

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16475

研究課題名（和文）オピオイド誘発性痛覚過敏での神経-グリア連関におけるセロトニンの関与の解明

研究課題名（英文）Studies on effects of serotonin in neuron-glia interaction for opioid-induced hyperalgesia.

研究代表者

佐々木 美佳（SASAKI, MIKA）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20774061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではモルヒネによるオピオイド誘発性痛覚過敏(OIH)モデルを用いてオピオイドによる逆説的痛覚過敏におけるセロトニンの関与について検討した。モルヒネによるOIHは、5-HT₃受容体拮抗薬オンダンセトロン(OND)およびセロトニン合成阻害剤 para-chlorophenylalanine(PCPA)により抑制されることがわかった。一方、OIH発症時に痛み関連タンパク質のリン酸化ERKの増加やアストロサイトは増加するが、ONDやPCPA投与による抑制効果はみられなかった。以上から、OIHには脊髄後角におけるセロトニンが関与しており、アストロサイトの活性化は二次的である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻薬性鎮痛薬（オピオイド）は、周術期疼痛管理やがん性疼痛の緩和治療に必須の鎮痛薬である一方、オピオイドの比較的大量投与や長期使用により、鎮痛効果とは逆の作用である逆説的な痛覚過敏（Opioid-Induced Hyperalgesia：OIH）を生じることが知られており、オピオイドの使用に対する臨床上的解決すべき問題となっている。本研究から、OIHにはセロトニンが深く関与していることが明らかになり、セロトニン及びその受容体がOIHの治療・予防標的となりうることを示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, a model of opioid-induced hyperalgesia (OIH) with repeated intraperitoneal administration of morphine was developed to elucidate the pathogenesis of paradoxical opioid-induced hyperalgesia, and the involvement of serotonin was investigated. Morphine-induced OIH was inhibited by the 5-HT₃ receptor antagonist ondansetron (OND) and the serotonin synthesis inhibitor para-chlorophenylalanine (PCPA). On the other hand, there was an increase in pain-related protein phosphorylated ERK and astrocyte activation during the onset of OIH, but no inhibitory effect of OND or PCPA administration. These results suggest that serotonin in the dorsal horn of the spinal cord is largely involved in OIH and that astrocyte activation may be secondary.

研究分野：痛み

キーワード：セロトニン アストロサイト モルヒネ オピオイド誘発性痛覚過敏

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

麻薬性鎮痛薬（オピオイド）は、周術期疼痛管理やがん性疼痛の緩和治療に必須の鎮痛薬である一方、オピオイドの比較的大量投与や長期使用により、鎮痛効果とは逆の作用であるオピオイド誘発性痛覚過敏（Opioid-induced hyperalgesia : OIH）を生じることが知られている。また、オピオイドを連用することによる鎮痛効果の減弱はオピオイド耐性として知られており、これらはオピオイドの使用に対する臨床上的解決すべき問題となっている。

末梢組織および神経の障害により、一次知覚神経および脊髄後角の2次ニューロン、グリア細胞において、どのような細胞内シグナリングがOIHを引き起こすのか、神経-グリア間での興奮にどのような伝達物質が関与しているのか、そのメカニズムの一端を明らかにする。

2. 研究の目的

【モルヒネ連続投与による OIH 発症メカニズムの検討をセロトニンと脊髄アストロサイトの関係により解明】

本研究では、モルヒネ連続投与によって作製された OIH モデルマウスを用いて脊髄後角の2次ニューロンおよびアストロサイトにおける細胞内シグナリングやセロトニン伝達系についての関係を明らかにする。また、モルヒネにより OIH が生じた際の脊髄後角における神経興奮の伝播様式は全く明らかになっていない。今回の研究では、セロトニンが OIH の発症に関与しているかを検討するため、セロトニン受容体の1つである 5-HT₃ 受容体の拮抗薬オンダンセトロン（OND）を同時投与し OIH 発症そのものを抑制できるか、または発症時期を遅延させるのかということ、セロトニン合成阻害剤である para-chlorophenylalanine（PCPA）を使用し、セロトニン枯渇マウスを作製することでセロトニンが OIH 発症に影響を与えているかということを確認する。また神経細胞やグリア細胞とどのような関係があるのかを含めて、行動学的・分子生物学的検討により多面的に関係性を解析したいと考える。

3. 研究の方法

①モルヒネ連続腹腔内投与による OIH モデルマウスの作製および行動学的検討

OIH の評価は、機械的刺激法の von Frey 法および熱刺激法の Hargreaves 法を用いる。

➤ 6~8 週齢の C57BL/6N 雄性マウスを用いる。モルヒネによる OIH モデルマウスは、モルヒネ塩酸塩 20mg/kg/body を 1 日 2 回、4 日間連続腹腔内投与し作製、投与開始 5 日後まで測定する。OND の投与は 0.5~2.0mg/kg/body でモルヒネと同時投与し、OND 投与による OIH 発症の有無を比較する。

➤ PCPA 150mg/kg を 1 日 1 回、4 または 8 日間連続腹腔内投与しセロトニン枯渇マウスを作製する。PCPA はモルヒネ投与前に中止するもの（PCPA 4 日間連続投与）とモルヒネ投与中も PCPA を継続投与するもの（PCPA 8 日間連続投与）とで、モルヒネ投与による OIH 発症への影響を明らかにする。

②分子生物学的検討

OIH モデルマウスの脊髄後角における痛みに関係するタンパク質の発現変化をウエスタンブロットィング（WB）法を用いて定量的に判断する。

➤ Control（生理食塩水のみ投与）群、モルヒネ単独投与群、OND+モルヒネ同時投与群のそれぞれ投与後 5 日目の脊髄後角を、PCPA 投与群においては PCPA 投与後 9 日目（モルヒネとの同時投与後 5 日目）の脊髄後角を回収し MAP kinase のうちリン酸化 ERK の発現変

化を WB 法で定量し、OIH に対する OND と PCPA の効果を検討する。

➤上記の投与群におけるアストロサイト (GFAP) の発現変化およびそれに対する OND と PCPA の効果を検討する。

③免疫組織化学的検討

OIH モデルマウスの脊髄後角における痛み関連物質の発現変化および局在を免疫組織化学染色 (IHC) 法により検討する。

➤Control 群, モルヒネ単独投与群, OND+モルヒネ同時投与群, PCPA 投与群の脊髄後角を採取し, OIH によって脊髄後角のアストロサイトの発現が変化するかを検討する。

4. 研究成果

①モルヒネ連続腹腔内投与による OIH モデルマウスの作製および行動学的検討の結果

マウスにモルヒネ塩酸塩 20mg/kg を 1 日 2 回腹腔内投与したところ, 投与 3 日目から投与後 5 日目まで, 機械的刺激に対する足底逃避閾値が低下した (図 1)。以上のことから, モルヒネ連続腹腔内投与によるオピオイド誘発性痛覚過敏 (OIH) モデルマウスを作製した。また OND が OIH の発症を抑制できるかどうか調べるために, モルヒネと同時に OND 0.5mg/kg, 1.0mg/kg, 2.0mg/kg を腹腔内投与した。モルヒネ 20mg/kg 投与群と比較して, OND 2.0mg/kg+モルヒネ投与群では, 投与後 3 日目に機械的刺激による足底逃避閾値が有意に上昇した (図 1)。モルヒネ投与群と比較して, 投与後 5 日目の足底逃避閾値の上昇は, 用量依存性を伴わないすべての用量の OND 投与群で有意であった (図 1C)。また OND 単独投与は, 機械的刺激に対する足底逃避閾値に影響を与えなかった (図 1B, C 灰色)。一方, 熱刺激による足底逃避閾値は, モルヒネ投与群でも投与 5 日目まで有意な低下は認められなかった (data not shown)。

図 1

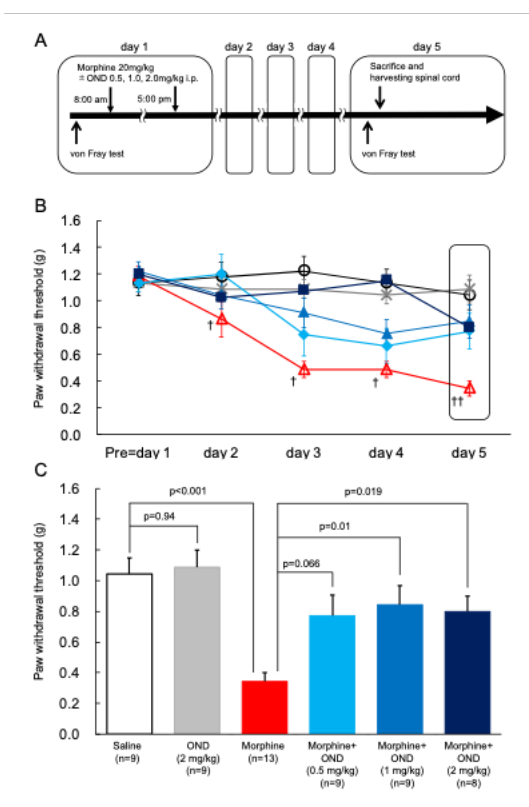
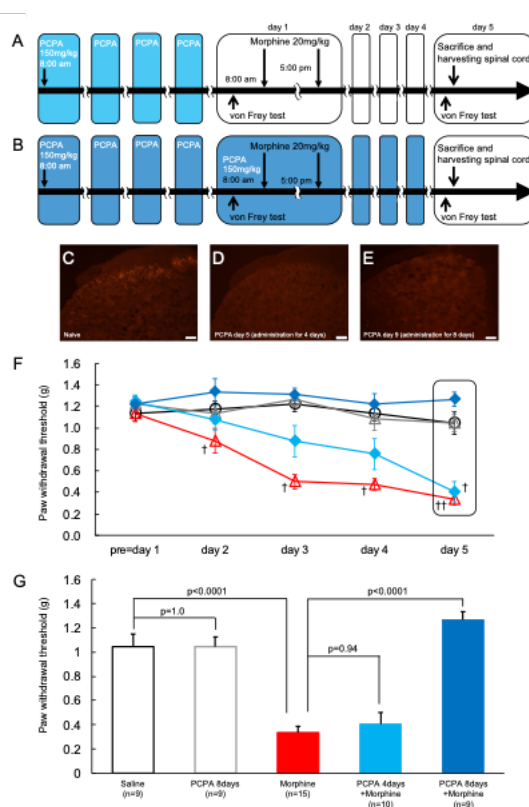


図 2



次に PCPA をモルヒネ投与開始 4 日前から 1 日 1 回腹腔内投与した。PCPA を 4 または 8 日間投与した結果、セロトニン発現はどちらもほぼ完全に低下した (図 2D, E)。セロトニン枯渇後、モルヒネ 20mg/kg を 1 日 2 回 4 日間投与することで、機械的足底逃避閾値がどのように変化するかを調べた。

PCPA 150 mg/kg を 4 日間投与した場合 (すなわち、モルヒネ投与前に PCPA を中止した場合)、OIH モデルマウスと比較して遅延したが、最終的にはモルヒネ単独投与と同等に OIH が発症した (図 2F, G)。しかし、PCPA を 8 日間投与 (モルヒネ投与中も PCPA を継続投与) すると、OIH の発症は完全に抑制された。PCPA 単独投与は、投与後 8 日目の足底逃避閾値に影響を与えなかった (図 2F, G)。

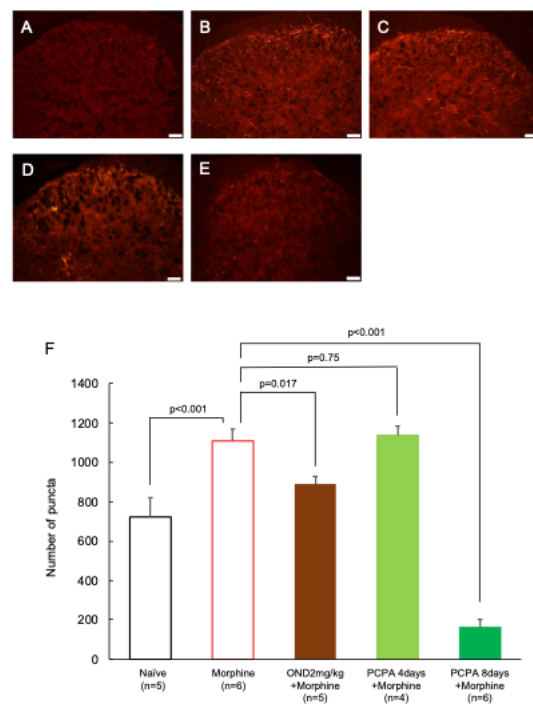
②OIH モデルマウスにおける脊髄後角でのセロトニンの発現変化と OND および PCPA の効果

セロトニンがモルヒネによる OIH に重要な役割を果たしていることが示唆されたことから、OIH モデルマウスの脊髄後角におけるセロトニン発現の変化を調べるために、モデルマウスの脊髄切片を用いてセロトニンに対する免疫組織化学染色を行った (図 3)。Naive マウスの脊髄後角 I/II 層でセロトニンの発現を確認した (図 3A)。OIH 群では、Naive と比較してセロトニンの発現が有意に増加した (図 3B)。OND 2mg/kg+モルヒネ群ではセロトニンの発現は減少しなかった (図 3C)。このことから、OND はセロトニン発現そのものには影響を与えずに、5-HT₃ 受容体を介したシグナルを阻害し、機械的痛覚過敏を抑制していることが示唆された。

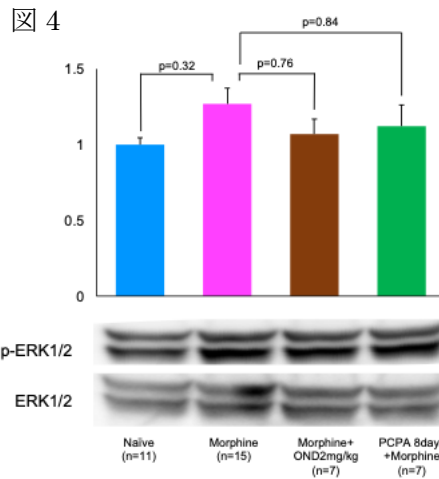
次に、PCPA の影響を評価した。PCPA 150mg/kg を 4 日間腹腔内投与すると、脊髄後角におけるセロトニン発現が完全に抑制された (図 3D)。しかし、PCPA 投与を中止した後にモルヒネを投与すると、OIH モデルマウスと同様に脊髄後角でのセロトニン発現が劇的に増加した (図 3D, F)。しかし、モルヒネ投与中にも PCPA を継続投与するとセロトニン発現が有意に抑制された (図 3E, F)。

③OIH モデルマウスにおける脊髄後角でのリン酸化 ERK の発現変化とそれに対する OND および PCPA の効果

図 3

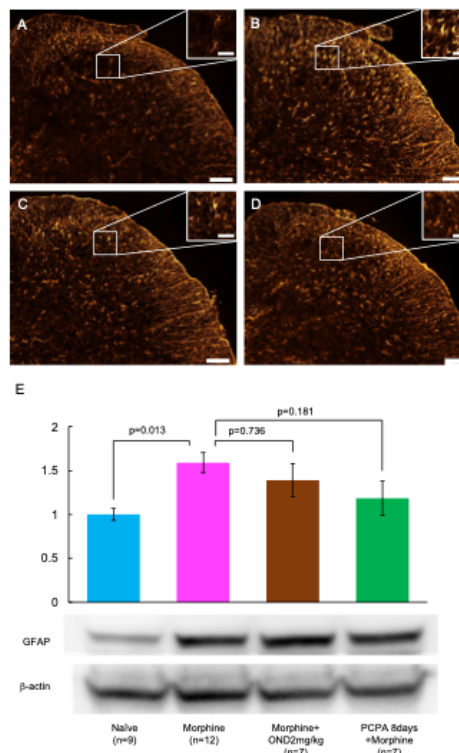


モルヒネ投与終了後、発現比 p-ERK/t-ERK は統計的有意差なくわずかに上昇傾向を示した。また、OND の併用投与および PCPA の投与は、ERK のリン酸化に影響を与えなかった (図 4)。これらの結果から、OIH は神経細胞の活動を直接的には変化させず他の因子の関与が示唆された。



④OIH モデルマウスの脊髄後角における GFAP の発現変化とそれに対する OND と PCPA の効果
有害な刺激や神経損傷を受けた後、神経細胞だけでなくグリア細胞でも機能的および表現型の変化を来すことが知られている。そこで今回の OIH モデルマウスにおいて、脊髄後角におけるグリア細胞のうちアストロサイト (GFAP) に注目し発現変化を検討した。結果、Naive と比較すると OIH モデルマウスの GFAP の発現は、脊髄後角の内層 (lamina II/III) で増加し細胞の形状は太く短く変化した (図 5A, B)。逆に、OND 2mg/kg または PCPA を併用した結果、GFAP の発現や形態変化は部分的に抑制された (図 5C, D)。

図 5



次に各群の脊髄後角における GFAP の発現レベルを WB 法を用いて評価した結果、IHC 法の結果から示唆されるように OIH モデルマウスでは GFAP の発現レベルは有意に増加した。しかし、OND 2mg/kg 投与群と PCPA 150mg/kg 投与群の GFAP の発現は減少傾向を示したが、モルヒネ投与群と比較して統計的に有意な差は認められなかった (図 5E)。これらの結果から、OIH でのアストロサイトの活性化にセロトニンが部分的に関与している可能性が示唆された。

以上すべての結果より、行動学的にみるとモルヒネによる OIH は、OND および PCPA により痛みが抑制される一方、OIH 発症時にみられるリン酸化 ERK やアストロサイトの増加が OND や PCPA の投与により完全に抑制されなかったことから、OIH は脊髄後角におけるセロトニンの増加が主たる原因であり、これまで示唆されていたアストロサイトの活性化や神経細胞そのものの持続的な活性化は副次的なものである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onishi Takeshi, Watanabe Tatsunori, Sasaki Mika, Kamiya Yoshinori, Horie Masao, Tsukano Hiroaki, Hishida Ryuichi, Kohno Tatsuro, Takebayashi Hirohide, Baba Hiroshi, Shibuki Katsuei	4. 巻 597
2. 論文標題 Acute spatial spread of NO mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 3441 ~ 3455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Goh, Kamiya Yoshinori, Sasaki Mika, Ikoma Miho, Baba Hiroshi, Kohno Tatsuro	4. 巻 123
2. 論文標題 Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate enhances pain transmission in rat spinal cord dorsal horn	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 e215 ~ e225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2019.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mika Sasaki., Yoshinori Kamiya., Keiko Bamba., Moegi Tanaka. and Takeshi Ohnishi.
2. 発表標題 Opioid-induced hyperalgesia by chronic administration of morphine is caused by serotonin in spinal dorsal horn and, in part, through the 5-HT3 receptor.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考