

## Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> (Tyr-W-MIF-1) analogである Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> の 抗侵害作用における $\mu$ オピオイド受容体の関与について

中山 大助, 渡邊 廣行, 藤村 務, 櫻田 忍\*

### Involvement of $\mu$ -opioid receptor on the antinociception induced by supraspinal administration of Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>

Daisuke NAKAYAMA, Hiroyuki WATANABE, Tsutomu FUJIMURA, and Shinobu SAKURADA \*

(Received November 21, 2006)

We have previously reported that Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> (D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1) given spinally produces clearly a dose-dependent attenuation of the antinociception induced by Tyr-W-MIF-1 without affecting endomorphins- and [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly(ol)<sup>5</sup>]-enkephalin (DAMGO)-induced antinociception, and D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 at any doses used (0.025-1.2 nmol) does not show any antinociception or hyperalgesic effect by itself. In the present study, we found that D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 given supraspinally produced the antinociception, which is mediated by stimulation of  $\mu$ -opioid receptors. D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 (0.5-16 nmol) given intracerebroventricularly (i.c.v.) produced an apparent dose-dependent antinociception. However, at the three highest doses (4, 8 or 16 nmol), there was a ceiling effect (about 30 %MPE) where the increase in dose did not lead to a greater effect. The antinociception induced by D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 at a dose of 4 nmol was blocked by i.c.v. co-administration with the  $\mu$ -opioid receptor antagonist D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub> (CTOP), but not by i.c.v. pretreatment with the  $\mu_1$ -opioid receptor antagonist naloxonazine, the  $\kappa$ -opioid receptor antagonist, nor-binaltorphimine, or the  $\delta$ -opioid receptor antagonist naltrindole. In contrast, the antinociception induced by DAMGO and Tyr-W-MIF-1 was blocked by i.c.v. co-administration with CTOP or by i.c.v. pretreatment with higher doses of naloxonazine, but not by pretreatment with nor-binaltorphimine or naltrindole. We propose that the antinociception induced by D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 and Tyr-W-MIF-1 is mediated by the stimulation of different subtypes of  $\mu_2$ -opioid receptors.

**Key words** — Antinociception,  $\mu$ -Opioid receptor, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1, Tyr-W-MIF-1, DAMGO

Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>) は, melanocyte-stimulating hormone-release inhibiting factor-1 (MIF-1) ファミリーに属する内因性のテトラペプチドとして, 1992年にヒト脳<sup>1)</sup> および1993年にはウシ脳<sup>2)</sup> から単離・同定された. このTyr-W-MIF-1はTyr-MIF-1結合部位に対して極めて高い親和性を示すほか, オピオイド受容体, 特に $\mu$ 受容体に対しても親和性を示すことが報告されて

いる<sup>1-3)</sup>. Tyr-W-MIF-1をマウスおよびラットの脳室内 (i.c.v.) および脊髄くも膜下腔内 (i.t.) に投与すると, naloxone感受性の抗侵害作用を発現することが報告されている<sup>4,5)</sup>.

これまで $\mu$ 受容体は $\mu_1/\mu_2$ 受容体拮抗薬である $\beta$ -funaltrexamine, および選択的 $\mu_1$ 受容体拮抗薬であるnaloxonazineを用いた行動薬理学的および生化学的研究から,  $\mu_1$ および $\mu_2$ 受容体の2つのサブ

クラスに分類されてきた。しかし, 特異的 $\mu_2$ 受容体拮抗薬は見いだされておらず,  $\beta$ -funtrexamineに感受性でかつnaloxonazineに非感受性の作用が $\mu_2$ 受容体の作用と考えられている。

近年, 内因性 $\mu$ オピオイドペプチドであるendomorphin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) およびendomorphin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) がそれぞれ選択的 $\mu_2$ および $\mu_1$ 受容体の作動薬であることが明らかにされている<sup>6,7)</sup>。また, endomorphin-1 およびendomorphin-2のdiastereoisomersであるD-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1 およびD-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2が, それぞれ $\mu_2$ および $\mu_1$ 受容体の特異的な拮抗活性を有することが報告されている<sup>8)</sup>。

Tyr-W-MIF-1はendomorphin-1とアミノ酸配列が類似しており, そのdiastereoisomerであるD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1はi.t.投与によるTyr-W-MIF-1の抗侵害作用を特異的に拮抗することが認められた<sup>9)</sup>。

一方, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1のマウスi.c.v.投与によってi.t.投与時と同様にTyr-W-MIF-1の抗侵害作用に対する拮抗作用が認められた。また, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1単独のi.t.投与では抗侵害作用は認められなかったが, i.c.v.投与によって抗侵害作用が誘発されることが見出された。そこで本研究では, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1の抗侵害作用の薬理作用について検討した。

### 実験材料および方法

全ての実験は, 東北薬科大学動物実験指針を遵守し, 動物実験委員会の承認を受けた動物実験計画書に従って行った。以下に示す全ての実験において使用動物数を削減し, また, 使用動物の苦痛を和らげるために最大限配慮した。

#### 1. 使用動物

実験には22-24 gのddY系雄性マウス (SLC, 静岡) を使用した。実験に供するまで, 明暗サイクル12時間 (明期: 7:00-19:00, 暗期: 19:00-7:00), 室温 $23 \pm 1$  °C, 湿度 $52 \pm 2\%$ の一定環境下で飼育した。なお, 使用動物には固形飼料 (実験動物用固形飼料 F2, 船橋農場, 千葉) および水道水を自由に摂取させ, 少なくとも2日以上実験室で予

備飼育した。

#### 2. 使用薬物

Tyr-W-MIF-1 (Bachem, San Carlos, CA), [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly(ol)<sup>5</sup>]-enkephalin (DAMGO: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> (D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1: 研究室にて合成), naloxonazine (Sigma/RBI, Natick, MA), D-Phe-cyclo-(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen)-Thr-NH<sub>2</sub> (CTOP: Bachem), naltrindole (Tocris Cookson, Bristol, UK), および, nor-binaltorphimine (Tocris Cookson) を使用した。全ての薬物は, 人工脳脊髄液 (126.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>) に溶解した。Naloxonazineとnor-binaltorphimineは鎮痛試験の24時間前にマウスにi.c.v.投与し, naltrindoleは試験の10分前にi.c.v.投与した。

#### 3. 抗侵害作用の測定

抗侵害作用は, tail-flick法により測定した。Tail-flick装置 (BM KiKi, Tokyo, Japan) を用い, マウス尾腹部に放射熱を加え, tail-flick反応 (尾を振ることにより放射熱から逃れる反応) の反応潜時を測定した。放射熱の強度は, 無処置マウスにおいてtail-flick反応の反応潜時が2.5-3.5秒になるよう調節した。抗侵害作用は, 以下の式から算出した最大有効反応率 (percent of maximum possible effect: % MPE) で表した。最大有効反応率(%) =  $[(T_1 - T_0) / (10 - T_0)] \times 100$ 。なお $T_0$ および $T_1$ は, それぞれ薬物投与前および投与後のtail-flick反応潜時とした。尾腹部組織の損傷を防ぐ為, 最長熱放射時間を10秒に設定した。

#### 4. マウス脳室内投与

マウス脳室内 (i.c.v.) 投与は, Haley and McCormickの方法<sup>10)</sup> に準じ, 10 $\mu$ lのハミルトンマイクロシリンジを用いて行った。また投与量は2 $\mu$ lとした。

#### 5. 統計処理

実験は一群10匹で行い, 抗侵害作用は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計学的検定は, 一元配置分

Table 1. Time course of antinociceptive effect after i.c.v. administration of D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 in the mouse tail-flick test.

	Time after injection (min)				
	5	10	15	20	30
Vehicle	6.1 ± 2.9	8.4 ± 2.4	1.9 ± 3.2	4.5 ± 1.7	3.8 ± 2.3
D-Pro <sup>2</sup> -Tyr-W-MIF-1 (nmol)					
0.5	0.1 ± 1.7	0.4 ± 2.0	1.8 ± 1.8	1.7 ± 1.1	2.8 ± 2.3
1	9.9 ± 2.2	8.4 ± 2.8	5.9 ± 2.6	5.6 ± 2.7	4.0 ± 2.7
2	11.8 ± 2.9	10.4 ± 2.6	10.3 ± 1.2	6.7 ± 1.5	5.9 ± 3.0
4	26.2 ± 2.4***	33.0 ± 2.7***	28.1 ± 2.6***	18.3 ± 1.9***	13.9 ± 2.2*
8	30.1 ± 3.4***	30.5 ± 2.0***	26.8 ± 3.3***	19.3 ± 3.2***	6.9 ± 2.8
16	29.9 ± 6.3***	26.3 ± 4.8***	22.1 ± 2.9***	16.3 ± 2.1	9.1 ± 4.0

Each value represents the mean ± S.E.M. of %MPE for 10 mice. The statistical significance of the differences between groups was assessed with a two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test. \*, p<0.05 and \*\*\*, p<0.001 versus vehicle treated group.

散分析 (one-way ANOVA) にて行い, Newman-Keuls testにより後検定を行い, または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) にて行い, Bonferroni's testにより後検定を行った。

## 実験結果

### 1. Tail-flick法におけるD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1誘発性抗侵害作用

D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1のマウスi.c.v.投与により, 0.5-2 nmolの範囲内において抗侵害作用は認められなかったが, 4, 6, 8, 12および16 nmolのi.c.v.投与により, 投与5-10分後にピークを有する抗侵害作用が認められ, 投与30分後にはその作用は消失した。4-16 nmolにおける抗侵害作用にはceiling effectが認められ, これらの用量による用量依存性は認められず, その抗侵害作用は約35%であった (Table 1)。一方, μ-opioid peptideであるDAMGO 20 pmolおよびTyr-W-MIF-1 12.5 nmolを投与すると, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 4-16 nmol投与時とほぼ同程度の抗侵害作用である36.7%および31.5%の抗侵害作用が認められた (Table 2)。

### 2. D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1, Tyr-W-MIF-1およびDAMGOの約30%抗侵害作用におけるCTOPおよびnaloxonazineの影響

D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 (4 nmol), Tyr-W-MIF-1 (12.5 nmol), DAMGO (20 pmol) のi.c.v.投与によって誘発される30-35%の抗侵害作用はμ-opioid受容体拮抗薬であるCTOP 100 pmolとの同時投与によりほぼ完全なまでに拮抗された。一方, μ<sub>1</sub>-opioid受容体拮抗薬であるnaloxonazineの前処理によって, DAMGOおよびTyr-W-MIF-1の抗侵害作用はいずれもnaloxonazineの16および32 nmolの前処理によって有意な拮抗作用が認められたが, D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1の抗侵害作用はnaloxonazineの32 nmolの前処理によってさえも, 有意な拮抗作用は認められなかった (Table 2)。

### 3. D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1, Tyr-W-MIF-1およびDAMGOの抗侵害作用におけるnaltrindoleおよびnor-binaltorphimineの影響

D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1, Tyr-W-MIF-1およびDAMGOのi.c.v.投与によって引き起こされる約35%前後の抗侵害作用は, δ-opioid受容体拮抗薬であるnaltrindoleおよびκ-opioid受容体拮抗薬であるnor-binaltorphimineの前処理によって全く影響を受けなかった (Table 2)。

## 考 察

μ受容体はオートラジオグラフィーを用いた受

Table 2. Effects of CTOP, naloxonazine (NLZ), nor-binaltorphimine (BNI) and naltrindole (NTI) on the antinociceptive action induced by i.c.v. injection of DAMGO, Tyr-W-MIF-1 or D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 in the mouse tail-flick test.

Treatment	% MPE
DAMGO (20 pmol) alone	36.7 ± 2.7
+ CTOP (100 pmol)	13.4 ± 2.6***
+ NLZ (8 nmol)	31.9 ± 2.7
+ NLZ (16 nmol)	19.8 ± 3.2**
+ NLZ (32 nmol)	16.0 ± 2.8**
+ BNI (6.6 nmol)	43.1 ± 6.7
+ NTI (20 nmol)	43.7 ± 7.9
Tyr-W-MIF-1 (12.5 nmol) alone	31.5 ± 4.5
+ CTOP (100 pmol)	6.7 ± 2.4***
+ NLZ (8 nmol)	29.1 ± 3.6
+ NLZ (16 nmol)	22.6 ± 2.7*
+ NLZ (32 nmol)	9.3 ± 2.5***
+ BNI (6.6 nmol)	43.8 ± 4.9
+ NTI (20 nmol)	38.4 ± 4.2
D-Pro <sup>2</sup> -Tyr-W-MIF-1 (4 nmol) alone	33.0 ± 2.7
+ CTOP (100 pmol)	6.9 ± 3.6***
+ NLZ (8 nmol)	27.1 ± 5.1
+ NLZ (16 nmol)	21.6 ± 2.4
+ NLZ (32 nmol)	19.2 ± 4.2
+ BNI (6.6 nmol)	28.1 ± 3.9
+ NTI (20 nmol)	32.6 ± 2.6

Each agonist was i.c.v. co-administered with CTOP or i.c.v. injected 24h after the i.c.v. treatment with NLZ or BNI, or 10 min after the i.c.v. treatment with NTI. Each value represents the mean ± S.E.M. for 10 mice. The statistical significance of the differences between groups was assessed with a one-way ANOVA followed by the Neuman-Keuls test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$  versus each agonist alone.

容体結合実験の結果から, 中脳水道周囲灰白質や脊髄後角などの痛覚伝達路に高濃度で存在していることが確認されている<sup>11-13)</sup>.  $\mu$ 受容体は,  $\beta$ -funaltrexamine および naloxonazine を用いた薬理学的および生化学的手法により  $\mu_1$  および  $\mu_2$  受容体に分類されている. これまでの研究から naloxonazine は選択的  $\mu_1$  受容体拮抗薬であり,  $\beta$ -funaltrexamine は  $\mu_1/\mu_2$  受容体拮抗薬であるので,  $\beta$ -funaltrexamine の作用から, naloxonazine の作用を差し引いた作用が  $\mu_2$  受容体の作用であると考えられている. また従来,  $\mu_2$  受容体に特異的

な拮抗薬は見出されていなかったが, endomorphin-1 アナログである D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1 が特異的  $\mu_2$  受容体拮抗活性を有することが, 近年明らかにされている<sup>8)</sup>. Tyr-W-MIF-1 は endomorphin-1 に類似のアミノ酸配列を有するオピオイドペプチドであり, Tyr-W-MIF-1 の i.t. 投与により有意な抗侵害作用が認められ, この Tyr-W-MIF-1 の抗侵害作用は  $\mu$  受容体拮抗薬である  $\beta$ -funaltrexamine 前処理により有意に抑制された. しかし選択的  $\mu_1$  受容体拮抗薬である naloxonazine 前処理では影響を受けなかった. さらに, Tyr-W-MIF-1 の抗侵害作用

は $\mu_2$ 受容体拮抗作用を示すD-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1のi.t.同時投与により有意に抑制されたが、 $\mu_1$ 受容体拮抗作用を示す、D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2のi.t.同時投与ではなんら影響を受けなかった。これらの結果から、Tyr-W-MIF-1のi.t.投与による抗侵害作用の発現には、 $\mu_2$ 受容体が強く関与していることが示唆されている<sup>9)</sup>。

Tyr-W-MIF-1にアミノ酸配列が類似しているendomorphin-1のD-Pro<sup>2</sup>置換体であるD-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1が $\mu_2$ 受容体拮抗活性を示すことから、Tyr-W-MIF-1のD-Pro<sup>2</sup>置換体が $\mu_2$ 受容体拮抗活性を示す可能性が期待できる。D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1は、脊髄における $\mu_2$ 受容体作動薬であるDAMGO, endomorphin-1およびTyr-W-MIF-1の抗侵害作用に対し、用量依存的な拮抗作用を示した<sup>9)</sup>。一方、 $\mu_1$ 受容体作動薬であるendomorphin-2の抗侵害作用に対してはなんら影響を及ぼさなかった。これらの結果からD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1は $\mu_2$ 受容体の純粋な拮抗薬として作用している可能性が示唆された。さらにD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1の拮抗作用はTyr-W-MIF-1のi.t.投与誘発性抗侵害作用に対し特に高い選択性を発揮した<sup>9)</sup>。

本実験では、D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1の4 nmolのi.c.v.投与によって約30%の抗侵害作用が認められたが、さらに高用量の投与によっても抗侵害作用の上昇は認められず、実験を行った4-16 nmolの用量によってceiling effectが認められた。またD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1 4 nmol i.c.v.投与による抗侵害作用は $\mu$ 受容体拮抗薬であるCTOPによってほぼ完全に拮抗されたが、 $\mu_1$ 受容体拮抗薬であるnaloxonazineの前処理によっては拮抗作用が認められなかった。一方、Tyr-W-MIF-1およびDAMGO投与によって約30%の抗侵害作用を示す用量である12.5 nmolおよび20 pmolはCTOPの前処理により拮抗作用を示したがその作用はD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1の抗侵害作用に対する拮抗作用と同様であった。しかしnaloxonazine前処理によるD-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1, Tyr-W-MIF-1およびDAMGOの抗侵害作用に対する拮抗作用は異なるものである。Tyr-W-MIF-1の抗侵害作用はnaloxonazineの高用量によってのみ拮抗作用が認められたことから、Tyr-W-MIF-1は $\mu_2$ 受容体の作動薬であることが考えられる。なお、

本実験で用いた3つのペプチドは $\delta$ -受容体拮抗薬であるnaltrindoleおよび $\kappa$ -受容体拮抗薬であるnor-binaltorphimineの前処理によって影響を受けなかった。これらの実験から3つのペプチドは $\delta$ および $\kappa$ オピオイド受容体には関与しないものと思われる。

以上の結果から、D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1は $\delta$ および $\kappa$ オピオイド受容体には関与せずnaloxonazine抵抗性の $\mu_2$ 受容体を介して、抗侵害作用を引き起こすものと思われる。さらに $\mu_2$ 受容体には非特異的な用量のnaloxonazineによってのみ拮抗される受容体と、naloxonazineに全く感受性を有さない受容体の少なくとも二つが存在する可能性が示唆された。加えて、D-Pro<sup>2</sup>-Tyr-W-MIF-1は、低用量では $\mu_2$ 受容体拮抗作用を示し、高用量では $\mu_2$ 受容体活性化作用を示すことが推察された。

## REFERENCES

- 1) Erchegeyi J., Kastin A.J., Zadina J.E., *Peptides*, **13**, 623-631 (1992).
- 2) Hackler L., Kastin A.J., Erchegeyi J., Zadina J.E., *Neuropeptides*, **24**, 159-164 (1993).
- 3) Zadina J.E., Paul D., Gergen K.A., Ge L.J., Hackler L., Kastin A.J., *Neurosci. Lett.*, **215**, 65-69 (1996).
- 4) Gergen K.A., Zadina J.E., Kastin A.J., Paul D., *Eur. J. Pharmacol.*, **298**, 235-239 (1996).
- 5) Gergen K.A., Zadina J.E., Paul D., *Eur. J. Pharmacol.*, **316**, 33-38 (1996).
- 6) Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J., Kastin A.J., *Nature*, **386**, 499-502 (1997).
- 7) Sakurada S., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Yonezawa A., Sakurada C., Takeshita M., Zadina J.E., Kastin A.J., Sakurada T., *Brain Res.*, **881**, 1-8 (2000).
- 8) Sakurada S., Watanabe H., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Sakurada C., Sakurada T., *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 1143-1146 (2002).
- 9) Watanabe H., Nakayama D., Ito K., Watanabe C., Mizoguchi H., Fujimura T., Murayama K., Kawamura S., Sato T., Sakurada C., Sakurada T., Sakurada S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1075-1081 (2005).

- 
- 10) Haley M.J., McCormick W.G., *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 12-15 (1957).  
11) Moskowitz A.S., Goodman R.R., *Brain Res.*, **360**, 117-129 (1985).  
12) Moskowitz A.S., Goodman R.R., *Brain Res.*, **360**, 108-116 (1985).  
13) Goodman R.R., Pasternak G.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 6667-6671 (1985).