

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592312

研究課題名(和文) Dセリン代謝関連酵素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) Long-term treatment with morphine increases the D-serine content in the rat brain and spinal cord by regulating the mRNA and protein expressions of serine racemase and D-amino acid oxidase

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：モルヒネ(10mg/kg)を30日間投与し耐性が形成されたラットの脳および脊髄におけるセリンラセマーゼ(Srr)、D-アミノ酸化酵素(DAO)の遺伝子発現、タンパク質発現、Dアミノ酸量を解析した。Srr mRNAおよびタンパク発現量は全ての脳部位および脊髄で、DAOは前脳部および脊髄において有意に増加した。Srrタンパク質量は全ての脳部位と脊髄で有意に増加した。Dセリン量は前脳部および脊髄において有意に増加した。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および脊髄のDセリン量を増加することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The expression of mRNA and protein of serine racemase and D-amino acid oxidase increased in forebrain and spinal cord of rats developing morphine tolerance. The levels of D-serine increased in forebrain and spinal cord of rats developing morphine tolerance. These results demonstrated that elevated D-serine level in rats developing morphine tolerance could at least in part be involved in the activation of NMDA receptor via glycine site.

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：モルヒネ 鎮痛耐性 NMDA受容体 D-セリン

1. 研究開始当初の背景

D-アミノ酸が、細胞壁ペプチドグリカンの構成成分として、細菌の生育に必須であることは以前から知られていた。しかし、哺乳類において D-セリンや D-アスパラギン酸などの遊離型 D-アミノ酸が重要な生理作用を有することが認められたのは最近である。申請者らは、哺乳類脳内に遊離型 D-セリンが多量に存在すること、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体グリシン結合部位の内因性リガンドであることなどを明らかにした。D-セリンは、L-セリンをラセミ化するセリンラセマーゼ (Serine racemase: Srr) により生成され、D-アミノ酸酸化酵素(D-amino acid oxidase; DAO) によりピルビン酸に分解される。申請者らは、D-セリンを脳室内投与し鎮痛効果が得られること、D-セリン脳内投与はモルヒネの鎮痛効果を増強すること、D-セリンの鎮痛効果がナロキソンによって拮抗されること、などを明らかにした。これらの結果は、NMDA 受容体を介しオピオイド受容体を刺激し鎮痛作用が現れることを示唆している。また、申請者らは、モルヒネ急性投与により Srr mRNA および DAO mRNA 量が一過性かつ用量依存的に増加することを明らかにした。この結果は、D-セリン代謝関連タンパク質の発現とオピオイド受容体活性との関連性を示唆している。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有意に減弱することが知られている (Popik et al, 1998, Neuropharmacology, 37, 1033-1042)。この結果は、モルヒネの報酬効果および退薬症候と、D-セリンとの関連性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、モルヒネを慢性投与し(その後ナロキソンで拮抗し)、脳内 Srr と DAO の mRNA 量、タンパク質量、および D-セリン量がどのように変化するかを解析する。すなわち、real time PCR 法、Western Blot 法、および HPLC によって定量的に解析する。さらに in situ hybridization、免疫組織化学を用いて、Srr と DAO の mRNA 量、タンパク質量、および D-セリン量の発現が変化する脳部位を詳細に観察し、D-セリン代謝とモルヒネ耐性形成、報酬効果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)・脊髄に分けた後、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 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および脊髄で、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と脊髄で有意に増加した。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)および脊髄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。

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および脊髄の 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 8件)

1. Ajimi J, Yoshikawa M, Takahashi S, Miura M, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of three peptidase inhibitors on antinociceptive potential and toxicity with intracerebroventricular administration of dynorphin A (1-17) or (1-13) in rat. J. Anesthesia. In press 査読有

2. Murata T, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Potentiation of [Met5]enkephalin-induced antinociception by mixture of three peptidase inhibitors in rat. J. Anesthesia DOI 10.1007/s00540-014-1819-5 査読有

3. Ito M, Yoshikawa M, Ito K, Matsuda M,

- Jin X.L., Takahashi S, Kobayashi H, Suzuki T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of d-serine on formalin-induced pain. *J. Anesthesia* 2014, 28(2), 228-234. 査読有
4. Miura, M, Yoshikawa M, Watanabe M, Takahashi S, Ajimi J, Ito K, Ito M, Kawaguchi M, Kobayashi H, Suzuki T. Increase in antinociceptive effect of [Leu5]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors. *Tokai J Exp Clin Med* 2013, 38 (2), 62-70. 査読有
 5. Okubo M, Yoshikawa M, Shinomiya T, Kawaguchi M. Methamphetamine-withdrawal stress activates PACAP-DBI pathway in rat salivary gland, resulting in inhibition of salivary secretion. *Tokai J Exp Clin Med* 2013, 38 (2), 55-61. 査読有
 6. Cotrim P. A*, Yoshikawa M*, Sunshine N. A, Zheng C, Sowers L. A, Thetford D. A, Cook J. A, Mitchell B. J, Baum J. B. Pharmacological protection from radiation- and chemoradiation-induced oral mucositis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 2012, 83 (4), 1284-1290, *These authors contributed equally to this work. 査読有
 7. Tsukagoshi E, Kawaguchi M, Shinomiya T, Yoshikawa M, Kawano T, Okubo M, Sawaki K. Diazepam Enhances Production of Diazepam-Binding Inhibitor (DBI), a Negative Saliva Secretion Regulator, Localized in Rat Salivary Gland. *J Pharmacol Sci* 2011; 115: 221-229.
 8. Sawaki K, Shinomiya T, Okubo M, Tsukagoshi E, Ogane M, Matsuura M, Yoshikawa M, Kawaguchi M. Proteomic Analysis of Lipopolysaccharide-treated Submandibular Gland in Rat. *Bulletin of Tokyo Dental College* 2011; 52(1):31-37.
- [学会発表](計7件)
1. 吉川正信, 大久保みぎわ, 三次百合香, 濱瀬健司, 村山千恵子, 金野柳一, 川口充. D-アミノ酸と唾液腺. 第87回日本薬理学会年会. 2013年3月19日 東北大学(宮城)
 2. 吉川正信, 大久保みぎわ, 三次百合香, 濱瀬健司, 金野柳一, 川口充. D-アミノ酸と唾液分泌. D-アミノ酸研究会第9回学術講演会. 2013年9月14日 関西大学(大阪)
 3. 吉川正信, 村山千恵子, Ana P. Cotrium, 平山亮一, 古澤佳也, 塚田秀雄, Bruce J Baum. D-methionine as a protector for irradiation-induced oral mucositis or salivary glands dysfunction. 第86回日本薬理学会年会. 2013年3月23日 福岡国際会議場 (福岡)
 4. 吉川正信, 村山千恵子, 古澤佳也, 平山亮一, 鶴澤玲子, 松本謙一郎. 放射線障害に対する防護薬としてのD体アミノ酸の可能性. 第15回癌治療増感研究シンポジウム. 2013年2月9日 猿沢荘 (奈良)
 5. 吉川正信, 村山千恵子, Ana P. Cotrium, 平山亮一, 鶴澤玲子, Bruce J Baum, 古澤佳也. X線・重粒子線照射による口腔粘膜障害・唾液腺機能障害に対するD-メチオニンの防護効果. 第8回D-アミノ酸研究会学術集会. 2012年9月7日 滋賀医科大学 (滋賀)
 6. 吉川正信, 村山千恵子, 平山亮一, 鶴澤玲子, 古澤佳也. 重粒子線照射による口腔粘膜障害および唾液腺機能障害に対するD-メチオニンの防護効果. 第41回放射線による制癌シンポジウム. 2012年6月30日 フェストーネ (沖縄)
 7. 吉川正信, 村山千恵子, Ana P. Cotrium, Anastatia L. Sower, James B. Mitchell, Bruce J Baum. 放射線照射による口腔粘膜障害に対するD体メチオニンの防護効

果 第31回日本歯科薬物療法学会. 2011
年6月24日 幕張メッセ国際会議場 (千葉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 健二 (ITO KENNJI)
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