

麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グリア型グルタミン酸 トランスポーターの役割に関する検討

中川 貴之

京都大学大学院薬学研究科, 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29

Involvement of Glial Glutamate Transporters in Morphine Dependence and Naloxone-Precipitated Withdrawal

Takayuki NAKAGAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received June 14, 2001)

A body of evidence supports that excitatory amino acid systems, particularly glutamatergic one, participate in morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal. In this study, we examined the involvement of glial glutamate transporters, GLT-1 and GLAST, in them. Rats were rendered morphine-dependent by subcutaneous implantation of two 75 mg morphine pellets for 5 days. Intracerebroventricular administration of DL-threo- β -benzyloxyaspartate, a glutamate transporter inhibitor significantly facilitated various naloxone-precipitated withdrawal signs. By northern blot analysis, the expression of GLT-1 mRNA was found to decrease significantly in the striatum and thalamus of morphine-dependent rats, and to increase significantly in the striatum 2 hr after the naloxone-precipitated withdrawal. On the other hand, there were no significant changes in GLAST mRNA levels in any brain regions. *In vivo* microdialysis experiments revealed that the extracellular glutamate levels was elevated in the striatum and nucleus accumbens, in which the changes of GLT-1 mRNA level were observed, during naloxone-precipitated morphine withdrawal. In cultured astrocytes, the expression of GLT-1 mRNA was regulated by agents activating the cAMP pathway, as well as β -adrenergic agonist and dopamine, but not morphine. These results suggest that the changes of GLT-1 expression, which alter the glutamate uptake and affect the glutamatergic transmission efficiency, play a role in the development of morphine dependence and the expression of morphine withdrawal.

Key words—morphine; dependence; glutamate transporter; GLT-1; GLAST; withdrawal

1. はじめに

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は有用な鎮痛薬として広く臨床で用いられているが、呼吸抑制、消化管運動抑制、吐き気などの副作用を持つほか、その連続的使用により容易に精神的及び身体的依存を生じる、いわゆる強い「麻薬」性を有しているため、臨床の現場においてモルヒネによる疼痛治療が必要な場合であっても、患者や医師がその「麻薬」性を恐れ、モルヒネ適正使用のマニュアルが確立された今日に至っても、十分な疼痛治療が行われない場合が見受けられる。それゆえ、麻薬依存形成のメカニズムを解明し、その制御を可能にすることは、依存を生ぜずに強い鎮痛効果を有する新規な鎮痛薬、あるいは禁断症状に対する有効な治療薬の創製につながるだけでなく、モルヒネ疼痛治療につきまとう不安

を解消し、より高い“Quality of life”を得ることができるものと考えられる。

これまでに、麻薬性鎮痛薬による依存形成あるいは禁断症状の発現のメカニズムに関して、脳内の興奮性アミノ酸、特にグルタミン酸の関与を示す報告が多数なされている。¹⁾すなわち、グルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体^{2,3)} non-NMDA 受容体⁴⁾や代謝型グルタミン酸受容体⁵⁾の拮抗薬により、麻薬依存形成あるいは禁断症状の発現が抑制されること、モルヒネ依存ラットにおいて青斑核や視床下部室傍核などの脳部位において、NMDA 受容体 NR1 サブユニット mRNA の発現量が増加すること、⁶⁾さらに、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いた検討により、禁断症状発現時に青斑核などの脳部位において細胞外グルタミン酸濃度

Table 1. Glutamate Transporter Family

	Species	Deduced number of amino acids	Tissue distribution	Cellular localization (brain)
GLAST	Rat	543	Brain, testis, lung, spleen, muscle, retina	Astrocytes, Bergmann glia
EAAT1	Human	542		
mEAAT1	Muuse	543		
bEAAT1	Bovine	542		
GLT-1	Rat	573 (453)	Brain, liver, retina	Astrocytes
EAAT2	Human	574 (565)		
mEAAT2	Mouse	572 (573, 574)		
EAAC-1	Rabbit	524	Brain, intestine, kidney, lung, retina	Neurons (cell bodies and dendrites)
rEAAC1	Rat	523		
EAAT3	Human	524 (525)		
mEAAC1	Mouse	523		
EAAT-4	Human	567	Cerebellum, retina	Purkinje cell (Dendrites)
rEAAT4	Rat	561		
mEAAT4	Mouse	561		
EAAT-5	Human	560	Retina	Neurons and glial cells

が著明に上昇することなどが報告されている。^{7,8)} これらの知見は、脳内のグルタミン酸神経系が、麻薬依存形成・禁断症状発現に非常に重要な役割を果たしていることを示すものである。

一方、グルタミン酸トランスポーターは、シナプス間隙に遊離されたグルタミン酸を神経細胞あるいはグリア細胞に取り込むことにより、グルタミン酸によるシナプス伝達を終結させ、細胞外グルタミン酸濃度を低い状態に維持する役割を果たしていることが知られている。⁹⁾ 脳内におけるグルタミン酸トランスポーターは、これまでに少なくとも5種類のサブタイプの存在が確認されており、^{9,10)} GLT-1及びGLASTは脳内では主にグリア細胞に、一方、EAAC1及びEAAT4は主に神経細胞に、また、EAAT5は網膜にのみ発現していることが報告されている (Table 1)。^{9,11)} また、これらグルタミン酸トランスポーターのアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドによって遺伝子をノックダウンさせたラットあるいはノックアウトマウスを用いた検討などから、脳内でのグルタミン酸の取り込みには神経型のものよりも、グリア型のグルタミン酸トランスポーターの方が重要な役割を果たしていることも報告されている。^{12,13)} 本総説では、麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの役割に関する著者らの知見を紹介したい。

2. グルタミン酸トランスポーター阻害薬を用いた行動薬理的検討

麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グルタミン酸トランスポーターの関与を検討するため、まず、グルタミン酸トランスポーター阻害薬 DL-*threo*- β -benzyloxyaspartate¹⁴⁾ (TBOA: サントリー生物有機科学研究所より御供与頂いた) を用いた検討を行った。雄性 Sprague-Dawley 系ラット (200–250 g) に対して側脳室内投与用のガイドカニューレの埋め込み手術を施した後、ラットの頸背部皮下にモルヒネ 75 mg を含有するペレットを、1日目に1個、2日目に1個、合計2個を埋め込み、5日目にナロキソン (0.3 mg/kg) を腹腔内投与して、誘発される種々の禁断症状を1時間、観察した。このナロキソンにより誘発される種々の禁断症状 (体重減少, wet-dog shake, teeth chattering, stretching, 跳躍行動, paw shake, head shake, 射精, 後ずさり, 流涎, lacrimation, rhinorrhea, 眼瞼下垂) は、TBOA (1–10 nmol) の側脳室内への前処置により、いずれも濃度依存的に増悪され、そのうちいくつかの禁断症状に関して、TBOA の作用は統計学的に有意なものであった (Fig. 1)。禁断症状発現時には、青斑核などの脳部位においてシナプス前終末からのグルタミン酸の遊離が促進され、このことが様々な禁断症状の発現に関与していることが報告されてい

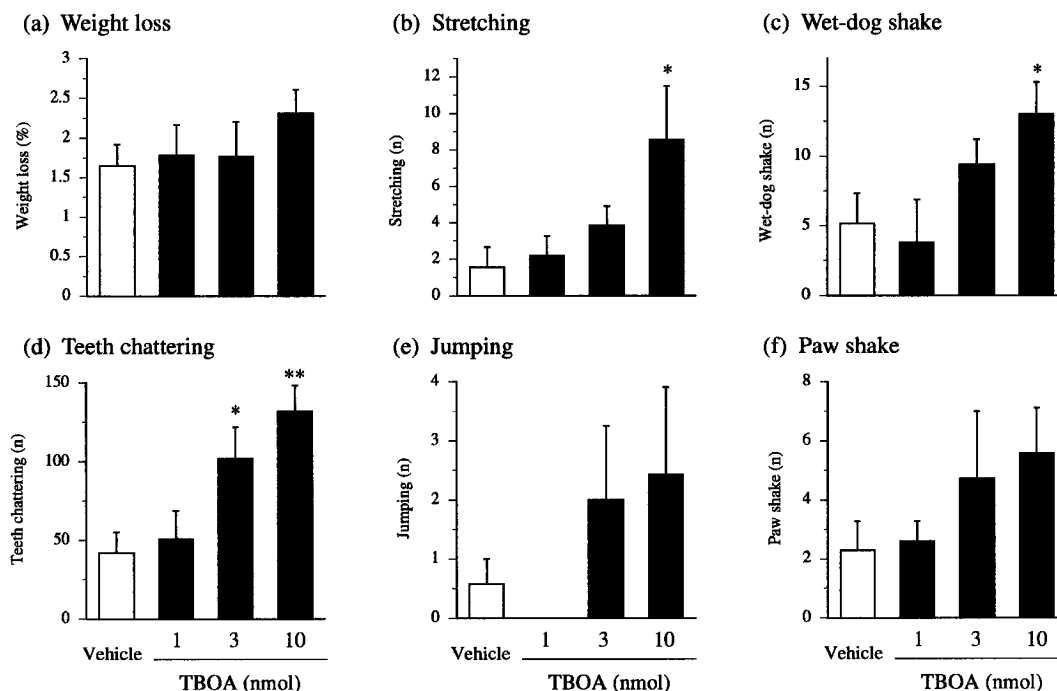


Fig. 1. Effect of Intracerebroventricular Administration of TBOA on Naloxone-Precipitated Withdrawal Signs in Morphine-dependent rats

Morphine-dependent rats were implanted with two morphine pellets for 5 days, and intracerebroventricularly injected with vehicle (0.1% DMSO in PBS) or TBOA at the indicated dose, at 10 min before the intraperitoneal (i.p.) injection of naloxone (0.3 mg/kg). Each column represents the means \pm S.E.M. of total numbers during 1 hr. * p <0.05, ** p <0.01 vs. vehicle, n =5–7.

る。^{1,7,8)} 本研究結果から、TBOAの処置により、禁断症状発現時に過剰遊離されたグルタミン酸のグルタミン酸トランスポーターによる取り込みが阻害された結果、シナプス間隙のグルタミン酸量の増加がより一層促進され、このことが禁断症状の増悪につながったと考えられる。すなわち、これらのことから、脳内のグルタミン酸トランスポーターが禁断症状の発現あるいはその調節に少なくとも一部関与していることが示唆される。

3. 脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの遺伝子発現変化

次に、モルヒネ依存ラット及び禁断症状発現後のラットの脳内において、グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 及び GLAST mRNA の発現量が変化するかを northern blot 法により解析した。

まず、正常ラット脳内においては、GLT-1 mRNA は、大脳皮質、海馬、線条体及び視床下部において強く、視床、中脳及び橋・延髄において中程度に発現していたが、小脳における発現はわずかなものであった。一方、GLAST mRNA は、小脳において顕著な発現が見られ、またその他の脳部位

においても程度の差は見られるものの、その発現が確認された。これらの分布パターンは、先に報告されたものと一致するものである。¹¹⁾ モルヒネ依存ラット脳内において、GLT-1 mRNA 発現量は、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳及び小脳において 20–50% 減少し、特に、線条体及び視床においては、プラセボペレットを処置したコントロール群のそれぞれ $66.4 \pm 14.8\%$ 及び $50.0 \pm 6.4\%$ にまで有意に減少した。一方、GLAST mRNA 発現量に関しては、モルヒネ依存ラットの脳内において、コントロール群と比較していずれの脳部位においても有意な変化は見られなかった (Fig. 2).¹⁵⁾ また、ナロキソン (3 mg/kg) の腹腔内投与により禁断症状を誘発した 2 時間後のラットの線条体、視床下部及び中脳においては、モルヒネ依存形成時と比較して GLT-1 mRNA 発現量が増加し、特に線条体においてはコントロール群の $155.4 \pm 26.7\%$ にまで増加し、コントロール群及びモルヒネ依存群と比較して有意な増加が見られた。一方、GLAST mRNA 発現量に関しては、コントロール群と比較して有意な変化は見られなかった (Fig. 2).¹⁵⁾

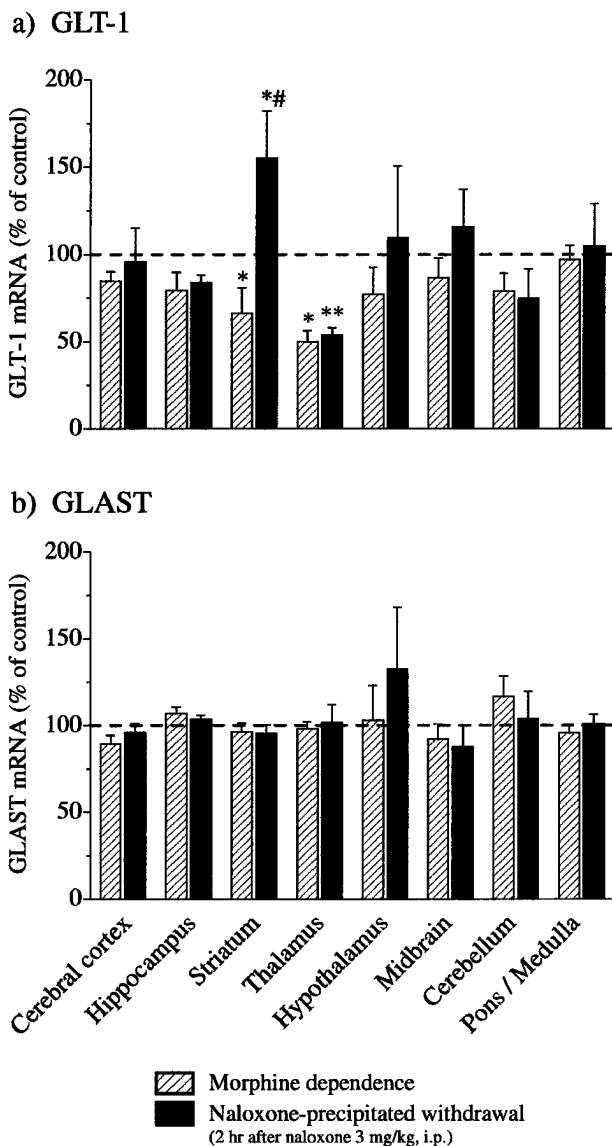


Fig. 2. Effects of Morphine Dependence and Naloxone-Precipitated Withdrawal on the Expression of GLT-1 (a) and GLAST (b) mRNAs in the Rat Brain

Animals in placebo-treated and morphine-dependent group were implanted with two placebo or morphine pellets for 5 days, respectively. For the morphine-withdrawal group, the morphine-dependent rats were intraperitoneally administered with naloxone (3 mg/kg). Northern blot analysis was conducted using a 32 P-labeled rat GLT-1 or GLAST antisense RNA probes. In each region, the expression of GLT-1 or GLAST mRNA in placebo-treated rats was assigned a value of 100%. Data are presented as the means \pm S.E.M. of the percentage of the placebo-treated group of 4–6 separate experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the placebo-treated group; # p <0.05 vs. morphine-dependent group (Mann-Whitney U -test).

4. 線条体及び側坐核における細胞外グルタミン酸濃度の変化

GLT-1 mRNA の発現量の変化が顕著であった線条体、及びその近傍に存在し、麻薬依存との関連性が指摘されている側坐核¹⁶⁾において、*in vivo* マイクロダイアリシス法により細胞外グルタミン酸濃度

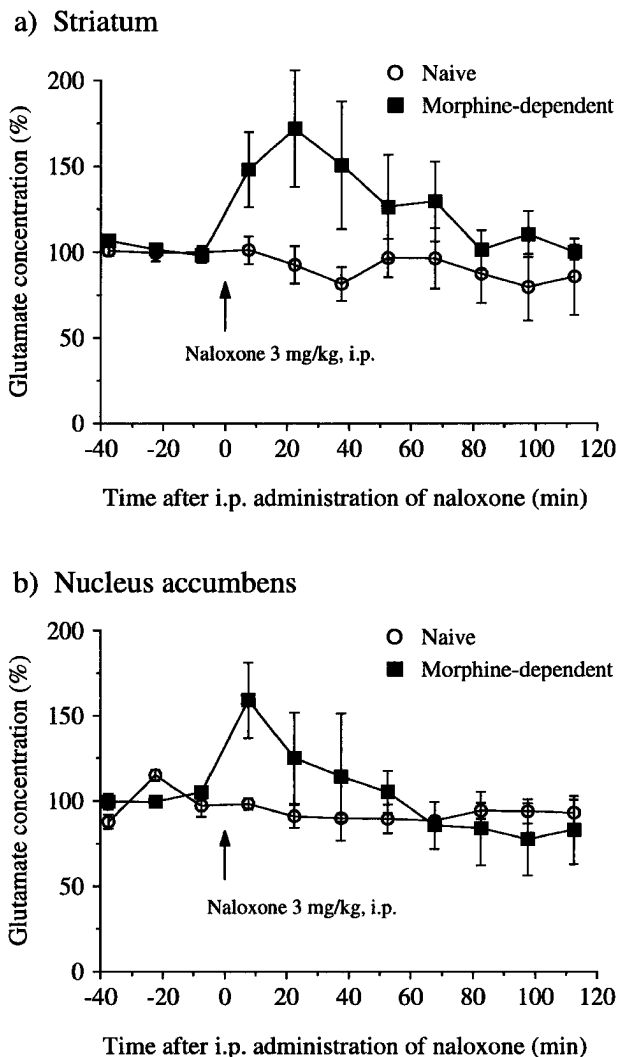


Fig. 3. Effect of Naloxone-Precipitated Withdrawal on Extracellular Glutamate Concentration in Rat Striatum (a) and Nucleus Accumbens (b)

Morphine-dependent rats were intraperitoneally administered with naloxone (3 mg/kg) at the time zero indicated (arrow). Dialysates were collected at 15 min intervals for the determination of glutamate levels. Data are expressed as the means \pm S.E.M. of the percentage of the basal values calculated as an average of three consecutive stable dialysates before naloxone administration. $n=3-5$.

の測定を行った。モルヒネ依存ラットの線条体及び側坐核どちらにおいても、ナロキソン (3 mg/kg) の腹腔内投与により、細胞外グルタミン酸濃度の一過性の上昇が見られ、ナロキソン投与前の約 150–180% にまで上昇した (Fig. 3)。このような禁断症状発現時におけるグルタミン酸濃度の上昇のメカニズムの一部には、これらの領域における GLT-1 の発現量の減少が関与している可能性が考えられる。

5. 培養アストロサイトをを用いた GLT-1 遺伝子発現変化のメカニズムの解析

麻薬依存形成時あるいは禁断症状発現後のラット

脳内における GLT-1 mRNA 発現量変化のメカニズムを分子レベルで解明する手始めとして、ラット新生児由来初代培養アストロサイトをを用いた検討を行った。通常条件で培養したアストロサイトにおいては、GLT-1 mRNA はわずかに検出できる程度にしか発現していなかったが、cAMP の非加水分解型アナログである dibutyl cAMP、ホスホジエステラーゼ阻害薬の 3-isobutyl-1-methylxanthine を処置することによって、GLT-1 mRNA 発現量は増加した。これらの結果から、GLT-1 mRNA は cAMP 系により、その発現が調節されるタイプの遺伝子であることが示唆される。^{10,17)}

一方、培養アストロサイトにおける GLT-1 mRNA 発現量、及び細胞外グルタミン酸の取り込み能は、モルヒネの持続的処置によっても何ら影響は受けなかった。このことは、モルヒネ依存形成時の GLT-1 mRNA 発現量の変化は、モルヒネのアストロサイトへの直接的な影響ではないことを示している。

次に、培養アストロサイトにおける GLT-1 mRNA 発現量に対する各種神経伝達物質受容体アゴニストの効果を検討した。その結果、 β -アドレナリン受容体アゴニスト isoproterenol、及びドパミンの処置によってその発現量は増加したが、アセチルコリン、セロトニン、GABA、グルタミン酸、ATP の処置によっては影響を受けなかった (Fig.

4)。これらの結果から、GLT-1 の発現は、ノルアドレナリン神経系及びドパミン神経系により調節を受けていることが示唆される。¹⁰⁾ これらの神経系はどちらも、モルヒネ依存に深く関与していることが知られており、モルヒネ依存形成時あるいは禁断症状発現時のこれらの神経系の可塑的变化が、GLT-1 の発現を調節しているものと考えられる。

6. おわりに

本研究において、著者は麻薬依存形成・禁断症状発現における脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの役割を検討し、グルタミン酸トランスポーター阻害薬がナロキソン誘発禁断症状を増悪すること、麻薬依存ラット脳内では GLT-1 mRNA の発現量が線条体、視床などの脳部位において減少するが、GLAST mRNA に変化は見られないこと、さらに、GLT-1 の顕著な遺伝子発現変化が見られた線条体及び側坐核において、禁断症状発現時に細胞外グルタミン酸濃度の一過性の上昇が見られることを見いだした。さらに、培養アストロサイトを用いた検討から、GLT-1 遺伝子発現変化のメカニズムに、ノルアドレナリン神経系あるいはドパミン神経系の可塑的变化が関与している可能性を示した。これらの結果から、麻薬依存形成時には、シナプス前終末から放出されたグルタミン酸の GLT-1 を介したアストロサイトへの取り込みが減少することにより、グルタミン酸神経伝達の効率に変化が生じ、このことが麻薬依存形成に関与していることが示唆される (Fig. 5)。

近年、グリア細胞のシナプス伝達あるいは神経機能の可塑的变化における役割が、多くの研究者の注目を集めつつあるが、¹⁸⁾ そのような観点から麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムを検討した報告はこれまでになく、本研究結果は、麻薬依存形成時における神経機能の可塑的变化に、脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターが関与している可能性を初めて示したものである。今後、これら脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの可塑的变化の意義を個体レベル及び分子レベル双方から一層明確にすることにより、麻薬依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関する新規な知見を得ることが期待できる。さらに著者は、グルタミン酸トランスポーターを活性化させる作用を有する薬物を、モルヒネと同時に連続投与することにより、モルヒネによる

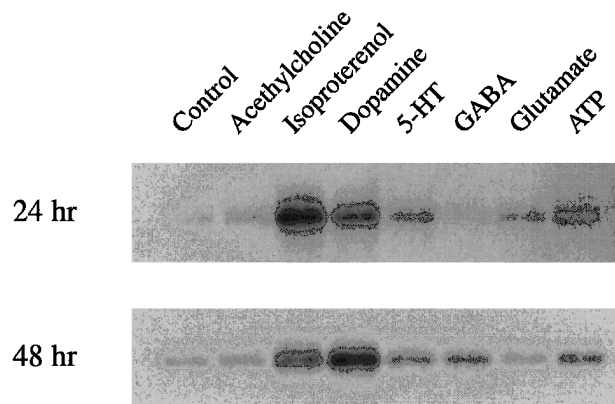


Fig. 4. Effects of Various Neurotransmitters on the Expression of GLT-1 mRNA in Rat Cultured Astrocytes

The rat cultured astrocytes were incubated with acetylcholine, isoproterenol, dopamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), L-glutamate and ATP at the concentration of 1 mM for 24 hr (upper) and 48 hr (lower). The cells were harvested and the total RNA was extracted. Northern blotting was conducted using a ³²P-labeled rat GLT-1 antisense RNA probe.

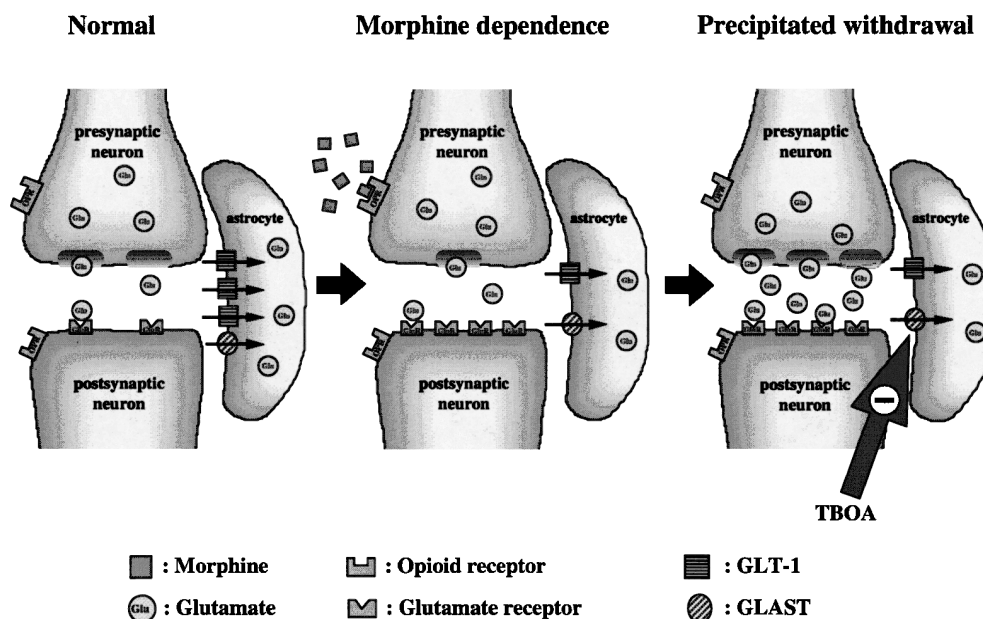


Fig. 5. Diagram of Glutamatergic Synapses in Morphine Dependent and Naloxone-Precipitated Withdrawal Rat Brain

耐性及び依存の形成が減弱されることをすでに報告しており,¹⁹⁾ 脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの機能調節を作用機序にする, モルヒネなどの依存形成能の強い薬物の連続投与の際の補助薬, あるいは麻薬禁断症状に対する有用な治療薬の創製の可能性も考えられる。

謝辞 本研究は, 京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野において行われたものであり, 終始懇切な御指導並びに御鞭撻を賜りました京都大学薬学研究科教授 佐藤公道先生に心から御礼申し上げます。また, 本研究の全般にわたり御指導を頂きました京都大学薬学研究科助教授 南 雅文先生に心から感謝の意を表します。さらに本研究遂行にあたり, 御協力頂きました京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 小澤 徹修士並びに教室員一同に深く感謝いたします。なお, 本研究の一部は文部科学省研究費補助金, 科学技術振興調整費目標達成型脳科学研究, 及び財団法人上原記念生命科学財団の援助の下に行われたものであり, 併せて感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Zhu H., Rockhold R. W., Ho I.K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **76**, 1-14 (1998).
- 2) Marek P., Ben-Eliyahu S., Gold M., Liebeskind J. C., *Brain Res.*, **547**, 77-81 (1991).
- 3) Trujillo K. A., Akil H., *Science*, **251**, 85-87 (1991).
- 4) Rasmussen K., Kendrick W. T., Kogan J. H., *Neuropsychopharmacology*, **15**, 497-505 (1996).
- 5) Fundytus M. E., Ritchie J., Coderre T. J., *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 1015-1020 (1997).
- 6) Zhu H., Jang C.-G., Ma T., Oh S., Rockhold R. W., Ho I. K., *Eur. J. Pharmacol.*, **365**, 47-54 (1999).
- 7) Aghajanian G. K., Kogan J. H., Moghaddam B., *Brain Res.*, **636**, 126-130 (1994).
- 8) Zhang T., Feng Y. Z., Rockhold R. W., Ho I. K., *Life Sci.*, **55**, PL25-PL31 (1994).
- 9) Seal R. P., Amara S. G., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 431-456 (1999).
- 10) Gegelashvili G., Schousboe A., *Mol. Pharmacol.*, **52**, 6-15 (1997).
- 11) Rothstein J. D., Martin L., Levey A. I., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N., Kuncl R. W., *Neuron*, **13**, 713-725 (1994).
- 12) Rothstein J. D., Dykes-Hoberg M., Pardo C. A., Bristol L. A., Jin L., Kuncl R. W., Kanai Y., Hediger M. A., Wang Y., Schielke J. P., Welty D. F., *Neuron*, **16**, 675-686 (1996).
- 13) Tanaka K., Watase K., Manabe T., Yamada

- K., Watanabe M., Takahashi K., Iwama H., Nishikawa T., Ichihara N., Kikuchi T., Okuyama S., Kawashima N., Hori S., Takimoto M., Wada K., *Science*, **276**, 1699–1702 (1997).
- 14) Shimamoto K., LeBrun B., Yasuda-Kamatani Y., Sakaitani M., Shigeri Y., Yumoto N., Nakajima T., *Mol. Pharmacol.*, **53**, 195–201 (1998).
- 15) Ozawa T., Nakagawa T., Shige K., Minami M., Satoh M., *Brain Res.*, **905**, 254–258 (2001).
- 16) Nestler E. J., *J. Neurosci.*, **12**, 2439–2450 (1992).
- 17) Swanson R. A., Liu J., Miller J. W., Rothstein J. D., Farrell K., Stein B. A., Longuemare M. C., *J. Neurosci.*, **17**, 932–940 (1997).
- 18) Sykova E., Chvatal A., *Neurochem. Int.*, **36**, 397–409 (2000).
- 19) Nakagawa T., Ozawa T., Shige K., Yamamoto R., Minami M., Satoh M., *Eur. J. Pharmacol.*, **419**, 39–45 (2001).