

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19390410  
 研究課題名（和文）新たな鎮痛手段の開発を目指した鎮痛、麻酔機序における G 蛋白結合受容体の解析  
 研究課題名（英文）The study on the G protein coupled receptors to find the new analgesics

研究代表者  
 南 浩一郎（MINAMI KOICHIRO）  
 産業医科大学・医学部・訪問研究員  
 研究者番号：70279347

## 研究成果の概要：

麻酔薬や鎮痛薬の作用機序解明は危急的課題であるが、いまだにその解明には至っていない。脊髄後根神経節(DRG)細胞は多くの神経ペプチドが含有され、疼痛への関与が強く示唆されている。申請者らは培養 DRG を用いた研究ではムスカリン受容体やサブスタンス P 受容体などが存在することを確認した。現在はこれらに対して麻酔薬がどのように反応するのかを確認しているところである。アフリカツメガエル卵母細胞系やスライスパッチ法を用いてこれらの受容体へ鎮痛薬、麻酔薬がどのように作用するのかを解析する予定である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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) 脊髄後根神経節(DRG)細胞 (5) *Xenopus oocytes* 発現系 (6) ムスカリン受容体 (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

日本人の3人に1人はガンで死亡する。進行ガンになると患者の7割が「痛みが最大の苦痛である」と訴える。鎮痛緩和医療に最近はさまざまな種類のモルヒネ製剤が導入され鎮痛緩和に寄与している。しかしモルヒネの効かない、あるいは耐性のために効かなくなった多くの患者が存在するのも事実である。

痛みはさまざまな要因で起こり、そのメカニズムは未だに解明されていない。痛みは一次求心性痛覚神経より脊髄後根神経節(Dorsal Root Ganglia, DRG)以降 DRG)を通して伝えられる。DRGからはグルタミン酸やサブスタンスPなどの鎮痛伝達物質が放出され痛みは中枢へ伝えられる。昨今の分子生物学の進展により、これらの鎮痛物質に加え、さまざま

な「痛みを伝える物質」が発見され、それらの受容体もDRGで痛覚伝達に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。しかしながら、DRGにおけるこれら受容体の同定はおろか、その分子生物学的な検討も行われていない。一般に、アゴニストの同定されていない受容体群は作用の不明な受容体(オーファンレセプター)として定義され、その受容体のほとんどは膜7回貫通型G蛋白結合受容体(G-Protein Coupled Receptor, GPCR 以降GPCR)に属する。DRGにも多数の作用不明な膜7回貫通型オーファンレセプターが存在しており、未知の痛覚伝達物質や受容体が存在すると考えられる。

現在までに、申請者らは鎮痛薬、麻酔薬の膜7回貫通型GPCRに対する作用をほぼ10年にわたって報告し、GPCRが痛覚伝達メカニズムに強く関与することを明らかにしてきた。申請者らはすでにDRG細胞における鎮痛薬の作用解析に着手しており、細胞内カルシウム( $Ca^{2+}$ )濃度測定法を同時に行える系、さらにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたGPCRの解析を同時に行い、麻酔薬や鎮痛薬の分子レベルでの作用機序を総合的に解析する方法を確立している。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、DRG細胞を用いて、

(1)現在までに痛覚に関与していると予想されている GPCR であるオレキシン受容体やニューロペプチドFF(NPFF)受容体、リゾホスファチジン酸(LPA)受容体が実際に DRG に存在するかどうかを RT-PCR 法、免疫組織染色法、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度測定法を用いて機能解析を行う。(2)これらの受容体に対する鎮痛薬、麻酔薬の影響を DRG 細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で調べる。

(3)さらに、これらの受容体のノックアウトマウスを作成し、痛覚伝達に及ぼす影響を検討する。

(4)PCR法を用いて、オレキシン受容体、NPFF受容体、LPA受容体と構造類似性を持つオーファン受容体を cDNA ライブラリーよりスクリーニングし、DRG細胞に特異的に発現するオーファン受容体を検索する。可能であれば新規に見つかった受容体のノックアウトマウスを作成し、これらの受容体が痛覚伝達に関与するのを確認したいと考えている。以上の検討を行い、生体物質由来の副作用のない鎮痛薬の開発を目指した、モルヒネに替わる、新たな鎮痛緩和医療の基礎を築きたい。

## 3. 研究の方法

今回の研究においては、DRG細胞を用いて、(1)現在までに痛覚に関与していると予想されているオレキシン受容体やニューロペプチドFF(NPFF)受容体、リゾホスファチジン

酸(LPA)受容体が実際に DRG に存在するかどうかを RT-PCR 法、免疫組織染色法、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度測定法を用いて機能解析を行う。(2)これらの受容体に対する鎮痛薬、麻酔薬の影響を DRG 細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で調べる。(3)さらに、これらの受容体のノックアウトマウスを作成し、痛覚伝達に及ぼす影響を検討する。(4)PCR法を用いて、オレキシン受容体、NPFF受容体、LPA受容体と構造類似性を持つオーファン受容体を cDNA ライブラリーよりスクリーニングし、DRG細胞に特異的に発現するオーファン受容体を検索する。可能であれば新規に見つかった受容体のノックアウトマウスを作成し、これらの受容体が痛覚伝達に関与するのを確認したいと考えている。以上の検討を行い、生体物質由来の副作用のない鎮痛薬の開発を目指した、モルヒネに替わる、新たな鎮痛緩和医療の基礎を築きたい。

## 4. 研究成果

本研究の現在までに DRG 細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた検討を併行して行い、申請書に記した課題とそれを発展させた検討により以下の結果を得た。

- (1)DRG細胞の培養の確立(担当 南)
  - ①ラットの成人ラット(12週齢)と幼弱(3週齢)に分けて DRG 細胞を培養を試みて、両者の培養を確立した。(図1)
  - ②ラットの成人ラット(12週齢)と幼弱(3週齢)の両者でその痛覚物質(サブスタンスP、カプサイシン)による細胞内カルシウムの上昇反応を確認している。しかし、その両者の反応様式やサブスタンスP、カプサイシン(パニロイド)受容体の発現量や形式に違いがあることが考えられた。
  - ③幼弱(3週齢)DRG細胞においてはサブスタンスP、ムスカリンによる細胞内カルシウムの上昇を確認することができた。これらの反応は再現性、反応性から考えて幼弱(3週齢)DRG細胞を研究共通の実験条件とした。

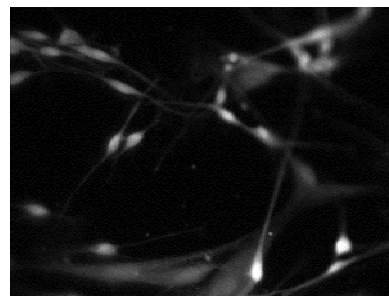


図1 培養脊髄後根神経節細胞

- (2)サブスタンスP受容体に対する麻酔薬の反応(南、上園)

サブスタンス P は DRG においては重要な痛覚伝達物質である。これらに対しては、申請者はすでにアフリカツメガエル卵母細胞発現系において麻酔薬が臨床濃度で抑制することを報告していた。しかし、DRG においては麻酔薬の反応は確認しておらず、アフリカツメガエル卵母細胞による再構築系だけの結果のみで In Site の結果がどうなるかが興味を持たれるところであった。今回、DRG においてサブスタンス P 刺激による細胞内カルシウムが上昇することを確認して麻酔薬の抑制効果を調べた。

その結果、吸入麻酔薬がサブスタンス P による細胞内カルシウム上昇を抑制する結果を得た。現在、確認している麻酔薬はハロセンであるが、予備実験ではイソフルラン、エンフルランも抑制していることを確認している。これらは、アフリカツメガエル卵母細胞発現系において麻酔薬が臨床濃度で抑制することの In site での証明であり、サブスタンス P 受容体が麻酔薬の作用部位になる可能性を強く示唆する所見であると考えられ、静脈麻酔薬の解析も急いでいる。

(3) DRG 細胞におけるオレキシン A の存在証明およびアフリカツメガエル卵母細胞系におけるオレキシン受容体への麻酔薬の影響解析 (南、上田、瀬尾)

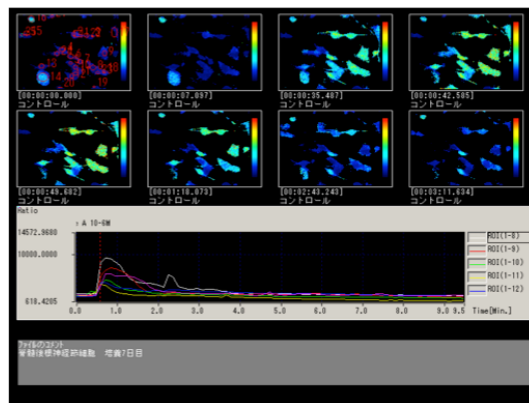
① DRG 細胞のオレキシン A の存在証明

オレキシンを DRG (3 週齢ラット) に投与したところ、細胞内カルシウムの有意な上昇を確認できた。現在は、これを免疫組織染色と In Site ハイブリダイゼーション法により、蛋白レベル、mRNA レベルで確認を急いでいる。(図 4)

② アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたオレキシン受容体に対する吸入麻酔薬、静脈麻酔薬、鎮痛薬の影響解析

(a) オレキシン受容体(オレキシン受容体 A, オレキシン受容体 B)がどのタイプの G 蛋白を介した細胞内情報伝達系を形成しているのか探るために、オレキシン受容体 RNA (A 及び B) をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に注入し発現させ、オレキシン受容体が G q 蛋白を介しているのか確認した。また Gi/Gq のキメラ G 蛋白 RNA と同時にオレキシン受容体 RNA を注入し発現させ、オレキシン受容体が G q 蛋白を介しているか確認した (図 5 参照)。

(b) 次に、オレキシン受容体 RNA をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に注入し発現させ、吸入麻酔薬や静脈麻酔薬がオレキシン受容体 (A 及び B) にいかに作用するかを検討した。その結果オレキシン受容体 (オレキシン受容体 A) は吸入麻酔薬 (イソフルラン、ハロ



セン、エンフルラン) に静脈麻酔薬 (ペントバルビタール) によって臨床濃度で抑制されていることが明らかとなった。

(c) さらに予備的ではあるがオレキシン B に関しては吸入麻酔薬や静脈麻酔薬が抑制をしている結果を得た。

(d) 現在、その麻酔薬の抑制機序として細胞内リン酸化酵素 Protein Kinase C が考えられている。そこで、麻酔薬のオレキシン受容体への抑制効果に Protein Kinase C が関与するかどうかを Protein Kinase C 阻害薬 (GF 109203X) の存在したでその反応を確認したところ、Protein Kinase C 阻害薬の存在下ではオレキシンの反応に変化がなく Protein Kinase C 自身の影響は全くないと考えられた。

(考察) アフリカツメガエル卵母細胞系におけるオレキシン受容体への麻酔薬の影響解析を行い、吸入麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、エンフルラン、ジエチルエーテル)、静脈麻酔薬 (ペントバルビタール、プロポフォール、ケタミン) は臨床濃度で強く抑制することを確認できた。しかし、鎮痛薬トラマドールやデクサメトミジンは抑制効果はほとんど見られていない。これは、麻酔薬は共通して就眠作用を持つがトラマドールやデクサメトミジンは就眠作用は弱いかまたはほとんどないという臨床所見と極めて一致する。これらのことより判断するとオレキシン受容体への麻酔薬の作用はその就眠作用に影響するということが予想される。

そのオレキシン受容体を麻酔薬が抑制するメカニズムについては Protein Kinase C 自体がオレキシン受容体へは影響が無いことより、Protein Kinase C 野関与は否定的と考えられる。その他の機序としては受容体への直接作用が考えられる。これについては、今後の詳細な解析が必要と思われる。

また、オレキシンは DRG に存在することが証

明できた。DRGは痛覚の一次神経繊維であり、その作用は痛覚などの作用と関連が考えられ、就眠などの作用とは関係が薄いと考えられる。現在、麻酔薬の痛覚への作用にDRGにおけるオレキシン受容体の作用が関与するのかを細胞内カルシウム測定法で解析を行っており、平成18年度にはその結果を提示できると考えている。4 アフリカツメガエル卵母細胞発現系およびDRG細胞を用いたナトリウムチャンネルに対する吸入麻酔薬、静脈麻酔薬、鎮痛薬の影響解析

(4)デクスメドトミジンのG蛋白結合受容体へ対する作用検討-アフリカツメガエル卵母細胞発現系およびDRG細胞を用いた検討-

デクスメドトミジンは今まで  $\alpha_2$  アゴニストとして鎮静に使用されてきたが、そのメカニズムは今まで不明な点が多かった。なぜ、鎮静作用があるのに就眠作用は非常に少ない点や抗コリン作用様な症状が多いなど単に  $\alpha_2$  アゴニストだけでは説明がつかないことが臨床で散見された。この疑問に対して我々はG蛋白結合受容体にどのように影響するのかをアフリカツメガエル卵母細胞発現系およびDRG細胞を用いた検討した。

方法：アフリカツメガエル卵母細胞に各種G蛋白結合受容体（ムスカリン受容体M1, M3, サブスタンスP受容体、5HT<sub>2A</sub>受容体、メタボトロピックグルタミン酸受容体type 1、オレキシンA受容体）を発現させ、voltage-clamp法を用いてデクスメドトミジンの影響を調べた。さらに、ラットの成人ラット（12週齢）と幼弱（3週齢）に分けてDRG細胞を培養をして、ムスカリンで刺激して細胞内カルシウムの上昇を測定し、それに対するデクスメドトミジンの影響を調べた。

結果：デクスメドトミジンはムスカリン受容体M3を臨床濃度で有意に抑制した。メタボトロピックグルタミン酸受容体type 1、に対しても高濃度であるが抑制効果が見られた。しかし、他のムスカリン受容体M1, サブスタンスP受容体、5HT<sub>2A</sub>受容体、メタボトロピックグルタミン酸受容体type 1、オレキシンA受容体に対しては全く影響はなかった。

DRG細胞を培養をして、ムスカリンで刺激して細胞内カルシウムの上昇を測定し、それに対するデクスメドトミジンの影響を調べた結果、有意に細胞内カルシウムの上昇を抑制した。

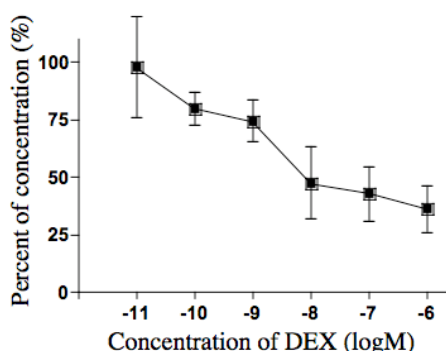
考察：現在まで、G蛋白結合受容体は麻酔薬や鎮痛薬のターゲットになると考えられて

きていた。デクスメドトミジンは鎮静効果は強いが、就眠、鎮痛効果は弱いとされている。

(Gertler et al., Proc (Bayl Univ Med Cent). 2001;14:13-21. Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent.) デクスメドトミジンは痛覚に関与していると言われるムスカリン受容体M1, サブスタンスP受容体、5HT<sub>2A</sub>受容体、就眠作用に関与していると言われるオレキシンA受容体には影響しないことを考えると臨床所見と一致すると考えられる。

デクスメドトミジンはムスカリン受容体M3を臨床濃度で有意に抑制していることは、デクスメドトミジンのもつ唾液分泌の低下などの抗コリン作用の機序の一つと考えられる。

#### Inhibitory effect of DEX on M3 receptor



#### 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  $Ca^{2+}$  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 Schmiedebergs 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

南 浩一郎 (MINAMI KOICHIRO)  
産業医科大学・医学部・訪問研究員  
研究者番号: 70279347

### (2) 研究分担者

上田 陽一 (UETA YOICHI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10232745

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)  
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

瀬尾 憲正 (SEO NORIMASA)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40093257

### (3) 連携研究者

重松 昭生 (SHIGEMATSU AKIO)  
産業医科大学・名誉教授  
研究者番号: 30037428