

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19214

研究課題名(和文) RTP4- μ ヘテロ二量体相互作用を標的とした新しい疼痛治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy targeting interaction between RTP4-mu-delta heteromers

研究代表者

藤田 和歌子 (FUJITA, Wakako)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：30382328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では2年間の研究期間内に、mu-delta ヘテロ二量体とRTP4との相互作用について解析し、その相互作用の阻害によるモルヒネ鎮痛耐性形成への影響を明らかにすることを目的とした。結果として、相互作用を阻害すると予想される RTP4 deletion mutant の作製が完了し、RTP4 ノックダウンが mu-delta ヘテロ二量体の形成を阻害することを *in vitro* で明らかにした。また RTP4 の発現誘導時に耐性形成を確認できる *in vitro* モデルの構築と、RTP4 floxed マウスの個体復元と繁殖に成功し、モルヒネ鎮痛耐性形成への影響の解析ツールの準備が整った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the interaction between RTP4 and mu-delta heteromer (mu-delta) and to reveal the effect of this interaction on the development of tolerance to mu opioid receptor (MOPr) signal. Here, I found long-term activation of MOPr would lead to the up-regulation of RTP4 and of the colocalization of RTP4 and mu-delta and thus results in the increase of mu-delta on cell surface. At the same time, I found the development of tolerance to Gi responses by MOPr activation. Taken together, it is hypothesized that the increase of RTP4-mu-delta interaction by long-term activation of MOPr will play an important role in development of tolerance to MOPr signal. In addition, here I could construct a deletion mutant of RTP4 that may inhibit the interaction between RTP4 and mu-delta. Moreover, I succeeded in the construction of RTP4 floxed mouse and started to breed of them. These tools will be useful for the future study to reveal this hypothesis by using *in vivo* study.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：RTP4 オピオイド 鎮痛耐性形成 mu-delta ヘテロ二量体

1. 研究開始当初の背景

疼痛治療の課題としての鎮痛耐性形成

現在、がん性疼痛や線維筋痛症を含む神経障害性疼痛などに苦しむ難治性の慢性疼痛患者の 65% が治療の有効性に満足しておらず、痛みが完全に寛解した人はわずか 3% に過ぎない。強力な重要な鎮痛薬としてオピオイドが知られるが、オピオイドの繰り返し使用による鎮痛耐性の発現、すなわち治療抵抗性の発現が治療の継続を困難にしている。しかし、オピオイド鎮痛耐性形成のメカニズムの全容は明らかにされていない。その鎮痛耐性形成メカニズムの解明および新規有効な疼痛治療薬の開発は喫緊の課題である。

オピオイド鎮痛耐性の関連分子としての mu-delta オピオイド受容体ヘテロ二量体

オピオイド受容体は分子間相互作用によってヘテロ二量体を形成し生体に存在することが知られている。これまでに、mu-delta オピオイド受容体ヘテロ二量体 (以下 mu-delta ヘテロ二量体) は、オピオイド鎮痛薬であるモルヒネの反復投与により脳・脊髄での発現が増加することが報告されている (Gupta et al., Sci Signal., 2010)。さらに、生体内で mu-delta ヘテロ二量体の形成を直接阻害することにより、モルヒネ鎮痛耐性形成が阻害されることも報告された (He et al., Neuron, 2011)。これらの背景から、研究代表者は、mu-delta ヘテロ二量体の発現制御機構の解明とその効果的な制御法の開発こそが疼痛治療の有効性の向上に重要であると考えた。しかし、現在までに、mu-delta ヘテロ二量体発現の細胞内制御機構は明らかにされておらず、これに注目している研究はほとんどない。

mu-delta ヘテロ二量体形成の制御分子としての RTP4

本研究では、mu-delta ヘテロ二量体の発現制御機構において唯一関与が明らかにされた受容体運搬分子である、シャペロン蛋白質 Receptor transporter protein 4 (RTP4) に注目する。RTP4 と mu-delta ヘテロ二量体の相互作用が、mu-delta ヘテロ二量体のゴルジ体における形成と、その後の細胞膜上への運搬・発現に深くかかわることがわかってきた (Decaillot et al, PNAS, 2008)。すなわち、この相互作用を阻害することによって、mu-delta ヘテロ二量体形成の抑制、そしてオピオイド鎮痛耐性の抑制ができると考えられる。しかし、これに注目する研究は全くない。

2. 研究の目的

本研究では、mu-delta オピオイド受容体ヘテロ二量体 (mu-delta ヘテロ二量体) を標的とした新たな鎮痛耐性形成抑制法の開発を行う。麻薬性鎮痛薬オピオイドは難治性の疼痛の重要な治療薬であるが、鎮痛耐性が

形成されることが治療の継続を困難にしている。mu-delta ヘテロ二量体は耐性形成に重要な役割を持つことが知られているが、その細胞内制御機構は未解明である。本研究は、mu-delta ヘテロ二量体と、その形成に必要なシャペロン蛋白質 RTP4 を分子標的とし、両者の相互作用と鎮痛耐性形成のメカニズムを解明するとともに、その相互作用を阻害することによる治療薬の開発を試みる。本研究の遂行は麻薬性鎮痛薬の臨床応用の可能性を高め、疼痛治療薬の開発、疼痛患者の QOL 改善に大きな波及効果が期待される。

3. 研究の方法

- (1) RTP4 コンディショナルノックアウトマウスの作製: Cre-LoxP system を用いた方法により、RTP4-floxed マウスの作製を行った (新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 包括脳リソース・技術支援、崎村健司教授に依頼)。新潟大学より受精卵を譲受し、長崎大学にて個体復元および繁殖・維持を行った。
- (2) mu-delta ヘテロ二量体との相互作用不活性 RTP4 deletion mutant の作製: RTP4 と mu 受容体との相互作用は mu 受容体の細胞内領域で生じているとの以前の報告から (Decaillot et al., 2008)、RTP4 の細胞内部位領域を欠如させた mutant を PCR により作製した。
- (3) RTP4 発現および mu-delta ヘテロ二量体形成誘導実験系の確立: マウス神経芽細胞腫である Neuro2a 細胞を用い、mu 受容体を高発現させた。各種オピオイド受容体リガンド (mu: DAMGO, delta: DeltorphineII, mu-delta: Eluxadolone and CYM51010) を細胞に 24 時間処置したのち、RNA を抽出し RT-qPCR あるいは細胞免疫染色法により RTP4 発現量あるいは mu-delta ヘテロ二量体の形成量解析を行った。
- (4) mu-delta ヘテロ二量体形成における RTP4 の役割の解析: RTP4 siRNA を用い、(3) で認められる mu-delta ヘテロ二量体の形成誘導に対する RTP4 ノックダウンの影響を細胞免疫染色法により解析した。
- (5) RTP4 と mu-delta ヘテロ二量体の相互作用解析: 細胞免疫染色において二重染色を行い、共局在する面積を画像解析ソフトウェア (ZEN imaging software) を用いて解析した。
- (6) in vitro 耐性モデルの構築: in vitro のオピオイド受容体活性化の指標として G-protein 活性量 (Gi response) を Cell Key system (Molecular Device 社) を用いて評価した。mu オピオイド受容体リガンドの 24 時間前処置による Gi response 量の変化を観察した。

4. 研究成果

本研究では 2 年間の研究期間内に、mu-delta ヘテロ二量体と RTP4 との相互作用について解析し、その相互作用の阻害によるモルヒネ鎮痛耐性形成への影響を明らかにすることを目的とした。結果として、初年度には相互作用を阻害すると予想される RTP4 deletion mutant の作製が完了し、mu 受容体刺激による RTP4 発現誘導と mu-delta ヘテロ二量体の形成量増加を観察できる in vitro 実験系が確立できた。最終年度には、RTP4 ノックダウンが mu-delta ヘテロ二量体の形成を阻害すること、および、長時間の mu 受容体刺激により RTP4 と mu-delta ヘテロ二量体の相互作用が増加する可能性を in vitro で示すことができた。さらには、RTP4 の発現誘導時に耐性形成を確認できる in vitro モデルの確立と、in vivo 実験に用いるための RTP4 floxed mouse の構築および繁殖・維持を開始できた。各年度の具体的な研究成果は次の通りである。

【H28 年度】 mu-delta ヘテロ二量体との相互作用が阻害される RTP4 の deletion mutant の作成 RTP4 floxed マウス（受精卵）の作製（新潟大学脳研究所に依頼）各種オピオイドによる RTP4 発現誘導 in vitro モデルの構築。

【H29 年度】 RTP4 floxed マウスの個体復元と繁殖：RTP4 floxed +/- 雄性マウス 17 匹、雌性マウス 15 匹、RTP4 floxed +/- 雄性マウス 2 匹、雌性マウス 4 匹を得た（継続繁殖中）。 RTP4 ノックダウンが mu-delta ヘテロ二量体形成に及ぼす影響：Neuro2a 細胞を用い、mu 受容体アゴニストの処置により mu-delta ヘテロ二量体の形成が増加することを見出し、さらにそれが RTP4 siRNA により有意に阻害されることを明らかにした。耐性形成の in vitro モデルの構築：Neuro2a 細胞を用い、mu 受容体アゴニストの 24 時間処置により Gi シグナルが有意に低下することを明らかにした（in vitro 耐性形成の確認）。

これらの研究成果より、モルヒネの慢性投与時など mu 受容体の長期間の刺激下においては、mu-delta ヘテロ二量体と RTP4 の相互作用を介して耐性が形成される可能性を示すことができた。さらに本研究で確立した実験系を用いることで、RTP4 と mu-delta ヘテロ二量体の相互作用を阻害するペプチドの作成やその評価が可能となり、今後、細胞レベルや動物個体においてこれらの相互作用がモルヒネの鎮痛作用や耐性形成へ及ぼす影響を解析することが可能になった。

鎮痛耐性形成の機序解明を目的とした本研究の遂行は、がん性疼痛の緩和に用いられるモルヒネなどの強力な鎮痛薬をより安全かつ効果的に使用するために重要であり、今後は本研究で作成した各種ツールを用い、本研究成果に基づき、動物個体を用いた研究を

展開し継続したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Wakako Fujita, Opioid receptor heteromers and its targeting ligands. *Pain Clinic*, 38, 2017, S185-S195. (査読無)

植田弘師、藤田和歌子. オピオイド受容体概論. *ペインクリニック*, 38, 2017, S157-S166. (査読無)

〔学会発表〕(計 15 件)

The role of endogenous chaperone protein RTP4 in Opioid Receptor Heteromer Regulation. Wakako Fujita, Mini Yokote, Hiroshi Ueda, Lakshmi A. Devi. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), (Kyoto, Japan), Jul. 01-06, 2018

MOPr-DOPr ヘテロ二量体形成促進機序におけるシャペロン分子 Receptor transporter protein 4 の役割. 横手未仁, 植田弘師, Lakshmi Devi, 藤田和歌子. 第 40 回日本疼痛学会(長崎) 2018 年 6 月 15-16 日

Role of endogenous chaperone protein RTP4 in opioid receptor heteromer regulation. Wakako Fujita, Mini Yokote, Hiroshi Ueda, Lakshmi A. Devi. 第 40 回日本疼痛学会(長崎) 2018 年 6 月 15-16 日

モルヒネ耐性形成機序における Receptor transporter protein 4 および MOPr-DOPr ヘテロ二量体の関与. 横手未仁, 植田弘師, Lakshmi Devi, 藤田和歌子. 第 138 回日本薬学会年会(金沢) 2018 年 3 月 25-28 日

MOPr-DOPr ヘテロ二量体シャペロンタンパク質 Receptor transporter protein 4 の生理的役割についての検討. 藤田和歌子, Lakshmi Devi. 第 138 回日本薬学会年会(金沢) 2018 年 3 月 25-28 日

Exploring the Mysteries of the Endogenous Opioid System: Role of RTP4, an endogenous chaperone protein, in regulation of MOPr-DOPr heteromer regulation and its possible physiological role in brain. Wakako Fujita, The 50th Winter Conference on Brain Research, (Whistler, Canada), Jan. 14-19, 2018

Role of RTP4, an endogenous chaperone protein, in regulation of MOPr-DOPr heteromer regulation. Wakako Fujita, The 50th Winter Conference on Brain Research,

(Whistler, Canada), Jan. 14-19, 2018
MOPr-DOPr ヘテロ二量体シャペロンタンパク質 RTP4 の μ オピオイド受容体刺激に伴う発現変化とその役割. 藤田和歌子、横手未仁、植田弘師、Lakshmi Devi, 第 70 回日本薬理学会西南部会(鹿児島) 2017 年 11 月 17 日
オピオイド受容体活性化による MOPr-DOPr ヘテロ二量体シャペロンタンパク質 RTP の発現変化. 藤田和歌子、横手未仁、植田弘師、Lakshmi Devi, 第 37 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(東京) 2017 年 9 月 8-9 日
MOPr-DOPr heteromer: Possible therapeutic target in central and peripheral tissues. Wakako Fujita, Ivone Gomes, Achla Gupta, and Lakshmi A. Devi. 第 40 回日本神経科学大会(千葉) 2017 年 7 月 20-23 日
エルクサドリンによる止瀉作用における MOPr-DOPr ヘテロ二量体の関与. 藤田和歌子、Ivone Gomes, Lakshmi A Devi, 第 39 回日本疼痛学会(神戸) 2017 年 6 月 16-17 日
MOPr-DOPr heteromer regulation by endogenous chaperones. Wakako Fujita, Ivone Gomes, Achla Gupta and Lakshmi A. Devi. 第 90 回日本薬理学会年会(長崎) 2017 年 3 月 15-17 日
Regulation of endogenous chaperone protein RTP4 by opioid receptor activation. Mini Yokote, Ivone Gomes, Achla Gupta, Hiroshi Ueda, Lakshmi A. Devi and Wakako Fujita. 第 90 回日本薬理学会年会(長崎) 2017 年 3 月 15-17 日
オピオイドによる MOPr-DOPr ヘテロ二量体シャペロン蛋白質 RTP4 の発現制御. 藤田和歌子、Ivone Gomes, Achla Gupta, 植田弘師 and Lakshmi A. Devi. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016(仙台) 2016 年 8 月 24 日
Regulation of RTP4, a Chaperone for MOPr-DOPr Heteromers. Wakako Fujita, Ivone Gomes, Achla Gupta, Hiroshi Ueda and Lakshmi A. Devi, The International Narcotics Research Conference 2016 (Bath, UK) Jul., 11-14, 2016

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 和歌子 (FUJITA, Wakako)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
准教授
研究者番号: 30382328

(2)研究協力者

Lakshmi A. Devi (DEVI, Lakshmi A)
植田 弘師 (UEDA, Hiroshi)
横手 未仁 (YOKOTE, Mini)