

覚醒剤逆耐性の機序

岩田 真一

本論文の背景

薬物は連用するとその効果が減弱し、同じ効果を得るためには多くの量を使用しなければならなくなる、これを薬理学で耐性が形成されたという。ところが覚醒剤（アンフェタミン類）は、連用するとその幻覚誘発作用が増強し、少量の再使用で統合失調様の幻覚が起こるようになる、これを逆耐性と呼んでいる。一度、逆耐性状態に生体が陥ると年余に渡り逆耐性状態は維持され、薬物を断って数年が経過しても少量の覚醒剤の再使用により幻覚が再現される。さらに、覚醒剤の再使用ではなく、ストレス状態に晒されると再使用と同様の幻覚が生じる。覚醒剤は依存薬物として極めて危険なものであり、特に我が国では違法薬物の中で使用頻度の高いものであり、社会的にも重要な薬物である。それと同時に、上述の現象は脳科学研究の観点から興味深く、記憶の機序や神経可塑性などの中枢神経機能の探求、統合失調症の病態解明の点からも興味を持たれている。

1995年から1997年にかけて覚せい剤逆耐性の神経科学的機序の研究を米国において行った。その時に3つ論文をまとめ、帰国後それらを補完する論文を1つ作成した。基本的には研究室の主任教授の考えに沿った結論となっている。それから20年が経っているが、いまだに、これらの論文は引用され続けている。そこで今回、20年経った時点での自分なりの考えをまとめてみた。

本論文の構成

第1部は覚醒剤逆耐性に関して著した3つの論文の和訳（意訳）を行った。第2部では3つの論文から逆耐性に関する私見を述べた。

キーワード：覚醒剤、逆耐性、ドパミン、シナプシン、ニューロモジュリン

第1部

1. 繰り返しアンフェタミンを投与したラット線条体における *in vivo* のリン酸化ニューロモジュリンとシナプシン I の増加

1.1. 要旨

アンフェタミンをラットに繰り返し投与するとロコモーションと常同行動が増強する。その時、ドパミンの放出は増加している。神経伝達物質放出に関与していると言われているニューロモジュリン (NM) とシナプシン I (SynI), 両者のリン酸化の状態を測定した。アンフェタミン 2.5 mg/kg を週2回、5週に渡って投与した。最終投与の1週間後にアンフェタミン 2.5 mg/kg を投与し(アンフェタミンチャレンジ投与), その30分後に断頭した。繰り返し投与せずにアンフェタミン 2.5 mg/kg を1回だけ投与した場合、リン酸化 SynI の量は増加していなかったが、繰り返し投与すると PKA の基質である site 1-リン酸化 SynI と CaM

kinase II (CKII) の基質である site 3-リン酸化 SynI がそれぞれ 38%, 34% 増加していた。PKC の基質であるセリン 41-リン酸化 NM の量はアンフェタミン 2.5 mg/kg を1回だけ投与した場合も増加していた。

もう一つ別のアンフェタミン投与方法(漸増法: 4週に渡ってアンフェタミンの投与量を徐々に増やしていく方法: これはアンフェタミン中毒者のアンフェタミン摂取パターンを模倣している)において、アンフェタミン3日退薬したのちアンフェタミンをチャレンジ投与してもロコモーションも常同行動も亢進しなかったが、4週退薬してアンフェタミンをチャレンジ投与した場合、ロコモーションと常同行動は増強し、線条体からのドパミンの放出も増加していた。この投与方法でも4週退薬の場合、リン酸化 SynI とリン酸化 NM の量は増加していた。

以上より、アンフェタミン逆耐性の時のドパミン放出亢進作用は SynI と NM のリン酸化が関係している可能性がある。

1.2. 緒言

ヒトは一旦、覚醒剤中毒となり幻覚や妄想が出現するようになると、覚醒剤を長期に渡って使用していなくても、少しの量の覚醒剤を再使用するだけで、簡単にそれらの精神異常が出現するようになってしまう。この状態は実験動物でも再現でき、逆耐性現象と呼ばれている。実験動物においてこの現象は常同行動や回転行動の増加として観察される。逆耐性は長期に渡って消えることなく保持される。逆耐性の成立には中脳に存在するドーパミン神経細胞体が必要であり、逆耐性の発現にはドーパミン神経終末が存在する線条体や側坐核が必要である。線条体は常同行動の発現の、側坐核はロコモーション発現の責任部位である。逆耐性の成立や発現はドーパミンアンタゴニストで抑制される。逆耐性におけるドーパミン受容体の変化については一定した見解はないが、ドーパミンの放出は線条体でも側坐核でも亢進しているという現象は広く認められている。(つまり、逆耐性の発現はドーパミン放出亢進である。)ドーパミン放出の分子メカニズムに関しての研究は緒に就いたばかりであるが、本研究では放出亢進の機序について実験してみた。

実験動物において逆耐性を成立させる繰り返し投与方法や漸増法を行った場合、Ca²⁺結合タンパクであるCaM量の増加が認められている。NMやSynIのようなCaM結合タンパクは神経伝達物質放出に関与しているというデータがある。NMは神経局在タンパクで、CaM、アクチン、GタンパクのGoに結合する。NMのセリン41はPKCでリン酸化されると、当該部位はCaM結合部位であるので、NMとCaMとの結合が外れる。これが神経伝達物質放出メカニズムの一端であるとも言われている。SynIは神経終末に局在しているCaM結合タンパクである。SynIはシナプス小胞の細胞質側とF-アクチンや微小管、神経フィラメント、そしてスペクトリンなどの細胞内骨格とを結合させているタンパクである。SynIは複数のリン酸化部位を持っているが、site1はPKAやCKI並びにCKIVでリン酸化され、site3はCKII並びにIVでリン酸化される。CKIIによってsite3がリン酸化されるとシナプス小胞と細胞内骨格との結合が外れる。以上より、SynIのリン酸化によりシナプス小胞が細胞内骨格から外れ、神経伝達物質放出が起こると思われる。

本研究では逆耐性が成立したラットの線条体におけるSynIとNMのリン酸化の状態を測定し、ドーパミン放出促進への関与について検討した。逆耐性となったラットの線条体でセリン41-リン酸化NMが増加していることを以前報告したが、今回はリン酸化部位特異抗体を利用して実験を行った。

1.3. 方法

1.3.1. アンフェタミン投与方法

雌性Holzmanラットを使用した。

A. 繰り返し投与方法

アンフェタミン2.5 mg/kgを週2回、5週に渡って投与した。コントロール群はアンフェタミンの代わりに生理食塩水を投与した。最終投与から1週間後、それぞれの群に同量のアンフェタミンまたは生理食塩水を投与し、30分後に断頭した。つまり、以下の4群を設定した。

1. 生理食塩水繰り返し投与+生理食塩水チャレンジ投与群 (SS)
2. 生理食塩水繰り返し投与+アンフェタミンチャレンジ投与群 (SA)
3. アンフェタミン繰り返し投与+生理食塩水チャレンジ投与群 (AS)
4. アンフェタミン繰り返し投与+アンフェタミンチャレンジ投与群 (AA)

この投与方法(つまりAA)では、ラットは激しい回転行動を呈することがすでに証明されている(行動薬理的に逆耐性が形成される)。

B. 漸増法

これはヒトにおける覚醒剤の使用方法を模した方法である。アンフェタミンは1日2回月曜日から金曜日まで投与し、土曜日と日曜日は投与しない。これを4週に渡って継続する。アンフェタミンの投与量は1 mg/kgから開始し、2-3日ごとに1 mg/kgずつ増量し8 mg/kgで終了した。そして、最終投与の3日後または4週間後に生理食塩水またはアンフェタミンのチャレンジ投与を行う。つまり、3日退薬にSS, SA, AS, AAの4群、4週間退薬に同様の4群が設定された。

1.3.2. NMとSyn Iの測定

それぞれSDS-PAGEで分離し、それぞれの特異抗体を用いたwestern blottingで検出、デンシトメトリーで定量化した。

1.3.3. シナプトゾーム分画のCaM量の測定

パーコールで作成したシナプトゾーム分画のCaM量をラジオイムノアッセイにより定量化した。

1.4. 結果

1.4.1. アンフェタミン繰り返し投与後のリン酸化Syn I量の変化

繰り返し投与によりリン酸化SynIの量はsite1もsite3もそれぞれ32%、34%増加した。アンフェタミンのチャレンジ投与ではリン酸化SynIは増加していなかった。全SynI量は無変化であった。

1.4.2. アンフェタミン繰り返し投与後線条体シナプト

ゾームのCaM量の変化

CaMの量は生理食塩水繰り返し投与群とアンフェタミン繰り返し投与群で、それぞれ 0.23 ± 0.02 ng/mg proteinと 0.30 ± 0.01 ng/mg proteinであった。アンフェタミン群で優位にCaM量が増加していた。シナプトゾームは神経終末が球形になったものであるため、逆耐性では神経終末においてCaM量が増加したと思われる。

1.4.3. アンフェタミン漸増法におけるリン酸化Syn I量の変化

3日退薬群ではリン酸化SynIの量も全SynIの量も変化していなかった。4週間退薬群ではsite3-リン酸化SynIの量が増加していた。しかし、site1-リン酸化SynIの量は無変化であった。全SynIの量は変化していなかった。

1.4.4. アンフェタミン漸増法におけるセリン41-リン酸化NM量の変化

3日退薬群ではコントロール群でもアンフェタミン慢性投与群でもアンフェタミンチャレンジ投与でリン酸化NM量は増加した。以前の研究で、アンフェタミンを初めて1回だけ投与してもリン酸化NM量は増加したので、リン酸化NMが増加したのは断頭前にチャレンジ投与したアンフェタミンの効果であると考えられた。3日退薬群ではアンフェタミンを慢性投与してもリン酸化NMの量は変化していなかった。

一方、4週間退薬群ではアンフェタミン慢性投与によりリン酸化NMの量が増加していた。更に、4週間退薬群ではその増加分がアンフェタミンのチャレンジ投与により消失した。

全NM量はすべての群で変化していなかった。

1.5. 考察

覚醒剤逆耐性が形成したとき、線条体におけるアンフェタミン刺激によるドパミン放出が増加するという現象は衆目一致の結果である。そして、逆耐性となった実験動物が示す行動異常はこのドパミン放出増加が原因である。逆耐性が形成されるとアンフェタミンを1回投与しただけでドパミン放出増加と行動異常は誘発され、その2つの現象は退薬することにより増強する。アンフェタミンの繰り返し投与によりアンフェタミンによるドパミン放出作用だけでなく、脱分極によるドパミン放出が増加することが報告されている。今回の実験では逆耐性下において神経伝達物質放出に関連しているタンパクのリン酸化状態を線条体で測定した。アンフェタミンを漸増法にて投与したラット線条体ではリン酸化NMとsite3-リン酸化SynIが増加していた。

1.5.1. NMのリン酸化について

PKCによるNMのリン酸化と神経伝達物質の放出が関係していると報告されている。その場合、PKC活性の結果としてリン酸化NMが増加しているのではなく、リン酸化NMそれ自身がCa²⁺誘発神経伝達物質放出にとって重要であるとのことである。1 mg/kgのアンフェタミンはセロトニンやアセチルコリンの放出に大きな影響を与えないが、線条体からのドパミン放出を増加されると同時にセリン41リン酸化NMを増加させる。また、ラット線条体でのPKC活性を増加させると報告されている。アンフェタミンはDATに結合してドパミンを放出する。多分、アンフェタミンが細胞内イオンの状態を変化させ（具体的にはCa²⁺を細胞内に流入させ）、PKCを活性化させて、NMをリン酸化したと彼らは考えている。

以前発表したデータであるが、アンフェタミンの単回投与や繰り返し投与を行ったラット線条体を使用したpost hocリン酸化アッセイ（リン酸化をin vitroで行わせる）でリン酸化NMが増加していることを報告した。今回はリン酸化NMを特異的に認識する抗体を用いた実験を行ったが、結果はほぼ同様であった。アンフェタミン漸増投与したラットで3日の退薬では変化がなく、4週間の退薬でリン酸化NMの量が増加した。つまり、退薬ということが重要である。アンフェタミン漸増法において3日の退薬では逆耐性は形成されないが、4週間の退薬でロコモーションが増加し、ドパミンの放出も同時に増加していることが報告されている。

逆耐性を形成したラットにアンフェタミンをチャレンジ投与した場合、増加したリン酸化NMが減少したが、脱リン酸化酵素の活性化などが考えられるが、その機序は不明である。

1.5.2. リン酸化Syn Iについて

アンフェタミンの1回投与ではリン酸化SynIは増加していなかった。しかし、繰り返し投与した場合は増加していた。その原因としてCKIIの活性増加が考えられた。一方、全SynI量は無変化であった。

SynIのリン酸化と神経伝達物質の放出促進との関連を示す多くのデータが蓄積されている。例えば、in vitroにおいて、SynIはシナプス小胞と可逆的に結合する、そしてGアクチンを凝集して重合し太いアクチンフィラメントを形成する。SynIはシナプス小胞とアクチンの3つ組を形成する。site1がリン酸化されるとそれらの結合が弱まり、site2と3がリン酸化されると結合が外れる。SynIは神経伝達物質放出の際のシナプス小胞のクラスタリングを行うと言われている。アンフェタミン誘発ドパミン放出はCa²⁺非依存性であるが、逆耐性状態ではCa²⁺依存性の放出

機構である小胞体性の放出が亢進している。

今回2種類のアンフェタミン慢性投与方法を採用したが、漸増法のデータはあまり良いものではなかった。(それはアンフェタミン高用量の神経破壊作用が疑われる。) 繰り返し投与のほうが良い方法かもしれない。

SynIもNMもすべての神経終末に含まれているが、アンフェタミンはドパミンの放出を増加させる。線条体の2つのタンパクのリン酸化状態を測定しても、それはドパミン神経終末における変化であるので、どうしてもその変化はタンパク全体から見ると小さいものになってしまうのは仕方がない。

1.5.3. CaMの増加について

CaM量は様々なアンフェタミン慢性投与で増加していることが証明されている。CaMは多機能タンパクで様々な作用をしている。神経終末ではSynIをリン酸化し、カルシニューリンを活性化するがそれはCa²⁺依存性神経伝達物質放出やダイナミン(GTPase活性を持った微小管結合タンパク)の脱リン酸化を介したシナプス小胞リサイクルに関与している。また、CaMはキネシンATPase活性を亢進させて軸索の速い輸送を促進する。CaM拮抗薬やCaM抗体を使用した実験からCaMの神経伝達物質放出への関与が言われている。

1.5.4. 結語

アンフェタミンの1回投与でリン酸化NM増加したが、リン酸化SynIは無変化だった。アンフェタミンの慢性投与でリン酸化NMは増加する場合と無変化の場合が投与方法により存在する。アンフェタミンの慢性投与は投与方法に寄らずリン酸化SynIが増加した。これらのタンパクは神経終末局在タンパクで神経伝達物質放出に関連しているので、この変化が逆耐性下におけるドパミン放出亢進と関係している可能性がある。

2. アンフェタミンによるラット線条体シナプトゾームにおけるNMとSynIのリン酸化の増加

2.1. 要旨

ラットにアンフェタミンを繰り返し投与した後、退薬するとアンフェタミン誘発ドパミン放出が亢進する。1.の論文でそのような状態で線条体のsite3-リン酸化SynIとセリン41リン酸化NMが増加していることを示した。「2」の論文ではアンフェタミンを繰り返し投与したラット線条体から調整したシナプトゾームにおいて、アンフェタミン誘発ドパミン放出が亢進しているか、そして2つのリン酸化タンパクが増加しているかを検討した。

増加したアンフェタミン誘発ドパミン放出はCa²⁺依存であった。site3-リン酸化SynIとセリン41-リン酸化NMはそれぞれのリン酸化部位を特異的に認識する抗体を使用してS1フラクション(シナプトゾームよりも粗な分画)とシナプトゾームのそれぞれの細胞分画において定量した。リン酸化Synは40%、リン酸化NMは30%それぞれ増加していた。一方、全SynIと全NMの量は無変化だった。また、シナプトゾームにおけるCKIIの活性は26%上昇していたが、そのタンパク量は無変化だった。PKCの活性もPKC α アイソザイム量も無変化だった。本研究でシナプトゾームにおいてアンフェタミン繰り返し投与によるアンフェタミン誘発ドパミン放出の増強が証明された。アンフェタミン繰り返し投与によるリン酸化や脱リン酸化活性をシナプトゾーム分画で測定することができた。繰り返しアンフェタミン投与によるドパミン放出亢進はCa²⁺依存であるので、リン酸化反応の変化、多分site3リン酸化SynIとリン酸化NMがそのドパミン放出促進を起こしているものと思われる。

2.2. 緒言

ヒトも実験動物もアンフェタミンに対する長期に渡る影響を受ける。アンフェタミンの常習的使用は妄想型統合失調症に見誤る精神異常を呈する。実験動物においてはその現象はアンフェタミン投与による常同行動が増強したり、回転行動が亢進したりすることに特徴づけられる。その逆耐性現象は1年以上アンフェタミンを中止しても消えることはない。逆耐性の神経科学的機序は十分明らかにはなっていないが、ドパミンの放出がアンフェタミン刺激だけでなく高カリウム刺激や電気刺激でも増加していることが報告されている。それは側坐核や線条体組織スライスやin vivo脳内透析法を用いた実験で証明されている。さらに、アンフェタミン刺激やアンフェタミンと異なりCa²⁺依存性の神経伝達物質放出を誘発する高カリウム刺激でもアンフェタミンの退薬によりドパミンの放出が亢進し、その現象は長期にわたって保持される。

我々は様々なアンフェタミン慢性投与方法を用いた研究で、CaMの量やCaMの基質であるSynIとNMのリン酸化体が増加していることを報告した。この2つのタンパクはシナプトゾームを用いた研究でエクソサイトシスや神経伝達物質放出に関与しているとの報告がある。2つのタンパクのリン酸化体が増加していることはCKIIの活性が増加したか、または脱リン酸化酵素の活性が低下したかである。

本研究では、アンフェタミンを繰り返し投与した

ラットから調整したシナプトゾームからのアンフェタミン誘発ドパミン放出が増強しているか検討した。さらに、site3-リン酸化 SynI とセリン 41-リン酸化 NM が増加しているか、リン酸化部位特異抗体を用いて定量した。加えて、PKC と CKII の活性をシナプトゾームで計測した。結果としてアンフェタミン繰り返し投与ラットから調整したシナプトゾームの CKII の活性が上昇して、site3-リン酸化 SynI が増加したことを見出した。

2.3. 方法

2.3.1. アンフェタミン慢性投与の方法

本研究では2種類の方法を行った。両者とも行動薬理的に逆耐性を示し、かつ微小透析法または線条体スライス標本からのアンフェタミン誘発ドパミン放出の亢進を証明されている。

方法1：論文「1」で示した漸増法。アンフェタミンの投与量と期間は以下の通り。第1～3日(1.0 mg/kg), 第4～5日(2 mg/kg), 第6～7日(3 mg/kg), 第8～9日(4 mg/kg), 第10～11日(5 mg/kg), 第12～14日(6 mg/kg), 第15～17日(7 mg/kg), 第18～20日(8 mg/kg)。コントロール群は生理食塩水を投与した。ラットは薬物最終投与から4週後に断頭した。

方法2：2.5 mg/kg のアンフェタミンを1日1回5日間連続で投与した。最終投与から10日後に断頭した。

2.3.2. ドパミン放出実験

線条体シナプトゾームからのドパミン放出を測定した。

2.3.3. リン酸化と酵素アッセイのための組織作成

リン酸化実験ではS1分画またはパーコール調整シナプトゾームを使用した。

2.3.4. NMとSyn I のリン酸化

リン酸化 NM とリン酸化 SynI を western blotting で定量した。

2.3.5. CK II の活性測定

前述のパーコール精製シナプトゾームを使用した。

2.3.6. PKCの活性測定

PKC 活性を溶解していないシナプトゾームと溶解したシナプトゾームから調整した上清と沈渣とで測定した。PKC 活性は後シナプス膜にくっついているシナプトゾームに存在しているので、溶解していないシナプトゾームも使用した。シナプトゾーム膜の PKC 活性は溶解していないシナプトゾームにおける活性から溶解したシナプトゾームの沈渣の活性を引くことにより計算した。なぜなら溶解していないシナプトゾームは後シナプスデンシティをくっつけているからである。

2.3.7. パーコールで精製した分画におけるPKCとCK II

の免疫プロット

溶解したシナプトゾームの細胞質分画と膜分画で PKC α アイソザイムと CKII α サブユニットの免疫反応性を測定した。

2.4. 結果

2.4.1. 繰り返しアンフェタミン投与したラット線条体から調整したシナプトゾームにおけるアンフェタミン誘発ドパミン放出

アンフェタミン誘発ドパミン放出をアンフェタミンを漸増法で慢性投与したラットの線条体から調整した P2 シナプトゾームで測定した。コントロールは 46.1 ± 2.7 でアンフェタミン慢性投与群では 64.4 ± 5.6 pmol/mg protein であった。ドパミンの基礎分泌部分は両者に差がなかった。

2.4.2. site3-リン酸化 Syn I とセリン41-リン酸化 NM の測定

繰り返しアンフェタミン投与したラットから調整した S1 分画を 30 秒インキュベートすると site3-リン酸化 SynI の量は有意に 41% 上昇していた。一方、全 SynI の量は変化していなかった。インキュベートしていない S1 分画中には site3-リン酸化 SynI は存在していなかった。つまり、インキュベートにより Syn I は再リン酸化されると考えられた。セリン 41-リン酸化 NM も同様に繰り返しアンフェタミン投与ラットで増加しており、全 NM は変化していなかった。

2.4.3. 方法2でアンフェタミンを慢性投与したラット線条体シナプトゾームからのアンフェタミン誘発ドパミン放出とsite3-リン酸化Syn I の定量

アンフェタミン慢性投与ラットでリン酸化 NM とリン酸化 SynI が増加しているのはそれぞれのリン酸化酵素 PKC と CKII の活性が増加しているとの仮説のもとで実験を行った。そこで、シナプトゾームでのそれぞれのリン酸化酵素の活性を測定した。アンフェタミンの色々な慢性投与方法で逆耐性が生じて、ドパミン放出が亢進するものならば、どの方法でも生じていると一般化するために、アンフェタミン投与方法2から調整した P2 シナプトゾームを使用した。アンフェタミン慢性投与したラット線条体から調整した P2 分画からの 1 μ M アンフェタミン誘発ドパミン放出は増加していてそれは Ca^{2+} 依存的であった。 Ca^{2+} を除くと増加分のドパミン放出は消失したが、コントロールにおけるアンフェタミンによるドパミン放出は変化しなかった。

site3-リン酸化 SynI の量は増加していた。

2.4.4. 繰り返しアンフェタミン投与によるCaMKキナーゼ II 活性と量

シナプトゾームは溶解してシナプトゾームに結合

している後シナプスを除いて CaM キナーゼ II の活性を測定した。溶解したシナプトゾームは 20,000 × g で遠心して、上清にシナプトゾームが保持されるようにした。Ca²⁺ と CaM の存在下での CKII 活性はアンフェタミン慢性投与 2 つの方法どちらでも 25-30% 増加していた。しかし、CaM キナーゼ II の量は無変化だった。沈渣分画では CaM キナーゼ II の活性も量も無変化だった。

2.4.5. PKCの活性とそのタンパク量

上清と沈渣で PKC 活性とそのタンパク量を測定したが、2 つのアンフェタミン慢性投与方法とも無変化だった。

2.5. 考案

様々な施設からの報告で、アンフェタミンの行動学上の逆耐性が発現する投与方法では必ず、アンフェタミン誘発ドパミン放出が増加している。ドパミン放出は脳スライスを用いた実験や脳内微小透析法で証明されている。我々も同様にアンフェタミン慢性投与ラット線条体から調整した P2 シナプトゾームからのアンフェタミン誘発ドパミン放出を証明した。これの意味するところは、逆耐性におけるアンフェタミン誘発ドパミン放出の増加は神経回路はいらなく、メカニズムは神経終末内に完結しているということである。そして、その増加分は Ca²⁺ 依存性だということである。

前の論文で、アンフェタミン逆耐性となると線条体組織の SynI のリン酸化体の割合が増加することを報告した。今回は、シナプトゾームでの Syn リン酸化能が増加することを報告した。シナプトゾームを調整する段階で、リン酸化 SynI は脱リン酸化され、インキュベートすることにより再リン酸化された。シナプトゾームの CKII 活性はシナプトゾームを溶解した上清に存在するので、その分画を今回の実験で使用した。しかし、かなりの量の CKII は後シナプスに存在する。α CKII はシナプス小胞に存在して、SynI の site2, site3 をリン酸化する。CKII の活性が上昇した理由は今回の実験では明らかではない。

同様に、リン酸化 NM も逆耐性で増加した。しかし、PKC の活性化は今回も、前回も変化していなかった。可能性としては、脱リン酸化酵素活性が減少しているかも知れない。

CKII による SynI のリン酸化と PKC による NM のリン酸化は Ca²⁺ 依存性の神経伝達物質放出を増加させると言われている。逆耐性となったときの増加分のドパミン放出は Ca²⁺ 依存性であった。SynI はリン酸化すると細胞内骨格とシナプス小胞との結合が外れ、神経伝達物質放出準備状態となる。アンフェタ

ミンによるドパミン放出は DAT の交換拡散メカニズムによる。しかし、ある濃度のアンフェタミンはシナプス小胞へのドパミン取り込みを抑制し、シナプス小胞はアンフェタミンによるドパミン放出に関連しているとの報告がある。つまり、シナプス小胞が DAT にリクルートされて、アンフェタミンによるドパミン放出が増加した可能性がある。逆耐性ではアンフェタミン誘発だけでなく、高カリウム刺激や電気刺激によるドパミン放出も増加している現象もこの考えをサポートしている。また、Ca²⁺ 依存性のドパミン再取り込み機構の存在も報告されている。

同様に、リン酸化 NM もドパミン放出増加に関与したと思われる。PKC による NM のリン酸化は Ca²⁺ 依存性のドパミンの放出を増加させると言われている。我々は他の論文でアンフェタミンの *in vivo* での急性投与で線条体でのリン酸化 NM 量が増加し、また、線条体のシナプトゾームでもリン酸化 NM 量が増加することを報告した。

Giambalvo は 0.1 μM 以上のアンフェタミンは PKC の活性化に必要な Ca²⁺ 濃度を低下させることにより、シナプトゾームでの PKC を活性化すると報告している。PKC による NM のリン酸化は NM からの CaM 遊離を増加させるので、シナプトゾームの細胞質における CaM が増加することにより Ca²⁺ 依存性の反応が増強されると思われる。

しかし、上述の SynI や NM の変化が線条体のどの神経終末で起こっているかは不明である。両蛋白質はすべての神経終末にあるので、そのタンパクの線条体における大部分はグルタミン酸の神経終末に存在している。

結論として、逆耐性におけるドパミン放出は神経終末レベルで生じている。SynI と NM のリン酸化体が増加していた、前者の原因は CaM キナーゼ II の活性化、後者の原因は不明である。ドパミン放出増加の増加部分は Ca²⁺ 依存性であり、これは Ca²⁺ 依存性リン酸化亢進がその原因の可能性がある。

3. アンフェタミンの繰り返し投与によりラット線条体のシナプトゾームからのドパミン放出が増加し、NM と Syn I のリン酸化も増加した

3.1. 要旨

アンフェタミンは神経終末の DAT から取り込まれ、ドパミンの放出を増強する。今回の報告では NM はアンフェタミンとインキュベートすることにより、PKC リン酸化部位であるセリン 41 のリン酸化が増加することを証明した。そのリン酸化は 37°C, 5 分, 100 nM から 10 μM の間で最大となった。

SynI の CKII リン酸化部位は 1 から 100 nM のアンフェタミンにより 30 秒から 2 分の時間で最大となった。アンフェタミンのこの効果はノミフェンシンでブロックされた。SynI のリン酸化は Ca²⁺ 依存であったが、NM のリン酸化は Ca²⁺ 依存ではなかった。アンフェタミンにより SynI のリン酸化体増加は脱リン酸化酵素阻害薬であるオカダ酸により持続し、ドパミン受容体ブロッカーでは影響を受けなかった。PKC インヒビターによりアンフェタミンによる NM リン酸化だけでなく PKC ではリン酸化されない SynI の site3 リン酸化も抑制された。

以上の結果から、アンフェタミンはシナプトゾームにおけるリン酸化に関連するセカンドメッセンジャー活性を修飾することを証明した。

3.2. 緒言

アンフェタミンは強力な精神刺激薬である。実験動物でアンフェタミンはロコモーションや常同行動を誘発する。それは側坐核や線条体のドパミン放出促進が原因である。ドパミン放出促進はアンフェタミンが DAT から取り込まれることが必須である。その機序として exchange-diffusion が提唱されている。アンフェタミンによるドパミン放出は細胞質からもシナプス小胞からも生じるが、それぞれを誘発する用量は異なっている。アンフェタミン誘発ドパミン放出は Ca²⁺ 非依存的であるが、Ca²⁺ 依存性のアンフェタミン関連神経活動も存在する。例えば、低い濃度のアンフェタミンは Ca²⁺ 依存的に線条体のシナプトゾームにおけるドパミン産生を促進する。更に、アンフェタミンは Ca²⁺ に対する Km(最大速度を与える基質濃度)を低下させて、線条体シナプトゾームにおける PKC 活性を増強するとの報告がある。

我々はアンフェタミンのラット腹腔内投与が NM のリン酸化体を増加することを発見している。NM は CaM やアクチン、G 蛋白(Go)に結合する。そして、神経終末の成長や神経伝達物質の放出、シナプスの可塑性に重要な役割を果たしている。

CaM 依存性キナーゼでリン酸化され、神経伝達物質放出と関連している蛋白として SynI がある。我々はアンフェタミンの繰り返し投与で SynI のリン酸化が増加していることを報告した。SynI はシナプス小胞の細胞質側と結合し、さらに様々な細胞骨格蛋白とも結合している。SynI はリン酸化されるとそれらとの結合が外れ、シナプス小胞が伝達物質放出されやすくなる。

アンフェタミンの急性投与も繰り返し投与も NM のリン酸化型を増加させたが、SynI のリン酸化型は急性投与では増加せず、繰り返し投与のみで増加した

ことを我々は報告した。急性投与の時アンフェタミンは線条体取り出しの 30 分前に投与したので、SynI のリン酸化反応が検出できなかった可能性がある。

この研究の目的はシナプトゾームにおける NM のリン酸化の検討と SynI のリン酸化により評価される CKII の活性増加がアンフェタミンで起こるかということである。

3.3. 方法

3.3.1. 線条体のシナプトゾームの調製パーコールを使用して精製した。

3.3.2. シナプトゾームのインキュベーション

リン酸化実験は Ca²⁺ 含有の KRB を加えることにより開始した。その KRB の中にアンフェタミンを入れた。ノミフェンシン、オカダ酸、スルピリド、Ro31-8220、SCH23390 は Ca²⁺ フリーの KRB に溶解し、シナプトゾームはそれぞれの薬物と 4°C、20-30 分ブレインキュベートした。

3.3.3. 免疫ブロッティング

SDS-PAGE で分離し、抗体を用いて western blotting で定量した。

3.3.4. PKC 活性の測定

PKC 活性は洗浄していないシナプトゾームと上清、そして沈渣で測定した。

3.4. 結果

3.4.1. アンフェタミンによる NM のリン酸化

アンフェタミンにより NM の総量は変わらなかったが、リン酸化 NM の量は増加した。phorbol ester である TPA や高カリウム刺激でもリン酸化 NM は上昇した (positive control)。アンフェタミンによる NM のリン酸化反応は迅速に起こる。30 秒で検出でき、2 分で最大となる。リン酸化体は 10 分たつと多分脱リン酸化され、コントロールと同じレベルにまで減少した (本文と異なる、グラフから推定)。このリン酸化はアンフェタミンの用量依存性があった (0.1-10 uM の範囲で、それ以下それ以上は測定していない、3 用量あるので適切ではある)。アンフェタミンの作用は DAT 阻害薬であるノミフェンシンで抑制されたので、アンフェタミンは DAT から取り込まれて作用したと考えられた。

アンフェタミン (1 uM) による PKC 活性の変化を線条体シナプトゾームで測定した。溶解したシナプトゾームではアンフェタミンにより 133% 上昇し、上清 (純粋なシナプトゾーム) ではコントロールの 85% に減少した。

3.4.2. アンフェタミンによるシナプシン I の site3 のリン酸化

SynIはCa²⁺が存在すると氷温でもリン酸化反応が起こってしまうので、シナプトゾーム作成する過程ではCa²⁺を入れないバッファーを使用した。そして、Ca²⁺を加えることによりリン酸化を開始した。リン酸化は30秒で最大となり、急速にリン酸化SynIの量はコントロールに戻った。用量依存性はベル型であり、10 nMのアンフェタミンによりリン酸化は最大値となった。アンフェタミンの効果はノミフェンシンでブロックされた。

3.4.3. オカダ酸の効果

リン酸化体が増加する機序として、リン酸化酵素活性が増加する場合と脱リン酸化酵素活性が抑制される場合がある。そこで、SynIはホスファターゼ1並びに2Bで脱リン酸化されるので、それらの抑制薬であるオカダ酸を使用して実験を行った。オカダ酸を加えるとリン酸化SynIが増加するが、アンフェタミンの効果は消えなかったので、アンフェタミンによるリン酸化SynI増加効果はリン酸化酵素活性増加と考えられた。

3.4.4. リン酸化反応に於けるCa²⁺依存性

Ca²⁺キレーターを使用していないので、Ca²⁺がリン酸化反応に必要なかは不明であるが、Ca²⁺を適量使用すると反応は大きくなる。

3.4.5. ドパミン受容体ブロッカーの効果

リン酸化SynIの量はドパミン受容体遮断薬で影響を受けなかった。

3.4.6. PKC抑制薬(Ro31-8220)の効果とCaMK II抑制薬(KN-62)の効果

NMのリン酸化とSynIのsite1リン酸化はRo31-8220で完全に抑制された。また、SynIのsite3リン酸化はKN-62で完全に抑制された。

3.5. 考案

線条体のシナプトゾームにおいて低濃度のアンフェタミンはセリン41-リン酸化NMとsite3-リン酸化SynIを増加させた。このことはアンフェタミンがリン酸化系のセカンドメッセンジャー系に影響を与えるということである。この結果はアンフェタミンの急性投与がNMのin vivoでのリン酸化を増強するという以前の報告と一致する。1または2.5 mg/kgのアンフェタミンの腹腔内急性投与はsite3-リン酸化SynIのレベルを増加させなかったが、繰り返し投与すると増加した。今回のin vitro実験ではアンフェタミンはsite3-SynIのリン酸化体を増加させたがそれは一過性で、低用量でのみ観察された。in vivoの実験でアンフェタミン投与の30分後に線条体を取り出したが、30分より前にSynIのリン酸化が起こっていたのかもしれない(訳注: in vitroでSynIのリン酸化

が起こるアンフェタミンの用量はとても低いのでこれをin vivoで検知するのは実際上不可能と考えられる)。文献から1 mg/kgのアンフェタミンの静脈投与の30分後の線条体でのアンフェタミン濃度は10 μMである。つまり、この濃度ではsite3-リン酸化SynIは不変である。

今回、アンフェタミンはシナプトゾームにおけるPKC活性を増加することを示した。一つはNMのリン酸化が上昇したことから、もう一つはPKCの活性を直接測定したことからそれが示唆された。この結果はGiambalvoの結果(アンフェタミンがラットの線条体から調製したsynaptoneurosomeやin vivo線条体で、Ca²⁺に対するKm(ミカエリス定数、反応速度を表す濃度)を変化することによりPKC活性を増加させたこと)を支持するものである。さらにPKC抑制薬はアンフェタミンによるドパミン放出を抑制したとの報告がある。アンフェタミンがどのような機序でシナプトゾームに作用するのかほとんどわかっていないし、アンフェタミンはどうやってPKCを活性化するのか不明である。Ca²⁺や脂質(diacylglycerolやアラキドン酸)がPKCを活性化した可能性がある。アンフェタミンのDATを介したドパミン放出はCa²⁺を必要としないが、アンフェタミンはシナプトゾームにおいてCa²⁺濃度を上昇させる可能性がある。文献から1-100 nMのCa²⁺はかたつむりの細胞内灌流した神経細胞の細胞内へのCa²⁺流入を促進するとの報告があり、低濃度のアンフェタミンはCa²⁺イオンの神経細胞内流入を促進する可能性がある。アンフェタミンはCa²⁺非依存的にドパミンの放出を行う、つまり、神経伝達物質放出機構と異なるドパミンのプールが枯渇する、それがPKCを活性化するという可能性もあるかもしれない。

アンフェタミンが何かPKC活性化を起こす物質を放出させるのかもしれない。例えば、様々な伝達物質。アンフェタミンは線条体からグルタミン酸を放出させるがこれはドパミンを介している。しかし、今回のドパミン拮抗薬を使用した実験からドパミンはSynやNMのリン酸化を起こさない(SCH23390は何らかの影響があったが)。ドパミンは線条体スライスにおいてSynIのリン酸化を起こすという報告があるが、しかし、それはCa²⁺非依存的でcAMPを介したものであった(PKAリン酸化部位であるsite1のリン酸化の研究であった)。1-10 nMの濃度のアンフェタミンが線条体シナプトゾームからドパミンを放出するかは不明である。その濃度でsynaptoneurosomeからのドパミン放出が抑制されるという報告がある。一方で10 nMのアンフェタミンが線条体シナプトゾームからドパミンを放出するという報告もある。しかしなが

ら、前シナプスドパミン受容体の働きにより、SynIのベル型のリン酸化用量反応曲線が説明可能かもしれない。アンフェタミンの高用量(1 μM 以上)がドパミンを放出して、そのドパミンが前シナプス性ドパミン受容体を刺激して、 Ca^{2+} の流入を抑制して、SynIのリン酸化を抑制したのかもしれない。本実験からNMのリン酸化は(SynIのリン酸化に比べ)高い濃度の Ca^{2+} を必要としていないので、アンフェタミンの濃度が高くなってもNMのリン酸化が抑制されなかったとも言える(訳注:アンフェタミンの濃度とNMのリン酸化量は用量依存性があるのでこの論理はありえない)。これがNMとSynIの用量反応曲線に矛盾がある理由かもしれない。

(訳注:シナプトゾームを使用しているのでアンフェタミンのCKIIを活性化作用がアンフェタミンのドパミン放出作用を介したものであれば、D2受容体を介したものと考えられるが、スルピリドの効果は全く無かったので、アンフェタミンのCKIIを活性化作用はドパミンを介さない。であるから、本文中のドパミンを介したセカンドメッセンジャーのことに言及したのは無意味。)

PKC抑制薬がPKCによりリン酸化されるセリン41-NMのリン酸化が抑制されるのは当然であるが、CKIIでリン酸化されるsite3-リン酸化SynIのリン酸化もPKC抑制薬で抑制されるというのは驚きである。同様のことが文献上報告されている(ラットの海馬スライスで、PKCを活性化するとSynIのCKII基質部位がリン酸化された)。純粋なSynIはPKCでリン酸化されないで、これはPKCとCKIIのクロストークである。PKCをホルボールエステルで活性化するとラット大脳皮質シナプトゾームでMARCKS, NM, SynIのリン酸化が誘発される。その場合、PKCによるNMやMARCKSのリン酸化によりCaMがそれらから遊離し、CKIIを活性化すると考えられる。アンフェタミンがSynIのsite3のリン酸化の経時変化を延長することによりCKIIのより長時間の活性化を起こすのかもしれない(訳注:意味不明)。この機序は(カテコールアミン系の培養細胞である)PC12細胞で既に証明されている。NMとSynIのリン酸化の用量反応曲線は極めて異なっているが、SynIをリン酸化するような低濃度でもNMはリン酸化できる。 Ca^{2+} を入れないKRBのシナプトゾームに Ca^{2+} を加える事による Ca^{2+} のシナプトゾームへの流入はアンフェタミンと相乗的に作用した可能性がある。PKC活性化の増加そして Ca^{2+} 誘発とPKC誘発のNMからのCaMの遊離の2つに機序より相加的に作用したのかもしれないということである。NMやMARCKSからCaMが遊離すると細胞膜の Ca^{2+} ポンプが活性化してシナ

プトゾームから Ca^{2+} を除去し、そしてCKII活性を抑制する。上述したように、ドパミンのシナプトゾームへの Ca^{2+} 流入抑制作用もNMとSynIの用量反応曲線の不一致を説明可能かもしれない(訳注:これらの考察は、当初の仮説(PKCが活性化してCaMが遊離し、そのCaMがSynIを活性化するという仮説)を肯定するためのものである。)

これらの反応がどのシナプトゾームで起こっているのか、ドパミン神経のシナプトゾームで起こっているのか不明である。脳幹においてNMはTHと共存していて、6-OHDA処理により消失する。一方、線条体のNMのうちドパミンに由来するものは20%しかない。SynIは主にグルタミン酸作動性神経に存在している。線条体内でドパミン神経終末とグルタミン酸神経終末との相互作用が存在している。低濃度のドパミンはグルタミン酸神経終末のドパミン受容体を介してグルタミン酸の放出を抑制している。もし、低濃度のアンフェタミンがドパミン放出を抑制したならば、グルタミン酸神経終末の神経伝達物質放出機構が活性化、つまり、SynIのsite3のリン酸化が亢進する(これが低濃度のアンフェタミンがSynIのsite3リン酸化を増加させた原因かもしれない:訳者注)。

アンフェタミンによるsite3-SynIのリン酸化はアンフェタミンの急性効果によるドパミン放出とは関係していない。なぜならば、site3-SynIのリン酸化には Ca^{2+} は必須であるが、アンフェタミンによるドパミン放出は Ca^{2+} 非依存であるからである。一方、アンフェタミンによるドパミン放出は細胞質内の不断のドパミン産生が必要であるとの報告がある。低濃度(1 μM)以下のアンフェタミンは線条体シナプトゾームにおけるドパミン産生を増加させるという報告がある。アンフェタミンによるドパミン合成はアンフェタミンによるリン酸化されたタンパクのレベルの増加に匹敵する。さらに、ドパミン合成におけるアンフェタミンの効果は二相性である。つまり、1 mM以上の濃度だとアンフェタミンはドパミンの合成を抑制する。アンフェタミンによるドパミン合成は Ca^{2+} 依存的で、そのアンフェタミンの濃度はアンフェタミンがドパミンを放出する濃度より低い。脱分極とアンフェタミンによるドパミン合成促進は似たような Ca^{2+} 依存性の機序により行われている。シナプトゾームを脱分極させるとTHのCKIIリン酸化部位が Ca^{2+} 依存性にリン酸化される。アンフェタミンによる Ca^{2+} 依存的ドパミン合成増加がin vivoで報告されている。従って、アンフェタミンはCKIIを活性化して、SynIやTHを含む幾種類かのタンパクをリン酸化するかもしれない。PKCがTHをリン酸化して活性化

するのでアンフェタミンはPKCを介して、THを活性化する可能性もある。Ca²⁺依存性のアンフェタミンによる行動も報告されている(EGTAを線条体に注入すると6-OHDA投与したマウスのアンフェタミンによる回転行動がブロックされ、そして、そのEGTAの効果がCa²⁺を加えることにより消失した)。従って、アンフェタミンの効果のうちCa²⁺依存性のものはドパミン合成や行動、そして、その他の未だ知られていないセカンドメッセンジャーの活動に重要かもしれない。

まとめると、アンフェタミンと線条体のシナプトゾームと一緒にインキュベートするとNMのセリン41(PKC基質)とSynIのsite3(CKII基質)のリン酸化が増加する。これらからアンフェタミンはシナプトゾームにおけるリン酸化に関与するセカンドメッセンジャー活性に影響を与え、それはCa²⁺依存性と非依存性の経路がある。

第2部

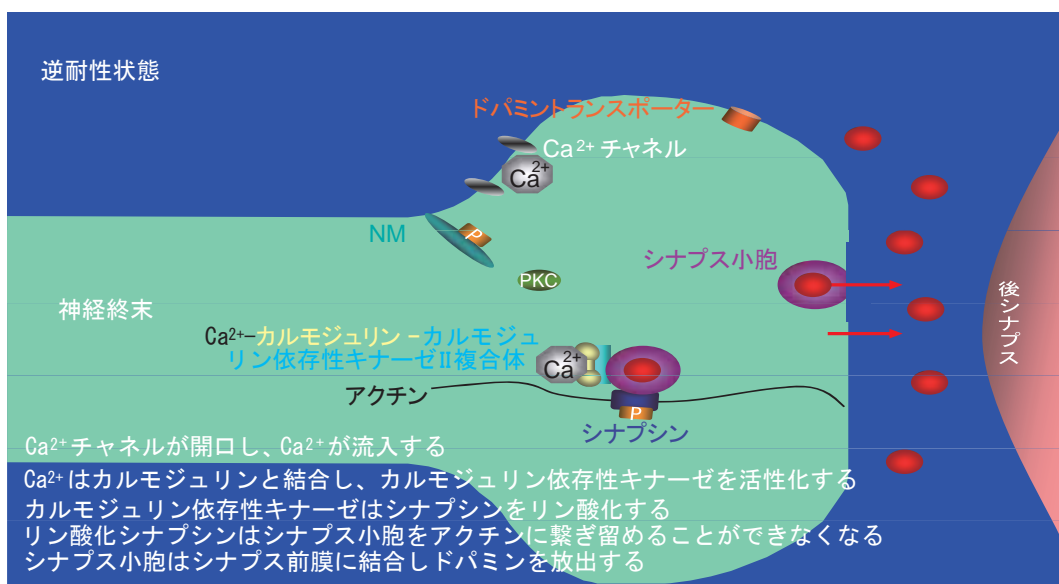
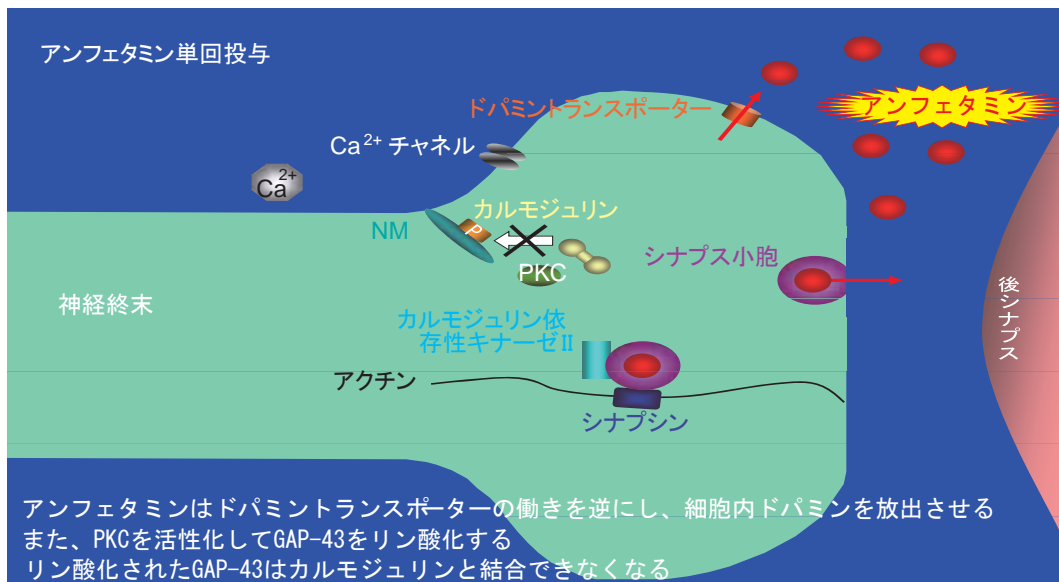
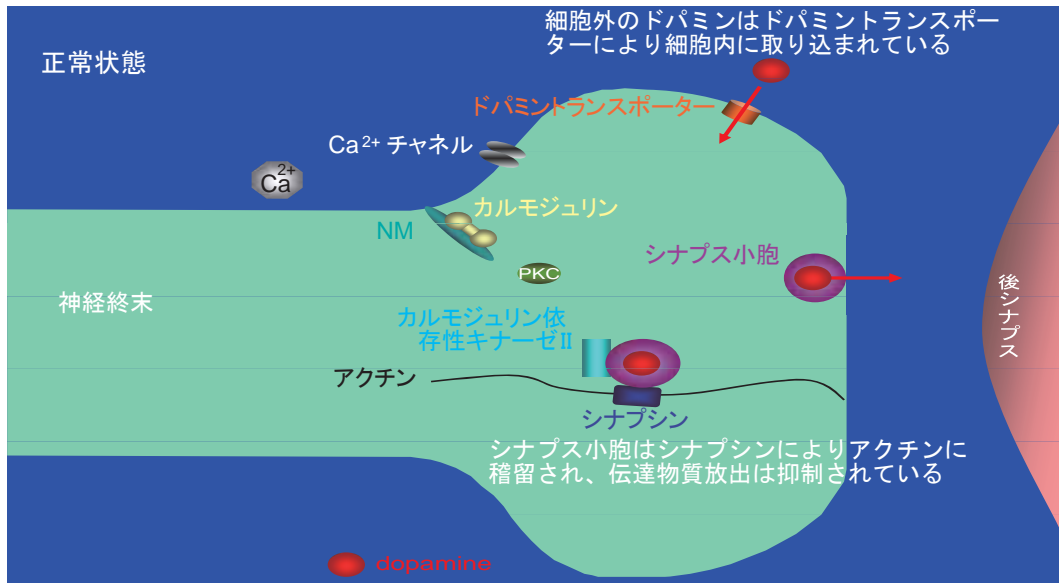
これらの論文はアンフェタミン逆耐性の機序を分子レベルで明らかにしようとした試みの一貫である。アンフェタミン逆耐性機序に関する論文は数多く存在し、諸説様々である。逆耐性の機序を研究する場合、逆耐性の形成と発現に分離して考える。形成過程は不明であるが、現時点で多くの研究者の一致した見解はアンフェタミン逆耐性の発現はドパミン放出亢進であるという点である。本研究は逆耐性獲得後のドパミン放出は逆耐性獲得前、つまりアンフェタミンの単回投与によるDATを介した放出とどう異なるかを見ている。「逆耐性におけるドパミン放出増加の増加分はCa²⁺依存性の伝達物質放出機構による」ことが重要な結論である。アンフェタミンによるドパミン放出はDATの逆輸送による。これはCa²⁺非依存性である。逆耐性となるとカルシウム依存性のアンフェタミン誘発ドパミン放出が起こる。これは何かという問題である。ひとつの考えはトランスポーター逆輸送が亢進するという考え。もう一つはCa²⁺依存性の所謂、vesicular releaseがリクルートされるという考えである。文献から逆耐性が形成されると脱分極によるドパミン放出が亢進するという報告があるので後者の可能性が高い。それでは、所謂vesicular releaseが逆耐性となるとリクルートされる機序は不明である。指導教授の実験開始前の仮説としては、逆耐性となると何らかの機序でPKCが活性化し、CaM結合タンパクであるNMのCaM結合部位がリン酸化され、CaMが細胞質に遊離し、CKIIが活性化し、SynIがリン酸化され、vesicular releaseが

亢進するというものであった。本研究から、NMのリン酸化体が増加し、CKIIの活性化によるSynIのリン酸化が明らかにされたが、そもそもNMとSynIは逆耐性に本質的に関与しているのか、それとも付随して起こる現象なのか全く不明である。それを証明するにはNMやSynIのノックアウト動物を使った実験を行わなければならない。しかし、ある分子をノックアウトしても逆耐性機構には幾重にも代償機構があり、逆耐性は形成されてしまうらしい。更に、線条体のシナプトゾームのなかのNMのうちドパミン神経終末に由来するものの割合は22%、SynIは8%に過ぎず、殆どはグルタミン酸神経終末由来である。それ故、NMやSynIの量の変化はグルタミン酸神経終末に由来すると考えられ、ドパミン神経終末でも同様の変化が起こっていてもグルタミン酸神経終末の変化にマスクされてしまって、ドパミン神経終末のNMとSynIの状態は全く不明である。ドパミン神経終末だけからなるシナプトゾームを作成することは抗体をくつけたビーズで可能であるが、最近開発された方法なので、アンフェタミン逆耐性での報告はない。追加であるが、逆耐性の発現には神経回路が必要であるという説が存在したが、シナプトゾームで放出亢進が観察されたので神経回路は不要で放出の亢進はドパミン神経終末内で完結する。

逆耐性形成はとても複雑である。心理学的要素が関わっている(state-dependency: アンフェタミンを投与した場所が同じならば逆耐性は形成されやすい。ストレスがあるラットだと逆耐性を形成しやすいなど。)ので、全く混沌としている。分子レベルで研究を進めるためには、脳スライスや培養細胞で実験結果の一致がまず必要である。類似現象として記憶のメカニズムとして考えられている海馬の長期増強や小脳の長期抑制やてんかんモデルとして考えられているキンドリングがある。それらと同様な実験方法でアンフェタミンを使用した研究を行えば良いと思う。

文献

1. Iwata S, Hewlett GH, Ferrell ST, Kantor L, Gnegy ME. Enhanced dopamine release and phosphorylation of synapsin I and neuromodulin in striatal synaptosomes after repeated amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283(3):1445-52.
2. Iwata S, Hewlett GH, Gnegy ME. Amphetamine increases the phosphorylation of neuromodulin and synapsin I in rat striatal synaptosomes. *Synapse.* 1997; 26(3):281-91.



3. Iwata S, Hewlett GH, Ferrell ST, Czernik AJ, Meiri KF, Gnegy ME. Increased in vivo phosphorylation state of neuromodulin and synapsin I in striatum from rats treated with repeated amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 278(3):1428-34.
4. Iwata S, Nomoto M, Fukuda T. Quantification of neuromodulin (GAP-43, B-50) and synapsin I in rat striata. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 1999; 19(5):261-6.