

Chronopharmacological study for neuropathic pain hypersensitivity in type I and type II diabetic mice

赤嶺, 孝祐

<https://hdl.handle.net/2324/1806960>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

Chronopharmacological study for neuropathic pain hypersensitivity in type I and type II diabetic mice

型および 型糖尿病モデルマウスを対象にした末梢神経障害痛に対する時間薬理学的研究

薬剤学分野 3PS13024P 赤嶺 孝祐

【背景・目的】

我が国における糖尿病患者数は年々増加しており、2014年の厚生労働省による調査ではその患者数は300万人以上と推計されている。糖尿病患者にとって最も深刻な問題となるのは末梢神経障害、腎症、網膜症を代表とする合併症である（三大合併症）。これらの合併症は患者のQOLを著しく低下させるため、糖尿病の治療は血糖値のコントロールとともに、これら合併症を予防および改善することが目的となる。糖尿病性末梢神経障害は三大合併症の中で最も早期に発症し、軽い触刺激を激しい痛みとして感知するアロディニア（症状）を特徴とする。糖尿病性末梢神経障害痛の治療は主に薬物療法であり、現在のところ Pregabalin が頻用されているが、有効性を示さない症例も多く、より効果的な治療方法の構築が求められている。

一方、薬物の効果や副作用は投与時刻の違いによって変化することが知られている。これは、薬物輸送に関わるトランスポーターや代謝酵素、薬物の標的分子の発現が日周リズムを示すためである。また、薬物の効果や体内動態のみならず、疾患の重症度や発症頻度にも日周リズムが認められる。これらの日周リズムを考慮して投薬スケジュールを設定することで、薬効を最大限に、副作用を最小限にすることを指向した薬物療法を「時間薬物療法」という。

糖尿病性末梢神経障害の主な原因は神経細胞内でのポリオール経路亢進による Sorbitol の蓄積である。末梢神経細胞内の Sorbitol の蓄積により Na^+/K^+ -ATPase 活性の低下が引き起こされ、神経の伝達に異常をきたすとされているが、その原因については未解明な部分が多い。また、ヒトにおける糖尿病性末梢神経障害痛が夜間に悪化することが報告されているが、その詳細な機序も明らかになっていない。糖尿病は Insulin の分泌の有無などの病型により 型と 型に大別される。末梢神経障害痛はいずれの糖尿病患者においても認められるが、時間生物学的な観点からそれぞれの特徴を比較した検討は行われていない。

本研究では、糖尿病性末梢神経障害痛に対する時間薬物療法の構築を目指し、 型および 型糖尿病モデルマウスを用いて、末梢神経障害痛に対する Pregabalin の鎮痛効果の投与時刻依存的な差異および末梢神経障害痛の重症度の日内変動を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】

糖尿病モデルマウスの作製と処置

型糖尿病モデルは ICR 雄性マウスに膵臓の細胞を選択的に破壊する Streptozotocin (STZ) を単回腹腔内投与 (200 mg/kg) することで作製した。また、 型糖尿病モデルには過食による肥満から糖尿病様症状を呈する BKS.Cg- $+Lepr^{db}/+Lepr^{db}$ /Jcl (db/db) マウスを用いた。これらマウ

スは明暗周期(明期: ZT0 - ZT12) 自由摂食摂水の条件下で飼育した。マウスに対する Pregabalin の投与は単回経口投与(50 mg/kg)にて行った。また、Epalrestat の投与は3週間連日で皮下投与(50 mg/kg/day)にて行った。

疼痛閾値の測定

Von frey filament を用いてマウスの後肢に触刺激を与え、素早く退けるまたは舐めるといった痛み行動の有無を確認した。それらの結果から up-down 法により疼痛閾値(PWT)を算出した。

血清および細胞中 Pregabalin 濃度の測定

血清および細胞中 Pregabalin 濃度は o-phthalaldehyde で蛍光標識した後、HPLC を用い内部標準法によって測定した。

Organic cation transporter novel-1 (Octn1) タンパク質発現量の測定

Octn1 タンパク質発現量はウェスタンブロット法を用いて測定した。

マウス小腸切片への Pregabalin 取込み量の測定

摘出した小腸切片内部を 0.5 mM Pregabalin 溶液で満たし、Octn1 選択的な阻害剤である Ergothioneine (ERGO) 存在下または非存在下でインキュベート(37℃, 30min)した。小腸切片をホモジナイズし、Pregabalin 濃度を HPLC を用い測定した。

末梢神経細胞内 Sorbitol 蓄積量の測定

摘出した坐骨神経をホモジナイズし、フィルターを用いて除タンパクを行った。このサンプル中に Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)および Sorbitol と特異的に反応する Sorbitol dehydrogenase を加え、産生する NADH の蛍光(Ex: 340 nm, Em: 460nm)強度を定量することで Sorbitol を定量した。

末梢神経細胞内 Na⁺/K⁺-ATPase 活性の測定

摘出した坐骨神経をバッファー(200 mM Sucrose, 20 mM Tris-HCl, 2 mM Disodium EDTA; pH 7.5)中でホモジナイズした。この試料をインキュベートバッファー(130 mM NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 30 mM Histidine, 3 mM ATP)に加え、Na⁺/K⁺-ATPase 特異的阻害剤である 1mM Ouabain 存在下または非存在下でインキュベート(37℃, 30 min)した。Fiske-subbarow 法により Ouabain 感受性の無機リン酸を測定することで Na⁺/K⁺-ATPase 活性を評価した。

統計解析

独立した2群間の比較には Student's t-test、多群間の比較には Analysis of variance (ANOVA)および Fisher's least significant difference test (Fisher-LSD) を用い、有意水準は5%とした。

【結果・考察】

型および 型糖尿病モデルマウスに対する Pregabalin の鎮痛効果に及ぼす投与時刻の影響

型糖尿病モデルマウスに対して Pregabalin (50 mg/kg)を STZ 投与後 21 日目の明期前半(ZT2)または暗期前半(ZT14)のいずれかに単回経口投与した。その結果、Pregabalin の鎮痛効果は明期前半投与時と比較して暗期前半投与時において有意に増強した(P<0.01)。また、経口投与後の血清中濃度も暗期前半投与時に有意に高値を示し、鎮痛効果との関連性が認められた(Fig. 1)。マウス小腸上

皮細胞を用いて Pregabalin の吸収に
関与するトランスポーターを検討し
たところ、SLC トランスポーターの
ひとつである Octn1 が同定された。
また、正常マウスおよび 型糖尿病
モデルマウスの小腸における Octn1
タンパク質の発現には日周リズムが
認められ、そのリズムによって
Pregabalin の消化管吸収が時刻依
存的に変化することが示唆された
(Fig. 2)。また、 型糖尿病モデル
マウスにおいても Pregabalin を暗期
前半に投与することで有意な鎮痛効果の増強が認められた。

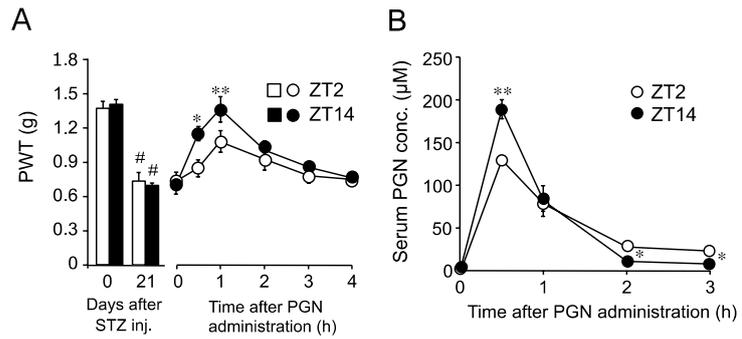


Fig. 1 Pregabalin の鎮痛効果および血清中濃度に及ぼす投与時刻の影響

(A) STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウスに Pregabalin (50 mg/kg) を ZT2 または ZT14 に経口投与し、疼痛閾値を経時的に測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=12-13)。#P<0.05; STZ 投与前との比較。**P<0.01, *P<0.05; ZT2 投与群との比較 (Fisher-LSD)。 (B) STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウスに Pregabalin (50 mg/kg) を ZT2 または ZT14 に経口投与し、血清中 Pregabalin 濃度を経時的に測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=5)。**P<0.01, *P<0.05; ZT2 投与群との比較 (Fisher-LSD)。

型糖尿病モデルマウスにおいても小腸 Octn1 タンパク質の発現にも 型糖尿病モデルマウスと同様の日周リズムが認められ、暗期前半に経口投与した Pregabalin の吸収能が亢進することが示唆された。以上の結果から、プレガバリンは至適投与スケジュールを設定することで、より効果的な疼痛緩和が期待できると考えられた。

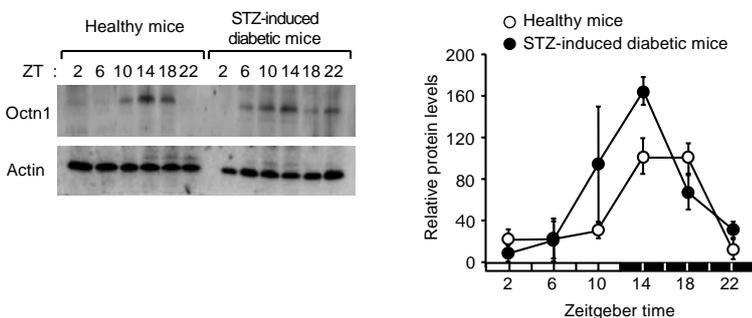


Fig. 2 型糖尿病モデルマウス小腸における Octn1 タンパク質発現量の日周リズム

STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウス小腸における Octn1 タンパク質発現量をウェスタンブロット法により測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=3)。正常マウスおよび 型糖尿病モデルマウス小腸における Octn1 タンパク質発現量には有意な日周リズムが認められた (正常マウス: P<0.05、 型糖尿病モデルマウス: P<0.01; ANOVA)。

型および 型糖尿病モデルマウスにおける末梢神経障害痛の概日的特徴の比較

型糖尿病モデルマウスにおいて末梢神経障害痛は明期後半から暗期前半にかけて有意に重症化する日周リズムが認められた (P<0.05)。一方、 型糖尿病モデルマウスにおいてはその重症度に日内変動は認められなかった (Fig. 3)。両モデルマウスにアルドース還元酵素阻害薬である Epalrestat を連日皮下投与したところ、いずれのモデルにおいても疼痛の発症は抑制された。このことから、これら

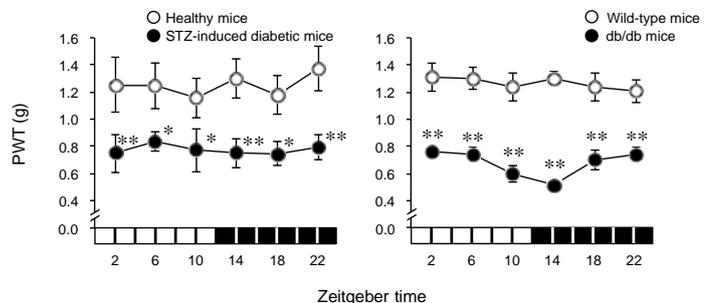


Fig. 3 糖尿病モデルマウスにおける疼痛閾値の日周リズム

STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウス (左) および 10 週齢の 型糖尿病モデルマウス (右) の疼痛閾値を 6 時点で測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=3-4)。**P<0.01, *P<0.05; 正常マウスまたは野生型マウスとの比較 (Fisher-LSD)。 型糖尿病モデルマウス (右) における疼痛閾値には日周リズムが認められた (P<0.05; ANOVA)。

のモデルマウスにおいても疼痛の発症に末梢神経細胞内への Sorbitol の蓄積が関与していることが示唆された。 型糖尿病モデルマウスにおける末梢神経細胞への Sorbitol の蓄積量は明期前半と比較して、暗期前半において有意に高値を示した (Fig. 4)。また、 Na^+/K^+ -ATPase 活性も明期前半と比較して暗期前半において有意に低下した (Fig. 5)。一方、 型糖尿病モデルマウスにおいては末梢神経細胞内での Sorbitol 蓄積量および Na^+/K^+ -ATPase 活性に時刻間における有意な変動は認められなかった。以上の結果から糖尿病はその発症原因の違いによって末梢神経障害痛の日周リズムの有無が異なるため、疼痛緩和のためにはこれらの違いを考慮した治療計画が必要であると考えられた。

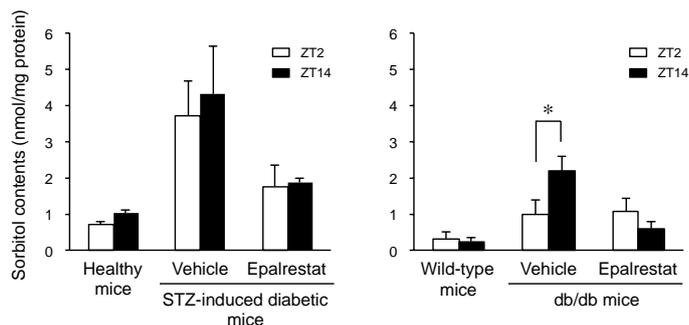


Fig. 4 糖尿病モデルマウスにおける末梢神経細胞内 Sorbitol 蓄積量

STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウス (左) および 10 週齢の 型糖尿病モデルマウス (右) の末梢神経細胞内 Sorbitol 蓄積量を測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=3-4)。* $P < 0.05$; 時刻間の比較 (Fisher-LSD)。

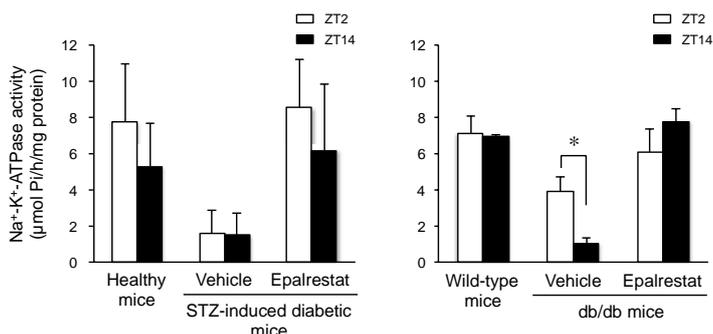


Fig. 5 糖尿病モデルマウスにおける末梢神経細胞内 Na^+/K^+ -ATPase 活性

STZ 投与後 21 日目の 型糖尿病モデルマウス (左) および 10 週齢の 型糖尿病モデルマウス (右) の末梢神経細胞における Na^+/K^+ -ATPase 活性を測定した。値は平均値 ± 標準偏差を示す (N=3-4)。* $P < 0.05$; 時刻間の比較 (Fisher-LSD)。

【総論】

本研究により、 型および 型糖尿病モデルマウスにおいて末梢神経障害痛に対する Pregabalin の鎮痛効果には、消化管からの吸収過程における日周リズムが原因となって投与時刻依存的な差異が生じることが明らかとなり、適切な投与スケジュールを設定することで、より効果的な疼痛緩和が期待できることが示された。一方、糖尿病はその発症原因の違いによって疼痛閾値の日周リズムの有無が異なることが明らかになった。現在、血糖値のコントロールに関しては糖尿病の各病因を考慮してそれぞれに適した治療法が行われているが、本疾患における末梢神経障害痛に対する時間薬物療法も、糖尿病の発症原因の違いを考慮して最適化する必要があると考えられた。

【発表論文】

Akamine T, Koyanagi S, Kusunose N, Hashimoto H, Taniguchi M, Matsunaga N, and Ohdo S. Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabarin on diabetic neuropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 354: 65-72, 2015.