

氏名（本籍）	今井哲司	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第162号	
学位授与年月日	平成19年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	Difference in tolerance to anti-hyperalgesic effect and its molecular mechanisms between chronic treatment with morphine and fentanyl under the chronic pain-like state	
論文審査委員	主査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 三澤 美和
	副査	教授 亀井 淳三

論文内容の要旨

緒言

Gタンパク共役型受容体である μ -opioid 受容体 (MOR) には、スプライスバリエント由来の数種サブタイプが存在することが知られている (図 1)。これらの中で、MOR-1B は exon 5 のスプライシングの結果生じるサブタイプで、細胞内陥入/再感作の回転が早いため、他のサブタイプより脱感作反応が起こりにくいことが報告されている。しかしながら、中枢神経系におけるその生理的役割については不明である。

臨床において MOR 作動薬である morphine はがん疼痛治療薬として頻用されているが、便秘、呼吸抑制、嘔気・嘔吐などの副作用に対する懸念から医師もその使用を躊躇するケースが少なくない。一方、fentanyl は低分子量および高脂溶性であり、その性質を利用して経皮吸収型がん疼痛治療薬として使用されている。また、fentanyl の副作用は morphine よりも弱いことが報告されている。これまでの臨床経験から、がん疼痛患者に morphine を適切に使用した場合には、morphine の鎮痛耐性はほとんど問題にならないことが明らかにされている。一方、fentanyl は適切に使用しても、鎮痛耐性の形成が早期から認められるといった臨床報告もあるが、実験的証明はなされていない。一般に、MOR は作動薬の刺激により、受容体 C 末端領域がリン酸化される結果として脱感作が引き起こされ、これが耐性形成の一因と考えられている。リン酸化受容体は、protein phosphatase 2A (PP2A) などにより脱リン酸化され、さらに Rab4 の調節を受けて細胞膜上へ再感作することが報告されている。しかしながら、MOR 作動薬の鎮痛耐性形成機構に関する検討は、培養細胞系あるいは過剰用量の MOR 作動薬を用いた実験系で行われたものがほとんどであり、その詳細な分子機構についてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、まず

中枢神経系における MOR-1B の存在、ならびに morphine および fentanyl の鎮痛効果発現における MOR-1B の役割について行動薬理的に検討を行った。さらに、complete Freund's adjuvant (CFA) を後肢足蹠皮下に投与して炎症性疼痛モデルマウスを作製し、熱痛覚閾値の低下を完全に回復しうる morphine および fentanyl の用量（除痛用量）の設定を行った。その後、疼痛下における除痛用量の fentanyl の反復投与による鎮痛耐性形成能およびその分子機構について、morphine と比較検討した。

CXBK マウスの脳内における MOR-1B の欠損とその機能に関する検討

CXBK マウスは、雄性 C57BL/6J (C57BL) と雌性 BALB/cJ マウスとを交配して得られたリコンビナント近交系マウスであり、MOR 部分欠損マウスとして知られている。CXBK マウスの脳内における MOR-1B mRNA 発現量は、C57BL マウスと比較して有意に低いレベルであった。このことより CXBK マウスは、脳内 MOR-1B のノックダウンマウスである可能性が示唆された。一方、内因性 MOR リガンドである endomorphin-1 は C57BL マウスにおいて用量依存的な鎮痛効果ならびに G タンパク活性化作用を示したのに対し、CXBK マウスにおいてはそれらの効果は有意に抑制された。また本実験において、MOR-1B mRNA に特異的である MOR 遺伝子 exon 5 に対する アンチセンス核酸 (exon 5 AS-ODN) を脳室内投与することにより、MOR-1B mRNA の発現が有意に抑制され、さらに endomorphin-1 誘発鎮痛効果は exon 5 AS-ODN の前処置により有意に抑制された。以上の結果より、CXBK マウスは、脳内 MOR-1B のノックダウンマウスである可能性が示唆された。さらに、脳内 MOR-1B は MOR 作動薬による鎮痛効果発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

Morphine および fentanyl 誘発鎮痛効果の発現における MOR1B の役割

C57BL マウスにおいて morphine および fentanyl を脳室内投与することにより著明な鎮痛効果が発現したのに対し、MOR-1B ノックダウン CXBK マウスにおいてはそれらの鎮痛効果は有意に軽度であった。このことから、脳内における morphine および fentanyl 誘発鎮痛効果は、一部 MOR-1B を介して発現している可能性が示唆された。さらに本研究では、両薬物の脊髄における鎮痛効果発現機構について検討を行った。MOR の選択的な放射性 ligand である [³H]DAMGO を用い、マウスの脊髄膜分画標本での morphine および fentanyl による [³H]DAMGO 置換実験を行ったところ、morphine および fentanyl はほぼ同様の置換曲線を示した。このことから、両薬物は脊髄内の MOR に対し同程度の結合親和性を有することが明らかとなった。また、両薬物とも δ -あるいは κ -opioid 受容体には結合性を示さなかった。一方、CXBK マウスの脊髄における MOR-1B mRNA 発

現量は C57BL マウスのそれと比較して有意に低いレベルであった。このような条件下、C57BL マウスにおいて morphine および fentanyl は用量依存的な鎮痛効果ならびに G タンパク活性化作用を示したのに対し、CXBK マウスにおいてはそれらの効果は有意に減弱した。以上の結果より、脊髄および脳内における morphine および fentanyl 誘発鎮痛効果発現に、MOR-1B が一部関与していることが示唆された。今後、morphine および fentanyl と MOR-1B との結合形式の比較、ならびに MOR-1B 以外の MOR サブタイプの生理機能を検討することにより、morphine および fentanyl 誘発抗侵害効果の発現機構がより明確になるものと思われる。

炎症性疼痛下における morphine および fentanyl 誘発鎮痛耐性形成およびその分子機構の比較

炎症性疼痛モデルマウスでは、有意な熱痛覚閾値の低下が認められ、この反応は 3.0 mg/kg の morphine および 30 µg/kg の fentanyl を皮下投与することにより、CFA 投与前の反応潜時にまで回復した。次に、CFA 投与後に morphine あるいは fentanyl を 15 日間反復投与し、鎮痛耐性形成について検討した。Morphine 慢性処置群では、投与 15 日目においても十分な熱痛覚閾値低下の回復が認められたのに対し、fentanyl 慢性処置群ではこの効果はほとんど認められなかった (図 2)。これらのことから、morphine とは異なり、炎症性疼痛下では fentanyl の反復投与により鎮痛耐性の形成が認められることが明らかとなった。さらに、炎症性疼痛モデルマウスの脊髄膜分画標本を作製し、Western-blot 法に従いリン酸化 MOR (p-MOR) 蛋白量の変化を検討した。その結果、saline を足蹠皮下投与した saline 慢性処置群 (saline-saline 群) と比較して、CFA を足蹠皮下投与した fentanyl 慢性処置群 (CFA-fentanyl 群) において p-MOR 蛋白量の有意な増加が認められた。また、不活性化体であるリン酸化 PP2A (p-PP2A) の蛋白量は CFA-fentanyl 群において、saline-saline 群と比較し、有意に増加していた。さらに興味深いことに、CFA-fentanyl 群において saline-saline 群と比較し、脊髄での有意な Rab4 の減少が認められた。一方、これらの蛋白量の変化は、morphine 慢性処置群においては認められなかった。以上の結果から、慢性疼痛下では、除痛用量の fentanyl を反復投与することにより、morphine と比較して鎮痛耐性が強度に形成されることが明らかとなった。また、この現象には、脊髄における PP2A の不活性化に依存した p-MOR の増加および Rab4 の減少に伴った受容体の再感作効率の低下が一部関与している可能性が示唆された。

結語

本研究の結果から、CXBK マウスは MOR-1B のノックダウンマウスである可能性を初

めて明らかにした。さらに、morphine および fentanyl 両薬物の鎮痛効果発現には、脊髄および脳内の MOR-1B が一部関与していることも明らかにした。一方、慢性疼痛下では morphine とは異なり、除痛用量の fentanyl を反復投与することにより、受容体再感作効率の低下に起因した鎮痛耐性が形成されることを見いだした。これらの結果は、がん疼痛治療における fentanyl の鎮痛耐性に関する臨床報告を裏付けるものであり、さらには fentanyl 鎮痛耐性による疼痛治療の困難化といった問題に対する解決の糸口を示唆している。

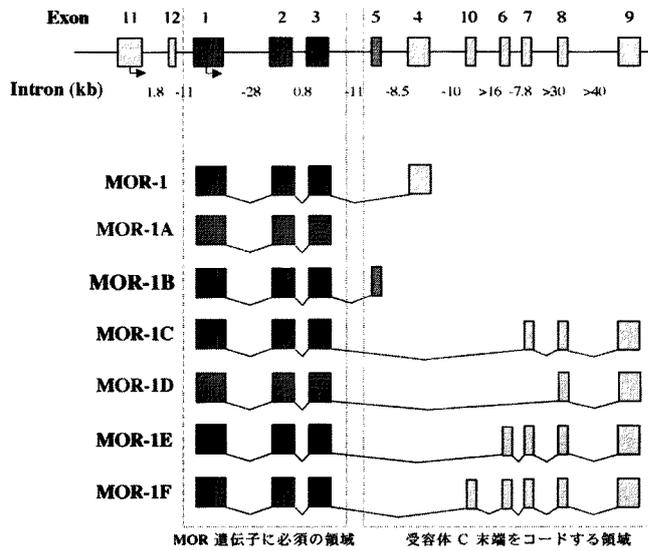


図 1 代表的なスプライスバリエント由来 MOR サブタイプの mRNA 構造

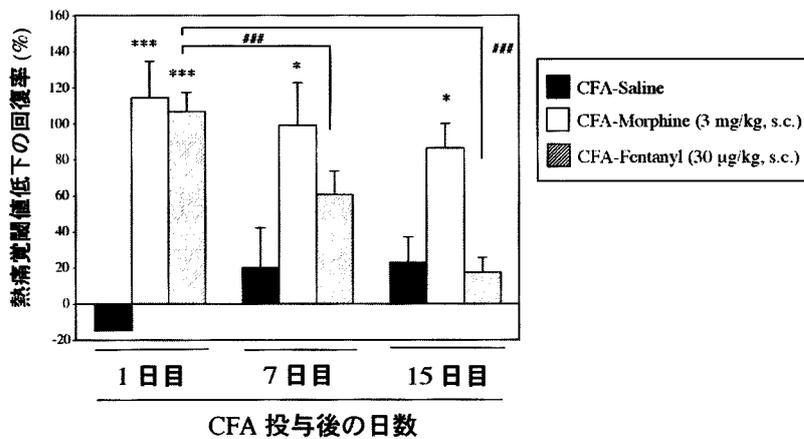


図 2 慢性疼痛下における morphine あるいは fentanyl 誘発鎮痛耐性形成の比較 CFA をマウス足趾皮下に投与した後、morphine あるいは fentanyl を 15 日間反復投与した。反復投与 1、7 および 15 日目における morphine あるいは fentanyl による熱痛覚閾値の回復について検討した。反復投与 15 日目において、morphine 投与群では十分な熱痛覚閾値の回復が認められたが、fentanyl 投与群ではその効果は有意に減弱した。 $*p<0.05$ および $***p<0.001$ vs. CFA-Saline 群

論文審査の結果の要旨

がん疼痛治療に医療用麻薬を使用したくない理由の一つに、「いざと言う時に医療用麻薬が効かなくなるから」があげられている。近年、がん疼痛患者に morphine を適切に長期間に渡って使用した場合でも morphine の鎮痛作用の減弱、すなわち耐性形成はほとんど問題にならないが、fentanyl では鎮痛耐性が早期から形成されることが臨床において報告されている。しかしながら、これらの臨床報告を裏付ける科学的根拠はほとんどないのが現状である。そこで本論文では、morphine と fentanyl の慢性投与による鎮痛耐性について慢性炎症性疼痛モデルマウスを用いて比較検討し、その分子機構を検討している。

Complete Freund's adjuvant (CFA) を後肢足蹠皮下に投与することにより、投与側の後肢においてのみ、著明かつ持続的な熱痛覚過敏反応が CFA 投与後15日間に渡って認められている。この熱痛覚閾値の低下を完全に回復しうる 3.0 morphine および fentanyl の用量を除痛用量として設定しているが、この除痛用量はそれぞれ 3.0 mg/kg morphine および 30 μ g/kg fentanyl 皮下投与であった。次に、CFA 投与後に除痛用量の morphine あるいは fentanyl を 15 日間に渡って反復投与し、鎮痛耐性の形成について検討している。その結果、morphine 反復投与群では、投与 15 日目においても十分な鎮痛効果が認められたのに対して、fentanyl 反復投与群では早期から鎮痛効果に対する耐性形成が認められている。さらに、痛みのない対照群に同一用量の morphine および fentanyl を慢性投与した場合には、両薬物共に速やかな鎮痛（痛覚鈍摩）耐性が認められている。

μ -Opioid 受容体 (MOR) は長期的な作動薬の刺激により、受容体の C 末端がリン酸化され、細胞内移行する。このような細胞膜上からの MOR の消失が鎮痛耐性形成の主因と考えられている。一方、MOR にはスプライスバリエーション由来の MOR サブタイプが存在することが現在までに報告されている。MOR サブタイプのうち、MOR 1B は MOR 作動薬による受容体の細胞内移行が、他のサブタイプと比較して素早く引き起こされることが知られている。そこで、

morphine および fentanyl の鎮痛耐性形成能の相違が、MOR 1B への選択性の違いに起因するか否かを検討している。MOR の選択的な放射性作動薬である [³H] [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin を用い、マウスの脊髄膜分画標本での morphine および fentanyl による置換実験を行ったところ、両薬物はほぼ同様の置換曲線を示し、脊髄内の MOR に対して同程度の結合親和性を有することを明らかにしている。次に雄性 C57BL/6J (C57BL) と雌性 BALB/cJ マウスとを交配

して得られたリコンビナント近交系マウスであり、MOR の部分欠損マウスとして知られている CXBK マウスの脊髄における MOR 1B mRNA 発現量について検討している。その結果、親系統である C57BL マウスと比較して CXBK マウスの MOR 1B mRNA 発現量は有意に低いレベルにあることを初めて明らかにしている。このような条件下、CXBK マウスの脊髄における morphine および fentanyl 誘発鎮痛効果ならびに G タンパク質活性化作用は C57BL マウスと比較して有意に減弱していることも明らかにしている。これらの結果より、CXBK マウスは MOR 1B ノックダウンマウスであり、また脊髄において MOR 1B は morphine および fentanyl 誘発鎮痛効果発現に重要な役割を果たしていることが明確になった。しかしながら、morphine あるいは fentanyl の MOR 1B の選択性については顕著な差が認められなかったことから、両薬物の MOR 1B 選択性が鎮痛耐性形成能の相違に起因している可能性は低いことを示唆している。

一方、細胞内移行したリン酸化 MOR (p-MOR) は protein phosphatase 2A (PP2A) によって脱リン酸化された後に、低分子量 G タンパク質 Rab4 依存的に細胞膜上へ再輸送 (再感作) されることが明らかにされている。そこで、本論文では、morphine あるいは fentanyl によって引き起こされる一連の受容体代謝回転機構を比較するために、炎症性疼痛モデルマウスの脊髄膜分画標本作製し、Western-blot 法に従い p-MOR 量の変化を検討している。その結果、saline を足蹠皮下投与した saline 反復投与群 (saline-saline 群) と比較して、CFA を足蹠皮下投与した fentanyl 反復投与群 (CFA-fentanyl 群) において p-MOR 量の有意な増加が認められている。また、不活性型であるリン酸化 PP2A の量は CFA-fentanyl 群において、saline-saline 群と比較して有意に増加していることを見出している。さらに興味深いことに、CFA-fentanyl 群において saline-saline 群と比較し、脊髄において Rab4 発現量が有意に減少していることも見出している。一方、これらの変化は、morphine 反復投与群においては認められないことから、fentanyl に特異的な現象であることを明確にしている。

以上の結果から、慢性疼痛下では除痛用量の fentanyl を反復投与することにより、morphine と比較して鎮痛耐性が早期から形成されることを明らかにしている。また、この現象には、脊髄における PP2A の不活性化に依存した p-MOR の増加および Rab4 の減少に伴った受容体の再感作効率の低下が一部関与している可能性を示唆している。本論文の内容はがん疼痛治療の現場に多大な貢献をするものであり、且つ論文は正確に記載されている。したがって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として相応しいものであると判定した。