

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791070

研究課題名（和文） 難治性疼痛に対する新規鎮痛療法の開発

研究課題名（英文） The analgesic effects of intrathecal morphine and baclofen for refractory pain

研究代表者

高田 正史 (TAKADA MASAFUMI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00404244

研究成果の概要：

少量モルヒネとバクロフェンの同時髄腔内投与が単独投与と比べ優れた鎮痛効果を持ち、かつ耐性を形成しにくい可能性について検討した。電気生理アッセイでは、少量モルヒネ+少量バクロフェン併用投与は脱感作を起こさず単独投与と同等の活性を示すことが分かった。In vivo assay ではバクロフェンの持続髄腔内投与を行ったラットで耐性形成が見られ、脊髄組織では、脱感作を促すと考えられている GRK4,5 が免疫組織学的に増加していることが判明した。今後はモルヒネ単独、少量モルヒネ+バクロフェン投与ラットの行動薬理的解析、ならびに脊髄組織 GRK の免疫学的解析を行い比較検討していきたい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：疼痛治療学

1. 研究開始当初の背景

緩和医療においては、がん患者に対し、様々なオピオイド製剤を用いた疼痛管理が行われている。オピオイド製剤の全身投与においては、疼痛コントロールが困難であったり副作用により増量が不可能な場合がある。このような場合にはモルヒネを脊髄くも膜下腔に投与する「モルヒネ髄腔内投与法」が行われ、優れた鎮痛効果を示すことが知られてきた。しかし、この方法においても、長期投与を行った場合では耐性が形成され、次第

に効果がなくなることが問題となっている。さらに近年、難治性の神経因性疼痛など、オピオイド製剤がはじめから効きにくい痛みに対しては、モルヒネ製剤に代わって GABA_B 受容体アゴニストであるバクロフェンの脊髄くも膜下投与が奏功することが知られてきた。しかし、この方法も、「モルヒネ髄腔内投与法」で見られるように、長期投与により耐性が形成され、バクロフェンが効きにくくなることがわかっている。私たちはこれまでの研究で、脊髄には G protein-coupled

receptor kinase (GRK)2-6 (GRK1 は網膜にのみ存在)が存在し、そのうち GRK4,5 は GABA_B 受容体の脱感作に関与し、GRK2,3,6 は関与しないことを見出した。また、 μ オピオイド受容体の脱感作には GRK2,3,6 が関与することがわかっている。これらの事実は、GABA_B 受容体、並びに μ 受容体の脱感作機構は異なっていることを示唆する。G 蛋白共役型受容体の脱感作の程度はアゴニスト濃度に比例して起こることが知られている。従って、そのそれぞれのアゴニストであるバクロフェン、およびモルヒネの少量併用投与は、単独投与と比較して受容体脱感作の程度は小さいと考えられる。さらに、同時に同じシグナルを来す受容体を刺激することで、これら併用療法は、単独投与と同等の鎮痛効果を示し、かつ脱感作を起こしにくい可能性がある。私たちは、オピオイドの効かない慢性疼痛に対し、優れた鎮痛効果を持ち、かつ耐性を起こしにくい薬物投与方法の開発のための基礎データを集積したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) モルヒネとバクロフェンの少量同時投与は、モルヒネまたはバクロフェンの単独投与と比べ受容体脱感作を受けにくいのか、さらにその活性の程度は単独刺激と同様の大きさが得られるかどうか、両受容体を同時に発現させた細胞を用いて、同時刺激による細胞反応、単独刺激による細胞反応の大きさを、電気生理的手法を用いてアッセイする。

(2) ラットの脊髄も膜下に持続注入ポンプを植え込み、バクロフェンを持続投与して、果たしてバクロフェン耐性ラットを得ることができるかどうか検討を行う。またもし耐性ラットが得られたならば、その脊髄組織を標本として抽出し、同組織における GRKs (特に GRK4,5 に注目して)の mRNA ならびにタンパク量の変動を解析する。

(3) ラットの脊髄も膜下に持続注入ポンプを植え込み、モルヒネを持続投与して、モルヒネ耐性ラットを得ることができるかどうか検討を行う。もし耐性ラットが得られたならば、その脊髄組織を標本として抽出し、同組織における GRKs (特に GRK2,3,6 に注目して)の mRNA ならびにタンパク量の変動を解析する。

(4) ラットの脊髄も膜下に少量(通常量の 1/10 程度)のバクロフェン、ならびにモルヒネを持続投与し、耐性ラットができるか、あるいは耐性は起こらないのかどうかを検討する。さらにその脊髄組織を標本として抽出し、同組織における GRKs (特に GRK2,3,6 に注目して)の mRNA ならびにタンパク量の変動を解析する。

3. 研究の方法

(1) クローン化 GABA_B 受容体、 μ オピオイド受容体、GRK2-6 を発現させた *Xenopus oocyte* をモルヒネ単独、バクロフェン単独、あるいは少量モルヒネ+バクロフェンで刺激し、内向き整流性 K チャネルを測定し、その活性と脱感作様式を解析する。

(2, 3, 4) ラット皮下に浸透圧ポンプを植え込み、モルヒネ単独、バクロフェン単独、あるいは少量モルヒネ+バクロフェンを持続注入し、疼痛閾値を Tail flick test により解析する。疼痛に対し、薬物耐性ができているのかどうかを行動薬理的に観察する。

上記3つの異なる薬物を投与した群のラットより脊髄を摘出し、リアルタイム RT-PCR により受容体、GRK の mRNA 発現変化を解析する。また、免疫染色ならびにウエスタンブロットによりそれらの蛋白発現を解析する。

4. 研究成果

(1) 電気生理アッセイ実験において、10 μ M モルヒネは、内向き整流性 K カレントを惹起した。また、100 μ M バクロフェンも K カレントを惹起した。K カレントの大きさは上記濃度のモルヒネ、バクロフェンにおいて、同様の大きさを示した。次に両受容体を発現させた卵母細胞において、1 μ M (1/10 量)モルヒネ+10 μ M (1/10 量)バクロフェンを同時に投与すると、内向き整流性 K カレントが流れた。その大きさは、モルヒネ 10 μ M、バクロフェン 100 μ M で惹起される大きさとほぼ同等であった。

少量モルヒネ+バクロフェン刺激が繰り返し投与による K カレントの大きさの減少(脱感作)を起こすかどうか検討した。モルヒネ単独、バクロフェン単独での脱感作に比較し、少量モルヒネ+バクロフェンは脱感作をほとんど起こさなかった。つまり K カレントの減少はほとんど認められなかった。このことは、少量モルヒネ+バクロフェン投与が単独(高濃度)での鎮痛効果に匹敵する効果を示し、かつ脱感作を起こしにくい可能性が示唆された。

(2) ラット髄腔内にバクロフェンを単独持続投与し、疼痛閾値の低下つまり耐性を形成することを Tail flick test により行動薬理的に観察できた。髄腔内にバクロフェンを単独投与したラット脊髄において、mRNA レベルでは GABA_B 受容体、GRK 発現はいずれも変化がなかった。また、ウエスタンブロットにおいても蛋白発現に変化はなかった。一方、脊髄組織切片を用いた免疫染色では、GABA_B 受容体の発現に変化はなかったが、GRK4,5 の発現が有意に増加していることがわかった。つまり、バクロフェン髄腔内投与における耐性形成の原因として GRK4,5 の増加が一因であることが In Vivo assay で証明された。

(3) ラット脊髄も膜下持続モルヒネ注入

ラットについては、本研究結果には間に合わなかった。現在モルヒネ耐性ラットが得られるかどうかの検討を行っているところである。

(4)ラット脊髄くも膜下腔への少量バクロフェン+モルヒネ注入による耐性ラット作製についても目下検討中であり、さらに鋭意研究を継続していく予定である。

まとめ：

In Vitro の検討においては、少量モルヒネ+バクロフェンは、単独の効果に匹敵する鎮痛効果を示すことが示唆され、さらに、単独で起こっていた受容体脱感作も回避できることがわかった。

In Vivo モデルにおいては、現在はバクロフェン耐性ラットの構築、ならびにその脊髄標本において、GABAB 受容体脱感作機構に関わる GRK4,5 のタンパク量が、痛みや運動を調節する脊髄後角ならびに脊髄前角で増加しているという結果を得ている。さらにモルヒネ耐性ラットでは GRK2,3,6 にどのような変化があるのか検討を行っていききたい。

最終的に、少量モルヒネ+バクロフェン投与ラットでは行動薬理学的解析において、耐性が回避されるのかどうかが一番興味のあるところである。今後も本研究を継続し、少量モルヒネ+バクロフェン投与したラット脊髄についても、受容体ならびに GRK の発現変化を解析し、耐性形成の分子生物学的機序ならびにその制御の可能性を明らかにし、難治性疼痛に対する新規鎮痛療法を開発する基盤となるデータを蓄積していききたい。

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4件)

Minoru Hojo, Yuko Ando (3), Masafumi Takada (5), Yasuhito Uezono (10) 計 10 名 μ -opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB_1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. J Pharmacol Sci 108; 308-19 (2008)、査読有

上園保仁(1) 計4名、オピオイド受容体の発現様式の違いが種々のオピオイド製剤の鎮痛効果耐性の違いを生む? - 基礎実験からのアプローチ ペインクリニック 29; 349-55 (2008)、査読無

成田年、上園保仁(2) 計4名、トランスレーショナル・オピオイドリサーチ 2008: μ オピオイド受容体の多機能性 ペインクリニック 29; 301-13 (2008)、査読無

安藤優子(1)、上園保仁(4) 計4名、ITB (髄腔内バクロフェン)療法 - 日本における新しい重度痙縮の治療、日本薬理学会雑誌 131; 109-14 (2008)、査読有

[学会発表](計21件)

安藤優子、高田正史 他. レミフェンタニルによる μ オピオイド受容体の internalization および recycling 様式の検討: フェンタニルとの比較、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日18日、横浜

須藤結香、高田正史 他. μ オピオイド受容体とカナビノイド CB_1 受容体はアゴニスト刺激に依存しない構成的な二量体を形成している、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日18日、横浜

Yasuhito Uezono. Visualization, biochemical and functional analyses of μ -opioid and cannabinoid CB_1 receptors: implication of interaction between morphine and cannabinoids at the receptor levels、痛み克服の国際的研究教育拠点の形成 第1回国際シンポジウム、2009年3月13日14日、長崎
Yuko Ando, Masafumi Takada et al. Distinct internalization and recycling profiles of μ -opioid and dimerized μ -opioid receptors in response to each opioid、痛み克服の国際的研究教育拠点の形成 第1回国際シンポジウム、2009年3月13日14日、長崎

Yuko Ando, Masafumi Takada et al. Dimerized μ -opioid receptors show distinct profiles of internalization and recycling in response to each opioid agonist. First Congress of Asian Society for Neuroanesthesia and Critical Care, Nov 28th- Dec 1st 2008, Beijing

安藤優子 他. S(+)-ケタミンはバクロフェンによる $GABA_B$ 受容体脱感作を抑制する - その分子生物学的メカニズム、第114回日本薬理学会近畿部会、2008年11月14日、神戸

Yuko Ando, Masafumi Takada et al. Distinct roles of μ -, δ -, and dimerized μ -opioid receptors in the tolerance to each opioid. American Society of Anesthesiologists, Oct 18th 22nd 2008, Orlando

Minoru Hojo, Masafumi Takada et al. Heterodimerized μ -opioid and cannabinoid CB_1 receptors are involved in their cross-talk analgesia. American Society of Anesthesiologists,

Oct 18th -22nd 2008, Orlando
須藤結香、高田正史 他. μ オピオイド受容体はカナビノイド CB₁ 受容体とヘテロ二量体を形成し、異なる細胞内シグナルを引き起こす - オピオイドとマリファナの相互作用の基礎研究 -、第 2 回日本緩和医療薬学会、2008 年 10 月 18 日 19 日、横浜
上園保仁、高田正史 他. 各種医療用麻薬による耐性/副作用発現の違いは、細胞レベルでのオピオイド受容体シグナルの多様性がその一因である - 基礎研究を通して -、第 2 回日本緩和医療薬学会、2008 年 10 月 18 日 19 日、横浜
安藤優子 他. ケタミンはバクロフェンによる GABA_B 受容体の脱感作を抑制する：ケタミンによるバクロフェン耐性制御の可能性について、第 55 回日本麻酔科学会、2008 年 6 月 12 日 14 日、横浜
上園保仁、高田正史 他. モルヒネ受容体シグナル多様性の解析：臨床でみられるモルヒネ製剤の作用・副作用のよりよき理解のために、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日 19 日、横浜
安藤優子、高田正史 他. GABA_B 受容体は μ オピオイド受容体と異なり arrestin 2 との複合体を形成しないため internalization されない、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日 19 日、横浜
上園保仁、高田正史 他. GABA_B 受容体のサブタイプのシグナル特性解析、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日 19 日、横浜
安藤優子、高田正史 他. GABA_B 受容体脱感作の抑制によるバクロフェン持続鎮痛の試み - ケタミン同時投与による受容体脱感作抑制効果について -、第 60 回日本薬理学会西南部会、2007 年 11 月 22 日、宮崎
上園保仁、高田正史 他. 各種医療用麻薬がオピオイド受容体に結合した後のシグナルの多様化が耐性・副作用発現の違いを生む、第 1 回日本緩和医療薬学会、2007 年 10 月 20 日 21 日、東京
須藤結香、高田正史 他. μ -, δ -オピオイド二量体化受容体では医療用麻薬の細胞内シグナルが異なる - 培養細胞を用いて -、第 1 回日本緩和医療薬学会、2007 年 10 月 20 日 21 日、東京
Yuko Ando et al. Roles of G protein-coupled receptor kinases in the tolerance of intrathecal baclofen (ITB). American Society of Anesthesiologists, Oct 11th -14th 2007, San Francisco
Minoru Hojo, Masafumi Takada et al.

Internalization profiles of dimerized opioid receptors: Implication for the mechanisms of tolerance. American Society of Anesthesiologists, Oct 11th -14th 2007, San Francisco

上園保仁 他. オピオイド受容体の発現様式の違いが、種々のオピオイド製剤の鎮痛効果、耐性の違いを生む？ - 基礎実験からのアプローチ -、第 28 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2007 年 8 月 28 日 29 日、札幌

21 安藤優子 他. バクロフェンの耐性形成機構の分子生物学的解析：バクロフェン耐性ラットにおける GABA_B 受容体および GRK4 の発現変化、第 54 回日本麻酔科学会、2007 年 5 月 31 日 6 月 2 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 正史 (TAKADA MASAFUMI)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：0040424

研究協力者

北條 美能留 (HOJO MINORU)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：00380957

上園 保仁 (UEZONO YASUHIRO)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：20213340

安藤 優子 (ANDO YUKO)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・大学院生