

**N-methyl-D-aspartate型グルタミン酸受容体  
NR2A, NR2BおよびNR2Dサブユニットの侵害性疼痛, 炎症性疼痛および神経因性疼痛への関与についての研究**

著者	檜杖 昌則
著者別名	Hizue, Masanori
雑誌名	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
巻	平成19年9月
ページ	55-57
発行年	2007-09-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/26685">http://hdl.handle.net/2297/26685</a>

氏名	檜杖 昌則
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第847号
学位授与の日付	平成18年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	N-methyl-D-aspartate型グルタミン酸受容体 NR2A, NR2B および NR2D サブユニットの侵害性疼痛, 炎症性疼痛および神経因性疼痛への関与についての研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	横井 毅(医学系研究科・教授), 山田 清文(自然科学研究科・教授), 田熊 一敏(自然科学研究科・助教授), 谷浦 秀夫(自然科学研究科・助教授)

*N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptors play an important role in nociceptive transmissions in various types of pain. The purpose of this study is to clarify involvement of NMDA NR2A, NR2B and NR2D subunits in the formalin-induced acute nociceptive and tonic inflammatory pain model, and the partial sciatic nerve ligation (PSL)-induced neuropathic pain model by using NR2A (GluR $\epsilon$ 1) subunit knockout mouse, NR2D (GluR $\epsilon$ 4) subunit knockout mouse and a novel NR2B subunit selective NMDA receptor antagonist.

In the NR2A and NR2D knockout mice study, the second tonic inflammatory phase response in the formalin test was significantly reduced in NR2A knockout NR2A(-/-) mice, but not in NR2D (-/-) when compared to wild-type mice. In the partial sciatic nerve ligation (PSL) model, NR2A (-/-) mice exhibited no difference in mechanical allodynia compared to wild-type mice. However, NR2D (-/-) mice failed to develop allodynia after the nerve ligation. A novel NR2B subunit selective NMDA receptor antagonist, DHQ ((-)-(R)-6-{2-[4-(3-Fluorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidinyl]-1-hydroxyethyl-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone}), exhibited significant inhibition in first phase response and second phase response in rat formalin test. Moreover, DHQ demonstrated significant improvement on mechanical allodynia in the mouse PSL model after oral administration. These results suggest that NR2A, NR2D and NR2B subunits are involved in tonic inflammatory pain, neuropathic allodynia and both of them, respectively.

*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体は中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質グルタミン酸の受容体の一つであり, 様々な生理的および病態生理的神経活動に重要かつ複雑な役割を担っている。これらの機能の一つとして, グルタミン酸による NMDA 受容体の活性化が疼痛反応に関与していること, 動物モデルおよび臨床で NMDA 受容体拮抗薬がすぐれた鎮痛作用を示すことは以前から報告されてきた。特に, 有効な治療薬が望まれている神経因性疼痛などの慢性難治性疼痛疾患において NMDA 受容体拮抗薬が治療効果を有することが数多く報告されており, NMDA 受容体拮抗薬はすぐれた疼痛治療薬の一つとして期待されている。しかしながら, NMDA 受容体は様々な神経活動に関与するため, これまでの NMDA 受容体拮抗薬はいずれも鎮

痛作用と副作用を有効に分離することができず、鎮痛薬としては限られた条件下でのみ使用されるにとどまってきた。したがって、副作用を分離した NMDA 受容体拮抗薬の開発は、慢性難治性疼痛疾患に対する新規疼痛治療薬の開発として強く望まれるものである。機能的 NMDA 受容体は NR1 サブユニットと 4 種の NR2 サブユニットが複数でヘテロ会合したイオンチャネルであるが、各 NR2 サブユニットとの組み合わせにより、それぞれの NMDA 受容体チャネルが異なる生理的もしくは病態生理的神経活動に関与していることが知られている。このことから、各 NR2 サブユニット選択的な抑制を行うことにより、NMDA 受容体に関与する神経活動を各サブユニットが関与する機能毎に抑制できる可能性が考えられ、いずれかの NR2 サブユニットを選択的に抑制することによって鎮痛作用と副作用を分離することができれば、慢性疼痛疾患に有効な新たな治療薬として有望であると考えられる。しかしながら、これまでのところ疼痛伝達における各サブユニットの関与は十分に解明されてはいない。よって筆者は、NMDA 受容体サブユニット選択的な鎮痛薬開発を目指した探索研究の第一歩として、まず各サブユニットがどのような疼痛反応に関与しているかを明らかにする目的で、NR2A (GluRε1) サブユニット欠損マウス、NR2D (GluRε4) サブユニット欠損マウスおよび新規 NR2B サブユニット選択的 NMDA 受容体拮抗薬を用いて各種疼痛反応モデルでの検討を実施した。

まず、NMDA 受容体 NR2A サブユニットおよび NR2D サブユニットの疼痛反応への関与の検討のため、NR2A サブユニット欠損マウスおよび NR2D サブユニット欠損マウスを用いて、ホルマリンテストおよび坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛モデルにおける評価を行った。その結果、NR2A サブユニット欠損マウスにおけるホルマリンテスト第 1 相反応は、ワイルドタイプマウスのそれと同等の反応を示した。これに対し、第 2 相反応はワイルドタイプと比較して有意に減弱していた。坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛モデルにおいては、施術 3 日後よりメカニカルアロデニアを発症し、ワイルドタイプマウスの反応との差異は観察されなかった。一方、NR2D サブユニット欠損マウスのホルマリンテスト第 1 相反応および第 2 相反応はワイルドタイプマウスのそれらと同等の反応を示し、NR2D サブユニット欠損の影響は観察されなかった。これに対し、驚くべきことに、坐骨神経部分結紮誘発神経モデルにおいては、ワイルドタイプマウスと異なり、施術 14 日後までメカニカルアロデニアを全く発症しなかった。

次に、新規化学構造を有する NMDA 受容体 NR2B サブユニット選択的拮抗薬 DHQ ((-)-(R)-6-{2-[4-(3-Fluorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidinyll]-1-hydroxyethyl}-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone)を用いて、NMDA 受容体 NR2B サブユニットの疼痛反応への関与を検討した。DHQ はラットならびにマウス NR2B サブユニットに特異的で強い親和性を有し、またラット NR1b/NR2B 発現細胞をグルタミン酸およびグリシンで刺激した際の細胞内カルシウム流入を濃度依存的に抑制する一方で、NR1b/NR2A 発現細胞、NR1b/NR2C 発現細胞ならびに NR1b/NR2D 発現細胞における反応に対しては高濃度においても抑制作用を示さないサブユニット選択的拮抗作用を有した。DHQ のラットホルマリンテストにおける効果を調べたところ、第 1 相反応および第 2 相反応をともに用量依存的に抑制した。またマウス坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛モデルにおけるメカニカルアロデニア反応に対しても、投与量に依存した強力な抗アロデニア効果を

示した。さらに局所投与による作用点の検討を行ったところ、DHQを脳室内投与した場合に抗アロデニア作用が得られたのに対し、脊髄髄腔内投与では10倍量の投与でもメカニカルアロデニアを抑制しなかった。一方、ローターロッド試験では、抗アロデニア作用を示した用量の33倍以上の投与量においても協調運動能に対する影響は観察されなかった。

以上本研究において、NR2Aサブユニットは脊髄後角細胞感作が関与する炎症性疼痛に、NR2Bサブユニットは侵害性疼痛、炎症性疼痛および神経因性疼痛に、そしてNR2Dサブユニットは神経因性疼痛にそれぞれ関与していることが示された。また、いずれのサブユニットに対する検討においても、本研究における行動観察を通じてサブユニット非選択的NMDA受容体拮抗作用で引き起こされる行動異常は観察されなかったことから、従来のNMDA受容体拮抗薬で見られる副作用を分離できる可能性が示唆された。これらことから、NMDA受容体NR2A、NR2BもしくはNR2Dサブユニットに選択的な拮抗薬は、それぞれ慢性難治性疼痛に有効な新しい疼痛治療薬としての可能性を有すると考えられた。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究では *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体を標的として、難治性慢性疼痛疾患に対する新規疼痛治療薬の開発を試みた。

NR2Aサブユニット欠損マウスでは、ホルマリンテスト第2相反応がワイルドタイプと比較して有意に減弱したが、坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛試験においては、欠損マウスでも施術3日後よりメカニカルアロデニアを発症し、ワイルドタイプマウスの反応との差異は観察されなかった。NR2Dサブユニット欠損マウスでは、ホルマリンテスト第1相および第2相反応に変動は見られなかったが、坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛モデルにおいては、メカニカルアロデニアは全く観察されなかった。一方、新規NR2Bサブユニット選択的拮抗薬DHQは、ラットホルマリンテスト第1相反応および第2相反応をともに用量依存的に抑制しただけでなく、マウス坐骨神経部分結紮誘発神経因性疼痛モデルにおけるメカニカルアロデニア反応に対しても、投与量に依存した強力な抗アロデニア効果を示した。DHQを脳室内投与すると抗アロデニア作用が得られたのに対して、脊髄髄腔内投与では10倍量の投与でもメカニカルアロデニアを抑制しなかった。ローターロッド試験では、抗アロデニア作用を示した用量の33倍以上の投与量においても協調運動能に対する著明な影響は観察されなかった。

以上の研究成績は、NMDA受容体NR2A、NR2BもしくはNR2Dサブユニットに選択的な拮抗薬が、それぞれ慢性難治性疼痛の改善に有効である可能性をはじめて証明した点で創薬の観点からも高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断する。