

氏 名 (本 籍)	鈴 木 雅 美	(東 京 都)
学 位 の 種 類	博士(薬学)	
学 位 記 番 号	甲 第108号	
学位授与年月日	平成18年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Molecular mechanisms of the development of tolerance to morphine-induced antinociception following repeated treatment with morphine in the mouse spinal cord	
論 文 審 査 委 員	主 査	教 授 鈴 木 勉
	副 査	教 授 三 澤 美 和
	副 査	教 授 吉 田 正

論文内容の要旨

緒言 動物実験において、morphine をはじめとした μ -opioid 受容体作動薬は慢性投与により著明な鎮痛耐性を形成することが知られており、そのメカニズム解明のために古くから数多くの研究が行われている。Morphine による鎮痛耐性形成機構は、薬物動態学的変化では説明がつかないため、生体側の薬物感受性の変化に何らかの原因があるものと考えられている。また、こうした耐性現象は、細胞レベルにおいては持続的な薬物処置により受容体応答が低下することから、「脱感作」とも呼ばれている。一般に、 μ -opioid 受容体の脱感作は、受容体の作動薬に対する親和性の低下、受容体と G 蛋白質との脱共役および受容体の細胞内陥入/移行に起因していると考えられている。また、これらの現象は、受容体自身のリン酸化による構造変化が深く関与し、このリン酸化反応には、G-protein coupled receptor kinase (GRK) や protein kinase C (PKC) といった serine/threonine kinase が重要な役割を担っていることが報告されている。リン酸化された受容体は、脱共役因子である arrestin と結合し、微小管結合蛋白質である dynamin により細胞内陥入/移行が引き起こされる。しかしながら近年、受容体の細胞内陥入を誘発する過程において、同じ μ -opioid 受容体作動薬でもその効果が異なることが明らかになってきた。そこで本研究では、 μ -opioid 受容体作動薬である morphine および etorphine の慢性処置による受容体の代謝回転関連機能蛋白質の変化を検討した。

一方、中枢神経系は神経細胞とグリア細胞（アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト）で構成されている。近年、これまで細胞外液の恒常性維持、血液脳関門の形成など、神経を支持する機能のみを担うと考えられていたグリア細胞が、神経機能発現に積極的に関与することが明らかにされ、グリア細胞の脳/脊髄内での生理的意義が注目されている。特にアストロサイトは、ほぼすべてのシナプスを取り囲み、グルタミン酸などの神経伝達物質に応答し、様々な生理活性

物質を放出することによりシナプス可塑性に関与することが報告されている。そこで本研究では、morphine および etorphine 鎮痛耐性形成に対する脊髄内アストロサイトの関与を詳細に検討した。

哺乳類の中樞神経系において主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸はシナプス形成やシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。グルタミン酸受容体は、イオンチャネル型と代謝調節型の 2 つに大別されており、その構造および機能の違いからさらに細分類されている。近年、G_q 蛋白質と共役し、phospholipase C (PLC) を介して PKC を活性化する metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) が、情動や痛みの調節など種々の生理作用の発現に関与することが明らかにされ、中樞神経系の様々な病態下における mGluR5 の変化が注目されている。そこで本研究では、morphine 鎮痛耐性形成に対する mGluR5 の関与を詳細に検討した。

Morphine および etorphine 慢性処置による μ -opioid 受容体の代謝回転関連機能蛋白質およびアストロサイトの変化

Morphine (10 mg/kg, s.c.) および etorphine (10 μ g/kg, s.c.) を 1 日 1 回、7 日間慢性処置し、最終投与の 24 時間後に選択的 μ -opioid 受容体作動薬である [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO) を髄腔内投与した時に認められる鎮痛効果を tail-flick 法により検討した。その結果、何れの薬物群においても DAMGO 誘発鎮痛効果の有意な減弱、すなわち μ -opioid 受容体の脱感作が認められた。そこで、同様のスケジュールを用いて脊髄細胞膜分画標本を作製し、受容体の代謝回転関連機能蛋白質の変化を Western blot 法に従い検討したところ、etorphine 慢性処置群において、GRK 2、Dynamin II、 β -arrestin 2 およびリン酸化型 Ca²⁺ 依存性 PKC の著明な増加が認められた。しかしながら、morphine 慢性処置群では細胞膜分画におけるこれら機能蛋白質の変化は認められなかった。次に、morphine および etorphine の鎮痛耐性形成が認められたマウスの脊髄凍結切片を作製し、アストロサイト特有の中間径フィラメントである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の特異的抗体を用いてアストロサイトの形態変化を免疫組織染色法に従い検討したところ、etorphine 慢性処置群では、saline 慢性処置群と比較し何ら変化は認められなかったものの、morphine 慢性処置群においては、GFAP 免疫活性の増大および樹状突起の伸展といったアストロサイトの著しい活性化が認められた。そこで、脊髄由来神経/グリア共培養細胞を用いて、morphine および etorphine を *in vitro* で処置し、同様に検討したところ、morphine 慢性処置群においてのみアストロサイトの著しい活性化が認められた。さらに、グリア機能調節薬である propentofylline (PPF) を用いて morphine の鎮痛耐性形成に対するアストロサイトの直接的な関与を検討したところ、morphine の鎮痛耐性形成の抑制が認められた。次に、脊髄由来初代培養アストロサイトおよびその培養上清の混合液を作製し、morphine 連投の 24 時間前に髄腔内投与したところ

morphine の鎮痛耐性形成の促進が認められた。しかしながら、etorphine の鎮痛耐性形成は PPF および アストロサイト/培養上清の混合液を前処置しても何ら影響は認められなかった。これらの結果から、etorphine 慢性処置による μ -opioid 受容体の脱感作は、受容体の代謝回転関連機能蛋白質に依存した受容体の持続的な細胞内陥入に起因し、また、morphine の鎮痛耐性形成には、脊髄内アストロサイトの活性化が深く関与していることが明らかとなった。

Morphine 慢性処置による脊髄内アストロサイトの活性化に対する PKC γ の関与

Morphine 慢性処置による脊髄内アストロサイトの活性化を詳細に検討する目的で、GFAP のプロモーター領域下流に enhanced green fluoro protein (EGFP) の cDNA を有したトランスジェニックマウスに morphine を慢性投与し、EGFP の自家発光の変化を観察した。その結果、morphine を慢性投与したマウスの脊髄後角灰白質および白質において、多数の分岐を有する強い EGFP の自家発光が認められた。次に、morphine の鎮痛耐性形成が認められたマウスの脊髄凍結切片を作製し、PKC γ の特異的な抗体を用いて morphine 慢性処置による PKC γ の変化およびその局在を検討した。その結果、saline 慢性処置群において脊髄後角 II 層内層に局在する PKC γ の免疫活性は、morphine の慢性処置により著明に増大し、その分布は、II 層外層および I 層まで拡大した。また、この増大した PKC γ の免疫活性は、活性化したアストロサイトには認められず、そのほとんどが神経細胞に局在していた。そこで、PKC γ の遺伝子欠損マウスを用いてモルヒネの慢性処置によるアストロサイトの変化を観察したところ、PKC γ 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスで認められるような morphine 慢性処置によるアストロサイトの活性化が全く観察されなかった。これらのことから、morphine 慢性処置によるアストロサイトの活性化は、神経細胞内の PKC γ に依存していることが明らかとなった。

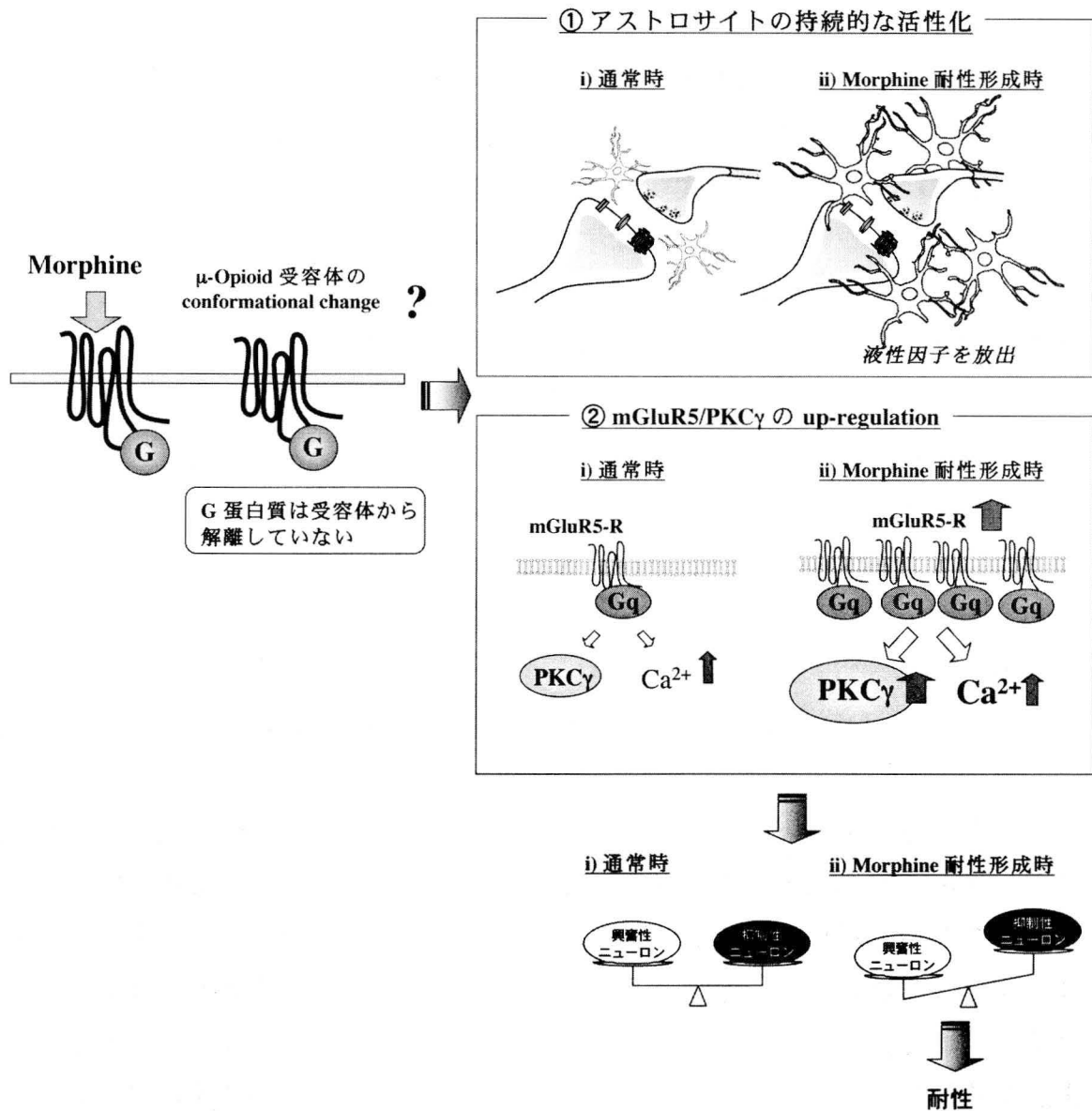
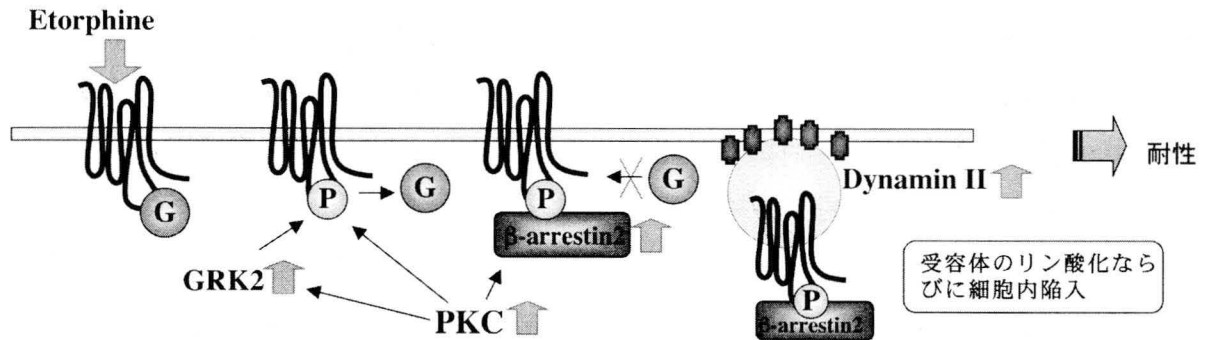
Morphine の鎮痛耐性形成に対する metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) の関与

Morphine 慢性投与による鎮痛耐性の形成に mGluR5 が関与するか否かを明らかにするため、選択的 mGluR5 拮抗薬である methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine hydrochloride (MPEP) を皮下および髄腔内に前処置し、morphine の鎮痛耐性形成に対する影響を検討した。その結果、saline 前処置群では、明瞭な morphine 鎮痛効果の減弱、すなわち鎮痛耐性の形成が認められたのに対し、MPEP 前処置群では、morphine 鎮痛耐性の形成が有意に抑制された。そこで、鎮痛耐性が形成されたマウスの脊髄における mGluR5 数の変化を検討するため、mGluR5 の選択的な放射性 ligand である [3 H]MPEP を用い、受容体結合実験を行ったところ、ligand 最大結合量を示す B_{\max} 値の有意な増加が認められた。さらに、morphine (10-20 mg/kg) および saline を慢性投与したマウスの脊髄における mGluR5 の局在およびその変化を免疫組織染色法に従い検討した。その結果、saline 慢性処置群において mGluR5 は脊髄後角の I-II 層に

高濃度に分布し、特に II 層内層の神経細胞に強い mGluR5 の免疫活性が認められた。また、この mGluR5 の免疫活性は、morphine を慢性処置することにより、用量依存的かつ有意に増大し、II 層内層のみではなく II 層外層から I 層および III 層にも強く認められた。さらに、神経細胞のマーカーおよびアストロサイトのマーカーと mGluR5 をそれぞれ二重染色し、morphine の慢性処置により増加した mGluR5 の局在を詳細に検討したところ、増加した mGluR5 は、主に神経細胞の樹状突起上あるいは神経細胞体の周囲に局在していた。しかしながら、morphine 慢性処置により活性化し突起を伸展させたアストロサイトには、ほとんど mGluR5 の免疫活性が認められなかった。一方、脊髄由来神経/グリア共培養細胞に morphine を *in vitro* で 3 日間処置し、選択的 group I mGluR 作動薬である 3,5-dihydrophenylglycine (DHPG) による神経細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の変化を fluo-3AM 法により測定したところ、morphine を処置した神経細胞において著明かつ有意な細胞内 Ca^{2+} 応答の増強が認められた。以上の結果から、morphine の慢性処置により機能的な mGluR5 が増加し、こうした現象が、morphine 鎮痛耐性の形成に関与していることが明らかとなった。

結語 本研究の結果から、etorphine 慢性処置による μ -opioid 受容体の脱感作は、受容体の代謝回転関連機能蛋白質に依存した受容体の細胞内陥入に起因していることが明らかとなった。一方、morphine 慢性処置による鎮痛耐性の形成は、 μ -opioid 受容体の細胞内陥入とはほとんど連動せず、神経細胞の mGluR5/PKC γ 経路に依存した脊髄内アストロサイトの活性化が直接的に関与していることが明らかとなった。これらのことから、morphine 慢性処置による長期的な μ -opioid 受容体刺激は、持続的にグルタミン酸の遊離を抑制するため、ポストシナプスの mGluR5 の up-regulation を誘導し、脊髄後角部の PKC γ の著しい活性化を引き起こすものと考えられる。またこの神経細胞で増加した PKC γ は、何らかの生理活性物質の産生および放出を促し、周辺に存在するアストロサイトを活性化させる可能性が考えられる。そしてそれらの結果の総和として、神経細胞の興奮閾値が変化し、脊髄後角部の興奮性神経伝達効率が大幅に増強され、morphine の鎮痛効果が減弱し、鎮痛耐性が形成されることが考えられる。

脊髄における etorphine および morphine の鎮痛耐性形成機構の概念図



論文審査の結果の要旨

Morphine を始めとした μ -opioid 受容体 (MOR) 作動薬は慢性投与により著明な鎮痛耐性を形成し、その機構解明のために数多くの研究が行われている。Morphine による鎮痛耐性の形成機構が薬物動態学的変化では説明ができないため、生体側の薬物感受性の変化に何らかの原因があると考えられる。一般に、MOR の脱感作は、受容体の作動薬に対する親和性の低下、受容体と G 蛋白質との脱共役および受容体の細胞内陥入/移行に起因していると考えられている。また、これらの現象は受容体の自己リン酸化による構造変化が深く関与し、このリン酸化反応には G-protein coupled receptor kinase (GRK) や protein kinase C (PKC) といった serine/threonine kinase が重要な役割を担っている。リン酸化された受容体は、脱共役因子である arrestin と結合し、微小管結合蛋白質である dynamin により細胞内陥入/移行が引き起こされる。しかし、受容体の細胞内陥入を誘発する過程において、同じ MOR 作動薬でもその効果が異なることが明らかになってきている。そこで本論文では、MOR 作動薬である morphine および etorphine の慢性処置による受容体の代謝回転関連機能蛋白質の変化を検討している。一方、近年アストロサイトは、ほぼすべてのシナプスを取り囲み、グルタミン酸などの神経伝達物質に応答し、様々な生理活性物質を放出することによりシナプス可塑性に関与することが報告されている。そこで本論文では、morphine および etorphine 鎮痛耐性形成に対する脊髄内アストロサイトの関与を詳細に検討している。さらに近年、 G_q 蛋白質と共役し、phospholipase C (PLC) を介して PKC を活性化する metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) が、情動や痛みの調節など種々の生理作用の発現に関与することが明らかにされていることから、morphine 鎮痛耐性形成に対する mGluR5 の関与も詳細に検討している。

Morphine を慢性投与したマウスの脊髄後角において、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein 免疫活性の増大および樹状突起の伸展といったアストロサイトの著しい活性化が認められた。また、saline 慢性処置群において脊髄後角 II 層内層に局在する PKC γ の免疫活性は、morphine の慢性処置により著明に増大し、その分布は、II 層外層および I 層まで拡大した。この増大した PKC γ の免疫活性は、活性化したアストロサイトには認められず、そのほとんどが神経細胞に局在していた。また、PKC γ 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスで認められるような morphine 慢性処置によるアストロサイトの活性化が全く観察されなかった。これらのことから、morphine 慢性処置によるアス

トロサイトの活性化は、神経細胞内の PKC γ に依存していることが明らかとなった。

Morphine の鎮痛耐性の形成に対する選択的 mGluR5 拮抗薬である methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine hydrochloride (MPEP) の影響を検討し、saline 前処置群では明瞭な morphine 鎮痛耐性が形成されたのに対し、MPEP 前処置群では morphine 鎮痛耐性の形成が有意に抑制された。そこで、鎮痛耐性が形成されたマウスの脊髄における mGluR5 数の変化を検討するため、mGluR5 の選択的な放射性 ligand である [3 H]MPEP を用い、受容体結合実験を行っている。その結果、 B_{\max} 値の有意な増加、すなわち受容体の増加を明らかにしている。さらに、morphine および saline を慢性投与したマウスの脊髄における mGluR5 の局在を免疫組織染色法に従い検討した。その結果、saline 慢性処置群において mGluR5 は脊髄後角の I-II 層に高濃度に分布し、特に II 層内層の神経細胞に強い mGluR5 の免疫活性が認められている。また、この mGluR5 の免疫活性は、morphine を慢性処置することにより、用量依存的かつ有意に増大し、II 層内層のみではなく II 層外層から I 層および III 層にも強く認められている。さらに、神経細胞のマーカーおよびアストロサイトのマーカーと mGluR5 をそれぞれ二重染色し、morphine の慢性処置により増加した mGluR5 の局在を詳細に検討したところ、増加した mGluR5 は主に神経細胞の樹状突起上あるいは神経細胞体の周囲に局在していた。しかしながら、morphine 慢性処置により活性化し、突起を伸展させたアストロサイトには、ほとんど mGluR5 の免疫活性が認められなかった。一方、脊髄由来神経 / グリア共培養細胞に morphine を *in vitro* で 3 日間処置し、選択的 group I mGluR 作動薬である 3,5-dihydrophenylglycine (DHPG) による神経細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の変化を fluo-3AM 法により測定したところ、morphine を処置した神経細胞において著明かつ有意な細胞内 Ca^{2+} 応答の増強が認められた。以上の結果から、morphine の慢性処置により機能的な mGluR5 が増加し、こうした現象が、morphine 鎮痛耐性の形成に関与していることを明らかにしている。

これらの結果から、etorphine 慢性処置による MOR の脱感作は、受容体の代謝回転関連機能蛋白質に依存した受容体の細胞内陥入に起因していることを明らかにしている。一方、morphine 鎮痛耐性形成は MOR の細胞内陥入とはほとんど連動せず、神経細胞の mGluR5/PKC γ 経路に依存した脊髄内アストロサイトの活性化が直接的に関与していることを明らかにしている。これらのことから、morphine 慢性処置による長期的な MOR 刺激は、持続的にグルタミン酸の遊離を抑制するため、ポストシナプスの mGluR5 の up-regulation を誘導し、脊髄後角

部の PKC γ の著しい活性化を引き起こすことを示唆している。またこの神経細胞で増加した PKC γ は、何らかの生理活性物質の産生および放出を促し、周辺に存在するアストロサイトを活性化させる可能性を示している。そしてそれらの結果の総和として、神経細胞の興奮閾値が変化し、脊髄後角部の興奮性神経伝達効率が大幅に増強され、morphine の鎮痛効果が減弱し、鎮痛耐性が形成されることを示している。

本論文で脊髄におけるオピオイドの鎮痛耐性機構を明らかにしたことは、オピオイドの研究分野に大きく貢献し、臨床にも応用されと考えられる。本論文は英文で正確に記載されており、博士（薬学）の学位に値する内容であると判断する。