

氏 名 (本 籍) 金 一 暁 (韓 国)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 5 3 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 5 年 9 月 1 0 日

学 位 論 文 題 目 Protein Kinase C $\beta$  Selective Inhibitor LY333531 Attenuates Diabetic Hyperalgesia Through Ameliorating cGMP Level of Dorsal Root Ganglion Neurons

(選択的 PKC $\beta$  阻害剤 LY333531 は後根神経節細胞 cGMP 含量を改善することにより糖尿病性痛覚過敏を軽減する)

審 査 委 員 主 査 教 授 木 村 宏

副 査 教 授 大 久 保 岩 男

副 査 教 授 松 浦 博

## 論文内容要旨

*整理番号	456	氏名 (ふりがな)	きむ ひょう 金 一暁
学位論文題目	<p>Protein Kinase C<math>\beta</math> Selective Inhibitor LY333531 Attenuates Diabetic Hyperalgesia Through Ameliorating cGMP Level of Dorsal Root Ganglion Neurons (選択的 PKC<math>\beta</math> 阻害剤 LY333531 は後根神経節細胞 cGMP 含量を改善することにより糖尿病性痛覚過敏を軽減する)</p>		
<p><b>【研究の目的】</b>          糖尿病性神経障害は末梢神経障害のうち最も頻度が高く病態も多様である。痛覚過敏はその主要症状の一つであり、疼痛は患者の日常生活を妨げる大きな問題となり得るが、その発症機序や病態の詳細は不明で、有効な治療も確立していない。          糖尿病性神経障害の発症に関しては、ポリオール経路、蛋白糖化、プロテインキナーゼ C(PKC)活性異常など様々な仮説があるが、特に糖尿病合併症の発症に PKC<math>\beta</math> の活性亢進が関与していることが明らかとなり、新しく開発された選択的 PKC<math>\beta</math> 阻害薬 LY333531(LY)の網膜症や腎症に対する有効性が報告されている。近年、神経障害に関しても有効性を示唆する報告がある。          一方、<math>\beta</math>アイソフォームも含めて PKC の活性化が痛覚発現に深く関与していることが明らかとなり、糖尿病モデル動物においても PKC の関与が報告されている。我々は糖尿病動物の疼痛発現に NO-cGMP 系の低下やテトロドトキシン(TTX)抵抗性 Na チャネルの活性化が関与することを報告してきたが、これらと PKC 活性の関係については明らかではない。          そこで今回、糖尿病における痛覚過敏に対する PKC<math>\beta</math> の関与を検討するため LY の有用性と作用機序について検討を行った。</p> <p><b>【方法】</b>          SD 雄性ラットにストレプトゾシン(STZ) 50mg/kg を静脈内投与し糖尿病モデルを作製した。糖尿病群には経口的に LY 10mg/kg/day を STZ 投与後 6 週間投与する(実験 1)と共に、L-arginine 250mg/kg/day を STZ 投与後 2 週目より 4 週間腹腔内に投与して(実験 2)、LY 及び L-arginine の効果・作用を対照群及び非投与糖尿病群と比較検討した。          侵害受容閾値の評価はラット後足背に機械的刺激を加え、痛覚閾値を Analgesy meter (Ugo Basile 社)で測定した。LY 経口投与及び L-arginine 腹腔内投与実験共に STZ 投与前及び投与 2,4,6 週後の痛覚閾値を経時的に測定した。さらに LY の局所作用を確認するため、糖尿病ラット(6 週)の後足背に LY 皮内投与して、痛覚閾値の変化を測定した。          実験終了時に後根神経節(DRG)ニューロンについて、各 PKC, nNOS, TTX 抵抗性 Na チャネルの蛋白発現及び cGMP 含量を検討し、特に PKC<math>\beta</math> に関しては蛋白発現及びリン酸化、膜/細胞質発現比で活性化を比較し、免疫組織学的にも検討した。LY の直接作用確認のため、摘出した DRG を ex. vivo で LY 添加・非添加の条件下で短時間培養して cGMP 含量を測定した。</p> <p><b>【結果】</b>          糖尿病群は STZ 投与 2 週以降、痛覚閾値の低下が認められ、LY 経口及び L-arginine</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。

の腹腔内投与で有意な改善が認められた。LY 局所投与でも、投与後 1 時間で 200~2000nM の濃度で痛覚閾値の改善を認めた。

糖尿病ラット DRG の各 PKC サブタイプ( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ )、nNOS 及び TTX 抵抗性 Na チャネルの蛋白発現は著明に低下しており、LY 投与で改善は認めなかった。糖尿病ラット DRG の PKC  $\beta$  II 活性(膜/細胞質分画比)は増加しており、LY 投与で改善した(リン酸化 PKC  $\beta$  II)。さらに同ラット DRGcGMP 含量は著明に減少し、LY 投与及び L-arginine 投与で改善を認め、この改善は ex. vivo 実験でも確認された。

免疫組織学的にはラット DRG ニューロンでは PKC  $\beta$  I を除く  $\alpha$ ,  $\beta$  II,  $\gamma$  の局在が認められ、PKC  $\beta$  II は小径細胞で特に強く染色された。

#### 【考 察】

本研究において、糖尿病動物は痛覚過敏を呈することが再確認され、PKC  $\beta$  の選択的阻害薬 LY に痛覚過敏改善作用が認められた。LY が血流改善により糖尿病性神経障害による神経機能を改善することが示唆されており、今回の痛覚過敏の改善も血流改善を介している可能性は否定できないが、局所皮下投与にて短時間内に改善効果を認めたことは皮下神経線維への直接作用が示唆するものと考えられる。糖尿病ラットの痛覚過敏と C 線維の興奮性亢進が PKC 阻害薬の局所皮下投与によって抑制されることが既に報告されている。

本研究では DRG において PKC  $\beta$  II は小径細胞に強く局在し、糖尿病状態では活性化の指標である PKC  $\beta$  II 膜/細胞質比が増大し、LY の投与でリン酸化 PKC  $\beta$  II が抑制されることが明らかとなった。これは糖尿病の感覚神経系末梢レベルにおいて、A $\delta$  や C 線維での PKC  $\beta$  II 活性亢進を LY は直接的に抑制している可能性を示唆する。

一方、我々は糖尿病ラットの DRGnNOS 発現と cGMP 含量の減少が痛覚過敏の発症に関与することを既に報告した。今回、LY は糖尿病ラットの低下した DRGcGMP 含量を正常化させた。さらに、NO ドナーである L-arginine 投与においても痛覚過敏と DRGcGMP 含量の改善が得られた。LY の神経細胞 cGMP 代謝を改善する機序は不明であるが糖尿病における痛覚過敏の改善に NO-cGMP 系増加が関与することが示唆される。

また、糖尿病ラットの痛覚過敏には TTX 抵抗性 Na チャネルのリン酸化増加や発現量の増加などが関与している可能性があるが、今回の検討により後者の関与は除外され、LY は TTX 抵抗性 Na チャネルのリン酸化を阻害して Na 電流を減らす可能性が否定できない。

#### 【結 論】

糖尿病性神経障害による痛覚過敏に対して LY は有用であり、その作用機序として末梢神経系の PKC  $\beta$  II 活性阻害を介して NO-cGMP 系の活性低下を改善することが関与していると考えられ、LY が糖尿病で発現する疼痛に対する治療薬となり得る可能性を示唆する。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	456	氏名	金 一 暁
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>糖尿病性神経障害の発症機序は未だ不明であるが、最近、プロテインキナーゼC (PKC) 活性亢進が痛覚発現に関与すること、PKCβ阻害剤LY333531 (LY) が糖尿病性の合併症の改善に有効であること等が報告されている。本研究は、糖尿病による痛覚過敏症とPKCβの関連を探るとともに、LYの作用機序ならびに薬物治療法の有用性を検討したものである。</p> <p>糖尿病モデルラットにLYを投与すると、第一次感覚ニューロンで異常亢進していたPKCβII活性および低下していたcGMP濃度が改善され、その結果として疼痛発現が抑制されることが実験的に立証された。</p> <p>本研究は、糖尿病性神経障害に対してLYが治療薬となる可能性を示唆したものであり、学位(医学)の授与に価するものと判定された。</p> <p>なお、最終口頭試問を8月29日に行い、合格と認められた。</p>			
(平成15年8月28日)			