

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860200

研究課題名(和文)新規CellKeyアッセイ法によるヘテロ二量体化受容体の特性解析ならびに薬物探索

研究課題名(英文) Establishment of a novel assay for activities of heterodimerized receptors and development of ligands specific to the receptors with CellKey assay system.

研究代表者

須藤 結香 (Sudo, Yuka)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：70646695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、難治性疼痛制御には主にオピオイド製剤が使用されているが、十分な鎮痛効果が得られない例も多く、より効果的な鎮痛療法の開発が求められている。近年オピオイドをはじめとするG蛋白共役型受容体(GPCR)がヘテロ二量体を形成し、単量体とは異なる機能を有することが報告されてきた。このヘテロ二量体に特化する新規疼痛治療法の開発にあたり、本研究は新しいアッセイ法であるCellKeyシステムを用いてオピオイド二量体化受容体の分子メカニズムを解明することを目的とした。現在 $\mu/$ 二量体化受容体に焦点を当て、CellKeyシステムを用いた、より正確で簡便な二量体機能評価法の確立を試みている。

研究成果の概要(英文)：To date, opioid analgesics are often used in the world including Japan for the treatment of severe pain such as cancer pain. However, some patients cannot be obtained sufficient analgesic effects because of the development of tolerance. Accordingly, more effective analgesic therapy without tolerance should be required. Several studies have shown that G protein-coupled receptors (GPCRs) including opioid receptors are able to form receptor heterodimerization, and heterodimer could represent a functional unit distinct from monomeric receptors. This research thus aimed to elucidate the molecular mechanism of functions of heterodimerized opioid receptors. Using the CellKeyTM assay system, we sought to establish a novel, more accurate and convenient assay for the detection of activities for heterodimerized opioid receptors. By this assay, we have been trying to reveal a novel and different properties of heterodimerized $\mu/$ receptors other than those of μ or receptor alone.

研究分野：分子薬理学・分子生物学・代謝学

キーワード：オピオイド GPCR カンナビノイド 二量体

1. 研究開始当初の背景

がん患者の疼痛制御には主に医療用麻薬（オピオイド製剤）が使用されているが、鎮痛補助薬を併用したり、オピオイドを増量しても十分な鎮痛効果が得られない症例もあり、生活の質（QOL）改善のためにはより効果的な鎮痛療法の開発が求められている。近年の G 蛋白質共役型受容体（以下 GPCR）研究により、オピオイド受容体は、 μ - δ など異なるサブタイプ間ならびに他の GPCR とヘテロ二量体を形成する事が明らかとなっており、申請者は各種オピオイド製剤の効果ならびに耐性形成の違いのひとつに、「二量体化オピオイド受容体への作用の違い」が関与しているのではないかという仮説をたて研究を計画した。事実オピオイド受容体以外にも、多くの GPCR が機能的なヘテロ二量体を形成し、単量体やホモ二量体とは異なる特異的な生理機能を持つこと、さらに様々な疾患の成因に關与することなどが明らかとなってきた（*Nat Chem Biol* 5(9):608-9, 2009）。従って、ヘテロ二量体化受容体の作用機序を解明し、その生理的役割を明らかにし、新規薬物の開発を行うことは重要な研究課題である。しかしながら二量体化受容体の「リガンド結合性・細胞内動態・下流シグナル伝達」といった薬理学的特性を正確かつ網羅的に解析することは難しく、正確で簡便な二量体化受容体の機能評価法の確立が不可欠であると考へた。

2. 研究の目的

本研究の目的はオピオイド受容体サブタイプならびにカンナビノイド受容体の種々の組み合わせ等から構成されるヘテロ二量体化受容体の作用機序を解明し、そのメカニズムに基づいた薬物スクリーニングを行い新規鎮痛療法の開発をめざすことである。また研究背景に記述のとおり、当研究の進展には二量体化受容体の薬理学的特性を正確に解析できる新たな評価法が望まれるため、本研究においては GPCR の機能解析に特化した CellKey™ システム (Molecular Devices 社) を応用して、二量体化オピオイド受容体の新規機能アッセイ法の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1). Cellkey システムを用いた GPCR 機能解析法の最適化

ヒト μ 、 δ 、オピオイド受容体ならびにヒト CB1 カンナビノイド受容体を用いて単独受容体発現ベクターを作製し、候補細胞種に導入して一過性あるいは安定発現細胞を作成した。CellKey 解析専用の電極付き 96well プレートに細胞を播種し、特異的アゴニスト処置による細胞のインピーダンス変化波長をリアルタイムに検出し、受容体活性の評価法を確立・最適化を行った。検討項目は宿主細胞種の選択、細胞数、プレートのコーティング条件などに注目して行った。

(2). 二量体化受容体発現細胞株の作成

オピオイド受容体サブタイプならびにカンナビノイド受容体の組み合わせから構成されるヘテロ二量体化受容体発現ベクターを構築することとした。単量体/ホモ二量体とヘテロ二量体化受容体とのシグナルを明確に区別できる二量体化受容体発現細胞アッセイ系を構築するために、両方向性プロモーターを有するベクターを使用し、二種類の受容体発現の比率を統一し、(1)で検討した最適な細胞種を用いて、両者の受容体が同程度に一過性あるいは安定して発現する細胞を作成した。作成した細胞は Western Blotting による蛋白質発現ならびに、アゴニスト処置による G 蛋白質活性を評価して確認することとした。

(3). 二量体化受容体発現細胞を用いた Cellkey アッセイ

(1)で最適化した条件を用い、(2)で作成した細胞を用いて、二量体化受容体発現細胞の G 蛋白質活性を評価した。二量体化受容体発現細胞において、薬物による細胞応答（impedance 変化の波形）が単独発現細胞と比較して異なる反応を示すものを同定することを目的とした。薬物は、活性しうる十分な濃度（1-10 μ M）を固定して用い、「同一濃度における検出波形の違い」を比較することで網羅的な解析を行い、これらの探索的解析で、二量体化受容体の組み合わせならびに特異的化合物が同定されたら、さらにそれらの詳細なメカニズム解析を行うこととした。

また薬物の同定に関しては、既存の評価法も用いた総合的シグナル解析を行い、より信頼性の高いデータを得ることとし、既存の評価系としては、カルシウムイメージング、cAMP アッセイ、MAP キナーゼアッセイ、蛍光蛋白を用いた細胞内動態の観察（internalization/recycling assay）などを用いることとした。

4. 研究成果

(1). 評価方法の条件検討・最適化

ヒト μ 、 δ 、オピオイド受容体ならびにヒト CB1 カンナビノイド受容体を用いて、単独受容体発現ベクターを作製した。構築ベクターを HEK293 細胞に導入し安定発現株を作成した後、CellKey システムを用いて特異的アゴニスト処置による濃度依存的なインピーダンス変化波長を検出し、受容体活性の評価法を確立・最適化を行った。プレートのコーティングは PEI (ポリエチレンジアミン) または PDL (ポリ D リジン) コーティングが最も波形検出に適していた。加えて既存のオピオイド製剤であるモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンについて、各種受容体安定発現株への活性評価を行ったところ、オピオイド受容体のサブタイプにより活性は異なり、CB1 受容体には活性は認められなかった。

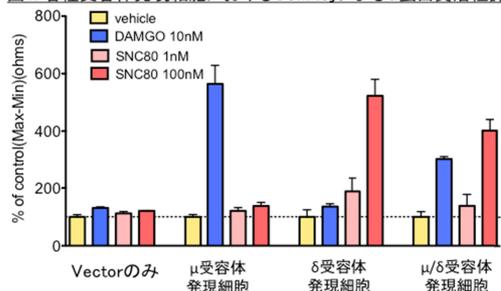
得られた波長は Gi/o 共役型と推定される上向き形状を示し、Gi/o 蛋白質阻害剤である百日咳毒素 PTX で完全に抑制されることを確かめた。二量体化受容体は単量体とは異なるシグナル伝達を引き起こす報告もあるため、グレリン受容体 (Gq) やアドレナリン 2 受容体 (Gs) といった Gi/o 蛋白質以外の共役型受容体の活性も検出可能であるかを確認したところ、各受容体アゴニスト刺激による濃度依存的な波長を検出出来た。

さらに一過性に発現させた細胞と同様、CellKey システムを用いた受容体活性を評価出来るか試みたところ、COS7 細胞を用いたアッセイ条件においてアゴニストに依存したインピーダンス変化波長を検出することができた。HEK293、Neuro2a、BHK、CHO 等の細胞では検出波長が小さく、一過性発現による解析は困難であることも明らかとなった。以上の結果により、一過性発現及び安定発現細胞を用いて受容体活性を評価できる実験系の最適化に成功した。

(2). 二量体化受容体発現細胞株の作成と CellKey システムを用いた薬効評価

二量体化受容体研究で最もその解析が進んでいるヒト μ/δ 二量体化受容体発現細胞株を作製し、CellKey を用いて特異的アゴニスト処置による濃度依存的なインピーダンス変化波長を解析した。その結果、単量体発現株と同様に二量体化受容体発現細胞においては μ 受容体特異的アゴニスト DAMGO、受容体特異的アゴニスト SNC-80 処置によるインピーダンスの変化波長が認められた

図1. 各種受容体発現細胞におけるCellKeyによるG蛋白質活性評価

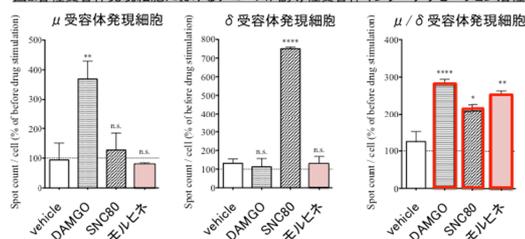


(図1)。しかしながら得られた波長はどちらも単量体発現細胞同様に Gi/o 共役型と推定される上向き形状を示し、Gi/o 蛋白質阻害剤である百日咳毒素 (PTX) で完全に抑制されたことから、単量体とは異なる種類の G 蛋白質を介した活性のは認められなかった。また近年二量体化特異的薬物と報告されている薬物の活性を解析したところ、単量体発現株と同様に、二量体化受容体発現細胞においても μ 、それぞれの活性を確認することができた。しかしその後の詳細な解析により、単量体発現細胞で見られる波形を観察したのみで、単量体とは異なる二量体特異的反応を認め見いだすことはできなかった。そこで、耐性形成に重要な役割を果たしている受容体インターナリゼーション様式に注目し、二量

体化受容体の特性を解析した。

既存の医療用麻薬を処置した際の受容体反応曲線を CellKey により作成した。その結果を元に受容体インターナリゼーション様式の比較解析を併せて行ったところ、フェンタニル、オキシコドン以外のモルヒネのみが単量体受容体での反応とは異なり、二量体化受容体発現株において有意なインターナリゼーションを引き起こすことがわかった (図2)。

図2. 各種受容体発現細胞におけるアゴニスト誘導性受容体インターナリゼーション活性



以上の結果より、 μ/δ 二量体化受容体は単量体受容体と同様に Gi/o 蛋白質を介したシグナルを惹起するが、リガンドによって細胞反応が異なる可能性が示された。また Cellkey システムをインターナリゼーションなど他の解析法と組み合わせることで、より詳細に二量体化受容体の特性を解析できることが考えられた。

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)

Kubota K, Ohtake N, Ohbuchi K, Mase A, Imamura S, Sudo Y, Miyano K, Yamamoto M, Kono T, Uezono Y. Hydroxy- α sanshool induces colonic motor activity in rat proximal colon: a possible involvement of KCNK9. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015 Apr 1;308(7):G579-90. doi: 10.1152/ajpgi.00114.2014. 査読有り

Okura D, Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Minami T, Kawasaki T, Sata T. Lidocaine preferentially inhibits the function of purinergic P2X7 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg*. 2015 Mar;120(3):597-605. doi: 10.1213/ANE.0000000000000585. 査読有り

Okita N, Tsuchiya T, Fukushima M, Itakura K, Yuguchi K, Narita T, Hashizume Y, Sudo Y, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Chronological analysis of caloric restriction-induced alteration of fatty acid biosynthesis in white adipose

tissue of rats. *Exp Gerontol.* 2015 Mar;63:59-66. doi:10.1016/j.exger.2015.01.043. 査読有り

Minami K, Sudo Y, Miyano K, Murphy RS, Uezono Y. μ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1). *J Anesth.* 2014 Nov 14. [Epub ahead of print] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25394761>) 査読有り

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 Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in xenopus oocytes. *Anesthesiology.* 2014 Sep;121(3):620-31. doi:10.1097/ALN.0000000000000296. 査読有り

Fujii H, Hayashida K, Saitoh A, Yokoyama A, Hirayama S, Iwai T, Nakata E, Nemoto T, Sudo Y, Uezono Y, Yamada M, Nagase H. Novel delta opioid receptor agonists with oxazatricyclodecane structure. *ACS Med Chem Lett.* 2014 Jan 27;5(4):368-72. doi:10.1021/ml400491k. 査読有り

Okura D, Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Sata T. The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg.* 2014 Mar;118(3):554-62. doi:10.1213/ANE.0000000000000070. 査読有り

Terawaki K, Sawada Y, Kashiwase Y, Hashimoto H, Yoshimura M, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Yanagihara K, Kase Y, Ueta Y, Uezono Y. New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Feb 15;306(4):E373-87. doi:10.1152/ajpendo.00116.2013. 査読有り

Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Takebayashi M, 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.* 2014;126(4):302-9. doi:10.1254/jphs.14R13CP. 査読有り

〔学会発表〕(計 25 件)

須藤結香、横山明信、宮野加奈子、長瀬隆弘、西村瞳、白石成二、上園保仁、樋上賀一. 種々の GPCR 可視化テクノロジーを用いた GPCR 細胞内動態アッセイ.

(シンポジウム: G protein-coupled receptor (GPCR)の多方面からのアッセイ法による新たな作用機構の解明 - 今なお魅力的な創薬ターゲット、GPCRの新たな役割を探る。)

第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) (2015.3.18-20)

宮野加奈子、須藤結香、横山明信、西村瞳、川合田恵美、佐藤汐莉、根本悦子、中島一恵、竹林実、森岡徳光、白石成二、樋上賀一、藤井秀明、仲田義啓、上園保仁. Cellular dielectric spectroscopy を用いた新たな G タンパク質共役型受容体活性評価.

(シンポジウム: G protein-coupled receptor (GPCR)の多方面からのアッセイ法による新たな作用機構の解明 - 今なお魅力的な創薬ターゲット、GPCRの新たな役割を探る。)

第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) (2015.3.18-20)

成田匠、藤井波木、須藤結香、沖田直之、樋上賀一. カロリー制限による抗老化・寿命延長効果に Srebp-1 が及ぼす影響. 日本ミトコンドリア学会・第 14 回日本ミトコンドリア学会年会. 九州大学 百年講堂 (福岡県・福岡市) (2014.12.3)

西村瞳、宮野加奈子、山川央、川合田恵美、横山明信、須藤結香、白石成二、樋上賀一、長瀬隆弘、上園保仁. アディポネクチン受容体 1 (AdipoR1) シグナルの迅速かつ簡便なアッセイ法の確立.

第 7 回トランスポーター研究会九州部会、産業医科大学ラマツィーニホール (福岡県・北九州市) (2014.11.22)

横山明信、須藤結香、宮野加奈子、白石成二、平山重人、林田康平、藤井秀明、長瀬博、樋上賀一、上園保仁. オピオイド受容体作動薬の新規スクリーニング法の確立及び同法を用いた オピオイド受容体作動薬の探索.
第 7 回トランスポーター研究会九州部会、産業医科大学ラマツィーニホール (福岡県・北九州市)(2014.11.22)

寺脇潔、柳原五吉、澤田祐美、鈴木雅美、宮野加奈子、須藤結香、白石成二、上園保仁. 新規がん悪液質モデルラットの作製及び同モデルに対する漢方薬六君子湯の改善効果.
第 7 回トランスポーター研究会九州部会、産業医科大学ラマツィーニホール (福岡県・北九州市)(2014.11.22)

横山明信、宮野加奈子、須藤結香、西村瞳、山川央、長瀬隆弘、白石成二、樋上賀一、上園保仁. pH 感受性リガンドによる受容体インターナリゼーションアッセイ法の確立及び同法を用いた各医療用麻薬の解析.
第 67 回日本薬理学会西南部会、産業医科大学(福岡県・北九州市)(2014.11.23)

西村瞳、宮野加奈子、山川央、横山明信、須藤結香、白石成二、長瀬隆弘、樋上賀一、上園保仁. アディポネクチン受容体 1 を介した迅速簡便な受容体シグナルアッセイ法確立の試み.
第 67 回日本薬理学会西南部会、産業医科大学(福岡県・北九州市)(2014.11.23)

水之江雄平、須藤結香、沖田直之、樋上賀一. 肥大化した脂肪細胞のオートファジーにおけるリソソーム機能障害.
第 8 回オートファジー研究会. シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)(2014.11.9-12)

沖田直之、成田匠、藤井波木、須藤結香、樋上賀一. カロリー制限における Srebp1c を介した de novo 脂肪酸合成とミトコンドリアバイオジェネシス、酸化ストレスの関連. 日本基礎老化学会・第 36 回日本基礎老化学会シンポジウム. 東海大学 高輪キャンパス (東京都・港区) (2014.10.26)

横山明信、宮野加奈子、須藤結香、西村瞳、川合田恵美、佐藤汐莉、根本悦子、平山重人、藤井秀明、山川央、長瀬隆弘、白石成二、樋上賀一、上園保仁. 各種オピオイド製剤の薬理学的特性の解明 - オピオイド受容体安定発現細胞を用いた in vitro 研究 -.
第 131 回日本薬理学会関東部会、横浜

市立大学福浦キャンパス(神奈川県・横浜市)(2014.10.11)

Arisa Negishi, Yuhei Mizunoe, Yuka Sudo, Yoshikazu Higami. Inhibition of autophagy by fatty acids in hepatocyte. 第 37 回基礎老化学会. あいち健康プラザ 健康科学館 (愛知県・名古屋市)(2014.6.26-27)

Ryota Miyakawa, Yuka Sudo, Hiroki Otuka, Akihumi Goto, Yohei Kashiwase, Yasuhito Uezono, Yoshikazu Higami. Lipid metabolism in cancer cachexia and caloric restriction in adipose tissue, effects of Rikkunshito. 第 37 回基礎老化学会. 名古屋・あいち健康プラザ 健康科学館 (愛知県・名古屋市)(2014.6.26-27)

Yuhei Mizunoe, Yuka Sudo, Naoyuki Okita and Yoshikazu Higami. ROS-ASSOCIATED LYSOSOMAL DYSFUNCTION IMPAIRES AUTOPHAGY FLUX AND ADIPOKINE PROFILE IN ADIPOCYTES. 2014 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and The 13th Kprea-Japan Gerontologist Joint Meeting. 韓国・濟州島・Nugavillage, Jeju Island (2014.6.19-21)

Kono, T., Kubota, K., Ohbuchi, K., Mase, A., Sudo, Y., Miyano, K., Yamamoto, M., Uezono, Y. Hydroxy-sanshool evokes unique colonic migrating motor complex in rat proximal colon via blocking of a two-pore domain potassium channel, KCNK9, in myenteric neurons. Digestive Disease Week 2014, Chicago, USA (2014.5.4-6)

横山明信、須藤結香、平山重人、樋上賀一、藤井秀明、上園保仁. オピオイドリガンドの新規スクリーニング法確立と同法を用いた 受容体サブタイプとオピオイド受容体ヘテロダイマーの相関解析 第 66 回日本薬理学会西南部会、福岡大学薬学部 17 号館(福岡県・福岡市)(2013.11.16)

柏瀬陽平、寺脇潔、鈴木雅美、宮野加奈子、須藤結香、白石成二、樋上賀一、加瀬義夫、柳原五吉、上園保仁. 新規がん悪液質モデルラットでのグレリン抵抗性の発現および漢方薬六君子湯によるグレリンシグナルを介した症状改善効果 第 66 回日本薬理学会西南部会、

福岡大学薬学部 17号館(福岡県・福岡市)(2013.11.16)

横山明信、須藤結香、平山重人、樋上賀一、藤井秀明、上園保仁. オピオイドリガンドの新規スクリーニング法確立および受容体サブタイプとオピオイド受容体ヘテロダイマーと相関解析 第33回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、神戸大学医学部会館(兵庫県・神戸市)(2013.9.6-7)

Namiki Fujii, Naoyuki Okita, Yoshikazu Chujo, Takumi Narita, Masahiro Sakai, Yuka Sudo, Yoshikazu Higami. SREBP-1c IS REQUIRED FOR LIFE-LONG CALORIC RESTRICTION-INDUCED MITOCHONDRIAL BIOGENESIS IN WHITE ADIPOSE TISSUE OF MICE. APDO Symposium 2013 Tokyo, Tokyo international Forum (2013.10.12-13)

Yuhei Mizunoe, Kentaro Mikami, Naoyuki Okita, Tomohiro Narahara, Arisa Negishi, Miki Yoshida, Yuka Sudo, Yoshikazu Higami. Autophagic flux is suppressed via ROS in differentiated and hypertrophic adipocytes. APDO Symposium 2013 Tokyo, Tokyo international Forum (2013.10.12-13)

⑳ 須藤結香、水之江雄平、三上健太郎、奈良原誠大、根岸亜梨沙、吉田実樹、沖田直之、樋上賀一. オートファジーは脂肪細胞におけるアディポカイン分泌バランスを改善する. 日本肥満学会・第18回アディポサイエンスシンポジウム・千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)(2013.8.24)

㉑ 土屋拓郎、沖田直之、須藤結香、樋上賀一. カロリー制限がミトコンドリアおよび脂質代謝に及ぼす影響の経時的解析. 日本基礎老化学会・第36回大会・大阪国際会議場(大阪府・大阪市)(2013.6.4-6)

㉒ 成田匠、藤井波木、沖田直之、須藤結香、樋上賀一. Srebp-1c はカロリー制限(CR)による抗老化・寿命延伸効果に重要である. 日本基礎老化学会・第36回大会・大阪国際会議場(大阪府・大阪市)(2013.6.4-6)

㉓ 水之江雄平、三上健太郎、沖田直之、須藤結香、樋上賀一. 脂肪細胞におけ

るオートファジーの役割. 日本基礎老化学会・第36回大会・大阪国際会議場(大阪府・大阪市)(2013.6.4-6)

㉔ 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、札幌市教育文化会館等(北海道・札幌市)(2013.5.23-25)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
須藤 結香 (SUDO, Yuka)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：70646695