

Table 2. Monoamine level 24 hr and 48 hr after repeated nicotine administration for 7 days in mice whole brains.

Monoamine level	Control	24hr withdrawal	48hr withdrawal
5-HT ( $\mu$ g/g)	742.78 $\pm$ 13.03	758.23 $\pm$ 15.40	721.36 $\pm$ 20.31
5-HIAA ( $\mu$ g/g)	275.50 $\pm$ 11.99	284.15 $\pm$ 5.37	290.21 $\pm$ 6.45
5-HIAA / 5-HT	0.429 $\pm$ 0.020	0.375 $\pm$ 0.004 *	0.404 $\pm$ 0.012
DA ( $\mu$ g/g)	1,094.55 $\pm$ 30.83	1,136.20 $\pm$ 32.81	1,125.32 $\pm$ 37.35
DOPAC ( $\mu$ g/g)	116.53 $\pm$ 1.24	117.30 $\pm$ 2.23	112.73 $\pm$ 2.48
DOPAC / DA	0.107 $\pm$ 0.003	0.104 $\pm$ 0.003	0.101 $\pm$ 0.003

## 2.2 競合的ニコチン受容体拮抗薬の作用

Saline 反復投与群においては DH $\beta$ E による影響は全くみられなかった (Fig. 5A)。しかしながら、nicotine 反復投与群においては mecamylamine の場合と同様に、DH $\beta$ E は用量依存的に自然休薬時と同様の HTR の増強作用を示した (Fig. 5B)。一方、MLA を用いた場合では、saline 反復投与群のみならず nicotine 反復投与群においても DOI 誘発 HTR に有意な変化はみられなかった。

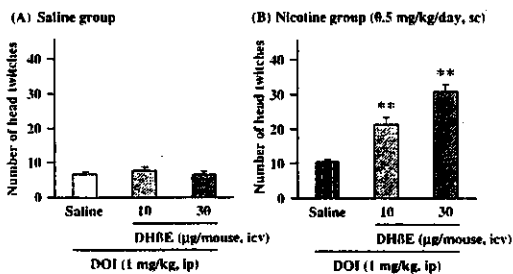


Fig. 5 Effect of dihydro- $\beta$ -erythroidine (DH $\beta$ E) on DOI-induced head twitch response (HTR) in mice pretreated with nicotine for 7 days. Data were analyzed by Dunnett's test. \*\* $p$ <0.01

Data were analyzed by Dunnett's test. \* $p$ <0.05

## D. 考察

ニコチン依存やニコチン退薬症状の動物モデルは、その発現機構の解明や治療薬の評価に有用であり、これまでに osmotic minipump による nicotine 連続注入ラットや nicotine 反復投与ラットがそのモデルとして提唱されている。いずれの動物モデルにおいても、nicotine の休薬に伴い jumping、shaking、chewing、facial tremor、scratching などの身体症状が認められる。また、これらはニコチン受容体拮抗薬の投与によっても誘発されることが知られている<sup>11-13</sup>。しかし、今回はこれらの報告とは異なり、低用量の nicotine 反復投与マウス (0.5 mg/kg/day, sc) を動物モデルとして用いた。その理由としては、条件付け場所嗜好性試験法 (conditioned place preference) によって低用量の nicotine (0.4-0.8 mg/kg/day) でも nicotine の嗜好効果が十分認められること<sup>15</sup>、ヒトにおける nicotine 離脱症状は精神症状が主体であ

り、重篤な身体症状を認めないことからである。実際、今回の低用量の nicotine 反復投与マウス (0.5 mg/kg/day) では、nicotine 休薬に伴う上記身体症状は確認されなかった。しかしながら、今回、ニコチン休薬後 24 時間後に DOI 誘発 HTR が nicotine の用量依存的に増加することを明らかにした。この nicotine 休薬に伴う HTR 増強作用は、連日の mecamylamine 前処置により有意に抑制され、hexamethonium によっては全く影響を受けなかったことから、中枢ニコチン受容体の関与が示唆された。さらに、この nicotine 自然休薬に伴う HTR の増強作用は、nicotine 最終投与の 1.5 時間後では抑制されることを明らかにした。Nicotine の半減期は約 2 時間であるため、nicotine 最終投与の 1.5 時間後は nicotine が体内に残っている状態と考えられる。すなわち、nicotine 退薬に伴う DOI 誘発 HTR の増強作用は、nicotine の再投与によって抑制されることが示唆された。これらの結果は、DOI 誘発 HTR の行動変化がニコチン退薬症候の一部を反映するものであり、ニコチン自然休薬時には 5-HT<sub>2</sub> 受容体の感受性が増大しているものと考えられた。

また、ニコチン受容体拮抗薬による強制退薬時にも同様に DOI 誘発 HTR が増強されることを明らかにした。この結果は、DOI 誘発 HTR の行動変化がニコチン退薬症候

を反映することを支持するものであり、またニコチン強制退薬時にも 5-HT<sub>2</sub> 受容体感受性が増大していることが示唆された。非競合的ニコチン受容体拮抗薬 mecamylamine および  $\alpha_4\beta_2$  競合的ニコチン受容体拮抗薬 DH $\beta$ E は、ニコチン依存ラットにおいて身体症状を誘発することが報告されている<sup>12,13)</sup>。本実験でも、両拮抗薬は、nicotine 反復投与マウスにおいて DOI 誘発 HTR を増強させた。DH $\beta$ E は [<sup>3</sup>H]-nicotine によりラベルされる部位に優勢に結合し、 $\alpha_7$ -ニコチン受容体よりも  $\alpha_4\beta_2$ -ニコチン受容体に対して 180 倍以上の高い選択性を持つとされている<sup>5)</sup>。一方、MLA は  $\alpha_4\beta_2$ -ニコチン受容体よりも  $\alpha_7$ -ニコチン受容体に対して 30 倍以上の高い選択性を持つ  $\alpha_7$  競合的ニコチン受容体拮抗薬である<sup>10)</sup>。本実験において、DH $\beta$ E は HTR を増強させ、MLA は全く影響を与えなかったことから、ニコチン退薬症候には  $\alpha_4\beta_2$ -ニコチン受容体サブタイプが重要な役割を担っていることが示唆された。実際、 $\alpha_4\beta_2$ -ニコチン受容体サブタイプがうつ病などの負の気分変調に関与することを示唆する報告もあり<sup>10)</sup>、これは我々の結果を支持するものである。

これまでの動物実験でも、nicotine は 5-HT 神経系に影響を及ぼすことが報告されている。ニコチン受容体は縫線核にある

5-HT神経細胞体および5-HT神経終末に存在し、5-HTの遊離を促進することが知られている<sup>14)</sup>。しかしながら、nicotine (0.4 mg/kg/day) 慢性投与はラット海馬での5-HT含量および合成を減少させると報告されている<sup>3)</sup>。nicotine 自然休薬24時間後では脳内5-HT代謝回転が有意に減少していることを明らかにした。さらに、この5-HT代謝回転の経時的変化はDOI誘発HTRの行動変化と相関性を示した。したがって、nicotine 自然休薬は前シナプス性5-HT神経機能を減弱させることで、二次的に後シナプス性5-HT<sub>2</sub>受容体の感受性を増大させるのではないかと考えられた。

様々な依存性薬物で認められる退薬症候にも中枢5-HT神経系が関与することが報告されている。低用量のcocaine反復投与後では、その休薬によりDOI誘発HTRが増強する。すなわちcocaine退薬時にも5-HT<sub>2</sub>受容体の感受性が増大することが示唆されている。さらに、cocaineやmorphineによる退薬症候が5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるritanserin、ketanserinにより抑制されることも報告されている。これらの知見は、5-HT神経系、特に5-HT<sub>2</sub>受容体が依存性薬物で認められる退薬症候の発現を左右するひとつの重要な因子であることを強く示唆している。

以上の結果より、nicotine退薬時にはDOI誘発HTRが増強し、5-HT<sub>2</sub>受容体に

対する感受性が増大していることが推察された。5-HT<sub>2</sub>受容体はうつ病や不安といった負の気分変調に関与することが知られている<sup>6)</sup>。特にうつ病に関しては、5-HT合成能が低下しているため5-HT<sub>2</sub>受容体の感受性亢進が生じているという仮説が報告されている<sup>1)</sup>。実際、うつ病患者における血小板の5-HT<sub>2</sub>受容体数は増加しており<sup>4)</sup>、自殺者の死後脳を用いた研究においても前頭前野における5-HT<sub>2</sub>受容体数が増加している<sup>2)</sup>。したがって、nicotine退薬時には、この5-HT<sub>2</sub>受容体感受性亢進による不安、抑うつ気分、不快感などの精神症状が出現し、その症状から逃れるためにnicotineへの強い欲求が生じる可能性が考えられた。最近、抗うつ薬であるfluoxetineが、臨床症状として抑うつ気分を示す喫煙者に有益であることが報告された<sup>5)</sup>。また、抗うつ薬であるbupropionとnicotine patchとの併用群では、nicotine patch単剤群よりも有意に長期間の禁煙率が高かったと報告されている。すなわち、本研究の結果よりニコチン退薬症候には5-HT神経系が重要な役割を担っていることが明らかになった。

#### E. 結論

nicotineの反復投与によって、その24時間後ではDOIに対する感受性は増大し、このとき5-HTの代謝回転が低下していることを明らかにした。この代謝回転の低下により5-HT<sub>2</sub>受容体の感受性の亢進が引き起こされている可能性が推察された。また、nicotine受容体拮抗薬投与によっても同様に5-HT<sub>2</sub>受容体の感受性が増大していることが明らかとなった。特にこの現象には、少なくとも $\alpha 4 \beta 2$  nicotine受容体 subtype

が重要な役割を担っていることを明らかにした。

#### 参考文献

1. Aprison M.H., Takahashi R. and Tachiki K: Hypersensitive serotonergic receptors involved in clinical depression; A theory. *Neuropharmacol. Behav*, Haber B and Aprison MH (ed), pp23-53, plenum press, New York, 1978.
2. Arango V., Ernsberger P., Marzuk P.M.: Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT<sub>2</sub> and  $\beta$ -adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 47: 1038-1047, 1990.
3. Benwell M.E. and Balfour D.J.: Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. *Psychopharmacol.* 63: 7-11, 1979.
4. Biegon A., Weizman A., Karp L.: Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor binding on blood platelets- A peripheral marker for depression ?. *Life Sci* 41: 2485-2492, 1987.
5. Chavez-Noriega L.E., Crona J.H., Washburn M.S.: Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha$ 2 $\beta$ 2,  $\alpha$ 2 $\beta$ 4,  $\alpha$ 3 $\beta$ 2,  $\alpha$ 3 $\beta$ 4,  $\alpha$ 4 $\beta$ 2,  $\alpha$ 4 $\beta$ 4 and  $\alpha$ 7 expressed in *Xenopus oocytes*. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 346-356, 1997.
6. Gonzalez-Heydrich J. and Peroutka S.J.: Serotonin receptor and reuptake sites: pharmacologic significance. *J Clin Psychiatry* 51: 5-12, 1990.
7. Henningfield J.E., Miyasato K. and Jasinski D.R.: Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 1-12, 1985.
8. Hitsman B., Pingitore R., Spring B.: Antidepressant pharmacotherapy helps some cigarette smokers more than others. *J Consult Clin Psychol* 67: 547-554, 1999.
9. Hughes J.R., Stead L.F. and Lancaster T.: Anxiolytics and antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD000031, 2000.
10. Lloyd G.K. and Williams M.: Neuronal nicotinic acetylcholine

- receptors as novel drug targets. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 461-467, 2000.
11. Malin D.H., Lake J.R., Carter V.A.: The nicotinic antagonist mecamlamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacol.* 115: 180-184, 1994.
12. Malin D.H., Lake J.R., Schopen C.K.: Nicotine abstinence syndrome precipitated by central but not peripheral hexamethonium. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 695-699, 1997.
13. Malin D.H., Lake J.R., Upchurch T.P.: Nicotine abstinence syndrome precipitated by the competitive nicotinic antagonist dihydro- $\beta$ -erythroidine. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 609-613, 1998.
14. Ribeiro E.B., Bettiker R.L., Bogdanov M.: Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res* 621: 311-318, 1993.
15. Shoaib M., Stolerman I.P. and Kumar R.C.: Nicotine-induced place preferences following prior nicotine exposure in rats. *Psychopharmacol.* 113: 445-452, 1994.

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：麻薬依存形成・禁断症状発現に対するグルタミン酸神経系の可塑的变化  
—グリア型グルタミン酸トランスポーターの関与—

分担研究者 佐藤公道

共同研究者 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** グルタミン酸神経系は広くシナプスの可塑的变化に関与していることが知られており、また麻薬依存形成・禁断症状発現にも重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究では、このグルタミン酸神経伝達の調節に深く関与していることが知られているグリア型グルタミン酸トランスポーターに焦点をあて、麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの役割を行動薬理学的および分子薬理学的に検討した。まず、モルヒネ依存マウスおよびラットにおいて、グルタミン酸トランスポーター阻害薬 TBOA を脳室内に投与することにより、ナロキソンの腹腔内投与により誘発される禁断症状が、有意に増悪された。次に、麻薬依存形成時および禁断症状発現後のラット脳内におけるグリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 および GLAST の発現量を northern blot 法により検討した。その結果、モルヒネ依存ラットにおいて、GLT-1 mRNA 発現量は線条体、視床などの脳部位において減少が見られ、また、ナロキソンによる禁断症状誘発 2 時間後の線条体などの脳部位において増加が見られた。一方、GLAST mRNA 発現量に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、麻薬依存形成・禁断症状発現におけるグルタミン酸神経機能の可塑的变化に、脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 が関与していることが示唆される。

## A. 目的

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および精神的・身体的依存を生じることが知られているが、その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。これまでに、麻薬性鎮痛薬の連続的処置による依存形成あるいは禁断症状の発現は各種グルタミン酸受容体拮抗薬により抑制されること<sup>1,2,3)</sup>、さらに禁断症状発現に深く関与すると言われている青斑核などの脳部位において、禁断症状の発現時に細胞外グルタミン酸濃度が上昇すること<sup>4)</sup>などが報告されており、脳内におけるグルタミン酸が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、シナプス間隙に遊離されたグルタミン酸を取り込むことによりグルタミン酸神経伝達

を調節することが知られているグルタミン酸トランスポーターは、これまでに脳内においては少なくとも 4 種類のサブタイプの存在が確認されており<sup>5,6)</sup>、EAAC-1 および EAAT-4 は主に神経細胞に、GLT-1 および GLAST は主にグリア細胞に発現していることが報告されている<sup>6,7)</sup>。また、これらのノックアウトマウスなどを用いた検討などから、脳内でのグルタミン酸の取り込みには神経型のものよりもグリア型のグルタミン酸トランスポーターの方が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>8)</sup>。

麻薬依存形成時における神経機能の可塑的变化に、脳内のグリア細胞が何らかの役割を果たしている可能性が十分考えられることから、本研究では、このグリア型グルタミン酸トランス

ポーターに焦点をあて、麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの役割を行動薬理学的および分子薬理学的に検討した。

## B. 方法

### (1) モルヒネ依存マウスを用いた行動薬理学的検討

実験動物には雄性 ddY 系マウス (20-25 g) を用いた。マウスの頸背部皮下に、塩酸モルヒネ  $11.5 \pm 0.3$  mg を含有するモルヒネペレットを1日目に1個埋め込み、3日目に実験に用いた。ペレット除去後、vehicle あるいはグルタミン酸トランスポーター阻害薬 DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA: サントリー生物有機科学研究所より御供与頂いた) (0.01 - 10 nmol) を 5  $\mu$ l の容量で大槽内に投与した。10分後に、ナロキソン (1 mg/kg) を腹腔内に投与し、誘発される典型的な禁断症状の一つである跳躍行動の回数を40分間計数した。

### (2) モルヒネ依存ラットを用いた行動薬理学的検討

実験動物には雄性 SD 系ラット (200-250 g) を用いた。側脳室内投与用のガイドカニューレの埋め込み手術のために、ラットをペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、脳定位固定装置に固定し、側脳室内投与用のガイドカニューレを bregma から尾側へ 0.8 mm、外側へ 1.5 mm の一にドリルで穴を開けて挿入し、先端が頭蓋骨表面から 2 mm のところで留置した。少なくとも 4-5 日間の回復期間の後、ラットの頸背部皮下にモルヒネ 75 mg を含有するモルヒネペレットを、1日目に1個、2日目にさらに1個、合計2個を埋め込み、5日目に実験に用いた。ラットを観察用のプラスチックシリンダーに入れ、30分間環境に慣らした。Vehicle あるいは TBOA (1, 3 および 10 nmol) の投与は注射用カニューレをガイド

カニューレに装着して行った。注射用カニューレはガイドカニューレに装着した際、先端が頭蓋骨表面から頭蓋内に 5 mm の位置の側脳室内に達するよう作製した。側脳室内投与はマイクロインジェクションポンプを用いて、流速 10  $\mu$ l/min の速度で 5  $\mu$ l を投与した。側脳室内投与 10 分後に、ナロキソン (0.3 mg/kg) の腹腔内投与により誘発される 14 項目 (体重減少、stretching、wet dog shake、paw shake、teeth chattering、跳躍行動、後ずさり、射精、下痢、流涎、涙液分泌、鼻漏眼瞼下垂) の禁断症状を 1 時間、観察・計数した。

### (3) ラット GLT-1 および GLAST cDNA のクローニングと $^{32}$ P 標識アンチセンス RNA プローブの合成

ラット GLT-1 および GLAST cDNA 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 GLT-1 および GLAST の配列を元に設計した。RT-PCR 法により得られた DNA 断片を、pBluescript プラスミドベクターに組み込み、シーケンスを同定したところ、それぞれ GLT-1 および GLAST 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 GLT-1 および GLAST cDNA をコードするものであることが確認された。またそれぞれのプラスミドを適当な制限酵素で切断し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP (15 TBq/mmol、Amersham) 存在下、T7 RNA ポリメラーゼ (Promega) により  $^{32}\text{P}$  標識アンチセンス RNA プローブを合成した。

### (4) ラット脳内における GLT-1 および GLAST mRNA 発現量の northern blot 法による解析

上記と同様の方法で作製したモルヒネ依存ラット、およびモルヒネ依存ラットにナロキソン (3 mg/kg) を腹腔内投与し、2時間経過したラットから全脳を摘出し、大脳皮質、海馬、線条

体、視床、視床下部、中脳、小脳および橋・延髄を切り出し、液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。ISOGEN (日本ジーン) を用いて各脳部位より total RNA を抽出し、northern blot 法により解析を行った。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 (12 μg) を電気泳動した後、ナイロンメンブランフィルター (Biodyne) に転写し、プレハイブリダイゼーションの後、<sup>32</sup>P で標識したラットの GLT-1 あるいは GLAST に対するアンチセンス RNA プローブを用いて 68℃ でハイブリダイズさせた。フィルターを 2 × SSC / 0.1% SDS 中で 2 回、0.1 × 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。また、モルヒネを含まないプラセボペレットを同様の処置により埋め込んだラットをコントロールとして用いた。

### C. 結果

(1) モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発跳躍行動に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬 TBOA の大槽内投与による影響

モルヒネ依存マウスに、vehicle を大槽内投与し、10分後にナロキソン 0.3 mg/kg を腹腔内投与することにより、16.9 ± 4.3 回の跳躍行動が見られた。このナロキソン誘発跳躍行動は、TBOA (0.01 - 10 nmol) を大槽内に投与しておくことにより、濃度依存的に増加し、0.1、1 および 10 nmol の用量で、vehicle 投与群と比較して有意なものであった (それぞれ 47.0 ± 14.4 回、54.3 ± 15.0 回および 47.3 ± 12.6 回、*P* < 0.05) (Fig.1)。

(2) モルヒネ依存ラットにおける各種ナロキソン誘発禁断症状に対する TBOA 側脳室内投与による影響

モルヒネ依存ラットにおいて、TBOA (1、3 および 10 nmol) を側脳室内投与することにより、

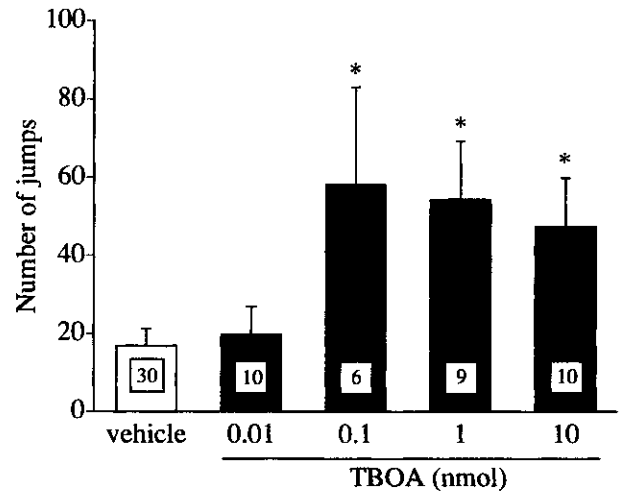


Fig.1 Effect of intracisternal administration of TBOA on naloxone-precipitated jumping behavior in morphine-dependent mice. \**P* < 0.05 vs. vehicle

ナロキソンにより誘発される wet-dog shake、teeth chattering、stretching、射精、後ずさり、流涎、鼻漏といった禁断症状が、濃度依存的に有意に増悪し、また、体重減少、跳躍行動、paw shake、head shake、下痢、涙液分泌、眼瞼下垂といった禁断症状も、統計学的に有意ではなかったものの増悪される傾向が見られた (Fig.2、Table 1)。

Table 1 Effect of intracerebroventricular administration of TBOA on naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent rats. Numer denote the number of rats showing positive signs relative to the total number of rats tested.

withdrawal signs	vehicle	TBOA (nmol)		
		1	3	10
diarrhea	3 / 7	3 / 5	3 / 7	5 / 7
salivation	0 / 7	1 / 5	4 / 7	5 / 7*
ptosis	1 / 7	1 / 5	5 / 7	4 / 7
lacrimation	1 / 7	2 / 5	5 / 7	6 / 7*
rhinorrhea	4 / 7	4 / 5	5 / 7	7 / 7

\**P* < 0.05 vs. vehicle by the Fisher's exact test.



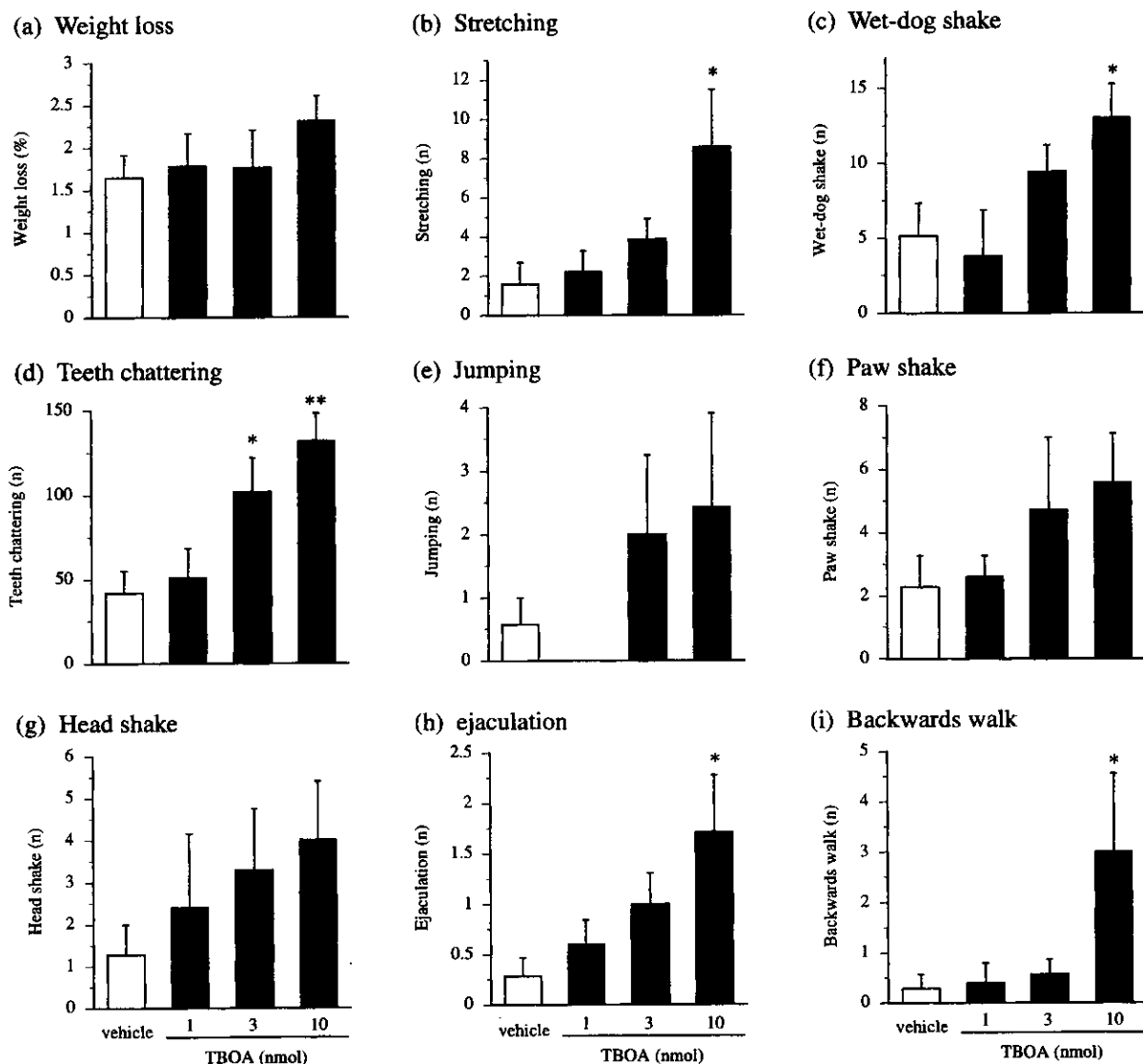


Fig.2 Effect of intracerebroventricular administration of TBOA on naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent rats. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs vehicle,  $n = 5-7$ .

### (3) 正常ラット脳内における GLT-1 および GLAST mRNA の発現

正常ラット脳内におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1およびGLAST mRNAの発現を northern blot法により検討した。GLT-1 mRNAは大脳皮質、海馬、線条体および視床下部において強く、視床、中脳および橋・延髄において中程度に発現していたが、小脳における発現は僅かなものであった。また、GLAST mRNAは小脳において顕著な発現が見られ、またその他の脳部位においても程度の差は見られるもの

の、その発現が確認された (Fig.3)。

### (4) モルヒネ依存ラットおよび禁断症状誘発後ラット脳内におけるGLT-1およびGLAST mRNA発現量の変化

モルヒネ依存ラット脳内においては、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳および小脳においてGLT-1 mRNA発現量は20-50%減少し、特に、線条体および視床においては、それぞれプラセボペレットを処置したコントロール群の  $66.4 \pm 14.8\%$  および  $50.0 \pm 6.4\%$  にまで有意に

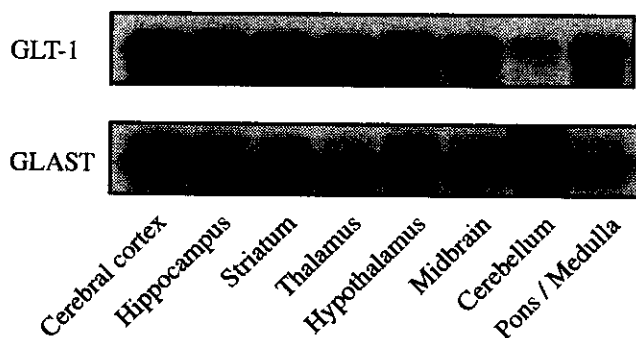


Fig.3 Distribution of glial glutamate transporter mRNAs for GLT-1 and GLAST in normal rat brain. The size of GLT-1 and GLAST mRNA was 11 kbp and 4.5 kbp, respectively.

減少した。また、ナロキソン (3 mg/kg) の腹腔内投与により禁断症状を誘発した2時間後のラットの線条体、視床下部および中脳においては、モルヒネ依存形成時と比較してGLT-1 mRNA発現量が増加し、特に線条体においてはコントロール群の155.4 ± 26.7%にまで増加し、コントロール群およびモルヒネ依存群と比較して有意な増加が見られた (Fig.4a)。一方、GLAST mRNA発現量に関しては、モルヒネ依存ラットおよび禁断症状誘発ラットの脳内において、コントロール群と比較して有意な変化は見られなかった (Fig.4b)。

#### D. 考察

モルヒネ依存マウスおよびラットにおいて、グルタミン酸トランスポーター阻害薬TBOAの脳室内投与により種々のナロキソン誘発禁断症状が増悪された。禁断症状発現時には、青斑核などの脳部位において細胞外グルタミン酸の濃度が増加することが報告されており<sup>4)</sup>、このグルタミン酸量の増加が禁断症状の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。TBOAの処置により、禁断症状発現時に過剰遊離されたグルタミン酸のグルタミン酸トランスポーターによる取り込みが阻害された結果、シナプス間隙のグルタミン酸量の増加がより一層促進され、

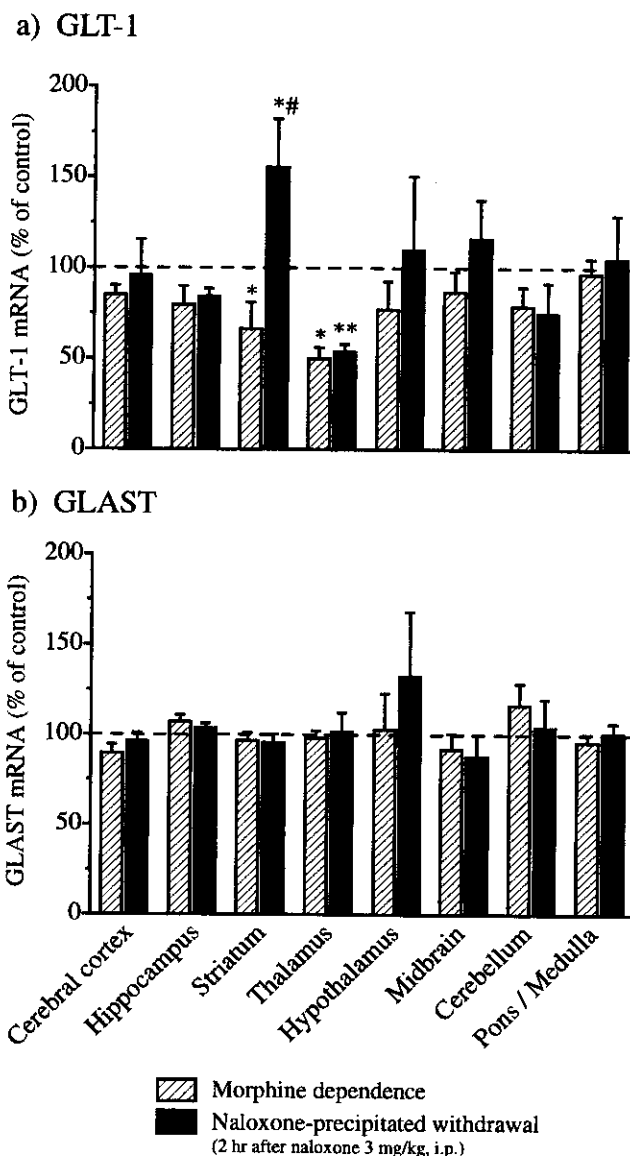


Fig.4 Effects of morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal on the expression of GLT-1 (a) and GLAST (b) mRNAs in the rat brain. In each brain region, the expression of GLT-1 or GLAST mRNA in placebo-treated rats was assigned a value of 100%. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. placebo-treated group, # $P < 0.05$  vs. morphine dependent group,  $n = 4-6$ .

このことが禁断症状の増悪につながったと考えられる。すなわち、これらのことから、脳内のグルタミン酸トランスポーターが禁断症状の発現あるいはその調節に少なくとも一部関与していることが示唆される (Fig.5)。

また、グリア型グルタミン酸トランスポーターGLT-1およびGLASTの脳内における発現変化を解析した結果、モルヒネ依存形成時には、線条体や視床などいくつかの脳部位においてGLT-1 mRNA発現量が減少していることを見いだした。このことからモルヒネの連続的使用によりシナプス前終末から放出されたグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みが減少し、グルタミン酸神経伝達の効率に変化が生じ、このことがモルヒネ依存形成に関与している可能性が考えられる (Fig.5)。グリア型グルタミン酸トランスポーター発現量の調節に関しては、in vivo および in vitro において様々な報告がなされている<sup>9)</sup>。例えば、ALS患者においては脳内におけるGLT-1発現量が減少していること<sup>9)</sup>、また、ラットに一過性脳虚血を負荷することにより、海馬におけるGLT-1発現量が減少すること<sup>10)</sup>などが報告されている。さらに、最近、初代培養アストロサイトにおいて、 $\delta$ オピオイド受容体アゴニストであるDPDPEを処置することにより、GLT-1

mRNA発現量が減少するという報告がなされた<sup>11)</sup>。モルヒネ依存形成時のGLT-1 mRNA発現量の減少は、モルヒネのアストロサイトへの直接的な影響の結果かもしれない。一方、ラット大脳皮質のグルタミン酸神経の遮断により、線条体および海馬におけるGLT-1およびGLAST発現量が減少すること<sup>12)</sup>なども報告されており、細胞外グルタミン酸の濃度によりグリア型グルタミン酸トランスポーターの発現量が調節されていることも考えられる。

一方、ナロキソン投与2時間後には、線条体などいくつかの脳部位において依存形成時と比較してGLT-1 mRNAの発現量の増加が見られた。これまでに、培養アストロサイトにおいて、グルタミン酸を処置することにより、GLT-1の発現量が増加することが報告されている<sup>13)</sup>。我々は、GLT-1 mRNA量の発現変化が顕著であった線条体およびその近傍に存在する側坐核においても、青斑核などの脳部位と同様に、禁断症状発現時に細胞外グルタミン酸濃度の増加が見られるこ

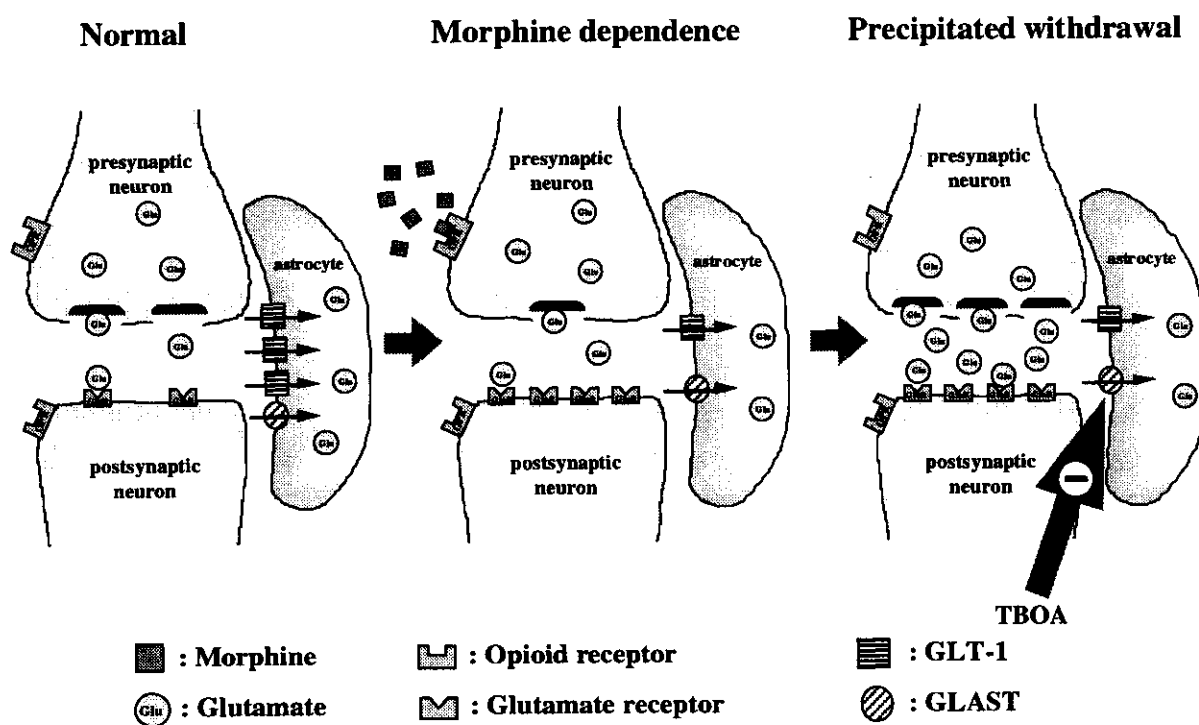


Fig.5 Diagram of glutamatergic synapses in morphine dependent and naloxone-precipitated withdrawal rat brain.

とを見いだしており、このようなグルタミン酸量の増加が禁断症状発現後の GLT-1 mRNA の発現量増加に関与しているのかもしれない。また、禁断症状発現時には、細胞内 cAMP 量が激増する、いわゆる "cAMP overshoot" 現象が起こることが知られている<sup>13)</sup>が、我々は、培養アストロサイトにおいて種々の cAMP 系の活性化薬 (isoproterenol, IBMX, dibutyl cAMP) の処置により、GLT-1 mRNA 発現量が増加することを見いだしており、その関与の可能性も考えられる。

近年、グリア細胞のシナプス伝達あるいは神経機能の可塑的变化における役割が、多くの研究者の注目を集めつつあるが、そのような観点から麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムを検討した報告はこれまでになく、本研究結果は、麻薬依存形成時における神経機能の可塑的变化に、脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターが関与している可能性を初めて示したものである。今後、これら脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの可塑的变化の意義を個体レベルおよび分子レベル双方から一層明確にすることにより、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関する新規な知見を得ることが期待できる。さらに脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの機能調節を作用機序にする、モルヒネなどの依存形成能の強い薬物の連続投与の際の補助薬、あるいは麻薬禁断症状に対する有用な治療薬の創製の可能性も考えられる。

## E. 結 論

モルヒネ依存動物において、TBOA の脳室内投与により、種々のナロキソン誘発禁断症状が有意に増悪された。また、モルヒネ依存形成時には線条体や視床などの脳部位において GLT-1 mRNA 発現量が減少していること、一方、GLAST mRNA 発現量に変化は見られないことを見いだした。また、禁断症状誘発後のラット脳内におい

て、線条体などの脳部位において GLT-1 mRNA 発現量が増加すること、GLAST mRNA 発現量に変化は見られないことを示した。これらの結果から、脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 が、モルヒネによる依存形成あるいは禁断症状の発現に関与していることが示唆される。

## F. 文 献

- 1) Zhu, H., Rockhold, R.W. and Ho, I.K.: The role of glutamate in physical dependence on opioids. *Jpn. J. Pharmacol.*, **76**, 1-14, 1998.
- 2) Trujillo, K.A. and Akil, H.: Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science*, **251**, 85-87, 1991.
- 3) Marek, P., Ben-Eliyahu, S., Gold, M. and Liebeskind, J.C.: Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in rats. *Brain Res.*, **547**, 77-81, 1991.
- 4) Aghajanian, G.K., Kogan, J.H. and Moghaddam, B.: Opiate withdrawal increases glutamates and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.*, **636**, 126-130, 1994.
- 5) Gegelashvili, G. and Schousboe, A.: High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 6-15, 1997.
- 6) Seal, R.P. and Amara, S.G.: Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 431-456, 1999.
- 7) Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. and Kuncl, R.W.: Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, **13**, 713-725, 1994.
- 8) Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P. and Welty,

- D.F.: Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitatory and clearance of glutamate. *Neuron*, **16**, 675–686, 1996.
- 9) Bristol, L.A. and Rothstein, J.D.: Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.*, **39**, 51-58, 1996.
- 10) Torp, R., Lekieffre, D., Levy, L.M., Haug, F.M., Danbolt, N.C., Meldrum, B.S. and Ottersen, O.P.: Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT-1, in the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.*, **103**, 51-58, 1995.
- 11) Throrin, T., Roginski, R.S., Choudhury, K., Nilsson, M., Rönnbäck, L., Hansson, E. and Eriksson, P.S.: Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and  $\delta$ -opioid receptor stimulation. *FEBS Lett.*, **425**, 453-459, 1998.
- 12) Ginsberg, S.D., Martin, L.J. and Rothstein, J.D.: Regional deafferentation down-regulates subtypes of glutamate transporter proteins. *J. Neurochem.*, **65**, 2800-2803, 1995.
- 13) Nakagawa, T., Ozawa, T., Minami, M. and Satoh, M.: Sensitization of the adenylyl cyclase system in cloned  $\kappa$ -opioid receptor-transfected cells following sustained agonist treatment: a chimeric study using G protein  $\alpha_{i2}/\alpha_q$  subunits. *Jpn. J. Pharmacol.*, **81**, 353-361, 1999.

## 薬物依存における脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の病態生理学的役割とその発現機序

大熊 誠太郎 川崎医科大学薬理学教室  
桂 昌司 川崎医科大学薬理学教室

Morphine 依存動物を用い、依存形成および退薬症候発症と内在性不安誘発物質である diazepam binding inhibitor (DBI)の脳皮質における発現との関連性を DBI mRNA を測定することにより検討するとともに、初代培養マウス脳皮質神経細胞への morphine 曝露により誘発される DBI mRNA 発現の機序を調べた。Morphine の単回投与は DBI mRNA 発現に影響を与えなかった。一方、依存形成時にはその発現は有意に増加し、また退薬症候発症時の発現は依存形成時に比して有意に高かった。これらの発現増加はオピオイド受容体拮抗薬である naloxone の同時投与により、いずれの場合も完全に消失した。初代培養神経細胞における DBI mRNA 発現は短時間の morphine の曝露では変化を与えなかったが、連続曝露により有意に亢進し、曝露の休止はより著明な発現亢進を誘発し、しかもいずれの場合も naloxone の同時曝露によりその発現増加は完全に抑制された。Morphine 誘発性 DBI mRNA 発現増加は $\mu$ 受容体拮抗薬である  $\beta$ -funaltrexamine により完全に消失し、選択的 $\mu 1$ 受容体拮抗薬である naloxonazine により約 50%抑制されたが、選択的 $\kappa$ および $\delta$ 受容体拮抗薬である nor-binaltorphimine および naltrindole は何らの影響も与えなかった。これらの結果から、DBI 発現は morphine 依存形成および退薬症候発症に機能的に関与しており、またその発現は長期間にわたるオピオイド受容体、特に $\mu 1$  および $\mu 2$  受容体の活性化に起因することが明らかとなった。

### A. 目的

Ethanol および nicotine などの依存性薬物の長期投与により生じる薬物依存（身体依存）の発現機序については多数の研究が行われているが、依然として十分に解明されていないのが現状である。例えば、ethanol による依存形成の場合、従来より行われている神経伝達物質代謝回転、神経伝達物質受容体、神経伝達物質受容体と機能的に共転する細胞内情報伝達系などの観点からの検討からは、薬物依存形成あるいは退薬症候発症の機序を十分解明することは困難であると考えられる<sup>1, 2)</sup>。

依存性薬物により依存形成が生じた場合、薬物投与

の急速な中止は退薬症候をもたらすが、これらの症候は主として興奮性神経精神症状および副交感神経刺激症状により構成されていることは周知の通りである。これらの症候は、依存性薬物の種類により出現する症状の種類、あるいは症状の程度などが異なるが、多くの症状が共通して出現しており、特に精神症状の1つである「不安」はほぼすべての依存性薬物における退薬症状の1つとして観察される。筆者らは、この不安に着目し、内在性不安誘発物質である diazepam binding inhibitor (DBI)<sup>3, 4)</sup> の依存動物脳内における発現変化を検討し、ethanol および nicotine 依存動物脳皮質における DBI 発現が、依存形成時に増加し、退薬症候発現時

には依存形成時に比してさらに増加することを報告してきた<sup>5)</sup>。これらの事実は、依存性薬物による依存形成あるいは退薬症候発症に DBI 発現が共通の因子として作用することを強く示唆すると考えられ、この発現の機序の解明は薬物依存形成あるいは退薬症候発症の機序解明に有益な情報を提供する可能性が高いと考えられる。

本研究では、依存形成における DBI 発現機序について、特に morphine 依存を対象として、morphine 依存形成動物および morphine を長期曝露した初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて解析を試みた。

## B. 方法

### 1. Morphine 依存動物の作製

Morphine 依存動物の作製は既報の方法<sup>6)</sup>に準じて行った。すなわち、morphine を 1 日 2 回、09:00 時および 19:00 時に以下の投与スケジュールに従って 5 日間、ddy 系雄生マウス (体重 30 g) に皮下投与した。第 1 日目 (8 および 15 mg/kg)、第 2 日目 (20 および 25 mg/kg)、第 3 日目 (30 および 35 mg/kg)、第 4 日目 (40 および 45 mg/kg) と morphine を連日投与し、第 5 日目には 09:00 時に 45 mg/kg のみを 1 回投与した。禁断症状の誘発には自然禁断 (natural withdrawal: NW) および naloxone 投与 (naloxone-precipitated withdrawal: NPW)<sup>7)</sup> により行った。NW の場合には、morphine の最終投与後 3 時間目に跳躍、振戦および下痢などの退薬症候が出現し、6 時間後に最も強くこれらの症状がみられた。一方、NPW の場合には naloxone 投与後 1 時間以内に上記の退薬症候が出現した。

DBI mRNA 発現の検討には、morphine 最終投与 2 時間後を依存形成時とし、退薬症候発症時として NW では最終投与 6 時間後、NPW では naloxone 投与後 1 時間目にそれぞれ動物を断頭して大脳皮質を摘出した。

Morphine 単回投与の DBI mRNA 発現への影響の検討は、50 mg/kg の morphine を 1 回皮下投与して行った。

### 2. 神経細胞の単離および初代培養

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、既報の方法に準じて調製した<sup>8)</sup>。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  $\mu$ 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 で処理した培養皿に添加し、湿度 100%、37°C、95% air - 5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 morphine 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。

### 3. 神経細胞への morphine の曝露

神経細胞への morphine 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。また、短時間の morphine 曝露の DBI mRNA 発現への影響は、0.3  $\mu$ M morphine を 15 分間および 1 時間曝露したのちに、morphine を含有する培養液を吸引除去し、次いで Hanks 液で神経細胞を 2 回洗浄し、morphine を含まない新鮮な培養液を培養皿に添加し、morphine 除去後 72 時間目までの DBI mRNA 発現の変化を検討した。

### 4. PCR によるマウス DBI cDNA のクローニング

マウス DBI cDNA のクローニングは Katsura らの方法に準じて作製した<sup>9)</sup>。すなわち、マウス全脳より FastTrack™ mRNA Isolation kit (Invitrogen) を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、First strand cDNA 合成キット

(Pharmacia) を用い、oligo(dT)をプライマーとして一本鎖の cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、PCR 法によりマウス DBI の cDNA を増幅した。なお、マウス DBI に特異的な一対のプライマーは、DNA 合成装置 (Pharmacia) により合成し、5'末端を T4 kinase でリン酸化したものをを用いた。95℃、55℃、72℃にて各 1分を 30 回繰り返すことにより増幅反応を行った結果、302 base pair の DNA 断片が増幅され、プラスミドにクローニングを行った後にその塩基配列の確認を行ったところ、DBI cDNA の塩基配列を有していた。

つぎに、得られた PCR 産物をフェノール処理およびエタノール沈殿により精製し、EcoRI アダプターを連結させ、さらに末端をリン酸化して pUC18 の EcoRI サイトに挿入した。こうして得られた DNA を大腸菌に導入して培養し、プラスミド DNA を超遠心で精製し、EcoRI で切断後アガロース電気泳動により cDNA を精製した。なお、本プローベをランダムプライマーと [<sup>32</sup>P]dCTP によりラベルしたものをプローブとしてノーザンブロット法により検討を行ったところ、マウス DBI mRNA を認識する約 650 base pair の単一バンドのみの発現が認められた。

#### 5. ノーザンブロット法による DBI mRNA の測定

上述の 1.および 2.によりそれぞれ得られたマウス大脳皮質および神経細胞より、FastTrack™ mRNA Isolation kit (Invitrogen) を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、ノーザンブロット法による解析を行った<sup>9)</sup>。

#### 6. [<sup>3</sup>H]Naloxone 結合実験

[<sup>3</sup>H]Naloxone 結合の検討には初代培養マウス大脳皮質神経細胞から調製した顆粒画分を使用した。氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)で神経細胞を 3 回洗浄し、神経細胞を上述の buffer とともに Polytron homogenizer を用いてホモゲナイズし、遠心操作(48,000 xg, 4℃, 10分)を加えた。この遠心操作を 4 回繰り返したのち、得られた顆粒画分を-80℃で 24 時間凍結保存した。結合実験直前にこの凍結試料を室温で解凍し、さ

らに上述と同一の条件下に 3 回遠心操作を加えたのちに結合実験に供した。

[<sup>3</sup>H]Naloxone 結合は既報の方法<sup>10)</sup>を 1 部変更して行った。50 mM Tris-HCl buffer で懸濁した顆粒画分 (500 μg/assay) を 1 nM [<sup>3</sup>H]naloxone 存在下で 25℃、60 分間インキュベートし、次いで反応液を減圧下で Whatman GF/B filter を介してろ過した。Filter をさらに氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer で 3 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 filter に残存した放射活性を測定し総結合量とした。特異的結合量は総結合量から 10 μM の非放射性 naloxone 存在下で得られた非特異的結合量を差し引くことにより算出した。

#### 7. 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<sup>11)</sup>により行った。

#### 8. 統計的検討

実験成績はすべて平均値±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) Morphine 依存マウス大脳皮質における DBI mRNA 発現の変化

マウスに morphine を単回投与し、投与後 2-4 時間までの DBI mRNA 発現変化を検討したところ、変化が認められなかった。

Morphine 依存マウス大脳皮質では、対照群に比して有意な DBI mRNA 発現の増加が観察された (Fig. 1)。また、退薬症候発症動物においては、NW および NPW のいずれの場合にも有意な DBI mRNA 発現亢進が認められ、しかもこの発現増加は依存形成時のそれに比しても有意に高値を示していた (Fig. 1)。なお、依存形成



時、および退薬症候発症時のいずれにおいても、 $\beta$ -actin mRNA 発現には変化がみられなかった (Fig. 1)。この morphine 連続投与による DBI mRNA 発現の変化は、naloxone の同時投与により完全に消失し、また NW において観察された発現増加も naloxone の併用により消失するのが観察された (Fig. 2)。

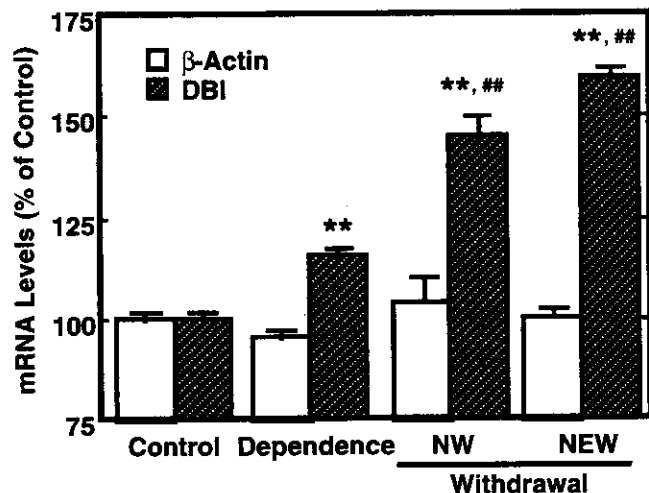


Fig. 1 Cerebral expressions of DBI and  $\beta$ -actin mRNA in morphine-dependent and -withdrawn mice. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value without treatment of morphine (Bonferroni's test). ## $p < 0.01$ , compared with the value determined in morphine-dependent mice (Bonferroni's test).

## 2) Morphine の短期および長期曝露による神経細胞における DBI mRNA 発現変化

0.3  $\mu$ M の morphine を 15 分および 1 時間神経細胞に曝露したのちに、72 時間まで DBI mRNA 発現の変化を調べたが、DBI mRNA 発現に変化は認められなかった。

次に morphine を長時間曝露するための基礎検討を行った。Morphine (0.3  $\mu$ M) を連続して神経細胞に曝露した場合には、曝露開始後 2 日目に有意な DBI mRNA 発現亢進が出現し、曝露開始後 5 日目まで発現の亢進は同一レベルに維持しされていた (Fig. 3)。また、諸種濃度 (0.1~3  $\mu$ M) の morphine を 3 日間連続して曝露した

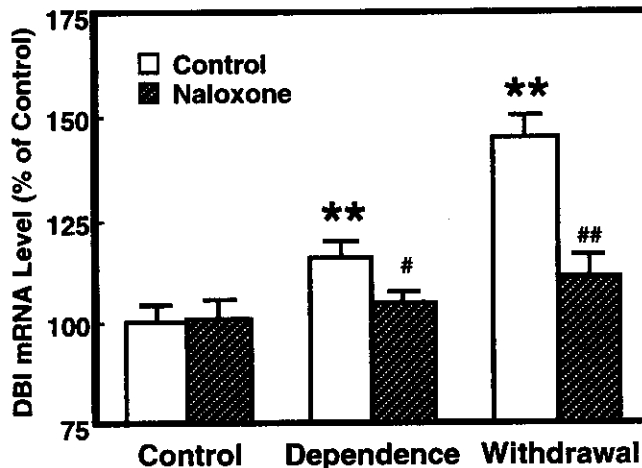


Fig. 2 Effect of naloxone on DBI mRNA expression in cerebral cortices from morphine-dependent and -withdrawn mice. Mice were subcutaneously injected with naloxone (3 mg/kg) once daily for 5 days and killed 2 hours after the last injection of naloxone. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without morphine treatment, Bonferroni's test). # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$ , compared with each value determined in mice without naloxone treatment (Bonferroni's test).

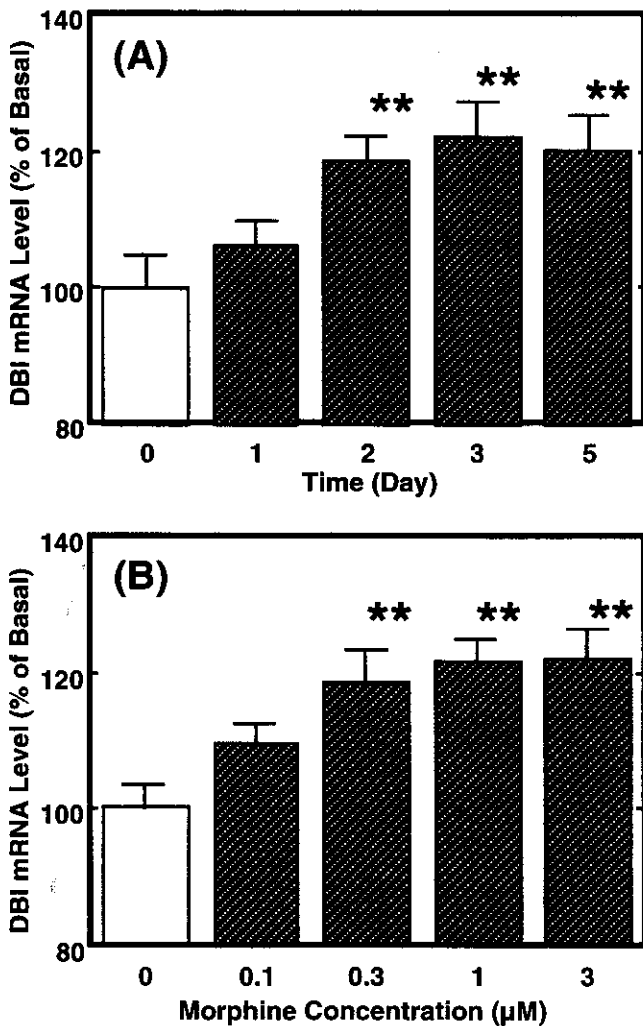
場合には、0.3  $\mu$ M の濃度で有意な発現増加が生じており、しかもこの発現の増加の程度は 3  $\mu$ M の濃度の曝露で認められた発現の増加の程度と同じであった (Fig. 3)。これらの実験成績から、morphine の長期曝露の条件を、morphine 濃度を 0.3  $\mu$ M、曝露期間を 3 日間とした。

Fig. 4 に示すように、0.3  $\mu$ M morphine の 3 日間の連続曝露により有意な DBI mRNA 発現増加が生じ、急速な曝露の停止後 24 時間目にはさらに発現の増加は増強した。これらの DBI mRNA 発現変化のパターンは morphine 依存動物大脳皮質における DBI mRNA 発現パターンとよく類似していると考えられ、morphine 依存動物大脳皮質内における DBI mRNA 発現増加の機序を解明する上で、この神経細胞は in vitro 系実験モデルとして使用可能であると判断した。

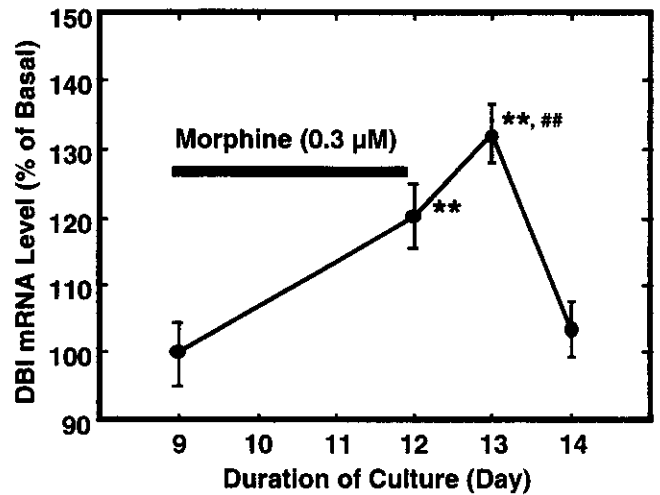
## 3) Morphine 長期曝露による DBI mRNA 発現増加に対するオピオイド受容体拮抗薬の影響

Morphine 曝露と同時に培養液中にそれぞれ  $\mu$ 、 $\kappa$  および  $\delta$  受容体拮抗薬である  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA)、nor-

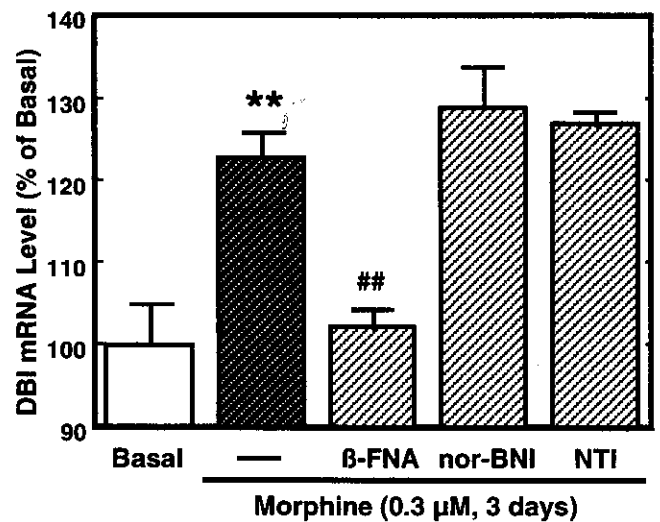
binaltorphimine (nor-BNI)、および naltrindole (NTI) を添加したところ、morphine 誘発性 DBI mRNA 発現増加は $\beta$ -FNA によりのみ完全に抑制されたが、nor-BNI および NTI は何ら変化を与えなかった (Fig. 5)。また、 $\mu$ 1 受容体拮抗薬である naloxonazine (Nal) は morphine 誘発性発現増加を約 50%抑制するのが観察された (Fig. 6)。



**Fig. 3** Effect of morphine exposure on DBI mRNA expression in cerebral cortical neurons. (A) Time course of DBI mRNA expression exposed to morphine (0.3  $\mu$ M). (B) Effect of exposure to various concentrations of morphine (3 days) on DBI mRNA expression. Two micrograms of poly (A)+ RNA were applied to each lane. \*\* $p$ <0.01, compared with the value determined in the absence of morphine (Dunnett's test,  $n=5$ ).



**Fig. 4** Changes in expression of DBI mRNA during culture of cerebral cortical neurons in morphine-free culture medium following exposure to morphine. \*\* $p$ <0.01, compared with the value determined before morphine exposure (Dunnett's test). ## $p$ <0.01, compared with the value determined immediately after removal of morphine (Bonferroni's test).



**Fig. 5** Effects of  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA), nor-binaltorphimine (nor-BNI) and naltrindole (NTI) on DBI mRNA expression in cerebral cortical neurons exposed to morphine. Two micrograms of poly (A)+ RNA were applied to each lane. \*\* $p$ <0.01, compared with the basal value (Bonferroni's test). ## $p$ <0.01, compared with the value determined in the presence of morphine alone (Bonferroni's test).

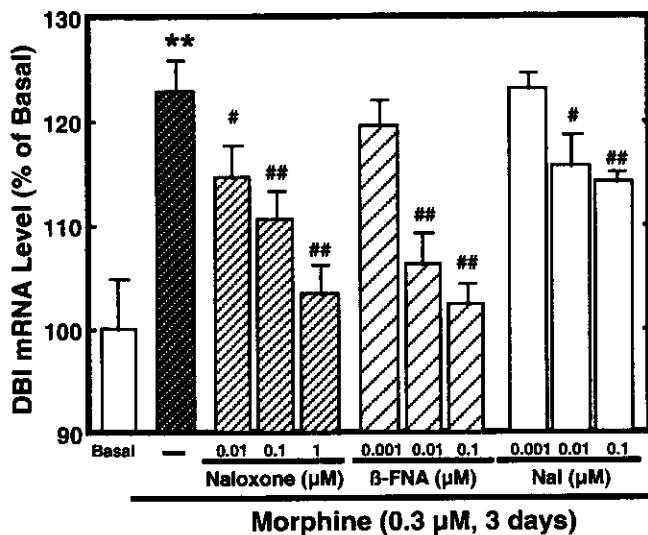


Fig. 6 Effects of naloxone,  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA) and naloxonazine (Nal) on DBI mRNA expression in cerebral cortical neurons exposed to morphine. Two microgram of poly (A)+ RNA were applied to each lane. \*\* $p < 0.01$ , compared with the basal value (Bonferroni's test). # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$ , compared with the value determined in the presence of morphine alone (Dunnet's test).

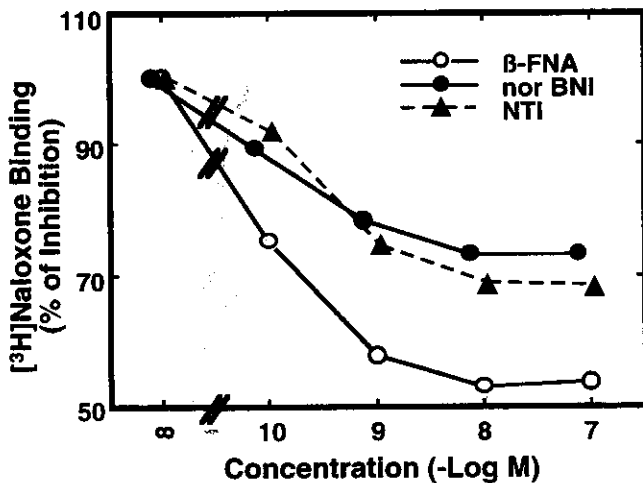


Fig. 7 Displacement of [ $^3$ H]naloxone binding to particulate fractions from cerebral cortical neurons by  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA), nor-binaltorphimine (nor-BNI) and naltrindole (NTI).

#### 4) 神経細胞膜への [ $^3$ H]Naloxone 結合に対する諸種オピオイド受容体拮抗薬の影響

前項で morphine 長期曝露により誘発される発現増加に対するオピオイド受容体拮抗薬の作用を検討したが、本研究に用いた神経細胞にこれらのオピオイド受容体サブタイプが存在しているか否かについて、 [ $^3$ H]naloxone 結合に対するそれぞれのオピオイド受容体サブタイプに選択的な拮抗薬の阻害作用の観点から検討したところ、いずれの拮抗薬も用量依存性に [ $^3$ H]naloxone 結合を阻害した。

#### D. 考察

DBI は内因性不安誘発物質として同定された内在性ペプチドであり、本研究者らはすでにアルコールおよび nicotine 依存動物脳においてその発現が亢進していることを報告しており<sup>12-14</sup>、DBI 発現が依存性薬物による身体依存形成に重要な役割を担っている可能性が示唆される。本研究では、morphine 依存動物大脳皮質における依存形成時および退薬症候発症時における DBI mRNA 発現の変化について検討するとともに、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、morphine による DBI mRNA 発現変化の機序について検討した。

Morphine 依存動物大脳皮質では、依存形成時には DBI mRNA 発現の有意な亢進が生じており、退薬症候発症時にはその発現の亢進が依存形成時に比してさらに増大しているのが観察されており、これらの変化はアルコール依存動物においてみられた変化<sup>1,2</sup>とよく一致していると考えられる。

Morphine 依存動物脳で観察された DBI mRNA 発現の変化は、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone

の同時投与により完全に抑制されたこと、および morphine の単回投与には DBI mRNA 発現に変化がみられないこと、などから、この DBI mRNA 発現の変化にはオピオイド受容体の長期間の活性化が原因となっている可能性が考えられる。神経細胞における DBI mRNA 発現は、動物の場合と同様に短時間の morphine 曝露では変化を誘発させず、長期間にわたる morphine 曝露によりその発現の亢進がみられた

ことも上述の結論を支持するデータと考えられる。

Morphine の長期曝露による DBI mRNA 発現増加の機序を培養神経細胞で検討する場合には、この神経細胞がオピオイド受容体のすべてのサブタイプを有していることが必要であるが、 $^3\text{H}$ naloxone 結合実験から、本研究に用いた初代培養マウス大脳皮質神経細胞にはいずれのサブタイプも存在していることが確認された。

培養神経細胞を用いた検討から、morphine 誘発性 DBI mRNA 発現の増加は、オピオイド受容体サブタイプに非選択的な拮抗薬である naloxone および  $\mu$  受容体拮抗薬である  $\beta$ -FNA により完全に抑制され、しかも選択的  $\mu_1$  受容体拮抗薬である Nal により約 50% が抑制されたことから、morphine 長期曝露による DBI mRNA 発現の亢進には  $\mu_1$  および  $\mu_2$  受容体がともに関与していると考えられる。Morphine 依存の形成には  $\mu_1$  受容体を欠損している CXBK マウスを用いた研究から、 $\mu_1$  および  $\mu_2$  受容体に関与していることが報告されており (15)、本研究で得られた実験成績はこれらの事実と一致すると考えられる。しかしながら、 $\mu_1$  受容体は跳躍や振戦の、また  $\mu_2$  受容体は下痢や体重減少などの退薬症候に関係するとされており (15)、本研究で観察された DBI 発現とこれらの退薬症候との関連性については現時点ではあきらかではない。一方、本研究の結果から、morphine 誘発性 DBI mRNA 発現増加には  $\kappa$  および  $\delta$  受容体は関与していないことが明らかとなった。

#### E. 結語

本研究では、の morphine 依存動物大脳皮質における DBI mRNA 発現変化を検討するとともに、その発現変化の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。その結果、morphine 依存形成時には DBI mRNA 発現が増大し、退薬症候発症時には依存形成時に比してより著明な発現増加が生じ、アルコールなどの依存性薬物における依存形成にみられるのと同様の発現パターンが確認された。また、この発現増加には  $\mu_1$  および  $\mu_2$  受容体がともに関与しており、 $\kappa$  および  $\delta$  受容

体の関与はないことが判明した

#### F. 参考文献

- 1) Kuriyama K. and Ohkuma S.: Alteration in the function of cerebral neurotransmitter receptors during the establishment of alcohol dependence: Neurochemical aspects. *Alcohol Alcoholism* 25: 239-249, 1990.
- 2) Faingold C.L., N'goume P. and Raiz A.: Ethanol and neurotransmitter interactions - From molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.* 55: 509-535, 1998.
- 3) Costa E. and Guidotti A.: Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49: 325-344, 1991.
- 4) Ferrarese C., Appollonio I., Bianchi G., et al.: Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: a possible link between stress, anxiety and the immune system. *Psychoneuroendocrinology* 18: 3-22, 1993.
- 5) Ohkuma S., Katsura M. and Tsujimura, A.: Alterations in cerebral diazepam binding inhibitor expression in drug dependence. A possible biochemical alteration common to drug dependence (Review). *Life Sci.* 68: 1215-1222, 2001.
- 6) Maldonado R., Dauge V., Callebert J., et al.: Comparison of selective and complete inhibitors of enkephalin-degrading enzymes on morphine withdrawal syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 165: 199-207, 1986.
- 7) Funada M., Narita M., Suzuki T., et al.: Effect of pretreatment with pertussis toxin on the development of physical dependence of morphine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348: 88-95, 1993.
- 8) Ohkuma S., Katsura M., Higo A., et al.: Peroxynitrite affects  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.* 76: 341-150, 2001.
- 9) Katsura M., Ohkuma S., Chen D.-Z., et al.: Nicotine