

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20084

研究課題名(和文)オピオイドによる痒みの細胞内シグナル及びTRPA1-痒みシグナル関連の解明

研究課題名(英文)Elucidation of intracellular signal of opioid-induced itching and TRPA1-itch signal interaction

研究代表者

佐々木 美佳 (SASAKI, MIKA)

新潟大学・医歯学総合病院・技術補佐員

研究者番号：20774061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：モルヒネ30nmol髄腔内投与によりマウスの痒み行動は増加し、脊髄後角では痛みや痒みと関連するMAPキナーゼのERK, p38のリン酸化が亢進することが確認できた。同時に脊髄後角1層およびDRGではヒスタミン非依存性痒み物質であるガストリン放出ペプチドの増加が免疫組織学により確認された。一方、セロトニン受容体の一つ5-HT3受容体拮抗薬オンダンセトロンの前投与及びセロトニン合成酵素阻害剤p-chlorophenylalanineの前投与により、モルヒネ髄腔内投与によるマウスの痒み行動は有意に抑制された。この結果、モルヒネによる痒みにセロトニン、特に5-HT3受容体の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The intrathecal administration of 30 nmol morphine increased the itching behavior of mice, and elevated the phosphorylation level of ERK and p38 of MAP kinase, which known to be associated with pain and itch at the dorsal horn of the spinal cord. At the same time, immunohistochemistry confirmed an increase in gastrin releasing peptides, which are histamine-independent itching substances, in the dorsal horn I and layer of the spinal cord and DRG. On the other hand, the itching behavior of mice by intrathecal administration of morphine was significantly suppressed by pre-administration of a 5-HT3 receptor antagonist ondansetron and pre-administration of serotonin synthase inhibitor p-chlorophenylalanine. These results suggested that activation of serotonin receptor, particularly 5-HT3 receptor, was involved in itching by morphine.

研究分野：痛み

キーワード：オピオイド誘発性痒み セロトニン受容体 オンダンセトロン ガストリン放出ペプチド MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

麻薬性鎮痛薬(オピオイド)は周術期疼痛管理を始めとして、がん性疼痛の緩和などに汎用される薬物であるが、その副作用は多岐に渡り、特に長期使用による鎮痛耐性や急な断薬による痛覚過敏、痒みなどが臨床上の問題となっている。オピオイド投与により生じる痒みは、特に硬膜外や髄腔内に投与した際に生じる頻度が高く(40-80%)、周術期患者のQOLを大きく損なうため、対策の基礎となるメカニズムの解明が急務である。

近年、ガストリン放出ペプチド受容体(Gastrin-releasing peptide receptor: GRPR)が μ オピオイド受容体(MOR)とヘテロ2量体を形成し、脊髄後角の神経細胞に存在すること、MOR刺激によりGRPR-MORヘテロ2量体が細胞内に移行し、細胞内カルシウムを上昇させ、細胞を興奮させることが明らかになった[1]。一方、痛みに関連するとされているTransient receptor potential cation channel A1: TRPA1ノックアウトマウスでは、ヒスタミン非依存的な痒みが減弱することが知られている[2]が、オピオイドによる痒みへのTRPA1の関与は明らかではない。また、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける慢性の痒みにおいては、脊髄後角におけるアストロサイトのSTAT-3活性化が重要であることが明らかになった[3]。しかし、急性に発症するオピオイドによる痒みについての細胞内シグナリングは解明できていない。

<引用文献>

[1] Cell. 2011; 147(2): 447-58.

[2] Nat Neurosci. 2011; 14(5): 595-602.

[3] Nat Med. 2015; 21(8): 927-31.

2. 研究の目的

麻薬性鎮痛薬の中でも痒みの副作用が多いとされるモルヒネを用いる。これまで、痒みに関連するものとして、MAP kinaseであるERK, JNKのリン酸化の関与、ヒスタミン非依存性の痒み物質として知られるGRPの関与、セロトニンの関与、痛み受容体として知られているTRPA1の関与が示唆されている。本研究では、モルヒネ誘発性の痒みとGRPRの関係をMAP kinaseを含め細胞内シグナリグの観点から検討すること。TRPA1の関与を解明することを目的とし、それらの相互作用についても検討することとする。

3. 研究の方法

(1)モルヒネを髄腔内投与することによ

て生じる自発行動の中でも主に引っ掻く・噛む行動時間をモルヒネ誘発性痒み行動(SB行動)として測定し、その他の自発行動との違いを検討する。

- (2)コントロール群と比較して、モルヒネ髄腔内投与モデルマウスの脊髄後角および後根神経節(Dorsal root ganglion: DRG)において、IHCを用いてGRPおよびGRPRの発現変化を検討する。また、これらがどのような細胞に局在するのかを二重染色法により検討する。
- (3)モルヒネ髄腔内投与モデルマウスにおいて、MAP kinase ERK, p-38, JNKのリン酸化による活性化が脊髄後角で生じているかをWestern blotting(WB)法を用いて生化学的に定量し、発現の局在については免疫組織化学染色(IHC)法を用いて検討する。さらに、セロトニン受容体のうち5-HT₃受容体拮抗薬オンダンセトロン(OND)を用いて、モルヒネ誘発性痒みの行動学的変化を、またMAP kinaseの変化はWBを用いて確認する。
- (4)セロトニンとの関与を調べるため、PCPA(para-Chlorophenylalanine)を用いてセロトニン枯渇モデルマウスを作製し、それに対してモルヒネを髄腔内投与することによるモルヒネ誘発性痒み行動の変化を検討する。
- (5)コントロール群と比較して、モルヒネ髄腔内投与モデルマウスでの、脊髄後角およびDRGにおけるTRPA1の発現変化をIHCを用いて検討する。
- (6)コントロール群と比較して、モルヒネ髄腔内投与モデルマウスでの、脊髄後角におけるSTAT3リン酸化の発現変化をIHCを用いて検討する。

4. 研究成果

(1)モルヒネ髄腔内投与モデルマウスの作製

6-8週齢のC57BL/6N雄性マウスを用い、マウスの脊髄腔内に比較的高用量のモルヒネを単回投与すると、投与数分後から後肢を引っ掻く・噛む・舐める(scratching, biting, licking: SBL behavior)といった疼痛関連行動が見られることがわかったので、覚醒下のマウス腰部髄腔内にモルヒネ10, 30, 60 nmol(5 μ L)を注入し、投与後20分まで、5分間刻みでSBL行動を測定した。その結果、モルヒネ30nmol以上の投与量で、明らかなSBL行動の増加を認めた。

さらにその中でも特に痒み関連行動とされるSB行動をおこなった時間のみを計測した結果、SB行動はSBL行動のうち約56%をしめた。

そのうちで最も用量の少ないモルヒネ30nmol/5 μ Lの髄腔内投与マウスを以後モルヒネ髄腔内投与モデルマウスとして作製

し検討に用いた。

図1. モルヒネ髄腔内投与後の SBL 行動の変化

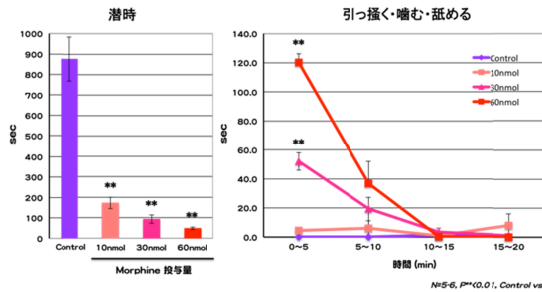
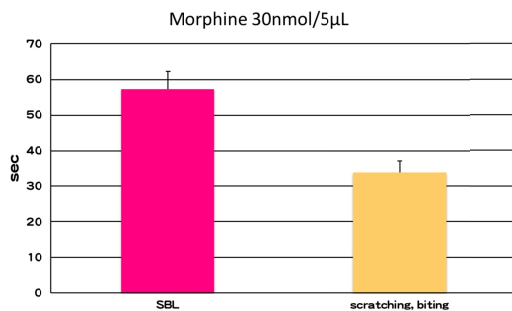
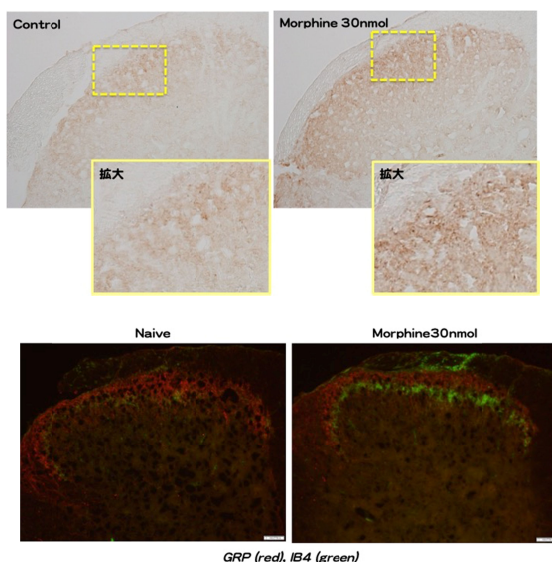


図2. Morphine 30nmol/5 μ l 投与後の SBL 行動に対する SB (痒み) 行動の割合



(2)モルヒネ髄腔内投与モデルマウスの脊髄後角および DRG における, GRP および GRPR の発現変化, および局在について Morphine 30nmol/5 μ l 髄腔内投与 5 分後の脊髄後角において GRP 発現増加がみられた。また, GRP 発現は IB4 と共同在しないことから, 脊髄後角 層目での発現と確認された。

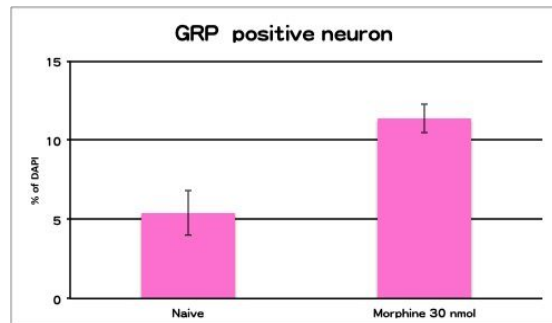
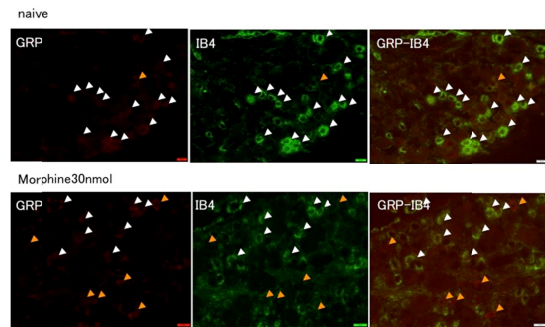
図3. コントロール群に対する Morphine 30nmol/5 μ l 髄腔内投与 5 分後の脊髄後角層目での GRP 発現変化および局在



DRG での GRP 発現を検討した結果, Naive と比較するとモルヒネ髄腔内投与モ

デル群では, GRP の増加が認められた。また Naive において GRP 陽性細胞のほとんどが IB4 陽性細胞との共同在がみられたが, モルヒネ投与群では IB4 陰性細胞での発現も多くみられた。また, A δ 神経細胞マーカー-NF200 とは共同在しなかった。ただし, 統計学上検討については現在, 数を増やして検討中である。

図4. コントロール群に対する Morphine 30nmol/5 μ l 投与 5 分後の DRG での GRP 発現変化および局在



よって, 脊髄後角および DRG において GRP の発現が増加したことから, ヒスタミン非依存性の痒みが誘発している可能性が示唆された。また, GRPR については現在 IHC を用いて条件検討中である。

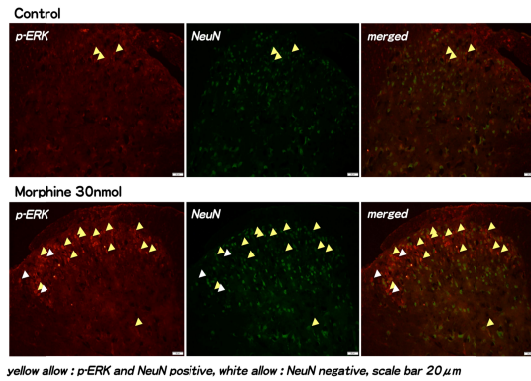
(3)モルヒネ髄腔内投与モデルマウスの脊髄後角における MAP kinase リン酸化変化および発現の局在について

(3)-1 モルヒネ髄腔内投与モデルを用いて, 脊髄後角における MAP kinase (ERK1/2, p-38, JNK) の発現量及びリン酸化の程度を WB により検討した。結果, モルヒネ髄腔内投与 5 分後の脊髄後角で, ERK1/2, p-38 リン酸化の有意な増加が認められた。一方, JNK のリン酸化の増加はみられなかった。また, OND 前投与による効果については, ERK1/2 リン酸化に対して抑制傾向ではあるが有意な差は認められなかった。なお, p-38 リン酸化に対する抑制効果は認められなかった。

IHC を用いて ERK1/2 リン酸化の局在を検討した結果, 脊髄後角 層目において ERK1/2 リン酸化の増加が認められた。さらに二重染色の結果, 神経細胞のマーカーである NeuN を用いたところ, NeuN 陽

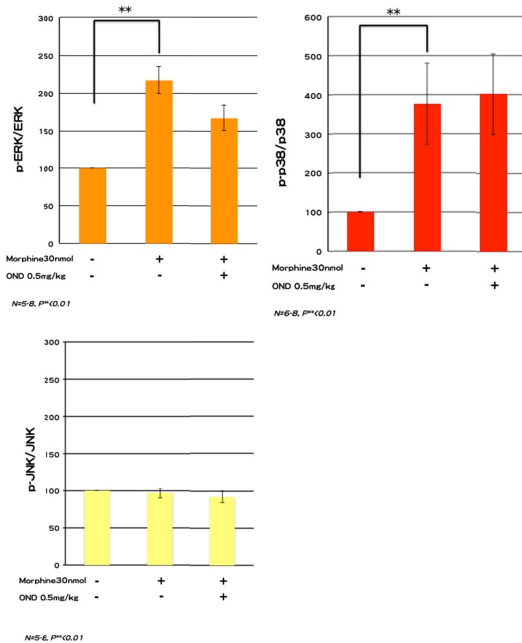
性・陰性細胞の両方に発現が認められた。NeuN 陰性細胞に対する発現は、おそらくグリア細胞への発現と思われるが、詳細な検討は現在進行中である。

図5 . コントロール群に対する Morphine 30nmol/5 μ l 髄腔内投与後の脊髄後角における ERK1/2 リン酸化の発現変化と局在 (IHC)



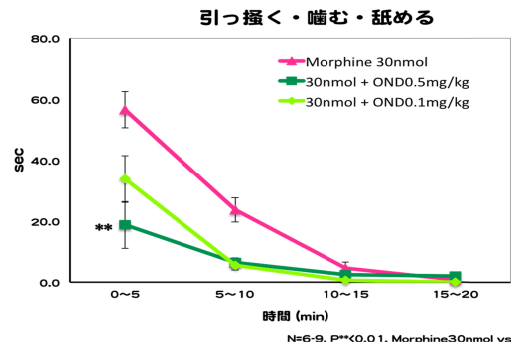
yellow allow : p-ERK and NeuN positive, white allow : NeuN negative, scale bar 20 μ m

図6 . Morphine 30nmol/5 μ l 髄腔内投与後の脊髄後角における MAP kinase 変化に対する OND 前投与による影響



(3)-2 モルヒネ髄腔内投与後の SBL 行動は、OND をモルヒネ投与 1 時間前に腹腔内に前投与しておくことによって用量依存性に抑制できることが明らかになった。

図7 . OND 前投与による, Morphine 30nmol/5 μ l 髄腔内投与後の SBL 行動の変化

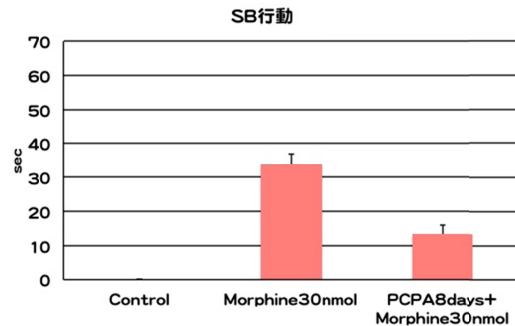


よって, OND はモルヒネによる SBL 行動に対して抑制作用を有するが, 脊髄後角における神経興奮そのものを抑制しているのではない可能性が示唆された。

(4)セロトニン枯渇マウスに対するモルヒネ髄腔内投与の影響

PCPA (para-Chlorophenylalanine) 1 日 1 回 150mg/kg, 8 日間腹腔内に連続投与しセロトニン枯渇モデルマウスを作製, その後モルヒネ髄腔内投与後の行動学的変化を検討した。結果, PCPA 前投与によりモルヒネ髄腔内投与後の SB 行動は有意に抑制した。

図8 PCPA 前投与モデルに対するモルヒネ誘発性痒み行動の変化



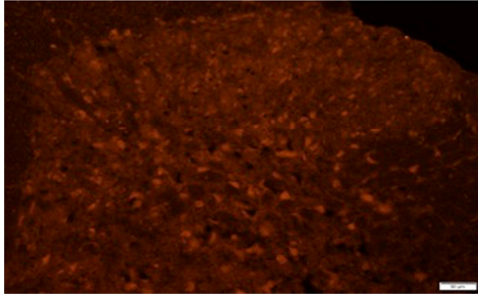
よって, モルヒネ誘発性痒み行動には, セロトニンの発現が関与している可能性が示唆された。

(5)モルヒネ髄腔内投与による脊髄後角および DRG における TRPA1 の発現変化について (IHC)

Naive 脊髄後角での TRPA1 発現を検討した。まず, 抗体 1 (abcam : ab58844) で何度か検討した結果, TRPA1 特異的な染色結果が得られなかった。抗体 2 (abcam : ab62053) を用いて現在条件検討中である。DRG の染色については, 脊髄後角で条件が整い次第検討する予定である。

図9 抗体 1 (abcam : ab58844) 染色画像

Naive



(6)モルヒネ髄腔内投与後の、脊髄後角における STAT-3 リン酸化の発現変化について (WB)

慢性掻痒には、脊髄後角のアストロサイトの活性化が関与しているとの報告があることから、モルヒネ誘発性痒み症状にもアストロサイトの活性化が関与しているかを検討した。アストロサイトの活性化は、WBを用いて STAT-3 リン酸化を定量することで検討した。結果、検討は進めているものの非特異的なバンドが多いため更に検討する余地がある。

引き続き、継続して検討を重ねることにより、論文投稿に向けて準備を進めている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshinori Kamiya, Mika Sasaki, Tatsuro Kohno. Contribution of Itch in Pain-related Behavior by Intrathecal Administration of Morphine, and Ondansetron, The 5HT₃ Antagonist, Suppressed Pain-like Behavior. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2017, October 24, 2017. Boston MA, USA

佐々木美佳, 紙谷義孝, 河野達郎. 高用量モルヒネ髄腔内投与による痛み関連行動メカニズムの解明. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会. 2016 年 5 月 26 日. 福岡, 日本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 美佳 (SASAKI, Mika)

新潟大学・医歯学総合病院・技術補佐員

研究者番号：20774061

(2) 研究分担者 なし

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

紙谷 義孝 (KAMIYA, Yoshinori)

新潟大学・医歯学系・准教授