

平成22年 6月 4日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500333

研究課題名 (和文) 脳内神経ペプチド・ノシセプチン類による学習・記憶機能障害
改善作用の作用機序解明研究課題名 (英文) MECHANISMS OF MODULATION OF LEARNING AND MEMORY FUNCTION
BY NOCICEPTIN

研究代表者

平松 正行 (HIRAMATSU MASAYUKI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：10189863

研究成果の概要 (和文)： ノシセプチンが学習・記憶機能に対し抑制的な役割をしているというこれまでの数多くの研究報告とは逆に、学習・記憶機能を障害する用量より低い用量では、学習・記憶障害が改善されること、この作用は、海馬においてノシセプチンまたは生体内で代謝された C 末端側のフラグメントが、NOP 受容体を介さずに発現していることを明らかにした。さらに、この改善作用は、cAMP/PKA 経路を介した機序である可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文)： Low doses of nociceptin attenuated the memory impairment, and this effect was not mediated via nociceptin opioid peptide receptors. We suggested that there is a novel action site or mechanism for these effects, and the sequence of nociceptin (14-17) is a critical structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学／神経薬理学

キーワード：神経機能の可塑性、ノシセプチン、細胞内情報伝達系、ペプチドフラグメント、nociceptin opioid peptide (NOP) 受容体、ERK / MEK 経路、学習・記憶機能、抗認知症薬開発

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、 κ オピオイド受容体に結合する神経ペプチドであるダイノルフィン A (1-17) やその誘導体が、高用量では学習・記憶機能を障害し、非常に低用量ではコリン作動性神経系やグルタミン酸作動性神

経系の機能が障害されたときに、その学習・記憶機能障害を改善することを明らかにしてきた (Hiramatsu et al., 1998, 2000, 2001, 2006)。一方、10 年程前に発見された内在性の神経ペプチドであるノシセプチン (別名：オーファニン FQ) は、ノシセプチンおよびそ

の受容体である nociceptin opioid peptide (NOP) 受容体がダイノルフィン A (1-17) および κ オピオイド受容体と相同性があり、学習・記憶機能に対し抑制的な役割をしていることが数多く報告されている (Reinscheid et al., 1995; Manabe et al., 1998; Sandin et al., 2004)。

一方、これまでの研究結果とは逆に、我々は、学習・記憶機能を障害する用量より低い用量のノシセプチンを投与することにより、薬物によって引き起こされる学習・記憶障害を改善することを報告してきた (Hiramatsu et al., 1999, 2000)。また、低用量のノシセプチンは、アルツハイマー病の原因物質のひとつである β アミロイド蛋白の活性フラグメント、アミロイド β ペプチド (25-35) により惹起される学習・記憶障害に対し改善作用を示すこと、さらに NOP 受容体ノックアウトマウスを用いた研究から、ノシセプチンの受容体が無くてもノシセプチンは低用量で学習・記憶障害を改善できること、その改善作用は NOP 受容体の拮抗薬では拮抗されないことから、この作用には NOP 受容体が関与していない可能性が考えられる。ノシセプチンの作用部位は現在までに NOP 受容体の存在しか知られておらず、低用量ノシセプチンによる学習・記憶障害改善作用の生化学的、分子生物学的メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、この興味ある新たなノシセプチンの作用機序を明らかにするため、1. ノシセプチン、ノシセプチン関連ペプチドが学習・記憶機能に対して作用する神経系を同定し、その分子生物学的な作用機序を明らかにする、2. ヒトに見られる認知症により近いとされる β アミロイド蛋白注入モデルや酸化ストレス負荷モデルなどの器質的、機能的な脳障害を起こした動物モデルを用い、ノシセプチン関連遺伝子、コリン作動性神経系の受容体遺伝子などの発現の変化を遺伝子レベルで解析する、3. これら遺伝子変化がその後のタンパク発現や機能の発現にどのような役割を果たしているのかを検討することにより、遅発性・進行性の学習・記憶機能障害やこれら神経ペプチドによる改善作用に係わる機序を明らかにすることを目的とした。

ノシセプチンや NOP 受容体は学習・記憶機能に重要な海馬、扁桃体、大脳皮質に分布し、脳内にノシセプチンを投与することにより、記憶機能が障害されることが報告されている。一方、我々は、記憶障害を誘発するノシセプチンの投与量は非常に高用量であり、低

用量のノシセプチンを投与することにより、薬物によって引き起こされる記憶障害を改善することを明らかにしてきた。しかし、その低用量ノシセプチン投与による記憶障害を改善するメカニズムは明らかになっていない。そこで記憶形成に重要な細胞内情報伝達系である mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK)/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び cAMP/protein kinase A (PKA) 経路を阻害することにより引き起こされる記憶障害に対するノシセプチンの海馬内投与の効果を、受動的回避学習試験法により検討した。また NOP 受容体欠損マウスやノシセプチンの代謝物フラグメント、ノシセプチン (1-13) 及び (14-17) を用いて受動的回避学習試験を行うことにより、ノシセプチン投与による記憶障害改善作用に NOP 受容体やノシセプチンの代謝物が関与しているかを検討した。

3. 研究の方法

実験には、7-9 週齢の ddY 系雄性マウスおよび、9-12 週齢の雄性 NOP 受容体欠損マウスを用いた。マウスをケタミン (100 mg/kg, i. p.) と塩酸キシラジン (10 mg/kg, i. p.) の混液による麻酔下で、薬物を海馬内に投与するためのカニューレを装着した。手術後、マウスを個別飼育し、3 日以上回復期間を待ってから行動実験に用いた。記憶機能の評価には受動的回避学習試験を用いた。受動的回避学習試験の訓練試行の 30 分前に、ノシセプチン及びノシセプチン関連ペプチドを、MEK 阻害薬、U0126 および PKA 阻害薬、Rp-cAMPS はこれらのペプチドの直前にイソフルラン麻酔下で海馬内 (i. h.) に投与した。

受動的回避学習試験の結果は、ボックスプロットにより中央値、第一及び第三四分位数で示した。有意差検定として、対応のない 2 群間の検定には、Mann-Whitney の U-検定を用い、多群間の検定には、Bonferroni 検定を用いて個々の群の比較を行った。なお危険率が 5%未満の場合を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

MEK 阻害薬、U0126 (2.63 nmol/mouse) を海馬内に投与すると、コントロール群と比べて、ステップダウン潜時が有意に短縮し、記憶障害が誘発された。この U0126 による記憶障害に対して nociceptin (1, 10 及び 100 fmol/mouse, i. h.) を投与したところ、ベル型の用量反応性を示し、10 fmol の用量において記憶障害が有意に改善された (Fig. 1A)。

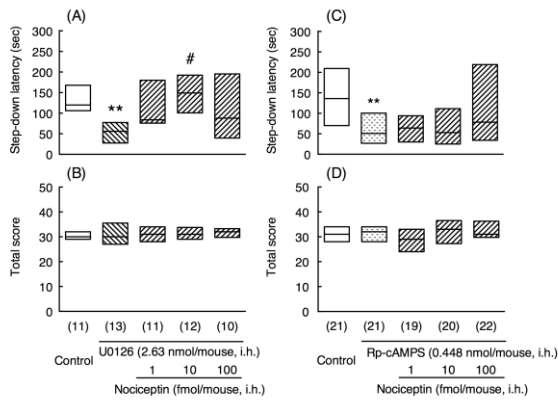


Fig. 1. Effects of nociceptin on U0126 and Rp-cAMPS-induced memory impairment (A, C) and responses to electric shocks (B, D) in the passive avoidance test. The number of mice used is shown in parentheses. Significant levels; ** $p < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney's U-test), # $p < 0.05$ vs. U0126 alone (Bonferroni's test).

また、PKA 阻害薬、Rp-cAMPS (0.448 nmol/mouse, i. h.) を投与すると、コントロール群と比べて、ステップダウン潜時が有意に短縮し、記憶障害が誘発された。しかしこの Rp-cAMPS による記憶障害に対してノシセプチン (1, 10 及び 100 fmol/mouse, i. h.) は、いずれの用量においても有意な改善作用を示さなかった (Fig. 1C)。また、海馬における受動的回避学習試験の訓練試行後の ERK のリン酸化に対する MEK 阻害薬、U0126 による抑制作用は、ノシセプチンを併用投与しても改善されなかった。

さらに、U0126 および Rp-cAMPS による記憶障害に対するホスホジエステラーゼ阻害薬、ロリプラムの効果を検討したところ、ノシセプチンと同様、U0126 (2.63 nmol/mouse, i. h.) による記憶障害に対しては改善作用を示したが、Rp-cAMPS (0.448 nmol/mouse, i. h.) による記憶障害は改善されなかった。

ノシセプチンによる記憶障害改善作用に NOP 受容体が関与しているかを検討するため、NOP 受容体欠損マウスを用いて同様の実験を行った。NOP 受容体欠損マウスに U0126 (5.26 nmol/mouse, i. h.) を投与すると、コントロール群と比べて、ステップダウン潜時が有意に短縮し、記憶障害が誘発された。この記憶障害に対してノシセプチン (0.1, 1 及び 10 fmol/mouse, i. h.) を投与したところ、ベル型の用量反応性を示し、1 fmol の用量において記憶障害が有意に改善された。

また、このノシセプチンの NOP 受容体を介さない記憶障害を改善する作用に、ノシセプチンの代謝物が関与しているかを検討するために、U0126 誘発記憶障害に対するノシセプチンの代謝物フラグメント、ノシセプチン (1-13) および (14-17) の作用を検討した。U0126 (2.63 nmol/mouse, i. h.) による記憶

障害に対してノシセプチン (14-17) (0.1, 1 及び 10 fmol/mouse) を海馬内に投与したところ、1 fmol の用量において記憶障害が有意に改善された。しかし、ノシセプチン (14-17) と同じアミノ酸組成で逆配列のノシセプチン (17-14) (1 fmol/mouse) を海馬内に投与したが、有意な改善作用は認められなかった (Fig. 2A)。また U0126 (2.63 nmol/mouse, i. h.) による記憶障害に対してノシセプチン (1-13) (0.1, 1 及び 10 fmol/mouse) を海馬内に投与したが、いずれの用量においても有意な改善作用は認められなかった (Fig. 2C)。

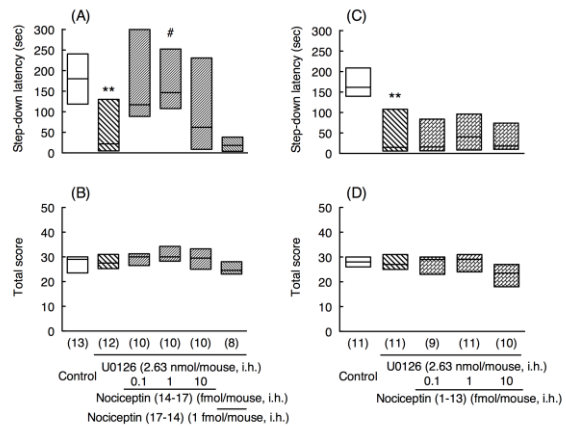


Fig. 2. Effects of nociceptin (14-17) and nociceptin (1-13) on U0126-induced memory impairment (A, C) and responses to electric shocks (B, D) in the passive avoidance test in ddY mice. The number of mice used is shown in parentheses. Significant levels: ** $p < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney's U-test), # $p < 0.05$ vs. U0126 alone (Bonferroni's test).

記憶機能に対するノシセプチンや NOP 受容体の関与について、現在までに数多くの報告があるが、その多くはノシセプチンや NOP 受容体作動薬を投与すると記憶機能が障害される、NOP 受容体やノシセプチンの前駆体タンパク質、プレプロノシセプチンの遺伝子を欠損させたマウスは通常のマウスに比べて、記憶機能が亢進しているといった報告で、ノシセプチンや NOP 受容体は生体内で記憶機能に対して抑制的な役割を果たしていると考えられてきた。しかし我々はこれらで報告されている記憶機能の障害は、非常に高用量のノシセプチンを投与した場合の作用であり、低用量のノシセプチンを投与することにより、ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬、スコポラミンやニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬、メカミラミンによって引き起こされる記憶障害を改善することを報告してきた。しかしながら低用量ノシセプチン投与による記憶障害を改善する作用は、NOP 受容体拮抗薬では拮抗されないことから、NOP 受容体を介さずに作用を発現している可

能性があり、そのメカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで記憶形成に重要な細胞内情報伝達系、MEK/ERK 経路、cAMP/PKA 経路を阻害することによって引き起こされる記憶障害に対するノシセプチンの作用を受動的回避学習試験により検討した。その結果、ノシセプチンを海馬内に投与することにより、MEK 阻害薬、U0126 による記憶障害は改善されたのに対して、PKA 阻害薬、Rp-cAMPS による記憶障害は改善されなかった。またこれら記憶障害に対して、ホスホジエステラーゼ阻害薬、ロリプラムもノシセプチンと同様、MEK 阻害薬による記憶障害を改善したのに対して、PKA 阻害薬による記憶障害は改善されなかった。また U0126 投与による受動的回避学習試験の訓練試行後の ERK のリン酸化の抑制に対してノシセプチンを併用投与しても影響がなかったことから、ノシセプチンは cAMP/PKA 経路を介して記憶障害を改善している可能性が示唆された。また NOP 受容体欠損マウスにおいても、ノシセプチンを併用投与することにより、MEK 阻害薬による記憶障害は改善されたことから、ノシセプチン投与による記憶障害改善作用は NOP 受容体を介さない作用であることが強く示唆された。

またこのノシセプチンに NOP 受容体を介さない作用があるとの報告はなされていないが、ノシセプチンの C 末端側のフラグメントであるノシセプチン (13-17) 及び (14-17) は、NOP 受容体には高い親和性を持たないが、生理活性を示すことが報告されている。さらに、ノシセプチンはラット海馬内においてノシセプチン (1-13) と (14-17) のフラグメントに分解されることが報告されており、低用量のノシセプチンによる記憶障害改善作用には、ノシセプチンの代謝物が関与している可能性が考えられる。そこでノシセプチンの代謝フラグメント、ノシセプチン (1-13) および (14-17) の U0126 誘発記憶障害に対する作用を検討した。その結果、ノシセプチンの C 末端側フラグメント、ノシセプチン (14-17) を併用投与することにより、U0126 による記憶障害は改善された。これらの結果から、ノシセプチンまたは生体内で代謝された C 末端側のフラグメントは、14-17 位のアミノ酸配列を持つことで、海馬において NOP 受容体を介さずに記憶障害を改善している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Masaya Miwa, Fumika Horiba, Hiroshi Takeshima, Toshitaka Nabeshima and Masayuki Hiramatsu: Nociceptin and its

metabolite attenuate U0126-induced memory impairment through a nociceptin opioid peptide (NOP) receptor-independent mechanism. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 93(3), 396-405 (2010). 査読有

- ② Masaya Miwa, Chieko Shinki, Shogo Uchida and Masayuki Hiramatsu: Distinct effects of nociceptin analogs on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 602 (2-3), 328-333 (2009). 査読有
- ③ Masayuki Hiramatsu, Masaya Miwa, Kazuki Hashimoto, Satoko Kawai and Nao Nomura: Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamlamine-induced learning and memory impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat. *Brain Res.*, 1195, 96-103 (2008). 査読有

他 5 件

[学会発表] (計 25 件)

- ① Masaya Miwa, Fumika Horiba, Shogo Uchida, Toshitaka Nabeshima, and Masayuki Hiramatsu: Nociceptin and its metabolite improve U0126-induced memory impairment through NOP receptor-independent mechanism, The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (Chicago), (2009 年 10 月 21 日)
- ② 滝口修直、西山亜希、森 啓真、鍋島俊隆、平松正行: β -amyloid protein (25-35) を用いたアルツハイマー型認知症モデルマウスに対する cilostazol の効果、第 82 回日本薬理学会年会 (横浜) (2009 年 3 月 17 日)
- ③ 三輪将也、堀場史加、内田将吾、鍋島俊隆、平松正行: ノシセプチン及びノシセプチン代謝物は MEK 阻害薬による記憶障害を NOP 受容体非依存的に改善する、第 82 回日本薬理学会年会 (横浜) (2009 年 3 月 17 日)
- ④ 平松正行、高橋ゆかり、川村美緒、鍋島俊隆: 拘束水浸ストレス負荷による学習・記憶障害とグルタミン酸作動性神経系の関与およびサイトカイン遺伝子の発現変化、第 13 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム・学術フロンティア報告会共催合同大会 (名古屋) (2009 年 1 月 9 日)
- ⑤ 内田将吾、藤井久美、三輪将也、鍋島俊隆、平松正行: 低用量ノシセプチンの海馬内投与による学習・記憶障害改善作用と細胞内情報伝達系の関与、第 81 回日本薬理学会年会 (横浜) (2008 年 3 月 19 日)
- ⑥ Masaya Miwa, Shogo Uchida, Fumika

Horiba, Kumi Fujii, Toshitaka Nabeshima and Masayuki Hiramatsu : Nociceptin improves long-term memory impairment induced by a MEK inhibitor, but not a PKA inhibitor. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders) (Nagoya) (2008年9月24日)

- ⑦ Masaya Miwa, Shogo Uchida and Masayuki Hiramatsu : Nociceptin improves impairment of learning and memory mediated by MEK/ERK pathway. The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience (San Diego) (2007年11月5日)

他 18 件

[図書] (計 3 件)

- ① 平松正行 : GraphPad Prism 5 による生物統計学入門、カットシステム (2010) 総ページ数 294 頁

他 2 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松正行 (HIRAMATSU MASAYUKI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 1 0 1 8 9 8 6 3