

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08931

研究課題名(和文) モルヒネ誘発性疼痛におけるNMDA受容体活性調節因子Dセリンの作用

研究課題名(英文) Effect of D-serine, a modulator of NMDA receptor activity, on 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：モルヒネ誘発性疼痛に伴う脊髄内オピオイドペプチド量の変化を明らかにするため、膜長3mmの直針型マイクロダイアリシスプローブA1-8-03(再生セルロース膜3mm、MWCO=50,000Da)をラット脊髄後角に挿入し、シナプス中のメチオニンエンケファリンを検出した。しかしロイシンエンケファリンは検出限界以下であった(1nM未満)。ホルマリン疼痛刺激後のDセリンは第1相(0-5min)において変化が観察されなかったが、刺激後30-50min第2相Lグルタミン酸が漸減する時期に漸増し、50min以降は刺激前と比べて有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モルヒネ慢性投与、高濃度投与が脳脊髄液中のグルタミン酸遊離量を増加させることはよく知られているが、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セリンが関与する可能性、Dセリンにより唾液腺よりシアロルフィンを遊離する可能性が示唆された。本研究によりモルヒネ誘発性疼痛がDセリンを介した機序が今後より検証出来れば、Dセリン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)：To clarify changes in the amount of opioid peptides in the spinal cord associated with morphine-induced pain, a straight-needle microdialysis probe A1-8-03 (regenerated cellulose membrane 3 mm in length, MWCO=50,000 Da) was inserted into the dorsal horn of rat spinal cord to detect methionine-enkephalin in the synapses. The results are shown in Table 1. However, leucine enkephalin was below the detection limit (<1 nM). After formalin pain stimulation, no change in D-serine was observed during phase 1 (0-5 min), but it gradually increased 30-50 min after stimulation during phase 2 when L-glutamate gradually decreased, and significantly increased after 50 min compared to pre-stimulation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：モルヒネ誘発性疼痛 Dセリン 脊髄 オピオイドペプチド シアロルフィン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疼痛患者に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)。また、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。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。一方、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 A (Dyn)濃度が増加することが知られている。Dyn は 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。Dyn はシステインプロテアーゼの Dyn 変換酵素(DCE)とペプチダーゼによって代謝される。Dyn 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 Dyn 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を申請者は明らかにした。また、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。

2. 研究の目的

モルヒネ誘発性疼痛への NMDA 受容体の関与が知られているが、どのようなメカニズムで NMDA が活性化するかについては明らかにされていない。生体を構成するアミノ酸は L 体であり、哺乳類において D 体はほとんど存在しない、と長年考えられてきた。しかし、ヒトを含む哺乳類において種々の遊離 D 体アミノ酸が存在し、多様な生理機能を有していることが明らかとなってきた。遊離 D 体セリン(以下 D セリン)は哺乳類脳内に大量に存在し、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体である NMDA 受容体のコアゴニスト(co-agonist)として作用する。すなわち、D セリンはグルタミン酸による NMDA 受容体の活性化を増強する。申請者が所属するグループは、1) D セリンの脊髄内投与により疼痛を増強すること、2) D セリンの脳内投与により鎮痛効果が用量依存的に現れ、モルヒネの鎮痛効果を増強すること、3) モルヒネ急性投与およびモルヒネ慢性投与が脳内 D セリン量を増加することなど、D セリンが痛覚情報伝達を制御することを初めて明らかにし当該領域をリードしている。

本研究ではモルヒネ誘発性疼痛発症時の脊髄内 NMDA 受容体活性化と D セリンとの関連性を明らかにすることを目的として、モデル動物を用いて、疼痛刺激後の脊髄内興奮性アミノ酸 L グルタミン酸量、D セリン量の経時的解析(神経化学的解析)を行う。

また、モルヒネ誘発性疼痛に伴う脊髄内オピオイドペプチド量の変化を明らかにするため、in vivo 脊髄マイクロダイアリシスにより脊髄後角シナプス中のエンケファリン類(メチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリン)の検出法の開発を世界に先駆けて行うことを目的とした。

さらに、モルヒネの約 3-6 倍の鎮痛効果を有するシアロルフィンがラット唾液腺より分泌され、ペプチド分解酵素阻害活性により内因性オピオイドペプチドの分解を阻害すること、ならびにシアロルフィンがミューオピオイド受容体のアロステリックモジュレーターとして機能して鎮痛効果を示すことを申請者は明らかにした。本研究では、神経障害性疼痛、唾液腺内交感神経活動、シアロルフィン代謝の関連性を明らかにするため、唾液腺組織中の D-アミノ酸量について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)疼痛実験

ラット後肢足蹠に 5%ホルマリン溶液を皮下注入し、後肢を振り回す (flinching) 回数を測定した。

(2) 脊髄後角におけるアミノ酸濃度の測定

後肢への Freund's Complete Adjuvant 投与により作成した疼痛モデルラットの脊髄後角 I, II 層に膜長 1 mm の直針型マイクロダイアリシスプローブを挿入した。プローブを介しリンゲル液を流速 1 μ l/min にて 120min 灌流し 5 分間隔で 30 分間灌流液(5 μ l)を分取した(6 画分: baseline)。痛覚刺激の摂動として 5%ホルマリン溶液を Freund's Complete Adjuvant 投与した同側後肢に皮下注入する。刺激後 135 分間、5 分間隔で灌流液(5 μ l)をフラクションコレクター(EFC-82, エイコム社)にて分取した。分取した還流液に o-phthaldialdehyde および N-acetyl-L-cysteine を加えアミノ酸をオートサンプリングインジェクター(M-510M, エイコム社)にてキラル蛍光誘導体化した。ODS カラム(E X-3ODS, エイコム社)を用いて D,L-アミノ酸を分離し、530 nm の蛍光発光 (励起波長 470 nm)したアミノ酸を蛍光検出器(FP-4020, 日本分光)にて測定した。baseline 値(刺激直前)を 100%とし、疼痛刺激による D セリン、L グルタミン酸量の変動を解析した。

(3)D-アミノ酸一斉分析

Micro Smash (MS-100R, TOMY Seiko Co., Tokyo, Japan)を用い、4°Cの水中(組織湿重量の 20 倍量)で 3500 rpm、2 分間ホモジナイズした。ホモジネートを 12,000 \times g で 10 分間遠心した。50 μ l

の上清に合計 200 μ L のメタノールを加え、12,000 \times g で 10 分間遠心した。50 μ L の上清を 40 $^{\circ}$ C で減圧下、蒸発乾固した。20 μ L の 200 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) と 5 μ L の乾燥アセトニトリル中の 40 mM NBD-F を残渣に加え、60 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した。誘導体化反応を終了させるため、水中 2% (v/v) トリフルオロ酢酸 75 μ L を加えた。その後、2 μ L の反応混合物を 2D-HPLC システム (NANOSPACE SI-2 series, Shiseido, Tokyo, Japan) に注入した。

(4) D-アミノ酸代謝関連酵素発現量解析

セリンラセマーゼ (GenBank accession number NM_198757.2)、D-アミノ酸酸化酵素 (GenBank accession number NM_053626.1)、D-アスパラギン酸酸化酵素 (GenBank accession number NM_001109465.2)、NMDA 受容体 NR1 サブユニット (GenBank accession number NM_017010.2)、NR2A サブユニット (GenBank accession number NM_012573.3)、NR2B サブユニット (GenBank accession number NM_012574.1)、NR2C サブユニット (GenBank accession number NM_012575.3)、NR2D サブユニット (GenBank accession number NM_022797.2) の遺伝子発現は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (GenBank accession number NM_017008) 遺伝子を内部対照として、リアルタイム PCR 法により定量分析した。また、セリンラセマーゼ (anti-Srr antibody; 1:50 dilution, ab182217, Abcam, Cambridge, UK)、D-アミノ酸酸化酵素 (anti-DAO antibody; 1:50 dilution, sc-398757, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、D-アスパラギン酸酸化酵素 (anti-DDO antibody; 1:50 dilution, 13682-AP-1, Proteintech, Rosemont, IL, USA)、NMDA 受容体 NR1 サブユニット (anti-NR1 antibody; 1:50 dilution, sc-518053, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、NR2A サブユニット (anti-NR2A antibody; 1:50 dilution, sc-515148, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、NR2B サブユニット (anti-NR2B antibody; 1:50 dilution, sc-365597, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、NR2C サブユニット (anti-NR2C antibody; 1:50 dilution, 600-401-D94, Rockland, Limerick, PA, USA)、NR2D サブユニット (anti-NR2D antibody; 1:50 dilution, sc-17822, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) のタンパク質発現は、GAPDH (anti-GAPDH antibody; 1:300 dilution, G9545, Sigma, St. Louis, MO, USA) を内部対照として、Capillary Electrophoresis-Based Immunodetection Assay (Simple Western) 法により定量分析した。

(5) 脊髄後角におけるエンケファリン濃度の測定

膜長 3mm の直針型マイクロダイアリシスプローブ AI-8-03 (再生セルロース膜 3mm、MWCO=50,000Da) および PEP-8-03 (ポリエチレン膜 3mm、MWCO=1,000,000Da) のメチオンエンケファリン、ロイシンエンケファリンの回収率を外液濃度 1 μ M ストック溶液 (メチオンエンケファリン、ロイシンエンケファリン混合液) を用いて灌流流速を 1 μ L/min、外液温度 37 $^{\circ}$ C でプレカラム (PC-04-AC)、分離カラム (HS-3ODS)、ダイヤモンド電極 (WE-DM)、電気化学検出器 (ECD-700) を用いて測定した。なお、印加電圧 +1300mV、時定数 1.3msec、移動相 (20mM リン酸バッファ pH3.2:アセトニトリル=82:18)、流速 120 μ L/min とした。ラットの脊髄後角 I, II 層に膜長 1mm の直針型マイクロダイアリシスプローブ (AI-8-03) を挿入した。プローブを介しリンゲル液を流速 1 μ L/min にて 120min 灌流し 15 分間隔で 60 分間灌流液 (5 μ L) を分取した (4 画分: baseline)。

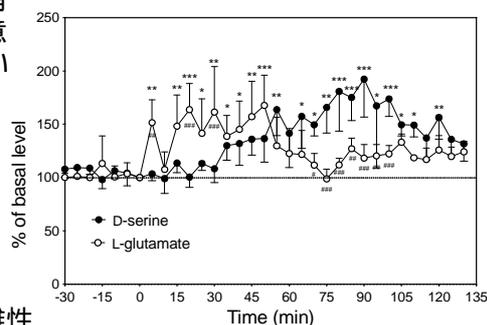
4. 研究成果

(1) 疼痛実験

ホルマリン投与後 5 分目まで後肢を振り回す (flinching) 行動が見られるが、その後一時的に消失した。投与後 15 分目以降に再度その後 flinching 行動が少なくとも 120 分目まで観察された (2 相性)。それぞれ、ホルマリンによる化学的刺激と炎症により生じることが知られている。

(2) 疼痛刺激時における脊髄後角における D セリン、L グルタミン酸濃度の変化

ホルマリン投与後の第 1 相 (0-5min) において脊髄後角の細胞間隙中の L グルタミン酸は刺激前と比べて有意に増加した。一方、刺激後 10-50min の第 2 相初期において、L グルタミン酸は刺激前と比べて有意に増加したが、50min 以降は漸減し 75min は刺激前と同程度となった。一方、D セリンは第 1 相 (0-5min) において変化が観察されなかったが、刺激後 30-50min 第 2 相 L グルタミン酸が漸減する時期に漸増し、50min 以降は刺激前と比べて有意に増加した (右図)。



(3) ラット唾液腺の D-アミノ酸分析

2D-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、舌下腺に高濃度の D-アスパラギン酸をはじめとして D-セリン、D-アラニンが存在することを明らかにした。D-アスパラギン酸、D-セリン、D-アラニンはいずれも NMDA 受容体の内因性リガンドである。D-アスパラギン酸は膵臓でペプチド分泌に関与することが知られていることから、顎下腺よりシアロルフィンが分泌される際にこれら D-アミノ酸が関与することが示唆された。

(4) ラット唾液腺の D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子発現量

耳下腺 (PG)、顎下腺 (SMG)、舌下腺 (SLG) におけるセリンラセマーゼ mRNA のレベルは、大脳皮質および小脳で観察されたレベルのそれぞれ約 400%、180%、120% であった。耳下腺 (PG)、

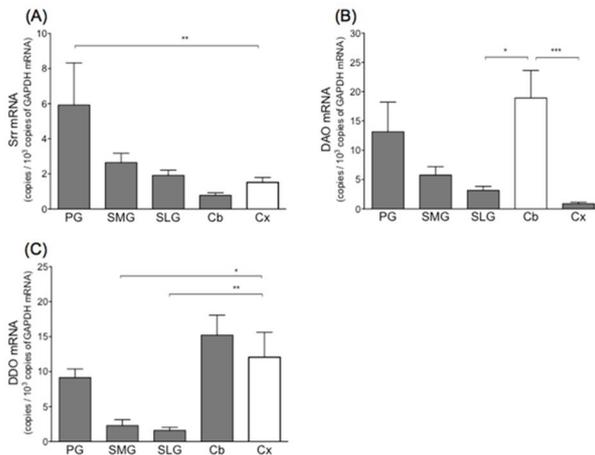
顎下腺(SMG)、舌下腺(SLG)における D-アミノ酸化酵素 mRNA のレベルは、小脳で観察されたレベルのそれぞれ約 70%、30%、15%であった。耳下腺(PG)、顎下腺(SMG)、舌下腺(SLG)における D-アスパラギン酸化酵素 mRNA のレベルは、大脳皮質で観察されたレベルのそれぞれ約 75%、20%、15%であった(右図)。

(5) プローブ(FX, PEP)によるエンケファリン回収率

メチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリンの AI-8-03、PEP-8-03 は右表の結果となった。PEP プローブの方がメチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリンいずれも高い回収率となったが、カットオフ 1,000,000Da のためエンケファリン以外のペプチドが回収されるため狭雑物が多くメチオニンエンケファリン、ロイシンエンケファリンの測定には不適であった。

(6) 脊髄後角におけるエンケファリン濃度の測定

エンケファリン類は3種のペプチド分解酵素によりほぼ完全に分解される。脊髄後角におけるエンケファリン濃度の測定にあたり、ペプチド分解酵素阻害剤ホスホラミドン(10mM)を含むリンゲル液にて灌流し、脊髄後角におけるエンケファリン類を測定した。その結果、メチオニンエンケファリンは検出できたが、ロイシンエンケファリンは検出限界以下(1nM 未満)であった。



● AI-8-03

AI(FX)	Met-Enk		Leu-Enk	
	Area(mV·s)	回収率	Area(mV·s)	回収率
平均回収率		8.9%		8.7%

● PEP-8-03

PEP	Met-Enk		Leu-Enk	
	Area(mV·s)	回収率	Area(mV·s)	回収率
平均回収率		18.2%		20.2%

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 2件）

1. 著者名 Yoshikawa M, Kan T, Shirose K, Watanabe M, Matsuda M, Ito K, Kawaguchi M	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 390-405
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 Yoshikawa M, Okubo M, Shirose K, Kan T, Kawaguchi M	4. 巻 12
2. 論文標題 D-Serine Increases Release of Acetylcholine in Rat Submandibular Glands	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1227-1239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology12091227	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 0件）

1. 発表者名 白勢康介 姜卓義 渡邊真理子 松田光正 伊藤健二 鈴木武志 小林広幸 吉川正信
2. 発表標題 イミプラミンは唾液腺内ノルエピネフリン、セロトニン遊離量を増加する 唾液腺マイクロダイアリシス法を用いた検討
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉川正信 大久保みぎわ 川口充
2. 発表標題 D-セリンはラット顎下腺間質液中に遊離されるアセチルコリン量を増加する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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	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
---------	---------