

麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムおよび
その制御に関する行動および分子薬理学的研究

2000

中川 貴之

麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムおよび
その制御に関する行動および分子薬理学的研究

2000

中川 貴之

目次

緒言	1
第一章 プロスタグランジン E ₂ 受容体 EP ₃ サブタイプ選択的アゴニストの 脳室内投与によるナロキソン誘発モルヒネ禁断症状抑制作用	3
実験方法	4
実験結果	9
第一節 モルヒネ依存マウスにおける各種プロスタグランジン受容体ア ゴニストの大槽内投与によるナロキソン誘発跳躍行動への影響	9
第二節 モルヒネ依存ラットにおける EP ₃ アゴニストの側脳室内投与に よるナロキソン誘発禁断症状抑制作用	11
第三節 EP ₃ アゴニストによるナロキソン誘発禁断症状抑制機構の検討	15
考察	19
第二章 クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的 処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性形成メカニズムに 関する検討	23
実験方法	24
実験結果	27
考察	42
総括および結論	47
謝辞	48
発表論文目録	49
引用文献	50

緒 言

モルヒネはケシ由来のアルカロイドで、鎮痛薬として古くから用いられており、現在でもなお優れた鎮痛薬として世界保健機構により特に癌末期患者の除痛のための使用が推奨されている。しかしながら、モルヒネは呼吸抑制、消化管運動抑制、吐き気などの副作用を持ち、さらに、その連続的使用により容易に身体的および精神的依存を生じる、いわゆる強い「麻薬」性を有し、そのことは臨床における適用を制限するだけでなく、薬物濫用に伴う種々の社会問題の原因ともなっている。そのような麻薬性鎮痛薬による依存形成・禁断症状発現のメカニズムを解明し、制御することは、依存を生ぜずに強い鎮痛効果を有する新規な鎮痛薬、あるいは禁断症状に対する有効な治療薬の創製つながる重要な基礎的知見となり得る。

現在、臨床において麻薬依存患者の治療には、methadone や buprenorphine などのオピオイド類、あるいは clonidine (α_2 アドレナリン受容体アゴニスト) といった薬物が用いられており、その作用機序に関して研究がなされている。一方、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関しても、これまでに数多くの研究がなされてきたが、未だ不明な点が多く残されている。1970年代半ばに、神経細胞様の性質を有する株化培養細胞 (NG108-15 細胞、SH-SY5Y 細胞など) において、モルヒネをはじめとする各種オピオイドアゴニストはセカンドメッセンジャーである細胞内 cAMP 生成を抑制するが、その持続的な適用により cAMP 生成抑制作用が減弱し、さらにアゴニスト退薬時には cAMP 産生系が過剰に活性化され、いわゆる "cAMP overshoot" 現象が起こることが報告された。後に、青斑核などの脳部位においても同様の現象が起こることが確認され、このアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の代償的な過感受性が、麻薬依存形成・禁断症状発現に関与している可能性が指摘されている。本研究において著者は、 G_i 蛋白質と共役し AC を抑制することが知られているプロスタグランジン E_2 受容体 EP_3 サブタイプの選択的アゴニストの脳室内投与により、モルヒネ禁断症状が抑制されることを見だし、その抑制機構の一部にノルアドレナリン神経の起始核である青斑核におけるモルヒネ退薬時の神経興奮の抑制が関与していることを明らかにした。さらに麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、アゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成のメカニズムについて、クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いた検討を行った。その結果、 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体いずれのタイプを発現させた CHO 細胞においても、アゴニスト持続的処置により AC 系の過感受性は、比較的短時間 (数分~数時間) のうちに形成された。また、その形成には新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達系の機能的な変化が関与していることが示された。しかしながら、各種プロテインキナーゼ阻害薬によっても、その形成に影響は見られず、また、過感受性形成時に GTPase 活性の変化は見られなかった。さらに、オピ

オイド受容体と各種キメラ α_{12}/α_q を共発現させたCHO細胞を用いた検討を行った結果、過感受性の形成には α_{12} のACとの連関に関与する領域 (Met²⁴⁴-Asn³³¹) の存在と機能保持が必要であるが、AC以降の細胞内情報伝達系の機能的変化の関与は少ないことを示した。また、AC系の過感受性は百日咳毒素非感受性 α_z を介しても形成されることを明らかにした。

これらの研究成果について、以下二章に分けて論述する。

なお本文中あるいは表中で使用した略号は以下のとおりである。

AC:	adenylyl cyclase
ATP:	adenosine 5'-triphosphate
cAMP:	cyclic adenosine monophosphate
cDNA:	complementary DNA
CHO:	Chinese hamster ovary
DPDPE:	Tyr-D-Pen-Gly-D-Pen-OH
DTT:	dithiothreitol
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX:	3-isobutyl-1-methylxanthine
LC:	locus coeruleus
M&B28,767:	(±)-15 α -Hydroxy-9-oxo-16-phenoxy-17,18,19,20-tetranorprost-13-trans-enoic acid
mRNA:	messenger RNA
norBNI:	norbinaltorphimine
PBS:	phosphate buffered saline
PTX:	pertussis toxin
RNase A:	ribonuclease A
RT-PCR:	reversed transcription-polymerase chain reaction
SDS:	sodium lauryl sulfate
SSC:	saline-sodium citrate
TCA:	trichloroacetic acid
TH:	tyrosine hydroxylase
tRNA:	transfer RNA
U69,593:	(+)-(5 α , 7 α , 8 β)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidiny)-1-oxaspiro-(4, 5) dec-8-yl] benzeneacetamide
UTP:	uridine-5'-triphosphate

第一章

プロスタグランジン E₂ 受容体 EP₃ サブタイプ選択的 アゴニストの脳室内投与による ナロキソン誘発モルヒネ禁断症状抑制作用

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は有用な鎮痛薬として臨床で用いられているが、高度の身体的・精神的依存を形成することが問題となっている。しかしながら、麻薬性鎮痛薬による依存形成あるいは禁断症状発現のメカニズムの詳細については、未だ明らかにされていない。一方、麻薬依存患者の治療には、methadone、buprenorphine あるいは clonidine といったような薬物が用いられており [1]、その作用機序に関して多くの研究がなされている。麻薬性鎮痛薬はオピオイド受容体を介してその薬理作用を発揮するが、麻薬依存形成・禁断症状発現には、オピオイド受容体だけでなく他の種々の神経伝達物質あるいは神経修飾物質の受容体を介した神経情報伝達の変化が関与していると考えられる。例えば、 α_2 アドレナリン受容体アゴニストであるクロニジンは、主として、モルヒネ退薬時に見られる青斑核を中心とするノルアドレナリン神経の興奮を抑制することにより、様々な禁断症状を抑制するものと考えられている [2-4]。さらに、最近では、興奮性アミノ酸 [5、6]、substance P [7-9]、neuropeptide FF [10]、cannabinoid [11]、あるいはサイトカイン [12、13] といった神経伝達物質あるいは神経修飾物質の関与も指摘されている。近年、モルヒネ依存マウスにおいて、サイトカインの一種である interleukin-1 β を脳室内に投与することによりモルヒネ禁断症状が抑制されること [14]、またこの抑制作用は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるサリチル酸を前処置しておくことにより減弱したことから、その抑制機構の一部には脳内プロスタノイド合成系が関与していることが報告された。そこで本研究では、このプロスタノイド類に着目した検討を行った。シクロオキシゲナーゼ系により産生される主要なプロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) E₂、PGD₂、PGF_{2 α} 、プロスタサイクリン (PGI₂)、トロンボキサン (TXA₂) であり、それぞれに対応する受容体として EP、DP、FP、IP、TP があり、さらに EP には4つのサブタイプが存在し、EP₁、EP₂、EP₃、EP₄ と呼ばれている [15、16]。著者は、まず、これらのうちのいくつかのプロスタノイド受容体に対するアゴニストを脳室内に投与し、ナロキソン誘発モルヒネ禁断症状に対する影響を行動薬理的に検討した。

一方、最初期遺伝子の一つである *c-fos* は *jun* とヘテロダイマーを形成し、種々の遺伝子の発現を調節することが知られており、また、*c-fos* mRNA およびその蛋白質の発現が神経興奮により短時間のうちに一過性に増加することから、従来より、その発現誘導は中枢神経系における神経興奮のマーカーとして用いられてきた [17、

18]。近年では、モルヒネ禁断時においてもラット脳内において *c-fos* mRNA および蛋白質の発現が誘導されることが報告されている [19-21]。本研究では、行動薬理的検討により、モルヒネ禁断症状に対して抑制作用を有することが示された EP₃ アゴニストによる禁断症状抑制機構を明らかにするために、モルヒネ退薬時に誘発される神経興奮が、EP₃ アゴニストにより抑制される脳部位を *c-fos* mRNA の発現を指標として検討した。さらに、脳内の広範な領域にノルアドレナリン神経線維を投射し、身体的依存形成や禁断症状発現に深く関与していることが報告されている青斑核 [22-25] に関しては、*c-fos* mRNA 発現の定量的解析を行うとともに、 μ オピオイド受容体 mRNA あるいは EP₃ 受容体 mRNA とカテコールアミン含有神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素 mRNA との共存をダブル *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。

実験方法

モルヒネ依存マウスを用いた検討

(1) 使用動物

実験には、体重 20 - 25 g の ddY 系雄性マウス (4 週齢) を使用した。10 ~ 20 匹を 1 つのケージに入れ、12 時間毎の明暗周期 (明期 8:00 ~ 20:00) 下に飼育し、自由に水及び餌を摂取させた。

(2) マウス用モルヒネペレットおよび薬物の調製

Molecular sieve 4A 1/8 (ナカライテスク株式会社、京都) および塩酸モルヒネ (武田薬品工業株式会社、大阪) より、Hui と Roberts [26] の方法に従って、塩酸モルヒネ 11.5 ± 0.3 mg を含有する徐放性のモルヒネペレットを作製した。塩酸ナロキソン (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) は生理的食塩水で溶解した。M&B28,767 (Rhone-Poulenc Rorer Ltd, Dagenham, U.K.)、butaprost (Bayer Ltd, Slough, U.K.)、sulprostone (Schering AG., Berlin, Germany) および PGF_{2 α} (フナコシ株式会社、東京) はエタノールに溶解し、-20 °C で保存した。使用時、エタノールを窒素ガスで揮発させ、PBS で溶解した。Iloprost (Schering AG、0.1 mg/ml 水溶液で供与された) は PBS で希釈した。

(3) モルヒネ依存マウスの作製および禁断症状の誘発

まず、最初に tail pinch 法における侵害刺激閾値を指標にマウスを選択した。すなわち、動脈クレンメ (圧力約 500 g) で肛門粘膜を含む尾根部をはさみ、2 秒以内にかみつきの行動を示すマウスのみを以後の実験に使用した。マウス用モルヒネペレットを 1 日目に 1 個、頸背部皮下に埋め込み、3 日目に実験に用いた。再び tail pinch 法により、モルヒネペレットが埋め込まれているにも拘わらず、2 秒以内にかみつ

き行動を示すモルヒネ耐性を獲得したマウスのみを選択し、以後の実験に用いた。マウスをプラスチックシリンダー（直径 25 cm、高さ 30 cm）に入れ、30 分間環境に慣らした後、ペレットを無麻酔下で除去し、vehicle（PBS）あるいは各薬物を、Ueda らによって考案された大槽内投与法により [27]、5 μ l の容量で投与した。大槽内投与 30 分後に、ナロキソン（10 mg/kg）を腹腔内に投与し、ナロキソンにより誘発される典型的な禁断症状の一つである跳躍行動の回数を 40 分間計数した。

モルヒネ依存ラットを用いた検討

（4） 使用動物

実験には、体重 200 - 250 g の Sprague-Dawley 系ラット（6 - 7 週齢）を使用した。入荷後、少なくとも 1 日は飼育室内で飼育後、側脳室内投与に用いるガイドカニューレの埋め込み手術を行った。手術後は、1 匹ずつケージに隔離して飼育した。

（5） ガイドカニューレの埋め込み手術

ガイドカニューレは外径 0.7 mm のステンレス製パイプを用いた。ラットをペントバルビタール（50 mg/kg）麻酔下、脳定位固定装置に固定し、頭皮を正中線に沿って切開した。骨膜を除去した後、瞬間接着剤で頭蓋骨表面をコートした。脳室内投与用ガイドカニューレは bregma から尾側へ 0.8 mm、外側へ 1.5 mm の位置にドリルで穴を開けて挿入し、先端が頭蓋骨表面から 2 mm のところで留置した。ガイドカニューレを頭蓋骨に歯科用セメントで固定した後、頭皮を縫合した。動物は少なくとも 4 - 5 日間の回復期間の後、手術による傷が十分回復したことを確認してから実験に用いた。脳部位の座標は、Paxinos, G. と Watson, C. の脳図譜 [29] に準拠した。

（6） モルヒネ依存形成と禁断症状誘発

モルヒネペレットは Gibson と Tingstad の方法 [28] に従って作製したモルヒネ 75 mg を含有する徐放性のペレットを用いた。モルヒネペレットを頸背部皮下に、1 日目に 1 個、2 日目にさらに 1 個、合計 2 個を埋め込み、5 日目に実験に用いた。ラットを観察用のプラスチックシリンダー（直径 30 cm、高さ 50 cm）に入れ、30 分間環境に慣らした。薬物あるいは vehicle（PBS）の投与は注射用カニューレをガイドカニューレに装着して行った。注射用カニューレはガイドカニューレに装着した際、先端が頭蓋骨表面から頭蓋内に 5 mm の位置の側脳室内に達するように作製した。側脳室内投与はマイクロインジェクションポンプを用いて流速 10 μ l/min の速度で 5 μ l を投与した。側脳室内投与 30 分後に、ナロキソン（3 mg/kg）の腹腔内投与により誘発される 15 項目（体重減少、rearing、stretching、wet dog shake、paw shake、head shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、下痢、流涎、眼瞼下垂、涙液分泌、鼻漏）の禁断症状を 1 時間、観察・計数した。対照群にはモルヒ

ネを含有しないプラセボペレットを埋め込み、生理的食塩水を腹腔内投与した動物を用いた。

(7) Northern blotting 法

v-fos cDNA (宝酒造株式会社、東京) を pBluescript II SK (-) (Stratagene, La Jolla, U.S.A.) に組み込んだ後、制限酵素 *Bam* H I で切断し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (15 TBq/mmol, Amersham, Buckinghamshire, U.K.) 存在下、T3 RNA polymerase (Promega, Madison, U.S.A.) により ^{32}P 標識アンチセンス *v-fos* RNA プローブを作製した。ナロキソンあるいは生理的食塩水の腹腔内投与より1時間後にラットを断頭し、全脳を摘出し、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、橋・延髄および小脳を切り出した。Isogen (日本ジーン、東京) を用いて各脳部位より抽出した total RNA 15 μg を1.2% アガロースホルマリン変性ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブラン (Bio-dyne, Pall, Glen Cove, U.S.A.) に転写した後、80°C で2時間処置することにより固定した。メンブランを以下のハイブリダイゼーションバッファーにより、68°C で2時間、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションバッファーを除去し、 ^{32}P 標識 RNA プローブを加えたハイブリダイゼーションバッファーで、68°C で16時間ハイブリダイズさせた。洗浄操作は68°C の2×SSC / 0.1% SDS で4回洗浄し、RNase A 処理 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C, 10分) し、さらに68°C の0.1×SSC / 0.1% SDS で2回洗浄した。乾燥後、フィルムオートラジオグラフィーにより可視化した。

ハイブリダイゼーションバッファーの組成を以下に示す。

Formamide	50 %
SSC	5 ×
Sodium phosphate	50 mM
Denhardt's solution	5 ×
SDS	0.4 %
yeast tRNA	0.1 mg/ml
Salmon Sperm DNA	0.25 mg/ml

1 × SSC の組成を以下に示す。

NaCl	150 mM
Sodium citrate	15 mM

(8) *In situ* ハイブリダイゼーション組織化学

プローブは、northern blotting 法と同じ鋳型DNAを用いて、 $^{35}\text{S}\text{-UTP}$ (30 TBq/mmol, Amersham) 存在下、 ^{35}S 標識 *v-fos* アンチセンスRNAプローブを合成し、さらに、平均鎖長約 250 塩基にアルカリ水解して用いた。ナロキソンあるいは生理的

食塩水の腹腔内投与より1時間後、ラットを無麻酔下断頭し、全脳を速やかに取り出し、粉末ドライアイスで急速に凍結させた。-80℃の冷凍庫で保存後、クリオスタットを用いて厚さ 16 μm の新鮮凍結切片を作製し、ゼラチンコートをしたスライドガラスに張り付けた。この切片を4% formaldehyde中で15分間固定し、Proteinase K 処理 (1 μg/ml、37℃、5分)、アセチル化 (0.25%、10分)、アルコール系列による脱水とchloroformによる脱脂を行った。乾燥後、以下のプレハイブリダイゼーションバッファーにより、55℃で1時間、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション終了後、バッファーを除去し、³⁵S標識RNAプローブを加えた以下のハイブリダイゼーションバッファーにより55℃で15時間ハイブリダイズさせた。洗浄操作は10 mM DTTを含む55℃の2×SSCで4回洗浄し、RNase A 処理 (50 μg/ml、37℃、30分) し、さらに55℃の2×SSC/50% formamideで2回洗浄した。アルコール系列で乾燥後、Hyper-film β-max (Amersham) を用いてフィルムオートラジオグラフィを行った。青斑核における *c-fos* mRNA発現の定量化は、フィルムオートラジオグラムを画像解析装置 (Nexus、東京) を用いて解析することにより行った。

	Prehybridization buffer	Hybridization buffer
Formamide	50 %	50 %
SSC	4 ×	4 ×
Denhardt's solution	5 ×	2.7 ×
EDTA	10 mM	10 mM
DTT	20 mM	20 mM
yeast tRNA	0.25 mg/ml	0.25 mg/ml
Dextran sulfate	—	10 %
Salmon Sperm DNA	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml

(9) ダブル *in situ* ハイブリダイゼーション組織化学

チロシン水酸化酵素 (TH) cDNA は pCR II (Invitogen, San Diego, U.S.A.) に組み込み、制限酵素 *Hind* III で切断してプローブ作製のための鋳型とした。11-digoxigenin-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 存在下、T7 RNA polymeraseにより digoxigenin 標識THアンチセンスRNAプローブを合成した。 μ オピオイド受容体 cDNA、EP₃受容体 cDNAはいずれも pBluescript II SK (-) に組み込み、制限酵素 *Xho* Iで切断してプローブ作製のための鋳型とした。³⁵S-UTP存在下、T3 RNA polymeraseにより³⁵S標識 μ オピオイド受容体アンチセンスRNAプローブおよび³⁵S標識EP₃受容体アンチセンスRNAプローブを合成した。無処置ラット脳より新鮮凍結切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法と同様の前処置およびプレハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーションを行った。ハイ

ブリダイゼーションには³⁵S標識 μ オピオイド受容体RNAプローブとdigoxigenin 標識 TH RNAプローブを混ぜ合わせたバッファーあるいは³⁵S標識EP₃受容体RNAプローブとdigoxigenin 標識TH RNAプローブを混ぜ合わせたバッファーを用いた。洗浄操作の後、digoxigenin 標識プローブの可視化を行うために以下の操作を行った。1.5%の正常ヒツジ血清 (DAKO, Carpinteria, U.S.A.) でブロッキングを行い、alkaline-phosphataseを結合させた抗digoxigenin抗体 (Boehringer Mannheim) と2時間反応させ、洗浄の後、4-nitro blue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim) と5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (Boehringer Mannheim) によってTH mRNA 陽性細胞の可視化を行った。アルコール系列で脱水の後、2.5% collodion (ナカライテスク株式会社) で切片表面をコーティングし、乳剤 NTB-3 (Kodak, Rochester, U.S.A.) を塗布した。4週間の露光後、現像し、グリセロールによる水性封入を行い検鏡した。

(10) 試薬

本研究で用いた試薬のメーカーは、試薬名の後に括弧書きで記した。その他の記載のないものは全て特級試薬を用いた。

(11) 統計処理

図表中の数値は平均値 \pm S.E.M.で表した。有意差検定はStudent's *t*-test、Mann-Whitney's *U*-testあるいはFisher's Exact testを用いて行った。危険率5%以下をもって有意であると判定した。

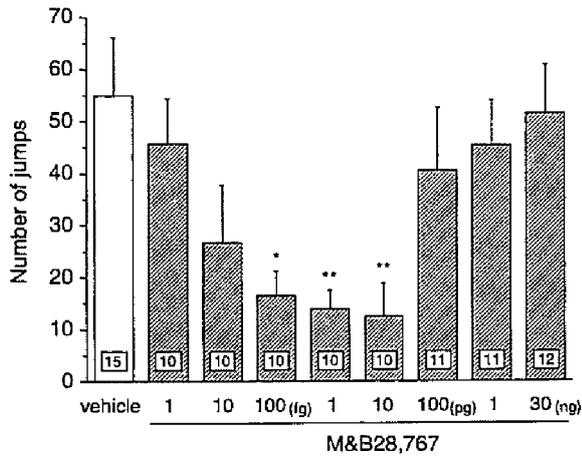
実験結果

第一節 モルヒネ依存マウスにおける各種プロスタノイド受容体アゴニストの大槽内投与によるナロキソン誘発跳躍行動への影響

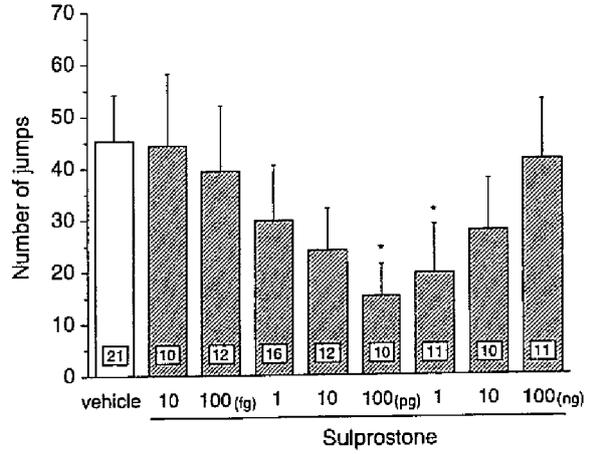
これまでの研究において、モルヒネ依存マウスにおいて、サイトカインの1種であるインターロイキン-1 β を大槽内に投与することによりナロキソン誘発跳躍行動が抑制されること [14]、またこの抑制作用は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるサリチル酸を前処置しておくことにより減弱したことから、その抑制機構の一部には脳内プロスタノイド合成系が関与していることが明らかにされている。そこで本研究では、このプロスタノイド類に着目し、まず、どのタイプのプロスタノイド受容体が関与しているかを検討するため、モルヒネ依存マウスに各種プロスタノイド受容体アゴニスト [sulprostone (EP₁/EP₃受容体アゴニスト)、M&B28,767 (EP₃受容体アゴニスト)、butaprost (EP₂受容体アゴニスト)、iloprost (IP/EP₁受容体アゴニスト)、PGF_{2 α} (FP受容体アゴニスト)] を10 fg - 100 ng (M&B28,767は1 fg - 30 ng)の用量で大槽内に投与し、30分後にナロキソンを腹腔内投与して、誘発される跳躍行動に対する効果を検討した。

ナロキソン誘発跳躍行動に対して、sulprostone (EP₁/EP₃受容体アゴニスト)の大槽内投与はU-shapeの用量作用関係を持つ抑制作用を示し、100 pg、1 ngの用量でvehicle投与群(45.3 \pm 8.9回)と比較して、有意な抑制効果が見られた(それぞれ、15.1 \pm 6.1回および19.5 \pm 9.4回)(図1-1a)。同様に、M&B28,767 (EP₃受容体アゴニスト)の大槽内投与も、ナロキソン誘発跳躍行動に対してU-shapeの用量作用関係を持つ抑制作用を示し、100 fg、1 pg、10 pgの用量でvehicle投与群(52.0 \pm 11.4回)と比較して、有意な抑制効果が見られた(それぞれ、16.5 \pm 4.7回、13.9 \pm 3.7回および12.5 \pm 6.3回)(図1-1b)。しかしながら、iloprost (IP/EP₁受容体アゴニスト)、butaprost (EP₂受容体アゴニスト)およびPGF_{2 α} (FP受容体アゴニスト)は、10 fg - 100 ngの用量で、ナロキソン誘発跳躍行動に対して有意な効果を示さなかった(図1-1 c-e)。なお、これらの薬物の大槽内投与は、調べた用量では運動機能や一般行動に明らかな影響を及ぼさなかった。

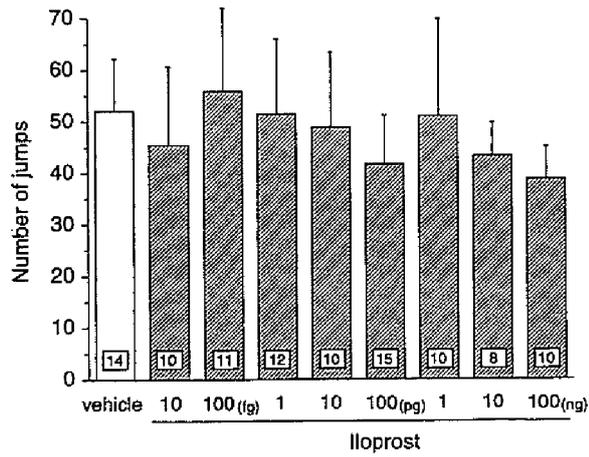
a) Sulprostone



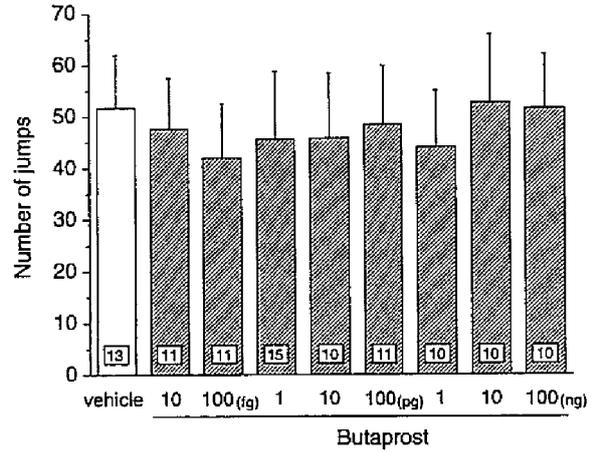
b) M&B28,767



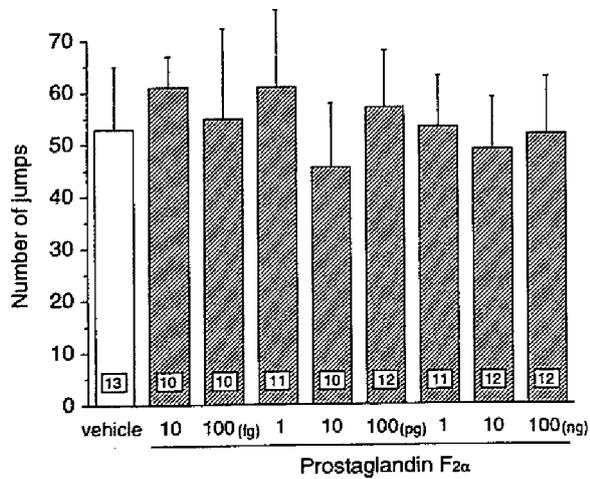
c) Iloprost



d) Butaprost



e) Prostaglandin F_{2α}



第二節 モルヒネ依存ラットにおけるEP₃アゴニストの側脳室内投与によるナロキソン誘発禁断症状抑制作用

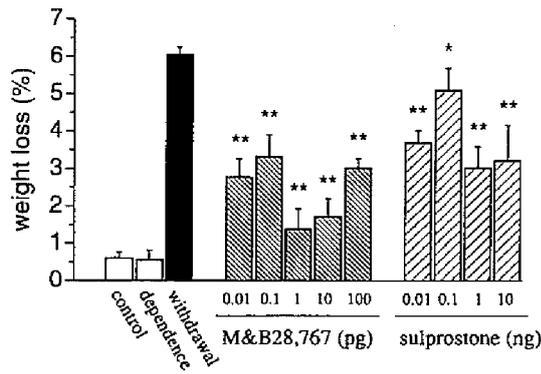
このEP₃受容体の活性化によるモルヒネ禁断症状抑制作用をより詳細に検討し、さらにその制御機構を検討するために、モルヒネ依存ラットを用いた検討を行った。

ラットにプラセボペレットを埋め込み、vehicle (PBS) を側脳室内投与し、生理食塩水を腹腔内投与した群 (コントロール群)、およびモルヒネペレットを埋め込み、vehicle を側脳室内投与し、生理食塩水を腹腔内投与した群 (モルヒネ依存形成群) の両群においては、行動に何ら差異は見られなかった。一方、モルヒネペレット処置後、vehicle を側脳室内投与し、ナロキソンを腹腔内に投与した群 (モルヒネ禁断誘発群) においては、体重減少、rearing、stretching、wet dog shake、paw shake、head shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、下痢、流涎、眼瞼下垂、涙液分泌、鼻漏といった禁断症状が観察された。この種々のナロキソン誘発禁断症状に対して、M&B28,767 (0.01 - 100 pg) の側脳室内投与は、U-shapeの用量作用関係を持つ抑制作用を示し、体重減少、rearing、stretching、wet dog shake、paw shake、head shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、流涎、眼瞼下垂、涙液分泌、鼻漏といった禁断症状が有意に抑制され、また下痢の発現に関しても、有意差はなかったものの、抑制傾向が見られた (図1-2、表1)。同様に、sulprostone (0.01 - 10 ng) の側脳室内投与は、U-shapeの用量作用関係を持つ抑制作用を示し、体重減少、rearing、stretching、wet dog shake、paw shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、流涎、鼻漏といった禁断症状が有意に抑制され、また、head shakeおよび眼瞼下垂、涙液分泌の発現に関しても、有意差はなかったものの、抑制傾向が見られた。しかしながら下痢の発現に関しては抑制効果は見られなかった (図1-2、表1-1)。なお、正常ラットに対するM&B28,767およびsulprostoneの側脳室内投与は、運動機能や一般行動等に明らかな影響を及ぼさなかった。

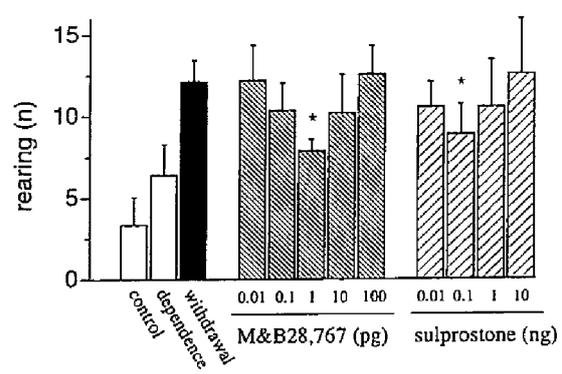
図 1-1 モルヒネ依存マウスにおける各種プロスタノイド受容体アゴニストの大槽内投与によるナロキソン誘発跳躍行動に対する効果

(a) sulprostone、(b) M&B28,767、(c) iloprost、(d) butaprost、(e) PGF_{2α}。各薬物あるいはvehicleを5 μlの容量で大槽内に投与し、30分後、ナロキソン (10 mg/kg) を腹腔内に投与し、誘発される典型的な禁断症状の一つである跳躍行動の回数を40分間計数した。*P<0.05、**P<0.01 vs. vehicle (Mann-Whitney U-test)

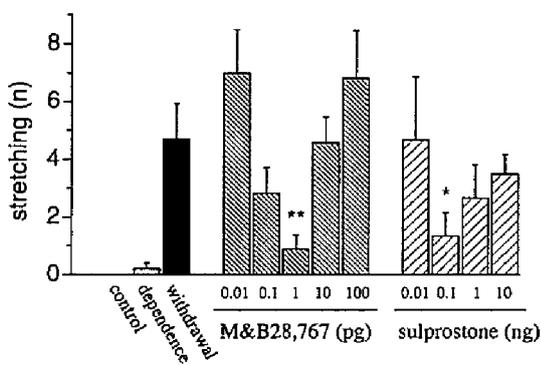
a) Weight loss



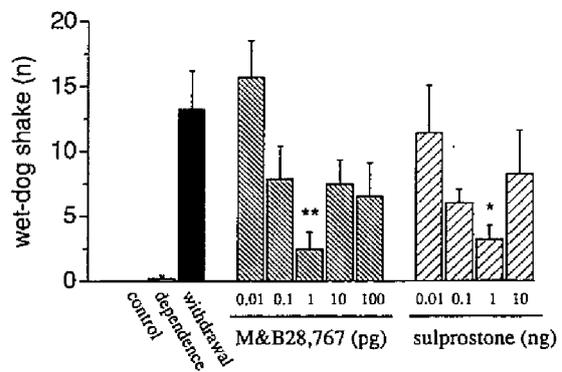
b) Rearing



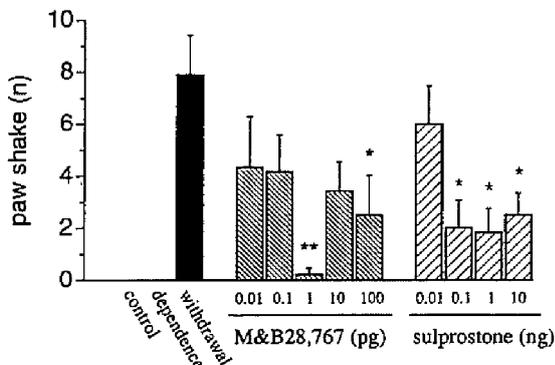
c) Stretching



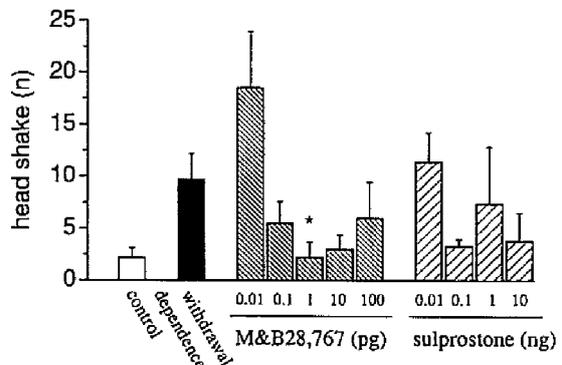
d) Wet-dog shake



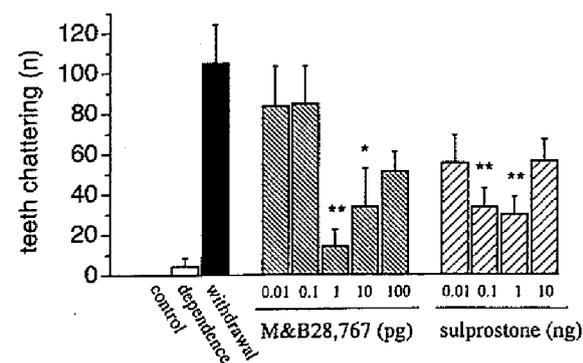
e) Paw shake



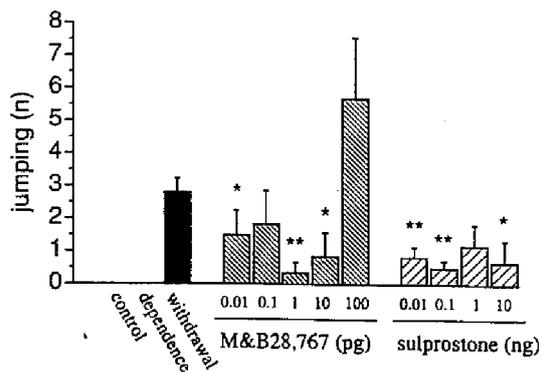
f) Head shake



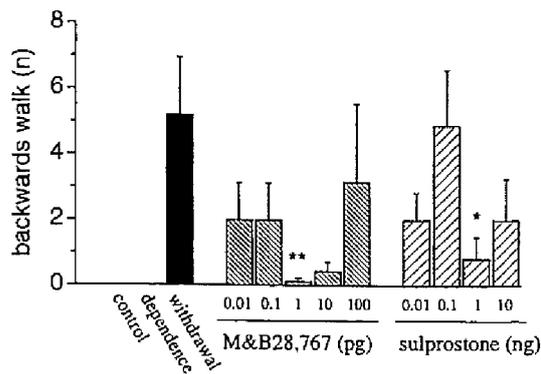
g) Teeth chattering



h) Jumping



i) Backwards walk



j) ejaculation

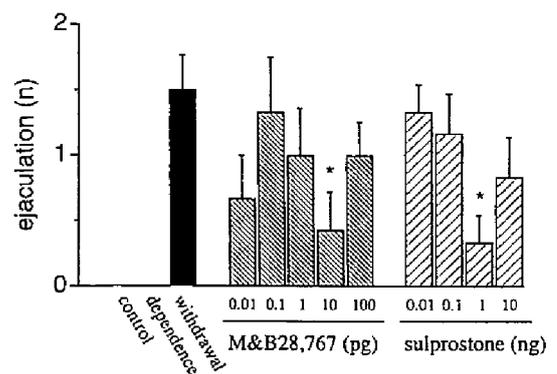


図 1-2 モルヒネ依存ラットにおける EP₃ 受容体アゴニストの側脳室内投与による各種ナロキソン誘発禁断症状に対する効果

(a) 体重減少、(b) rearing、(c) stretching、(d) wet-dog shake、(e) paw shake、(f) head shake、(g) teeth chattering、(h) 跳躍行動、(i) 後ずさり、(j) 射精

コントロール群 (control) あるいはモルヒネ依存形成群 (dependence) は、プラセボペレットあるいはモルヒネペレット 2 個をそれぞれ 5 日間埋め込み、vehicle (5 μ l) を側脳室内投与し、30 分後、生理食塩水を腹腔内投与した (open bar)。モルヒネ禁断誘発群 (closed bar) あるいは薬物処置群 (hatched bar) はモルヒネペレット 2 個をそれぞれ 5 日間埋め込み、vehicle あるいは M&B28,767、sulprostone を 5 μ l の容量で大槽内に投与し、30 分後、ナロキソン (3 mg/kg) を腹腔内に投与した。誘発される各種禁断症状の回数を 1 時間、計数した。* P <0.05、** P <0.01 vs. モルヒネ禁断誘発群 (Mann-Whitney U -test)、 n =5-9。

表 1-1 モルヒネ依存ラットにおける EP₃ 受容体アゴニストの側脳室内投与による各種ナロキソン誘発禁断症状に対する効果

	withdrawal signs				
	diarrhea	salivation	ptosis	lacrimation	rhinorrhea
control	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
dependence	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
withdrawal	8/9	9/9	9/9	8/9	8/9
M&B28,767 (pg)					
0.01	6/6	2/6*	3/6*	4/6	4/6
0.1	6/6	3/6*	5/6	3/6	2/6
1	6/9	1/9**	3/9**	2/9*	2/9*
10	5/7	1/7**	3/7*	3/7	4/7
100	6/6	4/6	5/6	3/6	1/6*
sulprostone (ng)					
0.01	6/6	4/6	6/6	5/6	4/6
0.1	5/6	6/6	6/6	4/6	3/6
1	6/6	3/6*	4/6	2/6	1/6*
10	4/6	5/6	5/6	2/6	2/6

(禁断症状を発現したラットの数) / (検討したラット数) で表している。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
vs. モルヒネ禁断誘発群 (Fisher's exact test)、 $n=5-9$

第三節 EP₃受容体アゴニストによるナロキソン誘発禁断症状抑制機構の検討

(1) モルヒネ禁断誘発時のラット脳内*c-fos* mRNA発現誘導に対するM&B28,767の効果 (northern blotting 法による検討)

コントロール群、モルヒネ依存形成群、モルヒネ禁断誘発群および M&B28,767 処置群のラット脳各部位における *c-fos* mRNA の発現を northern blotting 法により検討した。モルヒネ禁断誘発群では、コントロール群あるいはモルヒネ依存形成群と比較し、大脳皮質、視床、視床下部において *c-fos* mRNA 発現の著しい増加が見られた。また、海馬、線状体、橋・延髄においても発現の増加が観察された。これに対し、M&B28,767 を側脳室内に前処置することにより、いずれの脳部位においても *c-fos* mRNA の発現誘導が抑制された (図 1-3)。

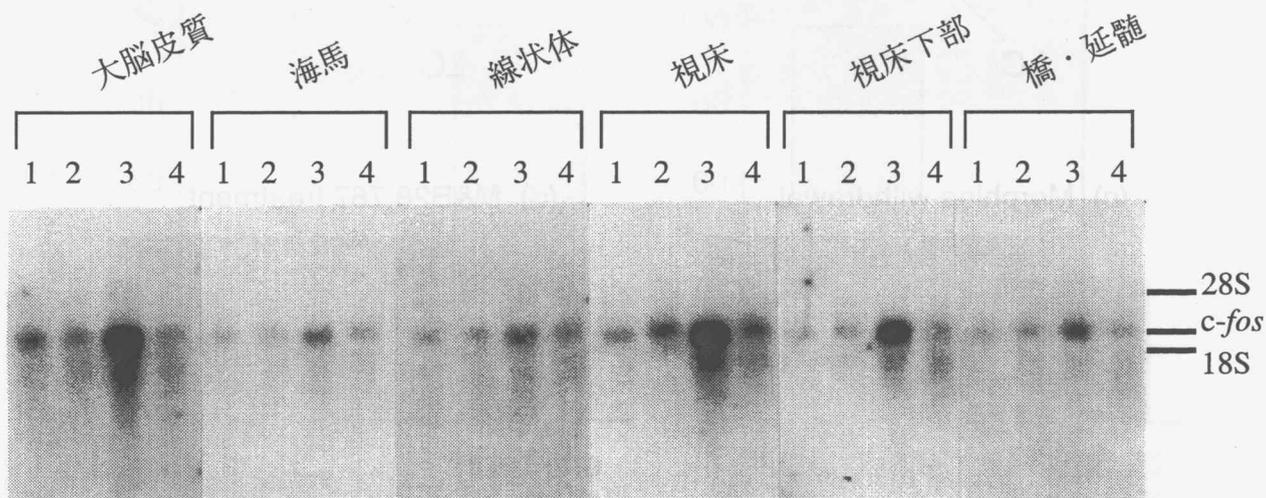


図 1-3 モルヒネ禁断誘発時のラット脳内 *c-fos* mRNA の発現誘導に対する M&B28,767 側脳室内投与の効果 (northern blotting 法による検討)

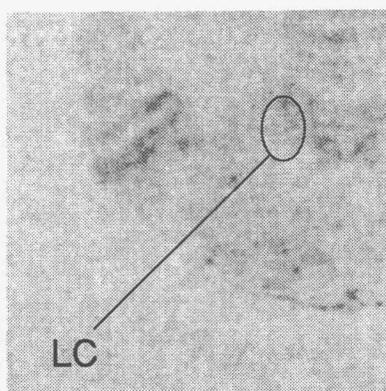
生理食塩水あるいはナロキソンを腹腔内投与した1時間後のラット (各群3匹づつ) から摘出した全脳を、大脳皮質、海馬、線状体、視床、視床下部、橋・延髄に部位分けし、total RNAを抽出した。各レーンに15 μ gのtotal RNAをアプライし、*c-fos* に対する³²P標識アンチセンスRNAプローブを用いて northern blotting 解析を行った。

レーン1: コントロール群、レーン2: モルヒネ依存形成群、レーン3: モルヒネ禁断誘発群、レーン4: M&B28,767 (1 pg) 処置群

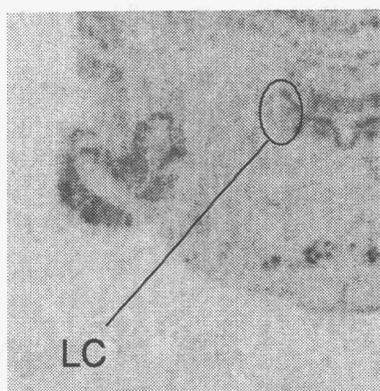
(2) モルヒネ禁断誘発時のラット脳内c-fos mRNA発現誘導に対するM&B28,767の効果 (*in situ* ハイブリダイゼーション法による検討)

C-fos mRNA 発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法によりさらに詳細に検討した結果、その発現変化が特に著明であった青斑核を含む脳領域を図1-4に示す。青斑核は、脳の広範な領域にノルアドレナリン神経線維を投射している核であり、また麻薬依存形成・禁断症状の発現に深く関与していることが報告されているが、この青斑核においても、モルヒネ禁断誘発群においては c-fos mRNA 発現が強く誘導され、その発現誘導は M&B28,767 の前処置により著明に抑制された (図1-4)。

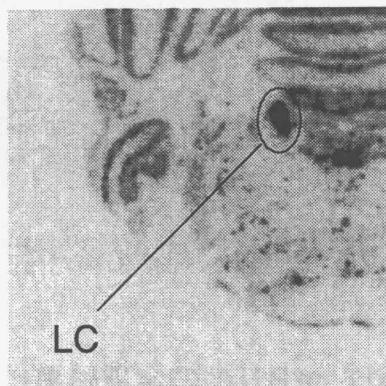
(a) Control



(b) Morphine dependence



(c) Morphine withdrawal



(d) M&B28,767 treatment

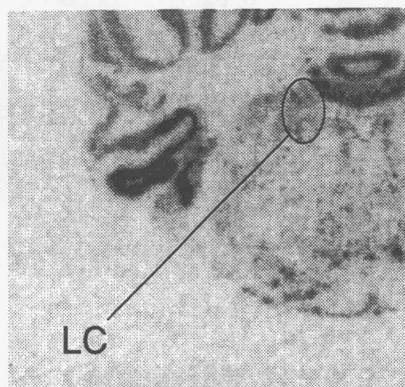


図1-4 モルヒネ禁断誘発時のラット脳内c-fos mRNAの発現誘導に対するM&B28,767側脳室内投与の効果 (*in situ* ハイブリダイゼーション法による検討)

生理食塩水あるいはナロキソンを腹腔内投与した1時間後のラットから全脳を摘出し、c-fosに対する³⁵S標識アンチセンスRNAプローブを用いて*in situ* hybridizationを行った。(a) コントロール群、(b) モルヒネ依存形成群、(c) モルヒネ禁断誘発群、(d) M&B28,767 (1 pg) 処置群。Bar = 5 mm、LC : locus coeruleus

(3) 青斑核でのモルヒネ禁断による *c-fos* mRNA 発現誘導に対する M&B28,767 の抑制効果の定量的解析

青斑核における *c-fos* mRNA 発現誘導に対する M&B28,767 の抑制効果を定量的に解析するため、フィルムオートラジオグラムを画像解析装置を用いて定量的に解析した。モルヒネ禁断誘発群の *c-fos* mRNA 発現レベルはコントロール群の 4.4 倍であったが、M&B28,767 処置群では、その発現は、ほぼコントロール群レベル近くにまで、すなわちモルヒネ禁断誘発群の $36 \pm 5\%$ にまで有意に抑制された (図 1-5)。

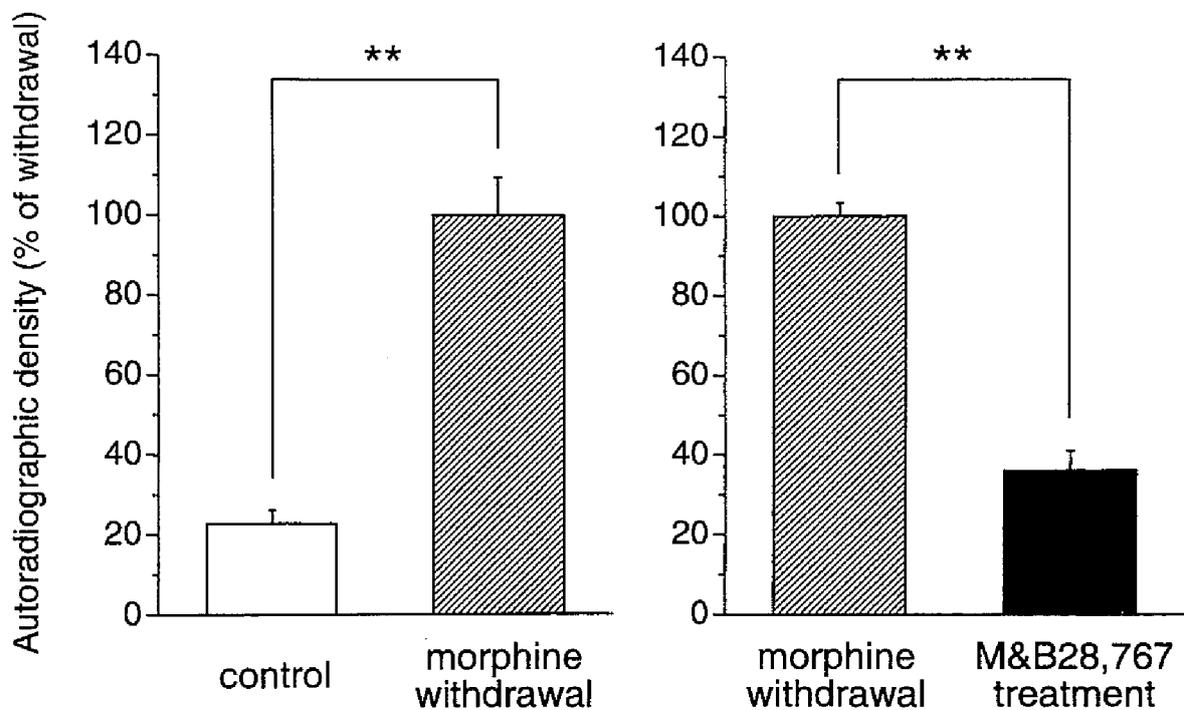


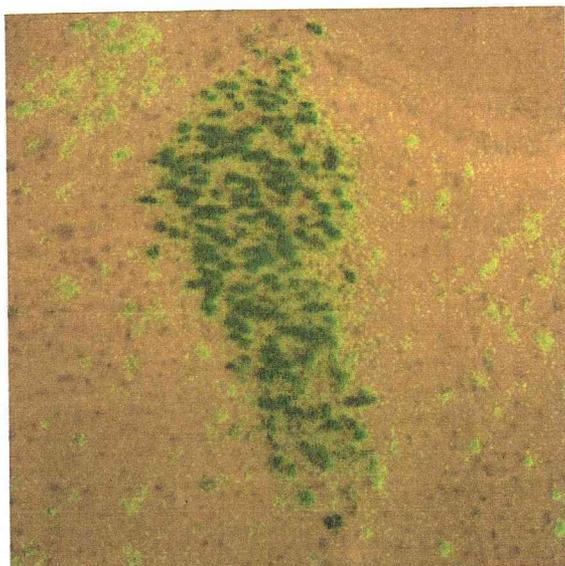
図 1-5 青斑核でのモルヒネ禁断誘発時のラット脳内 *c-fos* mRNA の発現誘導に対する M&B28,767 による抑制効果の定量的解析

それぞれの群に対して、青斑核を含む脳切片のフィルムオートラジオグラムを画像解析装置を用いて解析した。モルヒネ禁断誘発群における *c-fos* mRNA 発現量を 100% とした。 ** $P < 0.01$ vs. モルヒネ禁断誘発群 (Mann-Whitney *U*-test)、 $n=5$ 。

(4) 青斑核カテコールアミン含有神経における μ オピオイド受容体 mRNA と EP₃ 受容体 mRNA の発現

青斑核におけるカテコールアミン含有神経における μ オピオイド受容体 mRNA と EP₃ 受容体 mRNA の発現をダブル *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。青斑核には、紫色に染色された TH mRNA 陽性細胞が密集して存在しているが、そのほとんど全てにおいて μ オピオイド受容体 mRNA が、また、半数以上において EP₃ 受容体 mRNA がそれぞれ発現していた (図 1-6)。

a) μ -Opioid receptor - TH



b) EP₃ receptor - TH

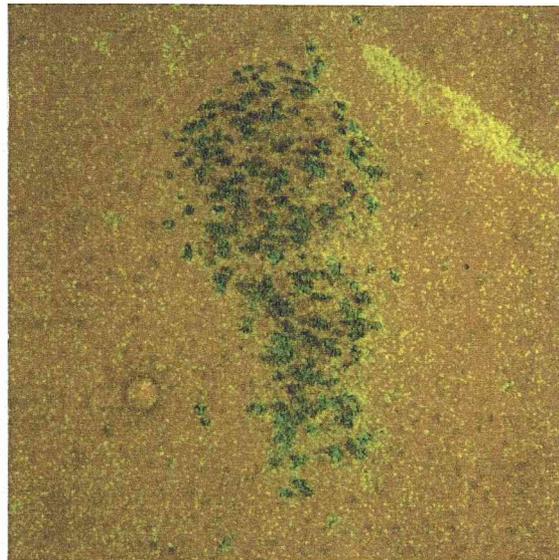


図 1-6 青斑核カテコールアミン含有神経における μ オピオイド受容体 mRNA (a) と EP₃ 受容体 mRNA (b) の発現

黄色あるいは黄緑色の粒子が集積した細胞が、(a) では μ オピオイド受容体 mRNA 陽性細胞、(b) では EP₃ 受容体 mRNA 陽性細胞。Alkaline-phosphatase 反応生成物により紫色に染色された細胞が、カテコールアミン神経のマーカであるチロシン水酸化酵素の mRNA 陽性細胞を示す。

考 察

これまでの研究において著者らは、モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発跳躍行動は、サイトカインの1種であるインターロイキン- 1β の大槽内投与により抑制されること、またこの抑制作用はシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるサリチル酸を前処置しておくことにより減弱されたことから、この抑制機構の一部に脳内プロスタノイド合成系が関与していることを明らかにしている[14]。本研究において著者は、まず、どのタイプのプロスタノイド受容体が関与しているかを、各種プロスタノイド受容体アゴニストを用い検討した。その結果、sulprostone (EP₁/EP₃受容体アゴニスト)、M&B28,767 (EP₃受容体アゴニスト)を大槽内投与することにより、ともにナロキソン誘発跳躍行動が有意に抑制されたが、iloprost (IP/EP₁受容体アゴニスト)、butaprost (EP₂受容体アゴニスト) および PGF_{2 α} (FP受容体アゴニスト)では有意な効果は見られなかった。これらの結果から、脳内においては、EP₁、EP₂、IP、FP受容体ではなく、EP₃受容体の活性化によりナロキソン誘発跳躍行動が抑制されることが示唆される。M&B28,767はsulprostoneより低濃度で跳躍行動を抑制したが、この結果はEP₃受容体を発現させたCHO細胞において親和性はほぼ同じであるにもかかわらず、フォルスコリン刺激によるcAMP産生に対してはM&B28,767がsulprostoneより低濃度で抑制するという報告と一致するものである[30]。

このEP₃受容体アゴニストによるモルヒネ禁断症状抑制作用をより詳細に検討し、さらにその作用機構を検討していくためには、マウスを用いるよりも、より詳細な行動観察が容易であり、これまで、様々な手法を用いて麻薬依存形成・禁断症状発現に関する研究が多くなされてきたラットを用いる方が適当であると考えた。そこで、モルヒネ75 mgを含有する徐放性のペレットを合計2個、5日間処置することによりモルヒネ依存ラットを作製し、EP₃受容体アゴニストによるナロキソン誘発禁断症状抑制効果をより詳細に検討した。その結果、M&B28,767およびsulprostoneを側脳室内投与することにより、下痢を除くほとんど全ての禁断症状(体重減少、rearing、stretching、wet dog shake、paw shake、head shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、流涎、眼瞼下垂、涙液分泌、鼻漏)の有意な抑制あるいは抑制傾向が見られた。これらの結果より、モルヒネ依存マウスと同様に、モルヒネ依存ラットにおいてもEP₃受容体アゴニストの脳室内投与により、ほとんど全ての禁断症状が抑制されることが示された。モルヒネ禁断時の下痢の発現に関しては、主に腸管に存在するオピオイド受容体はその役割を担っていると考えられており[4]、脳内投与されたEP₃受容体アゴニストは末梢において誘発される下痢を有意に抑制することができなかったものと推測される。また、モルヒネ依存マウスおよびラットどちらにおいても、EP₃受容体アゴニストのナロキソン誘発禁断症状抑制効果はU-shapeの用量作用関係を示した。EP₃受容体アゴニストのマウス脊髄くも膜下腔内

投与により惹起される痛覚過敏、さらにラット側脳室内投与により惹起される痛覚過敏などの作用においても、本研究と同様に U-shape の用量作用関係を示すことが報告されている [31、32]。EP₃ 受容体には、EP_{3α}、EP_{3β}、EP_{3γ} の 3 種類のスプライシングバリエーションが存在することが報告されており [16]、その中で EP_{3γ} 受容体は、G_i と G_s と共役する両方向性の性質を持つスプライシングバリエーションであることが知られている [16]。高用量の EP₃ 受容体アゴニストはこの両方向性の性質を持つ EP_{3γ} 受容体、あるいはその他のサブタイプのプロスタノイド受容体にも作用し、本研究でも見られたような U-shape の用量作用関係を示すのかもしれない。

これまでの多くの研究から、各種禁断症状の発現には、それに関与する脳部位が存在することが明らかにされている。例えば、青斑核は跳躍行動、rearing、wet dog shake、自発運動亢進、射精などの禁断症状に深く関与し、また、中脳水道周囲灰白質は rearing、自発運動亢進に、さらに前視床下部および大縫線核は wet dog shake に関与していることが報告されている [23、33]。本研究において、EP₃ 受容体アゴニストはモルヒネ依存ラットにおいて誘発されるほとんど全ての禁断症状を抑制することが示された。すなわちこれらの結果は、EP₃ 受容体アゴニストが脳内の広範な領域において、モルヒネ禁断時の神経興奮を抑制していることを示唆している。因みに、Sugimoto 等は、*in situ* ハイブリダイゼーション法により EP₃ 受容体 mRNA がマウス脳内において、扁桃核、大縫線核、視床内側部、青斑核など禁断症状の発現に関与していると考えられている脳部位を含む広範な脳領域において発現していることを報告している [34]。

一方、最初期遺伝子の一つである *c-fos* の mRNA およびその蛋白質は神経興奮により短時間のうちに一過性にその発現が増加することから、従来より、中枢神経系における神経興奮のマーカーとして用いられ [17、18]、また、モルヒネ禁断時においても、広範な脳部位において *c-fos* mRNA およびその蛋白質の発現が誘導されることが報告されている [19-21]。さらに、禁断症状抑制作用を有する α_2 アドレナリン受容体アゴニストのクロニジンおよび NMDA 受容体アンタゴニストである MK801、LY274614 の皮下投与によりモルヒネ禁断時の *c-fos* mRNA 発現誘導が抑制されることも報告されている [35]。そこで次に、モルヒネ禁断により誘発される神経興奮が EP₃ 受容体アゴニストにより抑制される脳部位を、神経興奮のマーカーとして利用される *c-fos* mRNA の発現を指標として検討した。先の行動薬理的検討において最も著明な抑制作用を示した M&B28,767 1 pg をラット側脳室内投与することにより、モルヒネ禁断時の *c-fos* mRNA 発現誘導は、大脳皮質、視床、視床下部を含む検討したほぼ全ての脳部位において抑制された。このことは、EP₃ 受容体アゴニストがモルヒネ禁断時の神経細胞の興奮を、脳内の広範な領域で抑制していることを示唆しており、行動薬理的検討により得られた知見と一致するものである。

中枢におけるノルアドレナリン神経系は麻薬依存形成・禁断症状発現に深く関与

していることが知られている [22]。モルヒネ禁断時には、大脳皮質、視床下部あるいは海馬を含む多くの脳部位において、ノルアドレナリンの遊離が増加することが報告されているが [22、36、37]、EP₃ 受容体アゴニストは、 α_2 アドレナリン受容体アゴニストと同様に、ラット大脳皮質の切片標本において電気刺激によるノルアドレナリンの遊離をシナプス前性に抑制することが報告されている [38]。このように、EP₃ 受容体アゴニストは脳内のノルアドレナリン神経終末に作用し、モルヒネ禁断時のノルアドレナリンの遊離を抑制する可能性が考えられる。

一方、脳内の広範な領域にノルアドレナリン神経を投射していることが知られている青斑核は、麻薬依存形成・禁断症状発現に深く関与していることが報告されているが、本研究において、EP₃ 受容体アゴニストにより、モルヒネ禁断時の *c-fos* mRNA 発現誘導は著明かつ有意に抑制されることを示した。さらに、ダブル *in situ* ハイブリダイゼーション法により、青斑核において、カテコールアミン含有神経のマーカーである TH の mRNA 陽性細胞の、ほとんど全てにおいて μ オピオイド受容体 mRNA が、また半数以上において EP₃ 受容体 mRNA がそれぞれ発現していることが明らかとなった。すなわちこれらの結果から、青斑核に細胞体を持つノルアドレナリン神経においては、 μ オピオイド受容体と EP₃ 受容体が共存していることが示唆され、EP₃ 受容体の活性化により、禁断症状発現に関わる μ オピオイド受容体を介した細胞内情報伝達が制御されうる可能性が考えられる。

麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムの一つとして、麻薬性鎮痛薬の作用点であり、正常時には G_i 蛋白質と共役し、AC を抑制するタイプの受容体であるオピオイド受容体 [39] を発現する培養細胞、あるいは青斑核などの脳部位において、退薬時には cAMP 産生系が過剰に活性化される、すなわち、AC 系の代償的な過感受性が関与している可能性が指摘されている [24、25]。一方、EP₃ 受容体は、これまで知られているプロスタノイド受容体の中では唯一、オピオイド受容体と同様に cAMP 産生系を抑制するタイプの受容体であり [16、40]、これらの諸知見から、モルヒネ退薬時に青斑核などの細胞において見られる cAMP 産生系の過剰な活性化を EP₃ 受容体が抑制することにより、モルヒネ禁断時の神経興奮を抑制するといった作用機構が考えられる (図 1-7)。

以上の結果から、EP₃ 受容体アゴニストの脳室内投与により、脳の広範な領域にノルアドレナリン神経線維を投射している青斑核を含む多くの脳部位において、おそらく cAMP 産生系の抑制により、モルヒネ禁断時の過剰な神経細胞の興奮が抑制され、その結果、様々なモルヒネ禁断症状が抑制されたものと考えられる (図 1-7)。

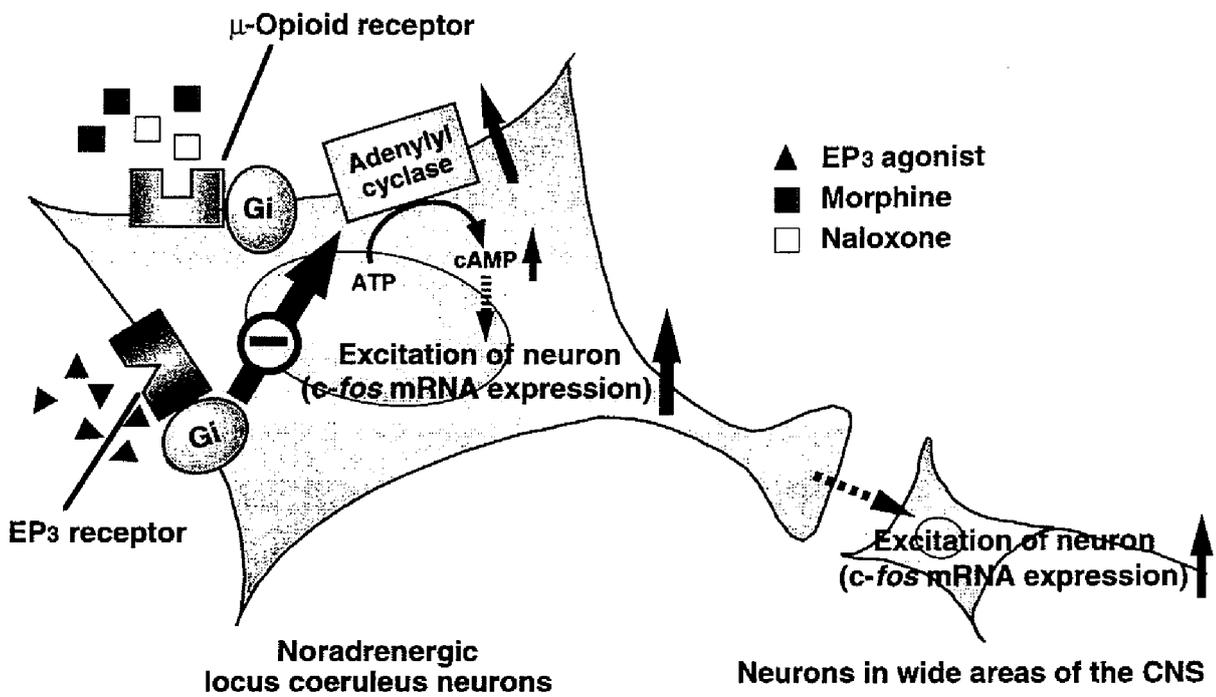


図 1-7 青斑核ノルアドレナリン神経における EP₃ 受容体アゴニストによるナロキソン誘発モルヒネ禁断症状抑制効果に対する作業仮説

第二章

クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性形成メカニズムに関する検討

第一章において、cAMP産生系を抑制するタイプの受容体であるEP₃受容体の活性化により、モルヒネ退薬時の過剰な神経細胞の興奮が抑制され、その結果、様々なモルヒネ禁断症状が抑制されることを明らかにし、G_i蛋白質共役型受容体がモルヒネ禁断症状を制御しうる可能性を示した。一方、麻薬性鎮痛薬による依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関して、これまでに数多くの研究がなされ、1970年代半ばには、マウス神経芽細胞腫とラットグリア細胞腫の雑種であるNG108-15細胞 [41-43]、あるいはヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞 [44-46] などの株化培養細胞において、モルヒネをはじめとする各種オピオイドアゴニストはセカンドメッセンジャーである細胞内cAMP生成を抑制するが、その持続的な適用によりcAMP生成抑制作用が減弱し、さらにアゴニスト退薬時にはcAMP産生系が過剰に活性化され、いわゆる"cAMP overshoot"現象が起こることが報告されている。後に、青斑核 [47、48]、線条体 [49]、扁桃体や側坐核 [50] などの脳部位においても同様の現象が起こることが確認された。さらに *in vivo* の実験においても、cAMPがモルヒネ耐性・依存形成を加速すること [51]、phosphodiesterase阻害薬であるIBMX、およびcAMPの非加水分解型のアナログであるdibutyl cAMPがモルヒネ禁断症状を増悪させること、反対にホスホジエステラーゼ活性化薬であるimidazoleが禁断症状を減弱させること [52] などが報告され、このアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の代償的な過感受性が、麻薬依存形成・禁断症状発現に関与している可能性が指摘されている [24、25]。しかしながら、このAC系の過感受性形成の分子メカニズムに関しては、未だ不明のままである。

一方、麻薬性鎮痛薬および関連化合物 (オピエート) の作用点として、これまでに μ 、 δ および κ オピオイド受容体がクローニングされ、いずれもG蛋白質に関連する7回膜貫通型の受容体であり、百日咳毒素感受性G蛋白質を介してACの抑制、Ca²⁺チャネルの抑制、K⁺チャネルの開口促進などと関連していることが明らかにされている [39]。得られた各オピオイド受容体cDNAをトランスフェクトすることにより得られたクローン化 μ 、 δ および κ オピオイド受容体を安定的に発現するCHO細胞は [53]、オピオイド受容体に関する様々な分子薬理学的特性を明確にするのに

適した系として多くの研究に用いられ、また、アゴニスト持続的処置時のオピオイド受容体を介する細胞内情報伝達系の変化の解析にも用いられてきた。そこで著者は、AC系の過感受性形成のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現させたCHO細胞を *in vitro* でのモデル系として用いた検討を行った。

実験方法

(1) クローン化オピオイド受容体およびm2ムスカリン受容体を安定的に発現させたCHO細胞株の培養

クローン化ラット μ 、 δ および κ オピオイド受容体を安定的に発現させたCHO細胞株（それぞれ μ -OPR/CHO、 δ -OPR/CHO、 κ -OPR/CHO）は、Katsumataら [53] が以前に樹立したものをを用いた。m2ムスカリン受容体を安定的に発現させたCHO細胞株（m2 receptor/CHO）は、東京大学医学部神経生化学教室 芳賀 達也 教授に御供与いただいた。それらCHO細胞株は、10%ウシ胎児血清、50 U/ml penicillin、50 μ g/ml streptomycin および 200 μ g/ml の G418（和光純薬工業株式会社、大阪）を含むハム F12 培地で、37℃、5% 炭酸ガス培養器中で培養し、維持した。

(2) 試薬

塩酸モルヒネおよび塩酸ナロキソンは第一章と同じものをを用いた。 δ オピオイド受容体選択的アゴニスト DPDPE は Research Biochemicals Inc. (Natick, U.S.A.) から購入した。 κ オピオイド受容体選択的アゴニスト U69,593 は Upjohn Co. (Kalamazoo, U.S.A.) より、 δ 受容体選択的アンタゴニスト naltrindole、および κ オピオイド受容体選択的アンタゴニスト norBNI は 東レ株式会社（鎌倉）から供与していただいた。カルバコール、アトロピン、cycloheximide および dibutyl cAMP は Sigma Chemical Co. から、H7、H8、H89 および staurosporine は 生化学工業株式会社（東京）から、calphostin C は Biomol Research laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, U.S.A.) から、forskolin および百日咳毒素は和光純薬工業株式会社からそれぞれ購入した。他の試薬は全て特級試薬を用いた。

(3) cAMP assay

cAMP assay は、Katsumataら [53] が以前に行った方法に若干の変更を加えて行った。各CHO細胞を24穴マルチウェルプレートに 1×10^5 個/well で播種し、一晚培養し、実験に用いた。一部の実験では各アゴニストあるいは薬物を培地中に添加した。所定の時間（特に示さない場合は4時間）後、薬物を含む培地を吸引除去し、直ちに 0.5 ml の HEPES-buffered saline（140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 11 mM glucose and 15 mM HEPES, pH 7.4）で洗浄操作を

行った。その後直ちに、各オピオイドリガンド、10 μ M forskolin および 1 mM IBMX を含む 0.5 ml の HEPES-buffered saline を処置し、37°C で 10 分間インキュベーションした。反応は氷冷した 0.5 ml の 10% TCA を添加することにより停止した。cAMP を抽出後、cAMP 定量キット (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) を用い、ラジオイムノアッセイで定量した。アゴニストとして μ オピオイド受容体：モルヒネ、 δ オピオイド受容体：DPDPE、 κ オピオイド受容体：U69,593、m2 ムスカリン受容体：カルバコール、アンタゴニストとして、 μ オピオイド受容体：ナロキソン、 δ オピオイド受容体：naltrindole、 κ オピオイド受容体：norBNI、m2 ムスカリン受容体：アトロピンを用いた。

(4) GTPase 活性の測定

GTPase 活性の測定は、Cassel と Selinger [54] が以前に行った方法に若干の変更を加えて行った。各 CHO 細胞を 60 mm のディッシュに 1×10^5 個、播種し、一晚培養した。細胞を 1 mM EDTA を含む PBS で洗浄後、回収し、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを 4°C、100,000 \times g で 5 分間遠心した。このようにして得られた粗膜標品 4–8 μ g を、0.5 μ M [γ - 32 P]GTP (6,000 Ci/mmol、DuPont-New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.) を含む HEPES 緩衝液中 (2 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM App(NH)p, 0.2 mM ATP, 2 mM phosphocreatine, 10 U/ml creatine phosphokinase, 15 mM HEPES, pH 7.5) で、各種オピオイドリガンドの存在下あるいは非存在下、37°C で 5 分間インキュベーションした。反応を charcoal (Norit SX plus、和光純薬工業株式会社) および 0.1% 牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加することにより停止し、10 分間氷冷した。非特異的な GTPase 活性は、同様の操作を 100 μ M GTP の存在下で行った。遠心することにより、charcoal を沈殿させ、上清中の [γ - 32 P]GTP から遊離した $^{32}\text{P}_i$ を液体シンチレーションにて測定し、定量した。

(5) 変異型およびキメラ G 蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q cDNA の作製

ラット α_{i2} およびラット α_q cDNA はラット大脳皮質から抽出した total RNA を鋳型とし、RT-PCR 法により得た。また、マウス α_q cDNA はマウス全脳から抽出した total RNA を鋳型とし、RT-PCR 法により得た。点変異導入は、目的の塩基配列を有するプライマーと Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (2nd version) (Clontech, Palo Alto, U.S.A.) を用いて、Minami ら [55] の方法と同様にして行った。キメラ G 蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q の作製には制限酵素 *Nsi* I 認識部位、*Sca* I 認識部位を用いた。 α_{i2} cDNA には *Sca* I 認識部位が、 α_q cDNA には *Nsi* I 認識部位、*Sca* I 認識部位が存在しないため、部位特異的な点変異導入によりそれぞれ導入した。*Sca* I 認識部位導入のため、アミノ酸配列の変化が生じたため、キメラ α サブユニット作製後、野生型 α サブユニットの対応する部位のアミノ酸配列と同じになるように再び点変異導入を

行った。各G蛋白質 α サブユニットcDNAを制限酵素 *EcoR V* と *NotI* で切断し、そのフラグメントを発現ベクター pTracer-CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) の *EcoR V/NotI* サイトに組み込んだ。作製した変異型およびキメラG蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q cDNA は、ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, U.S.A.) によるシーケンシングにより、その塩基配列を確認した。

(6) オピオイド受容体と野生型および各種変異型G蛋白質 α サブユニットを同時に安定的に発現する CHO 細胞株の樹立

得られた各種G蛋白質 α サブユニットcDNAを含むプラスミドを lipofectAMINE (Gibco BRL, Gaithersburg, U.S.A.) を用いて、すでにオピオイド受容体を安定的に発現している CHO 細胞にトランスフェクトし、200 $\mu\text{g/ml}$ の Zeocin (Invitrogen) 存在下で培養し、細胞を選別した後、western blotting によりさらに細胞を選別した。

(7) Western blotting

CHO細胞から調製した膜標品 (50 μg) を、SDS-PAGE (12% アクリルアミド) で分離後、ニトロセルロースメンブラン (日本ミリポア株式会社、東京) に転写し、図2-6に示す部位を抗原とする一次抗体 (抗 α_{i2} 抗体、抗 α_q 抗体あるいは抗 α_z 抗体) で2時間インキュベートした。一次抗体は、ラット α_{i2} の115番目から125番目のアミノ酸配列に相当するEEQGMLPEDLSに対して作製された抗 α_{i2} ウサギポリクローナル抗体 (Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Germany)、マウス α_q の115番目から133番目のアミノ酸配列に相当するEVDVEKSAFENPYVDAIKに対して作製された抗 α_q ウサギポリクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, CA, U.S.A.)、あるいはラット α_z の4番目から18番目のアミノ酸配列に相当するRQSSEEKESRRSRRに対して作製された抗 α_z ウサギポリクローナル抗体 (Biomol Research laboratories, Inc., Plymouth Meeting, U.S.A.) を用いた。洗浄後、bitoin標識抗ウサギIgG(H+L)抗体 (Vector lab., Burlingame, U.S.A.) で1時間反応させ、さらに洗浄後、avidinと peroxidase 標識 biotine (ABC Elite, Vector lab.) で1時間反応させた。次いで、0.02% 3,3'-diaminobenzidine/0.0045% H_2O_2 を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中で発色させ可視化した。

(8) 統計処理

図表中の数値は平均値 \pm S.E.M.で表した。有意差検定はStudent's *t*-testあるいはMann-Whitney *U* testを用いて行った。危険率5%以下をもって有意であると判定した。

実験結果

(1) クローン化 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体およびムスカリン受容体m2サブタイプ発現細胞におけるアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性の形成

クローン化 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体、いずれの受容体を発現させたCHO細胞(μ -OPR/CHO、 δ -OPR/CHO、 κ -OPR/CHO)においても、アゴニストの持続的な前処置を施していない細胞(naive細胞)では、それぞれのアゴニストであるモルヒネ 10 μ M、DPDPE 1 μ MあるいはU69,593 1 μ Mの処置により、forskolin誘発cAMP蓄積は有意に抑制されたが、それぞれのアンタゴニストであるナロキソン 1 μ M、naltrindole 1 μ MあるいはnorBNI 10 μ Mの単独処置によっては変化しなかった。一方、それぞれのアゴニストであるモルヒネ 10 μ M、DPDPE 1 μ MあるいはU69,593 1 μ Mを持続的に4時間前処置した細胞(dependent細胞)においては、それぞれのアンタゴニストの処置により、forskolin誘発cAMP蓄積は、naive細胞においてアンタゴニストを処置した場合と比較して、約2倍にまで有意に促進された(図2-1)。

また、オピオイド受容体と同様にG_i蛋白質と共役しACを抑制することが知られているムスカリン受容体m2サブタイプを安定的に発現させたCHO細胞(m2 receptor/CHO)においても、アゴニストであるカルバコール 10 μ Mの4時間の持続的処置したdependent細胞において、アンタゴニストであるアトロピン 1 μ Mの処置により、forskolin誘発cAMP蓄積は、naive細胞においてアンタゴニストを処置した場合と比較して、約2倍にまで有意に促進された(図2-1)。

(2) アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成の時間経過

μ -OPR/CHO、 δ -OPR/CHOおよび κ -OPR/CHOにおいて、それぞれモルヒネ 10 μ M、DPDPE 1 μ MおよびU69,593 1 μ Mの持続的処置により、AC系の過感受性は数分~数時間という比較的短時間のうちに形成され、約4時間でほぼプラトーに達し、また少なくとも24時間後まで持続した(図2-2)。

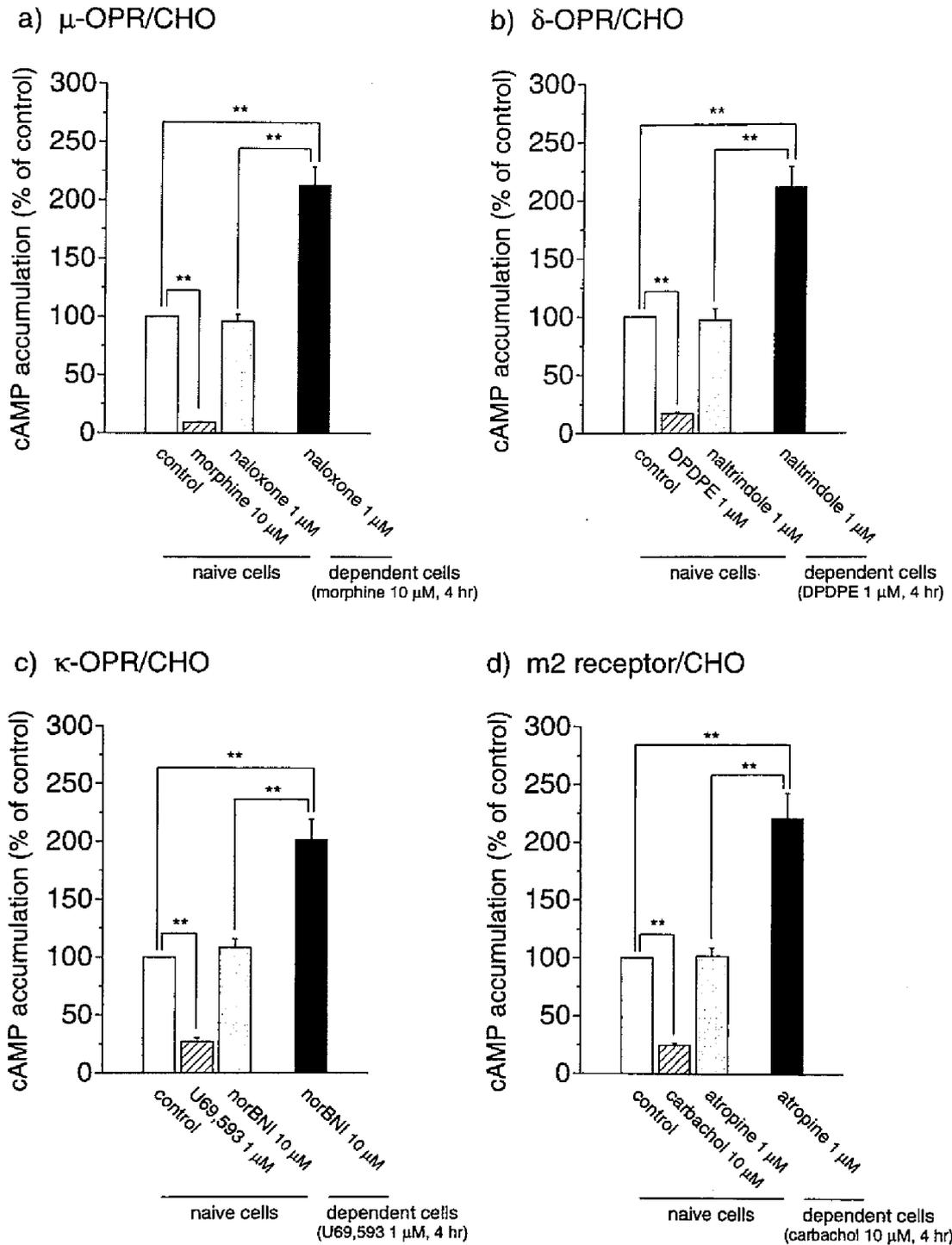
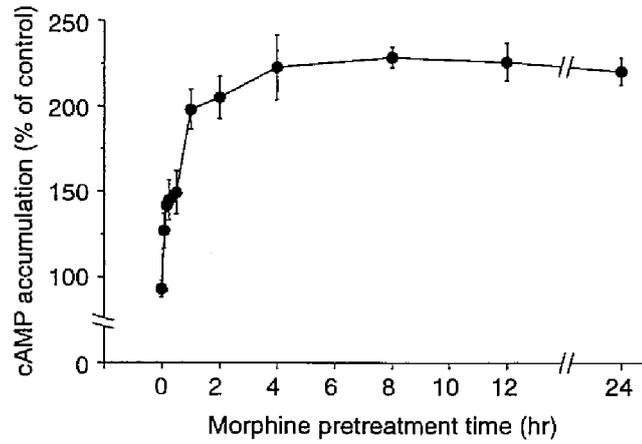


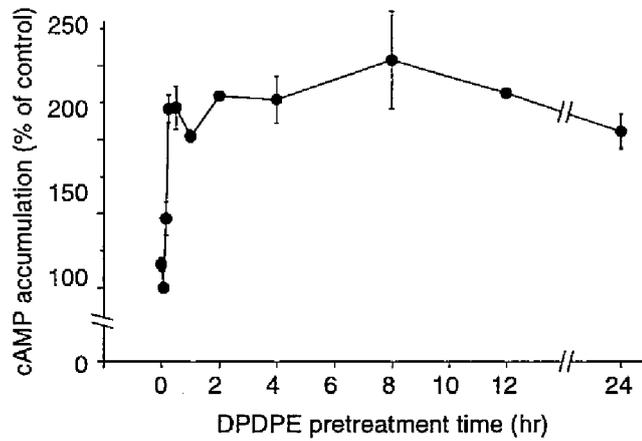
図 2-1 クローン化 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体および m2 ムスカリン受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性の形成

μ -OPR/CHO (a)、 δ -OPR/CHO (b)、 κ -OPR/CHO (c) および m2 receptor/CHO (d) において、アゴニスト前処置を施していない naive 細胞と、それぞれのアゴニスト (モルヒネ、DPDPE、U69,593、カルバコール) を 4 時間持続的に前処置した dependent 細胞に、それぞれのアゴニストあるいはアンタゴニストを処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。** $P < 0.01$ (Student's t test)、 $n = 3-5$ 。

a) μ -OPR/CHO



b) δ -OPR/CHO



c) κ -OPR/CHO

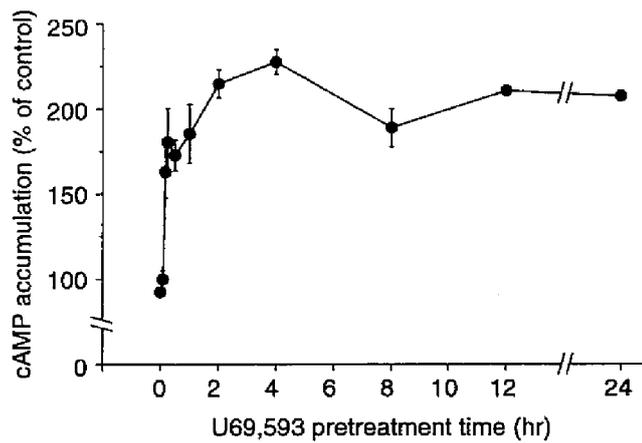


図 2-2 μ -OPR/CHO、 δ -OPR/CHO、 κ -OPR/CHO におけるアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成の時間経過

μ -OPR/CHO (a)、 δ -OPR/CHO (b) あるいは κ -OPR/CHO (c) において、それぞれモルヒネ 10 μ M、DPDPE 1 μ M あるいは U69,593 1 μ M を示した時間前処置し、その後直ちにナロキソン 1 μ M、naltrindole 1 μ M あるいは norBNI 10 μ M を処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。n=3.

(3) AC系の過感受性形成に対する蛋白質合成阻害薬 cycloheximide の効果

アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成に、新たな蛋白質の合成が関与しているか否かを検討するために、蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を用いた検討を行った。 μ -OPR/CHO および κ -OPR/CHO において、cycloheximide (10 μ M、50 μ M、100 μ M) を前処置1時間、アゴニストと共に4時間、計5時間処置したが、アゴニスト (それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) の持続的処置により、cycloheximide を前処置しない場合と同様、アゴニスト持続的処置を施していない naive 細胞と比較して有意な AC 系の過感受性形成が見られた (図 2-3)。

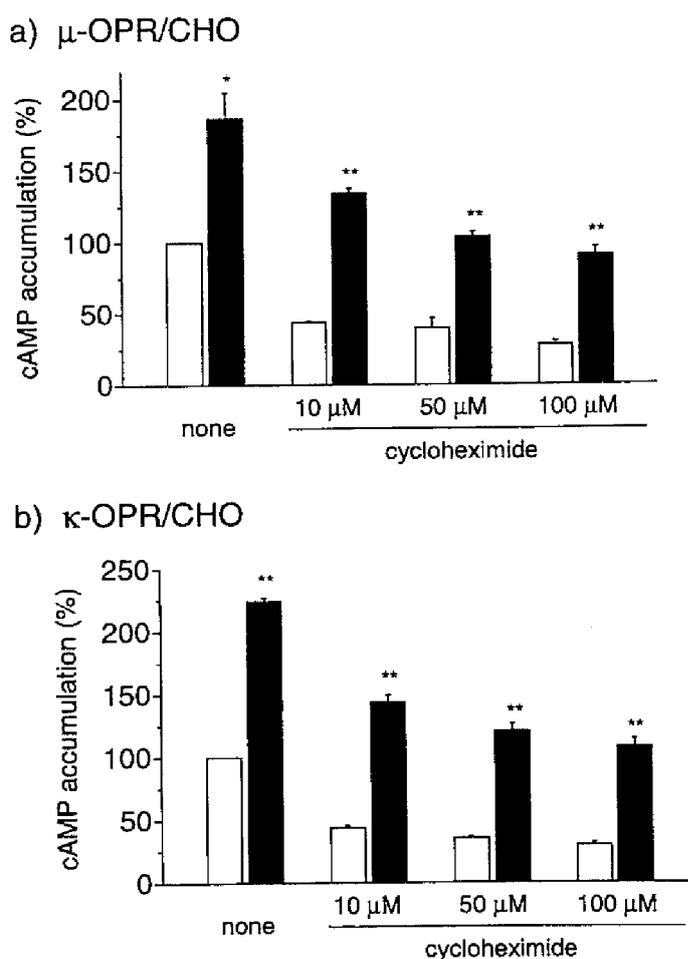


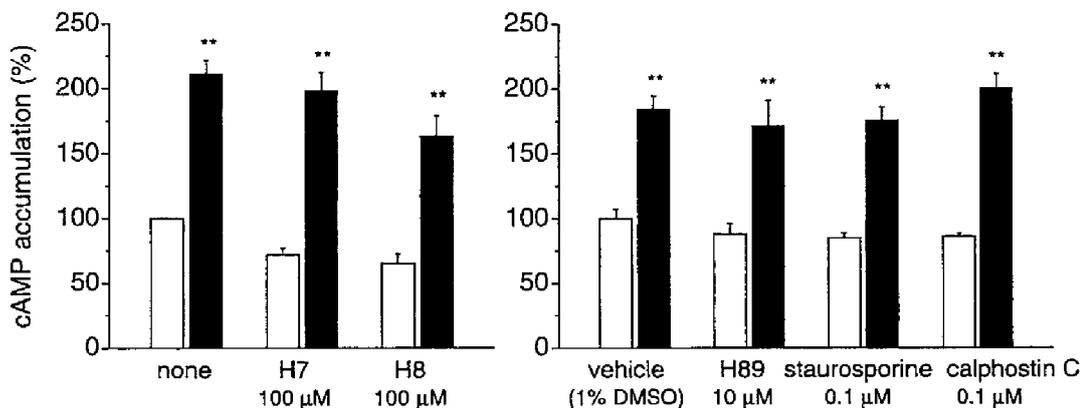
図 2-3 μ -OPR/CHO および κ -OPR/CHO におけるアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成に対する蛋白質合成阻害薬 cycloheximide の効果

μ -OPR/CHO (a) および κ -OPR/CHO (b) において、cycloheximide (10 μ M、50 μ M、100 μ M) を前処置1時間、アゴニスト (それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) と共に4時間、計5時間処置し、その後直ちにアンタゴニスト (それぞれナロキソン 1 μ M、norBNI 10 μ M) を処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。naive 細胞 (open bar)、dependent 細胞 (closed bar)、* P <0.05, ** P <0.01 vs. naive 細胞 (Student's t test)、 $n=3$ 。

(4) AC系の過感受性形成に対する各種プロテインキナーゼ阻害薬の効果

AC系の過感受性形成に対するリン酸化の関与を検討するため、 μ -OPR/CHOおよび κ -OPR/CHOにおいて、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H7 100 μ M、H8 100 μ M、H89 10 μ M、staurosporine 0.1 μ M、calphostin C 0.1 μ M) を前処置1時間、アゴニストと共に4時間、計5時間処置したが、アゴニスト(それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) の持続的処置により、無処置あるいは vehicle を処置した場合と同様、アゴニスト持続的処置を施していないnaive細胞と比較して有意なAC系の過感受性形成が見られた (図2-4)。

a) μ -OPR/CHO



b) κ -OPR/CHO

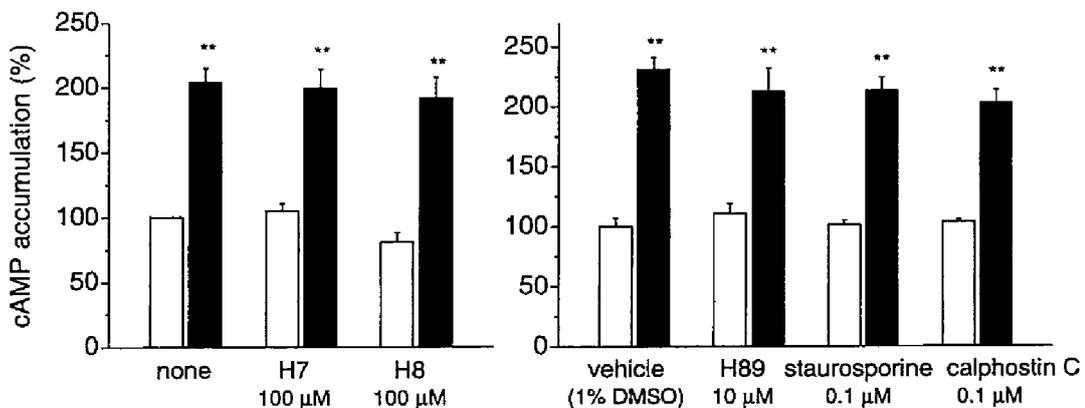


図2-4 μ -OPR/CHO および κ -OPR/CHO におけるアゴニスト持続的処置による AC系の過感受性形成に対する各種プロテインキナーゼ阻害薬の効果

μ -OPR/CHO (a)および κ -OPR/CHO (b)において、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H7 100 μ M、H8 100 μ M、H89 10 μ M、staurosporine 0.1 μ M、calphostin C 0.1 μ M) を前処置1時間、アゴニスト(それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) と共に4時間、計5時間処置し、その後直ちにアンタゴニスト(それぞれナロキソン 1 μ M、norBNI 10 μ M) を処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。H7、H8 は PBS に、H89、staurosporine、calphostin C は 1% DMSO を含む PBS で溶解した。naive 細胞 (open bar)、dependent 細胞 (closed bar)、** P <0.01 vs. naive 細胞 (Student's t test)、 $n=4$ 。

(5) AC系の過感受性形成時におけるGTPase活性の変化

次に、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した。 μ -OPR/CHOのnaive細胞から調製した膜標品において、アゴニスト（モルヒネ 10 μ M）を処置することにより、forskolin誘発cAMP蓄積は有意に抑制され、GTPase活性は有意に上昇したが、アンタゴニスト（ナロキソン 1 μ M）単独の処置はcAMP蓄積およびGTPase活性に変化を与えなかった。一方、アゴニスト（モルヒネ 10 μ M）を4時間持続的に前処置したdependent細胞から調製した膜標品において、アンタゴニスト（ナロキソン 1 μ M）を処置することにより、forskolin誘発cAMP蓄積は有意に促進されたが、GTPase活性に変化は見られなかった（図2-5）。

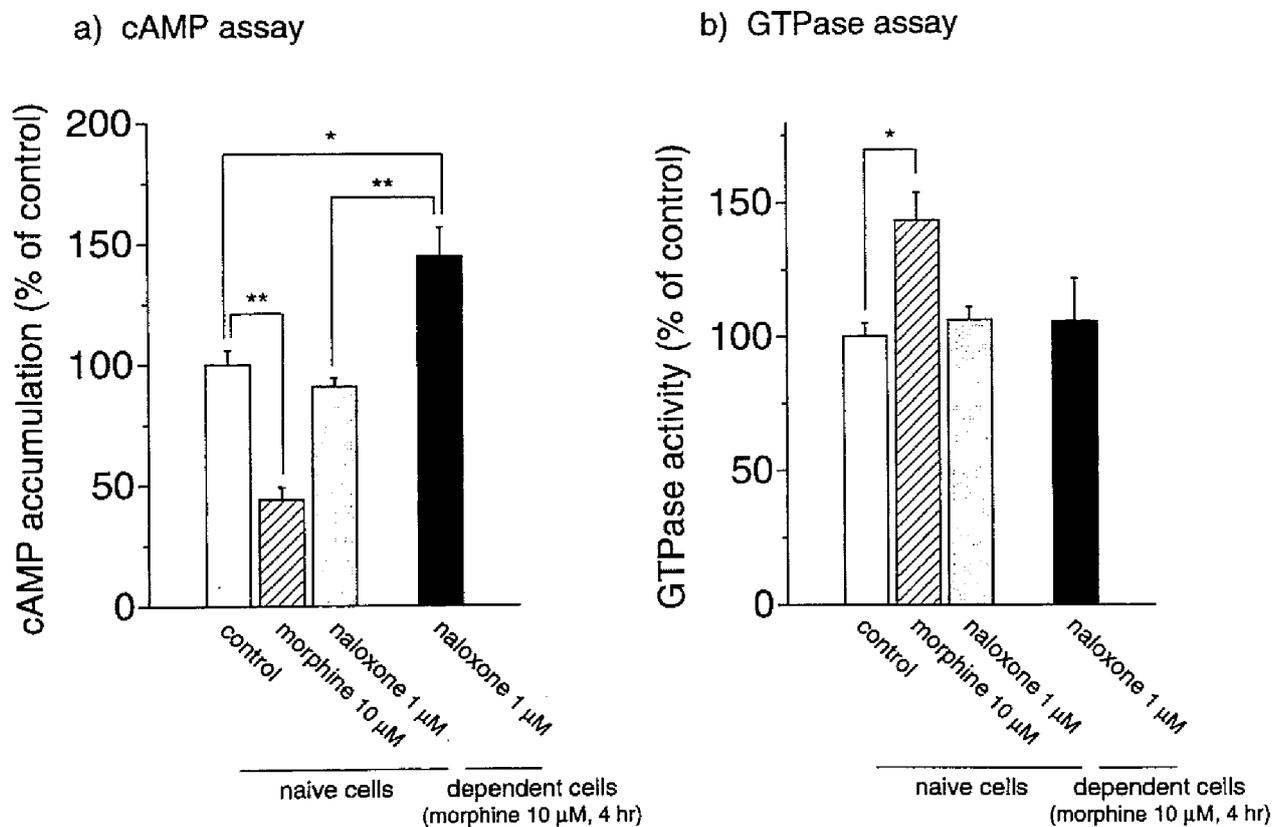


図2-5 AC系の過感受性形成時におけるGTPase活性の変化

無処置およびモルヒネ (10 μ M) を4時間前処置した μ -OPR/CHOから調整した膜標品において、cAMP assay (a) およびGTPase assay (b) を行った。* P <0.05, ** P <0.01 (Student's t test)、 $n=5$ 。

(6) オピオイド受容体と各種キメラG蛋白質 α サブユニット α_{i2}/α_q を共発現させたCHO細胞におけるAC系の過感受性形成

G蛋白質-AC連関が過感受性の形成に必要なのかどうかを明らかにするため、オピオイド受容体と連関しACを抑制することが知られているG蛋白質 α サブユニット α_{i2} と、オピオイド受容体とは連関せず、またACには影響を及ぼさない α_q とのキメラ α サブユニットを用いた検討を行った。まず、 α_{i2} の百日咳毒素によりADPリボシル化を受ける352番目のアミノ酸であるシステインをグリシンに置換した百日咳毒素非感受性の変異型 α_{i2} C352Gを作製した。この α_{i2} C352Gの1-243番目のアミノ酸残基を、 α_q の相当するアミノ酸248残基に置換したキメラ α_{i2}/α_q サブユニットGQI *Nsi* Iを作製した。同様にして、 α_{i2} C352Gの1-331番目のアミノ酸残基を、 α_q の相当するアミノ酸336残基に置換したGQI *Sca* Iを作製し、さらに、 α_{i2} C352Gの244-331番目のアミノ酸残基を、 α_q の相当するアミノ酸88残基に置換したGIQIを作製した(図2-6)。

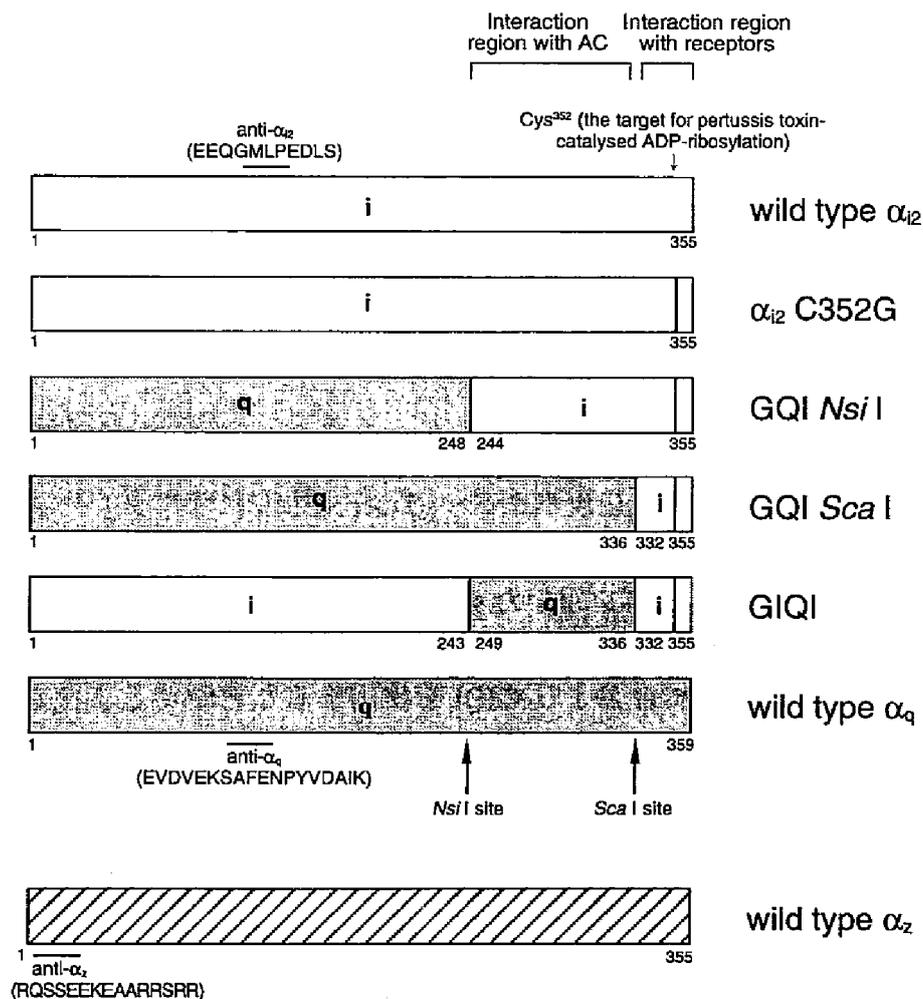


図2-6 野生型および変異型G蛋白質 α サブユニットの作製

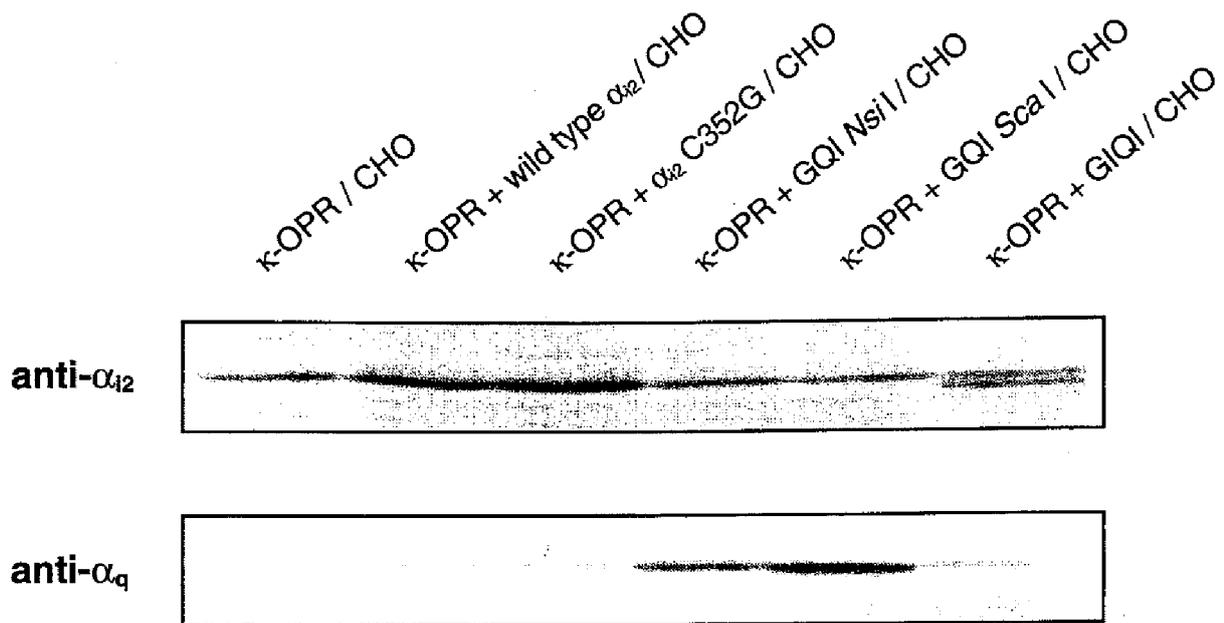


図 2-7 CHO 細胞における各種 G 蛋白質 α サブユニットの発現 (western blotting)
 κ -OPR/CHO、 κ -OPR+wild type α_{i2} /CHO、 κ -OPR+ α_{i2} C352G/CHO、 κ -OPR+GQI Nsi I/CHO、 κ -OPR+GQI Sca I/CHO、 κ -OPR+GIQI/CHO から調整した膜標品 (50 μ g) を SDS-PAGE (12% ゲル) により分画し、ニトロセルロースメンブランにトランスファーした後、抗 α_{i2} 抗体 (α_{i2} の Glu¹¹⁵ - Ser¹²⁵ を認識)、あるいは抗 α_q 抗体 (α_q の Glu¹¹⁵ - Lys¹³³ を認識) を用いて免疫染色した。

これらの各種 α サブユニットを発現ベクター pTracer-CMV にサブクローニングし、 κ -OPR/CHO にトランスフェクトした。その後、Zeocin の存在下で細胞を選別した後、抗 α_{i2} 抗体あるいは抗 α_q 抗体を用いた western blotting によりさらに細胞を選別した。これらの抗体はどちらも α サブユニットの N 末を認識するので (図 2-6)、抗 α_{i2} 抗体は野生型 α_{i2} 、 α_{i2} C352G および GIQI を検出することができ、抗 α_q 抗体は GQI Nsi I および GQI Sca I を検出することができる。このようにして、 κ オピオイド受容体とこれら各種 α サブユニットを同時に安定的に発現する CHO 細胞株 (κ -OPR+wild type α_{i2} /CHO、 κ -OPR+ α_{i2} C352G/CHO、 κ -OPR+GQI Nsi I/CHO、 κ -OPR+GQI Sca I/CHO、 κ -OPR+GIQI/CHO) を樹立し、最終的に western blotting により各種 α サブユニットの発現を確認した (図 2-7)。

これらのCHO細胞に発現させた各種 α サブユニットが機能的にオピオイド受容体と関連し、G蛋白質の活性化を引き起こしているかを確認するため、GTPase活性を指標とした検討を行った。 κ -OPR/CHOから調整した膜標品において、U69,593 (10 μ M) を処置することにより、内因性のG蛋白質の活性化により、GTPase活性が有意に上昇したが、百日咳毒素 20 ng/ml を16時間前処置することにより、この効果は完全に阻害された。同様に、 κ -OPR+wild type α_{i2} /CHOにおいても、百日咳毒素の前処置によりU69,593によるGTPase活性の上昇は完全に阻害された。一方、 κ -OPR+ α_{i2} C352G/CHO、 κ -OPR+GQI *Nsi* I/CHO、 κ -OPR+GQI *Sca* I/CHO、 κ -OPR+GIQI/CHOにおいては、百日咳毒素を前処置してもU69,593の処置によりGTPase活性は有意に上昇した (表2-1)。

表2-1 κ -OPRと各種G蛋白質 α サブユニットを共発現させたCHO細胞におけるGTPase活性に対するアゴニスト刺激の効果

	U69,593(10 μ M)-stimulated GTPase activity (% of control)	
	- PTX	+ PTX
κ -OPR / CHO	121.0 \pm 3.95 *	98.8 \pm 2.88
κ -OPR + wild type α_{i2} / CHO	122.7 \pm 5.80 **	94.9 \pm 3.94
κ -OPR + α_{i2} C352G / CHO	133.8 \pm 5.29 **	132.5 \pm 5.55 *
κ -OPR + GQI <i>Nsi</i> I / CHO	122.9 \pm 5.68 *	121.6 \pm 8.69 *
κ -OPR + GQI <i>Sca</i> I / CHO	127.8 \pm 8.02 *	123.4 \pm 7.48 *
κ -OPR + GIQI / CHO	125.9 \pm 5.47 **	123.2 \pm 6.43 *

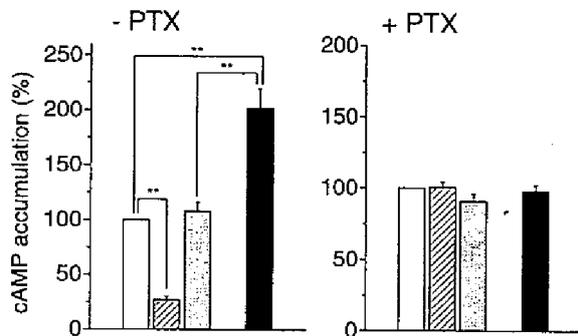
各CHO細胞を百日咳毒素 (20 ng/ml) の存在下 (+PTX) あるいは非存在下 (-PTX) で16時間、培養した。それらのCHO細胞から膜標品を調整し、U69,593 (10 μ M) の処置によるGTPase活性の変化を検討した。値はU69,593非処置時のGTPase活性を100%として表している。* P <0.05, ** P <0.01 vs. untreated control values (Mann-Whitney *U*-test)、 $n=3-5$ 。

これらのCHO細胞株におけるアゴニスト持続的刺激によるAC系の過感受性形成能を検討した。 κ -OPR/CHO および野生型の α_{i2} を発現させた κ -OPR+wild type α_{i2} /CHO において、百日咳毒素の前処置 (20 ng/ml, 16時間) により、naive細胞における U69,593 急性処置による ACの抑制効果、および U69,593 持続的処置による AC系の過感受性形成は完全に阻害された。一方、百日咳毒素非感受性の α_{i2} を発現させた κ -OPR+ α_{i2} C352G/CHO においては、百日咳毒素を前処置しても U69,593の急性処置により ACは抑制され、また、U69,593 持続的処置により AC系の過感受性が形成された。また、受容体および ACとの連関領域のみが α_{i2} 由来のキメラ α サブユニットを発現させた κ -OPR +GQI Nsi I /CHO においても、百日咳毒素を前処置しても U69,593 による ACの抑制効果、U69,593 持続的処置による AC系の過感受性形成が見られた。一方、受容体連関領域が α_{i2} 由来であるが、ACとの連関領域が α_q 由来のキメラ α サブユニットを発現させた κ -OPR+GQI Sca I/CHO および κ -OPR+GIQI/CHO では、百日咳毒素の前処置により、U69,593 による ACの抑制効果は見られなくなり、また、その持続的処置によっても AC系の過感受性形成は見られなかった (図 2-8)。

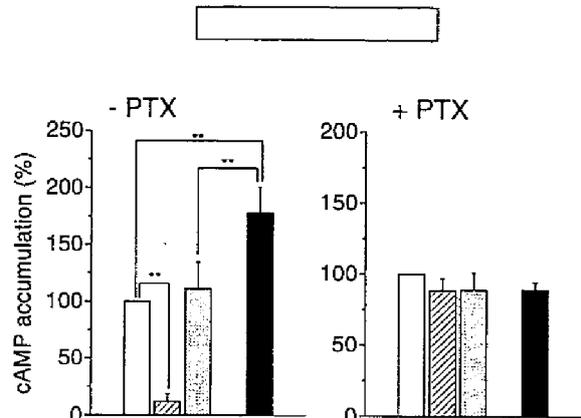
図 2-8 κ オピオイド受容体と野生型、変異型、あるいはキメラ G 蛋白質 α サブユニットを共発現させた CHO 細胞におけるアゴニスト持続的処置による AC 系への影響

(a) κ -OPR/CHO、(b) κ -OPR+wild type α_{i2} /CHO、(c) κ -OPR+ α_{i2} C352G/CHO、(d) κ -OPR+GQI Nsi I/CHO、(e) κ -OPR+GQI Sca I/CHO、(f) κ -OPR+GIQI/CHO。内因性の G_i 様 G 蛋白質の効果を除去するために、各 CHO 細胞を百日咳毒素 (20 ng/ml) の存在下 (+PTX) あるいは非存在下 (-PTX) で 16 時間培養した。アゴニスト前処置を施していない naive 細胞と、U69,593 10 μ M を 4 時間持続的に前処置した dependent 細胞に、U69,593 10 μ M あるいは norBNI 1 μ M を処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。* P <0.05、** P <0.01 (Student's t test)、 n =3-6。

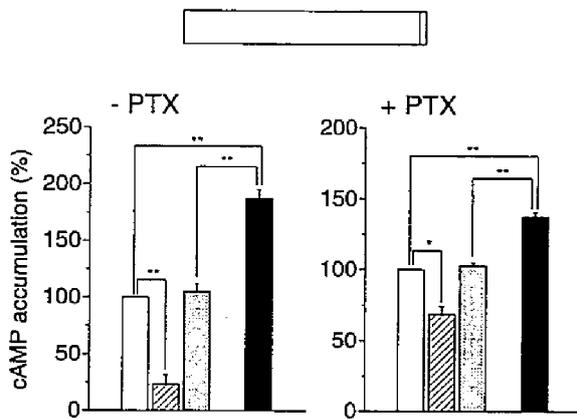
a) κ -OPR / CHO



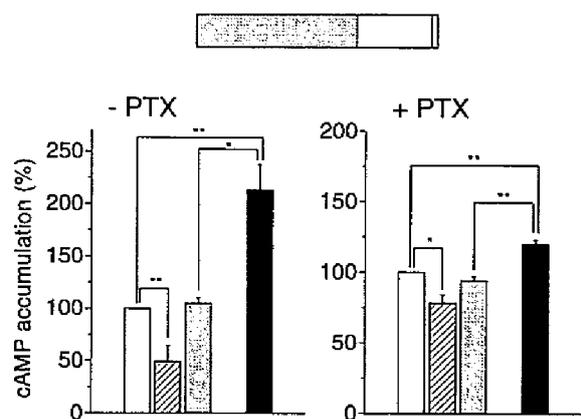
b) κ -OPR + wild-type α_{i2} / CHO



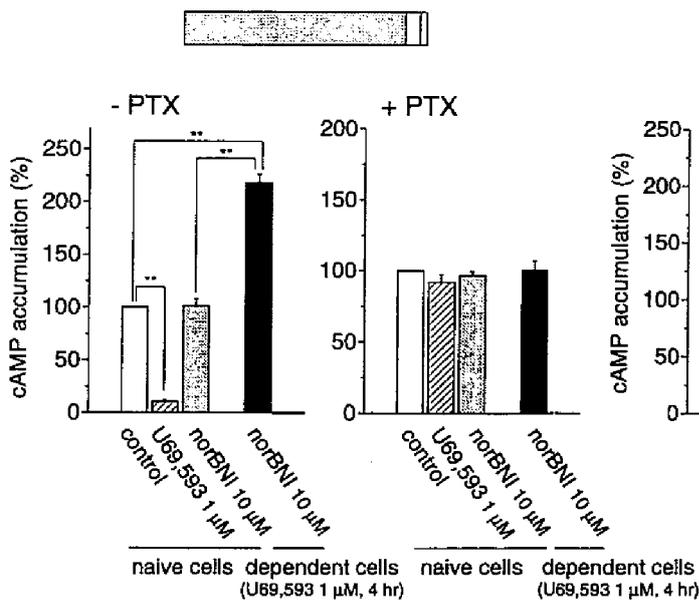
c) κ -OPR + α_{i2} C352G / CHO



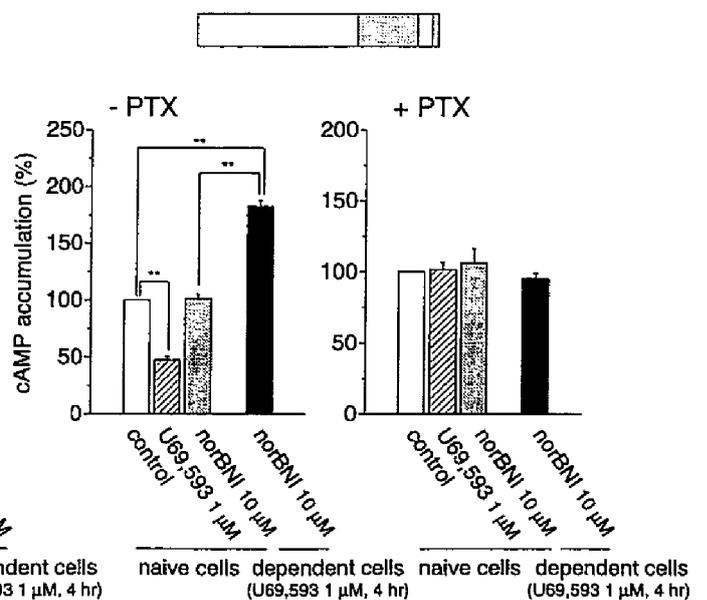
d) κ -OPR + GQI *Nsi* I / CHO



e) κ -OPR + GQI *Sca* I / CHO



f) κ -OPR + GIQI / CHO



(7) オピオイド受容体と百日咳毒素非感受性G蛋白質 α_z サブユニット α_z を共発現させたCHO細胞におけるAC系の過感受性形成

同様にして、 μ あるいは κ オピオイド受容体に発現ベクターpTracer-CMVのみをトランスフェクトしたCHO細胞 (μ -OPR+pTracer-CMV/CHOおよび κ -OPR+pTracer-CMV/CHO)、および百日咳毒素非感受性G蛋白質 α_z サブユニット α_z を共発現させたCHO細胞 (μ -OPR+ α_z /CHOおよび κ -OPR+ α_z /CHO) を作製し、抗 α_z 抗体を用いたwestern blottingにより α_z の発現を確認した (図2-9)。

これらのCHO細胞株におけるアゴニスト持続的刺激によるAC系の過感受性形成能を検討した。 μ -OPR+pTracer-CMV/CHOおよび κ -OPR+pTracer-CMV/CHOにおいては、アゴニスト (それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) 急性処置によるACの抑制効果、およびアゴニスト (それぞれモルヒネ 10 μ M、U69,593 1 μ M) の4時間の持続的処置によるAC系の過感受性形成は、百日咳毒素の前処置によりどちらも完全に阻害されたのに対し、 μ -OPR+ α_z /CHOおよび κ -OPR+ α_z /CHOにおいては、百日咳毒素を前処置しても、それぞれのアゴニストの急性処置によりACは有意に抑制され、また、4時間のアゴニスト持続的処置により、有意なAC系の過感受性が形成された (図2-10)。

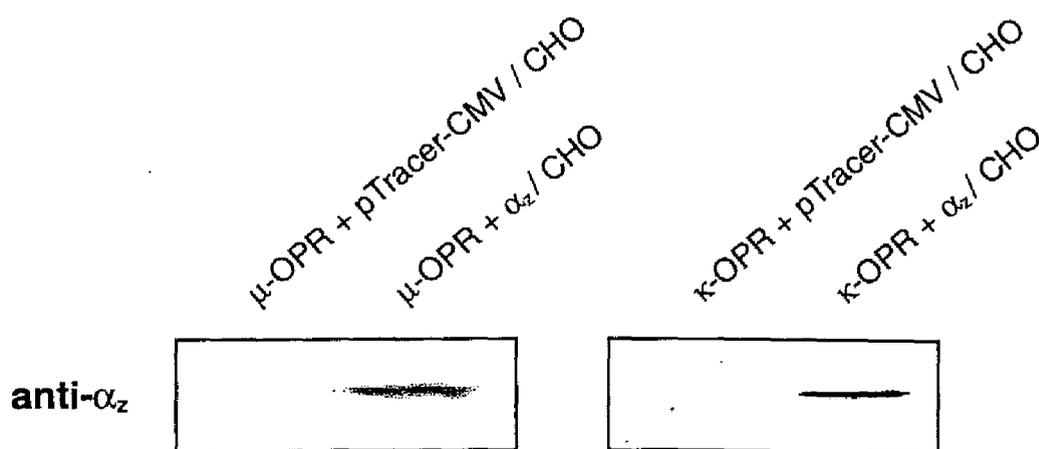


図2-9 CHO細胞における百日咳毒素非感受性G蛋白質 α_z サブユニットの発現 (western blotting)

μ -OPR+pTracer-CMV/CHO、 μ -OPR+ α_z /CHO、 κ -OPR+pTracer-CMV/CHO、 κ -OPR+ α_z /CHOから調整した膜標品 (50 μ g) をSDS-PAGE (12%ゲル) により分画し、ニトロセルロースメンブランにトランスファーした後、抗 α_z 抗体 (α_z のArg⁴ - Arg¹⁸を認識) を用いて免疫染色した。

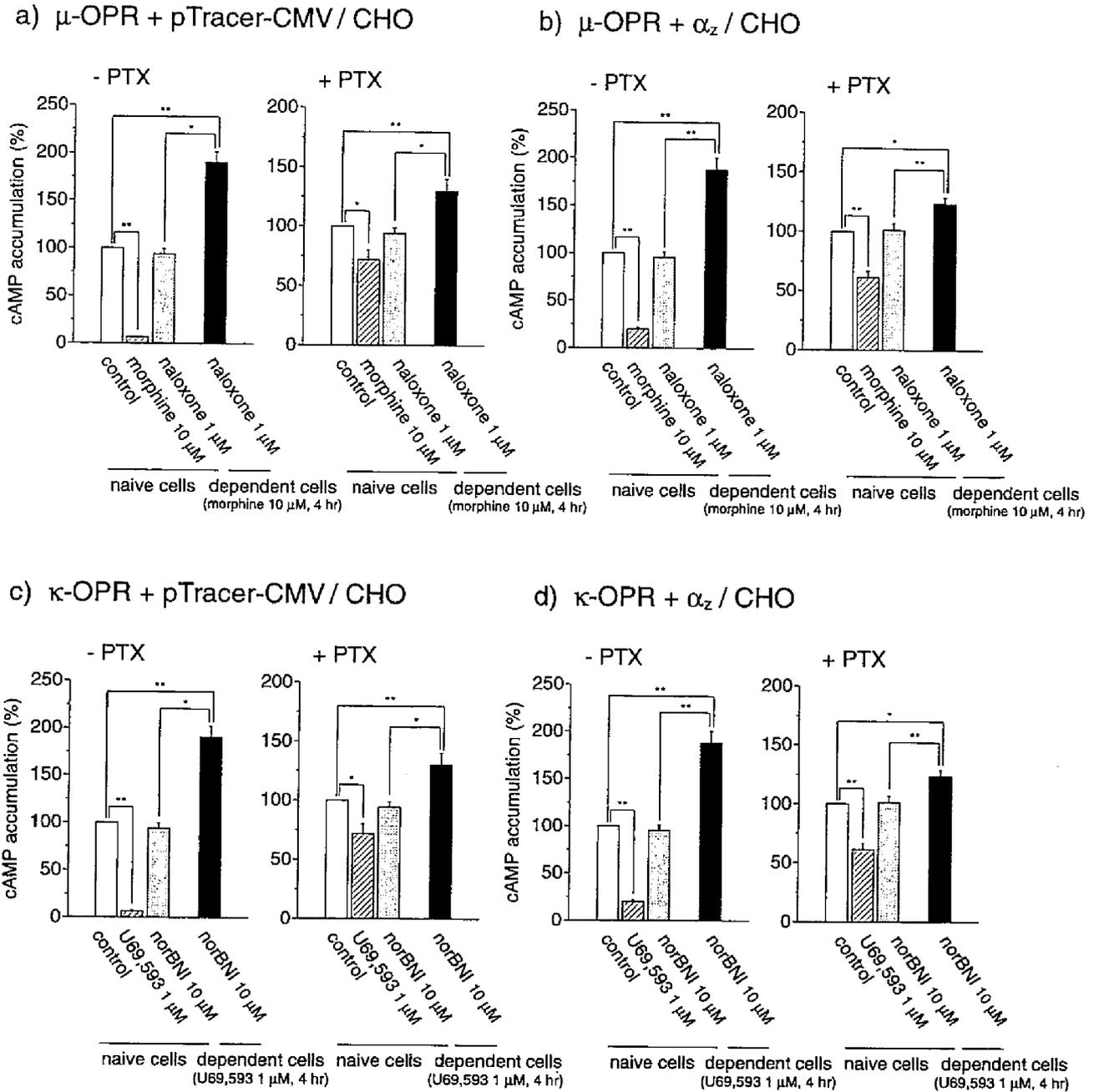


図2-10 κ オピオイド受容体と百日咳毒素非感受性G蛋白質 α_z サブユニットを共発現させたCHO細胞におけるアゴニスト持続的処置によるAC系への影響
 μ -OPR+pTracer-CMV/CHO (a)、 μ -OPR+ α_z /CHO (b)、 κ -OPR+pTracer-CMV/CHO (c)、 κ -OPR+ α_z /CHO (d)。内因性のG_i様G蛋白質の効果を除去するために、各CHO細胞を百日咳毒素(20 ng/ml)の存在下(+PTX)あるいは非存在下(-PTX)で16時間培養した。アゴニスト前処置を施していないnaive細胞と、アゴニスト(それぞれモルヒネ10 μ M、U69,593 1 μ M)を4時間持続的に前処置したdependent細胞に、アゴニスト(それぞれモルヒネ10 μ M、U69,593 1 μ M)あるいはアンタゴニスト(それぞれナロキソン1 μ M、norBNI 10 μ M)を処置し、forskolin誘発cAMP蓄積に対する効果を検討した。* P <0.05、** P <0.01 (Student's t test)、 n =5。

(8) AC系の過感受性形成に対するAC以降のカスケードの関与

AC系の過感受性形成に、アゴニスト持続的処置時のcAMP量の持続的な低下、あるいはそれ以降の細胞内情報伝達系の持続的な抑制が関与しているかを検討した。すなわち、 μ -OPR/CHOにおいて、アゴニストの持続的処置時の細胞内cAMP量の持続的な低下を回避する目的で、forskolin 100 μ M、ホスホジエステラーゼ阻害薬のIBMX 1 mMあるいはcAMPの非加水分解型のアナログである dibutylyl cAMP 3 μ Mを前処置1時間、アゴニスト（モルヒネ 10 μ M）と4時間、同時に処置しておき、細胞内cAMPのレベルを高い状態に維持した。しかしながら、いずれの処置においても、それらの処置を施していない細胞で見られた場合と同様、アゴニストの急性処置によりACは有意に抑制され、アゴニストの持続的処置により有意にAC系の過感受性が形成された（図2-11）。

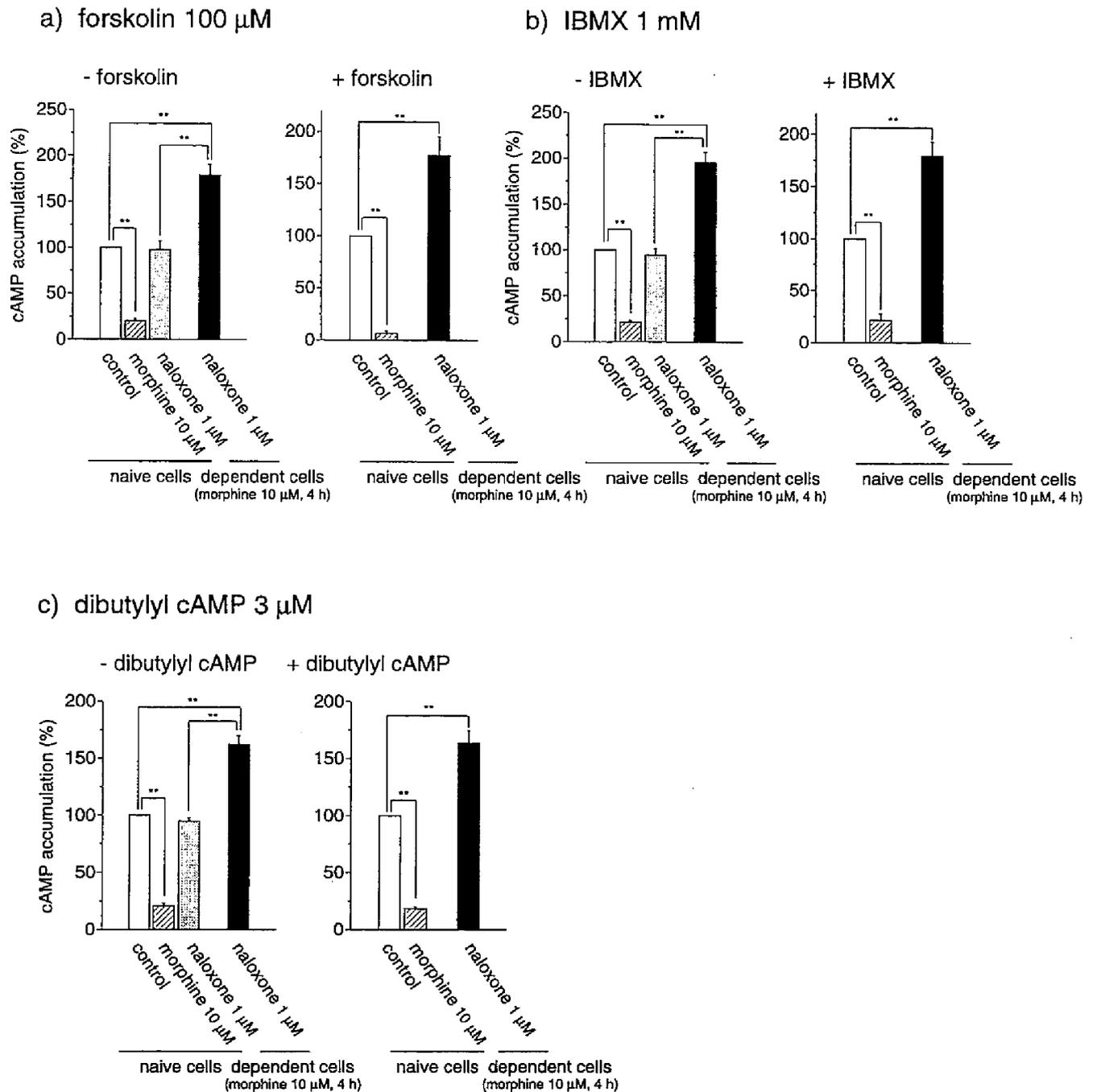


図 2-11 AC系の過感受性形成に対する forskolin、IBMX および dibutylyl cAMP の効果
 μ -OPR/CHO において、forskolin 100 μ M (a)、IBMX 1 mM (b) あるいは dibutylyl cAMP 3 μ M (c) を前処置 1 時間、モルヒネ 10 μ M と共に 4 時間、計 5 時間処置し、その後直ちにナロキソン 1 μ M を処置し、forskolin 誘発 cAMP 蓄積に対する効果を検討した。左のパネルは、forskolin、IBMX あるいは dibutylyl cAMP 非処置の細胞、右のパネルは処置した細胞を示している。値は全て cAMP assay の際の forskolin 非刺激時の cAMP 量を差し引いたもので示している。** $P < 0.01$ (Student's t test)、 $n = 3-5$ 。

考 察

本研究では、麻薬性鎮痛薬による依存形成・禁断症状の発現メカニズムを分子レベルで明らかにするため、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、in vitro系での依存形成・禁断症状発現のモデルと考えられているアゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性の形成メカニズム [24、25] について検討した。AC系の過感受性の形成は、オピオイド受容体のサブタイプにかかわらず、比較的短時間（数分～数時間）のうちに形成された。また、オピオイド受容体と同様にG_i蛋白質と共役しACを抑制することが知られているムスカリン受容体m2サブタイプにおいても、アゴニストの持続的処置によりAC系の過感受性が形成された。これまでも、オピオイド受容体、ムスカリン受容体 [59、60] 以外にも、G_i蛋白質共役型受容体の α_2 アドレナリン受容体 [61、62]、ソマトスタチン受容体 [63]、A1アデノシン受容体 [64] などにおいても同様にAC系の過感受性が形成されることが報告されている。これらのことより、AC系の過感受性はG_i蛋白質共役型受容体に共通のメカニズムを介して形成されるものであると考えられている [65]。

これまで、モルヒネなどのオピオイドアゴニストの慢性処置により、脳内においてプロスタグランジンE₂受容体、 β_1 アドレナリン受容体などのG_s連関型受容体 [66、67]、 α_s サブユニット [66]、あるいはACタイプIあるいはタイプVIII [68、69] などの発現量が増加することが報告されており、このようなcAMP産生にかかわる情報伝達因子の発現量の増加がAC系の過感受性のメカニズムであることが推察されていた。しかしながら、本研究における蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を用いた検討から、培養細胞レベルでのAC系の過感受性の形成には新たな蛋白質の合成は関与せず、情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていることが示された。

アゴニストを持続的に処置した際、多くの受容体において脱感作現象が生じることが知られているが、そのメカニズムの一つにプロテインキナーゼA、プロテインキナーゼCあるいはG蛋白質共役型受容体キナーゼによる受容体のリン酸化が深く関与していることが明らかにされている [70]。しかしながら、AC系の過感受性形成に対して、各種プロテインキナーゼ阻害薬 (H7、H8、H89、staurosporine、calphostin C) は影響を与えなかったことから、少なくとも今回用いたプロテインキナーゼ阻害薬によって阻害されるリン酸化は関与せず、この現象が脱感作現象とは異なったメカニズムを介するものであることが考えられる。

これらの結果からAC系の過感受性形成に関わるメカニズムとして、この現象がG_i蛋白質共役型受容体に共通のメカニズムを介していると考えられること、受容体のリン酸化は関与しないことから、受容体以降の情報伝達調節系の機能的変化が重要な役割を果たしていると考え、まず、受容体-G蛋白質連関における変化をGTPase活性を指標として検討した。しかしながら、"cAMP overshoot" 現象の発現時にGTPase活性に変化は見られず、このACの過活性化がG蛋白質自身の活性化

(GTPase 活性上昇) を伴わずに生じていることが示された。

次に、G 蛋白質-AC 連関が過感受性の形成に必要なのかどうかを明らかにするため、オピオイド受容体と G 蛋白質 α サブユニットの α_{i2} と α_q との各種キメラ α サブユニット [56] を共発現させた CHO 細胞を用いた検討を行った。このようなリコンビナントの各種 α サブユニットが過感受性の形成に及ぼす影響を検討するためには、まず内因性に発現している G_i 蛋白質の効果を取り除かなければならない。従って、最初に百日咳毒素により ADP リボシル化を受ける α_{i2} の 352 番目のシステインをグリシンに置換した百日咳毒素非感受性の α_{i2} C352G [57, 58] を作製した。これまでに、各種キメラ α サブユニットなどを用いて α サブユニットの受容体および AC との連関領域に関する検討がなされ、 α サブユニットの C 末端領域わずか数残基のアミノ酸が受容体-G 蛋白質の選択性を決定していること [71, 72]、 α_{i2} の His²⁴⁵ から Thr³²² の 78 アミノ酸残基に AC との連関領域が存在すること [56] が明らかにされている。このような知見を基に、いくつかの百日咳毒素非感受性キメラ α_{i2}/α_q サブユニットを作製し、 κ オピオイド受容体と共発現させた CHO 細胞を樹立した。また、これらの各種百日咳毒素非感受性 α サブユニットが機能的にオピオイド受容体と連関しているかを検討するために、百日咳毒素を前処置した細胞から調整した膜標品におけるアゴニスト刺激による GTPase 活性の上昇を測定した。その結果、 κ オピオイド受容体単独、あるいは野生型の α_{i2} を共発現させた細胞においては、百日咳毒素の前処置により完全に GTPase 活性の上昇が阻害されたのに対し、 α_{i2} C352G、GQI Nsi I、GQI Sca I、GIQI を共発現させた細胞においては、百日咳毒素の前処置によっても GTPase 活性の上昇が見られた。このことは、以前 α_{2a} アドレナリン受容体において得られた結果 [58] と同様、各種百日咳毒素非感受性 α サブユニットが機能的にオピオイド受容体と連関し、アゴニスト処置により G 蛋白質の活性化を引き起こしていることを示している。そこで、これらの CHO 細胞株におけるアゴニスト持続的刺激による AC 系の過感受性形成能を検討した。まず、 κ オピオイド受容体単独、あるいは野生型の α_{i2} を共発現させた細胞においては、百日咳毒素の前処置によりアゴニスト急性処置による AC の抑制効果およびアゴニスト持続的処置による AC 系の過感受性形成はどちらも完全に阻害されたが、このことは AC 系の過感受性形成にはアゴニスト持続的処置時の百日咳毒素感受性 G_i 様蛋白質の活性化が必要であることを示している。一方、百日咳毒素非感受性の α_{i2} C352G を共発現させた細胞においては、百日咳毒素の前処置によってもアゴニストの急性処置により AC が有意に抑制され、またアゴニストの持続的処置により AC 系の過感受性が有意に形成されたことから、発現させた α_{i2} C352G が機能的に AC を抑制し、また、この α_{i2} C352G を介して AC 系の過感受性が形成されたことが示される。さらに、オピオイド受容体および AC との連関に必要な α_{i2} の C 末側、Met²⁴⁴-Phe³⁵⁵ の領域のみが α_{i2} 由来で、それより N 末側が α_q 由来の GQI Nsi I を共発現させた細胞においても同様に、百日咳毒素を前処置してもアゴニスト急性処置による AC の有意な抑制効果、ア

ゴニスト持続的処置による有意なAC系の過感受性形成がどちらも見られた。しかしながら、オピオイド受容体との連関に必要な α_{i2} のVal³³²-Phe³⁵⁵は α_{i2} 由来であるが、それよりN末側が全て α_q 由来で、 α_{i2} のACとの連関領域を含むMet²⁴⁴-Asn³³¹を持たないGQI Sca Iを共発現させた細胞においては、百日咳毒素の前処置によってアゴニスト急性処置によるACの抑制効果、アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成は、どちらも完全に阻害された。 α_{i2} のACとの連関領域を含むMet²⁴⁴-Asn³³¹を持つGQI Nsf Iを共発現させた細胞においては、どちらの効果も見られた。これらの結果は α_{i2} のMet²⁴⁴-Asn³³¹がAC系の過感受性形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、この α_{i2} のACとの連関領域を含むMet²⁴⁴-Asn³³¹のみが α_q 由来の領域に置換されたGIQIを共発現させた細胞においても、百日咳毒素の前処置により、どちらの効果も完全に阻害された。これらの結果から、AC系の過感受性の形成には α_{i2} のACとの連関に関与する領域、Met²⁴⁴-Asn³³¹の存在と機能保持が必要であるが、 α_{i2} の他の領域、すなわちMet¹-Arg²⁴³あるいはVal³³²-Phe³⁵⁵が持続的に活性化されていようとも、ACを抑制することができない α_{i2} は過感受性を形成することができないことを示唆している。

一方、オピオイド受容体などのG_i共役型受容体は多くの場合、百日咳毒素非感受性G蛋白質G₂とも連関し、ACの活性を抑制することができることが報告されている [73, 74]。本研究において、AC系の過感受性形成が百日咳毒素非感受性G蛋白質 α サブユニット α_z を介しても形成されることを明らかにした。すなわちこのことは、 α_i に限らず、ACを抑制することが可能なG蛋白質 α サブユニットが、連関している受容体の連続的な刺激に対応してACの活性を持続的に抑制することが重要な役割を果たしていることを示唆している。

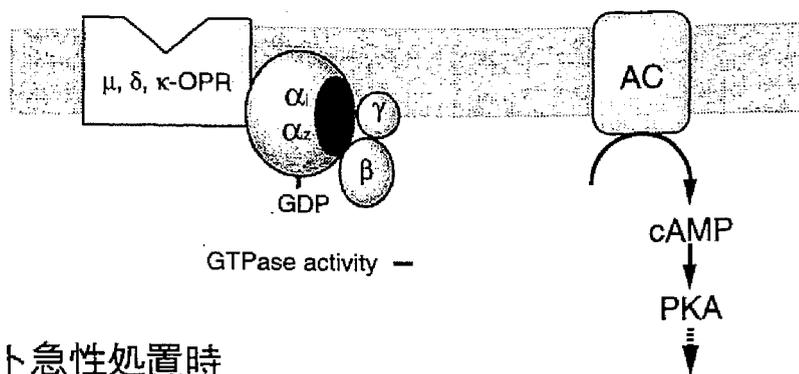
これまでの報告において、AC系の過感受性形成はACのアイソザイムに特異的であることが明らかにされている [75-78]。すなわち、アゴニストの急性処置により、ACのタイプI、V、VIおよびVIIIは抑制されるが、逆にACタイプII、IV、VIIは促進され、ACタイプIIIには影響はなく、またアゴニストの持続的処置により、ACタイプI、V、VIおよびVIIIにおいてはAC系の過感受性が形成されるが、ACタイプII、III、IV、VIIにおいては形成されず、このことはオピオイド受容体の活性化により α_i を介して抑制されるタイプのACアイソザイムにおいてのみ、過感受性が形成されることを示している。これらの知見を考え併せると、オピオイド受容体などのG_i共役型受容体においてアゴニスト持続的刺激により形成されるAC系の過感受性は、受容体あるいはGタンパク質そのものが持続的に活性化されることよりも、むしろG蛋白質 α サブユニットがACを持続的に抑制することが重要であることが示唆される。

さらに、ACより下流のカスケードの関与を検討した。すなわち、cAMPの持続的な低下、あるいはそれ以降の細胞内情報伝達系の持続的な抑制がAC系の過感受性形成に関わっているかを検討するため、アゴニスト持続的処置時のcAMP量を

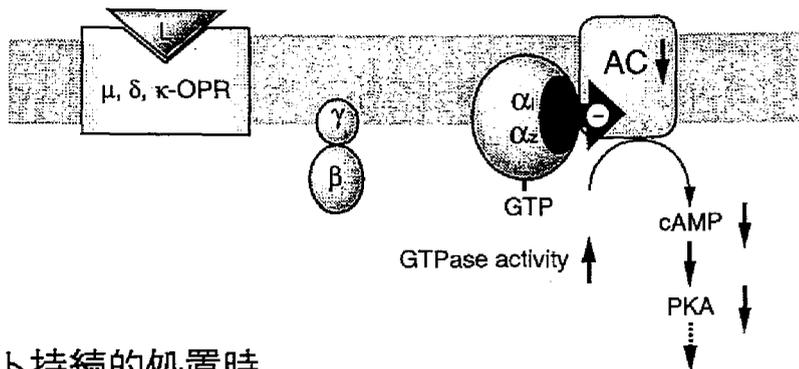
forskolin、IBMX および dibutylyl cAMP により高い状態に維持した。しかしながらいずれの処置においても同様にAC系の過感受性が形成されたことより、cAMP量の持続的な低下による細胞内情報伝達系の機能的変化が関与しているわけではないことが示唆される。

まとめると、クローン化オピオイド受容体発現細胞を用い、アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成の分子メカニズムを解析したところ、その形成に新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達調節系の機能的な変化が重要な役割を果たしていること、リン酸化の関与は少ないと考えられること、また、受容体あるいはG蛋白質そのものが持続的に活性化されることよりも、むしろG蛋白質 α サブユニットがACを持続的に抑制することが重要であること、またAC以降の細胞内情報伝達系の機能的変化の関与は少ないことが示唆される (図 2-12)。

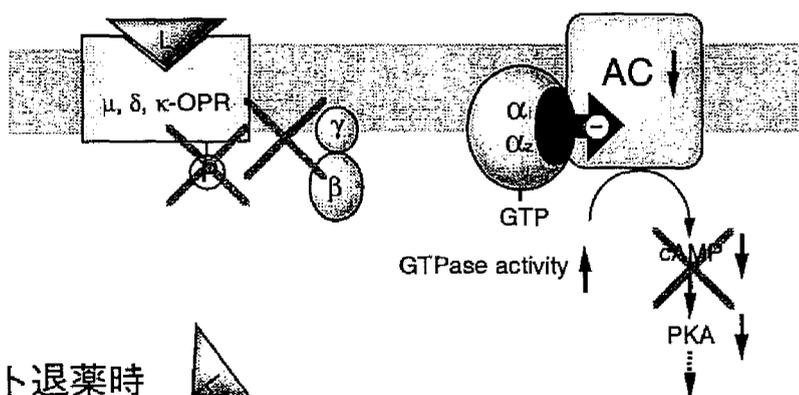
無処置時



アゴニスト急性処置時



アゴニスト持続的処置時



アゴニスト退薬時

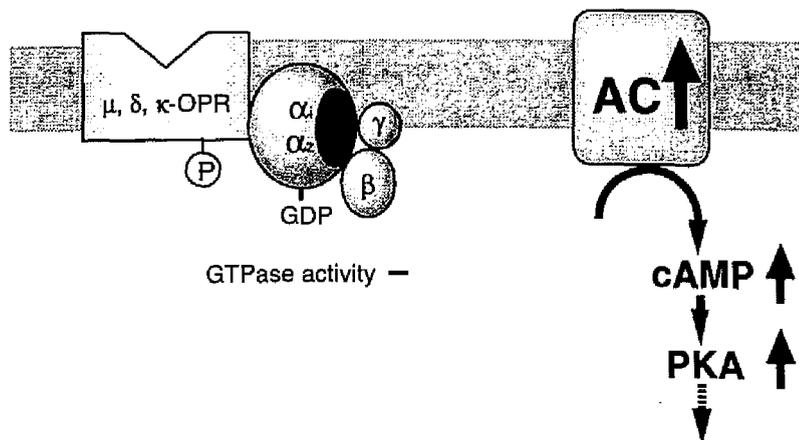


図 2-12 アゴニスト持続的処置によるAC系の過感受性形成メカニズムに関する仮説

総括および結論

本研究において著者は、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムおよびその制御に関して行動および分子薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

1. モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発跳躍行動はEP₃受容体アゴニストを大槽内投与することにより抑制されたが、EP₁、EP₂、IP、FP受容体に対すアゴニストは何ら影響を与えなかった。また、モルヒネ依存ラットにおいてEP₃受容体アゴニストの側脳室内投与により、ナロキソンにより誘発されるほとんど全ての禁断症状が抑制された。また、モルヒネ禁断時のラット脳内 *c-fos* mRNA の発現誘導は、大脳皮質、視床、視床下部を含む検討したほぼ全ての脳部位において抑制され、特に青斑核においては著明かつ有意な抑制作用が見られた。さらに、青斑核におけるTH mRNA陽性細胞のほとんど全てにおいて μ オピオイド受容体mRNAが、また、半数以上においてEP₃受容体mRNAがそれぞれ発現していることを明らかにした。
2. クローン化 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体いずれのタイプを発現させたCHO細胞においても、アゴニスト持続的処置によりAC系の過感受性は、比較的短時間（数分～数時間）のうちに形成された。また、その形成には新たな蛋白質の合成は関与せず、細胞内情報伝達系の機能的な変化が関与していることが示された。しかしながら、各種プロテインキナーゼ阻害薬によっても、その形成に影響は見られず、また、過感受性形成時にGTPase活性の変化は見られなかった。さらに、オピオイド受容体と各種キメラ α_{12}/α_q を共発現させたCHO細胞を用いた検討を行った結果、過感受性の形成には α_{12} のACとの連関に関与する領域（Met²⁴⁴-Asn³³¹）の存在と機能保持が必要であるが、AC以降の細胞内情報伝達系の機能的変化の関与は少ないことを示した。また、AC系の過感受性は百日咳毒素非感受性 α_z を介しても形成されることを明らかにした。

以上、著者は、EP₃受容体アゴニストによりナロキソン誘発禁断症状が抑制されることを見だし、その抑制機構の一部に青斑核ノルアドレナリン神経におけるモルヒネ禁断時の神経興奮の抑制が関与していることを明らかにし、G_i蛋白質共役型受容体がモルヒネ禁断症状を制御しうる可能性を示した。さらに、*in vitro*系での麻薬依存形成のモデルと考えられているAC系の過感受性形成のメカニズムの一部を明らかにし、G蛋白質-AC連関の重要性を示した。本研究成果は、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムの全容の解明のための重要な知見であり、依存を生ぜずに強い鎮痛効果を有する新規な鎮痛薬、あるいは禁断症状に対する有効な治療薬の創製につながる有用な基礎的知見となり得る。

謝 辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 佐藤公道 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂いた京都大学大学院薬学研究科助教授 南 雅文 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科教授 赤池昭紀 先生、助教授 金子周司 先生、並びに、助教授 香月博志 先生に深く感謝いたします。

さらに、本研究にご協力いただきました増田孝裕 修士、渡辺 豪 修士、並びに、小澤 徹 修士に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

- 1) Nakagawa, T., Minami, M., Kastumata, S., Ienaga, Y. and Satoh, M.
Suppression of naloxone-precipitated withdrawal jumps in morphine-dependent mice by stimulation of prostaglandin EP₃ receptor.
Br. J. Pharmacol., **116**, 2661-2666 (1995)
- 2) Nakagawa, T., Ozawa, T., Watanabe, T., Minami, M. and Satoh, M.
Sensitization of the adenylyl cyclase system in cloned κ -opioid receptor-transfected cells following sustained agonist treatment: a chimeric study using G protein α_{i2}/α_q subunits.
Jpn. J. Pharmacol., **81**, 353-361 (1999)
- 3) Ozawa, T., Nakagawa, T., Minami, M. and Satoh, M.
Supersensitization of the adenylyl cyclase system in Chinese hamster ovary cells co-expressing cloned opioid receptors and G_z, a PTX-insensitive G protein.
Neurosci. Lett., **267**, 117-120 (1999)
- 4) Nakagawa, T., Masuda, T., Watanabe, T., Minami, M. and Satoh, M.
Possible involvement of the locus coeruleus in inhibition by prostanoid EP₃ receptor-selective agonists of morphine withdrawal syndrome in rats.
Eur. J. Pharmacol., **390**, 257-266 (2000)

引用文献

- 1) Bhargava, H.N.: Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome, and self-administrative behavior. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 293–324 (1994)
- 2) Aghajanian, G.K.: Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature*, **276**, 186–188 (1978)
- 3) DiStefano, P.S. and Brown, O.M.: Biochemical correlates of morphine withdrawal. 2. Effects of clonidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 339–344 (1985)
- 4) Taylor, J.R., Elsworth, J.D., Garcia, E.J., Grant, S.J., Roth, R.H. and Redmond Jr., D.E.: Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. *Psychopharmacology*, **96**, 121–134 (1988)
- 5) Fundytus, M.E. and Coderre, T.J.: Morphine dependence is affected by activity at metabotropic, as well as ionotropic (NMDA), glutamate receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 1215–1220 (1994)
- 6) Trujillo, K.A. and Akil, H.: Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, **251**, 85–87 (1991)
- 7) Ueda, H., Tamura, S., Satoh, M. and Takagi, H.: Excess release of substance P from the spinal cord of mice during morphine withdrawal and involvement of the enhancement of presynaptic Ca^{2+} entry. *Brain Res.*, **425**, 101–105 (1987)
- 8) Kreeger, J.S. and Larson, A.A.: Substance P-(1-7), a substance P metabolite, inhibits withdrawal jumping in morphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **238**, 111–115 (1993)
- 9) Maldonado, R., Girdlestone, D. and Roques, B.P.: RP 67580, a selective antagonist of neurokinin-1 receptors, modifies some of the naloxone-precipitated morphine withdrawal signs in rats. *Neurosci. Lett.*, **156**, 135–140 (1993)
- 10) Malin, D.H., Lake, J.R., Leyva, J.E., Hammond, M.V., Rogillio, R.B., Arcangeli, K.R., Ludgate, K., Moore, G.M. and Payza, K.: Analog of neuropeptide FF attenuates morphine abstinence syndrome. *Peptides*, **12**, 1011–1014 (1991)
- 11) Vela, G., Ruiz-Gayo, M. and Fuentes, J.A.: Anandamide decreases naloxone-precipitated withdrawal signs in mice chronically treated with morphine. *Neuropharmacology*, **34**, 665–668 (1995)
- 12) Dafny, N.: Interferon modifies morphine withdrawal phenomena in rodents. *Neuropharmacology*, **22**, 647–651 (1983)

- 13) Okutomi, T., Nishizawa, T., Inagawa, H., Soma, G., Minami, M., Satoh, M. and Mizuno, D.: Inhibition of morphine dependence by a lipopolysaccharide from *Pantoea agglomerans*. *Eur. Cytokine Netw.*, **3**, 417–420 (1992)
- 14) Katsumata, S., Minami, M., Nakagawa, T. and Satoh, M.: Intracisternal administration of interleukin-1 β attenuates naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **278**, 143–150 (1995)
- 15) Coleman, R.A., Smith, W.L. and Narumiya, S.: International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 205–229 (1994)
- 16) Ichikawa, A., Sugimoto, Y. and Negishi, M.: Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J. Lipid Mediat. Cell. Signal.*, **14**, 83–87 (1996)
- 17) Sheng, M. and Greenberg, M.E.: The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, **4**, 477–485 (1990)
- 18) Morgan, J.I. and Curran, T.: Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 421–451 (1991)
- 19) Hayward, M.D., Duman, R.S. and Nestler, E.J.: Induction of the *c-fos* proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res.*, **525**, 256–266 (1990)
- 20) Stornetta, R.L., Norton, F.E. and Guyenet, P.G.: Autonomic areas of rat brain exhibit increased Fos-like immunoreactivity during opiate withdrawal in rats. *Brain Res.*, **624**, 19–28 (1993)
- 21) Beckmann, A.M., Matsumoto, I. and Wilce, P.A.: Immediate early gene expression during morphine withdrawal. *Neuropharmacology*, **34**, 1183–1189 (1995)
- 22) Maldonado, R.: Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 91–104 (1997)
- 23) Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L.H. and Koob, G.F.: Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 669–677 (1992)
- 24) Nestler, E.J., Hope, B.T. and Widnell, K.L.: Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, **11**, 995–1006 (1993)
- 25) Nestler, E.J. and Aghajanian, G.K.: Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, **278**, 58–63 (1997)

- 26) Hui, K.S. and Roberts, M.B.: An improved implantation pellet for rapid induction of morphine dependence in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **27**, 569-573 (1975)
- 27) Ueda, H., Amano, H., Shiomi, H. and Takagi H.: Comparison of the analgesic effects of various opioid peptides by a newly devised intracisternal injection technique in conscious mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, **56**, 265-268 (1979)
- 28) Gibson, R.D. and Tingstad, J.E.: Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *J. Pharmaceu. Sci.*, **59**, 426-427 (1970)
- 29) Paxinos, G. and Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn., Academic Press, San Diego (1986)
- 30) Negishi, M., Harazono, A., Sugimoto, Y., Hazato, A., Kurozumi, S. and Ichikawa, A.: TEI-3356, a highly selective agonist for the prostaglandin EP₃ receptor. *Prostaglandins*, **48**, 275-283 (1994)
- 31) Minami, T., Nishihara, I., Uda, R., Ito, S., Hyodo, M. and Hayashi, O.: Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E₂ to mice. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 735-740 (1994)
- 32) Oka, T., Aou, S. and Hori, T.: Intracerebroventricular injection of prostaglandin E₂ induces thermal hyperalgesia in rats: the possible involvement of EP₃ receptors. *Brain Res.*, **663**, 287-292 (1994)
- 33) Calvino, B., Lagowska, J. and Ben-Ari, Y.: Morphine withdrawal syndrome: Differential participation of structures located within the amygdaloid complex and striatum of the rats. *Brain Res.*, **177**, 19-34 (1979)
- 34) Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Mizuno, N., Narumiya, S. and Ichikawa, A.: Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP₃ in the mouse nervous system. *Neuroscience*, **62**, 919-928 (1994)
- 35) Rasmussen, K., Brodsky, M. and Inturrisi, C.E.: NMDA antagonists and clonidine block *c-fos* expression during morphine withdrawal. *Synapse*, **20**, 68-74 (1995)
- 36) Silverstone, P.H., Done, C. and Sharp, T.: Clonidine but not nifedipine prevents the release of noradrenaline during naloxone-precipitated opiate withdrawal: an in vivo microdialysis study in the rat. *Psychopharmacology*, **109**, 235-238 (1992)
- 37) Vargas, M.L., Martínez-Piñero, M.G. and Milanés, M.: Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: the role of calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **355**, 501-506 (1997)

- 38) Exner, H.J. and Schlicker, E.: Prostanoid receptors of the EP₃ subtype mediate the inhibitory effect of prostaglandin E₂ on noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **351**, 46–52 (1995)
- 39) Minami, M. and Satoh, M.: Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.*, **23**, 121–145 (1995)
- 40) Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S.: Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6463–6466 (1992)
- 41) Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3092–3096 (1975)
- 42) Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M.: Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3365–3369 (1977)
- 43) Traber, J., Gullis, R. and Hamprecht, B.: Influence of opiates on the levels of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Life Sci.*, **16**, 1863–1868 (1975)
- 44) Ammer, H. and Schulz, R.: Morphine dependence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with adaptive changes in both the quantity and functional interaction of PGE₁ receptors and stimulatory G proteins. *Brain Res.*, **707**, 235–244 (1996)
- 45) Yu, V.C., Eiger, S., Duan, D.-S., Lameh, J. and Sadée, W.: Regulation of cyclic AMP by the μ -opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.*, **55**, 1390–1396 (1990)
- 46) Wang, Z., Bilsky, E.J., Porreca, F., Sadée, W.: Constitutive μ opioid receptor activation as a regulatory mechanism underlying narcotic tolerance and dependence. *Life Sci.*, **54**, 339–350 (1994)
- 47) Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K. and Nestler, E.J.: Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.*, **10**, 2308–2317 (1990)
- 48) Duman, R.S., Tallman, J.F. and Nestler, E.J.: Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in Brain: specific effects in locus coeruleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 1033–1039 (1988)
- 49) Van Vliet, B.J., Van Rijswijk, A.L.C.T., Wardeh, G., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N.M.: Adaptive changes in the number of G_s- and G_i-proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **245**, 23–29 (1993)

- 50) Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D.B., Sevarino, K.A., Crain, S.M. and Nestler, E.J.: A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.*, **548**, 100–110 (1991)
- 51) Ho, I.K., Loh, H.H. and Way, E.L.: Effects of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate on morphine tolerance and physical dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **185**, 347–357 (1973)
- 52) Collier, H.O.J. and Francis, D.L.: Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. *Nature*, **255**, 159–162 (1975)
- 53) Katsumata, S., Minami, M., Nakagawa, T., Iwamura, T. and Satoh, M.: Pharmacological study of dihydroetorphine in cloned μ -, δ - and κ -opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **291**, 367–373 (1995)
- 54) Cassel, D. and Selinger, Z.: Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **452**, 538–551 (1976)
- 55) Minami, M., Nakagawa, T., Seki, T., Onogi, T., Aoki, Y., Katao, Y., Katsumata, S. and Satoh, M.: A single residue, Lys108, of the δ -opioid receptor prevents the μ -opioid-selective ligand [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]enkephalin from binding to the δ -opioid receptor. *Mol. Pharmacol.*, **50**, 1413–1422 (1996)
- 56) Medina, R., Grishina, G., Meloni, E.G. and Muth, T.R.: Localization of the effector-specifying regions of G_{i2 α} and G_{q α} . *J. Biol. Chem.*, **271**, 24720–24727 (1996)
- 57) Milligan, G.: Techniques used in the identification and analysis of function of pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins. *Biochem. J.*, **255**, 1–13 (1988)
- 58) Wise, A., Watson-Koken, M.-A., Rees, S., Lee, M. and Milligan, G.: Interactions of the α_{2A} -adrenoceptor with multiple G_i-family G-proteins: studies with pertussis toxin-resistant G-protein mutants. *Biochem. J.*, **321**, 721–728 (1997)
- 59) Thomas, J.M. and Hoffman, B.B.: Adaptive increase in adenylyl cyclase activity in NG108-15 and S49 cells induced by chronic treatment with inhibitory drugs is not due to a decrease in cyclic AMP concentrations. *Cell. Signaling*, **4**, 417–428 (1992)
- 60) Reithmann, C. and Werdan, K.: Chronic muscarinic cholinergic stimulation increases adenylyl cyclase responsiveness in rat cardiomyocytes by a decrease in the level of inhibitory G-protein α -subunits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **351**, 27–34 (1995)
- 61) Jones, S.B., Toews, M.L., Turner, J.T. and Bylund, D.B.: α_2 -Adrenergic receptor-mediated sensitization of forskolin-stimulated cyclic AMP production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1294–1298 (1987)

- 62) Jones, S.B. and Bylund, D.B.: Characterization and possible mechanism of α_2 -adrenergic receptor-mediated sensitization of forskolin-stimulated cyclic AMP production in HT29 cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 14236-14244 (1988)
- 63) Heisler, S. and Srikant, C.B.: Somatostatin-14 and somatostatin-28 pretreatment down-regulate somatostatin-14 receptors and have biphasic effects on forskolin-stimulated cyclic adenosine, 3',5'-monophosphate synthesis and adrenocorticotropin secretion in mouse anterior pituitary tumor cells. *Endocrinology*, **117**, 217-225 (1985)
- 64) Parsons, W.J. and Stiles, G.L.: Heterologous desensitization of the inhibitory A_1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 841-847 (1987)
- 65) Thomas, J.M. and Hoffman, B.B.: Adenylate cyclase supersensitivity: a general means of cellular adaptation to inhibitory agonists? *Trends Pharmacol. Sci.*, **8**, 308-311 (1987)
- 66) Ammer, H. and Schulz, R.: Morphine dependence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with adaptive changes in both the quantity and functional interaction of PGE_1 receptors and stimulatory G proteins. *Brain Res.*, **707**, 235-244 (1996)
- 67) Ammer, H. and Schulz, R.: Chronic morphine treatment increases stimulatory β_2 adrenoceptor signaling in A431 cells stably expressing the μ opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 512-520 (1997)
- 68) Lane-Ladd, S.B., Pineda, J., Boundy, V.A., Pfeuffer, T., Krupinski, J., Aghajanian, G.K. and Nestler, E.J.: CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J. Neurosci.*, **17**, 7890-7901 (1997)
- 69) Matsuoka, I., Maldonado, R., Defer, N., Noël, F., Hanoune, J. and Roques, B.-P.: Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur. J. Pharmacol.*, **268**, 215-221 (1994)
- 70) Chuang, T.T., Lacovelli, L., Sallese, M. and Blasi, A.D.: G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, **17**, 416-421 (1996)
- 71) Conklin, B. and Bourne, H.R.: Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$ receptors, and effectors. *Cell*, **73**, 631-641 (1993)
- 72) Liu, J., Conklin, B.R., Blin, N., Yun, J. and Wess, J.: Identification of a receptor / G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11642-11646 (1995)
- 73) Lai, H.W.L., Minami, M., Satoh, M. and Wong, Y.H.: G_2 coupling to the rat κ -opioid receptor. *FEBS Lett.*, **360**, 97-99 (1995)

- 74) Wong, A., Conklin, B.R. and Bourne, H.R.: G₂-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science*, **255**, 339-342 (1992)
- 75) Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T. and Vogel, Z.: Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V supersensitization. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21309–21315 (1996)
- 76) Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Saya, D., Bayewitch, M. and Vogel, Z.: Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5040–5047 (1997)
- 77) Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Bayewitch, M., Heldman, E. and Vogel, Z.: Regulation of adenylyl cyclase isozymes on acute and chronic activation of inhibitory receptors. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 419–426 (1998)
- 78) Thomas, J.M. and Hoffman, B.B.: Isoform-specific sensitization of adenylyl cyclase activity by prior activation of inhibitory receptors: role of bg subunits in transducing enhanced activity of the type VI isoform. *Mol. Pharmacol.*, **49**, 907-914 (1996)