

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11754

研究課題名(和文)可視化リアルタイム解析によるオピオイド製剤耐性形成機構解明と新規鎮痛法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of opioid tolerance formation by visualization real-time analysis and development of new analgesic methods

研究代表者

倉田 眞治 (KURATA, Shinji)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：20325666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最適な周術期鎮痛法開発のため、オピオイドや鎮痛薬のオピオイド受容体(OR)の活性に与える影響について、培養細胞を用いた可視化リアルタイム解析による $\mu$ OR細胞内局在ならびにCellKeyシステムによるGタンパク活性を解析した。(1)レミフェンタニル(RF)は、濃度依存性に鎮痛作用に関与する $\mu$ ORのGタンパク経路を活性化し、副作用に関与する $\beta$ -アレスチン経路を活性化した。(2)S(+) $\alpha$ -ケタミンを併用は、RFで活性化した $\mu$ ORのGタンパク活性には影響を与えないが、 $\beta$ -アレスチン経路を抑制した。これらの結果は、S(+) $\alpha$ -ケタミンがRFによる急性耐性形成などの副作用発症予防に有用である可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科・口腔外科領域では、持続的な鎮痛を行うことが難しく、手術の痛みや慢性痛で苦しむ患者も多い。鎮痛には医療用麻薬(オピオイド)が使用されているが、時に呼吸抑制や耐性形成(効きづらくなる)を発症しその対応に難しくなることがある。そこで副作用が少ないかつ効果的な鎮痛作用を併せ持つ、鎮痛方法の確立は重要である。本研究で得られた結果は、オピオイド製剤の特性を一部解明するとともに、呼吸抑制・耐性形成の副作用の問題を解決し、また適切な鎮痛方法の確立・新規鎮痛薬の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：To develop optimal perioperative analgesia, we investigated the effects of opioid receptor (OR) activity on opioid drugs and analgesics effect on the intracellular localization of  $\mu$ OR by visualization real-time analysis and Analysis of G-protein activity by the CellKey system.

(1) Remifentanyl (RF) activates the G protein pathway of  $\mu$ ORs, which is involved in analgesia, in a concentration-dependent manner. It also promotes the activity of the  $\beta$ -arrestin pathway, which is involved in side effects. (2) The combination of RF and S(+) $\alpha$ -ketamine have no effect on the G-protein activity of RF-activated  $\mu$ ORs, but inhibits the activation of the  $\beta$ -arrestin pathway. These results suggest that S(+) $\alpha$ -ketamine may be useful in preventing the development of RF-induced side effects such as acute tolerance formation.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：オピオイド オピオイド受容体 耐性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔外科手術をはじめとする周術期での術中侵害刺激および術後痛をはじめ、がん性疼痛・慢性疼痛に対する鎮痛には様々なオピオイド製剤が使用されているが、時に耐性形成や痛覚過敏を発症しその対応に難渋することがある。モルヒネやフェンタニルのほか、超短時間作用性オピオイドであるレミフェンタニル (以下 RF) においても激しい術後痛を引き起こし鎮痛対策に難渋することがあり、急性耐性出現や痛覚過敏発症の可能性も報告されている。(Guignard B, et al.: Anesthesiology 2000; 93: 409-17, Angst MS, et al.: Pain 2003; 106: 49-57)

がん性疼痛に対するオピオイドの使用では耐性形成対策としてオピオイド・スイッチングが行われる。周術期の RF 使用においても耐性獲得および痛覚過敏形成の予防を目的に各種薬剤を併用した臨床報告がある (Joly V, et al.: Anesthesiology 2005; 103: 147-55)。しかし、その有効性・作用メカニズムについてはまだ十分に明らかになっていない。

各種オピオイド製剤の耐性に関する研究報告は多いが、その分子メカニズムを解明する基礎的研究においては細胞組織学的解析ならびに電気生理学的解析にとどまるものが多く、オピオイド製剤の耐性獲得の細胞内分子機構についてはまだほとんど解明されていないのが現状である。

オピオイド製剤は、 $\mu$  オピオイド受容体 (以下  $\mu$ OR) に結合するとリン酸化酵素が結合、リン酸化された受容体には  $\beta$  アレスチンが結合し細胞内に引き込まれ、internalization (細胞内移行) される。Internalization された受容体は 80% が脱リン酸化の後、細胞膜に recycle され、残りは分解される。耐性形成の様式はオピオイド製剤ごとに異なることが知られており、その原因の一つとして、上述の  $\mu$ OR の細胞内への internalization および細胞膜への recycling の違いが示唆されている。(Imai S, et al.: Jpn J Neuropsychopharmacol, 2006; 26, 183-192)

我々はこれまで、RF が  $\mu$ OR への細胞内局在に与える影響を、様々な条件下 (作用時間・濃度・各種鎮痛剤)、で比較検討を行い、

- (1) RF は濃度依存性に internalization を促進すると共に recycling を抑制する。
- (2) RF の長時間作用は recycling を抑制する。
- (3) ケタミン併用が RF による internalization を抑制し、recycling を促進する。

との結果を得て、RF による急性耐性形成・痛覚過敏発症に、「高用量・長時間使用による  $\mu$ OR の recycling 抑制が関与している可能性」・「ケタミンの予防効果の可能性」を明らかにした。

一方、オピオイド受容体 (以下 OR) を含むいくつかの G 蛋白共役型受容体 (G protein-coupled receptors, GPCR) が二量体として生体に存在、さらに二量体化 OR の薬理学的特性は単量体のそれとは異なることが明らかとなってきた。鎮痛効果・耐性形成を考える上で、二量体化 OR が重要な役割を担っていると考えられているが、オピオイド製剤が二量体化 OR にどのように作用するのかは全く解明されていない。

我々は二量体化 OR の形成、その局在を Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法により可視化する手法を確立し、同アッセイ方法を用いてモルヒネとフェンタニルでは、単量体  $\mu$ OR と  $\mu$ - $\delta$  二量体化 OR の internalization 様式が異なることを見いだした (Hojo et al.; J Pharmacol Sci, 2008; 108(3):308-319, ASA Meeting, 2006, 2007, Ando Y et al.: ASA Meeting, 2008, 2009)。また、internalization した受容体の定量化を可能にした Halo Tag pH Sensor Ligand 結合  $\mu$  オピオイド受容体を発現させた HEK (Human Embryonic Kidney) 293 細胞を用いた細胞内局在の Real-time Visualizing Assay 法も確立し、RF による単量体  $\mu$ OR の細胞内局在を定量的・客観的に評価することに成功した。そこで我々が確立した両手法を応用し、オピオイド製剤に関する、単量体・二量体化 OR に対する分子生物学的解析とともに、濃度や作用時間の違い・各種鎮痛剤併用が細胞内局在に与える影響を Real-time Visualizing Assay 法

を用い比較・検討し、より詳細な分子メカニズムを明らかにして、オピオイド製剤による耐性形成を抑制し得る適切な周術期鎮痛法を臨床応用するための基盤を構築するために、本研究を行うに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、周術期における最適な術中・術後の新規鎮痛法の開発のため、

- (1) 我々がすでに確立している、蛍光タンパク結合 OR を用いた解析と Real-time Visualizing Assay 法による解析を用い、各種オピオイド製剤が単量体・二量体 OR の細胞内局在に与える影響を様々な条件下で検討する。
- (2) 各種オピオイド製剤と各種麻酔薬・鎮痛薬を併用した条件下での、単量体・二量体 OR の細胞内局在に与える影響を比較検討する。

以上の結果を基に、各種鎮痛薬・麻酔薬が OR の耐性・痛覚過敏形成に与える分子機構を明らかにし、耐性・痛覚過敏形成の少ない新規周術期鎮痛法開発に向けた基盤を構築する。

## 3. 研究の方法

各種オピオイド製剤の、濃度や作用時間の違いによる単量体・二量体 OR の細胞内局在の評価これまで行ってきた蛍光タンパク結合 OR を用いた解析に加え、

- (1) 細胞膜上に細胞膜非透過性で pH 低下により蛍光強度が上昇する Halo Tag pH Sensor Ligand を結合した  $\mu$  および  $\delta$  OR (単量体および二量体 OR) を発現する HEK293 細胞を作製
- (2) Halo Tag pH Sensor Ligand 結合 OR を発現させた HEK293 細胞に、以下の条件下での各種オピオイド製剤を作用させる。
  - ① 各種オピオイド製剤単独(モルヒネ・フェンタニル・オキシコドン・RF)など各種薬剤に最適化された濃度 (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M など), 作用時間 (30min, 60min, 120min, 180min など)
  - ② 各種オピオイド製剤 + OR の細胞内局在に影響を及ぼすと考えられる、各種鎮痛剤や細胞内外活性タンパク質 (例; PP2A・Rab4・ERK など)各条件下での各種オピオイド製剤作用後の、 $\mu$  OR・ $\delta$  OR および  $\mu$ - $\delta$  二量体 OR の細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いた Real-time Visualizing Assay 法により評価を行い、比較検討する。
- (3) 研究開始後に確立した、G タンパク活性を細胞の impedance 変化として捉える CellKey Assay 法を併用し、各種オピオイド製剤単独(モルヒネ・フェンタニル・オキシコドン・RF など)の各種濃度、および OR の G タンパク活性と細胞内局在などに影響を及ぼすと考えられる各種鎮痛剤の併用について解析を行った。

## 4. 研究成果

研究開始後、オピオイド製剤の鎮痛作用と副作用発症に細胞内シグナル伝達経路が関与し、鎮痛作用には OR の G タンパク経路の関与が、副作用には  $\beta$  アレスチン経路の関与が示唆され、その後確立した G タンパク活性を細胞の impedance 変化として捉える CellKey Assay 法を併用して解析を行った結果、

- (1) OR の G タンパク活性を、G タンパク依存性シグナル伝達経路に関するインピーダンス変化として捉えた解析方法 CellKey(TM) システムにより検討した結果、RF は主に  $\mu$  OR の G タンパク活性を濃度依存性に活性化することが示された (図 1)。

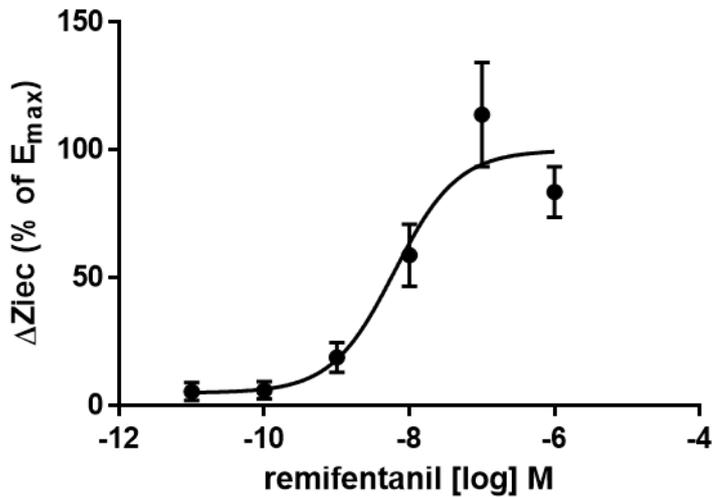
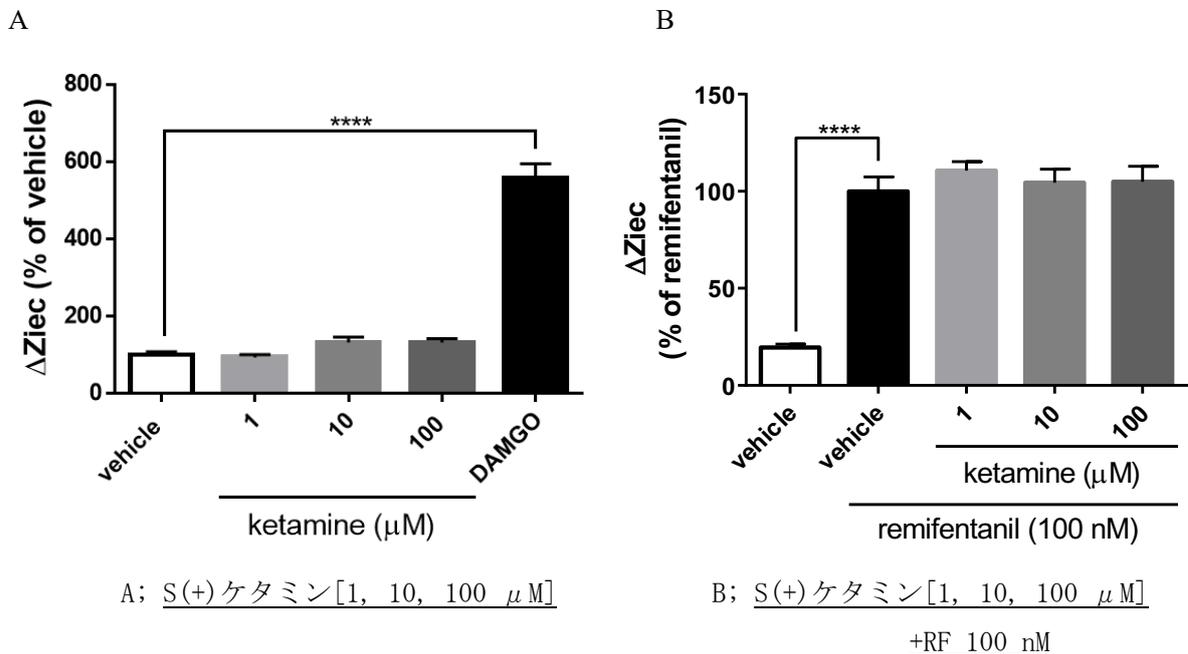


図1. CellKey システムにおける  $\mu$ OR の RF に対する濃度反応曲線

(2) RF による急性耐性形成や痛覚過敏の抑制に有用であると考えられている S(+)ケタミンの併用が与える影響について、CellKey(TM)システムによる解析を行った結果、S(+)ケタミン単独 (1, 10, 100  $\mu$ M) では  $\mu$ OR の G タンパク活性に影響を与えなかった。また、RF 100 nM と S(+)ケタミン(1, 10, 100  $\mu$ M) 併用においては、RF で活性化した  $\mu$ OR の G タンパク活性に影響を与えなかった (図 2A, 2B)。

図2. CellKey システムにおける  $\mu$ OR の G タンパク活性



A; S(+)ケタミン[1, 10, 100  $\mu$ M]

B; S(+)ケタミン[1, 10, 100  $\mu$ M]  
+RF 100 nM

以上の結果と、これまで我々が蛍光タンパク Venus 結合  $\mu$ OR を用いた細胞内局在の解析および Halo-Tag pH Sensor Ligand 結合  $\mu$ OR を用いた Real-time Visualizing Assay 法による解析で明らかにした、①RF は濃度依存性に細胞内移行(internalization)を促進する、②RF と S(+)ケタミン併用により  $\mu$ OR の細胞内移行 internalization を抑制し、細胞膜への recycling を促進する、という結果から、

① RF は濃度依存性に鎮痛作用に関与する  $\mu$ OR の G タンパク経路を活性化するとともに、副

作用に関与する $\beta$ アレスチン経路の活性を促進する。

- ② RF とケタミンの併用は、鎮痛作用に関与する RF によって活性化された $\mu$ OR の G タンパク活性に影響を与えないが、副作用に関与する $\beta$ アレスチン経路の活性化を抑制する可能性がある。このことは、S(+)S(+)ケタミンが RF による急性耐性形成や周術期痛覚過敏などの副作用発症の予防に有用である可能性を示唆するものである。

今後は、当初予定していたが遂行できなかった、鎮痛効果・耐性形成を考える上で重要な役割を担っていると考えられている二量体化オピオイド受容体の形成・局在解析に有用な Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)法と可視化リアルタイム解析、また OR の G タンパク活性を解析する CellKey(TM) システムの手法を駆使し、オピオイド製剤に関する単量体・二量体化 OR に対するより詳細な分子メカニズムを明らかにして、オピオイド製剤による耐性形成を抑制し得る適切な周術期鎮痛法を臨床応用するための基盤を構築していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石橋尚人, 倉田眞治, 大道容子, 荻野拓海, 大栗宝子, 松出知子, 江藤萌子, 宮野加奈子, 野中美希, 南 浩一郎, 藤井秀明, 樋上賀一, 鮎瀬卓郎, 上園保仁
2. 発表標題 麻酔および緩和ケアで用いられるレミフェンタニルおよびフェンタニルの薬理学的特性解析とその比較
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上園 保仁  (UEZONO Yasuhito)  (20213340)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長    (82606)	