

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592264

研究課題名(和文) 麻酔薬のオピオイド受容体への作用機序解明

研究課題名(英文) The effect of anesthetics on opioid receptor

研究代表者

南 浩一郎 (Minami, Kouichiro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70279347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：オピオイド受容体へ麻酔薬が影響するかどうか注目されている。今回の研究ではミュー型OR-Gi/qをアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法を用いてオピオイド受容体に対する静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の作用を電気生理学的に比較解析した。ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルランはミュー型OR-Gi/qを濃度依存性に抑制した。静脈麻酔薬プロポフォールはミュー型OR-Gi/qを抑制していないことが明らかとなった。さらに、トラマドールがミュー型OR-Gi/qをダイレクトに活性化しており、アゴニストであることが明らかになった。本研究で麻酔薬がオピオイド受容体へ影響を与える事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The effects of volatile anesthetics and intravenous anesthetics on the mu-opioid receptor functions were analyzed by using oocytes expressing mu-opioid receptors-Gqi5. Volatile anesthetics inhibited the DAMGO-induced Cl⁻ currents at clinically used concentrations. Intravenous anesthetics, ketamine inhibited, but propofol had little effects on it. Tramadol has been used as an analgesic for several decades. mu-opioid receptors are the major receptors that mediate the analgesic effects of opioids. Although mu-opioid receptors have been thought to be one of the sites of action of tramadol, there has been no report that directly proves whether the tramadol is an agonist of mu-opioid receptor or not. In this study, we examined the effects of tramadol and its main active metabolite O-Desmethyltramadol (M1), on the function of mu-opioid receptors using Xenopus oocytes expressing cloned human mu-opioid receptors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔薬 オピオイド受容体 イソフルラン ハロセン トラマドール プロポフォール セボフルラン
アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

現在臨床麻酔は単独の麻酔薬で行わず、鎮痛効果、鎮静効果をそれぞれの麻酔薬を組み合わせるバランス麻酔が主流である。とくに、レミフェンタニールなどの麻酔薬と静脈麻酔薬プロポフォールまたは吸入麻酔薬セボフルランは同時に使用され有効な麻酔法として幅広く使用されている。しかし、どちらの麻酔法が有効なのか臨床麻酔の中では大きな問題であるが結論はでていない。

現在まで、麻酔薬は GABA_A 受容体などのようなりガンド依存型イオンチャンネルが作用を及ぼすことにより薬理効果が得られると考えられていた。しかし、我々の研究グループはムスカリン受容体やサブスタンス P 受容体などの痛みに関する G 蛋白結合型受容体への作用も明らかにして、その薬理機序が多岐にわたることを示してきた。その中でもムスカリン type1 (M1) 受容体のように G 蛋白のサブタイプである G_q 蛋白に結合するものは、麻酔作用に大きく関与していることが明らかとなった。また最近、G 蛋白結合型受容体のなかでもムスカリン受容体 type2 のような G_i 蛋白に結合するものにも麻酔薬は影響することが明らかとなり、同じ G_i 蛋白に結合するオピオイド受容体へ麻酔薬が影響するかどうかについての関心がもたれ始めているが、詳細な検討はまったく行われていない。もし、オピオイド受容体へ麻酔薬が何らかの影響を及ぼすならば、より有効なバランス麻酔にどのような麻酔薬が最適なのかという臨床麻酔に極めて有用な情報が期待される。

一方、アフリカツメガエル卵母細胞発現系は中枢神経系の G 蛋白結合受容体に対する薬剤の作用を検討する実験系として広く使用されている。現在まで、申請者らはアフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用して G_q 蛋白結合受容体に対する麻酔薬の作用を検討してきた。(J. Pharmacol Exp Ther. 281: 1136, 1997; Eur J Pharmacol 339: 237-244, 1997; Mol Pharmacol 53: 148-156, 1998)。また最近、μ または オピオイド受容体 RNA と G_i/G_q キメラ G 蛋白 RNA を結合させて (μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q) アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、G_q 蛋白結合受容体と同じように PLC を介した細胞内 Ca²⁺の変動を利用した解析を可能にした。

2. 研究の目的

今回の私の研究においては、(1) μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法を用いてオピオイド受容体に対する静脈麻酔薬 (プロポフォール、ケタミン、トラマドール、ペントバルビタール) と吸入麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の作用を電気生理学的

に比較解析する。(2) さらに、現在まで吸入麻酔薬は GPCR をリン酸化酵素によって抑制することが報告されているため、オピオイド受容体への機能にもリン酸化酵素によって影響があるかどうかを検討する。(3) さらにさらにコントロールマウスとオピオイドノックアウトマウス (1997年に確立 S オピオイド a et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 1544-9., 1997.) を用いて行動薬理的解析にて、上記静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の作用を比較検討する。

3. 研究の方法

1. μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q に対する静脈麻酔薬、吸入麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の比較検討

μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法を用いて (図 1 参照) オピオイド受容体に対する静脈麻酔薬 (プロポフォール、ケタミン、トラマドール、ペントバルビタール) と吸入麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の作用を電気生理学的に比較解析する。

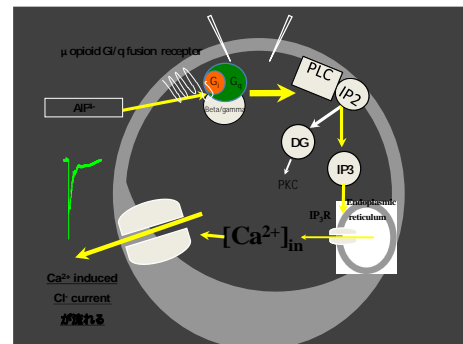


図 1 μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q をアフリカツメガエル卵母細胞発現系に同時に発現させた方法

2. 麻酔薬の μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q に対する抑制効果のメカニズム検討

抑制メカニズムを解明するために以下の実験を行う。

(1) μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q に対する静脈麻酔薬 (プロポフォール、ケタミン、トラマドール、ペントバルビタール) と吸入麻酔薬 (ハロセン、イソフルラン、セボフルラン、エンフルラン) の抑制作用にリン酸化酵素が関与するのかどうかを確かめる。

(2) μ オピオイド-G_i/q または オピオイド-G_i/q に対するリン酸化部位のアミノ酸を

他のアミノ酸へ変換させた受容体を用いてリン酸化が抑制メカニズムかどうかを確認する。

4. 研究成果

μ オピオイド-Gi/q に対する静脈麻酔薬、吸入麻酔薬の比較検討

図1で示した方法を利用して静脈麻酔薬、吸入麻酔薬の μ オピオイド-Gi/q に対する影響を解析した結果多くの麻酔薬が濃度依存性に抑制する事が明らかとなった。今までハロセン、イソフルラン、エンフルランが抑制していることが確認できている。

今回特にセボフルランについては詳細な検討ができた。図2、図3に示した通りにセボフルランは μ オピオイド受容体へ濃度依存性に抑制効果を示している。しかし、静脈麻酔薬のプロポフォールに関してはその抑制効果は認められなかった

図2 セボフルランに対する μ オピオイド受容体に抑制効果

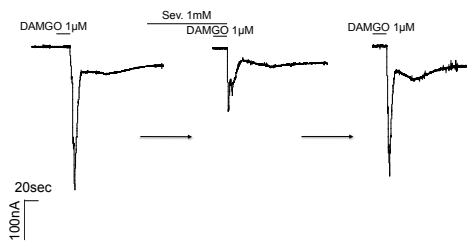
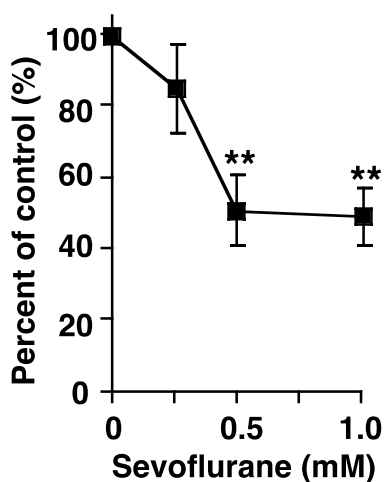


図3 セボフルランに対する μ オピオイド受容体に対する濃度依存性の抑制効果



μ オピオイド-Gi/q または オピオイド-Gi/q に対するセボフルラン、エンフルラン) の抑制作用にリン酸化酵素が関与するのかどうかを確かめたところ、プロテインキナー

ゼC (PKC) の阻害剤 GF109203X の処理を行ってもまったくその抑制効果に影響はなかった。このことから、セボフルランの抑制効果はPKCを介したものであることが明らかとなった。

また、この抑制効果はG蛋白以降のカスケードを活性化させる、 AlF_4^- を細胞内注入における細胞内カルシウム活性化に対してはまったく影響はなかった。

図4 AlF_4^- を細胞内注入における細胞内カルシウム活性化に対する麻酔薬セボフルランの影響

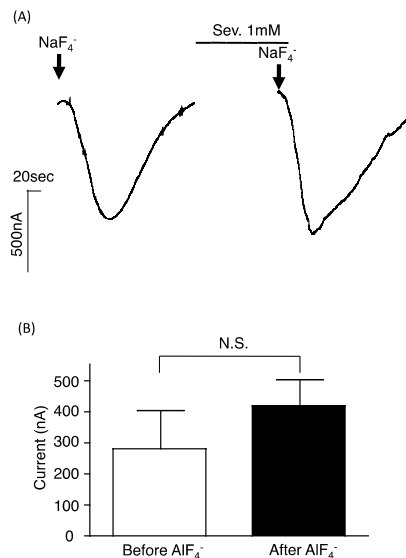
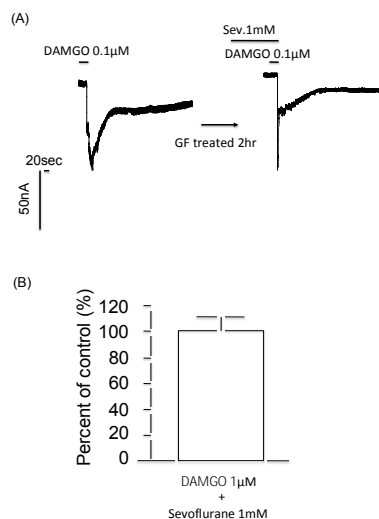


図5 プロテインキナーゼC (PKC) の阻害剤 GF109203X の処理後のセボフルランのオピオイド受容体に対する影響



トラマドールのオピオイド受容体への作用

トラマドールはガン性、慢性疼痛に広く用いられている鎮痛薬である。現在までノルエピネフリンやセロトニン（5HT）の再取り込みを抑制し、下行性抑制系を刺激することやムスカリン受容体、5HT 受容体、アセチルコリン受容体イオンチャンネルに作用することが明らかとなっているが、その薬理機序に関しては結論を得ていない。しかしトラマドールがオピオイド受容体(オピオイド)に対して結合する事は報告されているが、オピオイドに果たして作用しているかどうかは明らかとなっていない。

今回、 μ オピオイドに Gq 蛋白と Gi 蛋白のキメラ G 蛋白 Gqi5 に結合させた RNA (μ オピオイド-Gqi5) をアフリカツメガエル卵母細胞発現系にて発現させ、トラマドール、代謝産物 M1 のオピオイドに対する直接作用を観察した。その結果、非常に興味深い結果を得た。

μ オピオイド-Gqi5 を発現した卵母細胞でトラマドール、M1 刺激で Ca^{2+} 誘導性 Cl^{-} 電流が観察された。これによりトラマドール、M1 は μ オピオイドへの直接の刺激作用であることが明らかとなった。

図6 μ オピオイド受容体に対するトラマドールおよび代謝物 M1 のアゴニスト効果

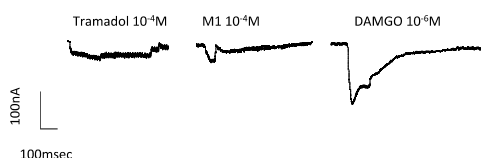
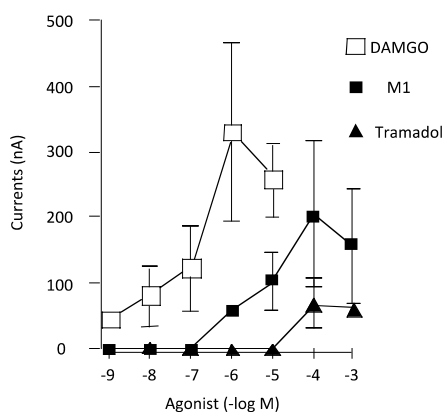


図7 μ オピオイド受容体に対するトラマドールおよび代謝物 M1 のアゴニスト効果-濃度曲線-



トラマドールはオピオイド受容体刺激に加えて、ノルエピネフリンやセロトニンの再取り込みの抑制、G 蛋白受容体抑制などの効果との相乗効果が薬理機序と考えられる。

今回の計画では、 μ オピオイド-Gi/q に対する作用だけでなく、オピオイド-Gi/q に対する抑制効果のメカニズム検討も現在実施しており、アフリカツメガエル卵母細胞系における実験が可能であることを確認している。今後の実験の結果が待たれる。

また、アフリカツメガエル卵母細胞系で得られた結果をコントロールマウスとオピオイドノックアウトマウスを用いて行動薬理的解析にて、上記静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の比較検討することを計画していたが、実行に移すことはできなかった。この解決が今後の課題としてあげられる。

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2件)

Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J, Takeuchi M, Uezono Y.

Sevoflurane inhibits the μ -opioid receptor function expressed in *Xenopus* oocytes.

Pharmacology. 2011;88(3-4):127-32.

doi: 10.1159/000330096.

Epub 2011 Sep 6.

Minami K, Uezono Y.

The recent progress in research on effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptor オピオイド s. J Anesth. 2013 Apr;27(2):284-92.

doi: 10.1007/s00540-012-1507-2.

Epub 2012 Oct 26.

〔学会発表〕(計4件)

南浩一郎、上園保仁、横山徹、尾方純一、竹内謙

日本麻酔学会第58回学術集会

セボフルランの μ オピオイド受容体への影響 (平成23年5月20日神戸)

横山徹、寺脇潔、南浩一郎、竹内謙、上園保仁

日本麻酔学会第59回学術集会

がん悪液質では中枢での浸透圧感受性が変化している：モデルラットを用いた検討 (平成24年6月7~9日神戸)

南浩一郎、須藤結花、上園保仁

日本麻酔学会第60回学術集会

トラマドールはオピオイド受容体を直接作用するアゴニストである

(平成25年5月23~25日札幌)

横山徹、南浩一郎、尾方純一、竹内謙、上園保仁

日本麻酔学会第60回学術集会

バソプレシン分泌ニューロンにおけるセボフルランの効果-ラットを用いた検討(平成25年5月23~25日札幌)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 浩一郎

自治医科大学(医学部)講師

研究者番号: 70279347

(2) 研究分担者

横山 徹

自治医科大学(医学部)助教

研究者番号: 80425321

(3) 連携研究者

上園 保仁

独立行政法人国立がん研究センター(その他部局等)その他

がん患者病態生理研究分野 分野長

研究者番号: 20213340