

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成果報告書

2024年 4月 1日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 藤 洋作 様

所属部局 農学研究科

職名 教授

氏名 井上 和生

助成の種類	令和5年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	行動する意欲と疲労との相互作用機構の解明と食品/成分によるその調節			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容	該当なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 該当なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 該当なし			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費目	金額	
		備品	57,200	
		消耗品	935,375	
		旅費	2,460	
学会参加費		1,500		
実験動物トタイ処理費	3,465			
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 今回貴財団に助成いただいたことで研究を継続することができ、今後の展開につながる結果が得られたことを深謝いたします。競争的資金の獲得が難しい時期に大変ありがたいものでした。2024年度は本研究を拡張する計画で科研費基盤Bに採択されましたが、2023年度に実験を継続することができたおかげだと考えます。どうもありがとうございました。			

## 研究内容

日本での疲労の蔓延は社会的な損失を伴った非常に大きな問題である。特に現代生活で主となる、肉体的負荷が少ないにも関わらず生じる中枢性疲労（＝疲労感）はまだその発生機構が解明されていない。報告者は中強度の運動により脳内で潜在型 Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ )が活性型に変換され、これが疲労様行動、すなわちオープンフィールドでの自発行動や、回転カゴでの自発運動（走行）量の低下を引き起こすことを明らかにしてきた。またストレス負荷に応じて分泌される内因性オピオイドのうち、 $\kappa$ -オピオイド（ダイノルフィン）が鎮痛とともに不快感を生じることから、低強度の運動や拘束ストレス負荷の後に生じる疲労様行動に関与すると予想し、その阻害剤（norBNI）を予め投与しておくことによって、疲労様行動が減弱される予備データを得ていた。エンドルフィンを含めたオピオイドの受容体はGタンパク質共役型受容体（GPR あるいは GPCR）であり、いずれも Gi/o タンパク質を介して cAMP の生成を減少させることが鎮痛作用を引き起こすと考えられる。一方、アゴニストが結合すると受容体がリン酸化され、細胞内の  $\beta$ -アレスチンが動員されることで受容体がインターナリゼーションを起こし、脱感作される。同時に、細胞内で各種の MAPK (mitogen-activated protein kinases) が活性化され、神経ではイオンチャネルのリン酸化などによって、膜の興奮性が変化し、神経活動が変調することも明らかとされている。 $\mu$ -オピオイド受容体ではこの経路が多幸感、さらには離脱に、 $\kappa$ -オピオイド受容体では嫌悪感などの発生に関与すると報告されている。興味深いことに、TGF- $\beta$  の細胞内信号伝達経路に MAPK を介する経路が知られている。TGF- $\beta$  は各種の Smad によって遺伝子発現を調節する機能が良く知られているが、非 Smad 経路として、MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B, mTORC を介した信号伝達が報告されている。MAPK や JNK を介した信号伝達は前述のように GPR でも起こるため、 $\kappa$ -オピオイドと TGF- $\beta$  に共通の信号伝達経路は疲労感の生成に関与することが強く示唆される。本申請研究では疲労感生成機構に脳内での  $\kappa$ -オピオイド信号伝達のうちでも  $\beta$ -アレスチンが関与する経路が関与することを明らかにすることを目的とした。

## 研究成果

### [材料と方法]

動物：全ての動物は京都大学実験動物取り扱い指針に則して扱った。実験動物委員会から倫理的に問題がないことの承認を受けて実験を行なった（動物実験計画承認番号 R5-32 および 89）。C57BL/6J（雄、7 週齢）は清水実験材料より

購入した。

試薬と投与： $\kappa$ -オピオイドアゴニストとして U69593 [(+)-(5 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ )-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]-benzeneacetamide]、U62066 [( $\pm$ )-(5 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 8 $\beta$ )-3,4-dichloro-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]benzeneacetamide mesylate salt]、および GR-89696 [4-([3,4-dichlorophenyl]acetyl)-3-(1-pyrrolidinylmethyl)-1-piperazinecarboxylic acid methyl ester fumarate salt]を用いた。U69593 は無偏向、U62066 は G タンパク質偏向、GR89696 は  $\beta$ -アレスチン偏向のアゴニストである。いずれのアゴニストも Sigma-Aldrich より購入した。U69593 は 45% 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin に、U62066 と GR89696 は滅菌水に溶解し、マウスには各々 1.0mg/kg 体重、0.3mg/kg 体重、0.3mg/kg 体重となるよう腹腔内投与した。投与は測定の前とした。

行動学的測定：マウスは無処置群、30 分間の拘束群、および各アゴニストを投与する 3 群の計 5 群に分けて行動を測定した。自発行動を直径 500mm、壁の高さ 400mm の測定ステージ内を自由に行動させ、その軌跡を上方からビデオ撮影し、ANY-maze Video Tracking Software (Stoelting Co. Wood Dale, CA)を用いて解析した。測定時間は 30 分とした。無処置マウスの行動量に対し、拘束ストレスやアゴニスト投与群の自発行動量減少を疲労度の指標とみなした。

脳内 MAPK 活性化の解析：各マウスについて行動測定終了後屠殺し、前頭前野、海馬、視床下部を採取し、ERK, p38 MAPK, JNK について、そのリン酸化タンパク質の抗体を用いてウェスタン解析した。

## 結果

自発行動：無処置のマウスに比較して、U69593、GR89696 投与群で行動量が減少した (図)。30 分間の拘束、U62066 投与群の行動量は無処置群と有意な差は見られなかった。投与量については、無偏向アゴニストである U69593 の影響を 1 と考えたとき、G タンパク質偏向アゴニストの U62066 の偏向係数が 6、 $\beta$ -アレスチン偏向アゴニストの GR89696 の係数が 5 と報告されていることから、U69593 と同等の効果を得られると考えられるモル数より投与量を決定した。このことから、G タンパク質経路ではなく、 $\beta$ -アレスチン経路を刺激することがマウスの自発行動量減少、すなわち疲労様行動を惹起すると考えられた。

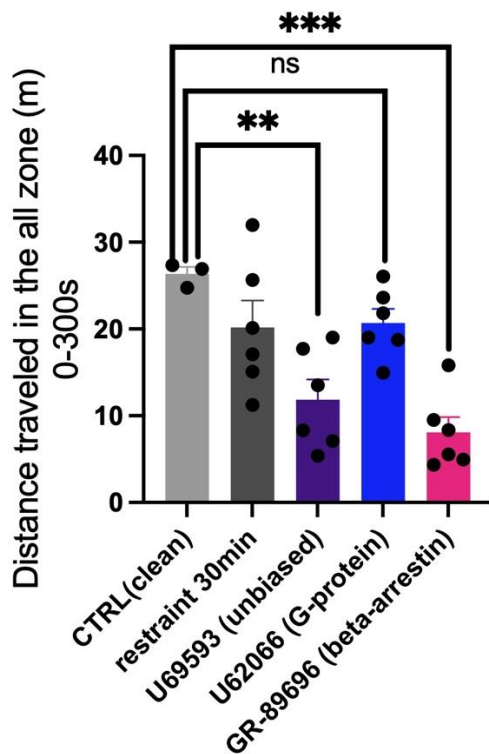


図. オープンフィールドでのマウス自発行動量. 30分の測定時間内の移動量を示した。

CTRL: 無処置、restraint: 30分間の拘束、U69593: 1.0mg/kg 体重腹腔内投与、U62066: 0.3mg/kg、

脳内 MAPK 活性化の解析：各 MAPK のリン酸化、すなわち活性化は各群間で有意な差が観察されなかった（図省略）。

#### 今後の見通し

$\kappa$ -オピオイドアゴニストのうち、 $\beta$ -アレステチン偏向に作用するアゴニスト GR89696 投与群で無偏向アゴニスト U69593 と同程度の自発行動量減少が観察されたが、G タンパク質偏向アゴニストの U62066 では有意な自発行動量減少が見られなかったことは、 $\kappa$ -オピオイドによる疲労感生成機構の解明に大きな示唆を与えるものである。 $\kappa$ -オピオイドはストレスによって分泌されるコルチコトロピン放出因子（CRF）によって放出が促進される。CRF は様々なストレスで放出されるが、軽度の運動や拘束によっても放出されることが明らかにされている。疲労感 は肉体のみならず精神的なストレスによっても生成することは経験的に明らかであり、これに  $\kappa$ -オピオイドが関与している可能性は高い。さらに、既に疲労感生成機構に関与することが明らかとなっている TGF- $\beta$  の信号伝達機構と  $\kappa$ -オピオイドのそれについて、MAPK 系で収斂する可能性が示された。今回生化学的な検討として MAPK のリン酸化を検討したが、いずれも有意な変化が見られなかったことは、各アゴニストについてのこれまでの報告を再現できていないため、再度実験を要する。また TGF- $\beta$  の脳内投与が、 $\kappa$ -オピオイド投与で活性化する MAPK 系と同じ伝達経路を活性化するかを明らかにする必要がある。