

論文の内容の要旨

論文題目 「Sialorphan potentiates effects of [Met⁵]enkephalin without toxicity by action other than peptidase inhibition」

(オピオイド受容体およびペプチダーゼに対する
シアロルフィンの作用に関する研究)

学位申請者 姜 卓義

キーワード： メチオニン、シアロルフィン、ペプチダーゼ阻害剤、
抗侵害作用、結合親和性

目的：これまでの研究からアマスチン、カプトプリル、ホスホラミドンの3種類のペプチダーゼ阻害剤 (PI) の混合物がメチオニンエンケファリン (ME) の抗侵害作用を有意に増加させることが知られている。近年、2つの内因性ペプチダーゼ阻害物質のシアロルフィンとオピオルフィンがそれぞれラットとヒトの唾液から分離された。シアロルフィンあるいはオピオルフィン投与によりオピオイド受容体の活性化を介して抗侵害作用を示すことが報告されている。しかし、内因性ペプチダーゼ阻害物質による抗侵害作用のメカニズムは不明な点が多い。本研究では、細胞、摘出標本、動物個体を用いてシアロルフィンのオピオイド受容体に対する作用を明らかにすることを目的とした。すなわち、ME によるマウス輸精管収縮の抑制作用、ラット髄腔内 ME 投与による抗侵害作用、およびラット髄腔内 ME 投与による神経毒性、などに対するシアロルフィンの効果について3種のPIを様々な組み合わせで併用し比較検討した。また、ラジオリガンド受容体結合アッセイを用いて、 μ -オピオイド受容体へのMEの結合親和性または最大結合量に対するシアロルフィンの効果を検討した。

方法：7週齢 ICR JCL マウス (体重 30-40 g) の輸精管を電気刺激のために調製した。 δ -, μ -, κ -オピオイド受容体優位の摘出マウス輸精管標本の電気刺激による収縮に対するMEの抑制割合について、Ratio of potency を用いて評価した。7週齢 Wistar 系雄性ラット (体重 180~220 g) の髄腔内へ胸腰部レベルに頭側から尾側へ留置カテーテルを挿入した。明らかな運動麻痺などが観察されなかったラットを実験に供試した。アマスチン、カプトプリル、ホスホラミドンならびにシアロルフィンを様々な組み合わせで調整したペプチダーゼ阻害物質混合物で前処理し、Tail Flick 法を用いて ME による抗侵害を評価した。また、放射性物質を用い受容体結合アッセイを行い、[D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]enkephalin (DAMGO) の結合親和性 (Kd) または最大結合能 (Bmax) に対するシアロルフィンの効果を確認

した。

結果：シアロルフィン単独 (1×10^{-6} M- 2×10^{-4} M) を前処理した結果、ME の輸精管運動への抑制効果を用量依存的に増強した。PI (各 1×10^{-6} M) 任意の組み合わせにおいても、シアロルフィン (1×10^{-4} M) は ME の輸精管運動への抑制効果を増強した。3 種 PI (各 5×10^{-6} M) 存在下でシアロルフィン (1×10^{-4} , 2×10^{-4} M) は用量依存的に ME の輸精管運動への抑制効果を増強した。ペプチダーゼを完全に阻害する PI (各 2×10^{-5} M) 存在下においてもシアロルフィン (2×10^{-4} M) は ME の輸精管運動への抑制効果を増強した。3 種 PIs (各 10 nmol) 非存在下において、シアロルフィン (400 nmol) 髄腔内投与は ME (3 nmol) 誘発性の抗侵害作用を増強しなかった。3 種 PIs (各 10 nmol) 存在下において、シアロルフィン (100~400 nmol) 髄腔内投与は ME (3 nmol) 誘発性の抗侵害作用を有意かつ用量依存的に増強させた。シアロルフィン非存在下でのペプチダーゼ阻害剤 (各 10 nmol) の任意の 2 つの組み合わせによる抗侵害作用の程度は、シアロルフィン (200 nmol) の存在下のどの場合よりも小さかった。シアロルフィン (200 nmol) と 3 種のペプチダーゼ阻害剤 (それぞれ 10 nmol) の混合物を前処理すると、ME (10 nmol) 誘発性の抗侵害作用が約 100 倍に増強されたが、運動機能障害などの毒性は認められなかった。3 種 PIs (各 10 nmol) 存在下において、シアロルフィン (200, 400 nmol) 髄腔内投与による ME (3 nmol) 誘発性の抗侵害作用はオピオイド受容体非選択的アンタゴニスト naloxone、 μ -オピオイド受容体選択的アンタゴニスト D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP)、 δ -オピオイド受容体選択的アンタゴニスト naltrindole により有意に拮抗された。また、3 種 PIs (各 10 nmol) 存在下において、シアロルフィン (400 nmol) 髄腔内投与による ME (1 nmol) 誘発性の抗侵害作用に対する増強作用は、 μ -オピオイド受容体サイレントアロステリックモジュレーター (BMS-986124, 1-5 nmol) 髄腔内投与により減弱された。ラジオリガンド受容体結合アッセイの結果、シアロルフィンは DAMGO の結合親和性や最大結合能に影響を与えなかった。

結論：これらの結果から、シアロルフィンはペプチダーゼ阻害以外のメカニズムにより毒性を伴わずに ME の抗侵害作用を増強し、 μ -オピオイド受容体への ME の親和性には影響を及ぼさないことが示された。