

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659289

研究課題名(和文)モルヒネ耐性発現における活性代謝物モルヒノンの役割解明

研究課題名(英文)The role of morphinone in the tolerance development to morphine

研究代表者

成松 鎮雄(NARIMATSU, SHIZUO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20113037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：モルヒネ(M)の活性代謝物モルヒノン(MON)につき検討した。まずM緩和療法を受けたがん患者の17尿サンプル全てからMONがLC/MSで検出された。次にラット由来リコンビナント17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素タイプ2と6を作成して速度論的解析を行った結果、NAD<sup>+</sup>又はNADP<sup>+</sup>存在下、タイプ2でのみMからMON生成が確認された。更に $\mu$ 受容体-緑色蛍光タンパク質融合体発現HEK293細胞系に $\mu$ 受容体作動薬DAMGO又はMを添加すると融合タンパク質のインターナリゼーションが確認された。この系はMONと $\mu$ 受容体との相互作用解析において有用なツールになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we characterized morphinone (MON) as an active metabolite of morphine (M), from various view points. Firstly, considerable amounts of MON were detected in urine samples from cancer patients receiving palliative therapy with M in the LC/MS analysis. Secondly, we characterized the enzyme(s) responsible for MON formation using recombinant rat 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases type 2 and 6, and kinetic analyses revealed that only type 2 catalyzed the conversion of M to MON in the presence of NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup>. Thirdly, HEK293 cells transformed with a vector in which cDNA encoding  $\mu$ -receptor-green fluorescence protein (GFP)-fusion proteins were introduced. Addition of M as well as DAMGO, a known  $\mu$ -receptor agonist, caused internalization of the fusion proteins in the cell membrane. This HEK 293 cell system may be a useful tool to analyze possible interaction between MON and  $\mu$ -receptor.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：モルヒノン、ヒト尿中代謝物、17 $\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素、モルヒネ、エピモルヒネ、 $\mu$ -受容体-GFP融合タンパク質、HEK293細胞、インターナリゼーション

### 1. 研究開始当初の背景

モルヒネ (M) はがん疼痛に対する緩和療法など、臨床面で不可欠の鎮痛薬である一方で、耐性・依存性発現に加えて便秘、嘔吐、体温下降等の副作用が問題となる。M の耐性発現機構に関して、G-タンパク質制御の K チャネルや Ca チャネル、並びにアデニレートシクラーゼの阻害 (1)、MAPK 経路の興奮、 $\beta$ -アレスチン 3 の関与 (2)、 $\mu$ -オピオイド受容体のインターナリゼーションの関与 (3) 等が考えられている。

モルヒネの代謝経路として、N-脱メチル化、6 位水酸基の脱水素、3 位及び 6 位水酸基のグルクロン酸抱合等が知られ、特にモルヒネ 6-グルクロニドは母化合物を上回る鎮痛効果を示す活性代謝物である (4)。一方、M 6-脱水素酵素により生成するモルヒノン (MON) は鎮痛活性を有さないが、グルタチオンやタンパク質の SH 基と容易に結合することから (5)、M 耐性発現における MON の関与が示唆されている。また M の構造異性体エピモルヒネ (EM) も鎮痛活性を持つもの (6)、それ以外の性質は明らかではない。生体内で MON から M と EM いずれも生成する可能性があり、M 耐性発現に MON が関与すれば、EM もそれに絡んでくる。さらに EM から MON が生成しにくいとすれば、EM 耐性は発現しにくいことにもなる。そこで本計画では、M から生成する活性代謝物 MON の M 耐性発現における役割を立体代謝化学的観点から追究することにした。

### 2. 研究の目的

本研究では

- (1) M を主とした緩和療法を受けている患者尿を用いて、ヒト *in vivo* における M からの MON 生成を確認すること、
- (2) ラット及びヒトにおける M から MON 生成に主に関与する酵素を明らかにすること、
- (3) ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を用いて、オピオイド受容体である  $\mu$  受容体-緑色

蛍光タンパク質 (GFP) 融合タンパク質の細胞膜発現系を構築し、M やそのジアステレオマーである EM によるインターナリゼーションの有無、並びに  $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質への MON 結合の有無を確認すること、を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 緩和療法患者の尿中 MON 定量実験：塩酸 M を用いた緩和療法を施されている岡山大学付属病院あるいは倉敷成人病センター入院がん患者尿 (17 サンプル) を採取し、LC/MS により尿中 MON を定量した。サンプルは Millex-LH シリンジフィルター (0.45  $\mu$ m, Millipore) を通した尿液を蒸留水で 10 倍希釈し、酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液で pH 3.5 に調整した。LC/MS 条件は以下の通りである。使用機器：Agilent Technologies 社製 Agilent 1100 series LC & LC-MSD SL MS, カラム; GL Science 社製 Inertsil C8-3 (3  $\mu$ m, 2.1 mm i.d. x 150 mm), 移動相; 10 mM HCOONH<sub>3</sub>/MeOH (80 : 20), 流速 0.2 mL/min, カラム温度; 40°C, SIM; m/z 284, m/z 115.3。塩酸モルヒノン標品を用いた絶対検量線法により、生成 MON 量を算出した。

(2) ラット肝臓からの 17 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (17 $\beta$ -HSD) type 2 及び type 6 をコードする cDNA クローニングと昆虫細胞発現系構築と酵素化学的性質の検討：山野ら (7) によりラット肝ミクロゾームが M から MON を生成することが明らかにされていることから、既に遺伝子クローニングされている小胞体膜結合性 17 $\beta$ -HSD type 2 及び type 6 に焦点を当て、既報 (8, 9) に従ってラット肝臓の Total RNA から cDNA をクローニングし、Sf9 昆虫細胞系に導入して酵素タンパク質を発現させた。これらを酵素源として、内因性基質である 17 $\beta$ -Estradiol (17 $\beta$ -E<sub>2</sub>) からの Estrone (E<sub>1</sub>) 生成と共に、M あるいは EM からの MON 生成を HPLC により定量し、速度論的に解析した。

(3)  $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質の HEK293 細胞発現系構築と  $\mu$  受容体作動薬によるインターナリゼーション解析実験：HEK293 細胞をディッシュに播種し、コンフルエントになった後、 $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質発現ベクターを jetPEI を用いてトランスフェクションした。細胞が蛍光を発していることを確認後、回収した細胞の溶解液について、抗ラット  $\mu$  受容体抗体および抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットによる  $\mu$  受容体の発現について検討した。また同様に操作して得られたソニケーション処理および無処理の細胞溶解液に Agarose conjugated Anti-GFP を加えて結合体を沈殿させ、SDS-サンプル buffer で処理した上清を直接電気泳動しウェスタンブロットを行った。このようにして得られた  $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質発現 HEK293 細胞に  $\mu$  受容体作動薬である DAMGO、M あるいはコデイン (C) を処理し、オピオイド処理 10、30 および 60 分後に蛍光顕微鏡で GFP タンパク質 (蛍光) の細胞内動態を観察した。PKC 阻害剤 calphostin c の影響を調べる場合には、細胞を 1  $\mu$ M calphostin c で 10 分間前処理した後、M あるいは C 処理し、同様に蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果 <結果>

(1) 緩和療法を受けたがん患者の尿中 MON の同定と定量：M を主とする緩和療法を受けているがん患者 10 名から得た 17 尿サンプルについて m/z 284.0 [ $M^+ + H$ ] を指標とする SIM-LC/MS 分析を行ったところ、全てのサンプルから MON が検出された。Figure 1 に 358 pmol/mL の MON が検出された女性患者 (非小細胞肺癌、MS コンチン投与) の尿サンプルのイオンクロマトグラムを示す。17 サンプル中に検出された MON の平均値は 394  $\pm$  423 pmol/mL 原尿 (最小値 28 pmol/mL, 最大値 1,633 pmol/mL) であった。

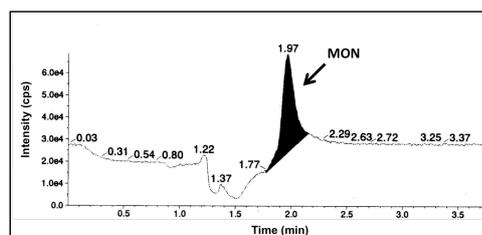


Fig. 1 SIM chromatogram showing morphinone in urine sample obtained from a cancer patient receiving palliative therapy with morphine

(2) ラット 17 $\beta$ -HSD type 2 及び type 6 のリコンビナント酵素による M からの MON 生成反応：既報 (7, 8) に従ってラット肝臓の Total RNA 画分から 17 $\beta$ -HSD type 2 及び type 6 を各々コードする cDNA をクローニングした。塩基配列、推定アミノ酸配列いずれも既報のものとは一致することを確認した後に昆虫細胞 (Sf9) 系に導入して酵素タンパク質を発現させ、その膜画分を酵素源とした。17 $\beta$ -E<sub>2</sub>、E<sub>1</sub>、M、EM あるいは MON を基質、NAD(H) あるいは NADP(H) を補酵素として反応させ、生成する酸化または還元生成体を HPLC にて定量した。その結果 17 $\beta$ -HSD type 2 による 17 $\beta$ -E<sub>2</sub>  $\rightarrow$  E<sub>1</sub> 生成反応は、NAD<sup>+</sup> を補酵素とした場合、 $K_m = 5.07 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 189.1 \text{ nmol/min/mg protein}$ 、NADP<sup>+</sup> では、 $K_m = 1.27 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 7.42 \text{ nmol/min/mg protein}$  であった。同様に 17 $\beta$ -HSD type 6 は、 $K_m = 1.88 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 14.1 \text{ nmol/min/mg protein}$  (補酵素 NAD<sup>+</sup>)、 $K_m = 17.2 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 30.1 \text{ nmol/min/mg protein}$  (補酵素 NADP<sup>+</sup>) であった。M  $\rightarrow$  MON 生成反応については、17 $\beta$ -HSD type 2 が活性 ( $K_m = 313 \mu\text{M}$ 、 $V_{max} = 162 \text{ nmol/min/mg protein}$  : 補酵素 NAD<sup>+</sup>) を示したのに対し、NAD<sup>+</sup> あるいは NADP<sup>+</sup> いずれを補酵素とした場合も、17 $\beta$ -HSD type 6 では MON 生成活性が認められなかった。一方、M 6 位水酸基の立体異性体である EM を基質とした場合、17 $\beta$ -HSD type 2、type 6 いずれも MON 生成活性は示さなかった。また MON からの還元反応を検討したところ、NADH を補酵素にしたときに M が生成したが、EM は生成しなかった。

(3) HEK293 細胞における  $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質発現系構築と  $\mu$  受容体作動薬によるインターナリゼーション解析: まず、細胞溶解液 (タンパク質量として 30~70  $\mu$ g) について、抗ラット  $\mu$  受容体抗体 (Novus NBP1-96656) での検出を試みたが上手く行かなかったことから、Agarose conjugated Anti-GFP を用いて細胞溶解液中の GFP タンパク質を特異的に結合させて濃縮抽出を行い、検出することにした。ソニケーション処理あるいは無処理の細胞溶解液、Agarose conjugated Anti-GFP 未処理の細胞溶解液、および Agarose conjugated Anti-GFP に結合しなかった細胞溶解液成分について電気泳動を行い、抗 GFP 抗体、抗ラット  $\mu$  受容体抗体 Novus NBP1-96656 Novus NB110-79878) によるウェスタンブロット分析を行った。いずれの抗体を用いた場合も、ラット  $\mu$  受容体 (分子量 49,000) と GFP (分子量 27,000) の融合タンパク質に相当する分子量 80,000 付近のバンドは検出されなかった。しかし抗 GFP 抗体を使ったウェスタンブロット分析では、細胞溶解液をソニケーション後に Agarose conjugated Anti-GFP で濃縮抽出したサンプルにおいてのみ GFP のところにバンドが検出された。また、抗ラット  $\mu$  受容体抗体 (Novus NB110-79878) を用いたウェスタンブロット分析では、細胞溶解液を Agarose conjugated Anti-GFP で濃縮抽出したサンプルで、ソニケーション処理の有無にかかわらず分子量 50,000 付近にバンドが確認された。そこで、この HEK236 細胞発現系を用いて、PKC 阻害剤 calphostin c 無処理細胞および前処理細胞における  $\mu$  受容体作動薬 DAMGO、M あるいは C による  $\mu$  受容体のインターナリゼーションについて検討した。その結果 1  $\mu$  M DAMGO 処理と calphostin c 前処理後の 10  $\mu$  M の M 処理で、 $\mu$  受容体のインターナリゼーションが観察された (Fig. 2) が、calphostin c 前処理細胞に C を 1 mM で処理

してもインターナリゼーションは認められなかった。

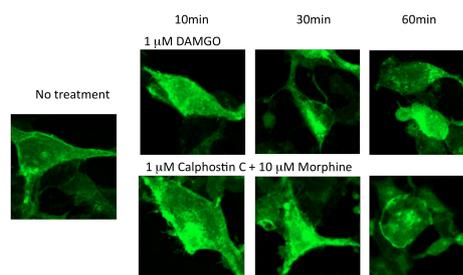


Fig. 2 Fluorescent microscope images showing internalization of  $\mu$ -receptor-GFP fusion proteins after treatment of HEK293 cells with DAMGO or morphine

### < 考察 >

本研究では、最初に主に M を用いた緩和療法を受けているがん患者の尿中からの MON 検出を試みたところ、分析した全ての尿サンプルから MON 生成が確認された。17 サンプル中の平均値は 0.39  $\mu$ M、最大値は 1.7  $\mu$ M であり、少なからぬ濃度の MON が M 投与患者の体内で生成していることを初めて明らかにした。

本研究計画の連携研究者である山野らは、既に人を含めた動物の肝細胞下画分 (マイクロゾームやサイトゾル) 並びにラットマイクロゾーム画分から得られた部分精製標品を用いた *in vitro* 実験より、ラット肝マイクロゾームのモルヒネ-6-脱水素酵素が M から MON 生成反応を触媒することを明らかにしているが (7)、モルヒネ-6-脱水素酵素の遺伝子を含めてその全貌は明らかにされていなかった。本研究では、ラット肝臓に複数発現している Short-chain dehydrogenase reductase の中で、特に膜結合性タンパク質である 17  $\beta$ -HSD type 2 と type 6 に焦点を当てて、そのタンパク質をコードしている cDNA をクローニングして、この 2 種類のリコンビナント酵素を各々昆虫細胞に発現させた。これらはいずれも内因性基質である 17  $\beta$ -E<sub>2</sub> を E<sub>1</sub> へと変換したが、M を MON へ変換する触媒機能は type 2 のみにしか見いだされなかった。さらに、M のジアステレオマーである EM からの MON 生成はいずれの酵素を用いた場合も認められず、

これらの基質と 17 $\beta$ -HSD タンパク質のドッキングシミュレーションからも、17 $\beta$ -HSD type 2 による脱水素反応には厳密な基質立体選択性のあることが示された。

蛍光顕微鏡下で、 $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質遺伝子をトランスフェクションした細胞中に GFP が発現していること、および細胞膜で強く蛍光を発していることが観察された。また、DAMGO あるいはモルヒネと PKC 阻害剤処理した両細胞で、蛍光物質の細胞膜から細胞内への移行（インターナリゼーション）が一部認められたことから、 $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質の発現が予想された。しかしながら、抗ラット  $\mu$  受容体抗体および抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット分析の結果からは、 $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質の発現を明確に示すことができなかった。この原因として細胞溶解液中でプロテアーゼによる発現タンパク質が分解されることや融合タンパク質発現量自体が非常に少ないこと等が考えられる。

本研究の遂行中に幾つかの困難な問題に遭遇して、当初の目的からすれば最終年度までの達成度は 80%程度と考えられる。しかし、ヒト尿中 *in vivo* M 代謝物としての MON 同定、ラット *in vitro* における MON 生成酵素としての 17 $\beta$ -HSD type 2 の確認、さらには  $\mu$  受容体-GFP 融合タンパク質発現細胞系のプロトタイプ構築に成功した。これらの結果を踏まえて、今後、ヒトにおける MON 生成酵素の確認と共に、細胞溶解液にプロテアーゼ阻害剤を添加して細胞膜成分の濃縮分離や、インサート ( $\mu$  受容体-GFP) を導入した新規高発現ベクター構築を進めて、 $\mu$  受容体-GFP への MON 結合の有無、今回は充分量の合成が出来ずに添加実験が出来なかった EM についてもさらに製法を工夫して充分量を確保し、インターナリゼーションの有無について検討を進める予定である。

#### <引用文献>

- 1) M.J. Christie, *Br. J. Pharmacol.*, **154**, 2008, 384-396.
- 2) S.K. Shanoy & R.J. Lefkowitz, *Biochem. J.*, **375**, 2003, 503-515.
- 3) L. Martini & J.L. Whistler, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**, 2007, 556-564.
- 4) E. Wittwer & E. Kern, *AAPS J.*, **8**, 2006, E348- E352.
- 5) K. Nagamatsu & A. Hasegawa, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, **1992**, 2631-2635.
- 6) T. Friedmann *et al.*, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **328**, 1994, 16-25.
- 7) S Toki & S. Yamano, *Yakugaku Zasshi*, **119**, 1999, 249-267.
- 8) L. Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1993, 12964-12969.
- 9) L. A. Akinola *et al.*, *Endocrinology*, **137**, 1996, 1572-1579.

#### 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 0 件) 現在執筆中

[学会発表] (計 2 件)

- ① 成松鎮雄, 松本考弘, 上島将幹, 増田和文, 加藤久登, 齋藤啓太, 片岡洋行, 熊本卓哉, 舟橋達也, 田邊知孝, 喜多秀樹, 石田 隆, 山野 茂, ラット 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 及び type 6 による Morphine 及び Epimorphine の立体選択的代謝反応の速度論的解析. 日本薬学会第 135 年会, 28PB-pm217 (2015).
- ② 増田和文, 加藤久登, 齋藤啓太, 片岡洋行, 熊本卓哉, 舟橋達也, 田邊知孝, 喜多秀樹, 石田 隆, 山野 茂, 松本考弘, 上島将幹, 成松鎮雄, ラット 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 による Morphine 及び Epimorphine の立体選択的代謝反応の機構解明. 日本薬学会第 135 年会, 28PB-pm216 (2015).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
成松 鎮雄 (NARIMATSU Shizuo)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：20113037
- (2) 研究分担者  
松岡 順治 (MATSUOKA Junji)  
岡山大学医学部保健学科・教授  
研究者番号：30332795
- (3) 研究分担者  
埴岡 伸光 (HANIOKA Nobumitsu)  
横浜薬科大学・教授  
研究者番号：70228518
- (4) 連携研究者  
山野 茂 (YAMANO Shigeru)  
福岡大学薬学部・教授  
研究者番号：80140755
- (5) 連携研究者  
喜多 秀樹 (KITA Hideki)  
福岡大学薬学部・助教  
研究者番号：60341450
- (6) 連携研究者  
熊本 卓哉 (KUMAMOTO Takuya)  
武蔵野大学薬学部・教授  
研究者番号：50292678
- (7) 連携研究者  
舟橋 達也 (FUNAHASHI Tatsuya)  
松山大学薬学部・教授  
研究者番号：60343646
- (8) 連携研究者  
田邊 知孝 (TANABE Tomotaka)  
松山大学薬学部・講師  
研究者番号：60532786
- (9) 連携研究者  
増田 和文 (MASUDA Kazufumi)  
就実大学薬学部・准教授  
研究者番号：00243486
- (10) 連携研究者  
片岡 洋行 (KATAOKA Hiroyuki)  
就実大学薬学部・教授  
研究者番号：80127555
- (11) 連携研究者  
齋藤 啓太 (SAITO Keita)  
就実大学薬学部・講師  
研究者番号：30454854
- (12) 研究協力者  
松永 尚 (MATSUNAGA Hisashi)

佐賀県医療センター好生館薬剤部・部長  
研究者番号：10569156

- (13) 研究協力者  
今村 牧夫 (IMAMURA Makio)  
倉敷成人病センター診療支援部・副部長  
研究者番号：なし