

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年度-20 年度
 課題番号：19500325
 研究課題名（和文） 難治性疼痛の克服-新規髄腔内薬物投与療法の開発と臨床応用に向けての基盤整備
 研究課題名（英文） Overcome of intolerable pain :improvement of intrathecal drug application and its clinical use.
 研究代表者：上園 保仁（UEZONO YASUHIITO）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：20213340

研究成果の概要：

内服、注射でのモルヒネが効かない痛みに対し、先進国ではモルヒネを髄腔内に投与する方法、さらには脊髄 GABA_B 受容体の活性化を目的として、バクロフェンの髄腔内投与が行われている。しかし両者とも持続投与で鎮痛効果が減弱することが判明している。これには、 μ オピオイド受容体、および GABA_B 受容体の脱感作が考えられている。 μ 受容体の脱感作には G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), GRK3 というリン酸化酵素が、GABA_B 受容体脱感作には GRK4, GRK5 が関与することを見いだしたが、高濃度アゴニストで脱感作が促進されることがわかった。従って両受容体が脱感作を起こさないような低濃度の薬物を用いれば鎮痛効果の減弱、耐性の発現は少ないと考え、両者を同時に投与する方法を提唱した。また脱感作のメカニズムが違うことから、低濃度の薬物の組み合わせでも十分な鎮痛効果が得られると考えた。

- 1) 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 チャンネルを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において、低濃度のバクロフェン(10 μ M)+モルヒネ(1 μ M)は、バクロフェン単独(100 μ M),モルヒネ単独 (10 μ M) で得られた K カレントの大きさとほぼ同程度かむしろ増強するカレントを示した。これは、低濃度の組み合わせでも十分な鎮痛効果を示すことを示唆するものである。
- 2) この少量バクロフェン+モルヒネは、繰り返し投与において K カレントを減弱させず、両受容体の脱感作をほとんど起こさなかった。
- 3) 低容量バクロフェン+モルヒネ投与法は、受容体脱感作を引き起こすことなく鎮痛効果を持続させうる可能性を示唆する。実際の使用にあたっては、2 剤の持つ副作用などを考慮しなければならないが、低濃度での副作用は起こりにくいことから、この組み合わせ療法は実際の臨床でも用いられる可能性がある。さらに動物モデル（ラット疼痛モデル）で検討を行う必要がある。
- 4) ラット、マウスを用いての鎮痛効果を評価するシステムを立ち上げて、現在解析を行っているところである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
19 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000

年度			
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	468 万

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：神経伝達物質と受容体

1. 研究開始当初の背景

緩和医療におけるオピオイド鎮痛療法の、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。

本邦において平成 19 年度よりがん対策基本法が施行され、オピオイドを用いた緩和医療はさらに進展すると期待される。オピオイド増量や鎮痛補助薬併用によっても鎮痛効果が得られない時、オピオイド先進国では**髄腔内モルヒネ療法**を行う。しかしこの方法でも**鎮痛効果を得ることができない患者に対してはその対策は確立されていない**。

近年、神経因性疼痛などのオピオイドの効かない痛みに、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)**」が**著効することが知られてきた**。しかし「**ITB 療法**」も、**長期投与では鎮痛効果が減弱する**

(**バクロフェン耐性の形成・GABA_B 受容体の脱感作**)。私たちは、GABA_B 受容体脱感作に G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4)、並びに GRK5 というリン酸化酵素が関与していることを報告した (Kanaide, Uezono, Sumikawa et al, J. Cell. Physiol. 2007)。さらに、ラット脊髄には受容体リン酸化酵素 GRK2-6 のすべてが発現していること (GRK1, GRK7 は網膜特異的発現)。脊髄に発現している GRK2,3,4,5,6 のうち、GRK4と GRK5が GABA_B 受容体脱感作に関与し、GRK2,3,6 は GABA_B 受容体脱感作に全く関与しないこと、一方 μ 受容体の脱感作には主に GRK2、GRK3 が関与することを見出した。

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ことを示唆する。

オピオイド μ 受容体、GABA_B 受容体は、どちらも痛みの伝達系路である脊髄後角第 I - II 層に発現している。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。これは、モルヒネとバクロフェンの少量同時投与は単独での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、薬剤耐性を生まず、鎮痛効果が持続する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

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す、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、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アプローチを行い、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？ In Vivo アッセイシステムで検討する。

クローン化 GABA_BR-CFP、mOR-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、

a)モルヒネのみ、b)バクロフェンのみ、c)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。

In Vitro アッセイで得られた結果が丸ごとの動物でも当てはまるかどうかを明らかにする。In Vitro Assay で設定された濃度の薬物を用いて、a)モルヒネのみ b)バクロフェンのみ c)少量のモルヒネと少量のバクロフェンの同時投与を行い、tail flick test などの行動薬理学的解析を行い、疼痛緩和の程度、耐性形成の程度を比較検討する。

4. 研究成果

1) 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おいて、低濃度のバクロフェン(10 μ M) + モルヒネ(1 μ M)は、バクロフェン単独(100 μ M)、モルヒネ単独(10 μ M)で得られた K カレントの大きさとほぼ同程度かむしろ増強するカレントを示した。これは、低濃度の組み合わせでも十分な鎮痛効果を示すことを示唆するものである。

2) この少量バクロフェン+モルヒネは、繰り返し投与において K カレントを減弱させず、両受容体の脱感作をほとんど起こさなかった。

3) 低容量バクロフェン+モルヒネ投与法は、受容体脱感作を引き起こすことなく鎮痛効果を持続させる可能性を示唆する。実際の使用にあたっては、2 剤の持つ副作用などを考慮しなければならないが、低濃度での副作用は起こりにくいことから、この組み合わせ療法は実際の臨床でも用いられる可能性がある。さらに動物モデル(ラット疼痛モデル)で検討を行う必要がある。

4) ラット、マウスを用いての鎮痛効果を評価するシステムを立ち上げて、現在解析を行っているところである。

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 14 件)

1. HOJO, M., SUDO, Y., ANDO, Y., MINAMI, K., TAKADA, M., MATSUBARA, T., KANAIDE, M., TANIYAMA, K., SUMIKAWA, K., UEZONO, Y. : μ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB₁ receptor • Electrophysiological and FRET assay analysis • J Pharmacol. Sci., 108 : 308-319 (2008)

2. Maruta, T., Yanagita, T., Matsuo, K., Uezono, Y., Satoh, S., Yoshikawa, N., Nemoto, T., Kobayashi, H., Takasaki, M., Wada, A. : Lysophosphatidic acid-LPA₁ receptor-Rho-Rho kinase-induced up-regulation of NaV1.7 sodium channel mRNA and protein in adrenal chromaffin cells: enhancement of ²²Na⁺ influx, ⁴⁵Ca²⁺ influx and catecholamine secretion. • J Neurochem, 105 : 401-412, 2008
3. Minoru Hojo • Yasuhito Uezono • Yuko Ando • Masafumi Takada • Koji Sumikawa : Heterodimerized μ -Opioid and Cannabinoid CB₁ Receptors Are Involved in Their Cross-Talk Analgesia. • American Society of Anesthesiologists: A114, 2008
4. Yuko Ando • Yasuhito Uezono • Masafumi Takada • Minoru Hojo • Koji Sumikawa : Distinctive roles of μ -, δ -, and dimerized μ - δ opioid receptors in the tolerance to each opioid • American Society of Anesthesiologists : A112, 2008
5. Yasuhito Uezono • Minoru Hojo • Yuko Ando • Masafumi Takada : Analysis of diversity of opioid receptor signaling : For the better understanding of clinically experienced opioid receptor-mediated events • Journal Pharmacological Science106 : 45, 2008
6. Yasuhito Uezono • Masato Kanaide • Yuko Ando • Yuka Sudo • Minoru Hojo • Masafumi Takada • Koji Sumikawa • Kohtaro Taniyama : Characterization of GABA receptor subtype signaling • Journal Pharmacological Science106 : 80, 2008
7. Yuko Ando • Minoru Hojo • Masafumi Takada • Yuka Sudo • Masato Kanaide • Koji Sumikawa • Kohtaro Taniyama • Yasuhito Uezono • : GABA_B receptors do not internalize because of lack of their association with β arrestin 2; comparison with μ opioid receptors • Journal Pharmacological Science106 : 64, 2008
8. Toyoaki Maruta • Toshihiko Yanagita • Kiyotaka Matuo • Yasuhito Uezono • Shinya Satoh • Takayuki Nemoto • Norie Yoshikawa • Tasuku Kanai • Hideyuki Kobayashi • Akihiko Wada : Lysophosphatidic acid-LPA₁ receptor-Rho-Rho Kinase-mediated up-regulation of cell surface Na_v 1.7 Na⁺ channels in adrenal chromaffin cells: enhancement of ⁴⁵Ca²⁺ influx and catecholamine secretion • Journal Pharmacological Science106 : 72, 2008
9. 高田正史・北條美能留・上園保仁・澄川耕二 : 少量のモルヒネ追加により疼痛が軽減したフェンタニル耐性のがん性腹膜炎による腹痛の 2 症例・日本ペインクリニック学

学会誌 15 (2): 160-164, 2008

10. 安藤優子・斉藤貴夫・金出政人・上園保仁：ITB（腹腔内バクロフェン）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: 109-114, 2008
11. 成田年・葛巻直子・上園保仁・鈴木勉：トランスレーショナル・オピオイドリサーチとオピオイドによる次世代の緩和医療の展望・ペインクリニック 29 (7): 929-942, 2008
12. 上園保仁・谷山紘太郎：自律神経の薬理・神経内科 68 (3): 245-252, 2008
13. 上園保仁・北條美能留・安藤優子・須藤結香：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 (7): 929-942, 2008
14. 成田年・上園保仁・葛巻直子・鈴木勉：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 (7): 301-313, 2008

〔学会発表〕（計 17 件）

1. Yuko Ando: Distinctive roles of μ -, δ -, and dimerized μ - δ opioid receptors in the tolerance to each opioid • American Society of Anesthesiologists Oct 18th-22nd, 2008 Orlando, USA
2. Minoru Hojo: Heterodimerized μ -Opioid and Cannabinoid CB 1 Receptors Are Involved in Their Cross-Talk Analgesia • American Society of Anesthesiologists • Oct 18th-22nd, 2008 • Orlando, USA
3. Yuko Ando: Dimerized μ - δ 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 2nd, 2008 • Beijing, China
4. Yasuhito Uezono: Visualization and functional analyzes of μ -opioid and cannabinoid CB1 receptors: mplication of interaction between morphine and cannabinoids at the receptor leclcs • 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・2008年3月13、14日・長崎
5. Yuko Ando: Distinct internalization and recycling profiles of μ -opioid and μ - δ 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・2008年3月13、14日・長崎
6. 安藤優子：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

7. 安藤優子：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
8. 安藤優子：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17日 - 19日・横浜
9. 上園保仁：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
10. 須藤結香： 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
11. 須藤結香： μ オピオイド受容体とカナビノイドCB₁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17日 19日・横浜
12. 上園保仁：ワークショップ「5 HT受容体の基礎と臨床—消化管運動と知覚の薬理学—」セロトニン受容体と消化管の運動：総論・第5回日本自律神経学会・2009年2月12日、13日・東京
13. 上園保仁：シンポジウム「自律神経調節とTRPチャネルファミリー;痛み、飲水、カルシウム吸収から血圧調節に至る多彩な関与」急速に世界に広まったTRPV6チャネル変異体のチャネル特製の解析—TR

PV6クローン発現細胞を用いての解析-
・第61回日本自律神経学会・2008年11月
6日、7日・横浜

14. 上園保仁：教育講演6「自律神経の薬理」・第61回日本自律神経学会2008年11月6日、7日・横浜
15. 須藤結香：神経型ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR α 7）活性化によって起こる受容体構造変化の解析・第61回日本薬理学会西南部会・2008年11月28日・鳥取
16. 松原岳大：異常型プリオン蛋白質による神経細胞変性死におけるmGluR1の役割とプリオン蛋白質との相互作用・第82回日本薬理学会年会・2009年3月17日 19日・横浜
17. 尾関あゆみ：神経障害性疼痛下を想定した β -endorphin存在下におけるopioid処置による μ -opioid受容体の細胞内陥入・第31回日本神経科学会・2008年7月9日 11日・東京

〔図書〕（計 1 件）

上園 保仁、谷山 紘太郎：神経内科「自律神経の薬理」・科学評論社：245-252, 2008

〔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

上園 保仁 (UEZONO YASUHIITO)

**長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授**

研究者番号：20213340

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし