

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791593

研究課題名(和文) μ オピオイド受容体内在化様式の違いを免疫電子顕微鏡法により解明する

研究課題名(英文) Subcellular localization of internalized mu-opioid receptors

研究代表者

石田 亮介 (ISHIDA, RYOSUKE)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：50508934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：フェンタニルおよびDAMGOはともに投与後5分から強い μ オピオイド受容体の内在化を引き起こし、発現時間に差はなかった。しかし細胞膜への受容体のリサイクリングはフェンタニルが概ね60分でほぼ完了していたのに対し、DAMGOではおよそ30%の受容体がendosomeに残存しており、フェンタニルの方が早い傾向にあった。電子顕微鏡では内在化した受容体はライソソーム、多包体およびゴルジに強く発現しており、これは受容体の分解経路であると推測されることから、細胞膜へのいわゆるリサイクリングは同一受容体が細胞膜表面へ戻されるのみならず、新規の受容体合成によるところが大きいと推測された。

研究成果の概要(英文)：Both fentanyl and DAMGO induced rapid receptor endocytosis into endosome, after just 5 min of exposure. Receptor recycling to cell membrane was almost complete within 60 min after fentanyl exposure; however, 60 min after DAMGO exposure, approximately 30% of MOR immunoreactivity was detected in the endosome, indicating slower recycling. In the early stage of internalization (5 min of exposure), MOR immunoreactivity was detected adjacent to coated vesicles near the cell membrane. In the late phase (15 and 30 min of exposures), MOR immunoreactivity was observed near lysosomes and multivesicular bodies as well as in Golgi cisterns and sacs, indicating possible degradation and de novo synthesis of MORs.

研究分野：麻酔科学

キーワード： μ オピオイド受容体 内在化 Gタンパク質共役受容体 オピオイド耐性

1. 研究開始当初の背景

モルヒネやフェンタニルなどのオピオイドは脊髄後角において主として μ オピオイド受容体(MOR)を介して鎮痛効果をもたらしている。

MORはGタンパク共役型(GPCR)の7回膜貫通型受容体である。一般にGPCRはアゴニストの結合により活性化され、その後エンドソーム内に陥入(内在化:internalization)することにより、不活化される。かつては内在化により細胞表面のMOR数が減少することが、 μ オピオイドアゴニストの慢性刺激による反応性低下、すなわち耐性形成の原因であるとされてきた。しかし現在では、逆に内在化とそれに続くリサイクリングによりMORは耐性形成から逃れ、アゴニストに対する反応性を保つのではないかと考えられるようになった。

受容体の内在化の程度はアゴニストの種類によって全く異なり、たとえば純粋なMORアゴニストであるDAMGO([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin)では内在化が起こり耐性は形成されないのに対し、モルヒネでは内在化は起こらず、耐性を形成する。だが、例外もあり、全てのオピオイドアゴニストにおける耐性形成が内在化で説明できるわけではない。

我々の研究室ではこれまでDAMGOとフェンタニルの投与後の脊髄後角ニューロンでのMOR内在化様式の違いについて鎮痛効果との関係を含め報告した(Hashimoto T. et al. 2006)。これによると、DAMGOと比較して同程度の鎮痛効果をもたらす投与量においてもフェンタニルでは内在化の程度が低かった。両者による細胞内局在の違いは、両者の鎮痛効果が同程度であるとすればMORのリサイクリングにかかる時間の違いであることが可能性として考えられる。すなわちDAMGOによるMORのリサイクリングが高速であるが故に、耐性を起こしにくいという仮説を立てることができる。このようにMORの細胞内動態は耐性機序に関与していることが推測されるが、細胞内小器官のレベルで実際にMORがどのように分布しているのか、時間を追って透過型電子顕微鏡で可視化した報告はほとんどない。さらに光学顕微鏡では細胞内における詳細な分布までは判別できない。

2. 研究の目的

DAMGOによって刺激されたMORがリサイクリングにかかる時間は約60分であるとする報告があるが、未だ一般的とはいえない。モルヒネ、フェンタニル、DAMGO、レミフェンタニルの各オピオイドを用い、時系列で脊髄後角ニューロンにおけるMORの細胞内局在を蛍光免疫組織化学法および免疫電子

顕微鏡法により解析する。これによりリサイクリング時間を推定し、各オピオイドの薬理学的特徴と内在化の関連性を探る。基本的な内在化のデータを取ることで、慢性疼痛下での内在化など、今後の研究のベースとすることができる。

これまで神経細胞内のMORを電子顕微鏡にて観察した研究は散見されるが、より臨床に近い形としてin vivoで投与したオピオイドによる内在化の特徴を免疫電顕法により形態学的に観察した報告は存在せず、今回の実験により新しい知見が得られる可能性がある。内在化が耐性と関係するという仮説は、オピオイド耐性機序を説明したいくつかの仮説のうちの一つであり、これを証明することによってオピオイド耐性機序の解明に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

古典的なオピオイドの内在化について検討するため、オスのSprague-Dawleyラットをモルヒネ、DAMGO、フェンタニルの3群に分けて以下の通りの検討を行った。

- (1) イソフルランによる全身麻酔下にL4/5より脊髄くも膜下腔にカテーテルを留置、2日間の回復期間をおく。
- (2) カテーテルより2%リドカイン10 μ lを注入した後、生理食塩液(生食)でフラッシュし、その後tail-flickテストを行い、カテーテルの有効性を確認する。
- (3) 翌日、カテーテルが有効であったラットを用い、tail flickテストで薬剤投与前の潜時を測定した後、生食10 μ lで溶解したモルヒネ(20 μ g)、DAMGO(100 μ g)、フェンタニル(10 μ g)の各薬剤を投与し10 μ lの生食でフラッシュする。
- (4) 5分後、15分後、30分後、60分後の時点でペントバルビタール(60mg/kg)腹腔内投与により麻酔を行い、ラット上行大動脈より(1)生食、(2)0.5%グルタルアルデヒド+4%パラホルムアルデヒドの混合液の順に灌流固定後脊髄を摘出する。後固定として4%パラホルムアルデヒドに30分浸漬する。各固定液は0.1Mリン酸緩衝液で希釈する。
- (5) ビプラトームを用いて30 μ mの脊髄水平断切片を作成し、光顕用と電顕用の2グループに分ける。
- (6) 蛍光顕微鏡観察用には、抗MOR抗体とAlexaFluor594標識二次抗体、抗NeuN抗体とAlexaFluo488標識二次抗体の組み合わせを用いて二重蛍光免疫染色を行い、

蛍光顕微鏡下で脊髄後角 MOR/NeuN 陽性二次ニューロンの分布を観察する。

- (7) 電顕用には MOR 抗体と金標識二次抗体、あるいはビオチン標識二次抗体を用いて、それぞれ immunogold 法あるいは immunoperoxidase 法により MOR の局在を可視化する。
- (8) 電顕解析に適する切片をオスミウムで後固定した後、常法通り電顕用試料を作製した、透過型電子顕微鏡下で観察する。

レミフェンタニルについては 10 μ g/kg/min および 1 μ g/kg/min で尾静脈より持続投与を行い、その後上記のプロトコルに従い、蛍光顕微鏡及び透過型電子顕微鏡で MOR の内在化を観察した。

4. 研究成果

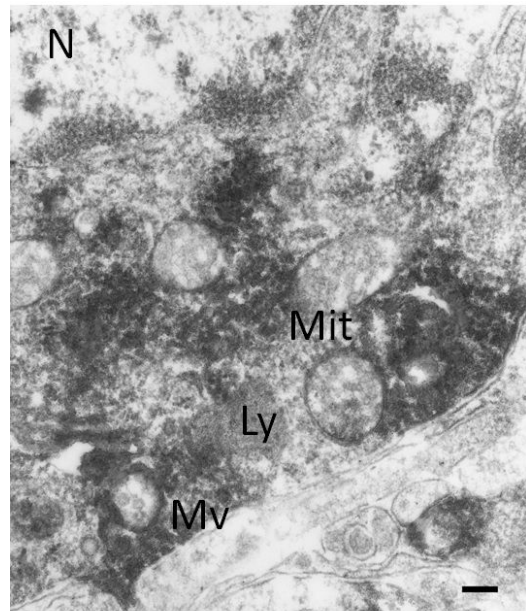
モルヒネ投与群ではこれまでの知見通り、すべてのポイントで MOR は細胞膜表面に存在し、内在化は認めなかった。

フェンタニルおよび DAMGO はともに投与後 5 分から強い内在化を引き起こしており、onset 時間には差がなかった。しかし細胞膜への受容体の recycling はフェンタニルが概ね 60 分でほぼ完了していたのに対し、DAMGO ではおよそ 30% の受容体が endosome に残存しており、フェンタニルの方が早い傾向にあった。電子顕微鏡による観察によると、内在化した受容体はライソソーム、多胞体および Golgi 体に強く発現しており、これは受容体の分解・新成経路であると推測されることから、細胞膜へのいわゆる "recycling" は同一受容体が細胞膜表面へ戻されるのみならず、新規の受容体合成によるところが大きいと推測された。

レミフェンタニルを 10 μ g/kg/min および 1 μ g/kg/min でそれぞれ 30 分と 120 分持続静脈内投与したところ、内在化の程度はレミフェンタニルの投与量に依存する傾向がみられ、投与時間との関連は低いと考えられた。電子顕微鏡所見では特に直径 10 μ m 程度の小型ニューロンにおいて Golgi 体など細胞内への反応産物の蓄積がみられたが、ニューロン間での内在化の差が大きく、傾向を形態学的につかむことは難しかった。これは時間設定、あるいは他のオピオイドと違い長時間持続的にアゴニストが作用し続けているというレミフェンタニルの特徴によるのではないかと推測した。

Fig.1 DAMGO 投与 30 分後の MOR 細胞内局在 (Immunoperoxidase 法) N:核, Mit:ミトコンドリア, Ly:ライソソーム, Mv:多胞体

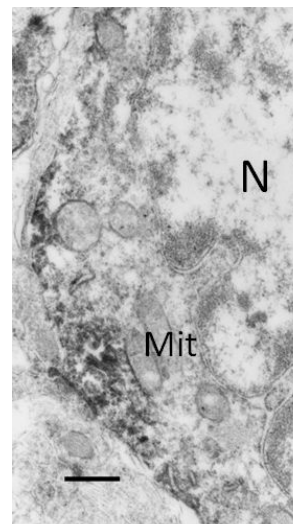
MOR 陽性反応部位は細胞質全体に分布したが、特にライソソーム、多胞体、ゴルジ体周辺に強く発現した。



scale bar=200nm

Fig.2 モルヒネ投与 30 分後の MOR 細胞内局在 (Immunoperoxidase 法) N:核, Mit:ミトコンドリア

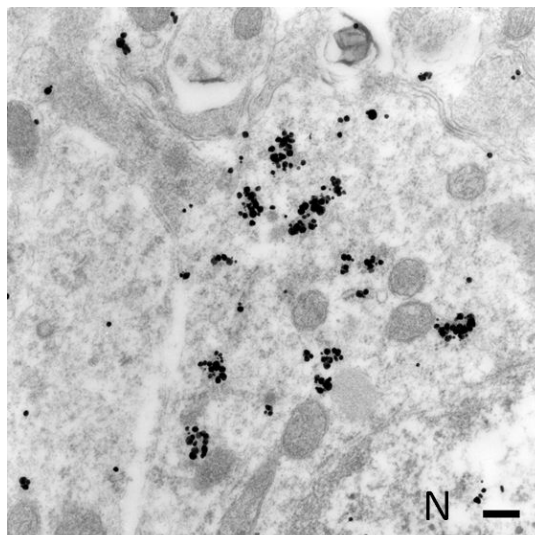
MOR 陽性反応は細胞膜直下でのみ観察された。



scale bar=500nm

Fig.3 フェンタニル投与 5 分後の MOR 細胞内局在(Immunogold 法) N:核

MOR 陽性反応は細胞質内で特に被覆小胞周囲に強く発現した。



scale bar=200 nm

5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

1. Ishida R. Spatiotemporal localization of internalized mu-opioid receptors in rats. Neuroscience2013. 2013/11/11. San Diego, USA.
2. 石田亮介. 免疫電子顕微鏡法による内在化 μ オピオイド受容体の細胞内局在の検討. 第37回日本神経科学大会. 2014年9月12日. パシフィコ横浜. 横浜市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 亮介 (ISHIDA, Ryosuke)
島根大学・医学部・特別協力研究員
研究者番号: 5 0 5 0 8 9 3 4

(2)研究協力者

津森 登志子 (TSUMORI, Toshiko)
県立広島大学・保健福祉学部・教授
研究者番号: 3 0 2 1 7 3 7 7

高橋 舞 (TAKAHASHI, Mai)
島根大学・医学部・技術職員

勝部 由貴子 (KATSUBE, Yukiko)
島根大学・医学部・事務補佐員