

[原著論文]

モルヒネのヒトがん細胞株の増殖に対する影響

岩田 紘樹^{*1} 佐藤 洋美^{*1} 岡部 裕之^{*2}
 矢野 友啓^{*3} 関根 祐子^{*2} 上野 光一^{*1}

^{*1} 千葉大学大学院薬学研究院高齢者薬剤学

^{*2} 千葉大学大学院薬学研究院実務薬学

^{*3} 東洋大学生命科学部分子病態制御学

(2011年8月24日受理)

【要旨】 モルヒネは、がん疼痛治療に用いられる主要な薬剤であるが、医療用麻薬の使用をより普及させるためには、その安全性に関するエビデンスの確立が必要である。本研究では、モルヒネが患者の腫瘍自体に影響を及ぼしているのかどうかを明らかにするため、ヒトがん細胞株に対するモルヒネおよびその代謝物の作用を検討した。ヒトでの血中濃度に相当する1 nM ~ 100 μMのモルヒネは、2種のがん細胞株の増殖および併用したビンブラスチンの効果に影響を与えなかった。一方、高濃度域(0.5 ~ 4 mM)のモルヒネによって、6種のがん細胞株の増殖が抑制され、subG1期の細胞が増加した。モルヒネの代謝物のmorphine-6-glucuronideは、モルヒネと同等の増殖抑制作用を示した。モルヒネの増殖抑制作用は、ナロキソンでは拮抗されなかった。以上より、血中濃度のモルヒネはヒトがん細胞株の増殖に直接的には影響しないこと、高濃度のモルヒネでは増殖抑制作用がみられることが示された。

キーワード：モルヒネ、がん細胞、細胞増殖

緒 言

モルヒネは、WHO方式がん疼痛治療法において中心的な役割を果たすオピオイド鎮痛薬のひとつである。わが国でも、フェンタニルやオキシコドンを含めた医療用麻薬の使用量は年々増加しているが、他の先進国に比べると、その使用量は非常に少ないのが現状である¹⁾。その原因のひとつとしては、モルヒネなどを使用すると麻薬中毒になるのではないかと、死期を早めるのではないかとといった誤解が根強いことが挙げられる^{2, 3)}。医療者を対象に実施された緩和医療に対するアンケート調査においても、がん治療医の10人に1人が「医療用麻薬は精神依存を引き起こす」という意識のもとに使用を躊躇することがあると答えている²⁾。医療用麻薬の使用をより普及させるためには、その安全性に関するエビデンスの確立が必要である。実際これまでに、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が、その機序も含めて解明されている^{4, 5)}。

われわれは、本研究において、がん患者に投与される機会が多いモルヒネが、腫瘍自体に影響を及ぼしているのか否かに着目した。

モルヒネが結合する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おり⁶⁾、モルヒネが抗炎症作用を示すこと⁷⁾や、マクロファージ⁸⁾や血管内皮細胞⁹⁾のアポトーシスを誘導することが報告されている。そして、がん細胞においても、ヒト乳癌細胞MCF-7などでは、μオピオイド受容体やδオピオイド受容体の発現がタンパク質レベルで確認されている¹⁰⁾。

モルヒネのがん細胞に与える影響については、これまでも報告がなされている。in vitroの系では、肺がん細胞や乳がん細胞、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¹⁰⁻¹³⁾。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¹⁰⁾、JNK経路の活性化とミトコンドリア膜におけるアポトーシス抑制因子Bcl-2の減少¹¹⁾などが示されている。ただし、これらの作用が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^{10, 14)}と、逆に増強されたという報告^{15, 16)}がある。

このように、モルヒネのがん細胞への影響については、統一した見解が得られていない。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、より詳細に検討することを目的とした。

ところで、モルヒネの疼痛緩和目的には用量上限がない

問合先：佐藤洋美 〒260-8675 千葉市中央区亥鼻1-8-1 千葉大学大学院薬学研究院高齢者薬剤学研究室

E-mail : hiromi-s@chiba-u.jp

略語：JNK: c-Jun N-terminal kinase, PVDF: polyvinylidene difluoride, PCR: polymerase chain reaction.

が、実際にどの程度の濃度域が適切なのだろうか。モルヒネの血中および組織中濃度と、モルヒネの代謝の観点から考えてみたい。

McQuay らの報告によると、モルヒネの投与用量と血中濃度との間には正の相関が示されている¹⁷⁾。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 μM であった。

一方で、モルヒネ血中濃度は患者の生体内環境の影響を受ける。モルヒネは、主として肝臓でグルクロン酸抱合を受け、2 種のグルクロン酸抱合体 morphine-3-glucuronide (M3G) および morphine-6-glucuronide (M6G) に代謝される。ところが、原発性の肝臓がんでは肝硬変が進行している場合が多いため、モルヒネ代謝が遷延して、血中濃度がピークをつくらずに上昇傾向を示すことがある¹⁸⁾。さらに、腹水、胸水、浮腫などを合併している場合は、分布容積が正常な患者に比べて作用部位に必要な量が到達しないということも懸念されている¹⁹⁾。

加えて、モルヒネの組織中濃度については、不明な点が多い。高濃度のモルヒネを持続注入ポンプで投薬されていた疑いの膵臓がん患者の検視解剖の結果が報告されており²⁰⁾、総モルヒネ濃度は心臓内血液、硝子体液、脳、肝臓、胃などにおいて、おのおの数百 mg/L という尋常でない濃度が検出され、血漿中から組織中へ広く高濃度に移行したことが示唆される。また、モルヒネがグルクロン酸抱合されることから、Duffou らは、腸肝循環による蓄積を指摘している²¹⁾。

本研究では、これらを勘案し、鎮痛用量を含む臨床の血漿中濃度を模倣した低濃度域 (1 nM ~ 100 μM) と報告の少ない組織中濃度を考慮した高濃度域 (0.5 mM ~ 4 mM) のモルヒネについて、増殖への影響および作用機序の検討を行った。また、代謝物の M3G および M6G についても検討した。一方、抗がん剤治療中に緩和療法を受ける場合も、実際のがん治療では想定される。そこで、多くのがん腫に汎用される化学療法薬ビンブラスチンを取り上げ、その増殖抑制効果にモルヒネが何らかの影響を及ぼすか、あわせて検討した。

方 法

1. 使用薬物

モルヒネ塩酸塩 (塩野義製薬 (株), 大阪), M3G および M6G (新日本薬業 (株), 東京) は、50 mM になるよう蒸留水に溶解した。ナロキソン塩酸塩 (Sigma, St. Louis, MO, USA) は、10 mM になるよう蒸留水に溶解した。ビンブラスチン硫酸塩 (和光純薬工業 (株), 大阪) は、1 mM になるよう dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。それぞれの薬物は培地で用時希釈した。3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT: 和光純薬工業 (株)) は、5 mg/ml になるよう phosphate-buffered saline (PBS) に溶解し、1% penicillin-streptomycin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) のみを含む無血清培地で 0.25 mg/ml に用時希釈した。

2. 細胞培養

がん細胞として、ヒト肺がん細胞 A549, ヒト前立腺がん細胞 DU-145 および PC3, ヒト膵臓がん細胞 PANC-1, ヒト腎がん細胞 786-O, ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いた。また、正常細胞として、ヒト中皮由来細胞 Met-5A を用いた。A549 および 786-O は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin), Met-5A は RPMI-1640 Glutamax (GIBCO) (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES), その他の細胞は RPMI (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) を用いて、37°C, 5% CO₂ 下に培養した。

3. 細胞生存率の測定

細胞を 96 well plate に播種し、24 時間後、モルヒネ、ナロキソンまたはビンブラスチンの単独添加、あるいは共添加を開始した。モルヒネの単独添加およびナロキソンとの共添加の影響は 72 時間曝露後、またモルヒネとビンブラスチンの共添加の影響は、48 時間曝露後に測定した。培地を除去して 0.25 mg/ml MTT 溶液を 100 μl/well 添加し、60 分間インキュベートした。さらに、MTT 溶液を除去して DMSO 100 μl/well を添加した後、マイクロプレートリーダー Multiskan JX (Thermo Labsystems, Cheshire, UK) にて吸光度 (540 nm, 対照波長として 650 nm) を測定した。細胞生存率は、薬物添加群の吸光度を control の吸光度に対する百分率 (%) で表した。

4. 細胞周期の解析

細胞を 60 mm dish に播種し、24 時間後にモルヒネを添加した。72 時間曝露後、細胞を回収して 80% エタノールで固定した。解析当日、50 μg/ml ヨウ化プロピジウム (和光純薬工業 (株)) と 200 μg/ml RNase A (Sigma) を含む PBS で細胞を懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートした。そして、細胞懸濁液をナイロンメッシュに通した後、MoFlo cell sorter (Dako Cytomation, 京都) にて解析を行った。

5. タンパク質発現の解析

細胞を 60 mm dish に播種し、24 時間後にモルヒネを添加した。72 時間曝露後、lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.5), 10% glycerol, 2% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% protease inhibitor cocktail] を用いて細胞を回収し、DC protein assay kit (Bio-Rad, 東京) によってタンパク定量を行った。20 μg のタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、PVDF 膜へ転写した。5% スキムミルクによって一晩ブ

ロッキングを行い、1次抗体および2次抗体とそれぞれ室温で1時間ずつ反応させた。その後、ECL試薬を用いてバンドを観察した。使用した抗体は、以下の通りである：Anti-Bax (1/1,000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-Bcl-2 (1/400) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti- β -actin (1/2,000) (Sigma)。

6. mRNA発現の解析

未処理の細胞から、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いてRNAを抽出した。PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa Bio, Inc., 滋賀) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。Premix Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa) を用いてPCRを行った後、PCR産物を3%アガロースゲル電気泳動にて分離し、エチジウムブロマイドで染色してバンドを観察した。プライマーの配列は、以下の通りである。 μ オピオイド受容体：5'-TCTGGCTCCAAAGAAAAGGA-3' (forward), 5'-CAATGCAGAAGTGCCAAGAA-3' (reverse)。また、PCR条件は、94℃ 5分の後、94℃ 30秒、60℃ 1分および72℃ 1分を40サイクル、さらに72℃ 5分とした。

7. 統計解析

結果は、平均値または平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。有意差検定には1-way ANOVA testによる分散分析の後、Dunnett's testによる多重比較を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。また、 IC_{50} 値は、解析ソフトGraphPad Prism4 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) によって求めた。

結 果

1. ヒトがん細胞に対する低濃度域のモルヒネの影響

低濃度域 (1 nM ~ 100 μ M) のモルヒネの作用をA549および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. 1)。また、化学療法薬ビンブラスチンの作用に対するモルヒネの影響を確認するため、臨床でビンブラスチンが治療薬として使用される可能性のある腎細胞がん株786-Oを用いて、その血漿中濃度を模倣した10 nMの濃度に固定し、単独作用を示さない100 μ Mのモルヒネと併用した。その結果、ビンブラスチンの殺細胞効果に対してモルヒネは影響を与えなかった (Fig. 2)。

2. ヒトがん細胞に対する高濃度域のモルヒネの影響

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. 3)。また、正常細胞株として用いたヒト中皮由来細胞株のMet-5Aは、がん細胞よりも低濃度側で生存率の低下がみられたが、2 mMまでは約70%の生存率を維持し、より高濃度側

では、がん細胞よりも高い生存率で推移した。それぞれの IC_{50} 値を算出したところ、1.47 ~ 2.81 mMの値となった (Table 1)。一方、生体内に取り込まれたモルヒネは、主として肝臓と小腸粘膜で代謝され、その多くはグルクロン酸抱合体となる。ヒトでは、3位が水酸化されるM3Gと6位が水酸化されるM6Gが知られており、約55%がM3Gに、約10%がM6Gになる²²⁾。モルヒネの増殖抑制作用が強くみられたA549を選択し、M6Gの作用を検討した結果、M6Gはモルヒネとほぼ同程度の増殖抑制作用をもつことが示されたが、M3Gはほとんど作用がみられ

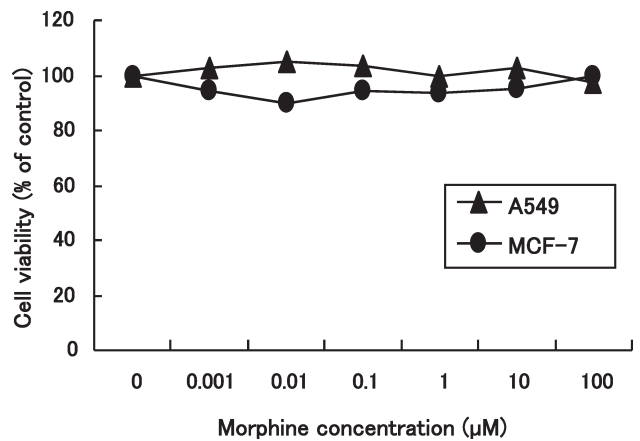


Fig. 1 A549とMCF-7の増殖に対するモルヒネの影響。図中に示した濃度のモルヒネを細胞に72時間曝露した後、MTTアッセイにて細胞生存率を測定した。結果は5ウェルの平均を示した。

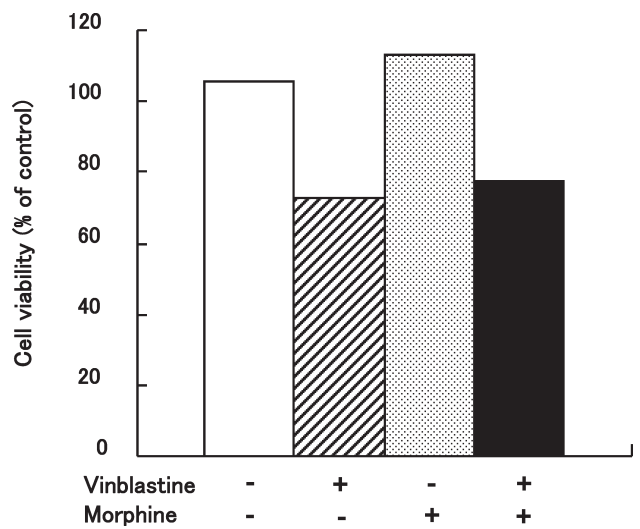


Fig. 2 A786-Oにおけるビンブラスチンの殺細胞効果に対するモルヒネの影響。ビンブラスチン (10 nM) とモルヒネ (100 μ M) を細胞に単独添加または共添加し、48時間後にMTTアッセイにて細胞生存率を測定した。結果は2回の実験の平均を示した。

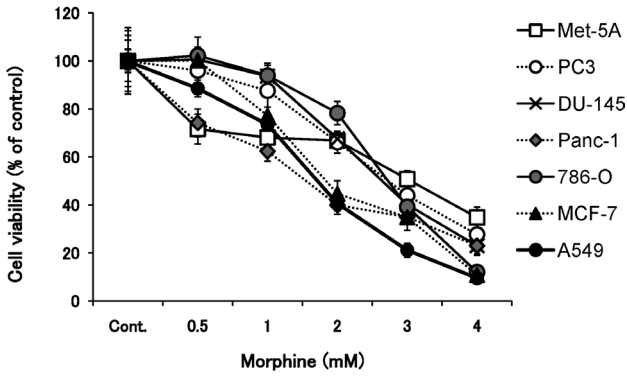


Fig. 3 A549, DU-145, MCF-7, PANK-1, PC3, 786-O および Met-5A の増殖に対するモルヒネの影響. 図中に示した濃度のモルヒネを細胞に 72 時間曝露した後, MTT アッセイにて細胞生存率を測定した. 結果は 3 ~ 4 回の実験の平均±標準誤差を示した.

Table 1 IC₅₀ values of morphine on the cell proliferation

Cell lines	IC ₅₀ (mM)
786-O	2.678
A549	1.600
DU145	2.601
MCF-7	1.895
PANK-1	1.466
PC3	2.649
Met-5A	2.814

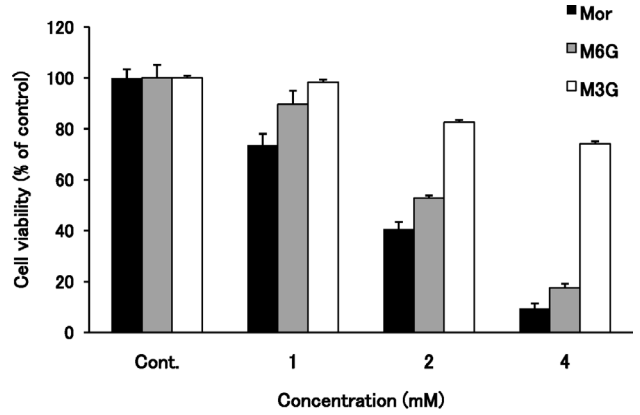
Cells were treated with morphine (0.5-4 mM) for 72 h and cell viability was determined by MTT assay.

なかった (Fig. 4).

モルヒネの増殖抑制作用が強かった A549 を用いて細胞周期を解析したところ, モルヒネの濃度依存的に, 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. 5). また, モルヒネによってアポトーシス促進因子 Bax の発現がやや増加し, アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現が減少しており (Fig. 6A), Bcl-2/Bax 比が有意に抑制された (Fig. 6B).

3. モルヒネの細胞増殖抑制作用におけるオピオイド受容体の関与

強い増殖抑制作用を示した A549 および MCF-7 にて, μ オピオイド受容体の mRNA 発現を検討したところ, 両細胞ともその発現が確認された (Fig. 7A). また, A549 において, モルヒネ 500 μM とナロキソン 10 μM を併用させたところ, 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. 7B).



Data are mean ± S.D. (n=3)

Fig. 4 モルヒネとその代謝物の抗腫瘍活性の比較. 図中に示した濃度のモルヒネまたはモルヒネ代謝物 (M3G, M6G) を A549 細胞に 72 時間曝露した後, MTT アッセイにて細胞生存率を測定した. 結果は 3 ウェルの平均±標準偏差を示した.

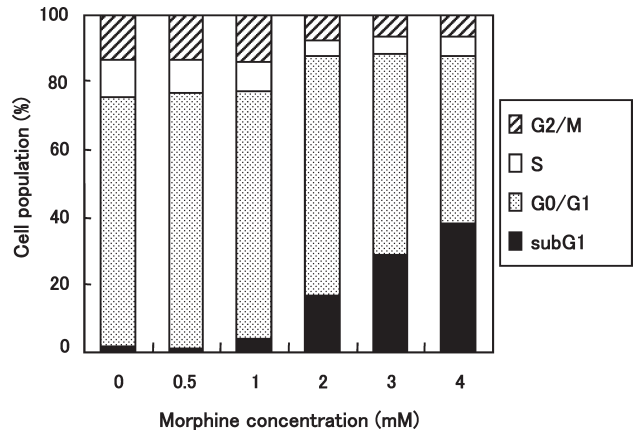


Fig. 5 A549 の細胞周期に対するモルヒネの影響. 図中に示した濃度のモルヒネを細胞に 72 時間曝露した後, フローサイトメトリーにて細胞周期を解析した. 結果は平均 (n = 3) を示した.

考 察

まず, 1 nM ~ 100 μM のモルヒネは, ヒトがん細胞および正常細胞の増殖にほとんど影響を与えないことが示された. がん患者でのモルヒネ血中濃度が 2 nM ~ 3.5 μM と報告されていることから¹⁷⁾, 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. また, ビンブラスチンとの共添加による検討からは, 同時に投与されている抗がん剤の効果にも, モルヒネは影響しないことが推測された.

一方, より高濃度の 0.5 ~ 4 mM のモルヒネを作用させ

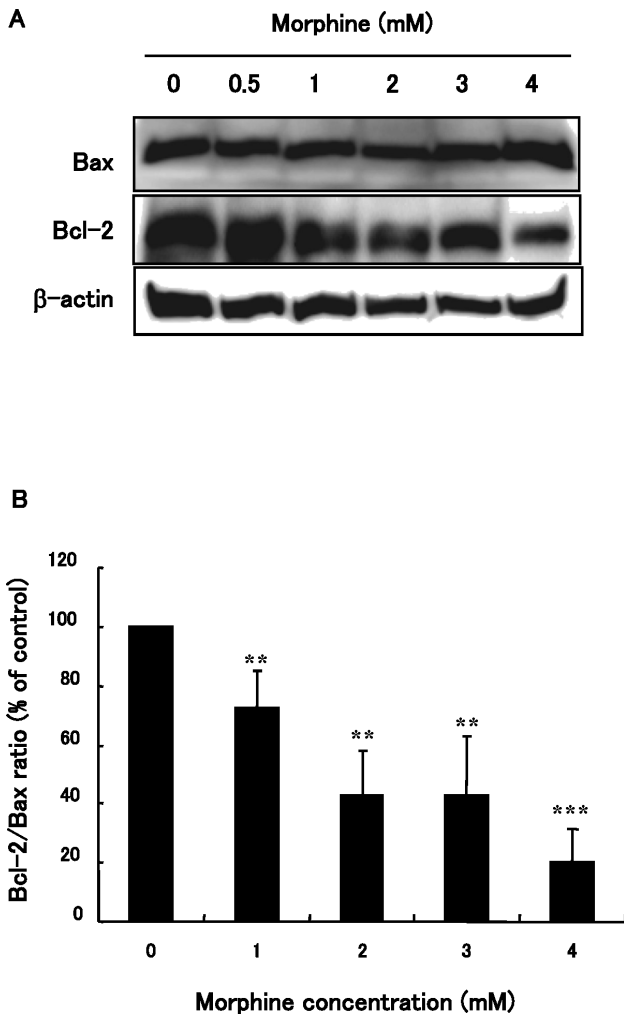


Fig. 6 A549 におけるアポトーシス制御因子の発現に対するモルヒネの影響. 図中に示した濃度のモルヒネを細胞に72時間曝露した後, ウェスタンブロットにて解析した. β アクトチンを内部標準に用いた. (A) 3例のうち代表1例を示した. (B) Bcl-2/Bax比に対する影響. 結果は平均±標準偏差 ($n=3$)を示した. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; v.s. control (Dunnett's test).

ると, ヒトがん細胞の増殖が抑制された. A549 では, アポトーシスの誘導も確認され, ミトコンドリア膜電位を調整する Bcl-2 ファミリータンパク質の発現が増減したことから, その機序として, ミトコンドリアを介した経路が示唆された. また, 増殖抑制作用の IC_{50} 値は $1.47 \sim 2.68$ 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^{23, 24}, 多くは mM オーダーでの作用発現を報告している^{12, 13, 23}. 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. ただし, 増殖抑制試験の結果より, 正常細胞である Met-5A においても, 3 mM 以上のモルヒネは強い増殖抑制作用がみられ, これ以上の濃度域は, 正常組織においても毒性発現を来す用量と考えられた.

モルヒネ代謝物については, M6G がモルヒネと同程度,

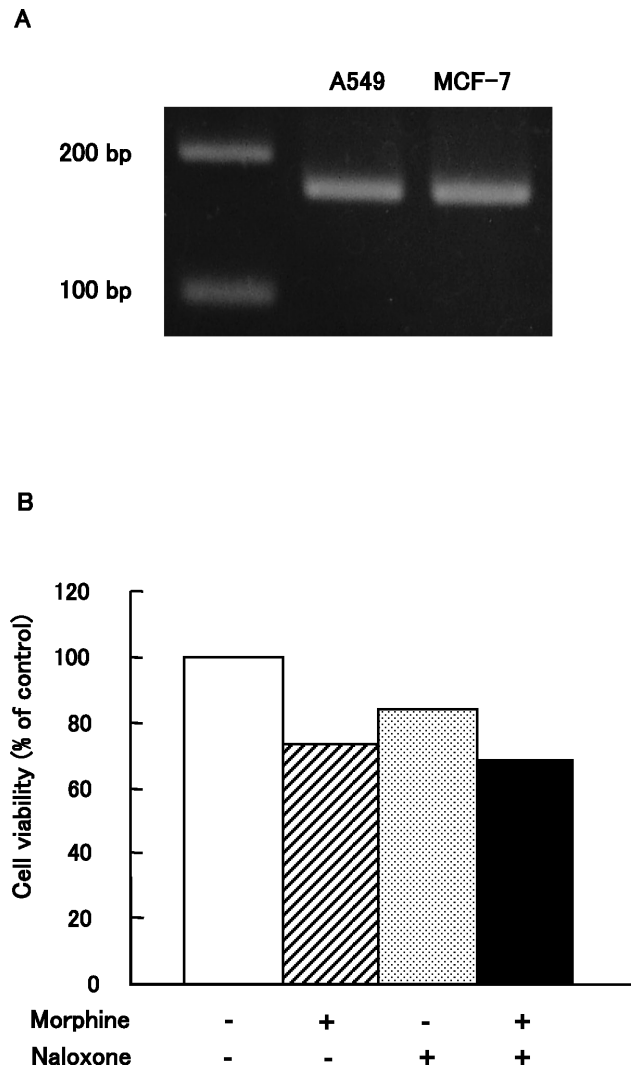


Fig. 7 モルヒネの増殖抑制作用における μ オピオイド受容体の関与. (A) 未処理の A549 と MCF-7 における μ オピオイド受容体発現の PCR による検討. (B) A549 の増殖に対するモルヒネおよびナロキソンの影響. モルヒネ ($500 \mu\text{M}$) とナロキソン ($10 \mu\text{M}$) を細胞に単独添加または共添加し, 72 時間後に MTT アッセイにて細胞生存率を測定した. 結果は 5 ウェルの平均を示した.

M3G が抑制作用なしという結果であった. M3G のほうが主代謝物であるが, オピオイド受容体への親和性は低く, 鎮痛作用は認められていない. 一方, M6G は, モルヒネよりも強い鎮痛作用があるとされ, モルヒネの活性代謝物であることが示されてきた²⁵. モルヒネの増殖抑制作用はオピオイド受容体を介したものであるという報告がなされていること²⁶を合わせて考えると, 今回の結果は, オピオイド受容体の親和度と細胞増殖抑制作用には正の相関があることが示唆された.

そこで, モルヒネのこれらの作用がオピオイド受容体を介しているか否かについて検討した. モルヒネは, μ オピオイド受容体への親和性が, δ や κ オピオイド受容体に比

べて20～90倍高いことが報告されている^{27, 28)}。そこでまず、増殖抑制作用の強かったA549およびMCF-7にて検討したところ、 μ オピオイド受容体のmRNA発現が確認された。

しかし、A549でのモルヒネの増殖抑制作用は、ナロキソンで拮抗されなかった。そのため、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、オピオイド同様に神経伝達物質やホルモンの放出を阻害する働きがあるが²⁹⁾、この受容体の発現がA549とMCF-7を含む複数のヒトがん細胞株においても確認されている³⁰⁾ため、モルヒネの増殖抑制作用への関与を検討する余地がある。

ただし、今回の検討では、高濃度のモルヒネに対してナロキソンが十分に拮抗できていない可能性も考えられ、 μ 受容体をノックダウンする実験系などを用いて、さらに検討する必要があると思われる。

本研究より、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。また、1剤のみの検討ではあるが、化学療法薬ビンブラスチンの増殖抑制作用に特に影響を及ぼさなかったことから、本検討では、モルヒネによってがん治療が阻害される一面は見いだされなかった。これは、今後いくつかの薬物で検証される必要がある。ただし、モルヒネは生体内では、血管新生¹⁵⁾や免疫機能¹⁶⁾などの他のファクターを介して、腫瘍の増殖に影響を与えることも報告されている。今後は、*in vivo*において、腫瘍増殖に対するモルヒネの作用を検討することが必要である。

謝 辞

M3GおよびM6Gの購入に際し、ご助言いただいた星薬科大学教授 鈴木 勉先生に深謝の意を表す。本研究の一部は、日本学術振興会科研費（特別研究員奨励費）、文部科学省科研費（“For SPECT”新規標識プローブの開発による医薬イノベーションの創出）を得て行われた。

文 献

- 1) がん研究振興財団. がんの統計 2010年版—資料編 12: 医療用麻薬使用量. <http://www.fpcr.or.jp/publication/statistics.html> (2011年3月11日アクセス)
- 2) ヤンセンファーマ. プレリリリース 「がん治療医の緩和医療に関する意識調査」集計結果～緩和医療への関心は高いものの、痛みに用いる薬への理解は不十分、教育機会の充実を求める結果に～ <http://www.janssen.co.jp/public/rls/news/2416> (2011年7月20日アクセス)
- 3) Japan Partners Against Pain. 疼痛治療の基礎 医療用麻薬をもっと知ろう. http://www.jpap.jp/medical/knowledge/03_01.html (2011年7月20日アクセス)

- 4) Suzuki T, Kishimoto Y, and Misawa M. Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci.* 1996; 59: 1667-1674.
- 5) Narita M, Kishimoto Y, Ise Y, et al. Direct evidence for the involvement of the mesolimbic κ -opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 111-118.
- 6) Cadet P. Mu opiate receptor subtypes. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10: MS28-32.
- 7) Romero A, Planas E, Poveda R, et al. Anti-exudative effects of opioid receptor agonists in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation of the paw. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 511: 207-217.
- 8) Kapasi AA, Coscia SA, Pandya MP, et al. Morphine modulates HIV-1 gp160-induced murine macrophage and human monocyte apoptosis by disparate ways. *J. Neuroimmunol.* 2004; 148: 86-96.
- 9) Hsiao PN, Chang MC, Cheng WF, et al. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology* 2009; 256: 83-91.
- 10) Tegeder I, Grosch S, Schmidtko A, et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: Involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res.* 2003; 63: 1846-1852.
- 11) Lin X, Wang YJ, Li Q, et al. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J.* 2009; 276: 2022-2036.
- 12) Hitosugi N, Hatsukari I, Ohno R, et al. Comparative analysis of apoptosis-inducing activity of codeine and codeinone. *Anesthesiology* 2003; 98: 643-650.
- 13) Sueoka E, Sueoka N, Kai Y, et al. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 252: 566-570.
- 14) Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 441: 185-191.
- 15) Gupta K, Kshirsagar S, Chang L, et al. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res.* 2002; 62: 4491-4498.
- 16) Ishikawa M, Tanno K, Kamo A, et al. Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 1993; 16: 762-766.
- 17) McQuay HJ, Carroll D, Faura CC, et al. Oral morphine in cancer pain: Influences on morphine and metabolite concentration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1990; 48: 236-244.
- 18) 亀上 隆, 的場光昭, 小川秀道. モルヒネ坐剤投与後異常な血中濃度パターンを呈した肝癌患者の1例. *麻酔* 1994; 43: 126-129.
- 19) 小川節郎. モルヒネによる癌疼痛治療の実際. オピオイド研究会編, オピオイド—適正使用と最近の進歩—, 1997; p. 49-66.
- 20) Kerrigan S, Honey D, and Baker G. Postmortem morphine concentrations following use of a continuous infusion pump. *J. Anal. Toxicol.* 2004; 28: 529-532.
- 21) Duflou J, Darke S, and Easson J. Morphine concentrations in stomach contents of intravenous opioid overdose deaths. *J. Forensic Sci.* 2009; 54: 1181-1184.
- 22) Hasselstorm J and Sawe J. Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative

- contribution of metabolites to active opioid concentrations. Clin. Pharmacokinet. 1993; 24: 344-354.
- 23) Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, et al. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines *in vitro*. Anticancer Res. 2007; 27: 857-864.
- 24) Maneckjee R, Biswas R, and Vonderhaar BK. Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. Cancer Res. 1990; 50: 2234-2238.
- 25) Romberg R, Sarton E, Teppema L, et al. 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. 2003; 91: 862-870.
- 26) Hsiao P, Chang M, Cheng W, et al. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. Toxicology 2009; 256: 83-91.
- 27) Mignat C, Wille U, and Ziegler A. Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. Life Sci. 1995; 56: 793-799.
- 28) Frances B, Gout R, Monsarrat B, et al. Further evidence that morphine-6 β -glucuronide is a more potent opioid agonist than morphine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1992; 262: 25-31.
- 29) Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, et al. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. Cancer Res. 1995; 55: 5632-5636.
- 30) Eden PA and Taylor JE. Somatostatin receptor subtype gene expression in human and rodent tumors. Life Sci. 1993; 53: 85-90.

Effect of Morphine on the Proliferation of Human Carcinoma Cell Lines

Hiroki IWATA^{*1}, Hiromi SATO^{*1}, Hiroyuki OKABE^{*2},
Tomohiro YANO^{*3}, Yuko SEKINE^{*2}, and Koichi UENO^{*1}

Departments of

^{*1} Geriatric Pharmacology and Therapeutics and

^{*2} Practical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan

^{*3} Laboratory of Molecular Patho-physiology, Faculty of Life Sciences, Toyo University,
1-1-1 Izumino, Itakura, Oura, Gunma 374-0193, Japan

Abstract: Morphine is one of the opioid analgesics used for relief of cancer-related pain, and more evidence about the safety of opioids has been necessary to diffuse their clinical use. In this study, we investigated the effect of morphine on the proliferation of human carcinoma cell lines in order to clarify whether morphine could affect the tumor in patients. The proliferation of two carcinoma cell lines was not affected by 1 nM-100 μ M of morphine, which is equivalent to its plasma concentration in humans. In addition, morphine caused no effect on the cytotoxic effect of a chemotherapeutic agent, vinblastine, when morphine and vinblastine were co-treated in the cell line. On the other hand, 0.5-4 mM of morphine inhibited the proliferation of six cancer cell lines accompanied by the increase of cell population of subG1 phase. The only noncancerous cell line, Met-5A, was also affected by a high concentration of morphine although its cell viability was higher than that of cancer cell lines. Morphine-6-glucuronide, one of the metabolites of morphine, also inhibited the cell growth. IC₅₀ value of the anti-proliferation effect of morphine ranged from 1.47 to 2.81 mM. However, this effect was not antagonized by naloxone. In conclusion, we showed that the plasma concentration of morphine could not directly affect the proliferation of human carcinoma cell lines although a higher concentration of morphine inhibited their proliferation.

Key words: morphine, carcinoma cells, proliferation