

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08869

研究課題名(和文)慢性疼痛時における内因性ミューオピオイド受容体アロステリックモジュレーター的作用

研究課題名(英文) Sialorphan potentiates effects of opioid peptide without toxicity as allosteric modulator

研究代表者

姜 卓義 (KAN, Takugi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60580256

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)：3種のペプチダーゼ阻害剤(Pis)(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)非存在下と存在下いずれにおいてもシアロルフィンにはメチオニンエンケファリン(ME)の輸精管運動への抑制効果を増強した。ラットの髄腔内投与したシアロルフィンはPis存在下においてもMEの鎮痛効果を増強した。ラジオリガンド受容体結合アッセイの結果、シアロルフィンは $\mu$ 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。本研究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することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究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示唆された。すなわち、シアロルフィンのようなオピオイド受容体アロステリックモジュレーターを用いることで、オピオイドの鎮痛効果増強、オピオイド使用量減量、オピオイドの有害作用を軽減、オピオイドを長期間安全に使用が可能、という新たな慢性疼痛治療法を創出できると考える。

研究成果の概要(英文)：Differences were compared among combinations of three chemical peptidase inhibitors (amastatin, captopril, and phosphoramidon). The ratio of potencies of methionine enkephalin (ME) in mouse was deferens pretreated with both sialorphan and a mixture of the three peptidase inhibitors (Pis) was higher than that with the mixture of peptidase inhibitors alone at any dose. Intrathecal administration both sialorphan and the mixture of three PIs produced an approximately 100-fold augmentation in ME-induced antinociception, but without signs of toxicity such as motor dysfunction in rats. Radioligand receptor binding assay revealed that sialorphan did not affect either binding affinity or maximal binding capacity of DAMGO. These results indicate that sialorphan potentiates the effects of ME without toxicity by a mechanism other than peptidase inhibition and with no effect on its affinity to  $\mu$ -opioid receptors.

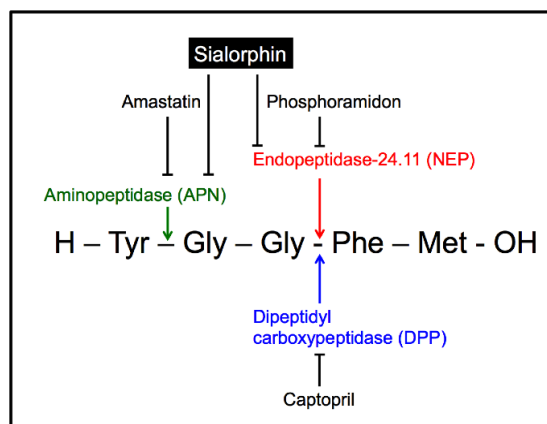
研究分野：麻酔科学

キーワード：シアロルフィン オピオイド受容体 鎮痛 アロステリックモジュレーター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

内在性オピオイドペプチドは主に3種のペプチド分解酵素、すなわち endopeptidase-24,11 (NEP), aminopeptidase (APN), dipeptidylcarboxypeptidase (DPP) によって加水分解される。申請者らは、*in vivo* 実験、*in vitro* 実験において3種のペプチド分解酵素阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)により内在性オピオイドペプチドの加水分解がほぼ完全に阻止されることから、内在性オピオイドペプチドはペプチド分解酵素によりその活性が調節されていることを明らかにしている。ラット顎下腺より抽出されたシアロルフィン(5アミノ酸のペプチド(QHNPR))で、オピオイドペプチド分解酵素の NEP, APN の内因性阻害物質と報告された(Rouget, et al., 2003)。しかし、その詳しい性状については不明である。我々はこれまでに3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)が各種オピオイドペプチド(メチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリン、ダイノルフィンなど)の加水分解をほぼ完全に阻害すること、鎮痛効果を増強すること、などを明らかにしてきた。



の内因性阻害物質と報告された(Rouget, et al., 2003)。しかし、その詳しい性状については不明である。我々はこれまでに3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)が各種オピオイドペプチド(メチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリン、ダイノルフィンなど)の加水分解をほぼ完全に阻害すること、鎮痛効果を増強すること、などを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究ではメチオニンエンケファリンに対するシアロルフィンの *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro* への効果を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *ex vivo*:

- ,  $\mu$  - , -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 の値を求め、Ratio of potency で表した。

#### (2) *in vivo*:

Yaksh らの方法に従い、7週齢 Wistar 系雄性ラットラットの髄腔内へ胸腰部レベルに頭側から尾側へ留置カテーテルを挿入し、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の温水にラットの尾を浸し、Tail-flick response までの潜時を測定した。アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドンならびにシアロルフィンを様々な組み合わせで調整したオピオイドペプチド分解酵素阻害混合物で前処理し、Tail Flick 法を用いて ME による抗侵害を評価した。

#### (3) *in vitro*:

[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  $\mu$  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)に対するシアロルフィンの効果について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) *ex vivo*

シアロルフィン単独(1x10<sup>-6</sup>M-2x10<sup>-4</sup>M)を前処理した結果、ME の輸精管運動への抑制効果を用量依存的に増強した。PI(各 1x10<sup>-6</sup>M)任意の組み合わせにおいても、シアロルフィン(1x10<sup>-4</sup>M)はME の輸精管運動への抑制効果を増強した。3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン; 各 5x10<sup>-6</sup>M)存在下でシアロルフィン(1x10<sup>-4</sup>, 2x10<sup>-4</sup>M)は用量依存的にME の輸精管運動への抑制効果を増強した。3種のペプチダーゼ阻害剤がそれぞれ標的とするペプチダーゼを完全に阻害するペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン; 各 2x10<sup>-5</sup>M)存在下においてもシアロルフィン(2x10<sup>-4</sup>M)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した。これらの実験より、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が示唆された。

#### (2) *in vivo*

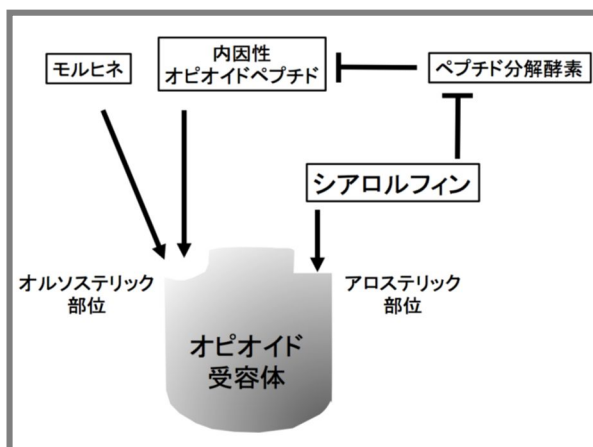
3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)非存在下において、シアロルフィン(400nmol)髄腔内投与はメチオニンエンケファリン(3nmol)誘発性の抗侵害作用を増強しなかった。3種のペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン; 各 10nmol)存在下において、シアロルフィン(100~400nmol)髄腔内投与はメチオニンエンケファリン(3nmol)誘発性の抗侵害作用を有意かつ用量依存的に増強させた。シアロルフ

イン非存在下でのペプチダーゼ阻害剤（各 10 nmol）の任意の 2 つの組み合わせによる抗侵害作用の程度は、シアルロフィン（200 nmol）の存在下のどの場合よりも小さかった。シアルロフィン（200 nmol）と 3 種のペプチダーゼ阻害剤（アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン；各 10nmol）の混合物を前処理すると、メチオニンエンケファリン（10 nmol）誘発性の抗侵害作用が約 100 倍に増強されたが、運動機能障害などの毒性は認められなかった。3 種ペプチダーゼ阻害剤（アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン；各 10nmol）存在下において、シアルロフィン（200, 400nmol）髄腔内投与によるメチオニンエンケファリン（3nmol）誘発性の抗侵害作用はオピオイド受容体非選択的アンタゴニスト naloxone、 $\mu$ -オピオイド受容体選択的アンタゴニスト D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub> (CTOP)、 $\delta$ -オピオイド受容体選択的アンタゴニスト naltrindole により有意に拮抗された。また、3 種ペプチダーゼ阻害剤（アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン；各 10nmol）存在下において、シアルロフィン（400nmol）髄腔内投与によるメチオニンエンケファリン（1nmol）誘発性の抗侵害作用に対する増強作用は、 $\mu$ -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, 1-5 nmol) 髄腔内投与により減弱された。これらの実験より、シアルロ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、 $\mu$ -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示唆された。

(3) *in vitro*:

ラジオリガンド受容体結合アッセイの結果、シアルロフィンは  $\mu$  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。

本研究結果よりシアルロフィンには  $\mu$  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示唆された。すなわち、シアルロフィンのようなオピオイド受容体アロステリックモジュレーターを用いることで、オピオイドの鎮痛効果増強 オピオイド使用量減量 オピオイドの有害作用を軽減 オピオイドを長期間安全に使用が可能、という新たな慢性疼痛治療法を創出できると考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 [Met5]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
---------	---------