

氏名	お ざわ とおる 小 澤 徹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 514 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	麻薬依存におけるグルタミン酸トランスポーターの役割に関する行動および分子薬理学的研究

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤 公道 教授 赤池 昭記 教授 市川 厚

### 論 文 内 容 の 要 旨

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は、強力な鎮痛作用を有することから疼痛治療において欠くことのできない薬物であるが、その連続使用により麻薬依存を引き起こす可能性があることから、必ずしも適正な使用がなされていないのが現状である。麻薬性鎮痛薬による精神および身体依存の形成あるいは禁断症状発現のメカニズムに関してはこれまでも数多くの研究が行われ、脳内のグルタミン酸神経系の関与を示唆する報告が多数なされている。一方、グルタミン酸トランスポーターにはグリア型および神経型のものが存在し、中枢神経系においてグルタミン酸神経伝達の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。著者は、麻薬依存時の神経機能の可塑的变化にグルタミン酸トランスポーターが何らかの役割を果たしているのではないかと考え、モルヒネ依存形成および禁断症状発現のメカニズムについて、グルタミン酸トランスポーターに焦点をあてた検討を行い、以下の新知見を得た。

#### 第一章 麻薬依存形成および禁断症状発現に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬および活性化薬の効果

まず、グルタミン酸トランスポーター阻害薬および活性化薬を用いた行動薬理学的検討を行った。モルヒネ依存ラットの側脳室内へグルタミン酸トランスポーター阻害薬 DL-*threo*- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA) (3 および 10nmol) を前処置することにより、ナロキシソンの腹腔内投与によって誘発される身体的禁断症状の発現が有意に増悪された。さらに、モルヒネ禁断時の不快な精神症状を評価するために条件付け場所嗜好性試験を行った結果、モルヒネ依存ラットの側脳室内へ TBOA (10nmol) を前処置することにより、ナロキシソン誘発モルヒネ禁断場所嫌悪反応の発現は有意に増悪された。反対に、グルタミン酸トランスポーター活性化作用を有する MS-153 (1-12.5mg/kg) をモルヒネと同時にマウスに皮下投与することにより、モルヒネの鎮痛作用そのものには影響を与えることなく、モルヒネ反復投与による身体依存の形成が有意に減弱された。また、精神依存形成に対する MS-153 の影響を検討した結果、モルヒネ反復皮下投与によって誘発される場所嗜好性は、MS-153 (10mg/kg) の同時投与によって有意に減弱された。これらの結果から、脳内のグルタミン酸トランスポーターは、モルヒネによる身体および精神依存の形成、さらにモルヒネ禁断時の身体および精神症状の発現に関与することが示唆される。

#### 第二章 麻薬依存時の脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター遺伝子発現変化およびその調節機構

脳内における細胞外グルタミン酸の取り込みには神経型よりもグリア型のグルタミン酸トランスポーターの方が重要であることが報告されている。そこで、モルヒネ依存ラットおよびモルヒネ禁断症状誘発後のラット脳内におけるグリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 および GLAST mRNA の発現変化をノーザンプロット解析により検討した。その結果、モルヒネ依存を形成させていない naive ラットと比較して GLT-1 mRNA 発現量はモルヒネ依存ラットの線条体、視床などの脳部位において減少していたが、禁断症状誘発 2 時間後のラットの線条体などの脳部位において逆に増加していた。一方、GLAST mRNA に関しては有意な変化は見られなかった。次に、GLT-1 遺伝子発現変化のメカニズムを分子レベルで明らかにするために、ラット初代培養アストロサイトをを用いた検討を行った。まず、培養アストロサイトに各種神経伝達

物質受容体アゴニストを処置し、GLT-1 mRNA 発現量に対する影響を検討した結果、 $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニスト isoproterenol およびドパミンは GLT-1 mRNA 発現量を濃度依存的に増加させた。また、cAMP 系の活性化薬 (dibutyl cAMP, forskolin および IBMX) の処置によっても増加した。さらに、forskolin および IBMX の処置による GLT-1 mRNA の増加は、モルヒネの同時処置により有意に減弱された。以上の結果から、モルヒネの連続投与による GLT-1 発現量の変化が、モルヒネ依存形成あるいは禁断症状発現に関与していることが示唆される。また、GLT-1 はノルアドレナリンおよびドパミン神経系により調節を受けていること、またそれらの受容体の下流に存在する cAMP 産生系が関与していること、さらにモルヒネのアストロサイトへの直接作用もあることが示唆される。

### 第三章 アデノウイルスベクターを用いた脳部位特異的 GLT-1 遺伝子導入のモルヒネ身体依存への影響

モルヒネ依存における GLT-1 の役割をさらに詳細に検討するため、アデノウイルスベクターを用いて GLT-1 遺伝子をラット脳内に部位特異的に導入することを試みた。まず、GLT-1 と変異型緑色蛍光蛋白 EGFP を同時に発現させることができるアデノウイルスベクターを作製し、培養細胞において GLT-1 蛋白の高発現およびグルタミン酸取り込み能の顕著な増大を確認した。さらに、このアデノウイルスベクターをラット側坐核に微量注入することにより、投与部位周辺に EGFP の蛍光が認められ、また、GLT-1 蛋白の発現も確認できた。そこで、このアデノウイルスベクターをモルヒネ身体依存との関連が指摘されているラット青斑核に両側性に微量注入し、モルヒネ身体的禁断症状に及ぼす影響を検討した。その結果、両側青斑核に EGFP のみを発現させたコントロール群と比較して、GLT-1+EGFP を発現させた群においては、体重減少、teeth chattering, paw shake, 下痢などの身体的禁断症状が有意に減弱していた。しかし、微量注入部位がずれて青斑核周辺の三叉神経中脳路核や前庭神経内側核などに GLT-1+EGFP が発現していた群では、そのような減弱は認められなかった。これらの結果から、青斑核内の GLT-1 はモルヒネによる身体依存形成あるいは禁断症状発現を抑制的に調節することが示唆される。

以上、著者は、モルヒネの連続的投与によって脳内のいくつかの部位においてグリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 の発現量が減少し、シナプス前終末から遊離されたグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みが減少するという、グルタミン酸神経系の可塑的变化が生じ、そのことが麻薬依存形成および禁断症状の発現を促進している可能性を指摘した。さらに、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、青斑核内の GLT-1 がモルヒネによる身体依存形成を抑制的に調節することも示した。本研究の成果はグルタミン酸トランスポーターがモルヒネなどの依存形成能の強い薬物による依存形成および禁断症状発現の軽減、あるいは治療のための新しいターゲットとなる可能性を示す基礎的知見であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

強力な麻薬性鎮痛薬モルヒネによる身体的および精神的依存形成ならびに禁断症状発現メカニズムにおけるグルタミン酸神経系の関与について、グルタミン酸トランスポーターの果たす役割という切り口で研究を展開し、以下のような新知見を得た。

### 第一章 麻薬依存形成および禁断症状発現に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬および活性化薬の効果

グルタミン酸トランスポーターを阻害する作用を持つ DL-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartate (TBOA) をモルヒネ依存ラット側脳室内に注射すると、ナロキソン誘発モルヒネ禁断による身体的症状および不快な精神的症状が増悪されること、逆に、グルタミン酸トランスポーター活性化作用を持つ MS-153 をモルヒネと同時にマウスに皮下注射するとモルヒネの鎮痛作用に影響することなく、反復投与による鎮痛耐性、身体的および精神的依存形成を抑制することを示し、脳内のグルタミン酸トランスポーターは、モルヒネによる身体的および不快な精神的症状発現を抑制する機能を持つことを明らかにした。

### 第二章 麻薬依存時の脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター遺伝子発現変化およびその調節機構

グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 および GLAST の脳内 mRNA 発現量に関して、GLT-1 mRNA はモルヒネ依存ラットの線条体、視床では有意に減少していたが、ナロキソンによる禁断症状誘発 2 時間後の線条体では逆に有意に増加していること、一方、GLAST mRNA にはいずれの処置によっても有意な変化が見られないことを示し、モルヒネ連続投与による GLT-1 発現量の変化が依存形成や禁断症状発現に寄与していることを指摘した。さらに、培養アストロ

サイトを用いた実験により、GLT-1 mRNA は、イソプロテレノール、ドパミンおよびそれらの受容体機構の下流にある cAMP 産生系によって促進的調節を受けること、逆にモルヒネはその発現促進を抑制することなどを示した。

### 第三章 アデノウイルスベクターを用いた部位特異的 GLT-1 遺伝子導入によるモルヒネ身体的依存への影響

GLT-1 と変異型緑色蛍光蛋白 EGFP を同時に発現させることが出来る組み換えアデノウイルスベクターを用いて、GLT-1 遺伝子をラット青斑核に導入し、部位特異的に GLT-1 を過剰に発現させたラットにおいて、ナロキソン誘発モルヒネ禁断の身体的症状が有意に減弱することを初めて明確に示した。

以上著者は、モルヒネ連続投与によって、脳内の特定部位でグリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 の発現量が減少し、シナプス前終末から遊離されたグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みを低下させるというグルタミン酸神経系機能の可塑的变化が生じ、これが麻薬依存形成および禁断症状発現を促進している可能性を指摘した。さらに、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、青斑核内の GLT-1 がモルヒネ依存ラットの禁断症状発現を抑制的に調節することを直接的に示した。本研究の成果は、グルタミン酸トランスポーターが、依存形成能の強い薬物による依存形成および禁断症状発現を軽減させるための新しいターゲットとなる可能性を示したものである。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月24日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。