

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592252

研究課題名(和文) T細胞に発現するオピオイド受容体の機能とその意義に関する研究

研究課題名(英文) The study on functions of opioid receptors expressed in T lymphocytes

研究代表者

正田 丈裕 (Shoda, Takehiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60335263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：麻薬の副作用の一つに免疫抑制があるが、その機序に免疫担当細胞に発現するオピオイド受容体が関連している可能性がある。

われわれは以前、ヒトTリンパ球およびTリンパ球系培養細胞であるJurkatにおいて、オピオイド受容体のアミノ末端が切れた変異体(KOR4と名付けた)の存在を示した。現在、その遺伝子をクローン化して別の細胞に発現させ、KOR4の性質を検討している。また、Tリンパ球およびJurkatにモルヒネを前投与すると、T細胞受容体を活性化する刺激に対して惹起される細胞内応答が変化することを明らかにした。この実験結果は、麻薬がTリンパ球の性質を、さらには免疫応答を変化させる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Narcotics have been reported to develop immunosuppression as one of their side effects, the mechanism of which might be involved in opioid receptors expressed on immune cells, such as T lymphocytes.

We have cloned before, from human T cell cDNA library, the cDNA encoding a splice variant of kappa opioid receptor, truncated at its amino terminus (termed as KOR4). The stable transformants of HEK293 cells heterologously transfected with KOR4 cDNA are now being constructed and characterization of KOR4 will be investigated. Moreover, we have demonstrated that, in human T lymphocytes and Jurkat cells, signaling pathways by T cell receptor stimulation would be altered by morphine pretreatment. These results suggest that narcotics could change T cell functions and modulate immune systems.

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：麻薬 モルヒネ Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

モルヒネを代表とするオピオイドは、周術期や慢性疼痛のコントロールにおいて多大な貢献をしているが、呼吸抑制、嘔気、便秘、身体・精神依存等多岐にわたる副作用が知られている。副作用には単球・マクロファージやリンパ球等の免疫担当細胞に存在するオピオイド受容体が関与すると考えられるもの、すなわち免疫抑制がある。

これまで免疫担当細胞におけるオピオイド受容体の存在が多くの研究施設から報告されてきた。われわれも、ヒト血液から分離した T リンパ球 (CD3 陽性 (+) T 細胞) および T 細胞系培養細胞 Jurkat から Total RNA を抽出し、 μ 、 κ 、 δ オピオイド受容体 cDNA 塩基配列に基づき作成したプライマーによって RT-PCR を施行し、 κ オピオイド受容体 (KOR1) 遺伝子に由来するメッセンジャー RNA が、CD3 (+) T 細胞および Jurkat に存在することを明らかにした (Biochim. Biophys. Acta. 1790, pp793-799, 2009)。

(1) KOR1 遺伝子は、3つのエクソンによって構成されている。上記の報告の中で、われわれは T 細胞から抽出した Total RNA を鋳型として exon2 内の順方向プライマー、エクソン 3 内の逆方向プライマーを用いて RT-PCR を行い、塩基配列解析の結果、PCR 産物は KOR1 遺伝子の一部の配列であることを確認した。一方、KOR1 のエクソン 1 を含む PCR 産物は検出されなかった。この結果は、KOR1 のエクソン 2 の上流に、エクソン 1 が存在しないスプライス変異体が存在することを示唆する。次に、エクソン 2 の上流にエクソン 1 とは異なる領域が存在することを証明するため、5' -RACE (既知の遺伝子の上流にあると予想される未知の遺伝子のクローニング) を施行した。その結果、エクソン 2 の上流に、従来はイントロンと考えられていた領域が結合する cDNA をクローニングし、その領域には開始コドン ATG が存在することを示した。この新規 cDNA の塩基配列解析からアミノ酸配列を推測した結果、従来 G タンパク共役受容体であるオピオイド受容体の特徴である 7 回膜貫通構造のうち、第 1 膜貫通領域を欠損する膜タンパクであることが明らかになった。この新規 κ オピオイド受容体スプライス変異体を仮に KOR4 (これまで、KOR2、KOR3 が報告されているため) と命名した。(図 1、未発表データ)

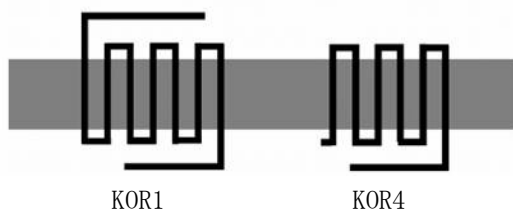


図 1: KOR1、KOR4 の構造: KOR4 は 7 回膜貫通型である KOR1 の第 1 膜貫通領域を欠損する

(2) モルヒネによる免疫抑制のメカニズムの一部は T 細胞機能の変化によるものと考えられている。一方、T 細胞受容体 (TCR) が刺激されると、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路および nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路が活性化され、T 細胞の増殖や機能に影響を及ぼすことが知られている。

(3) モルヒネ等のオピオイドは、血管を弛緩させるといわれており、さらにモルヒネは血管内皮から一酸化窒素を放出させるとの報告もある。炎症等で免疫担当細胞は血管内皮細胞と接着し、細胞外に遊走されて、組織における免疫応答という役割を果たしている。オピオイドと血管および血管内皮に対する反応を解析することは意義が大きい。また、モルヒネによる血管に対する反応は報告があるが、最近臨床使用されている短時間作用型のオピオイドであるレミフェンタニルによる血管への効果は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オピオイドによる免疫抑制という有害事象のメカニズムを明らかにするために、オピオイドの作用点である T 細胞における新規オピオイド受容体の機能を解析すること、およびオピオイドの血管および血管内皮に対する反応を解析することである。

3. 研究の方法

(1) KOR4 の cDNA を PCR によって得て、pTarget 発現ベクターに組み込んだ。また、同時にエピトピータグを結合した受容体を作成するため、p3×FlagCMV10 ベクターにも組み込んだ。培養細胞 HEK293 細胞 (この細胞には KOR4 は存在しない) に cDNA を導入し、KOR4 が安定に発現する細胞株 (HEK-KOR4) を作成し、比較のために、KOR1 を安定発現する細胞 (HEK-KOR1) も同時に作製する。作製した細胞から作製した膜分画を用いて、リガンド結合アッセイを施行する。3 種のオピオイド受容体の共通リガンドである 3H-diprenorphine、3H-naloxone 等の KOR4 に対する結合活性を、リガンド結合実験によって解析する。KOR4 は従来の κ リガンドと結合しない可能性もある。

HEK-KOR4 にモルヒネあるいは U50, 488H 等のアゴニストを作用させ、急性投与によるアデニル酸シクラーゼの抑制、慢性投与による活性化あるいは ERK の活性化等、従来のオピオイド受容体でみられた細胞応答が存在するかを検討する。また、類似受容体である μ 3 オピオイド受容体でみられたモルヒネ刺激による NO 産生の可能性も検討する。

CD3(+)T 細胞の解析で得られた、モルヒネ刺激による P53 の活性化、DNA 損傷の誘導 (Biochim. Biophys. Acta. 1790, pp793-799, 2009) 等が、HEK-KOR4 でも再現できるかを検討する。これらの細胞応答は T 細胞のみで見られる反応である可能性もあるため、KOR4(+)Jurkat および KOR4(-)Jurkat を用いた実験も行う。

(2) 図 2 に T 細胞受容体 (TCR) が活性化した際の細胞内シグナル伝達の模式図を示す。ヒト末梢血から単離した CD3+T 細胞およびヒト T 細胞系培養細胞 Jurkat を塩酸モルヒネで 24 時間刺激した後、抗 CD3 抗体あるいはフォルボールエステル (PMA) およびイオノマイシンによって TCR を活性化した。モルヒネ前刺激がある場合とない場合で、ERK のリン酸化 I κ B α のリン酸化をウェスタンブロットで解析し、比較した。また、モルヒネの前刺激の有無で、TCR 活性化によりインターロイキン-2(IL-2) の遺伝子発現の変化に違いがあるかどうかを解析した。さらに、これらの変化がオピオイド受容体を介するかを、拮抗薬であるナロキソンの同時投与で検討した。CD3+T 細胞および Jurkat には κ オピオイド受容体 (KOR) 遺伝子が存在することを PCR によって以前明らかにしたが、KOR1 の選択的アゴニストである U50, 488 はモルヒネと同様の効果をもたらすかどうかを検討した。

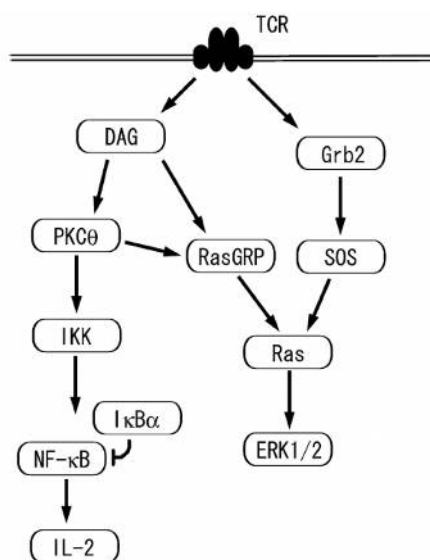


図 2 : TCR 刺激から ERK、NF- κ B 経路にいたる細胞内情報伝達経路

(3) ラット胸部大動脈あるいは腸間膜動脈条片標本を好氣的条件下で生理的栄養液中に懸垂し、血漿や薬物の投与による等尺性張力変化を記録した。弛緩反応はフェニレフリンで前収縮させた標本に物質を直接投与することで観察し、塩酸パパペリンで得られる最大弛緩を 100%として相対的に表した。内皮機能の関与は、内皮を保存した標本と剥離

した標本における作用を比較することで評価した。内皮の有無は 2-Methylthio-ADP に対する反応性で判定した。

4. 研究成果

(1) いまだ KOR4 の安定発現細胞を作成している段階である。本来、7 回膜貫通型の G タンパク共役受容体が 6 回膜貫通型になった変異体であり、発現することが難しい可能性があるが、現在この研究を継続中である。

(2) CD3+T 細胞および Jurkat を 100 μ M 塩酸モルヒネで 24 時間刺激した後、TCR を活性化すると、モルヒネ前刺激がない場合に比較して ERK のリン酸化が増強し、逆に I κ B α のリン酸化は減弱することを示した。さらにモルヒネの前刺激により、TCR 活性化による IL-2 の遺伝子発現が減少することが明らかになった。また、これらの変化は、オピオイド受容体アンタゴニストであるナロキソンで拮抗できなかった。KOR1 の選択的アゴニストである U50, 488 はモルヒネと同様の効果をもたらさなかった。以上の結果は、T 細胞において、モルヒネの前刺激は ERK 経路の活性化および NF- κ B 経路の抑制を引き起こすが、この効果は従来のオピオイド受容体を介さないことを示唆する。今回得られた知見は、モルヒネの慢性投与が T 細胞の機能変化を引き起こすメカニズムを説明する一つの証拠を提供し、かつ KOR4 の機能解明をすることの意義を再確認した。

(3) モルヒネ及びレミフェンタニルは内皮非依存性に、ラット大動脈および腸間膜動脈を収縮させることが明らかになった。弛緩反応を示すと予想していたので、この反応の臨床的意義は不明である。

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 1 件)

- ① Toshiyuki Mizota, Hiroshi Tsujikawa, Takehiro Shoda, Kazuhiko Fukuda, Dual modulation of the T-cell receptor-activated signal transduction pathway by morphine in human T lymphocytes. Journal of Anesthesia, 査読有, Vol. 27, 2013, pp. 80-87
DOI: 10.1007/s00540-012-1472-9.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正田 丈裕 (SHODA, Takehiro)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：60335263

(2) 研究分担者

岡村 富夫 (OKAMURA, Tomio)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：70152337

(3) 連携研究者

()

研究者番号：