

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460101

研究課題名(和文)慢性疼痛における脊髄アンジオテンシン系の役割の解明：新規治療法の開発を目指して

研究課題名(英文)Elucidation of the role of spinal angiotensin system in chronic pain: Aim at developing the new therapy

研究代表者

丹野 孝一 (TAN-NO, Koichi)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20207260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトゾトシン誘発性1型糖尿病モデルマウス(STZマウス)では血糖値の上昇に伴い疼痛閾値の低下が認められた。STZ投与後14日目における疼痛閾値の低下はAT1受容体拮抗薬のロサルタンによって抑制された。STZマウスの脊髄後角においてアンジオテンシン(Ang)およびAng変換酵素(ACE)の発現量は上昇していた。さらに、ACEはグリア細胞ではなく、神経細胞特異的に発現していることが確認された。以上の結果より、STZマウスでは脊髄後角の神経細胞におけるACEの発現量増加に起因し産生量が増加したAngがAT1受容体に作用し、糖尿病性神経障害性疼痛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)：Tactile allodynia was observed concurrently with an increase in blood glucose levels the day after mice received streptozotocin (STZ) injection. Tactile allodynia on day 14 was dose-dependently inhibited by intrathecal administration of losartan, an AT1 receptor antagonist. In the lumbar dorsal spinal cord, the expression of angiotensin (Ang) II, Ang converting enzyme (ACE) and phospho-p38 MAPK were all significantly increased on day 14 after STZ injection compared with vehicle-treated controls, whereas no differences were observed among AT1 receptors or angiotensinogen levels. Moreover, the increase in phospho-p38 MAPK was significantly inhibited by intrathecal administration of losartan. These results indicate that the expression of spinal ACE increased in STZ-induced diabetic mice, which in turn led to an increase in Ang II levels and tactile allodynia. This increase in spinal Ang II was accompanied by the phosphorylation of p38 MAPK, which was shown to be mediated by AT1 receptors.

研究分野：神経薬理学

キーワード：慢性疼痛 1型糖尿病 糖尿病性神経障害性疼痛 アンジオテンシン アンジオテンシン変換酵素  
AT1受容体 ロサルタン p38 MAPK

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における慢性疼痛保有患者数は全人口の約 20%と報告されており、これらの患者の中で治療に満足している者は僅か 25%に過ぎないのが現状である。慢性疼痛保有患者の quality of life (QOL) 向上を目指す上でも、「痛みとその治療」に関する研究は社会的にも最重要課題の一つになっている。このような状況下、世界中の多くの研究者達が未だ原因が明らかにされていない慢性疼痛の発症機構の解明とその治療法の確立のため精力的に研究に取り組んでいる。

### (1) アンジオテンシン (Ang) と痛み

脊髄後根神経節 (DRG) にアンジオテンシノーゲン、Ang 変換酵素 (ACE)、Ang タイプ (AT)<sub>1A</sub> および AT<sub>2</sub> 受容体の mRNA が発現しており、いくつかの DRG ニューロンで Ang はサブスタンス P や CGRP などの痛みの伝達物質と共存している [Regulatory Peptides, 162, 90-98 (2010)]。また、我々は平成 22 年度基盤研究 (C) の助成を受け、Ang は脊髄の AT<sub>1</sub> 受容体の活性化とそれに伴う p38 MAPK のリン酸化を介して疼痛関連行動を引き起こすことを明らかにしている [Mol. Pain, 9, 38 (2013)]。これらのことから、脊髄疼痛伝達機構において Ang は促進的な役割を担っていることが示唆される。一方、Ang は AT<sub>1</sub> 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はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体を活性化して神経障害性疼痛を軽減する [J. Pharmacol. Sci., 108, 341-347 (2008)]。また、2 型糖尿病モデルマウスにおいても、臨床でみられる神経障害性疼痛が観察されるが、この疼痛は JAK2/STAT3 系の活性化に伴うインスリンシグナリングの低下に起因することが明らかにされている [Pain Physician, 16, E71-E83 (2013)]。これらのことから、糖尿病性神経障害に伴う疼痛など神経障害性疼痛の治療を考える上で、Ang 系が有用な標的になり得る可能性が推察される。

### (2) 糖尿病の合併症における Ang の関与

糖尿病性神経障害は 1 型糖尿病患者の 60% 以上に認められる合併症で、その多くの場合、神経障害性疼痛を伴い、これが患者の QOL 低下を招く一因となっている。糖尿病のような高血糖状態では、Ang 系が活性化しており、糖尿病性腎症および網膜症などの合併症の原因となっている。しかしながら、糖尿病誘発性神経障害性疼痛における Ang 系の関与については未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究室ではこれまでに Ang が脊髄において痛みの伝達物質あるいは調節因子として機能している可能性を示唆している [Mol. Pain, 9, 38 (2013); Neurosci. Lett., 585, 17-22 (2015); Neuropharmacology, 99, 221-231 (2015)]。本研究では糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄内 Ang 系の関与の可能性を明らかにするため、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発性 1 型糖尿病モデルマウスを用い、Ang 系と、その細胞内情報伝達に關与する p38 MAPK シグナル経路から検討を行なった。

## 3. 研究の方法

実験には、ddY 系雄性マウス (体重 26-30g) を用いた。1 型糖尿病モデルマウスは、STZ (200 mg/kg) を尾静脈投与にて作製し、von Frey filament 法により疼痛閾値を測定した。脊髄内 Ang 系関連遺伝子の発現量は、リアルタイム RT-PCR 法により解析した。さらに、脊髄内 Ang 系関連タンパク質の発現分布は、灌流固定後マウスの脊髄標本を作製し、MapAnalyzer および共焦点顕微鏡を用いて解析した。

## 4. 研究成果

糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄内 Ang 系の関与の可能性を明らかにするため、STZ 誘発性 1 型糖尿病モデルマウス (STZ マウス) を用いて検討を行った。その結果、STZ マウスでは血糖値の上昇と平行に、対照群と比較して疼痛閾値の低下、すなわちアロディニアが認められた。最も顕著な疼痛閾値

の低下が認められた STZ 投与後 14 日目において、Ang タイプ 2 (AT<sub>2</sub>) 受容体拮抗薬である PD123319 (30 nmol) の脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) 投与は抗アロディニア作用を示さなかったものの、AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬のロサルタン (10-30 nmol) の i.t. 投与は対照群に影響を与えない用量で抗アロディニア作用を示した。STZ マウスの脊髄背側部における Ang 系関連遺伝子の発現量を解析したところ、アンジオテンシノーゲン (AGT)、ACE および AT<sub>1A</sub> 受容体の mRNA 量が有意に増加していた。次いで、STZ マウスの脊髄後角における AT<sub>1</sub> 受容体、AGT、ACE、Ang およびリン酸化 p38 MAPK の発現分布を画像解析したところ、AT<sub>1</sub> 受容体および AGT の発現量に変化は認められなかったが、ACE、Ang およびリン酸化 p38 MAPK の発現量は対照群と比較して STZ マウスにおいて有意に上昇していた。さらに、ACE の発現分布を共焦点顕微鏡により解析したところ、ACE はグリア細胞ではなく、神経細胞特異的に発現していることが確認された。以上の結果より、STZ マウスでは脊髄後角の神経細胞における ACE の発現量増加に起因し Ang の産生が促進されていることを明らかにした。さらに、脊髄後角において産生量が増加した Ang が AT<sub>2</sub> 受容体ではなく AT<sub>1</sub> 受容体に作用し、p38 MAPK をリン酸化することで、アロディニア (神経障害性疼痛) を引き起こしていることが示唆された [*Mol. Pharmacol.*, 90, 205-213 (2016)]。

#### 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 5 件)

Nemoto W, Yamagata R, Ogata Y, Nakagawasai O, Tadano T, Tan-No K. Inhibitory effect of angiotensin (1-7) on angiotensin -induced nociceptive behaviour in mice. *Neuropeptides*, 査読有、印刷中  
DOI: 10.1016/j.npep.2017.05.002.  
Ogata Y, Nemoto W, Nakagawasai O, Yamagata R, Tadano T, Tan-No K.

Involvement of spinal angiotensin system in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in mice. *Mol. Pharmacol.*, 査読有、90 巻、2016、205-213  
DOI: 10.1124/mol.116.104133.

Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tadano T, Tan-No K. Involvement of p38 MAPK activation mediated through AT1 receptors on spinal astrocytes and neurons in angiotensin - and - induced nociceptive behavior in mice. *Neuropharmacology*, 査読有、99 巻、2015、221-231

DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.07.022.

Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tanado T, Tan-No K. The intrathecal administration of losartan, an AT1 receptor antagonist, produces an antinociceptive effect through the inhibition of p38 MAPK phosphorylation in the mouse formalin test. *Neurosci. Lett.*, 査読有、585 巻、2015、17-22

DOI: 10.1016/j.neulet.2014.11.018.

Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tadano T, Tan-No K. Angiotensin (1-7) prevents angiotensin -induced nociceptive behaviour via inhibition of p38 MAPK phosphorylation mediated through spinal Mas receptors in mice. *Eur. J. Pain*, 査読有、18 巻、2014、1471-1479

DOI: 10.1002/ejp.512.

[学会発表](計 19 件)

小瀧佳輝、根本互、中川西修、丹野孝一  
アンジオテンシン (1-7) は糖尿病性神経障害性疼痛を抑制する  
第 90 回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市) 2017 年 3 月 15-17 日  
山縣涼太、根本互、小瀧佳輝、中川西修、八百板富紀枝、丹野孝一  
1 型糖尿病モデルマウスの機械的アロディニアにおける脊髄内アンジオテンシン系の関与

生体機能と創薬シンポジウム 2016、東北大学川内キャンパス(宮城県・仙台市) 2016年8月25-26日

小瀧佳輝、根本互、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

有痛性糖尿病性ニューロパチーにおける脊髄アンジオテンシン系の関与

第66回日本薬理学会北部会、富山国際会議場(富山県・富山市) 2015年9月18日

小瀧佳輝、根本互、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

有痛性糖尿病性神経障害における脊髄アンジオテンシン の関与

生体機能と創薬シンポジウム 2015、日本大学薬学部(千葉県・船橋市) 2015年8月27-28日

根本互、小瀧佳輝、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

1型糖尿病モデルマウスの神経障害性疼痛に対する脊髄アンジオテンシン系の関与

日本薬学会第135年会、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)

2015年3月25-28日

小瀧佳輝、根本互、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

ストレプトゾトシン誘発糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄アンジオテンシン系の関与

第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015年3月18-20日

小瀧佳輝、根本互、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

糖尿病誘発性アロディニアに対する脊髄アンジオテンシン系の関与

第24回神経行動薬理若手研究者の集い、名城大学名駅サテライト(愛知県・名古屋市) 2015年3月17日

小瀧佳輝、根本互、中川西修、八百板富紀枝、只野武、丹野孝一

糖尿病性神経障害性疼痛における脊髄アンジオテンシン の関与

第65回日本薬理学会北部会、コラッセふくしま(福島県・福島市) 2014年9月26-27日

Nemoto W, Nakagawasai O, Yaoita F, Tan-No K.

Role of the spinal angiotensin system in nociceptive transmission

生体機能と創薬シンポジウム 2014、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)

2014年8月28-29日

Nakagawasai O, Nemoto W, Ogata Y, Yaoita F, Tadano T, Tan-No K.

Angiotensin type 1 receptor-mediated increase in spinal p38 MAPK phosphorylation leads to the induction of nociceptive behavior in mice

International Narcotics Research Conference 2014, Montreal (Canada), 2014年7月13-18日

Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tadano T, Tan-No K.

Antagonistic effect of angiotensin (1-7) on angiotensin -induced nociceptive behavior in mice

International Narcotics Research Conference 2014, Montreal (Canada), 2014年7月13-18日

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹野 孝一 (TAN-NO, Koichi)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20207260

### (2) 研究分担者

中川西 修 (NAKAGAWASAI, Osamu)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50296018

根本 互 (NEMOTO, Wataru)

東北医科薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：80635136