

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19603002

研究課題名（和文）オピオイド系鎮痛薬の生体作用における神経型カルシウムチャネルの役割

研究課題名（英文）The roles of neuronal calcium channels on the physiological functions of opioid analgesics

研究代表者

栗原 崇（KURIHARA TAKASHI）

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60282745

研究成果の概要（和文）：R型電位依存性Caチャネル欠損マウス（本マウスではモルヒネの鎮痛効果の増強、および鎮痛耐性獲得の減弱が認められる）中脳・延髄部を用いたcDNAマイクロアレイ解析より、モルヒネの鎮痛効果や鎮痛耐性獲得の調節に関連することが示唆される複数の遺伝子群が選別された。モルヒネ鎮痛耐性獲得の調節に中脳・延髄部における新たな情報伝達経路の関与が示唆されるとともに、同経路が腸管運動制御にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Opioids like morphine exert strong analgesic effects and have essential therapeutic values to eliminate intractable pain. Thus opioid drugs became indispensable medicine to improve the quality of life of pain patient. However, opioid tolerance and dependence are difficult problems associated with the opioid therapy and opioid addiction. Unfortunately, efficient method to prevent analgesic tolerance based on the underlying mechanism has not been developed yet. We have shown previously that mice lacking R-type voltage-dependent Ca^{2+} channel showed enhanced morphine analgesia but also showed resistance to morphine tolerance. To identify molecules responsible for the altered analgesic responses, we have conducted cDNA microarray analysis using brainstem tissues and found several candidate genes involved in the altered morphine responses. The results from several pharmacological, biochemical and immunohistochemical experiments suggested the existence of new signal transduction mechanisms in the development of morphine tolerance in the brainstem area. We have also indicated that it might be possible to induce tolerance against morphine-evoked constipation by manipulating pharmacologically the similar signal transduction existed in the intestine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			

年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：オピオイド、モルヒネ、電位依存性カルシウムチャンネル、鎮痛、鎮痛耐性、cDNA マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) モルヒネを代表とするオピオイド系鎮痛薬はがん性疼痛などの難治性疼痛治療に欠かせない薬物であるが、臨床の場では長期繰り返し使用に伴う鎮痛耐性の問題、使用開始初期からの便秘および吐き気・嘔吐などの副作用の問題、社会的には乱用・依存という世界的にも大きな問題が存在する。モルヒネなどの依存性薬物は誤って使用すると強い精神依存を引き起こすばかりでなく、反復使用により身体依存、さらには薬物性精神病をも誘導する可能性がある。しかもこれらは一旦誘導されるとそれからの離脱は極めて困難になることが多いため、薬物乱用・依存問題を一層深刻化させる。それゆえ薬物依存形成機構の解明と並んで、依存性・鎮痛耐性を生じず、副作用の軽減された強力な鎮痛薬(昔から 夢の鎮痛薬 と言われる)開発の持つ社会的意義は非常に大きく、かつ急務となっている。

(2) オピオイド系鎮痛薬の鎮痛メカニズムの一つとして、電位依存性 Ca チャンネル(以下 Ca チャンネル)の機能抑制による神経伝達物質放出抑制が古くより想定されている。Ca チャンネルには多くの種類が存在し、電気生理学的・薬理的性質から少なくとも、L、N、P、Q、R、T 型の 6 種に分類されるが、生体においてオピオイド系鎮痛薬の標的となる Ca チャンネルサブタイプを実際同定した研究は知られていない。また R 型と呼ばれるサブタイプには最近まで有効な阻害薬が存在しなかったため、オピオイド系鎮痛薬の標的となるか否かはまったくわかっていなかった。

(3) 申請者らは主に神経系に豊富に発現する Ca チャンネル(N 型、P/Q 型、R 型)の生理機能の解明を目指し、R 型および N 型チャンネル欠損マウス作製を世界に先駆けて成功させ、その生理機能解明の一環として様々な疼痛刺激に対する反応を検討してきた。また P/Q 型チャンネルに関しては自然発生型ミュータントであるリーナー(leaner)マウスを用いた解析を行った。さらにこれらの Ca チャンネル欠損・ミュータントマウスは、どの神経型 Ca チャンネルがオピオイド系鎮痛薬の生体内における主たる標的となっているかを検討するのに絶好のモデル動物となると考え、解

析を行った。その結果、リーナーマウスおよび N 型チャンネル欠損マウスにおいては、野生型におけるのと変わらないモルヒネ誘発鎮痛効果が認められ、また N 型チャンネル欠損マウスにおいては鎮痛耐性も野生型と同様な時間経過で形成されたが、R 型チャンネル欠損マウスではモルヒネの鎮痛効果を増強し、かつ鎮痛耐性獲得を阻害するという意外な表現型を示したことが本研究着想の発端となった。

2. 研究の目的

(1) R 型チャンネル欠損マウスにおけるこれらの表現型は脊髄より上位の脳部位の関与が考えられたため、申請者らは最近野生型および R 型チャンネル欠損マウスにモルヒネを反復全身投与し、上位脳において発現変動を受ける遺伝子産物をマイクロアレイ法により比較検討することで、鎮痛効果および鎮痛耐性形成を直接あるいは間接的に調節すると思われる候補遺伝子のカタログ化を行う。

(2) R 型チャンネルにより何らかの発現調節を受けていると考えられるこれら遺伝子群のうち、その遺伝子産物に対する薬理的なツールが入手可能なものをまず選別し、これら薬理的ツールの痛覚伝達における効果やオピオイド系鎮痛薬の鎮痛効果および鎮痛耐性形成効果、精神・身体依存形成効果、さらにはオピオイド系鎮痛薬の重篤な副作用として知られる便秘に対する影響を検討する。

(3) R 型 Ca チャンネルによる痛覚伝達調節の神経生物学的基盤を探り、新規の鎮痛薬あるいはオピオイド系鎮痛薬の鎮痛効果を強め、副作用を軽減することのできる薬物を創薬するためのターゲット分子を見出す。

3. 研究の方法

(1) 鎮痛効果の測定

生後 7-11 週の C57BL/6J 雄性マウス(日本クレア)を用い、tail-flick 法により熱刺激に対する侵害受容閾値を測定した(tail-flick latency: TFL)。すなわちマウスをキムタオルで軽く保定し、温浴(48 ± 0.5)に尾を先端から 1/3 程度浸し、尾を持

ち上げるまでの時間を潜時とした。Cut-off timeは40秒とした。各薬物の効果の判定は、モルヒネ投与と30分前に各薬物の投与を行い、その30分後にTFLを測定することで、その薬物自身のTFLに及ぼす効果を判定した。またその直後にモルヒネを投与し、さらにその30分後にTFLを測定することで薬物のモルヒネ鎮痛に対する効果を判定した。これらのTFLから% maximal possible effect (%MPE)を次の計算式より求めた。 $\% \text{ MPE} = (\text{モルヒネ処置後測定値} - \text{薬物処置前測定値}) \div (\text{cut-off値} - \text{薬物処置前測定値}) \times 100$ 。

(2) cDNA マイクロアレイ法

野生型およびR型チャネル欠損マウスそれぞれに生理食塩水あるいは塩酸モルヒネ(10 mg/kg)を1日1回5日間連日腹腔内投与し、上記 tail-flick 法で鎮痛耐性形成過程を確認した。5日目の計測終了後、直ちにエーテル麻酔下で断頭して脳を摘出し、中脳・延髄部を液体窒素で凍結し、マイクロアレイのサンプルとした。マイクロアレイは Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix, INC., Santa clara, CA, USA)を用い、その解析にはクラボウ社の総合比較解析ソフトを用いた。

(3) 脳室内投与

脳室内投与はHaleyとMcCormick(1957)の方法に準じた。すなわちハロセン麻酔下でマウスの頭皮を切開し、針の長さ2.7 mmの27-gauge注射針で薬液あるいは標準液4 μ lを側脳室内に投与した。

(4) ウェスタンブロット法

マウスより摘出した中脳・延髄部は1.5 mLのlysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% protease inhibitor cocktail, 0.1% phosphatase inhibitor cocktail)を加え4でホモジナイズした。この溶解液を15,000gで10分間遠心した後、上清を回収しそれぞれのタンパク質含有量を計測した。タンパク質20 μ gを7% SDS-PAGEで分離し、PVDF membraneに転写した。このmembraneは1% BSAを含むTBS-T buffer (131 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20)を用いて室温で1時間のブロッキングを行った後、ウサギポリクロナール抗体(1:3,000, NOVUS)を4で一晩反応させた。さらに二次抗体HRP標識anti-rabbit IgG (1:50,000, Amersham)を室温で2時間反応させた後、ECL (Amersham)を用いて検出した。また定量的解析のためウサギ抗- α -アクチンポリクロナール抗体(1:5,000, Sigma)でリプローブして内部標準に用い、NIH Imageによりバンドの画像解析を行った。

(5) 消化管運動測定および摘出腸管標本作製

モルヒネあるいはロペラミド全身投与に

よるマウス小腸および大腸の運動度抑制作用をそれぞれ charcoal meal テストおよび bead expulsion テストで検討し、これに対する選別薬物の効果を検討する。また摘出腸管標本作製し、様々な薬物や電気刺激による腸管収縮反応に対するオピオイド類の持続的抑制効果を観察する。その後、選別薬物の持続的抑制効果に対する影響を観察した。

4. 研究成果

R型Caチャネル欠損マウス(本マウスではモルヒネの鎮痛効果の増強、および鎮痛耐性獲得の減弱が認められる)中脳・延髄部を用いたcDNAマイクロアレイ解析より、モルヒネの鎮痛効果や鎮痛耐性獲得の調節に関連することが示唆される十数種類の遺伝子群が選別された。

(1) これらのうち鎮痛耐性を形成する野生型マウスではmRNA発現量増加を示すが、欠損マウスではその増加が抑制されていたある遺伝子Aに着目し、モルヒネの鎮痛効果および鎮痛耐性形成との関連について検討した。この遺伝子産物の機能的阻害薬の腹腔内単回投与はモルヒネ急性鎮痛効果を有意に抑制したが、脳室内単回投与では急性鎮痛効果を変化させなかった。また腹腔内連日投与によって、鎮痛耐性形成を濃度依存的に変化させた(0.1-1 mg/kgでは耐性形成を促進。10-100 mg/kgでは耐性形成を抑制)。遺伝子Aはある転写調節因子の分解に関与することから、上記阻害薬による鎮痛耐性形成抑制にはこの転写調節因子の発現量上昇の関与が考えられる。そこでモルヒネ投与前にこの転写調節因子の発現量を上昇させる処置をマウスに5日間与えると、モルヒネ鎮痛耐性形成を有意に抑制した。また対照群中脳・延髄部におけるこの転写調節因子のタンパク質発現量は無処置群に比べ有意に減少するが、モルヒネ投与前に遺伝子A阻害薬を5日間連日投与、あるいは上記転写調節因子の発現量上昇処置を行った群では、当該転写調節因子タンパクの発現量低下が抑制された。以上の結果から、モルヒネ鎮痛耐性獲得に中脳・延髄部における新たな情報伝達経路の関与が示唆された。

(2) これらのうち鎮痛耐性を形成する野生型マウスではmRNA発現量減少(野生型の62%)を示すが、欠損マウスではその減少が抑制されていたある遺伝子Bに着目し、野生型マウスにおいてモルヒネの鎮痛効果および鎮痛耐性形成との関連について検討した。この遺伝子産物の機能的阻害薬の腹腔内単回投与(0.01-1 mg/kg)はモルヒネ急性鎮痛効果に影響を与えなかったが、脳室内単回投与ではある用量(1 fmol)で急性鎮痛効果を抑制した。また腹腔内連日投与によって、鎮痛耐性形成を濃度依存的(0.01-1 mg/kg)に促進した。そ

ここで本阻害剤が、モルヒネによる小腸・大腸運動抑制作用(耐性を生じないので、便秘などの副作用となる)についてどのような影響を与えるかを検討した。charcoal meal テスト(小腸)および bead expulsion テスト(大腸)で検討した結果、消化管運動抑制効果を有意に軽減することが両テストで観察された。現在摘出腸管標本を作製し、様々な薬物や電気刺激による腸管収縮反応に対するオピオイド類の持続的抑制効果を観察するとともに、本阻害薬がオピオイドの腸管収縮抑制効果にどのような影響を与えるのか検討中である。以上の結果から、モルヒネ鎮痛耐性獲得の調節に中脳・延髄部における新たな情報伝達経路の関与が示唆されるとともに、本経路は腸管運動制御にも関与する可能性が示唆された(論文投稿中のため具体的な遺伝子名等の名称をふせています)。

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)

Kondo, D., Saegusa, H., Yabe, R., Takasaki, I., Kurihara, T., Zong, S. & Tanabe, T. Peripheral-type benzodiazepine receptor antagonist is effective in relieving neuropathic pain in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **110**, 55-63, 2009, 査読有.

Sakurai, E., Kurihara, T., Kouchi, K., Saegusa, H., Zong, S & Tanabe, T. Upregulation of casein kinase 1 in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain. *Mol. Pain*, **5**, 74, 2009, 査読有.

[学会発表](計4件)

Tanabe, T., et. al. Enhanced expression of peripheral-type benzodiazepine receptor induces neuropathic pain. The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2007年11月7日, San Diego CA, USA.

Tanabe, T., et. al. Is up-regulation of neurosteroid synthesis important for the maintenance of neuropathic pain? Second International Congress on Neuropathic Pain, 2007年6月9日, Berlin, Germany.

Tanabe, T., et. al. Co-administration of ATP attenuates peripheral type benzodiazepine receptor antagonist-induced antinociception of neuropathic

pain. *The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 2008年11月16日, Washington DC, USA.

Tanabe, T., et. al. Enhanced expression of peripheral - type benzodiazepine receptor induces neuropathic pain through the activation of microglia. Third Asian Pain symposium, 2008年7月19日, Fukuoka, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/mphm/Yakuri.HTM>

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 崇 (KURIHARA TAKASHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 60282745

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし