

- Yamada, K. and Nabeshima, T.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
6. Kushida, S., Hori, N., Kimoto, K., Nitta, A., Nabeshima, T. and Onozuka, M.: Changes of masticatory activity influenced the dopamine release levels in the hippocampus. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
 7. Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrite, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
 8. Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Inhibitory effects of TNF- α and its inducer on morphine-induced rewarding effects and behavioral sensitization. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
 9. Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial cell line-derived neurotrophic factor mutant mice. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)
 10. Wang, D., Noda, Y., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid₂₅₋₃₅ i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)
 11. 串田祥生, 堀紀雄, 木本克彦, 豊田實, 新田淳美, 鍋島俊隆, 小野塚実: 軟性食餌飼育がドパミン遊離量に及ぼす影響. (Effect of Semi-fluid diet breeding on the hippocampal dopamine release.) 第 30 回日本神経科学大会, 第 50 回日本神経化学学会大会, 第 17 回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007.9.10-12)
 12. Tursun Alkam, Atsumi Nitta, Hiroyuki Mizoguchi, Akio Itoh, Toshitaka Nabeshima: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). 第 30 回日本神経科学大会, 第 50 回日本神経化学学会大会, 第 17 回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007.9.10-12)
 13. 溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 糸原重美, 坂野喜子, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与による異常行動とマトリクスメタロプロテアーゼの生理活性変化. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会, 第 19 回日本アルコール精神医学会, 第 10 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 19 年度合同学術総会 (大津, 2007.9.28-29)
 14. 新田淳美, 奥野友香, 曾南, 丹羽美苗, 宮崎雅之, 野田幸裕, 鍋島俊隆: ストレス誘発うつ病モデル動物におけるニコチン連続投与による抗うつ作用. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会, 第 19 回日本アルコール精神医学会, 第 10 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 19 年度合同学術総会 (大津, 2007.9.28-29)
 15. 新田淳美, 古川昭栄, 山田清文, 鍋島俊隆: 疎水性ジペプチドによる神経栄養因子誘導と精神・神経疾患治療薬への可能性. 第 35 回薬物活性シンポジウム (広島, 2007.11.29-30)

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 発明の名称: Akt 活性化剤
(2006 年 8 月 31 日国際公開)
2007 年 8 月 7 日国内移行 (特願 2007-504648)
出願人: 国立大学法人名古屋大学
発明者: 新田淳美, 鍋島俊隆
 - 2) 発明の名称: 精神障害関連遺伝子及びその利用
(2006 年 9 月 8 日国際公開)
2007 年 8 月 16 日国内移行 (特願 2007-505883)
2007 年 9 月 4 日米国移行 (番号未定)
出願人: 国立大学法人名古屋大学

発明者：新田淳美，丹羽美苗，鍋島俊隆

- 3) 発明の名称：脳内酸化抑制剤およびその使用
2007 年 10 月 23 日 国 際 出 願
(PCT/JP2007/070628)

出願人：国立大学法人名古屋大学

発明者：新田淳美，鍋島俊隆

- 4) 発明の名称：抗うつ・抗不安剤
2008 年 1 月 24 日出願 (特願 2008-013630)
出願人：協和醗酵工業株式会社，国立大学法人
名古屋大学
発明者：新田淳美，日比陽子，鍋島俊隆，森下
幸治，池田武史

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

乱用薬物への渴望（薬物探索行動）の再燃の脳内機序解明 およびその治療薬開発に関する研究

分担研究者：山本経之¹

研究協力者：縄田陽子¹、平仁田尊人²

¹長崎国際大学薬学部薬理学研究室、²米国国立衛生研究所薬物乱用研究所

[研究要旨]

薬物依存症患者はストレス負荷により薬物への渴望を誘発し、薬物探索行動を誘発する事が知られている。本研究ではこの点に着目し、覚せい剤 **methamphetamine (MAP)** の渴望の再燃に対するストレス関連因子である副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (**corticotropin-releasing factor; CRF**) の関与を追究した。実験は、ラットがレバーを1回押せば、MAP が薬物関連刺激 (**cue**) と共に微量注入される薬物自己投与実験法を用いて行った。10日間のMAP自己投与実験を行い（獲得過程）、その後MAPを生理食塩液に置換し自己投与実験 (**cue** 呈示なし) を続けた（消去過程；MAP退薬）。レバー押し行動が減弱した時点で、薬物関連刺激の呈示または少量のMAP投与によりレバー押し行動が再発するが、この反応をMAP探索行動（生理食塩液自己投与下）の指標とした。MAP探索行動は、CRF受容体拮抗薬 α -Helical CRF_{9,41} の脳室内、側坐核および扁桃体内への微量注入によって有意に抑制された。一方、逆にCRFの脳室内、側坐核および扁桃体内への微量注入は、ラットのレバー押し行動を有意に増加させMAP探索行動を惹起した。この脳室内へのCRF微量注入によるMAP探索行動は、CRF受容体拮抗薬 α -Helical CRF_{9,41} の側坐核ならびに扁桃体への微量注入によって抑制された。しかしながらこの作用は、コルチコステロン合成酵素阻害薬である **metyrapone** では抑制されなかった。

以上の今回の知見から、MAP探索行動はCRF受容体の活性化を介して発現するが、コルチコステロンの生成を介した反応ではない事が明らかとなった。

A. 研究目的

薬物依存症患者では、長期断薬後においても薬物への渴望が容易に再燃する事が知られている。この渴望再燃を誘発する因子として、①薬物の再使用、②薬物を使用していた環境への暴露および、③ストレス負荷、の3種類が挙げられる。近年、視床下部一下垂体－副腎系 (**hypothalamic-pituitary-adrenal system; HPA系**) を構成しているCRF (**corticotropin releasing factor**) ならびにコルチゾールは精神疾患との密接な関連性を有している

事が指摘されている^{1), 3), 4), 5), 10)}。一方、薬物依存症患者では健常者と比較し血中のコルチゾール量が増加している事が分かっている¹¹⁾。さらに、ストレス負荷による渴望の再燃時には血清中のACTHならびにコルチゾール量の増加が起こる事も報告されている⁹⁾。これらの知見から、薬物依存症患者の渴望再燃にはHPA系が関与している可能性が強く示唆されるが、その詳細なメカニズムは明らかではない。

本年度は、覚せい剤 **methamphetamine (MAP)**

自己投与実験法を用いて、MAP 探索行動の発現に対し CRF が関与するか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験には Wistar 系雄性ラット〔株 日本エスエルシー、250-350g〕を使用した。

2. 使用薬物

methamphetamine [MAP : (株) 大日本製薬]、は生理食塩液〔株 大塚製薬〕に溶解した。また、Corticotropin Releasing Factor human, rat (Sigma-Aldrich, Inc.) ならびに α -helical CRF₉₋₄₁ (Sigma-Aldrich, Inc.) は蒸留水に溶解した。

3. 薬物自己投与実験法

MAP 自己投与訓練に先立ち、ラットはあらかじめ餌ペレットを正強化子としたレバー押し行動を獲得させた。その後自己投与用のカテーテルの静脈内留置手術を行った。カテーテルはシラスティックカテーテル〔外径 1.0 mm、内径 0.5 mm ; 株 カネカメディクス〕を使用し、ラットの右頸静脈から挿入し、先端を心耳の入り口直前に留置した。実験には 2 つのレバーが装着されたオペラント箱〔29 cm × 23 cm × 33 cm ; 株 ニューロサイエンス〕を使用した。ラットがレバーを 1 回押せば、MAP (0.02 mg/100 μ L/infusion) が薬物関連刺激 (drug-associated cue : 音; 85 dB/2.9 kHz, 光; 200 lux) と共に微量注入される。10 日間の MAP 自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換した自己投与実験 (cue 呈示なし) を続けた (消去過程)。レバー押し行動が減弱した時点で、薬物関連刺激の呈示および MAP-priming 投与を行い“渴望”の指標としての MAP 探索行動 (生理食塩液自己投与下でのレバー押し反応) の発現の有無を調べた。

4. エサを正の強化子としたオペラント課題

薬物自己投与実験直後に food pellet (45 mg; Holton Industries Co. LTD.) を正強化子としてオペラント行動実験 (fixed ratio 1) を行い、ラットが 30 個の food pellet を獲得するまでの時間 (experimental time) を測定した。1200 秒を cut off time とした。

7. 統計学的処理

値は全て平均 \pm 標準誤差で表した。二群間の有意差検定には、Bonferroni / Dunn test を用いた。

C. 研究結果

1. MAP 探索行動発現における CRF 受容体の関与

MAP 自己投与最終日のラットのレバー押し回数は 35.8 ± 5.2 回であった。その後 MAP を生理食塩液に置換するとそのレバー押しは徐々に低下し、5 日目のレバー押し回数は 3.6 ± 0.7 回となった。退薬 6 日目に (生理食塩液自己投与下)、MAP 関連刺激または MAP (1.0 mg/kg, i.p.) priming 投与をすると、有意なレバー押し回数の増加が認められ、MAP 探索行動が発現した。これら 2 つの誘発因子によって発現した MAP 探索行動は、CRF 受容体拮抗薬 α -helical CRF₉₋₄₁ (10 μ g/side) の脳室内投与によって有意に抑制された (Fig. 1)。

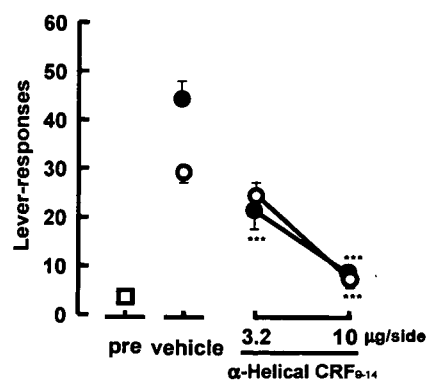


Figure 1. Effects of intraventricular administration of α -Helical CRF₉₋₄₁ on the reinstatement of MAP seeking behavior. Open squares, open and closed circles represent groups given pre, MAP-associated cues, and MAP-priming injections. *** $p < 0.001$, compared with the cue and MAP-priming injection alone.

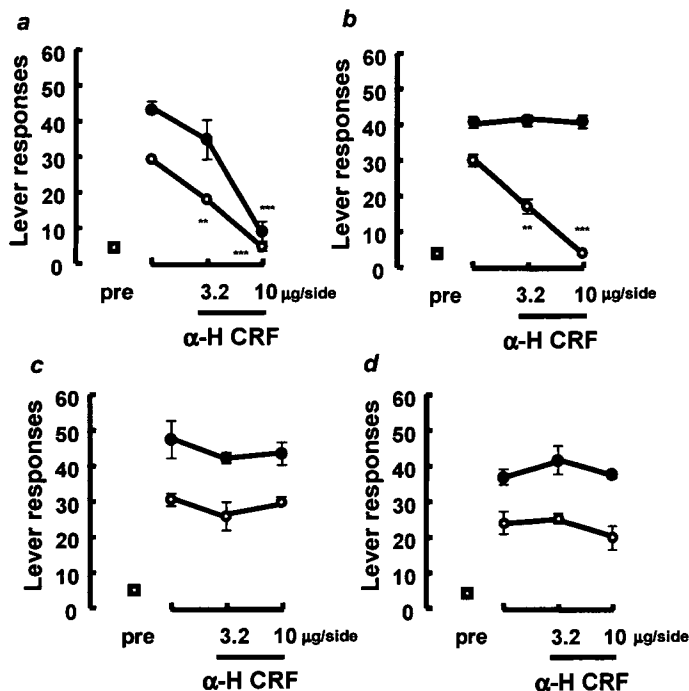


Figure 2. Effects of intracranial α -Helical CRF₉₋₄₁ injected into the a, nucleus accumbens, b, amygdala, c, prefrontal cortex and d, hippocampus on the reinstatement of MAP seeking behavior. Open squares, open and closed circles represent groups given pre, MAP-associated cues, and MAP-priming injections. *** $p < 0.001$, compared with the cue and MAP-priming injection alone.
 α -H CRF: α -Helical CRF₉₋₄₁

α -helical CRF₉₋₄₁ の脳内作用部位を調べる目的で、脳実質内投与を試みた。MAP 関連刺激呈示によって発現する MAP 探索行動は、 α -helical CRF₉₋₄₁ (10 μ g/side) の側坐核ならびに扁桃体内への微量注入によって有意に抑制された (Fig. 2a、2b)。一方、MAP priming 投与によって発現する MAP 探索行動は、 α -helical CRF₉₋₄₁ (10 μ g/side) の側坐核内への微量注入によって抑制されたが、扁桃体内への微量注入では抑制されなかった (Fig. 2a、2b)。前頭前皮質ならびに海馬内への α -helical CRF₉₋₄₁ (10 μ g/side) 微量注入は、いずれの MAP 探索行動も抑制しなかった (Fig. 2c、2d)。

2. CRF 投与による MAP 探索行動の発現

MAP 自己投与後の MAP 退薬 6 日目の CRF (3.2 μ g/side)の脳室内微量注入により、レバー押し行動は有意に増加し、MAP 探索行動が誘発された (Fig. 3a)。同様に、側坐核ならびに扁桃体内への微量注入は、MAP 探索行動を誘発した (Fig. 3b、

3c)。しかしながら、前頭前皮質ならびに海馬内への微量注入では、MAP 探索行動は誘発しなかった (Fig. 3d、3e)。

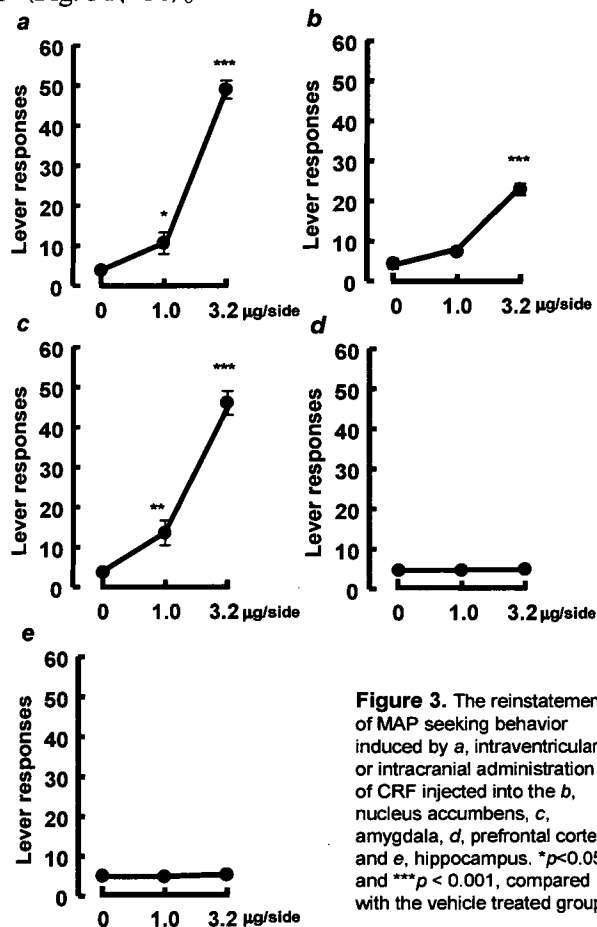


Figure 3. The reinstatement of MAP seeking behavior induced by a, intraventricular or intracranial administration of CRF injected into the b, nucleus accumbens, c, amygdala, d, prefrontal cortex and e, hippocampus. * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$, compared with the vehicle treated group.

この CRF 脳室内微量注入による MAP 探索行動は、側坐核 (Fig. 4a) ならびに扁桃体 (Fig. 4b) 内への α -helical CRF₉₋₄₁ 微量注入によって有意に抑制された。

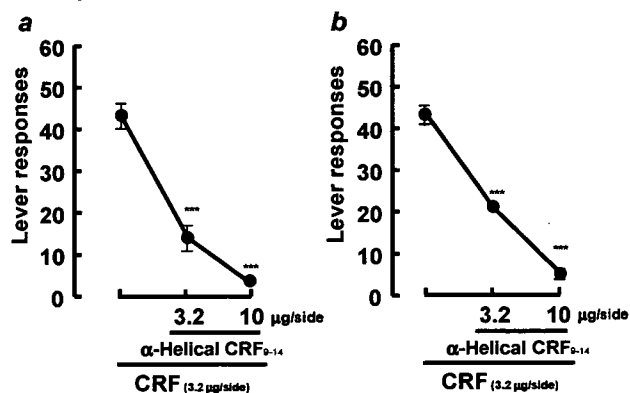


Figure 4. Effects of intracranial α -Helical CRF₉₋₄₁ injected into the a, nucleus accumbens and b, amygdala on the reinstatement of MAP seeking behavior induced by CRF administration. *** $p < 0.001$, compared with the CRF injection alone.

3. CRFによって発現するMAP探索行動に対するコルチコステロン合成酵素阻害薬の作用

CRF 脳室内投与によって発現するMAP探索行動は、コルチコステロン合成酵素阻害薬メチラポン (10-100 mg/kg, i.p.) 投与では抑制されなかった (Fig. 5)。

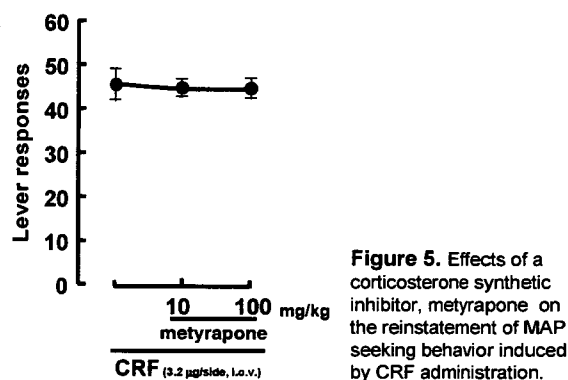


Figure 5. Effects of a corticosterone synthetic inhibitor, metyrapone on the reinstatement of MAP seeking behavior induced by CRF administration.

4. MAP 摂取行動に及ぼす α -helical CRF₉₋₄₁の作用

MAP 自己投与実験 10 日目におけるMAP摂取行動は、 α -helical CRF₉₋₄₁の脳室内投与によって全く影響を受けなかった (Fig. 6)。

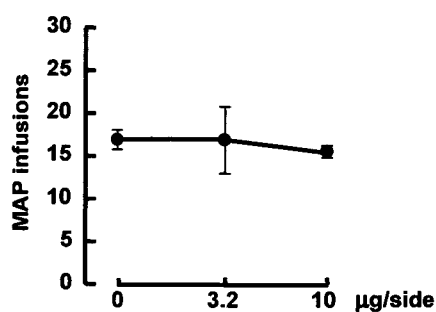


Figure 6. Effects of intraventricular administration of α -Helical CRF₉₋₄₁ on MAP taking behavior.

D. 考察

MAP priming 投与ならびにMAP関連刺激によって惹起されるMAP探索行動は、いずれもCRF受容体拮抗薬 α -helical CRF₉₋₄₁の脳室内投与によって抑制された。この結果から、MAP探索行動の発現はCRF受容体の活性化によって起こる事が示唆される。さらに、脳実質内微量注入実験の結

果から、MAP関連刺激呈示によるMAP探索行動発現では、少なくとも側坐核ならびに扁桃体でのCRFが、またMAP priming 投与によるMAP探索行動発現では側坐核でのCRFが促進的な役割を演じている事が分かった。今回、扁桃体内への α -helical CRF₉₋₄₁微量注入によって、MAP priming 投与によるMAP探索行動は抑制されなかった。また同様にリドカインの扁桃体内微量注入によってもMAP priming 投与によるMAP探索行動発現は影響を受けない⁶⁾。これらの知見はMAP priming によるMAP探索行動発現には扁桃体の関与がない事を示している。さらに、CRF単独投与によるMAP探索行動の発現も、側坐核ならびに扁桃体が重要である事が示唆された。このCRFによるMAP探索行動は、 α -helical CRF₉₋₄₁によって抑制されたが、コルチコステロン合成酵素阻害薬では抑制されなかった。この事から、MAP探索行動の発現にはコルチコステロン/コルチゾールが関与していない事が分かる。同様に、ヘロイン探索行動も、 α -helical CRF₉₋₄₁によって抑制されるが、コルチコステロンの合成酵素阻害薬では抑制されない事が報告され、同様の機序が推察される⁸⁾。海馬破壊による記憶障害はコルチコステロン合成酵素阻害薬によって改善される事から、この障害はコルチコステロンを介して起こる事が分かっている⁷⁾。一方、MAP摂取行動は、 α -helical CRF₉₋₄₁によって全く影響を受けなかった。脳内報酬系に關与するドパミン受容体の拮抗薬は、コカイン摂取行動ならびに探索行動共に抑制する事が報告されている²⁾。CRFのMAP探索行動ならびに摂取行動に対する関与は、ドパミンのそれとは異なる事が明らかとなった。

E. 結論

MAP探索行動は、CRF受容体の活性化により発現するがその反応はコルチコステロンの生成を介していない事が示唆される。また、CRF/CRF

受容体は MAP 探索行動の発現に関与するが、MAP 摂取行動には関与しない事が示唆された。

【参考文献】

- 1) Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB.: The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*, **160**: 1-12, 1999
 - 2) Bachtell RK, Whisler K, Karanian D, Self DW.: Effects of intra-nucleus accumbens shell administration of dopamine agonists and antagonists on cocaine-taking and cocaine-seeking behaviors in the rat. *Psychopharmacology*, **183**: 41-53, 2005
 - 3) Baker DG, Ekhtor NN, Kasckow JW, Dashevsky B, Horn PS, Bednarik L, Geraciotti TD.: Higher levels of basal serial CSF cortisol in combat veterans with posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, **162**: 992-994, 2005
 - 4) Gold PW, Gabry KE, Yasuda MR, Chrousos GP.: Divergent endocrine abnormalities in melancholic and atypical depression: clinical and pathophysiologic implications. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, **31**: 37-62, 2002
 - 5) Griebel G, Simiand J, Steinberg R, Jung M, Gully D, Roger P, Geslin M, Scatton B, Maffrand JP, Soubrie P.: 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *J Pharmacol Exp Ther.* **301**: 333-345, 2002
 - 6) Hiranita T., Sakimura K., Nawata Y., Anggadiredja K., Yamamoto T.: The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**: 8523-8527, 2006
 - 7) Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL.: Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci.*, **4**: 1169-1171, 2001
 - 8) Shaham Y, Funk D, Erb S, Brown TJ, Walker CD, Stewart J.: Corticotropin-releasing factor, but not corticosterone, is involved in stress-induced relapse to heroin-seeking in rats. *J Neurosci.*, **17**: 2605-2614, 1997
 - 9) Sinha R, Talih M, Malison R, Cooney N, Anderson GM, Kreek MJ.: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology.* **170**: 62-72, 2003.
 - 10) Tezval H, Jahn O, Todorovic C, Sasse A, Eckart K, Spiess J.: Cortagine, a specific agonist of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1, is anxiogenic and antidepressive in the mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 9468-9473, 2004
 - 11) Wisniewski AB, Brown TT, John M, Cofranceso J Jr, Golub ET, Ricketts EP, Wand G, Dobs AS.: Cortisol levels and depression in men and women using heroin and cocaine. *Psychoneuroendocrinology.* **31**: 250-255, 2006
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) 山本経之、縄田陽子、當原真奈美、脳内 endocannabinoid の異常性に基づくマウスの知的機能障害、*分子精神医学*, **7**: 83-84, 2007
 - 2) 山本経之、行動薬理学的側面からみた動物モデルの意義・役割・問題点、*日薬理誌*, **130**: 94-96 (2007)
 - 3) 山本経之、カンナビノイド受容体—中枢神経系における役割、*日薬理誌*, **130**: 135-140 (2007)

2. 学会発表

- 1) Hiranita, T., Nawata, Y., Anggadiredja, K and Yamamoto, T.: Attenuation of methamphetamine-seeking behavior by a cannabinoid CB1 receptor antagonist via the activation of nicotinic transmission in the prelimbic cortex, The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 69th Annual Meeting (Quebec City, Canada, 2007, June)
- 2) Nawata, Y., Hiranita, T., Kitaichi, K. and Yamamoto, T.: The involvement of the cannabinoid system in drug-seeking behavior and cognitive impairment after MDMA withdrawal, The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 69th Annual Meeting (Quebec City, Canada, 2007, June)
- 3) 縄田陽子、北市清幸、山本経之、認知機能障害における内因性カンナビノイドならびにアラキドン酸カスケードの関与、第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会合同年会（札幌、2007年7月）
- 4) 山本経之、シンポジウム：「鎮痛ターゲットとしてのカンナビノイドレセプタの可能性」、内在性カンナビノイドの役割とその破綻－創薬としての可能性－を探る、第28回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム（札幌、2007年8月）
- 5) 山本経之、シンポジウム：カンナビノイド－毒変じて薬となる？－行動薬理的側面からみた中枢神経系における内因性カンナビノイドの機能的役割、平成19年度北陸大学学術フロンティア公開シンポジウム（金沢、2007年9月）
- 6) 山本経之、平仁田尊人、MAP探索行動の発現における前頭前皮質／側坐核でのACh受容体ならびにCB1受容体の関与、平成19年度北陸大学学術フロンティア公開シンポジウム（金沢、2007年9月）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2007-091379 「薬物依存症治療薬 [エダラボン]」；(2007年3月30日)

乱用薬物による依存形成における視床下部神経ペプチドの役割

分担研究者：鈴木 勉

研究協力者：成田 年，鈴木雅美

（星薬科大学 薬品毒性学教室）

[研究要旨]

本研究では、腹側被蓋野内 orexin 神経に焦点を当て、orexin 神経系による中脳辺縁 dopamine (DA) 神経系の活性化ならびに morphine 報酬効果発現機構における orexin 神経系の役割を詳細に検討した。まず、免疫染色法にて、morphine 精神依存形成に重要な役割を担う腹側被蓋野において、ほとんどの orexin 受容体が DA 神経上に発現していることを確認した。また、DA 神経のマーカーである tyrosine hydroxylase に陽性のマウス由来初代培養神経細胞を用いて、orexin による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定したところ、orexin の処置により濃度依存的、かつ著明な神経細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が認められた。そこで、morphine の精神依存形成における orexin の関与を明らかにするため選択的 orexin 受容体拮抗薬 1-(2-methylbenzoxazol-6-yl)-3-[1.5]-naphthyridin-4-yl urea (SB334867A) を用いて morphine 誘発報酬効果発現に対する影響を検討した。その結果、morphine 誘発報酬効果は SB334867A を腹側被蓋野へ前処置することにより有意に抑制された。しかしながら、黒質へ SB334867A を前処置してもこのような抑制は認められなかった。さらに、prepro-orexin-knockout マウスを用いて morphine 誘発報酬効果発現の有無を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる morphine の用量に依存した報酬効果の発現は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて全く認められなかった。そこで、prepro-orexin-knockout マウスを用いて側坐核における morphine 誘発 DA 遊離の増加を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる側坐核での DA 遊離量の増加は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて有意に抑制された。これらのことから、中脳辺縁 DA 神経系を介した morphine 誘発報酬効果の発現には、腹側被蓋野に投射する orexin 神経系の活性化も関与している可能性が明らかとなった。

以上、本研究の結果から脳内 orexin 神経系は DA 神経上に発現する orexin 受容体を介して興奮性細胞内情報伝達を引き起こすことにより、直接的かつ促進的に DA 神経系の活動を調節し、神経終末において DA 遊離を促すことで、精神依存などの情動行動の発現を一部調節している可能性が明らかとなった。また、脳内 orexin 神経系は morphine のような opioid によってその神経活動が高められることにより orexin を遊離し、中脳辺縁 DA 神経系を興奮性に調節することで opioid が引き起こす精神依存形成に一役を担う可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

オーファンレセプターの内因性リガンドと

して同定された orexin は、前駆体タンパク質である prepro-orexin から生成され、7 回膜貫

通型 G タンパク共役型受容体に結合し、摂食や覚醒などの生理作用を示す神経ペプチドとして知られている。一方、dopamine (DA) は依存性薬物による精神依存形成のみならず情動反応や認知、さらには摂食などの多くの中枢神経機能を制御する重要な神経伝達物質として知られている。しかしながら、これまでに orexin 神経系と dopamine 神経系の相互作用を示唆する報告は少なく、また依存性薬物による中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化に対する orexin 神経系の介在に関しては全く報告がない。

そこで本研究では、腹側被蓋野内 orexin 神経に焦点を当て、orexin 神経系による中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化ならびに morphine 報酬効果発現機構における orexin 神経系の役割を詳細に検討した。

B. 研究方法

実験には、SD 系雄性ラット、ICR 系雄性マウス、orexin ノックアウトマウスおよびその野生型マウス C57BL/6J 系を使用した。薬物により誘発される報酬効果は conditioned place preference 法により測定し、自発運動量は tilting cage 法に従って評価した。また、orexin の発現分布は、RT-PCR 法および免疫組織染色法に従い確認し、orexin 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化は fluo-3 法に従い測定した。さらに、orexin 誘発 G タンパク質活性化作用は、 $[^{35}S]GTP\gamma S$ binding assay 法に従って測定した。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行なった。

C. 研究結果および考察

まず、依存性薬物による精神依存形成や情動

行動発現に重要な役割を果たすことが知られている帯状回、側坐核、腹側被蓋野、扁桃体および視床下部、ならびに疼痛制御に重要な役割を果たす橋/延髄および脊髄における orexin の発現分布を RT-PCR 法により検討した。その結果、orexin の前駆体である prepro-orexin mRNA の発現はいずれの部位においても認められるものの、特に視床下部における発現が顕著であった。そこで、これらの部位における機能的 orexin 受容体の分布について検討を行う目的で、orexin A および orexin B による G タンパク質活性化作用を検討したところ、各脳部位において有意な orexin A および B 誘発 G タンパク質活性化作用が認められた。次に、DA 神経のマーカーである tyrosine hydroxylase に陽性のマウス由来初代培養神経細胞を用いて、orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定したところ、orexin の処置により濃度依存的かつ著明な神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた。一方、グリア細胞の一つであるアストロサイトにおける $[Ca^{2+}]_i$ の変化について検討したところ、orexin の処置ではいずれの濃度によってもアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ に変化が認められなかった。そこで次に、初代培養神経細胞を用いて orexin による神経細胞内 Ca^{2+} 応答における G タンパク質の関与について検討した。その結果、orexin A は $G_{q/11}\alpha$ サブユニットを、orexin B は $G\beta$ サブユニットを介して $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示した。また、この orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、phospholipase C (PLC) 阻害薬 1-[6-[[[(17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U-73122)、protein kinase C (PKC) 阻害薬 chelerythrine の前処置により有意に抑制された。しかしながら、これらの反応は、extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) 阻害薬である 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059) を前処

置しても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。一方、orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、小胞体 Ca^{2+} 枯渇薬である thapsigargin ならびに電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害薬である nifedipine の前処置によっても有意に抑制された。そこで次に、orexin による報酬効果発現ならびに DA 遊離機構に PKC が関与するか否かについて検討を行ったところ、orexin A ならびに orexin B 誘発報酬効果発現ならびに側坐核における DA 遊離は、chelerythrine の前処置により有意に抑制された。以上の結果から、腹側被蓋野における orexin は、 $G_{q/11}\alpha$ あるいはおそらく G_i タンパク質の $G\beta\gamma$ サブユニットを介して PLC/PKC 経路を活性化させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで、中脳辺縁 DA 神経系の活動性を直接的かつ促進的に調節し、DA 神経が関与する情動行動の発現を一部調節している可能性が明らかとなった。次に、orexin を腹側被蓋野内へ処置した時の側坐核における DA ならびにその代謝物量の変化を検討したところ、有意な DA ならびにその代謝物量の増加が認められた。以上の結果から、脳内 orexin 神経系は中脳辺縁 DA 神経系の機能を促進的に調節し、DA の遊離を増加させていることが明らかとなった。

一般的に、依存性薬物 morphine は中脳辺縁 DA 神経系を活性化させることにより、精神依存を形成することが知られている。そこで本研究では、morphine 誘発報酬効果の発現における腹側被蓋野内 orexin 神経系の役割を検討した。まず、選択的 orexin 受容体拮抗薬 1-(2-methylbenzoxazol-6-yl)-3-[1.5]-naphthyridin-4-yl urea (SB334867A) を用いて morphine 誘発報酬効果発現に対する影響を検討したところ、morphine 誘発報酬効果は SB334867A を腹側被蓋野へ前処置することにより有意に抑制された。しかしながら、黒質へ SB334867A を

前処置してもこのような抑制は認められなかった。さらに、prepro-orexin-knockout マウスを用いて morphine 誘発報酬効果発現の有無を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる morphine の用量に依存した報酬効果の発現は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて全く認められなかった。また、lithium 誘発嫌悪効果についても検討したところ、prepro-orexin-knockout マウスにおいて認められる lithium 誘発嫌悪効果の発現は、野生型マウスと比較してなんら変化は認められなかった。そこで、prepro-orexin-knockout マウスを用いて側坐核における morphine 誘発 DA 遊離の増加を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる側坐核での DA 遊離量の増加は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて有意に抑制された。これらのことから、中脳辺縁 DA 神経系を介した morphine 誘発報酬効果の発現には、腹側被蓋野に投射する orexin 神経系の活性化も関与している可能性が明らかとなった。これらのことから、morphine 誘発報酬効果ならびに自発運動促進作用の発現に対して、脳内 orexin 神経系が促進的に調節を行なっている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究の結果から、脳内 orexin 神経系は DA 神経上に発現する orexin 受容体を介して興奮性細胞内情報伝達を引き起こすことにより、直接的かつ促進的に DA 神経系の活動性を調節し、神経終末において DA 遊離を促すことで、精神依存などの情動行動の発現を一部調節している可能性が明らかとなった。また、脳内 orexin 神経系は morphine のような opioid によって、その神経活動が高められることにより orexin を遊離し、中脳辺縁 DA 神経系を興奮的に調節することで opioid が引き起こす精神

依存形成に一役を担う可能性が明らかとなった。

[参考文献]

Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine.: M. Narita, Y. Nagumo, S. Hashimoto, M. Narita, J. Khotib, M. Miyatake, T. Sakurai, M. Yanagisawa, T. Nakamachi, S. Shioda and T. Suzuki, *J. Neurosci.*, 26, 398-405 (2006).

F. 研究発表

1. 論文発表

Implication of protein kinase C in the orexin-induced elevation of extracellular dopamine levels and rewarding effect.: M. Narita, Y. Nagumo, M. Miyatake, D. Ikegami, K. Kurahashi and T. Suzuki, *Eur. J. Neurosci.*, 25, 1537-1545 (2007).

2. 学会発表

鈴木雅美、成田 年、南雲康行、新倉慶一、尾関あゆみ、鈴木 勉・脳内報酬系における視床下部ネットワークに関与する神経ペプチドの役割・第 37 回 日本神経精神薬理学会・札幌・2007 年 7 月 12 日

乱用薬物に共通の依存症発症因子に対する新規 Ca^{2+} 動態調節剤の 治療への応用

分担研究者：大熊誠太郎

研究協力者：桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏
(川崎医科大学薬理学教室)

[研究要旨]

本研究では、覚醒剤精神依存形成過程における L 型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) の機能亢進の詳細と、この亢進に対する ryanodine 受容体活性化の関与について、methamphetamine (METH) 誘発精神依存マウス、および METH を連続曝露した初代培養大脳皮質神経細胞 (神経細胞) を用いて、行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。METH による報酬効果の形成および発現は、L 型 HVCC 阻害薬 (nifedipine) の処置により完全に消失した。この METH 誘発報酬効果獲得マウスの側坐核あるいは腹側披蓋野を含む領域、および大脳皮質前頭前野領域において、膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1\text{C}$ および $\alpha 2/\delta 1$ subunits 蛋白質の有意な増加が認められた。さらに、このマウス各脳部位より得られた顆粒画分において、L 型 HVCC への ^3H PN200-110 結合量の有意な増加が認められた。同様に、神経細胞への METH の連続曝露は、30 mM KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の有意な増加を生じ、この増加は nifedipine、細胞内 Ca^{2+} キレート剤 (BAPTA/AM) および非特異的 ryanodine 受容体拮抗薬 (dantrolene) の共存により完全に消失したが、P/Q 型および N 型 HVCC 阻害薬はこの増加に影響を与えなかった。L 型 HVCC 機能亢進に対する Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) 機構の関与について検討を加えたところ、METH 誘発報酬効果獲得マウスの側坐核あるいは腹側披蓋野を含む領域、および大脳皮質前頭前野領域のいずれの領域においても、膜結合型 ryanodine 受容体 subtype 2 の蛋白発現量の有意な増加が認められた。このマウス各脳部位より調整した P_3 画分において、ryanodine 受容体に対する ^3H ryanodine 結合の B_{max} の増加が観察された。METH による報酬効果の形成および発現は、dantrolene の処置により完全に消失した。さらに、METH 誘発精神依存を獲得したマウス顆粒画分における ^3H PN200-110 結合の有意な増加は、dantrolene の前処置により完全に消失した。以上の成績より、METH 誘発精神依存の形成および発現には、ryanodine 受容体の活性化を介した CICR 機構の機能亢進と、これに続く細胞膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1\text{C}$ および $\alpha 2/\delta 1$ subunits 蛋白発現の増加により L 型 HVCC の機能亢進が生じることが明らかとなった。さらに、本研究成果より dantrolene および ryanodine 受容体拮抗薬は精神依存形成時および獲得後の治療薬としての有用性が期待される。

A. 研究目的

Methamphetamine (METH)などの規制薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかし、実験条件の相違などから得られる成績には統一性が認められず、未だ依存形成機序の本体を解明するには至っていないのが現状である^{2,9)}。

薬物依存モデル動物および薬物依存発症患者に見られる症候の一部は、使用された依存性薬物により症状の発現程度に違いは認められるものの極めて類似している。したがって、依存性薬物摂取による精神依存の形成過程およびその発現に至る機序は、最終的に共通の神経化学的経路を介している可能性が考えられる。薬物依存成立に関連する諸種の生化学的変化のうち、細胞内 Ca^{2+} 動態変化は比較的共通の変化である可能性が高いと考えられている。例えば、アルコール (EtOH) 依存動物より得られた脳組織および EtOH を連続曝露した神経細胞のいずれの膜画分においても、放射性 dihydropyridene 系薬物の結合量が著明に増加すること^{7,8)}、PC12 細胞に EtOH を連続曝露により細胞内 Ca^{2+} 流入が有意に増加すること、などが報告されている。覚せい剤による強化効果についても dihydropyridene 系薬物により抑制されること⁶⁾、覚せい剤の長期投与は腹側被蓋野の dopamine 作動性神経細胞における Ca^{2+} 流入増加を誘発すること¹³⁾、などが報告されている。さらに当教室においても、methamphetamine や cocaine 等による精神依存形成時においては L 型 HVCC の機能亢進に伴う細胞内 Ca^{2+} 流入増加が認められていることを確認している。これらの事実、METH 長期投与に伴う精神依存の形成には、L 型 HVCC の機能亢進を介した神経細胞内への Ca^{2+} 流入増加が重要であり、しかもこの細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が

METH による精神依存形成過程に起こる諸種の神経機能変化を誘発している可能性は高いものと推察されるが、その詳細な形成機序については不明である。

本研究では、METH 精神依存形成過程および発現における機序を明らかにする目的で、L 型 HVCC 機能亢進とそれに続く細胞内情報伝達系の変化として ryanodine 受容体の機能変化に着目し、行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。

B. 研究方法

1. 薬物依存モデルの作製

METH による報酬効果は、ddY 系雄性マウスに 1 mg/kg の METH 投与による条件づけ場所嗜好性試験 (CPP) 法を用いて行った。

2. マウス大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

神経細胞の単離は既報に準じて行った[4]。胎齢 15 日目の ddY 系マウス新皮質領域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 μ 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 13 日目の神経細胞を実験に供した。なお、本研究で用いた神経細胞は 95%以上が神経細胞であることが確認されている。

3. 神経細胞への METH および各種薬物の曝露

神経細胞への METH の連続曝露は、Hanks 液で希釈した薬物を直接培養皿に添加することにより行った。Nifedipine および dantrolene は DMSO で希釈した薬物を培養液中での DMSO の終濃度

が 0.001 % になるように調整して添加した。それ以外の薬物の神経細胞への曝露は、Hanks 液で希釈したものを直接培養液中に添加した。なお、本研究で使用した薬物の 3 日間連続曝露によっても、lactec dehydrogenase 活性の神経細胞外への漏出、および trypan blue 色素排泄能には変化が認められないことを確認した。

4. 神経細胞内 Ca^{2+} 動態の測定

神経細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の測定は、神経細胞を 10 mM HEPES 含有 Ca^{2+} -free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB-H, pH 7.4) 中で 10 分間の preincubation を行った後、 $^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ (1 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2/\text{dish}$) を含む KRB-H 下に 2 分間の 30 mM KCl 刺激に伴い細胞内に取り込まれた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 放射活性を測定することにより行った¹¹⁾。

神経細胞への Ca^{2+} 流入変化の可視化は、予め 5 μM fura-2/AM にて処理した神経細胞を、KRB-H 下に 30 mM KCl 刺激により認められる蛍光強度を AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) により定量化した。

なお、本研究で使用した神経細胞は、P/Q、N および L 型 HVCC に特異的な阻害薬である ω -agatoxin VIA、 ω -conotoxin GVIA、および nifedipine により 30 mM KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入が用量依存性に阻害されることから、この神経細胞にはこれらの HVCC が存在していることが既に確認されている¹¹⁾。

5. HVCC および ryanodine 受容体 (RyR) subunit の発現測定

L 型 HVCC α subunit の $\alpha 1\text{C}$ 、 $\alpha 1\text{D}$ 、 $\alpha 2/\delta 1$ および RyR-1,2,3 の各蛋白発現変化の検討は、Western blot 法により行った。

6. ^3H PN200-110 および ^3H ryanodine 結合の測定

^3H PN200-110 結合は神経細胞より調整した顆粒画分を用いて、既報⁵⁾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 (pH 7.5) で 2 回洗浄し、同一 buffer で再懸濁化した。各種濃度 (0.02 - 2.5 nM) の ^3H PN200-110 の存在下で 25°C、60 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 μM の非放射性 nifedipine 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。

^3H Ryanodine は CPP 獲得マウス脳分画より調整した P_3 膜画分を用いて、既報¹⁵⁾に準じて行った。保存した P_3 膜画分を解凍したのち、氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 3 回洗浄し、同一の buffer で懸濁した。各種濃度 (0.2 - 16 nM) の ^3H ryanodine の存在下で 37°C、60 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、1 μM の dantrolene 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. 蛋白定量

顆粒ならびに P_3 膜画分、および 0.5 M NaOH にて可溶化処理した神経細胞中に含有される蛋白の含量は、bovine serum albumin を標準物質として Lowry らの方法を用いて定量した。

8. 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. 研究結果

1. METH による L 型 HVCC の動態変化

METH による報酬効果の形成および発現は、nifedipine の処置により完全に抑制された (Fig. 1)。この時点での側坐核あるいは腹側被蓋野を含む領域および大脳皮質前頭前野領域において、 $[^3\text{H}]$ PN200-110 結合の有意な増加 (Fig. 2)、および膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1$ および $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白発現の増加が観察された (Fig. 3)。一方、神経細胞への METH の連続曝露についても、 $[^3\text{H}]$ PN200-110 結合の有意な増加が観察された (Fig. 4)。

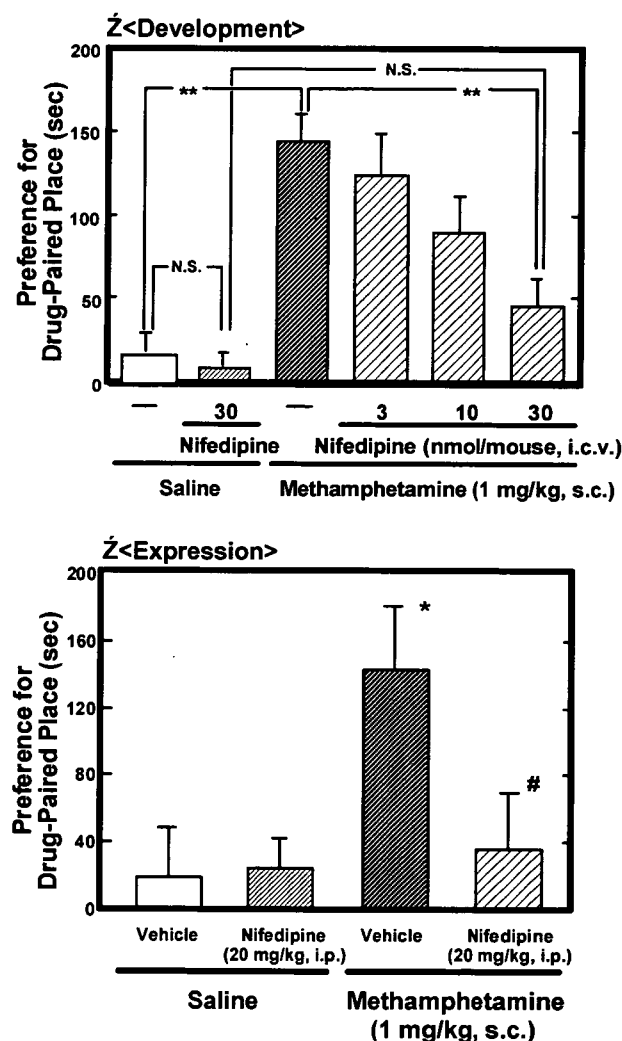


Fig.1 Effects of nifedipine on methamphetamine-induced place preference in mice. $**P < 0.01$ (Bonferroni's test).

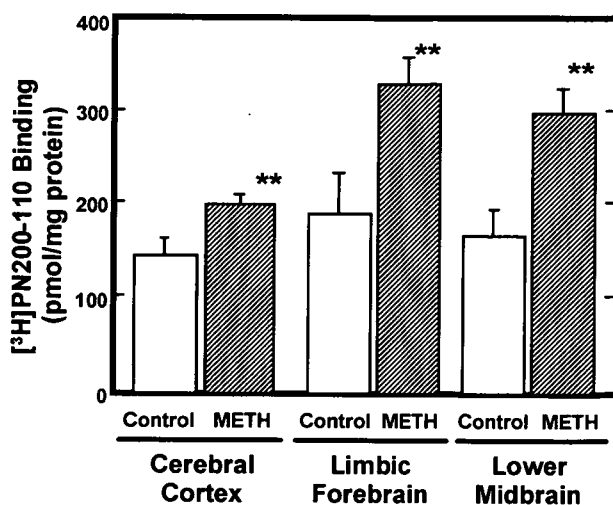


Fig.2 $[^3\text{H}]$ PN200-110 binding to the particulate fractions from cerebral cortex, limbic forebrain and lower midbrains following methamphetamine-induced place preference in mice. $**P < 0.01$, v.s. each control.

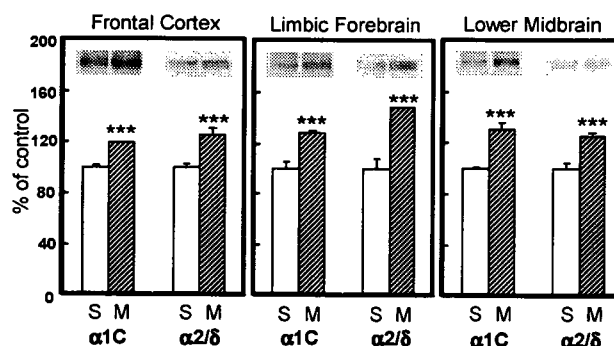


Fig.3 Expression of L-type HVCC $\alpha 1$ and $\alpha 2/\delta$ subunits in frontal cortex, limbic forebrain and lower midbrains following methamphetamine-induced place preference in mice.

2. HVCC の動態変化に対する各種拮抗薬の影響

神経細胞における 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は、METH の曝露濃度および曝露時間に依存した増加が観察されたが、この増加は L 型 HVCC 阻害薬 (nifedipine) および細胞内 Ca^{2+} キレート剤 (BAPTA/AM) の共存により完全に抑制されたが (Fig. 5 & 6)、P/Q 型および N 型 HVCC 阻害薬は何ら阻害作用を示さなかった (Fig. 5)。

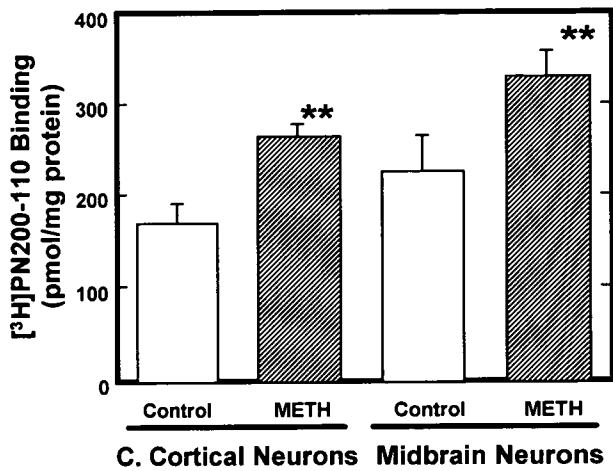


Fig.4 $[^3\text{H}]$ PN200-110 binding to the particulate fractions from cerebral cortical and midbrain neurons following sustained methamphetamine (METH) exposure. $**P < 0.01$, v.s. each control.

3. METH 報酬効果に対する dantrolene の影響

METH による報酬効果の形成および発現は、dantrolene の処置により用量依存性に抑制され、10 nmol/mouse (i.c.v.) により完全に消失した (Fig. 7)。

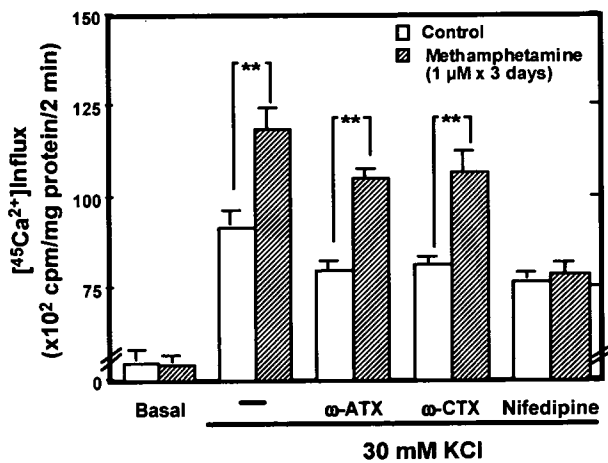


Fig.5 Effects of HVCC inhibitors on 30 mM KCl-induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into the cerebral cortical neurons after sustained methamphetamine exposure. $**P < 0.01$ (Bonferroni's test)

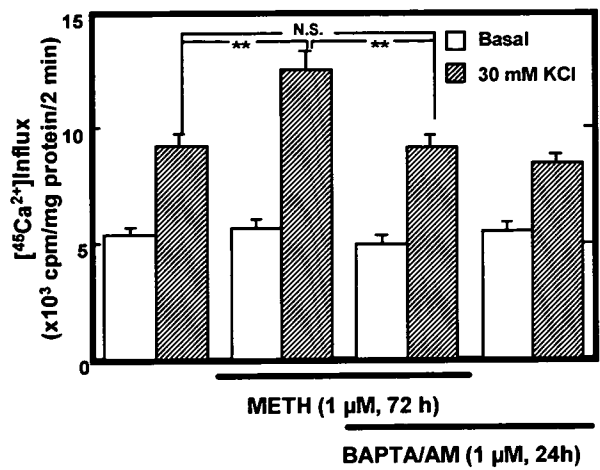


Fig.6 Effect of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ chelater (BAPTA/AM) on 30 mM KCl-stimulated $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into cerebral cortical neurons following sustained methamphetamine exposure. $**P < 0.01$.

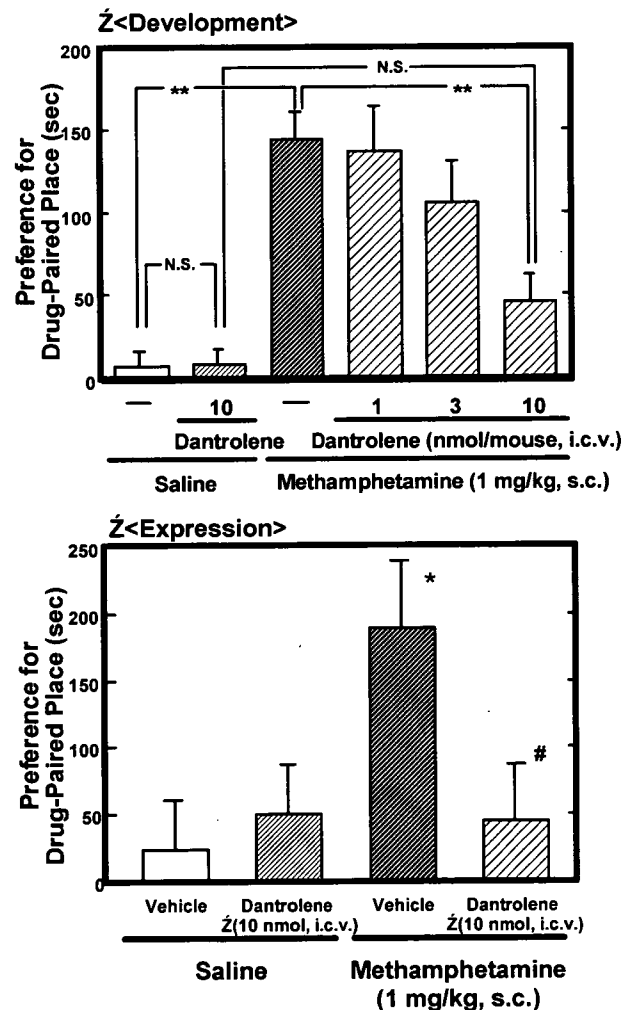


Fig.7 Effects of nifedipine on methamphetamine-induced place preference in mice. ****P<0.01** (Bonferroni's test).

4. METH による ryanodine 受容体の動態変化

METH による報酬効果を獲得したマウスの側坐核を含む領域およびその投射先である大脳皮質前頭前野領域において、ryanodine 受容体蛋白質の有意な増加と (Fig. 8)、 Bmax の増加に起因した [³H]ryanodine 結合量の増加が観察された (Fig. 9)。

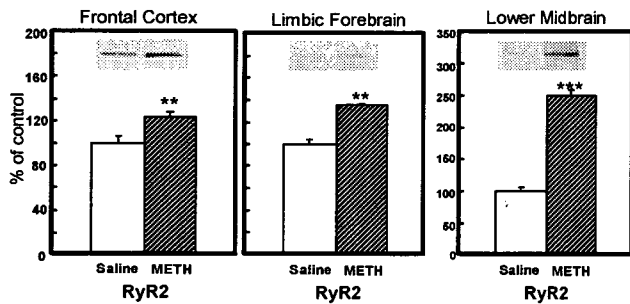
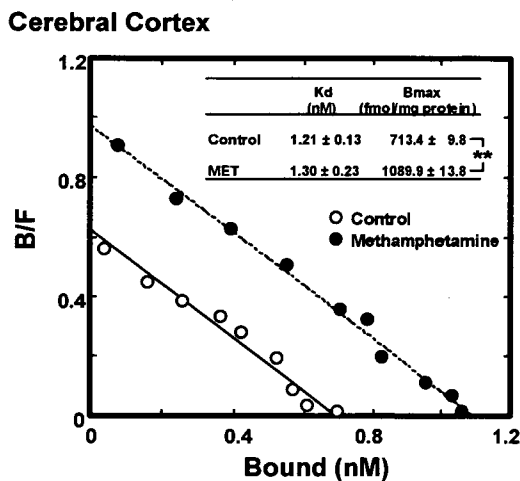


Fig.8 Expression of ryanodine receptor (RyR) subunits in frontal cortex, limbic forebrain and lower midbrains following methamphetamine-induced place preference in mice. ****P<0.01** and *****p<0.001**, compared with each control value (Bonferroni's test).



Limbic Forebrain

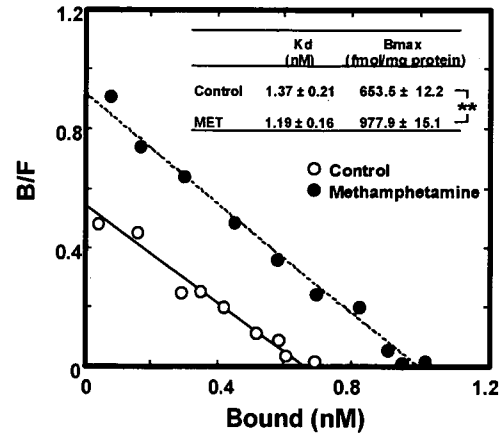


Fig.9 Scatchard analysis of [³H]ryanodine receptor binding to the P₃ synaptosomal fractions from cerebral cortex and limbic forebrain following methamphetamine-induced place preference in mice. ****P< 0.01**, v.s. each control (Bonferroni's test).

同様に、METH を連続曝露した神経細胞においても [³H]ryanodine 結合量の増加が観察された (Fig. 10)。

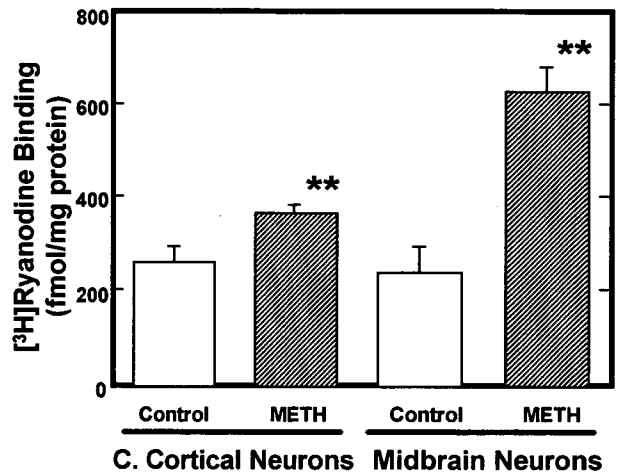


Fig.10 [³H]RyR binding to the P₃ synaptosomal fractions from cerebral cortical and midbrain neurons following sustained methamphetamine (METH) exposure. ****P< 0.01**, v.s. each control.

神経細胞における methamphetamine の連続曝露に伴う 30 mM KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加は、非選択的 ryanodine 受容体遮断薬 (dantrolene) の共存により完全に抑制され、その効果は ryanodine 受容体の active modulator である caffeine の添加により回復した (Fig. 11)。さらに、30 mM KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加は ryanodine の曝露濃度に依存して増加し、30 nM ryanodine の処置により最大反応を示した (Fig. 12)。

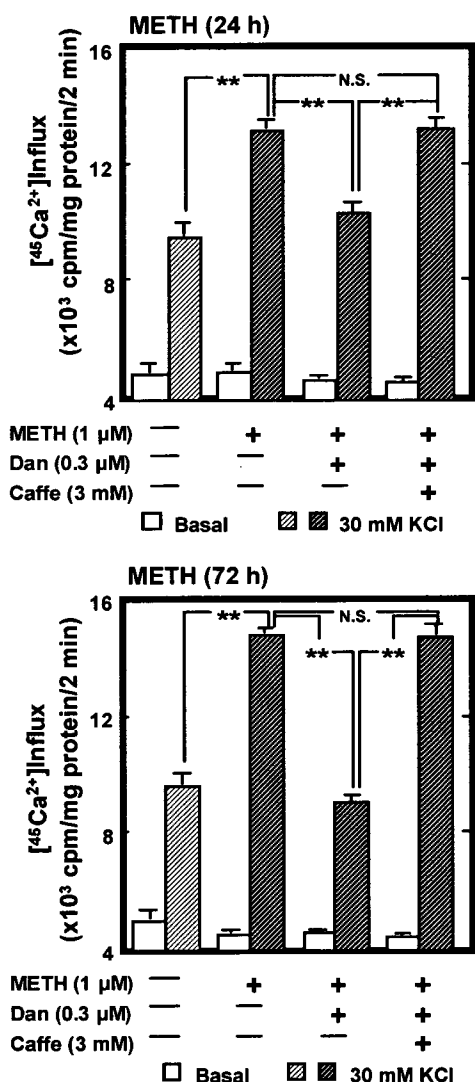


Fig.11 Effect of dantrolene and caffeine on methamphetamine (METH)-induced increase in 30 mM KCl-evoked $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into the cerebral cortical neurons. ****P<0.01.**

神経細胞における methamphetamine の連続曝露に伴う ^3H PN200-110 結合の K_d 値の低下に起因した増加は、dantrolene の共存により完全に消失した (Fig. 13)。

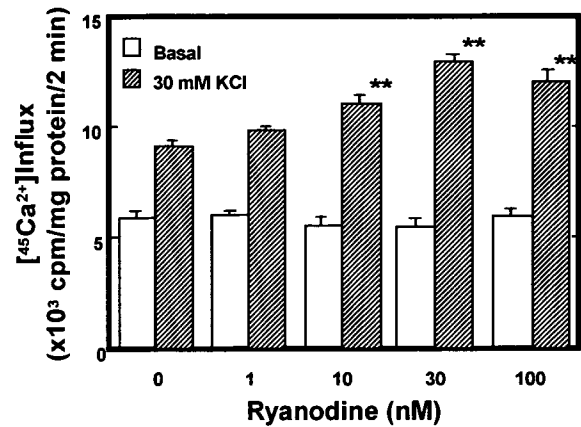


Fig.12 Effect of ryanodine exposure on 30 mM KCl-stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx into cerebral cortical neurons. ****P<0.01, v.s. control.**

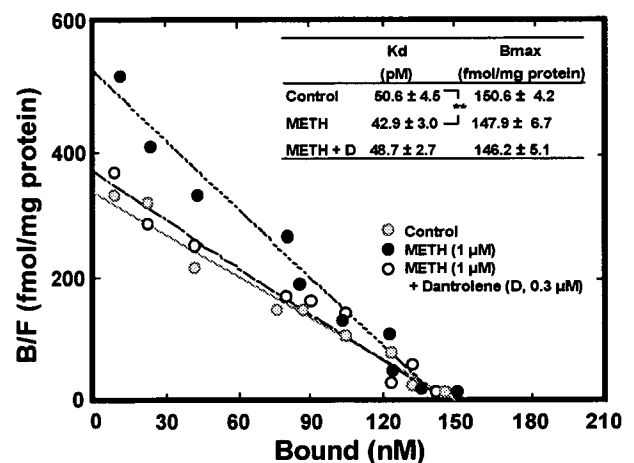


Fig.13 Scatchard analysis of ^3H PN200-110 binding to the particulate fractions from cerebral cortical neurons following exposures to methamphetamine and dantrolene (D). ****P<0.01.**

5. Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 動態変化に対する methamphetamine の影響

Methamphetamine の中脳神経細胞への連続曝露は、30 mM KCl による細胞内 Ca^{2+} oscillation を増

強した。また、その増加は nifedipine および dantrolene で完全に阻害されることが判明した。

D. 考察

本研究では METH 誘発精神依存形成における L 型 HVCC とそれに続く細胞内情報伝達系の機能変化を、CPP 法により METH 精神依存が確認されたモデル動物、および依存動物より摘出した脳断面にみられる諸種の神経化学的変化と一致した変化を示す神経細胞を用い、L 型 HVCC の機能変化とそれに続く細胞内 Ca^{2+} 動態変化を測定することにより比較検討した。

METH による報酬効果の形成および発現は、L 型 HVCC 阻害薬である nifedipine の処置により完全に消失した。また、精神依存の形成および発現に重要な側坐核あるいは腹側被蓋野を含む領域、およびその投射先である大脳皮質前頭前野領域における膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1C$ および $\alpha 2/\delta$ subunits 蛋白発現の有意な増加と、L 型 HVCC への $[^3H]PN200-110$ 結合の有意な増加が認められた。したがって、精神依存の形成および発現には細胞内への L 型 HVCC を介する Ca^{2+} 流入上昇が密接に関与している可能性が高いものと推察される。さらに METH による報酬効果は、小胞体 ryanodine 受容体の非特異的拮抗薬である dantrolene により完全に抑制されたこと、および上述の nifedipine の作用から、精神依存の形成および発現の機序に calcium-induced calcium release (CICR) を介した機能変化が関与する可能性が極めて高いものと考えられる。

神経細胞への METH 連続曝露後にみられる 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}Ca^{2+}]$ 流入の増加は、nifedipine、BAPTA/AM および dantrolene により用量依存性に阻害されたが、P/Q および N 型 HVCC 阻害薬はこの増加に影響を与えなかった。さらに低濃度の ryanodine 連続曝露は、METH 連続曝露後にみられる 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}Ca^{2+}]$ 流入の変化に類似し

た有意な増加が認められた。さらに、METH 連続曝露後の神経細胞における $[^3H]PN200-110$ および $[^3H]ryanodine$ 結合実験の成績は、上述の in vivo の成績と類似するものであったことから、本研究で用いた神経細胞は精神依存形成過程における細胞内 Ca^{2+} 動態の解析には有用な in vitro 実験モデルとして応用できると考えられた。

L 型 HVCC の蛋白発現増加については、従来から CaMKIV の活性化や CREB のリン酸化を介した L 型 HVCC mRNA 転写活性の亢進により生じることはよく知られている¹⁴⁾。一方、精神依存モデル動物および依存性薬物の連続曝露した神経細胞において誘発される L 型 HVCC の機能調節の亢進機序については全く解明されていない。しかし、今回得られた METH 精神依存に伴う L 型 HVCC の機能変化は、L 型 HVCC 阻害薬および非選択的 RyR 拮抗薬の共存により完全に消失していることから、細胞内への一過性の Ca^{2+} 流入の上昇とこれに伴う CICR の増加が関与している可能性は極めて高いと考えられる。最近、心筋由来の L 型 HVCC が CaMKII による L 型 HVCC $\beta 2a$ subunit のリン酸化を介して機能亢進することが報告されている⁴⁾。CaMKII を含む各種 Ca^{2+} 依存性蛋白質の活性化には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は必須であることから勘案すると、METH による精神依存形成過程においてみられた細胞内 Ca^{2+} 動態変化が L 型 HVCC $\alpha 1C$ および $\alpha 2/\delta$ subunits 蛋白以外の subunit からの調節により制御されている可能性は十分に考えられる。事実、覚せい剤による自発運動量の亢進が P/Q および N 型 HVCC 遮断薬により抑制されることが報告されていることから¹²⁾、他の subunit の発現変化を含めた詳細な検討が必要であると考えられる。

今回の我々の成績では、METH による精神依存の形成が dantrolene で完全に遮断されたこと、および RyR は現在までに遺伝子的に 3 種類のアイソフォームが同定されているが、METH による報酬