

200940017AB

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 21 年度 総括研究報告書

平成 19－21 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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 2007-2009

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 22 年 3 月

研究代表者 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 21 年度 総括研究報告書

平成 19-21 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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 2007-2009

(Chief; Toshitaka Nabeshima)

平成 22 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

発刊にあたって

研究代表者 鍋島俊隆

厚生労働省発薬食第 0604043 号をもって交付決定の通知をうけた平成 21 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、および平成 19 年度から 3 年間の研究をまとめた総合研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 22 年 3 月吉日

目次

1. 平成 21 年度総括研究報告

2. 平成 21 年度分担研究報告

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

研究代表者：鍋島俊隆

リサーチレジデント：毛利彰宏

(名城大学大学院薬学研究科薬品作用学研究室)

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

分担研究者：山本経之

(長崎国際大学薬学部薬理学研究室)

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

分担研究者：鈴木 勉

(星薬科大学薬品毒性学教室)

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

分担研究者：大熊誠太郎

(川崎医科大学薬理学教室)

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

分担研究者：新田淳美

(富山大学大学院・医学薬学研究部薬物治療学研究室；名古屋大学医学部附属病院より異動)

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

分担研究者：曾良一郎

(東北大学大学院医学系研究科・精神・神経生物学分野)

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

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)

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

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

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法開発のための候補分子の探索

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. 平成 19～21 年度総合研究報告

4. 平成 19～21 年度分担者総合研究報告

5. 平成 19～21 年度刊行物一覧

6. 研究代表者・研究分担者一覧

平成 21 年度総括研究報告

平成 21 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や依存症に対する予防・治療および診断法に関する研究」

研究代表者 鍋島俊隆

総括研究報告

本研究班の目的は、覚せい剤をはじめとする乱用薬物による神経毒性や依存症に対する予防・治療薬を開発し、薬物依存者の診断法を確立することであり、国際的な依存・乱用防止の啓発に役立て、研究成果を社会に還元することである。平成 21 年度の研究の目的は、これまでの 2 年間に行ってきた乱用薬物の依存および精神行動障害の分子機序の解明およびそれに基づいた予防・治療および診断法に関する研究をさらに発展させ、基礎研究と臨床研究のクロストークによる臨床応用を目指すことである。すなわち乱用薬物の依存および精神行動障害動物モデルを用いて候補薬物のスクリーニングをさらに進めるとともに、有力な候補物質に関しては臨床研究で確立した診断法でその有効性を検討する。一方で、臨床知見で報告されている現象について動物モデルを用いて再現し、薬物に対する依存や精神毒性の発生機序や精神病の発症脆弱性を分子生物学的なレベルでさらに解明する。本研究では、基礎研究は鍋島俊隆が責任者となり、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、平成 21 年度においても多くの研究成果が得られたので、その概要について報告する。

(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 薬品作用学研究室 鍋島俊隆)
(リサーチレジデント 毛利彰宏)
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
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美) *

*平成 21 年度に異動

(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)

(I) 基礎研究

薬物依存と摂食関連ペプチドの関連について、さらに広範な神経ペプチドについて検討を行い、それら発現調節におけるエピジェネティック修飾の関与について明らかにした。カルシウムチャンネルサブユニットの拮抗薬の薬物依存治療薬としての可能性については、覚せい剤による精神依存の形成機序におけるカルシウムチャンネルを介した神経細胞内のアクチン骨格脱重合因子の関与を明らかにすることで、その治療薬候補の作用点について明らかにした。薬物依存の渴望・再燃に注目してストレス誘発薬物再燃モデルを確立し、そのモデルにおいてストレス関連因子である副腎皮質刺激ホルモン放出因子の発現変化から渴望状態のバイオマーカーとしての有用性を示した。アルツハイマー病治療薬であるガラントミンは依存性薬物による精神障害や認知障害だけでなく精神依存に対しても有効性が示すことを明らかにした。また、本研究課題において発見された新規薬物依存関連遺伝子 *shati* および *piccolo* の生理的役割についても明らかにした。

(II) 臨床研究

選択的セロトントランスポーター阻害作用のある抗うつ薬の覚せい剤嗜好性に対する抑制効果がカリウムチャンネル阻害作用に由来することを動物実験において明らかにし、さらにアルコール依存患者におけるその作用の有効性についても昨年度に開発した再飲酒リスク評価を用いて明らかにした。動物実験において治療薬としての有効性が期待された抗生物質であるミノマイシンは臨床症例においても有効性を示すことを明かにした。また、患者サンプルを用いた研究についてはグルタミン酸作動性神経系の受容体のサブユニットやアデノシン受容体の遺伝子変異が覚せい剤精神障害の発症脆弱性に関与することを示した。また、発達による乱用薬物に対する感受性の変化に関連する遺伝子である *SAP97* を見出した。

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 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、ガラタ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、ガラタ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。ガラタミン (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。このようなガラタ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、ガラタ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 はガラタ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 はガラタ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、ガラタミン投与による 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。

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、ストレスによって誘発されるmethamphetamine (MAP) 探索行動に焦点を当て、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) の役割を明らかにする事を目的とした。実験は、ラットがレバーを1回押せば音と光の薬物関連刺激 (cue) と共に、MAP (0.02 mg/0.1 mL) が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saline に切り替え自己投与実験 (cue呈示なし) を続けた (消去過程 ; MAP退薬)。消去過程9日目にレバー押し行動の減弱を確認後、10日目にストレス負荷によるMAP探索行動の再発実験を試行した。MAP自己投与ラットにオペラント装置の床面の金属性グリッドからの15分間のfoot shock (0.8 mA) を負荷すると、レバー押し行動が出現し、MAP探索行

動が誘発された。このMAP探索行動は、非選択的CRF受容体拮抗薬である α -helical CRF₉₋₄₁の脳室内投与により有意に抑制された。一方、血漿中のCRF濃度は、saline に切り替えての退薬1日目では変化が認められなかったが、退薬10日目には有意に増加した。この時、扁桃体内のCRF濃度も有意に増加していた。しかしながらMAP自己投与期間中の血漿中CRF濃度には、変化が認められなかった。このCRFの増加が認められた退薬10日目に高架式十字迷路試験を行うと、MAP自己投与ラットのオープンアームへの進入回数および滞在時間は有意に減少し、不安レベルが高い事が分かった。これらの結果から、ストレス負荷によるMAP探索行動ならびに退薬に伴う不安作用の発現はCRF受容体の活性化を介して起こっている事、また少なくともその1つの責任部位として扁桃体が挙げられる事が明らかとなった。さらにMAP自己投与成立時およびMAP退薬時における有機カチオントランスポーターの発現変容についても合わせて報告する。

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)

これまでに視床下部神経ペプチドである orexin ならびに leptin が腹側被蓋野において dopamine 神経上に存在する orexin ならびに 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を明らかにしている。そこで本研究では、orexin、leptin に加えて神経ペプチドである neuropeptide Y、galanin、somatostatin、tachykinin ならびに vasoactive intestinal peptide (VIP) に着目して、腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経系におけるこれら神経ペプチドの役割について多角的に検討を行った。まず methamphetamine あるいは morphine を間欠投与することにより、自発運動量促進作用に対する逆耐性を形成させ、腹側被蓋野領域ならびに側坐核領域における各種ペプチドの mRNA 発現量の変化について検討し、腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経系の依存性薬物の依存形成および維持機構における役割を明確化した。さらに近年、より長期的なゲノム情報発現機構であるエピジェネティクスによる遺伝子発現制御が注目されるようになってきている。エピジェネティック修飾は脳内のシグナル応答のスイッチがすぐに“OFF”にされないように、長期にわたって神経可塑的变化を制御するのに重要な役割を担っていると考えられる。これまでに当教室において、methamphetamine は morphine と異なり、繰り返し投与によって長期的な神経可塑的变化を伴った、脳高次機能の破綻を引き起こすことを明らかにしている。そこで本研究では、依存性薬物によって活性化される dopamine 神経系の変化の多次元解析をエピジェネティック修飾という視点から検討し、methamphetamine あるいは morphine の繰り返し投与により引き起こされる、脳内エピジェネティクス修飾を介した特定の遺伝子発現の長期的発現制御について解析を行う。

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)

これまでに、methamphetamine による精神依存において、L型カルシウムチャンネル α 1c subunit が重要な役割を担っていることを明らかにしており、更に昨年度の報告においては、 α 2 δ subunit の変化と細胞内 Ca²⁺応答の重要性を報告した。一方、細胞内アクチン骨格は重合・脱重合の制御により神経成長円錐等の伸展・退縮などを流動的に調節しており、この脱重合に関連する因子として

actin depolymerizing factor (ADF) が知られている。神経細胞において Ca^{2+} の局所的な上昇はアクチン重合を誘導することから、methamphetamine による精神依存時に認められる細胞内 Ca^{2+} 応答の変化はアクチン動態の制御に重要な働きをしていることが推察されるが、methamphetamine 誘発精神依存における ADF の関与については、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、methamphetamine による精神依存における ADF の関与を、ADF 変異動物を用いて行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。その結果、methamphetamine 誘発報酬効果を獲得したマウスの側坐核を含む領域において、ADF 蛋白質量の有意な増加が認められた。また、ADF 変異型マウスおよび野生型マウスを用いて、methamphetamine 誘発報酬効果の変化について検討したところ、野生型マウスで認められる報酬効果は、ADF 変異型マウスにおいて有意な減弱が認められた。以上の成績より、methamphetamine による精神依存において ADF を介する細胞内アクチン動態の変化が関与することが示唆された。

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

(富山大学大学院医学薬学研究部 薬物治療学研究室 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、情報の多様化や供給組織の巧妙化等に抛って拡大し、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、薬物依存に対して法的、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。このような状況を打破するために、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を行う必要がある。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ってきた。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、薬物依存形成のメカニズムの詳細な解明を試みた。昨年度まで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、両分子を過剰発現しているマウスならびに shati 遺伝子欠損マウスの作成を行い解析を行った。CMV プロモーターを使用した shati および piccolo の発現過剰マウスでは、胎児期のみ発現が増加するが、生後 6-10 週令で行動試験を行うとワイルド型と比較して差異が観察された。Shati 遺伝子欠損マウスを用いて行動実験を行ったところ情動性についてワイルド型との差異が観察された。

今年度の結果から、我々が見出した shati および piccolo は、精神活動に影響を与えていることが明らかになった。今後、これらの遺伝子組み換えマウスを用いて、新規分子の生理的役割および薬物依存への形成との関係について検討する予定である。

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 (METH) 依存の形成機序としてドーパミン神経系が重要な役割を果たしていると考えられているが、他の神経伝達系の関与も示唆されている。我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰なセロトニントランスポーター欠損 (SERT KO) マウスでは METH 行動感作が形成されず、SERT KO マウスに 5-HT_{1B} 受容体阻害薬を前処置すると、METH 行動感作が形成されることを確認した。このことから、

5-HT_{1B}受容体の行動感作形成への関与が示唆された。そこで、本研究では、METH行動感作形成への5-HT_{1B}受容体の関与をより詳細に解析するため、5-HT_{1B}受容体KOマウスにおいてMETH行動感作形成について検討した。5-HT_{1B}受容体ホモKOマウスではMETH反復投与による移所運動量の増加が野生型マウスに比べて大きく行動感作形成が増強していた。一方、5-HT_{1B}受容体ヘテロKOマウスでは野生型マウスにより移所運動量の増加が少なく、行動感作形成は減弱していた。このことから、METHによる行動感作形成には、5-HT_{1B}受容体を介するセロトニン神経伝達が重要な役割を担うと考えられる。

ドーパミン神経伝達にアデノシン受容体が関与していることが知られている。そこでアデノシン受容体の遺伝子多型がMETH依存・精神病と相関するかどうかについて検討した。171例のMETH依存・精神病患者と229例の健常人においてアデノシンA₁、A₂受容体の遺伝子多型について解析した。アデノシンA₁受容体では相関は観察されなかったが、アデノシンA₂受容体の遺伝子多型と女性のMETH依存・精神病患者に有意な相関がみられた。これらの結果は、女性ではメタンフェタミンをより若年齢で使用し始めメタンフェタミン依存になりやすいが、治療によく反応することに関連している可能性が考えられる。

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)

覚せい剤関連精神障害の治療薬の開発を目的として、第二世代抗生物質ミノサイクリンの効果を検討した。場所嗜好試験より、ミノサイクリンが覚せい剤投与による依存形成を抑制する事が判った。さらに、覚せい剤関連精神障害患者に対してミノサイクリンが著効を示した症例を報告した。以上の結果より、ミノサイクリンは世界中で幅広く使用されている安全な薬剤(抗生物質)であるため、覚せい剤関連精神障害の新しい治療薬として期待されるであろう。

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機構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(生後21-25日: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ている。RAP-PCR、RT-PCR等により、シナプスの足場蛋白をコードするSAP97遺伝子の転写産物が、大脳新皮質において、PCP投与により臨界期後の生後50日には有意に増加するが臨界期前の生後8日には変化が見られないことがわかった。この増加は、NMDA受容体遮断薬dizocilpineでも認められたが、ドーパミン(DA)作動薬・GABA作動薬・D₁およびD₂DA受容体遮断薬等では生じず、強いD₂DA受容体遮断作用をもつ抗精神病薬haloperidolを前処置しても影響を受けなかった。これらの所見は、SAP97がPCP精神病に見られる抗精神病薬抵抗性の統合失調症様症状の病態に関与することを示唆しており、SAP97遺伝子やコード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予防・治療薬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。3年間の研究計画の最終年度である今年度は、開発した再使用リスク評価尺度を用いて、モデル動物において薬物依存治療効果が期待された治療薬の効果を、ヒトにおいて検討した。マウスにおいて、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)であるフルオキセチンとパロキセチンは覚せい剤嗜好性を減弱させたが、SSRIであるフルボキサミンは減弱させなかった。アフリカツメガエル卵母細胞実験系を用いてこれらのSSRIの作用機序を検討した結果、フルオキセチンとパロキセチンはG蛋白質活性化型内向き整流性カリウム(GIRK)チャネルを阻害したが、フルボキサミンは阻害しなかった。また、動物において依存性物質に対する嗜好性を減弱させることが報告されている脳循環・代謝改善薬のイフェンプロジルもGIRKチャネルを阻害することが明らかになった。さらに、覚せい剤依存患者の遺伝子多型解析の結果、GIRKチャネル遺伝子多型が覚せい剤依存脆弱性と関連することが明らかになった。そこで、アルコール依存患者に対して、再飲酒リスク評価尺度を縦断的に実施し、処方されていた治療薬との関係を予備的に解析したところ、GIRK阻害能を持つ治療薬が投与されていた患者群では、他の患者群と比べて断酒率が向上する傾向が認められた。GIRK阻害能を有する薬物は、依存治療薬として期待できる。

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を探索してきて、昨年度までに精神病性障害合併脆弱性を規定する遺伝子候補として、Dysbindin 遺伝子、D体アミノ酸酸化酵素活性因子遺伝子(G72, DAOA), セリンラセマーゼ遺伝子(SRR)の関与を発見してきた。これらの遺伝子産物はいずれもグルタミン酸神経伝達、特にNMDA受容体を介したシグナリングに関わっている。そこで、本年度ではNMDA受容体遺伝子であるGRIN1, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子を覚せい剤精神病で解析した。GRIN1ではrs6560665, rs2301363, hcv184019多型を、GRIN2Aでは5'上流の(GT)_n繰り返し多型を、GRIN2Bではrs1019385, rs1805502多型を覚せい剤精神病(N=220)と健常者群(N=291)で解析した。その結果、GRIN1遺伝子は相関がなかったが、GRIN2A, GRIN2Bが相関を示した。臨床表現型での解析ではGRIN1遺伝子のrs2301363がフラッシュバックの生じにくさと相関を示した。今回解析した多型の中ではGRIN2A遺伝子の(GT)_n繰り返し多型の生理作用が確認されており、リピート数が多いと転写活性が低下し、NMDA受容体結合が低下するが、覚せい剤精神病患者では健常者に比べて有意にリピート数が多かった。従って、NMDA受容体を介したシグナリングが低下する状態が覚せい剤乱用による精神病症状の合併しやすさを生じると考えられた。この知見は統合失調症での結果と一致しており、昨年までの成果と同様に、グルタミン酸神経伝達異常は疾患を超えて、精神病症状自体の発症脆弱性に関わると考えられた。

平成21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 （依存性薬物による精神依存に対するガランタミンの作用）

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 古関竹直¹

（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]

覚せい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。覚せい剤の乱用により精神依存とともに幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した精神障害も惹起する。覚せい剤による精神依存は、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、精神依存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、ガランタミンはニコチン様アセチルコリン受容体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。ガランタミンがアルコール依存に対して治療効果があるという報告から、本研究では、METH による精神依存に対するガランタミンの作用について検討を行った。ガランタミン (3 mg/kg) の投与は METH 投与により認められる運動量増加/行動感作、条件付け場所嗜好性試験における場所嗜好性、および薬物自己投与試験における再燃を抑制した。また、ガランタミンの投与は脳内報酬系の投射先である側坐核における METH 投与による細胞外ドパミン遊離量の増加を抑制した。METH 投与により誘発される運動量増加/行動感作に対するガランタミンの抑制効果はニコチン様アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンおよびムスカリ様アセチルコリン受容体拮抗薬であるスコポラミンの併用投与により拮抗された。一方、METH 投与により誘発される場所嗜好性に対するガランタミンの抑制効果はメカミラミンの併用投与では拮抗されなかったが、スコポラミンの併用投与により拮抗された。以上のことから、ガランタミンは METH 精神依存の指標となる行動変化およびそれらに関連した側坐核ドパミン細胞外遊離量増加を抑制し、それら効果はニコチン様ならびにムスカリ様アセチルコリン受容体の刺激によるものと考えられる。

A. 研究目的

依存性薬物による芸能人の逮捕が連日報道され、薬物乱用が確実に社会に浸透してきている。3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) お

よび大麻は安全という誤解から、乱用される場合もあり、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、軽はずみにこのような依存性薬物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依存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とともに精神依存も惹起する^{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⁾。これまで、ガラントミンが依存性薬物あるフェンシクリジン (PCP) および METH による精神・認知障害に対して有効性を示すことを明らかにした⁴⁻⁶⁾。また、ガラントミンがアルコール依存に対して有効であることが臨床的に報告されている⁷⁾。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依存に対する治療薬としての可能性がある。本研究は METH 投与により認められる精神依存とそれに関連したドパミン作動性神経系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 および C57BL/6J 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, s.c.) あるいは saline (10 ml/kg, s.c.) を投与したマウスを実験に使用した。ガラントミン (p.o.), メカミラミン (s.c.), およびスコポラミン (s.c.) は、体重あたり 10 ml/kg の用量で METH 投与の 30 分前に投与し、対照群には同用量の saline を投与した。

3. 運動量測定試験

METH (1 mg/kg) を 1 日 1 回 7 日間連続皮下投与し、METH 投与 1 日目および 7 日目に、投与直後からマウスを自発運動量測定ケージ (縦 30 cm, 横 47.5 cm, 高さ 35 cm) に入れ、投与直後から 2 時間の自発運動量を SCANET SV-10, メルクエスト, 富山) により測定した。

4. 条件づけ場所嗜好性試験

試験には、実験者が任意にギロチンドアで仕切ることができる黒色の部屋および床面に白色の網を敷いた透明の部屋からなるアクリル製の装置を使用した。装置に対する馴化は 2 日間行い、装置内のギロチンドアを開けた状態で、マウスを装置に入れ 20 分間自由に探索させた。馴化の翌日

に、マウスを装置に 15 分間入れて各部屋に滞在した時間を測定した。条件づけはギロチンドアを閉めた状態で 6 日間行い、1 日目、3 日目、5 日目には METH (10 mg/kg, s.c.) 投与直後に片方の部屋へ、2 日目、4 日目、6 日目には生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) 投与直後にもう片方の部屋へそれぞれ 20 分間マウスを閉じ込めた。なお、閉じ込める部屋は、カウンターバランス法により各群において各部屋に滞在した時間が均等になるように割り付けた。条件付け終了 24 時間後の 10 日目に、3 日目の Pre test と同様にしてマウスに装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した。3 日目の Pre test において、METH 投与側の部屋に滞在した時間から生理食塩水投与側の部屋に滞在した時間を引いたものを preconditioning value とし、10 日目の postconditioning value も同様にして求めた。さらに postconditioning value から preconditioning value を引いた値を post-pre value とし、場所嗜好性の指標とした。

5. 自己投与試験法

食餌オペラント条件付けでは、nose-poke センサー (ENV-313M, Med Associates) とランプが設置してある 2 つの穴と、その上方に食餌関連環境刺激となる Cue ランプ、2 つの穴の間にある 2.25×2.25 cm の開口部につながっている食餌分配装置 (ENV-203-20, Med Associates) が備わった標準的マウスオペラント箱型装置を用いた。食餌オペラント条件付けにおいて、1 つの穴を active ホール、もう片方の穴を inactive ホールとし、active ホールのランプとその上方にある Cue ランプが点灯している間にマウスが active ホールに鼻を突っ込むと、食餌ペレット (dustless precision pellets 20 mg, A Holton Industries Co, Frenchtown, NJ, USA) が 1 粒、開口部に分配されるようにした。それぞれのホールに鼻を突っ込んだ回数を MED-PC ソフトウエ

ア (Med Associates) により記録した。マウスを 20 時間以上絶食させ、翌日にマウスを食餌オペラント装置内に入れ、Fix ratio 1 (FR1) スケジュールで 3 時間、食餌オペラント条件付けを行った。再度絶食させ、24 時間後に FR1 スケジュールで食餌オペラント条件付けを行った。2 日目のセッションにおいて、食餌を 50 粒以上獲得したマウスをメタンフェタミン自己投与に使用した。食餌による条件付けから 2 日後にペントバルビタールの麻酔下で留置カテーテルを頸静脈に挿入した。

手術後 3 日間の回復期間の後に、メタンフェタミン自己投与、消去訓練、およびメタンフェタミン探索行動試験を行った。メタンフェタミン自己投与装置は、nose-poke センサーとランプが設置してある 2 つの穴をそれぞれ active ホールおよび inactive ホールとし、active ホールとその上方にある Cue ランプが点灯している間にマウスが active ホールに鼻を突っ込むと、インジェクションポンプが作動してメタンフェタミンが投与されるようにした。FR1 スケジュールにてメタンフェタミン自己投与セッションを 5 日間行った。最低でも 60% 以上 active ホールに鼻を突っ込み、2 セッション連続で 10 回以上メタンフェタミンを自己投与したマウスは、翌日より FR2 スケジュールに切り替え、3 セッション連続で active ホールに鼻を突っ込む回数の誤差が 15% 以内に到達した場合、メタンフェタミン自己投与を獲得したと判断した。次に消去訓練を行った。active ホールのランプとその上方の Cue ランプを消灯し、さらに active ホールに鼻を突っ込んでもメタンフェタミンが自己投与されないように設定し、2 セッション連続で active ホールに 20 回以上鼻を突っ込まなくなったら、メタンフェタミン自己投与が消去されたものと判断した。

消去訓練後、薬物関連環境刺激によるメタンフェタミン探索行動試験を行った。本試験では、active ホールのランプとその上方の Cue ランプは

点灯するが、メタンフェタミンは自己投与されない設定で、マウスを装置内にいれた。ランプがついているときに鼻を突っ込むと、メタンフェタミンを得られることを思い出し、マウスが激しく穴に鼻を突っ込む回数を渴望状態の指標として検討した。この強い渴望状態に対するガラントアミンの効果を検討するため、1日目はsalineを、2,3,4日目はそれぞれガラントアミンの0.1, 0.3, 1.0 mg/kg, s.c.を、5日目には再度salineをセッション開始の30分前に投与し、activeホールに鼻を突っ込んだ回数を計測した。

6. マイクロダイアリス法

マウスをペントバルビタール麻酔下において左側坐核 (AP+1.7, ML+0.75, DV+4.0) にガイドカニューレを挿入した。翌日、人工脳脊髄液を還流させた透析用プローブをガイドカニューレに挿入した。プローブを還流した人工脊髄液を回収し、高速液体クロマトグラフィー (HTEC-500, エイコム, 京都) により液中のドパミン量を測定した。透析された細胞外ドパミン量が1時間以上安定したことを確認し、METH (1 mg/kg, s.c.) を投与した。

7. 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、Fisher の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が5%未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. METH 投与により認められる運動量増加/行動感作に対するガラントアミンの効果

ICR 系雄性マウスにMETH (1 mg/kg, s.c.) を7日間連続投与し、1日目 (acute) および7日目 (chronic) に運動量を測定したところ、いずれの

測定日の運動量も saline 投与マウスのそれらに比べて有意に増加した (Fig. 1)。METH 投与7日目のマウスの運動量は、投与1日目のそれに比べて有意に増加しており、行動感作が認められた (Fig. 1)。このようなMETH投与による運動量増加および行動感作はガラントアミン (0.3 および 3 mg/kg, p.o.) の前投与により、用量依存的に抑制された (Fig. 1)。一方、ガラントアミンの前投与は saline 投与マウスの運動量に対して有意な影響を与えなかった (Fig. 1)。

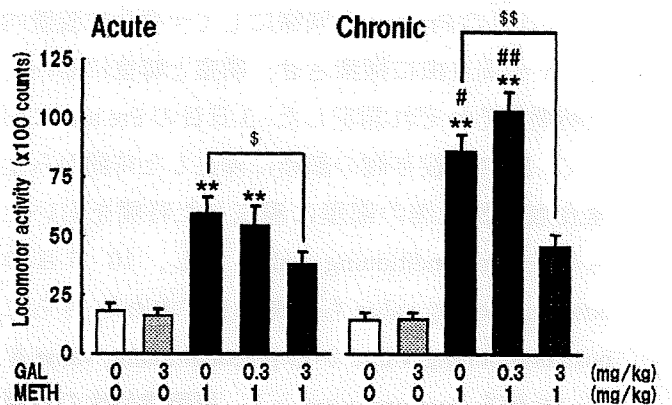


Fig. 1. The effect of galantamine on METH-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization. Mice were treated with GAL (0.3 and 3 mg/kg p.o.) 30min before METH (1 mg/kg s.c.) or saline (SAL) administration once a day for 7days. Locomotor activity was measured for 120min on the 1st (acute) and 7th (chronic) day. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 9-15). Values indicate the mean \pm S.E. (n = 9-15). **p < 0.01 compared with SAL/SAL-treated group, #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with corresponding acute-treated group, respectively, \$p < 0.05, \$\$p < 0.01 compared with SAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine.

2. METH 投与により認められる場所嗜好性に対するガラントアミンの効果

ICR 系雄性マウスにMETH (1 mg/kg, s.c.) を用いて条件づけを行ったところ、saline 投与マウスに比べて post-pre value が有意に増加し、場所嗜好性の形成が認められた (Fig. 2)。このようなMETH投与による post-pre value の増加はガラントアミン (0.3 および 3 mg/kg, p.o.) の前投与により、用量依存的に抑制された (Fig. 2)。一方、ガラントアミンの前投与は saline 投与マウスの post-pre value に対して有意な影響を与えなかった。

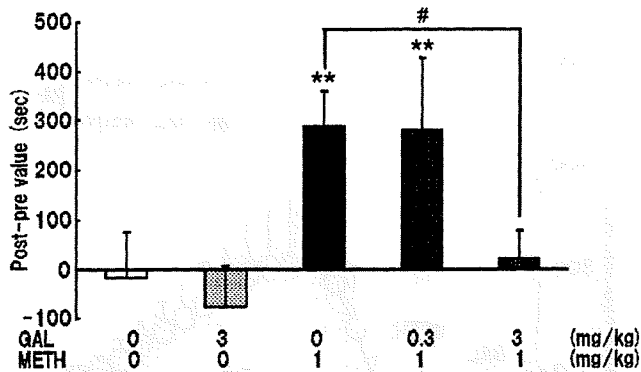


Fig. 2. The effect of galantamine on METH-induced place preference. Mice were treated with GAL (0.3 and 3 mg/kg p.o.) 30min before METH (1 mg/kg s.c.) or saline (SAL) administration during conditioning. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 9-14). **p < 0.01 compared with SAL/SAL-treated group, #p < 0.05 compared with SAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine.

3. METH 投与マウスに認められる刺激による再燃に対するガランタミンの効果

C57BL/6J 系雄性マウスにおける食餌条件付けから消去訓練までの一連の active および inactive ホールに対する鼻を突っ込む回数の変化を測定した (Fig. 3). 2 日間の食餌オペラント条件付けでマウスは active と inactive ホールを有意に弁別した (Fig. 3). METH 自己投与において, FR1 スケジュール下では L4-L5 セッション連続で 10 回以上 active ホールに鼻を突っ込む行動がみられ, また L5 セッションでは active ホールの方を 60%以上弁別して鼻を突っ込む行動がみられるようになった (Fig. 3). FR2 スケジュール下では active ホールを弁別して約 40 回前後鼻を突っ込む行動がみられ, FR2 スケジュールの L3 セッションにおける active ホールに鼻を突っ込む回数は, FR1 スケジュールの L3 セッションにおける active ホールに鼻を突っ込む回数に比べ, 有意に増加した (Fig. 3A). 消去訓練の L2, L3 セッションでは, active ホールに鼻を突っ込む回数が 20 回以下となり, METH 自己投与の消去がみられた (Fig. 3).

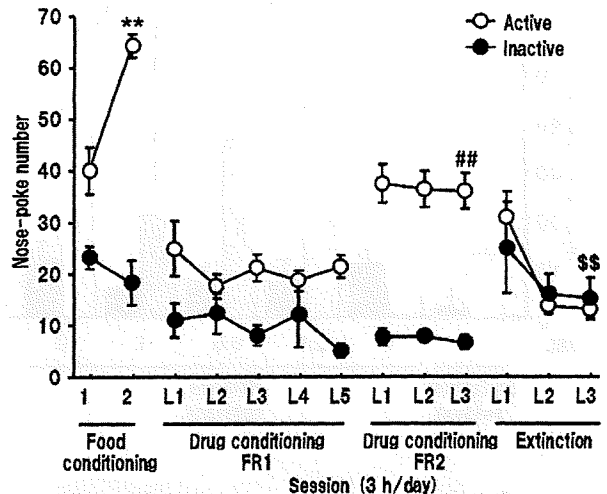


Fig. 3. Nose-poke responses during METH self-administration task. Nose-poke number during food conditioning, the last 5 sessions (session L1-L5/ FR1) and the last 3 sessions (session L1-L3/ FR2) of METH self-administration under FR1 and FR2 schedules and the last 3 sessions (L1-L3/ Extinction) of extinction training in C57BL/6J mice. Values are mean \pm S.E. (n=8). **P < 0.01 compared with inactive nose-poke number, ##P < 0.01 compared with active nose-poke number on the last day (session L5) of the FR1 schedule, \$\$P < 0.01 compared with active nose-poke number on the last day (session L3) of the FR2 schedule.

次に, 薬物関連環境刺激による METH 探索行動およびガランタミンの影響を検討した (Fig. 4). 十分な消去訓練により active ホールに鼻を突っ込んだ回数が減少していることが認められたマウスに, Saline を投与し薬物関連環境刺激を提示すると鼻を突っ込んだ回数が消去訓練時のそれと比較して有意な増加が認められた (Fig. 4). そのような active ホールに鼻を突っ込んだ回数の増加はガランタミン (0.1, 0.3 および 1 mg/kg, p.o.) の前投与により, 用量依存的に減少した (Fig. 4).

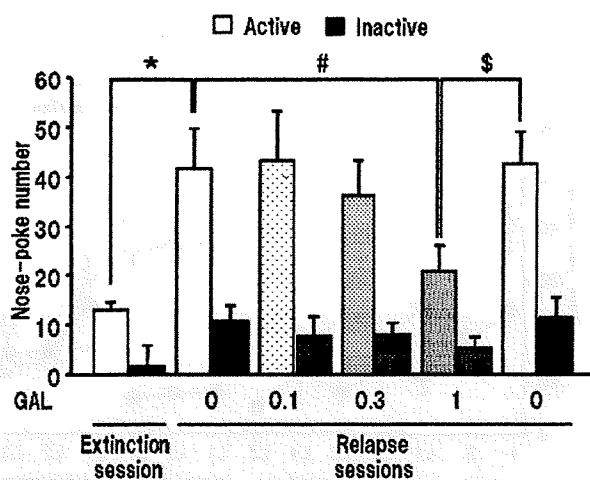


Fig. 4. The effect of galantamine on cue-induced relapse in METH-treated mice. Nose-poke responses during last extinction session and 5 sessions (GAL 0-1 mg/kg) of cue-induced reinstatement of drug-seeking behavior were shown. Values are mean±S.E. (n=8). *p<0.05 compared with active nose-poke number in extinction session, #p<0.05 compared with active nose-poke number in the 1st day of relapse phase, \$p<0.05 as compared with active nose-poke number in the 4th day of relapse sessions. SAL: Saline, GAL: Galantamine.

4. METH 投与により認められる側坐核ドパミン細胞外遊離量増加に対するガランタミンの効果
ICR 系雄性マウスの側坐核における細胞外ドパミン遊離量を in vivo マイクロダイアリス法により測定した。METH (1 mg/kg, s.c.) 投与によりマウスの側坐核における細胞外ドパミン遊離量は有意に増加した (Fig. 5)。この METH 投与による細胞外ドパミン遊離量の有意な増加は、ガランタミン (3 mg/kg, p.o.) の前投与により有意に抑制された (Fig. 5)。

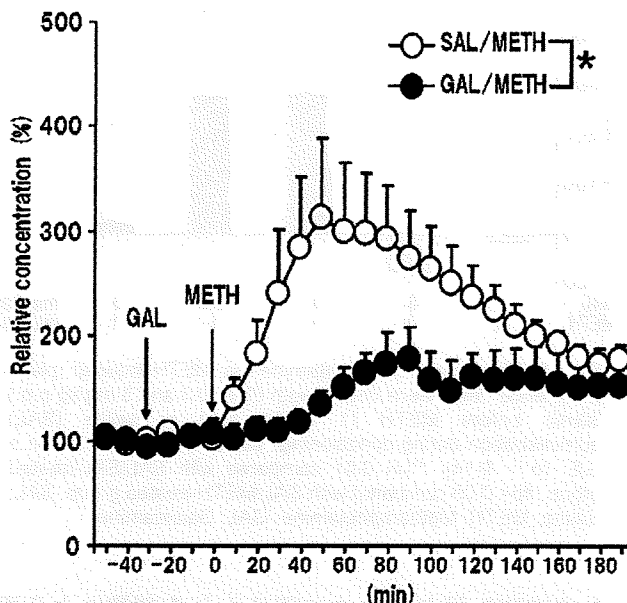


Fig. 4. The effect of galantamine on METH-induced dopamine release in nucleus accumbens. METH (1 mg/kg s.c.)-induced dopamine release was measured in the nucleus accumbens. Gal was pretreated 30min before METH treatment. Values are the means ±S.E. * p< 0.05 vs. SAL/METH-treated mice. SAL: saline, METH; methamphetamine, GAL: Galantamine.

5. ガランタミンの METH による運動量増加/行動感作および場所嗜好性形成への抑制作用に対するメカミラミンの作用
ガランタミンの METH による運動量増加/行動感作および場所嗜好性形成への抑制作用におけるニコチン様アセチルコリン受容体の関与について検討を行った。ICR 系雄性マウスに認められた METH 投与による運動量増加 および行動感作に対するガランタミンの前投与の抑制効果はニコチン様アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミン (3 mg/kg, p.o.) の併用投与により拮抗された (Fig. 6)。また、メカミラミン (3 mg/kg, s.c.) の前投与は saline 投与マウスの運動量に対して有意な影響を与えなかった (Fig. 6)。