

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11101

研究課題名(和文)オピオイドシステムのメカニズムと癌発現に関する多角的遺伝子研究

研究課題名(英文)Genetic research on mechanisms of opioid system and carcinoma

研究代表者

猪股 伸一 (SHINICHI, INOMATA)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10282352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：麻薬性鎮痛薬は癌細胞の分化を促進させるという。内因性のオピオイド(以下OP)は免疫系も調節し、その受容体は癌細胞にも発現。乳癌ではエストロゲン受容体が内因性OPに制御され、OP受容体遺伝子変異は危険因子とされている一方、変異型アリル患者では乳癌罹患率低下または増加の両方の報告がある。一因として、海外の変異型頻度は少なく、homo変異型を独立群とした3群比較がなされていない。そこで、変異頻度の多い日本で3群比較し、OP変異が乳癌の危険因子となるかを調査。OPRM1 A118G変異は、乳癌の発現に影響しないことが示唆された。周辺遺伝子などの解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻薬性鎮痛薬は、術後痛や慢性痛、癌患者の治療に広く利用されている。しかし麻薬性鎮痛薬は癌細胞を分化、癌転移を促進するという報告がある。麻薬性鎮痛薬が作用する受容体には、体内にある麻薬様物質(OP)も作用し、その物質は免疫系も調節する。先ず女性の癌で最多の乳癌に注目し研究を進めた。上記に加えエストロゲン受容体は内因性OPに制御され、OP受容体遺伝子変異が危険因子と考えたのが理由である。本邦ではhomo変異型(GG)の頻度が多く、これを独立群とした3群比較が可能であり、信頼性の高い結果が得られた。また、海外の研究結果は日本人に当てはまらないことが懸念され、現在多くのSNPについて急ぎ解析している。

研究成果の概要(英文)：Opioid receptors are expressed in breast cancer cells. It has been reported that morphine promotes tumor progression and metastasis. The mu-opioid receptor1 (OPRM1) A118G SNP is frequently discussed in terms of opioid analgesia and affinity with endogenous opioid. There are several research reports on the association between the G allele in the OPRM1 A118G SNP of the opioid receptor and the incidence of breast cancer. To investigate the cause of discrepancy in research results, a three-group comparison with GG genotype as independent group has not yet been performed due to the low frequency of G allele in Caucasians. We performed a three-group comparison in Japanese women, who have a higher frequency of the mutant. No significant difference was detected in the distribution of the OPRM1 A118G SNP in Japanese breast cancer patients by the three group comparison of AA/AG/GG genotypes. Further studies should be performed to determine the association between the SNPs and cancer incidence.

研究分野：麻酔科学、ペインクリニック、遺伝子解析

キーワード：麻薬性鎮痛薬 痛み 癌 遺伝子 遺伝多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、欧米での麻薬性鎮痛薬による死亡事故が報告され、薬剤感受性の個体差が注目されている。応募者は遺伝子・遺伝多型と麻酔効果の二大表現型である鎮静・鎮痛に関する基礎及び臨床研究（代謝酵素の遺伝多型が麻酔薬の鎮静効果および pharmacokinetics に及ぼす影響や難治性疼痛に対するウイルスベクターを用いた研究など）を行ってきた。手術中は麻酔科医が投与量を患者状態に合わせて常時調節し、術後も副作用と効果を定期的に観察する目的で、疼痛管理担当医のサービスを開始したところ、鎮痛効果と呼吸抑制などの副作用の発生する投与量には、最大 10 倍もの個人差が存在することを見出した。患者の安全管理上も至適量の予測と投与プログラムの策定は急務である。呼吸抑制などの重大な副作用を回避しつつ十分な鎮痛計画を実現させるため、解決策の前段階として μ 受容体の遺伝多型を調査する研究を展開し、日本人 50 名を対象に末梢静脈血を試料として 6q24-q25, A118G 変異（代表的な μ 受容体の遺伝多型の一つ）を調査し、米国白人 50 名の結果と比較・検討した。その結果、米国白人における μ 受容体の遺伝多型 A118G 変異の頻度が 50 人中 14 名（28%）であったのに対し、日本人においては 50 名中 39 名（78%）に変異が観察され、米国白人と日本人では μ 受容体遺伝多型頻度の逆転現象（ $P < 0.001$ ）が確認できた（日本麻酔科学会最優秀賞）。 μ 受容体の A118G 変異頻度に関し、homo 変異型を独立群とした国内外からの詳細な報告は極めて少なく、正確な研究結果は得られていない。海外の研究結果は、日本人に当てはまらないことが強く予想され、とても懸念される。モノアミン系神経伝達物質の代謝酵素 catechol-O-methyl transferase (COMT)、G タンパク質共役型受容体の細胞内シグナル伝達に関与する内向き整流 K^+ チャンネル KCNJ6(GIRK2) などシグナル伝達系の遺伝多型の影響も未解明であり、これら以外の可能性も含めて詳細に検討する必要がある。本邦においては、オピオイド受容体シグナル伝達等周辺遺伝子の遺伝子変異率が高いという特性があり、この利点を最大限に利用して、欧米では不可能な詳細かつ未開拓の分野を含めて研究を展開し、個人差の正確なメカニズムを明らかにしたい。また、A118G の臨床的な意義として、アルコールや覚せい剤依存症と治療効果との関連が報告されている。遺伝子の繰り返し回数観点から Triple repeated 病が注目され、アルツハイマー病やアルコール・覚せい剤依存症もその一つと示唆されている。最新の研究では、SNCA/alpha-synuclein の promoter 領域における short tandem repeats : STR 解析がドーパミン・ニューロンのシナプス機能を解明するとされる。したがって、ドーパミン DRD2 解析や SNCA/alpha-synuclein の STR 解析がオピオイド受容体およびシグナル伝達系周辺遺伝子の機能と合わせてオピオイド作用の多様性（個人差）を解明できる可能性が強く示唆される。しかし、このような研究報告は未だないため解決すべき研究課題と考える。一方、The GLOBOCAN 2012 International Agency for Research on Cancer database によると乳癌が女性の癌では 25% と第一位を占める。腫瘍の進展には、遺伝子要因の関与が報告され、80 の遺伝子と 145 の変異型について報告がなされている。SNPs と乳癌の関連を研究した報告によると 35 の遺伝子と 46 の変異型の関与が示唆されている。オピオイド関連事項については、内因性オピオイド・システムが神経・内分泌系や免疫系を調節し、ホメオスタシスの維持に関与している。注目すべきことに μ オピオイド受容体が乳癌細胞に発現している。

またエストロゲン受容体は、内因性のオピオイドペプチドに制御されるためオピオイド受容体の遺伝子変異の有無も乳癌の危険因子と考える。最も多い ductal carcinoma には、-endorphin と Met-enkephalin などの内因性オピオイドペプチドが発現しており、臨床研究で A118G 変異型 G アリル保有患者では乳癌の罹患率低下や食道癌の進展抑制も報告されている。 μ 受容体遺伝子(OPRM1)についての報告は 1 編のみ、かつ SNPs に関しても A118G のみの調査であり、詳細に検討した研究は皆無である。以上のように、内因性オピオイドペプチドを含むオピオイド関連システムを多角的に検討し、外因系のオピオイドの効果における多様性の機序を解明するとともに内因性オピオイド・システムが関連する乳癌発現の一機序もこれまで習得した PCR や STR 等の多角的な解析技術を駆使して明らかにすることが必要である。

2. 研究の目的

麻薬性鎮痛薬は周術期や緩和医療で重要な役割を担っているが、治療必要量と副作用発現量に大きな個人差があり、これまでも研究を進めてきた。モルヒネは癌細胞分化を促進するが癌細胞死も促進するという反する研究報告がある。研究結果が一致しない原因として、オピオイド受容体からのシグナル伝達等に関わる周辺遺伝子の遺伝子変異が考えられる。変異型の少ない欧米の臨床研究結果は一致していない。女性の死因第一位の乳癌では、エストロゲン受容体が

内因性のオピオイドペプチドに制御されるためオピオイド受容体の遺伝子変異も危険因子と考える。本研究では、オピオイド受容体シグナル伝達等周辺遺伝子の遺伝子変異率の高い本邦の特性を生かし、1)必要量と副作用発現量との関連の詳細を解明、2)安全な投与プログラムを策定、3)乳癌の発現リスク因子を解明、などを目指す。

3. 研究の方法

- (1) 解決策の第一段階として、日本人 1000 名を対象に 6 番染色体上の exon および intron にある μ 受容体の各種遺伝多型を調査。また手術麻酔時におけるオピオイドの正確な必要量と副作用発現量を解析。
- (2) 解決策の第二段階；縦方向の研究として、G タンパク質共役型受容体の細胞内シグナル伝達に關与する内向き整流 K^+ チャンネル KCNJ6(GIRK2)などシグナル伝達系の遺伝多型の影響を解析。
- (3) 解決策の第三段階；横方向の研究として、モノアミン系神経伝達物質の代謝酵素 catechol-O-methyl transferase (COMT) などの遺伝多型の影響を解析。
- (4) 解決策の第四段階；横方向の研究として、依存形成遺伝子群の関連性を解析する。依存に關与する Taq1A サイト (rs1800497) は DRD2 領域と新説では ANKK1 (Ankyrin repeat and kinase domain containing 1;rs4938012) 上の exon 8 にあるとされるため両方を解析。PCR 後にハプロタイプ分類による解析を加える。
- (5) 解決策の第五段階；革新的研究として、SNCA/alpha-synuclein の promoter 領域における short tandem repeats : STR の解析を麻酔科領域ではじめて行う。繰り返し数による解析を加える。
- (6) 解決策の第六段階；増加している乳癌への取り組みとして、同意を得た手術患者 (乳癌) で上記と同様の研究を行い、乳癌のリスク因子を詳細に解析。
- (7) 解決策の第七段階；実臨床への還元として、乳癌のリスク分析キットとテーラーメイドのオピオイド投与プログラムを開発する。

4. 研究成果

解決策の第一段階：Applied Biosystems 7500 Fast Rea-time PCR system を使用し PCR および検出。96 で 10sec、60 で 1min、45cycle など条件には適宜変更を加え最適化。例として A118G (rs1799971) SNP 検出には Applied Biosystems TaqMan R SNP Genotyping Assays や Applied Biosystems TaqMan R Genotyping Master Mix を使用。

Forward Primer ; 5' -CGGTTCTGGGTCAACTTGTC-3'

Reverse Primer ; 5' -GTTCGGACCGCATGGGT-3'

Reporter-1 ; VIC-CTTAGATGGCAACCTGT-MGB-NFQ

Reporter-2 ; FAM-CTTAGATGGCGACCTGT-MGB-NFQ などを使用

解決策の第二段階；Applied Biosystems 7500Fast Rea-time PCR system を使用し PCR、また RFLP (制限酵素法) も応用し rs2070995 SNP 等を検出。

Forward Primer 5' -GGCTACCGGGTCATCACAGATA-3'

Reverse Primer 5' -ACAATGGACCCCAACACAGATT-3'

などを使用し、97 30sec、56 30sec、70 30sec を 40 cycles など条件には適宜変更を加え最適化。

解決策の第三段階：rs 4680 などの SNP を検出する。Applied Biosystems TaqMan R SNP Genotyping Assays や TaqMan R Genotyping Master Mix を使用し、Applied Biosystems 7500Fast Rea-time PCR system を用いて PCR および検出。

解決策の第四段階；chromosome 11 の上流から I ~ III の領域に分類、プライマーを作成
領域 Forward cy5' -TGT GTG CTT GCA CCT TGC AG-3'

	Reverse	cy5 ' -CAG ATA GCA TCC AAG CCA GAT-3 '
領域	Forward	cy5 ' -TCC TGC ACA GCA TTA AGC CGC-3 '
	Reverse	cy5 ' -ACC TGG AGG CAA CCC TCA AGT-3 '
領域	Forward	cy5 ' -AGT AAG GGC TCT GGC CAA TCC-3 '
	Reverse	cy5 ' -GCA TCC TGA TAC CCA GCC TTA-3 '

QIAGEN 社 HotStar R Taq DNA Polymerase 等を使用し、SSCP 法を用いて PCR。SSCP 法では、直接 SNP 部位の塩基を確認できないため Sequence により SNP 部位の塩基を確認。Promega 社 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System にて PCR 産物を精製、DNA 濃度を測定し、Applied Biosystems BigDye R Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit を用い Sequence。Sequence 解析には Applied Biosystems 3130 Sequencer を使用。

解決策の第五段階：SNCA/alpha-synuclein の promoter Nacp-Rep1 領域を STR 解析する。Primer は、Forward Primer 5 ' -CCT GGC ATA TTT GAT TGC AA -3

Reverse Primer 5 ' FAM-GAC TGG CCC AAG ATT AAC CA -3 '

等を使用し、効率向上のために Gene scan 解析法を採用。Applied Biosystems 3130 Sequencer で Macrosatellite 解析。

解決策の第六段階；乳癌患者に上記と同様の解析を行い、乳癌のリスク因子について、患者背景因子を含めて遺伝学的に多角的な分析を加え、発現因子を特定。検査方法を可能な限り単純化し、実用化に耐えうる方法を確立することも目標に研究を進めた。

日本人 1000 名の解析において、A118G(rs1799971)のアリル比 A:G は一般男性で 0.54 : 0.46、一般女性で 0.52 : 0.48、乳癌女性で 0.59 : 0.41 であった。AA,AG,GG の比率にも差は見られず、欧米で報告のあったリスク因子 A118G 多型は、日本人にとってリスク因子にはならないことが判明した。この差異は、AA,AG,GG の 3 群を独立させた本研究において、初めて正確な結果が得られたことに起因すると結論できる。乳癌のリスク因子について、新たな因子を見出せるよう検討を加えている。

一方、GG 群では麻薬性鎮痛薬の必要量が数倍であり、逆に AA 群では数分の一を示した。AG 群では個体差が大きかった。A118G 多型は麻薬性鎮痛薬必要量・副作用発現量に大きく影響を及ぼす結果となった。これまで、第一段階から第六段階までの解析が終了し、統計解析中であり、個体差の大きい AG 群において、周辺遺伝子のいずれの多型を組み合わせるとサブグループに分類可能であって、薬物の感受性をさらに細かく予測できるのか、現在推計学的手法を工夫しつつ解明を急いでいる。

この解析が完了する際には、個々人の遺伝子多型に合わせて、適切な薬物投与量が投与前に決定できるテーラーメイド医療が完成する。欧米で急増している副作用の呼吸停止で死亡する事故や、世界中で使用されている強力な麻薬性鎮痛薬による周術期の呼吸循環抑制などを未然に回避可能となり、医療の安全性に大きく貢献できる。

今後さらに PCR 等の解析技術を向上させ、エピジェネティクスの領域に研究を進化させ、更なる医学の問題点解決につながる研究、臨床の現場と患者の完全に寄与できる研究を進めていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Inomata S, Ishigaki M.
2. 発表標題 Effect of opioid receptor polymorphism on the risk factor for breast cancer in Japanese
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2018, The European Anaesthesiology Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪股伸一 石垣麻衣子 村田雄哉 中村貴子 田中誠
2. 発表標題 オピオイド受容体遺伝子変異は日本人における乳癌の危険因子となるか
3. 学会等名 日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----