

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791436

研究課題名（和文） 神経因性疼痛におけるモルヒネ抵抗性形成の分子機序の検討

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for the development of morphine tolerance in neuropathic pain

研究代表者

土橋 玉枝 (DOBASHI TAMAE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10375694

研究成果の概要（和文）：

近年小胞体ストレス反応が神経変性疾患や躁うつ病、糖尿病を始めとする数々の疾患に関与していることが示唆されている。我々は、野生型マウスを用いて神経因性疼痛モデルを作成して化学シャペロンをモルヒネと併用投与し、野生型神経因性疼痛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。化学シャペロンは小胞体ストレス反応を抑制し、疼痛が抑制される傾向が見られた。

研究成果の概要（英文）：

Morphine is a potent analgesic, but the molecular mechanism for tolerance formation for neuropathic pain is not fully understood. Recent studies have suggested that chronic endoplasmic reticulum (ER) stress might modulate intracellular signaling pathways, resulting in several chronic disorders, such as type II diabetes and interstitial pneumonia. We found that a chemical chaperone which improves ER protein folding capacity has a tendency to attenuate the development of morphine tolerance in wild-type mice with neuropathic pain, suggesting a possible clinical application of chemical chaperones in preventing morphine tolerance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：ストレス、蛋白、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

モルヒネを代表とするオピオイドは mu, delta, kappa 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 mu 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、API 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 は一部はリソ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。モルヒネを連続使用した場合は 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こし、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。神経因性疼痛に対するモルヒネ抵抗性にも同様の分子機序が関与する可能性がある。

我々は、モルヒネを連続使用した場合に生じるモルヒネ耐性形成に小胞体ストレス反応が関与する事を研究して来た。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、酸化ストレス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。

代表的な神経因性疼痛である帯状疱疹後神経痛では、脊髄後角での NO (一酸化窒素) 合成酵素の活性が増加し、NO が疼痛発生に関与する。NO はまた細胞の小胞体機能を阻害し、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事が知られている。神経因性疼痛では、NO を介して、脊髄後角神経細胞に小胞体ストレス反応が起きている可能性がある。

2. 研究の目的

我々は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 (7) 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。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 (5)。また、変異 BiP マウスの神経細胞を調べた所、GSK3 β 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GSK3 β が活性化されること、また、GSK3 β 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、GSK3 β が抑制されており、モルヒネ耐性形成が阻害されていた。

本研究では神経因性疼痛モデルにおいてGSK3 β 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

野生型マウスおよび変異BiPマウスを用いて神経因性疼痛モデルを作成し、モルヒネ抵抗性を検討する。モルヒネの鎮痛効果は熱刺激を加えるホットプレートテストで評価する。

1モルヒネ単回投与による鎮痛作用

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) \times 100)として算出し、モルヒネに対する時間反応曲線を得る。

2モルヒネ連続投与後の鎮痛作用の変化

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) \times 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。

4. 研究成果

上記モルヒネ単回投与・連続投与後にマウスの脳、脊髄を摘出し、組織学的に、また、生化学的に、GSK3 β 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。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、野生型神経因性疼痛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。

神経因性疼痛モデルでは、モルヒネが効きにくい傾向が見られたが、変異BiPマウスでは、GSK3 β が抑制されており、モルヒネ耐性が形成はつきりと見られない事が示唆された。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し、モルヒネ耐性形成を抑制する傾向が見られた。今後さらに検討を加える事が必要と考えられた。

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2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.

〔学会発表〕(計 4 件)

① Tamae Dobashi, Serabi Tanabe, Hisayo Jin, Takashi Nishino, Tomohiko Aoe Effect of endoplasmic reticulum chaperones on the development of morphine tolerance. Euroanesthesia2010 2010 年 6 月 13 日 Helsinki Exhibition & Convention Centre

② 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 日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010 年 6 月 3 日 福岡サンパレス

③ Tamae Dobashi, Serabi Tanabe, Hisayo Jin, Takashi Nishino, Tomohiko Aoe An endoplasmic reticulum chaperone modulates the development of morphine tolerance Cell stress society international 2009 年 10 月 8 日 札幌

④ 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、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009 年 8 月 17 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 土橋 玉枝

(DOBASHI TAMAE)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10375694

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :