

氏 名	かつ 勝 又 せい 清 至
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 390 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 薬 学 専 攻
学位論文題目	クローン化オピオイド受容体を用いたオピオイド部分活性薬に 関する分子薬理学的研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 佐 藤 公 道	教 授 赤 池 昭 紀	教 授 市 川 厚
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

オピオイド部分活性薬には現在市販されている拮抗性鎮痛薬をはじめ、呼吸抑制や依存形成のようなモルヒネ様の副作用のない非麻薬性鎮痛薬となりうる化合物が含まれる。これまでオピオイドの受容体親和性やアゴニスト活性の測定に用いられてきた標本では必ずしも単一の受容体サブタイプのみが発現しているわけではなかったので、これら薬物の受容体各サブタイプにおける作用を厳密に調べることはできなかった。そこで著者はラットオピオイド μ , δ , κ 受容体を安定的に発現する CHO 細胞(それぞれ CHO/MORP, CHO/DOPR, CHO/KOPR)を樹立し、受容体各サブタイプに対する親和性と急性処置によるアゴニスト活性、アンタゴニスト活性および持続的処置による依存形成能、禁断症候誘発能を検討しうる系を確立した。さらに新規拮抗性鎮痛薬創製に資する基礎的知見を得るために、アゴニスト、アンタゴニスト活性の発現に関与する受容体構造についての分子薬理学的研究を行い以下の新知見を得た。

第一章 クローン化オピオイド受容体を用いたオピオイド部分活性薬のオピオイド受容体親和性とアゴニスト活性、アンタゴニスト活性の検討

CHO/MORP の膜標品における、各種オピオイドの親和性はジヒドロエトルフィン (DHE) > DAMGO > ブトルファノール (But) > プレマゾシン (Brem) > モルヒネ (Mor) > (-)-3-acetyl-6 β -acetylthio-*N*-cyclopropylmethyl-normorphine (KT-90) > プブレノルフィン (Bup) > ペンタゾシン (Pen) の順であった。CHO/DORP の膜標品における親和性は、DHE > Brem > DPDPE > But > KT-90 > Bup > Mor > Pen の順であった。CHO/KOPR の膜標品における親和性は、Brem > DHE > But > U69,593 > KT-90 > Bup > Pen > Mor の順であった。

CHO/MORP において DHE, DAMGO, Mor はこの順の強さで濃度依存的にフォルスコリン (For) 誘発 cAMP 蓄積を抑制し、それらの最大抑制効果に有意な差はなかった。拮抗性鎮痛薬は Bup, But, Pen の順で cAMP 蓄積を抑制したが、それらの最大抑制効果は DAMGO のそれより有意に弱かった。

Brem, KT-90 の抑制効果は非常に弱かった。これらの薬物による抑制効果はナロキソン (Nlx) により有意に拮抗されたが, Bup の抑制効果は他の薬物より拮抗されにくかった。CHO/DOPR では, DHE, Brem, Bup, KT-90, But, Pen, Mor の順で cAMP 蓄積を抑制したが, いずれの薬物の最大抑制効果も DPDPE のそれより有意に弱かった。また, それらの抑制効果はナルトリンドール (NTI) により有意に拮抗された。CHO/KOPR では, Brem, KT-90, DHE, But, Bup, Pen, Mor の順で cAMP 蓄積を抑制したが, いずれの薬物の最大抑制効果も U60,593 のそれより有意に弱かった。また, それらの抑制効果はノルピナルトルフィミン (norBNI) により有意に拮抗された。

CHO/MORP において, Nlx, Brem, KT-90, Bup, But, Pen は Mor の抑制効果に有意に拮抗した。一方 CHO/DORP, CHO/KOPR では, これらの薬物は Mor の抑制効果にほとんど拮抗しなかった。

以上の結果から, 拮抗性鎮痛薬の Bup, But, Pen および Brem, KT-90 はすべてのサブタイプで部分活性薬であり, 特に μ 受容体におけるアゴニスト作用は弱いため Mor に拮抗しうることが, また DHE は μ 受容体で完全活性薬, δ および κ 受容体で部分活性薬であることが明らかとなった。

第二章 クローン化オピオイド受容体を用いたオピオイド部分活性薬の依存形成能および禁断症状誘発能の検討

CHO/MOPR を 5 分間以上の Mor ($10 \mu\text{M}$) で前処置しておくこと For 誘発 cAMP 蓄積の Nlx ($10 \mu\text{M}$) による増大が認められ, 4 時間前処置後にはプラトーに達した。以後, 薬物 4 時間の持続的処置後に, アンタゴニスト処置により観察される For 誘発 cAMP 蓄積の増大を細胞レベルでの依存形成モデルとした。また, 受容体各サブタイプの完全活性薬持続的処置後にオピオイド部分活性薬が For 誘発 cAMP 蓄積を増大させるか否かにより, 禁断症状誘発能を検討した。その結果, Mor, Bup, But, Pen, DHE はすべてのサブタイプにおいて, Brem, KT-90 は δ および κ 受容体において依存形成能を有することが, また, Bup, But, Pen は μ および κ 受容体, Brem は μ 受容体, KT-90 は μ および δ 受容体, DHE は κ 受容体において禁断症状誘発能を有することが明らかとなった。

第三章 プレマゾシンの受容体サブタイプ選択的アゴニスト活性発現に関する受容体構造

オピオイド部分活性薬のアゴニスト活性発現に関与する受容体領域を同定するために, 第一章で最も顕著に μ 受容体アンタゴニスト活性および κ 受容体アゴニスト活性を示した Brem に関して, 種々の μ/κ キメラ受容体を用いてそのアゴニスト活性を検討した。対照薬にはすべてのサブタイプで強いアゴニスト活性を示した DHE を用いた。 μ 受容体の第 6 膜貫通部位周辺の領域を κ 受容体の対応する領域と交換したキメラ受容体において Brem はアゴニスト活性を発現した。次に, 当該領域において Brem が相互作用しうると考えられる μ/κ サブタイプ間で異なる 6 つのアミノ酸残基に注目してミュータント受容体を作製した。 κ 受容体の 293 番目の Phe を μ 受容体の対応するアミノ酸残基に置換したミュータント κ F293Y においてのみ, Brem の cAMP 蓄積抑制作用が DHE のそれより減弱した。これらの結果から, κ 受容体の 293 番目の Phe が Brem のアゴニスト活性発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

以上, 著者はラットオピオイド μ , δ , κ 受容体を安定的に発現する CHO 細胞を樹立し, オピオイド

の受容体各サブタイプに対する親和性と急性処置によるアゴニスト活性、アンタゴニスト活性さらには持続的処置による依存形成能、禁断症状誘発能を検討しうる系を確立した。また、オピオイド部分活性薬、Brem のアゴニスト活性発現に関与するアミノ酸残基を同定した。本研究の成果は、新規拮抗性鎮痛薬を開発するための有用な基礎的知見であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

オピオイド受容体には少なくとも3種のサブタイプ(μ , δ , κ)の存在が知られている。これらを作作用点とする強力鎮痛薬として麻薬性鎮痛薬および拮抗性鎮痛薬と称される薬物が使用されてきたが、それらのオピオイド受容体各サブタイプでの親和性やアゴニスト活性を調べるのに、従来は複数のサブタイプが混在する脳膜画分などの生体構成物を用いざるを得なかったので、受容体各サブタイプにおける薬理作用を厳密に調べることは出来なかった。1992年以降オピオイド受容体各サブタイプがクローニングされたので、著者はラット μ , δ , κ 受容体を安定的に発現するCHO細胞(各々、CHO/MOPR, CHO/DOPR, CHO/KOPR)を樹立し、諸種オピオイド部分活性薬の受容体各サブタイプに対する親和性、急性処置によるアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性ならびに持続的処置による依存形成能および禁断症状誘発能を検討することが出来る実験系を確立した。さらに、新規拮抗性鎮痛薬の創製に資するため、活性発現に関与する受容体構造についての分子薬理学的研究を行い、以下の新知見を得た。

第一章 クローン化オピオイド受容体を用いたオピオイド部分活性薬のオピオイド受容体親和性とアゴニスト活性、アンタゴニスト活性の検討

拮抗性鎮痛薬といわれているブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンおよびオピオイド部分活性薬といわれているKT-90、ジヒドロエトルフィンはいずれも μ および κ オピオイド受容体に同程度の、 δ オピオイド受容体にはそれよりやや弱い親和性を有すること、ジヒドロエトルフィン以外の上記薬物はいずれも、全ての受容体サブタイプで部分活性薬であり、特に μ 受容体におけるアゴニスト活性が弱いためモルヒネに拮抗し得ること、ジヒドロエトルフィンは μ 受容体では完全活性薬、 δ および κ 受容体では部分活性薬であ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を用いたオピオイド部分活性薬の依存形成能および禁断症状誘発能の検討

オピオイドの依存形成能および禁断症状誘発能を検討し得る実験系を確立し、ジヒドロエトルフィン、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンは全てのサブタイプにおいて、ブレマゾシン、KT-90は δ および κ 受容体において依存形成能を有する可能性、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンは μ および κ 受容体において、ブレマゾシンは μ 受容体において、KT-90は μ および δ 受容体において、ジヒドロエトルフィンは κ 受容体において、それぞれ禁断症状誘発能を有する可能性を示した。

第三章 ブレマゾシンの受容体サブタイプ選択的アゴニスト活性発現に関与する受容体構造

顕著な κ 受容体アゴニスト活性と μ 受容体アンタゴニスト活性を示すブレマゾシンについて、キメラおよび点変異型受容体を用いた実験により、本薬物の κ 受容体でのアゴニスト活性発現には、 κ 受容体の第

2, 第3膜貫通部位周辺および第6膜貫通部位周辺の領域, 特に後者領域中に存在するフェニルアラニン残基(293F)が重要であることを明らかにした。

以上, オピオイド部分活性薬のオピオイド受容体各サブタイプにおける薬理学的性質を詳細に明らかにし, さらにブレマゾシンの κ 受容体アゴニスト活性発現に関与するアミノ酸を同定した諸成績は, 新規拮抗性鎮痛薬の開発に有用な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9年2月24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。