

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15679

研究課題名(和文)オピオイドの新規効能を応用したPTSD治療法の開発

研究課題名(英文)The study to develop a therapeutic method for PTSD with opiate

研究代表者

宮崎 智之(Miyazaki, Tomoyuki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30580724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：超短時間作用型オピオイドであるレミフェンタニルは、海馬神経細胞に存在するAMPA受容体に対して容量依存的に脱リン酸化を促進し、その結果膜分画に存在するAMPA受容体が減少することが分かった。この作用はprotein phosphatase1を介した作用であることが分かった。この知見を応用して、恐怖記憶を消去することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：A ultra-short acting opiate, remifentanil, promoted the dephosphorylation of hippocampal AMPA receptors in a dose-dependent manner, leading to the reduction of membrane AMPA receptors. Furthermore, this phenomenon was mediated by protein phosphatase1. In vivo manipulation to promote the dephosphorylation of hippocampal AMPA receptors could erase fear memory in the rats.

研究分野：神経科学

キーワード：オピオイド AMPA受容体

1. 研究開始当初の背景

震災などの自然災害、戦争などの人為的災害が起こった際に、そこでの凄惨な体験を契機に PTSD を発症することが広く知られているが、現時点では有効な治療方法が限られている。そうした中で、イラク戦争従事兵を対象に、戦地での受傷に際して疼痛緩和目的にモルヒネが使用された群において、その後の戦争関連 PTSD の発症率が有意に低下したことが報告されている(Holbrook et al., NEJM. 2010)。PTSD のモデル動物では、細胞膜表面に提示される AMPA 受容体量が増加し、そのメカニズムの一つとして細胞内領域のリン酸化 (ser831、ser845) が増大することが分かっている (Mitsushima et al., PNAS. 2011)。また、このリン酸化の増加は、モルヒネ投与によって阻害されることが過去に報告されている(Kam et al., JNS. 2010)。申請者は *ex vivo* の系を用いた事前検討で、薬剤により化学的リン酸化を誘導し AMPA 受容体が増加した海馬において、手術麻酔で使用するレミフェンタニルが、その脱リン酸化を有意に引き起こすことを明らかにしている。レミフェンタニルが AMPA 受容体の脱リン酸化を誘導し、AMPA 受容体量を減少させる作用を応用してレミフェンタニルが PTSD の治療薬となりうるかを検証しようと考えた。

2. 研究の目的

臨床現場において、オピオイドは鎮痛薬としてのみ使用されているが、近年は鎮痛以外の神経機能を調節する作用が注目されている。その一つとして、オピオイドによる AMPA 受容体機能の抑制機構が明らかになってきた。PTSD モデル動物では AMPA 受容体のリン酸化およびシナプス提示量増加が生じている。

AMPA 受容体リン酸化を阻害することで恐怖記憶が消去できるが、現行の手段では遺伝子操作を必要とする。本研究では、オピオイドを用いた薬理的介入により PTSD 治療が可能かを検討する。オピオイドによる AMPA 受容体機能抑制のメカニズムを明らかにし、その結果を応用して、PTSD モデル動物で有害な恐怖記憶の消去が起きるかを行動学的に検討し、オピオイドの新たな臨床応用可能性の探索を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、オピオイドによる AMPA 受容体機能抑制のメカニズムを明らかにし、その効果を応用して、恐怖記憶消去に向けた治療的応用可能性を探る。PTSD モデル動物の急性海馬切片を用いて、レミフェンタニルの至適投与濃度、タイミングを設定する。またそのメカニズムについて、薬理学的手法にて明らかにした。次に、*in vivo* でレミフェンタニルを投与し、PTSD モデル動物の恐怖記憶が消去できるかを行動学的に検討する。最後に、薬理学的手法で AMPA 受容体の脱リン酸化を阻害した PTSD モデル動物を作成し、オピオイドが AMPA 受容体の脱リン酸化メカニズムを介して恐怖記憶を消去するのかを明らかにする。

具体的な実験内容は以下の通り。

1. PTSD モデル動物の急性脳切片を用いて、生化学的な AMPA 受容体リン酸化レベルを指標に、レミフェンタニルの至適投与濃度、タイミングを検討する。また電気生理学の実験を併用し、本投薬設定の有効性に対する機能的裏付けを検討する。
2. *in vivo* でのレミフェンタニル投与により、PTSD モデル動物の恐怖記憶が消去できるかを行動学的に検討し、そ

の際の AMPA 受容体リン酸化レベルを生化学的に定量する。

3. 薬理学的手法を用いて AMPA 受容体の脱リン酸化を阻害した PTSD モデル動物を用いて、オピオイドが恐怖記憶を消去できるかを行動学的に検討し、併せて電気生理学的検討も行う。

4. 研究成果

まずレミフェンタニルが増加した AMPA 受容体ならびにリン酸化を抑制することができるかを検討した。成体 SD ラットから厚さ 400um の急性海馬切片を作成し、そこに PDBu を加えて化学的 LTP を誘導した。その結果、膜表面の GluA1 および ser831、ser845 のリン酸化が増加した。超短時間作用型レミフェンタニルが GluA1 の挙動にどのように影響を及ぼすかを検討するため、PDBu にレミフェンタニルを同時投与することで膜表面の GluA1 および ser831、ser845 のリン酸化増加が抑制できるかを検討した。その結果、レミフェンタニルを 240、500、1000、2000 μ M と増加させるにつれ、膜表面の GluA1 および ser831、ser845 のリン酸化が容量依存的に低下することが明らかとなった(図1)。

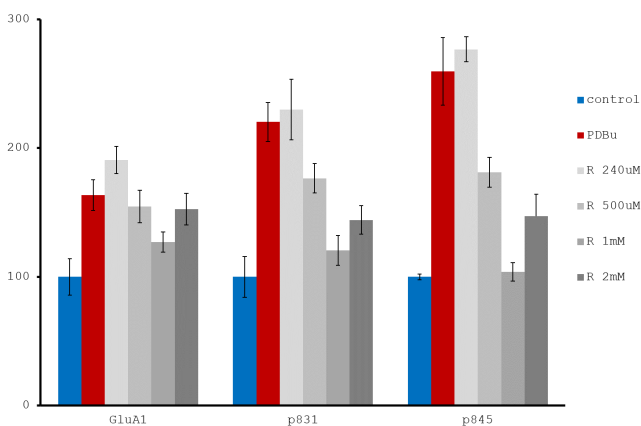


図1.AMPA 受容体に対するレミの効果

つぎに、こうした AMPA 受容体の脱リン酸化がどういったメカニズムで生じて

いるかを検討した。レミフェンタニルが AMPA 受容体の脱リン酸化を起こすメカニズムとしては、AMPA 受容体のリン酸化を阻害する、AMPA 受容体の脱リン酸化を促進する、のいずれかが考えられる。について、AMPA 受容体のリン酸化には protein phosphatase (PP) 1/2A が仲介する ser831 のリン酸化と、PP2B が仲介する ser845 のリン酸化が存在する。成体 SD ラットから厚さ 400um の急性海馬切片を作成し、そこに PDBu を加えて化学的 LTP を誘導した。また別切片に対して 1mM レミフェンタニルを投与した。この結果、レミフェンタニルの投与により、protein phosphatase-1 の活性が低下することが分かった(図2)。

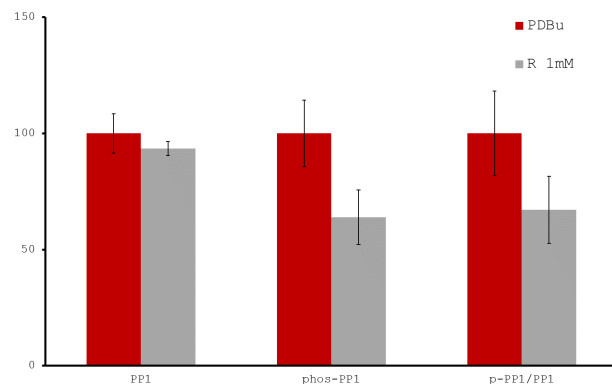
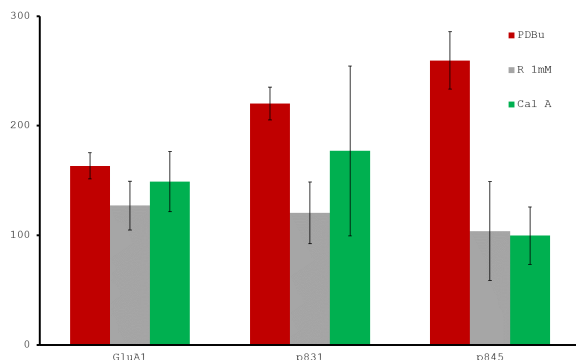


図2.レミフェンタニルは PP1 の活性化を阻害し、リン酸化を抑制する

次に、薬理学的に PP1 を抑制することで、レミフェンタニルの効果をリバースできるかを検討した。PP1 の選択的な拮抗薬に Calyculin A がある。成体 SD ラットから厚さ 400um の急性海馬切片を作成し、そこに PDBu を加えて化学的 LTP を誘導した。別の切片に 1mM レミフェンタニルを加えたもの、また 1mM レミフェンタニルに加えて Calyculin A を追加したものを準備し、検討した。この結果、Calyculin A の投与により、レミフェンタニルによるリン酸化低下の効果をレスキューできることが分かった(図3)。



**図3.AMPA 受容体に対するレミの効果
をリン酸化阻害剤でキャンセルした**

また上記の結果を応用して、PTSD モデルラットにレミフェンタニルを投与することで、恐怖記憶が消失するかを検討した。その結果、恐怖記憶形成後にレミフェンタニルを投与すると、恐怖記憶が消失することを明らかにした。

以上の結果を図4にまとめると、オピオイド(レミフェンタニル)の投与はPP1の阻害作用を有しており、それにより化学的 LTP により誘導される ser831 のリン酸化が阻害された。このリン酸化阻害は、刺激依存的な AMPA 受容体の膜提示量増加を阻害した。同様の現象は in vivo でも同様であり、恐怖条件付けによって生じる AMPA 受容体のリン酸化ならびに AMPA 受容体の膜への移行は、レミフェンタニル投与により阻害され、その結果恐怖記憶の成立が阻害された。

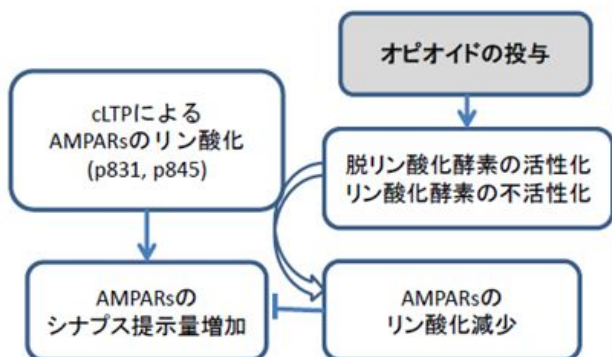


図4. 刺激依存的な AMPA 受容体の膜移行のメカニズムに対しオピオイド(レミフェンタニル)はリン酸化阻害により膜移行を阻害した

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

宮崎 智之 (MIYAZAKI, Tomoyuki)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号： 30580724

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

高瀬 堅吉 (TAKASE, Kenkichi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号： 80381474

(4)研究協力者

小林 綾子 (KOBAYASHI, Ayako)

横浜市立大学・医学部・指導診療医