

令和元年6月11日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16715

研究課題名(和文) CPEBがオピオイド耐性に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Examination of the effect of CPEB on opioid tolerance

研究代表者

飯田 高史 (Iida, Takafumi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40468442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：オピオイド耐性群(ミスマッチODN+モルヒネ)は、コントロール群(ミスマッチODN+0.9%NaCl)に比べて機械的刺激閾値が低下し、温熱性痛覚過敏性が上昇した。さらに治療群(アンチセンスCPEB+モルヒネ)では、コントロール群との間に有意差を認めなかった。コントロール群に比べて、モルヒネ群でMitoSox Redによる活性酸素の発現量に有意な増加が認められた。また、治療群では、コントロール群との間に有意差を認めなかった。

一方で、CPEB、pCREB、pC/EBP- の発現量においては、3群間に有意差が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オピオイド耐性モデルにおいて、アンチセンスCPEBのクモ膜下腔への投与は機械的刺激閾値を上昇させ、温熱性痛覚過敏性を低下させた。このことから、CPEBがオピオイド因性疼痛に関与することが示唆された。また、モルヒネの反服投与により、ラット脊髄後角における活性酸素産生は亢進し、アンチセンスCPEBの投与はこれを抑制することが確認できた。これにより、オピオイド耐性が形成されオピオイド因性疼痛をきたしているような症例において、脊髄後角レベルの活性酸素の産生を抑制することが、疼痛緩和につながる可能性がみいだされた。今後、活性酸素産生亢進に影響する物質についての解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：The opioid tolerance group (mismatched ODN + morphine) had a lower mechanical stimulation threshold value and increased thermal hyperalgesia than the control group (mismatched ODN + 0.9% NaCl). Furthermore, in the treatment group (antisense CPEB + morphine), no significant difference was found between the control group. Compared to the control group, significant increase was observed in the expression level of reactive oxygen species by MitoSox Red in the opioid tolerance group. Moreover, in the treatment group, no significant difference was found between the control group.

On the other hand, in the expression levels of CPEB, pCREB and pC / EBP- , no significant difference was found among the three groups.

研究分野：慢性疼痛

キーワード：オピオイド関連疼痛 CPEB 活性酸素 MitoSox 慢性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モルヒネ 10 μ g をラットのくも膜下に留置したカテーテルから一日2回、6日間連続投与する事で、脊髄後角の NMDA 受容体や protein kinase C (PKC)が増加する事が知られている (Science 1991; 251: 85-87, Brain Res 1995; 677: 257-267, Pain 2002; 94: 245-253)。さらに、cAMP-PKA-CREB pathway を介することも報告されている (J Neurosci 2005; 25: 11145-11154)。一方で、ミトコンドリアから産生される活性酸素を抑制する事でモルヒネによる鎮痛効果への耐性形成や、オピオイドによる痛覚過敏を抑制できたとも報告されている (J Clin Invest 2007; 117: 3530-9, Pain 2013; 154: 978-86)。

ミトコンドリア由来の活性酸素と神経障害性疼痛との関係については多くの報告がある。Bailey らは、活性酸素がミトコンドリアの生合成、細胞内輸送、fusion(融合)と fission などの動的変化を抑制すると報告した (Free Radic Res; 37: 585-596)。また、神経障害性疼痛の形成には多くのタンパク質が関与している。Cytoplasmic polyadenylation binding protein(CPEB)は、mRNA の翻訳に関与するタンパク質であり、 α CaMK II を介しての疼痛を誘発する (J Neurosci 2011; 31: 9093-9100)。さらにアンチセンス CPEB を用いた遺伝子治療が、PGE2 投与によって引き起こされる疼痛の記憶を抑制することが報告された (J Neurosci 2011; 31: 11404-10)。炎症反応を調節する転写因子のひとつと考えられている、CREB (cAMP response element binding protein)が神経障害性疼痛に関与していることが報告された (Pain 2001;93:295-301)。また、その下流シグナルと考えられている転写因子 C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein)は、炎症反応のみならず、神経損傷、記憶や学習に関する神経の可塑性への関連が示唆された (Neuroscience 2014;279:1-9)。

申請者は海外留学施設における研究において、ミトコンドリアの fission を抑制することで活性酸素の産生が低下し、HIV 関連神経障害性疼痛の軽減をもたらすことを報告した (Anesth Analg. 2015 Sep 28. ahead of print)。また、HIV 関連神経障害性疼痛における活性酸素と CPEB の関連および、その下流シグナルと考えられる CREB Bindind Protein(CBP)への影響についても報告した (Iida T, Exp Neurol. 2016 Jul)。

海外留学施設において行った予備実験では、神経障害性疼痛モデルラット(HIV envelope protein gp120)において上昇した脊髄後角神経細胞内の活性酸素をアンチセンス CPEB が減少させる事を MitoSox Red を用いて確認している。さらにオピオイド耐性モデルにおいて、機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応が生じる事も確認している。さらに MnSOD を産生する。Vector をラットの vIPAG に投与することで、モルヒネの退薬現象が軽減し、MnSOD の増加と、ER ストレスの指標である GRP78 や ATF6 が現象するという結果も得ており、ミトコンドリア由来活性酸素を抑制することで小胞体ストレスが軽減され、その結果モルヒネによる生体への影響を軽減する能性があるものと推測している。

本研究において、我々は、痛みの記憶に関わる CPEB の発現を、アンチセンス法を用いた遺伝子導入で抑制することにより活性酸素の産生が抑制され、その結果オピオイド耐性が緩和されるとの仮説を立てた。これまでの予備実験を基にアンチセンス CPEB が HIV 関連神経障害性疼痛モデルのみならず、オピオイド耐性モデルにおいても神経細胞内の活性酸素に影響を及ぼし耐性形成の一因となることを明らかにする。

2. 研究の目的

近年、患者の高齢化や癌治療の進歩とともに緩和医療の必要性が増加しており、長期投与におけるオピオイド耐性の出現およびそれにとまなう投与量、副作用の増加は避けられない。現

在に至るまで数多くの研究がなされており、オピオイドローテーションや対象療法による対応が行われているが、根本的な機序の解明と対処法は確立されていないのが現状である。本研究の目的は、モルヒネの長期投与における耐性モデルラットに対してアンチセンスオリゴ(ODN)を用いた遺伝子導入を行いミトコンドリアの fission(分裂)を抑制し、その治療の有効性、ミトコンドリアより産生される活性酸素(reactive oxygen species; ROS)および関連する蛋白質の関係を Western Blotting, 免疫染色法を用いて解明することである。オピオイド耐性モデルにおけるアンチセンス CPEB の有効性を検討し、更に活性酸素、その下流シグナルと考えられる pCREB と pC/EBP8 の発現を総合的に評価した報告は従来になく本研究の独創的な点である。これらの pathway を解明する事は、オピオイド耐性出現のメカニズムの一面を明らかにする事につながる。臨床的な観点では、オピオイド因性疼痛をきたしているオピオイド耐性モデルにアンチセンス CPEB を投与することで、温熱性痛覚過敏反応の潜時の増加および機械刺激性アロディニアの閾値の上昇と、脊髄後角における活性酸素産生の減少が証明されれば、緩和医療における遺伝子導入を用いた新たなオピオイド耐性への対応が期待できる。

3. 研究の方法

オピオイド耐性モデルを作成し、アンチセンスオリゴを用いた遺伝子導入を行い疼痛記憶に影響をおよぼす CPEB の発現を抑制させる。オピオイド、アンチセンス ODN と MitoSox Red を投与するために、第 2-4 腰髄付近のくも膜下にカテーテル先端を留置する。全身麻酔下の雄性 Sprague-Dawley ラットを両耳道で固定し、両耳間の正中線に沿って皮膚を切開し、筋肉を左右に剥離する。環椎後頭膜に 20G 針先を用いて切開をおき、脊髄液が溢れ出るのを確認する。PE-10 カテーテルをくも膜下腔に 8.5cm すすめ留置し、縫合を行う。術後、運動麻痺の発生を注意深く確認し、5 日間の回復期間が経過してから本研究に使用する。運動麻痺が出現したラットは本研究より除外する。モデルはミスマッチ CPEB+0.9%NaCl, ミスマッチ CPEB+モルヒネ、アンチセンス CPEB+モルヒネ、アンチセンス CPEB+0.9%NaCl の 4 群を作成し、各群での比較を行う。モルヒネは 1mcg/mcL に調整した後、10mcL を 12 時間おきに 13 回、脊髄くも膜下に留置したカテーテルより投与する。アンチセンスおよびミスマッチ CPEB は 40mcg/20mcL をモルヒネ投与 1 時間前に投与をおこなう。各薬液は 10mcL の 0.9%NaCl で後押しする。

遺伝子導入前後の機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応を von Frey フィラメントと Hot plate テストを用いて評価する。アロディニアの刺激閾値は、Von Frey フィラメントを用いて測定する。底に格子状の金属を貼りつけたプラスチックケージにラットを収容し、少なくとも 30 分以上かけラットを環境に順応させる。Von Frey フィラメントを後肢足底に押し付け、逃避反応を起こす閾値を測定する。15.1g の刺激によっても反応がない場合、それをラットのカットオフ値とする。刺激閾値は、up-and-down 方法を用いて 50%閾値を計測することとする。温熱性痛覚過敏反応は Hot plate テストを用いて測定する。熱刺激の温度設定は、予備実験の結果から 51.0℃とする。この温度設定における正常なラットの潜時は 10 秒程度となる。熱刺激による熱傷等の組織損傷を防ぐ為、カットオフ値は 30 秒とする。

同様の遺伝子導入を行い、ミトコンドリアより産生される活性酸素の脊髄後角における発現と局在を活性酸素マーカーである MitoSox Red を用いた免疫染色法、さらに pCREB と pC/EBP8 の発現と局在を 1 次抗体・2 次抗体を用いた免疫染色法で解析する。脊髄後角の CPEB、pCREB、pC/EBP8 の発現と分布を免疫染色法により評価する。4%PFA を含む 0.1M リン酸溶液を心臓より灌流し固定を行った後、第 4・5 腰神経が起始する脊髄を取り出す。組織は同溶

液で1晩固定し、その後、30%スクロースを含むPBS不凍液に2日間浸す。一次抗体は、goat anti-CPEB(1:100; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-pCREB (1:100; Cell Signaling Technology)、anti-pC/EBP β (1:200; Santa Cruz Biotechnology) を使用する。二次抗体は、fluorescent anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488, 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、anti-goat IgG(Alexa Fluor 488, 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いることとした。共焦点蛍光顕微鏡(大学実験センター現有機器)を用いて観察を行い、得られた画像はPC上画像レタッチソフトにて処理を行い、画像とする。CPEB-IR(immunoreactivity)、pCREB-IRとpC/EBP β -IRは、各画像におけるCPEB、pCREBとpC/EBP β のdensityをImage Jソフトウェアを用いて算出する。脊髄後角における活性酸素の発現をマーカーであるMitoSox Redを用いて評価する。方法は免疫染色法に準ずるが、一次抗体と二次抗体は必要としない。4%PFAによる固定後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて画像を作成する。細胞核周囲に斑点状のMitoSox Redによる染色が認められる神経細胞を陽性細胞と定義する。脊髄後角の各laminaeに存在するMitoSox Redに染色された細胞の個数を計測する。発現蛋白質の定量的評価をWestern Blotting法で行う。検体は第4-5腰神経が起始する脊髄後角とする。これらの組織は蛋白溶解バッファーを使用して均質化され、その蛋白溶解バッファーはプロテアーゼ阻害薬とフォスファターゼ阻害薬を含むものとする。ホモジネートは、18000g 摂氏4度で20分間遠心分離され、その上澄みを収集し、DC protein assayを使用して蛋白定量を行うこととする。30ugずつ蛋白を分注し、Laemmli bufferを加え、次に95度で5分間、蛋白変性させる。蛋白は、10-12%のgelを用いて電気泳動により展開され、メンブレンに転写する。メンブレンをrapid block solutionを用いて固定し、その後一次抗体を含んだ溶液中に摂氏4度で1晩、振盪させる。一次抗体は、goat anti-CPEB(1:1000; Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-pCREB (1:1000; Cell Signaling Technology)、anti-pC/EBP β (1:2000; Santa Cruz Biotechnology)を使用する。メンブレンは2次抗体(Santa Cruz Biotechnology)に浸され、次にchemiluminescence solutionを用いて検出する。得られたバンドはImageJを用いてPC上で定量し比較する。

4. 研究成果

コントロール群(ミスマッチ CPEB+0.9%NaCl)、オピオイド耐性群(ミスマッチ CPEB+モルヒネ)、治療群(アンチセンス CPEB+モルヒネ)、アンチセンス CPEB+0.9%NaClの4群を作成し、各群での機械性アロディニア、温熱性痛覚過敏反応の比較をおこなった。本研究では脊髄クモ膜下腔内に留置したカテーテルからモルヒネおよびオリゴデオキシヌクレオチドの投与をおこなったが、薬剤投与後に軽度麻痺を生じる個体が散見された。当初は塩酸モルヒネによる脊髄への毒性なども考慮したが、コントロール群でもこれらの所見を認めたことから、カテーテルの挿入による技術的な問題や薬液投与による容量負荷が繰り返しおこなわれることが原因であると結論づけ、モデルの作成を再考することとした。まずラットの頭部と脊椎のなす角度が大きいことがモデル作成に難渋する理由であると考え調整をおこなった。容量による負荷を軽減する目的で、薬剤の投与間隔を当初の12時間から24時間に変更した。結果としてオピオイド耐性群ではコントロール群に比べて、機械的刺激域値が低下した。さらに治療群においては、コントロール群との間に有意差を認めなかった。温熱性痛覚過敏反応について、オピオイド耐性群ではコントロール群に比べて域値の低下を認め、治療群はコントロール群との間に有意差をみとめなかった。

オピオイド耐性群での機械的刺激域値の低下をうけ、goat anti-CPEB(1:100; Santa Cruz

Biotechnology) による脊髄後角での免疫染色、MitoSox Red による活性酸素発現量の計測を蛍光顕微鏡（キーエンス BZ-X700）を用いておこなった。結果としてはコントロール群に比べて、オピオイド耐性群で MitoSox Red による活性酸素の発現量に有意な増加が認められた。また、治療群では、コントロール群との間に有意差を認めなかった。一方で、CPEB、pCREB、pC/EBP-β の発現量においては、3 群間に有意差が認められなかった。ウェスタンブロッティング法による計測でも、CPEB、pCREB、pC/EBP-β の発現量には有意差が認められなかった。以上より、CPEB がモルヒネ反復投与により形成されたオピオイド耐性、オピオイド因性疼痛に影響するという根拠はえられなかったが、活性酸素は脊髄後角レベルにおいて疼痛群で増加し、アンチセンス CPEB の投与はこの産生を抑制する事が確認できた。2017 年に我々がおこなった別の研究では、ラットにおけるモルヒネの急激な退薬現象は中脳水道周囲灰白質(PAG)における MitoSox Red の発現量を増加させ、MnSOD の産生はこれを抑制した。今後は、MnSOD の投与や産生により ROS を抑制する事は、脊髄レベルでも活性酸素の減少と OIH が改善をもたらす、CPEB を介さない別の分子生物学的機序が OIH に関わる事を証明していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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) 研究協力者

研究協力者氏名：神田 恵

ローマ字氏名：(KANDA, Megumi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。