

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11114

研究課題名(和文)オピオイド鎮痛機構の小胞体分子シャペロンによる制御

研究課題名(英文)Pharmacological Chaperones Attenuate the Development of Opioid Tolerance

研究代表者

青江 知彦 (Tomohiko, Aoe)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：90311612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウスの熱侵害受容応答を評価することにより、オピオイド耐性に対する薬理的シャペロンの効果を調べた。タウロウルソデオキシコール酸や4-フェニル酪酸などの薬理的シャペロンは、モルヒネ耐性形成を抑制し、鎮痛効果を回復させた。シャペロン投与だけでは鎮痛作用はなかった。モルヒネ投与は、GSK3 が不活性状態にあるときに鎮痛を誘発したが、シャペロンの同時投与は、GSK3 の不活性状態を維持した。これらから小胞体ストレスがMORシグナルに影響して、モルヒネ耐性を促進する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モルヒネを始めとするオピオイドは優れた鎮痛薬であるが、慢性疼痛疾患への連用では耐性や痛覚過敏性の形成が問題となり得る。本研究でオピオイド耐性形成に小胞体ストレスが関与することが示唆され、また、小胞体ストレスを緩和する薬理的シャペロンの併用使用により、鎮痛作用が保たれることが明らかになった。癌性疼痛などに対するオピオイド製剤の使用に際し薬理的シャペロンの併用が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that signaling from the endoplasmic reticulum (ER) stress contributed to the development of morphine tolerance. We examined the effects of pharmacological chaperones that alleviate ER stress on opioid tolerance development by assessing thermal nociception in mice. Pharmacological chaperones such as tauroursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate suppressed the development of morphine tolerance and restored analgesia. Chaperones alone did not cause analgesia. Although morphine administration induced analgesia when glycogen synthase kinase 3 (GSK3) was in an inactive state due to serine 9 phosphorylation, repeated morphine administration suppressed this phosphorylation event. Co-administration of chaperones maintained the inactive state of GSK3. These results suggest that ER stress may facilitate morphine tolerance due to intracellular crosstalk between the UPR and MOR signaling. Pharmacological chaperones may be useful in the management of opioid misuse.

研究分野：疼痛学

キーワード：オピオイド 慢性疼痛 下行性疼痛抑制系 痛覚過敏 耐性

1. 研究開始当初の背景

β -endorphineなどの内因性オピオイドやモルヒネなどの外因性オピオイドは主として μ オピオイド受容体 (MOR) を介して、鎮痛作用を発現する。MORは求心性神経線維の末梢では、侵害受容器におけるインパルスの発生を抑制する。一次求心性神経の神経終末では、presynapticに神経伝達物質の分泌を抑制する。また、脊髄後角の二次求心性神経にも発現し、postsynapticに痛みの情報伝達を抑制する。上位中枢にも広く発現し、視床や大脳皮質などの侵害受容ニューロンに作用し、痛覚情報伝達を抑制する(2)。また、脳 anterior cingulate cortex (ACC)領域や中脳水道周囲灰白質(periaqueductal gray :PAG)では、GABA作動性抑制性介在ニューロンに発現するMORが活性化すると脱抑制が起こり、下行性疼痛抑制系が賦活化され、脊髄後角細胞の興奮伝達を抑制する(1)。

μ オピオイド受容体はGTP結合蛋白質 (G蛋白) 共役型受容体で、細胞膜を7回貫通する複雑な構造を持つ(3)。 β -endorphineによってMORが刺激されると、G蛋白を介して神経細胞の興奮は抑制される。また、adenylyl cyclaseの抑制、phospholipase Cの活性化、MAPキナーゼ、AP1複合体の活性化などの細胞内情報伝達が起こる。一方、MORはG protein coupled receptor kinase (GRK) によってリン酸化され、arrestinとの結合を介して細胞内に内在化される。MORは、これによってG蛋白細胞内情報伝達系と一時的に遮断され (desensitization)、一部はリソゾームで分解されるが、数分から数十分で再び細胞表面に発現し、G蛋白と共役した活性型に戻る (resensitization)。一方、モルヒネが細胞表面のMORに結合した場合は、鎮痛作用が発現されるが、GRKによるMORのリン酸化やarrestinとの結合の程度は弱く、細胞内への内在化が起こり難い。このためモルヒネの連続使用によって細胞表面のMORを介する持続的な刺激入力に細胞内情報伝達系に変化を起こし、鎮痛作用が弱まり、耐性、依存、痛覚過敏が生じると考えられる(2)。

我々は、モルヒネ連用による耐性形成に小胞体ストレスが関与する事を小胞体シャペロンの遺伝子変異マウスの解析によって明らかにした(4)。MORを始め細胞表面受容体などの膜蛋白や分泌蛋白は小胞体膜上で合成され、小胞体に挿入される。小胞体に局在する分子シャペロンである immunoglobulin binding protein (BiP)等との相互作用によって折り畳み構造が形成され、糖鎖付加、複合体形成がなされ、機能的にも成熟して小胞体から分泌される。こうした過程が虚血、再灌流、低栄養、低酸素、毒物などの外界からの侵襲や遺伝子変異によって阻害されると小胞体内に異常な蛋白質が蓄積し、IRE1、PERK、ATF6などの小胞体膜蛋白質が活性化され、さらにASK1、JNKなどの種々の細胞内情報伝達分子が活性化され、小胞体ストレス反応が起こる。その結果、分子シャペロンの産生増加、蛋白合成の抑制、異常蛋白質の分解促進、が起こり、細胞は異常な蛋白質を排除しようとする。さらに、異常な蛋白質が蓄積すると細胞機能障害、細胞死が起こる(5)。こうした小胞体ストレス反応が神経変性疾患や躁鬱病、糖尿病、心筋症(6)を始めとする種々の疾患に関与している事が示唆されている。また、肥満によって小胞体ストレス反応が亢進し、活性化されたJNKが、インスリン受容体からの情報伝達に重要なIRS1を抑制し、細胞がインスリン耐性を示すことによって2型糖尿病が発症することが報告されている(7)。

2. 研究の目的

小胞体は細胞内で Ca^{2+} が貯蔵される主な部位であるが、MORの活性化によって小胞体に貯蔵された Ca^{2+} が細胞質に放出されることで、小胞体内の分子シャペロンの機能も阻害され、小胞体内に折り畳み構造の異常な蛋白質が蓄積し易くなる。また、外因性あるいは内因性のオピオイドの持続的なMORへ刺激入力はMORのdown regulationを起こすが、新たな機能的なMORの蛋白産生増大には十分な小胞体機能が必要である(3)。小胞体ストレス反応とMOR細胞内情報伝達系との関連をin vivoで検討するために、変異BiPノックインマウス(8)を用いて、モルヒネ耐性形成を検討した。BiPは小胞体ストレス反応を担う中心的な分子シャペロンであり、細胞にとって不可欠の分子である。我々は、マウスBiPゲノム遺伝子をクローニングし、相同組換えによって、正常BiPではなく、カルボキシ末端のKDEL配列が欠損した変異BiPが発現する、変異BiPノックインマウスを作製した。変異BiPノックインホモマウスは生後1日で呼吸不全で死亡するが、ヘテロマウスは一見正常に成長する。この変異BiPヘテロマウスではモルヒネ連続投与による耐性形成が抑制されていた(4)。

小胞体ストレス反応と、MORの細胞内情報伝達系の接点として、我々はGlycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)に着目した。GSK3 β はすべての細胞に存在し、生理的にも、また種々の疾患発症にも重要な細胞内情報伝達分子である。小胞体ストレス反応の亢進によって、GSK3 β は活性化される。一方、MORが活性化されると、PI3キナーゼ/AKTの活性化を介してGSK3 β は抑制されることが示されていた。モルヒネ連続投与によって耐性が形成された野生

型マウスの脳では、GSK3 β が活性化されていた(4)。マウスにモルヒネを連続投与する際にGSK3 β 阻害剤を併用した所、モルヒネ連続投与による耐性形成が抑制された。また、変異 BiP マウスの神経細胞を調べた所、GSK3 β が不活性化されている事が分かった。即ち、モルヒネ連続投与によってGSK3 β が活性化されること、また、GSK3 β 阻害剤を併用することによって、モルヒネ耐性形成が抑制される事、また、変異 BiP マウスでは、GSK3 β が不活性化されておりモルヒネ耐性形成が抑制された(4)。以上の結果を踏まえ、小胞体機能を補完し、過剰な小胞体ストレス反応を抑制する化学シャペロンを投与しすることによって、野生型マウスでモルヒネ耐性形成を抑制できるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

モルヒネ耐性、痛過敏性、退薬症状形成

野生型マウスにモルヒネ連続投与を行う。我々の過去の検討では、一日二回モルヒネ 20mg/kg を腹腔内に5日間投与すると、野生型マウスではモルヒネの鎮痛効果が失われ耐性が形成された。しかし、変異 BiP マウスでは、モルヒネの鎮痛効果は保たれ、耐性は形成されなかった(1)。5日間投与後にナロキソンを投与し、モルヒネの μ オピオイド受容体に対する効果を拮抗させ、マウスの退薬症状をビデオで観察記録する。我々の予備実験では、変異 BiP マウスでは退薬症状が見られにくい。痛覚過敏性や退薬症状発現に必要な期間が耐性形成よりも長期間必要な可能性も考慮して、モルヒネ投与期間は必要に応じて修正して研究を進める。

小胞体化学シャペロンを用いたマウス実験

小胞体での蛋白質の folding 機能を補完する作用のある小胞体化学シャペロンとして taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) (3)と 4-phenylbutyrate (PBA) (4)を用いる。2剤とも米国ではFDAから臨床使用が認可されている。モルヒネ耐性形成実験において野生型マウスにTUDCAあるいはPBAを投与し、痛覚過敏性やモルヒネの鎮痛効果が正常化されるかどうかを検証した。

上記モルヒネ単回投与後と連続投与後にマウスを経心臓的に灌流固定し、パラフィン包埋標本を作製する。組織切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色によって脳・脊髄の病理変化を形態学的に観察する。また、免疫染色によって、MORの発現量を検討する。ゴルジ体に分布するKDEL受容体、小胞体に分布するBiPあるいは細胞表面やエンドゾームに分布するtransferrin受容体などと、オピオイド受容体との二重免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、脊髄後角細胞、脳幹部PAG領域、脳ACC領域などにおけるMORの発現量、細胞内局在を調べ、モルヒネに対する反応性や痛覚過敏性との関連を検討した。また、患側、健側に左右差があるかどうかにも注意して観察する。

一部のマウスは上記モルヒネ投与実験終了後にペントバルビタール麻酔下に断頭し、直ちに脳・脊髄を摘出し、液体窒素で凍結し - 80度Cで保存する。脳については大脳皮質、脳幹を左右に切断して解析する。SDS蛋白サンプルを調整し、蛋白質電気泳動を行う。さらにWestern blotを行い、MORあるいはリン酸化MORを検出する。また、疼痛刺激やモルヒネ投与が小胞体機能に影響を与えているかどうかを検討するために、BiPなどの小胞体分子シャペロンの発現を調べる。また、小胞体ストレスによって誘導されるXBP-1、CHOP、ATF4などの転写因子や、IRE1、PERK、ATF6などの小胞体膜蛋白質の活性化型の検出を行う。さらに、GSK3 β やMAPキナーゼなどの情報伝達分子の活性化(チロシンリン酸化)やGSK3 β の不活性化(セリンリン酸化)を検出した。

4. 研究成果

タウロウルソデオキシコール酸や4-フェニル酪酸などの薬理的シャペロンは、モルヒネ耐性の発生を抑制し、鎮痛を回復させた。薬理的シャペロンだけでは鎮痛作用はなかった。モルヒネ投与は、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK3)がセリン9リン酸化のために不活性化状態にあるときに鎮痛を誘発したが、モルヒネ投与を繰り返すと、このリン酸化イベントが抑制された。シャペロンの同時投与は、GSK3の不活性化状態を維持した。これらの結果は、小胞体ストレスがUPRとMORシグナル伝達間の細胞内クロストークによるモルヒネ耐性を促進する可能性があることを示唆している。薬理的シャペロンを併用投与することによって、オピオイドによる耐性や痛覚過敏を抑制し、安全にオピオイドを使用出来る可能性があることが示された。詳細は論文として発表した(9)。

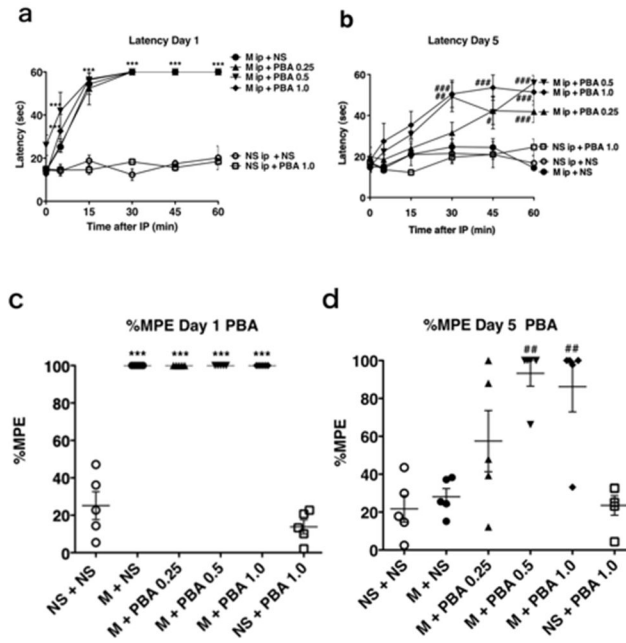


Figure 1. 薬理学的小胞体シャペロン PBA はモルヒネ耐性形成を抑制した。

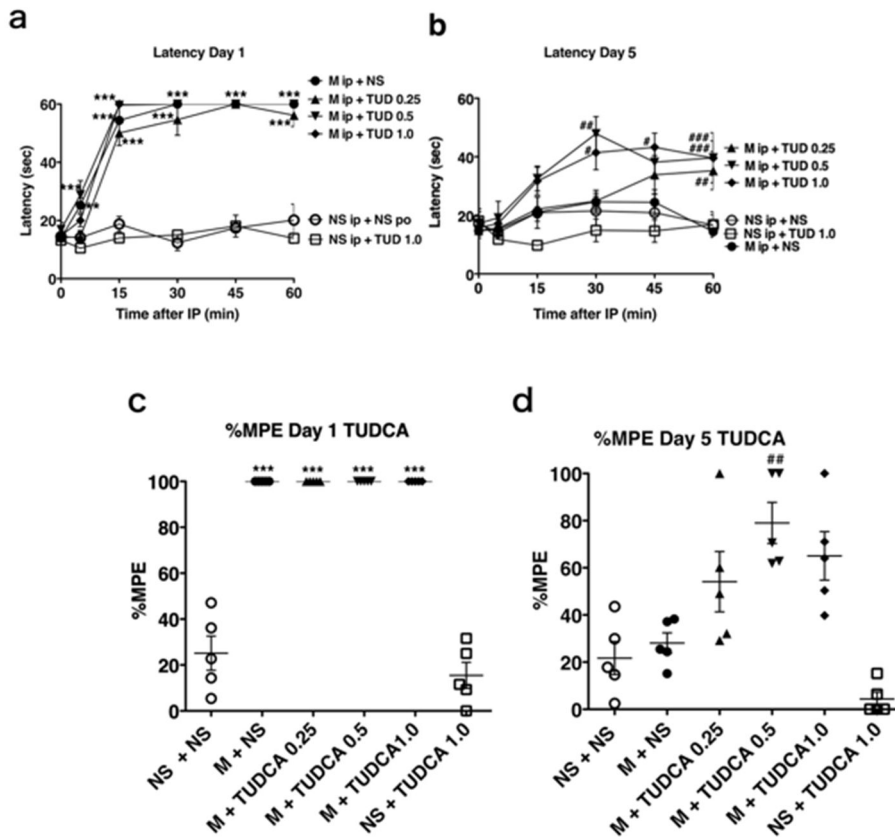


Figure 2. 薬理学的小胞体シャペロン TUDCA はモルヒネ耐性形成を抑制した。

引用文献

1. Andrew Schrepfa et al. 2016, Endogenous opioidergic dysregulation of pain in fibromyalgia: a PET and fMRI study. PAIN 157, 2217-2225
2. 青江知彦、土橋玉枝、オピオイド耐性のメカニズム, 臨床麻酔 2009; Vol 33, p1273-1280.
3. Petäjä-Repo UE1, Lackman JJ2 .2013.12.001. Targeting opioid receptors with pharmacological chaperones. Pharmacol Res. 2014 May;83:52-62. doi: 10.1016/j
4. Dobashi, T., Tanabe, S., Jin, H., Mimura, N., Yamamoto, T., Nishino, T., and T. Ao.

2010. BiP, an endoplasmic reticulum chaperone, modulates the development of morphine antinociceptive tolerance. (2010) *J Cell Mol Med* 14, 2816-2826.5.
5. Ron, D., and P. Walter. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519-29.
6. Hamada, H., M. Suzuki, S. Yuasa, N. Mimura, N. Shinozuka, Y. Takada, T. Nishino, H. Nakaya, H. Koseki, and T. Aoe. 2004. Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol* 24:8007-17.
7. Ozcan, et al. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-61.
8. Mimura, N., H. Hamada, M. Kashio, H. Jin, Y. Toyama, K. Kimura, M. Iida, S. Goto, H. Saisho, K. Toshimori, H. Koseki, and T. Aoe. 2007. Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP. *Cell Death Differ* 14:1475-1485.
9. Youuta Okuyama, Hisayo Jin, Hiroshi Kokubun and Tomohiko Aoe. 2020. Pharmacological Chaperones Attenuate the Development of Opioid Tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7536; doi:10.3390/ijms21207536

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Okuyama Youta, Jin Hisayo, Kokubun Hiroshi, Aoe Tomohiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Pharmacological Chaperones Attenuate the Development of Opioid Tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7536 ~ 7536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207536	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 Aoe Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathological Aspects of COVID-19 as a Conformational Disease and the Use of Pharmacological Chaperones as a Potential Therapeutic Strategy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1095-1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.01095	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 Kokubun H, Jin H, Komita M, Aoe T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Conflicting Actions of Inhalational Anesthetics, Neurotoxicity and Neuroprotection, Mediated by the Unfolded Protein Response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020450.	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 Kokubun H, Jin H, Aoe T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Pathogenic Effects of Impaired Retrieval between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225614.	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 Jin Hisayo, Ishii Takuro, Isono Shiroh, Igarashi Tatsuo, Aoe Tomohiko	4. 巻 5
2. 論文標題 A comparative study of the acute and long-term prognosis for mouse models undergoing laparoscopic surgery under continuous intra-abdominal perfusion with either CO2 gas or saline	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cogent Medicine	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2331205X.2018.1510358	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 Jin Hisayo, Nishino Takashi, Aoe Tomohiko, Isono Shiroh	4. 巻 263
2. 論文標題 A simple and safe method for tracheal intubation using a supraglottic intubation-aid device in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Physiology & Neurobiology	6. 最初と最後の頁 9~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2019.02.004	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 Jin Hisayo, Komita Mari, Aoe Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Decreased Protein Quality Control Promotes the Cognitive Dysfunction Associated With Aging and Environmental Insults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2018.00753	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 Hisayo Jin, Mari Komita and Tomohiko Aoe	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of BiP Retrieval by the KDEL Receptor in the Early Secretory Pathway and its Effect on Protein Quality Control and Neurodegeneration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2017.00222	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川中涼子・國分宙・佐久間承子・田垣内祐吾・梁 善光・青江知彦
2. 発表標題 手術中のオピオイド投与が術後の疼痛に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第67回日本麻酔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國分宙、小見田 真理、神 久予、青江 知彦
2. 発表標題 吸入麻酔薬による神経障害と神経保護という相反する作用に対する小胞体ストレス反応の関与。
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Kokubun, Hisayo Jin, Mari Komita, Mitsuo Aono and Tomohiko Aoe
2. 発表標題 Conflicting Actions of Inhaled Anesthetics, Neurotoxicity and Neuroprotection
3. 学会等名 2019 Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國分宙、奥山陽太、神久代、青江知彦
2. 発表標題 小胞体ストレスの抑制によってオピオイド耐性が緩和される
3. 学会等名 第65回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青江 知彦、國分宙、小見田 真理、神 久予
2. 発表標題 吸入麻酔薬の神経細胞保護作用と神経障害作用の二面性と小胞体ストレス
3. 学会等名 第13回BSSR：臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisayo Jin, Mari Komita, and Tomohiko Aoe
2. 発表標題 Declines in Protein Quality Control and External Insults Promote Cognitive Dysfunction
3. 学会等名 Society for Neuroscience, Annual Meeting, 2018, 11, 04, San Diego (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青江 知彦、小見田 真理、神 久予
2. 発表標題 小胞体機能障害マウスモデルでの胎生期の吸入麻酔薬暴露による神経障害と長期予後の検討
3. 学会等名 第64回日本麻酔科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 國分宙 神久予 奥山陽太 磯野史朗 青江知彦
2. 発表標題 疼痛過敏モデルマウス作成の試み
3. 学会等名 千葉大学第49回麻酔科例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青江知彦・川中涼子・ 國分宙・大曾根文雄・原啓・ 横川 徳造
2. 発表標題 慢性疼痛疾患における痛覚過敏形成機構の探索
3. 学会等名 2021 年第 68 回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川中 涼子, 佐久間 承子, 國分 宙, 田垣内 祐吾, 梁 善光, 青江 知彦
2. 発表標題 全身麻酔下での手術中のオピオイド投与が術後痛に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 2021 年第 68 回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Aoe , Ryoko Kawanaka , Takeshi Akiba
2. 発表標題 A woman who complains of pain throughout the body without sensing the usual nociceptive pain
3. 学会等名 2021 年第 68 回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	國分 宙 (Kokubun Horoshi) (50782695)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

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
---------	---------