

【オーラルセッション 2】 17:00-18:30 座長 岡 哲雄(東海大学)、鷓飼 良(名城大)

- 16:50 神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制に対する ERK (extracellular
O6 signal regulated kinase) の役割
尾崎 覚、成田 年、成田道子、尾崎雅彦、白藤明日香、鈴木 勉
星薬科大学薬品毒性学教室
The role of ERK (extracellular signal regulated kinase) in the inhibition of the morphine-
induced rewarding effect under neuropathic pain, Satoru Ozaki, et al, Department of
Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Hoshi University 18-21
- 17:10 モルヒネ禁断場所嫌悪反応における扁桃体中心核の役割
O7 中川貴之、渡辺 豪、山本梨絵、南 雅文、佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野
Role of the central nucleus of amygdala in morphine withdrawal-induced conditioned place
aversion in rats, Takayuki Nakagawa, et al, Department of Molecular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 22-27
- 17:30 扁桃体外側基底核へのモルヒネ微量注入による疼痛関連嫌悪反応の抑制
O8 南 雅文、山本潤希、町田泰一、谷本 幸、中川貴之、佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野
Suppression of Pain-induced Aversive Response by Microinjection of Morphine into the
Basolateral Amygdaloid Nucleus, Masabumi Minami, et al, Department of Molecular
Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 28-32
- 17:50 2,6-dimethyl-L-tyrosine(Dmt)のオピオイドミメティクス開発への応用
O9 岡田芳男^{1,2}、津田裕子^{1,2}、宮崎杏奈¹、横井利夫^{1,2}、藤田快男¹、藤沢豊¹、塩谷公隆¹、
佐々木有亮³、安保明博³、Sharon D. Bryant⁴、Lawrence H. Lazarus⁴
神戸学院大学薬学部¹・ハイテクリサーチセンター²、東北薬科大学³、米国立環境保健研究所⁴
Application of 2,6-Dimethyl-L-tyrosine (Dmt) to the Development of Opioid Mimetics
Yoshio Okada, et al, Faculty of Pharmaceutical Sciences¹ and High Technology
Research Center², Kobe Gakuin University, 33-37

神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制に対する

ERK (extracellular signal regulated kinase) の役割

尾崎 覚, 成田 年, 成田道子, 尾崎雅彦, 白藤明日香, 鈴木 勉
星薬科大学薬品毒性学教室

The role of ERK (extracellular signal regulated kinase) in the inhibition of the morphine-induced rewarding effect under neuropathic pain

Satoru Ozaki, Minoru Narita, Michiko Narita, Masahiko Ozaki, Asuka Shirafuji,

Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Science,

Hoshi University

Summary: We previously reported that the morphine-induced place preference was abolished in sciatic nerve-ligated mice. The present study was designed to investigate whether a state of neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation could be implicated in the ERK and p38 activation in the lower midbrain area including the ventral tegmental area (VTA), which contributes to the development of its rewarding effect, in the mouse. A dose-dependent place preference induced by s.c. morphine was observed in sham-operated mice but not in sciatic nerve-ligated mice. Here we found a persistent and significant reduction in protein levels of phosphorylated-ERK and p38, indicative of these active states, in cytosolic preparations of the lower midbrain following nerve injury. The inhibition of ERK cascade by either PD98059 or U0126 impaired the morphine-induced place preference in naive mice. In contrast, i.c.v. treatment with SB203580, a specific inhibitor of p38, did not interfere with its rewarding effect. These results suggest that the persistent reduction in the ERK-dependent signaling pathway in the lower midbrain may, at least in part, contribute to the suppression of the rewarding effect of morphine under neuropathic pain.

緒言

モルヒネは慢性投与により精神依存を形成するが、臨床においてがん患者にモルヒネを適切に使用した場合、精神依存が問題になることはほとんどない。我々はカラゲニンやホルマリンによる炎症性疼痛モデルにおいてモルヒネの報酬効果が形成されないことを既に

明らかにしており、これらは臨床報告を支持する結果である^{1,2)}。近年、オピオイドが効きにくい難治性の慢性疼痛として神経因性疼痛が問題視されており、この疼痛メカニズムを解明するためにさまざまな研究が行われている。最近我々は、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルを作製し、モルヒネの報酬効果について検討したところ、炎症性疼痛時と同

様に神経因性疼痛下においてはモルヒネの報酬効果が認められないことを明らかにした³⁾。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は様々な外界刺激を伝達するセリン/スレオニンキナーゼであり、現在までに 4 つの MAPK の存在が知られている。その 1 つである extracellular signal regulated kinase (ERK) は細胞分化・増殖に重要な役割を担っているが、近年、この ERK がオピオイド受容体刺激により活性化されることが報告されている。また、我々はモルヒネを慢性暴露した動物において長期的に ERK 活性が増加している事実を見いだしている。一方、p38 は UV 照射や高浸透圧などの物理的ストレスで活性化されることから、アポトーシスのシグナル伝達に参与している因子として以前より注目を集めている。しかしながら、オピオイド受容体を介したシグナル伝達における p38 の活性化経路の存在やオピオイドの依存形成における関与については依然として未知のままである。

そこで本研究では、坐骨神経結紮による神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制機構を解明する目的で、MAPK の中でも特に ERK ならびに p38 に着目し、坐骨神経結紮によるこれらの脳内活性変化について詳細に検討し、モルヒネ誘発報酬効果に対するこれらの役割を明らかにした。

方法

本研究において、実験動物として ICR 系雄性マウスを使用した。慢性疼痛モデルは、Seltzer らの方法をマウスに応用し、右後足坐骨神経を半周結紮することにより作製した⁴⁾。また、坐骨神経を結紮しないで同様の手術

を行った動物を非結紮群とした。これらの動物は手術後 4 日目より以下の実験にて使用した。

1. Conditioned Place Preference (CPP) 法

報酬効果は conditioned place preference (CPP) 法を用いて評価した。条件づけはブレ方式に従い 1 日 1 回行い、1 日目にモルヒネ (2.5, 5, 10 mg/kg) あるいは溶媒を皮下投与したマウスを白あるいは黒の区画に 60 分間閉じ込め、2 日目にはそれぞれ 1 日目とは逆の操作を行い、これを 6 日間繰り返した。また、条件づけ期間中、モルヒネの代わりに、その溶媒のみの投与を続け、条件づけを行った群を溶媒対照群とした。条件づけ開始の前日および 6 日間の条件づけが終了した翌日にそれぞれ pre- および post-test を行い、モルヒネあるいは溶媒のいずれも処置せずに 15 分間、白・黒の区画を自由に行き来させることにより、それぞれの区画に滞在する時間を測定し、これらの値から CPP スコアを算出した。

2. Western blot 法

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) に従って、4-20% の濃度勾配のゲル中の各レーンに 2% SDS、10% glycerol と 0.2 M dithiothreitol (DDT) を含む loading dye と 8-15 g の細胞質分画の混合液を注入し、抗原タンパクを分子量の差によって分離した。分離完了後、速やかにゲルを取り出し、電気泳動した抗原タンパクを 25 mM Tris と 192 mM glycine を含む Tris-glycine buffer に浸したニトロセルロースメンブランにトランスプロットセル (Bio-Rad) を用い電氣的に移行させた。ニトロセルロースメンブランに移行後、メンブランを 5% nonfat dried milk

を含む Tris-buffered saline (TBS) 中でブロッッキングし、さらに、メンブラン上で抗原タンパクと 5% nonfat dried milk 中で 250 倍希釈した phosphorylated-ERK 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および 2000 倍希釈した phosphorylated-p38 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を反応させるため、一晚インキュベーションを行った。その後、0.5% Tween 20 を含む TBS (TTBS) で洗浄し、膜上で抗原と結合した抗体を 5% nonfat dried milk 中で 10,000 倍希釈された horseradish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体と、室温にて 2 時間インキュベーションを行い反応させた。インキュベーション後、TTBS で洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い蛍光発色性の基質を用いて目的とするタンパクを検出した。

結果および考察

坐骨神経を結紮していない対照群において、モルヒネにより用量依存的かつ有意な報酬効果の発現が認められ、坐骨神経結紮群においてはモルヒネによる報酬効果の発現は認められなかった。この結果は、臨床での疼痛緩和を目的としたモルヒネ使用は精神依存をほとんど形成しないという報告を支持するものであり、本疼痛モデルのような神経因性疼痛の動物モデルでも確認できたことは意義深い。

モルヒネなどの μ オピオイド受容体作動薬は、腹側被蓋野から側坐核に投射している中脳辺縁ドパミン神経系に対して強力な活性化作用を示すために精神依存を形成する。この活性化機構には中脳辺縁ドパミン神経系の起始核が存在する腹側被蓋野が非常に重要であり、 μ オピオイド受容体作動薬はこの領域

において抑制性伝達物質である GABA の遊離を抑制し(脱抑制)、ドパミン神経系の過興奮を惹起する。実際、我々は オピオイド受容体作動薬を動物の腹側被蓋野へ微量注入することによりこれらの説を支持する結果を多数見いだしている⁵⁾。このような背景から、

オピオイドの精神依存形成と密接に関連する腹側被蓋野周辺部領域 (lower midbrain) に的を絞り、坐骨神経結紮 1, 4 および 28 日後における ERK および p38 活性変化を検討したところ、結紮 4 日後をピークとして持続的かつ有意な活性の減弱がそれぞれに認められた。そこで、ERK および p38 の選択的阻害薬を用いて、正常動物におけるモルヒネ誘発報酬効果の発現に対する ERK ならびに p38 の直接的な関与について検討した。その結果、モルヒネ誘発報酬効果は ERK の選択的阻害薬である PD98059 および U0126 の脳室内前処置によりそれぞれ有意に抑制されたが、p38 の選択的阻害薬である SB203580 の脳室内前処置では有意な変化が認められなかった。これらの結果から、モルヒネの報酬効果発現には少なくとも一部 ERK の活性化が関与していることが明らかとなった。

以上の本研究結果から、坐骨神経結紮による神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制は、lower midbrain での ERK 活性の減弱に一部起因している可能性が示唆された。モルヒネを含む依存性薬物の長期使用による依存形成には様々なタンパク質リン酸化や遺伝子発現の変化を伴う神経機能の再構築、すなわち可塑性変化が寄与している考えられている。ERK は遺伝子発現の調節やリン酸化酵素などの活性化に深く関与していることから、結紮下における ERK 活性の低下は

モルヒネ反復投与によって生じる神経系の可塑性変化に直接影響を及ぼし、その結果として報酬効果の抑制が認められたと推察される。

引用文献

- 1) Suzuki T., Kishimoto Y. and Misawa M. Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci.*: 59, 1667-1674, 1996.
- 2) Suzuki T., Kishimoto Y., Misawa M., Nagase H. and Takeda F. Role of the κ -opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. *Life Sci.*: 64, PL1-7, 1999.
- 3) Ozaki S., Narita M., Narita M., Iino M., Sugita J., Matsumura Y. and Suzuki T. Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: Implication of the reduction in μ -opioid receptor functions in the ventral segmental area. *J. Neurochem.* (in press).
- 4) Seltzer Z., Dubner R. and Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*: 43, 205-218, 1990.
- 5) Narita M., Funada M. and Suzuki T. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol. Ther.*: 89, 1-15. (2001)

モルヒネ禁断場所嫌悪反応における扁桃体中心核の役割

中川貴之、渡辺 豪、山本梨絵、南 雅文、佐藤公道
京都大学薬学研究所生体機能解析学分野

Role of the central nucleus of amygdala in morphine withdrawal-induced conditioned place aversion in rats

Takayuki Nakagawa, Takeshi Watanabe, Rie Yamamoto, Masabumi Minami and Masamichi Satoh
Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University

Summary : We investigated the role of the amygdala in the naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion (CPA). Excitotoxic lesion of the central (CeA), but not basolateral, nucleus of the amygdala attenuated the CPA. Both extracellular glutamate and noradrenaline levels in CeA were elevated during morphine withdrawal. Microinjection of glutamate receptor or β -adrenoceptor antagonists into bilateral CeA attenuated the CPA. These results suggest that both glutamatergic and noradrenergic systems in CeA contribute to the morphine withdrawal-induced CPA.

緒言

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の連続的使用により生じる麻薬依存には精神的依存と身体的依存が存在し、薬物の適用中止あるいはナロキソン等の拮抗薬の適用により、不快な精神症状を伴った禁断症候が発現する。しかしながら、このような退薬時の不快な精神症状発現のメカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。

一方、扁桃体は大脳辺縁系に属し、中心核 (CeA)、基底外側核 (BLA) などの機能の異なる幾つかの亜核から構成されており、外部からの各種感覚情報を受容し、それらを不安、恐怖などの情動反応として発現する機能や、自律神経応答に重要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。また、モルヒネ禁断症候発現後に扁桃体において c-fos mRNA 発現が顕著に誘導されること²⁾、モルヒネ依存ラットの扁桃体にオピオイド

受容体拮抗薬を局所微量投与することにより幾つかの禁断症候が誘発されること³⁾などが報告されており、扁桃体が麻薬依存形成あるいは禁断症候発現に関与していることが示唆されている。そこで本研究では、モルヒネ禁断症候発現時の不快な精神症状惹起における扁桃体の役割を明らかにするため、条件付け場所嗜好性試験によって得られる場所嫌悪反応を指標とし、まず、興奮性神経毒による CeA あるいは BLA の限局的損傷による影響を検討し、さらに、麻薬依存に重要な役割を果たしていることが指摘されているグルタミン酸神経系⁴⁾及びノルアドレナリン神経系⁵⁾の関与を検討した。

実験方法

使用動物

SD 系雄性ラット (体重 200-280 g)

CeA あるいは BLA の限局的損傷

ペントバルビタール麻酔下、興奮性神経毒である NMDA (0.3 M) を、CeA の場合には AP -1.8 mm、L \pm 4.0 mm、DV 8.0 mm の位置へ 0.3 μ l を 3 分間かけて、BLA の場合には AP -1.8 mm、L \pm 4.8 mm、DV 8.5 mm の位置へ 0.4 μ l を 3 分間かけて、両側性に微量投与した。NMDA の投与後、7 日目以降に実験を行った。

実験終了後、組織学的検討を行い、NMDA による各亜核での限局的損傷が両側共に確認できた個体から得られたデータのみを解析に用いた。

CeA への薬物微量投与

ペントバルビタール麻酔下、ガイドカニューレ (外径 0.5 mm) を AP -1.8 mm、L \pm 4.0 mm、DV 3.0 mm の位置に固定し、少なくとも 5 日間の回復期間の後に実験に用いた。薬物の投与は、このガイドカニューレにインジェクションカニューレ (外径 0.2 mm) を挿入し、DV 8.0 mm の位置へ薬液 1 μ l/side を、0.5 μ l/min の流速で 2 分間、両側性に同時に微量投与した。実験終了後、組織学的検討を行い、CeA 内への限局的投与が両側共に確認できた個体から得られたデータのみを解析に用いた。

条件付け場所嗜好性試験

床面が滑らかな黒い部屋と床面が凹凸の白い部屋の 2 つのコンパートメントからなる CPP 装置 (夏目製作所) を用いた。1 日目に、モルヒネ 75 mg を含有するモルヒネペレットあるいはプラセボペレットを頸背部皮下に 1 個埋込み、2 日目にラットが両コンパートメントを自由に探索できる状態で 900 秒間放置し、装置に対する馴化を行った。3 日目に同様の操作を行い、各ラットについて 900 秒間の各コンパートメントでの滞在時間を測定し、より長く滞在したプレファレンス・コンパートメントを決定した。4 日目に、中央のスライドドアを

降ろし、午前中に生理食塩水 (1 ml/kg) を腹腔内に投与し、プレファレンス・コンパートメントとは逆のコンパートメントに 60 分間閉じこめた。さらに同日の午後、ナロキソン (0.3 mg/kg) を腹腔内に投与し、プレファレンス・コンパートメントに 60 分間閉じ込め、ナロキソンによる場所条件付けを行った。5 日目に、両コンパートメントを自由に探索できる状態で、再び 900 秒間の各コンパートメントでの滞在時間を測定した。5 日目のプレファレンス・コンパートメントでの滞在時間から 3 日目の滞在時間を差し引き、その値が負になった場合、場所嫌悪反応が惹起されたものと評価した。

In vivo マイクロダイアリシス法

ペントバルビタール麻酔下、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレ (長さ 8.0 mm、外径 0.5 mm) を片方の CeA (AP -1.8 mm、L \pm 4.0 mm) に埋込んだ。翌日、マイクロダイアリシス用透析プローブ (長さ 8.0 mm、膜長 1.0 mm、外径 0.22 mm) を装着し、ラットが無拘束で自由に行動できる状態でリング液を流速 1 μ l/min で灌流した。10 分あるいは 20 分間隔で灌流液を回収し、グルタミン酸あるいはノルアドレナリン量を HPLC により測定した。

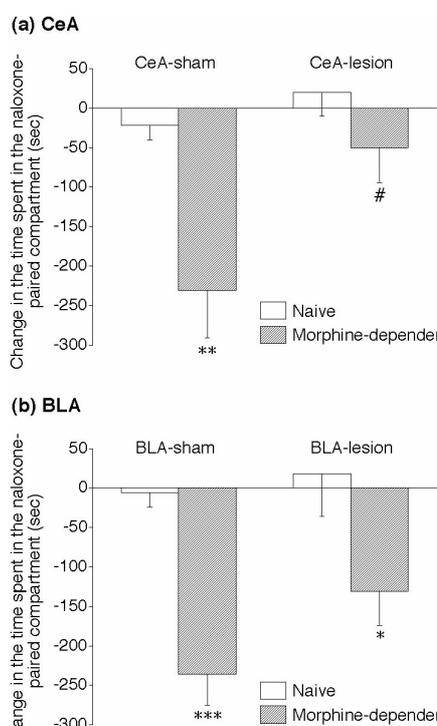
結果

1. CeA あるいは BLA の限局的損傷によるモルヒネ禁断場所嫌悪反応への影響

興奮性神経毒 NMDA を用いて、CeA あるいは BLA をそれぞれ限局的に損傷することによる、ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応への影響を検討した (Fig.1)。CeA に対して sham 処置を施したモルヒネ依存ラットにおけるナロキソン条件付け前後でのプレファレンス・コンパートメントにおける滞在時間の差は、プラセボペレットを埋め込んだ naive ラットの値と比較して有意に負

に増大しており、ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応が惹起されたことが確認できた。このナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応は、CeA 両側の限局的損傷により有意に減弱し、また CeA を損傷した naive ラットで得られた値との間に有意な差は見られなかった。

Fig.1 Effects of CeA (a) or BLA (b) lesions on the naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced CPA. Each column represents the time (sec) in the naloxone-paired compartment in the test session minus that in the preconditioning session. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs respective naive rats; # $P < 0.05$ vs CeA-sham-operated morphine-dependent rats (Bonferroni *post hoc* test). $n = 6-11$.

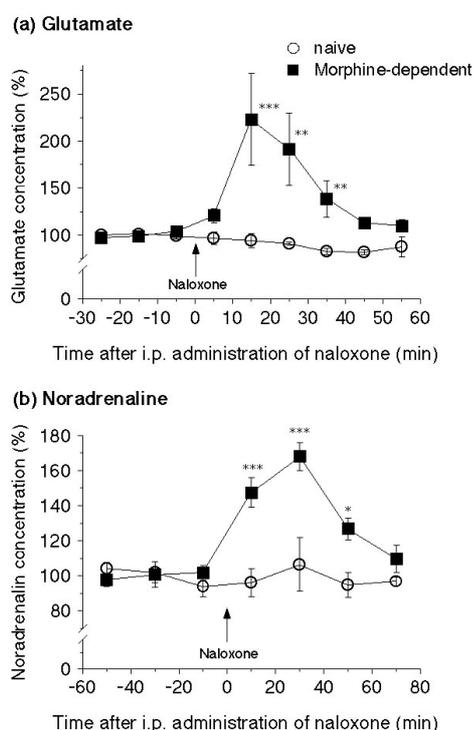


一方、BLA に対して sham 処置を施したラットにおいても、同様に有意なナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応が惹起されたが、BLA 両側の限局的損傷によって減少する傾向が見られたものの、これは有意な差ではなく、また、BLA を損傷した naive ラットの値との間には有意な差が認められた。

2. モルヒネ禁断症候発現時の CeA でのグルタミン酸およびノルアドレナリンの遊離

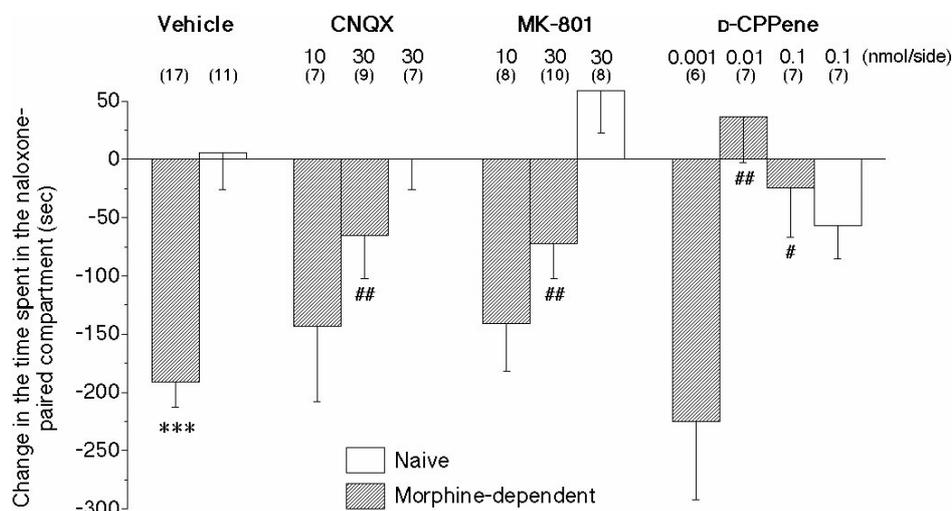
ナロキソン誘発モルヒネ禁断症候発現時の

Fig.2 Effects of naloxone-precipitated morphine withdrawal on the extracellular glutamate (a) and noradrenaline (b) level in CeA. Animals were i.p. injected with naloxone (0.3 mg/kg) at the time zero indicated. Data are expressed as the means \pm SEM of % of the basal values calculated as an average of three consecutive stable dialysates before naloxone injection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs naive rats (Bonferroni *post hoc* test). $n = 4-7$.



CeA での細胞外グルタミン酸量及びノルアドレナリン量の経時変化を *in vivo* マイクロダイアリス法により検討した (Fig.2)。その結果、naive ラットにおいては、ナロキソンの腹腔内投与によっても細胞外グルタミン酸量及びノルアドレナリン量に変化は見られなかったが、モルヒネ依存ラットにおいては、ナロキソンの投与により、グルタミン酸に関してはナロキソン投与後 10 分から 20 分、ノルアドレナリンに関しては投与後 20 分から 40 分をピークとする一過性の有意な増加が認められた。

Fig.3 Effects of microinjection of glutamate receptor antagonists into CeA on the naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced CPA. Morphine-dependent or naive rats were microinjected with vehicle, CNQX, MK-801 or D-CPPene into bilateral CeA 10 min before i.p. injection of naloxone (0.3 mg/kg). *** $P < 0.001$ vs vehicle-microinjected naive rats. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. vehicle-microinjected morphine-dependent rats (Bonferroni *post hoc* test). Numerals in parentheses indicate the numbers of rats used.



3. 各種グルタミン酸受容体拮抗薬の CeA 内微量投与によるモルヒネ禁断場所嫌悪反応への効果

ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応におけるCeAのグルタミン酸受容体の関与を検討するために、各種グルタミン酸受容体拮抗薬をナロキソンによる条件付けの10分前に両側CeA内に微量投与し、その効果を検討した (Fig.3)。モルヒネ依存ラットの両側CeA内にvehicleを微量投与した群においては、naiveラットにvehicleを微量投与した群と比較して有意な場所嫌悪反応が惹起された。このナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応は、AMPA/kainate型グルタミン酸受容体拮抗薬 CNQX (30 nmol/side) のCeA内微量投与により有意に減弱された。なお、naiveラットにCNQX (30 nmol/side) を微量投与しても、条件付け前後での滞在時間に何ら変化は見られなかった。同様に、非競合的NMDA受容体拮抗薬 MK-801 (30 nmol/side) あるいは競合的NMDA受容体拮抗薬 D-CPPene (0.01 および 0.1 nmol/side) によっても有意な減弱効果が認められた。一方、naive ラットに MK-801 (30

nmol/side) を微量投与すると僅かに場所嗜好性を示し、D-CPPene (0.1 nmol/side) を微量投与すると僅かに場所嫌悪反応を示したが、これらの効果は有意なものではなかった。

4. β -アドレナリン受容体拮抗薬の CeA 内微量投与によるモルヒネ禁断場所嫌悪反応への効果

各種 β -アドレナリン受容体拮抗薬をナロキソンによる条件付けの10分前に両側CeA内に微量投与し、その効果を検討した (Fig.4)。その結果、ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応は、 β -アドレナリン受容体拮抗薬 propranolol (30 nmol/side) のCeA内微量投与により、vehicle投与群と比較して有意に減弱された。さらに、膜安定化作用のない β -アドレナリン受容体拮抗薬 timolol (10 nmol/side) によっても有意に減弱された。なお、naive ラットに propranolol (30 nmol/side) あるいはtimolol (10 nmol/side) を両側CeA内に微量投与しても、条件付け前後での滞在時間に有意な変化は見られなかった。次に、

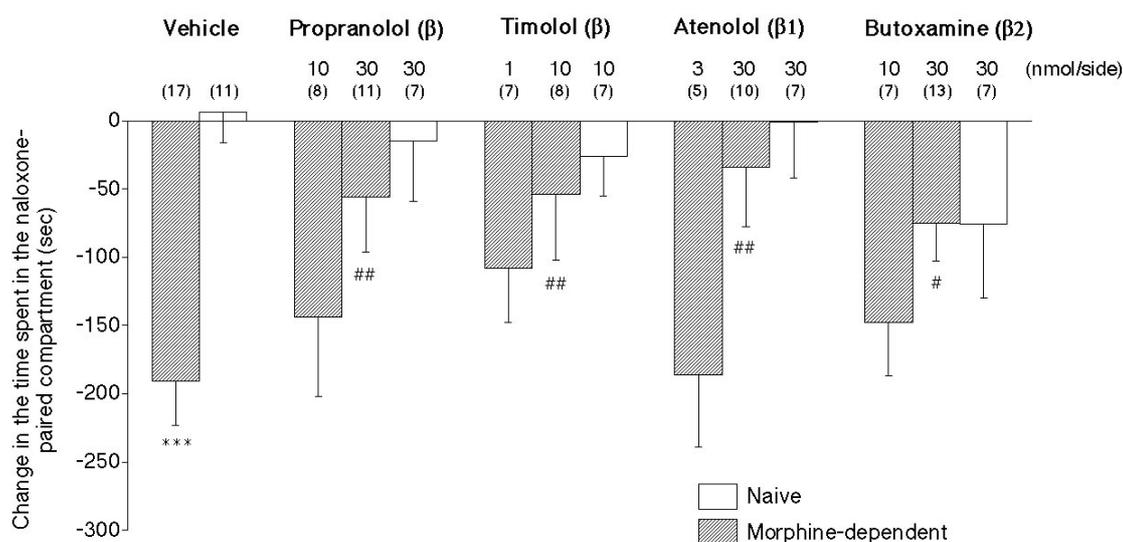


Fig.4 Effects of microinjection of β -adrenoceptor antagonists into CeA on the naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced CPA. Animals were microinjected with vehicle, propranolol, timolol, atenolol or butoxamine into bilateral CeA 10 min before i.p. injection of naloxone (0.3 mg/kg). *** P <0.001 vs vehicle-microinjected naive rats. # P <0.05, ## P <0.01 vs. vehicle-microinjected morphine-dependent rats (Bonferroni *post hoc* test). Numerals in parentheses indicate the numbers of rats used.

β_1 -受容体拮抗薬 atenololあるいは β_2 -受容体拮抗薬 butoxamineの効果を検討した。その結果、atenolol (30 nmol/side)あるいはbutoxamine (30 nmol/side)のCeA内微量投与により、場所嫌悪反応は有意に減弱された。なお、naiveラットにatenolol (30 nmol/side)を両側CeA内に微量投与しても滞在時間の差に何ら変化は見られず、butoxamine (30 nmol/side)を微量投与することにより僅かに場所嫌悪反応を示したが、この効果は有意なものではなかった。

考察

扁桃体は解剖学的に異なる幾つかの亜核から構成されており、近年ではそれらの亜核が、それぞれ異なる生理学的役割を担っていることが明らかにされている¹⁾。本研究においても、ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応は、興奮性神経毒により予めCeAを限局的に損傷しておくことにより有意に減弱されるが、BLAの限局的損傷によっては変化が見られないことが示された。これ

らの結果から、扁桃体亜核の中でも、BLAよりもむしろCeAがモルヒネ禁断場所嫌悪反応に重要な役割を果たしていることが示唆される。一方、グルタミン酸は広くシナプス機能の可塑的变化に関与し、さらにモルヒネ依存形成・禁断症候発現にも重要な役割を果たしていることが知られている⁴⁾。今回の、*in vivo*マイクロダイアリシスおよび両側CeA内への薬物微量投与による検討から、モルヒネ禁断時にCeAにおいてグルタミン酸が遊離され、このグルタミン酸がCeAのAMPA/kainate受容体およびNMDA受容体を介してモルヒネ禁断場所嫌悪反応の発現に関与していることが示唆される。同様に古くからモルヒネ依存との関連が指摘されてきたノルアドレナリン⁵⁾に関しても、モルヒネ禁断時にCeAで遊離が促進されること、CeA内の β_1 -および β_2 -アドレナリン受容体の活性化が重要な役割を果たしていることを示した。CeA内のグルタミン酸神経系及びノルアドレナリン神経系は、これまでも条件付け恐怖刺激やストレスによる応答などに関与していることが報告されており^{6, 7)}、様々なケースでの不快な精神症

状発現に共通するメカニズムとも考えられる。

参考文献

1. Gallagher M and Chiba AA. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol.* 6:221-27, 1996
2. Hayward MD, Duman RS and Nestlet EJ. Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res.* 525:256-66, 1990
3. Koob GF, Maldonado R and Stinus L. Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci* 15:186-91, 1992
4. Zhu H, Rockhold RW and Ho IK. The role of glutamate in physical dependence on opioids. *Jpn J Pharmacol.* 76:1-14, 1998
5. Maldonado R. Participation of noradrenergic pathway in the expression of opiate withdrawal: Biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev.* 21:91-104, 1997
6. LeDoux J. Fear and the brain: where have we been and where are we going? *Biol Psychiatry.* 44:1229-38, 1998
7. Davis M and Shi C. The extended amygdala: are the central nucleus of amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann NY Acad Sci.* 877:281-91, 1999

扁桃体基底外側核へのモルヒネ微量注入による 疼痛関連嫌悪反応の抑制

南 雅文, 山本潤希, 町田泰一, 谷本 幸, 中川貴之, 佐藤公道
京都大学薬学研究所生体機能解析学分野

Suppression of Pain-induced Aversive Response by Microinjection of Morphine into the Basolateral Amygdaloid Nucleus

Masabumi Minami, Junki Yamamoto, Taiichi Machida, Sachi Tanimoto, Takayuki Nakagawa,
Masamichi Satoh

Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University

Summary: Effect of morphine on the formalin-induced place aversion was examined when it was bilaterally injected into the basolateral amygdaloid nucleus (BLA). Intra-BLA injection of morphine at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{side}$ almost completely suppressed the formalin-induced place aversion. Although the intra-BLA injection of the same dose of morphine significantly suppressed the formalin-induced nociceptive responses such as lifting, licking and biting, the degree of the suppression was low, suggesting that the suppressive effect of morphine on the conditioned place aversion was not exclusively due to the analgesic effect of morphine. Microdialysis revealed that formalin-induced sustained pain evoked the glutamate release in the BLA, and this evoked release was suppressed by the local application of morphine via the microdialysis probe. Intra-BLA injection of MK801, but not CNQX or AP3, suppressed the formalin-induced place aversion, while neither of these glutamate receptor antagonists affected the formalin-induced nociceptive responses. These results suggest that intra-BLA injection of morphine produced suppressive effect on pain-induced aversive response through the inhibition of the glutamate release in the BLA.

序論

痛みに伴う情動反応(不快、不安、抑鬱)は患者のQOLを低下させるが、それに関わる神経機構および物質的基盤はほとんど不明のままである。また、モルヒネの鎮痛作用、特にヒトにおける鎮痛作用には、このような負の情動反応の抑制が関与している可能性が考えられる。

一方、種々の情動反応との関連が報告されている扁桃体は、中心核、基底外側核(BLA)、皮質内側核などの複数の亜核から構成されており、各亜核間に

種々の機能差があることが明らかにされつつある。本研究室でもこれまでに μ オピオイド受容体が扁桃体亜核の中でも特にBLAにおいて強く発現していること、さらに、ホルマリンの後肢足底皮下投与による侵害刺激によって、主としてBLAにおいてc-fos mRNA発現が上昇することを明らかにしている。

そこで本研究では、ホルマリン後肢足底皮下投与により惹起される侵害受容反応および疼痛関連嫌悪反応に対するBLAへのモルヒネ微量注入の効果を検討した。さらに、モルヒネの作用機序解明の手始めとしてグルタミン酸神経系の関与を検討した。

方法

使用動物

実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 6 週齢(体重 180-220g)を用いた。

基底外側核への薬物投与

ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg, i.p.)、ラットを脳定位固定装置に固定し、bregma から尾側へ 1.8mm、外側へ 4.8mm、腹側へ 3.0mm の位置に両側性にガイドカニューレの埋め込み、5日間の回復期間の後、実験に用いた。薬物投与時には、インジェクションカニューレはガイドカニューレに装着した際、その先端が頭蓋表面から腹側へ 8.5mm の位置に達するように作製した。各薬物は、saline に溶解し、マイクロインジェクションポンプにより 0.5 μ l/min の流速で両側の BLA に各 1 μ l を投与した。

条件付け場所嗜好性試験

壁の色と床の材質が異なった 2 つのボックスからなり、ラットが各々のボックスに滞在した時間を自動計測できる装置(夏目製作所製)を用いた。0日目に装置への馴化を行い、1日目に中央のスライドドアを開け両ボックス間の移動が可能な状態でラットを入れ、それぞれのボックスに滞在した時間を 15 分間計測し、プリファレンスサイドを決定した。2日目の条件付け時には、中央のスライドドアを下ろしボックス間の移動ができない状態で、ラットに saline 100 μ l を後肢足底皮下投与し、ノンプリファレンスサイドに 60 分間閉じ込め、その後さらに 2%ホルマリン 100 μ l を後肢足底皮下投与し、プリファレンスサイドに 60 分間閉じ込めた。3日目に、再び中央のスライドドアを開けた状態でテストを行い、ラットがプリファレンスサイドに滞在する時間を測定し、1日目と3日目でプリファレンスサイドでの滞在時間の変化を求めた。各薬物は、ホルマリン後肢足底皮下投与 5 分前に BLA へ両側性に投与した。

ホルマリンテスト

両側 BLA への薬物の微量投与 5 分後に 2 %ホル

マリン 100 μ l をラット後肢足底皮下に投与し、侵害受容反応の指標として lifting、licking および biting 行動を行った時間を 5 分間隔で 50 分間計測した。

In vivo マイクロダイアリシス法

透析用ガイドカニューレ(長さ 8.0 mm)を一側の BLA に埋め込み、ダミーカニューレを装着した。24 時間後にダミーカニューレを取り去り、透析プローブ(長さ 9.0 mm、うち透析膜長 1.0 mm)を装着した。灌流開始から約 60 分後に、2%ホルマリン 100 μ l を後肢足底皮下投与し 10 分間隔で 60 分後まで灌流液を回収した。なお、灌流路にはコイル状チューブおよび可動式連結具を用い、実験中ラットが無拘束でケージ内を行動できるようにした。回収したサンプル中のグルタミン酸量は、高速液体クロマトグラフィー法により定量した。

組織学的検討

実験終了後、BLA にクレシルバイオレットあるいはチオニン 1 μ l を両側性に投与した後、冠状切片を作製した。Nissle 染色の後、顕微鏡下で投与部位の確認を行い、両側の BLA への投与が確認された個体からのデータのみを統計学的処理に用いた。

結果

侵害刺激誘発場所嫌悪反応に対するモルヒネ BLA 内投与の効果

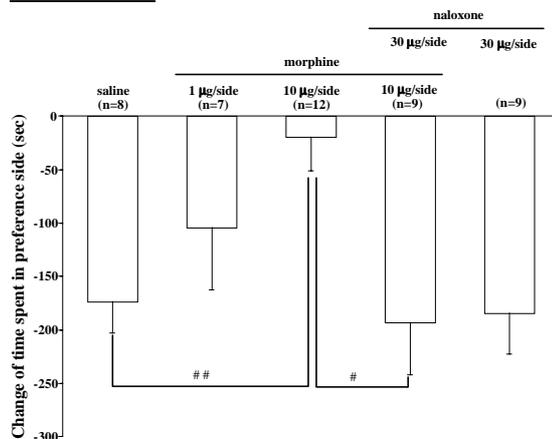


Fig. 1 Effect of intra-BLA injection of morphine on the formalin-induced place aversion. #, ##, $P < 0.05$ and 0.01 .

ホルマリン後肢足底皮下投与により、条件付け前と比較して条件付け後のプリファレンスサイド滞在時間が有意に短縮し、場所嫌悪反応が惹起された (Fig. 1)。この場所嫌悪反応は、ホルマリンによる条件付けの5分前にモルヒネ1および10 $\mu\text{g}/\text{side}$ を両側 BLA 内に微量投与することにより濃度依存的に抑制され、モルヒネ10 $\mu\text{g}/\text{side}$ では、ほぼ完全に有意に抑制された。また、この抑制作用はナロキソン30 $\mu\text{g}/\text{side}$ を同時投与することにより有意に拮抗されたが、ナロキソン30 $\mu\text{g}/\text{side}$ 単独投与ではホルマリン誘発場所嫌悪反応に対して影響は認められなかった。

なお、図には示さないが、ホルマリンの代わりに saline を後肢足底皮下投与したラットにおいては、場所嫌悪反応は惹起されず、saline の後肢足底皮下投与5分前にモルヒネ10 $\mu\text{g}/\text{side}$ のBLA内投与を行った群では有意な場所嫌悪反応および場所嗜好反応のどちらも惹起されなかった (10.0 ± 26.8 sec)。

侵害受容反応に対するモルヒネBLA内投与の効果

両側BLA内にモルヒネ1および10 $\mu\text{g}/\text{side}$ を微量投与することにより、ホルマリン後肢足底皮下投与により誘発される二相性の侵害受容反応は、saline投与群と比較して有意に抑制されたが、その抑制率はわずかであった (Fig. 2)。また、この抑制作用は、ナロキソン30 $\mu\text{g}/\text{side}$ を同時投与することにより拮抗された。

In vivo マイクロダイアリシス

ホルマリン後肢足底皮下投与群では、saline注射群と比較してBLAでの細胞外グルタミン酸量の増加が認められた (Fig. 3)。この細胞外グルタミン酸量の増加は、還流液中にモルヒネ30および100 μM を加えることにより濃度依存的に減少した。

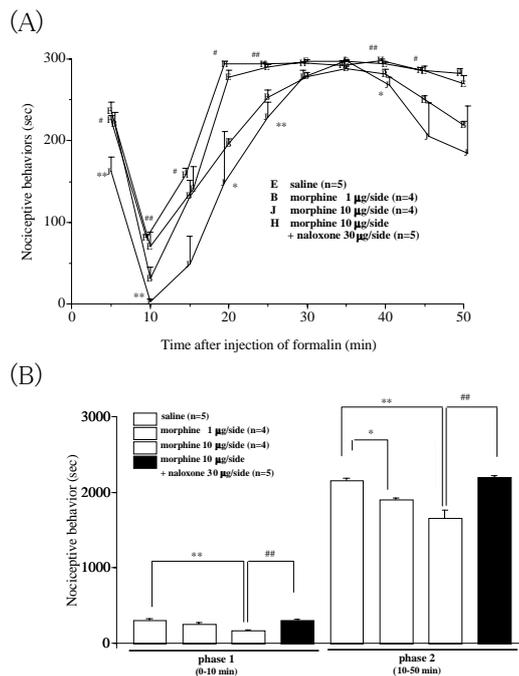


Fig. 2 Effect of intra-BLA injection of glutamate receptor antagonists on the formalin-induced aversive responses. Time course (A) and AUC (B) of the aversive responses. *, **, $P < 0.05$ and 0.01 compared with the saline-injected group. #, ##, $P < 0.05$ and 0.01 compared with the morphine (10 $\mu\text{g}/\text{side}$)-injected group.

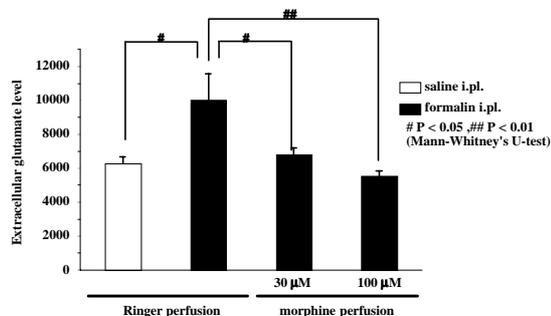


Fig. 3 Effect of morphine on glutamate release in the BLA induced by intraplantar injection of formalin.

侵害刺激誘発場所嫌悪反応に対するグルタミン酸受容体拮抗薬BLA内投与の効果

ホルマリンの条件付けによる場所嫌悪反応は、1および10 nmol/sideのMK801の両側BLA内投与により用量依存的に抑制され、10 nmol/sideのMK801によりほぼ完全に抑制された (Fig.4)。

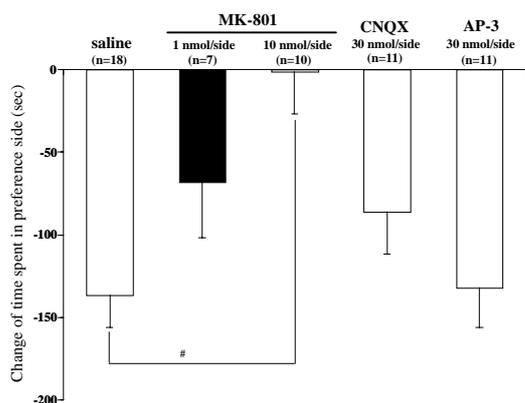
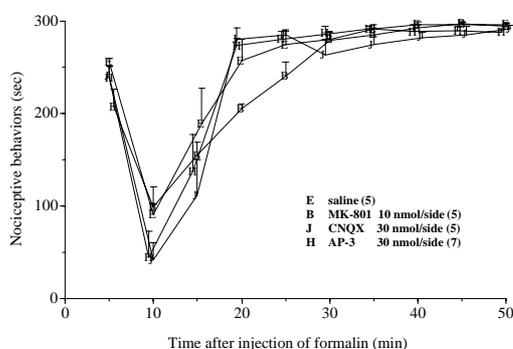


Fig. 4 Effect of intra-BLA injection of morphine on the formalin-induced place aversion. #, $P < 0.05$.

一方、30 nmol/side CNQX、および AP3 30 nmol/side の投与では場所嫌悪反応に対して有意な影響は見られなかった。また図には示さないが、ホルマリンの代わりに saline を後肢足底皮下投与した群においては、10 nmol/side のMK801のBLA内投与では有意な場所嫌悪反応および場所嗜好反応のどちらも惹起されなかった (0.0 ± 36.4)。

(A)



(B)

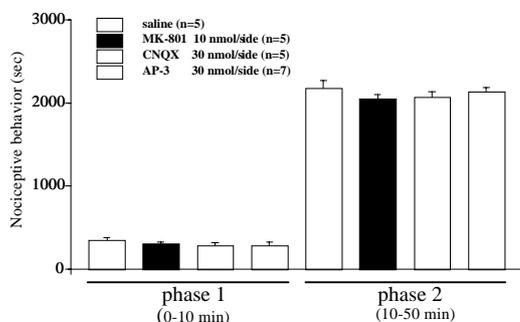


Fig. 5 Effect of intra-BLA injection of glutamate receptor antagonists on the formalin-induced aversive responses. Time course (A) and AUC (B) of the aversive responses.

侵害受容反応に対するグルタミン酸受容体拮抗薬 BLA 内投与の効果

NMDA 受容体拮抗薬 MK801 10 nmol/side
nonNMDA 受容体拮抗薬 CNQX 30 nmol/side および
代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬 AP3 30 nmol/side いずれの BLA 内投与も、ホルマリンによる侵害受容反応に影響を及ぼさなかった Fig. 5

考察

ホルマリン後肢足底皮下投与により惹起される場所嫌悪反応は、モルヒネのBLA内投与により用量依存的に抑制された。このモルヒネの抑制作用はナロキソンの同時投与によって有意に拮抗された。モルヒネ側脳室内投与により、条件付け場所嗜好性試験において嗜好性が惹起されるという報告があるが¹、saline 後肢足底皮下投与群へのモルヒネ BLA 内投与では場所嗜好性が惹起されなかったことから、本実験で見られたモルヒネの場所嫌悪反応抑制作用は、ホルマリンにより惹起される場所嫌悪反応がモルヒネの報酬効果によって相殺された結果ではないと考えられる。また、ホルマリン後肢足底皮下投与により惹起される侵害受容反応も、モルヒネ BLA 内投与により有意に抑制されたが、その抑制の程度は 10 $\mu\text{g/side}$ の用量でも小さいものであった。一方、場所嫌悪反応はモルヒネ 10 $\mu\text{g/side}$ の BLA 内投与によりほぼ完全に抑制されたことから、この抑制効果をモルヒネの鎮痛効果に専ら帰することはできないと考えられる。以上より、モルヒネは BLA 内に存在するオピオイド受容体に作用し侵害刺激により惹起される嫌悪反応を抑制することが示唆される。

グルタミン酸は、中枢神経系の種々の領域において神経機能の可塑的变化に関与していると考えられている。また、脊髄では痛覚情報の重要な伝達物質であることが知られている。本研究において、ホルマリン後肢足底皮下投与による持続性疼痛により BLA において細胞外グルタミン酸量が増加した。さらに、このグルタミン酸遊離量増加は、マイクロダイアリシス灌流液中にモルヒネを添加することにより有意に抑制された。BLA に終末を有するグルタミン酸

作動性神経が疼痛刺激により活性化されること、さらに、BLA 内に局在するオピオイド受容体がグルタミン酸遊離を抑制的に調節していることが示唆される。

ホルマリンにより惹起される場所嫌悪反応に対する各種グルタミン酸受容体アンタゴニストの効果を検討したところ、10 nmol/side の MK801 により場所嫌悪反応がほぼ完全に抑制されたが、30 nmol/side の CNQX および AP3 では有意な影響は見られなかったことから、ホルマリン後肢足底皮下投与により惹起される持続性疼痛が BLA 内においてグルタミン酸遊離を増大させ、NMDA 受容体を介して場所嫌悪反応を引き起こしている可能性が示唆される。MK801 の BLA 内投与がホルマリンによる侵害受容反応に影響を及ぼさなかったことから、MK801 の場所嫌悪反応抑制効果は鎮痛作用によるものではないと考えられる。

以上の結果より、モルヒネは、ホルマリン誘発持続性疼痛により惹起される BLA でのグルタミン酸遊離を抑制することにより、BLA 内NMDA受容体を介して起こる場所嫌悪反応を抑制することが示唆される。

参考文献

- 1) Minami M. Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 23: 121-145, 2002
- 2) Katsuya A. Yamamoto J. Machida T. Tanimoto s. Nakagawa T. Minami M. Satoh M. Effects of somatic and visceral noxious stimuli on the expression of c-fos mRNA and extracellular glutamate level in amygdala. *Jpn. J. Pharmacol.* 85 (Suppl. 1): 221P, 2001
- 3) Suzuki T. Conditioned place preference in mice. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 18: 75-83, 1996

2,6-Dimethyl-L-tyrosine (Dmt) のオピオイドミメティックス 開発への応用

岡田芳男^{1,2}、津田裕子^{1,2}、宮崎杏奈¹、横井利夫^{1,2}、藤田快男¹、藤沢豊¹、塩谷公隆¹、
佐々木有亮³、安保明博³、Sharon D. Bryant⁴、Lawrence H. Lazarus⁴
神戸学院大学薬学部¹・ハイテクリサーチセンター²、東北薬科大学³、米国立環境保健研究所⁴

Application of 2,6-Dimethyl-L-tyrosine (Dmt) to the Development of Opioid Mimetics

Yoshio Okada^{1,2}, Yuko Tsuda^{1,2}, Anna Miyazaki¹, Toshio Yokoi^{1,2}, Yoshio Fujita¹, Yutaka Fujisawa¹,
Kimitaka Shiotani¹, Yusuke Sasaki³, Akihiro Ambo³, Sharon D. Bryant⁴, Lawrence H. Lazarus⁴
Faculty of Pharmaceutical Sciences¹ and High Technology Research Center², Kobe Gakuin
University, Japan; Tohoku Pharmaceutical University, Japan³;
National Institute of Environmental Health Science, USA⁴

Summary: Endomorphins (Tyr-Pro-Trp/Phe-Phe-NH₂) are potent and μ -selective mammalian endogenous opioid ligand. Dmt-Pro-Phe-Phe-NH₂ exhibited more potent binding activity for μ - and δ -opioid receptors than Endomorphin-2 with K_i values of 0.15 (4.6 times) and 28.2 (330 times) nM, respectively. In this presentation, we discuss the effect of Dmt on interaction between ligands and opioid receptors.

緒言

我々の生活習慣が変遷し、また高齢化社会を迎えた今日、がん、心疾患、脳血管疾患が死亡原因の上位を占めている。中でもがんは増加の一途をたどっており末期がん患者の疼痛緩和は解決されなければならない大きな課題である。脳内に存在するオピオイド受容体を介して痛みが制御されており、鎮痛薬として主にモルヒネが使用されている。しかしながらモルヒネ使用時に伴う種々の副作用を考えると、それに替わりうる新しいタイプの体にやさしい鎮痛薬を開発しなければならない。我々は内因性オピオイドリガンドの構造をモデルにしてペプチド誘導体を合成し、構造-活性相関についての検討を続けている。今回オピオイドペプチドである Endomorphin-2⁽¹⁾ (以下 EM-2) 中の Tyr を 2,6-dimethyl-L-tyrosine⁽²⁾ (以下 Dmt) (Figure-1) に置換し、それらの活性を測定し、Dmt の *in vivo*, *in vitro* 活性に及ぼす影響を検討したので報告する。

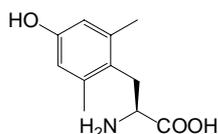
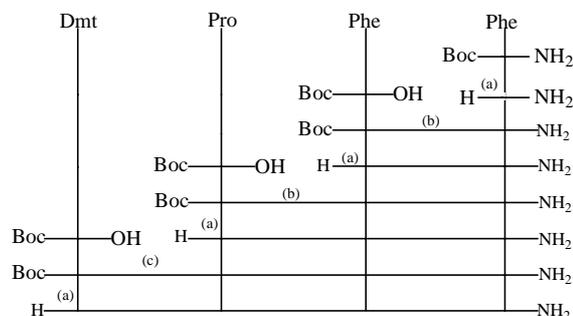


Figure-1. Structure of 2,6-dimethyl-L-tyrosine (Dmt).

実験方法

ペプチド及びペプチドミメティックスの合成

この報告で使用するペプチド及びペプチドミメティックスは液相法により合成された。その一例を Scheme-1 に示す。



Reagents:

(a) HCl/dioxane, (b) IBCF, NMM, (c) PyBop, DIPEA

Scheme-1. Synthetic scheme for [Dmt¹]EM-2.

分析機器類

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) には Waters 600E を使用した。カラムには COSMOSIL-5C18-AR を使い、移動相には A:0.05% TFA 水溶液、B:0.05% TFA アセトニトリル溶液を用いた。

NMR 測定には Bruker DPX400 を使い、内部標準物質としてテトラメチルシラン (δ : 0ppm) を用いた。

質量分析にはマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型計測質量分析装置 (MALDI TOF-MS) を使用した。数値は[M+H]⁺で表した。マトリックスにはシナピン酸を用いた。

CD測定には JASCO J-725 を用い、0.01, 0.02, 0.1cmのセルを用い、サンプルを溶媒 neat TFE (2,2,2-trifluoroethanol)に溶かし、室温で測定した。

オピオイド受容体との結合実験

化合物をラットの脳シナプス分画膜に [³H]ラベル化した μ -受容体に特異的なリガンドである DAMGO (Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol)、 δ -受容体に特異的なリガンドである DPDPE (cyclic[Tyr-Pen-Gly-Phe-Pen])をそれぞれ用い、それらとサンプルを競合拮抗させることにより K_i 値を求めオピオイド受容体との親和性の指標とした。

μ -及び δ -オピオイド受容体に対する agonist、antagonist の評価

モルモット回腸 (Guinea Pig Ileum, GPI) = μ agonist assay、マウス輸精管 (Mouse Vas Deference, MVD) = δ agonist assay

GPI, MVD を用いて μ -及び δ -オピオイド受容体に対する agonist の評価を行った。試験方法はモルモット回腸、マウス輸精管にそれぞれ電気刺激を与えた時の筋肉の収縮を 50% 阻害するのに要したサンプル量 IC_{50} 値を測定し、 μ -及び δ -受容体に対する agonist 活性の指標とした。

結果及び考察

I Endomorphin-2 置換体について

先ず、Endomorphin-2 (EM-2)を基本骨格とし

構成アミノ酸の活性に及ぼす影響を検討しその結果を Table-1 にまとめた。予想どおり 1 位 Tyr を Ala に置換した化合物の結合活性が最も弱く、1 位 Tyr の重要性が理解される。1 位 Tyr を Dmt に置換すると μ 受容体結合活性は 4.6 倍、 δ 受容体結合活性は 330 倍上昇した。また Endomorphin-2 の C 末端からアミノ酸を除去して得られる Tyr-Pro-Phe-NH₂ と Tyr-Pro-NH₂ はそれぞれ $K_i \mu = 46.3$, $K_i \delta = 15,900$ 及び $K_i \mu = 26,107$, $K_i \delta = 40,126$ nM を示した。これら両者の Tyr を Dmt に置換した化合物 Dmt-Pro-Phe-NH₂ と Dmt-Pro-NH₂ はそれぞれ $K_i \mu = 0.12$, $K_i \delta = 532$ 及び $K_i \mu = 41.7$, $K_i \delta = 734.9$ nM を示した。この結果は Tyr 誘導体と受容体との相互作用が弱い場合にも Dmt 置換する事により相互作用を強化することができる。Tyr 誘導体と受容体との相互作用がもともと強い場合には Dmt に置換しても増強の度合いは小さい。これらのことから Dmt の役割を類推することができる。Dmt 置換による結合活性増加の度合いを Figure-1 に示す。Figure-2 に [Ala¹]EM-2, EM-2, [Dmt¹]EM-2 の CD スペクトルを示す。また NMR を用いたコンフォーメーション解析の結果、DMSO 中、Tyr-Pro-X は *trans* 体が多く存在しているのに対し、Dmt-Pro-X は *cis* 体が多く存在していることが分かった。Table-3 に Tyr 誘導体とそれぞれに相当する Dmt 誘導体の GPI, MVD 活性を示す。[Dmt¹]EM-2 の GPI 活性は EM-2 のそれに比べ 81.5 倍の活性を示している。これは化合物の酵素抵抗性の増強と関連しているものと考えられる⁽⁴⁾。

Table-1. The binding activities of EM-2, [Dmt¹]EM-2, and their analogues.

Compounds	³ H]DAMGO		³ H]DPDPE		Binding selectivity $K_i \delta / K_i \mu$
	$K_i \mu$ (nM)	R.P.	$K_i \delta$ (nM)	R.P.	
EM-2	0.69 ± 0.16	1	9230 ± 200	1	13400
[des-Phe ⁴]EM-2 ⁽³⁾	46.3 ± 3.8	0.015	15900 ± 2300	0.58	343
H-Tyr-Pro-NH ₂	26107 ± 1397	(3) 2.6x10 ⁻⁶	40126 ± 1115	(3) 0.23	1.5
APFF-NH ₂	16750 ± 6242	(3) 4.1x10 ⁻⁶	4722 ± 650	(4) 2	0.3
YAFF-NH ₂	3272 ± 283	(3) 2.1x10 ⁻⁵	3466 ± 710	(4) 2.7	1
YPAF-NH ₂	257.4 ± 9.7	(3) 0.0027	2658 ± 738	(4) 3.5	10
YPFA-NH ₂	65.7 ± 2.3	(3) 0.011	3740 ± 662	(4) 2.5	57
[Dmt ¹]EM-2	0.15 ± 0.035	(3) 4.6	28.2 ± 8.1	(3) 330	188
H-Dmt-Pro-Phe-NH ₂	0.12 ± 0.09	(3) 5.8	53.2 ± 6.1	(3) 170	443
H-Dmt-Pro-NH ₂	41.7 ± 1.2	(3) 1.7	734.9 ± 97	(3) 12.6	24

Displacement of [³H]DAMGO (μ -selective) and [³H]DPDPE (δ -selective) from rat brain membrane synaptosome. The K_i values are the mean ± SEM. The potency is relative to that of EM-2.

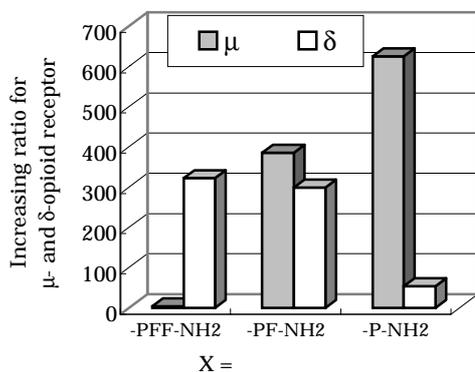


Figure 2. Increasing ratio in binding activities of EM-2 analogues for μ - and δ -opioid receptors by substitution Tyr with Dmt.

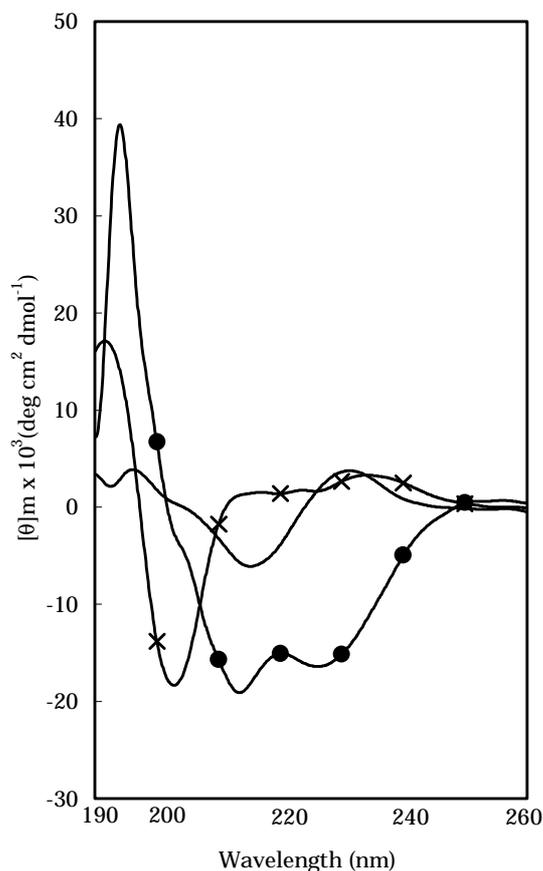


Figure-3. CD spectra of EM-2, [Dmt¹]EM-2 and their analogues in neat TFE. 0.993mM EM-2 (●), 1.25mM APFF-NH₂ (■), 1.00mM [Dmt¹]EM-2 (×).

Table-2. The *cis/trans* ratio of [Dmt¹]EM-2 and its Analogues in DMSO.

	<i>cis : trans</i> ^a
EM-1	1 : 3 ⁽⁵⁾
EM-2	1 : 2 ⁽⁶⁾
[des-Phe ⁴]EM-2	1 : 2
[Dmt ¹]EM-2	7 : 3
H-Dmt-Pro-Phe-NH ₂	13 : 7
H-Dmt-Pro-NH ₂	5 : 3

^a Determined by integration of the ¹H NMR.

Table-3. The GPI and MVD assay of [Dmt¹]EM-2 and its Analogues

Compounds	GPI assay ^{*1}		MVD assay ^{*2}	
	IC ₅₀ (nM)	R.P.	IC ₅₀ (nM)	R.P.
EM-2	5.79 ± 0.4	1	344 ± 93	1
[Dmt ¹]EM-2	0.071 ± 0.016	81.5	1.87 ± 0.6	184
H-Dmt-Pro-Phe-NH ₂	2.33 ± 0.49	2.5	113 ± 35	3.0

^{*1} Values are the mean of seven experiments ± SEM.

^{*2} Values are the mean of six experiments ± SEM.

The potency is related to that of EM-2.

Endomorphin C末端部の置換

我々は EM-2 の構造活性相関に関する研究を行い、YPF-NH₂ でもオピオイド受容体に弱いながら結合することを報告した⁽³⁾。EM-2 の 4 位の Phe-NH₂ を様々なアミンに置換した EM-2 誘導体、更にそれらの 1 位の Tyr を Dmt に置換した [Dmt¹]EM-2 誘導体を合成し、オピオイド受容体との結合活性を検討した。YPF-NH-X のシリーズの中に EM-2 より μ -受容体結合活性の強い誘導体は得られなかった。YPF-NH-C₂H₄-Ph は EM-2 の C 末端の -CONH₂ 基を除去した構造で、受容体との結合活性に -CONH₂ 基が重要である事が示された。これら誘導体の 1 位の Tyr を Dmt に置換すると、 μ -及び δ -受容体に対する結合活性が共に上昇し、EM-2 と同等若しくはそれ以上の結合活性を示した (Figure-4)。特に μ -受容体に対して 1 nM 以下の結合活性を示した。しかしながら、 δ -受容体に対する結合活性が上昇した為、EM-2 の特徴である μ -受容体選択性は著しく低下した。

Table-4. The binding activities of EM-2, [Dmt¹]EM-2, and their analogues.

Compounds	[³ H]DAMGO		[³ H]DPDPE		Binding selectivity <i>K</i> ₁ δ/ <i>K</i> ₁ μ
	<i>K</i> ₁ μ (nM)		<i>K</i> ₁ δ (nM)		
EM-2	0.69 ± 0.16		9230 ± 200		13400
[des-Phe ⁴]EM-2	46.3 ± 3.8		15900 ± 2300		343
H-Tyr-Pro-Phe-NH-C ₂ H ₄ -Ph	13.3 ± 2.6	(3)	4310 ± 635	(3)	324
H-Tyr-Pro-Phe-NH-1-Nph	2.41 ± 0.5	(4)	3640 ± 1260	(4)	1510
H-Tyr-Pro-Phe-NH-3-Qln	55.75 ± 5.03	(4)	18600 ± 1740	(3)	333
H-Tyr-Pro-Phe-NH-5-Qln	4.07 ± 0.45	(4)	12700 ± 2470	(3)	3110
H-Tyr-Pro-Phe-NH-6-Qln	72.9 ± 6.6	(4)	9880 ± 2640	(3)	136
H-Tyr-Pro-Phe-NH-8-Qln	249.2 ± 20.6	(4)	17100 ± 3590	(3)	68
H-Tyr-Pro-Phe-NH-5-Isq	61.11 ± 14.2	(5)	3480 ± 640	(3)	57
[Dmt ¹]EM-2	0.15 ± 0.035	(3)	28.2 ± 8.1	(3)	188
H-Dmt-Pro-Phe-NH ₂	0.12 ± 0.09	(3)	53.2 ± 6.1	(3)	443
H-Dmt-Pro-Phe-NH-C ₂ H ₄ -Ph	0.51 ± 0.15	(3)	18.0 ± 2.5	(3)	35
H-Dmt-Pro-Phe-NH-1-Nph	0.29 ± 0.037	(4)	19.9 ± 3.0	(4)	68
H-Dmt-Pro-Phe-NH-3-Qln	0.33 ± 0.017	(4)	190.4 ± 22.3	(3)	580
H-Dmt-Pro-Phe-NH-5-Qln	0.11 ± 0.014	(3)	30 ± 3.8	(3)	283
H-Dmt-Pro-Phe-NH-6-Qln	0.22 ± 0.038	(4)	46.6 ± 2.4	(3)	212
H-Dmt-Pro-Phe-NH-8-Qln	0.49 ± 0.057	(5)	33.1 ± 1.71	(4)	68
H-Dmt-Pro-Phe-NH-5-Isq	0.19 ± 0.018	(5)	98.3 ± 8.83	(4)	517

Displacement of [³H]DAMGO (μ-selective) and [³H]DPDPE (δ-selective) from rat brain membrane synaptosome.

The *K*₁ values are the mean ± SEM.

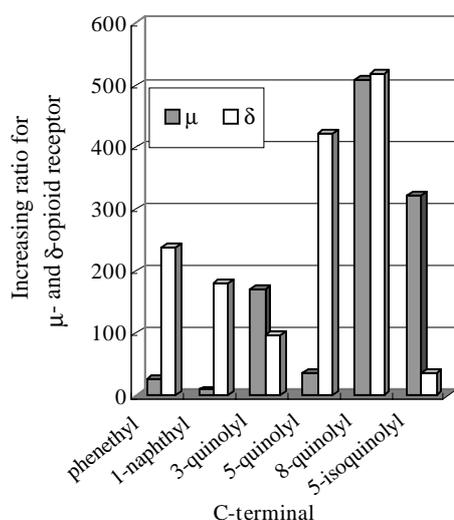
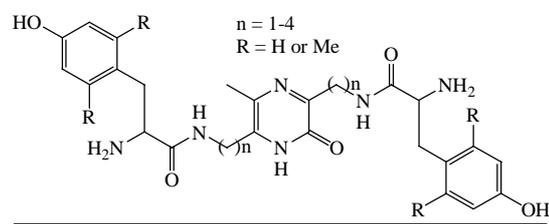


Figure 4. Increasing ratio in binding activities of EM-2 analogues for μ- and δ-opioid receptors by substitution Tyr with Dmt.

ピラジノン環を含む Dmt 誘導体

Figure-5 に示すようなピラジノン環の側鎖アミノ基に Tyr 又は Dmt を導入し、更にメチレン鎖の長さを変えたオピオイドミメティクス⁽⁷⁾を合成し、オピオイド受容体との結合活性を検討した。ピラジノン環側鎖に Tyr を導入した一連の化合物群では、n = 3 が *K*₁μ = 25.7

nM、*K*₁δ = 435 nM と最も結合活性が強かった。一方 Dmt を導入した化合物群では n = 3 が *K*₁μ = 0.042 nM、n = 2 が *K*₁δ = 7.26 nM と最も結合活性が強かった。



Compounds	<i>K</i> ₁ δ (nM)	<i>K</i> ₁ μ (nM)	δ / μ
n = 4 R = H	2185 +/- 133	70.2 +/- 4.8	31
= 4 = Me	23.2 +/- 2.5	0.114 +/- 0.0078	204
= 3 = H	434.7 +/- 84	25.7 +/- 3.0	17
= 3 = Me	13.2 +/- 1.7	0.042 +/- 0.003	314
= 2 = H	2902 +/- 587	308.5 +/- 11.2	9.4
= 2 = Me	7.26 +/- 1.2	0.115 +/- 0.009	63
= 1 = H	1833 +/- 520	460 +/- 14	4.0
= 1 = Me	15.7 +/- 2.1	1.16 +/- 0.18	13.5

Displacement of [³H]-DAMGO (μ-selective) and [³H]-DPDPE

(δ-selective) from rat membrane synaptosome. Values are means +/- S.E.

Figure-5. Structure and receptor binding profiles of opioid mimetics containing pyrazinone ring.

Tyr から Dmt への置換による結合活性の上昇は Figure-6 に示すように μ-及び δ-受容体共に n = 2 が最も上昇した。

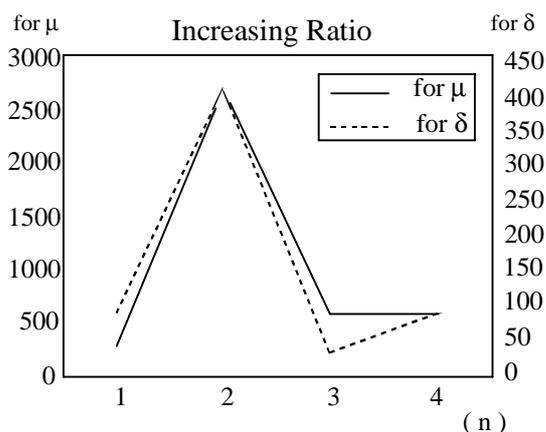
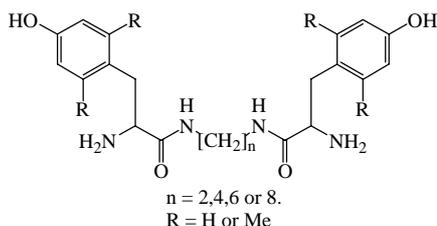


Figure-6. Increasing ratio in binding activity by substitution of Tyr with Dmt for μ - and δ -receptor.

メチレン鎖を含む Dmt 誘導体

次にピラジノン環をより簡単な構造にするためにジアミノアルカンを用い、Figure-7 に示すオピオイドミメティクス合成した。



Compounds	$K_i \delta$ (nM)	$K_i \mu$ (nM)	δ / μ
Dmt-NH-(CH ₂) ₂ -NH-Dmt	116 +/- 10.6	1.43 +/- 0.01	81
Dmt-NH-(CH ₂) ₄ -NH-Tyr	133 +/- 18	0.38 +/- 0.02	349
Dmt-NH-(CH ₂) ₄ -NH-Dmt	53.4 +/- 14.8	0.04 +/- 0.003	1300
Dmt-NH-(CH ₂) ₆ -NH-Dmt	46.1 +/- 8.8	0.053 +/- 0.01	870
Dmt-NH-(CH ₂) ₈ -NH-Dmt	14.8 +/- 3.0	0.19 +/- 0.024	78

Displacement of [³H]-DAMGO (μ -selective) and [³H]-DPDPE (δ -selective) from rat membrane synaptosome. Values are means +/- S.E.

Figure-7. Structure and receptor binding profiles of opioid mimetics containing diaminoalkane, H-Dmt-NH-(CH₂)_n-NH-Dmt-H.

ここでも Dmt 置換は Figure-8 に示すように、結合活性を上昇させた。これらの結果は、Dmt の治療薬への応用の可能性を示唆している。

引用文献

- (1) Zadina, E. J., Hackler, L., Ge, L.-J., Kastin, J. A., A potent and selective endogenous agonist for the μ -opioid receptor, *Nature*, **386**, 499-502(1997).
- (2) Dygos, H. J., Yanan, E. E., Scaros, G. M., Owen, J. G., Getman, P. D., Peroana, A. R., Beck, R. G., A convenient asymmetric synthesis of the

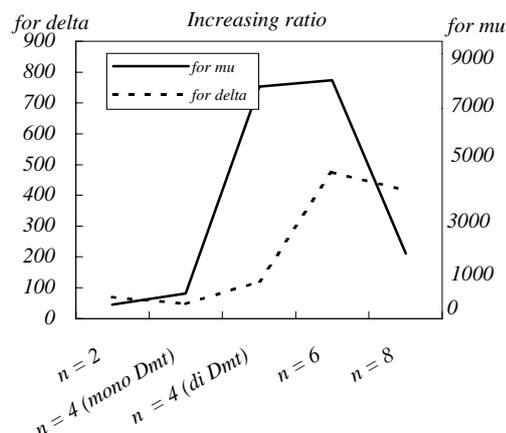


Figure-8. Increasing ratio in binding activities of opioid mimetics containing diaminoalkane, H-Dmt-NH-(CH₂)_n-NH-Dmt-H.

unnatural amino acid 2,6-dimethyl-L-tyrosine, *Synthesis*, 741-743(1992).

- (3) Okada Y., Fukumizu A., Takahashi M., Shimizu Y., Tsuda Y., Yokoi T., Bryant S. D., Lazarus L. H., Synthesis of stereoisomeric analogues of endomorphin-2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, and examination of their opioid receptor binding activities and solution conformation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 7-11(2000).

- (4) Sasaki Y., Suto T., Ambo A., Ouchi H., and Yamamoto Y., Biological properties of opioid peptides replacing Tyr at position 1 by 2,6-dimethyl-Tyr, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1506-1509 (1999).

- (5) Podlogar, B. L., Paterelini, M. G., Ferguson, D. M., Leo, G. C., Demetr, D. A., Brown, F. K., and Reitz, A. B., Conformational analysis of the endogenous μ -opioid agonist endomorphin-1 using NMR spectroscopy and molecular modeling, *FEBS Letters*, **439**, 13-20 (1998).

- (6) In, Y., Minoura, K., Ohishi, H., Minakata, H., Kamigauchi, M., Sugiura, M., and Ishida, T., Conformational comparison of m-selective endomorphin-2 with its C-terminal free acid in DMSO solution, by ¹H NMR spectroscopy and molecular modeling calculation *J. Peptide Res.*, **58**, 399-412 (2000).

- (7) Okada Y., Fukumizu A., Takahashi M., Yamazaki J., Yokoi T., Tsuda Y., Bryant S. D., Lazarus L. H., Amino acid and peptides. LVI. Synthesis of pyrazinone ring-containing opioid mimetics and examination of their opioid receptor binding activity, *Tetrahedron*, **55**, 14391-14406 (1999).