

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592263

研究課題名(和文) 脊髄疼痛機序に対する麻酔薬の薬理機序の解析

研究課題名(英文) The pharmacological analysis of anesthetics in Dorsal root ganglia

研究代表者

尾方 純一(Ogata, Junichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50352331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャネルだけでなくオピオイド受容体、サブスタンスP受容体などのG蛋白共役型受容体(GPCR)の疼痛機序における重要性が注目されている。脊髄後根神経節(DRG)細胞は、疼痛機序への関与するこれらの受容体が存在する。本研究では、DRGにおいてイオンチャネル、GPCRに対する麻酔薬の影響を、パッチクランプ法とカルシウム動態、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いてこれらの受容体、チャネルへの作用を詳細に解析した。その結果、セボフルランがオピオイド受容体を抑制することが証明できた。また、トラマドールおよび代謝産物M1がTRIPV1には影響をあたえず、TRIPA1を抑制することが証明でした。

研究成果の概要(英文)：G-protein-coupled receptors, such as opioid receptors, substance P receptors (Sub P receptor) have been attracting attention for pain mechanisms. On the other hand, the spinal cord dorsal root ganglion (DRG) cells are involved to pain, such as Sub-P receptor and opioid receptors are present. In this study, we studied the effects of anesthetics and analgesics on TRIPV1, opioid receptors and Sub P receptors using calcium kinetics in DRG and the Xenopus oocyte expression system. Consequently, inhaled anesthetics sevoflurane inhibited could opioid receptor function. Furthermore, analgesic tramadol and its metabolite M1 is no effect on TRIPV1, was demonstrated to inhibit TRIPA1.

研究分野：麻酔学

キーワード：脊髄後根神経節細胞 G蛋白共役型受容体 カルシウム動態 アフリカツメガエル卵母細胞発現系 イオンチャネル トラマドール TRIPV1 TRIPA1

1. 研究開始当初の背景

痛み”の克服は人類にとって重要な問題である。なかでも、手術侵襲から人類を解放した麻酔薬の作用機序解明は急務的課題であるが、その解明には至っていない。麻酔機序については多くの研究者が GABA_A 受容体を始めとしたリガンド内臓型イオンチャンネルに注目してきた¹⁾。しかし、最近、リガンド依存性イオンチャンネルへの作用だけでは麻酔機序を説明することはできないことが明らかとなり、麻酔機序解明は振り出しに戻り再考が迫られている。

神経細胞にはイオンチャンネルだけでなく、多くの G 蛋白結合受容体 (GPCR) が存在し、麻酔薬をはじめとした中枢神経作用薬はこれらを介して効果を発現している。最近のヒューマンゲノムの解明により、生体内リガンドが見つからない GPCR (オーファン GPCR) やイオンチャンネルが数多く存在することが明らかになり、これらの中に薬剤のターゲットの可能性が注目されている。

最近の研究により、中枢神経系に発現している GPCR やイオンチャンネルは麻酔機序に関与している事が明らかになってきている。GABA_A 受容体のようなリガンド依存性イオンチャンネルだけでなく、ムスカリン受容体のような GPCR や電位依存性チャンネルも麻酔薬が作用し、麻酔機序における重要性が認識されつつある²⁾³⁾⁴⁾。それぞれの単独の受容体やイオンチャンネルに対する麻酔薬の作用は解析が進んで来ているが、疼痛に関する神経細胞内で、それぞれの受容体、イオンチャンネルがどのように麻酔機序に関わっているか、またその受容体-イオンチャンネル間のクロストークなどは未だにまったく解明されていない。

また、近年従来から麻酔機序に関与が示唆されてきたリガンド依存性イオンチャンネルとは全く構造を異なるイオンチャンネルと痛みの関係が注目を集めている。その中でも末梢感覚神経に特異的に発現する温度受容体が TRP スーパーファミリーに属するイオンチャンネルであることが判明して“痛みのセンサー”として注目を浴びてきている。その中からトウガラシの主成分カプサイシンで痛みをひき起こすカプサイシン受容体遺伝子が単離され、Vanilloid receptor subtype 1 と命名された (TRPV1)。TRPV1 は外向き整流性を有する Ca²⁺透過性の高い非選択性陽イオンチャンネルで、後根神経節の無髄の C 線維の細胞体に発現し、TRPV1 欠損マウスはカプサイシンによる痛み反応を示さず熱刺激感受性も低下していることから、TRPV1 は痛覚に関与していることが明らかとなっている⁵⁾。TRPV1 がどのように麻酔機序に関与しているかは極めて興味深い。

一方、脊髄後根神経節 (Dorsal Root Ganglia, DRG) 細胞は Sub P などの神経ペプチドが含有され、細い一次求心性線維中枢側から急性侵害刺激により遊離され、疼痛への関与が強く、麻酔薬の作用部位として注目されている。Sub-P 受容体や μ オピオイド受容体、さらに電位依存性ナトリウムチャンネルなど疼痛機序への関与する受容体が 1 つの DRG 細胞内に存在し、さらに、TRPV1 や Na チャンネル、オーファン GPCR の存在も示唆され、DRG への麻酔薬の作用を詳細に検討する事によって、麻酔機序を単一神経細胞にて詳細に検討する事が可能であると考えられ、そのもたらす結果は中枢神経系での麻酔機序に極めて近いと考えられる。

- 1, 上野晋、南浩一郎、柳原延章: Protein, Nucleic Acid and Enzyme. 2001;46:2042-51
- 2, Minami K., Uezono Y.: Curr. Pharm. Des. 2006;12:1931-7.
- 3, 南浩一郎. 新しい麻酔の流れ. 2005;37-40
- 4, 南浩一郎, 上園保仁: 麻酔. 2005;54:118-125
- 5, Davis JB et al.. Nature 405, 183-187 2000

2. 研究の目的

今回の研究では、麻酔機序に対する DRG を用いて疼痛に関与する Sub P 受容体、 μ オピオイド受容体、TRPV1、Na チャンネルへの麻酔薬の影響の全貌を明らかにし、総合的に麻酔薬の疼痛抑制機序を明らかにする。

1: DRG 細胞におけるサブスタンス P 受容体、 μ 受容体、Na チャンネル、TRPV1 への麻酔薬の影響を培養細胞を用いてパッチクランプ法、細胞内 Ca²⁺イメージングにて同時多角的に解析する。

2: サブスタンス P 受容体、 μ 受容体、Na チャンネル、TRPV1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ麻酔薬の影響を電気生理学的に詳細にそのメカニズムを検討する。

3: DRG 細胞において麻酔薬の作用部位になる可能性のある新たなオーファン受容体を検索する。

3. 研究の方法

麻酔機序に関与していることが示されているサブスタンス P 受容体、 μ 受容体などの GPCR や Na チャンネル、TRPV1 が DRG 細胞において存在するのかどうか、細胞内カルシウムの変動、PCR、免疫組織染色法を用いて検討する。

これらの受容体、チャンネルへ鎮痛薬、麻酔薬がどのように作用するのかを細胞内カルシウムの変動を用いて検討する。次に培養 DRG 細胞で得た結果を基にアフリカツメガエル卵母細胞系を用いてこ

これらの受容体へ麻酔薬がどのように作用するのかを検討する。まず、 μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q に対する静脈麻酔薬、吸入麻酔薬（ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン）の比較検討を行い、麻酔薬の μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q に対する抑制効果のメカニズム検討を解明するために次の実験を行う。 μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q に対する静脈麻酔薬（プロポフォール、ケタミン、トラマドール、ペントバルビタール）と吸入麻酔薬（ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン）の抑制作用にリン酸化酵素が関与するのかどうかを確かめる。

μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法を用いて（下図参照）オピオイド受容体に対する静脈麻酔薬（プロポフォール、ケタミン、トラマドール、ペントバルビタール）と吸入麻酔薬（ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン）の作用を電気生理学的に比較解析する。

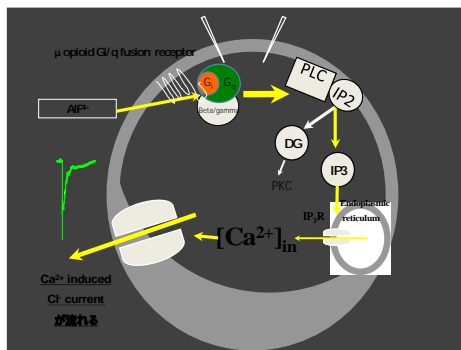


図1 μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法

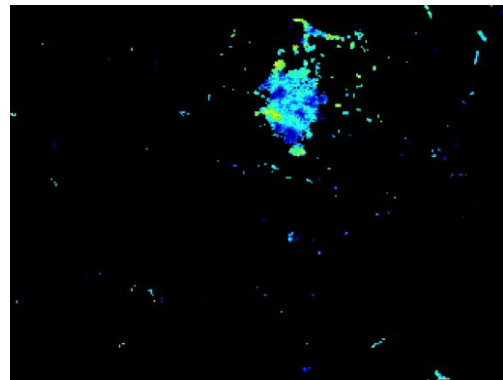
さらに現在までに痛覚に関与していると予想されているオーファン受容体であるオレキシン受容体ニューロペプチドFF(NPFF)受容体、リゾフォスファチジン酸(LPA)受容体が実際にDRGに存在するかどうかを膜電位でGPCRの解析が可能なセルキー（国立がんセンター病態生理学研究部に現有）を用いて解析し、さらに各受容体の機能解析を行う。

4. 研究成果

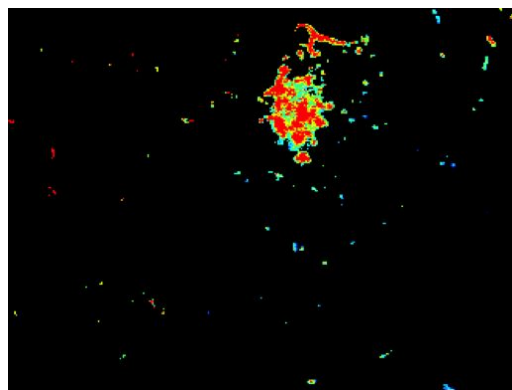
DRG細胞におけるサブスタンスP受容体、 μ 受容体、Naチャンネル、TRPV1への麻酔薬の影響をDRG培養細胞を用いた細胞内Ca²⁺イメージングを用いた解析

今回の研究ではDRGをサブスタンスPで刺激して細胞内のカルシウムの上昇を確認できた。培養細胞において吸入麻酔薬、静脈麻酔薬がサブスタンスPによるカルシウム

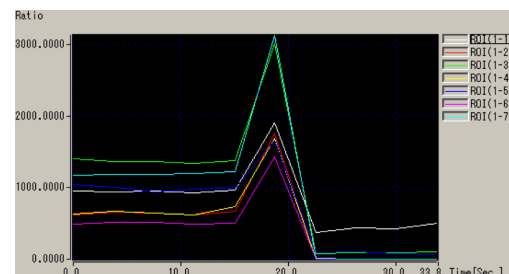
の上昇を抑制する知見を得た。



サブスタンスP刺激前のDRG細胞



サブスタンスP刺激後のDRG細胞



サブスタンスP刺激後のDRG細胞内部のカルシウム動態の時間変化

現在、これらの結果は集積中であり、検討を今後も継続する予定である。

サブスタンスP受容体、 μ 受容体、Naチャンネル、TRPV1をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ麻酔薬の影響を電気生理学的に詳細にそのメカニズム検討

現在様々な麻酔薬、鎮痛薬で解析を行っているが、救急麻酔薬イソフルラン、鎮痛薬トラマドールにおいて解析できた。

μ オピオイド-Gi/q に対する静脈麻酔薬、吸入麻酔薬の比較検討
 アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用してセボフルランについては詳細な検討ができた。図2、図3に示した通りにセボフルランはμ オピオイド受容体へ濃度依存性に抑制効果を示している。
 しかし、静脈麻酔薬のプロポフォールに関してはその抑制効果は認められなかった。

図2 セボフルランに対するμ オピオイド受容体に抑制効果

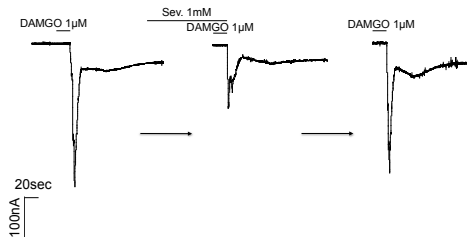
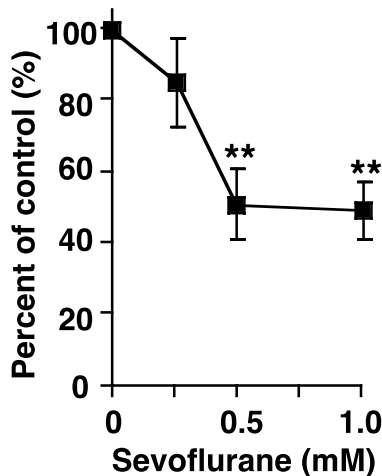


図3 セボフルランに対するμ オピオイド受容体に対する濃度依存性の抑制効果



μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q に対するセボフルラン、エンフルラン)の抑制作用にリン酸化酵素が関与するのかどうかを確かめたところ、プロテインキナーゼC (PKC) の阻害剤 GF109203X の処理を行ってもまったくその抑制効果に影響はなかった。このことから、セボフルランの抑制効果はPKCを介したものであることが明らかとなった。

また、この抑制効果はG 蛋白以降のカスケードを活性化させる、 AlF_4^- を細胞内注入における細胞内カルシウム活性化に対してはまったく影響はなかった。

図4 AlF_4^- を細胞内注入における細胞内カルシウム活性化に対する麻酔薬セボフルランの影響

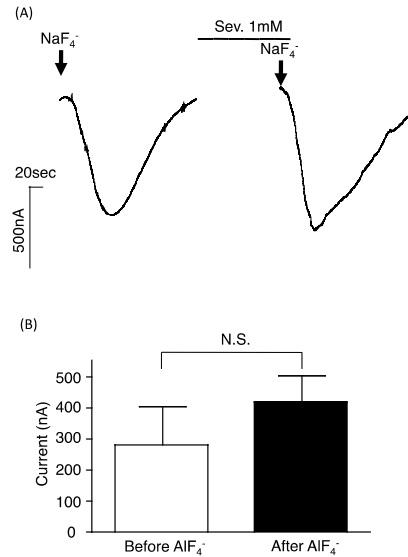
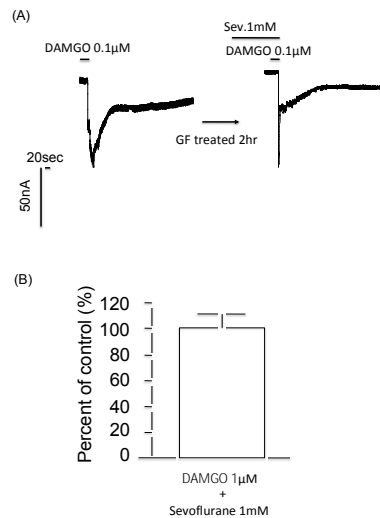


図5 プロテインキナーゼC (PKC) の阻害剤 GF109203X の処理後のセボフルランのオピオイド受容体に対する影響



トラマドールのオピオイド受容体への作用
 トラマドールはガン性、慢性疼痛に広く用いられている鎮痛薬である。現在までノルエピネフリンやセロトニン (5HT) の再取り込みを抑制し、下行性抑制系を刺激することやムスカリン受容体、5HT 受容体、アセチルコリン受容体イオンチャンネルに作用することが明らかとなっているが、その薬理機序に関しては結論を得ていない。しかしトラマドール

ルがオピオイド受容体(オピオイド)に対して結合する事は報告されているが、オピオイドに果たして作用しているかどうかは明らかとなっていない。

今回、 μ オピオイドに Gq 蛋白と Gi 蛋白のキメラ G 蛋白 Gqi5 に結合させた RNA (μ オピオイド-Gqi5) をアフリカツメガエル卵母細胞発現系にて発現させ、トラマドール、代謝産物 M1 のオピオイドに対する直接作用を観察した。その結果、非常に興味深い結果を得た。

μ オピオイド-Gqi5 を発現した卵母細胞でトラマドール、M1 刺激で Ca^{2+} 誘導性 Cl^- 電流が観察された。これによりトラマドール、M1 は μ オピオイドへの直接の刺激作用であることが明らかとなった。

図6 μ オピオイド受容体に対するトラマドールおよび代謝物 M1 のアゴニスト効果

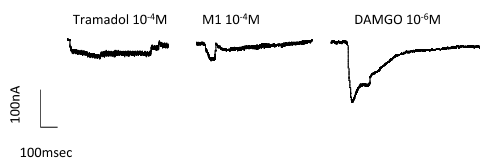
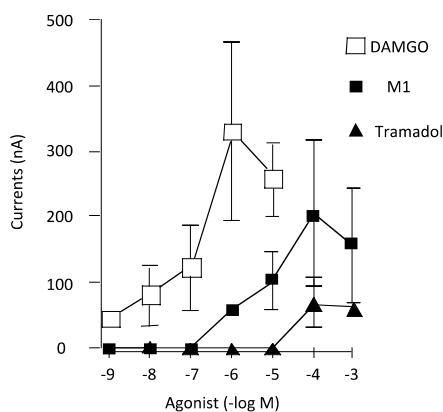


図7 μ オピオイド受容体に対するトラマドールおよび代謝物 M1 のアゴニスト効果-濃度曲線-



トラマドールはオピオイド受容体刺激に加えて、ノルエピネフリンやセロトニンの再取り込みの抑制、G 蛋白受容体抑制などの効果との相乗効果が薬理機序と考えられる。

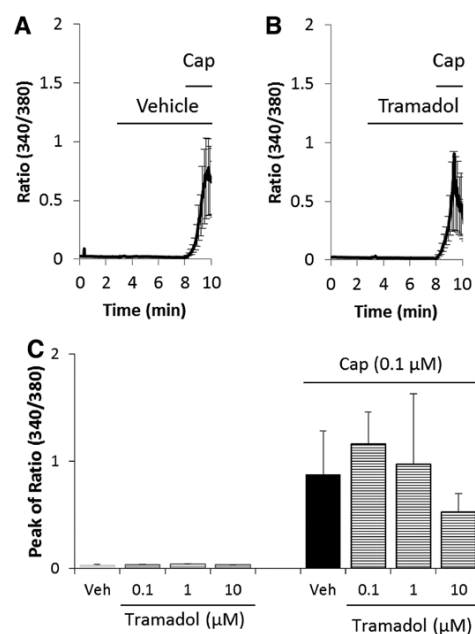
今回の計画では、 μ オピオイド-Gi/q に対する作用だけでなく、オピオイド-Gi/q に対する抑制効果のメカニズム検討も現在実施しており、アフリカツメガエル卵母細胞系における実験が可能であることを確認している。今後の実験の結果が待たれる。

また、アフリカツメガエル卵母細胞系で得られた結果をコントロールマウスとオピオイド

ドロックアウトマウスを用いて行動薬理的解析にて、上記静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の比較検討することを計画していたが、実行に移すことはできなかった。この解決が今後の課題としてあげられる。

トラマドールおよび代謝産物 M1 の TRPV1 受容体に対する影響

トラマドールと M1 は、hTRPV1 を発現させた HEK293 細胞内のカルシウム濃度の上昇はなかった。hTRPA1 を発現する HEK293 細胞では、トラマドールと M1 で AITC によって誘発される内向き電流を減少させた。これらのデータは、トラマドール、hTRPV1 へは影響を与えず、hTRPA1 を抑制することが明らかとなった。



トラマドールと M1 の hTRPV1 を発現させた HEK293 細胞細胞内カルシウム濃度の上昇への影響。

また現在、トラマドールのこれまでの知見をまとめて総説を作成中である (

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)

Miyano K, Minami K, Yokoyama T, Ohbuchi K, Yamaguchi T, Murakami S, Shiraiishi S, Yamamoto M, Matoba M, Uezono Y.

Tramadol and its metabolite m1 selectively suppress transient receptor potential ankyrin 1 activity, but not transient

receptor potential vanilloid 1 activity.
Anesth Analg. 2015 Apr;120(4):790-8. doi:
10.1213/ANE.0000000000000625.

Yokoyama T, Minami K, Terawaki K,
Miyano K, Ogata J, Maruyama T, Takeuchi
M, Uezono Y, Ueta Y.
Kisspeptin-10 potentiates miniature
excitatory postsynaptic currents in the rat
supraoptic nucleus.
Brain Res. 2014 Oct 2;1583:45-54. doi:
10.1016/j.brainres.2014.08.020.

Minami K, Sudo Y, Miyano K, Murphy
RS, Uezono Y.
 μ -Opioid receptor activation by tramadol
and O-desmethyltramadol (M1).
J Anesth. 2014 Nov 14.

Minami K, Uezono Y.
The recent progress in research on effects
of anesthetics and analgesics on G
protein-coupled receptor. J Anesth. 2013
Apr;27(2):284-92.
doi: 10.1007/s00540-012-1507-2.

Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J,
Takeuchi M, Uezono Y.
Sevoflurane inhibits the μ -opioid receptor
function expressed in *Xenopus* oocytes.
Pharmacology. 2011;88(3-4):127-32.
doi: 10.1159/000330096.

〔学会発表〕(計4件)

横山徹、南浩一郎、尾方純一、竹内護、上
園保仁
日本麻酔学会第60回学術集会
バソプレシン分泌ニューロンにおけるセ
ボフルランの効果-ラットを用いた検討(平
成25年5月23~25日札幌)

南浩一郎、須藤結花、上園保仁
日本麻酔学会第60回学術集会
トラマドールはオピオイド受容体を直接作
用するアゴニストである

横山徹、寺脇潔、南浩一郎、竹内護、上園
保仁
日本麻酔学会第59回学術集会
がん悪液質では中枢での浸透圧感受性が変
化している:モデルラットを用いた検討(平
成24年6月7~9日神戸)

南浩一郎、上園保仁、横山徹、尾方純一、
竹内護
日本麻酔学会第58回学術集会
セボフルランの μ オピオイド受容体への影響
(平成23年5月20日神戸)

(平成25年5月23~25日札幌)
〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾方 純一
自治医科大学(医学部)講師
研究者番号: 50352331

(2) 研究分担者

南 浩一郎
自治医科大学(医学部)講師
研究者番号: 70279347

(3) 研究分担者

横山 徹
自治医科大学(医学部)助教
研究者番号: 80425321

(4) 研究分担者

上園 保仁
独立行政法人国立がん研究センター(その
他部局等)その他
がん患者病態生理研究分野 分野長
研究者番号: 20213340