

Dermorphin analogue である H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH および  
H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> による  
capsaicin および substance P 誘発性 SBL 行動抑制の違いについて

結城 正幸, 渡邊 廣行, 岩田 陽子, 中山 大助, 照井 潤, 櫻田 忍

Differential Inhibitory Effects of Opioids,  
H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH and H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> on  
Capsaicin- and Substance P-induced SBL Behaviour in Mice

Masayuki YUHKI, Hiroyuki WATANABE, Yoko IWATA, Daisuke NAKAYAMA,

Jun TERUI and Shinobu SAKURADA

(Received November 22, 2003)

Intrathecal (*i.t.*) administration of substance P or capsaicin elicited a characteristic behavioural response consisting of scratching, biting and licking (SBL) in mice. The behavioural response induced by substance P or capsaicin was almost completely inhibited by simultaneous *i.t.* injection of [D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Gly(ol)<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO), H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH (TAPA) or H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> (TAPA-NH<sub>2</sub>). Pretreatment with naloxonazine significantly antagonized inhibitory action of TAPA-NH<sub>2</sub> on substance P-induced SBL behavioural response without antagonistic effect against DAMGO and TAPA, while antinociceptive effect of DAMGO, TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> was completely inhibited by the pretreatment with naloxone. TAPA-induced antinociception but not DAMGO- and TAPA-NH<sub>2</sub>-induced antinociception on behavioural response produced by *i.t.* capsaicin was completely inhibited by the pretreatment with naloxonazine, whereas naloxone at a dose of 1 mg/kg *s.c.* completely antagonized the antinociceptive effect of *i.t.* co-administered TAPA, DAMGO- or TAPA-NH<sub>2</sub>. These results led us to understanding of differential action mechanism of TAPA- and TAPA-NH<sub>2</sub>-induced antinociception, as assayed by SBL behavioural response produced by both capsaicin and substance P.

Key words —  $\mu$ -opioid receptor; dermorphin; tetrapeptides; naloxonazine; antinociception; mouse

Ersparmer ら<sup>1)</sup>によって, 南アフリカ産のカエル *amphibian genus Phyllomedusa* の皮膚より単離同定された dermorphin は, 自然界では細菌類以外には存在しないと言われていた D 体アミノ酸を配列中に含有するオピオイドペプチドであった. この dermorphin は 7 個のアミノ酸残基から構成される heptapeptide である.

Dermorphin の薬理学的作用については数多くの報告<sup>2-5)</sup>がなされてきたが,  $\mu$  受容体に対し

て morphine 以上に親和性を有することが報告されている.

Broccard ら<sup>2)</sup>は, この heptapeptide の構造活性相関において 2 位の D-Ala を L-Ala で置換するとほとんど活性を示さない事を報告しており, D-Ala はその強力なオピオイド活性にとって不可欠の存在であると言える. また, その強力な活性の発現のための最小構造は, N 端の tetrapeptide (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) であると

されている<sup>2,3)</sup>。しかし、この tetrapeptide の母体である dermorphin において C 端のアミノ酸を一つでも欠くと活性が著しく減少することから、活性本体は heptapeptide そのものに基づいているものと考えられている。

Dermorphin の N 端に D-Arg-kyotorphin<sup>6,7)</sup> を導入した [D-Arg<sup>2</sup>]-dermorphin (Tyr-D-Arg-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>) を合成し、その構造活性相関について検討したところ、N 端の tripeptide (Tyr-D-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) がその最小活性構造であること、また N 端の tetrapeptide (Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) がそのフラグメント中では最強の活性を有し、母体である heptapeptide の 2 倍以上の活性を示す点など、dermorphin の構造活性相関と比較してかなりの相違がみられた<sup>8)</sup>。さらに、この [D-Arg<sup>2</sup>]-dermorphin tetrapeptide analogue の構造活性相関において、[D-Arg<sup>2</sup>]-dermorphin (Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) の Gly を  $\beta$ -Ala で置換すると、さらに強力な抗侵害作用を有するペプチド (H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH : TAPA) が得られる事が報告されている<sup>4)</sup>。また TAPA の C 端のアミド化ペプチドである Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> (TAPA-NH<sub>2</sub>) は、受容体結合実験において TAPA よりも  $\mu$  受容体に対して親和性が高いことが示されている<sup>9)</sup>。

本研究では、substance P および capsaicin のマウス脊髄クモ膜下腔内 (*i.t.*) 投与によって誘発される scratching, biting および licking (SBL) 行動に対する [D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Gly(ol)<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO), TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> の抑制作用について検討すると共に、これらペプチドの抑制作用にかかわる  $\mu$  受容体の subtype ( $\mu_1$  および  $\mu_2$ ) について  $\mu_1$  受容体拮抗薬である naloxonazine<sup>10)</sup> を用いて検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 使用動物

実験には体重 20 - 25g の ddY 系雄性マウス (日本 SLC, 浜松) を使用し、実験に供するまで室温 22 ± 2 °C, 湿度 55 ± 10% および明暗サイクル 12 時間 (明期 9:00 - 21:00, 暗期 21:00 -

9:00) の一定環境下で最低 2 日以上飼育した。なお、動物には固形試料および水道水を自由に摂取させた。

### 2. 使用薬物および投与方法

使用薬物は H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-OH (TAPA), H-Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> (TAPA-NH<sub>2</sub>) および [D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Gly(ol)<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO) である。3つのペプチドは人工脳脊髄液に溶解して使用した。Naloxonazine および naloxone はシグマから購入して使用した。なお、naloxonazine は 24 時間前に投与した。

脊髄クモ膜下腔内投与 (*i.t.*) は、Hylden and Wilcox の方法<sup>11)</sup> に準じ、脊髄の 5 番 (L-5) と 6 番 (L-6) の間へ直接 5  $\mu$ L / マウスの割合で投与した。

### 3. Scratching, biting および licking (SBL) 行動の測定法

測定用のプラスチックケージ内にマウスを 1 匹ずつ入れ、約 1 時間環境に順応させた。Substance P および capsaicin をマウスに *i.t.* 投与すると SBL 行動が認められる。これらの一連の行動をストップウォッチで substance P 投与時には 5 分間、capsaicin 投与時には 10 分間測定した。3つのオピオイドペプチドは substance P または capsaicin と同時に *i.t.* 投与した。

### 4. 統計処理

実験結果は 1 群 10 匹として、平均値と標準誤差で示した。有意差検定については、分散分析 (ANOVA) により処理した後、Dunnett の検定<sup>12)</sup> に従い危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

## 実験結果

### 1. Substance P *i.t.* 投与誘発性 SBL 行動における $\mu$ 受容体作動薬の抑制作用

Substance P 0.1 nmol を *i.t.* 投与すると 50.7 ± 1.7 sec の SBL 行動が認められたが、DAMGO 20 pmol を substance P と共に *i.t.* 投与すると SBL

Table 1. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by DAMGO in Substance P-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/5min)
Substance P (0.1 nmol)	50.7 ± 1.6
Substance P (0.1 nmol) + DAMGO (20 pmol)	13.9 ± 2.3
Naloxonazine + Substance P (0.1 nmol) + DAMGO (20 pmol)	15.8 ± 1.9
Naloxone + Substance P (0.1 nmol) + DAMGO (20 pmol)	45.7 ± 2.3 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered *s.c.* 24 h before administration of DAMGO (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered *s.c.* 10 min before administration of DAMGO (*i.t.*).

Significant difference from substance P plus DAMGO group is indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

Table 2. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by TAPA-NH<sub>2</sub> in Substance P-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/5min)
Substance P (0.1 nmol)	50.7 ± 1.6
Substance P (0.1 nmol) + TAPA-NH <sub>2</sub> (4.0 pmol)	8.9 ± 0.9
Naloxonazine + Substance P (0.1 nmol) + TAPA-NH <sub>2</sub> (4.0 pmol)	22.9 ± 1.9 **
Naloxone + Substance P (0.1 nmol) + TAPA-NH <sub>2</sub> (4.0 pmol)	47.9 ± 1.8 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered *s.c.* 24 h before administration of TAPA-NH<sub>2</sub> (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered *s.c.* 10 min before administration of TAPA-NH<sub>2</sub> (*i.t.*).

Significant difference from substance P plus TAPA-NH<sub>2</sub> group are indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

行動は  $13.9 \pm 2.3$  sec まで著しく抑えられ、約 73% の抑制率であった。この抑制は  $\mu_1$  受容体拮抗薬である naloxonazine 35 mg/kg *s.c.* の前処理によって何ら変化は認められなかった。しかし、naloxone 1 mg/kg *s.c.* の前処理によって、ほぼ control 値まで回復した (Table 1)。

一方、TAPA-NH<sub>2</sub> 4 pmol *i.t.* 投与による substance P 誘発性 SBL 行動の抑制作用は約 83% であり、この抑制作用は naloxonazine の前処理によって有意な拮抗が認められた。また、naloxone 1 mg/kg *s.c.* 前処理によってほぼ完全に拮抗された (Table 2)。

TAPA-NH<sub>2</sub> の homologue である TAPA 2 pmol の *i.t.* 投与による substance P 誘発性 SBL 行動の抑制作用は 88% であり、この抑制作用は DAMGO と同様に naloxonazine の前処理によって拮抗されず、naloxone の投与によって 48.7 sec と、ほぼ control 値まで回復した (Table 3)。

## 2. Capsaicin *i.t.* 投与誘発性 SBL 行動における $\mu$ 受容体作動薬の抑制作用

Capsaicin 0.2 nmol を *i.t.* 投与すると投与直後から 10 分間で約 106 sec の SBL 行動が誘発された。この SBL 行動に対して、DAMGO (20 pmol),

Table 3. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by TAPA in Substance P-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/5min)
Substance P (0.1 nmol)	50.7 ± 1.6
Substance P (0.1 nmol) + TAPA (2.0 pmol)	5.9 ± 1.3
Naloxonazine + Substance P (0.1 nmol) + TAPA (2.0 pmol)	9.3 ± 1.3 **
Naloxone + Substance P (0.1 nmol) + TAPA (2.0 pmol)	47.9 ± 1.8 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered *s.c.* 24 h before administration of TAPA (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered *s.c.* 10 min before administration of TAPA (*i.t.*).

Significant difference from substance P plus TAPA group is indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

Table 4. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by DAMGO in Capsaicin-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/10min)
Capsaicin (0.2 nmol)	106.4 ± 8.8
Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (20 pmol)	21.1 ± 3.0
Naloxonazine + Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (20 pmol)	20.2 ± 2.9
Naloxone + Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (20 pmol)	136.2 ± 7.9 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered *s.c.* 24 h before administration of DAMGO (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered *s.c.* 10 min before administration of DAMGO (*i.t.*).

Significant difference from capsaicin plus DAMGO group is indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

Table 5. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by TAPA-NH<sub>2</sub> in Capsaicin-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/10min)
Capsaicin (0.2 nmol)	106.4 ± 8.8
Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (4.0 pmol)	35.1 ± 9.5
Naloxonazine + Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (4.0 pmol)	34.0 ± 5.9
Naloxone + Capsaicin (0.2 nmol) + DAMGO (0.4 pmol)	138.4 ± 7.9 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered *s.c.* 24 h before administration of TAPA-NH<sub>2</sub> (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered *s.c.* 10 min before administration of TAPA-NH<sub>2</sub> (*i.t.*).

Significant difference from capsaicin plus TAPA-NH<sub>2</sub> group is indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

Table 6. Antagonistic Effect of Naloxonazine or Naloxone on Antinociceptive Action Produced by TAPA in Capsaicin-induced SBL Response in Mice

Treatment	Behavioural Response (sec/10min)
Capsaicin (0.2 nmol)	106.4 ± 8.8
Capsaicin (0.2 nmol) + TAPA (0.5 pmol)	18.2 ± 4.7
Naloxonazine + Capsaicin (0.2 nmol) + TAPA (0.5 pmol)	81.9 ± 5.1 **
Naloxone + Capsaicin (0.2 nmol) + TAPA (0.5 pmol)	120.9 ± 6.1 **

Naloxonazine (35 mg/kg) was administered s.c. 24 h before administration of TAPA (*i.t.*).

Naloxone (1 mg/kg) was administered s.c. 10 min before administration of TAPA (*i.t.*).

Significant difference from capsaicin plus TAPA group are indicated by \*\*  $P < 0.01$ .

TAPA-NH<sub>2</sub> (4 pmol) および TAPA (0.5 pmol) は著しい抑制作用を示し、その抑制作用は naloxone (1 mg/kg s.c.) によって完全に拮抗された。DAMGO および TAPA-NH<sub>2</sub> の SBL 行動の抑制は、naloxonazine の前処理によって拮抗は認められなかったが、TAPA の *i.t.* 投与による抑制作用はほぼ完全に拮抗された (Table 4, 5)。

また、DAMGO (20 pmol) の *i.t.* 投与による substance P および capsaicin 誘発性 SBL 行動の抑制作用はほぼ同程度であるのに対して、TAPA-NH<sub>2</sub> (4 pmol) は capsaicin 誘発性 SBL 行動よりも substance P 誘発性 SBL 行動に対する抑制作用が強力であることが認められた。一方、TAPA (0.5 pmol) 投与による capsaicin 誘発性 SBL 行動の抑制作用は 83% であるのに対して、substance P 誘発性 SBL 行動 (50.7 sec/5 min) に対する抑制作用は 41% (30.0 sec/5 min) であった (Table 6)。

## 考 察

興奮性アミノ酸である glutamate<sup>13)</sup> およびタキキニンペプチドである substance P<sup>14)</sup> は脊髄後角において痛みの伝達に参与し、脊髄後角の表層に局存していることが知られている。脊髄後角表層の substance P 含有神経の約 90% に  $\mu$ -

受容体 m-RNA が発現することが見い出されていることから、 $\mu$ -受容体作動薬は pre-synapse に作用して substance P 含有神経からの substance P の遊離を制御している可能性が示唆されている<sup>15)</sup>。一方、 $\mu$ -受容体作動薬は生体内侵害刺激物質の受容体側である post synapse にも作用して、この受容体の活動を抑制することが報告されている事から、 $\mu$ -受容体作動薬は pre-<sup>14)</sup> および post-synapse<sup>16)</sup> の両部位に作用して抗侵害作用を示すと考えられる。

$\mu$ -受容体は  $\mu_1$  および  $\mu_2$  の subtype に分類されている<sup>17)</sup>。この分類方法は、 $\mu$  ( $\mu_1$  および  $\mu_2$ ) 受容体拮抗薬の  $\beta$ -funaltrexamine および  $\mu_1$ -受容体選択的拮抗薬の naloxonazine を用いた薬理的な手法によって分類されたものである。また、morphine に低感受性の  $\mu_1$  受容体遺伝子欠損マウスである CXBK マウスを用いた  $\mu_1$  および  $\mu_2$  受容体の分類もなされている<sup>18)</sup>。

Substance P をマウスに *i.t.* 投与すると SBL 行動が誘発される。これらの行動は NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬によって特異的に拮抗される事から、substance P は NK<sub>1</sub> 受容体を活性化してこれらの行動を誘発することが明かとなっている。一方、capsaicin の *i.t.* 投与によって誘発される SBL 行動は、興奮性アミノ酸である glutamate および substance P 含有神経の pre-synapse に存

在する vanilloid 受容体に作用する事により, これら興奮性物質の遊離を介して二次的に SBL 行動を誘発することが証明されている<sup>19,20)</sup>.

本研究においては, DAMGO, TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> の *i.t.* 投与により substance P 誘発性 SBL 行動が約 70 - 90% 抑制される用量であるそれぞれ 20 pmol, 2 pmol および 4 pmol を用いて実験を行った. 3つのオピオイドペプチドは substance P 誘発性 SBL 行動を抑制したことから, これらのオピオイドペプチドは post synapse 側に存在する  $\mu$ -受容体を介して, substance P による NK<sub>1</sub> 受容体の活性化を抑制することが明らかになった. この抑制作用は TAPA-NH<sub>2</sub> においてのみ naloxonazine 35 mg/kg *s.c.* 前処理によって有意な抗侵害作用の拮抗が認められた. この実験結果から, substance P 誘発性 SBL 行動に対する TAPA-NH<sub>2</sub> の抑制作用の一部は, naloxonazine 感受性の  $\mu$ -受容体を介している事が示唆された.

Capsaicin 誘発性 SBL 行動に対して3つのオピオイドペプチドは異なった作用態度を示した. 特に, TAPA 投与による SBL 行動の抑制作用は naloxonazine 35 mg/kg *s.c.* の前処理によってほぼ完全に拮抗された. 先の substance P 誘発性 SBL 行動に対する TAPA の抑制作用は naloxonazine 非感受性である事と考えあわせると, capsaicin によって遊離される substance P, glutamate および calcitonin gene-related peptide (CGRP) などの含有神経に TAPA が作用し, これら SBL 行動に関係する物質の遊離を抑制する事によって SBL 行動を抑制する事を示唆している.

### 引用文献

- 1) Montecucchi, P. C., de Castiglione, R., Piani, S., Gozzini, L., Erspamer, V., *Int. J. Pept Protein Res.*, **17**, 275-283 (1981).
- 2) Broccardo, M., Erspamer, V., Erspamer, G. F., Improta, G., Linari, G., Melchiorri, P., Montecucchi, P. C., *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 625-631 (1981).
- 3) Salvadori, S., Sato, G., Tomatis, R., *Int. J. Protein Res.*, **19**, 536-542 (1982).
- 4) Chaki, K., Sakurada, S., Sakurada, T., Nakata, N., Kisara, K., Watanabe, H., Suzuki, K., *Peptide*, **11**, 139-144 (1990).
- 5) Feuerstein, G., Faden, I. I., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**, 151 (1993).
- 6) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H., Amano, H., *Nature*, **282**, 410-412 (1979).
- 7) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H., Amano, H., *Eur. J. Pharmacol.*, **55**, 109-111 (1979).
- 8) Kisara, K., Sakurada, S., Sakurada, T., Sasaki, Y., Sato, T., Suzuki, K., Watanabe, H., *Br. J. Pharmacol.*, **87**, 183-189 (1986).
- 9) Sasaki, Y., Anbo, A., Suzuki, K., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2316-2318 (1991).
- 10) Ling, G. S. F., Spiegel, K., Lockhart, S. H., Pasternak, G. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 149-155 (1984).
- 11) Hylden, J. L. K., Wilcox, G. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **67**, 313-316 (1980).
- 12) Dunnett, C. W., *Biometrics*, **20**, 482-491 (1964).
- 13) Sorkin, L. S., McAdoo, D. L., *Brain Res.*, **607**, 89-98 (1993).
- 14) Go, V. L., Yaksh, T. L., *J. Physiol.*, **391**, 141-167 (1987).
- 15) Satoh, M., Minami, M., *Pharmacol. Ther.*, **68**, 343-364 (1995).
- 16) Chem, L., Huang, L. Y. M., *Neuron*, **7**, 319-326 (1991).
- 17) Sato, T., Sakurada, S., Takahashi, N., Sakurada, T., Tan-No, K., Wako, K., Kisara, K., *Eur. J. Pharmacol.*, **369**, 183-187 (1991).
- 18) Vaught, J. L., Mathiasen, J. H. R., Raffa, R. B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 12-16 (1988).
- 19) Holzer, P., *Neurosci.* **24**, 739-768 (1988).
- 20) Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., L. X., Elde, R., *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 946-958 (1999).