

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18613016  
 研究課題名 (和文) 慢性疼痛機構の解明：脊髄ダイノルフィン系と転写因子 p53 との相互  
 連関からの検討  
 研究課題名 (英文) Elucidation of chronic pain mechanism from interactions between  
 spinal dynorphin system and p53, a transcription factor.  
 研究代表者  
 丹野 孝一 (TAN-NO KOICHI)  
 東北薬科大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：20207260

研究成果の概要：神経因性疼痛（神経障害に起因する痛み）とモルヒネ鎮痛耐性（連用によりモルヒネの鎮痛作用が減弱する現象）の発現機序は、多くの点で類似している。本研究では、モルヒネ鎮痛耐性が脊髄におけるダイノルフィン (Dyn) の分解阻害および転写因子 p53 の阻害により抑制されることを見出し、脊髄 Dyn 系と p53 の相互連関が神経因性疼痛の発現にも関与している可能性を示唆した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	660,000	3,960,000

研究分野：行動薬理学、神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：モルヒネ、鎮痛耐性、神経因性疼痛、ダイノルフィン、システインプロテアーゼ、p53、脊髄クモ膜下腔内投与、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

内因性オピオイドペプチドのダイノルフィン (Dyn) は、脊髄疼痛伝達機構において抑制的のみならず促進的にも関与していることが明らかにされている。一方、神経因性疼痛モデルラットの脊髄後角細胞においてアポトーシスの誘導が報告されている。また、我々は以前 HeLa 細胞において転写因子 p53 によるアポトーシス誘導を Dyn 類の一つであるビッグダイノルフィンが増強することを報告している。これらの事実から、神経因性疼痛は脊髄 Dyn 系を介した p53 の機能亢進に基づき発現・維持されている可能性

が推察された。従って、この点を解明することを目的に本研究課題を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、慢性疼痛機構を脊髄 Dyn 系と p53 との相互連関から解明することを目的とし、行動薬理学的および分子生物学的観点から検討を行った。また、神経因性疼痛とモルヒネ鎮痛耐性の発現機序は多くの点で類似性を有しているので、モルヒネ鎮痛耐性についても同様の観点から検討を行った。さらに、我々は、先に NMDA 受容体イオンチャネル複合体のポリアミン調節

部位が Dyn 系の脊髄疼痛伝達機構において重要な役割を担っていることを明らかにしているが、ポリアミン調節部位と同じアロステリック部位であるグリシン調節部位の疼痛伝達機構における役割についてはほとんど解明されていない。慢性疼痛機構の解明を試みる上でもグリシン調節部位の脊髄疼痛伝達機構における役割を解明することは必須のことと考え、この点についても検討を試みた。

### 3. 研究の方法

実験には ddY 系雄性マウス (22-24 g) を使用した。

#### (1) 脊髄クモ膜下腔内 (i. t.) 投与の方法

薬液を 5 $\mu$ l/mouse の割合で腰椎の 5 番と 6 番の間に無麻酔下で直接投与した。

#### (2) 鎮痛作用の測定

0.5%ホルマリン液 20 $\mu$ l をマウスの右後肢足蹠内へ投与した際に誘発される licking および biting 行動の持続時間を投与直後から 5 分間測定した。

#### (3) モルヒネ鎮痛耐性の作製

モルヒネを 1 日目に 30 mg/kg、2 日目に 60 mg/kg をそれぞれ 1 日 2 回皮下に反復投与することにより鎮痛耐性マウスを作製した。

#### (4) 疼痛関連行動の測定

疼痛関連行動の測定項目は、両後肢による下腹部への scratching、両後肢や尾部への biting および licking 行動で、これらの行動の持続時間を D-サイクロセリン i. t. 投与直後から 5 分間隔で 30 分間測定した。

#### (5) 脊髄 p53 発現量の測定

腰髄部分を摘出し、ウエスタン・ブロッティング法で p53 発現量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脊髄疼痛伝達機構における NMDA 受容体イオンチャネル複合体グリシン調節部位の役割

NMDA 受容体グリシン調節部位の脊髄疼痛伝達機構における役割については、ほとんど解明されていない。慢性疼痛機構の解明を試みる上でもグリシン調節部位の役割を解明することは必須のことと考え、グリシン調節部位のパーシャルアゴニストである D-サイクロセリンをマウスの i. t. へ投与し、行動薬理的に検討を行ったところ以下の結果が得られた [*J. Pharmacol. Sci.*, **104**, 39-45 (2007)]。

①D-サイクロセリン (100 および 300 fmol) は、投与後 5-10 分をピークとする疼痛関連行動を誘発した。

②D-サイクロセリン誘発性疼痛関連行動は、グリシン調節部位の拮抗薬である 7-クロロキヌレニン酸をはじめとする NMDA 受容体関連拮抗薬によって用量依存的かつ有意に抑制された。

③D-サイクロセリン誘発性疼痛関連行動は、タキキニン NK1 および NK2 受容体拮抗薬によっては全く影響されなかった。

以上の結果から、D-サイクロセリンは脊髄 NMDA 受容体イオンチャネル複合体上のグリシン調節部位に作用し、その結果この複合体の機能が亢進して疼痛関連行動が発現することが判明した。また、この疼痛関連行動の発現にはタキキニン受容体機構は関与しないことが判明した。

#### (2) モルヒネ鎮痛耐性形成におけるシステインプロテアーゼの関与

慢性疼痛の一つである神経因性疼痛の維持に脊髄 Dyn 系が関与している。神経因性疼痛とモルヒネ鎮痛耐性の発現機序は多くの点で類似性を有しており、ラット大脳皮質初代培養細胞による Dyn B の分解がモルヒネ慢性処理によって亢進し、この亢進はシステインプロテアーゼ阻害薬で抑制されることが報告されている。そこで、モルヒネ鎮痛耐性形成に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の効果について他のプロテアーゼ阻害薬と比較検討を行なったところ、以下の結果が得られた [*Neuropeptides*, **42**, 239-244 (2008)]。

①モルヒネ 0.1 nmol の i. t. 投与による鎮痛作用は、鎮痛測定 2 日前に 30 mg/kg、前日に 60 mg/kg のモルヒネを 1 日 2 回皮下投与することにより完全に消失し、鎮痛耐性が形成された。

②モルヒネ反復投与ごとの 5 分前に Dyn A (2 nmol)、Dyn B (8 nmol)、選択的  $\kappa$ -オピオイド受容体作動薬である (-) U-50,488 (40 nmol)、システインプロテアーゼ阻害薬である N-エチルマレイミド (1 および 3 nmol) および Boc-Tyr-Gly-NH-Bz (0.5 および 2 nmol) を i. t. 投与することによりモルヒネ鎮痛耐性は有意に抑制された。

③セリンプロテアーゼ阻害薬のフッ化フェニルメタンスルホニル、アミノペプチダーゼ阻害薬のアマスタチン、エンドペプチダーゼ 24.11 阻害薬のホスホラミドンおよびアンジオテンシン変換酵素阻害薬のリシノプリルはモルヒネ鎮痛耐性に対し無影響であった。

以上の結果から、モルヒネ鎮痛耐性の形成に

は脊髄のシステインプロテアーゼ活性の上昇が重要な役割を担っており、システインプロテアーゼ阻害薬はモルヒネ鎮痛耐性の形成を抑制することを明らかにした (図1)。

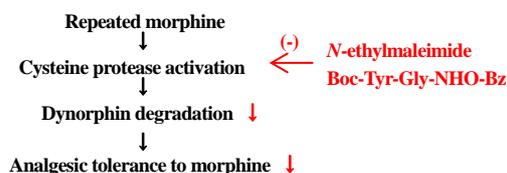


図1. モルヒネ鎮痛耐性形成機構の概略；  
脊髄ダイノルフィン系の関与

### (3) モルヒネ鎮痛耐性形成における p53 の関与

最近、ラットのi. t.へモルヒネを連続投与した際、カスパーズ-3が関与する脊髄後角細胞のアポトーシス誘導とそれに付随しての鎮痛耐性が発現されることが報告されている。また、モルヒネ鎮痛耐性に関与する一酸化窒素は、カスパーズ-2や-3の上流に位置して機能している転写因子p53の活性化を介してアポトーシスを誘導する。これらのことから、p53がモルヒネ鎮痛耐性形成に関与している可能性が推察される。そこで、モルヒネ鎮痛耐性形成におけるp53の関与について検討を行ったところ以下の結果が得られた [Neurosci. Lett., 450, 365-368 (2009)]。

- ①モルヒネ鎮痛耐性は、モルヒネ反復投与ごとの5分前にp53阻害薬であるピフスリン-α (1および10 nmol) をi. t. 投与することにより、一酸化窒素合成酵素の非選択的阻害薬であるL-NAME (2および20 nmol) やカスパーズの非選択的阻害薬であるZ-VAD-fmk (1および10 nmol) を処理した場合と同様に有意に抑制された。
- ②モルヒネ耐性マウスにおいて、脊髄p53の発現量は増加していた。

以上の結果から、モルヒネ鎮痛耐性の形成には脊髄のp53が関与していることを明らかにした (図2)。

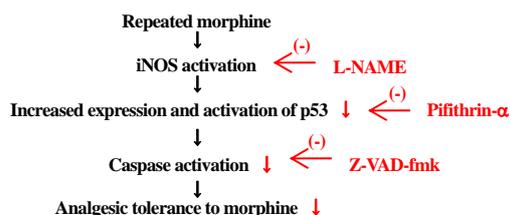


図2. モルヒネ鎮痛耐性形成機構の概略；脊髄 p53 の関与

## 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6件)

- ① Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Niijima, F., Sakurada, S., Bakalkin, G., Terenius, L., Tadano, T.  
Nociceptive behavior induced by the endogenous opioid peptides dynorphins in uninjured mice: evidence with intrathecal *N*-ethylmaleimide inhibiting dynorphin degradation.  
*Int. Rev. Neurobiol.*, **85**, 189-203 (2009)、査読有
- ② Tan-No, K., Shimoda, M., Watanabe, K., Nakagawasai, O., Niijima, F., Kanno, S., Ishikawa, M., Bakalkin, G., Tadano, T.  
Involvement of the p53 tumor-suppressor protein in the development of antinociceptive tolerance to morphine.  
*Neurosci. Lett.*, **450**, 365-368 (2009)、査読有
- ③ Tan-No, K., Shimoda, M., Sugawara, M., Nakagawasai, O., Niijima, F., Watanabe, H., Furuta, S., Sato, T., Satoh, S., Arai, Y., Kotlinska, J., Silberring, J., Terenius, L., Tadano, T.  
Cysteine protease inhibitors suppress the development of tolerance to morphine antinociception.  
*Neuropeptides*, **42**, 239-244 (2008)、査読有
- ④ Tan-No, K., Esashi, A., Nakagawasai, O., Niijima, F., Furuta, S., Sato, T., Satoh, S., Yasuhara, H., Tadano, T.  
Intrathecally administered D-cycloserine produces nociceptive behavior through the activation of *N*-methyl-D-aspartate receptor ion-channel complex acting on the glycine recognition site.  
*J. Pharmacol. Sci.*, **104**, 39-45 (2007)、査読有
- ⑤ Tan-No, K., Takahashi, K., Shimoda, M., Sugawara, M., Nakagawasai, O., Niijima, F., Sato, T., Satoh, S., Tadano, T.  
*S*-(+)-Fenfluramine-induced nociceptive behavior in mice: involvement of interactions between spinal serotonin and substance P systems.  
*Neuropeptides*, **41**, 33-38 (2007)、査読有
- ⑥ Tan-No, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Niijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S., Tadano, T.  
Anti-inflammatory effect of propolis

through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema.

*Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 96-99 (2006)、査読有

[学会発表] (計13件)

- ① Tan-No, K., Takahashi, H., Nakagawasai, O., Niijima, F., Sakurada, S., Bakalkin, G., Terenius, L., Tadano, T.  
Intrathecal *N*-ethylmaleimide, a cysteine protease inhibitor, produces nociceptive behavior through inhibition of dynorphin degradation.  
XI Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Sendai, Japan, September 12-14, 2008.
- ② 佐藤丞、丹野孝一、下田将司、中川西修、新島富紀枝、只野武  
モルヒネの身体的依存に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の抑制効果  
第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月17-19日
- ③ 菅原麻衣、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
ダイノルフィン A 足蹠内投与による痛覚過敏作用のメカニズム  
第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月17-19日
- ④ 江刺晶央、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
脊髄疼痛伝達機構における NMDA 受容体グリシン調節部位の役割  
第46回日本薬学会東北支部大会、仙台、2007年10月28日
- ⑤ 菅原麻衣、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
ホルマリン誘発性侵害行動に対するダイノルフィン A 足蹠内投与の二相性効果  
第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月29日
- ⑥ 佐藤丞、丹野孝一、下田将司、中川西修、新島富紀枝、只野武  
モルヒネの身体的依存に及ぼす各種プロテアーゼ阻害薬の影響  
第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月29日
- ⑦ 丹野孝一、下田将司、中川西修、新島富紀枝、只野武  
モルヒネ鎮痛耐性形成におけるシステインプロテアーゼの役割  
第2回東北薬科大学ハイテク・リサーチシンポジウム、仙台、2007年5月25日
- ⑧ 下田将司、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
システインプロテアーゼ阻害薬によるモルヒネ鎮痛耐性形成の抑制効果

第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月14-16日

- ⑨ 菅原麻衣、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、吉田真、中畑則道、只野武  
プロボリスの一酸化窒素産生抑制による抗炎症作用  
第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月14-16日
- ⑩ 下田将司、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
モルヒネ鎮痛耐性形成に及ぼすプロテアーゼ阻害薬の影響  
第16回神経行動薬理若手研究者の集い、名古屋、2007年3月13日
- ⑪ 下田将司、丹野孝一、中川西修、新島富紀枝、只野武  
モルヒネ鎮痛耐性に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の抑制効果  
第57回日本薬理学会北部会、弘前、2006年9月14-15日
- ⑫ Tan-No, K., Taira, A., Shimoda, M., Nakagawasai, O., Niijima, F., Demuth, H.-U., Silberring, J., Terenius, L., Tadano, T.  
Differential effects of *N*-peptidyl-*O*-acyl hydroxylamines on dynorphin-induced antinociception in the mouse capsaicin test.  
29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland, September 3-8, 2006.
- ⑬ 丹野孝一、高橋宏彰、中川西修、新島富紀枝、只野武  
ビッグダイノルフィン誘発性疼痛関連行動：脊髄一酸化窒素の関与  
第1回東北薬科大学ハイテク・リサーチシンポジウム、仙台、2006年5月26日

[その他]

ホームページ

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹野 孝一 (TAN-NO Koichi)  
東北薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：20207260

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者