

## オピオイド鎮痛薬の副作用発現に関わる

### シグナル分子機構を解明

#### — 副作用を低減した鎮痛薬の開発に貢献 —

#### 【発表のポイント】

- オピオイド系鎮痛薬の副作用機序の分子理解と、副作用を減弱した鎮痛薬の創製は急務かつ重要な課題です。
- オピオイド系鎮痛薬の作用点である  $\mu$  (ミュー) オピオイド受容体 (MOR)<sup>(注1)</sup> のシグナル伝達制御因子であり、副作用に関連する  $\beta$  アレスチン<sup>(注2)</sup> が、 $G\beta_5$ -GPCR キナーゼ 3 (GRK3)<sup>(注3)</sup> の経路により活性化を受けることを明らかにしました。
- 1分子観察によって、 $G\beta_5$  は GRK3 と一過的に結合し、MOR と GRK が結合する頻度を増加させることを世界で初めて見出しました。

#### 【概要】

モルヒネに代表されるオピオイド系鎮痛薬（以下、MOR 作動薬）は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR)<sup>(注4)</sup> の1種である  $\mu$  (ミュー) オピオイド受容体 (MOR) に結合することで薬効を発揮します。

MOR 作動薬の継続使用には様々な副作用が伴います。副作用の一部に関与するシグナル伝達制御因子である  $\beta$  アレスチンの活性を減弱させた G タンパク質バイアス型<sup>(注5)</sup> MOR 作動薬は安全性の高い鎮痛薬になると提唱されています。しかし、開発された G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬にも未だ副作用が残存することが報告されており、その分子機構は不明でした。

東北大学大学院薬学研究科のカリニョ カーロ マリオン コドッグ大学院生、木瀬亮次特任助教、井上飛鳥教授らの研究グループは、MOR 作動薬による細胞内シグナル伝達の特性をシグナルアッセイと一分子観察により解析しました。その結果、G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬は、非典型的経路である  $G\beta_5$ -GRK3 経路により  $\beta$  アレスチン活性を誘導する現象を見出しました。

MOR 作動薬による  $\beta$  アレスチン経路活性化メカニズムの理解や副作用を低減させた鎮痛薬の開発に繋がることが期待される成果です。

本研究成果は、2024年11月21日（現地時間）に European Journal of Pharmacology 誌の電子版に掲載されました。

※カテゴリは広報室に一任してください。

研究

## 【詳細な説明】

### 研究の背景

モルヒネに代表されるオピオイド系鎮痛薬（以下、MOR 作動薬）はその強い鎮痛作用から、末期がんなどの激しい疼痛を伴う疾患の症状緩和に利用されています。しかしながら、MOR 作動薬は継続使用によって効果が低減すること（耐性形成）や、依存性などの精神症状、致死性の呼吸抑制など多様な副作用を引き起こします。これらの副作用のリスクから、本邦におけるオピオイド系鎮痛薬の適用は一部疾患のみに制限されています。このため、副作用を減弱した、より安全なオピオイド系鎮痛薬の創製は急務かつ重要な課題となっています。

オピオイド系鎮痛薬は、G タンパク質共役型受容体（GPCR）の 1 種である  $\mu$ （ミュー）オピオイド受容体（MOR）の作動薬としてはたります。作動薬の結合によって活性化した MOR は、細胞内に存在するシグナル伝達因子のヘテロ三量体 G タンパク質<sup>(注 6)</sup>、および  $\beta$  アレスチンと結合します。MOR 作動薬の主作用である鎮痛作用は、Gi ファミリーに属する三量体 G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットを介したシグナル経路により生じます。一方で、副作用のうち耐性形成は、MOR のリン酸化とそれに続く MOR への  $\beta$  アレスチンの結合を介して生じます。このため、三量体 G タンパク質経路活性を有しつつ、 $\beta$  アレスチン活性を低減した G タンパク質バイアス型作動薬が、耐性形成を抑え、副作用のリスクを低減したオピオイド鎮痛薬になりうる可能性が提唱されてきました。実際にこのコンセプトに基づいて、2020 年にアメリカ食品医薬品局（FDA）に承認されたオリセリジン（Olynvyk<sup>®</sup>、TRV130）<sup>(注 7)</sup> を始めとする G タンパク質バイアス型の MOR 作動薬が開発されてきました。しかし、G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬においても、耐性形成といった副作用の低減は実現していません。また、モルヒネなどの従来の MOR 作動薬と比較して活性は低いものの、オリセリジンにおいても  $\beta$  アレスチン活性が残存することが報告されています。このように、完全に副作用のないオピオイド作動薬の創製には至っていません。

### 今回の取り組み

東北大学大学院薬学研究科のカリニョ カーロ マリオン コドッグ大学院生と木瀬亮次特任助教、井上飛鳥教授らの研究グループは、オリセリジンにおいて残存する  $\beta$  アレスチン活性を誘導する分子機構の解析に取り組みました。研究グループは、MOR にリン酸基を付与する細胞内酵素である GPCR キナーゼ（GRK）に着目しました。MOR は作動薬に活性化された際に GRK によってリン酸化され、 $\beta$  アレスチンはリン酸化 MOR を認識して結合します。GRK サブタイプのうち、4 つのサブタイプ（GRK2、GRK3、GRK5、GRK6）は全身に広く発現し、これらの GRK サブタイプが MOR のリン酸化を担っていると考えられます。オ

オリセリジンなどの G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬において、どの GRK サブタイプが  $\beta$  アレスチン活性に寄与しているか調べることで、これらの作動薬で残存している  $\beta$  アレスチン活性誘導機構の解明につながると考えました。

まず、研究グループは研究用試薬である MOR 作動薬(DAMGO、メチオニン-エンケファリン) と、承認薬である 4 種類の MOR 作動薬 (モルヒネ、フェンタニル、ブプレノルフィン、オキシコドン)、2 種類の G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬 (オリセリジン、PZM21) の、合計 8 種類の MOR 作動薬について、 $\beta$  アレスチン活性における GRK サブタイプごとの寄与を調べました。NanoBiT スプリットルシフェラーゼ<sup>(注8)</sup> を利用したタンパク質間相互作用解析法により、作動薬刺激後の MOR と  $\beta$  アレスチンの相互作用を、生物発光を指標に評価しました。以前の研究 (参考文献 1) で樹立した GRK 欠損細胞 (GRK2、GRK3、GRK5、GRK6 を全て欠損) に対して、プラスミド DNA の遺伝子導入により各 GRK サブタイプを 1 種類のみ再発現させることで、各 GRK サブタイプの寄与を調べました。その結果、DAMGO などのバランス型 MOR 作動薬ではどの GRK サブタイプ発現時にも  $\beta$  アレスチン活性が生じている一方で、オリセリジンなどの G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬では、GRK3 を発現させた場合にのみ  $\beta$  アレスチン活性が生じていることが明らかになりました (図 1)。このことから、オリセリジンにおいて残存している  $\beta$  アレスチン活性は、GRK3 を介して生じていることが明らかになりました。

次に、 $\beta$  アレスチン活性に GRK3 のみが選択的に寄与する分子機構について解析しました。GRK3 と GRK2 は三量体 G タンパク質から解離する  $G\beta\gamma$  複合体と相互作用することで、細胞質から形質膜<sup>(注9)</sup> に移行し、GPCR をリン酸化します。この時 GRK3 と GRK2 は  $G\beta\gamma$  複合体と、 $G\beta$  を介して相互作用します。研究グループは、5 種類の  $G\beta$  サブタイプ ( $G\beta_1$ 、 $G\beta_2$ 、 $G\beta_3$ 、 $G\beta_4$ 、 $G\beta_5$ ) と GRK サブタイプ (GRK3、GRK3) との MOR 作動薬刺激時の相互作用を、NanoBiT スプリットルシフェラーゼ法により評価しました。その結果、 $G\beta_{1-4}$  の 4 種類のサブタイプは GRK2 と GRK3 の両方と相互作用する一方で、 $G\beta_5$  は GRK3 とのみ相互作用することが明らかになりました (図 2)。この結果から、オリセリジンが GRK3 のみを選択する分子機構の一端として、 $G\beta_5$  が GRK3 と選択的に結合することが考えられました。

最後に、 $G\beta$  サブタイプ選択的に GRK3 が膜移行するメカニズムを調べるために、 $G\beta_1$  または  $G\beta_5$  を過剰発現した細胞において GRK3 のふるまいの違いを一分子レベルで解析しました。異なる蛍光色素で標識した MOR、 $G\beta_1/G\beta_5$ 、GRK3 を発現した細胞の三色同時一分子イメージング<sup>(注11)</sup> を行い、MOR、 $G\beta$ 、GRK が共局在する頻度・時間 (共局在時間)・形質膜上の動きを作動薬刺激前後で比較解析しました (図 3)。その結果、 $G\beta_5$  は  $G\beta_1$  よりも短時間の相互作用を介して、GRK3 を形質膜へと移行させる様子が観察されました。形質膜上の分子の動きの比較から、 $G\beta_5$  は  $G\beta_1$  と比べて 100-250 nm の微小領域(ナノドメイ

ン)に閉じ込められているものが多いことが分かりました。また、 $G\beta_1$ によって膜移行した GRK3 はナノドメイン内にとどまりやすいのに対し、 $G\beta_5$ によって膜移行した GRK3 は、すみやかに  $G\beta_5$  から解離してナノドメインの外を速く拡散するものが増加することを見出しました。これにより、GRK3 と MOR の結合頻度が増加し、効率的に MOR がリン酸化されることで、最終的に MOR への  $\beta$  アレスチンの結合を誘導するという、一連の分子機構が存在することを示されました。これまで、生細胞において GRK が  $G\beta$  と結合する様子を一分子観察した例はありませんでした。本研究の 1 分子観察結果は、「形質膜上で  $G\beta$  と GRK が安定な複合体を形成して GPCR をリン酸化する」という、従来予想されていたモデルを覆すものでした。GPCR・G タンパク質・GRK は、形質膜上でより動的な結合・解離を介してシグナル伝達を司ることが明らかになりました。

### **今後の展開**

本研究により、G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬の副作用の一因である、MOR への  $\beta$  アレスチンの結合を誘導する GRK の活性制御機構が明らかになりました。また、この GRK3 の活性制御が、三量体 G タンパク質の中の特定の  $G\beta$  サブタイプによって担われていることが明らかになりました。今回の発見は、鎮痛効果や副作用を担う GPCR の下流分子の、サブタイプレベルでの活性、選択性を詳細に解析することで、下流分子のサブタイプレベルでの緻密な活性制御が可能な作動薬の開発につながると考えられます。そして、副作用の少ない、より安全な鎮痛薬の創製戦略への展開が期待されます。

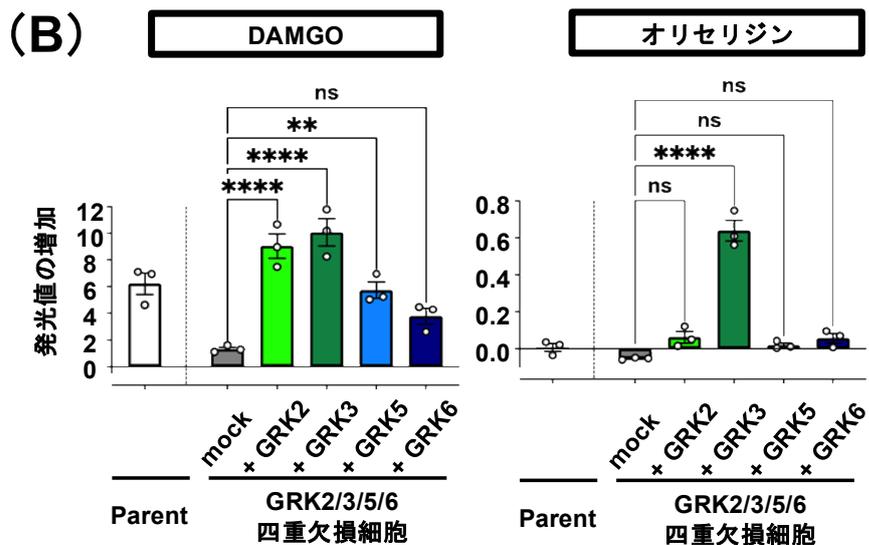
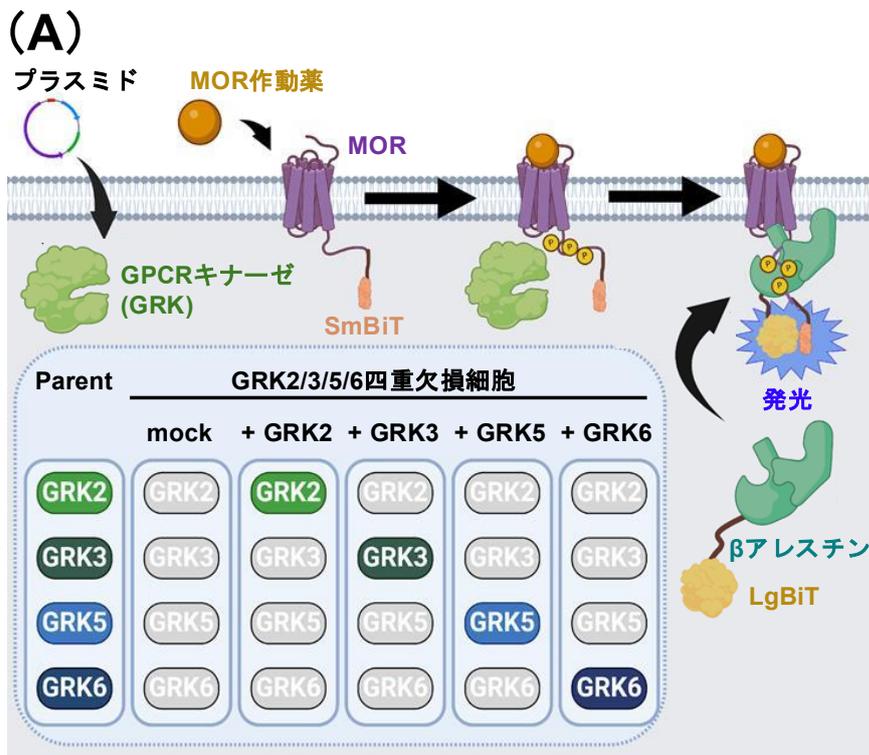


図 1. MOR 作動薬刺激による β アレスチンの膜移行に対する各 GRK サブタイプの寄与の評価

(A) 本実験系ではヒト培養細胞株の HEK293 細胞<sup>(注10)</sup> に発現する 4 種類の GRK サブタイプ (GRK2、GRK3、GRK5、GRK6) をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法により遺伝子欠失させた GRK 欠損細胞を利用した。この GRK 欠損細胞に対して、1 種類の GRK サブタイプを、タンパク質の発現量が同等となるように、遺伝子導入 (プラスミド DNA トランスフェクション) の量を調節し、個々の GRK サブタイプの β アレスチン誘導能を評価した。この際、MOR と β アレスチンに SmBiT 断片と LgBiT 断片 (NanoBiT スプリットルシフェラ

一ゼの 2 つの断片) をそれぞれ融合させた改変体を同時に発現させることで、作動薬刺激時の MOR へ  $\beta$  アレスチンが結合する過程を、発光を指標として検出した。

(B) バランス型作動薬である DAMGO と、G タンパク質バイアス型作動薬であるオリセリジンについて、親細胞である HEK293 細胞 (Parent) と、GRK 欠損細胞に各 GRK サブタイプを発現させた計 6 つの細胞条件において、 $\beta$  アレスチン活性を評価した。その結果、DAMGO 刺激時には、GRK2 や GRK3 を介して MOR に  $\beta$  アレスチンが結合する一方で、オリセリジン刺激時では、GRK3 発現時にのみ  $\beta$  アレスチンが結合することがわかった。

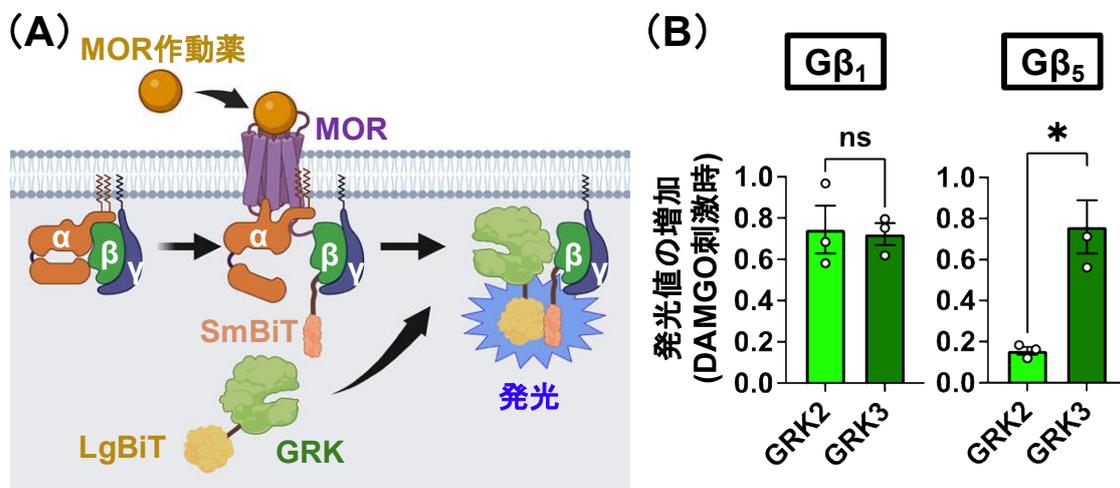


図 2. G $\beta$  サブタイプごとの GRK2 と GRK3 の選択性の評価

(A) 培養細胞に対して、各 G $\beta$  サブタイプと GRK に SmBiT 断片と LgBiT 断片をそれぞれ融合させた改変体を同時に発現させ、MOR 作動薬刺激時の G $\beta$  と GRK の相互作用を、発光を指標に評価した。

(B) バランス型作動薬である DAMGO 刺激時において、G $\beta_1$  は GRK2 と GRK3 の両者と同程度相互作用した。一方、G $\beta_5$  では、GRK3 との相互作用と比較して、GRK2 との相互作用が顕著に弱いことがわかった。他の G $\beta$  サブタイプの評価と合わせて、5 つの G $\beta$  サブタイプの中で、G $\beta_5$  のみが GRK3 を選択的に相互作用する特徴があることが明らかになった。

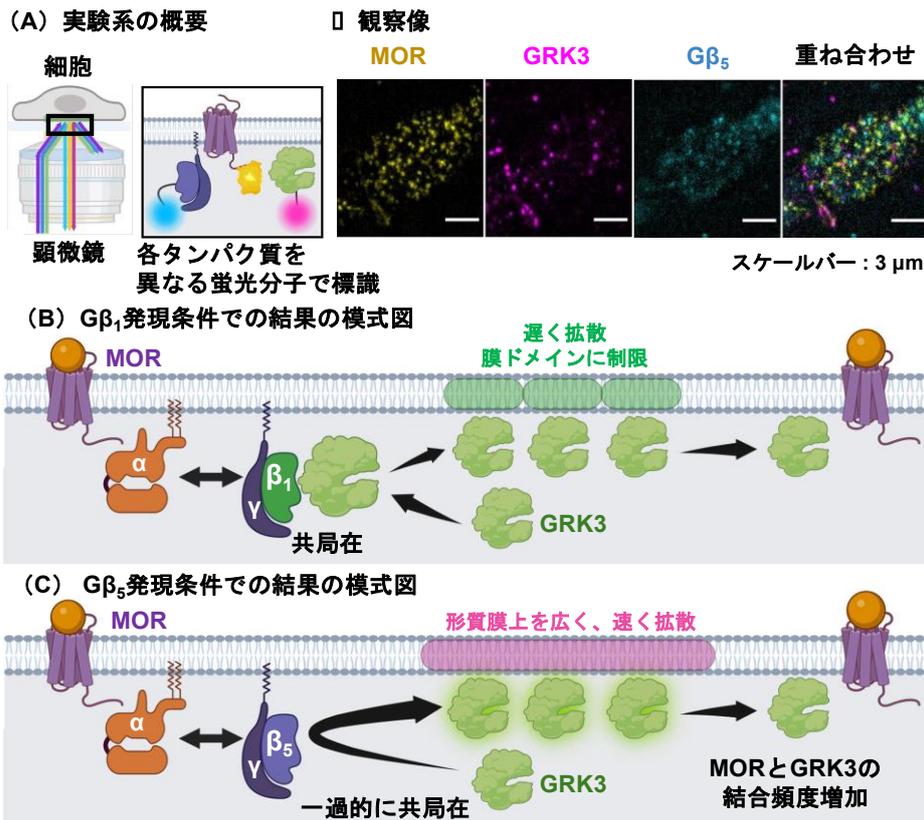


図 3. 三色同時一分子イメージングによる MOR、GRK3、Gβ の共局在解析

(A) 一つの細胞において、異なる 3 色の蛍光色素で標識した MOR タンパク質分子 (黄色) と GRK3 タンパク質分子 (マゼンタ)、Gβ<sub>5</sub> タンパク質分子 (青) を同時に撮影した蛍光顕微鏡画像。この例は作動薬刺激前の細胞を示す。生細胞を用いて、蛍光画像を連続撮影することで、輝点を追跡した軌跡から各分子の拡散動態を、輝点の明るさから同じ場所に集まっている分子数を推定できる。さらに、近接する蛍光色の異なる 2 輝点の挙動を追跡することで、2 分子間の結合頻度・共局在時間・共局在中の拡散動態を定量した。

(B) 一連の解析から推測された形質膜上における GRK3 の挙動変化のモデル図。Gβ<sub>1</sub> 発現条件では、Gβ<sub>1</sub> と GRK3 の共局在時間は増加していた。また、作動薬刺激後 GRK3 は形質膜上を遅く、制限された領域拡散する状態の割合が上昇した。MOR と GRK の相互作用頻度について、作動薬刺激前後で変化は見られなかった。

(C) Gβ<sub>5</sub> 発現条件において Gβ<sub>5</sub> と GRK3 の共局在時間は増加しなかった。また、GRK3 は形質膜上を速く拡散する状態の割合が上昇した。MOR と GRK の相互作用頻度は、作動薬刺激後に増加していた。このことから、Gβ<sub>5</sub> は GRK3 と一過的に相互作用することで、GRK3 の細胞質から形質膜への移行を効率的に行っていると考えられる。また、形質膜移行後の GRK3 が速く拡散する状態にあることで、MOR と相互作用頻度を増加させ、GRK3 による MOR のリン酸化が生じていることが示唆された。

## 【謝辞】

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業（JP21H04791）、科学技術振興機構創発的研究支援事業（JPMJFR215T）を始め多数の研究費支援を受けて実施されました。

本論文は『東北大学 2024 年度オープンアクセス推進のための APC 支援事業』により Open Access となっています。

本記事の図の作成には BioRender を使用しました。

## 【用語説明】

注1.  $\mu$ （ミュー）オピオイド受容体（MOR）

内因性オピオイドペプチドであるダイノルフィンやエンケファリンのほか、モルヒネなどのオピオイド系鎮痛薬により活性化される GPCR。オピオイドペプチドや作動薬が結合すると Gi タンパク質を介して神経活動を抑制することで鎮痛、鎮静作用を生じるほか、作動薬の副作用である鎮痛作用に対する耐性形成、便秘、オピオイド依存性、呼吸抑制を生じる。

注2.  $\beta$  アレスチン

リン酸化された GPCR に結合する細胞質タンパク質。三量体 G タンパク質と競合することで G タンパク質シグナルに拮抗する役割があるほか、GPCR の内在化やシグナル因子の足場としても機能する。

注3. GPCR キナーゼ（GRK）

作動薬により活性化した GPCR に結合して、そのセリン・スレオニン残基をリン酸化する酵素（キナーゼ）である。4 種類の GRK サブタイプ（GRK2、GRK3、GRK5、GRK6）が全身に広く発現しており、広範な GPCR のリン酸化を担う。

注4. G タンパク質共役型受容体（GPCR）

7 回細胞膜を貫通する構造を有する受容体分子。細胞外の物質を認識すると活性化型へ構造変化し、細胞内の情報伝達分子を介して、細胞外の情報を細胞内へ伝達する。

注5. G タンパク質バイアス型作動薬

G タンパク質活性を有しつつ、 $\beta$  アレスチン活性を低減した GPCR 作動薬。

注6. ヘテロ三量体 G タンパク質

$\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成される細胞内情報伝達因子。活性化した GPCR と結合すると  $\alpha$  サブユニットと  $\beta\gamma$  サブユニットに解離し、主に  $\alpha$  サブユニットが細胞内の情報伝達を誘導する。

注7. オリセリジン（Olynvyk®、TRV130）

G タンパク質バイアス型 MOR 作動薬。2020 年にアメリカ食品医薬品局（FDA）により承認された。モルヒネなど、従来のオピオイド系鎮痛薬と比較して有効血中濃度が低く、低容量で鎮痛作用を発揮するという利点がある。一方で、耐性形成や呼吸抑制など、オピオイド系鎮痛薬の典型的な副作用をヒトにおいて

も発現することが報告されている。

注 8. NanoBiT スプリットルシフェラーゼ

発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を分割して別々のタンパク質に融合することで、タンパク質間の相互作用を発光変化により測定する手法。本研究では深海エビ由来の NanoLuc ルシフェラーゼをもとに作られた NanoBiT システム（SmBiT=小断片と LgBiT=大断片から構成、Promega 社が開発）を用いた。

注 9. 形質膜

細胞膜のうち、細胞外と細胞内を仕切る脂質二重膜を指す。

注 10. HEK293 細胞

ヒト胎児腎細胞由来の細胞株。プラスミド DNA を用いた遺伝子導入が容易であることから GPCR 研究に汎用される。

注 11. 一分子イメージング解析

標的タンパク質を蛍光標識し、顕微技術により一分子の解像度で標的タンパク質の動態を可視化する技術。本研究においては、異なる波長の蛍光標識と全反射照明蛍光顕微鏡を用いることで、形質膜上の MOR と GRK、 $G\beta$  の 3 種類のタンパク質分子の動態を同時に計測した。

【参考文献】

1. Kawakami *et al.*, Nat Commun 13, 487 (2022)  
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2022/02/press20220210-03-signal.html>

**【論文情報】**

タイトル : Signal profiles and spatial regulation of  $\beta$ -arrestin recruitment through  $G\beta_5$  and GRK3 at the  $\mu$ -opioid receptor (日本語訳 :  $\mu$  オピオイド受容体における  $G\beta_5$  と GRK3 を介した  $\beta$  アレスチン膜移行のシグナル・空間制御の解明)

著者 : Carlo Marion C. Carino<sup>1#</sup>, Suzune Hiratsuka<sup>1#</sup>, Ryoji Kise<sup>1,\*</sup>, Gaku Nakamura<sup>1</sup>, Kouki Kawakami<sup>1</sup>, Masataka Yanagawa<sup>1,2</sup>, Asuka Inoue<sup>1,3,\*</sup>

1. 東北大学 大学院薬学研究科
2. 理化学研究所 開拓研究本部
3. 京都大学 大学院薬学研究科

#共同第一著者

\*責任著者 : 東北大学 大学院薬学研究科 特任助教 木瀬 亮次、同教授 (京都大学 大学院薬学研究科 教授 併任) 井上飛鳥

掲載誌 : European Journal of Pharmacology

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177151>

**【問い合わせ先】**

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥 (いのうえ あすか)

TEL: 022-795-6861

Email: iaska@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp