

令和 6 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16547

研究課題名(和文) オピオイドへの耐性形成や副作用発現におけるユビキチン修飾の意義と分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of the ubiquitination to the mu-opioid receptor in developing tolerance and adverse effects to opioids.

研究代表者

清水 覚司 (Satoshi, Shimizu)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80802793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オピオイドは強力な鎮痛薬であるが耐性を生じる。先行研究では μ オピオイド受容体(MOP)へのリン酸化が、活性化された受容体の脱感作、再利用・分解を介して神経細胞の感受性を制御する因子として注目されてきた。近年、ユビキチン修飾が細胞内シグナルを活性化し、活性化された受容体機能を制御する因子として注目されている。そこで、MOPのユビキチン化欠損変異体を作製し、ユビキチン化がGi/oを介した鎮痛シグナルの活性化、MOPの脱感作やその後の内在化に関与しているかを解析した。その結果、ユビキチン化はGi/o経路とMOPのリン酸化には必要ない一方で、MOPの内在化を促進する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オピオイドは非常に強力な鎮痛薬であるが、耐性を形成するために長期的には効果が減弱する場合がある。近年、がん治療が進歩して生命予後が改善している一方で、がんの疼痛が十分に緩和されていないケースが増えており、耐性形成機構の解明は重要な課題である。先行研究では、受容体へのリン酸化が受容体の脱感作や分解・再利用経路へと導く細胞内内在化において重要な役割を果たすことが注目されてきた。本研究では、リン酸化修飾だけでは機序の説明がつきにくい点に着目し、ユビキチン修飾が脱感作された受容体を分解・再利用経路へと導く第一段階となる内在化を効率的に行う上で重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Opioids are highly potent analgesics but develop tolerance. Previous studies have focused on phosphorylation to μ -opioid receptor as it is involved in maintaining cellular sensitivity via desensitization, recycling and degradation of the activated receptor. Recently, another form of post-translational modification of ubiquitination has attracted attention in terms of triggering intracellular signaling and regulation of the activated receptor. Here, we generated a ubiquitination-deficient mutant of the μ -opioid receptor to investigate whether ubiquitination is involved in driving Gi/o-mediated analgesic signaling, receptor desensitization or subsequent receptor internalization. We show that the Gi/o pathway and receptor phosphorylation do not require ubiquitination. Instead, ubiquitination regulates the internalization efficiency and might help promote internalization of the desensitized MOP.

研究分野：麻酔科学

キーワード：オピオイド受容体 耐性形成 Gタンパク質共役型受容体 ユビキチン修飾 受容体内在化

1. 研究開始当初の背景

オピオイドは強力な鎮痛薬であるが、容量依存的に致死的な副作用を発現し、また、長期使用に伴って耐性を形成するという問題がある。オピオイドによる鎮痛作用や副作用はいずれも主に μ オピオイド受容体(MOP)を介して発現する。MOPはGタンパク質共役型受容体(GPCR)であり、活性化するとGPCRキナーゼによってリン酸化されて脱感作される。脱感作された受容体はリン酸化によって生じる負の電荷を足場にしてアレスチンと結合する。アレスチンは、Gタンパク質の活性化を拮抗的に抑制するとともに、オピオイド受容体を細胞内に内在化してMOPを分解経路や再利用経路へと導き、細胞の感受性回復に寄与すると考えられていた。そのため、研究開始当初には、MOPへのリン酸化修飾が、鎮痛経路の活性化や受容体の内在化の効率を制御する因子として注目されてきた。

一方で、同じGPCRファミリーに属するアドレナリン作動性受容体やケモカイン受容体においては、受容体へのリン酸化修飾だけでなく、受容体へのユビキチン修飾が受容体の分解や細胞内シグナルの活性化時間を制御する因子として注目されている。しかし、同じGPCRファミリーに属するMOPがユビキチン修飾を受けることを示唆する先行研究は存在するものの、MOPへのユビキチン修飾の意義を解析した先行研究は極めて少なく、ユビキチン化の意義やその詳細な分子機構は不明であった。

また、本研究分野では、MOPへのリン酸化修飾が、鎮痛経路と副作用発現経路との偏り(Bias)を決定づける重要な因子として注目されてきた。鎮痛経路への偏りが強いリガンドを探索すれば、理想的なオピオイドを同定できると期待されたのである。先行研究では、MOPとアレスチンとの親和性がアレスチン経路への偏りの指標として広く受け入れられていた。ところが、申請者が本研究に先立ち、リン酸化修飾を受けないMOP変異体を発現する細胞株を作出したところ、この変異体も野生型のMOPと同等にMAPK経路を活性化することを見出した。つまり、MOPのリン酸化欠失変異体は、アレスチンを必要とする内在化は障害されるものの、MAPK経路は野生型と同等に活性化した。さらに、MOPとアレスチンとの会合に重要なMOPのC末端領域欠失変異体であっても、MAPK経路は活性化した。この予想外の知見から、リン酸化とは異なる因子に注目すれば、MOPの制御に関わる新しい分子機構を見出せるのではないかと着想し、同じGPCRファミリーに属するアドレナリン作動性受容体やケモカイン受容体の制御に重要な役割を果たしているユビキチン修飾の果たす役割を解析することにした。

2. 研究の目的

本研究では、活性化したMOPやアレスチンへのユビキチン化が、耐性形成や副作用の発現においてどのような役割を果たすのか、またその詳細な分子機構を明らかにすることを目的として着手した。具体的には、以下の点について明らかにすることを目指した。

- (1) MOPやアレスチンが、ユビキチン修飾を受けるのか、またMOPがユビキチン化を受けるのであれば、ユビキチン化にはアレスチンが必要であるかどうか、またそのサブタイプはいずれであるかを明らかにする
- (2) MOPやアレスチンへのユビキチン化が、受容体の内在化・分解、およびアレスチン経路の活性化に与える影響を明らかにする
- (3) MOPやアレスチンへのユビキチン結合酵素や、脱ユビキチン化酵素を同定する

3. 研究の方法

- (1) MOPを制御するアレスチンは、アレスチン1、アレスチン2であることが知られている。申請者は、アレスチン1、アレスチン2、アレスチン1かつ2を遺伝学的に欠損させた神経系細胞株SH-SY5Y細胞を樹立していたので、それぞれの細胞株にエピトープタグを付加したMOP(MOR1)を過剰発現させた細胞株を樹立することにした。細胞株をオピオイドで刺激し、活性化したMOPを免疫沈降してMOPへのユビキチン化の有無やその強度をウェスタンブロッティング法で評価する研究を立案した。
- (2) MOR1やアレスチンそれぞれに対して、ユビキチン化の標的となるリシン残基をアルギニンに置換して、ユビキチン修飾を受けないMOP変異体を作出し、SH-SY5Y細胞に発現させた。ユビキチン修飾がMOPの内在化に与える影響は、フローサイトメトリー法を利用して、細胞表面からの受容体の消失率を解析した。また、リソソーム阻害剤やプロテアソーム阻害剤を利用して、活性化した受容体が分解経路に導かれるのかどうかや、どのような分解経路に導かれるかを解析する研究を計画した。

- (3) MOP や アレスチンを過剰発現した細胞株を樹立して、オピオイドによって活性化された状態の細胞株から MOP や アレスチンを免疫沈降してウェスタンブロッティングし、活性化依存的に出現するバンドを質量分析で解析することで、刺激依存的に MOP の制御に関わる因子の候補を抽出する研究を計画した。

上記のうち、(1)および(3)は、解析に必要十分な量の MOP を免疫沈降することができず、様々な条件を検討したが、研究期間内に目的とした成果を上げることはできなかった。MOP は 7 回膜貫通型受容体であり、疎水性領域が多いために、免疫沈降は容易でないことは想定されたが、それだけ新規性の高い知見が得られると期待していた。しかし、免疫沈降に関わるさまざまな先行研究を参考にしたが、目標とした成果は得られなかった。

以下に、主に(2)について解析を進めて得られた結果を報告する。

4. 研究成果

- (1) MOP へのユビキチン修飾は、Gi/o を起点とする細胞内シグナルには影響を与えない

ユビキチン修飾は一般的に、付加される(ポリ)ユビキチン(鎖)の種類によって、分解シグナルだけでなく、さまざまな分子が会合する足場として機能することが知られている。そこで、MOP へのユビキチン修飾が細胞内シグナルの活性化に重要であるかを解析した。申請者が本研究に着手している期間に、これまで アレスチンを起点としていると想定されていた MAPK 経路は、実はその上流において Gi/o が先立って活性化することが重要であるという知見が Science 誌などから報告された。Gi/o は、オピオイドによる鎮痛効果の発現に重要な役割を果たすと想定されていることから、MOP へのユビキチン修飾が Gi/o の活性化において重要な役割を果たすかを MAPK 経路の活性化を指標に評価した。MOP のリシンをアルギニンに置換し、MOP がユビキチン修飾を受けない変異体(MOP-8KR 変異体)を作成して解析したところ、MOP-8KR 変異体は野生型と同等に MAPK 経路を活性化することがわかった。つまり、オピオイドによる鎮痛効果の発現に關与する、Gi/o の活性化において MOP へのユビキチン化必要でないことを明らかにした。

- (2) MOP へのユビキチン修飾は活性化した MOP の細胞内への内在化の効率を制御する

上述の MOP-8KR 変異体は、野生型の変異体と比べて、オピオイド刺激 60 分後の受容体内在化の程度は有意な差がないものの、10 分後の内在化の程度が減弱した。ユビキチン化に必要な E1 阻害剤を使用した実験でも同様の傾向が確認された。すなわち、MOP へのユビキチン修飾は、活性化した MOP を細胞内へ効率的に内在化する上で重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、MOP に存在する 8 つのリシン残基のうち、どのリシンへのユビキチン修飾が活性化した MOP の内在化に重要であるかを詳しく解析した。MOP は 7 回膜貫通型受容体であり、MOP-8KR のうち、第一細胞内ループのアルギニンをリシンに戻す(野生型のアミノ酸に戻す)ことで受容体の内在化効率が回復したことから、MOP の内在化には、第一細胞内ループに存在するリシンへのユビキチン修飾が重要であることを見出した。

次に、ユビキチン修飾には、ユビキチン鎖の結合様式によって、基質分子が受ける影響が異なることが知られている。例えば、ユビキチン分子の K48 を介して連なる K48 ポリユビキチン鎖が付加されると、基質分子はプロテアソームでの分解へと導かれる。プロテアソームを阻害する薬剤 MG132 を使用しても、ユビキチンの内在化は影響を受けなかったことから、K48 鎖の付加を介して内在化が制御されているわけではないという知見を得た。

- (3) 活性化した MOP がリン酸化修飾を受ける上で、MOP へのユビキチン化は重要でない

ユビキチン化は、上述のように、さまざまな酵素群を動員する足場として重要な役割を果たしている。活性化した MOP は、リン酸化修飾を受けることで脱感作されると理解されている。脱感作は、細胞の感受性を制御する重要なステップであるため、MOP へのリン酸化にユビキチン修飾が関与するかどうかを解析した。すなわち、MOP をリン酸化する GPCR キナーゼなどが MOP へ動員される上で、ユビキチン修飾が重要な役割を果たすかどうか、MOP-8KR 変異体を利用して解析した。MOP はリガンドに応じてさまざまなパターンのリン酸化修飾を受けることが知られているが、そのリン酸化には順序があり、まず Ser377 がリン酸化を受けることが知られている。MOP-8KR 変異体においては、Ser377 のリン酸化の程度は野生型と比べて同程度であった。つまり、MOP へのユビキチン修飾は、MOP へのリン酸化には必要がなく、脱感作、つまり受容体の感受性制御には直接的な役割を果たしていない可能性が示唆された。

以上のことから、本研究課題を通して、MOP へのユビキチン修飾は、鎮痛効果の発現に關与すると想定されている Gi/o の活性化や、MOP のリン酸化そのものには必須でないが、活性化してリン酸化修飾を受けた MOP を細胞内へと内在化を促進する可能性を見出した。

以上の成果は *Biochem Biophys Res Commun* 誌から発表された(2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyoshi Kentaro, Shimizu Satoshi, Shiraki Atsuko, Egi Moritoki	4. 巻 643
2. 論文標題 Ubiquitination of the μ -opioid receptor regulates receptor internalization without affecting Gi/o-mediated intracellular signaling or receptor phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 96~104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.12.077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiraki Atsuko, Shimizu Satoshi	4. 巻 640
2. 論文標題 The molecular associations in clathrin-coated pit regulate μ -arrestin-mediated MAPK signaling downstream of μ -opioid receptor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 64~72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.11.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Satoshi, Iwashita Narihito, Fukui Sei, Kitagawa Hiroto	4. 巻 8
2. 論文標題 Ultrasound imaging with an electric stimulant was useful in pulsed radiofrequency for chronic knee pain in the medial region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-022-00585-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Satoshi, Shiraki Atsuko	4. 巻 10
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 unveils the dynamics of the endogenous μ opioid receptors on neuronal cells under continuous opioid stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Satoshi、Kimura Kayo	4. 巻 8
2. 論文標題 Anesthetic management of living-donor lung transplantation for end-stage COVID-19 lung failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40981-022-00512-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清水覚司、岩下成人、石原真理子、河島愛莉奈、西脇侑子、赤澤舞衣、岩本貴志、中西 美保、松本富吉、福井聖、北川裕利
2. 発表標題 変形性膝関節症に対して伏在神経末梢枝へのパルス高周波法が疼痛緩和に有効であった1例
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第3会関西支部学術集会
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 清水覚司、岩下成人、石原真理子、河島愛莉奈、西脇侑子、赤澤舞衣、岩本貴志、中西 美保、松本富吉、福井聖、北川裕利
2. 発表標題 インターベンショナル治療を中心とした集学的痛み治療の研修
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第3会関西支部学術集会
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 清水覚司、岩下成人、石原真理子、河島愛莉奈、西脇侑子、赤澤舞衣、岩本貴志、中西美保、松本富吉、福井聖、北川裕利
2. 発表標題 変形性膝関節症に対して超音波ガイド下にパルス高周波法を施行した3症例
3. 学会等名 第44回 日本疼痛学会
4. 発表年 2022年~2023年

1. 発表者名 清水寛司、岩下成人、福井聖、北川裕利
2. 発表標題 脊髄神経後枝内側ブロックが緩和的放射線照射の開始や継続に有用であった2症例
3. 学会等名 第52回 日本慢性疼痛学会
4. 発表年 2022年～2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------