

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15657

研究課題名（和文）モルヒネ代謝物モルヒノンに着目したモルヒネ鎮痛耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of morphine analgesia tolerance with a focus on the morphine metabolite morphinone.

研究代表者

松尾 康平（Matsuo, Kohei）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10802499

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：がんの鎮痛に使用されるモルヒネの反復投与による鎮痛耐性と副作用の問題に対し、我々はモルヒネ代謝物であるモルヒノンを同定し、その親電子性に注目し、以下の成果を得た。1. モルヒノンはKeap1を親電子修飾し、Nrf2経路を活性化、抗酸化や薬剤耐性に関する遺伝子の発現を誘導した。2. HSP90を修飾し、HSF1経路を活性化、抗アポトーシスに関する遺伝子の発現を促進した。3. Aktをリン酸化し、CREB経路を活性化、Bcl-2の発現を誘導した。これらの結果は、モルヒノンが酸化還元シグナル伝達を介して遺伝子発現を制御し、鎮痛耐性に関する可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モルヒネの代謝については、これまでの数多くの研究から、多くの代謝物が単離・同定され、代謝物の鎮痛活性や毒性についても評価されているが、未解明の部分も多い。本研究課題では、親電子性を有するモルヒノンを介した直接的または間接的なシグナル伝達経路を同定し、モルヒノンの新たな生理活性物質としての役割を明らかにすることに成功した。モルヒノンのように耐性・生体防御への関与が示唆されるモルヒネ代謝物は明らかにされおらず、モルヒノンが耐性形成を軽減する薬剤開発のターゲットとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To address the problem of analgesic tolerance and side effects caused by the repeated administration of morphine for cancer analgesia, we identified morphinone, a morphine metabolite, and focused on its electrophilic properties, with the following results: 1. Morphinone electrophilically modified Keap1, activating the Nrf2 pathway and inducing the expression of genes involved in antioxidation and drug resistance. 2. Morphinone modified HSP90, activating the HSF1 pathway and promoting the expression of genes associated with anti-apoptosis. 3. Morphinone phosphorylated Akt, activating the CREB pathway and inducing the expression of Bcl-2. These results indicate that morphinone regulates gene expression via redox signaling and may be involved in analgesic tolerance.

研究分野：実験病理学

キーワード：モルヒネ モルヒノン 親電子代謝物 Nrf2 HSF1 CREB

1. 研究開始当初の背景

がんの鎮痛目的でのモルヒネの使用量が年々増加している一方で、反復投与により鎮痛効果が減弱する鎮痛耐性と、耐性形成に起因する副作用が問題となっている。現時点で、鎮痛効果を持続させたまま副作用のリスクを減らす治療は、不可能であるため、副作用を抑えた疼痛緩和治療の実現が、世界的に求められている。モルヒネは、がん患者の疼痛をはじめ、種々の疼痛緩和治療の主役を担う薬剤として世界的に頻用されている。一方、反復投与により鎮痛耐性が生じ、投与量を増やすことで鎮痛効果を維持するため、過量投与が行われ副作用の危険が増すことが臨床での深刻な問題となっている。当研究室では、モルヒネの代謝経路として親電子性を有するモルヒノンを経路を中間代謝物とする経路が生体内に存在することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、モルヒネ代謝物モルヒノンに着目し、モルヒノンとセンサータンパク質との結合解析、モルヒノンによる遺伝子発現変動解析を行い、生理活性物質としての役割を明らかにすることで、耐性形成および副作用を抑えた疼痛緩和治療の実現に近づける。

3. 研究の方法

【細胞の処理】HepG2 細胞に対して、親電子性を有するモルヒネ代謝物であるモルヒノン、または C7-C8 二重結合を持たず親電子性を有さないモルヒネ代謝物ジヒドロモルヒノンを添加して処理した。Nrf2 または HSF1 のノックダウン細胞は、siRNA トランスフェクションにより作製した。【センサータンパク質とモルヒノンの結合解析】ビオチン-PEAC5-マレイミド (BPM) アッセイを用いて、センサータンパク質の S-修飾を評価した。【核移行やリン酸化の分析】ウエスタンブロッティングを用いて、センサータンパク質およびその下流タンパク質の検出を行った。【遺伝子発現変動の解析】細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成後、特異的プライマーを用いて qPCR を行った。【細胞生存率】CCK-8 アッセイを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) モルヒノンによる Keap1/Nrf2 経路の活性化に関する研究: モルヒノンによる Keap1/Nrf2 経路の活性化について解析を行い、そのメカニズムの解析に成功した。(Matsuo, K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 46(2), 338-342 (2023)). 以下に具体的な成果 (①~④) を述べる。

① Keap1 の S-修飾が Nrf2 の活性化に関与するため、まず、HepG2 細胞がモルヒノンに曝露された際の Keap1 修飾を、BPM を用いた間接アッセイで評価した。BPM はタンパク質の遊離チオール基を標識し、その結果、BPM で標識されたタンパク質の量は S-修飾の量と逆相関する。図 1A に示しているように、モルヒノン処理後の HepG2 細胞では BPM で標識された Keap1 の量が減少しており、このことはモルヒノンによって Nrf2 が活性化されることを示している。予想通り、モルヒノン曝露は濃度および時間依存的に Nrf2 を活性化した (図 1B、C)。

② モルヒノンは Nrf2 の核への移行を促進した (図 2A)。対照的に、親電子性を有さないジヒドロモルヒノンは Nrf2 の核移行を促進しなかった (図 2B)。これらの結果は、モルヒノンが Keap1 の修飾を通じて Keap1/Nrf2 経路

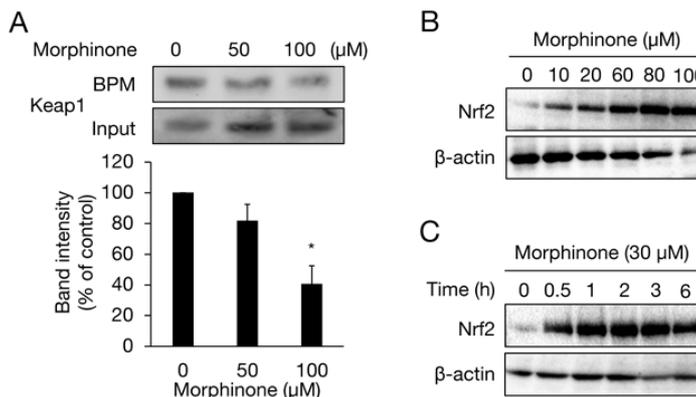


Fig. 1. Modification of Keap1 and Accumulation of Nrf2 in HepG2 Cells.

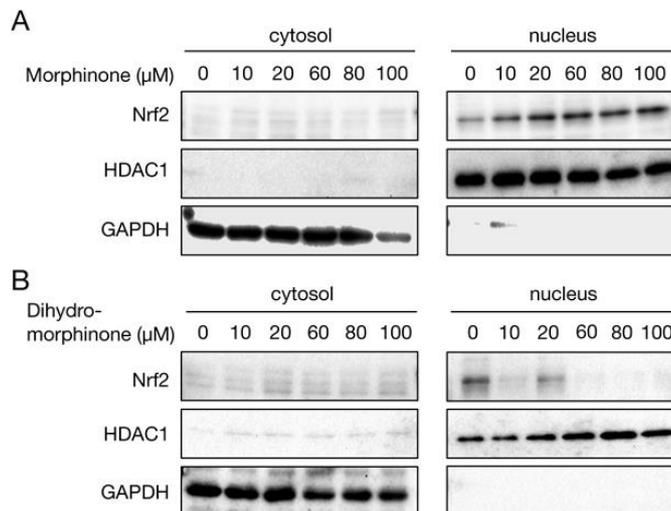


Fig. 2. Nrf2 during Exposure of HepG2 Cells to Morphine or Dihydromorphinone.

を活性化することを示唆しているが、修飾の正確な位置を特定するためにはさらなる解析が必要である。

③ Nrf2 は第 II 相薬物代謝酵素 (GCLM、GCLC、GSTs など)、第 III 相輸送体 (多剤耐性関連タンパク質 (MRPs)、システイン/グルタミン酸輸送体 (xCT/SLC7A11 など) および抗酸化タンパク質 (HO-1 など) を協調的に調節する。そこで、モルヒノンが Nrf2 の下流遺伝子の発現に与える影響について qPCR により解析した。モルヒノン曝露は HepG2 細胞において *GCLM*、*GCLC*、*GSTA1*、*HO-1*、*SLC7A11*、および *ABCC2* (*MRP2*) の発現レベルを有意に増加させた (図 3)。

④ siRNA を用いた Nrf2 のノックダウンにより、モルヒノンを介した *GCLM*、*SLC7A11*、および *ABCC2* の発現誘導が有意に抑制された (図 4)。このことは、Nrf2 の活性化にモルヒノンが重要な役割を果たすことを示唆している。

(2) モルヒノンによる HSP90/HSF1 経路の活性化に関する研究：モルヒノンによる HSP90/HSF1 経路の活性化について解析を行い、そのメカニズムの解析に成功した。(Matsuo, K. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 46(2), 334-337 (2023)). 以下に具体的な成果 (①~②) を述べる。

① モルヒノンによる HSP90 の修飾について BPM 標識を用いて評価した。HepG2 細胞をモルヒノンで処理すると、細胞内の HSP90 が修飾された (図 5B)。また親電子性を有するモルヒノンは HSF1 の核への移行を促進した (図 5C)。一方で、親電子性を有さないジヒドロモルヒノンは HSF1 の核移行を促進しなかった (図 5D)。これらの結果は、HSF1 がモルヒノンによる HSP90 の S-修飾に反応して複合体から解離することを示唆している。HSP90 にはストレス誘導型 HSP90 α と恒常的に発現する HSP90 β の 2 つのアイソフォームがあり、これらには 6 つのシステイ

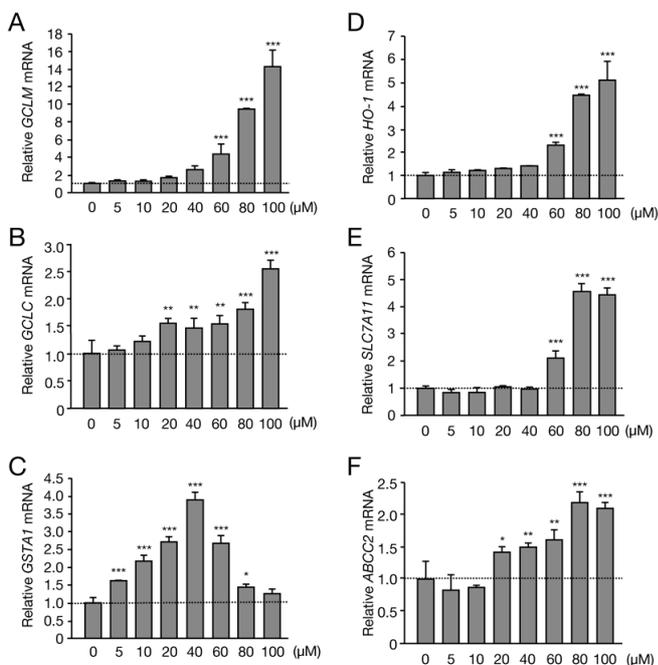


Fig. 3. Upregulation of Genes Downstream of Nrf2 by Morphine Exposure.

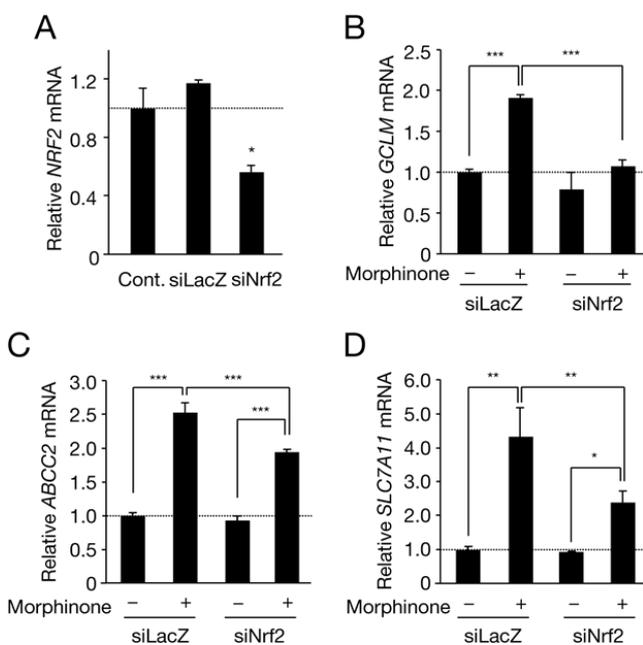


Fig. 4. Effect of Nrf2 Knockdown on the Expression of *GCLM*, *ABCC2*, and *SLC7A11* in Morphine-Treated HepG2 Cells.

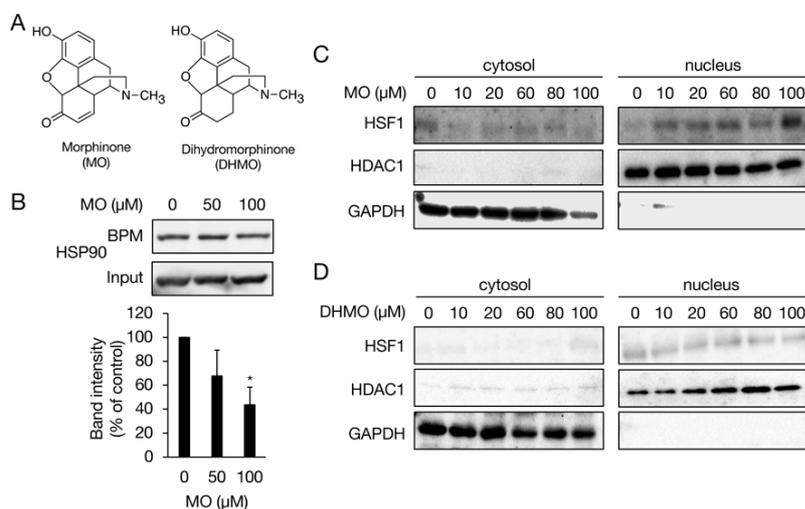


Fig. 5. Modification of Heat Shock Protein (HSP) 90 and Nuclear Localization of Heat Shock Factor 1 (HSF1) during Exposure of HepG2 Cells to Morphine.

ン残基が存在する。以前の研究では、環境中に存在する親電子物質であるカドミウムや1,4-ナフトキノンが HSP90β の Cys412 および Cys564 を修飾することが示されている (Abiko et al., *Free. Radic. Biol. Med.*, 104, 118-128 (2017); Shinkai et al., *Toxicol. Sci.*, 156, 412-421 (2017))。Cys564 は内因性の親電子物質である 4-ヒドロキシノネナールによっても修飾されることが示されている (Connor et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 24(8), 1275-1282 (2011))。さらに、6-(メチルスルフィニル)ヘキシルイソチオシアネートが HSP90β の Cys521 に結合することが示されている (Shibata et al., *J. Biol. Chem.*, 286(49), 42150-42161 (2011))。したがって、モルヒノンが HSP90 の Cys412、Cys564 または Cys521 に結合すると推測される。

② モルヒノンによる HSF1 の下流遺伝子への影響を調べるために、HSF1 によって調節されることが知られている *HSPA1A* (*HSP70*) および *BAG3* のレベルを測定した。図 6A および B に示されるように、HepG2 細胞への親電子性を有するモルヒノン曝露は一過性に *HSPA1A* および *BAG3* の発現レベルを増加させたが、親電子性を有さないジヒドロモルヒノン曝露では増加しなかった。モルヒノンによるこれらの遺伝子の発現誘導が

HSF1 に依存するかどうかを確認するために、siRNA を用いて HSF1 ノックダウン細胞を作製した (図 6C)。HSF1 ノックダウン細胞では、モルヒノンによる *HSPA1A* および *BAG3* の発現誘導が減少した (図 6D、E)。これらの結果より、モルヒノンが HSF1 を活性化し、その下流遺伝子を誘導することが示された。HSF1 が内因性および外因性の親電子物質 (4-ヒドロキシ-2-ノネナール、1,4-ナフトキノン、カドミウムなど) から細胞を保護することが示されている (Jacobs & Marnett, *J. Biol. Chem.*, 284(14), 9176-9183 (2009); Abiko et al., *Free. Radic. Biol. Med.*, 104, 118-128 (2017); Shinkai et al., *Toxicol. Sci.*, 156, 412-421 (2017))。HSP70 はタンパク質の維持および細胞生存に重要な役割を果たすシャペロンであり、*BAG3* は HSP70 と相互作用して細胞生存を促進する。これらの結果は、モルヒノンによる HSF1 の活性化が細胞死を抑制することを示唆している。

(3) モルヒノンによる Akt/CREB 経路の活性化に関する研究: モルヒノンによる Akt1/CREB 経路の活性化について解析を行い、そのメカニズムの解析に成功した。(Matsuo, K. et al., *Fundam. Toxicol. Sci.*, 11(2), 79-85 (2024))。以下に具体的な成果 (①~⑤) を述べる。

① Akt はリン酸化され活性化された後、細胞質から核へ移行する。そこで、HepG2 細胞がモルヒノンに曝露された際の Akt の核への移行を解析した。その結果、親電子性を有するモルヒノン曝露により、Akt の核移行が認められた (図 7B)。対照的に、親電子性を有さないジヒドロモルヒノンの曝露では、Akt の核移行は

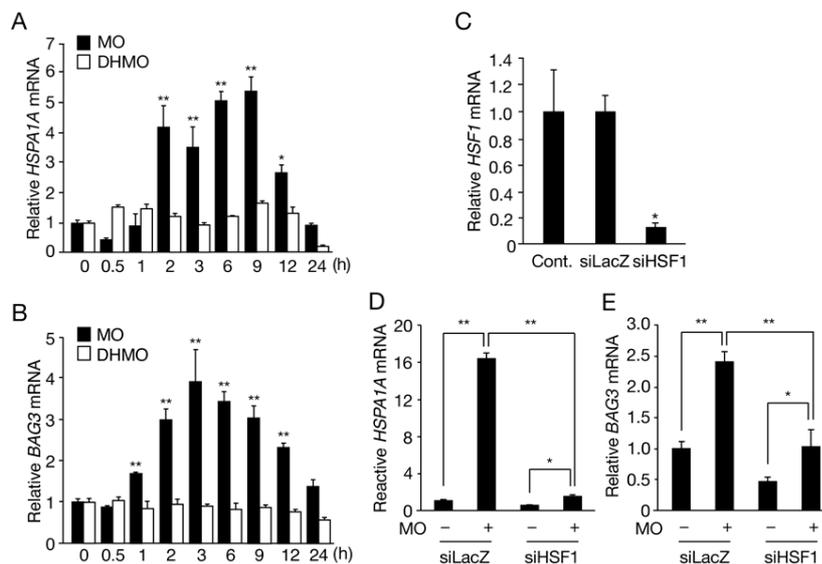


Fig. 6. Morphine-Mediated Upregulation of Heat Shock 70 kDa Protein 1A (*HSPA1A*) and B-Cell Lymphoma 2-Associated Anthanogene 3 (*BAG3*), and Effect of HSF1 Knockdown on Their Expression Levels in HepG2 Cells.

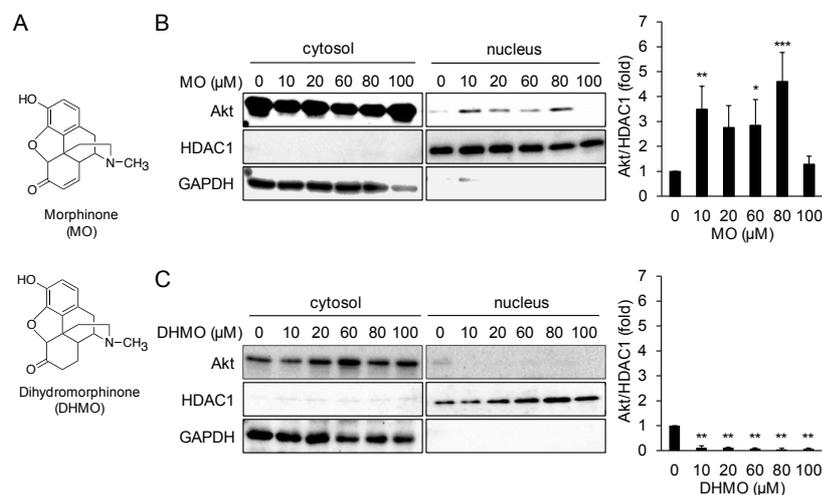


Fig. 7. Nuclear localization of protein kinase B (Akt) during exposure of HepG2 cells to morphine.

認められなかった (図 7C)。この結果は、モルヒノンの親電子性が細胞内での Akt 活性化の鍵であることを示している。

② 次に、モルヒノンによる Akt とその下流タンパク質 CREB のリン酸化を解析した。図 8 に示すように、モルヒノンは濃度依存的に Akt と CREB をリン酸化したが、ジヒドロモルヒノンではリン酸化されなかった (図 8)。

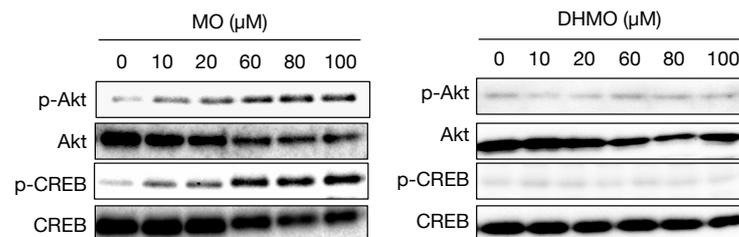


Fig. 8. MO-mediated activation of protein kinase B (Akt)-cAMP response element-binding protein (CREB) signaling in HepG2 cells.

③ Bcl-2 は phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Akt-CREB 経路の下流に位置するタンパク質であるため、モルヒノンは Bcl-2 の発現を誘導する可能性がある。予想通り、モルヒノンは Bcl-2 の発現を有意に誘導し (図 9A)、ジヒドロモルヒノンは誘導しなかった (図 9B)。

④ モルヒノンによる CREB のリン酸化と Bcl-2 の発現誘導が Akt 依存的であるかどうかを確認するために、HepG2 細胞をホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害剤であるワートマニンで前処理した。その結果、ワートマニンはモルヒノンによる Akt と CREB のリン酸化を抑制し、Bcl-2 の発現を抑制した (図 10)。

⑤ ワートマニン処理がモルヒノン曝露後の細胞生存率に与える影響について解析した。この結果、モルヒノンが Akt-CREB-Bcl-2 経路を活性化し、ワートマニン処理がモルヒノン曝露後の細胞生存率を低下させることが示された (図 11)。これは、この経路がモルヒノンによる細胞死の保護に寄与することを示唆している。

Akt は、高反応性のシステイン残基 (Cys71、Cys83、Cys124) を持つ PTEN によって脱リン酸化される。以前の研究では、外因性親電子性物質である 1,4-NQ が PTEN の Cys71 および Cys83 を修飾することで Akt-CREB シグナルを活性化することが示されている (Abiko et al., *Sci. Rep.*, 7(1), 4814 (2017))。本研究では、モルヒノンによる PTEN の修飾部位を特定していないが、モルヒノンが PTEN の反応性システインを修飾し、Akt を活性化することが示唆される。本研究では、モルヒノンは Akt-CREB-Bcl-2 シグナル経路も活性化することを示した。Akt シグナルは細胞生存に関連し、Bcl-2 は抗アポトーシスタンパク質であるため、細胞はモルヒノンの親電子性代謝物であるモルヒノンによる細胞毒性から、レドックスシグナル経路を活性化することで保護されている可能性がある。

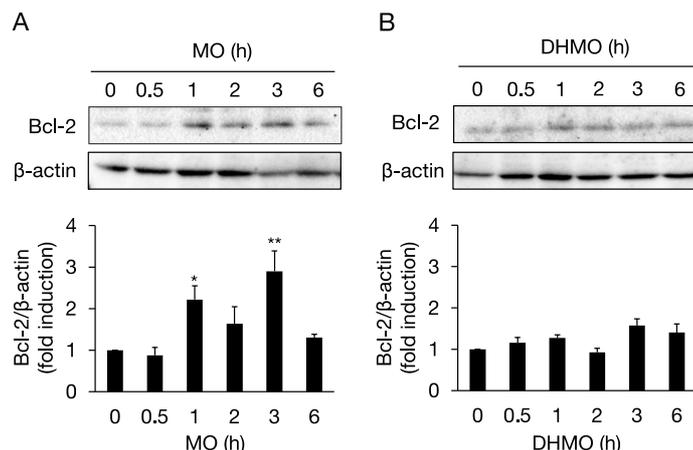


Fig. 9. Up-regulation of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) through exposure to MO in HepG2 cells.

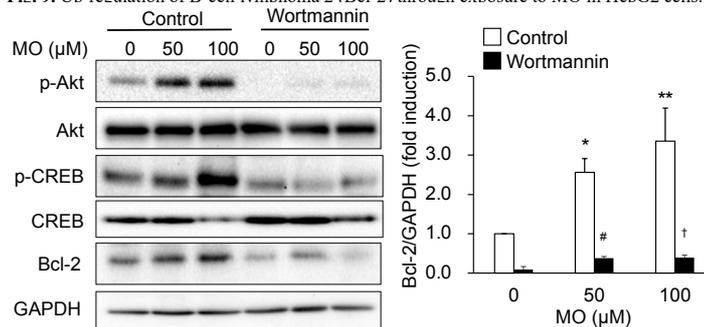


Fig. 10. Effect of a phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor on the Akt-CREB-Bcl-2 signaling pathway in HepG2 cells.

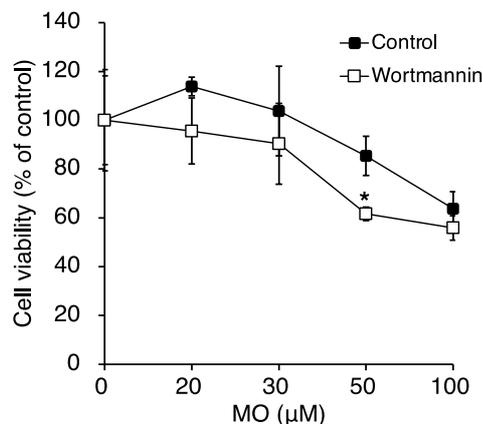


Fig. 11. Protective role of Akt signaling in MO-induced cell death in HepG2 cells.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuo Kohei, Yamano Shigeru, Toriba Akira, Matsusue Kimihiko, Kumagai Yoshito, Abiko Yumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Activation of Akt-cAMP response element-binding protein (CREB) signaling as an adaptive response to an electrophilic metabolite of morphine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 79 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.11.79	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 Kohei Matsuo, Yumi Abiko, Shigeru Yamano, Kimihiko Matsusue, Yoshito Kumagai	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of HSP90/HSP70 Signaling as an Adaptive Response to an Electrophilic Metabolite of Morphine.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 334-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00531	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 Kohei Matsuo, Yumi Abiko, Shigeru Yamano, Akira Toriba, Kimihiko Matsusue, Yoshito Kumagai	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of Keap1/Nrf2 Pathway as an Adaptive Response to an Electrophilic Metabolite of Morphine.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 338-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00543	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15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾康平、坂口愛、藍原大甫、松末公彦
2. 発表標題 Morphine の親電子性代謝物 Morphinone によるリン酸化を介した AKT/CREB 経路の活性化
3. 学会等名 フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藍原大甫、中野明日香、橋本楓乃、坂口愛、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 脂肪肝における Adig 遺伝子の発現解析 -PPAR による発現制御-
3. 学会等名 フォーラム 2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藍原大甫、浅田健人、坂口愛、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 肝 PPAR の新規標的遺伝子 Gpnmb の発現制御メカニズム
3. 学会等名 第 40 回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾康平、中井悠貴、坂口愛、藍原大甫、松末公彦
2. 発表標題 Liver PPAR -dependent microRNA 1 が脂質代謝関連遺伝子の発現に与える影響
3. 学会等名 第 40 回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂口愛、藍原大甫、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 機能未知 T2D1 遺伝子の発現調節機構の解析 - 2 型糖尿病モデルマウスの胃における高発現-
3. 学会等名 第 40 回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾 康平、坂口 愛、藍原 大甫、松末 公彦
2. 発表標題 PPAR を介した脂肪肝発症に關与する microRNA の探索
3. 学会等名 日本薬学会第 144 年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藍原大甫、税所佑太、坂口愛、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 脂肪肝における adipogenin 遺伝子の発現制御 -C/EBP の関与-
3. 学会等名 日本薬学会第 144 年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂口愛、藍原大甫、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 2 型糖尿病モデルマウスの胃で高発現する機能未知 T2D1 遺伝子の発現制御メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第 144 年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松尾 康平、藍原 大甫、松末 公彦
2. 発表標題 Morphine の親電子性代謝物 Morphinone による異物代謝反応に關わる遺伝子群の発現亢進
3. 学会等名 フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藍原 大甫、高田 紘佑、橋本 楓乃、坂口 愛、松尾 康平、松末 公彦
2. 発表標題 脂肪肝で高発現する Osbp13 遺伝子の PPAR による発現調節機構
3. 学会等名 フォーラム 2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 康平、坂口 愛、藍原 大甫、松末 公彦
2. 発表標題 Morphine の親電子性代謝物 Morphinone による AHR および NRF2 シグナルを介した異物代謝反応への影響
3. 学会等名 第 39 回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藍原 大甫、高田 紘佑、橋本 楓乃、坂口 愛、松尾 康平、松末 公彦
2. 発表標題 肝 PPAR の新規標的遺伝子 Osbp13 の発現制御メカニズム
3. 学会等名 第 39 回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾 康平、坂口 愛、藍原 大甫、松末 公彦
2. 発表標題 Morphine の親電子性代謝物 Morphinone が第 1-3 相異物代謝関連遺伝子の発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第 143 年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅田健人、藍原大甫、平井貴壮、坂口愛、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 脂肪肝における Gpmb 遺伝子の PPAR による発現制御 - 肝臓の脂肪蓄積における新規シグナル伝達経路 -
3. 学会等名 日本薬学会第 143 年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藍原大甫、中野明日香、橋本楓乃、坂口愛、松尾康平、松末公彦
2. 発表標題 脂肪肝で高発現する adipogenin 遺伝子の PPAR による発現調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第 143 年会
4. 発表年 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