

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592299

研究課題名(和文)オピオイドおよびカナビノイドと二量体化受容体の相互作用の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of the interaction of heterodimerized m-opioid and CB1 receptors

研究代表者

北條 美能留 (HOJO, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00380957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マリファナは古代より鎮痛を生じる物質として知られており、その主成分であるカナビノイドは、現在でも一部の国では多発性硬化症などの神経疾患患者や、悪性腫瘍やAIDSなどによる終末期の患者で合法的に使用されている。本研究によりモルヒネなどの医療用麻薬が作用するオピオイド受容体とカナビノイドが作用するカナビノイド受容体が二量体を形成することが明らかになり、それぞれ細胞内シグナルに異なる反応性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The marijuana is known as a drug producing for a long time. Cannabinoid CB1 which is the chief ingredient of the marijuana is used in multiple sclerosis and AIDs, cancer patients even now. To visually and biochemically demonstrate the heterodimerization of mOR and CB1R, we carried out confocal microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET), and immunoprecipitation followed by Western blot analysis. We also examined signal transduction pathways activated by dimerized mOR/CB1R with the electrophysiological assay of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels and the measurement of total and phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (ERK).

研究分野：麻酔科学

キーワード：オピオイド カナビノイド 鎮痛 二量体

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マリファナは古代より鎮痛を生じる物質として知られており、その主成分であるカナビノイドは、現在でも一部の国では多発性硬化症などの神経疾患患者や、悪性腫瘍や AIDS による終末期患者で合法的に使用されている。近年、オピオイド受容体を含むいくつかの G 蛋白共役型受容体 (G protein-coupled receptors, GPCR) が二量体として生体に存在することが報告されている。私たちは、カナビノイド受容体もオピオイド受容体と二量体を形成する事を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、オピオイドおよびカナビノイドが、オピオイド μ 、カナビノイド CB₁ で構成される二量体化受容体に与える影響を単量体のそれと比較検討し、各種オピオイドならびにカナビノイド製剤の二量体化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、各種オピオイド、カナビノイド製剤の鎮痛作用ならびにオピオイド製剤自身、抗がん剤による嘔吐作用におけるオピオイド/カナビノイド二量体化受容体の役割を明らかにし、がん患者における QOL の向上に際してのオピオイド製剤やカナビノイド製剤の効果的な使用方法について検討したい。

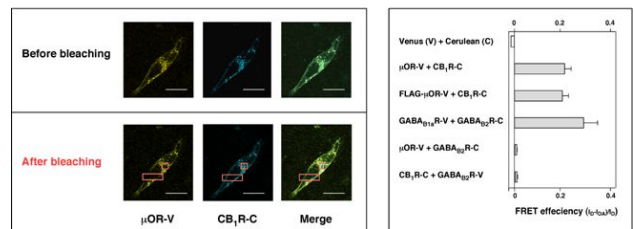
3. 研究の方法

μ -オピオイド受容体、 μ CB₁ 受容体など、二量体化受容体の活性化シグナルのみを測定できるシステム構築し、さらに二量体化受容体の脱感作、受容体細胞内移行を可視化できる実験系を構築する。その後、どの医療用麻薬の組み合わせが二量体化受容体を脱感作なく最大限に活性化できるかどうかを検討する。加えて、カナビノイド製剤のシグナル機構についても詳細に解析する。得られた結果を In Vivo アッセイ系を用いて明らかにする。さらに、 μ オピオイド受容体ノックアウトマウスを用いて、二量体化受容体の生理学的重要性を明らかにする。

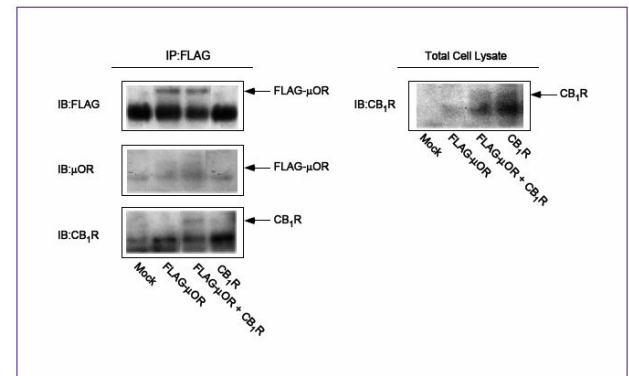
4. 研究成果

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方法を開発し、さらにアフリカツメガエル卵母細胞アッセイ系を用いて、二量体化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た。さらに μ CB₁ 二量体化受容体では同時投与で細胞内シグナルに影響を及ぼすことを見出した。

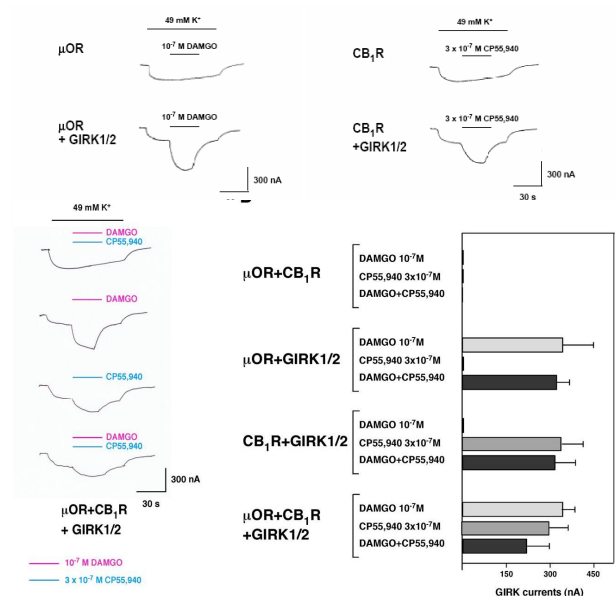
1) FRET and acceptor bleaching analysis of Venus-fused μ OR and Cerulean-fused CB₁R expressed in BHK cells.



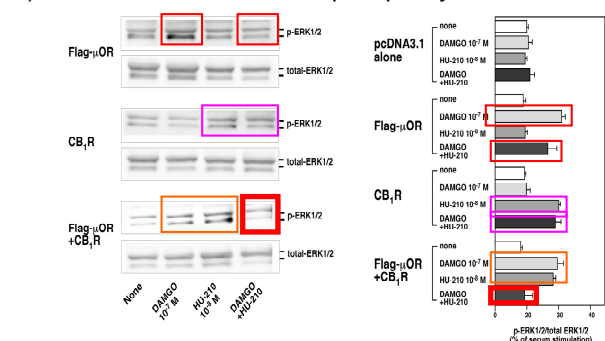
2) Coimmunoprecipitation and western blotting of FLAG- μ OR and CB₁R



3) Responses to DAMGO or CP55940 in Xenopus oocytes expressing μ OR or CB₁R



4) Measurement of ERK1/2 phosphorylation



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

- 1) Miyano, K., Minami, K., Yokoyama, T., Ohbuchi, K., Yamaguchi, T., Murakami, S., Shiraishi, S., Yamamoto, M., Matoba, M., Uezono, Y. Tramadol and its metabolite M1 selectively suppress the activity of the transient receptor potential ankyrin 1, but not that of the transient receptor potential vanilloid 1. *Anesth Analg*, 120: 790-798 (2014). 査読有
- 2) Miyano, K., Sudo, Y., Yokoyama, A., Hisaoka-Nakashima, K., Morioka, N., Takebayashi, M., Shiraishi, S., Nakata, Y., Higami, Y., Uezono, Y. History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. *J Pharmacol Sci*, 126: 302-309 (2014). 査読有
- 3) Motoyama, N., Morita, K., Shiraishi, S., Kitayama, T., Kanematsu, T., Uezono, Y., Dohi, T. Relief of cancer pain by glycine transporter inhibitors. *Anesth Analg*, 119: 988-995 (2014). 査読有
- 4) Horishita, T., Yanagihara, N., Ueno, S., Sudo, Y., Uezono, Y., Okura, D., Minami, T., Kawasaki, T., Sata, T. Neurosteroids allopregnanolone sulfate and pregnanolone sulfate have diverse effect on the α subunit of the neuronal voltage-gated sodium channels $Na_v1.2$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$ and $Na_v1.8$ expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology*, 121: 620-631 (2014). 査読有
- 5) Fujii, H., Hayashida, K., Saitoh, A., Yokoyama, A., Hirayama, S., Iwa, T., Nakata, E., Sudo, Y., Uezono, Y., Yamada, M., Nagase, H. Novel delta opioid receptor agonists with oxazatricyclodecane structure. *ACS Med Chem Lett*, 5: 368-372 (2014). 査読有
- 6) Morita, K., Shiraishi, S., Motoyama, N., Kitayama, T., Kanematsu, T., Uezono, Y., Dohi, T. Palliation of bone cancer pain by antagonists of platelet-activating factor receptors. *PLoS ONE*, 9: e91746 (2014). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0091746
- 7) Okura, D., Horishita, T., Ueno, S., Yanagihara, N., Sudo, Y., Uezono, Y., Sata, T. The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels $Na_v1.2$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$ and $Na_v1.8$ in *Xenopus* Oocytes. *Anesth Analg*, 118: 554-562 (2014). 査読有
- 8) 北條美能留、石井浩二、原哲也、アブストラク舌下錠の特徴と使い方、196-200、緩和ケア、2014年
- 9) 20) 北條美能留、富安志郎ほか、神経障害性疼痛、611-622、ペインクリニック、2014年
- 10) Minami, K., Uezono, Y. The recent progress in research on the effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors. *J Anesthesia*, 27: 284-292 (2013). 査読有
- 11) Narita, M., Imai, S., Nakamura, A., Ozeki, A., Asato, M., Rahmadi, M., Sudo, Y., Hojo, M., Uezono, Y., Devi, L.A., Kuzumaki, N., Suzuki, T. Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state. *Addict Biol*, 18: 614-622 (2013). 査読有
- 12) 村田寛明、村上優子、須藤結花、村上敏史、北條美能留、高田正史、倉田眞治、澄川耕二、上園保仁
すぐれた鎮痛効果を持ちかつ耐性形成を回避する新規モルヒネ髄腔内投与方法の開発 臨床薬理の進歩 34号 78 - 85(2013)査読無
- 13) Suzuki, M., Narita, M., Hasegawa, M., Furuta, S., Kawamata, T., Ashikawa, M., Miyano, K., Yanagihara, K., Chiwaki, F., Ochiya, T., Suzuki, T., Matoba, M., Sasaki, H., Uezono, Y. The sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied expression of substance P and by changes in the μ -opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*, 117: 847-856 (2012). 査読有
- 14) Sudo, Y., Hojo, M., Ando, Y., Takada, M., Murata, H., Kurata, S., Nishida, N., Uezono, Y. GABA_B receptors do not internalize after baclofen treatment, possibly due to a lack of β -arrestin association: Study with a real-time visualizing assay. *Synapse*, 66: 759-769 (2012). 査読有
- 15) 高田 正史, 北條 美能留, 前川 拓治, 三好 宏, 澄川 耕二オキシコドン製剤を使いこなす フェンタニル製剤からオキシコドン注射剤へ切り替えたがん疼痛の2症例、がん患者と対症療法 23巻1号; 65-69. 2012
- 16) 有吉 貴美代, 北原 隆志, 龍 恵美, 高田 正史, 宗像 千恵, 能勢 誠一, 宮永 圭, 樋口 則英, 北條 美能留, 佐々

木 均、徐放性オキシコドン導入時の嘔気・嘔吐における患者リスク因子に関する検討、がん患者と対症療法 23 巻 1 号；65-69. 2012

- 1 7) Imai, S., Sudo, Y., Nakamura, A., Ozeki, A., Asato, M., Hojo, M., Devi, L.A., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Uezono, Y., Narita, M. Possible involvement of β -endorphin in a loss of the coordinated balance of μ -opioid receptors trafficking processes by fentanyl. *Synapse*, 65: 962-966 (2011). 査読有
- 1 8) Minami, K., Sudo, Y., Yokoyama, T., Ogata, J., Takeuchi, M., Uezono, Y. Sevoflurane inhibits the μ -opioid receptor function expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacology*, 88: 127-132 (2011). 査読有
- 1 9) Yokoyama, T., Minami, K., Sudo, Y., Horishita, T., Ogata, J., Yanagita, T., Uezono, Y. Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel $Na_v1.8$, $Na_v1.7$, and $Na_v1.4$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J Anesth*, 25: 609-613 (2011). 査読有
- 2 0) 宮野加奈子, 上園保仁, 仲田義啓. パクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズム. *ペインクリニック* 32: 1491-1498 (2011). 査読無

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 石井浩二、北條美能留、大路牧人、原哲也；頭蓋内アスペルギローマによる症候性三叉神経痛に対する治療経験；日本ペインクリニック学会第 48 回大会、2014 年、東京
- 2) 南浩一郎、須藤結香、上園保仁. 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. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会、ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市) 2013 年 5 月 23-25 日.
- 3) 須藤結香、北條美能留、村田寛明、横山明信、宮野加奈子、鈴木雅美、白石成二、樋上賀一、上園保仁. バクロフェン刺激による $GABA_B$ 受容体の脱感作機構にはアレスチンの会合を伴うインターナリゼーション過程は関与しない. 第 86 回日本薬理学会年会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2013 年 3 月 21-23 日
- 4) 北條美能留：ガイドラインを使いこなす 3 がん疼痛に関するガイドライン 神経障害性疼痛への対応：第 17 回日本緩和医療学会学術大会、2012 年、神戸
- 5) 須藤結香、北條美能留、宮野加奈子、鈴木雅美、寺脇潔、白石成二、西田教行、上園保仁. シグナルペプチド付加 Halotag-GPCR の細胞膜移行と機能的アッ

セイ. 第 85 回日本薬理学会年会、国立京都国際会館(京都府京都市) 2012 年 3 月 14-16 日.

- 6) Sudo Yuka, Hojo Minoru, Ando Yuko, Nishida Noriyuki, Uezono Yasuhito GABAB receptors do not internalize upon activation by baclofen because of lack of their association with arrestin: comparison with μ opioid receptor-mediated signaling *Journal of Pharmacological Sciences*(1347-8613)115,Suppl.1 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市),2011.3.22 - 24
- 7) Uezono Yasuhito, Ando Yuko, Hojo Minoru, Takada Masafumi, Sudo Yuka, Sumikawa Koji S(+)-ketamine suppresses desensitization of GABAB receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of GABAB receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 and 5 *Journal of Pharmacological Sciences*(1347-8613)115, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市),2011.3.22 - 24
- 8) 上園保仁、須藤結香、宮野加奈子、柏瀬陽平、澤田祐美、寺脇潔、鈴木雅美、小柳尚史、白石成二、樋上賀一、西田教行. ラベルフリーで細胞機能をアッセイできるシステム、CellKey™ を用いた各種 GPCR, Ion channel の活性評価. 第 64 回日本薬理学会西南部会、KKR ホテル博多(福岡県福岡市)2011 年 11 月 19-20 日.
- 9) 宮野加奈子、白石成二、須藤結香、鈴木雅美、寺脇潔、上園保仁. Vinblastine と carboplatin は PAK を介して Human TRPA1 を活性化する. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2011 年 10 月 3-5 日.
- 10) 上園保仁. 各種オピオイド製剤によるオピオイド耐性の違いを明らかにする-オピオイド受容体への作用メカニズム解析を通して. 第 5 回日本緩和医療薬学会年会、幕張メッセ(千葉県千葉市) 2011 年 9 月 24-25 日.

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北條 美能留 (HOJO, Minoru)

長崎大学医歯薬総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：00380957

(2)研究分担者

上園 保仁 (UEZONO, Yasuhiro)

国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20213340