

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K08955

研究課題名(和文) 新しい内因性ペプチド、シアロルフィンの疼痛制御における役割

研究課題名(英文) Role of a new endogenous peptide, sialorphin, in pain control

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛を示す疾患には交感神経活動が関与していることが知られている。本研究では、慢性疼痛、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ことを目的とし、ラット唾液腺のD-アミノ酸分析により雄性ラット耳下腺、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、それ以外のD-アミノ酸は検出されないことを明らかにした。セリンラセマーゼ、D-アミノ酸酸化酵素、D-アスパラギン酸酸化酵素、NMDA受容体サブユニットNR1, NR2Dが耳下腺、顎下腺、舌下腺において発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト、ラット唾液腺よりモルヒネの約3-6倍の鎮痛効果を有するオピオルフィン、シアロルフィンがそれぞれ発見された。慢性疼痛時に髄液中のオピオイドペプチド量が有意に減少することが報告されている。また、慢性疼痛を示す疾患には交感神経活動が関与していることが知られている。本研究により疼痛刺激による唾液腺内交感神経活動が活性化することでD-アミノ酸代謝が亢進し、シアロルフィンが顎下腺より遊離される可能性を示唆する結果が得られた。本研究により、シアロルフィンなどの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を利用した新たな鎮痛法の開発に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is known that sympathetic nerve activity is involved in diseases that exhibit chronic pain. In this study, we aimed to clarify the relationship between chronic pain, sympathetic nerve activity in the salivary glands, and sialorphin metabolism. D-amino acid analysis of rat salivary glands revealed the presence of high concentrations of D-aspartic acid, D-serine, and D-alanine in the parotid, submandibular, and sublingual glands of male rats, while other D-amino acids were not detected. Serine racemase, D-amino acid oxidase, D-aspartate oxidase, and NMDA receptor subunits NR1 and NR2D were found to be expressed in the parotid, submandibular and sublingual glands.

研究分野：麻酔科学

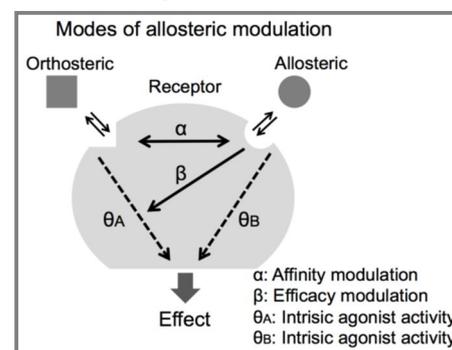
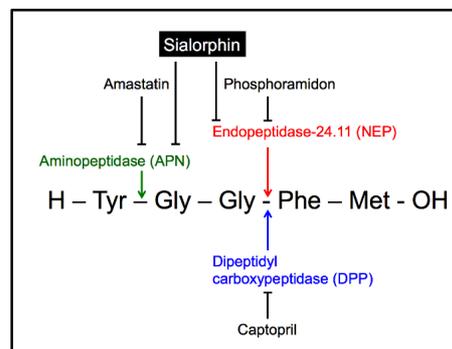
キーワード：シアロルフィン 唾液腺 Dアミノ酸代謝 疼痛 交感神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト、ラット唾液腺よりモルヒネの約3-6倍の鎮痛効果を有するオピオイド、シアロルフィンがそれぞれ発見された。endopeptidase-24,11(NEP), aminopeptidase (APN), dipeptidylcarboxypeptidase (DPP)の主に3種のペプチド分解酵素によって内在性オピオイドペプチドは加水分解される(右上図)。オピオイド、シアロルフィンはオピオイドペプチドの分解酵素を阻害する作用により鎮痛効果を示すと考えられてきた。申請者らは、*in vitro* (マウス輸精管摘出標本の電気刺激誘発性収縮試験)および *in vivo* (髄腔内投与による鎮痛効果)などにおいて、シアロルフィンがオピオイドペプチド分解酵素阻害活性以外に、 $\mu$  オピオイド受容体オルソステリックリガンドの Efficacy を増強するポジティブアロステリックモジュレーターであることを明らかにした。古典的なリガンドが結合するオルソステリック部位と異なる結合部位はアロステリック部位と呼ばれる。アロステリック部位に結合するアロステリックモジュレーターは、オルソステリックリガンドの結合やシグナル伝達を増強、減弱、無変化のそれぞれの作用を発揮する分子である(右下図)。

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は興奮性シナプス伝達の中心的な役割を担い、脊髄後角表層に高濃度に存在し、一次知覚神経から放出されるグルタミン酸の受容体として疼痛伝達に関与していることも明らかとなっている。申請者らは D-セリンが NMDA 受容体の活性調節因子として重要な働きを持つことを明らかにしてきた。



### 2. 研究の目的

このような二重機能をもつシアロルフィンは内因性オピオイドペプチドを介する疼痛抑制系の調節因子となっていると考えられる。慢性疼痛時に髄液中のオピオイドペプチド量が有意に減少することが報告されている。また、慢性疼痛を示す疾患には交感神経活動が関与していることが知られている。本研究では、慢性疼痛、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ことを目的とする。また、慢性疼痛時において脊髄後角と同様に唾液腺内の NMDA 受容体活性が変化するのではないかと仮説を立て、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) D-アミノ酸分析

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×gで10分間遠心した。50  $\mu$ Lの上清に合計200  $\mu$ Lのメタノールを加え、12,000×gで10分間遠心した。50  $\mu$ Lの上清を40°Cで減圧下、蒸発乾固した。20  $\mu$ Lの200 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)と5  $\mu$ Lの乾燥アセトニトリル中の40 mM NBD-Fを残渣に加え、60°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  $\mu$ Lを加えた。その後、2  $\mu$ 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。

#### (2) 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。

### (3) *in vivo* 唾液腺マイクロダイアリシス

これまでの研究で、ラットおよびマウスの唾液腺から得られたホモジネート中のモノアミンなどの神経伝達物質含量が示されている。しかし、ホモジネート中のモノアミンは、細胞内に貯蔵されているものと間質液中に放出されたものの両方を含んでいる。神経伝達物質の作用レベルは、主にその放出量によって決定される。生体内マイクロダイアリシスは、半透膜を通してシナプスで放出される神経伝達物質を集めることができるため、主に神経科学の分野で発展してきた。マイクロダイアリシス分析によって得られる神経伝達物質レベルの変化は、その局所における生理学的・機能的意義を反映していると考えられている。この手法は末梢臓器にも適用できる。唾液腺への *in vivo* マイクロダイアリシスの適用は、透析プローブが植え込まれた唾液腺の限局された領域内の細胞間隙中に遊離される神経伝達物質などの連続的な長期サンプリングが可能であるため、組織ホモジネートを使用する従来の方法よりも利点がある可能性がある。リニア透析プローブ(OP-100-10、エイコム社)を、酸素およびイソフルラン(2%)による吸入麻酔下でラットの顎下腺に植え込んだ。プローブの半透膜領域(10 mm)を長軸方向に沿って左顎下腺に留置した。マイクロインフュージョンポンプにより、2  $\mu$ L/分の速度でプローブにリンゲル液を灌流した。リンゲル液は 147 mM NaCl、2.2 mM CaCl<sub>2</sub>、4.02 mM KCl から成る。神経終末からのモノアミンの放出を誘発するために、マイクロダイアリシスプローブを通常より多量の KCl (147 mM NaCl、2.2 mM CaCl<sub>2</sub>、100 mM KCl) を含むリンゲル液(High K)で 30 分間灌流した。灌流液は、液体スイッチ(SI-60、エイコム社)を用いて、イミプラミン溶液または High K 溶液に切り替え、その後通常のリンゲル液に戻した。

### (4) モノアミン分析

透析液を直接、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器複合機(HTEC-510; エイコム社)により定量分析した。サンプルは逆相カラム( $\phi$ 2.1 mm  $\times$  150 mm; Eicompak SC-5ODS; エイコム社)で分離した。移動相の組成は 0.1 M クエン酸-酢酸緩衝液(pH 3.5)(v/v 83%)とメタノール(v/v 17%)、50mg/L EDTA、180 mg/L、1-デカンスルホン酸ナトリウムである。電位電極は、Ag/AgCl 参照電極とグラッシーカーボンの作用電極に対して+750 mV に設定した。データは PowerChrome ソフトウェア(eDAQ, Denistone Eas 社)を用いて収集・分析した。

## 4. 研究成果

### (1) 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、それ以外の D-アミノ酸は検出されない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。

### (2) ラット唾液腺の D-アミノ酸代謝関連酵素遺伝子発現量

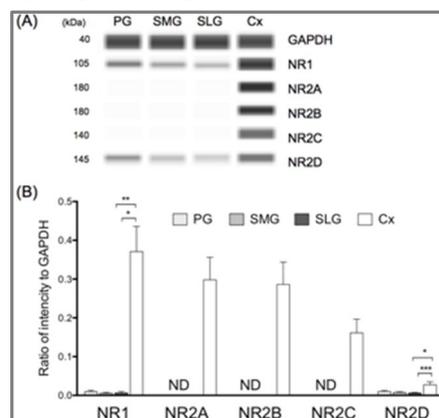
耳下腺、顎下腺、舌下腺におけるセリンラセマーゼ mRNA のレベルは、大脳皮質および小脳で観察されたレベルのそれぞれ約 400%、180%、120%であった。耳下腺、顎下腺、舌下腺における D-アミノ酸酸化酵素 mRNA のレベルは、小脳で観察されたレベルのそれぞれ約 70%、30%、15%であった。耳下腺、顎下腺、舌下腺における D-アスパラギン酸酸化酵素 mRNA のレベルは、大脳皮質で観察されたレベルのそれぞれ約 75%、20%、15%であった。

### (3) ラット唾液腺の D-アミノ酸代謝関連酵素タンパク質発現量

耳下腺、顎下腺、舌下腺におけるセリンラセマーゼのタンパク質発現は、大脳皮質で観察されたもののそれぞれ約 40%、20%、15%であった。耳下腺、顎下腺、舌下腺における D-アミノ酸酸化酵素のタンパク質発現は、小脳で観察された発現のそれぞれ約 30%、15%、20%であった。耳下腺、顎下腺、舌下腺における D-アスパラギン酸酸化酵素のタンパク質発現は、大脳皮質で観察された発現のそれぞれ約 7%、8%、5%であった。大脳皮質または小脳と比較すると、3 大唾液腺すべてにおけるセリンラセマーゼ、D-アミノ酸酸化酵素、D-アスパラギン酸酸化酵素のタンパク質発現量は比較的 low、mRNA の発現レベルとは異なっていた。

### (4) ラット唾液腺の NMDA 受容体サブユニット遺伝子並びにタンパク質発現量

耳下腺、顎下腺、舌下腺における NR1 のタンパク質発現



は、大脳皮質で観察された発現のそれぞれ約 2%、1%、1%であった。耳下腺(PG)、顎下腺(SMG)、舌下腺(SLG)における NR2D mRNA の蛋白発現は、大脳皮質(Cx)で観察された発現のそれぞれ約 40%、30%、20%であった(前ページ図)。NR1 と NR2D のタンパク質発現比は耳下腺、顎下腺、舌下腺でほぼ等しかった(1:1)。

(5)唾液腺細胞間隙中に遊離されるモノアミン量分析

*in vivo* 唾液腺マイクロダイアリシス法を 7 週齢 Wistar 系雄性ラット顎下腺で実施し、以下のことが明らかになった：(1)ノルエピネフリン、セロトニンが検出されたが、ドパミンは検出できなかった、(2)透析液中のノルエピネフリン、セロトニン濃度は、プローブ留置後 120 分間は変動が大きく不安定であったが、その後ほぼ安定したレベルに達した、(3)高カリウムリンゲル液(147 mM NaCl、2.2 mM CaCl<sub>2</sub>、100 mM KCl)による灌流は、透析液中のノルエピネフリン、セロトニン濃度をいずれも有意に上昇させた。以上の結果より、*in vivo* 唾液腺マイクロダイアリシスは唾液腺内の交感神経活動をモニターする手法として有用であることが明らかとなった。

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 1. 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
---------	---------