

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591843

研究課題名(和文) Dセリンとモルヒネ鎮痛耐性形成との関連に関する研究

研究課題名(英文) Study for interaction between D-serine synthesis and development of morphine tolerance

研究代表者

伊藤 健二 (ITO KENJI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10317779

研究成果の概要(和文)：モルヒネ慢性投与によりラット脳内においてDセリン合成酵素のセリンラセマーゼ(Srr) mRNA 量およびタンパク質量が増加すること、前脳部(大脳皮質、線状体、海馬)においてDセリン量が増加すること、Srr が神経細胞で主に発現していることを明らかにした。また、Dセリンを脳室内投与すると鎮痛効果が現れ、この鎮痛効果はミダゾラムで拮抗された。これらの結果より、モルヒネの鎮痛耐性が形成される際に N-メチル-L-アスパラギン酸(NMDA)受容体が活性化される機序として、Dセリン量の増加が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Repeated administration of morphine for 30 days produced a significant augmentations of both the mRNA and protein expressions of serine racemase in all the brain regions, and caused a slight but significant elevation in the elevated D-serine level in the cortex, striatum and hippocampus. The antinociception induced by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of D-serine was attenuated by i.c.v. administration of midazolam. These results indicate the elevated D-serine level following the chronic morphine treatment could at least in part be involved in the activation of NMDA receptors via the glycine site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類脳内に N-メチル-L-アスパラギン酸(NMDA)受容体グリシン結合部位の内在水性リガンドである遊離型Dセリンはセリンラセマーゼ(Srr)により生成され、Dアミノ酸酸化酵素(DAO)によりピルビン酸に分解される。

(2) 脳内の下行性疼痛抑制経路においてNMDA受容体を介してオピオイド受容体が刺激され、鎮痛効果が現れる経路が示唆されている。

(3) モルヒネの報酬効果およびナロキソン誘発退薬症候がNMDA受容体グリシン結合部位アンタゴニストにより減弱される

## 2. 研究の目的

モルヒネを慢性投与し鎮痛に対する耐性が形成されたラット脳内においてDセリン量、Dセリン関連タンパク質量、およびそれらの

遺伝子発現変化について解析し、Dセリン代謝とモルヒネ依存・耐性形成あるいは退薬症候との関連を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

モルヒネ(10mg/kg)を慢性投与し鎮痛効果に耐性形成が確認されたラットなどの脳を7部位(線状体、海馬、大脳皮質、間脳、中脳、小脳、橋・延髄)に分けた後、以下の実験に供試した。なお、鎮痛効果は tail Flick response 法により計測した。

(1)Srr および DAO(D-amino acid oxidase) mRNA 量の定量：定量的リアルタイム PCR 法

(2) Srr および DAO タンパク質量の定量：Western Blot 法

(3) Dセリン量の定量：HPLC 法

### 4. 研究成果

(1)耐性形成 モルヒネ(10mg/kg)を 30 日間投与し耐性が形成されたことを確認した。

(2)Srr & DAO mRNA 量の変化

モルヒネ慢性投与により Srr mRNA 発現量は全ての脳部位で、DAO は前脳部(線状体、海馬、大脳皮質)において有意に増加した。

(3)Srr & DAO タンパク質量の変化

モルヒネ慢性投与により Srr タンパク質量は全ての脳部位で有意に増加した。一方 DAO は有意な変化が観察されなかった。

(4) Dセリン量の変化

モルヒネ慢性投与により前脳部(線状体、海馬、大脳皮質)において有意に増加した。

(5)Srr 発現細胞

これまで Dセリンおよび Dセリン合成酵素 Srr は2型アストロサイトで発現されるとの報告があるが、神経細胞で発現していることが明らかとなった。

(6)Dセリン鎮痛効果

脳室内投与した Dセリンによる鎮痛効果がミダゾラムにより拮抗された。

以上の結果から、モルヒネ慢性投与は関連タンパク質(Srr, DAO)遺伝子発現の変化を伴い前脳部の Dセリン量を増加することが明らかとなった。

### 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9件)

1. hiba S, Nishiyama T, Yoshikawa M, Yamada Y. The antinociceptive effects of midazolam on three different types of nociception in mice. J Pharmacol Sci; 109(1): 71-77, 2009. 査読有り
2. Chiba S, Hayashida M, Yoshikawa M, Shu H, Nishiyama T, Yamada Y. Inhibitory effect of low-dose pentazocine on the development of antinociceptive tolerance to morphine. J Anesthesia; 23(1): 99-107, 2009. 査読有り
3. Takayasu N, Yoshikawa M, Watanabe M, Tsukamoto H, Suzuki T, Kobayashi H, Noda S. The serine racemase mRNA is expressed in both neurons and glial cells of rat retina. Arch Histol Cytol; 71(2): 123-129, 2008. 査読有り
4. Yoshikawa M, Shinomiya T, Takayasu N, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Oka T, Hashimoto A. Long-term treatment with morphine increases the D-serine content in the rat brain by regulating the mRNA and protein expressions of serine racemase and D-amino acid oxidase. J Pharmacol Sci; 107(3): 270-276, 2008. 査読有り
5. Hashimoto A, Konno R, Yano H, Yoshikawa M, Tamaki R, Matsumoto H, Kobayashi H. Mice lacking D-amino acid oxidase activity exhibit marked reduction of methamphetamine -induced stereotypy. Eur J Pharmacol; 856(1-3): 221-225, 2008. 査読有り
6. Ito K, Yoshikawa M, Maeda M, Jin XL,

- Takahashi S, Matsuda M, Tamaki R, Kobayashi H, Suzuki T, Hashimoto A. Midazolam attenuates the antinociception induced by D-serine or morphine at the supraspinal level in rats. *Eur J Pharmacol*; 856(1-3): 139-144, 2008. 査読有り
7. Tamaki R, Yoshikawa M, Shinomiya T, Hashimoto A, Kawaguchi M, Bryne WD, Kobayashi H. Acute administration of methamphetamine decreases the mRNA expression of diazepam binding inhibitor in rat brain. *Tokai J Exp Clin Med*; 33(1): 51-56, 2008. 査読有り
8. Tamaki R, Yoshikawa M, Shinomiya T, Andoh H, Kawaguchi M, Hashimoto A, Bryne WD, Kobayashi H. Chronic administration of methamphetamine increases the mRNA expression of diazepam binding inhibitor in rat brain. *Tokai J Exp Clin Med*; 33(1): 46-50, 2008. 査読有り
9. Akahori K, Kosaka K, Jin XL, Arai Y, Yoshikawa M, Kobayashi H, Oka T. Great increase in antinociceptive potency of [Leu5]enkephalin after peptidase inhibition. *J Pharmacol Sci*; 106(2): 295 - 300, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. 渡邊真理子, 吉川正信, 竹山和秀, 村田智彦, 金幸祿, 小林智美, 橋本篤司, 小林広幸, 鈴木利保. ケタミン長期投与によるDセリン代謝関連酵素遺伝子発現の変化. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月16日
2. 野田節子, 高安直子, 渡邊真理子, 吉川正信. セリンラセマーゼ遺伝子のラット眼組

織における発現について. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2009年3月28日

3. 前田美保, 松田光正, 鈴木利保, 吉川正信, 橋本篤司. ラット脳室内および髄腔内投与によるL-702,324の鎮痛効果に対する作用. 日本ペインクリニック学会第42回大会. 2008年7月18日
4. 松田光正, 吉川正信, 前田美保, 伊藤健二, 鈴木利保. ホルマリンテストでのD-serineの鎮痛効果. 日本麻酔科学会第55回学術集会. 2008年6月14日
5. 玉記雷太, 吉川正信, 四宮敬史, 橋本篤司, 川口充, 小林広幸. メタンフェタミン投与によるジアゼパムバインディングインヒビター遺伝子発現の変化. 第118回日本薬理学会関東部会. 2008年6月7日
6. 野田節子, 高安直子, 佐藤 雄一, 橋本篤司, 小林広幸, 吉川正信. セリンラセマーゼ遺伝子のラット脳神経細胞における発現について. 第113回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2008年3月27日
7. M.Yoshikawa, A.Hashimoto, H.Kobayashi. Long-term treatment with morphine increases the D-serine content in the rat brain by regulating the mRNA and protein expressions of serine racemase and D-amino acid oxidase. *Neuroscience* 2008. 2008年11月17日
8. 吉川正信, 四宮敬史, 小林智美, 赤堀一仁, 橋本篤司, 小林広幸, 川口充. 第81回日本薬理学会年会. 2008年3月17日
9. 吉川正信, 高安直子, 野田節子, 佐藤雄一, 小林広幸, 橋本篤司. セリンラセマーゼmRNAは主に神経細胞において発現する. 第50回神経化学学会大会. 2007年9月10日
- [図書] (計 0 件)  
[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 健二 (ITO KENJI)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：10317779

(2) 研究分担者

吉川 正信 (YOSHIKAWA MASANOBU)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：90276791

(3) 連携研究者

なし