

平成 21 年 3 月 30 日現在

研究種目： 若手研究 B

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19790833

研究課題名（和文）ドーパミン神経を介した後シナプス細胞へのニコチン、エタノールの作用

研究課題名（英文） The effects of nicotine and ethanol on postsynaptic neurons through dopaminergic neurons

研究代表者

井上 雄一郎 (INOUE YUICHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号： 40326343

研究成果の概要：

タバコとアルコールの共依存の頻度の高さ、タバコの離脱症状の強さのために禁煙の困難さなどの脳内での生物学的機序を明らかにするために、研究代表者が確立した腹側被蓋野 (VTA) + 側座核 (NAcb) の初代神経共培養システム (VTA のみ、NAcb のみ、VTA+NAcb) を利用して、PKA-cAMP-CREB-CRE 経路に注目し、遺伝子発現の変化を見るために細胞に CRE-luciferase を含むプラスミドを一時的に発現させてエタノール単独(EtOH)、ニコチン単独(Nic)、エタノール+ニコチン(EtOH+Nic)で刺激した際の luciferase 活性の測定、細胞免疫染色法などによる研究を行った。

平成 19 年度は低濃度の EtOH+Nic においてのみ、側座核の後シナプス神経細胞に細胞内シグナルの変化や遺伝子発現を誘導し、これが後シナプスドーパミン D₂ 受容体(D2R)、アデノシン A_{2a} 受容体(A2aR)両者の働きを必要とする結果を得たことから、アルコールとタバコの共依存という現象メカニズムの一つとして D2R, A2aR の働きを必要とする可能性を示した。

平成 20 年度は Nic の長時間刺激、離脱、再刺激 (Nic、EtOH+Nic) による luciferase 活性を検討した。Nic 長時間刺激群での活性低下からニコチン受容体 (nAChR) の脱感作による神経終末からのドーパミン(DA)放出低下による影響が、Nic 前処置群では離脱後の Nic 再刺激で luciferase 活性が上昇したことから慢性 Nic 投与による細胞内での神経伝達系の慢性的な変化が考えられる。しかし、この慢性的な変化をタンパク質、遺伝子レベルで検討するまでには至っていない。

当初計画していた、HPLC-ECD 法等を用いた細胞外アデノシン、ドーパミン濃度の測定は十分に検討できなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：薬物依存、ニコチン、ドーパミン、アデノシン、腹側被蓋野、側座核、cyclic AMP、G 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

タバコは世界中で使用されている依存性薬物であり、依存による継続喫煙の結果、肺癌等の多数の腫瘍性疾患、動脈硬化、高血圧の増強による循環器系疾患合併症の危険の増大をもたらす、タバコ喫煙関連疾患で必要な医療費は年間1兆円に上ると言われており、予防と同時に禁煙の教育が重要である。禁煙成率は月に6%といわれており、タバコの依存性の強さが考えられ、タバコ依存の治療に結びつく、タバコの依存をもたらす主成分であるニコチンの脳内での作用機序を明らかにすることが必要と考えられた。

その際、日常生活でよく見られる次の2つの現象に注目し、研究代表者が確立した胎児ラット部位別脳神経細胞初代培養を利用してニコチン、エタノールが神経細胞内のシグナル伝達に与える変化を明らかにする研究を行った。

- 1) ニコチン依存の者はアルコール依存である率が高い、また、アルコール依存者にはニコチン依存の率が高い、という共依存が多数報告されていること。
- 2) タバコ喫煙者は、ニコチンが切れてくると離脱症状として不快感、不安、いらいら、動悸、などの精神・自律神経症状を訴える(Henningfield JE, 1996)。また、朝の一本目の喫煙で得られる多幸福感・抗不安感が最大となること。

タバコの依存性は主成分のニコチン(Nic)に因ると言われており、Nicは脳内のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に結合して細胞の機能に変化を起こすことで始まると考えられている。

依存の獲得には脳内報酬系と呼ばれる腹側被蓋野(VTA)から側座核(NAc)に投射するドーパミン(DA)作動性A10神経への作用が重要視されている(Benowitz NL, 1996)。

nAChRはDAニューロンのVTA(細胞体)、NAc(軸索終末)両方に発現しており、A10神経のカルシウム流入による発火頻度の増加と軸索終末からのドーパミンの放出の両方に関わっている(Wonnacott S, 2005)。放出されたドーパミンはNAcにある節後神経であるγアミノ酪酸(GABA)性のニューロンに発現しているドーパミン受容体(DAR)に結合して細胞内情報伝達系の機能変化やGABA性神経の興奮性の変化を来すが、その細胞内

シグナル伝達の変化に関して不明な点が多い。

1) ニコチン依存の者はアルコール依存である率が高い、また、アルコール依存者にはニコチン依存の率が高い、という二重依存が報告されている(Istvan J, 1984; Sobell LC, 1990)。これはエタノールとニコチンが脳内報酬系で以下のいずれかの機序で相互作用を行っていることに因ると考えられる。(1)ニコチンとエタノールを併用すると少量ずつでも相互作用的にドーパミンの放出を増やすか、または(2)エタノールにより増加する細胞外アデノシン(Nagy LE, (1990))とニコチンにより放出されたドーパミンが後シナプスGABA性ニューロンへ相互作用を行い、細胞内シグナル伝達に変化をもたらす遺伝子産物の発現が各薬物単独とは異なった反応を来す。

2) タバコ喫煙者は、ニコチンが切れてくると離脱症状として不快感、不安、いらいら、動悸、などの精神・自律神経症状を訴える(Henningfield JE, 1996)。また、朝の一本目に得られる多幸福感・抗不安感が最大で、日中はそれほどの快楽が得られず、これはnAChRの脱感差によると考えられている。これらの現象を裏付けるCRE介在遺伝子産物の発現の変化やそれに関するシグナル伝達系の働きの変化に焦点を当てて明らかにする予定である。

2. 研究の目的

日常生活でよく見られる次の2つの現象に注目し、研究代表者が確立した胎児ラット部位別脳神経細胞初代培養を利用してニコチン、エタノールが神経細胞内のシグナル伝達に与える変化をPKA-cAMP-CREB-CRE経路に注目し、遺伝子発現の変化を見るためにluciferase活性の測定や免疫組織学的方法を用いて明らかにする研究を行った。

1) ニコチン依存の者はアルコール依存である率が高い、また、アルコール依存者にはニコチン依存の率が高い、という共依存が多数報告されていること。

2) タバコ喫煙者は、ニコチンが切れてくると離脱症状として不快感、不安、いらいら、動悸、などの精神・自律神経症状を訴える。ま

た、朝の一本目の喫煙で得られる多幸感・抗不安感が最大となることもよく報告されている。

3. 研究の方法

(1) ラット胎児の VTA のみ、NAcb のみ、VTA+NAcb の初代神経培養を行い、12-13 日間培養する。

(2) 平成 19 年度は 3 種類の初代神経細胞の培養 13 日に一時的に CRE-luciferase プラスミド発現させ、14 日にニコチン(Nic)とエタノール(EtOH)で刺激時の混合培養下でのドーパミンを介した NA cb 神経への作用を luciferase 活性で測定する。

(3) 平成 20 年度は 36 時間 Nic で刺激し(CHR)、12 時間 Nic を含まない培地に交換する(W/D)。その後 Nic と EtOH を単独、または組み合わせて各培養細胞群を刺激(CHA)し luciferase 活性を測定した。

4. 研究成果

(平成 19 年度) : 25mM エタノール(EtOH25)単独、または 3 μ M ニコチン(Nic3)単独では VTA、NAcb、VTA+NAcb いずれも CRE-luciferase 活性の上昇を認めないが、VTA+NAcb を EtOH25 + Nic3 で刺激した場合のみ luciferase 活性が上昇した。この上昇がドーパミン D2 受容体拮抗薬、またはアデノシン A2a 受容体拮抗薬の前処置で抑制され、また上記条件で刺激した際の免疫染色で観察されたリン酸化 CREB と μ オピオイド受容体の共染色が D2R, A2aR 受容体阻害薬、PKA 阻害薬、G β γ 阻害薬で阻害された。アルコールとタバコの共依存という現象メカニズムの一つとして D2R, A2aR の働きを必要とする可能性を示した。

(平成 20 年度) : 36 時間 Nic で刺激し (CHR)、12 時間 Nic を含まない培地に交換する(W/D)。その後 Nic または EtOH を単独、または Nic+EtOH で各培養細胞群を刺激(CHA)したところ、CHR ではニコチン使用群の Luciferase 活性(Luc)が対照群に比べて低い傾向があり、W/D では Luc は対照群と差がなく、CHA にて前処置群は非前処置群と比べて Luc が高値であり、CHA 時のニコチン濃度に依存するが、CHR 時のニコチン濃度とは相関がなかった。CHA 時のエタノール単独およびエタノールとニコチン併用群は Luc に統計学的有意差は得られなかった。これらの結果から Nic 長時間刺激群での活性低下からニコチン受容体 (nAChR) の脱感作による神経終末からのドーパミン(DA)放出低下による影響が、離脱後の Nic 再投与で Nic 前処置群で luciferase 活性が上昇したことから慢性 Nic 投与、離脱による細胞内での Nic の渴望や精神依存につながる神経伝達系の

慢性的な変化が生じたことが考えられる。しかし、現在のところ、この慢性的な変化をタンパク質レベル、遺伝子レベルでの特定には至っていないため、今後の課題と考える。また、当初計画していた、HPLC-ECD 法等を用いた細胞外アデノシン、ドーパミン濃度の測定は十分に検討できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yuichiro Inoue, Lina Yao, F. Woodward Hopf, Peidong Fan, Zhan Jiang, Antonello Bonci, and Ivan Diamond. Nicotine and ethanol activate protein kinase A synergistically via Gi β γ subunits in nucleus accumbens/ventral tegmental cocultures: The role of dopamine D₁/D₂ and adenosine A_{2A} receptors. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. 322, 23-29, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yuichiro Inoue, Lina Yao, et al. Nicotine and ethanol activate PKA synergistically in nucleus accumbens/ventral tegmental co-cultures
2nd WFSBP International Congress of Biological Psychiatry
2007, April 18th
Santiago, Chile

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上雄一郎 (INOUE YUICHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号 : 40326343

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし