

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593059

研究課題名(和文)レミフェentanilの二量体化オピオイド受容体脱感作メカニズムの解明

研究課題名(英文) Internalization and recycling profiles of dimeric 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(歯学系)・助教

研究者番号：20325666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：レミフェentanil(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、 μ オピオイド受容体(μ OR)の細胞内移行や再感作様式への関与が示唆されており、RFがオピオイド受容体の細胞内局在に与える影響について各種条件下で検討を行った。蛍光タンパク結合 μ ORを発現させた培養細胞を用いた従来の解析に加え可視化リアルタイム解析の結果、RFは濃度依存性に μ ORの細胞内移行を促進し、急性耐性や術後痛覚過敏を惹起する可能性が示唆された。またS(+)-ケタミン併用はRFによる μ ORの細胞内移行を抑制し、RFによる急性耐性・痛覚過敏発症予防に有効である可能性が示唆された。

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 μ -opioid receptor (MOR). We thus examined the intracellular localization profiles of MOR induced by remifentanil, and further investigated the effects of co-treatment with S(+)-ketamine and remifentanil on the internalization of MOR with real-time visualizing assay. We demonstrated that higher concentrations of remifentanil caused the acceleration of MOR internalization, 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 acceleration of MOR internalization induced by remifentanil. Combinational use with S(+)-ketamine and remifentanil may prevent the acute tolerance and postoperative hyperalgesia.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：歯科麻酔学

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔における手術侵襲時の侵害刺激および術後痛をはじめ、がん性疼痛・慢性疼痛に対する鎮痛に様々なオピオイド製剤が使用されているが、時に耐性形成や痛覚過敏を発症しその対応に難渋することがある。モルヒネやフェンタニルのほか、超短時間作用性オピオイドであるレミフェンタニル(以下RF)においても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、急性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)

がん性疼痛に対するオピオイドの使用では耐性形成対策としてオピオイド・ローテーションが行われる。周術期RF使用においても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がある(Joly V, et al.: Anesthesiology 2005; 103(1): 147-55)。しかしその有効性、作用メカニズムについては十分な検討が行われていない。RFの急性耐性に関する臨床報告は多いが、その分子メカニズムを解明する基礎的研究においては電気生理学的解析が散見されるのみであり、RFの耐性獲得の細胞内分子機構についてはほとんど解明されていないのが現状である。

オピオイド製剤は、 μ オピオイド受容体(以下 μ OR)に結合するとリン酸化酵素が結合、リン酸化された受容体に β -アレスチンが結合し、受容体が細胞内に引き込まれ、internalization(細胞内移行)される。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 μ OR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)

これまで我々は、細胞膜上に蛍光タンパクVenus融合 μ ORを発現させたBHK(Baby Hamster Kidney)細胞を用い、RFが μ ORの細胞内局在に与える影響を様々な条件下(作用時間・濃度・各種鎮痛剤)で比較検討を行い、

- (1) RFは濃度依存性にinternalizationを促進すると共にrecyclingを抑制する。
- (2) RFの長時間作用はrecyclingを抑制する。
- (3) S(+) μ ケタミン併用がRFによるinternalizationを抑制しrecyclingを促進する。

との結果を得て、RFによる急性耐性形成・痛覚過敏発症に、「高用量・長時間使用による μ オピオイド受容体 recycling 抑制が関与している可能性」・「ケタミンの予防効果の可能性」を明らかにした。

更に、RFに関する単量体オピオイド受容体での分子生物学的解析を進めるとともに、二量体化受容体をアッセイできるシステムを用い、RFの濃度や作用時間の違い・各種細胞内外活性調節タンパク質の存在の有無・各種鎮痛剤併用が、二量体オピオイド受容体の細胞内局在に与える影響も比較・検討し、より詳細な分子メカニズムを明らかにして、RFによる耐性形成を抑制し得る鎮痛法を臨床で使用可能にするための基盤を構築するために、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

本研究では、周術期におけるRFの最適な鎮痛法確立のため、我々が確立しているBHK細胞を用いた μ ORの細胞内局在の解析方法に加え、可視化リアルタイム解析を用い、RFが

- (1) 単量体および二量体化オピオイド受容体の細胞内局在に与える影響を様々な条件下で検討する。
- (2) 臨床で頻用されるフェンタニルなどの各種オピオイド製剤や各種鎮痛剤併用

下での、単量体および二量体化オピオイド受容体の細胞内局在に与える影響を比較検討する。

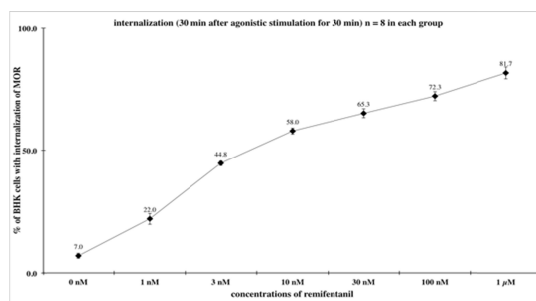
得られた結果をもとに、各種鎮痛剤が単量体および二量体化オピオイド受容体の耐性・痛覚過敏形成に与える分子機構を明らかにし、耐性・痛覚過敏形成を克服するための新規鎮痛法開発の基盤を構築する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞膜上に蛍光タンパク Venus 融合 μ OR および Cerulen 融合 オピオイド受容体を発現させた BHK 細胞に RF 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、オピオイド受容体の細胞内局在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。
- (2) 上記データを元に、Halotag pH Sensor Ligand(細胞膜非透過性・pH 低下により蛍光強度が上昇)を結合した μ OR(Halotag- μ OR)を発現させた Human Embryonic Kidney(HEK)293 細胞に、RF を作用させ、濃度や作用時間の違い・S(+) μ OR の併用が、単量体 μ OR の細胞内局在、すなわち internalization 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た可視化リアルタイム解析を用い評価する。

4. 研究成果

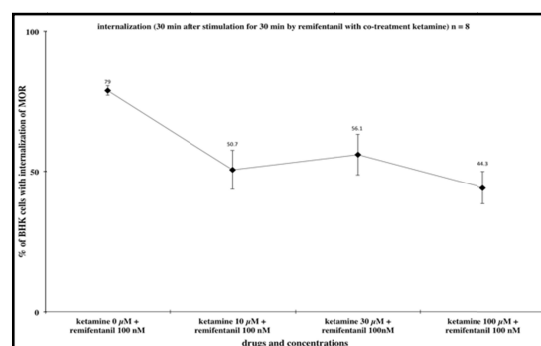
- (1) 蛍光タンパク(Venus)を連結した μ OR を BHK 細胞に発現させ、各濃度の RF(1-1000nM)を 30 分間刺激した後、 μ OR の細胞内局在に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した(30 分)。



RF は、 μ OR を濃度依存性に internalization させた。

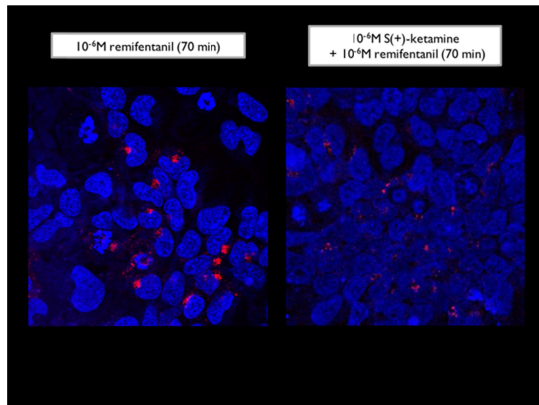
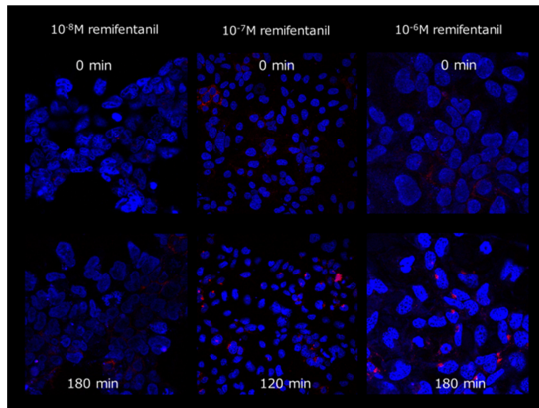
(1nM, 22; 3nM, 45; 10nM, 58; 30nM, 65; 100nM, 72; 1000nM, 82%)。

- (2) さらに、S(+) μ OR(10-100 μ M)で 10 分間処置後、30 分間 RF(100nM)で刺激し同様に観察した。



各濃度の S(+) μ OR 併用により、RF による μ OR の細胞内移行 internalization が各濃度(10, 30, 100 μ M)で抑制された(79% 51, 56, 44%)。

- (3) 客観的定量化のため、HEK293 細胞における Halotag- μ OR を用いた細胞内局在の可視化リアルタイム解析(オピオイド製剤を作用させることにより、Halotag- μ OR は internalization に伴う pH 低下により赤く発光する)でも濃度依存性に蛍光強度の上昇が S(+) μ OR 併用により蛍光強度の減少が認められた(現在詳細なデータ解析中)。



以上の結果から，高濃度 RF は μ OR の internalization を促進し、これが急性耐性や術後痛覚過敏を引き起こす可能性がある。また，S(+)-ケタミンは RF による internalization を抑制することで RF による急性耐性予防に有用かもしれない。

今後，当初予定していたが遂行できなかった，鎮痛効果・耐性形成を考える上で重要な役割を担っていると考えられている二量体化オピオイド受容体の形成・局在解析に有用な Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法と可視化リアルタイム解析の両手法を応用し，オピオイド製剤に関する単量体・二量体化オピオイド受容体に対するより詳細な分子メカニズムを明らかにして，オピオイド製剤による耐性形成を抑制し得る適切な周術期鎮痛法を臨床応用するための基盤を構築していきたい。

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. Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Nishida N, Uezono Y.

GABA(B) receptors do not internalize after baclofen treatment, possibly due to a lack of beta-arrestin association: study with a real-time visualizing assay. Synapse, 66(9): 759-69, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

1. 倉田真治，達聖月，讃岐拓郎，鮎瀬卓郎

remifentanylによる μ -オピオイド受容体の細胞内局在の解析:--with Real-time Visualizing Assay，第42回日本歯科麻酔学会総会・学術集会，2014年10月11日，日本歯科大学新潟生命歯学部（新潟）

6．研究組織

(1)研究代表者

倉田真治 (KURATA Shinji)

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：20325666

(3)連携研究者

上園保仁 (UEZONO Yasuhito)

国立研究開発法人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・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授

研究者番号：20222705