

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25年4月1日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791441

 研究課題名（和文） μ - δ オピオイド受容体複合体を介したレミフェンタニルによる鎮痛メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of analgesic action of remifentanil through dimerized mu-delta opioid receptors

研究代表者

村田 寛明（MURATA HIROAKI）

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90437856

研究成果の概要（和文）： μ - δ オピオイド受容体複合体を発現した baby hamster kidney 細胞にレミフェンタニルを投与すると、受容体複合体のインターナリゼーションおよびリサイクリングを生じる。 μ 受容体を単独で発現させた細胞にレミフェンタニルを作用させた場合と比較して、リサイクリングの程度が大きいことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Baby hamster kidney cells transfected with Venus-fused mu opioid receptors and Cerulean-fused delta opioid receptors were treated with remifentanil. To investigate the remifentanil-induced internalization and resensitization of the heterodimers, cells were fixed and examined by confocal microscopy after treatment of remifentanil. Fluorescence resonance energy transfer analysis was performed to confirm the heterodimerization of mu opioid receptors and delta opioid receptors. Remifentanil caused internalization of mu-delta heterodimers in a dose-dependent manner. Compared to our previous study using baby hamster kidney cells transfected with mu opioid receptors alone, baby hamster kidney cells transfected with mu opioid receptors and delta opioid receptors were more efficiently returned to plasma membrane after the remifentanil-induced internalization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
平成24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科、細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：オピオイド受容体、二量体、レミフェンタニル、急性耐性

1. 研究開始当初の背景

オピオイド受容体は、 μ 受容体、 δ 受容体、 κ 受容体に大別されるが、医療用麻薬として使用されるモルヒネ、フェンタニル、オキシコドン、レミフェンタニルの各オピオイド製剤は主に μ 受容体に作用して鎮痛効果を発揮する。近年、 μ 受容体が δ 受容体と二量体化複合体 (μ - δ 二量体) を形成し、単独の受容体とは異なる薬理学的特性を示すことが明らかとなってきた (Gomes I, et al: PNAS 2004)。特に、 μ - δ 二量体はオピオイド耐性形成に重要な役割を果たしていることが示され、 μ 受容体アゴニストと δ 受容体アンタゴニストの併用による μ - δ 二量体刺激は、鎮痛効果が増強される一方、副作用は軽減することが示唆されている (Abdelhamid EE, et al: J Pharmacol Exp Ther 1991)。

超短時間作用性のオピオイド製剤であるレミフェンタニルは効果発現や消失が速やかであるため、安定した麻酔維持や速やかな覚醒に対して有用であり、全身麻酔中の投与に非常に適している。しかし、レミフェンタニル使用時の問題点として、急性耐性や痛覚過敏を生じることが指摘されている (Guignard B, et al: Anesthesiology 2000)。静脈麻酔薬であるケタミンにレミフェンタニルの急性耐性・痛覚過敏予防効果があるとする臨床報告が見られるが (Joly V, et al, Anesthesiology 2005)、レミフェンタニルによる急性耐性・痛覚過敏の分子メカニズムはほとんど解明されていないのが現状である。

一方、平成 19 年のがん対策基本法施行による緩和医療の普及により、モルヒネやフェンタニルをすでに投与されているがん患者などに対する手術に際し、レミフェンタニルを用いた全身麻酔を行う機会が増加している。レミフェンタニルによる全身麻酔下に手術を行った場合、術後鎮痛に他のオピオイド製剤を併用する機会が多く、すでにオピオイド製剤を使用している患者へ、レミフェンタニルと他のオピオイド製剤の安全かつ適切な併用方法を提供することは、質の高い周術期疼痛管理を行う上で今後重要な課題となると考えられる。

現在、レミフェンタニルは全身麻酔中の鎮痛薬として重要な役割を担っている。レミフェンタニルによる急性耐性・痛覚過敏を抑制しつつ、他のオピオイド製剤の併用等による鎮痛作用を高めるためにも、レミフェンタニル投与による μ - δ 二量体刺激後の細胞内動

態並びにシグナル変化を分子レベルで解析し、 μ - δ 二量体刺激効果を生かした、「鎮痛効果を増強し副作用を軽減する処方」を明らかにすることは、周術期の各種鎮痛薬の最適な投与方法を開発する上で早急に取り組むべき課題である。 μ - δ 二量体に対するオピオイド製剤の特異的な効果を選択的に解析することは容易ではないが、我々は共焦点レーザー顕微鏡および生化学的手法を用いた特異的解析方法を確立し、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、 μ - δ 二量体を介したレミフェンタニルの薬理作用に関する分子生物学的機序を明らかにし、臨床におけるレミフェンタニルの新たな効果的使用方法を開拓する。

具体的には、

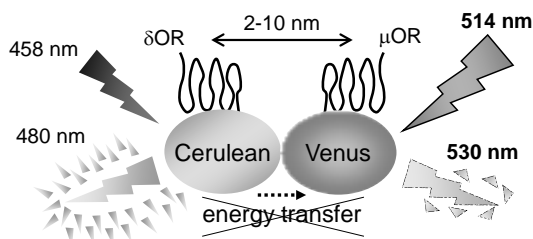
- (1) μ - δ 二量体の細胞内動態に対するレミフェンタニルの影響を、他のオピオイドなどの各種薬剤との併用による修飾を含めて解析する。
- (2) レミフェンタニルによる鎮痛および急性耐性・痛覚過敏に関連する生理活性分子並びにシグナル伝達機構を明らかにし、その新たな薬理学的制御方法を開拓する。
- (3) 既にオピオイド製剤の投薬を受けているがん患者等に対し、全身麻酔中の適切なレミフェンタニルの使用方法を確立するための基礎知見を蓄積する。

3. 研究の方法

Effectene®を用いて、細胞膜上に μ 受容体 Venus (μ 受容体に黄色蛍光タンパク Venus を結合した cDNA) と δ 受容体 Cerulean (δ 受容体に青色蛍光タンパク Cerulean を結合した cDNA) を baby hamster kidney 細胞に共発現させる。発現ベクターの transfection 後 24 時間の時点でまず複合体化受容体の存在を確認する。近接している Cerulean と Venus による共鳴による励起エネルギーの移動を利用する Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 現象を acceptor bleaching 法を用いて検出し、 μ - δ 二量体形成を証明する (図 1)。

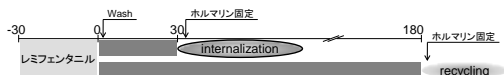
この baby hamster kidney 細胞に、種々の条件下でレミフェンタニルを作用させる。レミフェンタニルの濃度は臨床使用濃度等を考慮し、主として $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ とした。作用時間は 30 分とした。レミフェンタニルを細胞培養液中から除去後 30 分の時点で、細胞膜に存在する受容体の細胞質内への移行 (internalization) を、除去後 180 分の時点で、細胞質に移動した受容体の細胞膜への再移動 (recycling) を評価した (図 2)。 μ - δ 二量体の細胞内局在の評価には、共焦点レーザー顕微鏡を用いる。FRET 現象により μ - δ 二量体の存在を確認した単一細胞について、受容体が細胞質と細胞膜のどちらに偏在しているかを評価し、その比率を算出した。

図 1. Acceptor bleaching



FRETが生じる条件下で514nmの励起波長によりVenusを退色させると、458nmの励起波長を用いた際に生じるCeruleanからVenusへの励起エネルギーの移動がなくなり、相対的にCeruleanによる480nmの蛍光が増強する現象。FRET現象が生じていたことを証明できる。

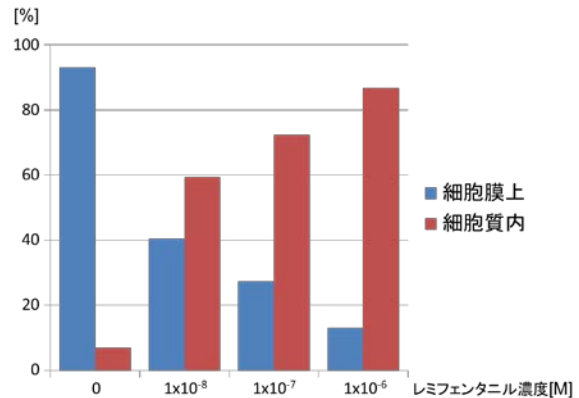
図 2. internalization と recycling の評価



4. 研究成果

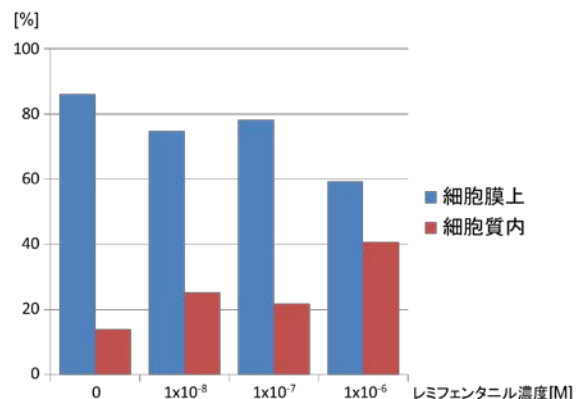
細胞膜上に μ - δ 二量体を発現させた baby hamster kidney 細胞にレミフェンタニルを 30 分間作用させ、レミフェンタニル除去後 30 分の時点で μ - δ 二量体の細胞質内への移行 (internalization) を評価した。その結果、レミフェンタニル濃度が 0 , $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の場合、レミフェンタニル除去後 30 分の時点で細胞質内に局在する μ - δ 二量体の比率はそれぞれ 7.0%, 59.5%, 72.5%, 86.8% であった。このことから、レミフェンタニルは濃度依存性に μ - δ 二量体の internalization を誘発することが明らかとなった (図 3)。

図 3 レミフェンタニル投与後30分における μ - δ 二量体の細胞内局在



同様に、細胞膜上に μ - δ 二量体を発現させた baby hamster kidney 細胞にレミフェンタニルを 30 分間作用させ、レミフェンタニル除去後 180 分の時点で μ - δ 二量体の細胞質から細胞膜上への再移行 (recycling) を評価した。その結果、 0 , $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の場合、レミフェンタニル除去後 30 分の時点で細胞膜上に局在する μ - δ 二量体の比率はそれぞれ 14.0%, 74.8%, 78.2%, 59.3% であった。

図 4 レミフェンタニル投与後180分における μ - δ 二量体の細胞内局在



internalization の時に認められたような濃度依存性は明らかではないが、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ と比較的高濃度のレミフェンタニルを作用させると、recycling が抑制されやすいことが明らかとなった (図 4)。

ここで認められる recycling の程度は、 μ 受容体のみ存在下にレミフェンタニルを投与した際と比較して大きかった (data not shown)。したがって、 μ - δ 二量体が存在するとレミフェンタニルにより誘発された internalization は recycling を生じやすいことが考えられる。 μ 受容体および δ 受容体は複合体を形成することにより、recycling が促進され、レミフェンタニル投与による急性耐性形成や痛覚過敏の軽減に関与している可能性が示唆された。

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)

須藤結香、北條美能留、安藤優子、高田正史、村田寛明、倉田眞治、西田教行、上園保仁、
GABA(B) receptors do not internalize after
baclofen treatment, possibly due to a lack
of β -arrestin association: study with a
real-time visualizing assay. Synapse 66:
759-769, 2012 査読有

[学会発表] (計1件)

須藤結香、宮野加奈子、村田寛明、北條美能
留、長瀬隆弘、西田教行、上園保仁：細胞膜
移行性シグナルペプチドを付加した
HaloTag-GPCR の発現様式ならびにその機能
的アッセイ、第85回日本薬理学会年会、
H24.3.15、京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 寛明 (MURATA HIROAKI)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90437856

(2) 研究協力者

上園 保仁 (UEZONO YASUHITO)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所・分野長

研究者番号：20213340

須藤 結香 (SUDO YUKA)

独立行政法人国立がん研究センター・

研究所・研究支援者

研究者番号：70646695