

平成 23 年 2 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791066

研究課題名 (和文) 抗侵害作用および麻酔における内在性カンナビノイド 2-AG の役割の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the role of endocannabinoid 2-AG in antinociception and anesthesia

研究代表者 Petrenko Andrey (Petrenko Andrey)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397153

研究成果の概要 (和文)：昔から医療に使用されているカンナビスという薬草は鎮痛や鎮静効果を持ち、その効果はカンナビスの中に含まれているカンナビノイドという物質によるものである。我々の体にもカンナビノイドと同類の物質は存在しており、2-AG はその一つである。2-AG を分解する MGL という酵素を阻害することによって 2-AG の脳内濃度は上昇し、痛みの減少などをもたらす。したがって、MGL 阻害薬は新しい治療薬として現在注目を浴びている。本研究では MGL 阻害薬の長期間使用モデルを作るために、MGL がいないため、通常より 2-AG レベルの高い MGL 欠損マウスを用いた。結果として MGL 欠損マウスにおいて、ある種の痛みは強くなっていることが明らかになった。よって、MGL 阻害薬は長期間の慢性疼痛に対する痛み治療ではなく、短期間の急性疼痛のような痛み治療により適応していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The herb *Cannabis* has been used in medicine from ancient times for its analgesic and sedative effects. These effects are caused by so-called cannabinoids contained in this plant. Our bodies can produce similar substances called endocannabinoids. One of the main endocannabinoids is called 2-AG and its action in the brain is terminated by enzyme called MGL. Drugs that inhibit MGL increase the concentration of 2-AG in the brain and cause beneficial effects, such as less pain. Therefore, MGL inhibitors are considered as promising candidates for the clinical use. Here, we used MGL-deficient mice to model the situation of prolonged MGL inhibitor use, such as could happen in chronic pain patients. We found that MGL-deficient mice become more sensitive to certain types of pain, which is supposedly because brain becomes less sensitive to 2-AG. This suggests that MGL inhibitors may not be well-suited for a long-term treatment of pain. Rather, they should be considered as a therapeutic option for short-lasting or acute pain episodes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：内在性カンナビノイド、モノアシルグリセロールリパーゼ、欠損マウス、麻酔作用、抗侵害作用

1. 研究開始当初の背景

内在性カンナビノイド系（エンドカンナビノイド系）には **anandamide** と **2-arachidonoylglycerol (2-AG)** という天然リガンドがあり、受容体として **CB1** と **CB2** という二つの G タンパク質共役型受容体がある。**CB1** 受容体は神経系に広く分布しており、カナビスの主要な精神賦活作用コンポーネントである **Δ^9 -tetrahydrocannabinol** のような多くのカンナビノイドアゴニストの効果を媒介している。エンドカンナビノイドの **anandamide** と **2-AG** は疎水性中性脂質であり、その作用の直前に生合成され放出される（いわゆるオンデマンド産生）。従って、エンドカンナビノイドの産生・分解に関わっている酵素はシグナル伝達の重要な制御因子である。

Anandamide と **2-AG** を分解する酵素はそれぞれ **FAAH** と **MGL** である。**FAAH** の重要性は **FAAH** 欠損マウスにおいて示された。**FAAH** 欠損マウスは通常より **anandamide** の脳内濃度が 15 倍高く、痛みに対して低感受性であるが、これは **CB1** アンタゴニストによって拮抗できる。**2-AG** はもう一つのエンドカンナビノイドであり、その脳内濃度は **anandamide** より 170 倍高く、カンナビノイド受容体の本当の天然リガンドであると考えられ始め、最近注目を集めている。**2-AG** を全身投与することによってテイルフリック試験での侵害性刺激による逃避反応は抑制されるエビデンスがある。**MGL** は **2-AG** の分解酵素である。**MGL** 阻害薬を用いると **2-AG** の脳内濃度は上昇し、疼痛関連行動の減少が見られる。

最近エンドカンナビノイド系は鎮痛作用だけでなく、麻酔作用にも関与していることを裏付けるデータが集まってきている。静脈麻酔薬のプロポフォールは **CB1** アゴニストによって増強され、**CB1** アンタゴニストによって減弱される。また、プロポフォールは **FAAH** を競合阻害できることが示された。プロポフォール投与によって **2-AG** の脳内濃度も上昇するが、その原因は **MGL** の阻害であるか、さらにその阻害は麻酔作用と関連があるかどうかはまだ明らかではない。

遺伝子操作マウスを使ったアプローチは一つの有効な研究ツールである。これまで **FAAH** 欠損マウスを用いて生体機能における **anandamide** の様々な役割が解明された。その一方、**MGL** 欠損マウスを用いた研究成果はなく、このマウスを用いて **2-AG** の機能を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では疼痛や麻酔作用の機序におけるエンドカンナビノイドの **2-AG** の役割を明らかにするために、そして臨床分野における **MGL** 阻害薬の可能性を確かめるため、**C57BL/6** マウス（野生型、**WT** マウス）と **MGL** 欠損マウス（**MGL** ノックアウト、**MGL-KO** マウス）を用い、(1) 吸入・静脈麻酔薬の作用 (2) 疼痛関連行動を比較検討した。

3. 研究の方法

雄性の成熟（8-14 週）**WT** マウス）と **MGL-KO** マウス）を用いる。

(1) 麻酔作用の実験

① 吸入麻酔薬

気化器及酸素を繋いだチャンバーにマウスを入れ、麻酔薬の濃度を継続的にモニタリングする。麻酔薬の各濃度を 20 分間維持する。

吸入麻酔薬の催眠作用を調べるために立ち直り反射の喪失 (**LORR**) といったエンドポイントを用いる。マウスを仰向けにし、立ち直り反射 (**RR**) の有無を 15 秒間観察する。

(実験開始時には、最初の濃度として、全てのマウスにおいて **LORR** をきたす濃度に設定する。) **RR** が認められなかった場合は濃度を 0.1%atm 下げ、20 分後にまた **RR** の有無を確かめる。最後に **LORR** を保った濃度と最初に **RR** が現れた濃度を平均にし、**LORR** の中央有効量(**LORR ED₅₀**)を計算する。

吸入麻酔薬の不動化作用を調べるためにテールクランプ法により最小肺胞内濃度 (**MAC** 値) を測る。麻酔薬の 20 分間の平衡終了後に、マウスの尻尾にアリゲータークランプを挟み、反応 (体の動き) の有無を観察する。

(実験開始時には、最初の濃度として、全てのマウスにおいて反応を許す濃度に設定する。) 反応が認められた場合は濃度を 0.1% atm 上げ、20 分後にまた反応の有無を確かめる。最初に反応がなくなった濃度と最後に反応があった濃度を平均にし、**MAC** 値を計算する。

② 静脈麻酔薬

マウスに薬剤を腹腔内投与し、2L のビーカーに入れる。2分置きにビーカーを 45° に傾け、マウスを仰向けにし、下記のレーティングスケールにより立ち直り反射を評価する：0 = 正常な反射；1 = やや障害のある、2 秒間以内の反射；2 = 障害のある、2 秒以上 10 秒以下の反射；3 = 立ち直り反射の喪失 (**LORR**)。 **LORR** からその回復までの時間を **LORR** の時間とし評価する。

(2) 痛み関連行動の実験
IASPの指針に基づいて行う。

① 急性疼痛

ホットプレートテスト：一定の温度に保たれたホットプレート上に覚醒動物を置き、疼痛関連行動：1)足をなめるlicking 2)立ち上がる 3)ジャンプするjumpingまでの潜時を測定する。熱刺激の閾値を評価する。
テールクリップテスト：マウスの尻尾にゴムで被覆されたアリゲータークリップを挟み、疼痛関連行動（クリップを噛むbiting）までの潜時を測定する。機械刺激の閾値を評価する。

② 急性持続性疼痛

ホルマリンテスト：セボフルランによる深麻酔下、5%のホルマリン溶液10μlをマウスの後肢足蹠にホルマリンを皮下注入し、自発痛によって生じる行動を解析する。lickingなどの持続時間を評価する。

ライジングテスト：マウスの腹腔に0.9%の酢酸を注射し痛みにより特有の「ストレッチ」が現れる。ストレッチの回数を数えて痛みの程度を評価する。

③ 慢性疼痛

完全フロイントアジュバントモデル：死んだ結核菌をエマルジョンにしたフロイントアジュバントを動物の皮下に投与すると炎症が発症する。注入後1日程度経過した後に、炎症が見られる。ホットプレートテストを用い、熱刺激痛覚過敏を評価する。

神経因性疼痛モデルを用いた実験：Spared nerve injury(SNI)モデルを3%セボフルラン麻酔下で成熟マウス(8-10週齢)において行う。SNIでは坐骨神経の枝である総腓骨神経(common peroneal nerve)と脛骨神経(tibial nerve)を8-0絹糸で結紮し切断する。この時、腓腹神経(sural nerve)を傷つけないように注意する。各神経損傷モデル作成後、網の下からマウスの足底に対して垂直にvon Frey Hairが曲がるまで押しつけ、動物が足をあげる機械刺激の閾値を測定し慢性疼痛の評価を行う。

(3) 統計学的処理

統計処理はStudent's T検定、または分散分析で行い、P<0.05を有意差有りとする。

4. 研究成果

(1) 麻酔作用の実験

WTマウスとMGL-KOマウスを用い、吸入麻酔薬及び静脈麻酔薬の催眠作用を立ち直り反射の有無(LORR)により、吸入麻酔薬の不動化作用をテールランプ法(最小肺胞内濃度、MACアッセイ)で調べた。

MGL欠損マウスでも、吸入麻酔薬イソフルラン、セボフルランのLORRの中央有効量(LORR ED₅₀)及びMAC値、また笑気によるイソフルランのLORR ED₅₀及び

MAC-sparing effectには変化は認められなかった(表1)。

表1: RR ED₅₀及びMAC値に対する吸入麻酔薬の効果

吸入麻酔薬	n	LORR ED ₅₀ , % atm	n	MAC, % atm
イソフルラン				
WTマウス	10	0.64 ± 0.2	10	1.18 ± 0.15
MGL-KOマウス	10	0.63 ± 0.11 NS	10	1.17 ± 0.17 NS
セボフルラン				
WTマウス	6	1.28 ± 0.24		1.97 ± 0.25
MGL-KOマウス	6	1.20 ± 0.28 NS	8 12	2.04 ± 0.17 NS
イソフルラン + 50% N ₂ O				
WTマウス	6	0.35 ± 0.06		0.83 ± 0.11
MGL-KOマウス	8	0.41 ± 0.09 NS	6 8	0.85 ± 0.16 NS

データは平均±標準偏差で示した。MAC=最小肺胞内濃度；LORR ED₅₀=立ち直り反射の喪失の中央有効量。n=匹数。NS=有意差なし。

静脈麻酔薬プロポフォール、ペントバルビタール、ケタミンによるLORR時間(スリープ時間)にも差はなかった(表2)。

表2:LORR及びLORR時間に対する静脈麻酔薬の効果

麻酔薬	LORR%	LORR時間
プロポフォール 140mg/kg		
WTマウス	40 (6/15)	12.7 ± 8.1
MGL-KOマウス	57 (12/21)	23.3 ± 17.5 NS
プロポフォール 160mg/kg		
WTマウス	73 (8/11)	28.8 ± 19.7
MGL-KOマウス	92 (12/13)	40.7 ± 29.7 NS
ペントバルビタール 40mg/kg		
WTマウス	100 (6/6)	15.0 ± 9.3
MGL-KOマウス	100 (6/6)	15.7 ± 12.4 NS
ケタミン 100 mg/kg		
WTマウス	100 (7/7)	11.1 ± 6.6
MGL-KOマウス	100 (9/9)	8.9 ± 4.3 NS

静脈麻酔薬は腹腔内に投与された。データは平均±標準偏差で示し、かっこはLORRのあった匹数/麻酔薬を投与された全匹数を示す。LORR=立ち直り反射の喪失。NS=有意差なし。

この結果から、MGL の永久的阻害による内因性カンナビノイド 2-AG の上昇は麻酔薬催眠作用及び不動化作用に影響を与えないことが示唆された。

(2) 痛み関連行動の実験

WT マウスと MGL-KO マウスを用いて、急性及び慢性疼痛モデルによる疼痛関連行動比較検討した。急性侵害性熱（ホットプレートテスト、図 1）また機械的刺激（テールクリップテスト、図 2）に対して MGL-KO マウスは WT マウスと同様なベースライン感受性（急性疼痛の閾値）を示した。

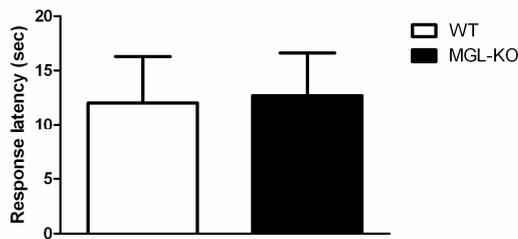


図 1. ホットプレートテスト

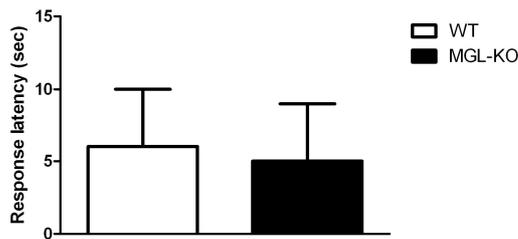


図 2. テールクリップテスト

CFA 慢性炎症モデルにおいて熱刺激に対する逃避反応の閾値の低下は MGL-KO マウスにおいても WT マウス同様に観察され、両者に有意差は認められなかった（図 3）。

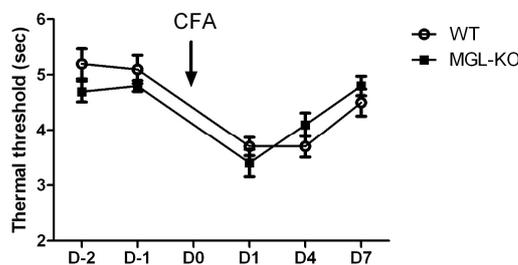


図 3. 完全フロイドアジュバント (CFA) モデル。矢印は CFA を投与した日を示す。

Spared nerve injury (SNI) は神経因性疼痛の動物モデルである。このモデルは坐骨神経の

三つの末梢枝の二つ、すなわち tibial nerve (脛骨神経) と common peroneal nerve (総腓骨神経) を結紮・切断し、sural nerve (腓腹神経) には損傷を与えないものである。神経損傷を与えてから 24 時間以内に生ずる sural nerve の支配領域での機械的刺激によるアロディニアは、MGL-KO マウスで WT マウスと同様に発現し、3 週間の観察期間持続し、有意差は認められなかった（図 4）。

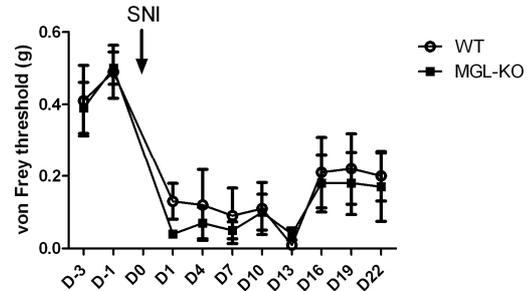


図 4. 神経因性疼痛モデル (SNI)。矢印は SNI 手術日を示す。

ホルマリンテストとライジングテストは急性疼痛モデルとして汎用されており、それぞれは体性および内臓性痛みを反映する。ホルマリンテストとライジングテストにおいて MGL-KO マウスは疼痛関連行動の増強を示した（図 5, 6）。

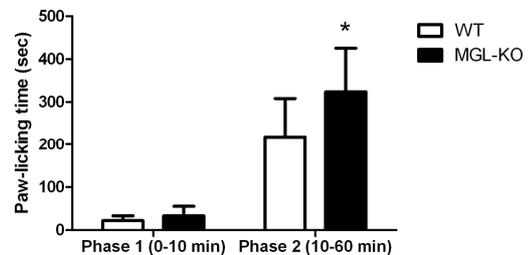


図 5. ホルマリンテスト。* $P < 0.05$, WT に比べて

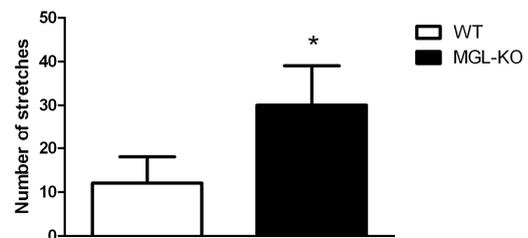


図 6. ライジングテスト。* $P < 0.05$, WT に比べて

Schlosburg ら (Nature Neurosci, 2010 年) の報告では MGL 欠損マウスにおいて 2-AG の蓄積によって内因性カンナビノイド系のダウンレギュレーションが起こることが分かった。本研究で観察された MGL-KO マウスの疼痛関連行動の増強はそのダウンレギュレーションが原因で起こる可能性が高い。この結果から、MGL の永久的阻害による内因性カンナビノイド 2-AG の上昇は急性侵害疼痛系に望ましくない影響の可能性があることが明らかとなった。

(3) まとめ

欧米ではカンナビノイド受容体作動薬の臨床使用が増加している。MGL 阻害薬は内在性カンナビノイド系をターゲットにする少し異なった薬剤であり、将来的に臨床で広く使用されるに違いない。疼痛領域でも使われるようになるだろう。慢性疼痛の患者数が年々増えており、将来的に MGL 阻害薬治療中の患者が手術を受けることも十分考えられる。本研究では術中麻酔管理に対する、また疼痛管理に対する MGL の阻害によって起こりうる影響を遺伝子学的アプローチを用いて検討した。MGL-KO マウスは麻酔薬に対して正常の感受性を示した。そこで MGL 選択的阻害薬の長期間投与は麻酔作用に有害な影響はなく、麻酔管理が安全に行うことができるだろう。一方、MGL-KO マウスは一部の疼痛関連行動の増強が観察された。今後、MGL 阻害薬の長期間使用による、耐性と思えるような現象は実際に患者に現れるのか、またもし現れたなら疼痛管理にどのような影響をあたえるのかはこれからの研究の課題といえる。MGL 阻害薬の使用は慢性疼痛管理ではなく、急性疼痛管理だけに適応されるかもしれない。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Petrenko Andrey、「モノグリセリドリパーゼ (MGL) 欠損マウスにおける疼痛関連行動について」、第 72 回新潟麻酔懇話会／第 51 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会、平成 22 年 (2010) 年 11 月 27 日、新潟。

(2) Petrenko Andrey、「モノグリセリドリパーゼ (MGL) 欠損マウスにおける疼痛関連行動について」、第 71 回新潟麻酔懇話会／第 50 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会、平成 22 年 (2010) 年 6 月 12 日、新潟。

(3) Petrenko Andrey、「内在性カンナビノイド受容体リガンド 2-AG の脳内濃度上昇は麻酔作用に関与していない」、第 69 回新潟

麻酔懇話会／第 48 回新潟ショックと蘇生・集中治療研究会、平成 21 年 (2009) 年 6 月 6 日、新潟。

(4) Petrenko Andrey、「モノグリセリドリパーゼ欠損マウスにおける麻酔薬の作用」、第 13 回日本神経麻酔・集中治療研究会、平成 21 年 (2009) 年 3 月 28 日、大阪。

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Petrenko Andrey (Petrenko Andrey)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30397153

(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：

