

低下することを報告しているが、この低下はモデル作成1週間後でも維持され、1ヵ月後には若干回復するものの以前、対照群と同レベルには回復しないことが明らかになった。

以上の結果を考え合わせると、METHの脳組織への移行性の低下がMETHの組織間隙へのバックフローを引き起こし、結果的にMETH脳組織間隙内濃度を上昇させていることが考えられた。この原因についてはさらに検討する余地があるが、その一因としてはMETHの標的分子であり、神経細胞に局在するドパミントランスポーターを含むモノアミントランスポーターの機能低下あるいは発現低下が考えられる。例えば、METH神経毒性モデル作成直後よりシナプトソームにおけるドパミン取り込み能は低下することが報告されている¹⁾。また、この取り込み能低下は少なくとも1週間は持続することも報告されている¹⁾。また、モノアミントランスポーターのひとつであるDAT発現はモデル作成直後には変化はないが、3日目以降には発現が低下するとの報告もある¹⁾。いずれにせよ、このような神経終末に局在するトランスポーターの機能低下がMETHの脳組織移行の低下に一部関与していることが考えられる。

一方、我々は先にMETH依存モデルのひとつであるMETH逆耐性モデルでもまたMETH組織間隙内濃度/血漿中濃度比率が特にMETH投与直後に上昇することを報告している¹⁾。そして、この変化にはMETH輸送能を持つ、有機カチオン輸送担体OCT3の発現低下が関与することを報告している¹⁾。

今回のMETH神経毒性モデルにおいても脳組織間隙へのMETH移行の上昇はやはり、METH投与直後に著明に観察された。そこで、脳におけるOCT3の発現について検討を行った。その結果、OCT3の発現はモデル作成1週間後、1ヵ月後のいずれにおいても有意に低下して

いることが明らかになった。したがって、本モデルにおいてもOCT3の発現低下がMETH脳組織間隙内濃度の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

本実験において

- 1) METH神経毒性モデル作成後1週間あるいは1ヵ月後のMETH血漿中濃度には変化が見られないこと、
 - 2) METH神経毒性モデル作成直後より見られるMETH脳組織移行の低下はMETH神経毒性モデル作成後1ヵ月後までも持続すること、
 - 3) METH脳移行に重要なOCT3の発現はモデル作成1ヵ月後まで持続的に低下していること、
- が明らかになった。

以上より、METH依存モデルである神経毒性モデルではモデル作成直後、作成後1週間から1ヶ月のいずれにおいてもMETH体内動態の変動が起きていることが明らかになった。また、このようなMETH体内動態の変化にはOCT3の長期的な発現低下が重要である可能性が示唆された。OCT3はMETH逆耐性モデルにおいても長期的に変化しており¹⁾、METH依存症の持続や再燃に重要な機能分子である可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Kitaichi K., Morishita Y., Doi Y., Ueyama J., Matsushima M., Zhao Y.L., Takagi K., Hasegawa T.: Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally

- sensitized rats. *Eur J Pharmacol*, 464: 39-48, 2003.
- 2) 喜田大三, 中嶋敏勝: Methamphetamine 神経毒性における最近の動向. *日本神経精神薬理学雑誌*, 22: 35-47, 2002.
 - 3) Volkow N.D., Chang L., Wang G.J., Fowler J.S., Leonido-Yee M., Franceschi D., Sedler M.J., Gatley S.J., Hitzemann R., Ding Y.S., Logan J., Wong C., Miller E.N.: Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry*, 158: 377-382, 2001.
 - 4) Fleckenstein A.E., Gibb J.W., Hanson G.R.: Differential effects of stimulants on monoaminergic transporters: pharmacological consequences and implications for neurotoxicity. *Eur J Pharmacol*, 406: 1-13, 2000.
 - 5) Yu J., Cadet J.L., Angulo J.A.: Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain. *J Neurochem*, 83: 613-622, 2002.

覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究

分担研究者：船田正彦

研究協力者：周曉華、佐藤美緒、和田清

(国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部)

【研究要旨】

薬物投与による遺伝子発現の変動を探索する方法として、DNA chip 法（マイクロアレイ法）が注目されている。本研究では methamphetamine (MAP) による精神依存および逆耐性動物モデルを作成し、マイクロアレイ法を用いて MAP 慢性投与後および休業時において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを行った。ICR 系雄性マウスを使用し、MAP (2 mg/kg, s.c.) は 1 日 1 回 7 日間に渡って慢性投与した。Conditioned place preference (CPP) 法による精神依存形成の評価および運動活性の測定を行い、MAP 慢性投与スケジュールで、MAP 精神依存および運動活性における逆耐性が形成されていることを確認した。この MAP 慢性投与動物の中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である腹側被蓋野を含有する midbrain および主要投射先である側坐核を含む limbic forebrain における mRNA の変動をマイクロアレイ法により解析した。900 種の遺伝子発現を検査し、安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した。Midbrain および limbic forebrain における MAP 急性投与群および MAP 慢性投与群を比較解析したところ、MAP 急性投与から慢性投与で 1.5 倍の発現変動が維持される遺伝子 4 (既知：1、未知 3) 個を見出した。既知遺伝子である glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) は、MAP 急性投与 24 時間後から休業後までの長期間に渡り持続した増加が認められた。そこで、GILZ antisense を作製し MAP 逆耐性および精神依存形成に対する影響を検討したところ、GILZ antisense の前処置により、MAP 逆耐性形成および精神依存形成は抑制された。また、MAP 逆耐性の発現は Raf-1 拮抗薬 GW-5074 の前処置により有意に抑制された。MAP 慢性動物の limbic forebrain においてリン酸化 Raf-1 量の増加が認められ、この増加は GILZ antisense の前処置により抑制された。

マイクロアレイ法は薬物の慢性投与で特異的変動を示す遺伝子を同定し、解析すべき遺伝子群の決定に有用であると考えられる。今回の解析結果から、MAP 急性投与から休業時までの長期間変動が維持される GILZ を見出し、MAP 精神依存形成および逆耐性形成に関与することを明らかにした。MAP 慢性投与により下垂体副腎系の制御に障害が生じ、MAP による GILZ の誘導を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、GILZ はプロテインキナーゼカスケードのうち Raf-1 の機能を調節し、MAP 精神依存形成および逆耐性の発現に関与していると推察された。

A. 目的

近年、薬物依存の発症機序やその病態について、脳内の遺伝子発現の変化という観点から精力的な研究がなされている。薬物依存関連遺伝子の同定は、薬物依存の診断の指標となり、更には原因遺伝子をターゲットにした遺伝子治療および新規治療薬開発への応用が可能になると予想される。

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、開発された DNA chip 法(マイクロアレイ法)が注目されている⁹⁾。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っ

ており、薬物依存形成の責任遺伝子の同定にも応用が期待できる。

本研究では同一条件下で多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、覚せい剤である methamphetamine (MAP) の急性投与、慢性投与および休業時において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを試みた。

B. 方法

使用動物: すべての実験には、ICR 系雄性マウス(20 - 25g)を使用した。

1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (2 mg/kg, s.c.) は1日1回7日間に渡って慢性投与した。MAP 慢性投与終了後、24時間および7日後にMAP (2 mg/kg, s.c.) 投与により誘発される運動活性を自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて検討した (Table 1)。

Table 1. MAP 投与スケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	○	○

↑: MAP (2 mg/kg, s.c.)

○: MAP (2 mg/kg, s.c.)

2. MAP 精神依存形成の評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP)法を用いた。白黒2区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、MAP (2 mg/kg, s.c.) を1日1回投与し、50分間装置内に閉じ込め、7日間にわたって条件付けを行った (Table 2)。対照群は溶媒である生理食塩液を投与し、MAP および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした。テストセッションとしては、条件付け24時間および7日後に薬物溶媒ともに投与せず、15分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 2. MAP 条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	T	T

↑: MAP (2 mg/kg, s.c.), 溶媒

T: テスト

3. マイクロアレイ法

MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与24時間後、MAP 慢性投与 (7日間) 24時間後および休薬後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である ventral tegmental area (VTA) を含有する midbrain および主要投射先である側坐核 (nucleus accumbens) を含む limbic forebrain を分画²⁾し、mRNA の抽出を行った (Figure 1)。ラベル方法としては、プライマーとして oligo dT (18) primer (300 pmol) を使用し、polyA RNA を鋳型として reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3-dUTP および Cy5-dUTP を取込ませた。また、内部標準物質

として lambda polyA RNA (50 pg) を反応時に等量ずつ添加した。遺伝子発現のスクリーニングは IntelliGene (Mouse CHIP Set 1, 宝酒造: <http://bio.takara.co.jp/catalog>) を用いて行った。Cy3 および Cy5 の各波長は、Affymetrix 428 Array Scanner により検出した。データの解析には、BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2. を用いた。Cy3-dUTP および Cy5-dUTP ラベルによる蛍光強度から scatter plot を作製し、内部標準物質として加えた lambda および house keeping (β -actin) 遺伝子の発現蛍光強度に対する変化率を算出し、1.5 倍以上の変動が認められた遺伝子群を抽出した。

MAPによる遺伝子発現の変化

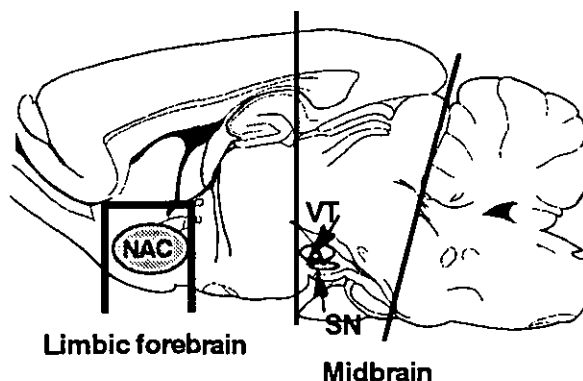
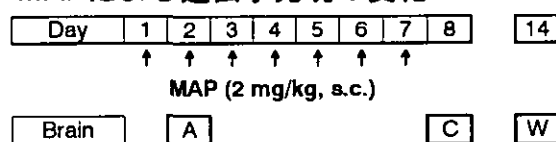


Figure 1. Schedule of MAP treatment and diagram showing location of coronal sections of midbrain and limbic forebrain tested. VTA: ventral tegmental area, SN: substantia nigra, NAC: nucleus accumbens. A: Acute treatment of MAP, C: Chronic treatment of MAP, W: MAP withdrawal

4. MAP 逆耐性形成における glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割

GILZ antisense 前処置の影響: GILZ S 化 antisense を設計し、MAP (2 mg/kg, s.c., 7日間) 慢性投与による逆耐性形成に対する影響を検討した。GILZ antisense (5 nmol/icv) は MAP 投与開始前3日間および MAP 慢性投与期間中1日置きに投与した。また、GILZ mRNA の変動は RT-PCR 法にて確認した。Corticosterone 定量: MAP (2 mg/kg, s.c.) 6日間投与後、MAP (2 mg/kg, s.c.) を再投与し20分後に採血し、血中 corticosterone 濃度

を EIA 法にて測定した。Raf-1 の役割:MAP(2 mg/kg, s.c.) 6 日間投与後、選択的 Raf-1 拮抗薬である GW-5074 (2 nmol/icv)を MAP (2 mg/kg, s.c.) 再投与 15 分前に処置し、MAP 逆耐性発現に対する影響を検討した。

5. MAP 精神依存形成における GILZ の役割

GILZ antisense 前処置の影響:GILZ S 化 antisense を設計し、MAP(2 mg/kg, s.c., 6 日間)慢性投与による MAP 精神依存形成に対する影響を検討した。GILZ antisense (5 nmol/icv)は MAP 投与開始前 2 日間および MAP 慢性投与期間中 1 日置きに投与した。また、GILZ mRNA の変動は RT-PCR 法にて確認した。

6. MAP 慢性投与による Raf-1 に対する影響

MAP (2 mg/kg, s.c., 6 日間)慢性投与後、limbic forebrain を分画し、Raf-1 およびリン酸化 Raf-1 のタンパク量をそれぞれの特異的抗体 (upstate 社) を使用し、ウェスタンブロット法により測定した。

C. 結果

1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (2 mg/kg, s.c.) 急性投与により、有意な自発運動亢進作用が認められた (Figure 2A)。MAP 慢性投与群では、MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与による自発運動亢進作用が認められ、この効果は MAP 急性投与群に比較して有意に増加していた MAP 慢性投与群におけるこの効果は MAP 慢性投与終了 7 日後においても持続していた。

2. MAP 精神依存形成の評価

生理食塩液により条件付けしたマウスでは place preference および place aversion の発現は認められなかった (Figure 2B)。一方、MAP の条件付け終了 24 時間後にテストを行ったところ有意な place preference の発現が認められた (139.4±36.7 sec)。この効果は、条件付け終了後、7 日目においても維持されていた (150.8±51.3 sec)。

3. マイクロアレイによる遺伝子発現の解析

Midbrain: 900 種の遺伝子の発現変化を検討した結果、

MAP 急性投与群では 708 種、MAP 慢性投与群では 698 種および MAP 休薬群では 696 種の遺伝子において安定した発現量が認められた。安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した (Figure 3, Table 3)。MAP 休薬群においては、21 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、4 個の遺伝子が低下 (1.5 倍以下) していた。MAP 休薬群を中心に MAP 急性投与群および慢性投与群を比較解析したところ、慢性投与から休薬時まで変動が維持される遺伝子は 7 (増加:3, 減少:4) 個であった。MAP 急性投与、慢性投与および休薬時まで変動が維持されている遺伝子としては、glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) および未知遺伝子 3 個であった。

Limbic forebrain: 900 種の遺伝子の発現変化を検討した結果、MAP 急性投与群では 689 種および MAP 慢性投与群では 671 種の遺伝子において安定した発現量が認められた。安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した (Table 4)。MAP 休薬群においては、10 個の遺伝子が増加し、18 個の遺伝子が低下していた。MAP 急性投与および慢性投与まで変動が維持されている遺伝子としては、遺伝子 6 (既知:3, 未知:3) 個であった。

Midbrain および limbic forebrain における MAP 急性投与群および MAP 慢性投与群を比較解析したところ、MAP 急性投与から慢性投与で変動が維持される遺伝子 4 (既知:1, 未知:3) 個を見い出した。既知遺伝子である glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) は、MAP 急性投与 24 時間後から休薬後までの長期間にわたり持続した増加が認められた。

4. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割

MAP 慢性投与時に GILZ antisense を前処置したところ、MAP 逆耐性形成が有意に抑制された (Figure 4B)。同様に、MAP による精神依存形成も抑制された (Figure 4C)。MAP 慢性投与後、血中 corticosterone 量を測定したところ、休薬群において有意な増加が認められた。また、MAP 慢性投与群に MAP を再投与したところ血中 corticosterone 量は有意に増加していた (Figure 5)。

5. MAP 慢性投与の Raf-1 に及ぼす影響

MAP 慢性投与後、選択的 Raf-1 拮抗薬である GW-5074 を MAP 再投与前に処置したところ MAP 逆耐

性の発現は有意に抑制された (Figure 6A)。また、MAP 慢性投与群に MAP を再投与した場合、limbic forebrain においてリン酸化 Raf-1 タンパク質量は有意に増加していた。一方、この効果は GILZ antisense の前処置により有意に抑制された (Figure 6B)。

D. 考察

MAP (2 mg/kg, s.c.) の 7 日間慢性投与による行動変化について検討したところ、MAP 自発運動亢進作用において増感現象、すなわち逆耐性の形成が確認された。また、この効果は休薬 7 日後においても維持されていた。さらに、同様の MAP 投与スケジュールで条件付けを行い、MAP 報酬効果を評価したところ、MAP による place preference の発現が確認され、この効果は条件付け 7 日後においても維持されていた。したがって、今回用いた MAP 投与スケジュールで、MAP の逆耐性および精神依存モデル動物の作成が可能であることを確認した。

覚せい剤による逆耐性および精神依存形成には中脳辺縁系ドパミン神経系の関与が示唆されている^{7,10)}。そこで、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である VTA を含有する midbrain および主要投射先である側坐核を含有する limbic forebrain を標的部位として、マイクロアレイを利用した mRNA 発現の変動を検討した。MAP 休薬群を中心に解析を行い、(1) MAP 休薬のみ、(2) MAP 慢性投与および休薬で変化が維持されるもしくは(3) MAP 急性から休薬時まで変化が維持される遺伝子を同定した。

今回の解析で特に興味深いものとして、MAP 急性投与 24 時間後から休薬時まで長期間 mRNA レベルの増加が認められた glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割について検討した。GILZ antisense の前処置により MAP 精神依存形成および逆耐性形成が抑制されることから、GILZ mRNA の誘導は MAP 精神依存および逆耐性形成に関与することが明らかになった。一方、GILZ は glucocorticoid によりその発現が誘導される遺伝子群として同定された経緯があることから¹⁾、MAP 慢性投与群で、血中 corticosterone 変動について検討した。その結果、MAP 慢性投与群では MAP の再投与により血中 corticosterone 量が増加していることが明らかになった。また、MAP 急性投与では、血中

corticosterone 量に有意な影響は認められなかったことから、MAP 慢性投与によって下垂体副腎系の制御に異常が生じている可能性が示唆された。MAP の逆耐性形成において中脳辺縁系ドパミン神経系が重要な役割を果していることが報告されている^{7,10)}。生体内の corticosterone 量の変動は中脳辺縁系ドパミン神経系に影響を与えることが報告されていることから⁵⁾、おそらく、MAP 慢性投与によって生じる下垂体副腎系の異常がドパミン神経系に影響を与えているものと考えられる。

GILZ が Raf-1 結合能を有することが報告され、GILZ の作用点として Raf-1 が注目されている¹⁾。そこで、MAP 逆耐性発現における Raf-1 の役割を検討した。選択的 Raf-1 拮抗薬の前処置により、MAP 逆耐性発現は抑制された。したがって、MAP 逆耐性発現に Raf-1 が関与していることが明確になった。また、Raf-1 のタンパク質量を測定したところ、MAP 慢性投与によってリン酸化 Raf-1 量の増加が認められた。この効果は、GILZ antisense の前処置により抑制された。したがって、MAP による GILZ mRNA の誘導は MAP 精神依存および逆耐性形成に関与し、そのメカニズムに Raf-1 のリン酸化が重要な役割を果していると考えられた。Raf-1 は MAP スーパーファミリーの一角であり特に、ERK1/2 などの MAPK 上流に位置する MAPKKK である。MAPK は、MAP 逆耐性の発現に関与することが報告されている⁹⁾。したがって、GILZ による Raf-1 の制御は MAPK の機能に影響を与えているものと考えられる。一方、以前の研究では、MAP が転写因子である AP-1 の活性を増加させること⁴⁾、さらに依存性薬物の慢性投与により c-Fos と AP-1 の複合体機能が長期間に渡り変化していることが明らかにされている³⁾。GILZ の役割として AP-1 の転写機能を調節することが報告されている⁶⁾。したがって、MAP 慢性投与による GILZ の増加は、MAP 精神依存形成およびその維持に関与する AP-1 などの各種転写過程の適応を引き起こす重要な因子であると推察された。

E. 結論

マイクロアレイ法は多数の遺伝子群から薬物の慢性投与で特異的変動を示す遺伝子を同定し、行動や細胞内情報伝達系の変化を含めて、解析すべき遺伝子の決定に有用である。今回の解析結果から MAP 急性

投与から休薬時までの長期間変動が維持される GILZ を見出し、MAP 精神依存形成および逆耐性形成に関与することを明らかにした。MAP 慢性投与により下垂体副腎系の制御に障害が生じ、MAP による GILZ の誘導が引き起こされる可能性が示唆された。さらに、GILZ はプロテインキナーゼカスケードのうち Raf-1 のリン酸化機能を調節し、MAP 精神依存形成および逆耐性の発現に関与していると推察された。

[参考文献]

- 1) Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, et al.: Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol.*, 22(22): 7929-7941, 2002.
- 2) Franklin K.B.J., Paxinos G: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego 1997.
- 3) Hope H.E., Nye M.B., Kelz D.W. et al.: Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of the altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatment. *Neuron*, 13, 1235-1244, 1994.
- 4) Lee Y.W., Hennig B., Yao J. et al: Methamphetamine induces AP-1 and NF-kappaB binding and transactivation in human brain endothelial cells. *J Neurosci Res*, 66: 583-591, 2001.
- 5) Louk J. M., Vanderschuren J., Donne Schmidt, E., et al.: A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J. Neurosci.*, 19(21): 9579-9586, 1999.
- 6) Mittelstadt P.R., Ashwell J.D.: Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*, 276, 29603-29610, 2001.
- 7) Pierce R.C., Kalivas P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 192-216, 1997.
- 8) Tanaka T., Jaradat S.A., Lim M.K.: Genomic-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA

microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 9127-9131, 2000.

- 9) Ujike H, Takaki M, Kodama M, et al.: Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. *Ann N Y Acad Sci.*, 965: 55-67, 2002.
- 10) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*, 51: 141-153, 1998.

F. 研究業績

[論文発表]

船田正彦: 揮発性有機溶剤吸入による精神依存性評価装置の開発. *精神保健研究*, 49, 29-33, (2003).

[学会発表]

船田正彦、周 曉華、和田 清、トルエン吸入による脳内モノアミン代謝酵素に対する影響. 第33回日本神経精神薬理学会、奈良 (2003).

Masahiko Funada, Xiaohua Zhou, Mio Sato, and Kiyoshi Wada: Role of the dopamine D1 receptor on the abused solvent toluene-induced rewarding effect in mice. 第76回日本薬理学会年会、福岡、(2003).

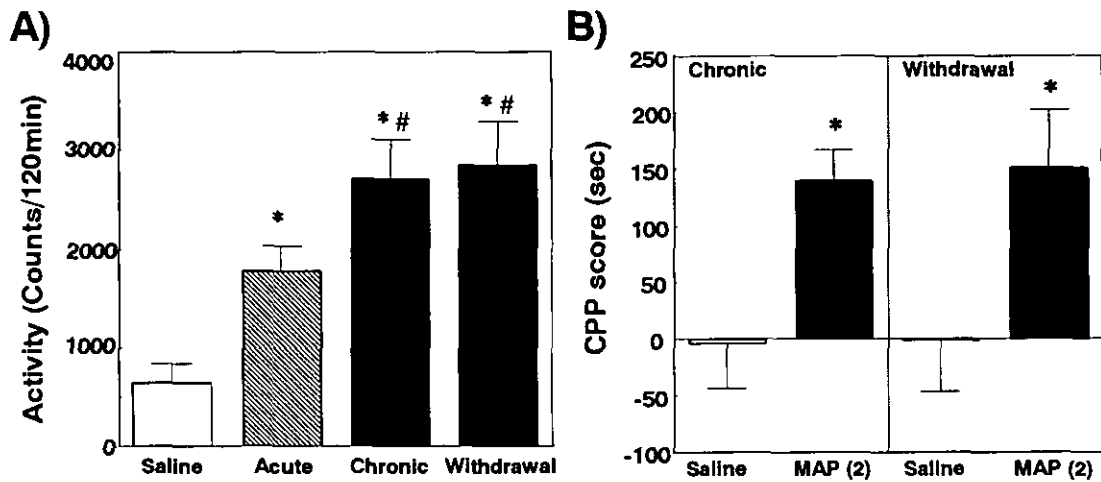


Figure 2. A) Effect of acute or chronic treatment with methamphetamine on methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice. Total locomotor activity changes in methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice by chronic treatment with MAP (2 mg/kg, s.c.) for 7 days. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 14 animals for 120 min after MAP treatment. B) Place conditioning produced by methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.). Conditioning sessions (7 for MAP; 7 for saline) were conducted. On day 8 (Chronic) or 14 (Withdrawal), test of conditioning was performed. Conditioning scores represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 12 - 14 animals. A) * $P < 0.05$ vs. saline control. # $P < 0.05$ vs. acute administration of MAP, B) * $P < 0.05$ vs. saline control.

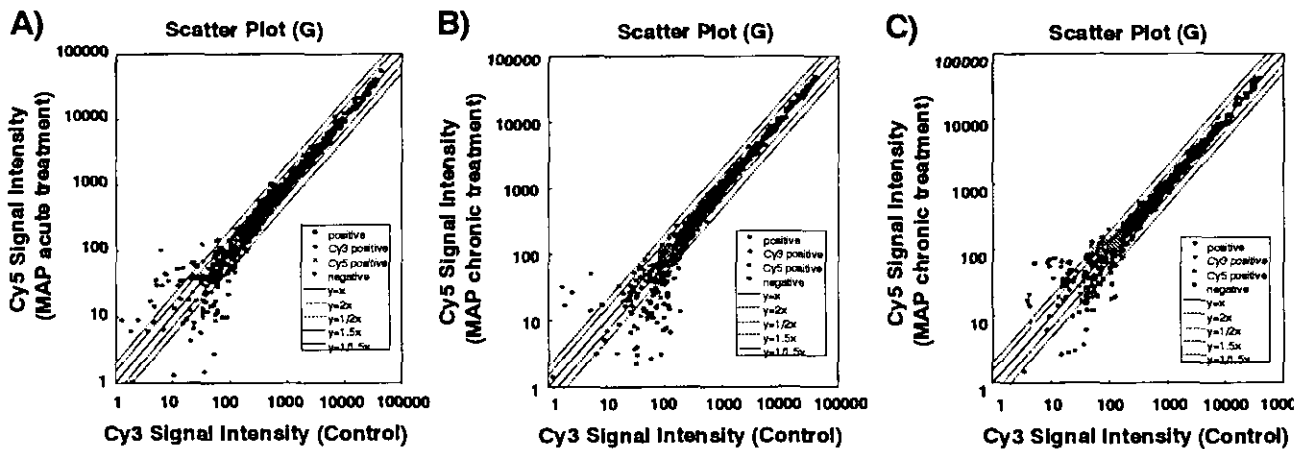


Figure 3. Expression profiling of 900 genes between methamphetamine (MAP) treatment and saline (Control) treatment. For each gene, average expression levels were calculated from two independent hybridization for midbrain, and displayed on a scatter plot. A) Effect of acute treatment with MAP, B) Effect of chronic treatment with MAP, C) Effect of MAP withdrawal.

Table 3. List of genes increased expression and decreased expression in the mouse midbrain.

A)

Gene	GeneBank	Fold change		
		A	C	W
inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa	U52044	1.08	1.96	2.19
SH3-domain binding protein 1	X87671	0.99	1.09	2.67
adenylate cyclase 7	U12919	1.18	0.91	2.56
mastocytoma N-deacetylase/N-sulfotransferase	U02304	1.18	1.14	2.50
procollagen, type XI, alpha 1	D36162	0.65	1.34	1.86
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	U34920	1.00	1.54	1.83
Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	D37874	1.25	1.39	1.76
Mouse gene for beta-1-globin	V00722	1.58	1.13	1.66
neuropeptide nociceptin 1	D82966	1.21	1.23	1.66
regulator of G-protein signaling 5	U67188	1.08	1.08	1.57
erythrocyte protein band 7.2	U17297	0.87	0.92	1.56
zinc finger protein 100	U22306	0.95	0.87	1.56
galactokinase	AB027012	0.95	1.06	1.53
splicing factor (SRp20)	X91656	0.98	1.14	1.52
glucocorticoid-induced leucine zipper	NM 010286	1.50	1.53	1.50
ret finger protein	L46855	0.93	0.87	1.50
ESTs	AI324037	1.5	1.23	1.73
ESTs	AJ484880	0.89	1.00	1.63
ESTs	AW414346	1.07	1.09	1.55
ESTs	AA046357	0.99	1.01	1.52
ESTs	AJ787288	1.12	1.17	1.51
		Increase	21(16)	

B)

Gene	GeneBank	Fold change		
		A	C	W
ESTs	AW012359	0.66	0.66	0.65
ESTs	AI327145	0.61	0.61	0.64
ESTs	AI314081	0.50	0.46	0.61
ESTs	AW556570	0.43	0.48	0.60
		Decrease	4	

List of genes increased expression (A) and decreased expression (B) in the mouse midbrain. A: Acute treatment with methamphetamine. C: Chronic treatment with methamphetamine. W: methamphetamine withdrawal. A) The number of specific genes in methamphetamine withdrawal group was 16.

Table 4. List of genes increased expression and decreased expression in the mouse limbic forebrain.

A)

Gene	GeneBank	Fold change	
		A	C
Leukotriene C4 synthase	U27195	1.19	1.90
Raf-related oncogene	D00024	0.68	1.58
ATP-binding cassette(MDR/TAP)	AI316470	0.96	1.56
SH3-domain binding protein-1	X87671	1.55	1.54
Protein kinase C delta	AB011812	0.89	1.54
Glucocorticoid-Induced leucine zipper	NM010286	1.59	1.51
Mus musculus mRNA for latexin	D88769	1.19	1.51
Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1A2)	U56649	1.20	1.50
DNA segment Chr 2	AJ242663	1.40	1.50
ESTs	AI324037	1.87	1.74

B)

Gene	GeneBank	Fold change	
		A	C
Protein kinase DNA activated catalytic polypeptide	D87521	1.41	0.66
Aldo-keto reductase	U68535	1.19	0.63
Amylase 1	V00719	1.37	0.60
REV3-like catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54	AB031049	1.08	0.59
E4F transcription factor 1	X76858	1.58	0.59
Procollagen type IV alpha 2	J04695	0.91	0.58
Procollagen type IV alpha 1	J04694	1.11	0.58
Ceruloplasmin	U49430	0.94	0.57
ESTs	10 genes		

List of genes increased expression (A) and decreased expression (B) in the mouse limbic forebrain. A: Acute treatment with methamphetamine. C: Chronic treatment with methamphetamine.

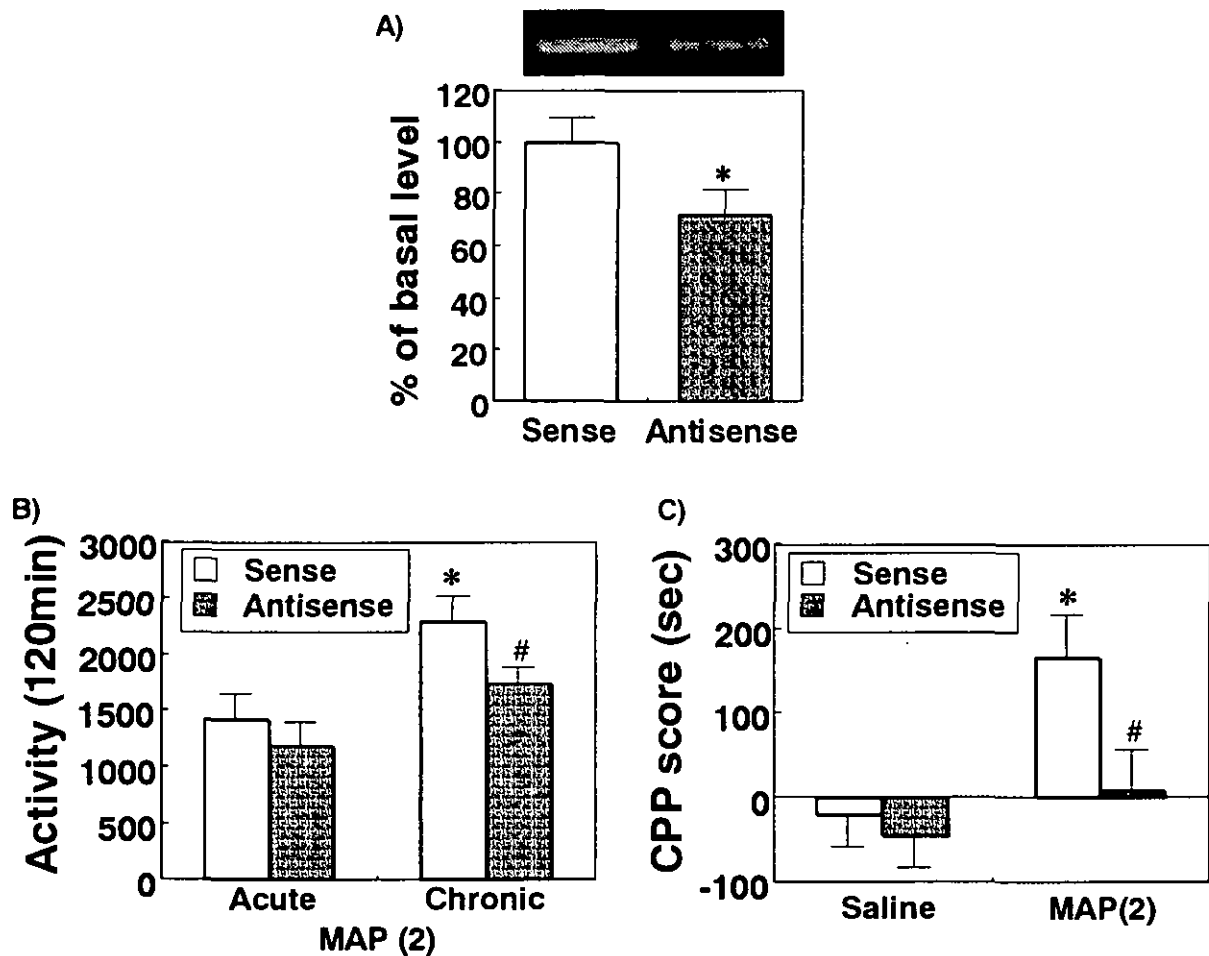


Figure 4. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) on the expression of methamphetamine-induced sensitization in mice. A) Effect of treatment with GILZ antisense (5 nmol/icv, 5 days) on the GILZ mRNA in the mouse midbrain. B) Effect of pretreatment with GILZ antisense on the expression of methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice. C) Effect of pretreatment with GILZ antisense on the expression of methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced rewarding effect in mice. * $P < 0.05$ vs. sense-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$ vs. sense-pretreated chronic treatment with MAP group.

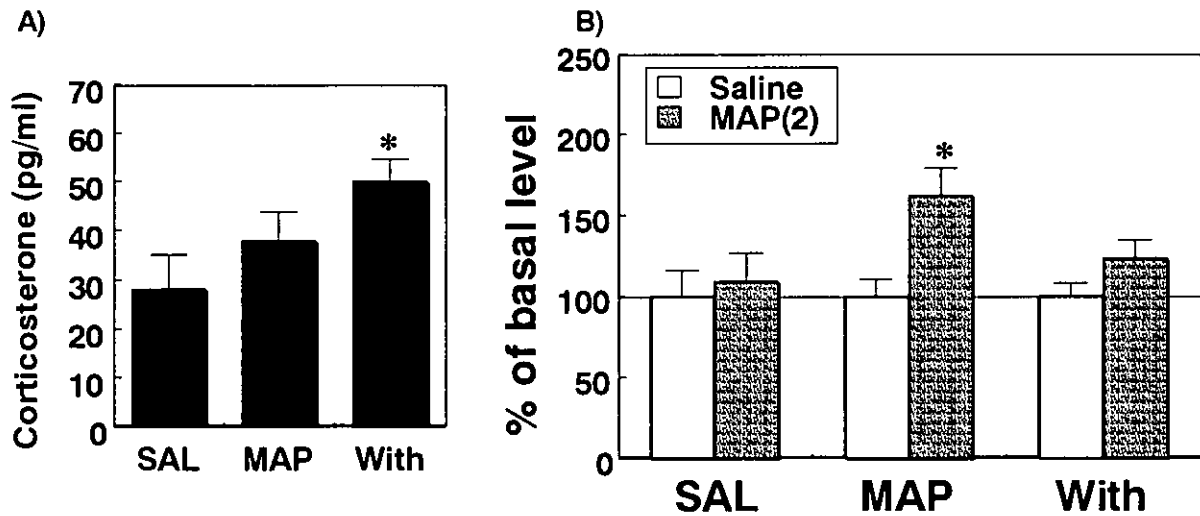


Figure 5. A) Effect of chronic treatment with methamphetamine on the basal plasma concentrations of corticosterone. Plasma concentrations of corticosterone in chronic treatment with methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.) for 7 days. Each column represents the mean plasma concentrations of corticosterone with S.E.M. of 6 animals. B) Effect of the administration of methamphetamine on the basal plasma concentrations of corticosterone. Each column represents the mean plasma concentrations of corticosterone with S.E.M. of 6 animals at 20 min after MAP treatment. SAL: saline, MAP: Chronic treatment with MAP, With: MAP withdrawal. * $P < 0.05$ vs. Sal-treated MAP group. B) Effect of glucocorticoid receptor antagonist mifepristone (15 mg/kg, i.p.) on the expression of MAP (2 mg/kg, s.c.)-induced sensitization in mice. * $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated chronic treatment with MAP group.

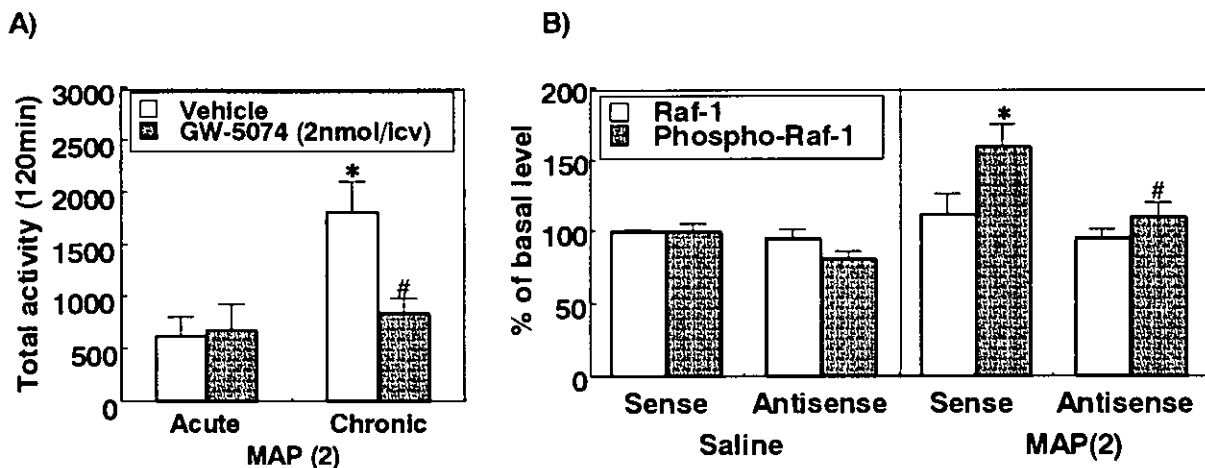


Figure 6. A) Effect of pretreatment with Raf-1 inhibitor GW-5074 on the expression of methamphetamine (MAP)-induced sensitization in mice. Total locomotor activity counts in methamphetamine (MAP 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice by chronic treatment with MAP (2 mg/kg, s.c.) for 6 days. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 12 - 14 animals for 120 min after MAP treatment. * $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated chronic treatment with MAP group. B) Effect of GILZ antisense on chronic treatment with methamphetamine (MAP)-induced phosphorylation of raf-1 in mouse limbic forebrain. * $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated saline group, # $P < 0.05$ vs. vehicle-pretreated chronic treatment with MAP.

低濃度セロトニン連続曝露に伴うL型高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化—大脳皮質神経細胞を用いた解析

分担研究者：大熊 誠太郎

研究協力者：桂 昌司

(川崎医科大学薬理学教室)

〔研究要旨〕

初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度セロトニン (5-HT) を連続曝露した場合のL型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCC) 機能変化を、30mM KCl 誘発性 $[Ca^{2+}]$ 流入、HVCCサブユニットの発現、および $[^3H]$ diltiazem 結合の観点から検討を加えた。5-HT (1 μ M) の連続曝露により $[Ca^{2+}]$ 流入は経時的に増加し、曝露48時間後には有意な流入増加が見られ、この流入増加は曝露後72時間目には plateau に達した。また5-HTは用量依存性に $[Ca^{2+}]$ 流入増加をもたらした。この流入増加は5-HT₁および2受容体拮抗薬であるmethysergideにより用量依存性に抑制され、また5-HT₃受容体拮抗薬であるMDL72222によっても用量依存性に抑制されたが、両拮抗薬を同時に曝露した場合には5-HT連続曝露により誘発される $[Ca^{2+}]$ 流入増加は完全に消失した。5-HT連続曝露により生じた30mM KCl 誘発性 $[Ca^{2+}]$ 流入の増加はnifedipineの同時曝露によって消失したが、P/QおよびN型HVCC拮抗薬では影響を受けなかった。Western blot法により上記HVCCのサブユニットの発現変化を解析したところ、それぞれP/QおよびN型HVCCを構成する $\alpha 1A$ および $\alpha 1B$ サブユニットのみならず、L型HVCCの $\alpha 1C$ および $\alpha 1D$ サブユニットの発現にも変化が認められなかった。さらに $[^3H]$ diltiazem 結合実験を行ったところ、5-HTの連続曝露により $[^3H]$ diltiazem 結合は増加し、この増加は K_d 値の低下に起因していた。これらの成績から、5-HT連続曝露により生じるL型HVCCの機能亢進は5-HT₁、2および3受容体が関与しており、しかもその機能亢進はL型HVCCの $[^3H]$ diltiazemに対する結合親和性の増加に起因することが明らかとなった。

A. 目的

覚醒剤であるコカインやアンフェタミンにより誘発される動物の行動異常は5-HT₃受容体拮抗薬やオピオイド受容体拮抗薬などにより修飾されることが報告されている[1]。L型カルシウムチャネル拮抗薬は身体依存を誘発するエタノール、モルヒネ、ベンゾジアゼピン系薬物、バルビツール酸誘導体などの依存性薬物の退薬症候を減弱する

のみならず[2]、覚醒剤により生じる動物行動などを減弱させることが報告されている[3-5]。

一方、覚醒剤のL型高電位開口性カルシウムチャネルに及ぼす影響についての検討はほとんどなされておらず、心筋などを用いた電気生理学的検討が行われており[6]、コカイン投与が選択的にL型高電位開口性カルシウムチャネルを介するカルシウム電流の増強をもたらすことが報告されている。しかしながら、生化学的、薬理的観点からの検

討を行った成績は報告されていない。

コカインやアンフェタミンは中枢神経系ではシナプス間隙におけるモノアミン量の増加を介してその薬理作用を発現することは周知の通りである。そこで、本研究では 5-HT₁、2 および 3 受容体を有していることが確認されている初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度セロトニン (5-HT) を持続曝露した場合に生じる高電位開口性カルシウムチャネル (HVCC) 機能の変化について検討した。

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[7]。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 10⁻⁵ M 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 5-HT の曝露

神経細胞への 5-HT の曝露は、5-HT 含有培養液を 5-HT の連続曝露中は毎日新鮮なものに交換した。なお、5-HT は光感受性が高いことから、5-HT およびこれを含む培養液などの取り扱い、神経細胞への連続曝露などはすべて遮光下で行った。

3. 神経細胞への [⁴⁵Ca²⁺] 流入の測定

神経細胞への [⁴⁵Ca²⁺] 流入の測定は既報[7]に従って行った。神経細胞を Ca²⁺ free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (10 mM HEPES 含有: KRB-H) とともに、37°C、10 分間の preincubation を行ったのち、buffer を吸引除去し、新鮮な Ca²⁺ free KRB-H を加え、2.7 mM [⁴⁵Ca²⁺]Cl₂ (1 mCi [⁴⁵Ca²⁺]/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 の添加は [⁴⁵Ca²⁺] 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)、 ω -conotoxin GVIA (ω -CTX)、および L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 の添加は [⁴⁵Ca²⁺] の添加の 15 秒前に行った。

4. Immunoblot 法による HVCC サブユニット発現の測定

Immunoblot 法による HVCC の測定は既報[8]に従って行った。培養神経細胞を 4°C 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 *g*, 4°C, 5 分) し、得られた pellet を氷冷した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。次いで、sample buffer (4% sodium lauryl sulfate, 12% β -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 *g*, 4°C, 60 分) を順次行い、得られた上清を実験に供するまで -80°C 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) 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 L、N および P/Q 型 HVCC ? 1 サブユニット、L 型 VDCC ? 2/? 1 サブユニットに対する抗体を 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 : H₂O = 4 : 1 : 5) で洗浄し、coomassie brilliant blue で染色した。

得られた HVCC サブユニットの immunoreactive band の染色強度は、ImageMaster 1D Elite software (Amersham Biotech, Buckinghamshire, England) にて解析した。

5. [³H]Diltiazem 結合実験

[³H]Diltiazem 結合は神経細胞より調整した顆粒画分を用いて、既報[8]に準じて行った。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]diltiazem の存在下で 25°C、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 の非放射性 diltiazem 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. 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。

7. 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. 5-HT 連続曝露による 30 mM KCl 誘発性 [⁴⁵Ca²⁺] 流入の変化

5-HT を 0.001 ~ 3 μM の濃度範囲で神経細胞に 7 2 時間曝露したところ、0.1 μM で有意な 30 mM KCl 誘発性 [⁴⁵Ca²⁺] 流入の増加が認められ、1 μM で 30 mM KCl 誘発性 [⁴⁵Ca²⁺] 流入量は最大値に達し、この流入量は 3 μM でも変化がなかった (Fig. 1)。なお、本研究で用いた 5-HT 濃度は、LDH 漏出率および trypan blue 排泄試験の検討から、細胞毒性を示さないことが確認されている。

5-HT (1 μM) の連続刺激により [⁴⁵Ca²⁺] 流入は経時的に増加し、曝露後 2 4 時間目には有意な増加が観察され、4 8 時間後には流入増加は plateau に達し、この増加は曝露後 7 2 時間目および 1 2 0 時間目においても 4 8 時間目のそれと同程度であった (Fig. 2)。

2. 5-HT 連続曝露による 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加に対する 5-HT 受容体拮抗薬の影響

5-HT (1 μM) の連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加に対し、それぞれ 5-HT₁ および 2 受容体、および 5-HT₃ 受容体拮抗薬である methysergide (MSG) および MDL72222 (MDL) を 5-HT 曝露の直前に培養液中に添加して連続曝露した場合には、5-HT 連続曝露により誘発される 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加は両薬物により用量依存性に抑制されたが (Fig. 3)、それぞれの拮抗薬による抑制作用は概ね 50%程度であり、単独では完全な抑制が生じなかった。一方、両拮抗薬を同時に 5-HT 曝露と共に神経細胞に曝露すると、Fig. 3 に示すように 5-HT 連続曝露により誘発される 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加は完全に消失した。

3. 5-HT 連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加に対する各種 HVCC 拮抗薬の影響

5-HT 連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加は Fig. 4 に示すように、L 型 HVCC 拮抗薬である nifedipine によつてのみ有意に、かつ完全に抑制された。一方、P/Q および N 型 HVCC 拮抗薬は影響を与えなかった。これらから、5-HT 連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加は L 型 HVCC の機能亢進に起因する可能性が示唆される。

4. 5-HT 連続曝露後における Bay k 8644 誘発性^[45Ca²⁺]流入に対する影響

5-HT 連続曝露後に、Bay k 8644 存在下に^[45Ca²⁺]流入を検討したところ、5-HT 非曝露群に比して Bay k 8644 誘発性^[45Ca²⁺]流入は有意に増加していた。

5-HT 曝露群および非曝露群における Bay k 8644 存在下において得られた^[45Ca²⁺]流入の差は、5-HT 曝露群および非曝露群における 30 mM KCl 誘発性^[45Ca²⁺]流入の差に等しかった (Fig. 5)。また、5-HT 連続曝露後に観察された Bay k 8644 誘発性^[45Ca²⁺]流入増加は nifedipine の存在により完全に消失した (Fig. 5)。

5. 5-HT 連続曝露後における各種 HVCC α1 サブユニットの発現変化

5-HT 連続曝露後、神経細胞における各種 HVCC α1 サブユニットの発現にいかなる変化が生じているのかを immunoblot 法を用いて検討した。その結果、P/Q 型、N 型 HVCC の α1 サブユニットのみならず、L 型 HVCC α1 および α2/δ1 サブユニットの発現も、非曝露群との間に有意な差異は認められなかった (Fig. 6)。

同様に 5-HT 連続曝露後 72 時間目における L 型 HVCC の α1F および β4 サブユニットの発現についてそれぞれの mRNA 発現の測定により検討したところ、いずれのサブユニットの mRNA 発現には変化が見られなかった (Fig. 7)。

6. 5-HT 連続曝露後における^[3H]diltiazem 結合の変化

5-HT 連続曝露後の神経細胞から調製した顆粒画分への^[3H]diltiazem 結合は非曝露群のそれに比して、有意な増加を示していた。Scatchard 解析を行ったところ、この結合増加は、Kd 値の減少に起因するものであり、^[3H]diltiazem 結合部位数には変化が認められないことが判明した (Fig. 8)。

D. 考 察

本研究ではコカインやアンフェタミンなどの覚醒剤の長期曝露が神経細胞のL型HVCC機能にいかなる影響を与えるのかを明らかにする目的で、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度5-HTを連続曝露することにより検討を行った。

低濃度5-HTの連続曝露が30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を増加させること、およびこの増加が5-HT受容体拮抗薬により抑制されることから、5-HTの連続曝露により生じる $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加には5-HT受容体が関与している可能性が示唆される。

上述の5-HT連続曝露に伴い生じる30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加が5-HT受容体のいかなるサブタイプにより誘発されるのかを検討するために、5-HT曝露直前に5-HT 1、2受容体拮抗薬であるMSGと5-HT受容体拮抗薬であるMDLを神経細胞に曝露した。その結果、いずれの受容体拮抗薬も有意に5-HT連続曝露に伴い生じる30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加を抑制したが、完全な抑制は認められなかった。一方、これら拮抗薬を同時に曝露した場合には、 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加は完全に消失した。これらの結果は、5-HT連続曝露により誘発される $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加には5-HT 1、2および3受容体が関与していることを意味すると考えられる。

5-HT連続曝露に起因する30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加がHVCCのうちいずれのタイプによるのかを、各種のHVCCに特異的な拮抗薬を用いて検討したところ、5-HT連続曝露による30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加はL型HVCCの機能亢進によるもので、他のHVCCであるP/Q型およびN型HVCCは関与していないことが明らかとなった。L型HVCCが関与していることはL型HVCCの選択的活性化薬であるBay k 8644を用いた本研究結果から

も明らかである。

心筋細胞では、コカインがL型HVCCを介したカルシウム電流を増加させることが報告されて[6]。覚醒剤がシナプス間隙におけるモノアミン量の増加をもたらすこと、および本研究で得られた5-HT連続曝露によるL型HVCC機能の亢進を誘発することを勘案すると、上述の心筋におけるカルシウム電流の増加には、少なくとも5-HT受容体が関与している可能性が考えられる。

本研究では5-HT連続曝露による30 mM KCl誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加がL型HVCCの $[\text{Ca}^{2+}]$ に対する親和性の亢進によるもので、チャンネル蛋白質の量的変化は関与していないことを $[^3\text{H}]$ diltiazem結合実験およびimmunoblot法による検討から明らかにした。一方、コカインを連続投与したラットでは、側坐核神経細胞におけるカルシウム電流はN型HVCCを介するもののみが減少し、P/Q型およびL型HVCCを介するカルシウム電流には変化がないことが報告されている[10]。この研究報告と本研究とでは、HVCCの反応が著しく異なるが、この相違は、本研究では5-HT受容体のみを連続刺激していること、両研究で用いた実験材料が異なること、しかも使用した神経細胞が異なる脳内部位のものであること、などが関係すると思われるが、詳細は不明である。

コカイン中毒者を対象とした臨床研究では、L型HVCC拮抗薬であるnimodipineが5-HTにより誘発された神経障害の一部を改善することが報告されている[11]。本研究で得られたように、5-HT連続曝露により誘発されるL型HVCC機能の変化がこのようなnimodipineの薬理作用と関係している可能性が考えられるが、覚醒剤が5-HTを介して5-HT受容体の活性化を誘発していることから、これら

の臨床研究で得られた結果は本研究の結果と一致するものと考えられる。しかしながら、5-HT による 5-HT 受容体の持続的な活性化に伴う HVCC 機能の変化がいかなる機序によるのかなどの点については、研究報告もきわめて少なく、今後解決すべき問題であるとともに、上述の臨床データを勘案すると、L型 HVCC 機能変化の機序を解明することにより覚醒剤中毒の治療あるいは予防に使用し得る薬物の開発のための重要な基礎的情報を提供し得るものと考えられる。

E. 結 論

本研究の結果から、低濃度 5-HT の連続曝露は 5-HT 1、2 および 3 受容体を介して L型 HVCC のみの機能亢進を誘発し、この亢進は L型 HVCC の [³H]diltiazem 結合に対する親和性の亢進に起因することが判明した。

[参考文献]

- 1) Calcagnetti D.J., Keck B.J., Quatrella L.A., et al.: Blockade of cocaine-induced conditioned place preference: Relevance to cocaine abuse therapeutics. *Life Sci.* 56: 475-483, 1995.
- 2) Little, H.J.: The role of neuronal calcium channels in dependence on ethanol and other sedatives/hypnotics. *Pharmac. Ther.* 50: 347-365, 1991.
- 3) Ansah, T.-A., Wade, L.H., and Shockley, D.C.: Effects of calcium channel entry blockers on cocaine and amphetamine-induced motor activities and toxicities. *Life Sci.* 53: 1947-1956, 1993.
- 4) Martellotta, M.C., Kuzmin, A., Muglia, P., et al.: Effects of the calcium antagonist isradipine on cocaine intravenous self-administration in rats. *Psychopharmacology* 113: 378-380, 1994.
- 5) Licata, S.C., Freeman, A.Y., Pierce-Bancroft, A.F., et al.: Repeated stimulation of L-type calcium channels in the rat ventral tegmental area mimics the initiation of behavioral sensitization to cocaine. *Psycho-pharmacology* 152: 110-118, 2000.
- 6) Premkumar, L.S.: Selective potentiation of L-type calcium channel currents by cocaine in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 56: 1138-1142, 1999.
- 7) Ohkuma S., Katsura M., Higo A., et al.: Peroxynitrite affects Ca²⁺ influx through voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.* 76: 341-350, 2001.
- 8) Katsura, M., Mohri, Y., Shuto, K., et al.: Up-regulation of L-type voltage-dependent calcium channels after long term exposure to nicotine in cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 277: 7979-7988 2002.
- 9) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., et al.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 293: 265-275, 1951.
- 10) Zhang, X.-F., Cooper, D.C., and White, F.J.: Repeated cocaine treatment decreases whole-cell calcium current in rat nucleus accumbens neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 1119-1125, 2002.
- 11) Ross, R.B., Alim, T.N., Fay-McCarthy, M., et al.: Nimodipine pharmaco-therapeutic adjuvant therapy for inpatient treatment of cocaine dependence. *Clin. Neuropharmacol.* 17: 348-358, 1994.

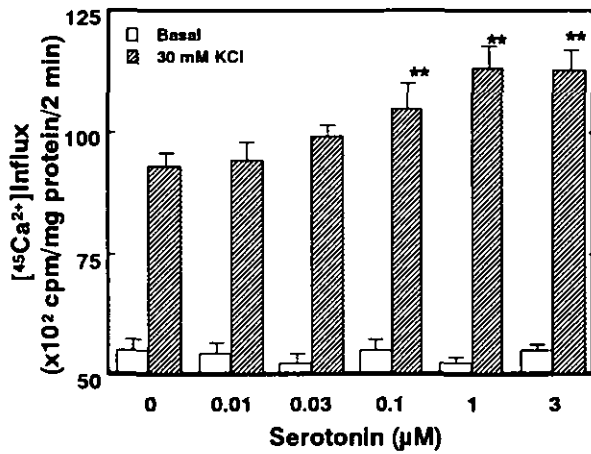


Fig. 1 Changes in 30 mM KCl-stimulated [⁴⁵Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons following exposure to various concentrations of serotonin. The neurons were cultured with various concentrations of serotonin at 37 °C for 3 days. *P<0.05 and **P<0.01, compared with the control value (without treatment of serotonin, Dunnett's test).

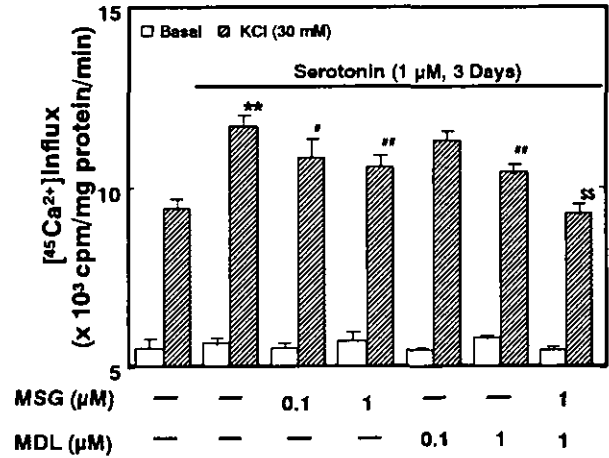


Fig. 3 Effects of methysergide (MSG) and MDL72222 (MDL) on serotonin-induced increase in 30 mM KCl-stimulated [⁴⁵Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons. **P<0.01, compared with the control value (without treatments with serotonin, Bonferroni's test). #P<0.05 and ##p<0.01, compared with the value determined in the presence of serotonin alone (Dunnett's test). §§P<0.01, compared with the value determined in the presence of serotonin alone (Bonferroni's test).

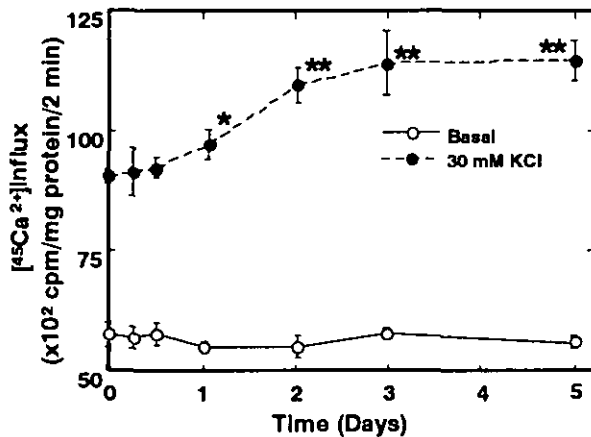


Fig. 2 Time course of changes in 30 mM KCl-stimulated [⁴⁵Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons following exposure to serotonin. The neurons were cultured with 1 µM serotonin at 37 °C for the period indicated in the figure. *P<0.05 and **p<0.01, compared with the control value (without treatment of serotonin, Dunnett's test).

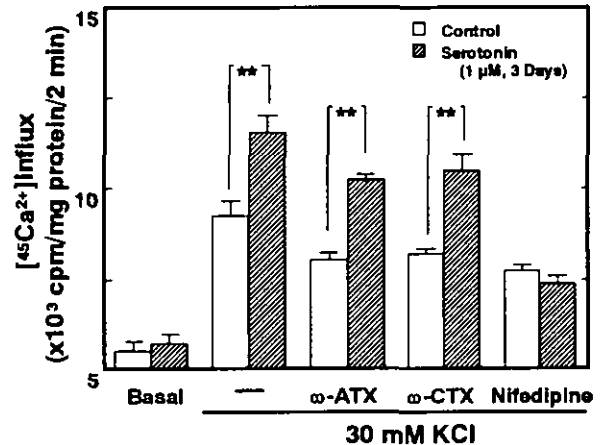


Fig. 4 Effects of various inhibitors for HVCCs on 30 mM KCl-stimulated [⁴⁵Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons following exposure to serotonin. **p<0.01, Bonferroni's test. Drug concentrations: ω-ATX, 1 µM; ω-CTX, 1 µM; nifedipine, 1 µM.

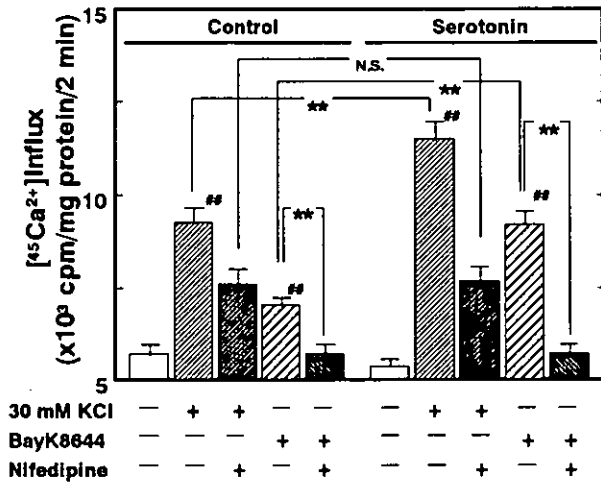


Fig. 5 Effect of nifedipine on Bay K 8644-stimulated [⁴⁵Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons following exposure to serotonin. The neurons were cultured with 1 μM serotonin at 37 °C for 3 days. ^{##}P<0.01, compared with each control value (Bonferroni's test). ^{**}P<0.01, Bonferroni's test. N.S.; not significant. Drug concentrations: Bay K 8644, 1 μM; nifedipine, 1 μM.

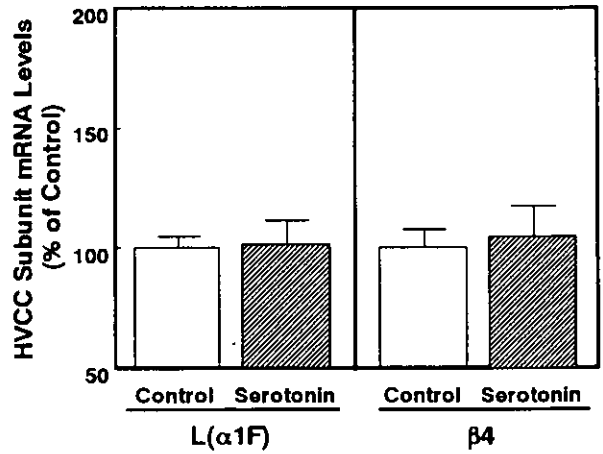


Fig. 7 Effect of serotonin exposure on expression of L-type HVCC subunit mRNA in cerebral cortical neurons. HVCC subunit mRNA expressions were analyzed by RNA blot hybridization. The neurons were cultured with 1 μM serotonin at 37 °C for 3 days.

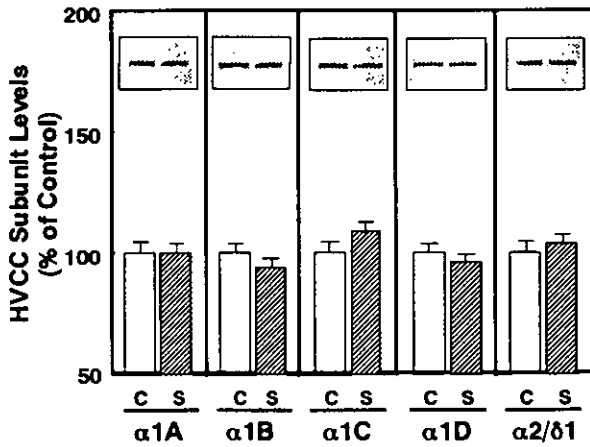


Fig. 6 Effect of serotonin (S) exposure on expression of HVCC subunits in cerebral cortical neurons. The neurons were cultured with 1 μM Serotonin at 37 °C for 3 days. Representative immunoblotting analysis was indicated in each figure.

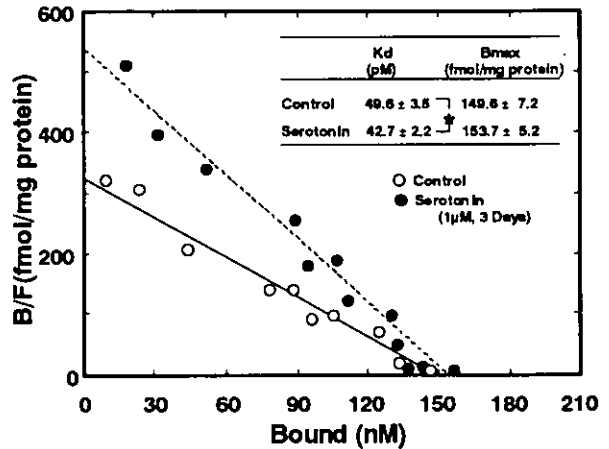


Fig. 8 Scatchard analysis of [³H]diltiazem binding to the particulate fractions from cerebral cortical neurons following exposure to serotonin. *p<0.01 (Bonferroni's test).

覚醒剤の分子作用機序におけるモノアミントランスポーターの役割

分担研究者： 曾良一郎^{1,2}

共同研究者： 沈昊偉²、萩野洋子²、小林秀昭^{1,2}、山下元康¹、福島攝¹、小原可久¹、
山本 敏文^{2,3}、山本秀子²、池田和隆²、沼知陽太郎^{1,2}

(¹ 東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野、² (財) 東京都医学研究機構・精神研・分子精神医学、
³ 横浜市立大大学院総合理学研究科)

【研究要旨】

覚醒剤の一種であるコカイン、メタンフェタミン(MAP)はドーパミントランスポーター(DAT)、セロニントランスポーター(SERT)及びノルエピネフrintランスポーター(NET)と結合することによって、モノアミン神経伝達を変化させる。中枢ドーパミン(DA)神経伝達の変化は覚醒剤の作用機序において重要な役割を果たしているが、DA 以外のモノアミン神経伝達の関与は十分には明らかにされていない。

コカインによる報酬は DAT 完全欠損に SERT 部分あるいは完全欠損が加わることにより消失した¹。これらの報酬試験の結果に対応する脳内モノアミン神経伝達の解析を目的として、脳内微量透析法を用いてコカインに対する線条体、側坐核、前頭前野における細胞外ドーパミン(DA_{ex})、セロニン濃度(5-HT_{ex})の変化を検討し、モノアミンに対応しないトランスポーターによる再取り込み補完作用の存在が示唆された。しかし、コカインの局所投与は、SERTKO マウスにおいては 5-HT_{ex}を増加させたが DATKO マウスにおいては DA_{ex}を増加させなかったことから、残存する DAT がセロニン再取り込みを補完するが、残存する SERT は必ずしもドーパミン再取り込みを補完しないと考えられた。これらの結果から細胞外へのモノアミンの放出・再取り込みは、トランスポーターによる取り込みに加えて複雑な分子機構が予想された。

MAPの逆耐性はDATもしくはSERTの完全欠損では形成されないことから、逆耐性の形成にはDATのみならずSERTも重要な役割を果たしていることを示唆してきた。さらに DAT もしくは SERT を部分欠損した場合は、MAP 逆耐性の表出(expression)には影響しないが、DAT の部分欠損は逆耐性の発展(development)を遅延させることを示し、逆耐性の発展にはDATの正常な発現が必須であることを示唆してきた。この逆耐性の発展に伴う移所運動量の増加とMAPに対するDA_{ex}の上昇を脳内微量透析法を用いて解析したところ、MAP では線条体における DA_{ex}の変化と関連する可能性が示唆された。

これらの結果から覚醒剤の分子作用機序におけるモノアミントランスポーターの役割は、従来想定されていた以上に複雑な分子機構が考えられた。

A. 目的

コカインはモノアミントランスポーターに結合し報酬効果を発揮する。従来、コカインの報酬効果はドーパミントランスポーター(DAT)を介していると考えられていた^{1,2}。しかし、DAT を欠損したノックアウト(KO)マウスでもコカインの報酬は保持され、セロニントランスポーター(SERT)、ノルエピネフrintランスポー

ー(NET)がそれぞれ単独に欠損した KO マウスでも、コカインの報酬効果は保持されていた^{3,6}。我々は、DAT 欠損に SERT 部分あるいは完全欠損が加えるとコカインの報酬は消失することを見出した¹。これらの結果は、コカイン報酬には DAT と SERT が共に関与し、同族トランスポーターの補完作用が存在することを示唆している。我々は、報酬に関するこれらの結果に対応する脳内モノアミン神経伝達の解析を目的と