

## エンドモルフィンの代謝に基づく鎮痛薬の開発

櫻田 誓<sup>1)</sup>Development of a New Analgesic Based on Metabolism of Endomorphin,  
an Endogenous Opioid PeptideChikai SAKURADA<sup>1)</sup>Department of Biochemistry, Daiichi College of Pharmaceutical Sciences,  
22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815-8511, Japan

(Received May 6, 2004)

Endomorphin-2 (Tyr-Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub>) was discovered as an endogenous ligand for the  $\mu$ -opioid receptor. The physiologic function of endomorphin-2 as a neurotransmitter or neuromodulator may cease after rapid enzymatic processing in the synapses of the brain, like other neuropeptides. The present study was conducted to examine the metabolism of endomorphin-2 by synaptic membranes prepared from mouse brain. Major metabolites were free tyrosine, free phenylalanine, Tyr-Pro, and PheNH<sub>2</sub>. Both the degradation of endomorphin-2 and the accumulation of major metabolites were inhibited by specific inhibitors of dipeptidyl peptidase IV, such as diprotin A and B. On the other hand, the accumulation of Phe-PheNH<sub>2</sub> and Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub> was increased in the presence of bestatin, an aminopeptidase inhibitor, whereas that of free phenylalanine and PheNH<sub>2</sub> was decreased. Furthermore, purified dipeptidyl peptidase IV hydrolyzed endomorphin-2 at the cleavage site, the Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> bond. Thus degradation of endomorphin-2 by brain synaptic membranes appears to occur mainly through the cleavage of the Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> bond by dipeptidyl peptidase IV, followed by the release of free phenylalanine and PheNH<sub>2</sub> from the liberated fragment, Phe-PheNH<sub>2</sub>, by aminopeptidase. We have also examined the effects of diprotin A on the antinociception induced by intracerebroventricularly administered endomorphin-2 in the mouse paw withdrawal test. Diprotin A simultaneously injected with endomorphin-2 enhanced endomorphin-2-induced antinociception. These results indicate that dipeptidyl peptidase IV may be an important peptidase responsible for terminating endomorphin-2-induced antinociception at the supraspinal level in mice. These findings also suggest that selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors or dipeptidyl peptidase IV-resistant endomorphin-2 analogues have the potential for the clinical use as analgesics.

**Key words**—antinociception; dipeptidyl peptidase IV; endomorphin-2; metabolic pathway; mouse brain; synaptic membranes

## 1. はじめに

エンドモルフィン Endomorphin-1 (EM1: Tyr-Pro-Trp-PheNH<sub>2</sub>), Endomorphin-2 (EM2: Tyr-Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub>) は, 1997年 Zadina ら<sup>2)</sup>により,  $\mu$  オピオイド受容体の内在性リガンドとして, ウシ及びヒト脳より単離されたテトラペプチドである (Table 1). 中枢神経系での分布は EM1 が傍小脳脚核や弧束核などの上位中枢に, また EM2 は脊髄後角の表層部や三叉神経脊髄路核などの脊髄であり,

両ペプチド間で差が見られるが, いずれも  $\mu$  オピオイド受容体が分布している部位で, かつ疼痛伝達に關与する重要な部位である.<sup>3)</sup> また EM2 は脊髄後根神経節の一次知覚神経で生成され, 脊髄後角の表層部に遊離することが示されている. 受容体結合実験などから, 両ペプチドは  $\mu$  オピオイド受容体に極めて高い親和性を示し, モルヒネの作用と類似していることが報告されている.<sup>2)</sup> さらに, 行動薬理的な研究から, エンドモルフィンを脳室内, 脊髄クモ膜腔内投与すると侵害閾値が上昇し, その効果は  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬で消失する.<sup>2,4-7)</sup> また,  $\mu$  オピオイド受容体欠損マウスを用いた実験では, エンドモルフィン誘発性の抗侵害効果は消失している.<sup>8)</sup>

第一薬科大学生化学教室 (〒815-8511 福岡市南区玉川町 22-1)

e-mail: chikai@nichiyaku.ac.jp

本総説は, 平成 15 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである.

Table 1. Endogenous Opioid Peptides

Peptides	Amino acid sequence	Receptor
Met-enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	$\delta$
Leu-enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	$\delta$
Dynorphin A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	$\kappa$
Dynorphin B	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	$\kappa$
$\beta$ -endorphin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	$\mu$
Endomorphin-1	Tyr-Pro-Trp-PheNH <sub>2</sub>	$\mu$
Endomorphin-2	Tyr-Pro-Phe-PheNH <sub>2</sub>	$\mu$
Nociceptin	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	Nociceptin receptor

以上の結果より、エンドモルフィン脳・脊髄レベルでの痛みの調節に重要な役割を演じていると言える。

エンドモルフィンのような神経ペプチドの生理作用を考える際、その生成と分解はその生理作用発現との関連において巧妙に制御されている。古典的神経伝達物質のアセチルコリンの場合、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンはシナプス膜に結合している膜結合性アセチルコリンエステラーゼによる酵素的分解でその生理作用を終結する。神経ペプチドの場合もアセチルコリン分解系とのアナロジーでシナプス膜に存在する膜結合性ペプチダーゼによる分解を通じて、そのペプチドの消長が調節されていると考えられており、そのラインでの研究がなされている。なかでも、最も研究が進んでいるのは内在性オピオイドペプチドであるエンケファリン分解系で、生化学的・生理学的研究から膜結合性のエンドペプチダーゼ-24.11 (EC3.4.24.11, 別名エンケファリナーゼ, ネプリライシン) が *in vivo* におけるエンケファリン分解酵素であることが明らかにされている。<sup>9)</sup> さらに、本酵素の阻害剤が非麻薬性鎮痛薬として有望視されている。同様のロジックが、エンドモルフィン分解系にも適用できると考えられる。本稿では、エンドモルフィンの分解に関与する主要なペプチダーゼをどのように推論したかを紹介し、また、エンドモルフィンの代謝機構に基づく鎮痛薬の可能性についても報告する。

## 2. マウス脳シナプス膜標品によるエンドルフィン-2の代謝<sup>10)</sup>

マウス脳シナプス膜標品による EM-2 の分解を解析した。EM-2 分解の測定は、逆相カラムを用い

た HPLC で分解物を相互に分離し、基質 EM-2 の減少あるいは代謝物の生成を追跡した。なお、代謝物の同定はアミノ酸組成分析により行った。マウス脳シナプス膜標品により EM-2 は、時間依存的に分解された。また、分解の半減期はロイシン-エンケファリンに比較し約 6 倍長く、比較的ペプチダーゼ抵抗性であった。

また代謝物を解析したところ、Fig. 1 に示すように、Tyr, PheNH<sub>2</sub>, Phe, Tyr-Pro, Phe-PheNH<sub>2</sub> が時間経過に伴って優位に増加し、これらが主要代謝産物であった。次に、EM-2 の最初の分解の引き金を引くペプチダーゼを明らかにするため、基質 EM-2 の減少に対する各種ペプチダーゼ阻害剤の効果を調べた。その結果、セリンプロテアーゼ阻害剤である DFP に加え、ジペプチジルペプチダーゼ IV 特異的阻害剤であるジプロチン A とジプロチン B で強く抑えられた (Table 2)。一方、アンジオテンシン変換酵素特異的阻害剤であるエナラプリル、アミノペプチダーゼ特異的阻害剤であるベスタチン、エンドペプチダーゼ-24.11 特異的阻害剤であるホスホラミドン、プロリルエンドペプチダーゼ特異的阻害剤である Z-321 ではほとんど阻害されなかった。よって、最初の分解にジペプチジルペプチダーゼ IV の関与が示唆された。次に主要代謝物の生成に対する阻害剤の影響を調べたところ、ジプロチン A により主要代謝物の生成が強く抑制された (Fig. 2)。さらに、ベスタチン存在下では、PheNH<sub>2</sub>, Phe の生成が強く抑えられ、一方、Phe-PheNH<sub>2</sub> と Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub> の生成が増強された (Fig. 3)。以上の結果より、EM-2 の最初の切断に、DFP 感受性のジペプチジルペプチダーゼ IV が関与し、2 次的な

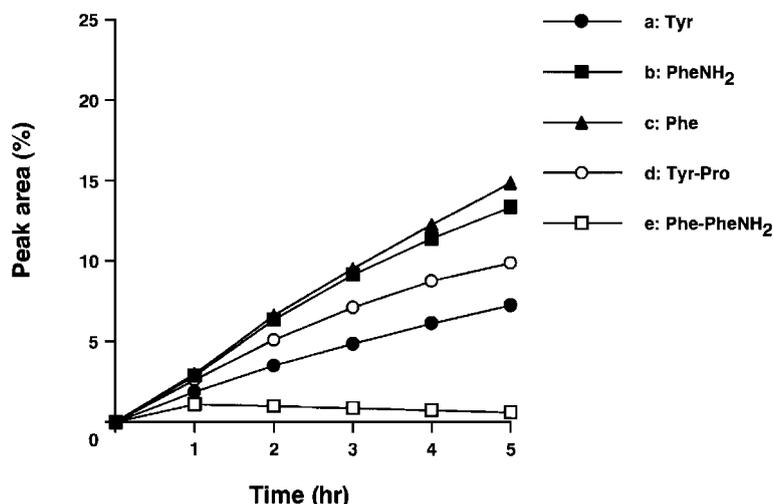


Fig. 1. Time Course of Endomorphin-2 Degradation Products Produced through the Action of Mouse Brain Synaptic Membranes

The reaction mixture (0.1 ml, pH 7.5) containing 10  $\mu$ g protein of the membrane preparation, was incubated at 37°C for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hr. After heating at 100°C for 10 min, 10  $\mu$ l aliquots of the mixture were analyzed by HPLC on a reversed phase column (4.6 $\times$ 150 mm) of Symmetry C18 which had been equilibrated with 1.0% acetonitrile in 0.05% TFA. Elution was carried out at room temperature with a 60 min linear gradient of 1.0–65% acetonitrile in 0.05% TFA at a flow rate of 1.0 ml/min. The absorbance at 210 nm was monitored. Cleavage products were separated by HPLC and their peaks areas traced on the chart were measured. The vertical coordinate indicates the relative value of the peak area calculated on the basis of that of the substrate, endomorphin-2 at 0 hr. The results are the mean of triplicate determinations. a: Tyr, b: PheNH<sub>2</sub>, c: Phe, d: Tyr-Pro, e: Phe-PheNH<sub>2</sub>.

Table 2. Effect of Peptidase Inhibitors on the Degradation of Endomorphin-2 by Mouse Brain Synaptic Membranes

Inhibitor	Concentration (mM)	Inhibition (%)
Diprotin A	1.0	51
Diprotin B	1.0	53
DFP	1.0	47
Enalapril	0.1	4
Bestatin	0.1	10
Phosphoramidon	0.1	13
Z-321	0.1	23

The activity was measured on the basis of the disappearance of endomorphin-2, as detected by HPLC.

代謝にアミノペプチダーゼが関与していることが明らかになった。

### 3. ジペプチジルペプチダーゼ IV によるエンドモルフィン-2 の代謝

マウス脳シナプス膜標品による EM-2 の最初の分解にジペプチジルペプチダーゼ IV の関与が予測されたため、ジペプチジルペプチダーゼ IV 酵素精製標品による EM-2 の代謝を解析した。その結果、Tyr-Pro (peak d) と Phe-PheNH<sub>2</sub> (peak f) のみが生成すること、さらにそれらの生成は、ジプロチン A と B で完全に抑えられた (Fig. 4)。この結果は、脳シナプスでの EM-2 の最初の分解が Pro<sup>2</sup>-Phe<sup>3</sup> 間

で生じることを強く支持している。

### 4. エンドモルフィン-2 誘発性の抗侵害作用に対するジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害剤の効果

EM-2 誘発性の抗侵害作用 (鎮痛作用) は、paw withdrawal test により評価した。<sup>10)</sup> EM-2 の脳室内投与によって誘発される抗侵害作用を Fig. 5 (A) に示した。

EM-2 (20 nmol, 40 nmol) 脳室内投与により、優位な抗侵害効果が出現した。EM-2 の効果は、投与後 5 分で最大となり、時間経過に伴いその効果は減弱し、20 分後には消失した。投与後 5 分における ED<sub>50</sub> は、13 nmol であった。次にジペプチジルペプチダーゼ IV 特異的阻害剤であるジプロチン A (4.0 nmol) と EM-2 を同時に脳室内投与したところ、EM-2 の抗侵害効果が増強された (Fig. 5 (B))。ジプロチン A 同時投与による EM-2 の投与後 5 分における ED<sub>50</sub> は、2.6 nmol であった。ED<sub>50</sub> 値から判断すると、ジプロチン A 同時投与による効果は、EM-2 単独投与に比較し約 5 倍増強されている。これらの結果は、脳内における EM-2 の不活性化にジペプチジルペプチダーゼ IV が関与していることを示唆している。

### 5. おわりに

現在までにエンドモルフィン代謝に関する報告がいくつかなされているが、ホモジネートや可溶性の

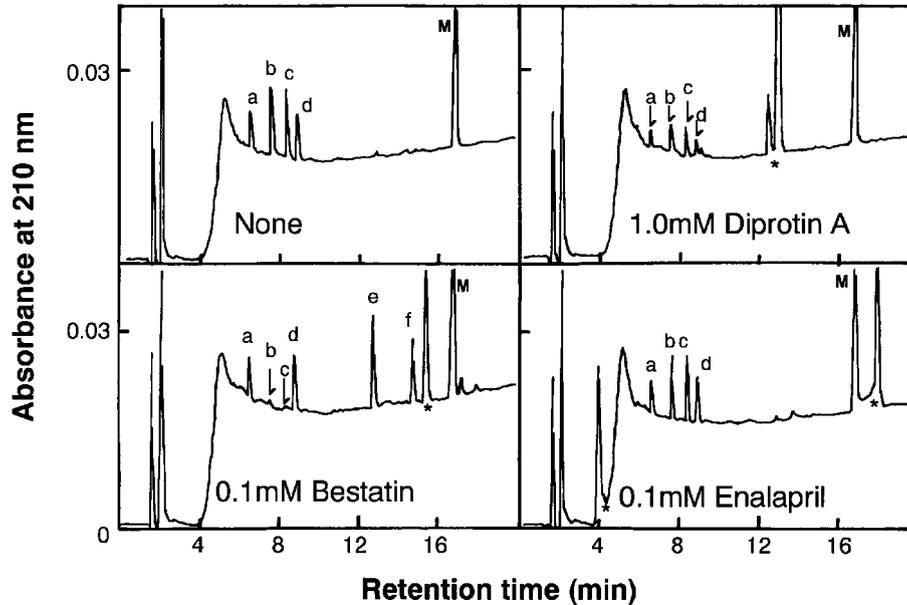


Fig. 2. Effect of Peptidase Inhibitors on the Degradation of Endomorphin-2 by Mouse Brain Synaptic Membranes

The reaction mixture (0.1 ml, pH 7.5) containing 20  $\mu$ g protein of the membrane preparation, was incubated at 37°C for 3 hr in the absence or presence of 1.0 mM diprotin A, 0.1 mM bestatin, or 0.1 mM enalapril. After heating at 100°C for 10 min, 10  $\mu$ l aliquots of the mixture were analyzed by HPLC as described in Fig. 1. Asterisk (\*) indicates the peak derived from the inhibitor added. a: Tyr, b: PheNH<sub>2</sub>, c: Phe, d: Tyr-Pro, e: Phe-PheNH<sub>2</sub>, f: Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub>, M: endomorphin-2.

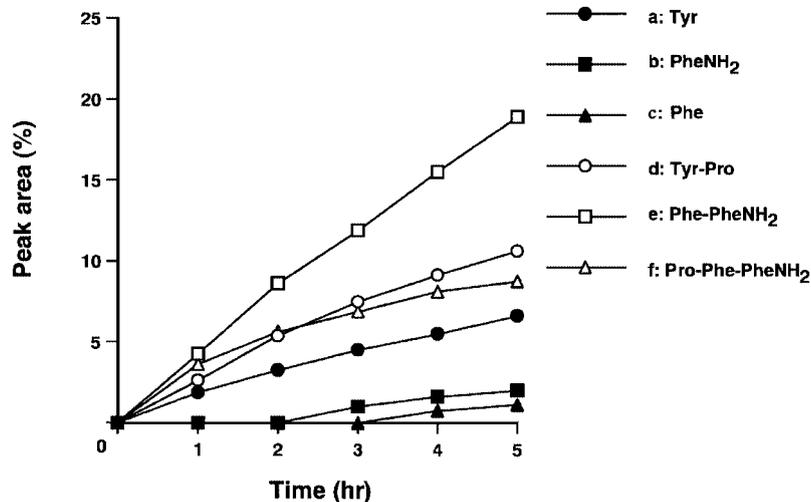


Fig. 3. Time Course of Endomorphin-2 Degradation Products Produced through the Action of Mouse Brain Synaptic Membranes in the Presence of 0.1 mM Bestatin

The reaction mixture was incubated and treated with the same procedure as described in Fig. 1. Cleavage products were separated by HPLC as described in Fig. 1 and their peak areas traced on the chart were measured. The vertical coordinate indicates the relative value of the peak area calculated on the basis of that of the substrate, endomorphin-2 at 0 hr. The results are the mean of triplicate determinations. a: Tyr, b: PheNH<sub>2</sub>, c: Phe, d: Tyr-Pro, e: Phe-PheNH<sub>2</sub>, f: Pro-Phe-PheNH<sub>2</sub>.

酵素を用いた研究であり、統一した結果は報告されていない。今回、筆者らは脳シナプス膜標品を用いて膜結合性ペプチダーゼに注目し解析した。その結果、脳シナプス膜標品による EM-2 の最初の分解にジペプチジルペプチダーゼ IV が関与していること、さらには *in vivo* での EM-2 の不活性化にジペ

プチジルペプチダーゼ IV が関与していることが明らかになった (Fig. 6)。これらの発見は、ジペプチジルペプチダーゼ IV 特異的阻害剤が臨床上有用な鎮痛薬と成り得る可能性を示唆している。すなわち、本酵素により特異的な阻害剤をデザインすることにより、シナプス間隙でのエンドモルフィンの濃

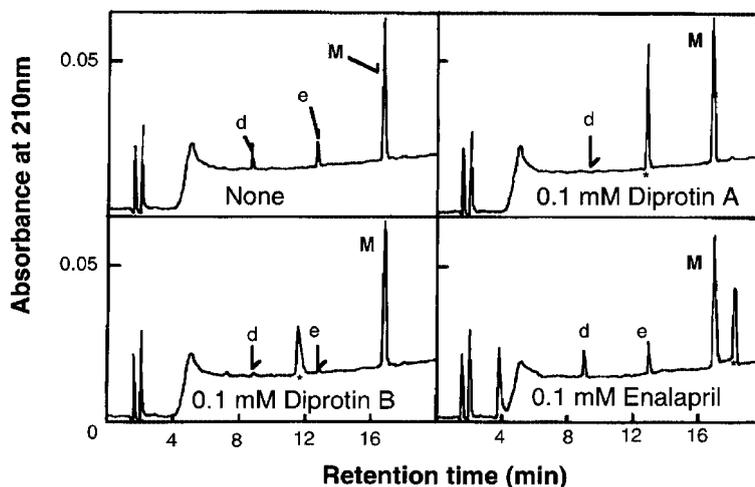


Fig. 4. Effect of Peptidase Inhibitors on the Degradation of Endomorphin-2 by Dipeptidyl Peptidase IV

The reaction mixture (pH 7.5) containing 1.0 ng of purified dipeptidyl peptidase IV from porcine kidney, was incubated at 37°C for 3 hr in the absence of an inhibitor, or in the presence of 0.1 mM diprotin A, 0.1 mM diprotin B and 0.1 mM enalapril. After heating at 100°C for 10 min, 10  $\mu$ l aliquots of the mixture were analyzed by HPLC as described in Fig. 1. Asterisk (\*) indicates the peak derived from the inhibitor added. d: Tyr-Pro, e: Phe-PheNH<sub>2</sub>, M: endomorphin-2.

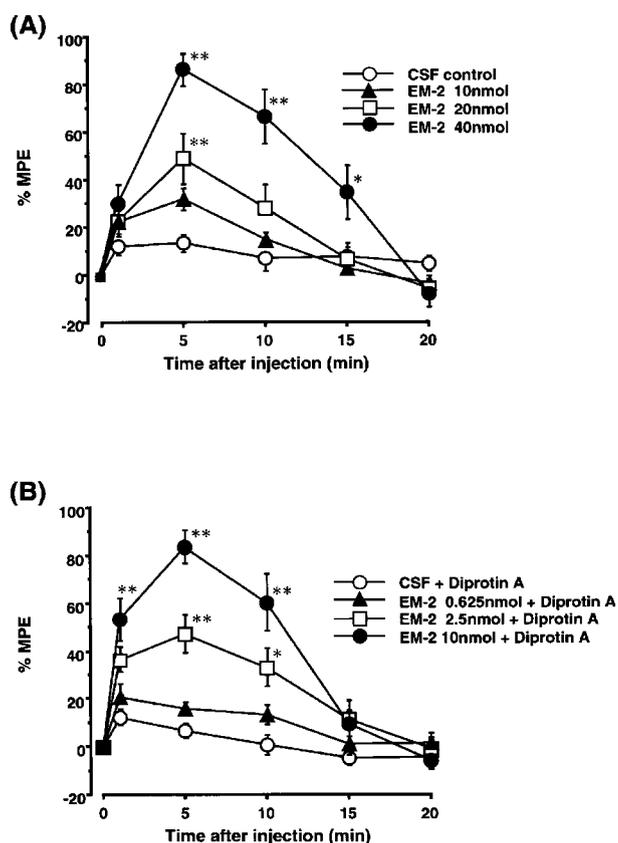


Fig. 5. Time Course of Antinociceptive Effect of i.c.v. Administered Endomorphin-2 in the Mouse Paw Withdrawal Test

Antinociception was expressed as percent of maximum possible effect (%MPE) = (post-drug responsive latency - pre-drug responsive latency) / (10 - pre-drug responsive latency)  $\times$  100. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. for 10 mice. \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 when compared to the respective value in the CSF-control group. (B): Effect of diprotin A on endomorphin-2 (EM-2) induced antinociception in the mouse paw withdrawal test. Mice were coadministered CSF or various doses of endomorphin-2 in combination with 4.0 nmol of diprotin A. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. for 10 mice. \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05 when compared to diprotin A alone.

度を維持し、作用の持続が期待できる。さらに、本酵素に分解抵抗性のエンドモルフィンアナログを合成し、新しいタイプの鎮痛薬の開発が可能となる。

現在、臨床上特に問題となっているのは、モルヒネが効きにくい神経因性疼痛（帯状疱疹後神経痛、糖尿病による疼痛、坐骨神経痛など）である。現在、これらの疼痛を抑える薬物は皆無である。最近、神経因性疼痛の動物モデルにおいて脊髄後角でのエンドモルフィンの特異的かつ劇的な減少が報告されている。<sup>11)</sup> このような観点からも神経因性疼痛治療薬として、ジペプチジルペプチダーゼ IV 分解抵抗性エンドモルフィンアナログの有効性が期待できる。

**謝辞** 本研究の遂行にあたり、終始、御懇切な御指導を賜りました、第一薬科大学 櫻田 司教授、東北薬科大学 櫻田 忍教授に厚く感謝の意を表します。また、ニューロペプチダーゼに対する興味をいだかせていただきました北海道大学大学院薬学研究科 横沢英良教授に深く感謝いたします。さらに、終始御協力頂きました、第一薬科大学生化学教室、東北薬科大学機能形態学教室の皆様にも心より感謝いたします。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費奨励研究 A (12780592)、基盤研究 C (15590086) により行われたものであり、感謝の意を表します。

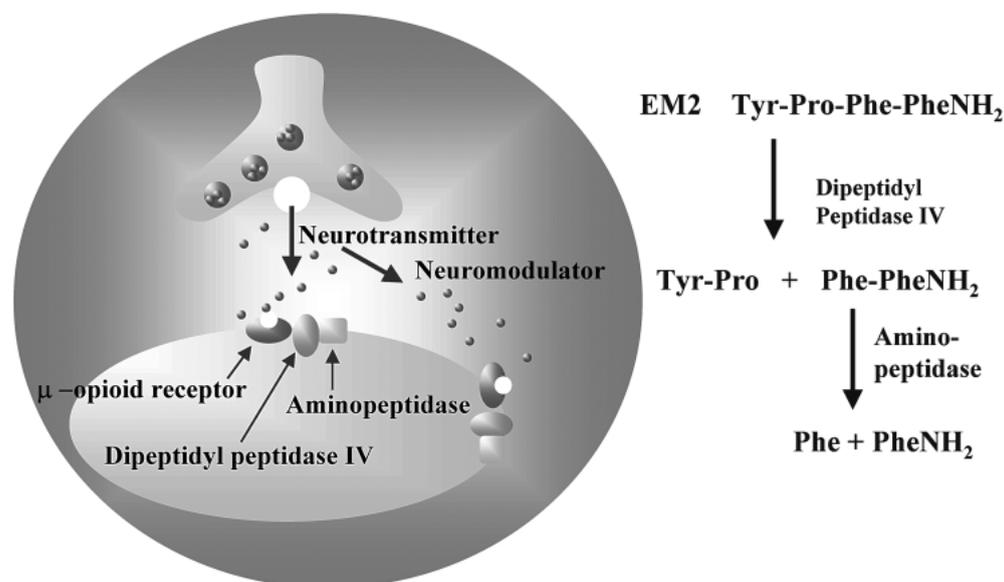


Fig. 6. Scheme for Metabolism of Endomorphin-2 by Synaptic Membranes of Mouse Brain

#### REFERENCES AND NOTES

- 1) Present address: Department of Biochemistry, Nihon Pharmaceutical University, School of Pharmacy, 10281 Komuro, Ina-machi, Kitaadachi-gun, Saitama 362-0806, Japan.
- 2) Zadina J. E., Hackler L., Ge L. J., Kastin A. J., *Nature*, **386**, 499-502 (1997).
- 3) Mansour A., Fox C. A., Burke S., Akil H., Watson S. J., *J. Chem. Neuroanat.*, **8**, 283-305 (1995).
- 4) Goldberg I. E., Rossi G. C., Letchworth S. R., Mathis J. P., Ryan-Moro J., Leventhal L., Su W., Emmel D., Bolan E. A., Pasternak G. W., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 1007-1013 (1998).
- 5) Sakurada S., Zadina J. E., Kastin A. J., Katsuyama S., Fujimura T., Murayama K., Yuki M., Ueda H., Sakurada T., *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 25-30 (1999).
- 6) Stone L. S., Fairbanks C. A., Laughlin T. M., Nguyen H. O., Bushy T. M., Wessendorf M. W., Wilcox G., *NeuroReport*, **8**, 3131-3135 (1997).
- 7) Sakurada S., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Yonezawa A., Sakurada C., Takeshita M., Sato T., Zadina J. E., Kastin A. J., Sakurada T., *Peptides*, **23**, 895-901 (2002).
- 8) Mizoguchi H., Narita M., Oji D. E., Suganuma C., Nagase H., Sora I., Uhl G. R., Cheng E. Y., Tseng L. F., *Neuroscience*, **94**, 203-207 (1999).
- 9) Roques B. P., Noble F., Dauge V., Fournie-Zaluski M. C., Beaumont A., *Pharmacol. Rev.*, **45**, 87-146 (1993).
- 10) Sakurada C., Sakurada S., Hayashi T., Katsuyama S., Tan-No K., Sakurada T., *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 653-661 (2003).
- 11) Smith R. R., Martin-Schild S., Kastin A. J., Zadina J. E. *Neuroscience*, **105**, 773-778 (2001).