

氏 名 早 瀬 史 子  
学 位 の 種 類 博 士 ( 医 学 )  
学 位 記 番 号 博 士 第 5 5 4 号  
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当  
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 9 月 1 2 日  
学 位 論 文 題 目 Inhibitory action of protein kinase C inhibitor on  
tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in small dorsal root ganglion  
neurons in diabetic rats  
( プロテインキナーゼC 阻害剤による糖尿病ラット小径脊髄後根神経節  
神経細胞に発現するテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流の抑制用 )

審 査 委 員 主 査 教 授 遠 山 育 夫  
副 査 教 授 木 村 宏  
副 査 教 授 山 路 昭

## 論文内容要旨

*整理番号	559	(ふりがな) 氏名	はやせ ふみこ 早瀬 史子
学位論文題目	Inhibitory action of protein kinase C $\beta$ inhibitor on tetrodotoxin-resistant $\text{Na}^+$ current in small dorsal root ganglion neurons in diabetic rats (プロテインキナーゼCB阻害剤による糖尿病ラット小径脊髄後根神経節神経細胞に発現するテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流の抑制作用)		
<p><b>【目的】</b>          我々はこれまで、ストレプトゾシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットを用いて有痛性神経障害の発症機序について検討してきた。その結果 STZ 投与後、4 から 12 週間の期間において、糖尿病モデル群では対照群に比し痛覚閾値が低下していることを明らかにした。また STZ 誘発糖尿病モデルラットの 小径脊髄後根神経節神経細胞 (DRG) に全細胞型パッチクランプ法を適応した実験において、痛覚の伝達に密接に関与しているテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流 (TTX-R <math>I_{\text{Na}}</math>) の振幅が増大し、より過分極電位から活性化されることを示し、このことは末梢における痛覚閾値の低下の一つの機序であると考えられた。さらに糖尿病性神経障害の治験薬として臨床治験中である LY333531 (プロテインキナーゼC (PKC) <math>\beta</math> 選択的阻害剤) をラットに経口投与したところ、痛覚閾値の低下が改善することも明らかにした。そこで今回 LY333531 による糖尿病性有痛性神経障害の改善の機序を明らかにする目的で、小径 DRG の TTX-R <math>I_{\text{Na}}</math> への作用につき、全細胞型パッチクランプ法による検討を行った。</p> <p><b>【方法】</b>          8 週齢の雄性 SD ラットに STZ (50mg/kg) を尾静脈から静注し 4 から 10 週間飼育し、静注後 1 週間後と DRG 採取時に血糖値を測定し随時血糖値 360mg/dl 以上を示すものを糖尿病モデルラットとして用いた。ラットより DRG を取り出し、酵素的に処理することにより単一ニューロンを単離し、初代培養を行った。2 から 7 時間後に全細胞型パッチクランプ法を用いて DRG の TTX-R <math>I_{\text{Na}}</math> を測定した。その際マイクロメーターによる細胞直径の計測を行い、痛覚の伝達に関与する小径ニューロン (直径 25 <math>\mu\text{m}</math> 以下) のみを検討の対象とした。週齢を等しくした対照群及び糖尿病群にて TTX-R <math>I_{\text{Na}}</math> の各テスト電位における電流量を測定し、細胞表面積に比例する膜容量で除して電流密度 (pA/pF) として評価した。また TTX-R <math>I_{\text{Na}}</math> の活性化の膜電位依存性についても解析を行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等で印字すること。  
 2. ※印の欄には記入しないこと。

さらに LY333531 (1-1000nmol/L) を細胞外液から灌流し、対照群、糖尿病群における TTX-R  $I_{Na}$  への効果を検討した。また、この効果が PKC 抑制を介したチャネルへの修飾によるものであるか否かを検討するために、PKC 活性化剤として用いられている phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を細胞外液から灌流してその効果を調べた。

#### 【結果】

対照群に比し糖尿病群にて TTX-R  $I_{Na}$  の振幅の有意な増大が認められた。また TTX-R  $I_{Na}$  の活性化は糖尿病群にて有意に過分極電位より認められた。次に LY333531 を各群に投与したところ、両群にて濃度依存性に TTX-R  $I_{Na}$  の抑制を認めたが、1, 10, 100nmol/L の各濃度にて糖尿病群でより強い抑制が認められた。さらに対照群の細胞を用いて PMA (100nmol/L) の細胞外液からの灌流による検討を行ったが、TTX-R  $I_{Na}$  の電流密度の増大傾向を認めた。このことより、PKC を介する経路によって TTX-R  $I_{Na}$  が抑制される可能性が示唆された。

#### 【考察】

本研究により、糖尿病状態において TTX-R  $I_{Na}$  が増大し、糖尿病性神経障害治療薬である LY333531 によってその増大した電流値が抑制されることが示された。糖尿病群にて有意に電流密度の増大が認められること及びチャネルの活性化がより過分極電位より起こることは、神経細胞が刺激によって興奮しやすい状態にあると考えられる。本研究に用いた糖尿病モデルラットは STZ 投与後 4 から 10 週間であり、我々及び他グループの研究により、痛覚過敏を示す時期であると報告されている。この糖尿病性有痛性神経障害の発症機序の一つとして、神経細胞の活動電位の発生及び伝導に重要な役割を果たす TTX-R  $I_{Na}$  の機能亢進の関与が示唆されている。この糖尿病状態における TTX-R  $I_{Na}$  の機能亢進が有痛性神経障害の一機序であり、糖尿病性有痛性神経障害の治療薬である LY333531 が TTX-R  $I_{Na}$  を抑制し、疼痛緩和に関与すると考え、その検討を行った。その結果、本研究では LY333531 により対照群、糖尿病群ともに TTX-R  $I_{Na}$  の抑制を認めるが、その抑制効果は糖尿病群にてより顕著であることを明らかにした。このことは LY333531 が有痛性神経障害の治療薬として有用である可能性を示唆し、糖尿病群にて治療効果が高いと考えられた。また LY333531 の TTX-R  $I_{Na}$  の抑制の機序として、以前の我々の検討で同糖尿病モデルラットの DRG の PKC $\beta$  膜分画活性が上昇していることから、上昇した PKC $\beta$  活性が TTX-R  $I_{Na}$  を増大させ、PKC $\beta$  選択的阻害剤の LY333531 がこの電流を抑制した可能性が考えられた。またその他の機序として、LY333531 が PKC pathway を介さずに TTX-R  $I_{Na}$  を直接抑制した可能性も考えられた。

#### 【結果・新知見】

糖尿病モデルラットにおいて TTX-R  $I_{Na}$  が増大し、糖尿病性神経障害治療薬である LY333531 によってその増大した電流値が抑制されることが新たに示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	359	氏名	早瀬 史子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>糖尿病モデルラットにプロテインキナーゼ CB (PKCB) 選択的阻害薬 LY333531 を経口投与すると、痛覚閾値の異常低下が改善するが、その作用機序は不明である。本研究は、LY333531 による糖尿病性神経障害の改善機序を明らかにする目的で、脊髄後根神経節 (DRG) の小径神経細胞に特異的に発現しているテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流に対する LY333531 の作用について、全細胞型パッチクランプ法によって検討を行ったものである。</p> <p>その結果、糖尿病性モデルラットの DRG 小径神経細胞では、テトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流の振幅が有意に増大し、より過分極側でチャネルの活性化が生じていた。LY333531 を投与すると、このナトリウム電流の振幅増大を抑制した。テトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流は、神経細胞の興奮性に深く関与していることから、LY333531 による糖尿病性神経障害の改善作用においては、テトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流の振幅増大を抑制することが、作用機序のひとつと考えられた。</p> <p>本研究は、糖尿病性神経障害の発生機序の一端と PKCB 選択的阻害薬による改善作用を明らかにした論文であり、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認められる。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 8 月 29 日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
(平成 19 年 8 月 29 日)			