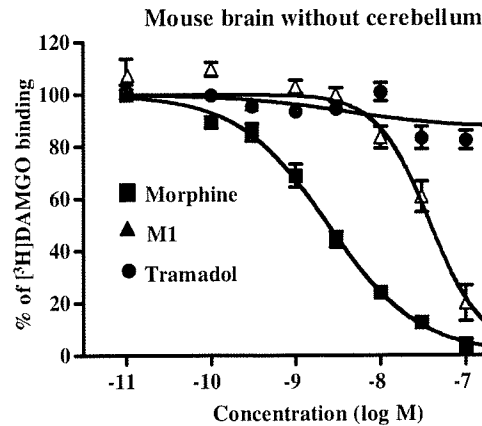


Fig. 1 Displacement of binding of the μ -opioid receptor ligand [^3H]DAMGO in membranes of the mouse brain without the cerebellum by morphine, tramadol, or M1. Experiments were performed in the presence of either [^3H]DAMGO (1 nM) or increasing concentrations of either morphine, tramadol, or M1. The data represent the mean \pm SEM of three to four samples. The IC_{50} values were determined using the analysis of variance and linear regression techniques. To calculate the IC_{50} values, at least nine drug doses were used and three to four samples were used for each dose



	Tramadol	M1	Morphine
[^3H]DAMGO (nM)	500<	38.83 (28.05-53.76)	2.44 (2.12-2.81)

(VTA) was examined by monitoring the binding of [^{35}S]GTP γ S to membranes. M1, but not tramadol, induced a concentration-dependent increase in the binding of [^{35}S]GTP γ S to membranes of the VTA in mice. Tramadol by itself could not stimulate the binding of [^{35}S]GTP γ S to membranes of the mouse VTA ($p < 0.001$ vs. tramadol group; Fig. 3a). Furthermore, M1-induced G protein activation was significantly suppressed by cotreatment with β -FNA (10^{-8} or 10^{-7} M) (β -FNA–M1 $p < 0.001$ vs. M1 alone) (Fig. 3b).

Effect of tramadol or M1 on the extracellular dopamine level in the mouse nucleus accumbens

Basal dialysis levels of dopamine were determined at 10 min before tramadol or M1 administration in each experimental group. The dopamine levels were markedly increased by the injection of tramadol (70 mg/kg, s.c.) or M1 (30 mg/kg, s.c.). The s.c. injection of tramadol or M1 produced a significant increase in the dopamine levels from 90 to 180 min after administration ($F_{(1,38)} = 5.654, p < 0.001$

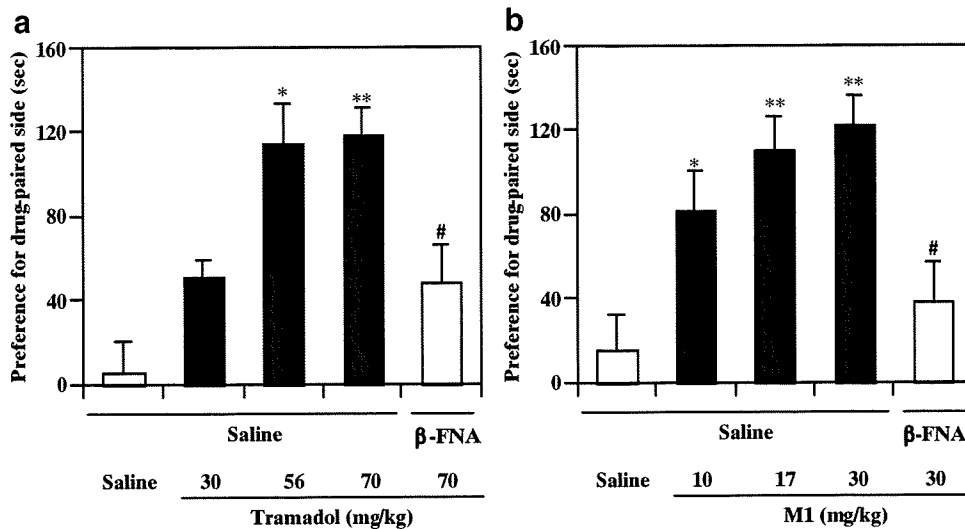
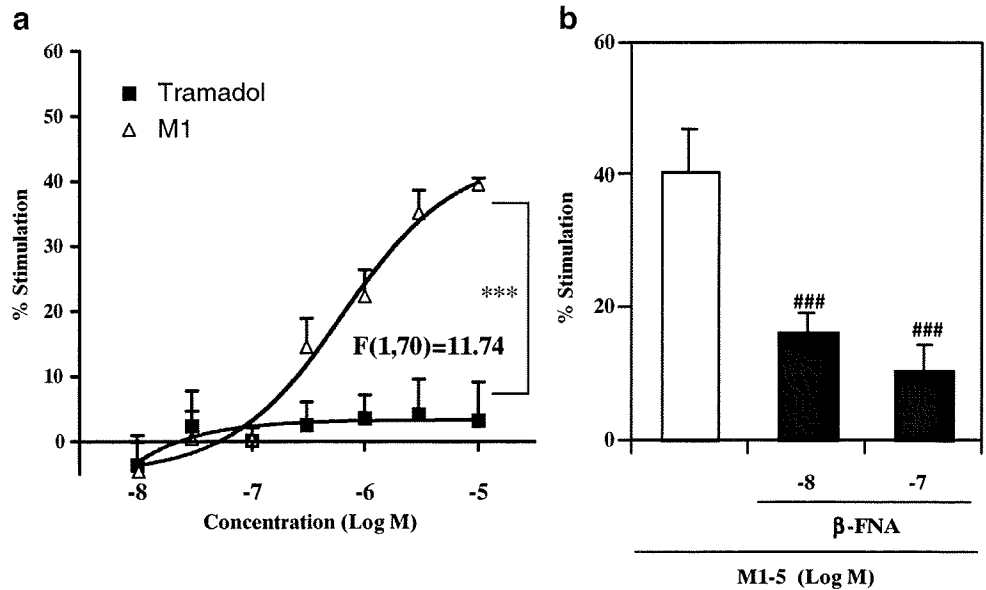


Fig. 2 Conditioned place preference produced by s.c. administration of tramadol (30–70 mg/kg, a) or M1 (10–30 mg/kg, b) in mice using the conditioned place preference paradigm. Effect of pretreatment with β -FNA (40 mg/kg, s.c.) on tramadol- or M1-induced conditioned place preference in mice. Groups of mice were pretreated with β -FNA at 24 h before the injection of tramadol or M1. Ordinate: mean

differences in time spent in the preferred place between postconditioning and preconditioning. Immediately after s.c. injection of tramadol or M1, mice were placed and conditioned in either compartment for 1 h. Each column represents the mean with SEM of seven to eight mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline–saline group; # $p < 0.05$ vs. saline–tramadol (70 mg/kg) or M1 (30 mg/kg) group

Fig. 3 Effect of tramadol (10^{-7} to 10^{-5} M) or M1 (10^{-7} to 10^{-5} M) on the binding of [35 S]GTP γ S to membranes of the mouse lower midbrain (a). The M1-induced increase in [35 S]GTP γ S binding to membranes in the mouse lower midbrain was blocked by β -FNA (b). Membranes were incubated with both [35 S]GTP γ S and GDP and M1 in the presence or absence of β -FNA. The data are shown as the percentage of basal [35 S]GTP γ S binding measured in the presence of GDP and absence of M1. Each column represents the mean \pm 0.001 vs. tramadol group; ### p < 0.001 vs. M1 group



tramadol group vs. saline group; $F_{(1,38)}=1.160$, $p < 0.001$ M1 group vs. saline group; Fig. 4).

Inhibition of tramadol- or M1-induced place preference and G protein activation in the lower midbrain of sciatic nerve-ligated mice

The hyperalgesic response and tactile allodynia after sciatic nerve injury are shown in Fig. 5. Partial ligation of the sciatic nerve caused a marked decrease in the latency of paw withdrawal against a thermal stimulus on the ipsilateral side in nerve-ligated mice, and this reduction in paw withdrawal latency lasted for at least 14 days ($p < 0.001$ vs. sham-operated group; Fig. 5a). In contrast, paw withdrawal latency in the ipsilateral side of sham-operated mice was not changed (Fig. 5a). Mice with sciatic nerve ligation also

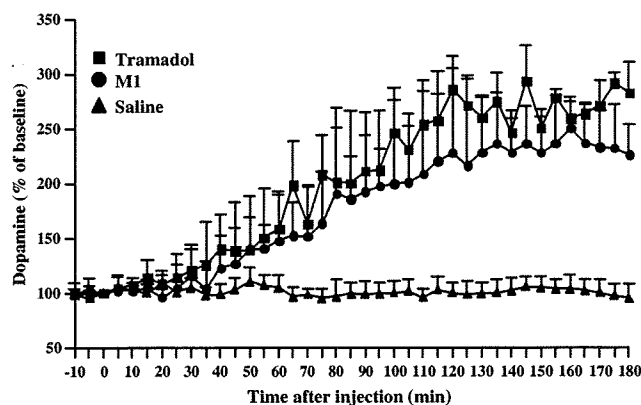


Fig. 4 Effect of tramadol (70 mg/kg, s.c.) or M1 (30 mg/kg, s.c.) on the extracellular dopamine level in the mouse NAcc. Data are presented as the percentage of the mean basal level \pm 0.001, saline group vs. tramadol group or saline group vs. M1 group

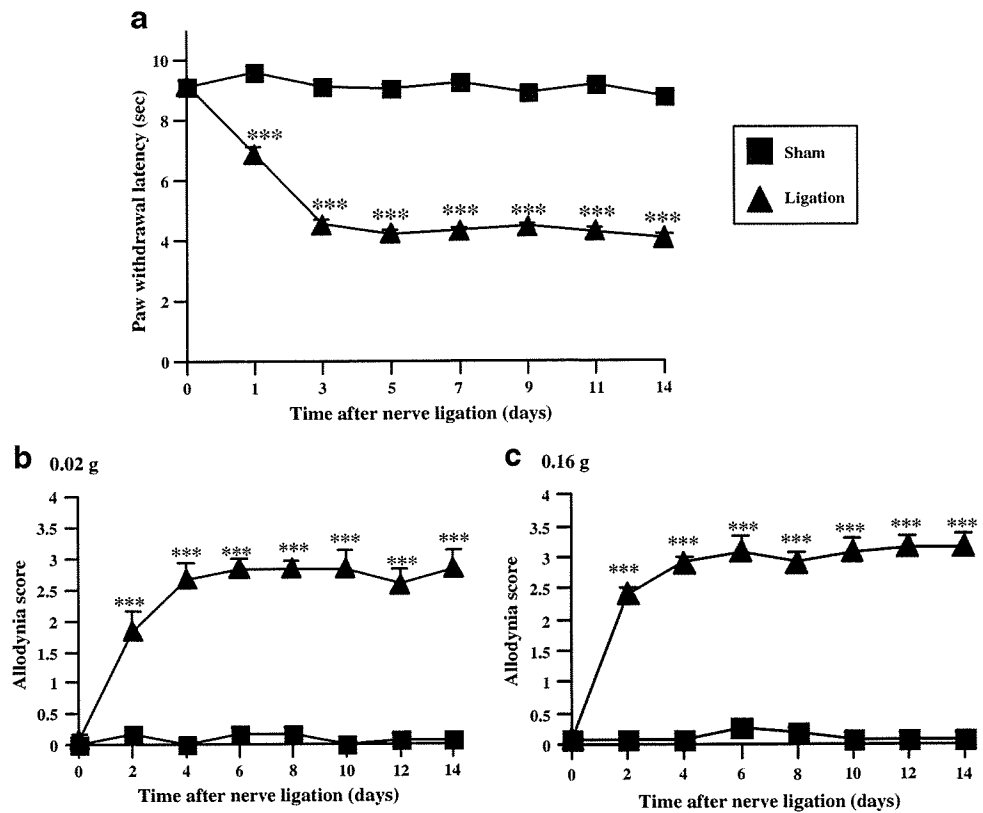
showed a marked increase in paw withdrawal in response to a tactile stimulus on the ipsilateral side in nerve-ligated mice ($p < 0.001$ vs. sham-operated group; Fig. 5b or c). Under these conditions, we investigated whether tramadol or M1 could produce rewarding effects in sciatic nerve-ligated mice using the CPP method. As shown in Fig. 6a s.c. administration of tramadol (30–70 mg/kg, s.c.) or M1 (10–30 mg/kg, s.c.) produced a dose-dependent preference for the each drug-associated place in sham-operated mice ($p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. sham-saline group; Fig. 6a or b). In contrast, tramadol and M1 each failed to produce a place preference under the neuropathic pain-like state ($p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. sham-tramadol or sham-M1 group; Fig. 6a or b).

Tramadol- or M1-induced stimulation of [35 S]GTP γ S in the lower midbrain including the VTA obtained from sham-operated and sciatic nerve-ligated mice was determined by monitoring the binding of [35 S]GTP γ S to membranes. According to the atlas reported by Paxinos and Franklin (2001), a coronal brain block of the lower midbrain area (box) was obtained from 2.5 to 4.5 mm posterior to the bregma (Fig. 7a). M1 (10^{-8} to 10^{-5} M) produced a concentration-dependent increase in the binding of [35 S]GTP γ S to lower midbrain membranes in sham-operated mice. Conversely, the levels of M1-stimulated [35 S]GTP γ S binding to this area in nerve-ligated mice were significantly lower than those observed in sham-operated mice ($p < 0.01$ vs. sham group; Fig. 7b).

Discussion

In the [35 S]GTP γ S binding and MOR binding assays, M1, but not tramadol, was found to have its functional activity for

Fig. 5 Effect of sciatic nerve ligation on withdrawal responses to thermal stimulation (a) and tactile allodynia (b or c). There was no difference in the basal response between sham-operated and sciatic nerve-ligated mice before surgery (day 0). Thermal hyperalgesia and tactile allodynia were observed in the ipsilateral side on sciatic nerve-ligated mice. The data are presented as the mean <0.001 vs. sham-operated group



MOR in the mouse brain. It has been reported that two major urinary metabolites, M1 and M2, are by-products of CYP2D6 and CYP3A4 metabolism (Lintz et al. 1981). Approximately 70% of tramadol is metabolized to M1, which shows high affinity for MORs (Raffa 1996). Several studies have reported that tramadol-induced analgesia results from a monoaminergic effect of tramadol itself and an opioidergic effect of its active metabolite M1 (Desmeules et

al. 1996; Raffa 1996; Mattia and Coluzzi 2005). Considering these results, our present data constitute evidence that the pharmacological effect of tramadol is mediated mainly through its active metabolite M1 via MORs.

The key approach in the present study was to investigate the rewarding effects of tramadol and its active metabolite M1. It has been reported that the approach for the conditioned place preference in rodents is appropriate for

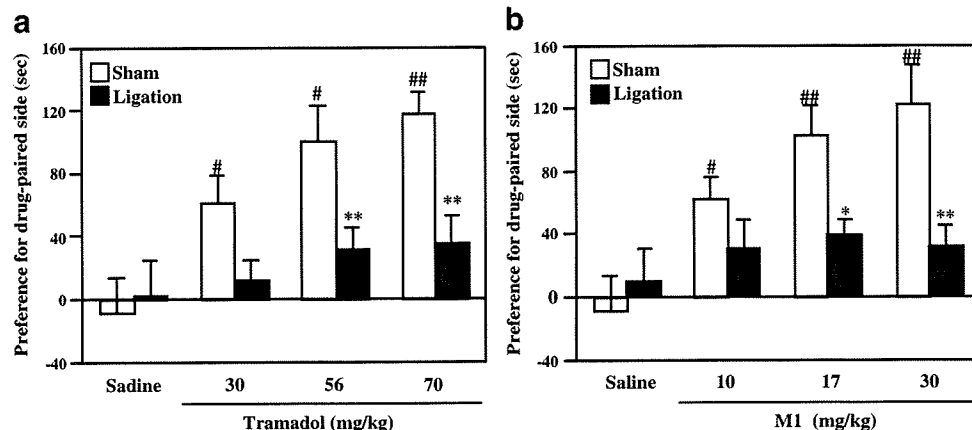


Fig. 6 Conditioned place preference produced by s.c. administration of tramadol (30–70 mg/kg, a) or M1 (10–30 mg/kg, b) in sham-operated and sciatic nerve-ligated mice using the conditioned place preference paradigm. Ordinate: mean differences in time spent in the

preferred place between postconditioning and preconditioning. Immediately after s.c. injection of tramadol or M1, mice were placed and conditioned in either compartment for 1 h. Each column represents the mean \pm SEM of seven to eight mice

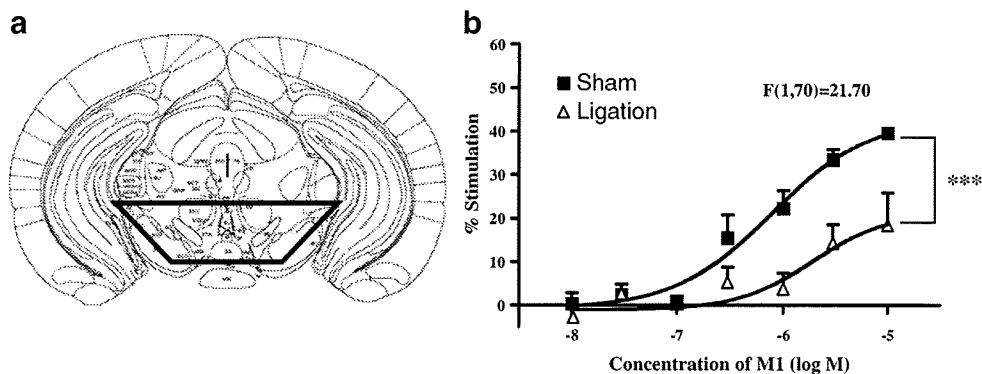


Fig. 7 According to the atlas reported by Paxinos and Franklin (2001), a coronal brain block of the lower midbrain area (*box*) was obtained from 2.5 to 4.5 mm posterior to the bregma (**a**). Effects of M1 on the binding of [35 S]GTP γ S to membranes of the lower

midbrain obtained from sham-operated and sciatic nerve-ligated mice (**b**). Membranes were prepared 7 days after nerve ligation. Each value represents the mean <0.05 , $##p < 0.01$ vs. sham-saline group; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs. sham-M1 group

the investigation on abuse potential of tramadol (Sprague et al. 2002; Tzschentke et al. 2002). We found that both tramadol and M1 produced a significant place preference in mice, and these effects were significantly suppressed by pretreatment with the MOR antagonist β -FNA. It was reported that tramadol may possess relatively low abuse potential in preclinical or clinical data (Budd 1994; Raffa 2008). Contradictorily, it was noted that a clinically prescribed dose of oral tramadol has abuse liability-related effects (Zacny 2005), which was included in the 2006 WHO report (WHO Expert Committee on Drug Dependence 2006). Although it seems likely to be still required to further investigate the abuse liability of tramadol in humans, our data support the idea that tramadol may show its abuse liability through M1-activated MOR.

Several studies have suggested that the mesolimbic dopaminergic system, which projects from the VTA of the midbrain to the NAcc, is the critical substrate of the rewarding effect of the MOR agonist morphine (Koob 1992; Nestler 1996; Narita et al. 2001b). MOR agonists have been shown to increase dopaminergic signals in the NAcc via the activation of dopamine cells in the VTA, an area that possesses high densities of MOR (Garzon and Pickel 2001). In the present study, we found that the dopamine levels in the NAcc were markedly increased by s.c. administration of either tramadol or M1. Furthermore, M1 induced a concentration-dependent increase in the binding of [35 S]GTP γ S to membranes of the VTA in mice, whereas tramadol had no such effect. These results suggest that the activation of MOR in the VTA by M1 after the s.c. administration of tramadol may facilitate the mesolimbic dopaminergic system and increase the extracellular dopamine levels in the NAcc, resulting in the initiation of the rewarding effect.

We previously reported that sciatic nerve-ligated mice show symptoms of neuropathic pain with hyperalgesia and allodynia in appropriate pain tests (Narita et al. 2005b).

Such persistent painful states caused by sciatic nerve ligation can last for months (Narita et al. 2005b). In the present study, mice with partial sciatic nerve ligation exhibited marked neuropathic pain-like behaviors only on the ipsilateral side at 7 days after the nerve ligation. Under these conditions, the place preference induced by the s.c. administration of tramadol or M1 was significantly suppressed in mice. Furthermore, the increase in the binding of [35 S]GTP γ S induced by M1 in lower midbrain membranes including the VTA was significantly attenuated in membranes obtained from sciatic nerve-ligated mice. We previously reported that sciatic nerve ligation results in the reduction of MOR functions to activate G protein in the VTA (Ozaki et al. 2003). On the other hand, no significant changes in dopamine receptor functions to activate G protein in the NAcc were observed in sciatic nerve ligation (Ozaki et al. 2003). We also demonstrated that the attenuation of the morphine-induced place preference under a neuropathic pain was associated with a decrease in morphine-induced dopamine release in the NAcc with a reduction in the MOR-mediated G protein activation in the VTA (Ozaki et al. 2002). Furthermore, we reported that sciatic nerve ligation caused a dramatic reduction in the activities of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in tyrosine hydroxylase-positive dopaminergic neurons of the VTA (Ozaki et al. 2004). These findings suggest that the reduction in MOR-mediated G protein activation in the lower midbrain area caused by sciatic nerve ligation may be responsible for inhibiting the rewarding effects induced by the s.c. administration of both tramadol and M1 under a neuropathic pain-like state.

In conclusion, we report in this study that tramadol has a unique receptor profile and greater potency, based upon its active metabolite M1, which can bind to MORs. Furthermore, treatment with tramadol produces less of a rewarding effect under a neuropathic pain-like state.

Acknowledgments This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Disclosure/conflict of interest The authors declare that, except for the income received from their primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

References

- Bamigbade TA, Davidson C, Langford RM, Stamford JA (1997) Action of tramadol, its enantiomers and principal metabolite, *O*-desmethytramadol, on serotonin (5-HT) efflux and uptake in the rat dorsal raphe nucleus. *Br J Anaesth* 79:352–356
- Budd K (1994) Chronic pain-challenge and response. *Drugs* 47:33–38
- Cicero TJ, Adams EH, Geller A, Inciardi JA, Munoz A, Schnoll SH, Senay EC, Woody GE (1999) A postmarketing surveillance program to monitor Ultram (tramadol hydrochloride) abuse in the United States. *Drug Alcohol Depend* 57:7–22
- Desmeules JA, Piguet V, Collart L, Dayer P (1996) Contribution of monoaminergic modulation to the analgesic effect of tramadol. *Br J Clin Pharmacol* 41:7–12
- Driessen B, Reimann W (1992) Interaction of the central analgesic, tramadol, with the uptake and release of 5-hydroxytryptamine in the rat brain in vitro. *Br J Pharmacol* 105:147–151
- Epstein DH, Preston KL, Jasinski DR (2006) Abuse liability, behavioral pharmacology, and physical-dependence potential of opioids in humans and laboratory animals: lesson from tramadol. *Biol Psychol* 73(1):90–99
- Garzon M, Pickel VM (2001) Plasmalemmal m-opioid receptor distribution mainly in nondopaminergic neurons in the rat ventral tegmental area. *Synapse* 41:311–328
- Gibson TP (1996) Pharmacokinetics, efficacy, and safety of analgesia with a focus on tramadol HCl. *Am J Med* 101:47S–53S
- Gillen C, Haurand M, Kobelt DJ, Wnendt S (2000) Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human m-opioid receptor. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 362:116–121
- Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl GR, Sora I, Ikeda K (2006) Mu opioid receptor-dependent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 51:651–658
- Imai S, Narita M, Hashimoto S, Nakamura A, Miyoshi K, Nozaki H, Hareyama N, Takagi T, Suzuki M, Narita M, Suzuki T (2006) Differences in tolerance to anti-hyperalgesic effects between chronic treatment with morphine and fentanyl under the pain-like state. *Japanese Journal of Psychopharmacology* 26:183–192
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):177–184
- Lemberg KK, Kontinen VK, Siiskonen AO, Viljakka KM, Yli-Kauhaluoma JT, Korpi ER, Kalso EA (2006) Antinociception by spinal and systemic oxycodone: why does the route make a difference. *Anesthesiology* 105:801–812
- Lintz W, Erlacin S, Frankus E, Uragg H (1981) Biotransformation of tramadol in man and animal. *Arzneimittelforschung* 31:1932–1943 (author's translation)
- Lintz W, Barth H, Becker R, Frankus E, Schmidt-Bothelt E (1998) Pharmacokinetics of tramadol and bioavailability of enteral tramadol formulations. 2nd communication: drops with ethanol. *Arzneimittelforschung* 48:436–447
- Liu ZM, Zhou WH, Lian Z, Mu Y, Ren ZH, Cao JQ, Cai ZJ (1999) Drug dependence and abuse potential of tramadol. *Zhongguo Yaoli Xuebao* 20:52–54
- Malmberg A, Basbaum AI (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76:215–222
- Mattia C, Coluzzi F (2005) Tramadol. Focus on musculoskeletal and neuropathic pain. *Minerva Anestesiol* 71:565–584
- Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD (1999) Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad USA* 96:7731–7736
- Narita M, Yajima Y, Aoki T, Ozaki S, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T (2000) Up-regulation of the TrkB receptor in mice injured by the partial ligation of the sciatic nerve. *Eur J Pharmacol* 401:187–190
- Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Narita M, Dun NJ, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001a) Enhanced mu-opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase Cgamma isoform. *J Biol Chem* 276:15409–15414
- Narita M, Funada M, Suzuki T (2001b) Regulation of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther* 89:1–15
- Narita M, Kishimoto Y, Ise Y, Yajima Y, Misawa K, Suzuki T (2005a) Direct evidence for the involvement of the mesolimbic kappa-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology* 30:111–118
- Narita M, Usui A, Narita M, Niikura K, Nozaki H, Khotib J, Nagumo Y, Yajima Y, Suzuki T (2005b) Protease-activated receptor-1 and platelet-derived growth factor in spinal cord neurons are implicated in neuropathic pain after nerve injury. *J Neurosci* 25:10000–10009
- Narita M, Nakamura A, Ozaki M, Imai S, Miyoshi K, Suzuki M, Suzuki T (2007) Comparative pharmacological profiles of morphine and oxycodone under a neuropathic pain-like state in mice: evidence for less sensitivity to morphine. *Neuropsychopharmacology* 33:1097–1112
- Nestler EJ (1996) Under siege: the brain on opiates. *Neuron* 16:897–900
- Nichols ML, Michael DB, Ossipov MH, Lai J, Porreca F (1995) Regulation of morphine antiallodynic efficacy by cholecystokinin in a model of neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1339–1345
- Oe K, Narita M, Imai S, Shibasaki M, Kubota C, Kasukawa A, Hamaguchi M, Yajima Y, Yamazaki M, Suzuki T (2004) Inhibition of the morphine-induced rewarding effect by direct activation of spinal protein kinase C in mice. *Psychopharmacology* 177:55–60
- Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Sugita J, Matsumura Y, Suzuki T (2002) Suppression of the morphine-induced rewarding effect in the rat with neuropathic pain: implication of the reduction in m-opioid receptor functions in the ventral tegmental area. *J Neurochem* 82:1192–1198
- Ozaki S, Narita M, Narita M, Iino M, Miyoshi K, Suzuki T (2003) Suppression of the morphine-induced rewarding effect and G-protein activation in the lower midbrain following nerve injury in the mouse: involvement of G-protein-coupled receptor kinase2. *Neuroscience* 116:89–97
- Ozaki S, Narita M, Narita M, Ozaki M, Khotib J, Suzuki T (2004) Role of extracellular signal-regulated kinase in the ventral tegmental area in the suppression of the morphine-induced rewarding effect in mice with sciatic nerve ligation. *J Neurochem* 88:1389–1397
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd edn. Academic, San Diego
- Peckham ME, Traynor JR (2006) Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague–Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1195–1201

- Radbruch L, Grond S, Lehmann KA (1996) A risk-benefit assessment of tramadol in the management of pain. *Drug Safety* 15:8–29
- Raffa RB (1996) A novel approach to the pharmacology of analgesics. *Am J Med* 101:40S–46S
- Raffa RB (2008) Basic pharmacology relevant to drug abuse assessment: tramadol as example. *J Clin Pharm Ther* 33:101–108
- Raffa RB, Friderichs E, Reimann W (1992) Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an atypical opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 260:275–285
- Sagata K, Minami K, Yanagihara N (2002) Tramadol inhibits norepinephrine transporter function at desipramine-binding sites in cultured bovine adrenal medullary cells. *Anesth Analg* 94:901–906
- Seltzer Z, Dubner R, Shi Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205–218
- Sprague JE, Leifheit M, Selken J, Milks MM, Kinder DH, Nichols DE (2002) In vivo microdialysis and conditioned place preference studies in rats are consistent with abuse potential of tramadol. *Synapse* 43:118–121
- Suzuki T (1996) Conditioned place preference in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18:75–83
- Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M (1996) Formaline- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci* 59:1667–1674
- Suzuki T, Kishimoto Y, Misawa M, Nagase H, Takeda F (1999) Role of the kappa-opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. *Life Sci* 64:PL1–PL7
- Suzuki T, Kishimoto Y, Ozaki S, Narita M (2001) Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. *Eur J Pain* 5(Suppl A):63–65
- Tzschenke TM, Bruckman W, Friderichs E (2002) Lack of sensitization during place conditioning in rats is consistent with the low abuse potential of tramadol. *Neurosci Lett* 23:25–28
- Vaccarino AL, Marek P, Kest B, Ben-Eliyahu S, Couret LC Jr, Kao B, Liebeskind JC (1993) Morphine fails to produce tolerance when administered in the presence of formalin pain in rats. *Brain Res* 627:287–290
- WHO Expert Committee on Drug Dependence (2006) World Health Organ Tech Rep Ser 942:1–21, 23–24
- Yanagita T (1978) Drug dependence potential of 1-(*m*-methoxyphenyl)-2-dimethylaminomethyl-cyclohexan-1-ol hydrochloride (tramadol) tasted in monkeys. *Arzneimittelforschung* 28:158–163
- Yates WR, Nguyen MH, Warnock JK (2001) Tramadol dependence with no history of substance abuse. *Am J Psychiatry* 158:964
- Zacny JP (2005) Profiling the subjective, psychomotor, and physiological effects of tramadol in recreational drug users. *Drug Alcohol Depend* 80:273–278

乱用薬物に共通の依存症発症因子に対する

新規 Ca²⁺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：芝崎真裕、黒川和宏

(川崎医科大学薬理学教室)

[研究要旨]

これまでに、methamphetamine (METH) による精神依存形成において、L 型 HVCC $\alpha 1c$ subunit が重要な役割を担っていることを明らかにしている。しかしながら、METH 誘発逆耐性形成機構における L 型 HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の関与についてはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、METH 誘発逆耐性形成機構における $\alpha 2/\delta$ subunit の関与について、条件づけ場所嗜好性ならびに逆耐性獲得動物を用いて、行動薬理学的および神経科学的観点から詳細に検討した。METH を 4 日に 1 回計 5 回投与したところ、その投与回数に比例した自発運動量の有意な増加、いわゆる逆耐性形成が認められた。この METH 誘発逆耐性獲得モデルの frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域より標品を作製し、Western blot 法により $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白質の変化について検討した。その結果、frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域において $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白質の有意な発現増加が認められた。次に $\alpha 2/\delta$ subunit へ作用が報告されている gabapentin を用いて METH 誘発逆耐性形成機構に対する効果について検討したところ、vehicle 前処置群で認められる METH の投与回数に比例した自発運動量の有意な増加は、gabapentin の脳室内前処置により完全に抑制された。さらに、条件づけ場所嗜好性試験においても、METH による報酬効果の形成は、gabapentin の脳室内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された。以上の本研究の結果より、METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性形成機構において、特に L 型 HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、本研究結果より、gabapentin が薬物乱用の治療薬となり得る可能性が示唆された。

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的確な診断法・治療法の開発に向けて精

力的な検討が行われている。しかしながら、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。薬物依存モデル動物および薬物依存症患者にみ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、その精神依存性の形成・発現機

序は共通の神経科学的機序を介していると考えられる。

種々の薬物依存症において、腹側被蓋野から側坐核へと投射する中脳辺縁 dopamine (DA) 神経系が重要な役割を果たすことが、数多く報告されている^{6, 9, 14})。また、覚せい剤の長期投与は DA 神経における Ca^{2+} 流入増加を誘発することが報告されており¹³)、覚せい剤の強化効果や報酬効果が dihydropyridine 系薬物により抑制されることが報告されている^{3, 11})。さらに当教室においても、methamphetamine や cocaine の連続処置により L 型 HVCC $\alpha 1c$ subunit の機能亢進に伴う細胞内 Ca^{2+} 流入量の増加が認められることを確認している。これらの事実は、METH による精神依存形成機序に、HVCC の機能亢進を伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与し、その Ca^{2+} 動態の変化が神経機能の変化を誘導していると推察される。

HVCC を構成する $\alpha 2/\delta$ subunit は、脳内に広く分布し、HVCC の機能を調節することが知られているが¹²)、METH による精神依存性との関連性については、殆ど明らかとなっていない。また、現在までに、 $\alpha 2/\delta$ subunit に対し、gabapentin が結合しその機能を阻害することが報告されている^{1, 4})。そこで本研究では、 $\alpha 2/\delta$ subunit に着目し、METH 誘発精神依存形成機構における $\alpha 2/\delta$ subunit の関与について、gabapentin を用いて行動薬理学的および神経科学的観点から詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 薬物依存モデルの作製

METH の精神依存の評価は、条件づけ場所嗜好性試験 (CPP) 法を用いて行った。METH における逆耐性現象は、METH を 4 日に 1 回計 5 回投与し、自発運動量の変化を測定した。

2. マウス大脳皮質由来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⁸)。週齢 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・培養した。各種薬物の曝露は、Hanks 液で希釈したものを直接培養液中に添加した。

3. 細胞内 Ca^{2+} 動態の測定

神経細胞内の Ca^{2+} 動態の変化は、予め $5\mu M$ fura-2/AM を処置した神経細胞を、 $30mM$ KCl 刺激により認められる蛍光強度の変化を測定した。

4. HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の発現測定

HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の蛋白発現変化の検討は、Western blot 法により行った。また、HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の mRNA 発現変化の検討は real time RT-PCR 法により行った。

5. 統計的検討

実験成績は全て平均値±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. 研究結果

1. METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性獲得動物における HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の発現変化

METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性を獲得した動物の frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域では、対照群に比べ HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白量の有意な発現増加が認められた。さらに、mRNA 発現量の変化についても検討したところ、METH を処置した動物では、frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域において、HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit mRNA の有意な発現増加が認められた。

2. METH 誘発逆耐性形成に対する gabapentin の影響

METH 誘発逆耐性形成機構に対する効果について検討したところ、vehicle 前処置群で認められる METH の投与回数に比例した自発運動量の有意

な増加は、gabapentin の脳室内前処置により完全に抑制された (Figure 1)。

3. METH 誘発報酬効果に対する gabapentin の影響

条件づけ場所嗜好性試験を用いて、METH 誘発報酬効果に対する gabapentin の影響について検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は、gabapentin の脳室内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された (Figure 2)。

4. METH 曝露による細胞内 Ca^{2+} 動態の変化

マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いて、METH 曝露による細胞内 Ca^{2+} 動態の変化について、 Ca^{2+} imaging 法により検討した。その結果、METH (1 μ M, 24hr) の曝露により 30mM KCl 刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答は、対照群に比べ明らかな増加が認められた。この増加は、gabapentin (1 μ M, 24hr) を共存することにより完全に消失した。

D. 考察

本研究結果より、METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性獲得動物の frontal cortex および limbic forebrain において、HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白量の有意な発現増加が認められた。さらに、昨年度までの報告より、これら両部位において $\alpha 1c$ subunit 蛋白発現の増加が認められることから、METH による精神依存形成には frontal cortex および limbic forebrain 領域における L 型 HVCC を介した細胞内への Ca^{2+} 流入上昇が関与している可能性が高いものと推察される。当教室の結果より、細胞内小胞輸送に関係する Vps34 が HVCC の up-regulation 調節に関与する結果を得ており、また、Vps34 は PKC γ により調節されることを明らかにしている¹⁰⁾。さらに、METH 処置により PKC γ が活性化されることが報告されていることから⁹⁾、HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit の発現増加に、PKC γ -Vps34 経路が関与するものと想定される。

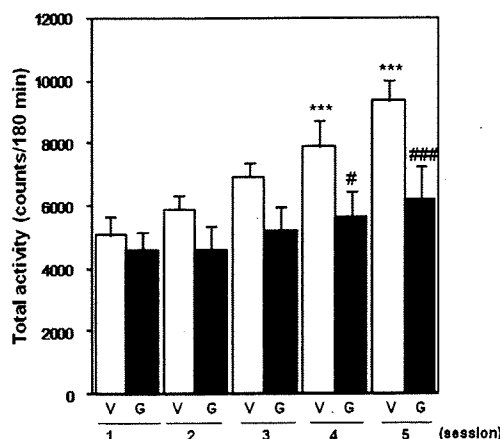


Figure 1. Blockade of the development of sensitization to methamphetamine (METH)-induced hyperlocomotion by co-treatment with gabapentin (GBP). Groups of mice were given fifth times with METH (2 mg/kg, s.c.) every 96 hr. Groups of mice were pretreated with vehicle or GBP (30 nmol/mouse, i.c.v.) 30 min before METH injection. Total activity was counted for 180 min after each treatment. The data represent the mean with S.E.M. of 10 mice. ***p<0.001 vs. the 1st drug administration, #p<0.05, ###p<0.001 vs. vehicle-METH group, each session.

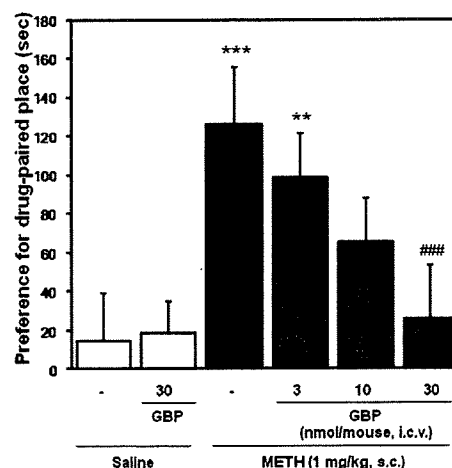


Figure 2. Effect of gabapentin (GBP) on the methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Chronic s.c. administration of METH (1 mg/kg, s.c.) produced a significant place preference in mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice. Mice were pretreated with vehicle or GBP (3, 10 or 30 nmol/mouse, i.c.v.) before s.c. administration of saline or METH. **p<0.01, ***p<0.001 vs. vehicle-saline group, ###p<0.001 vs. vehicle-METH group.

METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性形成に対して、 $\alpha 2/\delta$ subunit の阻害薬である gabapentin を処置することにより、有意な抑制が認められたことから、METH 誘発精神依存形成において $\alpha 2/\delta$ subunit が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在までに、覚せい剤の強化効果や報酬効果が、 $\alpha 1c$ subunit の拮抗薬である dihydropyridine 系薬物により抑制されることが報告されており^{3, 11)}、当教室においても同様の結

果を得ている。 $\alpha 2/\delta$ subunit は、 $\alpha 1$ subunit の修飾因子として知られており、 $\alpha 1$ subunit による細胞内への Ca^{2+} 流入を調節していると考えられているものの、その詳細な機序については不明な点が多い²⁾。また、覚せい剤の自発運動促進作用に対し、P/Q 型や N 型 HVCC の関与が報告されていることから⁷⁾、 $\alpha 2/\delta$ subunit と他の subunit の関連性や調節機序を含めた詳細な検討が必要であると考えられる。しかしながら、本研究結果を含む神経薬理的検討から、METH により L 型 HVCC 機能亢進とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 動態の変化が誘導され、これが神経細胞における機能変化を引き起こしている可能性は十分に考えられる。

一方、 Ca^{2+} imaging による細胞内 Ca^{2+} 動態の測定において、神経細胞への METH 連続曝露による細胞内 Ca^{2+} 応答の増加は、gabapentin の共処置により有意に抑制された。また、昨年までの成績より、細胞外からの Ca^{2+} 流入増加に伴った calcium-induced calcium release (CICR) が薬物依存形成に重要な役割を果たすことを明らかにしている。これらの結果から、 $\alpha 2/\delta$ subunit の up-regulation により、 $\alpha 1c$ subunit を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入の増加が引き起こされ、CICR の亢進が引き起こされるものと推察される。したがって、METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性形成における gabapentin による抑制は、このような細胞内 Ca^{2+} 応答の抑制が関与しているものと考えられる。

E. 結論

本研究より、METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性形成機構において、HVCC $\alpha 2/\delta$ subunit が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、本研究結果より、gabapentin が薬物乱用の治療薬となり得る可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Gee, N.S., Brown, J.P., Dissanayake, V.U., et al.: The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the $\alpha 2/\delta$ subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.* 271: 5768-5776, 1996.
- 2) Gurnett, C.A., De Waard, M. and Campbell, K.P.: Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha 2-\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16: 431-440, 1996.
- 3) Johnson, B.A., Roache, J.D., Ait-Daoud, N., et al.: Effects of isradipine, a dihydropyridine-class calcium-channel antagonist, on d-methamphetamine's subjective and reinforcing effects. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 203-213, 2005.
- 4) Marais, E., Klugbauer, N. and Hofmann, F.: Calcium channel $\alpha 2-\delta$ subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol. Pharmacol.* 59: 1243-1248, 2001.
- 5) Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., et al.: Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron-glia communication during the development of methamphetamine-induced psychological dependence. *Eur. J. Neurosci.* 22: 1476-1488, 2005.
- 6) Nestler, E.J.: Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci.* 8: 1445-1449, 2005.
- 7) Ogura, H., Furuya, Y., Teramoto, T., et al.: Peptide N- and P/Q-type Ca^{2+} blockers inhibit stimulant-induced hyperactivity in mice. *Peptides* 19: 1017-1022, 1998.
- 8) Ohkuma, S., Tomono, S., Tanaka, Y., et al.: Development of taurine biosynthesizing

system in cerebral cortical neurons in primary culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 4: 383-395, 1986.

9) Robinson, T.E. and Berridge, K.C.: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18: 247-291, 1993.

10) Shibasaki, M., Kurokawa, K., Katsura, M., et al.: Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse* 63: 365-368, 2009.

11) Suzuki, T., Shiozaki, Y., Masukawa, Y., et al.: Effects of calcium antagonists on the cocaine- and methamphetamine-induced conditioned place preference. *Arukuru Kenkyuto. Yakubutsu Ison* 27: 81-90, 1992.

12) Taylor, C.P. and Garrido, R.: Immunostaining of rat brain, spinal cord, sensory neurons and skeletal muscle for calcium channel α 2- δ type 1 protein. *Neuroscience* 155: 510-521, 2008.

13) Uramura, K., Yada, T., Muroya, S., et al.: Ca²⁺ oscillations in response to methamphetamine in dopamine neurons of the ventral tegmental area in rats subchronically treated with this drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 914: 316-322, 2000.

14) Vanderschuren, L.J. and Kalivas, P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 151: 99-120, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma

S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse*. 63: 365-368. 2009

2. 大熊誠太郎、芝崎真裕、黒川和宏. GABA_A受容体. *日本薬理学雑誌* 131: 388-390. 2008

2. 学会発表

1. 芝崎真裕、黒川和宏、桂昌司、大熊誠太郎: Morphine による IP₃ 受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の機能変化. 第 17 回神経行動薬理若手研究者の集い. 横浜. 2008 年 3 月.

2. 芝崎真裕、黒川和宏、桂昌司、大熊誠太郎: Morphine 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の機能亢進に対する PI 3-kinase の関与. 第 113 回日本薬理学会近畿部会. 岡山. 2008 年 6 月.

3. 黒川和宏、芝崎真裕、桂昌司、大熊誠太郎: Methamphetamine 誘発逆耐性形成機構における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の関与: α 2/ δ サブユニットを中心に. 第 113 回日本薬理学会近畿部会. 岡山. 2008 年 6 月.

4. 芝崎真裕、黒川和宏、桂昌司、大熊誠太郎: Methamphetamine 誘発精神依存形成機構における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) α 2/ δ subunit の役割. 第 43 回日本アルコール・薬物医学会総会. 横浜. 2008 年 9 月.

5. 芝崎真裕、黒川和宏、桂昌司、大熊誠太郎: Morphine 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能亢進に対する PI 3-kinase の調節機序. 第 38 回日本神経精神薬理学会. 品川. 2008 年 10 月.

6. 黒川和宏、芝崎真裕、桂昌司、大熊誠太郎: Methamphetamine 誘発逆耐性形成機構における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) α 2/ δ subunit の関与. 第 38 回日本神経精神薬理学会. 品川. 2008 年 10 月.

7. 黒川和宏、芝崎真裕、大熊誠太郎：Ethanol 誘発身体依存における gabapentin の有用性. 第 114 回日本薬理学会近畿部会. 神戸. 2008 年 11 月.

8. 芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎：Morphine 誘発報酬効果形成における高電位開口性 L 型カルシウムチャネル機能亢進機序に対する Vps34 の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.

9. 黒川和宏、芝崎真裕、大熊誠太郎：Methamphetamine 誘発逆耐性形成における高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

特願 2007-249462 (平成 19 年 9 月 26 日)

発明者：大熊誠太郎

発明の名称：薬物依存症治療剤

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Direct Evidence for the Up-regulation of Vps34 Regulated by PKC γ During Short-Term Treatment With Morphine

MASAHIRO SHIBASAKI, KAZUHIRO KUROKAWA, MASASHI KATSURA, AND SEITARO OHKUMA*
Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School, Matsushima, Kurashiki 701-0192, Japan

KEY WORDS synaptic plasticity; trafficking; μ -opioid receptor; PI 3-kinase

ABSTRACT In this study, we investigated whether PKC γ could be associated with functional changes of vacuolar protein sorting 34 (Vps34) during morphine treatment using primary cultures of cerebral cortical neurons from mice. The immunoprecipitation analysis showed that p-PKC γ and Vps34 are present together in molecular complexes. The treatment with morphine increases PKC γ and Vps34 levels. Phosphorylation of PKC γ increased Vps34 level. The inhibition of morphine-induced increase in PKC γ phosphorylation reduced Vps34 level. These results indicate that opioid receptor activation increases PKC γ phosphorylation in the neurons and, in turn, upregulates Vps34 during short-term treatment with neurons. **Synapse** 63:365–368, 2009. ©2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Vacuolar protein sorting 34 (Vps34) is the sole Class III enzyme in phosphoinositide (PI) 3-kinase family phosphorylating 3' hydroxy position of the phosphatidylinositol ring, and selectively catalyzes phosphatidylinositol to produce only PI(3)P (Herman et al., 1992; Volinia et al., 1995). PIs play several roles including regulation of membrane trafficking in cells (De Matteis and Godi, 2004). Early endosome trafficking requires PI 3-kinase activity, and dominant kinase in this organelle appears to be human homologue of Vps34 (hVps34) (De Matteis and Godi, 2004; Futter et al., 2001). However, little is known about functions of Vps34 in opioid receptor activation by morphine.

Repeated administration of morphine produces several long-lasting changes in brain function such as protein kinase C (PKC) upregulation in the nucleus accumbens (Aoki et al., 2004; Narita et al., 2002). PKC family controls numerous signaling cascades by phosphorylation of target proteins including neurotransmitter receptors and G proteins (Hug and Sarre, 1993; Premont et al., 1995). Recent investigations demonstrate neuronal cytoplasmic localization of PKC γ in soma including dendritic spines, axon and synaptic terminals (Kose et al., 1988, 1990) and modulatory roles of PKC in calcium channel trafficking via insertion of channels into the plasma membrane (Zhang et al., 2008). In addition, our preliminary data showed that morphine (0.3 μ M for 24 h) exposure to the primary cultures of cerebrocortical neurons upregulated calcium channel protein levels in neuronal

plasma membrane, whereas mRNA levels of calcium channel subunits did not change (data not shown). Taken together with these data it is suggested that functional interaction between PKC γ and Vps34 may occur and regulate mechanisms of trafficking of calcium channel subunits during morphine treatment. In this study, we therefore investigated whether PKC γ could be associated with functional changes of Vps34 during morphine exposure to the primary cultures of cerebrocortical neurons.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and primary culture of cerebral cortical neurons were carried out according to the method described earlier (Ohkuma et al., 1986). In short, the neopallium free of the meninges was removed from 15-day-old fetus of ddY mouse (Japan SLC, Hamamatsu, Japan), minced, dispersed by trypsin, and centrifuged at 1000g. Thereafter, the isolated cells were cultured at 37°C in humidified 95% air/5% CO₂ for 3 days. After the treatment of 10 μ M cytosine arabinoside for 24 h, the neurons were used on the 13th day of the culture.

Contract grant sponsor: The Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; Contract grant sponsor: Kawasaki Medical University.

*Correspondence to: Seitaro Ohkuma, M.D. Ph.D., Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki 701-0192, Japan. E-mail: sohkuma@bcc.kawasaki-m.ac.jp

Received 12 June 2008; Revised 14 August 2008; Accepted 26 August 2008

DOI 10.1002/syn.20612

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Fractions containing membranes and cytosol (S1) and endoplasmic reticulum plus Golgi complexes (microsomes, MI) were prepared from the neurons by sucrose density gradient centrifugation as described earlier (Noble et al., 2000) with a minor modification. All sucrose solutions contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 0.5% Triton X-100 with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The neurons were homogenized and centrifuged at 1000g for 10 min. Resultant supernatant (S1) was centrifuged at 20,000g for 1 h to yield the supernatant (S2), and S2 was centrifuged at 100,000g for 1 h to obtain the crude microsomal pellet (P3). The P3 was resuspended in 10% sucrose, and this formed the top of a two-step gradient of 10%/28.5% sucrose solutions. Following centrifugation at 100,000g for 2 h, the 10%/28.5% interface was collected (MI).

Cell extracts were subjected to immunoprecipitation for 2 h using 5 μ g of anti-p-PKC γ polyclonal antibodies and 25 μ l of protein G-conjugated agarose beads (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) at 4°C. The beads were washed three times with 1 ml of washing buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 0.5% Triton X-100 with a protease inhibitor cocktail]. Proteins bound to the beads were eluted with SDS/PAGE sample buffer and subjected to immunoblotting as described later. The antibody against Vps34 did not work for immunoprecipitation.

Protein concentration in the samples was assayed by the method of Lowry et al. (1951). PKC γ and Vps34 protein extracts in S1 and MI fractions were separated by SDS-PAGE on a 7.5% acrylamide gel to transfer to nitrocellulose membranes. The membrane was incubated with primary antibody diluted in PBS (1:1000 for p-PKC γ , Stressgen Bioreagents Limited Partnership, Victoria, B.C., Canada; 1:1000 for Vps34, Zymed Labs, S. San Francisco, CA) overnight at 4°C. Thereafter, the membrane was washed and incubated for 2 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:5000 in PBS. Immunoblots were detected with chemiluminescence detection (ECL) reagents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK).

Phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) and chelerythrine chloride (CHL) were obtained from Sigma-Aldrich Co., (St. Louis). Morphine hydrochloride was a product of Sankyo Co. (Tokyo, Japan). The data were expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance was assessed by the methods described in each figure legend following the application of the one-way ANOVA.

RESULTS

Using S1 extracts from the neurons, the well-characterized antibody against phospho-Thr514 of PKC γ immunoprecipitated Vps34 along with the p-PKC γ

Synapse

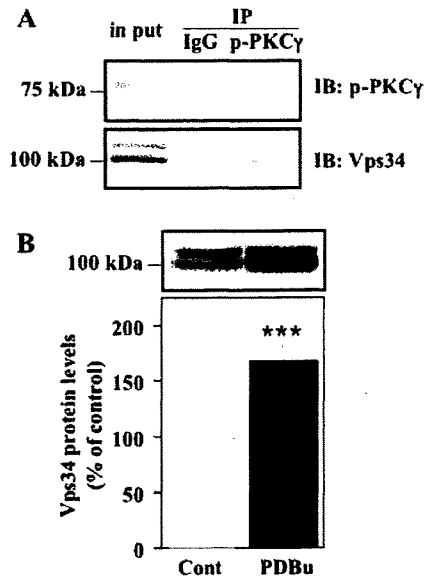


Fig. 1. **A:** Coimmunoprecipitation p-PKC γ and Vps 34 in the cerebrocortical neurons. S1 were immunoprecipitated (IP) with antibody to phospho-PKC γ (p-PKC γ), and then immunoblotted (IB) for p-PKC γ and Vps34. **B:** Vps34-IR in MI. The neurons were exposed to PDBu (1 μ M for 24 h). The data represent the mean with SEM *** P < 0.001 vs. control (Bonferroni's test; n = 5).

(Fig. 1A), suggesting that p-PKC γ and Vps34 are colocalized in the neurons as molecular complex (Fig. 1A). PKC activator PDBu (1 μ M for 24 h) significantly increased Vps34 level in MI of the neurons (Fig. 1B).

As phosphorylation of PKC γ is activated by morphine (Aoki et al., 2004), whether morphine regulates the upregulation of Vps34 was examined. Figure 2A shows that morphine exposure (0.3 μ M for 24 h) increases PKC γ phosphorylation in S1 of the neurons. We further investigated whether the increase of PKC γ phosphorylation regulates Vps34 during morphine exposure. Morphine exposure significantly increased Vps34 level, which was significantly suppressed by CHL (1 μ M for 24 h), a PKC γ inhibitor, in MI (Fig. 2B).

DISCUSSION

Vps34 forms a heterodimer with Vps15, a serine/threonine kinase (Stack et al., 1993) and localizes in Golgi apparatus and endosomes (Stack and Emr, 1994). Vps34 regulates vesicular trafficking in the endosomal/lysosomal system and participates in the recruitment of proteins with PI(3)P-binding domains to intracellular membranes (Lindmo and Stenmark, 2006). On the other hand, PKC γ works as a serine/threonine kinase to control numerous signaling cascades by phosphorylating target proteins such as neurotransmitter receptors, G proteins, and ion-channels as other kinases do (Hug and Sarre, 1993; Premont et al., 1995). As shown in this study, p-PKC γ and

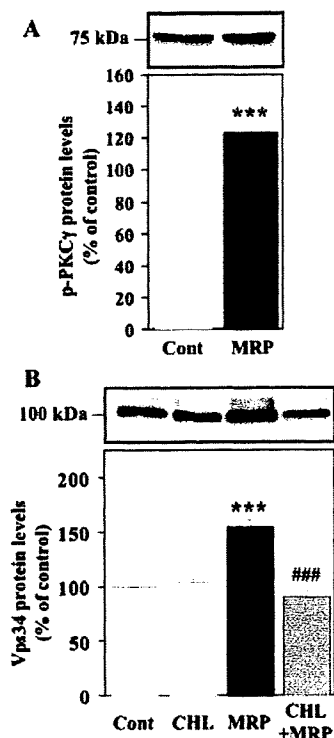


Fig. 2. **A:** Upregulation of p-PKC γ -IR in S1 of the neurons. The neurons were exposed to morphine (MRP; 0.3 μ M for 24 h). The data represent the mean with SEM *** P < 0.001 vs. control (Bonferroni's test; n = 5). **B:** Changes in Vps34 level in MI of the neurons during morphine exposure. The neurons were exposed to morphine (MRP; 0.3 μ M for 24 h) and/or PKC inhibitor CHL (1 μ M for 24 h). The data represent the mean with SEM *** P < 0.001 vs. control. ### P < 0.001 vs. MRP (Bonferroni's test; n = 5).

Vps34 are present together in molecular complexes in S1 of the neurons and the stimulation of PKC by PDBu upregulates Vps34 in MI of the cortical neurons. These results suggest that Vps34 may be translocated to Golgi and endosomes by activation of PKC γ and produce the PI(3)P for regulation of membrane trafficking.

A recent paper reported the blockade of carbachol-stimulated degranulation by inhibitory antibodies to hVps34 in the cells overexpressing M₁ muscarinic receptors (Windmiller and Backer, 2003), which suggests a link between hVps34 and G α_q -coupled receptors. In addition, several investigations provide a direct link between trimeric G-proteins and Vps34-Vps15 (Slessareva et al., 2006; Volinia et al., 1995). On the other hand, previous reports have also revealed that a G α_q -coupled receptor, metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5), relates to the development of morphine-induced rewarding effect (Aoki et al., 2004) and that upregulation of the G $\alpha_q/11$ protein and PKC is important in the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion (Narita et al., 2002). Several lines of evidence suggest

that glutamatergic projections to the nucleus accumbens originating from prefrontal cortex, hippocampus and amygdala (Meredith et al., 1993) regulate emotional and behavioral processing. Therefore, it is suggested that activation of glutamatergic neurons by morphine causes regulation of Vps34 through the stimulation of mGluR5, G $\alpha_q/11$, and PKC γ cascade in the nucleus accumbens. In fact, this study demonstrates that morphine increases both Vps34 and p-PKC γ protein levels and inhibition of PKC γ suppresses the upregulation of Vps34. Thus, it is speculated that upregulation of Vps34 by morphine in the Golgi apparatus and endosomes facilitates, in turn, the trafficking of several protein serving in vesicular transport or recycling systems. These findings provide direct evidence that upregulation of Vps34 is mediated through the activation of PKC γ during morphine treatment.

In conclusion, these data indicate that p-PKC γ and Vps34 are present together in molecular complexes in the neurons. The treatment with morphine increases PKC γ and Vps34 levels. The inhibition of morphine-induced increase in PKC γ phosphorylation reduced Vps34 level. These results indicate that opioid receptor activation increases PKC γ phosphorylation in the neurons and, in turn, upregulates Vps34 during short-term treatment with morphine.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Noriko Ohtsuki and Junko Katayama for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Aoki T, Narita M, Shibasaki M, Suzuki T. 2004. Metabotropic glutamate receptor 5 localized in the limbic forebrain is critical for the development of morphine-induced rewarding effect in mice. *Eur J Neurosci* 20:1633–1638.
- De Matteis MA, Godi A. 2004. PI-3-kinase membrane traffic. *Nat Cell Biol* 6:487–492.
- Futter CE, Collinson LM, Backer JM, Hopkins CR. 2001. Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J Cell Biol* 155:1251–1264.
- Hug H, Sarre TF. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. *Biochem J* 291:329–343.
- Herman PK, Stack JH, Emr SD. 1992. An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting. *Trends Cell Biol* 2:363–368.
- Kose A, Saito N, Ito H, Kikkawa U, Nishizuka Y, Tanaka C. 1988. Electron microscopic localization of type I protein kinase C in rat Purkinje cells. *J Neurosci* 8:4262–4268.
- Kose A, Ito A, Saito N, Tanaka C. 1990. Electron microscopic localization of γ - and β II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. *Brain Res* 518:209–217.
- Lindmo K, Stenmark H. 2006. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119:605–614.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Meredith GE, Pennartz CM, Groenewegen HJ. 1993. The cellular framework for chemical signaling in the nucleus accumbens. *Prog Brain Res* 99:3–24.
- Narita M, Mizuo K, Shibasaki M, Narita M, Suzuki T. 2002. Up-regulation of the G $\alpha_q/11$ protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience* 111:127–132.

- Noble F, Szücs M, Kieffer B, Roques BP. 2000. Overexpression of dynamin is induced by chronic stimulation of μ - but not δ -opioid receptors: relationships with μ -related morphine dependence. *Mol Pharmacol* 58:159–166.
- Ohkuma S, Tomono S, Tanaka Y, Kuriyama K, Mukainaka T. 1986. Development of taurine biosynthesizing system in cerebral cortical neurons in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 4:383–395.
- Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. 1995. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 9:175–182.
- Slessareva JE, Routt SM, Temple B, Bankaitis VA, Dohlman HG. 2006. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein α subunit at the endosome. *Cell* 126:191–203.
- Stack JH, Herman PK, Schu PV, Emr SD. 1993. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* 12:2195–2204.
- Stack JH, Emr SD. 1994. Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J Biol Chem* 269:31552–31562.
- Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, MacDougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, Domin J, Panaretou C, Waterfield MD. 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* 14:3339–3348.
- Windmiller DA, Backer JM. 2003. Distinct phosphoinositide 3-kinases mediate mast cell degranulation in response to G-protein-coupled versus FcepsilonRI receptors. *J Biol Chem* 278:11874–11878.
- Zhang Y, Helm JS, Senatore A, Spafford JD, Kaczmarek LK, Jonas EA. 2008. PKC-induced intracellular trafficking of Cav2 precedes its rapid recruitment to the plasma membrane. *J Neurosci* 28:2601–2612.

キーワード解説

GABA_A receptorsGABA_A 受容体

大熊 誠太郎, 芝崎 真裕, 黒川 和宏

1. GABA 受容体

γ アミノ酪酸 (GABA) は抑制性神経伝達物質の一つであり, その作用はこの神経伝達物質に対応する受容体である GABA 受容体に結合することにより発揮される。GABA 受容体には GABA_A, GABA_B, GABA_C 受容体の 3 種類のサブタイプが存在する。GABA_A および GABA_C 受容体はイオンチャンネルを内蔵するタイプの受容体であり, その活性化により Cl⁻ の神経細胞内への流入を増加させ, 神経細胞膜に過分極を誘発させて神経興奮を抑制させる。一方, GABA_B 受容体は生体膜を 7 回貫通する受容体であり, 前者とは異なり 3 量体 G タンパク質と共役する G タンパク質共役型受容体に分類されており, cAMP 生成を抑制して神経細胞機能を抑制する。いずれの受容体もその作用の発現は神経細胞興奮を抑制することにある。

本稿では紙幅の関係もあるので, 主に GABA 受容体のうちの GABA_A 受容体の分子構造, その機能と病態生理学的役割について解説する。GABA_B 受容体については最近の総説を参照されたい(1)。

2. GABA_A 受容体の分子構造と機能

GABA_A 受容体は 5 個のサブユニットにより構成される 5 量体であり, 現在知られている範囲ではアミノ酸配列の相違から 19 種類のサブユニットが存在する。それらは α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , π , θ および ρ (1-3) と名づけられ, これらの組み合わせの相違により多様なサブタイプが形成される。しかも脳内における局在と分布数, あるいは分布する神経細胞の種類の違いなどにより, GABA 受容体は多様な機能を示し, 中枢神経系機能の調節に参与している。

GABA_A 受容体は GABA との結合により活性化されると, 5 個のサブユニットの中心部に形成されるチャンネルを通して Cl⁻ の細胞内への流入が増加し, その結果細胞膜には過分極が誘発され, 神経細胞興奮が抑制

される(図 1)。GABA_A 受容体における GABA 結合部位は α および β サブユニットにより形成され, その結合は高親和性である。一方, 鎮静・催眠薬, 抗不安薬として臨床応用されているベンゾジアゼピン系薬物 (BZDs) は α および γ サブユニットとの境界部位に結合する(2)。

GABA_A 受容体は synaptic anchoring protein である gephyrin, あるいはチュブリンなどの細胞骨格と結合しているが, その結合の機序については解明されていない。

GABA 受容体のサブタイプのうち, GABA_C 受容体は ρ サブユニットによって構成される受容体であり(3), 網膜にのみ分布している。GABA_C 受容体は GABA_A 受容体と同様に Cl⁻ の細胞内流入の増加により過分極を起こすが, GABA_A 受容体のアンタゴニストであるピククリンに対しては非感受性であり, パルビツール酸誘導体や BZDs による機能修飾がみられず, GABA_A 受容体の亜型とする考えもある(4)。

3. GABA_A 受容体の神経細胞膜上の局在

GABA_A 受容体は神経細胞膜上の存在部位によりシ

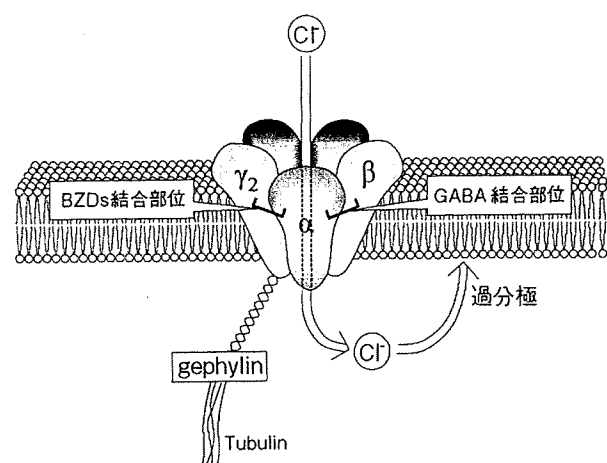


図 1 GABA 受容体の構造模式図

キーワード: GABA_A 受容体, GABA, ベンゾジアゼピン系薬物
川崎医科大学薬理学教室 (〒701-0192 倉敷市松島 577) E-mail: sohkuma@bcc.kawasaki-m.ac.jp
Seitaro Ohkuma, Masahiro Shibasaki, Kazuhiro Kurokawa

ナプス受容体 (synaptic receptors) とシナプス外受容体 (extrasynaptic receptors) とに区別される (図2)。シナプス受容体は GABA 作動性神経細胞の神経終末の GABA 放出部位の対極であるシナプス後膜に局在しており、後述するように α_2 や α_3 サブユニットを有する GABA_A 受容体である。これに対して、 α_4 あるいは α_5 サブユニットを有する GABA_A 受容体はシナプス直下以外の樹状突起棘基部やその周辺部位に

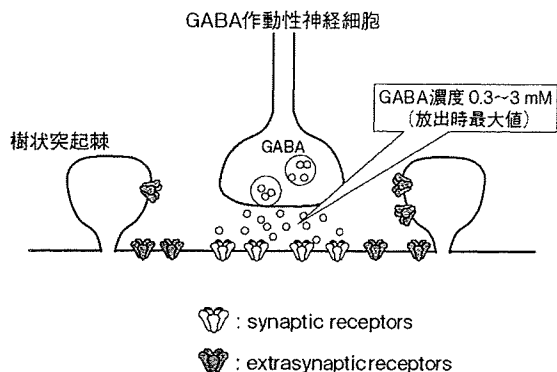


図2 GABA受容体の細胞膜上の存在部位

表1 GABA_A受容体サブユニットの薬理学的特性

サブユニット	多くみられるサブユニットの組み合わせ	神経細胞における局在部位	脳内分布	薬理学的特性
α_1	$\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$	synaptic extrasynaptic	広汎に分布	BZD _S + 最も多く分布 (60%) 鎮静, 健忘, 抗けいれん作用
α_2	$\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$ $\alpha_2 \beta_x \gamma_1$	synaptic synaptic		BZD _S + 15-20% 抗不安作用
α_3	$\alpha_3 \beta_x \gamma_2/3$	synaptic extrasynaptic		BZD _S +, ドパミン神経系機能の調節 10-15%
α_4	$\alpha_4 \beta_{2/3} \gamma$ $\alpha_4 \beta_{2/3} \delta$	extrasynaptic extrasynaptic	視床, 歯状回	BZD _S - 5% 以下 5% 以下
α_5	$\alpha_5 \beta_3 \gamma_2$	extrasynaptic	視床, 嗅球, 大脳皮質	BZD _S + 5% 以下, 記憶, 学習
α_6	$\alpha_6 \beta_{2/3} \gamma_2$ $\alpha_4 \beta_{2/3} \delta$	extrasynaptic extrasynaptic	小脳 小脳	BZD _S - 5% 以下
β_1	$\alpha_3 \beta_1 \gamma_2/3$?		BZD _S + 静脈麻酔時の鎮静
β_2	$\alpha_{1/4/6} \beta_2/ \gamma_{1/2}$ $\alpha_{4/6} \beta_2 \delta$	synaptic, extrasynaptic extrasynaptic		静脈麻酔時の不安化, 無痛
β_3	$\alpha_2 \beta_3 \gamma_2$	synaptic, extrasynaptic		BZD _S + BZD _S + BZD _S + BZD _S + BZD _S -
γ_1	$\alpha_2 \beta_3 \gamma_1$?		
γ_2	$\alpha_x \beta_x \gamma_2$	synaptic		
γ_3	$\alpha_3 \beta_x \gamma_3$ $\alpha_5 \beta_3 \gamma_3$?		
δ	$\alpha_4 \beta_{2/3} \delta$ $\alpha_6 \beta_{2/3} \delta$	extrasynaptic	小脳, 歯状回	BZD _S -
ϵ		?		BZD _S -
η		?		BZD _S -

BZD_S+ : ベンゾジアゼピン系薬物に感受性あり, BZD_S- : ベンゾジアゼピン系薬物に感受性なし, ? : 不明

存在する。GABA_A受容体の GABA に対する EC₅₀ 値は 50 μ M 以下であり、通常シナプス間隙における GABA 濃度は最も高いときには 0.3 ~ 3.0 mM になる。従って、シナプス外 GABA_A 受容体においてもその周辺部位には低濃度の GABA は存在し、BZDs の GABA_A 受容体増強作用は十分に発揮されると考えられている。 γ_2 サブユニットはゲフィリンを介して GABA_A 受容体がシナプスに局在するように調節しており、 γ_2 サブユニットを欠く受容体はシナプス外受容体として存在することが多い(5)。

4. GABA_A 受容体サブタイプの薬理作用と病態との機能的関連性 (表1)

β あるいは γ_2 サブユニットと受容体を構成する α_1 , α_2 , α_3 および α_5 サブユニットを含む GABA_A 受容体は脳内ではもっとも普遍的に存在する受容体であり、BZDs に対して感受性を示す。これらのなかで $\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$ 受容体は最も多く、嗅球顆粒細胞層、視床網状核、脊髄運動ニューロンには存在しない(6) が、すべての GABA_A 受容体の 40 ~ 60% を占める。

α_1 サブユニットの細胞外ドメインの 100 番目前後

に存在するヒスチジン残基はBZDs作用上必須である(7)。 α_2 、 α_3 および α_5 サブユニットにも同様にヒスチジン残基が存在し、かつBZDs感受性であるが、相当部位にアルギニン残基を有する α_4 および α_6 サブユニットではBZDsに対し感受性を示さない。

α_1 サブユニットはBZDsの薬理作用である鎮静、健忘、抗けいれん作用に重要な役割を果たす(8)が、抗不安作用には関与していないとされている。

α_2 サブユニットの点変異を加えたGABA_A受容体では、ジアゼパム誘発性の β 波頻度の増加やREM睡眠時の θ 波の増加が減弱することから、古典的BZDsによりもたらされるREM睡眠の減少、徐波睡眠の減少、 β 波頻度の増加などには α_2 GABA_A受容体が関与していると考えられる(9)。また、BZDsの α_2 サブユニットへの結合量は極めて低いにもかかわらず、 α_2 サブユニットはジアゼパムの抗不安作用を示す。一方、 α_3 GABA_A受容体欠損マウスではBZDsの抗不安作用が減弱するが、 α_3 サブユニットへの結合量が高いことから、抗不安作用の発現の主体は α_2 サブユニットと考えられている。

中枢神経系におけるドパミン作動性神経系の抑制には α_3 GABA_A受容体が主として関与している。特に、音響驚愕反応のプレパルスインヒビションの著明な低下が α_3 GABA_A受容体欠損マウスで観察され、ハロペリドールはこの低下を回復させる(10)。このことから、 α_3 GABA_A受容体アゴニストは鎮静作用や錐体外路症状をもたらさない抗精神病治療薬となる可能性が考えられる。

α_5 サブユニットはBZDsの抗不安効果に影響しないが、実験動物における記憶や学習に関係する可能性が示唆されている(11)。このサブユニットを含む受容体は視床錐体細胞樹状突起軸部近傍やその樹状突起棘基底部に分布しており、シナプス外受容体として存在する。

BZDsに感受性を示さない α_4 および α_6 サブユニットの脳内分布密度は低い。前者は視床や歯状回に分布しており、後者は主に小脳顆粒細胞層に限定して分布するが、この受容体は小脳内に存在する全GABA_A受容体の30~50%を占める。いずれのサブユニットも $\beta_{2/3}\gamma_2$ のほか、 $\beta_{2/3}\delta$ サブユニットとも受容体を形成する。 α_4 および α_6 サブユニットが δ サブユニットとともに受容体を形成するときは、シナプス外受容体として存在する。この受容体は高いアゴニストへの感受性を有しているため、低濃度のアゴニストの存在のみでも効率よく神経細胞興奮を抑制的に調節する。

β_2 および β_3 は麻酔作用に関係するが、異なった麻

酔時の症状や症候に関与する。例えば、静脈麻酔薬であるエトミナデートの鎮静作用には β_2 を含むGABA_A受容体が関わり、またエトミナドによる深麻酔時に見られる不動化や無痛は β_3 を含むGABA_A受容体の作用と考えられている(12)。一方、揮発性麻酔薬であるハロタン、エンフルランの麻酔作用には β_3 GABA_A受容体の関与はみられない。

γ_2 サブユニットは前述したようにゲフィリンを介してのGABA_A受容体のシナプスへの局在に重要な役割を果たすとともに、 α サブユニットとともにBZDs結合部位を形成する。 γ_1 および γ_3 サブユニットに関する生理的役割についての詳細は不明である。

δ サブユニットを構造内に有するGABA_A受容体は歯状回および小脳などの限られた脳内部位に局在しており、GABAに対し高い感受性を示す。またこのタイプの受容体の脱感作の発生は緩徐であり、強直性けいれんなどの抑制には好ましい薬理学的特性と考えられている(13)。

ϵ および θ を有するGABA_A受容体はBZDsに非感受性であり、またその受容体構造には γ_2 サブユニットを有しているが、これらの受容体はシナプス外受容体として存在する。

5. おわりに

GABA_A受容体は5量体であるため、受容体としての機能の解析は多くが各サブユニットの点変異の導入による動物モデルの作製とその行動薬理的、あるいは薬理的、神経化学的検討などで行われている。上述のように徐々に各サブユニットの生理機能と病態における役割が明らかになりつつある。今後、これらの解析が進展することにより、有害作用の少ないサブユニット選択的作用を有する薬物の開発に繋がるものと期待される。

文 献

- 1) Emson PC. Prog Brain Res. 2007;160:43-57.
- 2) Hevers W, et al. Mol Neurobiol. 1998;18:35-86.
- 3) Bormann J. Trends Pharmacol. 2000;21:16-19.
- 4) Bernard EA, et al. Pharmacol Rev. 1998;50:291-313.
- 5) Mangan PS, et al. Mol Pharmacol. 2005;67:775-788.
- 6) Fritschy J, et al. J Comp Neurol. 1995;359:154-194.
- 7) Dunn SM, et al. Mol Pharmacol. 1999;56:768-774.
- 8) McKernan RM, et al. Nat Neurosci. 2000;3:587-592.
- 9) Kopp C, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:3674-3679.
- 10) Yee BK, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:154-159.
- 11) Crestani F, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:8980-8985.
- 12) Jurd R, et al. FASEB J. 2003;17:250-252.
- 13) Brickley SG, et al. J Physiol. 1996;497:753-759.

乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討

分担研究者：新田淳美¹

研究協力者：日比陽子¹、劉 文亭¹、鍋島俊隆^{1,2}、山田清文¹、

（¹名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部、²名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室）

【研究要旨】薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、インターネットサイトを利用した情報の氾濫や供給組織の巧妙化等に拠って拡大し、現在も状況の悪化が続いている。日本においてはメタンフェタミンを主とした覚せい剤や麻薬による事犯の若年化が進み、薬物依存に対する法的、社会的な施策の充実と共に、医学的見地からの正しい対処法を見出す必要がある。そのためには薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究が必須である。我々はメタンフェタミンまたはモルヒネを投与したマウス側坐核で共通して発現が増加している遺伝子を検討することによって薬物依存形成のメカニズム解明を行い、薬物依存の予防や治療に用いることの出来る化合物についても報告している。しかし依存の形成機構は複雑であり、未知の遺伝子が、薬物依存形成の key を握っている可能性が考えられる。本研究では、PCR select cDNA サブトラクション法を用いて覚せい剤依存の形成に関連する新規遺伝子の同定を試み、その作用メカニズムの詳細な解明を試みた。昨年度の本研究課題において、shati および piccolo という 2 つの分子が薬物依存に深く関わっていることを明らかにした。本年度は、両分子の遺伝子組み換えマウスを作成し、これらのマウスを使用して両分子の生理機能について検討を開始した。特に shati については、抗体酵素免疫測定法の確立に成功し、精神疾患のマーカーとしての可能性を模索中である。

A. 研究目的

薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、情報の多様化や供給組織の巧妙化等に拠って拡大し、21 世紀を迎えた今日も、状況の悪化が続いている。日本においてはメタンフェタミンを主とした覚せい剤や麻薬による事犯の若年化が進み、薬物依存に対して法的、社会的な施策の充実と共に、医学的見地からの正しい対処法を見出す必要がある。このような状況を打破するために、薬物依存の形成メカ

ニズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究を行う必要がある。メタンフェタミンまたはモルヒネを投与したマウス側坐核で共通して発現が増加している遺伝子を検討することによって薬物依存形成メカニズムの解明を行ってきている^(2-5,9)。また薬物依存の予防や治療に用いることの出来る化合物についても報告している⁽⁸⁻¹¹⁾。しかし、薬物依存の形成機構は複雑であり、未知の遺伝子が、薬物依存形成の key を握っている可能性が考えられる。本研究では、PCR select cDNA