

糖尿病性神経障害における細胞内情報伝達系と チャンネル機能の連鎖機構の解明

研究課題番号：09670652

平成9年度一平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 安田斎
(滋賀医科大学医学部講師)

緒言

糖尿病における神経機能異常、特に神経伝導速度低下にNa/K-ATPaseの活性低下が関与すると考えられているが、その機序は不明である。一方、神経活動電位の発生にNa及びKチャンネルが関与していることを考慮すると、これらのチャンネル機能の障害が糖尿病における神経機能異常の原因となっている可能性が高いが実証されていない。さらに、Na及びKチャンネルは、糖尿病で活性が低下するprotein kinase A (PKA) やprotein kinase C (PKC)による磷酸化により調節されていることが分かっているが、糖尿病における調節機構については明らかではない。以上の諸点を明らかにすることは糖尿病性神経障害の治療を考慮する上で必須であり、神経細胞全般の情報伝達系と神経機能発現との連関を究明する上で意義深い。

本研究では、特に1) 糖尿病状態でNa,Kチャンネル機能が障害されるかどうか、2) 糖尿病において細胞内情報伝達系がチャンネル機能をどのように調節しているか、細胞内情報伝達系からチャンネルに至る何れの部位に障害が存在するか、などを検討することを目的とした。

研究組織

研究代表者：安田斎（滋賀医科大学医学部講師）

研究分担者：北里宏（滋賀医科大学医学部名誉教授）

研究分担者：寺田雅彦（滋賀医科大学医学部助教授）

研究分担者：西尾善彦（滋賀医科大学医学部助手）

研究経費

平成9年度	1800千円
平成10年度	600千円
平成11年度	800千円
計	3200千円

滋賀医科大学附属図書館



1999018593

研究発表

1. 学会誌等

- 1) Hirade M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R and Kitasato H:
Tetrodotoxin-resistant sodium channels of dorsal root ganglion neuron are readily activated in diabetic rats. *Neuroscience* 90: 933-939,1999.
- 2) Hirade M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R and Kitasato H: PKC-mediated regulation of Na currents is impaired in dorsal root ganglion neurons of diabetic rats. *J Peripher Nerv Syst* 2: 271, 1997.

2. 口頭発表

- 1) 平出美和、安田齋、寺田雅彦、瀧川智子、北里宏、吉川隆一：パッチクランプ法による糖尿病性神経障害のチャネル調節機構の検討、第40回日本糖尿病学会年次学術集会、平成9年5月22-24日
- 2) Hirade M, Yasuda H, Terada M, Takigawa T, Kitasato H and Kikkawa R:
PKC-mediated regulation of Na currents is impaired in dorsal root ganglion neurons of diabetic rats. 4th International Symposium on Diabetic Neuropathy, Netherlands, 1997
- 3) 平出美和、安田齋、吉川隆一、北里宏：糖尿病ラットにおける後根神経節神経細胞 tetrodotoxin-resistant Na channel の特性、第42回日本糖尿病学会年次学術集会、平成11年5月13-15日
- 4) Hirade M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Kitasato H and Kikkawa R:
Tetrodotoxin-resistant sodium-positive channels of dorsal root ganglion neurons are readily activated in diabetic rats. 123rd Annual Meeting of the American Neurological Association, Montreal, Canada, 1998

研究成果

1. 後根神経節神経細胞の培養の確立

痛覚に関与する tetrodotoxin-抵抗性 (TTX-R)Na チャネルを有する後根神経節(DRG) 小型細胞 (直径20-27 μ m) の培養条件を検討した。

- 1) 後根神経節はエーテル麻酔下にて断頭脱血後採取するよりも phentobarbital による全身麻酔下で採取する方が細胞の生存率がよかった。
- 2) poly-L-lysine より poly-ornithine が神経細胞に適していた。
- 3) コーティング後数日で使用していたが、即日で使用する方が細胞の接着がよいことが明らかになった。
- 4) トリプシン (0.1%) 処理は10分を越えると生存率が下がるが、5分以内では良好なシールが得られず、パッチクランプに適さないことが判った。
- 5) 細胞を単離する際に用いるピペットを熱処理し、先を細くすることで細胞の生存率が上がることが明らかになった。以上の改善により直径15mmの円形カバースリップ上に培養できる細胞の数は2~5個より20~30個に上昇し、培養可能期間も2日より5日に増加した。

2. 正常後根神経節神経細胞を用いたホールセルパッチクランプの検討

1) 細胞外 Na⁺ 濃度の調整

神経細胞の発現する Na⁺ channel は非常に多いため、normal Ringer 液を用いたところ、膜電位固定できず脱分極を起こしてしまう。様々な細胞外 Na⁺ 濃度を検討した結果、35 mM NaCl, 65mM TrisHCl, 30mM TEACl の細胞外液が最も適していることが明らかになった。さらに電極抵抗を0.5~1.5 MWまで下げることによりシリーズレジスタンスを抑え、完全に膜電位固定された波形を得られるようになった。この検討を直径20~27mmの細胞で行った。peak current の平均は0.94 \pm 0.12 nA, current density は46 \pm 6nA/pF(n=11)であった。また今までに報告されているようにこのチャンネルはテトラドトキシン感受性 Na⁺ チャネルに比べ遅い kinetics を持ち、time to peak 3.3 \pm 0.2 msec, time constant of decay 8.2 \pm 0.6msec とこれまでの報告と矛盾しなかった。

2) 細胞内液の Ca²⁺ 濃度の調整

通常ホールセルパッチクランプでは細胞内液の Ca²⁺ 濃度は低めに保つ。しかし細胞内情報伝達系の検討を行うにあたって、細胞内液 Ca²⁺ 濃度が低すぎると Ca²⁺ を介した反応が mask される可能性がある。そこでまず、文献上一般的に用いられる ① 1mM CaCl₂, 10mM EGTA (推定Ca²⁺ 濃度 10nM) より実験を始め、パッチクランプ法を確立した後、②1mM CaCl₂, 3mM EGTA (推定Ca²⁺ 濃度 40nM)、③2mM CaCl₂, 3mM EGTA (推定Ca²⁺ 濃度 200nM) の細胞内液を用い、同様の結果が得られるかどうかを検討した。検討の結果、溶液③においてもホールセルクランプ完成後 Na⁺ 電流のrun down は認めず、検討に用いることができると判断した。

3) pCLAMP6、インターフェイスを用いたテストパルスによる検討

以前用いていたstep plus generator では与えるテストパルスの種類に限界があった。今回購入したインターフェイスを用いることにより、Na⁺ 電流の IV-curve の検討に加え、steady-state inactivation, repriming kinetics の検討が速やかに行なえるようになった。steady-state inactivation はhalf inactivation potential (E_h)が -22.3 \pm 1.4mVといままでの報告に矛盾しないものだった。またrepriming kinetics

の検討ではこのチャンネルは2つの時係数を持ち、fast time constant : 5.2 ± 0.7 ms とこれもこれまでの報告に矛盾しないものだった。

4) 培養によるNa⁺ 電流の変化

溶液③を用いて培養後、Na⁺ 電流の変化を観察した。採取即日使用、培養1日、培養2日で検討を行った。また糖尿病ラットをにおいて preliminary ではあるが同様の検討を行い、両群で比較に適した日数の検討を行った。1 培養即日では糖尿病神経細胞において正常群に比較し、Na⁺ 電流の振幅が大きかった。2 培養1日後以降ではその差は認められなかった。以上の結果、両群の比較は即日培養で行うのが適当であると考えられた。

3. 糖尿病期間6週のラット神経細胞を用いたホールセルパッチクランプの検討

糖尿病ラットのDRG小型細胞に発現する tetrodotoxin-抵抗性 (TTX-R)Na チャンネルの機能について糖尿病期間短期(6週)のラットで検討した。糖尿病は8週のおスSDラットにストレプトゾシン(50mg/kg)を尾静脈へ静注して作製し 週後実験に用いた。腰部DRGをコラゲナーゼとトリプシンで処理しDRGニューロンを単離し、ポリオルニチンをコートしたカバーガラス上に細胞を撒布して2~7時間培養した後実験に用いた。ホールセルパッチクランプ法にて細胞全体を流れるTTX-R Na 電流を測定し次の結果を得た。

- 1) DRGニューロンのTTX-R Na 電流及び電流密度は糖尿病ラットで対照群に比較し増大していた。
- 2) DRGニューロンのTTX-R Na 電流の活性化速度及び不活性化速度は両群で差を認めなかった。
- 3) 静止膜電位を含む電位幅、 -90 mV ~ -40 mV に保持した後、脱分極させた時のTTX-R のNa 電流密度は糖尿病群で増大していた。
- 4) DRGニューロンのTTX-R Na チャンネルは糖尿病群でより過分極側から活性化及び不活性化された。今回、糖尿病期間長期のラットDRGで得られたTTX-R Na チャンネル電流・電流密度の増加及び過分極側で活性化される所見は、昨年度、同様な系で得られた糖尿病期間の短いラットの成績と酷似しており、本チャンネルを発現する小径線維の興奮性亢進や痛覚閾値の低下が糖尿病ラットで恒常的に起こっていること、即ち痛覚過敏が糖尿病ラットに存在することを示唆していると考えられる。

4. 糖尿病期間6週のラット神経細胞を用いたホールセルパッチクランプの検討

糖尿病ラットDRG小型細胞に発現する tetrodotoxin-抵抗性 (TTX-R)Na チャンネルの機能について糖尿病期間長期(8ヵ月)のラットで検討し、前年度の糖尿病期間6週と発症早期のラットから得られた成績と比較して、ほぼ同様な成績を得た。この所見は本チャンネルを発現する小径線維の興奮性亢進や痛覚閾値の低下が糖尿病ラットで恒常的に起こっていること、即ち痛覚過敏が糖尿病ラットに存在することを示唆していると考えられる。

09670652
基盤研究(C)
(2)

糖
尿
病
性
神
經
障
害
の
連
鎖
機
構
の
細
胞
内
情
報
伝
達
と
チ
ャ
ン
ネ
ル
機
能
の
連
鎖
機
構
の
細
胞
内
情
報
伝
達
と

滋賀医科大学医学部講師
安田 斎

滋賀医科大学附属図書館



1999018593

平成十二年三月