

氏名	なか がわ たか ゆき 中 川 貴 之
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 630 号
学位授与の日付	平成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	麻薬依存形式・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
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道 教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐

論 文 内 容 の 要 旨

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は、臨床上有用な鎮痛薬として用いられているが、身体的および精神的依存を生じやすく、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。麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関しては、これまでも数多くの研究がなされてきたにも拘わらず、未だ不明な点が多く残されているが、青斑核などの特定の脳部位におけるアデニル酸シクラーゼ (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。本研究において著者は、Gi 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 E₂ 受容体 EP₃ 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、その制御機構について検討を行った。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、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い、以下の新知見を得た。

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

モルヒネ依存マウスを用いて、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禁断症状に対する影響を行動薬理学的に検討した。モルヒネ依存マウスにおいてナロキシソンの腹腔内投与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に対して、プロスタグランジン E₂ 受容体 EP₃ サブタイプに対するアゴニストである M & B28,767 (100fg-10pg) および sulprostone (EP₁/EP₃ アゴニスト, 100pg, 1 ng) の大槽内投与は、U-shape の用量作用関係を持つ有意な抑制作用を示した。しかしながら、iloprost (EP₁/IP 受容体アゴニスト), butaprost (EP₂ 受容体アゴニスト) および prostaglandin F_{2α} (FP 受容体アゴニスト) は、10fg-100ng 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。また、モルヒネ依存ラットを用いて様々な禁断症状に対する効果を検討したところ、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) が、有意に抑制された。次に、モルヒネ禁断により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。M & B28,767 (1 pg) を側脳室内投与することにより、モルヒネ退薬時のラット脳内 *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。また、青斑核におけるチロシン水酸化酵素 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た。以上の結果から、 μ 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る EP₃ 受容体の活性化により、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、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たものと考えられる。

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

モルヒネ退薬時に青斑核などの脳部位や NG108-15 などの培養細胞で報告されている cAMP overshoot 現象 (AC 系の過感受性) の分子メカニズムを明らかにするために、クローン化オピオイド受容体発現細胞を *in vitro* でのモデル系として用いた検討を行った。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、持続的処置するアゴニストに対して濃度依存的に、比較的短時間 (数分~数時間) のうちに形成された。また、蛋白質合成阻害薬 cycloheximide を用いた検討から、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 (H7, H8, H89, staurosporine, calphostin C) の前処置によっても、その形成に影響は見られず、また、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が、過感受性形成時に GTPase 活性の変化は見られなかった。そこで、G 蛋白質-AC 連関の関与を検討するため、オピオイド受容体と各種キメラ G 蛋白質 α_{i2}/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_{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ことが示された。また、オピオイド受容体と百日咳毒素非感受性 α_2 を共発現させた検討より、AC 系の過感受性は α_2 を介しても形成されることを示した。

以上、著者は、EP₃ アゴニストの脳室内投与によりナロキソン誘発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、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。本研究の成果は、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。

論文審査の結果の要旨

強力鎮痛薬であるモルヒネ等の麻薬性鎮痛薬は身体的及び精神的依存形成能が高い。この依存形成、禁断症状発現のメカニズムには未だ不明な点が多いが、最近青斑核などの特定の脳部位におけるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の代償的過感受性の関与の可能性が指摘されている。著者は、AC を抑制することが知られているプロスタグランジン E₂ 受容体 EP₃ サブタイプの選択的アゴニストの脳室内投与のモルヒネ禁断症状に対する影響およびクローン化オピオイド受容体発現細胞を用いた *in vitro* 系で依存形成・禁断症状発現機序について検討し、以下の新知見を得た。

第一章 プロスタグランジン E₂ 受容体 EP₃ サブタイプの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 受容体アゴニスト作用を持つ M & B28,767 (0.1, 1.0, 10 pg), sulproston (0.1, 1.0 ng) の大槽内投与により抑制されるが、EP₁, EP₂, IP, FP 各受容体のアゴニストによっては有意な影響を受けないこと、さらに、モルヒネ依存ラットでも EP₃ 受容体アゴニストの側脳室内投与により、下痢以外の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) が抑制されることを示した。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認められること、さらに、青斑核内では、チロシンヒドロキシラーゼ mRNA 陽性細胞の、ほとんどにおいて 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。

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

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) で形成され、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すること、しかし、各種プロテインキナーゼ阻害薬（H7, H8, H89, staurosporine, calphostin C）はその形成に影響せず、また、過感受性形成時に GTPase 活性はほとんど変化していないことを示した。さらに、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_{12}/α_q を共発現させた CHO 細胞を用いた検討結果から、過感受性形成には、 α_{12} の AC との連関に関与する領域（Met²²⁴-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寄与は少ないことを明らかにした。また、AC 系の過感受性は百日咳毒素非感受性 α_2 を介しても形成されることを示した。

以上著者は、モルヒネ依存動物のナロキソン誘発禁断症状が、EP₃ 受容体アゴニストにより、少なくとも一部は青斑核ノルアドレナリン神経における神経興奮抑制を介して、抑制されること、さらに、in vitro 系での研究により、AC 系の過感受性形成における G 蛋白質-AC 連関の重要性を明らかにした。これらの研究成果は、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムの全容解明に重要な知見であり、また、依存形成能の低い強力鎮痛薬あるいは禁断症状抑制薬の創製につながる有用な基礎的知見と考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年6月14日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。