

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25年5月31日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21600012

研究課題名（和文）慢性疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性不形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism underlying the suppression of the development of analgesic tolerance to morphine under chronic pain

研究代表者

丹野 孝一 (TAN-NO KOICHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20207260

研究成果の概要（和文）：本研究では慢性疼痛下におけるモルヒネの鎮痛耐性不形成メカニズムについて検討を行なった。1%ホルマリンの足蹠内投与による慢性疼痛下ではモルヒネ鎮痛耐性の形成が有意に抑制された。ホルマリン疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性の抑制は、一酸化窒素のプレカーサーである L-アルギニンによって有意に減弱されたが、D-アルギニンによっては影響されなかった。以上の結果から、ホルマリン疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性の抑制メカニズムとして、一酸化窒素の産生低下が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study examined the mechanism underlying suppression of analgesic tolerance to morphine under chronic pain condition. Chronic pain was induced by intraplantar injection of 1% formalin, which significantly suppressed the development of analgesic tolerance to morphine. The formalin-induced suppression of analgesic tolerance to morphine was significantly reversed by L-arginine, a precursor of nitric oxide, but not by D-arginine. These results suggest that suppression of analgesic tolerance to morphine under formalin-induced pain may be mediated through the inhibition of nitric oxide production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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、身体的依存、慢性疼痛、一酸化窒素、ホルマリン試験、マウス

1. 研究開始当初の背景

現在、死亡原因の第一位は癌であり、癌末期には多くの患者が激しい疼痛に見舞われる。癌性疼痛の治療に際し、1986年に公表された世界保健機構（WHO）方式三段階癌性疼痛治療法が非常に有効で、約80%の患者

を癌性疼痛から解放できるとされている。この効果的な治療法により医療用モルヒネの使用量が世界各国で増加している。しかしながら、日本におけるモルヒネの人口当たりの消費量は欧米諸国の約1/6以下であり、このことは残念ながら日本の癌性疼痛治療は十

分な域に達していないことを意味するものである。日本においてモルヒネが未だ積極的に使用されていない一因としてモルヒネの副作用である身体的・精神的依存や鎮痛耐性に対する懸念が挙げられる。しかし、実際には癌患者にモルヒネを鎮痛目的で適切に使用する限り、モルヒネの精神的依存は形成されず、鎮痛耐性もほとんど起きないことが臨床・上明らかにされている。さらに、動物実験でも慢性疼痛下においてモルヒネの精神的依存は形成されず、その不形成メカニズムについても星薬科大学の鈴木教授のグループにより詳細に明らかにされている。一方、モルヒネ鎮痛耐性が慢性疼痛下において形成し難いことも動物実験で確かめられてはいるものの、その不形成メカニズムの詳細は明らかにされていないのが現状である。Evidence based medicine (EBM) に基づき癌性疼痛治療にモルヒネが積極的に使用され、一人でも多くの癌患者が激しい疼痛から解放され、quality of life (QOL) の向上を目指す上にも「慢性疼痛下におけるモルヒネの鎮痛耐性不形成メカニズム」を解明することは極めて重要な課題であると考え、本研究を着手した。

2. 研究の目的

モルヒネ鎮痛耐性および身体的依存の形成に一酸化窒素 (NO) の過剰産生が関与していることは周知の事実であり、疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性および身体的依存不形成メカニズムに NO 系の低下が関与している可能性が示唆される。そこで、本研究ではこの点について NO 系から検討を行った。

3. 研究の方法

実験には、ddY 系雄性マウス (22-24 g) を用いた。

(1) 脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) 投与の方法

薬液を 5 μ 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 μ 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) 慢性疼痛マウスの作製

ホルマリンおよびカラゲニンマウスをマウスの左後肢足蹠内に 20 μ L 投与して作製した。

(5) 身体的依存の測定

ナロキソン誘発退薬症候 (ジャンプ行動、体重減少、下痢) を指標に評価した。すなわち、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 回皮下に反復投与を行ない、3 日目の測定当日に 60 mg/kg のモルヒネを皮下投与した。モルヒネ最終投与の 3 時間後にナロキソン (8 mg/kg) を腹腔内に投与し、投与直後から 20 分間に発現するジャンプ行動の回数を計測した。また、体重減少はナロキソン投与直前の体重と投与 1 時間後の体重の差から算出し、下痢の有無をナロキソン投与から 1 時間観察した。

(6) DNA マイクロアレイ解析

モルヒネ鎮痛耐性形成の作製プロトコルに従いモルヒネの反復投与を行い、モルヒネ最終投与の 14 時間後にマウスの腰髄を摘出し、GeneChip アレイを使用して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 慢性疼痛下におけるモルヒネの鎮痛耐性および身体的依存不形成メカニズム

モルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成に及ぼす慢性疼痛の影響について検討を行なったところ以下の結果が得られた。

①モルヒネ (0.3 nmol) 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、鎮痛耐性の形成が認められた。

②カラゲニン (1 および 2%) をモルヒネ初回投与の 24 時間前に足蹠内投与したところ、モルヒネ鎮痛耐性形成に影響を与えなかった。

③ホルマリン (0.5-2%) をモルヒネ初回投与の 24 時間前に足蹠内投与することにより、モルヒネ鎮痛耐性の形成が有意に抑制された。

④最も顕著にモルヒネ鎮痛耐性形成を抑制した 1%ホルマリンはモルヒネ初回投与の 0.5-24 時間前に投与することによりモルヒネ鎮痛耐性の形成を抑制した。しかしながら、48 時間前投与ではその抑制作用は消失した。

⑤1%ホルマリン処理により認められるモルヒネ鎮痛耐性形成の抑制は、NO のプレカーサーである L-アルギニン (100 および 300 mg/kg) をモルヒネ反復投与ごとの 20

前日に腹腔内投与することにより有意に減弱されたが、D-アルギニン (300 mg/kg) によっては影響されなかった。

- ⑥DNA マイクロアレイ解析の結果、腰髄における NOS1AP (nNOS adaptor protein の一種)、NMDA 受容体の NR2A と GluR δ 1 サブユニット、AMPA 受容体の GluA2 サブユニットおよび L 型 Ca²⁺チャネル α 1D サブユニットの発現がナイーブマウスと比較してモルヒネ耐性マウスでは顕著に増加したが、1%ホルマリン処理によりほぼ完全に回復した。
- ⑦1%ホルマリン処理はモルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発退薬ジャンプ行動には影響を与えなかったが、体重減少および下痢を有意に抑制した。
- ⑧1%ホルマリン処理によるナロキソン誘発体重減少および下痢の抑制は L-アルギニン (30 mg/kg) によって有意に減弱されたが、D-アルギニン (30 mg/kg) によっては影響されなかった。

以上の結果から、ホルマリン疼痛下においてモルヒネ鎮痛耐性およびモルヒネの身体的依存の指標となるナロキソン誘発体重減少や下痢が抑制されることが判明した。また、鎮痛耐性形成の抑制メカニズムとしてモルヒネ反復投与による腰髄の NOS1AP、NMDA 受容体および AMPA 受容体の発現増加とそれに伴う NO 産生増加、さらには L 型 Ca²⁺チャネルの発現増加がホルマリン疼痛下で抑制されることに起因する可能性が示唆された。

(2) モルヒネの身体的依存形成に及ぼす各種プロテアーゼ阻害薬の影響

ホルマリン疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性形成の抑制にダイノルフィン- κ -オピオイド系が関与していることが明らかにされている。一方、我々はモルヒネの鎮痛耐性形成がダイノルフィンおよびダイノルフィンの分解に関わるシステインプロテアーゼの阻害薬によって有意に抑制されることを報告している [Neuropeptides, 42, 239-244 (2008)]。そこで、本研究ではモルヒネの身体的依存形成もシステインプロテアーゼ阻害薬の脳室内投与によって抑制されるか否か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, 44, 279-283 (2010); Neuropeptides, 47, 187-191 (2013)]。

①ダイノルフィン A (62.5 pmol) およびダ

イノルフィン B (250 pmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。

- ②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 (0.5 nmol) および Boc-Tyr-Gly-NHO-Bz (0.4 nmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。
- ③アミノペプチダーゼ阻害薬であるアマスタチン、エンドペプチダーゼ 24.11 阻害薬である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であるカプトプリルは、いずれも 4 nmol の用量においてもナロキソン誘発退薬ジャンプ行動には全く影響を与えなかった。
- ④セリンプロテアーゼ阻害薬であるフッ化フェニルメタンスルホニル (4 nmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。
- ⑤モルヒネ依存マウスにおいて、セリンプロテアーゼである組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) の発現量は前頭前皮質で有意に増加し、この発現量の増加はナロキソン投与による退薬により更に増加した。
- ⑥抗プラスミン薬である *trans*-4-(アミノメチル)-シクロヘキサンカルボキシル酸 (300 pmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。
- ⑦プロテアーゼ活性化受容体-1 (PAR-1) アンタゴニストである (Tyr¹)-トロンビン受容体活性化ペプチド 7 (0.45 および 2 nmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。

以上の結果から、モルヒネの身体的依存形成時にシステインプロテアーゼ活性の上昇に伴いダイノルフィン類が過剰に分解されており、システインプロテアーゼ阻害薬はこの活性上昇を抑制することでダイノルフィン類の分解を阻害し、モルヒネの身体的依存形成を抑制することが判明した。また、フッ化フェニルメタンスルホニルは t-PA-プラスミン系の抑制を介して PAR-1 の活性を阻害し、モルヒネの身体的依存形成を抑制することが示唆された。

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 5 件)

- ① Nemoto W., Sato T., Nakagawasai O., Yaoita F., Silberring J., Tadano T., Tan-No K.
Phenylmethanesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, suppresses naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice. *Neuropeptides*, **47**, 187-191 (2013) 【査読有り, doi: 10.1016/j.npep.2012.11.002】
- ② 丹野孝一
モルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成におけるシステインプロテアーゼの関与
東北薬科大学研究誌 **58** 号, 29-34 (2011) 【査読有り, URL: http://ci.nii.ac.jp/vol_issue/nels/AA1149311X_jp.html】
- ③ Watanabe S., Tan-No K., Tadano T., Higashi H.
Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia via a glutamate signaling mechanism
Pain, **152**, 327-334 (2011) 【査読有り, doi: 10.1016/j.pain.2010.10.036】
- ④ Tan-No K., Sato T., Shimoda M., Nakagawasai O., Nijima F., Kawamura S., Furuta S., Sato T., Satoh S., Silberring J., Terenius L., Takeshi Tadano.
Suppressive effects by cysteine protease inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice.
Neuropeptides, **44**, 279-283 (2010) 【査読有り, doi: 10.1016/j.npep.2010.02.001】
- ⑤ Tan-No K., Takahashi H., Nakagawasai O., Nijima 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**, 191-205 (2009) 【査読有り, doi: 10.1016/S0074-7742(09)85015-0】

[学会発表] (計 21 件)

- ① 根本互, 中川西修, 八百板富紀枝, 三浦圭裕, 長谷川大地, 大友光平, 大堀彩, 岡本駿, 只野武, 丹野孝一

脊髄疼痛伝達機構におけるアンジオテンシン II の役割について

平成 25 年度東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム, 仙台, 2013 年 5 月, 要旨集 p.26

- ② Watanabe S., Tan-No K., Tadano T., Higashi H.
Gangliosides produce nociceptive behavior and hyperalgesia via glutamate signals
International Symposium for Neurosciences 2013, 仙台, 2013 年 3 月, Abstract p.19
- ③ Nemoto W., Nakagawasai O., Yaoita F., Kanno S., Yomogida S., Ishikawa M., Tadano T., Tan-No K.
Angiotensin II induces nociceptive behavior accompanied by p38 MAPK phosphorylation mediated through spinal AT1 receptors
International Symposium for Neurosciences 2013, 仙台, 2013 年 3 月, Abstract p.34
- ④ 根本互, 中川西修, 八百板富紀枝, 菅野秀一, 蓬田伸, 石川正明, 只野武, 丹野孝一
アンジオテンシン II 誘発性疼痛関連行動における p38 MAPK の関与
第 63 回日本薬理学会北部会, 新潟, 2012 年 9 月, 要旨集 p.31
- ⑤ Tan-No K., Shimoda M., Watanabe K., Nakagawasai O., Yaoita F., Kanno S., Ishikawa M., Bakalkin G., Tadano T.
Involvement of the p53 tumor-suppressor protein in the development of antinociceptive tolerance to morphine
Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences, 仙台, 2011 年 9 月, Abstract p. P-14
- ⑥ Watanabe S., Tan-No K., Tadano T., Higashi H.
Intraplantar injection of gangliosides produces nociceptive behavior and hyperalgesia
Molecular Targets for Novel Pain Therapeutics. From Basic Research to Clinical Translation., Calabria (Italy), 2010 年 9 月, Abstract p.3
- ⑦ 鈴木義紀, 丹野孝一, 中川西修, 新島富紀枝, 菅野秀一, 蓬田伸, 石川正明, 只野武
アンジオテンシン II 脊髄クモ膜下腔内投与による疼痛関連行動
第 49 回日本薬学会東北支部大会, 郡山, 2010 年 10 月, 要旨集 p.49

- ⑧丹野孝一, 下田将司, 中川西修, 新島富紀
枝, 菅野秀一, 石川正明, 只野武
モルヒネ鎮痛耐性軽減薬の探索研究－慢
性疼痛患者の QOL 向上を目指して－
第 37 回薬物活性シンポジウム, 仙台, 2009
年 10 月, 要旨集 p.46

[その他]

ホームページ等

[http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/
yakuri/index.html](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・教授

研究者番号：20207260