

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：18K08831

研究課題名(和文)モルヒネ誘発性疼痛メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of morphine-induced pain

研究代表者

松田 光正(Matsuda, Mitsumasa)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10384918

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)：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上昇することが明らかとなった。モルヒネの還流液添加によりDセリン、グルタミン酸分泌量が減少した。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が明らかとなった。シアロルフィン生合成部位である唾液腺においてDアミノ酸および代謝関連酵素、NMDA受容体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

モルヒネを慢性あるいは高用量硬膜外投与するとアロディニアなどの疼痛が引き起こされる(モルヒネ誘発性疼痛)。脊髄後角ニューロンの過敏化に重要な役割を果たすNMDA受容体活性化にDセリン、シアロルフィン、オピオイドペプチド分解酵素が関与することが明らかに出来れば、これらを標的としたモルヒネ鎮痛効果の増強ならびにモルヒネの有害作用を軽減させる新たな治療薬を創出できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Microdialysis probes were inserted into the spinal cord under isoflurane anesthesia, and the amounts of D-serine and glutamic acid released by formalin stimulation were analyzed. The results showed that release of both D-serine and glutamic acid increased at both phase 1 and phase 2 after formalin stimulation. The addition of morphine into dialyzate decreased D-serine and glutamate secretion. Sialorphine potentiates the analgesic effect induced by endogenous opioid peptides as an allosteric modulator for mu-opioid receptor. The gene and protein of D-amino acids, metabolism-related enzymes, and NMDA receptors in the salivary glands, the site of sialorphin biosynthesis, was found.

研究分野：麻酔科学

キーワード：モルヒネ 脊髄 Dセリン シアロルフィン 唾液腺 疼痛 鎮痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

モルヒネはオピオイド  $\mu$  受容体と結合し、鎮痛作用を示す。しかし、疼痛患者へモルヒネを高用量、長期間にわたり硬膜外投与した場合、アロディニアなどの疼痛が引き起こされることが報告されている。同様に、マウスあるいはラットにモルヒネを慢性投与または高用量髄腔内投与した場合においても疼痛関連行動(皮膚のひっかき行動、後肢や尾部への噛みつき、アロディニアなど)が現れる。このモルヒネ誘発性疼痛はナロキソンで拮抗されず、ケタミンを併用することで疼痛が抑制できることから、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体の関与が考えられている。モルヒネを慢性投与あるいは高濃度投与するとラット脳脊髄液中のダイノルフィン濃度が増加する。ダイノルフィンはカッパオピオイド受容体に高い親和性を示す内因性オピオイドペプチドであるが、NMDA 受容体にも親和性を示すことが報告されている。ダイノルフィンはシステインプロテアーゼのダイノルフィン変換酵素(DCE)とペプチダーゼによって代謝される。ダイノルフィン単独をラット髄腔内投与すると鎮痛作用を示すが、DCE 阻害剤とペプチダーゼ阻害剤共存下でダイノルフィンを投与するとアロディニアなどの疼痛関連行動を現すこと、慢性疼痛モデルラットの脊髄後角において DCE 活性が著しく低下していること、などが報告されている。これらの結果より、脊髄ダイノルフィンが高濃度である場合、ダイノルフィンが NMDA 受容体に作用し疼痛作用を示すことが推察される。ダイノルフィンによる疼痛が NMDA 受容体グリシン結合部位アンタゴニストにより拮抗される。

### 2. 研究の目的

ラット顎下腺由来ペプチドのシアロルフィンがモルヒネの数倍の鎮痛効果を示すことが明らかとなった。本研究では脊髄内オピオイドシステムを介して鎮痛効果を示すシアロルフィンの作用機序を明らかにするとともに、シアロルフィンの合成部位のラット唾液腺の D アミノ酸について明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)イソフルラン麻酔下において、Wistar 系雄系ラット背部を正中切開し脊髄腰膨大部(L5)を露出した。膜長 1 mm の直管型マイクロダイアリスプローブ(Eicom, A-1-10-1)を 1mm 挿入した。その後、リンゲ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)摘出した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 IC<sub>50</sub> の値により、Ratio of potency を求めた。本実験により、シアロルフィンによるオピオイドペプチドのオピオイド受容体に対する作用の程度を解析する。

(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。本実験により、シアロルフィンによるオピオイドペプチドの鎮痛効果への影響を解析する。

(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(K<sub>d</sub>)または最大結合能(B<sub>max</sub>)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上昇することが明らかとなった。モルヒネの還流液添加により D セリン、グルタミン酸分泌量が優位に減少した。すなわち、本実験により、脊髄における疼痛伝達物質の遊離制御をリアルタイムに解析できることが明らかとなった。

(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<sup>1</sup>は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。

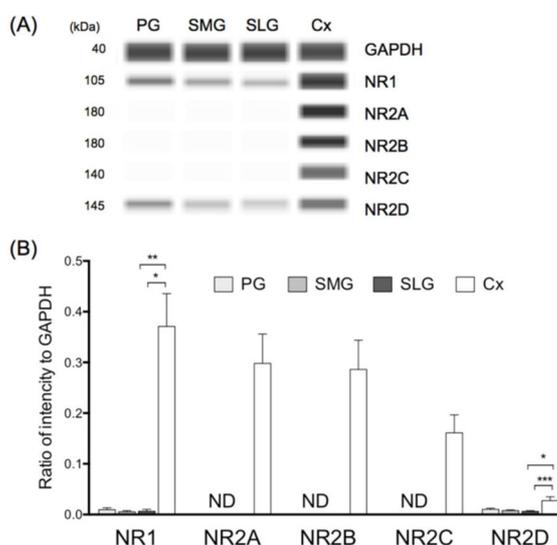
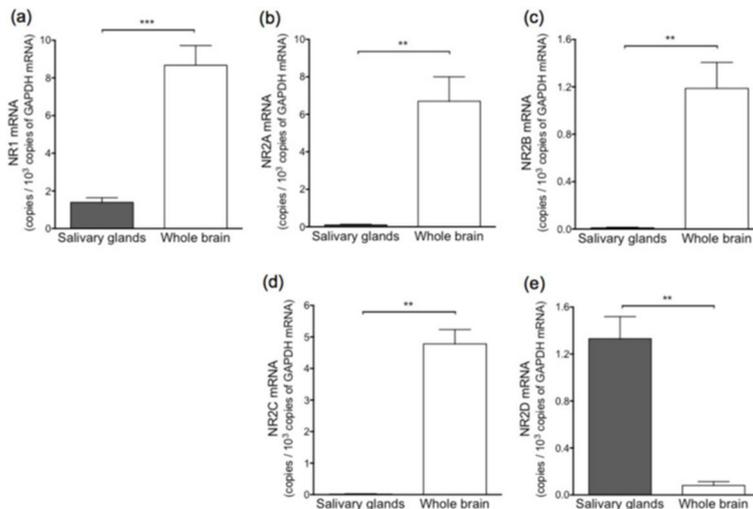
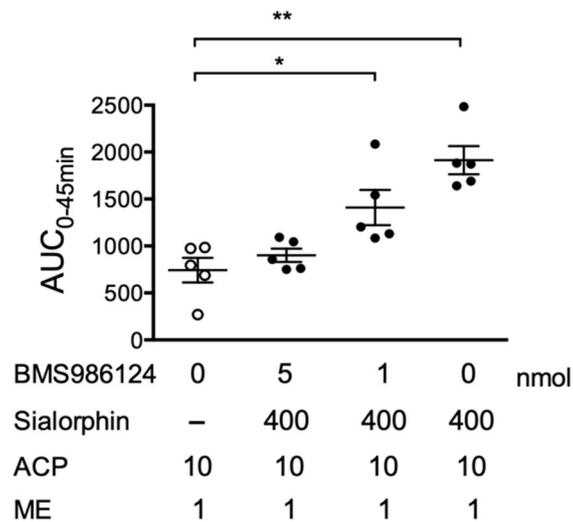
(3) シアロルフィン<sup>1</sup>髄腔内投与によるメチオニンエンケファリン誘発性の抗侵害作用に対する増強作用は、ミューオピオイド受容体サイレントアロステリックモジュレーター (BMS-986124) 髄腔内投与により減弱された。すなわち、シアロルフィン<sup>1</sup>ミューオピオイド受容体ポジティブアロステリックモジュレーターとして機能し、ミュー受容体を介する鎮痛効果を増強することが示唆された。

(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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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) シアロルフィン<sup>1</sup>の合成部位のラット唾液腺の D アミノ酸分析を行った。すなわち、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ラセマーゼ (Serine racemase: Srr) により生成され、D アミノ酸酸化酵素 (D-amino acid oxidase; DAO) により代謝される。また、D アスパラギン酸は D アスパラギン酸酸化酵素 (D-aspartic acid oxidase; DDO) により代謝される。ラット唾液腺において Srr, DAO, DDO の遺伝子とタンパク質が発現していること、NMDA 受容体サブユニット遺伝子、タンパク質が発現していること、などを明らかにした (Yoshikawa, Ito et al., Biology, 2022;11(3):390.doi:10.3390/biology11030390)。

(6) 唾液腺 *in vivo* マイクロダイアリ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)。

Sia (M)	IC <sub>50</sub> (×10 <sup>-9</sup> M)	Ratio of Potency
None	18.64 ± 2.41	1
10 <sup>-6</sup>	11.94 ± 0.41	1.45 ± 0.19
10 <sup>-5</sup>	5.83 ± 0.59	3.07 ± 0.56
10 <sup>-4</sup>	3.00 ± 0.30	5.70 ± 0.09 **
2×10 <sup>-4</sup>	3.55 ± 0.24	4.90 ± 0.65 *



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 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 -

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 -

〔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
---------	---------