

平成 20 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590068

研究課題名（和文） 海馬シナプスのノシセプチン代謝に基づく抗痴呆薬の創薬

研究課題名（英文） Development of anti-dementia drugs based on metabolism of nociceptin by synaptic membranes of hippocampus.

研究代表者

桜田 誓 (SAKURADA CHIKAI) 日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号： 30279244

- 研究成果の概要：ノシセプチンは学習・記憶形成に対し抑制的に作用していることから、痴呆性疾患の治療薬として、ノシセプチンの作用を抑制する薬剤が切望されている。そこで、海馬シナプスにおけるノシセプチンの生理作用の終結に関わる膜結合性ペプチダーゼを解析した。ノシセプチン分解の引き金を引くペプチダーゼの活性増強を目指した薬剤の創薬は、記憶障害を伴う痴呆性疾患の治療薬として有用かもしれない。また、高用量モルヒネの脊髄腔内投与によって誘発される疼痛関連行動のメカニズムについて知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	690,000	4,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学、脳・神経、海馬、ノシセプチン、痴呆、疼痛、モルヒネ

1. 研究開始当初の背景

学習・記憶障害を伴う疾患には、アルツハイマー病をはじめとする各種精神神経疾患などがある。記憶という現象は、高度に分化した脳の中でも特に複雑な機能であり、その分子レベルでのメカニズムに関してはいくつかのモデルが提唱されてきた。記憶・学習の成立に重要な役割を果たす海馬は、大脳皮質から興奮性の入力を受けて種々の処理を行った後、また信号を大脳皮質へと返すが、その過程で情報のソーティングを行い、記憶形成を制御していると考えられている。海馬でシナプスが高頻度で活性化すると、そのシナプスでの伝達効率が長時間にわたって上昇することが知られており、この現象は長期

増強(LTP)と呼ばれ、記憶の実験モデルとして広く研究されている。近年、遺伝子欠損動物でLTPや学習・記憶能力が調べられ、種々の分子がLTPに関与することがわかってきたが、その大半はLTPが減弱し、記憶能力が低下するという報告であった。ところが、LTPが増強される遺伝子欠損動物：ノシセプチン受容体ノックアウトマウスが発見された。ノシセプチン受容体のリガンドであるノシセプチンは、17個のアミノ酸からなるペプチドで、内因性のオピオイドペプチドのダイノルフィンと相同性が高いにも関わらず、既存のオピオイドとは異なり、痛覚過敏(痛み)を引き起こす。また、ノシセプチンをラットの海馬に投与すると水迷路学習試験において

学習・記憶が障害される。

さらに、ノシセプチン受容体ノックアウトマウスでは、個体レベルでの記憶能力が野生型よりも優れていることが報告されている。ノシセプチンおよびその受容体が海馬で豊富に発現していることを考えあわせると、ノシセプチンは学習・記憶形成に対して抑制的に作用しているといえる。これらの結果がヒトにまで拡張できると仮定すると、薬理的にノシセプチンの作用を抑えることができれば、記憶障害を伴う痴呆性疾患などの治療に用いることができる薬剤を開発できる可能性が大いにある。

ノシセプチンのような神経ペプチドの生成と分解はその生理作用発現との関連において巧みに制御されている。古典的伝達物質であるアセチルコリンの場合、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンはシナプス膜に結合した膜結合性のアセチルコリンエステラーゼによる酵素的分解でその生理作用を停止する。神経ペプチドの場合もアセチルコリン分解系のアナロジーで、シナプス膜に結合しているペプチダーゼによる分解で、その生理作用を終結することが予想される。そこで、学習・記憶に密接に関係している海馬シナプスにおけるノシセプチンの代謝過程を明かにし、ノシセプチンの代謝に基づく抗痴呆薬の可能性を探る。

また、疼痛に関する知見も得た。特に慢性疼痛の信号は、記憶・学習と同様に、脳・脊髄に可塑的变化を与えることにより記憶され、難治性疼痛となるケースが多い。痛みの除去にモルヒネが最強の鎮痛薬として使われるが、慢性投与あるいは脊髄腔内投与により、逆に疼痛反応を惹起することが報告されている。同様の現象は実験動物でも認められ、高用量のモルヒネを髄腔内投与すると疼痛関連行動が発現する。それらの発現機序に関しても解析を行った。

2. 研究の目的

ノシセプチンのような神経ペプチドは、アセチルコリン分解系のアナロジーで、シナプス膜に結合しているペプチダーゼによる分解で、その生理作用を終結することが予想される。研究代表者は、痛みの伝達・制御におけるノシセプチン代謝に関する研究において、脊髄シナプス膜によるノシセプチンの代謝過程を明かにした。その結果、脊髄シナプスのエンドペプチダーゼ-24.11によるノシセプチンの代謝は、ノシセプチン自体のシナプス伝達を終結させるばかりでなく、主要代謝物：ノシセプチン(1-13)フラグメントを生成させ、新たな活性(鎮痛)を生ずる二面性があることを明かにした。すなわち、ノシセプチンの代謝産物がノシセプチンの生理作用に拮抗する。同様なロジックが海馬シナプ

スのノシセプチン分解系に適用できると考えている。そこで、海馬シナプス膜によるノシセプチンの代謝過程及び分解に関するペプチダーゼを明らかにする。さらに、その代謝産物がノシセプチン誘発性の学習・記憶障害に拮抗するかを解析し、抗痴呆薬としての可能性を探る。

また、疼痛に関する研究も実施した。現在、癌性疼痛や術後痛をはじめとする極めて強い痛みに対してモルヒネが第一選択薬として使用されているが、その一方で便秘、悪心、嘔吐、耐性・依存性の発現などの副作用が問題となっている。また、モルヒネは強力な鎮痛薬であるにもかかわらず、慢性投与あるいは脊髄腔内投与により痛覚過敏やアロディニア(異痛症：神経損傷で起こる極めて深刻な痛覚症状で、普段痛みとして感じない軽い触刺激や風をも激痛として感じてしまう病態)を発現することも報告されている。従って、高用量モルヒネ誘発性の急性疼痛、痛覚過敏およびアロディニアの詳細なメカニズムを解明することは、臨床上的治療方法に有益な情報を与え、医師が躊躇なくモルヒネを使用することができる。また、疼痛患者やその家族がモルヒネの使用に対する不安を払拭することができ、モルヒネによる疼痛緩和治療の進展に大きく貢献するものと考えられる。これらのメカニズムを解明する一環として、マウスあるいはラットを用い、高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動に関わるサブスタンスPとN0(一酸化窒素) - ERK(extracellular signal-regulated protein kinase) 経路の関与について解析した。

研究の方法

①ラット海馬シナプス膜標品によるノシセプチン代謝の解析

海馬シナプスにおけるノシセプチンの分解に関与する膜結合性ペプチダーゼを調べる目的で、ラット海馬シナプス膜標品によるノシセプチンの分解を解析した。代謝物の分離分析は、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより行い、その同定はアミノ酸組成分析・質量分析により行い、代謝産物を明らかにした。更に、種々のペプチダーゼ阻害剤による効果を調べ、分解の引き金を引く主要なペプチダーゼを推察した。また、主要代謝産物の生成に対する阻害剤の効果を解析した。

②疼痛関連行動の測定

ラットの場合：高用量のモルヒネを脊髄腔内投与後、直ちにvocalization反応が見られるまでのlatency及び5分間毎のagitation反応及びvocalization反応を40分間測定した。

マウスの場合：高用量のモルヒネを脊髄腔

内投与後、観察される行動（後足による scratching回数及び足跡に対するbiting, licking反応）を5分間測定した。

③マイクロダイアリシス法

Marsalaらの方法に準じて行った。すなわち、U字型マイクロダイアリシスプローブの先端がラットの第5・第6腰髄に到達するように留置し、術後5日後に実験に使用した。Isoflurane麻酔下、マイクロダイアリシスプローブのinletより人工脳脊髄液を10 μ l/分で灌流し、outletから透析液を回収した。平衡状態になるまで30分間観察し、10分毎に2回透析液を採取し、その平均濃度を基準値とした。薬物投与後の透析液は、10分毎に90分間回収し、その濃度は基準値に対する変化率で表した。NO（一酸化窒素）遊離量は、透析液中のNO代謝物を指標とし、還元法にてNO analyzerを用いて測定した。また、グルタミン酸の分析は逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを用い、*o*-phthalaldehyde誘導法にて測定した。

④脊髄後角におけるERK(extracellular signal-regulated protein kinase) のリン酸化(活性化)の検討

薬物を脊髄腔内投与し、5分後、腰髄の背側部分を取り出し、ウエスタンブロット解析に用いた。ERKのリン酸化(活性化)は、リン酸化ERKに対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により行った。

4. 研究成果

①ラット海馬シナプス膜標品によるノシセプチン代謝の解析

ノシセプチンはラット海馬シナプス膜標品により時間依存的に分解した。その分解速度は、コントロールのペプチドである Leu-エンケファリンと比較すると、約0.5倍であり、生理的な分解を反映していると考えられる。次に、ノシセプチンの主要代謝産物を逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分離し、アミノ酸組成分析・質量分析により同定したところ、フェニルアラニンおよびノシセプチン(1-13)フラグメントが認められた。これら主要な代謝産物の生成に対する各種阻害剤の効果を調べたところ、金属キレート剤の *O*-フェナントロリンによって強く抑制された。一方、アンギオテンシン変換酵素の特異的な阻害剤であるエナラプリル、アミノペプチダーゼ阻害剤であるベスタチン、セリンプロテアーゼ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤では、ほとんど阻害されなかった。更に、ノシセプチンの最初の分解にどのようなペプチダーゼが関与するのかを明らかにするため、基質ノシセプチンの減少に対する阻害剤の効果を調べた。その結果、

金属キレート剤の *O*-フェナントロリンによって強く抑制され、エナラプリル、ベスタチン、セリンプロテアーゼ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤では、ほとんど阻害されなかった。以上の結果より、海馬シナプスにおけるノシセプチンの最初の分解に *O*-フェナントロリン感受性の金属ペプチダーゼが主要な役割を果たしていることが示唆された。今後、ノシセプチン分解の引き金を引くペプチダーゼの活性増強を目指した薬剤の創薬は、記憶障害を伴う痴呆性疾患の治療薬として有用かもしれない。

②高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動におけるNO（一酸化窒素）とグルタミン酸の役割

モルヒネ脊髄腔内投与により疼痛関連行動(agitation反応およびvocalization反応)が出現し、同時に脊髄NO代謝物及びグルタミン酸遊離量の増加が認められた。しかし、これらの変化はオピオイド受容体アンタゴニストであるナロキソンの投与では全く影響を受けなかった。一方、高用量モルヒネ誘発性関連行動は、NO合成阻害薬であるL-NAMEや競合的NMDA受容体アンタゴニストであるCPP及び非競合的NMDA受容体アンタゴニストであるMK-801の前処理により用量依存的に抑制された。さらに高用量モルヒネ投与直後からの脊髄内グルタミン酸遊離量の増加は、L-NAMEの前処理により完全に抑制され、CPP及びMK-801の前処理では、投与10分後から抑制された。また、脊髄内NO代謝物遊離量の増加は、L-NAME、CPP及びMK-801の前処理より投与10分以降で完全に抑制された。以上の結果より、高用量モルヒネ誘発性疼痛関連行動と脊髄内NO代謝物及びグルタミン酸遊離との間に相関関係が確認され、その発現には、グルタミン酸遊離→脊髄内NMDA受容体の活性化→NO産生→グルタミン酸遊離とする、脊髄内NMDA-NO cascade系が関与していることが強く示唆された。

③サブスタンスP(1-7)フラグメントは、脊髄内NMDA-NO cascade系を介した高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動を抑制する。

サブスタンスP *N*-末端フラグメントは、疼痛関連反応に抑制的に作用していることが知られている。高用量モルヒネ誘発性疼痛関連行動に対するサブスタンスP *N*-末端フラグメントの効果について検討した。高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動は、サブスタンスP(1-7)フラグメントの前投与により用量依存的に抑制された。

またその抑制効果は、サブスタンスP(1-7)アンタゴニストである[D-Pro², D-Phe⁷]substance P(1-7)の前処理により

完全に拮抗した。また、高用量モルヒネ投与直後からの脊髄内グルタミン酸遊離量及びNO代謝物の増加は、サブスタンスP(1-7)フラグメントの前処理によって優位に抑制された。またその効果は、サブスタンスP(1-7)アンタゴニストによって拮抗された。以上の結果より、サブスタンスP(1-7)フラグメントは、脊髄後角でのプレシナプスからのグルタミン酸の遊離とそれに連動するNO産生を阻害する機序で、高用量モルヒネ誘発性疼痛関連行動を抑制することが明らかになった。

④高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動におけるNO(一酸化窒素)とERK(extracellular signal-regulated protein kinase)の役割

Mitogen-activated protein kinase(MAPキナーゼ)カスケードは、酵母からヒトに至るまで真核生物において高度に保存された細胞内シグナル伝達経路の主要分子であり、細胞増殖・分化・アポトーシスなどの生命現象において重要な役割を果たしていることが知られている。MAPキナーゼカスケードは、細胞外から様々な刺激により活性化する細胞内タンパク質リン酸化酵素で、哺乳類にはERK1/2、JNK、p38、ERK5の4つが存在することが知られている。近年、ERK1/2をはじめとする細胞内情報伝達系の活性化が、痛みの発生またはそれに伴う可塑的な変化にも重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、高用量モルヒネ脊髄腔内投与誘発性疼痛関連行動におけるNO(一酸化窒素)－ERK経路の関与を検討した。高用量モルヒネ誘発性疼痛関連行動は、neuronal nitric oxide synthase(nNOS)の選択的阻害剤である7-NIおよびTRIMによって用量依存的に抑制された。一方、inducible nitric oxide synthase(iNOS)の選択的阻害剤である

W1400の場合では、用量非依的に阻害し、比較的高用量を必要とした。

次に高用量モルヒネ脊髄腔内投与による、脊髄後角でのERKのリン酸化(活性化)を解析したところ、投与後5分で著しいリン酸化が認められた。また、このERKのリン酸化は、ERKリン酸化を阻害するMEK阻害薬であるU0126を脊髄腔内に投与すると、脊髄後角におけるERKリン酸化は阻害され、高用量モルヒネ誘発性疼痛関連行動も抑制された。

さらには、高用量モルヒネ誘発性のERKのリン酸化は、7-NIおよびTRIMで強く阻害され、W1400では影響がなかった。これらの結果は、高用量モルヒネ誘発性の疼痛関連行動は、脊髄後角におけるnNOS-ERK経路の活性化が引き金となることを示唆している。

以上をまとめると、高用量モルヒネ誘発性の疼痛関連行動は、脊髄後角において求心性一次知覚神経終末からサブスタンスP、グルタミン酸の遊離を促進し、脊髄後角内における一酸化窒素(NO)－ERK経路を強化することにより発症することが明らかになった。

欧米諸国において疼痛治療にモルヒネを積極的に使用することが広く普及しているが、我が国においてはその使用頻度は増加しているものの、モルヒネの様々な副作用を懸念しモルヒネによる疼痛治療を躊躇する場合も見られる。副作用の一端であるモルヒネを高用量使用することにより引き起こされる急性疼痛、痛覚過敏やアロディニアの機序を解明することは、モルヒネによる疼痛緩和治療の進展に大きく貢献するものと考えられる。

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2件)

① 著者名

Takaaki Komatsu, Chikai Sakurada, Mika Sasaki, Kengo Sanai, Minoru Tszuki, Giacinto Bagetta, Shinobu Sakurada and Tsukasa Sakurada.

論文標題

Extracellular signal-regulated kinase(ERK) and nitric oxide synthase mediate intrathecal morphine-induced nociceptive behavior.

掲載誌名

Neuropharmacology 52 巻 1237 頁～1243 頁 2007 年

査読有り

② 著者名

Tsukasa Sakurada, Takaaki Komatsu, Hikari Kuwahata, Chizuko Watanabe, Toru Orito, Chikai Sakurada, Minoru Tszuki and Shinobu Sakurada.

論文標題

Intrathecal substance P(1-7) prevents morphine-evoked spontaneous pain behavior via spinal NMDA-NO cascade.

掲載誌名

Biochemical Pharmacology 74 巻 758 頁～767 頁 2007 年

査読有り

[学会発表](計2件)

① 発表者

小松生明、勝山 壮、真井健吾、桜田 誓、桜田 忍、桜田 司

発表標題
モルヒネ-3-グルクロニド マウス脊髄
内投与に伴うグリア細胞におけるサイト
カインの役割

学会名
第 82 回日本薬理学会年会

発表年月
2009 年 3 月

発表場所
横浜

② 発表者

小松生明、重野 牧、佐々木美佳、桜田
誓、都築 稔、桜田 忍、桜田 司

発表標題
Morphine-3-glucuronide の脊髄クモ膜
腔内投与により誘発される疼痛関連行動
の発現機序について

学会名
第 79 回日本薬理学会年会

発表年月
2006 年 3 月

発表場所
横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜田 誓 (SAKURADA CHIKAI)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号： 30279244

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

中島 孝則 (NAKAJIMA TAKANORI)
日本薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号： 80265404

桜田 司 (SAKURADA CHIKAI)
第一薬科大学・薬学部・教授
研究者番号： 80124907