

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462442

研究課題名(和文) 二量体化オピオイド受容体の多様性に立脚したオピオイド鎮痛法確立とその最適化

研究課題名(英文) Optimization of opioid therapy based on the diversity of dimerized opioid receptors

研究代表者

村田 寛明 (MURATA, Hiroaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：90437856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： $\mu$ 受容体(MOR)と受容体(DOR)のヘテロ二量体を共発現する細胞株として、HaloTag-MORとT7-DORを共発現するHEK293(#25)および、HaloTag-DORとFLAG-MORを共発現するHEK293(#49)をクローニングした。CellKey™により#25と#49のMOR/DOR活性を確認した。HaloTag pH sensor ligandで前処置した#25にDAMGO、SNC80、モルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニルを投与し、MOR-DORヘテロ二量体の存在を確認した。この実験系を用いて各種条件下におけるMOR-DORヘテロ二量体の細胞内動態を解析中である。

研究成果の概要(英文)：We cloned HEK293 cells that constantly co-expressed HaloTag-tagged mu opioid receptors (MOR) and T7-tagged delta opioid receptors (DOR) (#25), and constantly co-expressed HaloTag-tagged DOR and FLAG-tagged MOR (#49). Signal transduction analysis using Cellkey™ system revealed that both #25 and #49 possessed MOR and DOR activity. #25 was treated with cell-impermeant HaloTag pH sensor ligand to follow the intracellular dynamics of hetero-dimerized mu-delta receptors that originally located on the membrane surface. DAMGO (a selective MOR agonist), SNC80 (a selective DOR agonist), morphine, fentanyl, and remifentanyl induced internalization of heterodimerized MOR/DOR. Internalization induced by SNC80 showed that HaloTag-MOR/T7-DOR made a heterodimer. We are further evaluating the characteristics of intracellular dynamics of heterodimerized MOR/DOR under treatment of various concentrations of opioid agonists.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：オピオイド受容体 二量体

## 1. 研究開始当初の背景

オピオイド製剤はがん患者に対する鎮痛療法、および周術期の鎮痛療法に用いられている。がん性疼痛患者に対してはオピオイド投与期間が比較的長期に及ぶ場合があり、ある種のオピオイド製剤により鎮痛効果を得にくくなった場合、つまり耐性を生じた場合や、副作用が強く発現する場合、オピオイド製剤を変更するオピオイドローテーションや作用機序の異なる鎮痛補助薬の追加などが行われている。一方、周術期においては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も使用される。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, Anesthesiology 2000)。また、術後鎮痛はオピオイド製剤に非ステロイド性消炎鎮痛薬、アセトアミノフェン、ステロイド製剤、神経ブロック療法などを併用することでオピオイド投与量を極力減らし、副作用発現を抑えるべきであるとして多様式鎮痛法 (multimodal analgesia) (Kehlet H, Anesth Analg 1993, White PF, Anesthesiology 2010) の概念が導入されている。しかしながら、オピオイド受容体を介したシグナル伝達機構を解明し、そのメカニズムに基づいた「耐性や痛覚過敏を来さず、かつ副作用を生じにくく、安定した鎮痛効果の持続する最適なオピオイド投与法を開発する」といった観点からの研究は行われていない。

オピオイド受容体は G 蛋白共役型受容体 (GPCR) に属する 7 回膜貫通型受容体である。GPCR は生命活動の中枢に位置づけられ、高血圧やアレルギー疾患、精神疾患など、様々な疾患の治療薬の約半数は GPCR に関わるとされる。2012 年ノーベル化学賞は「GPCR に対する研究」に対して贈られるなど、薬物の最も重要な標的として盛んに研究されている。オピオイド受容体をコードする遺伝子は  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  の 3 種類の

サブタイプであるにも関わらず、オピオイド製剤の薬理学的特性にはさらに多様性があり、 $\mu 1$ ,  $\mu 2$  や  $\kappa 1$ ,  $\kappa 2$  などの仮想サブ・サブタイプを考えなければ説明がつかなかった。近年、オピオイド受容体をはじめとする GPCR には  $\mu - \delta$  などヘテロ二量体として存在するものがあり、その薬物特性は単量体のものと異なることが明らかになってきた。これら二量体化オピオイド受容体の薬理活性には、仮想サブ・サブタイプの特性を説明しうるものもある (Jordan BA, Nature 1999)。我々は先行研究において、[1] 各種オピオイド製剤の二量体化受容体に対する効果は単量体に対するものと異なること、[2] 二量体化受容体は脱感作を起こしにくいこと、[3] オピオイド受容体はカンナビノイド受容体など非オピオイド受容体とも二量体を形成すること、などを見出した。そこで新たな展開として「二量体化オピオイド受容体を介した細胞内シグナル伝達メカニズムに基づいた最適なオピオイド投与法」を明らかにし、実用化に向けた戦略を構築することを考えるに至った。

## 2. 研究の目的

さまざまな二量体化オピオイド受容体に対し、まずはモルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニルなどの既存のオピオイド鎮痛薬および DAMGO、SNC80 などオピオイド受容体サブタイプ選択的リガンドなどによりもたらされるシグナル伝達機構への影響を *in vitro* アッセイにより明らかにする。

さらにこれらオピオイド製剤と他の薬物の組合せ投与を行い、二量体化オピオイド受容体を選択的かつ持続的に活性化するオピオイド製剤の組合せと投与法を明らかにする。また、これらの組合せ毎に二量体化オピオイド受容体の細胞内局在の経時的変化を共焦点レーザー顕微鏡で評価する。こうして得られたデータを基に *in vivo* でその効果を明らかにし、治験を行えるまでの基盤となるデータを蓄積する。

### 3. 研究の方法

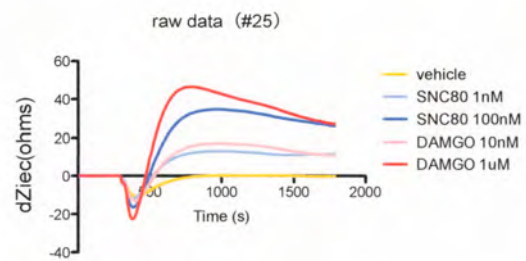
- (1) 異なる抗体で標識可能な  $\mu$  オピオイド受容体 (MOR) と  $\delta$  オピオイド受容体 (DOR) を同時に HEK293 細胞に発現させる。
- (2) MOR と DOR を共発現させた HEK293 細胞における両者の発現レベルおよび受容体応答やシグナル伝達を、特異的抗体による染色および生細胞の形態変化を高周波に対する電気抵抗変化からリアルタイムでモニターし、受容体応答やシグナル伝達を解析するシステムである CellKey™ を用いて確認する。
- (3) 細胞膜表面に存在する MOR-DOR ヘテロ二量体を選択的に認識し細胞内動態を追跡するために、細胞膜非透過性 HaloTag pH sensor ligand で前処置を行う。この細胞にオピオイド受容体の各種 agonist を投与し、共焦点レーザー顕微鏡で連続的に観察する。
- (4) 上記の実験系でオピオイド鎮痛薬の MOR-DOR ヘテロ二量体への影響を評価するための対照として、同様の実験系における MOR 単独あるいは DOR 単独で存在する状態での受容体応答/シグナル伝達解析および細胞内動態を CellKey™ および HaloTag pH sensor ligand を用いて評価する。

### 4. 研究成果

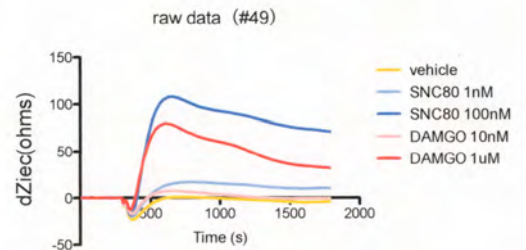
- (1) 当初は、MOR および DOR を一過性に共発現させることを想定していたが、安定したデータを得るために恒常的に共発現する HEK293 細胞をクローニングすることにした。HaloTag-MOR と T7-DOR を安定発現させた HEK293 細胞 (#25) および、HaloTag-DOR と FLAG-MOR を安定発現させた HEK293 細胞 (#49) を得た。

- (2) 細胞膜非透過性 HaloTag Alexa Fluor488 ligand, 細胞膜透過性 HaloTag TMR ligand を始めとする各種抗体を用いて、HaloTag-MOR, T7-DOR, FLAG-MOR, HaloTag-DOR の発現を確認した。また、両細胞のシグナル伝達解析を CellKey™ で行なったところ、MOR 受容体選択的リガンドである DAMGO および DOR 選択的リガンドである SNC80 のいずれに対しても濃度依存性の反応を示した(図 1, 2)。

(図 1)



(図 2)



- (3) HaloTag-MOR/T7-DOR HEK293 #25 細胞を細胞膜非透過性 HaloTag pH sensor ligand で前処置した後にオピオイド受容体の各種 agonist を投与してから 60 分間、細胞膜表面に存在する受容体の細胞内局在の継時的変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、表 1 に示すように MOR 選択的リガンドである DAMGO および MOR-DOR ヘテロ二量体に結合し細胞内への取り込み (internalization) を生じることがすでに

知られているモルヒネ、フェンタニル、レミフェンタニルだけでなく、DOR 選択的リガンドである SNC80 でも細胞質内での HaloTag-MOR 由来の蛍光強度増強を認めた(定量的解析は現在進行中)。すなわち、DOR 選択的リガンドによる刺激で MOR が細胞内へ移行したことから、この実験系が MOR-DOR ヘテロ二量体の細胞内動態を選択的に観察できるものであることが明らかになった。

agent (10 <sup>-6</sup> M)	internalization
DAMGO (MOR selective ligand)	+
SNC80 (DOR selective ligand)	+
morphine	+
fentanyl	+
remifentanyl	+

- (4) CellKey™での解析から fentanyl および remifentanyl は比較的高濃度で DOR に対する partial agonist としての作用を有することが明らかとなった。また、HaloTag pH sensor ligand を用いた実験より MOR に対してフェンタニルとレミフェンタニルは同様の時間経過で internalization を生じることが判明した。

本研究では MOR-DOR ヘテロ二量体を恒常的に発現する cell line を樹立し、細胞膜受容体の細胞内動態を選択的かつ連続的に観察するシステムを確立した。これは我々が確立した独自の実験系であるため、他の研究グループに先駆けて本研究テーマのデータを蓄積できる。今後は、MOR および DOR 単量体に対する各種薬物の作用特性と比較しながら、当初予定していたが本研究期間に遂行できなかった、薬物の種類、濃度、組み合わせによる MOR-DOR ヘテロ二量体の細胞内動態

を精査し、internalization および細胞膜表面での再利用(recycling)の違いを評価する。さらには、それらの細胞内動態が鎮痛効果にもたらす影響を明らかにし、最適なオピオイド鎮痛薬使用法を確立するための基盤を構築していきたい。

#### <引用文献>

- ① Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D, Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology*. 2000; 93 (2): 409-17
- ② Kehlet H, Dahl JB. The value of “multimodal” or “balanced analgesia” in postoperative pain management. *Anesth Analg*. 1993; 77 (5): 1048-56
- ③ White PF, Kehlet H. Improving postoperative pain management: what are the unsolved issues? *Anesthesiology*. 2010; 112 (1): 220-5
- ④ Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*. 1999; 399 (6737): 697-700

#### 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 4 件)

- ① Ohbuchi K, Miyagi C, Suzuki Y, Mizuhara Y, Mizuno K, Omiya Y, Yamamoto M, Warabi E, Sudo Y, Yokoyama A, Miyano K, Hirokawa T, Uezono Y. Ignavine: a novel allosteric modulator of the  $\mu$  opioid receptor. *Sci Rep*. 2016, 6: 31748. doi: 10.1038/srep31748. 査読有

- ② Minami K, Sudo Y, Miyano K, Murphy RS, Uezono Y.  $\mu$ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1). J Anesth. 2015, 29 (3): 475-479. doi: 10.1007/s00540-014-1946-z. 査読有
- ③ Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Takebayashi M, Nakata Y, Higami Y, Uezono Y. History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. J Pharmacol Sci. 2014; 126 (4): 302-9. doi: 10.1254/jphs.14R13CP. 査読有
- ④ Fujii H, Hayashida K, Saitoh A, Yokoyama A, Hirayama S, Iwai T, Nakata E, Nemoto T, Sudo Y, Uezono Y, Yamada M, Nagase H. Novel delta opioid receptor agonists with oxazatricyclodecane structure. ACS Med Chem Lett. 2014, 5 (4): 368-72. doi: 10.1021/ml400491k. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 寛明 (MURATA, Hiroaki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
准教授  
研究者番号：9 0 4 3 7 8 5 6

### (2) 研究分担者

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：2 0 2 1 3 3 4 0

須藤 結香 (SUDO, Yuka)  
東京理科大学・薬学部・外来研究員  
研究者番号：7 0 6 4 6 6 9 5