

氏名（本籍）	大澤 匡弘	（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	甲 第 72 号	
学位授与年月日	平成 11 年 3 月 13 日	
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当者	
学位論文の題名	Modifications of μ -opioid receptor agonist-induced several pharmacological actions by diabetes in mice: possible involvement of protein kinase C and intracellular calcium	
論文審査委員	主 査	学 長 南 原 利 夫
	副 査	教 授 豊 島 聰
	副 査	助 教 授 鎌 田 勝 雄
	副 査	講 師 亀 井 淳 三

論文内容の要旨

糖尿病時には、末梢神経系のみならず中枢神経系の機能が変化していることが知られている。また、糖尿病マウスにおいて、脊髄より上位中枢でのオピオイド μ 受容体を介した抗侵害作用が選択的に減弱していることが報告されている。一方、末梢神経系において細胞内基質、特にプロテインキナーゼ C (PKC) 活性が変化していることが知られている。また、細胞内カルシウム量 ($[Ca^{2+}]_i$) も増加していることが末梢神経および末梢組織において報告されている。近年、この PKC 活性の変化および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が、糖尿病性末梢性神経障害の原因であることが数多く示唆されている。

オピオイド μ 受容体はモルヒネを代表とする麻薬性鎮痛薬が作用する受容体であり、強力な鎮痛作用を発現する。一方、 μ 受容体作動薬は、耐性、身体依存性および精神依存性などの副作用を発現することも知られており、これらの副作用のために臨床の場で使用されることが敬遠されてきた。

近年、オピオイド受容体のアミノ酸配列が同定され、受容体の形態や機能が明らかとなりつつある。さらに、オピオイド受容体には、プロテインキナーゼによりリン酸化を受ける部位が存在し、プロテインキナーゼによるリン酸化がオピオイド受容体の脱感作に寄与していると報告されている。また、これらプロテインキナーゼの中でも特に PKC によるリン酸化がモルヒネ連用時にみられる耐性や身体依存性の発現に関与していることが報告されている。

オピオイド受容体作動薬による鎮痛効果と $[Ca^{2+}]_i$ の関係については、古くから検討が行われてきた。 μ 受容体作動薬により誘発される抗侵害効果が、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる薬物により抑制されること、さらにモルヒネ耐性時には $[Ca^{2+}]_i$ が上昇していることも報告されており、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は μ 受容体を介した薬理作用に対し抑制的に作用することが考えられている。

これらのことから、糖尿病マウスにおける μ 受容体を介した薬理作用発現の変化に PKC および細胞内カルシウムの変化が関与していることが考えられる。そこで本研究では糖尿病マウスにおけ

る μ 受容体作動薬による数種薬理作用の変化に対する PKC および $[Ca^{2+}]_i$ の関与について明らかにした。さらに、モルヒネ依存時のナロキソン誘発退薬症候発現に対する糖尿病の影響ならびにその変化における PKC および $[Ca^{2+}]_i$ の関与について検討した。また、モルヒネ慢性投与により身体依存性とともに認められる精神依存性形成能に対する糖尿病の影響についてもあわせて検討した。

【方法】

実験には、4 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。0.1 N クエン酸緩衝液により pH 4.5 - 4.8 に調製したストレプトゾトシン (STZ; 200 mg/kg) を尾側静脈より投与することにより糖尿病を誘発した。対照群マウスには溶媒 (クエン酸緩衝液) のみを投与した。STZ あるいは溶媒を投与して 2 週間経過したものを実験に用いた。なお、血糖値が 400 mg/dl 以上のものを糖尿病とした。

モルヒネによる挙尾反応は、水平面に対する尾の角度をスコア化し、評価した。また、オピオイド受容体作動薬誘発抗侵害作用は、tail-flick 法に従い測定した。モルヒネの身体依存は、注射法に従いモルヒネを 1 日 2 回、5 日間 (8-45 mg/kg) 漸増適用することにより形成した。モルヒネの最終投与 2 時間後にナロキソンを皮下投与し、jumping などの退薬症候を観察した。精神依存性は conditioned place preference 法に従い評価した。Conditioning は、2-compartment box を用い、薬物処置区画への滞在時間の延長を CPP スコアとして表し、place preference の指標とした。

【結果】

1. 糖尿病マウスにおけるモルヒネ誘発挙尾反応

糖尿病マウスにおけるモルヒネ脳室内投与により誘発される挙尾反応は、対照群マウスと比べ有意に減弱していた。PKC 活性化薬である phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) は対照群マウスにおけるモルヒネ誘発挙尾反応を有意に抑制したが、糖尿病マウスの挙尾反応には影響を与えなかった (Fig. 1-A)。一方、PKC 抑制薬である calphostin C は対照群マウスにおけるモルヒネ誘発挙尾反応に何ら影響を与えなかったが、糖尿病マウスにおけるモルヒネ誘発挙尾反応を対照群マウスとほぼ同程度にまで増強した (Fig. 1-B)。

2. 糖尿病マウスにおける μ 受容体作動薬誘発抗侵害作用減弱に対する PKC の関与

糖尿病マウスにおける μ 受容体作動薬である DAMGO の抗侵害作用は、対照群マウスと比べ有意に減弱していた。PDBu は対照群マウスにおける DAMGO の抗侵害作用を有意に減弱させたが、糖尿病マウスにおける DAMGO の抗侵害作用には有意な影響を与えなかった (Fig. 2-A)。また、calphostin C は糖尿病マウスにおける DAMGO の抗侵害作用を対照群マウスと同程度にまで回復させた (Fig. 2-B)。

3. 糖尿病マウスにおける μ および δ 受容体作動薬誘発抗侵害作用の変化に対する $[Ca^{2+}]_i$ の関与

対照群マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害作用は、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる $CaCl_2$ および thapsigargin (Ca^{2+} -ATPase inhibitor) により有意に抑制された (Fig 3-A)。しかし、糖尿病マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害作用はそれら薬物により有意な影響を受けなかった (Fig 3-B)。一方、対照

群および糖尿病マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害作用は $[Ca^{2+}]_i$ を減少させる EGTA および ryanodine (Ryanodine receptor antagonist) により有意に増強した (Fig. 3-A)。また、対照群マウスにおいて、 δ 受容体作動薬である (-)-TAN-67 による抗侵害作用は、 $CaCl_2$ および thapsigargin により有意に増強したが、それら薬物は糖尿病マウスにおける (-) TAN67 の抗侵害作用に対し、有意な影響を与えなかった (Fig. 4-A, B)。さらに、対照群マウスにおける (-) TAN-67 の抗侵害作用は EGTA により有意に抑制されたが、ryanodine によつては何ら影響を受けなかった (Fig. 4-A)。一方、糖尿病マウスにおける (-) TAN 67 の抗侵害作用は、EGTA および ryanodine により有意に抑制された (Fig. 4-B)。

4. モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping の減少に対する PKC の関与

モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は、ナロキソン投与 5 分後において、モルヒネ依存対照群マウスのそれと比べ有意に減弱していたが、ナロキソン投与 10-15 分後における jumping には有意な変化は認められなかった (Fig. 5-A, B, C)。また、ナロキソンによるノルアドレナリン代謝回転 (NA turnover) の上昇はモルヒネ依存糖尿病マウスでは認められなかった (Fig. 6)。モルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は calphostin C および protein kinase A 抑制薬である KT-5720 により有意に抑制された (Fig. 5-A, B)。モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は、calphostin C により増加し、calphostin C を前処置したモルヒネ依存対照群マウスとほぼ同程度にまで増加したが、KT-5720 によつては有意な影響を受けなかった (Fig. 5-A, B)。また、PDBu によりモルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は有意に抑制されたが、モルヒネ依存糖尿病マウスで PDBu による有意な影響は認められなかった (Fig. 5-C)。モルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソンによる NA turnover の上昇は、calphostin C および KT-5720 により有意に抑制された (Fig. 6-A)。モルヒネ依存糖尿病マウスにおいては calphostin C および KT-5720 を処置しても、ナロキソンによる NA turnover の変化は認められなかった (Fig. 6-A)。また、PDBu によりモルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソンによる NA turnover の上昇は有意に抑制されたが、モルヒネ依存糖尿病マウスでは有意な影響は認められなかった (Fig. 6-B)。

5. モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping の減少に対する $[Ca^{2+}]_i$ の関与

モルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は、ryanodine により有意に抑制された (Fig. 7-A)。また、thapsigargin により、モルヒネ依存対照群マウスのナロキソン誘発 jumping は有意に増加した (Fig. 7-B)。しかしながら、モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping は、ryanodine および thapsigargin により有意な影響を受けなかった (Fig. 7-A, B)。モルヒネ依存対照群マウスにおけるナロキソンにより誘発される NA turnover の上昇は、ryanodine により有意に抑制された (Fig. 8-A)。また、thapsigargin により、モルヒネ依存対照群マウスのナロキソンによる NA turnover の上昇は有意ではないものの増強傾向を示した (Fig. 8-B)。しかしながら、モ

ルヒネ依存糖尿病マウスにおける NA turnover は、ryanodineにより有意な影響を受けなかった (Fig. 8-A)。

6. 糖尿病マウスにおけるモルヒネ誘発 place preference

糖尿病マウスにおけるモルヒネ誘発 place preference は、対照群マウスと比べ増強していた (Fig. 9-A)。また、糖尿病マウスおよび対照群マウスにおけるモルヒネ (5 mg/kg) 誘発 place preference は、 β -フナルトレキサミンおよび δ_2 受容体拮抗薬であるナルトリベンにより抑制された。また、対照群マウスにおけるモルヒネ (5 mg/kg) 誘発 place preference は、 δ_1 受容体拮抗薬である 7-ベンジリデンナルトレキソン (BNTX) により抑制された。しかし、糖尿病マウスにおける低用量のモルヒネ (3 mg/kg) 誘発 place preference は、BNTX により抑制されたが、高用量のモルヒネ (5 mg/kg) により誘発された place preference は何ら影響を受けなかった。また、 δ 受容体作動薬の TAN-67 は糖尿病マウスにおいて place preference を示したが、対照群マウスでは place preference および place aversion のいずれも示さなかった。

7. 糖尿病マウスにおけるメタンフェタミン誘発 place preference

糖尿病マウスにおけるメタンフェタミン誘発 place preference は、対照群マウスと比べ増強していた (Fig. 9-B)。また、糖尿病マウスおよび対照群マウスにおけるメタンフェタミン誘発 place preference は、ドパミン D_2/D_3 受容体作動薬であるキンピロールおよびドパミン D_3 受容体作動薬である 7-OH-DPAT により抑制された。さらに、対照群マウスでは 7-OH-DPAT により有意な place aversion が認められたが、糖尿病マウスでは、place aversion および place preference のいずれも認められなかった。

【考察】

以上の結果より、糖尿病マウスにおける μ 受容体作動薬による薬理作用の発現の減弱に PKC の活性化が一部関与していることが明らかとなった。また、糖尿病マウスにおける μ および δ 受容体作動薬による抗侵害作用の変化に細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 量の上昇が一部関与していることも明らかとなった。モルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping の減弱に、PKC 活性の亢進が関与していることが明らかとなった。さらに、モルヒネ依存糖尿病マウスにおいてナロキソンによる NA turnover の上昇が認められないことが明らかとなった。このノルアドレナリン神経系の機能変化あるいはノルアドレナリン受容体の機能変化がモルヒネ依存糖尿病マウスにおけるナロキソン誘発 jumping の発現の減弱機序の一部として関与している可能性が示唆された。

これらのことから、糖尿病マウスに認められる μ 受容体作動薬誘発数種薬理作用発現の減弱に、PKC および細胞内カルシウム量の上昇が一部関与していることが明らかとなった。また、糖尿病マウスにおける μ および δ 受容体の感受性の変化に、細胞内カルシウム量の上昇が関与していることが示唆された。一方、モルヒネによる強化効果の増強にオピオイド受容体の変化のみならず、ドパミン神経系の機能変化が一部関与していることが示唆された。

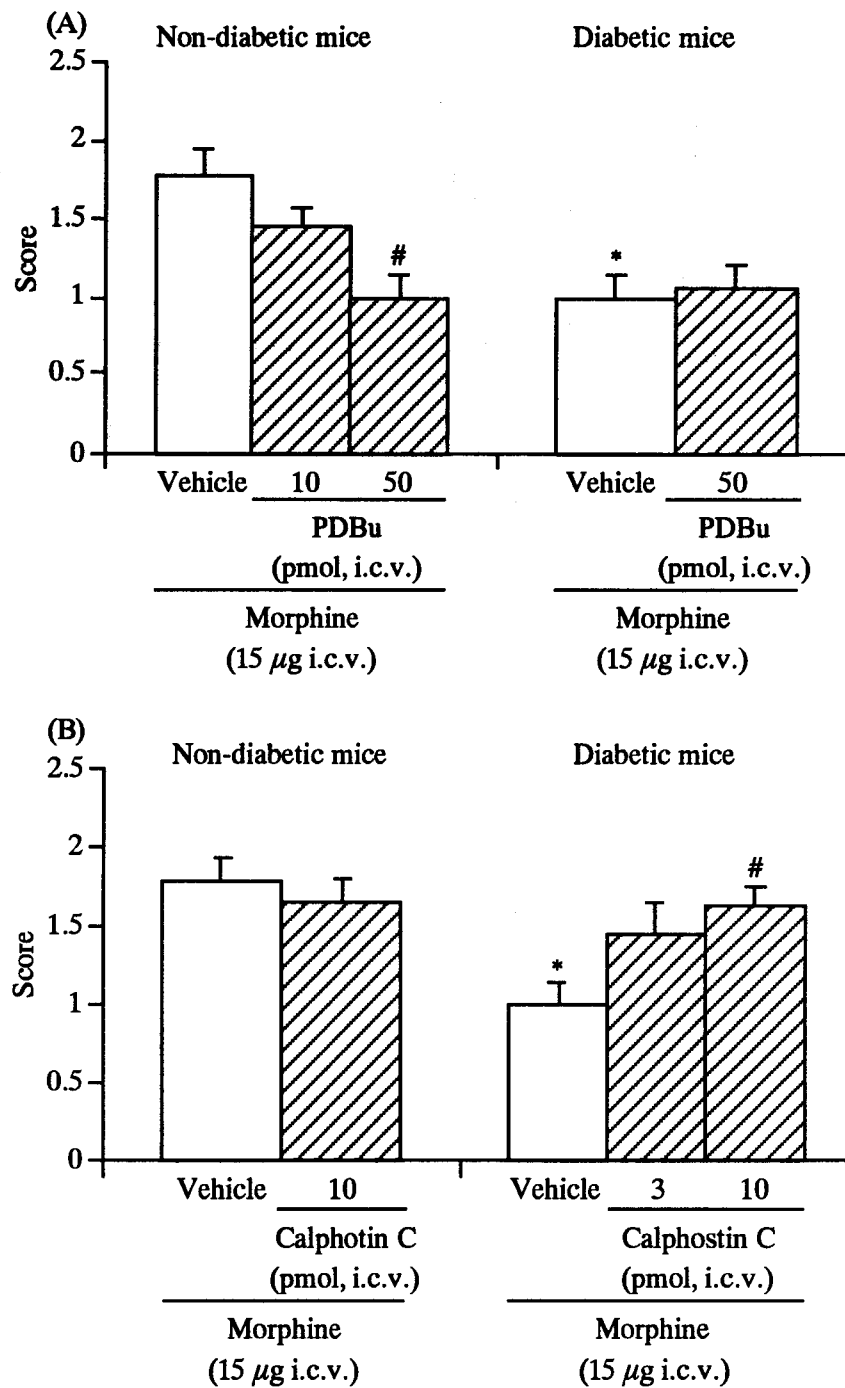


Figure 1. Effect of i.c.v. pretreatment with phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu; A) and calphostin C (B) on the i.c.v. morphine-induced Straub tail reaction PDBu (10 and 50 pmol) or calphostin C (1 or 3 pmol) was injected i.c.v. 60 min before administration of morphine (15 µg i.c.v.). The Straub tail reaction was graded using numerical scores, and was observed 20 min after the i.c.v. administration of morphine. Each column represents the mean with S.E. for 9-15 mice in each group. *P<0.05 vs. non-diabetic mice. #P<0.05 vs. respective vehicle treated group.

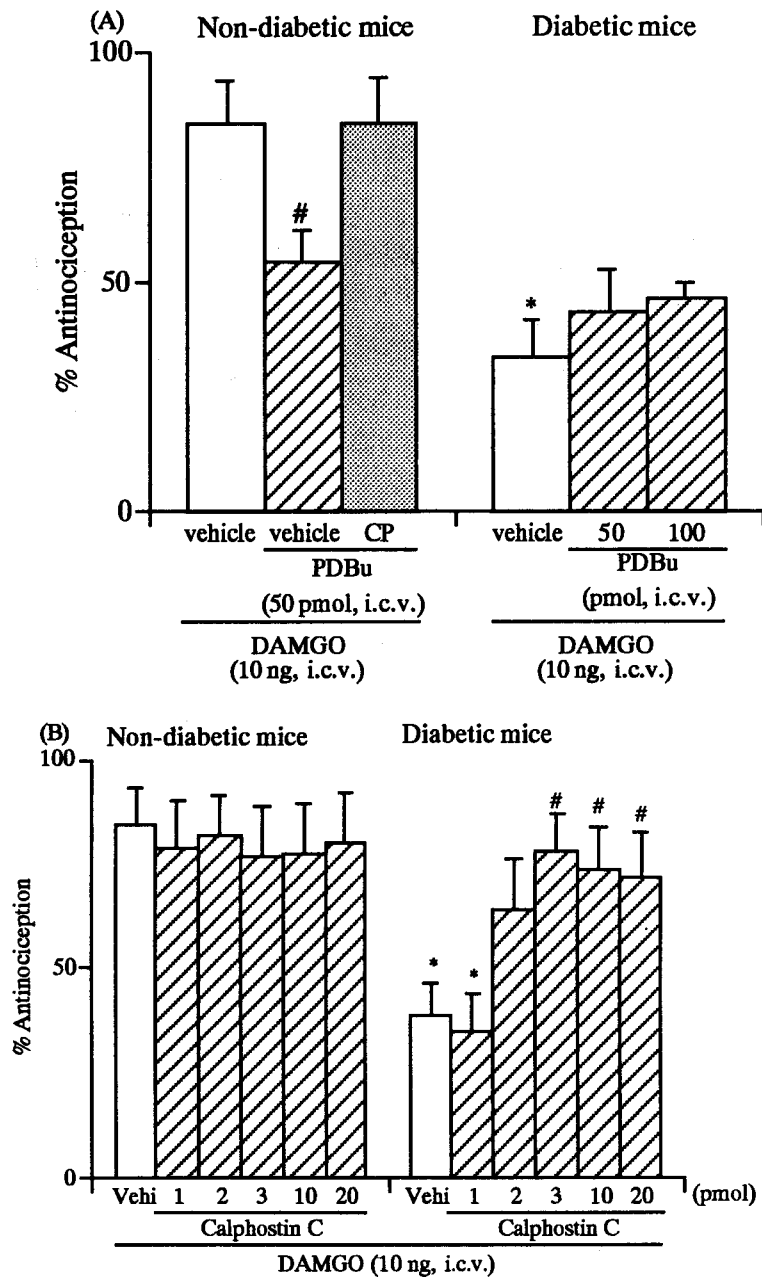


Figure 2. (A) Effect of i.c.v. pretreatment with phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) on DAMGO-induced antinociception in diabetic and non-diabetic mice. (B) Dose-response effect of i.c.v. pretreatment with calphostin C on DAMGO-induced antinociception in diabetic and non-diabetic mice. (A) PDBu (50 or 100 pmol) alone or a combination of PDBu and calphostin C (CP) was injected 60 min before the administration of DAMGO (10 ng, i.c.v.). Mice were tested 10 min after the injection of DAMGO in the tail-flick test. Each column represents the mean with S.E. for 10 mice in each group. [#] $P < 0.05$ compared with the vehicle-pretreated group. ^{*} $P < 0.05$ compared with respective non-diabetic mice.

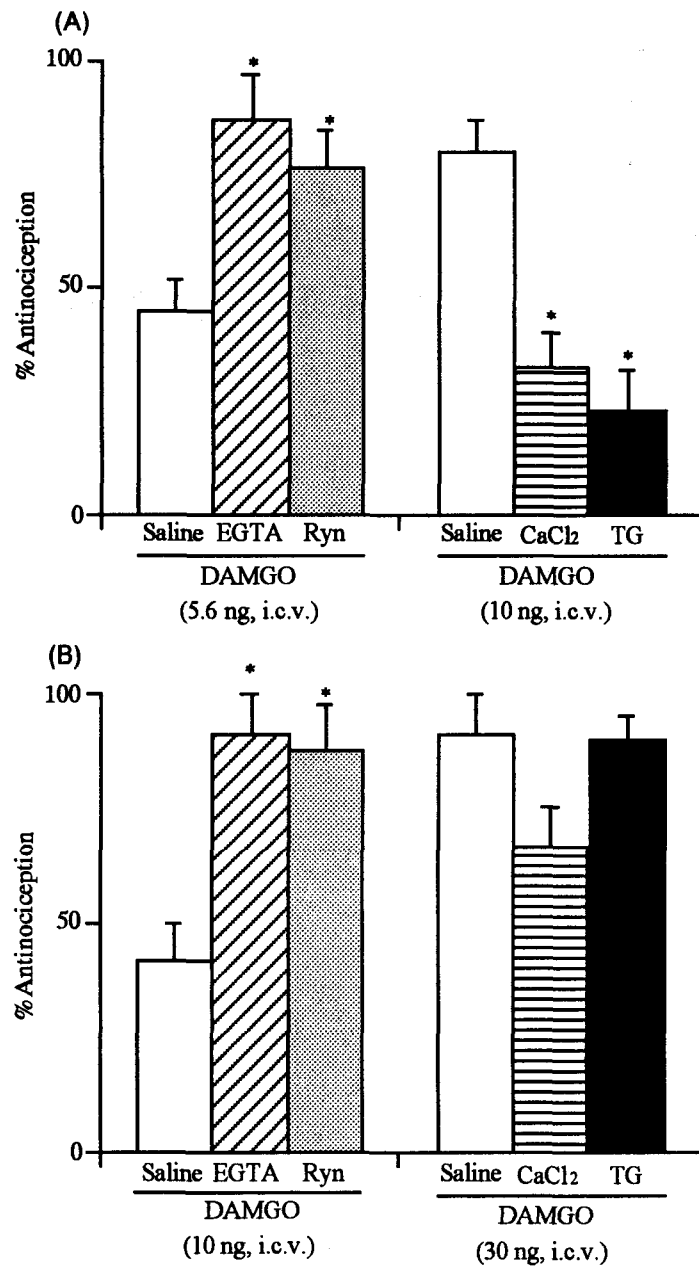


Figure 3. Effect of i.c.v. pretreatment with CaCl₂ (300 nmol), EGTA (60 nmol), ryanodine (3 nmol) and thapsigargin (3 nmol) on DAMGO-induced antinociception in non-diabetic (A) and diabetic (B) mice. CaCl₂ and ryanodine were injected 10 min before the administration of DAMGO. EGTA was injected 15 min before the administration of DAMGO. Thapsigargin was injected 60 min before the administration of DAMGO. Mice were tested 10 min after the injection of DAMGO in the tail-flick test. Each column and point represents the mean with S.E. for 10-15 mice in each group. * P<0.05 compared with the saline (open column)-pretreated group.

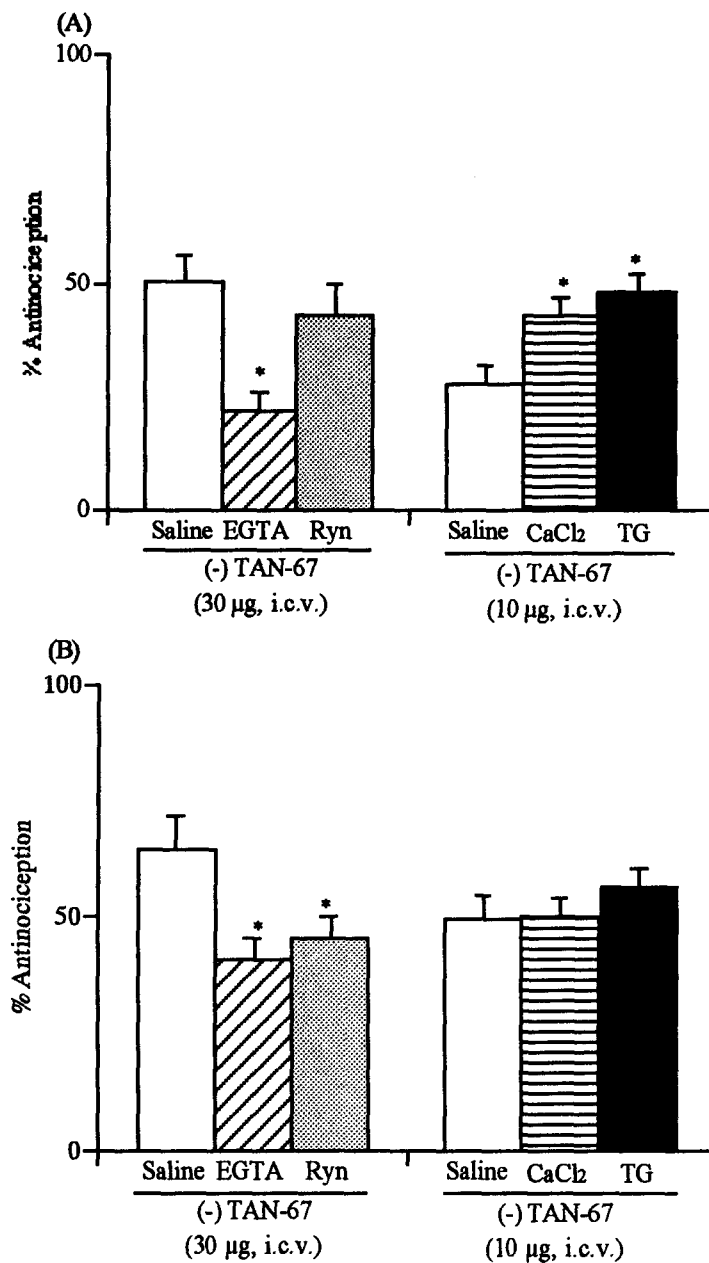


Figure 4. Effect of i.c.v. pretreatment with CaCl_2 (300 nmol), EGTA (60 nmol), ryanodine (3 nmol) and thapsigargin (3 nmol) on (-) TAN-67-induced antinociception in non-diabetic (A) and diabetic (B) mice. CaCl_2 and ryanodine were injected 10 min before the administration of DAMGO. EGTA was injected 15 min before the administration of DAMGO. Thapsigargin was injected 60 min before the administration of DAMGO. Mice were tested 10 min after the injection of DAMGO in the tail-flick test. Each column and point represents the mean with S.E. for 10-15 mice in each group. * $P < 0.05$ compared with the saline (open column)-pretreated group.

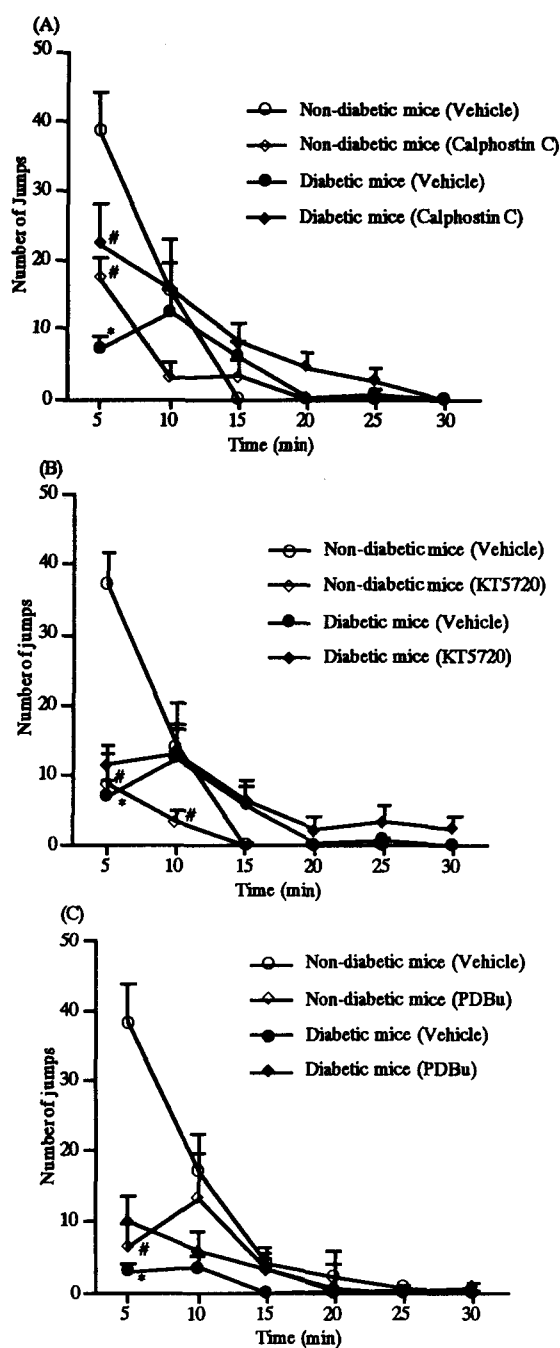


Figure 5. The effect of a protein kinase C inhibitor (A), protein kinase A inhibitor (B) and protein kinase C activator (C) on the time course of the number of naloxone-precipitated withdrawal jumps in morphine-dependent diabetic and non-diabetic mice. Calphostin C (20 pmol), KT-5720 (20 pmol) and vehicle were injected i.c.v. 1h before the administration of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.). PDBu (10 pmol) and vehicle were injected i.c.v. 1 h before the last injection of morphine (45 mg/kg, s.c.). Each point represents the mean \pm S.E. of 9-10 mice. * $P < 0.05$ versus non-diabetic mice. # $P < 0.05$ versus the respective vehicle-treated groups.

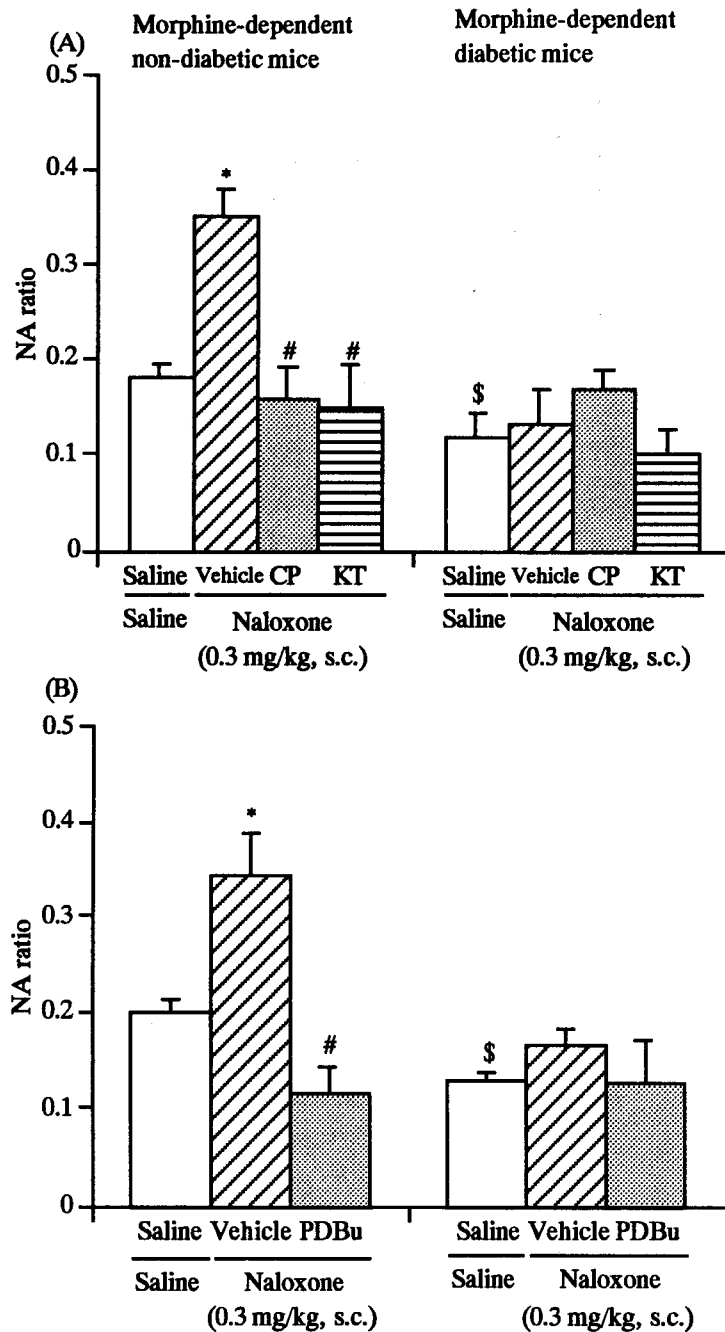


Figure 6. The effects of protein kinase C and A inhibitor (A) and protein kinase C activator (B) on a naloxone-induced increase of NA turnover in frontal cortex in morphine-dependent diabetic and non-diabetic mice. Calphostin C (CP; 20 pmol, i.c.v.) and KT5720 (KT; 20 pmol, i.c.v.) and vehicle were injected 1 h before the last injection of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.) (A). PDBu (10 pmol) and vehicle were injected i.c.v. 1 h before the last injection of morphine (45 mg/kg, s.c.). Each column represents the mean with S.E. of 5-10 mice. * $P < 0.05$ versus saline-challenged morphine-dependent non-diabetic mice. # $P < 0.05$ versus naloxone challenged chronic morphine-treated group. \$ $P < 0.05$ versus respective non-diabetic mice.

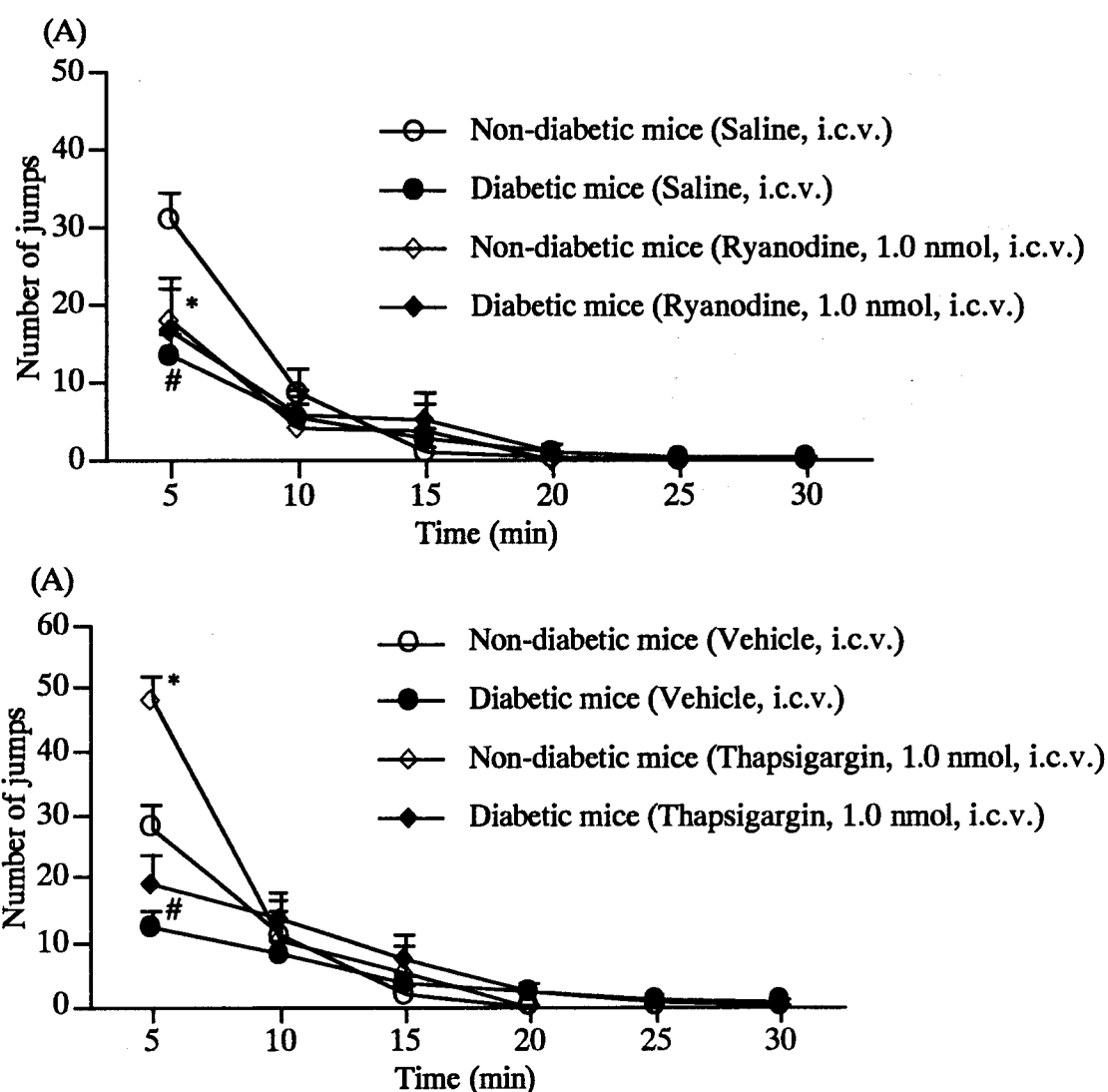


Figure 7. (A) The effect of ryanodine on the time course of the number of naloxone-precipitated withdrawal jumps in morphine-dependent diabetic and non-diabetic mice. (B) The effect of thapsigargin on the time course of the number of naloxone-precipitated withdrawal jumps in morphine-dependent diabetic and non-diabetic mice. Ryanodine (1.0 nmol) and saline were injected 15 min before the administration of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.). Thapsigargin (1.0 nmol) and vehicle were injected i.c.v. 1h before the administration of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.). Each point or column represents the mean \pm S.E. of 9-10 mice. * $P < 0.05$ versus non-diabetic mice. # $P < 0.05$ versus the respective saline-treated groups.

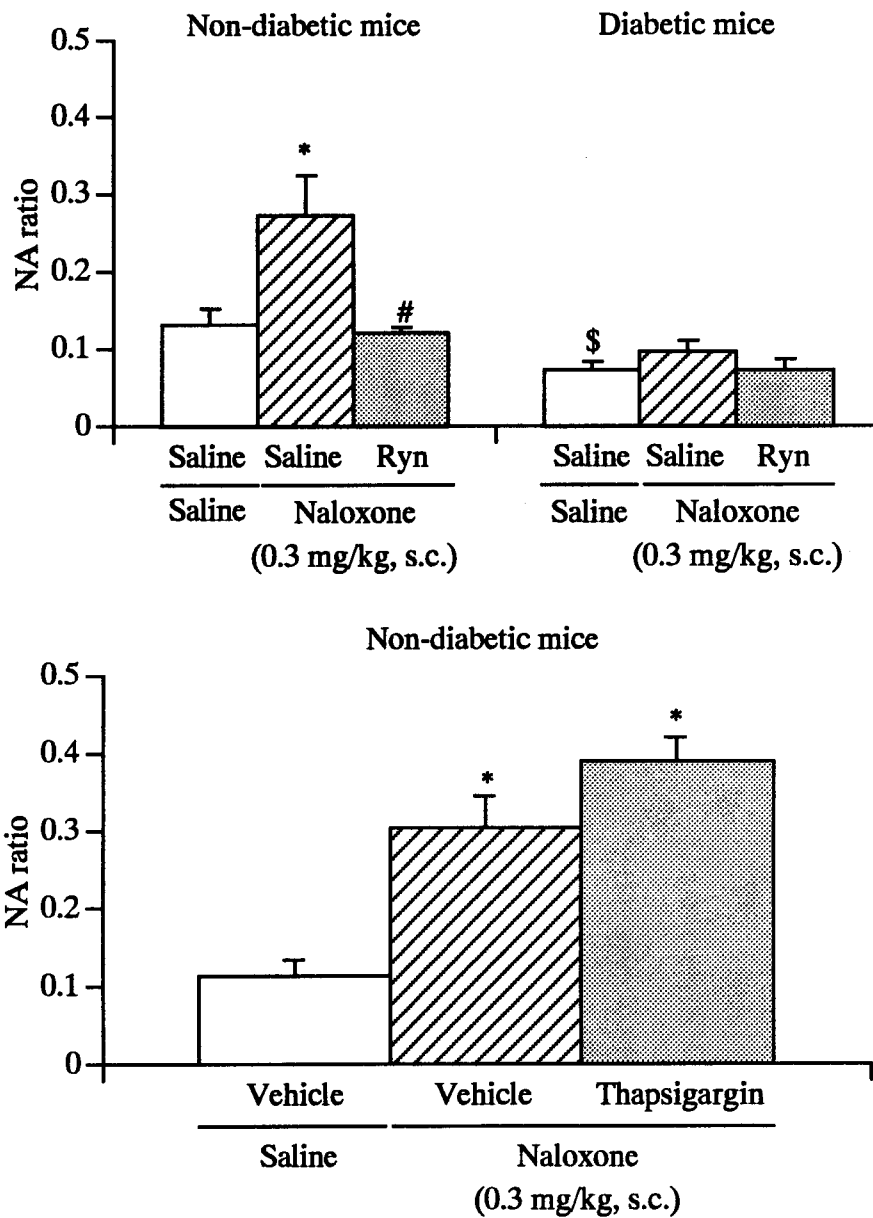


Figure 8. The effects of ryanodine (A) and thapsigargin (B) on naloxone-induced increase of NA turnover in the frontal cortex in morphine-dependent diabetic and non-diabetic mice. Ryanodine (Ryn; 1.0 nmol) and saline were injected 15 min before the administration of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.) (A). Thapsigargin (1.0 nmol) and vehicle were injected i.c.v. 1 h before the administration of naloxone (0.3 mg/kg, s.c.). Each column represents the mean with S.E. of 4-5 mice. * $P < 0.05$ versus saline-challenged morphine-dependent non-diabetic mice. # $P < 0.05$ versus naloxone challenged chronic morphine-treated group. \$ $P < 0.05$ versus respective non-diabetic mice.

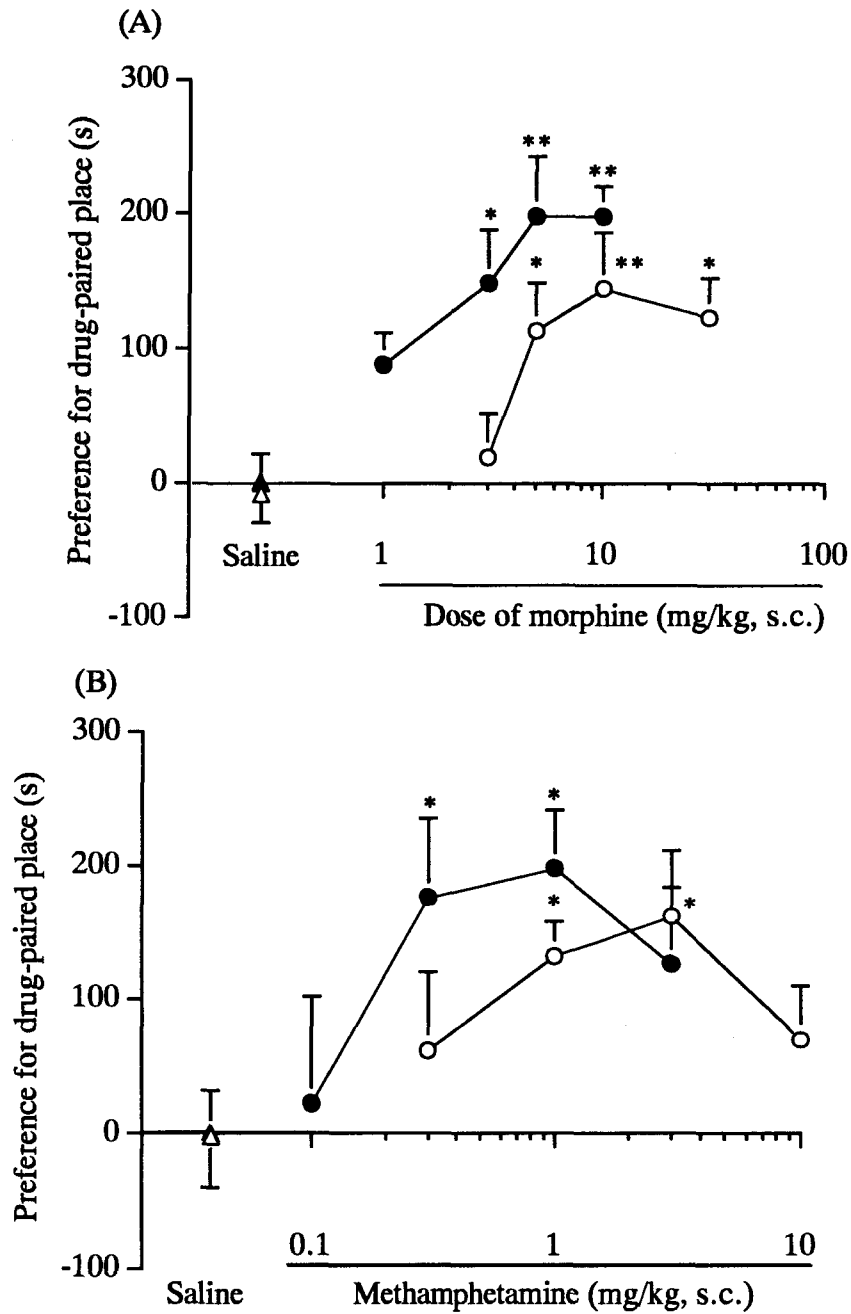


Figure 9. (A) Place conditioning produced by morphine (circle) in non-diabetic (open symbol) and diabetic (closed symbol) mice. (B) Place conditioning produced by methamphetamine in non-diabetic and diabetic mice. Ordinate: mean difference (s) between times spent on drug- and saline-paired sides of test box. Each point represents the mean \pm S.E. of 10-16 mice. The asterisk denotes significant preference conditioning (Wilcoxon test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. respective saline alone (triangle)).

論文審査の結果の要旨

本研究は、糖尿病時におけるオピオイド受容体の機能変化の機序を明らかにするため、オピオイド μ 受容体作動薬による薬理作用の変化に対するプロテインキナーゼCおよび細胞内カルシウムの関与を検討したものである。

その結果、1) 糖尿病時にみられるモルヒネの急性効果および身体依存性形成能の減弱に、プロテインキナーゼC活性の亢進が関与している 2) 糖尿病マウスにおけるオピオイド μ および δ 受容体を介した鎮痛効果の変化に、細胞内カルシウム量の変動が関与している 3) 糖尿病時のモルヒネ、メタンフェタミンおよびコカインの精神依存性形成能の変化に、オピオイド並びにドパミン神経系の機能変化が関与している などの知見を得ている。

これらの成績は、糖尿病時に見られる中枢神経系の神経変性機序を明らかにするうえに基礎的知見として重要な意義を有し、この分野の研究進展に寄与するところすこぶる大である。英文で書かれた本論文は、記述も正確であり、博士(薬学)論文としてきわめて価値ある内容と認める。