

主 題 3

オピオイド研究の進歩と展望

3-1

クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いたオピオイド「依存」現象形成に対する分子薬理的検討

○中川貴之、南 雅文、渡辺 豪、小澤 徹、佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

緒言

オピオイドによる依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関しては、これまでも多くの研究がなされており、青斑核などの特定の脳部位におけるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の代償的な過感受性が関与している可能性が示唆されてはきたが、その形成メカニズムについては未だ不明のままである。本研究では、このオピオイド「依存」現象形成のメカニズムを分子レベルで解明するために、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞を用いて、主に、細胞内情報伝達系のどのプロセスでの変化が重要であるのかを、forskolinにより誘発されるcAMP蓄積の変化を指標として検討した。

実験方法

オピオイド受容体 μ 、 δ あるいは κ 各サブタイプを発現させたCHO細胞を用いた。細胞を24穴マルチウェルプレートに 10^5 個/wellで播種し、それぞれ、モルヒネ (Mor)、DPDPEあるいはU69,593で前処置した。薬物を含む培地を吸引除去した後、直ちに洗浄操作を行い、naloxone (Nlx)、naltrindole (NTI) あるいはnorbinaltorphimine (norBNI) をそれぞれ、 $10\ \mu\text{M}$ forskolinおよび $1\ \text{mM}$ IBMXと同時に処置し、細胞内cAMP蓄積に対する効果を指標として、AC系の過感受性形成能を評価した。また、GTPase活性は各CHO細胞から調製した膜標品を用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ から遊離する ^{32}Pi を定量することにより評価した。また、各種キメラG蛋白 α サブユニットG α i2/G α qを作製し、そのフラグメントを発現ベクターpTracer-CMVに組み込み、lipofectin法によりすでにオピオイド受容体を安定的に発現しているCHO細胞にトランスフェクトした。Zeocine ($200\ \mu\text{g/ml}$) 存在下で細胞を選別した後、G α i2あるいはG α q/11に対する抗体を用いたWestern blotにより、オピオイド受容体と各種変異型G蛋白 α サブユニットを同時に安定的に発現するCHO細胞株をスクリーニングし、実験に用いた。

実験結果

μ 、 δ および κ オピオイド受容体いずれの受容体を発現させた細胞 (CHO/MOPR、CHO/DOPR、CHO/KOPR) においても、アゴニスト持続的処置を施していない細胞 (naive 細胞) では、アゴニストの急性処置により、forskolin 誘発 cAMP 蓄積は抑制されたが、アンタゴニスト単独急性処置によっては変化しなかった。一方、アゴニストを持続的に処置した細胞 (dependent 細胞) では、アンタゴニストの処置により、forskolin 誘発 cAMP 蓄積は、naive 細胞においてアンタゴニストを処置した場合と比較して、約2倍にまで促進された (Fig.1)。このアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性は、オピオイド受容体サブタイプにかかわらず、比較的短時間 (数分~数時間) のうちに (Fig.2)、持続的処置するアゴニストの濃度に依存して形成された。また、この AC 系の過感受性の形成は百日咳毒素を前処置することにより、完全に阻害された (Fig.1)。

アゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成に新たな蛋白質の合成が関与しているか否かを検討するために、アゴニスト持続的処置の1時間前から蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を前処置したが、過感受性の形成に影響は見られなかった (Fig.3)。すなわち、その形成に新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで、細胞内情報伝達系のどのプロセスでの変化が AC 系の過感受性の形成に重要であるのかを検討した。まず、過感受性形成に対するリン酸化の関与を検討するため、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H7 100 μ M、H8 100 μ M、H89 10 μ M、staurosporine 0.1 μ M) を前処置したが、過感受性の形成に影響は見

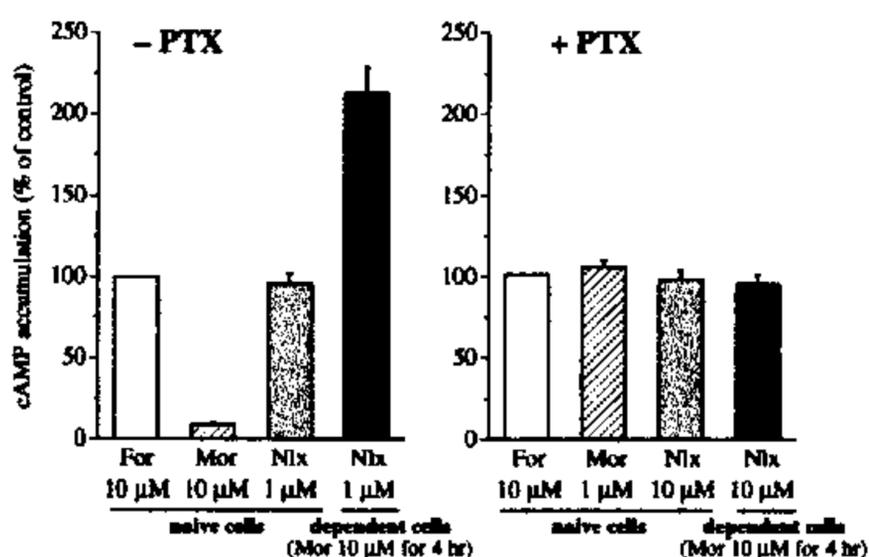


Fig.1 CHO/MOPRにおけるモルヒネ持続的処置 (10 μ M、4時間) による AC 系の過感受性形成と百日咳毒素前処置 (PTX; 20 ng/ml、12時間) による影響 ($n=3-5$)

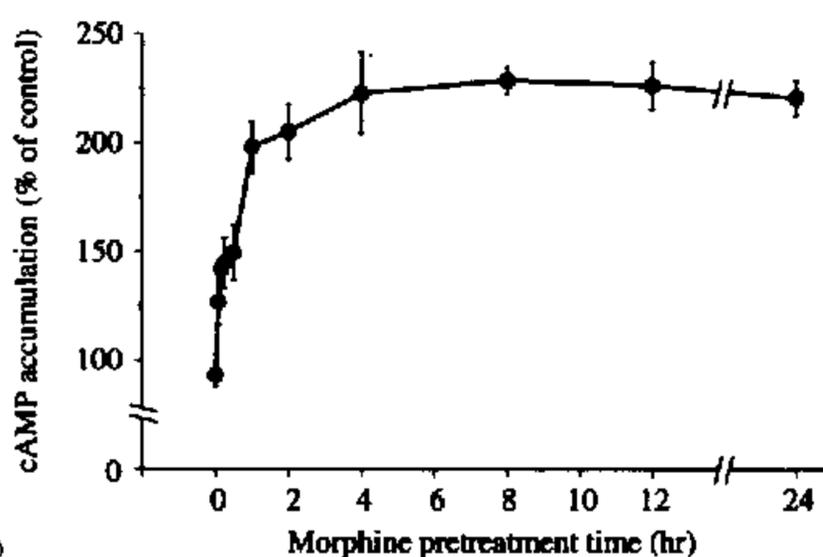


Fig.2 CHO/MOPRにおけるモルヒネ (10 μ M) 持続的処置による AC 系の過感受性形成の時間経過 ($n=3$)

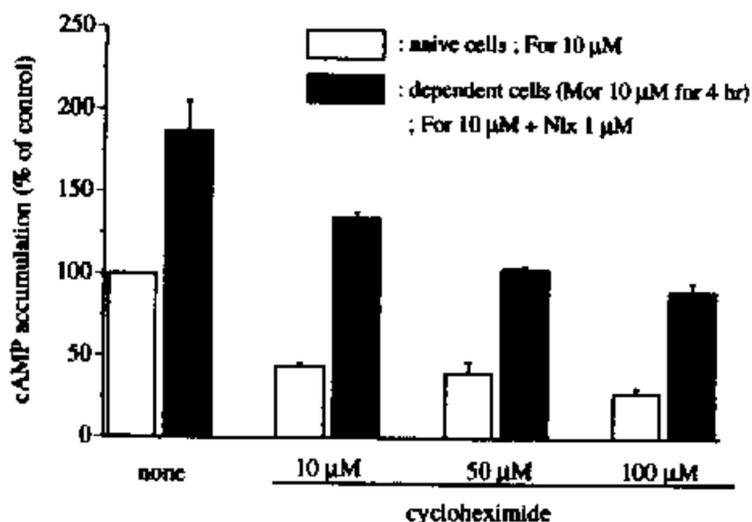


Fig.3 CHO/MOPRにおけるモルヒネ持続的処置によるAC系の過感受性形成に対する蛋白質合成阻害薬cycloheximideの効果。cycloheximide (10、50、100 μM) は前処置1時間、アゴニストとともに4時間、計5時間処置した。(n=3)

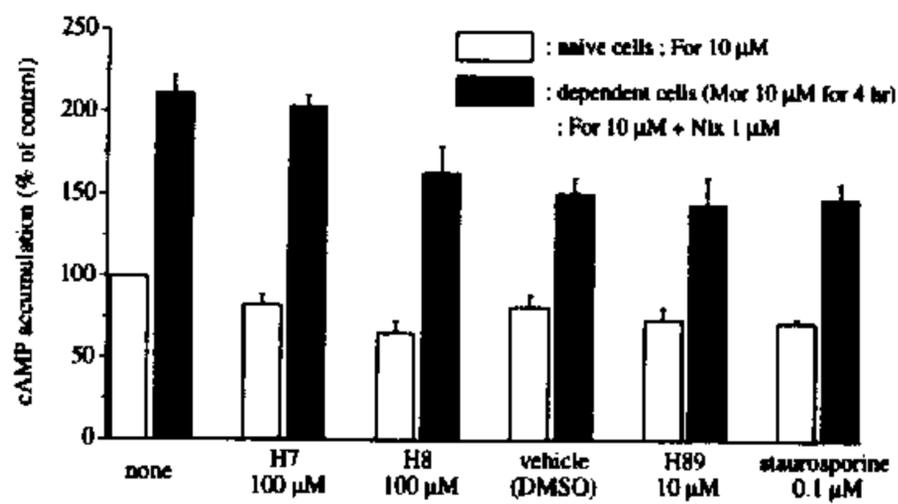


Fig.4 CHO/MOPRにおけるモルヒネ持続的処置によるAC系の過感受性形成に対する各種プロテインキナーゼ阻害薬の効果。H7、H8、H89およびstaurosporineは前処置1時間、アゴニストとともに4時間、計5時間処置した。(n=4)

られなかった (Fig.4)。

次に、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した。naive細胞から調製した膜標品において、アゴニストを急性処置することにより、forskolin誘発cAMP蓄積は抑制され、同時にGTPase活性は上昇したが、アンタゴニスト単独の処置はcAMP蓄積およびGTPase活性に変化を与えなかった。一方、dependent細胞から調製した膜標品において、アンタゴニストの処置によって、forskolin誘発cAMP蓄積は促進されたが、GTPase活性に変化は見られなかった (Fig.5)。

次に、G蛋白質-AC連関が過感受性の形成に必要なかどうかを検討するため、オピオイド受容体と連関し、ACを抑制するG蛋白質αサブユニット

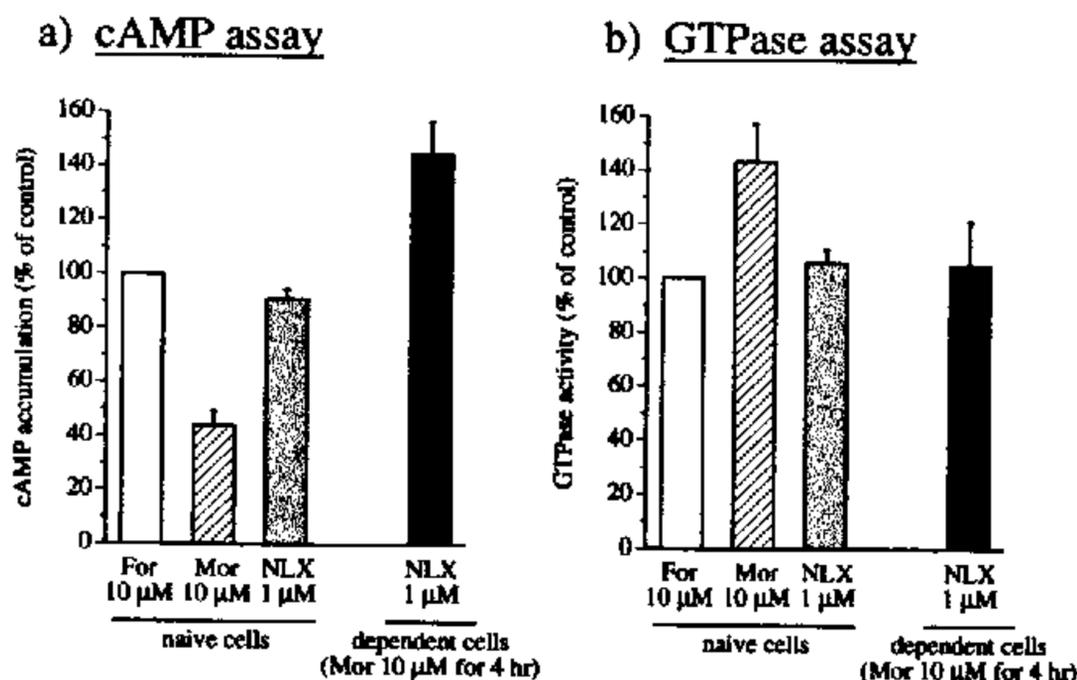
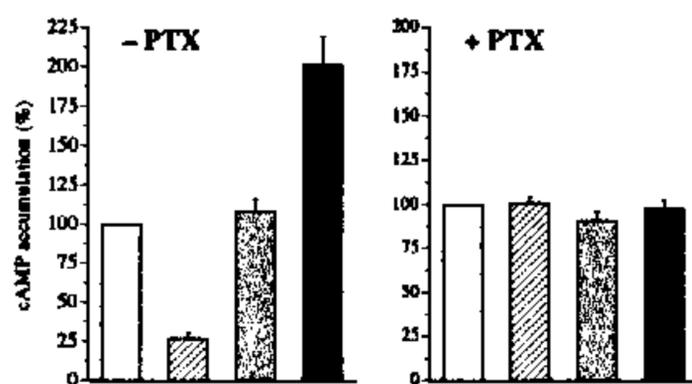


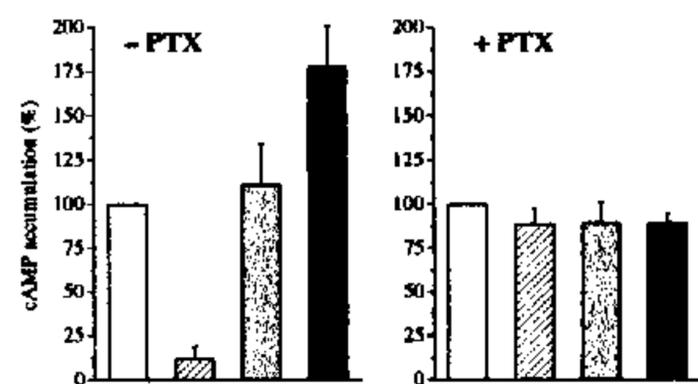
Fig.5 AC系の過感受性形成時におけるGTPase活性の変化。無処置およびモルヒネ(10 μM)を4時間前処置したCHO/MOPRから調製した膜標品において、cAMP assay (a) およびGTPase assay (b)を行った。(n=5)

Gαi2 と、オピオイド受容体とは関連せず、また AC には影響を及ぼさない Gαq とのキメラ α サブユニットを作製し、オピオイド受容体と共発現させた細胞における AC 系の過感受性の形成能を検討した。野生型 Gαi2、Gαi2 の 352 番目のアミノ酸であるシステインをグリシンに置換した百日咳毒素非感受性の変異型 Gαi2 (Gαi2 C352G) あるいは種々の百日咳毒素非感受性キメラ α サブユニット (GQI Nsi I、GQI (Sca I)、GIQI) を KOPR/CHO にトランスフェクションし、各種 G 蛋白質 α サブユニットと KOPR を同時に安定的に発現している CHO 細胞株 (KOPR+wild Gαi2/CHO、KOPR+Gαi2 C352G/CHO、KOPR+GQI Nsi I/CHO、

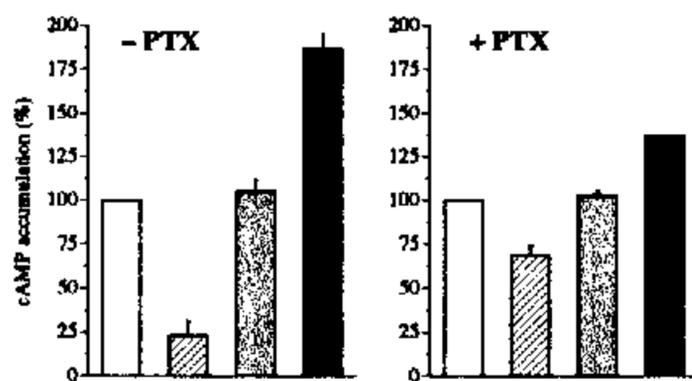
a) KOPR/CHO



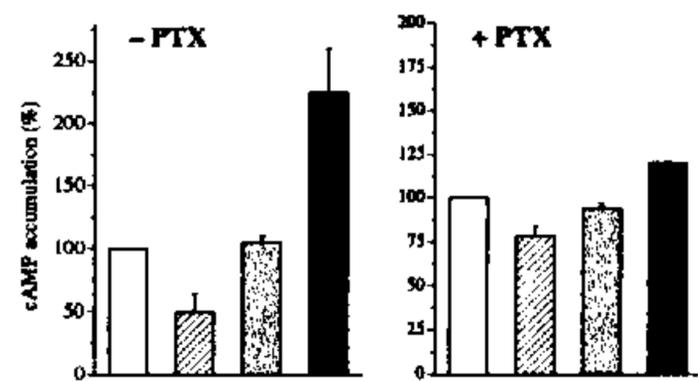
b) KOPR+wild Gαi2/CHO



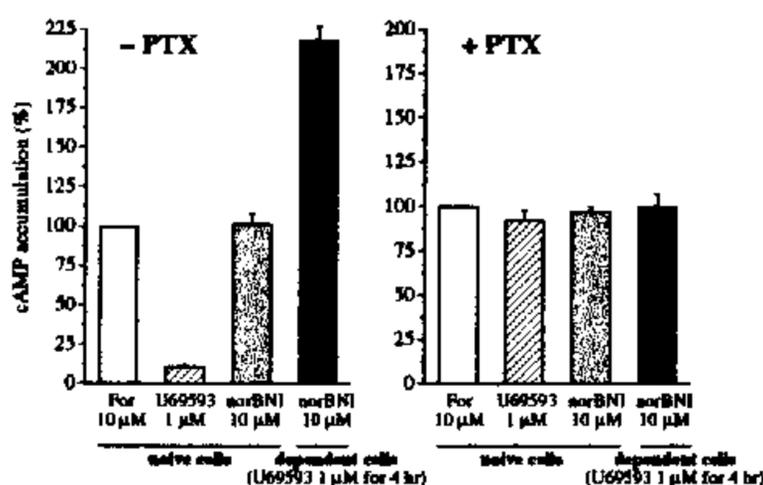
c) KOPR+Gαi2 C352G



d) KOPR+GQI Nsi I/CHO



e) KOPR+GQI (Sca I)/CHO



f) KOPR+GIQI/CHO

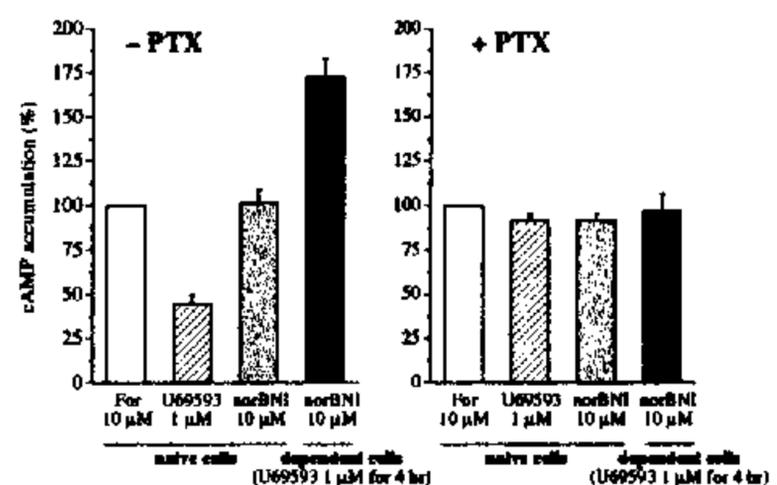


Fig.6 KOPR と各種変異型 G 蛋白質 α サブユニットを共発現させた CHO 細胞における、アゴニスト持続的処置による AC 系への影響 (n=3-5)

KOPR+GQI (Sca I)/CHO、KOPR+GIQI/CHO) を樹立し、さらに、GTPase 活性を指標として、それらが κ オピオイド受容体と機能的に連関していることを確認した。KOPR+wild G α i2/CHOにおいて、百日咳毒素の前処置により、U69,593 急性処置によるACの抑制効果およびU69,593 持続的処置によるAC系の過感受性形成は完全に消失した。しかし、百日咳毒素非感受性のG α i2を発現させたKOPR+G α i2 C352G/CHO、または、受容体および効果器との相互連関領域がG α i2由来のキメラG蛋白質を発現させたKOPR+GQI Nsi I/CHOでは、百日咳毒素を前処置してもU69,593の急性処置によりACは抑制され、また、U69,593 持続的処置によりAC系の過感受性が形成された。一方、受容体相互連関領域がG α i2由来であるが、効果器との相互連関領域がG α q由来のキメラG蛋白質を発現させたKOPR+GQI (Sca I)/CHO および KOPR+GIQI/CHO では百日咳毒素前処置下ではU69,593 急性処置によるACの抑制効果が見られなくなり、また、U69,593 を持続的処置してもAC系の過感受性は形成されなかった (Fig. 6)。

考察

本研究では、クローン化したオピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞を、依存形成機構解明の *in vitro* でのモデル系として、アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性の形成を指標として、細胞レベルでの依存形成機構を検討した。AC系の過感受性の形成は、オピオイド受容体サブタイプにかかわらず、比較的短時間 (数分～数時間) のうちに形成されること、この形成にはアゴニスト持続的処置時の百日咳毒素感受性G蛋白質の活性化が必要であることが示された。また、蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を用いた検討から、AC系の過感受性の形成には新たな蛋白質の合成は関与しないこと、また、各種プロテインキナーゼ阻害薬はその形成に影響を与えなかったことから、少なくともPKAあるいはPKCによるリン酸化は関与しないと考えられる。また、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した結果、過感受性形成時にGTPase活性の変化は見られず、このACの過活性化がG蛋白質の活性化を伴っていないことが示された。さらに、オピオイド受容体と各種キメラG α i2/G α q を共発現させたCHO細胞を用いた検討より、過感受性の形成にはG α i2のACとの相互連関に関与する領域 (Met²⁴⁴-Asn³³¹) が必須であることが明らかにされた。本研究結果は、オピオイド受容体におけるアゴニスト持続的刺激によるAC系の過感受性形成には、受容体あるいはGタンパク質そのものが持続的に活性化されることよりも、むしろGi蛋白質 α サブユニットのAC相互連関領域がACを持続的に抑制することが重要であることを示唆している。

3-2

Human nociceptin/orphanin FQ 受容体におけるオピオイドリガンドのアゴニストおよびアンタゴニスト活性

○関 貴弘、南 雅文、木村千晶、佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

緒言

Nociceptin/orphanin FQ 受容体は、オピオイド受容体と高い相同性を有するにもかかわらず、ほとんどのオピオイドリガンドと結合しない orphan 受容体として1994年にクローニングされ、その後、1995年に17アミノ酸残基からなる内在性のペプチドリガンドである nociceptin (orphanin FQ) が単離、構造決定された。Nociceptin の痛覚情報伝達に対する作用は、痛覚過敏惹起と鎮痛の両方の作用が報告されており、現在まだ明らかではなく、nociceptin 受容体 (NociR) が関連する生体機能調節機構の解明には、NociR に選択性の高い非ペプチド性リガンド、特にアンタゴニストの創製が重要である。

本研究では、NociRの非ペプチド性リガンド創製に役立つような知見を得るため、従来より用いられてきた代表的なオピオイドアゴニストおよびアンタゴニストであるモルヒネ (Mor) とナロキソン (Nlx) に加え、比較的新しく創製されたオピオイドリガンドである norbinaltorphimine (norBNI)、TAN-67、TRK-820、および naloxone benzoylhydrazone (NalBzoH) の human NociR に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性をクローン化human NociR発現細胞株を用いて検討した。

実験方法

Human NociR cDNA をリポフェクチン法により CHO細胞にトランスフェクトし、forskolin により誘発される cyclic AMP (cAMP) 蓄積に対する抑制効果を指標としてスクリーニングし、NociR を安定的に発現する

CHO 細胞株 (CHO/NociR) を得た。

各リガンドのアゴニスト活性はCHO/NociRにおけるforskolin 10 μ Mによる細胞内cAMP蓄積に対する抑制作用を指標として評価した。アンタゴニスト活性は種々の濃度のリガンドと 10nM nociceptin を同時処置することにより、nociceptin の細胞内cAMP蓄積抑制作用に対する拮抗作用を指標として検討した。

実験結果

CHO/NociR において、forskolin により誘発される cAMP 蓄積は nociceptin により濃度依存的に抑制され、その IC₅₀ 値は 0.18 \pm 0.04 nM であった (図 1)。

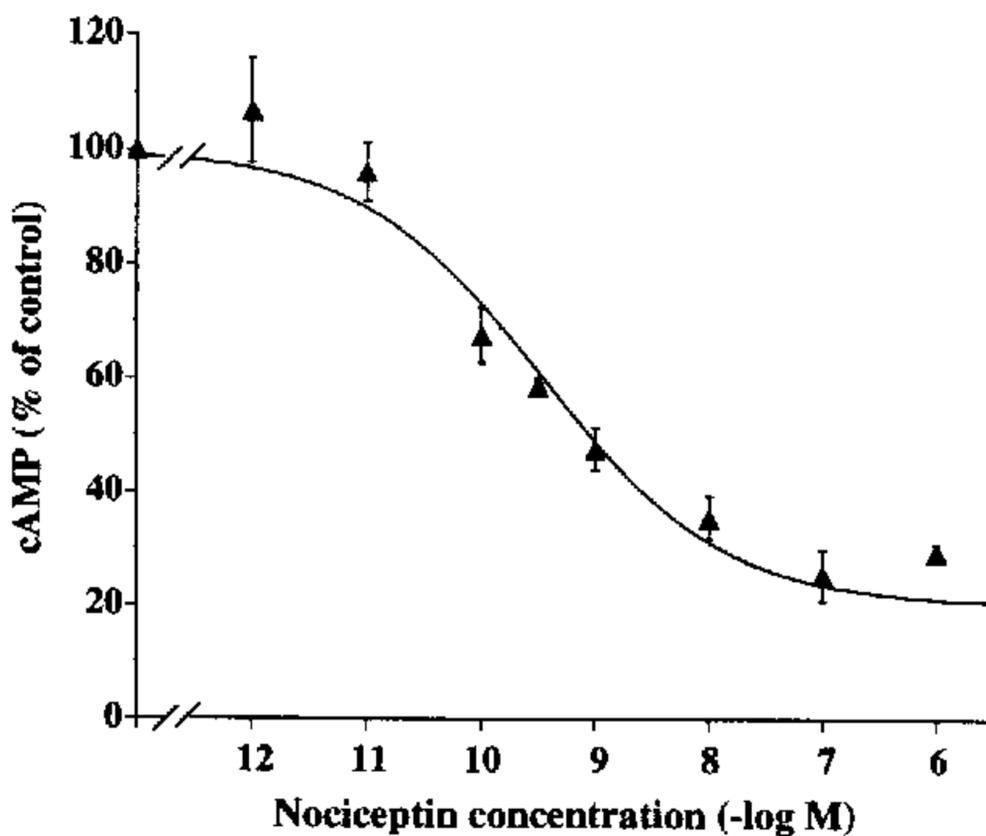


図 1 CHO/NociR における forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する nociceptin の抑制効果

アゴニスト活性の検討では、Mor、Nlx、norBNI、(+)-TAN-67、(-)-TAN-67、TRK-820 および NalBzoH は、いずれも単独では cAMP 蓄積に有意な影響を与えなかった (図 2)。

続いて、各リガンドと 10 nM の nociceptin を同時処置してアンタゴニスト活性を検討した。forskolin により誘発される cAMP 蓄積に対して、nociceptin による抑制分を a とし、さらに各オピオイドリガンドの添加による nociceptin の抑制効果に対する変化分を b とし、各オピオイドリガンドによる拮抗率を $(b/a) \times 100$ (%) により算出したところ、TRK-820 では 10⁻⁵M において 27%、10⁻⁴M において 54%、NalBzoH では 10⁻⁵M において 60%、10⁻⁴M において 82% の拮抗率であり、TRK-820 および

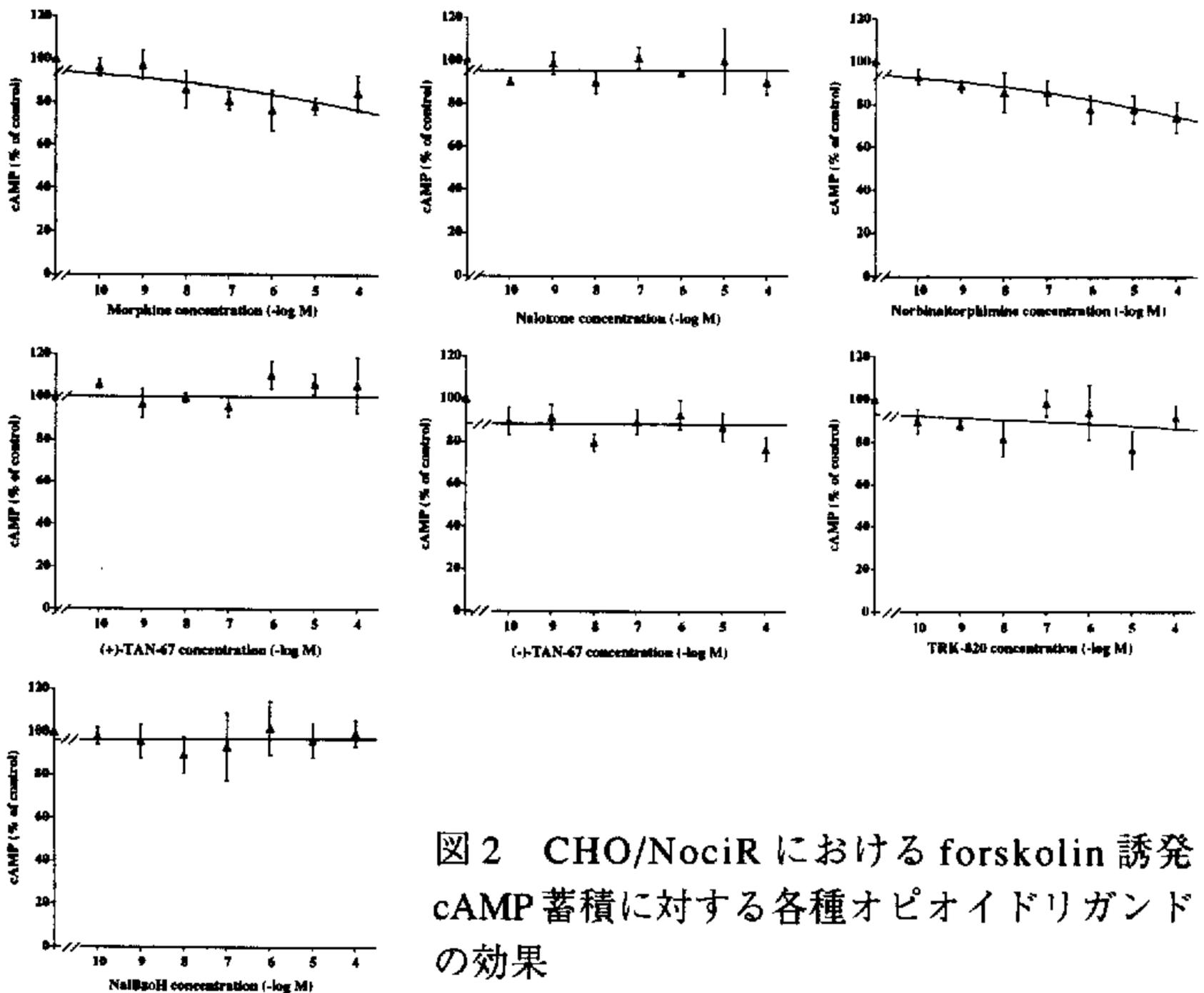


図2 CHO/NociRにおける forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する各種オピオイドリガンドの効果

NalBzoHは 10^{-5} M 以上および 10^{-4} M の濃度で nociceptin の forskolin 誘発 cAMP蓄積抑制効果に対して有意なアンタゴニスト活性を示した(図3)。

考察

本研究において、human NociR を安定的に発現する細胞株、CHO/NociR を得た。本細胞株では、nociceptin が濃度依存的に forskolin 誘発 cAMP蓄積を抑制することが明らかとなり、NociR のリガンド創製のためのスクリーニング系として有用であると考えられる。本研究では、この細胞株を用いて、代表的なオピオイドリガンドである Mor と Nlx に加え、比較的新しく創製されたオピオイドリガンドである norBNI、(+)-TAN-67、(-)-TAN-67、TRK-820 および NalBzoH の human NociR におけるアゴニストおよびアンタゴニスト活性を検討した。これらのオピオイドリガンドはいずれも NociR に対してアゴニスト活性を示さなかったが、nociceptin の cAMP蓄積抑制作用に対するアンタゴニスト性を検討した

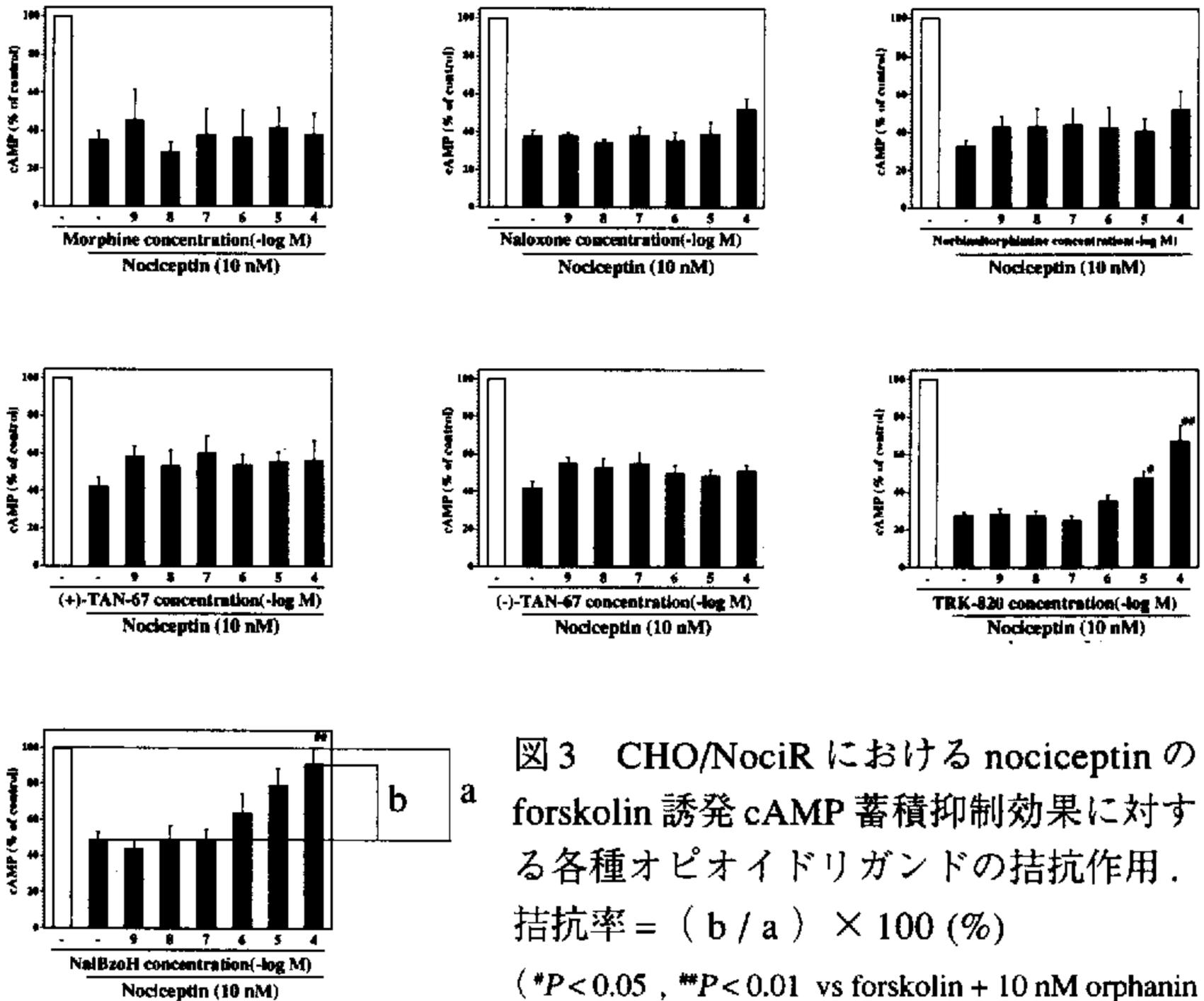


図3 CHO/NociRにおける nociceptin の forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果に対する各種オピオイドリガンドの拮抗作用。
拮抗率 = (b / a) × 100 (%)

(*P<0.05, **P<0.01 vs forskolin + 10 nM orphanin FQ)

(Dunnett multiple comparisons test)

ところ、TRK-820 および NalBzoH が $10^{-4}M$ の濃度で、nociceptin の作用を各々 54% および 83% 拮抗した。この TRK-820 および NalBzoH の拮抗作用には $10^{-4}M$ という非常に高い濃度が必要である上に、これらのリガンドは、オピオイド受容体には 1000 倍以上低い濃度でアゴニストあるいはアンタゴニスト活性を発揮するため、これらのリガンドそのものを OFQR アンタゴニストとして用いることは不適當であると考えられる。しかしながら、本研究結果は、これら化合物が NociR アンタゴニスト創製のためのリード化合物となりうる可能性を示唆するとともに、本研究において樹立した細胞株 CHO/NociR が、アゴニスト活性だけでなくアンタゴニスト活性の評価にも利用可能であることを示している。

3-3

Nociceptin 脊髄クモ膜下腔内投与による痛覚過敏反応について

○勝山 壮¹、櫻田 司²、轡 基治¹、櫻田 忍¹
1 東北薬大・機能形態, 2 第一薬大・生化

【緒言】

Nociceptin¹⁾あるいはorphaninFQ²⁾と名付けられた新規のペプチドは17個のアミノ酸からなりopioid receptor like-1 (ORL-1)受容体のリガンドとしてラットの脳¹⁾やウシの視床下部²⁾から発見された。nociceptinはマウスやラットの脳室内もしくは脊髄クモ膜下腔内(i.t.)に投与した際に、痛覚過敏(hyperalgesia)を誘発する報告¹⁾⁻⁴⁾と鎮痛作用(analgesia)⁵⁾⁻⁶⁾を発起するとする相反する報告がなされている。

本研究においては、nociceptinの侵害受容閾値に対する作用を解明することを目的とし検討した。その結果、極めて低用量のnociceptin(3-30 fmol)をマウスにi.t.投与した場合、tail-flick法(熱刺激)において痛覚過敏反応侵害受容閾値の低下が認められた。

本講演ではnociceptin誘発性痛覚過敏反応の特徴について、薬理学的に検討を加えたので報告する。

【実験方法】

実験には体重20-22gのddY系雄性マウスを用い、薬物は全て人工脳脊髄液(CSF)で溶解した。i.t.投与はHyldenと

Wilcoxの方法に準じ⁷⁾、無麻酔下で腰椎の5番と6番の間の髄腔内へ50 μ l用マイクロシリンジを用い、5 μ l/マウスの割合で投与した。侵害受容閾値の測定はtail-flick法を用いて検討した。すなわち、熱刺激をマウスの尾部(尾の先端より2cm)に与え、尾をflickするまでの潜時を測定した。なお、nociceptinとの併用実験では、サブスタンスP(SP)抗体をnociceptin i.t.投与5分前にi.t.投与し、他の薬物は全てnociceptinとi.t.同時投与した。

【実験結果】

1) Nociceptin i.t.投与による痛覚過敏反応

Nociceptin(3 fmol-30 fmol)のi.t.投与では15分をピークとする侵害受容閾値の低下(痛覚過敏)が認められた。このnociceptinの侵害受容閾値の低下は投与後10分-20分の間に出現し、投与直後から5分までの間には認められなかった。Fig.1にnociceptin(0.3 fmol-3000 fmol)のi.t.投与15分後における侵害受容閾値の影響を示した。nociceptinを3 fmol i.t.投与すると、有意かつ顕著な侵害受容閾値の低下が認められたので、以下の実験においては、3 fmolのnociceptinを用いた。

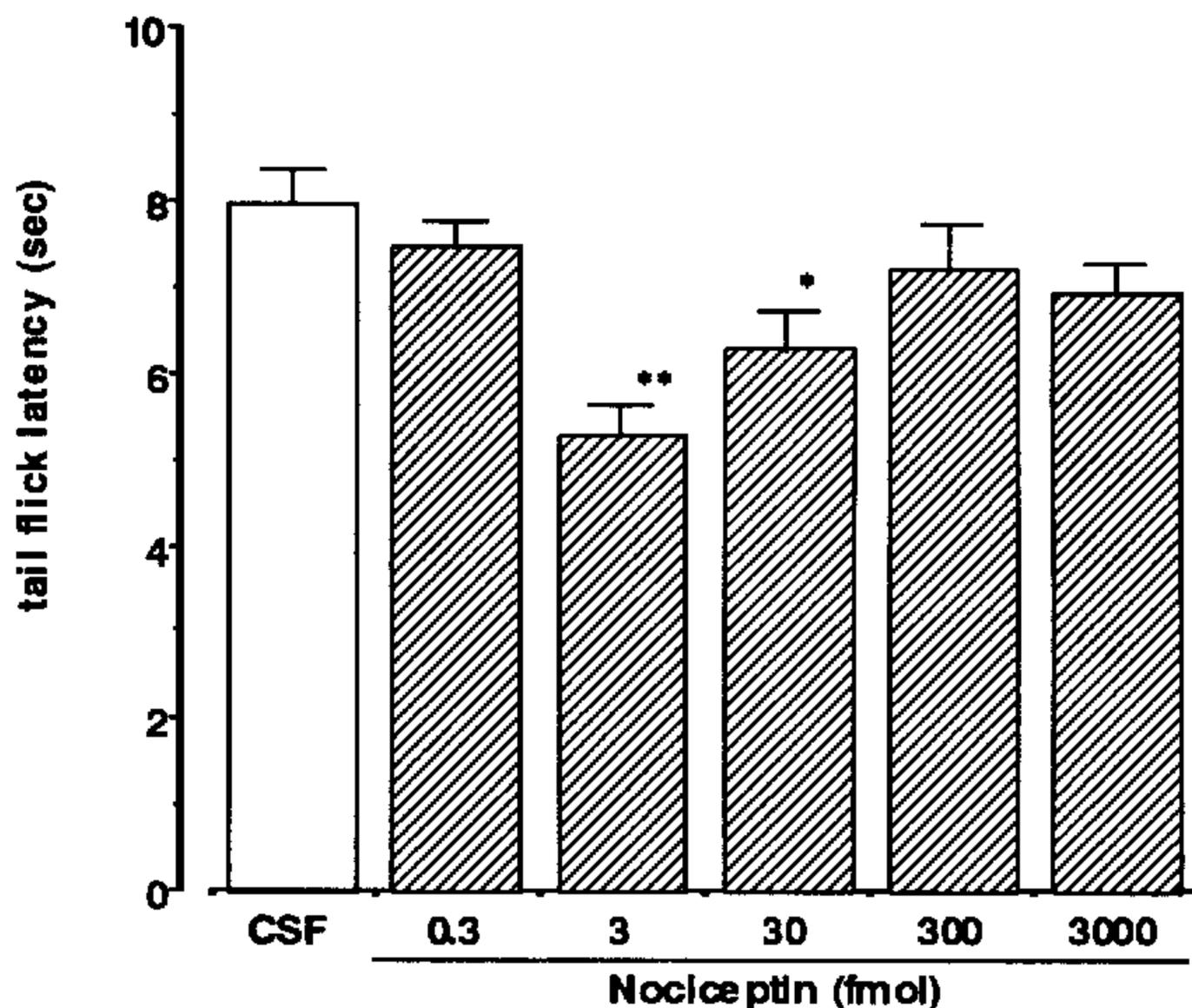


Fig.1 The effect of varying doses (0.3-3000 fmol) of nociceptin administered intrathecally in mice. After i.t. administration, the latency time was recorded after 15 min. The data are means \pm S.E.M. for groups of 10 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared to CSF-controls.

2) Nociceptin誘発性痛覚過敏反応に対する各種薬物の影響

Nociceptin(3 fmol)i.t.投与による侵害受容閾値の低下は、morphine(0.25-1.0 nmol)のi.t.同時投与により用量依存的に抑制した。このことから、nociceptinによる侵害受容閾値の低下は『痛覚系』に関連する反応であると考えら

れる。nociceptin による侵害受容閾値の低下はニューロキニン-1 (NK-1) 受容体拮抗薬 (CP-96,345、センダイド¹⁰⁾、[D-Phe7,D-His9]-SP(6-11)^{8),9)} および SP 抗体によって有意に抑制された。しかし、ニューロキニン-2 受容体拮抗薬 (MEN-10,376)、NMDA 受容体拮抗薬 (MK-801、D-2-アミノ-5-ホスホノバレリン酸 (D-APV)) および一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬 (L-N^G-ニトロアルギニンメチルエステル (L-NAME)) は nociceptin による侵害受容閾値の低下に対して何ら影響を示さなかった。

【考察】

本研究では極めて低用量の nociceptin (3-30 fmol) をマウスに i.t. 投与した場合、侵害受容閾値の低下を生じること示しこの侵害受容閾値の低下が morphine により抑制されることから『痛覚系』に作用し引き起こされるものと考えられる。nociceptin の i.t. 投与により生じる痛覚過敏が抑制性のアミノ酸であるグリシンのみにより抑制されることが報告されている⁴⁾。一方、我々は、nociceptin i.t. 投与すると、SP i.t. 投与時と類似の行動 (scratching、biting および licking) を惹起することを報告している¹¹⁾。また、この反応は SP 神経系を介する反応であることも、薬理的に確認している。本実験において、nociceptin の侵害受容閾値の低下は NK-2 受容体拮抗薬により何ら影響をうけないが、NK-1 受容体拮抗薬および SP 抗体によって有意に抑制されることを見出した。これらの結果から nociceptin の i.t. 投与によりの引き起こされる侵害受容閾値の低下は脊髄内 SP 神経系を介する反応であることが示唆された。

【文献】

- 1) Meunier J.-C. et al. Nature, 377, 532-535 (1995)
- 2) Reinscheid R.K. et al. Science, 270, 792-794 (1995)
- 3) Yamamoto T. et al. Brain Res., 754, 329-332 (1997)
- 4) Hara N. et al. Br. J. Pharmacol., 121, 401-408 (1997)
- 5) Rossi G. C. et al. Eur. J. Pharmacol., 311, R7-8 (1996)
- 6) King M. A. et al. Neurosci. Lett., 223, 113-116 (1997)
- 7) Hylden, J. L. K. and Wilcox, G. L. Eur. J. Pharmacol., 67, 313-316 (1980)
- 8) Sakurada T. et al. Eur. J. Pharmacol., 174, 153-160 (1989)
- 9) Sakurada T. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther., 259, 205-210 (1991)
- 10) Sakurada T. et al. Brain Res., 593, 319-322 (1992)
- 11) 井上 誠ら, 第18回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム要旨集

【謝辞】

本研究におきまして貴重な合成ペプチドを提供して下さいました旭硝子・中央研究所、大場優孝博士、佐々木潤博士に感謝の意を表します。

3-4

ノシセプチン受容体およびタキキニン1遺伝子欠損マウスにおける末梢性発痛機構の解明

○植田弘師*、井上誠*、徳山尚吾*、吉田明*、竹島浩**、
Andreas Zimmer***

*長崎大・薬・分子薬理、**東京大・医・薬理、
***NIMH

緒言

最近、オピオイド関連受容体内在性リガンドとしてノシセプチンが発見された(1,2)。このノシセプチンおよびその受容体はダイノルフィンAおよびオピオイド受容体にそれぞれ類似した構造を有している。しかしながら、低用量のノシセプチンを脊髄クモ膜下腔投与すると、痛覚過敏やアロディニアを誘発し、一方、比較的高用量を脊髄くも膜下腔に投与することによっては鎮痛作用を示すことが報告されている(3)。しかしながら、痛み調節におけるノシセプチンシグナルに関係する分子あるいは神経経路は未だ詳細に特徴づけられていない。

最近我々は、薬物の末梢性効果を測定できる極めて簡便かつ高感受性の評価法を確立した(4-7)。この評価法を用いて、ノシセプチン誘発性侵害反応およびそのin vivo細胞内情報伝達機構を明らかにした。

結果および考察

1. ノシセプチン誘発性末梢性侵害屈曲反応

ノシセプチン(1 fmol)のマウス足蹠皮下への適用により侵害性屈曲反応が誘発され、その反応は5分間隔の繰り返し投与によっても安定であった。このノシセプチン誘発性屈曲反応はノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスにおいて完全に消失し、また百日咳毒素感受性のもので

あった。また、ノシセプチン反応はノシセプチン受容体に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを脊髄クモ膜下腔に前処理することにより著明に減弱された (Figure 1)。これらの結果は、ノシセプチンはその受容体を介してのみ反応を引き起こすことを示唆し、またその受容体は末梢性知覚神経終末部に存在することを示唆している。

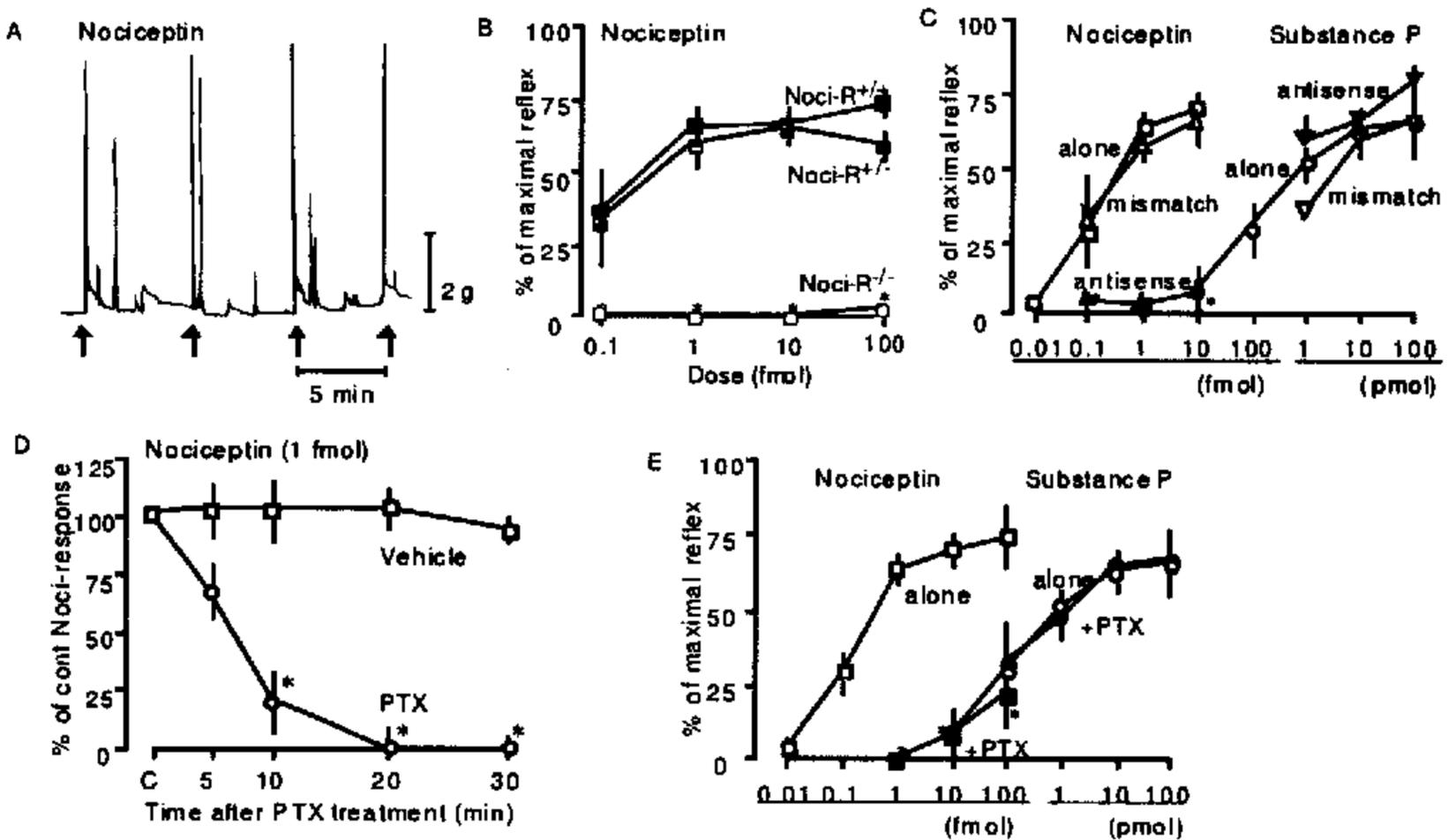


Figure 1 Receptor- and $G_{i/o}$ -involvement in Nociceptin-induced flexor responses.

2. ノシセプチン誘発性反応における *in vivo* 細胞内情報伝達機構

ノシセプチン反応はホスホリパーゼ C阻害剤であるU-73122で完全に抑制され、その不活性異性体であるU-73343では全く無影響であった。このことからノシセプチンの作用はホスホリパーゼ Cを介すものであるといえる。加えて、ノシセプチン作用は細胞外 Ca^{2+} のキレート剤であるEGTAあるいはイノシトール3リン酸(IP3)誘発性 Ca^{2+} 流入の阻害剤として海綿から抽出されたアルカロイドであるAraguspongine E (Xestospongine Cに相当する)によっても完全に抑制された。一方、細胞内 Ca^{2+} ストアーの枯渇剤であるThapsigarginの適用によっては全く影響されなかった (Figure 2)。これらの結果は、ノシセプチンの侵害反応誘発には細胞外 Ca^{2+} 動員が重要な役割を担っており、細胞内 Ca^{2+} スト

アーは関与しないことを示唆している。

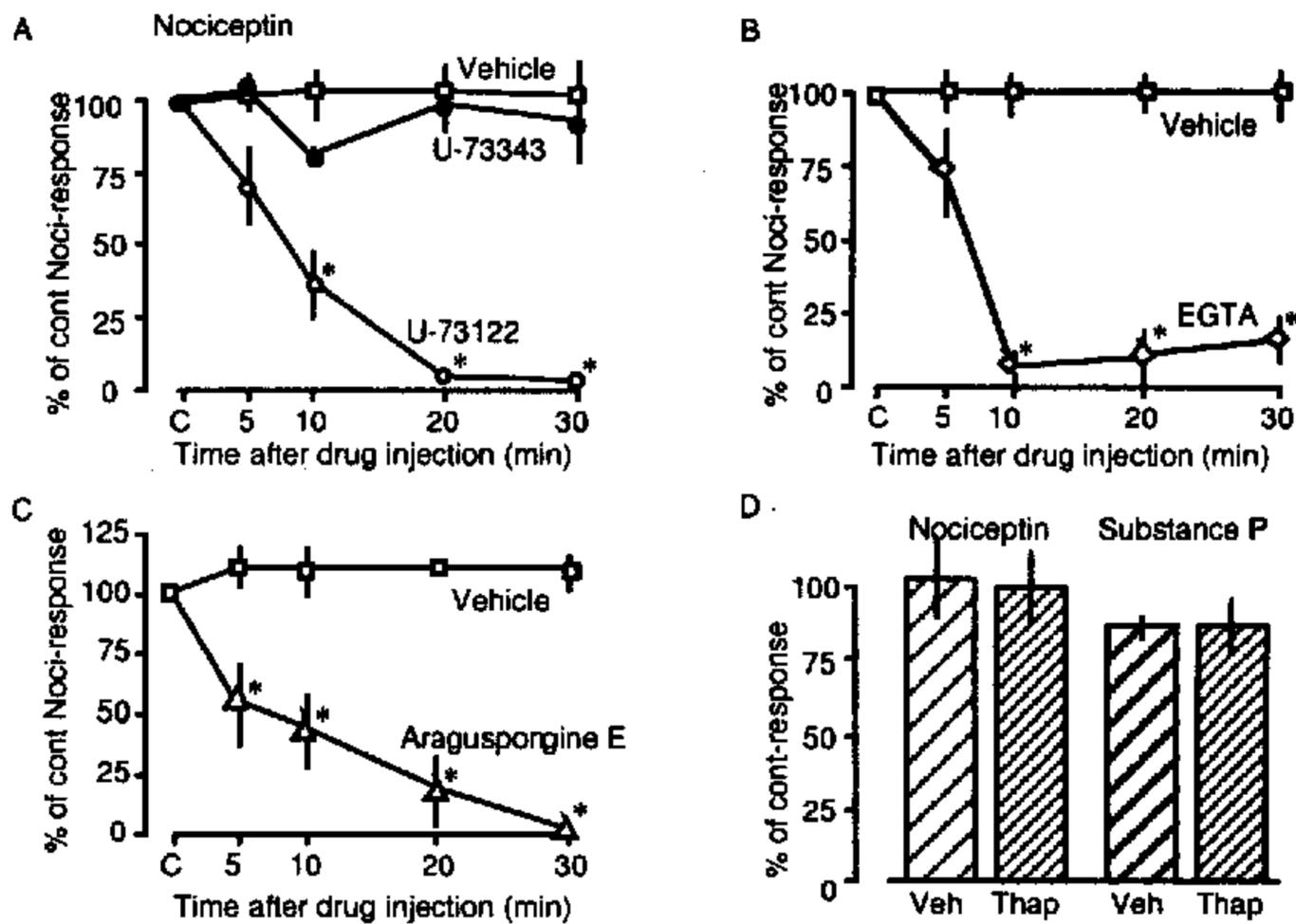


Figure 2 Possible involvement of inositol trisphosphate and Ca^{2+} influx into nerve endings in nociceptin-induced responses.

3. ノシセプチン誘発性反応における末梢局所のサブスタンスP関与

疼痛伝達物質のひとつであるサブスタンスPを末梢局所に適用すると、同様に侵害性屈曲反応が引き起こされ、その反応はサブスタンスP (NK1) 受容体アンタゴニストであるCP-99994あるいはCP-96345で完全に拮抗され、更にU-73122, EGTAあるいはテトロドトキシンによっても完全に抑制された。そこでノシセプチン反応に対し、CP-99994あるいはCP-96345を作用させたところ、その反応は完全に抑制され、また、タキキニン1遺伝子欠損マウスあるいはカプサイシン処理マウスにおいてもこの反応は全く観察されなかった (Figure 3)。これらのことからノシセプチンはサブスタンスPの遊離を介して疼痛反応を引き起こすことが判明した。

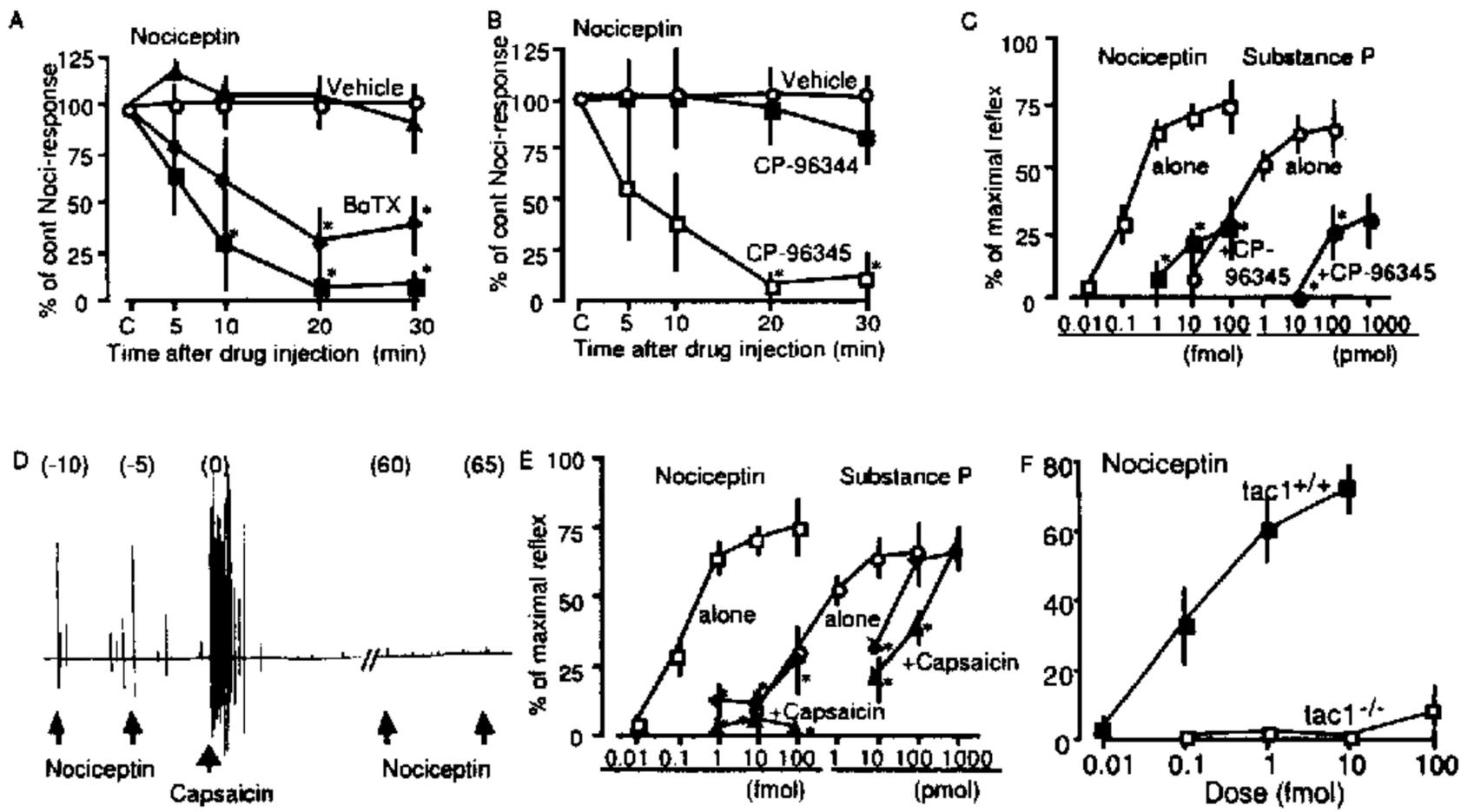


Figure 3 Involvement of local substance P release in nociceptin-induced nociceptive responses.

本研究成果をFigure 4に示す。末梢適用したノシセプチンは疼痛性屈曲反応を誘発し、その反応は知覚神経終末からのサブスタンスP遊離を介することが判明した。

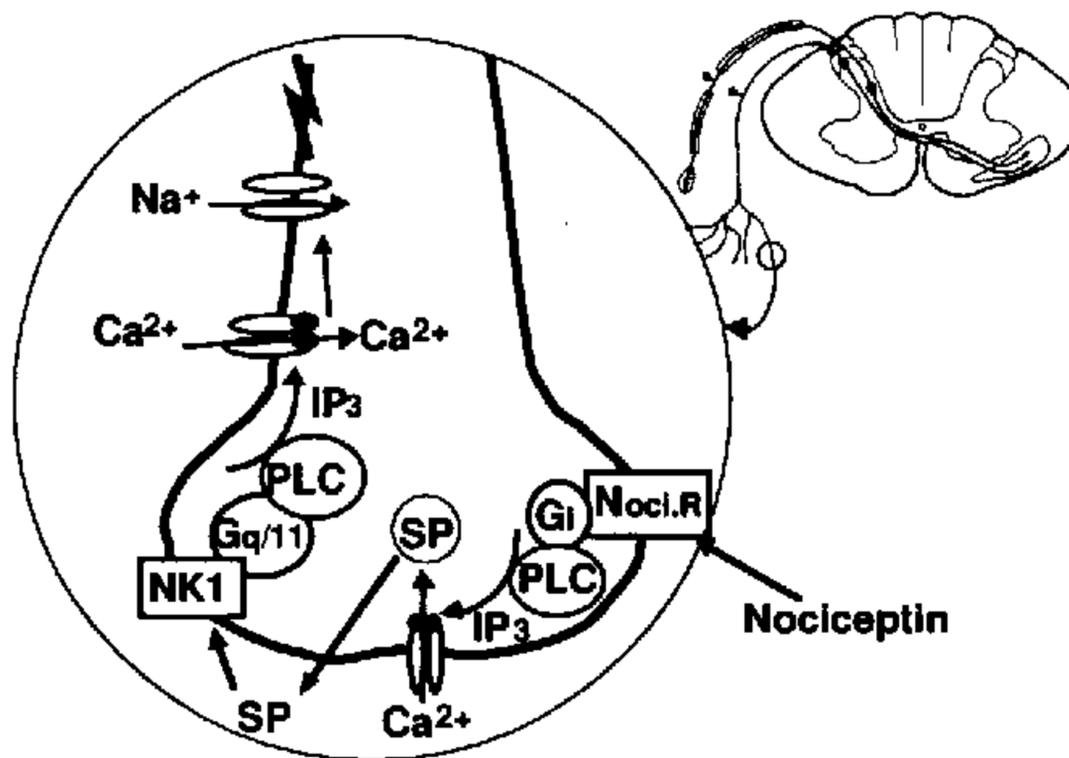


Figure 4 *In vivo* signal transduction of nociceptin-induced response

参考文献

1. Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., and Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**, 532-535.
2. Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma, F. J. Jr., and Civelli, O. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**, 792-794.
3. Meunier, J. C. (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **340**, 1-15.
4. Inoue, M., Nakayamada, H., Tokuyama, S., and Ueda, H. (1997). Peripheral non-opioid analgesic effects of kyotorphin in mice. *Neurosci. Lett.* **236**, 60-62.
5. Inoue, M., Tokuyama, S., Nakayamada, H., and Ueda, H. (1998). In vivo signal transduction of tetrodotoxin-sensitive nociceptive responses by substance P given into the plantar of mouse hind limb. *Cell. Mol. Neurobiol.* in press.
6. Tokuyama, S., Inoue, M., Fuchigami, T., and Ueda, H. (1998). Lack of tolerance in peripheral opioid analgesia in mice. *Life Sci.* **62**, pp.1677-1681.
7. Inoue, M., Kobayashi, M., Kozaki, S., Zimmer, A. and Ueda, H. (1998). Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

3-5

オピオイド受容体および G 蛋白質 α サブユニットに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの効果

○小林 広幸, 吉川 正信, 北村 憲, 金井 昌之,
赤堀 一仁, 中林 大, 岩尾 佳代子, 岡 哲雄
東海大学医学部薬理学教室

緒言

アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (AS-ODN) は, 標的蛋白質の発現を阻害できるものとして, 注目されている。今回, オピオイド受容体および G 蛋白質 α subunit を特異的に抑制するための AS-ODN をデザインし, その効果と特異性を検討した。

オピオイドの効果発現機序として, 他の G 蛋白質関連受容体と同様に, オピオイドと受容体との結合 \rightarrow G 蛋白質 \rightarrow 酵素あるいはイオンチャンネル, という流れが考えられている。現状では, 23 種以上ある G 蛋白質 α subunit に限ってもどの α subunit がオピオイド受容体の情報伝達機構に重要なのか十分明らかにされてはいない。そこで, 我々は, ①オピオイド受容体における情報伝達機構, ②鎮痛などのオピオイドの薬理作用と受容体遺伝子の発現レベルとの関係, ③ AS-ODN の特異性等を明らかにする目的で, Wistar 系雄性ラットの中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray; PAG) や側脳室 (lateral ventricle; LV) における μ オピオイド受容体 (MOR) 遺伝子ならびに各種 G 蛋白質 α subunit 遺伝子の発現を抑制する AS-ODN の系を作成した。AS-ODN 投与後の遺伝子発現抑制の効果のアッセイ系として, 遺伝子発現の定量と併せてモルヒネの鎮痛効果の減弱を観察する方法を用いた。

実験材料および方法

使用動物

Wistar 系雄性ラット, 6~8 週齢(180~250 g)を恒温(21 \pm 1 $^{\circ}$ C)で明期 12 時間(8:00a.m.~8:00p.m.)の明暗サイクルにコントロールされた動物舎において飼育し, 実験に供試した。

AS-ODN

ラット MOR 遺伝子に対する AS-ODN は, 翻訳開始コドンの上流域

(position -88~70)に対して相補的な配列(5'-CGC CCC AGC CTC TTC CTCT)を選択した。

各種のラット G 蛋白質 α subunit 遺伝子に対する AS-ODN は, Fig. 1 の下線で示した領域に対して相補的な配列を選択した。Gi1~3 α と Gs α については, 翻訳開始コドンを含む領域に対する AS-ODN をそれぞれ Weinstein ら及び Malbon らのものに準じて用意した。Go α については, 2箇所翻訳領域に対して AS-ODN をデザインした。Gi1 α と Go α については, 特異性を高める目的で 17~18 mer の短い AS-ODN も併せて作製した。

AS-ODN 並びに Sense-ODN は, いずれも phosphorothioate 修飾型で HPLC 精製したものを滅菌精製水で使用濃度の 2 倍の濃度となるよう溶解し小分けにし凍結保存し, 使用直前に等量の 1.8% NaCl で希釈し脳内投与に用いた。



Fig. 1 Design of AS-ODN directed against each G protein α subunit. cDNA sequences of G protein α subunit family are aligned by Clustal multiple sequence alignment. ATG initiation codons are indicated by open boxes. Target sites for AS-ODN are underlined.

AS-ODN の脳内投与方法

①ステンレス・スチール製のガイドカニューレ(24 gauge, 13 mm)を Paxinos & Watson の脳図譜に従い, PAG においては(A -6.7 mm, V+2.7 mm, L -0.6 mm), LV においては(A -0.8 mm, V+2 mm, L -0.6 mm)に挿入した。②手術後2日間以上休ませた後, カニューレの位置を確認するためフェンタニールを予備投与した。ガイドカニューレを通してカニューレ(30 gauge, PAG 16 mm; LV 15 mm)を目的部位まで挿入して, 1分後にフェンタニールを投与した(PAG では, 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 2 nmol, LV では, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 20 nmol)。鎮痛効果は, tail flick test (55°Cの温水に尾をいれる)により評価した。③予備投与から2日間以上おいた後, AS-ODN(PAG には, 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 1.7 nmol, LV では, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 1.7 nmol)を様々なスケジュールで投与した。

遺伝子抑制効果の評価

モルヒネによる鎮痛効果の変化とともに標的 mRNA 量の変化, 標的蛋白質量の解析を行い, AS-ODN の効果を評価した。併せて, 目的以外のオピオイド受容体や G 蛋白質 α subunit の影響を検討し, 特異性を評価した。mRNA 量の変化は, RT-PCR 法で解析し, 蛋白質量の変化はウェスタンブロット法で解析した。具体的には, ①RNA 抽出用サンプルには, 1 μl の色素 (0.1% bromophenol blue in saline) を 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で microinfusion し, 10分後に染色された小片を摘出し用いた。②摘出したサンプルより AGPC 法にて total RNA を抽出し, DNase I で処理した。③ *rTth* DNA polymerase を用いて, one-tube one-enzyme 方式にて G 蛋白質 α subunit mRNA またはオピオイド受容体 mRNA の RT-PCR アッセイを行った。各サンプル間の PCR 反応に用いた RNA 量を一定にするため, housekeeping 遺伝子の GAPDH の RT-PCR を別に行い整合性を持たせた。定量については, 各 PCR のサイクル数を指数関数的増加がみられる範囲に設定し, GAPDH 遺伝子の発現との比で NIH Image を用いて定量的解析を行った。④鎮痛効果は, カニューレを通してモルヒネを投与し(PAG では, 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 0.1 μmol , LV では, 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で 0.2 μmol), tail flick test により評価した。

実験結果および考察

PAG における MOR に対する AS-ODN の効果

① AS-ODN の特異性: AS-ODN 投与群でのみ有意にモルヒネの鎮痛効果が減弱し, 生食投与群や Sense-ODN 投与群では変化がなかった。

MOR に対する AS-ODN の投与により標的とした MOR mRNA 量は減少した。κ-, δ-オピオイド受容体の mRNA 量には、影響がなかった。

②鎮痛効果減弱作用の発現期間：AS-ODN の投与スケジュールを、1 回のみ、3 回連続投与、1 日おきに 2 回、1 日おきに 3 回とした。AS-ODN のモルヒネの鎮痛効果に対する減弱作用が現れる期間は、初回投与からいずれも 5~7 日後であり、投与回数には依存していなかった。

③ MOR mRNA が抑制される期間：上記のいずれの投与方法でも最終投与後 12~24 時間後に強い mRNA 発現抑制が観察され、48 時間後にはコントロールと同程度まで回復し、AS-ODN の効果が可逆的であることが確認された。

AS-ODN の投与開始から鎮痛効果の減弱が現れるまでの潜時は、MOR の turnover にかかる時間に相当すると考えられる。本実験の結果より、PAG における機能を有する MOR の turnover にかかる時間は約 5 日であることが予測される。

LV における MOR に対する AS-ODN の効果

AS-ODN 1.7 nmol を 1 日 2 回、5 日間 LV に投与した結果、モルヒネによる鎮痛効果の減弱、モルヒネによるカタレプシーの発現や正向反射消失の持続時間の短縮が認められた。それらの効果は、初回投与後 5~7 日目に最大となり、9 日目に消失した。小脳を除去した全脳で施行したノーザンブロット解析では、MOR mRNA 量は約 50 分の 1 まで減少していた。

G 蛋白質α subunit に対する AS-ODN の特異性

各 G 蛋白質α subunit に対する AS-ODN 1.7 nmol を 48 時間毎に 3 回、PAG に投与し、Gi1~3α, Goα, Gsα の mRNA 量と蛋白量の変化を検討した(Table 1)。

Table 1. Effects and specificities of AS-ODN against G protein α subunits.

AS-ODN \ mRNA Expression	Gi1α	Gi2α	Gi3α	Goα
Gi1α	↓↓	~	~	↓
Gi1α (17 mer)	↓↓	~	~	~
Gi2α	~	~	~	~
Gi3α	↓	~	↓↓	n.d.
Goα	↓	~	~	↓
Goα (downstream)	↓	~	~	↓
Goα (18 mer)	↓	~	~	↓

Gi1 α に対する AS-ODN では、標的遺伝子の発現は非常に良く抑制されたが、それ以外に Go α の発現も抑制された。AS-ODN が標的遺伝子以外の他の遺伝子へも影響を与えてしまう機序として、部分的な 2 重鎖の形成が RNase H 等の基質となり、抑制につながる可能性が示されている (Schultz, et al.)。この例でも標的とした部位の 3' 側で、Gi1 α と Go α との間に 12 base の相同性があり、3' 側を 5 base 削った 17 mer の AS-ODN をデザインしたところ、Go α の発現への影響は消失した。特異性を高めるために相同性のある部位を削ることが有効であった一例と考えられる。また、この AS-ODN の投与や Go α に対する AS-ODN で、tail flick test においてもモルヒネの効果を減弱させることが示された。前述のように、既報で特異性が高いとされている AS-ODN でも PAG の系では、特異性が得られない場合がみられた。投与部位により AS-ODN の細胞内への取り込みや細胞内動態が異なり効果の差として現れる可能性などが考えられる。尚、Western blot での蛋白量も、RNA 量とほぼ同様の挙動を示すことが確認された。

以上の結果より、MOR に対する AS-ODN の PAG および LV への投与によるモルヒネの薬理作用に対する減弱作用は、MOR mRNA 量の減少、すなわち転写レベルでの発現抑制によるものと考えられる。また、MOR の情報伝達に関わる G 蛋白質 α subunit は、Gi1 α や Go α である可能性が示唆されるが、今後さらに特異性の高い AS-ODN をデザインし、解析を進めることが必要と思われる。

文献

Wang HY, Watkins DC, Malbon CC. Antisense oligodeoxynucleotides to GS protein alpha-subunit sequence accelerate differentiation of fibroblasts to adipocytes. *Nature*. 1992; 358: 334-337.

de Mazancourt P, Goldsmith PK, Weinstein LS. Inhibition of adenylate cyclase activity by galanin in rat insulinoma cells is mediated by the G-protein Gi3. *Biochem J*. 1994; 303: 369-375.

Kalkbrenner F, Dippel E, Wittig B, Schultz G. Specificity of interaction between receptor and G protein: use of antisense techniques to relate G-protein subunits to function. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1314: 125-139.

3-6

κ 受容体作動薬開発における副作用の留意点 — CPP 法と薬物弁別法を用いた検討から —

○野村 睦子, 鈴木 勉, 三澤 美和
星薬大・薬理

【はじめに】

現在、 κ 受容体作動薬は精神依存や呼吸抑制を起こさない鎮痛薬としてその有用性が期待されている。しかし、副作用として実験動物において嫌悪効果を発現させる (1) ことや、ヒトにおいては幻覚・妄想などの精神症状を発現させる (2) ことが報告されている。このような副作用は、 κ 受容体作動薬を臨床で用いようとするときに立ちはだかってくる問題である。当教室では、ヒトにおける κ 受容体作動薬による精神症状の発現が、実験動物においては嫌悪効果 (嫌悪効果は精神症状を反映したものである) として表現される、という仮説をたて一連の実験を行っている。また、精神症状の発現には σ 受容体の関与も示唆されている (3) ことから、 σ 受容体と κ 受容体を介する反応の相互作用についても検討を行っている。

条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference: CPP 法 (4)) は、薬物の報酬効果の評価法の一つであり、その試験期間は短く、薬物の報酬効果だけでなく嫌悪効果をも簡便に評価できる優れた試験法である。一方、薬物を摂取したときに得られる感覚効果は薬物の精神依存性を評価するうえで重要な要素となっている。このような薬物の摂取感覚効果を実験動物で評価するのが薬物弁別法である。

本研究では、CPP 法および薬物弁別法を用いた実験を通して、 κ 受容体作動薬の副作用としての嫌悪効果と精神症状の関連性を検討した。

【実験方法】

実験動物：CPP 法には雄性 SD 系 ラットを用い、薬物弁別法には自由摂餌体重の 80 % に摂餌制限を行った雄性 Fischer 344 系

ラットを使用した。

薬物弁別実験：まず、一定回数レバーを押すと強化子（錠剤型飼料 20 mg）が与えられる FR (fixed ratio : 定率) 強化スケジュールを用いてレバー押し訓練を行った。FR1 によるレバー押しが確立された後、順に FR サイズを FR2、・・・FR10 と増加させた。FR10 によるレバー押しが確立された後、 κ_1 受容体作動薬 U-50,488H と saline の弁別訓練を行った。弁別訓練開始 30 分前に U-50,488H (3 mg/kg) あるいは saline (1 ml/kg) をラットに腹腔内投与し、2レバー付オペラント箱に入れた。U-50,488H を投与した場合には一方のレバー押しにより強化子が得られ、また saline の場合には他方のレバー押しにより強化子が得られる。しかし、それぞれもう一方のレバーは無効であり、強化子を得ることができない。このようにして U-50,488H と saline の弁別を獲得後、用量反応試験、般化試験、併用試験を行った。般化試験は、非競合的 NMDA 受容体拮抗薬 phencyclidine (PCP) (0.5, 1 および 2 mg/kg, i.p. 20 分前処置)、 σ_1 受容体作動薬 (+) pentazocine (3, 5.6 および 10 mg/kg, i.p. 30 分前処置)、 κ 受容体作動薬である E-2078 (1, 1.8 および 3 mg/kg, i.p. 30 分前処置)、KT-90 (0.3, 1 および 3 mg/kg, i.p. 30 分前処置) および TRK-820 (10, 30, 56 および 76 μ g/kg, i.p. 30 分前処置) をそれぞれ投与し、U-50,488H の弁別刺激効果と類似する効果を有するかどうかを検討した。さらに、U-50,488H の弁別刺激効果に対する PCP の般化が σ 受容体拮抗薬 NE-100 (1 および 3 mg/kg, i.p. 30 分前処置) により影響を受けるか否かについても検討した。それぞれの試験で、総レバー押し数に対する薬物側レバー押し数の割合 (%) を正反応率とし、また 1 分間あたりのレバー押し回数を反応率 (responses/min) として算出した。般化試験においては U-50,488H 側レバーへの正反応率が 80 % を超えた場合、その薬物が U-50,488H の弁別刺激特性に般化したとみなした。併用試験では、二元配置分散分析 (ANOVA) を用い

て統計学的有意性を検討した。

CPP 法：白黒の2-コンパートメントボックスを使用し、白側の区画は凹凸のある床となっており、黒側の区画は凹凸のない滑らかな床となっているものを用いた。Pre-conditioning session ではボックスの中央の仕切りを取り除いてプラットホームを設置し、無処置で各区画への滞在時間を15分間測定した。条件づけはラットに薬物を処置し pre-conditioning session において嗜好性を示した区画に、また saline を処置し非嗜好性を示した区画にそれぞれ50分間閉じ込め、翌日は反対の処置を行った。この操作を3回(6日間)繰り返し、7日目に post-conditioning session (test) を行った。Post-conditioning session は pre-conditioning session と同様の方法で行い、post-conditioning session の値から pre-conditioning session の値を差し引いた値を CPP score として算出した。本研究では、CPP 法を用いて U-50,488H (1, 3 および 5.6 mg/kg, i.p.)、E-2078 (0.1, 0.5, 1 および 5 mg/kg, i.p.)、KT-90 (0.3, 1 および 3 mg/kg, s.c.) および TRK820 (10, 20 および 40 μ g/kg, i.p.) により誘発される動機づけ効果(報酬効果あるいは嫌悪効果)を検討した。

【結果および考察】

CPP 法により U-50,488H の動機づけ効果を検討したところ、3 mg/kg を最大反応とする有意な嫌悪効果が認められた ($P < 0.01$)。本研究では、嫌悪効果と精神症状の関連性に注目しているため、この有意な嫌悪効果を示した 3 mg/kg の U-50,488H を訓練用量として弁別実験を行った。

U-50,488H の弁別刺激効果に対して、幻覚・妄想を発現させることで知られる PCP (5) は用量依存的に般化した。このことから、U-50,488H の弁別刺激効果は PCP 様の精神症状に類似していることが示唆された。したがって、本結果は κ 受容体作動薬により誘発される嫌悪効果は精神症状を反映したものであろう、という我々の仮説を支持するものであった。

次に、精神症状の発現には σ 受容体の関与が示唆されている

ことから、 κ 受容体と σ 受容体を介する反応の関連性について検討した。U-50,488H の弁別刺激効果に対して σ_1 受容体作動薬 (+) pentazocine は用量依存的に般化し、また U-50,488H の弁別刺激効果は σ 受容体拮抗薬 NE-100 の併用により用量依存的に、そして有意に抑制された ($F [1,133]=6.83, P<0.01$)。このことから、U-50,488H の弁別刺激効果発現には σ 受容体、特に σ_1 受容体が一部関与していることが示唆された。この機構として、 κ 受容体を介した σ 受容体への間接作用と、U-50,488H が σ 受容体にも親和性を示す (6) ことから、U-50,488H の σ 受容体に対する直接作用も関係している可能性が考えられるが、この点に関しては今後さらなる検討が必要である。

また、U-50,488H の弁別刺激効果に対する PCP の般化における σ 受容体の関与を検討した。PCP の U-50,488H に対する般化は σ 受容体拮抗薬 NE-100 の併用で有意に抑制された ($F[1,45]=7.23, P<0.01$)。したがって、U-50,488H に対する PCP の般化にも σ 受容体が関与していることが示唆された。PCP は σ 受容体に対する親和性は低く (7)、その作用は主に NMDA 受容体にリンクしたイオンチャネルを抑制的に制御する (8) ために発現していると考えられている。しかし、 σ 受容体は NMDA 受容体を調節していることも報告されており (9) PCP の般化にはこのような調節機構が関与しているものと考えられる。

次に、U-50,488H の嫌悪効果と精神症状の関連性が、U-50,488H に特異的なものか、あるいは κ 受容体作動薬に共通する効果であるかを検討するため、数種 κ 受容体作動薬の嫌悪効果および弁別刺激効果を検討した。CPP 法により E-2078、KT-90 および TRK-820 の動機づけ効果を検討したところ、E-2078 は用量依存的に、KT-90 は 1 mg/kg を最大反応として有意な嫌悪効果を発現した。しかし、TRK-820 は有意な嫌悪効果を示さなかった。次に、U-50,488H の弁別刺激効果に対する影響を検討したところ、E-2078、KT-90 は有意な嫌悪効果を示した用量で U-50,488H の弁別刺激効果に般化した。TRK-820 は般化しなかった。これらの結果は、嫌悪効果が精神症状を反映しているという我々の仮説を支持するものであった。

U-50,488H の PCP 様の弁別刺激効果は U-50,488H に特異的な作用ではなく、嫌悪効果を発現する κ 受容体作動薬に共通した作用であると推測されることから、嫌悪効果を示す κ 受容体作動薬である E-2078 や KT-90 は PCP 様の精神症状を発現させる可能性が考えられる。一方、TRK-820 は嫌悪効果を示さないことから、PCP 様の弁別刺激効果は発現しないことが示唆される。 κ 受容体には、 κ_1 、 κ_2 、 κ_3 の 3 つの受容体サブタイプが存在することが知られている (10)。U-50,488H が κ_1 受容体に選択的に作用することから、嫌悪効果や精神症状の発現には κ_1 受容体が重要な役割を果たしていると推測される。したがって、上記のような副作用の発現の有無は作用する κ 受容体のサブタイプの相違に起因すると考えられ、 κ_2 、 κ_3 受容体作動薬はこの様な副作用を発現することなく鎮痛効果を発現する有用な薬物となる可能性が推測される。

今後、 κ 受容体サブタイプに対するより選択的な作動薬や拮抗薬が開発され、基礎研究においても一層研究が進むことにより、副作用の少ない有用な鎮痛薬が開発されるものと思われる。

【引用文献】

1. Bals-Kubik, R. et al., *Psychopharmacology*, **98**, 203-206 (1989)
2. Pfeiffer, A. et al., *Science*, **233**, 744-746 (1986)
3. 富樫俊二ら, *精神治療学*, **8**, 171-184 (1993)
4. Suzuki, T. et al., *Psychopharmacology*, **102**, 438-442 (1990)
5. Ogawa, S. et al., *Life Sci.*, **55**, 1605-1610 (1994)
6. Brent, P.J., *Brain Res.*, **725**, 155-165 (1996)
7. Largent, B.L. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 739-748 (1986)
8. Anis, N.A. et al., *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 565-575 (1983)
9. Monnet, F.P. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 123-130 (1992)
10. Wollemann, M. et al., *Life Sci.*, **52**, 599-611 (1993)

3-7

記憶過程に対する内在性 μ -オピオイド受容体 作動薬 endomorphins の作用

○鶴飼 良, 渡辺佳子, 林 惠萍, 亀山 勉
名城大学薬学部薬品作用学教室

オピオイド受容体は, 生体内で色々な生理反応に関わっている. 特に, 脳高次機能においては, μ -および δ -オピオイド受容体を刺激すると学習・記憶が障害され, κ -オピオイド受容体を刺激すると記憶障害が改善されることが報告されている (Pan, 1998). 最近, 4個のアミノ酸から成る内在性 μ -オピオイド受容体作動薬がウシの脳から発見され, endomorphins (endomorphin-1 および endomorphin-2) と命名された (Zadina et al., 1997). 今回は, マウスの記憶過程に及ぼす endomorphins の影響をオピオイド受容体拮抗薬を用いて検討した.

【方法】

実験には, ddY系雄性マウス (体重 35~40 g) を用いた.

1) 自発的交替行動

マウスをY字型迷路のアームの先端に置き, 8分間にわたって自由に動き回らせ, アームへの移動回数を記録した (Ukai et al., 1997). 8分間にマウスが入ったアーム数を total arm entries とし, この中でマウスが連続して異なる3つのアームを選択した回数を no. of alternation とした. そして, percent alternation を ($[\text{no. of alternation}] / [\text{total arm entries}] - 2$) $\times 100$ の式から求め, 自発的交替行動の指標とした. Endomorphins, naltrindole, nor-binaltorphimine および β -funaltrexamine は, それぞれ自発的交替行動の測定開始15分, 20分, 60分および24時間前に投与 (i.c.v.) した.

2) 受動的回避学習

ステップダウン (step-down) 型の受動的回避学習装置を用いた (Ukai et al., 1997). 訓練試行では, 先ずマウスを木製プラットホーム上に静かにのせ, マウスがプラットホームから床グリッド上へステップダウンした直後に間欠的な電気ショック (80V, D.C., 0.5 sec, 1 Hz) を負荷した. 保持試行は, 訓練試行の24時間後に行い, マウスを再

びプラットホーム上にてストップダウンするまでの時間 (step-down latency: SDL) を測定し、これを学習の指標とした。なお、cut-off 時間の上限は 300 秒とした。Endomorphins は、訓練試行直後に投与 (i.c.v.) したが、naltrindole, nor-binaltorphimine および β -funaltrexamine は、それぞれ訓練試行の 20 分、60 分および 24 時間前に投与 (i.c.v.) した。

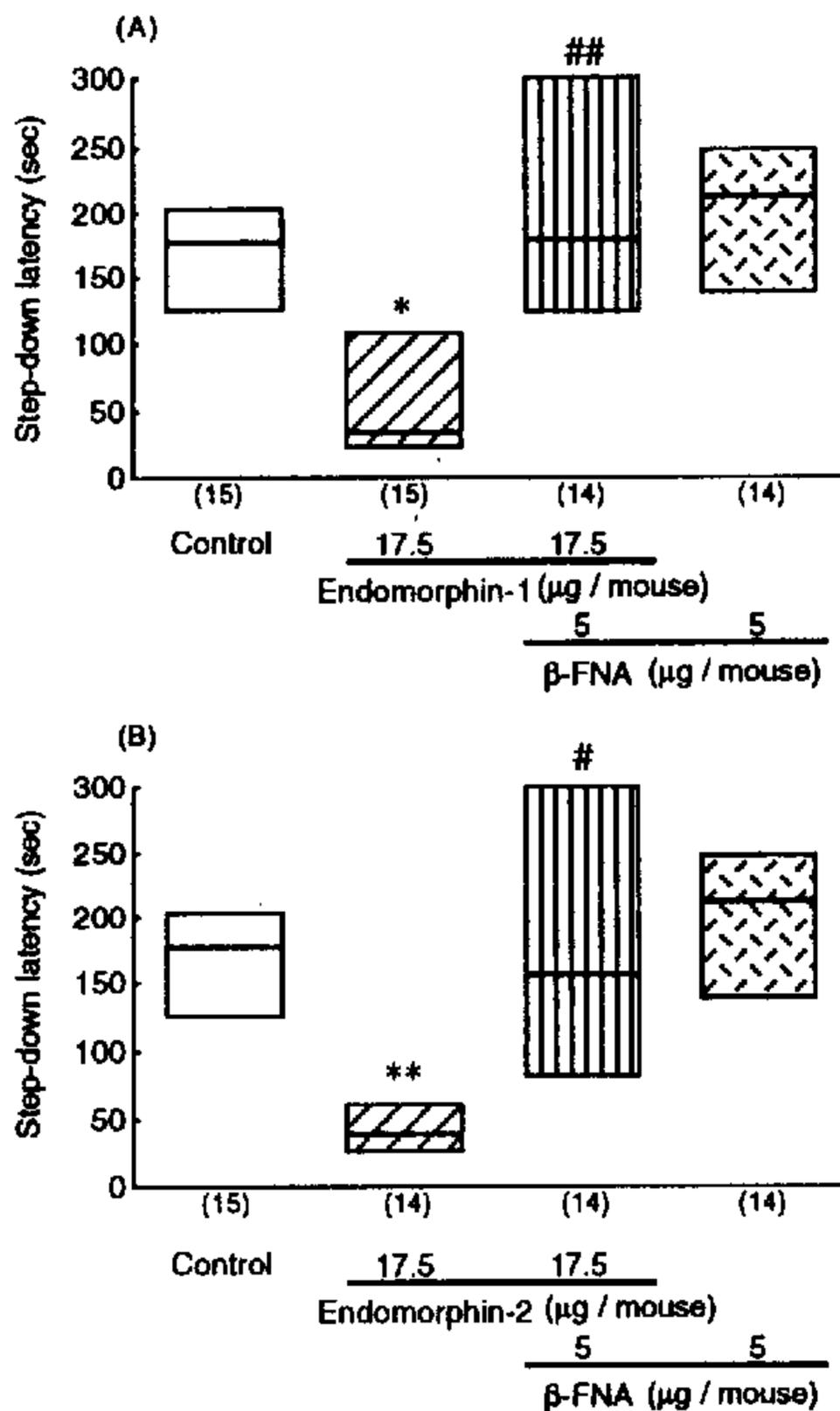


Fig. 1. Effects of endomorphin-1 (A) and endomorphin-2 (B) and their combinations with β -funaltrexamine (β -FNA) on passive avoidance learning in mice. Data are shown as the median and interquartile ranges, which are the distances between the first and third quartile. The number of mice used is shown in parentheses. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. endomorphins.

【結果および考察】

1) 自発的交替行動に及ぼす endomorphins の作用

Endomorphin-1 (10 および 17.5 μ g) および endomorphin-2 (10 μ g) は, percent alternation を有意に低下させた. Endomorphin-1 (10 μ g) および endomorphin-2 (10 μ g) による percent alternation の有意な低下は β -funaltrexamine (5 μ g) の併用により有意に抑制されたが, naltrindole (4 ng) あるいは nor-binaltorphimine (4 μ g) を併用しても影響されなかった.

2) 受動的回避学習に及ぼす endomorphins の作用

Endomorphin-1 (10 および 17.5 μ g) および endomorphin-2 (17.5 μ g) は, 保持試行時の SDL を有意に短縮させた. β -Funaltrexamine (5 μ g) は, endomorphin-1 (17.5 μ g) および endomorphin-2 (17.5 μ g) による SDL の短縮作用を有意に抑制したが (Fig. 1), naltrindole (4 ng) あるいは nor-binaltorphimine (4 μ g) は無効であった.

以上の結果より, endomorphins は μ -オピオイド受容体を介して, 短期記憶の指標である自発的交替行動および長期記憶の指標である受動的回避学習を障害させることが示唆された.

【文献】

- Pan, Z.Z. (1998) μ -Opposing actions of the κ -opioid receptor, Trends in Pharmacol. Sci. 19: 94-98.
- Ukai, M., Itoh, J., Kobayashi, T., Shinkai, N. and Kameyama, T. (1997) Effects of the κ -opioid dynorphin A(1-13) on learning and memory in mice, Behav. Brain Res. 83: 169-172.
- Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.-J. and Kastin, A.J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor, Nature 386: 499-502.