

O-6-1

アルコール依存時のアルコール自発摂取に対するnifedipineの効果

○黒川和宏¹、山本昇平²、大熊誠太郎³

¹国際医療福祉大学薬学部、²川崎医大・薬理、³京都府立医科大学

【目的】アルコール依存状態では、中枢神経系において興奮性神経であるグルタミン酸作動性神経の活動が亢進し、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達の間不均衡が生じていることが報告されている。従って、この亢進した興奮性神経伝達を抑制することで神経伝達の不均衡を是正すれば、飲酒欲求を抑制できると考えられている。これまでに、脳内の神経細胞内 Ca^{2+} 動態、特にL型カルシウムチャネルが興奮性に働き、アルコール身体依存発現に関与することを明らかにしている。しかしながら、アルコール自発摂取に対するL型カルシウムチャネルの役割については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、アルコールの自発摂取に対するL型カルシウムチャネルの関与について、アルコール慢性動物を用いて、行動薬理学的および神経化学的観点から詳細に検討した。

【方法】アルコール慢性処置は、Goldsteinの方法に従い、マウスにアルコール蒸気を間欠的(16時間/1日)に4日間吸入させ、3日間休薬することを1サイクルとし、2サイクル行った。アルコールの自発摂取は、2-bottle choice法に従い、15%アルコール摂取量により評価した。L型カルシウムチャネルの α_1 subunitであるCav1.2およびCav1.3のタンパク質の発現をWestern blot法ならびにmRNAの発現をReal-time PCR法により解析した。

【結果および考察】アルコール慢性処置を2サイクル処置した24時間後の側坐核領域において、対照群と比較してL型カルシウムチャネルの α_1 subunitであるCav1.2およびCav1.3のmRNAの有意な増加が認められた。さらに、アルコール自発摂取を始める時点での側坐核領域のPSD-95画分においてCav1.2およびCav1.3のタンパク質発現の増加が認められた。このような条件下で、アルコール慢性処置群において対照群と比較してアルコール自発摂取量の有意な増加が認められた。次に、アルコール慢性処置後におけるアルコール自発摂取量の増加へのL型カルシウムチャネルの関与について、L型カルシウムチャネルの阻害薬であるnifedipineを用いて検討したところ、アルコール慢性処置後に認められるアルコール自発摂取量の増加は、nifedipineを側坐核に微量注入することにより用量依存的に抑制された。以上の結果より、アルコール依存時での飲酒欲求には、側坐核のL型カルシウムチャネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

O-6-2

Ethanol 慢性処置によるmTOR 活性変動に対する dopamine 神経応答の変化

芝崎真裕、古谷絵菜里、青木萌、新井理沙、成田道子、葛巻直子、成田年
星薬科大学 薬理学教室

Mammalian target of rapamycin (mTOR) は、phosphoinositide 3-kinase に属する serin/threonine kinase であり、タンパク質と相互作用し、mTORC1 と mTORC2 と呼ばれる二つの異なった複合体を形成する。mTORC1 は細胞内外のアミノ酸、ストレス、酸素、エネルギー、増殖因子に応答し、タンパク質、脂質合成、オートファジーを含む多くの過程を調整し、神経機能を調節することが知られている。一方、ethanol は肝細胞において alcohol dehydrogenase および aldehyde dehydrogenase により酢酸にまで代謝されることで、ミトコンドリアでの TCA 回路の代謝活性を抑制し、エネルギーの生合成を抑制することが報告されていることから、ethanol によるミトコンドリアにおけるエネルギー生合成の変化が、mTOR の活性に関わると考えられる。一般に ethanol の長期曝露は、中脳辺縁 dopamine 神経系に可塑的变化を引き起こすことで ethanol 依存を誘導すると考えられている。しかしながら、ethanol が mTOR Signal に与える影響は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、ethanol 慢性処置モデルを作製し、mTOR の変化について、行動薬理的、免疫組織学的ならびに生化学的に検討を行った。

Ethanol 慢性処置モデルの腹側被蓋野領域における mTOR のタンパク質発現量の検討を行ったところ、有意な増加が認められた。mTORC1 は下流因子のリン酸化を介し、タンパク質、脂質合成、オートファジーを調節することが報告されている。そこで次に、下流因子およびオートファジー関連因子についてタンパク質発現量の検討を行ったところ、ethanol 慢性処置モデルの腹側被蓋野領域において p-S6K、p-4E-BP、p-LRRK2、p-FOXO1 のタンパク質発現量の有意な増加が認められた。そこで、ethanol 慢性処置における ethanol 誘発報酬効果に及ぼす影響を検討した。その結果、ethanol 慢性処置における ethanol 誘発報酬効果の増強は、mTOR 阻害薬である rapamycin (3 nomol/mouse, i. c. v.) の処置により有意に抑制した。以上、本研究により、ethanol 慢性処置は、腹側被蓋野領域において mTOR の活性変動を変化させ、ethanol に対する dopamine 神経応答の変化に関与する可能性が示唆された。

O-6-3

白血球の遺伝子発現情報を利用した新規うつ様状態評価系の開発

宮田茂雄^{1, 2}、三國雅彦²、柳川右千夫¹、福田正人²

群馬大学大学院医学系研究科・¹遺伝発達行動学分野、²神経精神医学分野

【目的】基礎薬理学研究において、抑うつ状態に関わると考えられる脳内ネットワークの解析や、抗うつ効果を有すると考えられる化合物の有効性評価は、主に動物の情動行動を指標にして行われている。しかし、モノアミン欠乏仮説に則った抗うつ薬以外はこれまでに開発されていないという事実と、うつ病の診断基準は徐々に見直されてきていることを考慮すると、時代の流れに即した新たな抑うつ様状態の指標を開発することも基礎薬理学の重要な課題といえる。近年、白血球に発現しているmRNAを指標にして、うつ病の客観的補助診断マーカーを開発する試みが精力的に行われている。本研究では、うつ病モデルマウスとうつ病患者の白血球における遺伝子発現情報の類似性について検討し、白血球mRNAを指標とした新たな抑うつ様状態評価系を開発する重要性について考察した。

【方法】8週齢の雌性C57BL/6Jマウスの卵巣を摘除 (OVX) し、慢性軽微ストレス (CMS) を負荷することで、更年期の女性に認められるうつ病の病態モデルを作製した。また、初発年齢が50歳以降の女性のうつ病患者10名と同年齢の健康な女性7名をリクルートし、ハミルトンうつ病評価尺度により抑うつ状態の重症度を評価した。血液 (白血球) に発現している遺伝子について、マイクロアレイ法による網羅的解析を行った。遺伝子発現情報に生物学的な注釈を付与し、モデルマウスと患者のデータを比較した。

【結果】非ストレス下で飼育したOVXマウスは対照群と同様の情動行動を呈したが、CMS負荷することによりOVXマウスにおいてのみうつ様行動および不安様行動が誘発された。マウスの白血球に発現している多くの遺伝子が、OVXおよびCMSの影響により有意な量的変化を示した。また、うつ病患者の白血球では健常者と比べて約4,000種の遺伝子プロンプに有意な発現量変化が認められた。発現量変化を認めた遺伝子群に生物学的な注釈を付与し、モデルマウスと患者のデータを比較した結果、マウスの白血球に対するOVXの影響はうつ病患者に認められた遺伝子発現変化と近似していた。一方、マウスの白血球に対するCMSの影響はうつ病患者に認められた遺伝子発現変化とは大きく異なっていた。

【考察】行動実験の結果に従えば、OVXとCMS負荷を併用したマウスがうつ病モデルと解釈できた。一方、遺伝子発現解析の結果からは、OVXがうつ病病態と近似した影響を与えており、CMS負荷はうつ病病態とは異なる影響を与えていることが示唆された。白血球に発現しているmRNAはうつ病の病態分類や治療反応性の客観的な指標になると期待されており、基礎薬理学研究への応用が期待される。

O-6-4

抑肝散とその活性成分のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への作用

植木俊之、今村幸子、田淵雅宏、川上善治、溝口和臣、五十嵐康、服部智久、加瀬義夫

株式会社ツムラ 製品戦略本部 ツムラ研究所

【目的】抑肝散は7つの生薬から構成される漢方薬であり、近年、認知症患者の攻撃性や幻覚などのBPSDを改善することが報告されている。本稿では抑肝散のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への作用と、それらを担う活性成分について報告する。

【方法】BPSDモデル動物や培養細胞系を用いて、抑肝散のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への効果を検討した。その後、抑肝散のこれら神経系への作用を担う成分の同定を試みた。さらに、それら成分の血中や脳内への移行性、脳組織への結合特性を解析した。

【結果】抑肝散は5-HT_{1A}受容体の刺激を介して隔離飼育ストレスマウスの攻撃行動を改善した。釣藤鈎アルカロイドの一つであるガイソシジンメチルエーテル (GM) は5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を示し、隔離飼育ストレスマウスの攻撃行動を改善した。抑肝散はまた、チアミン欠乏ラットの興奮性神経症状を改善し、脳内の過剰なグルタミン酸放出を減少させた。チアミン欠乏条件下で培養したアストロサイトにおいて、抑肝散はグルタミン酸トランスポーターの減少を改善し、アストロサイトへのグルタミン酸取込みを促進した。甘草由来のトリテルペン、18β-グリチルレチン酸 (GA) もまた、アストロサイトへのグルタミン酸取込みを促進した。抑肝散の経口投与後に両成分は血中および脳で検出された。In vitro定量的オートラジオグラフィの結果、³H GMの結合部位は前頭前野に、³H GAの結合部位は海馬に高密度に分布した。

【まとめ】抑肝散はセロトニンおよびグルタミン酸神経系へ作用して攻撃性や神経興奮を改善し、それぞれの作用にはGMとGAが関与することが示唆された。これらの薬理作用と成分が抑肝散のBPSD改善効果に寄与していると考えられる。

O-6-5

成熟マウス大脳皮質におけるmGluRを介した経験依存性シナプス維持機構

大久保 洋平¹、久保田 淳¹、三上 義礼^{1, 2}、金丸 和典¹、関谷 敬¹、飯野 正光^{1, 3}

¹東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学、²東邦大学医学部医学科生理学講座統合生理学、³日本大学医学部細胞分子薬理学

感覚などの経験入力に依存して惹起される大脳皮質可塑性は、動物が周囲の環境へ適応するための基盤である。幼若期のみならず成熟期においても経験依存性の可塑性が観察されるが、その機構には不明な点が多い。本研究では、成熟マウス大脳皮質における、ヒゲ切除依存性の可塑性を解析した。五日間のヒゲ切除により、ヒゲ入力に対応する大脳バレル皮質の第4層-第2/3層シナプスにおいて、前シナプス放出確率の低下が惹起された。このヒゲ切除依存性の放出確率低下は、5型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR5) のpositive allosteric modulatorの投与により阻害され、放出確率が維持された。さらに、ヒゲを切除しないマウスに対してmGluR5のnegative allosteric modulatorを投与したところ、前シナプス放出確率低下を再現することができた。さらに、後シナプス側の第2/3層錐体細胞選択的に、イノシトール三リン酸 (IP₃) 分解酵素の過剰発現によってmGluR5に共役するIP₃産生を阻害したところ、前シナプス放出確率低下を再現することができた。以上より、成熟マウスにおいては、ヒゲ入力により第2/3層錐体細胞においてmGluR5-IP₃シグナルが持続的に活性化されることで、なんらかの逆行性機構を介して前シナプス機能が維持されており、この維持機構の遮断がヒゲ切除依存性の可塑性をもたらすことが強く示唆される。

O-6-6

島皮質における抑制性シナプス伝達の短期可塑性に対する電位依存性カルシウムチャネルサブタイプの役割

山本清文, 小林真之

日本大学歯学部薬理学講座

中枢神経系のシナプスにおける神経伝達物質の放出は、神経終末に発現する電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を介した $[Ca^{2+}]_i$ の流入によってトリガーされる。選択的なVDCC遮断薬を用いた実験によって、小脳、脊髄ならびに海馬における伝達物質放出は、主としてP/Q-typeおよびN-typeが関与することが報告されている (Takahashi and Momiyama, 1993; Minz et al., 1992)。しかしこれらVDCCのサブタイプの違いが、シナプス終末における神経伝達物質の放出様式におよぼす影響は不明な点が多い。そこで本研究では、シナプス前終末に存在するVDCCのサブタイプによって、GABAの放出効率が変化するか否かを明らかにする目的で、ラット島皮質の急性スライス標本を作製し、複数のニューロンから同時にホールセル記録を行った。抑制性ニューロンを2連の脱分極性パルス (刺激間隔50 ms) にて興奮させ、シナプス後ニューロンからGABA作動性シナプス後電流 (uIPSCs) を記録して各種VDCC阻害薬の効果を調べた。さらにuIPSCの振幅比 (paired-pulse ratio, PPR) を算出し、シナプス終末におけるGABAの放出特性を評価した。GABA作動性ニューロンの1つであるfast-spikingニューロンが投射している異なるタイプのシナプス後ニューロンから抑制性シナプス応答を記録したところ、N-typeの選択的な遮断薬である、 ω -conotoxin-GVIA (CgTx, 3 μ M) の投与に対して、一方は減弱し、他方は変化が認められなかった。これは、同じシナプス前ニューロンから投射するシナプス終末であってもN-typeの発現量が異なることを示している。またPPR値とシナプス応答に対する ω -agatoxin-IVA (AgTx) の感受性と相関をしらべたところ、正の相関性が認められた ($r = 0.45$, $P = 0.02$, $n = 28$, Pearson correlation) ことから、AgTxの感受性が高いシナプスほど、GABAの放出効率が低い可能性が示された。この可能性を検証するため、CgTxを投与しP/Q-type VDCCを介したシナプス放出の条件のもと、高濃度 (4 mM) の $[Ca^{2+}]_i$ で置換したところ、PPR値の増加が認められた。またCgTxとP/Q-type VDCCの賦活薬であるroscovitine (30 μ M) の併用投与においてもPPRの増加が認められた。これらの結果は、シナプス前ニューロンにおけるVDCCサブタイプの発現割合の違いが、シナプス後ニューロンに対する抑制効率を制御している可能性を示唆する。