



Title	モルヒネの耐性獲得機構におけるGTP結合蛋白の関与
Author(s)	荒巻, 忠幸
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41187">https://hdl.handle.net/11094/41187</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	荒 巻 忠 幸
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 2 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 12 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	モルヒネの耐性獲得機構における GTP 結合蛋白の関与
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米田 俊之 (副査) 教 授 松浦 英夫 助教授 松本 憲 講 師 前田 定秋

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【研究目的】

モルヒネは、麻薬性鎮痛薬として、癌性疼痛などに広く使用されている。その鎮痛作用機序に関しては、GTP結合蛋白を介した細胞内へのカルシウム流入抑制と考えられている。一方、モルヒネを連用すると、鎮痛作用に耐性を生じ、更に依存を形成しモルヒネの投与中止により禁断症状を示すことが知られている。耐性獲得および依存性形成機構に関して現在まで多くの研究が行われており、モルヒネの連用によるオピオイド受容体の変化、細胞内情報伝達系の変化あるいは蛋白合成の変化が報告されている。本研究では、モルヒネの急性および慢性投与によるGTP結合蛋白の活性の変化について調べ、耐性獲得機構との関連について検討を行った。

#### 【実験方法】

##### (1) ラット脳海馬切片の作成と膜分画の調製

SD系雄性ラットを断頭後すみやかに脳を取り出して氷冷Krebs-Ringer液中にて300 μmの切片を作成した。切片を10倍量のTris-HCl緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズし、40,000×g、15分間遠心して得られた沈渣を膜分画とした。また、ラットの大脳皮質を摘出して10倍量の0.32Mショ糖でホモジナイズし、1,000×g、10分間遠心した後、その上清を11,500×gで30分間遠心分離した。得られた沈渣をTris-HCl緩衝液に懸濁して膜分画とした。

##### (2) $^{35}\text{S}$ -GTP-γ-Sの結合実験

脳海馬切片から得られた膜分画を5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む50 mM Hepes緩衝液(pH 7.4)中で $^{35}\text{S}$ -GTP-γ-Sと37°C、60分間インキュベートした。ガラスフィルター(Whatman GF/F)で吸引ろ過して反応を停止し、フィルター中の放射活性を測定した。

##### (3) $^{32}\text{P}$ -4-azidoanilido-GTPの結合

ThomasとPfeufferの方法に従って $^{32}\text{P}$ -4-azidoanilido-GTPを合成した。海馬膜分画を25 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、および1 mM EDTAを含む50 mM Hepes緩衝液(pH 7.4)中で $^{32}\text{P}$ -4-azidoanilido-GTPと反応させた後、SDSポリアクリラミドゲル電気泳動により解析した。

#### (4) 鎮痛試験

ddy系雄性マウスの腹腔内に1%酢酸を投与することにより誘発された苦悶反応(writhing)回数を10分間計測した。

#### (5) 慢性投与動物の作成

モルヒネの投与量を1日目から5日目まで2.5, 5, 10, 60, 80 mg/kgと增量し、最後の2日間は100 mg/kgを投与してモルヒネ慢性投与マウスを作成した。クロニジン慢性投与マウスの作成は、クロニジン(5 µg/ml)を飲水に溶解し、2週間自由摂取させることにより行った。

#### (6) GTPase活性の測定

大脳皮質膜分画を100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTTを含む10 mM Tris-HCl緩衝液で $\gamma$ -<sup>32</sup>P-GTPと37°Cで30分間反応させ、遊離した<sup>32</sup>Pを測定した。

#### 【実験結果】

- (1) 海馬切片をオピオイドペプチドである[D-Ala, D-Leu]エンケファリン(DADLE)と反応させた後、膜分画を調製し、<sup>35</sup>S-GTP- $\gamma$ -Sの結合を調べた結果、その結合はDADLEにより濃度依存的に抑制された。この抑制作用はオピオイド受容体アンタゴニストのナルトリンドールにより拮抗された。
- (2) DADLEは<sup>32</sup>P-4-azidoanilido-GTPの43 kDaと33~34 kDaのGTP結合蛋白への結合を抑制した。
- (3) フッ化アルミニウムの投与によりモルヒネの鎮痛作用は減弱した。
- (4) フッ化アルミニウムの併用投与によりモルヒネおよびクロニジンの耐性形成が増強された。また、モルヒネとクロニジンの交叉耐性もフッ化アルミニウム投与により増強された。
- (5) モルヒネおよびクロニジン耐性獲得時において脳のGTPase活性の上昇がみられた。このGTPase活性の上昇に対し、フッ化アルミニウムの併用投与は影響を及ぼさなかった。
- (6) 脳膜分画中の43 kDa蛋白への<sup>32</sup>P-4-azidoanilido-GTPの結合がモルヒネ耐性マウスにおいて減少していた。また、フッ化アルミニウム投与により41 kDa蛋白への<sup>32</sup>P-4-azidoanilido-GTPの結合が観察された。

#### 【結論】

モルヒネは、脳のGTP結合蛋白のGDP-GTP交換反応を抑制することにより鎮痛作用を発揮することが示唆された。また、モルヒネ耐性時にはGTP結合蛋白のGTPase活性の上昇とGDP-GTP交換反応の低下が生じており、鎮痛作用の減弱と深く関与していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

モルヒネの耐性獲得機構に関して現在まで多くの研究が行われており、モルヒネの運用によるオピオイド受容体の変化、細胞内情報伝達系の変化あるいは蛋白合成の変化が報告されていたが、未だ明確な結論は得られていない。本研究は、モルヒネの急性および慢性投与によるGTP結合蛋白の活性の変化について調べ、耐性獲得機構との関連について検討を行ったものである。

その結果、オピオイドペプチドである[D-Ala, D-Leu]エンケファリンが、ラットの脳海馬の43 kDaと33~34 kDaのGTP結合蛋白への<sup>35</sup>S-GTP- $\gamma$ -Sの結合を濃度依存的に抑制することを示し、オピオイドがGTP結合蛋白のGDP-GTP交換反応を阻害することを明らかにした。また、GTP結合蛋白を活性型に維持するフッ化アルミニウムのマウスへの投与によりモルヒネの鎮痛作用が減弱されること、さらにフッ化アルミニウムとモルヒネとの併用によりモルヒネの耐性形成が増強されることを示した。モルヒネの耐性獲得時において脳のGTPase活性の上昇と43 kDaのGTP結合蛋白への<sup>32</sup>P-4-azidoanilido-GTPの結合が減少していることを示した。これらの結果より、モルヒネ耐性時における鎮痛作用の減弱に、GTP結合蛋白のGTPase活性の上昇とGDP-GTP交換反応の低下が深く関与していることが示唆された。

本論文は、モルヒネ慢性投与による耐性獲得時において脳のオピオイド受容体と共にGTP結合蛋白の活性の低下がおきていることを示したものであり、モルヒネ耐性獲得機構におけるGTP結合蛋白の関連を強く示唆するもので、博士（歯学）の学位に値するものと認める。