The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of a factor involved in morphine reverse torelance
Author(s)	池本, 光志
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42840
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【91】

氏　　名	池　本　光　志（いけもとみつし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15863　号
学位授与年月日	平成13年2月13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	Identification of a factor involved in morphine reverse torelance （モルヒネ逆耐性因子の同定）
論文審査委員	（主査） 教　授　三木　直正 （副査） 教　授　岡野　栄之　　教　授　遠山　正彌

論文内容の要旨

〔目的〕

マウスに麻薬・覚醒剤などの薬物を反復投与すると、投与薬物が生体から完全に消失した後においても一部の効果に対して感受性の増大が持続して観察される。この現象は、逆耐性現象と称されており、特に麻薬・覚醒剤などの反復投与時における動物の自発運動活性に対して顕著に出現する。しかしながら、逆耐性現象に関与する因子と逆耐性現象の分子機序は不明である。本研究では、モルヒネ逆耐性現象の分子機序の一端を解明することを目的として、モルヒネ逆耐性現象に関与する因子の同定とその中枢神経系における生理機能について検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

(1) モルヒネ逆耐性現象に関与する脳内部位の検索

脳組織切片上で、転写因子群のDNA結合活性とその局在を検出する新技術 *in situ* DNA Protein Binding 法を用いて、モルヒネ反復投与時に遺伝子発現変化が顕著である脳内部位を検索した。その結果、cAMP Response Element（CRE）に対するDNA結合活性の変化が、扁桃体においてモルヒネ反復投与終了後14日以上持続していた。

(2) Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine（SPARC）遺伝子の同定

モルヒネ反復投与マウス群および生理食塩水反復投与マウス群の扁桃体から抽出したmRNAを用いてサブトラクションクローニングを行い、モルヒネ反復投与時に発現が増加する遺伝子群の単離・同定を試みた。その結果、分泌性抗接着糖蛋白質をコードするSPARC（別名 Osteonectin/BM-40）遺伝子を単離・同定した。免疫組織化学法および *in situ* hybridization 法を用い、陽性シグナル数を計測することにより、SPARC mRNA量ならびに蛋白質量を半定量的に解析したところ、モルヒネ反復投与を施した場合のみに、扁桃体外側基底核におけるSPARC mRNA量ならびに蛋白質量の有為な増加が観察された（mRNA: 181±11%，蛋白質: 148±25%，$n=4$）。これらの増加は、モルヒネの拮抗薬であるナロキソンの同時投与により完全に抑制された。

(3) 扁桃体外側基底核におけるSPARC遺伝子発現と逆耐性現象との相関性

ddYマウス（6週令、雄）にモルヒネ反復投与を施して作成したモデルマウスを用いて、扁桃体外側基底核におけるSPARC mRNA量と逆耐性現象との間の相関性について検討した。まず最初に、カイネティクスRT-PCR法を用い、モルヒネ反復投与マウスの扁桃体外側基底核におけるSPARC mRNA量の経時変化を定量的に解析した。SPARC mRNA量は、モルヒネ最終投与から16時間後（469±47%，$n=4$）に最大になり、休薬3日目（214±15%，

$n=4$）から少なくとも14日目（210±23%，$n=4$）まで約2倍量を維持していたが、休薬28日目にはSPARC mRNA量の増加は認められなかった。一方、逆耐性現象は、休薬7日目および14日目に観察されたが、28日目には観察されなかった。更に、モルヒネに対する感受性が異なるマウスを用いて、モルヒネ反復投与時の扁桃体外側基底核におけるSPARC mRNA量を定量した。逆耐性現象を示すC57BL/6系およびddY系マウスでは、モルヒネ反復投与群において有為なSPARC mRNA量の増加が認められた（C57BL/6: 306±31%，$n=3$，ddY: 469±46%，$n=4$）。しかし、逆耐性現象を全く示さないDBA2系マウスでは、モルヒネ反復投与群におけるSPARC mRNA量の増加は認められなかった（119±10%，$n=4$）。

(4) 生理活性型Trx-SPARCキメラ蛋白質の調製

チオレドキシン蛋白質（Trx-Tag）のC末端側にSPARC蛋白質全長を結合させたキメラ蛋白質（Trx-SPARC）を大腸菌AD494(DE3）によって大量に発現させる系を確立した。ニッケルキレートカラムおよびゲルろ過カラムの2段階精製により、CBB染色にて純度95%以上のTrx-SPARCを得た。このTrx-SPARCは、含有エンドトキシン量が極微量（<100 pg/ml）であること、C6Bu-1，N18TG-2，NG108-15神経培養細胞に対して抗接着活性（ED50＝1.6μM）を示すことを確認した。

(5) Trx-SPARC蛋白質を脳内微量注入したマウスにおける逆耐性現象の惹起

ddYマウス（7週令、雄）の両側の扁桃体外側基底核にガイドカニューレ挿入手術を施し、術後7日目に試料溶液を脳内微量注入した。術後9日目にモルヒネ単回投与（100mg/kg）を行って自発運動量を測定したところ、Trx-SPARCを注入したマウス群では、逆耐性現象が3時間以上にわたり顕著に誘導された。一方、対照群として、試料溶媒単独、Trx-Tagおよび熱失活（100℃、30分間）させたTrx-SPARCをそれぞれ脳内微量注入したマウス群では、逆耐性現象は全く認められなかった。また、逆耐性現象は、Trx-SPARC脳内微量注入量およびモルヒネ投与量それぞれにおいて用量依存的に顕著となった。

〔総括〕

モルヒネ逆耐性現象は、モルヒネ反復投与時に扁桃体外側基底核において、分泌性抗接着性糖蛋白質SPARCの発現量が増加することにより惹起されることを見い出した。SPARC蛋白質は、抗接着活性を有することならびにシナプス形成に関与するSC1蛋白質と高い相同性があることなどから、扁桃体における神経シナプス機能を調節することによりモルヒネ逆耐性を引き起こす可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

マウスにモルヒネを反復投与すると、強度な耐性・依存性を生じることが知られている。また、耐性・依存性の発現には遺伝子発現を伴うことも明らかにされているが、その分子機序の詳細に関しては依然不明な点が多い。

本研究は、モルヒネ反復投与により自発運動活性の感受性が亢進する現象（以下、逆耐性現象と称する）を誘導する因子の単離・同定を行い、モルヒネ逆耐性現象の分子機序の解明を試みたものである。

本研究により、分泌性抗接着糖蛋白質であるSecreted Protein Acidic and Rich in Cysteine（SPARC）のマウス扁桃体外側基底核における遺伝子発現変化と逆耐性現象の経時変化が強く相関すること、さらには、扁桃体外側基底核にSPARC蛋白質を脳内微量投与したマウスではモルヒネの単回投与により逆耐性現象が出現することが明らかにされた。

これらの知見は、SPARCが逆耐性現象を誘導する主要な因子である可能性を初めて示したものであり、逆耐性現象の分子機構の実体を解明する上で大変重要な成果である。従って本研究は、学位に値するものと認める。