

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 3 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790518

研究課題名（和文） 受容体の糖鎖修飾が麻薬性鎮痛薬の作用において果たす役割の解明

研究課題名（英文） Role of receptor glycosylation on the effects of narcotic analgesics

研究代表者

笠井 慎也 (KASAI SHINYA)

財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：20399471

研究成果の概要（和文）：

μ オピオイド受容体の Asn 結合型糖鎖修飾に遺伝子多型を有する HMI マウス系統からコンジェニックマウス *Oprm1*^{HMI/HMI} を作出した。*Oprm1*^{HMI/HMI} マウスではモルヒネの鎮痛作用が有意に亢進しており、糖鎖修飾部位の増加により麻薬性鎮痛薬の効果が亢進すると考えられる。この *Oprm1*^{HMI/HMI} マウスはヒト μ オピオイド受容体遺伝子多型のモデルとして有用である。今回得られた結果は、Asn 結合型糖鎖修飾変異体の強制発現細胞株を用いた解析をさらに進めることで、効果の高い鎮痛薬の開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：

We established a congenic mouse strain (*Oprm1*^{HMI/HMI}) from wild-derived HMI inbred mice. The *Oprm1*^{HMI/HMI} congenic mice exhibited increased antinociception induced by morphine in the tail-flick and hot-plate tests. These data indicated that N-linked glycosylation of the μ opioid receptor would influence the effects of opioid analgesics. The congenic mouse is useful strain for analyzing the effects of N-linked glycosylation of the μ opioid receptor *in vivo*. The further studies with mutants of the N-linked μ opioid receptor glycosylation would absolutely contribute to the development of effective analgesics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：オピオイド受容体、鎮痛薬、オピオイド、糖鎖修飾、遺伝子多型、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

モルヒネやフェンタニルなど麻薬性鎮痛薬や、内因性オピオイドペプチドである dynorphin や endorphin は主に脳において発現するオピオイド受容体に作用しその効果を発揮する。サブタイプが 3 種類存在するオピ

オイド受容体の中で、ミュー (μ) オピオイド受容体はモルヒネやフェンタニルの主要な受容体であり、主作用である鎮痛効果だけでなく、依存効果、鎮痛耐性、呼吸抑制効果など副作用においても主要な働きを担っていることが遺伝子欠損マウスを用いた解析

で明らかになっている。

この μ オピオイド受容体については、遺伝子構造が明らかにされ (Ide et al. (2005) *Gene* 365:139-145; Han et al. (2006) *Pharmacogenet Genomics* 16:451-460)、転写制御についても多くの研究者により解析されている (Kasai et al. (2006) *Psychiatry Clin. Neurosci.* 60:S11-17)。 μ オピオイド受容体は、翻訳後に様々な修飾を経て、7回膜貫通G蛋白質共役型受容体として機能する。特に、細胞膜外に位置するアスパラギン (Asn) 結合型糖鎖修飾部位 (Asn-X-Ser/Thr/Cys, Xは全てのアミノ酸が可) は、マウスで4箇所、ラット及びヒトでは5箇所と多く、また生物種間でも高い保存性を保っている。マウス μ オピオイド受容体蛋白質は western blotting で約60~67 kDaの migrating band として検出され、4箇所ある Asn 結合型糖鎖修飾のパターンに複数あることが推測される。さらに、糖鎖を除去すると約40 kDaにまで分子量が低下することから、この差に相当する糖鎖が細胞外のN末端に付加されていることを考えると、モルヒネやフェンタニルといったリガンドの結合性及び特異性に与える Asn 結合型糖鎖修飾の影響は大きいと考えられる。

ヒトの μ オピオイド受容体遺伝子について、5箇所ある Asn 結合型糖鎖修飾部位の一つにアミノ酸置換を引き起こす一塩基多型 (A118G, Asn40Asp) が解析されており、特にアジア人種ではマイナーアレル頻度が約40%と高く、研究代表者らはモルヒネ及びフェンタニルの鎮痛効果と関連することを報告している (Hayashida et al. (2008) *Pharmacogenomics* 9:1605-1616; Fukuda et al. *Pain* 147:194-201)。この一塩基多型が受容体のリガンドと μ オピオイド受容体との結合性に与える影響について、変異体 (118G) を発現させた細胞株の解析により報告されているが、統一的な見解が得られていない。その理由として、発現細胞株により Asn 結合型糖鎖修飾が変化している可能性、リガンドとの結合性は、リガンドの種類と Asn 結合型糖鎖修飾部位の組み合わせで決定される可能性が考えられる。

また、研究代表者らは、野生由来近交系マウスの解析により、 μ オピオイド受容体遺伝子上に複数の遺伝子多型を同定しているが (Shigeta et al. (2008) *Pharmacogenet Genomics* 18:927-936)、その際に HMI マウス系統が Asn 結合型糖鎖修飾部位を4箇所から5箇所へ1箇所追加する遺伝子多型 (G164A, Ser55Asn) を有することを見出しており、この遺伝子多型は麻薬性鎮痛薬の鎮痛効果に影響を与えることが予想される。

2. 研究の目的

μ オピオイド受容体は、モルヒネやフェ

ンタニルといった麻薬性鎮痛薬の主要な受容体であり、遺伝子欠損マウスなどを用いて様々な麻薬性鎮痛薬の効果が解析されている。この μ オピオイド受容体は、7回膜貫通G蛋白質共役型受容体であり、アミノ末端は細胞外に突出している。このアミノ末端には、マウスで4箇所、ラット及びヒトで5箇所の糖鎖修飾部位 (Asn-X-Ser/Thr/Cys) を有しており、この糖鎖修飾がモルヒネなどのリガンド特異性に重要であることは示唆されているが詳細は明らかではない。本研究では、この糖鎖修飾部位の変異体やこの糖鎖修飾に変異を有する HMI マウス系統を用いて、 μ オピオイド受容体の作動薬及び拮抗薬の特異性を検討し、リガンドに対する各糖鎖修飾の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス μ オピオイド受容体遺伝子の Asn 結合型糖鎖修飾変異体を強制発現させた細胞株を用いて、 μ オピオイド受容体作動薬及び拮抗薬の作用に与える影響を解析する。また、麻薬性鎮痛薬の鎮痛効果について HMI マウス系統を用いて解析し、個体レベルにおいて糖鎖修飾の影響を明らかにする。

マウス μ オピオイド受容体の Asn 結合型糖鎖修飾変異体は、すべてが変異しているもの (1変異体)、一箇所のみ変異しているもの (4変異体)、一箇所以外変異しているもの (4変異体)、HMI 型変異体 (1変異体) の計10変異体を作製する。変異株を安定発現する HEK293 細胞株を用いて、免疫染色により細胞内取り込みについて解析する。

HMI マウス系統は野生由来近交系マウスであるため、対照となる C57BL/6 系統に戻し交配を行ない、HMI コンジェニックマウス (*Oprm1*^{HMI/HMI}) を作成する。*Oprm1*^{HMI/HMI} マウスの遺伝子背景は一塩基遺伝子多型 (SNPs) を用いて検定し、コンジェニックマウスとして用いることが出来るか評価を行なう。*Oprm1*^{HMI/HMI} コンジェニックマウスを用いて tail -flick test 及び hot-plate test によりモルヒネ感受性を解析する。

4. 研究成果

pcDNA 3.1 vector にマウス μ オピオイド受容体 cDNA をクローニングし、計10種の Asn 結合型糖鎖修飾変異体を作製した。これら変異体の安定発現 HEK293 細胞株を作出し、 μ オピオイド受容体作動薬及び拮抗薬の作用を解析中である。

G164A 遺伝子多型を指標にして、HMI 系統を C57BL/6 (B6) 遺伝子背景に戻し交配して作成した *Oprm1*^{HMI/HMI} コンジェニックマウスの遺伝子背景の解析を行った。遺伝子背景の解析には Illumina Mouse MD Linkage Panel を使い、1,449 SNPs (Chr. 1-19, X) において

遺伝子型判定を行った。HMI 系統及び C57BL/6J 系統間では 699 SNPs で塩基に違いがあり (223 SNPs では HMI 系統若しくは *Oprm1*^{HMI/HMI} マウスで検定不可)、rs29368538 においてのみ *Oprm1*^{HMI/HMI} マウスの遺伝型が HMI マウス系統の遺伝型と一致した。rs29368538 遺伝子多型は Chr. Position: 3987385 (MGSCv37, Build37.1)であり、*Oprm1* 遺伝子 (Chr. Position: 3309495-3557272) と同じ Chr. 10 に位置する。遺伝型判定を行った SNPs の中で HMI 系統及び B6 系統間で塩基の異なる最も近傍の SNP は rs6185923 (Chr. Position: 5378624)で、*Oprm1*^{HMI/HMI} マウスの遺伝型は B6 系統であることから、*Oprm1*^{HMI/HMI} マウスでは *Oprm1* 遺伝子を含む最大約 5 Mbs を除き B6 系統へ戻し交配が完了していると考えられる。

Oprm1^{HMI/HMI} コンジェニックマウスにおいて、熱刺激に対する閾値を tail-flick test 及び hot-plate test により測定した結果、*Oprm1*^{HMI/HMI} コンジェニックマウスでは *Oprm1*^{B6/B6} マウスと比較してモルヒネ感受性が有意に亢進していた。B6 型 μ オピオイド受容体遺伝子には 4 箇所 (Asn 結合型糖鎖修飾部位が存在し、HMI 型 μ オピオイド受容体遺伝子では 5 箇所に増加する。これら糖鎖修飾の変化がオピオイドリガンドの結合性または下流の情報伝達に影響を及ぼした結果、HMI 系統でモルヒネ感受性亢進が引き起こされたと考えられる。ヒト μ オピオイド受容体遺伝子の遺伝子多型 A118G は、Asn 結合型糖鎖修飾部位を 5 箇所 (118A) から 4 箇所 (118G) へ減少させる。これまでにモルヒネやフェンタニルなど μ オピオイド受容体作動薬の作用が、変異型 118G の保有者で低下していることが多く報告されている。今回、*Oprm1*^{HMI/HMI} コンジェニックマウスで鎮痛薬感受性が亢進したことは、 μ オピオイド受容体遺伝子多型の解析結果と一致する。本研究結果より、HMI 系統は μ オピオイド受容体糖鎖修飾部位変異体のモデルとして有用であることが示された。

本研究により明らかになりつつある薬物感受性におけるマウス系統差の遺伝子メカニズムは、将来的にはヒト個人差の分子メカニズムの解明に繋がると考えられる。モルヒネの精神依存、身体依存などの深刻な副作用を最小限に抑えつつ、効果的な慢性疼痛治療を可能とするテーラーメイドの緩和医療に道を拓くことが期待できる。

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 9 件)

- ① Kasai S, Ikeda K. Pharmacogenomics of the

human μ -opioid receptor. *Pharmacogenomics* **12**:1305-1320 (2011). [査読有]

- ② Han W, Takamatsu Y, Yamamoto H, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. Inhibitory role of inducible cAMP early repressor (ICER) in methamphetamine-induced locomotor sensitization. *PLoS ONE* **6**:e21637 (2011). [査読有]
- ③ Kasai S, Yamamoto H, Kamegaya E, Uhl GR, Sora I, Watanabe M, Ikeda K. Quantitative detection of μ opioid receptor: Western blot analyses using μ opioid receptor knockout mice. *Curr Neuropharmacol* **9**:219-222 (2011). [査読有]
- ④ Takamatsu Y, Shiotsuki H, Kasai S, Iwamura T, Hattori N, Ikeda K. Enhanced hyperthermia induced by MDMA in parkin knockout mice. *Curr Neuropharmacol* **9**:96-99 (2011). [査読有]
- ⑤ 笠井慎也, 韓文華, 畑春美, 高松幸雄, 萩野洋子, 城石俊彦, 小出剛, 池田和隆. 野生由来近交系マウス系統における *Oprm1* 遺伝子多型とモルヒネ感受性の関連性. 日本神経精神薬理学雑誌 **31**:87-88 (2011). [査読無]
- ⑥ Han W, Takamatsu Y, Kasai S, Endo S, Shirao T, Kojima N, Ikeda K. Reduced locomotor sensitization induced by methamphetamine and altered gene expression in ICER overexpressing mice. 日本神経精神薬理学雑誌 **31**:79-80 (2011). [査読無]
- ⑦ Hagino Y, Kasai S, Han W, Yamamoto H, Nabeshima T, Mishina M, Ikeda K. Essential role of NMDA receptor channel epsilon4 subunit (GluN2D) in the effects of phencyclidine, but not methamphetamine. *PLoS ONE* **5**:e13722 (2010). [査読有]
- ⑧ Aoki J, Hayashida M, Tagami M, Nagashima M, Fukuda K, Nishizawa D, Ogai Y, Kasai S, Ikeda K, Iwahashi K. Association between 5-hydroxytryptamine 2A receptor gene polymorphism and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. *Neurosci Lett* **479**:40-43 (2010). [査読有]
- ⑨ 笠井慎也. 緩和医療～テーラーメイド医療の推進に向けて～. UP **2010-8 (No. 454)**:19-23 (2010). [査読無]

[学会発表] (計 19 件)

- ① 村岡渡 他, 外科的顎矯正手術における UGT2B7 遺伝子多型とフェンタニル感受性の関連について. 神経化学 I, 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 東京, 2011 年 10 月 28 日.
- ② Nishizawa D et al., Association analysis

- between GIRK2 gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after painful cosmetic surgery. 12th IGHG, Montreal, Canada, 2011.10.14
- ③ 萩野洋子 他, フェンサイクリジンの作用における NMDA 受容体チャネル GluN2D サブユニットの役割. 平成 23 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 14 日.
- ④ 笠井慎也 他, 日本人の喫煙歴と関連する *OPRL1* 遺伝子多型の解析. 平成 23 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 13 日.
- ⑤ Sato A et al., Autism-like behaviors in mouse models of tuberous sclerosis complex and their recovery by rapamycin. The 2nd Meeting of Asian College of Neuropsychopharmacology (2nd AsCNP, 2011), Seoul, Korea, 2011.9.23-24
- ⑥ Nishizawa D et al., Association analysis between GIRK2 gene polymorphisms and opioid sensitivity. The 2nd Meeting of Asian College of Neuropsychopharmacology (2nd AsCNP, 2011), Seoul, Korea, 2011.9.23-24
- ⑦ 池田和隆 他, シンポジウム S4-I-1, 感覚から不快情動を生成する神経経路, 第 34 回日本神経科学大会—こころの脳科学—, 横浜, 2011 年 9 月 17 日.
- ⑧ Ikeda K et al., Molecular mechanisms underlying the effects of phencyclidine. The Third Annual International Drug Abuse Research Society/ International Society for Neurochemistry/ESN Satellite Meeting, Istanbul, Turkey, 2011.8.23
- ⑨ Kasai S et al., μ -Opioid receptor gene: recent findings and future intervention approach. 1st National Symposium of Biological Psychiatry and Psychopharmacology, Makassar, Indonesia, 2011.4.4
- ⑩ Nishizawa D et al., Association between GIRK3 gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting, Washington DC, 2010.11.3
- ⑪ 小林大輔 他, 口腔外科手術後の下歯槽神経知覚障害と関連する遺伝子多型の網羅的探索. 日本人類遺伝学会 第 55 回大会, さいたま, 2010 年 10 月 28 日.
- ⑫ 森山彩子 他, 痛みや鎮痛薬に対する感受性とベータ 1 アドレナリン受容体遺伝子(*ADRB1*)多型との関連解析. 第 4 回日本緩和医療薬学会年会, 鹿児島, 2010 年 9 月 25 日.
- ⑬ 池田和隆 他, 痛覚感受性個人差の遺伝要因. 第 4 回日本緩和医療薬学会年会, 鹿児島, 2010 年 9 月 25 日.
- ⑭ 西澤大輔 他, GIRK チャネルサブユニット GIRK3 の遺伝子多型と開腹術後鎮痛との関連. 第 40 回日本神経精神薬理学会, 仙台, 2010 年 9 月 17 日.
- ⑮ 青木淳 他, *OPRM1* 118A/G 遺伝子多型と Temperament and Character Inventory の関連研究. 第 40 回日本神経精神薬理学会, 仙台, 2010 年 9 月 16 日.
- ⑯ 笠井慎也 他, オピオイド感受性に及ぼすミューオピオイド受容体遺伝子配列の影響. 第 31 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 名古屋, 2010 年 8 月 26 日.
- ⑰ Ikeda K et al., Polymorphisms of the genes encoding the mu-opioid receptor and GIRK2 (*KCNJ6*) are associated with postoperative opioid requirements. CIMP 2010, Hong Kong, 2010.6.7
- ⑱ Kasai S et al., Associations between nucleotide sequence differences in the *Oprm1* gene and sensitivity to morphine in wild-derived inbred mouse strains. CIMP 2010, Hong Kong, 2010.6.7
- ⑲ Han W et al., Reduced locomotor sensitization induced by methamphetamine and altered gene expressions in ICER over-expressing mice. CIMP 2010, Hong Kong, 2010.6.7
- [図書] (計 1 件)
- ① 小川節郎, 鈴木勉, 池田和隆, 下山直人, 松島英介, 笠井慎也. 東京大学出版会, 緩和医療: 痛みの理解から心のケアまで. 2010, 190.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 慎也 (KASAI SHINYA)

財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員
研究者番号: 20399471

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし