

【ポスターセッション】10月0-11日0時(自由討論)、2日15時00-2日1時00分(ポスター掲示)

セッション1：非オピオイド鎮痛物質

- P1 **新規ノシセプチン前駆体由来ペプチドの発痛分子メカニズム**
近藤沙織¹、川島敏子¹、井上誠¹、Richard J. Allen²、植田弘師¹
¹長崎大学医歯薬学総合研究科分子薬理学研究
²Center for Research on Occupational and Environmental Toxicology (CREAT),
The Oregon Health Sciences University
In vivo signal transduction of novel prepronociceptin-derived peptides
Saori Kondo, et al, Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences 38-40
- P2 **新奇環境における情動行動に対するノシセプチンの効果**
松縄保宏、亀井淳三
星薬科大学薬物治療学教室
Effect of nociceptin on the exploratory behaviors of mice on a hole-board
Masahiro Matsunawa, et al, Department of Pathophysiology Therapeutics, Hoshi
University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo Japan 41-43
- P3 **N型カルシウムチャンネル阻害薬としてのジヒドロピリジンの鎮痛効果**
村上 学¹、中川西修²、萩原邦恵、森 豊樹、柳澤輝行、北村憲司⁵、
飯島俊彦¹、只野 武²
¹秋田大学医学部薬理、²東北薬科大学薬理、³東北大学医学部分子薬理、
⁴大塚製薬薬効開拓、⁵福岡歯科大学歯科薬理
Analgesic action of dihydropyridines blocking N-type calcium channels
Manabu Murakami, et al,
Department of Pharmacology, Akita University School of Medicine 44-48
- P4 **カプサイシン受容体 VR1 の PKC リン酸化部位の同定**
沼崎満子、富永 真琴
三重大学医学部第一生理学講座、筑波大学臨床医学系麻酔科
Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ
and identification of two target serine residues, Mitsuko Numazaki, et al
Department Physiology, Mie University School of Medicine 49-53
- P5 **催眠・鎮痛作用を有するウリジン N 位誘導体及びその関連化合物の作用メカニズム
(その3) オピオイド受容体との相互作用**
清水寛美¹、木村敏行¹、舟橋達也¹、渡辺和人¹、近藤繁美²、橘園臣²、Inb Kang³、
山本郁男
¹北陸大学薬学部、²日水製薬(株)、³ミシシッピ大医学部、
九州保健福祉大学保健科学部
Mechanism of uridine and arabinofuranosyluracil derivatives having analgesic and hypnotic
effects. T. O. O. O., T. O. O.,
Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University 54-56
- P6 **牛乳 β -ラクトグロブリン由来のニューロテンシンアゴニスト β -lactotensin の鎮痛作用**
山内玲奈、園田荘司、Anden insmaa、吉川正明
京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻
Antinociceptive activity of β -lactotensin, a neurotensin agonist derived from β -lactoglobulin
in bovine milk, Rena Amauchi, et al, Division of Food Bioscience and Biotechnology,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University 57-59
- P7 **ハロセン麻酔と血中タキキニン濃度の変動**
関山裕詩、角田俊信、澤村成史、富岡俊也、有田英子、花岡一雄
東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター
Serum tachykinins levels are not elevated during emergence from halothane-anesthesia
in normal rats. Hiroshi Sekiyama, et al, Department of Anesthesiology and Pain Relief

新規ノシセプチン由来ペプチドの発痛分子メカニズム

近藤沙織¹、川島敏子¹、井上誠¹、Richard G.Allen²、植田弘師¹

¹長崎大学医歯薬学総合研究科分子薬理学研究室

²Center for Research on Occupational and Environmental Toxicology (CRTO),
The Oregon Health Sciences University

In vivo signal transduction of novel prepronociceptin-derived peptides

Saori Kondo,¹ Toshiko Kawashima,¹ Makoto Inoue,¹ Richard G. Allen,² Hiroshi Ueda¹

¹Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan

²Division of CRTO, The Oregon Health Sciences University, USA

Summary : Prepro-nociceptin/orphanin F₁ 160-187, a C-terminal peptide of its prohormone was recently found to exist in the brain and spinal cord. However, little is known of its pharmacological actions and physiological roles in pain regulation. In a novel algogenic-induced nociceptive flexion (ANF) test in mice, we found the pharmacological mechanisms of C-terminal peptide-induced nociception were mediated via G_s-mediated mechanism through capsaicin insensitive fibers. On the other hand, nociceptin/orphanin F₁ (N/OF₁), heptadecapeptide is reported that this peptide metabolized by the activation of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15. I.p.l. administration of the C-terminal fragments of N/OF₁ elicited nociceptive actions, and of the C-terminal fragments, N/OF₁ (13-17), was found to be most potent. The nociceptive effects of N/OF₁ (13-17) were insensitive to N/OF₁ receptor (NOR) gene knock-out mice, indicating that N/OF₁ (13-17)-induced nociception is mediated by a novel mechanism independent of activation of NOR. Like N/OF₁, N/OF₁ (13-17)-induced nociception was completely abolished by PTX, indicating the involvement of G_i in this signaling mechanism. Moreover, NK1 receptor antagonist CP-99994 effectively blocked the nociception induced by N/OF₁ (13-17) indicating that N/OF₁ (13-17) may elicit the nociceptive responses through an SP release from nociceptor endings via activation of G_i. These results suggest that two novel neuropeptides derived from prepro N/OF₁ have different mechanisms underlying algogenic actions in the ANF test, and the C-terminal peptide mediates G_s activation unlike both N/OF₁ and its fragment N/OF₁ (13-17).

緒言

ノシセプチン¹⁾やノシスタチンは、ノシセプチン前駆体由来の生理活性ペプチドとして広く知られており、疼痛制御機構において重

要な役割を果たしていると考えられている。近年、この前駆体のカルボキシル末端側から生成される新たな生理活性ペプチドとして、プレプロノシセプチン 160-187^{2),3)}が発見され、疼痛制御における薬理学的作用、及び生理

的役割が注目されている。又、ノシセプチンはある条件下でアミノペプチダーゼ N により Phe¹-Gly² 結合が、エンドペプチダーゼ 24.15 により Ala⁷-Arg⁸、Ala¹¹-Arg¹² および Ala¹²-Lys¹³ 結合が切断され、それに伴い分解フラグメントが生じることが報告されている。今回、発痛物質誘発性屈曲反射試験法を用い、二種の新規ノシセプチン前駆体由来ペプチドであるノシセプチン (13-17)⁴⁾、及びプレプロノシセプチン 160-187 の疼痛制御機構における役割を解析した。

実験方法

発痛物質誘発性屈曲反射試験法

マウスを柔らかい布製の袋に入れ、布にあけた穴から四肢を出しそれぞれの肢に糸を取り付けた。右後肢に取り付けた糸はアイソトニックトランスデューサーに連結し、それに接続されたレコーダーを利用して屈曲反射の軌跡を記録した。他の三肢に取り付けた糸は床に固定しマウスを空中に浮かせた状態で保持した。マウスの右後肢足蹠皮下にカニューレを挿入しこれより薬物を投与し数秒以内に生じる屈曲反応を侵害反応として評価した。

結果

発痛物質誘発性屈曲反射試験法において、ノシセプチン (13-17) およびプレプロノシセプチン 160-187 は用量依存的な侵害性反応を誘発した。この侵害反応について疼痛制御機構を解析した結果、両薬物によって誘発される侵害反応は、ノシセプチン受容体遺伝子欠損あるいは受容体拮抗薬による影響を受けなかった。又、ノシセプチン (13-17) 10 amol の繰り返し投与によって得られた安定した侵害反応は、百日咳

毒素 (PTX) 10 ng、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害薬、及び NK1 拮抗薬 (CP-99994) 1 pmol の前処置によって完全に抑制され、これはノシセプチン誘発性の反応と同様の結果であった (Fig.1-A)。一方、プレプロノシセプチン 160-187 (1 pmol) による侵害反応は、これらの阻害薬による影響を受けず、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) 阻害薬 (3 nmol) の投与により抑制された (Fig.1-B)。又、新生仔カプサイシン処理マウスにおいては、ノシセプチン (13-17) 反応は完全に消失した。一方、プレプロノシセプチン 160-187 反応は、このマウスにおいても対照マウスと同様の反応が観察された (Fig.2)。

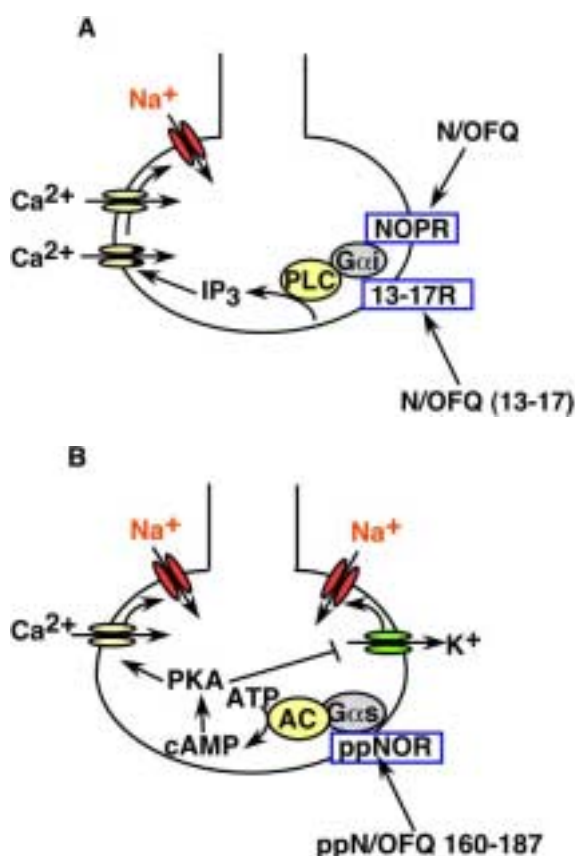


Fig.1 Schematic model of in vivo signal transduction of N/OF, N/OF (13-17) (A), and ppN/OF 160-187 (B) at the nociceptor endings

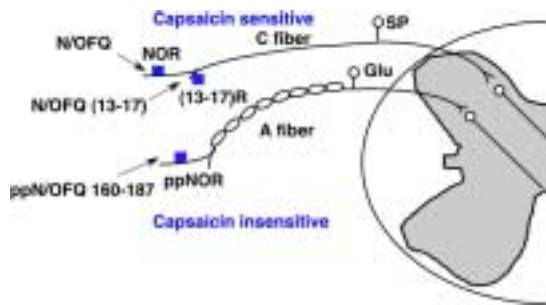


Fig.2 Schematic model of in vivo signaling induced by novel prepronociceptin-derived peptides in primary afferent neuron

考察

本研究では、ノシセプチン受容体遺伝子欠損あるいは受容体拮抗薬を用いることにより、ノシセプチン(13-17)及びプレプロノシセプチン160-187によって誘発される侵害反応は、ノシセプチンとは異なる受容体に作用することが明らかになった。更にノシセプチン(13-17)は、ノシセプチンと同様にポリモーダルC線維に作用し、Gi蛋白の活性化とSPの遊離を介して侵害作用を引き起こすのに対して、プレプロノシセプチン160-187はカプサイシン非感受性の侵害線維(A δ 線維など)に作用し、PKAを介して侵害反応を誘発することが明らかになった。

引用文献

- 1) Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, immer A, Ueda H. Nociceptin/orphanin F -induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 95 (18):10949-10953, 1998
- 2) Connor M, Vaughan CW, Jennings EA, Allen RG, Christie MJ. Nociceptin, Phe (1) psi-nociceptin(1-13), nocistatin and prepro-nociceptin (154-181) effects on calcium channel currents and a potassium current in rat locus coeruleus in vitro. Br J Pharmacol, 128 (8):1779-1787, 1999
- 3) Mathis JP, Rossi GC, Pellegrino MJ, Jimenez C, Pasternak GW, Allen RG. Carboxyl terminal peptides derived from prepro-orphanin F /nociceptin (ppOF /N) are produced in the hypothalamus and possess analgesic bioactives. Brain Res. 23;895(1-2):89-94, 2001
- 4) Inoue M, Matsunaga S, Rashid MH, oshida A, Mizuno K, Sakurada T, Takeshima H, Ueda H. Pronociceptive Effects of nociceptin/Orphanin F (13-17) at peripheral and spinal level in mice. J Parmacol Exp Ther. 299 (1):213-219, 2001

新奇環境における情動行動に対するノシセプチンの効果

松縄保宏、亀井淳三
星薬科大学薬物治療学教室

Effect of nociceptin on the exploratory behaviors of mice on a hole-board

Yasuhiro Matsunawa, Junzo Kamei

Department of Pathophysiology Therapeutics, Hoshi University
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan.

Summary: Nociceptin (1-5 nmol, i.c.v.) produced dose-dependent anxiogenic effect in mice. Anxiogenic effect of nociceptin was antagonized by either nocistatin, an ORL-1 receptor antagonist, or 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist. These results suggest that anxiogenic effect of nociceptin may be mediated by the inhibition of serotonergic functions followed by the activation of ORL-1 receptors.

緒言

ノシセプチンは中枢神経系に内在する 17 アミノ酸ペプチドであり、構造的にはオピオイドペプチドに非常に類似しているが、従来のオピオイド受容体 (μ 、 κ 、 δ 受容体) にはほとんど親和性を示さず、opioid receptor like-1 (ORL-1) 受容体に対し選択的に結合する。不安やうつといった情動性との密接な関係が多数報告されている脳内セロトニン (5-HT) の遊離をノシセプチンが抑制するといった報告があり¹⁾、さらに、このノシセプチンをマウスやラットに脳室内投与すると、高架十字迷路やコンフリクト試験において抗不安作用を示すことが報告されている²⁾。以上のことから、内因性のノシセプチンが情動性の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、ノシセプチンは侵害刺激反応や自発運動量に対して、用量により相反する作用を示すことが報告されている³⁾⁴⁾。したがって、ノシセプチンは用量により情動行動に対しても、異なった修飾作用を示す可能性が考えられる。そこで本研究では、hole-board 試験を用いて情動行動に対するノシセプチンの影響について検討した。また、ノシ

セプチンの情動行動に対する作用が 5-HT 神経系、特に 5-HT_{1A} 受容体を介したものであるかについても併せて検討した。

実験方法

実験動物

実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。

hole-board 試験

情動行動は自動 hole-board 試験装置を用いて 5 分間測定した。測定項目としては、総行動距離、立ち上がりの回数および時間、head-dip 行動の回数、時間および潜時とし、特に head-dip 行動の変化を不安の指標として用いた。

5-HT および 5-HIAA の測定

Hole-board 試験終了後、直ちに摘出、分画したマウスの前脳、海馬、扁桃核、中脳をそれぞれホモジナイズし、HPLC により 5-HT および 5-HT の代謝物である 5-HIAA の濃度を測定した。5-HT 代謝回転は 5-HIAA/5-HT を算出することで評価した。

使用薬物

ノシセプチンは測定 30 分前に脳室内に投与し、ノシスタチン (ORL-1 受容体拮抗薬) はノシセプチン投与の直前に脳室内投与した。また、WA 100635 (5-HT_{1A} 受容体拮抗薬) および 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} 受容体作動薬) はノシセプチン投与 15 分前に腹腔内投与した。

結果

低用量のノシセプチン (0.01nmol) 投与により head-dip 回数および時間は saline 処置群と比較して有意に増加した。それに対し、高用量のノシセプチン (1 – 5nmol) 投与により head-dip 回数および時間は saline 処置群と比較して、用量依存的な減少を示し、5nmol のノシセプチン投与群においては、head-dip 回数の有意な減少が認められた (Fig. 1)。

低用量のノシセプチン (0.01nmol) 投与によって認められた head-dip 回数と時間の増加および高用量のノシセプチン (5nmol) 投与によって認められた head-dip 回数と時間の減少はともに、ノシスタチン (5nmol) により有意に拮抗された (Fig. 2)。

低用量のノシセプチン (0.01nmol) 投与によって認められた head-dip 回数の増加および head-dip 時間の増加は WA 100635 (0.03 – 0.3mg/kg) の併用により用量依存的かつ有意に拮抗された。一方、高用量のノシセプチン (5nmol) 投与によって認められた head-dip 回数の減少は 8-OH-DPAT (0.1 – 1μg/kg) の併用により用量依存的かつ有意に拮抗された。

海馬において、低用量のノシセプチン(0.01nmol) を投与することにより 5-HT 代謝回転の有意な亢進が認められた。一方、扁桃体においては、高用量のノシセプチン (5nmol) を投与することにより 5-HT 代謝回転の有意な抑制が認められた。しかし、前脳と中脳においては、ノシセ

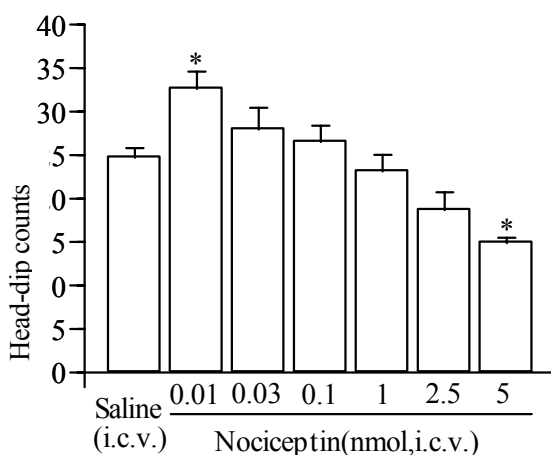


Figure 1. Effect of nociceptin on head-dip counts of mice tested in the hole-board test. Nociceptin (0.01 – 5 nmol, i.c.v.) or vehicle was injected 30 min prior to the measurement of exploratory behavior. Each column represents the mean with S.E.M. of 9 to 17 mice. *P<0.05 vs saline-treated group (open column).

プチンを投与しても 5-HT 代謝回転に有意な変化は認められなかった。

考察

低用量のノシセプチン (0.01nmol) 投与によって head-dip 行動の有意な増加が認められたことから、低用量のノシセプチンは抗不安作用を示すことが明らかとなり、この結果は過去の報告と一致するものであった。一方、高用量のノシセプチン (5nmol) 投与によって head-dip 行動の有意な減少が認められ、高用量のノシセプチンは不安惹起作用を有することが明らかとなった。以上のことから、侵害刺激反応や自発運動量と同様に、ノシセプチンは不安などの情動に対しても、用量によって相反する作用を示すことが明らかとなり、内因性のノシセプチンが情動の変化に一部関与している可能性が示唆された。また、低用量のノシセプチンによる抗不安作用および高用量のノシセプチンによる不安惹起作用が、ともにノシスタチンの併用により有意に拮抗されたことから、ノシセプチンは ORL-1 受容体を介して情動に対する調節を行

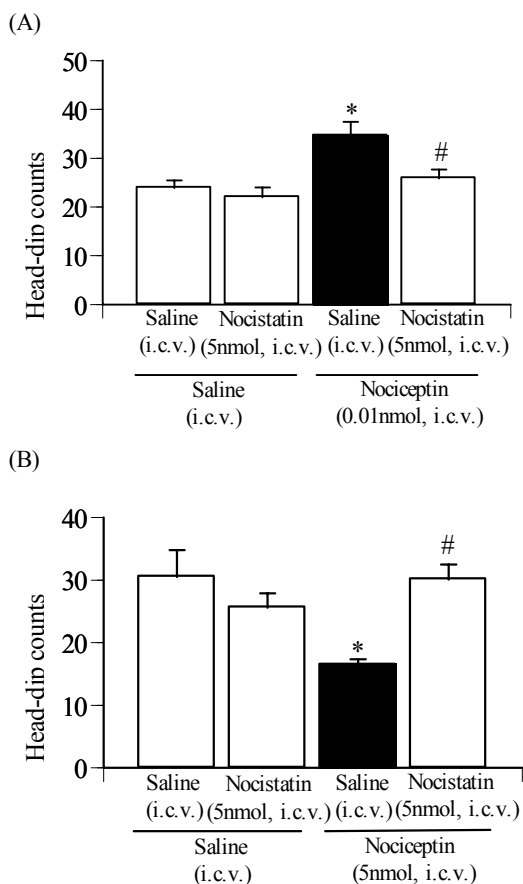


Figure 2. Effect of nocistatin on the nociceptin (0.01 nmol (A) and 5nmol (B), i.c.v.)-induced behavior responses of mice in the hole-board test. Nociceptin (0.01 nmol or 5nmol, i.c.v.) was administered 30 min before testing. Nocistatin (5nmol, i.c.v.) was given 15 min before nociceptin injection. Each column represents the mean with S.E.M. of 9 to 12 mice. * $P < 0.05$ vs saline-saline-treated group (open column). # $P < 0.05$ vs saline-nociceptin-treated group (closed column).

っていることが明らかとなった。低用量のノシセプチンによる抗不安作用が 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬である WA 100635 によって、また、高用量のノシセプチンによる不安惹起作用が 5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH-DPAT によってそれぞれ有意に拮抗された。以上のことから、ノシセプチンは 5-HT_{1A} 受容体を介して情動性に影響を与えていることが明らかとなった。さらに、低用量のノシセプチン投与により海馬での 5-HT 代謝回転の亢進、つまり 5-HT 神経

系の亢進が認められ、逆に、高用量のノシセプチン投与によって扁桃体での 5-HT 代謝回転の抑制、つまり 5-HT 神経系の抑制が認められた。過去に、ストレス負荷によって 5-HT の遊離促進や 5-HT 神経系の過活動が多数報告されているが⁵⁾、これらの結果はストレス等の不安を惹起するような状態に対する、生体内の順応もしくは防御機構と考えることができる。したがって、ORL-1 受容体を介したノシセプチンによる情動行動の変化は、その詳細な機序は依然として不明であるが、5-HT 神経活性を調節することにより二次的にシナプス後膜の 5-HT_{1A} 受容体を介し発現すると推察できる。

引用文献

1. Siniscalchi A, Rodi D, Beani L, Bianchi C. Inhibitory effect of nociceptin on [3H]-5-HT release from rat cerebral cortex slices. *Br J Pharmacology*. 128(1):119-123,1999
2. Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O, Orphanin F acts as an anxiolytic to attenuate behavioral response to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(26):14854-14858,1997
3. Inoue M, Shimohira I, Oshida A, Immer A, Takeshima H, Sakurada T, Ueda H. Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin F of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 291(1):308-313,1999
4. Civelli O, Northacker H.P., Reinscheid R. Reverse physiology: discovery of the novel neuropeptide orphanin F nociceptin. *Crit Rev Neurobiol*. 12:163-176,1998
5. Hashimoto S, Inoue T, Koyama T. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur J Pharmacol*. 378:23-30,1999

N型カルシウムチャネル阻害薬としてのジヒドロピリジンの鎮痛効果

村上 学¹、中川西修²、萩原邦恵³、森 豊樹⁴、丹野孝一²、只野 武²

¹秋田大・医・薬理、²東北薬大・薬理、³東北大学・医・分子薬理、⁴大塚製薬・薬効開拓

Analgesic action of dihydropyridines blocking N-type calcium channels

Manabu Murakami¹, samu Nakagawasai², Kunie agiwara, Toyoki Mori,
Koichi Tan-No², Takeshi Tadano²

¹Department of Pharmacology, Akita University School of Medicine,

²Department of Pharmacology, Tohoku Pharmaceutical University,

Department of Molecular Pharmacology, Tohoku University School of Medicine,

²nd Tokushima Institute of New Drug Research, tsuka, Pharmaceutical Co., td.,

Summary : We investigated the antinociceptive action of dihydropyridine (DHP) derivatives, which act on voltage-dependent calcium channels in mice. Further, we compared their pharmacological effects with toxins, which specifically inhibit N-(ω -conotoxin GVIA) or P/-(ω -agatoxin IVA) type calcium channels. Intrathecal injection of cilnidipine, pranidipine or amlodipine, which are thought to act on L- and N-type channels, significantly shortened the licking time in the late phase of a formalin test. On the contrary, nifedipine, which is another DHP derivative and acts exclusively on L-type channels, showed no effect. Toxins, which act either N-type (ω -conotoxin GVIA) or P/-(ω -agatoxin IVA) channels, also showed analgesic effects.

DHP analogues, which have analgesic effects, significantly suppressed the KCl-induced intracellular calcium changes ($[Ca^{2+}]_i$) increase in a dose-dependent fashion in DRG neurons, which are known to have L-, N-, P/-(ω -agatoxin IVA) and R-type channels. ω -conotoxin GVIA and ω -agatoxin IVA also showed inhibitory effects on the calcium-influx due to high KCl, suggesting that $[Ca^{2+}]_i$ measurement might be a tool for surveying antinociceptive effect of calcium channel antagonist.

Our results suggest that calcium channel antagonists exert their antinociceptive actions by blocking N-type calcium channels in the primary nociceptive afferent fibers, resulting in attenuation of synaptic transmission of nociceptive neurons.

緒言

型カルシウムチャンネルを阻害するジヒドロピリジン(P)系カルシウム拮抗薬は降圧治療の目的で広く臨床応用されている¹。近年になり、 Pアナログでありながら、型だけでなく、N型(o)カルシウムチャンネルにも作用するシルニジピン、アムロジピンが注目され^{2,3}、我々はこれらの鎮痛効果について報告してきた^{4,5}。このほかシルニジピンとの構造の類似性からプラニジピンも N 型チャンネル抑制作用があるのではないかと考えられている。われわれは N 型カルシウムチャンネルが神経終末に豊富に存在することから、痛覚一次繊維の神経終末における神経伝達物質のシナプス間隙への放出に関与すると考え、本研究では特にプラニジピンによる鎮痛効果、およびそのチャンネル抑制効果を中心に検討した。

実験方法

鎮痛作用

マウス(体重 23-25g)に各種薬剤を脊髄腔内投与し、10分後に右下肢底に2.0%フォルマリンを皮下注射し、疼痛反応を測定した。

細胞内カルシウム濃度の測定

脊髄後根神経細胞に蛍光カルシウム指示薬である fura-2AM を負荷し(1 μM, 60分室温)浜松フォトニクス製アルガス装置にて細胞内カルシウム濃度を測定した。

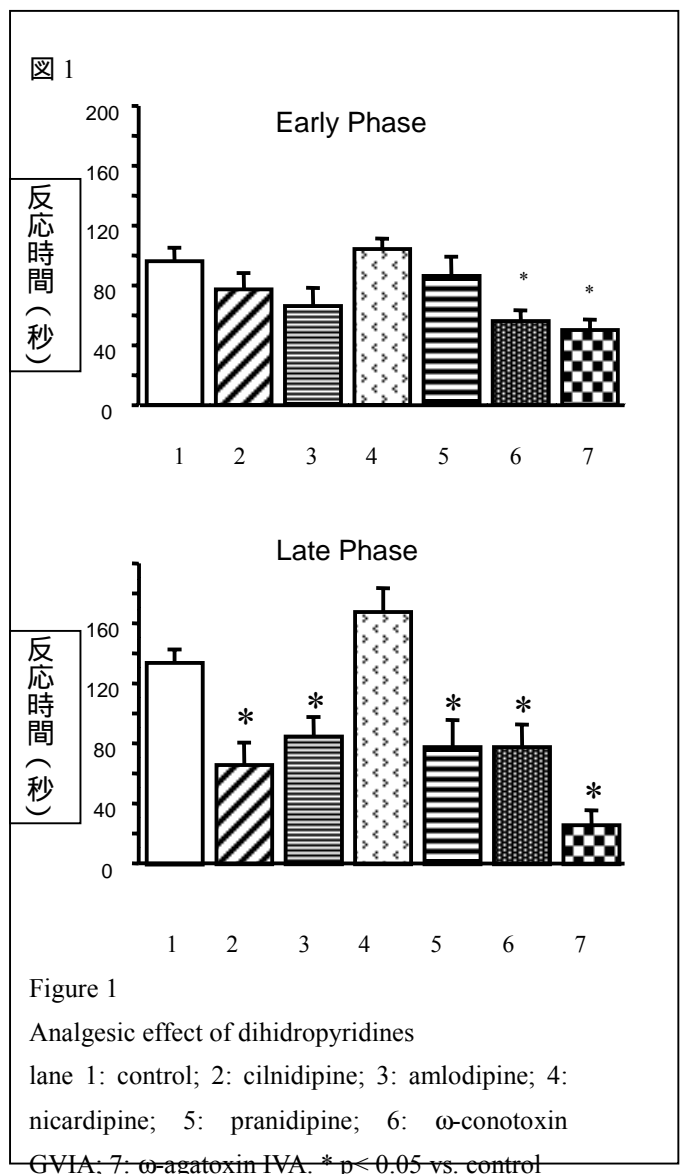
マウス脳膜分画を用いたω-conotoxin GVIA 結合阻害作用

マウス脳膜分画を用いてω-conotoxin GVIA 結合に対する阻害作用を検討した。

結果

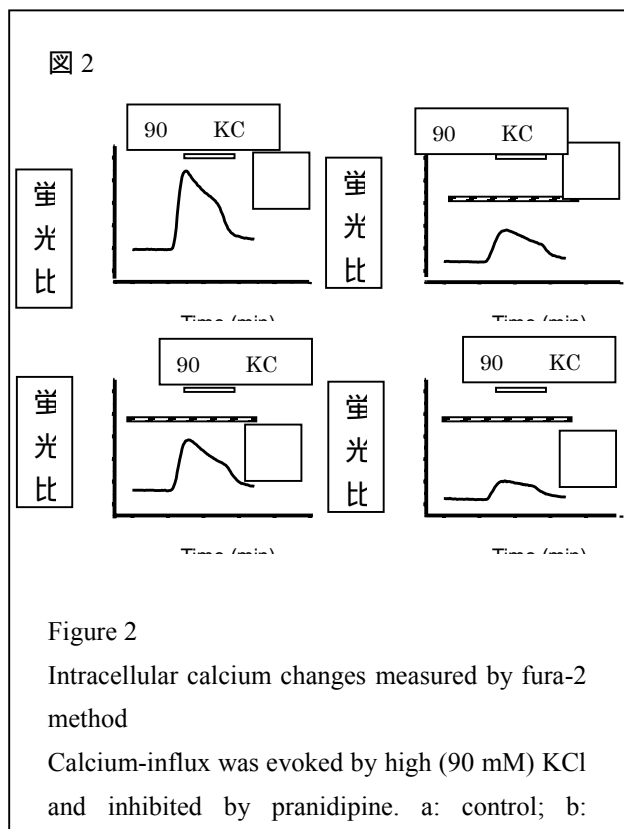
鎮痛作用

シルニジピン、アムロジピン、プラニジピン(各々300 o)は脊髄腔内投与により、有意な鎮痛効果を示した(図1)。これら薬物による鎮痛効果は後期反応でのみ認められた。一方、L 型チャンネルのみを選択的に阻害するニカルジピンは鎮痛効果を示さなかった。これに対し、特異的に N 型あるいは P 型チャンネルを抑制するω-conotoxin GVIA、ω-agatoxin IVA はそれぞれより低濃度(ω-conotoxin GVIA 0.5 o、ω-agatoxin IVA 0.02 o)で前期、後期反応とも有意な鎮痛効果を示した。



細胞内カルシウム濃度の測定

脊髄後根神経節には痛覚一次繊維の細胞体が存在するので、その神経細胞を単離培養し、下記の実験を行った。本実験の目的として、複雑な制御機構が存在する生体ではなく、より単純かつ平易な方法で上記薬物の鎮痛効果のスクリーニング解析を試みた。後根神経節培養細胞において高濃度 KCl (90 mM) による脱分極刺激により、電位依存性カルシウムチャンネルを介するカルシウム流入が発生する。このカルシウム流入による細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光指示薬である fura-2 により、比較的平易に測定可能である⁶。そこで本研究では上記薬物、特にプラニジピンによるこのカルシウム流入に対する阻害程度と鎮痛効果との相関を調べた(図2)。



プラニジピンは濃度依存性に細胞内へのカルシウム流入を阻害した。その作用は 1 μM で

ピークに達した(75.6%抑制)。さらに高濃度のプラニジピンも試みたが、細胞内カルシウム流入を完全に阻害することはできなかった。このほか、L/N 型抑制作用を示すシルニジピンも同様の効果を示した。ω-conotoxin GVIA (1 μM) により 37.5%、ω-agatoxin IVA (0.1 μM) により 46.9%の細胞内カルシウム流入の抑制が認められたことから、N 型、および P/Q 型チャンネルを介するカルシウム流入はそれぞれ約 38%と 47%であると推定された。

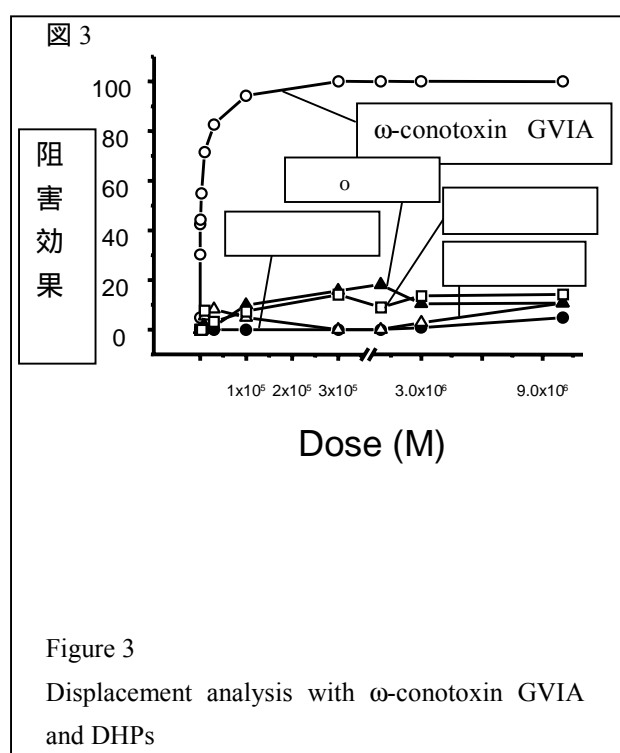
マウス脳膜分画を用いたω-conotoxin GVIA 結合阻害作用

上記鎮痛効果を示すジヒドロピリジン系薬物が N 型チャンネル阻害作用を介して鎮痛作用を示すと考えられることから、N 型チャンネルに対する特異的阻害剤である ω-conotoxin GVIA に対する結合阻害作用を検討した(図3)。

まず ω-conotoxin GVIA 自身による結合阻害効果であるが、ラット脳膜分画における研究と基本的には同様の知見が得られた⁷。Ki 値は 6.06×10^{-10} M であった。一方、すべての鎮痛実験に用いたジヒドロピリジン化合物は結合阻害効果を示さなかった(図3)。したがって、L/N 型ジヒドロピリジンは少なくともマウス脳においては ω-conotoxin GVIA とは N 型チャンネルの全く別の部位に結合すると考えられた。

シルニジピンは以前ラット脳膜分画を用いた研究で結合阻害効果が報告されているが⁷、その効果は弱く、我々のマウス脳膜分画を用いた実験では認められなかった。したがって、少なくともマウスにおいては N 型チャンネルに作用するジヒドロピリジンは ω-conotoxin GVIA の N 型チャンネル結合部位に影響を及ぼさない結合部位を有すると考えられる。このことは、鎮痛を目的にこれら薬剤を用いる上で重要と思われる。なぜなら、現在米国等で臨床応用、あるいは臨床試験段階にあるジコ

ノタイドは ω -conotoxin 類似のペプチドであり、有効濃度と副作用を起こす濃度との差が比較的近い、つまり振戦などの副作用を起こしやすいと考えられる。したがって、L/N 型ジヒドロピリジンをジコノタイドと同時投与、追加投与することにより、ジコノタイドの N 型チャンネルに対する結合に影響せずにその投与量を低下させることが可能と考えられ、相当程度ジコノタイドによる副作用の発生を抑えることが期待できる。



考察

今回、われわれはジヒドロピリジン、とくにプラニジピンを中心にその鎮痛効果、カルシウム流入抑制効果、 ω -conotoxin GVIA の N 型チャンネル結合に対する阻害作用について検討した。

ジヒドロピリジン系化合物による鎮痛効果は一部の薬物でのみ認められ、さらにその効果は後期反応でのみ認められた。シルニジピン、アムロジピンが L 型だけでなく、N 型カ

ルシウムチャンネルにも作用することから、おそらく N 型チャンネル抑制作用を有するジヒドロピリジン系化合物に限定した効果であると考えられる。

次に Fu 2 を用いたスクリーニングの可能性について検討する。イオンチャンネルの電気生理学的解析は 19 0 年代後半に始まったパッチクランプ法の開発に伴い、革命的に進歩した。しかし、パッチクランプ法は技術の習得が比較的困難であること、短期間での多数サンプルの検討に適さないことなどが問題である。これに対し、19 0 年代に T 1 のグループにより開始されたカルシウム蛍光指示薬 2 を用いた細胞内カルシウム濃度測定法 6 は比較的平易な方法であり、初心者でも一旦条件が安定すれば可能であり、短時間に多数の薬物を試すことが可能である。

本研究においても同方法でプラニジピンによる濃度依存性の効果が認められたことから、ある程度のスクリーニング効果は期待できると考えられた。しかし、N 型を特異的に抑制する ω -conotoxin GVIA により 37.5 %、P 型を特異的に抑制する ω -agatoxin IVA により 46.9 %しか細胞内カルシウム濃度を抑制できないのに対し、プラニジピンでは 75.6 %も抑制するのに、鎮痛効果はほぼ同等であるなど、一部鎮痛効果と解離する結果も得られた。これは神経情報伝達において神経終末に多く存在する N、P/ L 型チャンネルがより重要でありながら、細胞体に多く存在するのは L 型チャンネルであるためと考えられる。つまり、情報伝達にあまり関係のないチャンネルに対する効果まで測定してしまうためである。今後、L 型チャンネルを特異的に抑制するニカルジピンなどを前処置することなどにより、薬理的に N、P/ L 型チャンネルのみを検討することにより、この問題は解決可能であると思われる。

今後の課題

現在まで研究対象とされているジヒドロピリジン系化合物が L 型チャンネルに対する作用中心にスクリーニングされているため、L 型チャンネルに作用を有さないジヒドロピリジン系化合物は入手困難である。今後、N 型特異的に作用するジヒドロピリジン系化合物など、特徴をもったジヒドロピリジン系化合物の開発が望まれる。

参考文献

- 1) Fleckenstein A. Calcium Antagonists in Heart and Smooth Muscle: Experimental Faces and Therapeutic Prospects, New York: Wiley, 1963.
- 2) Fuji S, Kameyama K, Hosono M, Hayashi . and Kitamura K. Effect of cilnidipine, a novel dihydropyridine Ca²⁺-channel antagonist, on N-type Ca²⁺ channel in rat dorsal root ganglion neurons, J.Pharmacol. Exp. Ther., 280: 1184-1191, 1997.
- 3) Furukawa T, Nukada T, Suzuki K, Fujita ., Mori ., Nishimura M, Amanaka M. Voltage and pH dependent block of cloned N-type Ca²⁺ channels by amlodipine. Br. J. Pharmacol. 121: 1136-40, 1997.
- 4) Murakami M, Nakagawasai O, Fuji S, Hosono M, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, Okamura T, Suzuki T, Sasano H, anagisawa T, Tan-No K, Tadano T, Kitamura K, and Kisara K. Antinociceptive effect of cilnidipine, a novel N-type calcium channel antagonist, Brain Res., 868: 123-127, 2000.
- 5) Murakami M, Nakagawasai O, Fuji S, Kameyama K, Murakami S, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, anagisawa T, Tan-No K, Tadano T, Kitamura K, and Kisara K. Antinociceptive action of amlodipine blocking N-type Ca²⁺ channels at the primary afferent neurons in mice. Eur. J. Pharmacol., 419:175-181, 2001.
- 6) Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien R . A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J.Biol.Chem., 260: 3440-3450, 1985.
- 7) Hosono M, Fuji S, Hiruma T, Watanabe K, Hayashi ., Ohnishi H, Takata ., and Kato H. Inhibitory effect of cilnidipine on vascular sympathetic neurotransmission and subsequent vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. Jpn. J. Pharmacol. 69: 127-134, 1995.

カプサイシン受容体 VR1 の PKC によるリン酸化部位の同定

沼崎満子、富永真琴

三重大学医学部生理学第 1 講座、筑波大学臨床医学系麻酔科

Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by Protein Kinase C ϵ and Identification of Two Target Serine Residues

Mitsuko Numazaki, Makoto Tominaga

Department Physiology, Mie University School of Medicine

Department Anesthesiology, University of Tsukuba School of Medicine

Summary : The capsaicin receptor, VR1 is a six trans-membrane ion channel that serves as a polymodal detector of pain-producing chemical and physical stimuli. It has been reported that ATP, one of the inflammatory mediators potentiates the VR1 currents evoked by capsaicin or protons and reduces the temperature threshold for activation of VR1 in a PKC-dependent pathway, suggesting the phosphorylation of VR1 by PKC. In this study, direct phosphorylation of VR1 upon application of PMA was proven biochemically in cells expressing VR1. An *in vitro* kinase assay using GST fusion proteins with cytoplasmic segments of VR1 showed that both the first intracellular loop and carboxyl terminus of VR1 were phosphorylated by PKC ϵ . Patch-clamp analysis of the point mutants where Ser or Thr residues were replaced with Ala in the total 16 putative phosphorylation sites showed that two Ser residues, S502 and S800 were involved in the potentiation of the capsaicin-evoked currents by either PMA or ATP. In the cells expressing S502A/S800A double mutant, the temperature threshold for activation was not reduced upon PMA treatment. The two sites would be promising targets for the development of substance modulating VR1 function, thereby reducing pain.

緒言

カプサイシン受容体 VR1 はカプサイシン、熱、酸という痛み刺激を受容する 6 回膜貫通型イオンチャンネルである。痛みは炎症によって増強されるが、炎症関連メディエーターである ATP やブラジキニンがプロテインキナーゼ C (PKC) 依存的に VR1 活性を増大させることが報告されている^{1,2}。この効果には PKC による VR1 のリン酸化の関与が予想され、VR1 に

は計 16 ヶ所の PKC によるリン酸化候補部位が N 末端、第 1 細胞内ループおよび C 末端に存在する。そこで、PKC による VR1 のリン酸化の証明およびリン酸化部位の同定を試みた。

実験方法

In vivo phosphorylation assay: HEK293 細胞を 10% fetal bovine serum、ペニシリン、ストレプトマイシン、L-グルタメート添加 Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (SIGMA)で培養し、Lipofectamine plus reagent (Invitrogen)で rat VR1 plasmid DNA を導入した。非血清培地にて 36 時間培養し、 $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate (300 $\mu\text{Ci/ml}$)で標識した。(37 $^{\circ}\text{C}$, 3 時間) PMA (50ng/ml)で 10 分間刺激した後、TNE buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, complete EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche), phosphatase inhibitor mixture (Sigma)に懸濁し、100,000 $\times g$, 15 分間遠心した。ペレットを 1%Nonidet P-40 TNE buffer に懸濁し、100,000 $\times g$, 30 分間遠心後、上清に Protein A を加え preclear を行った。rabbit anti-rat VR1 抗体 1 μg を加え 4 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間反応後、anti-rabbit IgG を追加し、1 時間反応させた。上記の免疫沈降によって得られた蛋白を SDS-PAGE に展開し、オートラジオグラフィで検出した。

In vitro kinase assay: VR1 の細胞内ドメイン(N 末端、第 1 細胞内ループ、C 末端)を PCR にて作成し、pGEX vector (Amersham Biosciences)にサブクローニングした。VR1 の各細胞内ドメインの GST 融合蛋白質を Amersham Biosciences 社の方法に準じて精製した。これらの蛋白質を以下の反応液 (20mM Tris-HCl, 0.01%Triton-X, 100mM MgCl_2 , 200 $\mu\text{g/ml}$ phosphatidylserine, 10 μM ATP, 0.5mM CaCl_2 , 0.25% bovine serum albumine, 0.5mM dithiothreitol, 1 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$)に 0.04unit PKC ϵ を加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間反応させた。SDS-PAGE に展開し、オートラジオグラフィで検出した。

電気生理学的解析: PCR 法を用いて VR1 の点変異体を作成し、pcDNA3 vector にサブクローニングした。これらの VR1 点変異体プラスミドおよび Green Fluorescent Protein (GFP) cDNA を Lipofectamine plus reagent (Invitrogen)で HEK293 細胞に導入し、1-2 日後にパッチクランプ法を用いて全細胞膜電流記録を行った。

細胞外液の組成は、140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose で NaOH で pH7.4 に調整した。細胞内液の組成は、140 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA で NaOH

で pH7.4 に調整した。

結果

VR1 を発現した HEK293 細胞を $[^{32}\text{P}]$ orthophosphate で標識し、PKC を直接活性化させる PMA で刺激したところ、膜分画から抗 VR1 抗体で免疫沈降した蛋白質での ^{32}P の取り込みが上昇し、細胞レベルでの PKC による VR1 のリン酸化が確認された。(Fig.1A)

VR1 には細胞内ドメインのうち N 末端、第 1 細胞内ループ、C 末端に計 16 ヶ所の PKC によるリン酸化の候補部位が存在する。(Fig.1B) これらの GST 融合蛋白質を用いて *In vitro* kinase assay を行ったところ、第 1 細胞内ループと C 末端において ^{32}P の取り込みを認めた。(Fig.1C)

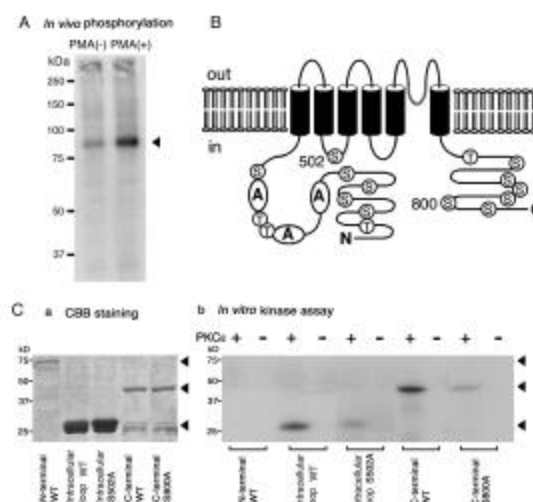


Fig. 1. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of VR1 by PMA or PKC ϵ . (A) PMA induced phosphorylation of VR1 *in vivo*. An arrow head indicates the expected size of VR1. (B) Positions of Ser and Thr residues sensitive to PKC-dependent phosphorylation in the VR1 channel are shown in the context of a putative transmembrane topology model. (C) a CBB staining of the GST-VR1 fusion proteins shows nearly equal amount of proteins were loaded in the gel. Arrow heads indicate the expected size for GST fusion proteins with N-terminus, the first intracellular loop and C-terminus of VR1. b *In vitro* kinase assays with GST-VR1 fusion proteins (wild type and the indicated point mutants) as substrates. Arrow heads indicate the expected size for GST-VR1 fusion proteins.

第1細胞内ループとC末端には16ヶ所のうち8ヶ所の候補部位が存在し、これらのセリンおよびスレオニンをアラニンに置換した点変異体を用いて電気生理学的解析を行った。野生型では20 nMのカプサイシンにより小さな内向き電流が観察され、細胞外カルシウム非存在下ではカプサイシンの繰り返し投与によって活性化電流の大きさは変化しない。一方、100 nM PMAの1分間の前投与により同量のカプサイシンによる活性化電流は大きく増大する。野生型や他の点変異体と比べて502番目のセリンと800番目のセリンの点変異体ではPMAによるカプサイシン活性化電流の増大が有意に小さくなった。(Fig.2)

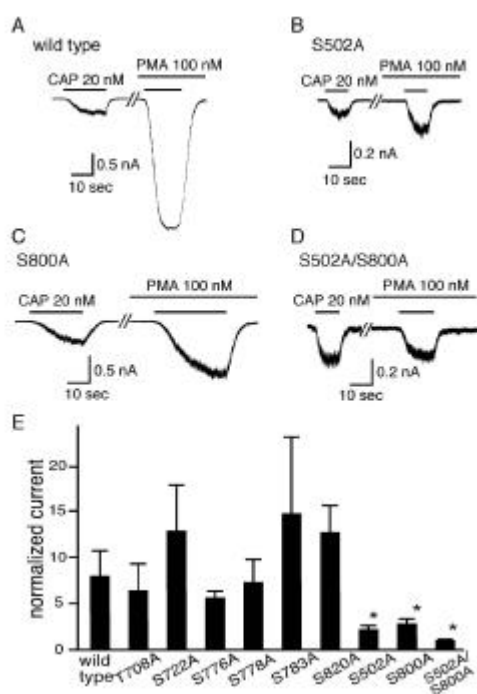


Fig. 2. **Two Ser residues are involved in phosphorylation of VR1 by PMA.** (A - D) Representative traces of increase of capsaicin (CAP)-activated currents in transfected HEK293 cells expressing wild type (A) and mutants (B - D) of VR1. PMA (100 nM) increased the currents a little in S502A and S800A mutants (B and C) whereas PMA greatly increased the current in wild type VR1 (A). PMA did not increase the current in a S502A/S800A double mutant (D). Currents initially activated by capsaicin (20 nM) were 330 ± 52 pA (mean \pm SEM) (30 - 1600 pA) without any

significant change in the wild type and the mutants. Positions S502 and S800 were shown in Fig.1 B. Cells were perfused for 1 min with solution containing PMA before exposure to capsaicin. Holding potential was -60 mV. (E) Effects of PMA on the capsaicin-activated currents in HEK293 cells expressing wild type and point mutants of VR1. Currents were normalized to the currents evoked initially by capsaicin (20 nM) before application of PMA and the normalized values represent the mean \pm SEM. Normalized currents were 7.95 ± 2.72 (n = 8), 6.36 ± 2.92 (n = 5), 12.8 ± 4.94 (n = 8), 5.58 ± 0.74 (n = 5), 7.24 ± 2.47 (n = 5), 14.6 ± 8.27 (n = 5), 12.6 ± 2.91 (n = 8), 2.13 ± 0.41 (n = 9), 2.76 ± 0.52 (n = 11) and 0.95 ± 0.04 (n = 7) for wild type, T708A, S722A, S776A, S778A, S783A, S820A, S502A, S800A and S502/S800A, respectively. *, p < 0.05 vs. wild type; one-way ANOVA and two-tailed unpaired t test.

また、ATPでも同様に野生型で見られるカプサイシン活性化電流の増大がこれらの点変異体では見られなかった。(Fig.3)

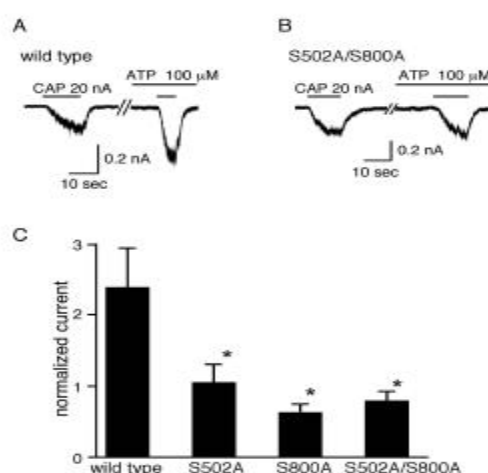


Fig. 3. **Two Ser residues are involved in phosphorylation of VR1 by PKC ϵ .** (A and B) Representative traces of increase of capsaicin (CAP)-activated currents in transfected HEK293 cells expressing wild type (A) and S502A/S800A mutant (B) of VR1. ATP (100 μ M) did not increase the currents in S502A/S800A mutant (B) whereas ATP increased the current in wild type VR1 (A). Cells were perfused for 1 min with solution containing ATP before exposure to capsaicin. Holding potential was -60 mV. (C) Effects of ATP on the capsaicin-activated currents in HEK293 cells expressing wild type and point mutants of VR1. Currents were normalized to the currents evoked initially by capsaicin (20 nM) before application of ATP and the normalized values represent the mean \pm SEM. Normalized currents were 2.61 ± 0.19 (n = 7), 1.05 ± 0.24 (n = 7), 0.63 ± 0.10 (n = 6) and 0.79 ± 0.12 (n = 7) for wild type, S502A, S800A and S502/S800A, respectively. *, p < 0.05 vs. wild type; two-tailed unpaired t test.

In vitro kinase assay においても 502 番目のセリンと 800 番目のセリンをアラニンに置換した GST 融合蛋白質では野生型に比べて ^{32}P の取り込みが減少し、リン酸化の減少が確認された。

VR1 の活性化温度閾値についても、野生型では PMA 存在下で約 42°C から約 32 度まで低下したが、S502A/S800A では活性化温度閾値は PMA 投与によって変化しなかった。(Fig.4)

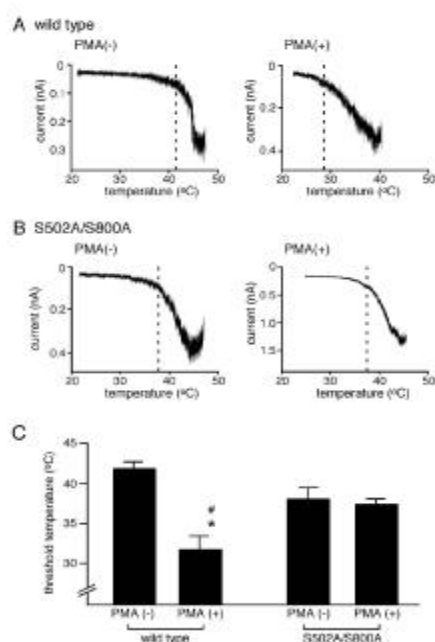


Fig. 4. Thermal sensitivity is increased by PMA in wild type VR1, but not in S502A/S800A mutant. (A) Representative temperature-response profiles of heat-activated currents obtained by a temperature ramp in wild type VR1 without (left) and with (right) PMA treatment. Temperature-response profiles were made with only current responses during the heat stimulation. Dashed lines show the threshold temperature for heat activation of VR1. Holding potential was -60 mV. (B) Representative temperature-response profiles of heat-activated currents in a S502A/S800A mutant without (left) and with (right) PMA treatment. (C) Temperature threshold for activation of wild type VR1 in the presence of PMA ($31.8 \pm 1.6^\circ\text{C}$, $n = 4$) was significantly lower than that in the absence of PMA ($41.9 \pm 0.9^\circ\text{C}$, $n = 3$). *, $p < 0.005$ vs. wild type without PMA; #, $p < 0.05$ vs. S502A/S800A without or with PMA; two-tailed unpaired t test. There was no significant difference in temperature threshold for activation of S502A/S800A mutant ($38.0 \pm 1.4^\circ\text{C}$, $n = 7$, and $37.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$, $n = 9$, with and without PMA treatment, respectively, $p = 0.7$; two-tailed unpaired t test). Threshold was defined as a temperature at which clear current increase was observed in the temperature-response profile.

考察

炎症性疼痛の発生メカニズムの1つとしてとして感覚神経終末に発現したイオンチャネルの感作が挙げられる。VR1 は感覚神経特異的に発現するイオンチャネル型受容体でカプサイシン、熱、プロトンという複数の痛み刺激を受容する^{3,4}。VR1 は炎症関連メディエーターである細胞外ATPやブラジキニンにより活性化温度閾値が体温以下に低下することが報告されており¹²、新たな疼痛発生メカニズムとして注目されている。いずれも代謝型受容体に作用し phospholipase C 活性化・PKC 活性化を介することが知られており、PKC は VR1 を活性化することが報告されている^{5,6}。今回の結果はこれらの報告に一致し、このシステムにおいて PKC が重要な役割を果たすことが示された。PKC のアイソフォームのうち特に PKC β は疼痛感作に関与することが報告されており^{7,8}、今回の結果においても PKC β による VR1 のリン酸化が確認された。PMA によるカプサイシン活性化電流の増大が 502 番目のセリンおよび 800 番目のセリンの点変異体では有意に小さくなることから PKC の基質がこれらのセリンであることが示唆される。一方、PMA にはフォスファチジルイノシトール 2 リン酸による VR1 の抑制を阻害するという報告があり⁹、PMA の効果について PKC を介さない系の関与を否定できない。そこで生理的的刺激である ATP での反応についても検討したところ、ATP によるカプサイシン活性化電流の増大もこの点変異体 (S502A/S800A) では観察されなかった。より生理的な条件下においても PKC のリン酸化にこれらのセリン残基が関与することが強く示唆された。また、VR1 の活性化温度閾値の低下もこの点変異体では見られないことから、これらのセリン残基のリン酸化が炎症性疼痛の発生メカニズムに大きく関与すると思われる、新たな鎮痛薬のターゲットなることが期待される。

参考文献

- (1) Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5;98(12):6951-6, 2001
- (2) Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol*. 88(1):544-8, 2002
- (3) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 23;389(6653):816-24, 1997
- (4) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21(3):531-43, 1998
- (5) Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*. 21-28;408(6815):985-90, 2000
- (6) Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*. 1;534(Pt 3):813-25, 2001
- (7) Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*. 23(3):617-24, 1999
- (8) Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci*. 15;20(12):4680-5, 2000
- (9) Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature*. 21;411(6840):957-62, 2001
- (10) Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*. 19;277(16):13375-8, 2002

催眠・鎮痛作用を有するウリジン N³位誘導体及び その関連化合物の作用メカニズム (その3) - オピオイド受容体との相互作用 -

清水寛美¹、木村敏行¹、舟橋達也¹、渡辺和人¹、近藤繁美²、橘園臣²、
Ing Kang Ho³、山本郁男⁴、

¹北陸大学薬学部衛生化学教室、²日水製薬(株)、³ミシシッピ大学医学部薬毒理学教室、
⁴九州保健福祉大・保健科学部

Mechanism of uridine and arabinofuranosyluracil derivatives having analgesic and hypnotic effects - Their interactions with opioid receptors -

Tomomi Shimizu¹, Toshiyuki Kimura¹, Tatsuya Funahashi¹, Kazuhito Watanabe¹, Shigemi Kondo²,
Kunio Tachibana², Ing Kang Ho³ and Ikuo Yamamoto⁴

Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University¹,
Nissui Pharmaceutical Co., Ltd²., Department of Pharmacology and Toxicology, University
of Mississippi Medical Center³, Faculty of Health Sciences, Kyushu University of Health
and Welfare⁴

Summary: Uridine is one of sleep-promoting substances. We revealed that hypnotic activities of uridine derivatives were mediated through uridine receptor. In addition, we have found for the first time that these derivatives also exerted analgesic effect on mice by intracerebroventricular (i.c.v.) administration. ³-(2,4- and 2,5-Dimethoxyphenacyl)arabinofuranosyluracil exhibited the strong analgesic effects among uridine and arabinofuranosyluracil derivatives synthesized, but the affinities of these derivatives to uridine receptor were quite low. Moreover, the analgesic effects of these derivatives were antagonized by naloxone. In the present study, the interaction of uridine and arabinofuranosyluracil derivatives with opioid receptor assay was also studied. Scatchard analyses utilizing ³-(2,4- and 2,5-dimethoxyphenacyl)arabinofuranosyluracil had not revealed the apparent interaction of these derivatives to opioid receptors (μ , κ and δ -receptor). These results suggest that uridine and opioid receptors have not been involved significantly in the analgesic effect of uridine and arabinofuranosyluracil derivatives.

緒言

我々は核酸であり内因性睡眠物質として知られるウリジン(Ud)の N³位置換体が催眠の他、マウス脳室内投与による鎮痛作用を有することを既に報告した^{1,2)}。これまでに内因性睡眠物質である Delta sleep inducing peptides (DSIP)、Prostaglandin

D₂ (PG D₂)及びOxidized glutathione (GSSG)には鎮痛作用が報告されている。また、核酸であるアデノシンやアデノシン関連物質である Adenosine triphosphate (ATP) にもその作用が確認されており、これら鎮痛作用メカニズムの詳細は各々異なるものの、一部の物質には共通した

オピオイド受容体への直接的あるいは間接的な関与が知られている³⁻⁵⁾。そこで先にウリジン誘導体の鎮痛作用メカニズム追究の一貫として催眠作用との比較を行ったところ、両作用間には相関性は認められなかった。更に、ウリジン N^{β} 位置換体の催眠作用に関わる特異的な受容体、ウリジン受容体⁶⁾の関与についても検討したが相関は認められなかった。そこでオピオイド受容体との関連を明確にするため、ウリジン N^{β} 位置換体の中で強い鎮痛作用を有する N^{β} -(2',4'-及び2',5'-ジメトキシフェナシル)アラビノフラノシルウラシル (N^{β} -(2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc)AraU)を用い鎮痛作用におけるナロキソン拮抗作用を評価した。その結果、有意な拮抗作用が認められ⁷⁾、ウリジン N^{β} 位置換体の鎮痛作用に一部オピオイド受容体(μ 及び κ 受容体)の関与が示唆された。

今回、特に N^{β} -(2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc)AraU を選びウリジン受容体及び κ 受容体を含むオピオイド受容体についてスキッチャード解析を行い、オピオイド受容体の関与があるか否かをより詳細に検討した。

方法

鎮痛作用

ddY 系雄性マウス(体重 23-28g)を用い、各試験化合物は 1% Tween-80 生理食塩液に溶解した。

試験化合物は 500 nmol/mouse の用量で脳室内(i.c.v.)投与し 15 分後、Hot plate 法により鎮痛活性を測定した。Cut off time は 60 秒とし、Analgasic effect (%) = [(test latency - control latency) / (60 sec - control latency)] x 100 の式により算出した。

受容体結合実験

[³H] N^{β} -フェナシルウリジン(N^{β} -PhAcUd) 結合阻害実験: 常法に従いウシ視床から得たシナ

プス膜を用いリガンドを [³H] N^{β} -PhAcUd として、各試験化合物 100 nM 添加による結合阻害能を比較検討した。

[³H]DAMGO(μ)、 [³H]DPDPE(κ) 及び [³H]U-69,593(σ)結合阻害実験: ラット大脳から得たシナプス膜画分を用い、オピオイド μ 、 κ 及び σ 受容体に対し各々 [³H] DAMGO、 [³H]DPDPE 及び [³H]U-69,593 をリガンドとし、試験化合物 100 nM 添加時における各リガンドの結合量を測定、更にスキッチャード解析を行った。

結果及び考察

N^{β} -(2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc)AraU は催眠作用を最大にもつ N^{β} -PhAcUd と比較し、より強い鎮痛作用を示した (Fig. 1)。

これら誘導体のウリジン受容体に対する作用について受容体結合実験を行った結果、 N^{β} -PhAcUd と比較し N^{β} -(2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc)AraU はウリジン受容体に対しその関与が少ないことが明らかとなった (Table 1)。

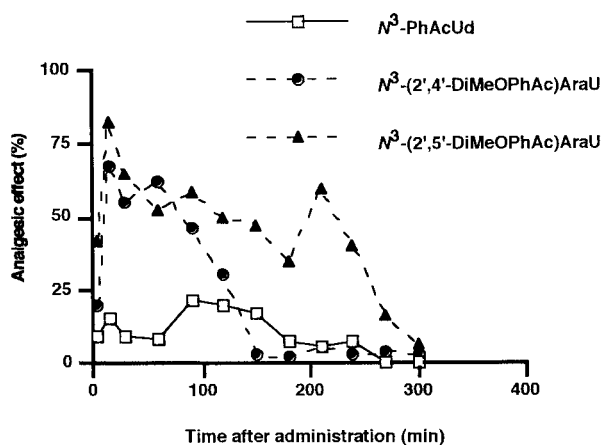


Fig. 1 Analgesic effects of N^{β} -substituted uridine and arabinofuranosyluracil on the hot plate test by i.c.v. injection to mice.

Table 1 Specific [³H]N^β-PhAcUd binding to synaptic membranes.

Compounds	Specific [³ H]N ^β -PhAcUd binding to synaptic membranes ^{a)} (% of control)
N ^β -PhAcUd	23
N ^β -(2',4'-DiMeOPhAc)AraU	52
N ^β -(2',5'-DiMeOPhAc)AraU	51

a) Specific [³H]N^β-PhAcUd binding is expressed % of the control specific binding in the presence of compound (100 nM).

Table 2 Inhibitory effects of uridine and arabinofuranosyluracil derivatives on specific binding of [³H]DAMGO(μ), [³H]DPDPE(δ) or [³H]U-69,593(κ) to opioid receptors.

Compounds ^{a)}	μ		δ				κ			
	Kd ^{b)}	B _{max} ^{c)}	Kd ^{b)}	B _{max} ^{c)}	Kd ^{b)}	B _{max} ^{c)}	Kd ^{b)}	B _{max} ^{c)}		
Control	35.7	3.2	1230	55	11.1	1.6	208	16	4.5	30
³ -PhAcUd	31.3	5.0	750	145**	14.3	0.6	198	18	4.8	28
³ -(2,4-DiMeOPhAc)AraU	35.7	4.1	505	135**	9.5	2.0	131	4**	4.4	25
³ -(2,5-DiMeOPhAc)AraU	34.5	4.5	840	80*	8.5	0.5	89	6**	4.5	29

a) The concentration of the derivatives added was 100μM. b) nM c) fmol/mg protein * and ** indicate significant difference from control at the level of <0.05 and <0.01, respectively.

オピオイド受容体の関与についてはμ、及び受容体に対する受容体結合実験を行った。その結果、μあるいは受容体に対しウリジン誘導体である2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc体、また同置換基を有するアラビノフラノシルウラシル誘導体において阻害傾向が認められた。そこで更にN^β-PhAcUd及びN^β-(2',4'-及び2',5'-DiMeOPhAc)AraUにおいてスキッチャード解析を行ったところ、μ、及び受容体においてコントロールと比較しKd値には何ら影響が認められなかったものの、B_{max}を比較したところμ及び受容体に対して各誘導体に有意な低下が認められた (Table 2)。しかし、基質濃度が100 nMと高濃度であったことからそれらの相互作用は弱く、オピオイド受容体はウリジン誘導体の鎮痛作用発現に主要となる役割を演じていないと推察された。

以上の結果から、鎮痛作用を有するウリジン関連誘導体はウリジン受容体を介さない、つまり催眠とは異なるメカニズムにおいて作用を発現し

ていることが明らかとなった。また、これらの鎮痛作用へのオピオイド受容体の直接的な関与が少ないことも示唆され、今後、更なるウリジン誘導体の特異的な鎮痛メカニズム追究が必要である。

参考文献

- 1) 木村敏行, 清水寛美, 山本郁男 他, 第21回 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(長崎)講演要旨, pp 93-96 (2000).
- 2) 清水寛美, 木村敏行, 山本郁男 他, 日本薬学会 第121回年会講演要旨3(札幌), p 56 (2001).
- 3) 井上昌次郎, 山本郁男編 “睡眠のメカニズム” 塩見浩人, 睡眠誘発機構と痛覚制御機構 睡眠誘発へのオピオイドペプチドの関与-, 朝倉書店, pp 74-102 (1997).
- 4) Fukui, M., Nakagawa, T., Minami, M., Satoh, M., Antinociceptive effects of intracerebroventricularly administered P2 purinoceptor agonists in the rat. *Brain Res* 91, 25-31 (2001).
- 5) Fukui, M., Nakagawa, T., Minami, M., Satoh, M., Involvement of β₂-adrenergic and μ-opioid receptors in antinociception produced by intracerebroventricular administration of α, β-methylene-ATP. *Jpn. J. Pharmacol.*, **86**, 423-428 (2001).

- 6) Kimura T., Ho I. K., amamoto I., Uridine receptor; discovery and its involvement in sleep mechanism. **2** , 251-260 (2001).
- 7) 清水寛美, 木村敏行, 山本郁男 他, 第22回 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(京都)講演要旨, pp 138-141 (2001).

牛乳 β -lactoglobulin由来のニューロテンシンアゴニスト

β -lactotensinの鎮痛作用

山内玲奈、園田壮司、Yunden Jinsmaa、吉川正明

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻

Antinociceptive activity of β -lactotensin, a neurotensin agonist derived from β -lactoglobulin in bovine milk

Rena Yamauchi, Soushi Sonoda, Yunden Jinsmaa, Masaaki Yoshikawa

Division of Food Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture,
Kyoto University

Summary: β -Lactotensin (His-Ile-Arg-Leu), which has been isolated from the chymotrypsin digest of β -lactoglobulin as an ileum-contracting peptide, showed weak affinities for neurotensin receptors; IC_{50} for NT_1 and NT_2 were 18.6 μ M and 10 μ M, respectively. We examined antinociceptive activity of β -lactotensin since neurotensin is known to show antinociceptive activity, which is mediated by NT_2 receptor. β -Lactotensin showed antinociceptive activity by i.c.v. (200 nmol/mouse) and s.c. (300 mg/kg) administration by tail-pinch test in dd mice. The antinociceptive activity was not blocked by naloxone (2 mg/kg, i.p.).

緒言

β -lactotensin (H-I-R-L) は、 β -lactoglobulinのキモトリプシン消化物から回腸収縮活性を指標にして単離されたペプチドである。以前我々は、 β -lactotensinがneurotensin NT_2 レセプターを介してコレステロール低下作用を有することを見出した¹⁾。neurotensinは NT_2 レセプターを介した鎮痛作用を示すことから^{2,3)}、本研究では、 β -lactotensinのマウスに対する鎮痛作用について検討した。

実験方法

ddY マウス (体重 16-18 g、) を用い、 β -lactotensin を脳室内投与または皮下投与し、投与後 5 分間隔で tail-pinch 法により response time (sec) を計測した。naloxone 及び haloperidol は β -lactotensin 投与の 30 分前に 2 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

結果および考察

1. レセプター親和性

neurotensin 及び β -lactotensin の NT_1 及び NT_2 レセプターに対する affinity を Table 1 に示した。 NT_2 レセプターに対する親和性を比較すると neurotensin と β -lactotensin では 2,000 倍の差がみられる。しかし、neurotensin が NT_1 に対して選択性を示すのに対して、 β -lactotensin はむしろ NT_2 に対する選択性を示す。 β -lactotensin は、 NT_2 -selective な最初の天然リガンドである。

Table 1. Receptor affinity of neurotensin agonists.

peptides	IC ₅₀ (μ M)		NT ₁ / NT ₂
	NT ₁	NT ₂	
neurotensin	0.00025	0.005	20
β -lactotensin	18.6	10	0.54

2. 鎮痛作用

β -lactotensin はマウスへの脳室内投与の際に 200 nmol/mouse の用量で tail-pinch test により鎮痛活性を示した (Fig.1)。皮下投与では 300 mg/kg という高用量で鎮痛活性が見られた (data not shown)。

また、 β -lactotensin による鎮痛活性は、オピオイドレセプターのアンタゴニストである naloxone の投与によって阻害されなかった (Fig.2)。このことより、 β -lactotensin の鎮痛活性は非オピオイド性のメカニズムによるものであると考えられる。一方、haloperidol を投与すると β -lactotensin による鎮痛活性が block された (data not shown)。neurotensin が dopamine ニューロンを制御するという報告もあることから^{4,5)}、neurotensin アゴニストである β -lactotensin の鎮痛活性は dopamine レセプ

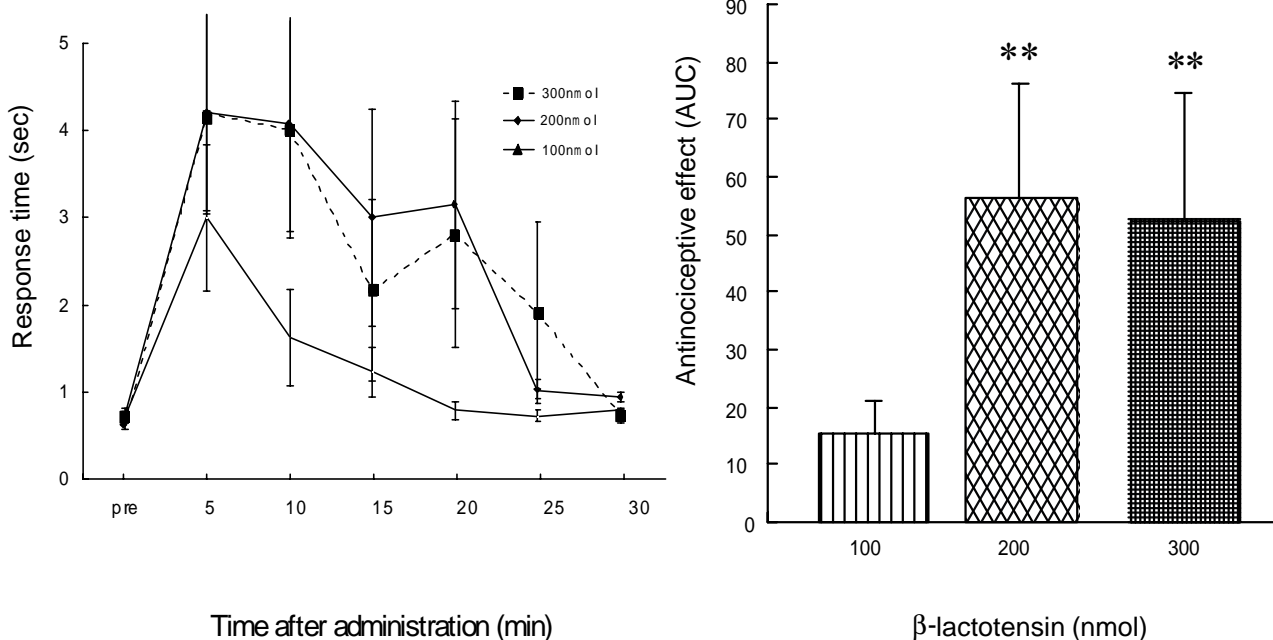


Fig. 1. Antinociceptive effect of β -lactotensin. β -lactotensin was given by i.c.v. administration. The values shown are the means \pm SEM. ** P < 0.01 against control.

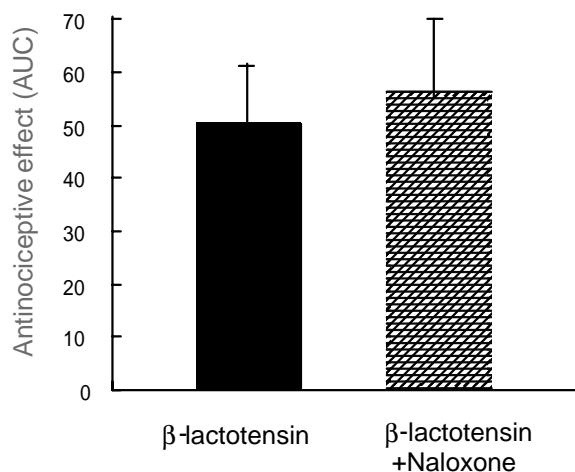


Fig. 2. Effect of naloxone on antinociceptive effect of β -lactotensin. Naloxone (2 mg/kg, i.p.) was given 30 min. before i.c.v. injection of β -lactotensin (200 nmol/mouse).

ターが関与している可能性がある。 β -lactotensin の鎮痛作用の耐性形成の有無については現在検討中である。

文献

- 1) amauchi R., Jinsmaa ., Takenaka ., oshikawa M. Hypocholesterolemic activity of β -lactotensin as a neurotensin receptor agonist. Peptide Science 2000. 225-228, 2001.
- 2) Dubuc I., Sarret P., Labbe-Julle C., Botto J. M., Honore E., Bourdel E., Martinez J., Costentin J., Vincent J. P., Kitabgi P., Mazella J. Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. J. Neurosci. **1** : 503-510, 1999
- 3) Tyler B. M., Groshan K., Cusack B., Richelson E. In vivo studies with low doses of levocabastine and diphenhydramine, but not pyrilamine, antagonize neurotensin-mediated antinociception. Brain Res. **8** : 78-84, 1998
- 4) Haubrich D. R., Martin G. E., Pflueger A. B., Williams M. Neurotensin effects on brain dopaminergic systems. Brain Res. **2** **1**: 216-221, 1982
- 5) Brun P., Steinberg R., Le Fur G., Soubrie P. Blockade of neurotensin receptor by SR48692 potentiates the facilitatory effect of haloperidol on the evoked in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens. J. Neurochem. : 2073-2079, 1995

ハロセン麻酔と血中タキキニン濃度の変動

関山裕詩、角田俊信、澤村成史、富岡俊也、有田英子、花岡一雄
東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

Serum tachykinins levels are not elevated during emergence from halothane-anesthesia in normal rats.

Iroshi Sekiyama, Toshinobu Sumida, Shigehito Sawamura, Toshiya Tomioka, Ideko Arita and
Kazuo Anaoka

Department of Anesthesiology, The University of Tokyo Hospital

Summary : Intraoperative bronchospasm can have many etiologies, including the patient's intrinsic disease and mechanical, chemical, or neurogenic causes. Insufficient anesthesia, such as emergence is also one of risk factors of intraoperative bronchospasm. However, the mechanism of bronchospasm by insufficient anesthesia is not well defined. Recently tachykinins (substance P, neurokinin A) are reported to have potent effects on bronchomotor tone, airway secretions, and bronchial circulation. We hypothesized that the possible mechanism of bronchospasm by insufficient anesthesia would involve tachykinins released from sensory airway nerves and, therefore serum tachykinins levels would be elevated during insufficient anesthesia like emergence. The aim of this study was to compare serum substance P (SP) or neurokinin A (NA) levels under halothane-anesthesia and during the emergence. This protocol was approved by our institutional Animal Care and Use Committee. Experiments were conducted on 14 adult male Sprague-Dawley rats weighing 300-350g. They were divided into two groups: 1) SP group (n = 7); 2) NA group, (n = 7). Following tracheotomy and tracheal intubation under general anesthesia, catheters were inserted into the left external jugular vein for fluid administration, and the left carotid artery for blood sampling. Each rat was mechanically ventilated with 100% O₂ to maintain normal end tidal CO₂ levels. We used colorectal distention (70-80 mmHg) as noxious stimulation, because colorectal distention is repeatable and visceral pain involves tachykinins. We maintained each halothane level (0.3MAC, 1.0MAC, 2.0MAC, and 0MAC i.e. emergence) for 20 minutes and performed colorectal distention during last 5 minutes of each 20 minutes period. After each colorectal distention, blood samplings of SP or NA were collected. The serum SP or NA levels were estimated by radioimmunoassay. Although the serum

SP and NA levels during the emergence were a little higher, analysis of the blood samples demonstrated no significant change in the SP ($p = 0.628$) or NA ($p = 0.216$) level at all anesthetic levels. Serum tachykinins levels are not elevated during emergence from halothane-anesthesia in the rat. However, we are not sure that the mechanism of bronchospasm by insufficient anesthesia do not involve tachykinins system. One reason is that tachykinins are scarce in a human body and serum tachykinins levels may not do reflect local release of tachykinins. Another reason is that we employed normal animals, not asthmatic rats, which might demonstrate higher serum tachykinins levels during emergence from halothane-anesthesia.

緒言

術中気管支痙攣は臨床麻酔の現場では重大な麻酔合併症であり、その原因としては気管支への機械的刺激、副交感神経亢進¹、気管支喘息の増悪、そして浅麻酔もその誘発因子として挙げられている²。しかし、浅麻酔が気管支痙攣を起こしやすい機序については不明である。

近年喘息発症機序はアレルギー性疾患としての側面だけではなく、神経原性疾患としての機序に注目が集まっている^{3,4}。この中心がサブスタンスP (SP)、ニューロキニンA (NKA)そしてカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)等の知覚神経C線維に存在するニューロペプチドによる軸索反射である⁵。これらのニューロペプチドは脊髄後根神経節疼痛伝達物質としてのみではなく、気管支平滑筋収縮作用、気道分泌促進作用、血管拡張透過性亢進作用があることが判明している³。

今回我々は不十分な麻酔が気管支痙攣を起こしやすい原因として「気道上皮下の知覚神経C線維神経終末に浅麻酔ではニューロペプチドが軸索反射で多く産生され輸送集積し、麻酔が深い状態ではその量も少ない。このため浅麻酔ではこれらのニューロペプチドが放出され易く気管支痙攣を発症し易い状態にある。」という仮説を立て、麻酔中及び覚醒時の血中SP、NKA濃度を測定し検討した。

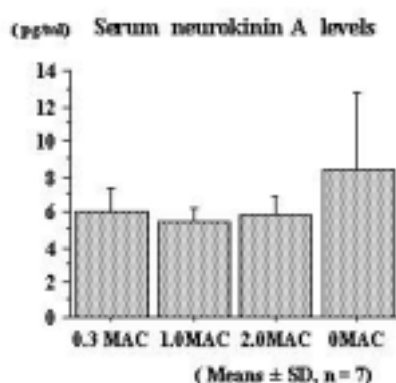
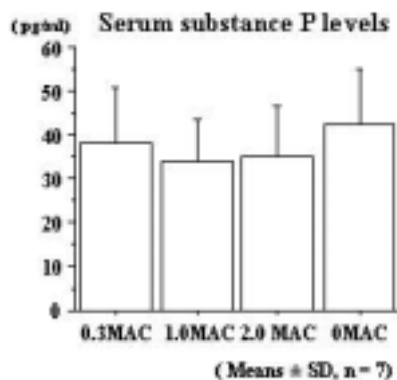
実験方法

ハロセン麻酔下に体重 300 350g の健常 SD ラット($n=14$)に気管切開、総頸動静脈カニューレーションを施行し、経直腸的にバルーンを挿入した。その後純酸素にて人工呼吸下でハロセンを約 20 分毎に 0.3MAC (minimum alveolar concentration)、1.0MAC、2MAC、0MAC と変化させた。各ハロセン濃度を一定化してから 15 分後経直腸的バルーンを緩急に拡張させ 70 80 mmHg で維持し、その 5 分後動脈ラインより採血した。また採血後バルーンは脱気した。Colorectal distention (CRD)を術中侵害刺激として代用した。各サンプルは遠心分離後、放射性免疫測定法により SP, NKA (各 $n=7$)を定量化した。

統計処理は repeated ANOVA にて有意差が認められた場合 Posthoc test を施行した。 $P<0.05$ にて有意差ありとした。

結果

SP, NKAともにハロセン麻酔覚醒時にやや上昇したものの、有意な変化ではなかった。(各 $p = 0.628$, $p = 0.216$)



考察

術中気管支痙攣の治療としては 2 作動薬、テオフィリン、ステロイド等が主として用いられる。また最近ではロイコトリエン拮抗薬も注目を集めている。タキキニン拮抗薬もまた抗喘息薬として期待されており、術中気管支痙攣の治療薬としての可能性を秘めている。

今回我々はハロセン麻酔中及び覚醒時の血中 SP、NKA 濃度を測定し検討した。しかし、有意な血中 SP、NKA 濃度の上昇は認められなかった。原因として 2 つ考えられる。(1) 本対象が健常ラットであったため、浅麻酔に対しても反応性が弱かった。気管支の被刺激性が亢進している喘息モデルを用いればより大きな変化が得られた可能性はある。(2) SP、NKA が浅麻酔で確かに一次求心性線維から放出されていたとしても、局所的な放出でしかなく生体内で微量のため血中濃度に反

映されにくかった。局所での SP、NKA の変化をとらえられれば、よりの確であったであろう。ただし、有意でなかったものの、ハロセンの麻酔深度が増すと SP、NKA 濃度がやや低下し覚醒時に上昇したということは局所での変化の反映とも考えられる。

今回の仮説には端緒となった症例がある。喘息及びアレルギー疾患の既往歴、家族歴の全くない健常男性の予定手術において初めの侵害刺激が加わったと同時に術中気管支痙攣が発症した⁶。一般的には副交感神経優位の際に喘息発作は発症しやすい。しかし一方で浅麻酔でも気管支痙攣を誘発し易いとされる²。浅麻酔であれば交感神経優位であろう。これを説明するために、疼痛のニューロトランスミッターであり、近年喘息発症機序にも関連があるとされているタキキニンに着目した。

本モデルでは浅麻酔の状態とするため、術中手術侵襲に CRD を用いハロセンを 0 MAC としている。CRD は反復刺激でき、内臓痛にはタキキニン系が関与しているとされているため用いた。仮説では「SP、NKA 濃度が高ければ術中気管支痙攣のリスクが増す。」ということを前提としている。本モデルで真に気管支の被刺激性に影響を与えているかは検討していない。しかし実際には局所での SP、NKA の上昇は起きており、気道内圧上昇等のメカニクスの変化は起きていたという可能性は否定できない。

結語

正常ラットにおいてハロセン麻酔覚醒時に血中 SP、NKA 濃度は有意に上昇しなかった。

今後の課題

今後は喘息モデルにおいて局所でのタキキニンの変化を捉えて、気道のメカニクスとも関連付けて検討していきたい。

参考文献

1. Liu M, Schellenberg AG, Patterson T, Bigelow DC, Stecker MM: Intraoperative bronchospasm induced by stimulation of the vagus nerve. *Anesthesiology* ,88:1675-7,1997
2. Olsson GL: Bronchospasm during anaesthesia. A computer-aided incidence study of 136,929 patients. *Acta Anaesth Scand*, 31:244-52,1987
3. Barnes PJ: Asthma as an axon reflex. *Lancet*, 1:242-5,1986
4. Barnes PJ: Neuropeptides and asthma: *Am Rev Respir Dis*; 143: S28-32,1991
5. Verleden GM: Neural mechanisms and axon reflexes in asthma. Where are we . *Biochemical Pharmacology* 1996; 51:1247-57
6. Sekiyama H, Hanaoka K, Severe bronchospasm during surgery for herniated lumbar disc (Love technique) *JSA meeting abstracts* A219, 1994