

# 植物タンパク質由来 オピオイドペプチドの中枢作用

園田壮司<sup>1</sup>、楊樹長<sup>1</sup>、土山直美<sup>1</sup>、高橋正克<sup>2</sup>、吉川正明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科

<sup>2</sup>長崎大学教育機能開発センター

## Central effect of a $\delta$ -opioid peptide derived from plant protein

Soushi Sonoda<sup>1</sup>, Shuzhang Yang<sup>1</sup>, Naomi Doyama<sup>1</sup>, Masakatu Takahashi<sup>2</sup>, Masaaki Yoshikawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture  
Kyoto University

<sup>2</sup>Division of Higher Education Research, Research and Development Center  
for Higher Education, Nagasaki University

**Summary:** Rubiscolin-6 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe) a delta-selective opioid peptide derived from ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) showed analgesic and memory-enhancing activity after oral administration at dose of 100 mg/kg. It also showed an anxiolytic effect in mice at a dose of 30 nmol/mouse (i.c.v.) or 100 mg/kg (p.o.) in elevated plus maze experiment. The anxiolytic effect was blocked by naltrindole.

## 緒言

Rubiscolin-6 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe) はすべての緑葉の主要タンパクである ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) から派生する $\delta$ オピオイドペプチドである<sup>1)</sup>。以前、我々は小麦グルテンより得られた $\delta$ オピオイドペプチド Gluten exorphin A5 (Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr) が学習促進作用および弱い抗不安作用を有することを見出した<sup>2,3)</sup>。また、Rubiscolin-6 が Gluten exorphin A5 よりも強い学習促進作用を有することを見出した<sup>4)</sup>。今回は、Rubiscolin-6 の抗不安作用について検討した。

## 実験方法

抗不安実験は ddY 系雄性マウス(体重 23-26 g) と高架式十字迷路装置を用いて行った。ペプチドは観察開始の 10 分前(脳室内投与)、30 分前(経口投与)にそれぞれ投与した。アンタゴニストはペプチド投与の 10 分前に投与した。実験開始後、目視にて、オープンアームの滞在時間およびそれぞれのアームへの侵入回数を 5 分間にわたり観察した。

## 結果

Rubiscolin-6 の脳室内投与(30 nmol) および経口投与(100 mg/kg) により、オープンアーム

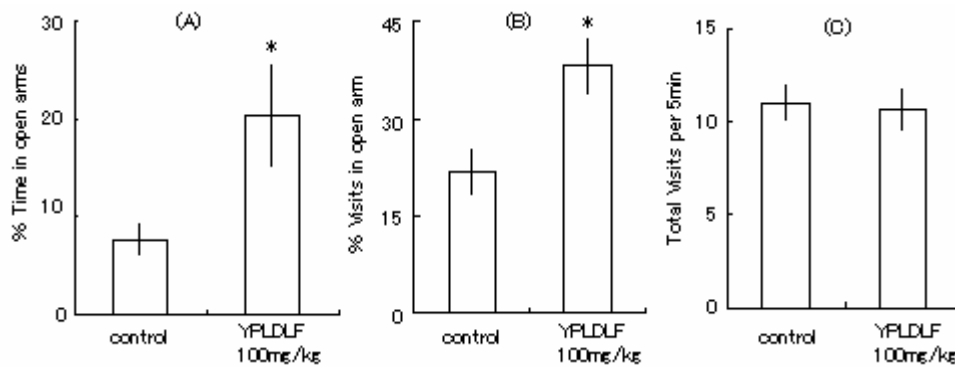


Fig. 1. Anxiolytic effect of rubiscolin-6 after oral administration. Rubiscolin-6 was given orally 30 min before applying the mice onto elevated plus maze. Each value represents mean  $\pm$  sem. \*  $p < 0.05$  vs control group, students t-test.

への滞在時間および侵入回数の有意な増加が認められた (Fig. 1A および B)。なお、両アームへの総侵入回数に変化は見られず行動抑制は生じなかった (Fig. 1C)。また、オピオイドアンタゴニストである naltridole の投与によりこの抗不安作用の有意な抑制が認められた。

## 考察

Rubiscolin-6 の脳室内投与 (30 nmol)、経口投与 (100 mg/kg) いずれの場合にもオープンアームへの滞在時間の延長および侵入回数の増加が認められたことにより、Rubiscolin-6 は、抗不安作用を有することがわかった。また、オピオイドアンタゴニスト投与によりこの現象は抑制されたことにより、抗不安作用は  $\delta$  オピオイドレセプターを介していることがわかった。

なお、以前の結果では Gluten exorphin A5 は経口投与の際に有意ではないが、用量依存的な抗不安作用を示した。また、経口投与による学習促進作用に必要な最小用量については Gluten exorphin A5 が 300 mg/kg であったのに対し、Rubiscolin-6 は 100 mg/kg であった。

このように rubiscolin-6 と Gluten exorphin A5 はいずれも  $\delta$  オピオイドレセプターを介して

抗不安作用および学習促進作用を示し、Rubiscolin-6 の方が作用が強いことがわかった。

## 引用文献

- 1) Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama N, Lipkowski AW, Kawamura Y, Yoshikawa M. Rubiscolin, a  $\delta$  selective opioid peptide derived from plant Rubisco. FEBS Lett 2001;509:213-7.
- 2) Fukudome S, Yoshikawa M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. FEBS Lett 1992;296:107-111.
- 3) Takahashi M, Fukunaga H, Kaneto H, Fukudome S, Yoshikawa M. Behavioral Pharmacological studies on gluten exorphins A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. JPN J Pharmacol 2000;84:259-265.
- 4) Yang S, Kawamura Y, Yoshikawa M. Effect of rubiscolin, a  $\delta$  opioid peptide derived from Rubisco, on memory consolidation. Peptides 2003;24:325-328

# モルヒネ禁断時の不快な精神症状における extended amygdalaの役割

富士尾まゆみ、山本梨絵、中川貴之、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

## A role of the extended amygdala in the negative affective component of morphine withdrawal in rats

Mayumi Fujio, Rie Yamamoto, Takayuki Nakagawa, Masabumi Minami, Masamichi Satoh  
Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Summary: We examined the role of the central nucleus of the amygdala (CeA) and the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in the negative affective component of morphine withdrawal in rats. CeA- or BNST-lesion significantly reduced the naloxone-precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion. CeA-lesion reduced morphine withdrawal-induced c-Fos expression in the BNST, while BNST-lesion had no effect on that in the CeA. More than a half of retrogradely labeled neurons in the CeA by intra-BNST injection of WGA-apoHRP-gold, a retrograde-tract tracer, were immunoreactive to morphine withdrawal-induced c-Fos. Further, many CRF-immunoreactive neurons in CeA were retrogradely labeled from the BNST and labeled to morphine withdrawal-induced c-Fos. Intra-BNST injection of  $\alpha$ -helical CRF (9-41), a CRF antagonist, significantly reduced the morphine withdrawal-induced CPA. These results suggest that activation of the CRF-containing neurons from the CeA to BNST contributes to the negative affective component of morphine withdrawal.

## 緒言

モルヒネは強い鎮痛作用を有することから、疼痛治療において欠くことのできない薬物であるが、医師や患者がその「麻薬」性を恐れて使用をためらい、適正な疼痛治療が行われない場合がある。モルヒネ依存には精神依存と身体依存が存在し、その退薬時には不快な精神症状を伴った禁断症状が発現する [1]。最近では、扁桃体中心核 (CeA) や分界条床核 (BNST)、側坐核shellなどからなる extended amygdala と呼ばれる前脳基底部の領域が、

様々な依存性薬物による薬物耽溺に関与していることを示唆されている [2]。Extended amygdala に含まれる神経核間には互いに密な線維連絡があり、特にCeAからBNSTへは非常に密な投射があること [3]。さらに、これらの神経核はどちらもモルヒネ禁断発現時に強く活性化されることが知られている [4,5]。そこで本研究ではこれらの神経核に焦点を絞り、モルヒネ禁断時の不快な精神症状に関与するCeA-BNST間の神経ネットワークを明らかにするため、モルヒネ禁断により惹起される条件付け場所嫌悪反応を不快な精神症状の指標とした行動薬理的検討のほか、解剖学的、免疫組織化

学的手法を用いた検討を行った。さらに、そこで働く神経伝達物質を同定するため、各種依存性薬物による依存形成に寄与することが報告されているcorticotropin-releasing factor (CRF) [6]の関与を検討した。

## 実験方法

### 両側CeAあるいはBNSTの興奮性神経毒による限局的損傷

動物は雄性SD系ラット(体重180-250g)を使用した。CeAの限局的損傷はbregmaよりAP -1.8 mm、L  $\pm$ 4.0 mm、DV 8.0 mmの位置へ、BNSTの限局的損傷はbregmaよりAP -0.3 mm、L  $\pm$ 1.6 mm、DV 7.0 mmの位置へ0.3 M NMDA 0.3  $\mu$ l/sideを、3分間かけて投与することにより行った。実験終了後、組織学的検討を行い、CeAおよびBNSTが両側ともに限局的に損傷されている個体のみをデータ解析に用いた。

### 条件付け場所嫌悪性試験

壁の色と床の質感が異なる2つのボックスからなる装置を用いた。ラット頸背部皮下にモルヒネ75 mgを含有するペレット1個を3日間埋め込むことにより依存を形成させた。条件付け場所嫌悪性試験開始1日目と2日目に、15分間両ボックス間を自由に探索させ、2日目により長く滞在したボックスを嗜好側ボックスとした。3日目午前にsaline (1 ml/kg)を腹腔内投与して非嗜好側ボックスに1時間閉じこめ、同日午後ナロキソン (0.3 mg/kg)を腹腔内投与して嗜好側ボックスに1時間閉じこめることで条件付けを行った。4日目に再び15分間両ボックス間を自由に探索させ、この時の嗜好側ボックスでの滞在時間から2日目の滞在時間を引き、その値が負の場合、場所嫌悪反応が惹起されたものと評価した。

### 免疫染色および逆行性標識

ナロキソンによりモルヒネ禁断を誘発した1時間後に、4% paraformaldehydeで経心灌流固定して脳を摘出した。後固定、sucrose置換後脳を凍結させ、クリオスタットで厚さ25  $\mu$ mの切片を作成した。免疫染色には抗c-Fos抗体、抗CRF抗体を一次抗体として用い、ABC法-DAB発色もしくは蛍光標識した二次抗体を用いて可視化した。また、一部のラットにおいては、モルヒネペレットを埋め込んだ翌日に、逆行性標識物質である wheat germ agglutinin (WGA) -apoHRP gold (0.5  $\mu$ l)を5分間かけてBNSTに注入した。逆行性標識物質は銀染色を施すことで可視化した。

### 両側BNST内への薬物微量投与

麻醉下、BNSTの背側へガイドカニューレを埋め込み、手術後6日目以降に実験に用いた。薬物は、33Gインジェクションカニューレを用いて両側BNST内へ1.0  $\mu$ l/sideを2分間かけて微量投与した。実験終了後、組織学的検討を行い、両側ともにBNSTへの投与が確認された個体のみをデータ解析に用いた。

## 結果

### CeA あるいは BNST 限局的損傷によるモルヒネ禁断場所嫌悪反応および c-Fos 発現誘導への影響

モルヒネ依存ラットにナロキソンを腹腔内投与することによって惹起される条件付け場所嫌悪反応は、両側 CeA あるいは両側 BNST を限局的に損傷しておくことにより、どちらも有意に減弱された (Fig.1)。

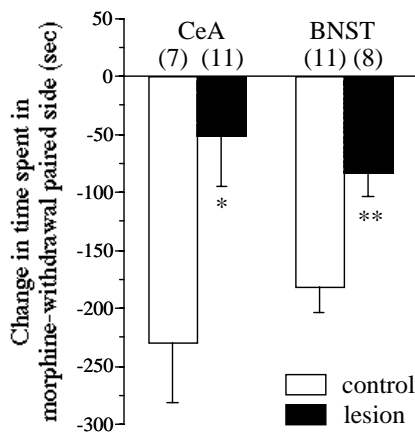


Fig.1 Effect of CeA- or BNST-lesion on naloxone precipitated morphine withdrawal-induced conditioned place aversion. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control.  $n = 7-11$ .

CeA-BNST 間の神経連絡の相互関係を、モルヒネ禁断による c-Fos の発現誘導を神経活性化の指標として検討した。その結果、モルヒネ禁断により誘導される BNST での c-Fos の発現細胞数は、CeA の限局的損傷により、特に lateral division, juxtacapsular part (BSTLJ)、lateral division, posterior part (BSTLP)、medial division, anterior part (BSTMA) において、非損傷群と比較して有意に減弱された。一方、CeA での c-Fos 発現細胞数は、BNST の限局的損傷によっても、いずれの subdivision においても有意な変化は見られなかった (Table 1)。

#### モルヒネ禁断時の CeA から BNST へ投射する神経の活性化

BNST に逆行性標識物質を注入することにより、CeA において逆行性標識された神経 (すなわち、CeA から BNST に投射する神経) の約半数以上が、モルヒネ禁断後に、抗 c-Fos 抗体によって二重標識された (Fig.2)

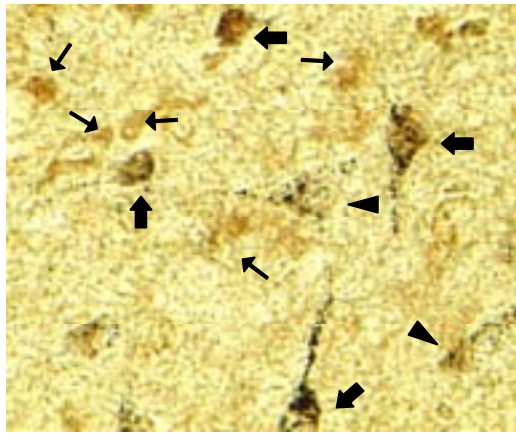
Table 1 Effect of CeA- or BNST-lesion on the numbers of c-Fos immunoreactive cells induced by naloxone-precipitated morphine withdrawal.

	Numbers of c-Fos immunoreactive cells	
	control	lesion
<i>CeA-lesion</i>		
BSTLJ	49.6 ± 5.7	31.5 ± 7.7 **
BSTLD	154 ± 19	118 ± 16
BSTLP	29.3 ± 7.3	17.1 ± 5.1 *
BSTMA	156 ± 24	68.9 ± 14 **
BSTLV/MV	81.1 ± 2.4	80.7 ± 4.0
<i>BNST-lesion</i>		
CeC	221 ± 6.1	216 ± 4.9
CeL	9.9 ± 3.8	7.3 ± 5.3
CeM	7.5 ± 3.1	7.3 ± 2.3

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control. *BSTLJ*; bed nucleus of the stria terminalis, lateral division, juxtacapsular part, *BSTLD*; lateral division, dorsal part, *BSTLP*; lateral division, posterior part, *BSTMA*; medial division, anterior part, *BSTLV*; lateral division, ventral part, *BSTMV*; medial division, ventral part, *CeC*; central nucleus of the amygdala, capsular part, *CeL*; lateral division, *CeM*; medial division.

#### モルヒネ禁断時の CeA から BNST へ投射する CRF 含有神経の活性化

ナロキソン誘発モルヒネ禁断後の CeA において、CRF に対する免疫染色と BNST からの逆行性標識との二重染色を行った。その結果、BNST から逆行性に標識された CeA の神経の多くが抗 CRF 抗体を用いた免疫染色により二重標識された。さらに、ナロキソン誘発モルヒネ禁断発現 1 時間後の CeA において、抗 c-Fos 抗体と抗 CRF 抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行った。その結果、CeA における CRF 陽性細胞の多くが抗 c-Fos 抗体陽性であった。



**Fig.2 Double staining with retrograde tract-tracer (intra-BNST) and anti-c-Fos antibody in the CeA.**  
 (■ Double labeled neurons, ▲ retrogradely labeled neurons, → c-Fos positive neurons)

### CRF受容体アンタゴニストのBNST内微量投与によるナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応の変化

CRF受容体アンタゴニストである $\alpha$ -helical CRF (9-41) (0.1  $\mu$ g/side) を条件付けの10分前に、両側BNST内へ微量投与したところ、ナロキソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応は有意に減弱された。

### 考察

本研究において、興奮性神経毒をもちいた脳部位限局的損傷実験により、モルヒネ禁断時の場所嫌悪反応に、extended amygdala に含まれる CeA および BNST がともに寄与していることが示された。この extended amygdala に含まれる神経核間には互いに密な線維連絡があることが知られており[3]、特にこの CeA-BNST 間の線維連絡が関与している可能性が考えられた。c-Fos の発現誘導を神経活性化の指標とした本研究結果から、モルヒネ禁断時には、CeA から BNST へ投射する神経が興奮し、そのシグナルを受けた BNST の神経が

活性化され、不快な精神症状の惹起につながっていくことが示唆される。一方、CeA から BNST に投射するニューロンの多くは CRF を含有していることが報告されている[7]。本研究においても、BNST から逆行性に標識された CeA のニューロンの多くが抗 CRF 抗体を用いた免疫染色により二重標識されることを確認し、また、抗 c-Fos 抗体と抗 CRF 抗体を用いた蛍光二重免疫染色により、モルヒネ禁断時の CeA における CRF 陽性細胞の多くが、抗 c-Fos 抗体陽性であることを見いだした。本研究結果より、CeA から BNST へ投射する神経の活性化がモルヒネ禁断による条件付け場所嫌悪反応(不快な精神症状)を惹起させること、またその神経の少なくとも一部のニューロンは CRF を伝達物質としていることが示唆される。

### 引用文献

- [1] Schulteis, G., Markou, A., Gold, L. H., Stinus, L., Koob, G. F.: Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271, 1391-1398 (1994)
- [2] Koob, G.F.: The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877, 445-460 (1999)
- [3] Bourgeois, L., Gauriau, C., Bernard, J. F.: Projections from the nociceptive area of the central nucleus of the amygdala to the forebrain: a PHA-L study in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 14, 229-255 (2001)
- [4] Guen, S.L., Gestreau, C., Besson, J.M.: Sensitivity to naloxone of the behavioral signs of morphine withdrawal and c-Fos expression in the rat CNS: A quantitative dose-response analysis. *J. Comp. Neurol.*, 433, 272-297 (2001)
- [5] Frenois, F., Cador, M., Caillé, S., Stinus, L., Moine, C.L.: Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur. J. Neurosci.*, 16, 1377-1389 (2002)
- [6] Sarnyai, Z., Shaham, Y., Heinrichs, S.C.: The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol. Rev.*, 53, 209-243 (2001)
- [7] Sakanaka, M., Shibasaki, T., Lederis, K.: Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res.*, 382, 213-238 (1986)

# 内因性 $\mu$ -オピオイド受容体作動薬 endomorphin-1 の マウス認知機能モジュレーターとしての作用

間宮隆吉、加藤寿規、奥田亜美、鶴飼 良  
名城大学薬学部 薬品作用学教室

## Effects of endomorphin-1, a $\mu$ -opioid receptor agonist on the learning and memory function in mice

Takayoshi Mamiya, Toshinori Katoh, Ami Okuda and Makoto Ukai

Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University

Summary: Endomorphin-1, an endogenous  $\mu$ -opioid peptide, has been reported to distribute in the brain and plays various roles in not only regulation of pain threshold but also emotion and memory in rodents. Here we investigated the effects of this neuropeptide on cognitive functions in mice using Y-maze and passive avoidance tests. At higher doses, endomorphin-1 impaired the spontaneous alternation behavior of the Y-maze and the performances of step-down type passive avoidance in mice. In the Y-maze test, higher doses of endomorphin-1 induced the deficits of short-term memory, although lower doses did not affect alternation behavior. Lower doses of endomorphin-1 attenuated the scopolamine-induced memory deficits. In the step-down type passive avoidance test, lower doses of this peptide decreased the step-down latency, but at higher doses it was ineffective. These results suggest that endomorphin-1 has biphasic neuroregulatory effects on cognitive functions in mice.

### 緒言

脳内の神経ペプチドのうちオピオイドペプチドはオピオイド受容体に作用するペプチドであり、オピオイド受容体は、生体内では  $\mu$ -、 $\delta$ -、 $\kappa$ -の3種に分類され、それらが学習記憶に影響を与えていることは古くから知られている。内在性の  $\delta$ -オピオイドペプチドおよび  $\kappa$ -オピオイドペプチドに続き、近年  $\mu$ -オピオイドペプチドとして4個のアミノ酸からなる endomorphin-1 および endomorphin-2 が単離精製され、第4のオピオイド様ペプチドの nociceptin を含めオピオイド受容体に関連した内在性のペプチドはすべて発

見された。さらにそれらの受容体欠損マウスもすべて作製され、ペプチドおよび受容体を含めたオピオイド神経系の学習記憶機能における役割が詳細に検討されてきている。

内在性  $\mu$ -オピオイドペプチドの endomorphin-1 の含量はウシ全脳において  $\kappa$ -オピオイドペプチドの dynorphin と同程度であり、特に endomorphin-1 の脳内含量は endomorphin-2 の約3倍であることも認められている。Endomorphin-1 は視床、視床下部、線条体、前脳皮質などに分布し、 $\mu$ -オピオイド受容体の分布と類似している。そこで、endomorphin-1 を用いて

$\mu$ -オピオイド受容体を介した学習記憶に対する作用について検討した。

## 実験方法

7-8 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。また、実験前の少なくとも 3 日間は室温  $24 \pm 1$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、8:00-20:00 明期の明暗サイクルの恒温室で飼育し、水および飼料は自由に摂取させた。Endomorphin-1 および scopolamineHBr は 0.9% 生理食塩液に溶解した。側脳室内投与では、マウスをエーテル麻酔下で頭部を固定し、マイクロシリンジに長さ 2 mm のステンレス製注射針 (30 ゲージ) をつけた。その注射針の先端をマウスの耳の付け根と正中線との交点より左右いずれかの外側 2 mm の頭蓋骨に垂直に刺入し、約 30 秒かけて 4  $\mu$ l/mouse を側脳室内に注入した。

### 1. 自発的交替行動試験

実験装置として、1 本の arm の長さが 40 cm、壁の高さが 12 cm、床の幅が 3 cm、上部の幅が 10 cm で、内側が黒色に塗装された 3 本の arm が 120 度の角度で接続された木製 Y 字型迷路を使用した。自発的交替行動の測定は、マウスを Y 字型迷路のいずれかの arm の先端より入れ、8 分間にわたってマウスが入った arm の総数を total arm entries とし、自発運動の指標とした。次に、マウスが連続して異なる 3 本の arm を選択した数を no. of alternation とし、常法に従って自発的交替行動率を算出した。なお、endomorphin-1 は自発的交替行動の測定開始 15 分前に側脳室内投与 (i.c.v.) した。

### 2. 受動的回避試験

実験装置として、電球 (15 W) のついた木製半防音箱 (35 x 35 x 90 cm) の中に、30 x 30 x 40 cm の透明アクリル製ケージを設置し、床にはグリッド (直径 3 mm のステンレス棒を 1 cm 間隔で 30 本設置) と、その中央には 4 x 4 x 4 cm の木製プラットフォームを固定した step-down 型装置を用いた。また、電気ショック負荷用として電気刺激装置およびアイソレーターを接続した。

訓練試行では、マウスをプラットフォーム上に静かに置き、床グリッドにステップダウン (四肢が

プラットフォームより離れ、床グリッドへ完全に下りること) した直後より、間欠的な電気ショック (80V, D.C., 1 Hz, 0.5 秒) を 15 秒間負荷した。なお、3 秒から 15 秒以内にステップダウンしたマウスのみを使用した。保持試行では、訓練試行の 24 時間後に訓練試行と同様にマウスをプラットフォーム上にのせ、床グリッドへ完全に下りるまでの時間 (step-down latency) を測定した。この試行では、グリッドからの電気ショックは負荷されなかった。Cut-off 時間は、300 秒とした。なお、endomorphin-1 は保持試行の 15 分前に側脳室内投与 (i.c.v.) した。

### 3. 統計処理

Kruskal-Wallis 検定による一元配置分散分析を行い、その後 Bonferroni 検定を用いて群間の比較を行った。なお、 $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありとみなした。

## 結果および考察

### 1. 自発的交替行動試験

自発的交替行動は、マウスが実験室の壁や物の位置などを手がかりとした空間記憶により、Y 字型迷路の各 arm を区別しているものと考えられており、この行動は作業記憶または短期記憶に基づくと考えられている。今回の研究では  $\mu$ -オピオイド受容体作動薬の役割を詳しく調べるために幅広く用量を検討した。Endomorphin-1 (10 および 17.5  $\mu$ g) は、自発的交替行動率を有意に減少させた。このことは  $\mu$ -オピオイド受容体を刺激すると学習記憶機能が障害されることを意味している。実際、ヒトにおいてもモルヒネを高用量摂取すると意識障害などの認知機能障害が観察されることもあり、このような薬理学的作用を反映した用量なのではないかと考えられる。そしてこの endomorphin-1 (10  $\mu$ g) による自発的交替行動率の有意な減少は、 $\mu_1$ -オピオイド受容体拮抗薬で抑制されたことから、 $\mu_1$ -オピオイド受容体を介した反応と考えられる。

一方、スコポラミン誘発自発的交替行動障害に対し endomorphin-1 は高用量では何ら作用しなかったが、非常に低い用量で緩解作用を示した。この緩解作用も  $\mu_1$ -オピオイド受容体拮抗薬で抑



制されたことから、 $\mu_1$ -オピオイド受容体を介した反応と考えられる。Endomorphin-1の低用量は一般行動に対しては特に無作用であったことを含めると、上述したように自発的交替行動を障害した用量は薬理的に過剰投与であったのかも知れない。以上のことから、endomorphin-1は学習記憶機能と密接に関連しており、コリン作動性神経機能の低下を伴った学習記憶障害に対して優れた治療薬となる可能性があると考えられる。

## 2. 受動的回避試験

この試験では、マウスに電気(嫌悪)刺激を与えることによって、床が危険であることを学習させ、再び同じ条件下に置いた時の反応状態からその学習記憶能を測定することができる。マウスが同じ条件下で再び情報を思い出すためには、長期間その情報を記憶する必要があり、受動的回避学習は長期記憶に相当すると考えられる。受動的回避試験において、endomorphin-1 (10 および 17.5  $\mu\text{g}$ ) は step-down latency を有意に短縮した。この短縮は、 $\beta$ -FNA (5  $\mu\text{g}$ ) により有意に抑制されたが、 $\delta$ -オピオイド受容体拮抗薬 NTI (4 ng) あるいは $\kappa$ -オピオイド受容体拮抗薬 n-BNI (4  $\mu\text{g}$ ) を併用しても影響されなかった。これらの結果は、 $\mu$ -オピオイド受容体作動薬 TAPA を受動的回避試験の訓練試行前に投与すると学習記憶が障害される事実と一致した。したがって、endomorphin-1 は  $\mu$ -オピオイド受容体を介して長期記憶を障害させるものと考えられる。また、今回用いた学習記憶障害を誘発させる endomorphin-1 の用量は、抗侵害作用を誘発させる用量と異なっており、それらの作用メカニズムも異なっている可能性が示唆される。

## 結論

Endomorphin-1 は単独では学習記憶障害を誘発するが、低用量では学習記憶障害モデル動物に対して改善作用を示し、2相性の作用を有してい

ることが見出された。どちらも $\mu_1$ -オピオイド受容体を介した反応と考えられるが、どのような調節機構によるものかについては詳細な検討が必要である。

## 参考文献

- Ukai M, Okuda A. Endomorphin-1, an endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonist, improves apomorphine-induced impairment of prepulse inhibition in mice. *Peptides, in press.*
- Ukai M, Lin HP. Endomorphins 1 and 2 induce amnesia via selective modulation of dopamine receptors in mice. *Eur J Pharmacol.* 2002 446:97-101.
- Ukai M, Lin HP. Involvement of  $\mu_1$ -opioid receptors and cholinergic neurotransmission in the endomorphins-induced impairment of passive avoidance learning in mice. *Behav Brain Res.* 2002 129:197-201.
- Ukai M, Katoh T, Mamiya T. Endomorphin-1 improves scopolamine-induced impairment of short-term memory via  $\mu_1$ -opioid receptor in mice. *Neuroreport.* 2001 12:3723-3727.
- Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. Endomorphins 1 and 2, endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists, impair passive avoidance learning in mice. *Eur J Pharmacol.* 2001 421:115-119.
- Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. Effects of endomorphins-1 and -2, endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists, on spontaneous alternation performance in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000 395:211-215.

# Morphine 誘発報酬効果発現に対する 脊髄内 protein kinase C の役割

大江公晴<sup>1,2)</sup>、成田 年<sup>2)</sup>、芝崎真裕<sup>2)</sup>、  
久保田千晴<sup>2)</sup>、矢島誠識<sup>2)</sup>、山崎光章<sup>1)</sup>、鈴木 勉<sup>2)</sup>

1) 富山医科薬科大学麻酔科学講座

2) 星薬科大学薬品毒性学教室

## The role of protein kinase C within the spinal cord in the expression of the morphine-induced rewarding effect in mice

Kousei Oe<sup>1,2)</sup>, Minoru Narita<sup>2)</sup>, Masahiro Shibasaki<sup>2)</sup>, Chiharu Kubota<sup>2)</sup>,  
Yoshinori Yajima<sup>2)</sup>, Mitsuaki Yamazaki<sup>1)</sup> and Tsutomu Suzuki<sup>2)</sup>

1) Department of Anesthesiology, Toyama Medical and Pharmaceutical University  
Faculty of Medicine

2) Department of Toxicology, Hoshi University  
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Summary: We previously demonstrated that the morphine-induced rewarding effect was attenuated under a neuropathic pain-like state following partial sciatic nerve ligation in rodents. Furthermore, it is well recognized that the facilitation of protein kinase C (PKC) activity in the spinal cord is the key factor for the induction of thermal hyperalgesia following nerve ligation. However, little is known about the possible involvement of spinal PKC in the reduction of rewarding effect induced by morphine. The present study was designed to investigate whether activation of spinal PKC by nerve ligation could be implicated in the suppression of the morphine-induced rewarding effect under the neuropathic pain-like state in mice. The rewarding effect induced by morphine was markedly attenuated in nerve-ligated mice accompanied with the activation of spinal PKC by nerve ligation. It should be noted that the suppression of the morphine-induced rewarding effect by nerve ligation was significantly reversed by repeated i.t. pretreatment with PKC inhibitor RO-32-0432 just before and once a day for first 3 days after the nerve ligation. These findings suggest that the preliminary facilitation of spinal PKC activity caused by nerve ligation could affect the morphine-induced rewarding effect in mice. Then, the next study was designed to examine whether direct activation of PKC in the spinal cord by a specific activator, phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu), could suppress the rewarding effect induced by morphine in mice. A single i.t. injection of PDBu produced a marked pain-like behaviors and a long-lasting thermal hyperalgesia in a dose-dependent manner. Under these conditions, the rewarding effect induced by morphine was abolished by a single i.t. pretreatment with PDBu in mice. Furthermore, it is worthwhile to note that a single i.t. injection of PDBu caused a marked increase in the number of c-Fos-like immunoreactivity expressing cells in the parafascicular nucleus, amygdala and cingulate cortex, but not hippocampus in the mouse. Collectively, these findings raise the possibility that activated PKC in the spinal cord with chronic pain-like hyperalgesia causes synaptic changes in the emotionality-related brain regions, resulting in the suppression of the morphine-induced rewarding effect in mice.

## 緒言

近年、神経因性疼痛の発現に protein kinase C (PKC) が関与している可能性が示唆されており

<sup>1,2)</sup>、我々も脊髄の PKC の持続的な活性化が神経因性疼痛の発現に重要な役割を果たしていることを確認している<sup>3,4)</sup>。一方、幅広い臨床経験から、疼痛下においてはモルヒネに対する精神依存は

ほとんど問題とならないことが知られている。我々は、起炎物質であるカラゲニンあるいはホルマリンの足蹠皮下投与により作製した炎症性疼痛モデルおよび坐骨神経結紮により作製した神経因性疼痛モデルを用いて、慢性疼痛下ではモルヒネに対する精神依存（報酬効果）が形成されないことを明らかにしている<sup>5-8)</sup>。

こうした背景から、脊髄における PKC の活性化は、モルヒネの精神依存形成の抑制に深く関与している可能性が想定される。そこで本研究では、坐骨神経を結紮したマウスの髄腔内に選択的 PKC 阻害薬である Ro-32-0432 を前処置し、坐骨神経結紮によるモルヒネの報酬効果の抑制作用に及ぼす影響を検討した。また、PKC の活性化薬である phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) を正常マウスの髄腔内に投与し、モルヒネの報酬効果に対する影響についても検討した。

## 実験方法

### 実験動物

実験には ICR 系雄性マウス (20-25g) を使用した。

神経因性疼痛モデルは、Seltzer ら<sup>9)</sup> の方法に準じ、sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて、絹糸で右側後肢の坐骨神経を半周結紮することにより作製した。これに対し、坐骨神経を露出ただけで、結紮しなかった群を非結紮群とした。

### 使用薬物

本研究では、選択的 PKC 阻害薬として Ro-32-0432 (0.1 および 1 nmol/mouse) を、PKC の活性化薬として PDBu (1, 3 および 10 nmol/mouse) を用いた。なお、マウスの髄腔内への薬液の投与容量は 4  $\mu$ L/mouse とした。

### モルヒネ誘発報酬効果の測定

モルヒネの報酬効果は、条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference; CPP) を用いて評価した。条件づけはプレ方式に従い、プレテスト

終了後 1 日目にモルヒネ (5 mg/kg) あるいは溶媒をマウスに皮下投与し、白あるいは黒の区画に 60 分間閉じ込めた。2 日目にはそれぞれ 1 日目とは逆の操作を行い、これを 1 セッションとし、計 3 セッション (6 日間) 行った。また、条件づけ開始前日および条件づけ終了翌日にプレおよびポストテストを行い、モルヒネあるいは溶媒のいずれも処置せずに 15 分間、白と黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画に滞在する時間を測定し、下記の式にしたがって CPP スコアを算出した。

CPP スコア (sec) = ポストスコア - プレスコア

### PKC 活性化薬の髄腔内投与による疼痛関連行動の測定

PKC 活性化薬である PDBu (1, 3 および 10 nmol/mouse) をマウスの髄腔内に投与し、引き起こされる引掻き (Scratching)、舐め (Licking)、噛み (Biting) 行動の発現回数あるいは累積発現持続時間、および尾を激しく振る行動 (Severe tail-shaking) ならびに啼鳴反応 (Vocalization) の発現の有無を投与後 20 分間観察した。

### 熱刺激に対する疼痛閾値の測定

坐骨神経結紮による熱刺激に対する痛覚過敏反応の測定には、正常動物において後肢を跳ねのけるまでの反応潜時が、約 8-10 秒になるように熱刺激を調整した足底熱刺激装置を用いた。マウスの両側後肢の足底にそれぞれ熱刺激を加え、後肢を跳ねのけるまでの反応潜時を疼痛閾値の指標とし、3 回測定した平均値を結果として示した。なお、体重移動などによる後肢の動きは評価しなかった。また、測定はマウスをアクリル製シリンダー (高さ 15 cm、直径 8 cm) 内で無拘束下にて行った。

## 結果および考察

坐骨神経を結紮すると、結紮後 4 日目をピークとする熱刺激に対する痛覚過敏反応が観察され

た。そこで、熱痛覚過敏反応がピークとなる結紮後4日目からモルヒネの条件づけを行ったところ、非結紮群で認められるモルヒネの報酬効果は著明に抑制された。

一方、選択的PKC阻害薬であるRo-32-0432 (1 nmol) を坐骨神経結紮前ならびに結紮後1日1回3日間マウスの髄腔内に処置すると、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は有意に抑制された。このような条件下で、坐骨神経結紮によるモルヒネの報酬効果の抑制に対するRo-32-0432の髄腔内前処置の影響を検討した。その結果、坐骨神経結紮群の溶媒処置マウスで認められるモルヒネ誘発報酬効果の減弱は、Ro-32-0432 (0.1 および 1 nmol/mouse) の髄腔内前処置により用量依存的に回復し、非結紮群と同程度のモルヒネの報酬効果が発現した。これらのことから、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応の発現には、脊髄におけるPKCの活性化が重要な役割を果たしていることが改めて確認された。また、この活性化を阻害することにより、坐骨神経結紮によるモルヒネの報酬効果の減弱は、コントロールレベルにまで回復することが明らかとなった。

このように、脊髄におけるPKCの活性化が、モルヒネの報酬効果の抑制に関与している可能性が強く示唆されたため、次にPKCの活性化薬であるPDBuをマウスの髄腔内に直接投与し、モルヒネの報酬効果に及ぼす影響を検討した。PDBu (1, 3および10 nmol/mouse) をマウスの髄腔内に単回投与すると、scratching、biting、licking、tail-shaking および vocalization が用量依存的に誘発された。さらにこれらのマウスでは、PDBuを単回投与した24時間後および5日後においても、熱刺激に対して有意な痛覚過敏反応を示した。そこで、PDBu (10 nmol/mouse) を単回髄腔内投与した24時間後からモルヒネの条件づけを開始し、モルヒネの報酬効果発現に対する影響を検討した。その結果、溶媒処置群で認められるモルヒネの報酬効果は、PDBuを単回髄腔内前処置することにより著しく抑制された。これらのことから、PDBuを髄腔内投与し、痛みを惹起させた状態では、坐骨神経結紮時と同様にモル

ヒネの報酬効果は著明に抑制されることが明らかとなった。

このように、脊髄におけるPKCの活性化を介した上位中枢への痛覚伝達が、モルヒネの報酬効果を抑制する主因となっている可能性が推察される。そこで、PDBuの単回髄腔内投与後の上位中枢におけるc-Fosタンパク(神経の活動マーカー)の変化を免疫組織染色法により検討した。その結果、PDBuを単回髄腔内投与した1時間後には、痛みや情動機能を司る脳部位である側傍核、帯状回、扁桃体においてc-Fos様免疫陽性細胞数の著明な増加が認められたが、記憶・学習に重要な役割を担う海馬においては、このような変化は認められなかった。

以上、本研究の結果から、脊髄におけるPKCの活性化を介した上位中枢への痛覚情報伝達は、痛みや情動機能を司る脳部位の可塑的变化を引き起こし、モルヒネの報酬効果を抑制する可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Mao J, Price DD, Mayer DJ, Hayes RL (1992) Pain-related increases in spinal cord membrane-bound protein kinase C following peripheral nerve injury. *Brain Res* 588: 144-149
- 2) Yashpal K, Pitcher GM, Parent A, Quirion R, Coderre TJ (1995) Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in <sup>3</sup>H-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. *J Neurosci* 15: 3263-3272
- 3) Narita M, Yajima Y, Aoki T, Ozaki S, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T (2000) Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve. *Eur J Pharmacol* 401: 187-190
- 4) Ohsawa M, Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Tseng LF (2000) Involvement of spinal protein kinase

C in thermal hyperalgesia evoked by partial sciatic nerve ligation, but not by inflammation in the mouse.

Eur J Pharmacol 403: 81-85

5) Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M (1996) Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. Life Sci 59: 1667-1674

6) Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M, Nagase H, Takeda F (1999) Role of the  $\kappa$ -opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. Life Sci 64: PL1-7

7) Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Miyoshi K, Suzuki T (2003) Suppression of the morphine-induced rewarding effect and G-protein activation in the lower midbrain following nerve injury in the mouse: involvement of G-protein-coupled receptor kinase 2. Neuroscience 116: 89-97

8) Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Sugita J, Matsumura Y, Suzuki T (2002) Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: implication of the reduction in  $\mu$ -opioid receptor functions in the ventral tegmental area. J Neurochem 82: 1192-1198

9) Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. Pain 43: 205-218

# モルヒネ暴露によるP糖タンパク質機能変化

黄倉 崇、小澤匡宏、井部路子、山田静雄、木村良平  
静岡県立大学薬学部薬剤学教室

## Regulation of P-glycoprotein function by morphine treatment

Takashi Okura, Tadahiro Ozawa, Michiko Ibe, Shizuo Yamada, Ryohei Kimura

Department of Biopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

Summary: Morphine is a substrate for P-glycoprotein (Pgp), a broad-specificity efflux pump. The uptake by human colon carcinoma Caco-2 cells of the Pgp substrates, [<sup>3</sup>H]vincristine and Rhodamine123, was significantly reduced by pretreatment with morphine. The reduction of [<sup>3</sup>H]vincristine uptake was seen at 12 h after morphine treatment and almost same reduction level was maintained during morphine treatment for 14 days. Further, morphine transport through the Caco-2 cell monolayer in the efflux direction was increased by pretreatment with morphine. These results suggest that treatment with morphine increases Pgp activity and efflux transport of morphine in Caco-2 cells.

## 緒言

P糖タンパク質 (Pgp) は、癌細胞の多剤耐性因子として見出された排出トランスポーターであり、血液脳関門や消化管などの正常組織にも分布し、薬物の排出輸送に関わる。モルヒネはPgpの基質であり、その鎮痛作用はPgp阻害剤の投与やPgpのノックアウトにより増強される<sup>1,2)</sup>。また、モルヒネの連続投与によりラット脳組織におけるPgp発現量が増加すること<sup>3)</sup>、Pgpに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によりモルヒネの鎮痛耐性形成が抑制されること<sup>4)</sup>から、モルヒネの慢性投与に伴うPgp発現量の増加が、モルヒネの鎮痛耐性形成に関与する可能性が考えられる。しかし、モルヒネ暴露によりPgpの排出機能が亢進し、モルヒネの膜透過性が変化するのは明らかでない。そこで本研究では、薬物の膜透過性評価に汎用されるヒト大腸腺癌由来Caco-2細胞を用い、Pgp排出機能並びにモルヒネの膜透過性に対するモルヒネ暴露の影響に

ついて検討した。

## 実験方法

### 細胞培養

24ウェルプレートまたはトランスウェルにCaco-2細胞を $1 \sim 5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>で播きHEPES (20 mM)、非必須アミノ酸 (1%)、ペニシリン (50 unit/ml)、ストレプトマイシン (0.05 mg/ml)、fetal bovine serum (10%)を含むDulbecco's Modified Eagle Mediumを培地として37℃で培養した。実験には24ウェルプレート上で14日間、またはトランスウェル上で21日間単層培養したものをを用いた。

### Pgp基質の取り込み実験及び排出実験

Pgpの排出機能は、Pgp基質である[<sup>3</sup>H]ビンクリスチンまたはローダミン123のCaco-2細胞への取り込み実験または排出実験により評価した。薬物未処理 (対照群) またはモルヒネ暴露 (0.1 ~ 500 μM, 12時間 ~ 14日間) したCaco-2細胞を洗浄後、[<sup>3</sup>H]ビンクリスチン (31 nM) またはローダミン123 (3 μM) を含むメ

ディウム中で、細胞を37℃、10～120分間インキュベーションした。その後細胞をPBSで洗浄、可溶化し<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの放射活性またはローダミン123の蛍光強度を測定した。タンパク質量はBCA protein assay kitを用いて測定した。またジゴキシン(0.1 μM, 24時間)、リファンピシン(10 μM, 24時間)またはコルヒチン(7.5 μM, 48時間)暴露し、同様にローダミン123の細胞内取り込み量を測定した。

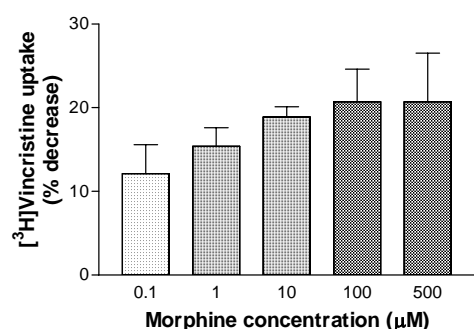
ローダミン123の排出実験では、ローダミン123(3 μM)を37℃、90分間インキュベーションし、ローダミン123を細胞内に取り込ませた後、37℃に加温したローダミン123を含まないメディアムを添加し、37℃、90分間インキュベーションした。インキュベーション終了後、細胞内に残存するローダミン123の蛍光強度を同様に測定した。

#### モルヒネ透過実験

モルヒネの透過実験には、トランスウェル上で単層培養したCaco-2細胞を用いた。薬物未処理またはモルヒネ暴露(10 μM, 21日間)したCaco-2細胞を洗浄後、apical膜側またはbasolateral膜側にモルヒネ(10 μM)を添加した。37℃で60、120、180分インキュベーション後、apical膜側からbasolateral膜側(A to B)またはbasolateral膜側からapical膜側(B to A)へのモルヒネの透過量をHPLC法により定量した。次式に従い、見かけの透過係数(P<sub>e</sub>)を算出した。

$$P_e = \frac{dx/dt}{C_0 \cdot A_{\text{cell}}}$$

ここで、dx/dtは単位時間当たりのモルヒネ



透過量(pmol/min)を、C<sub>0</sub>は初濃度(pmol/mL)を、A<sub>cell</sub>は培養細胞面積(cm<sup>2</sup>)を示す。またCaco-2細胞の膜抵抗値はMillicell-ERSにより測定し、膜抵抗値が200 Ω/cm<sup>2</sup>以上の単層膜を実験に用いた。

## 結果

### Caco-2細胞におけるPgp排出機能

Caco-2細胞への<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの取り込み量は、<sup>3</sup>H]ビンクリスチンを添加後経時的に増加し、60分で定常状態(15 μL/mg protein)に達した。<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの定常状態取り込み量は、Pgp阻害剤のペラパミル(500 μM)及びシクロスポリンA(17 μM)存在下で有意に増加した。同様にローダミン123のCaco-2細胞への取り込み量は、シクロスポリン存在下で増加した。これらの結果から、本実験で用いたCaco-2細胞におけるPgpの排出輸送機能が確認された。

次に、Caco-2細胞をモルヒネ存在下で14日間培養後、<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの定常状態取り込み量を指標にしてPgp排出機能を測定した。<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの取り込み量は、モルヒネ暴露により対照群に比べ有意に減少し、その減少率はモルヒネ濃度(0.1～500 μM)に依存して増加した(Fig. 1)。この<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの取り込み量の減少は、シクロスポリンAの存在下で、モルヒネ未処理群の場合と同程度まで回復した。また、<sup>3</sup>H]ビンクリスチンの取り込み量の減少は、モルヒネ暴露12時間ですでに観察され、1、2、3、7、14日の暴露期間中、その減少率はほぼ一定の値を示した。同様にローダミン123の取り込み量は、10 μMのモルヒネ暴露(24時間)により減少し、その減少率は8.5%であった(Fig. 2)。リ

Fig. 1 <sup>3</sup>H]Vincristine uptake by Caco-2 cells pretreated with morphine (0.1 – 500 μM, 14 days)

The cells pretreated with or without morphine were incubated with 31 nM <sup>3</sup>H]vincristine at 37℃ for 60 min. <sup>3</sup>H]vincristine uptake was demonstrated as % decrease from the control value. Each column represents mean ± S.E. of three to nine experiments.

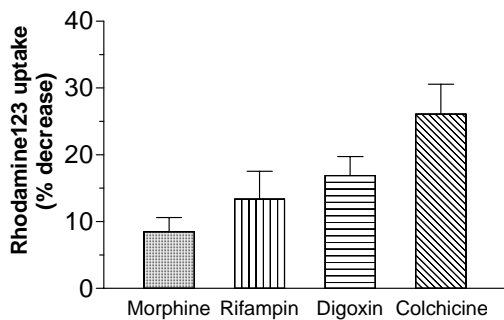


Fig. 2 Rhodamine123 uptake by Caco-2 cells pretreated with morphine, rifampin, digoxin or colchicine

The cells were pretreated with morphine (10  $\mu$ M, 24 hr), rifampicin (10  $\mu$ M, 24 hr), digoxin (0.1  $\mu$ M, 24 hr) or colchicine (7.5  $\mu$ M, 48 hr). The cells were incubated with 3  $\mu$ M rhodamine123 at 37 for 90 min. Rhodamine123 uptake was demonstrated as % decrease from the control value. Each column represents mean  $\pm$  S.E. of three to eleven experiments.

ファンピシン、ジゴキシン及びコルヒチン暴露によりCaco-2細胞へのローダミン123の取り込み量は減少し、その減少率は、リファンピシンで13%、ジゴキシンで17%、コルヒチンで26%であった。

Caco-2細胞にローダミン123を取り込ませた後測定したローダミン123の細胞からの排出量は、モルヒネ（10  $\mu$ M, 24時間）暴露により対照群に比べ1.4倍有意に増加し、ジゴキシン（0.1  $\mu$ M, 24時間）暴露により2.5倍有意に増加した。（Fig. 3）

#### モルヒネの Caco-2細胞単層膜透過性

Caco-2細胞単層膜を介したモルヒネの累積透過量は、180分まで直線的に増加し、これより算出したモルヒネの膜透過係数は、A to B 方向で $0.206 \pm 0.019 \times 10^{-3}$  cm/min、B to A 方向で $0.203 \pm 0.011 \times 10^{-3}$  cm/min であった（Fig. 4）。モルヒネ暴露（10  $\mu$ M, 21日間）により、モル

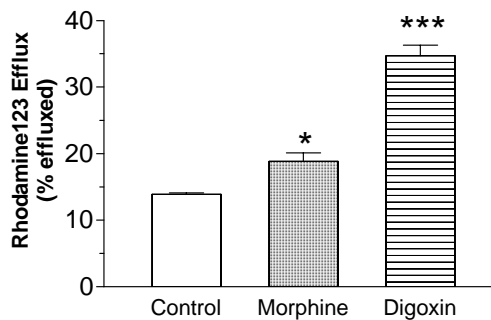
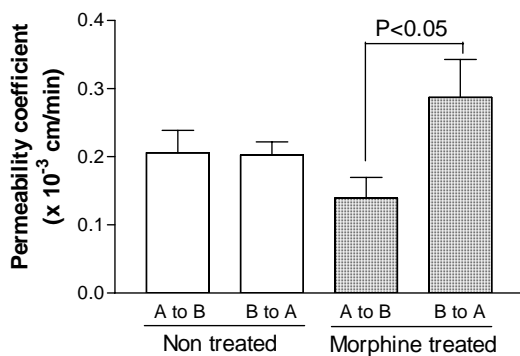


Fig. 3 Rhodamine123 efflux from Caco-2 cells pretreated with morphine or digoxin

The cells were pretreated with morphine (10  $\mu$ M, 24 hr) or digoxin (0.1  $\mu$ M, 24 hr). The cells were incubated with 3  $\mu$ M rhodamine123 at 37 for 90 min. Then cells were washed, and incubated with rhodamine123-free medium at 37 for 90 min. Each column represents mean  $\pm$  S.E. of three experiments. Asterisks show a significant difference from control values, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

ヒネの膜透過係数は、A to B 方向で減少、B to A 方向で増加し、A to B 方向に比べ、B to A 方向の膜透過係数は2倍有意に高値を示した。

## 考察

Pgpの薬物排出機能及びモルヒネの細胞膜透過性に対するモルヒネ暴露の影響について、Caco-2細胞を用いて検討した。Caco-2細胞のapical膜に局在するPgp機能の評価のため、Pgpの代表的な基質である $[^3\text{H}]$ ピンクリスチン及びローダミン123の細胞内取り込み量を測定した。Caco-2細胞への $[^3\text{H}]$ ピンクリスチン取り込み量は、モルヒネ暴露により濃度依存的に減少した。この $[^3\text{H}]$ ピンクリスチンの取り込み量の減少は、シクロスポリンAの存在下で、モルヒネ未処理群の場合と同程度まで回復した。これらの結果から、モルヒネ暴露によりPgpの排出機能が亢進することが示唆された。このPgp機能の亢進は、モルヒネ暴露開始後12

Fig. 4 Effect of pretreatment with morphine (10  $\mu$ M, 21 days) on transepithelial transport of morphine in the apical to basolateral direction (A to B) and basolateral to apical direction (B to A) across Caco-2 cell monolayers.

The cells were pretreated with 10  $\mu$ M morphine for 21 days. The cells were washed, and then 10  $\mu$ M morphine was added to the apical side (A to B) or to the basolateral side (B to A) of monolayers. After incubation at 37 for 120 min, the medium on the other side was collected and assayed. Each column represents mean  $\pm$  S.E. of three experiments.



時間ですでにみられ、14日の暴露期間中維持された。また、 $[^3\text{H}]$ ピンクリスチンと同様に、ローダミン123のCaco-2細胞への取り込みがモルヒネ暴露により減少したことから、モルヒネ暴露はローダミン123の排出輸送も亢進することが示された。モルヒネ(10  $\mu\text{M}$ )暴露によるCaco-2細胞へのローダミン123の取り込みの減少率は8.5%であり、Pgp誘導作用のあるリファンピシン<sup>5)</sup>、ジゴキシン<sup>6)</sup>、コルヒチン<sup>7)</sup>暴露では、モルヒネ暴露以上の減少率(13~26%)がみられた。また、Caco-2細胞からのローダミン123の排出は、モルヒネ暴露により1.4倍増加し、ジゴキシン暴露では2.5倍に増加した。モルヒネのPgp機能亢進作用は、10  $\mu\text{M}$ で最大であったことから、モルヒネは、リファンピシン、ジゴキシン、コルヒチンほどのPgp機能亢進作用は示さないと考えられる。

次に、モルヒネの細胞膜透過性に対するモルヒネ暴露の影響について検討した。Caco-2細胞単層膜を介したモルヒネの累積透過量から算出したモルヒネの透過係数は、A to BとB to A方向で差はみられなかったが、モルヒネ暴露によりモルヒネの膜透過係数は、B to A方向で減少、A to B方向で増加した。この結果から、モルヒネの長期投与によりモルヒネの排出輸送が亢進し、モルヒネの吸収方向への膜透過性が低下する可能性が示唆された。

モルヒネの連続投与によりラット脳ホモジネートにおけるPgpの発現量が2倍に増加することが報告<sup>3)</sup>されているが、このPgpの増加が、脳毛細血管が脳実質で起きているのかは明らかではない。Caco-2細胞においてモルヒネ暴露によるPgp機能亢進とモルヒネ膜透過性の変化がみられたことから、モルヒネ暴露が脳毛細血管内皮細胞管腔側膜に存在するPgpの機能亢進とモルヒネの脳移行性の低下を起こす可能性が考えられる。しかしモルヒネの鎮痛耐性形成におけるPgpの寄与に関してはさらに検討が必要であろう。

以上の結果から、Caco-2細胞においてモルヒネ暴露によりPgp機能並びにモルヒネの排出輸送が亢進することが示された。

## 引用文献

- 1) Letrent SP, Pollack GM, Brouwer KR, Brouwer KLR: Effects of a potent and specific P-glycoprotein inhibitor on the blood-brain barrier distribution and antinociceptive effect of morphine in the rat. *Drug Metab Dispos*, 27, 827-34 (1999)
- 2) Zong J, Pollack GM: Morphine antinociception is enhanced in *mdr1a* gene-deficient mice. *Pharm Res*, 17, 749-753 (2000)
- 3) Aquilante CL, Letrent SP, Pollack GM, Brouwer KLR: Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats. *Life Sci*, 66, 47-51 (2000)
- 4) King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW: Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci*, 4, 268-274 (2001)
- 5) Geick A, Eichelbaum M, Burk O: Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*, 276 14581-14587 (2001)
- 6) Takara K, Tsujimoto M, Ohnishi N, Yokoyama T: Digoxin up-regulates MDR1 in human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 292, 190-194 (2002)
- 7) Declèves X, Chappey O, Boval B, Niel E, Scherrmann JM: P-glycoprotein is more efficient at limiting uptake than inducing efflux of colchicine and vinblastine in HL-60 cells. *Pharm Res*, 15, 712-718 (1998)

# **μ-Opioid 受容体作動薬の慢性処置による脊髄内 μ-opioid 受容体のトラフィック機構およびアストロサイトの形態変化の解析**

鈴木雅美, 成田 年, 鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室

## **μ-Opioid receptor trafficking and changes in astroglial cells in the mouse spinal cord induced by repeated opioid administration**

**Masami Suzuki, Minoru Narita, Tsutomu Suzuki**

**Department of Toxicology,**

**Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo Japan**

Summary: Chronic treatment with μ-opioid receptor agonist has been reported to cause the receptor desensitization and internalization which were deeply concerned with the modulation by kinds of protein kinases. Either repeated s.c. administration of morphine or etorphine once a day for 7 days produced a marked reduction in each spinal μ-opioid receptor-mediated antinociceptive effect in the mouse. The present molecular approach strongly supports the idea that the etorphine-induced μ-opioid receptor desensitization may result from μ-opioid receptor internalization associated with translocation of several kinds of trafficking proteins and conventional protein kinase C (cPKC) to the plasma membrane. Unlike etorphine, morphine had no effect on the levels of trafficking proteins in membranes and failed to induce the internalization of μ-opioid receptors. Repeated treatment with morphine also had no effect on levels of membrane-bound cPKC, whereas it produced a significant increase in the level of phosphorylated-cPKC (p-cPKC) in the spinal dorsal horn detected by immunohistochemistry. Repeated treatment with morphine promoted astroglial hypertrophy as well as its proliferation in the dorsal horn of the mouse spinal cord. A deletion of cPKC caused a dramatic inhibition of astroglial changes by chronic administration of morphine. These findings provide further evidence that the etorphine-induced μ-opioid receptor internalization may be associated with the translocation of trafficking proteins to the plasma membrane in the mouse spinal cord. Furthermore, the present data raise the fascinating possibility that the increased astroglial response is involved in the development of morphine tolerance associated with the sustained activation of cPKC.

## 緒言

一般に、 $\mu$ -opioid 受容体作動薬の慢性適用は、受容体の脱感作および細胞内陥入を引き起こし、これらの反応は protein kinase など多種の細胞内リン酸化酵素によって調節されていると考えられている<sup>1,2,3</sup>。しかしながら、臨床で汎用されている morphine は、動物実験において慢性処置によりほとんど受容体の細胞内移行を示さずに鎮痛耐性を形成することが報告されている。一方、現在、臨床における疼痛治療はがん疼痛のような激しい痛みが存在下では morphine を長期使用しても鎮痛耐性は形成されないという臨床上の経験を基に進められているが、これらの科学的根拠は未だに十分とは言えない。そこで本研究では、morphine 鎮痛耐性の分子機構を解明する目的で、opioid 受容体作動薬慢性処置による  $\mu$ -opioid 受容体のトラフィッキング（代謝回転）機構およびアストロサイトの変化を機能形態学的に解析した。

## 実験方法

実験には、ICR 系雄性マウスを使用した。まず、morphine (10 mg/kg, s.c.) および etorphine (10 mg/kg, s.c.) を 1 日 1 回、7 日間投与することで鎮痛耐性が形成されることを tail-flick 法により確認した。次に、各薬物を 7 日間投与し、最終投与の 24 時間後に脊髄細胞膜分画標本を作製し、受容体の細胞内陥入を制御することが報告されている G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2)、

dynamin II および  $\beta$ -arrestin 2 の蛋白量の変化を、Western blot 法に従い定量した。さらに、各薬物を 7 日間投与し、最終投与の 24 時間後に灌流固定を行い、脊髄凍結切片を作製した。この脊髄切片を用いて、それぞれ  $\mu$ -opioid 受容体、phosphorylated-conventional protein kinase C (p-cPKC)、樹状突起のマーカーである microtubule associated protein 2 (MAP2) およびアストロサイトのマーカーである glia fibrillary acidic protein (GFAP) の特異的抗体を使用し、その局在および形態変化を免疫染色法に準じて検討した。

## 結果および考察

まず、etorphine を 7 日間投与し、鎮痛耐性が形成されたことを確認した後、脊髄後角における  $\mu$ -opioid 受容体陽性細胞の形態を観察した。その結果、etorphine 群において明瞭な  $\mu$ -opioid 受容体の細胞内移行が認められた。次に、etorphine 慢性処置による脊髄後角の p-cPKC の変化を検討したところ、脊髄後角表層部において膜結合型 p-cPKC の著明な増加が認められた。さらに、脊髄細胞膜分画における GRK2、dynamin II および  $\beta$ -arrestin 2 の蛋白量の変化を検討したところ、etorphine 群では saline 群と比較し、GRK2、dynamin II および  $\beta$ -arrestin 2 の著明な増加が認められた。これらのことから、etorphine 反復投与は、p-cPKC、GRK2、dynamin II および  $\beta$ -arrestin 2 に依存した  $\mu$ -opioid 受容体の持続的な細胞内陥入を引き起こし、これら一連の反応により鎮痛耐性が形成されるものと想

定される。一方、morphine を慢性処置し、同様の検討を行ったところ、従来の報告通り、 $\mu$ -opioid 受容体の細胞内移行がほとんど観察されないにもかかわらず、脊髄後角表層部における p-cPKC 活性の増大や、鎮痛耐性が認められた。また、この時の脊髄細胞膜分画における GRK2、dynamin II および  $\beta$ -arrestin 2 の蛋白量は、saline 群と比べ、有意な変化は認められなかった。そこで morphine 慢性処置により、脊髄後角において p-cPKC が著明に増加することの生理的意義を詳細に検討するために、MAP2 抗体および GFAP 抗体を用いて p-cPKC と二重染色を行った。その結果、p-cPKC の増加はアストロサイトではなく、主として脊髄後角表層の神経終末周辺部および樹状突起で強く認められた。また、これらの条件下、アストロサイトの著しい星状化が認められた。しかしながら、この反応は選択的 PKC 阻害薬の併用により抑制された。一方、PKC 基質の一つであり、神経細胞の軸索伸展ならびにシナプス形成に関与することが報告されている GAP-43 免疫活性の morphine 慢性処置による変化を検討したところ、saline 群と morphine 慢性処置群間に大きな差は認められなかった。

以上、本研究の結果より、morphine 慢性処置による  $\mu$ -opioid 受容体の脱感作は、 $\mu$ -opioid 受容体のトラフィックングに対する直接的な影響よりもむしろ、神経細胞内の PKC の活性化に依存したアストロサイトの形態変化を伴うシナプス伝達効率の変化が関与している可能性が考えられる。

## 引用文献

- 1) Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of  $\mu$ -opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7157-7162.
- 2) Narita M, Mizoguchi H, Narita M., Suzuki T, Narita M, Dun N J, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Enhanced  $\mu$ -opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase C $\gamma$  isoform. *J Biol Chem* 27:15409-15414.
- 3) Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Involvement of spinal protein kinase C $\gamma$  in the attenuation of opioid  $\mu$ -receptor mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO). *J Neurosci* 11:3715-3721.