



Title	Inhibition by Naloxone of Promoter Activity of the Neurofilament Gene in SK-N-SH cells
Author(s)	牛, 三勇
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41776">https://hdl.handle.net/11094/41776</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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	牛 三 勇
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 3 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 3 月 2 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 医 学 系 研 究 科 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 名	Inhibition by Naloxone of Promoter Activity of the Neurofilament Gene in SK-N-SH cells (ナロキソンによるニューロフィラメント遺伝子の転写抑制作用)
論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授 三 木 直 正  (副 査) 教 授 倉 智 嘉 久 教 授 吉 川 和 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

モルヒネの反復投与により依存・耐性が生じることが知られているが、そのメカニズムは不明である。依存・耐性形成には、連続した薬物の投与が必要であることから、脳内の遺伝子発現が関わっている可能性が示唆されている。ニューロフィラメントは神経細胞の軸索輸送や形態支持など様々な役割を果たしている。慢性的モルヒネ投与により、ラット腹側被蓋野のニューロフィラメントレベルの減少が報告されているが、その作用機序は不明である。今回、ニューロフィラメントプロモータをもつレポーター遺伝子を培養細胞に導入し、モルヒネおよびナロキソンによる転写活性の変化を調べた。また、ナロキソン処理後の細胞内カルシウム濃度の変化についても検討した。

#### 【方法】

マウスニューロフィラメント遺伝子のプロモータ領域を含む1.7 Kbをルシフェラーゼ遺伝子と結合させ、pGL-3-enhancer vector に挿入した。また、ラット CaMII プロモータの0.74Kb断片も同じベクターに挿入した。SK-N-SH細胞にベクターをトランスフェクトし、各種試薬の存在下でインキュベートした後に、プロモータ活性をルシフェラーゼ活性として測定した。培養細胞内に Fura-2 をあらかじめ取り込ませ、各種試薬の添加後に、細胞内カルシウムレベルの変化を、Fura-2-Ca<sup>2+</sup> 蛍光強度として測定した。

#### 【成績】

1. オピオイドアゴニストおよびアンタゴニストを SK-N-SH 細胞に添加後、ニューロフィラメントプロモータ活性を測定したところ、ナロキソンにのみ抑制効果が認められ、 $10^{-5}M$  で55%の抑制が見られた。オピオイドアゴニストのモルヒネ、DAMGO、DPDPE、U50488の $10^{-5}M$  では抑制は認められなかった。また、アンタゴニストのレバロルファン $10^{-5}M$  でも、抑制は認められなかったが、ナルトレキソン $10^{-5}M$  では、約20%の抑制が見られた。なお、ナロキソン添加により SK-N-SH 細胞の形態変化や細胞死は認められなかった。また、ナロキソンは、カルモジュリンII (CaMII) プロモータ活性を抑制しなかった。
2. PC12細胞と N18TG-2細胞を用いて同様の実験を行った。両細胞に導入したニューロフィラメントプロモータ活性は、ナロキソンおよびモルヒネ $10^{-5}M$  により抑制されなかった。
3. ナロキソンによる抑制作用に関係する部位を調べるために、ニューロフィラメントプロモータ領域の種々の欠損遺伝子を SK-N-SH 細胞に導入し、ナロキソン $10^{-5}M$  を添加し、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ニュー

ロフィラメントプロモータ領域の-328から-101までの領域がナロキソン抑制に関与していることが分かった。

4. ナロキソンによるニューロフィラメントプロモータ抑制機序を調べるために、SK-N-SH細胞内カルシウムの変化を調べた。ナロキソン $10^{-5}$ Mで、細胞内カルシウムの増加が見られた。また、この増加はモルヒネにより抑制されなかった。

5. モルヒネ投与によるCaM遺伝子発現の変化を調べたところ、PC12細胞とマウス大脳皮質および副腎で、CaM mRNAが用量依存的に増加した。この変化はナロキソンにより抑制された。

#### 【総括】

ニューロフィラメントプロモータを神経由来の培養細胞にトランスフェクトして、モルヒネとナロキソンによるプロモータ活性への影響を調べた。予想に反して、モルヒネでは影響されず、ナロキソンにより阻害されることを見出した。ナロキソンは、モルヒネの特異的な拮抗薬であるが、固有の薬理作用もあることが知られている。この実験では、ナロキソン阻害が認められたのは、SK-N-SH細胞のみで、PC12やN18TG-2細胞では見られなかったことより、どの神経細胞にでも作用する訳ではないことが分かる。また、細胞内カルシウムを測定したところ、SK-N-SH細胞においてのみ、ナロキソンにより細胞内カルシウム上昇が見られた。以上のことより、SK-N-SH細胞には、ナロキソンに反応する受容体あるいは特異的な結合蛋白質が存在し、細胞内カルシウム上昇を介して、ニューロフィラメント遺伝子発現の抑制を引き起こしている可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

ナロキソンは、モルヒネのアンタゴニストとして使用されているが、それ自身には薬理活性はほとんどないと言われている。

本論文では、ナロキソンがSK-N-SH細胞において、ニューロフィラメント(NF68)プロモータ活性を抑制することを見出し、そのメカニズムを解析した。オピオイドアゴニストおよびアンタゴニストをSK-N-SH細胞に処理したところ、ナロキソンにのみNF68プロモータ活性を抑制する作用が認められた。この抑制作用は、モルヒネ及びオピオイドのアゴニストにより回復しなかった。PC12細胞とN18TG-2細胞に導入したNF68プロモータ活性は、ナロキソンおよびモルヒネにより抑制されなかった。さらに、NF68プロモータ領域の-328から-101までの領域がナロキソン抑制に関与していることを明らかにした。また、ナロキソンは、SK-N-SH細胞内においてのみ、細胞カルシウムを増加させた。この増加はモルヒネにより抑制されなかった。この研究により、ナロキソンが、特定の細胞において、オピオイド受容体を介さない独自の薬理作用を持つことが明らかとなった。さらに、これには細胞内カルシウムイオンが関係している可能性を示した。本研究は、ナロキシソンの新しい薬理作用の解明に重要な情報を提供することが期待され、学位に値するものと認める。