

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10357

研究課題名(和文) 周術期脳虚血モデルに対するデルタオピオイド受容体アゴニストの効果

研究課題名(英文) Effects of delta opioid receptor agonists on perioperative cerebral ischemia models

研究代表者

前田 茂 (Maeda, Shigeru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50253000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは全身麻酔薬として広く使われているレミフェンタニルは中枢神経系に対して抗炎症作用があることを示しましたが、この研究ではオピオイド受容体の中でも特に δ 受容体に注目し、その特異的な作動薬と拮抗薬の作用を培養細胞によって調べました。結果として、嫌気的環境では炎症反応が増強され、培養細胞においても動物と同様の反応が再現されていました。またオピオイド δ 受容体の作動薬と拮抗薬のいずれにおいてもむしろ炎症反応を増強する傾向があり、各オピオイド受容体の作用のバランスが乱れることが総合的に炎症反応を増強している可能性が考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは高齢者の術後せん妄や認知機能の低下は、手術に伴う炎症反応の中枢神経系への波及と、循環動体の変動による一過性の脳虚血の相乗作用による中枢神経系の炎症反応ではないかと考えています。全世界で麻酔薬として使われているレミフェンタニルにより中枢神経系の炎症反応がコントロールされることもわかり、本研究では新たに δ オピオイド受容体の関連について調べました。その結果、 δ 受容体は作用と阻害のいずれにおいても炎症反応を増強することがわかりました。これらの結果から、 δ 受容体は中枢神経系の炎症反応に関して直接的な作用を有するのではなく、間接的に複数の作用をもつことが考えられました。

研究成果の概要(英文)：We have shown that remifentanyl, a widely used general anesthetic, has anti-inflammatory effects on the central nervous system. In this study, we focused on the opioid receptor, especially the δ receptor, and investigated the effects of specific agonists and antagonists of this receptor in cultured cells. The results showed that the inflammatory response was enhanced under anaerobic conditions, and the same response was reproduced in cultured cells as in the animals. In addition, both agonists and antagonists of opioid δ -receptors tend to enhance the inflammatory response, suggesting that a disturbance in the balance of actions of each opioid receptor may enhance the inflammatory response in general.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：オピオイド受容体 脳虚血 炎症

1．研究開始当初の背景

本邦では人口の高齢化と医学の進歩によって、高齢者に対する全身麻酔下手術が増加しているが、それに伴って術後認知機能障害(postoperative cognitive dysfunction: 以下POCD)が問題となっている。POCDは、高齢者での侵襲の大きな手術後に高い割合で発症することから、加齢に伴う変化に加えて、周術期の循環動態の変動と炎症性サイトカインの増加、および麻酔薬や高濃度酸素の曝露などが関与すると考えられている。メタ解析の結果、炎症反応の指標であるC反応蛋白とIL-6がPOCDの発症と関連することが示されており¹⁾、炎症性サイトカインをコントロールすることがPOCDの対策になることが期待されている。しかし現在のところ、抗炎症作用を有するとして期待されたデクスメトミジンを始め、POCDをコントロールための特異的な方法はない²⁻⁴⁾。

2．研究の目的

オピオイドは中枢神経に作用し、がん性疼痛や手術中の侵害刺激に対して広く用いられているが、その作用は、主に μ (μ) オピオイド受容体(MOR)を介している。MORは鎮痛の他に、副作用として、呼吸抑制やオピオイドへの依存、さらに近年はオピオイドの使用後の痛覚過敏がもたらされることが知られている。研究代表者は、超短時間作用性のオピオイドであるレミフェンタニルが、中枢神経系(central nervous system, CNS)のcAMPを抑制することによって、IL-6の発現をコントロールするという機序を発表したが⁶⁾、動物実験では(δ)オピオイド受容体(DOR)⁵⁾を介した脳虚血に対する保護作用が報告されている。このことから、レミフェンタニルの抗炎症作用はMORよりもむしろ、DORを介する可能性があり、レミフェンタニルはグリア細胞のDORに作用して炎症性サイトカインをコントロールし、脳保護およびPOCDに対する効果を有する可能性があると考えられる。そこで本研究では、われわれの研究を発展させ、選択的DORアゴニストのCNSにおける保護効果と作用機序について解明することを目的とした。

3．研究の方法

1)マウスを用いた周術期脳虚血モデル：ICRマウスに対して左総頸動脈を露出した後、絹糸で結紮し、それとともに100 mcg/kgの少量のlipopolysaccharide(LPS)を腹腔内へ投与し

た。6時間後に左総頸動脈を露出させ結紮を解除した。3日後にイソフルラン吸入麻酔下に灌流固定を行い、取り出した脳をパラフィン固定し、切片を作成したのち、TUNEL染色した。

2)マウス海馬 primary culture によるモデル：海馬 primary culture に対して、低酸素環境と非低酸素環境でリコンビナント TNF alpha を作用させ、TNF alpha 受容体および DNA 断片化に対する免疫染色を行なった。

3)マウスミクログリア由来の MG6 によるモデル：MG6 に対して LPS を作用させた炎症反応モデルに対して、オピオイド 受容体特異的作動薬である SNC80 を作用させ、培地の IL-6 濃度を指標にして抗炎症効果を調べた。またそれに対して、オピオイド 受容体の特異的拮抗薬である Naltrindole と BD1008 を使って受容体の性質を調べた。また、細胞内シグナル伝達における MAPKK の MEK 阻害薬である PD58059 および PI3K 阻害薬である Wortmannin の効果を調べた。

4)ラットアストログリア由来の C6 によるモデル：C6 に対して嫌気環境下で LPS を作用させて炎症反応を惹起し、それに対するオピオイド 受容体作動薬の SNC-80 およびオピオイド 受容体の拮抗薬である Naltrindole の効果をリアルタイム PCR により調べた。

4. 研究成果

マウス脳虚血モデルの TUNEL 染色の結果、海馬歯状回において DNA 断片化が認められた。

以前同様のモデルで海馬に発現する IL-6 mRNA レベルを調べたところ、少量の LPS により虚血再灌流による IL-6 mRNA の発現が増強されたことから、今回の DNA 断片化も少量の LPS により増強されたと考えられた。

低酸素環境を6時間維持したところ、海馬ニューロンの生存を維持することができず、TNF 受容体および DNA 断片化についての結果を得ることができなかった。しかし、非低酸素環境下ではリコンビナント TNF alpha により TNF alpha 受容体に対する強いシグナルが認められた。このことから海馬ニューロンは TNF alpha によって TNF 受容体の発現が強まり、その後の細胞内シグナル伝達が促されることが考えられた。このことは前述のマウスを用いた実験で示唆された海馬神経細胞のアポトーシスが惹起された機序を示唆するものであると思われた。すなわち、炎症反応が海馬で惹起されることにより、海馬ニューロン膜上の TNF 受容体が活性化され、それから始まるシグナル伝達を介してアポトーシスが惹起されると

考えられた。

MG6 では 受容体作動薬である SNC80 が濃度依存的に LPS に対する IL-6 の分泌を抑制した。SNC80 の作用がオピオイド 受容体に特異的であることを確認するために、オピオイド 受容体特異的拮抗薬 である Naltrindole と BD1008 を用いて、SNC80 の作用を検証したところ、Naltrindole は濃度依存的に SNC80 の効果を増強した。BD1008 も Naltrindole と同様に濃度依存的に SNC80 の効果を増強する傾向を示した。次に、SNC80 の作用と細胞内シグナル伝達との関係を調べるために、MAPKK の MEK の阻害役である PD58059 およびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬である Wortmannin を作用させた。その結果、PD58059 は LPS による炎症反応と、SNC80 の抗炎症効果に対する作用は認めなかった。Wortmannin は LPS による炎症反応に対しては抑制的な効果を認めたが、SNC80 の抗炎症効果に対する作用は認めなかった。本研究から、中枢神経系においてオピオイド 受容体のアゴニストとアンタゴニストにいずれにおいても、抗炎症作用が示され、しかもその作用は互いに増強することが示唆された。シグナル伝達に関しては本研究において明らかな傾向は認められなかった。C6 では嫌気環境では好気環境に比べて、各種サイトカイン mRNA レベルが上昇することがわかった。LPS は非常に微量であったため LPS によるサイトカイン mRNA レベルの上昇は軽微であったが、嫌気環境と LPS の組み合わせにより、炎症反応が増強される傾向が認められた。オピオイド 受容体の作動薬である SNC-80 および拮抗薬である Naltrindole はいずれも各種サイトカイン mRNA レベルを上昇させた。

以上の結果から、周術期脳虚血モデルは動物と各種培養細胞で作ることが可能で、それぞれで炎症反応の増強とアポトーシスを認めた。それに対して オピオイド受容体は抗炎症作用を示す傾向が強いが、細胞によっては炎症反応を増強することもわかった。これらの機序は不明であるが、オピオイド受容体の炎症増強および抗炎症作用はいずれにしても直接的なものではなく、間接的な経路を解する可能性があると思われた。そして臨床的には単にオピオイド受容体を活性化または抑制することにより、炎症をコントロールできるという可能性は高くないように思われた。

参考文献

1. Liu X, Yu Y, Zhu S. PLoS One. 2018;13(4):e0195659.
2. Carr ZJ, Cios TJ, Potter KF, Swick JT. A Brief Review of the Recent Literature. 2018.
3. Wu M, Liang Y, Dai Z, Wang S. J Clin Anesth. 2018;50:33-42.

4. Evered LA, Silbert BS. *Anesth Analg.* 2018;127(2):496-505.
5. Sheng S, Huang J, Ren Y, et al. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(1):302-315.
6. Maeda S, Andoh T, Onishi R, et al. *J Anesth.* 2018;32(5):731-739.
7. Maeda S, *Neuroscience 2017*, Washington DC, USA, Nov 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujimoto Maki, Higuchi Hitoshi, Honda-Wakasugi Yuka, Miyake Saki, Nishioka Yukiko, Yabuki-Kawase Akiko, Maeda Shigeru, Miyawaki Takuya	4. 巻 892
2. 論文標題 Dexmedetomidine inhibits LPS-induced inflammatory responses through peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) activation following binding to 2 adrenoceptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173733 ~ 173733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173733	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 Maeda Shigeru, Higuchi Hitoshi, Fujimoto Maki, Miyake Saki, Honda-Wakasugi Yuka, Miyawaki Takuya	4. 巻 67
2. 論文標題 Assessing the Effectiveness of Combined Analgesics for Bilateral Ramus Osteotomies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 140 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-67-01-05	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 Hayashi Reina, Maeda Shigeru, Hideki Taninishi, Higuchi Hitoshi, Miyawaki Takuya	4. 巻 67
2. 論文標題 Pulmonary Aspiration During Induction of General Anesthesia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 214 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-67-02-03	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 Ito Takaya, Utsumi Nozomi, Baba Yukiko, Matsumura Tomoka, Wakita Ryo, Maeda Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Considerations for Satisfactory Sedation during Dental Implant Surgery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 461 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm13030461	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S Maeda, S Miyake, M Fujimoto, Y Nishioka, H Hitoshi, T Miyawaki
2. 発表標題 Delta opioid receptor ligand suppresses increase in IL-6 in cultured microglia
3. 学会等名 IADR (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本磨希, 若杉優花, 三宅沙紀, 樋口 仁, 前田 茂, 宮脇卓也
2. 発表標題 デクスメドミジンはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) 活性を介してLPS誘発性炎症反応を抑制する
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会総会
4. 発表年 2020年

〔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	樋口 仁 (Higuchi Hitoshi) (30423320)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	

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
---------	---------