

新制
薬
205

ヒトゲノム及び遺伝子改変マウスを用いた
 μ オピオイド受容体遺伝子に関する
行動および分子薬理学的研究

2004

井手 聡一郎

目次

緒言	1
第一章 日本人における μ オピオイド受容体遺伝子多型の同定と 覚醒剤依存との相関性の検討	3
方法	4
結果	7
考察	16
第二章 μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた ブプレノルフィンの鎮痛・報酬効果のメカニズム解析	19
方法	20
結果	24
考察	31
第三章 アドレナリン・ノルアドレナリン神経特異的に μ オピオイド受容体を導入したトランスジェニックマウスの作製と解析	34
第一節 遺伝子改変マウスの作製	35
方法と結果	35
第二節 遺伝子改変マウスを用いた行動薬理的解析	41
方法	41
結果	43
考察	48
総括および結論	51
謝辞	52
引用文献	53

緒言

μ オピオイド受容体は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の主たる受容体であり、鎮痛効果のみならず、依存や耐性、眠気、便秘といった副作用の発現に重要な役割を担っていることが明らかにされている。また、それら μ オピオイド受容体を介した作用には、少なからず個人差が存在する。臨床の現場において麻薬性鎮痛薬による疼痛治療が必要な際に、これら作用・副作用の個人差は、投与量の設計や多剤の併用、副作用抑制薬の使用の判断において、常に問題とされている。さらに、近年 μ オピオイド受容体は、麻薬性鎮痛薬以外の薬物・アルコール依存や精神疾患の一部にも関与していることが知られており、これらの治療においても同様に個人差が問題になるケースは多く存在する。 μ オピオイド受容体を介した作用において、個人差が生じるメカニズムを解明し、事前に予測・制御することが可能となれば、オピオイドを用いたテーラーメイド医療に深く貢献すると共に、患者にとってより質の高い医療を提供することが出来ると期待される。

個人差が生じるメカニズムとして、 μ オピオイド受容体発現量の個人差や、アミノ基の変異による蛋白の機能変化が考えられ、これらの変化は種々の遺伝子多型に起因する可能性が示唆されている。こういった従来解析が非常に困難であった遺伝子多型に起因する生体機能あるいは薬物作用の相違は、近年著しく進歩を遂げた遺伝子改変動物の作製等の個体レベルでの分子機能解析法により次第に明らかにされてきている。また一方で、現在までに、数多くの疾患・病態の遺伝的要因とヒト遺伝子多型との関係が研究されてきた。しかしながら、その多くは欧米人のゲノムを用いた解析で、人種によって遺伝子多型の有無並びに発生頻度は大きく異なることが知られており、日本人の疾患・病態と遺伝的要因を扱う上で日本人のゲノムを用いた解析は必須である。本研究において、著者は、 μ オピオイド受容体遺伝子に注目して、日本人ゲノムを用いて遺伝子多型を解析し、薬物依存における個人差との相関を検討すると共に、 μ オピオイド受容体遺伝子改変マウスを用いて、受容体量の変化が、麻薬性鎮痛薬の作用変化、並びにストレス応答に与える影響を検討した。

第一章では、日本人健常人の μ オピオイド受容体遺伝子多型をゲノムの広範囲にわたって解析し、多くの新規遺伝子多型並びに強度の連鎖不平衡を見いだした。また、覚醒剤依存患者のゲノムを用いた解析より、intron 2内のSNP、IVS2+G691Cにおいて、覚醒剤依存患者にてG alleleの頻度が高い傾向があり、さらに覚醒剤精神病様症状におけるいくつかの臨床的知見を基に分類したところ、有意に健常人と異なる多型頻度を示していることを見いだした。第二章では、 μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いて、疼痛治療においてオピオイドローテーションで使用され、また近年、薬物依存患者の退薬症候抑制にも広く用いられるようになった、ブプレノルフィンの鎮痛・報酬効果に関して検討を行った。ブプレノルフィンによる鎮痛作用は μ オピオイド受容体の存在が不可欠であるが、報酬効果は部分的に他のオピオイド受容体サブタイプが関与していることを明らかにした。第三章では、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系に特異的に μ オピオイド受容体を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。さらに μ オピオイド受容体ノックアウトマウスとの交配により、ヒト μ オピオイド受容体のみをアドレナ

リン・ノルアドレナリン神経系に特異的に発現するノックアウト・トランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。遺伝子導入により、モルヒネの鎮痛、耐性及び身体依存に変化は見られなかったが、ストレスに対する逃避行動に変化が見られ、アドレナリン・ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体がストレス応答ないし感受性に関与することを明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中あるいは表中で使用した略語は以下の通りである。

5'F	5'flanking region
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHO	Chinese hamster ovary
DAMGO	Tyr-D-Ala-Gly-N-Methyl-Phe-Gly-ol
DPDPE	Tyr-D-Pen-Gly-D-Pen-OH
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
IVS	intervening sequence
MAP	methamphetamine
norBNI	norbinaltorphimine
PCR	polymerase chain reaction
s.c.	subcutaneous injection
SNP	single nucleotide polymorphism
U69,593	(+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)1-oxaspiro[4,5]dec-8-yl]benzeneacetamide
UTR	untranslated region

また、遺伝子多型の位置は以下の法則で表記する。

5'F, 5'UTR:	開始コドン (ATG) の A から数えた塩基数 (A の直前を -1 とする) を major allele と minor allele で挟んで表記
exon 領域:	開始コドン (ATG) の A から数えた塩基数 (intron 部分を除いて計数) を major allele と minor allele で挟んで表記
intron 領域:	IVS の後ろに + であれば 5' 側の exon との境界から、- であれば 3' 側の exon との境界からを意味し、境界から数えた塩基数を major allele と minor allele で挟んで表記。但し、表中のこれまでに未報告の SNP に関して、位置の下二桁を xx と表記。
3'UTR:	終止コドン (TAA) の直後の塩基を 1 として数えた塩基数を major allele と minor allele で挟み、先頭に TAA+ を付けて表記

第一章

日本人における μ オピオイド受容体遺伝子多型の同定と 覚醒剤依存との相関性の検討

メタンフェタミンなどの覚醒剤は、モノアミン神経伝達を活性化することでその作用を発現しており、中でもドパミンが最も直接的に強化作用に関与していると考えられている [1]。ドパミン神経系とオピオイド神経系が相互作用を行うことは、一般的によく知られている。これまでに、オピオイド受容体アゴニストが、神経終末でのドパミン代謝を調節し、シナプス間隙へのドパミン放出を惹起すること [2] や、メタンフェタミン誘発ドパミン神経伝達の変化を減弱させること [3、4] が報告されている。さらに、近年の遺伝子欠損動物を用いた実験などからも、両神経系の密接な相互作用の存在が示されている [5 - 7]。それ故、オピオイド受容体の機能的変化が、覚醒剤依存並びに覚醒剤精神病様症状の形成され易さにおいて、個人差を生じさせている可能性が考えられる。

μ オピオイド受容体は、内因性のオピオイドペプチドや麻薬性鎮痛薬が、鎮痛作用並びに依存形成、耐性形成、禁断症状といった様々な副作用を発現する上で、非常に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。さらに最近では、麻薬性鎮痛薬以外の薬物やアルコールに対する依存や精神疾患の一部にもその関与が知られてきている [8 - 11]。オピオイドや非オピオイドの薬物による依存形成に、 μ オピオイド受容体遺伝子多型が、促進ないし抑制的に影響する可能性が考えられる。これまでに、 μ オピオイド受容体遺伝子の多型研究において、主に欧米人 (Caucasian、African-American) の遺伝子を用いて、翻訳領域や 5' UTR 並びに intron の一部を中心に多型の存在が示されている [12 - 14]。中でもアミノ基変異を引き起こす一塩基多型 A118G に関し、培養細胞系にて発現させた変異型受容体において、内因性リガンドの一つ、 β エンドルフィンの結合親和性が上昇すると報告され、注目を集めている。さらに様々な人種において、A118G を中心に麻薬・アルコール依存に関して調べられてきたが、関連性の有無は研究者によって異なっており、統一した結論には至っていないのが現状である [15 - 21]。一方で、現在までに数多くの疾患・病態の遺伝的要因とヒト遺伝子多型の関係が研究なされてきた。しかしながら、その多くは欧米人のゲノムを用いた解析であり、人種によって遺伝子多型の有無並びに発生頻度は大きく異なることが知られているので、日本人の疾患・病態と遺伝的要因を研究する上で、日本人のゲノムを用いた解析は必須である。そこで本研究では、覚醒剤依存の中でも日本国内で最も依存患者が多いメタンフェタミン依存、並びに覚醒剤精神病様症状の形成され易さにおける個人差と、日本人における μ オピオイド受容体遺伝子多型との相関性を明らかにすることを目的として検討を行った。

方法

(1) 研究対象

研究は、Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA) に所属する日本国内の精神病院(精神科)に入院中及び退院した、WHOの診断基準ICD-10 DCRでF15.2及びF15.5を示す、メタンフェタミン依存患者128名(男性99名、女性29名、平均年齢 35.9 ± 1.0 歳)、並びに、主に医療従事者で過去及び家族に薬物依存歴がなく、また精神疾患を患っていない、健常人179名(男性139名、女性40名、平均年齢 34.6 ± 1.5 歳)を対象に行った。また、健常人での多型頻度の解析の結果、エクソン1並びにイントロン2において、これまでに報告されてきた多型頻度と非常に異なる頻度でSNPが観察されたため、この2領域に関しては、健常人サンプルをそれぞれ34名並びに53名追加して、解析を行った。診断は、2人の熟練した精神科医による問診と、病院の記録を含めた入手可能な全ての情報を基に行われた。また、依存患者のうち、統合失調症、器質精神症候群、並びに他の精神性疾患を患った経歴のある患者は、研究対象より除外した。また、研究対象は全て日本人で、その出生並びに居住地は、北九州、瀬戸内、東海並びに関東地方に局限されていた。本研究は、JGIDAに所属する各機関での倫理審査にて承認を得た後、全ての研究対象者に、ゲノムサンプルを今回の研究に用いることに対しての、文書による同意を得て行った。

(2) 覚醒剤精神病様症状における症例分類解析

臨床情報を基にメタンフェタミン依存患者を分類して行った解析では、患者を以下の4項目に関してグループに分け、解析を行った。

(A) Latency of psychosis (使用開始から妄想・幻覚が発症するまでの期間)

- ・ 3年以内に発症 (n=54, 平均年数 = 0.83年)
- ・ 3年以上経過後に発症 (n=53, 平均年数 = 9.98年)

(B) Prognosis of psychosis (使用停止後、妄想・幻覚が持続する期間)

- ・ transient (n=72, 1ヶ月以内に消失)
- ・ middle (n=17, 1ヶ月から6ヶ月で消失)
- ・ prolong (n=26, 6ヶ月以上持続)

(C) Spontaneous relapse (再燃性の有(n=86)無(n=42))

(D) Poly drug abuse (多剤乱用)

- ・ none (n=36, メタンフェタミンの単独乱用)
- ・ easily accessible drug only (n=49, アルコール、シンナーに乱用歴)
- ・ heavy (n=43, モルヒネ、ヘロイン、大麻などに乱用歴)

また、メタンフェタミン依存患者のうち、各項目に関して臨床情報が得られなかった患者は、本解析から除外した。

(3) Genotyping

ゲノムサンプルは、各対象者より採取した血液検体から、通常フェノール抽出法を

用いて精製した。すなわち、全血に対して3倍量の溶血試薬（0.1 mM EDTA、155 mM NH_4Cl_2 ）を加え、室温で10分間放置した後、遠心し、沈殿を再懸濁させた後に、Proteinase K処理、RNase処理を行い、遠心して得られた上清から、フェノール・クロロホルム抽出さらにエタノール沈殿を経て、ゲノムDNAを調整した。ゲノムDNAを鋳型として、KOD Dash（TOYOBO、東京）を用いてPCR法を行い、エタノール沈殿にて精製後、シーケンス用の鋳型DNAとした。 μ オピオイド受容体遺伝子の5'側非翻訳領域（5' UTR並びに5' flanking region）は、開始コドンより上流5765 bpまでの領域を2つのPCR増幅（-5765 ~ -2272、-2612 ~ 421）を行うことで、目的とする全域を増幅した。エクソン1、エクソン2-3（イントロン2を含む）、エクソン4（終止コドンより下流2952 bpを含む）、さらにイントロン1及び3の一部は、それぞれの箇所別にPCR法によりDNA断片の増幅を行った（増幅領域は図1-1参照）。3'側非翻訳領域（3' UTR並びに3' flanking region）は、終止コドンより下流13830 bpまでの領域を、4つのPCR増幅（TAA+2004 ~ 6288、4980 ~ 10376、8292 ~ 12120、11260 ~ 14677）を行うことで、目的とする全域を増幅した。これらのPCR産物を鋳型として、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction（アプライドバイオシステム、東京）を用いたシーケンス法により塩基配列を解読し、遺伝子多型の解析を行った。まず初めに、健常人のゲノムサンプル44例を使用し、増幅したPCR断片の全領域を、計152本のプライマーを用いて、 μ オピオイド受容体遺伝子上に高頻度で見られる多型を見いだした。次に全エクソン領域と、高い頻度（Allelic frequency > 5%）で観察される多型を含む領域に関して、残りの健常人サンプル及びメタンフェタミン依存患者サンプルのゲノムDNAを用いて、 μ オピオイド受容体遺伝子の多型解析を行った。プライマーは、National Center of Biotechnology Information（Genebank Accessions no. NT-023451）にて公開されている遺伝子配列を参照にして、設計を行った。

（4）統計解析

健常人とメタンフェタミン依存患者のサンプル間での多型頻度の有意差検定は、カイ二乗検定を用いて行った（有意水準 $\alpha = 0.05$ ）。また、全ての多型に関して、カイ二乗検定を用いてHardy-Weinberg（HW）平衡の検討を行った。連鎖不平衡解析並びにハプロタイプ解析においては、健常人179例とメタンフェタミン依存患者128例の遺伝子型情報を、Arlequin program (<http://anthro.unige.ch/arlequin>で入手)[22]を用いて解析した。連鎖不平衡の尺度を示す値であるD'値並びに r^2 値は、以下の定義に基づき算出した。

定義：SNP A と SNP B とがあり、それぞれの allele を A,a と B,b とする。SNP A と SNP B とが作る 4 haplotypes を AB, Ab, aB, ab とし、それぞれの haplotype 頻度を P_{AB} , P_{Ab} , P_{aB} , P_{ab} とすると、

$$D = P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB}$$

($D > 0$ のとき)

$$D' = (P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB}) / \text{Minimum}(((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{Ab} + P_{ab})), ((P_{AB} + P_{Ab}) \times (P_{aB} + P_{ab})))$$

($D < 0$ のとき)

$$D' = (P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB}) / \text{Minimum}(((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{Ab} + P_{ab})), ((P_{aB} + P_{ab}) \times (P_{Ab} + P_{AB})))$$

$$r^2 = (P_{AB} \times P_{ab} - P_{Ab} \times P_{aB})^2 / \{(P_{AB} + P_{Ab})(P_{AB} + P_{aB})(P_{aB} + P_{ab})(P_{Ab} + P_{ab})\}$$

但し、 $\text{Minimum}(((P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{aB} + P_{ab})), ((P_{AB} + P_{Ab}) \times (P_{Ab} + P_{ab})))$ は、 $(P_{AB} + P_{aB}) \times (P_{aB} + P_{ab})$ と $(P_{AB} + P_{Ab}) \times (P_{Ab} + P_{ab})$ との内、値の小さい方をとることを意味する。

繰り返し多型における、健常人とメタンフェタミン依存患者サンプルの多型頻度の有意差は、モンテカルロ法を基に作製された CLUMP program [23]を用いて行った。

ハプロタイプ解析の結果から、HaploBlockFinder Version 0.6 (<http://cgi.uc.edu/cgi-bin/kzhang/haploBlockFinder.cgi>)を用いて連鎖ブロックを推定した。

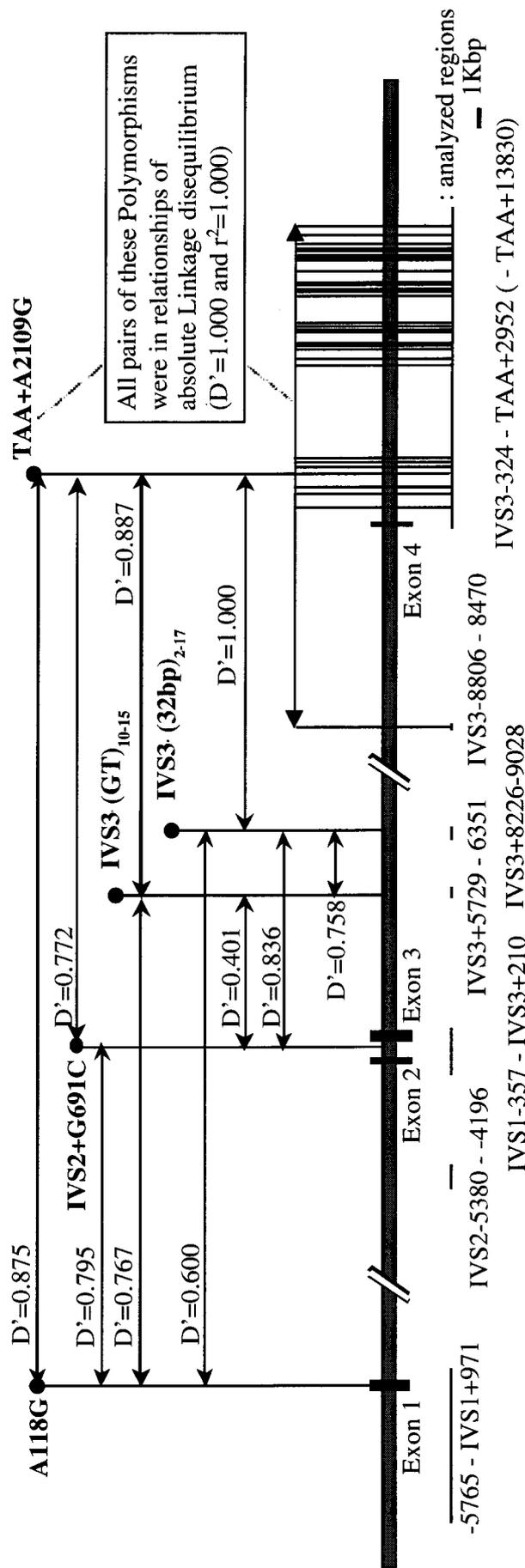


図 1-1 μ オピオイド受容体遺伝子の概略図：解析範囲並びに主要多型間の連鎖不平衡解析結果

図中ゲノム模式図下の7本の線で示した領域に関して多型解析を行った。また、A118G、IVS2+G691C、intron3から3' UTR 下流約4 kbp 付近まで広範囲で見られる完全連鎖不平衡を示す SNP 群、並びに二塩基繰り返し返し多型 IVS3 (GT)₁₀₋₁₅ と 32 塩基繰り返し返し多型の IVS3 (32bp)₂₋₁₇ に関して、健康人サンプルの多型頻度から連鎖不平衡の解析を行い、有意に連鎖不平衡の関係にある多型間での D' 値を図中に示した (P < 0.05)。

結果

(1) 日本人ゲノムにおける μ オピオイド受容体遺伝子多型の解析

まず始めに、 μ オピオイド受容体遺伝子多型を同定するため、日本人健常人のゲノム DNA を用いて、全エクソン領域、イントロン領域の一部、さらに 3' 並びに 5' の非翻訳領域に関して、PCR 増幅の後、配列の解読を行った（解析範囲は図 1-1 参照）。この領域において、39 の新規遺伝子多型と、既に他人種を用いた研究にて報告されている 3 つの SNP を、日本人ゲノム上に見いだした（表 1-1）。日本人で見られた 39 の SNP のうち、transversion 変異が 37 で大半を占め、transition 変異は 2 箇所であった。また、これら全ての多型は、HW 平衡にあったことから、集めたサンプルに偏りが無いことも確認された。日本人のゲノム上では、5' 非翻訳領域にて 14 の SNP が確認されたが、これまでに同じ領域で報告されていた 24 の SNP は見られなかった[13]。また、他人種を用いた研究で以前に高い多型頻度で報告されていた、C17T などのその他の翻訳領域に存在する SNP も観察されなかった[13、15 - 21]。さらに、A118G と IVS2+G691C の二つの SNP に関しては、その多型頻度は日本人ゲノムでは、それぞれ 45.3% と 81.9% であり、これまで欧米人を中心に報告されてきた多型頻度、それぞれ 7.5-25.8% と 42.5-53.3% と比較して、著明に高い頻度で観察された[13、15 - 21]。

また興味深いことに、イントロン 3 及び 3' 非翻訳領域に見られた SNP のうち、一部において多型がほぼ同時に観察され、連鎖不平衡解析において D' 値 1.000 を示した。そこで、この連鎖不平衡ブロックのサイズを検討するため、例数を減らし（3 genotype に関して各 5 例ずつ）、終止コドン(TAA)より下流約 14 kbp まで解析範囲を広げたところ、さらに新たに 56 の遺伝子多型を見だし、そのうち 27 の遺伝子多型は、上述の連鎖不平衡にある多型群と同時に確認され、連鎖不平衡解析において D' 値並びに r^2 値が共に 1.000 を示す完全連鎖不平衡の関係にあった（表 1-2）。

(2) μ オピオイド受容体遺伝子多型におけるハプロタイプ解析と連鎖不平衡解析

次に、見いだした多型のうち、多型頻度が 5% 以上であった 10 箇所の SNP（intron 3 から 3' 非翻訳領域にかけて存在する完全連鎖不平衡を示す SNP 群に関しては、そのうちの 1 つ TAA+A2109G を代表とした）に関して、Arlequin program を用いてハプロタイプを推定し（表 1-3）、そのハプロタイプ頻度を基に連鎖不平衡解析を行った（表 1-4）。34 のハプロタイプが推定され、そのうち 3% 以上の高頻度でみられるものは 7 ハプロタイプであった。また、上述の TAA+A2109G の G allele は、5 番のハプロタイプでのみ見られ、他のいくつかの SNP も同様の傾向があった。また、 D' 値を算出したところ、IVS3+G59xxA 及び IVS3+A22xxG を除き、全ての SNP の組み合わせにおいて、有意な連鎖不平衡が確認された。また、より厳しい指標である r^2 値においても、intron 3 と 3' 非翻訳領域の 3 つの SNP において有意な連鎖不平衡が観察され、そのうちの 1 つは上述した完全連鎖不平衡を示す多型群の一つ TAA+A2109G であった。また、ハプロタイプ解析の結果から、4 つの連鎖ブロックが推定された。

表 1-1 日本人健常人のゲノム上で見られたSNPとその多型頻度

Position	SNP name	Amino acid substitution	Allelic frequency	Sample size	Reported Allelic frequency
5'flanking region and 5'UTR	A-55xxG		<1.5%	44	
	C-53xxT		<1.5%	44	
	A-53xxG		<1.5%	44	
	C-52xxT		<1.5%	44	
	G-50xxA		<1.5%	44	
	G-49xxA		<1.5%	44	
	C-45xxA		<1.5%	44	
	T-26xxG		<1.5%	44	
	A-26xxC		<1.5%	44	
	T-26xxC		<1.5%	44	
	T-24xxC		<1.5%	44	
	C-16xxT		<1.5%	44	
	G-6xxT		<1.5%	44	
G-4xxT		<1.5%	44		
Exon 1	A118G	Asn40Asp	45.3%	213	7.5 - 25.8 %
Intron 1	IVS1-A49xxG	-	2.7%	187	
	IVS1-A49xxG	-	2.7%	187	
	IVS1-G46xxA	-	<1.5%	113	
	IVS1-T45xxG	-	2.7%	113	
	IVS1-T44xxG	-	<1.5%	113	
Intron 2	IVS2+G31A	-	2.6%	232	4.2%
	IVS2+G5xxA	-	<1.5%	232	
	IVS2+G691C	-	81.9%	232	42.5 - 53.3%
Intron 3	IVS3+G58xxA	-	44.4%	179	
	IVS3+G59xxA	-	13.1%	179	
	IVS3+A61xxG	-	92.5%	179	
	IVS3+A84xxG	-	9.2%	179	
	IVS3+C84xxT	-	31.3%	179	
	IVS3-G88xxA	-	9.5%	179	
3'UTR	TAA+G8xxA	-	10.8%	97	
	TAA+T13xxC	-	<1.5%	97	
	TAA+T13xxC	-	10.8%	97	
	TAA+G16xxA	-	11.4%	44	
	TAA+G17xxA	-	5.7%	44	
	TAA+C20xxT	-	11.4%	44	
	TAA+A2109G	-	8.4%	179	
	TAA+A22xxG	-	11.7%	179	
	TAA+G22xxA	-	90.8%	179	
	TAA+G23xxC	-	8.4%	179	

表 1-2 μ オピオイド受容体遺伝子 3' 非翻訳領域に見られる多型と連鎖不平衡

TAA+	reported	major allele	minor allele	LD	TAA+	reported	major allele	minor allele	LD
	A	G	A	*		A(13)	A(16)	A(13)	*
	T	T	C			C	C	T	
	T	T	C	*		A	G		
	A	G	A	*		G	A	G	*
-2000	G	G	A			T	T	A	
2000-	C	C	T	*		T	G	T	*
	G	G	A		-10000	C	A	C	*
	A	A	G	*		C	C	A	
	A	A	G			A(4)	A(3)	A(4)	*
	G	A	G	*		A	T	A	*
	G	G	C	(*)		A	G		
	G	G	C			G	G	A	
	T	T	C			T	G	T	*
	G	G	A			C	T		
	G	G	T	*		C	A	C	*
	C	A				CA(17)	CA(17)	CA(14)	*
	G	G	T	*		A	A	G	
	G	G	T			TCTC	-	TCTC	*
-4000	T	C				T	T	C	
4000-	A	G				T	C	T	*
	A(6)	A(5)	A(6)			-	TTTC	-	*
	A	A	C			G	G	A	*
-6000	A	A	G			A	C	A	*
6000-	A	A	C			C	T		
	T	T	G	*		C	C	T	*
	C	G	C	*	-12000	A	C		
	322 bp	-			12000-	A	A	G	*
	C	C	T	*		A	G		
	A	-				T	T	C	*
	T	C	T	*		T	C		
-8000	A	G	G	*		G	C		
8000-	C	T	C	*		T(15)	T(14)	T(15)	
	C	T	T	*	-14000	G	T		
	G	A	A	*					

距離は終止コドン(TAA)からの塩基数で表している。reportedはgenebank配列での遺伝型、major、minorはそれぞれ日本人のゲノム上で多数派と少数派の遺伝型を表している。表中括弧内の数値は前の塩基の繰り返し数、"- "は欠失ないし挿入を意味する。LD (Linkage disequilibrium) 欄の*は有意且つ完全連鎖不平衡 ($D'=1.000$ 、 $r^2=1.000$) であった多型群に属する多型で、(*)は有意に連鎖不平衡 ($D'=1.000$) であった多型であることを示す。

表 1-3 健常人における μ オピオイド受容体遺伝子多型のハプロタイプ

No.	frequency	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +G58xxA	IVS3 +G59xxA	IVS3 +A61xxG	IVS3 +A84xxG	IVS3 +C84xxT	TAA +A2109G	TAA +A22xxG	TAA +G22xxA
1	4.9%	A	C	A	G	G	A	C	A	A	A
2	3.0%	A	C	G	G	G	A	C	A	A	A
3	24.6%	A	C	G	G	G	A	T	A	A	A
4	6.5%	A	G	G	A	G	A	C	A	G	A
5	5.4%	A	G	G	G	A	G	C	G	A	G
6	35.9%	G	C	A	G	G	A	C	A	A	A
7	3.6%	G	C	G	G	G	A	T	A	A	A
8	16.1%	27 haplotypes with lower frequencies less than three percents									
sum	100.0%										

頻度が3%以下の27ハプロタイプ（全体の16.1%）に関しては、纏めて8番として記載した。

表 1-4 健常人における μ オピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衡

		D'									
Locus		A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +G58xxA	IVS3 +G59xxA	IVS3 +A61xxG	IVS3 +A84xxG	IVS3 +C84xxT	TAA +A2109G	TAA +A22xxG	TAA +G22xxA
A118G			0.795	0.704	0.626	0.866	0.884	0.633	0.875	0.458	0.890
IVS2 +G691C		0.125		1.000	0.714	0.746	0.795	0.775	0.772	0.672	0.795
IVS3 +G58xxA		0.453	0.134		0.921	0.849	0.883	0.895	0.868	0.535	0.883
IVS3 +G59xxA		0.052	0.341	0.102		0.023	0.009	1.000	0.034	0.742	0.009
IVS3 +A61xxG		0.054	0.201	0.047	0.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IVS3 +A84xxG		0.069	0.284	0.063	0.000	0.001		1.000	1.000	1.000	0.967
IVS3 +C84xxT		0.159	0.062	0.291	0.069	0.037	0.046		1.000	0.763	1.000
TAA +A2109G		0.061	0.241	0.055	0.001	0.892	0.901	0.042		1.000	1.000
TAA +A22xxG		0.024	0.266	0.030	0.484	0.011	0.014	0.035	0.014		1.000
TAA +G22xxA		0.070	0.284	0.063	0.000	0.800	0.934	0.046	0.989	0.014	

連鎖不平衡解析の結果、D' 値（表右上）が有意且つ0.7以上を示す多型の組み合わせを、明灰色で表し、さらに r^2 値（表左下）も有意且つ0.5以上である組み合わせに関しては、暗灰色で表している。

表 1-5 健常人における μ オピオイド受容体遺伝子の塩基繰り返し多型

	number of repeats	11	12	13	14	15							
IVS3 (GT) _n	control (2n=358) (%)	35 (9.8)	1 (0.3)	284 (79.3)	33 (9.2)	5 (1.4)							
	number of repeats	2	-	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
IVS3 (32bp) _n	control (2n=358) (%)	34 (9.5)	-	1 (0.3)	12 (3.4)	100 (27.9)	33 (9.2)	118 (33.0)	18 (5.0)	9 (2.5)	6 (1.7)	25 (7.0)	2 (0.6)

括弧内の数値は全体における % を表す。

さらに、 μ オピオイド受容体遺伝子上において、SNP 以外のいくつかの塩基繰り返し多型を新たに見いだした。イントロン3内で、二塩基繰り返し多型 IVS3 (GT)₁₁₋₁₅、並びに 32塩基の繰り返し多型 IVS3 (32bp)₂₋₁₇ が観察された (表1-5)。これら繰り返し多型は非常に多様性があったものの、表1-4に示す 10 SNP 全てとの間で有意な連鎖不平衡が確認された ($P < 0.05$)。

(3) μ オピオイド受容体遺伝子多型とメタンフェタミン依存・覚醒剤精神病様症状との相関

μ オピオイド受容体遺伝子多型とメタンフェタミン依存・覚醒剤精神病様症状との相関を検討するため、健常人における連鎖不平衡解析・ハプロタイプ解析の結果より、5%以上の多型頻度で、推定された連鎖ブロック内の SNP を代表する 4箇所の SNP を選択し、まず、全メタンフェタミン依存患者における多型頻度を解析し、健常人の多型頻度との

表1-6 健常人とメタンフェタミン依存患者における μ オピオイド受容体遺伝子多型の多型頻度の比較

Locus	健常人			メタンフェタミン依存患者				
	Genotypic data		Allelic data	Genotypic data			Allelic data	
	number	allelic frequency	number	number	allelic frequency	P value	number	P value
A118G	A 67 (0.31) A/G 99 (0.46) G 47 (0.22) total 213	45.3%	A 233 (0.55) G 193 (0.45) total 426	A 49 (0.38) A/G 54 (0.43) G 25 (0.19) total 128	40.6%	P = 0.43	A 152 (0.59) G 104 (0.41) total 256	P = 0.23
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) C 154 (0.66) total 232	81.9%	G 84 (0.18) C 380 (0.82) total 464	G 12 (0.09) G/C 43 (0.33) C 73 (0.57) total 128	73.8%	P = 0.012	G 67 (0.26) C 189 (0.74) total 256	P = 0.011
IVS3 +A6xx1G	A 2 (0.01) G/A 23 (0.13) G 154 (0.86) total 179	92.5%	A 27 (0.08) G 331 (0.92) total 358	A 1 (0.01) G/A 26 (0.20) G 101 (0.79) total 128	89.1%	P = 0.21	A 28 (0.11) G 228 (0.89) total 256	P = 0.15
IVS3 +C8xx7T	C 85 (0.47) C/T 76 (0.42) T 18 (0.10) total 179	31.3%	C 246 (0.69) T 112 (0.31) total 358	C 73 (0.57) C/T 42 (0.33) T 13 (0.10) total 128	26.6%	P = 0.209	C 188 (0.73) T 68 (0.27) total 256	P = 0.21

健常人との比較で有意に多型頻度が異なっていたもののみを記載する

表1-7 健常人とメタンフェタミン依存患者における μ オピオイド受容体遺伝子多型のハプロタイプ頻度の比較

	Control	MAP dependent	Haplotype			
	frequency	frequency	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +A61xxG	IVS3 +C84xxT
1	1.4%		A	C	A	C
2	0.2%		A	C	A	T
3	10.9%	11.0%	A	C	G	C
4	24.3%	23.2%	A	C	G	T
5	5.7%	10.9%	A	G	A	C
6	9.2%	12.7%	A	G	G	C
7	1.7%	1.5%	A	G	G	T
8	40.0%	37.8%	G	C	G	C
9	4.9%	1.8%	G	C	G	T
10	0.3%		G	G	A	T
11	1.5%	0.9%	G	G	G	C

表1-8 健常人とメタンフェタミン依存患者における μ オピオイド受容体遺伝子多型間の連鎖不平衡の比較

D'

Locus	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +A61xxG	IVS3 +C84xxT
A118G		0.795 0.897	0.866 1.000	0.633 0.794
IVS2 +G691C	0.125 0.195		0.746 1.000	0.775 0.739
IVS3 +A61xxG	0.054 0.084	0.201 0.346		1.000 1.000
IVS3 +C84xxT	0.159 0.156	0.062 0.071	0.037 0.044	

r^2

連鎖不平衡解析の結果、D' 値（表右上）が有意且つ0.7以上を示す多型の組み合わせを、明灰色で表している。表の各組み合わせの、上の数値が健常人、下の数値がメタンフェタミン依存患者のゲノムにおける、連鎖不平衡解析の結果を表す。

比較を行った（表1-6）。メタンフェタミン依存患者においては、IVS2+G691Cの多型頻度が73.8%と、健常人の81.9%と比較して低く、遺伝子型（genotype）は有意に異なっており（ $P=0.023$ カイ二乗検定）、Allele頻度の比較においてもC alleleが多く、有意に健常人と異なっている（ $P=0.023$ カイ二乗検定）ことが明らかとなった。また、IVS3+A84xxGにおいても、有意ではないものの、G alleleの割合が高い傾向が確認された。

次に、メタンフェタミン依存患者の遺伝子多型情報から、arlequin programを用いてハ

プロタイプを推定し（表1-7）、そのハプロタイプ頻度を基に連鎖不平衡解析を行い、健常人と比較した（表1-8）。健常人とメタンフェタミン依存患者間で有意な差は見られなかった($P=0.40$)ものの、ハプロタイプ5番及び6番において、健常人と比較してメタンフェタミン依存患者の頻度が高い傾向を示した。両ハプロタイプの違いは、intron 3から3' 非翻訳領域にかけて存在する完全連鎖不平衡を示す SNP 群のうちの一つ IVS3+A61xxG の allele タイプのみの違いであった。また、4 SNP における連鎖不平衡解析では全ての組み合わせで D' 値は有意な値を示していたが、 r^2 値はいずれも有意な値を示さなかった。

(4) 覚醒剤精神病様症状における症例分類解析

メタンフェタミン依存患者を、臨床情報を基に、覚醒剤精神病様症状の症例によって分類し、解析を行った（表1-9）。覚醒剤の使用開始から妄想・幻覚を発症するまでの期間で分類したところ、3年以内に発症した群において、健常人と比較して、3箇所の SNP (A118G、IVS2+G691C、IVS3+A61xxG) の多型頻度が低い値を示し、遺伝子型が有意に異なっていた（それぞれ、 $P = 0.040$ 、 $P = 0.0085$ 、 $P = 0.027$ ）。IVS2+G691C に関しては、メタンフェタミン使用開始から3年以上経過した後に、妄想・幻覚が発症した群においても同様に、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ($P = 0.039$) が、発症までの期間が短い群の方が、より大きく異なる傾向を示した。次に、覚醒剤の使用停止から妄想・幻覚が消失するまでの期間で分類したところ、1ヶ月以内に比較的速やかに消失した群において、IVS2+G691C の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ($P = 0.0034$)。また、再燃性の有無に関して分類した場合も、再燃性が見られた群において、同様に IVS2+ G691C の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ($P = 0.014$)。最後に、多剤乱用を指標として分類し、解析を行ったところ、メタンフェタミンにのみ乱用歴があった群において、2箇所の SNP (IVS2+ G691C、IVS3+C84xxT) の多型頻度が低い値を示し、健常人と比較して有意に遺伝子型が異なっていた ($P = 0.0059$ 、 $P = 0.014$)。

表1-9 健常人と覚醒剤精神病様症状により分類したメタンフェタミン依存患者間での μ オピオイド受容体遺伝子多型の多型頻度の比較

Locus	健常人		メタンフェタミン依存患者				
	例数	多型頻度	group 1 例数 多型頻度	group 2 例数 多型頻度	group 3 例数 多型頻度		
(1) 妄想・幻覚の発症時期			3年未満		3年以上		
A118G	A 67 (0.31) A/G 99 (0.46) 45.3% G 47 (0.22) total 213		25 (0.46) 24 (0.44) 31.5% 5 (0.09) 54	P= 0.0404	20 (0.38) 25 (0.47) 38.7% 8 (0.15) 53	P= 0.4691	
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232		6 (0.11) 20 (0.37) 70.4% 28 (0.52) 54	P= 0.0085	5 (0.09) 19 (0.36) 72.6% 29 (0.55) 53	P= 0.0394	
IVS3 +A61xxG	A 2 (0.01) G/A 23 (0.13) 92.5% G 154 (0.86) total 179		0 (0.00) 15 (0.28) 86.1% 39 (0.72) 54	P= 0.0269	1 0.019 7 0.132 91.5% 45 0.849 53	P= 0.9060	
(2) 妄想・幻覚の持続期間			transient		middle		
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232		8 (0.11) 27 (0.38) 70.1% 37 (0.51) 72	P= 0.0034	0 (0.00) 5 (0.29) 85.3% 12 (0.71) 17	P= 0.7807	
(3) 再燃性の存在			not exist		exist		
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232		6 (0.07) 30 (0.35) 75.6% 50 (0.58) 86	P= 0.1250	5 (0.12) 14 (0.33) 71.4% 23 (0.55) 45	P= 0.0143	
(4) 多剤乱用			none		easily accesible drug		
IVS2 +G691C	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232		5 (0.14) 11 (0.31) 70.8% 20 (0.56) 36	P= 0.0059	3 (0.06) 15 (0.31) 78.6% 31 (0.63) 49	P= 0.4401	
IVS3 +C84xxT	C 85 (0.47) C/T 76 (0.42) 31.3% T 18 (0.10) total 179		24 (0.67) 6 (0.17) 25.0% 6 (0.17) 36	P= 0.0137	24 (0.49) 22 (0.45) 28.6% 3 (0.06) 49	P= 0.6986	
					heavy		
					1 (0.02) 18 (0.42) 76.7% 24 (0.56) 43		P= 0.3801
					22 (0.51) 17 (0.40) 29.1% 4 (0.09) 43		P= 0.9104

解析は健常人の連鎖不平衡解析から、推定される連鎖ブロックを代表する4箇所のSNP全てで行い、そのうち、有意に健常人と多型頻度が異なっている群が存在した多型のみを記載している。

考察

本実験において、多くの新規遺伝子多型を μ オピオイド受容体遺伝子上で見いだした。日本人サンプルにおいて、翻訳領域に存在する多型はエクソン1に存在し、アスパラギンがアスパラギン酸に変化するA118Gのみであった。このアスパラギンは、7回膜貫通型受容体である μ オピオイド受容体のN末端に存在する5箇所のglycosylation部位のうちの1箇所と考えられている。これまでに点変異型受容体を発現させた*in vitro*の実験において、内因性オピオイドペプチド、 β エンドルフィンの結合能が上昇しているが、他のリガンドに対しては影響を与えないことが報告されている[15]。また、 μ オピオイド受容体遺伝子多型研究の多くが、この多型に焦点を当ててきたが、薬物並びにアルコールに対する依存との相関性に関しては否定的な結果が多かった[15-21]。本実験において、A118Gの多型頻度は、健常人とメタンフェタミン依存患者との比較では、これまでの報告と同様に有意な差は見られなかったが、メタンフェタミン依存患者を覚醒剤精神病様症状により分類した際に、いくつかの群で健常人と比較し有意に多型頻度が異なっていた。A118Gの多型頻度はAsian populationにおいて他の人種と比較し、高い多型頻度を示す[15-21]。Case-control studyにおいて、要因と遺伝子多型の相関性の解析における検出力は、危険因子と考えられる多型頻度が50%の時に最も高くなるため、日本人のメタンフェタミン依存患者における、A118Gの相関性が示されたことも考えられる。しかしながら、A118Gにおける相関性は、危険率に対しBonferroniの補正をかけた場合（危険率5%を解析した数4で除した1.25%を危険率と設定した場合）、有意傾向に留まっており、その相関性は他の多型と比較し低いことも考えられる。

一方で、メタンフェタミン依存並びに覚醒剤精神病様症状により分類した際に、 μ オピオイド受容体遺伝子の翻訳領域以外の多型との相関性が、より強いことが示された。著者は、日本人サンプルの μ オピオイド受容体遺伝子5'領域において14のSNPを見だし、大半が開始コドンより上流3-6 kbpに位置していた。しかし、欧米人のゲノムを用いた解析で報告されてきた、開始コドンより上流1-3 kbpに位置するSNPは全く見られなかった[13]。これまでに、ヒト及びマウスの5'非翻訳領域の配列の相同性比較を行い、両配列で非常に相同性の高いプロモーター領域と考えられる配列とは別に、開始コドンより上流2.5-4.5 kbpにかけて、非常に高い相同性が見られることが報告されている[12]。さらに、マウスゲノムの5' F領域にて、二塩基繰返し配列(GT) n が存在し、マウスの種差による μ オピオイド受容体発現量の違いに影響を与えていることが示唆されている[12]。日本人の μ オピオイド受容体ゲノム上では、開始コドンより上流5.6 kbpまでには高頻度の多型は見られなかったが、イントロン及び3'非翻訳領域において、繰返し多型を含む多くの高頻度多型が見られた。近年、マウス及びヒトの μ オピオイド受容体においてスプライシングによる変異体が存在する可能性が報告されている[24、25]。また、CXBKマウスにおいて、3'非翻訳領域の配列の長さの違いが、 μ オピオイド受容体発現量に影響を与えていることも報告されている[26、27]。本実験において、特にIVS2+G691Cなど、メタンフェタミン依存・覚醒剤精神病と相関性を有していた多型は、A118Gを除き、全てイントロンに位置していた。これ

までのところ、これらの多型がメタンフェタミン依存に寄与するメカニズムは明らかにされていないが、 μ オピオイド受容体遺伝子の転写調節や mRNA の安定性並びにスプライシングに相違をもたらし、 μ オピオイド受容体タンパク質の発現量に影響を与えている可能性が示唆される。

さらに、OPRM 内には強い連鎖不平衡が存在することが新たに明らかとなった。特にイントロン3から3' 非翻訳領域の終止コドン下流 13kbp まで続く約 31kbp に点在する、完全連鎖不平衡を示す多型群は、 μ オピオイド受容体遺伝子の約 1/3 にわたるこの領域において相同性遺伝子組み替えが起こっていないことを示唆している。これまでに、マウス μ オピオイド受容体 mRNA の全長は、約 12-14 kbp であることも報告されており[27]、 μ オピオイド受容体遺伝子の 3' 非翻訳領域は、終止コドンより下流 10 kbp 程度であることが推測され、この完全連鎖不平衡は、 μ オピオイド受容体遺伝子の 3' 非翻訳領域全域に存在することが示唆される。メタンフェタミン依存に対する相関性は有していなかったものの、今後、この連鎖が何らかの疾患・症状に影響を与えているのか、また、有用な遺伝子マーカーとなりうるのか、さらなる検討が必要である。

メタンフェタミン依存患者を臨床情報を基に分類し解析したところ、妄想・幻覚の発現時期、持続期間並びに再現性の有無において、いくつかの SNP で健常人と比較して有意に多型頻度が低い群が見られた。このことは、メジャー allele を持つ群の方が、メタンフェタミンによる覚醒剤精神病を発症し易いことを示唆している。また、多剤乱用を指標として分類し検討したところ、メタンフェタミンにのみ乱用歴がある患者において有意な差が見られた。多剤乱用を形成している群は、メタンフェタミン依存形成にいたる要因として、遺伝的要因よりもむしろ環境要因の寄与が大きいのではないかと考えられる。このため、メタンフェタミンにのみ乱用歴がある患者の方がより遺伝的要因を反映しており、本解析で健常人と比較し有意に低い多型頻度を示したことが考えられる。また、この結果は、これまで行われてきた薬物とアルコールの両者に対し依存を形成している患者を対象とした研究において、 μ オピオイド受容体遺伝子多型との相関性が否定されていたことと一致している[13、16]。

オピオイド神経系は、様々な薬理作用において重要な役割を果たしている。これまで、オピオイド神経系と依存に関する研究は、主にモルヒネやヘロイン等のオピオイドによる薬物依存を中心としてなされ、近年アルコール依存に関する研究もなされてきたものの、覚醒剤との関係は殆ど報告されていなかった。メタンフェタミンは、ドパミン神経のシナプス終末においてドパミントランスポーターによりサイトゾル内に取り込まれ、ドパミンの再取り込みを阻害し、さらにシナプス間隙へのドパミン遊離を惹起し、シナプス間隙のドパミン濃度を上昇させることで、ドパミン神経系を活性化すると考えられており[28]、これまで行われてきたメタンフェタミン依存の遺伝子多型研究の多くは D2、D4 受容体やドパミントランスポーター並びに代謝酵素に焦点があてられてきた[29-32]。一方、 μ オピオイド受容体は、アルコールやコカイン依存の形成に関与していることが、近年の遺伝子改変マウスを用いた研究を中心として明らかにされてきており[8-11]、さらにこれまでの様々な薬理学的研究からドパミン神経を介した依存形成のメカニズムにオピオイド神経系が関与していることが示唆されてきた[5、33-35]。これまでに、ドパミン神経の持続的な活性化により、シナプス間隙

における内因性エンケファリン類の量の減少や、 μ オピオイド受容体発現量の増加が引き起こされることが報告されている。また、ドパミン D2 受容体のノックアウトマウスにおいてモルヒネの報酬効果が消失していることも報告されている。さらに、カテコラミンの主要な代謝酵素の1つである COMT 遺伝子上の機能的な遺伝子多型が、痛みに対する応答を変化させることも報告されている[36]。また、オピオイドがドパミン神経系を介した報酬システムを活性化させるという報告もある。 μ オピオイド受容体ノックアウトマウスにおいて、ドパミン D2 受容体量が海馬において有意に低下していること[9]も明らかとされている。これらの知見は、オピオイド神経系とドパミン神経系の間にも両方向性の調節機構が存在していることを示唆している。

本研究の成果は、 μ オピオイド受容体の遺伝子多型、特に IVS2+G691C が、メタンフェタミン依存並びに覚醒剤精神病における脆弱性に関する有用な遺伝子マーカーの1つと考えられることを示唆している。また、 μ オピオイド受容体を介した作用における様々な個人差には、翻訳領域以外の遺伝子多型による μ オピオイド受容体発現に対する何らかの調節機構の違いが大きく寄与している可能性を示している。

第二章

μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた ブプレノルフィンの鎮痛・報酬効果のメカニズム解析

第一章において、 μ オピオイド受容体遺伝子多型が覚醒剤依存・覚醒剤精神病様症状と相関性を有していることを明らかにし、それら相関性を有する多型が非翻訳領域に存在していたことから、これら遺伝子多型により発現量の相違が引き起こされ、個人差を生じる要因となっている可能性が示唆された。そこで第二章では、遺伝子の欠損によって μ オピオイド受容体の発現量が変化しているノックアウトマウスを用いて、実際に臨床現場で広く用いられているブプレノルフィンの作用の変化を解析し、 μ オピオイド受容体発現量の差が鎮痛作用・報酬効果に与える影響を検討した。

ブプレノルフィンは、長時間持続型のオピオイド受容体部分アゴニストとして、疼痛治療や薬物依存の治療に広く用いられてきた。これまでに、ブプレノルフィンは、 μ オピオイド受容体を介した鎮痛作用を有することや、モルヒネによる μ オピオイド受容体を介した鎮痛作用を拮抗することが報告されてきた[37-39]。また、ブプレノルフィンの脊髄くも膜下腔内投与によるtail-flick法で見られる鎮痛効果が、 κ オピオイド受容体アンタゴニストnorBNIにより阻害されるものの、酢酸法において κ オピオイド受容体アゴニストU50,488Hによるライジング行動の抑制効果をブプレノルフィンが阻害することも明らかとされている[40, 41]。一方で、ブプレノルフィンの δ オピオイド受容体を介した作用は、部分アゴニストとして作用することが報告されているが、相反する報告もなされており、まだ不明瞭な点が多い[42, 43]。それ故、ブプレノルフィンの鎮痛効果に関しても、各サブタイプの関与が考えられるものの、未だその作用機序は明確にされていない。

また、ブプレノルフィンは、オピオイド依存の患者に対する治療に広く用いられてきた[44, 45]。しかしながら、いくつかの研究において、ブプレノルフィンは報酬効果を有し、実験動物において反復自己投与を生じさせることが報告されており[46, 47]、ブプレノルフィン自体への依存が生じる可能性が示されている。これまでにオピオイド受容体サブタイプ選択的といわれる作動薬・拮抗薬を用いた様々な研究がなされてきたが、ブプレノルフィンの薬物依存治療における有用性や報酬効果において、オピオイド受容体の各サブタイプがどのように関与しているのかは、未だ明らかにされていない。

近年、 μ オピオイド受容体遺伝子を欠損させたノックアウトマウスが作製され、様々な新しい知見がもたらされた。これまでに、モルヒネの鎮痛・報酬効果が共に消失していることが明らかとされている[48-51]。さらに、 δ オピオイド受容体アゴニストであるDPDPEの鎮痛効果も、顕著に減弱していることが明らかとされている[52, 53]。 μ オピオイド受容体ノックアウト (MOR-KO) マウスにおいて、 δ 及び κ オピオイド受容体の発現量変化は見られていないことから[49, 50, 52]、 μ オピオイド受容体は、 μ オピオイド受容体選択的リガンドのみならず、他のオピオイドリガンド、とりわけ非選択的なオピオイドリガンドにおいて、その作用の発現に中心的な役割を果たしていることが考えられる。そこで、本実験では、MOR-KOマウスを用いて、ブプレノルフィンの鎮痛・報

酬効果発現における μ オピオイド受容体発現量の影響を検討した。併せて、もともとオピオイド受容体を発現していないCHO細胞に、ヒト μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体cDNAをトランスフェクションして、受容体各サブタイプを安定的に発現するクローン化CHO細胞を樹立し、ブプレノルフィンの結合特性並びにアゴニスト活性を検討した。

方法

(1) 使用動物

MOR-KOマウスは、曾良らにより作製された μ オピオイド受容体エクソン1を欠損させたマウスを用いた[50]。ホモ及びヘテロMOR-KOマウス並びに野生型マウスは、遺伝背景をC57BL6Jとした[51]ヘテロMOR-KOマウス同士の交配によって作製し実験に用いた。実験操作並びに飼育環境は、東京都精神医学総合研究所の動物委員会並びに研究倫理審査委員会により承認され、全てのマウスは動物実験指針に沿って扱った。マウスは、1ケージ6匹以内とし、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50%、12時間毎の明暗周期（明期8:00～20:00）下で飼育し、自由に水及び餌を摂取させた。

(2) 薬物調整

マウスに投与する薬物は、全て生理食塩水に溶解し、10 ml/kgの用量でマウスに投与出来るよう濃度の調整を行った。ブプレノルフィン (buprenorphine hydrochloride)、ナロキソン (naloxone hydrochloride)、ナルトリンドール (naltrindole hydrochloride) 及びnorBNI (norbinaltorphimine hydrochloride) はSigma Chemical Co.(St. Louis, USA)から購入した。モルヒネ (morphine hydrochloride) は三共(東京)より購入した。DAMGOとDPDPEはPeninsula Laboratories Ltd. (Merseyside, UK)から購入した。U69593はUpjohn (Kalamazoo, USA)より購入した。 ^3H DAMGO (50.5 Ci/mmol)、 ^3H DPDPE (33.0 Ci/mmol)、 ^3H U69 593 (47.5 Ci/mmol) はDuPont-New England Nuclear (Wilmington, USA)より購入した。

(3) 鎮痛検定

熱的抗侵害受容作用の検定には、体重20-35g (10週齢以上) のマウスを用いて実験を行った。Hot-plate testは、アクリル製の観察用ケージで覆われたアルミニウム製のHot-Plate (Model MK-350A、室町機械、東京) を用い、WoolfeとMacDonaldの方法[54]を一部改変して行った。Hot-plateは 52°C に保ち、マウスを観察ケージに入れてから、licking、bitingあるいはjump行動を呈するまでの時間を測定した。火傷による損傷を防ぐためにcut-off timeを60秒とした。Tail-flick testは、感光装置にて自動計測するTail-flick unit (Model MK-330A、室町機械、東京) を用い、D'AmourとSmithの方法[55]を一部改変して行った。マウスを体が動かないようにフェルト地のタオルで緩やかに固定し、尾部に放射熱刺激を与え始めてからflick反応を呈するまでの時間を自動計測した。火傷による組織損傷を防ぐためにcut-off timeを15秒とした。実験操作に対する馴化は、薬物投与前の一日のみ行った。

ブプレノルフィンは、1マウスに対し20分間隔で0.1、0.2、0.7、2.0 mg/kgを皮下注射にて投与し、蓄積投与総量がそれぞれの注射の時点で、0.1、0.3、1.0、3.0 mg/kgとなる

ようにした。Soraらの相加蓄積投与方法[51]に従い、tail-flick test並びにhot-plate testをブプレノルフィンの皮下注射の20分後に連続して行い、両鎮痛検定の直後に次の用量の投与を行った。モルヒネは10 mg/kgを皮下注射にて投与し、投与20分後にtail-flick test並びにhot-plate testを連続して行った。各検定における薬物による熱的抗侵害受容作用は、%MPEにて表した。

$$\%MPE = (\text{薬物投与後の閾値} - \text{投与前の閾値}) / (\text{cut-off time} - \text{投与前の閾値}) \times 100\%$$

(4) 条件付け場所嗜好性試験

条件付け場所嗜好性試験には、体重20~35g(10週齢以上)のマウスを用い、Conditioned place preference装置(ニューロサイエンス、大阪)を使用した。床面が滑らかで遮光してある黒い部屋(17.5×15×17.5 cm)と、床面が凸凹で採光してある白い部屋(17.5×15×17.5 cm)の2コンパートメントからなる装置を用いた。Pre及びPost conditioning test phaseでは、二箇所(各6×6 cm)のあるマウスの出入りが自由な仕切により両コンパートメントを隔て、各マウスの両コンパートメント内での滞在時間並びに部屋間の移動回数をコンピューターにより自動計測した。また、conditioning phaseでは、穴のない仕切を用いることで、マウスの動きを一方のコンパートメント内に制限した。装置は、防音・遮光箱の中に静置し、装置内を約40 luxの明るさとなるように照明を調節した。

Pre-conditionig phase (1-3日目)

まず、1日目と2日目にマウスが両コンパートメントを自由に探索できる状態で、マウスを装置内に静かに置き15分間(900秒)放置した(装置への馴化作業)。3日目に同様の操作を行い、各マウスについて15分間の各コンパートメントでの滞在時間を測定し、より長く滞在したコンパートメントをプレファレンスコンパートメントとした。なお、一方のコンパートメントに滞在した時間が、総時間の80%(720秒)を超えたマウス、あるいは2日目に一方のコンパートメントに600秒以上滞在して、3日目には他方のコンパートメントに600秒以上滞在したマウスについては、統計から除外した。また、3日目の床面が滑らかで黒色のコンパートメントでの平均滞在時間と、床面が凸凹で白色のコンパートメントでの平均滞在時間に有意な差は見られなかったことから、条件付け前には、どちらか一方のコンパートメントに対して嗜好性を示すことはないことが確認された。

Conditionig phase (4-7日目)

4日目には、ブプレノルフィン(1.0 mg/kg)か生理食塩水を皮下投与し、直後に各マウスを黒色ないし白色のコンパートメントに50分間閉じこめた。5日目には、4日目とは逆の処置(すなわち、4日目に生理食塩水を処置したマウスにブプレノルフィンを、ブプレノルフィンを処置したマウスに生理食塩水をそれぞれ皮下投与)を行い、4日目とは逆側のコンパートメントに50分間閉じこめた。6日目と7日目は、それぞれ4日目と5日目と同様の操作を各マウスに対して行った。ナロキソン(1.0 mg/kg)、ナルトリンドール(2.5 mg/kg)及びnorBNI(5.0 mg/kg)はブプレノルフィンないし生理食塩水の処置を行う10分前に皮下投与した。薬物処置を行うコンパートメントは、プレファレンスコンパートメントが黒い部屋か白い部屋でマウスを2群に分け、各群内でコンパートメント及び薬物

処置に関して数のバランスがとれるように、4日目に黒い部屋、白い部屋のどちらに閉じ込めるか、薬物、生理食塩水のどちらの処置を行うかを決定した（カウンターバランス法）。

Test phase (8日目)

8日目には、再びマウスが両コンパートメント間を自由に探索できる状態で、pre-conditioning phaseと同様の試行を行い、15分間（900秒）の各コンパートメントでの滞在時間を測定した。

Conditioning phaseにおいて薬物処置を行ったコンパートメントでの、8日目の滞在時間と3日目の滞在時間の差をCPPスコアとし、その値が正であったとき、薬物の報酬効果ありと評価した。

(5) ヒトオピオイド受容体各タイプを安定的に発現する CHO 細胞株の樹立

CHO 細胞を 10% ウシ胎児血清、50 U/ml ペニシリン、50 µg/ml 硫酸ストレプトマイシンを含むハム F12 培地で、37°C、5%CO₂ 下培養した。ヒト大脳皮質より抽出した total RNA を鋳型とし、RT-PCR 法によりヒト μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体 cDNA を得た。得られた cDNA を発現ベクター pcDNA3 にサブクローニングし、リポフェクチン法により CHO 細胞にトランスフェクトした。500 µg/ml の G418 存在下で培養し、生存するコロニーを [³H] DAMGO、[³H] DPDPE、[³H] U69 593 を用いた結合実験により選別し、オピオイド受容体各タイプを高レベルで発現している細胞株 MOR/CHO、DOR/CHO、KOR/CHO を得た。

(6) 受容体結合実験

MOR/CHO、DOR/CHO、KOR/CHO を Tris 緩衝液（Tris 50 mM (pH 7.4)、MgCl₂ 10 mM、EDTA 1 mM）中でホモジナイズした後、30,000g、20 分間の遠心で得られたペレットを緩衝液中に再懸濁し、これを粗膜標品とした。各チューブあたり、タンパク量として 40-60 µg の粗膜標品、放射性標識リガンドとして 2 nM [³H] DAMGO、2 nM [³H] DPDPE あるいは 3 nM [³H] U69,593、及び種々の濃度のリガンドを加え、25°C で 60 分間インキュベートした。各チューブの内容物を 0.1% polyethyleneimine で前処置した Whatman GF/C フィルター上で濾過し、フィルターに捕集された放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。各リガンドの結合阻害定数 (K_i) は、標識リガンドの結合を 50% 置換するために必要な濃度 (IC_{50} 値) から、Cheng&Prusoff の式により計算した。データは 7 から 15 回の実験結果の平均値（±標準誤差）で表している。

(7) cAMP assay

MOR/CHO、DOR/CHO、KOR/CHO を 24well プレートに 1×10^5 cells/well で播種し、37°C で 12-24 時間培養した。培地を除去し、HEPES - buffered saline 0.5 ml（140 mM NaCl、4.7 mM KCl、1.2 mM MgCl₂、11 mM glucose、15 mM HEPES、pH 7.4）で 1 回洗浄後、cAMP 分解酵素阻害剤である 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 1 mM を含む HEPES - buffered saline 0.45 ml 中で 37°C、10 分間プレインキュベーションした。100 µM forskolin（最終濃度 10 µM）、1 mM IBMX 及び種々の濃度のリガンドを含む HEPES - buffered saline 50 µl

を加え反応を開始し、37℃で10分間インキュベーションした。氷冷した10%トリクロロ酢酸0.5 mlを加えることで反応を停止させた後、cAMPをエーテル抽出し、ラジオイムノアッセイ法により定量した。cAMPの定量における IC_{50} 値は、フォルスコリンにより誘発されるcAMP蓄積の各リガンドによる最大抑制効果 (I_{max}) の50%を発現するのに必要な濃度として計算した。データは3から5回の実験結果の平均値 (±標準誤差) で表している。

(8) 統計解析

ブプレノルフィン及びモルヒネの熱的抗侵害受容作用の評価は、ANOVA並びに Student-Newman-Keuls post hoc test 及び paired *t*-test を用いて行った。有意差検定は、Tukey-Kramer test を用いて行った。条件付け場所嗜好性試験における場所嗜好性の評価は、paired *t*-test を用いて行った。遺伝子型、並びに薬物処置によるグループ間の有意差検定は、Fisher' s PLSD post hoc 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断した。cAMP assay における I_{max} 値の検定は Student' s *t*-test により行い、5%の危険率で有意差を判定した。

結果

(1) 抗侵害受容作用

野生型、ホモ及びヘテロMOR-KOマウスにおけるブプレノルフィン投与による熱的抗侵害受容作用を検討した。ブプレノルフィン投与 (s.c.) により、hot-plate 法及びtail-flick法ともに、野生型マウス(ANOVA: $p < 0.0001$; $F = 8.38$; $df = 4,75$, $p < 0.0001$; $F = 34.18$; $df = 4,75$, respectively)とヘテロMOR-KOマウス(ANOVA: $p < 0.0001$; $F = 6.96$; $df = 4,95$, $p < 0.0001$; $F = 16.83$; $df = 4,95$, respectively)において、有意な%MPEの上昇を示した(図2-1)。一方、ホモMOR-KOマウスにおいては、3 mg/kgの高用量においても、ブプレノルフィン投与による有意な%MPEの上昇は、hot-plate法及びtail-flick法ともに認められなかった。また、野生型マウスにおけるブプレノルフィンの鎮痛効果は、hot-plate法及びtail-flick法ともに、検定した全ての用量において、ヘテロ及びホモMOR-KOマウスと比較し有意に強かった($P < 0.05$)。一方、tail-flick法においては、ヘテロMOR-KOマウスで見られるブプレノルフィンの鎮痛効果は、検定した全ての用量において、ホモMOR-KOマウスと比較し有意に強かったが($P < 0.05$)、hot-plate法においてはこれら両群間に有意な差は見られなかった。

また、モルヒネ(10 mg/kg s.c.)投与により、ブプレノルフィンと同様に、hot-plate法及びtail-flick法ともに、野生型マウスとヘテロMOR-KOマウスにおいて有意な鎮痛効果を示し(paired t -test: $p < 0.05$)、ホモMOR-KOマウスでは有意な作用を示さなかった(図2-2)。さらに野生型マウスにおけるモルヒネの鎮痛効果は、hot-plate法及びtail-flick法ともに、ヘテロ及びホモMOR-KOマウスと比較し有意に強かったが($P < 0.05$)、ブプレノルフィンとは異なり、hot-plate法及びtail-flick法ともに、ヘテロMOR-KOマウスとホモMOR-KOマウスとの間で有意な差が見られた($P < 0.05$)。

(2) 報酬効果

野生型、ホモ及びヘテロMOR-KOマウスにおける、ブプレノルフィン(1.0 mg/kg s.c.)投与による報酬効果を検討した。ブプレノルフィンは野生型マウスにおいて、条件付けを行ったコンパートメントへの滞在時間を有意に上昇させた(CPP score = 154 ± 18 , paired t -test, $p < 0.0001$)。さらに、ヘテロ(CPP score = 96 ± 24 , paired t -test, $p < 0.005$)及びホモ(CPP score = 73 ± 18 , paired t -test, $p < 0.001$)MOR-KOマウスにおいても、滞在時間は有意に上昇していた(図2-3)。また、one-way ANOVAにより検討したところ、ブプレノルフィンによる場所嗜好性は遺伝子型により有意に異なっていることが示され($p < 0.05$; $F = 4.33$; $df = 2,53$)、野生型マウスは、ホモ及びヘテロMOR-KOマウスと比較し、有意なCPP scoreの上昇が見られた($p < 0.05$)。一方、ヘテロMOR-KOマウスとホモMOR-KOマウスとの間でブプレノルフィンによる場所嗜好性の形成に有意な差は見られなかった。

次に、ホモMOR-KOマウスにおける、各種オピオイド拮抗薬による場所嗜好性の変化を検討した(図2-4)。非選択的オピオイド拮抗薬のナロキソン(1.0 mg/kg s.c.)単独処置では、これまでの報告と同様に[56]、場所嗜好性の変化を全く示さなかった(CPP score = -4 ± 29)。また、 δ オピオイド受容体選択的アンタゴニスト・ナルトリンドール単独処置、

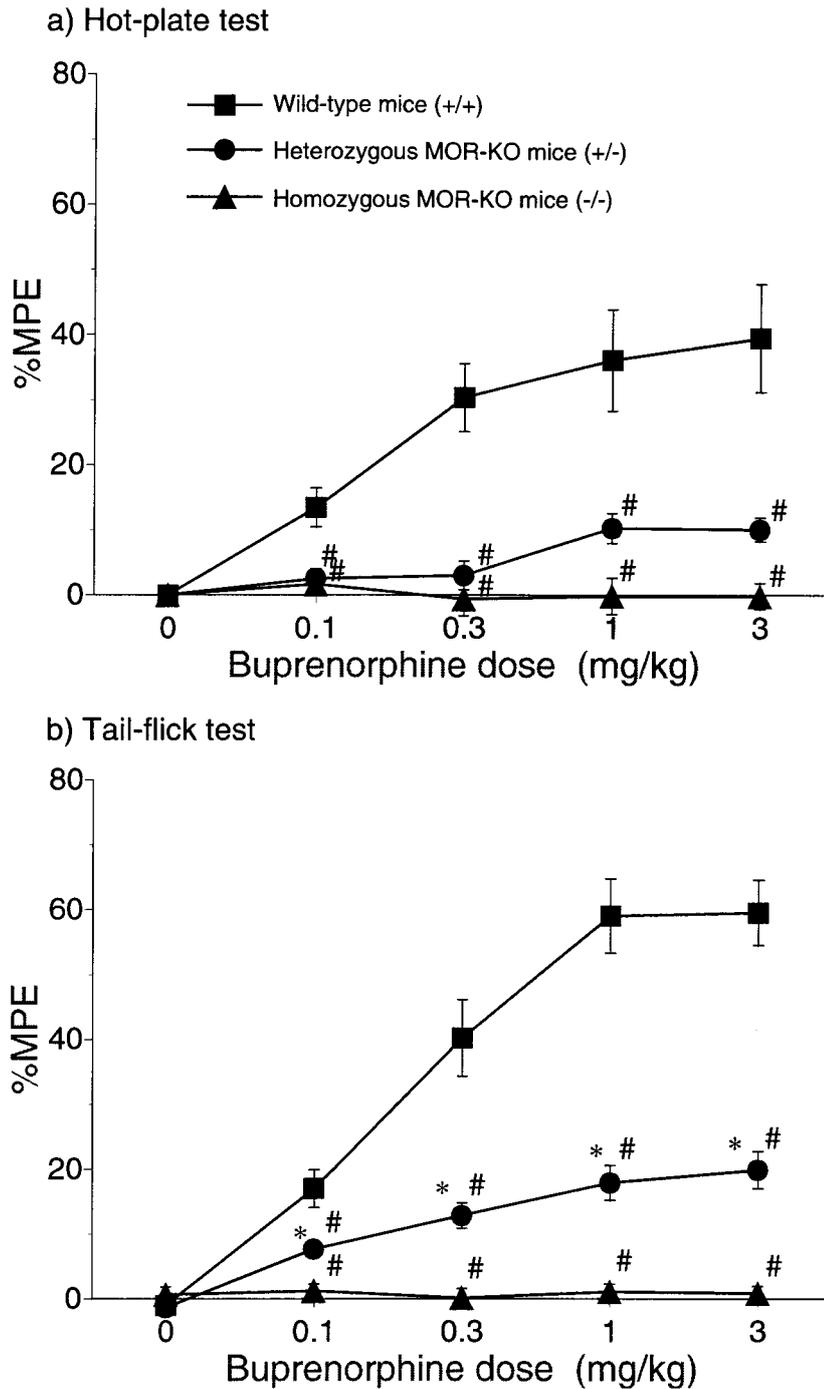


図 2-1 野生型、ヘテロ及びホモ MOR-KO マウスにおけるブプレノルフィンの鎮痛作用

野生型 (n = 16)、ヘテロ MOR-KO (n = 20)、ホモ MOR-KO (n = 15) マウスにおける、ブプレノルフィン相加蓄積投与 (s.c.) による A) hot-plate 法及び B) tail-flick 法での %MPE の変化。# $P < 0.05$ vs 野生型マウス、* $P < 0.05$ vs ヘテロ MOR-KO マウス (Tukey-Kramer test)。

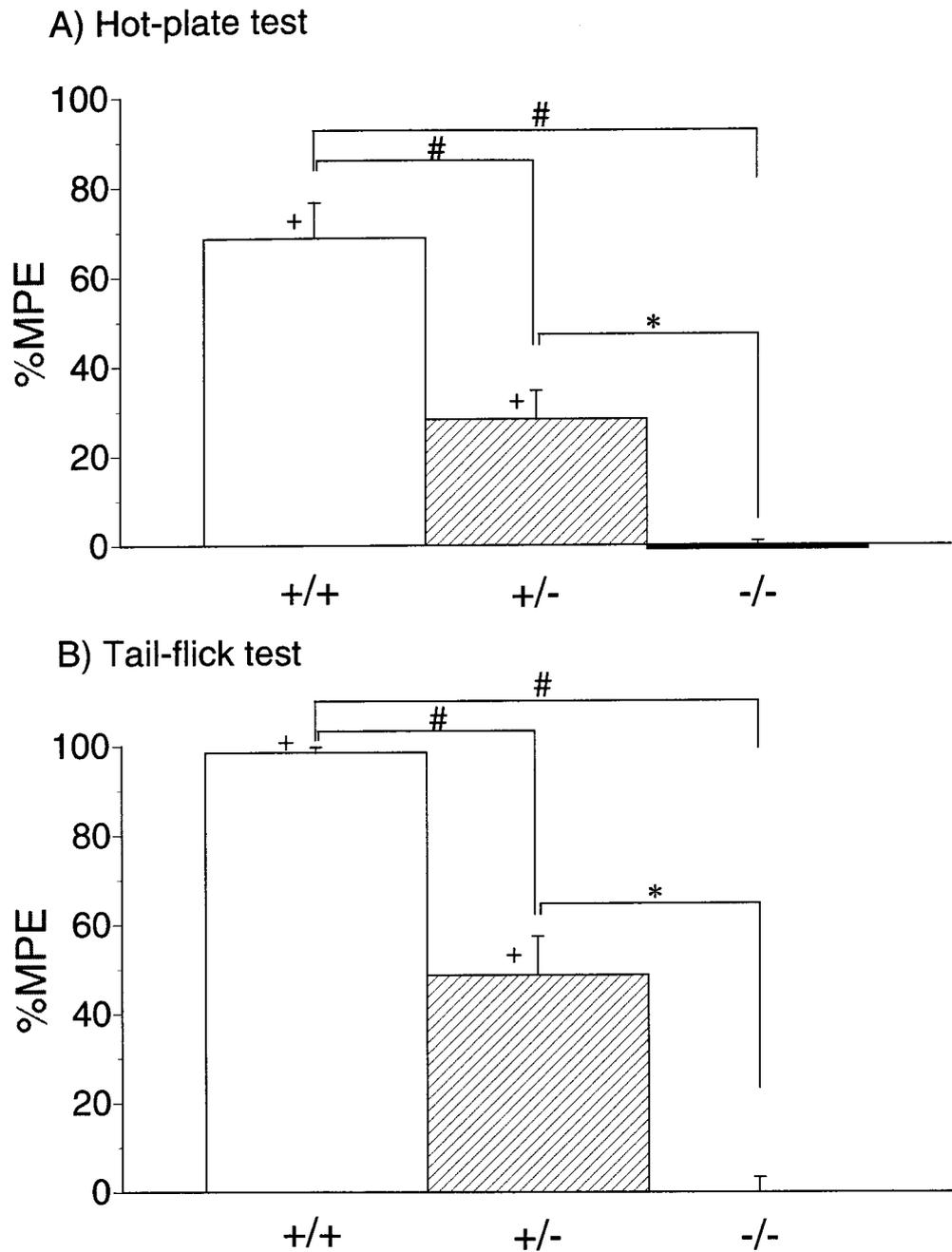


図 2-2 野生型、ヘテロ及びホモ MOR-KO マウスにおけるモルヒネの鎮痛作用
 野生型 (n = 13)、ヘテロ MOR-KO (n = 14)、ホモ MOR-KO (n = 11) マウスにおける、モルヒネ 10 mg/kg 投与 (s.c.) による A) hot-plate 法及び B) tail-flick 法での %MPE。
 + P<0.05 pre vs post morphine treatment (paired t-test)。#P<0.05 vs 野生型マウス、*P<0.05 vs
 ヘテロ MOR-KO マウス(Tukey-Kramer test)。

及び κ オピオイド受容体選択的アンタゴニスト・norBNI 単独処置は、それぞれ場所嫌悪性(CPA; naltrindole CPP score = -25 ± 25)及び場所嗜好性(norBNI CPP score = 36 ± 18)を示す傾向が見られたが、いずれも有意な変化ではなかった。

さらに、ホモMOR-KOマウスにおいて見られる、ブプレノルフィンの場所嗜好性に対する各アンタゴニストの影響を検討した(図2-4)。ナロキソン前処置後のブプレノルフィン投与では、条件付け側のコンパートメントにおける滞在時間に変化は見られず(CPP score = 13 ± 17)、one-way ANOVAにてナロキソン単独処置群及びブプレノルフィン単独処置群と解析したところ、薬物処置による有意な差が見られ($p < 0.05$; $F = 3.72$; $df = 2,53$)、ナロキシソンの前処置にてホモMOR-KOマウスにおけるブプレノルフィンの報酬効果が有意に減弱していることが明らかとなった($p < 0.05$)。一方、ナルトリンドール及びnorBNIの前処置によっては、ブプレノルフィンの場所嗜好性に有意な変化は見られなかったもの(the CPP score = 33 ± 35 and 45 ± 22 , respectively)、ともに減弱させる傾向があること

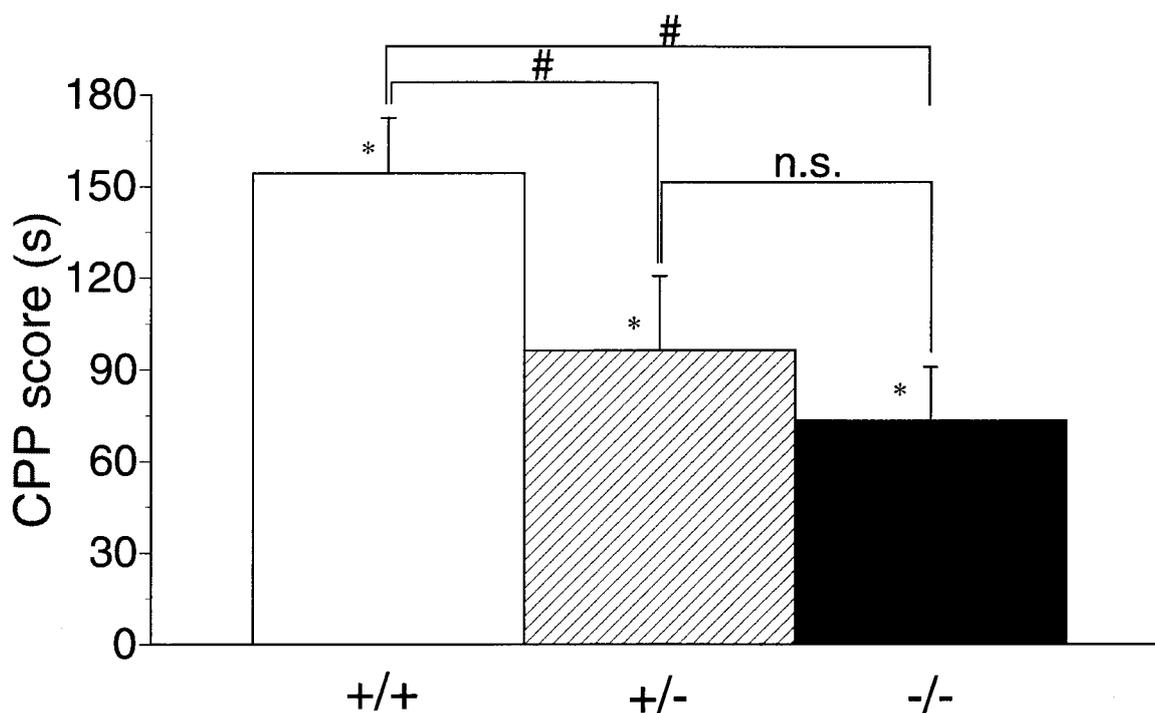


図 2-3 野生型、ヘテロ及びホモMOR-KOマウスにおけるブプレノルフィンの報酬効果(条件付け場所嗜好性試験)

野生型 ($n = 18$)、ヘテロMOR-KO ($n = 18$)、ホモMOR-KO ($n = 20$) マウスにおける、ブプレノルフィン (1.0 mg/kg s.c.) によるconditioned sideでの滞在時間の変化。 $*P < 0.05$ pre- vs post-conditioning time spent (paired t-test)。 $\#P < 0.05$ vs 野生型マウス(Fisher's PLSD post hoc test)。n.s. not significant。

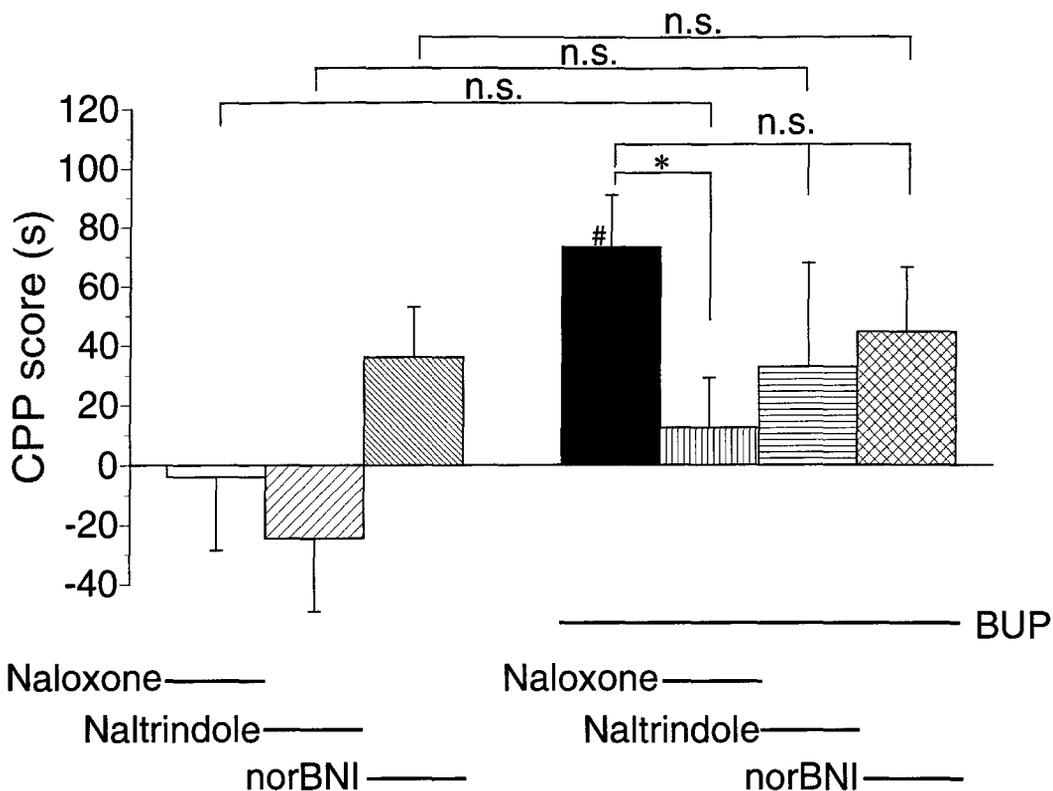


図2-4 ホモMOR-KOマウスにおける各種オピオイド拮抗薬の作用と、ブプレノルフィンの報酬効果に対する前処置における影響(条件付け場所嗜好性試験)

ホモMOR-KOマウスにおける、ナロキソン (n=18)、ナルトリンドール (n=8) 及び norBNI (n=8) 単独処置、並びにナロキソン (n=18)、ナルトリンドール (n=10) 及び norBNI (n=10) 前処置を行ったブプレノルフィン処置による、conditioned sideでの滞在時間の変化。#P<0.05 vs ブプレノルフィン単独処置群 (Fisher's PLSD post hoc test)。*P<0.05 pre- vs post-conditioning time spent (paired t-test)。n.s. not significant。

が示された。

(3) 受容体結合親和性

ブプレノルフィンのオピオイド受容体各サブタイプにおける親和性を検討するために、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体を安定的に発現する細胞株 (MOR/CHO、DOR/CHO及びKOR/CHO)を作製した。作製した細胞から調整した細胞膜標品に対し、それぞれのサブタイプに選択的な放射性リガンド $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ 、 $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ 及び $[^3\text{H}]\text{U69593}$ は高い結合親和性を示し、Kd値はそれぞれ、 1.7 ± 0.3 nM (n=4)、 2.2 ± 0.2 nM (n=4)及び 2.5 ± 0.2 nM (n=3)、Bmax値はそれぞれ 2300 ± 160 、 3000 ± 270 及び 5000 ± 450 fmol/mg proteinであった。

ブプレノルフィンは、MOR/CHO、DOR/CHOあるいはKOR/CHOの膜標品において、 $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ 、 $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ あるいは $[^3\text{H}]\text{U69593}$ 結合を競合的に阻害し、各オピオイド受容体サブタイプに対し、高い結合親和性を有していた(図2-5 a)および表2-1)。ブプレノル

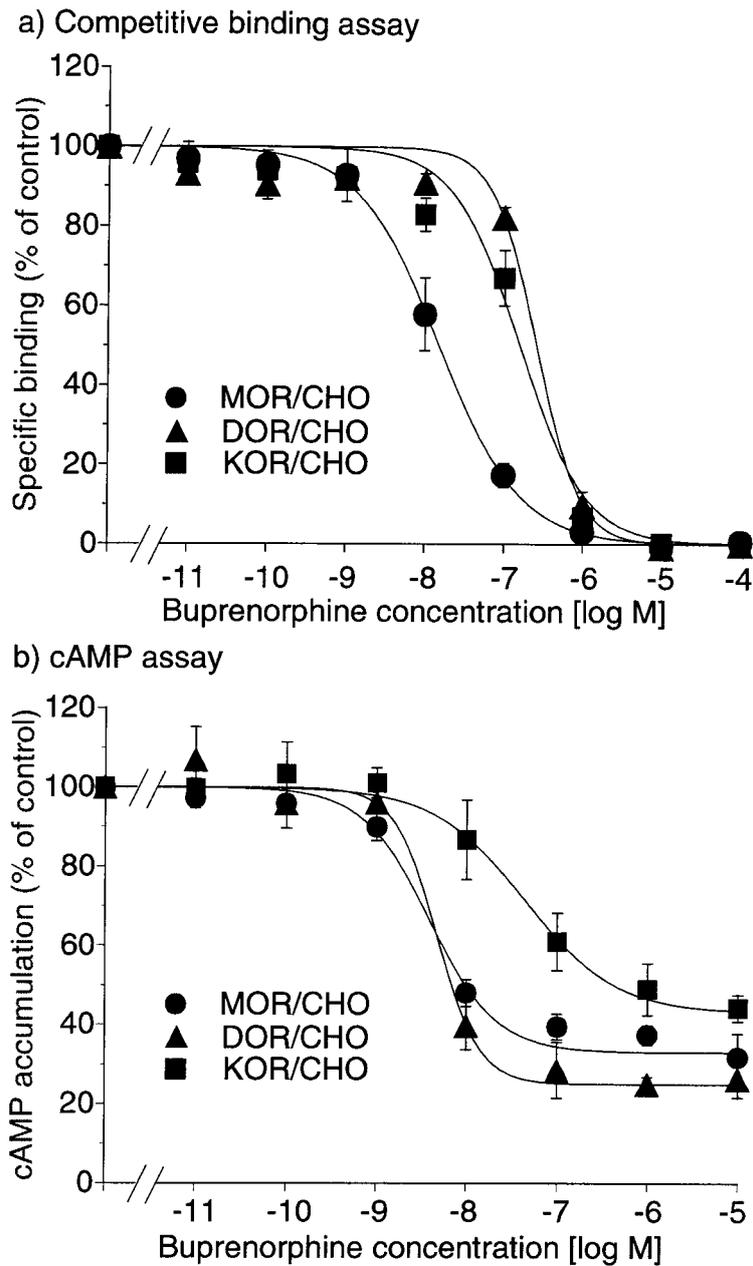


図 2-5 ブプレノルフィンのヒトオピオイド受容体各サブタイプに対する作用

a) MOR/CHO, DOR/CHO 及び KOR/CHO の膜標品に対する、 $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ 、 $[^3\text{H}]\text{DPDPE}$ 及び $[^3\text{H}]\text{U69593}$ 結合のブプレノルフィンによる阻害。n = 11 - 15。

b) MOR/CHO, DOR/CHO 及び KOR/CHO におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積のブプレノルフィンによる抑制。

フィンの μ オピオイド受容体に対する K_i 値はモルヒネと同程度であり、また、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_i 値はモルヒネより低く、より高い結合親和性を有していることが明らかとなった。

(4) アゴニスト活性

次に、MOR/CHO, DOR/CHO及びKOR/CHOにおけるフォルスコリン誘発cAMP蓄積に対するブプレノルフィンの効果を検討した。ブプレノルフィンは、オピオイド受容体の3サブタイプ全てにおいて、濃度依存的にフォルスコリン誘発cAMP蓄積を抑制した(図2-5 b)。ブプレノルフィンの最大抑制効果(I_{max})は、MOR/CHO並びにKOR/CHOにおいてモルヒネより有意に低い値を示しており、DOR/CHOにおいては有意ではないもののモルヒネよりわずかに低い値を示していた(表2-1)。一方、ブプレノルフィンの IC_{50} 値は全ての細胞、特にDOR/CHOにおいて、モルヒネと比較し低い値を示していた。

表2-1 ブプレノルフィン及びモルヒネのヒトオピオイド受容体各サブタイプに対する結合特性とアゴニスト活性

	MOR/CHO	DOR/CHO	KOR/CHO
competitive binding assay			
Ki value (nM)			
buprenorphine	12.4 ± 3.5	154 ± 27	108 ± 27
morphine	21.0 ± 3.7	524 ± 83	247 ± 13
cAMP assay			
IC ₅₀ (nM)			
buprenorphine	3.7 ± 0.5	5.5 ± 1.3	20.6 ± 6.4
morphine	25.0 ± 9.0	610 ± 220	340 ± 160
I _{max} (%)			
buprenorphine	66.0 ± 4.7 *	75.7 ± 2.8	57.3 ± 4.1*
morphine	88.0 ± 3.1	83.7 ± 2.7	84.3 ± 3.3

*P<0.05 vs morphine の I_{max} 値 (student's t-test)

考察

本実験において、tail-flick 法及び hot-plate 法のいずれの検定法においても、ブプレノルフィンによる鎮痛作用は、ヘテロマウスでは有意に減弱しており、ホモマウスにおいては、完全に消失していることが示された。ブプレノルフィンは μ オピオイド受容体のみならず、 δ 及び κ オピオイド受容体に対しても作用することが報告されており [57, 58]、そのことは、ヒトクローン化オピオイド受容体発現細胞を用いた本研究においても確認された。しかしながら、ブプレノルフィンによる鎮痛作用は μ オピオイド受容体遺伝子量の減少に依存して減弱した。この結果は、異なるラインの μ オピオイド受容体ホモノックアウトマウスを用いて検討を行い、tail-flick 法におけるブプレノルフィンの熱的抗侵害受容作用消失を示した、Lutfy らの最近の報告と一致する [59]。これらの知見から、ブプレノルフィンによる熱的抗侵害受容作用では、 μ オピオイド受容体が中心的な役割を果たしていることが示唆される。また、ブプレノルフィンと同様の結合特性を示すペンタゾシンやブトルファノールなどの他の拮抗性鎮痛薬も、その鎮痛作用の発現に μ オピオイド受容体が中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。

これまでに行われてきた研究や本実験の結果から、 δ 及び κ オピオイド受容体に対しても低結合親和性を有する μ オピオイド受容体作動薬モルヒネの鎮痛作用は、複数のラインのヘテロ MOR-KO マウスにおいて鎮痛効果に減弱が見られ、ホモ MOR-KO マウスにおいては完全に消失していることが明らかとされている [49 - 51]。また、 δ オピオイド受容体に比較的選択的な DPDPE も、MOR-KO マウスにおいてその鎮痛作用が減弱していることが示されている [52, 53]。さらに C57BL/6 や BALB/c といったマウス種と比較し、約半分程度しか μ オピオイド受容体の発現が見られない CXBK マウス種においても、モルヒネや κ オピオイド受容体選択的作動薬の U50488H による鎮痛効果が減弱していることも報告されている [26, 27]。一方で、モルヒネによる鎮痛作用は δ オピオイド受容体ノックアウトマウス [60] や κ オピオイド受容体ノックアウトマウス [61] においては、変化が見られないことも報告されている。これらのことから、オピオイド受容体リガンド、特にブプレノルフィンやモルヒネによる鎮痛作用発現においては、 μ オピオイド受容体が中心的な役割を果たしていると考えられる。また、本実験において、モルヒネ及びブプレノルフィンの鎮痛効果は、いずれも μ オピオイド受容体遺伝子量依存的であったが、hot-plate 法による検定において、ヘテロ MOR-KO マウスにおけるブプレノルフィンの鎮痛作用は極めて弱くホモ MOR-KO マウスと比較し有意な差が見られなかった。この結果は、ブプレノルフィンによる上位中枢性の抗熱的侵害受容作用は、特に μ オピオイド受容体発現量減少による影響を受けやすい可能性を示している。本実験の結果は、 μ オピオイド受容体発現量の個人差が、オピオイドによる疼痛治療において重要であることを示唆している。

一方、ブプレノルフィンの条件付け場所嗜好性試験では、さらに興味のある結果が示された。ブプレノルフィンの報酬効果は、鎮痛作用と同様に、 μ オピオイド受容体の遺伝子量依存的に減弱が見られたが、ホモ MOR-KO マウスにおいても、依然として有意な報酬効果が見られることが明らかとなった。この結果は、ホモ MOR-KO マウス

において、モルヒネによる場所嗜好性が完全に消失しているというこれまでの報告[51、62]と対照的であった。さらに、このホモ MOR-KO マウスにおいて見られるブプレノルフィンの報酬効果は、ブプレノルフィンによる条件付け期間において、非選択的なオピオイド受容体拮抗薬のナロキソンを前処置することによって、完全に消失することが示されたことより、 δ 及び κ オピオイド受容体の関与が示唆された。また、 δ オピオイド受容体選択的拮抗薬ナルトリンドール、並びに κ オピオイド受容体選択的拮抗薬 norBNI の前処置により、いずれもホモ MOR-KO マウスにおいて見られるブプレノルフィンの報酬効果を減弱させる傾向が見られたことから、両オピオイド受容体サブタイプが共にブプレノルフィンの報酬効果に関与していることが明らかとなった。

これまでに、野生型マウスでの実験において、 κ オピオイド受容体選択的作動薬の処置では、条件付け場所嫌悪反応が誘発されるのに対して[63、64]、 δ オピオイド受容体選択的作動薬の処置では、条件付け場所嗜好性が誘発されること[65]が報告されている。さらに、 κ オピオイド受容体拮抗薬により、野生型ラットにおいて場所嗜好性が誘発されることも報告されており[66]、内因性の κ オピオイド受容体ペプチドのダイノルフィンによる、嫌悪ないし報酬を弱めるような、情動系に対する恒常的な作用の存在が示唆される。これらの結果は、報酬効果においては、 μ 及び δ オピオイド受容体は促進的に関与しており、 κ オピオイド受容体は抑制的に関与していることを示唆している。一方、ホモ MOR-KO マウスにおいて、norBNI 前処置により κ オピオイド受容体を完全に遮断した場合、ブプレノルフィンの部分的な遮断と比較し報酬効果が弱かったことより、 κ オピオイド受容体の部分的な活性化が、 δ オピオイド受容体を介したブプレノルフィンの報酬効果を増強するようなメカニズムが存在することにより見られた可能性が考えられる。このため、ブプレノルフィンは、 μ 及び δ オピオイド受容体を活性化し、 κ オピオイド受容体を部分的に阻害することで、報酬効果を発現していることが考えられる。このブプレノルフィンによる、 κ オピオイド受容体に対する部分的な拮抗作用は、*in vitro* 実験でのブプレノルフィンによる κ オピオイド受容体選択的作動薬の結合抑制と、フォルスコリン誘発 cAMP 蓄積に対する弱い阻害効果からも推測される。

ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体を発現させた細胞株を用いた *in vitro* 実験において、ブプレノルフィンは μ オピオイド受容体のみならず、 δ 及び κ オピオイド受容体を介して作用を発現することが示された。結合実験においてブプレノルフィンは、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対し、それぞれ強い結合親和性を有していた。また cAMP assay において、ブプレノルフィンの I_{max} 値は、 δ オピオイド受容体に対してはモルヒネと有意な差は見られないが、 κ オピオイド受容体に対しては有意に低いことが示されたことより、 δ オピオイド受容体に対してはアゴニスト活性が強い部分作動薬、 κ オピオイド受容体に対してはアゴニスト活性が弱く拮抗性が強い部分作動薬として作用する可能性が考えられる。これらの結果は、マウスと同様に、ヒトにおいてもブプレノルフィンの報酬効果に μ オピオイド受容体のみならず δ 及び κ オピオイド受容体に関与している可能性を示唆している。

これまでに、ブプレノルフィンは実験動物のみならず[46、47]、ヒトにおいても[67]報酬効果を有することが報告されている。近年、ブプレノルフィンはモルヒネ並びに

ヘロイン依存患者の薬物依存治療において、臨床の現場で広く使われるようになってきた[44、45、68]。ブプレノルフィンには μ オピオイド受容体に加え、 δ 及び κ オピオイド受容体を介して報酬効果を発現すると考えられるが、一般的に、モルヒネ並びにヘロイン依存に対するブプレノルフィンの有効性は、ブプレノルフィン処置による μ オピオイド受容体活性の減弱によりもたらされていると考えられている[69、70]。現在までのところ、 μ オピオイド受容体以外のオピオイド受容体サブタイプが、ブプレノルフィンによる薬物依存治療に関して寄与しているのかどうかは明らかにされていない。本実験において示されたブプレノルフィンによる δ 及び κ オピオイド受容体を介する報酬効果が、薬物依存治療においてどの程度関与しているかは、今後の研究により明らかにされることが期待される。

以上、本実験において、ホモMOR-KOマウスにおいてはブプレノルフィンの鎮痛効果は消失しているが、報酬効果は一部残っていることが明らかとなった。ナロキソンの前処置によるブプレノルフィンの報酬効果の消失と、結合実験並びにcAMP assayにおけるブプレノルフィンは μ 、 δ 並びに κ オピオイド受容体に対してそれぞれ作用するという実験結果より、ブプレノルフィンの鎮痛効果は完全に μ オピオイド受容体量に依存的であるが、報酬効果は、 μ オピオイド受容体のみでなく δ オピオイド受容体に対する作動薬としての作用と、 κ オピオイド受容体に対する部分拮抗薬としての作用により発現していると考えられる。

第三章

アドレナリン・ノルアドレナリン神経特異的に μ オピオイド受容体を導入した トランスジェニックマウスの作製と解析

第二章において、 μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた解析によって、 μ オピオイド受容体の発現量の変化に伴い、ブプレノルフィンの鎮痛作用は μ オピオイド受容体発現量依存的に変化するが、報酬効果においては、 μ オピオイド受容体に加えて δ 及び κ オピオイド受容体も介していることを明らかにし、ヒトにおける麻薬性鎮痛薬を用いた疼痛治療において、 μ オピオイド受容体発現量変化が、特に鎮痛作用に影響を与え、さらに副作用である依存形成にも異なる程度で影響を与える可能性を示した。一方、 μ オピオイド受容体を介した様々な薬理作用は、様々な神経系による調節を受けていることも良く知られており、 μ オピオイド受容体が部位特異的あるいは神経系特異的に発現している個体を用いた解析は、それら調節機構に関し重要な知見を提供するものと考えられる。そこで、第三章では、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系に特異的に μ オピオイド受容体を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。

中枢神経系のノルアドレナリン神経は、主として脳幹内に細胞体が存在し、大脳皮質、辺縁系、視床、小脳、脊髄など広範な領域に投射し、様々な生体機能に関わっている。オピオイドとノルアドレナリンの関係として、これまでにオピオイドによる鎮痛やモルヒネなどの麻薬依存形成・禁断症状にノルアドレナリン神経が関与していることが報告されている[71-73]。さらに、各種ストレス負荷時に、ノルアドレナリン並びに β エンドルフィンの遊離量が上昇し、ストレス応答に深く関与していることも明らかとされている[74-76]。これら両神経系の相互作用において、特に青斑核が注目され、様々な研究がなされているが、ストレス応答時における視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA-axis) との関係など、未だ未解明な部分も多く残されている[77, 78]。ストレスは、麻薬性鎮痛薬の効果の減弱や、副作用の増強を引き起こすなど、臨床における問題点となる。さらに、ストレス感受性やストレス応答においても個人差が存在する。 μ オピオイド受容体を介した生理的あるいは薬理的反応とストレス応答の相互関係に個人差が生じるメカニズムを解明することは、オピオイドを用いたテーラーメイド医療に深く貢献すると考えられる。

著者は、dopamine β -hydroxylase (DBH)のプロモーター領域下流にヒト μ オピオイド受容体遺伝子を組み込むことで、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系に特異的にヒト μ オピオイド受容体を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。さらにMOR-KOマウスとの交配により、上記神経上に導入したヒト μ オピオイド受容体のみを発現し、他の神経系には μ オピオイド受容体が発現していないMOR-KO Tgマウスを作製した。これらの遺伝子改変マウスを用いて、モルヒネによる鎮痛、移所運動量、耐性・身体依存形成を検討すると共に、ストレス応答に対する影響について検討を行った。

第一節 遺伝子改変マウスの作製

方法および結果

(1) Tg マウスの作製

導入遺伝子を含むプラスミドは、以前に報告されている、インターロイキン2受容体 α サブユニット(IL-2R α)をDBHプロモーターによりアドレナリン・ノルアドレナリン神経系特異的に発現させることに成功したトランスジェニックマウスの作製[79]の際に用いられたプラスミド(pDIL)(福島医科大学 小林博士より譲渡)の、IL-2R α cDNAの領域を、前述(第二章)のhuman μ オピオイド受容体cDNAと組み換えることで作製した(図3-1)。制限酵素切断並びにシーケンス法を用いた配列確認の後、プラスミドから導入遺伝子部分を制限酵素により切断し、SeaKem GTG agarose (BMA、Rockland、USA)を用いた電気泳動により分離、透析チューブを用いて目的遺伝子片を抽出した。フェノール・クロロホルム抽出・ジエチルエーテル抽出により精製をし、エタノール沈殿を行った後、TE buffer (10 mM Tris、0.1 mM EDTA、pH7.4、フィルター(0.22 μ m)濾過)に溶解し700 ng/ μ lの高濃度導入遺伝子溶液を作製した。C57BL/6J系統の受精卵400個への導入遺伝子マイクロインジェクションを、(財)実験動物中央研究所(神奈川)並びに(株)ワイエスニューテクノロジー研究所(栃木)に依頼し、それぞれ65匹並びに77匹の生存離乳可能なマウスを得た。

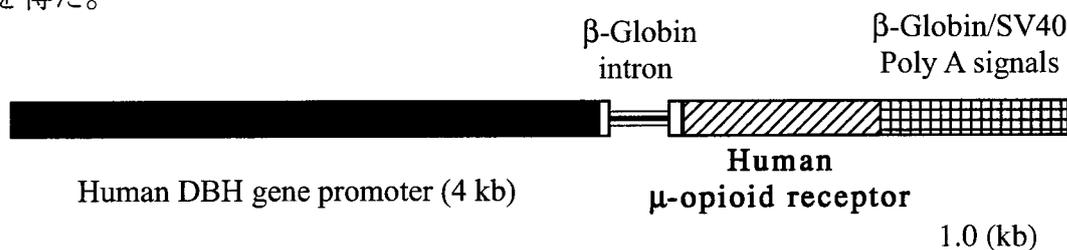


図 3-1 導入遺伝子の模式図

作製した導入遺伝子は、全長 7.2 kb で、4 kb の human DBH プロモーター領域、0.5 kb の rabbit β -globin intron 2、1.6 kb の human μ -opioid receptor cDNA そして、rabbit β -globin poly A シグナル領域と simian virus 40 (SV40) early-gene poly A シグナル領域からなる。

(2) 遺伝子導入の確認

得られた全てのマウスより、尾の先端 5 mm を切断し、Proteinase K 溶液で溶解、RNaseA 処理後、通常のフェノール抽出法を用いてマウスゲノム DNA を精製した。遺伝子導入の確認として、ゲノム DNA を鋳型として、KOD Dash (TOYOBO、東京)を用いて PCR を行った(図 3-2)。さらに、ゲノム DNA を制限酵素 BamHI にて切断し、サザンブロットを行った(図 3-3)。

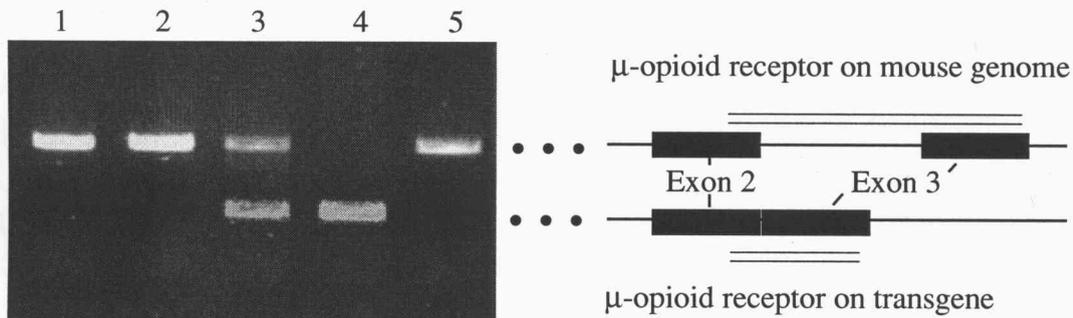
サザンブロット法において、プローブは PCR 法での確認の際に human μ オピオイド受容体 cDNA より増幅した遺伝子を、 32 P-dCTP(3,000 Ci/mmol、Amersham)存在下、Random Primer DNA Labeling Kit ver.2 (TAKARA、東京)を用いて標識したものを使用した。ゲノム DNA を制限酵素 BamHI で切断後、アガロースゲルにて 55CV、16 時間電気泳動し、Nytran

図 3-2 PCR による遺伝子導入の確認

マウス及びヒト μ オピオイド受容体遺伝子の exon 2 及び exon 3 の相同性の高い配列をプライマーとし、PCR により増幅した。図中二重線で示す、約 1250bp (マウスゲノム由来) 並びに約 500bp (ヒト cDNA 由来) の 2 本のバンドが確認できるライン (図中、ライン 3) が Tg マウスであると判断した。

exon 2 primer: 5' TCC GTA CTC CCC GAA ATG 3'

exon 3 primer: 5' GGC AGC TGT TTG TGT AAC 3'



各レーンの template

1,2: 野生型マウスゲノム DNA

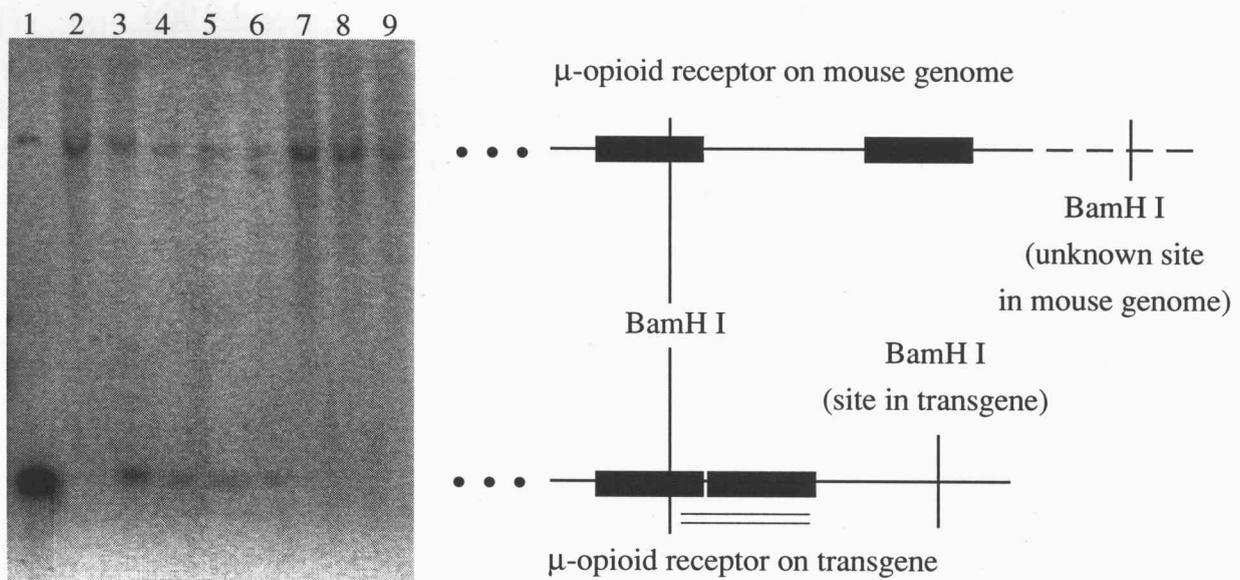
3: Tg マウスゲノム DNA

4: ヒト μ オピオイド受容体 cDNA

5: control 野生型マウスゲノム DNA

図 3-3 サザンブロットによる遺伝子導入の確認

ヒト μ オピオイド受容体遺伝子 cDNA の exon2, 3 の配列をプローブ (図中、二重線で示す) とし、マウスゲノム DNA を制限酵素 BamH I (μ オピオイド受容体遺伝子 exon 2 内に一箇所と、導入遺伝子の Poly(A)signal 領域に 1 箇所制限酵素サイトが存在) にて切断後、サザンブロットを行った。



各レーンの泳動サンプル (全て BamH I 切断後)

1: ヒト μ オピオイド受容体 cDNA (plasmid) 2,7,8,9: 野生型マウスゲノム DNA

3-6: Tg マウスゲノム DNA

膜(Nytran super charge, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) に転写した後、UV crosslinker を用いて固定した。以下に組成を示す Melton's solution により、42℃で3時間プレハイブリダイゼーションを行い、バッファーを除去後、新たに³²P 標識 DNA プローブを加えた Melton's solution により、42℃16時間ハイブリダイズさせた。洗浄操作は2×SSCで素早く洗浄の後、0.4×SSC/0.5% SDS、30分40℃で2度、さらに0.4×SSCで再度軽く洗浄した。IP plate を12時間曝露させ、BAS 3100II システム (Fujix、東京) を用いて解析を行った。

また、ゲノム DNA を導入遺伝子内に1箇所のみ制限酵素サイトが存在する Nco I にて切断後、サザンブロット法を行うことで、遺伝子導入が複数の座位で起こっていないことを確認した。PCR 法並びにサザンブロット法により、全142のマウス中、4匹のマウス (雄3匹、雌1匹) で遺伝子が導入されたことを確認した。

Melton's solution		1 × SSC	
Formamide	50.0 ml	NaCl	150 mM
20 × SSC	25.0 ml	Sodium citrate	15 mM
1M phosphate buffer	5.0 ml		
0.5 M EDTA	0.2 ml		
20 % SDS	5.0 ml		
Denhart's solution	2.5 ml		
ss DNA (100℃,10分熱処理)	1.0 ml		
+ nano pure	11.3 ml		

(3) MOR-KO Tg マウスの作製

得られたTgマウス4ラインを、まずホモMOR-KOマウス(第二章と同じマウスを使用)と交配し、マウス μ オピオイド受容体がヘテロとなったTgマウスを得た。さらにホモMOR-KOマウスと交配することにより、マウス本来の μ オピオイド受容体が欠損した、MOR-KO Tgマウスを作製した。また、得られた全てのラインのTgマウス、及びMOR-KO Tgマウスにおいて、形態・生殖・一般行動に著明な変化は認められなかった。

(4) MOR-KO Tgマウスにおける μ オピオイド受容体mRNAの発現

プローブは、pBluescriptに組み込んだヒト及びマウス μ オピオイド受容体cDNAの配列中、相同性の低い5'UTR領域を制限酵素により切り出し、³⁵S-UTP (30 TBq/mmol) 存在下、T3 RNA polymerase (Promega, Medison, USA) により、 μ オピオイド受容体に対するヒト及びマウス特異的な³⁵S標識アンチセンスRNAプローブを合成した。

In situ ハイブリダイゼーションは、薬物無処置のマウスより摘出し、凍結させた全脳を用い、クリオスタットにより厚さ16 μ mの新鮮凍結切片を作製して、MASコートをしたスライドガラスにマウントした。この切片を4% formaldehyde 中で15分間固定した後、Proteinase K 処理 (0.5 μ g/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およびchloroformによる脱脂処理を施して乾燥させた。その後、以下に示し

たプレハイブリダイゼーションバッファーを用いて55°Cで1時間、プレハイブリダイゼーションを行った。次に、プレハイブリダイゼーションバッファーを除去し、³⁵S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を用いて55°Cで17時間ハイブリダイズさせた。洗浄操作は、10 mM DTTを含む55°Cの2×SSCで4回洗浄し、RNase A 処理（50 µg/ml、37°C、30分）を施し、さらに55°Cの2×SSC/50% formamideで2回洗浄した後、アルコール系列で乾燥させ、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（図3-4 a）。さらに、乳剤 NTB-3 (Kodak, Rochester, USA) を塗布し、3週間の露光後に現像して、cresyl violetで対比染色したものを検鏡した（図3-4 b）。

MOR-KO Tgマウス4ライン全てに関し実験を行ったところ、全てのラインで青斑核におけるμオピオイド受容体mRNAの発現が確認された。図3-4は最も発現量の多かったラインの結果を示している。青斑核に限局した発現が確認されたことで、導入遺伝子による、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系特異的な発現が確認された。

	Prehybridization buffer	Hybridization buffer
Formamide	50 %	50 %
SSC	4x	4x
Denhardt's solution	5x	2.7x
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

(5) MOR-KO Tg マウス脳におけるμオピオイド受容体結合活性の確認

In situ ハイブリダイゼーション法と同様に凍結脳切片をスライドグラスにマウントし、binding buffer (pH 7.4、50 mM Tris、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA) 内で25°C10分プレインキュベーションを行い、バッファーを除去後、新たに³H]DAMGO 2 nMを加えたbinding buffer中で、25°C1時間振盪し受容体結合反応を行った。洗浄はbinding buffer、4°C120分を2回行った後、4°Cの超純水で軽く洗浄し、スライドを4°Cで1時間乾燥させた後、IP plateを4週間曝露させ、BAS 3100II システム (Fujix、東京) を用いて解析を行った。

MOR-KO Tgマウス4ライン全てに関し実験を行ったところ、全てのラインでノルアドレナリン神経の主たる投射先の一つである大脳皮質を中心とした結合活性が確認された。mRNA量が最も多かったラインの受容体結合量が最も多かった。図3-5に、図3-4で示したものと同一ラインのMOR-KO Tgマウスの結果を示す。一方、副腎など末梢での発現は検出されなかった。

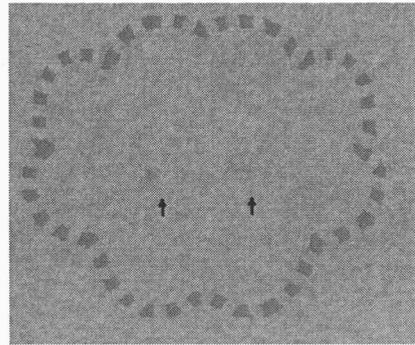
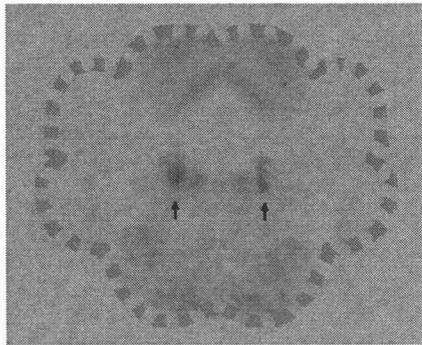
以上の結果より、mRNA並びに受容体結合量が最も多かった1ラインを用い、以下の行動薬理的解析を行った。

a) マクロオートラジオグラフィー

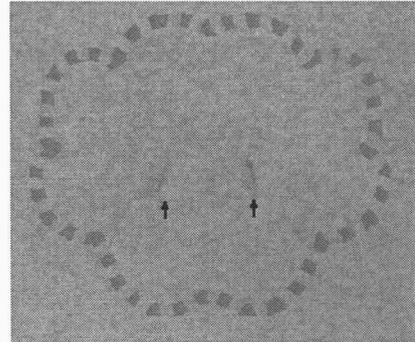
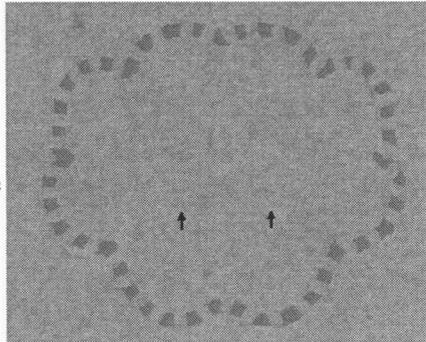
野生型マウス

MOR-KO Tg マウス

mouse probe



human probe

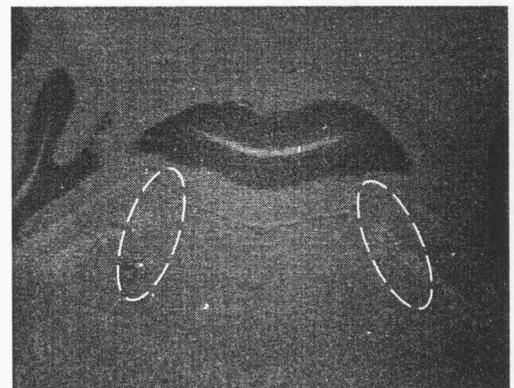
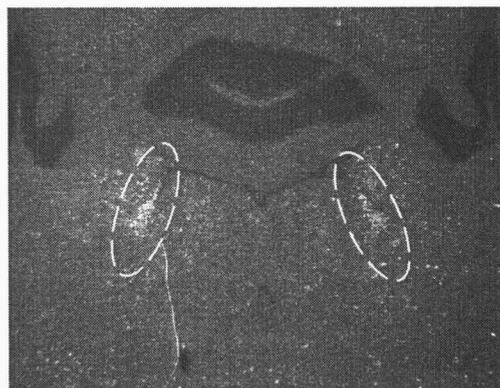


b) ミクロオートラジオグラフィー

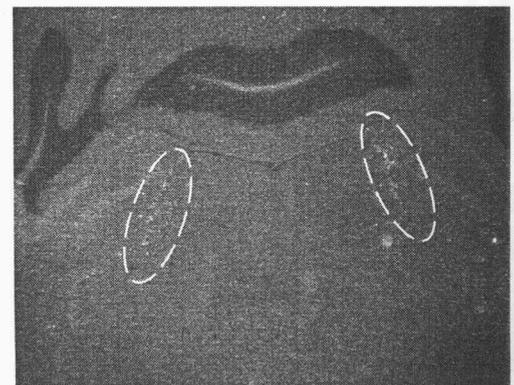
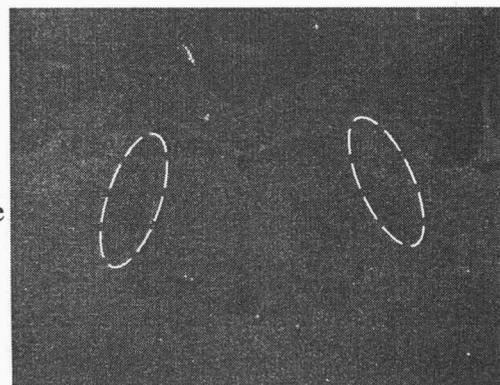
野生型マウス

MOR-KO Tg マウス

mouse probe



human probe



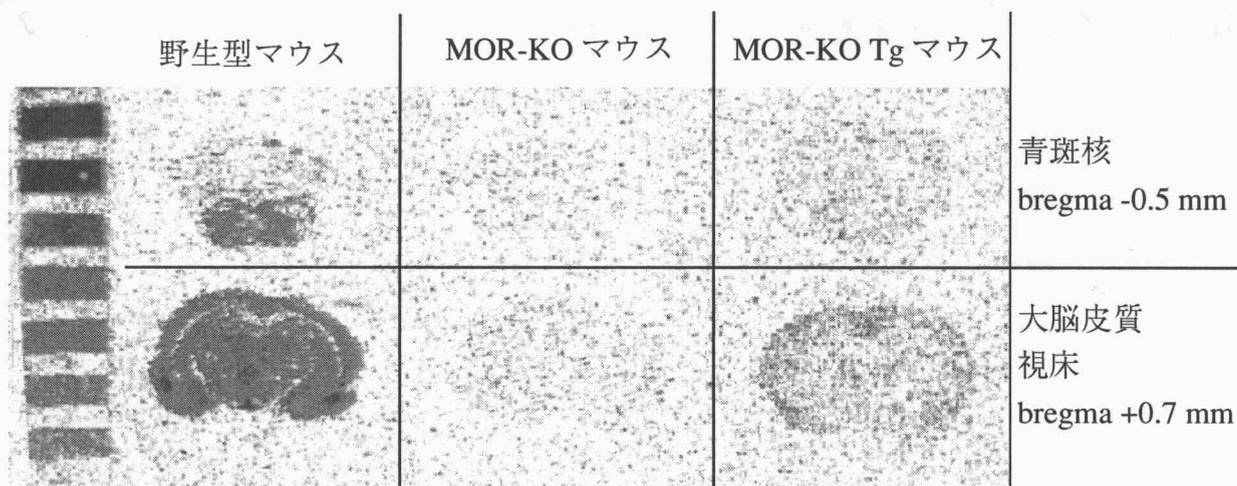


図 3-5 MOR-KO Tg マウスにおける μ オピオイド受容体の発現と受容体結合能の確認

野生型、MOR-KO 並びに MOR-KO Tg マウスより調整した、視床・大脳皮質ないし青斑核を含む冠状切片（それぞれ bregma から吻側へ 0.7 mm 付近、尾側へ 5.5 mm 付近）に対して、 $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ による結合実験を行った。

図 3-4 青斑核における μ オピオイド受容体 mRNA の発現（左ページ）

野生型及び MOR-KO Tg マウスより作製した青斑核を含む冠状切片（bregma から尾側へ 5.5 mm 付近）に対して、マウス（a,b 上段）及びヒト（a,b 下段） μ オピオイド受容体に対する特異的な ^{35}S 標識アンチセンス RNA プロブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。a) マクロオートラジオグラフィーの結果を示す。図中の灰破線は脳切片の輪郭を矢印は青斑核を示す。b) ミクロオートラジオグラフィーの暗視野像を示す。図中の白破線は青斑核を含む領域を示す。

第二節 遺伝子改変マウスを用いた行動薬理的解析

方法

(1) 使用動物

野生型マウスとTgマウスは、両マウスの交配によって作製した。ホモMOR-KOマウスとMOR-KO Tgマウスも同様に、両マウスの交配によって作製した。使用したマウスの遺伝的背景は全てC57BL/6Jマウスと同一とした。飼育環境は第二章と同じ条件で行った。実験には20-35 g（10週齢以上）のマウスを用いた。

(2) 薬物調整

モルヒネ及びナロキソンは第二章と同じものを用いた。

(3) 移所運動量の測定

マウスをホームケージより測定用のケージ（30 × 45 × 30 cm）に移し、自発運動量測定装置（ニューロサイエンス、大阪）により、新規環境探索行動を3時間30分測定した。さらに、連続してモルヒネ(10 mg/kg s.c.)処置を行い、モルヒネ投与による自発運動量の変化を3時間計測した。

(4) 鎮痛検定

Hot-plate法並びにtail-flick法を用い、第二章と同様の相加蓄積投与法でモルヒネによる鎮痛効果を検討した。モルヒネによる急性効果では、1マウスに対し20分間隔で1.0、2.0、7、20 mg/kgを皮下注射にて投与し、蓄積投与総量がそれぞれの注射の時点で、1.0、3.0、10、30 mg/kgとなるようにし、各投与の20分後に鎮痛検定を行った。モルヒネの急性効果の検討を行った翌日より、1日2回モルヒネ 15 mg/kg s.c. から毎日5 mg/kgずつ増量し、5日間連続投与（1マウスに15、20、25、30、35 mg/kg s.c.）を行い、耐性を形成させた。最終日の35 mg/kg投与より20時間後に、モルヒネ慢性処置後の鎮痛検定を行った。モルヒネ慢性処置後には蓄積総投与量で3.0、10、30、56 mg/kgとなるように投与した。

(5) ナロキソン誘発禁断症状の観察

慢性処置後の鎮痛検定の終了後、マウスを透明なプラスチック観測用ケージ（10 × 20 × 15 cm）に入れ、1時間馴化させた。ナロキソン（1.0 mg/kg s.c.）処置により誘発される跳躍行動を15分間計測した。

(6) Tail-suspension 法

マウスの尾の先端を、メンディングテープにてワイヤーに固定し、逆さ吊りにした状態で、15分間マウスの回避行動量（一分あたりの回避行動をとった秒数）をテールサスペンション実験システム（ニューロサイエンス、大阪）を用いて計測した。データ解析には、5分ごとの回避行動量の総和を用いた。

(7) ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度の測定

まず、薬物無処置のマウスより採血し、3日間の休息期間の後、Tail-suspension ストレスを15分与え、ストレス処置の30分後に採血を行った。翌日、拘束ストレスとして50 mlのプラスチックチューブ（側面に直径5 mmの空気穴を6箇所と、底に直径1 cmの空気穴を一箇所あけた。）内にマウスを閉じこめ、チューブを垂直に立てた状態で12時間放置した。処置後12時間の休息期間を与え、再度拘束ストレス処置を行い、2度目の拘束ストレスの直後にマウスより採血した。採血は、マウス尾静脈より行い、採血後速やかに1,000 × g、20分間の遠心を行い、上清の血漿分画を採取した。酢酸エチルにより、血漿中のコルチコステロンを抽出し、乾燥窒素下で酢酸エチルを蒸発させ、コルチコステロンの定量をエンザイムイムノアッセイ法（Assay Designs, Inc., Ann Arbor, USA）を用いて行った。

(8) データ解析

モルヒネの移所運動量増加効果並びに熱的抗侵害受容作用、及びTail-suspension法における回避活動時間の変化の評価は、ANOVA並びにStudent-Newman-Keuls post hoc testを用いて行った。ナロキソン誘発跳躍行動の遺伝子型による有意差検定は、Tukey-Kramer testを用いて行った。ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度の変化の評価は、paired *t*-testを用いて行った。また、遺伝子型による有意差検定は、Tukey-Kramer 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断した。

実験結果

(1) 移所運動量の検討

野生型マウス、Tgマウス、MOR-KOマウスおよびMOR-KO Tgマウスを用い、新規環境探索行動に対する遺伝子導入の影響を検討した(図3-6 a, b)。全てのマウスにおいて、時間の経過に比例した移所運動量の減少がみられ、遺伝子型による比較において有意な影響は見られなかった。

次に、モルヒネ(10 mg/kg s.c.)処置による自発運動量の変化を検討したところ、遺伝子型により有意な移所運動量変化が見られた(ANOVA: $p < 0.0001$; $F = 483.19$; $df = 3, 2156$) (図3-6 c, d)。これまでの報告[51]と同様に、野生型では有意な移所運動量増加が見られ、

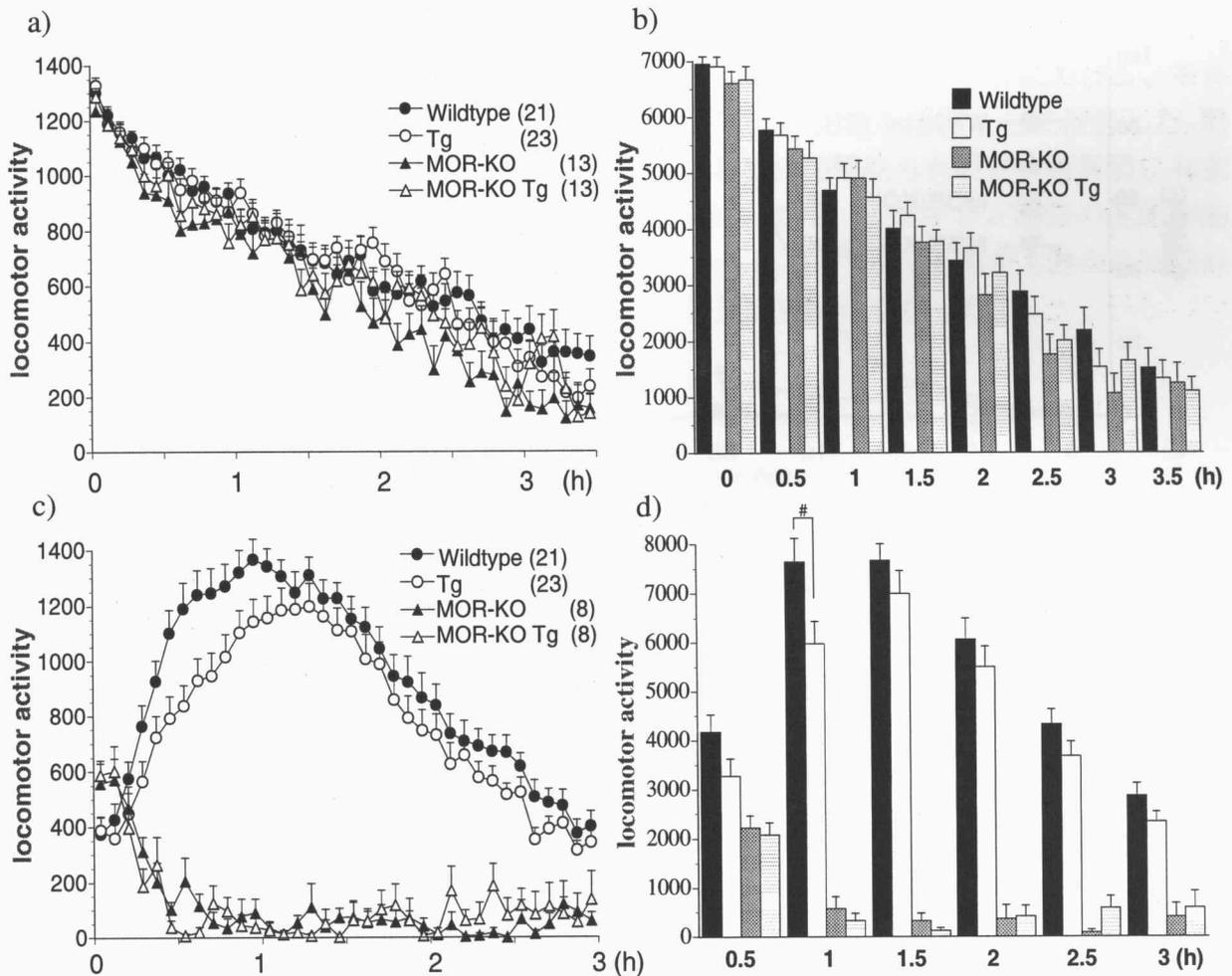


図 3-6 新規環境探索行動並びにモルヒネ誘発自発運動量増加に対する遺伝子導入の影響

野生型マウス、Tgマウス、MOR-KOマウスおよびMOR-KO Tgマウスにおける新規環境探索行動量 (a, b) とモルヒネ (10 mg/kg s.c.) 処置による自発運動量の増加 (c, d) を検討した。5分ごとの行動量変化 (a, c) と30分ごとの行動量変化 (b, d) を示す。# $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test)

MOR-KOマウスではモルヒネ処置による移所運動量の増加は確認されなかった。Tgマウスにおいては、野生型マウスと同様にモルヒネによる有意な移所運動量の増加が見られたが、投与より30分から1時間の行動量は、野生型マウスと比較して有意に減少していた(ANOVA: $p < 0.05$; $F = 6.17$; $df = 1,42$)。一方、MOR-KO Tgマウスにおいては、MOR-KOマウスと同様に、モルヒネによる自発運動量増加効果は消失しており、両群間に有意な差は見られなかった。

(2) モルヒネによる鎮痛作用および耐性の検討

まず、野生型マウス、Tgマウス、MOR-KOマウス並びにMOR-KO Tgマウスを用い、モルヒネ急性投与に対する遺伝子導入の影響を、相加蓄積投与法を用いて検討した(図

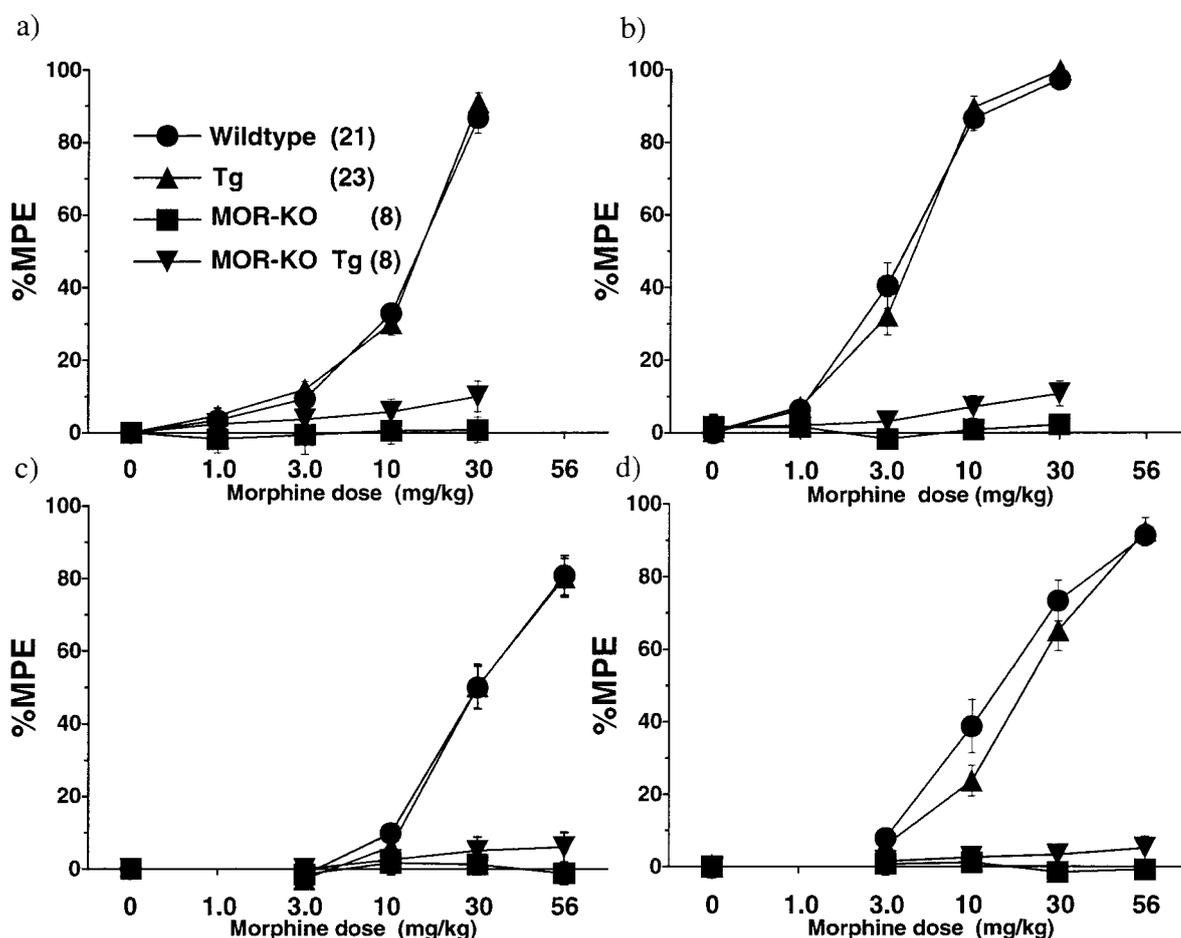


図 3-7 急性および慢性処置後のモルヒネ誘発抗熱的侵害受容作用に対する遺伝子導入の影響

野生型マウス、Tgマウス、MOR-KOマウス並びにMOR-KO Tgマウスにおける、急性 (a, b) 及びモルヒネ慢性処置後 (c, d) の、モルヒネによる抗熱的侵害受容作用を、相加蓄積投与法により検討した。Hot-plate法 (a, c) 並びにTail-flick法 (b, d) の結果を%MPEにて示す。

3-7 a, b)。これまでの報告[51]と同様に、hot-plate 法及び tail-flick 法ともに野生型では有意な %MPE の上昇が見られ、MOR-KO マウスではモルヒネ処置による %MPE の上昇は確認されなかった。一方、野生型マウスと同様に、Tg マウスでも有意な %MPE の上昇がみられ、両群間で有意な差は見られなかった。また、MOR-KO Tg マウスにおいては、MOR-KO マウスと同様に、両検定法において有意な鎮痛効果は見られなかったが、高濃度のモルヒネ処置により若干の %MPE 上昇傾向が見られた。

次に、モルヒネ慢性処置を行い、耐性を形成させたマウスにおいて、遺伝子導入の影響を相加蓄積投与法を用いて検討した (図 3-7 c, d)。野生型、Tg マウスともに急性効果と比較し用量-反応曲線が右にシフトし、耐性の形成が認められたが、両群間で有意な差は見られなかった。また、MOR-KO Tg マウスにおいても、急性効果で僅かながら見られる用量-反応曲線の上昇が、右にシフトする傾向が見られたが、有意な %MPE の上昇は確認できず、MOR-KO マウスと比較し有意な差は見られなかった。

(3) ナロキソン誘発禁断症状の検討

野生型マウス、Tg マウス、MOR-KO マウス並びに MOR-KO Tg マウスにおける、モルヒネ慢性処置後のナロキソン誘発禁断症状を、跳躍行動の回数を指標として検討した。野生型及び Tg マウスにおいては、共に跳躍行動の顕著な誘発が見られたが、両群間に有意な差は見られなかった。一方、MOR-KO マウスにおいては、ナロキソン誘発の跳躍行動は全く観察されなかった。また、MOR-KO Tg マウスにおいては、8 例中 1 例のみ跳躍行動を示したが、MOR-KO マウスと比較し、有意な差は見られなかった。

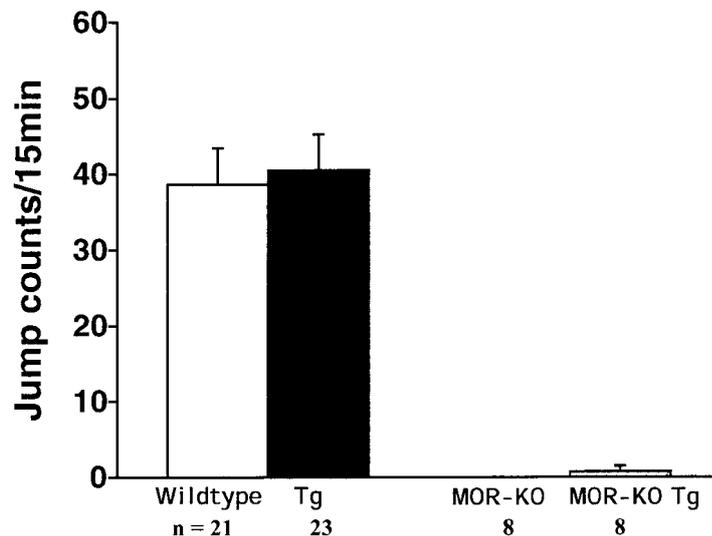


図 3-8 跳躍行動を指標としたナロキソン誘発禁断症状に対する遺伝子導入の影響

野生型マウス、Tg マウス、MOR-KO マウス並びに MOR-KO Tg マウスにおける、モルヒネ慢性処置後のナロキソン (1.0 mg/kg s.c.) 誘発禁断症状を、跳躍行動の回数を指標として検討した。

(4) Tail-suspension 法による回避行動量変化の検討

野生型マウス、Tg マウス、MOR-KO マウス並びにMOR-KO Tg マウスを用い、tail-suspension 処置 15 分間における回避行動量に対する遺伝子導入の影響を検討した (図 3-9 a, b)。全てのマウスにおいて、時間の経過により回避行動量の減少がみられるが、ANOVA により 1 分ごとの回避行動量変化を解析したところ、遺伝子型間で有意な差を示した ($p < 0.0001$; $F = 13.69$; $df = 3,926$)。野生型マウスと比較し、Tg マウスにおける回避行動量の変化には差が見られなかった。一方、MOR-KO マウスにおいては、5 分ごとの回避行動量において処置後 5 分から 10 分の間で、野生型と比較し有意な行動量増加が観察された ($P < 0.05$)。さらに、MOR-KO Tg マウスにおいては、野生型レベルまで低下しており、5 分ごとの回避行動量において処置後 5 分から 10 分の間で、MOR-KO マウスと比較し有意に回避行動量は減少していた ($P < 0.05$)。

(5) ストレス誘発血漿中コルチコステロン濃度変化の検討

Tail-suspension 及び拘束ストレス処置時における血漿中コルチコステロン濃度の上昇に対する遺伝子導入の影響を、野生型マウス、MOR-KO マウス並びにMOR-KO Tg マウスを用い検討した (図 3-10)。Tail-suspension 及び拘束ストレスは、ともに野生型マウス (paired t -test: $P < 0.0005$, $t = -5.68$; $P < 0.0001$, $t = -7.56$)、MOR-KO マウス (paired t -test: $P < 0.0005$, $t = -4.54$; $P < 0.0001$, $t = -9.48$) 並びにMOR-KO Tg マウス (paired t -test: $P < 0.0001$, $t = -7.39$; $P < 0.0001$, $t = -24.01$) のどの遺伝型においても、有意な血漿中コルチコステロン濃度の上昇を誘発した。一方、ANOVA によりストレスによる血漿中コルチコステロン濃度の変化を解析したところ、遺伝子型間で有意に異なっていた (tail-suspension; $p <$

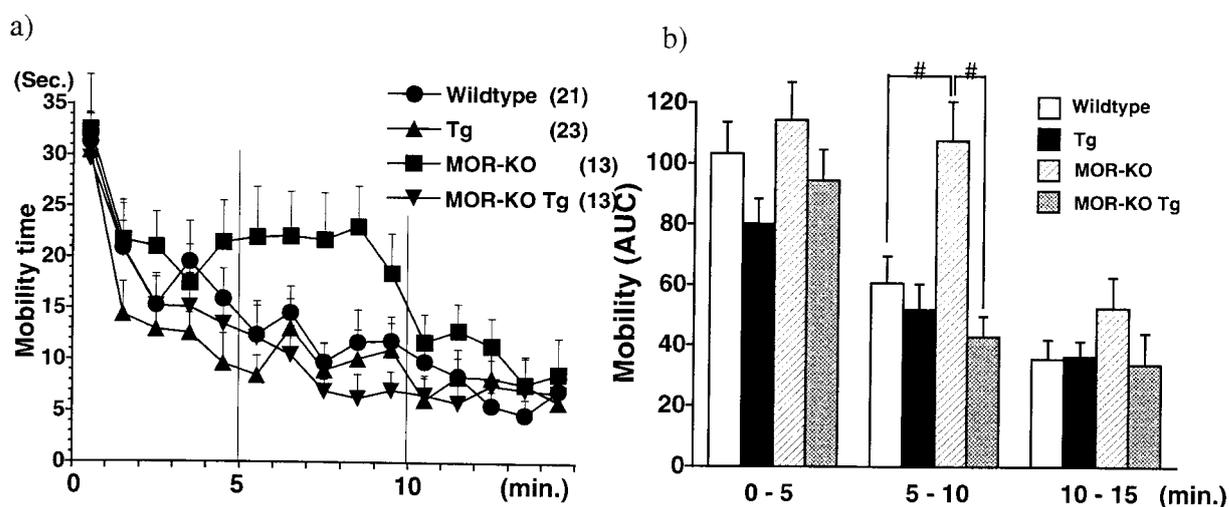


図 3-9 Tail-suspension 法における回避行動量に対する遺伝子導入の影響

野生型マウス、Tg マウス、MOR-KO マウス並びにMOR-KO Tg マウスにおける、tail-suspension 状態での回避行動量変化を、a) 1 分間あたりの行動量変化 (sec./1 min)、b) 5 分間あたりの行動量変化 (sec./5 min) を指標として検討した。# $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test)

0.0005; $F = 11.14$; $df = 2,38$ 、拘束ストレス; $p < 0.0001$; $F = 14.04$; $df = 2,38$)。野生型マウスと比較して、MOR-KOマウスにおける血漿中コルチコステロン濃度は、tail-suspension及び拘束ストレス負荷時に有意に低い値を示した($P < 0.05$)。さらにMOR-KO Tgマウスにおいては、野生型マウスと同程度の血漿中濃度上昇が見られ、MOR-KOマウスと比較して有意な上昇が見られた ($P < 0.05$)。

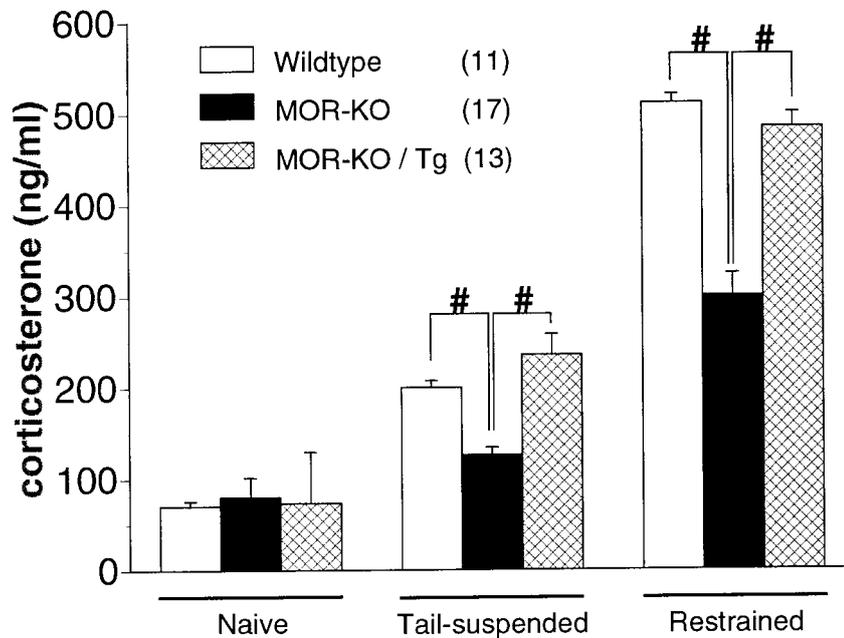


図 3-10 各種ストレス処置時における血漿中コルチコステロン濃度の上昇に対する遺伝子導入の影響

野生型マウス、MOR-KOマウス並びにMOR-KO Tgマウスにおける、無処置、tail-suspension負荷後、並びに拘束ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度を測定した。# $P < 0.05$ (Tukey-Kramer test)

考察

本実験において、ヒト DBH 遺伝子のプロモーター領域下流に、ヒト μ オピオイド受容体 cDNA を組み込んだ遺伝子を導入した Tg マウスを作製した。さらに、MOR-KO マウス[53]と交配させることで、マウス本来の μ オピオイド受容体が欠損しており、導入遺伝子に由来するヒト μ オピオイド受容体のみを発現する、MOR-KO Tg マウスを作製した。今回用いたヒト DBH 遺伝子のプロモーター領域は、これまでに phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) 並びに IL-2R α をアドレナリン・ノルアドレナリン神経系特異的に発現するトランスジェニックマウスの作製に用いられ、それぞれの cDNA の神経系特異的な発現が確認されている[79、80]。本実験においても、ノルアドレナリン神経の細胞体が集積している青斑核に局限した、ヒト μ オピオイド受容体 mRNA の発現を中脳冠状切片において確認し、さらに、ノルアドレナリン神経の投射が多い大脳皮質を中心とした受容体タンパク質の機能的発現を確認した。Tg マウス及び MOR-KO Tg マウスにおいて、形態・生殖・一般行動に著明な変化は認められなかったことから、本実験において作製した Tg 及び MOR-KO Tg マウスは、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系に特異的にヒト μ オピオイド受容体を発現し、内因性のオピオイドとアドレナリン・ノルアドレナリン神経系の相互作用機序の解明に有用な実験動物になると考えられる。

Tg マウス及び MOR-KO Tg マウスにおいて、モルヒネによる抗熱的侵害受容作用、耐性及び身体依存は、それぞれ野生型及び MOR-KO マウスと比較し有意な変化は見られなかった。ノルアドレナリン神経は、青斑核、延髄吻側の A5 及び中脳 A7 から脊髓前側索を下行し、脊髓後角の侵害受容ニューロンを抑制することが知られている。今回の結果は、これら下行性ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体は、モルヒネの鎮痛作用への関与が少なく、むしろ他の神経系上の μ オピオイド受容体が下行性ノルアドレナリン神経の活性化に重要であることを示唆している。一方、上行性のノルアドレナリン神経は、扁桃核、海馬、視床及び大脳皮質を中心に投射しており、オピオイドの禁断症状などに関与していることが報告されている[81、82]。特に青斑核において、オピオイドの禁断症状発現時に、ノルアドレナリン神経興奮が起こっていることは良く知られている[57]。今回、遺伝子導入による禁断症状に対する影響は確認できなかったが、この結果より、ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体発現量の違いは禁断症状発現に対して与える影響が少ないことが考えられる。しかしながら、今回作製した MOR-KO Tg マウスでは青斑核での μ オピオイド受容体 mRNA 発現の程度が野生型のそれに比べ弱いものであったことから、 μ オピオイド受容体量が十分でなかったために、外来性 μ オピオイド受容体が鎮痛作用や依存形成・禁断症状発現に影響を与えなかったという可能性も考えられるため今後さらなる検討が必要である。

移所運動量においては、新規環境探索行動量は各遺伝型のマウス間で有意な差が見られなかったものの、モルヒネにより誘発される自発性運動量増加において、野生型マウスと比較し Tg マウスでは行動量上昇の程度は有意に低いものであった。この傾向はモルヒネ処置の直後から約 90 分後まで見られた。興味深いことに、近年作製された、 α_{1B} アドレナリン受容体ノックアウトマウスにおいて、モルヒネ誘発自発運動量の増

加は野生型マウスと比較し有意に低く、その傾向は処置の直後から約90分後にかけて見られることが報告されている[83]。さらに、 α_{1B} アドレナリン受容体ノックアウトマウスにおいては、コカイン及びアンフェタミン処置による自発運動量増加効果の消失も報告されている[83]。これら薬物による自発運動量の増加効果は、側坐核におけるドーパミン遊離量の増加により引き起こされると考えられており[84、85]、ノルアドレナリン神経は α_1 アドレナリン受容体を介して促進的に関与していることが報告されている[85、86]。本実験においてTgマウスで見られる、モルヒネ誘発自発運動量増加効果の減弱は、ドーパミン神経と相互作用をしているノルアドレナリン神経の活動を、過剰発現させた μ オピオイド受容体が野生型と比較しより強く抑制するため生じている可能性が考えられる。一方で、MOR-KO Tgマウスにおいて、モルヒネ誘発自発運動量の増加が起らなかったことは、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系以外の神経系に発現する μ オピオイド受容体がモルヒネ誘発自発運動量増加に必須であることを示唆している。

ストレスに対するマウス遺伝子型の違いによる影響を検討したところ、MOR-KOマウスでは、tail-suspension法における回避行動量が、野生型マウスと比較し有意に増加しており、また、ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度を測定したところ、野生型と比較し有意なコルチコステロン濃度上昇の減弱が見られた。一方、MOR-KO Tgマウスにおいてはtail-suspension法における回避行動量、並びにストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度上昇は、野生型とほぼ同じでMOR-KOマウスと比較し有意な差が見られた。これらの結果は、アドレナリン・ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体の発現が、ストレスに対する感受性あるいは応答において重要な役割を果たしていることを示唆している。Tail-suspension法では、抗うつ薬の処置により回避行動量の増加（無動時間の減少）がみられるため、抗うつ薬のスクリーニング法として広く用いられている[87]。その作用機序は未だ不明な点が多く存在するが、デシプラミンなどの一部の三環系抗うつ薬は、プレシナプスでのノルアドレナリン再取り込みを阻害することが作用機序の少なくとも一端を担っていると考えられている。ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体が、これらノルアドレナリン再取り込み阻害薬処置時に活性化する神経機構をtonicに抑制していると考えれば、MOR-KOマウスではtail-suspension法における回避行動量の増加が見られ、MOR-KO Tgマウスでは野生型と同程度であったことがうまく説明できる。一方これまでに、血漿中コルチコステロン濃度は、モルヒネ処置により上昇し、さらに血漿中アドレノコルチコステロン及び β エンドルフィン量の上昇も確認されていることから[88、89]、 μ オピオイド受容体が視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA-axis）を活性化させていると考えられる。HPA-axisはストレス負荷時に活性化することが知られており、 μ オピオイド受容体は、その活性化惹起あるいはその維持において促進的な役割を担っていることが考えられる。本実験の結果は、ストレス負荷時のHPA-axisの活性化には、アドレナリン・ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体が促進的に関与している可能性を示唆している。

以上、本実験において、MOR-KOマウスでは野生型と比較し、tail-suspensionに対する回避行動量の増加や、ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度上昇の減弱が見られ、MOR-KO Tgマウスでは野生型マウスと比較して差は見られなかった。このこ

とは、特にノルアドレナリン・アドレナリン神経上の μ オピオイド受容体の発現が、ストレス感受性あるいはストレス応答において重要な役割を果たしていることを示唆し、当該受容体の発現量の相違が個体間のストレス感受性あるいは応答の相違に影響を与えている可能性を示唆している。

総括および結論

本研究において著者は、ヒトゲノム及び遺伝子改変マウスを用いた μ オピオイド受容体遺伝子に関する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. 日本人ゲノムでは、OPRM 翻訳領域に見られる多型は A118G のみであり、非翻訳領域およびイントロンに多くの高頻度多型が存在した。また、OPRM 内には完全連鎖不平衡が intron 3 から 3' 非翻訳領域にかけて存在することを明らかとし、OPRM の全域にわたる連鎖不平衡の存在を示した。さらに、日本人の健常人とメタンフェタミン依存患者において、OPRM 内の SNP, IVS2+ G691C の多型頻度が有意に異なっており、また、メタンフェタミン依存患者を臨床情報により分類し解析したところ、いくつかの SNP で有意な多型頻度の差が見られることを明らかにした。

2. ブプレノルフィンによる抗侵害受容作用は、ヘテロ MOR-KO マウスにおいて減弱が見られ、ホモ MOR-KO マウスにおいては完全に消失していた。一方、報酬効果は、 μ オピオイド受容体遺伝子量に依存的に減弱が見られるが、ホモ MOR-KO マウスにおいても依然として有意な報酬効果を確認した。その効果はナロキソンの前処置により消失し、 δ および κ 選択的拮抗薬で部分的に減弱することを示し、ブプレノルフィンの鎮痛作用には μ オピオイド受容体が不可欠であるが、報酬効果はオピオイド受容体の3つのサブタイプが関与していることを明らかとした。

3. DBH プロモーターの下流にヒト μ オピオイド受容体遺伝子を組み込んだコンストラクトを導入した Tg マウスを作製し、さらに MOR-KO マウスと交配することで、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系にのみ特異的に μ オピオイド受容体を発現する MOR-KO Tg マウスを作製した。MOR-KO Tg マウスでは、MOR-KO マウスと比較し、モルヒネによる鎮痛作用、耐性形成、身体依存形成に有意な差は見られなかった。一方、tail-suspension 法において MOR-KO マウスで見られる回避行動の増加は、MOR-KO Tg マウスにおいて野生型マウスのレベルまで低下しており、ストレス負荷後の血漿中コルチコステロン濃度の上昇では、MOR-KO マウスで野生型マウスと比較し低下しているが MOR-KO Tg マウスでは野生型マウスのレベルまで上昇していることを明らかにし、ノルアドレナリン・アドレナリン神経上の μ オピオイド受容体が、ストレス応答において重要な役割を果たしている可能性を示した。

以上、著者は、日本人ゲノムを用いたヒト μ オピオイド受容体遺伝子多型解析において、一部の多型が覚醒剤依存や覚醒剤精神病様症状の形成と相関性を有することを示した。さらに、 μ オピオイド受容体遺伝子改変マウスを用いた解析より、 μ オピオイド受容体発現量がブプレノルフィンの鎮痛および報酬効果に対して異なる度合いで影響を及ぼすことを明らかにすると共に、アドレナリン・ノルアドレナリン神経上の μ オピオイド受容体発現量の相違が個体間のストレス応答の相違に関係している可能性を示した。本研究成果は、 μ オピオイド受容体を介した作用において個人差が生じるメカニズムの一端を明らかにしたものであり、オピオイドを用いたテーラーメイド医療に貢献する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、東北大学大学院医学系研究科教授 曾良一郎 先生、並びに東京都精神医学総合研究所部門長 池田和隆 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、教授 杉本八郎 先生、助教授 金子周司 先生、助教授 香月博志 先生、助教授 新留徹広 先生、助手 中川貴之 先生、助手 久米利明 先生、並びに、助手 木原武士 先生に深く感謝いたします。さらに、健常人並びにメタンフェタミン依存患者ゲノムを供与していただいた、Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA) に所属する氏家寛 先生、並びに他の先生方、また、DBH プロモーター遺伝子を供与していただいた、福島医科大学 小林和人 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山本秀子 博士、小林秀昭 博士、高松幸雄 博士、萩野洋子 博士、沈昊偉 博士、韓文華 博士、田中慶子 修士、高橋雄大 学士、並びに、小松紘子 学士に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Uhl GR, Hall FS, Sora I. Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry*, **7**, 21-6, (2002)
- 2) Wood PL. Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: a review of methodology, receptor types, regional variations and species differences. *Peptides*, **4**, 595-601, (1983)
- 3) El Daly E, Chefer V, Sandill S, Shippenberg TS. Modulation of the neurotoxic effects of methamphetamine by the selective kappa-opioid receptor agonist U69593. *J Neurochem*, **74**, 1553-62, (2000)
- 4) Hayashi T, Tsao LI, Cadet JL, Su TP. [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin blocks the methamphetamine-induced c-fos mRNA increase in mouse striatum. *Eur J Pharmacol*, **366**, R7-8, (1999)
- 5) Smith JW, Fetsko LA, Xu R, Wang Y. Dopamine D2L receptor knockout mice display deficits in positive and negative reinforcing properties of morphine and in avoidance learning. *Neuroscience*, **113**, 755-65, (2002)
- 6) Spielewoy C, Gonon F, Roubert C, Fauchey V, Jaber M, Caron MG, et al. Increased rewarding properties of morphine in dopamine-transporter knockout mice. *Eur J Neurosci*, **12**, 1827-37, (2000)
- 7) Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS. Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur J Neurosci*, **18**, 1915-22, (2003)
- 8) Lichtman AH, Sheikh SM, Loh HH, Martin BR. Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **298**, 1007-14, (2001)
- 9) Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Hollt V. Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **365**, 296-302, (2002)
- 10) Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, **22**, 10935-40, (2002)
- 11) Contarino A, Picetti R, Matthes HW, Koob GF, Kieffer BL, Gold LH. Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol*, **446**, 103-9, (2002)
- 12) Uhl GR, Sora I, Wang Z. The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7752-5, (1999)
- 13) Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, et al. Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Hum Mol Genet*, **9**, 2895-908, (2000)
- 14) Mayer P, Hollt V. Allelic and somatic variations in the endogenous opioid system of humans. *Pharmacol Ther*, **91**, 167-77, (2001)
- 15) Bond C, LaForge KS, Tian M, Melia D, Zhang S, Borg L, et al. Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implica-

- tions for opiate addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9608-13, (1998)
- 16) Bergen AW, Kokoszka J, Peterson R, Long JC, Virkkunen M, Linnoila M, et al. Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol Psychiatry*, **2**, 490-4, (1997)
 - 17) Sander T, Gscheidel N, Wendel B, Samochowiec J, Smolka M, Rommelspacher H, et al. Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 2108-10, (1998)
 - 18) Gelernter J, Kranzler H, Cubells J. Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry*, **4**, 476-83, (1999)
 - 19) Franke P, Wang T, Nothen MM, Knapp M, Neidt H, Albrecht S, et al. Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am J Med Genet*, **105**, 114-9, (2001)
 - 20) Shi J, Hui L, Xu Y, Wang F, Huang W, Hu G. Sequence variations in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) associated with human addiction to heroin. *Hum Mutat*, **19**, 459-60, (2002)
 - 21) Schinka JA, Town T, Abdullah L, Crawford FC, Ordorica PI, Francis E, et al. A functional polymorphism within the mu-opioid receptor gene and risk for abuse of alcohol and other substances. *Mol Psychiatry*, **7**, 224-8, (2002)
 - 22) Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin 2000: a software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept of Anthropology Univ of Geneva.
 - 23) Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet*, **59**, 97-105, (1995)
 - 24) Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M, Pasternak GW. Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14084-9, (2001)
 - 25) Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK, Pasternak GW. Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 1057-61, (2003)
 - 26) Ikeda K, Ichikawa T, Kobayashi T, Kumanishi T, Oike S, Yano R. Unique behavioural phenotypes of recombinant-inbred CXBK mice: partial deficiency of sensitivity to mu- and kappa-agonists. *Neurosci Res*, **34**, 149-155, (1999)
 - 27) Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Kumanishi T, Niki H, Yano R. The untranslated region of (mu)-opioid receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice. *J Neurosci*, **21**, 1334-9, (2001)
 - 28) Uhl GR, Li S, Takahashi N, Itokawa K, Lin Z, Hazama M, Sora I. The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J*, **14**, 2459-65, (2000)
 - 29) Sery O, Vojtova V, Zvolosky P. The association study of DRD2, ACE and AGT gene polymorphisms and methamphetamine dependence. *Physiol Res*, **50**, 43-50, (2001)
 - 30) Tsai SJ, Cheng CY, Shu LR, Yang CY, Pan CW, Liou YJ, et al. No association for D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and methamphetamine abuse in Chinese males. *Psychiatr Genet*, **12**, 29-33, (2002)
 - 31) Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggsah, Cohn JB. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA*, **263**, 2055-2060, (1990)

- 32) Arinami T, Itokawa M, Komiyama T, Mitsushio H, Mori H, Mifune H, Hamaguchi H, Toru M. Association between severity of alcoholism and the A1 allele of the dopamine D2 receptor gene TaqI A RFLP in Japanese. *Biol Psychiatry*, **33**, 108-14, (1993)
- 33) King MA, Bradshaw S, Chang AH, Pintar JE, Pasternak GW. Potentiation of opioid analgesia in dopamine2 receptor knock-out mice: evidence for a tonically active anti-opioid system. *J Neurosci*, **21**;7788-92, (2001)
- 34) Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E. Changes in extra-cellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci*, **22**, 3293-301, (2002)
- 35) Steiner H, Gerfen CR. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp Brain Res*, **123**, 60-76, (1998)
- 36) Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*, **299**, 1240-3, (2003)
- 37) Cowan A, Lewis JW, Macfarlane IR. Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *Br J Pharmacol*, **60**, 537-545, (1977)
- 38) Kamei J, Saitoh A, Suzuki T, Misawa M, Nagase H, Kasuya Y. Buprenorphine exerts its antinociceptive activity via mu 1-opioid receptors. *Life Sci*, **56**, PL285-290, (1995)
- 39) Kamei J, Sodeyama M, Tsuda M, Suzuki T, Nagase H. Antinociceptive effect of buprenorphine in mu1-opioid receptor deficient CXBK mice. *Life Sci*, **60**, PL 333-337, (1997)
- 40) Leander JD. Buprenorphine is a potent kappa-opioid receptor antagonist in pigeons and mice. *Eur J Pharmacol*, **151**, 457-461, (1988)
- 41) Tejwani GA, Rattan AK. The role of spinal opioid receptors in antinociceptive effects produced by intrathecal administration of hydromorphone and buprenorphine in the rat. *Anesth Analg*, **94**, 1542-1546, (2002)
- 42) Neilan CL, Akil H, Woods JH, Traynor JR. Constitutive activity of the delta-opioid receptor expressed in C6 glioma cells: identification of non-peptide delta-inverse agonists. *Br J Pharmacol*, **128**, 556-562, (1999)
- 43) Pick CG, Peter Y, Schreiber S, Weizman R. Pharmacological characterization of buprenorphine, a mixed agonist-antagonist with kappa 3 analgesia. *Brain Res*, **744**, 41-46, (1997)
- 44) Cheskin LJ, Fudala PJ, Johnson RE. A controlled comparison of buprenorphine and clonidine for acute detoxification from opioids. *Drug Alcohol Depend*, **36**, 115-121, (1994)
- 45) Lintzeris N, Bell J, Bammer G, Jolley DJ, Rushworth L. A randomized controlled trial of buprenorphine in the management of short-term ambulatory heroin withdrawal. *Addiction*, **97**, 1395-1404, (2002)
- 46) Mello NK, Lukas SE, Bree MP, Mendelson JH. Progressive ratio performance maintained by buprenorphine, heroin and methadone in Macaque monkeys. *Drug Alcohol Depend*, **21**, 81-97, (1988)
- 47) Winger G, Woods JH. The effects of chronic morphine on behavior reinforced by several opioids or by cocaine in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend*, **62**, 181-189, (2001)
- 48) Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 19-26 (1999).
- 49) Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN. mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res*, **54**, 321-326, (1998)
- 50) Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, et al. Opiate receptor knockout

- mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1544-1549, (1997)
- 51) Sora I, Elmer G, Funada M, Pieper J, Li XF, Hall FS, et al. Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology*, **25**, 41-54, (2001)
 - 52) Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, et al. Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor. *J Neurosci*, **18**, 7285-7295, (1998)
 - 53) Sora I, Funada M, Uhl GR. The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol*, **324**, R1-2, (1997)
 - 54) Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther*, **80**, 300-307, (1944)
 - 55) D'Amour F, Smith D. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther*, **72**, 74-79, (1941)
 - 56) Skoubis PD, Matthes HW, Walwyn WM, Kieffer BL, Maidment NT. Naloxone fails to produce conditioned place aversion in mu-opioid receptor knock-out mice. *Neuroscience*, **106**, 757-763, (2001)
 - 57) Blake AD, Bot G, Freeman JC, Reisine T. Differential opioid agonist regulation of the mouse mu opioid receptor. *J Biol Chem*, **272**, 782-90, (1997)
 - 58) Bot G, Blake AD, Li S, Reisine T. Mutagenesis of the mouse delta opioid receptor converts (-)-buprenorphine from a partial agonist to an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**, 283-290, (1998)
 - 59) Lutfy K, Eitan S, Bryant CD, Yang YC, Saliminejad N, Walwyn W, et al. Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J Neurosci*, **23**, 10331-10337, (2003)
 - 60) Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, et al. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*, **24**, 243-252, (1999)
 - 61) Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, et al. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *Embo J*, **17**, 886-897, (1998)
 - 62) Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, **383**, 819-823, (1996)
 - 63) Funada M, Suzuki T, Narita M, Misawa M, Nagase H. Blockade of morphine reward through the activation of kappa-opioid receptors in mice. *Neuropharmacology*, **32**, 1315-1323, (1993)
 - 64) Sante AB, Nobre MJ, Brandao ML. Place aversion induced by blockade of mu or activation of kappa opioid receptors in the dorsal periaqueductal gray matter. *Behav Pharmacol*, **11**, 583-589, (2000)
 - 65) Longoni R, Cadoni C, Mulas A, Di Chiara G, Spina L. Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 2. Place-preference and brain microdialysis studies in rats. *Behav Pharmacol*, **9**, 9-14, (1998)
 - 66) Iwamoto ET. Place-conditioning properties of mu, kappa, and sigma opioid agonists. *Alcohol Drug Res*, **6**, 327-339, (1985)

- 67) Comer SD, Collins ED, Fischman MW. Intravenous buprenorphine self-administration by detoxified heroin abusers. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 266-276, (2002)
- 68) Gibson AE, Doran CM, Bell JR, Ryan A, Lintzeris N. A comparison of buprenorphine treatment in clinic and primary care settings: a randomised trial. *Med J Aust*, **179**, 38-42, (2003)
- 69) Greenwald MK, Johanson CE, Moody DE, Woods JH, Kilbourn MR, Koeppe RA, et al. Effects of buprenorphine maintenance dose on mu-opioid receptor availability, plasma concentrations, and antagonist blockade in heroin-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 2000-2009, (2003)
- 70) Zubieta J, Greenwald MK, Lombardi U, Woods JH, Kilbourn MR, Jewett DM, et al. Buprenorphine-induced changes in mu-opioid receptor availability in male heroin-dependent volunteers: a preliminary study. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 326-334, (2000)
- 71) Bohn LM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG. Potentiated opioid analgesia in norepinephrine transporter knock-out mice. *J Neurosci*, **20**, 9040-5, (2000)
- 72) Bie B, Fields HL, Williams JT, Pan ZZ. Roles of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the nucleus raphe magnus in opioid analgesia and opioid abstinence-induced hyperalgesia. *J Neurosci*, **23**, 7950-7, (2003)
- 73) Jasmin L, Boudah A, Ohara PT. Long-term effects of decreased noradrenergic central nervous system innervation on pain behavior and opioid antinociception. *J Comp Neurol*, **460**, 38-55, (2003)
- 74) Prieto M, Gomez FM, Teresa Giralt M. Effects of acute, repeated and chronic variable stress on in vivo tyrosine hydroxylase activity and on alpha2-adrenoceptor sensitivity in the rat brain. *Stress*, **6**, 281-7, (2003)
- 75) Chance WT. Autoanalgesia: opiate and non-opiate mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, **4**, 55-67, (1980)
- 76) Sharp BM, Roy S, Bidlack Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J Neuroimmunol*, **83**, 45-56, (1998)
- 77) Nestler EJ, Alreja M, Aghajanian GK. Molecular control of locus coeruleus neurotransmission. *Biol Psychiatry*, **46**, 1131-9, (1999)
- 78) Valentino RJ, Van Bockstaele E. Opposing regulation of the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor and opioids. Potential for reciprocal interactions between stress and opioid sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)*, **158**, 331-42, (2001)
- 79) Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Fujita K, Kreitman RJ, Pastan I, Nagatsu T. Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1132-6, (1995)
- 80) Kobayashi K, Sasaoka T, Morita S, Nagatsu I, Iguchi A, Kurosawa Y, Fujita K, Nomura T, Kimura M, Katsuki M, et al. Genetic alteration of catecholamine specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1631-5, (1992)
- 81) Maldonado R. Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev*, **21**, 91-104, (1997)
- 82) Akaoka H, Aston-Jones G. Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input. *J Neurosci*, **11**, 3830-9, (1991)
- 83) Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP. Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci*, **22**,

2873-84, (2002)

- 84) Delfs JM, Schreiber L, Kelley AE. Microinjection of cocaine into the nucleus accumbens elicits locomotor activation in the rat. *J Neurosci*, **10**, 303-10, (1990)
- 85) Darracq L, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP. Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine. *J Neurosci*, **18**, 2729-39, (1998)
- 86) Blanc G, Trovero F, Vezina P, Herve D, Godeheu AM, Glowinski J, Tassin JP. Blockade of prefronto-cortical alpha 1-adrenergic receptors prevents locomotor hyperactivity induced by subcortical D-amphetamine injection. *Eur J Neurosci*, **6**, 293-8, (1994)
- 87) Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, **85**, 367-70, (1985)
- 88) Ignar DM, Kuhn CM. Effects of specific mu and kappa opiate tolerance and abstinence on hypothalamo-pituitary-adrenal axis secretion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **255**, 1287-95, (1990)
- 89) Coventry TL, Jessop DS, Finn DP, Crabb MD, Kinoshita H, Harbuz MS. Endomorphins and activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol*, **169**, 185-93, (2001)