S-35

海馬神経活動に対するシグマ受容体リガンド OPC-24439 の作用

石原 熊寿^{1,2)}, Muhammad Akbar¹⁾, 笹 征史¹⁾

広島大学医学部 ¹⁾医学科薬理学教室, ²⁾総合薬学科薬物治療学講座

要約: シグマ受容体は, 中枢神経系においては精神機能調節, 記憶・学習などに関与する可能性がある受容体である. しかし, その生理機能の詳細は未だ不明な点が多い. シグマ受容体の神経活動調節における役割を明らかにするため, 海馬スライス標本を用いてシグマ受容体リガンドの OPC-24439 の作用を電気生理学的に検討した. 生後 4-7 週齢の雄性 Wistar 系ラットより厚さ約 450 μm の海馬スライスを作成し, 細胞外記録法により CA1 野の集合活動電位をまた細胞内記録法により CA1 野ニューロンの単一神経活動を記録した. シェーファー側枝/交連線維の刺激によって誘発される CA1 野の集合活動電位は OPC-24439 (1-100 μM) により可逆的にかつ用量依存的に抑制された. この抑制作用はシグマ受容体拮抗薬のハロペリドール 1 μM によって拮抗された. 細胞内記録において OPC-24439 は記録細胞の静止膜電位に影響を及ぼさなかった. また外的に投与したグルタミン酸による脱分極とそれに伴う活動電位発射に対しても OPC-24439 は影響しなかった. これらのことから, シグマ受容体の活性化は海馬の神経活動を抑制することが示された. この抑制作用は CA1 野錐体細胞における静止膜電位に影響していないイオンチャネルに対する作用, シナプス前あるいは介在ニューロンに対する作用によると考えられる.

キーワード: シグマ受容体, 海馬, 電気生理学的記録, OPC-24439

はじめに

シグマ受容体は当初, N-アリルノルメタゾシンの作用するオピオイド受容体のサブタイプの一つとして名づけられたが (1), その後の研究によりオピオイド受容体とは区別されるようになった. このシグマ受容体は最近になって一部がクローニングされたが (2), 薬理的にはシグマ1とシグマ2受容体に分類されており (3), 生理機能におけるその働きの詳細については未だ明らかにされてはいない. しかしながら, これまでの研究からシグマ受容体に関与するとされる生理機能および病態として, 精神分裂病, 記憶・学習, 脳保護作用などがあげられる (4, 5). このように中枢機能にいろいろ関与すると考えられるシグマ受容体は新しい薬物のターゲットとしての可能性が高く, シグマ受容体リガンドの開発が進められている (6). そこでこのシグマ受容体の神経活動調節における働きを明らかにするため, シグマ受容体リガンドの OPC-24439 (*m*-(*p*-chlorobenzoyloxy)-N-cyclopropylmethyl-N-methylbenzylamine hydrochloride, Fig.1) の作用を海馬スライスを用いて, 電気生理学的手法

Fig.1 Chemical structure of OPC-24439.

により検討を加えた。

方 法

動 物

実験には生後4-7週齢の雄性 Wistar 系ラット(日本チャールスリバー)を用いた。ラットは実験に用いるまで広島大学医学部附属動物実験施設にて飼育した。

海馬切片作成

エーテルにて麻酔後、断頭し、すばやく脳を摘出し、シャーベット状にした Ca-free 人工脳脊髄液中にて充分冷却しながら、マイクロスライサー(DTK-1000, 堂阪イーエム)にて厚さ約 450 μm の海馬スライスを作成した。作成したスライスは人工脳脊髄液中で 34 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベーションした後、記録に用いるまで、室温下に保存した。なお、人工脳脊髄液には切片作成・保存時および記録時共に常に 95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気している。Ca-free 人工脳脊髄液の組成は次の通りである: NaCl 113mM, KCl 3mM, NaH_2PO_4 1mM, MgCl_2 5mM, NaHCO_3 25mM, D-Glucose 11mM。また、人工脳脊髄液の組成は次の通りである: NaCl 113mM, KCl 3mM, NaH_2PO_4 1mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 1mM, NaHCO_3 25mM, D-Glucose 11mM。

細胞外記録

双極刺激電極は CA2 野近傍の放線層に刺入し、CA1 野への入力線維であるシェーファー側枝/交連線維を刺激した(Fig. 2B)。記録電極には 3M NaCl を充填したガラス微小電極を用い、CA1 野の錐体細胞層より、細胞外記録にて集合活動電位を記録した。集合活動電位は 5 分毎にシェーファー側枝/交連線維に 11 回の刺激を与え、そのうち後半の 6 回分の反応を加算平均した。刺激は 10V 以下の強度、0.1msec の持続の矩形波を用い、刺激間隔は 0.2Hz で与えた。集合活動電位は微小電極増幅器(MEZ-8201, 日本光電)を介してオシロスコープ(VC-11, 日本光電)上にて観察し、反応加算装置(QC-111J, 日本光電)を用いて加算したのち、サーマルアレイレコーダー(RTA-1100, 日本光電)を用いて記録用紙に描画した。記録された集合活動電位はその振幅を Fig. 2C に示す方法で測定した。記録用バスの温度は細胞外記録実験では約 30 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。記録用バスは人工脳脊髄液を 1.5-3ml/分 の速度で灌流した(Fig. 2A)。

Fig.2 A. Schematic drawing of experimental set-up. B. Arrangement of electrodes on a hippocampal slice. C. Methods of measurement of population spike amplitude.

細胞内記録

細胞内記録には3M KClを充填したガラス微小電極を用いた。CA1野の錐体細胞層に記録電極を刺入し、単一ニューロンより細胞内記録を行った。静止膜電位が -45mV よりも大きい細胞のみを実験に用いた。反応は微小電極増幅器を介してオシロスコープ上で観察し、サーマルアレイレコーダーにて記録用紙に描画した。また、後からの解析などのためにデジタルオーディオテープ(RD-101T, TEAC)あるいはマックラブ(MacLab, ADInstruments)を介してコンピューターに保存した。記録用バスの条件は細胞外記録実験と同様であるが、温度は基本的に室温下にて行った。

薬物

用いた薬物 OPC-24439(大塚製薬(株))、ハロペリドール(大日本製薬(株))、グルタミン酸(関東化学(株))はすべて人工脳脊髄液に溶解し、灌流系を介して記録スライスあるいは細胞に適用した。

統計

データは平均値 $\pm$ SEMで表した。薬物処置前後の変化の有意差は paired Student's t-test を用いた。また、拮抗実験では unpaired Student's t-test を用いた。集合活動電位はそれぞれのスライスにおいて薬物投与前3~4回の反応の平均を100%としそれに対する変化を計算し標準化した。

結 果

集合活動電位に対する作用(細胞外記録)

OPC-24439は1–100 μM の範囲で用量依存的にシェーファー側枝/交連線維刺激誘発のCA1野の集合活動電位を抑制した。1 μM では投与後最初に約25%の抑制が観察されたのみであった。10–100 μM では投与期間(20分間)中抑制が観察されたが、抑制の程度は投与直後のほうが大きかった。投与後最初の記録における反応の大きさは10 μM で 16.9 ± 6.9 ($p < 0.05$, $n=5$), 100 μM で 43.2 ± 11.8 ($p < 0.01$, $n=8$) (% of control)であった。Fig.3にOPC-24439 10 μM による集合活動電位抑制効果の反応の一例を示す。

Fig.3 Effects of OPC-24439 (10 μM) on population spikes in hippocampal CA1 region. Triangle indicates the artifact of stimulation. Calibration: 4mV, 10msec.

OPC-24439による抑制作用はハロペリドールの同時投与により拮抗された。OPC-24439(100 μM)による抑制が最大で約90%であったスライスにおいてハロペリドール(10 μM)を同時処置することによってOPC-24439の抑制効果は約30%に減弱した。しかし、ハロペリドール 10 μM 同時処置では洗浄後も反応は回復しなかった。そこでハロペリドールを1 μM に減量して、OPC-24439との拮抗実験を行ったところ、ハロペリドール1 μM によってもOPC-24439 100 μM の効果はほぼ完全に拮抗された。薬物による集合活動電位の抑制の程度の指標として集合活動電位の変化の時間経過のグラフと100%(投与前の基準値)のラインで囲まれる面積を計算して比較した。OPC-24439 100 μM 単独では 751.1 ± 116.9 ($n=8$)であったがハロペリドール1

μM + OPC-24439 $100 \mu\text{M}$ では $24.3 \pm 213.2 (n=3)$ となり, OPC-24439 の作用はハロペリドールにより有意に拮抗された ($p<0.05$).

単一神経細胞活動に対する作用(細胞内記録)

OPC-24439 $100 \mu\text{M}$ は CA1 野ニューロンの静止膜電位に対して有意な変化を及ぼさなかった. 水槽内に投与したグルタミン酸 1 mM (1 分間) によって CA1 野ニューロンには約 $30-40 \text{ mV}$ の脱分極と脱分極開始時に活動電位の発射亢進が観察された. このグルタミン酸誘発の脱分極と活動電位発射亢進は OPC-24439 $100 \mu\text{M}$ によって影響を受けなかった.

考 察

シグマ受容体リガンドの OPC-24439 は海馬において CA1 野のニューロン活動を抑制する作用を示した. この抑制効果はシグマ受容体拮抗薬のハロペリドールにより拮抗されたことから, OPC-24439 の作用はシグマ受容体を介したものであり, OPC-24439 は作動薬として働いているものと考えられた.

この OPC-24439 による集合活動電位抑制効果の作用メカニズムを明らかにする目的で細胞内記録実験を行ったが, OPC-24439 は CA1 野の記録ニューロンの静止膜電位には影響を示さなかった. また外的にグルタミン酸を投与して, 直接 CA1 野の記録ニューロンのグルタミン酸受容体を活性化し誘発した脱分極反応に対しても OPC-24439 は影響しなかった. これらのことから, OPC-24439 はシェーファー側枝/交連線維からの神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体に対する作用ではなく, またグルタミン酸受容体にリンクしたチャネルに対する作用でもなく, 記録細胞上のシグマ受容体を介して静止膜電位に影響をしていないチャネルに対して作用するか, あるいはシナプス前細胞や介在ニューロン上のシグマ受容体に作用したものと示唆される. シグマ受容体のニューロン活動調節機能に関しては, 実際に修飾されるイオンチャネルなど更に詳細な検討が必要であるが, 今回の成績はシグマ受容体の活性化によって海馬神経活動が抑制的に調節を受けることを明らかにしたものである.

謝 辞

この研究は広島大学医学部附属動物実験施設の設備を使用して行った実験であり, 研究内容は広島大学医学部動物実験委員会によって承認を受けている.

文 献

- 1) Martin WR, Eades CG, Thompson, JA, Huppler, RE and Gilbert PE: The effects of morphine and morphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **197**, 517-532 (1976)
- 2) Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E and Glossmann H: Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8072-8077 (1996)
- 3) Quirion R, Bowen W, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su T-P, Tam SW and Taylor DP: A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 85-86 (1992)
- 4) 鍋島俊隆, 奥山 茂: シグマ受容体の機能: リガンドの中樞薬理作用. *日神精薬理誌* **14**, 51-76 (1994)
- 5) 天野 学, 山田清文, 松野 聖, 鍋島俊隆: シグマ受容体リガンドの中樞薬理作用—抗不安作用, 学習・記憶障害改善作用および脳保護作用を中心に—. *日神精薬理誌* **16**, 73-84 (1996)
- 6) 鍋島俊隆, 村岡 勲: シグマ受容体リガンドの開発と臨床応用. *日薬理誌* **114**, 3-11 (1999)

Abstract — Effects of OPC-24439, a sigma ligand, on neuronal activities in the hippocampus. Kumatoshi ISHIIHARA^{1) 2)}, Muhammad AKBAR¹⁾, Masashi SASA¹⁾, 1) Department of Pharmacology, 2) Department of Pharmacotherapy, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima 734-8551, Japan.

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **114**, Suppl 1, 204P~208P (1999)

Sigma receptors in the central nervous system have been considered to play an important role in the modulation of mental diseases and memory/learning. However, the physiological function of sigma receptors still remains unknown. To elucidate physiological functions of the sigma receptors in modulation of neuronal activities, the effects of OPC-24439 (a sigma receptor ligand) on neuronal activities in hippocampal slices were studied with electrophysiological methods. Hippocampal slices (thickness ca. 450 μm) were prepared from male Wistar rats (4-7 weeks of age). In extracellular recording, population spikes in the CA1 region evoked by stimulation applied to the Schaffer collateral/commissural fibers were suppressed by OPC-24439 (1-100 μM) in a dose-dependent manner. This inhibition was antagonized by simultaneously applied haloperidol at 1 μM . In intracellular recording experiments, OPC-24439 (100 μM) did not affect the resting membrane potentials of neurons recorded. In addition, OPC-24439 had no effects on depolarization and firing induced by glutamate. These results indicate that sigma receptor activation caused suppression of neuronal activities in the hippocampus via the sigma receptors. This inhibition probably mediated via the suppression of ion channels that are not related to membrane potentials on post-synaptic neurons and/or sigma receptors on pre-synaptic neurons or interneurons.

Key Words: sigma receptor, hippocampus, electrophysiological recording, OPC-24439