

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月26日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791453

研究課題名（和文）：レミフェンタニル急性耐性形成の分子メカニズム解析

研究課題名（英文）：Internalization and recycling profiles of μ - and dimerized μ - δ opioid receptors induced by remifentanil：implication of acute tolerance of remifentanil.

研究代表者

高田 正史（TAKADA MASAFUMI）

長崎大学・病院・助教

研究者番号：00404244

研究成果の概要（和文）：

高用量のレミフェンタニル（RF）は急性耐性をきたしうる。RFによる急性耐性形成の分子機構を明らかにするため、RF刺激による μ -オピオイド受容体（ μ OR）、二量体化 μ - δ オピオイド受容体（ μ - δ OR）の細胞内動態について解析した。 μ OR、二量体化 μ - δ ORはいずれもRF濃度依存性にRecyclingが阻害された。 μ ORと比較して μ - δ ORは高濃度RFでもRecyclingされやすかった。これより、 μ ORおよび μ - δ ORのRecycling障害が高濃度RFによる急性耐性の一因である可能性が示唆された。 μ - δ ORは μ ORよりも急性耐性を起こしにくいかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Remifentanil might develop acute tolerance when infused at large dose.

We investigated the effects of small- and large-doses of remifentanil on the internalization and recycling profiles of both μ -opioid receptors (μ OR) and dimerized μ - δ OR. There was no significant difference among the rate of internalized μ OR by remifentanil at any concentrations, whereas the percentages of internalized μ - δ OR by remifentanil increased in a concentration-dependent manner. The rate of recycling of μ OR and dimerized μ - δ OR was decreased when stimulated by remifentanil at large doses. μ - δ OR internalized by remifentanil were recycled more than μ OR internalized at the same concentrations. These findings may account for the acute tolerance induced by large-doses of remifentanil.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2010年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2011年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：レミフェンタニル、急性耐性、オピオイド、リサイクル機構、二量体化受容体、共焦点レーザー顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

オピオイド製剤使用においては耐性や痛覚過敏などの対策が課題である。今日の全身麻酔におけるオピオイド鎮痛の主翼は超短時間作用性で用量調節性の高いレミフェンタニルである。しかしレミフェンタニル麻酔を受けた患者においては術直後の激しい疼痛、すなわち急性耐性や痛覚過敏などが問題視されるようになってきた。しかし、そのレミフェンタニル急性耐性の分子機序についてはほとんど解明されていない。また、レミフェンタニルの主なターゲットであるオピオイド受容体は、近年、ヘテロ二量体を形成することがわかってきており、単量体とは異なる薬理学的特性を持つことからそれらが受容体機能に与える影響が注目されているが、レミフェンタニルが二量体化オピオイド受容体にどのように作用し、それが急性耐性、痛覚過敏の原因となるのかは全く不明である。

今回、レミフェンタニルの急性耐性形成の分子機序およびそれらにおける二量体化 μ - δ オピオイド受容体 (μ - δ OR) の役割を解明したいと考えた。また、ケタミンがレミフェンタニルの急性耐性形成に予防効果があるという報告があることから、ケタミンがレミフェンタニル刺激による μ ORの細胞内動態に与える影響についても同様に解析することとした。

2. 研究の目的

本研究では、オピオイド製剤であるレミフェンタニルが二量体化オピオイド受容体に与える影響を単量体受容体のそれと比較検討し、二量体化オピオイド受容体に対する反応性の違いを明らかにする。得られた結果をもとにレミフェンタニルの急性耐性・痛覚過敏形成における二量体受容体の役割を明らかにし、臨床麻酔におけるレミフェンタニル使用法の最適化のための基礎データを蓄積することを目的とした。

私たちは、二量体化オピオイド受容体の形成、その局在をFluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)法により可視化する手法をすでに開発しており、さらにアフリカツメガエル卵母細胞アッセイ系を用いた、二量体化オピオイド受容体の活性化のみをアッセイできるシステムを開発し、最適化している。このシステムを用いて、

(1)レミフェンタニルの単量体および二量体化オピオイド受容体の活性化・脱感作に与える影響をIn Vitro アッセイシステムにて明らかにする。

(2)レミフェンタニル耐性形成時に有用とされる麻酔薬ケタミンを併用し、レミフェンタニル+ケタミンが二量体化オピオイド受容体の活性化・脱感作に与える影響を分子レベルで解明する。

つまり、クローン化 μ ORと δ -オピオイド受容体 (δ OR) のC末に黄色蛍光蛋白 (Venus) と青色蛍光蛋白 (Cerulean) をそれぞれ連結したものをBHK cellに発現させ、これらが二量体化しているかを共焦点レーザーおよびFRETアッセイで解析する。また、様々な濃度のレミフェンタニル刺激後のinternalization、あるいはrecyclingされた μ ORと δ ORについても同様に解析する。さらに μ ORをレミフェンタニルとケタミンで同時刺激し、ケタミンが μ ORのinternalizationおよびrecyclingに与える影響を解析する。

3. 研究の方法

(1)クローン化 μ ORと δ -オピオイド受容体 (δ OR) のC末に黄色蛍光蛋白 (Venus) と青色蛍光蛋白 (Cerulean) をそれぞれ連結し、BHK cellに発現させた。これを共焦点レーザーで観察し、FRETアッセイにより受容体二量体化の有無について検討した。レミフェンタニル刺激後のinternalization、あるいはrecyclingされた μ ORと δ ORについても同様に二量体化について解析した。

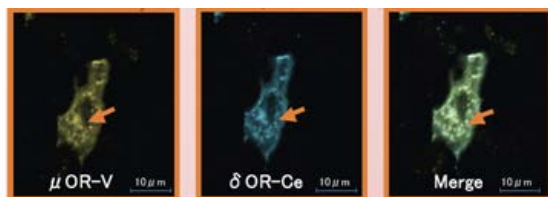
(2)前述の細胞を様々な濃度のレミフェンタニル (10nM, 100nM, 1 μ M) で30分間刺激したのち、その30分後に μ ORならびに μ - δ ORのinternalizationについて共焦点レーザーで解析した。

(3)同様に様々な濃度のレミフェンタニル (10nM, 100nM, 1 μ M) で30分間刺激したのち、その180分後に μ ORならびに μ - δ ORのrecyclingについて共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

(4)前述の細胞をS(+)-ケタミン (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M) で10分間刺激した後、レミフェンタニル (10nM, 100nM, 1 μ M) で30分同時に刺激した。その30分後に μ ORのinternalization、180分後にrecyclingを共焦点レーザーにより解析した。

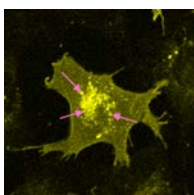
4. 研究成果

(1)Venusを連結した μ OR、Ceruleanを連結した δ ORはいずれもBHK cellの細胞膜に発現していた。FRETアッセイによりこれらが二量体を形成していることが分かった。また、レミフェンタニル刺激によりinternalization、recyclingされた μ OR、 δ ORも同様に二量体を形成していた。



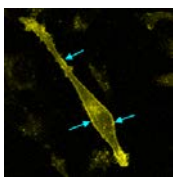
(例： μ - δ OR； internalization (+))

(2) いずれも濃度のレミフェンタニルも μ OR ならびに μ - δ OR の多くを細胞質内へと internalization させた。

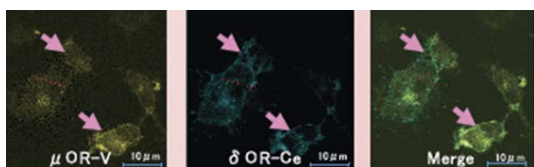


(1 μ M remifentanyl, μ OR: internalization (+))

(3) μ OR、 μ - δ OR のいずれも、レミフェンタニルの濃度依存性に細胞膜への recycling が抑制された。また、高濃度においては μ - δ OR は μ OR より多く recycling された。



(1 μ M remifentanyl、 μ OR: recycling (+))



(μ - δ OR： recycling (+))

(4) S(+)-ケタミンの同時投与により、各濃度のレミフェンタニルによる μ OR の internalization が抑制された。また、100nM のレミフェンタニルにより internalization された μ OR は、S(+)-ケタミンの同時投与により recycling が促進された。

まとめ：

レミフェンタニルにより internalization された μ OR ならびに μ - δ OR は、高濃度のレミフェンタニルで刺激した場合に recycling が阻害された。 μ OR および μ - δ OR の recycling 障害が、高濃度レミフェンタニルを投与した際に見られる急性耐性形成の一

因である可能性が示唆された。また、高濃度のレミフェンタニル刺激では、 μ - δ OR は μ OR よりも急性耐性を起こしにくいのかも示唆されない。

また、ケタミンにより、レミフェンタニル刺激による μ OR の internalization が阻害され、recycling が促進された。ケタミンのレミフェンタニル急性耐性の予防効果には、 μ OR の internalization/recycling 機構が関与している可能性が考えられた。

今後の課題としては、ケタミンがレミフェンタニル刺激による μ OR、 μ - δ OR の internalization および recycling 機構に与える影響など、さらなる基礎データを蓄積し、レミフェンタニルによる急性耐性の分子機構および急性耐性を起こさないレミフェンタニル投与方法について解明したい。また今回なしえなかった In Vitro 研究で μ - δ 二量体オピオイド受容体を活性化し最小の脱感作を引き起こすレミフェンタニル使用法が、実際にどのような鎮痛効果を示すか、さらに耐性形成についても In Vitro と In Vivo の結果が一致するのかを明らかにし、 μ オピオイドノックアウトマウス (δ 受容体は正常に発現しているマウス、 μ - δ 二量体化受容体の存在しないマウス) を用いて、上記レミフェンタニル (+ケタミン) の鎮痛効果を検討し、二量体化受容体の生理的重要性をさらに明らかにしたい。

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 2 件)

① Yuko Ando (1), Minoru Hojo (2), Masafumi Takada (4), Yasuhito Uezono (8) 計 8 名 S(+)-ketamine suppresses desensitization of γ -aminobutyric acid type B receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of γ -aminobutyric acid type B receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 or 5. *Anesthesiology* 114; 401-11 (2011)、査読有

② Yasuhito Uezono (2), Yuko Ando (4) Presence of GABA_B receptors forming heterodimers with GABA_{B1} and GABA_{B2} receptor subunits in human lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Sci.* 111; 253-9 (2009)、査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

① Yuko Ando, Masafumi Takada et al. Opioid receptors show distinct

internalization/recycling profiles in a cellular chronic pain model. American Society of Anesthesiologists, Oct 17th-21st 2009, New Orleans

② 安藤優子、高田正史 他. 医療用麻薬による μ オピオイド受容体の細胞内移行と再感作の新たな知見：疼痛下におけるオピオイド鎮痛耐性発現の解釈と誤解、第 56 回日本麻酔科学会 最優秀演題受賞、2009 年 8 月 16 日-18 日、神戸

③ 倉田眞治、高田正史 他. レミフェンタニルによる μ オピオイド受容体の細胞内移行および再感作様式の解析 -フェンタニルとの比較および S(+)-ケタミン併用の影響-、第 56 回日本麻酔科学会、2009 年 8 月 16 日-18 日、神戸

④ 高田正史、北條美能留、上園保仁 他. 開腹手術において術中高用量レミフェンタニルは術直後のフェンタニル必要量を増加させる 第 56 回日本麻酔科学会、2009 年 8 月 16 日-18 日、神戸

⑤レミフェンタニル急性耐性と術後疼痛過敏が疑われた高用量フェンタニルパッチの 1 症例 原田弥生、高田正史、北條美能留 他. 九州麻酔科学会第 47 回大会、2009 年 10 月 10 日、長崎

⑥ Yuko Ando et al. Internalization and recycling profiles of μ - and dimerized μ - δ opioid receptors induced by remifentanil: implication of acute tolerance of remifentanil. International Anesthesia Research Society, Mar 20th-23rd 2010, Honolulu

⑦ Yuko Ando, Masafumi Takada et al. GABA_B

subunit-dependent functions of heterodimeric GABA_B receptors. 13th Asian Australasian congress of anesthesiologists, Jun 1st-5th 2011, Fukuoka

⑧ 倉田眞治、高田正史 他. remifentanil による μ -オピオイド受容体の細胞内局在の解析-受容体刺激時間および濃度による影響、第 57 回日本麻酔科学会、2010 年 6 月 3 日-5 日、福岡
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織
(1)研究代表者
高田正史 (TAKADA MASAFUMI)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：0040424

(2)研究協力者
北條美能留 (HOJO MINORU)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：00380957

上園保仁 (UEZONO YASUHITO)
国立がん研究センター・研究所・部長
研究者番号：20213340

安藤優子 (ANDO YUKO)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：70580322