

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07977

研究課題名(和文) シグマ受容体シャペロンによる細胞保護作用および μ -受容体機能調節の機序解明

研究課題名(英文) Underlying mechanism of cytoprotective effects and regulation of mu-opioid receptor induced by sigma-1-receptor chaperone

研究代表者

森 友久 (Mori, Tomohisa)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40366331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シグマ1受容体シャペロンとBcl-2は、細胞に対するストレスに対し、ミトコンドリアにおいて作用を惹起すると信じられて来たが、小胞体においてそれぞれカスパーゼならびに GSK-3 を介して細胞保護作用を示すことが明らかとなった。

一方、長期間の受容体刺激に対して、シグマ1受容体シャペロンは細胞内増加し、細胞保護作用を示すことも明らかに出来た。さらに、この状況で急激に刺激がなくなった場合、シグマ1受容体シャペロンが核膜周辺に細胞内移行し、離脱症状が発現し、これらの効果は拮抗薬の処置で完全に抑制された。

この様に、シグマ受容体シャペロンは細胞保護作用に重要であり、その機序を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to delineate the possible involvement of Bcl-2 in the cytoprotective effects of Sig-1R against mitochondria originated apoptosis in cells. We expected that Sig-1R may exert cytoprotective effects against mitochondria oriented stress through regulation of Bcl-2, however our findings indicate that Sig-1R as well as Bcl-2 regulates mitochondria-originated apoptosis through different ways; Sig-1R and Bcl-2 at mitochondria could regulate the caspase pathway and phosphorylation of GSK-3 to protect the cells, respectively.

Sig-1R as an ER chaperone is upregulated to protect cells against long-term stimulation of MOR1C, and sabotage its assigned functions by translocation induced by unexpected stimuli. Thus, Sig-1R is an important molecule in the maintaining the homeostasis and the expression of withdrawal signs in the morphine-adapted state. Our findings indicate that Sig-1R antagonists could be a candidate for the treatment of opioid withdrawal symptoms.

研究分野：行動薬理

キーワード：Sigma-1 receptor Morphine Bcl-2 withdrawal symptom

1. 研究開始当初の背景

がん・緩和領域において、がん対策基本法の施行および morphine の非がん性疼痛への適応拡大に伴い、科学的根拠に基づいた包括的なオピオイドに対する副作用対策が必要になってくる。また、抗がん剤は、その細胞毒性などから多くの副作用を持つにも関わらず、その副作用の抑制方法などは殆ど明らかとされていない。さらに、これらのオピオイドおよび抗がん剤の副作用により患者の QOL が下がり治療が制限されるケースが多い。これらの有効性および副作用は、動物において、表現型として把握しやすいにも関わらず、その作用機序は殆ど明らかにされていない。また、作用機序を詳細に検討するためには、動物実験といったマクロからの視点だけではなく、タンパク質レベルでのミクロレベルからといった包括的研究からの詳細な検討が必要である。

シグマ 1 受容体シャペロン (Sig-1R) は、想定していた細胞膜に存在している受容体でなく、小胞体において変性したタンパクを正常に戻すことにより非常に強い神経保護作用を示す小胞体シャペロンタンパクであることが見出された。また、Sig-1R は正常時には、他のシャペロンタンパクである BiP と複合体を形成し、互いのシャペロン活性が抑制されており、小胞体ストレスおよび Sig-1R 作動薬は、BiP との複合体化を解除させ、Sig-1R 活性を誘導する物質であるという概念が、証明された (Cell (2007) 131:596)。これらに伴い、シャペロン機能以外の作用も見出されており、小胞体以外での多くの機序が想定されている。特に、Sig-1R が抗がん剤およびオピオイド鎮痛薬の投与により非常にダイナミックに変動することを見出しており、Sig-1R の作用薬が行動薬理的に様々な薬理作用を有していることも明らかにしている。

しかしながら、これらの機序に関する詳細な機序は明らかに出来ていない。

2. 研究の目的

分子生物学および薬理学の観点から、がん・緩和ケア領域に焦点を絞り、培養細胞ならびに個体レベルの両端、即ち、分子生物学および薬理学の両面から Sig-1R の分子薬理的機構を明らかにし、Sig-1R 作動薬・拮抗薬の病態における有用性に関するエビデンスを示し、早期の臨床応用の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

Sig-1R の細胞保護作用の機序解明：Sig-1R は GSK-3 に結合し、脱リン酸化するといった知見が出つつある。しかし、結合様式および脱リン酸化の機序は全く不明である。そこで、リン酸化部位に点変異を施した GSK-3 を作製し、すでに作製した部分欠損 Sig-1R を用いて共免疫沈降法等によりタンパク相互作用の機序を解明する。さらに、Sig-1R 作動薬ならびに knockdown を用いて、GSK-3 のリン酸化による NF- κ B 系を介した apoptosis への関与を WB および PCR 法を用いて明らかにする。さらに、Sig-1R の非常に強い抗がん作用を示す staurosporine に対する細胞保護効果に抗アポトーシスタンパク Bcl-2 依存および非依存の機序が存在することが明らかになりつつある。そこで、Sig-1R knockdown ならびに強制発現および Bcl-2 強制発現などによりカスパーゼの活性化を伴った apoptosis に至る Sig-1R のミトコンドリアにおける細胞保護作用の機序について tunnel および annexin V および WB 法により培養細胞を用いて明らかにする。必要に応じ、ミトコンドリア特

異的酸化ストレスの影響についても rotenone などを用いて比較検討する。

Sig-1R の μ -受容体機能調節の機序解明: Morphine 処置後の動物の脳・脊椎および末梢臓器サンプルを用いて、Sig-1R のタンパクレベルの変化、膜分画を用いた Sig-1R 細胞内移動、さらには免疫組織染色を行い、機能解剖学的に明らかにする。また、内因性の μ -受容体を認識する抗体が販売されていないことから、既に作製している Sig-1R および μ -受容体ベクターを用いて、CHO もしくは HEK293 細胞等に μ -受容体および Sig-1R を強制もしくは安定発現させる。これらを用いて、WB、共免疫沈降法およびセルキーシステムを用いて morphine およびオピオイド受容体拮抗薬による μ -受容体/Sig-1R 複合体の形成後の μ -受容体刺激および遮断によるシグナル変化および形態変化を検討し、細胞レベルでの morphine の薬理作用に対する Sig-1R の関与を解明する。

既報 (Mol. Pharmacol (2010)) によると μ -受容体/Sig-1R 複合体は、細胞膜上に存在していると報告されているが、既報では脱糖鎖が既にされており、詳細は不明である。そこで脱糖鎖を行わない状態で μ -受容体/Sig-1R 複合体が共免疫沈降法を用いて検出された場合、細胞膜上で説明されるため、 μ -受容体および Sig-1R 部分欠損ベクターによる細胞への過剰発現を行い、共免疫沈降法より μ -受容体/Sig-1R 複合体の結合部位および Sig-1R による μ -受容体へ結合部位部位を明らかとする。さらに、WB および PCR などの生化学的手法を用いて μ -受容体のシグナル伝達に対する Sig-1R の影響を検討する。逆に、 μ -受容体/Sig-1R 複合

体の形成が糖鎖のついていない μ -受容体と結合するのであれば、Sig-1R の作用は小胞体における作用であり、 μ -受容体刺激および退薬時における細胞内 Ca^{2+} の放出を Fura 2 等を用いて測定し、さらに Sig-1R の細胞内移動について μ -受容体/Sig-1R-EYFP 安定発現 CHO 細胞を用いて morphine 退薬後の Sig-1R の細胞内分布を機能形態学的に解析する。

抗がん剤誘発神経障害性疼痛に対する sigma-1 受容体作用薬の鎮痛効果
Paclitaxel を処置し、投与後開始後 1、5、9 および 13 日目に von Frey test を実施して allodynia の確認を行う。また、oxaliplatin を 1、2、8、9、15、16、22 および 23 日目に処置し、投与開始後 1、8、15、22 および 36 日目に von Frey test を実施し、allodynia の確認を行う。

4 . 研究成果

各種ストレス inducer 処置に伴うアポトーシス機構の比較

各種薬物処置によるアポトーシスに対する Sig-1R の関与を比較した。Antimycin A ($\square \mu\text{M}$)、rotenone ($\square \mu\text{M}$) および staurosporine ($\square \mu\text{M}$) を処置した CHO cell を用いて、WB 法により検討を行った。Sig-1R の発現抑制により、antimycin A と rotenone により誘発されるアポトーシスの増強は認められなかったが、staurosporine 誘発アポトーシスは、Sig-1R の発現抑制によって有意に増強された。

Staurosporine 処置による Sig-1R の局在ターゲット分子の同定し、Sig-1R の局在を確認するために、CHO cell に EYFP 付加された Sig-1R vector を導入し、Hoechst33342 による Sig-1R の細胞

内の局在変化の検討を行った。Staurosporine 処置による Sig-1R の局在を検討したところ、staurosporine 処置 6 時間後に、Sig-1R の核膜への移行、24 時間後には核内移行が認められた。また、24 時間後において Sig-1R の核内移行が認められた細胞において、クロモゾーム染色薬である Hoechst33342 (□□1/ml) を処置したところ、アポトーシスが認められた。

CHO cell に staurosporine (1 μ M) を処置し 1、3 および 6 時間後の Akt および GSK-3 のリン酸化について、WB 法を用いて検討を行った。その結果、staurosporine 処置 1 時間後において、GSK3 の Ser9 部位の有意な脱リン酸化が認められた。また、それに伴う Ser473 がリン酸化された Akt の有意な変化は認められなかった。一方で、Thr390 がリン酸化された GSK3 の変化は認められなかった。ここで認められた GSK3 の Ser9 部位の有意な脱リン酸化に対して Sig-1R ならびに Bcl-2 の過剰発現の影響を検討したところ、Bcl-2 の過剰発現により脱リン酸かが解除され、Sig-1R の過剰発現の過剰発現では、このような作用は全く認められなかった。よって、Bcl-2 は GSK3 のリン酸化に対して強く影響していることが明らかとなった。

Saurosporine により誘発される caspase-3 の活性化は Sig-1R の knockdown おいて増強され、Sig-1R の過剰発現により抑制された。一方、Bcl-2 の knockdown では、staurosporine の処置 6 時間後に認められる caspase-3 の活性化は抑制されたのに対し、Bcl-2 の過剰発現では caspase-3 の活性化の抑制は全く認められなかった。よって、少なくとも staurosporine 処置 6 時間 (early phase) までの caspase-3 に対する抑制作用は、Sig-1R と Bcl-2 ではその作用様式が異なることが明らかとなった。

これまでに、Bcl-2 ファミリーは late phase において細胞保護作用を示すことが報告されている。本研究において、staurosporine 処置 16 時間後には、Sig-1R は小胞体から核に細胞内移行すること、さらに、Bcl-2 の過剰発現による caspase-3 の活性化の抑制作用は、Sig-1R の knockdown 時においてのみ認められた。そこで、Bcl-2 は late phase などの Sig-1R が機能出来ない状態において caspase-3 を調節して細胞保護作用を示す抗アポトーシスタンパク質であると仮定し、staurosporine 処置 12 および 16 時間後の caspase-3 の活性化に対する Bcl-2 の抑制作用について検討した結果、12 および 16 時間後における caspase-3 の活性化は、Bcl-2 の過剰発現により明らかに抑制された。よって Sig-1R および Bcl-2 はミトコンドリアストレスに対して、アポトーシスの early phase では、それぞれ caspase-3 および GSK-3 を調節することにより細胞保護作用を発現している事が明らかとなった。一方 Bcl-2 は、late phase において caspase-3 を抑制することにより抗アポトーシス作用を示すことが示唆された。

さらに、Sig-1R-EYFP ならびに Bcl-2-GFP を安定発現させた細胞株を樹立し、それぞれの細胞内局在を解析した所、Bcl-2 は主に小胞体に存在し、Sig-1R は小胞体とミトコンドリアの結合部 (MAM) に存在していた。薬物によるストレス初期には Sig-1R は小胞体へ細胞内移行し、一方で、Bcl-2 はストレス後期にミトコンドリアに細胞内移行し細胞保護作用を示していた。ストレス後期では、Sig-1R はもはや細胞保護作用を惹起していないのに対し、ストレス初期に GSK-3 を介して細胞保護作用を発現していた Bcl-2 はストレス後期においてミトコンドリア移行し、caspase-3 依存的に細胞保護作用を示した。このように Bcl-2 および Sig-1R はそれぞれ時間依存的に、あるいはオルガネラ依存的に異なるアポトーシス関連タ

ンパク質を調節して細胞保護作用を惹起していることを見出した。

我々は、これまでにSig-1Rがオピオイド鎮痛薬の退薬症候発現に関与していることを見出してきているものの、未だ詳細な機序の解明はなされていない。そこで本研究では、morphine 身体依存形成時の naloxone 誘発下痢及び体重減少における Sig-1R の関与について検討を行った。Western blot 法に従って Sig-1R タンパク質量の変化を検討したところ、morphine 身体依存を形成したマウスの上行結腸において有意な増加が確認された。さらに RT-PCR 法に従って μ -opioid 受容体 (MOR) mRNAを検討したところ、上行結腸には MOR1C のみが発現していることが明らかとなったことから、Sig-1R-MOR1C 間の相互作用に注目した。残念ながら、Chinese hamster ovary 細胞において、Sig-1R によって糖鎖付加されている、即ち細胞膜に存在すべき成熟した MOR1C は共免疫沈降されなかった。即ち、これまでの報告における Sig-1R-MOR間の相互作用は、小胞体における新しく合成されたMORに対するフォールディングを反映して言う事が推測された。

Sig-1R-EYFP は小胞体マーカータンパク質と共局在を示し、モルヒネを処置した場合でもこの局在に変化は認められなかった。次に、モルヒネの長期処置に対するSig-1Rの細胞保護作用について検討を行った。Sig-1R の siRNA による knockdownされた細胞では、モルヒネの処置により有意なアポトーシスが認められた。よって、Sig-1Rは、小胞体において細胞内増加することにより、細胞保護作用を示すところが明らかとなった。さらに、モルヒネの長期処置後、naloxone の添加

し、細胞における離脱症候を確認したところ、興味深いことにSig-1R-EYFP は、小胞体から核膜側へ細胞内移行した。また、この細胞内移行は、Sig-1R 拮抗薬の前処置により完全に認められなくなった。同様の検討をマウスを用いて再現した。Morphineに対して身体依存を形成したマウスに Sig-1R 拮抗薬を前処置したところ、naloxone 誘発下痢及び体重減少は有意に抑制された。以上の結果より、morphine 依存マウスにおけるnaloxone 誘発下痢及び体重減少の発現に、MOR1C-Sig-1Rの直接的なタンパク相互作用ではなく、Sig-1R の細胞内移行を伴うシャペロンタンパクとしての機能異常が退薬症候の発現に関与している可能性が推測された。以上の結果より、アメリカにおいてオピオイド危機などで問題となっている薬物依存にSig-1R受容体拮抗薬が非常に有効である可能性が示唆された。

抗がん剤誘発神経障害性疼痛下における脊髄の小胞体シャペロンタンパク Sig-1Rおよび BiP の変化を確認したところ、Sig-1Rのdownregulationが認められたが、BiP では変化が認められなかった。さらに、paclitaxel誘発 Sig-1R細胞内分布の変化をSig-1R -EYFP 安定発現 CHO 細胞を用いて検討を行ったところ、paclitaxel 処置後に CHO 細胞内の Sig-1Rの分布が小胞体から核膜付近に移動していた。これらの結果は、paclitaxel がSig-1Rの細胞内分布を変化させ、且つ、downregulation を引き起こすことにより、Sig-1Rとしての作用を抑制している可能性が考えられた。最後に、Sig-1R作用薬の鎮痛効果についても検討を行った。抗がん剤誘発神経障害性疼痛モデルに対し、Sig-1R作動薬である SA4503 の投与により鎮痛効果が認められたが、

その鎮痛効果はSig-1R拮抗薬であるNE100によって抑制された。以上の結果より、SA4503には抗がん剤誘発神経障害性疼痛に対して鎮痛作用があり、この鎮痛作用はSig-1Rを介していることが示唆され、Sig-1R作動薬はある種の神経障害性疼痛に有効であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Mori T, Ohya J, Masumoto A, Harumiya M, Fukazu M, Yoshizawa K, Hayashi T, Suzuki T (2015) Possible involvement of the Sigma-1 receptor chaperone in chemotherapeutic-induced neuropathic pain. Synapse 69: 526-532

[学会発表](計2件)

森 友久、成田 年

Sigma-1 受容体シャペロンならびに Bcl-2 による時間的およびオルガネラ特異的細胞保護作用, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸 H27.12.8.

Mori T Morphine 身体依存における sigma-1 受容体 chaperone の細胞内変動, 平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同総会, 神戸, H27.10.13.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 友久 (Tomohisa Mori 星薬科大学・薬学部・教授)

研究者番号: 40366331

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()