

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号：18591734

研究課題名 (和文) オピオイド受容体に対する麻酔薬、鎮痛薬の作用解析

研究課題名 (英文) The study of anesthetics and analgesics on opioid receptors

研究代表者

瀬川 賀世子 (SEGAWA KAYOKO)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：70289578

研究成果の概要：

モルヒネやフェンタネストなどのオピオイドと吸入麻酔薬の相互作用は不明である。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用し、オピオイド受容体に対する麻酔薬の作用を電気生理学的に解析した。現在までの検討で、これらの Gq/Gi キメラ G 蛋白結合  $\mu$  オピオイド受容体の高率の発現を示し、麻酔薬ハロセンなどは  $\mu$  オピオイド受容体に影響することを明らかにした。現在までハロセンは多くの G 蛋白結合受容体をリン酸化酵素プロテインキナーゼ C (PKC) によって抑制することが報告されているため、 $\mu$  オピオイド受容体の機能にもリン酸化酵素によって影響があるかどうか検討している。これらの結果をもとに  $\mu$  オピオイド受容体への麻酔薬の作用の全貌を明らかにしたいと考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：

(1) 疼痛メカニズム (2) 麻酔薬 (3) 鎮痛薬 (4) Gi 蛋白結合受容体 (5) *Xenopus oocytes* 発現系 (6)  $\mu$  オピオイド受容体 (7) G 蛋白共役型受容体 (8) イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

モルヒネやフェンタネストなどのオピオイドは吸入麻酔薬の MAC に影響することが知られているが、その相互作用にどのようなメカニズムがあるのかは不明である。麻酔薬は

イオンチャネルや受容体に作用することが知られているが、最近、ムスカリン (M1) 受容体といった G 蛋白結合受容体が麻酔機序に大きく関与していることが明らかとなってきた。さらに、G 蛋白結合受容体には Gq 蛋白

結合受容体だけでなくムスカリン type2 受容体 (M2) を始めとした Gi 蛋白結合受容体も多く存在し、これらの受容体にも麻酔薬が関与しているという報告がなされてきた (Synapse. 50:35-40, 2003)。オピオイド受容体も脊髄、中枢神経に分布している Gi 蛋白結合受容体で麻酔薬の作用に関与しているという報告がなされているが (Life Sci. 2003; 73:2591-602)、オピオイド受容体への麻酔薬の作用について詳しい検討は全くなされていない。一方、アフリカツメガエル卵母細胞発現系は中枢神経系の Gq 蛋白結合受容体に対する薬剤の作用を検討する実験系として広く使用されている。現在まで、当教室ではアフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用して M1 といった Gq 蛋白結合受容体に対する麻酔薬の作用を検討してきた (J Pharmacol Exp Ther. 281:1136, 1997, Eur J Pharmacol. 339:237-244, 1997, Mol Pharmacol. 53:148-156, 1998)。また最近、当教室の南らによって M2 と Gi/Gq キメラ G 蛋白 RNA を同時にアフリカツメガエル卵母細胞に注入して発現させ、Gq 蛋白結合受容体と同じように PLC を介した細胞内 Ca<sup>2+</sup> の変動を利用した解析が可能になり (Pharmacology. 2004; 72:205-212)、麻酔薬が Gi 蛋白結合受容体にも影響を及ぼしている事実を明らかにしてきた。また、さらに東京大学医科学研究所基礎医学部門神経ネットワーク分野の松井らによってオピオイド受容体のノックアウトマウスの開発準備が始まり行動薬理的解析が可能となる見込みである。

【当該分野におけるこの研究の学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義】

現在、麻酔薬のオピオイド受容体などの Gi 蛋白結合受容体への直接作用の報告はいまだない。今回の研究で使用する Gi/Gq キメラ G 蛋白を用いた解析はユニークであり、これらの方法で得られる結果は麻酔薬の M2 受容体に与える影響を直接観察できる。(現在までの検討で、これらの Gq/Gi キメラ G 蛋白合 μ オピオイド受容体の高率の発現を示し、麻酔薬ハロセンなどは μ オピオイド受容体に影響することを明らかにしている、図参照)。さらに、オピオイド受容体ノックアウトマウスを用いた行動薬理的解析はオピオイド受容体に対する麻酔薬の影響を個体レベルでとらえることができる。ここで得られる結果は麻酔薬とオピオイド受容体の関係解明に大きく貢献できると思われる。

【国内外の関連する研究のなかでの当該研究の位置づけ】

オピオイド受容体に対する麻酔薬の作用は現在までほとんど解明されていない。

特にアフリカツメガエル卵母細胞発現系の様な再構築系での Gi 蛋白結合受容体への麻酔薬の直接作用はまだ検討されていない。キメラ G 蛋白を用いたオピオイド受容体に対する麻酔薬の影響解析やノックアウトマウスを用いた研究は初めてであり世界でも先駆的で、麻酔薬作用の新たな側面があらかと思われる。

## 2. 研究の目的

今回の研究においては、麻酔薬の直接的なオピオイド受容体への影響を明らかにするため、

(1) Gq/Gi キメラ G 蛋白と μ オピオイド受容体を分子生物学的に結合させた μ オピオイド受容体 (Gq/Gi キメラ G 蛋白結合 μ オピオイド受容体) をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に発現させ、μ オピオイド受容体に対する麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン、ケタミン、プロポフォール、トラマドール) の作用を電気生理学的に解析する (現在までの検討で、これらの Gq/Gi キメラ G 蛋白結合 μ オピオイド受容体の高率の発現を示し、麻酔薬ハロセンなどは μ オピオイド受容体に影響することを明らかにしている)。

(2) 現在までハロセンは多くの G 蛋白結合受容体をリン酸化酵素プロテインキナーゼ C (PKC) によって抑制することが報告されているため、μ オピオイド受容体の機能にも燐酸化酵素によって影響があるかどうか検討する。

(3) さらに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系において得られた結果が生体内でどの様に作用しているかを確認するために、オピオイド受容体のノックアウトマウスを用いて麻酔薬がどのように影響するかを行動薬理的に比較検討する。

これらを総合的に判断し、μ オピオイド受容体への麻酔薬の作用の全貌を明らかにしたいと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系における Gq/Gi キメラ G 蛋白と μ オピオイド受容体を分子生物学的に結合させた μ オピオイド受容体 (Gq/Gi キメラ G 蛋白結合 μ オピオイド受容体) への麻酔薬の薬理的解析  
① Gq/Gi キメラ G 蛋白結合 μ オピオイド受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に注入発現させ、DAMGO で刺激させる。(この予備実験は既に完了しており、高率の発現を得られることが確認されている)

② それらに対する麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン、ケタミン、プロポフォール、ペントバルビタール、トラマドール、デクサメドミゼン) の作用

を解析する。(現在麻酔薬ハロセン、イソフルランは臨床使用濃度において、 $\mu$ オピオイド受容体受容体に抑制効果を持つことも確認している。)

(2) Gq/Gi キメラ G 蛋白結合  $\mu$  オピオイド受容体に対する麻酔薬の効果と細胞内リン酸化酵素の関係解析

Gq/Gi キメラ G 蛋白結合  $\mu$  オピオイド受容体をアフリカツメガエル卵母細胞に注入発現させ、DAMGO で刺激し、それらに対する麻酔薬(ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の作用をリン酸化酵素 (Protein Kinase A, Protein Kinase G, Protein Kinase C) の阻害薬存在下で解析する。

(3) 細胞内リン酸化酵素の作用部位を遺伝子変換させた  $\mu$  オピオイド受容体に対する麻酔薬の効果と関係解析

さらに、上記で Gq/Gi キメラ G 蛋白結合  $\mu$  オピオイド受容体に対する麻酔薬の効果に細胞内リン酸化酵素が関与していると考えられた場合は  $\mu$  オピオイド受容体のリン酸化酵素部位である、セリン-スレオニンの部位を他のリン酸化を受けないアミノ酸に配列を変換し、これらの RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入発現させ、DAMGO で刺激し、それらに対する麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の作用をリン酸化酵素 (Protein Kinase A, Protein Kinase G, Protein Kinase C) の阻害薬存在下で解析する。

(4)  $\mu$  オピオイド受容体ノックアウトマウスの行動薬理学的研究による  $\mu$  オピオイド受容体への麻酔薬の作用判定

麻酔薬の鎮痛効果に対する影響をホットプレート刺激による判定を行い、 $\mu$  オピオイド受容体ノックアウトマウスとコントロールでの痛覚反応の比較をおこなう

現在、 $\mu$  オピオイド受容体ノックアウトマウスを開発した Dr Kieffer にマウスの供給について依頼を計画している (Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature. 1996 Oct 31;383:819-23.)

(5) 細胞内リン酸化酵素の作用部位を遺伝子変換させた  $\mu$  オピオイド受容体ノックインマウスに対する麻酔薬の効果と関係解析

アフリカツメガエル卵母細胞発現系において Gq/Gi キメラ G 蛋白結合  $\mu$  オピオイド受容体に対する麻酔薬の効果に細胞内リン酸化酵素が関与していると考えられた場合は  $\mu$  オピオイド受容体のリン酸化酵素部位であ

る、セリン-スレオニンの部位を他のリン酸化を受けないアミノ酸に配列を変換した  $\mu$  オピオイド受容体のノックインマウスを作成して麻酔薬の鎮痛効果に対する影響をホットプレート刺激による判定を行い、 $\mu$  オピオイド受容体ノックアウトマウスとコントロールでの痛覚反応の比較をおこなう。これらの研究において、The University of Texas at Austin, Waggoner Center for Alcohol and Addiction Research の RA Harris 教授、および Ogata J. 氏 (Research Scholar) には技術的な指導および研究へのアドバイスをもらっており、クローンなどの提供を受けている。

#### 4. 研究成果

オピオイドは吸入麻酔薬の MAC に影響するが、その相互作用にどのようなメカニズムがあるのかは不明である。本研究ではオピオイド受容体に対する麻酔薬の直接的な影響を明らかにするため、Gq/i キメラ G 蛋白と  $\mu$  オピオイド受容体 ( $\mu$ OR) を分子生物学的に結合させた  $\mu$  オピオイド受容体 (Gq/i キメラ G 蛋白共役型  $\mu$  オピオイド受容体,  $\mu$ OR-Gqi) をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に発現させ、 $\mu$ OR に対する麻酔薬の作用を電気生理学的に解析した。また、 $\mu$ OR の機能にもリン酸化酵素の影響があるかどうかを検討した。さらに、 $\mu$ OR のノックアウトマウスを用いて麻酔薬がどのように影響するかを行動薬理学的に比較検討するために以降の実験を行った。

まず、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における Gq/i キメラ G 蛋白と  $\mu$  オピオイド受容体を分子生物学的に結合させた  $\mu$  オピオイド受容体 (Gq/i キメラ G 蛋白共役型  $\mu$  オピオイド受容体,  $\mu$ OR-Gqi) への麻酔薬の薬理学的解析した。その結果、麻酔薬ハロセン、イソフルランは臨床使用濃度において、 $\mu$ OR に影響を持つことを確認した。現在、 $\mu$ OR-Gqi に対する麻酔薬の効果と細胞内リン酸化酵素の関係を解析していたが、本年度は解析に至らなかった。現在は細胞内リン酸化酵素の作用部位を遺伝子変換させた  $\mu$ OR に対する麻酔薬の効果との関係を解析しており、さらに、上記で  $\mu$ OR-Gqi に対する麻酔薬の効果に細胞内リン酸化酵素が関与していると考えられた場合は  $\mu$  オピオイド受容体のリン酸化酵素部位である、セリン-スレオニンの部位を他のリン酸化を受けないアミノ酸に配列を変換し、これらの RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入発現させ、DAMGO で刺激し、それらに対する麻酔薬(ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の作用をリン酸化酵素存在下で解析する予定である。

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 4 件)

- ① mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. Hojo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y. J Pharmacol Sci 2008;108(3):308-19. Epub 2008. 査読有
- ② Dexmedetomidine inhibits muscarinic type 3 receptors expressed in Xenopus oocytes and muscarine-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat dorsal root ganglia cells. Takizuka A, Minami K, Uezono Y, Horishita T, Yokoyama T, Shiraishi M, Sakurai T, Shigematsu A, Ueta Y. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol. 2007 Jul;375(5):293-301. Epub 2007 Jun 12. 査読有
- ③ Effects of anesthetics on the function of orexin-1 receptors expressed in Xenopus oocytes. Minami K, Uezono Y, Sakurai T, Horishita T, Shiraishi M, Ueta Y. Pharmacology. 2007;79(4):236-42. Epub 2007 Apr 13. 査読有
- ④ Pharmacological aspects of the effects of tramadol on G-protein coupled receptors. Minami K, Uezono Y, Ueta Y. J Pharmacol Sci. 2007 Mar;103(3):253-60. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬川 賀世子 (SEGAWA KAYOKO)

産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号: 70289578

(2) 研究分担者

南 浩一郎 (MINAMI KOICHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70279347

上園 保仁 (UEZONO YASUHIRO)

国立がんセンター研究所・がん患者病態生理  
研究部・部長

研究者番号: 20213340

横山 徹 (YOKOYAMA TORU)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80425321

(3) 連携研究者

なし