

2008 38037A

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業)

乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究

平成 20 年度 研究報告書

Establishment of the Methods of Diagnosis, Therapy and Prophylaxis for
Dependence and Neurotoxicity induced by Drugs of Abuse.

Annual Report

Research on Pharmaceutical and Medical Safety

Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,

Japan in 2008

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 21 年 3 月

主任研究者 鍋島俊隆

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業）

乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究

平成20年度 研究報告書

**Establishment of the Methods of Diagnosis, Therapy and Prophylaxis for
Dependence and Neurotoxicity induced by Drugs of Abuse.**

**Annual Report
Research on Pharmaceutical and Medical Safety
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2008
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)**

平成21年3月

主任研究者 鍋島俊隆

発刊にあたって

主任研究者 鍋島俊隆

厚生労働省発薬食第060694号をもって交付決定の通知をうけた平成20年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）課題名「乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究」について、その総括研究報告書、分担研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成21年3月吉日

目次

1. 平成 20 年度総括研究報告	7
2. 平成 20 年度分担研究報告	17
<u>乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究</u>	19
主任研究者：鍋島俊隆 リサーチレジデント：毛利彰宏 (名城大学薬学部)	
<u>乱用薬物への渴望(薬物検索行動)の再燃の脳内機序解明およびその治療薬開発に関する研究</u>	88
分担研究者：山本経之 (長崎国際大学薬学部薬理学研究室)	
<u>乱用薬物による依存形成における視床下部神経ペプチドの役割</u>	110
分担研究者：鈴木 勉 (星薬科大学 薬品毒性学教室)	
<u>乱用薬物に共通の依存症発症因子に対する新規 Ca²⁺動態調節剤の治療への応用</u>	151
分担研究者：大熊誠太郎 (川崎医科大学薬理学教室)	
<u>乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討</u>	164
分担研究者：新田淳美 (名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部)	
<u>メタンフェタミン行動感作形成におけるセロトニン神経伝達の関与</u>	216
分担研究者：曾良一郎 (東北大学大学院精神・神経生物学分野)	
<u>覚せい剤精神障害に対する治療法の開発</u>	262
分担研究者：伊豫雅臣 (千葉大学大学院医学研究院・精神医学)	
<u>乱用薬物による易再発性精神病様状態および依存症の予防・治療法開発に関する研究</u>	282
分担研究者：西川 徹 (東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野)	

薬物依存における薬物再使用危険度評価尺度の開発と候補治療薬の探索 336

研究分担者：池田和隆

(東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究チーム)

薬物依存の新たな治療開発のための候補分子の探索 Dysbindin 遺伝子の解析 417

分担研究者：氏家 寛

(岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野)

3. 刊行物一覧（平成 20 年度） 439

4. 主任研究者・分担研究者一覧 455

平成20年度 総括研究報告書

平成20年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業)

「乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法」

主任研究者 鍋島俊隆

総括研究報告

3ヵ年計画の2年目を迎え、概ね当初の計画に準じて研究調査を実施している。まず、摂食関連ペプチドと薬物依存の関連については、網羅的に検討を行ったところ今まで知られていなかった脳内報酬系サーキットが明らかになりつつある。またカルシウムチャンネルサブユニットの拮抗薬が薬物依存治療薬になる可能については、計画していた調査対象の候補化合物そのものの検討に先んじ、ドパミン作動性神経系との相互的作用を検討中である。薬物報酬系に関与を確認した幾つかの受容体に関連し、新たに“ストレス誘発薬物報酬モデル”の作成に着手した。また患者サンプルを用いた実験では予定通り **Tagman genotyping assay** 法によって **haplotype** 頻度をシミュレートした。その中でも、NMDAサブユニットの分子が薬物依存に及ぼす影響を明らかにしつつあり、際立った成果を挙げている。依存治療薬についてはガラントミン、ミノマイシンやD-サイクロセインの有効性を見出し、いずれも本邦において使用実績のある薬物であることから安全性が確認されており、臨床応用への可能性が高まっている。薬物関連遺伝子として見出されている複数の分子については、更に調査を進め、21年度にはそれらの遺伝子改変モデルを作成して解析へと進む予定である。再発の予防法については、薬物再使用リスク評価尺度および再飲酒リスク評価尺度の実施プログラムを継続的に実施し、結果を多角的に分析した。また調査協力機関も新規の医療機関や法務機関に拡大しつつあり、今後は得られたデータを素に

①尺度の改良を図る②処方されている治療薬や回復プログラムにおける再使用リスク度との相互関係を明らかにする③①と②に拠って治療薬やプログラムの効果を評価する。

3年目である21年度はそれぞれの課題について各担当者から寄せられた具体的な報告を融合した協同研究として、社会に還元できる成果を挙げるべく当初設定した目標を超える成果を挙げ、薬物依存治療薬と予防薬の開発及び薬物依存患者の診断法の確立に迫る。

(I) 基礎研究

1. 乱用薬物による神経毒性や依存症に対する予防・治療および診断法に関する研究
(名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻 薬品作用学研究室 鍋島俊隆)
2. メタンフェタミンおよびMDMAへの渴望(薬物検索行動)の再燃の脳内機序解明及びその治療薬開発に関する研究
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)
3. 乱用薬物による依存形成における視床下部神経ペプチドの役割
(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)

4. 乱用薬物に共通の依存症発現因子に対する新規 Ca²⁺動態調節剤の治療への応用

(川崎医科大学 薬理学教室 大熊誠太郎)

5. 乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討

(名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部 新田淳美)

(II) 臨床研究

1. ケミカルドラッグ乱用への治療薬開発のための標的分子機序の解明

(東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野 曾良一郎)

2. 覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究

(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)

3. 乱用薬物による易再発性精神病様状態および依存症の予防・治療薬開発に関する研究

(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)

4. 薬物依存における薬物再使用危険度評価尺度の開発と候補治療薬の検索

(東京都精神医学総合研究所 分子精神医学研究部門 池田和隆)

5. 薬物依存の新たな治療法開発のための候補分子の探索

(岡山大学大学院医歯学総合研究科 精神神経病態学分野 氏家 寛)

平成20年度 総括報告

1. 乱用薬物による神経毒性や依存症に対する予防・治療および診断法に関する研究

(名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻 薬品作用学研究室 鍋島俊隆)

覚醒剤であるメタンフェタミン (METH) は、現在わが国で最も深刻な社会的影響を及ぼしている依存性薬物である。覚醒剤の乱用により幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害のみならず認知障害も惹起する。覚醒剤精神病は、乱用を中止した後も、遷延・持続・再燃することがあり、METH 乱用によるこのような長期的な脳機能変化の発生機序解明と治療法および再発予防法の開発が医学的にも社会的にも急務になっているが、適切な治療法は未だ確立されていない。一方、ガラントミンはニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) に対するアロステリックモデレーターとして働き、また弱いコリンエステラーゼ阻害作用を併せ持つアルツハイマー病の治療薬である。本研究では、ガラントミンの依存性薬物による精神障害に対する作用について検討を行った。ガラントミン (3 mg/kg) の投与は METH 連続投与動物の休薬後に認められる認知障害を緩解し、前頭皮質の細胞外ドパミン遊離量を著しく増加させた。このようなガラントミンによる緩解効果およびドパミン遊離量の増加作用はニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンの併用投与により拮抗された。また、学習試験に関連した細胞シグナル分子である extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化は METH 連続投与マウスでは認められないが、ガラントミンはこのような変化に対しても緩解効果を示した。ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH2339 はガラントミンによる認知障害ならびにそれに関連した ERK1/2 の活性低下に対する緩解効果を拮抗した。さらに、Mitogen-activated protein

kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 はガラントミンによる認知障害に対する緩解効果を拮抗した。以上のことから、ガラントミン投与による METH 連続投与マウスに認められる認知障害ならびに学習に関連した細胞内シグナル伝達低下に対する緩解効果は nAChR を介した前頭皮質のドーパミン遊離量の増加および、それによるドーパミン D1 受容体の刺激によるものであると考えられる。

2. メタンフェタミンおよび MDMA への渴望 (薬物探索行動) の再燃の脳内機序解明及びその治療薬開発に関する研究 (長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)

ストレスは薬物依存症患者における薬物への渴望再燃の誘発因子の1つと考えられている。本研究では、①覚せい剤methamphetamine (MAP) 探索行動は、ストレス負荷によって誘発されるか、また MAP 探索行動の発現に②ストレス関連分子である副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing factor; CRF) 受容体ならびに③副腎皮質刺激ホルモンの遊離を亢進させるプロスタグランジンE (EP) 受容体がいかなる役割を演じているかを追究した。実験は、ラットがレバーを1回押せばMAPが薬物関連刺激 (cue) と共に微量注入される薬物自己投与実験法を用いて行った。10日間のMAP自己投与実験後、MAPを生理食塩液に置換し自己投与実験 (cue呈示なし) を続けた (消去過程; MAP退薬)。レバー押し行動が減弱した時点で、cue呈示またはMAPの少量投与 (MAP-priming) によりレバー押し行動が再発する。この反応をMAP探索行動 (生理食塩液自己投与下) の指標とした。コミュニケーションボックスを用いての身体的ストレス負荷 (foot shock; 0.4-0.8 mA) および精神的ストレス負荷後では、レバー押し行動はいずれも認められなかった。一方、オペラントボックス内の床面の金属性グリッドを通してfoot shock (0.8 mA) を15分間負荷すると、その期間に限ってレバー押し行動は増加し、MAP探索行動が誘発された。しかし、ストレス負荷を中止すると、直ちにレバー押し行動は減弱した。一方、cueまたはMAP-priming によるMAP探索行動は、非選択的CRF受容体拮抗薬である α -Helical CRF₉₋₄₁によって有意に抑制された。このMAP探索行動は、選択的CRF₁受容体拮抗薬NBI27914の脳室内投与またはONO-SF-353-02の経口投与によっても抑制された。選択的CRF₂受容体拮抗薬Astressin 2Bはcue 呈示によるMAP探索行動を抑制したが、MAP-primingによるMAP探索行動は抑制しなかった。cue呈示またはMAP-priming によるMAP探索行動は、EP1ならびにEP3受容体拮抗薬の脳室内投与によって有意に抑制されたが、EP4受容体拮抗薬ではいずれも抑制されなかった。以上より、MAP探索行動はfoot shock暴露中のみ惹起される事が分かった。また、cue呈示によるMAP探索行動の発現にはCRF₁ならびにCRF₂受容体の活性化が、MAP-primingによるMAP探索行動の発現にはCRF₁受容体の活性化がそれぞれ関与している事が明らかとなり、MAP探索行動の動因によってCRF受容体の関与の仕方が異なる事も分かった。さらには、MAP探索行動の発現にEP1およびEP3受容体が促進的に関与する可能性が示唆され、CRFとの関連性を今後追究する。

3. 乱用薬物による依存形成における視床下部神経ペプチドの役割 (星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)

本研究では、視床下部神経ペプチドである orexin ならびに leptin に焦点を当て、これら視床

下部ペプチドが脳内報酬系に及ぼす影響について分子生物学的ならびに機能解剖学的な検討を行った。まず、逆行性輸送マーカである fluoro-gold (FG) を側坐核領域に微量注入し、腹側被蓋野において dopamine 生合成の律速段階酵素である tyrosine-hydroxylase (TH) ならびに orexin 1 受容体の特異的抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、FG 陽性反応を有する TH 陽性細胞上に orexin 1 受容体の発現が認められた。次に、腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経が orexin-A により活性化されるか否かを検討する目的で、腹側被蓋野に orexin-A を微量注入し、側坐核における dopamine 遊離量の変化を *in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、腹側被蓋野に orexin-A を微量注入したところ側坐核において dopamine ならびにその代謝物である DOPAC、HVA 遊離量の有意な増加が認められた。さらに、腹側被蓋野に leptin を微量注入し、側坐核における dopamine 遊離量の変化について同様に検討を行ったところ、側坐核において dopamine 遊離量の増加傾向が認められた。

以上、本研究の結果より orexin は腹側被蓋野において dopamine 神経上に存在する orexin 受容体を介して腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経を活性化させる可能性が示唆された。また、leptin は腹側被蓋野に存在する leptin 受容体を介して腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経を活性化させる可能性が示唆された。

4. 乱用薬物に共通の依存症発現因子に対する新規 Ca²⁺動態調節剤の治療への応用

(川崎医科大学 薬理学教室 大熊誠太郎)

本研究では、覚醒剤精神依存形成過程における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の機能亢進の詳細と、この亢進に対する ryanodine 受容体活性化の関与について、methamphetamine (METH) 誘発精神依存マウス、および METH を連続曝露した初代培養大脳皮質神経細胞 (神経細胞) を用いて、行動薬学的小および神経化学的観点から検討した。METH による報酬効果の形成および獲得は、L 型 HVCC 阻害薬 (nifedipine) の処置により完全に消失した。この METH 誘発報酬効果獲得マウスの中脳辺縁系領域および大脳皮質領域において、細胞膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1C$ および $\alpha 2/d1$ subunits 蛋白質の有意な増加が認められた。さらに、このマウス各脳部位より得られた顆粒画分において、L 型 HVCC への [³H]PN200-110 結合量の有意な増加が認められた。同様に、神経細胞への METH の連続曝露は、30 mM KCl 誘発性 [⁴⁵Ca²⁺] 流入の有意な増加を生じ、この増加は nifedipine、細胞内 Ca²⁺キレート剤 (BAPTA/AM) および非特異的 ryanodine 受容体拮抗薬 (dantrolene) の共存により完全に消失したが、P/Q 型および N 型 HVCC 阻害薬はこの増加に影響を与えなかった。そこで次に、L 型 HVCC 機能亢進に対する Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) 機構の関与について検討を加えた。METH 誘発報酬効果獲得マウスの中脳辺縁系領域および大脳皮質領域のいずれの領域においても、膜結合型 ryanodine 受容体 subtype 2 の蛋白発現量の有意な増加が認められた。このマウス各脳部位より調整した P₃ 画分において、ryanodine 受容体に対する [³H]ryanodine 結合の B_{max} の増加が観察された。METH による報酬効果の形成および獲得は、dantrolene の処置により完全に消失した。さらに、METH 誘発精神依存を獲得したマウス顆粒画分における [³H]PN200-110 結合の有意な増加は、dantrolene の前処置により完全に消失した。以上の成績より、METH 誘発精神依存の形成および獲得には、ryanodine 受容体の活性化を介した CICR 機構の機能亢進と、これに続く細胞膜結合型 L 型 HVCC $\alpha 1C$ およ

び a 2/d1 subunits 蛋白発現の増加により L 型 HVCC の機能亢進が生じることが明らかとなった。さらに、本研究成果より dantrolene および ryanodine 受容体拮抗薬は精神依存形成および獲得後の治療薬としての有用性が期待される。

5. 乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討

(名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部 新田淳美)

薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、インターネットサイトを利用した情報の氾濫や供給組織の巧妙化等に拠って拡大し、現在も状況の悪化が続いている。日本においてはメタンフェタミンを主とした覚せい剤や麻薬による事犯の若年化が進み、薬物依存に対する法的、社会的な施策の充実と共に、医学的見地からの正しい対処法を見出す必要がある。そのためには薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究が必須である。我々はメタンフェタミンまたはモルヒネを投与したマウス側坐核で共通して発現が増加している遺伝子を検討することによって薬物依存形成のメカニズム解明を行い、薬物依存の予防や治療に用いることの出来る化合物についても報告している。しかし依存の形成機構は複雑であり、未知の遺伝子が、薬物依存形成の key を握っている可能性が考えられる。本研究では、PCR select cDNA サブトラクション法を用いて覚せい剤依存の形成に関連する新規遺伝子の同定を試み、その作用メカニズムの詳細な解明を試みた。昨年度の本研究課題において、shati および piccolo という 2 つの分子が薬物依存に深く関わっていることを明らかにした。本年度は、両分子の遺伝子組み換えマウスを作成し、これらのマウスを使用して両分子の生理機能について検討を開始した。特に shati については、抗体酵素免疫測定法の確立に成功し、精神疾患のマーカーとしての可能性を模索中である。

6. ケミカルドラッグ乱用への治療薬開発のための標的分子機序の解明

(東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野 曾良一郎)

メタンフェタミン (MAP) 行動感作の形成機序としてドーパミン神経伝達が重要な役割を果たしているが、セロトニン神経伝達の関与も示唆されている。セロトニン神経伝達が過剰なセロトニントランスポーター完全欠損 (SERT KO) マウスでは MAP 行動感作が形成されなかったことから、過剰なセロトニン神経伝達が行動感作を抑制する機序として考えられる。しかし、セロトニン神経伝達は多くのサブタイプの受容体が関与し、MAP 行動感作形成に役割を果たすセロトニン受容体サブタイプは明らかではない。今回、我々は MAP による行動感作が形成されない SERT KO マウスに選択的セロトニン受容体阻害薬を投与し、MAP 行動感作形成におけるセロトニン受容体サブタイプの役割を検討した。MAP 反復投与のたびに 5-HT₂ 受容体阻害薬であるケタンセリンを前投与しても、SERT KO マウスでは MAP の反復投与後の移所運動量の増加は認められなかった。一方、MAP 反復投与のたびに 5-HT_{1B} 受容体阻害薬の SB 216641 を前投与すると、SERT KO マウスでは MAP の反復投与後の移所運動量の増加が認められた。MAP の行動感作が形成されない SERT KO マウスにおいて、5-HT₂ 受容体ではなく 5-HT_{1B} 受容体阻害薬が行動感作の形成に関与する結果が得られた。これらの結果より 5-HT_{1B} 受容体が関与するセロトニン神経伝達が MAP 行動感作形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

7. 覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究

(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)

これまで我々は、第二世代抗生物質ミノサイクリンが覚せい剤の投与によって引き起こされる様々な障害に対して治療効果を示すことを報告した。今回我々は覚せい剤投与による薬物依存形成におけるミノサイクリンの効果を検討した。場所嗜好性試験より、覚せい剤投与による場所嗜好性の増加が観察され、ミノサイクリンの前投与は、覚せい剤投与による場所嗜好性の増加を有意に抑制した。一方、ミノサイクリン単独投与は、生理食塩水投与群と同等であった。本研究の結果より、ミノサイクリンは覚せい剤依存の治療薬となる可能性が示唆された。

8. 乱用薬物による易再発性精神病様状態および依存症の予防・治療薬開発に関する研究

(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)

乱用薬物による精神障害の分子病態を明らかにする目的で、(1) PCP、ケタミン等の NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬による依存や精神病状態が小児期には生じにくいことや、(2) 実験動物において一定の発達期(臨界期)以降に成熟期タイプの異常行動が生ずるようになることに注目し、PCP 精神病関連候補分子として、ラットの脳において臨界期前後で PCP への応答が異なる遺伝子を探索した。DNA アレイ、RT-PCR、In situ hybridization 等により、leiomodin 2 遺伝子 (*Lmod2*) が、視床前核群を中心とした視床の限局した部位で、生後 32 日以降に発現が増加する発達依存的な発現増加を示すことが明らかになった。これらの所見は、*Lmod2* mRNA を発現する視床核群が PCP 精神障害の病態に関与する神経回路を構成することを示唆している。また、*Lmod2* 遺伝子や蛋白を含む分子カスケードが薬物性精神病状態に対する新しい診断・予防・治療法開発の分子標的になる可能性がある。

9. 薬物依存における薬物再使用危険度評価尺度の開発と候補治療薬の検索

(東京都精神医学総合研究所 分子精神医学研究部門 池田和隆)

本研究では、薬物依存における薬物再使用リスクを客観的な指標によって評価するシステムを構築すると同時に、モデル動物を用いて薬物依存治療薬を探索し、最終的にこれらを組み合わせて、治療薬の開発・評価ならびに治療プログラムの改善を目指している。今年度は、依存治療のために入院した患者を対象に、前年度までに開発した再飲酒リスク評価尺度 ARRS(Alcohol Relapse Risk Scale)を複数回実施し、再飲酒に関わる認知のゆがみや行動の問題の変化と処方薬との関連を検討した。抗うつ薬投与が ARRS 合計得点と逆相関するなど、処方薬と ARRS のスコアとの間の関連が見出された。また、研究分担者らが標準化した尺度である ASI(Addiction Severity Index)日本語版(ASI-J)と SRRS(Stimulant Relapse Risk Scale)の法務機関への導入を前年度より引き続き推進しており、共同作成した法務省版 SRRS の試行版は 700 例以上の薬物事犯受刑者で実施された。基礎研究では、モルヒネなどオピオイドに対する感受性と遺伝子多型との関連を検討し、ミューオピオイド受容体、G 蛋白質活性化型内向き整流性カリウムチャネルおよび ATP 結合カセット B1 トランスポーターの遺伝子多型が関連することを見出した。

10. 薬物依存の新たな治療法開発のための候補分子の探索

(岡山大学大学院医歯学総合研究科 精神神経病態学分野 氏家 寛)

薬物依存の新たな治療法開発のための候補分子の探索として、平成 19 年度では薬物依存の、特に精神病性障害合併脆弱性を規定する遺伝子の候補の 1 つとして *Dysbindin* 遺伝子を解析し、*risk haplotype* と *protective haplotype* を同定し、特に後者は他の内因性精神病性障害と同一であることを明らかにした。*Dysbindin* は種々の神経機能に関与しているが、その中でグルタミン酸の放出に関わっていることが知られている。薬物依存の形成にはグルタミン酸神経伝達に関わっていることは多くの動物実験で示されており、この点をヒトにおいて明らかにするため、今年度は D 体アミノ酸酸化酵素活性因子 (G72, D-amino acid oxidase activator; DAOA) とセリンラセマーゼ (*serine racemase*; SRR) 遺伝子を解析した。どちらも、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体の *co-agonist* である D 体セリンの調節に重要な遺伝子で、前者は代謝に、後者は合成に関わっている。DAOA 遺伝子では 6 遺伝子座位 (m12, m15, m18, m22, m23, m24) にて、覚せい剤精神病 (N=209) と健常者群 (N=291) で解析した。その結果、m22 において強い相関がみられ (m22; rs778293, 遺伝子型: $p=0.00016$ 、アレル: $P=0.0015$)、マイナーアレルの G が覚せい剤精神病発症危険因子であった。オッズ比は G アレルで 1.6 倍であり、G/G 遺伝子型では頻度が少ないもののオッズは 5.7 倍と強い因子であった。また、m12-m15 および m23-m24 から形成されるハプロタイプも強い相関を示した ($p=0.00024$, $p=0.00085$)。SRR 遺伝子では 3 座位 (rs2224770; SNP1, rs3760229; SNP2, rs408067; SNP3) を解析した。その結果、どの部位も覚せい剤精神病脆弱性とは相関しなかったが、SNP1 が精神病の自然再燃に、SNP3 が精神病の遷延化および多剤乱用と相関し、覚せい剤精神病的臨床経過や行動特性に影響することが分かった。今年度の成果を昨年度と合わせると、グルタミン酸神経伝達に関与する複数の分子が覚せい剤精神病脆弱性やその経過・予後に関与しており、それらの遺伝子多型の違いが個体間での感受性の違いを規定していることが推定された。

平成20年度 分担研究報告

乱用薬物による神経毒性や依存症に対する予防・治療および診断法 に関する研究 (依存性薬物による認知障害に対するガラントミンの作用)

主任研究者：鍋島俊隆¹

リサーチレジデント：毛利彰宏¹

研究協力者：野田幸裕²

(¹名城大学薬学部薬品作用学, ²名城大学薬学部病態解析学)

[研究要旨]

覚醒剤であるメタンフェタミン (METH) は、現在わが国で最も深刻な社会的影響を及ぼしている依存性薬物である。覚醒剤の乱用により幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害のみならず認知障害も惹起する (覚醒剤精神病)。覚醒剤精神病は、乱用を中止した後も、遷延・持続することがあり、METH 乱用によるこのような長期的な脳機能変化の発生機序解明と治療法および再発予防法の開発が医学的にも社会的にも急務になっているが、認知障害の発症の分子機序および適切な治療法は未だ確立されていない。一方、ガラントミンはニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) に対するアロステリックモデュレーターとして働き、また弱いコリンエステラーゼ阻害作用を併せ持つアルツハイマー病の治療薬である。本研究では、ガラントミンの依存性薬物による精神障害に対する作用について検討を行った。ガラントミン (3 mg/kg) の投与は METH 連続投与動物の休薬後に認められる認知障害を緩解し、前頭皮質の細胞外ドパミン遊離量を著しく増加させた。このようなガラントミンによる緩解効果およびドパミン遊離量の増加作用はニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンの併用投与により拮抗された。また、学習試験に関連した細胞シグナル分子である extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化は METH 連続投与マウスでは認められないが、ガラントミンはこのような変化に対しても緩解効果を示した。ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH2339 はガラントミンによる認知障害ならびにそれに関連した ERK1/2 の活性低下に対する緩解効果を拮抗した。さらに、Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 はガラントミンによる認知障害に対する緩解効果を拮抗した。以上のことから、ガラントミン投与による METH 連続投与マウスに認められる認知障害ならびに学習に関連した細胞内シグナル伝達低下に対する緩解効果は nAChR を介した前頭皮質のドパミン遊離量の増加および、それによるドパミン D1 受容体の刺激によるものであると考えられる。

A. 研究目的

近年、大学生が大麻売買・栽培・使用などにより摘発される報道が後を絶たない。名門大学でも摘発され、学力とは関係なく薬物乱用が広まってきている。大麻はタバコよりも無害などの情報から、使用する学生もあり、依存性薬物に対する適切な情報提供が必要であると考えられる。また、このような軽はずみに大麻を摂取したことがきっかけで、さらに強い依存性薬物に興味を持ち、覚せい剤 (METH) などを摂取するようになることも多い。そのため、こうした依存性薬物を投与した動物を用いて依存性薬物による精神障害に対する治療薬を評価するような研究は社会的要求性の高いものになると考えられる。METH は幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害のみならず認知障害も惹起する^{1,2)}。一方、ガラントミンは、ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) に対するアロステリックモデュレーターとして働き、また弱いコリンエステラーゼ阻害作用を併せ持つアルツハイマー病の治療薬である³⁾。ガラントミンが統合失調症患者に認められる感情鈍磨などの陰性症状や注意力低下などの認知障害の改善効果を示したとの臨床報告がある⁴⁻⁶⁾。これらの報告から、ガラントミンは依存性薬物による精神障害に対する治療薬としての可能性がある。本研究は METH 連続投与後に認められる認知障害とそれに関連した神経機能低下に対するガラントミンの効果について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には、野生型である 6-8 週齢の ICR 系雄性マウス (日本エスエルシー, 静岡) を使用した。動物は実験を開始する前少なくとも 3 日間は、室温

23±1 °C, 湿度 50±5 % で、明暗サイクル (明期 8 時~20 時) の室内にて飼育し、水および餌は自由に摂取させた。なお、本実験計画は Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った。

ガラントミン臭化水素酸塩 (4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-6H-benzofuro [3a,3,2-ef] benzazepin-6-ol hydrobromide) [ヤンセンファーマ株式会社 (東京) より供与], メタンフェタミン塩酸塩 (大日本住友製薬株式会社, 大阪), メカミラミン塩酸塩 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), (-) スコポラミン臭化水素酸塩水和物 (Sigma-Aldrich) および R (+)-SCH23390 塩酸塩 (R (+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride) (Sigma-Aldrich) は saline に溶解した。Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 (Sigma-Aldrich) は 60%ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) に溶解した。

2. 薬物処置

METH (1 mg/kg/day s.c.) あるいは saline (0.1 mL/10 g body weight/day s.c.) を 7 日間連続投与したマウスを実験に使用した。ガラントミン, メカミラミン, スコポラミンおよび SCH23390 は、体重あたり 0.1 mL/10 g の用量で投与し、対照群には同用量の saline を投与した。

PD98059 を前頭皮質 (PFC) に微量注入するために、ジエチルエーテル麻酔下で、マウスを脳定位固定装置 (Narishige, 東京) に固定し、L 字型注入カニューレ (27 ゲージ) を mPFC (両眼の尾側眼角を結んだ線と矢状縫合の交点から内外方向に +0.3 mm 移動した地点に、-2.5 mm の深さへ) に埋め込んだ。PD98059 (2 µg/0.5 µL/マウス) は PFC の片側に注入した。対照群には同用量の溶媒 (60% DMSO) を注入した。

3. 新奇物体認識試験

METH連続投与最終日の翌日から新奇物体認識試験 (NORT) を行った。実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱 (縦 40×横 40×高さ 29 cm) を用い、装置の底には木屑を敷いた。装置は静かな部屋に設置し、光源を用いて約 40 ルクスの照明を与えた。

NORTは馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に10分間マウスを慣らした。2日目の訓練試行では、装置内に2つのオブジェクト (オブジェクトAおよびオブジェクトB) を設置し、マウスを10分間自由に探索させた。3日目の保持試行では、いずれか片方のオブジェクト (例: オブジェクトA) を新奇オブジェクト (例: オブジェクトC) に置換し、訓練試行24時間後に、再びマウスを装置内に入れ、10分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および2つのオブジェクトを探索している総探索時間をストップウォッチで測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合 (%) を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合 (%) を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

ガラントミン (3 mg/kg p.o.) は訓練試行1時間前に、メカミラミン (3 mg/kg s.c.), スコポラミン (0.1 mg/kg s.c.) およびSCH23390 (0.02 mg/kg s.c.) は、それぞれ訓練試行30分前に投与した。PD98059 (2 µg/0.5 µL/マウス) は訓練試行30分前にPFCの片側に直接注入した。

4. マイクロダイアリス法

マウスはペントバルビタール (40 mg/kg i.p.) の麻酔下において、ガイドカニューレ (AG-6, エイコム, 京都) を左前頭皮質 (AP +1.7, ML +1.0 from bregma, DV -1.5 from skull) に15度の角度から挿入

した。翌日、ダイアリスプローブ (AI-6-1; 膜長 1mm, エイコム) をガイドカニューレを介して挿入し、人工脳脊髄液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl and 2.3 mM CaCl₂) を 1.2 µl/min の流速で還流した。還流液を採取し、高速液相クロマトグラフィー (HTEC-300, エイコム) により細胞外ドパミン遊離量を測定した。

5. ウエスタンブロッティング法

NORTの訓練試行終了後、直ちにマウスを断頭し、脳を摘出した。氷冷下で摘出した脳から前頭皮質を摘出し、測定を行うまで-80°Cで凍結保存した。

脳サンプルは溶解バッファー [lysis buffer; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM sodium pyrophosphate decahydrate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, and 10 µg/mL pepstatin (pH 7.4)] 中4°Cでソニケーターにより超音波破碎し、ホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルを13000×gで20分間遠心分離し、得られた上清を使用した。タンパク量を調整したサンプルにサンプルバッファー [sample buffer; 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% glycerol, 0.002% bromphenol blue, and 5% 2-mercaptoethanol] を加えた後、95°Cで5分間煮沸した。蛋白 (20 µg) は10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ蛋白を転写し、Detector Block Kit (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を加えてブロッキングした。

PVDF膜に1次抗体 (anti-phospho-ERK1/2) [1:1000 dilution, phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Antibody #9101, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA] を加え、イン

キュベーションした後、2次抗体 [horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1: 2000 dilution)] を加え、インキュベーションした。ウェスタンブロッティング検出試薬の ECL (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA) を用いて免疫複合体を検出し、ERK1/2 リン酸化蛋白の発現量を画像解析により算出した。次いで、総 (リン酸化および非リン酸化) ERK1/2 蛋白の発現量を調べるため、ストリッピングを行い、1次抗体 (anti-ERK1/2) (1:1000 dilution, p44/42 MAPK Antibody #9102, Cell Signaling Technology Inc.) を加え、インキュベーションした。以降、上述と同様の処理を行い、総 ERK1/2 蛋白の発現量を算出した。結果は、得られたリン酸化 ERK1/2 のバンドを ERK1/2 のバンドで補正し、コントロール群に対する発現量を百分率 (%) として示した。

6. 統計解析

結果は平均値±標準誤差として示した。得られた結果は、one-way による分散分析を行い、各群間比較には、Bonferroni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が 5%以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. METH 連続投与マウスにおける認知学習障害に対するガラントミンの効果

マウスに METH (1 mg/kg/day s.c.) を 7日間連続投与後、NORT を行ったところ、保持試行において、saline 連続投与マウスに比べ新奇オブジェクトに対する探索行動が減少しており、認知障害が認められた (Fig. 1A)。ガラントミン (3 mg/kg p.o.) を NORT の訓練試行 1時間前に投与したところ、新奇オブジェクトに対する探索行動の減少は緩解され、METH 連続投与マウスに認められる認知障害は改善された (Fig. 1A)。一方、saline 連続投与

マウスにおいて、ガラントミン単独投与は NORT における探索嗜好率に影響を及ぼさなかった (Fig. 1A)。また、ガラントミンは、訓練試行および保持試行における総探索時間に何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 1B)。

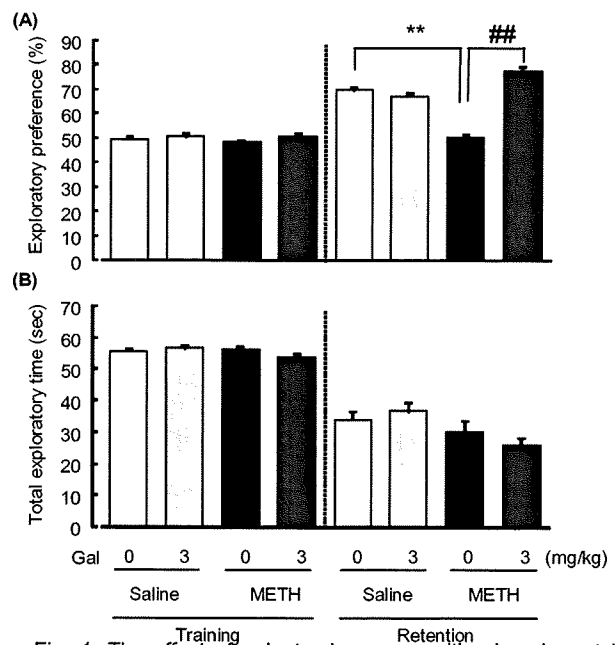


Fig. 1. The effect of galantamine on cognitive impairment in METH-treated mice. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. METH (1 mg/kg, s.c.) was injected for 7days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) were administered 1hr before the training trial. Values indicate the mean ± S.E. (n = 10). **p < 0.01 compared with (saline + saline)-treated group (Bonferroni test). ##p < 0.01 compared with (METH + saline)-treated group (Bonferroni test). METH: Methamphetamine, Gal: Galantamine

2. METH 連続投与マウスにおけるガラントミンの認知障害改善作用に対するメカミラミンおよびスコポラミンの作用

METH 連続投与マウスに認められる認知障害に対するガラントミンの緩解作用は、メカミラミン (3 mg/kg s.c.)によって有意に拮抗されたが (Fig. 2A)、スコポラミン (0.1 mg/kg s.c.)ではそのような作用は認められなかった (Fig. 3A)。一方、saline 連続投与マウスにおいて、メカミラミン単独投与は、NORT における探索嗜好率に影響を及ぼさなかったが (Fig. 2A)、スコポラミンは保持試行の探

索嗜好率を有意に減少させ、認知障害を惹起させた (Fig. 3A). また, saline 連続投与マウスにおいて, メカミラミンおよびスコポラミンは, 訓練試行および保持試行における総探索時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 2B, 3B).

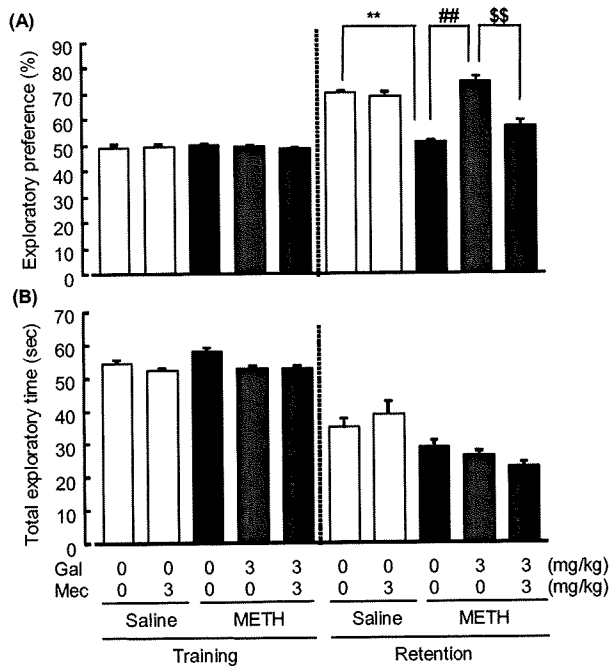


Fig. 2. Nicotinic AChRs are critical for the alternative effect of galantamine. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. METH (1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) and mecamlamine (3 mg/kg, s.c.) were administered 1hr and 30 min before the training trial, respectively. Values indicate the mean \pm S.E. ($n = 10-15$). ** $p < 0.01$ compared with (saline + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). ## $p < 0.01$ compared with (METH + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). \$\$\$ $p < 0.01$ compared with (METH + galantamine/saline)-treated group (Bonferroni test). METH: Methamphetamine, Gal: Galantamine, Mec: Mecamylamine

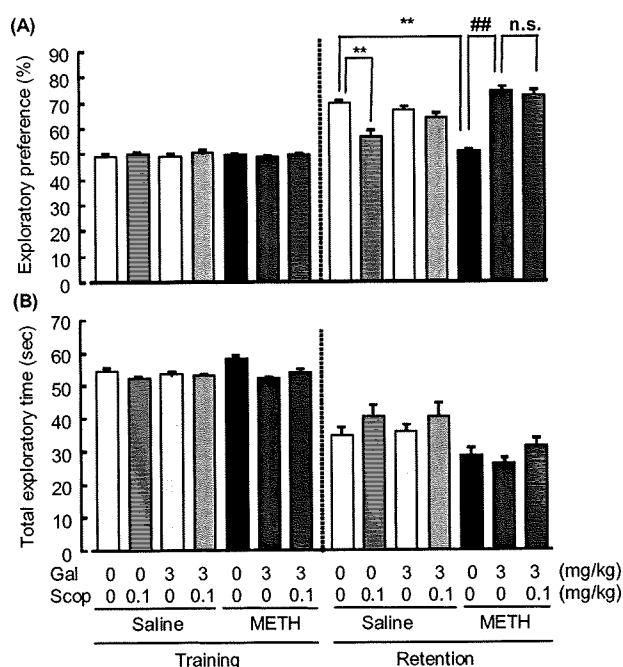


Fig. 3. Muscarinic AChRs are not critical for the alternative effect of galantamine. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. METH (1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) and scopomine (3 mg/kg, s.c.) were administered 1hr and 30 min before the training trial, respectively. Values indicate the mean \pm S.E. ($n = 10-15$). ** $p < 0.01$ compared with (saline + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). ## $p < 0.01$ compared with (METH + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). n.s.: not significant. METH: Methamphetamine, Gal: Galantamine, Scop: Scopomine

3. METH 連続投与マウスにおけるガランタミン投与による前頭皮質細胞外ドパミン遊離量の増加

マウスに METH (1 mg/kg/day s.c.) を 7 日間連続投与し, 最終投与日から 3 日後, PFC における細胞外ドパミン遊離量を *in vivo* マイクロダイアリシス法により測定した. Saline 連続投与群と METH 連続投与群の間で, PFC における細胞外ドパミンの基礎遊離量に有意な差は認められなかった (データ示さず). ガランタミン (3 mg/kg p.o.) 投与により METH 連続投与マウスの PFC における細胞外ドパミン遊離量は有意に増加した (Fig. 4). この細胞外ドパミン遊離量の有意な増加は, ガランタミン投与 30 分後から認められたが, ガランタミン投与 20 分後, METH 連続投与マウスにメカ

ミラミン (3 mg/kg s.c.) を投与するとガラントミンによる細胞外ドパミン濃度の増加は有意に抑制された (Fig. 4). 一方, saline 連続投与マウスにおけるメカミラミン単独投与は細胞外ドパミン濃度に影響を及ぼさなかった (データ示さず).

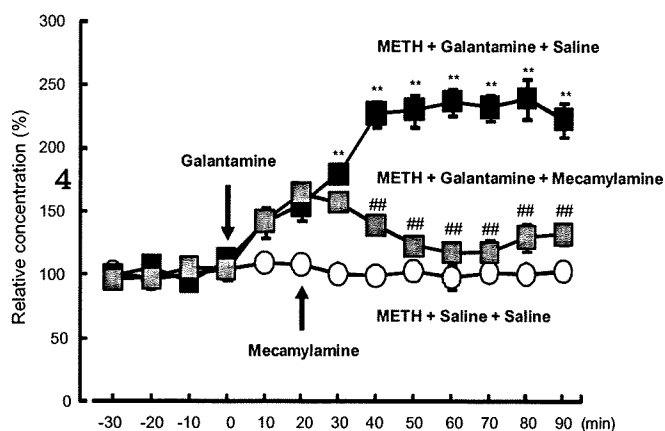


Fig. 4. The effect of galantamine on extracellular concentration of dopamine in mPFC of METH-treated mice. METH (1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) was administered 3 days after the withdrawal of METH. Mecamylamine (Mec, 3 mg/kg, s.c.) was injected 20 min after the galantamine administration. Values indicate the mean \pm S.E. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ compared with (METH + Saline + Saline)-treated group. ## $p < 0.01$ compared with (METH + Galantamine + Saline)-treated group. METH: Methamphetamine.

4. METH 連続投与マウスに認められる認知障害に対するガラントミンによる緩解効果におけるドパミン D1 受容体の関与

METH 連続投与マウスに認められる認知障害に対するガラントミンの緩解作用は, SCH23390 によって有意に拮抗された (Fig. 5A). 一方, saline 連続投与マウスにおいて, SCH23390 単独投与は NORT における探索嗜好率に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 5A). また, saline 連続投与マウスにおいて, SCH23390 は, 訓練試行および保持試行における総探索時間に影響を及ぼさなかった (Fig. 5B).

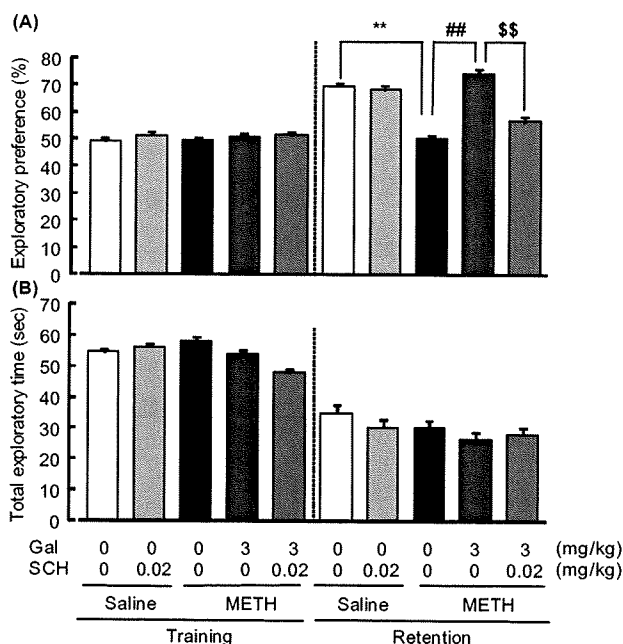


Fig. 5. Attenuative effect of galantamine is mediated by D1 receptors. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. METH (1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) and SCH 23390 (0.02 mg/kg, s.c.) were administered 1hr and 30 min before the training trial, respectively. Values indicate the mean \pm S.E. ($n = 10-15$). ** $p < 0.01$, compared with (saline + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). ## $p < 0.01$ compared with (METH + saline/saline)-treated group (Bonferroni test). \$\$\$ $p < 0.01$ compared with (METH + galantamine/saline)-treated group (Bonferroni test). METH: Methamphetamine, Gal: Galantamine, SCH: SCH23390

5. ガラントミンの認知障害緩解作用におけるドパミン D1 受容体-ERK1/2 シグナル経路の関与
NORT の訓練試行において, saline 連続投与マウスを新奇オブジェクトに暴露すると, ERK1/2 のリン酸化は, 訓練試行前と比較して増加したが, METH 連続投与マウスではそのような増加は認められなかった (Fig. 6). しかし, METH 連続投与マウスにガラントミン (3 mg/kg p.o.) を投与すると, ERK1/2 のリン酸化は有意に増加した (Fig. 6). また, ガラントミン投与による ERK1/2 の活性化は, ドパミン D1 受容体拮抗薬の SCH23390 (0.02 mg/kg s.c.) により有意に拮抗された (Fig. 6).