

# 大脳皮質神経細胞における Nicotine 長期曝露に伴う L 型電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルの機能変化について

毛利 豊

神経細胞への低濃度 nicotine 長期曝露 (0.1  $\mu$ M, 72時間) による電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル (VDCC) および中枢性 nicotinic acetylcholine (nnACh) 受容体の機能変化について初代培養マウス大脳皮質神経細胞 (神経細胞) を用いて検討した。

30 mM KCl 刺激に伴う神経細胞内への [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入は, 神経細胞への nicotine の曝露時間および濃度依存性に増加した。また, この [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入量は nicotine 曝露開始24時間後に最大増加を示し, その後72時間まで継続した。

0.1  $\mu$ M nicotine の72時間曝露による神経細胞内への [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入増加は, nnACh 受容体阻害薬である mecamylamine の共存下において完全に抑制された。同様に, L 型 VDCC 阻害薬である nifedipine の共存下でも抑制されたが, N 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬では抑制されなかった。この nicotine 処理により [ $^3H$ ] verapamil 結合は増加し, しかもこの結合増加は  $B_{max}$  値 ([ $^3H$ ] verapamil 結合部位数) の増加に起因するものであり, 一方,  $K_d$  値 ([ $^3H$ ] verapamil に対する親和性) には変化がなかった。Western blot および Northern blot 法では L 型 VDCC  $\alpha1C$ ,  $\alpha1D$ ,  $\alpha1F$  および  $\alpha2/\delta1$  subunit の発現が増加したが, それぞれ P/Q 型および N 型 VDCC,  $\alpha1A$  および  $\alpha1B$  subunit については変化が認められなかった。また L 型 VDCC  $\beta4$  mRNA の発現変化も認められなかった。

神経細胞への nicotine 曝露により [ $^3H$ ] nicotine 結合の増加が生じ, この増加は [ $^3H$ ] nicotine 結合の  $B_{max}$  値のみの増加によるものであり,  $K_d$  値には変化が認められなかった。さらに Western blot 法による検討からこの nnACh 受容体 subunit である  $\alpha4$  および  $\beta2$  subunit の増加が観察された。

nnACh 受容体の変化については, Western blot 法において,  $\alpha4$  および  $\beta2$  subunit の発現が増加したが,  $\alpha3$  subunit については変化が認められなかった。

以上の結果から, 神経細胞への低濃度 nicotine 長期曝露により nnACh 受容体の up-regulation とともに L 型 VDCC の up-regulation が生じ, これにより神経細胞内への [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入増加が起こると考えられる。

(平成14年2月26日受理)

## Long-term Exposure to Nicotine Induces Up-regulation of L-type Voltage-dependent Calcium Channels in Mouse Cerebrocortical Neurons.

Yutaka MOHRI

The effects of long-term (72 hours) exposure to a low concentration (0.1  $\mu$ M) of nicotine

on various types of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VDCCs) and neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nnAChRs) were examined using primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. Thirty millimolar KCl stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] influx into the neurons increased with increase in the duration of nicotine exposure and its concentrations. The maximal increase of KCl-stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] influx was observed 24 hours after the initiation of exposure and thereafter was maintained up to 72 hours, at which time it was completely suppressed by mecamylamine, an inhibitor for nnAChRs. The KCl-induced [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] influx observed after long-term exposure to nicotine, which was sensitive to nifedipine, an inhibitor of L-type VDCCs, was facilitated while the [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] influx through P/Q- and N-type VDCCs showed no changes. Moreover, enhanced immunoreactivity against antibodies for  $\alpha 1\text{C}$ ,  $\alpha 1\text{D}$  and  $\alpha 2/\delta 1$ , subunits of L-type VDCCs was recognized, whereas no changes in immunoreactivity against antibodies for  $\alpha 1\text{A}$  and  $\alpha 1\text{B}$  subunits of other types of VDCCs were noted. In addition, the expression of mRNA for L-type VDCC subunit,  $\alpha 1\text{F}$ , was also enhanced, although  $\beta 4$  mRNA expression did not change. Up-regulation of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits, but not  $\alpha 3$  subunit of nnAChRs, was also noted after the nicotine exposure. Taken together, these results indicate that long-term exposure of the neurons to a low concentration of nicotine induces both increased [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] influx through up-regulated L-type VDCCs and nnAChR up-regulation. (Accepted on February 26, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(1): 43-58, 2002

**Key Words** ① Nicotine ② Nicotinic acetylcholine receptor  
③ Voltage-dependent calcium channel ④ Cerebral cortical neurons

## 緒 言

中枢型 nicotinic acetylcholine (nnACh) 受容体は内因性神経伝達物質である acetylcholine (ACh) や nicotine などによる活性化に伴い、種々の陽イオンを細胞内へ流入させることが知られている<sup>1), 2)</sup>。また、nnACh 受容体は5つの subunit で構成されており<sup>3)</sup>、多様な機能を発現するが<sup>2)</sup>、中枢神経系においては nicotine 刺激による神経細胞膜の脱分極を介し、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性の亢進により細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入が促進される<sup>4), 5)</sup>。この神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の亢進が、nicotine の中枢神経作用として記憶力亢進や自発性増加、痙攣、易刺激性低下、食欲低下、糖利用亢進などを誘発すると考えられている<sup>6), 7)</sup>。また、nnACh 受容体の活性化は、ACh, dopamine,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glutamate, serotonin などの神経伝達物質放出の促進を介した中枢神経系機能の変化に関与しており、この nnACh 受容体の神経伝達物質放出

促進作用は種々の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (VDCC) 阻害剤により抑制されることから、VDCC が nnACh 受容体の活性化による神経伝達物質放出の促進に重要な役割を有するのみならず、神経細胞膜の脱分極により誘発される VDCC 開口は nnACh の神経細胞機能の修飾にも重要である可能性が提案された<sup>8)</sup>。後者の可能性については、低濃度の nicotine による長期間の nnACh 受容体活性化が、不安誘発作用を有する内因性神経活性 peptide である dizapam binding inhibitor (DBI)<sup>9)</sup> の発現増加を誘発することがマウス大脳皮質および初代マウス大脳皮質神経細胞において認められ、しかもこの変化が L 型 VDCC を介した変化である<sup>10)</sup> という事実からも支持されるものと考えられる。

nnACh 受容体を構成する subunit の薬理活性に及ぼす nicotine の急性および慢性作用が、nicotine 耽溺にみられる nicotine 耐性、依存および退薬症候の発現に関与していると考えられる<sup>11), 12)</sup>。神経細胞への低濃度 nicotine の長期曝露は高親和性 [ $^3\text{H}$ ] nicotine 結合部位を有する

nnACh 受容体の  $\alpha 4/\beta 2$  subunit の up-regulation を生じさせるが<sup>13)~15)</sup>, 受容体の nicotine に対する反応性は低下することが報告されている<sup>16)~18)</sup>. この nnACh 受容体 up-regulation は nnACh 受容体 agonist による受容体の脱感作に対する代償性変化と考えられ<sup>16), 19)</sup>, これらのデータから, 低濃度 nicotine の長期曝露のちにみられる nnACh 受容体の機能低下は主に nnACh 受容体  $\alpha 4/\beta 2$  subunit の機能変化に起因している可能性が高いことが推測される.

すでに著者らは, 培養神経細胞への長期間の nicotine 曝露により 30 mM KCl 刺激性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加を報告しており<sup>10)</sup>, この実験成績から長期にわたる nnACh 受容体活性化による受容体の機能変化は, nnACh 受容体と機能的に関連する VDCC 機能が随伴して低下する可能性が考えられる. しかしながら, 上述の条件下における VDCC の機能的変換についての検討は十分に行われていない. 本研究では, 低濃度 nicotine を長期曝露した初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い, nnACh 受容体の持続的活性化に随伴する VDCC の機能変化の詳細を明らかにすることを試みた.

## 実験方法および実験材料

### 1) 大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

大脳皮質神経細胞の単離および初代培養は既報に準じて行った<sup>20)</sup>. すなわち胎齢15日目の ddY 系マウス胎児から新皮質を摘出し, 髄膜を除去した後, 剪刀にて細切し, trypsin 処理にて得られた細胞懸濁液に遠心操作 (900 xg, 4 °C, 2 分) を加え沈渣を得た. 単離した細胞を poly-L-lysine を前処置した培養皿で, 15% ウシ胎児血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) とともに, 37°C, air 95%/CO<sub>2</sub> 5% の条件下で 3 日間培養した. ついで 10  $\mu\text{M}$  cytosine arabinoside および 10% ウマ血清を含有する DMEM 中で 24 時間培養することにより, 非神経細胞の増殖を抑制した. その後, 10% ウマ血清含有 DMEM 中にて上記の条件と同一条件

下で培養を継続し, 培養液は 4 日毎に新鮮な 10% ウマ血清含有 DMEM に交換した. なお, 免疫組織学的検討などから, 本研究に用いた細胞の 95% 以上が神経細胞であることが確認されている<sup>20)</sup>.

### 2) Nicotine の長期曝露

神経細胞への nicotine 長期曝露による VDCC 機能変化についての検討は, Hank's solution で調整した nicotine を直接培養皿に添加することで行った. 光感受性である nicotine の分解を避けるため, nicotine 添加や nicotine 曝露中の神経細胞の取り扱いには暗室内で行い, nicotine 含有培養液は毎日交換した. 本研究では nicotine 非曝露神経細胞を対照群として使用した. Mecamylamine (1  $\mu\text{M}$ ) の添加は, nicotine 添加の 5 分前に行った.

本研究で用いた実験条件下では, nicotine (0.1  $\mu\text{M}$ ) の神経細胞への 72 時間の曝露は, 神経細胞からの lactic dehydrogenase (LDH) 漏出測定と trypan blue による色素排泄試験による検討から, 神経毒性を示さないことが確認された.

Nicotine 依存マウスの作製は, 体重 30 g の ddY 系雄マウス (Japan SLC., Hamamatu, Japan) を 1 週間通常飼料と水により飼育後, nicotine (1 mg/kg) を 1 日 3 回, 7 日間皮下注射することにより作製した. 最終 nicotine 投与 4 時間後にマウスを断頭して大脳皮質を摘出し, [ $^3\text{H}$ ]nicotine および [ $^3\text{H}$ ]vepamil 結合実験の標品とする顆粒画分を作製した<sup>21)</sup>. なお, nicotine 連続投与により, マウスには体重減少, 排泄増加, 運動量増加などが認められたことから, 本研究で行った nicotine の連続投与により, マウスには nicotine 依存が形成されているものと判断される.

### 3) [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入量の測定

神経細胞への [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入量の測定方法は既報に準じて行った<sup>22)</sup>. すなわち, 神経細胞を 20 mM Hepes を含有する Ca<sup>2+</sup>-free Krebs-Ringer bicarbonate Buffer (KRB-Hepes: 137 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub> ·



6 H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose, pH 7.4) で37℃, 10分間の incubation を行った後, 新鮮な Ca<sup>2+</sup>-free KRB-Hepes に交換し, 2.7 mM CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O (1.0 μCi of [<sup>45</sup>Ca] Cl<sub>2</sub>/dish) を培養皿に添加して反応を開始した. 37℃で2分間の incubation を行った後, [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] を含有する反応液を吸引除去し, さらに氷冷した2.7 mM CaCl<sub>2</sub>含有 KRB-Hepes で神経細胞を5回洗浄し, 0.5 M NaOH により培養皿から神経細胞を剥離した. 等モルの酢酸で中和し, 神経細胞内に流入した [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定した.

30 mM KCl, nicotine および Bay k 8644 は [<sup>45</sup>Ca] Cl<sub>2</sub> と同時に添加し, VDCC 阻害薬は [<sup>45</sup>Ca] Cl<sub>2</sub> の15秒前に添加した.

4) [<sup>3</sup>H] Nicotine および [<sup>3</sup>H] vepapamil 結合実験

[<sup>3</sup>H] Nicotine および [<sup>3</sup>H] vepapamil を用いた結合実験は, マウス大脳皮質神経細胞から作製した顆粒画分を用いて行った. 神経細胞を氷冷した phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) で3回洗浄し, 氷冷した50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) とともに培養皿から神経細胞を剥離し, ついで Polytron homogenizer で作製した homogenate を遠心 (48000 xg, 4℃, 20分) した. この遠心操作を4回繰り返すことにより, 結合実験に使用する顆粒画分を作製した. 得られた顆粒画分は -80℃下に24時間以上静置し, 受容体結合実験前に解凍し, 上記の遠心による洗浄操作を3回行い, 実験に供した. Nicotine 依存マウスの大脳皮質を用いた結合実験も神経細胞の場合と同様の操作で顆粒画分を作製した. [<sup>3</sup>H] Nicotine 結合実験は Zhang and Nordberg らの方法<sup>23)</sup>に多少の補正を加えて行った.

顆粒画分を用いた [<sup>3</sup>H] nicotine 結合実験は既報<sup>23)</sup>に準じて行った. すなわち, 5 nM [<sup>3</sup>H] nicotine を含有する50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で60分間の incubation を行った後, 氷冷した Tris-HCl buffer 2 ml を反応系に添加す

ることにより反応を停止させ, この反応液を予め0.3% polyethylenimine solution で5時間浸潤させた Whatman GF/C glass filter で濾過した. ついで glass filter を氷冷した Tris-HCl buffer で3回洗浄したのち, glass filter に残留する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した. なお, 結合実験系における反応液総量は 1 ml とした. また, [<sup>3</sup>H] nicotine の特異的結合量は, 1 μM cystine 存在下において得られた非特異性結合量を cystine 非存在下で得られた総結合量から差し引くことにより算出した. Scatchard 解析は種々の [<sup>3</sup>H] nicotine 濃度 (0.2 ~ 20 nM) の [<sup>3</sup>H] nicotine の存在下に上述と同様の結合実験を行うことにより得られたデータを用いて行った.

[<sup>3</sup>H] Vepapamil 結合実験は既報<sup>24)</sup>に準じて行った. 顆粒画分を5 nM [<sup>3</sup>H] vepapamil を含有する2 ml の50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) とともに2℃, 60分間の incubation を行ったのち, 氷冷した2 ml の Tris-HCl buffer で反応を停止させ, 反応液を予め0.3% polyethylenimine solution で5時間浸潤させた Whatman GF/B glass filter で濾過した. さらに, glass filter を氷冷した Tris-HCl buffer で3回洗浄したのちに glass filter をシンチレーションバイアルに移し, 液体シンチレーションカウンターで filter に残留する放射能活性を測定した. [<sup>3</sup>H] Vepapamil の特異的結合量は, 10 μM vepapamil を用いて得られた非特異性結合量を vepapamil 非存在下で得られた総結合量から差し引いて算出した. また, Scatchard 解析は種々の濃度 (0.01 ~ 8 nM) の [<sup>3</sup>H] vepapamil 存在下に同実験方法で得られたデータを用いて行った.

5) Immunoblot 法による nnACh 受容体および VDCC の測定

Immunoblot 法に用いる蛋白質は神経細胞から以下の方法で抽出した. 培養神経細胞を氷冷した0.15 M NaCl 溶液で5回洗浄し, さらに4℃の条件下で6% trichloroacetic acid を含有する0.15 M NaCl で固定したのち培養皿から剥離した. この試料を遠心 (10000 xg, 4℃, 5分)



して pellet を作製した。この pellet を氷冷した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄し, sample buffer (4% sodium lauryl sulfate, 12%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol 含有 100 mM Tris-HCl, pH 6.8) を添加し最終容量が 0.2 ml となるよう調整したのち攪拌し, 超音波破碎, 3 分間の煮沸処理, 遠心操作 (10000 xg, 4 °C, 60分) を順次行い, 得られた上清を実験に供するまで -80°C で保存した。

5/20% gradient gel (100 × 100 × 0.5 mm) を用いて SDS-PAGE ゲル電気泳動 (20 mA, 90 分) を行った後, semi-dry 型 transblotter (160 mA, 60分) で転写<sup>25)</sup>させた nitrocellulose 膜 (NitroPure, Osnimics Inc., Westborough, U.S.A.) を PBS で洗浄し, 1% ウシ血清アルブミン含有 Tris buffered saline (TBS; 0.15 M NaCl 含有 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で固定した。この nitrocellulose 膜に nnACh 受容体  $\alpha 4 \cdot \alpha 3 \cdot \beta 2$  subunit および L · N · P/Q 型 VDCC  $\alpha 1$  subunit, L 型 VDCC  $\alpha 2/\delta 1$  subunit に対する抗体を 4 °C で一晚反応させた後, 0.05% Tween 20 を含有する TBS で 4 回洗浄し, さらに抗ウサギ IgG 抗体 (nnACh 受容体: 1/2000 倍希釈) と抗ヤギ Ig G 抗体 (VDCC: 1/2500 倍希釈) を反応させた。泳動された蛋白質の染色は prestained buffer (ethanol : acetic acid : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 5) で洗浄し, coomassie brilliant blue で染色した。

得られた nnACh 受容体および VDCC の subunit の immunoreactive band の染色強度は ImageMaster 1D Elite software (Amersham Biotech, Buckinghamshire, England) にて解析した。

6) L 型 VDCC  $\alpha 1F$  および  $\beta 4$  subunit cDNA の作製

L 型 VDCC  $\alpha 1F$  および  $\beta 4$  subunit cDNA はそれぞれの subunit の oligonucleotide ( $\alpha 1F$ , TT CGACTCTTGTTGGGTCTTG and TCAAAGCGG GAAAGAATAGA :  $\beta 4$ , CTATAAACTCTCATC ATTTAC and TCATAACGGGTTGCACATAC) を用い, polymerase chain reaction (PCR) 法に

よりマウス全脳 cDNA から増幅を行い<sup>26), 27)</sup>, 得られた PCR 産物は EcoRI アダプターを連結させ, pUC 18 の EcoRI サイトに挿入して作製した。

7) Northern blot 法による mRNA 発現の測定

神経細胞を氷冷した PBS (pH 7.4) で洗浄したのちに培養皿から剥離し, FASTTrack™ isolation kit を用いて poly(A)<sup>+</sup>RNA を分離した<sup>10)</sup>。神経細胞可溶性抽出物を oligo(dT)-cellulose affinity chromatography に適用して poly(A)<sup>+</sup>RNA を精製した。

RNA blot hybridization は既報に準じて行った<sup>10)</sup>。すなわち, 変性 poly(A)<sup>+</sup>RNA を formaldehyde 含有 1.1% agarose gel を用いた電気泳動で分離したのち, gel を ethidium bromide で染色し, UV 照射下で RNA の band を確認した。ついで RNA を nitrocellulose 膜に 20 x standard saline citrate (SSC) を用い capillary blotting 法により転写させ, 転写が十分行われたことを ethidium fluorescence で確認した。マウス大脳皮質から調整した cDNA の断片の標識には [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP, random primer および Klenow 断片を用いて行った。また,  $\beta$ -actin mRNA については, Biosystems 社製の DNA synthesizer により合成した  $\beta$ -actin の antisense oligomer (AGGTCTCAAACATGATCTGGGTC A)<sup>28)</sup> を terminal deoxynucleotidyl transferase を用い [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で標識した。次いで baking した nitrocellulose 膜を 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 5 × standard saline citrate (SSC), 50 mg/ml salmon sperm DNA, 1 × Denhardt's solution, 30% formamide, 10% dextran sulfate および [<sup>32</sup>P] labeled probe とともに 42°C, 24 時間の hybridization を行ったのち, 0.2 × SSC と 0.1% sodium lauryl sulfate で 50°C, 2 時間洗浄した。得られた band の放射性強度は Fujix BAS 2000 System (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

8) 蛋白質の定量

神経細胞に含まれる蛋白質は Lowry らの方法<sup>29)</sup>を用い, ウシ血清アルブミンを標準物質と

して測定した。

#### 9) 統計学的検討

得られた値はすべて mean ± S.E.M. で示し、統計的有意差の検討は、それぞれの図に記載した統計法により行った。

#### 10) 試薬

[<sup>45</sup>Ca] Cl<sub>2</sub> (0.3511 GBq/mg), [<sup>3</sup>H] nicotine (3.02 TBq/mmol), [<sup>3</sup>H] verapamil (2.81 TBq/mmol) は New England Nuclear (Boston, U.S.A.) より購入した。抗 nnACh 受容体 α3・α4・β2 subunit 抗体および抗ヤギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, U.S.A.) の製品を使用した。抗 VDCC 抗体は Almone Labs Ltd. (Jerusalem, Israel) から入手した。また、抗ウサギ IgG 抗体および picoBlue™ immunoscreening kit は Stratagene Cloning Systems (La Jolla, U.S.A.) より、Nifedipine は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) より、ω-conotoxin GIVA (ω-CTX) および ω-agatoxin VIA (ω-ATX) は Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan) より、Gradient gel (5/20%) は Atto Co. Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。実験に使用した試薬は市販の特級試薬を用いた。

## 実験結果

### 1) Nicotine 長期曝露による神経細胞への30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入

神経細胞への0.1 μM nicotine 曝露による30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の変化について検討した。30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入は、nicotine 曝露時間に依存して増加しており、この増加は nicotine 曝露開始後24時間で plateau に達し、72時間まで継続した (Fig. 1A)。一方、基礎 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入量は nicotine の持続曝露によっても影響を受けなかった。

Figure 1B に示すように nicotine 72時間曝露条件下では nicotine 濃度に依存して30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の増加が認められ、0.1 μM でその流入量は plateau に達した。また、3

μM nicotine を72時間曝露した場合には30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入はさらに増加していたが、この条件下では神経細胞からの著明な LDH 漏出が認められたため (data not shown)、この [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入量の増加は神経細胞膜傷害によるものと判断される。なお、0.1 μM nicotine 72時間曝露条件下では有意な LDH 漏出は認められなかった (data not shown)。以上の結果から以下の実験における nicotine の曝露濃度を0.1 μM とした。

次に、0.1 μM nicotine の72時間曝露により誘発される30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の増加が nnACh 受容体の持続的活性化に起因するか否かについて検討するために、nnACh 受容体の選択的 antagonist である mecamylamine 共存下における30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の変化について検討したところ、30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入の増加は完全に抑制された (Fig. 1C)。このことから、0.1 μM nicotine の72時間曝露による30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入増加は、nnACh 受容体の活性化を介した変化であることが確認された。また30 mM KCl が神経細胞に脱分極を誘発すること、さらに本研究で用いた神経細胞においては30 mM KCl 刺激による VDCC 開口に伴う [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入増加が報告されている<sup>22)</sup>ことから、0.1 μM nicotine の長期曝露による30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入が VDCC の up-regulation に起因している可能性が考えられる。

### 2) 低濃度 nicotine の長期曝露による30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入における VDCC 阻害薬の影響

0.1 μM nicotine の72時間曝露による30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入増加に、いずれの VDCC subtype が関与しているのかについて検討した。なお本研究で用いた神経細胞には L 型、N 型、P 型および Q 型 VDCC が存在していることが確認されている<sup>22)</sup>。本研究で使用した VDCC 阻害薬の濃度は、30 mM KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>] 流入に対して最大阻害効果を示す濃度である。さらに注意すべき点は、30 mM



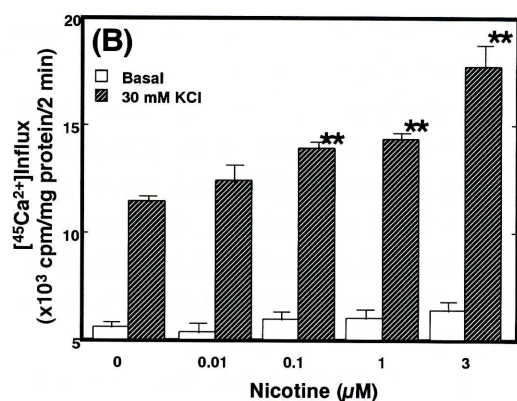
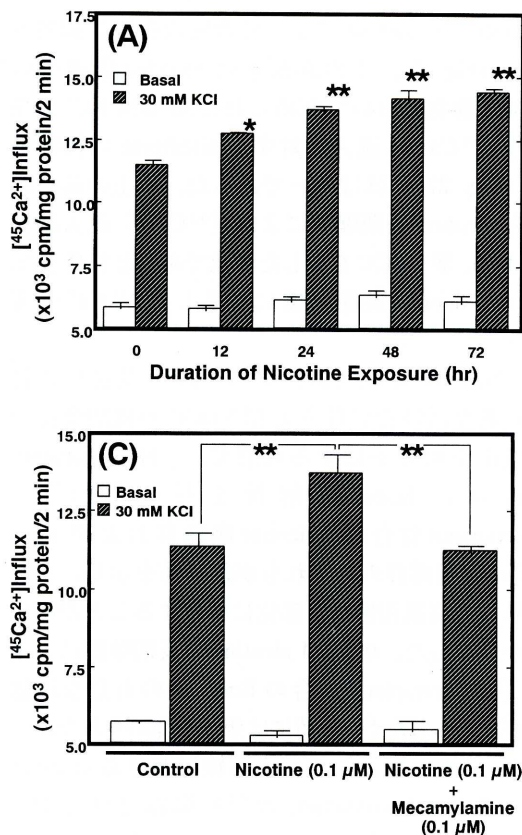


Fig. 1. Effects of 30 mM KCl on  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 separate experiments run in triplicate. (A) Time course of changes in 30 mM KCl-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without treatment of nicotine, Dunnett's test). (B) Changes in 30 mM KCl-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx following exposure to various concentrations of nicotine. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without treatment of nicotine, Dunnett's test). (C) Effect of mecamylamine on 30 mM KCl-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx. \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test.

KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に対する  $0.1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX の阻害効果は  $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX による阻害効果より有意に低く<sup>22)</sup>、一方  $\omega$ -ATX は  $200 \text{ nM}$  以下の濃度では P 型 VDCC のみを選択的に阻害し、この濃度より高い場合には P 型および Q 型 VDCC をともに阻害することが報告されている<sup>30)~33)</sup>。このことから、 $1 \mu\text{M}$   $\omega$ -ATX は本研究で用いた神経細胞において P 型および Q 型 VDCC をともに阻害していることは明白である。

30 mM KCl 刺激による  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は L 型、N 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬である nifedipine ( $1 \mu\text{M}$ )、 $\omega$ -CTX ( $1 \mu\text{M}$ ) および  $\omega$ -ATX ( $1 \mu\text{M}$ ) で有意に抑制され、抑制率はそれぞれ約 40%、25%、35%であった

(Fig. 2)。VDCC 阻害薬存在下では 72 時間の  $0.1 \mu\text{M}$  nicotine の曝露により生じる 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の変化に対し、 $\omega$ -CTX 曝露群 ( $1717 \pm 158 \text{ dpm/mg protein/2 min}$ ,  $n = 4$ )

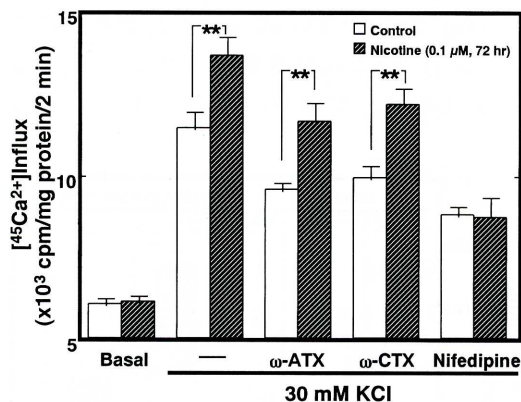


Fig. 2. Effects of VDCC inhibitors on 30 mM KCl-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 separate experiments run in triplicate. \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test. Drug concentrations:  $\omega$ -agatoxin VIA ( $\omega$ -ATX),  $1 \mu\text{M}$ ;  $\omega$ -conotoxin GIVA ( $\omega$ -CTX),  $1 \mu\text{M}$ ; nifedipine,  $1 \mu\text{M}$ .

では  $\omega$ -CTX 非曝露群 ( $1683 \pm 199 \text{ dpm/mg protein/2 min}$ ,  $n = 4$ ) と有意差がなく、同様に  $\omega$ -ATX 曝露群 ( $1919 \pm 163 \text{ dpm/mg}$

protein/2 min,  $n = 4$ ) も  $\omega$ -ATX 非曝露群 ( $1895 \pm 178$  dpm/mg protein/2 min,  $n = 4$ ) と有意差がなかった. 一方, nifedipine 曝露群では  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加が有意に抑制されており (Fig. 2), nicotine 曝露による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は L 型 VDCC の up-regulation を介した変化であることが示唆された.

### 3) 低濃度 nicotine の長期曝露による Bay k 8644 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入変化

上述の実験成績から低濃度 (0.1  $\mu\text{M}$ ) nicotine の長期曝露によって L 型 VDCC の機能亢進が誘発される可能性が考えられることから, L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644<sup>34)</sup> を用いて nicotine 長期曝露による Bay k 8644 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の変化を検討した. Nicotine 非曝露神経細胞では Bay k 8644 濃度依存性に  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加が認められ, 1  $\mu\text{M}$  で最大効果が得られた (Fig. 3). またこの  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入量の約 40% であり, nifedipine による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入抑制量と一致していた (Fig. 2). 0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の 72 時間曝露のちには Bay k 8644 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は有意に増加しており, この  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入

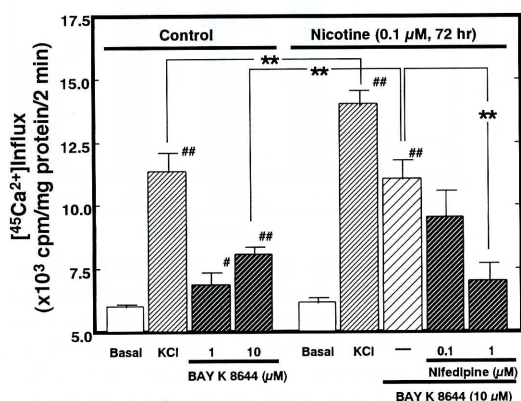


Fig. 3. Effect of nifedipine on Bay k 8644-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 separate experiments run in triplicate. # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$ , compared with each basal value (Bonferroni's test). \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test.

増加は nifedipine によって濃度依存性に抑制され (Fig. 3), この抑制量は nicotine 曝露後の神経細胞において認められた 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に対する nifedipine の抑制量 (Fig. 2) とほぼ同一であった. 以上の結果から nicotine 長期曝露による  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は, L 型 VDCC を介した変化であると判断した.

### 4) Nicotine 長期曝露による L 型 VDCC の変化

Nicotine 長期曝露による mACh 受容体の持続的な活性化に伴う L 型 VDCC の機能変化の機序を明らかにする目的で,  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合の Scatchard 解析を行った.  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合は, nicotine 曝露群および nicotine 非曝露群のいずれもが飽和性を示し, また単一の高親和性結合部位に結合することが明らかとなった. 0.1  $\mu\text{M}$  nicotine の長期曝露により  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合の Bmax 値の有意な増加が認められたが Kd 値には変化が認められなかった (Table 1). なお, 本実験における nicotine および mecamlamine の同時曝露では  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合量の変化は認められなかった (Table 1).

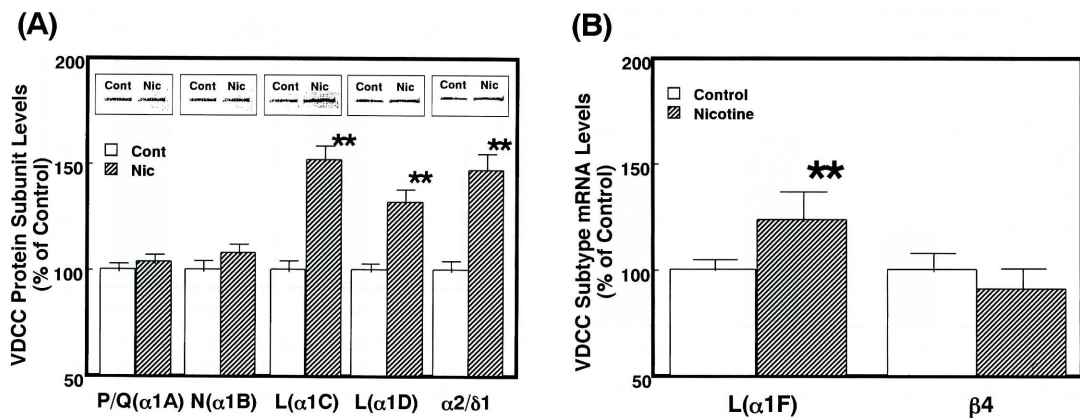
Nicotine 長期曝露による L 型 VDCC up-re-

Table 1. Changes in Bmax and Kd Values of  $[^3\text{H}]$  Nicotine and  $[^3\text{H}]$  Verapamil Bindings to Particulate Fractions from Cerebral Cortical Neurons in Primary Culture following Exposure to Nicotine.

	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)
<i>[^3H]nicotine binding</i>		
control	9.3 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.7
nicotine (72 hr)	13.7 $\pm$ 0.7 **	6.1 $\pm$ 0.8
<i>[^3H]verapamil binding</i>		
control	95.1 $\pm$ 6.0	21.0 $\pm$ 1.2
nicotine (72 hours)	133.4 $\pm$ 1.2 **	21.3 $\pm$ 1.3
nicotine (72 hours) + mechamylamine	93.9 $\pm$ 4.1	21.1 $\pm$ 1.7

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 separate experiment run in triplicate. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without nicotine treatment, Bonferroni's test).





**Fig. 4.** Effect of nicotine exposure on expression of VDCC subunits in cerebral cortical neurons. (A) Expression of proteins of VDCC subunits after nicotine exposure for 3 days. Representative immunoblotting analysis was indicated in each Figure. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Cont, control (non-treated neurons); Nic, nicotine-treated neurons. L, N, and P/Q represent L-, N-, and P/Q-type VDCCs, respectively. (B) Expression of mRNA for subunits ( $\alpha 1F$  and  $\beta 4$  of L-type VDCCs) after nicotine exposure for 3 days. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained 3 separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Control non-treated neurons; Nicotine, nicotine-treated neurons. L represents L-type VDCCs.

regulationを確認するために、L型VDCCを構成するsubunitについてのWestern blot法による検討を行った。Nicotineを曝露した神経細胞膜におけるL型VDCC  $\alpha 1C$  および  $\alpha 1D$  subunitの免疫反応性の強さはnicotine非曝露神経細胞の場合に比して有意に強かったが、N型およびP/Q型VDCC subunitである  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1A$  subunitに対する免疫反応性には変化が認められなかった (Fig. 4A)。同様にL型VDCC  $\alpha 2/\delta 1$  subunitの発現増加がnicotineを72時間曝露した場合にも観察された (Fig. 4A)。さらにNorthern blot法による検討の結果、L型VDCC  $\alpha 1F$  subunit mRNA発現の有意な増加が認められたが、 $\beta 4$  mRNAの発現には変化がみられなかった (Fig. 4B)。以上の結果から、低濃度nicotine長期曝露によるL型VDCCのup-regulationが明らかとなった。

#### 5) Nicotine長期曝露によるnnACh受容体の薬理的機能変化

従来より、nicotineによるnnACh受容体の持続的な活性化は脱感作を伴うnnACh受容体数の増加が報告されているが<sup>(19), (35)~(38)</sup>、0.1  $\mu M$  nicotineの72時間曝露後における [ $^3H$ ] nico-

tine結合実験によるScatchard解析ではBmax値の増加のみが認められ、Kd値の変化はなかった (Table 1)。

Nicotine長期曝露によるnnACh受容体の性状の変化を検討するために、Western blot法によるnnACh受容体  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunitの発現変化を調べた。Figure 5に示すように  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunitの発現増加が観察されたが、 $\alpha 3$  subunitの発現には変化が認められなかった。これら受容体結合実験およびWestern blot法で得られた実験成績から、nicotine長期曝露により  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunitにより構成されるnnACh受容体のup-regulationが誘発されていると考えられる。

前述したようにnicotine長期曝露はnnACh受容体数を増加させるにもかかわらず、nnACh受容体機能の低下が生じることが報告されている<sup>(19), (35)~(38)</sup>。従って、本研究では72時間のnicotine曝露後におけるnicotine誘発性 [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入についても検討を加えた。予備実験において、1  $\mu M$  nicotineは [ $^{45}Ca^{2+}$ ] 流入をnicotine添加後3分まで直線的に増加させ、またnicotine添加後2分間ではnicotineの濃度

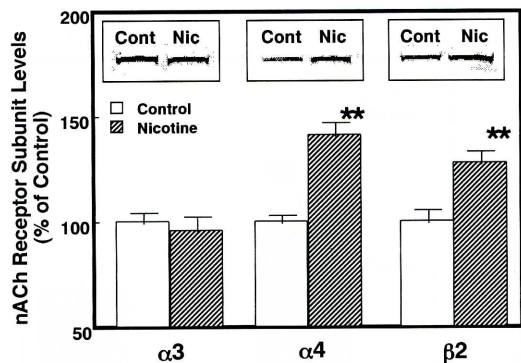


Fig. 5. Effect of nicotine exposure on expression of nnAChR subunits in cerebral cortical neurons. Representative immunoblotting analysis was indicated in each figure. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 3 separate experiments. \*\* $p < 0.01$ , compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Control, non-treated neurons; Nicotine, nicotine-treated neurons.

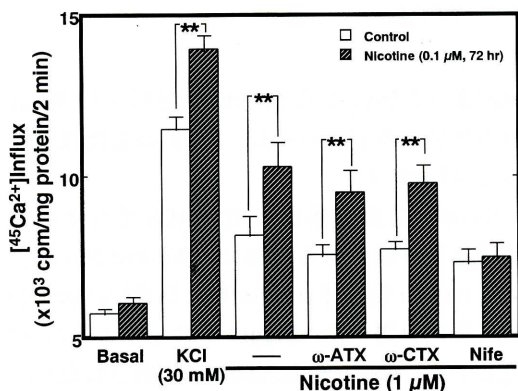


Fig. 6. Effects of VDCC inhibitors on 1  $\mu$ M nicotine-stimulated  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 separate experiments run in triplicate. \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test. Drug concentrations:  $\omega$ -agatoxin VIA ( $\omega$ -ATX), 1  $\mu$ M;  $\omega$ -conotoxin GIVA ( $\omega$ -CTX), 1  $\mu$ M; Nife (nifedipine), 1  $\mu$ M.

に依存した  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加がみられ、1~3  $\mu$ M で最大流入量がみられた。この  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加は 0.1  $\mu$ M mecamylamine の共存下で完全に抑制された。以上の検討から nicotine 刺激による  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の測定は、1  $\mu$ M nicotine で 2 分間刺激することにより行った。0.1  $\mu$ M nicotine を 72 時間曝露した場合、1  $\mu$ M nicotine により誘発される  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は、

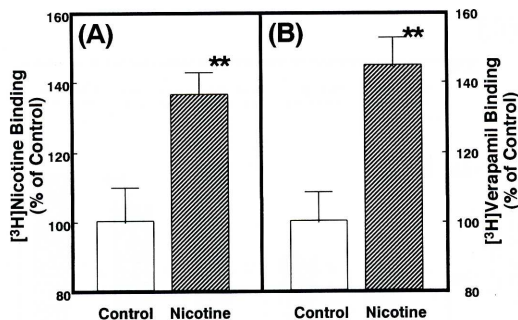


Fig. 7. Changes in bindings of  $[^3\text{H}]$  nicotine and  $[^3\text{H}]$  verapamil to the particulate fractions prepared from the cerebral cortices of the nicotine-dependent mice. (A)  $[^3\text{H}]$  nicotine binding. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4-6 mice and expressed as percent of control. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (Bonferroni's test). Control, 4.8  $\pm$  0.5 fmol/mg protein. (B)  $[^3\text{H}]$  Verapamil binding. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 5 mice and expressed as percent of control. \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (Bonferroni's test). Control, 61.9  $\pm$  3.5 fmol/mg protein.

30 mM KCl により誘発される  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の場合 (Fig. 2) と同様に増加した (Fig. 6). さらに各種の VDCC 阻害薬による nicotine 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の抑制パターンは 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の抑制パターンと同様であることが確認された (Fig. 6). これらの結果から、nicotine 長期曝露後においても nnACh 受容体の  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入促進作用は維持されていると考えられる。

#### 6) Nicotine 依存マウス大脳皮質に対する $[^3\text{H}]$ nicotine および $[^3\text{H}]$ verapamil 結合の変化

Nicotine 依存マウスにおいても、nicotine の長期曝露を行った神経細胞の場合と同様に、nnACh 受容体および L 型 VDCC の up-regulation が生じているか否かを検討した。Nicotine 依存マウス大脳皮質から調整した顆粒画分を用い、 $[^3\text{H}]$  nicotine および  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合実験を行ったところ、 $[^3\text{H}]$  nicotine および  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合は有意に増加した (Fig. 7). この結果から、nicotine 依存マウス大脳皮質においても nnACh 受容体および L 型 VDCC の up-regulation が生じていることが示唆される。



## 考 察

すでに著者らは nicotine 長期曝露が神経細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入増加と付随した内在性不安誘発物質である DBI 発現の増加を誘発することを報告していることから<sup>10)</sup>、本研究では nicotine 長期曝露後にみられる神経細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入変化の機序を明らかにするため、VDCC および nnACh 受容体を有する初代培養マウス大脳皮質神経細胞<sup>22), 39)</sup>を用いて検討を加えた。

本研究に示すように、高  $\text{K}^+$  (30 mM KCl) 刺激により誘発される神経細胞への [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入は nicotine 曝露時間および nicotine 濃度に依存して増加し、この 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加は nicotine による nnACh 受容体の持続的刺激に起因することは nnACh 受容体 antagonist である mecamylamine により抑制されることから、明らかと考えられる。

中枢神経系に存在する神経細胞には少なくとも L, N, P および Q 型の 4 種類の VDCC subtype が存在し<sup>40), 41)</sup>、また、高  $\text{K}^+$  刺激は神経細胞膜の脱分極を起すことが知られている。従って、nicotine 長期曝露による 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加には、これら VDCC subtype のすべて、もしくはいずれかの VDCC subtype の機能亢進が関与している可能性が考えられ、諸種の VDCC subtype 阻害薬存在下において測定した [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の変化から、nicotine 長期曝露による [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入増加は nifedipine によってのみ抑制されることが本研究の結果、明らかにされた。さらに、L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 により誘発される [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入は nicotine 長期曝露により有意に増強されることも明らかとなった。これらの実験成績から、神経細胞への nicotine 長期曝露により誘発される [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加は L 型 VDCC の機能亢進に起因していると考えられる。

持続的な nnACh 受容体活性化により L 型 VDCC up-regulation が誘発される可能性は、L

型 VDCC の subunit 蛋白質の発現増加が [ $^3\text{H}$ ] verapamil 結合実験および Western blot 法により確認された。なお、本研究で用いた神経細胞には高親和性の [ $^3\text{H}$ ] verapamil のみが存在し、この結果は、脳内には高親和性 dihydropyridine 結合部位のみが存在するという従来の研究報告<sup>42)~44)</sup>と一致する。本研究では、nicotine の長期曝露により生じる [ $^3\text{H}$ ] verapamil 結合の増加が Bmax 値のみの増加によるものであり Kd 値には変化が認められないことが判明した。また、Western および Northern blot 法による解析から、L 型 VDCC を構成する subunit のうち、 $\alpha 1\text{C}$ ,  $\alpha 1\text{D}$ ,  $\alpha 1\text{F}$ ,  $\alpha 2/\delta 1$  subunit の発現増加が認められたが、L 型 VDCC  $\beta 4$  subunit, P/Q 型 VDCC  $\alpha 1\text{A}$  subunit および N 型 VDCC  $\alpha 1\text{B}$  subunit には変化が認められず、これらの結果から、nicotine 長期曝露によって生じる [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入増加は、L 型 VDCC  $\alpha 1$  および  $\alpha 2/\delta 1$  subunit 数の増加によって生じていると考えられる。

Nicotine は依存性薬物の一つで、主に長期間の喫煙によって nicotine 依存が形成される。Nicotine 依存症者では nicotine の退薬により不安、易刺激性、睡眠障害、振戦、痙攣などの退薬症候群が認められるが、ethanol, morphine, benzodiazepine などの他の依存性薬物も身体依存をおこし、しかもいずれの場合もそれぞれの薬物の退薬により nicotine の場合と同様の退薬症候群が出現する。薬物依存形成および退薬症候群の発現機序については十分な解明がなされていないが、最近の研究から中枢神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis の障害、特に神経細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入の異常が薬物依存に部分的に関与していることが報告されている<sup>45)</sup>。Ethanol, morphine および benzodiazepine などによる薬物依存については、L 型 VDCC up-regulation が  $\text{Ca}^{2+}$  流入増加の原因である可能性が指摘されているが<sup>45)~48)</sup>、nicotine に関する報告は少ない。これらの薬物依存における N 型および P/Q 型 VDCC の関与については一致した見解がなく<sup>45)</sup>、また nicotine 依存に関しては神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  動態に関する研究報告はほとんど

どなされていないが、本研究結果から、nicotine長期曝露後にみられるL型VDCCのup-regulationが他の依存性薬物の場合と同様に、nicotine依存形成あるいはその退薬症候の発現に深く関与していると考えられる。

Nicotine依存動物における脳内のL型VDCCのup-regulationに関する報告はほとんどない。本研究で明らかになったように、大脳皮質神経細胞へのnicotine長期曝露がL型VDCC up-regulationを誘発するが、これと同様の変化がnicotine依存マウス脳においても生じているか否かを大脳皮質を用いて検討した。本研究ではL型VDCCおよびnnACh受容体機能の変化を検討するために、それぞれ $[^3\text{H}]$  verapamilと $[^3\text{H}]$  nicotineを用いた結合実験を行い、これらの結合実験の結果、 $[^3\text{H}]$  verapamilおよび $[^3\text{H}]$  nicotine結合部位増加がみられたことから、L型VDCCおよびnnACh受容体の機能亢進がnicotine依存動物の大脳皮質で生じていることが判明した。このnicotine依存動物大脳皮質における $[^3\text{H}]$  nicotine部位数の増加はnicotine依存動物を用いて $[^3\text{H}]$  nicotine結合を検討した他の報告<sup>37),38)</sup>とよく一致する。これらのことから大脳皮質神経細胞へのnicotine長期曝露によるL型VDCCのup-regulationは、nicotine依存動物脳においても生じる現象であることは間違いないものと考えられる。

NicotineはnnACh受容体の活性化を介して神経伝達物質であるACh, dopamine, serotonin, GABAおよびglutamateなどの神経伝達物質放出を促進する因子である。VDCC阻害薬はこのnicotineの神経伝達物質放出促進作用を阻害することから、nicotineの神経伝達物質放出促進機構にVDCCが関与している可能性が提案されている<sup>8)</sup>。近年、N型VDCCと同様にL型VDCCも神経伝達物質放出に関与することが明らかとなり<sup>49)~53)</sup>、また、L型VDCCを介した細胞外から細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入がリン酸化反応を介して蛋白機能と転写調節を修飾することも報告されている<sup>54)~56)</sup>。従って、nicotine

長期曝露によるnnACh受容体のup-regulationに付随したL型VDCCの機能亢進が、神経細胞における諸種の生化学的過程を修飾する可能性が推測される。事実、nicotineの長期曝露はマウス大脳皮質神経細胞において $[^3\text{H}]$  nicotine結合および $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加をもたらすのみならず、DBI mRNA発現の亢進をも誘発することが報告されており、しかもこの増加したDBI mRNA発現はL型VDCC阻害薬により抑制される<sup>10)</sup>。

本研究において、nicotineの72時間曝露における $[^3\text{H}]$  nicotine結合実験では $[^3\text{H}]$  nicotine結合部位の増加が認められたが、nnACh受容体の $[^3\text{H}]$  nicotineに対する親和性には変化が認められなかった。Nicotine長期投与動物<sup>37),38),57)</sup>と神経細胞へのnicotine曝露<sup>13),58)</sup>による $[^3\text{H}]$  nicotine結合実験での検討でも同様のnnACh受容体up-regulationが報告されており、本研究結果と一致する。

nnACh受容体には種々のsubtypeが存在し、これによりnnACh受容体の機能的多様性が出現することはよく知られている。中枢神経系において、特に $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 4$  subunitが大脳皮質各層で不均等に分布しているが<sup>59)</sup>、神経細胞あるいは非神経細胞にnnACh受容体を発現させた場合、nnACh受容体のup-regulationは $\alpha 4/\beta 2$ ,  $\alpha 2/\beta 4$ および $\alpha 7$  subunit数増加によることが報告されている<sup>13),17),60)</sup>。さらに、 $\alpha 4/\beta 2$  subunitにより構成されるnnACh受容体は10~100 nMの低濃度nicotineによっても活性化され<sup>13)</sup>、nicotineの長期曝露によってup-regulationが誘発されることが報告されている<sup>13)~15),18)</sup>。これらの既報を勘案して、本研究で用いたnnACh受容体のup-regulationを誘発する条件下で $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ および $\beta 2$  subunitの発現変化を検討したところ、 $\alpha 4/\beta 2$ により構成されるnnACh受容体のup-regulationが生じることが観察された。同様のup-regulationがヒト胎児腎細胞<sup>14)</sup>および、本研究で用いたnicotine濃度の10倍高い濃度を必要としているが、アフリカツメガエル<sup>15)</sup>を用いたnnACh受容体発現



系においても生じることが報告されている。

従来から、up-regulation を生じた nnACh 受容体の機能変化の1つとして、電気生理学的検討あるいは  $[^{86}\text{Rb}^+]$  流入の測定などの検討から、受容体の脱感作が生じることが知られている<sup>14), 15), 61)</sup>。しかしながら、本研究では nnACh 受容体が up-regulation をおこしているにもかかわらず、nicotine 刺激により up-regulation をおこした L 型 VDCC を介して神経細胞内への  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入が増加することが確認された。電気生理学的検討では nnACh 受容体 up-regulation の結果として受容体の脱感作が認められているが、報告されたデータを詳細に検討すると、この脱感作は単に nicotine への反応の低下であり、完全に nicotine に対する反応が消失しているわけではない<sup>15)</sup>。従って、低濃度の nicotine の長期曝露によって nnACh 受容体に up-regulation が誘発されている場合でも nicotine 刺激により nnACh 受容体が神経細胞膜を脱分極させ L 型 VDCC を開口させる機能は適切に維持されているものと考えられる。

## 結 語

初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度 nicotine (0.1  $\mu\text{M}$ ) 曝露による L 型 VDCC および nnACh 受容体の機能変化について神経化学的検討を加え、以下の結果を得た。

1) 神経細胞への nicotine 曝露によって、nicotine 曝露時間および濃度依存性に 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入が増加した。

2) 低濃度 nicotine の長期曝露による 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は、L 型 VDCC 阻害薬である nifedipine により有意に抑制されたが、N 型および P/Q 型 VDCC 阻害薬は何らの影響をも与えなかった。さらに L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 の刺激による Bay k 8644 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入も低濃度の nicotine の長期曝露により増加するのが観察された。

3) 低濃度 nicotine の長期曝露は  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合を増加させ、この結合増加は

Scatchad 解析により、Bmax 値 ( $[^3\text{H}]$  verapamil 結合部位数) の増加に起因するものであることが明らかとなったが、Kd 値 ( $[^3\text{H}]$  verapamil に対する親和性) には変化がなかった。

4) Western blot および Northern blot 法による検討から、L 型 VDCC subunit のうち  $\alpha 1\text{C}$ 、 $\alpha 1\text{D}$ 、 $\alpha 1\text{F}$ 、 $\alpha 2/\delta 1$  subunit の発現増加が認められたが、L 型 VDCC  $\beta 4$  subunit、P/Q 型 VDCC  $\alpha 1\text{A}$  subunit および N 型 VDCC  $\alpha 1\text{B}$  subunit には変化が認められなかった。これらの結果から、nicotine 長期曝露によって生じる  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は、L 型 VDCC  $\alpha 1\text{C}$ 、 $\alpha 1\text{D}$ 、 $\alpha 1\text{F}$ 、 $\alpha 2/\delta 1$  subunit の発現増加が関与している可能性が示唆される。

5) 低濃度 nicotine 長期曝露における  $[^3\text{H}]$  nicotine 結合の増加は、 $[^3\text{H}]$  nicotine 結合実験による Scatchad 解析により、Bmax 値のみの増加によるものであり、一方、Kd 値には変化が認められなかった。さらに Western blot 法による検討からこの  $[^3\text{H}]$  nicotine 結合数の増加は nnACh 受容体 subunit である  $\alpha 4$  および  $\beta 2$  subunit の増加によることが示唆された。

6) Nicotine 依存マウス大脳皮質を用いた  $[^3\text{H}]$  nicotine および  $[^3\text{H}]$  verapamil 結合実験では、いずれの放射性 ligand に対する結合も有意に増加しており、初代培養マウス神経細胞を用いた場合と同様の結果が得られた。

7) 以上の結果から、神経細胞への低濃度 nicotine の長期曝露により、nnACh 受容体の up-regulation とともに L 型 VDCC の up-regulation が生じることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました川崎医科大学薬理学教室 大熊誠太郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を行うに際し、御助言および御支援を頂きました川崎医科大学脳神経外科学教室 石井録二教授に深謝申し上げます。研究を遂行するに当たり、直接御助言、御指導を頂いた川崎医科大学薬理学教室 桂 昌司先生に謝意を表するとともに、

mRNA 測定に際しそのプローベの作製に御協力下さいました京都府立医科大学脳血管老化研究センター 辻村 敦先生に深謝いたします。本研究の遂行に御協力頂いた薬理学教室員各位にも御礼申し上げます。また

RI センターおよび生化学センターの皆様にも厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は厚生労働省科学研究補助金の援助により行われた。

## 文 献

- 1) Role LW : Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Opin Neurobiol* 2 : 254 - 262, 1992
- 2) Sargent PB : The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann Rev Neurosci* 16 : 403 - 443, 1993
- 3) Brisson A, Unwin PN : Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature* 315 : 474 - 477, 1985
- 4) Connolly JG : Structure-function relationships in nicotinic acetylcholine receptor. *Complement. Biochem Physiol* 93 : 221 - 231, 1989
- 5) Vernino S, Amador M, Luetje CW, Pareick J, Dani JA : Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8 : 127 - 134, 1992
- 6) Clarke PB : Nicotine and smoking : a perspective from animal studies. *Psychopharmacol Berl* 92 : 135 - 143, 1987
- 7) Ochoa EL : Nicotine-related brain disorders : the neurobiological basis of nicotine dependence. *Cell Mol Neurobiol* 14 : 195 - 225, 1994
- 8) Vizi ES, Lendvai B : Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Rev* 30 : 219 - 235, 1999
- 9) Ferrarese C, Appollonio I, Bianchi G, Frigo M, Marzorati C, Pecora N, Perego M, Pierpaoli C, Frattola L : Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor : a possible link between stress, anxiety and the immune system. *Psychoneuroendocrinol* 18 : 3 - 22, 1993
- 10) Katsura M, Higo A, Tarumi C, Tsujimura A, Takesue M, Mohri Y, Shuto K, Ohkuma S : Mechanism for increase in expression of cerebral diazepam binding inhibitor mRNA by nicotine : involvement of L-type voltage-dependent calcium channels. *Mol Brain Res* 80 : 132 - 141, 2000
- 11) Balfour DJ : Neural mechanisms underlying nicotine dependence. *Addiction* 89 : 1419 - 1423, 1994
- 12) Dani JA, Heinemann S : Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16 : 905 - 908, 1996
- 13) Bencherif M, Fowler K, Lukas RJ, Lippiello PM : Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 275 : 987 - 994, 1995
- 14) Gopalakrishnan M, Molinara EJ, Sullivan JP : Regulation of human alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol Pharmacol* 52 : 524 - 534, 1997
- 15) Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RAJ : Upregulation of surface alpha 4 beta 2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J Neurosci* 19 : 4804 - 4814, 1999
- 16) Boyd ND : Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC12 cells. *J Physiol (London)* 389 : 45 - 67, 1987
- 17) Peng X, Anand R, Whiting P, Lindstrom J : Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol* 46 : 523 - 530, 1994
- 18) Hsu Y-N, Amin J, Weiss DS, Wecker L : Sustained nicotine exposure differentially affects alpha 3 beta 2 and alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 66 : 667 - 675, 1996
- 19) Marks MJ, Burch JB, Collins AC : Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 226 : 817 - 825, 1983
- 20) Ohkuma S, Tomono S, Tanaka Y, Kuriyama K, Mukainaka T : Development of taurine biosynthesizing system in cerebral cortical neurons in primary culture. *Int J Dev Neurosci* 4 : 383 - 395, 1986



- 21) Katsura M, Ohkuma S, Xu J, Hibino Y, Tsujimura A, Kuriyama K : Continuous treatment with nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol Brain Res* 55 : 345–349, 1998
- 22) Ohkuma S, Katsura M, Hibino Y, Xu J, Shirotani, Kuriyama K : Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 54 : 133–140, 1998
- 23) Zhang X, Nordberg A : The competition of (-) - [<sup>3</sup>H] nicotine binding by the enantiomers of nicotine, normicotine and anatoxin-a in membranes and solubilized preparations of different brain regions of rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348 : 28–34, 1993
- 24) Xu Y-F, Hewett SJ, Atchison WD : Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome induces dihydropyridine sensitivity of ICa in mouse motor nerve terminals. *J Neurophysiol* 80 : 1056–1069, 1998
- 25) Laemli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680–685, 1970
- 26) Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL : Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene Cchb4 is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell* 88 : 385–392, 1997
- 27) Naylor MJ, Rancourt DE, Bech-Hansen NT : Isolation and characterization of a calcium channel gene, Cacna1f, the murine orthologue of the gene for incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Genomics* 66 : 324–327, 2000
- 28) Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning F, Kedes L : Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs : DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 12 : 1687–1691, 1984
- 29) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265–275, 1951
- 30) Small DL, Monette R, Mealing G, Buchan AM, Morley P : Neuroprotective effects of omega-Aga-IVA against in vitro ischaemia in the rat hippocampal slice. *Neuroreport* 6 : 1617–1620, 1995
- 31) Lambert NA, Wilson WA : High-threshold Ca<sup>2+</sup> currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA (B) receptors. *J Neurophysiol* 492 : 115–127, 1996
- 32) Currie KP, Fox AP : Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J Neurosci* 15 : 4570–4579, 1997
- 33) Toner CC, Stamford JA : Involvement of N- and P/Q- but not L- or T-type voltage-gated calcium channels in ischaemia-induced striatal dopamine release in vitro. *Brain Res* 748 : 85–92, 1997
- 34) Ferrante J, Luchowski E, Rutledge A, Triggle DJ : Binding of A 1, 4-dihydropyridine calcium channel activator, (-) S Bay K 8644, to cardiac preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 158 : 149–154, 1989
- 35) Schwartz RD, Kellar KJ : In vivo regulation of [<sup>3</sup>H] acetylcholine recognition sites in brain by nicotinic cholinergic drugs. *J Neurochem* 45 : 427–433, 1985
- 36) Wonnacott S : The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci* 11 : 216–219, 1990
- 37) Rowell PP, Li M : Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J Neurochem* 68 : 1982–1989, 1997
- 38) Ke L, Eisenhour CM, Bencherif M, Lukas RJ : Effects of chronic nicotine treatment on expression of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. I. Dose- and time-dependent effects of nicotine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 286 : 825–840, 1998
- 39) Katsura M, Ohkuma S, Chen D-T, Tsujimura A, Kuriyama K : Nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA in primary cultured neurons. *Neurosci Lett* 168 : 1–4, 1994
- 40) Tareilus E, Breer H : Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neurochem Int* 26 : 539–558, 1995
- 41) Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwarz A : Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 72 : 83–109, 1996

- 42) Marangos PJ, Patel J, Miller C, Martino AM : Specific calcium antagonist binding sites in brain. *Life Sci* 31 : 1575 – 1585, 1982
- 43) Reynolds IJ, Gould RJ, Snyder SH : [<sup>3</sup>H] Verapamil binding sites in brain and skeletal muscle : regulation by calcium. *Eur J Pharmacol* 95 : 319 – 321, 1983
- 44) Kadous A, Matsumura F, Enan E : High affinity binding of <sup>3</sup>H-verapamil to rat brain synaptic membrane is antagonized by pyrethroid insecticides. *J Environ Sci Health B* 29 : 855 – 871, 1994
- 45) Little HJ : The role of neuronal calcium channels in dependence on ethanol and other sedatives/hypnotics. *Pharmac Ther* 50 : 347 – 365, 1991
- 46) Brennan CH, Littleton JM : Chronic exposure to anxiolytic drugs, working by different mechanisms causes up-regulation of dihydropyridine binding sites on cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuropharmacol* 30 : 199 – 205, 1991
- 47) Diaz A, Ruiz F, Flórez J, Hurlé MA, Pazos A : Mu-opioid receptor regulation during opioid tolerance and supersensitivity in rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 274 : 1545 – 1551, 1995
- 48) Gerstein EH Jr, McMahon T, Dadgar J, Messing RO : Protein kinase Cdelta mediates ethanol-induced up-regulation of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 273 : 16409 – 16414, 1998
- 49) Bonci A, Grillner P, Mercuri NB, Bernardi G : L-Type calcium channels mediate a slow excitatory synaptic transmission in rat midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 18 : 6693 – 6703, 1998
- 50) Protti DA, Llano I : Calcium currents and calcium signaling in rod bipolar cells of rat retinal slices. *J Neurosci* 18 : 3715 – 3724, 1998
- 51) Takahashi T, Momiyama A : Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366 : 156 – 158, 1993
- 52) Wheeler DB, Randall A, Tsien RW : Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264 : 107 – 111, 1994
- 53) Fossier P, Tauc L, Baux G : Calcium transients and neurotransmitter release at an identified synapse. *Trends Neurosci* 22 : 161 – 166, 1999
- 54) Thompson MA, Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME : L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J Biol Chem* 270 : 4224 – 4235, 1995
- 55) Monjaraz E, Navarrete A, Lopez-Santiago LF, Vega AV, Arias-Montano JA, Cota G : L-type calcium channel activity regulates sodium channel levels in rat pituitary GH3 cells. *J Physiol* 523 : 45 – 55, 2000
- 56) Robidoux J, Simoneau L, Masse A, Lafond J : Activation of L-type calcium channels induces corticotropin-releasing factor secretion from human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 3356 – 3364, 2000
- 57) Miao H, Liu C, Bishop K, Gong Z-H, Nordberg A, Zhang X : Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *J Neurochem* 70 : 752 – 762, 1998
- 58) Warpmann U, Friberg L, Gillespie A, Hellström-Lindahl E, Zhang X, Nordberg A : Regulation of nicotinic receptor subtypes following chronic nicotinic agonist exposure in M10 and SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 70 : 2028 – 2037, 1998
- 59) Jones S, Sudweeks S, Yakel JL : Nicotinic receptors in the brain : correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22 : 555 – 561, 1999
- 60) Lukas RJ, Ke L, Bencherif M, Eisenhour CM : Regulation by nicotine of its own receptors. *Drug Develop Res* 38 : 136 – 148, 1996
- 61) Lukas RJ : Effects of chronic nicotinic ligand exposure on functional activity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the PC12 rat pheochromocytoma or the TE671/RD human clonal line. *J Neurochem* 56 : 1134 – 1145, 1991