

平成 22 年度 博士論文

癌緩和・薬物療法におけるモルヒネ及び
脱メチル化薬の有用性に関する薬理学的研究

2011 年

千葉大学大学院 医学薬学府 創薬生命科学専攻

高齢者薬物学講座 高齢者薬剤学研究室

岩田 紘樹

目次

略語一覧	3
序章	4
第1章 モルヒネ及びその代謝物の便秘誘発作用とその機序に関する検討	9
第1節 モルヒネとその 6-glucuronide 及び 3-glucuronide 代謝物の 消化管運動に及ぼす影響	11
第1項 小腸輸送能、胃排出能に対する抑制作用について	11
第2項 摘出回腸の電気刺激収縮に対する抑制作用について	15
第3項 摘出回腸における収縮作用について	19
考察	23
第2節 モルヒネの摘出腸管における収縮作用機序の解析	25
第1項 オピオイド受容体タイプ選択性の検討	27
第2項 モルヒネによる収縮作用機序の検討	34
考察	44
小括	48
第2章 モルヒネのがん細胞に対する作用の検討	49
考察	57
小括	58
第3章 脱メチル化薬による腎細胞癌の抗がん剤感受性増強作用の検討	59
第1節 腫瘍皮下移植モデルマウスにおける脱メチル化薬とビンブラスチン の併用効果およびその作用機序の検討	62
考察	74
第2節 <i>in vitro</i> における脱メチル化薬とビンブラスチンの併用効果および その作用機序の検討	76
考察	90
小括	93
総括	94

参考文献	96
論文目錄	111
謝辭	112
審查	114

略語一覽

ACh: acetylcholine
Aza: 5-aza-2'-deoxycytidine
Cx: connexin
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HIF: hypoxia-inducible factor
L-NNA: N^G-nitro-L-arginine
M3G: morphine-3-glucuronide
M6G: morphine-6-glucuronide
MDR: multidrug resistance
NANC: non-adrenergic non-cholinergic
NO: nitric oxide
NOS: NO synthase
nor-BNI: nor-binaltorphimine
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PG: prostaglandin
P-gp: P-glycoprotein
PVDF: polyvinylidene difluoride
RCC: renal cell carcinoma
RPL: ribosomal protein large
RT: reverse transcription
TBS: tris buffered saline
TTX: tetrodotoxin
VBL: vinblastin
VEGF: vascular endothelial growth factor
VHL: von Hippel-Lindau
VIP: vasoactive intestinal polypeptide
XAF1: X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-associated factor 1

序章

我が国における死亡原因は、1981 年から悪性新生物（がん）が第 1 位を占め、2009 年には約 34.4 万人ががんで亡くなり、その死亡率は 30.1%に上る(1)。国民の高齢化に伴い、今後さらに罹患者数が増加すると予測され、がん対策は現在の医療において非常に重要な課題となっている。

がん医療は予防、検診、治療、さらに緩和医療と多岐にわたっている。その中で問題点として、がん医療の水準に地域間・施設間格差があることやがん治療医が不足していること、緩和ケアの実施が不十分であること、がん医療の評価に必要な患者データを収集するためのがん登録が普及していないことなどが挙げられる。これを受けて、2007 年 4 月にがん対策基本法が施行され、併せて 2011 年度までの 5 年間を対象としたがん対策推進基本計画が策定された。この基本計画には、全体目標としてがんによる死亡者の減少と、がん患者・家族に対する緩和ケアの実施が掲げられ、個別目標として化学療法の実施、がん医療の均てん化やがん登録の促進などが明文化された(2)。

がんと診断された患者に対しては、がんの治療と、疼痛管理を中心とする緩和医療が行われることになる。ただこれまでは、あるいは現在でも、がんの治療のみが先行して行われ、終末期に近くなってから緩和医療が開始されるというのが実情であった。しかし、がん疼痛はどの病期においても発生するため、緩和医療もがん治療の初期段階から行われるべきであると、がん対策基本法においても定められた。すなわち、がんの治療、症状改善、または延命といった目的に応じて、がん治療と緩和医療を適切な時期に適切な方法で提供してがん患者の QOL 向上を目指すことが、がん患者に対する医療の理想形であると考えられる。

私は本研究において、緩和医療とがん治療の両面からアプローチし、がん医療の発展に寄与することを目指した。まず、緩和医療の充実に向けたエビデンスの確立として、オピオイド鎮痛薬であるモルヒネの便秘誘発作用及びがん細胞への影響を検討した。さらに、新たながん治療法の探索として、がんのエピジェネティック異常を正常化する脱メチル化薬の治療への応用について検討した。

がん疼痛はどの病期においても発生し、末期がん患者では約 70%が主症状として痛みを体験する。持続性の痛みが大半を占め、その痛みの 50%はかなり強く、30%は耐え難いほど強いといわれている(3)。がんの身体的な痛みとしては、管腔臓器の閉塞や神経の圧迫、転移など腫瘍自体に起因する痛みが最も多く、他に手術後の痛

みや褥瘡の痛みなどがある(3)。さらに WHO では、がん患者の痛みを身体的な痛みばかりでなく、精神的な痛みや社会的な痛み、スピリチュアルな痛みなどを含めた全人的な痛み (total pain) としてとらえるべきであるとし、がん疼痛治療は患者の QOL の維持に重要な意味をもつとしている。

現在、疼痛治療について多くの国々が模範としているのが、1986 年に公表された「WHO 方式がん疼痛治療法」である。その中で「WHO 3 段階除痛ラダー」が示され、痛みの強さに応じて、NSAIDs やアセトアミノフェンといった非オピオイド鎮痛薬、コデインなどの弱オピオイド鎮痛薬、モルヒネなどの強オピオイド鎮痛薬を選択し、必要な場合は抗うつ薬や抗痙攣薬といった鎮痛補助薬を併用する方法が提唱されている。さらに鎮痛薬の使用法は、経口的に (by mouth)、時刻を決めて規則正しく (by the clock)、除痛ラダーにそって効力の順に (by the ladder)、患者ごとの個別的な量で (for the individual)、その上で細かい配慮を (attention to detail) という 5 点に集約されている。この治療法により、70~90%のがん患者の痛みを消失させることができるとされている(4)。

日本でも強オピオイド製剤として、様々なモルヒネ製剤に加えて、オキシコドンの徐放錠、散剤、注射剤、さらにフェンタニルの注射剤、経皮吸収型貼付剤が発売されている。あるオピオイドで副作用が強く出た場合や、増量しても痛みのコントロールが不十分になった場合などに他のオピオイドに変更する「オピオイドローテーション」も行うことができる。

現在、全国の多くの施設において緩和ケアチームが発足しつつある。しかし日本では、モルヒネを使用すると麻薬中毒になるのではないかといった誤解が患者や医療従事者の間で根強く、2005~09 年の医療用麻薬の使用量は、アメリカの約 20 分の 1、イギリスの 3 割程度と極端に少ない(5)。だがこれまでに、臨床経験上だけでなくマウスにおいても、疼痛下でモルヒネを使用した場合は精神依存が形成されないこと(6)、またその機序として疼痛下では κ オピオイド系が活性化されて、依存形成の原因となるドパミンの遊離を阻害していること(7)も明らかになっている。医療用麻薬の使用を普及させるためには、まず、それに対する誤解を取り除くことが不可欠である。

モルヒネの鎮痛作用は、中枢のオピオイド受容体を介して発現する。その機序としては、脊髄での一次求心性神経からの痛覚伝達物質の遊離阻害や視床での疼痛伝達経路の抑制、中脳における GABA 神経の抑制を介した下行性疼痛抑制経路の活性化などが解明されている(8)。モルヒネがオピオイド受容体に結合すると、 G_i タンパクと共役してアデニル酸シクラーゼ活性が抑制され、 Ca^{2+} チャンネルの開口抑制、

K⁺チャネルの開口促進を介して神経活動が抑制される。このオピオイド受容体には主に μ 、 δ 、 κ の 3 つのタイプがあり、モルヒネはこのうち μ 受容体への親和性が、 δ や κ 受容体に比べて 20~90 倍高いということが、受容体結合実験から分かっている(9, 10)。

このオピオイド受容体は中枢だけでなく末梢にも存在しており、そのためモルヒネ服用患者には様々な副作用が現れる。副作用によって患者の QOL 低下を招き、その結果モルヒネの継続投与が困難となる場合もあるため、副作用対策は十分に行う必要がある。

モルヒネの副作用には嘔気・嘔吐、眠気、呼吸抑制などもあるが、最も深刻なものは便秘である。便秘はモルヒネ服用患者のほとんどすべてに生じ、鎮痛用量以下で発生すること(8)、また耐性ができにくいこと(11)も患者を悩ませる一因となっている。そのため、モルヒネ投与開始と同時に対策を講じる必要があり、通常、酸化マグネシウムなどの塩類下剤やセンノシド、ピコスルファートなどの大腸刺激性下剤などが投与される(8)。モルヒネは、主に腸管神経系に分布するオピオイド受容体に結合して、便秘を引き起こすと考えられているが、その詳細な機序については、未だ不明な点が残されている。

ところで、体内に吸収されたモルヒネは主に肝臓と小腸内粘膜で代謝され、多くはグルクロン酸抱合体になる。それには morphine-6-glucuronide (M6G) および morphine-3-glucuronide (M3G) が知られており、ヒトでは静注と経口どちらにおいても、モルヒネの約 55% が M3G に、約 10% が M6G に代謝されるといわれている(12)。また、ヒトにモルヒネを経口投与した場合、最高血中濃度がモルヒネに比べて M6G は 4.0 倍、M3G は 21.1 倍高濃度であることが報告されている(13)。M3G の方が主代謝物ではあるが、オピオイド受容体への親和性は非常に低く、鎮痛作用は認められていない(14)。

一方、M6G はモルヒネよりも強い鎮痛活性があるとされ、M6G はモルヒネの活性代謝物であることが示されてきた(10, 15-17)。M6G はモルヒネの鎮痛作用だけでなく、副作用にも関与していることが考えられ、呼吸抑制は M6G の方がやや強いといわれている(18)。しかし最も深刻な副作用である便秘に対する関与については、報告が限られている。そこで本研究第 1 章では、モルヒネと M6G 及び M3G の消化管に対する作用を比較し、モルヒネ誘発便秘への代謝物の関与及びその発生機序を検討した。

一方で、モルヒネはがん患者に対して、長期間にわたり、また用量を増やしながらか使用されることも多いため、一般的な副作用以外にも、予期せぬ作用が発現する

可能性が考えられる。その一つとして、鎮痛目的でモルヒネをがん患者に投与した場合、腫瘍自体には影響を及ぼしているのか、という疑問が生じた。実際これまでは、実験室レベルでモルヒネによってがんが増悪したという報告と、がんの増殖が抑制されたという報告が混在している。そこで第 2 章では、モルヒネのがん細胞に対する作用を複数のヒトがん細胞株を用いて検証した。

がんによる死亡者減少に最も直結すると考えられるのは、やはりがんの治療成績の向上である。がんの治療方法には手術、化学療法、放射線療法があり、最も確実性の高い方法は手術による病巣の切除であるが、これら 3 つを組み合わせた集学的治療がこれからのがん治療の中心となるであろう。化学療法の分野では、これまでの殺細胞性抗腫瘍薬に加えて、近年数多くの分子標的薬が臨床の場に登場し、がん種によっては予後の改善が見られている。個別化医療への可能性も広がったと同時に、分子標的薬の効果予測のためのバイオマーカーの開発や薬剤耐性機構の解明(19)は、なお今後の課題である。

そのような中、がん研究の新たな分野としてエピジェネティクスが注目を集めている。その研究成果から生まれた薬剤が既に臨床使用もされており、がん薬物療法への応用が期待されている。

がんに見られる遺伝子の異常は、突然変異や染色体欠失などのジェネティックなもの、エピジェネティックなものに分けられ、共にがんの発生や進展に寄与している。エピジェネティクスとは「DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する現象」のことで、主に DNA メチル化とヒストン修飾が関与している。DNA メチル化はシトシンとグアニンが連続した CpG 部位のシトシンの 5 位がメチル化されることを指し、このメチル化は細胞分裂の際にも DNA メチル基転移酵素 1 (DNMT1) によって正確に複製される。遺伝子のプロモーター領域にある CpG アイランドがメチル化されると、本来ならヌクレオソーム（ヒストン 8 量体に DNA が巻きついた構造）が存在しない領域にもヌクレオソームが形成され、RNA 合成酵素が結合できずに転写が行われなくなる。一方、ヒストン 8 量体から各ヒストンのアミノ末端が突出しており、ここが修飾を受ける。各ヒストンのアセチル化及び H3 の 4 番目のリジン（H3K4）のメチル化は活性な修飾として、H3K9 と H3K27 のメチル化は非活性な修飾として知られている。これらのエピジェネティック修飾は生理的には、各細胞でどの遺伝子を使用されるのかを決定、記憶する役割を担っており、受精卵から様々な種類の細胞へと発生・分化する過程では、エピジェネティック修飾が劇的に変化するといわれている。また生殖細胞では、それらの修飾が

一度リセット（リプログラミング）されると考えられている。しかし、何らかの原因でエピジェネティック修飾に変化や異常が誘発されると、がんなどの疾患に関与する(20)。

様々ながん種において、がん抑制遺伝子のプロモーター領域が高メチル化され、転写が抑制（サイレンシング）されていることが分かってきた。Rb や p16（細胞周期阻害）、BRCA1 や MLH1（DNA 修復）、E-cadherin（細胞接着）など、多くのがん抑制遺伝子のメチル化が検出されている(21)。これに対し、DNA メチル基転移酵素阻害作用をもつ DNA 脱メチル化薬は、このメチル化を解除することができる。その結果遺伝子の発現が回復し、抗腫瘍効果を示す(22, 23)。欧米では 5-azacytidine (24)と 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) (25)が骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome: MDS）や急性骨髄性白血病（5-azacytidine のみ）の治療薬として承認されている。さらに日本でも、2011 年 1 月に 5-azacytidine が MDS 治療薬として承認された。一方で、これら脱メチル化薬は固形腫瘍には効果が弱いことが臨床試験で示されている(26)。そこで本研究第 3 章では、有効な治療薬が少ない腎細胞癌を対象に、脱メチル化薬の有効性を探るべく検討を行った。

第1章 モルヒネ及びその代謝物の便秘誘発作用とその機序に関する検討

緒言

消化管運動を制御する神経系として、促進的に働く副交感神経系と、抑制的に働く交感神経系に加え、これら自律神経系からは独立した腸管神経系が消化管壁内に形成されている。腸管神経系は縦走筋と輪状筋の間に見られる筋層間神経叢（アウエルバッハ神経叢）と、輪状筋と管腔側の上皮細胞の間に見られる粘膜下神経叢（マイスナー神経叢）の2つから成る。このうち、前者は消化管運動を制御し、後者は消化液の分泌と局所の血流を支配していることが分かっている。

食物の消化と吸収を効率よく行うためには、それを順次口腔側から肛門側へと移行させる必要があるが、その役割を担うのが反射性の蠕動運動である。そして筋層間神経叢に、この蠕動運動を制御する神経系が備わっていると考えられている（図1）。食物など管腔内の内容物によって壁が伸展すると、セロトニンが放出され、局所の知覚神経を刺激して筋層間神経叢を活性化する。すると、伸展部の刺激を口腔側へ伝える上行性コリン作動性神経は、興奮性運動神経を刺激して **acetylcholine (ACh)** やサブスタンス P を放出し、輪状筋を収縮させる。一方肛門側では、下行性コリン作動性神経の刺激により抑制性運動神経から **nitric oxide (NO)**、**vasoactive intestinal polypeptide (VIP)**、**ATP** などが放出され、輪状筋が弛緩する。この結果、口腔側と肛門側の圧勾配によって食物は肛門側へと移行していく(27, 28)。

これまでに筋層間神経叢にオピオイド受容体が存在していることが、モルモットやラットの腸管で免疫染色法により確かめられてきた(29, 30)。生体内にはエンケファリンやダイノルフィンといった内因性オピオイドペプチドが分布していて、普段は消化管運動を抑制的に制御していると考えられ、オピオイド受容体アンタゴニストのナロキソンを投与すると蠕動運動は亢進する(31)。平滑筋上にもオピオイド受容体が存在するかについては、肯定する報告(32)と否定する報告(33)とがある。また、交感神経を切除したり α 遮断薬や β 遮断薬を投与したりするとモルヒネの腸管運動抑制作用が阻害されることから、便秘作用には中枢を介した経路も一部関与していると考えられる(34)。

外因性のモルヒネは、主に腸管神経系に分布するオピオイド受容体を介して、腸管の蠕動運動の抑制や肛門括約筋の緊張亢進、十二指腸での腸液の分泌低下などを引き起こして、便秘を誘発していると考えられている(8)。しかし、その詳細な分子メカニズムは完全には解明されていない。

M6G については、1971 年に Shimomura らにより、モルヒネよりも強い鎮痛活性を持つことが報告されて以来(15)、盛んに研究が行われてきた。動物実験では M6G の鎮痛作用はモルヒネに比べて、特に脳室内投与 (*i.c.v.*) では 52～92 倍、脊髄くも膜下腔内投与 (*i.t.*) では 49～678 倍強いと報告されている(16, 17)。さらに M6G はモルヒネよりも鎮痛作用時間が長く(10, 15, 16)、モルヒネの持続性の鎮痛作用に特に寄与していることが示唆された。M6G はモルヒネに比べて脂溶性が低いいため脳内移行性が低いとされているが、M6G の鎮痛作用は脳に移行した少量の M6G に由来することが報告されている(35)。

μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体のうち、M6G もモルヒネと同様 μ 受容体に対する親和性が最も高い。ただしモルヒネと比較すると、その親和性はやや低い (1.9～3.6 分の 1) とされている(9, 10)。しかし、cAMP 産生抑制(36)や K^+ 電流増加(37)といった受容体の機能解析では、M6G の作用強度がモルヒネと同程度かやや強いことから、M6G の方が受容体以降の反応を誘起する効力が強いことが示唆された。その他、M6G の δ 受容体への親和性はモルヒネよりやや強く (1.7～7.3 倍)、 κ 受容体への親和性はモルヒネに比べて非常に低い (42～60 分の 1) ことが報告されている(9, 10)。

本研究では、モルヒネが蠕動運動にどのような影響を与えて、便秘を誘発しているのか解明するため、*in vivo* または摘出腸管を用いた検討を行った。第 1 節では、モルヒネと代謝物の腸管運動への影響を比較するため、①小腸輸送能と胃排出能に対する作用、②電気刺激収縮の抑制作用、③腸管収縮作用という 3 つの観点から検討を行った。その中で得られたモルヒネの腸管収縮作用について、第 2 節では、関与するオピオイド受容体タイプの検討及びその収縮機序の検討を行った。

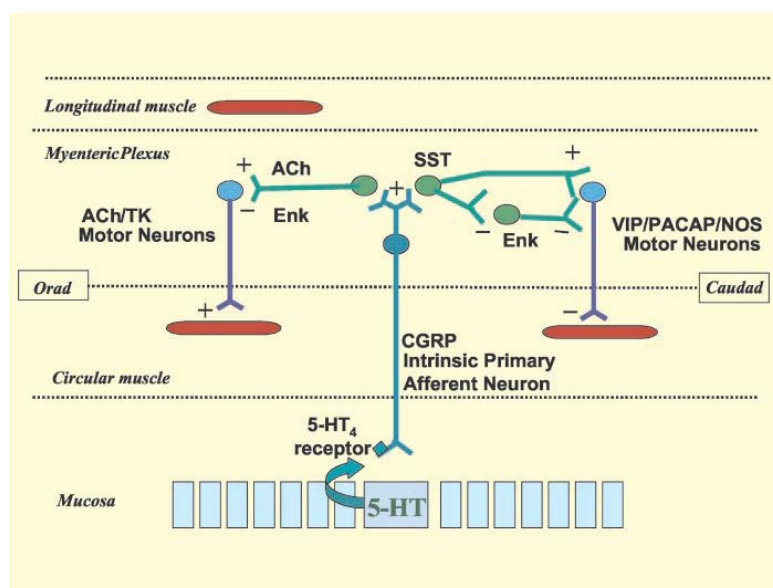


図 1 反射性蠕動運動の腸管神経系による調節機構 (文献 28 より引用)

第1節 モルヒネとその 6-glucuronide 及び 3-glucuronide 代謝物の消化管運動に及ぼす影響

オピオイドの便秘誘発作用の指標によく用いられるものとして、小腸輸送能と胃排出能があり、モルヒネがその両者を抑制することが示されている(11, 38-40)。第1節では、モルヒネと主に活性代謝物の M6G の消化管への作用を比較するため、まず第1項では両者のマウス小腸輸送能、胃排出能への影響を検討した。つづいて摘出腸管を用いて、第2項では電気刺激下での作用、第3項では非刺激下での作用を検討した。なお第3項では M3G も用いて検討を行った。

第1項 小腸輸送能、胃排出能に対する抑制作用について

1. 方法

1) 使用動物

5～6週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を用いた。恒温（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、恒湿（ $60 \pm 5\%$ ）の動物飼育室で実験日まで飼育した。

2) 使用薬物

Morphine hydrochloride

大日本製薬

Morphine-6-glucuronide (M6G)

塩野義製薬より譲受

上記の薬物は蒸留水に溶解した。

NaOH

Wako

Phenol red

Wako

骨炭末

関東化学

アラビアゴム末

SIGMA

Phenol red (0.5 mg/ml)、骨炭末(50 mg/ml)、アラビアゴム末(100 mg/ml)を混合して蒸留水に懸濁し、charcoal meal とした。

3) 実験手法

【小腸輸送能の測定】

マウス 5～6 匹を 1 群とした。一晩絶食させたマウスを 9 群に分け、第1群には control として saline を、第2～第5群にはモルヒネ 0.67、2、6 及び 18 mg/kg を、第6～第9群には M6G 0.67、2、6 及び 18 mg/kg をそれぞれ皮下投与した。その

30 分後に charcoal meal を 1 匹あたり 0.2 ml 経口投与した。さらに 30 分後、マウスを頸椎脱臼して、胃と小腸（幽門部から回盲部まで）を摘出した。ここで小腸の全長と、charcoal meal の幽門部からの移動距離を測定し、この移動距離を全長で除して小腸輸送能(%)を算出した。

【胃排出能の測定】

上記の方法で摘出した胃を、蒸留水 5 ml の入った遠沈管に入れてはさみで細切した。蒸留水をさらに 10 ml 加えて、胃内容物が溶液に移行するようにボルテックスでよく攪拌した。その後 3,000 rpm、4℃で 5 分間遠心して、上清 0.8 ml を 1.5 ml マイクロチューブに移し、0.1 N NaOH 0.4 ml を加えてよく攪拌した。そしてそれぞれのサンプルの吸光度（450 nm）をマイクロプレートリーダー Multiskan JX（Thermo Labsystems）で測定し、値が高いほど phenol red の残存量が多い、すなわち胃排出能が低いと判断した。

4) 統計処理

結果は平均値±標準誤差（S.E.）で示した。有意差検定には Dunnett's test または Student's *t* test を用いた。また ED₅₀ 値は、解析ソフト GraphPad Prism4 によって求めた。

2. 結果

小腸輸送能は、モルヒネ群、M6G 群ともに用量依存的に抑制され、0.67 及び 6 mg/kg では M6G の方がモルヒネよりも、有意に強く抑制した。（Fig. 1-1）。また control 群の輸送能を 50%抑制するのに必要な有効用量 ED₅₀ を求めたところ、モルヒネは 2.46 mg/kg、M6G は 0.61 mg/kg となり、その差は 4.03 倍であった。

胃排出能の指標として用いた 450 nm での吸光度は、モルヒネ群、M6G 群ともに 18 mg/kg で control 群に比べて有意な上昇がみられた（Fig. 1-2）。両群間の作用強度には差はみられなかった。

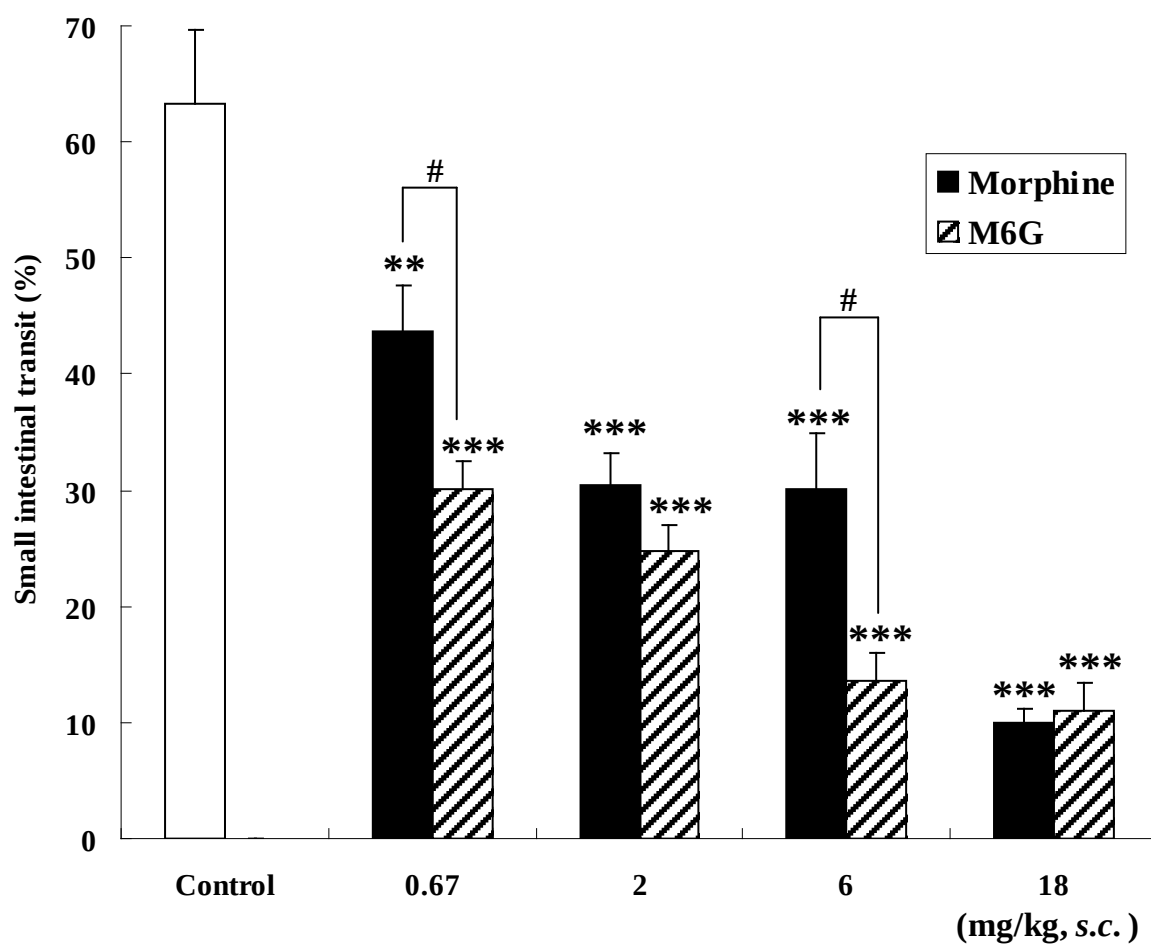


Fig. 1-1 Effects of morphine and M6G on small intestinal transit in mice. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, significantly different from control by Dunnett's test. # $p < 0.05$, significantly different by Student's *t* test.

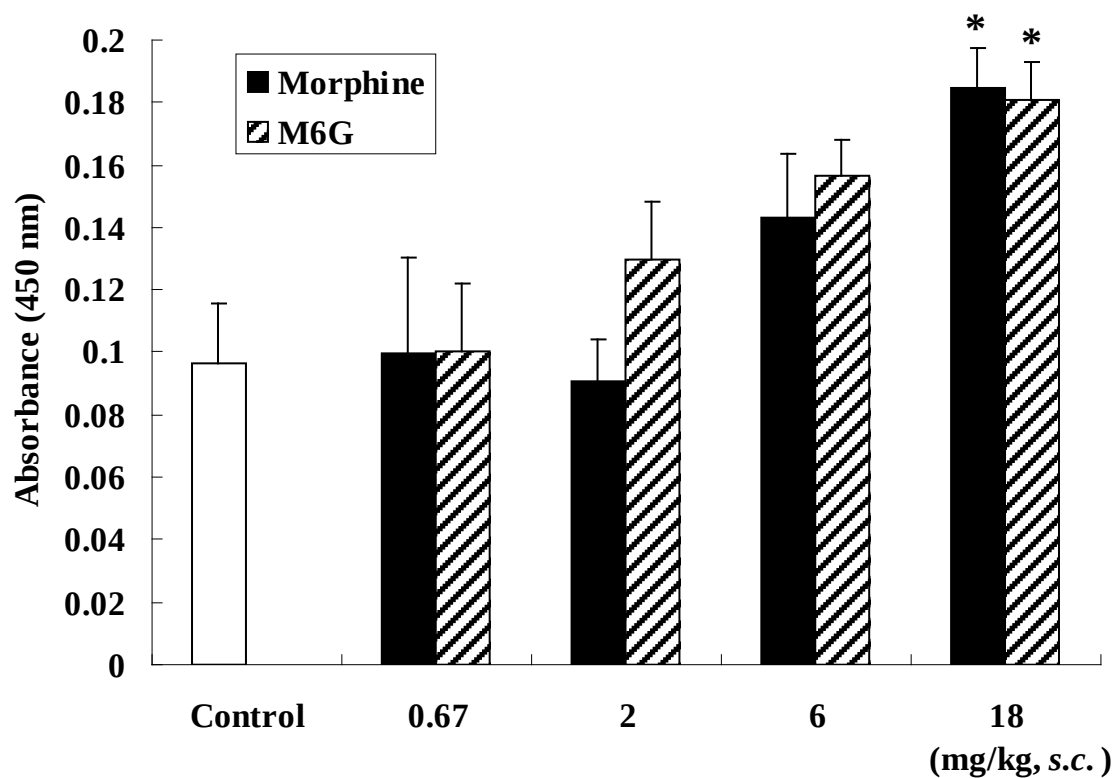


Fig. 1-2 Effects of morphine and M6G on gastric emptying in mice. Concentration of phenol red was used as the index of remaining gastric contents. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=5-6$). * $p<0.05$, significantly different from control by Dunnett's test.

第2項 摘出回腸の電気刺激収縮に対する抑制作用について

オピオイド作用の評価系には、それぞれの受容体タイプが豊富に分布している臓器を選択し、 μ 及び κ 受容体の評価にはモルモット回腸、 δ 受容体の評価にはマウス輸精管がよく用いられる。モルモット回腸では経壁電気刺激を与えると、副交感神経が刺激されて神経終末から ACh が遊離され、収縮反応が誘起される。その神経終末にオピオイド受容体が存在しており、アゴニストが結合すると ACh 遊離を阻害するため、電気刺激収縮は抑制される。そこで本節では、モルヒネや M6G は μ 受容体への親和性が高いことから、モルモット回腸を用いてそのオピオイド作用の強度を比較した。

なお、第1項において小腸輸送能・胃排出能をマウスで検討したことから、当初はマウス回腸を用いた電気刺激実験を試みたが、刺激条件を変えても安定した収縮が得られなかったため、モルモット回腸で検討することにした。

1. 方法

1) 使用動物

5～6週齢の Hartley 系雄性モルモット（日本 SLC）を用いた。恒温（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、恒湿（ $60 \pm 5\%$ ）の動物飼育室で実験日まで飼育した。

2) 栄養液

Krebs-Henseleit solution (mM)

NaCl : 112.08	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O : 1.22
KCl : 5.90	NaHCO ₃ : 25.00
MgCl ₂ · 6H ₂ O : 1.18	Glucose : 11.49
CaCl ₂ · 2H ₂ O : 1.97	

3) 使用薬物（下記以外のものは第1章第1節第1項に従った）

Naloxone hydrochloride dehydrate SIGMA

上記の薬物は蒸留水に溶解した。

ネンブタール注射液

大日本製薬

4) 実験手法

【標本作製】

モルモットにネンブタール注射液 (50 mg/kg, *i.p.*) で麻酔をかけた後、開腹、瀉血し、回盲部より 5 cm を除いて回腸を摘出した。次にゾンデを付けたシリンジで、37°C に保温した栄養液を腸管内に注入し、腸の内容物を排出させた。その後、栄養液を満たし、95% O₂、5% CO₂ を通気したビーカーに 15 分ほど静置した。

そして、腸の下端から長さ約 15 mm の縦走筋標本を作製し、白金 needle-ring 電極に取り付けた。この標本を、栄養液 5 ml を入れて通気し、37°C に保温したオーガンバス内に懸架し、1.0 g の張力を負荷した。その状態で約 1 時間安定化させた後、電気刺激、薬物投与を行った。

【刺激条件・測定法】

刺激装置 (SEN-2201、日本光電) を用いて、voltage : 110 V、duration : 0.1 ms、frequency : 0.2 Hz の条件で刺激し、収縮反応は isometric (等尺性) transducer (TB-611T, TB-612T、日本光電)、さらに増幅器 (AP-621G、日本光電) を介してペンレコーダーに記録した。

【薬物投与】

電気刺激収縮が安定した後、モルヒネまたは M6G の累積投与 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-4}$ M) を行った。その後、naloxone の累積投与 ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ M) を行った。

5) 統計処理

結果は、薬物投与前の収縮に対する抑制率を % で表し、平均値 ± 標準誤差 (S.E.) で示した。また IC₅₀ 値は、解析ソフト GraphPad Prism4 によって求めた。

2. 結果

モルヒネ及び M6G の曝露により電気刺激収縮は抑制され、この抑制は naloxone の添加によって回復した (Fig. 1-3, 1-4)。IC₅₀ 値はモルヒネ : 8.9×10^{-6} M、M6G : 11×10^{-6} M となり、両者の作用強度に有意な差はみられなかった。

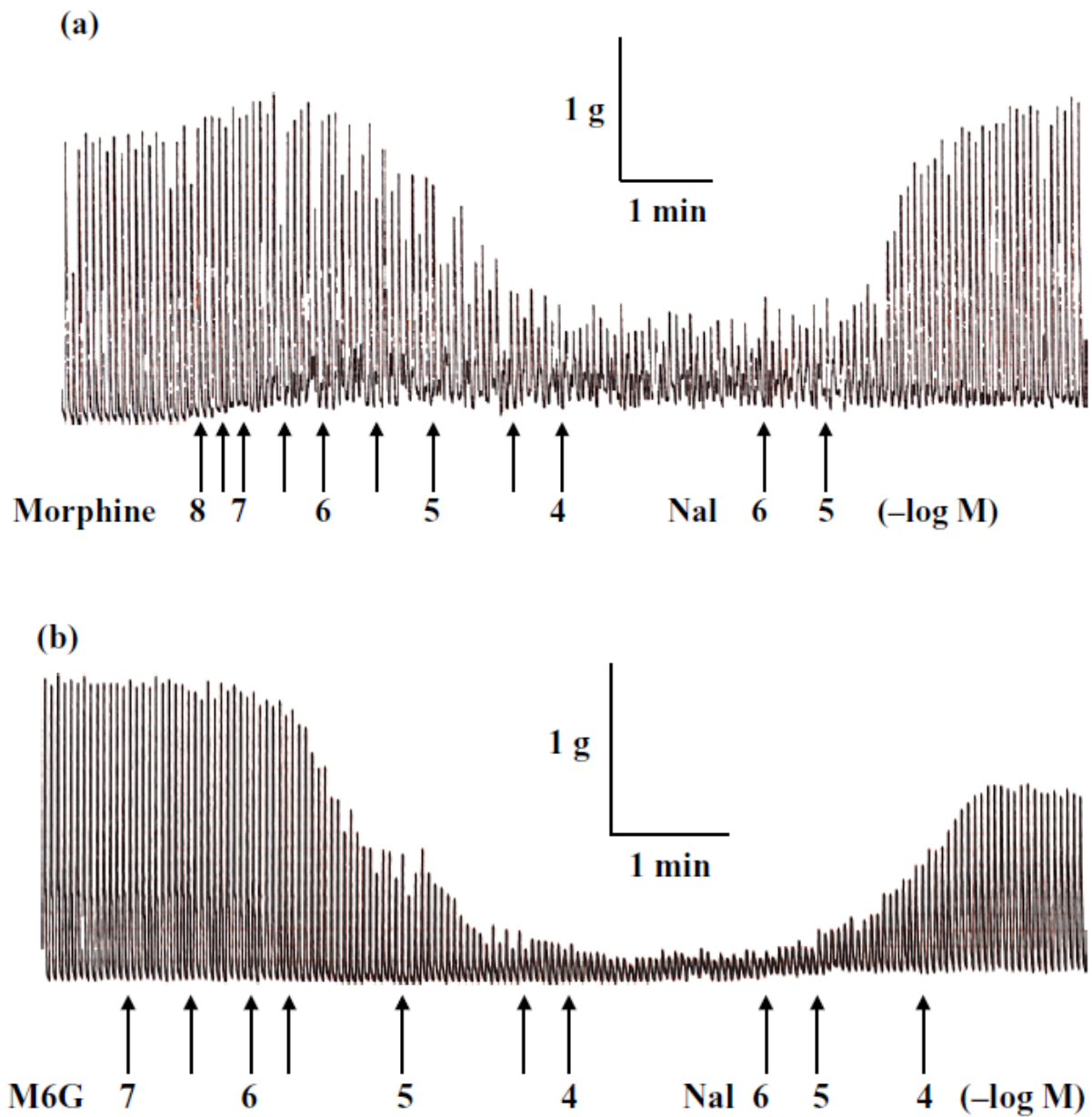


Fig. 1-3 Typical recordings of inhibitory effects of (a) morphine and (b) M6G on electrically stimulated contraction in longitudinal muscle of the guinea pig ileum.

Nal: Naloxone

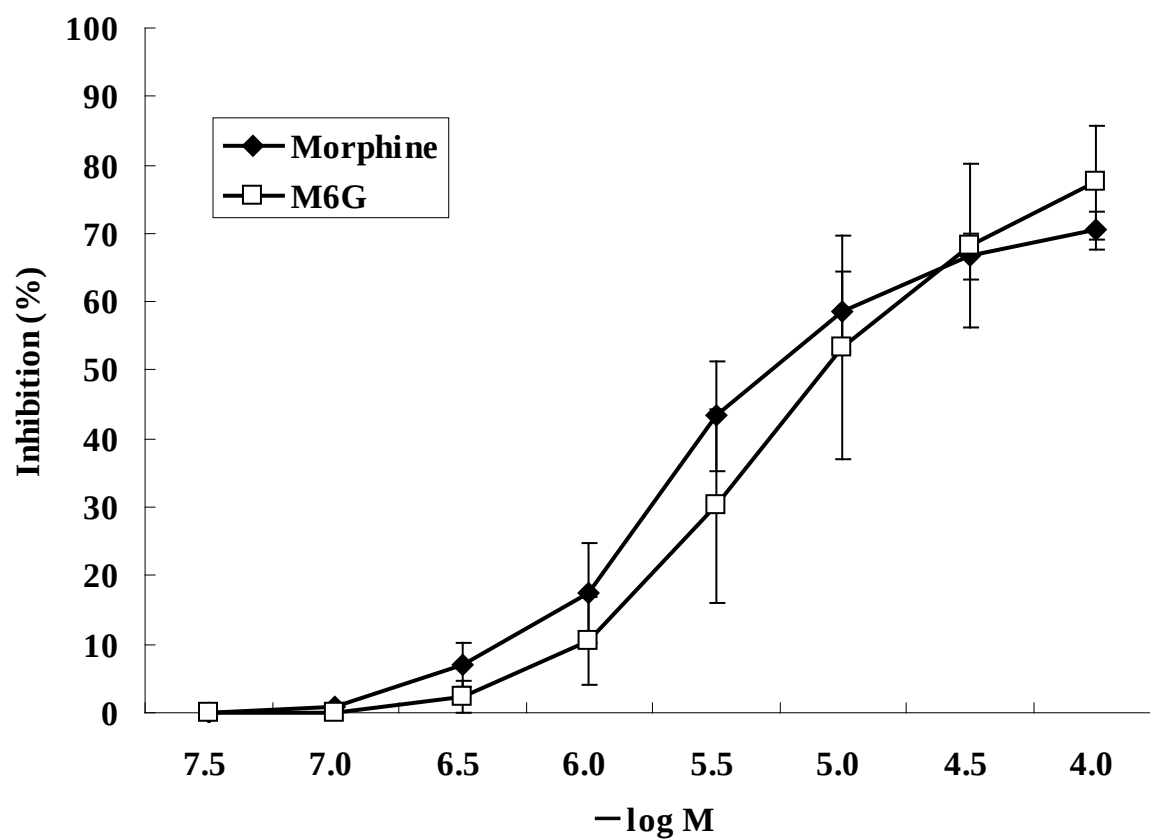


Fig. 1-4 Inhibitory effects of morphine and M6G on electrically stimulated contraction in longitudinal muscle of the guinea pig ileum. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=5$).

第3項 摘出回腸における収縮作用について

1. 方法

1) 使用動物

5～8週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を用いた。恒温（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、恒湿（ $60 \pm 5\%$ ）の動物飼育室で実験日まで飼育した。

2) 栄養液

第1章第1節第2項に従った。

3) 使用薬物（下記以外のものは第1章第1節第1、2項に従った）

Acetylcholine chloride (ACh)

SIGMA

Morphine hydrochloride

大日本製薬、武田薬品

Morphine-3-glucuronide (M3G)

独立行政法人国立病院機構北海道がんセンターより譲受

上記の薬物は蒸留水に溶解して用いた。

4) 実験手法

【標本作製】

マウスの頸動脈を切断して瀉血後、速やかに開腹し、回盲部より 5 cm を除いて回腸を摘出した。次にゾンデを付けたシリンジで、 37°C に保温した栄養液を腸管内に注入し、腸の内容物を排出させた。その後、栄養液を満たし、95% O_2 、5% CO_2 を通気したビーカーに 15 分ほど静置した。

そして回腸の下端から、回腸縦走筋（長さ約 8 mm）と回腸輪状筋（幅約 5 mm）の標本作製した。この標本を、栄養液 5 ml を入れて通気し、 37°C に保温したオーガンバス内に懸架し、縦走筋には 0.5 g、輪状筋には 0.2 g の張力を負荷した。その状態で約 1 時間安定化させた後、薬物投与を行った。

【測定法】

収縮反応は、縦走筋は isotonic（等張性）transducer（TD-111T、日本光電）、さらに増幅器（AD-632J、日本光電）を介して、輪状筋は isometric（等尺性）transducer（TB-611T, TB-612T、日本光電）、さらに増幅器（AP-621G、日本光電）を介してペンレコーダーに記録した。

【薬物投与】

ACh 1×10^{-6} M を 15 分おきに 2~3 回投与して腸管の反応性を安定化させた後、モルヒネ、M6G 及び M3G の累積投与 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-4}$ M) を行った。その後、naloxone の累積投与 ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ M) を行った。

5) 統計処理

縦走筋での結果は、ACh 1×10^{-6} M の収縮を 100% として各収縮を%で表し、輪状筋での結果は、収縮を張力の絶対値 (g) として表し、平均値±標準誤差 (S.E.) で示した。また、有意差検定には Student's *t* test または Aspin-Welch *t* test を用いた。

2. 結果

回腸縦走筋に対してモルヒネを投与した際、47 例中 21 例で収縮がみられた。ただし、半分以上の標本では収縮がみられず、収縮のみられた標本でもその大きさは ACh 1×10^{-6} M による収縮の 10% 以下であった (data not shown)。

回腸輪状筋に対してモルヒネを投与すると、緩やかに base line が上昇し、持続的な収縮作用がみられた (Fig. 1-5a)。M6G によっても、同様の持続的な収縮反応がみられた (Fig. 1-5b)。両者の収縮強度を比較すると、 3×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 3×10^{-6} 及び 3×10^{-5} M にて、M6G の方がモルヒネよりも有意に収縮が大きかった (Fig. 1-6)。一方、M3G は 1×10^{-4} M でのみ弱い収縮作用を示した (Fig. 1-5c)。またこれらの収縮はすべて、naloxone によって抑制された (Fig. 1-5)。

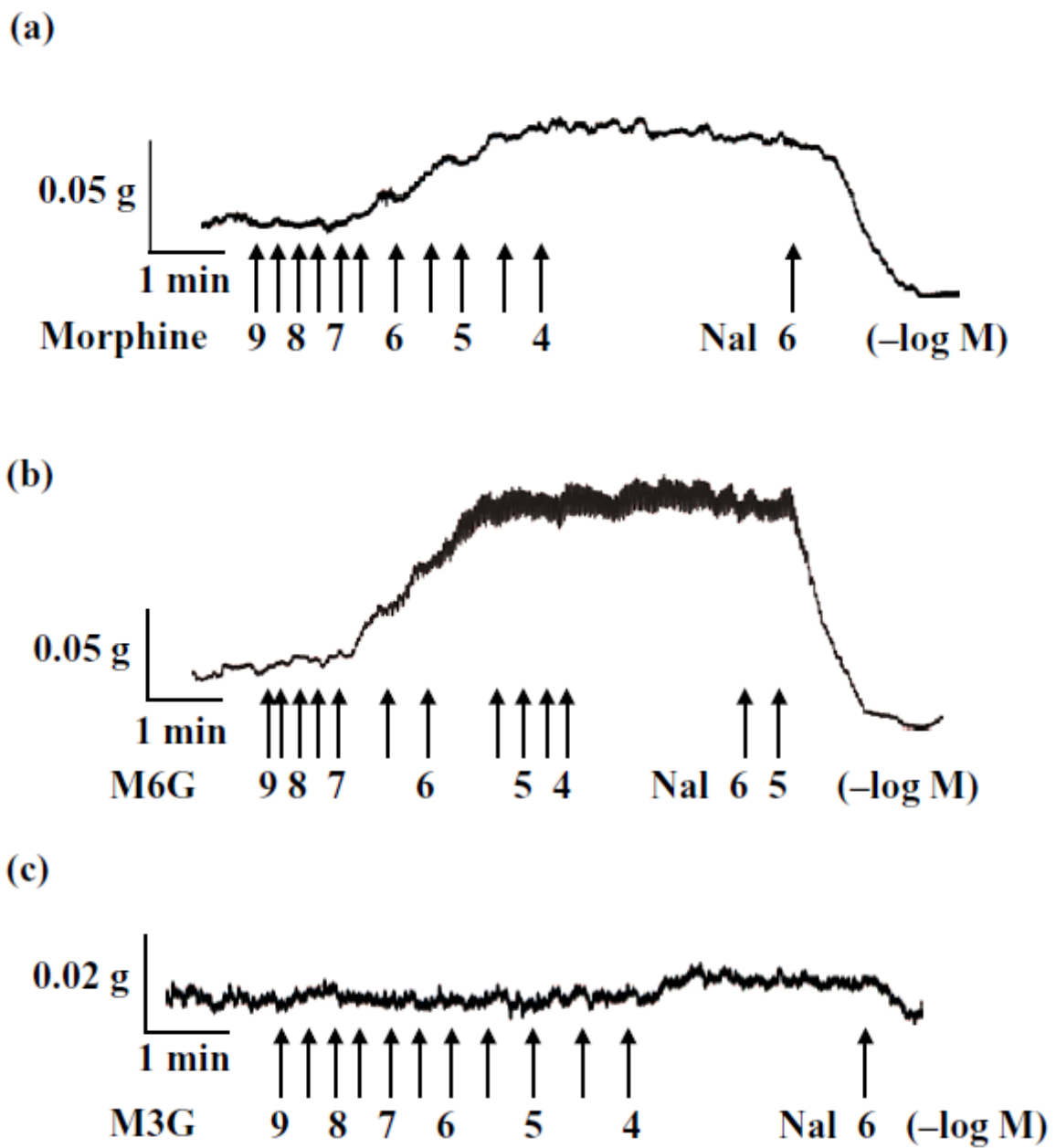


Fig. 1-5 Typical recordings of contractile effects of (a) morphine, (b) M6G, and (c) M3G in circular muscles of the mouse ileum.

Nal: Naloxone

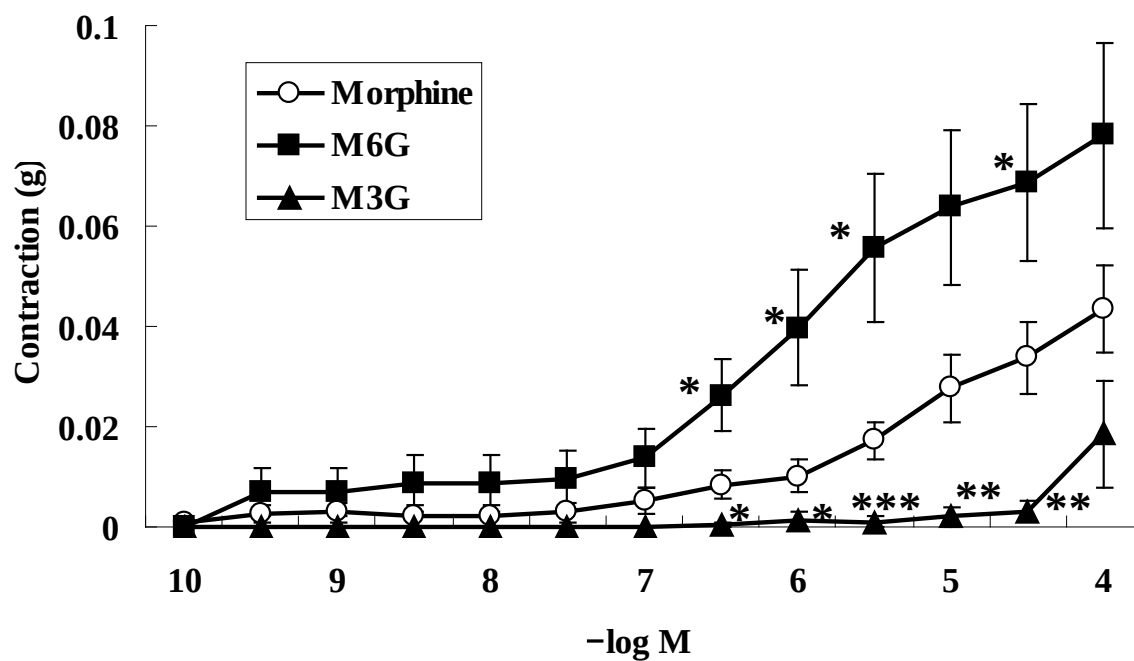


Fig. 1-6 Contractile effects of morphine, M6G, and M3G in circular muscles of the mouse ileum. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-15$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$, significantly different from morphine by Student's t test or the Aspin-Welch t test.

考察

第1項では、M6Gによってマウス小腸輸送能が用量依存的に抑制されたことから、代謝物のM6Gがモルヒネ誘発便秘に寄与していることが示唆された。また抑制作用のED₅₀がM6Gの方がモルヒネよりも4.03倍小さかったことから、M6Gの方が輸送能を強く抑制し、便秘を起こしやすいと推測された。また胃排出能の検討において、charcoal meal中のphenol redに由来する吸光度がモルヒネ及びM6Gともに18 mg/kgにてcontrol群に比べて有意に上昇し、胃排出能が抑制される結果となった。すなわち、M6Gもモルヒネと同様に、胃排出能抑制作用を持つことが示された。

第2項では、モルヒネ及びM6Gともに用量依存的に、回腸縦走筋の電気刺激収縮を抑制することが観察され、また、抑制された収縮がオピオイド受容体アンタゴニストのnaloxoneによって回復した。このことから、M6Gがオピオイド受容体を介して、ACh遊離抑制作用を示したことが確認された。副交感神経の刺激によって縦走筋が収縮すると、腸管の内容物は肛門側へと移行すると考えられる。よって、モルヒネやM6Gによる縦走筋収縮の抑制作用は、便秘の誘発に一部寄与していると推測される。

第3項では、第2項の電気刺激条件下とは異なり、非刺激下における作用を検討した。その結果、回腸輪状筋において、モルヒネ、M6G及びM3Gによって持続的な収縮反応が引き起こされることが明らかとなった。また、naloxoneによって収縮が抑制されたことから、これらの収縮作用がオピオイド受容体を介していることも示された。これまでに摘出腸管がモルヒネによって収縮したという報告は、ラット結腸縦走筋(41, 42)やモルモット回腸輪状筋(43, 44)、モルモット結腸輪状筋(45)などでなされている。マウス腸管では、結腸縦走筋での報告(46)はあるが、他の標本についてはまだない。

ここで、モルヒネによる回腸輪状筋の収縮反応と便秘発生との関連性について考察を行う。消化管の蠕動運動は内容物より口腔側の輪状筋が収縮し（ascending contraction）、肛門側の輪状筋が弛緩する（descending relaxation）ことによって機能する。Ivancheva らはこの下行性弛緩が内因性オピオイドであるMet-enkephalinによって抑制されたと報告している(47)。よって、モルヒネも同様にオピオイド受容体を介して、肛門側の輪状筋を収縮させる、すなわち弛緩を抑制することで蠕動運動を阻害し、便秘を引き起こしている可能性が考えられた。また、輪状筋の持続的な収縮は消化管の狭窄をもたらし、その結果、内容物の通過を妨げ

ているとも推測された。

今回の検討では、**M6G**の方がモルヒネよりも輪状筋収縮作用が有意に大きいことが示され、この差が、**M6G**による小腸輸送能抑制作用がモルヒネによる抑制作用よりもやや強かった原因である可能性が示唆された。

モルヒネと**M6G**で、回腸輪状筋収縮作用の強度に差異が生じた原因の一つとして、 μ 受容体のサブタイプの関与が考えられた。 μ 受容体には μ_1 と μ_2 のサブタイプが知られており、オピオイド受容体アンタゴニストの **naloxonazine** で拮抗される受容体を μ_1 、拮抗されないものを μ_2 と区別している。これまでの報告で、 μ_1 は脊髄より上位での鎮痛に、 μ_2 は脊髄での鎮痛に加え呼吸抑制や便秘作用に関わっているとされている(48-50)。どちらのサブタイプに対しても、モルヒネの方が**M6G**よりも親和性は1.9～5.4倍高いといわれている(16, 51)。

これまでにモルヒネと**M6G**の作用態度の違いについて、興味深い報告が数多くなされている。モルヒネ耐性モデルマウスに**M6G**を投与したところ鎮痛作用が現れたことから、モルヒネと**M6G**の間に交差耐性は形成されていないことになり、両者が結合する μ 受容体はサブタイプのレベルで異なることが推測された(52)。遺伝的に μ_1 受容体が欠損している **CXBK** マウスによる鎮痛活性の検討では、**wild type**のマウスと比較して、モルヒネの鎮痛作用は大きく抑制されるが、**M6G**の作用には変化が見られなかった(52)。そのため**M6G**は μ_1 受容体以外の受容体を介して鎮痛作用を発現していたと推測された。また、 μ 受容体には少なくとも15種類のスプライスバリエントが知られている(53)。これに関しても、**exon 1**が欠損しているとモルヒネの鎮痛が消失し、一方**exon 2**が欠損していると**M6G**の鎮痛が抑制されると報告されており(52, 54)、やはりモルヒネと**M6G**の作用する受容体サブタイプが異なることが推測された。どのスプライスバリエントが μ_1 、 μ_2 に対応するかはまだ明らかではないが、一部では研究が始められている(55)。

Paulらの報告では、主に μ_1 受容体が関与する脳室内投与(*i.c.v.*)の場合と、 μ_2 受容体が関与する脊髄くも膜下腔内投与(*i.t.*)の場合とで鎮痛作用を比較すると、モルヒネは両方で活性が同程度なのに対して、**M6G**では*i.t.*の方が約5倍強い鎮痛作用を示した(16)。この結果から、**M6G**では μ_2 受容体を介する作用発現がより強いことが推測された。そして消化管運動に主に関与しているのは μ_2 受容体であることから、**M6G**の方が腸管運動により強く作用を及ぼした可能性が考えられた。

一方、今回の検討で**M3G**による輪状筋の収縮は、高濃度側でのみ観察され、またその収縮強度も小さかった。したがって、モルヒネや**M6G**に比べると**M3G**は消化管への作用が弱いことが示唆された。

第2節 モルヒネの摘出腸管における収縮作用機序の解析

消化管平滑筋は、副交感神経の刺激により収縮し、交感神経の刺激により弛緩すると考えられていた。しかし、胃平滑筋の電気刺激による弛緩がノルエピネフリン遊離抑制薬の存在下でも認められたことから(56)、抑制性の非アドレナリン非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic; NANC) 神経の存在が考えられた。さらに後の研究で、抑制性 NANC 神経の伝達物質として、NO、VIP および ATP などが同定され(57)、中でも NO は最も重要な伝達物質の一つと考えられている。

NO は L-arginine を基質として NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) によってつくられ、その際 L-citrulline も生じる。消化管の筋層間神経叢において、神経細胞体や神経線維に神経型 NOS (neuronal NOS; nNOS) が豊富に存在していることが確認され(58-60)、マウス摘出胃では電気刺激による弛緩が NOS 阻害薬によって消失することや、外来性の NO によって弛緩が生じることが報告された(61)。この弛緩反応では、まず、NANC 神経の興奮により活性化された nNOS が NO を合成し、それが神経終末から遊離される。そして、平滑筋細胞膜を透過した NO が細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP を増加させることによって平滑筋が弛緩する。管腔臓器の緊張を精細に調節するためには、収縮神経以外に積極的に拡張させる機構が必要となり、NO などを伝達物質とする NANC 神経は重要な働きを担っている。

また、プロスタグランジン (PG) も消化管平滑筋に対する作用をもっている。PG はその種類によって作用が異なり、PGE₂ や PGF_{2α} は腸管平滑筋を収縮させることが知られている(62)。その収縮が、tetrodotoxin (TTX) やムスカリン受容体遮断薬によって完全には抑制されなかったことから、PG の収縮作用にはコリン作動性神経を介したものと、平滑筋直接作用によるものがあることが示唆された。一方で、PGI₂ は結腸の自動運動を抑制することが報告されている(63)。

一方で、Fox らはイヌ小腸輪状筋を用いた検討で、静止状態ではモルヒネによって収縮が起こり、電気刺激で収縮を起こしている状態ではモルヒネによってその収縮が抑制されることを示しており(64)、モルヒネの腸管に対する作用態度は、刺激下と非刺激下とで差異があると考えられる。

腸管に対するモルヒネの収縮作用の機序は、これまでも調べられており、セロトニンの遊離促進(41, 42, 65, 66)や NO の遊離阻害(43)によるという報告がある。また atropine (66, 67)や indomethacin (46)によってモルヒネ収縮が抑制され、アドレナリン受容体遮断薬には影響を受けなかったという報告がある(46)。しかし、

atropine (41, 42, 46)やセロトニン受容体遮断薬(46)がモルヒネ収縮に影響しなかったという報告もあり、統一した見解は得られていない。

また、腸管神経系におけるオピオイド受容体の分布には種差の存在が知られており、免疫染色法(29, 30)以外に、それぞれの受容体タイプ選択的なアゴニスト、アンタゴニストを用いた方法で調べられている。その一つとして、摘出回腸の電気刺激収縮に対するアゴニストの抑制作用を比較する方法があり、マウスでは δ と κ 、モルモットでは μ と κ (68)、ラットでは μ と δ (69)受容体が多く分布していると報告されている。これと一致する事象として、モルモットの場合、蠕動運動(70)や小腸輸送能(38)が μ あるいは κ 受容体アゴニストでは抑制されるが、 δ 受容体アゴニストでは抑制されないという報告がある。

第1節第3項では、モルヒネによるマウス回腸輪状筋の収縮作用を示した。第2節ではまず、マウス結腸の縦走筋及び輪状筋に対するモルヒネの作用を検討した。そこで得られたモルヒネの腸管収縮作用について、第1項では、オピオイド受容体タイプ選択的なアンタゴニストを用いて、収縮作用に関与している受容体タイプを検討した。そして第2項では、モルヒネの収縮機序を検討するため、tetrodotoxin、NOS 阻害薬の L-NNA、atropine 及び indomethacin を用いて実験を行った。

第1項 オピオイド受容体タイプ選択性の検討

1. 方法

1) 使用動物

5～8週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を用いた。恒温（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、恒湿（ $60 \pm 5\%$ ）の動物飼育室で実験日まで飼育した。

2) 栄養液

第1章第1節第2項に従った。

3) 使用薬物（下記以外のものは第1章第1節第2、3項に従った）

Morphine hydrochloride	武田薬品
Cyprodime hydrobromide（ μ 受容体アンタゴニスト）	SIGMA
Naltrindole hydrochloride（ δ 受容体アンタゴニスト）	SIGMA
nor-Binaltorphimine (nor-BNI)（ κ 受容体アンタゴニスト）	SIGMA

Cyprodime は DMSO に溶解後、蒸留水で希釈した。

その他の薬物は蒸留水に溶解した。

4) 実験手法

【標本作製】

マウスの頸動脈を切断して瀉血後、速やかに開腹して、回盲部より 5 cm を除いて回腸を摘出し、さらに盲腸の先にある結腸も摘出した。次にゾンデを付けたシリンジで、 37°C に保温した栄養液を腸管内に注入し、腸の内容物を排出させた。その後、栄養液を満たし、95% O_2 、5% CO_2 を通気したビーカーに 15 分ほど静置した。

そして、回腸の下端から回腸輪状筋（幅約 5 mm）の標本作製した。さらに結腸のうち、腸管がくびれているペースメーカー領域よりも肛門側の distal colon の部分から、結腸縦走筋（長さ約 8 mm）と結腸輪状筋（幅約 5 mm）の標本作製した。これらの標本を、栄養液 5 ml を入れて通気し、 37°C に保温したオーガンバス内に懸架し、縦走筋には 0.5 g、輪状筋には 0.2 g の張力を負荷した。その状態で約 1 時間安定化させた後、薬物投与を行った。

【測定法】

第1章第1節第3項に従った。

【薬物投与】

ACh 1×10^{-6} M を15分おきに2～3回投与して腸管の反応性を安定化させた後、モルヒネの累積投与 ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ M)、またはモルヒネの単回投与を行った。モルヒネ単回投与の濃度としては、結腸縦走筋・結腸輪状筋では 1×10^{-5} M、回腸輪状筋では 1×10^{-6} M を用いた。

アンタゴニストを用いる実験では、はじめにモルヒネを単回投与してその収縮を測定し、wash して20分後に、naloxone, cyprodime, naltrindole または nor-BNI (3×10^{-7} , 1×10^{-6} , 3×10^{-6} または 1×10^{-5} M) を前投与し、3分後にモルヒネを投与して収縮を測定した。

5) 統計処理

結果は、各アンタゴニスト投与前のモルヒネ収縮を100%として、投与後のモルヒネ収縮を%で表し、平均値±標準誤差 (S.E.) で示した。また、有意差検定には Aspin-Welch *t* test を用いた。

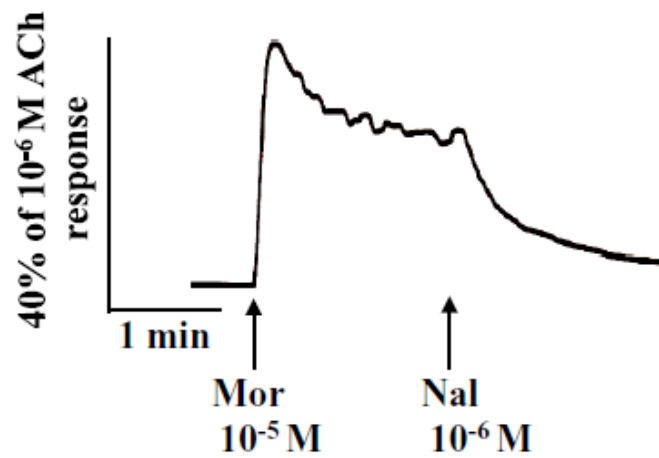
2. 結果

モルヒネを単回投与したときの典型チャートを Fig. 1-7 に示した。回腸輪状筋と同様に、結腸縦走筋、結腸輪状筋でも、モルヒネによって持続的な収縮反応を示した。結腸縦走筋では、モルヒネ投与後に ACh 収縮に類似した素早いピークの上昇がみられた。それらの収縮は naloxone によって抑制された。またモルヒネを累積投与すると、用量依存的に収縮が増強した (Fig. 1-8)。

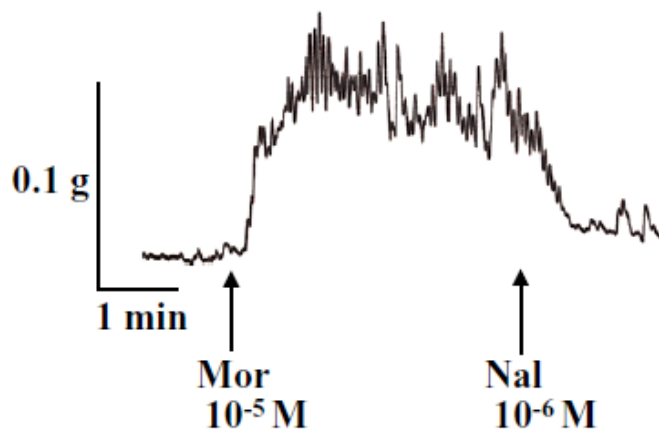
結腸縦走筋では、naloxone の前投与によってモルヒネ収縮は83%抑制された。また、 μ 受容体アンタゴニスト cyprodime 10 μ M で49%、 δ 受容体アンタゴニスト naltrindole 3 μ M で37%、 κ 受容体アンタゴニスト nor-BNI 3 μ M で74%抑制された (Fig. 1-9a)。

結腸輪状筋では、naloxone によってモルヒネ収縮は86%抑制された。また、cyprodime 10 μ M で71%、naltrindole 0.3 μ M で38%、nor-BNI 3 μ M で42%抑制された (Fig. 1-9b)。回腸輪状筋では、naloxone によってモルヒネ収縮は78%抑制された。また、cyprodime 3 μ M で73%、naltrindole 3 μ M で48%、nor-BNI 3 μ M で74%抑制された (Fig. 1-9c)。

(a) Longitudinal muscle of distal colon



(b) Circular muscle of distal colon



(c) Circular muscle of ileum

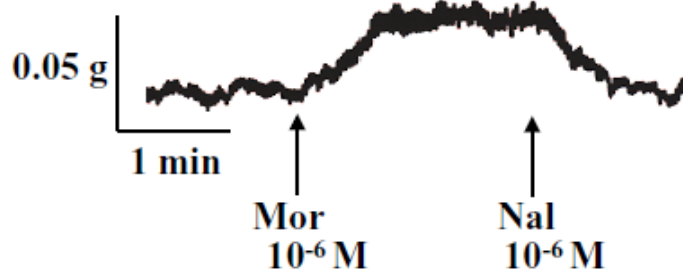
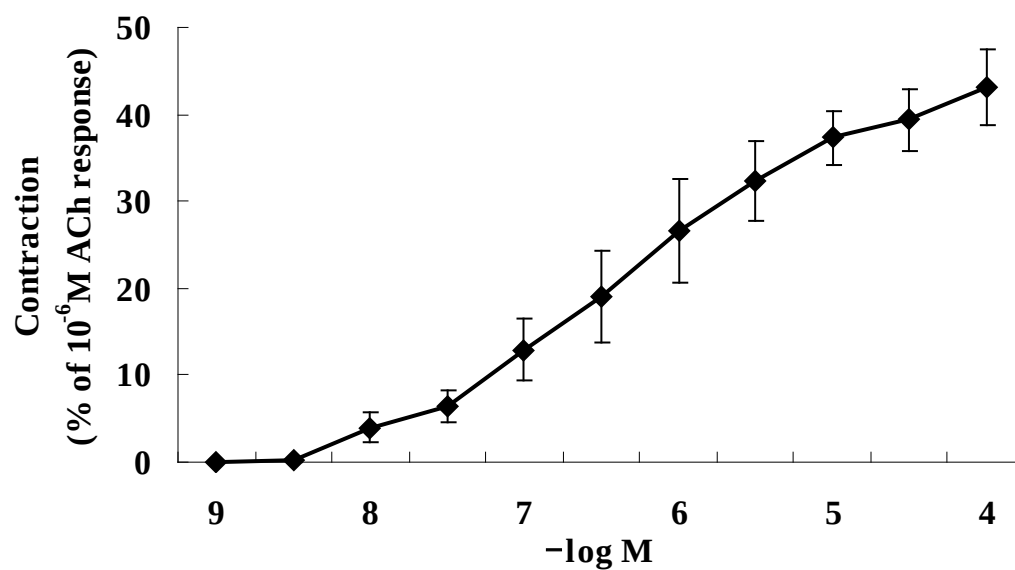


Fig. 1-7 Typical recordings of morphine (Mor)-induced contraction in (a) longitudinal and (b) circular muscles of the mouse distal colon and (c) circular muscle of the mouse ileum.

ACh: Acetylcholine, Nal: Naloxone

(a) Longitudinal muscle of distal colon



(b) Circular muscle of distal colon

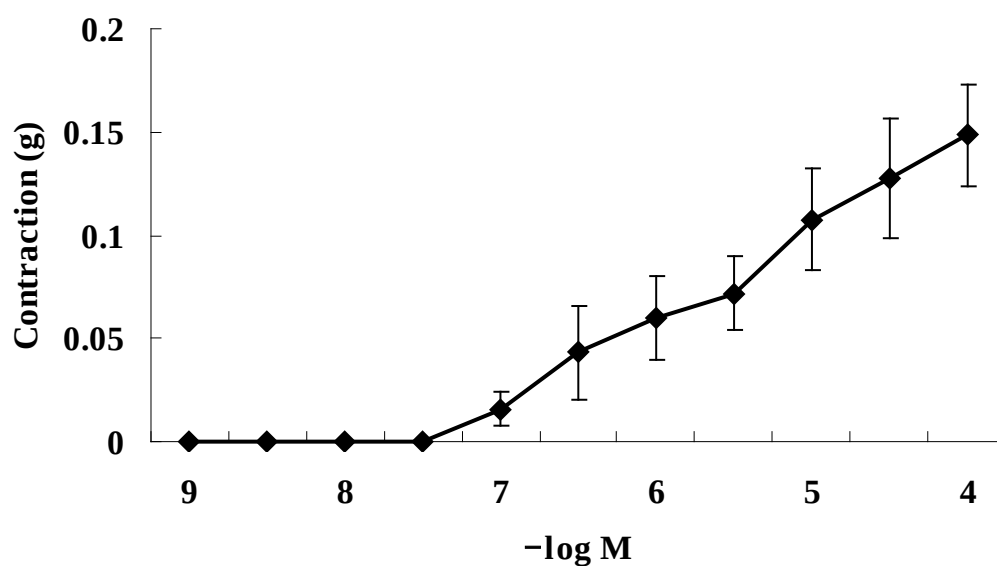


Fig. 1-8 Contractile effects of morphine in (a) longitudinal and (b) circular muscles of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$).
ACh: Acetylcholine

(a) Longitudinal muscle of distal colon

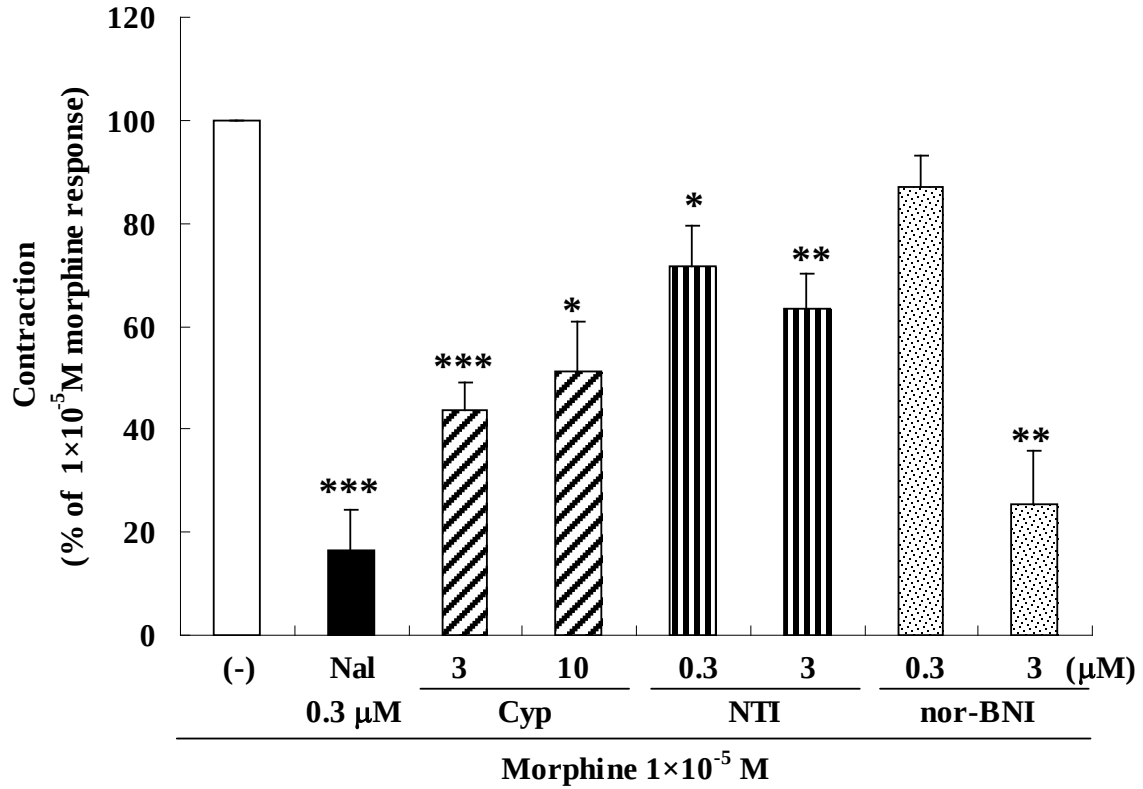


Fig. 1-9 (a) Effects of naloxone (Nal), cyprodime (Cyp), naltrindole (NTI), and nor-BNI on morphine (1×10^{-5} M)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test.

(b) Circular muscle of distal colon

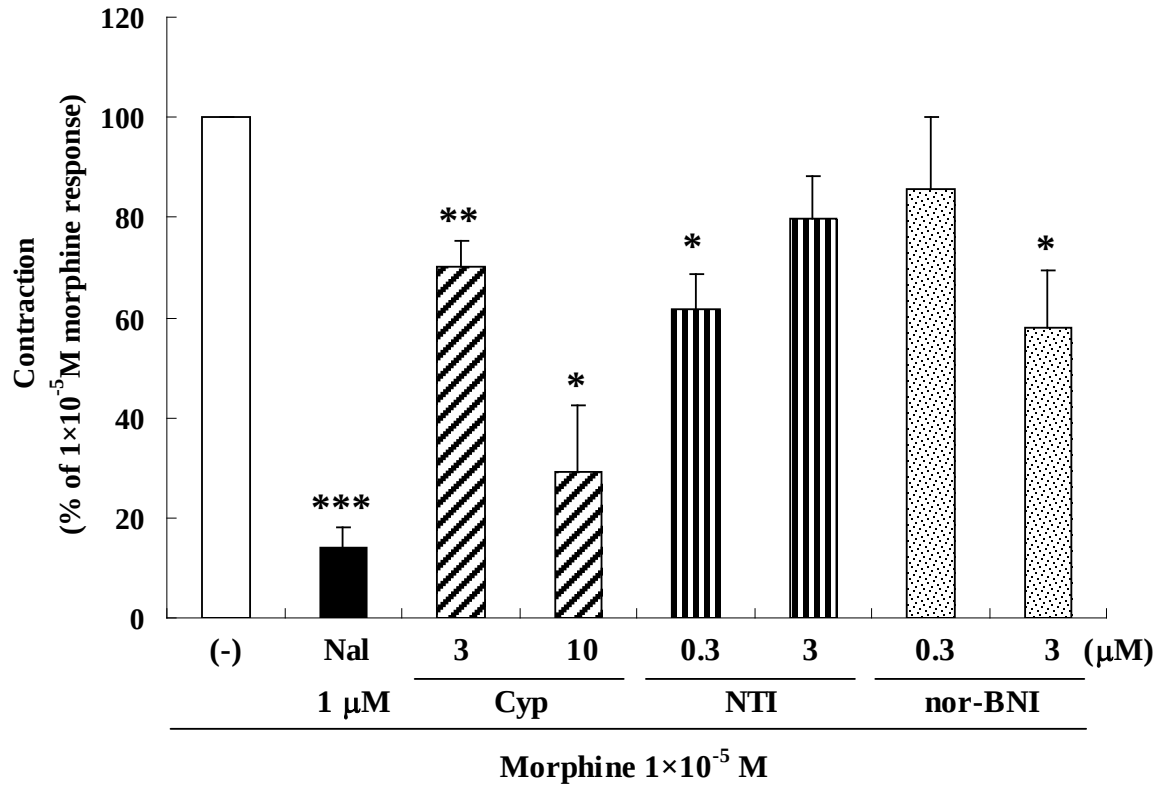


Fig. 1-9 (b) Effects of naloxone (Nal), cyprodime (Cyp), naltrindole (NTI), and nor-BNI on morphine (1×10^{-5} M)-induced contraction in circular muscle of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test.

(c) Circular muscle of ileum

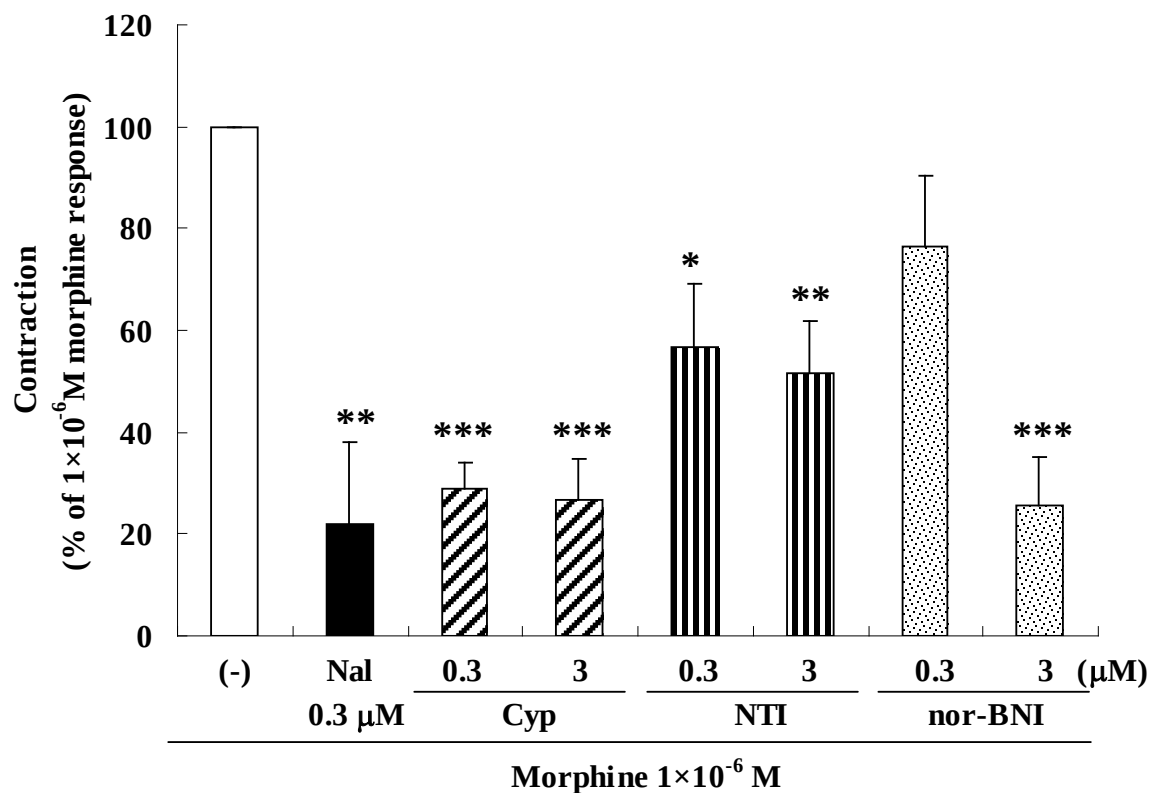


Fig. 1-9 (c) Effects of naloxone (Nal), cyprodime (Cyp), naltrindole (NTI), and nor-BNI on morphine (1×10^{-6} M)-induced contraction in circular muscle of the mouse ileum. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test.

第2項 モルヒネによる収縮作用機序の検討

1. 方法

1) 使用動物

5～8週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を用いた。恒温（ $24\pm1^{\circ}\text{C}$ ）、恒湿（ $60\pm5\%$ ）の動物飼育室で実験日まで飼育した。

2) 栄養液

第1章第1節第2項に従った。

3) 使用薬物（下記以外のものは第1章第1節第3項に従った）

Morphine hydrochloride	武田薬品
Tetrodotoxin (TTX)	Wako
Atropine sulfate	SIGMA
Indomethacin	SIGMA
$\text{NG-nitro-L-arginine}$ (L-NNA ; NOS 阻害薬)	SIGMA
L-Arginine hydrochloride (L-Arg)	SIGMA
D-Arginine hydrochloride (D-Arg)	SIGMA

Indomethacin は ethanol に溶解後、Krebs-Henseleit 液で希釈した。
その他の薬物は蒸留水に溶解した。

4) 実験手法

【標本作製、測定法】

第1章第2節第1項に従った。

【薬物投与】

モルヒネ単回投与の濃度として、結腸縦走筋・結腸輪状筋では 1×10^{-5} M、回腸輪状筋では 1×10^{-6} M を用いた。

はじめにモルヒネを単回投与してその収縮を測定した。Wash して 20 分後に、TTX 1×10^{-6} M、atropine 3×10^{-7} M、indomethacin 2×10^{-5} M または L-NNA 1×10^{-4} M を前投与し、TTX と atropine では 3 分後、indomethacin では 20 分後、L-NNA では 5 分後にモルヒネを投与して収縮を測定した。

加えて、阻害剤を複数併用する検討として、モルヒネ投与の 20 分前に indomethacin、5 分前に L-NNA を前投与した場合と、その 2 種に加えて 3 分前に atropine を前投与した場合のモルヒネ収縮を測定した。

また、L-Arg と D-Arg を用いた検討として、L-Arg または D-Arg 8×10^{-3} M をまず投与して、その 5 分後に L-NNA 1×10^{-4} M を投与し、さらに 5 分後にモルヒネを投与して収縮を測定した。

5) 統計処理

結果は、各阻害剤投与前のモルヒネ収縮を 100% として、投与後のモルヒネ収縮、または阻害剤単独での収縮を % で表し、平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) で示した。また、有意差検定には Student's *t* test または Aspin-Welch *t* test を用いた。

2. 結果

結腸縦走筋では、TTX を投与すると base line の上昇がみられた (Fig. 1-10a, Table 1-1)。さらにモルヒネを加えると、それ以上はほとんど収縮せず、モルヒネ収縮は 94% 抑制された (Fig. 1-12a)。NOS 阻害薬の L-NNA を前投与すると同様の base line の上昇がみられ (Fig. 1-10b, Table 1-1)、モルヒネ収縮は 44% 抑制された (Fig. 1-12a)。また indomethacin によっても有意に抑制され (48%)、atropine では抑制される傾向がみられた (17%; $p=0.087$) (Fig. 1-12a)。Indomethacin と L-NNA を併用すると、モルヒネ収縮は 80% 抑制され、さらに atropine も加えておくと 96% 抑制された (Fig. 1-11, 1-12a)。

結腸輪状筋と回腸輪状筋の場合も、TTX および L-NNA を前投与すると base line が上昇した (Table 1-1)。結腸輪状筋では、TTX によりモルヒネ収縮はほぼ消失し (92%)、L-NNA によって 42% 抑制された。また atropine (33%)、indomethacin (50%) によってもモルヒネ収縮は有意に抑制された (Fig. 1-12b)。回腸輪状筋では、TTX によってモルヒネ収縮は完全に抑制され、L-NNA により 88% 抑制された。また atropine によって有意に抑制され (32%)、indomethacin では抑制される傾向がみられた (42%; $p=0.082$) (Fig. 1-12c)。

結腸縦走筋では、NO 合成の基質となる L-Arg と、その異性体 D-Arg を用いた検討も行った。L-Arg を前投与しておく、L-NNA を加えても base line は上昇せず (Fig. 1-13a)、モルヒネ収縮も変化しなかった (Fig. 1-14)。一方、D-Arg を前投与すると、L-NNA によって base line は上昇し (Fig. 1-13b)、モルヒネ収縮は 51% 抑制された (Fig. 1-14)。

Table 1-1 Contractile effects of TTX (1×10^{-6} M) and L-NNA (1×10^{-4} M) in longitudinal and circular muscles of the mouse distal colon and circular muscle of the mouse ileum.

	TTX	L-NNA
Longitudinal muscle of distal colon	128 ± 9	54 ± 10 ***
Circular muscle of distal colon	225 ± 25	65 ± 4 **
Circular muscle of ileum	115 ± 14	197 ± 48

(% of morphine response)

Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-6$). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, significantly different from TTX group by Student's t test or Aspin-Welch t test.

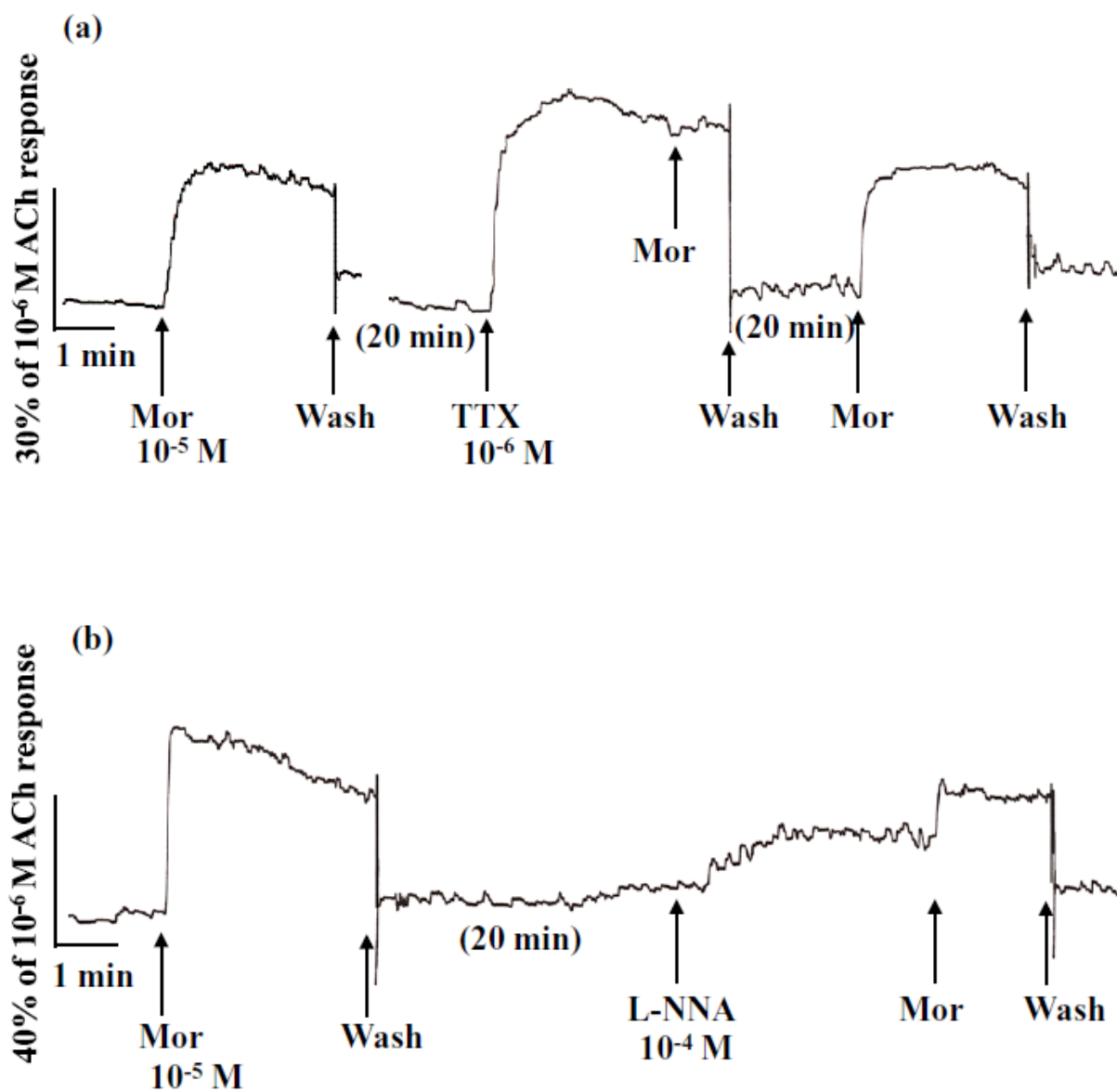


Fig. 1-10 Typical recordings of effects of (a) tetrodotoxin (TTX) and (b) L-NNA on morphine (Mor)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon.

ACh: Acetylcholine

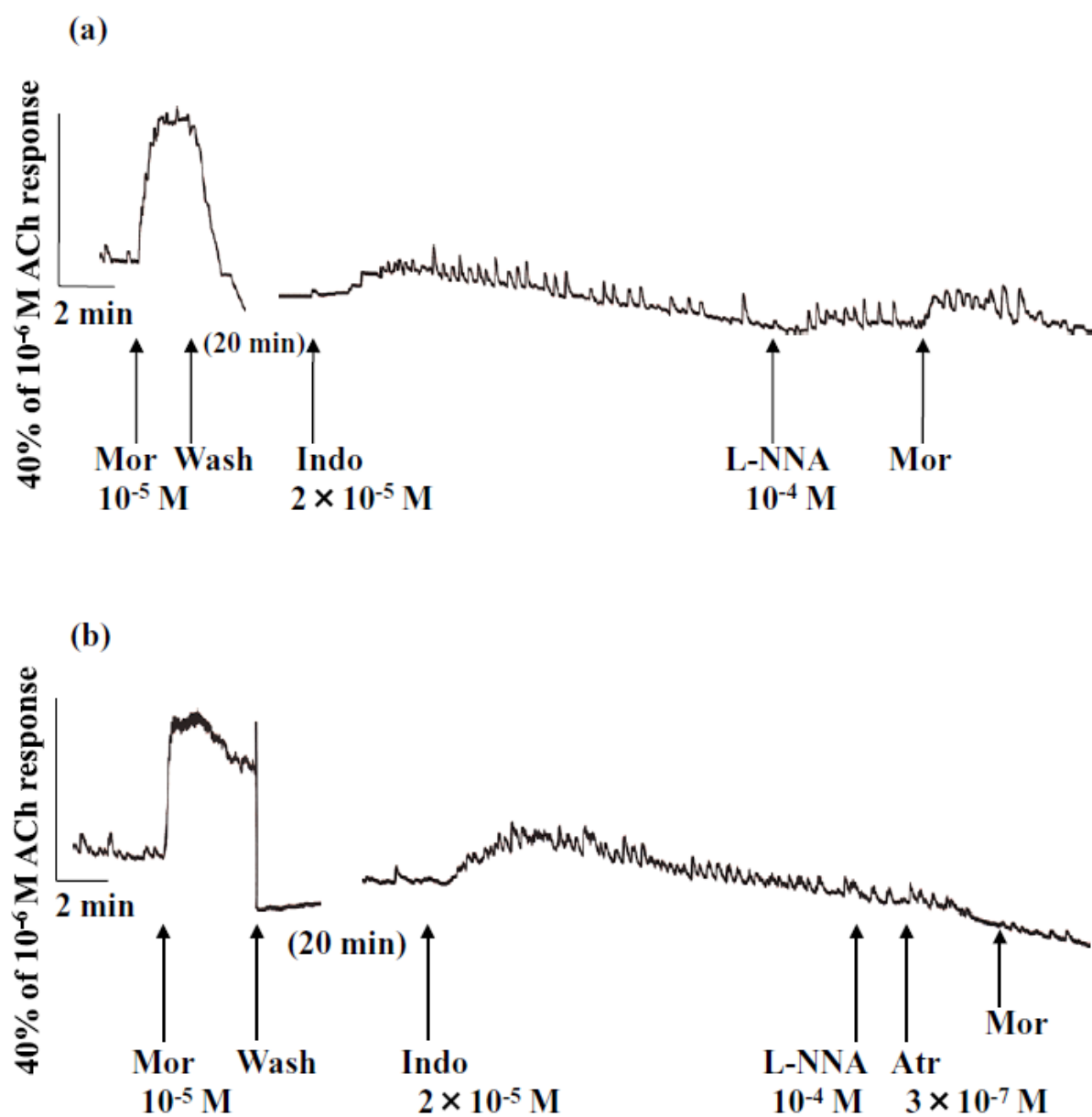


Fig. 1-11 Typical recordings of effects of (a) indomethacin (Indo) + L-NNA and (b) Indo + L-NNA + atropine (Atr) on morphine (Mor)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon.

ACh: Acetylcholine

(a) Longitudinal muscle of distal colon

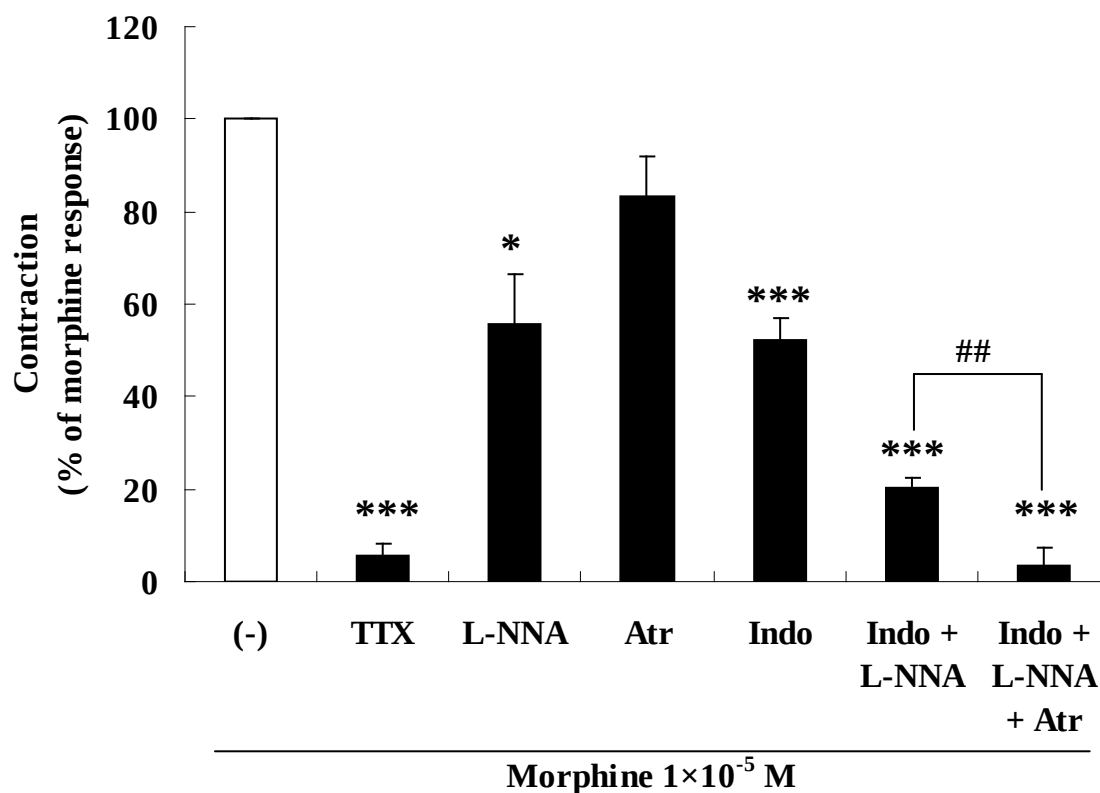


Fig. 1-12 (a) Effects of TTX (1×10^{-6} M), L-NNA (1×10^{-4} M), atropine (Atr; 3×10^{-7} M), and indomethacin (Indo; 2×10^{-5} M) on morphine (1×10^{-5} M)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-10$). * $p<0.05$ and *** $p<0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test. ## $p<0.01$, significantly different from Indo+L-NNA group by Student's t test.

(b) Circular muscle of distal colon

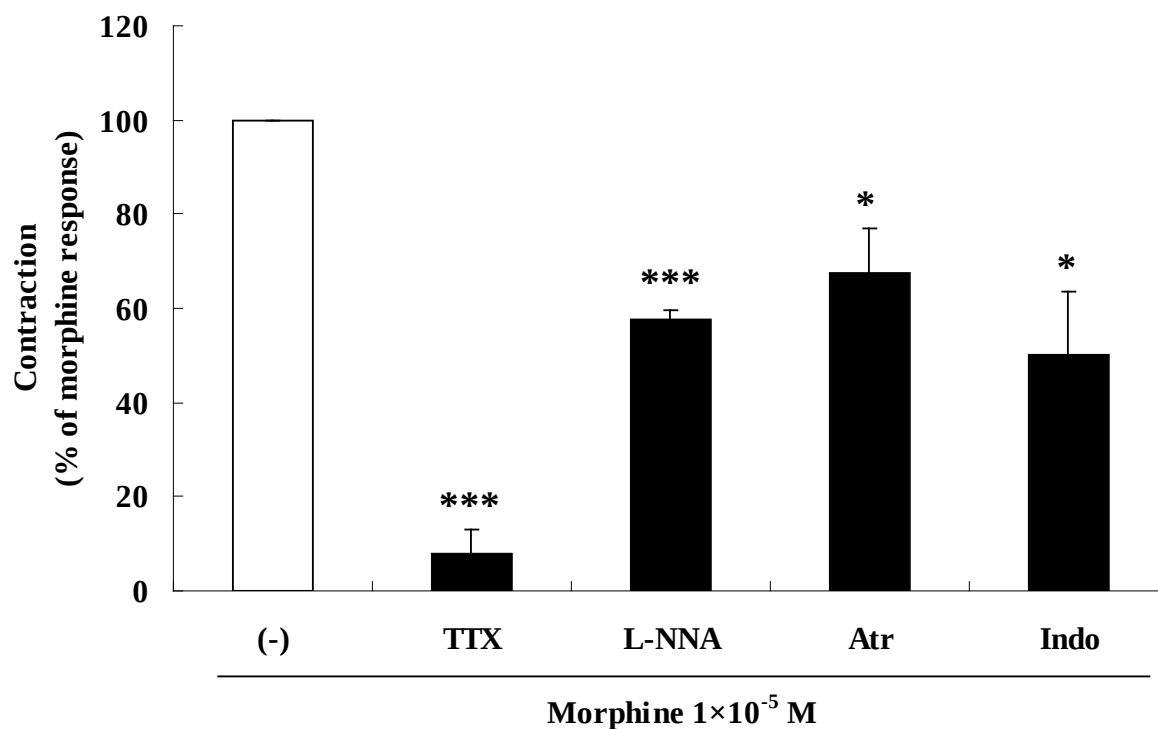


Fig. 1-12 (b) Effects of TTX (1×10^{-6} M), L-NNA (1×10^{-4} M), atropine (Atr; 3×10^{-7} M), and indomethacin (Indo; 2×10^{-5} M) on morphine (1×10^{-5} M)-induced contraction in circular muscle of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-6$). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test.

(c) Circular muscle of ileum

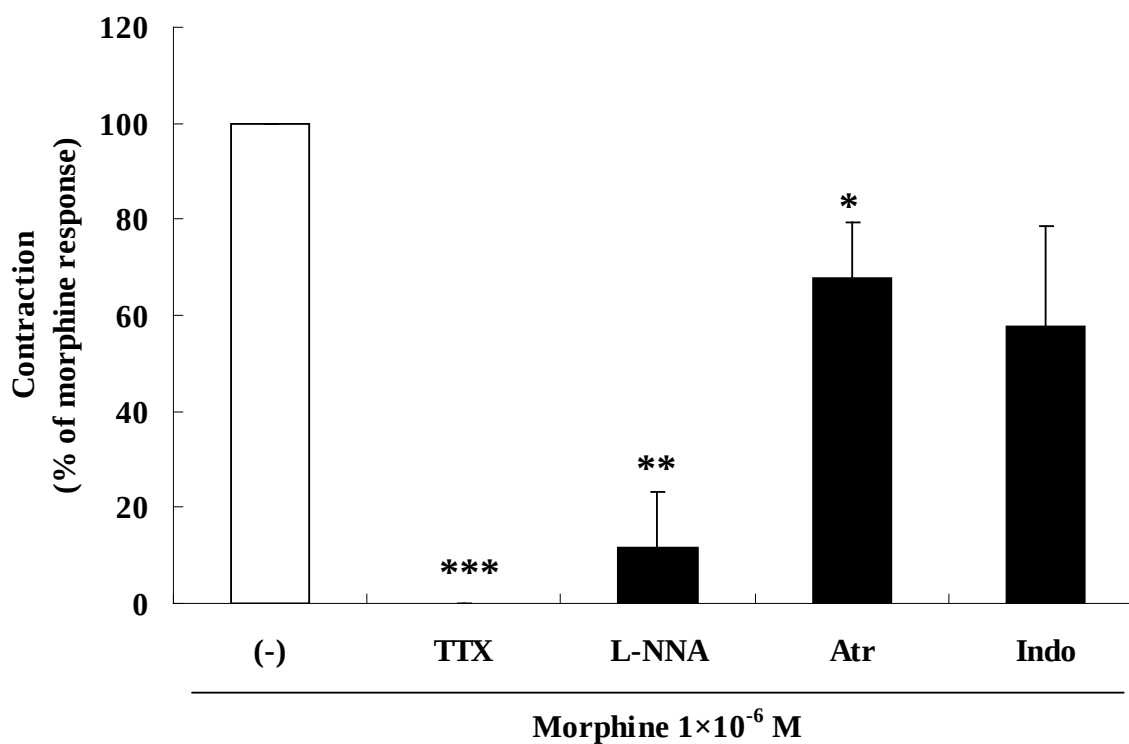


Fig. 1-12 (c) Effects of TTX (1×10^{-6} M), L-NNA (1×10^{-4} M), atropine (Atr; 3×10^{-7} M), and indomethacin (Indo; 2×10^{-5} M) on morphine (1×10^{-6} M)-induced contraction in circular muscle of the mouse ileum. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=4-9$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, significantly different from control by Aspin-Welch t test.

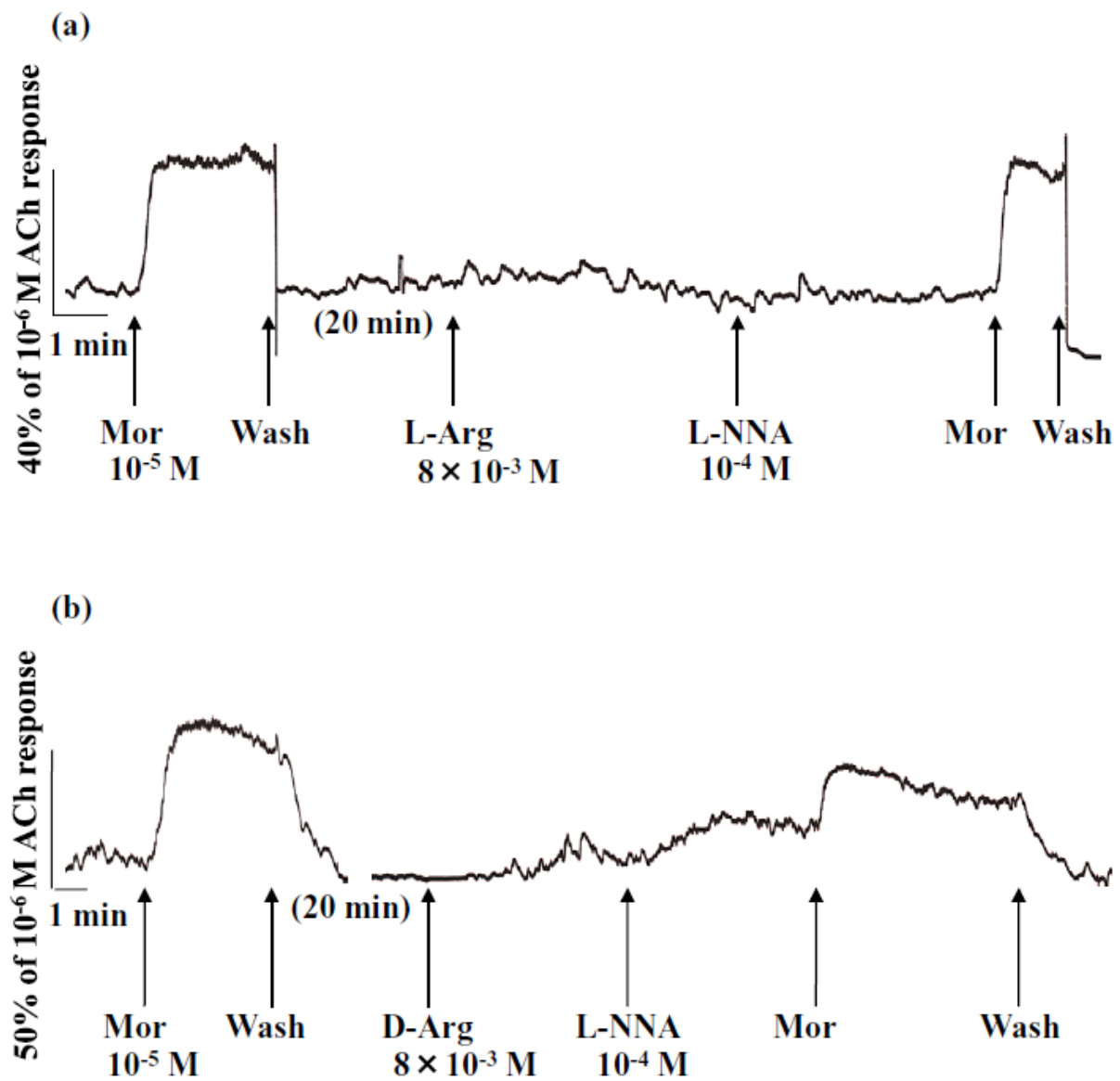


Fig. 1-13 Typical recordings of effects of (a) L-Arg + L-NNA and (b) D-Arg + L-NNA on morphine (Mor)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon.

ACh: Acetylcholine

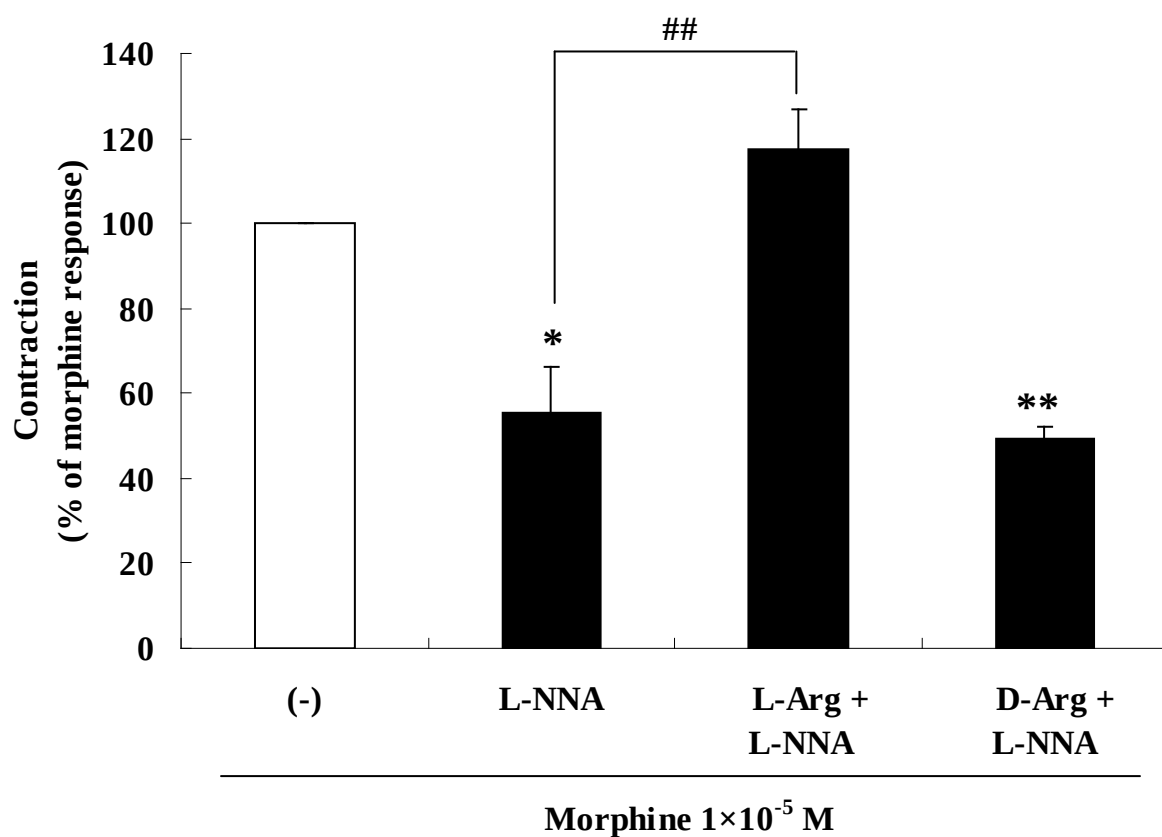


Fig. 1-14 Effects of L-NNA (1×10^{-4} M), L-Arg (8×10^{-3} M), and D-Arg (8×10^{-3} M) on morphine (1×10^{-5} M)-induced contraction in longitudinal muscle of the mouse distal colon. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=3-5$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, significantly different from control by Aspin-Welch t test. ## $p<0.01$, significantly different by Student's t test.

考察

回腸輪状筋と同様、結腸縦走筋、結腸輪状筋においても、モルヒネによって持続的な収縮作用がみられた。回腸縦走筋とは異なり、結腸縦走筋では再現性よくモルヒネによる収縮作用がみられた。この縦走筋の収縮が持続的なものであったため、結果として平滑筋の活動を阻害し、内容物の停滞、すなわち便秘につながる可能性が考えられた。

第1項では、まず、3種の標本において、モルヒネ収縮が **naloxone** の前投与によって大きく抑制されたことから、この収縮反応がオピオイド受容体を介したものであることが確認された。つづいて、モルヒネの収縮作用がどのオピオイド受容体タイプを介して発現しているのかを、 μ 受容体アンタゴニストの **cyprodime**、 δ 受容体アンタゴニストの **naltrindole**、 κ 受容体アンタゴニストの **nor-BNI** を用いて検討した。なお、アンタゴニストにもその効力に差があることが予想され、Shahbazian ら(70)や Matsumoto ら(71)はオピオイド受容体タイプを検討する際、**naltrindole** と **nor-BNI** は 30 nM で用いているのに対して、**cyprodime** は 1 μ M や 10 μ M といった高濃度で用いている。今回の検討においても、**cyprodime** は最大 10 μ M まで濃度を上げて用いた。

結腸縦走筋では、**nor-BNI** や **cyprodime** による抑制が **naltrindole** よりも大きかったため、このモルヒネ収縮には κ 受容体と μ 受容体の関与が大きいことが示唆された。Fontaine らは、マウス結腸縦走筋において受容体タイプ選択的アゴニストによって収縮が起こることを報告しており、そのうち δ 受容体アゴニストが最も低濃度で収縮を起こし、 μ と κ 受容体アゴニストの作用は同程度だったとしている(46)。このことから、結腸縦走筋には δ 受容体が多く分布していると推測される。しかし、モルヒネの δ 受容体への結合親和性が μ 受容体よりも低いために、今回のモルヒネ収縮への δ 受容体の関与は小さかったと推測された。

結腸輪状筋では、**cyprodime** 10 μ M で大きく抑制されており、モルヒネ収縮には μ 受容体の関与が大きいと推測された。しかし、**naltrindole** や **nor-BNI** によってもモルヒネ収縮が約 40%抑制され、 δ 及び κ 受容体の関与も示唆された。

回腸輪状筋では、**cyprodime** 0.3 μ M で既に **naloxone** と同程度まで抑制されており、モルヒネ収縮には主に μ 受容体が関与していることが示唆された。マウス回腸では電気刺激収縮が μ 受容体アゴニストで抑制されないため、 μ 受容体が少ないという報告があったが(68)、今回のモルヒネの収縮作用には μ 受容体が関与していることが示唆された。また δ 及び κ 受容体の関与も示唆された。

モルヒネの受容体親和性が、 δ や κ 受容体に比べると μ 受容体に対して 20~90 倍高い(9, 10)ということから、 μ 受容体アンタゴニストの **cyprodime** を前投与したときのみモルヒネ収縮が抑制されることが予想された。しかし結果としては、 δ 及び κ 受容体アンタゴニストによっても一部抑制された。これは、モルヒネの作用がどのオピオイド受容体を介しているかは、モルヒネの受容体親和性と、その臓器における受容体分布の 2 つの要因によって決定されるためであると思われる。

第 2 項では、モルヒネの収縮作用の機序を検討した。

消化管平滑筋の静止張力は興奮性神経と抑制性神経のバランスで決定される。今回用いた結腸縦走筋、結腸輪状筋及び回腸輪状筋の 3 種の標本では、**TTX** によって **base line** が上昇した。よってこれらの標本では抑制性神経の方が静止張力を優位に制御していることが示唆された。さらに、**NOS** 阻害薬の **L-NNA** によっても収縮したことから、抑制性の神経伝達物質の一つとして **NO** が考えられた。ここで結腸縦走筋と結腸輪状筋では、**TTX** による収縮が **L-NNA** の収縮よりも有意に大きかったことから、**NO** 以外の抑制性伝達物質の存在が推測された。その候補としては、**VIP** や **calcitonin gene related peptide (CGRP)** などが考えられる(60)。一方、回腸輪状筋では、**L-NNA** による収縮の方がむしろ **TTX** の収縮よりも大きいほどであったので、抑制性神経伝達物質の大部分は **NO** であることが示唆された。

なお、これら 3 種の標本とは対照的に、回腸縦走筋では **TTX** を加えても **base line** が変化しなかった (**data not shown**)。つまり、回腸縦走筋では興奮性、抑制性の神経支配が釣り合っているものと思われる。

そして、結腸縦走筋、結腸輪状筋及び回腸輪状筋におけるモルヒネ収縮が、**TTX** の前投与によってほぼ消失したことから、この収縮は平滑筋への直接作用ではなく、興奮性または抑制性の神経伝達物質の遊離を介したものであることが示唆された。

そこでまず、前述のようにこれら 3 種の標本では抑制性神経が優位に働いていることが考えられたので、モルヒネの収縮機序における **NO** の関与を検討した。すると **L-NNA** によってモルヒネ収縮が有意に抑制されたことから、モルヒネは抑制性神経からの **NO** の遊離を抑制することで収縮を起こしていることが示唆された。さらに結腸縦走筋での検討では、**NO** 合成の基質となる **L-Arg** を **L-NNA** に併用するとモルヒネ収縮が有意に回復し、異性体の **D-Arg** の併用では回復しないことも確認された。**Lenard** らは、モルモット回腸輪状筋でのモルヒネ収縮が **NO** 遊離の抑制によると報告しており(43)、今回用いたマウス腸管においても、同様の機序が考えられた。回腸や結腸の蠕動運動についての報告で、内容物より肛門側の輪状筋の弛緩 (**descending relaxation**) が **NO** によって起こっているといわれている(28, 72)。

さらに Met-enkephalin によってこの下行性弛緩が抑制され(47)、同時に NO 産生の減少が示されている(73)。よってモルヒネも同様に、NO 遊離を抑制して下行性弛緩を抑制することで、蠕動運動を阻害している可能性が考えられた。

回腸輪状筋では L-NNA による抑制が 88%に上り、収縮機序の大部分が NO 遊離抑制によることが推測されたが、結腸縦走筋・輪状筋では L-NNA による抑制が約 50%であったため、他の収縮機序として、ACh や PG の関与について検討した。その結果、モルヒネ収縮が、ムスカリン受容体遮断薬 atropine によって 17~33%、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬の indomethacin によって 42~50%抑制されたことから、コリン作動性神経や PG も収縮機序に関与していることが示唆された。また結腸縦走筋において、L-NNA、atropine 及び indomethacin の 3 種を併用したところ、TTX のときとほぼ同程度までモルヒネ収縮が抑制されたことから、NO と ACh、PG の 3 つの因子で、モルヒネ収縮機序が説明できることが推測された。

Giuliani らはモルモット結腸輪状筋での δ 受容体アゴニストによる収縮が atropine で抑制されたことを示しているが(67)、その他にはモルヒネ収縮は atropine で変化しないという報告が多い(41, 42, 46)。今回も、結腸縦走筋での検討で阻害薬を 3 種併用した場合、atropine 以外の 2 種の場合よりもさらにモルヒネ収縮が抑制されたため、やはりコリン作動性神経が関与していると推測された。Fontaine らはマウス結腸縦走筋でのモルヒネ収縮が indomethacin によって抑制されたとしており、PG は最終的に平滑筋に直接作用していたと述べている(46, 74)。しかし今回の検討では、モルヒネ収縮が TTX によってほぼ消失したことから、PG は神経性の経路で関与しているものと思われた。

結腸輪状筋と回腸輪状筋では、モルヒネ収縮の atropine による抑制率と indomethacin の抑制率が同程度であったため、indomethacin の下流に atropine の作用点が存在すると考えることが可能である。PG はコリン作動性神経を介して収縮を起こすことが報告されていることから(62)、モルヒネが何らかの機序でこの PG の作用を増強していることが推測された。

一方で結腸縦走筋では、atropine による抑制率が indomethacin の抑制率よりも小さかったため、indomethacin の下流に atropine の作用点が存在するとは考えにくい。そこで PG の別の作用機序として、NO との関連が考えられた。これまでに炎症モデルではない健常動物から摘出した腸管において、NO によって PG 産生が起こっているという報告がある(75, 76)。また本検討にて、結腸縦走筋に indomethacin を前投与した際に、14 例中 7 例で base line がやや上昇しており、

PG が弛緩方向に働いていた可能性も考えられた。よって一つの可能性として、抑制性神経から遊離された NO が直接平滑筋を弛緩させると同時に、平滑筋に抑制的に働く PG の合成を亢進させており、モルヒネが抑制性神経を阻害することで、この一連の作用を抑制していたことが考えられた。

一方、モルヒネはセロトニンの遊離を促進し、コリン作動性神経を介して収縮を起こしていたという報告がある(66)。結腸縦走筋においてモルヒネ収縮が **atropine** で一部抑制されたのは、このセロトニンを介した経路が阻害されたためである可能性が考えられた。

ただし、これらのコリン作動性神経や PG を介したモルヒネの収縮機序は推測による部分が大きいため、セロトニン受容体アンタゴニストやプロスタノイド受容体アンタゴニストなどを用いて、さらに詳細な検討を行う必要があると思われる。

小括

- **M6G** によってマウス小腸輸送能・胃排出能が抑制され、**M6G** がモルヒネ誘発便秘に寄与していることが示唆された。このうち小腸輸送能は、**M6G** によってモルヒネよりもやや強く抑制された。
- **M6G** によってモルモット回腸縦走筋の電気刺激収縮が抑制され、その作用強度はモルヒネと同程度であった。
- マウス回腸輪状筋において、モルヒネ、**M6G** 及び **M3G** によって持続的な収縮反応が示された。**M6G** の収縮作用はモルヒネよりも有意に大きく、一方、**M3G** の収縮作用は高濃度側でのみ観察された。この輪状筋の持続的な収縮は、消化管の狭窄や蠕動運動の阻害をもたらし、便秘誘発に寄与していることが推測された。
- 回腸輪状筋に加え、結腸縦走筋・輪状筋においてもモルヒネの収縮作用が示された。この作用は、モルヒネの親和性が高い μ 受容体だけでなく、 δ 及び κ 受容体も関与していることが示唆された。
- 結腸縦走筋・輪状筋及び回腸輪状筋におけるモルヒネの収縮作用は、神経伝達物質の遊離を介していることが示唆された。その機序として、抑制性 NANC 神経からの NO 遊離を抑制していることが示唆され、さらにコリン作動性神経やプロスタグランジンも一部関与していることが推測された。

第2章 モルヒネのがん細胞に対する作用の検討

緒言

オピオイド受容体は非神経組織である免疫系細胞や内皮細胞にも発現していることが分かっており、その受容体の一つとして、 μ 受容体の新規サブタイプである μ_3 受容体も同定されている(77)。この μ_3 受容体を介しているかは明らかでないが、モルヒネが抗炎症作用を示すこと(78)や、マクロファージ(79)や血管内皮細胞(80)のアポトーシスを誘導することが報告されている。

また、がん細胞においても、乳癌細胞 MCF-7 などでは μ 受容体や δ 受容体の発現がタンパク質レベルで確認されており(81)、モルヒネのがん細胞に与える影響について、これまでに数多く報告がなされている。*in vitro*の系では、肺癌細胞や乳癌細胞、白血病細胞、神経芽腫細胞などにおいて、モルヒネによって細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されたという報告が相次いでいる(81-84)。この機序として、p53 やアポトーシス誘導因子 Fas の発現上昇(81)、JNK 経路の活性化とアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の減少(82)などが示されている。ただし、これらの作用がオピオイド受容体アンタゴニストのナロキソンで拮抗されるかについては結果が分かれており、モルヒネの作用がオピオイド受容体を介したものであるかは明確ではない。一方、マウスの腫瘍移植モデルでの検討では、鎮痛用量に近いモルヒネの全身投与によって、腫瘍増殖が抑制されたという報告(81, 85)と、逆に増強されたという報告(86, 87)がある。

これらの報告をふまえると、臨床現場でモルヒネを鎮痛目的でがん患者に投与した場合、モルヒネは腫瘍自体にどのような影響を与えているのか、という疑問が生じる。そこで本研究では、複数のヒトがん細胞株に対して、モルヒネがその増殖に影響を与えるかどうか検討した。その際、モルヒネの濃度を2つの濃度域に分けて検討した。McQuay らによるモルヒネ服用患者 151 人に対する調査(88)では、モルヒネの用量と血中濃度との間に正の相関が確認された。また大部分の患者では血中濃度が 500 nM 以下（最低は 2 nM）であったが、高用量服用している患者では最高で 3.5 μ M であった。今回は、これら鎮痛用量を含む低濃度域（1 nM～100 μ M）とそれよりも高濃度域（0.5 mM～4 mM）にて検討を行った。

1. 方法

1) 使用細胞

ヒト膵癌細胞：Panc-1

ヒト肺癌細胞：A549、PCP

ヒト前立腺癌細胞：DU-145、PC3

ヒト乳癌細胞：MCF-7

Panc-1、A549、PCP、DU-145 及び PC3 は東洋大学生命科学部 矢野友啓教授より譲受した。MCF-7 は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより入手した。

A549 と PCP は DMEM (10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin)、その他は RPMI (10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin) を用いて、37°C、5% CO₂ 下にて培養した。

2) 使用薬物

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (high glucose) SIGMA、Wako

RPMI-1640 SIGMA

Fetal bovine serum (FBS) EQUITECH-BIO

Penicillin-Streptomycin GIBCO

Dulbecco's PBS (－) 日水製薬

0.25% Trypsin-EDTA solution SIGMA

0.4% Trypan blue solution SIGMA

モルヒネ塩酸塩水和物「シオノギ」原末 塩野義製薬

50 mM になるよう蒸留水に溶解し、培地で用時希釈した。

Naloxone hydrochloride dihydrate SIGMA

10 mM になるよう蒸留水に溶解し、培地で用時希釈した。

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

DOJINDO

5 mg/ml になるよう PBS に溶解し、無血清培地 (1% Penicillin-Streptomycin) で 0.25 mg/ml に用時希釈した。

Dimethyl sulfoxide (DMSO) Wako

99.5% Ethanol Wako

Sodium azide (NaN₃) Wako

CH₃COONa Wako

Staining medium (3% FBS/PBS)

3% FBS、0.01% NaN₃ を PBS に溶解し、フィルター滅菌した。

Propidium iodide (PI)

Wako

1 mg/ml になるよう PBS に溶解し、フィルター滅菌した。

Ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A)

SIGMA

10 mg/ml になるよう 10 mM CH₃COONa 水溶液 (pH 5.2) に溶解した後、100℃で 15 分間煮沸し、フィルター滅菌した。

Flow-Check (光軸調整用のビーズ)

Beckman Coulter

3) 実験手法

【薬剤処理】

細胞を播種して 24 時間後、各 well の培地を除去し、モルヒネまたはナロキソンの単独添加、あるいは両者の共添加を行った。72 時間曝露後、各アッセイを行った。

【細胞生存率の検討～MTT assay～】

①細胞を 4×10^3 cells/well となるよう 96 well plate に播種し (100 μ l/well)、上記の薬剤処理を行った。

②各 well の培地を除去し、0.25 mg/ml MTT 溶液を 100 μ l/well 添加し、60 分間インキュベートした。その後 MTT 溶液を除去して DMSO 100 μ l/well を添加し、プレートを経くたいて溶液を均一にした後、マイクロプレートリーダー Multiskan JX (Thermo Labsystems) にて吸光度 (540 nm、対照波長として 650 nm) を測定した。

【細胞周期の検討～Flow cytometry～】

①細胞を 2×10^5 cells/dish となるよう 60 mm dish に播種し (4 ml/dish)、上記の薬剤処理を行った。

②各 dish の培地を遠沈管に回収し、トリプシンで細胞をはがした後、移した培地を 2 ml 戻して懸濁した。懸濁液を再び遠沈管に戻して 1,000 rpm、4℃で 3 分間遠心した。

③＜エタノール固定＞上清を除いて、冷 PBS 500 μ l を加えて懸濁し、それを 1.5 ml マイクロチューブに移して 1,000 rpm で 5 分間遠心した。PBS が 50～100 μ l 残るように上清を除き、タッピングした。そして 80%エタノールを 1 ml 加えて、すぐに 10 秒間ボルテックスし、-20℃で (最低でも 1 時間) 保存した。

④<PI 染色>解析当日、細胞を 3% FBS/PBS 500 μ l で 2 回洗い、上清を除いて、下記の PI と RNase A の混合液 500 μ l を加えて懸濁した。その後、遮光して 37°C で 30 分間インキュベートした。

3% FBS/PBS	465 μ l	(最終濃度)
1 mg/ml PI	25 μ l	→ 50 μ g/ml
10 mg/ml RNase A	10 μ l	→ 200 μ g/ml
500 μ l		

⑤懸濁液をナイロンメッシュに通した後、MoFlo cell sorter (Dako Cytomation) にて解析を行った。

4) 統計処理

MTT assay の結果は control の吸光度に対する百分率 (%) で表し、平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。また IC₅₀ 値は、解析ソフト GraphPad Prism4 によって求めた。Flow cytometry の結果は平均値を示した。

2. 結果

まず、低濃度域 (1 nM~100 μ M) のモルヒネの作用を A549 と MCF-7 にて検討したところ、細胞増殖にほとんど影響がみられなかった (Fig. 2-1)。次に、高濃度域 (0.5~4 mM) のモルヒネの作用を 6 種類のヒトがん細胞株を用いて検討したところ、すべての細胞株で濃度依存的に細胞生存率が抑制された (Fig. 2-2)。IC₅₀ 値を算出したところ、1.47~2.65 mM の値となった (Table 2-1)。

6 種類の細胞株の中で IC₅₀ 値の小さかった Panc-1 と A549 においてナロキソンの単独作用を検討したところ、モルヒネ同様、濃度依存的な細胞生存率の抑制がみられた (Fig. 2-3)。このうち単独作用の弱い濃度としてナロキソン 10 μ M を選択して、モルヒネ 500 μ M と併用させた。その結果、モルヒネの増殖抑制効果はナロキソンによってほとんど影響を受けなかった (Fig. 2-4)。

A549 にて細胞周期を解析したところ、モルヒネによって濃度依存的に、アポトーシスの指標となる subG1 期の割合が増加し、4 mM では 38.0%に達した (Fig. 2-5)。

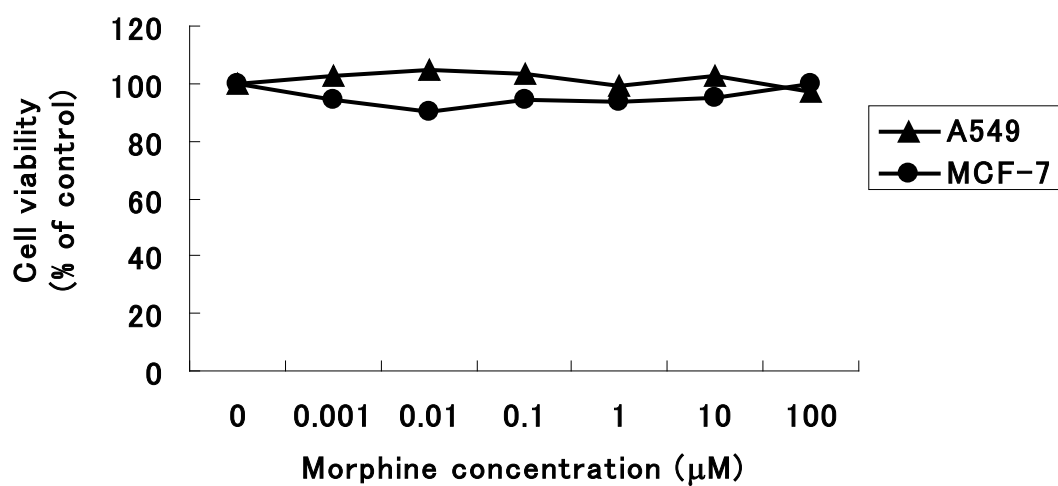


Fig. 2-1 Effects of morphine on the proliferation of A549 and MCF-7 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of morphine for 72 h and cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean of 5 replicate wells.

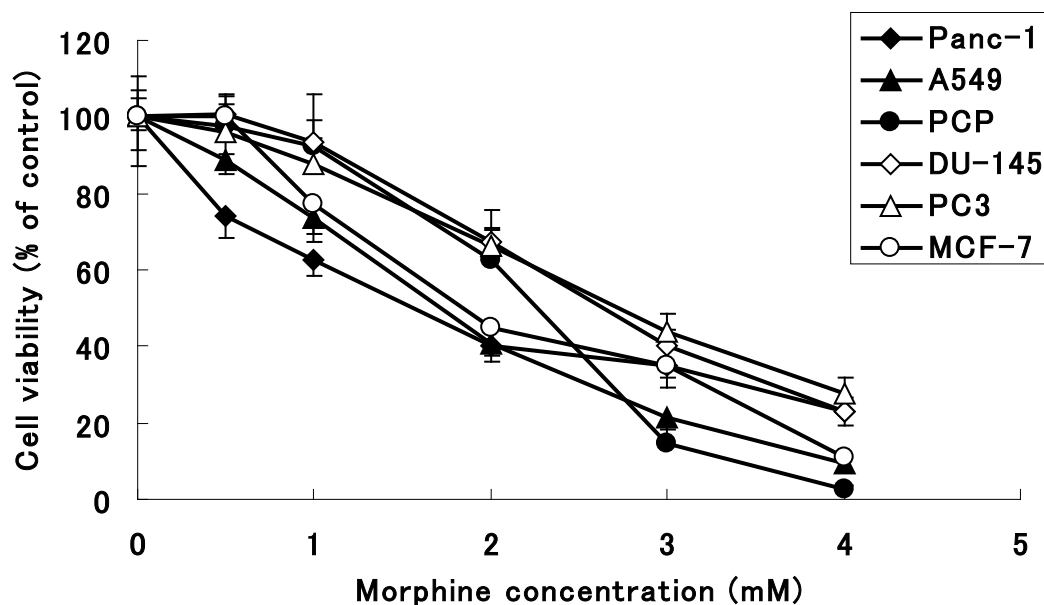


Fig. 2-2 Effects of morphine on the proliferation of Panc-1, A549, PCP, DU-145, PC3, and MCF-7 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of morphine for 72 h and cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 replicate wells.

Table 2-1 IC₅₀ values of morphine on the cell proliferation.

Cell lines	IC ₅₀ (mM)
Panc-1	1.47
A549	1.61
PCP	2.19
DU-145	2.60
PC3	2.65
MCF-7	1.90

Cells were treated with morphine (0.5-4 mM) for 72 h and cell viability was determined by MTT assay.

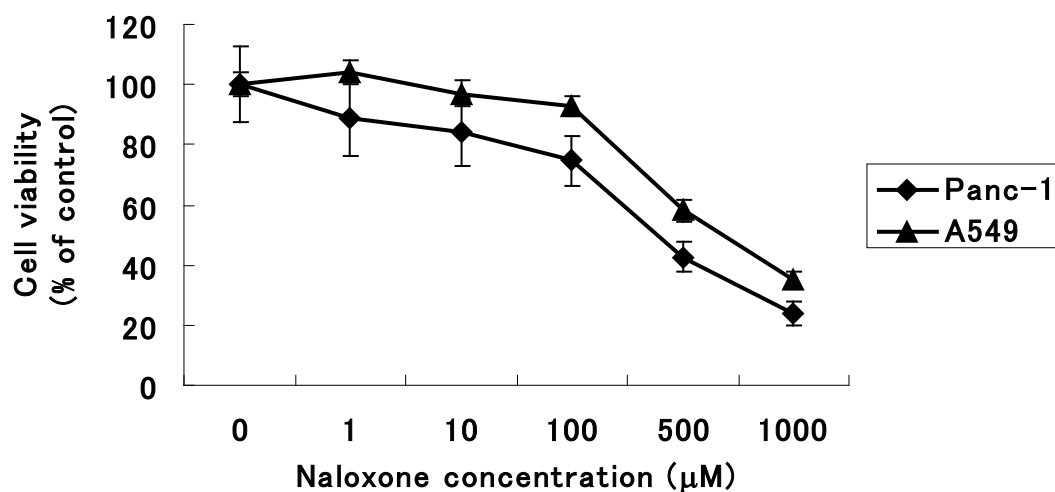


Fig. 2-3 Effects of naloxone on the proliferation of Panc-1 and A549 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of naloxone for 72 h and cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 5 replicate wells.

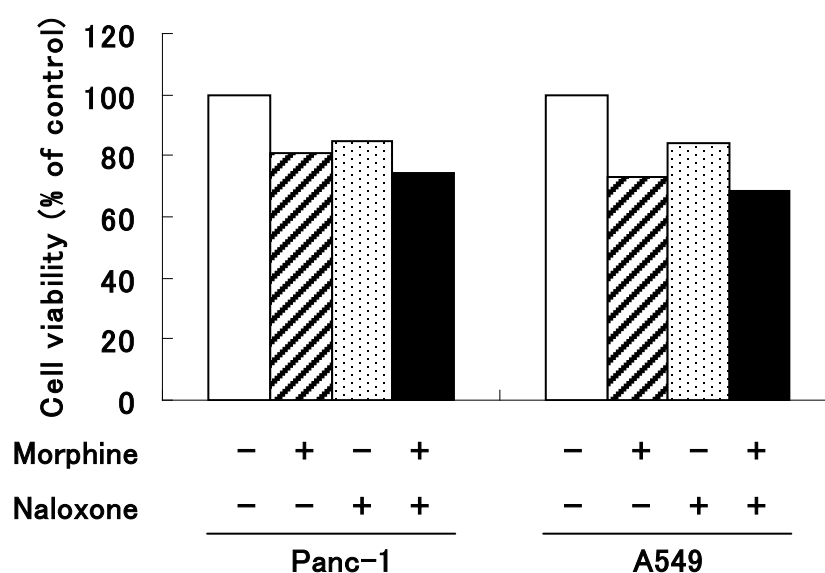


Fig. 2-4 Effects of morphine and naloxone on the proliferation of Panc-1 and A549 cells. Cells were treated with morphine (500 μM), naloxone (10 μM), or the combination of morphine and naloxone for 72 h. Cell viability was determined by MTT assay. Each value represents the mean of 5 replicate wells.

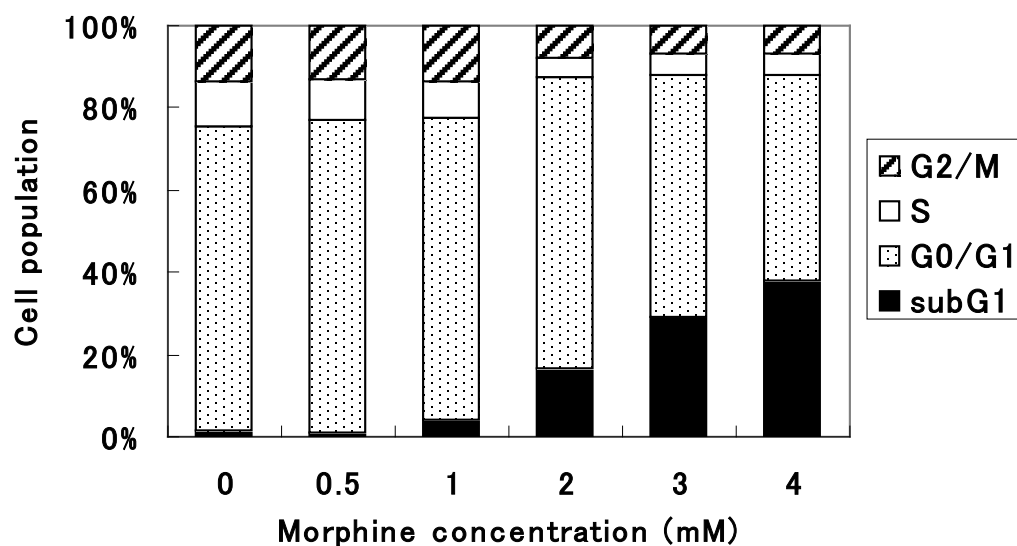


Fig. 2-5 Effects of morphine on A549 cell cycle distribution. Cells were treated with the indicated concentrations of morphine for 72 h. After treatment, cell cycle analysis was performed by flow cytometry. Each value represents the mean ($n=3$).

考察

まず、1 nM～100 μ M のモルヒネはヒトがん細胞の増殖にほとんど影響を与えなかった。がん患者でのモルヒネ血中濃度が 2 nM～3.5 μ M と報告されていることから(88)、鎮痛用量のモルヒネによっては、腫瘍の増殖は抑制も増悪もされないということが示唆された。

一方、より高濃度の 0.5～4 mM のモルヒネを作用させると、ヒトがん細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。また、増殖抑制作用の IC₅₀ 値は 1.47～2.65 mM となった。モルヒネの抗腫瘍作用については、一部には 10 nM のモルヒネで認められたという報告もあるが(89, 90)、多くは mM オーダーでの作用発現を報告しており、増殖抑制作用の IC₅₀ 値も 0.5～6.5 mM となっている(83, 84, 89)。よって、本研究における結果は、後者の報告を支持するものであった。

また、モルヒネの増殖抑制作用がナロキソンで拮抗されなかったため、高濃度域でのモルヒネの作用はオピオイド受容体を介していないことが示唆された。これまでの報告の中では、オピオイド受容体以外のモルヒネの作用点として、ソマトスタチン受容体が挙げられている。ソマトスタチンは神経細胞で産生されるホルモンであり、オピオイド同様、神経伝達物質やホルモンの放出を阻害する働きがある(91)。このソマトスタチンの受容体が、A549 と MCF-7 を含む複数のヒトがん細胞株に発現していることが PCR にて確認されている(92)。そして、ソマトスタチンアナログが増殖抑制作用を示し、モルヒネがソマトスタチン受容体に親和性を示したことから(91)、モルヒネがソマトスタチン受容体を介して増殖抑制作用を示した可能性が考えられた。

今回の *in vitro* での検討では、鎮痛用量のモルヒネはがん細胞の増殖に直接的には影響を与えないことが示された。ただし、*in vivo* でモルヒネによって腫瘍増殖が抑制されたという報告では、マウスの坐骨神経を切断しただけでも腫瘍の増殖が抑えられた。このことから、モルヒネが直接がん組織に作用したのではなく、モルヒネによってがんの痛みが除去され、マウスのストレスが軽減されて免疫力が回復した結果、がんが抑制されたと推測している(85)。また、腫瘍が増悪したという報告では、モルヒネによって血管新生が促進されたり(86)、免疫機能が抑制された(87)結果であるとも考察されている。このように、モルヒネは生体内では、他のファクターを介して腫瘍の増殖に影響を与える可能性もある。今後は *in vivo* にて、腫瘍増殖に対するモルヒネの作用を検討する必要があると思われる。

小括

- ・ 鎮痛用量のモルヒネは、ヒトがん細胞の増殖に影響を与えなかった。
- ・ 鎮痛用量よりも高濃度のモルヒネでは、ヒトがん細胞に対する増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用が確認された。

第3章 脱メチル化薬による腎細胞癌の抗がん剤感受性増強作用の検討

緒言

腎癌はがん全体の約2%を占めるがん種であり(93)、その85%以上を占めているのが腎細胞癌 (renal cell carcinoma: RCC) である(94)。日本における2006年の腎細胞癌による死亡数は3,767人(男性2,498人、女性1,269人)であり、がんによる死亡の1.1%を占めていた(95)。それほど多いがん種ではないが、日本での死亡数は2000年までの25年間で約4倍になっており(95)、今後も死亡率の増加が予想されている。罹患率は男性:女性=2:1であり(96)、危険因子として喫煙や肥満、高血圧などが挙げられている(94)。さらに透析患者で発生頻度が高いことも知られている(95)。また、RCCの2~3%は家族性の遺伝的欠損が原因であるとされ、その遺伝子として von Hippel-Lindau (VHL) や fumarate hydratase、c-Met などが分かっている(94)。

このうち VHL の変異は、家族性ではない散発性の (sporadic) RCC においても高頻度に観察され(97)、RCC 進行の主要な原因遺伝子と考えられている。腫瘍は、増殖に伴って特にその中心部では低酸素状態 (hypoxia) になっているが(98)、がん細胞では転写因子である低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) が発現し、血管新生促進因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) やグルコーストランスポーター GLUT1 などの転写を促進することで hypoxia に適応している。HIF のサブユニットの一つである HIF- α は、通常酸素分圧下ではユビキチン化に続くプロテアソーム分解を受けており、VHL はこのユビキチン化に必須な因子である(99)。よって、RCC では VHL が変異しているため、HIF- α が分解を受けずに恒常的に発現し、血管新生などが促進されている。

RCC の治療の基本は手術療法であり、切除不能あるいは進行性の RCC には薬物療法が行われる。しかし、患者の3分の1で発見時に既に転移しており、また40%では腎摘出後に転移が発見される(100)。さらに、RCC は化学療法に抵抗性を示すため(96)、その予後は非常に悪く、5年生存率は5~10%といわれている(101)。これまでは、インターフェロン- α やインターロイキン-2 による免疫療法が RCC の標準的な薬物療法であったが、その奏成功率は10~20%と低かった(101)。しかし近年、VEGF 受容体などに対するマルチチロシンキナーゼ阻害薬のソラフェニブ(102)とスニチニブ(103)、さらに mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害薬のエベロリムス(104)とテムシロリムス(105)が相次いで RCC 治療薬として承認され、

RCC 治療の選択肢は大きく広がったといえる。これらの分子標的薬の開発は、RCC では VEGF シグナルが亢進していることや、mTOR が様々な増殖シグナルや HIF- α の翻訳に関わる因子であること(106, 107)に基づいている。一方で、ソラフェニブやスニチニブでは、血小板減少や、手足に痛みを伴う強い角質肥厚を起こす手足皮膚反応などの副作用が、特に日本人で高頻度に起こることが報告されている(108, 109)。したがって、これら分子標的薬は慎重に投与する必要があるとともに、RCC に対するより安全で有効な薬物療法が求められている。

一方、抗がん剤治療の抱える問題点の一つとして、がんの薬剤耐性が挙げられる。耐性機構としては、P 糖タンパク質 (P-gp) や multidrug resistance protein (MRP) などの薬剤排出トランスポーターの過剰発現や、DNA 修復機構の亢進(110)、抗アポトーシスタンパク質の過剰発現(111)などが挙げられる。この中で最もよく研究されてきたのが P-gp についてである。P-gp は multidrug resistance 1 (MDR-1) 遺伝子にコードされた、170 kDa の 12 回膜貫通型タンパク質であり、ATP 依存的に薬剤を細胞外へと排出する。その結果、薬剤の細胞内濃度が低下して、薬剤耐性を示す。ドキソルビシンやエトポシド、ビンブラスチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ドセタキセルなど、多くの脂溶性の高い抗がん剤が P-gp の基質となりうる。一方でシスプラチンは P-gp の基質にはなりにくいといわれている(112, 113)。薬剤耐性克服のため、P-gp 阻害薬としてシクロスポリン A や valspodar (PSC-833) がこれまでに開発されてきたが、これらの薬剤はヒトに投与した際に毒性や薬物相互作用を示した。そこで現在では、薬物相互作用の少ない新たな P-gp 阻害薬が臨床試験中である(112, 113)。

P-gp は種々の正常組織にも発現しており、生体内異物や毒物の排出に関与している(113)。腎臓では近位尿細管に存在し、ジゴキシンなどの薬物を尿中へ排出する働きがある。そして、RCC 患者の 76% で P-gp の過剰発現が見られること(114)、RCC 組織由来の細胞では正常組織由来の細胞に比べて P-gp 機能が高いこと(115)が報告されており、RCC の薬剤耐性に P-gp が寄与していることが推測されている。したがって、P-gp の発現・機能を調節することが RCC の薬剤耐性改善に有用であると考えられる。

近年、様々ながん種において、遺伝子のプロモーター領域が高メチル化され、転写が抑制されていることが明らかになってきている。RCC においても、VHL (100) や E-cadherin (116, 117)、Ras-association domain family (RASSF) 1A (118) などのがん抑制遺伝子について、メチル化によって発現が低下していることが分かっている。また、RCC 患者において、メチル化頻度が高いほど予後が悪いという報告

もなされている(119, 120)。よって、脱メチル化薬でこれら遺伝子の発現を正常化することで、RCC の進展を抑制できる可能性が推測される。

現在のがん薬物療法では、複数の抗がん剤の併用療法が行われることが多い。単剤のみでは効果が限られてしまい、がんがその薬剤に対して耐性化する可能性も高くなる。一方で、作用機序の異なる薬剤を併用することで最大限の抗腫瘍効果が得られ、また耐性細胞の出現をできるだけ抑えることができる(121)。脱メチル化薬の場合、固形腫瘍に対して単剤では効果が乏しいという臨床試験の結果があるが(26)、*in vitro* 及び *in vivo* の系で、脱メチル化薬と他の殺細胞薬を併用すると固形腫瘍にも抗腫瘍効果を示すことが報告されている(122-124)。この場合、脱メチル化薬は転写が抑制されている遺伝子の発現を回復させることで殺細胞薬の作用を増強していると推測されている(123)。しかし、RCC に対する脱メチル化薬と他の抗がん剤の併用効果についてはほとんど報告されていない。

我々はこれまでに、腎細胞癌株 Caki-1 においてビンブラスチン (VBL) の殺細胞効果が、脱メチル化薬 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) の併用によって増強されることを見出した(125)。VBL は微小管重合を阻害するビンカアルカロイド系抗がん薬であり、RCC に対して効果を示したとされる数少ない抗がん剤の一つである(96)。また我々の研究では、Aza と VBL の併用効果には connexin (Cx) 32 の脱メチル化による発現回復と、P-gp の発現抑制が寄与していることが示唆された(125)。Cx32 はギャップジャンクションの構成タンパク質であり、RCC ではがん抑制遺伝子として機能していることが分かっている(126)。そこで本研究では、Caki-1 に対する Aza と VBL の併用効果が *in vivo* でも認められるか検討し、また他の腎細胞癌株でも同様の併用効果がみられるか検討し、腎細胞癌治療への Aza の有用性を検証した。

第1節 腫瘍皮下移植モデルマウスにおける脱メチル化薬とビンブラスチンの併用効果およびその作用機序の検討

1. 方法

1) 使用動物

Balb/c An-nu/nu athymic mice、雄性、5週齢、18-22 g（日本チャールスリバー）を用いた。固形飼料（CE-2、日本クレア）および滅菌水を自由摂取させ、定時照明（6:00～18:00）下で飼育した。

2) 使用細胞

ヒト腎細胞癌株：Caki-1

ATCC より購入

McCoy's 5A medium modified（10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin）を用いて、37℃、5% CO₂下にて培養した。

3) 使用薬物（下記以外のものは第2章に従った）

McCoy's 5A medium modified

GIBCO

Matrigel

BD Biosciences

5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza)

SIGMA

Vinblastin sulfate (VBL)

Wako

Aza と VBL は共に、マウスに投与する場合は PBS に溶解した。

RNeasy Mini Kit

QIAGEN

2-Mercaptoethanol

Wako

TE (pH 8.0)

ニッポンジーン

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)

TaKaRa

SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)

TaKaRa

UltraPure Tris

Invitrogen

HCl

Wako

NaCl

Wako

Polyoxyethylene (10) octylphenyl ether (Triton-X)

Wako

β-glycerophosphate

SIGMA

Sodium orthovanadate (Na₃VO₄)

SIGMA

Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)

DOJINDO

Protease inhibitor cocktail

SIGMA

Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)	SIGMA
100 mM になるよう 99.5% ethanol に溶解した。	
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad
2 mg/ml Bovine serum albumin (BSA)	PIERCE
Bovine serum albumin (BSA、粉末)	SIGMA
Sucrose	Wako
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Wako
Bromophenol blue (BPB)	Wako
30% Acrylamide solution	Wako
Ammonium peroxodisulfate (APS)	Wako
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Wako
Prestained protein ladder	Fermentas
Glycine	MP Biomedicals
Methanol	Wako
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	ナカライテスク
スキムミルク	雪印
イムノエンハンサー	Wako
Immobilon Western (ECL 試薬)	Millipore
Monoclonal anti-P-glycoprotein (MDR)	SIGMA (P7965)
Monoclonal anti-p21 ^{WAF1/Cip1}	SIGMA (P1484)
Anti-cyclin B1 (GNS1)	Santa Cruz (sc-245)
Anti-Bax (N-20)	Santa Cruz (sc-493)
Purified mouse anti-Bcl-2	BD Biosciences (610538)
Anti-XAF1 (L-16)	Santa Cruz (sc-19193)
Monoclonal anti- β -actin	SIGMA (A5441)
Horse anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling (7076)
Donkey anti-rabbit IgG, HRP-conjugate	Beckman Coulter (732986)
Rabbit anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz (sc2768)

Lysis buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Protease inhibitor cocktail

ただし、PMSF と protease inhibitor cocktail は使用直前に混合した。

Sample buffer : 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % Sucrose, 5% 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, BPB (適量)

Running buffer : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

Transfer buffer : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol

TBS-T : 25 mM Tris, 13.7 mM NaCl, 0.05% Tween 20

Stripping buffer : 25 mM Glycine, 1% SDS (pH 2.0)

☆ゲルの組成

	Running		Stacking
	7.5%	12%	
蒸留水	9.6 ml	6.6 ml	5.8 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	5.0	5.0	—
0.5 M Tris (pH 6.8)	—	—	2.5
30% Acrylamide	5.0	8.0	1.5
10% SDS	0.2	0.2	0.1
10% APS	0.2	0.2	0.1
TEMED	20 μ l	20 μ l	20 μ l

4) 実験手法

【腫瘍皮下移植モデル】

①Caki-1 を 1×10^7 cells/0.1 ml となるよう PBS に懸濁し、さらに同量のマトリゲルを混合した。その懸濁液をマウスの右後肢の付け根に 0.2 ml 皮下移植した（1ヶ所あたり 1×10^7 cells）（Day 0）。腫瘍移植後は 2、3 日ごとに体重および腫瘍径を測定し、腫瘍体積を $3.14/6 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ にて算出した。

②Day 7 の腫瘍体積をもとに、体積のばらつきが群間で小さくなるようにマウスを 4 群（control 群、Aza 単独群、VBL 単独群、併用群）に分けた。そして Day 9、16、23 及び 30 に Aza 1.5 mg/kg を、Day 12、19、26 及び 33 に VBL 1.5 mg/kg を腹腔内投与した。投与容量は体重 10 g あたり 0.1 ml とした。また control 群および単独群で薬剤を投与しない場合には PBS を投与した。また薬物投与開始後は、下痢の有無や動きが鈍っていないかなどの様子も観察した。

③Day 34 にマウスを頸椎脱臼した後、腫瘍を摘出した。シャーレ上で PBS で洗浄しながら、皮膚や脂肪を取り除き、キムタオル上で水分を除いた後、腫瘍重量を測定した。腫瘍は 2 等分してからクライオチューブに入れ、 -80°C で保存した。

腫瘍体積変化率を (Day 34 の体積) / (Day 9 の体積) にて算出した。

【腫瘍内 mRNA 発現の検討～Real-time PCR～】

①－80℃で凍結保存しておいた腫瘍片の一部を切り出し、キムタオル上で水分を除いた後、1.5 ml マイクロチューブに入れて約 15～35 mg はかりとった。そこへ Buffer RLT (2-mercaptoethanol を 10 µl/ml 含有) を 600 µl 加えて、エッペン用ホモジナイザーで腫瘍片をよくすりつぶした。15,000 rpm、20℃で 3 分間遠心した後、上清を回収した。

②RNA 抽出を RNeasy Mini Kit を用いて行った。

得られた上清に 70% ethanol を 600 µl 加えてよく懸濁し、これを RNeasy Mini Spin Column に 2 回に分けてアプライし、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。Buffer RW1、Buffer RPE (×2 回) で洗浄後、カラムのメンブレンを乾燥させ RNase-free water 50 µl で RNA を溶出した。RNA 溶液を TE で希釈し、RNA 濃度を吸光度計 Smart Spec 3000 (Bio-Rad) を用いて定量した。

③RT 反応を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて行った。

5×PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 µl		
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 µl		
Oligo dT Primer	0.5 µl		
Random 6 mers	0.5 µl	反応時間	
RNA template	0.25 µg	37℃	15 min
RNase Free dH ₂ O		85℃	5 sec
Total	10 µl		

④Real-time PCR を SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)を用いて行った。

用いたプライマーの配列を Table 3-1 に示した。また、各遺伝子の 1 ng/ml の DNA 溶液を用いて希釈系列を 4 点調製して検量線を作成した。

	Cx32	その他		
SYBR Premix Ex Taq (2×)	10 µl	10 µl		
QuantiTect Primer Assay (10×)	2 µl	—		
Primer Mix (各 10 µM)	—	0.4 µl	反応時間	
ROX Reference Dye (50×)	0.4 µl	0.4 µl	95℃	10 sec
D.W.	5.6 µl	7.2 µl	95℃	5 sec
cDNA template	2 µl	2 µl	60℃	31 sec
Total	20 µl	20 µl		

} 40 cycle

Table 3-1 Primer sequences for real-time PCR

Gene	NCBI reference	Primer sequences (5'-3')	Product (bp)
<i>MDR-1</i>	NM_000927	F: GCTCCGATACATGGTTTTCCT R: TTACAGCAAGCCTGGAACCT	146
<i>p21</i>	NM_000389	F: GGAAGACCATGTGGACCTGT R: GGCCTTTGGAGTGGTAGAAA	146
<i>XAF1</i>	NM_017523	F: CTCGGTGTGCAGGAAGTGTAAA R: CAGGAACCGCAGGCAGTAA	79
<i>E-cadherin</i>	NM_004360	F: TTTTCCCTCGACACCCGATT R: GTGGTGGTGCCCCACTGTAT	165
<i>VEGF</i>	NM_001171623	F: AACTTTCTGCTGTCTTGG R: TTTGGTCTGCATTACAT	395
<i>RPL32</i>	NM_000994	F: CATCTCCTTCTCGGCATCA R: AACCTGTGTGCAATGCCTC	153
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: CCAACGTGTCAGTGGTGGAC R: CAGCGTCAAAGGTGGAGGAG	180

F: forward primer, R: reverse primer

Cx32 のプライマーには下記の 10×QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) を用いた : Hs_GJB1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (Product : 121 bp)

【腫瘍内タンパク質発現の検討～Western blotting～】

①－80℃で凍結保存しておいた腫瘍片の一部を切り出し、キムタオル上で水分を除いた後、1.5 ml マイクロチューブに入れて約 60～85 mg（腫瘍が小さい場合は約 20～45 mg）はかりとった。そこへ腫瘍重量の 5 倍量の lysis buffer を加えて、ソニケーターで氷上にて 30 秒間粉碎し、さらにマイクロチューブ用ホモジナイザーで腫瘍片をすりつぶした。15 分間氷上に静置した後、15,000 rpm、4℃で 20 分間遠心し、上清を回収した。

②タンパク定量を DC Protein Assay Kit を用いて行った。検量線は BSA (2.0 mg/ml) を用いて作成し、サンプルは 3～10 倍に希釈して、duplicate で定量した。なお希釈には蒸留水を用いた。またサンプルの吸光度は lysis buffer のみを加えた blank の吸光度で補正した。

- ③各サンプルをタンパク質量が 20 µg/well、アプライ量が 20 µl/well になるように lysis buffer と 4×sample buffer と混合し、95℃で 3 分間煮沸した。
- ④P-gp 用に 7.5%、その他のタンパク質用に 12%の SDS-polyacrylamide gel を作製してサンプルをアプライし、stacking gel を 50V、running gel を 120～150V で泳動した。
- ⑤泳動が終了したら PVDF 膜 (ATTO) への転写を 200 mA で 60 分間行った (分子量の大きい P-gp のみ 90 分間)。
- ⑥メンブレンを TBS-T で軽く洗浄後、5%スキムミルク/TBS-T 溶液で 4℃で一晩ブロッキングを行った (p21 と XAF1 のみ 0.5%ミルク)。
- ⑦TBS-T で 5 分×3 回洗浄後、1 次抗体溶液を加えて、室温で 1 時間かくはんした。
- ⑧TBS-T で 10 分×3 回洗浄後、2 次抗体溶液を加えて、室温で 1 時間かくはんした。
- ⑨TBS-T で 15 分×3 回洗浄後、メンブレンに ECL 試薬を滴下して発光させ、イメージスキャナーLAS-1000 Plus (フジフィルム工業) にて検出し、定量を行った。

☆抗体の希釈方法

	一次抗体		二次抗体	
	希釈倍率	希釈液	希釈倍率	希釈液
P-gp	1/500	1%ミルク	Mouse 1/10000	0.1%ミルク
p21	1/200	0.5% FBS, 1% BSA	Mouse 1/5000	1%ミルク
Cyclin B1	1/200	0.5% FBS, 1% BSA	Mouse 1/5000	1%ミルク
Bax	1/1000	0.5% FBS, 1% BSA	Rabbit 1/10000	1%ミルク
Bcl-2	1/1000	0.5% FBS, 1% BSA	Mouse 1/5000	1%ミルク
XAF1	1/200	イムノエンハンサー	Goat 1/5000	1%ミルク
β-actin	1/10000	0.5% FBS, 1% BSA	Mouse 1/5000	1%ミルク

イムノエンハンサー以外の抗体希釈液は TBS-T に溶解した。

5) 統計処理

結果は平均値±標準誤差 (S.E.) または標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定には Tukey-Kramer test を用いた。

2. 結果

投与試験中に死亡したマウスはいなかった。マウスの体重は、VBL 単独群および併用群で VBL の初回投与後に 1~3 g 減少した。しかし、2 回目以降の VBL 投与では、それ以上の体重減少はみられなかった (Fig. 3-1)。また VBL を投与したマウスでは、実験期間を通して便が水分を多く含んでいる様子だった。しかし、特に動きが鈍っている様子はみられなかった。

腫瘍径から体積を算出したところ、control 群での腫瘍体積の増加に比べて、Aza 単独群及び VBL 単独群ではあまり差異がなかったが、併用群では有意に腫瘍体積が抑制された (Fig. 3-2)。体積変化率も併用群で抑制される傾向がみられた (Fig. 3-3)。摘出後の腫瘍重量は、併用群で control 群や VBL 単独群よりも有意に抑制された (Fig. 3-4)。

次に、この併用効果の機序を検討した。まず mRNA 発現の結果を Fig. 3-5 に示した。検討する因子には、RCC のがん抑制遺伝子として報告されている Cx32、P-gp をコードする MDR-1、血管新生促進因子 VEGF に加え、メチル化による転写制御が報告されている細胞周期阻害因子 p21 (127)、アポトーシスを促進する XAF1 (X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-associated factor 1) (128)、及び細胞接着因子 E-cadherin (116, 117) を選択した。その結果、MDR-1、p21 及び XAF1 の mRNA 発現が、併用群で増加する傾向にあった。一方、Cx32 mRNA は減少する傾向にあり、VEGF 及び E-cadherin の mRNA 発現には変化がみられなかった。

つづいて、mRNA 発現が増加した因子に加え、他の細胞周期やアポトーシスに関わる因子についてタンパク質発現を検討した。Fig. 3-6 には、各群 3 匹ずつの Western blotting のバンドの写真及びその定量結果を示した。P-gp 発現は、MDR-1 mRNA 発現の変化とは逆に、併用群で control 群や VBL 単独群に比べて抑制された。p21 は併用群でやや増加する傾向にあり、細胞周期進行に関わる cyclin B1 およびアポトーシス抑制因子 Bcl-2 は減少する傾向にあった。アポトーシス促進因子の Bax は変化がみられなかった。XAF1 については mRNA 発現は増加していたが、タンパク質発現では増加を確認できなかった。

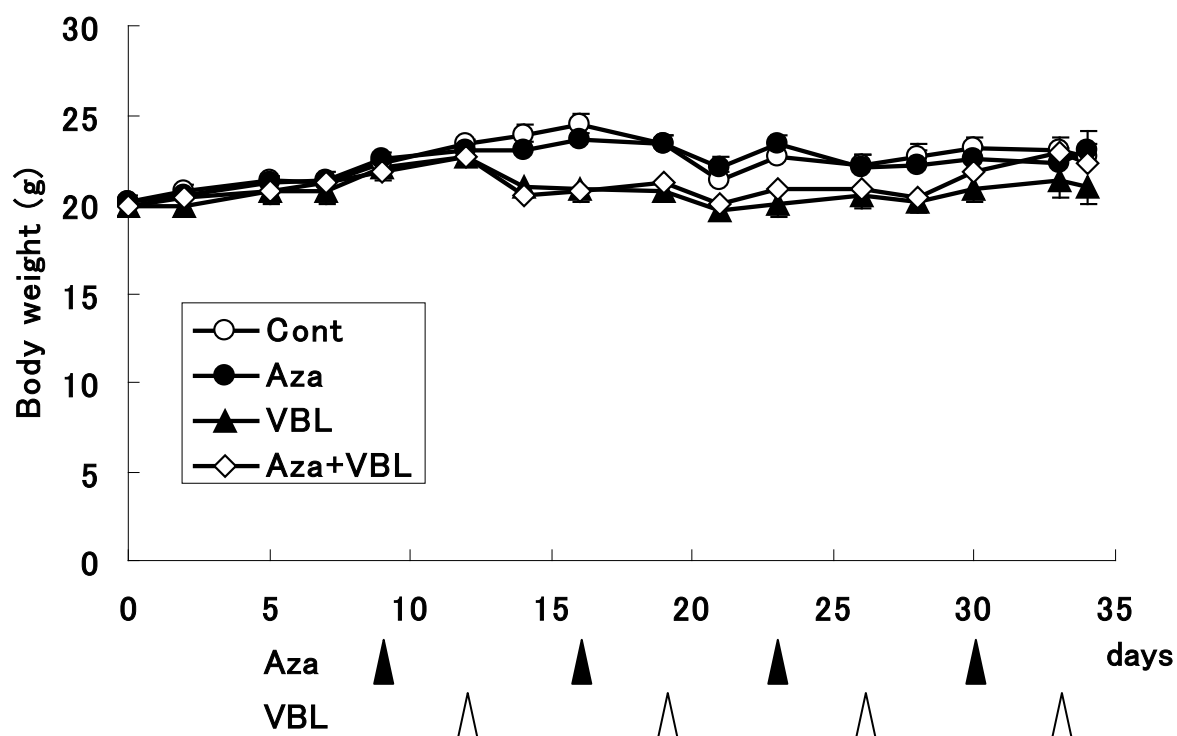


Fig. 3-1 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on the body weight of mice in a xenograft model. Aza (1.5 mg/kg) and VBL (1.5 mg/kg) was administered by *i.p.* injection. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$).

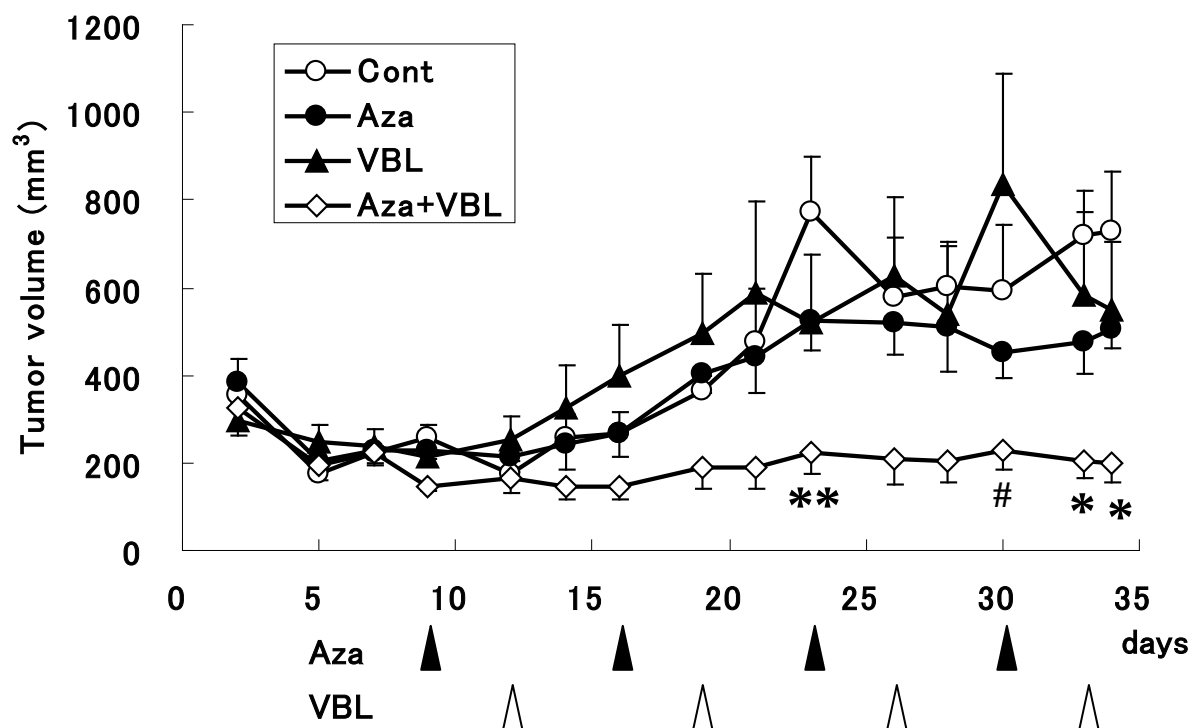


Fig. 3-2 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on the development of Caki-1 tumor volume in a xenograft model. Aza (1.5 mg/kg) and VBL (1.5 mg/kg) was administered by *i.p.* injection. The tumor volume was calculated as $[\pi/6 \times \text{large diameter} \times (\text{small diameter})^2]$. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, significantly different from control, # $p<0.05$, significantly different from VBL by Tukey-Kramer test.

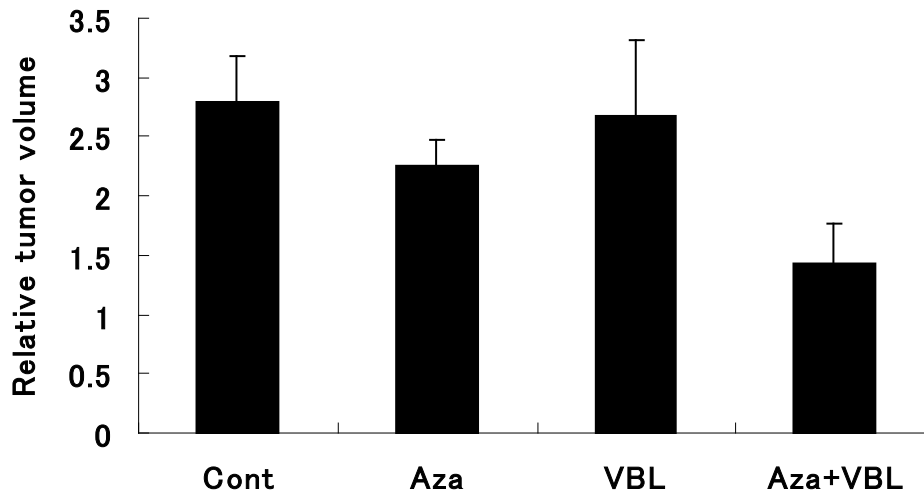


Fig. 3-3 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on the relative tumor volume of Caki-1 in a xenograft model. The relative tumor volume was determined as [(tumor volume on day 34)/(tumor volume on day 9)]. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$).

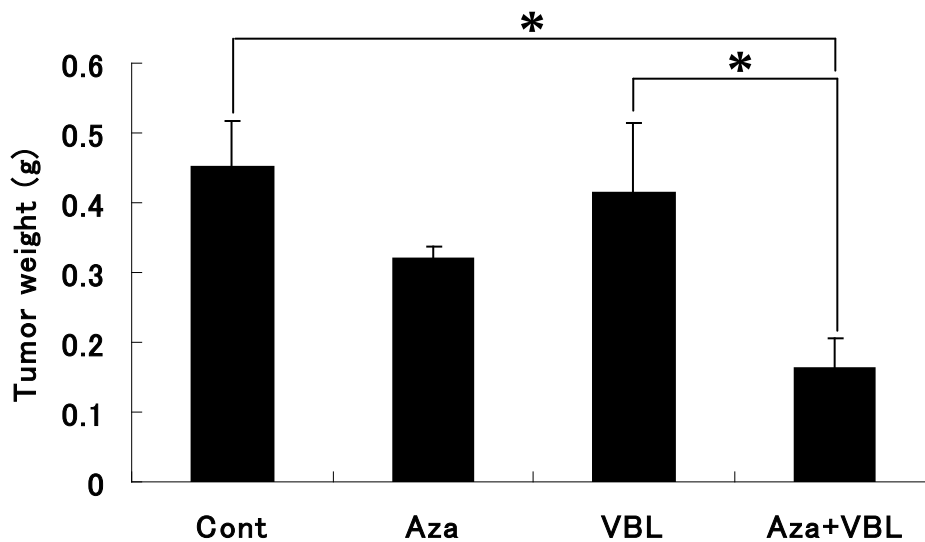


Fig. 3-4 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on the tumor weight of Caki-1 in a xenograft model. Tumor weight was measured after the removal of the tumor on day 34. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=6$). * $p<0.05$, significantly different by Tukey–Kramer test.

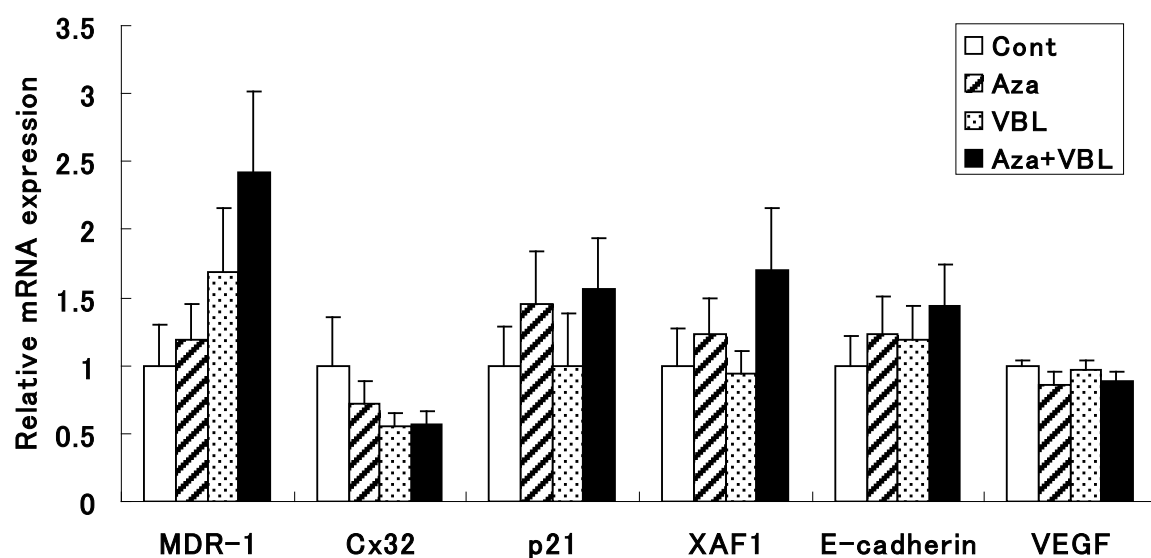


Fig. 3-5 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on mRNA expression in Caki-1 xenografts. Total RNA was extracted from xenografts and the mRNA levels were determined by real-time PCR. The mRNA level of each gene was normalized to the internal standard RPL32 and presented as a ratio to the control. Each value represents the mean $\pm$ S.E. ($n=5-6$).

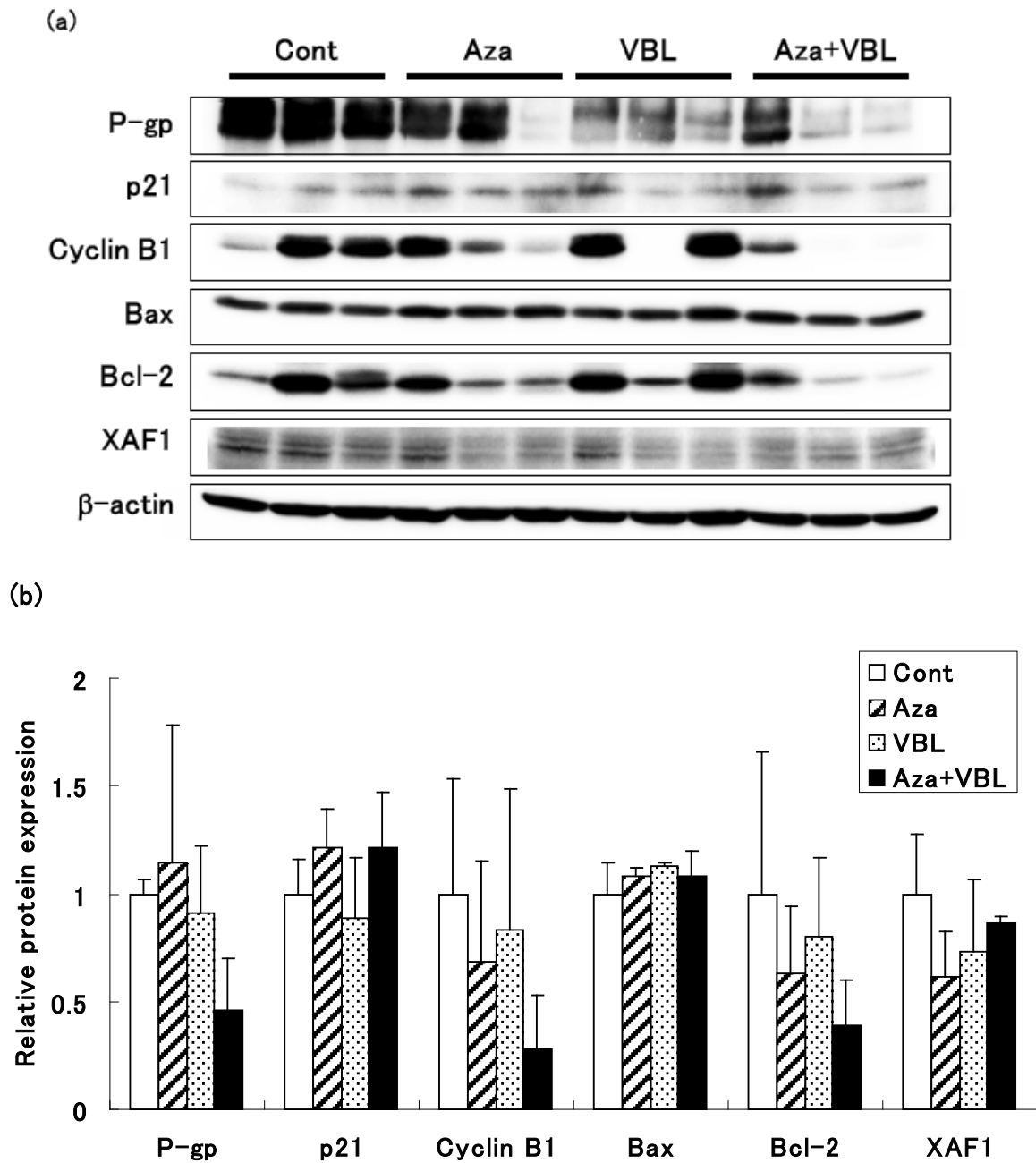


Fig. 3-6 Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on protein expression in Caki-1 xenografts. Whole cell lysates isolated from xenografts were analyzed by western blotting. (a) The bands corresponding to three samples per group are shown. (b) The intensity of the bands was normalized to the internal standard β -actin and presented as a ratio to control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

考察

これまでの報告(129, 130)を参考にして投与量に関する予備検討を行ったところ、Aza 2.5 mg/kg では単独での腫瘍増殖抑制作用が顕著であり、VBL 2.0 mg/kg では死亡するマウスもいるという結果などを得た。そこで、併用効果を検討する今回は、Aza と VBL の投与量とともに 1.5 mg/kg に決定した。

まず、マウスに Caki-1 を皮下移植したモデルにおいて、腫瘍体積の増加や摘出後の腫瘍重量が、Aza 単独群と VBL 単独群では抑制されなかったのに対し、併用群では有意に抑制された。よって、Caki-1 に対する Aza と VBL の併用効果は、腫瘍移植モデルにおいてもみられることが確認された。また、VBL 投与によって体重減少と軽度な下痢の症状がみられたが、忍容できるものであった。

次に、腫瘍内の mRNA やタンパク質発現から、この併用効果の作用機序を検討した。以前の *in vitro* の検討で、Aza によって P-gp 発現が抑制されたことから(125)、今回の *in vivo* の検討でも P-gp 発現への影響を調べた。その結果、P-gp 発現が併用群で抑制されていることが確認され、細胞内の VBL 濃度が上昇し、VBL の抗腫瘍効果が増強した可能性が考えられた。RCC の薬剤耐性の原因の一つとして P-gp の過剰発現が考えられるため(114, 115)、Aza と殺細胞薬の併用は RCC の耐性克服に有望であることが示唆された。

今回の検討では、P-gp タンパク質発現の変化が MDR-1 mRNA 発現の変化と一致しない結果となった。これまでの報告から、その原因として P-gp の翻訳阻害と、P-gp の分解系の亢進が考えられた。Yague らは、白血病細胞においてコルヒチンやビンブラスチンなどの抗がん剤の曝露によって、MDR-1 mRNA は誘導されるが、P-gp は増加しなかったことを報告している(131)。そして、この翻訳阻害の機序として、mRNA にリボソームが会合していないことを明らかにしている。一方、P-gp の分解経路としては、ユビキチン化に続くプロテアソームでの分解と小胞体のプロテアーゼによる分解が報告されている(132, 133)。このうちプロテアソーム分解において、ユビキチン化されたタンパク質を ATP ase まで輸送する働きのある SHP1 という因子(134)が、Aza によって脱メチル化されて発現が上昇するという知見がある(23)。すなわち、Aza によってプロテアソーム分解が亢進することが考えられ、実際、増殖シグナル因子の JAK2 が、Aza によってその発現が減少し、プロテアソーム阻害薬の MG132 を併用することで発現が回復したことが示されている(23)。我々の検討で、併用群で MDR-1 mRNA の増加に関わらず P-gp タンパク質発現が減少したことには、P-gp の翻訳過程での制御とプロテアソームによる P-gp 分解の

亢進が関与している可能性が考えられた。

Cyclin B1 は G2 期の終わりに発現し、cyclin-dependent kinase (CDK) である cdc2 と複合体を形成して、細胞周期を M 期へ進行させる働きがある。p21 は CDK の阻害因子であり、G1 期および G2 期にて細胞周期を停止させる (arrest) を引き起こすことが分かっている(135, 136)。これまでに、Aza が、cyclin B1 mRNA の減少や p21 タンパク質の増加を介して G2/M arrest を起こすことが報告されている(137)。今回の検討では、併用群で control 群や VBL 単独群に比べて p21 の mRNA、タンパク質発現が共にやや上昇し、cyclin B1 タンパク質発現が減少したことから、G1 期や G2 期での arrest が併用効果に寄与していることが推測された。また、アポトーシス抑制因子の Bcl-2 が減少したことから、併用群でアポトーシスが亢進していることが示唆された。

我々の以前の検討では、Aza 2.5 mg/kg の単独投与 (週 1 回、*i.p.*) によって腫瘍増殖が顕著に抑制された(129)。このとき腫瘍内の Cx32 mRNA 発現の回復及び VEGF タンパク質発現の減少がみられており、Aza の抗腫瘍効果への Cx32 や VEGF の関与が推測された。しかし今回の検討では、Aza 単独、併用群ともに Cx32 mRNA は増加せず、また VEGF mRNA に変化はなかった。その原因としては、今回は低用量の 1.5 mg/kg の Aza を用いたことが考えられた。よって、今回の増殖抑制作用には Cx32 や VEGF は関与していないことが示唆された。

E-cadherin はがん細胞の浸潤や転移に関与するがん抑制遺伝子であり、最近では、E-cadherin が増殖シグナルを抑制していることも報告された(138)。一方、XAF1 はカスパーゼ阻害因子である XIAP を抑制し、アポトーシスを促進する働きがある(139)。また、RCC 患者で XAF1 発現と予後の関連も示唆されている(140)。Ishiguro らは大腸癌細胞に対して Aza とイリノテカンを併用添加した際、XAF1 mRNA が単独添加に比べて増加したと報告している(122)。しかし、本検討の併用群では、E-cadherin mRNA と XAF1 タンパク質の明確な増加は確認できず、併用効果には寄与していないと推測された。

つづいて第 2 節では、Caki-1 でみられた Aza と VBL の併用効果が、他のヒト腎細胞癌株でもみられるか検討するため、786-O 細胞株と A498 細胞株も用いて *in vitro* にて検討した。

第2節 *in vitro*における脱メチル化薬とビンブラスチンの併用効果およびその作用機序の検討

1. 方法

1) 使用細胞

ヒト腎細胞癌株：Caki-1、786-O 及び A498

Caki-1 は ATCC より購入した。786-O 及び A498 は東洋大学生命科学部 矢野友啓教授より譲受した。

Caki-1 は McCoy's 5A medium modified (10 % FBS、1 % Penicillin-Streptomycin)、786-O 及び A498 は DMEM (10 % FBS、1 % Penicillin-Streptomycin) を用いて、37°C、5 % CO₂ 下にて培養した。

2) 使用薬物（下記以外のものは第2章および第3章第1節に従った）

5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza)	SIGMA
100 mM になるよう DMSO に溶解し、培地で用時希釈した。	
Vinblastine Sulfate (VBL)	Wako
1 mM になるよう DMSO に溶解し、培地で用時希釈した。	
Anti-cdc2 p34 (17)	Santa Cruz (sc-54)
Phospho-cdc2 (Tyr15) antibody	Cell Signaling (9111)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
Methylamp DNA Modification Kit	Epigentek
<i>Premix Ex Taq</i> Hot Start Version	TaKaRa
Agarose XP	ニッポンジーン
Acetic acid	Wako
Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt solution (EDTA)	SIGMA
100 bp DNA Ladder	Genedirex
6×Loading buffer	TaKaRa
Ethidium bromide	Wako
TAE buffer : 40 mM Tris, 40 mM Acetic acid, 1 mM EDTA	

3) 実験手法

【薬剤処理】

細胞を播種して 24 時間後、培地を除去して Aza を添加した。MTT assay では

0.02, 0.1, 0.5, 1 及び 5 μM の Aza を、その他の検討では Caki-1 と A498 には 0.1 μM 、786-O には 0.5 μM の Aza を加えた。Control には、最大濃度の Aza と同濃度の DMSO 含有培地を加えた。72 時間後、培地を除去して VBL 10 nM を添加した。Control には同濃度の DMSO 含有培地を加えた。さらに 48 時間後、各アッセイを行った。

【細胞生存率の検討～MTT assay～】

細胞を Caki-1: 2×10^3 cells/well、786-O 及び A498: 1.5×10^3 cells/well となるよう 96 well plate に播種し (100 μl /well)、上記の薬剤処理を行った。

その後の操作は第 2 章に従った。

【細胞周期の検討～Flow cytometry～】

細胞を Caki-1: 8×10^4 cells/dish、786-O 及び A498: 6×10^4 cells/dish となるよう 60 mm dish に播種し (4 ml/dish)、上記の薬剤処理を行った。

その後の操作は第 2 章に従った。

【mRNA 発現の検討～Real-time PCR～】

①細胞を Caki-1: 4×10^4 cells/well、786-O 及び A498: 3×10^4 cells/well となるよう 6 well plate に播種し (2 ml/well)、上記の薬剤処理を行った。

②各 well の培地を除去して冷 PBS 1 ml で 1 回洗った後、Buffer RLT (2-mercaptoethanol を 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 含有) を 350 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加えて、細胞を回収した。

③RNA 抽出を RNeasy Mini Kit を用いて行った。

細胞 lysate を 1 ml シリンジに取り付けた 21G 注射針に 10 回通した。ここに 70% ethanol を 350 μl 添加し、これを RNeasy Mini Spin Column にアプライし、10,000 rpm で 15 秒間遠心した。Buffer RW1、Buffer RPE (×2 回) で洗浄後、カラムのメンブレンを乾燥させ RNase-free water で RNA を溶出した。RNA 溶液を TE で希釈し、RNA 濃度を吸光度計 Smart Spec 3000 (Bio-Rad) を用いて定量した。

RT 反応以降の操作は第 3 章第 1 節に従った。

【タンパク質発現の検討～Western blotting～】

①細胞を Caki-1: 6×10^4 cells/well、786-O 及び A498: 4.5×10^4 cells/well となるよう 6 well plate に播種し (2 ml/well)、上記の薬剤処理を行った。

②各 well の培地を除去して冷 PBS 1 ml で 1 回洗った後、液体窒素で急速冷凍 (3

秒) と室温で解凍とを 3 回繰り返した。Lysis buffer を 150 μ l/well 加えて、セルスクレーパーでかき取って 1.5 ml マイクロチューブに移し、氷上で 10 秒間超音波をかけた。そして氷上に 15 分間静置した後、15,000 rpm、4℃で 20 分間遠心し、上清を回収した。

タンパク定量以降の操作は第 3 章第 1 節に従った。ただし、cdc2 と p-cdc2 の検出の際は、5%スキムミルクによるブロッキングを室温で 1 時間に、一次抗体反応を 4℃で一晩にそれぞれ変更した。

☆抗体の希釈方法

	一次抗体		二次抗体	
	希釈倍率	希釈液	希釈倍率	希釈液
cdc2	1/200	0.5% FBS, 1% BSA	Mouse 1/5000	1% ミルク
p-cdc2	1/2000	0.5% FBS, 1% BSA	Rabbit 1/10000	1% ミルク

抗体希釈液は TBS-T に溶解した。

【p21 遺伝子のメチル化状態の検討～Methylation-specific PCR～】

①Caki-1 を 1×10^5 cells/well となるよう 6 well plate に播種し (2 ml/well)、24 時間後、培地を除去して Aza 1 または 5 μ M を添加した。Control には 5 μ M Aza と同濃度の DMSO 含有培地を加えた。

②72 時間曝露後、トリプシンで細胞をはがした後、培地を加えて懸濁し、懸濁液を 1.5 ml マイクロチューブに移して 300 g で 5 分間遠心した。そしてアスピレーターで上清を完全に除去した。

※なお、同様に培養した細胞を用いて、p21 mRNA 発現を上述の方法を用いて検討した。

③DNA 抽出を QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いて行った。

細胞ペレットを PBS 200 μ l で懸濁し、QIAGEN Protease を 20 μ l 加えた。ここに Buffer AL を 200 μ l 加えて、15 秒間ボルテックスした後、56℃で 10 分間インキュベートした。さらに 99.5%エタノールを 200 μ l 加えて、15 秒間ボルテックスした後、混合液を QIAamp Spin Column にアプライして 8,000 rpm、20℃で 1 分間遠心した。Buffer AW1、Buffer AW2 で洗浄後、カラムのメンブレンを乾燥させ Buffer AE 100 μ l で DNA を溶出した。DNA 溶液を TE で希釈し、DNA 濃度を吸光度計 Smart Spec 3000 (Bio-Rad) を用いて定量した。

④バイサルファイト処理を Methylamp DNA Modification Kit を用いて行った。

DNA 200 ng を含む DNA 溶液と滅菌水を合計 24 μ l になるよう 1.5 ml マイクロチューブに入れ、さらに R1 を 1 μ l 加えてよく混合し、37°C で 10 分間インキュベートした。ここへ R1/R2/R3 Mix を 125 μ l 加えてボルテックスし、65°C で 90 分間インキュベートした。

つづいて R4 を 300 μ l 加えてよく混合した後、Spin Column にアプライして 12,000 rpm、20°C で 15 秒間遠心した。R5 200 μ l で洗浄した後、R1 含有 90% エタノールを 50 μ l 加え、8 分間静置した後、12,000 rpm で 15 秒間遠心した。90% エタノールで 2 回洗浄後、R6 18 μ l で modified DNA を溶出した。

⑤PCR を *Premix Ex Taq* Hot Start Version を用いて行った。用いたプライマーの配列およびアニーリング温度を Table 3-2 に示した。

		反応時間	
<i>Premix Ex Taq</i> Hot Start Version	10 μ l	94°C	5 min
Primer Mix (各 10 μ M)	0.8 μ l	94°C	30 sec
D.W.	8.2 μ l	—°C	1 min
Modified DNA	1 μ l	72°C	1 min
Total	20 μ l	72°C	5 min

} 38 cycle

Table 3-2 Primer sequences for methylation-specific PCR

Gene /NCBI reference	Primer sequences (5'-3')		Location to transcription start	Annealing temperature /Product
p21	(M)	F: TGTAGTACGCGAGGTTTTCG	−196~+5	55°C
NG_009364		R: TCAACTAACGCAACTCAACG		202 bp
	(U)	F: TTTTGTAGTATGTGAGGTTTGG	−200~−1	60°C
		R: AACACAACTCAACACAACCCTA		200 bp

M: methylated sequence, U: unmethylated sequence

F: forward primer, R: reverse primer

⑥3%アガロースゲルを用いて電気泳動 (100 V) を行い、増幅産物を分離した。Ethidium bromide により染色後、UV トランスイルミネーターによりバンドを確認した。なお、電気泳動の際は 1×TAE buffer を用い、塩基量のマーカーとして

100 bp DNA Ladder を用いた。

【モルヒネ共添加の影響の検討～MTT assay～】

786-O を 1.5×10^3 cells/well となるよう 96 well plate に播種し (100 μ l/well)、24 時間後、培地を除去して Aza 0.5 μ M とモルヒネ 1, 10 及び 100 μ M を同時添加した。Control には Aza 0.5 μ M + モルヒネ(-)と同濃度の DMSO 含有培地を加えた。72 時間後、培地を除去して VBL 10 nM とモルヒネ 1, 10 及び 100 μ M を同時添加した。Control には VBL 10 nM + モルヒネ(-)と同濃度の DMSO 含有培地を加えた。さらに 48 時間後、MTT assay を行った。MTT assay の操作は第 2 章に従った。

4) 統計処理

MTT assay の結果は control の吸光度に対する百分率 (%) で表し、平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で示した。Flow cytometry の結果は平均値を示した。Real-time PCR の結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定には Tukey-Kramer test または Dunnett's test を用いた。

2. 結果

いずれの細胞株でも、Aza 単独によって用量依存的に細胞増殖が抑制された。そして VBL 10 nM の殺細胞作用が、Aza の前投与により増強された (Fig. 3-7)。このとき明確な併用効果をもたらした Aza の濃度として、Caki-1 及び A498 では 0.1 μ M、786-O では 0.5 μ M を選択して、その後の検討を行った。細胞周期への影響を検討したところ、どの細胞株においても、薬物添加によって subG1 期の顕著な増加が認められた (Fig. 3-8)。特に 786-O と A498 では、併用添加によって単独添加よりもさらに subG1 期が増加した。

この併用効果の機序の検討として、まず、MDR-1 と p21 の mRNA 発現を検討した。なお、786-O と A498 では RPL32 の発現が Aza によってやや変動したため、内部標準を GAPDH に変更した。MDR-1 については、Caki-1 では VBL によって発現が低下し、一方で 786-O では発現が増加し、Aza 併用による変化はなかった。A498 では、control に比べて Aza 添加で、また VBL 添加に比べて併用添加で MDR-1 発現が抑制された (Fig. 3-9)。p21 については、いずれの細胞でも Aza 単独で 2.1 ~ 6.2 倍に増加し、併用添加によっても同様の発現増加がみられた (Fig. 3-10)。

次に、P-gp、Bax 及び Bcl-2 のタンパク質発現を検討した (Fig. 3-11a)。786-O と A498 では、VBL によって P-gp の発現がやや上昇し、それが Aza 併用により抑制された。また、Bcl-2 発現が Aza 単独及び併用添加により大きく減少した。一方、Caki-1 では、VBL によって control よりも P-gp の発現が増加したが、Aza 併用による変化はみられなかった。Bcl-2 発現にも変化はみられなかった。さらに、Caki-1 については細胞周期に関わる因子も検討した (Fig. 3-11b)。その結果、p21 の発現が薬物添加によって増加した。また、cyclin B1 と cdc2 の不活性化体である phosphorelated-cdc2 (p-cdc2) の発現は、VBL 単独添加ではほぼ消失し、Aza 併用ではそれらの発現が維持されていた。cdc2 には変化はみられなかった。

ここまでの *in vivo* (第1節) 及び *in vitro* (本節) の検討から得られた、VBL 単独群と比較した併用群でのタンパク質発現の変動について、Fig. 3-12 にまとめた。

さらに、Aza の標的遺伝子を探索するため、Caki-1 における Aza による p21 タンパク質の発現上昇に注目した。Caki-1 に Aza 1 及び 5 μ M を 72 時間作用させたところ、p21 の mRNA 発現も有意に増加した (Fig. 3-13a)。次に、p21 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態についてメチル化特異的 PCR を用いて調べた。その結果、control の細胞では非メチル化 DNA のバンドが検出され、メチル化 DNA のバンドは確認されなかった。また、Aza を作用させた細胞でも、control と同様の結果となった (Fig. 3-13b)。

最後に、Aza と VBL の併用効果が鎮痛用量のモルヒネの影響を受けるか検討するため、786-O にて Aza または VBL とモルヒネを同時添加した。その結果、モルヒネ 100 μ M を添加した場合でも、control、Aza 単独、VBL 単独及び併用添加の細胞生存率にほとんど影響は与えなかった (Fig. 3-14)。

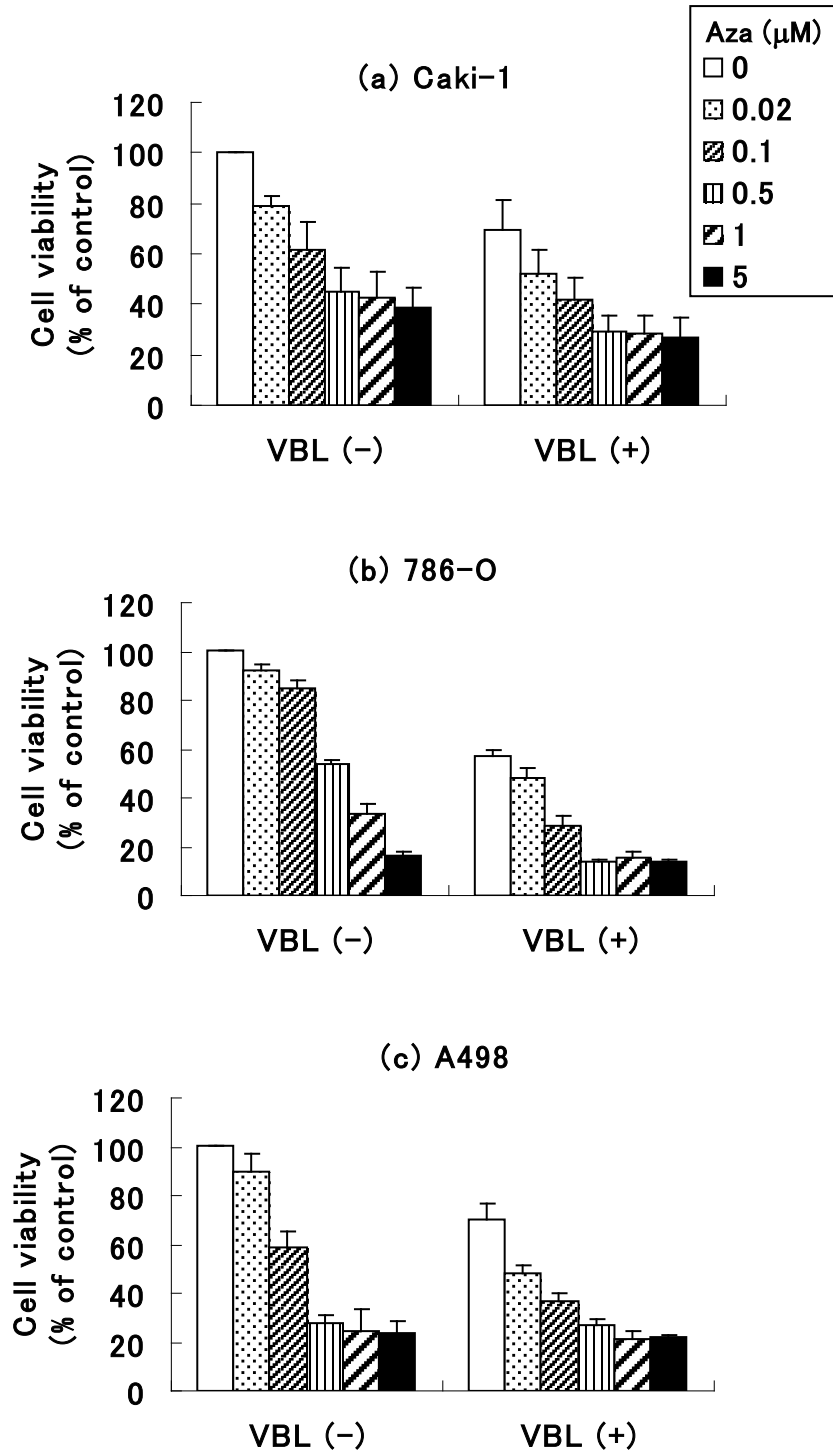


Fig. 3-7 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on (a) Caki-1, (b) 786-O, and (c) A498 cell proliferation. Cells were treated with the indicated concentrations of Aza for 72 h followed by 10 nM of VBL for 48 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$).

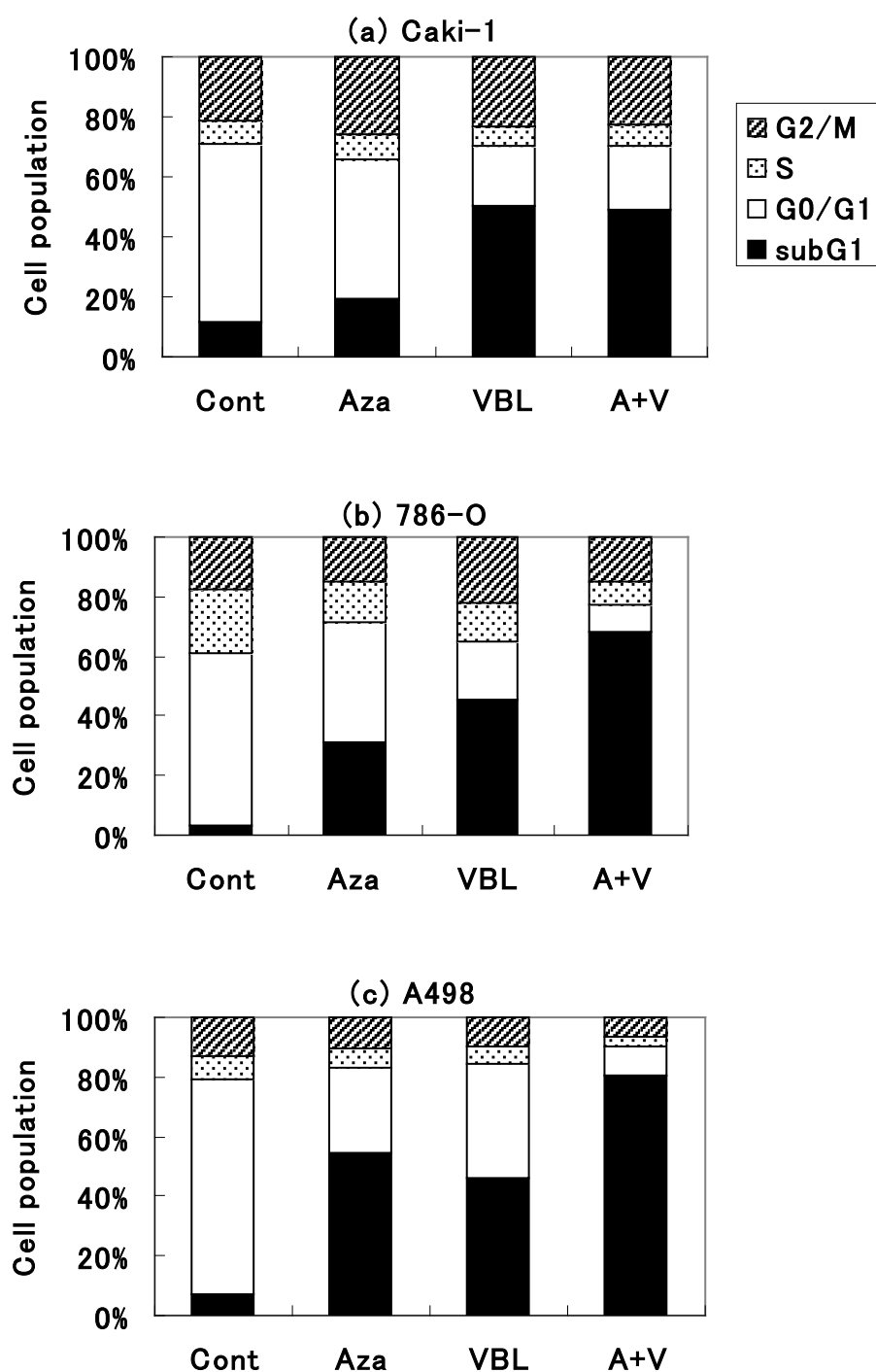


Fig. 3-8 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on (a) Caki-1, (b) 786-O, and (c) A498 cell cycle distribution. Cells were treated with 0.1 μ M (Caki-1 and A498) or 0.5 μ M (786-O) of Aza for 72 h followed by 10 nM of VBL for 48 h. After treatment, cell cycle analysis was performed by flow cytometry. Each value represents the mean ($n=3$). A+V, Aza followed by VBL.

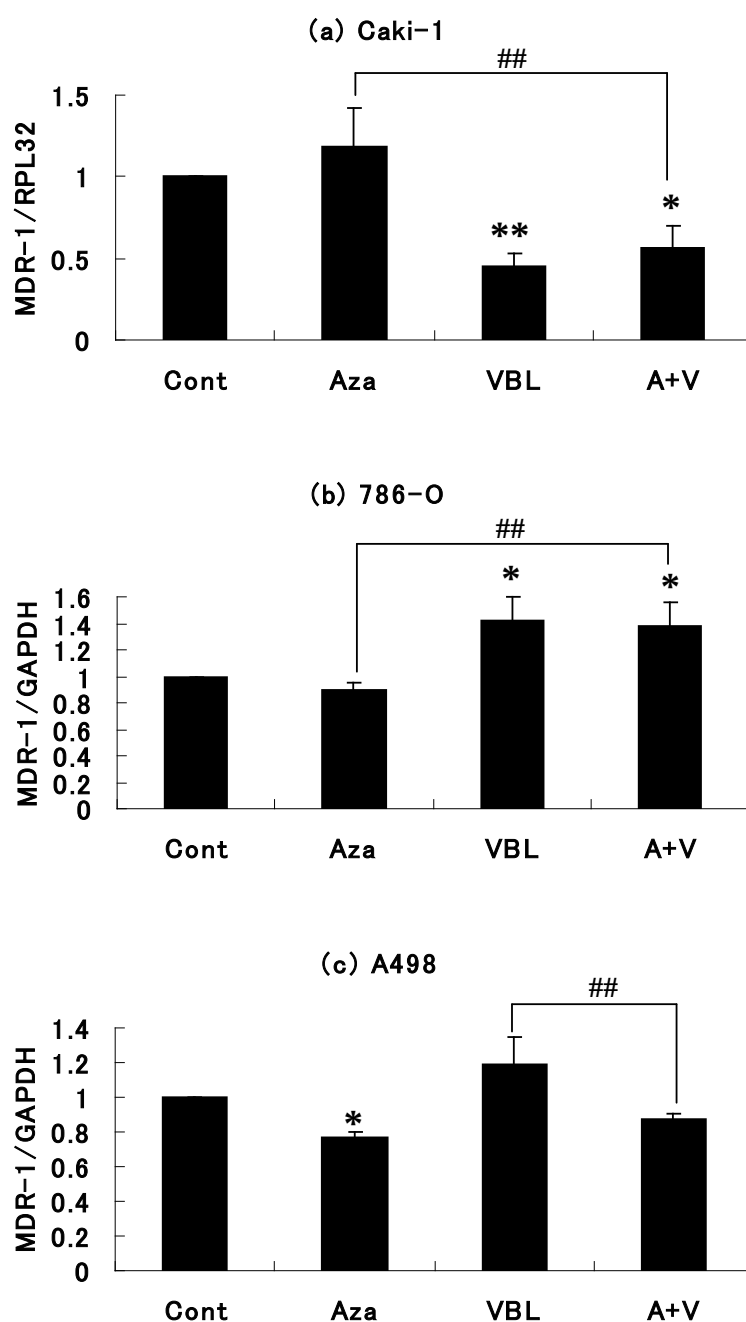


Fig. 3-9 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on MDR-1 mRNA expression in (a) Caki-1, (b) 786-O, and (c) A498 cells. Cells were treated as described in the legend to Fig. 3-8. The mRNA levels were determined by real-time PCR, normalized to the internal standard RPL32 or GAPDH, and presented as a ratio to the control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, significantly different from control, ## $p<0.01$, significantly different by Tukey-Kramer test. A+V, Aza followed by VBL.

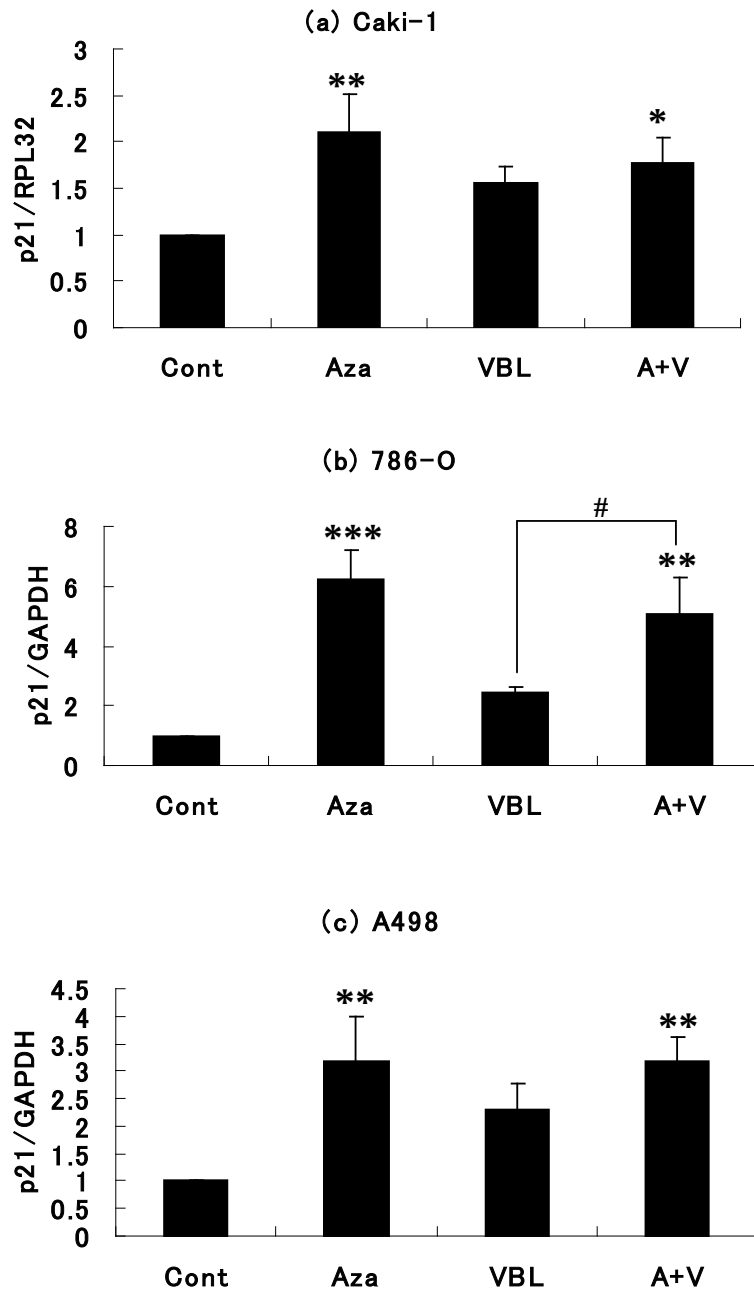


Fig. 3-10 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on p21 mRNA expression in (a) Caki-1, (b) 786-O, and (c) A498 cells. Cells were treated as described in the legend to Fig. 3-8. The mRNA levels were determined by real-time PCR, normalized to the internal standard RPL32 or GAPDH, and presented as a ratio to the control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$, significantly different from control, # $p<0.05$, significantly different by Tukey-Kramer test. A+V, Aza followed by VBL.

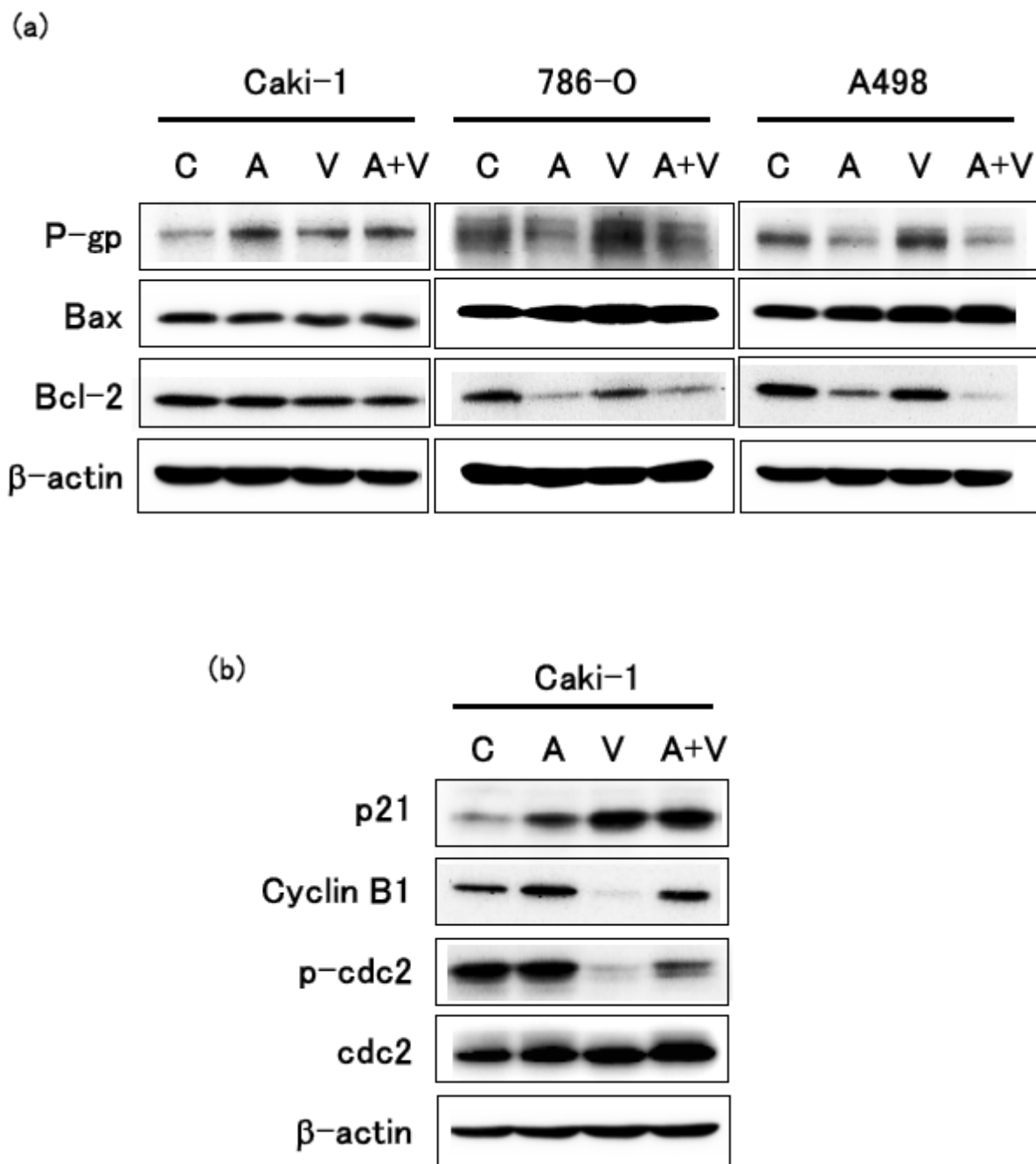


Fig. 3-11 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) and vinblastine (VBL) on the protein expression in Caki-1, 786-O, and A498 cells. Cells were treated as described in the legend to Fig. 3-8. Whole cell lysates were analyzed by western blotting. β -Actin was used as an internal control. The data shown are representative of three independent experiments.

C, control; A, Aza alone; V, VBL alone; A+V, Aza followed by VBL.

Protein	Caki-1 xenografts	<i>in vitro</i> assay		
		Caki-1	786-O	A498
P-gp	↓	→	↘	↓
Bax	→	→	→	→
Bcl-2	↓	→	↓	↓
p21	↗	→	—	—
Cyclin B1	↓	↑	—	—
p-cdc2	—	↗	—	—
cdc2	—	→	—	—

↗ : increased, ↑ : strongly increased
 ↘ : decreased, ↓ : strongly decreased
 → : not changed, — : not detected

Fig. 3-12 Summary of the changes in protein expression in the co-treatment group with 5-aza-2'-deoxycytidine and vinblastine, compared to vinblastine alone. Data were obtained from the *in vivo* and *in vitro* assays.

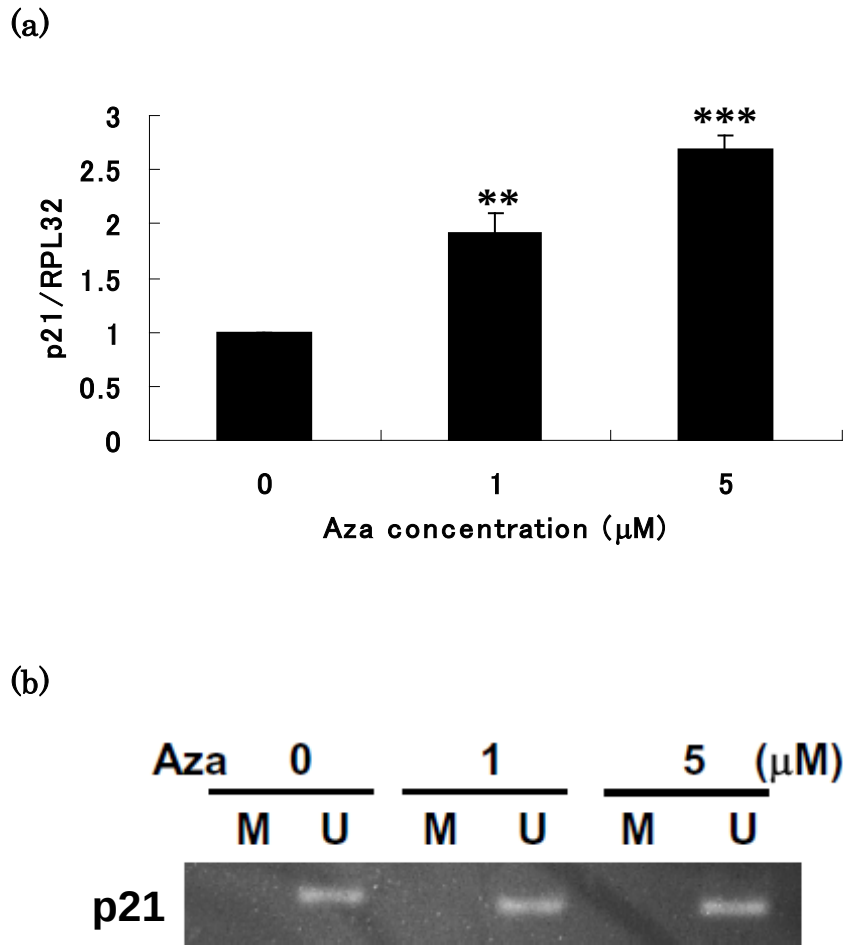


Fig. 3-13 (a) Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) on the expression of p21 mRNA in Caki-1 cells. Cells were treated with 1 and 5 μ M Aza for 72 h. p21 mRNA levels were determined by real-time PCR, normalized to the internal standard RPL32, and presented as a ratio to the control. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, significantly different from control by Dunnett's test. (b) Analysis of the methylation status of the p21 gene promoter in Caki-1 cells. Cells were treated with 1 and 5 μ M Aza for 72 h. After the treatment, methylation-specific PCR analysis was performed using bisulfite-modified DNA. M, methylated DNA; U, unmethylated DNA.

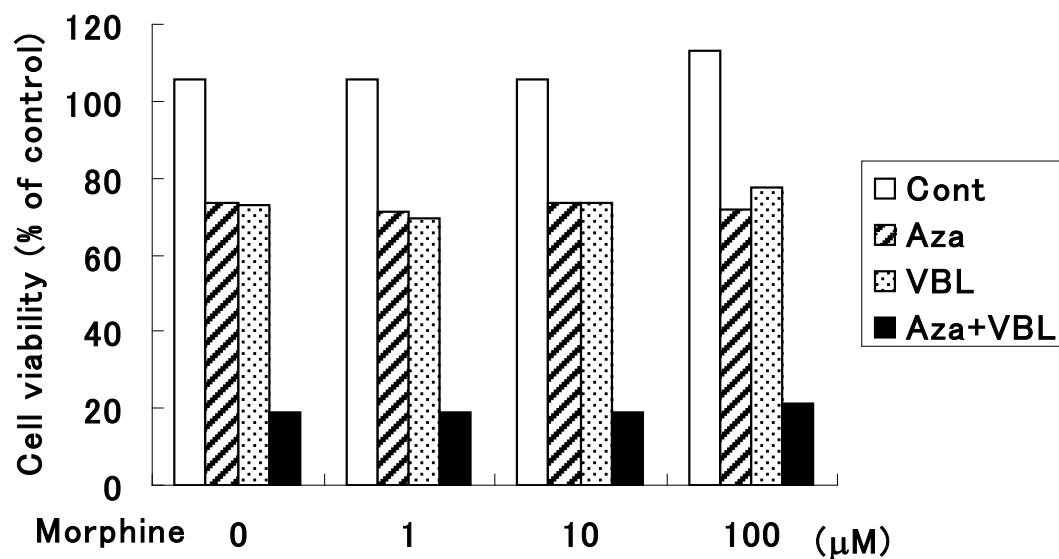


Fig. 3-14 Effects of the combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza), vinblastine (VBL), and morphine on 786-O cell proliferation. Cells were treated with 0.5 μM of Aza for 72 h followed by 10 nM of VBL for 48 h in the presence of morphine (1, 10, or 100 μM). Cell viability was determined by the MTT assay. Each value represents the mean ($n=2$).

考察

第2節では、Caki-1に加え、他の腎細胞癌株 786-O 及び A498 も用いて、Aza と VBL の併用効果を *in vitro* にて検討した。その結果、786-O 及び A498 においても、Caki-1 と同様に VBL の殺細胞作用が Aza 併用によって増強されることが示された。続いて併用効果の作用点について解析した。

まず、*in vivo* の検討で作用点と考えられた MDR-1 mRNA 発現と P-gp タンパク質発現を検討したところ、A498 では両者の変動がほぼ一致したが、Caki-1 と 786-O では一致していない部分もあった。第1節で考察したように、P-gp の翻訳過程や分解過程での制御が影響している可能性が考えられる。最終生成物のタンパク質発現でみると、786-O と A498 では併用添加によって P-gp が減少しており、細胞内 VBL 濃度が上昇していることが推測された。一方、Caki-1 では、Aza 併用による P-gp タンパク質発現の変化はみられなかった。

次に細胞周期制御に関わる因子について検討した。Caki-1 において、p21 の mRNA 及びタンパク質発現が共に薬物添加によって増加したが、VBL 単独と併用の間では差がみられなかった。ここで、cyclin B1 は cdc2 と複合体を形成するが、この cdc2 は Tyr15 と Thr14 がリン酸化されると不活性化体 (p-cdc2) となる。今回の Caki-1 における検討では、cyclin B1 と p-cdc2 の発現が VBL 単独 (48 時間曝露) ではほぼ消失したが、併用では発現が一部維持されていた。これまでに、がん細胞を微小管作用薬のパクリタキセルやノコダゾールで処理すると、M 期の細胞の割合や cyclin B1 発現、cdc2 のキナーゼ活性は 24 時間後にピークに達し、48 時間後には著しく減弱することが分かっている(141)。また Yan らは、アルキル化薬によって生じた G2/M arrest が、DNA メチル基転移酵素阻害薬を併用することで、曝露 48 時間後でも持続することを示している(142)。さらにこの時、アルキル化薬単独では cyclin B1 と p-cdc2 の発現が 48 時間後には減少しているのに対し、2 剤を併用するとこれらの発現が 48 時間後でも上昇していることが明らかになった。今回の検討でも、VBL 添加 48 時間後で cyclin B1 と p-cdc2 の発現が維持されていたことから、Aza 併用によって G2 arrest が持続している可能性が考えられた。それにより、VBL 単独に比べて Aza 併用時に細胞生存率が低下したと推測された。

なお、786-O と A498 においても p21、cyclin B1 及び cdc2 の発現を検討したが、Caki-1 ほど再現性が得られなかった。VBL 添加 48 時間後というタイムポイントが因子の発現を見るうえでは適切でなかったことも考えられるため、より短いタイムポイントでも検討する必要があるだろう。

さらにアポトーシス経路について検討したところ、786-O と A498 では、VBL 単独に比べて Aza 併用によってさらに subG1 期が増加し、また Bcl-2 が減少していたことから、併用効果にはミトコンドリア経路を介したアポトーシスが寄与していると推測された。一方 Caki-1 では、併用による subG1 期のさらなる増加や、Bcl-2 の変化はみられなかった。

今回の検討では、用いた細胞株の間でアポトーシスの強度や因子の発現に違いがみられた。この違いの要因を細胞の特性に注目して考えてみると、RCC での主要ながん抑制遺伝子である VHL について、Caki-1 では野生型の VHL 遺伝子が発現しているが、786-O と A498 では VHL 遺伝子に変異が見つかっている(100)。VHL は低酸素誘導因子 HIF- α の分解に関わる因子である。そのため、VHL が変異すると HIF- α が恒常的に発現し、種々の遺伝子の転写が活性化される(99)。その遺伝子の中には、アポトーシス促進因子である BNIP3 も含まれている(143)。また BNIP3 は、メチル化制御を受けており、Aza で発現が増加することも報告されている(144)。786-O や A498 では、VHL の変異及び Aza 添加によって BNIP3 の発現が増加し、Caki-1 に比べてアポトーシスへの感受性が高くなっていた可能性が推測された。ただし、P-gp や Bcl-2 のタンパク質発現変化の細胞間での違いについては、VHL 変異の有無のみで説明するのは困難であるため、RCC の細胞株を増やして検討し、発現変化の傾向を明確にする必要がある。

また、第 1 節の Caki-1 の腫瘍移植モデルでは、併用群にて P-gp や Bcl-2 の減少がみられたが、本節の Caki-1 の *in vitro* での検討では、それらの発現に変化がみられなかった。これは、*in vivo* で腫瘍組織内に到達した薬物濃度が *in vitro* での添加濃度と必ずしも一致しないことが影響していると考えられる。薬物の生体内での代謝や、腫瘍増殖に対する血管新生の影響なども考慮し、他の腎細胞癌株を用いた皮下移植モデルにおいても Aza と VBL の併用効果を検証する必要がある。

さらに、Aza が脱メチル化作用を及ぼしている標的遺伝子を探索するため、p21 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を検討した。しかしながら、Aza 非添加の細胞において、メチル化シトシンを含む配列が確認されなかったことから、Aza による p21 の発現上昇は、プロモーター領域の脱メチル化によるものではないことが示唆された。これまでに Aza が直接的な DNA 損傷を引き起こし、その結果 DNA 修復系の p53-p21 経路が活性化されたという報告がある(145)。Aza の直接の作用点を明らかにするには、別の標的遺伝子の探索に加え、DNA 損傷の評価も必要である。

Aza は単剤では固形腫瘍に効果が低いといわれており、VBL も白血球減少などの

副作用が問題となっていた。本検討の結果から、両者を併用投与することによって、Aza が固形腫瘍にも有効となることが示唆され、また VBL も投与量を減少させることが可能となり、副作用軽減につながる可能性が示された。

また、Aza と VBL の併用効果が、鎮痛用量のモルヒネを共添加した場合でもその影響を受けなかったことから、両薬剤の併用療法はモルヒネ服用患者にも有効であることが示唆された。

小括

- Caki-1 の皮下移植モデルマウスにおいて、Aza と VBL の併用投与により腫瘍の増殖及び重量が有意に抑制された。その機序としては、P-gp 抑制による細胞内 VBL 濃度の上昇、アポトーシスの亢進や細胞周期の停止が示唆された。
- Aza と VBL の併用効果は、Caki-1、786-O 及び A498 の 3 つの腎細胞癌株に対して *in vitro* にて認められた。その機序として、Caki-1 では細胞周期進行の阻害、786-O 及び A498 では P-gp 発現の抑制やアポトーシスの亢進が考えられた。
- 786-O において、Aza と VBL の併用効果はモルヒネ存在下でも確認された。

以上の結果から、Aza と VBL の併用療法が腎細胞癌の新たな治療法になりうる事が考えられた。また、この併用療法はモルヒネ服用患者にも有効であることが示唆された。

総括

がん緩和・薬物療法に対するモルヒネ及び脱メチル化薬の有用性について、薬理的ならびに分子生物学的手法を用いて解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) モルヒネの活性代謝物である **M6G** が、モルヒネ誘発便秘に寄与していることが明らかとなった。また、モルヒネ及び **M6G** は、オピオイド受容体を介して回腸輪状筋を収縮させて、便秘を誘発していることが推測された。一方、**M3G** は消化管平滑筋に対する作用が弱いことが示唆された。**M6G** は、現在、術後疼痛に対する臨床試験が行われているが(146)、便秘の発生には十分注意する必要があると言える。
モルヒネは結腸縦走筋及び結腸輪状筋に対しても収縮作用を示し、その機序として、抑制性神経からの NO 遊離を抑制していることが示唆された。
- 2) 鎮痛用量のモルヒネによって、ヒトがん細胞の増殖は変化しないことが示され、がん患者に対するモルヒネ使用は腫瘍に直接的には影響を与えないことが示唆された。
- 3) 治療薬の少ない腎細胞癌に対して、DNA 脱メチル化薬 **5-aza-2'-deoxycytidine** と化学療法薬ビンブラスチンの併用療法が有用であることが、腫瘍皮下移植モデル及び *in vitro* にて示された。その機序として、P 糖タンパク質の発現抑制や、アポトーシスの亢進、細胞周期の停止が考えられた。また、両薬剤の併用療法は、モルヒネ服用患者においても有効であることが示唆された。

適切な緩和医療を行うためには、鎮痛薬ごとの効果や副作用の特徴及びその発生機序を正しく理解しておくことが不可欠である。本研究では、モルヒネ誘発便秘への代謝物の関与とそのメカニズムをより明らかにした。また、モルヒネによってがんが増悪することはないことを示し、これはモルヒネの積極使用につながるものとする。一方、がん薬物療法の分野では、分子標的薬の登場によって大きな変革を迎えているが、分子標的薬単独で用いるのではなく、既存の抗がん剤との併用療法が行われる場合が多い。本研究では、血液系腫瘍には既に効果を示している DNA 脱メチル化薬とビンブラスチンの併用療法が、治療法の少ない腎細胞癌にも有用で

あることを示した。また、この併用療法がモルヒネによる緩和医療との共存が可能であることも示唆された。

これから先、がん患者が痛みに苦しむことなくがんに立ち向かい、そして、がんの克服に向け医療がさらに進歩していくことを願いたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省 平成 21 年 (2009 年) 人口動態統計 (確定数) の概況―第 6 表 : 性別にみた死因順位別死亡数・死亡率.
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei09/index.html>
(2011.1.17 アクセス)
- 2) 厚生労働省 「がん対策推進基本計画」の策定について.
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/06/s0615-1.html> (2011.1.17 アクセス)
- 3) 武田文和、石垣靖子 編. 癌患者の症状のコントロール. 医学書院. 1991.
- 4) 世界保健機関 編、武田文和 訳. がんの痛みからの解放 : WHO 方式がん疼痛治療法 第 2 版. 金原出版. 1996.
- 5) がん研究振興財団 がんの統計 2009 年版―資料編 11 : 医療用麻薬使用量.
<http://www.fpcr.or.jp/publication/statistics.html> (2011.1.17 アクセス)
- 6) Suzuki, T., Kishimoto, Y., Misawa, M. Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci.* **59**: 1667-1674, 1996.
- 7) Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K., Suzuki, T. Direct evidence for the involvement of the mesolimbic κ -opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology*. **30**: 111-118, 2005.
- 8) 日本緩和医療薬学会 編. 臨床緩和医療薬学. 真興交易(株)医書出版部. 2008.
- 9) Mignat, C., Wille, U., Ziegler, A. Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci.* **56**: 793-799, 1995.
- 10) Frances, B., Gout, R., Monsarrat, B., Cros, J., Zajac, J. M. Further evidence that morphine-6 β -glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**: 25-31, 1992.
- 11) Tan-No, K., Niijima, F., Nakagawasai, O., Sato, T., Satoh, S., Tadano, T. Development of tolerance to the inhibitory effect of loperamide on gastrointestinal transit in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**: 357-363, 2003.
- 12) Hasselstrom, J., Sawe, J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin. Pharmacokinet.* **24**: 344-354, 1993.

- 13) Osborne, R., Joel, S., Trew, D., Slevin, M. Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: Demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin. Pharmacol. Ther.* **47**: 12-19, 1990.
- 14) Pasternak, G. W., Bodnar, R. J., Clark, J. A., Inturrisi, C. E. Morphine-6-glucuronide, a potent μ agonist. *Life Sci.* **41**: 2845-2849, 1987.
- 15) Shimomura, K., Kamata, O., Ueki, S., Ida, S., Oguri, K. Analgesic effect of morphine glucuronides. *Tohoku J. Exp. Med.* **105**: 45-52, 1971.
- 16) Paul, D., Standifer, K. M., Inturrisi, C. E., Pasternak, G. W. Pharmacological characterization of morphine-6 β -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**: 477-483, 1989.
- 17) King, M. A., Su, W., Nielan, C. L., Chang, A. H., Schutz, J., Schmidhammer, H., Pasternak, G. W. 14-methoxymetopon, a very potent μ -opioid receptor-selective analgesic with an unusual pharmacological profile. *Eur. J. Pharmacol.* **459**: 203-209, 2003.
- 18) Romberg, R., Sarton, E., Teppema, L., Matthes, H. W., Kieffer, B. L., Dahan, A. Comparison of morphine-6-glucuronide and morphine on respiratory depressant and antinociceptive responses in wild type and μ -opioid receptor deficient mice. *Br. J. Anaesth.* **91**: 862-870, 2003.
- 19) Engelman, J. A., Janne, P. A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**: 2895-2899, 2008.
- 20) 牛島俊和. エピゲノムとがん. 最新医学 **64** 巻 (9 月増刊号) : 24-35, 2009.
- 21) Teodoridis, J. M., Strathdee, G., Plumb, J. A., Brown, R. CpG-island methylation and epigenetic control of resistance to chemotherapy. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 916-917, 2004.
- 22) Schneider-Stock, R., Diab-Assef, M., Rohrbeck, A., Foltzer-Jourdainne, C., Boltze, C., Hartig, R., Schonfeld, P., Roessner, A., Gali-Muhtasib, H. 5-aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**: 525-536, 2005.
- 23) Xiong, H., Chen, Z. F., Liang, Q. C., Du, W., Chen, H. M., Su, W. Y., Chen, G. Q., Han, Z. G., Fang, J. Y. Inhibition of DNA methyltransferase induces G2

- cell cycle arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells via inhibition of JAK2/STAT3/STAT5 signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **13**: 3668-3679, 2009.
- 24) Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R. M., Nelson, D., Powell, B. L., DeCastro, C. M., Ellerton, J., Larson, R. A., Schiffer, C. A., Holland, J. F. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: A study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol.* **20**: 2429-2440, 2002.
 - 25) Kantarjian, H., Issa, J. P., Rosenfeld, C. S., Bennett, J. M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R. III, Shen, L., Nimer, S. D., Leavitt, R., Raza, A., Saba, H. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: Results of a phase III randomized study. *Cancer.* **106**: 1794-1803, 2006.
 - 26) Goffin, J., Eisenhauer, E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann. Oncol.* **13**: 1699-1716, 2002.
 - 27) 永田博司. *Medicina.* **39**: 800-802, 2002.
 - 28) Grider, J. R. Neurotransmitters mediating the intestinal peristaltic reflex in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 460-467, 2003.
 - 29) Sternini, C., Patierno, S., Selmer, I. S., Kirchgessner, A. The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol. Motil.* **16 Suppl 2**: 3-16, 2004.
 - 30) Gray, A. C., Coupar, I. M., White, P. J. Comparison of opioid receptor distributions in the rat ileum. *Life Sci.* **78**: 1610-1616, 2006.
 - 31) Holzer, P., Lippe, I. T., Heinemann, A., Bartho, L. Tachykinin NK₁ and NK₂ receptor-mediated control of peristaltic propulsion in the guinea-pig small intestine in vitro. *Neuropharmacology.* **37**: 131-138, 1998.
 - 32) Bitar, K. N., Makhlouf, G. M. Specific opiate receptors on isolated mammalian gastric smooth muscle cells. *Nature.* **297**: 72-74, 1982.
 - 33) Fickel, J., Bagnol, D., Watson, S. J., Akil, H. Opioid receptor expression in the rat gastrointestinal tract: A quantitative study with comparison to the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **46**: 1-8, 1997.
 - 34) Jiao, Y. Y., Guo, S. Y., Umezawa, T., Okada, M., Hisamitsu, T. The sympathetic nervous system is involved in the inhibitory effect of morphine

- on the colon motility in rats. *Auton. Neurosci.* **100**: 27-31, 2002.
- 35) Wu, D., Kang, Y. S., Bickel, U., Pardridge, W. M. Blood-brain barrier permeability to morphine-6 β -glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab. Dispos.* **25**: 768-771, 1997.
 - 36) Brown, G. P., Yang, K., Ouerfelli, O., Standifer, K. M., Byrd, D., Pasternak, G. W. ³H-morphine-6 β -glucuronide binding in brain membranes and an MOR-1-transfected cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**: 1291-1297, 1997.
 - 37) Osborne, P. B., Chieng, B., Christie, M. J. Morphine-6 β -glucuronide has a higher efficacy than morphine as a μ -opioid receptor agonist in the rat locus coeruleus. *Br. J. Pharmacol.* **131**: 1422-1428, 2000.
 - 38) Gallantine, E. L., Meert, T. F. A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the μ -opioid agonist morphine and the δ -opioid agonist SNC80. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**: 39-51, 2005.
 - 39) Hammas, B., Thorn, S. E., Wattwil, M. Propofol and gastric effects of morphine. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **45**: 1023-1027, 2001.
 - 40) Asai, T. Effects of morphine, nalbuphine and pentazocine on gastric emptying of indigestible solids. *Arzneimittelforschung.* **48**: 802-805, 1998.
 - 41) Kitazawa, T. Evidences that endogenous 5-hydroxytryptamine participates in the contractile response to morphine in the rat isolated colon. *Kitasato Arch. Exp. Med.* **57**: 47-56, 1984.
 - 42) Huidobro-Toro, J. P., Way, E. L. Contractile effect of morphine and related opioid alkaloids, β -endorphin and methionine enkephalin on the isolated colon from long evans rats. *Br. J. Pharmacol.* **74**: 681-694, 1981.
 - 43) Lenard, L., Jr, Halmai, V., Bartho, L. Morphine contracts the guinea pig ileal circular muscle by interfering with a nitric oxide mediated tonic inhibition. *Digestion.* **60**: 562-566, 1999.
 - 44) Nakamura, T., Sakai, A., Isogami, I., Noda, K., Ueno, K., Yano, S. Abatement of morphine-induced slowing in gastrointestinal transit by *Dai-kenchu-to*, a traditional japanese herbal medicine. *Jpn. J. Pharmacol.* **88**: 217-221, 2002.
 - 45) Tonini, M., Onori, L., Perucca, E., Manzo, L., De Ponti, F., Crema, A. Depression by morphine of the excitability of intrinsic inhibitory neurons in the guinea-pig colon. *Eur. J. Pharmacol.* **115**: 317-320, 1985.
 - 46) Fontaine, J., Reuse, J. Contractor responses of the isolated colon of the

- mouse to morphine and some opioid peptides. *Br. J. Pharmacol.* **85**: 861-867, 1985.
- 47) Ivancheva, C., Radomirov, R. Control of non-adrenergic non-cholinergic reflex motor responses in circular muscle of guinea-pig small intestine by Met-enkephalin. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **22**: 199-207, 2002.
 - 48) Pasternak, G. W. Incomplete cross tolerance and multiple μ opioid peptide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 67-70, 2001.
 - 49) Pick, C. G., Paul, D., Pasternak, G. W. Comparison of naloxonazine and β -funaltrexamine antagonism of μ_1 and μ_2 opioid actions. *Life Sci.* **48**: 2005-2011, 1991.
 - 50) Ling, G. S., Spiegel, K., Lockhart, S. H., Pasternak, G. W. Separation of opioid analgesia from respiratory depression: Evidence for different receptor mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**: 149-155, 1985.
 - 51) Stachulski, A. V., Scheinmann, F., Ferguson, J. R., Law, J. L., Lumbard, K. W., Hopkins, P., Patel, N., Clarke, S., Gloyne, A., Joel, S. P. Structure-activity relationships of some opiate glycosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 1207-1214, 2003.
 - 52) Rossi, G. C., Brown, G. P., Leventhal, L., Yang, K., Pasternak, G. W. Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 β -glucuronide analgesia. *Neurosci. Lett.* **216**: 1-4, 1996.
 - 53) Pasternak, G. W. Multiple opiate receptors: Deja vu all over again. *Neuropharmacology.* **47 Suppl 1**: 312-323, 2004.
 - 54) Schuller, A. G., King, M. A., Zhang, J., Bolan, E., Pan, Y. X., Morgan, D. J., Chang, A., Czick, M. E., Unterwald, E. M., Pasternak, G. W., Pintar, J. E. Retention of heroin and morphine-6 β -glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat. Neurosci.* **2**: 151-156, 1999.
 - 55) Narita, M., Imai, S., Ozaki, S., Suzuki, M., Narita, M., Suzuki, T. Reduced expression of a novel μ -opioid receptor (MOR) subtype MOR-1B in CXBK mice: Implications of MOR-1B in the expression of MOR-mediated responses. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 3193-3198, 2003.
 - 56) Ohga, A., Nakazato, Y., Saito, K. Considerations of the efferent nervous mechanism of the vago-vagal reflex relaxation of the stomach in the dog. *Jpn. J. Pharmacol.* **20**: 116-130, 1970.

- 57) Van Geldre, L. A., Lefebvre, R. A. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 2483-2497, 2004.
- 58) Bredt, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* **347**: 768-770, 1990.
- 59) Barbiers, M., Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Adriaensen, D., Mayer, B., De Groodt-Lasseel, M. H. Nitric oxide synthase-containing neurons in the pig large intestine: Topography, morphology, and viscerofugal projections. *Microsc. Res. Tech.* **29**: 72-78, 1994.
- 60) Singaram, C., Sengupta, A., Sweet, M. A., Sugarbaker, D. J., Goyal, R. K. Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. *Gut.* **35**: 1690-1696, 1994.
- 61) Yano, S., Kiyota, Y., Yamamoto, M., Watanabe, K. Pharmacological features of non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation induced by electrical vagal stimulation in isolated mouse stomach. *Jpn. J. Pharmacol.* **69**: 9-15, 1995.
- 62) Horie, S., Tsurumaki, Y., Someya, A., Hirabayashi, T., Saito, T., Okuma, Y., Nomura, Y., Murayama, T. Involvement of cyclooxygenase-dependent pathway in contraction of isolated ileum by urotensin II. *Peptides.* **26**: 323-329, 2005.
- 63) Qian, Y. M., Jones, R. L. Inhibition of rat colon contractility by prostacyclin (IP-) receptor agonists: Involvement of NANC neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **115**: 163-171, 1995.
- 64) Fox, J. E., Daniel, E. E. Exogenous opiates: Their local mechanisms of action in the canine small intestine and stomach. *Am. J. Physiol.* **253**: G179-88, 1987.
- 65) Burks, T. F. Acute effects of morphine on rat intestinal motility. *Eur. J. Pharmacol.* **40**: 279-283, 1976.
- 66) Burks, T. F. Mediation by 5-hydroxytryptamine of morphine stimulant actions in dog intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **185**: 530-539, 1973.
- 67) Giuliani, S., Lecci, A., Tramontana, M., Maggi, C. A. Role of κ opioid receptors in modulating cholinergic twitches in the circular muscle of

- guinea-pig colon. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 985-989, 1996.
- 68) Smith, C. F., Waldron, C., Brook, N. A. Opioid receptors in the mouse ileum. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **291**: 122-131, 1988.
- 69) Gray, A. C., White, P. J., Coupar, I. M. Characterisation of opioid receptors involved in modulating circular and longitudinal muscle contraction in the rat ileum. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 687-694, 2005.
- 70) Shahbazian, A., Heinemann, A., Schmidhammer, H., Beubler, E., Holzer-Petsche, U., Holzer, P. Involvement of μ - and κ -, but not δ -, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea-pig intestine. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 741-750, 2002.
- 71) Matsumoto, K., Hatori, Y., Murayama, T., Tashima, K., Wongseripipatana, S., Misawa, K., Kitajima, M., Takayama, H., Horie, S. Involvement of μ -opioid receptors in antinociception and inhibition of gastrointestinal transit induced by 7-hydroxymitragynine, isolated from Thai herbal medicine *Mitragyna speciosa*. *Eur. J. Pharmacol.* **549**: 63-70, 2006.
- 72) Fujita, A., Okishio, Y., Fujinami, K., Nakagawa, M., Takeuchi, T., Takewaki, T., Hata, F. Role of the interstitial cells distributed in the myenteric plexus in neural reflexes in the mouse ileum. *J. Pharmacol. Sci.* **96**: 483-492, 2004.
- 73) Grider, J. R. Interplay of somatostatin, opioid, and GABA neurons in the regulation of the peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* **267**: G696-701, 1994.
- 74) Fontaine, J., Grivegnée, A., Reuse, J. Adrenoceptors and regulation of intestinal tone in the isolated colon of the mouse. *Br. J. Pharmacol.* **81**: 231-243, 1984.
- 75) Espanol, A. J., Sales, M. E. Participation of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in the signal transduction pathway of ileal muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Res.* **42**: 489-493, 2000.
- 76) van Hoogmoed, L. M., Harmon, F. A., Stanley, S., White, J., Snyder, J. In vitro investigation of the interaction between nitric oxide and cyclo-oxygenase activity in equine ventral colon smooth muscle. *Equine Vet. J.* **34**: 510-515, 2002.
- 77) Cadet, P. Mu opiate receptor subtypes. *Med. Sci. Monit.* **10**: MS28-32, 2004.
- 78) Romero, A., Planas, E., Poveda, R., Sanchez, S., Pol, O., Puig, M. M.

- Anti-exudative effects of opioid receptor agonists in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation of the paw. *Eur. J. Pharmacol.* **511**: 207-217, 2005.
- 79) Kapasi, A. A., Coscia, S. A., Pandya, M. P., Singhal, P. C. Morphine modulates HIV-1 gp160-induced murine macrophage and human monocyte apoptosis by disparate ways. *J. Neuroimmunol.* **148**: 86-96, 2004.
- 80) Hsiao, P. N., Chang, M. C., Cheng, W. F., Chen, C. A., Lin, H. W., Hsieh, C. Y., Sun, W. Z. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology.* **256**: 83-91, 2009.
- 81) Tegeder, I., Grosch, S., Schmidtke, A., Haussler, A., Schmidt, H., Niederberger, E., Scholich, K., Geisslinger, G. G protein-independent G₁ cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: Involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res.* **63**: 1846-1852, 2003.
- 82) Lin, X., Wang, Y. J., Li, Q., Hou, Y. Y., Hong, M. H., Cao, Y. L., Chi, Z. Q., Liu, J. G. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J.* **276**: 2022-2036, 2009.
- 83) Hitosugi, N., Hatsukari, I., Ohno, R., Hashimoto, K., Mihara, S., Mizukami, S., Nakamura, S., Sakagami, H., Nagasaka, H., Matsumoto, I., Kawase, M. Comparative analysis of apoptosis-inducing activity of codeine and codeinone. *Anesthesiology.* **98**: 643-650, 2003.
- 84) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T., Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 566-570, 1998.
- 85) Sasamura, T., Nakamura, S., Iida, Y., Fujii, H., Murata, J., Saiki, I., Nojima, H., Kuraishi, Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur. J. Pharmacol.* **441**: 185-191, 2002.
- 86) Gupta, K., Kshirsagar, S., Chang, L., Schwartz, R., Law, P. Y., Yee, D., Hebbel, R. P. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth.

- Cancer Res.* **62**: 4491-4498, 2002.
- 87) Ishikawa, M., Tanno, K., Kamo, A., Takayanagi, Y., Sasaki, K. Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 762-766, 1993.
 - 88) McQuay, H. J., Carroll, D., Faura, C. C., Gavaghan, D. J., Hand, C. W., Moore, R. A. Oral morphine in cancer pain: Influences on morphine and metabolite concentration. *Clin. Pharmacol. Ther.* **48**: 236-244, 1990.
 - 89) Hatsukari, I., Hitosugi, N., Ohno, R., Hashimoto, K., Nakamura, S., Satoh, K., Nagasaka, H., Matsumoto, I., Sakagami, H. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer Res.* **27**: 857-864, 2007.
 - 90) Maneckjee, R., Biswas, R., Vonderhaar, B. K. Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. *Cancer Res.* **50**: 2234-2238, 1990.
 - 91) Hatzoglou, A., Ouafik, L., Bakogeorgou, E., Thermos, K., Castanas, E. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res.* **55**: 5632-5636, 1995.
 - 92) Eden, P. A., Taylor, J. E. Somatostatin receptor subtype gene expression in human and rodent tumors. *Life Sci.* **53**: 85-90, 1993.
 - 93) Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* **127**: 2893-2917, 2010.
 - 94) Weikert, S., Ljungberg, B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: Perspectives of primary prevention. *World J. Urol.* **28**: 247-252, 2010.
 - 95) 津島知靖. 腎癌の疫学. *日本臨床*. **68** 巻 (増刊号 4) : 63-66, 2010.
 - 96) Amato, R. J. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* **27**: 177-186, 2000.
 - 97) Yao, M., Yoshida, M., Kishida, T., Nakaigawa, N., Baba, M., Kobayashi, K., Miura, T., Moriyama, M., Nagashima, Y., Nakatani, Y., Kubota, Y., Kondo, K. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**: 1569-1575,

- 2002.
- 98) Wartenberg, M., Ling, F. C., Muschen, M., Klein, F., Acker, H., Gassmann, M., Petrat, K., Putz, V., Hescheler, J., Sauer, H. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* **17**: 503-505, 2003.
 - 99) Semenza, G. L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov. Today.* **12**: 853-859, 2007.
 - 100) Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N., Murai, M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 α expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 α . *Carcinogenesis.* **28**: 529-536, 2007.
 - 101) Motzer, R. J., Russo, P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **163**: 408-417, 2000.
 - 102) Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Staehler, M., Negrier, S., Chevreau, C., Desai, A. A., Rolland, F., Demkow, T., Hutson, T. E., Gore, M., Anderson, S., Hofilena, G., Shan, M., Pena, C., Lathia, C., Bukowski, R. M. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J. Clin. Oncol.* **27**: 3312-3318, 2009.
 - 103) Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G. A., Garcia-del-Muro, X., Sosman, J. A., Solska, E., Wilding, G., Thompson, J. A., Kim, S. T., Chen, I., Huang, X., Figlin, R. A. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **27**: 3584-3590, 2009.
 - 104) Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Kay, A., Ravaud, A., RECORD-1 Study Group. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : Final results and analysis of prognostic factors. *Cancer.* **116**: 4256-4265, 2010.
 - 105) Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z.,

- Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I. G., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R. J., Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **356**: 2271-2281, 2007.
- 106) Cho, D., Signoretti, S., Regan, M., Mier, J. W., Atkins, M. B. The role of mammalian target of rapamycin inhibitors in the treatment of advanced renal cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**: 758s-763s, 2007.
- 107) Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., Semenza, G. L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: Novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3995-4004, 2001.
- 108) Akaza, H., Tsukamoto, T., Murai, M., Nakajima, K., Naito, S. Phase II study to investigate the efficacy, safety, and pharmacokinetics of sorafenib in Japanese patients with advanced renal cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **37**: 755-762, 2007.
- 109) Uemura, H., Shinohara, N., Yuasa, T., Tomita, Y., Fujimoto, H., Niwakawa, M., Mugiya, S., Miki, T., Nonomura, N., Takahashi, M., Hasegawa, Y., Agata, N., Houk, B., Naito, S., Akaza, H. A phase II study of sunitinib in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma: Insights into the treatment, efficacy and safety. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **40**: 194-202, 2010.
- 110) Jun, H. J., Ahn, M. J., Kim, H. S., Yi, S. Y., Han, J., Lee, S. K., Ahn, Y. C., Jeong, H. S., Son, Y. I., Baek, J. H., Park, K. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br. J. Cancer.* **99**: 167-172, 2008.
- 111) Su, Y., Zhang, X., Sinko, P. J. Exploitation of drug-induced Bcl-2 overexpression for restoring normal apoptosis function: A promising new approach to the treatment of multidrug resistant cancer. *Cancer Lett.* **253**: 115-123, 2007.
- 112) Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* **2**: 48-58, 2002.
- 113) Coley, H. M. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* **34**: 378-390,

- 2008.
- 114) Walsh, N., Larkin, A., Kennedy, S., Connolly, L., Ballot, J., Ooi, W., Gullo, G., Crown, J., Clynes, M., O'Driscoll, L. Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma. *BMC Urol.* **9**: 6-12, 2009.
 - 115) Soto-Vega, E., Arroyo, C., Richaud-Patin, Y., Garcia-Carrasco, M., Vazquez-Lavista, L. G., Llorente, L. P-glycoprotein activity in renal clear cell carcinoma. *Urol. Oncol.* **27**: 363-366, 2009.
 - 116) Nojima, D., Nakajima, K., Li, L. C., Franks, J., Ribeiro-Filho, L., Ishii, N., Dahiya, R. CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol. Carcinog.* **32**: 19-27, 2001.
 - 117) Kawakami, T., Okamoto, K., Ogawa, O., Okada, Y. Multipoint methylation and expression analysis of tumor suppressor genes in human renal cancer cells. *Urology.* **61**: 226-230, 2003.
 - 118) Morrissey, C., Martinez, A., Zatyka, M., Agathangelou, A., Honorio, S., Astuti, D., Morgan, N. V., Moch, H., Richards, F. M., Kishida, T., Yao, M., Schraml, P., Latif, F., Maher, E. R. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **61**: 7277-7281, 2001.
 - 119) Kawai, Y., Sakano, S., Suehiro, Y., Okada, T., Korenaga, Y., Hara, T., Naito, K., Matsuyama, H., Hinoda, Y. Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* **21**: 1612-1617, 2010.
 - 120) Christoph, F., Weikert, S., Kempkensteffen, C., Krause, H., Schostak, M., Kollermann, J., Miller, K., Schrader, M. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* **12**: 5040-5046, 2006.
 - 121) 武田真幸, 中川和彦. 併用化学療法. *日本臨床*. **67** 卷 (増刊号 1) : 365-368, 2009.
 - 122) Ishiguro, M., Iida, S., Uetake, H., Morita, S., Makino, H., Kato, K., Takagi, Y., Enomoto, M., Sugihara, K. Effect of combined therapy with low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine and irinotecan on colon cancer cell line HCT-15. *Ann. Surg. Oncol.* **14**: 1752-1762, 2007.

- 123) Morita, S., Iida, S., Kato, K., Takagi, Y., Uetake, H., Sugihara, K. The synergistic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and 5-fluorouracil on drug-resistant tumors. *Oncology*. **71**: 437-445, 2006.
- 124) Flis, S., Gnyszka, A., Misiewicz-Krzeminska, I., Splawinski, J. Decytabine enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin and 5-fluorouracil in the colorectal cancer cell line colo-205. *Cancer. Cell. Int.* **9**: 10-19, 2009.
- 125) Takano, Y., Iwata, H., Yano, Y., Miyazawa, M., Virgona, N., Sato, H., Ueno, K., Yano, T. Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-2'-deoxycytidine enhances vinblastine-induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signalling. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 463-470, 2010.
- 126) Fujimoto, E., Sato, H., Shirai, S., Nagashima, Y., Fukumoto, K., Hagiwara, H., Negishi, E., Ueno, K., Omori, Y., Yamasaki, H., Hagiwara, K., Yano, T. Connexin32 as a tumor suppressor gene in a metastatic renal cell carcinoma cell line. *Oncogene*. **24**: 3684-3690, 2005.
- 127) Xu, X. L., Yu, J., Zhang, H. Y., Sun, M. H., Gu, J., Du, X., Shi, D. R., Wang, P., Yang, Z. H., Zhu, J. D. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* **10**: 3441-3454, 2004.
- 128) Zou, B., Chim, C. S., Zeng, H., Leung, S. Y., Yang, Y., Tu, S. P., Lin, M. C., Wang, J., He, H., Jiang, S. H., Sun, Y. W., Yu, L. F., Yuen, S. T., Kung, H. F., Wong, B. C. Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology*. **131**: 1835-1843, 2006.
- 129) Hagiwara, H., Sato, H., Ohde, Y., Takano, Y., Seki, T., Ariga, T., Hokaiwado, N., Asamoto, M., Shirai, T., Nagashima, Y., Yano, T. 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses human renal carcinoma cell growth in a xenograft model via up-regulation of the connexin 32 gene. *Br. J. Pharmacol.* **153**: 1373-1381, 2008.
- 130) Venturelli, S., Armeanu, S., Pathil, A., Hsieh, C. J., Weiss, T. S., Vonthein, R., Wehrmann, M., Gregor, M., Lauer, U. M., Bitzer, M. Epigenetic combination therapy as a tumor-selective treatment approach for hepatocellular carcinoma. *Cancer*. **109**: 2132-2141, 2007.

- 131) Yague, E., Armesilla, A. L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C. F., Raguz, S. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J. Biol. Chem.* **278**: 10344-10352, 2003.
- 132) Xie, Y., Burcu, M., Linn, D. E., Qiu, Y., Baer, M. R. Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Mol. Pharmacol.* **78**: 310-318, 2010.
- 133) Zhang, Z., Wu, J. Y., Hait, W. N., Yang, J. M. Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination. *Mol. Pharmacol.* **66**: 395-403, 2004.
- 134) Schubert, C., Richly, H., Rumpf, S., Buchberger, A. Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep.* **5**: 818-824, 2004.
- 135) Medema, R. H., Klompmaker, R., Smits, V. A., Rijksen, G. p21^{waf1} can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene.* **16**: 431-441, 1998.
- 136) Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M., Okamoto, T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J. Biol. Chem.* **276**: 42971-42977, 2001.
- 137) Missiaglia, E., Donadelli, M., Palmieri, M., Crnogorac-Jurcevic, T., Scarpa, A., Lemoine, N. R. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway. *Oncogene.* **24**: 199-211, 2005.
- 138) Asnaghi, L., Vass, W. C., Quadri, R., Day, P. M., Qian, X., Braverman, R., Papageorge, A. G., Lowy, D. R. E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: Role of rho GTPases. *Oncogene.* **29**: 2760-2771, 2010.
- 139) Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., Korneluk, R. G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-caspase activity. *Nat. Cell Biol.* **3**: 128-133, 2001.
- 140) Kempkensteffen, C., Fritzsche, F. R., Johannsen, M., Weikert, S., Hinz, S.,

- Dietel, M., Riener, M. O., Moch, H., Jung, K., Krause, H., Miller, K., Kristiansen, G. Down-regulation of the pro-apoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer. *BMC Cancer*. **9**: 276-282, 2009.
- 141) Ling, Y. H., Tornos, C., Perez-Soler, R. Phosphorylation of bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 18984-18991, 1998.
- 142) Yan, L., Donze, J. R., Liu, L. Inactivated MGMT by *O*⁶-benzylguanine is associated with prolonged G2/M arrest in cancer cells treated with BCNU. *Oncogene*. **24**: 2175-2183, 2005.
- 143) Bruick, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 9082-9087, 2000.
- 144) Murai, M., Toyota, M., Suzuki, H., Satoh, A., Sasaki, Y., Akino, K., Ueno, M., Takahashi, F., Kusano, M., Mita, H., Yanagihara, K., Endo, T., Hinoda, Y., Tokino, T., Imai, K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 1021-1027, 2005.
- 145) Zhu, W. G., Hileman, T., Ke, Y., Wang, P., Lu, S., Duan, W., Dai, Z., Tong, T., Villalona-Calero, M. A., Plass, C., Otterson, G. A. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21^{Waf1/Cip1} pathway to inhibit cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **279**: 15161-15166, 2004.
- 146) Smith, T. W., Binning, A. R., Dahan, A. Efficacy and safety of morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief: A randomized, double-blind study. *Eur. J. Pain.* **13**: 293-299, 2009.

論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による。

- 1 . H. Iwata, S. Tsuchiya, T. Nakamura, S. Yano. Morphine leads to contraction of the ileal circular muscle via inhibition of the nitreergic pathway in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **574 (1)**: 66-70 (2007).
- 2 . H. Iwata, S. Tsuchiya, K. Ueno, T. Nakamura, S. Yano. Morphine-6-glucuronide induces contraction of the ileal circular muscle more potently than morphine in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **600 (1-3)**: 130-132 (2008).
- 3 . Y. Takano, H. Iwata, Y. Yano, M. Miyazawa, N. Virgona, H. Sato, K. Ueno, T. Yano. Up-regulation of connexin 32 gene by 5-aza-2'-deoxycytidine enhances vinblastine-induced cytotoxicity in human renal carcinoma cells via the activation of JNK signaling. *Biochem. Pharmacol.* **80 (4)**: 463-470 (2010).

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 上野光一教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究において御指導、御助言を賜り、本論文の御校閲をいただきました佐藤洋美助教に謹んで感謝致します。

また、本研究において御指導、御助言を賜りました山浦克典講師に心より感謝致します。

本研究において御指導、御助言を賜りました群馬大学大学院医学系研究科 臨床薬理学分野 中村智徳准教授に心より御礼申し上げます。

旧薬物治療学研究室在籍時に、本研究において多大なる御指導、御鞭撻を賜りました帝京平成大学薬学部 矢野眞吾教授ならびに土屋静子准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において御指導、御助言をいただき、さらに細胞を御提供いただきました東洋大学生命科学部 分子病態制御学研究室 矢野友啓教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、試薬提供のお取次ぎを頂きました国立がんセンター中央病院特殊病棟部 平賀一陽先生、ならびに国立病院機構北海道がんセンター薬剤科 高田慎也先生に深く感謝致し、厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究において御指導、御助言をいただき、さらに試薬を御提供いただきました城西国際大学薬学部 薬理学講座 堀江俊治教授、田嶋公人講師、ならびに松本健次郎助教に心より御礼申し上げます。

細胞周期の検討に際し、御協力・御助言をいただきました千葉大学大学院薬学研究院 分子細胞生物學研究室 中山祐治准教授に深く御礼申し上げます。

そして、本研究において御協力、御助言していただき、常に私の支えとなってくれた高齢者薬剤学研究室の高野泰幸修士、奥澤紘子修士、山田遼太修士、一之宮紗紀さん（学部 5 年）、柳原碧さん（学部 5 年）、鈴木梨菜さん（学部 4 年）、岡部裕之君（学部 4 年）ならびに卒業生、在校生の皆様に心から感謝致します。

また、本研究に尊い命を捧げてくれた数多くの動物達に深く感謝するとともに、ご冥福をお祈り致します。

最後に、本大学院博士課程で学ぶ機会を与えて下さり、常に心の支えとなり温かく見守ってくれた両親、弟、祖母に心より感謝を述べて、私の謝辞とかえさせていただきます。

2011 年 2 月 18 日

岩田 紘樹

審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 佐藤 信範

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 村山 俊彦

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 山口 直人