情報伝達に重要な役割を果たしており、糖尿病状態においてオピオイド受容体の機能低下が報告されていることから、PAG の機能異常が有痛性糖尿病性神経障害の一因となっている可能性が想定される。また最近、放射性同位元素を用いた脳血流代謝の検討で、糖尿病モデル動物の PAG ニューロンの機能が低下し、有痛性糖尿病性神経障害に関連すると考察され、我々の仮説を支持する報告を得ている。しかしながら、標本作成が難しくかつ限定されているため、生理学的検討は全く実施されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は有痛性糖尿病性神経障害発症における PAG の役割について明らかにすることを目的とし、糖尿病状態においてオピオイド受容体およびアセチルコリン受容体の機能異常が、実際に存在しているのかを検討する。

具体的には両受容体はその調節に関与している、G 蛋白連関型内向き整流性  $K^+$  電流について解析し、正常対照群との比較、およびオピオイド受容体・アセチルコリン受容体の病態関与への割合に検討する。

また血糖管理を中心とした糖尿病管理で PAG 機能異常が是正されるのか、および神経因性疼痛に奏功すると考えられている抗うつ薬・抗てんかん薬でこれら機能異常が是正されるのか、実地臨床にも即応用することが可能な治療薬の効果についても検討する。

## 3. 研究の方法

1. 8 週齢雄性 Sprague-Dawley ラットにストレプトゾシン (STZ; 50mg/kg) を静脈内注射し、糖尿病モデル動物を作成する。
2. STZ 投与 (糖尿病モデル) 2 週後ラット、および週齢を一致させた STZ 非投与 (正

常モデル) ラットを深麻酔下にて断頭、速やかに全脳検体を摘出し、持続的に 95%  $O_2$  5%  $CO_2$  ガスにてバブリングされた冷却人工脳脊髄液中に移動させる。

3. 脳検体を十分に冷却した後、シャーレの上に検体を載せブロックを作成する。
4. ブロックをマイクロスライサーに固定し、95%  $O_2$  5%  $CO_2$  ガスにてバブリングされた冷却人工脳脊髄液内で脳検体を薄切する。標本は 300 $\mu$ m 厚で水平面に薄切し、中脳レベルの標本を採取する。尚、薄切は実体顕微鏡下で行う。
5. 標本は人工脳脊髄液中に静置、実験使用時まで常時バブリング下としておく。
6. 標本をチャンバー内に留置、CCD カメラにて PAG ニューロンを確認する。
7. PAG ニューロンの細胞膜にガラス管微小ピペットを高抵抗で密着させ、その先端開口部の微小膜領域 (パッチ膜) を破って穴を開け、パッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を記録する (ホールセル・パッチクランプ法)。

検討項目は以下の通りである。

- I. 膜電位固定法にて  $K^+$  電流を測定し、PAG ニューロンにおける、内向き整流性  $K^+$  チャンネルの機能解析を行う。
- II. オピオイド受容体およびアセチルコリン受容体作動薬投与下での、内向き整流性  $K^+$  チャンネルの機能解析を行う。
- III. 上記 2 点を糖尿病および正常モデルラット由来の標本で施行、両群間の差異を詳細に検討する。

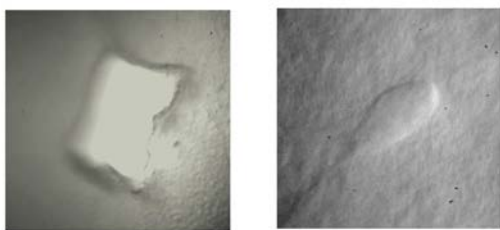
次いで、使用動物モデルにインスリン治療群を加え、血糖管理後の内向き整流性  $K^+$  チャンネルの機能解析を行う。また治療薬として Amitriptyline・Carbamazepine・Phenytoin・Gabapentin 投与下で機能異常は正の可能性について検討する。

## 4. 研究成果

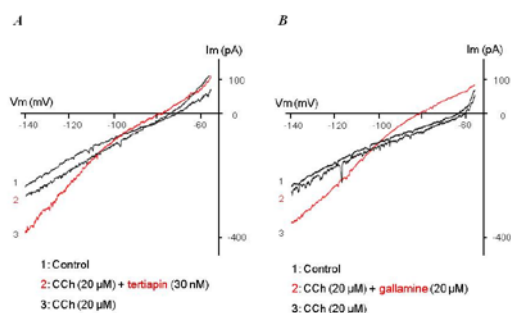
- ① 研究に先立ち、研究遂行技術の確認も含め、他検体であるが単離マウス心房細胞を用いた検討で、機能的  $K^+$  チャンネル  $I_{kr}$  電流の検出に初めて成功し、学術報告を行った (Nakamura H, et al. Eur J Pharmacol. 2010)。
- ② PAG (図 1) における検討では、アセチルコリン受容体を介した G 蛋白連関型内向き整流性  $K^+$  チャンネル電流の検出 (図 2) は可能であり、糖尿病ラットにおいて同電流が減弱する傾向を確認されたが、研究期間内に糖尿

病モデル及び正常モデルラット間の差異を確認することは困難であった。糖尿病モデル動物との差が不明瞭であったことから、インスリン治療後の内向き整流性  $K^+$  チャンネルの機能解析及び治療薬投与後の機能解析は実施不可であった。

今回の結果に至った理由として、ラット中脳スライス標本の作製が困難でありかつ電気生理学的検討も技術的に難しく、現時点での解析可能な実験結果が限定されているためと考えている。



(図1) ラット中脳水道スライス標本及び PAG ニューロンの外観



(図2)ラット PAG ニューロンにおけるアセチルコリン  $M_2$  受容体を介した G 蛋白連関型内向き整流性  $K^+$  (GIRK) チャンネル電流の検出 A: GIRK チャンネル blocker である tertiapin による内向き整流性  $K^+$  電流抑制効果 B: アセチルコリン  $M_2$  受容体 blocker である gallamine による内向き整流性  $K^+$  電流抑制効果

③ 現在、疾患モデル動物間のみでの検討は困難であると考え、糖尿病性神経障害の成因に関与しているサイトカインの一種である  $TNF-\alpha$  と  $K^+$  チャンネル電流間の検討を考慮しており、現時点で末梢神経系の一次求心性線維の細胞体が存在する脊髄後根神経節神経細胞における  $TNF-\alpha$  の  $K^+$  チャンネルに及ぼす影響を確認している。今後実験材料を PAG に代えて検討する予定である。尚、本研究実施期間中に  $TNF-\alpha$  の不活性化が疼痛を含めた糖尿病性神経障害の治療において重要であるとする学術報告を行っている (Yamakawa I, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H. Inactivation of  $TNF-\alpha$  ameliorates diabetic neuropathy in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011; 301: E844-52. (査読有)
- ② Sanada M, Yasuda H. Epidemiology of diabetic neuropathy. Nihon Rinsho. 2010; 68 Suppl 9: 538-41. (査読無)
- ③ Nakamura H, Ding WG, Sanada M, Maeda K, Kawai H, Maegawa H, Matsuura H. Presence and functional role of the rapidly activating delayed rectifier  $K(+)$  current in left and right atria of adult mice. Eur J Pharmacol. 2010; 649: 14-22. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山川勇、小島秀人、寺島智也、大井二郎、浦部博志、真田充、川合寛道、木村博、安田齋: 糖尿病性末梢神経障害における  $TNF\alpha$  の関与と治療標的としての有用性 第 51 回日本神経学会総会. (2010.5.21). 東京
- ② 真田充、片山由理、寺島智也、川合寛道、安田齋: 高齢者糖尿病症例における膀胱機能障害: 糖尿病性神経障害との関連から 第 51 回日本神経学会総会. (2010.5.21). 東京
- ③ 寺島智也、Kazuhiro Oka, Angelika Kritz、小島秀人、山川勇、川合寛道、真田充、片山由理、Andrew Baker、Lawrence Chan DRG-targeted helper-dependent adenovirus vector による感覚神経選択的遺伝子治療 第 51 回日本神経学会総会. (2010.5.21). 東京
- ④ 山川勇、小島秀人、寺島智也、大井二郎、浦部博志、真田充、川合寛道、木村博、安田齋、前川聡: 糖尿病性末梢神経障害における  $TNF\alpha$  の関与と治療標的としての有用性 第 25 回糖尿病合併症学会. (2010.10.23). 大津

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○ 出願状況（計 0 件）

○ 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

真田 充 (SANADA MITSURU)  
滋賀医科大学・医学部・客員講師  
研究者番号：10418759