

コカインの報酬効果は、従来、ドーパミントランスポーター(DAT)を介すると考えられてきたが<sup>5)</sup>、DAT、セロトニントランスポーター(SERT)、ノルエピネフリントランスポーター(NET)のいずれの欠損でもコカインの報酬効果は減少しなかった<sup>6), 10), 12)</sup>。コカインの報酬効果は、いずれかのトランスポーターが欠損しても他のものが補うと考えられた。また、オピオイド系は、内因性オピオイドペプチドファミリーと  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  と名付けられた三種の受容体とから成り立ち、鎮痛・報酬をはじめとして広範な生理機能の調節に関わっている<sup>11)</sup>。我々は  $\mu$  オピオイド受容体 KO マウスや  $\mu$  受容体が減少している CXBK マウスにおいてモルヒネ鎮痛が消失あるいは減少していることを報告し<sup>3), 9)</sup>、 $\mu$  受容体がモルヒネ鎮痛に不可欠であることを明らかにしてきた。

今年度、我々は 1) DAT/SERT ダブル KO マウスを作製し、コカインの報酬作用の変化、2) 脳内微量透析法を用いて、モノアミントランスポーター KO マウスにおけるコカイン投与による脳内ドーパミン(DA) 及びセロトニン(5-HT) の変化、3)  $\mu$  受容体 KO マウスにおけるオピオイド受容体作動薬の報酬効果の変化、を検討した。

## B. 方法

### 実験動物：

DAT/SERT ダブル KO マウスは、DAT 単独 KO マウスと SERT 単独 KO マウスより作製、繁殖させた。

### 条件づけ場所嗜好試験：

一方は wire mesh floor、もう一方は corncob bedding floor で両コンパートメント間は自由に移動できる Plexiglas

chamber 内にてマウスの各コンパートメントにおける滞在時間を測定した。条件付けとして嗜好性を示した側に 20 あるいは 30 分間置いた後生食塩水を投与し、嗜好性を示さなかった側に 30 分間置いた後依存性薬物を投与する試技を行った。最後の投与から 24 時間後における場所嗜好性の変化を見ることで、各薬物の報酬効果を検討した。

### 静脈内自己投与試験：

マウス静脈内にカニューレを埋め込む手術を行い、マウスがレバー押し行動を 4 回行う毎に、刺激光を照射すると同時にモルヒネを  $5\text{--}8\ \mu\text{l}/15$  秒で静脈内投与する方法で検討を行った。各モルヒネ投与量でのレバー押し回数を測定し、3 日間の試技の回数の平均を指標として、モルヒネの報酬効果を評価した。

### 脳内微量透析法：

ペントバルビタール麻酔下、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、透析プローブ(透析膜の長さ 2 mm) を Franklin と Paxinos の脳アトラスに基づいて線条体(bregma より前方 0.6mm、側方 1.8mm、深さ 4.0mm) に挿入した。各マウスは、24 時間後に実験に用いた。無拘束の条件下で Ringer 液を  $1\ \mu\text{l}/\text{min}$  の速度で灌流し、10 分毎に自動的に液体高速クロマトグラフシステムに注入した。DA と 5-HT は逆相カラム(PP-ODS) で分離し、電気化学検出器(ECD-100) を用いて検出、定量した。移動相には、EDTA(50mg/l)、デカンスルホン酸ナトリウム(500mg/l)および 1%メタノールを含む 0.1M リン酸緩衝液(pH5.5)を用いた。灌流開始 3.5 時間後、コカイン(10mg/kg) か生食塩水を皮下投与した。

統計解析：

Statistical Package for Social Science (SPSS)統計パッケージ中の Student t-test、分散分析(ANOVA)を用いた。

本研究は当研究所の動物実験委員会に実験計画書を提出し許可を得、動物の取り扱いには倫理面を配慮して行った。

## C. 結果

**DAT/SERTダブルKOマウスにおける報酬効果の変化：**

コカインの報酬試験としての条件づけ場所嗜好試験を行ったところ、DAT(-/-)SERT(-/-)およびDAT(-/-)SERT(+/-)マウスではコカインの報酬が消失、DAT(+/-)SERT(-/-)マウスでは保持された(Fig. 1)<sup>8)</sup>。シナプス間隙モノアミン基礎濃度：

DATが完全に欠損したマウスのDAとSERTが完全に欠損したマウスの5-HTは有意に高かった。DAT(-/-)SERT(-/-)では、DAと5-HT両方とも有意に高かった(Fig. 2)。

**コカインに対するDA反応性：**

DAT(-/-)SERT(+/-)マウスにおいて、野生型マウスほど強くないが、DAは有意に増加した。DAT(-/-)SERT(-/-)及びDAT(-/-)SERT(+/-)マウスでは、DA反応性は消失した(Fig. 3)。

**コカインに対する5-HT反応性：**

DAT(-/-)SERT(+/-)マウスの5-HT反応性は、野生型マウスと変わらなかった。DAT(-/-)SERT(+/-)マウス及びDAT(-/-)SERT(-/-)マウスでは、5-HT反応性は消失した(Fig. 4)。

**$\mu$ 受容体KOマウスにおける報酬効果の変化：**

モルヒネの報酬試験としての条件づけ場所嗜好性試験において、 $\mu$ 受容体KOマウスではホモ体で野生型と比較して有意に報酬効果が減弱し、ヘテロ体でもその傾向がみられた(Fig. 5A)<sup>7)</sup>。さらに、別のモルヒネ報酬試験として静脈内自己投与試験を行ったところ、レバー押し行動回数は、ヘテロ及びホモ体のKOマウスにおいて、0.1ないし0.3 mg/kg/injectionの際に野生型と比較し有意に少なかった。モルヒネ総摂取量は、いずれの試験においても野生型マウスの摂取量が最も大きな値を示した(Fig. 5B)。

エタノールの報酬試験としての条件づけ場所嗜好性試験において、雌性マウスでは、野生型でエタノールによる報酬効果が有意に観察され、ヘテロ体、並びにホモ体ではエタノールの報酬効果が減少していた。また、雄性マウスにおいてもその傾向は観察された(Fig. 6)<sup>2)</sup>。

## D. 考察

我々はこれまでにモノアミントランスポーターが単独に欠損するとコカインの報酬効果が保持されることを報告している<sup>10)</sup>。今回の研究では、DAT単独完全欠損にSERT欠損が加わることによりコカインの報酬効果が消失することを示した<sup>8)</sup>。これらの結果により、コカイン報酬効果にはDA神経伝達系と5-HT神経伝達系が共に関与していることが推測される。また、DAT(-/-)SERT(+/-)マウスではコカインの報酬が消失、DAT(+/-)SERT(-/-)マウスでは保持されたことから、SERTよりもDATがより重要な役割を果たしていると考えられる。

コカイン報酬効果における DA と 5-HT の神経伝達系の相互作用をさらに詳しく検討するために、脳内微量透析法を用いて神経化学的な解析を行なった。DAT あるいは SERT が単独欠損しても、コカインによる線条体の細胞外 DA と 5-HT が上昇し、報酬効果も保持されていた。一種類のモノアミントランスポーターが欠損しても、他のトランスポーターによる補完作用により、再取り込み機能は部分的に維持されている可能性がある。DAT 単独完全欠損に SERT 欠損が加わると、モノアミントランスポーター間の補完作用が崩れ、DA と 5-HT 反応性も、コカインの報酬効果も消失する可能性が考えられる。

DAT が欠損した場合、5-HT 神経伝達系が報酬作用を代償する可能性も考えられる<sup>1)</sup>。しかし DA 反応性を示さない DAT(-/-)SERT(+/-)マウスの場合、5-HT が増加しても、コカインの報酬効果が消失していた。この結果より、5-HT 神経伝達系が単独に報酬作用を担う可能性は少ないと考えられる。

また、 $\mu$  受容体欠損マウスにおいて、報酬試験としての静脈内自己投与試験、場所条件付け試験では、モルヒネの報酬効果が消失していた<sup>7)</sup>。この結果は、モルヒネの報酬効果には  $\mu$  受容体の発現が必要であり、 $\delta$  あるいは  $\kappa$  受容体では代償できないことを示している。エタノールの報酬効果にオピオイド系の関与が示唆されているが<sup>4)</sup>、 $\mu$  受容体欠損マウスではエタノールの報酬効果が減少していたことから、 $\mu$  受容体の重要性が明らかとなった<sup>2)</sup>。モルヒネのみならずエタノールの報酬効果にも  $\mu$  受容体が関与していると考えられる。

## E. 結論

報酬効果が保持されている各種モノアミントランスポーター欠損マウスはコカインに対する DA 反応性を示した。また、5-HT 反応性の有無と関係なく、DA 反応性を示さなかったマウスはコカインの報酬効果を失った。これらの結果は、コカイン報酬効果における DA 神経伝達系の重要な役割を示唆する。また、 $\mu$  受容体欠損マウスに関する報酬試験は、 $\mu$  受容体が鎮痛作用以外、モルヒネ及びエタノールの報酬作用にも関与していることを示唆した。

## 【参考文献】

- 1 Caine, S.B., Cocaine abuse: hard knocks for the dopamine hypothesis?. *Nat Neurosci*, 1: 90-92, 1998.
- 2 Hall, F.S., Sora, I. and Uhl, G.R., Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154: 43-9, 2001.
- 3 Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., et al.: The untranslated region of (mu)-opioid receptor mRNA contributes to reduced opioid sensitivity in CXBK mice. *J Neurosci*, 21: 1334-1339, 2001.
- 4 Koob, G.F., Roberts, A.J., Schulteis, et al.: Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, 22: 3-9, 1998.

- 5 Kuhar, M.J., Ritz, M.C. and Boja, J.W., The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci*, 14: 299-302, 1991.
- 6 Rocha, B.A., Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., et al.: Cocaine self-administration in dopamine transporter knockout mice. *Nat Neurosci*, 1: 132-137, 1998.
- 7 Sora, I., Elmer, G., Funada, M., et al.: Mu Opiate Receptor Gene Dose Effects on Different Morphine Actions. Evidence for Differential in vivo Mu Receptor Reserve. *Neuropsychopharmacology*, 25: 41-54, 2001.
- 8 Sora, I., Hall, F.S., Andrews, A.M., et al.: Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 5300-5305, 2001.
- 9 Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., et al.: Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1544-1549, 1997.
- 10 Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., et al.: Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 7699-7704, 1998.
- 11 Uhl, G.R., Sora, I. and Wang, Z., The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7752-7755, 1999.
- 12 Xu, F., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., et al.: Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci*, 3: 465-471, 2000.

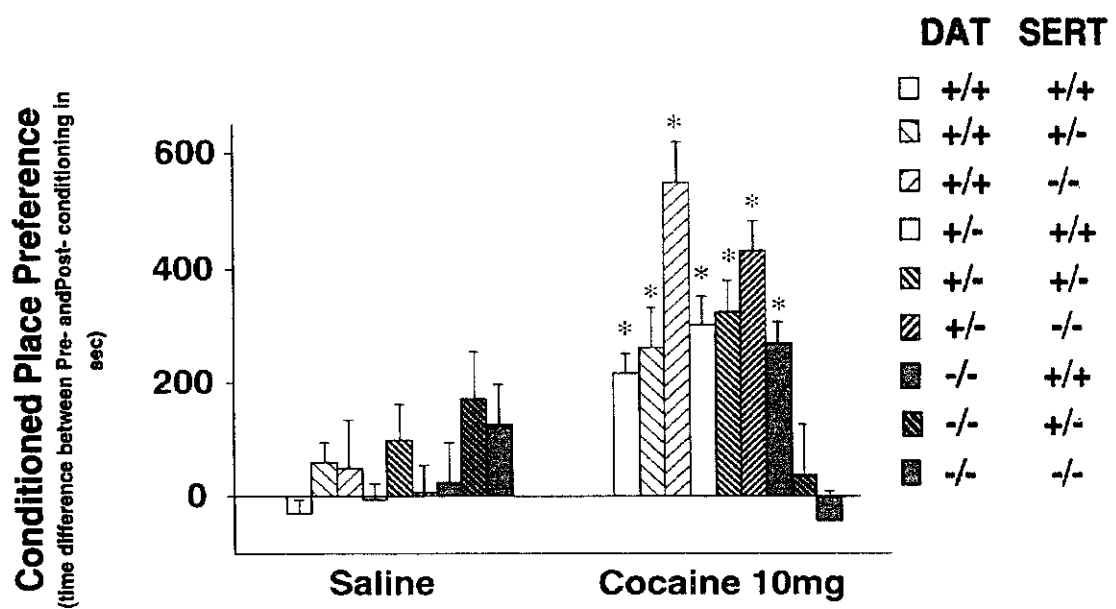


Figure 1. Lack of cocaine-conditioned place preference in DAT knockout mice with no or one copy of the SERT gene. (\*,  $P < 0.05$  vs. saline group)

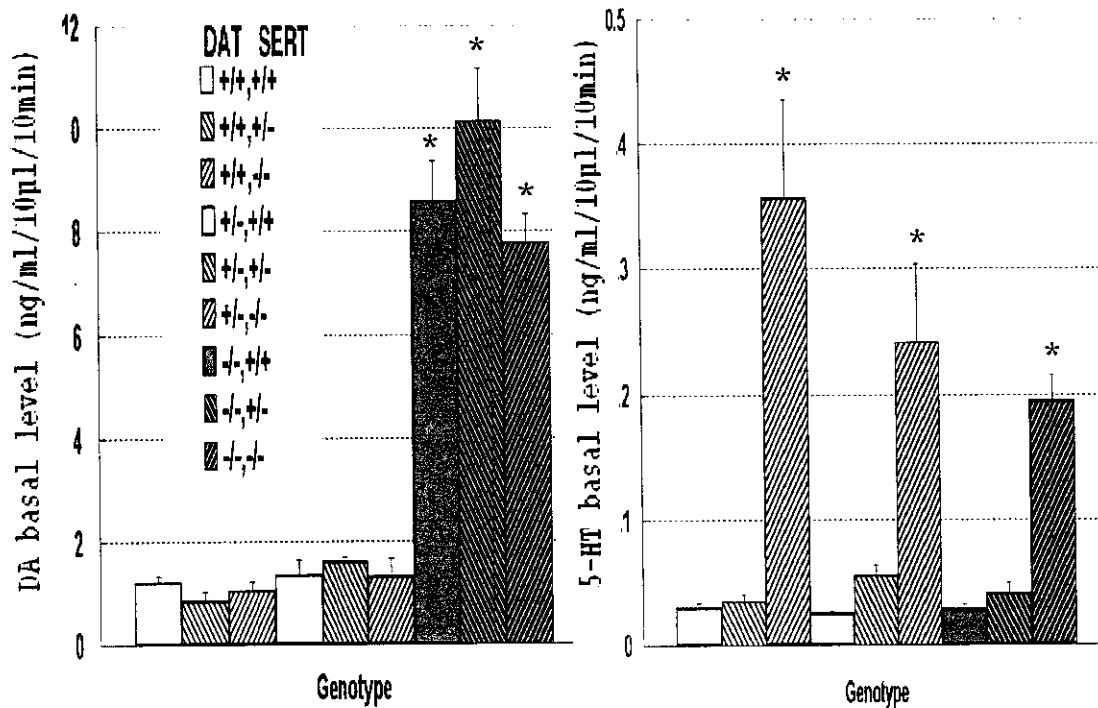


Figure 2. The basal levels of extracellular DA and 5-HT. (\*,  $P < 0.01$  vs. wild-type group)

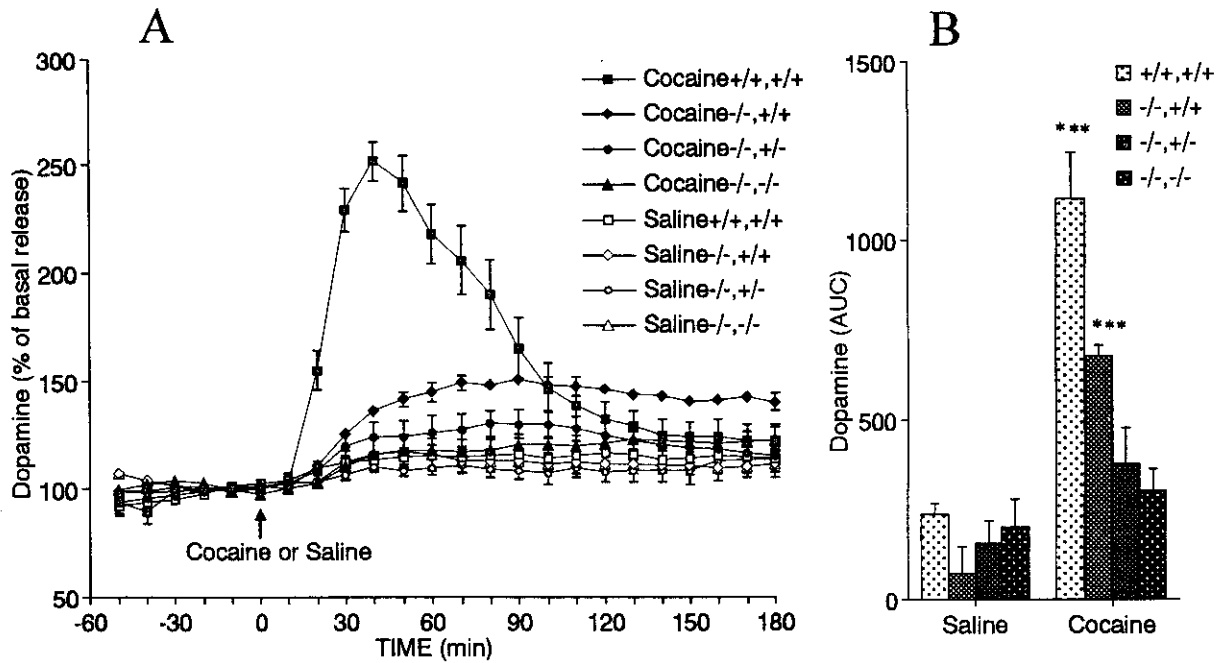


Figure 3-A: Temporal pattern of dopamine response to cocaine in striatum; 3-B: the area under the curve (AUC) of dopamine response during 180min interval after injection. Cocaine increased significantly extracellular dopamine in DAT (-/-) SERT (+/+), but not in DAT (-/-) SERT (+/-) and DAT (-/-) SERT (-/-) mice. (\*\*\*)P < 0.001 vs. saline group)

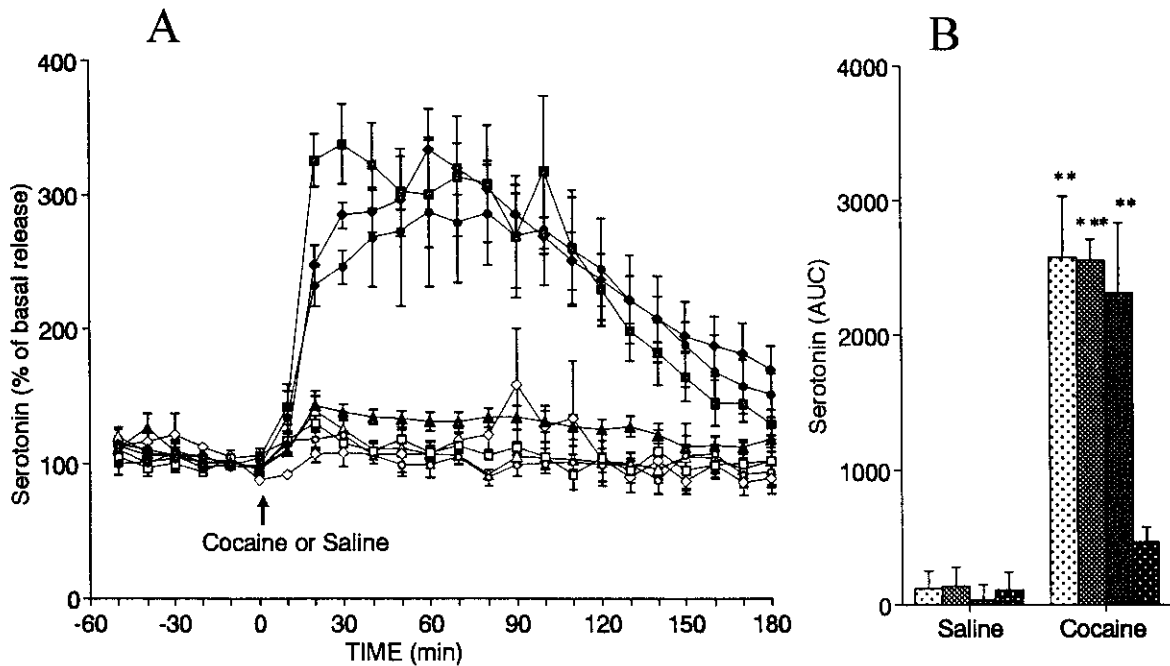


Figure 4-A: Temporal pattern of dopamine response to cocaine in striatum; 4-B: the area under the curve (AUC) of serotonin response during 180min interval after injection. Cocaine increased significantly extracellular dopamine in DAT (-/-) SERT (+/+) and DAT (-/-) SERT (+/-), but not in DAT (-/-) SERT (-/-) mice. (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. saline group)

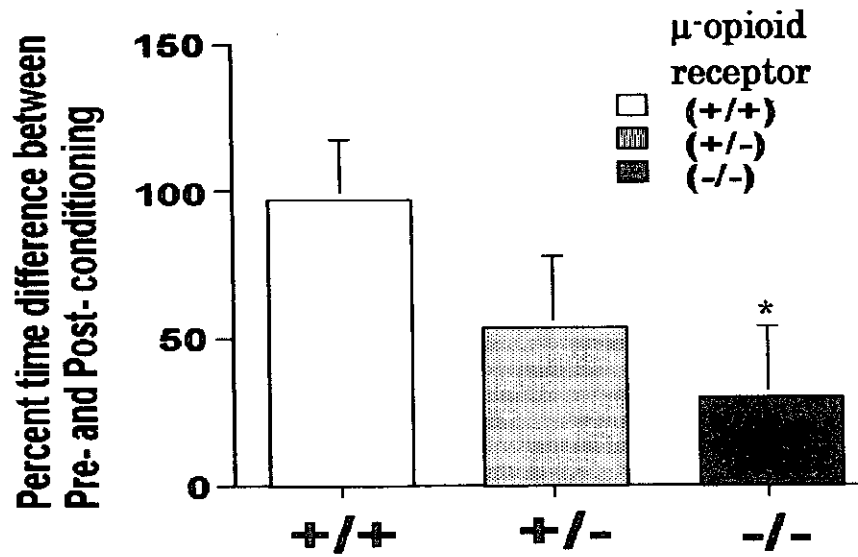


Figure 5A. Diminution of morphine-conditioned place preference in  $\mu$ -opioid receptor KO mice. (\*,  $P < 0.05$  vs. wild-type group)

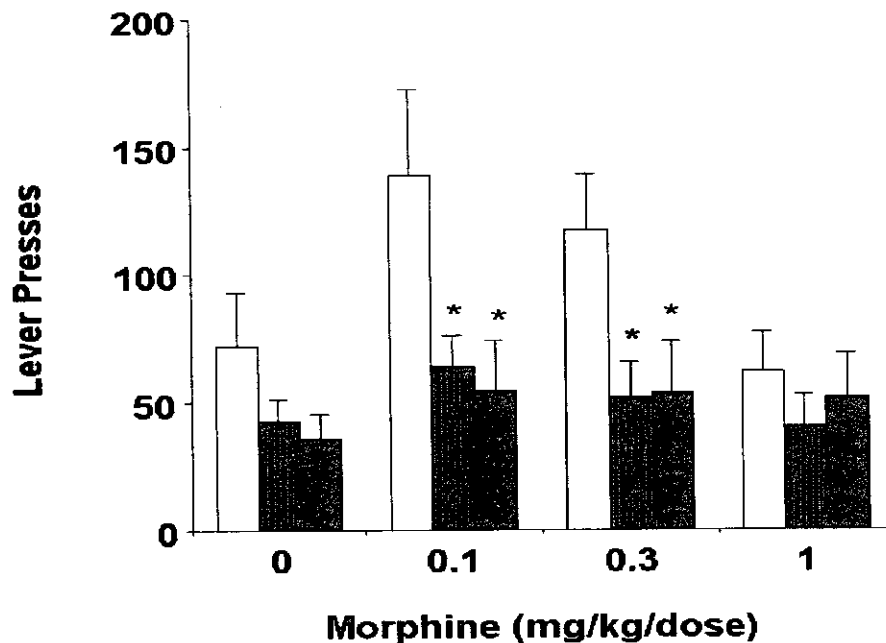
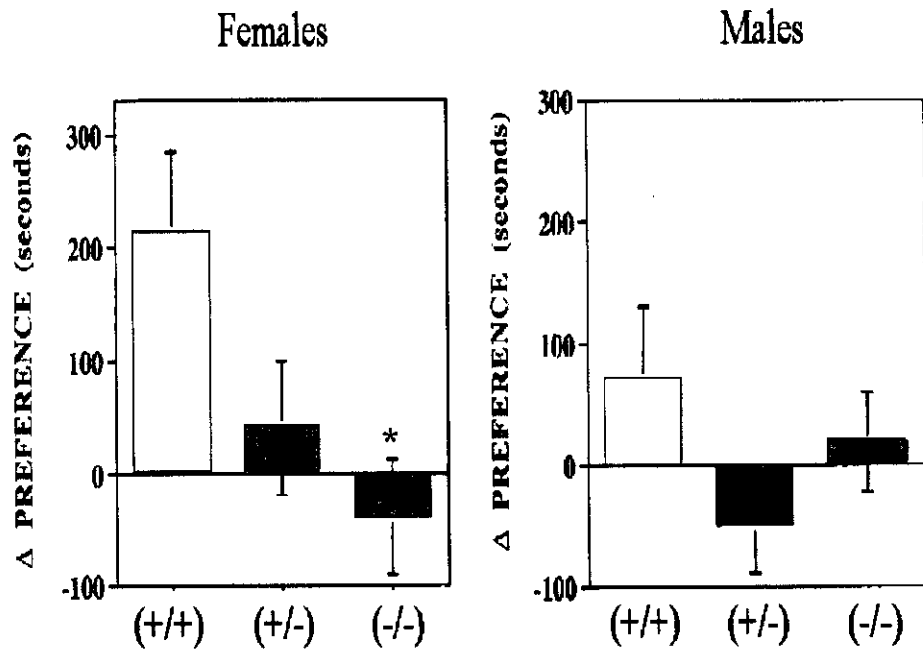


Figure 5B. Diminution of intravenous morphine self-administration in  $\mu$ -opioid receptor KO mice. (\*  $p < .05$  vs. wild-type group)



**Figure 6. Lack of alcohol-conditioned place preference in  $\mu$ -opioid receptor KO mice. (\*,  $P < 0.05$  vs. wild-type group)**



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：覚せい剤反復投与による側坐核および腹側被蓋野ドーパミンニューロンへの毒性に関するパッチクランプ法による解析

分担研究者 笹 征史

共同研究者 天野 託、松林 弘明

広島大学医学部薬理学教室

研究要旨

成熟ラットにメタアンフェタミン(MAP)を5日間反復投与した場合、側坐核ニューロンはマイクロイオントホレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対し、最終投与後5日後においては過感受性を示すことを報告してきた。さらに、スライスパッチクランプ法を用いた研究において、新生児ラット（ヒトでは胎生期に相当）に対する同様の処置をした場合、メタアンフェタミン投与中止5日後において、腹側被蓋野ドーパミンニューロンのD1およびD2両レセプターにドーパミンに対する感受性亢進が起こっていることを報告した。また昨年は、赤外線カメラを使用したスライスパッチクランプ法を用いた研究を行い、成熟ラットに対するメタアンフェタミンを反復投与した場合、側坐核ニューロンにおいてもドーパミンおよびメタアンフェタミンに感受性の亢進が起こっていることを報告してきた。今回は成熟ラットに同様のMAPの反復投与を行った場合、どのドーパミンサブタイプにドーパミンに対し過感受性が起こるのかを明らかにするために、側坐核スライス標本において、赤外線カメラを用いホールセルパッチクランプ法により検討した。また、実験終了後、電極よりmRNAをRT-PCRにより増幅し、ドーパミン受容体サブタイプに変化があるか否かを検討した。(1) MAP(1mg/kg/日、i.p.)を5日間投与し、その中止5日後において、側坐核ニューロンに電流固定下に、キンピロール(D2アゴニスト)を投与した場合には生食投与群よりもMAP投与群において大きな過分極が認められた。(2) 側坐核ニューロンにはD1、D2LおよびD3レセプターのmRNAが存在したが、D4およびD5レセプターのmRNAは存在していなかった。しかし、生食投与群およびMAP投与群ではドーパミンレセプターのmRNAの発現パターンには変化は認められなかった。以上の成績から、以上より、および前回の成績から、側坐核ニューロンにおいてドーパミン、MAPおよびキンピロールに対し、D2レセプターの感受性亢進が起ると考えられる。しかし、単一側坐核ニューロンのドーパミンのサブタイプにmRNAの発現パターンに変化はなく、感受性の亢進はレセプター密度の増加か、細胞内伝達系の変化により機能が亢進していると考えられる。

A. 研究目的

MAPの乱用者では、次第にMAPに対する感受性が亢進し容易に精神病様症状を発現する事が知られている<sup>4,5,6)</sup>。我々はこれまでこの逆耐性現象について新生児期および成熟期の

ニューロンにおけるMAPに対する感受性の変化を明らかにするために主として電気生理学的研究を行ってきた。in vivoの実験において成熟ラットにMAPを5日間反復投与した場合、側坐核ニューロンは、マイクロイオント

ホレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対し、最終投与後24~30時間後においては低感受性を、最終投与後5日後においては過感受性を、10日後には生理的食塩水投与群の動物におけると同程度の感受性を示すことを報告した<sup>1)</sup>。さらに、新生児ラット(ヒトの胎生期に相当する時期)にMAPを5日間投与し、その中止5日後においてスライスパッチクランプ法を用いた研究を行ったところ、既に腹側被蓋野ドーパミンニューロンのD1およびD2レセプターには感受性亢進が起こることを見出した<sup>2,3)</sup>。また、赤外線カメラを使用したスライスパッチクランプ法を用いた研究において成熟ラットに対する同様のメタアンフェタミンの反復投与により投与中止5日後には、側坐核ニューロンにおいてもドーパミンおよびメタアンフェタミンに対する感受性の亢進が起こっていることを報告してきた。今回さらに、成熟ラットに同様のMAP処置をした場合に側坐核ニューロンにおけるドーパミンに対する感受性の変化がどのドーパミンサブタイプに起こるのかを明らかにするために、スライス標本を用い、パッチクランプ法により検討を行った。また、実験終了後に単一神経細胞内より、mRNAを採取しRT-PCR法を用いてドーパミンレセプターサブタイプの変化をMAP投与群と生食群とについて比較検討した。

## B. 研究方法

5週齢の雄性WistarラットにMAP(1mg/kg/日、i.p. : MAP投与群)を連続5日間投与した。コントロール群として同用量の生理的食塩水(生食投与群)を同様に投与した。

### B-1. パッチクランプ記録

最終投与より5日後に断頭し、氷冷下に側

坐核を含む厚さ500  $\mu\text{m}$ のスライス標本を作成し、人工脳脊髄液(イオン組成(mM) : NaCl, 113; KCl, 3;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1; glucose, 11;  $\text{CaCl}_2$ , 2;  $\text{MgCl}_2$ , 1; pH 7.4)にて灌流している小水槽内(容量 : 1ml; 35°C)に1時間保持後に実験に供した。パッチ電極(イオン組成(mM) : K-gluconate, 130; KCl, 10; NaCl, 9;  $\text{CaCl}_2$ , 1;  $\text{MgCl}_2$ , 2; HEPES, 10; EGTA, 10; pH 7.3)を用い、赤外線カメラを用い側坐核ニューロンを観察下に、室温にてホールセル記録を行った。薬物は3ml/min速度で灌流している液中に投与した。

### B-2. RT-PCR法によるmRNAの測定

実験終了後、パッチ電極内に陰圧をかけ細胞質を電極内に吸い込み、回収した細胞質をPCRチューブに移した後、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM dNTP、20 units RNase inhibitor、2.5  $\mu\text{M}$  random hexamer、50 units MuLV reverse transcriptase (PE Biosystems) を含んだ逆転写反応液を加え全容量20  $\mu\text{l}$ とし、42°Cにて50分間逆転写反応を行った。逆転写反応終了後、反応液2  $\mu\text{l}$ に、2mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2mM dNTP、0.2  $\mu\text{M}$  1st PCR用上流および下流の特異的primers、ならびに2.5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems) を加え全容量100  $\mu\text{l}$ として、次の条件でPCRを行った。95°Cにて10分間、次いで95°Cにて30秒間、各アニリング温度にて30秒間、さらに72°Cで1分間の条件にて、45サイクルにて1st PCRを行った。その後1st PCR反応液2  $\mu\text{l}$ に、2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2mM dNTP、0.2  $\mu\text{M}$  2nd PCR用上流および下流の特異的primers、ならびに2.5 units Gold Taq DNA polymeraseを加え全容量100  $\mu\text{l}$ とし、1st PCRと同様の条件下で2nd PCRを行った。2nd PCR反応液10  $\mu\text{l}$ を1% agarose電気泳動で、また、0.25  $\mu\text{l}$ を4% polyacrylamide電気泳動で分析し、各々、

ethidium bromide染色あるいはBAS2000 Bioimaging analyzer (Fujix) で検出解析した。

### C. 研究結果

#### C-1. 側坐核ニューロンについてのパッチクランプ記録

側坐核ニューロンの生食群とMAP投与群においては、静止膜電位 (RMP)、大きさ (diameter)、膜容量 (capacitance) および input resistance)には有意の差は認められなかった。生食群では検討した36個のニューロンすべてに自発発火は認められなかったが、MAP投与群では20個中16個(80%)のニューロンに自発発火が認められた。

静止膜電位はMAP投与群および生食群におい

てそれぞれ、 $-65.2 \pm 3.0$ および $-62.2 \pm 3.8$ mV (n=6)であった。生食投与群およびMAP投与群の両群について電流固定下にドーパミンニューロンにキンピロール(1~100  $\mu$ M)を投与した場合、両群のニューロンに用量依存性の過分極が認められた(Fig1)。キンピロールによる過分極は生食群よりもMAP群において、有意に大であった(Fig2)。一方、ドーパミン1~100  $\mu$ MおよびMAP1~100  $\mu$ Mを投与した場合にも用量依存性の過分極が認められ、ドーパミンおよびMAPによる過分極は生食群よりもMAP群において有意に大であった(Fig2)。

C-2. ドーパミンレセプターサブタイプmRNA実験終了後のニューロンから得たmRNAをRT-PCRにて増幅した結果、側坐核にはD1、

#### A. physiological saline -treated animal quinpirole 100 $\mu$ M



#### B. methamphetamine-treated animal quinpirole 100 $\mu$ M

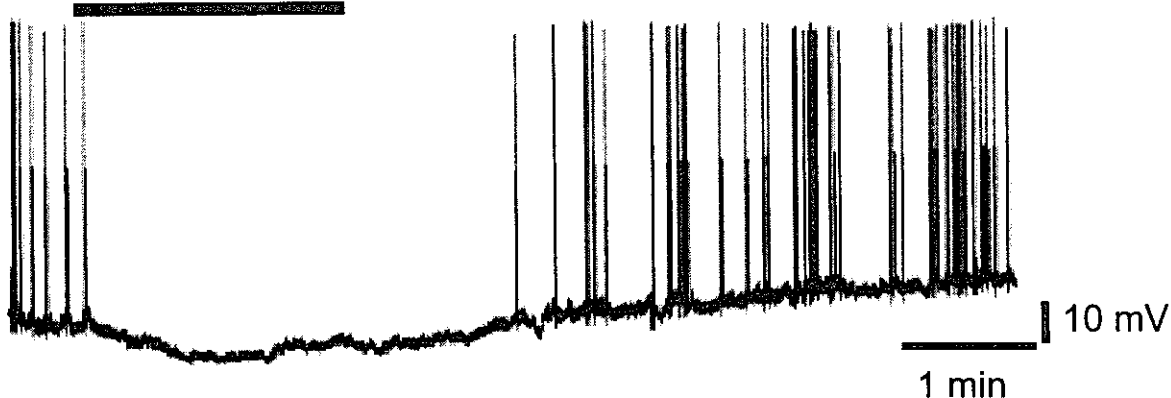


Fig.1 Effects of quinpirole on membrane potentials of nucleus accumbens neurons in physiological saline(A)- and methamphetamine(B)-treated groups.

D2LおよびD3レセプターのmRNAが認められ、D4およびD5レセプターのmRNAは認められなかった。しかし、生食投与群およびMAP投与群ではドーパミンレセプターのmRNAの発現パターンには変化は認められなかった。

#### D. 考察

我々のこれまでのin vivoの実験において、MAPを5日間反復投与し、休薬5日間後におい

て側坐核ニューロンはマイクロイオントフォレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対して過感受性が亢進すると事を報告した1)。今回は、MAPに同様の処置を行い、ドーパミンに対し過感受性が認められる休薬5日後の動物において、IR-DICスライスパッチクランプ法をによる検討を行った。その結果、側坐核ニューロンの電気生理学的性状は反復MAP投与によって変化しなかったが、ドーパミンおよびMAPに対する過分極反応は

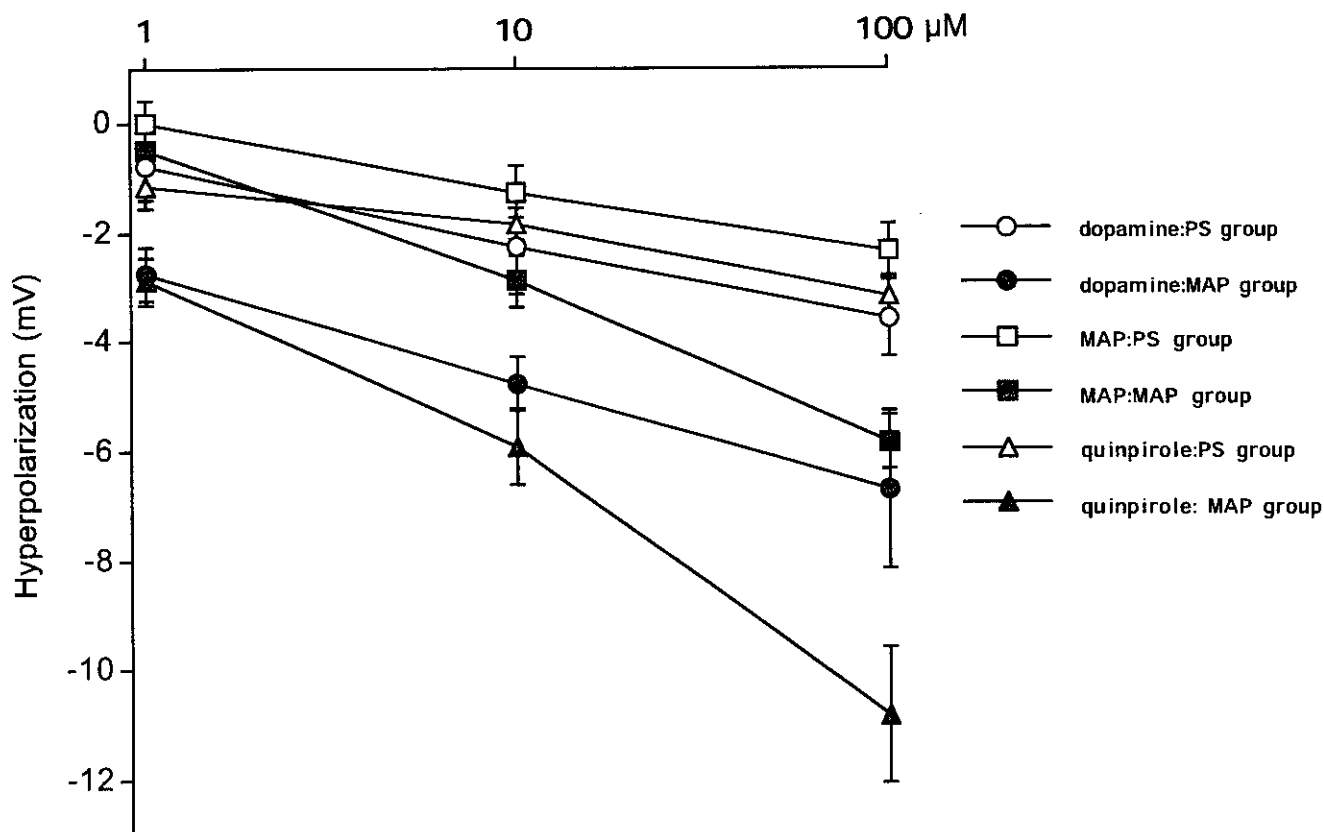


Fig 2 Effects of dopamine, methamphetamine and quinpirole (D2 agonist) on the membrane potentials of nucleus accumbens neurons in physiological saline(PS)- and methamphetamine(MAP)-treated groups. vertical bars : S.E.M.

生食群よりMAP投与群において亢進していた。一方、D2アゴニストのキンピロールは用量依存性に側坐核ニューロンに過分極を惹起し、この作用はMAP群の方が生食群よりも大であった。このことからMAP反復投与によるMAPに対する感受性の亢進は側坐核ニューロンのD2レセプターに起こっていることを示している。一方、実験終了後のニューロン内から得たmRNAをRT-PCRにより増幅した結果、ドーパミンレセプターサブタイプmRNAの発現パターンには変化が認められなかった。本法ではmRNAの量的変化の定量できないが、電気生理学的成績と考え合わせると、MAP反復投与後のドーパミンとMAPに対する感受性の亢進は、ドーパミンD2レセプター密度が増加した可能性と、細胞内伝達系の変容による可能性が考えられる。

#### E. 結論

成熟ラットにMAPを反復投与した場合、側坐核ニューロンにおいてドーパミンおよびMAPに対する感受性亢進が起り、この現象はD2レセプターの感受性亢進によることが見出された。しかし、単一側坐核ニューロンのドーパミンのサブタイプmRNAの発現パターンに変化はないことから、この感受性の亢進はレセプター密度の増加か、細胞内伝達系の変化により機能が亢進している可能性が考えられる。

#### 参考文献

1. Amano T., Matsubayashi H., and Sasa M.: Hypersensitivity of nucleus accumbens neurons to methamphetamine and dopamine following repeated administrations of

methamphetamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 801:136-147, 1996

2. Amano T., Matsubayashi H., Muhammad A., and Sasa M.: Dopamine D2 receptor-mediated hypersensitivity in VTA dopamine neurons following repeated methamphetamine treatment with the patch clamp method. *Japan.J. Pharmacol.*, 79, suppl.I, 223P, 199, 1999.
3. Amano T., Matsubayashi H. and Sasa M.: Patch clamp studies on dopamine D1 and D2 receptor-mediated hypersensitivity to dopamine of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area following repeated administration of methamphetamine. submitted.
4. Bickel W. K., DeGrandpre R. J. and Higgins S. T.: The behavioral economics of concurrent drug reinforcers: a review and reanalysis of drug self-administration research. *Psychopharmacology (Berl)*, 118, 250-259, 1995.
5. Carroll M. E.: PCP and hallucinogens. *Adv Alcohol Subst Abuse*, 9, 167-910, 1990.
6. Collier H. O.: Cellular site of opiate dependence. *Nature*, 283, 625-629, 1980.

# Nicotine 連続投与による電位依存性カルシウムチャネルの機能変化と diazepam binding inhibitor 発現の機能的相関性

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

初代培養マウス大脳皮質神経細胞 (神経細胞) への nicotine 長期曝露 (0.1  $\mu\text{M}$ 、72 時間) による生じる diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA 発現の増加と高電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル (HVCCs) との機能的相関性を検討し、併せて L 型 HVCCs の機能変化についても検討を加えた。Nicotine (0.1 mM) を 72 時間連続曝露することにより DBI mRNA 発現は有意に増加し、この増加は L 型 HVCC 阻害薬である nifedipine の同時曝露により完全に消失した。30mM KCl 刺激に伴う神経細胞内への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入は、神経細胞への nicotine の曝露時間および濃度依存性に増加し、この  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入量は nicotine 曝露開始 24 時間後に最大増加を示し、その後 72 時間まで継続した。0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の 72 時間曝露による神経細胞内への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入増加は、nicotine 性 acetylcholine (nACh) 受容体阻害薬である mecamylamine の共存下において完全に抑制された。同様に、L 型 VDCC 阻害薬である nifedipine の共存下でも抑制されたが、N 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬では抑制されなかった。この nicotine 処理により  $^3\text{H}$ verapamil 結合は増加し、しかもこの結合増加は  $B_{\text{max}}$  値の増加に起因するものであった。Western blot および Northern blot 法では L 型 VDCC  $\alpha 1\text{C}$ 、 $\alpha 1\text{D}$ 、 $\alpha 1\text{F}$ 、および  $\alpha 2/\delta 1$  subunit の発現増加が認められたが、それぞれ P/Q 型および N 型 VDCC  $\alpha 1\text{A}$  および  $\alpha 1\text{B}$  subunit については変化が認められなかった。また L 型 VDCC  $\beta 4$  mRNA の発現変化も認められなかった。神経細胞への nicotine 曝露により  $^3\text{H}$ nicotine 結合の増加が生じ、この増加は  $^3\text{H}$ nicotine 結合の  $B_{\text{max}}$  値のみ増加によるものであった。さらに Western blot 法による検討からこの nnACh 受容体 subunit である  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit の増加が観察された。以上の結果から、神経細胞への nicotine 長期曝露により nACh 受容体の up-regulation とともに L 型 HVCC の up-regulation が生じ、これにより神経細胞内への  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入が増加し、これらの L 型 HVCCs の機能変化により DBI 発現の増加が生じると考えられる。

## A. 目的

依存性薬物による依存形成時および退薬症候発現時には共通の症状及び症候が少なくないことは臨床的によく知られており、依存形成あるいは退薬症候の発現には共通の神経細胞機能変化が関与している可能性が高いと推測される。これらの病態にみられる症状および症候のなかで「不安」は代表的な症状の 1 つといえる。

不安には  $\text{GABA}_A$ /benzodiazepine (BZD)/

chloride ionophore 複合体などの神経伝達物質受容体の機能変化が原因となっていると考えられており、また内在性不安誘発物質である diazepam binding inhibitor (DBI) が関与していることが知られている<sup>1)</sup>。本研究者は身体依存形成時あるいは退薬症候発現時に不安が認められることから、DBI 発現が依存形成や退薬症候発現に関与している可能性を考え、ethanol、morphine および nicotine などの依存性薬物による身体依存形成および退薬症候発現に

における DBI 発現の変化を検討し、DBI 発現が依存性薬物による依存形成に重要な役割を果たしていることを報告してきた<sup>2-4)</sup>。さらに、DBI 発現は依存形成に共通の神経細胞機能変化である可能性が高いと考えられ、従ってこの発現機序の解明は薬物依存形成機序の一端を明らかにしうる可能性があると考えられる<sup>5)</sup>。

従来より、依存形成に高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) が関与していることが報告されている<sup>6)</sup>。また、細胞内  $Ca^{2+}$  の増加は  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases (KMKs) の活性化を介し遺伝情報の transcription を促進することが知られている<sup>7)</sup>。本研究ではこれらの観点から、nicotine 長期曝露による DBI 発現と HVCCs との機能的相関性を検討するとともに、HVCCs の機能変化についても検討を加えた。

## B. 方法

### 1. マウス大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

マウス大脳皮質は既報に準じて行った<sup>8)</sup>。胎齢 15 日目の ddY 系マウス新皮質を酵素処理および遠心操作を加えて単離し、15%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 中で 3 日間培養した。ついで 10 mM cytosine arabinoside および 10%ウマ血清を含有する DMEM 中で 24 時間培養した後、10%ウマ血清含有 DMEM 中で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10%ウマ血清含有 DMEM に変更し、培養 14 日目の神経細胞を実験に供した。なお、本研究で用いた培養細胞は 95%以上が神経細胞であった。

### 2. 神経細胞への nicotine の曝露

神経細胞への nicotine の曝露は既報<sup>9)</sup>に準じて行った。すなわち、nicotine 含有培養液を nicotine の連続曝露中は毎日新鮮なものに交換した。なお、nicotine が光感受性の高いことから、nicotine 溶液の培養皿への添加、神経細胞への曝露などの操作はすべて暗室内で行った。

### 3. ノーザンブロット法による DBI mRNA の測定

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>3)</sup>。すなわち、マウス全脳より FastTrack<sup>TM</sup> 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 (Amersham Biotech) 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 (Amersham Biotech) により合成し、5'末端を T<sub>4</sub> 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、本プローブ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。

初代培養を行ったマウス大脳皮質神経細胞より、FastTrack<sup>TM</sup> 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>3)</sup>。

### 4. 神経細胞への [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の測定

神経細胞への [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の測定は既報<sup>8)</sup>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<sup>2+</sup>-free Krebs-Ringer bicarbonate

buffer (pH 7.4, KRB-H) で3回洗浄したのち、37℃に保温した  $\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-H を加え、37℃、10分間の preincubation を行った。この buffer を吸引除去後、37℃に保温した  $\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-H を加え、2.7 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_2$  (1 mCi  $[\text{Ca}^{2+}]$ /dish) の存在下に37℃、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  $[\text{Ca}^{2+}]$  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,  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX)、および  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX) の添加は  $[\text{Ca}^{2+}]$  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  $[\text{Ca}^{2+}]$  の添加の15秒前に行った。

#### 5. $[\text{H}^3]$ Nicotine 結合実験

神経細胞膜に対する  $[\text{H}^3]$ nicotine 結合の測定は既報<sup>9)</sup>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 xg、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  $[\text{H}^3]$ 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  $\mu\text{M}$  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  $[\text{H}^3]$ 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。

#### 6. $[\text{H}^3]$ Verapamil 結合実験

神経細胞膜への  $[\text{H}^3]$ verapamil 結合の測定は既報の方法<sup>9)</sup>に準じて行った。すなわち、 $[\text{H}^3]$ 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  $[\text{H}^3]$ verapamil の存在下で 25℃、90分間の 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  $[\text{H}^3]$ 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。

#### 7. Immunoblot 法による nnACh 受容体および HVCCs の測定

Immunoblot 法に用いる蛋白質は神経細胞から以下の方法で抽出した。培養神経細胞を氷冷した 0.15 M NaCl 溶液で5回洗浄し、さらに4℃の条件下で 6% trichloroacetic acid を含有する 0.15 M NaCl で固定したのち培養皿から剥離した。この試料を遠心 (10,000 xg、4℃、5分) して pellet を作製した。この pellet を氷冷した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄し、sample buffer (4 % sodium lauryl sulfate, 12 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 % glycerol 含有 100 mM Tris-HCl, pH 6.8) を添加し最終容量が 0.2 ml となるよう調整したのち攪拌し、超音波破碎、3分間の煮沸処理、遠心操作 (10,000 xg、4℃、60分) を順次行い、得られた上清を実験に供するまで-80℃で保存した。

5/20% gradient gel (100×100×0.5 mm) を用いて SDS-PAGE ゲル電気泳動 (20 mA, 90分) を行っ



た後、semi-dry型 transblotter (160 mA, 60分) で転写<sup>25)</sup>させた nitrocellulose 膜 (NitroPure, Osnimics Inc., Westborough, U.S.A.) を PBS で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン含有 Tris buffered saline (TBS; 0.15 M NaCl 含有 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で固定した。この nitrocellulose 膜に nnACh 受容体  $\alpha 4 \cdot \alpha 3 \cdot \beta 2$  subunit および L・N・P/Q 型 HVCC  $\alpha 1$  subunit、L 型 VDCC  $\alpha 2/\delta 1$  subunit に対する抗体を 4°C で一晩反応させた後、0.05% Tween 20 を含有する TBS で 4 回洗浄し、さらに抗ウサギ IgG 抗体 (nACh 受容体: 1/2000 倍希釈) と抗ヤギ Ig G 抗体 (VDCC: 1/2500 倍希釈) を反応させた。泳動された蛋白質の染色は prestained buffer (ethanol: acetic acid: H<sub>2</sub>O = 4: 1: 5) で洗浄し、coomassie brilliant blue で染色した。

得られた nnACh 受容体および HVCCs の subunit の immunoreactive band の染色強度は、ImageMaster 1D Elite software (Amersham Biotech, Buckinghamshire, England) にて解析した。

#### 8. L型 VDCC $\alpha 1F$ および $\beta 4$ subunit cDNA の作製

L 型 HVCC  $\alpha 1F$  および  $\beta 4$  subunit cDNA はそれぞれのサブユニットの oligonucleotide ( $\alpha 1F$ , TTCGACTCTTGTGGGTCTTG および TCAA-AGCGGGAAAGAATAGA:  $\beta 4$ , CTATAAACTCTCATCATTTAC および TCATAACGGGTTGCACATAC) を用い、polymerase chain reaction (PCR) 法によりマウス全脳 cDNA から増幅を行い<sup>26-27)</sup>、得られた PCR 産物は EcoRI アダプターを連結させ、pUC18 の EcoRI サイトに挿入して作製した。

#### 9. Northern blot 法による L 型 VDCC $\alpha 1F$ および $\beta 4$ subunit mRNA 発現の測定

神経細胞を氷冷した PBS (pH 7.4) で洗浄したのちに培養皿から剥離し、FASTTrack™ isolation

kit を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を分離した<sup>10)</sup>。神経細胞可溶性抽出物を oligo(dT)-cellulose affinity chromatography に適用して poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製した。

RNA blot hybridization は既報<sup>9)</sup>に従って行った。すなわち、変性 poly(A)<sup>+</sup> RNA を formaldehyde 含有 1.1% agarose gel を用いた電気泳動で分離したのち、gel を ethidium bromide で染色し、UV 照射下で RNA の band を確認した。ついで RNA を nitrocellulose 膜に 20 x standard saline citrate (SSC) を用い capillary blotting 法により転写させ、転写が十分行われたことを ethidium fluorescence で確認した。マウス大脳皮質から調整した cDNA の断片の標識には [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP、random primer および Klenow 断片を用いて行った。また、 $\beta$ -actin mRNA については、Biosystems 社製の DNA synthesizer により合成した  $\beta$ -actin の antisense oligomer (AGGTCTCAAACATGATCTGGGTCA)<sup>28)</sup> を terminal deoxynucleotidyl transferase を用い [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP で標識した。ついで baking した nitrocellulose 膜を 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)、5 x standard saline citrate (SSC)、50 mg/ml salmon sperm DNA、1 x Denhardt's solution、30% formamide、10% dextran sulfate および <sup>32</sup>P-labeled probe とともに 42°C、24 時間の hybridization を行ったのち、0.2 x SSC と 0.1% sodium lauryl sulfate で 50°C、2 時間洗浄した。得られた band の放射性強度は Fujix BAS 2000 System (Fuji Film、Tokyo、Japan) を用いて測定した。

#### 10. 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>10)</sup>により行った。

#### 11. 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 連続曝露による DBI mRNA 発現に対する L 型 HVCC 阻害薬の影響

Nicotine (0.1  $\mu\text{M}$ ) を 72 時間連続曝露することにより DBI mRNA 発現は有意に増加し、この増加は L 型 HVCC 阻害薬である nifedipine の同時曝露により完全に消失した (Fig. 1)。一方、P/Q 型および N 型 HVCC 阻害薬は DBI mRNA 発現には何ら影響を与えなかった (Fig. 1)。

### 2. Nicotine 連続曝露による 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の変化

神経細胞への 0.1  $\mu\text{M}$  nicotine 曝露による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の変化について検討した。30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は、nicotine 曝露時間に依存して増加しており (Fig. 2)、この増加は nicotine 曝露開始後 24 時間で plateau に達し、72 時間まで継続した (Fig. 2)。

Fig. 3 に示すように nicotine の 72 時間曝露条件下では nicotine の濃度に依存して 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加が認められ、0.1~1  $\mu\text{M}$  でその流入量は plateau に達した。また、3  $\mu\text{M}$  nicotine を 72 時間曝露した場合には 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入はさらに増加していたが、この条件下では神経細胞からの著明な LDH 漏出が認められたため、この  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入量の増加は神経細胞膜傷害によるものと判断される。なお、0.1  $\mu\text{M}$  nicotine に神経細胞を 72 時間曝露した場合には有意な LDH 漏出は認められなかった。以上の結果から以下の実験における nicotine の曝露濃度を 0.1  $\mu\text{M}$  とした。

0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の 72 時間曝露により誘発される 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加が nicotine 性 acetylcholine (nACh) 受容体活性化に起因するか否かについて検討するために、nACh 受容体の選択的 antagonist である mecamylamine

共存下における 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の変化について検討したところ、30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加は完全に抑制された (Fig. 4)。このことから、0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の 72 時間曝露による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は、nACh 受容体の活性化を介した変化であることが確認された。

### 3. Nicotine 連続曝露による 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入における HVCC 阻害薬の影響

HVCC 阻害薬存在下では 72 時間の 0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の曝露により生じる 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は、 $\omega$ -CTX 曝露群と  $\omega$ -CTX 非曝露群とに有意差はなく、同様に  $\omega$ -ATX 曝露群と  $\omega$ -ATX 非曝露群との間に有意差は認められなかった。一方、nifedipine 曝露群では  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加が有意に抑制されており (Fig. 4)、nicotine 曝露による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は L 型 HVCC の up-regulation を介した変化であることが示唆された。

上述に実験成績から nicotine (0.1  $\mu\text{M}$ ) の長期曝露によって L 型 HVCC の機能亢進が誘発される可能性が考えられることから、L 型 HVCC 活性化薬である Bay k 8644 を用いて nicotine 長期曝露による Bay k 8644 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の変化を検討した。Nicotine 非曝露神経細胞では Bay k 8644 濃度依存性に  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加が認められ、1~10  $\mu\text{M}$  で最大効果が得られた。またこの  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入量の約 40% であり (Fig. 5)、nifedipine による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入抑制量と一致していた (Fig. 5)。0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の 72 時間曝露ののちには bay k 8644 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は有意に増加しており、この  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は nifedipine によって濃度依存性に抑制され (Fig. 5)、この抑制量は nicotine 曝露後の神経細胞において認められた 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に対する nifedipine の抑制量 (Fig. 4) とほぼ同一であった。以上の結果から nicotine 長期曝露による  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は、L 型 HVCCs を

介した変化であると判断した。

#### 4. Nicotine 連続曝露による [<sup>3</sup>H]verapamil 結合の変化

[<sup>3</sup>H]Verapamil 結合は nicotine の長期曝露により有意に増加しているのが観察された。この増加が結合部位数の増加によるのか、あるいは放射性リガンドに対するチャンネルの親和性の変化によるのかについて Scatchard 解析を行ったところ、 [<sup>3</sup>H]verapamil 結合の増加は Bmax 値の増加に起因しており、親和性には変化がないことが判明した (Table 1)。

#### 5. Nicotine 連続曝露による L 型 HVCC の変化

Nicotine 長期曝露による L 型 HVCC up-regulation を確認するために、L 型 HVCC を構成するサブユニットについての Western blot 法による検討を行った。Nicotine を曝露した神経細胞膜における L 型 HVCC  $\alpha 1C$  subunit に対する免疫反応性が分子量 240kDa を示すバンドに認められ、この免疫反応性の強さは nicotine 非曝露神経細胞の場合に比して有意に強かったが、N 型および P/Q 型 HVCC subunit である  $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1A$  subunit に対する免疫反応性には変化が認められなかった (Fig. 6)。同様に L 型 HVCC  $\alpha 1D$  および  $\alpha 2/\delta 1$  subunit の発現増加が nicotine を 72 時間曝露した場合にも観察された (Fig. 7)。さらに Northern blot 法による検討の結果、L 型 HVCC  $\alpha 1F$  subunit mRNA 発現の有意な増加が認められたが、 $\beta 4$  mRNA の発現には変化がみられなかった (Fig. 8)。以上の結果から、nicotine 長期曝露による L 型 HVCC の up-regulation が明らかとなった。Western および Northern blot による検討の結果、L 型 HVCC サブユニットである  $\alpha 1C$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 1F$  および  $\alpha 2/\delta 1$  サブユニットの有意な増加が観察されたが、それぞれ P/Q および N 型 HVCC サブユニットである  $\alpha 1A$  および  $\alpha 1B$ 、L 型 HVCC サブユニットである  $\beta 4$  には変化が認められなかった。

#### 4. Nicotine 連続曝露による nACh 受容体の変化

0.1  $\mu$ M nicotine の 72 時間曝露後における [<sup>3</sup>H]nicotine 結合実験による Scatchard 解析では Bmax 値の増加のみが認められ、Kd 値の変化はなかった (Table 1)。

Nicotine 長期曝露による nACh 受容体の性状の変化を検討するために、Western blot 法による nACh 受容体  $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit の発現変化を調べた。Fig. 7 に示すように  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit の発現増加が観察されたが、 $\alpha 3$  subunit の発現には変化が認められなかった (Fig. 9)。これら受容体結合実験および western blot 法で得られた実験成績から、nicotine 長期曝露により  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit により構成される nACh 受容体の up-regulation が誘発されていると考えられる。

#### D. 考 察

Nicotine の長期曝露により誘発される DBI 発現の増加は nACh 受容体拮抗薬により消失することが確認されており<sup>4)</sup>、また本研究で示したようにこの DBI 発現増加は L 型 HVCC 阻害薬によってのみ消失することから、nACh 受容体の持続的活性化による L 型 HVCCs の機能変化がこの DBI 発現増加に関与する可能性が高いと考えられる。

諸種の VDCC subtype 阻害薬存在下において測定した [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の変化から、nicotine 長期曝露による [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入増加は nifedipine によってのみ抑制されることが本研究の結果、明らかにされた。さらに、L 型 HVCC 活性化薬である Bay k 8644 により誘発される [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入は nicotine 長期曝露により有意に増強されることも明らかとなった。これらの実験成績から、神経細胞への nicotine 長期曝露により誘発される [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の増加は L 型 HVCC の機能亢進に起因していると考えられる。

[<sup>3</sup>H]Verapamil 結合実験の結果から、 [<sup>3</sup>H]verapamil 結合の増加は Bmax 値の増加に起因しており、 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入実験の成績とを考えると、nicotine 長期曝露により L 型 HVCCs の up-regulation が生じている可能性は極めて高いと

考えられる。

Western および Northern blot 法による解析から、L型 HVCC を構成する subunit のうち、 $\alpha 1C$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 2/\delta 1$ 、 $\alpha 1F$  subunit の発現増加が認められたが、L型 HVCC  $\beta 4$  subunit、P/Q型 VDCC  $\alpha 1A$  subunit および N型 VDCC  $\alpha 1B$  subunit には変化が認められなかった。これらの結果から、nicotine 長期曝露により、L型 HVCC  $\alpha 1$  および  $\alpha 2/\delta 1$  subunit 数の増加に起因する L型 HVCCs の up-regulation が生じていることが明らかとなった。

本研究において、nicotine の 72 時間曝露における  $[^3H]$ nicotine 結合実験では  $[^3H]$ nicotine 結合部位の増加が認められたが、nACh 受容体の  $[^3H]$ nicotine に対する親和性には変化が認められなかった。Nicotine 長期投与動物<sup>11,12</sup>と神経細胞への nicotine 曝露<sup>13,14</sup>による  $[^3H]$ nicotine 結合実験での検討でも同様の nACh 受容体 up-regulation が報告されており、本研究結果と一致する。

神経細胞あるいは非神経細胞に nACh 受容体を発現させた場合、nACh 受容体の up-regulation は  $\alpha 4/\beta 2$ 、 $\alpha 2/\beta 4$  および  $\alpha 7$  subunit 数増加によることが報告されている<sup>14,15</sup>。さらに、 $\alpha 4/\beta 2$  subunit により構成される nACh 受容体は 10~100 nM の低濃度 nicotine によっても活性化され<sup>13</sup>、nicotine の長期曝露によって up-regulation が誘発されることが報告されている<sup>16,17</sup>。これらの既報を勘案して、本研究で用いた nACh 受容体の up-regulation を誘発する条件下で  $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit の発現変化を検討したところ、 $\alpha 4/\beta 2$  により構成される nACh 受容体の up-regulation が生じることが観察された。従って、本研究で用いた神経細胞における nicotine 長期曝露誘発性 nACh 受容体 up-regulation は生理的現象と考えられ、このことから nicotine 長期曝露に誘発される L型 HVCCs の up-regulation も生理的変化と判断される。

従来より依存性薬物による依存形成では、L型 HVCC の機能亢進が関与していると考えられ、退薬症候が L型 HVCC 阻害薬により抑制されることが明らかにされている。従って、本研究で観察され

た nicotine 長期曝露により誘発される L型 HVCC の発現変化は、他の依存性薬物の長期曝露においても同様に生じる可能性が考えられ、これらの観点からの検討により、薬物依存形成の機序に一端を解明しうる可能性が考えられる。

#### D. 結論

本研究の結果から、nicotine の長期曝露により誘発される DBI 発現亢進は L型 VDCC サブユニットである  $\alpha 1C$ 、 $\alpha 1D$ 、 $\alpha 1F$  および  $\alpha 2/\delta$  サブユニットの発現増加に伴う当該チャネルの up-regulation に付随して生じていることが明らかとなった。

#### [参考文献]

- 1) Ferrarese C., Appollonio I., bianchi M., et al.: Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor' a possible link between stress, anxiety and immune system. *Psychoneuroendocrinol.* 18: 3-22, 1993.
- 2) 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. *Life Sci.* 68: 1215-1222, 2001.
- 3) Katsura M., Ohkuma S., Tsujimura A., et al.: Increase of diazepam binding inhibitor mRNA levels in the brains of chronically ethanol-treated and -withdrawn mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 1529-1533, 1995.
- 4) Katsura M., Ohkuma S., Xu J., et al.: Continuous treatment with nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 55: 345-349, 1998.
- 5) Katsura M., Hara A., Higo A., et al.: Continuous treatment with morphine increases diazepam binding inhibitor mRNA in mouse brain. *J. Neurochem.* 72: 2638-2641, 1998.
- 6) Little H.J.: The role of neuronal calcium