

表 題 がん性疼痛の新規治療薬としての oxytocin の有用性に関する研究  
～oxytocin が  $\mu$  opioid receptor に与える影響について～

論 文 の 区 分 論文博士

著 者 名 目黒 由行

所 属 自治医科大学医学部 外科学講座 消化器・一般外科学教室  
\_\_\_\_\_

2018年7月27日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系専攻消化器外科学専攻科  
教授・佐田 尚宏

## 目次

1. 緒言	1
2. 方法	5
2.1 Plasmid の構築と安定細胞株の作製	5
2.2 細胞培養	6
2.3 試薬	6
2.4 CellKey™ システムを用いた hMOR および hOTR の活性評価	7
2.5 細胞内 cAMP assay	14
2.6 Opioid 受容体結合試験	18
2.7 統計	19
3. 結果	20
3.1 CellKey™ assay による MOR 発現 HEK293 細胞を用いた oxytocin の MOR に対する活性評価	20
3.2 CellKey™ assay による MOR 発現 HEK293 細胞を用いた opioid 誘発性 MOR 活性に対する oxytocin の効果	22
3.3 GloSensor™ cAMP assay を用いた opioid 誘発性細胞内 cAMP 産生抑制に対する oxytocin の効果	27
3.4 Oxytocin が opioid の MOR への binding affinity へ与える影響	29
3.5 CellKey™ assay による OTR 発現 HEK293 細胞を用いた oxytocin 誘発性 OTR 活性に対する endomorphin-1 の効果	32
4. 考察	34
5. 結論	45
6. 謝辞	46
7. 引用文献	47

## 1 緒言

我が国における全部位のがん死亡数は 37.1 万人(2015 年)であり総死亡数の約 29%をも占めているため、がん緩和ケアは重要である。がん対策基本法におけるがん対策推進基本計画でも、第 2 期である 2007 年からの 10 年間の目標として全てのがん患者、家族の苦痛の軽減、療養生活の質の向上が設定され緩和ケアへの認識が高まってきている。現在がん性疼痛の治療に関しては WHO 方式の 3 段階除痛ラダーが広く普及しており、高度の痛みに対しては morphine, oxycodone , fentanyl, methadon などの強オピオイドが使用される。その上、わが国でも 2017 年 6 月から hydromorphone の使用が可能となり、先進諸国に比肩する opioid の種類が揃った状況にある。しかし突出痛については未だ十分な対応ができておらず、また opioid 全身投与量の増加に伴う副作用出現の問題も存在するため、即効性があり、かつ鎮痛作用を短時間増強するような新規鎮痛補助薬の開発が期待されている状況である。

Oxytocin は 9 個のアミノ酸からなる神経ペプチドで、視床下部室傍核及び視索上核で合成される神経ペプチドである。Oxytocin は下垂体後葉より分泌され全身を循環し、末梢での作用として子宮収縮や射乳に重要な役割を果たしている

<sup>1)</sup>。さらに oxytocin neuron が脳内に投射する経路も存在し、中枢での作用として母性行動、対人的友好関係等の多くの機能に影響を与えているとされている<sup>2, 3)</sup>。また最近、いくつかの臨床試験によって社会不安、autism spectrum disorder (ASD) や統合失調症に対する oxytocin の点鼻投与は高い関心を集めている<sup>4, 5)</sup>。

このような状況の中、近年ヒト及び動物での研究で oxytocin と疼痛閾値に関する知見が着実に蓄積されている<sup>6-13)</sup>。Oxytocin と痛みに関する第 1 の重要なメカニズムは hypothalamo-spinal oxytocinergic pathways である。室傍核への刺激や oxytocin の髄腔内投与は、痛覚伝導路に重要とされる脊髄後角表層 (Laminae I, II) に存在する oxytocin 感受性の興奮性グルタミン作動ニューロンを介して、抑制性の  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 介在神経を興奮させ、抑制性の GABA 介在神経の活性化は、侵害受容特異的ニューロン (nociceptive specific neuron) や広域作動ニューロン (wide-dynamic-range neuron) をシナプス前に抑制すると考えられる<sup>9, 14-16)</sup>。これらの作用は oxytocin 受容体拮抗薬によって抑制されるため、oxytocin および oxytocin 受容体による疼痛抑制機構であると考えられる<sup>14, 15)</sup>。Oxytocin と痛みに関する第 2 の重要なメカニズムは oxytocin の鎮痛効果が opioid 受容体拮抗薬の投与によって部分的に拮抗されるというこ

とが報告されており<sup>6-8)</sup>、内因性 opioid システムを介した indirect pathway と呼ばれる疼痛抑制機構が存在すると考えられている。この oxytocin と内因性 opioid との関連に関しては少なくとも 2 つのメカニズムが存在すると仮定できる。1 つ目の可能性としては、oxytocin が脳内で内因性 opioid の放出を刺激している可能性<sup>17,18)</sup>、もう 1 つの可能性として、oxytocin 自体が直接 opioid 受容体に影響を及ぼしている可能性が推察される。

$\mu$  opioid receptors (MORs) は鎮痛薬のターゲットとして最も研究が進んでいる受容体であり、Class A family の G 蛋白質共役型受容体 (GPCRs) である。シグナル伝達の様式としては Gi/o に分類され、アデニル酸シクラーゼを抑制しその結果として cAMP の産生が抑制される<sup>19)</sup>。オピオイド鎮痛薬はその有効性の高さから幅広く研究が行われ臨床利用されているが、副作用として出現する呼吸抑制、便秘、依存、耐性や離脱症候群が問題となっている<sup>20)</sup>。こうした中、近年 Burford らによって 2013 年に初めて報告され<sup>21)</sup>、その後 2016 年に Ohbuchi らによっても報告された<sup>22)</sup> MORs の positive allosteric modulators ( $\mu$ -PAMs) に注目が集まってきている。GPCR の allosteric ligands は orthosteric agonist が結合する受容体部位とは異なる部位に結合し、標的となる受容体の活性を制

御する<sup>23)</sup>。PAM 自体は本来直接的に受容体への活性を示さないが、orthosteric agonists が受容体に結合した際に、その binding affinity や efficacy を増強するとされる。このような PAM の特性は、直接受容体を活性化させる opioid 受容体作動薬と比較して、副作用の軽減、耐性や依存が少なくなるといったメリットが期待されるため、新規鎮痛薬の開発において有望なターゲットとなってきている<sup>23)</sup>。本研究で我々は human MOR (hMOR) を発現した HEK293 細胞を用いて、oxytocin が MOR に与える影響を、新規 electrical impedance-based receptor biosensor assay である CellKey™ assay (MDS Sciex, Ontario, Canada)<sup>24)</sup>, intracellular cAMP assay, 及び競合法を用いた receptor-binding analysis を施行し評価した。

## 2. 方法

### 2.1 Plasmid の構築と安定細胞株の作製

CellKey™ assay および cAMP assay で使用した細胞は、国立がん研究センターがん患者病態生理研究分野に保存されている細胞株を用いた。その作成方法の概要を以下に示す。

hMOR cDNA (NM\_000914) を Flexi ORF clone (Promega, Madison, WI, USA) から増幅し、増幅した MOR 断片を pcDNA3.1 vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) へ導入した。American Type Culture Collection (ATCC®、Manassas, VA, USA) から購入したヒト胎児腎臓 293 (HEK293) 細胞へ構築した plasmid をリポフェクタミン試薬を用いて transfection し、CellKey™ assay によって高い MOR 活性をもつ細胞株を選択し、hMOR を安定的に発現する stable cell line を作成した。さらに細胞内 cAMP レベルをモニターするため、既に作成された hMOR 安定発現細胞株に pGloSensor™-22F plasmid (Promega) をリポフェクタミン試薬を用いて transfection し、hMOR と pGloSensor™-22F を共に発現した stable cell

line を作成した。Oxytocin 受容体発現細胞株も human OTR (hOTR) cDNAs (Promega) を用いて MOR stable cell line と同様に作成した。

## 2.2 細胞培養

2.1 で作成された細胞は 95%空気と 5%の CO<sub>2</sub>を含有し加湿された 37°Cの cell-culture incubator 内で培養した。培養液は 10% bovine serum と penicillin (100U / mL) , streptomycin (100mg / mL) および genistein (100mg / mL) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を使用した。

## 2.3 試薬

Oxytocin はペプチド研究所(大阪)、endomorphin-1 は Tocris Bioscience (Bristol, UK), D-Ala(2)-N-Me-Phe(4)-Gly-ol(5)-enkephalin (DAMGO),  $\beta$ -endorphin, forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Ro 20-1724 は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), morphine hydrochloride は Takeda



Pharmaceutical Co., Ltd (東京)、fentanyl は Janssen Pharmaceutical K. K. (東京) からそれぞれ購入した。Forskolin, IBMX, Ro 20-1724 は dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し、それ以外の試薬に関しては H<sub>2</sub>O で溶解した。

#### 2.4 CellKey™ システムを用いた hMOR および hOTR の活性評価

CellKey™ システムを用いた hMOR の活性評価は過去複数の論文に報告されている<sup>24-26)</sup>。CellKey™ システムの原理を以下に記載する。CellKey™ システムで用いられる専用プレートのウェル底部には 2 本の電極が取り付けられており、そのプレート上に細胞を培養し高周波電流を流す(図 1)。電流は細胞間および細胞内を通り、結果として電極間に impedance (電気抵抗) が生じる。

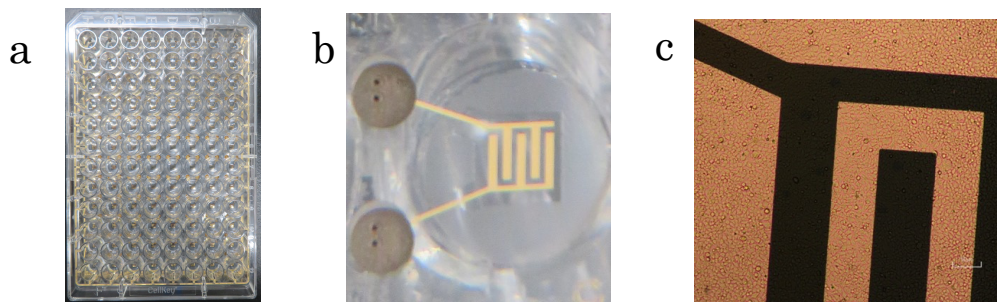


図1 CellKey™ 専用プレートの構造

- a. 96 well CellKey™ 専用プレートの全体像
- b. CellKey™ 専用プレートの well 底部の拡大像

底部に 2 本の電極がつけられており、ここに高周波電流を流し impedance を測定する。

- c. 細胞播種後の電極間の拡大像

電極間は播種された受容体発現細胞が敷き詰められた状態になっている。

Impedance は、細胞接着性、細胞形態・体積、細胞間相互作用により変化する。

細胞に発現した GPCR に agonist が結合すると、G タンパクが  $\alpha$  サブユニットと  $\beta \gamma$  サブユニット複合体に分解する。 $\alpha$  サブユニットには  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  などのタイプが存在し、各タイプに対応したシグナル伝達が起こり、そのいずれもが細胞接着性、細胞形態・体積、細胞間相互作用に影響を及ぼし、impedance 変化を引き起こす (図 2)。

<Gs-シグナル伝達>

<Gi/o-シグナル伝達>

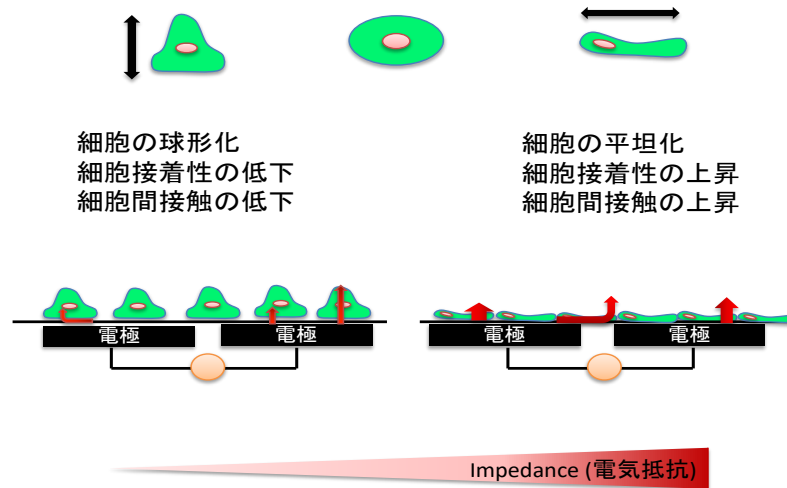


図2 Gs-及びGi/o-シグナル伝達における細胞変化と impedance

Gs シグナルが活性化した場合には細胞は細胞接着性が低下し、細胞形態は上方向に増大し丸みを帯びることによって細胞間の接触も低下する。その結果 impedance は低下する。逆に Gi/o シグナルが活性化した場合には細胞接着性が上昇し、細胞形態は水平向に増大し flat になることによって細胞間の接触も上昇する。その結果 impedance は上昇する。

従って評価試薬を加えることによって生じる impedance 変化を観測することにより評価試薬の受容体への活性評価が可能であり、更には impedance 変化のパターンを解析することにより、結合している G 蛋白のタイプを知ることも可能である<sup>27)</sup>。

本研究では国立がん研究センターがん患者病態生理研究分野で標準的に行われている方法を用いて実験を施行した。具体的には hMOR および hOTR の安定発現細胞を CellKey™ システム専用の 96 well のマイクロプレートにそれぞれ  $6.0 \times 10^4$  及び  $5.0 \times 10^4$  cells/well ずつ播種した。21-24 時間 incubate した後、各 well を CellKey™ buffer で wash した。CellKey™ buffer は Hanks' balanced salt solution (1.3 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.81 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5.4 mM KCl, 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 136.9 mM NaCl, 0.34 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 5.6 mM D-glucose) に 20 mM HEPES と 0.1% bovine serum albumin を加え作成した。その後、各 well に CellKey™ buffer を  $135 \mu\text{l}$  加え CellKey™ システム内において 29°C の環境で 30 分静置し平衡化してから assay を開始した。CellKey™ システムで 10 秒ごと 30 分間 (5 分間はベースライン、試薬投与後は 25 分間) 細胞外電流を流すことによって計測された impedance (dZiec) をモニターした。試薬投与後の dZiec 値の最大値か

ら最小値を引いた値を  $\Delta Zie$  ( $\Delta Zie = dZie \text{ maximum} - dZie \text{ minimum}$ ) と定義し、各試薬における receptor への反応の指標とした。データ解析にあたっては各々の  $\Delta Zie$  値は control sample の  $\Delta Zie$  値によって normalize した上で解析を行った。hMOR を発現させた HEK293 細胞において様々な濃度の DAMGO を反応させた際の CellKey™ assay の波形を示す(図 3)。

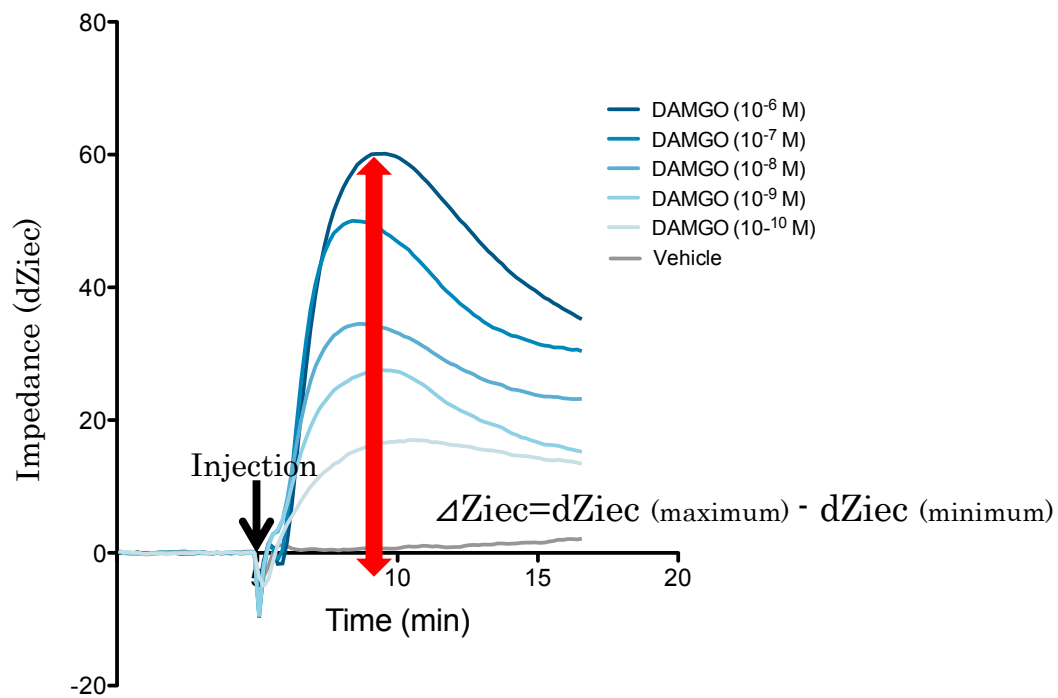


図 3 hMOR を発現させた HEK293 細胞において様々な濃度の DAMGO を反応させた際の CellKey™ assay の波形

$\Delta Z_{iec} (=dZ_{iec} \text{ maximum} - dZ_{iec} \text{ minimum})$  は DAMGO の濃度依存的に上昇がみられており、MOR signal の活性化を反映している。

## 2.5 細胞内 cAMP assay

The GloSensor™ cAMP biosensor (Promega) を用いた cAMP assay の原理は以下のようである<sup>28)</sup>(図 4)。



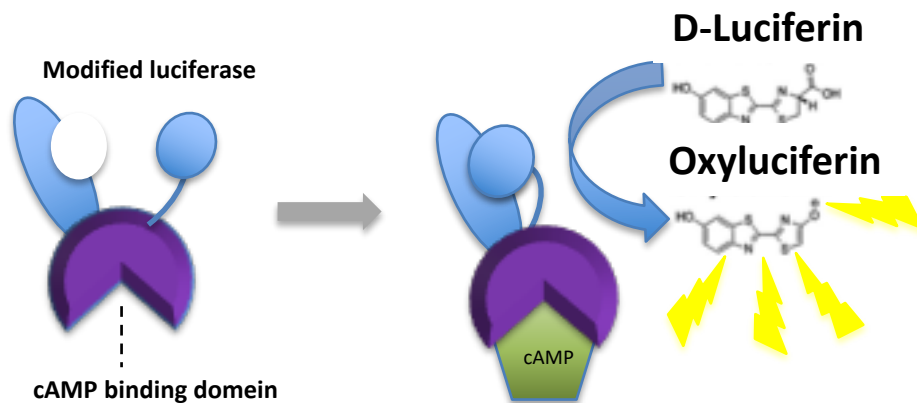


図 4 The GloSensor™ cAMP biosensor の原理

ホタルルシフェラーゼは 61kDa の単量体酵素で、Mg, ATP, 酸素分子の存在下で D-Luciferin を酸化し Oxyluciferin とすることで光を発生させる。ルシフェラーゼの結晶構造は 2 つのドメインがヒンジ状の領域で繋がっており、基質が結合するとそのヒンジ部分が回転し、2 つのドメインを近づける。このヒンジ構造の変化を利用し発光の程度を調節することができる。The GloSensor™ cAMP biosensor はホタルルシフェラーゼの内部に cAMP 結合タンパク質の一部が挿入されており、cAMP が結合すると、構造変化をおこして発光量が増加する。

図は Fan ら (引用文献 28) の図を改変して引用

本研究では研究室に保存されている hMOR 及び GloSensor™ cAMP biosensor をともに安定発現した HEK293 細胞を使用した。Corning 社 (Corning, NY, USA) より購入した poly-D-lysine で透明な底がコーティングされた 96 well の白色プレートに  $3 \times 10^4$ /well の細胞を播種し 24 時間 incubate した。その後に protocol どおりに希釈した GloSensor™ reagent を加え室温で 2 時間静置した。Assay 開始 10 分前に 250 mM IBMX 及び 50 mM Ro 20-1724 を加えた CellKey™ buffer で溶解した試薬を加え、Synergy™ H1 system (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) を用いて蛍光度の baseline を測定した。Assay 開始直前に各 well に  $3 \times 10^{-6}$  M の forskolin を injection し 2.5 分ごとに 40 分間蛍光度を測定し、time-luminescence curve を作成した。各 sample の cAMP 産生は time-luminescence curve の area under the curve (AUC) を算出し評価した (図 5)。

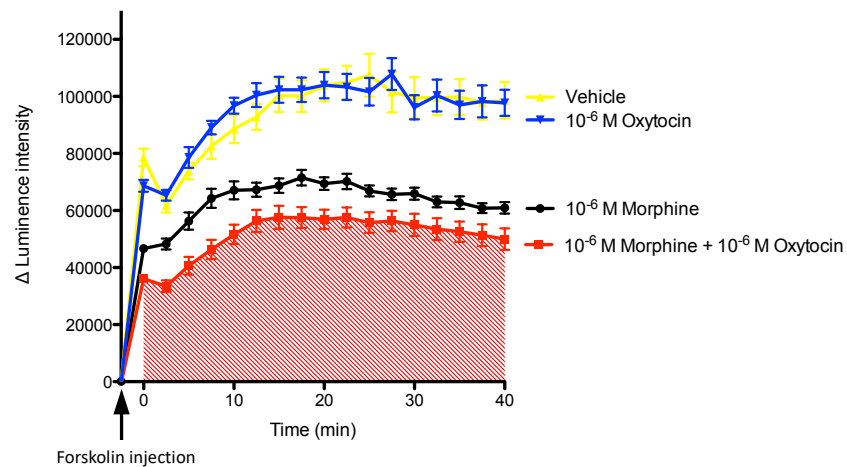


図 5 hMOR 及び GloSensor™ cAMP biosensor をともに安定発現した HEK293 細胞を用いた細胞内 cAMP assay の time-luminescence curve

Test compound として vehicle,  $10^{-6}$  M oxytocin,  $10^{-6}$  M morphine, 及び  $10^{-6}$  M oxytocin +  $10^{-6}$  M morphine を用いた際の time-luminescence curve を示す。

赤の領域は  $10^{-6}$  M oxytocin +  $10^{-6}$  M morphine の AUC を示す。

データは 6 回の独立した実験での means  $\pm$  standard error of the mean

(S. E. M.) (n=9-18) を示す。図は主論文 Meguro ら (引用文献 29) より引用

## 2.6 Opioid 受容体結合試験

Opioid 受容体結合試験は北里大学 平山重人氏へ依頼し実施した。hMOR を発現した Chinese hamster ovary (CHO) cell 由来の protein pellets を 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA を含加えた 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 で再懸濁した。再懸濁した細胞を glass-Teflon homogenizer で粉砕し 48,000g で 15 分間遠心した。上清を破棄したのち protein pellets は 5 mg/ml の濃度で buffer に再懸濁し使用まで -80°C で保管した。hMOR を発現した CHO 細胞膜を様々な濃度の試薬 (oxytocin, endomorphin-1, morphine)、0.5 nM [<sup>3</sup>H]diprenorphine (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) を含む 0.25 mL の buffer と 25°C の環境下で 2 時間 incubate した。Incubation 終了後は FilterMate™ harvester (PerkinElmer) を使用し Filtermat B filter に細胞膜を回収した。フィルターは pH 7.4 の 50 mM Tris-HCl で 3 回 wash し MicroBeta scintillation counter (PerkinElmer) で放射線量を測定した。Nonspecific binding は 1 μM の unlabeled diprenorphine 存在下に測定した。K<sub>i</sub> values は GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, CA, USA) を用いて計算した。

## 2.7 統計

統計学的解析と concentration response curve fitting は GraphPad Prism software を使用した。ΔZiec 値及び cAMP の AUC は one-もしくは two- way analysis of variance (ANOVA) を用い Bonferroni's test で検定を行った。Bartlett's test で分散が均一でないと判定されたデータ群はノンパラメトリック検定である Kruskale Wallis test を行い Dunn's test で検定を行った。(図 6, 7a, c, 及び 9d).  $P < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3.1 CellKey™ assay による hMOR 発現 HEK293 細胞を用いた oxytocin の MOR に対する活性評価

はじめに、CellKey™ assay により、MOR 発現 HEK293 細胞を用いて DAMGO と oxytocin の MOR に対する影響を評価した (図 5)。Vehicle と比較して  $10^{-5}$  M DAMGO では有意に  $\Delta Zie$  の上昇を認めたが、 $10^{-10} - 10^{-5}$  M の oxytocin では  $\Delta Zie$  の上昇を認めず、oxytocin は単独では MOR に対して agonist 作用を示さないことが示唆された。

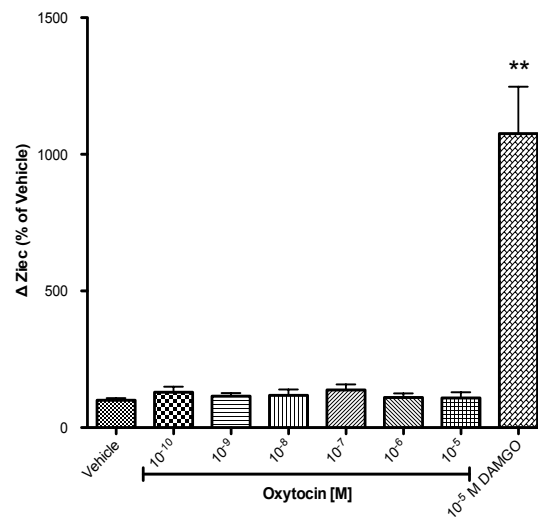


図 6 CellKey™ assay による oxytocin の MOR に対する活性評価

データは 3 回の独立した実験での means ± S. E. M. (n=9) を示す。

P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

図は主論文 Meguro ら(引用文献 29) より引用

### 3.2 CellKey™ assay による MOR 発現 HEK293 細胞を用いた opioid 誘発性 MOR 活性に対する oxytocin の効果

次に oxytocin が MOR に対して positive allosteric modulation (PAM) 効果を示すかどうかを検討した。10<sup>-6</sup> M の数種類の opioid (endomorphin-1, morphine, 及び DAMGO ) が MOR にもたらす効果を様々な濃度の oxytocin の存在下、非存在下において CellKey™ assay を用いて評価した (図 7a-c)。Opioid 単独と比較して (a) endomorphin-1 は 10<sup>-6</sup> M の oxytocin、(b) morphine は 10<sup>-6</sup> M と 10<sup>-5</sup> M の oxytocin、(c) DAMGO は 10<sup>-6</sup> M の oxytocin の存在下でそれぞれ有意な  $\Delta Z_{\text{iecl}}$  の上昇を認めた。



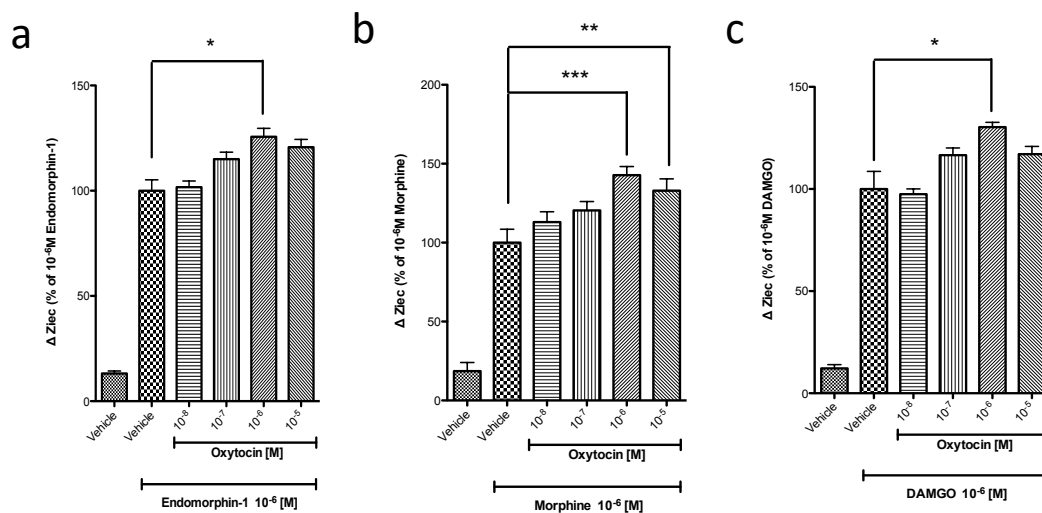


図7 CellKey™ assay による  $10^{-6}$  M の opioid 誘発性 MOR 活性に対する oxytocin の効果

細胞はそれぞれ  $10^{-6}$  M の (a) endomorphin-1, (b) morphine, (c) DAMGO により処置され、そこに  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M の oxytocin を共処置させた状態でも評価した。

データは 3-4 回の独立した実験での means  $\pm$  S. E. M. (n=9-15) を示す。

P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

図は主論文 Meguro ら(引用文献 29) より引用

前述の実験より  $10^{-6}$  M の oxytocin が最も強い PAM 効果を持つことが想定されたため  $10^{-6}$  M の oxytocin の存在下、非存在下において endomorphin-1,  $\beta$ -endorphin, morphine, fentanyl, 及び DAMGO の concentration-response curve を作成した (図 8a-e)。 $10^{-6}$  M の oxytocin によって  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M の endomorphin-1(a),  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M の  $\beta$ -endorphin (b),  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M の morphine(c),  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M の fentanyl(d),  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M の DAMGO(e) によってもたらされる  $\Delta Z_{\text{iec}}$  は有意に増加し、opioid の MOR への反応を増強していることが示唆された。 $E_{\text{max}}$  values は (agonist 単独, agonist +  $10^{-6}$  M oxytocin) ではそれぞれ endomorphin-1: (100.8, 118.4),  $\beta$ -endorphin: (103.9, 136.3), morphine: (100.3, 138.0), fentanyl: (98.77, 110.1), DAMGO: (99.07, 130.4) であった。 $EC_{50}$  値は評価した全ての opioid で  $10^{-6}$  M oxytocin の存在下、非存在下に関わらずほぼ同じであった。

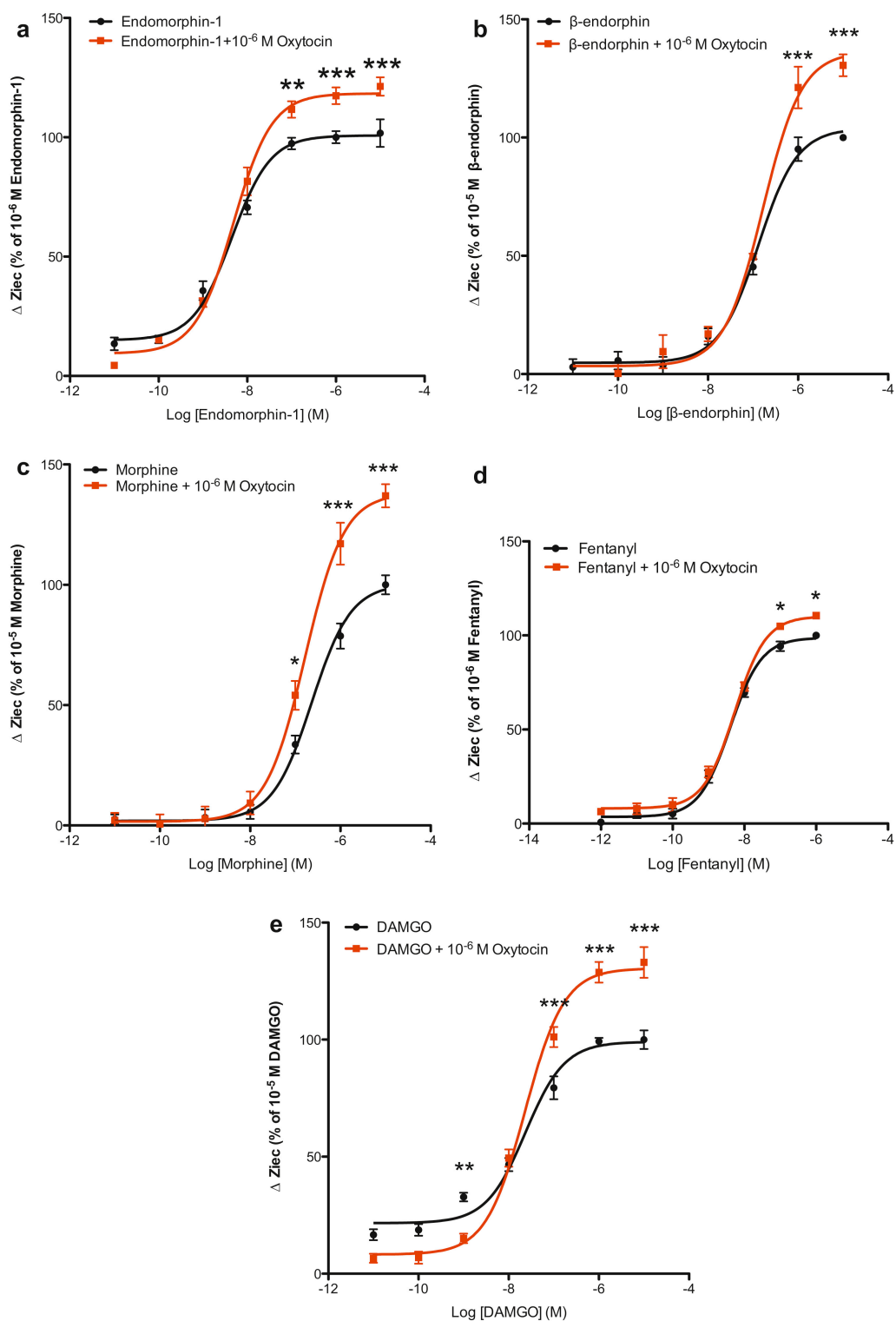


図 8 CellKey™ assay による opioid 誘発性 MOR 活性に対する  $10^{-6}$  M oxytocin の存在下、非存在下における concentration-response curve

(a) endomorphin-1 ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M), (b)  $\beta$ -endorphin ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M),  
(c) morphine ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M), (d) fentanyl ( $10^{-12}$  -  $10^{-6}$  M), 及び (e) DAMGO  
( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M) の MOR への反応を  $10^{-6}$  M の oxytocin の存在下、非存在下で  
評価した。データは 3-7 回の独立した実験の means  $\pm$  S. E. M. (n=9-21) を示す。

P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

図は主論文 Meguro ら (引用文献 29) より引用

### 3.3 GloSensor™ cAMP assay を用いた opioid 誘発性細胞内 cAMP 産生抑制に対する oxytocin の効果

CellKey™ assay の結果により  $10^{-6}$  M の oxytocin は opioid がもたらす MOR への作用を増強することが示唆された。そこで次に、この作用が真に GPCR のシグナル伝達を介しているかを確認するために細胞内 cAMP の産生を評価することとした。hMOR と GloSensor™ を共に発現させた HEK293 細胞を用いて cAMP assay を行い oxytocin が MOR に与える効果を評価した(図 9a - e)。 $10^{-6}$  M の oxytocin 単独では vehicle と比較して細胞内 cAMP 産生の変化は認められなかったものの、 $10^{-6}$  M の oxytocin は  $10^{-6}$  M の endomorphin-1,  $\beta$ -endorphin, morphine, fentanyl, DAMGO によって誘発された細胞内 cAMP 産生抑制効果を有意に増強した。このことより  $10^{-6}$  M の oxytocin は cAMP を介した MOR signal を増強することが示された。

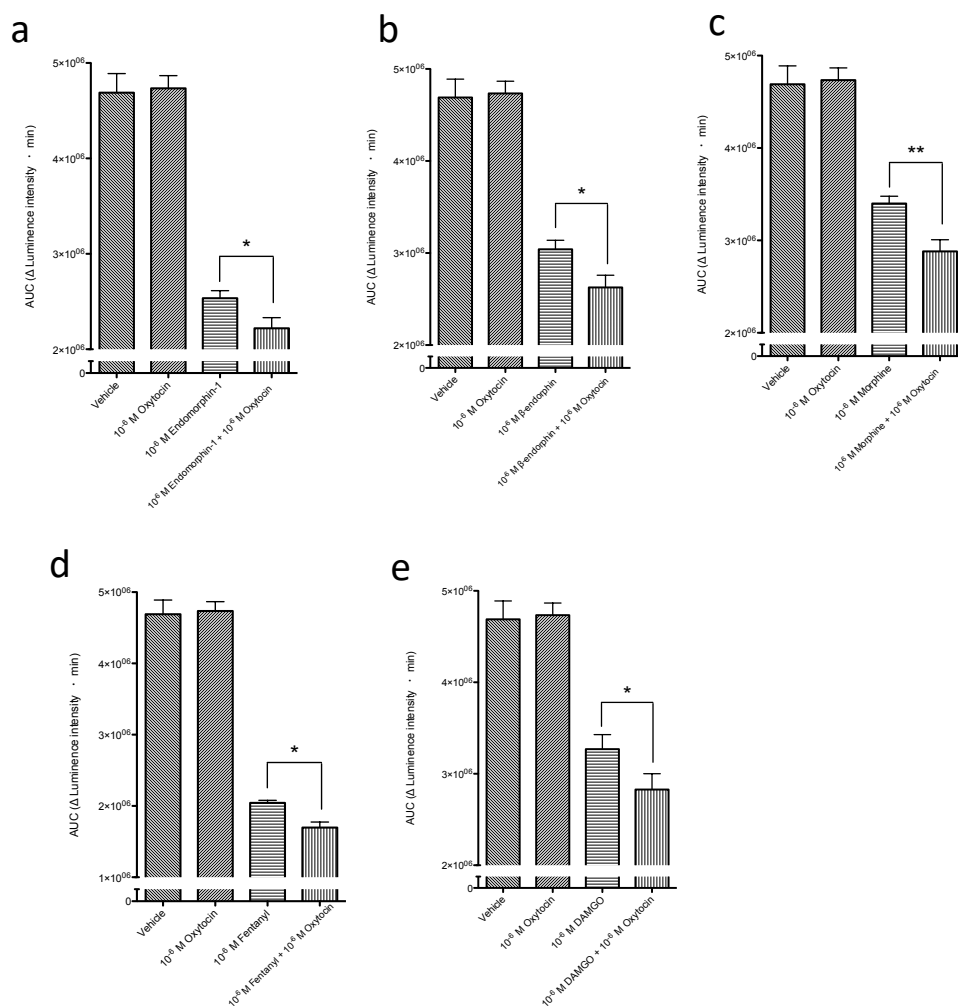


図 9 GloSensor™ cAMP assay を用いた opioid 誘発性細胞内 cAMP 産生抑制に対する oxytocin の効果

cAMP 産生の評価には assay 開始から 40 分間の time-luminescence curve の AUC を使用した。データは 6 回の独立した実験での means ± S. E. M. (n=9-18) を示す。

P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

図は主論文 Meguro ら (引用文献 29) より引用

### 3.4. Oxytocin が opioid の MOR への binding affinity へ与える影響

CellKey™ assays と細胞内 cAMP assays の結果から oxytocin が MOR の PAM であると考えられた。そこで oxytocin が endomorphin-1 及び morphine の MOR への binding affinity を修飾するかに関して、MOR の orthosteric agonist である [<sup>3</sup>H]diprenorphine との競合反応を用いた receptor binding study によって検討した。まず始めに [<sup>3</sup>H] によって標識されていない unlabeled diprenorphine は濃度依存性に [<sup>3</sup>H]diprenorphine との競合反応が認められたのに対して、oxytocin は  $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M の範囲で [<sup>3</sup>H]diprenorphine との競合反応が認められなかった (図 10a) 。さらに  $10^{-6}$  M の oxytocin は  $10^{-6}$  M の endomorphin-1 及び morphine の MOR への affinity に影響を及ぼさなかった (図 10b c)。

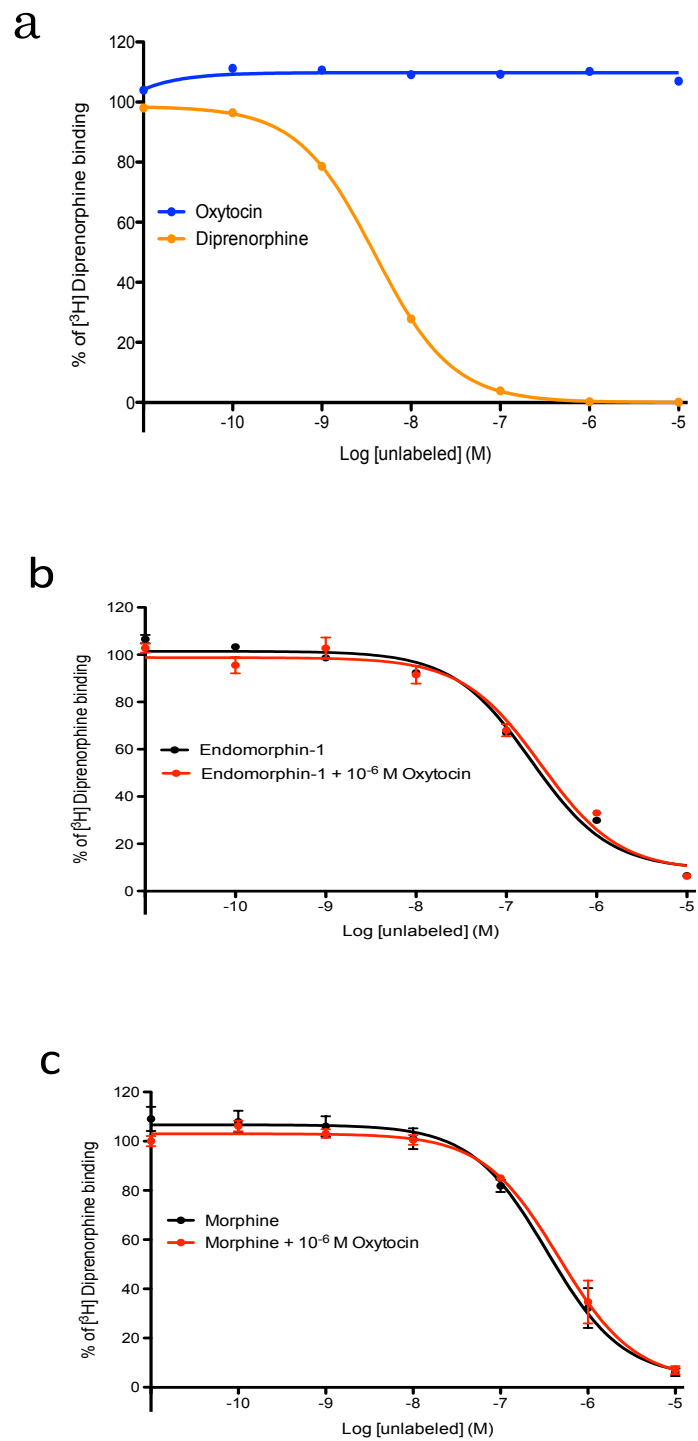


図 10  $[^3\text{H}]$ diprenorphine を用いた opioid 受容体結合試験



図 10 (a) Oxytocin の MOR の orthosteric site への結合評価

(b), (c) Opioid の MOR への affinity に与える oxytocin の影響

データはそれぞれ 2 回の独立した実験での means  $\pm$  S. E. M. (n=6) を示す。

$P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$

図は主論文 Meguro ら(引用文献 29) より引用

### 3.5. CellKey™ assay による oxytocin 誘発性 OTR 活性に対する endomorphin-1 の効果

これまでの結果を受けて、最後に opioid（今回は endomorphin-1 を使用した）が oxytocin の OTR への作用を修飾するかについて、hOTR 発現 HEK293 細胞を用いた CellKey™ assay により評価した（図 11）。Endomorphin-1 は oxytocin によって OTR にもたらされた  $\Delta Z_{iec}$  に影響を与えなかった。

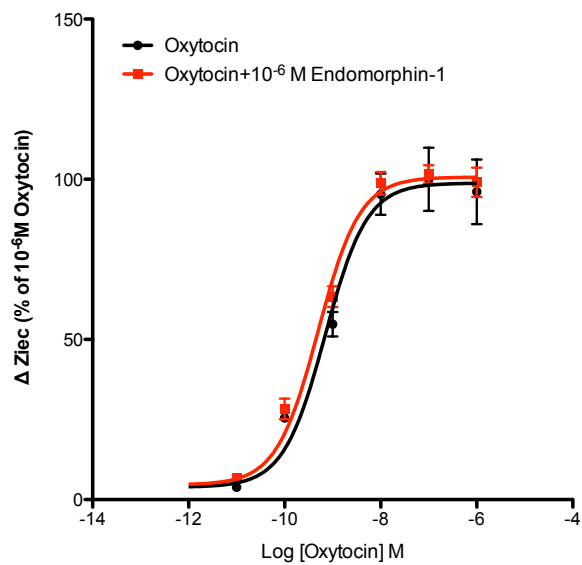


図 11 CellKey™ assay による oxytocin 誘発性 OTR 活性に対する endomorphin-1 の効果

データは 3 回の独立した実験での means ± S. E. M. (n=6) を示す。

P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

図は主論文より引用

#### 4. 考察

本研究では oxytocin が MOR に与える影響について *in vitro* での実験を行った。

過去の報告で oxytocin の鎮痛効果と MOR に関する研究報告は存在するものの、これらはいずれもラットを用いた *in vivo* での疼痛閾値を測定したものである<sup>6-8)</sup>。著者の知り得る限りで本研究は oxytocin が単独で MOR の活性を修飾していることを *in vitro* で明確に示した初の研究である。本研究では、はじめに MOR 活性の評価として impedance based system である CellKey™ assay を用いた。

この新規 assay の信頼性に関しては、CellKey™ assay が cAMP や  $[Ca^{2+}]_i$  測定, GTP  $\gamma$  S binding などの従来から行われてきた GPCR 活性の評価法と比較して遜色がなく、むしろ同等かそれ以上の sensitivity があることは我々のグループを始め他の研究グループからも報告されている<sup>24, 30)</sup>。今回の研究結果でも CellKey™ assay の結果と cAMP assay の結果には一致が見られた。はじめに、hMOR を発現した HEK293 細胞を用いた CellKey™ assay や cAMP assay で oxytocin 単独では agonist 作用は認められなかったこと (図 6, 9)、receptor binding 試験の結果 (図 10a) より、oxytocin は MOR に対して単独では agonist 作用を持たないことが示された。次に考慮した可能性としては、oxytocin の鎮痛効果の一つとして内因

性オピオイドが MOR に作用する際に positive allosteric modulator として働いている可能性である。我々は  $10^{-6}$  M もしくはそれより高濃度の oxytocin が hMOR 発現細胞を用いた CellKey™ assay で  $10^{-6}$  M の endomorphin-1, morphine, 及び DAMGO によってもたらされた  $\Delta Z_{\text{iec}}$  の上昇を増強していることを示した (図 7)。次に  $10^{-6}$  M oxytocin の存在下、非存在下において endomorphin-1,  $\beta$ -endorphin, morphine, fentanyl, 及び DAMGO によってもたらされた  $\Delta Z_{\text{iec}}$  の concentration-response curves を作成したところ、興味深いことに  $10^{-6}$  M の oxytocin は比較的高濃度の opioid の MOR への作用を増強することが示された (図 8)。それとは対照的に  $10^{-6}$  M の endomorphin-1 は oxytocin の OTR への作用を増強しなかった (図 11)。CellKey™ assay は細胞外電流を流した際の impedance を測定することにより GPCR 活性を評価する modality であり、pH や浸透圧などの非特異的な機序が impedance を変化させてしまった場合、偽陽性の結果となる可能性を孕んでいると思われる。しかしこの実験より oxytocin と opioid は非特異的な機序で CellKey™ assay の  $\Delta Z_{\text{iec}}$  を上昇させているのではなく oxytocin が opioid による MOR への作用を増強した結果として  $\Delta Z_{\text{iec}}$  を上昇させたと考えられ、このことは cAMP assay の結果によっても支持された。

Oxytocin の MOR に対する PAM 作用に関して、本研究では oxytocin が MOR の orthosteric site に結合していないことは証明されたが、oxytocin が MOR に結合する直接的な証拠は得られていない。Oxytocin が oxytocin 受容体ではなく MOR に直接作用していることを証明する方法としては、1) Oxytocin 受容体拮抗薬や oxytocin 受容体欠損マウスを用いても oxytocin の効果が変わらず観察される。2) Oxytocin 自体をラベリングした [<sup>3</sup>H]oxytocin 等を用いて、MOR 発現数の違う細胞株でそれぞれ受容体結合試験を行い、MOR が増加する場合には、oxytocin の結合も増加することを確認する。などの実験が考えられる。

本研究では oxytocin の MOR への PAM 効果の程度は opioid の種類によって異なっていた。例えば morphine は CellKey™ assay、cAMP assay いずれでも fentanyl より強い PAM 効果を示した。このような現象は probe dependence と呼ばれ、PAM の重要な特徴であるとされている<sup>23)</sup>。各 opioid によって MOR の binding pocket で作用するアミノ酸が異なっているため、MOR の立体構造変化も probe 毎に差異が生じ、結果として PAM 効果に差が出ているのかもしれない。Conn らは allosteric 効果のモデルを提唱しているが<sup>31)</sup>、その中で positive allosteric

ligand は orthosteric agonist とは異なった部位に結合し、主に (1) Affinity modulation (2) Efficacy modulation の役割を果たしうるとされる (図 12)。

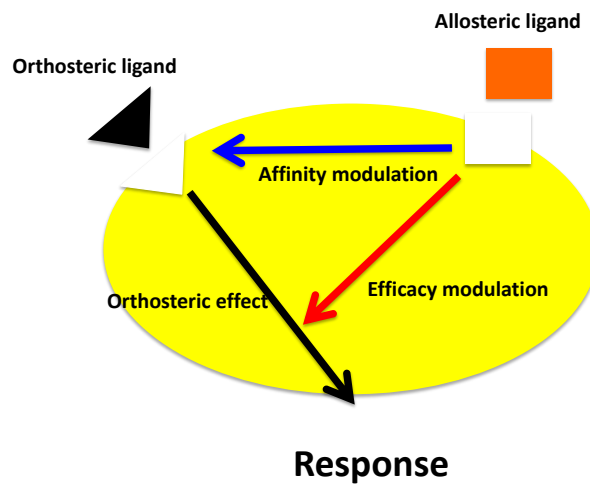


図 12a Allosteric 効果のモデル

Conn ら (文献 31) の図を改変

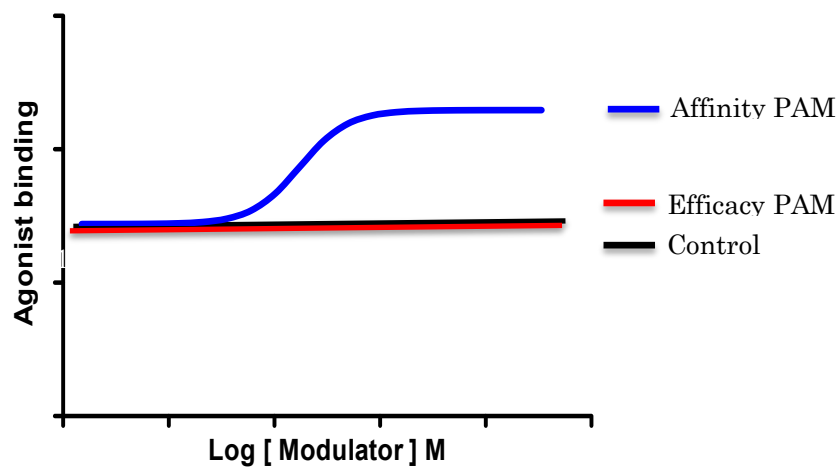


図 12b 各種 PAM における Agonist binding の違い

Conn ら (文献 31) の図を改変



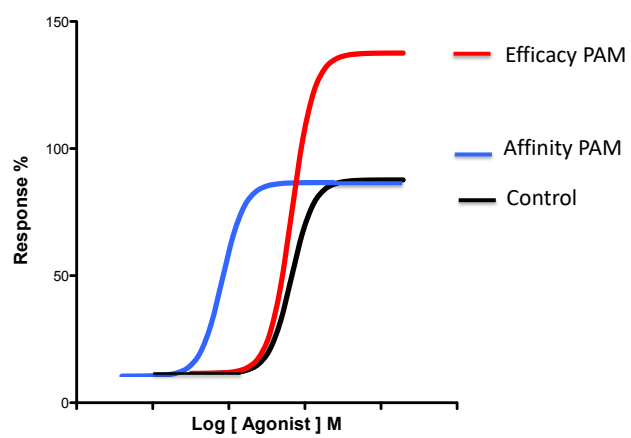


図 12c 各種 PAM 存在下における Concentration-response curves

Conn ら (文献 31) の図を改変

Affinity modulation は orthosteric ligand の affinity を変化させることにより orthosteric agonist の作用を増強するもので、receptor binding study では orthosteric agonist の binding affinity の上昇が認められる (図 12b)。CellKey などの functional analysis では dose response curve は左に shift するが最大効果は上昇させない (図 12c)。Efficacy modulation は orthosteric ligand の affinity は変化させないが (図 12b)、functional analysis では orthosteric ligand が高濃度になるにつれて efficacy を大きく増大させる (図 12c)。今回の実験結果より oxytocin は endomorphin-1 や morphine の MOR への affinity を変化させず (図 10b, c)、efficacy に関しては orthosteric ligand が高濃度になるにつれ MOR の efficacy を大きく増大させている (図 8) ため、Conn のモデルでの efficacy modulation に相当するものであると考えられた。本研究では検討されてはいないが、この現象は oxytocin の効果が受容体の efficacy に直接ではなく、MOR の細胞膜への局在を高める方向に働いている可能性についても考慮されるべきであると考えられた。

鎮痛薬の開発にあたり過去に行われてきた opioid receptor (OR) についての研究では、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  の異なった ORs に選択的に作用する orthosteric agonist

や full agonist と比較して efficacy を減弱させた partial agonist、combination therapy としての併用療法のできる agonist などの開発に focus が当てられてきた<sup>32, 33)</sup>。しかしながらこれらの orthosteric binding sites を標的とした ligands は時間、空間的、すなわち必要な時、必要な場所のみに選択的に作用できないという共通の欠点があった。このような orthosteric ligands が鎮痛薬として全身投与された場合、疼痛に関連した部分のみではなく target としない組織にも作用することとなる。さらに opioid agonists が orthosteric binding site に持続的に結合した場合、中毒性の副作用の問題のみならず、receptor が脱感作状態となり急性耐性につながっていくことの問題も考えられる<sup>21, 23)</sup>。このような問題を克服した疼痛治療の新しい戦略として  $\mu$ -PAM の投与に注目が集まっている。 $\mu$ -PAM の投与は内因性 opioid の効果を増強することとなり、内因性 opioid が本来もつ MOR の activity が必要な時間や場所の選択性を保ちつつ、MOR の signal を増幅させ、鎮痛効果を増強させることができるという画期的な利点をもつと考えられている<sup>23)</sup> (図 13)。

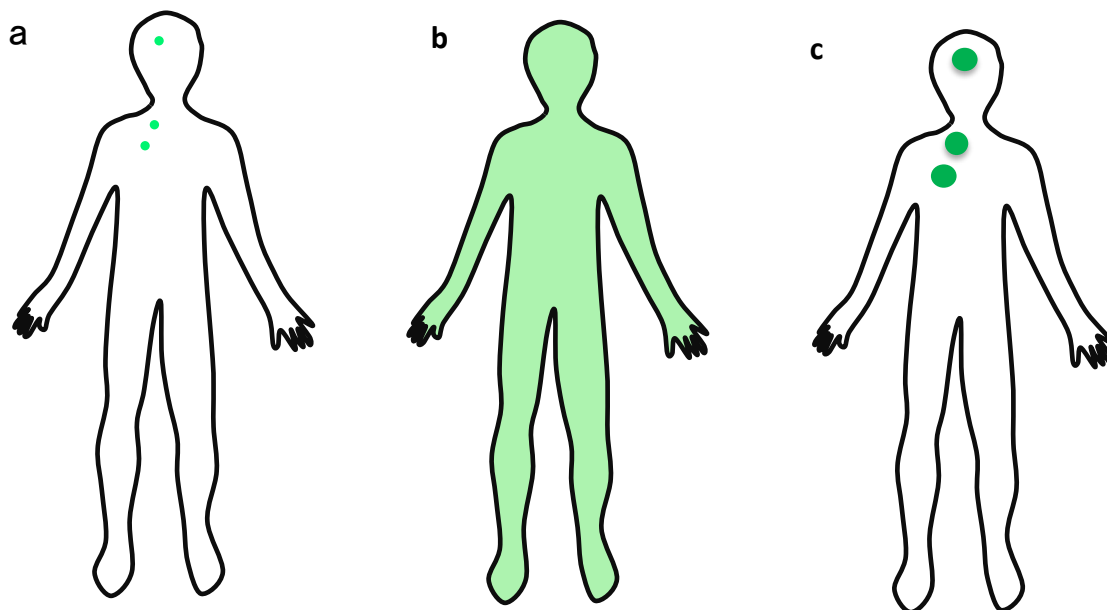


図 13 opioid の全身投与と  $\mu$ -PAM 投与の違い

Burford ら（引用文献 23）の図を一部改変し引用

(a) 疼痛時は生体内で産生される内因性 opioid により鎮痛を得ている。必要とされる時間的、空間的な選択性はもつが鎮痛効果は十分ではない。

(b) Opioid の全身投与では鎮痛効果は得られるが時間的、空間的な選択性に乏しく全身性の副作用が出現する可能性がある。

(c)  $\mu$ -PAM の投与では内因性 opioid が本来もつ MOR の activity が必要な時間や場所の選択性を保ちつつ、鎮痛効果を増強させることができる。

Oxytocin の最適な dose に関して、本研究では  $10^{-6}$  M という比較的高い濃度で最も強い MOR への PAM 効果が認められた。一般的に oxytocin を含めた neurotransmitters は神経細胞から放出される前は高濃度で小胞内に存在し、exocytosis によって axonal terminals や dendrites より放出、拡散していくため<sup>34)</sup>、狭いシナプス間隙の局所では比較的高濃度のオキシトシンが存在する可能性がある。加えて疼痛条件下のラットでは血中及び脊髄後角の Laminae I, II において oxytocin レベルが上昇していることが過去に報告されている<sup>12, 13)</sup>。しかし、実際に  $10^{-6}$  M という高濃度の oxytocin が MOR の存在する局所で存在しうるかに関しての直接的な根拠は、文献を検索し得た範囲で確認することができなかった。この点に関しては実際の *in vivo* の環境と recombinant の receptor を強制発現させた *in vitro* の環境との違いによるものである可能性もあるが、本論文の限界であると考えられた。また、内因性 opioid は疼痛条件下で上昇することが報告されているが<sup>35)</sup>、本研究で oxytocin は比較的高濃度の  $\beta$ -endorphin や endomorphin-1 による MOR signal を増強した(図 8a, b)。比較的高濃度の oxytocin が高濃度の内因性 opioid の signal を増強するというこの現象は、内因性の oxytocin は疼痛条件下において、過去に報告されている OTR を

介した鎮痛効果だけでなく、MOR の PAM として鎮痛効果を reasonable に発揮している可能性がある。

Oxytocin の点鼻製剤を鎮痛薬として臨床利用する際、oxytocin はペプチドであるため経口での投与は不可能であり、経鼻的な経路で投与される。製剤として経鼻的に投与された高濃度の oxytocin は三叉神経や嗅神経の extraneuronal, perineuronal なルートを介して高濃度を保ち得ながら直接脳の必要な部位に到達しうると考えられる<sup>4)</sup>。この観点から薬剤として外因的に投与された oxytocin は以下の様な特異的な利点をもつと考えられる。疼痛下で単独で投与された場合、oxytocin は部位的、時間的な厳密性を保った高濃度の内因性 opioid の鎮痛作用を速やかに増強することによって、副作用が少なく効果的に鎮痛作用の上乗せを発揮し得ると考えられる。さらに、医療用麻薬との併用を考えた場合には、高容量の opioid でも鎮痛効果が不十分な場合に対して鎮痛補助薬として使用することにより、既に投与されている高濃度の opioid の鎮痛効果を速やかに増強し、さらに鎮痛効果を高めることができる可能性がある。

最後に oxytocin の効果と安全性に関して、oxytocin はもともと生体内に存在しているペプチドであり、産科領域では子宮収縮薬として古くから使用されて

きている。Okamoto らは ASD 患者らに対する oxytocin の長期間の点鼻投与を調査した clinical trials を review し、その全ての研究結果で 12-64 IU/day 長期間の oxytocin の投与は忍容性があり、深刻な有害事象は報告されていないとしている<sup>5)</sup>。急性疼痛に対する鎮痛薬としても 1 回 40 IU という投与量で臨床研究が行われており、有効性と安全性が報告されている<sup>11)</sup>。このような状況を考慮すると oxytocin 点鼻投与は安全であり、臨床的に有効性が期待できる鎮痛薬として drug repositioning が可能な薬剤であると考えられ、今後医療用麻薬との併用も含めた更なる臨床研究が必要と思われる。さらに今後は oxytocin と MOR の関係に関して、*in silico* でのさらなる立体構造変化の解析や oxytocin のアミノ酸の一部を置換し、より効果を高めた新規薬剤の合成・評価にも期待が寄せられるところである。

## 5. 結論

本研究において oxytocin は  $\mu$  opioid receptor signaling の efficacy を増強する positive allosteric modulator である可能性が示唆された。

## 6. 謝辞

研究のテーマ設定から国立がん研究センターとの共同研究へ至るまでのマネージメント、論文作成に関わる全ての過程において、oxytocin に関する重要なアドバイスを頂き、多大なる御尽力を賜りました自治医科大学統合生理学教室、矢田俊彦前教授に篤く御礼申し上げます。研究の基礎から様々な知識をご教示頂きました星薬科大学薬理学教室の成田年教授をはじめ、教室の皆様に感謝致します。また本研究を行うにあたり終始多大なる御指導、御鞭撻を承りました国立がん研究センター研究所 がん患者病態生理研究分野 上園保仁分野長、宮野加奈子先生に深く感謝致します。この研究成果はお二人の暖かい人柄と指導力によって得ることが出来ました。Receptor binding 試験を実施して頂きました北里大学薬学部 平山重人先生、国立がん研究センターでの様々な調整にご協力頂きました江塚準子様にも篤く御礼申し上げます。実験準備や手技を手伝って下さった国立がんセンター研究所の研究員、研修生の皆様に感謝致します。そして最後に、義務年限中であった私の研究活動の当初から本研究の進捗状況を終始暖かく見守って頂き、ご指導を賜りました佐田尚宏教授に篤く御礼申し上げます。



## 7. 参考文献

1. Kiss A, Mikkelsen JD. Oxytocin—anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul.* 2005;39:97-105.
2. Pedersen CA, Vadlamudi SV, Boccia ML, Amico JA. Maternal behavior deficits in nulliparous oxytocin knockout mice. *Genes Brain Behav.* 2006;5:274-281.
3. Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, Munesue T, Minabe Y, Kikuchi M, Ono Y, Korshunova N, Salmina AB. Oxytocin signal and social behavior: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice. *J Neuroendocrinol.* 2010;22:373-379.
4. Macdonald, K. M. & Feifel, D. Helping oxytocin deliver: considerations in the development of oxytocin-based therapeutics for brain disorders. *Front. Neurosci.* 2013;7:35.
5. Okamoto Y, Ishitobi M, Wada Y, Kosaka H. The potential of nasal oxytocin administration for remediation of autism spectrum disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016;15:564-577.
6. Ge Y, Lundeberg T, Yu LC. Blockade effect of mu and kappa opioid antagonists on the anti-nociception induced by intra-periaqueductal grey injection of oxytocin in rats. *Brain Res.* 2002;927:204-207.
7. Gao L, Yu LC. Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regul Pept.* 2004;120:53-58.
8. Gu XL, Yu LC. Involvement of opioid receptors in oxytocin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats. *J Pain.* 2007;8:85-90.
9. Breton JD, Veinante P, Uhl-Bronner S, Vergnano AM, Freund-Mercier MJ, Schlichter R, Poisbeau P. Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is

- mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Mol Pain*. 2008;4:19.
10. Rash JA, Aguirre-Camacho A, Campbell TS. Oxytocin and pain: a systematic review and synthesis of findings. *Clin J Pain*. 2014;30:453-462.
  11. Rash JA, Campbell TS. The effect of intranasal oxytocin administration on acute cold pressor pain: a placebo-controlled, double-blind, within-participants crossover investigation. *Psychosom Med*. 2014;76:422-429.
  12. Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Ishikura T, Yoshimura M, Ohkubo JI, Maruyama T, Motojima Y, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. Fluorescent visualisation of oxytocin in the hypothalamo-neurohypophysial/-spinal pathways after chronic inflammation in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rats. *J Neuroendocrinol*. 2015;27:636-646.
  13. Matsuura T, Kawasaki M, Hashimoto H, Yoshimura M, Motojima Y, Saito R, Ueno H, Maruyama T, Ishikura T, Sabanai K, Mori T, Ohnishi H, Onaka T, Sakai T, Ueta Y. Possible involvement of the rat hypothalamo-neurohypophysial/-spinal oxytocinergic pathways in acute nociceptive responses. *J Neuroendocrinol*. 2016;28:doi: 10.1111/jne.12396.
  14. Rojas-Piloni G, Mejía-Rodríguez R, Martínez-Lorezana G, Condés-Lara M. Oxytocin, but not vasopressin, modulates nociceptive responses in dorsal horn neurons. *Neurosci Lett*. 2010;476:32-35.

15. Condes-Lara M, Rojas-Piloni G, Martinez-Lorezana G, Rodoriguez-Jimenez J, Lopez Hidalgo M, Freund-Mercier MJ. Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. *Brain Res.* 2006;1081:126e137.
16. Rojas-Piloni G, Martínez-Lorezana G, DelaTorre S, Condés-Lara M. Nociceptive spinothalamic tract and postsynaptic dorsal column neurons are modulated by paraventricular hypothalamic activation. *Eur J Neurosci.* 2008;28:546-558.
17. Csiffáry A, Ruttner Z, Tóth Z, Palkovits M. Oxytocin nerve fibers innervate beta-endorphin neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 1992;56:429-435.
18. Yang J, Liang JY, Li P, Pan YJ, Qiu PY, Zhang J, Hao F, Wang DX. Oxytocin in the periaqueductal gray participates in pain modulation in the rat by influencing endogenous opiate peptides. *Peptides.* 2011;32:1255-1261.
19. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:953-990.
20. McNicol E, Horowicz-Mehler N, Fisk RA, Bennett K, Gialeli-Goudas M, Chew PW, Lau J, Carr D. Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: a systematic review. *J Pain.* 2003;4:231-256.
21. Burford NT, Clark MJ, Wehrman TS, Gerritz SW, Banks M, O'Connell J, Traynor JR, Alt A. Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the  $\mu$ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:10830-10835.

22. 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.
23. Burford, NT, Traynor, JR, Alt A. Positive allosteric modulators of the  $\mu$ -opioid receptor: a novel approach for future pain medications. *Br J Pharmacol*. 2015;172:277-286.
24. 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;126:302-309.
25. Hisaoka-Nakashima K, Miyano K, Matsumoto C, Kajitani N, Abe H, Okada-Tsuchioka M, Yokoyama A, Uezono Y, Morioka N, Nakata Y, Takebayashi M. Tricyclic antidepressant amitriptyline-induced glial cell line-derived neurotrophic factor production involves pertussis toxin-sensitive  $G\alpha_{i/o}$  activation in astroglial cells. *J Biol Chem*. 2015;290:13678-13691.
26. Kajitani N, Miyano K, Okada-Tsuchioka M, Abe H, Itagaki K, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Uezono Y, Takebayashi M. Identification of lysophosphatidic acid receptor 1 in astroglial cells as a target for glial cell line-derived neurotrophic factor expression induced by antidepressants. *J Biol Chem*. 2016;291:27364-27370.
27. 藤井秀明, 宮野加奈子, 上園保仁. CellKey™システムを用いた新しいGPCRの活性評価系. THE CHEMICAL TIMES. 2015;235:3-7.
28. Fan F, Binkowski BF, Butler BL, Stecha PF, Lewis MK, Wood KV. Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase. *ACS Chem Biol*. 2008;3:346-351.

29. Meguro Y, Miyano K, Hirayama S, Yoshida Y, Ishibashi N, Ogino T, Fujii Y, Manabe S, Eto M, Nonaka M, Fujii H, Ueta Y, Narita M, Sata N, Yada T, Uezono Y. Neuropeptide oxytocin enhances  $\mu$  opioid receptor signaling as a positive allosteric modulator. *Journal of Pharmacological Sciences*.2018;137:67-75
30. Scott CW, Peters MF. Label-free whole-cell assays: expanding the scope of GPCR screening. *Drug Discov Today*. 2010;15:704-716.
31. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8:41-54.
32. Dietis N, Guerrini R, Calo G, Salvadori S, Rowbotham DJ, Lambert DG. Simultaneous targeting of multiple opioid receptors: A strategy to improve side-effect profile. *Br J Anaesth*. 2009;103:38-49.
33. Davis MP. Evidence from basic research for opioid combinations. *Expert Opin Drug Discov*. 2012;7:165-178.
34. Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:126-136.
35. Rasmussen NA, Farr LA. Beta-endorphin response to an acute pain stimulus. *J Neurosci Methods*. 2009;177:285-288.