

- 8) 下山直人：フェンタニルはこう使う、診療アップデート(日経メディカル編)、日経BP社、p223-224,2005,11
- 9) 下山直人、下山恵美：モルヒネが効きにくい痛みとその対策、患者の疑問に答えるオピオイドの要点(下山直人編著)、真興交易株式会社医書出版部、p85-97,2005-11
- 10) 下山直人、下山恵美：痛みのマネジメント、がん緩和ケアに関するマニュアル(武田文和編著：厚生労働省、日本医師会編)、日本ホスピス・緩和ケア研究振興財団、p11-31,2005
- 11) 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：麻酔科医がペインクリニシャン、そして緩和ケア医となって、日本臨床麻酔学会誌、26(1):18-24,2005
- 12) 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：がん治療における緩和ケアチームの役割、癌の臨床、51(10):781-786,2005
- 13) 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：オピオイドスイッチングにおけるオキシコドン徐放錠の役割、がん患者と対症療法、16(2):33-38,2005
- 14) 下山直人：自分に影響を与えた痛みのエピソード、がん患者と対症療法、16(2):69-74,2005
- 15) 下山直人：骨転移治療の新たな展開序、緩和医療学、7(4):349-350,2005
- 16) 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：坐薬、口腔粘膜吸収薬、吸入薬—その他、最近の開発薬—、Drug Delivery System、20(5):538-542,2005
- 17) 高橋秀徳、村上敏史、下山直人：緩和医療、モダンフィジシャン、25(10):1289-1295,2005-10
- 18) 下山直人、中田稚子、村上敏史、高橋秀徳、中山理加、首藤真理子、下山恵美：モルヒネは現在でもがん性疼痛治療におけるスタンダードである、日本臨床麻酔学会誌、25(5):526-532,2005-9
- 19) 下山恵美、下山直人：がん性疼痛のメカニズム、呼吸器科、7(2):159-164,2005
- 20) 下山直人、下山恵美：神経因性(障害性)疼痛治療法—基礎と臨床—、癌の臨床、51(3):153-157,2005-3
- 21) 下山直人、村上敏史、高橋秀徳：疼痛コントロール、治療、87(4):1571-1574,2005-4
- 22) 武田文和、下山直人：がん疼痛緩和対策のアドバイス、がん患者と対症療法、16(1):69-71,2005
- 23) 村上敏史、高橋秀徳、下山直人：突出痛とレスキュードーズ、薬局別冊、56(2):17-24,2005
- 24) 下山直人、村上敏史、高橋秀徳、笹子三津留：がんの Informed Consent の最近の変化、癌と化学療法、32(2):152-155,2005-2
- 25) 市田智彦、高橋秀徳、下山直人：WHO ラダー第2段階としての役割、緩和医療学、7(1):32-38,2005

## 2. 学会発表

特記すべきことなし。

- 1) Shimoyama N: “A multi-center study to determine the efficacy and safety of strontium ( $^{89}\text{Sr}$ ) chloride for palliation of painful bony metastases in cancer patients”, 11<sup>th</sup> World Congress on Pain International Association for the Study of Pain, 2005.8.24, Sydney
- 2) 下山直人：がん治療に於ける支持療法の意義、「がん治療における緩和ケアチームの役割」、第三回日本臨床腫瘍学会、シンポジウム、2005.3.5、横浜
- 3) 下山直人：トランスレーショナルリサーチと薬理学の役割、「EBMに基づく緩和医療実践のためのトランスレーショナルリサーチ」、第78回日本薬理学会年会、シンポジウム、2005.3.22、横浜
- 4) 下山直人：がん疼痛対策の科学ー現場で活かす基礎と臨床の進歩ー「オピオイドの選択 いつ・どのように・なぜ」、第43回日本癌治療学会総会、シンポジウム、2005.10.25、名古屋

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

## テーラーメイド疼痛治療法開発のための ミューオピオイド受容体遺伝子多型解析、相関解析

分担研究者：井手 聡一郎

（広島国際大学薬学部 神経薬理学分野）

---

### 【研究要旨】

本研究では、日本人のゲノムサンプルを用い、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子（*OPRM*）の遺伝子多型の解析を行った。日本人 *OPRM* 上では、翻訳領域に見られる多型は A118G のみであったが、非翻訳領域には数多くの新規遺伝子多型が確認された。また、連鎖不平衡解析により、*OPRM* 内の多型は4つの連鎖ブロックに別れ、特にイントロン3から3'非翻訳領域にかけて、有意な連鎖不平衡の関係にあることが明らかとなった。さらに、覚醒剤依存並びに覚醒剤精神病様症状との相関性を検討したところ、その脆弱性との間に有意な相関性が見られた。本研究から、 $\mu$  オピオイド受容体の遺伝子多型が、なんらかの機能的な変化をもたらし、鎮痛・依存などの作用に個人差が生じる機構に関与していることが示唆された。

---

### A. 研究目的

$\mu$  オピオイド受容体は、内因性のオピオイドペプチド並びにモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬が、鎮痛作用並びに依存形成、耐性形成、禁断症状といった様々な副作用を発現する上で、重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。さらに最近では、アルコールや覚醒剤などの麻薬性鎮痛薬以外の薬物に対する依存や精神疾患の一部にも  $\mu$  オピオイド受容体の関与が知られてきている<sup>1,4,7)</sup>。

一方、ヒトゲノム配列の解析が進められるにつれ、多くの遺伝子多型の存在とそれら多型の一部がタンパク質の機能や発現に影響を与えることが報告されている。 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子（*OPRM*）上に存在する多型が、麻薬性鎮痛薬及び他の薬物による鎮痛作用並びに依存の形成に影響を与える可能性は十分に考えられる。 $\mu$  オピオイド受容体の遺伝子多型を解析することで、これら  $\mu$  オピオイド受容体を介した鎮痛・依存などの作用に個人差が生じる機構

を解明する有用な知見が得られることが期待される。そこで本研究では、日本人健常人のゲノムサンプルを用い  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型の解析を行うと共に、近年、日本国内で深刻化している覚醒剤（メタンフェタミン：MAP）依存並びに覚醒剤精神病様症状との相関性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 研究対象

ゲノムサンプルは、日本人の健常人、並びに MAP 依存患者（ICD-10-DCR: F15.2 and F15.5）より採取した血液よりフェノール抽出法を用いて精製した。血液を採取する際に、全ての対象者に文書による同意を得て、東京都精神医学総合研究所及び関連施設の倫理委員会により承認された研究指針に沿って実験を行った。集めたサンプルの平均年齢（35.9 ± 1.0）、性別（男：女 = 3：1）、並びに居住地域分布は健常人と MAP 依存患者群で差が見られなかった。

### 2. 多型解析

まず、健常人 44 サンプルを用いて全エクソン領域（exon 1-4）、開始コドンより 5' 上流側 5.5 kbp、終止コドンより 3' 下流側 14 kbp、及び intron 2 全領域と intron 1, 3 の繰り返し配列を含む一部の領域に関して PCR-sequence 法を用いて解析を行った（Fig.1）。この解析において、高頻度で多型が見られた領域に関して、さらに例数を追加し解析を行い、多型頻度を推定した。相関解析においては、健常人 179 サンプル

及び MAP 依存患者 128 サンプルに関して遺伝子多型の解析を行った。また、A118G 並びに IVS2+G691C の二つの SNP に関しては、これまでの多くの報告と異なる多型頻度が見られたため、さらに健常人の例数を増やして解析を行った。

### 3. 覚醒剤精神病様症状における症例分類解析

臨床情報を基に MAP 依存患者を以下の 4 項目に関してグループに分け、解析を行った。

（1）Latency of psychosis（覚醒剤の使用開始から妄想・幻覚が発症するまでの期間）：3 年以内に発症（n = 54、平均年数 0.83 年）、3 年以上経過後に発症（n = 53、平均年数 9.98 年）。（2）Prognosis of psychosis（覚醒剤の利用停止後、妄想・幻覚が持続する期間）：1 ヶ月以内に消失（n = 72）、1 ヶ月以上持続（n = 43）。（3）Spontaneous relapse（再燃性の有無）：再燃性が見られた群（n = 86）、見られなかった群（n = 42）。

（4）Poly drug abuse（多剤乱用）：メタンフェタミンの単独乱用群（n = 36）、アルコールやシンナー等に対しての乱用歴があった群（n = 49）、モルヒネ・ヘロイン・大麻等に乱用歴があった群（n = 43）。また、MAP 依存患者のうち、各項目に関して臨床情報が得られなかった患者は、本解析より除外した。

### 4. 統計解析

健常人と MAP 依存患者のサンプル間における多型頻度の有意差検定は、

Chi-square test を用いて行い (有意水準  $\alpha=0.05$ )、Bonferroni 補正を行った。また、検定を行った全ての多型に関しては Hardy-Weinberg 平衡にあることを確認した。連鎖不平衡 (LD) の解析並びにハプロタイプの推定には Arlequin program (<http://anthro.unige.ch/arlequin>) を用い、LD block の推定には HaploBlockFinder Version 0.7 (<http://cgi.uc.edu/cgi-bin/kzhang/haploBlockFinder.cgi>) を用いて行った。連鎖不平衡の程度を表す数値である  $D$  値並びに  $r^2$  値に関しては、定義式に基づき、excel プログラ

ムで計算した。

## C. 研究結果

### 1. 日本人健康人における *OPRM* 遺伝子多型

健康人 44 サンプルを用いた解析により、既に報告のあった 3 つの一塩基多型 (SNP) を含め 98 の遺伝子多型を見いだした。日本人においては、翻訳領域の存在する多型は A118G (Asn40Asp) のみであり、これまで欧米人で報告されていた他の翻訳領域に存在する多型 (e.g. C17T) 2,3,5,6,10) は見られなかった。

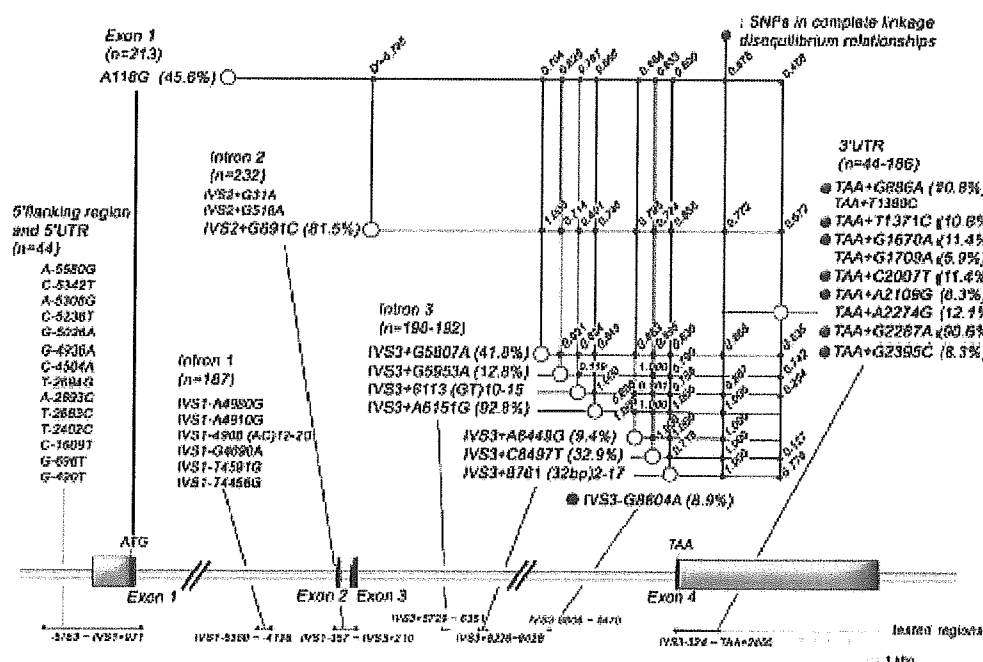


Figure 1 日本人健康人における *OPRM* 遺伝子多型の多型頻度と連鎖不平衡 (LD)。図中ゲノム模式図の下に、今回解析した領域を示している。各多型横の括弧内の数値は多型頻度を、図中の直線の交差している点の右肩の数値は  $D$  値を表している。TAA+2400 から TAA+13830 の間の多型は、例数が少ないため示していない。

		D'									
	Locus	A118G	IVS2 +G691C	IVS3 +G5807A	IVS3 +G5953A	IVS3 +A6151G	IVS3 +A8449G	IVS3 +C8497T	TAA +A2109G	TAA +A2274G	TAA +G2287A
r <sup>2</sup>	A118G		0.795	0.704	0.626	0.866	0.884	0.633	0.875	0.458	0.890
	IVS2 +G691C	0.125		1.000	0.714	0.746	0.795	0.775	0.772	0.672	0.795
	IVS3 +G5807A	0.453	0.134		0.921	0.849	0.883	0.895	0.868	0.535	0.883
	IVS3 +G5953A	0.052	0.341	0.102		0.023	0.009	1.000	0.034	0.742	0.009
	IVS3 +A6151G	0.054	0.201	0.047	0.000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	IVS3 +A8449G	0.069	0.284	0.063	0.000	0.001		1.000	1.000	1.000	0.967
	IVS3 +C8497T	0.159	0.062	0.291	0.069	0.037	0.046		1.000	0.763	1.000
	TAA +A2109G	0.061	0.241	0.055	0.001	0.892	0.901	0.042		1.000	1.000
	TAA +A2274G	0.024	0.266	0.030	0.484	0.011	0.014	0.035	0.014		1.000
	TAA +G2287A	0.070	0.284	0.063	0.000	0.800	0.934	0.046	0.989	0.014	

Table 1 *OPRM* 遺伝子内の連鎖不平衡

明灰色のカラムは  $D$  値  $>0.7$  で有意であったもの、暗灰色のカラムは  $D$  値並びに  $r^2$  値共に 0.7 以上で有意な連鎖不平衡であったものを示している。

また、さらに高頻度の多型に関しサンプル数を増やして検討したところ、日本人でも見られた多型の頻度も欧米人と比較して有意に異なるものであった（日本人の多型頻度、A118G 45.6%、IVS2+G691C 81.9%。欧米人の多型頻度 6-10)、A118G 7.5・25.8%、IVS2+G691C 42.5・53.3%)

(Fig.1)。また、intron 3 内の一部多型と 3' 非翻訳領域内に存在する一部多型で、ほぼその発生が一致する完全連鎖不平衡の関係にある SNP 群が見いだされ、約 55kbp にわたって存在する 27 の多型が完全に同時に見られた。さらに、それら完全連鎖不平衡の関係にある SNP 群を代表した TAA+A2109G を含めた、多型頻度 5% 以上の高頻度 SNP に関して連鎖不平衡解析を行い、 $D$  値並びに  $r^2$  値を算出したところ

(Table 1)、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子の全域にわたり広範囲で有意な連鎖不平衡が存在することが明らかとなった。さらに、これら 10 箇所の SNP データを用いた連鎖不平衡解析の結果から、*OPRM* 内には 4 つの LD block : (A) A118G を含むエクソン 1 の周辺領域、(B) IVS2+G691G を含むイントロン 2 からエクソン 3・イントロン 3 接合部下流約 5.9 kb までの全長 6.4 kb の領域、(C) IVS3+G5953A を含むエクソン 3・イントロン 3 接合部下流約 6 kb 付近の領域、(D) 他の SNP を全て含む、イントロン 3 から 3' 非翻訳領域にかけての少なくとも 23.4 kb の領域、が存在することが確認された。そこで、HaploBlockFinder Version 0.7 により推定された、それぞれの LD block を代表する 4 つの SNP に関して、相関解析を行

った。

## 2. MAP 依存患者を用いた *OPRM* 遺伝子多型の相関解析

次に MAP 依存患者のサンプルを用い解析を行ったところ、intron 2 内に存在する SNP、IVS2+G691C に関して、その

genotype 及び allele 頻度が健常人 (GG 3%, GC 31%, CC 66% : allelic frequency = 81.9%) と MAP 依存患者群 (GG 9%, GC 33%, CC 58% : allelic frequency = 74.8%) で有意に異なっていることが明らかとなった (Chi-square test,  $P=0.023$  and  $P=0.021$ ) (Table 2)。

Table 2 日本人健常人並びに MAP 依存患者における *OPRM* 遺伝子多型頻度

Locus	Control subjects		MAP-dependent/psychotic subjects			
	Genotypic data number	Allelic data allelic frequency number	Genotypic data number	Allelic data allelic frequency P value	number	P value
<b>A118G</b>	A 67 (0.31) A/G 99 (0.46) 45.3% G 47 (0.22) total 213	A 233 (0.55) G 193 (0.45) total 426	A 49 (0.38) A/G 54 (0.43) 40.6% G 25 (0.19) total 128	P = 0.43	A 152 (0.59) G 104 (0.41) total 256	P = 0.23
<b>IVS2 +G691C</b>	G 6 (0.03) G/C 72 (0.31) 81.9% C 154 (0.66) total 232	G 84 (0.18) C 380 (0.82) total 464	G 12 (0.09) G/C 43 (0.33) 73.8% C 73 (0.57) total 128	P = 0.012	G 67 (0.26) C 189 (0.74) total 256	P = 0.011
<b>IVS3 +G5953A</b>	G 135 (0.75) A/G 41 (0.23) 13.1% A 3 (0.02) total 179	G 311 (0.87) A 47 (0.13) total 358	G 96 (0.75) A/G 28 (0.22) 14.1% A 4 (0.03) total 128	P = 0.70	G 220 (0.86) A 36 (0.14) total 256	P = 0.74
<b>IVS3 +A6151G</b>	A 2 (0.01) A/G 23 (0.13) 92.5% G 154 (0.86) total 179	A 27 (0.08) G 331 (0.92) total 358	A 1 (0.01) A/G 26 (0.20) 89.1% G 101 (0.79) total 128	P = 0.21	A 28 (0.11) G 228 (0.89) total 256	P = 0.15

さらに、これら MAP 依存患者の臨床情報を基に覚醒剤精神病の発生時期・持続期間・再燃性、さらに多剤乱用に関して分類して、解析を行った (Table 3)。まず覚醒剤使用から妄想・幻覚を生じるようになるまでの期間 (三年以内 ( $n=54$ )、それ以上 ( $n=53$ )) で分類したところ、その期間が三年以内の群において健常人と比較し 3 つの SNP (A118G, IVS2+G691C and IVS3+A6151G) においてその多型頻度に有

意な差が見られた。次に覚醒剤の使用を止めてからも妄想・幻覚が続いた期間 (1 ヶ月以内 ( $n=72$ )、1 ヶ月以上 ( $n=43$ )) で分類したところ、1 ヶ月以内に妄想・幻覚が起こらなくなった群において健常人と比較して、IVS2+G691C の多型頻度に有意な差が見られた。さらに、再燃性の有無 (有 ( $n=86$ )、無 ( $n=42$ )) に関して分類したところ、再燃性が存在する群で健常人と比較して

SNP IVS2+G691C において多型頻度に有意な差が見られた。これらの分類で有意であった群は、いずれも健常人と比較して多型頻度が少なかった。最後に、多剤乱用を指標として分類した。モルヒネ、ヘロイン、大麻など、他の薬物の乱用歴がある群(n=43)並びにアルコールやシンナーなどに対して乱用歴を有する群(n=49)と比較して、

MAP にのみ乱用歴がある患者群(n=36)において、健常人と比較して2つの SNP (IVS2+G691C and IVS3+C8497T)の多型頻度は有意に異なっていた。さらにこれらの解析に関して、Bonferroni 補正を行ったところ、覚醒剤の使用停止から妄想・幻覚が持続する期間においては、依然として有意な相関性が確認された。

Table 3 覚醒剤精神病様症状における分類と *OPRM* 遺伝子多型との相関解析

Locus	Control subjects		MAP-dependent/psychotic subjects					
	number	frequency	group 1		group 2		group 3	
			number	frequency	number	frequency	number	frequency
(1) Latency of Psychosis			< 3 years			≥ 3 years		
A118G	A	67 (0.31)	25 (0.46)		20 (0.38)			
	A/G	99 (0.46) 45.3%	24 (0.44) 31.5%	P=	25 (0.47) 38.7%	P=		
	G	47 (0.22)	5 (0.09)	0.0404	8 (0.15)	0.4691		
	total	213	54		53			
IVS2 +G691C	G	6 (0.03)	6 (0.11)		5 (0.09)			
	G/C	72 (0.31) 81.9%	20 (0.37) 70.4%	P=	19 (0.36) 72.6%	P=		
	C	154 (0.66)	28 (0.52)	0.0085	29 (0.55)	0.0394		
	total	232	54		53			
IVS3 +A6151G	A	2 (0.01)	0 (0.00)		1 (0.02)			
	G/A	23 (0.13) 92.5%	15 (0.28) 86.1%	P=	7 (0.13) 91.5%	P=		
	G	154 (0.86)	39 (0.72)	0.0269	45 (0.84)	0.9060		
	total	179	54		53			
(2) Prognosis of Psychosis			transient			prolonged		
IVS2 +G691C	G	6 (0.03)	8 (0.11)		3 (0.07)			
	G/C	72 (0.31) 81.9%	27 (0.38) 70.1%	P=	13 (0.30) 77.9%	P=		
	C	154 (0.66)	37 (0.51)	0.0034	27 (0.63)	0.3303		
	total	232	72		43			
(3) Spontaneous Relapse			non-existent			existent		
IVS2 +G691C	G	6 (0.03)	6 (0.07)		5 (0.12)			
	G/C	72 (0.31) 81.9%	30 (0.35) 75.6%	P=	14 (0.33) 71.4%	P=		
	C	154 (0.66)	50 (0.58)	0.1250	23 (0.55)	0.0143		
	total	232	86		42			
(4) Poly-drug Abuse			none			easily accessible drug		
IVS2 +G691C	G	6 (0.03)	5 (0.14)		3 (0.06)		1 (0.02)	
	G/C	72 (0.31) 81.9%	11 (0.31) 70.8%	P=	15 (0.31) 78.6%	P=	18 (0.42) 76.7%	P=
	C	154 (0.66)	20 (0.56)	0.0059	31 (0.63)	0.4401	24 (0.56)	0.3801
	total	232	36		49		43	



#### D. 考察

今回の研究において、これまで報告されてきた欧米人の *OPRM* 内に存在する遺伝子多型頻度と比較し、日本人の多型頻度は大きく異なっており、あらためてそれぞれの人種を用いた多型解析の重要性を示唆する結果となった。また、*OPRM* 内には強い連鎖不平衡が存在することが新たに明らかとなり、今後、この連鎖が何らかの疾患・症状に影響を与えているのか、さらなる検討が必要である。

MAP 依存患者を臨床情報により分類し解析したところ、妄想・幻覚の発現時期、持続期間並びに再燃性の有無において、いくつかの SNP で有意な群が見られ、これらはいずれも健常人と比較して多型頻度が少なかった。このことは、メジャーアレルを持つ群の方が MAP に対して脆弱性を有することを示唆している。また、多剤乱用を形成している群は、遺伝子多型との相関性を検討したところ、MAP にのみ乱用歴がある患者において有意な差が見られた。多剤乱用を形成している群は、MAP 依存形成にいたる要因として、遺伝要因よりもむしろ環境要因の寄与が大きいのではないかと考えられる。

MAP は主にドパミン神経系を介してその作用を発現すると考えられてきた。一方、 $\mu$  オピオイド受容体は、アルコールやコカイン依存の形成に関与していることが近年の遺伝子改変マウスを用いた研究を中心として明らかにされてきており、さらにこれ

までの様々な薬理学的研究からドパミン神経を介した薬物依存形成のメカニズムとオピオイド神経系の相互作用の存在が示唆されてきた<sup>8,9,11)</sup>。本研究は、 $\mu$  オピオイド受容体の遺伝子多型がドパミン神経を介した覚醒剤依存形成に対し何らかの影響を与えることを示唆し、遺伝子多型の研究として初めて、両神経系の相互作用の存在を示唆している。

#### E. 結論

$\mu$  オピオイド受容体は薬物依存を始めとして様々な作用に関与しており、また、それらの  $\mu$  オピオイド受容体を介した作用には個人差が多く存在する。今回の研究は、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型が、薬物依存並びに覚醒剤精神病様症状に対する脆弱性と相関性を有することを示すと共に、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型による何らかの機能変化が生体内で起こっていることを示唆している。今後、 $\mu$  オピオイド受容体遺伝子多型と、オピオイドの副作用である依存並びに他の副作用との相関性、さらには主作用である鎮痛作用との相関性を検討することで、テーラーメイド疼痛治療法の開発にあたり、非常に有用な知見を提供すると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Becker, A., Grecksch, G., Kraus, J., et al.: Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient

- mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 365(4):296-302, 2002.
- 2) Bergen, A.W., Kokoszka, J., Peterson, R., et al.: Mu opioid receptor gene variants: lack of association with alcohol dependence. *Mol. Psychiatry*, 2(6):490-494, 1997.
- 3) Bond, C., LaForge, K.S., Tian, M., et al.: Single-nucleotide polymorphism in the human mu opioid receptor gene alters beta-endorphin binding and activity: possible implications for opiate addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(16):9608-9613, 1998.
- 4) Contarino, A., Picetti, R., Matthes, H.W., et al.: Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 446(1-3):103-109, 2002.
- 5) Franke, P., Wang, T., Nothen, M.M., et al.: Nonreplication of association between mu-opioid-receptor gene (OPRM1) A118G polymorphism and substance dependence. *Am. J. Med. Genet.*, 105(1):114-119, 2001.
- 6) Gelernter, J., Kranzler, H., Cubells, J.: Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol. Psychiatry*, 4(5):476-483, 1999.
- 7) Hall, F.S., Sora, I., Uhl, G.R.: Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154(1):43-49, 2001.
- 8) King, M.A., Bradshaw, S., Chang, A.H., et al.: Potentiation of opioid analgesia in dopamine2 receptor knock-out mice: Evidence for a tonically active anti-opioid system. *J. Neurosci.*, 21(19):7788-7792, 2001.
- 9) Rouge-Pont, F., Usiello, A., Benoit-Marand, M., et al.: Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: Crucial control by D2 receptors. *J. Neurosci.*, 22(8):3293-3301, 2002.
- 10) Sander, T., Gscheidel, N., Wendel, B., et al.: Human mu-opioid receptor variation and alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22(9):2108-2110, 1998.
- 11) Smith, J.W., Fetsko, L.A., Xu, R., et al.: Dopamine D2L receptor knockout mice display deficits in positive and negative reinforcing properties of morphine and in avoidance learning. *Neuroscience*, 113(4):755-765, 2002.
- F. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Ide, S., Kobayashi, H., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Tanaka, K., Shen, H., Iwahashi, K., Itokawa, M., Minami, M., Satoh, M., Ikeda, K., Sora, I.: Linkage disequilibrium and association with methamphetamine dependence/psychosis of mu-opioid receptor gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J*, (in press), 2006.

2) Ide, S., Han, W., Kasai, S., Hata, H., Sora, I., Ikeda, K.: Characterization of the 3' untranslated region of the human mu-opioid receptor (MOR-1) mRNA. *Gene*, 364:139-45, 2005.

3) Ikeda, K., Ide, S., Han, W., Hayashida, M., Uhl, G.R., Sora, I.: How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26(6):311-7, 2005.

4) 池田和隆、大谷保和、西澤大輔、井手聡一郎、曾良一郎：モルヒネ感受性の遺伝子解析．日本臨床．63 増刊号 12: 463-466, 2005.

5) 曾良一郎、渡邊秀和、井手聡一郎、池田和隆：モルヒネの効き、副作用のかたは個人で異なるか？．患者の疑問に答えるオピオイドの要点（下山直人 編）．pp.53-60. 真興交易（株）医書出版部、東京、2005.

## 2. 学会発表

1) Sora, I., Ide, S., Minami, M., Uhl, G.R., Ikeda, K. • Exclusive expression of  $\mu$ -opioid receptors in noradrenergic neurons reverses the decrements in stress responses noted in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. •

International Narcotics Research Conference. (INRC) • Annapolis • 2005 年 7 月

2) 井手聡一郎、南雅文、Uhl, G.R.、石原熊寿、曾良一郎、池田和隆・ $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスにおけるペンタゾシンの抗熱性・機械性侵害受容効果の消失と抗化学性侵害受容効果の維持・第 7 9 回日本薬理学会年会・横浜・2005 年 3 月

3) 井手聡一郎、南雅文、Uhl, G.R.、石原熊寿、曾良一郎、池田和隆・ $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いたブプレノルフィンとトラマドールの鎮痛・報酬効果の解析・日本薬学会第 1 2 6 年会・仙台・2005 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 一分子蛍光検出法を用いたハイスループットな 遺伝子多型検出法の確立

分担研究者 古閑 比佐志

（かずさ DNA 研究所）

---

### 【研究要旨】

平成 17 年度においては、最終目標であるテーラーメイド疼痛治療を可能とする遺伝子検査キットの開発に先立ち、一分子蛍光検出法がコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法になりうるかを、 $\mu$ オピオイド受容体 1 ( $\mu$ OR1) の複数の多型領域をターゲットとして検証を行った。

一分子蛍光はオリンパス社の 1 分子蛍光分析システム MF20 で検出したが、具体的には sequence specific primer (SSP)-PCR 法により導入した異なる蛍光分子を、蛍光相関分光法 (FCS: 約 1 フェムトリットル中で増幅した蛍光ラベルプライマーの 1 分子レベルの並進拡散時間を計測する) で解析した (図 1-2 参照)。LD block を代表すると考えられる 5 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G) に対して解析を行なった。現時点で 3 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A) に関してはほぼ至適条件の調整が終了し、97%以上のサンプル (約 650 検体中) でシーケンス解析での結果を再現できた。2 つの SNPs (A8449G, A2109G) に関して、前者ではプライマーのデザインが困難で解析を断念し、後者では現在再度プライマーの設計から行なって解析を進めている。

本手法が 384 ウェルベースでの解析を可能とすることから、至適条件の確立によりコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法になりうる事が明らかとなった。プライマーの設計など課題も残されているので、今後さらに解析を進め最終目標である遺伝子検査キットの開発にプロジェクト期間内に到達できるよう努力していく。

---

## A. 研究目的

最終目標であるテーラーメイド疼痛治療を可能とする遺伝子検査キットの開発に先立ち、コストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を開発することを目的とする。

## B. 研究方法

平成 17 年度においては、一分子蛍光検出法を利用した遺伝子多型検出法が、上記要件を満たした検出法となりうるかを、 $\mu$  オピオイド受容体 1 ( $\mu$ OR1) の複数の多型領域をターゲットとして検証を行った。一分子蛍光はオリンパス社の 1 分子蛍光分析システ

ム MF20 で検出したが、具体的には sequence specific primer (SSP)-PCR 法により導入した異なる蛍光分子を、蛍光相関分光法(FCS: 約 1 フェムトリットル中で増幅した蛍光ラベルプライマーの 1 分子レベルの並進拡散時間を計測する)で解析した (図 1A・B 参照)。FCS 法は分子間相互作用などによって分子サイズが 4 倍以上変化する反応に適し、溶液中の 3 つの分子種について同時にデータ取得可能である。対象としたのは  $\mu$  オピオイド受容体 1 ( $\mu$ OR1) の多型の内、LD block を代表すると考えられる 5 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A8449G, A2109G)である。

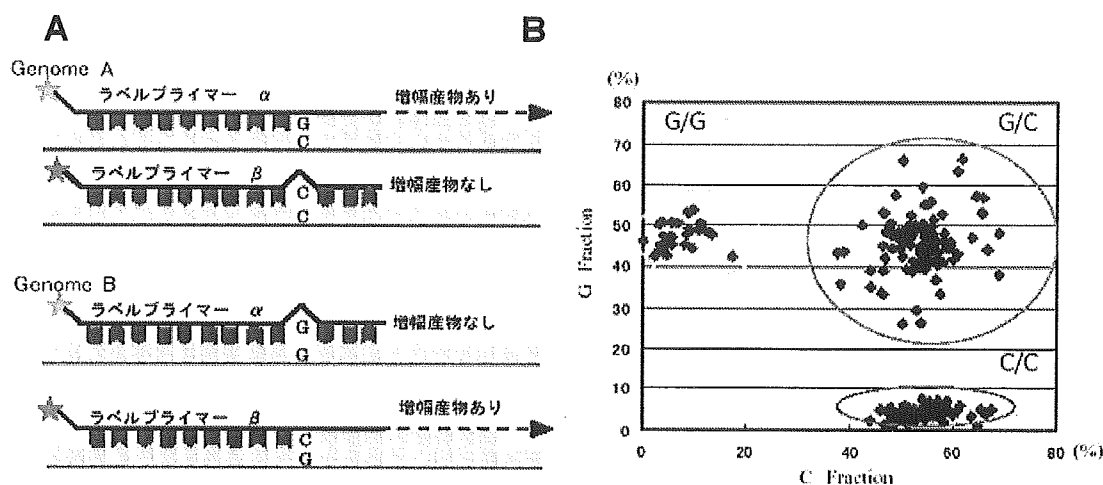


図 1 sequence specific primer (SSP)-PCR 法の概略図(A)と、タイピング解析例(B)

## C. 研究結果

その結果、3 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A) に関してはほぼ至適条件の調整が終了し、97%以上のサンプル (約 650 検体中) でシーケンス解析の結果を再現できた (図 2、表 1)。2 つの SNPs (A8449G, A2109G) に関しては、プライマーのデザインが困難で解析を断念した。時期を同じくして HapMap Project (国際ハップマップコンソーシア

ムによるヒトゲノム上に存在する頻度の高い多型についての公共データベース作成プロジェクト)の結果が利用可能となったので、当該 SNPs における Allele frequency を、今回の結果と比較した (表 1)。その結果、我々の結果は HapMap Project における日本人 Allele frequency ときわめて近時した結果であった。この点からのデータの信頼性が確かめられた。

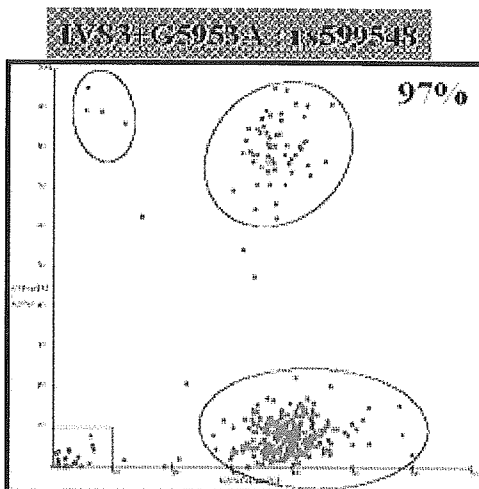
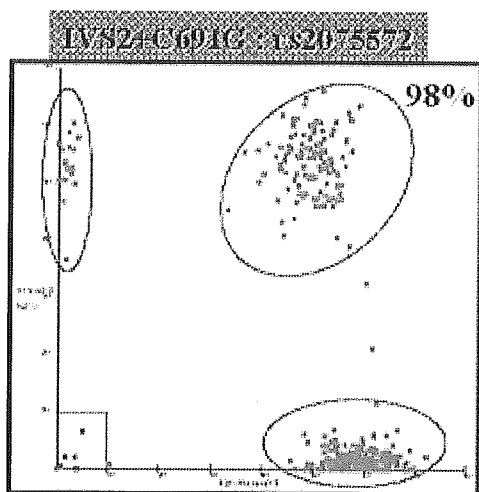
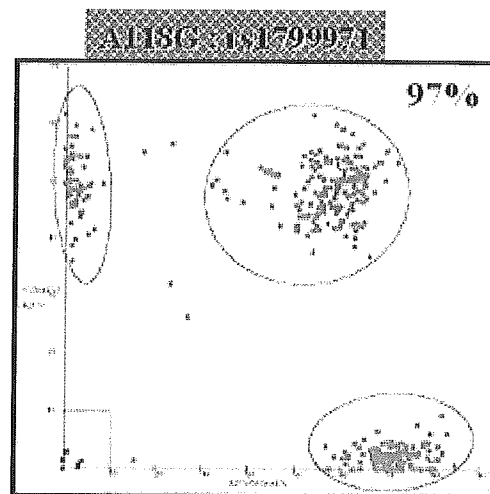


図 23 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A) に関するタイピング解析結果

SNPs name	A118G	IVS2+C691G	IVS3+G5953A
dbSNP ID rs#	rs1799971	rs2075572	rs599548
allele	A G	C G	G A
Detected here	0.554 0.446	0.781 0.219	0.901 0.099
<i>HapMap JPT</i>	<b>0.511</b> <b>0.489</b>	<b>0.789</b> <b>0.211</b>	<b>0.922</b> <b>0.078</b>
<i>HapMap CHB</i>	<b>0.644</b> <b>0.356</b>	<b>0.800</b> <b>0.200</b>	<b>0.878</b> <b>0.122</b>
<i>HapMap JPT+CHB</i>	<b>0.579</b> <b>0.421</b>	<b>0.794</b> <b>0.206</b>	<b>0.900</b> <b>0.100</b>
<i>HapMap CEU</i>	<b>0.833</b> <b>0.167</b>	<b>0.575</b> <b>0.425</b>	<b>0.850</b> <b>0.150</b>
<i>HapMap YRI</i>	<b>1.000</b> <b>0.000</b>	<b>0.383</b> <b>0.617</b>	<b>0.892</b> <b>0.108</b>

図1 Allele frequency の HapMap Project との比較 (JPT: 日本人、CHB: 中国人、CEU: CEPH-北ヨーロッパや西ヨーロッパから来た祖先を持つ米国ユタ州の住民、YRI: ナイジェリアーイバダンのヨルバ族、サンプル数はそれぞれ 45、45、90、90 と我々のサンプル数と比較して僅かである)

#### D. 考察

以下のような理由から、一分子蛍光検出法を多型検出法の候補として選択した。

- 1) 生体内に近い環境下で分子間相互作用を解析可能: 分子移動が自由な溶液中での計測
- 2) 固相化・洗浄が不要: 溶液のまま計測可能
- 3) 短時間での計測: 0.5 秒から数十秒の計測
- 4) 共焦点レーザ光学系による蛍光計測: 有色サンプル、蛍光ノイズに強い
- 5) 少量のサンプルで、全回収可能: 1 nM のサンプルが  $50 \mu\text{L} = 50 \text{ fmol}$
- 6) 異なる波長を検出可能: 488nm、543nm、633nm  
これらの特性は、384 ウェルベースでの解析を可能とし、至適条件の確立によってはコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を確立させることが明らかとなった。しかし、次

項のごとくプライマーの設計やサンプル濃度など調整すべき課題も残されているので、今後さらに検討を加えたい。

- 1) プライマー設計においてTAの繰り返し配列が存在すると、その設計が困難である。
- 2) 検体 DNA の濃度(1st PCR 時のテンプレート濃度が至適濃度  $0.25 \sim 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  より外れると特にヘテロのクラスタにばらつきが生じやすい)を一定化することが重要である。
- 3) サーマルサイクラーの機種によって SSP-PCR の最適条件が多少変わってくるため、使用機種よりの条件検討が必要となる。

#### E. 結論

今年度の解析結果から、一分子蛍光検出法はコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子

多型検出法の一つの有力な候補であることがはっきりした。しかしその一方で改善すべき問題点も露呈した。今後さらに解析を進め、改良を加えるとともに、別な遺伝子多型検出法に関しても検討を加える。具体的には NAP(Nuclease Activated Probe)-Ligation 法と MPEX(Multiple Primers EXtension)法で、次年度前半でその有効性を比較し、最終目標である遺伝子検査キットの開発にプロジェクト期間内で到達できるよう努力していく。

# 【参考文献】

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kai N, Iwase K, Imai K, Nakahira E, Soma M, Ohtsuka S, Yagi T, Kobayashi K, Koga H, Takiguchi M, Yuasa S. Masaki Takiguchi and Shigeki Yuasa.: Altered gene expression in the amygdaloid subdivision of Fyn-deficient mice as revealed by cDNA array analysis, *Molecular Brain Research*, 143 (Epub ahead of print), 2006.
2. Ohara R, Knappik A, Shimada K, Frisch C, Ylera F, Koga H.: Antibodies for Proteomic Research: Comparison of Traditional Immunization with Recombinant Antibody Technology, *Proteomics*, 6 (in press), 2006.
3. Murakami M, Shimada K, Kawai M, Koga H.: InCeP: Intracellular pathway based on mKIAA protein-protein interactions, *DNA Res.*, 12 379-387, 2005.
4. Nakajima D, Saito K, Yamakawa H, Kikuno R, Nakayama M, Ohara R, Okazaki N, Koga H, Nagase T, Ohara O.: Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method, *DNA Res.*, 12 257-267, 2005.
5. Okazaki N, Imai K, Kikuno RF, Misawa K, Kawai M, Inamoto S, Ohara R, Nagase T, Ohara O, Koga H.: Influence of the 3'-UTR-length of mKIAA cDNAs and their Sequence Features to the mRNA Expression Level in the Brain, *DNA Res.*, 12; 181-189, 2005.
6. Kyo M, Usui-Aoki K, Koga H.: Label-free detection of proteins in crude cell lysate with antibody arrays by a surface plasmon resonance imaging technique, *Anal Chem.*, 77: 7115-7121, 2005.
7. Ozaki A, Nagase T, Watanabe A, Nakajima D, Shimada K, Nagano M, Ohara O, Koga H, Inamoto S.: Utilization of mammalian cells for efficient and reliable evaluation of specificity of antibodies to unravel the cellular function of mKIAA proteins, *Gene*, 360: 35-44, 2005.
8. Imai K, Kawai M, Tada M, Nagase T, Ohara O, Koga H.: Temporal change in mKIAA gene expression during the early stage of retinoic acid-induced neurite outgrowth, *Gene*, 364: 114-122, 2005.
9. Shimada K, Nagano M, Kawai M, Koga H.: Influences of amino acid features of glutathione S-transferase fusion proteins on their solubility, *Proteomics*, 5: 3859-3863, 2005.
10. Usui-Aoki K, Kyo M, Kawai M, Murakami M, Imai K, Shimada K, Koga H.: Protein and antibody microarrays: clues towards biomarker discovery, *Frontiers in Drug Design and Discovery* (in press), 2006.
11. Nagase T, Koga H, Ohara O.: Kazusa Mammalian cDNA Resources: Towards Functional Characterization of KIAA Gene Products, *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*



- (in press), 2006.
12. **Koga H.**: Establishment of the platform for reverse chemical genetics targeting novel protein-protein interactions, *Molecular BioSystems*, 2 (Advance Articles), 2006.
  13. 古閑 比佐志、使ってみよう！バイオデータベース 連載 第4回 GENSAT、2006、細胞工学、24: 179-182
  14. 古閑 比佐志：最新疾患プロテオミクス研究の現状と展望—かずさDNA研究所・地域結集型プロジェクト研究チーム、戸田年総、荒木令江、遺伝子医学Mook 疾患プロテオミクスの最前線-プロテオミクスで病気を治せるか、メディカルドゥ、大阪、173-176、単著、2005.
  15. 古閑 比佐志：DNA プロジェクトから疾患プロテオミクスへの融合、戸田年総、荒木令江、遺伝子医学Mook 疾患プロテオミクスの最前線-プロテオミクスで病気を治せるか、メディカルドゥ、大阪、354-360、単著、2005.
  16. **Koga H.**, Murakami M, Shimada K, Imai K, Kawai M, Usui-Aoki K, Miki F, Yuasa S, Inamoto S, Magae J, Okazaki N, Nagase T, Ohara O.: InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying functions of mKIAA/KIAA proteins. *Amino Acids*. 29(1):51-52, 2005.
  17. Imai K, Mimori T, Kawai M, **Koga H.** : Microarray Analysis of Host Gene-Expression during Intracellular Nests Formation of *Trypanosoma cruzi* Amastigotes. *Microbiol Immunol*. 49(7):623-31, 2005.
  18. **Koga H.**, Izawa I, Araki N, Saya H, Mimori T.: Observation of the intracellular behavior of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *Microbiol Immunol*. 49(4):297-302, 2005.
  19. Usui-Aoki K, Shimada K, Nagano M, Kawai M, **Koga H.**: A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. *Proteomics*. 5(9):2396-401, 2005.
  20. Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Kishida M, Hagino Y, Hara Y, Shimada K, Yamamoto T, Sora I, **Koga H.**, Ikeda K.: Methamphetamine modulation of gene expression in the brain: analysis using customized cDNA microarray system with the mouse homologues of KIAA genes. *Brain Res Mol Brain Res*. 137(1-2):40-6, 2005.
  21. 島田希代、古閑比佐志：cDNA を利用した網羅的抗体作製法、バイオテクノロジージャーナル、5(5): 639-642, 2005.
- ## 2. 学会発表
1. M Murakami, K Shimada, M Nagano, K Imai N Okazaki, F Miki, S Inamoto, R Ohara, R Kikuno, T Nagase, O Ohara, **H Koga.**: InCeP: INTRACELLULAR PATHWAY BASED ON mKIAA PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. Cold Spring Harbor; Meeting Name; SYSTEMS BIOLOGY: GLOBAL REGULATION OF GENE EXPRESSION, 2006.
  2. 薄井(青木)一恵、島田 希代、長野 美穂子、川井 誠、古閑 比佐志：体アレイを用いたマウスKIAAタンパク質の発現プロファイリング～新しい疾患マーカーの発見を目指して～、第28回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2005.
  3. 古閑比佐志：cDNAプロジェクトからプロテオーム領域への挑戦～かずさDNA研究所の取り組み～、第2回 プロテオミクスシンポジウム

- 招待講演, 2005.
4. **Koga H.:** InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying functions of mKIAA/KIAA proteins, 9th International Congress on Amino Acids and Proteins, 2005.
  5. **Koga H.:** InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying novel pathways and theories, VIth European Symposium of the Protein Society, 2005.
  6. 長野 美穂子, 島田 希代, 村上 雅利, 岡崎 規理子, 古閑 比佐志: 抗マウスKIAA抗体の網羅的作製とその評価, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  7. 島田 希代, 小原 令子, Achim Knappik, Christian Frisch, Francisco Ylera, 長野 美穂子, 古閑 比佐志: 一抗原で作製したポリクローナル抗体とファージ抗体との比較, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  8. 長瀬 隆弘, 中島 大輔, 岡崎 規理子, 古閑 比佐志, 小原 收: 培養細胞を用いたKIAA遺伝子産物過剰発現によるレポーター遺伝子解析, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  9. 中島 大輔, 村上 雅利, 菊野 玲子, 岡崎 規理子, 古閑 比佐志, 小原 收, 長瀬 隆弘: 培養細胞を用いたKIAAタンパク質の細胞内局在および生化学的解析, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  10. 長野 美穂子, 島田 希代, 村上 雅利, 岡崎 規理子, 古閑 比佐志: 網羅的に作製した抗体を用いた内在性mKIAA蛋白質の検出, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  11. 稲本進, 渡部綾子, 尾崎照遵, 渡辺眞理, 南雲利之, 島田希代, 長野美穂子, 古閑 比佐志, 中島大輔, 長瀬隆弘, 小原收, 瀧景子, 馬替純二, 川上泰: 抗マウスKIAA抗体の網羅的作製とその評価, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
  12. 村上 雅利, 島田希代, 長野美穂子, 岡崎規理子, 今井一英, 川井誠, 中島 大輔, 小原令子, 三木 双葉, 稲本進, 馬替純二, 湯浅茂樹, 長瀬隆弘, 小原收, 古閑 比佐志: InCeP database ~タンパク-タンパク相互作用に基づくパスイデータベース~, 第28回日本分子生物学会年会 ポスター, 2005.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
    1. 情報処理装置、情報処理方法及びそのプログラム 2005-203404 古閑, 村上
    2. パスウェイ表示方法、情報処理装置及びパスイデータ表示プログラム 2005-212824 川井, 古閑, 村上
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## デルタ及びカッパオピオイド受容体の役割に関する研究

分担研究者：南 雅文

（北海道大学大学院薬学研究科・薬理学分野）

### 【研究要旨】

本研究では、クローン化オピオイド受容体各サブタイプ発現細胞株を活用し、市販のオピオイド性鎮痛薬のうち、ブプレノルフィン、ブトルファノールおよびペンタゾシンのオピオイド受容体各サブタイプにおける薬理学的性質、すなわち、受容体結合親和性とアゴニストとしての固有活性を計測した。得られた結果より、これら薬物が、 $\mu$ 受容体だけでなく $\kappa$ 受容体にも部分アゴニストとして作用することが示された。

### A. 研究目的

拮抗性鎮痛薬は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の作用には拮抗するが、単独投与により鎮痛作用を発現する薬物であり、我が国では、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンなどが市販されている。拮抗性鎮痛薬は、オピオイド $\mu$ 受容体には拮抗薬（アンタゴニスト）として作用するが、オピオイド $\kappa$ 受容体には作動薬（アゴニスト）として作用し、それにより鎮痛作用を発揮するとの考え方が従来よりあったが、現在までに報告されている拮抗性鎮痛薬のオピオイド受容体各タイプ、すなわち、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各タイプにおける作用に関する知見は、報告によって相違が見られることも多く、必ずしも正確な知見が得られているとは言い難い。その最も大きな原因は、受容体各タイプに対するオピオイド類の作用を解析するために用いられてきた評価系にある。オピオイド類

の結合親和性やアゴニスト活性の評価は、脳膜標品を用いた結合実験やモルモット回腸縦走筋標本あるいはマウス輸精管標本などを用いた生物活性測定実験などにより行われてきたが、これら組織由来の標本では必ずしも純粋に1種類の受容体タイプのみが存在しているわけではなく、また、オピオイド受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与えるタンパク質（GTP結合タンパク質やリン酸化酵素など）の種類や量が組織ごとに異なっているため、異なった組織由来の膜標品や摘出組織標本を用いた評価系より得られた結果をそのまま、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各受容体における当該薬物固有の薬理学的性質と把らえて、それらを直接比較することには少なからず問題があった。薬物固有の薬理学的性質である結合親和性とアゴニスト活性をオピオイド受容体の $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 各タイプについて評価し、それらを

比較するためには、受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与えるタンパク質、さらにはアゴニスト活性の指標となる生物活性の発現に必要なタンパク質が同一である細胞上に、オピオイド受容体の各タイプが単独に発現している標本を評価系に用いることが望ましい。1992 年から 1993 年にかけて、オピオイド受容体  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  各タイプの cDNA がクローニングされたことにより<sup>1,2,4-6)</sup>、そのような理想的な評価系の構築が可能となった。すなわち、遺伝子工学的手法を用いて、オピオイド受容体のクローンを、本来オピオイド受容体のいずれのタイプも有していない株化細胞に発現させることにより、単一タイプのオピオイド受容体を発現し、かつ、オピオイド受容体以外のタンパク質の種類や量が同一である細胞標本を得ることが可能となった。一方、テーラーメイド疼痛治療法の開発・普及のためには、現在用いられているオピオイド性鎮痛薬の作用機序、特に、鎮痛作用や副作用におけるオピオイド受容体各サブタイプの寄与を、定量的に解析し数値化することが重要である。そこで本研究では、ヒト型クローン化オピオイド受容体各サブタイプ発現細胞株を活用し、拮抗性鎮痛薬であるブプレノルフィン、ブトルファノールおよびペンタゾシンのオピオイド受容体  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  各タイプにおける結合親和性とアゴニスト活性を検討し、モルヒネなどのオピオイド受容体に作用する薬物のそれと比較することにより拮抗性鎮痛薬の薬理学的性質を評価した。

## B. 実験方法

### 1. ヒトオピオイド $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体を安定的

### に発現する CHO 細胞の樹立

CHO 細胞は 10 %ウシ胎児血清、50 U/ml ペニシリン、50  $\mu$ g/ml 硫酸ストレプトマイシンを含むハム F12 培地で、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養・維持した。各ヒトオピオイド受容体 cDNA を組み込んだプラスミドを、リポフェクチン法により CHO 細胞にトランスフェクションした。500  $\mu$ g/ml の G418 存在下で培養し、生存するコロニーのうち、[<sup>3</sup>H]オピオイドリガンドを用いた結合実験により各受容体を高レベルに発現しているクローン細胞 ( CHO/hMOPR 、 CHO/hDOPR 、 CHO/hKOPR ) を選別した。それぞれの受容体の発現はノーザンブロット法にて確認した。

### 2. 受容体結合実験

CHO/hMOPR 、 CHO/hDOPR 、 CHO/hKOPR を Tris 緩衝液 (50 mM Tris (pH 7.4)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA) 中で、ホモジナイズした。ホモジネートを 4 °C、30,000 ×g で 20 分間遠心した後、沈殿を Tris 緩衝液に再懸濁したものを粗膜標品として実験に用いた。オピオイド  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  受容体は、それぞれの受容体に選択的なリガンドである [<sup>3</sup>H]DAMGO、[<sup>3</sup>H]DPDPE、[<sup>3</sup>H]U69,593 を用いて標識した。標識リガンド 10  $\mu$ l、非標識リガンド 10  $\mu$ l、膜標品 80  $\mu$ l を混合し、25 °C、1 時間インキュベートした後、氷冷した Tris 緩衝液 1 ml で反応を停止した。これを 0.1 % ポリエチレンイミンにあらかじめ浸した Watman GF/C フィルターで濾過し、Tris 緩衝液で 3 回洗浄した後、フィルターを 5 ml のクリアゾル I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に入れ、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。飽和結合実験には、種々の