

氏 名	目黒 由行
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	乙第 756 号
学位授与年月日	平成 30 年 12 月 6 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	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 μ opioid receptor に与える影響について～
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 興 水 崇 鏡 (委 員) 教授 丹 波 嘉一郎 教授 尾 仲 達 史

論文内容の要旨

1 研究目的

現在我が国における全部位のがん死亡数は総死亡数の約 29%をも占めているため、がん緩和ケアは重要である。わが国でも 2017 年より 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が、突出痛については未だ十分な対応ができておらず、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、autism spectrum disorder に対する点鼻投与で近年高い関心を集めているが、鎮痛効果を有するとの研究報告もあり、*in vivo* の実験で μ opioid 受容体との関連が示唆されている。今回我々は、がん性疼痛に対する oxytocin の臨床利用を目的として、oxytocin の鎮痛機序を解明するため、oxytocin と μ opioid 受容体との関連を *in vitro* で評価した。

2 研究方法

μ opioid 受容体を安定発現した HEK293 細胞を使用し、電気抵抗の変化によって受容体への反応が評価可能な CellKey™ assay を用いて、oxytocin が単独で μ opioid 受容体に agonist 作用を示すか、そして opioid が μ opioid 受容体に作用する際に、oxytocin が与える影響を評価した。次いで μ opioid 受容体と cAMP biosensor を共に発現した HEK293 細胞を用いて cAMP assay を行い、opioid が μ opioid 受容体に作用する際に、oxytocin が与える影響を評価した。更に μ opioid 受容体を発現させた CHO 細胞膜を用いて、 $[^3\text{H}]$ diprenorphine との競合法による receptor binding study を行い、opioid が μ opioid 受容体へ結合する際の affinity に、oxytocin が影響を与えているかを評価した。最後に oxytocin が oxytocin 受容体に作用する際に、opioid が与える影響に関しても CellKey™ assay を使用し評価した。

3 研究成果

CellKey™ assay で、oxytocin は μ opioid 受容体への agonist 作用は示さなかった。しかし

10^{-6} M もしくはそれより高濃度の oxytocin は、 10^{-6} M の opioid (endomorphin-1, morphine, DAMGO)による μ opioid 受容体への signal を増強した。CellKey™ assay を用いて 10^{-6} M の oxytocin の存在下、非存在下において endomorphin-1, β -endorphin, morphine, fentanyl, 及び DAMGO の concentration-response curve を作成したところ、 10^{-6} M の oxytocin は比較的高濃度の opioid の μ opioid 受容体への作用を増強していることが示された。次いで μ opioid 受容体発現細胞を用いた細胞内 cAMP assay を施行した。 10^{-6} M oxytocin 単独では、 μ opioid 受容体への agonist 作用を示さなかったが、 10^{-6} M の oxytocin は 10^{-6} M の endomorphin-1, β -endorphin, morphine, fentanyl, 及び DAMGO による細胞内 cAMP 産生抑制の程度を増強し、CellKey™ assay の結果と同様に、opioid の μ opioid 受容体への作用を増強した。さらに μ opioid 受容体発現 CHO 細胞膜を用いた receptor binding study では、oxytocin は 10^{-11} – 10^{-5} M の範囲で、 μ opioid 受容体の orthosteric site へ結合しないことが示された。また、 10^{-6} M の oxytocin は、 10^{-6} M の endomorphin-1 及び、morphine の μ opioid 受容体への affinity に影響を及ぼさなかった。最後に、CellKey™ assay による評価では、oxytocin が oxytocin 受容体に作用する signal に、 10^{-6} M の opioid (endomorphin-1)は影響を与えなかった。

4 考察

本研究では oxytocin が μ opioid 受容体に与える影響について、*in vitro* での実験を行った。はじめに、 μ opioid 受容体発現細胞を用いた CellKey™ assay や cAMP assay、receptor binding 試験の結果より、oxytocin は単独では agonist 作用を持たないことが示された。次いで CellKey™ assay 及び細胞内 cAMP assay によって、 10^{-6} M の oxytocin が、比較的高濃度の opioid の μ opioid 受容体への作用を増強することが示された。Positive allosteric ligand は主に (1)Affinity modulation (2) Efficacy modulation の役割を果たしうるとされる。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。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といった特徴をもつ。Efficacy modulation は、orthosteric ligand の affinity は変化させないが、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特徴をもつ。以上より oxytocin は、opioid が μ opioid 受容体へ作用する際の efficacy を増強することが示唆された。

臨床で μ opioid 受容体の positive allosteric modulator が投与される場合、疼痛下で単独投与された場合には、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、医療用麻薬と併用された場合には、高濃度の opioid によって得られている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。また、autism spectrum disorder に対する oxytocin の点鼻投与は有効性と安全性が報告されており、鎮痛薬として drug repositioning が可能な薬剤であると考えられるため、今後更なる研究が必要と思われる。

5 結論

本研究において oxytocin は μ 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。

論文審査の結果の要旨

本研究は、神経ペプチドホルモンオキシトシンが、オピオイド鎮痛を増強する機序について検討した。特にオキシトシンが、 μ オピオイド受容体に対してアロステリック効果を持つ可能性について、 μ オピオイド受容体を強制発現させた培養細胞株を用いて検討した。細胞の電氣的抵抗を測定する系を用い、オキシトシンは単独では μ オピオイド受容体発現細胞には影響を与えないが、オピオイドアゴニストとオキシトシンを投与した場合には、オキシトシンはオピオイドの効果を増強した。また、cAMP 産生抑制効果でも同様に、オキシトシンはオピオイドの効果を増強した。しかし、オキシトシンは、オピオイドが μ 受容体に結合する段階には影響を及ぼさなかった。これらの結果より、オキシトシンは μ 受容体のオピオイドの結合部位とは異なる部分に作用している可能性が示唆された。すなわち、オキシトシンがオピオイドの positive allosteric agonist として働き、特に efficacy を増強することを明らかにした。オピオイドは医療用鎮静薬としてがん性疼痛その他に多く用いられている。特に臨床的には突出痛が問題となっており、さらなる短時間での痛みのコントロールが求められている。本研究により、オピオイドに追加する形で、オキシトシンを鎮痛補助として用いる使用法が考えられ、その機序を見出した点に独創性と臨床的意義を認める。

博士論文中、得られた結果から解釈を行なった際に、否定できない他の可能性については、審査員の指導を含めた上で修正により公平な議論ができたと考えられる。使用した薬物の濃度が高い状態で効果が見られた点については、神経系においてシナプスなどの伝達物質放出部位では、局所的にリガンドが高濃度になり得ることを論文に引用しつつ議論した。論文には審査員からの指摘を受けた事項が適切に反映されており、最終的に博士論文として相応しいと考えられ、審査員全員一致で合格と判定した。

試問の結果の要旨

博士論文の内容を、研究背景と発展性を含め時間内に適切に提示することができた。質疑応答では、審査員からの質問や指摘事項に真摯に対応した。発表、質疑応答を通じ、研究に必要な知識や理論性は十分備わっていると考えられた。質疑応答を経ることにより、さらに論文の内容を高めることが可能であった。試問での指摘の細かい部分まで対応し、学位論文、論文要旨、調書が適切に修正された。以上より、審査委員全員一致で申請者が医学博士号を受けるに値すると判断し、試問に合格とした。