

主 題 1

Nociceptin / Orphanin の新展開

1-1

ノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスにおける痛覚過敏現象

○井上 誠*, 竹島 浩**, 植田弘師*

*長崎大・薬・分子薬理, **東京大・医・薬理

緒言

ノシセプチン(1,2)はオピオイドペプチドと非常に類似したアミノ酸配列を示すにも関わらず、オピオイドペプチドとは逆に痛覚過敏や抗オピオイド作用を示したことで大変注目された。しかしながら、その後の研究により、このペプチドは投与経路や用量によって侵害作用あるいは抗侵害作用を示すことが明らかとなった。しかしながら、この侵害あるいは抗侵害作用における細胞内情報伝達機構については詳細に特徴づけられていない。また、疼痛機構におけるノシセプチンの生理的役割についても十分な検討はされていない。

我々は最近、マウスにおける新しい末梢性疼痛試験法を確立し(3)、ノシセプチンの用量に応じた疼痛関連作用の分子メカニズムの解析を試みた。その結果、用量に依存して侵害反応および抗侵害作用を示すことを見出した。また、ノシセプチン受容体(NOR)遺伝子欠損マウスを用い、その生理的役割についても明らかとした。

結果および考察

1. 侵害神経受容器末端におけるノシセプチン誘発性侵害および抗侵害作用

極めて低用量のノシセプチン(0.01-100 fmol)をマウス足蹠皮下に微量(2 μ l)投与すると用量依存的に侵害性屈曲反応が誘発された(Figure 1)。この極低用量による侵害性屈曲反応の情報伝達機構については種々の拮抗薬、阻害薬、アンチセンスオリゴヌクレオチドあるいはNOR遺伝子やタキキニン1遺伝子を欠損させたマウスを用いた実験成績(3)からFigure 2Aに示す様なin vivo情報伝達機構を見出すことができた(4)。すなわち、侵害反応においてノシセプチンはノシセプチン受容体に特異的に作用し、 G_i 、ホスホリパーゼC、細胞膜に局在する IP_3 受容体を介するカルシウム流入とそれに続くサブスタンスP遊離、 NK_1 受容体、 G_{o11} 、PLC、カルシウム流入、活動電位発生というメカ

ニズムが示唆された。したがって、ノシセプチンは侵害受容器末端においてそのシグナルをSPに置き換え、しかも量的にも増幅していることが示唆された。また、ノシセプチンあるいはSP誘発性侵害反応は脊髓腔にサブスタンスPアンタゴニストを投与することによって完全に抑制された(Figure 3)ことから、この反応はSP含有侵害神経を介した反応であることが示唆された。一方、この用量よりも高用量(1 pmol-1 nmol)を用いると逆に侵害反応が低下する現象が認められ、ノシセプチンはベル型用量依存性を示すことが明らかとなった(Figure 1)。さらに、この高用量は外因的に投与したサブスタンスPやブラジキニンによる侵害作用に拮抗するという結果を示した。従って、このことはNORがB₂型BKやNK₁受容体以後のレベルで干渉していることを示唆している。我々は、この受容体クロストークについてFigure 2Bに示すような仮説を立てている(4)。すなわち、ノシセプチンを高用量用いることによりG_iの活性化が増し、多量のG蛋白質βγサブユニットが生成され、サブスタンスPやブラジキニンによって活性化を受けたG_{q/11}のαサブユニットを吸収してしまう、あるいはG_iのαサブユニットがPLCに対してG_{q/11}のαサブユニットと競合してしまうという、いわゆる部分アゴニストあるいは部分アンタゴニストとして機能する可能性が示唆された。

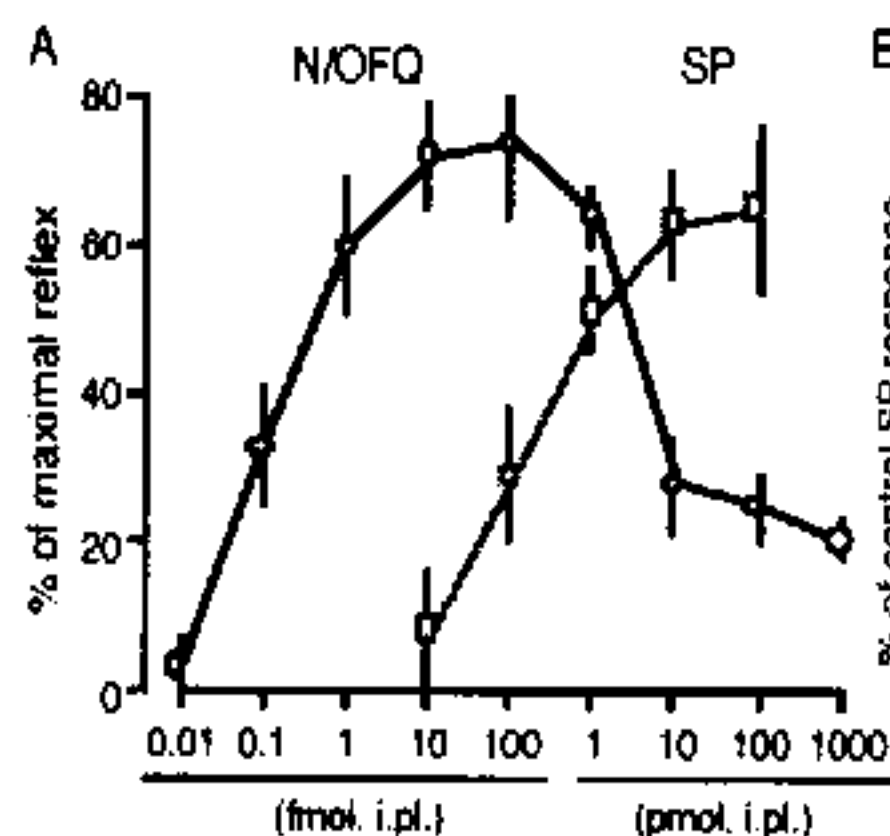


Fig. 1. Nociceptive and antinociceptive effects of N/OFQ in the peripheral nociceptive flexor test (5).

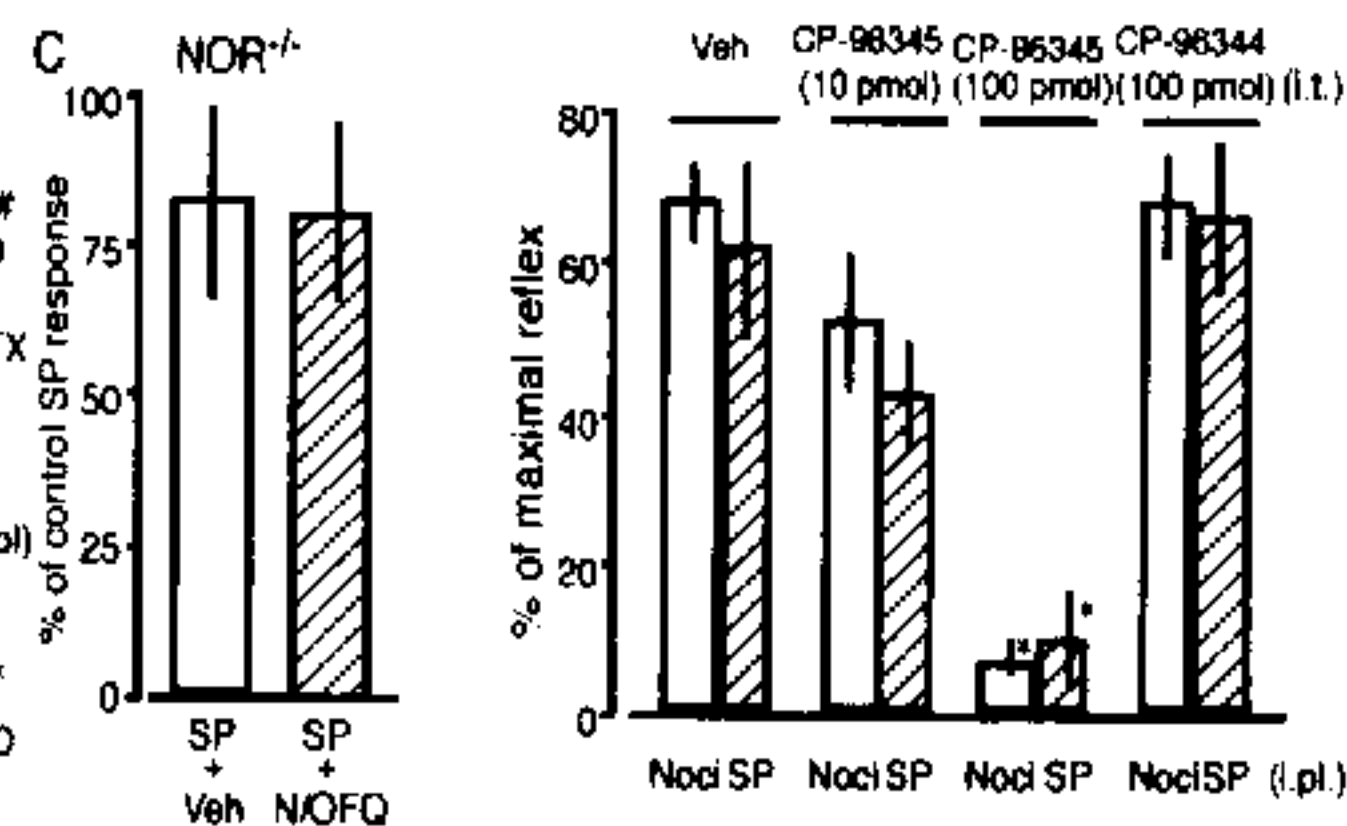


Fig. 3. Blockade of N/OFQ (or SP)-induced nociceptive flexor responses by intrathecally injected NK1 antagonist (5).

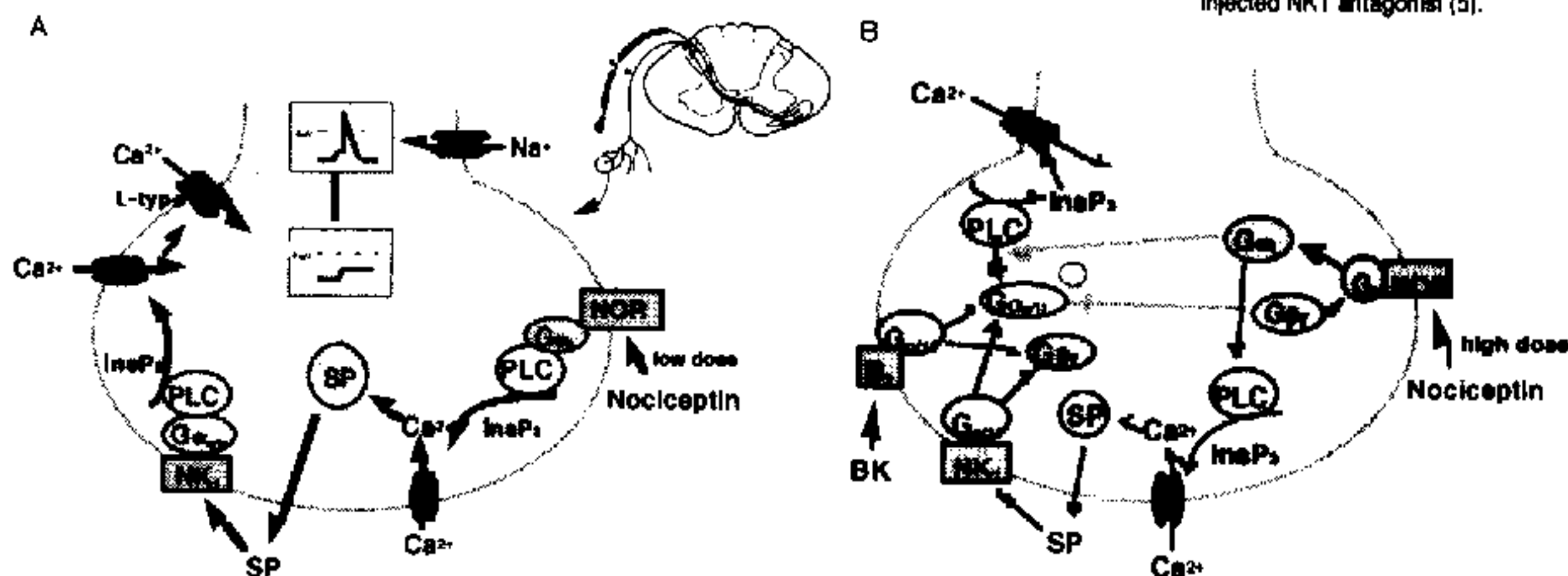


Fig. 2 Proposed model of peripheral pain transmission produced by low and high dose of nociceptin through a substance P-release from nociceptors of polymodal C fibers. Details are described in the text

2. 脊髄におけるノシセプチン誘発性侵害および抗侵害作用

極めて低用量 (3 amol-1 fmol) のノシセプチンを脊髄クモ膜下腔に投与すると、サブスタンスPを投与したときに認められる後肢による引っかかり、後肢への噛みつきあるいは舐めるといった疼痛関連行動 (SBL行動) が認められた (Figure 4)。一方、高用量 (10 fmol-1 nmol) を用いると逆に侵害反応が低下する現象が認められ、侵害神経受容器末端時と同様に、ノシセプチンはベル型用量依存性を示すことが明らかとなった (Figure 4)。この低用量による侵害反応はサブスタンスPアンタゴニストで抑制され、更にカプサイシン処理マウスやタキキニン1遺伝子欠損マウスによっては認められなかった (Figure 5)。したがって、この反応は一次知覚神経の中枢端からのサブスタンスP遊離を介していることが示唆された。一方、高用量では上述した侵害神経受容器末端における抑制機構が一次知覚神経の中枢端において認められるものと推測できる。更に、我々は一次知覚神経の受容ニューロン (脊髄後シナプス) における作用をカプサイシン処理マウスやタキキニン1遺伝子欠損マウスを用い、検討した。その結果、ノシセプチンはサブスタンスP誘発性SBL行動に対し、用量依存的抑制作用を示した (Figure 6)。

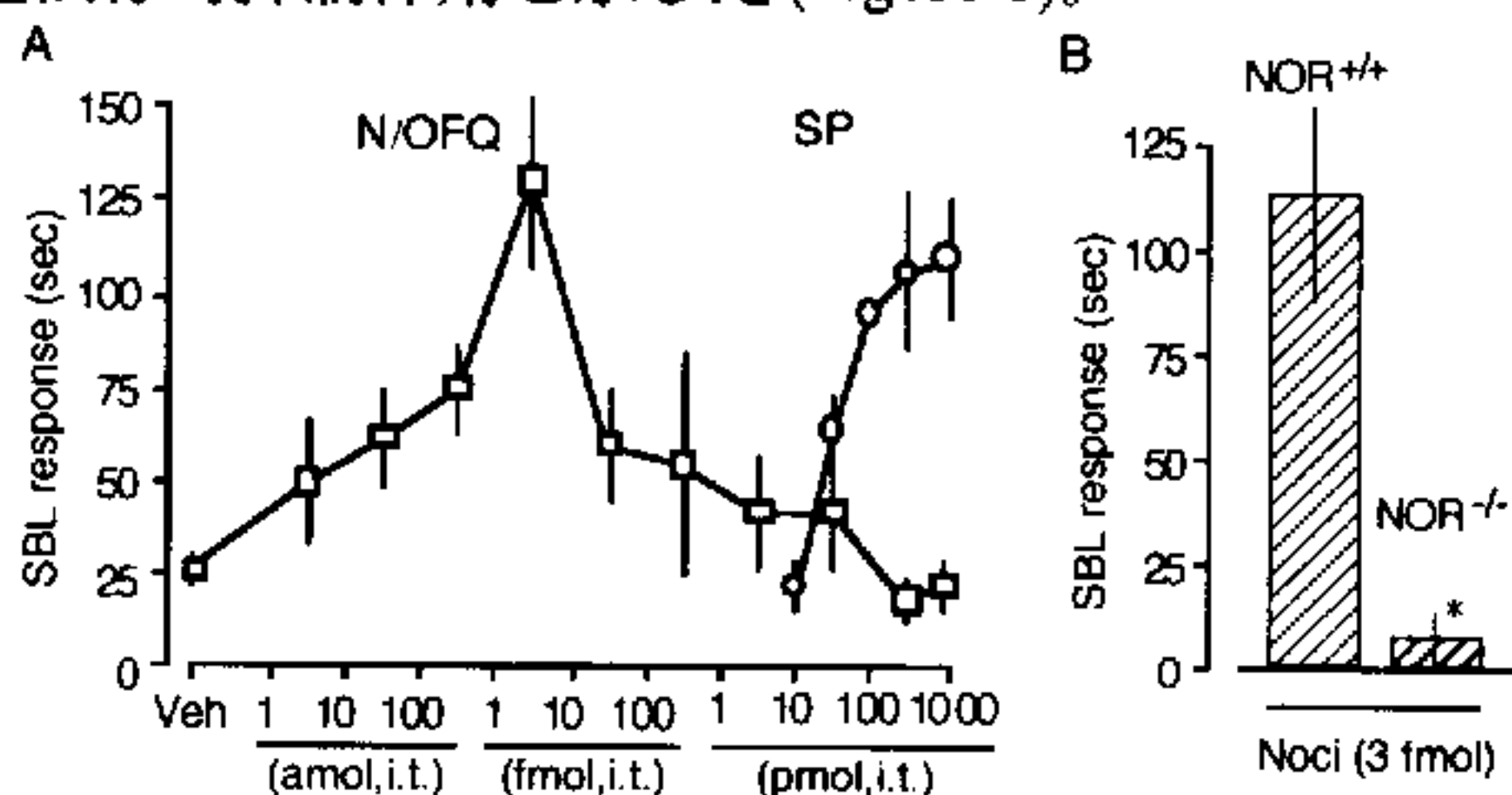


Fig. 4. Nociceptive effects of N/OFQ evaluated by nociceptive SBL responses (5).

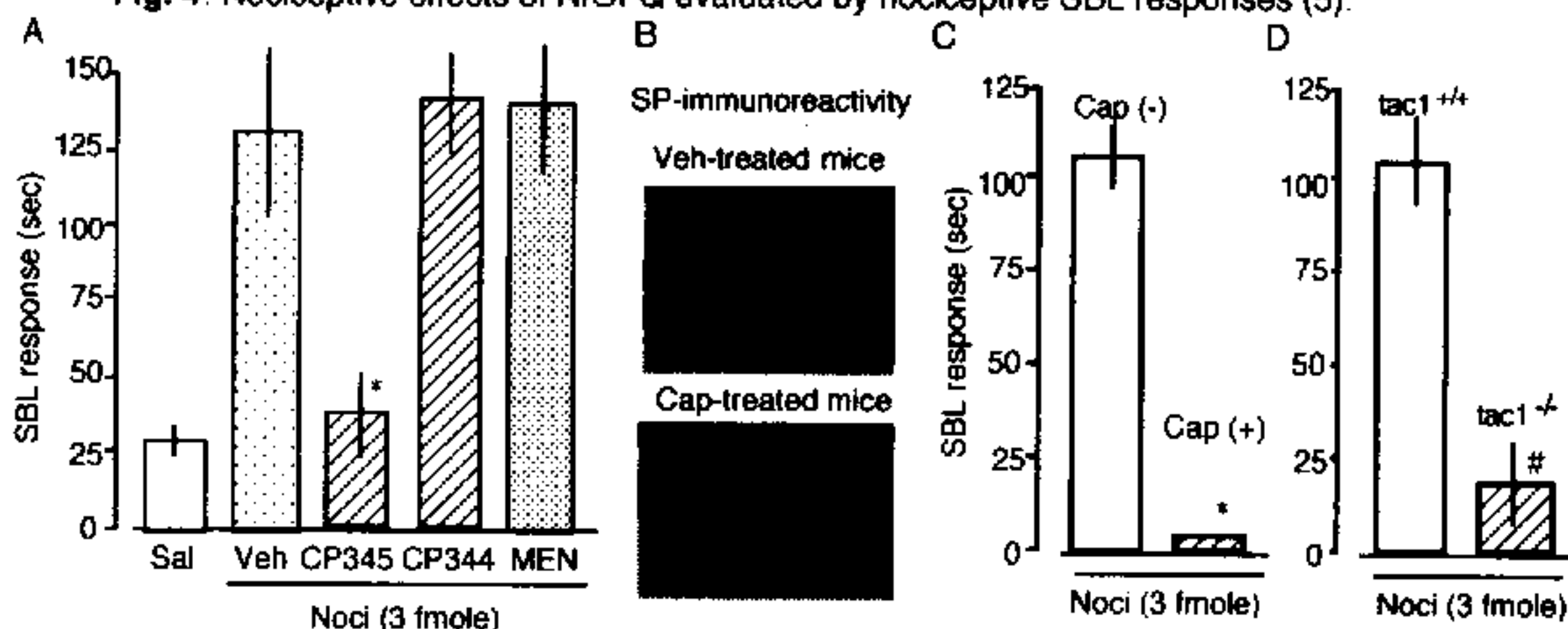


Fig. 5. N/OFQ induced SBL responses through a SP release. (5)

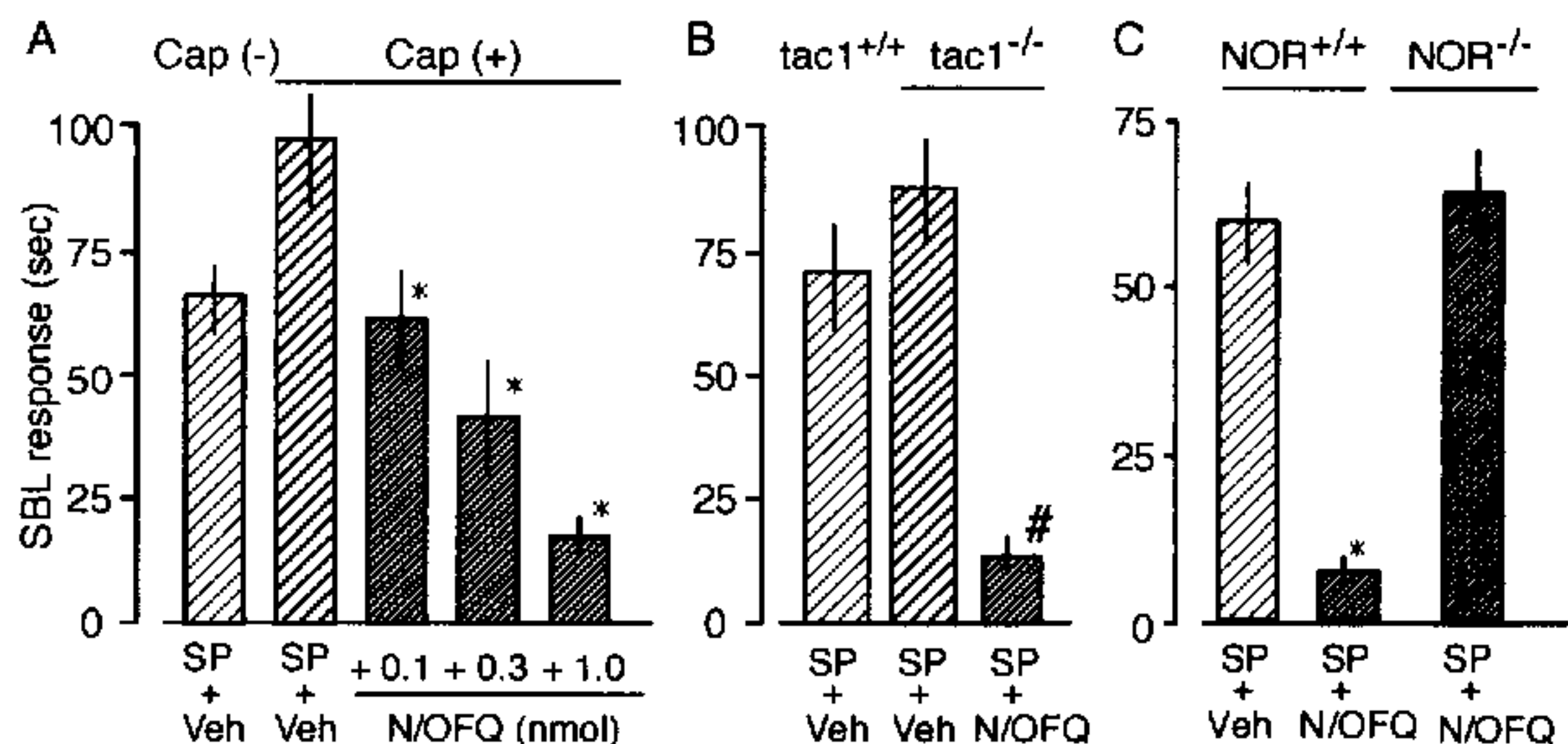


Fig. 6 Inhibitory effects of N/OFQ on SP-induced nociceptive responses in the spinal cord (5).

3. ノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスにおける痛覚過敏現象

ノシセプチンが侵害神経受容器末端および脊髄において、侵害および抗侵害の両作用を有することから、次にその生理的役割についてノシセプチン受容体遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、NOR受容体遺伝子欠損マウスにおいて、末梢投与したサブスタンスPやブラジキニンの侵害反応はその野生型マウスと比較して1000倍以上も過敏であるという成績を得ている。更に脊髄腔に投与したSPの効果にも過敏応答が認められた。従って、脊髄においてノシセプチン神経系がサブスタンスPを含むポリモーダルC線維の下流に存在し、侵害情報を抑制する方向に働く可能性が示唆された (Figure 7)。

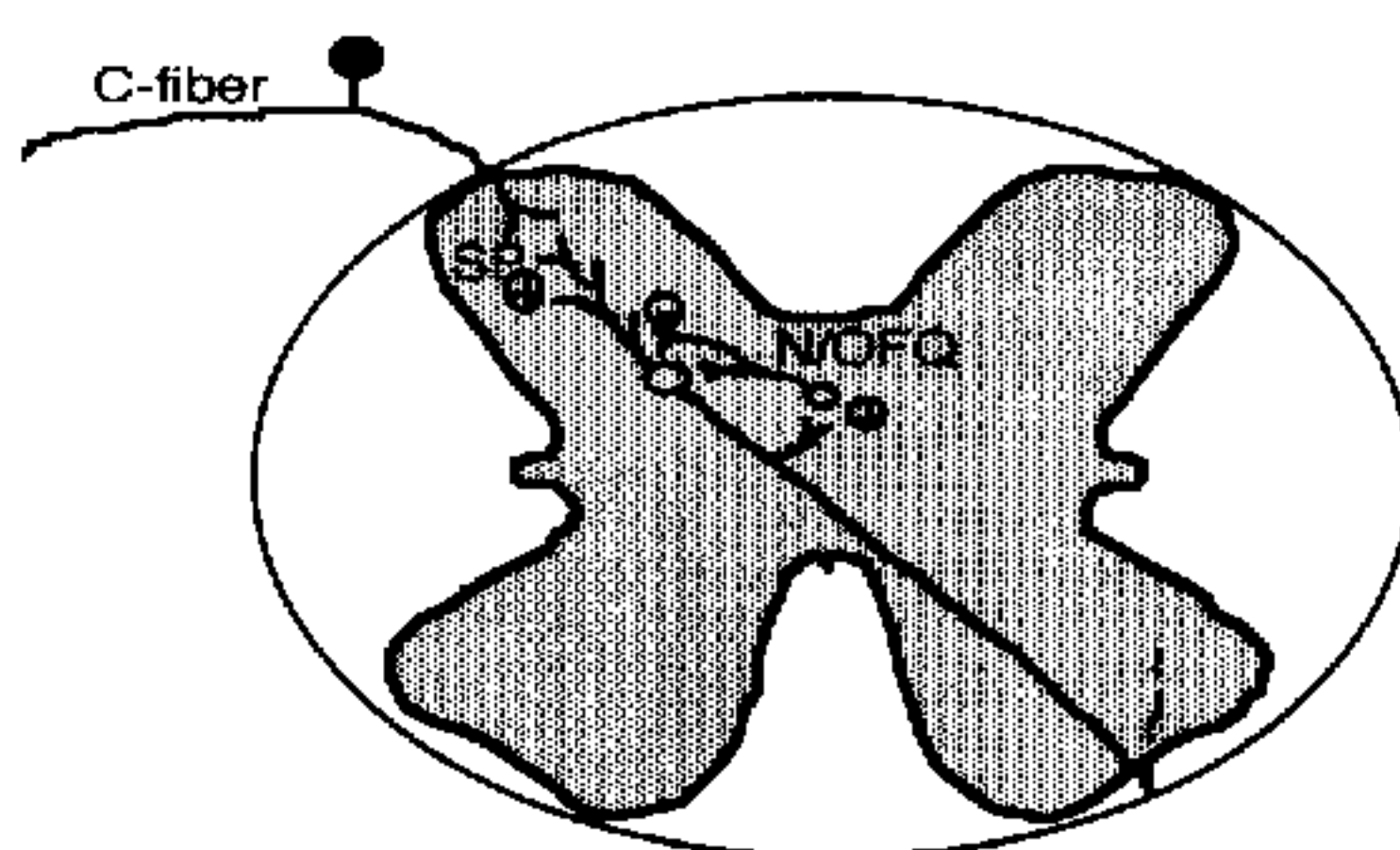


Fig. 7 Model of the *in vivo* role of N/OFQ in the postsynaps of dorsal horn of spinal cord under the physiological condition.

参考文献

- 1) Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M and Costentin J: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377,532-535 (1995)
- 2) Reischek RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ and Civelli O: Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*, 270,792-794 (1995)
- 3) Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A and Ueda H: Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95,10949-10953 (1998)
- 4) Ueda H: In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. *Jpn J Pharmacol* 79,263-268 (1999)
- 5) Inoue M, Shimohira I, Yoshida A H, Zimmer A, Takeshima H, Sakurada T and Ueda H: Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P-nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* (in press)

1-2

ノシセプチンとノシスタチンの痛覚反応

○南 敏明¹、中野弘行¹、阿部浩司²、芦高恵美子³、伊比井信廣²、
森 秀磨¹、伊藤誠二³

¹大阪医科大学麻酔科学教室、²塩野義製薬新薬研究所薬理評価部門

³関西医科大学医化学教室

〔緒言〕

演者らはマウス髄腔内に投与したプロスタグランジン (PG) E_2 と $PGF_{2\alpha}$ が生理活性物質としてはじめてアロディニア (非侵害性刺激による痛みの反応) を誘発すること、 PGE_2 が痛覚過敏反応を惹起することを見いだした (1-3)。

オピオイド受容体のクローニングはこれまで知られている3種の μ 、 κ 、 δ オピオイド受容体に加えて、第4のオピオイド受容体の存在が報告された。さらに、フランスとスイスのグループがラット、ブタから、少し遅れて、われわれの研究グループがウシから、その内因性リガンドの単離・同定に成功し、いずれも17個のアミノ酸からなるペプチドで従来のオピオイドペプチドと反対に痛覚過敏反応を誘発することからノシセプチン (nociceptin) あるいはオーファニン (orphanin) FQ と名付けられた (4-6)。演者らは、マウス髄腔内投与したノシセプチンは生理的濃度で、非侵害性触覚刺激に対してアロディニアを、侵害性熱刺激に対して痛覚過敏反応を誘発することを明らかにした (6, 7)。

今回、演者らは、ノシセプチンと同じ前駆物質 prepronociceptin から切り出されたノシスタチン (nocistatin) (8, 9) の脊髄における痛覚反応を検討し以下の知見を得た。

〔実験方法〕

アロディニア

マウス (雄、体重 20 ± 2 g) を用い、無麻酔下にノシセプチン、その他の薬剤 $5 \mu\text{l}$ を髄腔内に投与した。アロディニアは、一群を6匹とし対照は生食 $5 \mu\text{l}$ 投与群とした。薬剤投与5分後より、5分毎にアロディニアを50分間観察しスコアで表した。アロディニアのスコアは、0:変化なし、1:触覚刺激を加えようとする筆から逃げる、啼く、2:触覚刺激により激しく啼く、勢いよく逃げるとした。

ホットプレート試験

ホットプレート試験は、一群を10匹とし対照は生食 $5 \mu\text{l}$ 投与群とした。ノシセプチンおよび PGE_2 髄腔内投与15 および30分後にホットプレート試験 (55°C) を行い、熱刺激に対する逃避反応時間を指標とした。

ホルマリン試験

2% ホルマリン $20 \mu\text{l}$ をマウス後肢に皮下注射し、ホルマリン投与から10分間を第1

相とし、ホルマリン投与 10 分後から 30 分後までの 20 分間を第 2 相とし、ホルマリンを皮下注された後肢を噛んだり舐めたりする時間の総和を第 1 相、第 2 相で集計した。

[結果]

ノシスタチンによるアロディニアの抑制作用

ウシノシセプチン前駆体は 176 個のアミノ酸からなり、プロセシングペプチドにより、ノシセプチン以外に bPNP-2 から bPNP-5 の 4 種類のペプチドの存在が予想された(図 1)。それらのペプチドはそれ自体用いた用量では痛覚反応を誘発しなかったが、図 2 に示すように、bPNP-3 (ノシスタチン) はノシセプチンのアロディニアを用量依存的に抑制した。ノシスタチンはノシセプチンだけでなく PGE₂ および PGF_{2α} のアロディニアも抑制した。

	signal peptide	
Bovine	NRILFCOLLILSLFSSVSSSCQDCLVCHKEKLPFELDEFLEDCILECEKXFTSPFWF	60
Human	--V-L-----F-----R---T-Q---H-L---D--V-----V-F-----	60
Mouse	-----VILLKLLSVFSECFEDCLTQCKLELPAPDSFN-KT---Q---V-PR---V	60
Rat	NRILFCOVILLKLLSVFSECFEDCLTQCKLELPAPDSFN-KL---Q---V-PR---L	60
bPNP-2		
Bovine	CTKVARGGNGQLSPADPDEVAALDQFRASEQKLEKPRVRSLSFGKQ-----	109
Human	CTKVARGGNGQLSPADPDEVAALDQFRASEQKLEKPRVRSLSFGKQ-----E	109
Mouse	CTKVARGGNGQLSPADPDEVAALDQFRASEQKLEKPRVRSLSFGKQ-----	120
Rat	CTKVARGGNGQLSPADPDEVAALDQFRASEQKLEKPRVRSLSFGKQ-----	114
bPNP-3 (Nocistatin)		
Bovine	QEPFGLLEVGRIRKQLQKFGFTGARKSARLANQKSEFMRQYLVLNQSSQKPKK	169
Human	QEPFGLLEVGRIRKQLQKFGFTGARKSARLANQKSEFMRQYLVLNQSSQKPKK	169
Mouse	DAEPGADDAEVEKQLQKFGFTGARKSARLANQKSEFMRQYLVLNQSSQKPKK	180
Rat	DAEPGADDAEVEKQLQKFGFTGARKSARLANQKSEFMRQYLVLNQSSQKPKK	174
bPNP-4		
Bovine	LNQNGHA	176
Human	LNQNGHV	176
Mouse	LNQNGHV	187
Rat	LNQNGHV	181

図 1. Prepronociceptin のアミノ酸配列

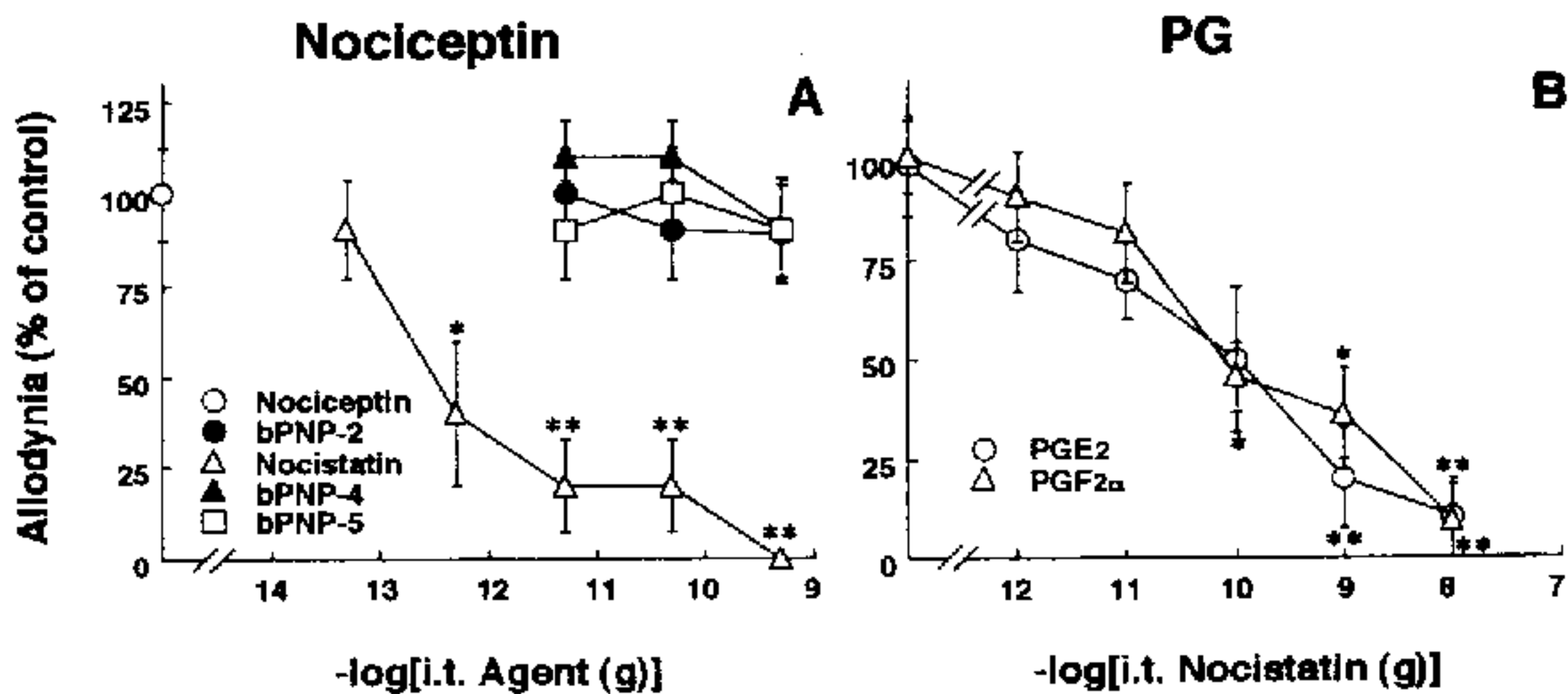


図 2. ノシスタチンによるアロディニアの抑制

A: ノシセプチン (50 pg) と様々の濃度のノシスタチン、bPNP-2、bPNP-4、bPNP-5 を同時に髄腔内投与して 10 分後にアロディニアを評価した。縦軸のアロディニアは触覚刺激に対する反応で評価し、ノシセプチン単独で誘発されるアロディニアの強さを 100% とした。

B: PGE₂ (10 ng) または PGF_{2α} (1 μg) と様々の濃度のノシスタチンを同時に髄腔内投与してそれぞれ 5 または 15 分後にアロディニアを評価した。

ノシスタチンによる痛覚過敏反応の抑制作用

マウス髄腔内投与したノシセプチンおよび PGE_2 は、侵害性熱刺激に対して痛覚過敏反応を誘発するが、ノシスタチンは、ノシセプチンと PGE_2 で惹起される痛覚過敏反応も抑制した (図 3)。

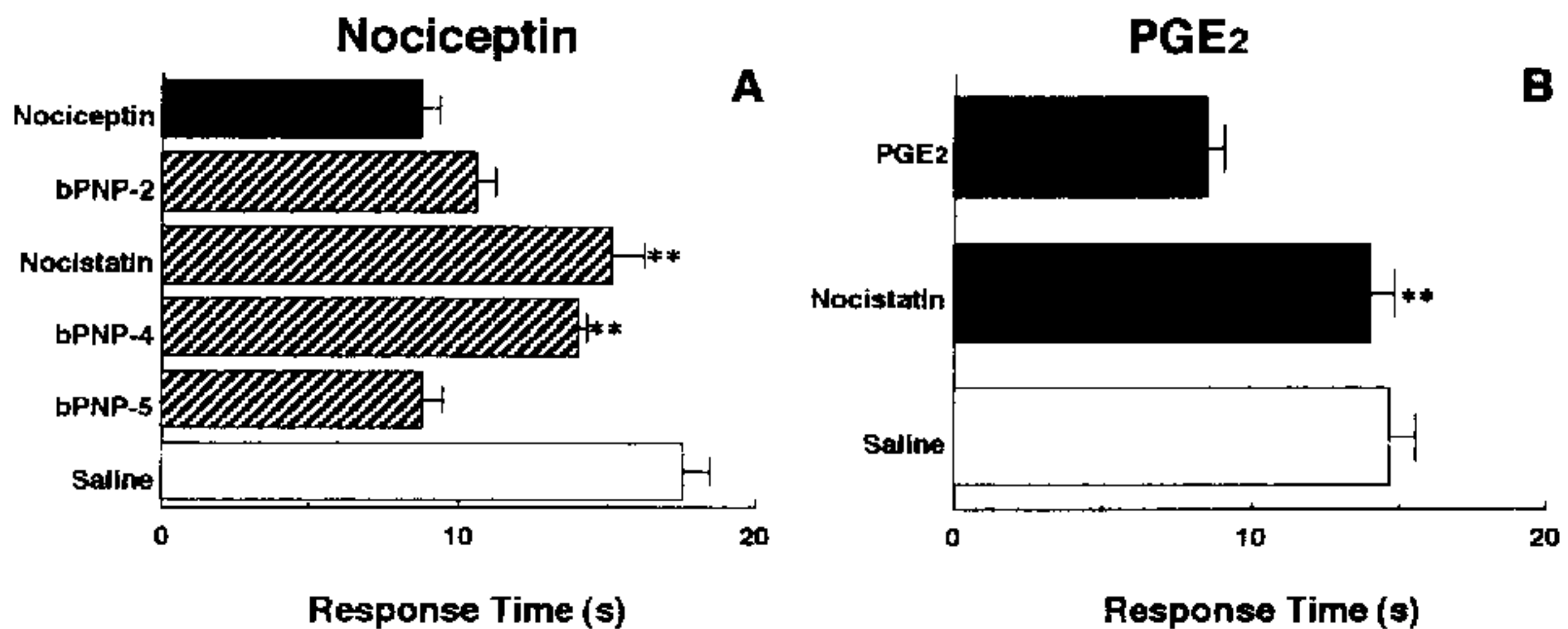


図 3. ノシスタチンによる痛覚過敏反応の抑制

A: ノシセプチン (50 pg) とノシスタチン、bPNP-2、bPNP-4、bPNP-5 それぞれ 500 pg を同時に髄腔内投与して 15 分後に 55 °C のホットプレート試験で痛覚過敏反応を評価した。横軸は、55 °C の熱刺激に対する逃避反応時間を指標とした。

B: PGE_2 (10 ng) ノシスタチン 500 pg を同時に髄腔内投与して 30 分後にホットプレート試験で痛覚過敏反応を評価した。

マウスホルマリンテストに対するノシスタチンの効果

ノシスタチン髄腔内投与直後にホルマリンをマウス後肢に皮下注すると、ホルマリンテストの第 1 相は生食髄腔内投与群に比べ抑制されたが、第 2 相は抑制されなかった。このため、ホルマリンテストの第 1 相終了直後にノシスタチンを髄腔内投与するとホルマリンテストの第 2 相も生食髄腔内投与群に比べ抑制された (図 4)。

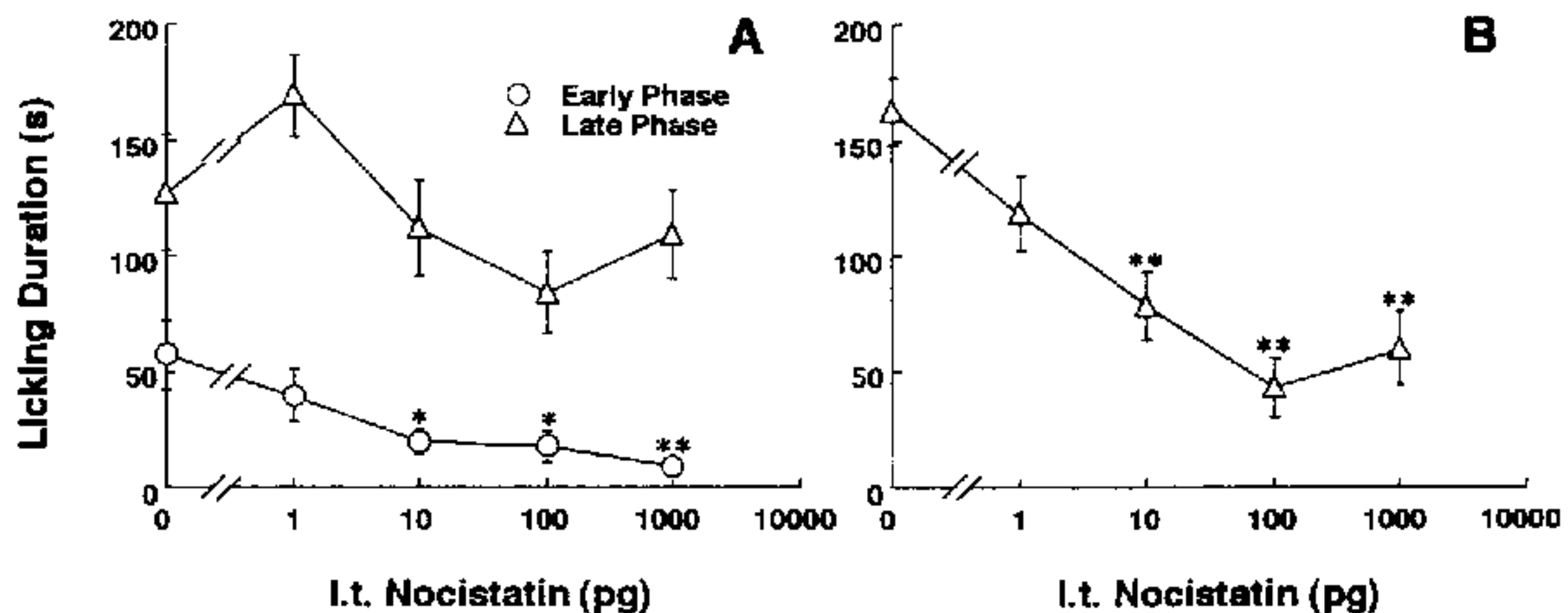


図 4. ノシスタチンによるホルマリンテストの抑制

A: 様々の濃度のノシスタチンを髄腔内投与した直後に 2% ホルマリン 20 μl をマウス後肢の皮下に投与した。

B: ホルマリンテストの第 1 相終了直後に様々の濃度のノシスタチンを髄腔内投与した。

[まとめ]

ノシスタチンは、非侵害性触覚刺激によるアロディニア、侵害性熱刺激による痛覚過敏反応、および炎症反応のホルマリンテストを抑制した(図 5)。

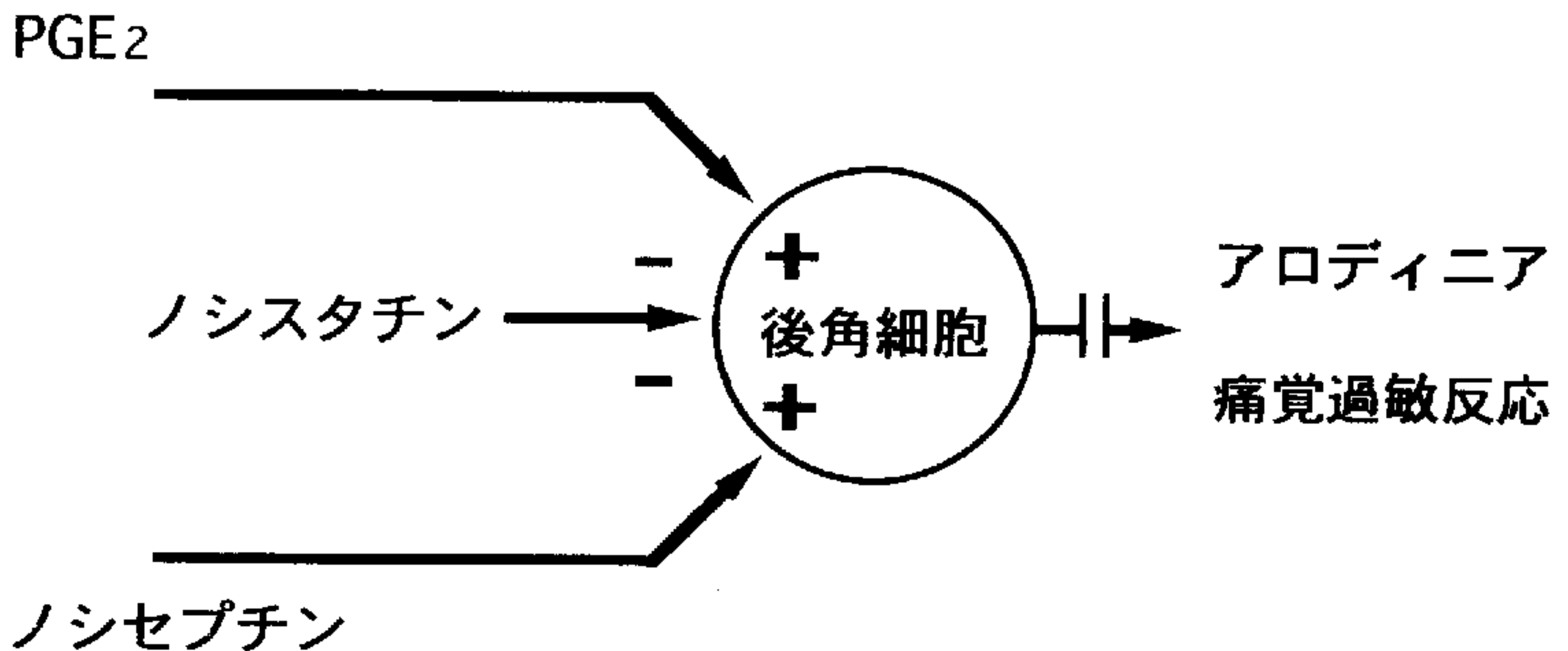


図 5. ノシスタチンによる痛覚反応の抑制

[参考文献]

- 1) Minami, T., Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M. and Hayaishi, O., Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ to conscious mice, Pain, 50 (1992) 223-229.
- 2) Minami, T., Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M. and Hayaishi, O., Allodynia evoked by intrathecal administration of prostaglandin E_2 to conscious mice, Pain, 57 (1994) 217-223.
- 3) Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M., and Hayaishi, O., Nociceptive effects induced by intrathecal administration of prostaglandin D_2 , E_2 , or $F_{2\alpha}$ to conscious mice, Brain Res., 510 (1990) 26-32.
- 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., Parmentier, M., and Costentin, J., Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor, Nature, 377 (1995) 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., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor, Science, 270 (1995) 792-794.
- 6) Okuda-Ashitaka, E., Tachibana, S., Houtani, T., Minami, T., Masu, Y., Nishi,

M., Takeshima, H., Sugimoto, T. and Ito, S., Identification and characterization of an endogenous ligand for opioid receptor homologue ROR-C: its involvement in allodynic response to innocuous stimulus, *Mol. Brain Res.*, 43 (1996) 96-104.

7) Hara, N., Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Sugimoto, T., Sakai, M., Onaka, M., Mori, H., Imanishi, T., Shingu, K., and Ito, S., Characterization of nociceptin hyperalgesia and allodynia in conscious mice, *Br. J. Pharmacol.*, 121 (1997) 401-408.

8) Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tachibana, S., Yoshihara, Y., Nishiuchi, Y., Kimura, T., and Ito, S., Nocistatin: a peptide blocking nociceptin action in pain transmission, *Nature*, 392 (1998) 286-289.

9) Minami, T., Okuda-Ashitaka, E., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Tachibana, S., Mori, H., and Ito, S., Anti-nociceptive responses produced by human putative counterpart of nocistatin, *Br. J. Pharmacol.*, 124 (1998) 1016-1018.

1-3

Nociceptin および関連アナログ [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin (1-13)NH₂ に関する 分子薬理学的、行動薬理学的解析

○稲村省吾、添田裕子、関 貴弘、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

緒言

Nociceptin は、オピオイド受容体と高い相同性を有するにも拘わらずほとんどのオピオイドリガンドと高親和性には結合しない orphan 受容体の内因性ペプチドリガンドとして単離、構造決定された。これまでに nociceptin の痛覚情報伝達系に対する作用は、投与部位、用量の違いにより痛覚過敏、あるいは抗侵害受容作用を発現するという報告があり、未だに一致した見解は得られていない。Nociceptin による生体機能調節機構の解明には、nociceptin 受容体に選択性の高いアンタゴニストが必須であるが、近年その選択的アンタゴニストとして nociceptin のアナログである [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin(1-13)NH₂ ([F/G]NC(1-13)NH₂) が報告された。しかしその後、このアナログが in vitro 実験系および in vivo 実験系においてアゴニスト作用も有することが示された。そこで、本研究では nociceptin と nociceptin 受容体アンタゴニストとされる [F/G]NC(1-13)NH₂ について、クローン化 human nociceptin 受容体を安定的に発現させた CHO 細胞を用いた in vitro での分子薬理学的検討と、マウスを用いた in vivo での行動薬理学的検討を行った。

実験方法

1 分子薬理学実験

クローン化 human nociceptin 受容体を安定的に発現させた CHO 細胞 (CHO/NociR) から調製した膜標品を用いて、0.5 nM [³H]nociceptin の結合に対する各リガンドの置換結合実験を行った。各リガンドのアゴニスト活性は CHO/NociR における forskolin 10 μM による細胞内 cAMP 蓄積に対する抑制作用を指標として評価した。[F/G]NC(1-13)NH₂ のアンタゴニスト活性は、10 nM nociceptin による細胞内 cAMP 蓄積抑制作用に対する拮抗作用を指標として検討した。

2 行動薬理学実験

実験には ddY 系雄性マウス (4 週齢、20 - 25 g) を用いた。薬物は全て脊髄く

も膜下腔内 (i.t.) に投与した。薬物投与後、観察ケージにおいて、後肢による引っ掻き様行動 (scratching)、後肢あるいは尾部をかむ (biting)・なめる (licking) などの侵害受容と関連すると考えられる嫌悪行動 (以下、SBL 行動と省略する) の発現時間を、4 分間測定、1 分間休止という手順を繰り返して 44 分まで測定した。また、マウス後肢に皮下投与したホルマリンにより惹起される疼痛関連嫌悪反応 (licking) の発現時間を SBL 行動実験と同様の手順で測定した。この場合、薬物はホルマリン投与の 10 分前に投与した。ホルマリンは 4 種の条件 (0.5 % - 10 μ l, 0.5 % - 15 μ l, 1 % - 10 μ l, 1 % - 20 μ l) で検討した結果に基づき、実験によって 1 % - 20 μ l あるいは 0.5 % - 15 μ l のいずれかを用いた。

実験結果

1 各薬物の CHO/NociR に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性

CHO/NociR において、nociceptin は K_i 値 0.35 ± 0.09 nM、[F/G]NC(1-13)NH₂ は K_i 値 5.9 ± 1.4 nM の結合能を示した。また、forskolin により誘発される cAMP 蓄積は nociceptin により濃度依存的に最大 23.3 % まで抑制され、その IC₅₀ 値は 0.18 ± 0.04 nM であった。一方、[F/G]NC(1-13)NH₂ は forskolin 誘発 cAMP 蓄積を最大 56.7 % まで抑制し、IC₅₀ 値は 15.2 ± 5.1 nM であった (図 1 A)。しかし、[F/G]NC(1-13)NH₂ の最大抑制効果は nociceptin よりも有意に弱いものであった ($P < 0.01$; Student's *t*-test)。また、最大抑制に近い作用を示す 10 nM nociceptin による cAMP 蓄積抑制効果に対して、[F/G]NC(1-13)NH₂ は 10^{-6} M において有意な拮抗作用を示した (図 1 B)。

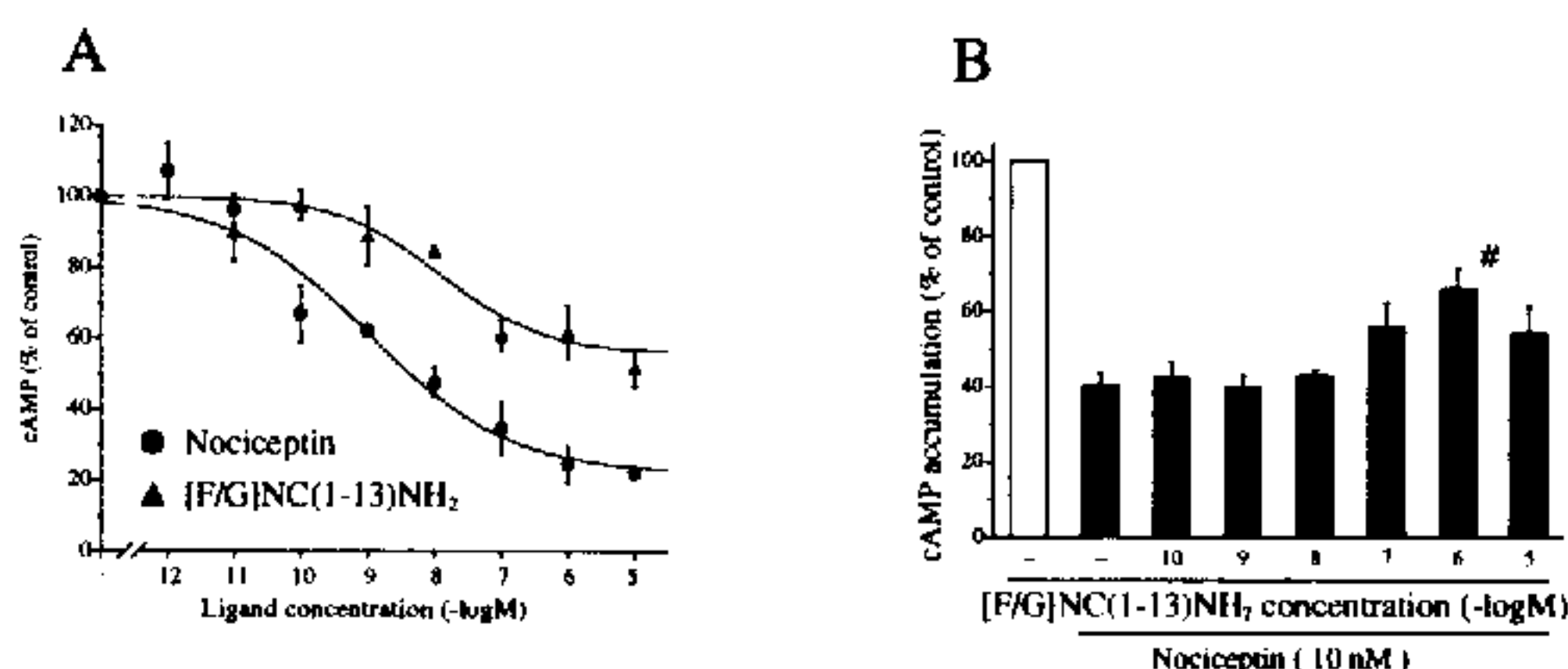


図 1 A ; CHO/NociR における forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する nociceptin および [F/G]NC(1-13)NH₂ の抑制効果。B ; CHO/NociR における nociceptin の forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果に対する [F/G]NC(1-13)NH₂ の拮抗作用。# $P < 0.01$ vs 10 nM nociceptin alone (Dunnett multiple comparisons test)

2 . 1 Nociceptin および [F/G]NC(1-13)NH₂ のマウス i.t. 投与による嫌悪行動発現

Nociceptin (0.03 – 300 amol/mouse) を i.t. 投与することにより SBL 行動が惹起され、そのほとんどは biting および licking であった。その効果を曲線下面積

(AUC) で解析すると、3 - 300 amol/mouse の nociceptin により有意に SBL 行動が惹起され、3 amol/mouse において最大効果が得られた (図 2 A)。また、[F/G]NC(1-13)NH₂ (3 - 3000 amol/mouse) を i.t. 投与することによってもマウスに SBL 行動を発現させ、nociceptin の場合と同様にそのほとんどは biting および licking であった。その効果を AUC で解析すると 30 および 300 amol/mouse の [F/G]NC(1-13)NH₂ において有意な SBL 行動が惹起され、300 amol/mouse において最大効果が得られた (図 2 B)。

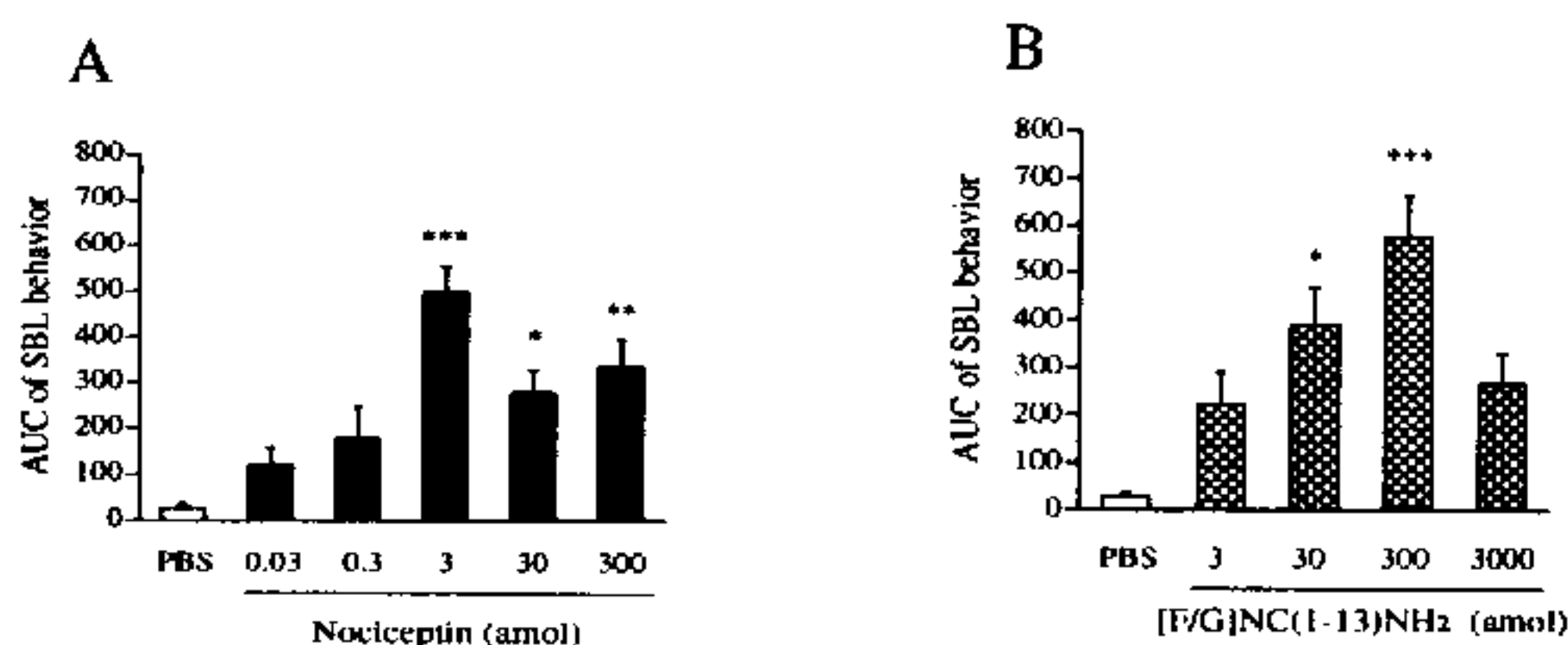


図 2 マウスにおける nociceptin (A) および [F/G]NC(1-13)NH₂ (B) により誘発される SBL 行動の曲線下面積。***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05 vs PBS (Dunn's multiple comparisons test)

2.2 ホルマリン誘発疼痛関連嫌悪反応に対する nociceptin, [F/G]NC(1-13)NH₂ の影響

マウス後肢皮下にホルマリンを投与することにより、ホルマリン投与直後および、投与後 15 - 20 分にピークを持つ 2 相性の嫌悪反応が惹起された。ホルマリンの濃度 (0.5 %, 1 %) および容量 (10 μ l, 15 μ l, 20 μ l) を組み合わせて 4 種類の条件で投与したところ、1 % - 20 μ l によってほぼ最大と思われる安定した 2

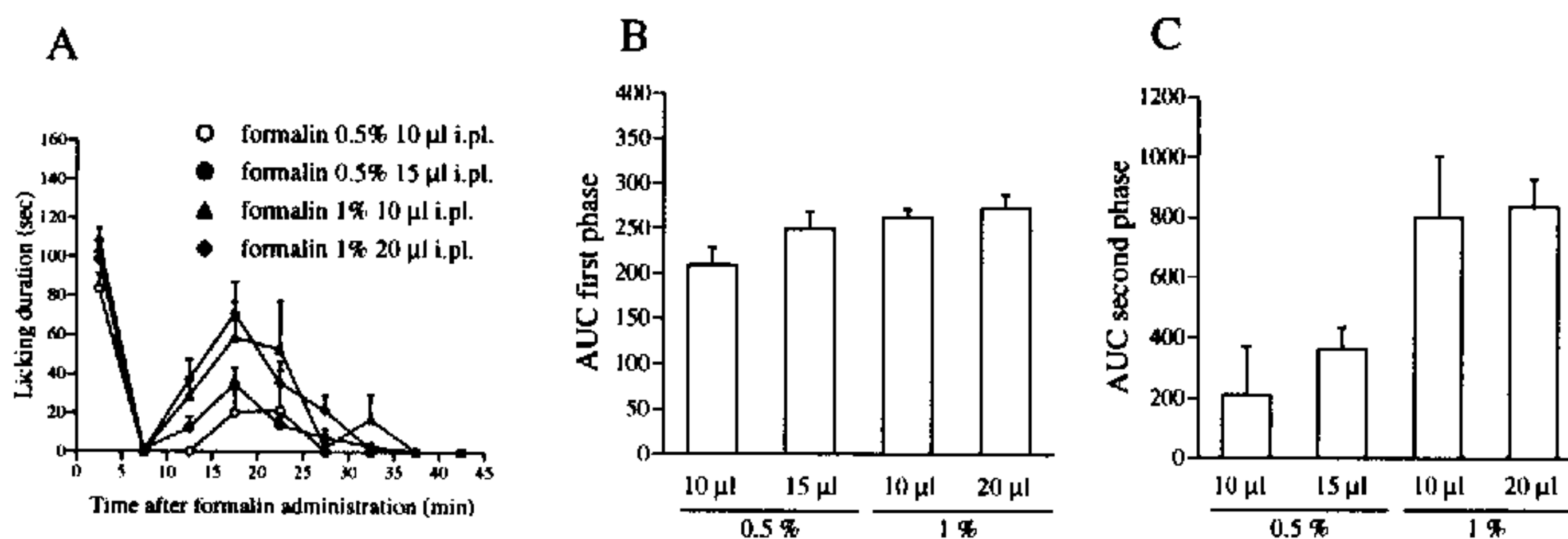


図 3 ホルマリン誘発嫌悪反応惹起作用。A; ホルマリン誘発嫌悪反応の時間経過、B; ホルマリン誘発嫌悪反応第 1 相の曲線下面積、C; ホルマリン誘発嫌悪反応第 2 相の曲線下面積。以後、抗侵害受容作用の検討にはホルマリン 1 %-20 μ l を、痛覚過敏作用の検討にはホルマリン 0.5 %-15 μ l を用いることにした。

相性を示す嫌悪反応が惹起され、0.5 % - 15 μ l によって中程度で安定した嫌悪反応が惹起された (図 3)。そこで、以後の実験では抗侵害受容作用の検討においては前者を、痛覚過敏作用の検討には後者を用いた。

Nociceptin (0.3 fmol – 3 nmol/mouse) をホルマリン (1 % - 20 μ l) 投与の 10 分前に i.t. 投与したところ、ホルマリン誘発嫌悪反応は対照群と比較して 3 nmol/mouse 投与群においてのみ、第 1 相では有意ではないものの抑制傾向が、第 2 相においては有意な抑制効果が見られた (図 4 A-C)。また、[F/G]NC(1-13)NH₂ (0.3 fmol – 3 nmol/mouse) を i.t. 投与したところ、ホルマリン誘発嫌悪反応は対照群と比較して 3 nmol/mouse 投与群においてのみ、第 1 相、第 2 相共に有意に抑制された (図 4 D-F)。

非常に低用量の nociceptin および [F/G]NC(1-13)NH₂ は有意に SBL 行動を惹起させたが、1 % - 20 μ l のホルマリンによる嫌悪反応に対して nociceptin (0.3 fmol – 0.3 nmol/mouse) および [F/G]NC(1-13)NH₂ (0.3 fmol – 0.3 nmol/mouse) は有意な作用を示さなかった。しかし、0.5 % - 15 μ l のホルマリンによる嫌悪反応に関しては、非常に低用量の 3 amol、0.3 fmol/mouse nociceptin と 0.3 fmol/mouse [F/G]NC

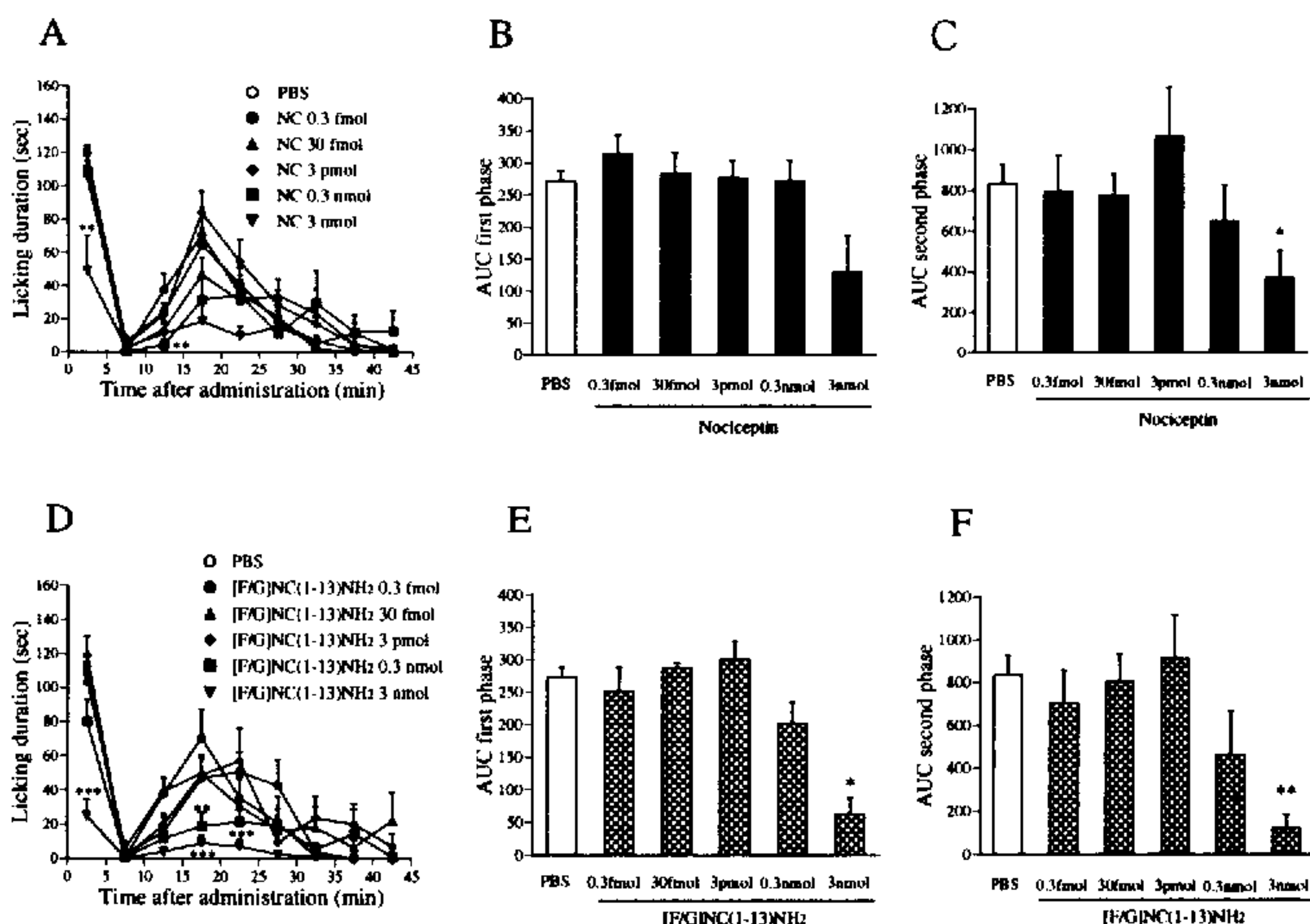


図 4 ホルマリン (1 % - 20 μ l) 誘発嫌悪反応に対する nociceptin (A-C) および [F/G]NC(1-13)NH₂ (D-F) の影響。A, D; ホルマリン誘発嫌悪反応の時間経過、B, E; ホルマリン誘発嫌悪反応第 1 相の曲線下面積、C, F; ホルマリン誘発嫌悪反応第 2 相の曲線下面積。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs PBS (Dunn's multiple comparisons test)

(1-13)NH₂ をホルマリン投与の 10 分前に i.t. 投与したところ、いずれの処置も第 1 相反応には有意な影響を及ぼさなかったが、第 2 相反応を有意に増強した (図 5)。

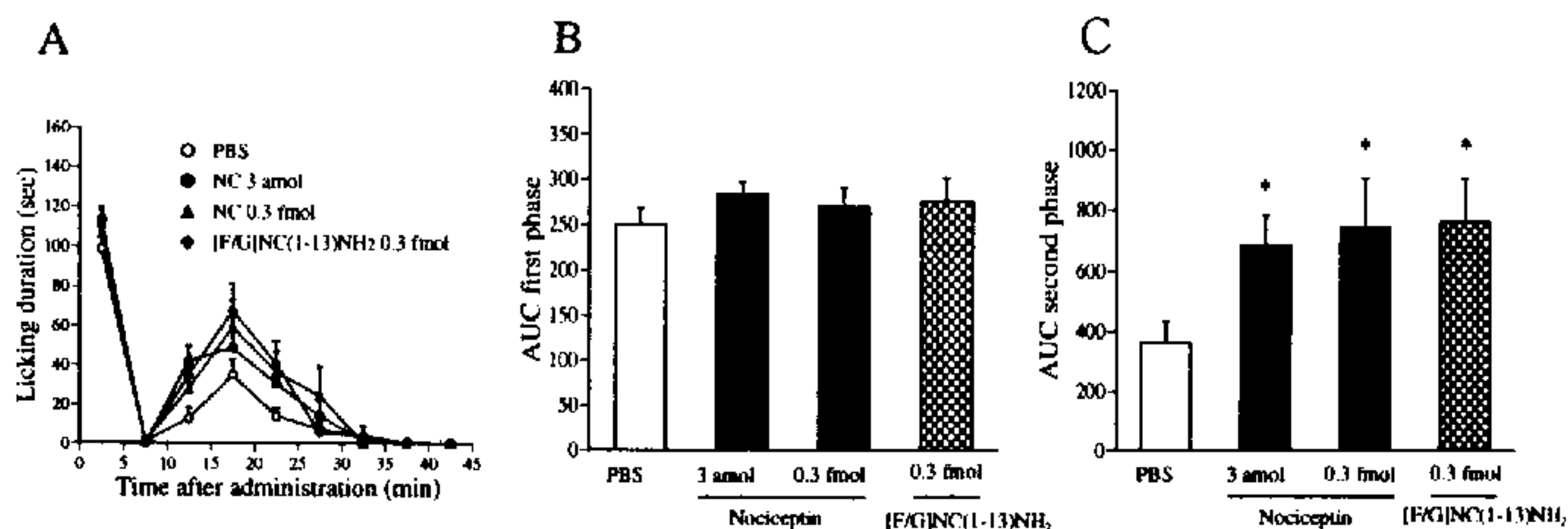


図 5 ホルマリン (0.5 %-15 μ l) 誘発嫌悪反応に対する nociceptin および [F/G]NC(1-13)NH₂ の影響。A; ホルマリン誘発嫌悪反応の時間経過、B; ホルマリン誘発嫌悪反応第 1 相の曲線下面積、C; ホルマリン誘発嫌悪反応第 2 相の曲線下面積。*P < 0.05 vs PBS (Dunn's multiple comparisons test)

考察

クローン化 human nociceptin 受容体を発現させた CHO 細胞を用いた in vitro 実験系において、[F/G]NC(1-13)NH₂ は nociceptin と同様に濃度依存的に forskolin 誘発 cAMP 蓄積を抑制したが、その最大抑制効果は nociceptin よりも有意に弱いものであった。また、ある濃度条件では [F/G]NC(1-13)NH₂ は nociceptin の cAMP 蓄積抑制作用に対して拮抗的作用を示したことから、培養細胞を用いた forskolin 誘発 cAMP 蓄積を指標とする系においては、本アナログが nociceptin 受容体に対してアゴニスト/アンタゴニストとして作用することが示唆される。また、マウスを用いた in vivo 実験系において、nociceptin を i.t. 投与することにより、amol オーダーという非常に低い用量で疼痛関連行動が惹起されることを見いだした。さらに、ホルマリン誘発嫌悪反応に対して nociceptin は、3 amol および 0.3 fmol/mouse では増強作用を、3 nmol/mouse では減弱作用を示し、用量によって両方向性の作用を有していることが示された。一方、[F/G]NC(1-13)NH₂ は、nociceptin によるこれらの作用と質的にはほぼ同様の作用を示した。このことは、in vivo 実験系においても本アナログが nociceptin と同様のアゴニスト作用を持つことを示唆している。

本研究結果は、痛覚情報伝達系において、内因性 nociceptin が促進的役割を果たしている可能性を示唆している。一方、nociceptin 受容体アンタゴニストとして報告された [F/G]NC(1-13)NH₂ は、今回の検討により、明らかにアゴニスト活性も有していることが示された。

1-4 マウス脊髄シナプス膜標品によるノシセプチンの代謝

○櫻田 誓¹, 櫻田 忍², 米沢 章彦², 櫻田 司¹

¹第一薬大・生化, ²東北薬大・機能形態

【緒言】

ノシセプチン (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腔内 (i.t.) に投与した際に痛覚過敏 (hyperalgesia) または鎮痛作用 (analgesia) を誘発するとの相反する報告¹⁾がなされている。演者らは、Nociceptin の脊髄痛覚伝達・制御機構における役割を明らかにする目的で行動薬理的手法により検討を行なってきた。その結果、極めて低用量の Nociceptin (fmol オーダー) をマウスに i.t. 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²⁾、また、tail-flick 法 (熱刺激) において侵害受容閾値の低下 (痛覚過敏)³⁾が生じること、さらにはそれらの生理作用が SP 神経系を介することを本シンポジウムで報告してきた。今回は、Nociceptin の脊髄痛覚伝達・制御機構を解明する一環として、①マウス脊髄シナプス膜標品を用いて、Nociceptin の分解に関与する膜結合性ニューロペプチダーゼを解析し、②ノシセプチン i.t. 投与によって誘発される SBL 行動に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の影響について、生化学的、行動薬理的見地から検討を加えた。

【実験方法】

マウス脊髄シナプス膜標品による Nociceptin の分解

マウス脊髄シナプス膜標品の調製は Jones と Matus⁴⁾ の方法に従った。Nociceptin 分解の測定は、逆相カラムを用いた HPLC で分解物を相互に分離し、基質 Nociceptin の減少あるいはフラグメントの生成を

追跡した。分解物の同定はアミノ酸組成分析により行った。さらに、Nociceptin の分解に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の影響を調べた。

Nociceptin i.t. 投与によって誘発される SBL 行動に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の影響

実験には体重 20 - 22 g の ddY 系雄性マウスを用い、薬物は全て、人工脳脊髄液 (CSF) で溶解した。I.t. 投与は Hylden と Wilcox⁵⁾ の方法に準じ、無麻酔下で腰椎の 5 番と 6 番の間の髄腔内へ 50 μ l 用マイクロシリンジを用い、5 μ l / mouse の割合で投与した。測定はケージから約 1 m 離れて行い、SBL 行動の持続時間を i.t. 投与直後から、5 分間隔で 20 分測定した。

【実験結果】

マウス脊髄シナプス膜標品による Nociceptin の分解

マウス脊髄シナプス膜標品により Nociceptin は SP と同様に時間依存的に分解された。分解物の生成を調べたところ、フラグメント (1-13) が時間経過に伴って増加し、主要な代謝産物であることが明らかとなった。次に、Nociceptin の最初の分解にどのようなペプチダーゼが関与するかを明らかにするため、基質 Nociceptin の減少に対するペプチダーゼ阻害剤の効果を調べた。その結果、金属キレート剤である o-フェナントロリンによって強い阻害作用が観察された。また、エンドペプチダーゼ-24.11 (NEP) の特異的な阻害剤であるホスホラミドン、チオルファンでは 30 % の阻害効果が得られたが、アンジオテンシン変換酵素の特異的な阻害剤であるカプトプリル、アミノペプチダーゼの特異的な阻害剤であるベスタチン、さらにはセリンプロテアーゼ阻害剤やシステインプロテアーゼ阻害剤では、ほとんど阻害されなかった。また、フラグメント (1-13) の生成に対するペプチダーゼ阻害剤の効果を調べたところ、ホスホラミドン、チオルファンによって強く阻害されたが、他の阻害剤の添加では影響されなかった。以上のことから、マウス脊髄シナプス膜標品による Nociceptin 分解の初期に NEP および金属感受性のメタロペプチダーゼが関与することが明らかとなった。さらに、主要代謝産物であるフラグメント (1-13) が、

NEPの特異的な阻害剤で抑えられることから、フラグメント(1-13)の生成に NEP が関与していると考えられる。

Nociceptin i.t.投与によって誘発される SBL 行動に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の影響

Nociceptin (0.3-30000 fmol) i.t.投与により、SP i.t.投与によって見られるのと同様の SBL 行動が観察された。Nociceptin は 3.0 fmol 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、3.0 fmol の Nociceptin を用いた。次に、Nociceptin i.t.投与によって誘発される SBL 行動に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の影響をしらべたところ、ホスホラミドンが投与後 20 分間に誘発される SBL 行動を用量依存的に増強させた。一方、ベスタチン (1.0 nmol)、カプトプリル (1.0 nmol)、システインプロテアーゼ阻害剤である PHMB (4.0 nmol) は Nociceptin 誘発性 SBL 行動に対し無影響であった。

【考察】

神経ペプチドの生成と分解は、その生理作用の発現との関連において巧妙に制御されている。神経ペプチドの寿命はアセチルコリンとのアナロジーで、細胞膜に結合している膜結合型のペプチダーゼの作用により調節されと考えられている。

現在までに、Nociceptin 代謝に関する研究がいくつか報告^{6,7)}されているが、可溶性の酵素や脳スライスを用いた研究であり、必ずしも膜結合性酵素に焦点をあてたものではない。そこで、マウス脊髄シナプス膜標品を用いて、Nociceptin の分解に関与する膜結合性ニューロペプチダーゼを解析した。その結果、脊髄シナプス膜標品による Nociceptin の分解に NEP が関与していること、さらに、Nociceptin i.t.投与によって誘発される SBL 行動に対しても NEP が関与していることが明らかになった。免疫組織化学的解析により、NEP が脊髄に局在している報告⁸⁾を考えあわせると、脊髄シナプスでの Nociceptin の代謝に NEP が主要な役割を演じていると考えられる。

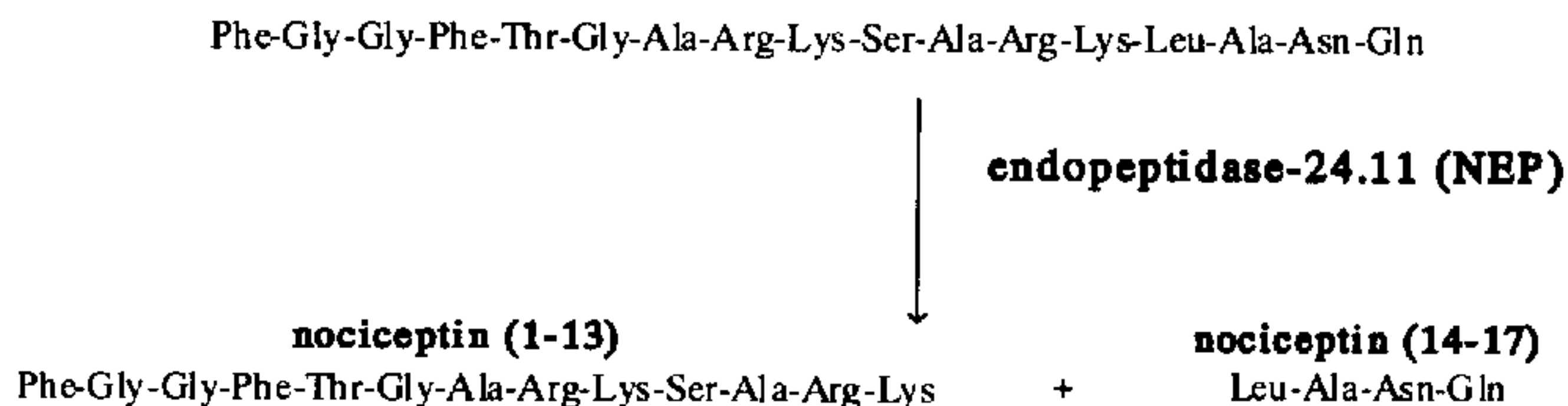


Fig.1 Scheme for degradation of nociceptin by synaptic membranes of mouse spinal cord

【文献】

- 1) Henderson, G. and McKnight, A. T. **TIPS** **18**. 293-300 (1997)
- 2) Sakurada, T. et al. **Br. J. Pharmacol.** in press (1999)
- 3) 勝山 壮ら, 第 19 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム要旨集
- 4) Jones, D. H. and Matus, A. **Biochem. Biophys. Acta.** **356**. 276-287 (1974)
- 5) Hylden, J. L. K. and Wilcox, G.L. **Eur. J. Pharmacol.** **67**. 313-316 (1980)
- 6) Montiel, J. L. et al. **J. Neurochem.** **68**. 354-361 (1997)
- 7) Valskovska, M et al. **Brain Res.** **818**. 212-220 (1999)
- 8) Pollard, H. et al. **Neuroscience** **30**. 339-376 (1989)

○平松正行, 井上かおり
(名城大・薬・薬品作用)

Nociceptin は, dynorphin A (1-17) と高い相同性を持つ内因性のペプチドであるが, 従来のオピオイド受容体には結合せず, opioid receptor like-1 受容体 (ORL1 受容体) に結合する¹⁾. Nociceptin は, 実験に用いる用量, 投与時間の違いによって, 痛覚過敏を誘発したり, 抗侵害作用を示す²⁾. また, 自発運動量を増加させたり³⁾, 減少させたりする⁴⁾ など, 相反する作用を有することが報告されている. Nociceptin を脳内に投与すると, 水迷路試験において, 学習・記憶が障害されたり⁵⁾, 海馬における長期増強 (LTP) が抑制されること⁶⁾, ORL1 受容体をノックアウトすると, 空間的注意力や潜在学習能力が増強されること⁷⁾, また, LTP が増強されたり, 水迷路試験において, 逃避するまでの時間が短縮したりすること⁸⁾なども報告されている. 今回は, nociceptin の学習・記憶行動に対する作用が, 痛みや自発運動量に対する作用のように, 用量により相反する作用を持つか否かを, 自発的交替行動法および受動的回避学習法を用いて検討した.

【方法】

実験には6-7 週齢のddY 系雄性マウス (30-35 g)を用いた.

自発的交替行動法: マウスをY字型迷路のいずれかのアームの端に入れ, 8分間に入ったアームの数 (総エントリー数) を記録し, 異なる3つのアームに連続して入った回数から自発的交替行動率を求めた.

受動的回避学習法: ステップダウン型の装置を用い, 訓練試行においてマウスに間欠的な電気ショック (1 Hz, 0.5 sec, 80 V, D.C.) を15秒間負荷した. 訓練試行の24時間後, 訓練試行と同様にマウスをプラットフォーム上のせ, のせてから床グリッドに下りるまでの時間 (ステップダウン潜時) を測定した.

薬物処置: 高用量側の nociceptin として0.5, 1.5 または 5.0 nmol/mouse を, 低用量側の nociceptinとして, 1, 10, 100 または 1,000 fmol/mouse を, nociceptinの作用に生理的に拮抗することが報告されている

nocistatin (0.5 または 5.0 nmol/mouse) は、自発的交替行動測定あるいは受動的回避学習法における訓練試行の30分前にエーテル麻酔下で側脳室内に投与した。κ 3-オピオイド受容体作動薬である naloxone benzoylhydrazone (NalBzoH, 2.3, 11.2 または 22.4 μmol/kg, s.c.) または、κ 1-オピオイド受容体拮抗薬である nor-binaltorphimine (n-BNI, 4.9 nmol/mouse) は、それぞれ行動実験の30分前に投与した。Scopolamine (自発的交替行動法では1.65 μmol/kg, 受動的回避学習法では0.1 μmol/kg) および dizocilpine ((+)-MK-801; 0.3 μmol/kg) は、ペプチド投与の直前に皮下投与した。

【結果】

1. 自発的交替行動法：正常マウスに低用量の nociceptin を側脳室へ投与しても、自発的交替行動率に変化は見られなかったが、高用量の nociceptin (1.5 および 5.0 nmol/mouse) を投与すると、自発的交替行動率が有意に減少した (Fig. 1(A))。この自発的交替行動の障害は、nociceptin の抗侵害作用に拮抗することが報告されている nocistatin (5.0 nmol/mouse) および κ 3-オピオイド受容体作動薬である NalBzoH (2.3 μmol/kg) により有意に拮抗された。一方、低用量の nociceptin (10 および 100 fmol/mouse) は、scopolamine により誘発される自発的交替行動の障害を有意に改善したが (Fig. 2(A))、高用量の nociceptin は改善作用を示さなかった。

非競合的 N-methyl-D-aspartate 受容体拮抗薬である (+)-MK-

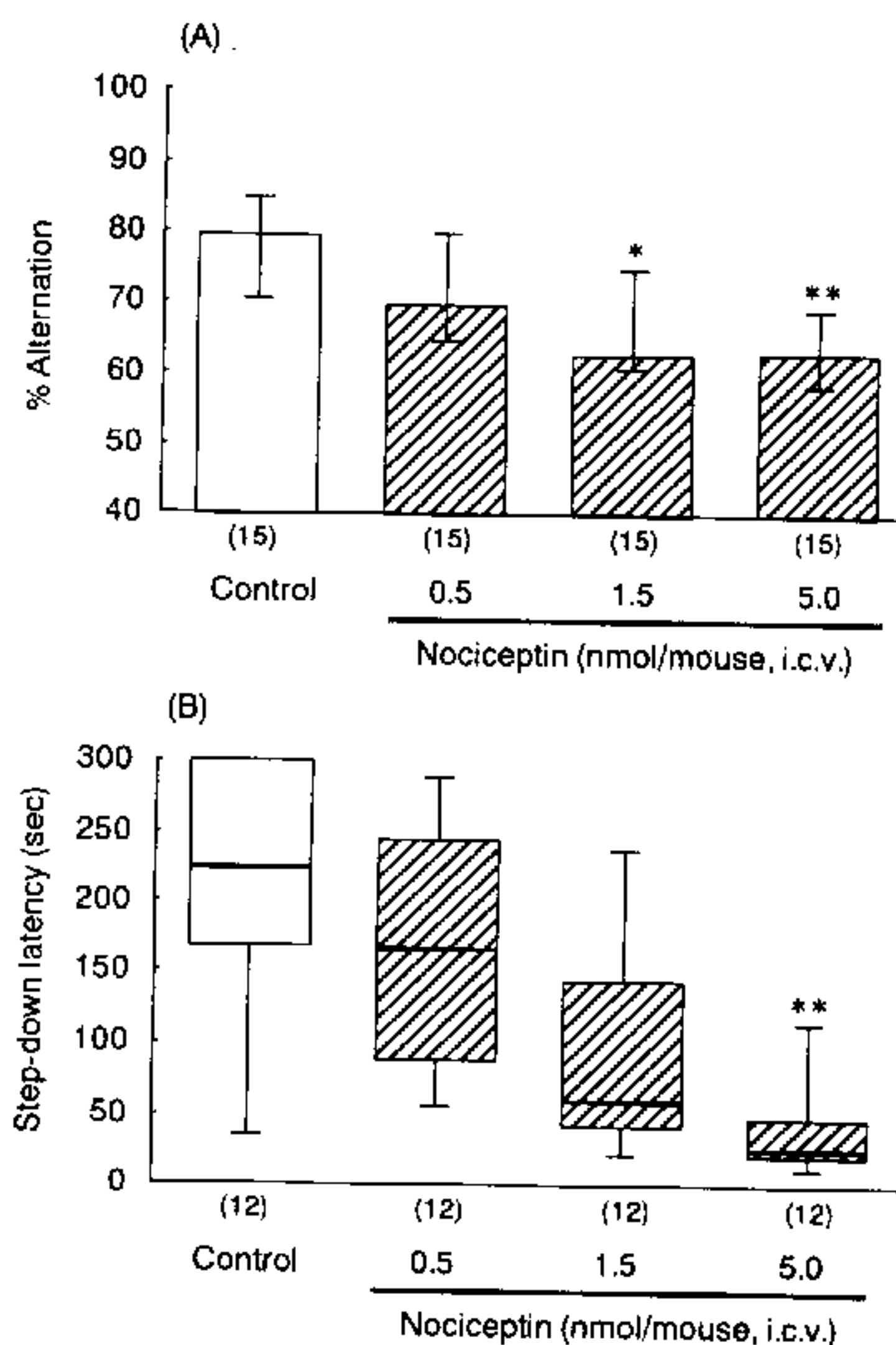


Fig. 1. Effects of nociceptin on percent alternation in Y-maze (A) and step-down latency in passive avoidance task (B) in normal mice.

Mice were treated with nociceptin (0.5 - 5.0 nmol/mouse, i.c.v.) 30 min before testing. Values are shown as the median and range. N shows the number of mice used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control (Bonferroni's test).

801により誘発される学習・記憶障害に対して、低用量の nociceptin は改善作用を示さなかった。

Nocistatin は、高用量の nociceptin による自発的交替行動の障害を有意に改善したが、scopolamine により誘発される自発的交替行動の障害を改善する低用量の nociceptin の作用には、拮抗作用を示さなかった。また、NalBzoH や、 $\kappa 1$ -オピオイド受容体拮抗薬である n-BNI も、低用量の nociceptin による改善作用を抑制しなかった。

2. 受動的回避学習法：高用量側の nociceptin (5.0 nmol/mouse) を訓練試行30分前に側脳室内へ投与すると、ステップダウン潜時は有意に短縮し、学習・記憶行動の障害が認められた (Fig. 1(B))。この作用は、nocistatin (5.0 nmol/mouse) を併用投与することにより、有意に改善された。一方、scopolamine により誘発される学習・記憶行動の障害に対して、この用量の nociceptin は有意な作用を示さなかった。一方、低用量の nociceptin (100 fmol/mouse) は、scopolamine により誘発される受動的回避学習の障害を有意に改善した (Fig. 2(B))。

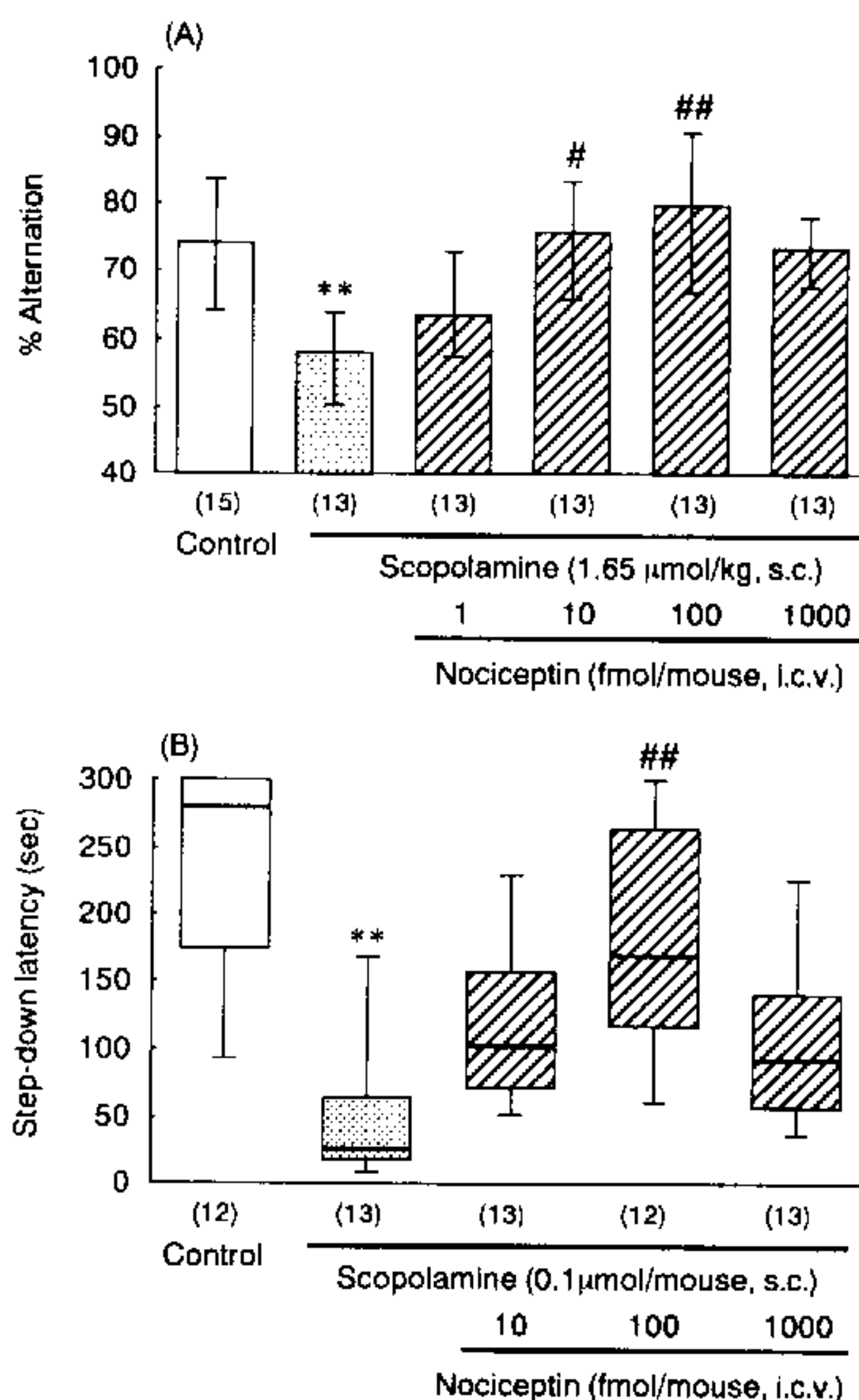


Fig. 2. Effects of nociceptin on scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation in Y-maze (A) and step-down latency in passive avoidance task (B) in mice. Mice were treated with nociceptin (1 - 1,000 fmol/mouse, i.c.v.) 30 min before testing. Scopolamine was injected immediately before nociceptin. Values are shown as the median and range. N shows the number of mice used. ** $p < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney's U-test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. scopolamine alone (Bonferroni's test).

【考察】

比較的高用量の nociceptin は、以前からの報告^{5,7,8)}と一致し、正常マウスで学習・記憶行動を障害するが、低用量の nociceptin は、逆に scopolamine による学習・記憶障害を改善することが明らかとなった。また、高用量の nociceptin 投与による学習・記憶行動の障害に対し、nocistatin や nociceptin による痛覚過敏を減弱させる $\kappa 3$ -オピオイド受容体作動薬の NalBzoH⁹⁾ は拮抗作用を示したが、低用量の nociceptin による改善作用は減弱されなかった。さらに、低用量の nociceptin による改善作用は、 $\kappa 1$ -オピオイド受容体拮抗薬である n-BNI によっても拮抗されなかった。最近の報告で、nociceptin が結合する受容体には、サブタイプがあることが推察されている^{9,10)}。今回の結果は、低用量の nociceptin による作用は、従来から報告されている ORL1 受容体とは異なった部位に作用していることが考えられた。

以上の結果より、nociceptin は脳内で学習・記憶行動の調節にも重要な役割を持ち、痛みや自発運動量に対する作用のように、用量の違いによって相反する作用を持つことが明らかとなった。グルタミン酸受容体遮断による学習・記憶障害に対し、nociceptin は著明な作用を示さなかったので、nociceptin による脳内の学習・記憶行動の調節には、主にアセチルコリン神経系が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., Parmentier, M. and Costentin, J. (1995) *Nature*, **377**: 532-535.
- 2) Rossi, G.C., Leventhal, L., Bolan, E. and Pasternak, G.W. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**: 858-865.
- 3) Florin, S., Suaudeau, C. Meunier, J.C. and Costentin, J. (1996) *Eur. J. Pharmacol.*, **317**: 9-13.
- 4) 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. (1995) *Science*, **270**: 792-794.
- 5) Sandin, J., Georgieva, J., Schott, P.A., Ogren, S.O. and Terenius, L. (1997) *Eur. J. Neurosci.*, **9**: 194-197.
- 6) Yu, T.P., Fein, J., Phan, T., Evans, C.J. and Xie, C.W. (1997)

Hippocampus, **7**: 88-94.

- 7) Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H. and Nabeshima, T. (1998) *Brain Res.*, **783**: 236-240.
- 8) Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T. and Takeshima, H. (1998) *Nature*, **394**: 577-581.
- 9) Mathis, J.P., Ryan-Moro, J., Chang, A., Hom, J.S.H., Scheinberg, D.A. and Pasternak, G.W. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 462-465.
- 10) Pan, Y.X., Cheng, J., Xu, J., Rossi, G., Jacobson, E., Ryan-Moro, J., Brooks, A.I., Dean, G.E., Standifer, K.M. and Pasternak, G.W. (1995). *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1180-1188.