

氏 名（本 籍）	加 藤 英 明	（東京都）
学 位 の 種 類	博士(薬学)	
学 位 記 番 号	乙 第158号	
学位授与年月日	平成18年9月6日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	Role of tyrosine kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in morphine reward	
論 文 審 査 委 員	主 査	教 授 鈴 木 勉
	副 査	教 授 瀬 山 義 幸
	副 査	教 授 亀 井 淳 三

論文内容の要旨

緒言

近年、がん疼痛に対する麻薬性鎮痛薬 morphine の普及と伴に、morphine の効きにくい痛みが存在することが再認識されている。Morphine が有効でないがん疼痛、特に神経障害性疼痛に対してグルタミン酸受容体の一つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の拮抗薬が有効であることが明らかになり、その鎮痛補助薬としての有用性が注目されている。グルタミン酸受容体は哺乳類中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が結合する受容体であり、イオンチャネル内蔵型および G タンパク質共役型受容体が存在する。イオンチャネル内蔵型である NMDA 受容体を構成するサブユニットには、脳内分布や発現時期、機能特性や活性調節を異にする多数の分子種が存在し、その組み合わせにより受容体の機能的多様性を決定している。NMDA 受容体は、NR1 および NR2 (A-D) サブユニットから構築されており、ketamine や MK-801 など多くの NMDA 受容体拮抗薬が NR2A サブユニットおよび NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体の両者に対して拮抗作用を示すのに対し、脳卒中後のめまいの治療薬として用いられている ifenprodil は、NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体に対して比較的選択的に拮抗作用を示す。NMDA 受容体を構築する NR2B サブユニットの C 末端領域は、神経細胞内におけるリン酸化標的部位を数多く有しており、NR2B サブユニットがリン酸化されることにより NMDA 受容体の活性化が引き起こされることが知られている。これまでに、セリン／スレオニンリン

酸化酵素である protein kinase C (PKC) が NMDA 受容体の活性化に関与していることが報告されているが、NR2B サブユニット C 末端領域のチロシンリン酸化もまた、NMDA 受容体の活性化に重要な役割を担っている。近年、オピオイドや覚せい剤の精神依存形成過程に NMDA 受容体の関与を強く示唆する報告が数多く発表されていることから、本研究では morphine 誘発報酬効果に対する選択的 NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体拮抗薬 ifenprodil の影響を検討し、morphine の報酬効果発現機構における NR2B サブユニット C 末端領域のチロシン (Tyr-1472) およびセリン (Ser-1303) 残基のリン酸化レベルならびにチロシンリン酸化酵素である Src family kinase の関与について併せて検討を行った。

実験方法

実験には、ddY 系および ICR 系雄性マウス (20-30 g) を用いた。Morphine 誘発報酬効果の評価には条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference; CPP) 法を、morphine 誘発抗侵害作用の評価には tail-flick 法を用いた。Morphine 誘発報酬効果の認められたマウス側坐核 (nucleus accumbens; N.Acc.) 含有領域における NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体および Src family kinase の役割については、Western blot 法および免疫染色法により検討した。また、神経／グリア共培養系およびアストロサイト単離培養系を用いてグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入およびアストロサイトの活性化に対する NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体の機能的役割についても検討した。

Morphine 誘発報酬効果に対する選択的 NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体拮抗薬 ifenprodil の影響

Morphine 誘発報酬効果は ifenprodil の併用処置により有意に抑制されたことから、morphine 誘発報酬効果の形成に NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、ifenprodil は、morphine 誘発抗侵害作用を有意に増加させることが明らかとなった。Ifenprodil は morphine の鎮痛作用を増加させる一方で、morphine の副作用である精神依存形成を軽減させることから、ifenprodil が安全で有効性の高い鎮痛補助薬となり得る可能性が示唆された。

Morphine の報酬効果発現マウス側坐核含有領域における NR2B サブユニット リン酸化レベルの変化

Morphine 誘発報酬効果の形成に NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることを明らかにした。そこで、morphine の報酬効果発現マウスの側坐核含有領域における NR2B サブユニット C 末端領域のチロシン (Tyr-1472) およびセリン (Ser-1303) 残基におけるリン酸化レベルを Western blot 法を用いて対照群と比較検討した。その結果、リン酸化 Tyr-1472 NR2B サブユニット量の有意な増加が認められた。一方、リン酸化 Ser-1303 NR2B サブユニット量に有意な変化は認められず、さらに morphine 単回投与後のマウス側坐核含有領域において、リン酸化 Tyr-1472 NR2B サブユニット量の有意な変化は認められなかった。これらの結果から、morphine 誘発報酬効果に側坐核含有領域における NR2B サブユニットのチロシンリン酸化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Morphine 誘発報酬効果における Src family kinase の関与

チロシンリン酸化酵素である Src family kinase は、NR2B サブユニット C 末端領域のチロシン残基、特に Tyr-1472 のリン酸化調節を担っていることが報告されている。Morphine 誘発報酬効果は Src family kinase の阻害薬である 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) の併用処置によって有意に抑制されたことから、morphine 誘発報酬効果の形成に Src family kinase が深く関与していることが明らかとなった。そこで、morphine の報酬効果発現マウスの側坐核含有領域における活性化 Src family kinase (リン酸化 Tyr-416 Src family kinase) の変化を Western blot 法および免疫染色法を用いて対照群と比較検討した。その結果、活性化型 Src family kinase 量の有意な増加および免疫活性の有意な増大が認められた。これらのことから、morphine 誘発報酬効果には、側坐核含有領域における Src family kinase の活性化が重要であり、NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体のチロシンリン酸化に深く関与していると考えられた。

グルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入およびアストロサイトの活性化に対する ifenprodil の影響

NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体の神経細胞ならびにアストロサイトにおける機能的役割を明らかにする目的で、神経／グリア共培養系およびアストロサイト

単離培養系を用いてグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入およびアストロサイトの活性化に対する ifenprodil の影響を検討した。Ifenprodil は神経／グリア共培養系において神経細胞へのグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入を抑制したが、アストロサイト単離培養系においてはグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入を抑制しなかった。さらに、ifenprodil は神経／グリア共培養系におけるグルタミン酸誘発アストロサイトの活性化を抑制したが、アストロサイト単離培養系においてはグルタミン酸誘発アストロサイトの活性化を抑制しなかった。これらのことから、神経細胞上に存在する NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体が神経細胞内の Ca^{2+} 応答やアストロサイトの活性調節に関与していることが明らかとなった。

結語

選択的 NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体拮抗薬である ifenprodil は、morphine の鎮痛作用を増加させる一方で、morphine の副作用である精神依存形成を軽減させることから、ifenprodil が安全で有効性の高い morphine 鎮痛補助薬となり得る可能性が示唆された。さらに本研究の結果から、morphine 報酬効果の形成には、NR2B サブユニット構築型 NMDA 受容体およびチロシンリン酸化酵素である Src family kinase が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、morphine の報酬効果発現マウスの側坐核領域において NR2B サブユニットチロシン残基のリン酸化レベルの増加および Src family kinase の活性化を見出した。以上、morphine 誘発報酬効果の発現には、Src family kinase の活性化を介した NR2B サブユニットのチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

近年、がん疼痛に対する医療用麻薬の普及に伴い、morphine が神経障害性疼痛に抵抗性を示すことが知られている。Morphine 抵抗性がん疼痛、特に神経障害性疼痛に N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬が有効であり、鎮痛補助薬として使用されている。グルタミン酸受容体はイオンチャネル内蔵型と G タンパク質共役型受容体に分類されている。イオンチャネル内蔵型である NMDA 受容体は、NR1 および NR2 (A?D) サブユニット (NR1 および NR2A?D) から構築されており、NMDA 受容体拮抗薬である ketamine や MK-801 は NR1/NR2A あるいは NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体の双方に対して拮抗作用を示すのに対し、ifenprodil は NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体に対して比較的選択的な拮抗作用を示す。NMDA 受容体を構築する NR2B の C 末端領域は神経細胞内にリン酸化標的部位を数多く有しており、NR2B がリン酸化されることにより NMDA 受容体が活性化される。これまでに、セリン／スレオニンリン酸化酵素である protein kinase C (PKC) が NMDA 受容体の活性化に関与しているが、NR2B の C 末端領域のチロシンリン酸化もまた、NMDA 受容体の活性化に重要な役割を担っていることが知られている。また、オピオイドや覚せい剤の精神依存形成や維持に NMDA 受容体の関与を強く示唆する多くの報告がなされている。そこで、本研究では morphine 誘発報酬効果に対する選択的 NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体拮抗薬 ifenprodil の影響を検討し、morphine の報酬効果発現機構における NR2B の C 末端領域のチロシン (Tyr-1472) およびセリン (Ser-1303) 残基のリン酸化レベルならびにチロシンリン酸化酵素である Src family kinase の関与についても検討している。

本研究では morphine 誘発報酬効果を示したマウスの側坐核を分画し、NR1/NR2B構築型 NMDA 受容体およびSrc family kinase の役割を Western blot 法および免疫染色法により検討している。また、神経／グリア共培養系およびアストロサイト単離培養系を用いてグルタミン酸誘発 Ca²⁺ 流入およびアストロサイトの活性化に対する NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体の機能的役割についても検討している。

Morphine 誘発報酬効果の形成は ifenprodil により有意に抑制されたことから、morphine 精神依存の形成に NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。また、ifenprodil は morphine 誘発抗侵害作用を有意に増加させることも明らかにしている。Ifenprodil は morphine の鎮痛作

用を増加し、副作用である精神依存の形成を軽減させることから、ifenprodil が安全で有効性の高い鎮痛補助薬となり得る可能性を示している。そこで、morphine の報酬効果発現マウスの側坐核における NR2B の C 末端領域のチロシン (Tyr-1472) およびセリン (Ser-1303) 残基におけるリン酸化レベルを対照群と比較検討し、リン酸化 Tyr-1472 NR2B 量の有意な増加を明らかにしている。一方、リン酸化 Ser-1303 NR2B 量に有意な変化は認められず、さらに morphine 単回投与後でもリン酸化 Tyr-1472 NR2B 量の有意な変化は認められなかった。これらの結果から、morphine 精神依存の形成に側坐核における NR2B のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることを示唆している。

一方、morphine 誘発精神依存が Src family kinase の阻害薬によって有意に抑制されたことから、morphine 精神依存の形成に Src family kinase が深く関与していることも明らかにしている。また、morphine の精神依存発現マウスの側坐核における活性化 Src family kinase (リン酸化 Tyr-416 Src family kinase) 量の有意な増加および免疫活性の有意な増大が認められている。これらのことから、morphine 精神依存の形成には、側坐核における Src family kinase の活性化が重要であり、NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体のチロシンリン酸化に深く関与していることを示している。

さらに、NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体の神経細胞ならびにアストロサイトにおける機能的役割を明らかにする目的で、神経／グリア共培養系およびアストロサイト単離培養系を用いてグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入およびアストロサイトの活性化に対する ifenprodil の影響を検討している。Ifenprodil は神経／グリア共培養系において神経細胞へのグルタミン酸誘発 Ca^{2+} 流入を抑制したが、アストロサイト単離培養系では抑制しなかった。また、ifenprodil は神経／グリア共培養系におけるグルタミン酸誘発アストロサイトの活性化を抑制したが、アストロサイト単離培養系では抑制しなかった。これらのことから、神経細胞上に存在する NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体が神経細胞内の Ca^{2+} 応答やアストロサイトの活性調節に深く関与していることを明らかにした。

以上の結果より本論文では、選択的 NR1/NR2B 構築型 NMDA 受容体拮抗薬である ifenprodil は、morphine の鎮痛作用を増加し、精神依存形成を抑制することから、鎮痛補助薬として有用であることを示唆している。さらに morphine の精神依存発現には側坐核における Src family kinase の活性化を介した NR2B のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

これらの研究成果は緩和医療の現場、特に神経障害性疼痛の治療に大きく貢

献するものであり、またオピオイドの精神依存形成機構の解明にも貢献する内容である。さらに、本論文は英文で正確に記載されており、博士（薬学）の学位論文として十分な内容であると判断した。