

Fig. 3 痛覚感受性と *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、薬物無処置時の手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間 (a,b)、並びにフェンタニル処置による手指に対する冷水負荷時の疼痛感知時間の延長効果 (%MPE) (c,d) の相関性を検討した。Allelic data (b,d) では C allele を持つ群 (TC,CC) と持たない群 (TT) で分類し解析を行っている。各データは平均±標準誤差で表している。

次に、術中・術後疼痛の抑制に必要なであったフェンタニルの総投与量 (Fig. 4a) 並びに術後 24 時間以内に必要であったフェ

ンタニル投与量 (Fig. 4b) に関して、T463C の遺伝子型との相関性を検討したが、各遺伝子型間で除痛に必要なであったフェンタニル量に有意な差は見られなかった。また、術後 3 及び 24 時間後にフェンタニルによる除痛下での痛みの強さを VAS を用いて検討したところ、CC 遺伝子型のサンプルで疼痛抑制効果が高い傾向は見られたものの、各遺伝子型間で有意な差は見られなかった (Fig. 4c,d)。

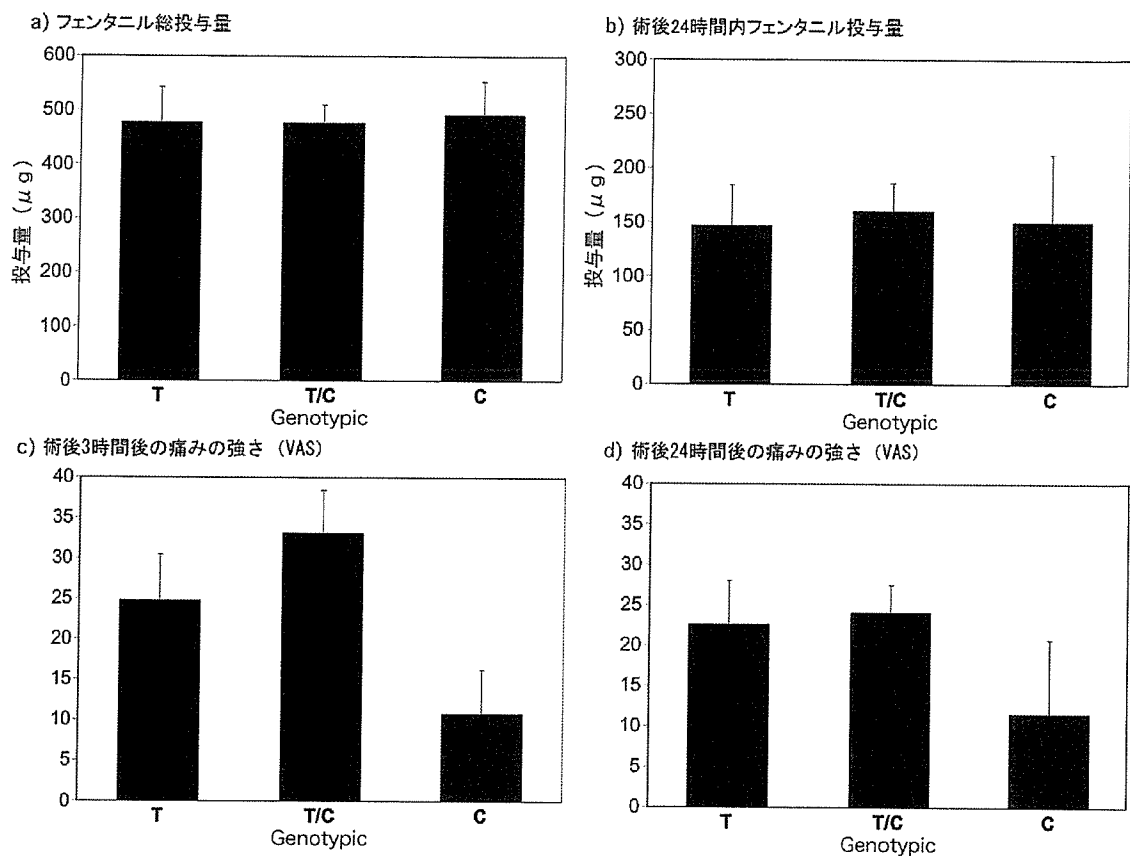


Fig. 4 術後疼痛制御に必要であった鎮痛薬量、並びに除痛下での痛みの強さと *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、術中・術後に除痛に必要であったフェンタニルの総投与量 (a)、術後 24 時間以内のフェンタニル投与量 (b)、並びに術後 3 及び 24 時間後の痛みの強さ(c,d)の相関性を検討した。VAS は患者が考え得る最大の痛みを 100 とした際の、各時点での痛みの強さである。各データは平均±標準誤差で表している。

3. 東大医科研病院・東邦大佐倉病院の症例サンプルを用いた痛覚感受性との相関解析

外科開腹手術を受けて麻薬による術後硬膜外鎮痛を受けた 125 症例に関して、術後の疼痛治療に必要とされた鎮痛薬量、並びに術後 24 時間内の鎮痛薬必要回数を T463C の各遺伝子型間で比較をしたところ、いずれの項目に関しても遺伝子型と有意な相関性を示さなかった。(Fig. 5a-e)。さらに、除痛下の患者における痛みの強さを、患者自身に 5 段階で評価させたアンケート結果に関しても同様に解析を行ったが、各遺伝子型間で有意な差は確認されなかった (Fig. 5f)。

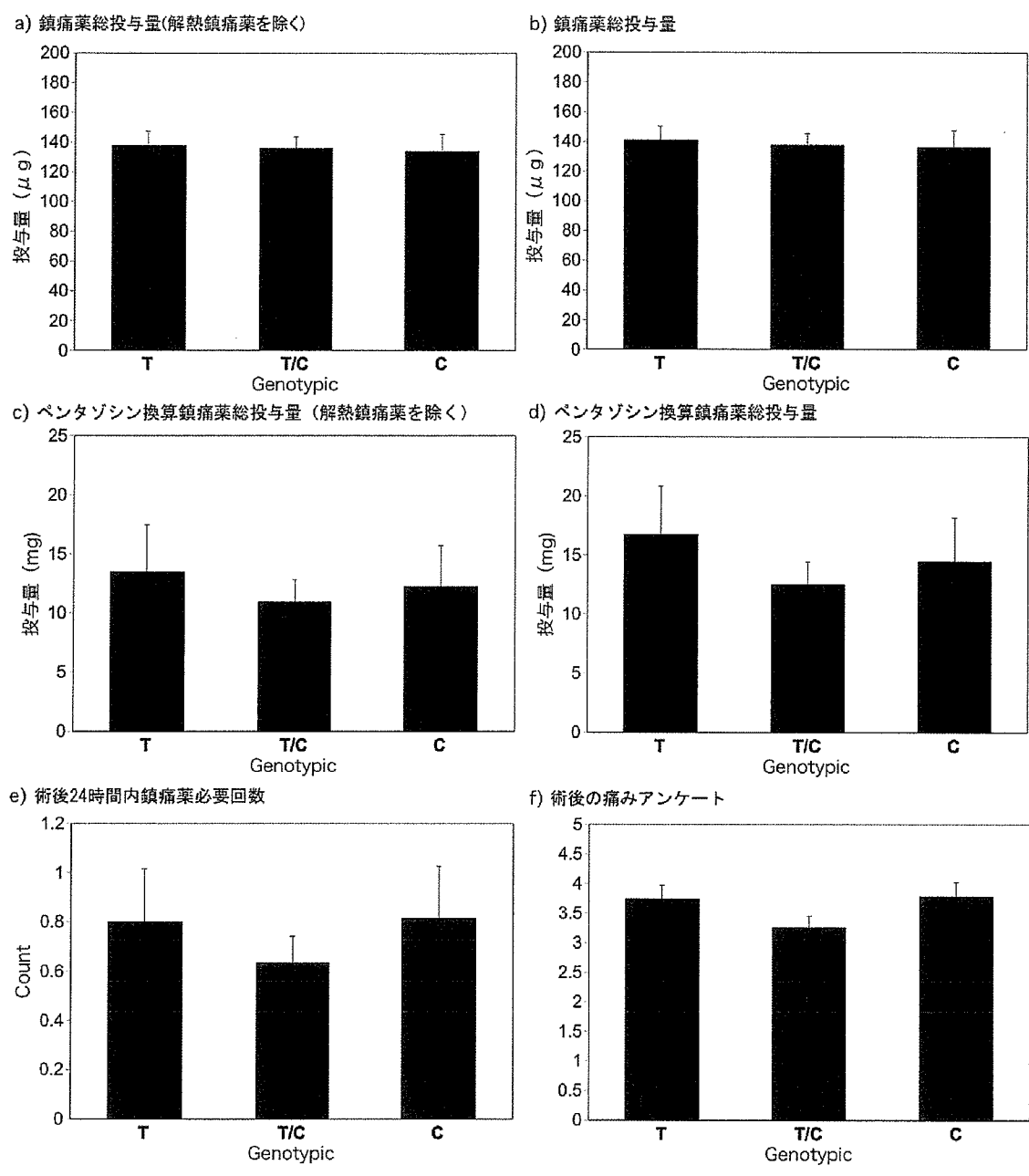


Fig. 5 術後疼痛制御に必要であった鎮痛薬量、並びに除痛下での痛みの強さと *P2RX7* 上の SNP、T463C との相関性

T463C の遺伝子型と、術中・術後に除痛に必要であった鎮痛薬の総投与量（解熱鎮痛薬を除いたもの (a) と含めたもの (b)）、使用した鎮痛薬をペンタゾシン換算した際の鎮痛薬総投与量（解熱鎮痛薬を除いたもの (c) と含めたもの (d)）、術後 24 時間内に除痛のため鎮痛薬投与が必要であった回数 (e)、並びに術後疼痛の除痛下での各患者の痛みの強さのアンケート結果（5 段階評価）との相関性を検討した。各データは平均±標準誤差で表している。

#### D. 考察

今回の研究において、日本人における *P2RX7* 上の SNP、T463C の多型頻度は 44.6% であった。本多型は、*P2RX7* 上の他の高頻度多型と連鎖不平衡の関係にあるため(2,3)、今後、*P2X<sub>7</sub>* 受容体が痛覚感受性を含めた疼痛治療のみならず、種々の疾患・症状に影響を与えているのかを検討する上で、重要なマーカーになると考えられる。これまでに、*P2RX7* 遺伝子多型と双極性の情動障害やうつ病などの精神疾患との相関性が報告されているものの(4-6)、*P2RX7* を含め ATP 受容体サブタイプ遺伝子に関して、痛覚感受性や痛覚抑制機構に関しての相関性解析は殆ど為されておらず、今後これらの研究を進めることで非常に重要な知見を得ることが出来ると考えられる。

健常者のサンプルを用いて解析したところ、C allele を有する群は TT 遺伝子型群と比較して、冷刺激により痛みを感知するまでの時間が長いことが明らかとなり、冷刺激による疼痛感受性と T463C 多型の間に有意な相関性が存在することが明らかとなった。同様の解析を東京歯科大病院の患者に

関して行ったところ、有意ではないものやはり C allele を有する群で冷刺激誘発の疼痛に対して耐性が高い傾向が確認された。東京歯科大病院のサンプル数は今回 40 例と少数であったため、今後例数を増やしていき、この傾向が有意であるか確認する必要がある。一方で、圧刺激誘発疼痛感受性に関しては、各遺伝子型間で有意な差は確認されず、*P2X<sub>7</sub>* 受容体が冷刺激誘発の疼痛感受性に対して選択的に関与している可能性が示唆される。

下顎骨切り術、並びに外科開腹手術後にオピオイドを用いた除痛処置を行った患者において、その疼痛治療に必要であった鎮痛薬の処方量・回数、並びに除痛時の痛みの強さ（VAS 並びに痛みに関するアンケート）と T463C の遺伝子型間の相関性を検討したところ、いずれの項目に関しても有意な相関性を示さなかった。このことは、*P2X<sub>7</sub>* 受容体はオピオイドによる鎮痛作用機序に対し影響を殆ど有さない可能性を示唆している。

*P2X<sub>7</sub>* 受容体は、中枢および末梢の免疫系細胞に主として発現し、それらの機能を担うことが知られているが、近年ではラット脊髄後根神経節の末梢グリア細胞に発現していることが確認され、末梢での痛覚伝達に関与する可能性が示されていた(7)。また、*P2X<sub>7</sub>* 受容体アンタゴニストの処置や *P2X<sub>7</sub>* 受容体遺伝子欠損により神経因性疼痛や炎症性疼痛が減弱することも報告されている(8-10)。今回の結果から、冷刺激に対する関与が示唆されたが、今後、本多型の神経因性疼痛並びに炎症性疼痛に関しての関与の有無を検討することは非常に重要な知見を提供すると考えられる。

## E. 結論

ATP 受容体は、生体内において種々の薬理作用を調節する神経伝達を担っていることが明らかとなっており、痛覚の発生並びにその情報伝達制御における役割を明らかにしていくことが期待される。今回の研究では、P2X<sub>7</sub> 遺伝子多型 T463C が、冷刺激誘発の疼痛感受性に相関性を有することを示し、この遺伝子多型による何らかの受容体機能変化が生体内で起こっていることを示唆している。また、P2X<sub>7</sub> 受容体は冷刺激による痛みの発生ないし末梢の痛覚情報伝達制御に関与するものの、圧刺激誘発疼痛やオピオイドによる疼痛制御機構には影響が少ないことを示唆している。今後、他の ATP 受容体サブタイプの遺伝子多型と、痛覚感受性、並びにオピオイド投与時の鎮痛作用や副作用との相関性を検討することで、テーラーメイド疼痛治療法の開発にあたり、非常に有用な知見を提供すると考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Sawynok J. : Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 177:309-28, 2007
- 2) JSNP: a database of common gene variations in the Japanese population. *Nucleic Acids Research*, 30:158-162, 2002
- 3) Haga H., Yamada R., Ohnishi Y., Nakamura Y., Tanaka T. : Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project : identification of 190,562 genetic variations in the human genome. *Journal of Human Genetics*, 47(11):605-610, 2002
- 4) Erhardt A., Lucae S., Unschuld PG., Ising M., Kern N., Salyakina D., Lieb R., Uhr M., Binder EB., Keck ME., Muller-Myhsok B., Holsboer F. : Association of polymorphisms in P2RX7 and CaMKKb with anxiety disorders. *J Affect Disord.*, (in press)
- 5) Lucae S., Salyakina D., Barden N., Harvey M., Gagne B., Labbe M., Binder EB., Uhr M., Paez-Pereda M., Sillaber I., Ising M., Bruckl T., Lieb R., Holsboer F., Muller-Myhsok B. : P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Hum Mol Genet.*, 15(16):2438-45, 2006
- 6) Barden N., Harvey M., Gagne B., Shink E., Tremblay M., Raymond C., Labbe M., Villeneuve A., Rochette D., Bordeleau L., Stadler H., Holsboer F., Muller-Myhsok B. : Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*, 5;141(4):374-82, 2006
- 7) Zhang XF., Han P., Faltynek CR., Jarvis MF., Shieh CC. : Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 1052(1):63-70, 2005
- 8) Honore P., Donnelly-Roberts D., Namovic MT., Hsieh G., Zhu CZ., Mikusa JP., Hernandez G., Zhong C., Gauvin DM., Chandran P., Harris R., Medrano AP., Carroll W., Marsh K., Sullivan JP., Faltynek CR., Jarvis MF. : [N-(1-{{(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl}amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces

neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.*, 319(3):1376-85, 2006

9) Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, Egerton J, Murfin M, Richardson J, Peck WL, Grahames CB, Casula MA, Yiangou Y, Birch R, Anand P, Buell GN. : Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain.*, 114(3):386-96, 2005

10) Dell'Antonio G, Quattrini A, Cin ED, Fulgenzi A, Ferrero ME.: Relief of inflammatory pain in rats by local use of the selective P2X7 ATP receptor inhibitor, oxidized ATP. *Arthritis Rheum.*, 46(12):3378-85, 2002

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl GR, Sora I, Ikeda K.: Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 51: 651-658, 2006.
2. Ide S, Kobayashi H, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Tanaka K, Shen H, Iwahashi K, Itokawa M, Minami M, Satoh M, Ikeda K, Sora I.: Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 6: 179-188, 2006.
3. Kasai S, Han W, Ide S, Hata H, Takamatsu Y, Yamamoto H, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. : Involvement of the 3' non-coding region of the mu opioid receptor gene in

morphine-induced analgesia. *Psychiatry Clin. Neurosci*, 60 Suppl 1:S11-7, 2006.

4. Kobayashi H, Hata H, Ujike H, Harano M, Inada T, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Naka M, Ide S, Ikeda K, Numachi Y, Sora I.: Association analysis of delta-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet*, 141(5):482-6, 2006.

### 2. 学会発表

1. 井手聡一郎, 南雅文, Uhl GR, 石原熊寿, 佐藤公道, 曾良一郎, 池田和隆:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いたブトルファノールの抗侵害受容作用の評価. 第80回日本薬理学会年会, 名古屋 [2007/03].
2. 井手聡一郎, 南雅文, Uhl GR, 石原熊寿, 曾良一郎, 池田和隆:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスにおけるペンタゾシンの抗熱性・機械性侵害受容効果の消失と抗化学性侵害受容効果の維持. 第79回日本薬理学会年会, 横浜 [2006/03].
3. 井手聡一郎, 南雅文, Uhl GR, 石原熊寿, 曾良一郎, 池田和隆:  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いたブプレノルフィンとトラマドールの鎮痛・報酬効果の解析. 日本薬学会第126年会, 仙台 [2006/03].
4. Sora I, Ide S, Minami M, Uhl GR, Ikeda K.: Exclusive expression of  $\mu$ -opioid receptors in noradrenergic neurons reverses the decrements in stress responses noted in

$\mu$ -opioid receptor knockout mice.  
International Narcotics Research  
Conference. (INRC), Annapolis [2005/07].

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## modified MPEX 法を用いたハイスループットな 遺伝子多型検出法の確立

分担研究者 古閑 比佐志

### 【研究要旨】

平成 17 年度においては、一分子蛍光検出法がコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法になりうるかを、 $\mu$ オピオイド受容体 1 ( $\mu$ OR1) の複数の多型領域をターゲットとして検証を行った。この手法である程度満足の良い結果が得られたが、検出機器が高価なことから、サンプルを一施設に集約して解析せざるを得ない。そこで本年度は、卓上の家庭用スキャナーがあれば、誰でもどこでも SNPs を検出可能な系を構築するため、MPEX(Multiple Primer Extension)法を改良することとした。

MPEX 法は住友ベークライト株式会社の plastic 基盤である S-BIO に SNPs 特異的オリゴを固相化し、基板上で伸長反応を行わせるというものである。本来は基板上で増幅反応も行なえるよう開発されたが、感度を高めることで基板上での増幅を行わずとも、肉眼で呈色反応を検出可能な系を構築し、modified MPEX 法とした。この手法を用い、96 well plate の 1 well に  $\mu$ OR1 の LD block を代表すると考えられる 5 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G) に対応するオリゴ全てを固相化し、解析を行なった。これらの SNPs は前年度、一分子蛍光法で判定しているの、その結果とも照合し、アッセイの確からしさを検証した。その結果、modified MPEX 法では一分子蛍光法で判定困難であった A2109G も含め、4 つの SNPs の判定が可能であった。また、その再現性は約 650 検体を用いた解析でほぼ 100%であった。1 つの SNPs (A8449G) に関して、一分子蛍光法の時と同様に、AT rich でプライマーのデザイン自体が困難であることが不成功の原因であった。

今回は 1 well に 20 種のオリゴを固相化したが、50 程度は可能なことから、他の疼痛関連遺伝子のオリゴもスポットして、更にコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法の確立が可能である。プライマーの設計など課題も残されているのが、最終年度の次年度で、さらに解析を進め最終目標である遺伝子検査キットの開発に努めていく。

### A. 研究目的

最終目標であるテーラーメイド疼痛治療を

可能とする遺伝子検査キットの開発に先立ち、コストパフォーマンスの高いハイス



ループットな遺伝子多型検出法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

平成 17 年度においては、一分子蛍光検出法がコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法になりうるかを、 $\mu$ オピオイド受容体 1 ( $\mu$ OR1) の複数の多型領域をターゲットとして検証を行った。この手法である程度満足の良い結果が得られたが、検出機器が高価なことから、サンプルを一施設に集約して解析せざるを得ない。そこで本年度は、卓上の家庭用スキャナーがあれば、誰でもどこでも SNPs を検出可能な系を構築するため、MPEX(Multiple Primer Extension)法を改良することとした。

MPEX 法は住友ベークライト株式会社の plastic 基盤である S-BIO に SNPs 特異的オリゴを固相化し、基板上で伸長反応を行わせるというものである。本来は基板上で増幅反応も行なえるよう開発されたが、感度を高めることで基板上での増幅を行わずとも、肉眼で呈色反応を検出可能な系を構

築し、modified MPEX 法とした (図 1)。この手法を用い、96 well plate の 1 well に  $\mu$ OR1 の LD block を代表すると考えられる 5 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G) に対応するオリゴ全てを固相化し、解析を行なった。これらの SNPs は前年度、一分子蛍光法で判定しているので、その結果とも照合し、アッセイの確からしさを検証した。

## C. 研究結果

今回は図 2 に示すように 7 X 7 mm grid area 中に forward 及び reverse の両鎖を固相化したモジュールを作製し 96 well フォーマットで解析を行った。至適バッファーや温度更には polymerase の種類など様々な点を予備検討し、最終的には一分子蛍光法で判定困難であった A2109G も含め、4 つの SNPs の判定が可能となった。また、その再現性は 88 検体 352SNPs を用いた解析で 98% 以上であった。1 つの SNPs (A8449G) に関して、一分子蛍光法の時と同様に、AT rich でプライマーのデザイン自体が困難であることが不成功の原因であった。

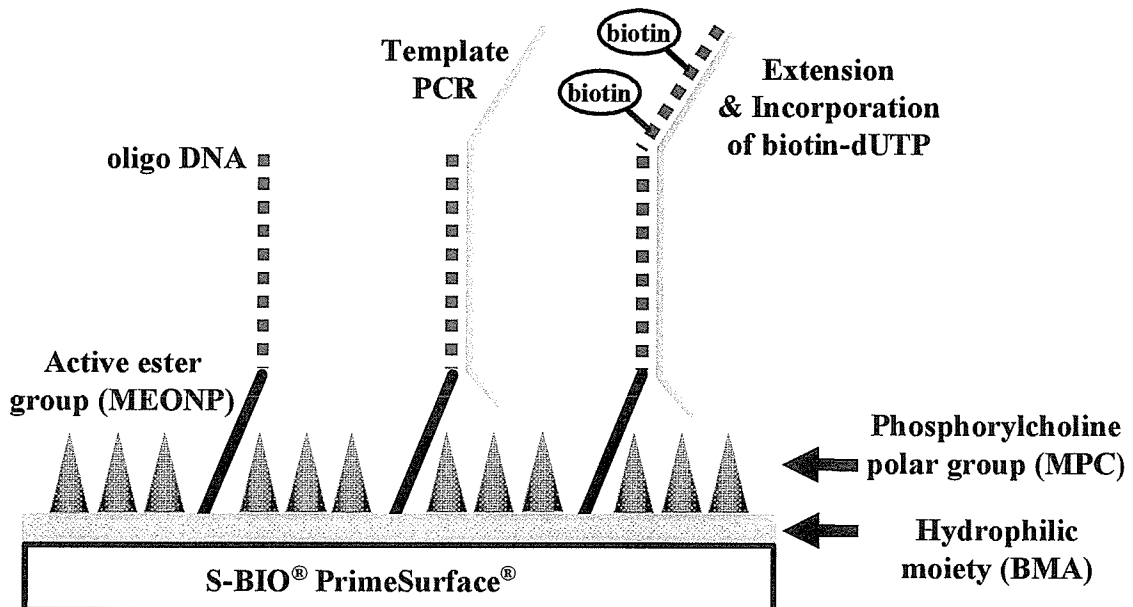


図 1 . S-BIO<sup>®</sup> PrimeSurface<sup>®</sup> を用いた modified MPEX (Multiple Primer Extension)法の概略図:5'端のアミノ化した C6 と S-BIO<sup>®</sup>表面の活性化したエステル基

を介してプライマーを固相化した。この基盤上で nucleotides (dNTP) と *Taq* DNA polymerase の存在下 SNPs 特異的伸長反応を行なわせる。

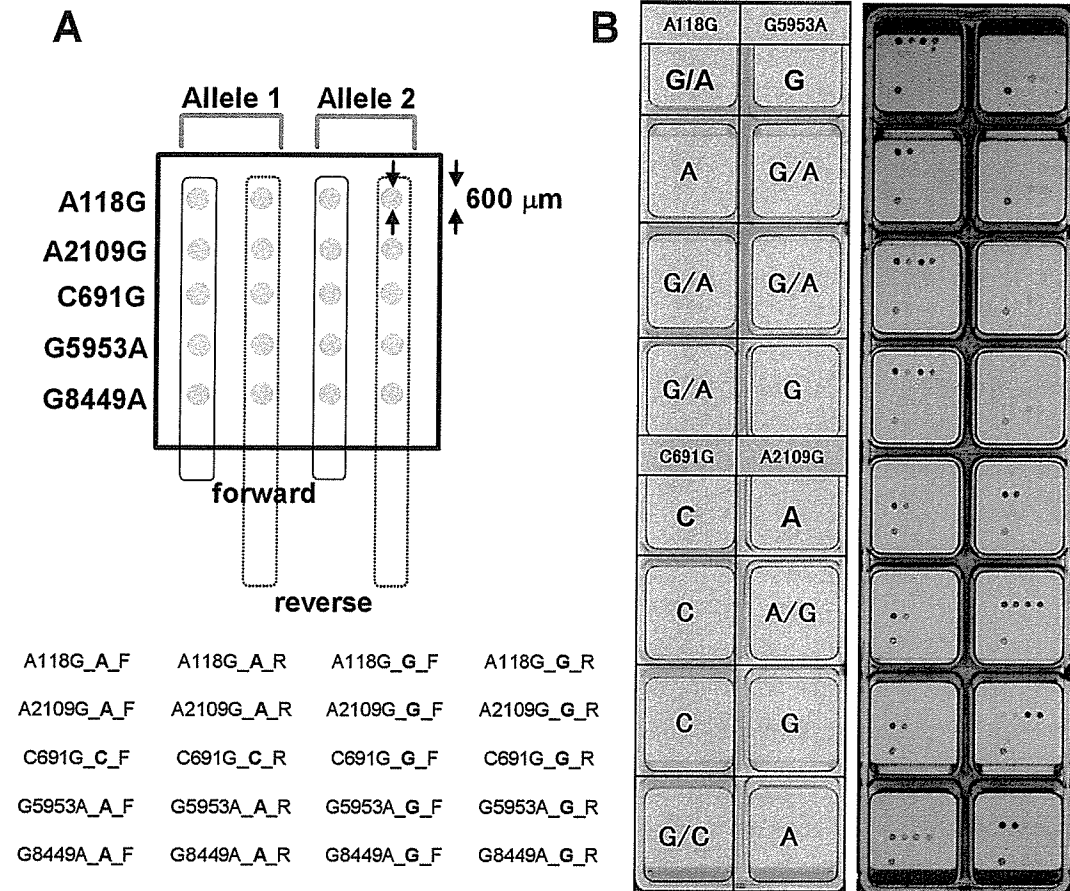


図 2. S-BIO<sup>®</sup> PrimeSurface<sup>®</sup> を用いた OPRM1 遺伝子多型判定のためのモジュール: BioChip Arrayer<sup>®</sup> spotting robot を用いて 12.5 nl の SNPs 特異的オリゴを A に示す

ようにスポットした。B, 各 well に 100 μl の MPEX reaction buffer で反応を行なったが、A8449G 以外全く cross-hybridization の起きない条件を設定した。

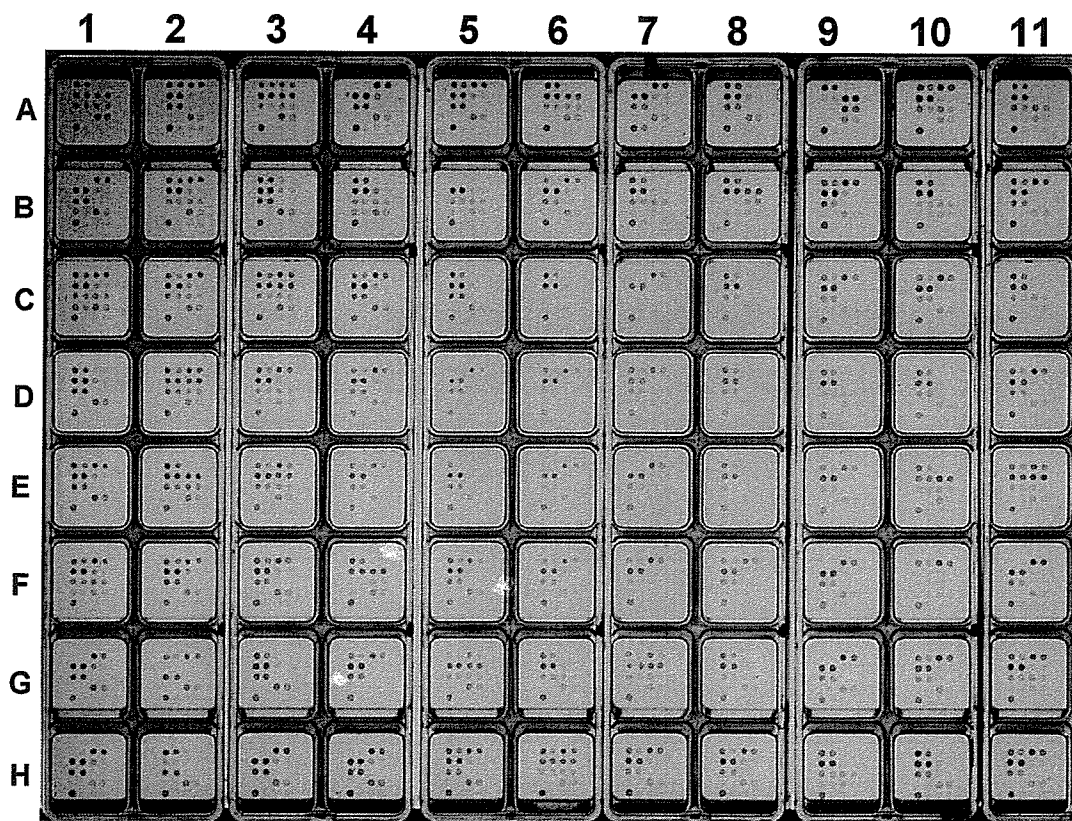


図 3. 96 well format で行なった反応結果: 88 検体 352 SNPs を用いた解析で 98% 以上の再現性を得た。direct DNA sequencing と一分子蛍光検出法で得られた結果との比較は表

1 に別途示してある。表 1 の well 番号はこの図の数字及びアルファベットに対応している。

#### D. 考察

以下のような理由から、modified MPEX 法を多型検出法の候補として選択した。

1) シグナル検出のための特別なインフラ整備が不要

2) 一度に複数の SNPs を解析可能

3) コストパフォーマンスが高い

これらの特性は、将来的に特別な機器を要

しない病院検査部や発展途上国でも SNPs 解析を展開可能とするだろう。しかし、次項のごとくプライマーの設計や至適反応条件など調整すべき課題も残されているので、今後さらに検討を加えたい。

1) プライマー設計において TA の繰り返し配列が存在すると、その設計が困難である。

2) 卓上スキャナーを用いると、プレート全

体で見ると中央部の呈色反応が弱く出てします。現在画像取得後に調整しているが、画像取得時に調整できると更に簡便になる。また現時点では目視で判定を行なっているが、modified MPEX 法専用のソフトの開発も必要かも知れない。

3) プライマーの機種によって modified MPEX 法の最適条件が多少変わってくるため、プライマーごとに条件検討が必要である。

## E. 結論

今回は 1 well に 20 種のオリゴを固相化したのが、50 程度は可能なことから、他の疼痛関連遺伝子(GIRKs, CYPs など)のオリゴもスポットして、更にコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法の確立が可能である。プライマーの設計など課題も残されているのが、最終年度の次年度で、さらに解析を進め最終目標である遺伝子検査キットの開発に努めていく。

## 【参考文献】

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Koga H.: Establishment of the platform for reverse chemical genetics targeting novel protein-protein interactions. **Molecular BioSystems** 2:159-164, 2006.
2. 島田希代, 古閑比佐志: cDNA を利用した網羅的抗体作製法. バイオテクノロジージャーナル5 639-642, 2006.
3. 古閑比佐志: 使ってみよう! バイオデータベース 連載 第4回 GENSAT. 細胞工学 25, 179-182, 2006.
4. 古閑比佐志: 抗mKIAAウサギポリクローナル抗体の網羅的作製と蛋白質レベルでの発現解析への展開. 和光時報 74(3):8-10, 2006.
5. Nagase T, Koga H., Ohara O.: Kazusa Mammalian cDNA Resources: Towards Functional Characterization of KIAA Gene Products. **Briefings in Functional Genomics & Proteomics** 5:4-7, 2006.
6. Usui-Aoki K, Kyo M, Kawai M, Murakami M, Imai K, Shimada K, Koga H.: Protein and antibody microarrays: clues towards biomarker discovery. **Frontiers in Drug Design and Discovery** 2:23-33, 2006.
7. Koga H., Kyo M, Usui-Aoki K, Inamori K.: A chip-based miniaturized format for protein expression profiling: the exploitation of comprehensively produced antibodies. **Electrophoresis** 27:3676-3683, 2006.
8. Kai N, Iwase K, Imai K, Nakahira E, Soma M, Ohtsuka S, Yagi T, Kobayashi K, Koga H., Takiguchi M, Yuasa S.: Altered gene expression in the amygdaloid subdivision of Fyn-deficient mice as revealed by cDNA array analysis. **Brain Research** 1073-1074:60-70, 2006.
9. Ohara R, Knappik A, Shimada K, Frisch C, Ylera F, Koga H.: Antibodies for Proteomic Research: Comparison of Traditional Immunization with Recombinant Antibody Technology. **Proteomics** 6:2638-2646, 2006.
10. Oh-hashii K, Hirata Y, Koga H., Kiuchi K.: GRP78-binding protein regulates cAMP-induced glial fibrillary acidic protein expression in rat C6 glioblastoma cells. **FEBS Letters** 580:3943-3947, 2006.

11. Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, Akira S, Iwamatsu A, Koga H, Murakami M, Hirano T.: TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* 25:4108-4119, 2006.
12. Yamamoto H, Imai K, Kamegaya E, Takamatsu Y, Irigoien M, Hagino Y, Kasai S, Shimada K, Yamamoto T, Sora I, Koga H, Ikeda K.: Repeated Methamphetamine Administration Alters Expression of the NMDA Receptor Channel  $\epsilon$ 2 Subunit and Kinesins in the Mouse Brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1074:97-103, 2006 Aug.
13. Usui-Aoki K, Shimada K, Koga H: A novel antibody microarray format using non-covalent antibody immobilization with chemiluminescent detection. *Molecular BioSystems* 3:36-42, 2007.
2. 学会発表
- 1 Koga H, Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M.: Antibody microarray is a expected tool to bridging the gap between gene and protein expressions, (シンポジウム) The International Conference on Proteomics:"Bridging the Gap Between Gene Expression and Biological Function", ルクセンブルク [2006/10/10-14].
- 2 Murakami M, Shimada K, Nagano M, Imai K, Okazaki N, Miki F, Inamoto S, Ohara R, Kikuno R, Nagase T, Ohara O, Koga H: InCeP: INTRACELLULAR PATHWAY BASED ON mKIAA PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS, Cold Spring Harbor; Meeting Name; SYSTEMS BIOLOGY: GLOBAL REGULATION OF GENE EXPRESSION [2006]
- 3 Koga H, Usui-Aoki K, Kyo M, Inamoto K, CHIP-BASED MINIATURIZED FORMAT FOR PROTEIN EXPRESSION PROFILING, 10th International Symposium on Biochromatography [2006]
- 4 Inamoto S, Watanabe A, Ozaki A, Watanabe M, Nankumo T, Shimada K, Nagano M, Koga H, Nakajima D, Nagase T, Ohara O, Taki K, Magae J, Kawakami Y.: A set of comprehensively raised antibodies as a novel post-genomic tool to study endogenous mKIAA proteins, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology [2006].
- 5 Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Koga H: A protein expression analysis of mouse KIAA gene products using a noncovalently immobilized antibody microarray system, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology [2006].
- 6 Ozeki Y, Nogi A, Mizoguchi Y, Murakami M, Koga H.: KeyMolnet Draw for InCeP (IntraCellular Pathway based on mKIAA protein-protein interactions) ~ The implementation of bidirectional communication system in the pathway database ~, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology [2006].
- 7 Ichikawa H, Ozeki Y, Murakami M, Koga H.: KeyMolnet for InCeP (IntraCellular Pathway based on mKIAA protein-protein interactions) ~ The implementation of

bidirectional communication system in the  
pathway database ~, 20th IUBMB  
International Congress of Biochemistry  
and Molecular Biology [2006].

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

**1. 特許取得**

なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし

## デルタ及びカッパオピオイド受容体の役割に関する研究

分担研究者：南 雅文

（北海道大学大学院薬学研究院・薬理学研究室）

### 【研究要旨】

本研究は、クローン化ヒトオピオイド受容体各サブタイプ発現細胞株を活用し、各種オピオイド性鎮痛薬のオピオイド受容体各サブタイプにおける薬理的性質、すなわち、受容体結合親和性とアゴニストとしての固有活性の計測を目的としている。本年度は、オキシコドン、フェンタニル、トラマドールに関して解析を行った。実験の結果から、その受容体親和性は、オキシコドンおよびフェンタニルは、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各受容体に対して結合親和性を有するものの、 $\mu$ 受容体に対する選択性が高く、 $\delta$ あるいは $\kappa$ 受容体に対する親和性に比較して82-117倍の高親和性を示した。一方、トラマドールは、非常に弱いながらも $\mu$ 受容体に対してのみに結合親和性を示した。また、 $\mu$ 受容体におけるアゴニスト活性の評価では、オキシコドン、フェンタニルがモルヒネと同様に完全アゴニストであるのに対し、トラマドールは部分アゴニストとして作用することが示された。

### A. 研究目的

本邦において現在、癌性疼痛の治療に用いられているオピオイド性鎮痛薬のうち、麻薬指定を受けているものには、モルヒネ、フェンタニル、オキシコドンがある。これら3種の薬物は、全てオピオイド受容体を介してその鎮痛効果を発揮するが、便秘や悪心・嘔吐などの副作用に関しては異なることが知られており、これらの薬物を用いたオピオイドローテーションにより、単独薬物では制御困難であった疼痛の治療や副作用の軽減に効果を発揮している。薬理作用の違いの原因としては、生体内分布、代謝・排泄の違いや、代謝物の薬理活性の有無とともに、受容体サブタイプにおける親和性の違いが挙げられる。3種の薬物は全て $\mu$ 受容体を介してその薬理作用を発揮すると考えられているが、オピオイド受容体各サブタイプ、すなわち、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各タイプにおける作用に関する知見は、報告によって相違が見られることも多く、必ずしも正確な知見が得られて

いるとは言えない。その最も大きな原因は、これまで用いられてきた評価系にある。オピオイド類の結合親和性やアゴニスト活性の評価は、脳膜標品を用いた結合実験やモルモット回腸縦走筋標本あるいはマウス輸精管標本などを用いた生物活性測定実験などにより行われてきたが、これら組織由来の標本では必ずしも純粋に1種類の受容体タイプのみが存在しているわけではなく、また、オピオイド受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与えるタンパク質（GTP結合タンパク質やリン酸化酵素など）の種類や量が組織ごとに異なっているため、異なった組織由来の膜標品や摘出組織標本を用いた評価系より得られた結果をそのまま、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各受容体における当該薬物固有の薬理的性質と捉らえて、それらを直接比較することには少なからず問題があった。薬物固有の薬理的性質である結合親和性とアゴニスト活性をオピオイド受容体の $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各タイプについて評価し、それらを比

較するためには、受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与えるタンパク質、さらにはアゴニスト活性の指標となる生物活性の発現に必要なタンパク質が同一である細胞上に、オピオイド受容体の各タイプが単独に発現している標本を評価系に用いることが望ましい。1992年から1993年にかけて、オピオイド受容体 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各タイプのcDNAがクローニングされたことにより<sup>1,4-6,8)</sup>、そのような理想的な評価系の構築が可能となった。すなわち、遺伝子工学的手法を用いて、オピオイド受容体のクローンを、本来オピオイド受容体のいずれのタイプも有していない株化細胞に発現させることにより、単一タイプのオピオイド受容体を発現し、かつ、オピオイド受容体以外のタンパク質の種類や量が同一である細胞標本を得ることが可能となった。一方、テーラーメイド疼痛治療法の開発・普及のためには、各種オピオイド性鎮痛薬の作用機序、特に鎮痛作用や副作用におけるオピオイド受容体各サブタイプの寄与を、定量的に解析し数値化することが重要である。そこで我々はクローン化ヒトオピオイド受容体安定発現細胞株を活用し、各薬物の受容体親和性ならびにアゴニスト活性を定量的に調べ、比較検討してきた。昨年度は、3種の拮抗性鎮痛薬、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンに関して解析を行ってきたが、今年度は麻薬性鎮痛薬であるフェンタニルおよびオキシコドンに関して、モルヒネとの比較検討を行った。

さらに、非麻薬性鎮痛薬トラマドールはそのラセミ体間で薬理活性が異なることや、代謝物M1が薬理活性を有することが知られている<sup>2)</sup>。また我々はモノアミン神経伝達調節が、トラマドールの鎮痛作用機序の一部を担っていることを示してきた<sup>3)</sup>。そこでトラマドールに関しても、先の2種の薬物同様に受容体結合親和性ならびにアゴニスト活性に関して検討した。

## B. 実験方法

### 1. ヒトオピオイド $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体を安定的に発

### 現する CHO 細胞の樹立

CHO細胞は10%ウシ胎仔血清、50 U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml 硫酸ストレプトマイシンを含むハムF12培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で培養・維持した。各ヒトオピオイド受容体cDNAを組み込んだプラスミドを、リポフェクチン法によりCHO細胞にトランスフェクションした。500  $\mu$ g/ml のG418存在下で培養し、生存するコロニーのうち、<sup>3</sup>H]オピオイドリガンドを用いた結合実験により各受容体を高レベルに発現しているクローン細胞(CHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPR)を選別した。それぞれの受容体の発現はノーザンブロット法にて確認した。

### 2. 受容体結合実験

CHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPRをTris緩衝液(50 mM Tris (pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA)中で、ホモジナイズした。ホモジネートを4°C、30,000×gで20分間遠心した後、沈殿をTris緩衝液に再懸濁したものを粗膜標品として実験に用いた。オピオイド $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体は、それぞれの受容体に選択的なリガンドである<sup>3</sup>H]DAMGO、<sup>3</sup>H]DPDPE、<sup>3</sup>H]U69,593 (ParkinElmer, Boston, MA, USA)を用いて標識した。標識リガンド10  $\mu$ l、非標識リガンド10  $\mu$ l、膜標品80  $\mu$ lを混合し、25°C、1時間インキュベートした後、氷冷したTris緩衝液1 mlで反応を停止した。これを0.1%ポリエチレングリコールにあらかじめ浸したWatman GF/Cフィルターで濾過し、Tris緩衝液で3回洗浄した後、フィルターを3 mlのクリアゾールI(ナカライテスク、京都)に入れ、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。競合実験には一定濃度の<sup>3</sup>H]DAMGO、<sup>3</sup>H]DPDPE、<sup>3</sup>H]U69,593と、種々の濃度の非標識オピオイドリガンドを用い、非特異的結合は100  $\mu$ MのDAMGO、DPDPE、U69,593いずれかの存在下で求めた。

### 3. cAMP アッセイ

24穴マルチウェルプレートで培養したCHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPR(1×10<sup>5</sup> cells/well)を0.5 mlのHBS(140 mM NaCl、4.7 mM KCl、



2.2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11 mM glucose、15 mM HEPES、pH 7.4) で1回洗浄後、0.45 ml の1 mM IBMX を含むHBS 中で37 °C、10 分間プレインキュベートした。反応は種々の濃度のオピオイドリガンド、フォルスコリン (最終濃度 10 μM)、1 mM IBMX を含むHBS 50 μl を加えて開始した。37 °C で、10 分間インキュベートした後、氷冷した 0.5 ml の 10 % TCA 添加して反応を停止した。cAMP を抽出後、含有する cAMP 量を cAMP assay kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用い、ラジオイムノアッセイで定量した。

#### 4. データ解析

受容体結合実験における各オピオイドリガンドの阻害定数 ( $K_i$ ) は、標識リガンドの結合を 50 %置換するために必要な濃度 ( $IC_{50}$  値) から Cheng & Prusoff の式により計算した。

また cAMP アッセイによる各薬物のアゴニスト活性は、フォルスコリン刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇に対する抑制効果を指標とし、最大抑制率 ( $I_{max}$  (%)) ならびに  $I_{max}$  の 50% を発現するのに必要な濃度 ( $IC_{50}$  値) を算出することで検討した。

#### 5. 統計解析

cAMP アッセイにおける  $I_{max}$  値の検定は Student's *t*-test により行い、5 % の危険率で有意差を判定した。

### C. 実験結果

#### 1. フェンタニルおよびオキシコドン

麻薬性鎮痛薬および各種オピオイドリガンドの  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  各受容体に対する結合親和性を検討するために、ヒトオピオイド受容体各サブタイプ発現細胞株から調整した細胞膜標品に対する [<sup>3</sup>H]標識リガンド ([<sup>3</sup>H]DAMGO、[<sup>3</sup>H]DPDPE、[<sup>3</sup>H]U69593) と各薬物との競合実験を行い (図 1)、そこから各薬物の受容体に対する結合親和性の高さを表す解離定数  $K_i$  を算出した (表 1)。  $K_i$  値は、その値が小さいほど親和性が高いことを示す。その結果、フェンタニル、オキシコドンともに、 $\mu$  受容体に対する選択性が高く、 $\delta$  あるいは  $\kappa$  受容体に対する親和性に比較して

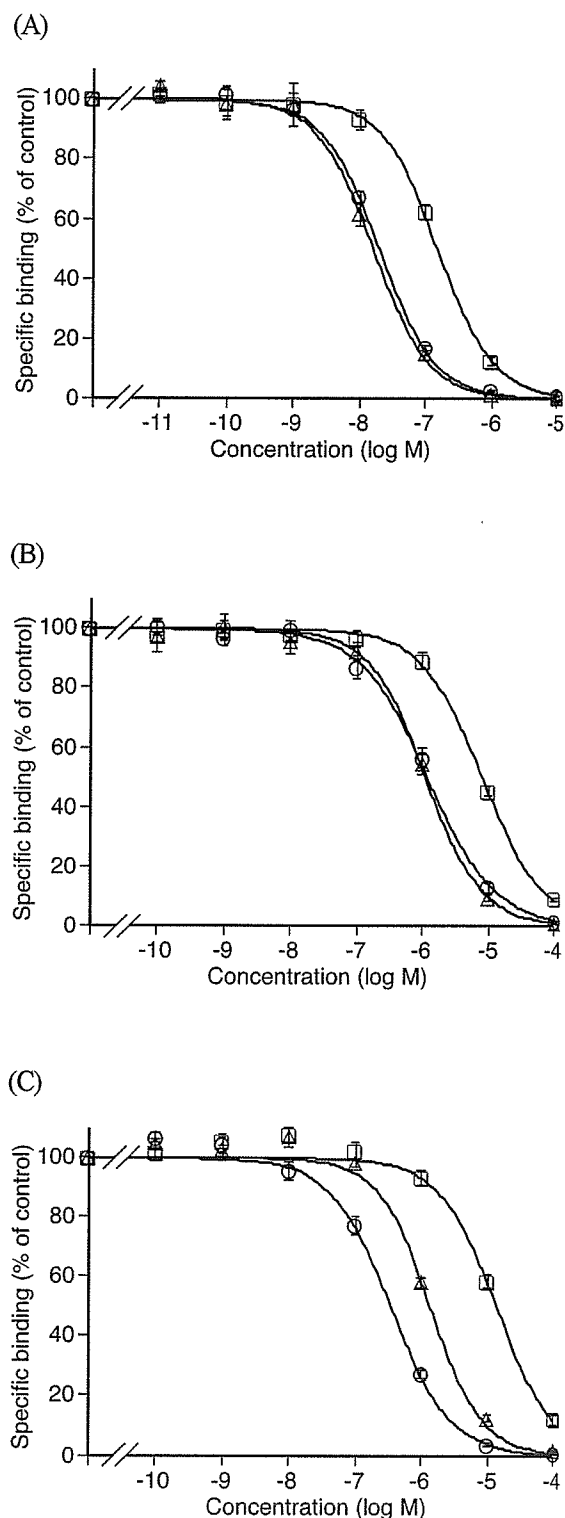


図 1 CHO/hMOPR (A)、CHO/hDOPR (B)、CHO/hKOPR (C) から得た膜標品における、[<sup>3</sup>H]標識各受容体選択的リガンド結合のモルヒネ (O)、フェンタニル (Δ)、オキシコドン (□) による阻害

	$\mu$ K <sub>i</sub> (nM)	$\delta$ K <sub>i</sub> (nM)	$\kappa$ K <sub>i</sub> (nM)
モルヒネ	12.7	1250	281
フェンタニル	9.2	1080	1040
オキシコドン	91.6	7490	9060

表1 ヒト型オピオイド受容体に対するモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンの親和性

$\mu$ 、 $\delta$ および $\kappa$ 受容体に対する各薬物の結合親和性を解離定数K<sub>i</sub>で示した。

82-117倍の高親和性を示した。一方、モルヒネの $\delta$ 受容体に対する選択性は、 $\mu$ 受容体に対するそれと比較し98分の1であったが、 $\kappa$ 受容体に対する親和性は比較的高く、 $\mu$ 受容体に対する親和性の22分の1であった。

次に、 $\mu$ 受容体に着目し、cAMP産生抑制作用を指標として各薬物のアゴニスト活性を検討した。すなわち、CHO/hMOPRをフォルスコリンで刺激した際に観察される細胞内cAMP濃度上昇に対する抑制効果を指標として各薬物のアゴニスト活性を評価した。図2は、 $\mu$ 受容体を介したモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンのcAMP産生抑制効果を示している。これから、最大抑制効果(I<sub>max</sub>(%))およびIC<sub>50</sub>値を算出した(表2)。フェンタニル、オキシコドンはモルヒネとほぼ同等のI<sub>max</sub>を示し、 $\mu$ 受容体に対して完全アゴニストとして作用することが示された。

## 2. ترامadol

続いて、 ترامadolについても同様に検討した。図3は $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各受容体の発現細胞株における受容体結合実験の結果を示しており、表3はそこから算出した解離定数K<sub>i</sub>を示している。 ترامadolはモルヒネと比較して約1,600倍という非常に低親和性ながらも、 $\mu$ 受容体に対して親和性を有することが明らかとなった。 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体に関しては、1mMにおいても、標識リガンド結合を十分に置換しな

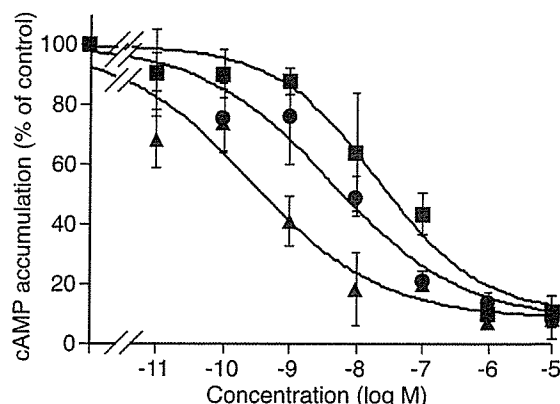


図2 CHO/hMOPRにおけるフォルスコリン誘発cAMP蓄積のモルヒネ(●)、フェンタニル(▲)、オキシコドン(■)による抑制

	IC <sub>50</sub> (nM)	I <sub>max</sub> (%)
モルヒネ	6.57±3.62	91.3±2.9
フェンタニル	0.32±0.13	91.0±6.2
オキシコドン	37.6±22.2	89.2±2.1

表2 CHO/hMOPRにおけるモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンのアゴニスト活性

$\mu$ 受容体における各薬物のアゴニスト活性の強さをIC<sub>50</sub>値ならびに最大抑制効果I<sub>max</sub>で示した。

った。

次に、 $\mu$ 受容体に着目し、cAMP産生抑制作用を指標として ترامadolのアゴニスト活性を検討した。図4は、 $\mu$ 受容体を介した ترامadolのcAMP産生抑制効果を示している。これから、最大抑制効果(I<sub>max</sub>(%))およびIC<sub>50</sub>値を算出した(表4)。 ترامadolのI<sub>max</sub>はモルヒネに比べ有意に低く、 ترامadolは $\mu$ 受容体に対して部分アゴニストとして作用していることが明らかとなった。

## D. 考察

オピオイド受容体の3つのタイプ、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ はすべてオピオイド類の鎮痛作用に関与していることが知られているが、今回検討したフェンタニルおよ

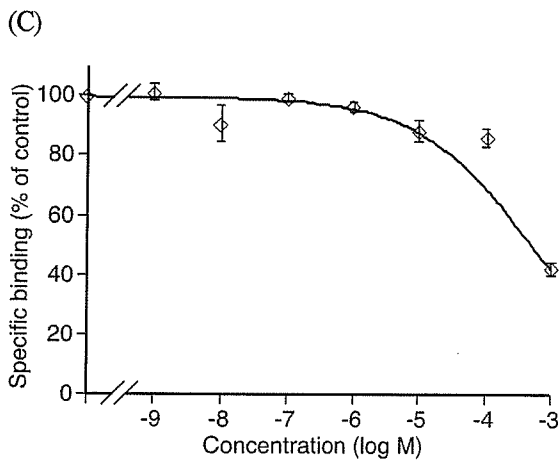
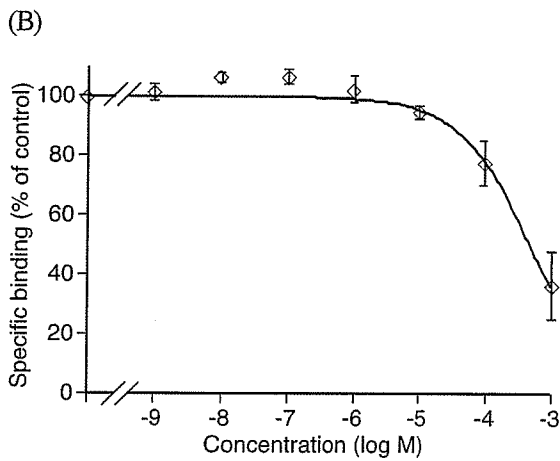
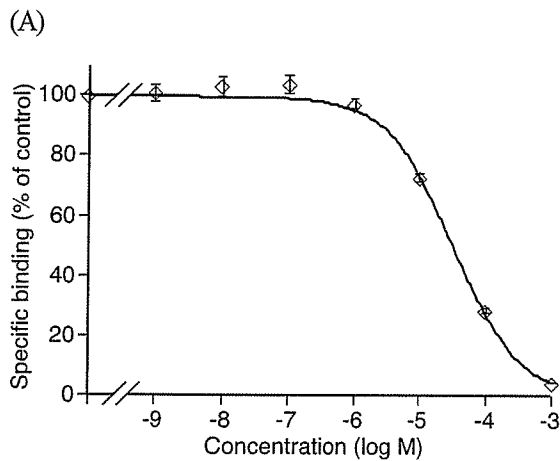


図3 CHO/hMOPR (A)、CHO/hDOPR (B)、CHO/hKOPR (C)から得た膜標品における、 $^3\text{H}$ 標識各受容体選択的リガンド結合のトラマドール ( $\diamond$ ) による阻害

	$\mu$ $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\delta$ $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$\kappa$ $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
トラマドール	20.1	>100	>100

表3 ヒト型オピオイド受容体に対するトラマドールの親和性

$\mu$ 、 $\delta$ および $\kappa$ 受容体に対する各薬物の結合親和性を解離定数 $K_i$ で示した。

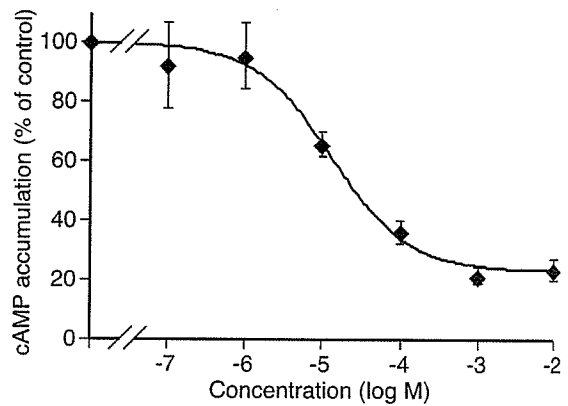


図4 CHO/hMOPR におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積のトラマドール ( $\blacklozenge$ ) による抑制

	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{I}_{\text{max}}$ (%)
トラマドール	$11.2 \pm 3.9$	$76.4 \pm 3.7^*$

表4 CHO/hMOPR におけるトラマドールのアゴニスト活性

$\mu$ 受容体におけるトラマドールのアゴニスト活性の強さを $\text{IC}_{50}$ 値ならびに最大抑制効果 $\text{I}_{\text{max}}$ で示した。

\* $P < 0.05$  vs モルヒネ (Student's *t*-test)

びオキシコドンはその受容体各サブタイプに対する親和性とアゴニスト活性を考慮すると、ともに主として $\mu$ 受容体を介してその鎮痛作用を発揮しているものと考えられる。オキシコドンは、 $\mu$ 受容体だけでなく $\kappa$ 受容体にもアゴニスト作用があるとの報告

があるが<sup>3)</sup>、本結果では、むしろモルヒネの方が $\kappa$ 受容体に対する親和性が相対的に強く、オキシコドンはフェンタニルに類似し、 $\mu$ 受容体に対する選択性が高いことが示された。

一方、トラマドールに関しても、主として $\mu$ 受容体に親和性を有することが明らかとなった。また、cAMP アッセイより、トラマドールは $\mu$ 受容体に対して部分アゴニストとして作用することが示された。トラマドールに関しては、その代謝物 M1 ならびに M5 が $\mu$ 受容体に対して、より高親和性を有することが報告されており、今後これらの代謝物の作用に関しても検討することで、トラマドールの鎮痛作用機序の詳細が明らかになるものと期待される。

#### E. 結論

本研究結果より、フェンタニルおよびオキシコドンの薬理作用は、ともに $\mu$ 受容体を介しており、 $\delta$ および $\kappa$ 受容体の寄与は小さいことが示唆された。また、トラマドールに関しても、オピオイド受容体を介したその薬理作用は主として $\mu$ 受容体を介したものであることが示された。

#### [参考文献]

- 1) Evans, C.J., Keith, D.E. Jr., Morrison, H., et al.: Cloning of a  $\delta$  opioid receptor by functional expression. *Science*, 258: 1952-1955, 1992.
- 2) Gillen, C., Haurand, M., Kobelt, D.J., et al.: Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human  $\mu$ -opioid receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 362: 116-121, 2000.
- 3) Ide, S., Minami, M., Ishihara, K., et al.: Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology*, 51: 651-658, 2006.
- 4) Kieffer, B.L., Befort, K., Gavériaux-Ruff, C., et al.: The  $\delta$ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 12048-12052, 1992.
- 5) Minami, M., Toya, T., Katao, Y., et al.: Cloning and

expression of a cDNA for the rat  $\kappa$ -opioid receptor. *FEBS Lett.*, 329: 291-295, 1993.

6) Minami, M. and Satoh, M.: Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.*, 23: 121-145, 1995.

7) Ross, F.B. and Smith, M.T.: The intrinsic antinociceptive effects of oxycodone appear to be  $\kappa$ -opioid receptor mediated. *Pain*, 73: 151-157, 1997.

8) Uhl, G.R., Childers, S. and Pasternak, G.: An opiate-receptor gene family reunion. *Trends Neurosci.*, 17: 89-93, 1994.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl GR, Sora I, Ikeda K.: Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 51: 651-658, 2006.