

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860426

研究課題名(和文) NAAG分解酵素阻害薬の臨床応用に向けての基礎研究

研究課題名(英文) An analgesic effect of NAAG peptidase inhibitor injected into locus coeruleus

研究代表者

山田 寿彦(Yamada, Toshihiko)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10571044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NAAG分解酵素阻害薬を用いて、NAAGの作用を検討した。NAAG分解酵素阻害薬である2PMPA・ZJ43などを全身投与・髄腔内投与・脳室内投与・末梢投与することにより、鎮痛効果が得られることが報告されてきた。今回は特に青斑核に注目し、青斑核に2PMPAを選択的に投与することによる鎮痛効果を検討した。2PMPAは、青斑核を介して脊髄でのノルアドレナリンの放出を増加させることにより鎮痛効果を示すこと、この2PMPAの作用がmGluR3を介することを確認した。NAAG分解酵素阻害薬は、多くの部位で作用することが確認でき、臨床応用を検討すべき薬物であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) is one of the most abundant neurotransmitter in the mammalian central nervous system. It has been reported that NAAG acts as a mGluR3 agonist and that NAAG peptidase inhibitors, such as 2-PMPA and ZJ43, have an analgesic property in inflammatory pain, neuropathic pain and cancer pain models when they are administered systemically, intrathecally, intracerebroventricularly or locally. In the present study, I investigated the effect of NAAG peptidase inhibitor injected into the locus coeruleus (LC) in the brain. NAAG peptidase inhibitor injected into LC produced an analgesic effect in the rat formalin test and this effect was antagonized by LY341495, an antagonist of mGluR3. I also found that NAAG peptidase inhibitor injected into LC induced noradrenalin released in the spinal cord. These data suggested that NAAG peptidase inhibitor have a potential to be a clinical analgesic drug.

研究分野：麻酔科

キーワード：侵害刺激 グルタミン酸代謝型受容体 青斑核 炎症性痛

1. 研究開始当初の背景

N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG)は1965年～1966年に初めて報告された中枢神経系に豊富に存在するグルタミン酸関連の神経伝達物質である。NAAGはグルタミン酸の代謝型受容体のうち group II に属する mGluR3 の作動薬として作用することが知られている。NAAGは星状神経膠細胞や神経細胞の細胞膜表面に存在する NAAG ペプチダーゼ (glutamate carboxy-peptidase II (GCP II)、N-acetylated- α -linked-acidic dipeptidase (NAALADase)とも呼ばれる)により加水分解され N-acetyl-aspartate (NAA) とグルタミン酸になる。このグルタミン酸は、さらに NMDA 受容体や他の代謝型グルタミン酸受容体などに作用することが出来る。従って NAAG の投与による効果がみられた場合、その効果が NAAG そのものによる効果であるか、分解産物であるグルタミン酸の効果であるかを判別することは出来ない。このため、現在 NAAG の研究をするためには NAAG を直接投与するのではなく、NAAG の分解を NAAG ペプチダーゼ阻害薬により抑制することにより NAAG 量を増加させることにより、NAAG そのものの効果を検討することが行われている。

前述の通り、NAAGは中枢神経系に大量に含まれている神経伝達物質である。しかしながら、その役割が十分には解明させているとは言いがたい。最近では中枢神経以外にもその存在が報告されるようになった。脊椎動物の神経筋接合部では NAAG が放出され、シナプス前終末に存在する mGluR3 に作用してアセチルコリンの放出を調整していることが示されてきている。このように、NAAGは様々なシナプスで神経伝達物質の放出を調整する役割を果たしていることが示唆され、今後その役割のさらなる研究が待たれるところである。phencyclidine (PCP)により統合失調症様の行動が誘発されることが知られ

ているが、この行動を NAAG 分解酵素阻害薬にて NAAG 量を増加させることにより mGluR3 を介して抑制することが出来ることも知られている。このように NAAG 分解酵素阻害薬は様々な効果が期待でき、創薬のターゲットの一つであると考えている。

さらに、NAAG の代謝産物である NAA は Magnetic resonance spectroscopy (MRS)にて測定可能な物質であり、様々な病態と NAA の関係が明らかになってきている。慢性腰痛患者では前頭葉前部皮質の側背部で NAA が減少していること、また神経障害性痛患者では視床の NAA 量が減少していることが報告された。これらの結果は、慢性痛患者は NAAG 関連物質が減少していることを示している。もちろん、NAA の減少が原因であるか結果であるかは不明であるが、NAAG 量を増加させることが治療につながる可能性があると考えている。最近の MRS の研究では、NAAG 量も測定可能となってきた。臨床での NAAG 研究の展開も期待される。

2. 研究の目的

今までの研究で、中脳水道周辺灰白質と吻側延髄腹内側部へ NAAG peptidase inhibitor である 2PMPA を選択的に投与すると、ラットホルマリンテストで鎮痛効果を認めた。そこで今回の研究では、中脳水道周辺灰白質と吻側延髄腹内側部と同様に下降性疼痛抑制系の重要な核である青斑核 (Locus coeruleus; LC) に着目した。青斑核にステレオ手術の方法を用いて 2PMPA を投与し、ラットホルマリンテストにおける鎮痛効果を確認するとともに、鎮痛効果発現のメカニズムを検討することを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

ラットホルマリンテストは、ラット後肢に 5%ホルマリンを 50 μ l 皮下注することにより作成した。痛みの程度は、ホルマリンを皮下注した後肢を振り回す回数を測定するこ

とにより行った。

2PMPA を青斑核へ選択的に投与するために、ハロセン麻酔下にステレオ手術の方法を用いて青斑核へカニュラを挿入した。投与量依存性を検討するために、2PMPA は 15 μg ~ 150 μg を投与した。2PMPA は、ホルマリンを皮下注した後肢と同側または対側に投与した。

2PMPA の効果が NAAG による mGluR3 を介したものであることを確認するため、mGluR3 の拮抗薬である LYU341495 を前処置して 2PMPA の効果を検討した。

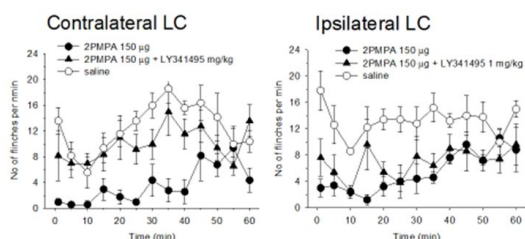
2PMPA の効果が、LC を介した脊髄でのノルアドレナリン依存性の効果であることを確認するために、髄腔内へ $\alpha 2$ ブロッカーである idazoxan を前処置した後に、2PMPA を腹腔内投与し鎮痛効果を検討した。さらに、2PMPA を腹腔内投与し、腰部脳脊髄液にノルアドレナリンが放出されていることを確認するため、マイクロダイアリシスの方法を用いて検討を行った。

3 . 研究成果

青斑核投与の効果

下図の通り、2PMPA をホルマリン皮下注側と対側・同側のいずれの青斑核へ投与しても、鎮痛効果を示した。しかしながら、対側の青斑核へ投与した時は LY341495 にて拮抗できたが、同側へ投与した時は拮抗できなかった。従って、青斑核における 2PMPA の効果は異なることが示唆された。対側の青斑核では、NAAG を介する効果であることが推測されるが、同側の効果は今回の結果からは作用機序は不明である。

Effect of microinjection of 2PMPA into LC

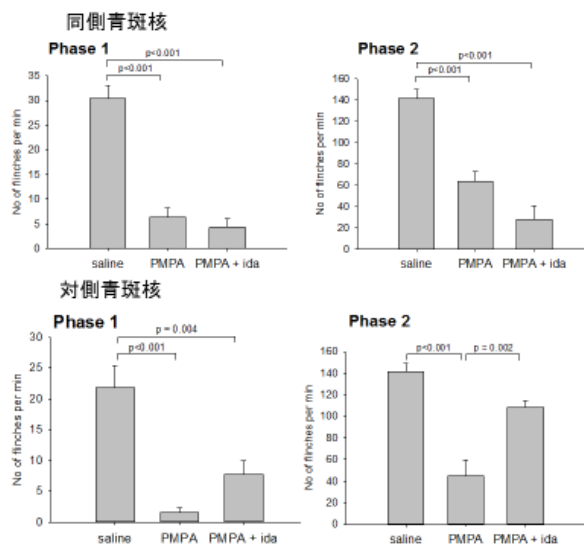


Idazoxan による拮抗

同側青斑核に 2PMPA を投与した時は、Idazoxane 髄腔内投与により鎮痛効果を拮抗することは出来なかった。従って、同側青斑核へ投与した時は、下降性疼痛抑制系が活性

化された結果として鎮痛効果が発揮されたのではなく、他のメカニズムを介して鎮痛効果を発揮していることが示唆された。

一方、対側青斑核に 2PMPA を投与した時は、idazoxan により第 2 相は拮抗されたが、第 1 相は拮抗されなかった。このことから、第 2 相の鎮痛効果は 2PMPA により青斑核が活性化され、結果としてノルアドレナリンが脊髄で放出され、鎮痛効果を発揮していることが示唆された。第 1 相の鎮痛効果のメカニズムはノルアドレナリンを介していないことが示された。



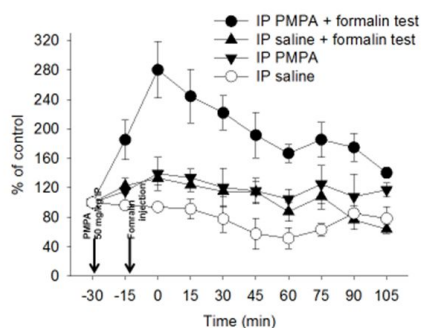
さらに、2PMPA の効果はナロキソンにより拮抗できなかった。このことにより、2PMPA の鎮痛効果はオピオイド受容体を介さないことが示された。

マイクロダイアリシスによる検討

2PMPA を腹腔内投与することにより、腰部脳脊髄液へのノルアドレナリンの放出が増加した。さらにホルマリンを皮下注することによりノルアドレナリンの放出が増加した。ホルマリン皮下注・2PMPA 腹腔内投与単独でもノルアドレナリンの放出は増加するが、2PMPA 腹腔内投与とホルマリン皮下注を組み合わせることにより、ノルアドレナリンの放出量の増加は一層大きくなった。

これらの結果から、NAAG peptidase inhibitor である 2PMPA の青斑核での鎮痛効果は、痛みの存在する部位と対側の時は下降性疼痛抑制系を介する機序が主であることが示唆された。一方痛みが存在する部位が同側の青斑核に 2PMPA を投与しても鎮痛効果を発揮するが、その機序は対側に投与下時とは異なることが示された。

Intrathecal noradrenalin release



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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Nonaka T, Yamada T, Araki M, Yamamoto T (2014) Microinjection of Neuropeptide W, an endogenous ligand for GPR7 and 8, into rostral ventromedial medulla (RVM) produces an analgesic effect in the rat formalin test. Neuroscience 2014 (Washington DC, November 17, 2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 寿彦 (YAMADA Toshihiko)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10571044

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：