

# 主 題 1

## Nociceptin / Orphanin FQ Receptor

オーガナイザー 植田弘師（長崎大・薬・分子薬理）  
川島誠一（都臨床研・遺伝情報）

# 1-1

## Nociceptin脊髄クモ膜下腔内投与による疼痛関連行動について

○井上誠<sup>1</sup>, 勝山壮<sup>2</sup>, 櫻田忍<sup>2</sup>, 丹野孝一<sup>3</sup>, 木皿憲佐<sup>3</sup>, 佐々木潤<sup>4</sup>, 大場優孝<sup>4</sup>, 植田弘師<sup>1</sup>, 櫻田誓<sup>5</sup>, 櫻田司<sup>5</sup>  
1 長崎大・薬・分子薬理, 2 東北薬大・機能形態,  
3 東北薬大・薬理, 4 旭硝子・中央研, 5 第一薬大・生化

### 〔緒言〕

nociceptin<sup>1)</sup>あるいはorphanin FQ<sup>2)</sup>と名付けられた新規 heptadecapeptideは、ダイノルフィン Aと類似のアミノ酸配列を有し、opioid receptor like-1(ORL-1)受容体のリガンドとして、ラット脳<sup>1)</sup>やウシ視床下部<sup>2)</sup>から発見された。nociceptinの痛覚伝達・制御機構における役割については、nociceptinをマウスやラットの脳室内あるいは脊髄クモ膜下腔内(i.t.)に投与した際にhyperalgesiaを誘発するとの報告<sup>1-4)</sup>とanalgesiaを誘発するとの報告<sup>5,6)</sup>があり、未だ解明されていない。

本研究ではnociceptinの痛覚伝達・制御機構における役割を解明することを目的とし、行動薬理的に検討を行った。その結果、極めて低用量のnociceptin(3-3000 fmol)をマウスのi.t.へ投与した際、サブスタンスP(SP)やN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)のi.t.投与時と同様に両後肢による下腹部へのscratching、両後肢へのbitingおよびlicking(SBL)行動を誘発することを見出した。

本講演ではnociceptin誘発性SBL行動の特徴とその発現機序について報告する。

### 〔実験方法〕

実験には体重20-22gのddY系雄性マウスを用い、薬物はmorphineを除いて全て人工脳脊髄液(CSF)で溶解した。I.t.投与はHyldenとWilcoxの方法<sup>7)</sup>に準じ、無麻酔下で腰椎の5番と6番の間の髄腔内へ50 $\mu$ l用マイクロシリンジを用い、5 $\mu$ l/mouseの割合で投与した。測定はケージから約1m離れて行い、SBL行動の持続時間をnociceptin i.t.投与直後から5分間隔で20分測定した。なお、nociceptinとの併用実験ではmorphineを生理食塩水に溶解し、nociceptinのi.t.投与15

分前に腹腔内投与した。また、SP抗体はnociceptinのi.t.投与5分前にi.t.投与し、他の薬物は全てnociceptinとi.t.同時投与した。

## [実験結果]

### 1) nociceptin i.t.投与によって誘発されるSBL行動

nociceptin(0.3-3000 fmol) i.t.投与によってSP i.t.投与によって見られると同様のSBL行動が観察された。SP i.t.投与によって誘発されるSBL行動は、投与直後からの5分間をピークとする行動であったのに対し、nociceptinによる行動は投与後10-15分をピークとする行動であり、SPの場合とは経時変化において違いが認められた。Fig.1にnociceptin(0.3-3000 fmol) i.t.投与直後から20分間に認められるSBL行動の持続時間を示すが、nociceptinは3fmolの用量において有意かつ顕著なSBL行動を誘発したので、以下の実験においては3fmolのnociceptinを用いた。

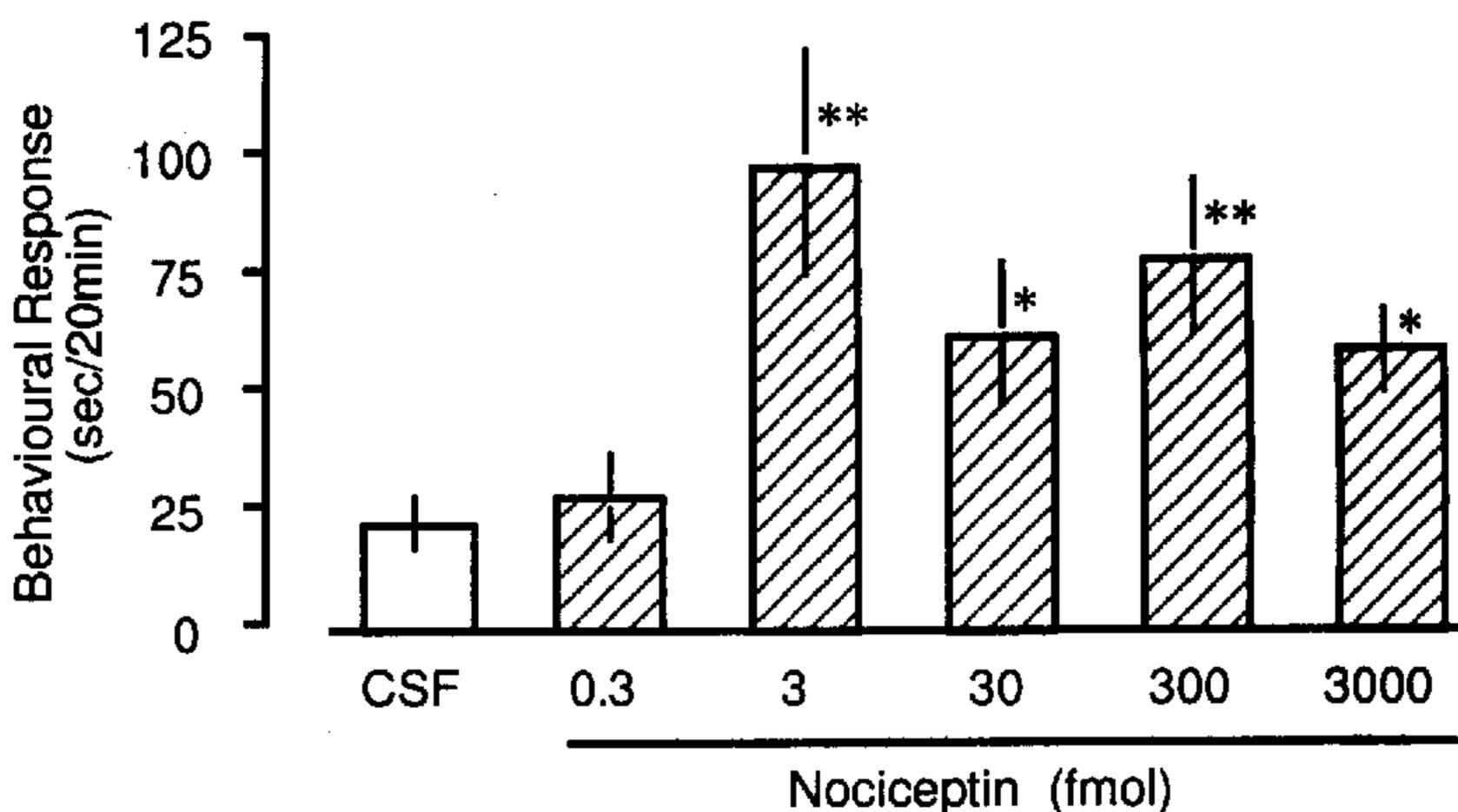


Fig.1 The effect of varying doses (0.3-3000 fmol) of nociceptin administered intratheacally in mice. The duration of scratching, biting and licking induced by nociceptin was determined over a 20 min period starting immediately after injection. The data are given as means  $\pm$  S.E.M. for groups of 10 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  when compared to CSF-controls.

## 2) nociceptin誘発性SBL行動に対する併用薬物の影響

nociceptin(3fmol)i.t.投与によって誘発されるSBL行動は、nociceptin投与15分前にmorphine (0.1-0.8 mg/kg) を腹腔内投与することによって用量依存的に抑制された。このことから、nociceptin誘発性SBL行動は「痛み」に関連した行動であることが判明した。また、nociceptin誘発性SBL行動はCP-96,345、センダイド<sup>8)</sup>あるいは[D-Phe<sup>7</sup>,D-His<sup>9</sup>]-SP(6-11)<sup>9,10)</sup>などのニューロキニン-1(NK-1)受容体拮抗薬およびSP抗体によって有意に抑制された。さらに各種プロテアーゼ阻害剤の効果について検討したところ、フッ化フェニルメタンシルフォニル(PMSF)のみがnociceptin誘発性SBL行動を有意に抑制した。しかし、NMDA受容体拮抗薬のMK-801あるいはD-2-アミノ-5-ホスホノバレリン酸および一酸化窒素(NO)合成酵素阻害薬のL-N<sup>G</sup>-ニトロアルギニンメチルエステル(L-NAME)はnociceptin誘発性SBL行動に対し何らの影響も示さなかった。

### 【考察】

本研究ではマウスのi.t.へ極めて低用量のnociceptinを投与することによってSBL行動が誘発されることを見出し、この行動はmorphineによって抑制されたことから「痛み」に関連した行動であることを明らかにした。非侵害性触覚刺激に対し、nociceptinのi.t.投与はグルタミン酸受容体-NO系を介しallodyniaを誘発することが報告されている<sup>4)</sup>。しかし、nociceptin誘発性SBL行動はNMDA受容体拮抗薬およびL-NAMEによって影響を受けなかった。一方、nociceptin誘発性SBL行動はNK-1受容体拮抗薬およびSP抗体によって抑制されたことより、SP神経系を介した反応であることが示唆される。また、プロテアーゼ阻害剤の中でPMSFのみがnociceptin誘発性SBL行動を抑制した。以上の結果から、nociceptin i.t.投与によるSBL行動はセリンプロテアーゼによるnociceptinの代謝産物がSP神経系を活性化することによって惹起され、グルタミン酸受容体-NO系の関与はないことが示唆された。

### 【文献】

- 1) Meunier J.-C. et al. *Nature*, 377, 532-535 (1995)
- 2) Reinscheid R.K. et al. *Science*, 270, 792-794 (1995)

- 3) Yamamoto T. et al. *Brain Res.*, **754**, 329-332 (1997)
- 4) Hara N. et al. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 401-408 (1997)
- 5) Rossi G. C. et al. *Eur. J. Pharmacol.*, **311**, R7-8  
(1996)
- 6) King M. A. et al. *Neurosci. Lett.*, **223**, 113-116 (1997)
- 7) Hylden, J. L. K. and Wilcox, G.L. *Eur. J. Pharmacol.*,  
**67**, 313-316 (1980)
- 8) Sakurada T. et al. *Brain Res.*, **593**, 319-322 (1992)
- 9) Sakurada T. et al. *Eur. J. Pharmacol.*, **174**, 153-160  
(1989)
- 10) Sakurada T. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 205-  
210 (1991)

# 1-2

## 糖尿病マウスの侵害受容閾値に対する nociceptin の効果

○大澤 匡弘、亀井 淳三

星薬科大学医療薬学第2研究室

Nociceptin は、opioid receptor like-1 受容体 (OLR-1 受容体) の内因性のリガンドとして単離された。OLR-1 受容体は CHO 細胞などの発現系で、オピオイド  $\mu$ 、 $\delta$  および  $\kappa$  受容体と同様にアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが報告されている<sup>1), 2)</sup>。しかしながら、nociceptin は、 $\mu$ 、 $\delta$  および  $\kappa$  受容体作動薬とは異なり、脳室内投与により痛覚閾値の低下を、髄腔内投与により抗侵害効果を発現することが報告されている<sup>1), 2), 3)</sup>。一方、我々は、糖尿病マウスにおいて、オピオイド受容体を介した抗侵害効果が変化していることを報告している<sup>4), 5)</sup>。これらのことから、糖尿病マウスにおいて、nociceptin による薬理作用が変化していることが考えられる。そこで、本研究では nociceptin の侵害受容閾値に対する作用を糖尿病および対照群マウスで比較検討した。

### 【実験方法】

実験には 4 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。0.1 N クエン酸緩衝液により pH 4.5-4.8 に調整したストレプトゾトシン (STZ; 200 mg/kg) を尾側静脈より投与することにより糖尿病を誘発した。対照群には溶媒 (クエン酸緩衝液) のみを投与した。ストレプトゾトシンあるいは溶媒を投与して 2 週間経過したものを実験に用いた。血糖値が 400 mg/dl 以上の動物を糖尿病として用いた。

痛覚閾値の測定は、tail-flick 法を用いて評価した。すなわち、輻射熱による熱刺激をマウス尾部に与え、この時生じる尾の払いよけ反応までの時間を測定した。また、強い熱刺激を与える場合は、白色光ランプ (50 W) に 65 V の電圧を、弱い熱刺激を与える場合は、50 V の電圧をかけた。なお、nociceptin は髄腔内に投与した。また、 $\beta$ -funaltrexamine は nociceptin 投与 24 時間前に、naltrindole は nociceptin 投与 15 分前に、nor-binaltorphimine は nociceptin 投与 3 時間前に皮

下に投与した。

### 【結果】

#### 1) Nociceptin の tail-flick 潜時に対する影響

Nociceptin の髄腔内投与は、対照群マウスおよび糖尿病マウスの両群において用量依存的な抗侵害作用を発現した。また、糖尿病マウスにおける nociceptin 誘発抗侵害作用は対照群マウスと比べ増強していた (Fig.1)。

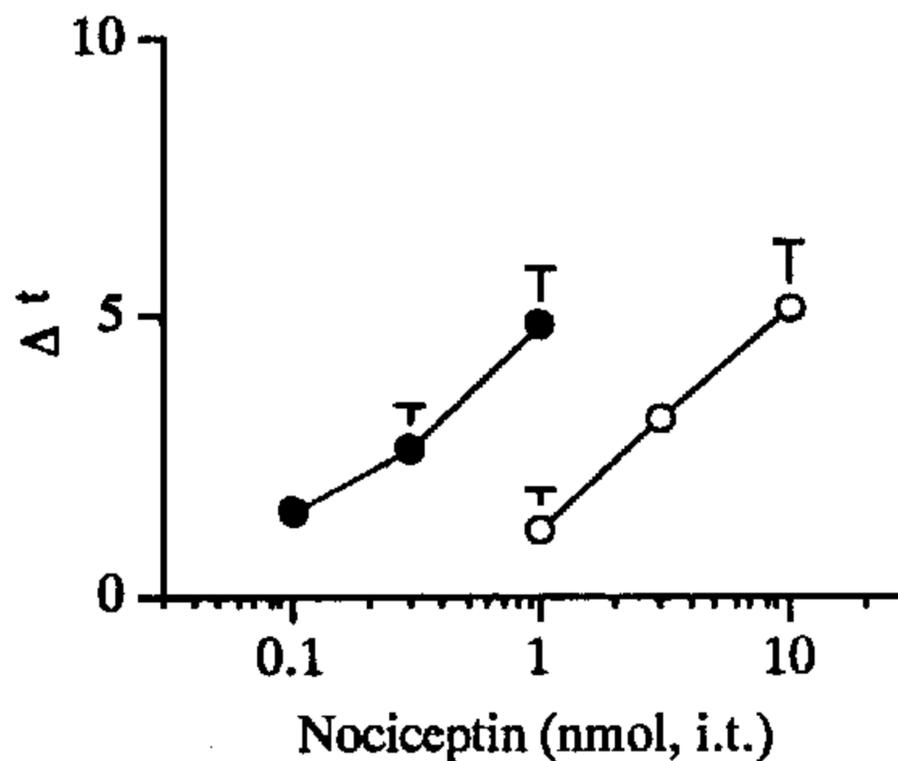


Figure 1.

Effect of nociceptin on nociception as measured in the tail-flick test in diabetic (closed circle) and non-diabetic (open circle) mice. Mice were tested 10 min after intrathecal (i.t.) administration of nociceptin. The voltage was set at 65 V, and cut off time of 60 s.

#### 2) Nociceptin 誘発抗侵害刺激効果におけるオピオイド受容体の関与

糖尿病および対照群マウスにおける nociceptin 髄腔内投与による抗侵害作用は、 $\mu$ 受容体拮抗薬である  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA)、 $\delta$ 受容体拮抗薬である naltrindole (NTI) および  $\kappa$ 受容体拮抗薬である nor-binaltrphimine (nor-BNI) により何ら影響を受けなかった (Fig. 2)。

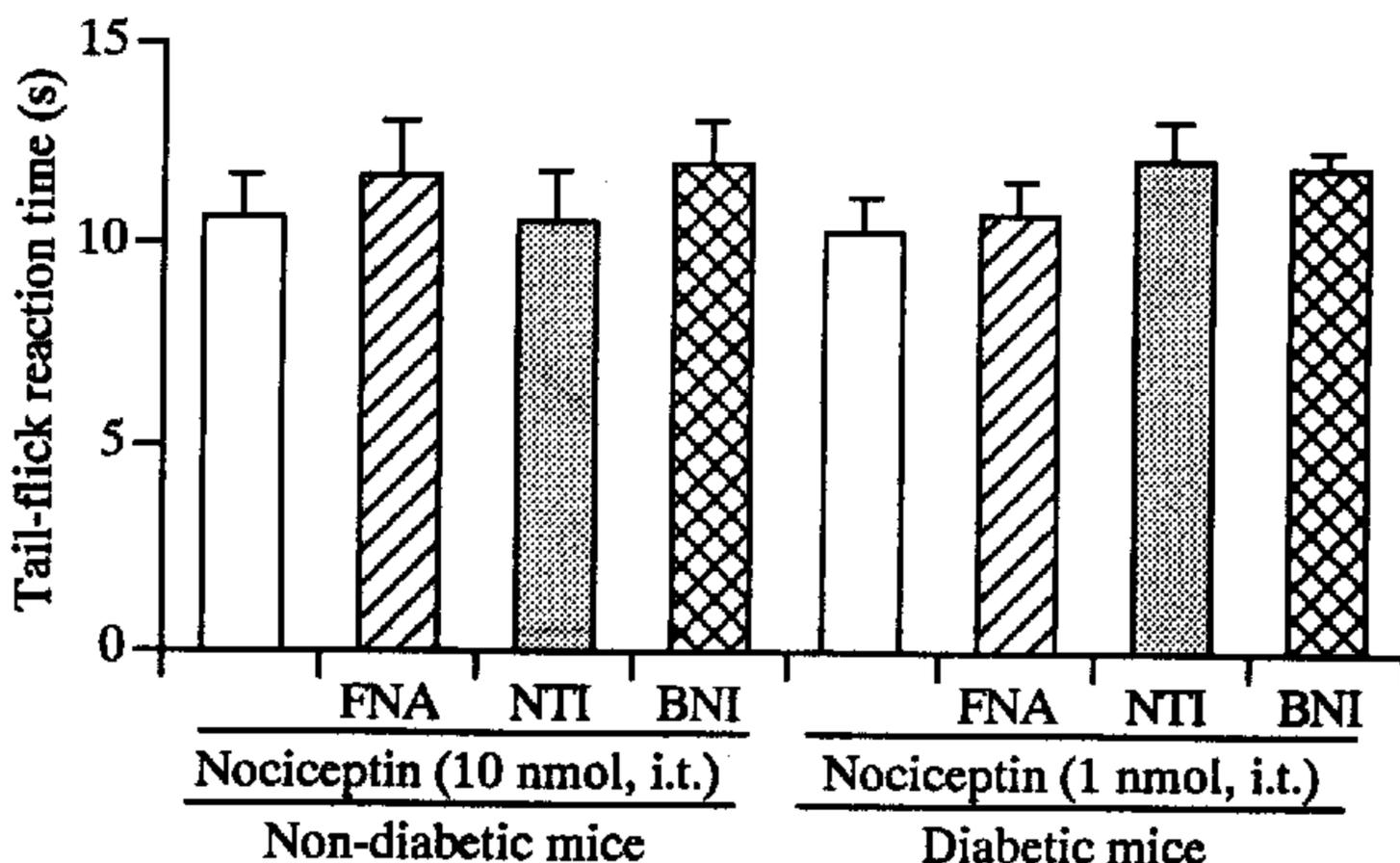


Fig. 2

Effect of opioid receptor antagonists on nociceptin-induced antinociception in diabetic and non-diabetic mice.  $\beta$ -Funaltrexamine (FNA, 20 mg/kg) was injected s.c. 24 h before nociceptin administration. Naltrindole (NTI, 1 mg/kg) was injected s.c. 15 min before nociceptin administration. Norbinaltorphimine (BNI, 20 mg/kg) was injected s.c. 3 h before nociceptin administration.

### 3) 糖尿病および対照群マウスにおける nociceptin 誘発抗侵害作用に対するカプサイシンの影響

糖尿病マウスにおける強い熱刺激による tail-flick 潜時は、対照群マウスと比べ変化が認められなかった。しかし、糖尿病マウスにおける弱い熱刺激による tail-flick 潜時は、対照群マウスと比べ有意に短縮していた。また、この tail-flick 潜時の短縮は、糖尿病マウスにカプサイシン (0.56 nmol) を 24 時間前に髄腔内投与することにより、対照群マウスと同程度にまで回復した。さらに、糖尿病マウスにおける nociceptin 誘発抗侵害作用は、カプサイシン前処置により抑制されたが、対照群マウスにおける nociceptin 誘発抗侵害作用は何ら影響を受けなかった (Fig. 3)。

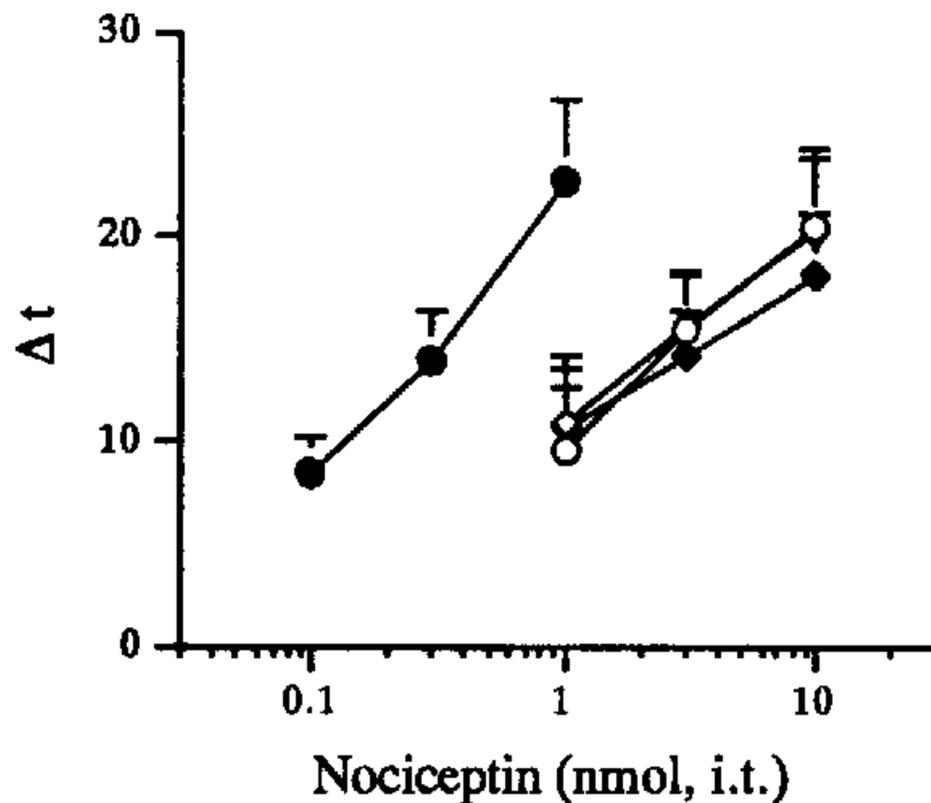


Figure.3

Effect of i.t. pretreatment with capsaicin (diamond symbol) on the antinociceptive effect of nociceptin in diabetic (closed symbol) and non-diabetic (open symbol) mice. Capsaicin was injected i.t. 24 h before nociceptin administration. Mice were tested 10 min after the nociceptin administration. The voltage was set at 50 V, and cut off time of 60 s.

### 【考察】

糖尿病マウスにおける nociceptin 髄腔内投与により誘発される抗侵害作用は、対照群マウスと比べて有意に増強していた。一方、nociceptin の抗侵害作用は、 $\mu$ 、 $\delta$  および  $\kappa$  受容体拮抗薬により有意な影響を受けなかったことから、 $\mu$ 、 $\delta$  および  $\kappa$  受容体以外の受容体すなわち OLR-1 受容体を介して作用を発現していることが示唆された。また、サブスタンス P が関与していることが報告<sup>6)</sup>されている弱い熱刺激による tail-flick 反応において、糖尿病マウスの反応潜時が、対照群マウスと比べ有意に短縮していた。しかし、カプサイシンを糖尿病マウスの髄腔内に投与することにより、糖尿病マウスにおける弱い熱刺激での tail-flick 反応潜時の短縮が有意に回復し、対照群マウスの潜時と同程度まで回復した。一方、我々は、糖尿病時において脊髄におけるサブスタンス P の遊離が増加していることを報告している<sup>7)</sup>。これらのことから、糖尿病マウスにおける弱い熱刺激による tail-flick 潜時の短縮にサブスタンス P 神経系の亢進が関与していることが示唆された。さらに、糖尿病マウスにおける nociceptin の抗侵害作用は、カプサイシン前処置により抑制され、対照群マウスにおける nociceptin 誘

発抗侵害作用と同程度となった。これらのことから、nociceptin が脊髄においてサブスタンス P の遊離を抑制することにより、抗侵害作用を発現している可能性が示唆された。さらに、糖尿病マウスにおける nociceptin 誘発抗侵害作用の増強に、糖尿病時にみられる脊髄でのサブスタンス P 神経系の亢進が関与していることが考えられる。

#### 【引用文献】

- 1) Meunier, J.-C., Mollerau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguli, H., Vassart, G., Parmentier, M. and Costentin, J., Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like OLR1 receptor, *Nature (London)*, 377 (1995) 532-535.
- 2) Reinscheid, R.K., Nothacker, H.-P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma Jr., F.J. and Civelli, O., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, 270 (1995) 792-794.
- 3) Xu, X.-J., Hao, J.-X. and Wisenfeld-Hallin, Z., Nociceptin or antinociceptin: potent spinal antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ in the rat, *NeuroReport*, 7 (1996) 2092-2094.
- 4) Kamei, J., Iwamoto, Y., Hitosugi, H., Misawa, M., Nagase, H. and Kasuya, Y., Streptozotocin-induced diabetes selectively reduces antinociception mediated by  $\mu_1$ -opioid receptors, but not that mediated by  $\mu_2$ -opioid receptors. *Neurosci. Lett.*, 165 (1994) 141-143.
- 5) Kamei, J., Iwamoto, Y., Misawa, M., Nagase, H. and Kasuya, Y., Streptozotocin-induced diabetes selectively enhance antinociception mediated by  $\delta_1$ - but not  $\delta_2$ -opioid receptors. *Life Sci.*, 55 (1994) PL121-PL126
- 6) Zachariou, V., Goldstein, B.D. and Yeomans, D.C., Low but not high rate noxious skin heating evokes a capsaicin-sensitive increase in spinal cord dorsal horn release of substance P. *Brain Res.*, 752 (1997) 143-150
- 7) Kamei, J., Ogawa, M., Ohhashi, Y. and Kasuya, Y., Alternations in the potassium-evoked release of substance P from the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats in vitro. *Gen. Pharmacol.*, 22 (1991) 541-544

# 1-3

## ノシセブチンペプチドの構造活性相関

○下東康幸・畑野 陵・中島理恵・野瀬 健（九大理）  
朱雀鉄城・西郷 晶・長久 厚（ファイザー製薬）

ORL1受容体を介して痛み促進のシグナルを伝達するノシセブチンは、アミノ酸 17 個から成るペプチドであり、その配列は鎮痛作用を示すダイノルフィンA（アミノ酸 17）と類似している（1, 2）。

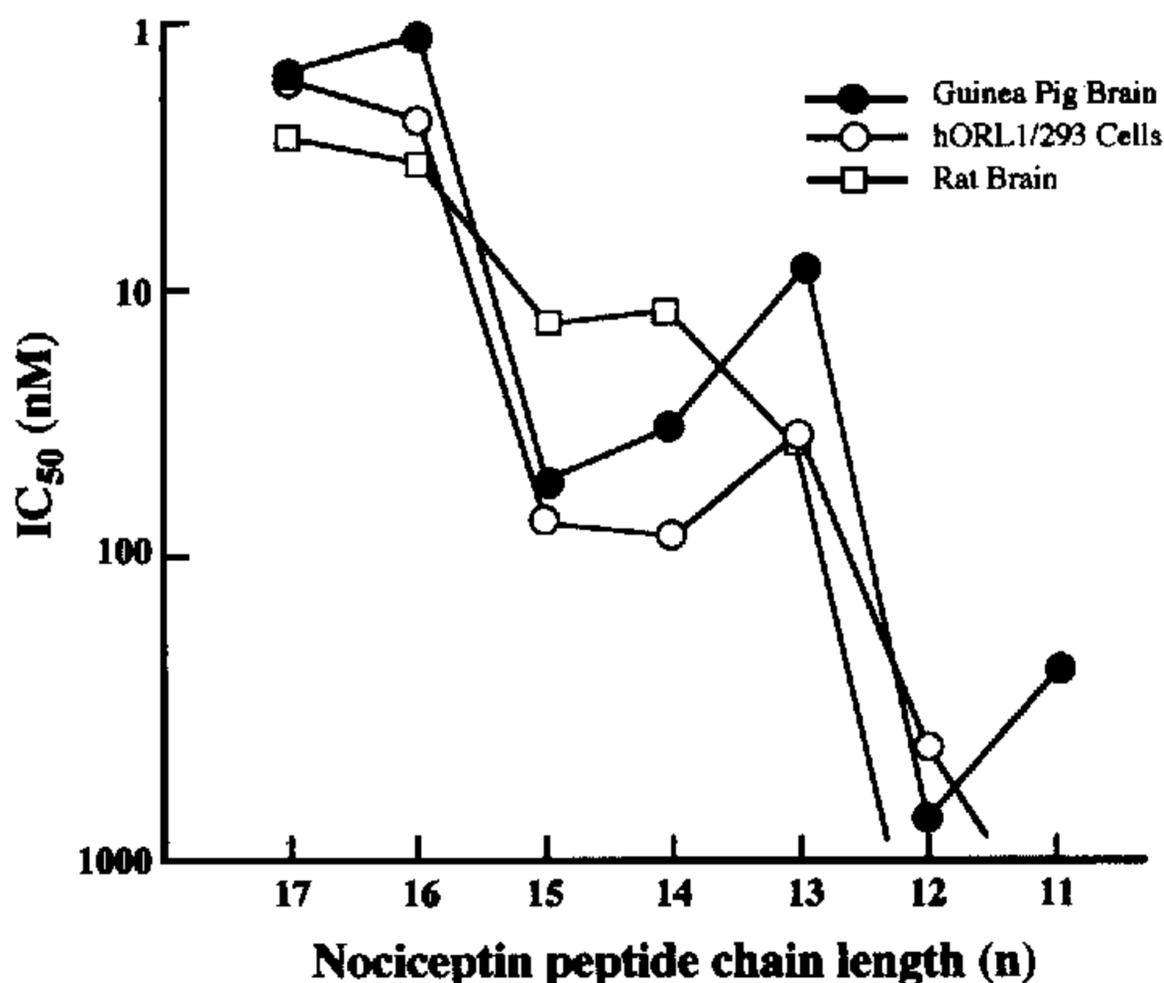
ノシセブチン：**Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln**  
ダイノルフィンA：**Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln**

両ペプチドの類似性は、NおよびC末端の配列、塩基性アミノ酸（**Arg**、**Lys**）を4～5残基含むことである。配列の特徴としては、N末端の**Phe-Gly-Gly-Phe**がオピオイドペプチドのメッセージ配列にきわめて良く似ていること、また、プロセッシングの可能性のある**Arg-Lys**を2カ所（8—9、12—13位）含むことがある。1995年暮れにノシセブチンの単離・精製、生理活性が報告されて以来約1年半に展開された構造活性相関（SAR）研究はさほど多くはない。しかし、いくつかの重要な構造要因が明らかにされた。本報告では、ノシセブチンの生理活性について、我々が実施したSAR研究を中心に今日的な構造的理解を紹介したい。

### （1）ノシセブチンとダイノルフィンAの交差性

ノシセブチンとダイノルフィンAの構造が類似していると同様に、ORL1受容体とオピオイド受容体も構造が類似している。それでは、ノシセブチンはオピオイド受容体に結合するのか、そして、ダイノルフィンAはORL1受容体に結合するか、興味もたれる。結論から言うと、ダイノルフィンAはORL1受容体にかなり弱いながらも結合するが、活性はない（3）。一方、ノシセブチンはオピオイド受容体にはきわめて弱くしか結合しない（4）。κ型受容体への結合を $^3\text{H}$ U69593で調べたところ、U69593の約60%しか占有できなかった。

ところで、ノシセブチンのN末端**Phe**を**Tyr**に置換すると、ダイノルフィンAと共通のN末端配列になり、ますます類似することになる。実際にこのアナログはオピオイド受容体にかかなり良く結合する（4）。面白いのは、1位**Tyr**アナログが良く結合するのはκ型受容体ではなく、μ型受容体である事実である。さらに興味あることに、この1位**Tyr**アナログはORL1受容体にノシセブチン同様に非常に良く結合し、受容体を活性化した。オピオイドペプチドでは1位**Tyr**を**Phe**に置換すると活性が失われるが、ノシセブチンではこのように**Phe**から**Tyr**への変換にきわめて鈍感である。



**Fig. 1. Receptor binding affinities of nociceptin and its C-terminal shortened analogs in the membrane preparations of 293 cells, rat brain, and guinea pig brain.**

### (2) ノシセプチン活性発現の最小構造

ノシセプチンのN末端**Phe**を削除するとほとんど不活性になる。C末端からアミノ酸を1残基ずつ削除したとき、16位**Asn**を削除した段階と、特に13位**Lys**を削除した段階で受容体結合能が大きく低下した (Fig. 1)。従って、活性発現の最小単位は1~13位ペプチドである。上述のようにプロセッシングの可能性のある**Arg-Lys**が2カ所あるが、プロセッシングにより生成する1~7位ペプチドも1~11位ペプチドも不活性であり、従って、ノシセプチンは1~17位ペプチドが天然のリガンドとして唯一作用しているものと考えられる。

類似の合成研究は2、3のグループで実施されたが細かいいくつかの点で異なる結果が報告されている (3, 5)。例えば、DooleyとHoughtenはペプタペプチド (n=5) にある程度の結合親和性を認めたが、我々の合成したペプタペプチドは全く結合しなかった (5)。これはC末端がアミドになっているか、遊離しているかによるコンホメーションによる差異を反映するものかも知れないが、詳細は不明である。

### (3) ノシセプチン活性発現におけるアミノ酸側鎖の重要性

生理活性ペプチドの各アミノ酸残基の重要性を調べるのに、側鎖をメチル基に置換するいわゆるアラニン・スキャンニングが有効である。まず、ノシセプチンで特徴的な構造要因と思われる1位および4位の**Phe**をそれぞれ

**Table 1. Receptor binding affinities of nociceptin and its analogs in rat brain.**

Peptides	IC <sub>50</sub> (nM)	Relative potency (%)
nociceptin	2.8 ± 1.1	100
[Ala <sup>1</sup> ]nociceptin	640 ± 110	0.44
[Ala <sup>4</sup> ]nociceptin	2000 ± 790	0.14
[Ala <sup>1,4</sup> ]nociceptin	—	inactive
[Ala <sup>8,9</sup> ]nociceptin	—	inactive
[Ala <sup>12,13</sup> ]nociceptin	—	inactive
[Ala <sup>16</sup> ]nociceptin	24.0 ± 9.2	13

れ**Ala**に置換した。ラット脳での<sup>3</sup>H|ノシセプチンによるアッセイの結果、200～600倍の親和性低下が見られ、**Phe**フェニル基の結合における重要性が判明した (Table 1)。1位および4位を同時に**Ala**に置換すると全く結合しなかった。

2カ所の**Arg-Lys**を**Ala-Ala**でそれぞれ置換したところ、いずれも全く結合しなかった。これら塩基性アミノ酸側鎖は受容体結合に決定的な重要性を持つ。ORL1受容体の第2細胞外ループに**Asp**、**Glu** 6残基から成る酸性アミノ酸のクラスターが存在し、**Arg-Lys**はここで特異的に結合するのではと推定されている。16位**Asn**の重要性が短鎖型アナログによって示されたが、これを**Ala**で置換した誘導体の結合能は約1/10に低下した。**Asn**のβアミドは受容体との(水素)結合に必要な構造要因と思われる。

系統的なアラニン・スキャンニングの結果が2つのグループによって報告されているが、上記に加えて2位**Gly**、5位**Thr**における置換が有意な活性低下をもたらしている(5, 6)。2位**Gly**ではもともと側鎖がないので、この活性低下はL型のアミノ酸を配したことによる受容体との立体的な不対合によると考えられる。

#### (4) アミノ酸置換によるノシセプチンの活性動態

特定のアミノ酸残基を他のアミノ酸で置換して、結合親和性、生物活性の増強をはかる試みがある。しかしながら、ノシセプチンに関してはそのようなSARを展開した報告例は現在までほとんどない。**Phe**フェニル基の受容体との相互作用において、芳香環同士のあいだのπ-π相互作用が重要な場合がある。このようなとき、パラ位にフッ素を導入するとこの相互作用が著しく増強されることがある。そこで、1位および4位の**Phe**をそれぞれ**Phe(p-F)**に置換した。その結果、4位の置換ではほぼ結合が維持されたが、1位の置換では約1/5に低下した。配向性の問題などがあるので、一概に言えないが、**Phe**フェニル基の芳香族性と疎水性を考えるうえで、重要

な知見である。

Reinscheidらは4位を**Tyr**で置換したところ、結合性は約10倍、活性は200倍以上、いずれも低下した。これはパラ位水酸基が受容体活性化に明らかに不利であることを示す(6)。

一方、14位**Leu**を**Tyr**で置換しても結合性は全く変化しなかった。これは、ノシセプチンは14位で疎水相互作用をしていることを示唆する(4)。

### (5) ノシセプチンのコンホメーション

ノシセプチンは直鎖17ペプチドである。受容体との結合時は特有のコンホメーションを取ると思われるが、このような直鎖ペプチドでは溶液中では通常はしっかりした構造を取ることが希有である。しかし、特定の構造を取りやすいかの傾向は溶媒の選択によって読みとることが可能な場合がある。そこで、我々はCDを測定した。リン酸緩衝液中では全くランダムな構造であったが、生体膜環境に類似するとされる60%トリフルオロエタノール中ではわずかながら $\beta$ シート構造を部分的に取る傾向が伺えた

(Fig. 2)。わずかな $\beta$ シート構造はC端3残基を削除すると見られなくなった。この $\beta$ シート構造が生理活性コンホメーションかは不明であるが、ノシセプチンは溶液中では本質的に特定のコンホメーションを取っていないと判断された。

二次構造予測法による解析では、N端5残基が $\beta$ シート構造を、以下のC端側はランダムコイルとなった。CDの結果はこれと一致すると言える。一方最近、SalvadoriらはノシセプチンのNMRによるコンホメーション解析を報告している(7)。DMSO/H<sub>2</sub>Oでの測定では、典型的なランダムコイルのパターンが解析されている。特にC端部分はフレキシブルであるとしている。しかし、N端側はエンケファリンに類似したNOEパターンが見られ、ターン構造を予測している。

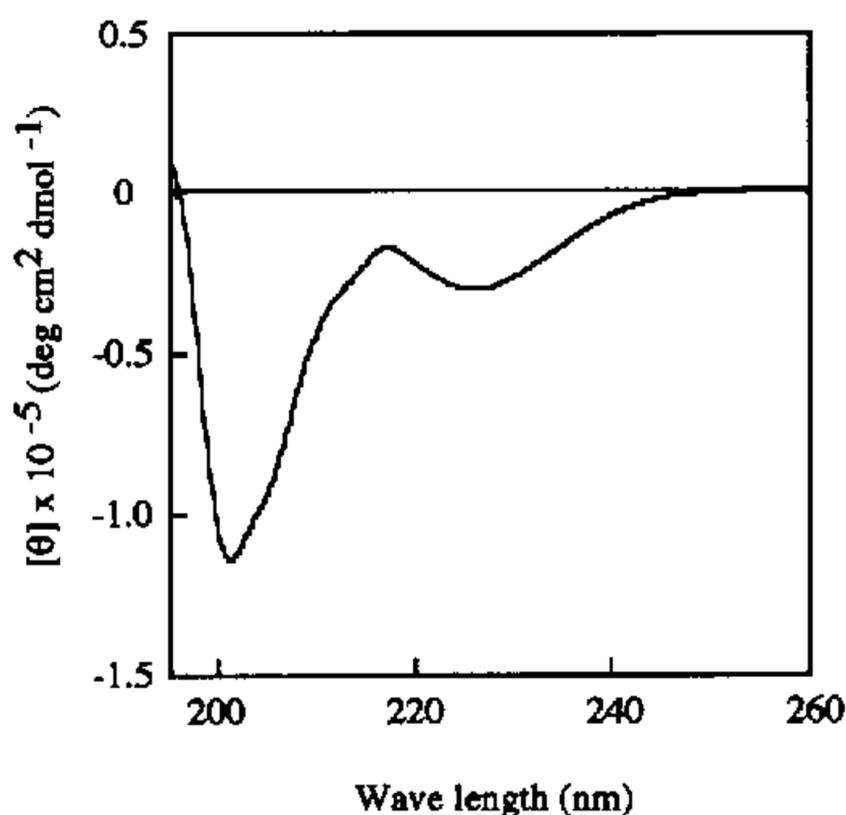


Fig. 2. CD spectrum of nociceptin in 60% trifluoroethanol.

## (6) 文献

1. Meunier, J.-C. *et al.*, *Nature*, **377**, 532-535 (1995).
2. Reinscheid, R.K. *et al.*, *Science*, **270**, 792-794 (1995).
3. Botour, J.-L., *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **321**, 97-103 (1997).
4. Shimohigashi, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 23642-23645 (1996).
5. Dooley, C.T. & Houghten, R.A., *Life Sci.*, **59**, 23-29 (1996).
6. Reinscheid, R.K. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14163-14168 (1996).
7. Salvadori, S., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 640-643 (1997).

# 1-4

## Nociceptin 関連リガンドの設計

○Yunden Jinsmaa、吉川正明

(京都大・食糧科研)

我々は $\delta$ -および $\kappa$ -レセプターの内因性リガンドであるenkephalinおよびdynorphinの逆の配列を持つretro-enkephalin およびretro-dynorphinのメチルエステルまたはC末端アルコールがアンタゴニスト活性を示すことを見い出してきた<sup>1)</sup>。今回、nociceptinの逆の配列を持つ[Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptinについても同様なことが適合するかどうかを検討した。

### 方法

#### レセプターアッセイ

ラット脳膜画分と[<sup>3</sup>H] nociceptin (NEN<sup>TM</sup> Life Science Products) を用いてレセプターアッセイを行った。

#### 鎮痛活性

ddy系雄性マウス（体重 22-24 g）にペプチドを脳室内投与し、5分間隔でtail-pinch法によって測定した。naloxone 2 mg/kgはペプチドの15分前に皮下投与した。

#### 観血法による血圧測定

血圧降下作用は麻酔下のラットにペプチドを静脈内投与することによって検討した。

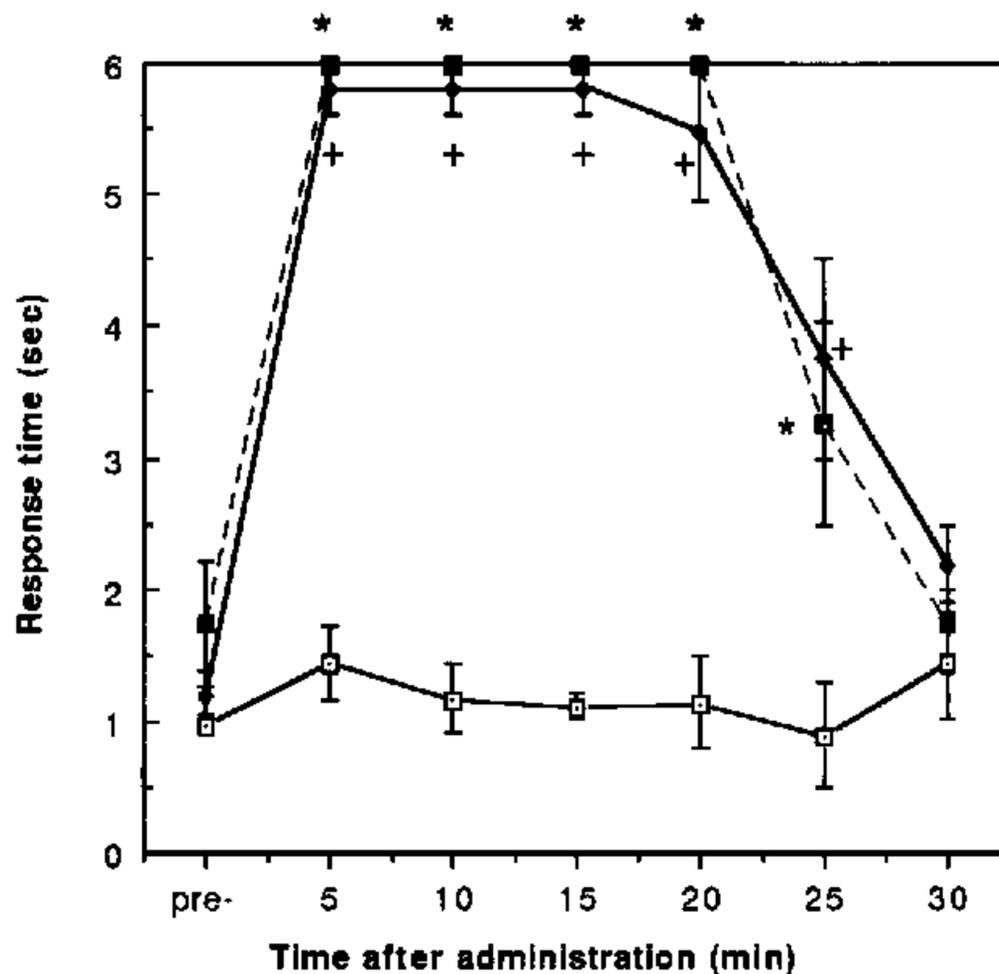
### 結果

#### 1. レセプターアッセイ

ラット脳膜画分および[<sup>3</sup>H] nociceptin を用いた系では nonspecific な結合が大きいので定量的な取扱いは出来なかったが、[Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptin は nociceptin の同程度の結合抑制を示したことからORL1レセプターに結合活性を有するものと考えられる。

## 2. 鎮痛活性

[Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptinの鎮痛作用を検討したところ 30 および 100 nmole/mouse の用量で鎮痛作用を示した。この効果はオピオイドアンタゴニストであるnaloxoneで抑制されなかった (Fig.1.)。なお、tail-pinch法ではnociceptinは投与15分後に痛覚過敏、30分後にnaloxone-reversibleな鎮痛作用と示すという報告がある<sup>2)</sup>が [Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptinの結果はこれとは明らかに異なるものである。



**Fig.1.** Effect of [Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptin on tail-pinch task after i.c.v. administration to mice.

-□- saline

-●- [Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptin 100 μg/mouse

-■- Naloxone 2mg/kg were given 15 min (s.c.) before administration of [Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptin 100 μg/mouse

\* p < 0.01, vs saline

+ p < 0.01, vs saline

## 3. 血圧降下作用

最近、nociceptin (1-30nmole/kg) がラットに対する静脈内投与の際に血圧降下

作用を示すことが報告されたため<sup>3)</sup>、[Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptinの血圧に対する効果を検討したところ30、100および300 nmole/kgの用量で血圧上昇作用を示した。

### 考察

[Pheol<sup>17</sup>]retro-nociceptinが弱いながらORL1活性を示した。本ペプチドの鎮痛作用はオピオイドアンタゴニストであるnaloxoneで抑制されなかったことからORL1レセプターを介していると考えられる。

### 文献

1. Masaaki Yoshikawa et al . , Peptide Chemistry , 473- 476 (1987)
2. Grace C . Rossi et al . , Eur. J. of Pharmacol , 311 , R7-R8 (1996)
3. Hunter C . Champion et al . , Life Sciences , 60 , 16 , pp . PL 241-245 (1997)

# 1-5

## 変異型 nociceptin 受容体を用いた リガンド認識機構の解析

○南 雅文、関 貴弘、上原知也、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

### 緒言

Nociceptin 受容体は、当初、オピオイド受容体と高い相同性を有している (図 1) にもかかわらず、オピオイドリガンドには結合しない orphan 受容体として 1993 年にクローニングされた<sup>1, 2)</sup>。その後、1995 年には内在性ペプチドリガンドである nociceptin/orphaninFQ<sup>3, 4)</sup> が単離、構造決定されているが、現在に至っても nociceptin 受容体の非ペプチド性リガンドの創製は報告されていない。非ペプチド性リガンドの創製は、本受容体の関与する生体機能調節系の解明やその系をターゲットとした新規医薬品の開発につながることを期待される。われわれは、オピオイドリガンドによるオピオイド受容体/nociceptin 受容体間識別の分

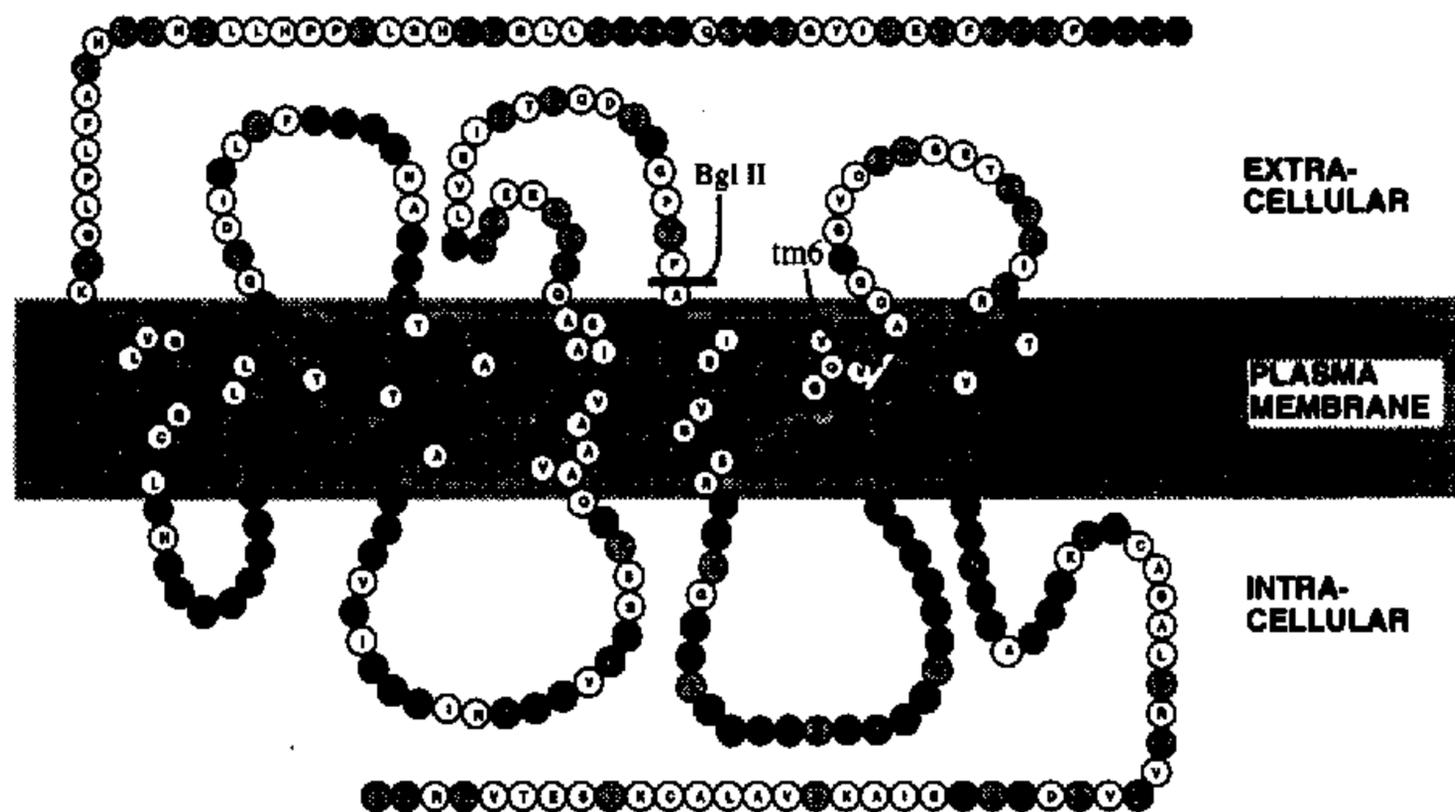


図1 ヒトノシセプチン受容体の構造。黒丸は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  3つのオピオイド受容体すべてとノシセプチン受容体で保存されているアミノ酸残基、灰色の丸は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  3つのオピオイド受容体のうちの1つないしは2つとノシセプチン受容体で保存されているアミノ酸残基を示す。キメラ受容体の作製に用いた Bgl II サイトと tm6 サイトを図中に示す。

子機構を明らかにすることにより、nociceptin 受容体リガンド設計に有用な知見が得られるものと考え、種々の  $\kappa$  オピオイド/nociceptin キメラ受容体を作製し、非選択的オピオイドリガンドである [ $^3\text{H}$ ]bremazocine の結合実験を行い、nociceptin 受容体にオピオイドリガンドが結合しない原因となっている、両受容体間の一次構造上の相違を明らかにした。

## 実験方法

$\kappa$  オピオイド/nociceptin キメラ受容体の作製は、制限酵素切断及びPCRを用いて行った。部位特異的 point mutation 導入は、CLONTECH 社の Transformer<sup>TM</sup> Site-directed Mutagenesis Kit を用いて行った。各受容体 cDNA を適当な制限酵素で切断し、そのフラグメントを発現ベクター pcDNA3 に組み込み、得られたキメラ、点変異型あるいは野生型受容体 cDNA を含むプラスミドを DEAE-dextran 法により COS-7 細胞にトランスフェクトし 65 時間培養後、細胞を回収した。得られた細胞を Tris 緩衝液中でホモジナイズし、30,000g で 20 分間遠心した後、ペレットを緩衝液に再懸濁し、これを粗膜標品として用い、[ $^3\text{H}$ ]nociceptin および [ $^3\text{H}$ ]bremazocine の飽和結合実験を行った。

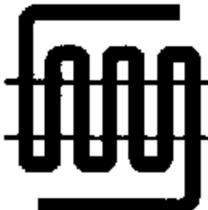
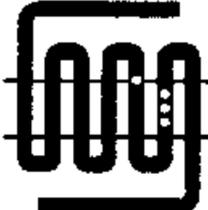
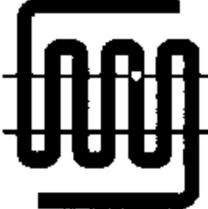
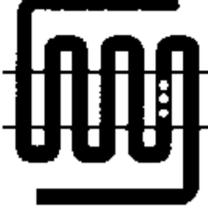
表1 野生型およびキメラ受容体を発現する COS-7 細胞から調製した粗膜画分に対する [ $^3\text{H}$ ]ブレマゾシンと [ $^3\text{H}$ ]ノシセプチンの  $K_d$  値。N.D. は、リガンドの特異的結合が著しく低いため  $K_d$  値が求められなかったことを示す。

		Kd(nM)	
		[ $^3\text{H}$ ]bremazocine	[ $^3\text{H}$ ]nociceptin
rat KOPR		3.1 ± 0.4	38 ± 11
human NocIR		N.D.	1.3 ± 0.1
NKbgl		11 ± 3.4	13 ± 1.9
NKbglNtm6		N.D.	16 ± 7.4
NKbglNtm6 + VQV(279-281)IH1		28 ± 3.0	19 ± 4.9

## 実験結果および考察

第2細胞外ループに存在する制限酵素認識部位Bgl IIサイトで切断し、N末側を nociceptin 受容体、C末側を  $\kappa$  受容体にしたキメラ受容体である NKbgl に対して [<sup>3</sup>H]bremazocine は高親和性 ( $K_d=11 \pm 3.4$  nM) で結合した (表1)。さらに、PCR法により第6膜貫通部位中程 (tm6 サイト) より後部をも nociceptin 受容体にしたキメラ受容体 NKbglNtm6 では、 [<sup>3</sup>H]bremazocine の特異的結合は検出可能であったが、その親和性は低く  $K_d$  値を求めることができなかった。このことから、第6膜貫通部位中程より C末側に bremazocine の結合に重要な受容体領域が存在すると考えられる。 $\mu$ 、 $\delta$  および  $\kappa$  オピオイド受容体の第6膜貫通部位に共通に存在する Ile-His-Ile (IHI) がオピオイドリガンドの結合に重要であることが報告されており、nociceptin 受容体では、対応する 279-281 番目のアミノ酸残基は Val-Gln-Val (VQV) となっている。そこで、NKbglNtm6 キメラ受容体に対し、さらに、VQV を IHI に置換する変異を施した変異型受容体 NKbglNtm6+VQV(279-281)IHI

表2 野生型および点変異型受容体を発現する COS-7細胞から調製した粗膜画分に対する [<sup>3</sup>H]ブレマゾシンと [<sup>3</sup>H]ノシセプチンの  $K_d$  値。N.D. は、リガンドの特異的結合が著しく低いため  $K_d$  値が求められなかったことを示す。

		Kd(nM)	
		[ <sup>3</sup> H]bremazocine	[ <sup>3</sup> H]nociceptin
NociR		N.D.	1.3 ± 0.1
NA216K+VQV (279-281)IHI		31 ± 14	21 ± 3.9
NA216K		N.D.	4.6 ± 1.4
NVQV (279-281)IHI		N.D.	4.3 ± 1.2

を作製し飽和結合実験を行ったところ、この変異型受容体に対し $[^3\text{H}]$ bremazocineは高親和性に結合し、その $K_d$ 値は $28 \pm 3.0 \text{ nM}$ であった(表1)。NKbglNtm6+VQV(279-281)IHI受容体中の $\kappa$ 受容体に由来する領域、すなわちbgl IIサイトとtm6サイトの間の領域で $[^3\text{H}]$ bremazocineの結合に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、さらなる点変異導入を行った(表2)。nociceptin受容体の第2細胞外ループと第5膜貫通部位の境界に存在する216番目のアミノ酸残基であるAlaを $\kappa$ 受容体の対応する位置に存在するLysに置換し、それをVQV $\rightarrow$ IHIの置換と組み合わせた変異型受容体NA216K+VQV(279-281)IHIに対し $[^3\text{H}]$ bremazocineは、NKbglNtm6+VQV(279-281)IHIと同等の親和性( $K_d=30 \pm 13 \text{ nM}$ )を示した。また、それぞれを単独で変異させたNA216K及びNVQV(279-281)IHIでは $[^3\text{H}]$ bremazocineの特異的結合は検出できなかった。したがってbremazocineの結合にはこれら2つの受容体領域が同時に必要であると考えられる。以上の結果より、nociceptin受容体の第2細胞外ループと第5膜貫通部位の境界に存在する216番目のAlaと第6膜貫通部位に存在する第279-281番目のVal-Gln-Valを、 $\kappa$ 受容体の対応する位置に存在する213番目のLys、277-279番目のIle-His-Ileに置換することにより、非選択的オピオイドリガンドであるbremazocineの結合が可能となることが示された。本研究結果は、nociceptin受容体の非ペプチド性リガンドの設計に有用な情報を提供するものであると考えられる。

## 参考文献

- 1) Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P. et al. : ORL1, a novel member of the opioid receptor family. cloning, functional expression and location. FEBS Lett., 341: 33-38, 1994.
- 2) Bunzow, J.R., Saez, C., Mortrud, M. et al. : Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a  $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  opioid receptor type. FEBS Lett., 347: 284-288, 1994.
- 3) Meunier, J.-C., Mollereau, C., Toll, L. et al. : Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. Nature, 377: 532-535, 1995.
- 4) Reinscheid, R.K., Nothacker, H.-P., Bourson, A. et al. : Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. Science, 270: 792-794, 1995.

# 1-6

## ノシセプチン/Orphanin FQ受容体の情報伝達

○植田弘師<sup>1</sup>、徳山尚吾、井上誠、柿澤慶子、入江圭一、山口拓、林田壮一郎、下平伊知郎、桜田司<sup>2</sup> (<sup>1</sup>長崎大・薬・分子薬理、<sup>2</sup>第一薬大・生化)

ノシセプチン/Orphanin FQは1994年にオピオイド受容体のホモログとしてクローニングされたORL1受容体(1)の内在性リガンドで、翌年フランスのJ.-C. Meunier博士らのグループ(2)とスイスの製薬会社ロッシュ社のCivelli博士(現在カリフォルニア州立大学アーバイン校教授)らのグループ(3)により独立して発見された17アミノ酸からなるペプチドである。この発見で特徴的なことは、ORL1受容体のアミノ酸配列がオピオイド $\delta$ 、 $\mu$ 、 $\kappa$ 各サブタイプ受容体のG蛋白質連関に関わる領域において特に類似していることを利用し、このオーファン受容体を哺乳動物細胞に発現させ、アデニル酸シクラーゼ活性抑制作用を指標に単離したという新しい試みである。1975年にオピオイドペプチド、エンケファリンが発見されてちょうど20年後の研究成果であることもオピオイド研究者にとって、記念すべき出来事であると思われる。ところが、このペプチドはオピオイドペプチドと正反対に痛みを誘発あるいは増強するなど、薬理作用の点でオピオイド系と明らかに対立することが報告され、その情報伝達機構との整合性の検討が必要とされるようになってきている。ここでは、第一歩として、ノシセプチン受容体の情報伝達をオピオイドの薬理作用メカニズムとの関連において検討した。

### ヒトがん細胞株からのノシセプチン受容体のクローニング

ヒト扁平上皮性肺がんの一種であるA549細胞からノシセプチン受容体cDNAをRT-PCR法によりクローニングし、これをバキュロウイルス/昆虫細胞発現系に組み込み、本受容体を超高発現させた。各種G蛋白質とin vivoで共発現させ、 $[^{35}\text{S}]$  GTP $\gamma$ S結合を測定したとき、Gi1およびGo1が本受容体と機能的に関連しうることが明らかになった。一方、 $\kappa$ -オピオイド受容体を用いた同様の実験においてもGi1およびGo1との関連を確認している。

## マウス脳におけるin situ [<sup>35</sup>S] GTPγS結合

Childersらのグループ(4)により最近開発された方法であるが、この方法を用いてマウス脳切片でのin situ [<sup>35</sup>S] GTPγS結合オートラジオグラフィを行ったとき、扁桃体を始めとする神経の可塑性に関与する領域にノシセプチンによる高い活性が観察された。興味ある観察は海馬歯状回にノシセプチン受容体遺伝子発現が認められるが、受容体機能活性はこの部位に見い出されず、むしろ受容体遺伝子発現が認められない錐体細胞CA1-CA3の領域に見い出された点である。一方、各種オピオイドアゴニストを用いた成績と比較したとき、明らかな分布の相違が認められた。

## マウス扁桃体シナプス膜におけるノシセプチン受容体とG蛋白質との連関

先に述べた [<sup>35</sup>S] GTPγS結合実験において、ノシセプチンによる本結合活性は百日咳毒素感受性であり、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系において調製したリコンビナントGαi1β1γ2およびGαo1β1γ2の再構成によりin vitroにおいても機能回復が観察された。

## ヒト肺がん細胞膜におけるノシセプチン受容体とG蛋白質との連関

先に述べたA549細胞より細胞膜を調製し、 [<sup>35</sup>S] GTPγS結合実験を行ったところ、脳シナプス膜と同様、ノシセプチンのG蛋白質活性増強が認められ、さらに再構成実験においてもGαi1β1γ2およびGαo1β1γ2と機能的連関が存在することが確認された。しかし興味あることにノシセプチンは本細胞株の増殖活性を高める作用を有しているが、この作用は百日咳毒素非感受性であった。対照的にオピオイド関連薬のがん細胞生存活性を観察したとき、逆にアポトーシスを引き起こす化合物が見い出されたが、この効果はいわゆるオピオイド受容体を介するものではなかった。

## ノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスにおける情報伝達機構の修飾

竹島らのグループ(5)により作成された本受容体遺伝子欠損マウスにおいて、脳シナプス膜におけるノシセプチンの [<sup>35</sup>S] GTPγS結合増強作用はことごとく消失した。

以上の成績より、ノシセプチンのG蛋白質を介する細胞膜情報伝達機構はオピオイド系と同様のものであるが、脳内分布などの点において大きな相違が見いだされた。従って、ノシセプチンのアンチオピエート様の作用は同一の細胞膜におけるクロストークによるというより、シナプスを介する別の回路上の相互作用に由来するものであると考えられた。

## 参考文献

1. Mollereau, C et al. (1994) FEBS Lett., 341, 33-38.
2. Meunier, J.-C. et al., (1995) Nature, 377, 532-535.
3. Reinscheid, R.K. et al. (1995) Science, 270, 792-794.
4. Sim, L.J. et al. (1995) P.N.A.S., 92, 7242-7246.
5. Nishi, M. et al. (1997) EMBO, 16, 1858-1864.

# 1-7

## Nociceptin/Orphanin前駆体遺伝子発現による神経細胞分化の誘導

斎藤祐見子<sup>1</sup>、丸山 敬<sup>2</sup>、川野 仁<sup>3</sup>、川村光毅<sup>3</sup>、西道隆臣<sup>1</sup>、  
○川島誠一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門、<sup>2</sup>国立生理学研究所神経化学部門、<sup>3</sup>慶応大学医学部解剖学教室

脳中枢神経系は、その発生段階で神経細胞の分化・移動・神経回路形成などの複雑な過程を経ることにより、高次機能を獲得し得るようになる。しかし、中枢神経系の発生に関わる遺伝子とその発現についての知見は極めて少ない。そこで、マウス脳腫瘍C1300由来NS20Y細胞の dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) による神経分化 [1] をモデル系として未分化-分化のサブトラクション並びにプラス-マイナス法を併用し、神経分化関連遺伝子を探索した。その結果、NS20Y細胞の神経突起伸長時にその発現が急上昇する新規の遺伝子N27KおよびN23Kが得られた。その全翻訳領域の構造を決定したところ、N23KはN27Kにストップコドンを含む57塩基のインサーションが挿入されたスプライシングフォームであった[2, 3]。また、N27KとN23Kがコードするタンパク質（それぞれ217アミノ酸と187アミノ酸）は、ウエスタンブロット上で27 kDaと23 kDaの分子量を示した。27 kDaタンパク質と23 kDaタンパク質は、未分化NS20Y細胞ではほとんど検出できないが、dbcAMP添加後12時間で出現し始め、48時間で最大になり、120時間で減少する。この時間経過はmRNAの変化と一致する。これらのmRNAの組織発現分布は脳・脊髄などの神経系臓器に特異的であり、マウス胎生期の脳発生時に一過性に発現が上昇した。また、その翻訳産物であるN27K・N23Kタンパク質は、NS20Y細胞の神経分化に伴ってダイナミックな局在変化を示した。すなわち、分化開始初期にはゴルジ体周辺に出現し、突起の伸長に伴いその先端に点状に局在する。さらに、ネットワークを形成する時期には、その量は激減した。この挙動は分泌タンパク質の性質に類似しているため、他の分泌関連タンパク室に対する抗体で共染色したところ、large dense core vesicle固有のタンパク質であるsecretogranin Iと局在が一致した。

その後、新規の痛み関連オピオイド系神経ペプチドnociceptin/orphanin FQが発見され[4, 5]、N27K/N23Kはその前駆体に相当することが判った。そこで、N27K/N23Kの質的に異なる機能を明らかにするために、マウス

神経発生過程での発現時期・発現部位を免疫組織化学的に検討した。大脳皮質における特異抗体との陽性反応は、胎生期12日より神経管周辺に存在する幼弱な神経細胞に出現し、新生仔期には皮質のほぼ全ての神経細胞が陽性を示した。一方、成熟マウスでは陽性細胞は著しく減少し、特定領域の特定神経細胞（視床下部の室傍核・弓状核・脊髄後角の痛覚伝達部位・脊髄後根神経節の痛覚関連小型神経細胞）に限定される。これらの局在変化は、N27K/N23Kが発生過程において異なる機能をもつ dualな分子であることを示している。

また、N27K/N23Kが神経分化で指導的役割を果たしているのかを明らかにするために、未分化NS20Y細胞にN23K、N27K、N23K+N27Kを強制発現させ、その形態変化を観察した。過剰発現株で発現したタンパク質は正常の分化状態と同じ局在を示し、かつ過剰発現株はdbcAMP処理をしなくても自発的に神経突起を形成した。N23KとN27Kを共発現した場合、どちらか片方のみを発現させた場合より長い神経突起が生じた。これらのことから、N23KとN27Kは神経分化の結果として発現するのではなく、積極的に神経分化を誘導する能力をもつことが証明された。

以上のような神経発生におけるN27K/N23Kの動態および突起形成能は、従来の神経ペプチド前駆体の概念を超えるものであり、これらの分子はオピオイドファミリーの中でも特異な位置に属すると考えられる。

1. Amano, T., Richelson, E., and Nirenberg, M. (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 258-263
2. Saito, Y., Maruyama, K., Saido, T.C., and Kawashima, S. (1995) N23K, a gene transiently up-regulated during neural differentiation, encodes a precursor protein of a newly identified neuropeptide nociceptin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 539-545
3. Saito, Y., Maruyama, K., Kawano, H., Hagino-Yamagishi, K., Kawamura, K., Saido, T.C., and Kawashima, S. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel form for neuropeptide gene as developmentally regulated molecule. *J. Biol. Chem.*, 271, 15615-15622
4. Meunier, J-C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J-L., Guillemot, J-C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Mazarguil, H., Vassart, G., Oarmentier, M., and Costentin, J. (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*, 377, 532-535
5. Reinscheid, R.K., Nothacker, H-P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J., Jr., and Civelli, O. (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activated and opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*, 270, 792-794
6. Saito, Y., Maruyama, K., Saido, T.C. and Kawashima, S. (1997) Overexpression of a neuropeptide nociceptin/orphanin FQ precursor gene, N23K/N27K, induces neurite outgrowth in mouse NS20Y cells. *J. Neurosci. Res.*, in press,

# 1-8

カラゲニン誘発の炎症性疼痛過敏におけるラット後根神経節での prepronociceptin mRNA の発現誘導

○安東嗣修、伊藤雅之、倉石 泰  
富山医科薬科大学薬学部薬品作用学教室

## 緒言

Nociceptin(1,2)は、脊髄後角表層に分布し、その脊髄クモ膜下腔内注射により侵害受容過感受性(痛覚過敏・アロディニア)(3,4)あるいは痛覚鈍麻(5,6)を生じることから、脊髄後角における痛覚伝達の調節に何らかの役割を演じていることが推測される。しかし、内因性の nociceptin の痛覚伝達調節における生理的・病的役割は不明である。そこで本研究では、内因性 nociceptin の侵害受容感受性の調節への関与を明らかにする目的で、末梢性炎症下における後根神経節での prepronociceptin (PPN) mRNA の発現量の変化を調べ、侵害受容感受性の変化の時間経過と比較した。

## 実験方法

実験には、雄性 Sprague-Dawley 系ラット(5週令)を使用した。炎症は、ラット右後肢足底に 1%  $\lambda$ -carrageenan 0.1 ml を皮下注射することにより引き起こした。また、反対側には、生理食塩水を注射しコントロールとした。侵害受容閾値の測定は、planter test 法により行い、足の厚さは、dial thickness gauge を用いた。PPN mRNA の発現及びそのレベルの解析は、reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)法及び Southern blot 法により行った。

## 実験結果及び考察

全脳の total RNA を用いた RT-PCR 法により得られた PCR 産物(256 bp) が PPN mRNA 由来のものであるかどうか同定するために PCR 産物の制限酵素(*Alu I*, *Apa I*, *Hae III*)による切断を行った。*Alu I*により 156、65 bp に、*Apa I*により 224、32 bp に、*Hae III*により 168、54 bp にそれぞれ予想される主要なバンドが確認された。従って、我々の構築したプライマーにより得られた PCR 産物は、PPN mRNA 由来であることが確かめられた。PCR 法を用いた PPN mRNA の発現レベルの定量性は、total RNA を希釈することにより検討した。Total RNA 2、1、0.5、0.25、0.125  $\mu\text{g}/\text{tube}$  を用いた場合、RNA の量に応じて PCR 産物の量も減少し、直線性を示した。従って、本実験で用いた PCR の条件で、準定量化が可能であることが示めされた。

無処置ラットにおける PPN mRNA の発現レベルは、大脳皮質、中脳、延髄で高く、海馬、線条体、視床、視床下部、小脳、脊髄では低かった。後根神経節及び臭球では、ほとんど発現していなかった。

Carrageenan を後肢足底に皮下注射すると、注射側の後根神経節(L4-L6)での PPN mRNA の顕著な発現誘導が認められた。生理食塩水注射側では、ほとんど発現していないか、あるいは若干の発現しか認められなかった。Carrageenan 注射側の後根神経節での PPN mRNA の発現誘導は carrageenan 注射後 30 min 以内にピークに達し、その後 6 hr までに元のレベルにまで戻った(Fig. 1A)。

PPN mRNA の発現が侵害受容感受性と炎症の変化に関係しているかどうか注射後の時間経過を追って調べた。Carrageenan 注射後、注射側の足の浮腫は、30 min 以内に起こり、1 hr 後にはほぼ最大になり、少なくとも 6 hr 後まで続いた。24 hr 後には元のレベルにまで回復した(Fig. 1B)。浮腫を測定したのと同じ動物の侵害受容感受性は、注射後 30 min では、その値に変化は認められず、1 hr 後より減少し、3 hr でその減少がほぼ最大に達した。6 hr 後にはほぼ元の閾値にまで回復した(Fig. 1C)。

本研究では、末梢組織の炎症により後根神経節において PPN mRNA の発現が急速に誘導されることを見出した。本結果は、末梢組織の炎症により nociceptin の動態が変化することを示した初めての知見である。起炎薬処置後 30 min には、明らかな浮腫の発症と PPN mRNA の発

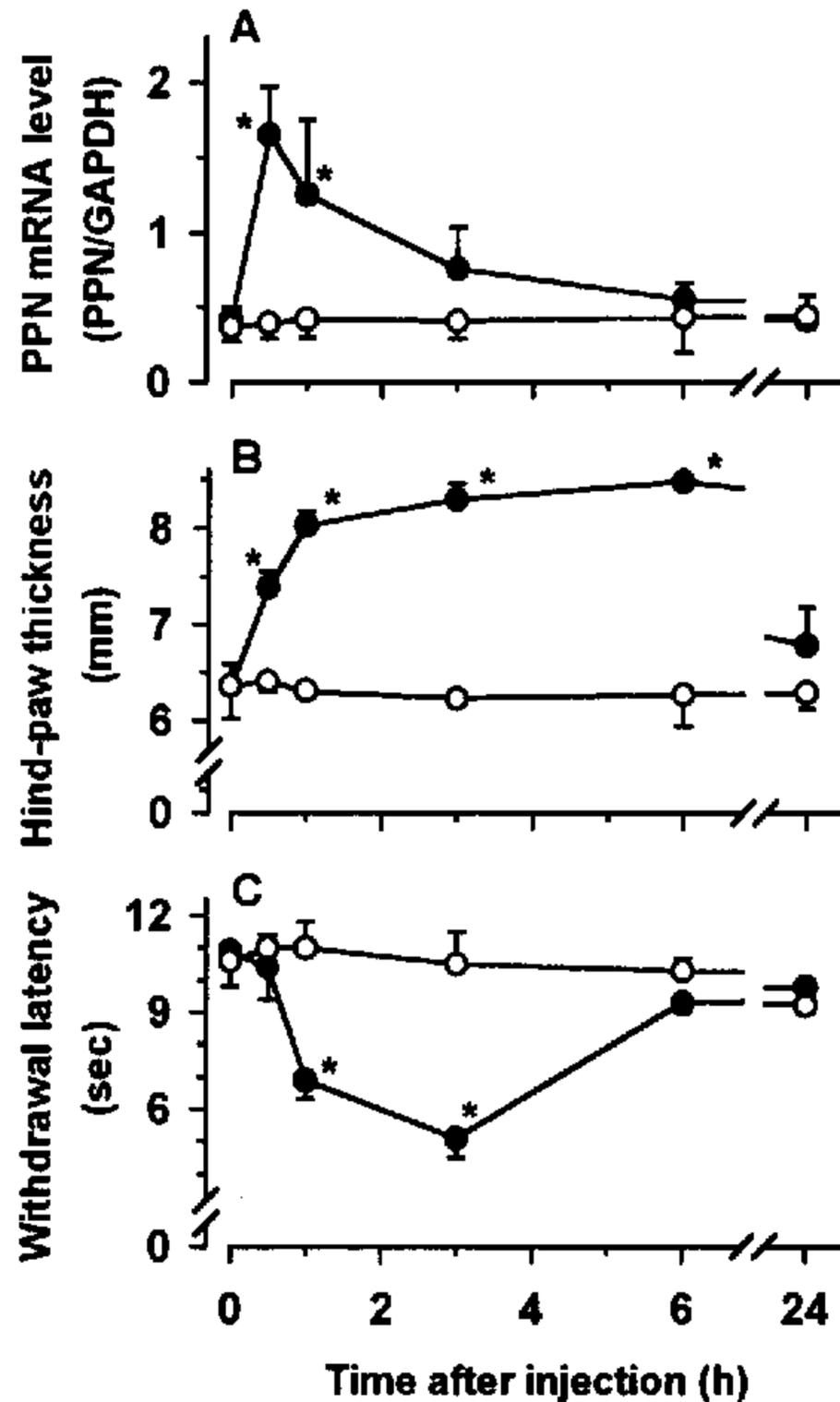


Fig. 1 The induction by carrageenan injection of the expression of prepronociceptin mRNA in the dorsal root ganglia, nociceptive hypersensitivity and inflammation in the rat. The animals were given carrageenan (●) or saline (○) into either hind paw. A: Carrageenan-induced expression of PPN mRNA (normalized to the level of GAPDH; mean and S.E.M.,  $n = 6$ ) in the dorsal root ganglia. B: Carrageenan-induced edema (mean and S.D.,  $n = 6$ ). C: Carrageenan-induced nociceptive hypersensitivity (mean and S.E.M.,  $n = 6$ ) of the same rats as those in B. \*  $P < 0.05$  when compared to the contralateral side (paired  $t$ -test).

現量増加が認められたが、侵害受容感受性はほとんど変化しなかった。侵害受容感受性の最大が認められたのが起炎薬処置後 1 hr で、最大変化が観察されたのが 3 hr 後であったことは、PPN mRNA の発現量変化

が侵害受容感受性の最大に先行して起こることを示している。Nociceptin の脊髄クモ膜下腔内注射が侵害受容過感受性を惹起することを考慮すると、本実験の結果は、末梢組織の炎症により後根神経節(おそらく一次感覚神経)に発現した nociceptin が侵害受容過感受性の発症に少なくとも一部関与する可能性が推測される。この可能性を明確にするために、今後、nociceptin の成熟ペプチドの濃度変化と nociceptin の発現あるいは機能の阻害による侵害受容過感受性の発症への影響を明らかにする必要がある。Nociceptin の脊髄クモ膜下腔内注射により痛覚鈍麻が発現するとの報告があるので、一次感覚神経で発現した nociceptin が侵害受容過感受性の抑制(回復)に関わっている可能性も考えられるかも知れない。しかし、末梢組織の炎症が少なくとも 6 hr 以上持続したにも関わらず、後根神経節における PPN mRNA の発現量増加は、起炎薬投与後 30 min をピークとして、その後比較的速やかに回復した。侵害受容過感受性がピークを示した 3 hr 後には、PPN mRNA レベルがほぼ健常値に近いレベルまで減少していた。従って、少なくとも一次感覚神経で発現した nociceptin が侵害受容過感受性の回復に関与する可能性は少ないと考えられる。一方、carrageenan 処置により、脊髄後角において preprodynorphin mRNA の発現増加が観察されるが、その潜時は 2 hr と侵害受容過感受性の回復開始に先行する(7)。従って、侵害受容過感受性の回復には、一次感覚神経における nociceptin よりむしろ脊髄後角におけるオピオイドペプチドなどの発現増大の関与が大きいと考えられる。

健常状態では、ラットの脊髄後角の nociceptin は、一次感覚神経由来ではないといわれる(8)。しかしながら、末梢組織の炎症が発生すると一次感覚神経で PPN mRNA の発現が誘導され、新たに生合成された nociceptin が脊髄後角中に遊離し、侵害受容過感受性の発現に少なくとも一部関与する可能性が考えられる。

#### 参考文献

- (1) Meunier, JC. et al. *Nature* 377 (1995) 532-535.
- (2) Reinscheid, RK. et al. *Science* 270 (1995) 792-794.

- (3) Okuda-Ashitaka, E. et al., *Mol. Brain Res.* **43** (1996)96-104.
- (4) Hara, N. et al. *Br. J. Pharmacol.* **121** (1997) 401-408.
- (5) Stnfa, LC. et al. *Br. J. Pharmacol.* **120** (1997) 1875-1877.
- (6) Tian, JH. et al. *Br. J. Pharmacol.* **120** (1997) 676-680.
- (7) Draisci, G. and Iadarola, MJ. *Mol. Brain Res.* **6** (1989) 31-37.
- (8) Riedl, M. et al. *NeuroReport* **7** (1996) 1369-137