

氏 名	しょう だ たけ ひろ 正 田 文 裕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2495 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Activation of μ -opioid receptor induces expression of c-fos and junB via mitogen-activated protein kinase cascade (μ オピオイド受容体の活性化により MAP キナーゼ系を介して c-fos および junB の発現が誘導される)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 柴 崎 浩 教 授 福 田 和 彦

論 文 内 容 の 要 旨

麻薬性鎮痛薬ならびに内因性オピオイドペプチドの作用の基盤となるオピオイド受容体は G 蛋白共役受容体の一種で、薬理学的には 3 種類 (μ , δ , κ) に大別される。3 種類のオピオイド受容体はいずれもアデニル酸シクラーゼの抑制、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの抑制、内向き整流型 K^{+} チャンネルの活性化など、様々な細胞応答を引き起こす。申請者らは以前に、cDNA 導入によってオピオイド受容体を発現させた培養動物細胞を用いて、本受容体をアゴニストで刺激する事により extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) が活性化されることを示した。今回、 μ オピオイド受容体 (MOR) 刺激が ERK の活性化を介して遺伝子発現を誘導する可能性を検討した。

ラット MOR を安定発現させた Chinese hamster ovary 細胞を使用した。RNA プロット解析の結果、MOR 活性化により、immediate early gene である c-fos および junB の発現が誘導されること、その発現は百日咳毒素 (PTX) あるいは MEK 阻害薬 PD98059 の前処置により抑制されることが明らかになった。この結果は、MOR 活性化により、PTX 感受性 G 蛋白 (Gi あるいは Go) および ERK を介して immediate early gene の発現が誘導されることを示している。

次に、c-fos および junB の発現誘導機構を明らかにするため、ERK の基質として知られている転写因子 Elk-1 の活性調節についてレポーターアッセイにより検討した。Elk-1 の転写活性化ドメインを含む融合蛋白を発現するプラスミドを細胞に導入し、アゴニスト DAMGO あるいはモルヒネで刺激すると、Elk-1 が磷酸化され、Elk-1 による転写活性が約 10 倍上昇するが、PTX あるいは PD98059 による前処置を行うと MOR 活性化による転写活性の上昇は観察されなかった。c-fos と junB の転写調節領域には Elk-1 が関与する部位が存在する。従ってこの結果は、ERK は Elk-1 を磷酸化することにより c-fos および junB の発現を誘導する可能性を示唆する。

MOR 活性化により発現が誘導される c-Fos と JunB は Fos-Jun ファミリーに属する転写因子である。そこで、Fos-Jun ファミリーが構成する 2 量体 AP-1 の転写活性を検討するため、ルシフェラーゼ cDNA の上流に 7 個の AP-1 結合領域を持つプラスミドを細胞に導入してレポーターアッセイを行った。その結果、MOR 刺激で AP-1 を介する転写活性が約 2 倍に上昇することが示された。さらに、electrophoretic mobility shift assay の結果、MOR 活性化により AP-1 の DNA 結合活性が上昇すること、AP-1 の構成因子には c-Fos, JunB が含まれることが明らかになった。

以上の結果は、MOR 刺激により ERK 系を介して c-Fos, JunB の発現が誘導されることを示し、さらに誘導された c-Fos, JunB が AP-1 を構成して他の遺伝子の発現が誘導される可能性を示唆している。

疼痛治療の目的で臨床的に広く用いられているモルヒネを代表とする麻薬性鎮痛薬は MOR を活性化することにより、その多彩な薬理活性を示す。モルヒネ連用に対して生じる耐性、依存性は、MOR の活性化により生じる神経細胞機能の可塑的な変化がその基盤となると考えられる。本研究で示された、MOR 活性化により誘導される遺伝子発現の変化は、可塑的な神経細胞機能の変化を惹起して耐性や依存性の成立に関与する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

麻薬に対する耐性、依存性の成立には遺伝子発現の変化が関与する可能性があるが、未解明の部分が多い。本研究では、麻薬の主な作用点である μ オピオイド受容体(MOR)活性が、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)を介して遺伝子発現を誘導する可能性を検討した。

MORを安定発現させたCHO細胞においてMOR活性化によりc-fosおよびjunBのmRNA発現が誘導され、この反応は百日咳毒素とMEK阻害薬PD98059で抑制されることから、GiあるいはGoとERKを介することが示唆された。c-fosとjunB遺伝子の転写調節領域にはERKの基質である転写因子Elk-1の結合部位が存在するが、MOR活性化によりElk-1を介する転写活性が上昇することから、ERKがElk-1を磷酸化することによりc-fos, junBの発現を誘導する可能性が示唆された。さらに、MOR活性化で転写因子AP-1を介する転写活性が上昇し、c-Fos, JunBで構成されるAP-1のDNA結合が増加することが明らかとなり、麻薬によってc-Fos, JunBを介する遺伝子発現が誘導される可能性が示唆された。

以上の研究は、麻薬による遺伝子発現変化の分子機構の解明に貢献し、麻酔科学の発展および疼痛管理法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位投与申請者は、平成14年3月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。