

審査の結果の要旨

氏名 繁田悦宏

本研究は、野生由来近交系マウスを含む近交系マウス 10 系統 (Mishima battery of inbred mouse strains) を用いて、マウス *Oprm1* の一塩基多型 (SNP) や Short Tandem Repeat (STR) のような多型が、モルヒネ感受性の系統差に寄与する可能性を示し、「オピオイド感受性個人差を引き起こす分子メカニズム」を明らかにすること、及び、「野生由来の近交系マウスを用いて、ヒトのオピオイド感受性個人差の動物モデルを構築する」ことを目的となされたものであり、下記の結果及び示唆を得ている。

1. 野生由来近交系マウスを含む近交系マウス 10 系統のマウス *Oprm1* の配列解析及び、**dendrogram** を作成し、DNA 配列データの分子進化・系統学的解析を行い、系統間における塩基配列差異 (遺伝子多型) が多数存在することが示された。
2. これらの塩基配列差異のうち、5' フランキング領域と 3' UTR に 4 ヶ所の塩基配列差異の特に著しい領域を認め、同領域に 5 つの新しい repeat 数多型 (GA repeat, T repeat, TA repeat, CA repeat, CT repeat) が存在することが示された。
3. *Mus musculus domesticus* では、repeat 数や 3' UTR における塩基配列の差異は小さく、特に、PGN 系統では、3' UTR の塩基配列は B6 系統と完全に一致していることが示された。*Mus musculus musculus* においても、塩基配列の差異が小さいなど、*Oprm1* の塩基配列は亜種内で類似していることが示された。
4. 野生由来近交系マウスの系統間において、モルヒネ感受性は、マウス系統ごとに非常に多様であることが示された。これまでに、海外の研究グループにより近交系マウスの系統差が報告されているが、ほとんどのグループが *Mus musculus domesticus* に属する実験用マウス系統しか用いていない。本研究で用いた Mishima battery of inbred mouse strains には、*Mus musculus musculus* に属するマウス系統も含まれていたことから、オピオイド感受性の亜種間差が初めて見出された。
5. 5' フランキング領域に存在した GA repeat 数多型は、オピオイド感受性と負の相関関係を認めた。この周囲には、転写因子となるシス作用エレメントが幾つか見つかったが、その中に抑制性の転写因子は認めなかった。GA repeat が insulator 蛋白質をリクルートして転写を抑制することが報告されていることから、GA repeat 数多型が insulator 蛋白質などをリクルートすることにより、転写を抑制している可能性が示された。
6. GA-T haplotype では、SL type (GA repeat 数が少なく T repeat 数が多いタイプ) のマウス系統の方が、LS type (GA repeat 数が多く T repeat 数が少ないタイプ) のマウス系統より、モルヒネによる鎮痛効果が有意に高いことが示された。また、GA-3' Others haplotype において

は、SM type (GA repeat 数が少なく 3' Others の塩基配列差異が多いタイプ) のマウス系統の方が、LF type (GA repeat 数が多く 3' Others の塩基配列差異が少ないタイプ) のマウス系統より、モルヒネによる鎮痛効果が有意に高かった。T-3' Others haplotype では、LM type (T repeat 数が多く 3' Others の塩基配列差異が多いタイプ) のマウス系統の方が、SF type (T repeat 数が少なく 3' Others の塩基配列差異が少ないタイプ) のマウス系統より、モルヒネによる鎮痛効果が有意に高かった。TA-3' Others haplotype では、LM type (TA repeat 数が多く 3' Others の塩基配列差異が多いタイプ) および SM type (TA repeat 数が少なく 3' Others の塩基配列差異が多いタイプ) のマウス系統の方が、SF type (TA repeat 数が少なく 3' Others の塩基配列差異が少ないタイプ) のマウス系統よりモルヒネによる鎮痛効果が有意に高かった。

7. 3' UTR に存在する T repeat 数多型, TA repeat 数多型, 3' Others はオピオイド感受性と正の相関関係を認めた。3' UTR は、mRNA の細胞内局在、安定性などに関与することが知られ、T repeat 数多型, TA repeat 数多型, 3' Others の周囲には AU-rich elements (AREs) と呼ばれる、mRNA の安定性に関与する蛋白質結合領域が存在することから、T repeat 数多型, TA repeat 数多型は、この AREs に影響を及ぼすことで mRNA の安定化に寄与している可能性が示された。

8. 本研究では、Tail-flick test における %MPE と GA repeat 数多型, T repeat 数多型, TA repeat 数多型の間に関係を示した。一般的に、repeat 数多型や塩基配列差異は、mRNA の発現量に影響を与えることがあるので、本研究においても因果関係が推察された。このため、本研究で発見された repeat 数多型, 3' Others とモルヒネによる鎮痛効果の因果関係を示すための 1 つの方法として、各系統のマウスの whole brain における MOR-1 mRNA の発現量との関連を調べたが関連が認められなかった。この理由として、MOR-1 の発現量を whole brain で測定しているためモルヒネによる鎮痛効果に関与しない mRNA も含めて測定したこと、脳・脊髄の部位による MOR-1 発現量の差があること、もともと MOR-1 の発現量が少ないために正確な定量が困難であること、3' UTR における差異が翻訳にも影響を与えている可能性があることに加え、行動解析の結果は Oprm1 以外の他の遺伝子や蛋白質の影響も受けている可能性も考えられた。今後、Oprm1 の STR 多型, 3' Others と行動解析の結果との因果関係を証明するために、部位特異的に MOR-1 の発現量を測定すること、Oprm1 以外の遺伝子についてその多型や蛋白質などの影響を Biological な方法で解析を行うこと、あるいは、コンジェニックマウスを用いた QTL (Quantitative Trait Locus) 解析などの Genetics な方法を用いて研究を進める必要があることが示された。

9. ヒト OPRM1 には多数の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) が見出され、幾つかの SNPs は受容体機能に影響を与えることや、オピオイド依存脆弱性や鎮痛作用と関連することが報告されているが、repeat 数多型が関連するとの報告はない。ヒト OPRM1 はマウス Oprm1 と高い相同性を有し、3' UTR などに repeat 配列が存在することから、本研究結果は、ヒト OPRM1 の repeat 数多型解析が必要となる可能性も示唆することになった。

10. このため、Mishima battery of inbred mouse strains は、オピオイド感受性だけでなく、

様々な薬物感受性や疾患脆弱性の個人差を引き起こす分子メカニズムを明らかにする上でモデルになると考えられる。

以上、本論文は、野生由来の近交系マウスを含む *Mishima battery of inbred mouse strains* を用いた解析から、マウス *Oprm1* の遺伝子多型とモルヒネ感受性が関連のある可能性を示唆した。本研究はこれまで未知に等しかった、オピオイド感受性個人差を引き起こす分子メカニズムの解明、及び、ヒトのオピオイド感受性個人差の動物モデルの構築に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。