

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20790406  
 研究課題名（和文）：  
 鎮痛個人差及び依存脆弱性における脳領域別 POMC 遺伝子発現変化の役割  
 研究課題名（英文）：  
 Role of POMC gene expression changes for individual differences in analgesia  
 and susceptibility to dependence  
 研究代表者：笠井 慎也（KASAI SHINYA）  
 財団法人 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員  
 研究者番号：20399471

## 研究成果の概要（和文）：

先行研究において見出した鎮痛個人差や依存脆弱性と関連するプロオピオメラノコルチン（POMC）遺伝子多型は、近傍の遺伝子多型と連鎖不平衡領域を形成しないことが明らかとなり、直接の原因遺伝子多型であると考えられる。この目的遺伝子多型を含む POMC 遺伝子の 5' flanking 領域を用いて発現解析用ベクターを構築した。また、AIE に有効な翻訳領域上の遺伝子多型を exon 3 に 2 箇所同定した。POMC 遺伝子発現に与える目的遺伝子多型の影響について解析を進めており、鎮痛個人差や依存脆弱性の分子機構の解明が期待できる。

## 研究成果の概要（英文）：

In the previous study, a single nucleotide polymorphism (SNP) in the proopiomelanocortin (POMC) gene was identified to be associated with individual differences in opioid analgesia and susceptibility to alcohol dependence. The POMC SNP does not form linkage disequilibrium block with other polymorphisms, suggesting that the SNP would directly affect on individual differences in analgesia and susceptibility to dependence. The expression vector was constructed with 5' flanking region of the POMC gene including the SNP. The human POMC gene consists of three exons, but effective polymorphisms for allelic imbalance experience (AIE) were identified in the last exon. The expression analyses are now on going, and molecular mechanisms underlying individual differences in opioid sensitivity or susceptibility to dependence would be elucidated by these analyses.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：遺伝子多型、個人差、鎮痛薬感受性、プロオピオメラノコルチン遺伝子

1. 研究開始当初の背景

| オピオイド性鎮痛薬は、がん性疼痛治療や

多くの外科手術において頻用され、現在の医療には必要不可欠の薬である。しかし、このオピオイド性鎮痛薬は鎮痛の他にも依存や耐性、嘔吐、眠気などの副作用を生じ、さらにこれらの作用には著しい個人差が存在する。

遺伝子欠損マウスを用いた研究により、 $\mu$  オピオイド受容体 (MOP) がモルヒネやフェンタニルといったオピオイド性鎮痛薬のターゲットであり、その鎮痛作用とほとんどの副作用において重要な働きを果たしていることが示されている。また、MOP ヘテロ遺伝子欠損マウスでは、モルヒネによる鎮痛作用の半減が見られる (MOP-haploinsufficiency; Sora et al., (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1544-1549)。研究代表者らは、MOP 発現量が半減している CXBK マウス系統において、モルヒネによる鎮痛作用の低下と MOP 遺伝子配列の異常を報告している (Han et al., (2006) *Pharmacogenet Genomics* **16**: 451-460)。これらの研究は、MOP 必要量の閾値が高く、遺伝子配列の変化 (遺伝子多型など) のオピオイド感受性に及ぼす影響が大きいことを意味する。実際、MOP 遺伝子がオピオイド感受性に関与していることは遺伝子多型の解析により、数多く報告されている (Kasai et al., (2008) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**: 269-281)。

一方、MOP の内因性リガンドである  $\beta$ -endorphin も鎮痛作用を有する。 $\beta$ -Endorphin をコードする proopiomelanocortin (*POMC*) 遺伝子は、その他に非オピオイドペプチドである adrenocorticotropin (ACTH)、corticotropin-like intermediate-lobe peptide (CLIP)、 $\beta$ -,  $\gamma$ -lipotropin (LPH) 及び  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -melanotropin (MSH) をコードする。*Pomc* 遺伝子欠損マウスでは、毛色の退色、肥満、各種ホルモン産生の低下などが (Yaswen et al., (1999) *Nat Med* **5**: 1066-1070; Challis et al., (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4695-4700)、 $\beta$ -endorphin 欠損マウスではストレス誘導性の鎮痛作用の欠失といった表現型が現れる (Rubinstein et al., (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3995-4000)。さらに、ACTH や  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH の受容体である melanocortin-1 受容体遺伝子 (*Mclr*) の突然変異マウスでは、モルヒネの活性型代謝産物である morphine-6-glucuronide による鎮痛効果の亢進が見られ、不活性型を産生する *MC1R* 遺伝子変異を有する女性において、オピオイド性鎮痛薬による鎮痛効果の亢進が見られる (Mogil et al., (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4867-4872; (2005) *J Med Genet* **42**: 583-587)。以上のことから、*POMC* 遺伝子産物のなかで、 $\beta$ -endorphin だけでなく ACTH や  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH もオピオイド感受性に関与すると考えられる。*Pomc* 遺伝子欠損マウスは MOP 遺伝子欠

損マウスと同様に haploinsufficiency であるため、遺伝子多型などが *POMC* の発現量や機能に及ぼす影響は大きいと考えられる。

## 2. 研究の目的

*POMC* 遺伝子からは前駆体ペプチドが合成され、この前駆体ペプチドが脳の各領域でプロセッシングされ各ペプチドになる。下垂体前葉では ACTH、 $\gamma$ -MSH と  $\beta$ -LPH、 $\beta$ -LPH の分解産物として、 $\gamma$ -LPH と  $\beta$ -endorphin が生じる。下垂体中葉ではさらに ACTH が分解されて  $\alpha$ -MSH と CLIP が生じ、 $\gamma$ -LPH からは  $\beta$ -MSH が生じる。また、*POMC* 産生細胞及びその投射終末は、視床下部弓状核、扁桃体内側核、中脳水道周囲灰白質、孤束核及び延髄交連核など幾つかの脳領域に分布する。*POMC* C-1802T 遺伝子多型は *POMC* 遺伝子のプロモーター領域に存在するため、脳の関連領域において、この多型を含む連鎖不平衡領域が *POMC* 遺伝子発現に影響を及ぼしていると考えている。そこで、*POMC* C-1802T 遺伝子多型による *POMC* mRNA 及び各ペプチドの発現量の変化を脳領域別に同定し、*POMC* 遺伝子を介したオピオイド感受性発現に関わる脳領域及び *POMC* 遺伝子由来ペプチドを明らかにする。

## 3. 研究の方法

目的遺伝子多型はヒト *POMC* 遺伝子の 5' flanking 領域 (米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) database に登録されている転写開始点から約 1.5 kb 上流) に存在する。鎮痛薬感受性個人差および依存脆弱性の関連解析において解析した開腹手術患者の遺伝子サンプル 48 検体において、*POMC* 遺伝子の 5' flanking 領域 3 kbp の塩基配列をシーケンシングにより決定する。決定した遺伝子多型データを基に、HaploView ver. 4.1 (Broad Institute, USA) を用いて、連鎖不平衡解析を行い、目的遺伝子多型が形成する連鎖不平衡領域の 3' 及び 5' 末端を決定する。

さらに、allelic expression imbalance (AIE) 法に利用する翻訳領域上の遺伝子多型を、exon1 ~ 3 をシーケンシングにより決定する。

下垂体・視床下部・扁桃体・中脳水道周囲といった脳領域別に検体提供が可能な海外の brain bank に供与依頼し、各領域の死後脳の提供を受ける。上記に決定した AIE 用遺伝子多型を用いて AIE をを行い、目的多型により *POMC* 遺伝子の発現量変化を明らかにする。

ヒト遺伝子解析については、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に基づいて取り扱い、所属機関倫理委員会の承認を得て研究を進める。また、組替え DNA 実験に関しては、“遺伝子組換え生物等の使用

等の規制による生物多様性の確保に関する法律”及び“遺伝子組換え生物等の規制による生物多様性の確保に関する法律施行規則”を遵守し、所属機関の遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て研究を推進する。

#### 4. 研究成果

ヒト *POMC* 遺伝子の 5' flanking 領域に位置する目的遺伝子多型が、*POMC* 遺伝子の発現または機能に影響を及ぼす直接の原因遺伝子多型であるかを明らかにするため、5' flanking 領域 3 kbp の全塩基配列を決定し、連鎖不平衡解析を行った。その結果、目的遺伝子多型の上流には連鎖不平衡領域を共有する遺伝子多型が存在しなかった。しかし、下流には minor allele frequency (MAF) > 0.01 の遺伝子多型は存在しなかったため、目的遺伝子が exon 1 以降の遺伝子多型と連鎖不平衡の関係にない可能性を排除出来なかった。そのため、さらに exon 1-3 まで約 10 kbp の全塩基配列を決定し、この領域の全遺伝子多型 (MAF > 0.01) の同定及び目的遺伝子多型を含む連鎖不平衡領域の決定を行なった。

Intron 2 及び 3 において、dbSNP database に登録されていない遺伝子多型を各 5 及び 4 箇所同定した。これら遺伝子多型は、1 箇所を除き MAF < 0.05 の遺伝子多型である。連鎖不平衡解析の結果、目的遺伝子多型の下流においてもこの遺伝子多型を含む連鎖不平衡領域は形成されておらず、この遺伝子多型自身が鎮痛薬感受性などに直接関与していると考えられた。

AIE に用いる翻訳領域に位置する遺伝子多型は exon 1 及び 2 には存在せず、exon 3 に 2 箇所見出した。この 2 箇所の遺伝子多型は、目的遺伝子多型から約 9 kb 下流とかなり離れた位置にあるが、MAF がそれぞれ 0.344 及び 0.354 と高いため、AIE 用として有用であると考えられる。また、この遺伝子多型を含む翻訳開始点から 3 kb の領域をクローニングし、発現調節解析用ベクターを作製した。現在、構築したベクター及び翻訳領域に見出した遺伝子多型を用いて目的遺伝子多型の *POMC* 遺伝子発現に対する影響の解析を進めている。

本研究により、*in vivo* 及び *in vitro* の両面から、*POMC* 遺伝子多型の遺伝子発現調節機構を明らかに出来ると考えられる。

#### 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 12 件)

Fukuda K, Hayashida M, Ide S, Saita N, Kokita Y, Kasai S, Nishizawa D, Ogai Y, Hasegawa J, Nagashima M, Tagami M,

Komatsu H, Sora I, Koga H, Kaneko Y, Ikeda K. Association between *OPRM1* gene polymorphisms and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. *Pain* **147**:194-201 (2009). [査読有]

Nishizawa D, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Kasai S, Ogai Y, Han W, Hasegawa J, Shimoyama N, Sora I, Hayashida M, Ikeda K. Association between *KCNJ6* (*GIRK2*) gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. *PLoS ONE* **4**:e7060 (2009). [査読有]

Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, Katoh R, Tagami M, Ide S, Kasai S, Nishizawa D, Ogai Y, Hasegawa J, Komatsu H, Sora I, Fukuda K, Koga H, Hanaoka K, Ikeda K. Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with *OPRM1* gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics* **9**(11):1605-1616 (2008). [査読有]

Shigeta Y, Kasai S, Han W, Hata H, Nishi A, Takamatsu Y, Hagino Y, Yamamoto H, Koide T, Shiroishi T, Kasai K, Tsunashima K, Kato N, Ikeda K. Association of morphine-induced antinociception with variations in the 5' flanking and 3' untranslated regions of the mu opioid receptor gene in 10 inbred mouse strains. *Pharmacogenetics and Genomics* **18**(11):927-936 (2008). [査読有]

小林大輔, 笠井慎也, 池田和隆. 鎮痛薬感受性個人差の遺伝的因子. *Anesthesia 21 Century* **10**(3-32):4-12 (2008). [査読無]

笠井慎也, 池田和隆, 下山直人. がん性疼痛患者におけるオピオイドの作用, 副作用に関する遺伝子解析. *ペインクリニック* **29**:S439-S449 (2008). [査読無]

笠井慎也, 池田和隆. 鎮痛薬感受性個人差の遺伝子メカニズム. *LiSA* **15**[別冊'08]:96-105 (2008). 査読無

井手聡一郎, 笠井慎也, 池田和隆. 医療用麻薬の鎮痛効果の個人差. *神経精神薬理学雑誌* **28**:43-48 (2008). [査読有]

Kasai S, Hayashida M, Sora I, Ikeda K. Candidate gene polymorphisms predicting individual sensitivity to opioids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **377**:269-281 (2008). [査読有]

[学会発表](計 9 件)

Nishizawa D *et al.*, A genome-wide association study on opioid analgesic sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, 2009/10/22, Honolulu, USA.

西澤大輔 他, ゲノムワイド関連解析によるオピオイド鎮痛薬感受性関連遺伝子多型の網羅的探索. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 2009/09/24, 東京.

Kasai S et al.,  $\mu$ -Opioid peptide receptors (MOPs) are detected as broad bands around 65 kDa in western blotting: analyses using MOP knockout mice. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, 2009/08/18-19, Seoul, Korea.

池田和隆 他, 鎮痛薬感受性個人差の遺伝子メカニズムの臨床応用. 第 2 回日本緩和医療学会年会, 2008/10/19, 横浜.

福田謙一 他, ヒト  $\mu$ -オピオイド受容体遺伝子(*OPRM1*)の一塩基多型(SNPs)が、下顎骨切り術を受ける患者におけるフェンタニルの鎮痛効果に及ぼす影響. 第 29 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2008/08/30, 富山.

池田和隆 他, 鎮痛のファーマコゲノミクス. 第 33 回日本外科系連合学会学術集会, 2008/06/12, 浦安.

[ 図書 ] (計 2 件)

Koide T, Catanesi CI, Nishi A, Shiroishi T, Kasai S, Ikeda K, Takahashi A. Nova Science Publishers, Advantage of using wild-derived mouse strains for a variety of pain-related studies: Genetic diversity and new genetic tools. In: Acute Pain: Cause, Effects and Treatment (Sam D' Alonso, Katherine L. Grasso, ed), pp79-99 (2009).

Kobayashi D, Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Hayashida M, Fukuda K, Ikeda K. Nova Science Publishers, Association between analgesic requirements after major abdominal surgery and polymorphisms of the opioid metabolism-related gene *ABCB1*. In: Acute Pain: Cause, Effects and Treatment (Sam D' Alonso, Katherine L. Grasso, ed), pp101-110 (2009).

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 2 件)

名称 : POMC 遺伝子解析による薬物感受性の評価方法

発明者 : 池田和隆、笠井慎也、林田眞和、樋口進

権利者 : 財団法人 東京都医学研究機構

種類 : PCT 出願

番号 : PCT/JP2008/058083

出願年月日 : 20 年 4 月 25 日

国内外の別 : 国内

名称 : POMC 遺伝子解析による薬物感受性の評価方法

発明者 : 池田和隆、笠井慎也、林田眞和、樋口進

権利者 : 財団法人 東京都医学研究機構

種類 : 特許出願

番号 : 2009-511918

取得年月日 : 21 年 10 月 23 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 : 笠井 慎也 (KASAI SHINYA)  
財団法人 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号 : 20399471

(2) 研究分担者 : なし

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 : なし

( )

研究者番号 :