

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08858

研究課題名（和文）リアルタイム可視化アッセイによるオピオイド受容体細胞内動態解析と新規鎮痛法の開拓

研究課題名（英文）Development of novel analgesic strategy based on the intracellular localization analysis of opioid receptors using real time visualization assay

研究代表者

村田 寛明（MURATA, Hiroaki）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：90437856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、周術期に用いる代表的なオピオイド鎮痛薬であるレミフェンタニルとフェンタニルが引き起こす $\mu$ オピオイド受容体（MOR）の脱感作について、MORを安定発現するヒト胎児腎細胞293を用いて解析した。レミフェンタニルとフェンタニルにより生じるMOR活性の変化は同等であった。また、MORの脱感作に関連するアレスチン活性もレミフェンタニルとフェンタニルでは同等であった。しかし、レミフェンタニルおよびフェンタニルを反復投与したところ、フェンタニルはレミフェンタニルと比較してMORの脱感作を生じやすかった。一方、レミフェンタニルではフェンタニルよりMORの細胞内陥入が生じやすかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レミフェンタニルとフェンタニルは効果発現時間や作用持続時間など臨床的な特徴はやや異なるものの鎮痛力価は同等といわれ、周術期疼痛管理に用いられる標準的なオピオイド鎮痛薬である。オピオイド鎮痛薬の使用においては耐性形成や痛覚過敏誘発などの問題が指摘されているが、本研究成果はこれらの発生メカニズムに関与する分子機序を示唆するものであり学術的意義がある。また、これらの現象を踏まえた最適な周術期のオピオイド鎮痛薬使用プロトコルを提唱する基盤となる成果が得られたと考えられ、より優れた周術期疼痛管理に貢献できる点で社会的意義もあると言える。

研究成果の概要（英文）：Remifentanyl and fentanyl are two major opioid analgesics often used for perioperative analgesia. We investigated the desensitization profiles of remifentanyl and fentanyl to the  $\mu$ -opioid receptor using human embryonic kidney 293 cells stably expressing HaloTag-tagged  $\mu$ -opioid receptor. The efficacy and potency during the first administration of remifentanyl or fentanyl in activating the  $\mu$ -opioid receptor were almost equal. Similarly, in arrestin recruitment, which determines desensitization processes, they showed no significant difference. Repetitive administration of fentanyl resulted in a stronger  $\mu$ -opioid receptor desensitization potency than that of remifentanyl. Subsequently, we demonstrated that remifentanyl possessed a higher internalization potency of the  $\mu$ -opioid receptor than fentanyl by the real-time visualization assay.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：オピオイド鎮痛薬 オピオイド受容体 脱感作 細胞内陥入 アレスチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

モルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニルなどのオピオイド鎮痛薬は選択的 $\mu$ オピオイド受容体 (MOR) アゴニストであり、癌性痛、各種病態に基づく慢性痛、手術侵襲に伴う周術期の急性痛などに対する強力な鎮痛法として幅広く使用されている。しかし、オピオイド鎮痛薬は継続投与あるいは大量投与することにより急性耐性や痛覚過敏をきたすことがあり、その対応に難渋する場合がある。臨床現場では、癌性痛などの治療において、オピオイド鎮痛薬の副作用により鎮痛効果を示す量を投与できない場合および鎮痛効果が不十分な場合には、別のオピオイド鎮痛薬に変更するオピオイドスイッチング (opioid switching) が実施される。同様に周術期疼痛管理では、作用機序の異なる鎮痛薬を併用することで、オピオイド鎮痛薬の副作用を軽減し、全体として鎮痛効果を高めようという多様式鎮痛法 (multimodal analgesia) の概念に基づいて処方が行われる。このようにオピオイド鎮痛薬は臨床使用に際して様々な工夫が施されているが、急性耐性や痛覚過敏の分子メカニズムは十分には解明されておらず、現時点では臨床経験に基づいて使用されている。レミフェンタニルは全身麻酔に用いられる超短時間作用性オピオイド鎮痛薬である。血中半減期が3~4分と短いため生体内での再分布を考慮する必要がなく、またその代謝産物は薬理作用を有しないため、手術操作による侵襲に対して十分量を投与できる。しかし、高用量のレミフェンタニル使用は急性耐性や痛覚過敏を招来することもわかってきている。これらの急性耐性や痛覚過敏には、オピオイド受容体の細胞内局在変化が関与していることが示唆されている。オピオイド鎮痛薬の作用により細胞膜表面に存在するオピオイド受容体が細胞質内へ取り込まれることを細胞内陥入 (internalization)、細胞質内に取り込まれたオピオイド受容体が細胞膜表面へ移動し再利用されることを recycling と呼び、これらのバランスの変化等がその要因と考えられている。したがって、分子機序に基づいた「最適化されたオピオイド鎮痛薬の投与方法」を開発するための基盤を確立するためには、オピオイド受容体の細胞内局在変化を経時的かつリアルタイムに解析し、種々のオピオイド鎮痛薬刺激によるオピオイド受容体活性の関連性を明らかにすることが重要と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、リアルタイム可視化アッセイ法を用いて種々のオピオイド鎮痛薬刺激後のオピオイド受容体の細胞内局在変化を解析し、オピオイド受容体活性との関連を明らかにすることで、分子機序に基づいた「急性耐性・痛覚過敏を来しにくい最適な鎮痛法の開発」に向けた基盤の確立を以下の手法を用いて行う。

- リアルタイム可視化アッセイ法を用いて、オピオイド鎮痛薬を単独、あるいは複数のオピオイド鎮痛薬を併用した際の MOR の細胞内局在変化を経時的に解析する。
- 種々の条件下でオピオイド鎮痛薬が引き起こすオピオイド受容体活性の変化について、CellKey™ システムを用い、細胞誘電分光法によりその活性を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) オピオイド鎮痛薬の投与設定

種類： レミフェンタニル、フェンタニル

投与順序： 同一薬剤の反復投与あるいは異なる薬剤の連続投与

## (2) リアルタイム可視化アッセイ法 : Real-time Visualization Assay

細胞膜非透過リガンドである HaloTag pH Sensor リガンドは、HaloTag に特異的に結合する。オピオイド鎮痛薬非存在下では、HaloTag を連結させた  $\mu$ OR (Halo- $\mu$ OR) は HaloTag pH Sensor リガンドと結合してはいるが、中性環境である細胞膜上に存在している状態では蛍光を発しない。一方、アゴニスト刺激を受けた Halo- $\mu$ OR は、クラスリン被膜小胞によって細胞内に取り込まれる。Halo- $\mu$ OR が取り込まれた小胞内は酸性環境であり、この条件下では Halo- $\mu$ OR は赤色蛍光を発する。 $\mu$ OR の細胞内陥入が生じると赤色蛍光を呈するという特徴を活かして、この蛍光でリアルタイムかつ経時的に定量評価する。Halo- $\mu$ OR を安定発現するヒト胎児腎細胞 293 (HEK293 cells) を作成し (Halo- $\mu$ OR HEK293) 本研究に用いた。

## (3) CellKey™ システムを用いた細胞誘電分光法によるオピオイド受容体活性測定

オピオイド受容体は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) に属する。本システムにより、細胞に発現した GPCR に作動薬が結合する際のインピーダンス変化を測定することで細胞全体の統合的な応答をリアルタイムに測定した。脱感作の評価においてはレミフェンタニルおよびフェンタニルを反復投与し、初回投与後と 2 回目投与後のインピーダンス変化を測定した。

## (4) cAMP アッセイ及び アレスチンアッセイ

レミフェンタニルおよびフェンタニルがもたらす MOR の活性変化について cAMP の変化を GloSensor™ cAMP Assay キットを用いて、アレスチン recruitment の変化を PathHunter® eXpress -Arrestin / 内在化 GPCR アッセイキットを用いて評価した。

## 4. 研究成果

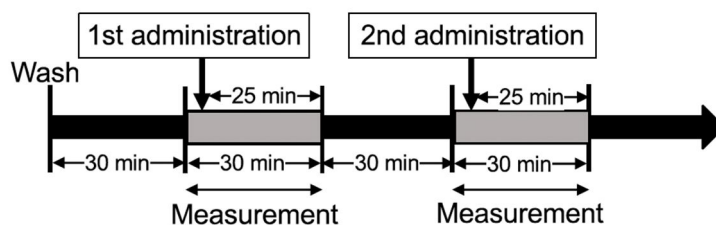
### (1) MOR 活性測定

CellKey™ アッセイ、cAMP アッセイ、アレスチンアッセイにおいてレミフェンタニルおよびフェンタニルで処置し dose-response curve を比較したところ、いずれも  $EC_{50}$  および  $E_{max}$  に有意な差は認められなかった。

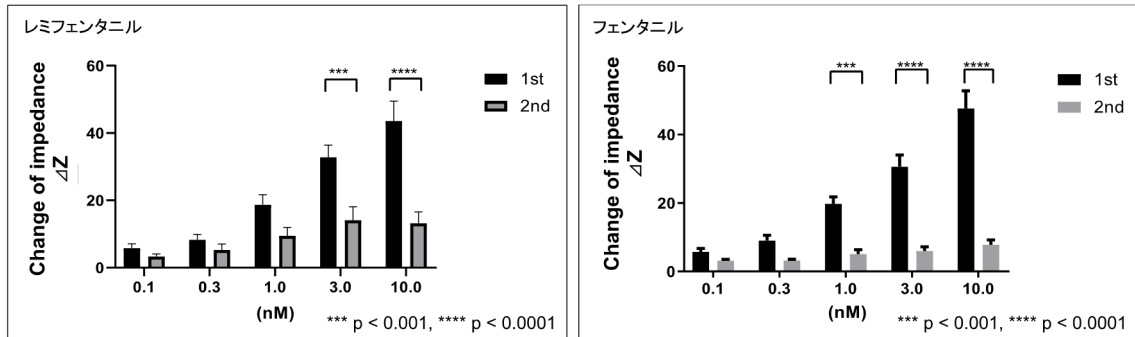
### (2) MOR 脱感作の評価

レミフェンタニルおよびフェンタニルを同一濃度で連続投与し (図 1) CellKey™ を用いてインピーダンス変化を測定したところ、レミフェンタニルは 3 nM、フェンタニルは 1 nM の濃度より MOR の脱感作を生じることが示された (図 2)。

(図 1)



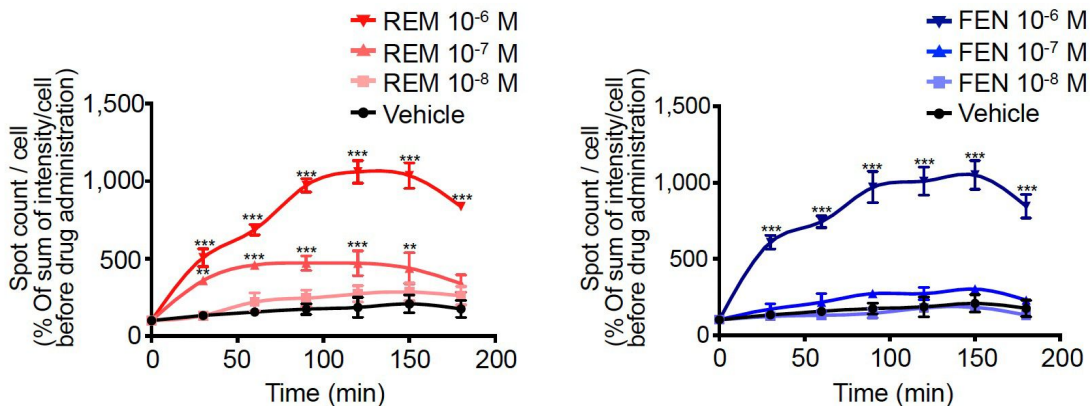
( 図 2 )



( 3 ) リアルタイム可視化アッセイ法による MOR の細胞内陥入 ( internalization ) の評価

アレスチンを介するシグナル伝達経路が関与する MOR の細胞内陥入について、HaloTag pH Sensor リガンドを用いてリアルタイムに可視化したところ、レミフェンタニルの方がフェンタニルよりも MOR の細胞内陥入を生じやすいことが明らかとなった。細胞内陥入を生じ小胞体に取り込まれた結果 red spot として検出された MOR をカウントしたところ、vehicle と比較した細胞内陥入数はレミフェンタニルでは  $10^{-6}$  M および  $10^{-7}$  M で、フェンタニルでは  $10^{-8}$  M のみで統計学的に有意な差を認められた ( 図 3 )。このことから、レミフェンタニルではフェンタニルより MOR の細胞内陥入が生じやすいことが明らかとなった。

( 図 3 )



REM, レミフェンタニル; FEN, フェンタニル; \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

以上の結果より、フェンタニルはレミフェンタニルと比較して MOR の脱感作を生じやすく、レミフェンタニルはフェンタニルより MOR の細胞内陥入が生じやすいことが明らかとなった。結果 ( 1 ) に示すように、アレスチン全体としての recruitment はレミフェンタニルとフェンタニルで同等であった。しかしながら、アレスチンの関与する細胞内陥入がレミフェンタニルとフェンタニルでは異なるという結果が得られた。これらを説明する何らかの機序が存在すると考えられ、今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyano Kanako, Ohbuchi Katsuya, Sudo Yuka, Minami Kouichiro, Yokoyama Toru, Yamamoto Masahiro, Uzu Miaki, Nonaka Miki, Shiraishi Seiji, Murata Hiroaki, Higami Yoshikazu, Uezono Yasuhito	4. 巻 143
2. 論文標題 A novel method for evaluating activity of transient receptor potential channels using a cellular dielectric spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 320 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.05.001	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 Miyano Kanako, Shiraishi Seiji, Minami Koichiro, Sudo Yuka, Suzuki Masami, Yokoyama Toru, Terawaki Kiyoshi, Nonaka Miki, Murata Hiroaki, Higami Yoshikazu, Uezono Yasuhito	4. 巻 20
2. 論文標題 Carboplatin Enhances the Activity of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 through the Cyclic AMP-Protein Kinase A-A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3271 ~ 3271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133271	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上園 瑛子, 溝渕 有也, 宮野 加奈子, 村田 寛明, 山口 政広, 唐澤 佑輔, 山口 敬介, 井関 雅子, 上園 保仁
2. 発表標題 レミフェンタニルおよびフェンタニルによるオピオイド受容体脱感作様式の解析 受容体安定発現細胞を用いて
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第55回学術集会
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	上園 保仁  (UEZONO Yasuhito)  (20213340)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (32651)	
研究分担者	宮野 加奈子  (MIYANO Kanako)  (50597888)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授    (32651)	

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