

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861247

研究課題名(和文) 脊髄後角における エンドルフィンの鎮痛機序の解明：サブスタンスP放出への影響

研究課題名(英文) Mechanisms for antinociceptive effect of beta-endorphin on the spinal dorsal horn.

研究代表者

寺島 哲二(Terashima, Tetsuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：30526398

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)：脊髄後角における エンドルフィンの鎮痛機序を明らかにするため、各オピオイド受容体選択的拮抗薬投与下での、ホルマリン誘発性急性炎症モデルにおいてサブスタンスP放出に与える影響をNK1受容体インターナリゼーションを指標に評価した。髄腔内への エンドルフィン投与はサブスタンスPの放出を抑制し(前抑制)、 $\mu$ 受容体拮抗薬により拮抗されたが、受容体拮抗薬では有意に拮抗されなかった。この結果から、エンドルフィンには 受容体を介した鎮痛作用機序にサブスタンスP放出を介さないメカニズムがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To further elucidate the mechanisms for antinociceptive effects of beta-endorphin on spinal dorsal horn, we evaluated the effects of beta-endorphin with or without selective opioid receptor antagonists on formalin-induced acute pain model. Intrathecal beta-endorphin inhibited the release of substance P from primary afferent (presynaptic): neurokinin 1 receptor internalization reflects release of substance P, mu-antagonist reversed the effects, but delta-antagonists did not reverse. This result implied that antinociceptive effects for beta-endorphin through delta-opioid receptor associated with another substance P release from primary afferent mechanism.

研究分野：医歯薬学

キーワード： エンドルフィン オピオイド受容体 サブスタンスP 脊髄後角 内因性鎮痛 急性炎症モデル NK1受容体 c-Fos

### 1. 研究開始当初の背景

ストレス環境下では、自身から分泌され鎮痛効果をしめす物質には内因性オピオイドペプチドホルモンとしてエンケファリン、ダイノルフィン、エンドルフィンが知られ、それぞれ受容体、受容体、そして $\mu$ ・受容体アゴニストとして作用していると考えられている。下垂体前葉から放出されるプロピオメラノコルチンはプロセッシングを受け、エンドルフィンとなる。中でも分子構造などから由来する特徴により、内因性オピオイドペプチドは血液脳関門をほとんど通過しない事も明らかになっており、急性痛のみならず慢性痛の鎮痛作用および鎮痛作用機序に最近注目が集まっている。

このオピオイド受容体は主に鎮痛作用を示すが、精神活動、消化管機能、呼吸機能、免疫機能などにも関与しており、受容体の分布は中枢神経系から末梢神経系にまで及んでいる。 $\mu$ 受容体はアデニル酸シクラーゼの活性化を抑制しサイクリックAMPを増加させシナプス前の神経終末に存在する電位依存性カルシウムチャンネルを抑制し、結果的にシナプス伝達を抑制する。また内向き整流性カリウムチャンネルを活性化し、ニューロンの興奮性を低下させる。これらの働きにより侵害受容の伝達は抑制される。その他にも、脳から脊髄へ下行しノルアドレナリンやセロトニンが放出され痛覚情報を抑制する下行性抑制系の賦活化への関与も指摘されている。このようにさまざまな作用機序が示唆されておりそのメカニズムは非常に複雑である。そこで我々は侵害受容刺激下でのエンドルフィンと、各オピオイド受容体拮抗薬との相互関与による鎮痛機序が、脊髄後角における求心性一次繊維におけるサブスタンスPの放出にどのような影響を与えるかを調べ、それが鎮痛作用機序の解明につながるのではないかと考えた。

さらに神経興奮マーカーの即時型遺伝子であるc-fosは、興奮性シナプス伝達における後性成分を反映しているとされ、抑制効果を示す場合、さらなる機序解明に役立つと考えた。

### 2. 研究の目的

オピオイド性鎮痛薬として広く利用されているモルヒネは、全身投与およびも膜下投与により脊髄後角表層における求心性一次線維からのサブスタンスP放出を抑制することが知られている。一方内因性オピオイドであるエンドルフィンの髄腔内投与と選択的オピオイド受容体拮抗薬の相互作用を調べることにより、サブスタンスPの放出に与える影響を評価することにより内因性オピオイドによる鎮痛作用機序を明らかにすることを目的とした。またサブスタンスPの評価法は以前よりELIZA法が用いられていたが、近年になり侵害受容性痛により求心

性一次繊維のシナプス前終末端から放出されたサブスタンスPは二次ニューロンに発現しているニューロキニン1(NK1)受容体と結合、細胞内に取り込まれてインターナリゼーション(内在化)することが免疫組織学的に証明された。

このNK1受容体インターナリゼーションを免疫学的手法を用いて測定することにより、興奮性神経伝達物質の一つであるサブスタンスPの、求心性一次繊維からの放出におよぼす影響を明らかにすることができると思った。

その結果我々は電位依存性カルシウムチャンネル拮抗薬で、くも膜下腔投与により鎮痛効果を示すものがあり、特にR型電位依存性カルシウムチャンネル拮抗薬(SNX-482)は脊髄後角におけるサブスタンスPの放出を抑制し、その作用機序は、求心性一次繊維でのシナプス前抑制であることを証明した。

また我々は選択的受容体刺激薬であるSNC80の髄腔内投与により、用量依存性に抗侵害受容作用を示したほか、この作用機序は脊髄後角でのサブスタンスPの放出抑制を介していたことから、シナプス前による鎮痛作用機序であることを明らかにした。これらの研究を踏まえ、鎮痛作用を持つ内因性オピオイドであるエンドルフィンと、選択的オピオイド受容体拮抗薬による脊髄後角におけるサブスタンスP放出に与える影響を免疫組織学的に評価することで、エンドルフィンの侵害受容性シナプス伝達に及ぼす影響から、さらなる鎮痛作用機序の解明に寄与すると考えた。これと平行して、脊髄後角表層ニューロンにおけるc-fos発現を評価することにより、後性のシナプス成分についての関与も明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) 侵害受容に対する疼痛行動評価(ホルマリン試験)

SDラット(200-250g)へあらかじめ全身麻酔下に持続くも膜下カテーテルを留置し、数日間経過観察をした後、このくも膜下カテーテルより以下のとおり4つの薬物投与群に分け、各種薬物を投与した後、足底部へホルマリン(2.5%、50 $\mu$ l)注射を行う。注射直後より、侵害受容刺激により後肢を動かす行動(フリンチング)を観察し、第一相(0-10分)、第二相(10-60分)に分けて各群の侵害受容行動を評価する。

エンドルフィン(10 $\mu$ g)群  
CTOP(10 $\mu$ g)+ エンドルフィン群  
ナルトリンドール 3mg/kg+ エンドルフィン群  
生理食塩水(対照群)。

### 2) NK1受容体インターナリゼーションの評

価

上記と同様の4つの薬物投与群を用意した。CTOP、ナルトリンドールは エンドルフィン髄腔内注入 15 分前に投与する。 エンドルフィンもしくは生理食塩水髄腔内注入 10 分後に、ラット後肢足底部へホルマリン (2.5%、50  $\mu$ l) を皮下注射する。ホルマリン注射 10 分後、全身麻酔下に4%パラホルムアルデヒドを用いて経心臓的灌流固定を行う。腰部脊髄を取り出し、後固定した後、30%スクロース溶液に浸透させる。その後脊髄を氷結し、マイクロトームを用いて厚さ 30  $\mu$ m の脊髄スライスを得、不凍液に保存する。このスライスをリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄・前処置後、Alexa 488 および Alexa 555 を用いた 2 次抗体と攪拌させる。その後 PBS で洗浄しスライドに張り付け、カバーガラスで覆い脊髄スライス標本作製した。蛍光顕微鏡を用いて脊髄後角表層における NK1 受容体インターナリゼーション陽性および陰性の神経細胞数の割合を算出し、各投与群で比較する。

3) c-Fos 発現の評価

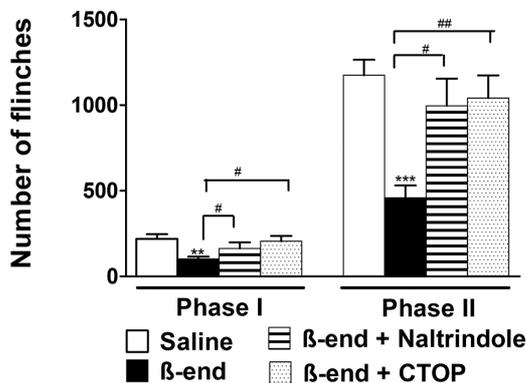
上記と同じ 4 つの薬物投与群を用意した。同様にホルマリンを後肢足底部に皮下注射した 2 時間後、同様にパラホルムアルデヒドによる経心臓的灌流固定を行い、取り出した 30  $\mu$ m の脊髄標本切片を free-floating 法を用いて ABC 染色による免疫組織染色を行い、明視野顕微鏡下にて脊髄後角 (第 I-II 及び III-V 層) における c-Fos 陽性神経細胞数を計測する。

4. 研究成果

1) ホルマリン試験

ホルマリンの足底部皮下注により疼痛行動 (フリンチング) が認められ、 エンドルフィンにより第一相 (0-10 分) 及び第二相 (10-60 分) のフリンチング数が抑制された。また CTOP 及びナルトリンドールにより第一相と第二相は有意に拮抗された。

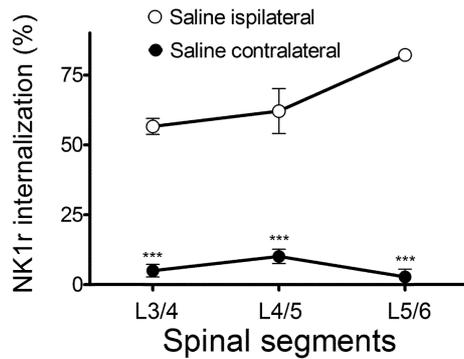
図1 ホルマリン試験によるフリンチング数



2) ニューロキニン 1 受容体インターナリゼーションの評価

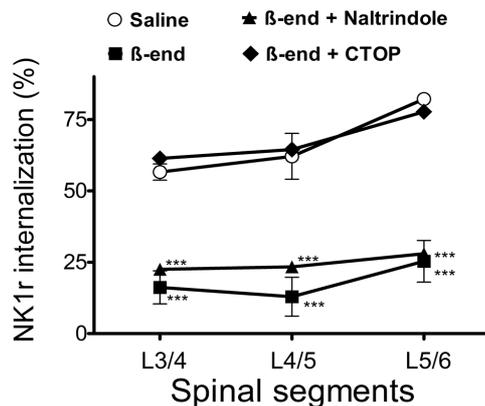
ホルマリンの足底部皮下注により、同側の脊髄後角表層 (I 層) における NK1 受容体インターナリゼーションの陽性率が反対側に比べ有意に増加した。

図2 ホルマリン皮下注による NK1 受容体インターナリゼーションについて



さらに、 - 群におけるホルマリン投与側の NK1 受容体インターナリゼーションの陽性率は CTOP は エンドルフィンによる侵害受容性サブスタンス P 抑制を有意に拮抗したが、ナルトリンドールは エンドルフィンによるサブスタンス P 放出抑制の拮抗に影響を及ぼさなかった。このことから、 エンドルフィンによる  $\mu$  受容体に関する鎮痛作用機序の一つはシナプス前性であることが確認できたが、 受容体を介する鎮痛作用機序にはサブスタンス P を介さない機序が示唆される結果となった。

図3 エンドルフィンと各拮抗薬投与下の NK1 受容体インターナリゼーションについて

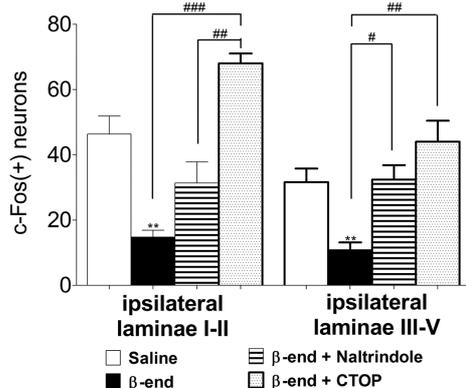


3) c-Fos 発現の評価

ホルマリンの皮下注により脊髄後角 (第 I-II、III-V 層) の c-Fos 陽性神経細胞数は増加させた。 エンドルフィンホルマリン誘発性 c-Fos 発現を有意に抑制した。一方、この作用は CTOP で拮抗され、ナルトリンド

ールで部分拮抗された。このことから、エンドルフィンによる鎮痛作用機序の一つはシナプス後性抑制作用であることが示唆された。

図4 ホルマリン皮下注における エンドルフィンと c-Fos 発現について



### 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 1 件)

1. Marino MJ, Terashima T, Steinauer JJ, Eddinger KA, Yaksh TL, Xu Q: Botulinum toxin B in the sensory afferent: transmitter release, spinal activation, and pain behavior. *Pain* 155(4):674-84, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.009>, 査読あり

[学会発表](計 5 件)

1. 寺島哲二, 池田知史、小松崎誠、古川直樹、木村嘉之、濱口眞輔、山口重樹: 自殺企図の誘因となったフェンタニル貼付製剤乱用の一例. 第 45 回慢性疼痛学会, 2/27, 2016

2. Tetsuji Terashima, Shigeki Yamaguchi, Toshifumi Takasusuki, Yuuichi Hori, Tony L. Yaksh: Antinociceptive mechanisms of spinal beta-endorphine with opioid receptor antagonists on acute pain. 44<sup>th</sup> Annual meeting of Society of Neuroscience, Washington DC, Nov 16, 2014.

3. 寺島哲二, 高薄敏史, 山口重樹, 五月女俊也, 沼田祐貴, 堀雄一, M Koucek, Tony L. Yaksh: オピオイド受容体作動薬の髄腔内投与は一次求心性線維におけるサブスタンス P 放出を抑制する. 第 34 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 東京, 9/6, 2014

4. Tetsuji Terashima, Shigeki Yamaguchi, Toshifumi Takasusuki, Yuuichi Hori, Tony

L. Yaksh: ROLE OF SPINAL  $\beta$ -ENDORPHIN ON SUBSTANCE P RELEASE AND c-Fos EXPRESSION IN THE SPINAL CORD DORSAL HORN. 10<sup>th</sup> Euroanaesthesia congress, Stockholm, May 31, 2014

5. 寺島哲二, 山口重樹, 高薄敏史, 濱口眞輔, 堀雄一: 抗侵害受容作用における脊髄後角サブスタンス P 放出と P/Q 型, R 型電位依存性カルシウムチャネルの影響について. 日本麻酔科学会第 61 回総会, 横浜, 2014, 5/16.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

寺島哲二 (TERASHIMA Tetsuji)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30526398

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし