

モルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成におけるシステインプロテアーゼの関与

丹野 孝一

Involvement of Cysteine Proteases in the Development of Analgesic Tolerance and Physical Dependence to Morphine

Koichi TAN-NO

(Received November 20, 2011)

はじめに

現在, 死亡原因の第1位は癌であり, 癌末期には多くの患者が激しい疼痛に見舞われる. 癌性疼痛の治療に際し, 1986年に公表された世界保健機構(WHO)方式三段階癌性疼痛治療法が非常に有効であり, 約80%の患者を癌性疼痛から解放できるとされている. この効果的な治療法により医療用モルヒネの使用量が世界各国で増加している. しかしながら, 日本におけるモルヒネの人口当たりの消費量は欧米諸国の約1/6以下であり, このことは残念ながら日本の癌性疼痛治療は十分な域に達していないことを意味するものである. 日本においてモルヒネがまだ積極的に使用されていない一因として, モルヒネの副作用である身体的・精神的依存や鎮痛耐性に対する懸念が挙げられる. Evidence based medicine (EBM)に基づき癌性疼痛をはじめとする慢性疼痛の治療にモルヒネが積

極的に使用され, 一人でも多くの患者が激しい疼痛から解放され, quality of life (QOL)の向上を目指す上にも「モルヒネ鎮痛耐性および身体的・精神的依存形成メカニズムの解明」は極めて重要な研究課題の一つであると考えられる. このような考えのもと, 当教室では主にオピオイドペプチド類のダイノルフィン類をはじめとする生理活性ペプチドおよびこれらに関連する機構から上述の研究課題に取り組んでいる. その過程において, ダイノルフィン類の代謝に関わるシステインプロテアーゼがモルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成に関与することを見いだしたので, 本稿ではこれらの研究結果について紹介する.

I. ダイノルフィン類の代謝的不活性化機構

ダイノルフィン類とは前駆タンパク質プロダイノルフィン由来のオピオイドペプチドの総称で,

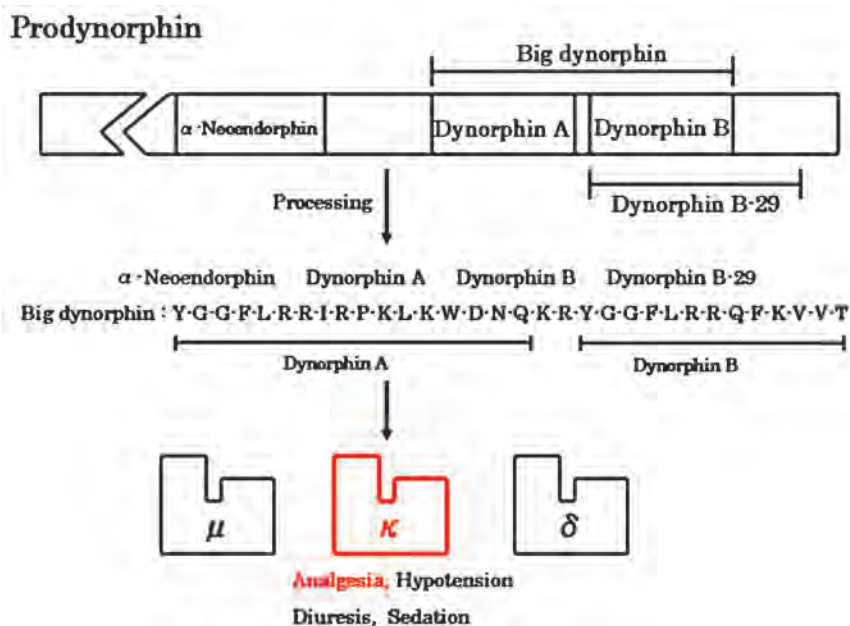


Fig. 1. Prodynorphin-Derived Peptides and their Actions through κ -Opioid Receptors

ダイノルフィン A (Dyn A) およびダイノルフィン B (Dyn B) などが属している。これらのペプチドは痛覚情報伝達・制御に関わる脊髄背側部や中脳水道周囲灰白質に高濃度に分布¹⁾しており、 κ -オピオイド受容体に高親和性を有し、マウスの脊髄クモ膜下腔内 (i.t.)^{2,3)} や脳室内 (i.c.v.)⁴⁾ に投与することにより鎮痛作用を示す (Fig. 1)。

ダイノルフィン類の代謝に関わるプロテアーゼとして、ダイノルフィン変換酵素 (DCE) がヒト⁵⁾ やウシ⁶⁾ の脊髄から抽出・精製されており、その生化学的プロフィールが明らかにされている。すなわち、DCE の本質はシステインプロテアーゼであり、Dyn A および Dyn B の Arg⁶-Arg⁷ 間あるいは Leu⁵-Arg⁶ 間のペプチド結合を開裂させ、主代謝産物としてロイシンエンケファリン-Arg⁶ (Leu-Enk-Arg⁶) と少量のロイシンエンケファリン (Leu-Enk) を生成する。また、Dyn B はラット黒質の抽出液によって脊髄から抽出・精製された DCE と同様、主に Leu-Enk-Arg⁶ に代謝される⁷⁾ のに対し、ラット海馬および線条体の抽出液によっては主として Leu-Enk に代謝される^{7,8)} ことから Dyn B の代謝機構に組織間で違いがあることを明らかにしている。このようにダイノルフィン類の代謝機構について *in vitro* の実験系から検討されているものの、*in vivo* におけるダイノルフィン類の代謝に関しての解明はなされていなかった。このような背景のもと、脊髄におけるダイノルフィン類の代謝に関わるプロテアーゼを *in vivo* の実験で明らかにすることを目的として、Dyn A および Dyn B をマウスの i.t. へ投与した際の鎮痛作用に対

する各種プロテアーゼ阻害薬の効果についてホルマリン試験を用いて検討を行った。²⁾ 対照として人工脳脊髄液を i.t. 投与し、その5分後にマウス右後肢足蹠内へ0.5%ホルマリン液 20 μ L を投与すると、ホルマリン液投与直後からの5分間で約90秒のlicking行動が誘発されたが、Dyn A (0.5-2 nmol) および Dyn B (2-8 nmol) は用量依存的かつ有意なlicking行動の抑制、すなわち鎮痛作用を示した。Dyn A (2 nmol) および Dyn B (8 nmol) の鎮痛作用は投与後それぞれ60分および30分まで観察され、90分および60分にはほぼ完全に消失した。しかしながら、システインプロテアーゼ阻害薬であるパラヒドロキシマーキュリー安息香酸 (PHMB) 4 nmol を Dyn A (2 nmol) および Dyn B (8 nmol) と同時投与することにより、投与後それぞれ90分および60分においても有意な鎮痛作用を示した。Dyn A および Dyn B はシステインプロテアーゼである DCE によって Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ に代謝される^{5,6)} ことが明らかにされているが、10 nmol の Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ はいずれも i.t. 投与5分後において鎮痛作用を示さなかった。また、マウス脊髄抽出液による Dyn A の分解はシステインプロテアーゼ阻害薬である *N*-エチルマレイミド (NEM) によってほぼ完全に抑制された。⁹⁾ これらの結果から、Dyn A および Dyn B はシステインプロテアーゼによって Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ に代謝され、その鎮痛作用が消失することが明らかとなった。同様に他のプロテアーゼ阻害薬の効果についても検討した結果、セリンプロテアーゼ阻害薬のフッ化フェ

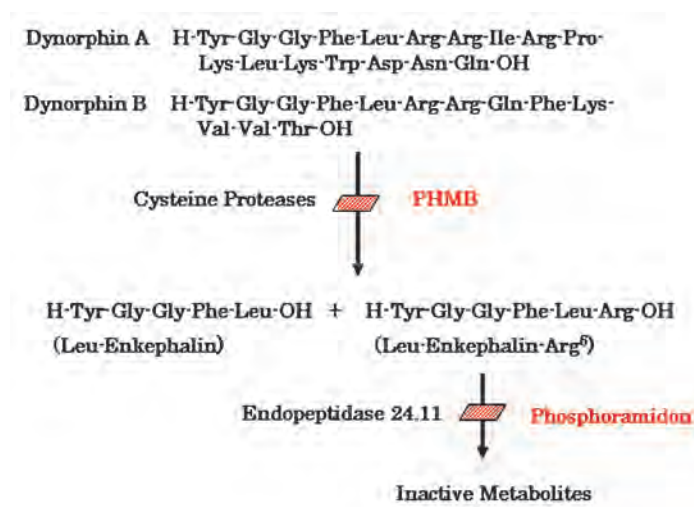


Fig. 2. Metabolic Pathway of Dynorphins A and B in the Mouse Spinal Cord

PHMB: *p*-Hydroxymercuribenzoate.

ニルメタンスルホニル, アミノペプチダーゼ阻害薬のベスタチンおよびアンジオテンシン変換酵素阻害薬のカプトプリルはいずれも 4 nmol の用量においても, Dyn A および Dyn B の鎮痛作用には何の影響も与えなかった.²⁾ しかしながら, Dyn A や Dyn B の代謝には関与しない¹⁰⁾ とされているエンドペプチダーゼ 24.11 の阻害薬であるホスホラミドン (1 nmol) は Dyn A および Dyn B の鎮痛作用の持続時間を有意に延長した.²⁾ ホスホラミドンによる Dyn A および Dyn B の鎮痛作用の持続化の機序について探る目的で, Dyn A および Dyn B の DCE による代謝産物である Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ それぞれ 2 nmol とホスホラミドン (1 nmol) をホルマリン液投与 90 分前に投与した結果, Leu-Enk においては有意な鎮痛作用は認められなかったが, Leu-Enk-Arg⁶ において有意な鎮痛作用が認められた. このことから, ホスホラミドンによる Dyn A および Dyn B の鎮痛作用の持続化はシステインプロテアーゼによって生成された Leu-Enk-Arg⁶ の代謝阻害に起因していることが示唆された.

以上の結果についてまとめると, Dyn A および Dyn B はシステインプロテアーゼによって Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ に代謝され, さらに Leu-Enk-Arg⁶ はエンドペプチダーゼ 24.11 によって代謝されることによりその鎮痛作用が消失することが示唆された (Fig. 2). また, カプサイシン試験において, PHMB の i.t. 単独投与は内因性ダイノルフィン類の分解阻害を介して鎮痛作用を示すことを見出している.¹¹⁾ これらの結果から, システインプロテアーゼは脊髄における内因性ダイノルフィン類の代謝に関与し, ダイノルフィン系の生理機能の制御に重要な役割を担っていることが示唆された.

II. モルヒネの鎮痛耐性形成に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の抑制効果

モルヒネ鎮痛耐性形成がダイノルフィン類¹²⁻¹⁵⁾ および選択的 κ -オピオイド受容体作動薬である U-50,488H^{16,17)} によって軽減されることから, κ -オピオイド受容体機構を含めたダイノルフィン系の機能亢進がモルヒネ鎮痛耐性の抑制に関与することは疑いのない事実である. また, ラット大脳皮質初代培養細胞における Dyn B から Leu-Enk-Arg⁶ への代謝がモルヒネ慢性処理により著しく亢進し,

この代謝亢進はシステインプロテアーゼ阻害薬により抑制されることが報告されている.¹⁸⁾ システインプロテアーゼを本態とする DCE によるダイノルフィン類の特徴的な代謝様式が Leu-Enk および Leu-Enk-Arg⁶ への変換である^{5,6)} ことを考慮すると, モルヒネの連続投与が DCE 活性の上昇を介してダイノルフィン類の代謝を亢進しているものと考えられる. 従って, モルヒネ鎮痛耐性形成過程において DCE 活性の上昇が重要な役割を担っており, システインプロテアーゼ阻害薬がモルヒネ鎮痛耐性形成を抑制する可能性が推察される. そこで, システインプロテアーゼ阻害薬のモルヒネ鎮痛耐性形成に及ぼす影響について他のプロテアーゼ阻害薬と比較検討を行った.¹⁹⁾

モルヒネ (0.1 nmol) の i.t. 投与によって認められるマウス・ホルマリン試験における鎮痛作用は, 鎮痛測定 2 日前に 30 mg/kg, 前日に 60 mg/kg のモルヒネを 1 日 2 回, 皮下投与することにより完全に消失し, 鎮痛耐性が形成された.^{19,20)} このモルヒネ鎮痛耐性はモルヒネ反復投与ごとの 5 分前に Dyn A (2 nmol), Dyn B (8 nmol), 選択的 κ -受容体作動薬である (-)-U-50,488 (40 nmol) およびシステインプロテアーゼ阻害薬である NEM (1 および 3 nmol) を i.t. 投与することにより有意に抑制された.¹⁹⁾ また, *N*-ペプチジル-*O*-アシルヒドロキシルアミン類の Boc-Tyr-Gly-NHO-Bz (BYG-Bz) はシステインプロテアーゼを強力かつ選択的に阻害²¹⁾ し, さらに Dyn A および Dyn B i.t. 投与による鎮痛作用の持続時間を有意に延長する³⁾ ことから, BYG-Bz についても検討を行ったところ, BYG-Bz (0.5 および 2 nmol) は NEM の場合と同様にモルヒネ鎮痛耐性の形成を有意に抑制した.¹⁹⁾ モルヒネ i.t. 投与による鎮痛作用の ED₅₀ 値はモルヒネ反復投与によって約 18 倍に増加したが, NEM (3 nmol) および BYG-Bz (2 nmol) をモルヒネ反復投与ごとの 5 分前に i.t. 投与することにより, その ED₅₀ 値の増加はそれぞれ 1.5 倍および 3.4 倍にまで低下した. 臨床の場合において, 癌患者に除痛目的でモルヒネを使用した場合には鎮痛耐性は生じないことが知られている. 基礎研究においても, 炎症や痛みの存在下ではモルヒネ鎮痛耐性の形成が抑制され, その抑制は選択的 κ -オピオイド受容体拮抗薬により減弱される²²⁾ ことから, 疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性の抑制には, ダイノルフィン- κ -オピオイド受容体機構の関与が示唆

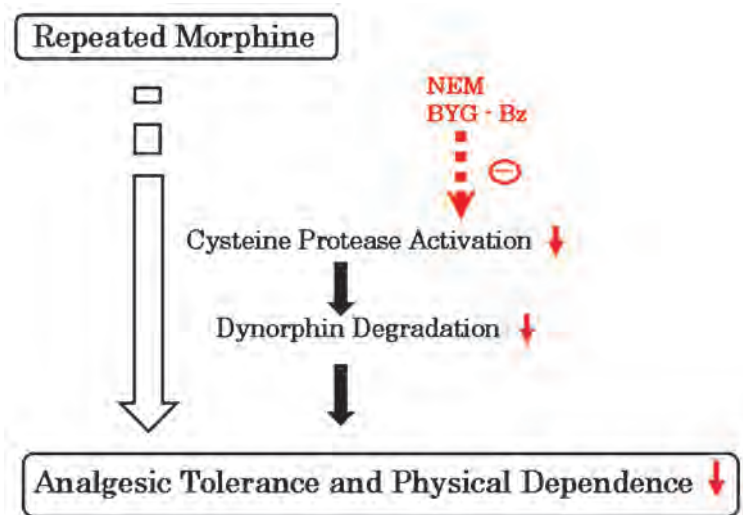


Fig. 3. Summary of Suppressive Mechanism of Cysteine Protease Inhibitors on the Development of Analgesic Tolerance and Physical Dependence to Morphine

NEM: N-Ethylmaleimide. BYG-Bz: Boc-Tyr-Gly-NHO-Bz. Details are described in this text.

されている。また、アジュバント関節炎ラットでは脊髄背側部のDCE活性が著しく低下²³⁾しており、これらの事実を加味すると、慢性疼痛下においてモルヒネ鎮痛耐性が形成し難い要因の一つに脊髄背側部におけるシステインプロテアーゼ活性の低下とそれに伴うダイノルフィン代謝の抑制が関与している可能性が推察される。

一方、アミノペプチダーゼ阻害薬、エンドペプチダーゼ24.11阻害薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬およびセリンプロテアーゼ阻害薬はモルヒネ鎮痛耐性形成には全く影響を与えなかった。¹⁹⁾以上の結果から、モルヒネ鎮痛耐性の形成過程には脊髄におけるシステインプロテアーゼ活性の上昇が重要な役割を担っており、システインプロテアーゼ阻害薬はモルヒネ鎮痛耐性形成を抑制することを明らかとした (Fig. 3)。

Ⅲ. モルヒネの身体的依存形成に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の抑制効果

モルヒネの反復投与によって鎮痛耐性と共に身体的依存が形成されることは周知の事実である。モルヒネの身体的依存形成には青斑核を起始核とするノルアドレナリン神経が関与していることが明らかにされており、青斑核にはダイノルフィン神経²⁴⁾および κ -受容体²⁵⁾が存在する。モルヒネ依存マウスにオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンを投与するとジャンプ、身震い、立ち上がり、下痢や体重減少などの退薬症候が現れるが、

この退薬症候はダイノルフィン類によって抑制¹³⁻¹⁵⁾され、反対に選択的 κ -受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミンによって増悪²⁶⁾される。我々は初日に30 mg/kg、2日目に60 mg/kgをそれぞれ1日2回、3日目に60 mg/kgのモルヒネを皮下投与することによりモルヒネ依存マウスを作製し、モルヒネ最終投与の3時間後にナロキソン (0.5-8 mg/kg) を腹腔内に投与して退薬症候を観察した²⁷⁾。その結果、ナロキソン投与直後からの5分間をピークとし、投与後15分以降にはほぼ完全に消失する顕著なジャンプ行動が用量依存的に発現した。このナロキソン誘発退薬ジャンプ行動はDyn A (62.5 pmol) およびDyn B (250 pmol) を測定前日までのモルヒネ反復投与毎の5分前にi.c.v.投与することにより有意に抑制された。しかしながら、(-)-U-50,488 (1.25-20 nmol) はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動に対して無影響であった。 κ -受容体には κ_1 、 κ_2 および κ_3 の3種のサブタイプが存在している。^{25,28)}ダイノルフィン類は全ての κ -受容体サブタイプに結合するが、U-50,488Hは κ_1 -受容体サブタイプに高親和性である。²⁸⁾一方、強力かつ極めて選択性の高い κ -受容体作動薬であるTRK-820はU-50,488Hとは異なる κ -受容体サブタイプに高親和性を有することが明らかにされている。²⁹⁾興味深いことに、TRK-820はU-50,488Hとは異なりナロキソン誘発退薬症候を抑制する。³⁰⁾これらの事実を加味すると、Dyn AおよびDyn Bは κ_2 および/あるいは κ_3 -受容体サブタイプの活

性を介し、モルヒネの身体的依存形成を抑制したと考えられる。

以前、我々は Dyn A を i.c.v. 投与した際に認められる 2%ホルマリン試験の第 2 相（ホルマリン液投与後 10 分から 30 分の 20 分間）における鎮痛作用が PHMB を Dyn A と同時に i.c.v. 投与することにより有意に増強され、マウスの脳抽出液による Dyn A の分解は PHMB および NEM で阻害されることを報告している。⁴⁾ このことはシステインプロテアーゼが脊髄のみならず上位脳においてもダイノルフィン類の代謝に関与していることを示唆するものである。その上、ラット大脳皮質初代培養細胞における Dyn B から Leu-Enk-Arg⁶ への代謝がモルヒネ慢性処理により著しく亢進することを前述したが、この代謝亢進はナロキソン処理による退薬によってさらに高まり、これらの処理による Leu-Enk-Arg⁶ への代謝亢進は、いずれもシステインプロテアーゼ阻害薬によって抑制される。¹⁸⁾ これらの事実から、モルヒネの身体的依存形成および退薬症候の発現にシステインプロテアーゼ活性の上昇が関与しており、システインプロテアーゼ阻害薬がモルヒネの身体的依存形成を抑制する可能性が推察される。そこで、モルヒネの身体的依存形成に及ぼすシステインプロテアーゼ阻害薬の影響について検討を行った。²⁷⁾ その結果、NEM (0.5 nmol) および BYG-Bz (0.4 nmol) の i.c.v. 前処理はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動を有意に抑制した。しかしながら、アミノペプチダーゼ阻害薬、エンドペプチダーゼ 24.11 阻害薬およびアンジオテンシン変換酵素阻害薬はナロキソン誘発退薬ジャンプ行動には全く影響を与えなかった。以上の結果から、ナロキソン誘発退薬ジャンプ行動、すなわちモルヒネの身体的依存形成には脳内のシステインプロテアーゼ活性の上昇が重要な役割を担っており、システインプロテアーゼ阻害薬はモルヒネの身体的依存形成を抑制することを明らかとした (Fig. 3)。

おわりに

臨床経験から、慢性疼痛下ではモルヒネの鎮痛耐性や依存性はほとんど形成されないことが明らかにされているが、モルヒネ使用にまつわる不安（耐性、依存に対する恐れ）のため臨床の場における疼痛治療は必ずしも十分であるとは言い難い。こうした根強い不安を解消し、積極的に慢性疼痛

治療にモルヒネが使用される上にも「モルヒネの鎮痛耐性および依存形成メカニズムの解明」ならびに「モルヒネの鎮痛耐性および依存形成軽減薬の開発研究」は必要不可欠な研究課題であると思われる。本研究でシステインプロテアーゼがモルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成に関与していることを明らかにしたが、このことはモルヒネの鎮痛耐性および身体的依存形成軽減薬を開発する上で、システインプロテアーゼが有用なターゲットになり得る可能性を示すものである。今後も「モルヒネの鎮痛耐性および依存形成メカニズムの解明」なる研究を通して慢性疼痛患者の QOL 向上のため微力ながらも貢献できることを願っている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始有益なご助言を与えてくださいました東北薬科大学薬理学教室の故木皿憲佐名誉教授、只野武名誉教授、スウェーデン王立カロリンスカ研究所の Lars Terenius 名誉教授、Jerzy Silberring 教授（現 AGH 科学工科大学）、Ingrid Nylander 教授（現ウプサラ大学）、Georgy Bakalkin 教授（現ウプサラ大学）に衷心より感謝致します。また、ご協力いただいた中川西修講師、八百板富紀枝助教、石井（平）亜希博士、大島清史修士、下田将司修士、佐藤丞修士をはじめとする東北薬科大学薬理学教室の諸氏に感謝致します。

REFERENCES

- 1) Tan-No K., Terenius L., Silberring J., Nylander I., *Neurochem. Int.*, **31**, 27–32 (1997).
- 2) Tan-No K., Taira A., Sakurada T., Inoue M., Sakurada S., Tadano T., Sato T., Sakurada C., Nylander I., Silberring J., Terenius L., Kisara K., *Eur. J. Pharmacol.*, **314**, 61–67 (1996).
- 3) Tan-No K., Taira A., Nakagawasai O., Nijima F., Demuth H-U., Silberring J., Terenius L., Tadano T., *Neuropeptides*, **39**, 569–573 (2005).
- 4) Tan-No K., Ohshima K., Taira A., Inoue M., Nijima F., Nakagawasai O., Tadano T., Nylander I., Silberring J., Terenius L., Kisara K., *Brain Res.*, **891**, 274–280 (2001).
- 5) Silberring J., Castello M.E., Nyberg F., *J. Biol. Chem.*, **267**, 21324–21328 (1992).
- 6) Silberring J., Nyberg F., *J. Biol. Chem.*, **264**,

- 11082–11086 (1989).
- 7) Sandin J., Tan-No K., Kasakov L., Nylander I., Winter A., Silberring J., Terenius L., *Peptides*, **18**, 949–956 (1997).
- 8) Nylander I., Tan-No K., Winter A., Silberring J., *Life Sci.*, **57**, 123–129 (1995).
- 9) Tan-No K., Takahashi H., Nakagawasai O., Nijima F., Sato T., Satoh S., Sakurada S., Marinova Z., Yakovleva T., Bakalkin G., Terenius L., Tadano T., *Pain*, **113**, 301–309 (2005).
- 10) Roques B. P., Noble F., Dauge V., Fournie-Zaluski M. C., Beaumont A., *Pharmacol. Rev.*, **45**, 87–146 (1993).
- 11) Tan-No K., Taira A., Inoue M., Ohshima K., Sakurada T., Sakurada C., Nylander I., Demuth H-U., Silberring J., Terenius L., Tadano T., Kisara K., *Neuropeptides*, **32**, 411–415 (1998).
- 12) Schmauss C., Herz A., *Eur. J. Pharmacol.*, **135**, 429–431 (1987).
- 13) Hooke L. P., He L., Lee N. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, 292–297 (1995).
- 14) Takemori A. E., Loh H. H., Lee N. M., *Eur. J. Pharmacol.*, **221**, 223–226 (1992).
- 15) Takemori A. E., Loh H. H., Lee N. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 121–124 (1993).
- 16) Yamamoto T., Ohno M., Ueki S., *Eur. J. Pharmacol.*, **156**, 173–176 (1988).
- 17) Tsuji M., Yamazaki M., Takeda H., Matsumiya T., Nagase H., Tseng L. F., Narita M., Suzuki T., *Eur. J. Pharmacol.*, **394**, 91–95 (2000).
- 18) Vlaskovska M., Nylander I., Schramm M., Hahne S., Kasakov L., Silberring J., Terenius L., *Brain Res.*, **760**, 85–93 (1997).
- 19) Tan-No K., Shimoda M., Sugawara M., Nakagawasai O., Nijima F., Watanabe H., Furuta S., Sato T., Satoh S., Arai Y., Kotlinska J., Silberring J., Terenius L., Tadano T., *Neuropeptides*, **42**, 239–244 (2008).
- 20) Tan-No K., Shimoda M., Watanabe K., Nakagawasai O., Nijima F., Kanno S., Ishikawa M., Bakalkin G., Tadano T., *Neurosci. Lett.*, **450**, 365–368 (2009).
- 21) Silberring J., Demuth H-U., Brostedt P., Nyberg F., *J. Biochem.*, **114**, 648–651 (1993).
- 22) Tokuyama S., Nagae R., Mashida E., Hamabe W., *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**, 1109–1115 (2007).
- 23) Silberring J., Sakurada T., Nyberg F., *Life Sci.*, **50**, 839–847 (1992).
- 24) Reyes B. A., Johnson A. D., Glaser J. D., Commons K. G., Van Bockstaele E. J., *Neuroscience*, **145**, 1077–1086 (2007).
- 25) Zukin R. S., Eghbali M., Olive D., Unterwald E. M., Tempel A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 4061–4065 (1988).
- 26) Suzuki T., Narita M., Takahashi Y., Misawa M., Nagase H., *Eur. J. Pharmacol.*, **213**, 91–97 (1992).
- 27) Tan-No K., Sato T., Shimoda M., Nakagawasai O., Nijima F., Kawamura S., Furuta S., Sato T., Satoh S., Silberring J., Terenius L., Tadano T., *Neuropeptides*, **44**, 279–283 (2010).
- 28) Clark J. A., Liu L., Price N., Hersh B., Edelson M., Pasternak G. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 461–468 (1989).
- 29) Nagase H., Hayakawa J., Kawamura K., Kawai K., Takezawa Y., Matsuura H., Tajima C., Endo T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 366–369 (1998).
- 30) Tsuji M., Takeda H., Matsumiya T., Nagase H., Yamazaki M., Narita M., Suzuki T., *Life Sci.*, **66**, PL 353–358 (2000).