

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16446

研究課題名(和文) オピオイドへの耐性形成に関与するオピオイド受容体制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms how the tolerance toward opioids develops.

研究代表者

清水 覚司 (Satoshi, Shimizu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80802793

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)：神経系細胞に内因性に発現している $\mu$ オピオイド受容体に、CRISPR/Cas9を利用してタグ配列を組み込み、長期間のリガンド刺激下における受容体の内在化を24-72時間解析した。受容体を強く内在化する合成エンケファリンでは50-60%、内在化の程度が弱いモルヒネでは20-30%が細胞内へと内在化された。細胞表面での発現量は24時間後をピークとして一旦減少し、その後72時間後まではほぼ不変であった。受容体発現量は、新規合成、再利用、分解の総和であるが、長期持続的にオピオイドを投与すると、細胞表面上の発現量は未刺激の状態よりは一旦減るものの、その後は安定的に発現することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オピオイドへの耐性形成には、活性化して脱感作した受容体を細胞内へ内在化して、再感作・再利用する経路が重要な役割を果たす。 $\mu$ オピオイド受容体をヒト胎児腎細胞などに発現させた実験系を利用した先行研究では、受容体は数時間の持続刺激で約半分に減少すると報告している。しかし、臨床では術後数日間オピオイドを投与することが通常で、数時間で効果が著減することはない。本研究では、神経系細胞では、オピオイド受容体は持続的な刺激によって一旦減弱するものの、新規合成や再利用によって一定の発現量を維持することがわかった。また、リガンドによって発現量が減る程度は異なるなど、耐性形成の一旦を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression levels of mu-opioid receptors (MOP) on cell surface under continuous stimulation with opioids using SH-SY5Y cell lines where endogenous MOP are expressed. We used CRISPR/Cas9 to introduce epitope tag sequence at the 5' terminus of the MOP gene to investigate the expression level of endogenous MOP. We showed that the synthetic opioid peptide DAMGO internalized MOP about 50-60%, while morphine internalized MOP about 20-30% at 24 hours of stimulation. The expression level of MOP did not change till 72 hours of stimulation under stimulation with each ligand. The results indicate that the expression level of MOP is strictly regulated as the sum of de novo synthesis, recycling, and degradation under continuous stimulation, and it is maintained at the specific levels depend on ligands.

研究分野：麻酔科学

キーワード：オピオイド 耐性形成 副作用発現

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

オピオイドは強力な鎮痛薬であるが、耐性を形成して鎮痛効果が減弱したり、呼吸抑制などの致死的な副作用を発現するという問題がある。耐性形成や副作用発現は、臨床的に非常に重要な問題であるが、その分子機序には不明な点が多く残されており、麻酔科学における重要な課題である。

耐性形成には、活性化して脱感作した受容体を細胞内へ内在化して再感作・再利用経路へと導く過程が、副作用の発現には、活性化した $\mu$ オピオイド受容体を起点とする細胞内シグナルが重要な役割を果たすと想定されている。例えば、 $\mu$ オピオイド受容体はリン酸化修飾を受けると、アレスチンが $\mu$ オピオイド受容体に結合して受容体を内在化し、受容体の感受性を制御する。また、アレスチンは、Gタンパク質経路とは独立して副作用に関連したシグナルの起点となると想定されている。そのため、 $\mu$ オピオイド受容体へのリン酸化修飾や、代表的なアダプター分子であるアレスチンは、 $\mu$ オピオイド受容体の感受性や、受容体を起点とするシグナルを制御する重要な因子として注目されてきた。しかし、先行研究では、リン酸化修飾という特定の翻訳後修飾や、アレスチンといった特定の分子に焦点を当てた限定的な解析が主流であるという問題があった。

近年の結晶構造解析による研究成果から、同じ $\mu$ オピオイド受容体に結合するリガンドであっても、受容体は結合したリガンドの種類によって特異的な構造をとることが報告された。さらに、この違いは特に細胞内領域で顕著であることが注目されている。受容体の細胞内領域は、活性化した $\mu$ オピオイド受容体が、活性化依存的に様々な分子群を動員したり、また、受容体自身が翻訳後修飾を受けて機能制御される領域である。そのため、リガンドによって $\mu$ オピオイド受容体が動員する分子群や、受容体を受ける翻訳後修飾も違うのではないかと着想した。そしてその差異が、同じ $\mu$ オピオイド受容体を標的とする薬剤であっても、耐性形成や副作用発現の様式がわずかに異なることの原因なのではないかと仮説を立てた。本研究課題では、 $\mu$ オピオイド受容体を受ける翻訳後修飾や結合分子を広く探索して耐性形成や副作用発現に関与する未同定の因子を見出し、臨床上的問題の解決につなげたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、特にリガンドによる差異に着目しつつ、受容体への結合分子群や翻訳後修飾様式を明らかにし、耐性形成や副作用発現に関連する重要な因子を見つけることを目的とした。さらに、未同定の因子も視野に入れつつ、 $\mu$ オピオイド受容体への結合分子や翻訳後修飾を網羅的に検出することに挑戦した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析モデルとする細胞株の樹立

まず、本分野の先行研究では、 $\mu$ オピオイド受容体を内在性には発現していない細胞株に、 $\mu$ オピオイド受容体を異所性に強制的発現させた実験系を利用していることに着目した。先行研究では、 $\mu$ オピオイド受容体を HEK293 細胞などに異所性に発現させると、数時間の持続的なリガンド刺激によって受容体発現量が約半分に減少するという報告がある。しかし、臨床的には、例えば手術後に鎮痛目的で持続的にオピオイドを使用したからといって、わずか数時間の経過で鎮痛効果が著しく減弱するわけではない。この矛盾は、異所性発現系には、そもそも $\mu$ オピオイド受容体を制御する分子機構が全て備わっておらず、活性化して脱感作された受容体が生理的な制御機構とは異なる機構で処理されるからではないかと仮説を立てた。そこで、従来は遺伝子導入や遺伝子改変の効率が低いために利用されにくかった神経系細胞株(内因性に $\mu$ オピオイド受容体を発現した細胞株)を利用して、持続的にオピオイドによって活性化された場合に、 $\mu$ オピオイド受容体の発現量がどのように変化するか自らの手で解析するとともに、先行研究の解析では見逃されているような分子機構も視野に入れつつ探索することにした。

解析対象とする細胞株には、 $\mu$ オピオイド受容体を内因性に発現しているヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を選択した。CRISPR/Cas9 を利用して SH-SY5Y 細胞のゲノム DNA を編集し、内因性 $\mu$ オピオイド受容体にタグ配列を組み込んだ細胞株を樹立した。神経系細胞に発現する $\mu$ オピオイド受容体の解析を行う上で、内因性 $\mu$ オピオイド受容体を検出したり免疫沈降するのに利用できる感度の良い市販抗体が存在しないという問題があったのだが、タグ配列を組み込んだ細胞株を樹立することで、リガンド刺激によって細胞表面からの消失する程度(内在化の程度)や、細胞内へ内在化した後の受容体の局在について、高い感度で解析することが可能となる。また、より高い効率で免疫沈降することができるようになるため、質量分析による結合分子群や翻訳後修飾様式の解析の感度が向上すると期待できる。

#### (2) リガンドによる細胞内シグナルや内在化の程度の差異を検証する

まず、上記のゲノム編集が受容体機能に明らかな影響を与えていないことを検証する。つまり、リガンド刺激によって受容体の内在化が検出できることや、細胞内シグナル伝達経

路がゲノム編集前の細胞株と同程度であることを確認した。次に、神経系細胞においてリガンド刺激によって細胞の感受性に直接的に関与すると考えられる受容体発現量の経時的変化をフローサイトメトリー法で解析した。SH-SY5Y 細胞は、レチノイン酸と脳由来神経増殖因子(BDNF)を利用して分化誘導することで、細胞分裂を停止し、かつ、より生理的な神経細胞に近い特徴を備えた実験系とすることができるので、細胞株を分化誘導し、リガンド刺激によって内在性に発現している  $\mu$  オピオイド受容体が細胞表面から消失する程度を解析した。周術期の疼痛管理では、急性疼痛が最も強い 2-3 日間持続的にオピオイドを投与することが通常であるため、24 時間から 72 時間の持続投与による変化を解析した。

### (3) 結合分子や翻訳後修飾の意義の検討

上記(1)の細胞を利用し、特に活性化した  $\mu$  オピオイド受容体が受けるリン酸化の程度が大きく異なることが知られている合成エンケファリン(DAMGO)とモルヒネとを利用して細胞株を刺激した。活性化した  $\mu$  オピオイド受容体を組み込んだタグに対する抗体を利用して免疫沈降し、試料を質量分析することで、結合分子群や翻訳後修飾様式を検出する計画を立てた。候補となる分子や、翻訳後修飾検出することができたら、当該結合分子を遺伝学的に欠損した細胞株を樹立したり、当該翻訳後修飾を受けないような変異体を作成し、それぞれの因子が活性化した  $\mu$  オピオイド受容体の内在化や細胞内での輸送(局在変化)、細胞内シグナル伝達において果たす役割を明らかにする計画を立てた。

## 4. 研究成果

### (1) 内因性 $\mu$ オピオイド受容体を検出する実験系の樹立

研究開始当初は、 $\mu$  オピオイド受容体の細胞外領域(N末端側)に 3xFLAG 配列を組み込んだ SH-SY5Y 細胞を樹立する計画を立てた。3xFLAG 配列は親水性が高く、免疫沈降したときに、より多く目的のタンパク質を得ることができると見込んでいた。しかし、遺伝子改変を複数回試行しても期待していた感度で受容体の局在や発現量を検出できなかった。そこで、過剰発現系を利用した予備実験を行ったところ、3xFLAG 配列を N 末端側に組み込んだ  $\mu$  オピオイド受容体は、(HEK293 細胞などでは解析可能な十分量を発現させることができるのだが、)SH-SY5Y 細胞ではほとんど安定して発現しないことがわかった。3xFLAG 配列は可溶性を高めるために荷電したアミノ酸を多く含んでいるため、疎水性の強い膜を貫通する際に適切に発現されないのかもしれないと考えた。そこで、電荷の偏りの少ない HA 配列を組み込む計画へ切り替えたところ、当初の想定より約一年近く時間を要したものの、目的とする細胞株の樹立に成功した。次に、ゲノム編集によって  $\mu$  オピオイド受容体の発現量や、受容体を起点とする細胞内シグナルが影響を受けるか評価し、実験系として問題がないことを検証した。

一方で、この細胞株を利用して、活性化した  $\mu$  オピオイド受容体を免疫沈降して質量分析による解析を進めたが、試料中に質量分析に必要なだけの  $\mu$  オピオイド受容体や、活性化依存的に結合してくる分子を得ることは困難であった。免疫沈降の条件を詳細に検討することで改善を試みたが、上記の予備実験で樹立した過剰発現系であっても質量分析可能な量の試料を得ることができず、さらに少ない内在性の発現量では十分なタンパク量を得ることは困難だと判断した。

### (2) 長期刺激による生理的な $\mu$ オピオイド受容体発現量の解析

4(1)で樹立した細胞株を利用し、内在性の  $\mu$  オピオイド受容体が、リガンドによる長期刺激によってどの程度細胞表面から消失するのかを解析した。SH-SY5Y 細胞は腫瘍細胞であり、2-3 日でおおよそ 2 倍程度に増殖するため、そのままでは長時間刺激による細胞表面の発現量を評価するには適切な実験系とはいえない。そこで、レチノイン酸および脳由来神経栄養因子(BDNF)を添加して、初代培養の神経細胞に近い状態へ分化誘導して解析した。すると、申請者の予想とは反して、内在性の受容体も 24 時間程度の刺激時間で(過剰発現系と同様に、)合成エンケファリン(DAMGO)では 50-60%程度、モルヒネでは 20-30%、細胞内へと内在化して細胞表面から消失することがわかった。さらに、その発現量は、約 72 時間後まで(24 時間の時点での発現量と)大きく変わらず経過した。 $\mu$  オピオイド受容体が活性化すると、 $\mu$  オピオイド受容体の転写・翻訳も活性化することが報告されており、再利用経路、分解経路との総和として、細胞の感受性を一定の範囲内に維持する機構があることが示唆された。

### (3) $\mu$ オピオイド受容体が受けるリン酸化修飾の意義

受容体への結合分子群や、受容体への翻訳後修飾様式を、質量分析法を利用して網羅的に探索する研究計画は、4(1)に記載したように、当初計画したようには進まなかった。ウイルスペクターを利用してさらに安定した発現量を得るなど条件検討を重ねれば、必ずしも実現不可能ではないと考えたが、タグ配列の選択にも一年近い条件検討が必要であったため、そのままの研究計画では残された研究期間内に十分な研究成果をあげるのは困難だと判断した。そこで、当初計画と比べて限定的な解析にはなるものの、 $\mu$  オピオイド受容体へのリン酸化修飾とユビキチン修飾に焦点をあて、それぞれの翻訳後修飾が受容体の内在化や

アレスチンを起点とするシグナル経路の活性化において果たす意義を解析した。

先行研究では、活性化した $\mu$ オピオイド受容体とアレスチンとの結合親和性が、アレスチン経路活性化の程度と相関すると想定されていた。具体的には、各リガンドが刺激下での $\mu$ オピオイド受容体とアレスチンとの結合親和性が計測され、アレスチン経路への偏りの指標とされてきた。つまり、 $\mu$ オピオイド受容体を受けるリン酸化修飾の強度が、アレスチン経路への偏りの指標であり、アレスチン経路への偏りの少ない薬剤が(副作用の少ない理想的なオピオイドとして)探索されてきた。しかし一方で、動物実験モデルでは、Gタンパク質経路への偏りが強いリガンドであっても、十分な鎮痛を得られる程度まで投与量を増加すると、呼吸抑制などの副作用が発現することが報告されてきた。この矛盾は、アレスチンを起点とするシグナルが活性化される分子機構を明らかにすれば、解決できるのではないかと着想した。アレスチンを起点とするシグナルとして、MAPK経路が代表的なシグナルの一つであると想定されている。そこで、まずは、 $\mu$ オピオイド受容体を強くリン酸化する合成エンケファリン(DAMGO)と、 $\mu$ オピオイド受容体を弱くしかリン酸化できないモルヒネの二種類の薬剤を利用して、それぞれのリガンドがMAPK経路の代表的な基質の1つであるERKをリン酸化する強度を評価した。先行研究では、アレスチンの動員の程度がアレスチンを起点とするシグナルの強度を規定すると想定しているため、DAMGOとモルヒネでは、DAMGOの方がアレスチン経路への偏りが強いと考えられる。そのため、MAPK経路の活性化も、モルヒネに比べてDAMGOにおいて強いと予想できる。しかし、結果は予想とは全く異なり、いずれのリガンドもERKをほぼ同程度リン酸化した。本分野の先行研究では、実験に利用する細胞株によってはGタンパク質経路からもMAPK経路が活性化されるといふ報告も見られる。そのため、まずは神経系細胞においてMAPK経路の活性化がアレスチンを起点とするものであるかを検証した。つまり、遺伝学的にアレスチン1および2をいずれか一方を欠損した細胞株と、両者をもとに欠損したSH-SY5Y細胞を樹立し、DAMGOおよびモルヒネで細胞を刺激して、ERKのリン酸化の程度を評価した。すると、アレスチン1もしくは2の一方を欠損すると、ERKのリン酸化が減弱した。さらに両者を欠損するとERKのリン酸化はほぼ消失した。次に、 $\mu$ オピオイド受容体が発現する細胞株を樹立したところ、いずれの変異体においても、アレスチンを起点とするMAPK経路が活性化することが確認できた。つまり、アレスチンを起点とするERKのリン酸化には、 $\mu$ オピオイド受容体のリン酸化や、アレスチンを動員する足場となるC末端領域すら必要でないことがわかった。

従来は、アレスチンは、 $\mu$ オピオイド受容体が発現するリン酸化修飾を認識して結合し、その結合親和性がアレスチン経路の活性の指標だと考えられていたが、アレスチンはリン酸化修飾を介して受容体と会合しなくても活性化構造を維持できるということが示唆された。本研究結果により、アレスチン経路の活性化は、 $\mu$ オピオイド受容体への動員程度とは全く関係がない可能性が示唆された。そこで現在、アレスチンが活性化状態を維持する機構をさらに詳細に解析し、副作用の発現を制御する分子標的を探索している。

#### (4) $\mu$ オピオイド受容体が発現するユビキチン修飾の意義

上記のリン酸化修飾に関する解析と並行して、 $\mu$ オピオイド受容体へのユビキチン修飾の意義についての解析も進めた。ユビキチン修飾は、ユビキチン結合酵素が、基質のリシン残基にユビキチン分子を共有結合させる反応である。そこで、 $\mu$ オピオイド受容体の細胞内領域に存在する8つのリシン全てをアルギニン分子に変異させて、 $\mu$ オピオイド受容体(の細胞内領域)がユビキチン修飾されえない変異体を作成して解析した。アルギニン置換変異体( $\mu$ オピオイド受容体8K/R変異体)は、 $\mu$ オピオイド受容体が発現するMAPK経路への活性化には影響を与えなかったが、 $\mu$ オピオイド受容体の内在化は著しく低下した。 $\mu$ オピオイド受容体の内在化には、 $\mu$ オピオイド受容体が発現するリン酸化修飾を受けてアレスチンと結合することが起点となることから、まずはこの変異体が発現するリン酸化修飾を受けているのかどうかを検証した。すると、 $\mu$ オピオイド受容体8K/R変異体は、野生型 $\mu$ オピオイド受容体とほぼ同程度にリン酸化されていることがわかった。すなわち、先行研究からはオピオイドへの感受性に直接的に関与する受容体内在化には、 $\mu$ オピオイド受容体のリン酸化修飾が必要十分であると想定されていたが、 $\mu$ オピオイド受容体は、単にリン酸化修飾を受けるだけでは内在化されず、リン酸化修飾を受けたのちに、適切にユビキチン化されることが必要であると示唆された。現在、リン酸化修飾を受けない変異体は、ユビキチン修飾を受けるのかどうか、また、受容体のユビキチン修飾には例えばアレスチンのよう

なアダプター分子がどのような役割を果たしているのか、また、 $\mu$ オピオイド受容体をユビキチン化するユビキチン結合酵素は何であるかなど、上記の予備的な研究結果から生まれた研究課題に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水覚司 白木敦子 若田竜一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を利用した内因性 $\mu$ オピオイド受容体発現量の解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白木敦子 清水覚司
2. 発表標題 オピオイドの副作用発現に関与する $\mu$ オピオイド受容体- アレスチン経路の活性化には、アレスチンがクラスリン被覆小孔 (Clathrin-coated pits; CCP) を形成することが重要である
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白木敦子 清水覚司
2. 発表標題 Clathrin regulates the $\mu$ -arrestin pathway upon $\mu$ -opioid receptor activation. アレスチン経路の活性化には、 $\mu$ オピオイド受容体のC末端側のリン酸化修飾を介した会合は必要でなく、アレスチンがクラスリン重鎖と会合することが重要な役割を果たす
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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