

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32206
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22600014
 研究課題名（和文） オピオイドの新規標的分子・視床細胞のナトリウムチャンネルを介する鎮痛制御機構の解明
 研究課題名（英文） The function of Na⁺ channel as a novel target molecule for chronic pain treatment in thalamus neuron
 研究代表者 天野 託 (AMANO TAKU)
 国際医療福祉大学・薬学部・教授
 研究者番号：10294547

研究成果の概要（和文）：オピオイド鎮痛薬であるモルヒネは、視床手綱核における興奮性神経伝達を複雑に調節する可能性を見出した。さらに、オピオイド鎮痛薬は視床において、 μ オピオイド受容体を介さずに直接、電位依存性 Na⁺ チャンネルを抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： In conclusion, we have found that morphine may induce cell-dependent dual modulation of glutamatergic synaptic transmission in the habenular nucleus. Moreover, it is our conclusion that morphine, fentanyl and oxycodone each produce the mu-opioid receptor-independent suppression of sodium currents by distinct mechanisms in thalamic neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ナトリウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

末梢に生じた痛覚シグナルは脊髄へと入力され、視床を経由して大脳皮質に至り認知される。モルヒネ、フェンタニルならびにオキシコドン、本邦における癌性疼痛の緩和に適応を有する重要なオピオイド鎮痛薬であり、脊髄において、脊髄後角の μ オピオイド受容体に作用して上位中枢への痛覚伝達を遮断する。

また、中脳・延髄領域においては、 μ オピオイド受容体を介して抑制性神経系を抑制することにより、これらの領域から脊髄に投射する下行性疼痛抑制系を活性化し、脊髄

後角において痛覚伝達を遮断する。一方、上位中枢においては、視床、視床下部、大脳知覚領等に存在する μ オピオイド受容体を介して脊髄からの痛覚伝達を抑制すると言われていたが、これまでのオピオイド鎮痛薬による鎮痛作用発現機構に関する研究の多くは、脊髄あるいは中脳・延髄領域に焦点が当てられてきたため、上位中枢におけるオピオイド鎮痛薬の疼痛制御機構の詳細についてはほとんど議論されていない。特に視床は、痛覚伝導の中継機構ならびに痛覚緩和に関わる疼痛制御機構を含む、痛覚に関するあらゆる情報の中継核であり、痛みの認知に必要

不可欠な脳部位である。そのため、視床におけるオピオイド鎮痛薬の作用メカニズムの解明は、これまで着目されてきた脊髄ならびに中脳・延髄領域における研究と同様に非常に重要な課題であると言える。一般に、オピオイド受容体刺激は G 蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼの活性抑制、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口抑制ならびに K^+ チャネルの開口促進により強力な神経興奮抑制作用を示す。一方、近年、オピオイド受容体の刺激により興奮性の細胞内シグナル伝達の活性化が引き起こされることが示されたことから、オピオイド受容体を介したシグナルは抑制性の細胞内情報伝達系の活性化にとどまらず、近傍に存在する連動した他の情報伝達系を即時的に活性化する可能性が考えられる。

そこで、定説であるオピオイド受容体を介したシグナルのみならず、個々のオピオイド鎮痛薬に存在する特徴的な反応性を考慮してオピオイド鎮痛薬の視床における疼痛制御機構の探索を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

視床は、痛覚伝導の中継機構ならびに痛覚緩和に関わる疼痛制御機構を含む、痛覚に関するあらゆる情報の中継核であり、痛みへの認知に必要不可欠な脳部位である。本研究は、オピオイド鎮痛薬（モルヒネ、オキシコドン、フェンタニル）の μ オピオイド受容体以外への新規薬理作用を検索する目的で、視床における電位依存性 Na^+ チャネルに対するオピオイド鎮痛薬の影響について電気生理学的手法を用いて検討した。さらに、鎮痛作用発現機序における視床の役割を解明する目的で、モルヒネの視床神経細胞に対する興奮性神経伝達の変化ならびに視床の痛覚制御への関与を電気生理学的、解剖学的ならびに行動薬理学的手法により検討した。

3. 研究の方法

(1)① パッチクランプ法

実験には、SD 系雄性ラットを使用し、視床由来初代培養神経/グリア共培養細胞として実験に使用した。視床由来初代培養神経/グリア共培養細胞を人工脳脊髄液で灌流させた小水槽内で保持し、視床神経細胞に室温下でホールセル記録を行い、 Na^+ チャネルに対するオピオイド鎮痛薬の影響を検討した。薬物は灌流液中に添加した。

HEK293 細胞に Na^+ チャネル (Nav1.2, Nav1.4, Nav1.7) を安定化発現させて、同様にホールセル記録を行い Na^+ チャネルに対するオピオイド鎮痛薬の影響を検討した。

② スライスパッチクランプ法

実験には、SD 系雄性ラットを使用し、氷冷下に視床を含む厚さ 400 μm のスライス

標本を作成し、IR カメラを用いて、視床ニューロンにホールセル記録を行い微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current: mEPSC) の発現頻度ならびに振幅を測定した。

(2) モデル動物

神経障害性疼痛モデルは麻酔下、右側後肢大腿部の坐骨神経を結紮糸により半周だけ強度に結紮することにより作製し、これらを ligation 群とした。対象として、坐骨神経を露出しただけで結紮を行わなかった群を sham 群として、これらを比較した。坐骨神経結紮 7 日後にラットを灌流固定し、視床を含む脳凍結切片を作製し、免疫組織学的染色法に従い解剖学的に検討を行った。なお、本研究を遂行するにあたり、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的として制定された動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

4. 研究成果

(1) 視床上部に位置し、疼痛制御に積極的に関与する視床における興奮性神経伝達に対するモルヒネの影響を有する手綱核ならびに視床内側領域に位置し、末梢から大脳皮質に至る痛覚伝導路の中継核である視床外側中心核におけるグルタミン酸由来の興奮性神経伝達に対するモルヒネの影響について、スライス切片を用いて検討した。その結果、手綱核において、モルヒネの処置により mEPSC の発現頻度ならびにその振幅が減少する細胞が観察されたが、mEPSC の発現頻度ならびに振幅が増加する細胞も観察された。視床外側中心核においては、モルヒネの処置により mEPSC の振幅には変化が認められないものの mEPSC の発現頻度が減少する細胞が観察された。これらの結果より、手綱核においてモルヒネは、グルタミン酸由来の興奮性神経伝達を細胞依存的に促進または抑制することで、興奮性神経応答を複雑に調節する可能性が示された。一方、モルヒネは視床外側中心核において、シナプス前膜からのグルタミン酸遊離を抑制的に制御する可能性も示唆された。

(2) モルヒネ誘発鎮痛効果発現機序における視床グルタミン酸作動性神経の役割
免疫組織化学的染色法でラットの視床における μ オピオイド受容体の分布を検討したところ、手綱核において μ オピオイド受容体の明瞭な免疫活性が認められた。さらに、手綱核で NMDA 受容体と μ オピオイド受容体が共局在していたことから、モルヒネは手綱核において μ オピオイド受容体を刺激することにより、興奮性神経伝達の修飾を引き起こす可能性が示唆された。

次に、手綱核にモルヒネを微量注入したところ、用量依存的かつ有意な抗侵害作用が認められ、この作用は NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 で抑制された。さらに、単独ではほとんど抗侵害効果を発現しない濃度のグルタミン酸およびモルヒネを手綱核に併用投与することにより、グルタミン酸誘発抗侵害作用の増強が認められた。中脳および橋・延髄領域における下行性疼痛抑制系の起始核は、中脳水道周囲灰白質や吻側延髄腹側核、背側縫線核および青斑核に存在することが知られているので、手綱核との直接的なつながりを検討するために、逆行性神経軸索輸送物質である fluoro-gold を下行性疼痛抑制系の起始核の一つである中脳水道周囲灰白質へ微量注入した結果、手綱核から中脳水道周囲灰白質への神経投射が認められ、その神経上に μ オピオイド受容体ならびに NMDA 受容体が存在することが明らかになった。以上より、モルヒネは一部手綱核に作用することで、手綱核から中脳水道周囲灰白質に投射している神経の興奮を増強させることにより、下行性疼痛抑制系を賦活化させ、鎮痛効果を示す可能性が示された。

(3) 視床における電位依存性 Na^+ チャネルに対するオピオイド鎮痛薬の影響

視床神経培養細胞における Na^+ 電流に対するオピオイド鎮痛薬の影響についてホールセル記録法で検討した。その結果、モルヒネ、オキシコドンおよびフェンタニルの処置により Na^+ 電流は濃度依存的に抑制された。特にフェンタニルの IC_{50} は Na^+ チャネル遮断薬であるリドカインの IC_{50} より低濃度であることが明らかになった。次に、オピオイド鎮痛薬による Na^+ 電流の抑制作用を経時的に観察したところ、 Na^+ 電流の抑制はオピオイド鎮痛薬の処置により速やかに生じ、処置を中止することにより消失した。このことより、オピオイド鎮痛薬による Na^+ チャネルの抑制は可逆的な反応であった。オピオイド鎮痛薬による Na^+ 電流抑制作用における μ オピオイド受容体の関与について検討を行ったところ、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンはモルヒネ、オキシコドン、フェンタニルによる Na^+ 電流抑制作用に影響およぼさなかった。次に、 μ オピオイドレセプターノックアウトマウスより採取した視床神経培養細胞を用いて Na^+ 電流に対するフェンタニルの影響を検討したところ、野生型マウスと同程度の Na^+ 電流抑制作用を示した。さらに、 Na^+ 電流に対する内因性 μ オピオイドペプチドである β -endorphin、endomorphin-1 および endomorphin-2 の影響を検討したが、これらすべての μ オピオイドペプチドは、 Na^+ 電流に対して全く影響を与えなかったことから、オピオイド鎮痛薬は、視床において直

接 Na^+ 電流を抑制することが明らかになった。また、 Na^+ チャネル安定化細胞を作成し、Nav1.4 に対するモルヒネに対する作用を検討したが、同様に Na^+ 電流抑制作用を観察されたことから、オピオイド鎮痛薬は、直接 Na^+ 電流を抑制することが明らかになった。

続いて、フェンタニルが Na^+ 電流を抑制する機序を詳細に検討するために、チャネルの開口と Na^+ 電流の抑制の関係についてリドカインと比較した。その結果、リドカインと同様に、 Na^+ 電流はフェンタニルの投与によりチャネルの開口回数に依存して漸減したが、リドカインとは異なり、フェンタニルを Na^+ チャネル非開口時に処置しても Na^+ 電流は抑制された。また、 Na^+ チャネルの不活性化電位に対するオピオイド鎮痛薬の影響について検討したところ、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニルの投与により Na^+ チャネルの不活性化電位は薬物処置前と比較して過分極側へシフトした。さらに、オピオイド鎮痛薬の Na^+ チャネルに対する結合部位が細胞内に存在するか否かを検討した結果、オキシコドン、フェンタニルおよびリドカインの細胞内処置は Na^+ 電流に何ら影響を及ぼさなかったが、モルヒネは細胞内処置により、 Na^+ 電流は抑制された。以上より、オピオイド鎮痛薬は視床において、 μ オピオイド受容体を介さずに電位依存性 Na^+ チャネルを抑制することが明らかとなった。また、フェンタニルはリドカインと同様に、チャネルの刺激回数に依存した抑制作用の増強を示すが、リドカインとは異なり静止状態の Na^+ チャネルにも作用する可能性が明らかとなった。さらに、オキシコドン、フェンタニルおよびリドカインは細胞外から Na^+ チャネルに作用するが、モルヒネは細胞外のみならず細胞内からも Na^+ チャネルに作用する可能性が示唆された。

本研究より、モルヒネは、視床手綱核における興奮性神経伝達を複雑に調節する可能性が示された。また、モルヒネは手綱核から中脳水道周囲灰白質に投射している神経の興奮を増強させることにより、下行性疼痛抑制系を賦活化させ、鎮痛効果を示す可能性があることを見出した。一方、オピオイド鎮痛薬は視床において、 μ オピオイド受容体を介さずに直接電位依存性 Na^+ チャネルを抑制することが明らかとなった。特にフェンタニルは、リドカインよりも強度な Na^+ チャネル阻害作用を有しており、その抑制作用の性質が一部共通することが明らかとなった。このように、オピオイド鎮痛薬の新規作用を探索することで、オピオイド神経系の生理応答ならびに医療用麻薬への理解が深まり、「痛み」の意義とその制御機構をより包括的にとらえることが可能になった。

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4件)

- ① H OHIDE, K MIYAGAWA, T TAKEUCHI, Y NAKATANI, H YOKOYAMA, T AMANO, A HARA, Acute effects of caffeine on blood pressure and heart rate in habitual and habitual coffee consumers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study., The Journal of Applied Therapeutic Research:11,294, in press
- ② Y NAKATANI, T AMANO, H TAKEDA, Corticosterone Suppresses the Proliferation of RAW264. 7 Macrophage Cells via Glucocorticoid, but not Mineralocorticoid, Receptor., Biological & Pharmaceutical Bulletin: 36(4), 592-601, 2013
- ③ Y NAKATANI, T AMANO, M TSUJI, H TAKEDA, Corticosterone Suppresses the Proliferation of BV2 Microglia Cells via Glucocorticoid, but not Mineralocorticoid Receptor., Life Sciences:91, 761-770, 2012
- ④ T AMANO, S HOSAKA, H TAKAMI, K ODA, R MORIKAWA, The lipid metabolism abnormality in patients administered with olanzapine., Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi: 32(5-6), 257-61, 2012

[学会発表] (計9件)

- ① 大出浩子、宮川和也、中谷善彦、宮岸寛子、池田俊也、天野託、原明義、国際医療福祉大学薬学部における血圧測定の応用実習(第5報)-カフェインの急性昇圧作用における性差の解析- 日本薬

学会第133年会(2013年3月27-2012年3月30日 横浜)

- ② 中谷善彦、天野託、辻稔、武田弘志、抑肝散のセロトニン神経系細胞株B65の増殖機能に及ぼす影響 第42回日本神経精神薬理学会年会(2012年10月18日-10月20日 栃木)
- ③ 天野託、オランザピン服用者のインスリン上昇と脂質代謝異常 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会(2011年10月27日-10月29日 東京)
- ④ 大出浩子、宮川和也、中谷善彦、竹内智子、横山秀克、天野託、原明義、国際医療福祉大学薬学部における血圧測定の応用実習(第4報)-カフェインの急性昇圧作用に及ぼすコーヒーと茶類の飲用習慣の影響- 日本薬学会第132年会(2012年3月28-2012年3月31日 札幌)
- ⑤ 中谷善彦、大出浩子、宮川和也、竹内智子、横山秀克、天野託、原明義、国際医療福祉大学薬学部における新しい尿検査実習の試み 日本薬学会第132年会(2012年3月28-2012年3月31日 札幌)
- ⑥ 天野託、高見浩、箱守英雄、織田一衛、森川龍一、オランザピン服用患者における糖負荷試験後のインスリン分泌の増加 第106回日本精神神経学会学術総会(2010年5月20日-5月22日 広島)
- ⑦ 中谷善彦、天野託、宮川和也、加藤英明、辻稔、武田弘志、グリア細胞増殖に及ぼすコルチコステロンの影響とその特徴 第84回日本薬理学会年会(2011年3月22-2012年3月24日 横浜)
- ⑧ 加藤英明、辻稔、天野託、武田弘志、慢性ストレス負荷がアルコール依存形成

に及ぼす影響 第 84 回日本薬理学会年
会(2011年3月22 - 2012年3月24日 横
浜)

- ⑨ 大出浩子、宮川和也、竹内智子、中谷善彦、横山秀克、天野託、原明義、国際医療福祉大学薬学部における血圧測定の実用実習(第3報)-カフェインの血圧上昇作用- 日本薬学会 第131年会(2011年3月28 - 2012年3月31日 静岡)

[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]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者：

天野 託 (AMANO TAKU)
国際医療福祉大学・薬学部・教授
研究者番号：10294547

(2)研究分担者：()

研究者番号：

(3)連携研究者：

中谷 善彦 (NAKATANI YOSHIHIKO)
国際医療福祉大学・薬学部・助教
研究者番号：40582169

辻 稔 (TSUJI MINORU)
国際医療福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号：70297307

宮川 和也 (MIYAGAWA KAZUYA)
国際医療福祉大学・薬学部・講師
研究者番号：10453408

加藤英明 (KATOH HIDEAKI)
国際医療福祉大学・薬学部・講師
研究者番号：30438220