

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20043

研究課題名(和文) NMDA受容体拮抗薬の鎮痛作用におけるオピオイド受容体ファミリーの関与

研究課題名(英文) Involvement of opioid receptor family in the analgesic action of NMDA receptor antagonists

研究代表者

深川 博志 (FUKAGAWA, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00742991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、亜酸化窒素の鎮痛作用にはノシセプチン受容体が関与すること、 $\mu$ オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用は野生型と有意差がないことが示されていた。本研究では、これらの研究成果をもとに、オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の作用について検討し、オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用はほとんど消失していることを示した。一方、立ち直り反射抑制作用を指標として亜酸化窒素の鎮静作用を評価したところ、オピオイド受容体欠損マウスと野生型マウスの間に有意差は認められなかった。以上の結果から、亜酸化窒素の鎮痛作用と鎮静作用は異なる機序に基づくことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that the nociceptin receptor is involved in the analgesic action of nitrous oxide, and that the analgesic action of nitrous oxide in the mu-opioid receptor knockout mice is not significantly different from that in the wild-type mice. In this study, we have analyzed the analgesic action of nitrous oxide in the kappa-opioid receptor knockout mice. It was demonstrated that the analgesic action of nitrous oxide was almost completely lost in the kappa-opioid receptor knockout mice. In contrast, the sedative action of nitrous oxide, which was estimated by loss of righting reflex, was not significantly different between kappa-opioid receptor knockout mice and wild-type mice. These results suggest that the analgesic action and the sedative action of nitrous oxide are mediated by different mechanisms.

研究分野：麻酔科学

キーワード：NMDA受容体 亜酸化窒素 キセノン ケタミン オピオイド受容体

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室では、cDNA クローニングにより世界に先駆けてオピオイド受容体 ( $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ ) とノシセプチン受容体の一次構造を明らかにした。これらの受容体のアミノ酸配列は 50-60% の相同性を有し、オピオイド受容体ファミリーを構成している [Fukuda, K. et al. (1994) FEBS Lett. 343, 42]。一方、オピオイド受容体 ( $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ )、ノシセプチン受容体のそれぞれに対して、選択的に作用するアゴニストとして、 $\beta$ -エンドルフィン、ダイノルフィン、エンケファリン、ノシセプチンが生体内に存在することが知られている。ノシセプチンはダイノルフィンと相同性を有する 17 アミノ酸から成るペプチドである。ノシセプチンおよびノシセプチン受容体の生理的機能については、完全に解明されたとはいえない。

申請者らの研究室は、代表的な吸入麻酔薬である亜酸化窒素の鎮痛作用がノシセプチン受容体欠損マウスにおいて有意に減弱することを報告し [Himukashi, S. et al. (2006) Anesth Analg 103, 738]、ノシセプチン受容体拮抗薬が亜酸化窒素の鎮痛作用を抑制することを明らかにした [Koyama, T. et al. (2009) J Anesth 23, 301]。さらに、 $\mu$  オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用は野生型と有意差がないこと [Koyama, T. et al. (2009) Br J Anaesth 103, 744]、 $\kappa$  オピオイド受容体選択的アンタゴニストの投与により亜酸化窒素の鎮痛作用が有意に抑制されること [Koyama, T. et al. (2010) J Anesth 24, 297] を示した。申請者は、これらの研究成果をもとに  $\kappa$  オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の作用について検討し、 $\kappa$  オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素の鎮痛作用はほとんど消失しているが、亜酸化窒素の鎮静作用は野生型マウスと差がないことを示唆する結果を得ている。以上の結果は、亜酸化窒素の

鎮痛作用はノシセプチン受容体ならびに  $\kappa$  オピオイド受容体の活性化によること、亜酸化窒素の鎮痛作用と鎮静作用が異なる機序を介することを初めて明らかにしたものである。

亜酸化窒素が作用する分子標的は NMDA 受容体であり、亜酸化窒素の薬理作用は NMDA 受容体拮抗作用を基盤とすると考えられているが、NMDA 受容体拮抗作用がノシセプチン受容体と  $\kappa$  オピオイド受容体の活性化を引き起こす機序については不明である。また、NMDA 受容体拮抗作用を有する麻酔薬であるキセノンとケタミンの鎮痛作用が亜酸化窒素と同様にオピオイド受容体ファミリー活性化を介するか否かも不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、亜酸化窒素と同様に NMDA 受容体拮抗作用を有する全身麻酔薬 (ケタミン、キセノン) の鎮痛機構にオピオイド受容体ファミリーが関与する可能性について、選択的拮抗薬と遺伝子欠損マウスを用いた行動薬理学的実験、分子生物学的手法等により検討することを目的とする。第一の目標は、研究期間内にケタミンとキセノンの鎮痛作用にオピオイド受容体ファミリーのどの受容体が関与するかを明らかにすることである。亜酸化窒素、キセノン、ケタミンの鎮痛作用がすべて NMDA 受容体拮抗作用に基づくとすれば、亜酸化窒素と同様にキセノン、ケタミンの鎮痛作用も  $\kappa$  オピオイド受容体の活性化を介する可能性があるが、とキセノン投与によって受容体とそれに対する内因性オピオイドペプチドの発現が増加するか否かを明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

オピオイド受容体ファミリー遺伝子欠損マウスにおける亜酸化窒素、キセノン、ケタ

ミンの鎮痛作用を検討する。

オピオイド受容体ファミリー ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  オピオイド受容体とノシセプチン受容体) 遺伝子欠損マウスと対照マウスに対して、各種の疼痛刺激に誘発される反応の抑制を指標として、亜酸化窒素、ケタミン、キセノンの鎮痛作用に関する群間差の有無を検討する。

1) オピオイド受容体ファミリー遺伝子欠損マウス、対照マウスそれぞれについて、各種濃度の亜酸化窒素あるいはキセノン吸入させた後、tail flick 法、hot plate 法、酢酸ライジング法により、退避反応消失を指標として鎮痛効果の有無を検討する。さらに、立ち直り反射消失 (loss of righting reflex) を指標として、各亜酸化窒素あるいはキセノン濃度における鎮静作用の有無を決定する。

2) 各群 10 頭程度のマウスについて検討し、50%のマウスにおいて鎮痛効果あるいは鎮静効果を示す亜酸化窒素あるいはキセノン濃度すなわち EC50 を決定する。

3) 遺伝子欠損マウスと対照マウスの鎮痛効果あるいは鎮静効果に関する EC50 を比較し、いずれの遺伝子欠損マウスが対照マウスとの間に有意差を示すかを検討する。

4) オピオイド受容体ファミリー ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  オピオイド受容体とノシセプチン受容体) 遺伝子欠損マウス、対照マウスについて、50%のマウスにおいて鎮痛効果あるいは鎮静効果を示すケタミン投与量すなわち ED50 を決定し、いずれの遺伝子欠損マウスが対照マウスとの間に有意差を示すかを検討する。

#### 4. 研究成果

亜酸化窒素の鎮痛作用にオピオイド受容体が関与することは従来報告されていたが、どのオピオイド受容体が関与するかは明らかではなかった。本研究では、オピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の作用を野生型マウスと比較した。

揮発性麻酔薬セボフルラン、イソフルラン

の力価の指標である最小肺胞濃度 (MAC) は野生型マウスでそれぞれ  $2.57 \pm 0.04$  %、 $1.25 \pm 0.13$  %であるのに対して、オピオイド受容体欠損マウスでは  $2.70 \pm 0.31$  %、 $1.27 \pm 0.08$  %で、有意の差はなかった。この結果は、これらの麻酔薬に MAC が  $\mu$  オピオイド受容体欠損マウスで変化しないという私たちの従来の結果と併せて、揮発性麻酔薬の作用にオピオイド受容体は直接関与しないという従来の結果、報告を裏付けるものである。

亜酸化窒素の MAC は大気圧下では求めることができないので、セボフルラン MAC に対して亜酸化窒素がどのように影響するかを検討して、間接的に評価した。野生型マウスでは 70%亜酸化窒素存在下でセボフルランの MAC は約 30%低下するが、オピオイド受容体欠損マウスでは有意な変化がなく、亜酸化窒素の揮発性麻酔薬の MAC を低下させる作用はオピオイド受容体を介することが示唆された。オピオイド受容体選択的アゴニストである U-50488 の作用を検討したところ、野生型マウスではセボフルラン MAC が有意に低下するのに対して、オピオイド受容体欠損マウスでは MAC に変化がなかった。これは、オピオイド受容体が活性化されると揮発性麻酔薬の MAC を低下させる作用を示すことを意味している。

亜酸化窒素の鎮痛作用を酢酸ライジング試験、ホットプレート試験により検討した。野生型マウスでは、亜酸化窒素吸入により酢酸ライジング試験において 10 分間に観察されるライジング反応の回数が有意に減少し、ホットプレート試験における潜時が有意に延長した。一方、オピオイド受容体欠損マウスでは、いずれの方法においても亜酸化窒素吸入群と非吸入群で有意の差は見出されず、亜酸化窒素の鎮痛作用がほとんど消失していることが明らかになった。これらの試験により オピオイド受容体選択的アゴニス

トである U-50488 の作用を検討したところ、オピオイド受容体欠損マウスでは有意な鎮痛作用が消失しており、オピオイド受容体欠損マウスにおいてオピオイド受容体活性化による薬理作用が消失していることが確認された。

野生型マウスでは 70%亜酸化窒素吸入により腰髄後角 - 層における c-Fos 陽性細胞数が増加していた。腰髄後角 - 層は下行抑制系からの入力により活性化される神経細胞が存在することが知られている。これまでも亜酸化窒素によりこの部位に c-Fos 陽性細胞が増加することが報告され、亜酸化窒素はノルアドレナリン系下行抑制系の活性化を介して脊髄における GABA 作動性介在神経細胞を活性化することの証拠とされている。一方、オピオイド受容体欠損マウスでは亜酸化窒素を吸入させても c-Fos 陽性細胞数増加は認められなかった。この結果は、亜酸化窒素による下行抑制系の活性化にはオピオイド受容体が必須であることを示している。

全身麻酔は鎮痛、鎮静、不動化の 3 要素が必要とされており、吸入麻酔薬の薬理作用にもこの 3 要素が含まれると考えられている。そこで、鎮痛作用以外の亜酸化窒素の作用にもオピオイド受容体が関与する可能性を検討するために、野生型マウスとオピオイド受容体欠損マウスにおける亜酸化窒素の鎮静作用を比較した。70%亜酸化窒素存在下及び非存在下で立ち直り反射抑制に要するセボフルランの濃度を評価したところ、野生型マウスとオピオイド受容体欠損マウスいずれにおいても 70%亜酸化窒素により EC50-LORR は約 30%低下し、両者間に有意差はなかった。この結果は、亜酸化窒素の鎮静作用は鎮痛作用と異なり、オピオイド受容体の活性化を必要としないことを示唆している。

以上の結果は、亜酸化窒素の鎮痛作用は

オピオイド受容体を介して下行抑制系が活性化されることによって生じること、亜酸化窒素の鎮静作用はオピオイド受容体を介さない機序によることを示唆するものである。

一方、キセノンとケタミンの鎮痛作用については、これまでの検討ではオピオイド受容体欠損マウスと野生型マウスの間で有意な差は認められず、さらなる検討が必要と考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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:

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

深川 博志 (FUKAGAWA, Hiroshi)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00742991