

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04323

研究課題名(和文) 麻薬の鎮痛耐性を防げるか？ オピオイド受容体高次シグナル複合体研究と治療応用

研究課題名(英文) Can we prevent analgesic tolerance to morphine? Study of high-order opioid receptor signal complex and its clinical application.

研究代表者

奥水 崇鏡 (Koshimizu, Taka-aki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20392491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本研究課題において、医療用麻薬の鎮痛効果が減弱する耐性が獲得される機序を解明し、対策を提示することに成功した。すなわち、V1b遺伝子欠損動物の延髄腹側においてモルヒネの鎮痛効果が上昇していることを契機に、 μ オピオイド受容体とV1b受容体がアレスチンを含む3者の複合体を形成している可能性を見出した。さらに、V1b遺伝子欠損の効果が、V1b拮抗薬が有効であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続する痛みに繰り返し医療用麻薬を使用すると、鎮痛効果の減弱(耐性)を来す。臨床では、耐性を避けるために医療用麻薬の投与量を増加させたり、他の麻薬を使用するオピオイドローテーションの対策が取られているが、耐性を減弱させる手段は限られる。安全性を保ったまま非癌性慢性疾患にオピオイド鎮痛薬を使用するプロトコルや、科学的知見に基づく共通認識は十分でなく、過量投与や麻薬への依存症を増加させた。我々は、耐性を減弱させてより効果的な鎮痛治療を可能にする、V1b拮抗薬の働きを世界で初めて見出した。

研究成果の概要(英文)：We successfully discovered how V1b vasopressin receptor regulates a process of development of morphine tolerance. V1b receptor complexed with mu-type opioid receptor and enhanced morphine tolerance. Antagonist of V1b receptor was effective to reduce the morphine tolerance. We also found that morphine tolerance was delayed in mice lacking V1b receptors. In the rostral ventromedial medulla, transcripts for V1b and mu opioid receptors are localized. Complex formation among V1b, β -arrestin 2 and mu-receptor resulted in ERK phosphorylation and adenylate cyclase sensitization by morphine and vasopressin. Leucine-rich segment in the V1b carboxyl-terminus was necessary for the association with β -arrestin 2. Our findings indicate that inhibition of V1b receptor, which is complexed with mu receptor, is a molecular target to enhance morphine analgesia without increasing analgesic tolerance.

研究分野：受容体分子薬理学

キーワード：鎮痛耐性 医療用麻薬 受容体 オピオイド バゾプレッシン ゲノム編集 アデニレートサイクラーゼ アレスチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オピオイド麻薬が持つ強い鎮痛効果は、繰り返し投与により減弱する。この減弱（鎮痛耐性）を防ぎ、麻薬投与量の増量を避ける事で、副作用の危険を軽減することは研究申請時点では不可能であった。鎮痛耐性の機序は、これまでに2つの説により説明されてきた。第一に、モルヒネで刺激されたオピオイド受容体がリン酸化されて機能を失う脱感作、第二に、モルヒネがアデニレートサイクラーゼ（AC）を抑制し続けた結果、この酵素活性が反動的に増大した、スーパーアクチベーション（高感受性）である[1]。しかしこの2つでは説明できない大きな疑問点が残っていた。すなわち、 μ -オピオイド受容体受容体が脱感作するためには、受容体とアレスチンとの相互作用が必要である。しかし、モルヒネはこの相互作用を起こす能力が極めて低いことが知られる。また、アデニレートサイクラーゼ酵素がスーパーアクチベーションを来す機序は不明である。これらの未解決の問題は“アレスチンパラドクス”と呼ばれていた。

申請者らは、これまで鎮痛とは関連が知られていないホルモン受容体の欠損動物において、野生型と比較して1)痛みを感じにくく、2)鎮痛麻薬には感受性が高く、3)モルヒネの鎮痛耐性が減弱している、といったユニークな性質を見出した(図1)。本研究では、この受容体欠損動物の知見を鎮痛治療に応用するための研究を展開した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の“アレスチンパラドクス”に挑み、古来より人類を悩ませてきた鎮痛耐性の分子基盤を明らかにする。そのために以下の2点を解決することを目標とした。1)内因性オピオイドの感受性を上昇させて、痛みを感じる閾値を上昇させる。さらに、2)薬として投与された麻薬の鎮痛効果を持続させ、鎮痛耐性を防ぐ方法を開発する。これらより、鎮痛を担うオピオイド受容体を生かしたままに、非オピオイド受容体を遮断し、痛み閾値と鎮痛持続をコントロールする全く新しい鎮痛療法を世界で初めて提示する。

3. 研究の方法

痛みを感じにくく耐性が生じにくいV1b受容体欠損動物を使用し、鎮痛耐性に重要なV1bの脳部位と機序を見出す。さらに、V1b拮抗薬を用いて鎮痛効果を持続させる手段を開発する。具体的には、

- 1) V1b受容体と μ -オピオイド受容体の脳内分布を明らかにする。
- 2) 受容体相互作用を介し鎮痛耐性を増強する分子を、リガンド、Gタンパク質、アレスチン、リン酸化シグナルの各段階で機能阻害して解明し、シグナル複合体の構成分子を同定し再構成する。
- 3) 耐性を促進できないV1b変異体を作成し、その分子機序を同定する。
- 4) オピオイド受容体機能は保ちつつ、V1b遮断薬で鎮痛耐性を防ぐ鎮痛療法を確立する。

4. 研究成果

(1) In situ hybridizationによる発現分布検索；mRNAの1分子から検出可能なRNA Scopeシステムを用い、 μ -オピオイド受容体とV1b受容体の発現分布を検索したところ、下行性痛覚抑制経路に属する中脳腹側に、両受容体を共発現する神経細胞を検出した[2]。

(2) Crispr/Cas9を用いたタグ抗原付V1b受容体の発現解析；受容体を含む膜蛋白質に対する良い抗体を得ることは容易でない。我々はV1b受容体に対する抗体を、複数の部位を抗原として作成を試みた。しかし、特異性が高い抗体を得ることは不可能であった。そこで、ゲノム編集により受容体機能を保ちつつ受容体カルボキシル基末端に既知のHAタグ抗原を挿入し、十分に親和性の高い抗HAタグ抗体を用いて受容体の細胞分布を解明することを試みた。そこで、受精卵へのCas9とguideRNAのインジェクションを行い産仔を得た。その中で予想した通り、Cas9で切断したV1b受容体配列にHAタグ抗原配列を組み込むことに成功した。

(3) 受容体複合体の証明；V1b受容体と μ -オピオイド受容体が共発現する脳内の神経細胞において、両受容体が直接の相互作用を及ぼす距離に局在するか解明する。そのために、各受容体とルシフェラーゼタンパク質、蛍光タンパク質をカルボキシル基末端にそれぞれ融合させた。ルシ

図1 V1b受容体欠損動物における熱痛み刺激への感受性低下

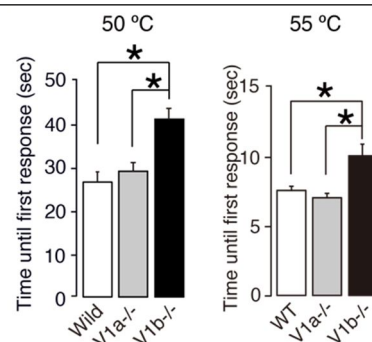
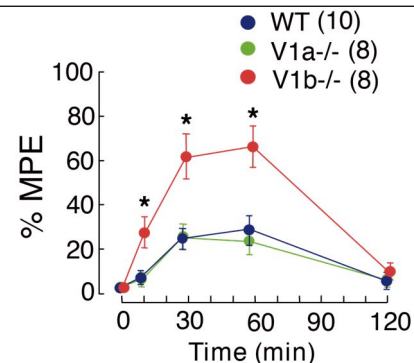
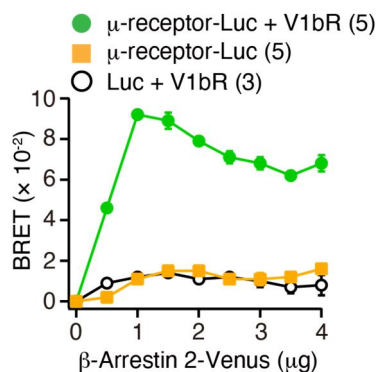
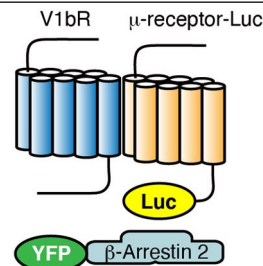


図2 V1b欠損動物はモルヒネ鎮痛に対する感受性が上昇している。モルヒネ 10mg/kg 投与におけるTail flick試験



フェラーゼによる発光から蛍光タンパク質への振動エネルギー移動を観察して受容体が複合体を形成することを見出した。さらに、 μ オピオイド受容体と V1b 受容体が、アレスチンを含む 3 者の複合体として存在する可能性が高いことを見出した[2]。しかし、 μ 受容体とアレスチンは直接相互作用はなく、V1b がアレスチンと μ 受容体の橋渡しをしていると考えられた(図 3)。

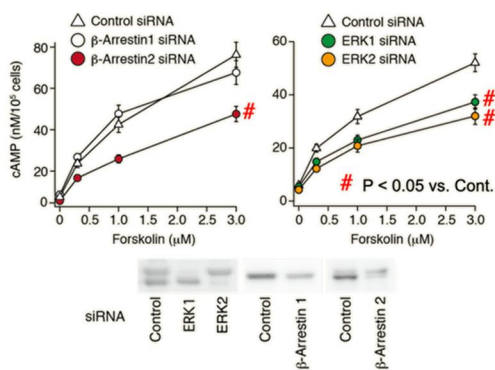
図 3 V1b- μ 受容体と アレスチン 2 の複合体形成が示唆された
V1b 受容体存在下、 μ 受容体-luciferase と アレスチン 2-Venus での光共鳴エネルギー移動検出



(4) 脳内局所への V1b 受容体拮抗薬投与；V1b 受容体遺伝子欠損動物で観察されたモルヒネ鎮痛耐性の減弱が、V1b 遺伝子の欠損によって起こる二次的な影響である可能性を排除した。すなわち、野生型マウスの脳内で V1b 受容体の発現が検出された箇所、V1b 受容体拮抗薬を投与したところ、鎮痛耐性の減弱が再現されることが判明した。また、側脳室に V1b 受容体拮抗薬を投与し、広く脳内の V1b 受容体を阻害した場合、鎮痛耐性が減弱することも見出した。

(5) 耐性獲得の生化学マーカーによる評価；耐性を獲得した脳組織では、アデニレートサイクラーゼが刺激に過剰反応する状態(スーパーアクチベーション)となっている。この場合、 μ -オピオイド受容体が Gi を介し、アデニレートサイクラーゼの活性を抑制する効果が減弱する。我々は、V1b 遺伝子欠損と V1b 拮抗薬の処置が、鎮痛耐性の減弱と合わせ、スーパーアクチベーションも抑制していることを、cAMP 測定を通じ見出した。このシグナルには、アレスチン 2 と ERK が関与することが、ノックダウンを用いた実験より明らかとなった(図 4)。細胞内 cAMP 計測の実験系は、ランタニドキレートと Alexa647 との間で起こる、光振動エネルギー移動の時間分解測定を行う実験系を使用した。

図 4 アレスチン 2 と ERK を介する耐性シグナル
siRNA によるノックダウンにより、AC 高感受性の抑制が見られた



(6) モルヒネの結合親和性に与える影響の解析；オピオイド受容体への親和性を解析する際、放射線標識リガンドと未標識オピオイド化合物、受容体発現細胞からの膜分画試料の 3 種類を用いて結合実験を行った。ここに、V1b 受容体を共発現させヘテロマー受容体の形成が考えられ、バゾプレッシンを加えて結合実験を実施した。バゾプレッシンは単独では標識オピオイドリガンド [³H]Naloxane の結合には影響を与えず、モルヒネと共存した場合にモルヒネの親和性を上昇させることが判明した。よって受容体直接相互作用により、バゾプレッシンのアロステリック効果がモルヒネの親和性を変化させる意外な結果を得た[2]。

(7) アレスチンに依存する細胞内情報伝達の解析；G タンパク質に依存せず、アレスチンを介する細胞内シグナルが、受容体複合体形成により変化するが、3 種類の MAP キナーゼのリン酸化状態を指標に評価した。アレスチンを介する場合には、ERK のリン酸化が 30 分以上持続する。我々は、モルヒネとバゾプレッシンの共存によって、有意にリン酸化が増強され、持続も長くなることを見出した。即ち、V1b- μ 受容体複合体は、アレスチン 2 タンパク質を介して ERK リン酸化シグナルを惹起することが明らかとなった[2]。

(8) 受容体細胞内局在変化の解析； μ -オピオイド受容体の細胞内への移動は、受容体の脱感作を解除するために重要である。V1b 受容体は多くが非刺激時に内在化しており、V1b- μ 受容体複合体により、 μ 受容体は多くが内在化することが判明した[2]。

(9) 麻薬耐性細胞モデルでの解析；麻薬耐性の細胞レベルでのモデルとして、cAMP 産生のスーパーアクチベーションを指標に受容体相互作用の影響を単独受容体と比較した。モルヒネと共存するバゾプレッシンの濃度を高めることでスーパーアクチベーションが高度になることが判明した。

(10) ヘテロマー受容体を含む高次シグナル複合体の構成タンパク質同定；FLAG 及び His タ

グを其々V1b、 μ -オピオイド受容体に付加し、細胞株に発現させる。アフィニティクロマトグラフィーにより2種のタグ抗体を利用してタンデムに蛋白質複合体を精製して複合体を証明した。同定したシグナル複合体の構成成分には蛍光タンパク質を付加して発現させ、実際に細胞内でお互いが近傍に位置することを光振動エネルギー移動を指標に確認した。V1b- μ -オピオイド受容体ヘテロマーには、アレスチン2が相互作用することが判明した。

(11) V1b受容体の変異体で、アレスチン2との相互作用が低下しているものを作成した。その場合、V1b変異体- μ 複合体受容体では、cAMP産生のスーパーアクチベーションが減弱することが判明した。さらに、この変異体を発現するマウスをCrispr/Cas9システムで作成した。その上でモルヒネを反復投与してTail Flickの潜時を調べたところ、野生型と比較して耐性が起こりにくく、医療用麻薬の鎮痛効果がより保たれることが判明した[2]。

以上の如く、麻薬鎮痛薬の耐性獲得機序の一端を解明することに成功し、V1b受容体拮抗薬が病状の軽減に役立つ可能性を見出し、意義ある研究成果を残すことができたと考える。

<引用文献>

1. Williams, J.T., et al., Regulation of mu-Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 2013. **65**(1): p. 223-54.
2. Koshimizu, T.A., et al., Complex formation between the vasopressin 1b receptor, beta-arrestin-2, and the mu-opioid receptor underlies morphine tolerance. *Nat Neurosci*, 2018. **21**(6): p. 820-833.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koshimizu TA, et al.	4. 巻 21(6)
2. 論文標題 Complex formation between the vasopressin 1b receptor, -arrestin-2, and the μ -opioid receptor underlies morphine tolerance.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Neurosci.	6. 最初と最後の頁 820-833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-018-0144-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Campos-Lira E, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Dynamic Modulation of Mouse Locus Coeruleus Neurons by Vasopressin 1a and 1b Receptors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2018.00919	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 該当する
1. 著者名 Nemoto D, et al.	4. 巻 5(6)
2. 論文標題 Topical lidocaine inhibits spasm during colonoscopy: a double-blind, randomized controlled trial (with video)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endosc Int Open	6. 最初と最後の頁 E402-E407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0043-105489	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 Giesecke Torsten, Himmerkus Nina, Leipziger Jens, Bleich Markus, Koshimizu Taka-aki, F?hling Michael, Smorodchenko Alina, Shpak Julia, Knappe Carolin, Isermann Julian, Ayasse Niklas, Kawahara Katsumasa, Schmoranzler Jan, Gimber Niclas, Paliege Alexander, Bachmann Sebastian, Mutig Kerim	4. 巻 30
2. 論文標題 Vasopressin Increases Urinary Acidification via V1a Receptors in Collecting Duct Intercalated Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 946 ~ 961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018080816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Nuttawadee Ngamlertwong et. al.
2. 発表標題 mu-オピオイド受容体-V1bバゾプレシン受容体複合体と相互作用するbeta-アレスチンの解析
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujianti Casmad et. al.
2. 発表標題 V1a vasopressin receptor deficient mice as a model for accelerated aging
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sajjaviriya Chortip
2. 発表標題 Computer vision analysis and deep learning of maternal behavior in mice
3. 学会等名 第34回日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nuttawadee Ngamlertwong et. al.
2. 発表標題 Opioid-promoted complex involves mu-opioid and V1b receptors and beta-arrestin 2
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 森生、奥水崇鏡
2. 発表標題 ラット下垂体前葉の内分泌細胞が接する基底膜を構成するラミニン分子の役割
3. 学会等名 第141回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sajjaviriya Chortip
2. 発表標題 Deep learning model for analysis of maternal behavior in mice
3. 学会等名 第30回バソプレシン研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥水崇鏡、Chortip S、Fujianti C、Nuttawadee N、藤原葉子、東森生、土屋裕義、谷口淳一
2. 発表標題 オピオイド鎮痛耐性におけるV1bバソプレッシン受容体複合体の機能解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyoshi Tsuchiya et. al.
2. 発表標題 バソプレッシンV1a受容体欠損マウスが示す離乳後の体重減少
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ngamlertwong Nuttawadee et. al.
2. 発表標題 Analysis of interaction between dimerized receptor and beta-arrestin
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 森生、輿水 崇鏡
2. 発表標題 ラット下垂体前葉の内分泌細胞は基底膜成分ラミニン 3鎖および 5鎖に反応する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koshimizu TA et. al.
2. 発表標題 Analysis of interaction between dimerized receptor and receptor-interacting protein
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuchiya H et. al.
2. 発表標題 V1a vasopressin receptor involved in the uterus contraction
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki M et. al.
2. 発表標題 コンピュータービジョンと深層学習を用いたバゾプレッシン受容体遺伝子改変動物の 行動解析
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koshimizu TA et. al.
2. 発表標題 V1bバゾプレッシン受容体高次複合体によるオピオイド鎮痛の調節
3. 学会等名 第139回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 輿水崇鏡
2. 発表標題 バゾプレッシン研究最前線：受容体データサイエンスからの期待と展望
3. 学会等名 東京腎生理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 NgamIertwong et. al.
2. 発表標題 Allosteric effect of Vasopressin on Carboxyl termini of homomeric V1a receptor dimers
3. 学会等名 第29回バゾプレッシン研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥水崇鏡、Chortip S、Fujianti C、Nuttawadee N、藤原葉子、東森生、土屋裕義、谷口淳一
2. 発表標題 マシンインテリジェンスによるバソプレシン受容体欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 第29回バソプレシン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ngamlertwong et. al.
2. 発表標題 Vasopressin suppress mutual interaction between cytoplasmic tail of V1a receptors
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taka-aki Koshimizu, Kenji Honda, and Yukio Takano
2. 発表標題 Regulation of morphine sensitivity and adenylyl cyclase sensitization by carboxyl-terminus of V1b vasopressin receptors
3. 学会等名 International Narcotics Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土屋裕義、北條寛典、杉本幸彦、Ngamlertwong Nuttawadee、藤原葉子、奥水崇鏡
2. 発表標題 マウス視床下部神経細胞の突起形成へのプロスタグランジンD2 の作用
3. 学会等名 日本下垂体研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹井隆太郎、宮崎葵、奥水崇鏡
2. 発表標題 分子系統樹を用いた、オーファンGタンパク質共役型受容体の機能予測
3. 学会等名 自治医大シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Torsten Giesecke, Taka-aki Koshimizu, et al.
2. 発表標題 Comparative analysis of vasopressin V1a receptor distribution in rodent and human kidneys
3. 学会等名 2017 Kidney Week (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥水崇鏡
2. 発表標題 バゾプレッシンV1b受容体の痛覚における新知見と応用
3. 学会等名 氷川フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥水崇鏡、Nuttawadee Ngamlertwong、藤原葉子、土屋裕義、谷口淳一
2. 発表標題 痛みに関わるV1bバゾプレッシン受容体高次複合体の機能解析
3. 学会等名 バゾプレッシン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Aki Kashiwazaki, Taka-aki Kashimizu, Masaru Tanaka
2. 発表標題 Zwitterionic Polymers for Peptide Hormone Delivery to the Intracellular G-Protein Coupled Receptors
3. 学会等名 Biomaterials International 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥水崇鏡
2. 発表標題 バゾプレッシン受容体高次複合体の基礎と臨床
3. 学会等名 薬師寺腎臓セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>自治医科大学医学部薬理学講座分子薬理学部門 http://www.jichi.ac.jp/molpharm/ 自治医科大学研究情報 http://www.jichi.ac.jp/news/research/2018/20180509.html 福岡大学研究ニュース https://www.fukuoka-u.ac.jp/research/column/18/05/02090825.html 毎日新聞記事 (令和2年6月15日確認) https://mainichi.jp/articles/20180502/ddl/k09/040/115000c 第32回 日本下垂体研究会学術集会 http://www.jichi.ac.jp/jspr/2017/</p>
--

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
研究 分 担 者	土屋 裕義 (Tsuchiya Hiroyoshi) (80508755)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	東 森生 (Azuma Morio) (90709643)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	