

主 題 3

オピオイド研究の新展開

3-1

クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いた拮抗性鎮痛薬の薬理的性質の解析

○南 雅文、勝又清至、家永裕賀、佐藤公道

京都大・薬学研究科・生体機能解析学分野

緒言

拮抗性鎮痛薬は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の作用には拮抗するが、単独投与により鎮痛作用を発現する薬物であり、麻薬性鎮痛薬の副作用である呼吸抑制に対して天井効果を有していること、身体的・精神的依存形成能が弱いこと、麻薬に指定されていないために取り扱いやすいことなどの理由により臨床的によく利用されている。我々は、クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いて、拮抗性鎮痛薬であるブプレノルフィン (Bup)、ブトルファノール (But)、ペンタゾシン (Pen)、およびオピオイドアゴニスト・アンタゴニストであるブレマゾシン (Bre) のオピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各タイプに対する薬理作用特性を麻薬性鎮痛薬のモルヒネ (Mor)、および μ 、 δ 、 κ 各タイプに選択的な完全アゴニストと考えられるDAMGO、DPDPE、U69,593の薬理作用特性と比較検討した。

実験方法

オピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各タイプをそれぞれ安定的に発現するCHO細胞 (CHO/MOPR、CHO/DOPR および CHO/KOPR) から粗膜標品を調製し、各タイプに選択的な放射性標識リガンド、 $[^3\text{H}]$ DAMGO、 $[^3\text{H}]$ DPDPE および $[^3\text{H}]$ U69,593 による飽和結合実験、および Bup、But、Pen、Bre、Mor などの非標識オピオイド類による置換実験を行った。また、各オピオイド類のアゴニスト活性をフォルスコリンによる細胞内cAMP蓄積に対する抑制効果を指標として評価した。さらに、アンタゴニスト性を検討するため、Mor と各薬物を同時処置することにより、Mor のcAMP蓄積抑制効果に対する各薬物の効果を調べた。

実験結果および考察

CHO/MOPR、CHO/DOPR および CHO/KOPR 膜標品における、各オピオイド類の親和性 (K_i 値) を表1に示す。拮抗性鎮痛薬である Bup、But、Pen は、

いずれも μ および κ オピオイド受容体に同程度の、 δ オピオイド受容体にはそれらの 1/8-1/25 程度の親和性を有していた。これら 3 種の拮抗性鎮痛薬では、 μ 、 δ 、 κ いずれの受容体においても、 $\text{But} > \text{Bup} > \text{Pen}$ の順で親和性が高かった。Bre は κ 受容体に対する親和性が非常に高く、 μ および δ 受容体にはそれより 1/10 程度弱い親和性を示した。Mor は、 μ 受容体に対する親和性が高く、 δ および κ 受容体に対する親和性は、その 80 ~ 160 分の 1 程度であった。各受容体タイプに選択的なアゴニストである、DAMGO、DPDPE および U69,593 は、各々、 μ 、 δ および κ 受容体に対して高親和性を示すが、他のタイプに対する親和性は著しく低いことが確認された。麻薬拮抗薬であるナロキソン (Nal) は、 μ 受容体に対する親和性が高く、 δ および κ 受容体に対する親和性は、その 5 ~ 20 分の 1 程度であった。ナルトリンドール (NTI) およびノルビナルトルフィミン (norBNI) は、各々、 δ および κ 受容体に対する親和性が高かった。

表 2 に、CHO/MOPR、CHO/DOPR および CHO/KOPR におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積に対する、各オピオイド類による最大抑制率 ($I_{\max}$, %) と、その 50% にまで抑制するために必要な濃度 (IC_{50} , nM) をまとめる。CHO/MOPR において Bup, But, Pen, Bre は濃度依存的にフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積を抑制したが、その最大抑制効果は、DAMGO および Mor のそれより有意に弱かったことから、Bup, But, Pen, Bre は μ 受容体に対して部分アゴニストとして作用すると考えらる。しかしながら、Bup は But, Pen, Bre より有意に強いアゴニスト活性を示したことから、Bup は μ 受容体に対して比較的強いアゴニスト活性を有する部分アゴニストとして作用することが明らかとなった。一方、Bre は μ 受容体に対し高い親和性を示すにもかかわらず、ア

表 1 CHO/MOPR, CHO/DOPR, CHO/KOPR 膜標品に対する
オピオイド類の K_i 値

	CHO/MOPR nM	CHO/DOPR nM	CHO/KOPR nM
Buprenorphine	4.60	72.5	6.17
Butorphanol	1.16	17.9	0.72
Pentazocine	34.8	283	13.6
Bremazocine	1.49	2.38	0.18
Morphine	1.67	281	140
DAMGO	0.93	>3000	463
DPDPE	514	7.33	>3000
U69,593	>3000	>3000	1.49
Naloxone	4.10	83.5	18.7
Naltrindole	38.4	6.23	27.6
Norbinaltorphimine	94.2	166	2.27

表2 CHO/MOPR, CHO/DOPR, CHO/KOPRにおける各薬物による
フォルスコリン誘発cAMP蓄積の最大抑制率(I_{max} , %)と、その
50%にまで抑制するために必要な濃度(IC_{50} , nM)

	CHO/MOPR		CHO/DOPR		CHO/KOPR	
	I_{max} (%)	IC_{50} (nM)	I_{max} (%)	IC_{50} (nM)	I_{max} (%)	IC_{50} (nM)
Buprenorphine	81.5±2.5 ^a	6.2±0.56	75.3±3.2 ^c	9.2±1.0	60.8±3.0 ^d	45.9±14
Butorphanol	58.4±1.8 ^b	4.4±0.92	69.4±1.7 ^d	18.4±1.2	60.4±3.0 ^d	6.8±3.6
Pentazocine	59.4±2.9 ^b	274±65	75.5±3.5 ^c	439±49	59.6±3.4 ^f	131±11
Bremazocine	29.3±0.74 ^b	2.4±0.26	79.1±1.9 ^c	1.7±0.60	72.6±2.2 ^f	0.88±0.10
Morphine	91.2±1.3	22.5±0.89	64.1±2.2 ^a	592±86	57.4±2.2 ^a	1088±293
DAMGO	94.1±0.11	3.0±0.60	N.D.		N.D.	
DPDPE	N.D.		88.2±1.9	2.1±0.43	N.D.	
U69,593	N.D.		N.D.		81.6±0.33	9.5±2.7

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ vs DAMGO

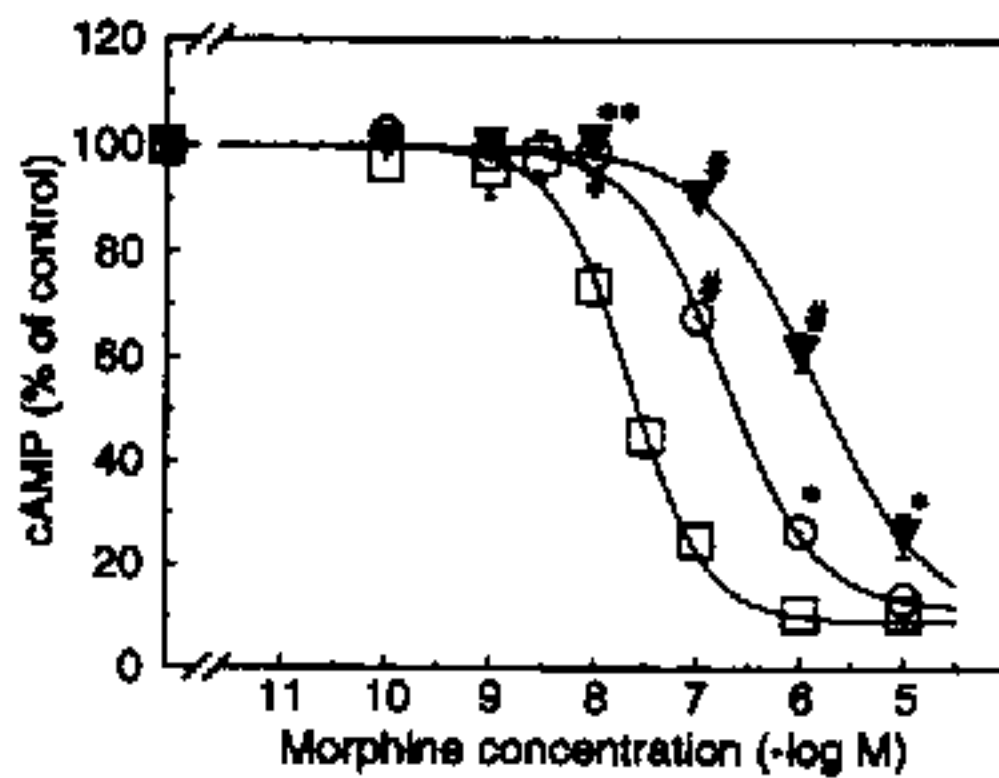
^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.001$ vs DPDPE

^f $P < 0.05$, ^g $P < 0.01$, ^h $P < 0.01$ vs U69,593

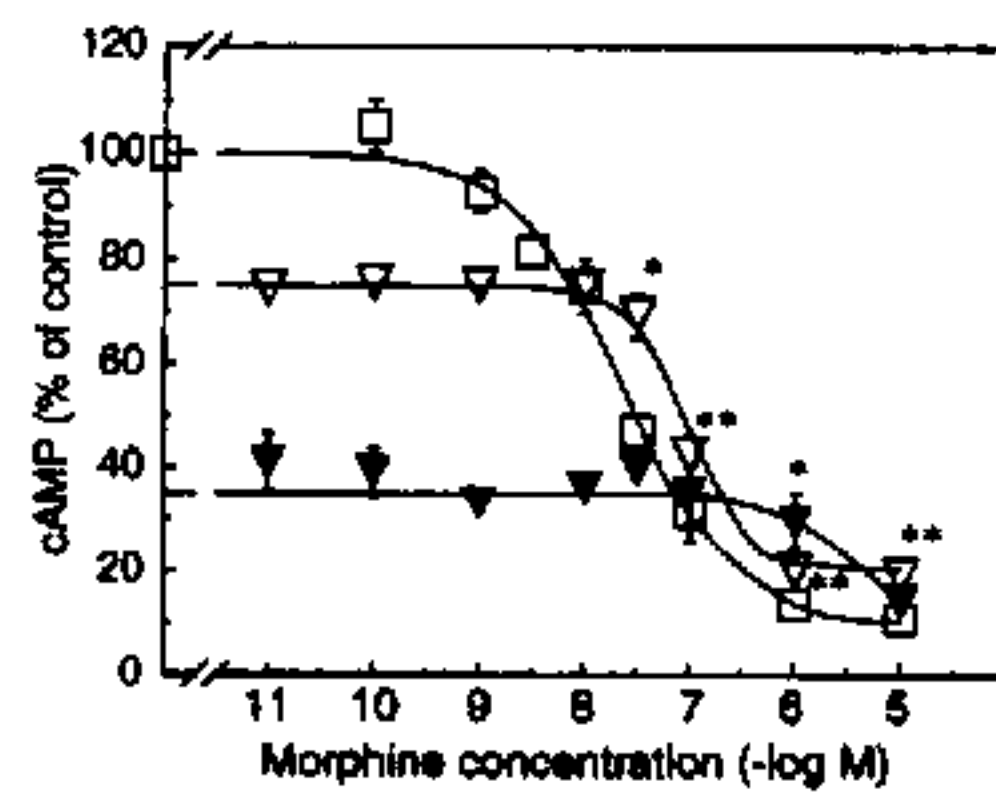
N.D.=not determined. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=3-5)

ゴニスト活性が著しく低いことから、 μ 受容体拮抗薬として作用することが予想される。CHO/DOPRにおいてBup, But, Pen, Bre, Mor は濃度依存的にフォルスコリン誘発cAMP蓄積を抑制し、その最大抑制効果はDPDPEより有意に弱かったことから、これら薬物はすべて、 δ 受容体に対し部分アゴニストとして作用すると考えられる。CHO/KOPRにおいてBup, But, Pen, Mor は濃度依存的にフォルスコリン誘発cAMP蓄積を抑制したが、その最大抑制効果はU69,593より有意に弱かったことからこれらの薬物は、 κ 受容体に対し部分アゴニストとして作用すると考えられる。Bre は、 κ 受容体に対してU69,593の8倍、Morの780倍高い親和性を示し、cAMP蓄積を強く抑制した。その最大抑制効果はU69,593より有意に弱いものであったが、Bup, But, Pen, Morよりは有意に強く、Breは κ 受容体の部分活性薬であるが、そのアゴニスト活性は比較的強いことが明らかとなった。

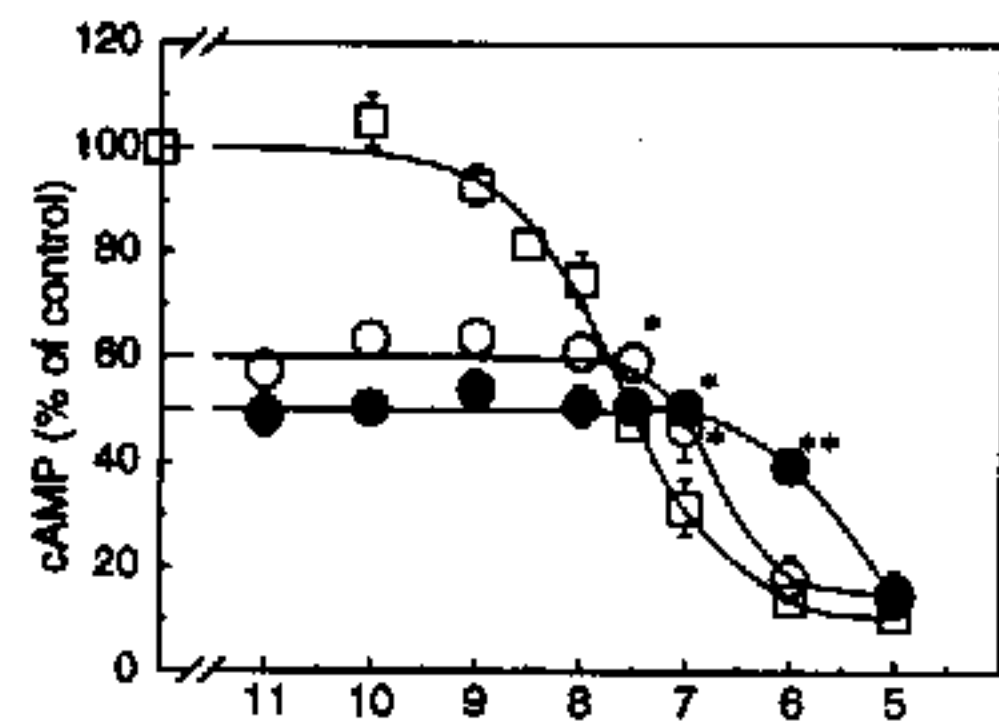
拮抗性鎮痛薬であるBup, But, Pen およびオピオイドアゴニスト・アンタゴニストのBreのアンタゴニスト活性を、MorのcAMP蓄積抑制作用に対する拮抗作用を調べることにより検討した。CHO/MOPRにおいて(図1)、麻薬拮抗薬であるNalはMorのフォルスコリン誘発cAMP蓄積抑制効果の濃度反応曲線を右方に移動させた。Bup, But およびBreを10あるいは100 nMの濃度で、Penを1 μ Mの濃度でMorと同時に処置することにより、MorのcAMP蓄積抑制効果の濃度反応曲線を高濃度側で右方に移動させた。これらの結果は、 μ 受容体では、Bup, But, Pen およびBreが高濃度のモルヒネに対して拮抗作用を有することを示している。CHO/DOPRにおいて(図2)、 δ 受容体



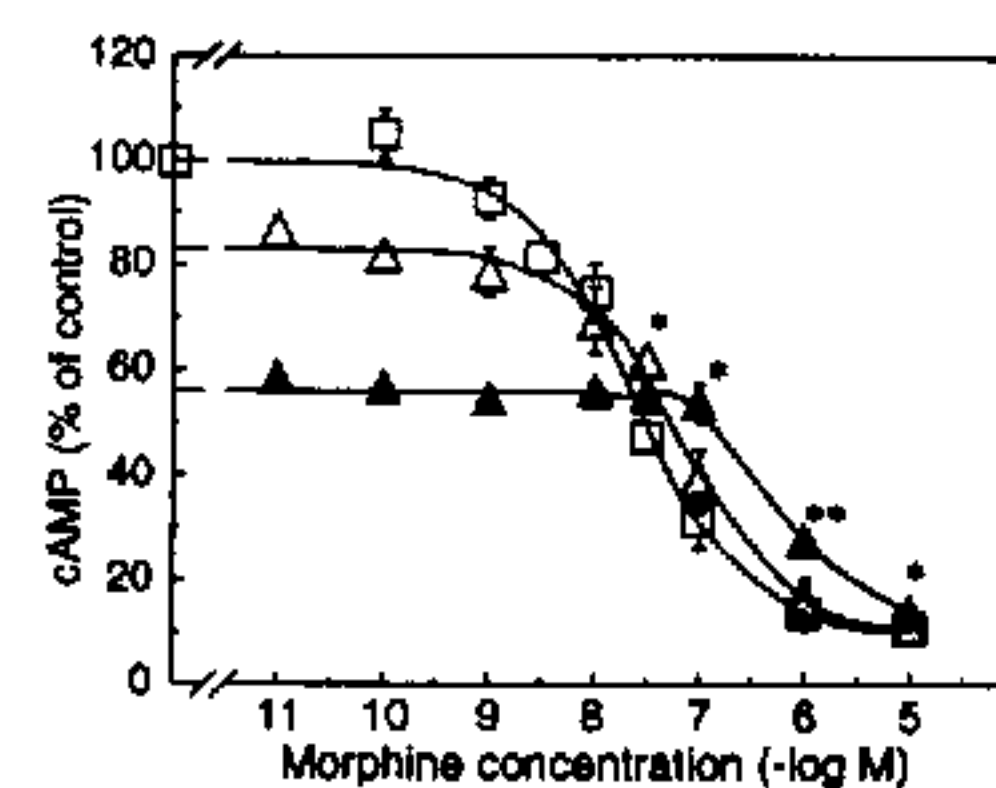
□ :Morphine
○ :Morphine+ 10 nM naloxone
▼ :Morphine+100 nM naloxone



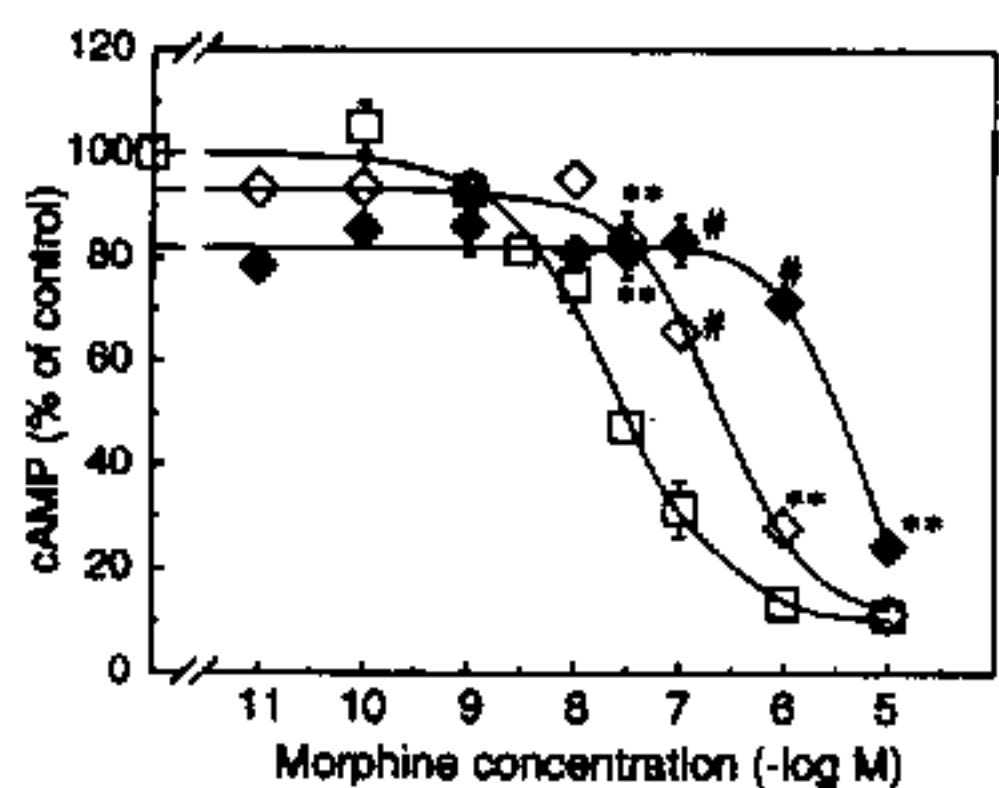
□ :Morphine
○ :Morphine+ 10 nM buprenorphine
● :Morphine+100 nM buprenorphine



□ :Morphine
○ :Morphine+ 10 nM butorphanol
● :Morphine+100 nM butorphanol



□ :Morphine
△ :Morphine+ 10 nM pentazocine
▲ :Morphine+100 nM pentazocine



□ :Morphine
◇ :Morphine+ 10 nM bremazocine
◆ :Morphine+100 nM bremazocine

図1 CHO/MOPRにおけるモルヒネのcAMP蓄積抑制効果に対するナロキソン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンの拮抗作用

選択的拮抗薬のNTIは100nMの濃度でMorと同時に処置した場合に、Morの濃度反応曲線を右方へ移動した。一方、Bup, But, Pen および Bre は、検討した濃度でMorの濃度反応曲線を下方へ移動し、Mor に対する拮抗作用は観察されなかった。CHO/KOPRにおいて(図3)、 κ 受容体選択的拮抗薬のnorBNIは100nMの濃度でMorと同時に処置した場合に、Morの濃度反応曲線を右方へ移動した。一方、Bup, But, Pen および Bre は、Bup が10 μ MのMorの効果に拮抗した以外は、検討した濃度でMorの濃度反応曲線を下方へ移動し、Mor に対する拮抗作用を示さなかった。

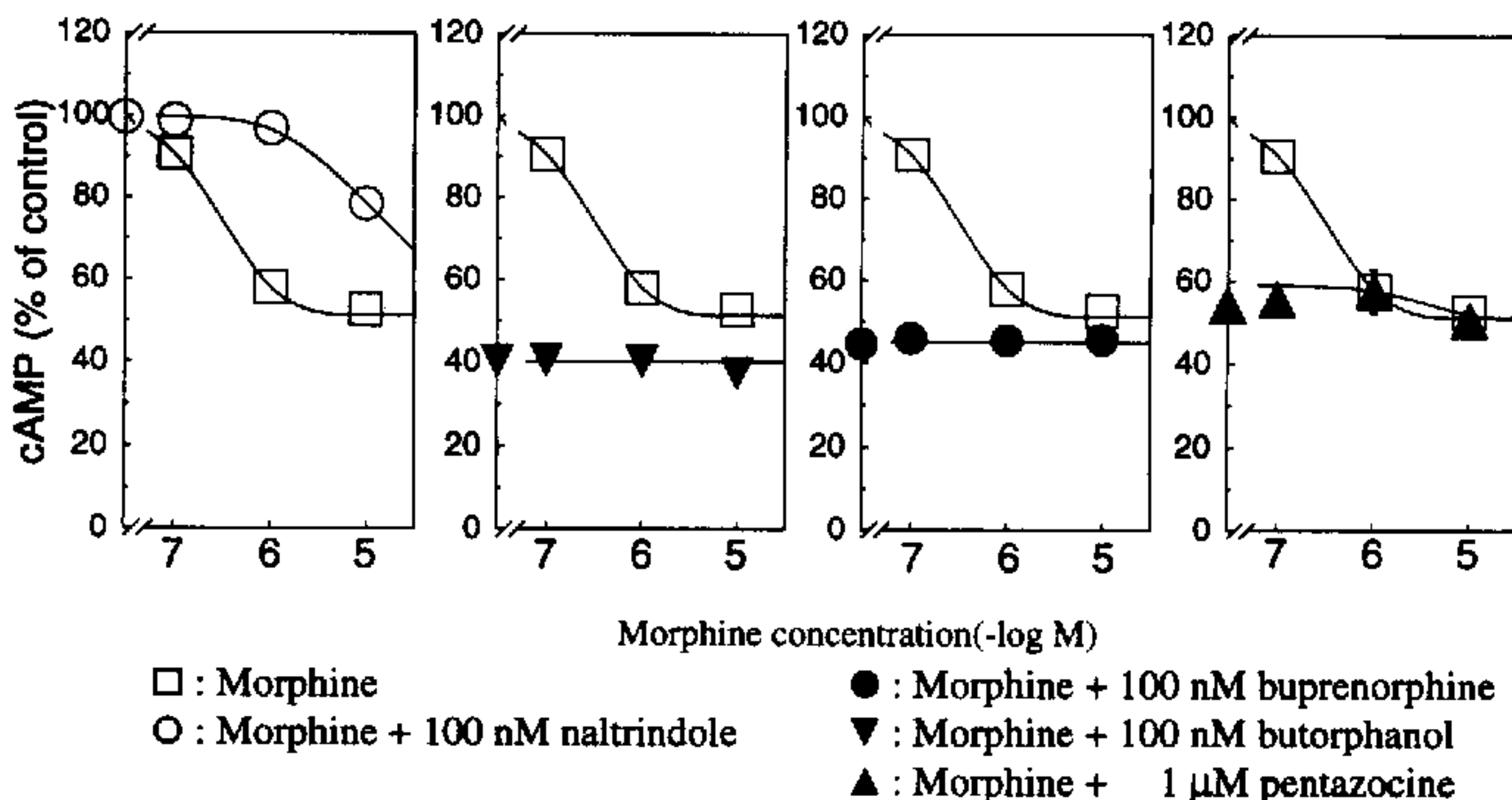


図2 CHO/DOPRにおけるモルヒネのcAMP蓄積抑制効果に対するナルトリンドール、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンの拮抗作用

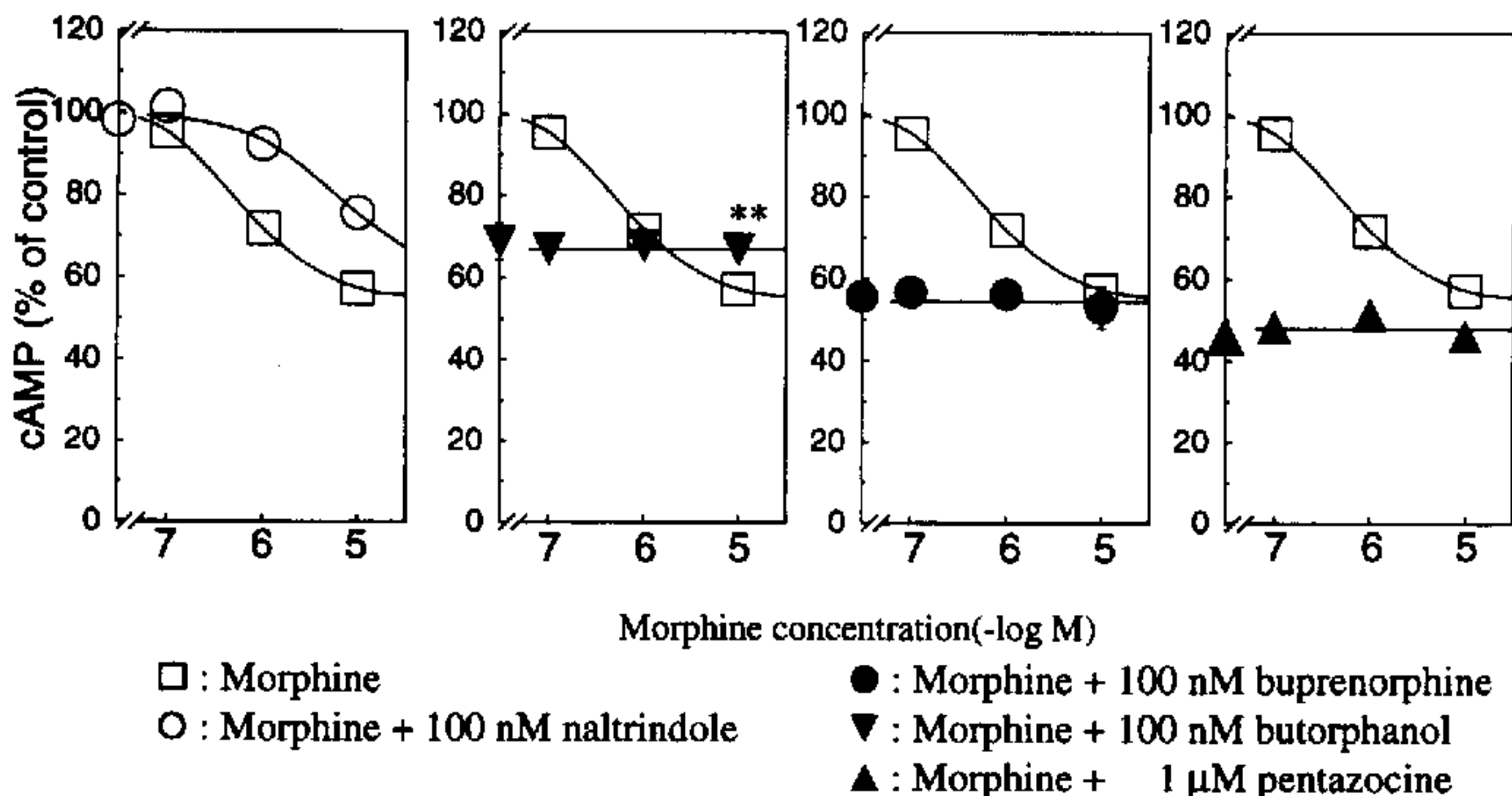


図3 CHO/KOPRにおけるモルヒネのcAMP蓄積抑制効果に対するノルビナルトルフィン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、の拮抗作用

クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いた検討により、拮抗性鎮痛薬であるBup, But, Penが、オピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ いずれのタイプにおいても部分アゴニストとして作用すること、また、Morの作用に対しては、 μ 受容体でのみ拮抗作用を示すことが明らかとなった。一方、Breは、 κ 受容体に対して高親和性で結合し比較的強いアゴニスト活性を示すが、 μ 受容体に対するアゴニスト活性は著しく弱いため、 μ 受容体にはアンタゴニストとして作用することが示唆される。

3-2

クローン化オピオイド受容体発現細胞における拮抗性鎮痛薬の「依存」現象形成および「禁断」現象誘発

○木村千晶、勝又清至、南 雅文、佐藤公道

京都大・薬学研究科・生体機能解析学分野

緒言

オピオイドによる依存形成・禁断症状発現のメカニズムは、現在まで必ずしも明らかになっていないが、脳内cAMP系の代償的な過活性化が関与している可能性が種々の研究により示唆されている。そこで本研究では、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞を用いて、cAMP系に対するオピオイド類の持続的処置の影響を受容体タイプごとに検討することにより、オピオイド受容体各タイプを介した薬物の「依存」現象形成能および「禁断」現象誘発能を推定しうる実験系を確立し、拮抗性鎮痛薬ブプレノルフィン（Bup）、ブトルファノール（But）、ペンタゾシン（Pen）、およびオピオイドアゴニスト・アンタゴニストであるブレマゾシン（Bre）の各オピオイド受容体タイプを介した「依存」現象形成能および「禁断」現象誘発能について検討した。

実験方法

オピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各タイプを発現させたCHO細胞、CHO/MOPR、CHO/DOPR、CHO/KOPRを用いた。24穴マルチウェルプレートに細胞密度 1×10^5 cells/well で播種し、Bup, But, Pen および Bre あるいはモルヒネ（Mor）で前処置した。4 時間後、薬物を含む培地を吸引除去した後、直ちに各受容体タイプ選択的拮抗薬であるナロキソン（Nal）、ナルトリンドール（NTI）、ノルピナルトルフィミン（norBNI）あるいは Bup, But, Pen, Bre を、 $10 \mu\text{M}$ フォルスコリンおよび 1 mM IBMX と同時に処置した。37℃、10 分間インキュベーションした後、氷冷した 10% TCA 0.5 ml を添加することにより反応を停止した。cAMP を抽出後、cAMP 量をラジオイムノアッセイ法により定量した。データは 3 回の実験結果の平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。検定は Student's *t*-test により行い、5% の危険率で有意差を判定した。

実験結果

1. 拮抗性鎮痛薬の「依存」現象形成能の検討

CHO/MOPRにおいてMor (0.1-10 μ M), But (0.01-10 μ M), Pen (1-10 μ M) の4時間の前処置により、10 μ M Nal 存在下のフォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大したが、Bup, Breの前処置では有意な変化は観察されなかった(図1)。CHO/DOPRにおいてMor (10-100 μ M), But (1-10 μ M), Pen (1-10 μ M), Bre (0.01-10 μ M)の前処置により、10 μ M NTI 存在下のフォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大したが、Bupの前処置では有意な変化は見られなかった(図2)。CHO/KOPRにおいてMor (1-100 μ M), But (0.1-10 μ M), Pen (1-10 μ M), Bre (1 nM-10 μ M)の前処置により、10 μ M norBNI 存在下のフォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大したが、Bupの前処置では有意な変化は見られなかった(図3)。

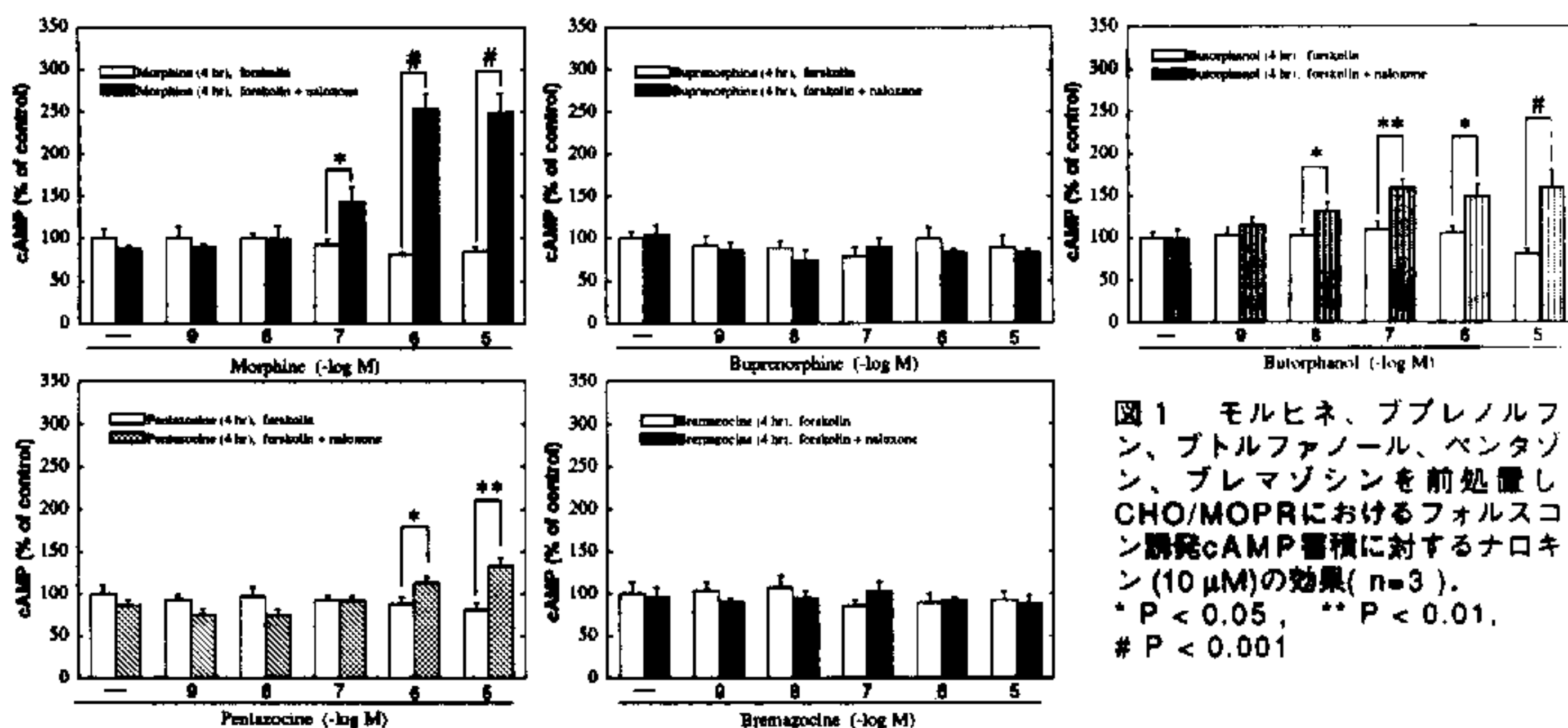


図1 モルヒネ、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンを前処置したCHO/MOPRにおけるフォルスコリン誘発cAMP蓄積に対するナロキソン(10 μ M)の効果 (n=3).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
$P < 0.001$

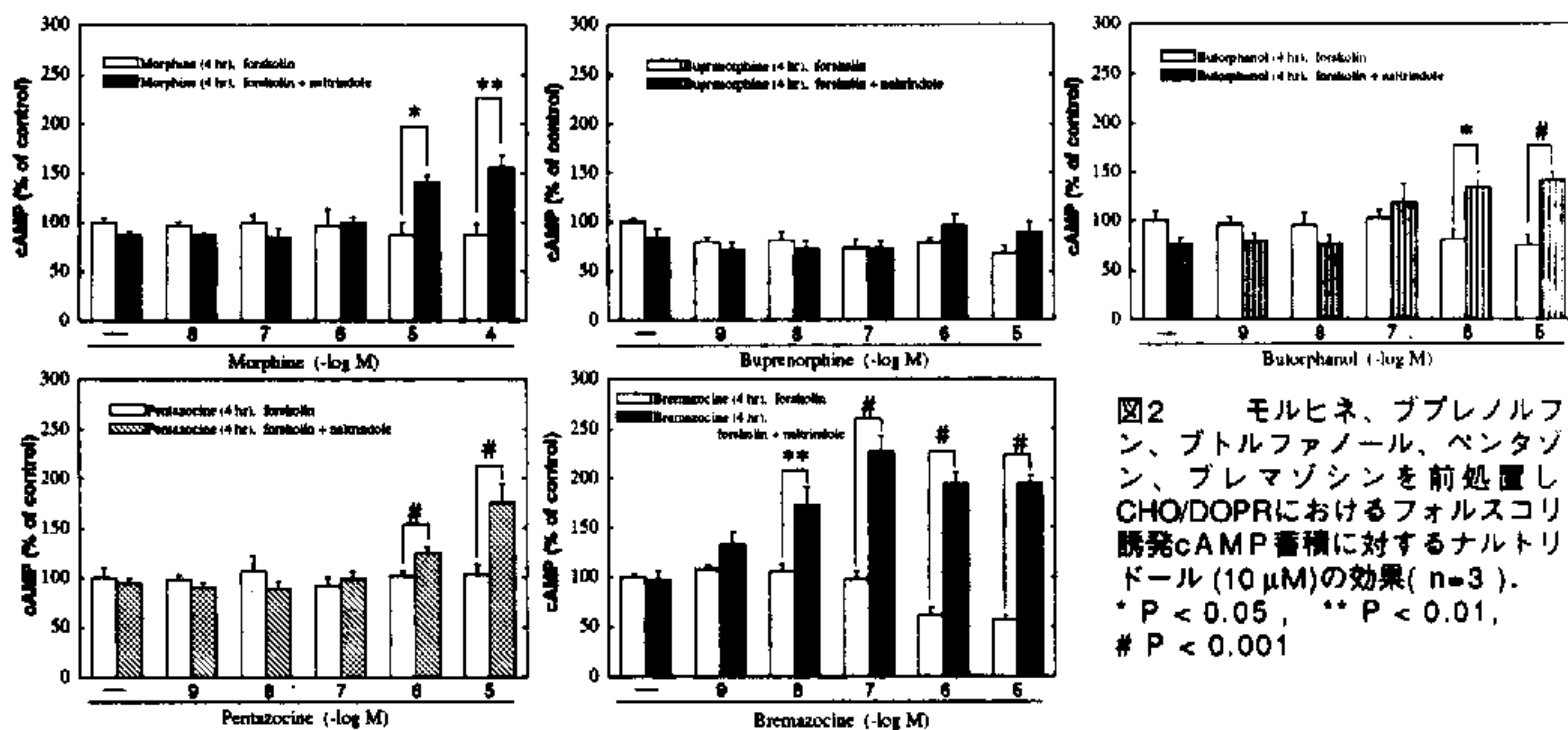
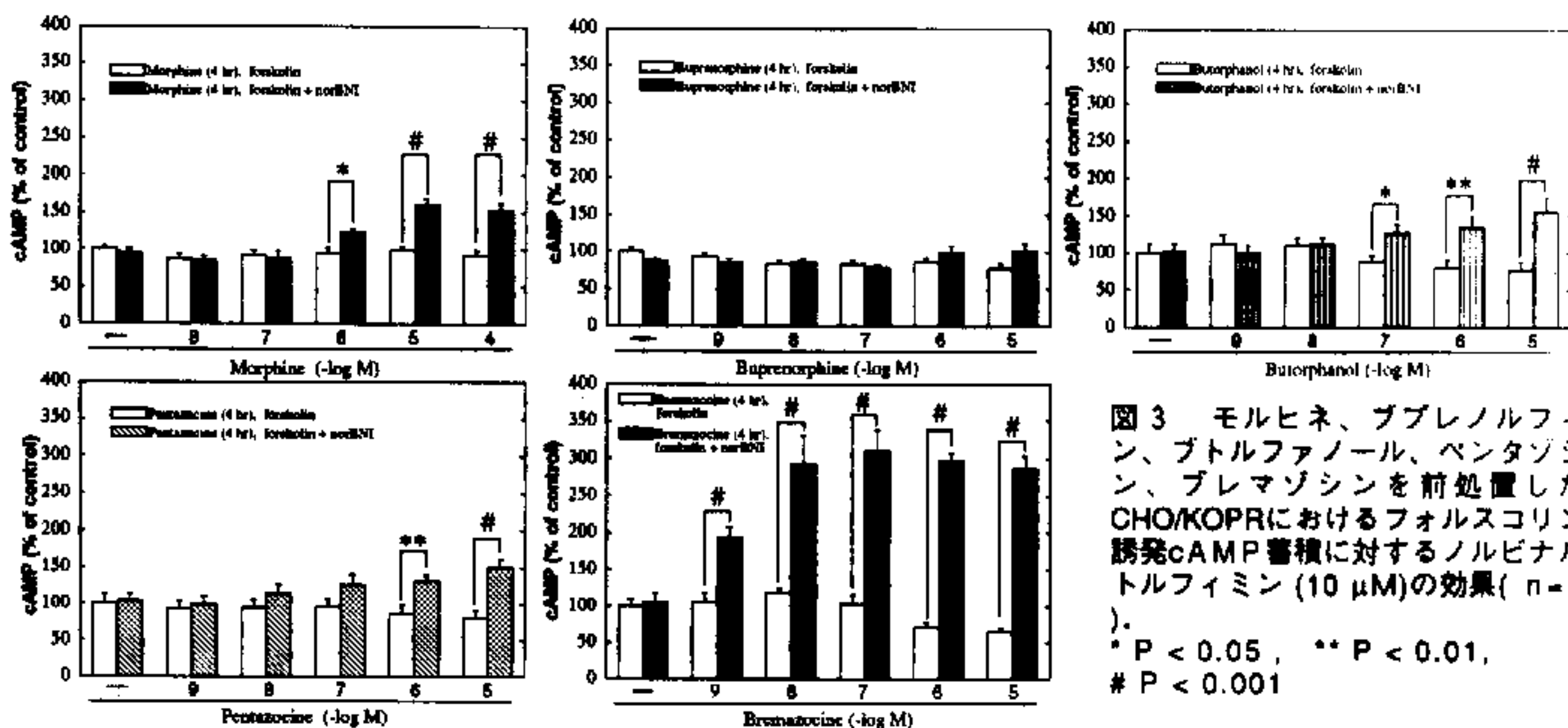
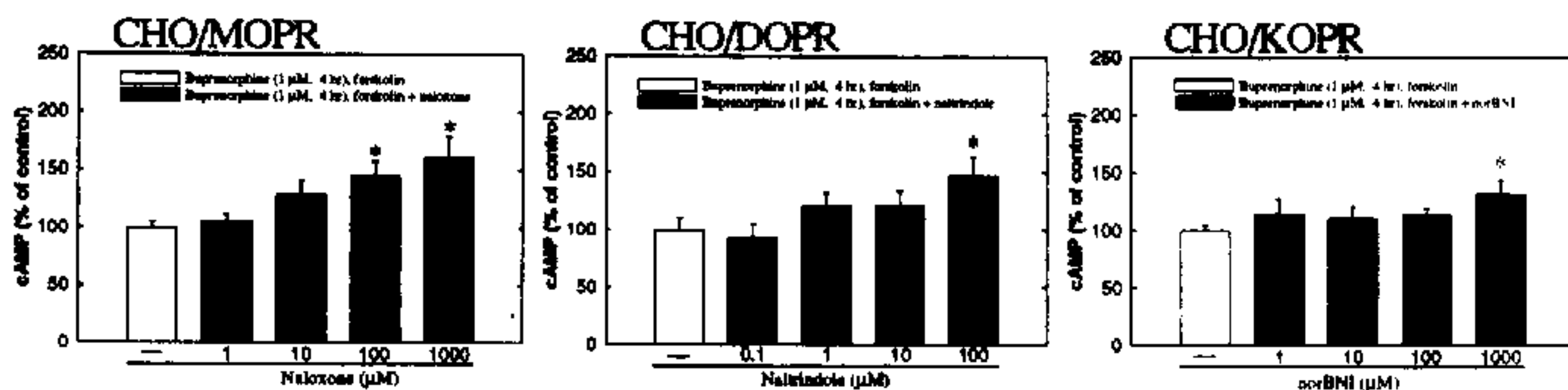


図2 モルヒネ、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンを前処置したCHO/DOPRにおけるフォルスコリン誘発cAMP蓄積に対するナルトリンドール(10 μ M)の効果 (n=3).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,
$P < 0.001$



Bupの作用についてさらに詳細に検討した。CHO/MOPR、CHO/DOPR、CHO/KOPRにおいて1 μM のBupを4時間前処置した後、各タイプ選択的拮抗薬を1-1000 μM の濃度で処置すると、100-1000 μM Nal, 100 μM NTI, 1000 μM norBNIによって、各々フォルスコリン誘発cAMP蓄積が有意に増大した(図4)。



2. 拮抗性鎮痛薬の「禁断」現象誘発能の検討

CHO/MOPRにおいてMor (10 μM) 4時間前処置後に、Nal (0.01-10 μM), Bup (0.1-10 μM), But (0.1-10 μM), Pen (1-10 μM), Bre (0.1-10 μM) をフォルスコリンと同時に処置することにより、フォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大した(図5)。CHO/DOPRにおいてMor (10 μM) 4時間前処置後に、NTI (0.001-10 μM) をフォルスコリンと同時に処置することにより、フォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大したが、Bupでは変化は見られず、But (0.1-10 μM), Pen (10 μM), Bre (0.1-10 μM) ではフォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に抑制された(図6)。CHO/KOPRにおいてMor (10 μM) 4時間前処置後に、norBNI (0.001-10 μM), Bup (0.001-10 μM) をフォルスコリンと同時に処置することにより、フォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に増大したが、But, Penでは顕著な変化は見られず、Bre (0.1-10 μM) ではフォルスコリン誘発cAMP蓄積は有意に抑制された(図7)。

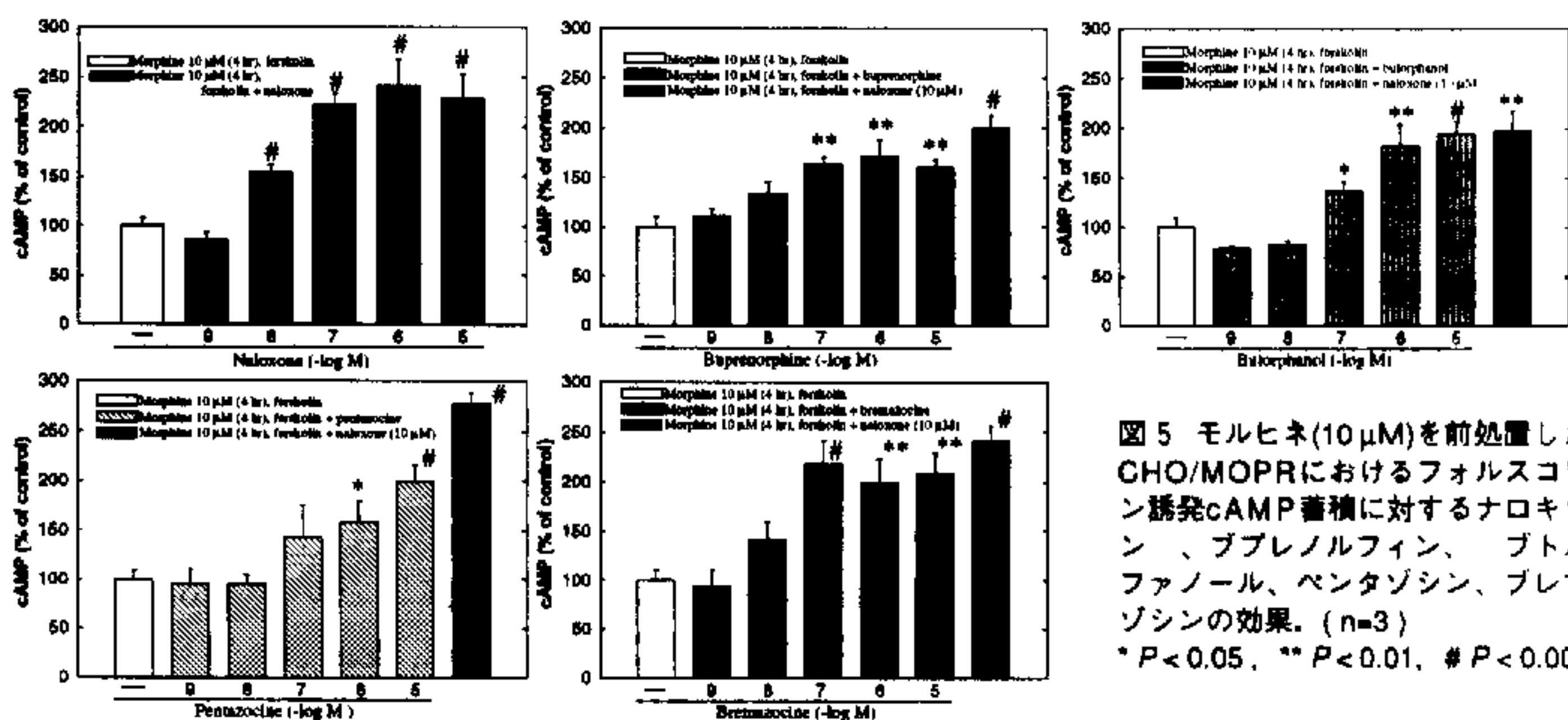


図5 モルヒネ(10 μM)を前処置したCHO/MOPRにおけるフォスコリン誘発cAMP蓄積に対するナロキソン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンの効果。(n=3)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$

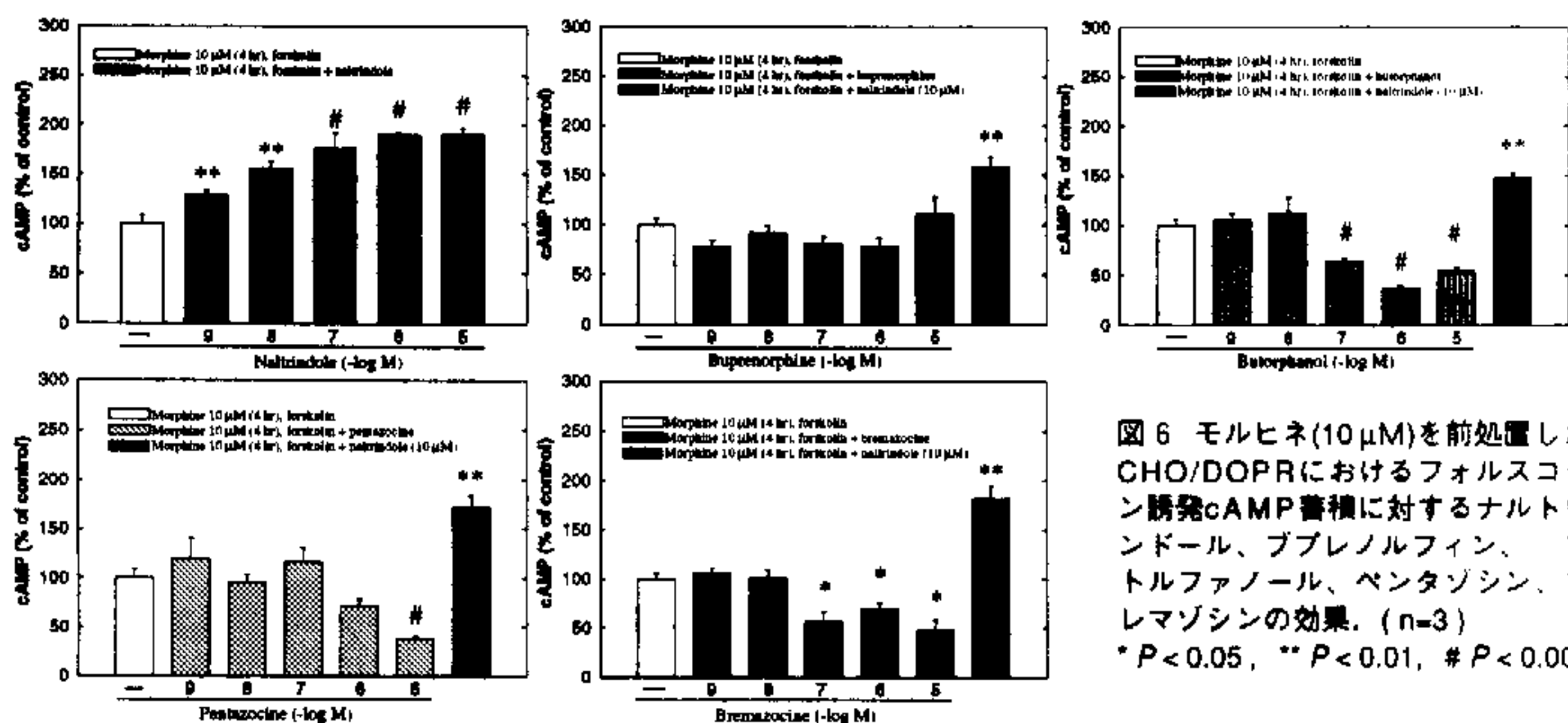


図6 モルヒネ(10 μM)を前処置したCHO/DOPRにおけるフォスコリン誘発cAMP蓄積に対するナルトリンドール、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンの効果。(n=3)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$

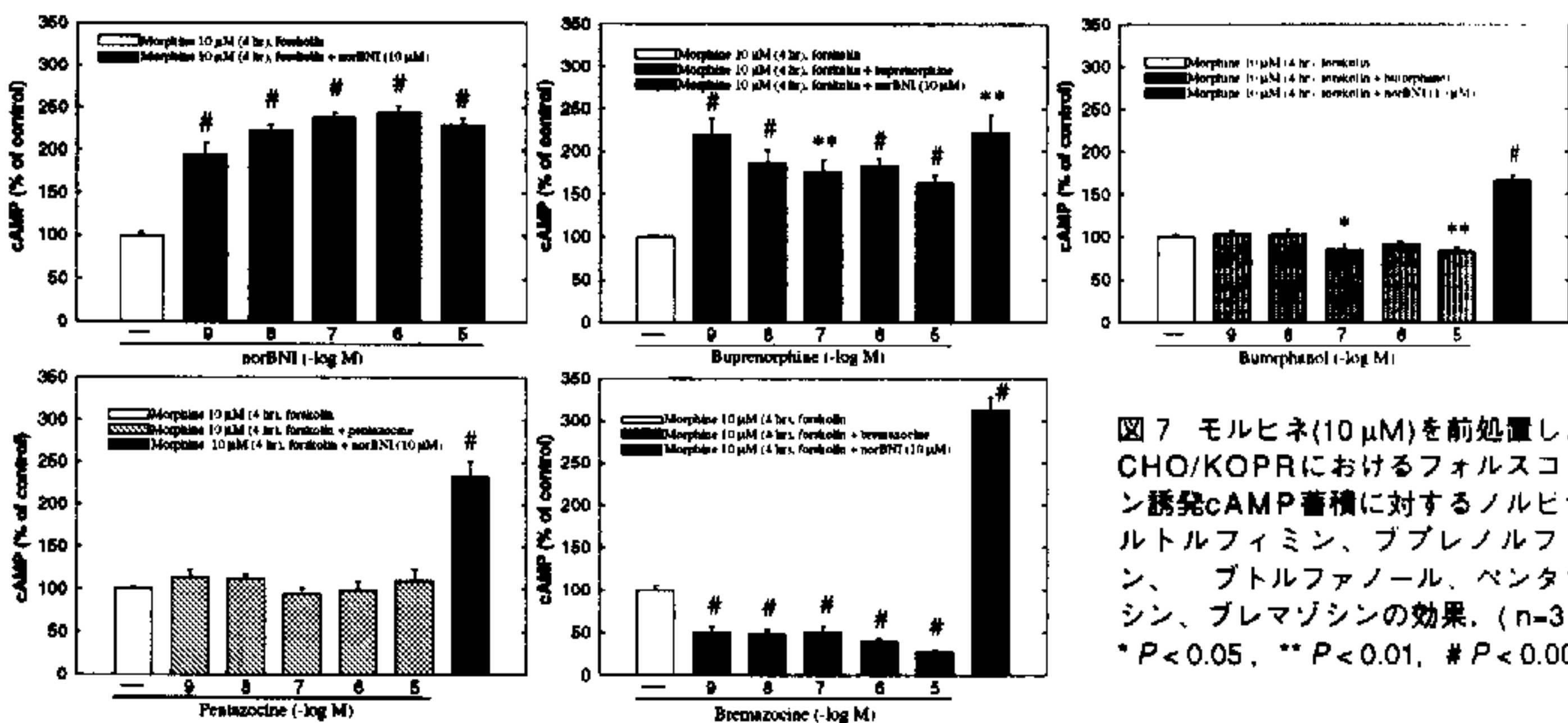


図7 モルヒネ(10 μM)を前処置したCHO/KOPRにおけるフォスコリン誘発cAMP蓄積に対するノルビナルトルフィミン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、ブレマゾシンの効果。(n=3)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P < 0.001$

考察

結果を表1にまとめた。拮抗性鎮痛薬 But, Pen は、 μ 、 δ 、 κ すべての受容体タイプにおいて細胞レベルの「依存」現象を形成しうることが示された。Bup は、 μ 、 δ 、 κ すべてにおいて「依存」現象を形成しうるが、その「禁断」現象の誘発には、Mor や他の拮抗性鎮痛薬に比べ、高い濃度の拮抗薬を必要とすることが明らかとなった。このことは、Bup の脂溶性の高さおよび受容体からの解離速度の遅さに起因する可能性が考えられる。Bre は、 δ および κ タイプ受容体では、「依存」現象形成能を有するが、 μ 受容体では「依存」現象形成はみられなかった。 μ 受容体におけるBreのアゴニスト活性が著しく低いことによるものと考えられる。Bup, But, Pen, Bre はいずれも μ 受容体においてMorに拮抗し「禁断」現象を誘発したが、 δ 受容体では逆に、Bup, But, Pen, Bre はいずれも「禁断」現象を誘発し得なかった。 κ 受容体ではBupがMorに拮抗しフォルスコリン誘発cAMP蓄積を有意に増大させたが、But, Pen, Breは「禁断」現象を誘発しなかった。モルヒネ依存において拮抗性鎮痛薬により誘発される禁断症状は、主として μ 受容体における拮抗に因るものであり、Bup の場合一部 κ 受容体が関与する可能性のあることが示唆された。

これら拮抗性鎮痛薬あるいはBre のオピオイド受容体各サブタイプにおける「依存」現象形成能および「禁断」現象誘発能の細胞レベルの検討は、ヒトあるいは動物における依存形成能および禁断症状誘発能の推定に有用であり、拮抗性鎮痛薬を臨床で用いる際の副作用予測等に役立つ可能性が考えられる。

表1 クローン化オピオイド受容体における拮抗性鎮痛薬の「依存」現象形成能および「禁断」現象誘発能

「依存」現象形成能および「禁断」現象誘発能の有無を+/-で示す。

(+) は「禁断」現象誘発能に高濃度の拮抗薬を必要とすることを示す。

	μ		δ		κ	
	「依存」現象形成能	モルヒネに対する「禁断」現象誘発能	「依存」現象形成能	モルヒネに対する「禁断」現象誘発能	「依存」現象形成能	モルヒネに対する「禁断」現象誘発能
ブプレノルフィン	(+)	+	(+)	-	(+)	+
ブトルファノール	+	+	+	-	+	-
ペンタゾシン	+	+	+	-	+	-
ブレマゾシン	-	+	+	-	+	-

3-3

DAMGO による μ/κ オピオイド受容体間識別に関与する アミノ酸残基の決定

○関 貴弘、南 雅文、中川貴之、森貞亜紀子、
佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

緒言

オピオイド受容体の3つのサブタイプ μ, δ, κ 間のアミノ酸配列の相同性は約60%と非常に高いものであるが、DAMGOに代表される μ 選択的リガンドは δ や κ 受容体に対する親和性が非常に低い。このサブタイプ選択性と受容体構造の関係について、我々はこれまでに、制限酵素を用いて作製した μ/κ キメラ受容体を用いた研究により、DAMGOによる μ/κ 受容体間識別には第3細胞内ループに存在するBan IIサイトと第3細胞外ループに存在するPvu II-1サイトの間の領域及びPvu II-1サイトと第7膜貫通部位に存在するPvu II-2サイトの間の領域がそれぞれ重要であることを明らかにした(図1)。そこで本研究では、キメラ受容体及び野生型 κ 受容体に種々の点変異を導入した変異型受容体を作製することにより、DAMGOによる μ/κ 受容体識別に関与するアミノ酸残

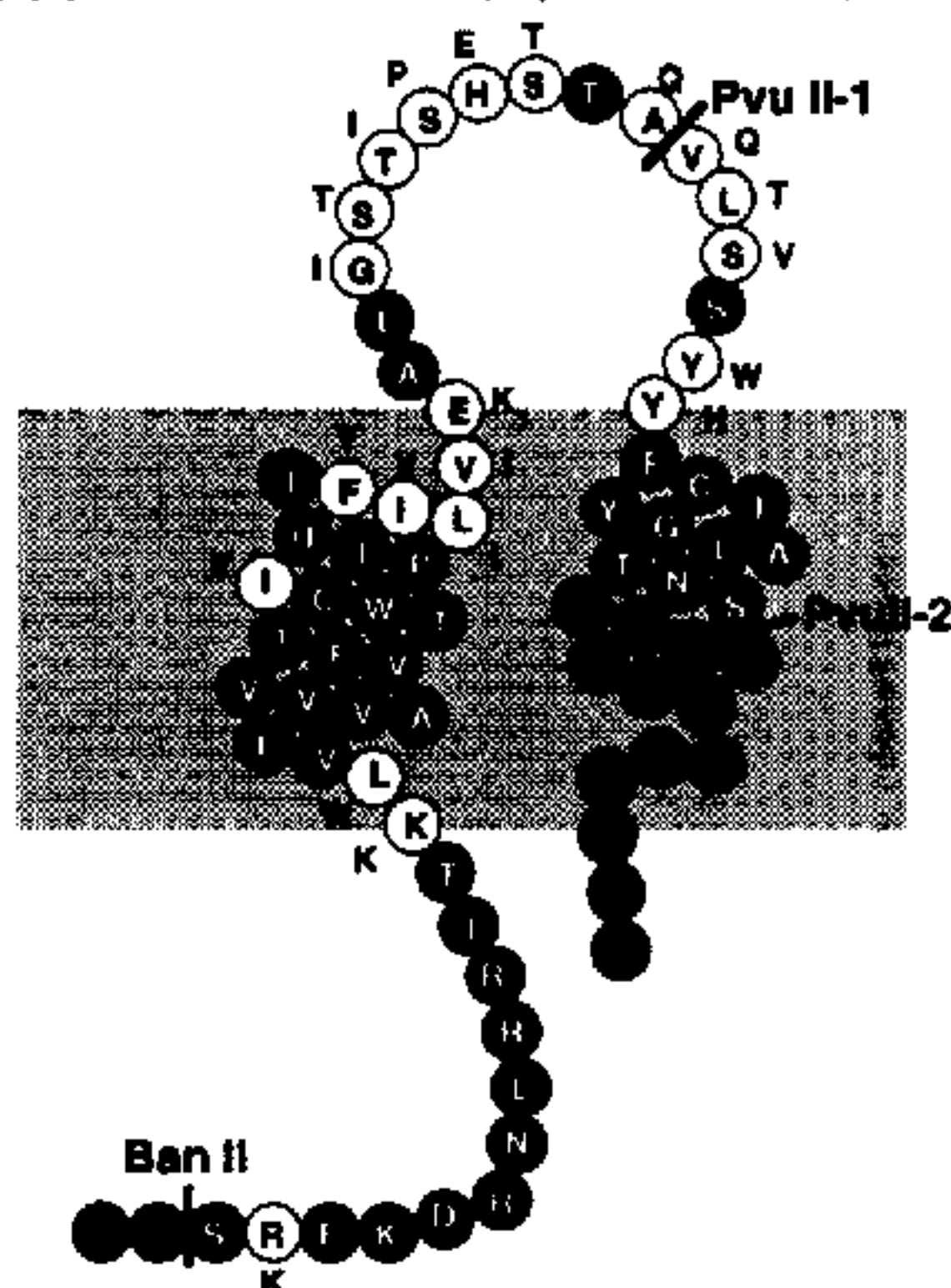


図1 κ オピオイド受容体の第三細胞外ループ付近の推定構造。黒丸は μ/κ 受容体間で保存されているアミノ酸残基を示す。白丸は保存されていないアミノ酸残基を示し、その横には、 μ 受容体の対応する位置に存在するアミノ酸残基を表示している。キメラ受容体の作製に用いた3種の制限酵素サイトをそれぞれ示す。

基を検討した。

実験方法

部位特異的点変異導入には、CLONTECH 社の TransformerTM 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 時間培養の後細胞を回収した。得られた細胞を Tris 緩衝液中でホモジナイズし、30000g 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結合実験を行った。結合実験は [³H] DAMGO 及び [³H] bremazocine を用い、飽和結合実験を行った。一部の実験では、受容体を安定的に発現させた CHO 細胞を用い、膜標品による結合実験及び生細胞における cAMP 産生に対するオピオイドの効果の検討を行った。

実験結果及び考察

まず最初に、Ban II サイトから Pvu II-1 サイトまでの領域に存在するアミノ酸残基のうち、どのアミノ酸残基が重要であるかを調べるため、 κ 受容体の Pvu II-1 サイトから C 末端側を μ 受容体に置換したキメラ受容体である $\kappa\mu$ Pvu II-1 の Ban II サイトから Pvu II-1 サイトまでの領域に点変異を導入し、変異型受容体を作製した。第 6 膜貫通部位と第 3 細胞外ループの境界に位置する κ 受容体 297 番目のグルタミン酸残基を μ 受容体の対応する位置に存在するリジン残基に置換した $\kappa\mu$ Pvu II-1 (E297K) 受容体を作製し、[³H] DAMGO の飽和結

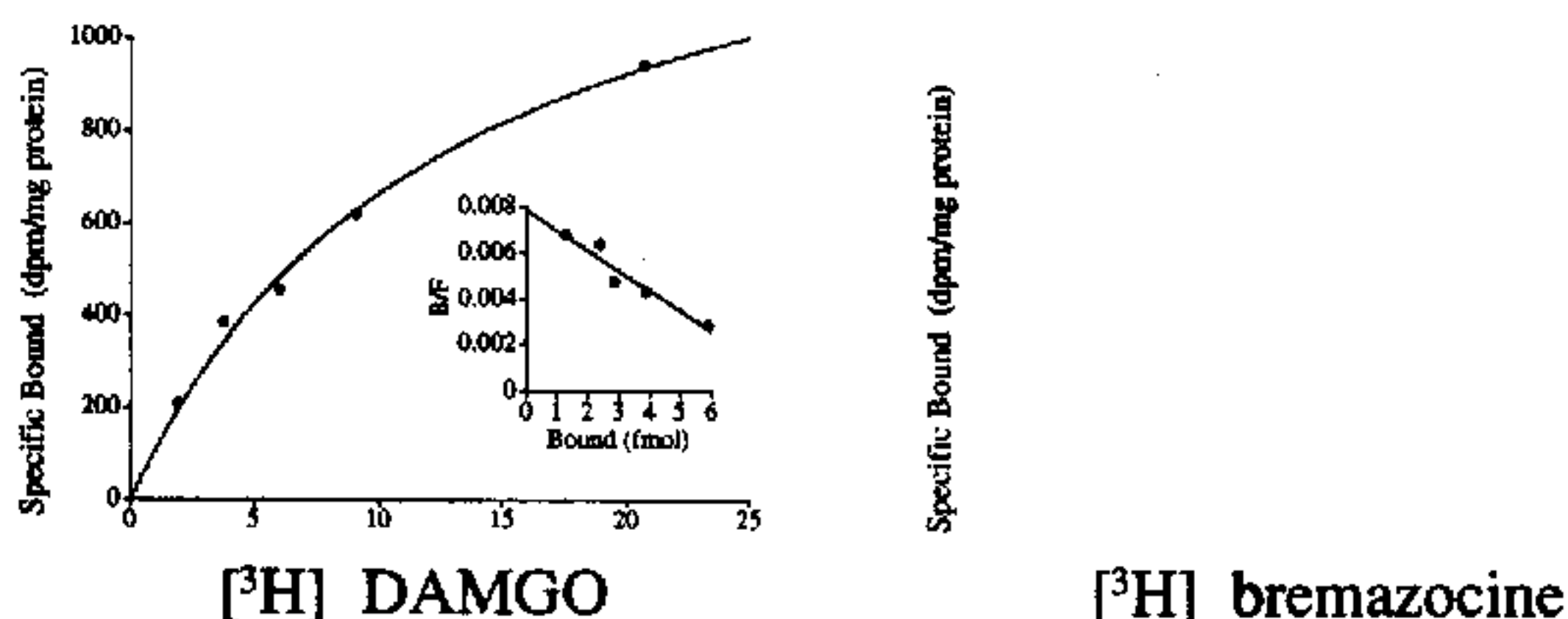


図2 変異型受容体 $\kappa\mu$ Pvu II-1 (E297K) を発現した COS-7 細胞の膜画分を用いた [³H] DAMGO 及び [³H] bremazocine の飽和結合実験。[³H] DAMGO 及び [³H] bremazocine 結合のスキッチャード解析の結果を図中に示している。

合実験を行った (Fig.2)。[³H] DAMGO は κ Pvu II-1 (E297K) 受容体に高親和性 ($K_d=11 \pm 2.7$ nM) で結合したことから、Ban II サイトから Pvu II-1 サイトまでの領域では、 κ 受容体 297 番目のグルタミン酸残基と μ 受容体の対応する位置に存在するリジン残基の違いが DAMGO の μ/κ 受容体間識別に重要であると考えられた。

次に、Pvu II-1 サイトから Pvu II-2 サイトまでの領域に存在するアミノ酸残基のうち、どのアミノ酸残基が重要であるかを調べるため、 κ 受容体の 297 番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換した変異型受容体である κ (E297K) 受容体に対しさらに第 3 細胞外ループと第 7 膜貫通部位の境界に位置する 313 番目のチロシン残基から順に N 末へ向かって 1 つずつ μ 受容体の対応する位置に存在するアミノ酸残基に置換した変異型受容体を作製し、[³H] DAMGO の飽和結合実験を行った (Table 1)。313 番目のチロシン残基のみを置換した κ (E297K+Y313H) と 312 番目のチロシン残基までの 2 つのアミノ酸残基を置換した κ (E297K+Y313H+Y312W) 受容体に対しては、[³H] DAMGO の高親和性結合はみられなかった。さらに 310 番目のセリン残基も μ 受容体の対応する位置に存在するバリン残基に置換した変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V) に対し、[³H]DAMGO は高親和性 ($K_d=8.7 \pm 1.2$ nM) で結合した。309

表 1 変異型 κ 受容体を発現した COS-7 細胞の膜画分に対する [³H] DAMGO 及び [³H] bremazocine の K_d 値。黒丸は μ/κ 受容体間で保存されているアミノ酸残基を示し、灰色の丸は κ 受容体のアミノ酸残基を μ 受容体の対応する位置に存在するアミノ酸に置換したことを示している。N.D. は低親和性のために K_d 値を求められなかったことを示す。

	K _d (nM)			K _d (nM)	
	[³ H]DAMGO	[³ H]bremazocine		[³ H]DAMGO	[³ H]bremazocine
κ (E297K+Y313H) 	N.D.	8.9 ± 1.5	κ (E297K+S310V) 	N.D.	5.0 ± 0.80
κ (E297K+Y313H+Y312W) 	N.D.	2.1 ± 0.92	κ (E297K+Y312W) 	N.D.	2.6 ± 0.42
κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V) 	8.7 ± 1.2	6.3 ± 0.54	κ (E297K+Y312W+S310V) 	N.D.	5.6 ± 0.39
κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V+L309T) 	17 ± 1.7	5.0 ± 1.7	κ (E297K+Y313H+S310V) 	45 ± 9.5	12 ± 0.81

番目のロイシン残基のスレオニン残基への置換 L309T を加えた κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V+L309T) では、さらなる親和性の上昇は見られなかった ($K_d=17 \pm 1.7$ nM)。

次に、DAMGO の高親和性結合に S310V、Y312W および Y313H の 3 つの点変異がすべて必要であるか否かを検討するため、これらの点変異をそれぞれ単独で E297K と組み合わせた 3 種類の変異型受容体を作製し、 $[^3\text{H}]$ DAMGO の飽和結合実験を行った (Table 1)。これらの変異型受容体に対しては $[^3\text{H}]$ DAMGO の高親和性結合はみられず、 K_d 値を求めることはできなかった。さらに、S310V、Y312W および Y313H のうちの 2 つずつを E297K と組み合わせた変異型受容体については、 κ (E297K+Y313H+S310V) に対して $[^3\text{H}]$ DAMGO は比較的高い親和性 ($K_d=45 \pm 9.5$ nM) で結合したが、 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V) に比べ、その親和性は 5 倍程度低いものであった。残りの 2 つの変異型受容体に対しては $[^3\text{H}]$ DAMGO の高親和性結合はみられず、 K_d 値を求めることはできなかった (Table 1)。これらの結果より、Pvu II-1 サイトから Pvu II-2 サイトまでの領域では、 κ 受容体 310 番目のセリン、312 番目のチロシンおよび 313 番目のチロシン残基と、 μ 受容体の対応する位置に存在するバリン、トリプトファンおよびヒスチジン残基の違いが DAMGO による μ/κ 受容体間識別に重要であると考えられた。

変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V) を安定的に発現する CHO 細胞を樹立した。本細胞株より調製した粗膜標本においても DAMGO は、 $K_d=8.9 \pm 1.5$ nM の高親和性で結合した。さらに、本細胞株において、DAMGO はフォルスコリン刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇を $\text{IC}_{50}=36 \pm 11$ nM で抑制した。これは、野生型 μ 受容体における DAMGO のアゴニスト活性 ($\text{IC}_{50}=3.0 \pm 0.6$ nM) と比較すると低いものであったが、野生型 κ 受容体における DAMGO の cAMP 産生抑制効果の IC_{50} は 3000 nM 以上であり、変異型受容体 κ (E297K+Y313H+Y312W+S310V) では、野生型 κ 受容体に比べ DAMGO の結合親和性が上昇しているだけでなく、DAMGO のアゴニスト活性も 80 倍以上上昇していることが明らかとなった。

以上の結果より、DAMGO による μ/κ 間識別に、 κ 受容体の第 3 細胞外ループと第 6 膜貫通部位の境界領域に存在する Glu297 及び第 3 細胞外ループと第 7 膜貫通部位の境界領域に存在する Ser310、Tyr312 及び Tyr313 と、 μ 受容体の対応する位置に存在する Lys303、Val316、Trp318 及び His319 の違いが重要であることが示された。

3-4

オピオイド受容体関連細胞情報伝達とアンチセンスオリゴヌクレオチド

○北村 憲、吉川正信、岩尾佳代子、小林智美、金井昌之、赤堀一仁、中林 大、安藤順一郎、岡 哲雄
東海大学医学部薬理学教室

オピオイドアゴニストは、受容体と結合後、Gタンパク質を介して、酵素あるいはイオンチャネルを変化させて効果を現わすと考えられている。しかし、その詳細は不明の部分が多い。

一方、特定のタンパク質の mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS ODN) を用いることにより、特定のタンパク質の発現を抑制できることが報告されている¹⁾。しかし、AS ODN を特定タンパク質発現抑制の一般的手段として用いるには、解決されるべきことが多く残されている¹⁾。

そこで私達は、AS ODN の有用性を確かめる目的で、最初にミューオピオイド受容体 (MOR) に対する AS ODN の効果を研究した。その結果、AS ODN は有用であることが明らかにされたので、次に、Gタンパク質に対する AS ODN の研究を行った。

1. MOR に対する AS ODN の MOR mRNA 量に及ぼす影響

〔実験方法〕 MOR 遺伝子²⁾ (GenBank accession number L13069) に対する ODN として、開始コドンの上流域 (position -88 ~ -70) を用いた (sense, 5'-AGA GGA AGA GGC TGG GGC G-3'; AS, 5'-CGC CCC AGC CTC TTC CTC T-3')。また、これらの配列の特異性は、BLAST algorithm を用い GenBank で検索し確認した。なお、ODN はホスホロチオエート化したものを用いた。

体重 200 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを、ペントバルビタール (40 mg/kg, i.p.) で麻酔後、脳固定装置を用い、Paxinos and Watson の脳図譜³⁾に従い、ガイドカニューレ (外径 0.55 mm、長さ 13 mm) を periaqueductal gray (PAG) (A, -6.7 mm; V, +5.7 mm; L, -0.6 mm) の 3.0 mm 上、あるいは左側脳室 (LV) (A, -0.8 mm; V, +4.0 mm; L, -1.5 mm) の 2.0 mm 上に挿入固定した。薬は、PAG には 1 μ l を 0.27 μ l/min の

速度で、LV には 10 μ l を 3.1 μ l/min の速度で、注射用カニューレ（外径 0.30 mm）を用い投与した。手術後 3 - 5 日目にモルヒネを投与し、鎮痛効果を調べることにより、カニューレの位置の正しさを薬理的に推測した。モルヒネ投与後 3 日目に、ODN（10 μ g/ 1 μ l of saline）あるいは生理食塩液（1 μ l）を 1 - 10 回投与した。ODN あるいは生理食塩液投与後一定時間目に断頭し、脳を摘出した。側脳室に投与したラットでは、小脳を除いた脳から、total RNA を抽出し、MOR mRNA の northern blot analysis に用いた。また、PAG に投与したラットでは、PAG から total RNA を抽出後、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。MOR 遺伝子に対するプライマーは sense orientation (5'-CCT GCC GCT CTT CTC TGG TTC-3') と antisense orientation (5'-CCT GCC TGT ATT TTG TGG TTG-3') を用いた。

RT-PCR 産物は電気泳動後、ゲルより抽出し、DNA シーケンサーにより MOR 遺伝子の配列を確認した。また、各サンプル間の cDNA 量の均一性を確認するため、ハウスキーピング遺伝子の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

[実験結果および考察]

(1) MOR に対する AS ODN (10 μ g) を PAG に 1 回投与し、投与後、3, 6, 12, 24, 48, および 72 時間目に断頭し、PAG の MOR mRNA 量を RT-PCR 法で測定した。その結果、投与後 12 時間目の MOR mRNA 量は、生理食塩液投与群に比べ、約 1/3 に減少した。しかし、3, 6, 24, 48, および 72 時間目では、MOR mRNA 量の有意な減少は認められなかった。すなわち、AS ODN による MOR mRNA の減少には、かなりの時間を要すること、減少は短時間で、すぐに回復すること、などが明らかにされた。これらの実験結果より、AS ODN が作用点である細胞内に入るのに時間がかかること、MOR mRNA は活発に作られていること（少なくとも減少した場合には）、などが示唆された。

(2) MOR に対する AS ODN (10 μ g) を PAG に 48 時間間隔で 3 回投与し、最終投与後、3, 6, 12, 24, 48, および 72 時間目に断頭し、PAG の MOR mRNA 量を RT-PCR 法で測定した。その結果、MOR mRNA 量は、生理食塩液投与群に比べ、投与後 6 時間目で約 60%、12 時間目で 40%、24 時間目で 5% にそれぞれ減少した。しかし、3, 48, および 72 時間目では、MOR mRNA 量の有意な減少は認められなかった。すなわち、

MOR mRNA 量の AS ODN による経時的変化は、AS ODN 1 回投与と 3 回投与とで著しく異なることが明らかにされた。9 6 時間前と 4 8 時間前とに、それぞれ 10 μ g の AS ODN を投与することより、1 回だけ投与した場合と著しく異なる結果になる理由は、今回の実験結果では明らかでなく、解決されるべき問題として残された。

(3) MOR に対する AS ODN (10 μ g) を PAG に 1 時間間隔で 3 回投与し、最終投与後、3, 6, 12, 24, 48, および 72 時間目に断頭し、PAG の MOR mRNA 量を RT-PCR 法で測定した。その結果、MOR mRNA 量は、生理食塩液投与群に比べ、投与後 12 時間目で 14%、24 時間目で 15% にそれぞれ減少した。しかし、3, 6, 48, および 72 時間目では、有意な減少は認められなかった。すなわち、AS ODN を 1 回投与した時に比べ、短時間内に 3 回連続して投与した場合には、MOR mRNA 量の減少している時間が長くなるとともに、減少の程度も大きくなることが明らかにされた。これは、AS ODN が細胞内に蓄積されるために生じることが示唆された。

(4) MOR に対する AS ODN (10 μ g) を、左側脳室に 1 日 2 回 5 日間投与し、最終投与後、24 時間目に、小脳を除いた脳の MOR mRNA 量を northern blot 法で測定した。その結果、生理食塩液投与群に比べ、約 1/50 に減少した。この結果から、このような投与スケジュールでは、左側脳室に投与された AS ODN は、ほぼ全脳に分布し、全脳で効果を現わすことが示唆された。

(5) MOR に対する sense ODN (10 μ g) を PAG に 48 時間間隔で 3 回投与し、最終投与後、24 時間目に断頭し、PAG の MOR mRNA 量を RT-PCR 法で測定した。その結果、MOR mRNA 量の有意な変化は認められなかった。今回の実験の投与スケジュールのなかで、AS ODN により PAG の MOR mRNA 量が最も減少する時に、sense ODN では MOR mRNA 量が変化しないことから、MOR に対する AS ODN は、特異性が高いことが示唆された。また、今回のどの投与方法でも、最終投与後、48 時間目には、MOR mRNA 量は元に回復すること、ラットの一般行動に異常が認められないこと、などは少なくとも今回の投与方法に限っては AS ODN に著しい毒性は無いことを示唆している。

2. G タンパク質に対する AS ODN のモルヒネの鎮痛に及ぼす影響

〔実験方法〕 $G_{11\alpha}$ AS ODN (5'-AGA CCA CTG CTT TGT A-3'), $G_{12\alpha}$ AS ODN (5'-CTT GTC GAT CAT CTT AGA-3'), $G_{13\alpha}$ AS ODN (5'-GCC CAT GAC GGC GGC CGG AGA-3'), および $G_{0\alpha}$ AS ODN (5'-CGC CTT GCT CCG CTC-3')などを1日2回 10 μ g ずつ5日間左側脳室に投与した。最終投与後12時間目に、モルヒネ 200 nmol を左側脳室に投与し、鎮痛効果、正向反射消失効果、およびカタレプシー発現効果などを調べた。鎮痛効果の測定には、tail-flick response を用いた。55℃の温水に尾を入れ、尾を振るまでの時間をストップウォッチで測定した。なお、cut off time は5秒とした。また、ラットを背位に置き、15秒間その状態を保ったときに正向反射が消失したと判定した。なお、一辺3cmの立方体の上に前足をのせて15秒間その状態を保ったときにカタレプシーが現れたと判定した。

〔実験結果および考察〕

(1) $G_{11\alpha}$, $G_{12\alpha}$, および $G_{0\alpha}$ などの AS ODN 投与群では、生理食塩液投与群に比べ、モルヒネの鎮痛作用が有意に抑制された。また、 $G_{0\alpha}$ に対する AS ODN 投与群では、モルヒネの鎮痛作用に有意な変化は認められなかった。すなわち、モルヒネは MOR と結合後、 G_{11} , G_{12} , および G_{13} などを介して鎮痛効果を現わすことが示唆された。

(2) $G_{11\alpha}$, および $G_{12\alpha}$ などに対する AS ODN 投与群では、生理食塩液投与群に比べ、モルヒネによるカタレプシー発現作用が有意に抑制された。しかし、 $G_{13\alpha}$ および $G_{0\alpha}$ などの AS ODN 投与群では、有意な変化は認められなかった。

(3) $G_{11\alpha}$, $G_{12\alpha}$, および $G_{13\alpha}$ などの AS ODN 投与群では、モルヒネの正向反射消失作用が有意に抑制された。しかし、 $G_{0\alpha}$ に対する AS ODN 投与群では、有意な変化は認められなかった。

以上の実験結果より、モルヒネの鎮痛効果、および正向反射消失効果などは、モルヒネが MOR と結合後、 G_{11} , G_{12} , および G_{13} などを介して現われることが示唆された。また、モルヒネのカタレプシー発現作用は、 G_{11} , および G_{12} を介して現われることが示唆された。

以上より、AS ODN は細胞内情報伝達機構を明らかにする1つの有力な手段であることが示唆された。

文献

- 1) W. Roush : Antisense aims for a renaissance. *Science* 276 : 1192-1193, 1997
- 2) Y. Chen, A. Mestek, J. Liu, J.A. Hurley and L. Yu : Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from the rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44 : 8-12, 1993
- 3) G. Paxinos and C. Watson : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, New York, NY, USA, 1986.

3-5

β -funaltrexamine methylsulfonate (β -FNA)

による μ_2 -受容体遮断におけるGTPの関与

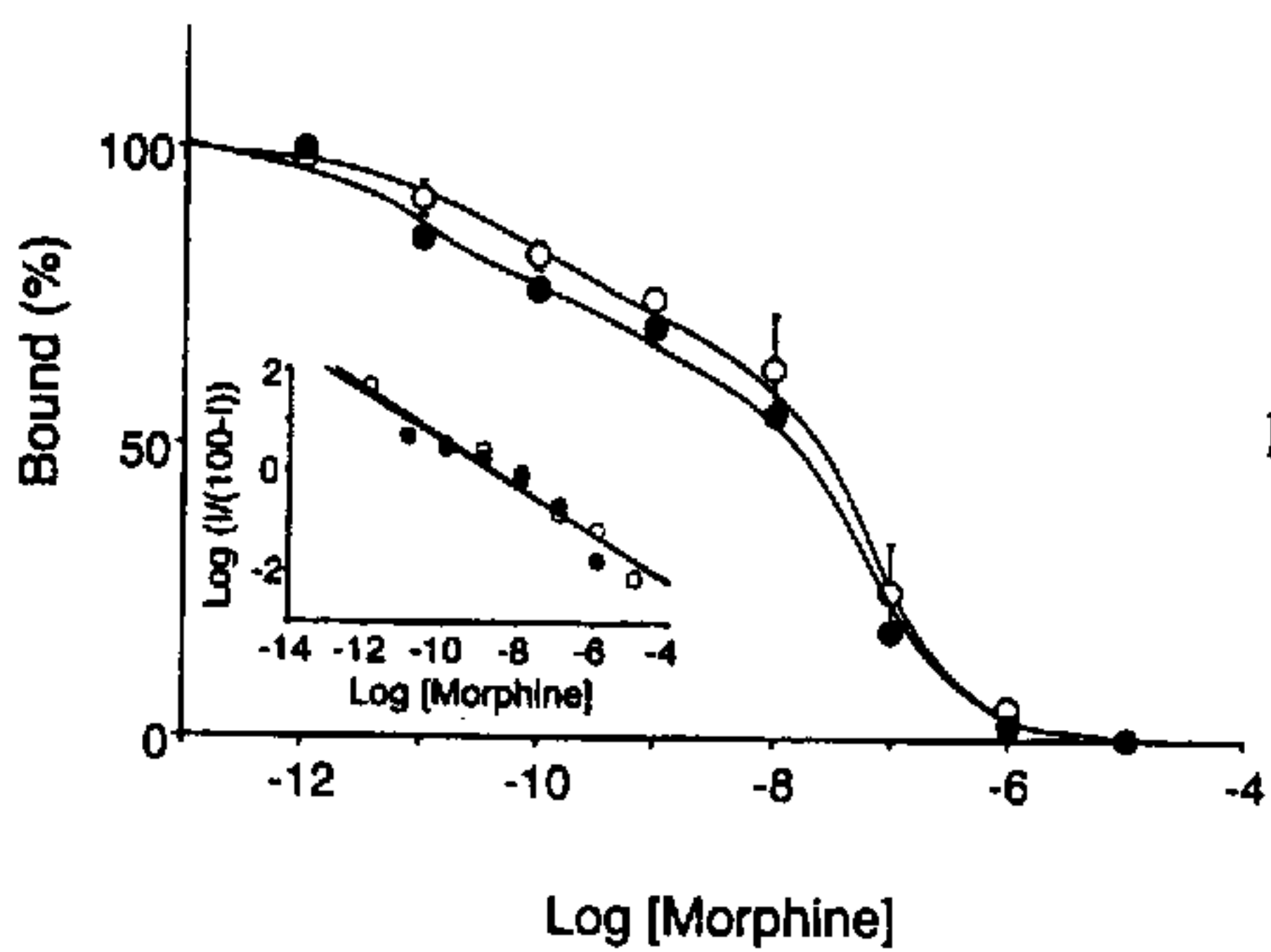
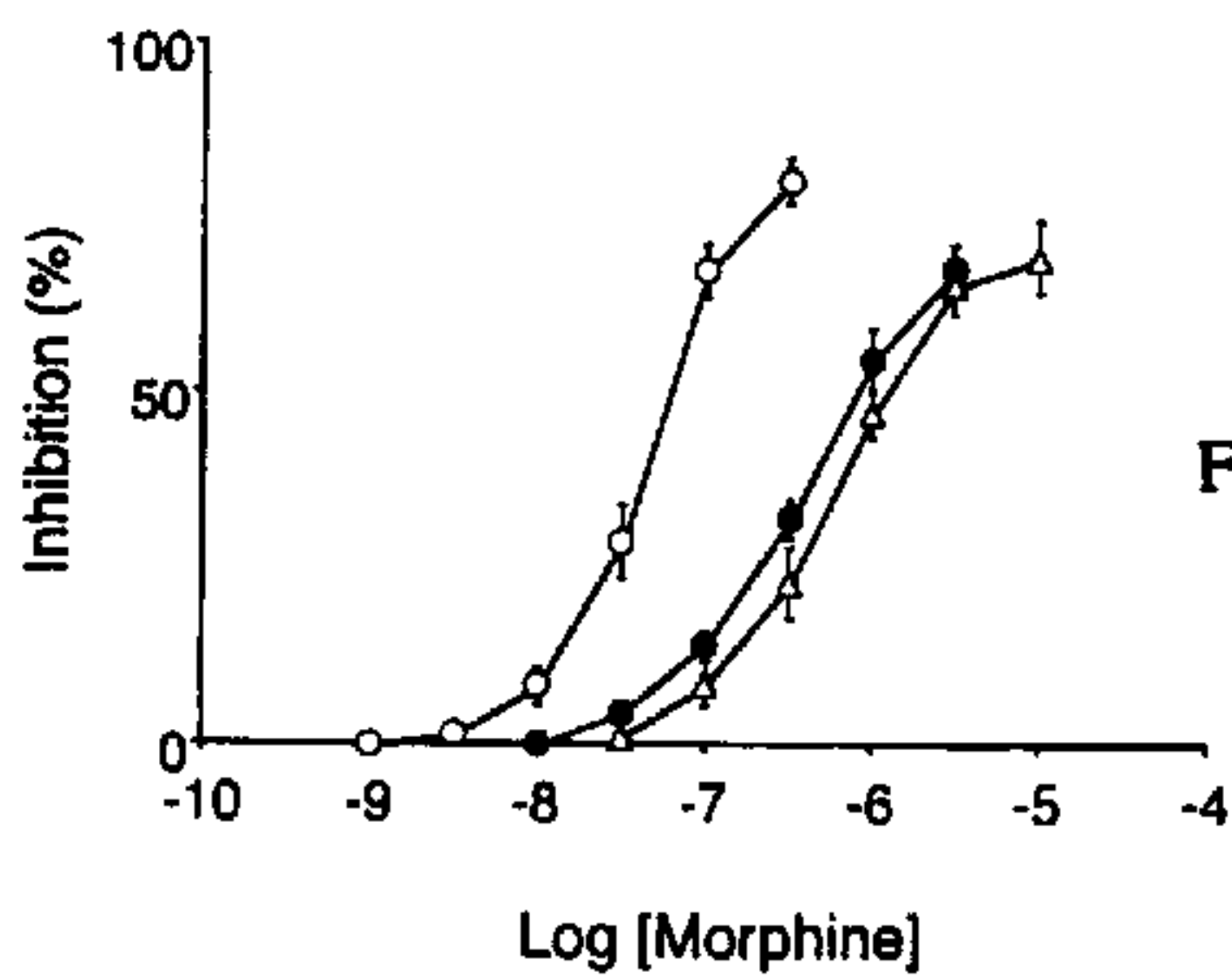
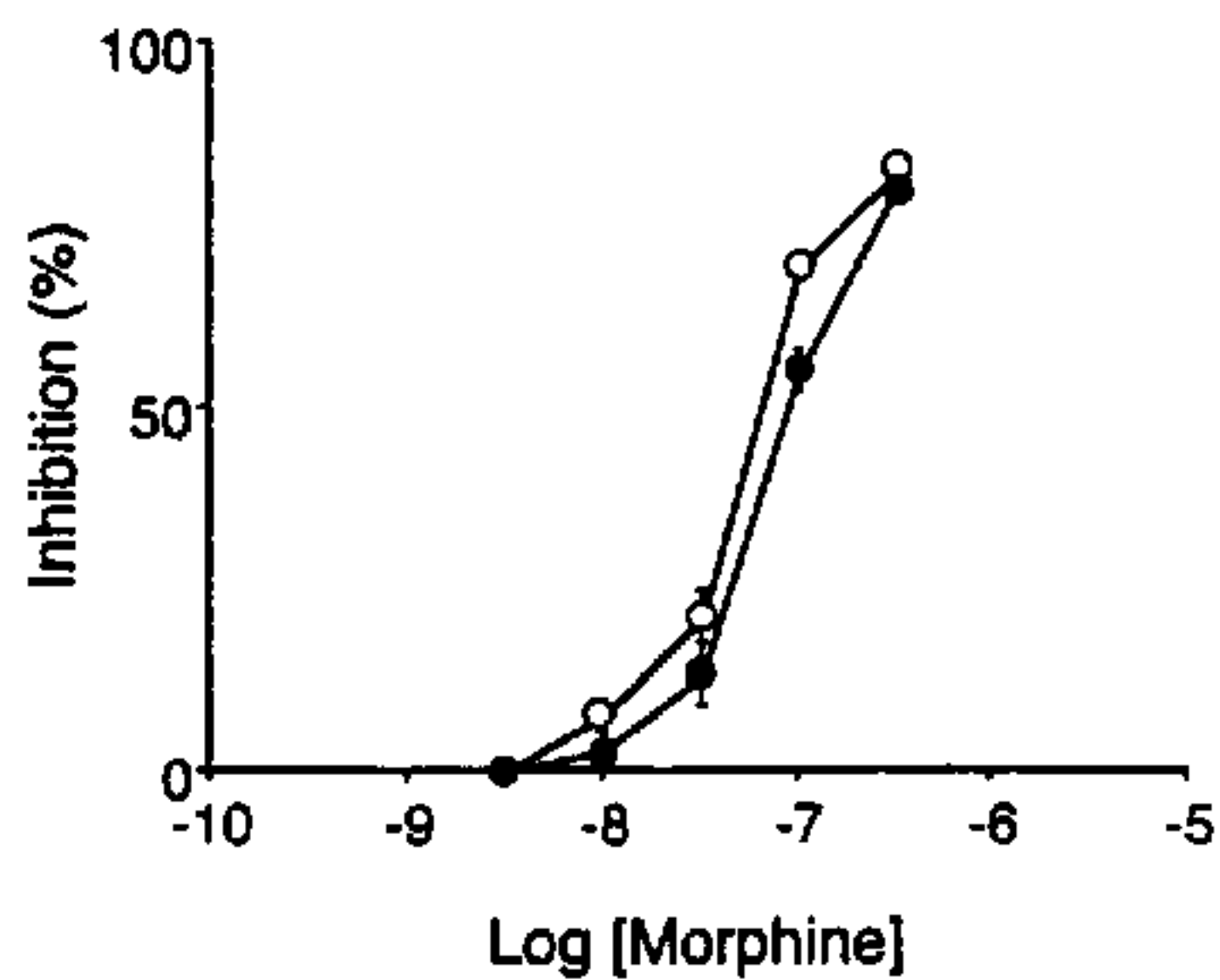
○高柳一成, 岡安綾子, 小池勝夫, 細木
るみこ, 鈴木 勉* (東邦大・薬・薬理,
*星薬大・薬理)

私どもの研究室では、 β -chloroethylamineである propylbenzilylcholine mustarde (PrBCM)によってアセチルコリン M_3 受容体が、PrBCM-sensitiveと-resistantに分類されることを示した(1)。また、 α_{1B} -選択的遮断薬である chloroethylclonidine (CEC)も β -chloroethylamineであるが、CECによってアドレナリン α_1 -受容体が α_{1A} と α_{1B} に細分類されることが出来るのも PrBCMによる分類と同じ意味を持つことを報告した(1)。また、phenoxybenzamineも β -chloroethylamineであるので、ヒスタミン H_1 受容体を sensitiveと resistantに分類しうる(2)。このような β -chloroethylamine誘導体が sensitiveと resistant受容体との細分類をするにはGTP及びその類似作用物質の存在が必要であることを示してきた(1, 2)。

上述の受容体は、いずれも平滑筋に存在するものである。そこで、神経に存在する受容体についても検討を試みた。モルモット回腸を支配しているコリン作動性神経にはオピオイド μ_2 受容体が抑制的に支配していることは知られている。本実験では、経壁刺激をしたモルモット回腸標本について、非可逆的 μ_2 遮断薬として β -chloroethylamineではないが、 β -FNAを使用して μ_2 受容体と β -FNAとの相互作用を検討した。

〔機械的反応〕雄モルモット (300-350g) より回腸縦走筋標本を作り、95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスを通気し、37℃に保温したKrebs液を満たした20mlのorgan bathに2枚の白金電極の間に吊るした。経壁刺激は duration 0.1msec, 0.1Hzで supramaximal voltageの電流を流すことで行い、twitch反応は500mgの静止張力のもと等尺性に記録した。実験結果は6例の平均値±標準誤差として示してある。

回腸標本のtwitchは、Fig. 1に示すように、モルヒネによって濃度依存的にオープンサークルで示すように抑制された。一方、 μ_1 -遮断薬のナロキソナジン50nMの存在ではクロースドサークルで示すようになり、

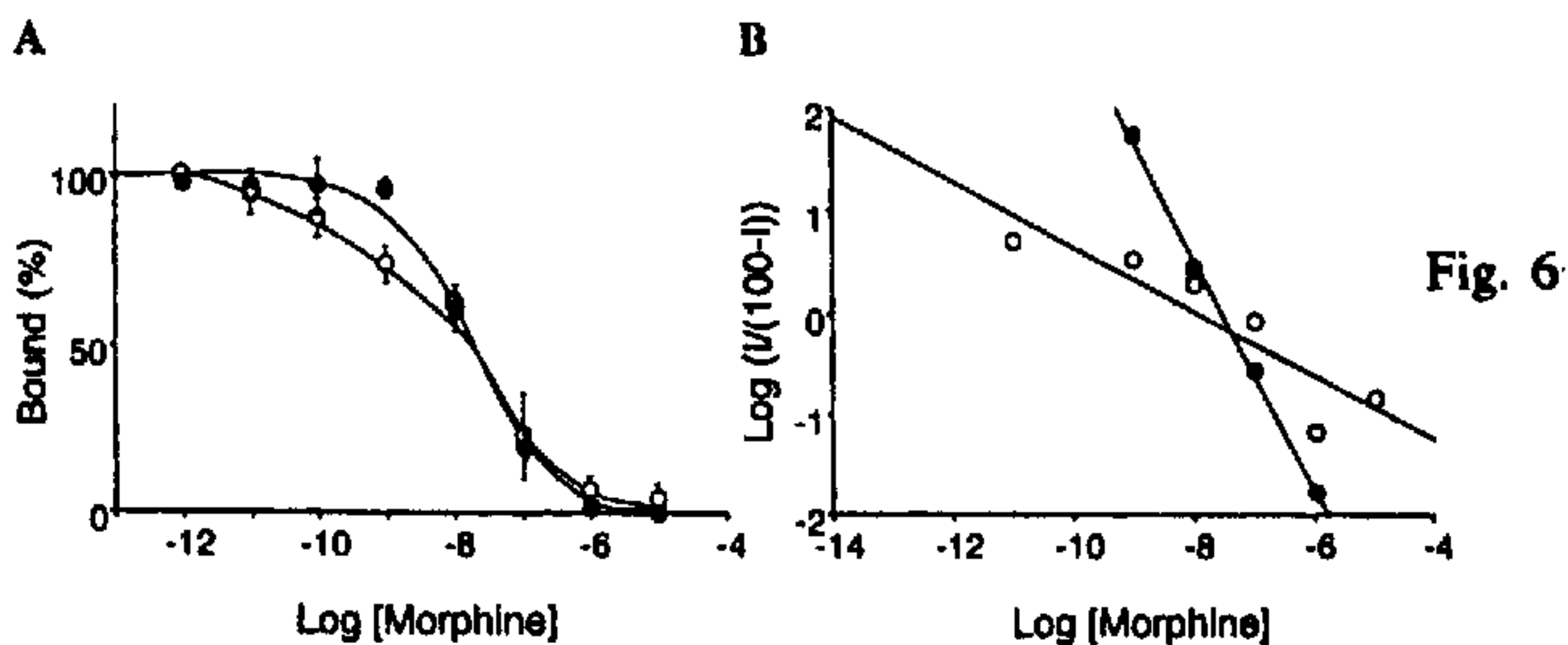
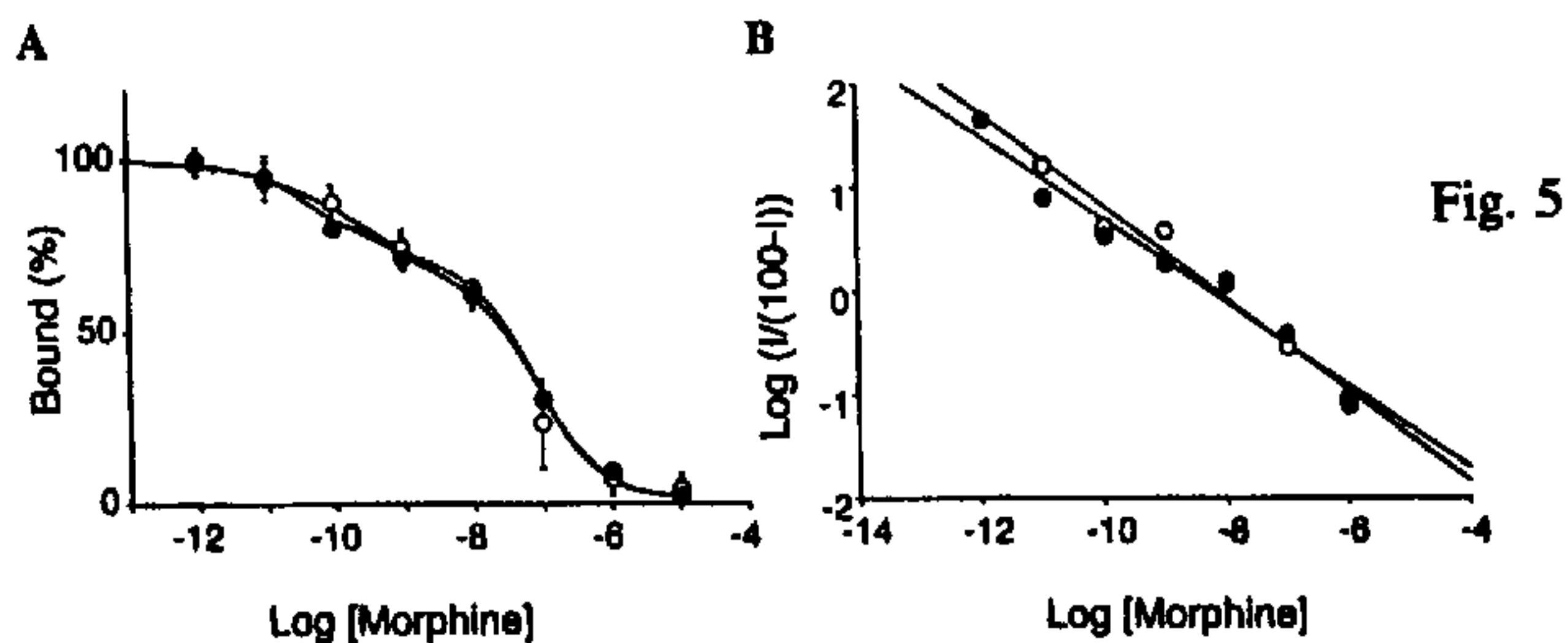
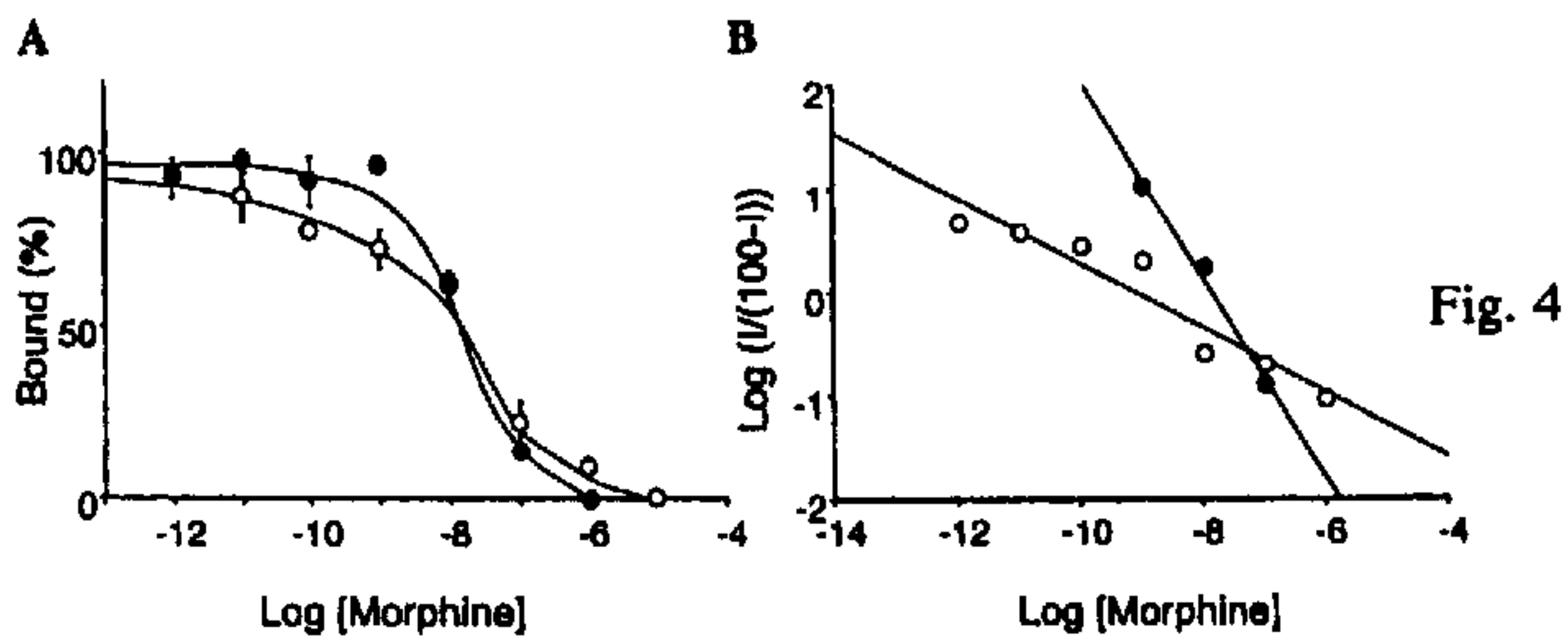


ほとんど影響されなかった (Fig. 1)。また、モルヒネの濃度抑制曲線は μ -拮抗薬のナロキソンの広範囲の濃度 ($10^{-8} \sim 3 \times 10^{-7}$ M) で平行移動され、ナロキソン 3×10^{-7} M で約 500 倍高濃度側へ移動した。このデータの Schild plot の勾配は 1.05 ± 0.03 で、勾配 1 の直線とみなされ、ナロキソンの pA_2 は 8.53 ± 0.13 であった。この結果は、Takayanagi et al. (1988) の値 (3) に近似した。このことは広範囲の濃度において μ 受容体に対して単純な 1 分子同志の競合拮抗をしていることを示している。故に、モルヒネによる twitch の抑制は主として μ_2 受容体を介したものであると考えられる。

Fig. 2 において、オープンサークルは無処置の標本における濃度抑制曲線である。クロースドサークルは β -FNA 0.1 nM で 60 分間処置した後求めたモルヒネのための曲線である。 β -FNA の濃度を 0.1 nM とし 60 分間処置してモルヒネのための曲線を求めると、オープントライアングルのようになり、 β -FNA の濃度を濃くしても抑制作用は強くないことが明らかとなった。これらの事実は、神経末端には β -FNA sensitive と resistant の受容体が存在し、モルヒネの低濃度による反応は、 β -FNA sensitive 受容体を介したものであり、高濃度による反応は、 β -FNA resistant 受容体を介したものであることを示している。

〔結合実験〕 結合実験の結果はいずれも 3 例の平均値 $\pm$ 標準誤差として示してある。モルモット回腸縦走筋から遠心分離法を用いて神経末端を含むシナプトソーム分画を作り結合実験に用いた。 ^3H ナロキソン 0.5 nM による特異的結合に対して Fig. 3 に示すようにモルヒネ (オープンサークル) は 2 相性の置換曲線を与え、高、低 2 つの親和性の違った結合部位が存在することを示した。そして、 μ_1 -遮断薬のナロキソナジン 50 nM を共存しておいてもクロースドサークルのようになり、ほとんど影響を受けなかった。挿入図は Hill プロットである。これらはモルヒネによる置換反応には μ_1 受容体は関与していないことを示している。

Fig. 4 の A は、置換曲線を、B は、Hill プロットを示してある。オープンサークルで示した曲線は Fig. 3 と同様に対照となる置換曲線で、2 相性を示し、その Hill 係数は 1 より有意に小さくなった。クロースドサークルで示す曲線は、内因性 GTP が存在する縦走筋のままで β -FNA 0.5 nM で 60 分間処置し、その後マイクロソーム分画を作り、 ^3H ナロキソン 0.5 nM による特異的結合をモルヒネで置換し、 ^3H ナロキソン単独のときの結合量を 100% として置換曲線を描いたものである。高



た。このことはGTPが存在すると β -FNAは高親和性結合部位と結合したことを示している。

Fig. 5においては、回腸縦走筋からシナプトソーム分画を作った後、 ^3H ナロキソン0.5nMによる結合へ対するモルヒネの置換実験の結果を示したものである。シナプトソーム分画は遠心分離法(4)によって作ったので、この分画にはGTPが存在しない。故に、 β -FNAは高親和性結合部位との結合が消失し(クロースドサークル)、オープンサークルで示した対照の置換曲線と差がなかった。そこで、シナプトソーム分画を作った後、GTP γ -S10nMを加えたあと β -FNA0.5nMで処理し、 ^3H ナロキソン0.5nMによる特異的結合のモルヒネによる置換曲線を求めたのが、Fig. 6のクロースドサークルであり、高親和性結合部位は β -FNAによって遮断され消失し、1相性となり、また、Hill係数も1となった。Fig. 6のオープンサークルで示した置換曲線は対照実験である。このことはGTP γ -Sが存在すると β -FNAは高親和性結合部位と結合することを示している。

[結論] β -FNAとモルヒネとの拮抗に使われたモルヒネの濃度で、主として μ_2 受容体を介した反応と考えられるので、 μ_2 受容体は β -FNA sensitiveとresistantの受容体に分類される。また、結合実験の結果は β -FNA sensitiveな受容体はナロキソン結合部位のうち高親和性のものに相当し、 β -FNA resistantな受容体は低親和性のものであることが示された。しかし、resistantな受容体については詳細な検討の余地が残る。

非可逆的受容体遮断薬によってはsensitiveとresistantな受容体に分けられるものは、 M_3 , α_1 及び H_1 受容体についても報告しているが(1, 2)、これらのいずれにおいても、両者を識別しその一方と非可逆的に結合するにはGTPまたはその類似作用物質の存在が必要であり、ここに報告した事実は細胞膜7回貫通型受容体においては可成り一般的におこる可能性が考えられる。

1. Takayanagi, I., Koike, K., Satoh, M. & Okayasu, A.: Jpn. J. Pharmacol. 73, 1-22, 1997 (Review); Takayanagi, I.: Yakugaku Zasshi 116, 417-440, 1996 (Review)
2. Takayanagi, I., Satoh, M., Shinkai, M., Okayasu, A. & Hosoki, R.: J. Smooth Muscle Res. 32, 249-254, 1996
3. Cotman, C. W. & Matthews, D. A.: Biochem. biophys. Acta 249, 380-390, 1971
4. Takayanagi, I., Konno, F., Goromaru, N., Koike, K., Kanematsu, K., Fujii, I. & Togame, H.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 294, 71-84, 1988

3-6

アンチオピオイド Tyr-MIF-1 の脊髄腔内投与による 抗鎮痛作用について

○福永浩子¹, 高橋正克¹, 吉川正明², 金戸 洋³

¹ 長崎大・薬・医療情報分析, ² 京都大・食糧科研,

³ 長崎大・名誉教授

<緒言>

生体が種々の侵害刺激に対して、ストレス誘発鎮痛 (SIA) のような内因性の生体防御機構を発動すること、この機構にはオピオイド系をはじめ種々の機構が関与することが知られている。一方、過剰な SIA の発現による生体への影響を緩和するための抗鎮痛作用機構の存在も考えられており、この機構にはオピオイドの作用に対して拮抗作用を示す一連の内因性ペプチド、いわゆる "アンチオピオイド" の関与が示唆されている。

1990 年 Kastin ら¹⁾ のグループによってヒト脳内から同定された内因性ペプチド Tyr-MIF-1 (Tyr-Pro-Leu-Gly amide) は、モルヒネの抗侵害効果や直接身体的侵襲の加わるストレスによる SIA に対して抑制効果を示す^{2,3)} ことから、アンチオピオイドの一つと考えられている。一方、Tyr-MIF-1 の他にコレシストキニン (CCK-8)⁴⁾ やニューロペプチド FF (NPFF)⁵⁾ などアンチオピオイドの候補に挙げられているが、Tyr-MIF-1 は他のペプチドに比べ、オピオイドレセプターに対して比較的高い親和性を示すことが報告されており⁶⁾、アンチオピオイドの有力候補と考えられる。

我々もすでに、内因性オピオイド系を介して発現するフットショックおよび心理的ストレス SIA が Tyr-MIF-1 の腹腔内 (i.p.) および脳室内投与 (i.c.v.) により抑制されることを報告しており⁷⁾、Tyr-MIF-1 はアンチオピオイドとして痛覚調節機構に関与している可能性を示唆している。

そこで、本研究では、Tyr-MIF-1 の痛覚調節機構への関与をさらに明らかにするために、外因性の μ オピオイド受容体アゴニストのモルヒネおよび κ 受容体アゴニスト U-50,488H の抗侵害効果に対する影響を上位中枢および脊髄レベルで検討した。

＜実験方法＞

体重 22~25 g の ddY 系雄性マウスを用いて、Tyr-MIF-1 の腹腔内 (i.p.), 脳室内 (i.c.v.) および脊髄腔内 (i.t.) 投与を行い、その 15 または 5 分後にモルヒネ (5 mg/kg) と U-50488H (20 mg/kg) をそれぞれ皮下投与し、経時的に 90 分間抗侵害効果を測定した。

なお、抗侵害効果の測定は tail-pinch 法を用いて行い、i.c.v. は Haley and McCormick⁸⁾, i.t. は Hylden and Wilcox⁹⁾ による方法に従って行った。

＜実験結果＞

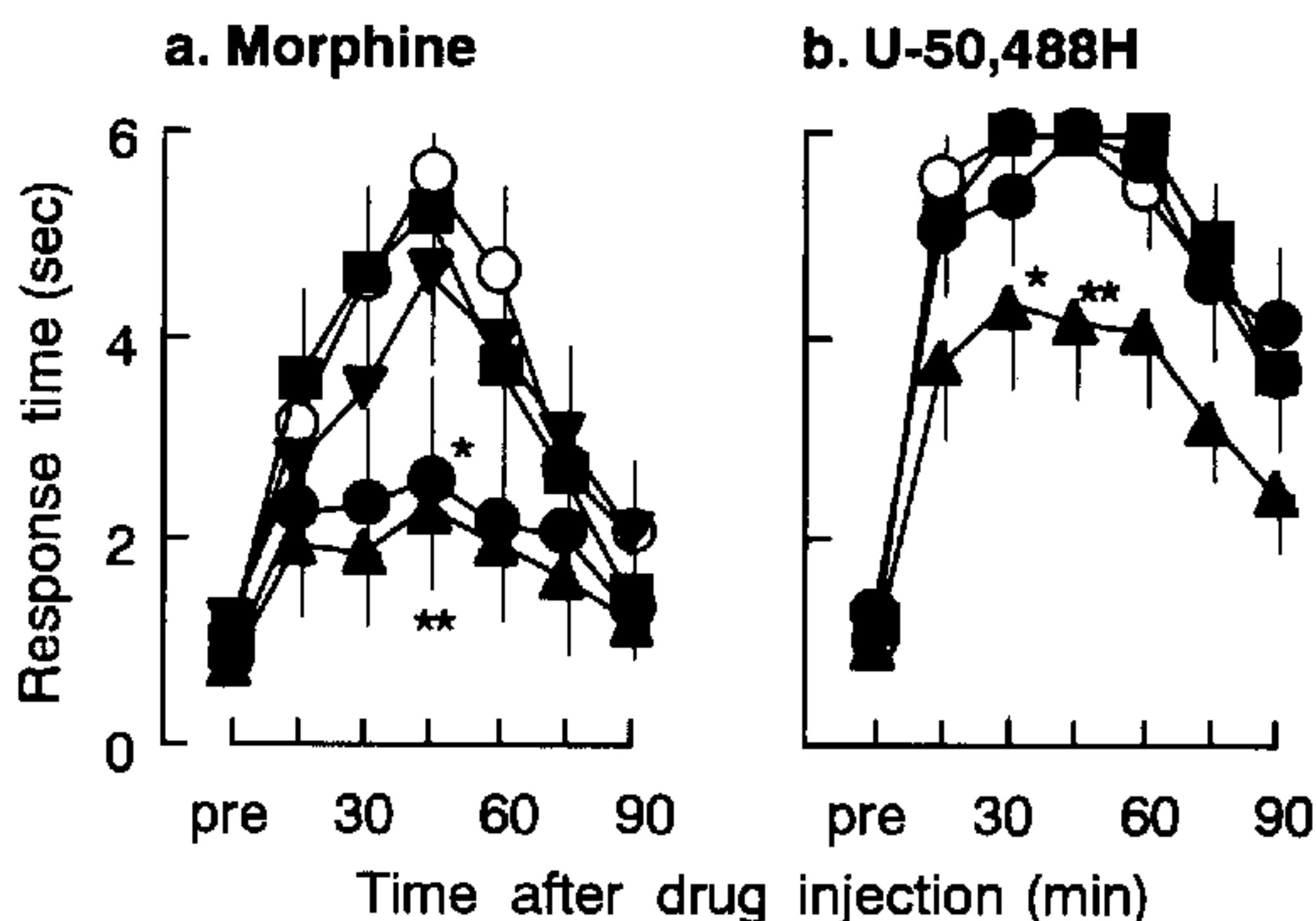


Fig. 1. Effect of intraperitoneal Tyr-MIF-1 on morphine and U-50,488H antinociception.

a) Mice were treated with morphine at 5 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 0.3 (▼), 1 (●), 3 (▲), 30 (■) mg/kg, i.p. was given 15 min before morphine. b) Mice were treated with U-50,488H at 20 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 3 (●), 10 (▲), 30 (■) mg/kg, i.p. was given 15 min before U-50,488H. Control groups (○) treated with saline instead with of Tyr-MIF-1.

Tyr-MIF-1 の 1 および 3 mg/kg i.p. はモルヒネの抗侵害効果を有意に減弱 (Fig. 1, a) したが, 高用量の 10 mg/kg ではむしろ抑制はみられず, ベルシェイプ型の効果を示した。この成績は Kastin らの報告²⁾ と一致した。U-50,488H による抗侵害効果は Tyr-MIF-1 の 10 mg/kg i.p. で抑制された (Fig. 1, b)。

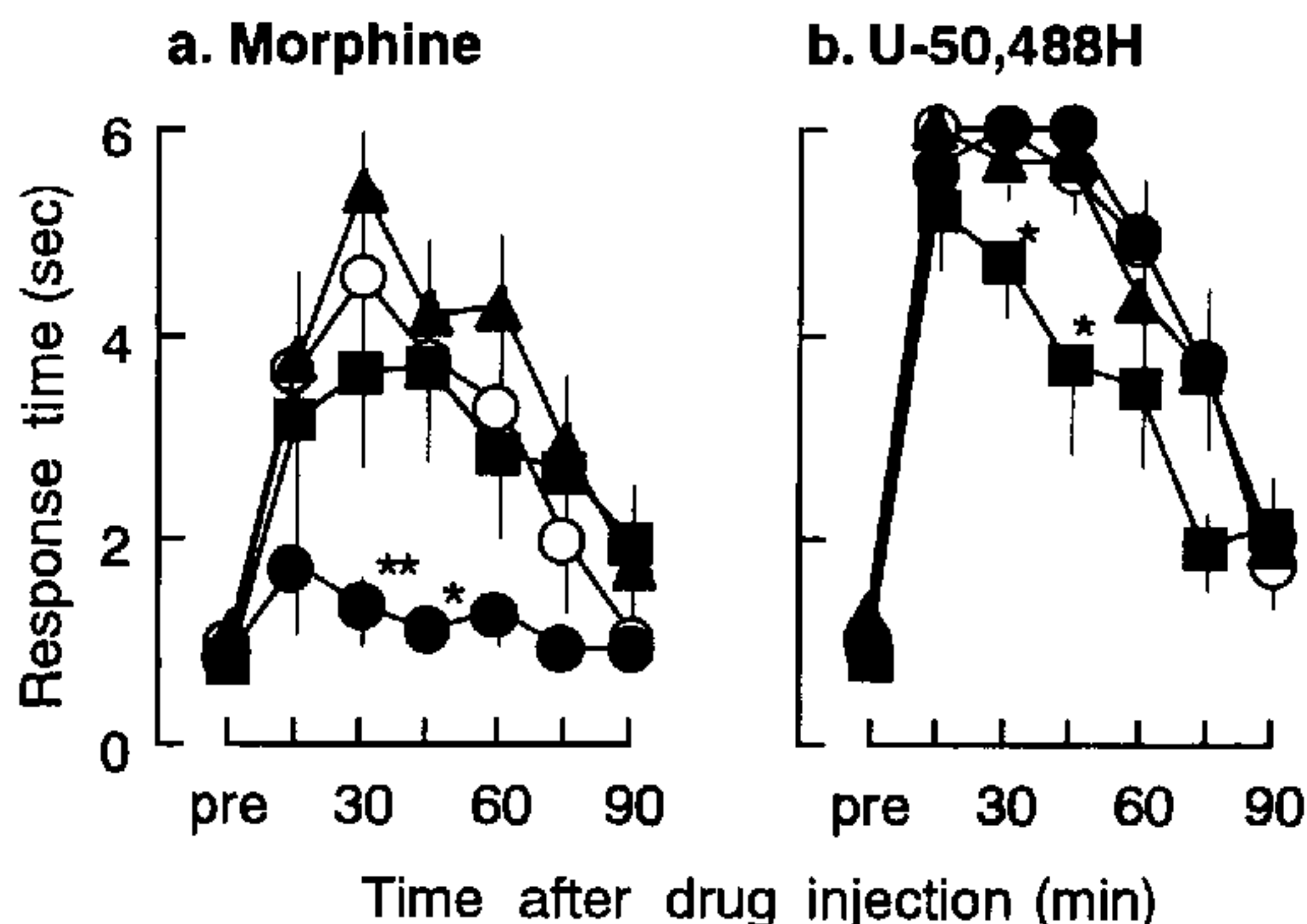


Fig. 2. Effect of intrathecal Tyr-MIF-1 on morphine and U-50,488H antinociception.

- a) Mice were treated with morphine at 5 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 0.1 (●), 1 (▲), 10 (■) mg/kg, i.t. was given 5 min before morphine.
b) Mice were treated with U-50,488H at 20 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 0.1 (●), 1 (▲), 10 (■) mg/kg, i.t. was given 5 min before U-50,488H. Control groups (○) treated with saline instead with of Tyr-MIF-1.

一方, Tyr-MIF-1 の 0.1 および 10 μ g/mouse i.t. はそれぞれモルヒネおよび U-50,488H の効果を減弱した (Fig. 2) が, Tyr-MIF-1 の i.c.v. 処置はいずれの抗侵害効果にも影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。

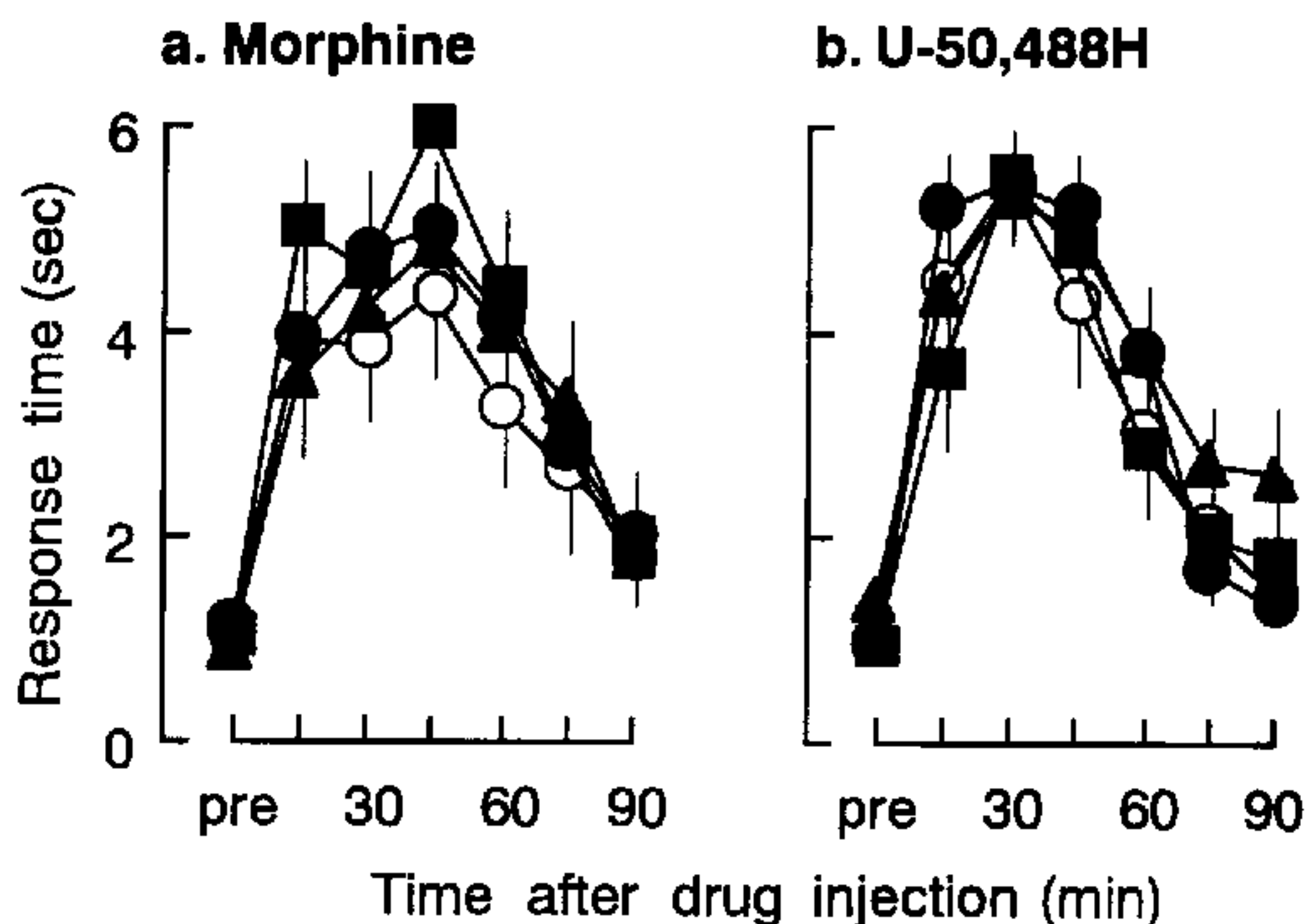


Fig. 3. Effect of intracerebroventricular Tyr-MIF-1 on morphine and U-50,488H antinociception.

a) Mice were treated with morphine at 5 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 0.1 (●), 1 (▲), 10 (■) mg/kg, i.c.v. was given 5 min before morphine. b) Mice were treated with U-50,488H at 20 mg/kg s.c. Tyr-MIF-1, 0.1 (●), 1 (▲), 10 (■) mg/kg, i.t. was given 5 min before U-50,488H. Control groups (○) treated with saline instead with of Tyr-MIF-1.

＜考察および結論＞

Tyr-MIF-1 はモルヒネだけでなく U-50,488H の抗侵害効果も減弱したことから、 μ と同様、 κ オピオイド受容体に対しても抑制効果を及ぼすことが示唆された。

一方、Tyr-MIF-1 の i.t. 処置ではモルヒネおよび U-50,488H の抗侵害効果の抑制が認められたが、i.c.v. では影響しなかったことから、Tyr-MIF-1 は上位中枢ではなく脊髓を介してオピオイドの抗侵害作用を抑制するものと推察される。

以上、Tyr-MIF-1 は μ および κ 受容体を介する痛覚抑制系を脊髓レベルで調節している可能性が示唆された。

＜参考文献＞

1. A. Horvath and A.J. Kastin : International J. Pept. Protein Res., **36**, 281-284 (1990)

2. Z. H. Galina and A. J. Kastin : Br. J. Pharmacol., **90**, 699-674 (1987)
3. A. Z. Kastin et al. : Pharmacol. Biochem. Behav., **21**, 937-941 (1984)
4. P. K. Faris et al. : Science, **219**, 310-312 (1983)
5. H. Y.-T. Yang et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **82**, 7757-7761 (1985)
6. J. E. Zadina and A. J. Kastin : Pharmacol. Biochem. Behav., **25**, 1303-1305 (1986)
7. 福永浩子ら : 第 47 回日本薬理学会西南部会要旨集, P 21 (1994)
8. T. J. Haley and W. G. McCormick : Br. J. Pharmacol., **12**, 12-15 (1957)
9. J. L. K. Hylden and G. L. Wilcox : Eur. J. Pharmacol., **67**, 313-316 (1980)

○吉川正明¹、Yunden Jinsmaa¹、園田壮司¹、高橋正克²

¹京都大学食糧科学研究所、²長崎大学薬学部

Gluten exorphin A5 (Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr) は我々が小麦グルテンのペプシン-サーモリシン消化物から単離した δ 選択性のオピオイドペプチドである¹⁾。本ペプチドのラットへの経口投与(30mg/kg)によってインスリンレベルの一過性の上昇が見られ、同時にgroomingの誘発が認められた²⁾。そこで本ペプチドを経口投与した際の中枢作用をマウスで検討した。

方法

オピオイド活性は摘出マウス輸精管の電気刺激収縮に対する抑制により評価した。ddy雄性マウス(22-24g)を用い、高架式十字迷路により抗不安作用を、ステップスルー型受動的回避実験装置により学習促進作用を検討した。Gluten exorphin A5 の各種誘導体はFmoc法にて合成した。

結果および考察

1. Gluten exorphin A5 の中枢作用

Gluten exorphin A5 はマウスにおいてもgrooming誘発作用 (30mg/kg 経口投与) を示し、また高架式十字迷路では300mg/kgの経口投与によってopen arm 滞在時間を増加する傾向が見られた。一方、受動的回避実験では訓練試行後の300mg/kgの経口投与によって明らかな学習促進効果が見られた (Fig. 1)。また、100mg/kgの経口投与でも有意な効果が認められた。

2. Gluten exorphin A5 の構造-活性相関と強力誘導体の学習促進効果

Gluten exorphin A5 はオピオイドペプチドとしてはきわめて特異な構造を有しており、特に2残基のTyrを有するが、それらのいずれが活性に必須であるかを解明するためにAla scanning を行った。その結果、Tyr² およびPro³ が δ オピオイド活性に必須であることがわかった。一方、Gluten exorphin A5 はNMDAレセプターGly site に対しても弱い親和性を示した。そこで、上で見られた学習促進効果とGly site 親和性の関連を検討すべく、Gly¹をGly site に対して親和性を有するD-AlaおよびD-Serに置換したペプチドを合成した。その結果、これら

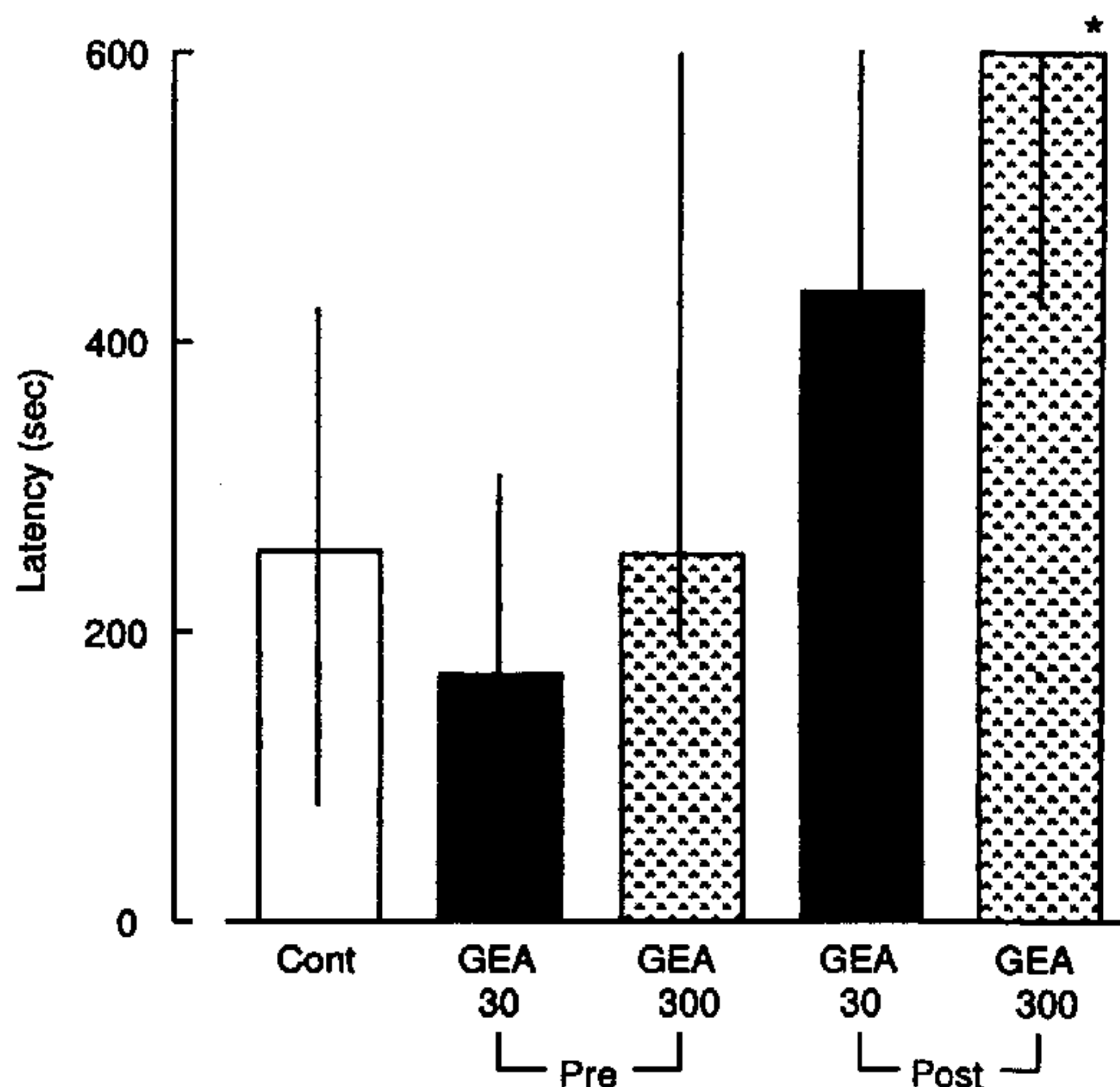


Fig. 1. Effect of pre- and post-training gluten exorphin A (GEA) on memory/ learning in the step-through type one trial passive avoidance learning task. GEA at 30 and 300 mg/kg p.o. was administered 1 hr before the training trial (pre-training) or immediately after the training trial (post-training).

* $p < 0.05$, compared with the saline control group. Each values represents the median and interquartile ranges.

の誘導体はNMDAレセプターGly site に対する親和性は示さなかったが、意外にも δ オピオイド活性はそれぞれ、約50倍および10倍上昇した。L-Ala およびL-Ser との置換ではこのような効果は見られなかった。D-Ala-Tyr-Tyr-Pro-Thr は 1mg/kgの訓練後経口投与によって明らかな学習促進効果を示した。このことはGluten exorphin A5および誘導体の学習促進効果は δ オピオイド活性に基づくものであることを示唆している。

文献

1. S. Fukudome and M. Yoshikawa, FEBS Lett., **296**, 107 (1992)
2. S. Fukudome, A. Shimatsu, H. Suganuma and M. Yoshikawa, Life Sciences, **57**, 729 (1995)

○末岡榮三朗¹、末岡尚子¹、岡部幸子¹、菅沼雅美¹、神津知子¹、小森敦正¹、兼松顕²、藤木博太¹ (¹埼玉がんセ・研、²学位授与機構)

<要旨>

がんの緩和ケアにおける主要な薬剤としてモルヒネの使用は年々増加している。モルヒネは鎮痛作用の他に、制がん作用を持つことを私共は見出した。即ちモルヒネは種々のヒトがん細胞の増殖を抑制し、TNF- α 、LIFなどがん悪液質の誘導因子の遊離を抑制した。今回、新たに合成されたモルヒネ誘導体であるKT-90 (k-agonist) およびKT-87 (μ -agonist) を用いてその制がん作用を検討した。選択的 κ -アゴニストであるKT-90は鎮痛効果がモルヒネの約6倍強く、身体、精神的依存形成能が弱いので、新しいがん緩和療法への応用が期待される。

<方法および結果>

1. ヒトがん細胞株に対する増殖抑制効果

モルヒネの種々のヒトがん細胞株、PC-9 (ヒト肺がん細胞)、HL-60 (ヒト白血病) 及びヒト神経芽細胞腫株に対する増殖抑制効果

Table 1 Growth inhibition of cell lines by morphine

Cell line	IC ₅₀ ^a (mM)
PC-9	4.8
HL-60	2.7
Neuroblastoma	3.3

^aIC₅₀, concentration for 50 % cell growth inhibition.

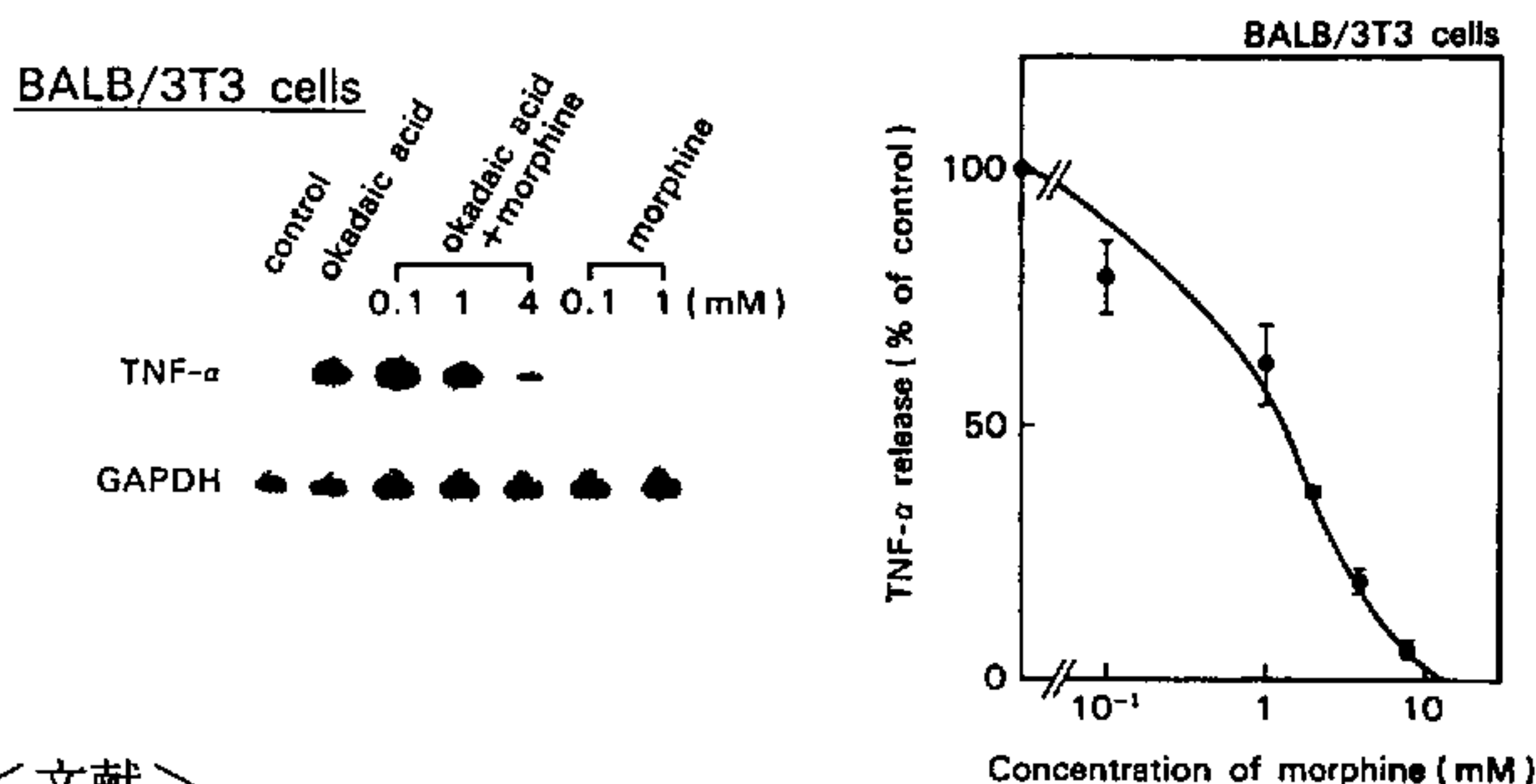
をトリパンブルー法、MTT法を用いて検討した。モルヒネは上記3種ヒトがん細胞の増殖を濃度依存性に抑制した (Table 1)。

KT-90およびKT-87の細胞増殖抑制効果についても解析中であり本学会に於て発表する。また、モルヒネ誘導体のがん細胞増殖抑制の作用機構が δ , κ および μ レセプターを介する作用であるか検討を進めている。

2. 腫瘍壊死因子 (TNF- α) の遊離抑制作用

最近私共はTNF- α が内因性発がんプロモーターとして発がん促進作用を持つことを見出した。さらにTNF- α はがん悪液質の重要なメディエーターである。それらの結果をもとに、モルヒネによるTNF- α の遊離抑制作用について検討した。発がんプロモーターであるオカダ酸0.2 μ Mをマウス線維芽細胞BALB/3T3に処理するとメデイウム中にTNF- α が遊離する。この系にあらかじめモルヒネを処理し、BALB/3T3細胞におけるTNF- α mRNAの発現をRT-PCR法により、またメデイウム中へのTNF- α の遊離をELISA法を用いて解析した。モルヒネはオカダ酸によるTNF- α mRNAの発現およびメデイウム中へのTNF- α の遊離を濃度依存性に抑制した (図1)。KT-90およびKT-87のTNF- α の遊離抑制作用については、現在詳細な検討を行っている。

図1



<文献>

Sueoka N., Sueoka E., Okabe S. and Fujiki H. Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumour necrosis factor- α release and mRNA expression. *Carcinogenesis*, 17, 2337-2341, 1996

○羽里忠彦、島村真里子、植木正彬*、山本行男
(東京都臨床医学総合研究所、* 東京理科大学)

はじめに

オピオイド受容体の選択的内因性アゴニストであるエンケファリン等が数多く脳内より見出されてきた¹⁻²⁾。これら、エンケファリン等の神経ペプチドは、生体内に広く分布し、炎症等の生体防御機構に働いていることも報告されてきた。例えば、エンケファリンが炎症の担当細胞となる好中球機能を活性化することにより、神経系と炎症・免疫系との密接な関係が明らかにされてきた³⁾。更に、好中球の細胞膜表層に、数多くの蛋白が同定されてきた。これら細胞膜蛋白のうち、CD10やCD13がエンケファリン代謝酵素のEnkephalinase (Neutral Endopeptidase, NEP, EC 3.4.24.11) やAminopeptidase N (AP-N, EC 3.4.11.2) 等⁴⁻⁵⁾であり、エンケファリンによる好中球機能の活性化をdown-regulate すると考えられてきた⁶⁾。

我々は、内因性疼痛制御物質・Spinorphinが脊髄に高濃度で存在し、7 コのアミノ酸からなるヘプタペプチド (LVVYPWT) であることを報告してきた。即ち、本物質は中枢に存在しているそれぞれのエンケファリン分解酵素に対して阻害効果を示し、薬理試験で単独で鎮痛活性を示した。このSpinorphinは水とメタノール等の有機溶媒に可溶の特性を有していた⁷⁻⁸⁾。最近、このSpinorphinはin vitroにおいて、細菌由来の炎症性ペプチド・fMLPで刺激した好中球機能（遊走性、活性酸素生成、脱顆粒）をそれぞれ有意に阻害し、好中球表層Aminopeptidase N (CD13) がSpinorphinの代謝酵素であることも判明してきた⁹⁾。

そこで、本研究は、エンケファリン調節因子・Spinorphinが、好中球を介した炎症機構にどのように関与しているかを報告する。

実験方法

1. 使用動物

動物は、5週齢の雌性ICR マウス（日本チャールス・リバー）を用い、薬物は、1/5 皮下針を用いてマウス尾静脈に注入した。

2. ヒト末梢血の好中球調製法

好中球は、定法に従い調製した。採取した血液は、リン酸緩衝液で希釈し、2%Dextran-T500を加えて赤血球を凝集させた。その後、白血球濃縮画分に含まれてる赤血球を除く為に、低張操作を行った。更に、白血球画分中の多形核白血球画分を、Ficoll-Paqueを用いた密度勾配法を利用して分離した。遠心分離操作後、沈殿物をリン酸緩衝液で洗い、細胞数を血球計算盤にて計測した。この細胞をライトーギムザ試薬にて染色し、95%以上多形核白血球であることを確認した。以後、この多形核白血球画分を好中球として取り扱った。

3. 好中球表層のFMLPレセプターに対するSpinorphinの影響

2×10^6 細胞の好中球に放射標識した100nM FML [^3H]Pをリン酸緩衝液中で37°C, 15分間反応させた。緩衝液で細胞を充分洗浄し、1%Triton X-100にて4°C, 1時間可溶化した。特異結合活性は、リガンド結合の総カウント量から標識リガンドの100倍濃度の未標識FMLPを添加して得られたカウント量を差し引いたカウント量で示す。

4. マウスを用いた急性炎症モデル

急性炎症モデルであるマウスair-pouch法を用いて、Spinorphinの抗炎症効果を検討した。0日目に空気5mlを背中に皮下注入し、3日に空気2.5mlを追加注入した。6日目、生理食塩水にて調整した起炎剤1% λ -Carrageenan 1mlをair-pouch内に投与した。起炎剤注入後、pouch内の浸出液は1mlの生理食塩水を加えて、経時的に採取した。その浸出液中の細胞は、10分間、1600rpmで遠心して回収し、パラホルムアルデヒド法にて固定した。その細胞数は、Turk液にて染色し、血球計算盤を用いて測定した。遊走細胞は、好中球(95%以上)を含む多形核白血球数を炎症の指標とした。薬物の投与方法は尾静脈以外に、腹腔内・炎症部位への直接投与等を検討した。しかし、尾静脈投与以外、Spinorphinの抗炎症効果は示さなかった。

5. 統計処理

検定は、Student's t-test (t検定)を用いた方法で解析した。

実験結果・考察

SpinorphinがfMLP刺激したさまざまな好中球機能を阻害する特性を報告してきた。今回、Spinorphinによる好中球への機能阻害効果が、好中球に存在している受容体への起炎剤fMLPの結合段階に起因しているかを検討した。図1は、fMLP受容体へのfML [^3H]P結合に、Spinorphinがどのように影響を及ぼすかを示した。その結果、Spinorphinは、fMLPの特異結合量を顕著に抑制した(

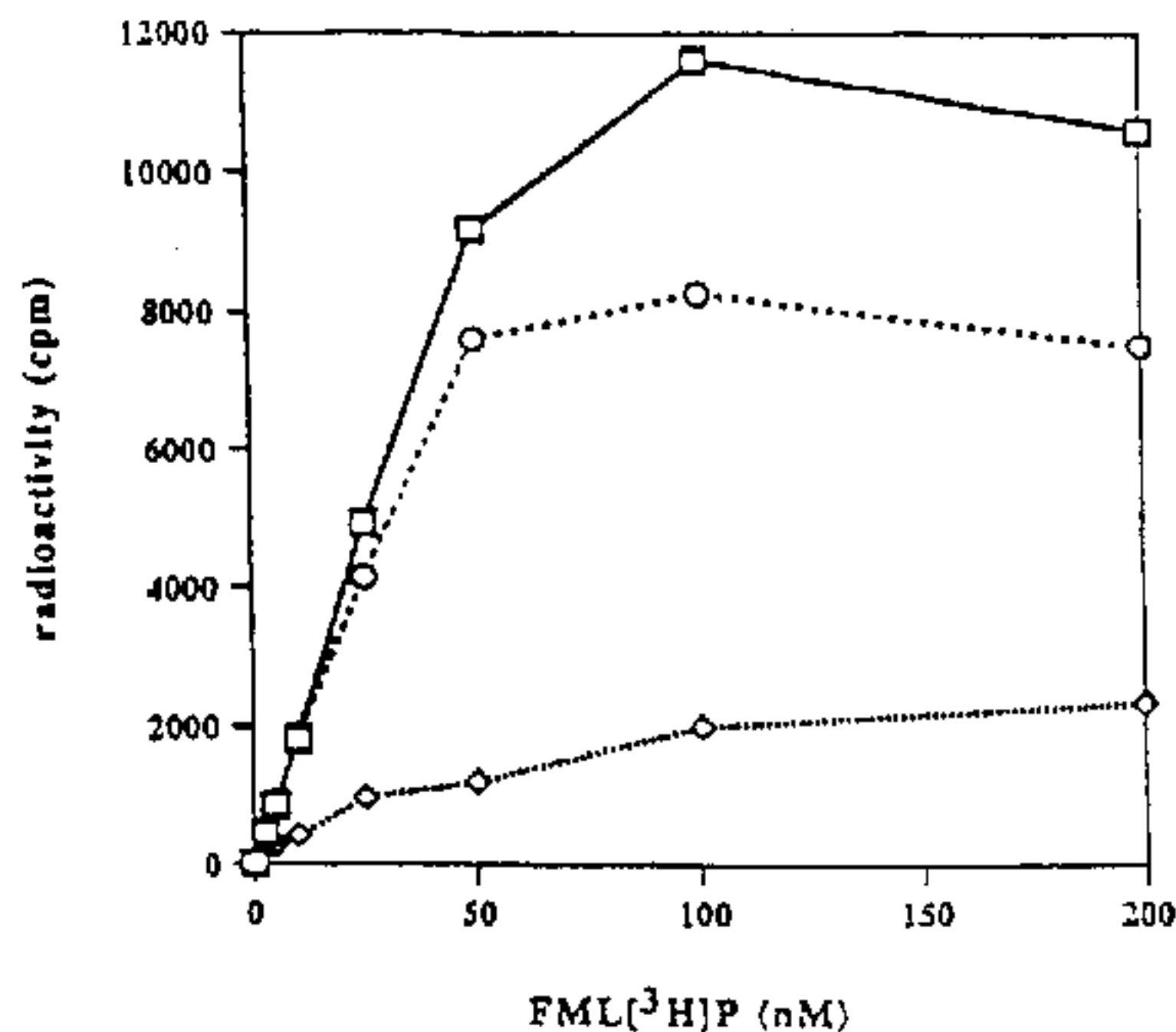


FIG. 1 Effect of spinorphin on the binding of FML[³H]P to its receptor on PMNs. PMNs (2×10^6 cells) were reacted with 100 nM FML[³H]P at 37° for 15 min in the presence or absence of 10 μ M peptide. Nonspecific binding was defined as the amount of binding not inhibited by 10 μ M unlabeled FMLP. Specific binding was defined as the total amount of FML[³H]P bound minus the nonspecific binding. Representative results of four different experiments are shown. Key: (□) total binding; (◇) nonspecific binding; and (○) specific FML[³H]P binding in the presence of spinorphin.

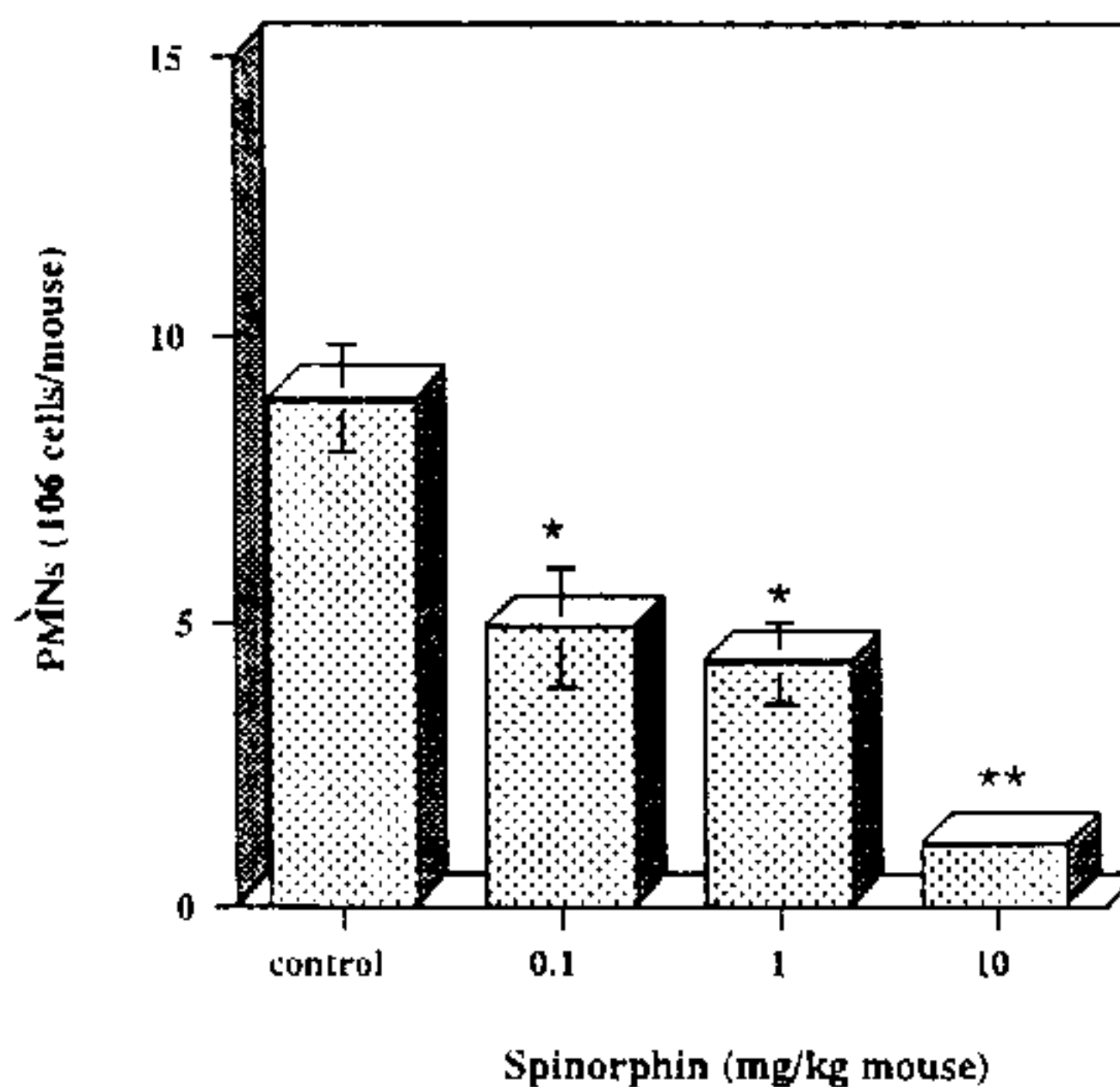


Fig. 2 Effect of spinorphin on carrageenan-induced PMN accumulation in mouse air pouches.

After the administration of 1 ml of carrageenan (1%) into mouse air pouches, spinorphin (10 mg/kg, i.v.) and leuhistin (2 mg/kg, i.v.) were co-injected every hour 6 times. After washing with a saline solution, the infiltrates were harvested. The numbers of PMN in the filtrates were determined by light microscopy. Values represent the means $\pm$ SEM for five different mice in three experiments. Significance, as compared to the carrageenan-treated control group, was determined using the Mann-Whitney U test.

50.8±12.0% N=4, P<0.01)。この効果がSpinorphin関連化合物等や他の神経ペプチド (Angiotensin III, Substance P等) でもあるのかを検討した。現在のところ、このような特色のある作用は、Spinorphin以外の化合物では観測されなかった。更に、Fura 2-AMを取り込ませた好中球にfMLPを刺激した場合の細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]$ に、Spinorphinがどのような影響を示すかを検討した。本物質は、100uM細胞内カルシウム変化を有意に抑制した (37% 阻害 N=5, P<0.01%)。以上の結果より、Spinorphinは、fMLP受容体に作用し、細胞応答性の引き金となる $[Ca^{2+}]$ 変化をコントロールする可能性が分かった。次に、急性炎症のモデルであるマウスair-pouch法を用いて、Spinorphinが炎症作用に効果があるかを検討した。炎症の程度は、マウスに1% λ -Carrageenan を投与し、この起炎剤により誘導される体液中の多形核白血球数で評価した。10mg/kg mouseのSpinorphin単独投与群 ($3.21 \pm 0.95 \times 10^6$ 細胞数; $p < 0.01, n=5$) は生理食塩水投与群 ($8.92 \pm 0.96 \times 10^6$ 細胞数; $n=5$) と比較すると、多形核白血球の遊走数は64.0%程度の抑制効果があつた。前述したように、好中球表層に存在しているAminopeptidase Nの影響で、本物質本来の抗炎症活性が十分に観測されないと考えられた。そこで、Spinorphinと微生物由来の特異的Aminopeptidase N阻害物質Leuhistin¹⁰⁾を併用投与して、Spinorphinの活性を詳細に検討した。SpinorphinはLeuhistinと併用投与すると、生理食塩水投与群と比較してSpinorphinの活性を有意に増強させ ($1.11 \pm 0.17 \times 10^6$ 細胞数; $p < 0.01, n=5$)、87.6% 抑制した (図2)。なお、Leuhistin単独投与群は多形核白血球遊走数に何らかの影響を及ぼさなかった ($8.88 \pm 0.55 \times 10^6$ 細胞数; $n=5$)。Spinorphin代謝酵素阻害物質を併用投与することにより、Spinorphin本来の活性が観測されることが明らかとなった。そこで、SpinorphinがCarrageenan刺激で浸潤してきた多形核白血球の遊走にどの程度のID₅₀を有するか詳細に検討した。Spinorphinは6時間後の多形核白血球の遊走に対して濃度依存的に抑制し、ID₅₀ = 30 ug/kg/hrを示した。

以上、内因性疼痛制御物質・Spinorphinが、好中球機能を介して、急性炎症に関与している可能性が充分考えられた。更に、Spinorphinの活性発現機構・体内動態・組織分布等を詳細に研究すれば、複雑な疼痛と炎症の制御機構の関係を解明する糸口が拓けると思える。

文献

- 1) Hughes J., et al., Nature. 258, 577 (1975)
- 2) Zadina, J.E., et al., Nature. 386, 499 (1997)
- 3) Simpkins C., et al., J. Surgical Res. 41, 645 (1986)

- 3) Epps, D., et al., J. Immunol. 132, 3046 (1984)
- 4) Shipp, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 297 (1989)
- 5) Look, A., et al., J Clin. Invest. 83, 1299 (1989)
- 6) Shipp, M., et al., Nature. 347, 394 (1990)
- 7) Nishimura K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 713 (1993)
- 8) Nishimura K., et al., Jpn Anaesthesiology. 42, 1663 (1993)
- 9) Yamamoto Y., et al., Biochem Pharmacol. 54, in press (1997)
- 10) Yoshida S., et al., J Antibiotics. 44, 683 (1991)