

氏名	井 手 聡 一 郎
学位の種類	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 541 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	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

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀 教授 伊藤信行

論 文 内 容 の 要 旨

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、鎮痛作用のみならず依存、便秘、眠気、錯乱といった副作用の発現にも重要な役割を担っていることが明らかとされている。また、それら μ オピオイド受容体を介した作用・副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の際に、これら作用・副作用の個人差は、投与設計や副作用抑制薬を使用する際に常に問題とされている。さらには、近年 μ オピオイド受容体はアルコールやコカインなどの麻薬性鎮痛薬以外の薬物に対する依存や精神疾患の一部にもその関与が報告されており、これらの治療においても同様に個人差が問題である。著者は、これら個人差が生じる原因の一つとして μ オピオイド受容体遺伝子多型による受容体発現量の相違があると考え、ヒトゲノムを用いた多型解析並びに μ オピオイド受容体遺伝子改変マウスを用いた検討を行い、以下の新知見を得た。

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

まず、日本人健康人 ($n=179$) の μ オピオイド受容体遺伝子に関して、ゲノムの広範囲にわたってシーケンス法を用いて多型解析を行い、多くの新規遺伝子多型を見いだした。また、欧米人のゲノムで報告されている多型のいくつかにおいては、日本人ではその多型頻度が欧米人とは大きく異なっていることを明らかにした。さらに、新たに intron 3 から3'非翻訳領域と考えられる14kbpの領域にわたり、完全連鎖不平衡を示す多型群を見いだした。これらの非翻訳領域に存在する多型は、転写活性調節やメッセンジャーRNAの安定性に影響することで、タンパク質の発現量を変化させ、 μ オピオイド受容体の発現量の個人差と関係する可能性が考えられる。次に、覚醒剤 (メタンフェタミン) 依存患者のゲノム ($n=128$) を用いた解析より、intron 2 内の一塩基多型、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ることを見いだした。さらに覚醒剤精神病様症状におけるいくつかの臨床情報を基に分類したところ、覚醒剤使用開始から妄想・幻覚が発症するまでの期間が短い群、覚醒剤の使用停止から妄想・幻覚が消失するまでの期間が短い群、並びに再燃性の存在する群において、有意に健康人と異なる多型頻度を示すことを見いだした。これらの結果から、 μ オピオイド受容体の遺伝子多型が依存形式、さらに覚醒剤精神病様症状の形成に対し影響を与えることが示唆される。

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

ブプレノルフィンは、疼痛治療においてオピオイドローテーションの一角として使用され、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が、未だその作用メカニズムに不明な点が存在する。そこで、 μ オピオイド受容体の発現量が、ヘテロ体では半分、ホモ体では完全にそれぞれ消失している、 μ オピオイド受容体遺伝子欠損 (MOR-KO) マウスを用いて、ブプレノルフィンの鎮痛・報酬効果に関して、 μ オピオイド受容体発現量による影響の検討を行った。ブプレノルフィンによる鎮痛作用を tail-flick 法及び hot-plate 法を用いて検討したところ、ヘテロ MOR-KO マウスにおいて減弱がみられ、ホモ MOR-KO マウスにおいては消失していた。一方、ブプレノルフィンによる報酬効果を、条件付け場所嗜好性試験を用いて検討したところ、ホモ MOR-KO マウスにおいても、野生型マウスよりは減弱しているものの、

有意な場所嗜好性がみられ、その効果はナロキソンの前処置により消失した。さらに、 δ 選択的拮抗薬ナルトリンドール並びに κ 選択的拮抗薬ノルビナルトルフィミンの前処置によって、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共に減弱した。これらの結果は、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示唆しており、 μ オピオイド受容体発現量の違いが、ブプレノルフィンの鎮痛作用と報酬効果に対して異なる影響を及ぼすことを示している。

第三章 アドレナリン・ノルアドレナリン神経特異的に μ オピオイド受容体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製と解析

ノルアドレナリンは各種ストレス応答に関与するモノアミンの一つであり、モルヒネなど麻薬依存にも深く関与していることが報告されている。そこで、dopamine β -hydroxylase のプロモーター領域にヒト μ オピオイド受容体遺伝子を組み込んだ遺伝子を導入することで、アドレナリン・ノルアドレナリン神経系に特異的に 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4ライン作製した。さらにMOR-KOマウスとの交配により、導入した μ オピオイド受容体のみを発現するMOR-KO・Tgマウスを4ライン作製した。遺伝子導入をPCR法並びにサザンプロット法にて確認し、さらに機能的な受容体タンパク質の発現確認を放射性作動薬結合実験により行い、比較的発現量の多かった1ラインを行動解析に用いた。遺伝子導入による著明な行動変化は、Tgマウス及びMOR-KO・Tgマウスで認められなかった。また、MOR-KO・Tgマウスではモルヒネの有意な鎮痛作用および、耐性・依存形成は認められず、MOR-KOマウスと同様であった。一方、tail-suspension法を用いた解析において、MOR-KO・Tgマウスでは、MOR-KOで見られる行動量の増加が、野生型と同様のレベルまで減弱しており、ストレス応答に変化がみられた。これらの結果から、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に関与することが推察され、当該受容体の発現量の相違がストレスによりもたらされる個人差に影響を与えていることを示唆している。

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、数多くの新規多型を見だし、それら多型の一部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及び報酬効果に対して異なる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影響を及ぼすことを示した。本研究の成果は、 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解明に寄与し、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であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

モルヒネなどの主として μ オピオイド受容体 (μ 受容体) に作用する麻薬性鎮痛薬の効果にはかなりの個人差がある。また、 μ 受容体は麻薬性鎮痛薬以外の薬物に対する依存や精神疾患の一部にもある程度の個人差をもちながら関与しているとの報告がある。著者はこれらの個人差の問題に迫るため、ヒトゲノムを用いた受容体遺伝子多型解析および μ 受容体遺伝子改変マウス等を用いた分子薬理的検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 日本人における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

健常日本人 (n=179) での μ 受容体遺伝子の多型解析の結果、多くの新規遺伝子多型を見出し、欧米人とはそれらの多型頻度が大きく異なっていること、intron 3 から3'非翻訳領域と考えられる14kbpにかけての領域に完全連鎖不平衡を示す多型群が存在することを見出した。後者における多型は、 μ 受容体タンパク質の発現量の違いを導き、個人差惹起に関与する可能性を指摘した。さらに、覚醒剤依存患者 (n=128) のゲノム解析を行い、intron 2 内の一塩基多型、IVS2+G691Cにおいて覚醒剤依存患者では G allele の頻度が高い傾向にあること、覚醒剤使用開始から妄想・幻覚が発症するまでの期間の短い群、覚醒剤使用停止から妄想・幻覚消失までの期間が短い群および再燃性がある群において、健常人と有意に異なる多型頻度を示すことを見出した。これらの結果は、 μ 受容体の遺伝子多型が依存形成や覚醒剤精神病様症状形成に影響を及ぼしていることを示唆している。

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

疼痛治療や麻薬依存患者の退薬症候抑制などに日本でも広く用いられているブプレノルフィンの作用メカニズムに関し

て、 μ 受容体遺伝子欠損 (MOR-KO) マウス (ヘテロ体では半分, ホモ体では完全に欠損) を用いて, 鎮痛作用と報酬効果調べ, 本薬物の鎮痛作用発現には μ 受容体が不可欠であるが, 報酬効果発現には μ , κ , δ オピオイド受容体いずれもが関与していることを示した。

第三章 アドレナリン・ノルアドレナリン神経特異的に μ オピオイド受容体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製と解析

Dopamine β -hydroxylase のプロモーター領域にヒト μ 受容体遺伝子を組み込んだ遺伝子を導入してアドレナリン・ノルアドレナリン (Ad/NA) 神経特異的に μ 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, それと MOR-KO とを交配することにより μ 受容体が上記神経系にのみ特異的に発現している MOR-KO \cdot Tg マウスを作製した。このマウスでは, 自発性行動は野生型のそれと顕著な相違は認められず, また, モルヒネの鎮痛作用, 耐性・依存形成は MOR-KO マウスと同様認められなかった。しかし, tail-suspension 法によるストレス応答性の解析において, MOR-KO マウスで見られた回避行動量増加が MOR-KO \cdot Tg マウスでは野生型と同レベルにまで低下しており, ストレス負荷による血漿中コルチコステロン濃度上昇の MOR-KO マウスにおける減弱が MOR-KO \cdot Tg マウスでは野生型と同レベルまで上昇することを明らかにし, Ad/NA 神経上の μ 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。

以上の成果は, μ 受容体を介する作用の個人差を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開発のための基礎的知見であると考えられる。

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16年2月26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。