

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390413

研究課題名（和文） モルヒネ耐性の新たな分子機構の解析

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for the development of morphine tolerance.

研究代表者

青江 知彦（AOE TOMOHIKO）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90311612

研究成果の概要（和文）：

癌性疼痛や慢性疼痛に対してモルヒネは強力で有効な鎮痛薬である。しかし連続使用により耐性が形成され、鎮痛効果が損なわれる。モルヒネの耐性形成の機序については様々なメカニズムが提唱されているが、不明な点も多い。本研究において我々は、モルヒネ耐性形成の新たな分子機序として、小胞体ストレス反応による μ オピオイド受容体細胞内情報伝達系の変化を提唱し、これに基づいた臨床的なモルヒネ鎮痛法の改善策を検討した。

研究成果の概要（英文）：

Morphine is a potent analgesic, but the molecular mechanism for tolerance formation after repeated use is not fully understood. Binding immunoglobulin protein (BiP) is an endoplasmic reticulum (ER) chaperone that is central to ER function. We examined knock-in mice expressing a mutant BiP with the retrieval sequence deleted in order to elucidate physiological processes that are sensitive to BiP functions. Repeated morphine administration caused the development of morphine tolerance in the wild-type mice. The activation of glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) was associated with morphine tolerance, because an inhibitor of GSK-3beta prevented it. On the other hand, the mutant BiP mice showed less morphine tolerance, and the activation of GSK-3beta was suppressed in their brain. These results suggest that BiP may play an important role in the development of morphine tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学麻酔・蘇生学

キーワード：小胞体、シャペロン、ストレス、疾患、マウス

1. 研究開始当初の背景

癌性疼痛やその他の慢性疼痛に対して、モルヒネは強力で有効な鎮痛薬である。しかし、連続使用により耐性が形成され、鎮痛効果が損なわれることが問題となる。モルヒネの耐

性形成の機序については、様々なメカニズムが提唱されているが、不明な点も多い。

モルヒネを代表とするオピオイドは μ , δ , κ などのオピオイド受容体を介して、鎮痛作用を発現する。これらのオピオイ

ド受容体はGTP結合蛋白質(G蛋白)共役型受容体で、細胞膜を7回貫通する複雑な構造を持つ。モルヒネは主に μ オピオイド受容体(MOR)に結合し、脊髄後角あるいは脳幹部の神経細胞を刺激し疼痛抑制系路を活性化することによって鎮痛作用を発現する。内因性のオピオイドペプチドあるいは合成ペプチド(DAMGO)によって刺激されたMORはG蛋白を介して、adenyl cyclaseの抑制、phospholipase Cの活性化、MAPキナーゼ、AP1複合体の活性化などの細胞内情報伝達系を通じて鎮痛作用を発現する。一方、MORはGRKキナーゼによってリン酸化され、arrestinとの結合を介して細胞内に内在化(internalization)される。これによって、G蛋白細胞内情報伝達系と一時的に遮断されるが(desensitization)、MORは一部はリゾームで分解されるものの、数分から数十分で再び細胞表面に発現し、G蛋白と共役した活性型に戻る(resensitization)。これに対して、モルヒネはMORに結合し鎮痛作用を発現するものの、GRKキナーゼによるリン酸化やarrestinとの結合の程度が弱く、desensitization/resensitizationが起こり難い。このためモルヒネの連続使用によってMORを介して細胞内情報伝達系に刺激が入り続ける。こうした持続的なMORへの刺激入力に細胞内情報伝達系に何らかの変化を起し、鎮痛作用が効率的に発現しなくなり、耐性が生じると考えられる。我々は、こうした変化の原因として小胞体ストレス反応を想定した。

細胞表面受容体などの膜蛋白や分泌蛋白は小胞体膜上で合成され、小胞体に挿入されて、小胞体に局在する分子シャペロンであるBiP等との相互作用によって折り畳み構造が形成され、糖鎖付加、複合体形成がなされ、機能的にも成熟して小胞体から分泌される。こうした過程が虚血、再灌流、低栄養、低酸素、スーパーオキシド、毒物などの外界からの侵襲や遺伝子変異によって阻害されると、小胞体内に折り畳み構造の異常な蛋白質が蓄積し、IRE1、PERK、ATF6などの小胞体膜蛋白質が活性化され、さらにASK1、JNKなどの種々の細胞内情報伝達分子が活性化され小胞体ストレス反応が起こる。その結果、分子シャペロンの産生増加、蛋白合成の抑制、異常蛋白質の分解促進、が起こり、細胞は異常な蛋白質を排除しようとする。さらに、異常な蛋白質が蓄積すると細胞機能障害、細胞死が起こる。近年こうした小胞体ストレス反応がアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患や躁鬱病、糖尿病、心筋症を始

めとする種々の疾患に関与している事が示唆されている。また、最近肥満によって小胞体ストレス反応が亢進し、活性化されたJNKが、インスリン受容体からの情報伝達に重要なIRS1を抑制し、細胞がインスリン耐性を示すことによってII型糖尿病が発症することが報告されている。

MORの活性化によって、神経細胞には刺激が入り、小胞体での神経伝達物質の産生分泌が亢進すると考えられる。また、MORの活性化によって小胞体に貯蔵された Ca^{2+} が細胞質に放出される。小胞体は細胞内で Ca^{2+} が貯蔵される主な部位であるが、小胞体から Ca^{2+} が放出されることで、小胞体内の分子シャペロンの機能も阻害され、小胞体内に折り畳み構造の異常な蛋白質が蓄積し易くなる。モルヒネの連続使用によって持続的にMORへ刺激入力があると、こうしたことから負荷がかかり、小胞体ストレス反応が起こると考えられる。

2. 研究の目的

小胞体ストレス反応とMOR細胞内情報伝達系との関連をin vivoで検討するために、変異BiPノックインマウスを用いて、モルヒネ耐性形成を検討した。BiPは小胞体ストレス反応を担う中心的な分子シャペロンであり、細胞にとって不可欠の分子である。我々は、マウスBiPゲノム遺伝子をクローニングし、相同組換えによって、正常BiPではなく、カルボキシ末端のKDEL配列が欠損した変異BiPが発現する、変異BiPノックインマウスを作製した。変異BiPノックインホモマウスは生後1日で呼吸不全で死亡するが、ヘテロマウスは一見正常に成長する事が分った。この変異BiPヘテロマウスではモルヒネ連続投与による耐性形成が抑制されていた。

小胞体ストレス反応と、MORの細胞内情報伝達系の接点として、我々はGlycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)に着目した。GSK3 β はすべての細胞に存在し、生理的にも、また種々の疾患発症にも重要な細胞内情報伝達分子である。小胞体ストレス反応の亢進によって、機序は不明であるが、GSK3 β は活性化される。一方、MORが活性化されると、PI3キナーゼ/AKTの活性化を介してGSK3 β は抑制されることが示されていた。しかしながら、モルヒネ連続投与によって耐性が形成された野生型マウスの脳では、GSK3 β が活性化されていた。我々はMOR刺激による鎮痛作用発現にはGSK3 β が抑制されている事が必要と考え、マウスにモルヒネを連続投与し、GSK3 β 阻害剤を併用した所、モルヒネ連続投与による耐性形成が抑制された。他施設からもラッ

トで同様の結果が報告された。また、変異BiPマウスの神経細胞を調べた所、GSK3βが抑制されている事が分かった。即ち、モルヒネ連続投与によってGSK3βが活性化されること、また、GSK3β阻害剤を併用することによって、モルヒネ耐性形成が阻害される事、また、変異BiPマウスでは、GSK3βが抑制されており、モルヒネ耐性形成が阻害されていた。

本研究では [1] 小胞体ストレス反応でGSK3βが活性化される分子機序の解明 [2] GSK3βが抑制されるとモルヒネ耐性形成が抑制される分子機構の解明 [3] GSK3βあるいは、小胞体ストレス反応を制御することによってモルヒネ耐性形成を阻害するための薬剤の検討とその臨床応用に向けた動物実験を行う。

3. 研究の方法

BiPは小胞体ストレス反応を担う中心的な分子シャペロンであり、細胞にとって不可欠の分子である。野生型マウスおよび変異BiPマウスを用いて、モルヒネを連続投与し、モルヒネ耐性形成モデルマウスを作成した。

変異BiPノックインヘテロマウスはSPF条件下で飼育し、小胞体機能が障害された場合に、どのような病態を引き起こすかを解析する。これらのマウスは少なくとも生後6ヶ月程度までは表面的には異常は認められず、痛み刺激による疼痛行動の解析が可能である。安静状態では野生型と変わりなくとも、疼痛刺激など侵襲下には、変性蛋白が増大し、異常蛋白の分泌、凝集、侵襲に対する脆弱性、細胞内情報伝達系の変化が見られる可能性がある。

マウス用足底熱刺激装置(hot plate)により熱刺激を与え、それに対する反応時間を測定する。生後10週程度の上記遺伝子変異マウス、それらのback groundであるC57/BL6マウスにおいて、コントロール条件下では熱刺激反応時間に有意差は認めていない。そこで、モルヒネ単回投与-単回の熱刺激に対する反応を検討する。Hot plateの温度設定は54.5度とする。測定時間は熱による組織の障害を防ぐため、60秒を最大値とし、それ以上の場合はずみやかにマウスをhot plateから移動させる。モルヒネ投与量は、back groundであるC57/BL6マウスにおいてモルヒネ投与量・反応曲線を得る予備実験を行い、単回投与後30分に反応時間が最大値となる最少量とする。予備実験からモルヒネ20mg/kgが適当であると考えられる。測定はモルヒネ投与前、投与後5分、15分、30分、45分、60分の時点で行う。マウス間での比較のため、反応時

間は%MPE (% maximum possible effect=(測定値-基準値)/(最大値-基準値)×100)として算出し、モルヒネに対する時間反応曲線を得る。

上記の単回投与方法と同じくモルヒネ20mg/kgを12時間おきに一日2回、5日間連続して投与を行う。最初の投与と最後の投与時に、hot plateによる熱刺激実験を行う。Hot plateの温度設定は54.5度とし、測定時点はモルヒネ投与前、投与後5分、15分、30分、45分、60分の時点で行う。

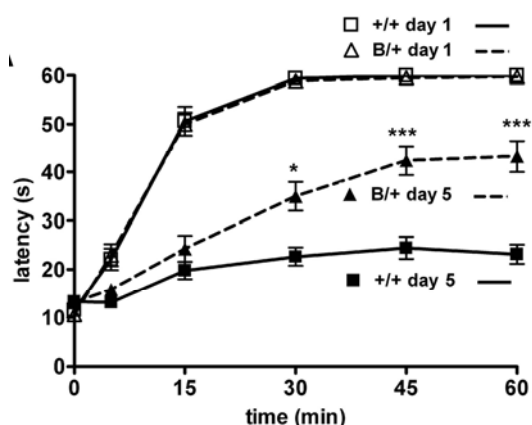
マウス間での比較のため、反応時間は%MPE (% maximum possible effect=(測定値-基準値)/(最大値-基準値)×100)として算出し、モルヒネに対する時間反応曲線を得る。また、連続投与前後でモルヒネ投与量を変化させて、モルヒネ用量反応曲線を得る以上の実験で野生型マウスと遺伝子変異マウスでのモルヒネ鎮痛作用の相違・連続投与による耐性形成の相違があるか検討する。

テスト後にマウスの脳、脊髄を摘出し、組織学的に、また、生化学的に、GSK3γなどの細胞内情報伝達分子やBiPなどの分子シャペロンの発現を調べ、モルヒネの鎮痛効果との相関を検討した。

また、小胞体ストレスを軽減する臨床投与可能な適当な薬剤として、内因性の胆汁酸の成分であるtaurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA)をモルヒネと併用投与して、野生型モデルマウスにおけるモルヒネ抵抗性が抑制されるかどうかを検討した。TUDCAはシャペロンとして機能し小胞体ストレス反応を抑制する。

4. 研究成果

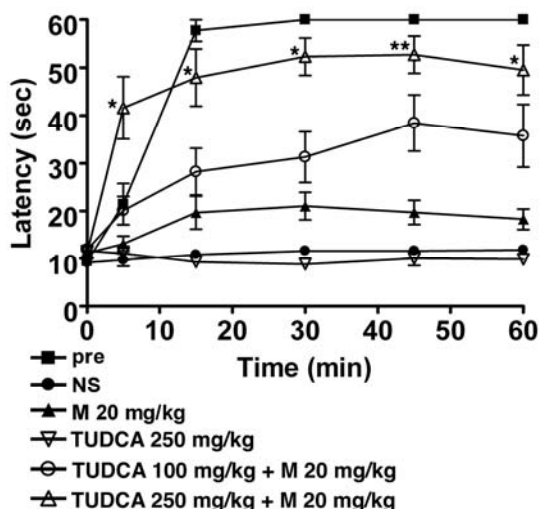
変異BiPヘテロマウスではモルヒネ連続投与による耐性形成が抑制されていた。



+/+ 野生型マウス

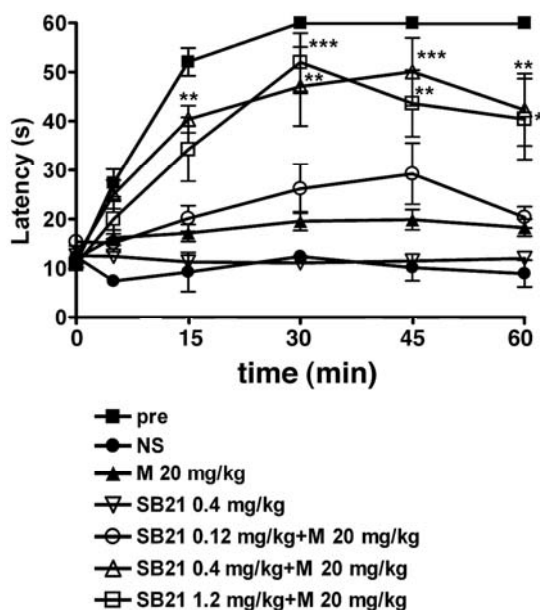
B/+ 変異 BiP ヘテロマウス

また、化学シャペロン TUDCA をマウスに投与した所、モルヒネ耐性形成が抑制される事が示唆された。



TUDCA はシャペロンとして機能し小胞体ストレス反応を抑制する傾向が見られた。

GSK3 βの活性の変化がモルヒネ耐性形成に重要である事が示唆された。



SB21; SB216763, GSK3 β阻害薬

以上の結果より、モルヒネ耐性形成に小胞体分子シャペロン BiP が関与し、化学シャペロンはモルヒネ耐性形成を抑制する事が示唆された。

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 Dobashi T, Tanabe S, Jin H, Mimura N, Yamamoto T, Nishino T, Aoe T. BiP, an endoplasmic reticulum chaperone, modulates the development of morphine antinociceptive tolerance. J Cell Mol Med. 査読有、2010, 14(12):2816-26.
- ② Dobashi T, Tanabe S, Jin H, Nishino T, Aoe T. Valproate attenuates the development of morphine antinociceptive tolerance. Neurosci Lett. 査読有、2010, 485(2):125-8.
- ③ 青江知彦、土橋玉枝 オピオイド耐性のメカニズム。臨床麻酔、査読無、2009、Vol 33、p1273-1280
- ④ 青江知彦 麻酔と小胞体ストレス、Anesthesia 21 Century 査読無 2009、Vol 11、No. 2-34、p2121-2126
- ⑤ 青江知彦 中枢神経障害とERストレス。(2008) 血管医学 査読無、2008、11月号、p23-30

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① Yasuraoka M, Dobashi M, Tanabe S, Jin H, Saito O, Goto S, Aoe T. BiP, an endoplasmic reticulum chaperone plays an important role on the development of morphine tolerance. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, 2010, 11, 17, San Diego, USA
- ② Saito O, Yamamoto T, Aoe T. The effects of systemic lidocaine in a mouse model of bone cancer pain. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, 2010, 11, 16, San Diego, USA
- ③ Dobashi T, Tanabe T, Jin H, Nishino T, Aoe T. BiP, an endoplasmic reticulum chaperone, modulates the development of morphine antinociceptive tolerance. 札幌国際がんシンポジウム2010、6、28、2010、札幌
- ④ Tamae Dobashi, Serabi Tanabe, Hisayo Jin, Takashi Nishino, Tomohiko Aoe Effect of endoplasmic reticulum chaperones on the development of morphine tolerance Euroanesthesia2010, 2010,6,13, Helsinki, Finland
- ⑤ 青江知彦 「加齢による慢性腎機能障害に対する小胞体ストレスの影響」第57回日本麻酔科学会、2010、6、4 福岡
- ⑥ 土橋玉枝、田辺瀬良美、西野卓、青江知彦 「小胞体分子シャペロンによるモルヒネ耐性形成の軽減」第57回日本麻酔科学会、2010、6、3 福岡 (最優秀演題)
- ⑦ Tamae Dobashi, Serabi Tanabe, Hisayo Jin, Takashi Nishino, Tomohiko Aoe An endoplasmic reticulum chaperone modulates the development of morphine tolerance The 4th International Congress

on Stress Responses in Biology and Medicine Oct. 6-9, 2009, Sapporo, Japan

⑧ Tomohiko Aoe, Naoya Mimura, Hisayo Jin
Pulmonary dysfunction and reeler mutant-like neural malformation in knock-in mice expressing a mutant BiP. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine Oct. 6-9, 2009, Sapporo, Japan

⑨ 青江知彦、オピオイド鎮痛と耐性形成機序、第56回日本麻酔科学会、2009、8、18 神戸

⑩ 土橋玉枝、田辺瀬良美、西野卓、青江知彦、モルヒネ耐性形成における小胞体ストレス反応の影響の検討、第56回日本麻酔科学会、2009、8、17 神戸

⑪ 青江知彦、小胞体ストレスとモルヒネ耐性形成、第60回日本細胞生物学会、2008、6、29、横浜

⑫ 青江知彦、新生児呼吸不全に対する小胞体ストレスの関与、第55回日本麻酔科学会、2008、6、12、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青江 知彦 (AOE TOMOHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90311612

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：