

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21600009

研究課題名（和文） 難治性疼痛の克服：G 蛋白共役型受容体同時活性化による鎮痛耐性形成の回避

研究課題名（英文） Overcoming refractory pain: prevention of tolerance of pain by simultaneous activation of G_{i/o}-coupled receptors

研究代表者

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20213340

研究成果の概要（和文）：難治性疼痛には髄腔内モルヒネ並びにバクロフェン投与が行われるが、これらの持続投与は鎮痛効果を減弱させる。各々の受容体の脱感作のためである。

今回、①ケタミン+バクロフェンは受容体脱感作を抑制すること、②GABA_B受容体はβアレスタチンとの会合せず、受容体陥入を起こさないこと、③μ/GABA_B受容体共発現細胞にて、低濃度バクロフェン+モルヒネは脱感作を起こさないことを見出し、鎮痛耐性の克服にバクロフェン+ケタミン、低濃度モルヒネ+バクロフェンが有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Management of refractory pain seen in advanced cancer patients is hard to control, and in such cases intrathecal morphine (ITM) or intrathecal baclofen treatment (ITB) is currently used. However, persistent use of either ITM or ITB often causes tolerance due to desensitization of μ-opioid (μOR) or GABA_B receptors (GBR).

To overcome such issue, we demonstrated by using in vitro experimental system that 1) treatment of baclofen with ketamine suppressed GBR desensitization, 2) GBR did not internalize because of failure of association with β-arrestins, key proteins for receptor desensitization, 3) in cells coexpressing μOR and GBR, combination of low concentrations of morphine and baclofen hardly caused receptor desensitization. These results suggest that some of newer treatments described above would be useful for the control of refractory pain by prevention of receptor desensitization.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：GABA_B受容体、μ受容体、耐性、オピオイド、FRET、β-アレスタチン、ケタミン、受容体陥入

1. 研究開始当初の背景

本邦においては、がん対策基本法の施行に伴い、オピオイドを用いた緩和医療は進展す

ると期待される。オピオイドによっても鎮痛効果が得られない場合、欧米諸国では髄腔内へのモルヒネ療法（ITM）が選択される。

近年、オピオイドの効かない痛み、脊髄の GABA_B 受容体を活性化する「髄腔内バクロフェン療法(ITB 療法)」も奏効することが知られてきた。しかし ITM も ITB も、長期投与では鎮痛効果が減弱する。この作用には受容体脱感作が関与している。オピオイド μ 受容体、GABA_B 受容体脱感作には G protein-coupled receptor kinase (GRK) というリン酸化酵素が関与している。GABA_B 受容体の脱感作には GRK4, 5 が関与し、 μ 受容体の脱感作には主に GRK2, 3 が関与する。つまり、GABA_B 受容体と μ 受容体は異なる脱感作機構を有する。

μ 受容体、GABA_B 受容体は痛みの伝達系路である脊髄後角に発現しており、またモルヒネ+バクロフェンの同時投与で相乗的に鎮痛効果を示すことが報告されている。このことは、モルヒネとバクロフェンの少量同時投与は単独投与に比し同等の鎮痛効果を示す可能性があること、さらに少量アゴニスト投与は脱感作が回避される結果、薬剤耐性を生みず、鎮痛効果が持続する可能性が考えられる。加えて、脱感作を抑制する薬物があれば、モルヒネ並びにバクロフェン投与時の耐性を回避できる可能性がある。

2. 研究の目的

緩和医療におけるオピオイド鎮痛療法は、鎮痛効果の持続に加え、耐性形成を防止する投与方法が理想である。オピオイドが効きにくい症例には、オピオイド製剤を変更する「オピオイドローテーション」や、鎮痛補助薬の追加投与が行われている。しかし、オピオイド受容体を刺激した後のシグナル伝達機構を解明し、そのメカニズムに基づいた「鎮痛効果を持続させる、耐性形成を防ぐ新規投与方法」を開発するという研究はこれまでにない。今回私たちは、オピオイド受容体をはじめ、他の G 蛋白共役型受容体の細胞内シグナル機構を解明することで、オピオイド受容体、ならびに同じ細胞内シグナルを惹起し、鎮痛効果をもたらす G 蛋白共役型受容体(GABA_B、 $\alpha 2$ 受容体など)を同時に活性化させることで、少量投与で強い鎮痛効果をもたらし、さらに少量であるが故に受容体耐性形成が起こりにくい新規投与方法を、細胞内シグナルのメカニズム解明から *in vivo* での動物を用いた実験で明らかにする。そして多施設における治験に至るまでのトランスレーショナルリサーチを行い、実用化しうる「持続鎮痛のための薬物の組み合わせとその投与方法」の基盤となるデータを蓄積する。

3. 研究の方法

オピオイド受容体と同様、強い鎮痛効果を持つ同じ GABA_B 受容体を用いて、少量のバクロフェン+モルヒネ投与が強い細胞内シグ

ナルを惹起しかつ受容体脱感作は起こりにくいかどうかを、申請者の開発した *in vitro* アッセイシステムで明らかにする。さらにその組み合わせは持続する鎮痛効果を持ちかつ耐性形成を回避するかを *in vivo* アッセイシステムで検討する。

クローン化 GABA_BR-CFP、 μ OR-CFP、GRK2, 3, 4, 5, 6-YFP を Baby Hamster Kidney (BHK) 細胞に発現させ、

(1) 発現を共焦点レーザー顕微鏡で免疫蛍光組織学的に解析する。

(2) 各受容体とそれぞれの GRK の複合体化を FRET によりアッセイする。

(3) クローン化 GABA_BR、mOR、GRK2, 3, 4, 5, 6 のすべてを *Xenopus oocyte* に発現させ、①モルヒネのみ、②バクロフェンのみ、③少量モルヒネ+少量バクロフェン同時投与した際の K カレントの大きさを比較検討する。この条件での K カレント脱感作の程度を比較検討する。

4. 研究成果

モルヒネが効かない痛みに対し、欧米諸国では髄腔内モルヒネ投与に加え、脊髄 GABA_B 受容体活性化による髄腔内バクロフェン(ITB)療法が行われている。しかしこれらは持続投与により鎮痛効果が減弱するため、効果の維持のためには濃度を上げざるを得ず、このことが耐性に繋がる。この減弱効果は、 μ オピオイド受容体、GABA_B 受容体の持続的活性化による脱感作が関与する。 μ 受容体の脱感作には G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)、GRK3 が、GABA_B 受容体脱感作には GRK4、GRK5 という受容体リン酸化酵素が関与しており、この効果は特に高濃度リガンドで認められる。従って低濃度リガンド併用(低用量モルヒネ+バクロフェン)で鎮痛効果が維持できれば、臨床においても脱感作や耐性の発現が少ないと考えた。また、脱感作を抑制する薬物を見出せれば、その薬物を併用することで耐性防止につながると考えた。

本研究では、

(1) NMDA 受容体アンタゴニストである麻酔薬ケタミンとバクロフェンを組み合わせると受容体脱感作が抑制されることを見いだし(Ando et al., 2011)、ケタミンとバクロフェンの併用という臨床研究の基礎データを構築した。

(2) 耐性形成には細胞内への受容体陥入が重要であることがわかっているが、GABA_B 受容体は陥入に関与する β arrestin との会合ができないため、脱感作はするも、陥入は起きないことを明らかにした(Sudo et al., 2012)。

(3) クローン化 μ 受容体、GABA_B 受容体、GRK2、GRK4、および内向き整流性 K チャネルを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に

において、低濃度バクロフェン(1 μ M)+モルヒネ(3 μ M)は、単独高濃度リガンドで起こるKチャンネル活性化と同等の活性を示し、少量バクロフェン+モルヒネは、高濃度の処置と比較し、受容体脱感作がほとんど起きないことを見出した。

(4) 髄腔内投与による鎮痛耐性の克服としてバクロフェン+ケタミン、低濃度モルヒネ+バクロフェンの投与方法が耐性を起こしにくい方法であることを基礎レベルで明らかにした。動物モデル(ラット疼痛モデル)でこのことを明らかにし、さらに臨床応用の基礎データを蓄積し、将来の臨床研究につなげていく予定である。

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 26 件)

1. Sudo, Y., Hojo, M., Ando, Y., Takada, M., Murata, H., Kurata, S., Kanaide, M., Nishida, N., Uezono, Y. GABA_B receptors do not internalize after baclofen treatment possibly due to lack of the β -arrestin association: a real-time visualization study. *Synapse*, Epub ahead of print (2012). (DOI: 10.1002/syn.21565) 査読あり
2. Fujitsuka, N., Asakawa, A., Uezono, Y., Minami, K., Yamaguchi, T., Niijima, A., Yada, T., Maejima, Y., Sedbazar, U., Sakai, T., Hattori, T., Kase, Y., Inui, A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatr*, 1: e23- (2011). (DOI: 10.1038/tp.2011.25) 査読あり
3. Narita, M., Imai, S., Nakamura, A., Ozeki, A., Asato, M., Rahmadi, M., Sudo, Y., Hojo, M., Uezono, Y., Devi, L.A., Kuzumaki, N., Suzuki, T. Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state. *Addict Biol*, Epub ahead of print (2011). (DOI: 10.1111/j.1369-1600.2011.00354.x) 査読あり
4. 上園保仁. がん患者の症状緩和に役立つ漢方薬-漢方薬の有効性を示す、臨床につながる基礎研究-. がん患者と対症療法, 22 (2): 140-146 (2011). 査読なし
5. 上園保仁, 須藤結香. 腸管神経叢に発現している消化管運動制御受容体と、それらをターゲットにした消化管機能改善薬. *医学のあゆみ*, 238 (10): 904-908 (2011). 査読なし
6. Imai, S., Sudo, Y., Nakamura, A., Ozeki, A., Asato, M., Hojo, M., Devi, L.A., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Uezono, Y., Narita, M. Possible involvement of β -endorphin in a loss of the coordinated balance of μ -opioid receptors trafficking processes by fentanyl. *Synapse*, 65 (9): 962-966 (2011). 査読あり
7. 上園保仁. がん患者の症状緩和のために-がん悪液質の予防、症状改善をめざす基礎医学研究. がん患者と対症療法, 22 (1): 58-63 (2011). 査読なし
8. Minami, K., Sudo, Y., Yokoyama, T., Ogata, J., Takeuchi, M., Uezono, Y. Sevoflurane inhibits the μ -opioid receptor function expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacology*, 88 (3-4): 127-132 (2011). 査読あり
9. Yanagita, T., Satoh, S., Uezono, Y., Matsuo, K., Nemoto, T., Maruta, T., Yoshikawa, N., Iwakiri, T., Minami, K., Murakami, M. Transcriptional up-regulation of cell surface Na_v1.7 sodium channels by insulin-like growth factor-1 via inhibition of glycogen synthase kinase-3 β in adrenal chromaffin cells: enhancement of ²²Na⁺ influx, ⁴⁵Ca²⁺ influx and catecholamine secretion. *Neuropharmacology*, 61 (8): 1265-1274 (2011). 査読あり
10. Yokoyama, T., Minami, K., Sudo, Y., Horishita, T., Ogata, J., Yanagita, T., Uezono, Y. Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na_v1.8, Na_v1.7, and Na_v1.4 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Anesth*, 25 (4): 609-613 (2011). 査読あり
11. Narita, M., Imai, S., Nakamura, A., Ozeki, A., Asato, M., Rahmadi, M., Sudo, Y., Hojo, M., Uezono, Y., Devi, L.A., Kuzumaki, N., Suzuki, T. Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state. *Addict Biol*, Epub ahead of print (2011). 査読あり
12. 上園保仁. がん対策推進基本計画に基づく緩和ケア推進・研究の今後. がん患

- 者と対症療法, 21 (2): 164-169 (2010).
査読なし
13. Miyano, K., Morioka, N., Sugimoto, T., Shiraishi, S., Uezono, Y., Nakata, Y. Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca²⁺ release from IP₃-sensitive Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ influx through TRPC3. *Neurochem Int*, 57 (8): 923-934 (2010). 査読あり
 14. Sudo, Y., Matsuo, K., Tetsuo, T., Tsutsumi, S., Okura, M., Nakai, J., Uezono, Y. Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca²⁺ influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: Evidence from *Xenopus* oocytes and mammalian cell expression system. *J Pharmacol Sci*, 114 (3): 281-291 (2010). 査読あり
 15. 上園保仁. がん疼痛基礎医学研究-経験を科学-. がん患者と対症療法. 21 (1): 78-79 (2010). 査読なし
 16. Ando, Y., Hojo, M., Kanaide, M., Takada, M., Sudo, Y., Shiraishi, S., Sumikawa, K., Uezono, Y. S(+)-ketamine suppresses desensitization of γ -aminobutyric acid type B receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of γ -aminobutyric acid type B receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 or 5. *Anesthesiology*, 114 (2): 401-411 (2011). 査読あり
 17. Minami, K., Sudo, Y., Shiraishi, S., Seo, M., Uezono, Y. Analysis of the effects of anesthetics and ethanol on μ -opioid receptor. *J Pharmacol Sci*, 112 (4): 424-431 (2010). 査読あり
 18. Yanagita, T., Maruta, T., Nemoto, T., Uezono, Y., Matsuo, K., Satoh, S., Yoshikawa, N., Kanai, T., Kobayashi, H., Wada, A. Chronic lithium treatment up-regulates cell surface Na_v1.7 sodium channels via inhibition of glycogen synthase kinase-3 in adrenal chromaffin cells: enhancement of Na⁺ influx, Ca²⁺ influx and catecholamine secretion after lithium withdrawal. *Neuropharmacology*, 57 (3): 311-321 (2009). 査読あり
 19. Torashima, Y., Uezono, Y., Kanaide, M., Ando, Y., Enjoji, A., Kanematsu, T., Taniyama, K. Presence of GABA_B receptors forming heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} subunits in human lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Sci*, 111 (3): 253-259 (2009). 査読あり
 20. 上園保仁, 須藤結香. 急速に世界に広まった TRPV6 チャネル変異体のチャネル特性の解析-TRPV6 クローン発現細胞を用いての解析-. *自律神経*, 46 (3): 190-197 (2009). 査読なし
 21. 上園保仁. 自律神経の薬理. *自律神経*, 46 (3): 139-146 (2009). 査読なし
 22. 上園保仁. がん対策基本法とがん疼痛基礎医学研究. がん患者と対症療法, 20 (2): 71-73 (2009). 査読なし
- [学会発表] (計 29 件)
1. 須藤 結香, 北條 美能留, 宮野 加奈子, 鈴木 雅美, 寺脇 潔, 白石 成二, 西田 教行, 上園 保仁. シグナルペプチド付加 HaloTag-GPCR の細胞膜移行と機能的アッセイ. 第 85 回日本薬理学会年会. 京都市 (2012 年 3 月 14-16 日).
 2. 上園保仁, 須藤結香, 宮野加奈子, 柏瀬陽平, 澤田祐美, 寺脇潔, 鈴木雅美, 小柳尚史, 白石成二, 樋上賀一, 西田教行. ラベルフリーで細胞機能をアッセイできるシステム、CellKey™ を用いた各種 GPCR, Ion channel の活性評価. 第 64 回日本薬理学会西南部会. 福岡市 (2011 年 11 月 20 日).
 3. Ohtake, N., Ikemura R., Ohbuchi, K., Sudo, Y., Uezono, Y., Yamamoto, M. The synergistic effects of herbal pungents 6-gingerol (6GC) 6-shogaol (6SG) and hydroxy α -sanshool (HAS) on in vitro peristaltic motility of isolated rat colon: Lessons from the unique prokinetic activity of Japanese traditional medicine daikenchuto. *Digestive Disease Week 2011*. Chicago, U. S. A. (2011 年 5 月 7-10 日).
 4. 上園保仁. 患者さんの QOL 向上を目指して: 基礎研究を臨床に生かすための試み. 第 4 回日本緩和医療薬学会年会. 鹿児島 (2010 年 9 月 25-26 日).
 5. Suzuki, M., Matoba, M., Sasaki, H., Terawaki, K., Shiraishi, S., Uezono, Y. Development of a rat model for cancerous peritonitis pain. 13th World Congress on Pain. Montreal, Canada (2010 年 8 月 29 日-9 月 2 日).
 6. Hojo, M., Sudo, Y., Ando, Y., Takada, Y., Uezono, Y., Sumikawa, K. Cellular signaling and internalization profiles of heterodimerized cannabinoid CB1 and opioid M receptors: Implication of cannabinoid

- and opioid interaction at the receptor levels. International Anesthesia Research Society 2010 Annual Meeting. Honolulu, U.S.A (2010年3月20-23日).
7. Ando, Y., Murata, H., Kurata, S., Hojo, M., Sumikawa, K., Uezono, Y. Internalization and recycling profiles of μ - and dimerized μ - δ opioid receptors induced by remifentanyl: implication of acute tolerance of remifentanyl. International Anesthesia Research Society 2010 Annual Meeting. Honolulu, U.S.A. (2010年3月20-23日).
8. 上園保仁. シンポジウム「統合医療」緩和ケア推進から3年-緩和医療研究における基礎医学の役割: 経験を科学に. 第16回日本行動医学会学術総会. 鹿児島市 (2010年2月26, 27日).
9. 上園保仁. 「緩和医療による生活の質向上を求めて-基礎から臨床まで 根拠を踏まえた情報提供のありかたを探る-」緩和医療による患者さんの生活向上を目指して-基礎医学者のできること. 第19回日本医療薬学会年会. 長崎市 (2009年10月24, 25日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)
独立行政法人国立がん研究センター・
研究所・分野長
研究者番号: 20213340

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: