

クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置の細胞内情報伝達系への影響： regulator of G protein signaling (RGS) に関する検討

分担研究者 佐藤公道

共同研究者 南 雅文、中川貴之

京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

研究要旨 昨年度の研究により、クローン化オピオイド受容体発現細胞においてアゴニスト持続的処置によって形成されるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の過感受性には、G 蛋白質 α_i サブユニットによる持続的な AC の抑制が必須であることを示した。本研究では、近年、この G 蛋白質 α サブユニットの GTPase 活性を増強させることにより G 蛋白質の機能を調節していることが明らかとなった regulator of G protein signaling (RGS) に着目し、アゴニスト持続的処置時の RGS mRNA 発現量の変化、及び RGS がオピオイド受容体情報伝達系に及ぼす影響を検討した。クローン化 μ あるいは κ オピオイド受容体を安定的に発現させた PC12 細胞に、それぞれのアゴニスト (μ : モルヒネ、DAMGO、 κ : U69,593) を持続的に処置したところ、PC12 細胞に dominant に発現している RGS である RGS4 の mRNA 発現量は濃度依存的に増加し、それは処置後 2 時間をピークとしたものであった。また、この RGS4 mRNA の増加は、それぞれのアンタゴニスト (μ : ナロキソン、 κ : norBNI) の同時処置、あるいは百日咳毒素の前処置により阻害された。一方、 μ オピオイド受容体と RGS4 を共発現させた HEK293 細胞において、モルヒネによる forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果は、 μ オピオイド受容体のみを発現する HEK293 細胞の場合と比較して、有意に減弱された。以上の結果は、オピオイド受容体の持続的な活性化、及びそれに引き続く G 蛋白質 $G_{i/o}$ ファミリーの持続的な活性化により、RGS4 mRNA の発現量が増加し、また、その RGS4 はオピオイド受容体を介する情報伝達系を負に調節することを示し、RGS ファミリーが、オピオイド持続的処置による耐性の形成、あるいは依存性の形成に関与する可能性を示唆している。

A. 目的

1980年代半ばに、酵母において、Gタンパク質が介在する MAP キナーゼ系に対して、負の調節をする制御因子として Sst2p が同定され¹⁾、その後、この Sst2p とのホモロジー検索から、カビ、線虫、そして 1996 年には哺乳類からも同様のタンパク質が次々と見いだされ、RGS (regulators of G-protein signaling) と命名された²⁾。同年、RGS は Gタンパク質 α サブユニットの GTPase 活性を促進する、いわゆる GAP (GTPase-activating protein) として働き、Gタンパク質を介する情報伝達系を負に調節することが明らかにされ^{3,4)}、薬物による順応や脱感

作、依存形成に関与している可能性が示された。これまでに、約 20 種類の RGS ファミリーの全長あるいは部分配列が同定、命名されており、また、いずれも $\alpha_{i/o}$ ファミリー、 α_q 、 α_z に対して GTPase 活性を著明に促進するが、 α_s に対しては作用しないことが知られている³⁻⁶⁾。

一方、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は、その連続的使用により容易に耐性・依存性が形成されることが知られているが、その形成メカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。昨年度の厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業) 「規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究」において、我々

は、クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いて、*in vitro*系での麻薬依存形成のモデルと考えられているアゴニスト持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の過感受性の形成には^{7,8)}、G 蛋白質 α_i あるいは α_z サブユニットによる持続的なACの抑制が必須であることを、キメラG 蛋白質 α サブユニットを用いた検討により示した^{9,10)}。

このような知見から、RGSがG 蛋白質 α サブユニットの機能を調節することにより、アゴニスト持続的処置による細胞内情報伝達系の変化に何らかの役割を果たしていることが考えられる。そこで本研究では、オピオイドアゴニスト持続的処置による細胞内情報伝達系の変化に対するRGSの関与を検討するため、まず、クローン化オピオイド受容体を安定的に発現するPC12細胞を用いて、オピオイド受容体の持続的活性化によるRGS mRNAの発現量の変化をnorthern blot法により検討した。さらに、オピオイド受容体とRGSを培養細胞に同時発現させることにより、RGSがオピオイド受容体情報伝達系に与える影響について検討した。

B. 方法

(1) 各種ラット RGS サブタイプ cDNA のクローニング

ラット RGS2、4、7、8、10 cDNA の部分長は、ラット大脳皮質より抽出した total RNA から RT-PCR法により得た。RT-PCRの際に用いたセンスおよびアンチセンスプライマーは既知のラット RGS2、4、7、8、10 の配列 (GeneBank AA858950、U32327、U32328、U32432、U32437) を元に設計した (表 1)。RT-PCR法により得られた DNA 断片は、pBluescript プラスミドベクターに組み込み、シークエンスを同定したところ、それぞれをコードする cDNA と 100% のホモロジーがあることが明らかになり、得られたクローンがそれぞれラット RGS2、4、7、8、10 cDNA をコードす

る部分長であることが確認された。また、同様の方法により完全長の RGS4 cDNA も得た。

(2) PC12 細胞における RGS mRNA 発現の northern blotting による解析

クローン化 μ -あるいは κ -オピオイド受容体を安定的に発現させた PC12 細胞 (μ -OPR/PC12 あるいは κ -OPR/PC12) を用い、培地 (10% 非働化ウマ血清および 5% 非働化ウシ胎児血清を含む DMEM) 中に各薬物を所定の濃度および時間、処置した。各 PC12 細胞から total RNA を抽出し、northern blot 解析を行った。すなわち、6%ホルムアルデヒド含有 1.2% アガロースゲルにて、得られた total RNA (10 μ g) を電気泳動した後、ナイロンメンブランフィルターに転写し、プレハイブリダイゼーションの後、³²P で標識した各ラット RGS2、4、7、8、10 アンチセンス RNA プロブを用いてハイブリダイズした。フィルターを 2 \times SSC / 0.1% SDS 中で 2 回、0.1 \times SSC / 0.1% SDS 中で 4 回洗浄した。データは画像解析装置 BAS2000 により数値化した後、X 線フィルムに露光し可視化した。

Table 1 各種 RGS のクローニングに用いたセンスおよびアンチセンスプライマー

RGS	sense or antisense	primer
rRGS2	sense	GGTGTGACTGACGTTCTTA
	antisense	CAATGAGTGCTCCTAGGAAT
rRGS4	sense	ATCAGCTGTGAGGAGTACAA
	antisense	CAGGTTGAAAATCTTCTTCT
rRGS7	sense	TTGGCAGTGGAGGACCTGAA
	antisense	CAGCTTGAAATGTGCTCCT
rRGS8	sense	CTGGCCTGTGAGGAGTTCAA
	antisense	GAGGCTGTGGACTTTTCCCT
rRGS10	sense	CTAGCGTGTGAAGATTTCAA
	antisense	GAGATTGAAGATCTGGTCTCT
rRGS4 (complete)	sense	GTGAGCTACGTCAACGGTTA
	antisense	GAGTCTTGGCAITTCGGTTC

(3) HEK293細胞へのRGS4 cDNAのトランスフェクション

完全長のRGS4 cDNAを哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3にサブクローニングし、リン酸カルシウム法により、クローン化 μ オピオイド受容体を安定的に発現させたHEK293細胞 (μ -OPR/HEK293) に、さらにトランスフェクトした。RGS4 mRNAの発現は northern blot 法により、RGS4 タンパクの発現は anti-RGS4抗体を用いた western blot 法により確認した。

(4) Western blotting

HEK293細胞を細胞溶解液にて可溶化し、得られたタンパク質 100 μ g を SDS-PAGE (14.5% アクリルアミドゲル) により分離した後、ニトロセルロースメンブランに転写し、anti-RGS4抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いて免疫染色を行った。

(5) cAMP assay

細胞を 24 穴マルチウェルプレートに 10^5 個/well で播種し、12時間培養した。HEPES-buffered saline 0.5 ml で一回洗浄後、cAMP 分解酵素抑制薬である 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 1 mM を含む 0.45 ml の HEPES-buffered saline 中で 37°C、プレインキュベートした。10分後、100 μ M forskolin (最終濃度 10 μ M)、1 mM IBMX、種々の濃度のリガンドを含む HEPES-buffered saline 50 μ l を加えて反応を開始した。37°C で 10 分間インキュベートした後、氷冷した 10% TCA 0.5 ml の添加によりインキュベーションを停止し、cAMP を抽出した。cAMP 量は、ラジオイムノアッセイ法により定量した。

C. 結果

(1) PC12細胞におけるRGS mRNA発現の northern blot による解析

まず、ラット大脳皮質から抽出した total RNA

を用いて、RGS2、4、7、8、10 に対するアンチセンス RNA プロブを用いて northern blot を行った。その結果、全ての RGS mRNA の発現が確認された (data not shown)。次に、同じアンチセンス RNA プロブを用いて、PC12細胞における各種 RGS mRNA の発現を検討した結果、RGS4 mRNA は強く発現していたが、RGS2、7、8、10 mRNA の発現は検出できない、あるいは検出できてもかなり弱い程度にしか発現していなかった (Fig. 1)。PC12細胞において、検討した RGS の中で dominant に発現していた RGS4 は、各種 RGS の中でも特に脳内での発現量が多いことが報告されており、さらに、脳内において薬物依存形成に深く関与していることが知られている青斑核や側坐核、あるいは扁桃体にその発現が多く見られることが報告されており¹¹⁾、以降の実験では、RGS4 を中心に検討を進めていくことにした。

(2) クローン化オピオイド受容体を発現させた PC12細胞におけるオピオイドアゴニストによる RGS4 mRNA の発現調節

μ -あるいは κ -オピオイド受容体を安定的に発現させた PC12細胞 (μ -OPR/PC12 あるいは κ -OPR/PC12) において、それぞれのアゴニストであるモルヒネ (10 μ M) あるいは U69,593 (1 μ M) を処置することにより、処置時間 2 時間をピークとして、RGS4 mRNA の発現量の増加が見られた (Fig. 2)。

また、 μ -OPR/PC12 において、モルヒネおよび μ 選択的アゴニストである DAMGO を 2 時間処

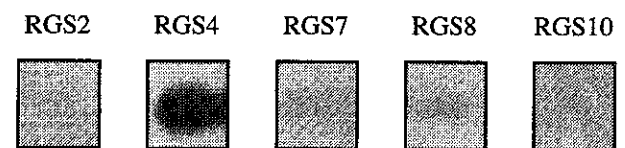
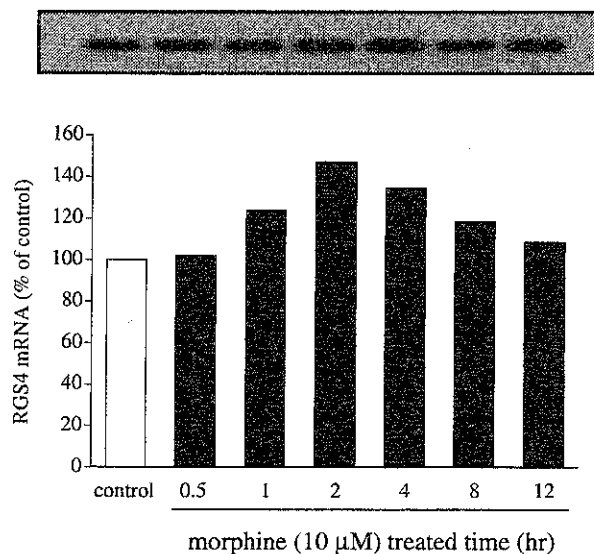
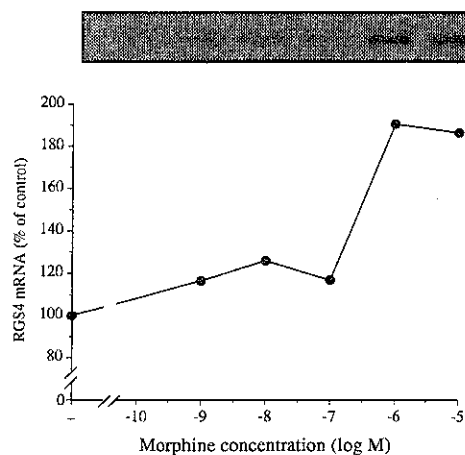


Fig. 1 PC12細胞における各種 RGS mRNA の発現 (northern blot)

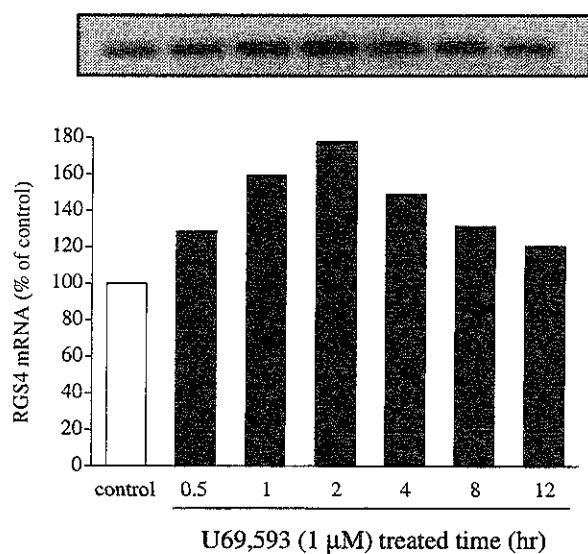
a) μ -OPR/PC12 – morphine (10 μ M)



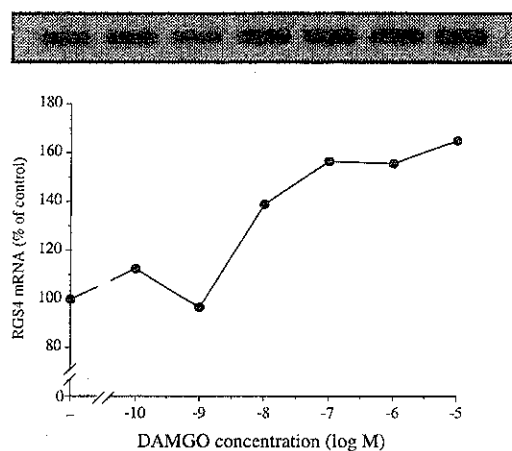
a) μ -OPR/PC12 – morphine (2 hr)



b) κ -OPR/PC12 – U69,593 (1 μ M)



b) μ -OPR/PC12 – DAMGO (2 hr)



c) κ -OPR/PC12 – U69,593 (2 hr)

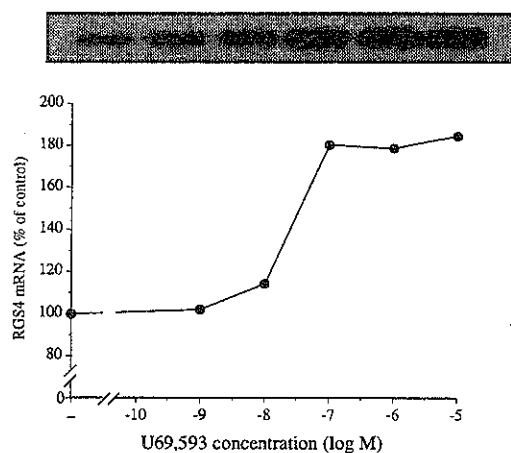


Fig. 2 クローン化オピオイド受容体を発現する PC12 細胞におけるアゴニスト処置による RGS4 mRNA 量の経時的変化

置することにより、それぞれのアゴニストに対して濃度依存的に RGS4 mRNA の発現量の増加が観察された。同様に、 κ -OPR/PC12 において、U69,593 を 2 時間処置することにより、濃度依存的に RGS4 mRNA の発現量が増加した (Fig. 3)。

Fig. 3 クローン化オピオイド受容体を発現する PC12 細胞における各濃度のアゴニスト処置による RGS4 mRNA 量の変化

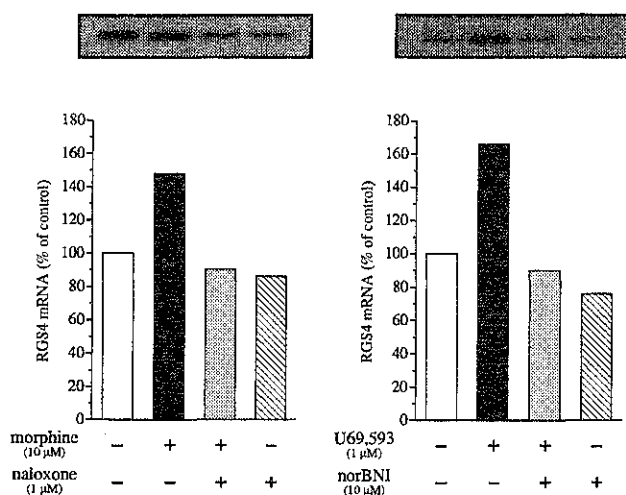
a) μ -OPR/PC12b) μ -OPR/PC12

Fig. 4 クローン化オピオイド受容体を発現する PC12 細胞におけるアゴニスト処置による RGS4 mRNA 量増加に対するアンタゴニストの効果

また、 μ -OPR/PC12 および κ -OPR/PC12 において、それぞれモルヒネ (10 μ M)、U69,593 (1 μ M) の 2 時間処置による RGS4 mRNA 量の増加は、それぞれのアンタゴニストである naloxone (1 μ M) および norBNI (10 μ M) を、アゴニストと同時に処置することにより拮抗された (Fig. 4)。

さらに、 μ -OPR/PC12 および κ -OPR/PC12 において、それぞれモルヒネ (10 μ M) あるいは U69,593 (1 μ M) を 2 時間処置することによる RGS4 mRNA 量の増加は、百日咳毒素 (20 ng/ml) を 16 時間前処置しておくことにより、阻害された (Fig. 5)。

(3) RGS4 によるオピオイド受容体情報伝達系の調節

オピオイド受容体を介した情報伝達系に対する RGS4 の関与を検討するため、安定的にクローン化オピオイド受容体を発現させた HEK293 細胞に、さらに RGS4 cDNA をトランスフェクトすることにより、オピオイド受容体と RGS4 を共発

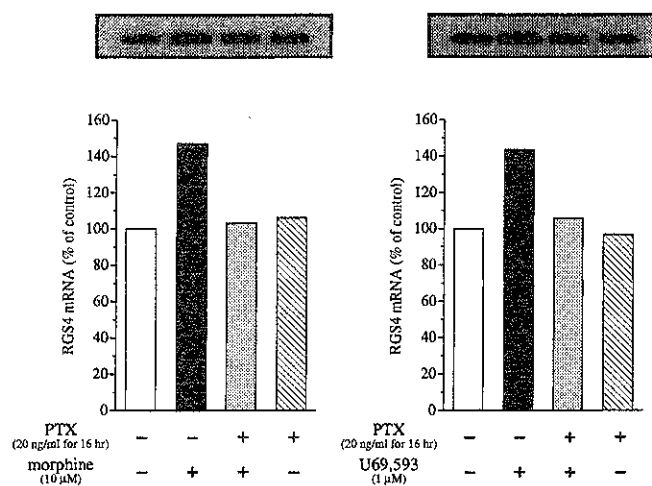
a) μ -OPR/PC12b) μ -OPR/PC12

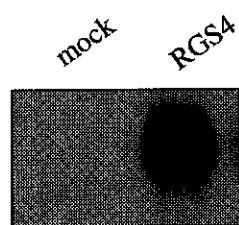
Fig. 5 クローン化オピオイド受容体を発現する PC12 細胞におけるアゴニスト処置による RGS4 mRNA 量増加に対する百日咳毒素 (PTX) 前処置の効果

現させ、オピオイドアゴニスト急性処置による forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果に与える影響を検討した。

μ オピオイド受容体を安定的に発現させた HEK293 細胞に、発現用ベクター pcDNA3 (mock)、あるいは RGS4 cDNA を挿入した pcDNA3 をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。これらの細胞から mRNA を抽出し、RGS4 に対するアンチセンス RNA プローブを用いて northern blot を行ったところ、ベクターのみ (mock) をトランスフェクションした細胞においては、RGS4 mRNA の発現は確認されず、一方、RGS4 cDNA をトランスフェクションした細胞においては著明な RGS4 mRNA の発現が確認された。同様に、anti-RGS4 抗体を用いた western blot により、これら細胞における RGS4 タンパクの発現を検討した結果、RGS4 cDNA をトランスフェクションした細胞においてのみ、RGS4 タンパクが検出された (Fig. 6)。

この μ オピオイド受容体と RGS4 を共発現さ

a) RGS4 mRNA (northern blot)



b) RGS4 protein (western blot)

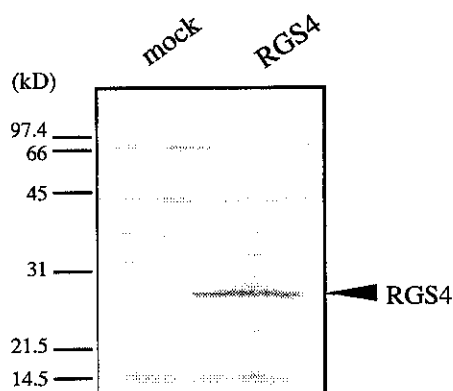


Fig. 6 HEK293細胞におけるRGS4 mRNA (a) およびRGS4タンパク (b) の発現

せたHEK293細胞において、モルヒネ急性処置による forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果について検討した。ベクターのみ (mock) をトランスフェクトしたHEK293細胞において、モルヒネの急性処置 (インキュベーション時間 10 分) により forskolin 誘発 cAMP 蓄積は濃度依存的に抑制され、その IC₅₀ 値は 3.58 ± 0.65 nM であった。一方、RGS4 cDNA をトランスフェクトした HEK293 細胞においては、モルヒネによる forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果は、mock をトランスフェクトしたHEK293細胞と比較して、有意に弱いものであった (IC₅₀ 値=10.2 ± 1.72 nM, $P < 0.05$, Mann-Whitney *U*-test, 図 2-7)。

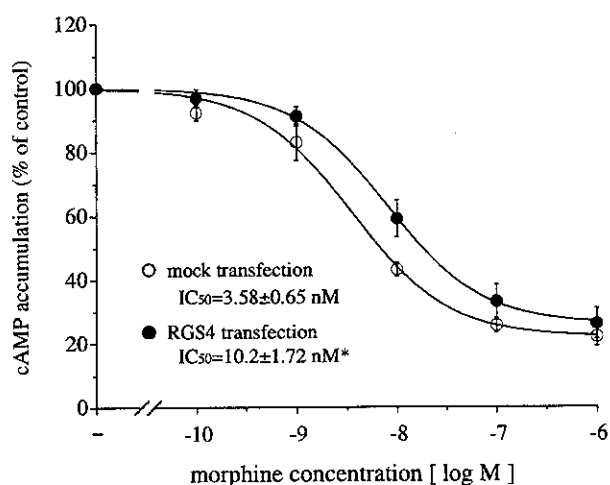


Fig. 7 μ オピオイド受容体と RGS4 を共発現する HEK293 細胞における、モルヒネ急性処置による forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果

* $P < 0.05$ vs. mock transfection (Mann-Whitney *U*-test), $n=5$.

D. 考 察

G タンパク質を介する情報伝達系を負に調節する因子として、酵母において発見された Sst2p とのホモロジー検索から、近年、哺乳類においても同様の機能を持つ新たなタンパク質、RGS が同定され、細胞内情報伝達調節因子の一つとして注目を集めている。これまでに、20 種類ほどのサブタイプの存在が確認されている RGS は、いずれも G_{i/o} ファミリー、G_q あるいは G_z の α サブユニットの GTPase 活性を上昇させることにより、G タンパク質の活性化を抑制する働きがあることが明らかにされている³⁻⁶⁾。しかしながら、種々の RGS タンパク質が個々の G タンパク質 α サブユニットに対して選択性を示さない場合が多く、このように多数の RGS サブタイプが存在する生理的意義は不明のままである。最近、Gold らは、各 RGS サブタイプの脳内での発現領域を *in situ hybridization* 法により詳細に検討し、各 RGS サブタイプにより異なった発現パターンを示すことを明らかにした¹¹⁾。さらに彼らは、ラットに電気痙攣を施すことにより海馬におい

てRGS10 mRNAが減少することを報告し、RGSは何らかの刺激によりその発現が調節されるものであることを示した。本研究において、クローン化オピオイド受容体を発現させたPC12細胞において、オピオイドアゴニストを数時間、持続的に処置することによりPC12細胞において比較的 dominant に発現している RGS4 mRNA の発現が増加することを northern blot 解析により明らかにした。また、この RGS4 mRNA 量の増加は、処置するアゴニストの濃度に依存的であり、またアンタゴニストの同時処置により拮抗されたことより、この RGS4 mRNA の増加は発現させたオピオイド受容体を介したものであることが示された。さらに、百日咳毒素の前処置によりこの効果が阻害されたことより、オピオイド受容体活性化に伴う百日咳毒素感受性 $G_{i/o}$ 様 G タンパク質の持続的な活性化によって引き起こされるものであることが示された。RGS4 は、これまでに $G_{q/11}$ 共役型の bombesin 受容体の刺激による MAPK 活性およびホスホリパーゼ C 活性の上昇、あるいは G_i 共役型の D_2 受容体の刺激による MAPK 活性の上昇を負に調節することが報告されている¹²⁾。すなわち、本研究結果におけるオピオイド受容体の持続的な活性化による RGS4 mRNA の発現量の増加は、G タンパク質 α サブユニットの GTPase 活性を上昇させることにより、細胞内情報伝達系の過剰な亢進を抑制する働きがあることが予測される。そこで、実際に RGS4 の発現によりオピオイド受容体を介した細胞内情報伝達系がどのような影響を受けるかを HEK293 細胞にクローン化オピオイド受容体と RGS4 を共発現させることにより検討した。その結果、RGS4 の発現によりオピオイドアゴニスト急性処置による forskolin 誘発 cAMP 蓄積抑制効果が有意に減弱され、RGS4 が実際にオピオイド受容体を介した細胞内情報伝達系を負に調節していることが示された。これらの研究結果から、RGS4 は、オピオイド受容体を介した情報伝達系

の持続的な活性化によりその発現量が増加し、オピオイド受容体情報伝達系の過剰な活性化の負の調節に関与していることが示唆される (Fig. 8)。このような RGS の発現量増加によって、アゴニスト持続的処置時の G 蛋白質 α_i (あるいは α_2) サブユニットによる AC への抑制効果が減弱され、このことが、 α サブユニットによる AC の持続的抑制を必須とする AC 系の過感受性の形成を抑制する方向に働く可能性が考えられる。

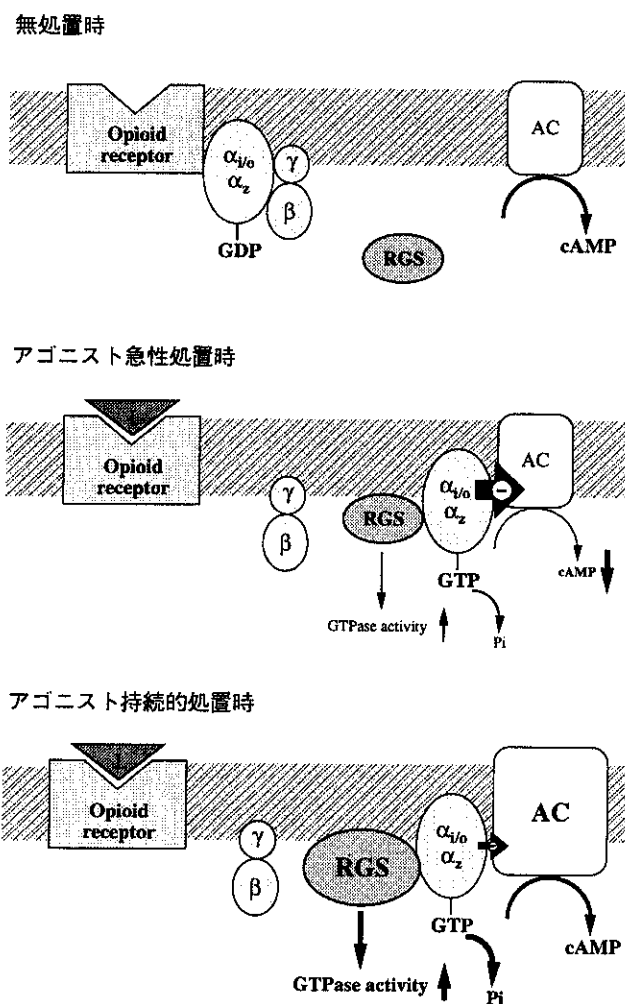


Fig. 8 アゴニスト持続的処置時のRGSによるオピオイド受容体情報伝達系への影響

E. 結 論

クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いて、アゴニスト持続的処置による細胞内情報伝達系の変化に対するRGSの関与を検討したところ、オピオイド受容体を介した情報伝達系の持続的な活性化によりRGS4 mRNAの発現量が増加し、そのことが細胞内情報伝達系の負の調節に関与することが示された。

F. 文 献

- 1) Chan, R.K. and Otte, C.A.: Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 11-20, 1982.
- 2) Druey, K.M., Blumer, K.J., Kang, V.H. and Kehrl, J.H.: Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature*, **379**, 742-746, 1996.
- 3) Watson, N., Linder, M.E., Druey, K.M., Kehrl, J.H. and Blumer, K.J.: RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits. *Nature*, **383**, 172-175, 1996.
- 4) Hunt, T.W., Fields, T.A., Casey, P.J. and Peralta, E.G.: RGS10 is a selective activator of $G\alpha_i$ GTPase activity. *Nature*, **383**, 175-177, 1996.
- 5) Dohlmann, H.G. and Thorner, J.: RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3871-3874, 1997.
- 6) Tu, Y., Wang, J. and Ross, E.M.: Inhibition of brain G_z GAP and other RGS proteins by palmitoylation of G protein α subunits. *Science*, **278**, 1132-1135, 1997.
- 7) Nestler, E.J., Hope, B.T. and Widnell, K.L.: Drug addiction: A model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron*, **11**, 995-1006, 1993.
- 8) Sharma, S.K., Klee, W.A. and Nirenberg, M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3092-3096, 1975.
- 9) Ozawa, T., Nakagawa, T., Minami, M. and Satoh, M.: Supersensitization of the adenylyl cyclase system in Chinese hamster ovary cells co-expressing cloned opioid receptors and G_z , a PTX-insensitive G protein. *Neurosci. Lett.*, **267**, 117-120, 1999.
- 10) Nakagawa, T., Ozawa, T., Watanabe, T., Minami, M. and Satoh, M.: Sensitization of the adenylyl cyclase system in cloned κ -opioid receptor-transfected cells following sustained agonist treatment: a chimeric study using G protein α_2/aq subunits. *Jpn. J. Pharmacol.*, in press.
- 11) Gold, S.J., Ni, Y.G., Dohlmann, H.G. and Nestler, E.J.: Regulators of G-protein signaling (RGS): region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J. Neurosci.*, **17**, 8024-8037, 1997.
- 12) Yan, Y., Chi, P.P. and Bourne, H.R.: RGS4 inhibits G_q -mediated activation of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide synthesis. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11924-11927, 1997.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：薬物依存における細胞内情報伝達物質の役割：

Phencyclidine 誘発 place aversion および place preference における cyclic AMP の役割

主任研究者：鍋島俊隆^{1) 2)}

研究協力者：野田幸裕^{1) 2)}、宮本嘉明¹⁾

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学¹⁾、医学部附属病院薬剤部²⁾

研究要旨

我々は conditioned place preference 法において phencyclidine (PCP) は、place aversion (PA) を誘発するが、PCP を連続投与した動物においては、place preference (PP) を誘発することを報告している。そこで、薬物依存に重要な役割を果たしている細胞内情報伝達物質 cyclic AMP (cAMP) が PCP 誘発 PA および PP においてどのような役割を果たしているか、選択的 cAMP phosphodiesterase 阻害剤の rolipram および細胞内 cAMP 含量を増加させる nefiracetam を用いて検討した。PCP 誘発 PA は、rolipram および nefiracetam によって有意に抑制された。PCP を急性投与すると、脳内 cAMP 含量は減少し、この減少は rolipram の併用投与により抑制された。PA を発現したマウスの脳内 cAMP 含量は変化していなかった。一方、PCP と rolipram あるいは nefiracetam を 28 日間連続併用投与したマウスにおいて PCP は、PP を誘発しなかった。同様な現象は、conditioning の期間中、PCP と rolipram あるいは nefiracetam を併用投与した場合にも認められた。PCP を 28 日間連続投与したマウスおよび PP を発現したマウスの脳内 cAMP 含量は増加していた。このような cAMP 含量の増加は、rolipram を PCP と 28 日間連続併用投与すると抑制された。以上の結果から、PCP 誘発 PA および PP の獲得過程、さらには PCP 誘発 PP の形成過程に脳内 cAMP が関与していることが示唆される。

A. 研究目的

精神異常発現薬である phencyclidine (PCP) は、ヒトにおいて連用により薬物依存（精神・身体依存）を引き起こすことが知られている。また、実験動物においては、自己投与¹⁾、弁別刺激効果²⁾ あるいは連続投与後の休薬により退薬症状³⁾ を発現する。しかし、PCP の依存形成メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

Conditioned place preference (CPP) 法は、薬物依存を評価する実験方法のひとつであり、薬物自己投与法や薬物弁別法に比べて

評価期間が短く、かつ簡便であり、薬物の嗜好性 (preference) だけではなく嫌悪性 (aversion) をも評価することができる³⁾。この CPP 法において PCP は、place aversion (PA) を誘発することが報告されている。我々は以前に、PCP を連続投与したラットやマウスにおいて、PCP 誘発 PA が PP に変化することを報告している³⁾。この現象は、臨床上、ヒトにおいて PCP を急性的に投与すると、ほとんどのヒトが嫌悪刺激として感じるが、連用により依存が形成されるという知見と類似していることから、PCP の

依存形成メカニズムを解明するうえで非常に興味深い現象である。

近年、分子生物学的手法の発展により *in vitro* での薬物依存の形成メカニズムの解明がなされており、これらの研究から各種中枢神経作用薬による薬物依存の形成メカニズムには、かなり共通した神経系や細胞内情報伝達系が関与していることが示唆されている。その中で、薬物の強化および報酬効果に脳内 cyclic AMP (cAMP) 系の関与が報告されている。特に、細胞内での cAMP から始まる cAMP response element binding protein (CREB)、CRE および標的遺伝子転写の開始へと続く一連のカスケードが、共通の情報伝達系として注目されている⁶⁾。

そこで、本研究では、*in vitro* の実験により得られた結果に基づき、PCP によって誘発される PA および PP における cAMP の役割について行動薬理学的および神経化学的に検討した。

B. 方法

動物および薬物

Std-ddY 系の雄性マウス (日本 SLC) を、恒温恒湿条件下 (室温 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %) で飼育し、実験室に 1 時間以上馴化した後、実験に使用した。

Phencyclidine (PCP) は、名城大学薬学部の古川宏教授に合成していただいた。Rolipram は RBI より購入し、nefiracetam (DM-9384) は第一製薬より提供していただいた。PCP、nefiracetam は生理食塩水に、rolipram は、2% DMSO に溶解した。

CPP 法

CPP 法の装置は、実験者が任意にギロチンドアで仕切ることのできる黒色の部屋および床面に白色の網を敷いた透明の部屋か

らなるアクリル製のものを使用した。実験スケジュールは、Noda らの方法⁷⁾ に従って行った。すなわち、ステージ 1 (Pre-conditioning) は 3 日間行い、装置内のギロチンドアを開けた状態で、マウスを装置に入れ 900 秒間自由に探索させた。Pre-conditioning の 3 日目に、各部屋に滞在した時間を測定し、長く滞在した部屋を preferred side、逆の部屋を non-preferred side とした。続くステージ 2 (Conditioning) は、6 日間に渡り行い、1、3、5 日目には PCP (8 mg/kg) を皮下投与した直後にギロチンドアを閉めた preferred side に、2、4、6 日目には saline を皮下投与した直後にギロチンドアを閉めた non-preferred side にそれぞれ 20 分間マウスを閉じ込めた。なお、PCP (10 mg/kg/day s.c.) および rolipram (1 mg/kg/day i.p.) を 28 日間連続投与または連続併用投与したマウスを用いた実験では、1、3、5 日目には PCP (8 mg/kg) を投与した直後にギロチンドアを閉めた non-preferred side に、2、4、6 日目には saline を投与した直後にギロチンドアを閉めた preferred side にそれぞれ 20 分間マウスを閉じ込めた。ステージ 3 (Post-conditioning) は、Conditioning 終了の翌日に行い、マウスをギロチンドアを開けた装置内に入れ 900 秒間自由に探索させ、Pre-conditioning の 3 日目と同様に各部屋に滞在した時間を測定した。Pre-conditioning および Post-conditioning おいてマウスが各部屋に滞在している時間は、東洋産業社の SCANET SV-10 LD を用いて測定した。

薬効評価は、Pre-conditioning および Post-conditioning において PCP で conditioning した side に滞在した時間から saline で conditioning した side に滞在した時間を引いた値をそれぞれ Pre value およ

び Post value とし、さらに、Post value から Pre value を引いた値を Post-Pre value として評価した。

Rolipram (腹腔内投与) および nefiracetam (経口投与) は、それぞれ PCP 投与の 30 および 60 分前に処置した。

脳内 cAMP 含量の測定

マウスにマイクロウェーブを照射し、断面により摘出した各脳分画からサンプルを調製し、Pharmasia Biotech の cAMP 測定用酵素免疫検定キットを用いて脳内 cAMP 含量を測定した。

統計処理

結果は、すべて平均 ± 標準誤差で表した。得られたデータの統計解析は、figure および table に示した検定法を用いて行い、 $P < 0.05$ であるものを有意であるとした。

C. 結果

PCP 誘発 PA の獲得に対する rolipram および nefiracetam の作用

Conditioning の期間中、rolipram (0.1 あるいは 1 mg/kg i.p.) と PCP (8 mg/kg s.c.) を併用投与すると、PCP 誘発 PA は、有意に抑制された (Fig. 1A)。同様な抑制作用は、nefiracetam (5 あるいは 10 mg/kg p.o.) の併用投与によっても観察された (Fig. 1B)。

Rolipram (1 mg/kg i.p.) および nefiracetam (10 mg/kg p.o.) の単独投与は、PA あるいは PP のいずれも誘発しなかった (Fig. 1A and B)。

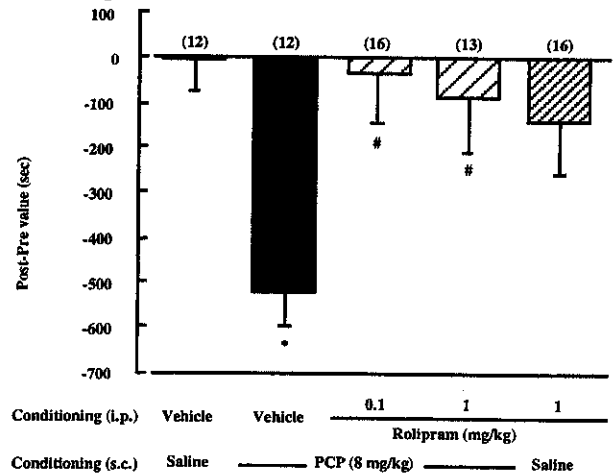
PCP および rolipram の急性あるいは併用投与による脳内 cAMP 含量の変化

PCP (8 mg/kg s.c.) の単独投与は、視床/視床下部における cAMP 含量を有意に減少さ

せたが、rolipram (1 mg/kg) の単独投与は、逆に増加させた (Table 1)。この PCP による cAMP 含量の減少作用は、rolipram (1 mg/kg i.p.) の併用投与により抑制された (Table 1)。皮質および線条体における cAMP 含量は、いずれの投与によっても有意な変化は認められなかった (Table 1)。

PCP 誘発 PA を発現したマウスの cAMP 含量は、皮質、線条体および視床/視床下部のいずれの部位においても有意な変化は認められなかった (未データ)。

A : Rolipram



B : Nefiracetam

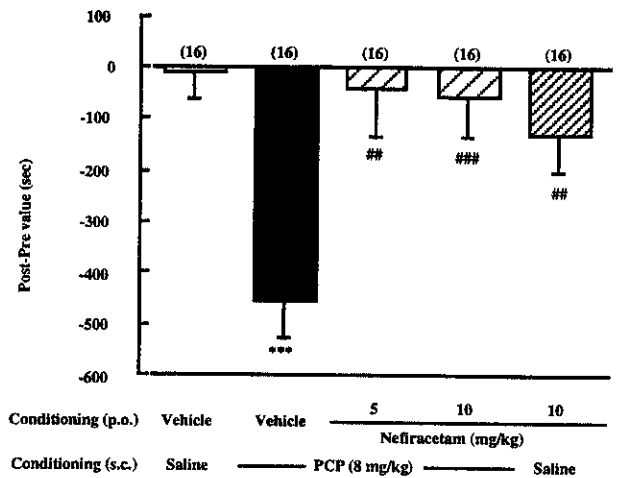


Fig. 1 Effects of rolipram (A) and nefiracetam (B) on the acquisition of PCP-induced place aversion in mice. Rolipram (0.1 or 1 mg/kg i.p.) and nefiracetam (5 or 10

mg/kg p.o.) were administered 30 and 60 min, respectively, before PCP treatment (8 mg/kg s.c.). Each column represents the mean \pm S.E.M. Numbers in parentheses are the number of animals used. *P < 0.05, ***P < 0.001 vs corresponding (vehicle+saline)-treated group. #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs corresponding (vehicle+PCP)-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

Table 1. Cyclic AMP levels in brain regions of mice treated with PCP and/or rolipram acutely.

Drug treatment	cAMP levels (% of control)		
	Cortex	Striatum	Thalamus/hypothalamus
Vehicle + Saline	100.0 \pm 7.8	100.0 \pm 9.1	100.0 \pm 10.1
Vehicle + PCP	113.6 \pm 15.8	114.3 \pm 13.5	65.6 \pm 5.2 *
Rolipram + PCP	112.2 \pm 14.0	98.2 \pm 19.2	121.4 \pm 11.8 **
Rolipram + Saline	105.7 \pm 18.3	141.1 \pm 21.8	156.1 \pm 17.4 **

Rolipram (1 mg/kg i.p.) was administered 30 min before PCP treatment. Mice were sacrificed 10 min after PCP treatment (8 mg/kg s.c.). Cyclic AMP levels in the cortex, striatum and thalamus/hypothalamus in the (vehicle+saline)-treated group were 496.1 \pm 38.7, 2737.7 \pm 249.1 and 293.2 \pm 29.6 pmol/g tissue, respectively. N = 7-8. *P < 0.05, **P < 0.01 vs (vehicle+saline)-treated group. ##P < 0.01 vs (vehicle+PCP)-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

PCP 誘発 PP の獲得に対する rolipram および nefiracetam の作用

PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 28 日間連続投与したマウスにおいて、conditioning の期間中、rolipram (0.1 あるいは 1 mg/kg i.p.) あるいは nefiracetam (5 あるいは 10 mg/kg p.o.) と PCP (8 mg/kg s.c.) を併用投与すると、PCP 誘発 PP は、有意に緩解した (Fig. 2A and B)。

Rolipram (1 mg/kg i.p.) あるいは nefiracetam (10 mg/kg p.o.) の単独投与は、PA あるいは PP のいずれも誘発しなかった (Fig. 2A and B)。

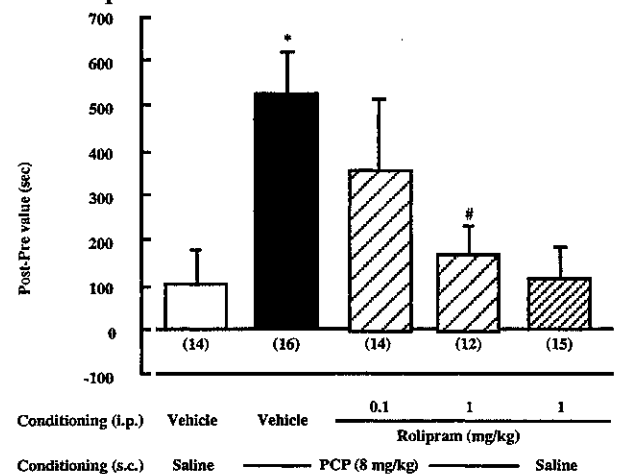
PCP 誘発 PP の形成に対する rolipram お

よび nefiracetam の作用

Rolipram (1 mg/kg/day i.p.) あるいは nefiracetam (10 mg/kg/day p.o.) と PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 28 日間連続併用投与したマウスにおいて、conditioning 期間中、PCP (8 mg/kg s.c.) を単独投与した時、PCP 誘発 PP は誘発されなかった (Fig. 3A and B)。

Rolipram (1 mg/kg/day i.p.) あるいは nefiracetam (10 mg/kg/day p.o.) を 28 日間連続投与したマウスにおいて PCP (8 mg/kg s.c.) は、PA および PP のいずれも誘発しなかった。

A: Rolipram



B: Nefiracetam

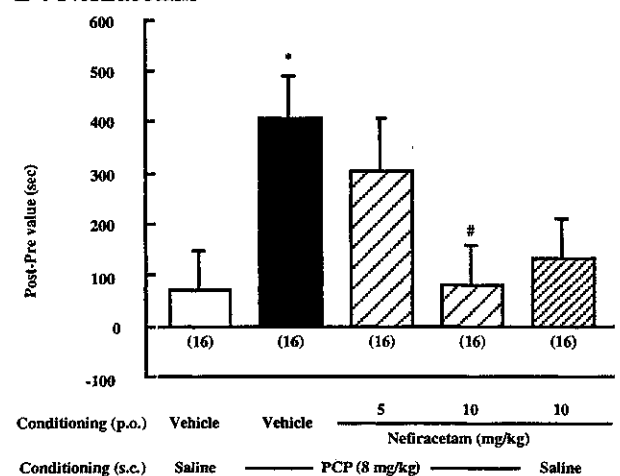


Fig. 2 Effects of rolipram (A) and nefiracetam (B) on

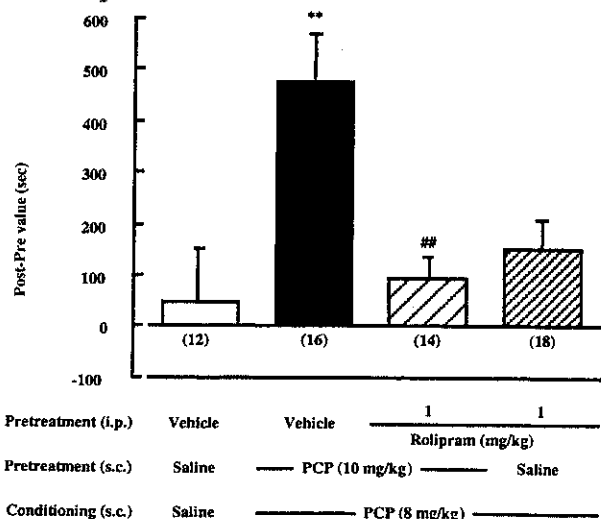
the acquisition of PCP-induced place preference in mice. Mice were pretreated with PCP (10 mg/kg/day s.c.) for 28 days before the CPP task. During conditioning, rolipram (0.1 or 1 mg/kg i.p.) and nefiracetam (5 or 10 mg/kg p.o.) were administered 30 and 60 min, respectively, before PCP treatment (8 mg/kg s.c.). Each column represents the mean \pm S.E.M. Numbers in parentheses are the number of animals used. *P < 0.05 vs corresponding (vehicle+saline)-treated group. #P < 0.05 vs corresponding (vehicle+PCP)-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

Table 2. Cyclic AMP levels in brain regions of mice pretreated with PCP for 28 days

Drug treatment	cAMP levels (% of control)		
	Cortex	Striatum	Thalamus/hypothalamus
Saline	100.0 \pm 11.3	100.0 \pm 8.9	100.0 \pm 10.3
PCP	88.5 \pm 12.5	134.3 \pm 14.5 *	160.5 \pm 14.2 **
Rolipram + PCP	99.7 \pm 12.7	91.8 \pm 13.8	86.3 \pm 14.2 ##

Mice were pretreated with saline, PCP (10 mg/kg/day s.c.), and rolipram (1 mg/kg/day i.p.) + PCP (10 mg/kg/day s.c.) for 28 days. Such mice were sacrificed 24 hr after the final administration of PCP. Cyclic AMP levels in the cortex, striatum and thalamus/hypothalamus of saline-treated group were 514.2 \pm 58.1, 2471.0 \pm 220.0 and 316.3 \pm 32.6 pmol/g tissue, respectively. N = 7-8. *P < 0.05, **P < 0.01 vs corresponding saline-treated group. ##P < 0.01 vs corresponding PCP-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

A : Rolipram



B : Nefiracetam

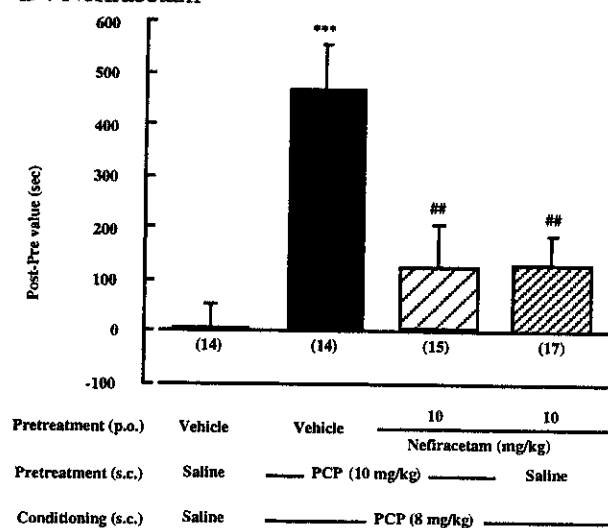


Fig. 3 Effects of rolipram (A) and nefiracetam (B) on the development of PCP-induced place preference in mice. Rolipram (1 mg/kg i.p.) and nefiracetam (10 mg/kg) were administered 30 and 60 min, respectively, before PCP treatment (10 mg/kg s.c.). Such treated mice were used in the CPP test. Each column represents the mean \pm S.E.M. Numbers in parentheses are the number of animals used. **P < 0.01, ***P < 0.001 vs corresponding (vehicle+saline+saline)-treated group. ##P < 0.01 vs corresponding (vehicle+PCP+PCP)-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

PCP 連続投与マウスにおける PCP および rolipram の単独あるいは併用投与による脳内 cAMP 含量の変化

PCP (10 mg/kg/day s.c.) を 28 日間連続投与したマウスの線条体および視床/視床下部における cAMP 含量は、有意に増加していた (Table 2)が、この増加は、PCP と rolipram (1 mg/kg i.p.)の連続併用投与によって有意に抑制された (Table 2)。

PCP 誘発 PP を発現したマウスおよび conditioning の期間中 PCP(8 mg/kg) と rolipram (1 mg/kg)を併用投与したマウスの線条体および視床/視床下部において cAMP 含量は増加していた (Table 3)。

Table 3. Cyclic AMP levels in brain regions of mice showing the PCP-induced place preference

Drug treatment	cAMP levels (% of control)		
	Cortex	Striatum	Thalamus/ hypothalamus
Pretreatment with saline			
Vehicle + Saline	100.0 ± 14.9	100.0 ± 17.4	100.0 ± 14.5
Pretreatment with PCP			
Vehicle + PCP	88.8 ± 14.8	144.5 ± 14.5 *	156.1 ± 18.4 **
Rolipram + PCP	101.6 ± 14.3	138.3 ± 14.3 *	165.9 ± 15.3 **

Mice were pretreated with PCP (10 mg/kg/day s.c.) for 28 days before the CPP task. During conditioning, rolipram (1 mg/kg i.p.) was administered 30 min before PCP treatment (8 mg/kg s.c.). Immediately after CPP test, mice were sacrificed. Cyclic AMP levels in the cortex, striatum and thalamus/hypothalamus of saline-treated group were 464.8±69.3, 2504.4±453.2 and 278.4±40.4 pmol/g tissue, respectively. **P < 0.01 vs corresponding saline-treated group (Student-Newmann-Keuls multiple comparisons test).

D. 考察

近年、分子生物学的手法の発展により *in vitro* で薬物依存の形成および発現メカニズムの解明が行なわれている。これらの研究から各種中枢神経作用薬による薬物依存の形成メカニズムには、かなり共通した神経系や細胞内情報伝達系が関与していることが示唆されている。すなわち、薬物の強化および報酬効果に脳内モノアミンや cAMP 系の関与が報告されている⁶⁾。我々はこれまでに、脳内モノアミン作動性神経系が PCP による依存の形成メカニズムに関与していることを報告している^{4,7)}。そこで今回は、共通した細胞内情報伝達系として注目されている cAMP から CREB、CRE および標的遺伝子の転写開始へと続く一連のカスケードが、PCP 誘発 PA および PP に関与しているかどうか調べるため、この細胞内カスケードの出発点となる細胞内 cAMP 濃度を増加させる 2 種類の薬物を用いて、行動薬理学的および神経化学的に検討した。

選択的 phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram⁸⁾ および細胞内 cAMP 濃度を増加させる作用を有する nefiracetam^{9,10)} は、PCP によって誘発される PA の獲得を阻害した。さらに、PCP の急性投与によって視床/視床下部における cAMP 含量が減少し、この減少は rolipram の併用により拮抗された。これらの結果から、視床/視床下部における cAMP 系は、PCP によって誘発される嫌悪性の獲得に重要な役割を果たしていることが示唆され、PCP による cAMP 系の抑制が PA の発現に関与している可能性がある。しかし、PCP がどのような機序で cAMP 含量を減少させるかについて検討する必要がある。

PCP を 28 日間連続投与したマウスにおいて PCP は、PP を惹起し、この PP は、CPP 試験開始前に PCP と rolipram あるいは nefiracetam を連続併用投与しておくとは形成されなかった。さらに PCP を 28 日間連続投与したマウスの線条体および視床/視床下部において cAMP 含量が増加しており、この増加は、rolipram の連続併用投与によって抑制された。これは、PCP の急性投与によって誘発される cAMP 含量の減少作用が、PCP を連続投与することによって代償的に細胞内 cAMP の産生を促進させることによるものと思われる。従って、PCP 誘発 PP の形成過程に脳内 cAMP 系の機能亢進が重要な役割を果たしていることが示唆される。一方、PCP 誘発 PP を発現したマウスにおいても脳内 cAMP 含量は増加していた。しかし、conditioning の期間中、PCP と rolipram を併用投与したマウスにおいて、PCP 誘発 PP は認められなかったにもかかわらず、cAMP 含量は増加していた。従って、conditioning の期間中、PCP と rolipram を併用投与したマウスにおける cAMP 含量の増

加は、PCP を 28 日間連続投与した効果を反映したものであり、PCP 誘発 PP 発現に特異的な変化ではないと示唆される。以上のことから、線条体および視床／視床下部における cAMP 系が PCP によって誘発される嗜好性の獲得および嫌悪性から嗜好性への変化に重要な役割をしていると考えられる。

これまでに分子生物学的手法により *in vitro* の実験系において、以下の様な薬物依存の形成メカニズムの仮説が提唱されている。すなわち、その仮説とは依存性薬物の連続投与により adenylate cyclase とカップリングしている受容体を介して細胞内 cAMP の産生が促進される。産生された cAMP は cAMP-dependent protein kinase を活性化させ CREB をリン酸化し、coactivator である CBP が CREB に結合して CREB は活性型となる。つぎに、活性型の CREB が、DNA 上に存在する CRE に結合し、その下流にある標的遺伝子の転写を促進することにより、細胞レベルでの薬物依存状態への機能的変化を引き起こすというものである。つまり、昨年の本研究報告において得られた CREB の coactivator である CREB binding protein (CBP) 遺伝子変異マウスにおいて PCP 誘発 PP が形成されなかったという結果と今回の結果は、上記に示した *in vitro* の系で提唱されている薬物依存の形成メカニズムを支持するものである⁶⁾。さらに、上記の仮説は、主に *in vitro* での morphine 依存形成過程において確立されてきたものであるが、今回の結果は、PCP によって誘発される精神依存の形成および獲得過程にも脳内 cAMP が関与する情報伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆され、依存性薬物による依存形成には共通したメカニズムが存在する可能性がある。

以上のように、我々は、分子生物学的手法により解明された薬物依存の形成メカニズムを行動薬理学的に検討し、PCP 誘発 PP の形成および獲得過程において cAMP が重要な役割を果たしていることを見出した。今後、さらに種々の薬物依存に共通する因子を探索していく予定である。

E. 結 論

本研究において、PCP 誘発 PA の獲得および PP の形成・獲得のメカニズムに、細胞内 cAMP が関与する情報伝達システムが重要な役割を果たしていることが見出された。

引用文献

- 1) Carroll M.Y.N., France C.P. and Meisch R.A.: Intravenous self-administration of etonitazene, cocaine and phencyclidine in rats during food deprivation and satiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217: 241-247, 1981
- 2) Holtzman S.G.: Phencyclidine-like discriminative effects of opioids in the rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 214: 614-619, 1980
- 3) Kitaichi K., Noda Y., Hasegawa T., Furukawa H. and Nabeshima T.: Acute phencyclidine induces aversion, but repeated phencyclidine induces preference in the place conditioning test in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 318: 7-9, 1996
- 4) Kitaichi, K., Noda, Y., Miyamoto, Y., Numaguchi, A., Osawa, H., Hasegawa, T., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Involvement of the serotonergic neuronal system in phencyclidine-induced place aversion in rats. *Behav. Brain Res.*, 103:

105-111, 1999.

- 5) Nabeshima T., Ishikawa K., Yamaguchi K., Furukawa H. and Kameyama T.:
Methysergide-induced precipitated withdrawal syndrome in phencyclidine-dependent rats. *Neurosci. Lett.*, 69: 275-278, 1986
- 6) Nestler E.J.: Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Critical Rev. in Neurobiol.*, 7: 23-39, 1993.
- 7) Noda Y., Miyamoto Y., Mamiya T., Kamei H., Furukawa H. and Nabeshima T.:
Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286: 44-51, 1998.
- 8) Schwabe U., Miyake M., Ohga Y. and Daly J. W.:
4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 12: 900-910, 1976.
- 9) Yamada K. and Nabeshima T.: Possible involvement of the activation of voltage-sensitive calcium channels in the ameliorating effects of nefiracetam on scopolamine-induced impairment of performance in a passive avoidance task. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 881-892, 1994.
- 10) Yoshii M. and Watabe S.: Enhancement of neuronal calcium channel currents by the nootropics on high-voltage activated calcium channels in NG 108-15 cells. *Brain Res.* 642: 123-131, 1994.

Nicotine 長時間曝露に伴う神経細胞機能変化

大熊 誠太郎
桂 昌司

川崎医科大学薬理学教室
川崎医科大学薬理学教室

Nicotine 長期曝露により誘発される diazepam binding inhibitor (DBI) 発現の増加が神経細胞への Ca^{2+} 流入の増加によることから、この Ca^{2+} 流入増加機序を初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて検討した。Nicotine 長時間(24 時間)曝露により [^3H]nicotine 結合が増加し、この増加は B_{max} 値の増加に起因していた。さらに、30mM KCl により誘発される [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入は nicotine 曝露群において有意に増加していた。KCl 誘発性 [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入の抑制の程度は nicotine 曝露および非曝露細胞のいずれにおいても P/Q および N 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) 阻害薬である ω -agatoxin IVA、および ω -conotoxin GVIA の共存下では同一であり、一方 L 型 VDCC 阻害薬である nifedipine による KCl 誘発性 [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入阻害量は nicotine 曝露群で有意に高く、しかも nifedipine 共存下にみられた KCl 誘発性 [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入量は両群において同一値を示した。L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 による [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入は nicotine 曝露群で有意に高値を示した。 [^3H]Verapamil 結合量は nicotine 曝露群で有意に高く、これは K_d 値の低下によるものであり、 B_{max} 値には変化が認められなかった。これらの実験成績から、nicotine 長時間曝露による神経細胞への [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入の増加は、L 型 VDCC の Ca^{2+} に対する親和性の亢進を介した L 型 VDCC の機能亢進に起因することが明らかとなった。

A. 目的

薬物依存病態の 1 つである nicotine 依存には種々の精神的あるいは身体的症状あるいは症候が認められることはよく知られている。中枢神経系に存在する nicotine 性 acetylcholine 受容体 (nAChR) は 5 量体であり、それぞれのサブユニットの組み合わせにより多様な生理機能に関与している^{1,2)}。中枢神経系における nAChR はその活性化により神経細胞膜の脱分極を誘発し、この結果細胞内への Ca^{2+} 流入の増大とこれに伴う諸種の機能変化、すなわち、記憶の亢進、痙攣、食欲や易怒性の抑制、局所的な glucose 消費の低下などが生じるとされている¹⁾。同様に、このような nAChR の機能の多様性が nicotine 依存とその退薬時にみられる諸種の精神的および身体的な症状や症候の出現に関

係していると考えられている。

一方、内在性 benzodiazepine 様物質として知られている diazepam binding inhibitor (DBI) は、脳内 γ -aminobutyric acid (GABA) 作動性神経細胞の軸索終末部小胞体において、GABA と共存する約 10 kDa の内在性神経活性ペプチドであり³⁾、また抗不安薬として臨床で繁用されている BZD 系薬物の特異的受容体に対して、inverse agonist としての薬理活性を示す内在性不安誘発物質であり精神的不安に誘発に関与するものと考えられている。したがって、各種ストレス環境下および薬物依存禁断症状発現時などの多くの精神症状の変化に深く関与している可能性が考えられている。また、近年 DBI の単離と cDNA の塩基配列および DBI の脳内分布などの生物学的特性が明らかにされている²⁾。

DBI は alcohol、nicotine、および morphine などの依存が形成された場合には、その脳内発現が増加することが報告されている⁵⁻⁷⁾。このような DBI 発現の増加の機序についての詳細は不明であるが、予備実験において nicotine の長期曝露により生じる DBI 発現の増加が細胞内への Ca^{2+} 流入の増加に起因する可能性を示唆する実験成績を得ている。そこで、本研究では依存形成薬物の 1 つである nicotine を神経細胞に長時間曝露した場合に、神経機能にいかなる変化が生じるかについて、nACh 受容体および電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) を中心として、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて神経化学的に検討を加えた。

B. 方法

1. 神経細胞の単離・初代培養

マウス大脳皮質からの神経細胞の単離およびその初代培養は、Ohkuma らの方法に準じて調製した¹¹⁾。すなわち、胎齢 15 日目の ddY 系マウス胎児より新皮質を採取し、髄膜を除去したのち細切した。Trypsin 処理により得られた細胞を遠心操作により分離し、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に再浮遊の後、nylon mesh (mesh size; 60 μ m) でろ過した。得られた細胞を含むろ液を、予め 24 時間 poly-L-lysine で処理した培養皿 (PRIMARIA™, Falcon) に添加し、湿度 100%、37℃、95% air - 5% CO₂ の条件下で 1 時間放置した。その後、培養液を 15% fetal bovine serum を含む DMEM に変更し、上述と同一条件下で 3 日間培養した。次に、培養液を 10% horse serum および 10 μ M cytosine arabinoside を含む DMEM に置換して 24 時間培養し、再度 10% horse serum を含む DMEM で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10% horse serum 含有 DMEM に変更し、実験には培養 14 日目の神経細胞を使用した。なお、本研究で使用した培養細胞は 90% 以上が大脳皮質神経細胞であった。

培養細胞への各種薬物ならびに nicotine の曝露は、Hanks 液で希釈したものを培養皿中に直接添加することにより行った。

2. 神経細胞への nicotine 曝露法

初代培養神経細胞への nicotine の曝露は既報⁸⁾に準じて行った。すなわち、最終濃度が 0.1 μ M となるように Hank's solution に溶解した nicotine を直接培養液中に添加し、24 時間の曝露を行った。予備実験から、本研究で用いた nicotine の濃度および曝露時間は、最大の DBI mRNA 発現を誘発する条件であることが判明している⁸⁾。

3. [³H]Nicotine 結合実験

神経細胞膜に対する [³H]nicotine 結合の測定は既報¹³⁾に準じて行った。すなわち、神経細胞を氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で 3 回洗浄したのちに、同一の buffer とともに培養皿より剥離し、Polytron ホモゲナイザーで破碎し、48,000 \times g、4℃、20 分間の遠心操作を加えた。同様の遠心操作による洗浄を 4 回行ったのち、実験に供するまで -80℃ で保存した。この標品を結合実験前に解凍し、上述と同一の洗浄操作を 2 回行い、顆粒画分を得た。この顆粒画分を 50 mM Tris-HCl buffer により懸濁し、5 nM [³H]nicotine の存在下で 2℃、60 分間の incubation を行った。反応終了後、反応系に 2 ml の氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer を加え、0.3% の polyethylenimine とともに Whatman GF/C フィルターを用いて吸引濾過した。フィルターを氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer で 5 回洗浄したのち、液体シンチレーションカウンターによりフィルター上に残存する放射活性を測定した。非特異的結合の測定は、1 μ M cystine の存在下にて結合実験を行った。

Scatchard 解析を行う場合には、顆粒画分を各種の濃度 (0.2 - 20 nM) の [³H]nicotine の存在下に上述と同様の方法を用いて結合実験を行った。

4. [³H]Verapamil 結合実験

神経細胞膜への [³H]verapamil 結合の測定は既報の方法⁴⁾に準じて行った。すなわち、[³H]nicotine 結合実験の場合と同様の方法で顆粒画分を調製し、氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer を用い 3 回の洗浄操作を行い、実験に供するまで -80℃ にて保存した。保存した顆粒画分を解凍したのち、氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer で 1 回洗

浄し、同一の buffer で懸濁した。各種濃度(0.025 - 6.4 nM)の ^3H verapamil の存在下で 25°C、90 分の incubation を行ったのち、Whatman GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルター上に残存する放射活性を測定した。非特異的結合の測定は、 10^{-4} M の ^3H verapamil の存在下に上述と同様の方法を用いて結合実験を行った。

5. 神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の測定

神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の測定は既報¹¹⁾に従って行った。神経細胞を氷冷した 20 mM HEPES を含有する Ca^{2+} -free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4, KRB-H) で 3 回洗浄したのち、37°C に保温した Ca^{2+} -free KRB-H を加え、37°C、10 分間の preincubation を行った。この buffer を吸引除去後、37°C に保温した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-H を加え、2.7 mM $^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ (1 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /dish) の存在下に 37°C、2 分間の incubation を行った。反応終了後、神経細胞を氷冷した KRB-H で 5 回洗浄し、0.5 M NaOH とともに神経細胞を培養皿より剥離し、その 1 部を等モルの酢酸で中和し、シンチレーターとともに液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

30 mM KCl および nicotine の添加は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の添加と同時にを行った。それぞれ L、P/Q、N 型 VDCC 阻害薬である nifedipine、 ω -agatoxin IVA (ω -ATX)、および ω -conotoxin GVIA (ω -CTX) の添加は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の添加の 15 秒前に行った。L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 の添加も $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の添加の 15 秒前に行った。

6. 蛋白定量

顆粒画分および 0.5 M NaOH した神経細胞中に含有される蛋白の定量は、bovine serum albumin を標準物質とした Lowry らの方法⁹⁾により行った。

9. 統計的検討

実験成績はすべて平均値 \pm 標準誤差で表示し、統計的有意差の検定は一元配置分散分析(one-way ANOVA)の後に Bonferroni's test および Dunnett's test を用いて行った。

C. 結果

1) Nicotine 長時間曝露に伴う神経細胞膜への

^3H nicotine 結合の変化

初代培養神経細胞に 24 時間の nicotine を曝露した場合、曝露開始後 6 時間目より有意な ^3H nicotine 結合の増加がみられ、この増加は曝露時間の延長とともにより著明となるのが観察された(Fig. 1)。

すでに nicotine 曝露 24 時間で DBI mRNA 発現が最大値を示すことが報告されている⁸⁾ことから、nicotine 曝露 24 時間目における ^3H nicotine 結合の Scatchard 解析を行ったところ、Fig. 1 に示すようにこの ^3H nicotine 結合の増加は B_{max} 値の増加に起因するもので、 K_d 値には変化が認められなかった。

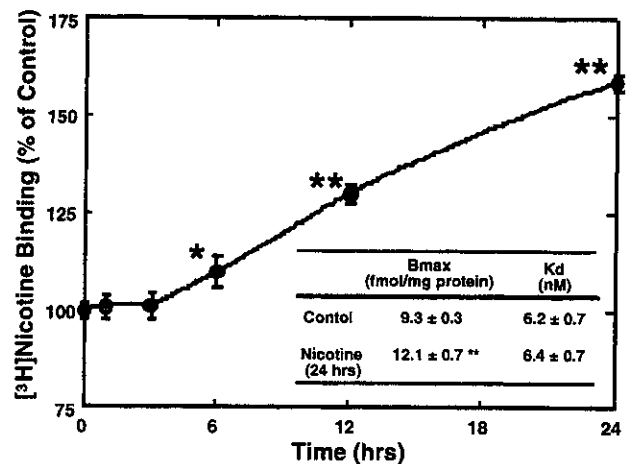


Fig. 1. Time course of ^3H nicotine binding to particulate fractions from cerebral cortical neurons following exposure to nicotine. The neurons were cultured with 0.1 μM nicotine at 37 °C for the period indicated in the figure. The control determined before nicotine exposure was 178.3 ± 5.1 fmol/mg protein. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control value (Dunnett's test).

2) Nicotine 長時間曝露に伴う神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の変化

Nicotine 長時間曝露に伴う神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の変化について検討したところ、Fig. 2 に示すように、30 mM KCl 刺激による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は nicotine の曝露時間に伴い増加し、曝露後 12 時間目にすでに流入量は最大値に達し、この流入量の増大は nicotine 曝露 24 時間目

においてもほぼ同じであった。この結果から、nicotine 曝露により生じる KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は、KCl が神経細胞膜の脱分極を誘発することを勘案すると、VDCC が関与している可能性が高いと考えられる。

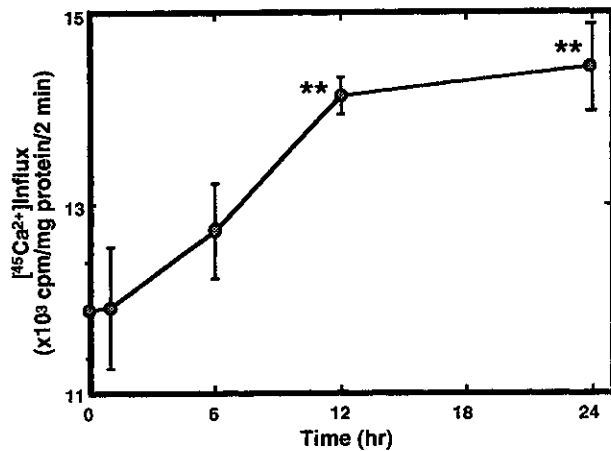


Fig. 2. Time course of 30 mM KCl-induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into cerebral cortical neurons following exposure to nicotine. $p < 0.01$ vs the value determined before nicotine exposure (Dunnett's test).

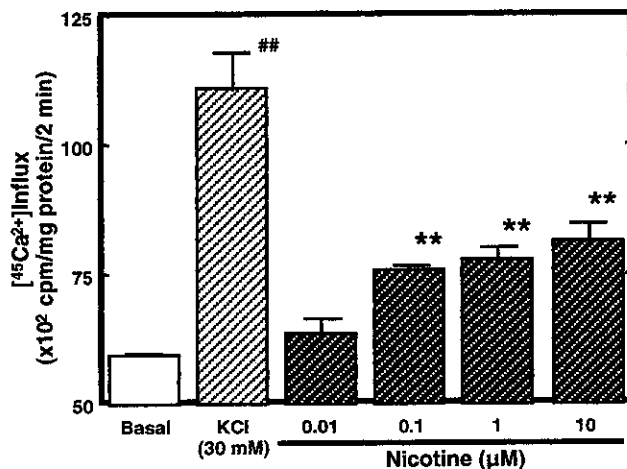


Fig. 3. Effects of 30 mM KCl and nicotine on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into cerebral cortical neurons. ## $p < 0.01$ vs basal influx (Bonferroni's test). *** $p < 0.01$ vs basal influx (Dunnett's test).

KCl の場合と同様に nicotine 刺激による $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入についても検討した。その結果、nicotine 無処置の神経細胞では nicotine は用量依存性に $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加をもたらし、nicotine 0.1 μM の濃度で $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は最大値に達し、nicotine 10 μM 存在下においても $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入量は nicotine 0.1 μM と同程度であった (Fig. 3)。従って、以下の nicotine 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の検討には 1 μM の nicotine を用いることとした。

Nicotine 0.1 μM の長時間曝露後の nicotine 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は、明らかに nicotine 曝露時間に伴い有意に増加するのが観察された (Fig. 4)。

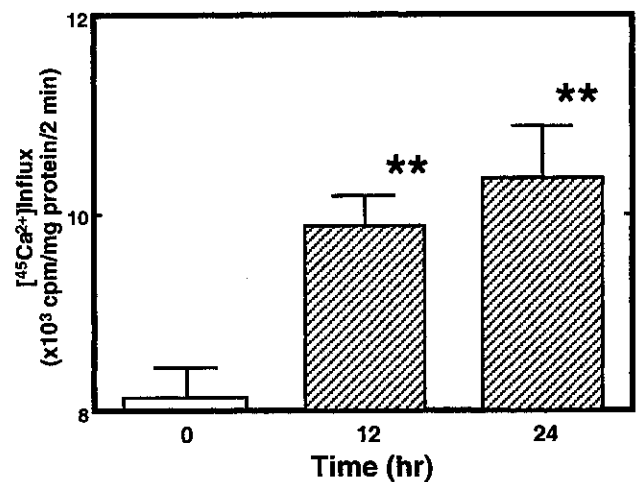


Fig. 4. Time course of changes in nicotine (1 μM)-induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into cerebral cortical neurons following nicotine (0.1 μM) exposure. *** $p < 0.01$ vs the value determined before nicotine exposure (Dunnett's test).

3. Nicotine 長時間曝露に伴い生じる $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加における VDCC の関与

本研究で用いた神経細胞は P/Q、L および N 型 VDCC を有することが確認されている¹¹⁾。そこで nicotine 非曝露および 24 時間曝露を行った神経細胞の両者を用い、KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす各種の VDCC 阻害薬の影響を検討した。

Nicotine 非曝露神経細胞ではそれぞれ P/Q、N および L 型 VDCC 阻害薬である ω -ATX、 ω -CTX および