

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792016

研究課題名（和文）：レミフェンタニルによる急性耐性・痛覚過敏のメカニズム解明ならびに新規麻酔法の開発

研究課題名（英文） Internalization and recycling profiles of  $\mu$ -opioid receptors induced by remifentanil ; Implication for the mechanism of tolerance and hyperalgesia

研究代表者

倉田 眞治 (KURATA SHINJI)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：20325666

研究成果の概要（和文）：

レミフェンタニル(RF)は、時に急性耐性や術後痛覚過敏を引き起こす。オピオイドによる急性耐性獲得や痛覚過敏発症に、 $\mu$ オピオイド受容体(MOR)の細胞内移行や再感作様式への関与が示唆されている。RFおよびS(+)-ケタミンの併用によるMORの細胞内移行や再感作様式に与える影響を解析し、RFのMORに対しどのように作用するのか、その分子メカニズム解明と発症予防対策について検討した。RFは濃度依存性にMORの再感作を抑制した。これが急性耐性や術後痛覚過敏を引き起こす一因かもしれない。また、ケタミン併用によりRFによる $\mu$ ORの細胞内移行を抑制し、再感作を促進した。S(+)-ケタミンはRFによる急性耐性・痛覚過敏発症予防に有用かもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Remifentanil occasionally induces acute tolerance and postoperative hyperalgesia. Development of acute tolerance and opioid-induced hyperalgesia might be related to accelerated internalization and impaired recycling of  $\mu$ -opioid receptor (MOR). We thus examined the internalization and recycling profiles of MOR induced by remifentanil. We further investigated the effects of co-treatment with S(+)-ketamine and remifentanil on the internalization and recycling of MOR. We demonstrated that higher concentrations of remifentanil caused impairment of MOR recycling, which may explain acute tolerance or hyperalgesia after infusion of remifentanil at high concentrations in the clinical settings. Furthermore, we found that co-treatment with S(+)-ketamine prevented the impairment of MOR recycling induced by remifentanil. Combinational use with S(+)-ketamine and remifentanil may prevent the acute tolerance and postoperative hyperalgesia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学・歯科麻酔学

キーワード：歯科麻酔学，レミフェンタニル，耐性形成，痛覚過敏，オピオイド受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年全身麻酔中の鎮痛は，主に超短時間作用性オピオイドであるレミフェンタニルが使用されている。レミフェンタニルは強力な鎮痛作用を有するのみならず，作用発現・消失が速く，安定した麻酔維持や速やかな覚醒を期待できる。しかし，口腔外科手術後に激しい術後痛を引き起こし鎮痛対策に難渋する場合もあり，耐性出現や痛覚過敏発症の可能性も報告されている。(Guignard B, et al.:Anesthesiology 2000;93(2):409-17. Angst MS, et al.:Pain 2003;106(1):49-57.)

このことからレミフェンタニル麻酔では急性耐性獲得および痛覚過敏形成の予防を目的に，各種薬剤を併用し検討した臨床報告もある(Joly V, et al.: Anesthesiology 2005;103(1):147-55.)が，その有効性についてはまだ十分な検討・確認がされていない。このようにレミフェンタニルの急性耐性に関する臨床報告は多いが，基礎的研究においては電気生理学的解析がなされているのみであり，レミフェンタニルの耐性獲得の分子機構についてはまだほとんど解明されていない。

オピオイド製剤は， $\mu$ オピオイド受容体(MOR)に結合するとリン酸化酵素が結合し，受容体のリン酸化がおこる。リン酸化された受容体には $\beta$ -アレスチンが結合し，受容体が細胞内に引き込まれる。これをinternalization(細胞内移行)という。Internalizationされた受容体は80%が脱リン酸化されて細胞膜にrecycleされ，残りは分解される。耐性形成の様式は製剤ごとに異なることが知られており，その原因の一つとして，上述の $\mu$ オピオイド受容体の細胞内へ

のinternalizationおよび細胞膜へのrecyclingの違いが示唆されている。(Imai S, et al.: Jpn. J. Neuropsychopharmacol 2006;26 183-192)

## 2. 研究の目的

- (1) レミフェンタニルの濃度や作用時間の違いがMORの細胞内局在にどのような影響を及ぼすかを検討することにより，その分子メカニズムを明らかにする。
- (2) 得られた結果をもとにレミフェンタニルの耐性形成に抑制効果があると考えられている鎮痛剤(S(+)-ケタミン)を併用し同様に解析および比較・検討し，レミフェンタニル麻酔による耐性形成を抑制し得る麻酔法を検討する。

## 3. 研究の方法

細胞膜上に蛍光タンパクVenus融合 $\mu$ オピオイド受容体を発現させたBHK(Baby Hamster Kidney)細胞にレミフェンタニルを作用させ，濃度や作用時間の違いや各種鎮痛剤の併用が，MORの細胞内局在，すなわちinternalization(細胞内移行)およびrecycling(再感作)の状態にどのような影響を与えるかを，共焦点レーザー顕微鏡を用い評価する。

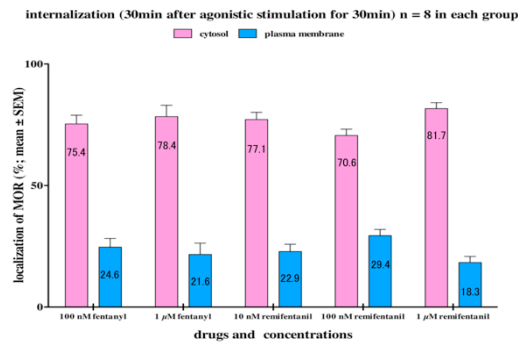
## 4. 研究成果

- (1) レミフェンタニルとフェンタニルによる受容体刺激時間および濃度の違いが，MORの細胞内移行および再感作様式に与える影響について共焦点レーザー顕微鏡で検討した。

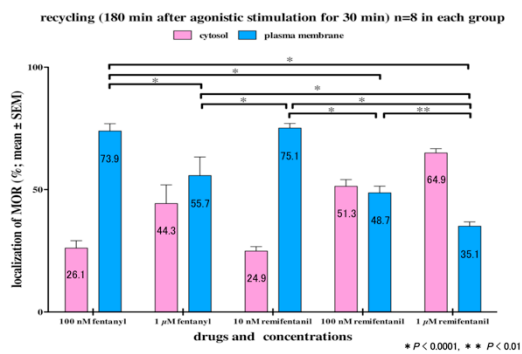
グラフは，各濃度のレミフェンタニル(10 nM,

100 nM, 1 μM), フェンタニル(100 nM, 1 μM) 30分間および120分間刺激後のMOR細胞内局在について示す。

[30分間刺激群]

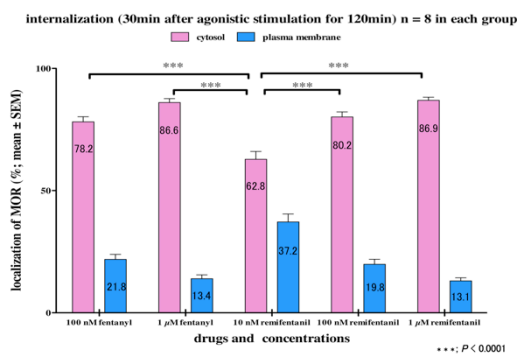


各濃度のレミフェンタニルおよびフェンタニルは、刺激後30分にほとんどのMORが細胞内に細胞内移行された。



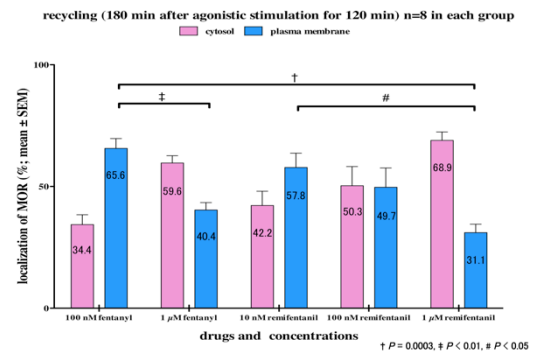
一方、刺激後180分には、100 nM フェンタニルでは多くのMORが細胞膜へ再感作された(74%)が、レミフェンタニルは濃度依存的に再感作が抑制された(10 nM, 75; 100 nM, 49; 1 μM, 35%)。また同一濃度のフェンタニルに比べレミフェンタニルは再感作を有意に抑制した。

[120分間刺激群]



刺激後30分において10 nM レミフェンタニル

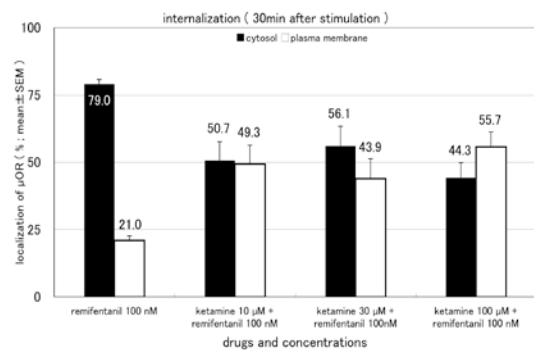
では他に比べ細胞内移行の抑制が認められた。



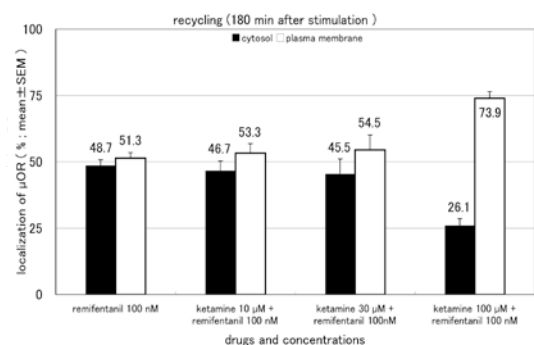
刺激後180分ではレミフェンタニル・フェンタニル共に濃度依存的に再感作を抑制した。

(2) S(+)-ケタミンがレミフェンタニルによるMORの細胞内移行および再感作様式に与える影響についても検討した。

グラフは、レミフェンタニル 100 nMおよびS(+)-ケタミン(10・30・100 μg)併用による30分間刺激後のMOR細胞内局在について示す。



各濃度のS(+)-ケタミン併用によりレミフェンタニルによるMORの細胞内移行が抑制された。



S(+)-ケタミン 100  $\mu$ M併用により, レミフェンタニル100 nMによる MORの細胞膜への再感作が促進された。

以上の結果より,

- ① レミフェンタニルは濃度依存性に MOR の細胞膜への再感作(recycling)を抑制した。
- ② 低濃度レミフェンタニルによる長時間の暴露も, 同様に MOR の細胞膜への再感作(recycling) を抑制した。

このことは, 高濃度レミフェンタニルもしくは長時間のレミフェンタニル使用が, MOR の internalization/recycling 過程に影響を与え, その結果急性耐性や術後痛覚過敏の惹起に関与している可能性が示唆された。

また,

- ③ S(+)-ケタミンはレミフェンタニルによるMORの細胞内移行を抑制し, 100  $\mu$ Mでは再感作を促進した。

このことは, ケタミンの急性耐性予防効果にはNMDA受容体拮抗作用のみならずMORの internalization/recycling様式に影響を与えている可能性が示唆された。

今後は, レミフェンタニルとその他各種鎮痛剤・細胞内外活性タンパク質(例;PP2A・Rab4・ERKなど)併用による影響について検討を行うとともに, in vitroで得られた結果を基に, レミフェンタニルと薬剤の組み合わせを用いて, 実験動物(ラットおよびマウス)での行動薬理的解析を行い, 比較検討をしていきたい。

## 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1件)

1. Yuka Sudo, Minoru Hojo, Yuko Ando, Masafumi Takada, Hiroaki Murata, Shinji Kurata, Noriyuki Nishida, Uezono, Yasuhito: GABAB receptors do not internalize after baclofen treatment, possibly due to a lack of  $\beta$ -arrestin association: study with a real-time visualizing assay, Synapse, 2012, in press.

[学会発表] (計3件)

1. 倉田眞治, 安藤優子, 高田正史, 北條美能留, 大井久美子, 上園 保仁  
remifentanil による  $\mu$ -オピオイド受容体の細胞内局在の解析-受容体刺激時間および濃度による影響-, 日本麻酔科学会第 57 回学術集会, 2010 年 6 月 3 日-5 日, 福岡
2. Kurata S, Ando Y, Sumikawa K, Oi K, Uezono Y., Remifentanil-induced impairment of  $\mu$ -opioid receptor recycling, The 2009 American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, Oct 17th-21st 2009, New Orleans, USA.
3. 倉田 眞治, 安藤優子, 高田正史, 北條美能留, 大井久美子, 上園保仁  
レミフェンタニルによる  $\mu$  オピオイド受容体の細胞内移行および再感作様式の解析-フェンタニルとの比較および S(+)-ケタミン併用の影響-, 日本麻酔科学会第 56 回学術集会, 2009 年 8 月 16 日-18 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 眞治 (Kurata Shinji)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：20325666

(2) 研究協力者

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)

国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20213340

鮎瀬 卓郎 (AYUSE TAKAO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号：20222705

河井 真理 (KAWAI MARI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

大学院生

渡邊 利宏 (WATANABE TOSHIHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

大学院生