

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08830

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における活性化アストロサイト由来Dセリンの作用

研究課題名(英文) Effects of activated astrocyte-derived D-serine in neuropathic pain

研究代表者

伊藤 健二 (Ito, Kenji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10317779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ホルマリン刺激後に第1相、第2相いずれも脊髄内におけるDセリン、グルタミン酸分泌量がいずれも補完的に上昇することが明らかとなった。顎下腺由来シアロルフィンの鎮痛効果の作用機序を、摘出マウス輸精管標本、ラット髄腔内投与、ラジオリガンド受容体結合を用いて検討した。また唾液腺内Dアミノ酸をマイクロダイアリシス法で検討した。研究結果から、シアロルフィンがミュー受容体アロステリックモジュレーターとして内因性オピオイドペプチドの鎮痛効果を増強すること、唾液腺細胞間隙中にDセリンなどが存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはDセリンが内因性コアゴニストとしてNMDA受容体の活性化を調節すること、生体の生理変化によりアストロサイト由来Dセリンが生成されることを明らかにした。神経障害性疼痛時にNMDA受容体活性亢進とアストロサイトの活性化が生じることはよく知られている。神経障害性疼痛とDセリン代謝、唾液腺Dアミノ酸、シアロルフィンとの関連性が示されれば、Dセリン代謝を標的とした独創的かつ画期的な難治性疼痛治療薬を創出できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Both D-serine and glutamate secretion in the spinal cord in both phase 1 and phase 2 were found to be complementarily increased after formalin stimulation. The mechanism of action of the analgesic effect of sialorphin from the submandibular gland was investigated using excised mouse vas deferens, intrathecal administration in rats, and radioligand receptor binding assay. In addition, D-amino acids in salivary glands were examined by in vivo salivary gland microdialysis. The study results revealed that sialorphin potentiates the analgesic effect of endogenous opioid peptides as a mu-receptor allosteric modulator and that D-serine and others are present in the salivary gland intercellular spaces.

研究分野：麻酔科学

キーワード：Dアミノ酸 シアロルフィン 唾液腺 疼痛 鎮痛 マイクロダイアリシス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は発症機序が不明なため、根本的な治療法が無く临床上重大な問題となっている。末梢神経を損傷させた神経障害性疼痛の脊髄においてアストロサイトは細胞体および突起を肥大化させ活性化することが知られている。また、神経障害に伴うアロディニアや痛覚過敏などの発症に N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体活性化が深く関与しているが、その NMDA 活性化メカニズムは不明である。申請者はこれまでに、1) グリシン結合部位内因性コアゴニストである D セリンは NMDA 受容体の活性化を制御すること、2) 生理的狀態では神経細胞で生成される D セリンは、生体の病態変化によってアストロサイトにおいても生成されること、などを明らかにした。神経障害性疼痛は長期持続する難治性の疼痛である。持続的な痛みは患者の QOL を著しく低下させることから、痛み自体が治療の対象となる。末梢神経を傷害させた神経障害性疼痛モデルや神経障害を伴う病態モデルの脊髄において、アストロサイトは細胞体および突起を肥大化させ活性化する。アストロサイトは神経損傷後比較の後期から活性化するため、神経障害性疼痛の維持メカニズムに重要であると考えられている。しかし、活性化アストロサイトによる脊髄後角ニューロン変調メカニズムは不明である。末梢神経から強い侵害刺激が脊髄後角神経細胞に入力されると、NMDA 受容体活性化を介する過敏化が生じ、この過敏化はアロディニアや痛覚過敏などの発症に関わることが知られている。申請者らは、遊離型 D セリンが NMDA 受容体活性の調節因子として脳内疼痛シグナル伝達に関与することなどを明らかにした。D セリンは、セリンラセマーゼ (Serine racemase: Srr) により L セリンから生成され、D アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO)によりピルビン酸に分解される。生理的な個体レベルでは D セリンは神経細胞の Srr により生成されるが、生理的狀態から逸脱した場合アストロサイトの Srr により D セリンが生成されることを申請者らは明らかにした。以上から、神経障害性疼痛の維持期における脊髄後角で活性化アストロサイト由来 D セリンが NMDA 受容体機能を亢進し、脊髄後角ニューロンを過敏化し、アロディニアや痛覚過敏などの神経障害性疼痛の維持メカニズムの一因となっていると考えられた。

### 2. 研究の目的

近年、ラット顎下腺由来新規ペプチドシアロルフィンがオピオイドペプチド分解酵素阻害効果により鎮痛効果を示すとの報告がなされた。本研究は神経障害性疼痛時の脊髄後角ニューロン変調メカニズムを明らかにするために、D セリンの神経障害性疼痛における役割解明を基軸に据え、オピオイドペプチド、シアロルフィンとの相互関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Wistar 系雄系ラットを用い、イソフルラン 0.5%で維持した。直腸温をモニターし、温熱マットによって 36.5 度前後に維持した。背部を正中切開し第 13 胸椎を椎弓切除し脊髄腰膨大部(L5)を露出した。右側の硬膜を切開し、膜長 1 mm の直管型マイクロダイアリシスプローブ(Eicom, A-1-10-1)を 1mm 挿入した。その後、リングル液をマイクロシリンジポンプにて 1  $\mu$ l/分の速度で灌流し、5 分間隔で灌流液を採取した。およそ 120 分灌流した後、baseline 値を測定した。その後、薬剤を静注し 120 分間サンプルを採取した。採取された 5 分毎のサンプルは、フラクションコレクターにより分取した。各フラクションの各種 D,L アミノ酸分析には OPA 誘導体化後に C18 カラム(Waters, Nova-Pac)を用いて、蛍光検出器(Jasco, FP4020)により測定した。

(2) デルタ、ミュー、カッパオピオイド受容体優位の摘出マウス輸精管標本の電気刺激による収縮に対するメチオニンエンケファリンの抑制割合について IC50 の値により、Ratio of potency を求めた。

(3) Yaksh らの方法に従い、Wistar 系雄性ラット髄腔内へ胸腰部レベルに頭側から尾側へカテーテルを挿入留置し、明らかな運動麻痺などが観察されなかったラットを実験に供試した。薬液投与後に 55 °C の温水にラットの尾を浸し、Tail-flick response までの潜時を測定し、鎮痛効果を評価した。

(4) [D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO)をトレーサーとしたミューオピオイド受容体に対する結合親和性試験を行い、DAMGO の結合親和性(Kd)または最大結合能(Bmax)に対する効果について検討した。

(5) Wistar 系雄性ラット顎下腺に挿入した唾液腺用マイクロダイアリシス透析プローブ(Eicom, OP-100-10)に Ringer 液を還流し、透析液を分取した。アセチルコリン濃度分析には酵素カラム(Eicom, AC-ENZYM-PAC)を、モノアミンには分析カラム(Eicom, CA-50DS)を用い、HPLC 電気化学検出器(Eicom, HITEC510)により測定した。各種 D,L アミノ酸分析には C18 カラム(Waters, Nova-Pac)を用いて、蛍光検出器(Jasco, FP4020)により測定した。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄における神経伝達物質の遊離をマイクロダイアリシス法で検出するシステムを構築した。すなわち、イソフルラン麻酔下でマイクロダイアリシスプローブを脊髄内に挿入し、ホルマリン刺激による D-セリン、グルタミン酸などの遊離量を解析した。その結果、ホルマリン刺激後に第 1 相、第 2 相いずれも D-セリン、グルタミン酸分泌量がいずれも補完的に上昇することが明らかとなった。すなわち、脊髄内の神経伝達物質を解析するシステムにより痛み刺激により疼痛伝達物質(グルタミン酸、D セリン) 変化量を世界に先駆けて定量的に解析した。

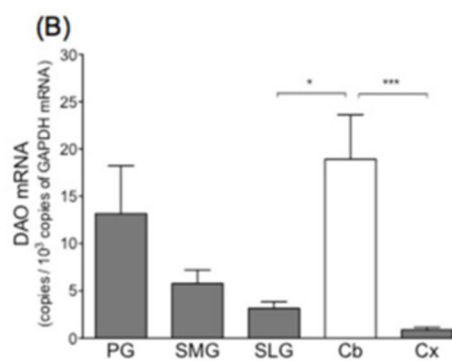
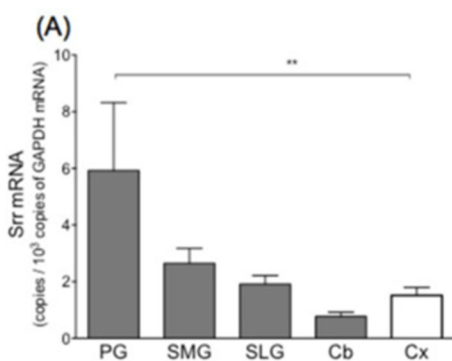
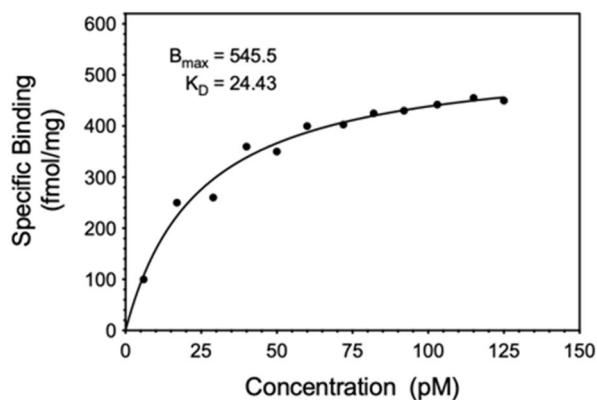
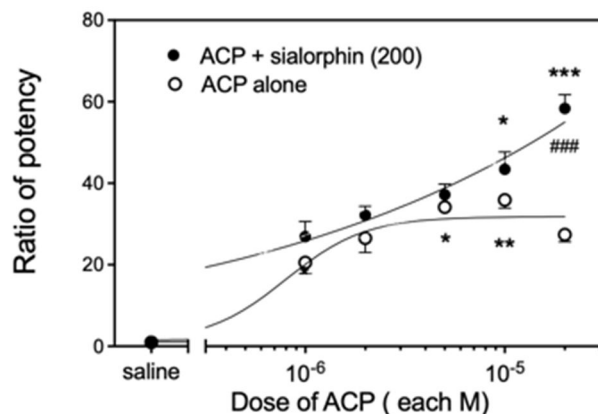
(2) 摘出マウス輸精管標本の電気刺激による収縮に対するメチオニンエンケファリンの抑制割合についての解析結果より、シアロルフィン(200)はペプチダーゼ阻害作用以外の作用によりメチオニンエンケファリンの輸精管運動への抑制効果を増強することが明らかとなった。

(3) シアロルフィン髄腔内投与によるメチオニンエンケファリン誘発性の抗侵害作用に対する増強作用は、ミューオピオイド受容体サイレントアロステリックモジュレーター(BMS-986124)髄腔内投与により減弱された。これらの結果より、シアロルフィンはペプチダーゼ阻害作用以外の作用によりメチオニンエンケファリンの輸精管運動への抑制効果を増強すること、ミューオピオイド受容体ポジティブアロステリックモジュレーターとして機能することが明らかとなった。

(4) 放射性 DAMGO を用いた受容体結合アッセイの結果、シアロルフィンはミューオピオイド受容体選択的アゴニスト DAMGO の結合親和性や最大結合能に影響を与えなかった。以上の結果より、シアロルフィンには  $\mu$  オピオイド受容体の結合親和性に影響せず、 $\mu$  オピオイド受容体の内活性を増強し、内因性オピオイドペプチドの効力を増強する機能を有することが明らかとなった(Kan, Yoshikawa, Ito et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2020, 375, 104-114)。

(5) D セリンの末梢臓器に対する作用についての報告はほとんどない。HPLC アミノ酸一斉分析により 7 週齢 Wistar 系雄性ラット耳下腺、顎下腺、

舌下腺に D セリン、D アスパラギン酸、D アラニンが存在することを明らかにした。D セリンは L-セリンをラセミ化するセリン異性化酵素(Serine racemase: Srr) により生成され、D アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO)によりヒドロキシピルビン酸に代謝される。ラット唾液腺において Srr と DAO の遺伝子がそれぞれ大脳皮質と小脳と同程度に発現していること、NMDA 受容体サブユニット遺伝子が発現していること、などを RT-qPCR により明らかにした(Yoshikawa, Ito et al., Biology, 2022;11(3):390.doi: 10.3390/biology11030390)。唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリシス法により唾液腺細胞間質液中に D セリン、D アラニンなどが比較的高濃度に存在することを明らかにした(Yoshikawa, Ito et al., Biology, 2022;11(3):390.doi: 10.3390/biology11030390)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kan Takugi, Yoshikawa Masanobu, Watanabe Mariko, Miura Masaaki, Ito Kenji, Matsuda Mitsumasa, Iwao Kayoko, Kobayashi Hiroyuki, Suzuki Takeshi, Suzuki Toshiyasu	4. 巻 375
2. 論文標題 Sialorphan Potentiates Effects of [Met <sup>5</sup> ]Enkephalin without Toxicity by Action other than Peptidase Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 104 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.120.266080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Masanobu, Kan Takugi, Shirose Kosuke, Watanabe Mariko, Matsuda Mitsumasa, Ito Kenji, Kawaguchi Mitsuru	4. 巻 11
2. 論文標題 Free d-Amino Acids in Salivary Gland in Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 390 ~ 390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11030390	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉川 正信 (Yoshikawa Masanobu) (90276791)	東海大学・医学部・准教授  (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------