

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10522

研究課題名(和文) 麻酔薬・鎮痛薬の作用機序におけるGs、Gi蛋白共役型受容体の果たす役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of Gs and Gi protein coupled receptors in the mechanism of action of anesthetics and analgesics

研究代表者

南 浩一郎 (MINAMI, KOUICHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70279347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬・鎮痛薬の作用機序にGs結合型GPCR、Gi結合型GPCRがどのように関与するか研究を行った。今回の研究では、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、トラマドールとその主な活性代謝物である0-デスメチルトラマドール(M1)が μ ORの機能に及ぼす影響を調べた。その結果、トラマドールとM1は濃度依存的にDAMGO刺激によるCl電流を抑制した。この結果からトラマドールとM1は μ ORに直接影響を及ぼすことが明らかになった。さらに、ヒドロモルフォンによる μ ORシグナルを検討した。ヒドロモルフォンは濃度依存的に電気抵抗値を上昇させ、cAMP量を抑制し、緩徐な細胞内陥入が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はGs蛋白またはGi蛋白をカルシウム動員型Gq蛋白と融合させたキメラG蛋白共役型受容体を作製して、アフリカツメガエル卵母細胞発現系に発現させ、GsならびにGi結合型GPCRに対する作用を細胞内カルシウムの変動で測定する方法で、麻酔薬・鎮痛薬のG蛋白共役型受容体に対する影響を観察するものである。今回の研究では、トラマドールと0-デスメチルトラマドール(M1)がこの結果からトラマドールとM1は μ ORに直接影響を及ぼすことが明らかになった。これらの方法は麻酔薬や鎮痛薬に広く応用ができ、今後の麻酔薬、鎮痛薬の機能解析の一助になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of tramadol and its main active metabolite 0-desmethyltramadol (M1), on the function of μ ORs using *Xenopus* oocytes expressing cloned human μ ORs. The effects of tramadol and M1 were evaluated using the Ca(2+)-activated Cl(-) current assay method for G(i/o)-protein-coupled receptors by using a μ OR fused to G(qi5) (μ OR-G(qi5)) in *Xenopus* oocytes. Tramadol and M1 also evoked Cl currents in the oocytes expressing μ OR-G(qi5); however, relatively higher concentrations (compared to DAMGO [(D-Ala(2), N-MePhe(4), Gly(5)-ol)-enkephalin]) were necessary to induce such currents. Tramadol and M1 had a direct effect on μ ORs expressed in *Xenopus* oocytes. The μ OR signal by Hydromorphone was examined. Hydromorphone increased the electrical resistance in a concentration-dependent manner, suppressed the amount of cAMP.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 Gs蛋白共役型受容体 Gi蛋白共役型受容体 トラマドール オピオイド受容体 ヒドロモルフォン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬や鎮痛薬の薬理機序は未だに解決されていない。麻酔薬や鎮痛薬の薬理機序には GABA_A 受容体やニコチン性アセチルコリン受容体などのイオンチャネルへの作用が主であると考えられてきたが (Nature 1998, 392:390-7) 現在ではそれだけでは説明できないことが明らかになり、麻酔薬や鎮痛薬のメカニズム解明のための新たな理論が求められている。最近のヒューマンゲノムプロジェクトの進展により、生体内リガンドが見つからない G 蛋白共役型受容体 (GPCR) が実に 100 種類以上存在することが明らかになってきた。これらの GPCR の多くは中枢神経系に発現しており、麻酔薬・鎮痛薬の作用機序に関係していることが予想されている。未知の GPCR を含めて、GPCR の鎮痛への関与を詳細に検討することは、鎮痛薬・麻酔機序を考える上できわめて重要である。

我々の研究グループは今まで『麻酔薬・鎮痛薬の薬理機序に GPCR は重要な役割を演じている』という仮説を立て、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて麻酔薬の Gq 蛋白結合 GPCR に対する様々な作用を継続的に報告してきた (以下総説参照 Minami K, Uezono Y. J Anesth. 2013;27:284-92. Minami K, Uezono Y, et al. J Pharmacol Sci. 2007 103:253-60. Minami K, Uezono Y. Curr Pharm Des .2006;12:1931-7)。サブスタンス P 受容体などの Gq 結合型 GPCR に関しては、麻酔薬や鎮痛薬の薬理機序に関係しているという一定の知見を集積することができている。しかし、循環器系に大きな影響を及ぼす α_1 アドレナリン受容体、ドーパミン受容体をはじめとした Gs 結合型 GPCR や血管収縮作用を持つ α_2 アドレナリン受容体や鎮痛に関与する μ アドレナリン受容体のような Gi 結合型 GPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用についてはほとんど手つかずである。

また、GPCR は長年ホモマーとして働いていると考えられていたのであるが、近年多くの GPCR がホモオリゴマー、あるいは他の受容体とのヘテロマーを形成して細胞膜に発現していることが明らかとなってきた。1999年にオピオイド μ 受容体がヘテロダイマーを形成し、かつそのヘテロダイマーが単独での受容体の薬物特性とは異なることがわかり、生体での薬物特性はこれらヘテロダイマーの存在も考慮すべきであるという報告がなされた。その後相次いで、痛覚に関連する GPCR ヘテロダイマーが存在することが判明し、かつヘテロダイマーが生体で重要な働きを持っていることが次々と判明してきている。この事実は、単体のクローン化受容体から得られる薬物特性のみの解析するだけではもはや不十分であり、ヘテロマー受容体での薬物の反応を考慮すべきであるという示唆である。果たして麻酔薬・鎮痛薬はホモマー GPCR、ヘテロマー GPCR にいかなる作用を示すのか？ この問題は新たな麻酔薬・鎮痛薬の薬理機序を解明する新たな理論構築の可能性として極めて興味深い。このように、麻酔薬・鎮痛薬の Gs、Gi 結合型受容体への作用や麻酔薬・鎮痛薬のホモマー GPCR、ヘテロマー GPCR への作用を解明することは、『麻酔薬・鎮痛薬の薬理機序に GPCR は重要な役割を演じている』という仮説を証明するために避けては通れない重要な問題である。

2. 研究の目的

本研究は、Gs 蛋白、Gi 蛋白をカルシウム動員型 Gq 蛋白と融合させたキメラ G 蛋白受容体を作製、用いることにより、Gs ならびに Gi 結合型 GPCR に対する作用を細胞内カルシウム (Ca²⁺) の変動で測定する方法を開発し、幅広く GPCR に対する作用を幅広く解析する技術を確立した。この技術により GPCR の麻酔薬・鎮痛薬の薬理機序における役割を総合的に解析する事ができる。今回の研究では、麻酔薬・鎮痛薬の作用機序に Gs 結合型 GPCR、Gi 結合型 GPCR がどのように関与するかを、さらに麻酔薬・鎮痛薬がこれらのホモマー GPCR、ヘテロマー GPCR にどのような作用を示すのかを明らかにするために、アフリカツメガエル卵母細胞発現系、培養後根神経節細胞を用いて以下の研究を行う。

- (1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて Gs 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を用いた手法で、 α_1 アドレナリン受容体とドーパミン受容体 (D₁、D₅) への麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。
- (2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、Gi 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を用いた手法で、 α_1 、 α_2 アドレナリン受容体、ドーパミン受容体 (D₂、D₃、D₄)、オピオイド受容体 (μ , κ) に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。
- (3) これらの作用に Protein Kinase C などの細胞内リン酸化酵素が関与するか検討する。
- (4) 現在までアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて明らかとなった麻酔薬・鎮痛薬の Gq 結合型 GPCR への作用を培養脊髄後根神経節細胞で検証する。
- (5) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、 α_2 アドレナリン受容体、オピオイド受容体

のホモマーGPCR、ヘテロマーGPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用を明らかにする。
以上の検討をすることにより、麻酔薬・鎮痛薬の薬理機序に関して GPCR がどのような役割を演じているのかを総合的に解析し、麻酔薬、鎮痛薬の薬理機序の新しい理論を構築したい。

3. 研究の方法

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて Gs 蛋白あるいは Gi 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を結合した RNA を発現させ、Gs 結合型 GPCR (α_1 アドレナリン受容体、ドーパミン受容体) への麻酔薬・鎮痛薬の作用解析 Gi 結合型 GPCR (μ_1 アドレナリン受容体、 μ_2 アドレナリン受容体、オピオイド受容体 (μ, δ, κ)) に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用解析を行い、さらにこれらに対する Protein Kinase C などの細胞内リン酸化酵素の関与を解析する。さらに、Gq 結合型 GPCR への麻酔薬・鎮痛薬の作用を培養後根神経節細胞を用いて確認する。更に μ_2 アドレナリン受容体、オピオイド受容体 (μ, δ, κ) のホモマーGPCR、ヘテロマーGPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用解析を行う。以上により GPCR への薬理作用を総合的に解析する。

検討する麻酔薬、鎮痛薬は以下のものとする。

吸入麻酔薬：ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン、ジエチルエーテル

静脈麻酔薬：ケタミン、プロポフォール、ペントバルビタール、デクスメトミジン

鎮痛薬：トラマドール

(1) アドレナリン受容体への麻酔薬・鎮痛薬の作用解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて アドレナリン受容体と Gs 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を結合した RNA を発現させ、アドレナリンで刺激し アドレナリン受容体に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。

(2) ドーパミン受容体への麻酔薬・鎮痛薬の作用解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いてドーパミン受容体 (D1、D5 : Gs 共役型、および D2、D3、D4 : Gi 共役型) にそれぞれ、Gs ならびに Gi を Gq 蛋白と融合させたキメラ G 蛋白 RNA を発現させ、ドーパミンで刺激しドーパミン受容体に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。

(3) μ_1 アドレナリン、 μ_2 アドレナリン受容体に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて CGRP 受容体と Gi 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を結合した RNA を発現させ、アドレナリンで刺激し μ_1 アドレナリン受容体、 μ_2 アドレナリン受容体に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。

(4) オピオイド受容体 (μ, δ, κ) に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いてオピオイド受容体 (μ, δ, κ) と Gi 蛋白と Gq 蛋白とのキメラ G 蛋白を結合した RNA を発現させ、DAMGO 等のアゴニストで刺激しオピオイド受容体 (μ, δ, κ) に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響を明らかにする。

(5) Protein Kinase C などの細胞内リン酸化酵素が関与の解明

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて各受容体に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響が細胞内リン酸化酵素阻害薬 (GF109203X) によって抑制されるかどうかを確認する。

(6) 培養後根神経節細胞を用いた GPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の影響

培養後根神経節細胞にはサブスタンス P 受容体など多くの Gq 結合型 GPCR が存在する。これに対して麻酔薬、鎮痛薬が抑制するかどうかを細胞内 Ca²⁺動態 (Ca²⁺測定装置は現有) で観察する。

(7) アフリカツメガエル卵母細胞系を用いて μ_2 アドレナリン受容体、各種オピオイド受容体 (μ, δ, κ) のホモマーGPCR、ヘテロマーGPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用測定

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて μ_2 アドレナリン受容体、 μ, δ, κ オピオイド受容体のホモマーGPCR、ヘテロマーGPCR に対する麻酔薬・鎮痛薬の作用するか測定する。

4. 研究成果

トラマドールの薬理作用解明

トラマドールは数十年間鎮痛剤として使用されてきた。 μ -オピオイド受容体 (μ OR) は、オピオイドの鎮痛作用を媒介する主要な受容体であると考えられてきた。 μ OR はトラマドールの作用部位の1つであると考えられてきたが、トラマドールが μ OR のアゴニストであるかどうかを直接証明する報告はない。本研究では、クローンヒト μ OR を発現するアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、トラマドールとその主な活性代謝物である O-デスメチルトラマドール (M1) が μ OR の機能に及ぼす影響を調べた。トラマドールと M1 の効果は、 α (qi5) に融合した μ OR (μ OR-G) を用いて、G(i/o)-タンパク質共役受容体に対する Ca²⁺-活性化 Cl⁻電流アッセイ法を用いて評価した。DAMGO [(D-Ala (2), N-MePhe (4), Gly (5) -ol) - エンケファリン] は濃度依存的に μ OR- α (qi5) を発現する卵母細胞において Cl⁻電流を誘発した。トラマドールと M1 はまた、 μ OR-G を発現している卵母細胞に Cl⁻電流を誘発した (qi5)。しかしながら、そのような電流を誘導するためには比較的高い濃度 (DAMGO と比較して) が必要であった。トラマドールと M1 は、アフリカツメガエル卵母細胞で発現した μ OR に直接影響を及ぼしました。モノアミン取り込み系

および数種類のリガンド依存性イオンチャネルはトラマドールの標的の1つであると考えられているが、トラマドール誘発抗侵害受容は少なくとも部分的には、 μ ORの直接活性化によって仲介される。

アセトアミノフェンならびにAM404のオピオイド受容体に対する作用解析
アセトアミノフェンならびにAM404単独処置による各種オピオイド受容体の活性評価を行ったところ、両薬はいずれのオピオイド受容体に対してもアゴニスト活性を示さないことを明らかにした。次に、医療用麻薬モルヒネによる各種オピオイド受容体活性化に対するアセトアミノフェン、AM404の効果について解析した。その結果、アセトアミノフェンおよびAM404はフェンタニルによるMOR活性を増強したが、両薬物はDOR, KOR活性に対して無影響だった。以上の結果より、アセトアミノフェンとフェンタニルの併用による鎮痛作用にMOR活性促進作用が関与する可能性が示唆された。現在、他の(1)から(3)についても研究を進めている段階である。

医療用麻薬のオピオイドシグナリングに関する研究

今年度は今回のテーマと並行して、宮野らを中心に解析を行ってきた医療用麻薬のオピオイドシグナリングについての研究が進捗を見せている。医療用麻薬(モルヒネ、フェンタニル、オキシコドン、ヒドロモルフォン)は μ ORを介して鎮痛作用を発揮する。しかし、各薬剤により鎮痛作用の強さや副作用および鎮痛耐性の発生が異なる。この違いは各薬剤による μ ORを介した細胞内シグナル伝達経路の違いに基づく。近年、 μ ORを活性化によりGタンパク質依存的シグナルおよびアレスチン依存的シグナルを活性化することが知られている。Gタンパク質依存的シグナルは、Gi/oタンパク質を活性化し、アデニル酸シクラーゼを抑制による細胞内cAMP量の低下、ならびにカルシウムチャネルの抑制、カリウムチャネルの活性化などにより鎮痛作用を示す。一方、アレスチン依存的シグナルは、Gprotein-coupled receptor kinaseによる受容体のリン酸化、アレスチンの μ ORへのリクルートメントによる μ ORの細胞内陥入などにより、鎮痛耐性に関与する。本研究では、 μ OR活性化により変化する細胞内外の電気抵抗値ならびに細胞内cAMP量、 μ ORの細胞内陥入を指標に、ヒドロモルフォンによる μ ORシグナルを医療用麻薬と比較した。方法はHaloTag- μ OR安定的発現HEK293細胞を用いた。その結果、医療用麻薬は濃度依存的に電気抵抗値を上昇させ、そのEC50値はフェンタニル<ヒドロモルフォン<モルヒネ<オキシコドンの順であった。また、全ての医療用麻薬は濃度依存的にcAMP量を抑制した。加えて、フェンタニルは急峻かつ顕著な μ ORの細胞内陥入を引き起こす一方、ヒドロモルフォン、モルヒネおよびオキシコドンでは緩徐な細胞内陥入が観察された。本研究により、各種医療用麻薬はそれぞれ異なる μ ORシグナリングを示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

What is the main mechanism of tramadol?

Minami K, Ogata J, Uezono Y.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2015 Oct;388(10):999-1007.

doi: 10.1007/s00210-015-1167-5. Epub 2015 Aug 21. 査読有り

Tramadol and its metabolite m1 selectively suppress transient receptor potential ankyrin 1 activity, but not transient receptor potential vanilloid 1 activity.

Miyano K, Minami K, Yokoyama T, Ohbuchi K, Yamaguchi T, Murakami S, Shiraishi S, Yamamoto M, Matoba M, Uezono Y.

Anesth Analg. 2015 Apr;120(4):790-8. doi: 10.1213/ANE.0000000000000625. 査読有り

μ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1).

Minami K, Sudo Y, Miyano K, Murphy RS, Uezono Y.

J Anesth. 2015 Jun;29(3):475-479. doi: 10.1007/s00540-014-1946-z. Epub 2014 Nov 14.

査読有り

Modulation of synaptic inputs in magnocellular neurones in a rat model of cancer cachexia.

Yokoyama T, Terawaki K, Minami K, Miyano K, Nonaka M, Uzu M, Kashiwase Y, Yanagihara K, Ueta Y, Uezono Y.

J Neuroendocrinol. 2018 Sep;30(9):e12630. doi: 10.1111/jne.12630. 査読有り

5. [学会発表](計5件)

宮野加奈子、松出知子、大栗宝子、南浩一郎、藤井秀明、上園保仁。

アミノフェンおよびその代謝産物AM404は医療用麻薬によるオピオイド受容体活性を増強する。第129回日本薬理学会近畿部会 2016年06月24日~2016年06月24日 広島県医師会館(広島県広島市)

大道容子、大栗宝子、川合田恵美、根本悦子、横山明信、宮野加奈子、山川央、松出知子、江藤萌子、佐藤夕莉、平山重人、野中美希、南浩一郎、横山徹、白石成二、長瀬隆弘、藤井秀明、上園保仁。オピオイド耐性に関するオピオイド受容体インターナリゼーションへの Acetaminophen および AM404 の効果解析-可視化 Halotag 融合オピオイド受容体発現細胞を用いて。第 69 回日本薬理学会西南部会 2016 年 11 月 26 日～2016 年 11 月 26 日 松山大学（愛媛県松山市）

宮野加奈子、大道容子、石橋尚人、今井康太、荻野拓海、野中美希、南浩一郎、平山重人、吉澤一巳、藤井秀明、上園保仁。ヒドロモルフォンのオピオイド受容体を介した薬理学的特性の解析～既存の医療用麻薬との比較～第 11 回日本緩和医療薬学会年会 2017

真鍋星、宮野加奈子、松岡義和、佐藤哲文、森松博史、上園保仁。本邦における新規医療麻薬ヒドロモルフォンの特性の解析：他オピオイド製剤の特性との比較検討を通して。日本麻酔科学会第 65 回学術集会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市（2018.5.17-19）日本麻酔科学会第 65 回学術集会

Manabe, S., Miyano, K., Ogino, T., Ohshima, K., Uzu, M., Nonaka, M., Matsuoka, Y., Sato, T., Morimatsu, H., Uezono, Y. Characterization of the properties of four opioid analgesics approved in Japan with cells stably expressing μ ORs using the CellKey™ and GloSensor™ cAMP assay systems. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto International Conference Center, Kyoto (2018.7.1-6)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

上園 保仁

Yasuhito Uezono

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所

分野長

20213340

宮野 加奈子

Kanako Miyano

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所

研究員

50597888

横山 徹

Toru Yokoyama

自治医科大学麻酔科

助教

80425321

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。