

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：21K09004

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に伴う脊髄後角ニューロン変調におけるD体セリンの作用

研究課題名(英文) Effects of D-body serine on spinal dorsal horn neuron modulation associated with neuropathic pain

研究代表者

伊藤 健二 (Ito, Kenji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10317779

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)：疼痛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)を実施した。すなわち、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者のグループは生理的な個体レベルではDセリンは神経細胞により生成されるが、生理的狀態から逸脱した場合アストロサイトによりDセリンが生成されることを明らかにした。本研究により疼痛の発症時にはNMDA受容体アゴニストのLグルタミン酸遊離量が増加し、維持期にはDセリン遊離量が増加することが示された。以上の先行研究などから、神経障害性疼痛の維持期における脊髄後角で活性化アストロサイト由来DセリンがNMDA受容体機能を亢進し、脊髄後角ニューロンを過敏化し、アロディニアや痛覚過敏などの病的な疼痛維持メカニズムの一因となっているとの仮説に至離、新規疼痛治療法の開発に寄与できるものと考えられる。

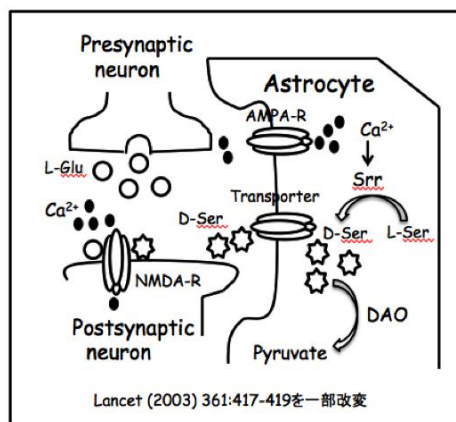
研究成果の概要(英文)：Using an animal model of pain, we conducted an analysis (neurochemical analysis) of the amounts of excitatory amino acids L-glutamic acid and D-serine in the spinal cord after pain stimulation. In the first phase (0-5 min) after formalin administration, L-glutamic acid in the intercellular spaces of the dorsal horn of the spinal cord increased significantly compared to that before stimulation. On the other hand, L-glutamate was significantly increased in the early phase 2 (10-50 min post-stimulation), but decreased gradually after 50 min to the same level as that before stimulation at 75 min. On the other hand, D-serine did not change during phase 1 (0-5 min), but increased significantly during phase 2 (30-50 min post-stimulation) when L-glutamate gradually decreased, and increased significantly after 50 min compared to pre-stimulation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：疼痛 脊髄 興奮性アミノ酸 Dセリン グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

神経組織の障害による神経障害性疼痛では、アロディニアや痛覚過敏などの病的疼痛を呈することがある。この病的な疼痛は患者の QOL を著しく低下させることから、痛み自体が治療の対象となる。神経組織の障害による持続性の侵害刺激により脊髄後角の神経細胞で自発発火の増大、異所性の異常発火が生じ、一次感覚神経の過敏化(末梢神経感作)を引き起こす。この脊髄後角での過敏化には NMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸)受容体拮抗薬により減弱される。すなわち、末梢から強い侵害刺激が脊髄後角神経細胞に入力されると、NMDA 受容体活性亢進を介する過敏化が生じ、この過敏化はアロディニアや痛覚過敏などの発症に関わることが知られている。



2. 研究の目的

末梢からの侵害刺激は、脊髄後角において侵害受容神経線維終末からグルタミン酸、サブスタンス P などの興奮性神経伝達物質を遊離する。末梢から繰り返し侵害刺激の入力があった場合、侵害受容ニューロンの反応性が亢進する現象が見られる。この現象は中枢神経感作と呼ばれ、グルタミン酸受容体の一種である NMDA 受容体の活性化が深く関わっていると考えられている。侵害受容ニューロンの反応性亢進は痛み刺激が無くなくても痛覚過敏状態として残存し、治療に難渋する慢性痛に移行する(難治性慢性疼痛)。慢性疼痛モデルの研究から、1) 術前から十分な鎮痛が行われていた群とそうでない群とを比較した結果、術前の痛みは術後の痛覚過敏の発生要因となること、2) NMDA 受容体拮抗薬の脊髄クモ膜下腔内投与は炎症性慢性疼痛を用量依存的に抑制すること、3) 神経の傷害により生じる慢性疼痛(神経因性疼痛)モデル動物の脊髄において NMDA 受容体活性が高まること、などが示されている。しかし、脊髄内においてグルタミン酸量はほぼ飽和しておりグルタミン酸遊離量の増加のみで中枢神経感作における NMDA 受容体活性化を説明出来ない。

生体を構成するアミノ酸は L 体であり、鏡像異性体の D 体は細菌ペプチドグリカンの構成成分など極めて限られた生体成分である、と長年考えられてきた。しかし、哺乳類を含む高等動物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。

本研究では中枢神経感作による神経障害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、申請者らは、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 1μl/min にて 120min 灌流し 5 分間隔で 30 分間灌流液(5μl)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(5μl)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×g で 10 分間遠心した。50 μL の上清に合計 200 μL のメタノールを加え、12,000×g で 10 分間遠心した。50 μL の上清を 40°Cで減圧下、蒸発乾固した。20 μL の 200 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) と 5 μL 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 μL を加えた。その後、2 μL 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。

4. 研究成果

(1) 疼痛実験

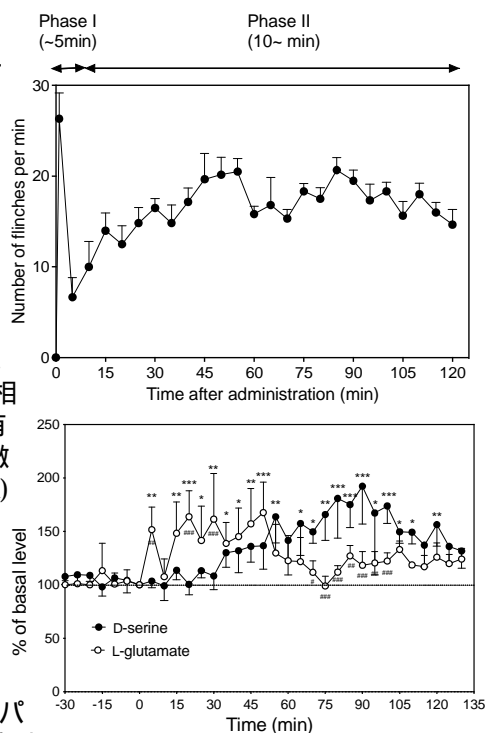
ホルマリン投与後 5 分目まで後肢を振り回す (flinching) 行動が見られるが、その後一時的に消失した。投与後 15 分目以降に再度その後 flinching 行動が少なくとも 120 分目まで観察された (2 相性) (右上図)。それぞれ、ホルマリンによる化学的刺激と炎症により生じることが知られている。

(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 (右下図)。

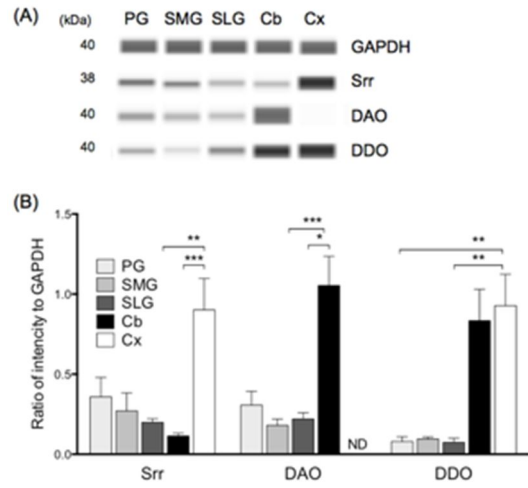
(3) ラット唾液腺の *D*-アミノ酸分析

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(右図)。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(右図)。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(右図)。コントロール(大脳皮質または小脳)と比較すると、3つの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レベルは比較的 low、mRNA の発現レベルとは異なっていた。



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