

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462385

研究課題名(和文) モルヒネの鎮痛耐性形成に対するNMDA受容体活性調節因子D-セリンの作用

研究課題名(英文) Effects of D-serine on tolerance to the antinociceptive effects of morphine

研究代表者

伊藤 健二 (ITO, Kenji)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10317779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：モルヒネ慢性投与によりセリンラセマーゼ mRNA発現量は全ての脳部位および脊髄において、DAOは前脳部において有意に増加した。モルヒネ鎮痛耐性形成時に増加することが知られている内因性オピオイドペプチドのダイノルフィンAはC末端領域がNMDA受容体と親和性をもつ。髄腔内にダイノルフィン A (1-17)を1nmolを越える用量(3-10 nmol)を投与するとallodyniaを生じた。ダイノルフィン類の代謝に関わるダイノルフィン変換酵素(DCE)とダイノルフィン A (1-17)(0.3nmol)を髄腔内投与すると痛覚過敏が生じた。

研究成果の概要(英文)：Chronic morphine administration induced mRNA expression of serine racemase in all brain regions and spinal cord and that of D-amino acid oxidase in forebrain of rats. Dynorphin A and its derived peptides interact with opioid and glutamate receptors at their N- and C-terminals, respectively. Pretreatment with peptidase inhibitors augmented Dyn A (1-17) or (1-13)-induced antinociception by approximately 50- or 30-fold with no sign of allodynia when administered intrathecally at low doses. Pretreatment with peptidase inhibitors induced neuropathy. These findings showed that intrathecal administration of low-dose Dyn A (1-17) or Dyn A (1-13) increased antinociception under pretreatment with ACP, but without signs of allodynia in rat. These results indicated that administration of chronic morphine increased dynorphin A (1-17), and then induced nociception through NMDA receptors.

研究分野：麻酔科学

キーワード：モルヒネ 鎮痛耐性形成 Dセリン NMDA受容体 dynorphin

1. 研究開始当初の背景

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てきた。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。脳内の下行性疼痛抑制系のうち、中脳水道周囲灰白質(PAG)からの入力を受ける延髄腹外側野の大縫線核ニューロン上の NMDA 受容体は、下行性疼痛抑制の調節機能において重要な役割を持つことが報告されている。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 (Yoshikawa, Ito et al., 2007.; Ito, Yoshikawa, et al, 2008.; Yoshikawa et al., 2008; Ito Yoshikawa et al., 2007)。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。麻薬性鎮痛薬であるモルヒネは強力な鎮痛作用を持っているものの、長期間の使用により耐性・依存が形成される。この分子機構としてモルヒネ慢性投与に伴う耐性形成にグルタミン酸-NMDA 受容体機能亢進が関与することを見出されている。しかしながら、その制御機構についての詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

以上の先行研究から、申請者はモルヒネ鎮痛耐性形成に内在性 NMDA 受容体グリシン結合部位リガンドである D-セリンが NMDA 受容体の活性化に関与しているとの仮説に至った。本研究では、D-セリン代謝関連酵素遺伝子改変動物などを用いてモルヒネ長期投与時における NMDA 受容体機能亢進、耐性形成の連関を明らかにし、耐性形成機序の解明を当初の目的とした。モルヒネ鎮痛耐性形成時に内因性オピオイドペプチドのダイノルフィンが脊髄内で増加すること、ダイノルフィン類の代謝に関わるダイノルフィン変換酵素 (DCE) の発現が亢進することが知られている。ダイノルフィン A (1-17) の N 末端領域はオピオイド受容体に、C 末端領域は NMDA 受容体に親和性を有することが知られている。本研究では脊髄における Dynorphin 類 (Dyn A (1-17), (1-13), (1-6)) の代謝に関わるペプチダーゼによる鎮痛作用と神経毒性への影響を明らかにすることを新たな目的とした。また、グルタミン酸受容体の AMPA 受容体と NMDA 受容体との脳内における鎮痛効果の違いについて検討を行った。

3. 研究の方法

a. マウス輸精管平滑筋電気刺激標本マウスを断頭放血後、Okamoto の方法に準じて輸精管標本を作製した。標本を 8ml のマグナス槽の上下に設置した 2 つのリング型白金電極 (直径 7mm, 間隔 1cm) のリングの中心に懸垂し、それぞれ 100mg の荷重をかけた。マウス輸精管の電気刺激は電気刺激装置を用い、電気刺激装置の出力をさらにブースターアンプに入力して増幅し電圧約 100V, duration 1 msec, 頻度 0.1Hz の条件で行った。電気刺激によって生じた収縮は等尺性に、Force-displacement transducer を介し、アイソメトリックアンプによって増幅してペンレコーダーにて記録した。

b. ラット髄腔内薬物投与と鎮痛効果の評価
7週齢 Wistar 系雄性ラット (体重 180~220g) の髄腔内へ胸腰部レベルに頭側から尾側へ置置カテーテルを挿入した。明らかな運動麻痺などが観察されなかったラットを実験に供試した。10 μ l の薬物あるいは生理食塩水をそれぞれ 1 分間かけて注入した。薬物または生理食塩液を投与した 10 分後から Tail Flick 法を行った。

c. von Frey 法によるアロディニアの評価
薬剤を髄腔内投与したラットの足底に、太さにより決まった圧力を加えることが出来る von Frey フィラメントを押し当てることで機械刺激を与え、逃避行動を起こす疼痛閾値を測定した。

4. 研究成果

(1) モルヒネ鎮痛耐性形成における D-セリン代謝

ラット脳内において D セリン量、D セリン関連タンパク質、およびそれらの遺伝子発現について解析した。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。セリンラセマーゼ (Srr) ならびに D-アミノ酸酸化酵素 (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で DAO は前脳部において有意に増加した。

(2) ダイノルフィン A 類 (Dyn A (1-17), (1-13), (1-6)) の代謝に関わるペプチダーゼによるマウス輸精管の電気刺激誘発性収縮に対する Dynorphin の抑制効果への影響

ダイノルフィン A (1-17) に 3 種ペプチダーゼ (アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン) 混合物を併用すると、ダイノルフィン A (1-17) のマウス輸精管の電気刺激誘発性収縮に対する Dynorphin の抑制効果 (効力) が 3 種ペプチダーゼの用量依存的に増加することが明らかとなった。また、2 種のペプチダーゼ阻害剤混合物の組合せ (アマスタチン、カプトプリル)、(アマスタチン、フォスフォラミドン)、(カプトプリル、フォスフォラミドン) はいずれも 3 種ペプチダーゼ (アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン) 混合物に比べて有意に効力が低かった。即ち、3 種ペプチダーゼ阻害剤 (アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン) はいずれ

れもダイノルフィン A (1-17)の代謝阻害には必要であることが示された。

(3) 脊髄における Dynorphin A 類(Dyn A (1-17),(1-13),(1-6)) の代謝に関わるペプチダーゼによる鎮痛作用への影響

ダイノルフィン A (1-17)(0.03-1 nmol)と3種ペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン)混合物を併用投与すると鎮痛効果がダイノルフィン A(1-17) (0.03-1 nmol) 単独と比較し、1-17;50 倍, 1-13; 30 倍の増強するが、本条件下では神経毒性は生じなかった。また、ダイノルフィン A 類のペプチド長により鎮痛効果の違いを認めた[ダイノルフィン A (1-17) > (1-13) > (1-6)]。即ち、3種ペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン)混合物を併用投与したダイノルフィン A (1-6)の鎮痛効果はダイノルフィン A (1-17)の 30%程度であった。髄腔内投与したダイノルフィン類[ダイノルフィン A (1-17), (1-13)] は D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP, μ -opioid receptor antagonist) ならびに Nor-binaltorphimine dihydrochloride (Nor-BNI; μ -opioid receptor antagonist)で有意に拮抗されるが Naltrindole hydrochloride (NTI: μ -opioid receptor antagonist)では有意な拮抗は認められなかったことから、主に μ , 受容体を介して鎮痛効果を示すことが明らかとなった。

(4) 脊髄におけるダイノルフィン A 類(Dyn A (1-17),(1-13),(1-6)) の代謝に関わるペプチダーゼによる神経毒性への影響

ラット髄腔内に 1nmol を越える用量(3-10 nmol)のダイノルフィン A (1-17)を投与によりアロディニアを生じた。ダイノルフィン A(1-17)(0.3nmol)にダイノルフィン変換酵素阻害剤(PHMB: パラヒドロキシマーキュリー安息香酸)を併用すると神経毒性(痛覚過敏)が亢進したが、アロディニアは生じなかった。

(5)ペプチダーゼによるダイノルフィン A (1-17)の分解産物解析

ラット脳膜標本にダイノルフィン A (1-17)と3種ペプチダーゼ阻害剤を加えて質量分析解析を行った結果、ダイノルフィン変換酵素により生じる[Leu5]enkephalin-Arg-Arg が検出された。しかし、そのC末端側の産物は検出されなかった。すなわち、3種ペプチダーゼ阻害剤(アマスタチン、カプトプリル、フォスフォラミドン)はダイノルフィン A (1-17)のC末端領域の分解には阻害作用を有しないことが明らかとなった。すなわち、ダイノルフィン変換酵素(DCE)によって生じる[Leu5]enkephalin-Arg-Arg はオピオイド受容体に結合し鎮痛効果を示すが、NMDA 受容体に結合しうるC末端領域分解産物はさらに分解を受けることで神経毒性を生じないと考えられる。

(6) グルタミン酸受容体の AMPA 受容体と NMDA 受容体との脳内における鎮痛効果の違い

AMPA 受容体拮抗薬 YM872 をラット脳内投与すると鎮痛効果を示した。また、YM872 をラット脳内投与すると NMDA 受容体グリシン結合部位内在性アゴニストの D-セリンの鎮痛効果を増強した。すなわち、AMPA 受容体と NMDA 受容体は脳内において鎮痛作用に対し異なる機能を有することが示唆された。

<引用文献>

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

Yoshikawa M, Shinomiya T, Takayasu N, Tsukamoto H, Kawaguchi M, Kobayashi H, Oka T, Hashimoto A. Long-term treatment with morphine increases the D-serine content in the rat brain by regulating the mRNA and protein expressions of serine racemase and D-amino acid oxidase. J Pharmacol Sci 2008; 107(3): 270-276.

Ito K, Yoshikawa M, Maeda M, Jin XL, Takahashi S, Matsuda M, Tamaki R, Kobayashi H, Suzuki T, Hashimoto A. Midazolam attenuates the antinociception induced by D-serine or morphine at the supraspinal level in rats. Eur J Pharmacol 2008; 586(1-3): 139-144.

Yoshikawa M, Ito K, Maeda M, Akahori K, Takahashi S, Jin XL, Matsuda M, Suzuki T, Oka T, Kobayashi H, Hashimoto A. Activation of supraspinal NMDA receptors by both D-serine alone or in combination with morphine leads to the potentiation of antinociception in tail-flick test of rats. Eur J Pharmacol 2007; 565(1-3): 89-97.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Watanabe M, Ajimi J, Takahashi S, Miura M, Ito K, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of peptidase inhibitors on dynorphin A (1-17) or (1-13)-induced antinociception and toxicity at spinal level. Pharmacol Pharmacy. 査読有, 2017, 8, 33-51.

Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Nishiyama T.

Inhibition of AMPA receptors and activation of the glycine site or polyamine site of NMDA receptors at the supraspinal level induces antinociception. Eur J Biomed Pharm Sci. 査読有, 2017, 4(3), 77-83.

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. 査読有, 2015, 29(1), 65-77

〔学会発表〕(計1件)

姜卓義、吉川正信、渡邊真理子、安心院純子、三浦正明、鈴木利保。ラット髄腔内に投与した3種ペプチド分解酵素阻害剤はダイノルフィン A(1-17)の神経毒性を示さずに鎮痛効果を増強する。日本麻酔科学会第62回学術総会。2015.5.28。神戸国際展示場

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 健二 (ITO, Kenji)
東海大学・医学部・准教授
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