

Fig. 6. The involvement of nicotinic acetylcholine receptor in suppressive effect of galantamine on METH-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization. Mice were treated with MEC (3 mg/kg s.c.) and GAL (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 120 min on the 1st (acute) and 7th (chronic) day. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 10-15). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with SAL/SAL/SAL-treated group, # p < 0.05 compared with corresponding acute-treated group, respectively, \$\$ p < 0.01 compared with SAL/SAL/METH-treated group, \$\$\$ p < 0.01 compared with SAL/GAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine, MEC: Mecamylamine.

一方、ICR系雄性マウスに認められたMETH投与による場所嗜好性に対するガランタミンの前投与の抑制効果はメカミラミン (3 mg/kg, s.c.) の併用投与では拮抗されなかった (Fig. 7).

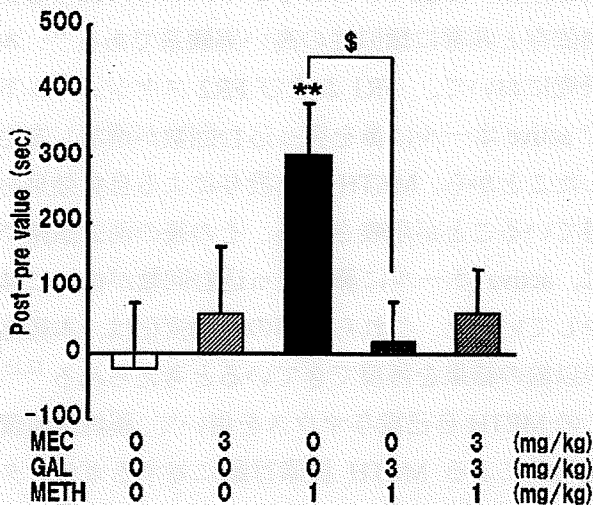


Fig. 7. The involvement of nicotinic acetylcholine receptor in suppressive effect of galantamine on METH-induced place preference. Mice were treated with MEC (3 mg/kg s.c.) and GAL (3 mg/kg p.o.) 30min before METH (1 mg/kg s.c.) or saline (SAL) administration during conditioning. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 10-17). ** p < 0.01 compared with SAL/SAL/SAL-treated group, # p < 0.05 compared with SAL/SAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine, MEC: Mecamylamine.

6. 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スコポラミンの作用

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ムスカリ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による抑制効果はムスカリン様アセチルコリン受容体拮抗薬であるスコポラミン (0.05 mg/kg, s.c.) の併用投与により拮抗された (Fig. 8)。また、スコポラミンの前投与は 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. 8)。

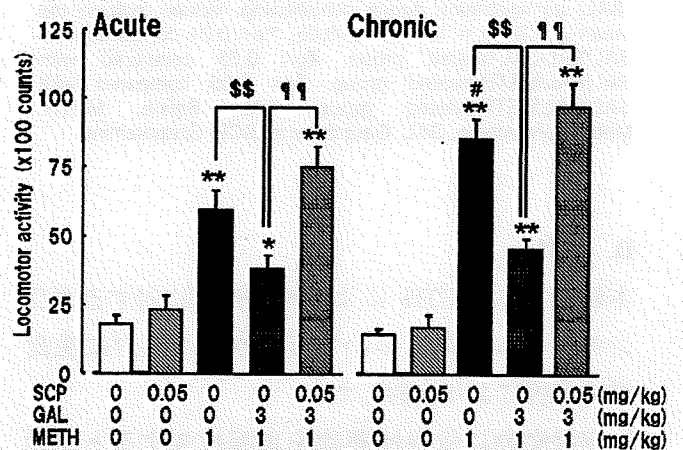


Fig. 8. The involvement of muscarinic acetylcholine receptor in suppressive effect of galantamine on METH-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization. Mice were treated with SCP (0.05 mg/kg s.c.) and GAL (3 mg/kg p.o.) 30min before METH (1 mg/kg s.c.) or saline (SAL) administration once a day for 7days. Locomotor activity was measured for 120min on the 1st (acute) and 7th (chronic) day. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 10-15). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with SAL/SAL/SAL-treated group, # p < 0.05 compared with corresponding acute-treated group, respectively, \$\$ p < 0.01 compared with SAL/SAL/METH-treated group, \$\$\$ p < 0.01 compared with SAL/GAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine, SCP: Scopolamine.

ICR系雄性マウスに認められたMETH投与による場所嗜好性に対するガランタミンの前投与の抑制効果はスコポラミンの併用投与により拮抗された (Fig. 9)。また、スコポラミン (0.05 mg/kg, s.c.)

の前投与は saline 投与マウスの場所嗜好性に対して有意な影響を与えなかった (Fig. 9).

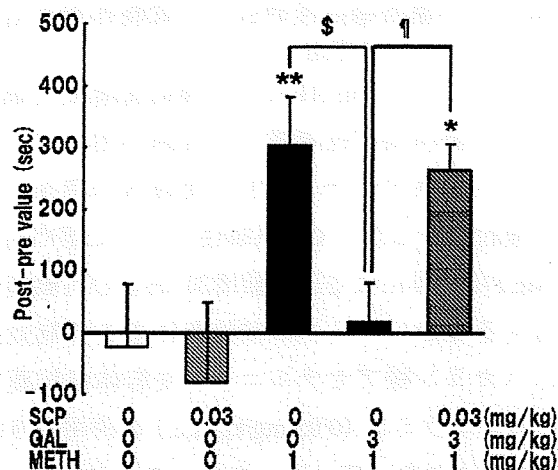


Fig. 9. The involvement of muscarinic acetylcholine receptor in suppressive effect of galantamine on METH-induced place preference. Mice were treated with SCP(0.03mg/kg s.c.) and GAL (3 mg/kg p.o.) 30min before METH (1 mg/kg s.c.) or saline (SAL) administration during conditioning. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 10-17). * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with SAL/SAL/SAL-treated group, # p < 0.05 compared with SAL/SAL/METH-treated group, \$ p < 0.05 compared with SAL/GAL/METH-treated group. SAL: Saline, METH: Methamphetamine, GAL: Galantamine, SCP: Scopolamine.

D. 考察

本研究では METH による精神依存に対するガラントミンの効果について行動学的ならびに生化学的解析により検討した。

実験動物に依存性薬物を単回投与すると運動量増加が認められるが、連続投与するに伴い、薬物に対する感受性が亢進し、その結果、運動量増加が亢進する(行動感作)⁸⁾。この効果は長期断薬後も薬物の再投与や非特異的ストレスによって再現される⁸⁾。そのため、行動感作は精神依存の指標として考えられている。本研究において METH (1 mg/kg, s.c.) の7日間連続投与により、運動量増加ならび行動感作の形成が認められた(Fig. 1)。ガラントミン (3 mg/kg, p.o.) の前投与は METH 連続投与による運動量増加ならび行動感作の形成を抑制したことから、METH による精神障害に対してガラントミンが有効であることが示唆された。

条件づけ場所嗜好性試験は、動物に依存性薬物を投与した時、薬物が引き起こす感覚効果(中枢神経作用)と環境刺激(環境の差異に基づく視覚、触覚など)を結びつけさせることにより、動物が依存性薬物を投与された環境に長く滞在するようになる現象を指標として、依存性薬物の薬物報酬効果の発現強度、つまり精神依存を検討することができる^{9,10)}。行動感作の形成が認められた METH (1 mg/kg, s.c.) の投与量により、条件付け場所嗜好性試験においてマウスは場所嗜好性を示し、ガラントミン (3 mg/kg, p.o.) の前投与によりその場所嗜好性は抑制された。以上より、METH (1 mg/kg, s.c.) の投与により精神依存を形成し、METH の連続投与により精神障害を惹起し、それらに対してガラントミンが有効な抑制効果を示すこと示唆された。

薬物自己投与法は動物がレバーを押すなどして自ら薬物を摂取し、休薬過程を経て薬物関連環境刺激の再提示や少量の薬物再投与をすることで薬物に対する渴望状態を再現した薬物探索行動を観察、評価できることから、ヒトにおける薬物依存と非常に類似性の高い実験系である¹¹⁾。本研究において、FR1 および FR2 スケジュール下で active ホールに鼻を突っ込む回数が増加し安定したことから、METH 自己投与による自覚効果を得ていることが示唆される。その後の消去訓練では、active ホールに鼻を突っ込む回数が徐々に減少していった。これら一連の行動変化は、本教室の以前の結果を再現できていると考えられる^{12,13)}。この METH 自己投与マウスを用いて、薬物関連環境刺激による METH 探索行動に対するガラントミンの影響を検討したところ、ランプを再提示することにより惹起される active ホールに鼻を突っ込む行動の回数の有意な増加は、ガラントミン (1 mg/kg, p.o.) の前投与により有意に抑制された。

中枢興奮薬による薬物報酬効果は中脳の腹側被蓋野から側坐核に投射するドパミン作動性中

脳皮質辺縁系投射路が中心的な役割を担っている¹⁴⁾。投射先の側坐核は、中枢興奮薬により惹起される精神行動障害および精神依存の形成・発現に関与しており¹⁴⁾、側坐核における細胞外ドパミン遊離量が行動感作と関係していることが示唆されている¹⁵⁾。本研究において METH (1 mg/kg, s.c.) の投与による側坐核ドパミン細胞外遊離量の増加はガラントミン (3 mg/kg, p.o.) の前投与により有意に抑制されたことから、ガラントミンの METH により誘発される精神依存関連行動に対する抑制効果は側坐核におけるドパミン伝達の調節に関与していることが示唆される。

自己投与試験においてニコチンがラットに認められる METH 薬物探索行動を抑制し^{16,17)}、また臨床研究において、ニコチンの摂取によりコカインによる高揚感が抑制されるとの報告があることから¹⁸⁾、ニコチン様アセチルコリン受容体が薬物探索行動において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。本研究ではガラントミンの METH により誘発される精神依存関連行動に対する抑制効果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、メカミラミンを併用投与することで検討したところ、メカミラミン (3 mg/kg, s.c.) の併用投与はガラントミンの METH による運動量増加/行動感作への抑制作用は拮抗したが、場所嗜好性形成への抑制作用は拮抗しなかった。今後はさらにメカミラミンの他の用量について詳細に検討し、行動試験の違いによるガラントミンの作用機序の違いについて検討する必要がある。一方、ムスカリン様アセチルコリン受容体の拮抗薬併用やその遺伝子欠損により依存性薬物による運動量増加/行動感作および場所嗜好性の形成が亢進されることが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。本研究においてもムスカリン様アセチルコリン受容体拮抗薬であるスコポラミン (0.05 mg/kg, s.c.) の併用投与によりガラントミンの 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は拮抗された。したがって、ガラントミンの 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はニコチン様ならびにムスカリン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。

E. 結論

ガラントミンは 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ン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。

[参考文献]

- 1 : Cruickshank CC, Dyer KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*. 104:1085-99 (2009).
- 2 : Srisurapanont M, Ali R, Marsden J, Sunga A, Wada K and Monterio M: Psychotic symptoms in methamphetamine psychotic in-patients. *Int J Neuropsychopharmacol*, 6: 347-352 (2003).
- 3 : Samochocki M, Höffle A, Fehrenbacher A, Jostock R, Ludwig J, Christner C, Radina M, Zerlin M, Ullmer C, Pereira EF, Lübbert H, Albuquerque EX, Maelicke A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 305:1024-1036 (2003).
- 4 : Wang D, Noda Y, Zhou Y, Nitta A, Furukawa H and Nabeshima T. Synergistic effect of galantamine with risperidone on impairment of social interaction in phencyclidine-treated mice as a schizophrenic animal model. *Neuropharmacology*, 52: 1179-87 (2007).
- 5 : Wang D, Noda Y, Zhou Y, Nitta A, Furukawa H and Nabeshima T. Synergistic effect of combined treatment with risperidone and galantamine on phencyclidine-induced impairment of latent visuospatial learning and memory: Role of nAChR

- activation-dependent increase of dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission. *Neuropharmacology*, 53: 379-89 (2007).
- 6 : Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Wang D, Nabeshima T. Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors, dopaminergic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 systems. *Int J Neuropsychopharmacology*, inpress, (2010).
- 7 : Mann K, Ackermann K, Diehl A, Ebert D, Mundle G, Nakovics H, Reker T, Richter G, Schmidt LG, Driessen M, Rettig K, Opitz K and Croissant B. Galantamine: a cholinergic patch in the treatment of alcoholism: a randomized, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)*, 184: 115-21 (2006).
- 8 : Sato M, Numach Y, Hamamura T. Relapse of paranoid psychotic state in methamphetamine model of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 18:115-122 (1992).
- 9 : Jeffrey M, Lieberman, Steven J. Cooper.:*The Neuropharmacological basis of reward* Clarendon Press, Oxford. 264-319 (1989).
- 10 : Bozarth MA.:*Methods of assessing the reinforcing properties of abused drug*. Springer. 241-273 (1987).
- 11 : Arroyo M, Markou A, Robbins TW and Everitt BJ. Acquisition, maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration under a second-order schedule of reinforcement in rats: effects of conditioned cues and continuous access to cocaine. *Psychopharmacology (Berl)*, 140: 331-44 (1998).
- 12 : Yan Y, Nitta A, Mizoguchi H, Yamada K and Nabeshima T. Relapse of methamphetamine-seeking behavior in C57BL/6J mice demonstrated by a reinstatement procedure involving intravenous self-administration. *Behav Brain Res*, 168: 137-43 (2006).
- 13 : Yan Y, Yamada K, Niwa M, Nagai T, Nitta A and Nabeshima T. Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial-cell-line-derived neurotrophic factor mutant mice. *FASEB J*, 21:1994-2004 (2007)
- 14 : Koob GF. Drug of abuse: Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 13:177-184 (1992).
- 15 : Erinoff L, Brown RM .: *Neurobiological models for evaluating mechanisms underlying cocaine addiction*. National Institute on Drug Abuse Research Monograph, 145, US Government Printing Office (1994).
- 16 : Hiranita T, Anggadiredja K, Fujisaki C, Watanabe S and Yamamoto T. Nicotine attenuates relapse to methamphetamine-seeking behavior (craving) in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1025: 504-507 (2004).
- 17 : Hiranita T, Nawata Y, Sakimura K, Anggadiredja K and Yamamoto T. Suppression of methamphetamine-seeking behavior by nicotinic agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 8523-8527 (2006).
- 18 : Kouri EM, Stull M and Lukas SE. Nicotine alters some of cocaine's subjective effects in the absence of physiological or pharmacokinetic changes. *Pharmacol Biochem Behav*, 69:209-17 (2001).
- 19 : Thomsen M, Conn PJ, Lindsley C, Wess J, Boon JY, Fulton BS, Fink-Jensen A, Caine SB. Attenuation of Cocaine's Reinforcing and Discriminative Stimulus Effects via Muscarinic M1 Acetylcholine Receptor Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Mar;332(3):959-69.
- 20 : Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:15312-15317 (2001).
- 21 : Lee KW, Tian YH, You IJ, Kwon SH, Ha RR, Lee SY, Kim HC, Jang CG. Blockade of M1 muscarinic acetylcholine receptors modulates the methamphetamine-induced psychomotor stimulant effect. *Neuroscience*, 153:1235-44 (2008).

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Noda Y, Mouri A, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Wang D, Nabeshima T. Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors, dopaminergic-extracellular signal-regulated kinase 1/2 systems. *Int J Neuropsychopharmacology*, In press, 2010.
2. Alkam T, Nitta A, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T. Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. *Behav Brain Res*, In press, 2010.
3. Ikeda M, Tomita Y, Mouri A, Koga M, Okochi T, Yoshimura R, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Hashimoto R, Williams HJ, Takeda M, Nakamura J, Nabeshima T, Owen MJ, O'Donovan MC, Honda H, Arinami T, Ozaki N, Iwata N. Identification of Novel Candidate Genes for Treatment Response to Risperidone and Susceptibility for Schizophrenia: Integrated Analysis Among Pharmacogenomics, Mouse Expression, and Genetic Case-Control Association Approaches. *Biol Psychiatry*, 67, 263-269, 2010.
4. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Nabeshima T. Prenatal exposure to phencyclidine produces abnormal behaviour and NMDA receptor expression in postpubertal mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, In press, 2010.
5. Miwa M, Uchida S, Horiba F, Takeshima H, Nabeshima T, Hiramatsu M. Nociceptin and its metabolite attenuate U0126-induced memory impairment through a nociceptin opioid peptide (NOP) receptor-independent mechanism. *Neurobiol Learn Mem*, 93, 396-405, 2010.
6. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, Gruber AJ, Tomita K, Lu L, Tomisato S, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Hiyama H, Huang B, Kohda K, Noda Y, O'Donnell P, Nakajima K, Sawa A, Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits *Neuron*, 65, 1-10, 2010
7. Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Niwa M, Kim HC, Zou LB, Nagai T, Yamada K, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin attenuates cognitive deficits and decreases of dopamine and serotonin induced by repeated methamphetamine treatment. *Behav Brain Res* 207, 387-393, 2010.
8. Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The Role of Cyclophilin D in Learning and Memory. *Hippocampus* 20, 293-304, 2010.
9. Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav Brain Res* 206,

- 32-37, 2010.
10. Kurata K, Maruyama S, Kato S, Sato W, Yamamoto J, Ozaki T, Nitta A, Nabeshima T, Morita Y, Mizuno M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Tissue-type plasminogen activator deficiency attenuates peritoneal fibrosis in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, 1510-1517, 2009.
 11. Mizoguchi H, Arai S, Koike H, Ibi D, Kamei H, Nabeshima T, Kim HC, Takuma K, Yamada K. Therapeutic potential of nicotine for methamphetamine-induced impairment of sensorimotor gating: involvement of pallidotegmental neurons. *Psychopharmacology (Berl)* 207, 235-243, 2009.
 12. Ibi D, Nitta A, Ishige K, Cen X, Ohtakara T, Nabeshima T, Ito Y. Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Int* 56, 77-83, 2009.
 13. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Niwa M, Hiramatsu M, Zou LB, Nagai T, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin attenuates amyloid 25-35 peptide-induced memory impairments: Implication of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 319-326, 2009.
 14. Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa KH, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T, Yamada K. Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid β -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 14-22, 2009.
 15. Shin EJ, Bing G, Chae JS, Kim TW, Bach JH, Park DH, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Role of Microsomal Epoxide Hydrolase in Methamphetamine-induced Drug Dependence in Mice. *Journal of Neuroscience Research* 87, 3679-3686, 2009.
 16. Jin CH, Shin EJ, Park JB, Jang CG, Li Z, Kim MS, Koo KH, Yoon HJ, Park SJ, Choi WC, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Fustin flavonoid attenuates β -amyloid (1-42)-induced learning impairment. *J Neurosci Res* 87, 3658-70, 2009.
 17. Tomida S., Mamiya T., Sakamaki H., Miura M., Aosaki T., Niwa M., Kameyama T., Kobayashi J., Iwaki Y., Imai S., Ishikawa A., Abe K., Yoshimura T., Nabeshima T., and Ebihara S. Identification of Usp46, encoding a ubiquitin specific peptides, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test *Nature Genetics* 43, 648-653, 2009.
 18. Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, Hiramatsu M, Ikejima T, Nabeshima T. Silibinin prevents amyloid β peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice.:Silibinin and memory deficits. *British Journal of Pharmacology* 157, 1270-1277, 2009.
 19. Shin EJ, Jang CG, Bing G, Park DH, Oh CH, Koo KH, Oh KW, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Prodynorphin gene deficiency potentiates nalbuphine-induced behavioral sensitization and withdrawal syndrome in mice. *Drug and Alcohol Dependence* 104, 175-184, 2009.

20. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda Y, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K. Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci Res* 64, 297-305, 2009.
21. Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res* 202, 114-121, 2009.
22. Hritcu L, Clicinschi M, Nabeshima T. Kainic acid lesion-induced spatial memory deficits of rats. *Central Europe. Journal of Biology* 4, 179-185, 2009.
23. Villard V, Espallergues J, Keller E, Alkam T, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T, Vamvakides A, Maurice T. Antiamnesic and Neuroprotective Effects of the Aminotetrahydrofuran Derivative ANAVEX1-41 Against Amyloid beta(25-35)-Induced Toxicity in Mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 1552-1566, 2009.
24. Shin EJ, Chae JS, Park SJ, Kim SC, Koo KH, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC. Growth hormone-releaser diet attenuates beta-amyloid(1-42)-induced cognitive impairment via stimulation of the insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in mice. *J Pharmacol Sci* 109, 139-143, 2009.
25. Lu L, Mamiya T, Lu P, Niwa M, Mouri A, Zou LB, Nagai T, Hiramatsu M, Nabeshima T. The long-lasting effects of cross-fostering on the emotional behavior in ICR mice. *Behav. Brain Res* 198, 172-178, 2009.
26. Niwa M, Nitta A, Cen X, Kitaichi K, Ozaki N, Yamada K, Nabeshima T. A novel molecule shati increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- in pheochromocytoma-12 cells: Shati increases dopamine uptake via TNF- α . *J Neurochem* 107, 1697-1708, 2009.
27. Nagai T, Murai R, Matsui K, Kamei H, Noda Y, Furukawa H, Nabeshima T. Aripiprazole ameliorates phencyclidine-induced impairment of recognition memory through dopamine D1 and serotonin 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 202, 315-328, 2009.
28. Miwa M, Shinki C, Uchida S, Hiramatsu M. Distinct effects of nociceptin analogs on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Eur J Pharmacol* 602, 328-333, 2009.
29. Yan Y, Nabeshima T. Mouse model of relapse to the abuse of drugs: Procedural considerations and characterizations. *Behav. Brain Res.* 196, 1-10, 2009
30. 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆 第1編 行動薬理研究における実験技術 10 統合失調症動物モデルとその評価法 実践行動薬理学, 79-93, 2010.
31. 野田幸裕, 毛利彰宏, 脇由香里, 鍋島俊隆 臨床知見に基づいた統合失調症動物モデルを作製するために - 統合失調症モデル作成のため, 基礎研究者が臨床医に臨むこと - 日本神経薬理学雑誌 29 巻, 2 号, 47-53, 2009.

2. 学会発表

1. 溝口博之, 田熊一徹, 衣斐大祐, アルカムトルソン, 毛利彰宏, 野田幸裕, 鍋島俊隆, 山

- 田清文: アミロイド蛋白により誘発される記憶障害における Matrix metaroproteinases の役割: 第 115 回日本薬理学会近畿部会 金沢 (2009. 6)
2. 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile による抗うつ効果の解析: 第 115 回日本薬理学会近畿部会 金沢(2009. 6)
 3. 山田真之亮, 永井拓, 吉見陽, 野田幸裕, 尾崎紀夫: 精神疾患発症脆弱性因子の網羅的解析による病態解明のためのアプローチ第 55 回 (平成 21 年度) 日本薬学会東海支部総会・大会 名古屋 (2009. 7)
 4. 毛利彰宏, 野田 幸裕, Dayong Wang, 安藤雄, 脇由香里, 古関竹直, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: 覚せい剤により誘発される精神障害に対するガラントミンの効果: 第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム (第 44 回日本アルコール・薬物医学会・第 21 回日本アルコール精神医学会・平成 21 年度合同学術総会) 横浜 (2009. 9)
 5. 永井拓, 鍋島俊隆, 山田清文: ニコチンの報酬効果における組織プラスミノージェン活性化因子の関与: 第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム (第 44 回日本アルコール・薬物医学会・第 21 回日本アルコール精神医学会・平成 21 年度合同学術総会) 横浜 (2009. 9)
 6. 丹羽美苗, Hanna JP, 尾崎紀夫, 澤明, 鍋島俊隆: 隔離飼育ストレス負荷 Disrupted-in-Schizophrenia-1 変異遺伝子過剰発現マウスは新規統合失調症および気分障害病態モデルマウスとして有用である: 第 52 回日本神経化学学会大会 伊香保 (2009. 9)
 7. 衣斐大祐, 永井拓, 新田淳美, 鍋島俊隆, 澤明, 山田清文: ドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスのエンドフェノタイプにおける polyI:C 処置の影響: 第 32 回日本神経科学学会大会 Neuro2009 名古屋 (2009. 9)
 8. 鳥海和也, 毛利彰宏, 成澤志穂, 青山雄紀, 井川夏実, 陸玲玲, 永井拓, 鍋島俊隆: 胎生期におけるフェンシクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動障害をもたらす: 第 32 回日本神経科学学会大会 Neuro2009 名古屋 (2009. 9)
 9. 新田淳美, 山田清文, 鍋島俊隆: ピッコロによるドパミントランスポーター内在化抑制とマウス行動変化: 第 32 回日本神経科学学会大会 Neuro2009 名古屋 (2009. 9)
 10. 丹羽美苗, 神谷篤, 村井里菜, 久保健一郎, Hanna Jaaro-Peled, 陸玲玲, 尾崎紀夫, 仲嶋一範, 野田幸裕, 澤明, 鍋島俊隆: 発達期大脳皮質における Disrupted-in-Schizophrenia-1 の発現異常はドパミン作動性神経系機能異常を伴う精神疾患表現型を発現する: 第 32 回日本神経科学学会大会 Neuro2009 名古屋 (2009. 9)
 11. 溝口博之, 衣斐大祐, 亀井浩之, 鍋島俊隆, H-C Kim, 田熊 一徹, 山田 清文, 覚せい剤誘発感覚情報処理機能障害に対するニコチンの有効性: 第 32 回日本神経科学学会大会 Neuro2009 名古屋 (2009. 9)
 12. 青山雄紀, 毛利彰宏, 鳥海和也, 古関竹直, 成澤志穂, 井川夏実, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: フェンサイクリジン連続投与マウスを用いた抗精神病薬の作用発現におけるヒストン修飾の関与について: 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 京都 (2009. 11)
 13. 鳥海和也, 毛利彰宏, 成澤志穂, 青山雄紀, 井川夏実, 陸玲玲, 永井拓, 鍋島俊隆: 胎生期におけるフェンサイクリジンの投与は神経産生を障害し、長期間持続する行動異常を惹起する: 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 京都 (2009. 11)
 14. 成澤志穂, 毛利彰宏, 鳥海和也, 青山雄紀, 古

- 関竹直, 井川夏実, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: フェンサイクリジン連続投与マウスの行動障害に対する注意欠陥・多動性障害治療薬の作用: 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 京都 (2009. 11)
15. 間宮隆吉, 路平, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: 胎生期に受けた心理的ストレスによる成熟期以降の行動障害: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
16. 毛利彰宏, 野田幸裕, 佐々木文, 宮本嘉明, 渡辺研, 鍋島俊隆: MAGE-D1 遺伝子欠損マウスはモノアミン作動性神経機能低下を伴った意欲低下を示す “うつ病モデルマウスとしての可能性”: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
17. Turson Alkam, 平松正行, 間宮隆吉, 毛利彰宏, 鳥海和也, 鍋島俊隆: 妊娠期ニコチン曝露は出生マウスの感情及び認識行動を障害する: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
18. 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 鍋島俊隆, 山田清文: 新規蛋白質 Shati をノックアウトしたマウスの行動解析: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
19. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 鍋島俊隆, 山田清文: PolyI:C 処置アストロサイト由来の液性因子が初代培養神経細胞に及ぼす影響: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
20. 于静華, 永井拓, 衣斐大祐, 北原裕子, 鍋島俊隆, 山田清文: NMDA 受容体が関与する精神病モデルマウス: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
21. 古関竹直, 毛利彰宏, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: マウスのメタンフェタミン探索行動に対するガラントミンの効果: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
22. 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 澤明, 山田清文: 新生仔期 PolyI:C 投与ドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの行動異常に対する抗精神病薬の効果: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
23. 安藤雄, 脇由香里, 山田真之亮, 吉見陽, 毛利彰宏, 鍋島俊隆, 尾崎紀夫, 野田幸裕: 神経発達過程における慢性社会ストレス負荷が社会性行動に及ぼす影響: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
24. 青山雄紀, 毛利彰宏, 鳥海和也, 古関竹直, 成澤志穂, 井川夏実, 間宮隆吉, 鍋島俊隆: クロザピンはドパミン D1 受容体を介したヒストンアセチル化によりフェンサイクリジン投与マウスに認められる行動異常を緩解する: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)
25. 成澤志穂, 星野佑太, 毛利彰宏, 吉村崇, 鍋島俊隆: 甲状腺刺激ホルモン受容体欠損マウスはメチルフェニデート応答性の ADHD 様の行動変化を示す: 第 83 回日本薬理学会 大阪 (2010. 3)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 発明の名称: 新規ステロイド誘導体及びその製造方法 (現在 PCT 出願準備中)
国内 (特願 2009-039770)
発明者: 小鹿一, 間宮隆吉, 鍋島俊隆
2. 実用新案登録
(あれば記入, なければ “なし”)
なし
3. その他
なし

乱用薬物への渴望（薬物探索行動）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

分担研究者：山本経之

研究協力者：北市清幸、縄田陽子

（長崎国際大学薬学部薬理学研究室）

[研究要旨]

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) 呈示と共に、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を生理食塩液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)。レバー押し行動が減弱する消去過程10日目にストレス負荷によるMAP探索行動の再発を試みた。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 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、生理食塩液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。この事からMAP探索行動の発現には扁桃体のCRF濃度増加が関与している可能性が示唆され、同時に“渴望”のバイオマーカーとしての血漿CRF測定の有用性が示唆された。高架式十字迷路試験法を用いての実験では、MAP退薬時におけるオープンアームへの進入回数および滞在時間は有意に低下していた。このようにMAP退薬時では不安状況にある事が分かった。

一方、有機カチオントランスポーターOCT3の発現は、MAP自己投与時およびMAP退薬時において低下していることが明らかとなり、MAP脳移行の低下およびドパミンなどのモノアミンの消失遅延が起こっている可能性が示唆される。

A. 研究目的

薬物依存症患者では、長期断薬後において薬物への渴望が容易に再燃する事が知られている。この渴望再燃を誘発する因子として、①類似薬物の

使用、②薬物の使用に関連する環境刺激および、③ストレス負荷の3種類が挙げられる。また、渴望の再燃時には血漿中の ACTH ならびにコルチゾール量が増加する事も報告されている⁸⁾。これ

らの知見は、薬物依存症患者の渴望再燃に視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary- adrenal system; HPA 系) が関与している可能性を示唆するものであるが、その詳細なメカニズムは明らかではない。本年度は、HPA 系の中でも脳内に広く分布する事が知られている副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing factor ; CRF) に着目し、ストレスにより誘発される MAP 探索行動の発現における CRF の関与を追究した。合わせて、MAP 自己投与、退薬ならびに MAP 探索行動発現時における血漿中 CRF 濃度を測定した。さらに、前年度に CRF によって誘発される MAP 探索行動の発現の脳内責任部位として、扁桃体および側坐核を指摘したが、これらの脳部位における CRF 濃度変化と、MAP 探索行動発現との関連性を追究した。また、退薬時での情動行動変化も同時に検討した。

一方、有機カチオントランスポーターOCT3は、脳内では脈絡叢、グリア細胞など神経支持細胞に局在し、モノアミンの量的調節に重要な役割を果たしていると考えられている。MAP 連続投与によって OCT3 の脳内発現が低下するとともに、MAP 脳移行が増大することはすでに確認されていることから³⁾、MAP 摂取/退薬時での OCT3 の変容を調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験には Wistar-ST 系雄性ラット [株日本エスエルシー、300-350g] を使用した。

2. 使用薬物

Methamphetamine [MAP : 株大日本住友製薬] は生理食塩液 [株大塚製薬] に溶解した。また、 α -helical CRF₉₋₄₁ (Sigma- Aldrich, Inc.) は蒸留水に溶解した。

3. エサを正の強化子としたオペラント訓練

薬物自己投与実験に先立ち餌ペレット (45 mg; Holton Industries Co. LTD.) を正強化子としたオペラント訓練 (fixed ratio 1) を実施した。訓練ではラットが 30 個の餌ペレットを獲得するまでの時間を測定し、3 回連続して 300 秒以内でペレットを獲得するまで繰り返した。また、1200 秒を cut off time とした。

4. 薬物自己投与実験法

MAP 自己投与訓練に先立ち、あらかじめラットに餌ペレットを正強化子としたレバー押し行動を獲得させた。その後自己投与用のカテーテルの静脈内留置手術を行った。カテーテルはシラステイックカテーテル [外径 1.0 mm、内径 0.5 mm ; 株カネカメディクス] を使用し、ラットの右頸静脈から挿入し、先端を心耳の入り口直前に留置した。実験には、レバー押しに伴い薬物が注入されるアクティブレバーと、薬物が得られないインアクティブレバーの 2 つのレバーが装着されたオペラント箱 [29 cm×23 cm×33 cm ; 株ニューロサイエンス] を使用した。ラットがアクティブレバーを 1 回押せば (FR1 条件下)、MAP (0.02 mg/100 μ L/infusion) が薬物関連刺激 (drug-associated cue : 音; 85 dB/2.9 kHz, 光; 200 lux) と共に微量注入される。10 日間の MAP 自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換した自己投与実験 (cue 呈示なし) を続けた (消去過程)。退薬 10 日目のレバー押し行動が減弱した時点で、ストレスを負荷し“渴望”の指標としての MAP 探索行動 (生理食塩液自己投与下でのレバー押し反応) の発現の有無を調べた。

5. ストレス負荷

オペラントボックスの床面の金属性グリッドを通して、foot shock (0.8 mA、ON; 1 秒, variable interval; 10-70 秒) を 15 分間負荷した。

6. 高架式十字迷路装置を用いた不安様行動の測定

高架式十字迷路装置は互いに直行するオープンアーム、クローズドアームと実験開始位置のセンターからなる。各々のアームは長さ 50 cm、幅 10 cm で、closed arm は高さ 50 cm の壁で周囲が覆われている。迷路の床からの高さは 50 cm である。実験では、まずラットをセンターに置き、10 分間でのオープンアームへの進入回数 (number of open arm entries)、滞在時間 (time in open arm) ならびに中央を横切った回数 (number of crossings) を記録した。

7. 血漿中ならびに脳内 CRF 濃度の測定

血漿中ならびに脳内 CRF 濃度は、Mouse/Rat CRF-HS Elisa キット [YK131; 榊内原研究所] を用いて測定した。血液は、イソフルラン麻酔下にて、眼窩静脈叢より反復採取を行った。血液は EDTA-2Na 採血管を用いて採取し、採血後直ちに遠心処理 (4°C、3000 rpm) を行い得られた上清を血漿サンプルとした。一方、脳サンプルは、ペントバルビタール (50mg/kg, i.p.) 深麻酔下において、左心室より大動脈に PBS 溶液を灌流し脱血した後、脳を摘出し、扁桃核、側坐核ならびに視床下部に分画した。各組織はマイクロチューブに移し、氷冷しておいた PBS (0.2% Nonidet P-40 含有) を脳重量の 30 倍量加え、ハンディソニケーター (TOMY SEIKO Co., LTD; UR-20P) を使用して組織をホモジナイズし測定サンプルとした。作製したサンプルは使用するまで -80°C で冷凍保存した。

8. 脳内有機カチオントランスポーター OCT3 発現量の測定

脳内 OCT3 発現の測定はウエスタンブロッティング法で行った。すなわち、小脳を除く脳サンプルはプロテアーゼインヒビターを含む Tris 溶液中でホモジナイズ、6,500 rpm、4°C で 15 分間遠心し

た。その後上清を 100,000 g、30 min、4°C でさらに遠心し、ペレットを得た。得られたペレットは可溶化し、電気泳動の後、PVDF 膜に転写した。さらに、ブロッキングの後、抗 OCT3 抗体 (Transgenic 社)、抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、OCT3 のシグナルを化学発光法によって発光、検出した。

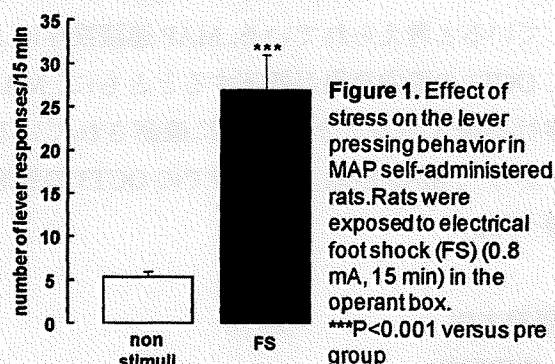
9. 統計学的処理

値は全て平均±標準誤差で表した。二群間の有意差検定には、Bonferroni / Dunn test を用いた。

C. 研究結果

1. ストレス負荷による MAP 探索行動の発現

MAP 自己投与後の退薬時に MAP を生理食塩液に置換するとそのレバー押しは徐々に低下し、9 日目のレバー押し回数は 5.4 ± 0.7 回となった。退薬 10 日目に (生理食塩液自己投与下)、オペラントボックス床面のグリッドから foot shock を負荷すると、レバー押し行動は有意に増加し、MAP 探索行動が誘発された (Fig. 1)。



2. ストレス誘発性 MAP 探索行動の発現における CRF の関与

床面からの foot shock ストレスにより誘発される MAP 探索行動は、非選択的 CRF 受容体拮抗薬である α -helical CRF₉₋₄₁ (30 μ g/side) の脳室内微量注入により有意に抑制された (Fig. 2)。

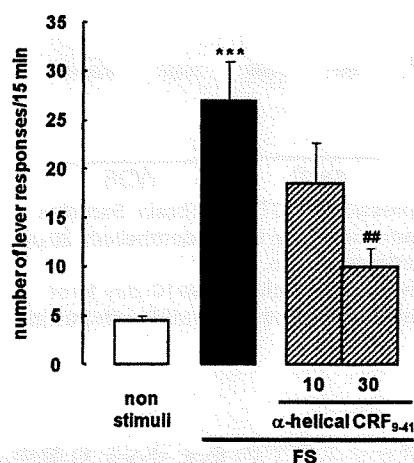


Figure 2. Effect of α -helical CRF₉₋₄₁ on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by footshock stress. Rats were exposed to electrical foot shock (FS) (0.8 mA, 15 min) in the operant box. *** $P < 0.001$ versus pre group, ## $P < 0.01$ versus foot shock group

3. MAP 自己投与、退薬ならびに MAP 探索行動発現時での血漿 CRF 濃度の変化

MAP 自己投与実験直前の CRF 濃度は 0.31 ± 0.02 ng/mL であり、また第 1 日目実験直後の CRF 濃度は 0.40 ± 0.12 ng/mL であった。その後、MAP 自己投与最終日 (10 日目) の実験直後の CRF 濃度は 0.43 ± 0.07 ng/mL で (Fig. 3a)、第 1 日目直後と差がなかった。

一方、MAP 退薬 1 日目では CRF 濃度の変化は認められなかった (0.38 ± 0.04 ng/mL)。しかし、退薬日数を重ねるに従って CRF 濃度は増加し、10 日目では有意差が認められた (0.47 ± 0.06 ng/mL)。また、foot shock ストレス直後においても CRF 濃度はさらに増加する事はなかったが、pre 値と比較し変わらず高値を示した (0.46 ± 0.07 ng/mL; $p < 0.05$) (Fig. 3b)。

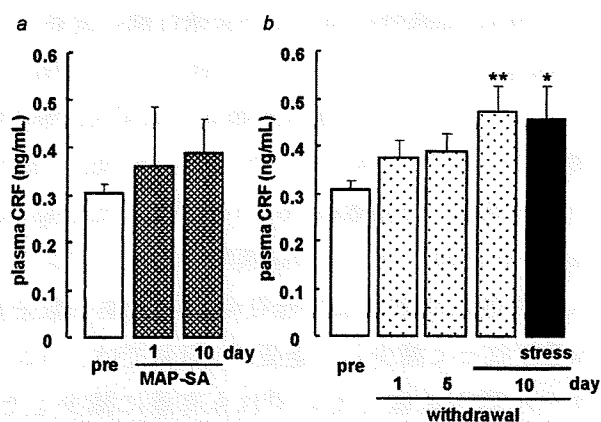


Figure 3. The level of plasma CRF during a, MAP self-administration and b, withdrawal. ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ versus pre group.

4. MAP 自己投与、退薬ならびに MAP 探索行動発現時での脳内 CRF 濃度の変化

コントロール群における脳分画 10 mg 当たりの扁桃体内 CRF 量は、 153.5 ± 17.0 pg であった。MAP 退薬日数の増加に伴いこの CRF 濃度は増加し、退薬 10 日目には有意な増加が認められた (234 ± 25.3 pg; Fig. 4)。しかし、側坐核ならびに視床下部では退薬に伴う CRF 量の変化は認められなかった。一方、退薬 10 日目での foot shock 負荷により、側坐核ならびに視床下部でも CRF 濃度の増加傾向は認められたが、有意な差は見られなかった (Fig. 4)。

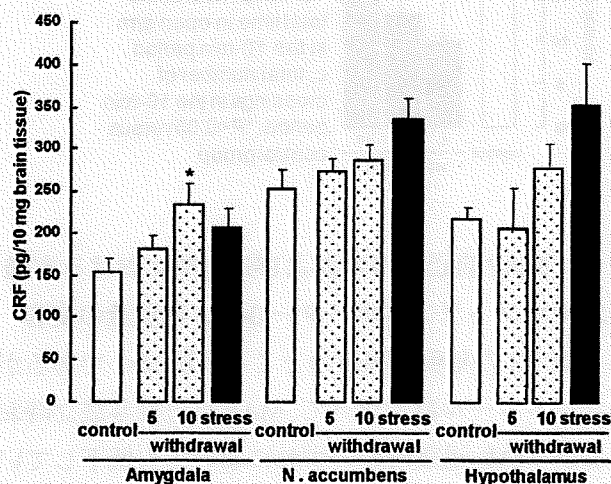


Figure 4. Change of CRF concentration in the amygdala, nucleus accumbens and hypothalamus during MAP withdrawal. * $P < 0.05$ versus control group

5. MAP 退薬時における不安様行動の変容

naïve ラット (コントロール群) の 10 分間でのオープンアームへの進入回数は 17 ± 4 回、滞在時間は 216.8 ± 70.6 秒であった (Fig. 5a, 5b)。また、中央を横切った回数は 16 ± 3 回であった (Fig. 5c)。MAP 自己投与ラットの退薬時でのオープンアームへの進入回数および滞在時間は退薬日数を重ねるに従って減少し、退薬 10 日目では、コントロール群と比較していずれも有意に減少した。(進入回数: 6 ± 2 回, $p < 0.05$ 、滞在時間: 20.8 ± 4.9 秒, $p < 0.05$) (Fig. 5a, 5b)。この時、中央を横切った回数 (16 ± 5 回) に差はなかった (Fig. 5c)。

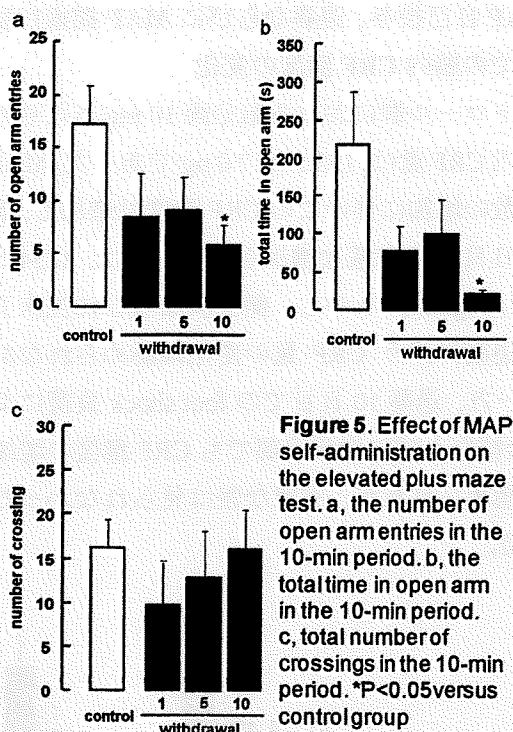


Figure 5. Effect of MAP self-administration on the elevated plus maze test. a, the number of open arm entries in the 10-min period. b, the total time in open arm in the 10-min period. c, total number of crossings in the 10-min period. * $P < 0.05$ versus control group

6. MAP 自己投与時および退薬時における有機カチオントランスポーターOCT3 発現量の変容

OCT3 の発現は現在のところ各群 $N=2$ であるが、コントロール群に比べて、MAP 自己投与成立時および MAP 退薬時のいずれにおいても低下していた (Fig. 6)。今後さらに例数を増やして検討する予定である。

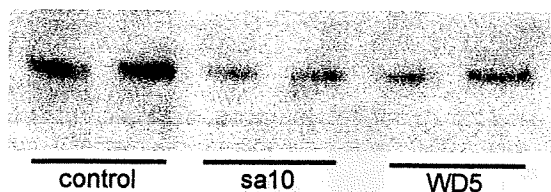


Figure 6 The expression of OCT3 in rat brain. Samples were obtained from whole brain except cerebellum. 20 μ g protein was loaded in each lane. control: animals with no MAP infusion, sa10: day 10 of MAP self-administration, WD5: day 5 of MAP withdrawal

D. 考察

オペラントボックス内での foot shock 負荷中のレバー押し行動は増加し、MAP 探索行動が誘発された。このストレスにより誘発される MAP 探索行動は、非選択的 CRF 受容体拮抗薬 α -helical CRF₉₋₄₁ により有意に抑制されたので、CRF 受容体の活性化を介して発現する事が明らかとなった。

MAP 退薬時での扁桃体内 CRF 量は、有意に増加する事が分かった。しかしながら側坐核および視床下部ではそのような増加は認められなかった。MAP の急性投与により HPA 系が活性化し、血漿中コルチコステロンが増加する事が報告されている⁴⁾。一方、副腎から遊離されるコルチコステロンは、脳へのフィードバックにより扁桃体内 CRF 量を増加させる事が報告されている⁷⁾。これらの知見より、MAP 退薬時での扁桃体内 CRF の増加は、MAP 自己投与により遊離されたコルチコステロンに基づくフィードバックの可能性が示唆される。

扁桃体は、薬物探索行動の発現に重要な役割を果たしている腹側被蓋野へ CRF 含有神経を投射している。CRF 含有神経の腹側被蓋野への投射は、視床下部室傍核からもあるが、その割合は扁桃体的の方が高いと考えられている⁶⁾。一方、コカイン退薬時での foot shock 負荷により、コカイン探索行動が誘発されるが、この時腹側被蓋野ではグルタミン酸 (Glu) やドパミン (DA) が遊離される事が分かっている。CRF 受容体拮抗薬はこれらの神経伝達物質の遊離を抑制する事によって、コカ

イン探索行動を抑制する事が示唆されている⁹⁾。また、コカイン退薬時における腹側被蓋野への CRF 微量注入は、グルタミン酸遊離を促す事が報告されている⁹⁾。これらの知見を踏まえると、MAP 探索行動は、扁桃体からの CRF 含有神経の活性化を介し腹側被蓋野での CRF の遊離増加を起こし、その結果としての脳内報酬系の興奮により発現している可能性が示唆される。

また、高架式十字迷路試験を用いた実験により MAP 退薬時では不安様行動が発現している事が明らかとなり、臨床知見と同様の結果が得られた。一方、Rainnie らは、CRF 受容体アゴニスト ウロコルチンの扁桃体内微量注入によって、高架式十字迷路試験での不安様行動が誘発される事を報告している⁵⁾。これらの事から、今回退薬時に認められた不安誘発行動は、MAP 退薬時での扁桃体内 CRF 量の増加に基因する可能性が考えられる。血漿 CRF 濃度の測定では MAP 摂取時に血漿 CRF 濃度変化は認められなかった。この点は、前年度に明らかにした CRF 受容体は MAP 摂取行動には関与しないとの結果を支持するものである。また、血漿中 CRF 濃度は、脳内での CRF 量を反映している可能性が考えられる。従って、退薬時での血漿 CRF 濃度の変容は今後、“渴望の予知”のバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

有機カチオントランスポーターは、MAP 自己投与最終日ならびに退薬時においてその発現が低下することが明らかになった。これまでに、我々は MAP 連続投与 (5 mg/kg×5 日間) 後、退薬 21 日目に、脳での OCT3 発現が低下すること¹⁾、さらにこの発現低下は少なくとも 3 ヶ月後まで持続することを確認している²⁾。これらを考え合わせると、OCT3 の発現が長期にわたって低下している可能性が推察される。MAP 探索行動は遷延性で且つ易再燃性であるが、OCT3 の発現低下が MAP 探索行動といかなる関係を有しているのかは今後の課題である。

E. 結論

foot schck により誘発される MAP 探索行動の発現は、CRF 受容体の活性化を介して起こっている事が分かった。また、退薬時に見られる扁桃体での CRF 量の増加は、薬物探索行動発現の“準備状況”を作り出す重要な因子の 1 つである可能性が示唆される。この事は CRF 受容体拮抗薬の薬物依存症治療薬としての可能性と共に、血漿 CRF 測定による“渴望の予知”のバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。さらに退薬時での不安様行動の発現は、临床上と相関するものであり、本モデルの妥当性を裏付けるものである。

一方、MAP 退薬時に認められた OCT3 発現の低下は、MAP 探索行動の発現といかなる関連性があるか今後の検討課題である。

【参考文献】

- 1) Kitaichi, K., Morishita, Y., Doi, Y., et al.: Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 464: 39-48, 2003.
- 2) Kitaichi, K., Morishita, Y., Ueyama J., et al.: Pharmacokinetic changes of methamphetamine and their mechanisms in rats having behavioral sensitization to methamphetamine. 23rd Congress of Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Montreal, Canada, June 2002.
- 3) Nakayama, H., Kitaichi, K., Ito, Y., et al.: The role of organic cation transporter-3 in methamphetamine disposition and its behavioral response in rats. *Brain Res.*, 1184: 260-269, 2007.
- 4) Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., et al.: Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J. Neurosci.* 27: 616-626, 2007.

- 5) Rainnie, D.G., Bergeron, R., Sajdyk, T.J., et al.: Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *J. Neurosci.*, 24: 3471-3479, 2004.
- 6) Rodaros, D., Caruana, D.A., Amir, S., et al.: Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 150: 8-13, 2007.
- 7) Shepard, J.D., Barron, K.W., Myers, D.A.: Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res.*, 861: 288-295, 2000.
- 8) Sinha, R., Talih, M., Malison, R., et al.: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology*, 170: 62-72, 2003.
- 9) Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., et al.: Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J. Neurosci.*, 25: 5389-5396, 2005.
- 107: 935-939, 2010.
2. Hiranita, T., Yamamoto, T. and Nawata, Y.: A tryptamine-derived catecholaminergic enhancer, (-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane [(-)-BPAP], attenuates reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience*, 165: 300-312, 2010.
3. Nawata, Y., Hiranita, T. and Yamamoto, T.: A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*, 35: 515-520, 2010.
4. Jinno, S., Araki, K., Matsumoto, Y., Suh, Y.H. and Yamamoto, T.: Selective apoptosis induction in the hippocampal mossy fiber pathway by exposure to CT105, the C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Brain Res.*, 1249: 68-78, 2009.

2. 学会発表

1. 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: メタンフェタミン探索行動の発現における副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の促進的関与—退薬時での血漿中 CRF 濃度の増加. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪、2010 年 3 月予定)
2. 山本経之: ラットの行動から何が分かるか? —中枢神経系作用薬の前臨床評価法. 第3回ラットリソース・リサーチ研究会 (京都、2010年1月)
3. 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: foot shockストレスにより誘発されるメタンフェタミン探索行動の発現における副腎皮質刺激ホルモン放出因子の関与. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会 合同年会 (京都、2009年11月)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R.F. and Ninomiya, Y.: Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*,

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究協力者：成田 年、葛巻直子

（星薬科大学 薬品毒性学教室）

[研究要旨]

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。一方、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。

A. 研究目的

Dopamine は依存性薬物による精神依存形成のみならず情動反応や認知、さらには摂食などの多くの中枢神経機能を制御する重要な神経伝達物質として知られている。当教室はこれまでに視床下部神経ペプチドである orexin や leptin が腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経の活性調節を行っている可能性を見出しており^{1), 2), 3)}、dopamine 関連行動の調節にはさまざまな神経ペプチドを介

した複雑な神経-グリア細胞間ネットワークが関与している可能性が考えられる。一方、DNA の塩基配列を伴わない遺伝子の後天的修飾であるエピジェネティクスが近年注目されてきており、DNA のメチル化やヒストン修飾などのメカニズムが神経、免疫ならびに代謝疾患の一因であるといった報告がなされていることから、脳内報酬系を介した精神依存形成にもエピジェネティクスな変化が関与している可能性が想定される。そこ

で本研究では、依存性薬物である methamphetamine および morphine の逆耐性形成時における脳内エピジェネティクスを介した各種神経ペプチドならびに神経ペプチドにより遺伝子発現制御を受けると考えられる cytokine/chemokine の遺伝子発現変化について多角的な検討を行った。

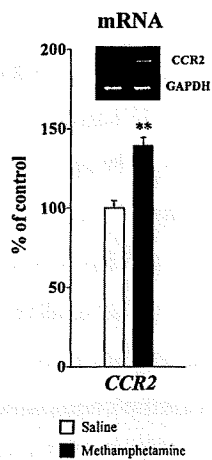
B. 研究方法

実験には C57BL/6J 系雄性マウスならびに CCR2 knockout マウスを使用した。Methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) または morphine (10 mg/kg, s.c.) を 1 日 1 回、3 日おきに計 5 回投与することにより逆耐性を形成させ、最終投与 24 時間後にサンプル採取を行った。さらに、最終投与 5 週間後に再び薬物を投与することにより逆耐性の維持を検討した。自発運動量は tilting cage 法に従って評価した。また、遺伝子発現変化は RT-PCR 法、免疫活性の変化は免疫組織染色法に従い検討した。さらに、ヒストン修飾の変化は ChIP on PCR 法に従い検討した。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にしてすべての実験を行った。

C. 研究結果および考察

まず初めに、methamphetamine または morphine 逆耐性形成時の腹側被蓋野領域を含む中脳領域ならびに側坐核領域における各種神経ペプチド neuropeptide Y、somatostatin、tachykinin、vasoactive intestinal peptide (VIP)、choresistkinin の遺伝子発現変化を RT-PCR 法に従い検討した。その結果、中脳領域において saline 処置群と比較し、methamphetamine 処置群では VIP mRNA 発現量の有意な増加が認められた。一方、saline 処置群と morphine 処置群との間の各種神経ペプチド

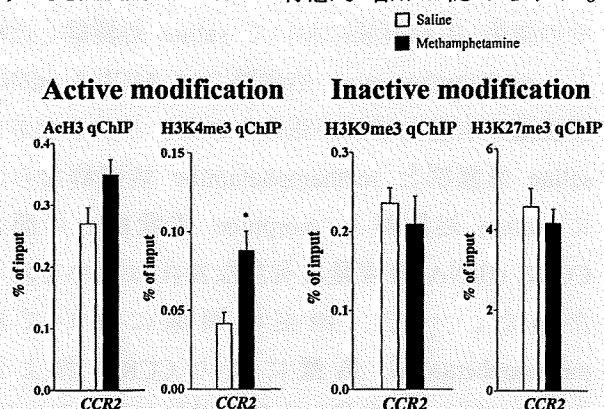
mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。さらに、側坐核領域においても saline 処置群と methamphetamine 処置群ならびに saline 処置群と morphine 処置群との間の各種神経ペプチド mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。一方、このような神経ペプチドは神経のみならず、それらの受容体を介してグリア細胞を活性化させ、cytokine/chemokine の産生を促進することが知られている。遊離された cytokine/chemokine もまた神経活動を制御することが知られていることから、orexin や leptin をはじめとした神経ペプチドは複雑な神経-グリア細胞間ネットワークを介して、腹側被蓋野-側坐核 dopamine 神経の活動を制御している可能性が想定される。そこで次に、逆耐性形成時における cytokine/chemokine の遺伝子発現変化についても同様に検討を行った。その結果、中脳領域において saline 処置群と比較し、methamphetamine 処置群では MCP-3 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。しかしながら saline 処置群と methamphetamine 処置群ならびに saline 処置群と morphine 処置群との間の CCR2 mRNA 発現量に有意な変化は認められなかった。一方、側坐核領域においては methamphetamine 処置により CCR2 および GDNF mRNA 発現量の有意な増加が認められた。さらに、アストロサイトの構成タンパク質である GFAP の特異的抗体を用い免疫染色を行ったところ、saline 処置群と比較して、methamphetamine 処置群では GFAP 免疫活性の増加が認められた。そこで次に、逆耐性形成時の中脳領域における dopamine transporter (DAT)、COX-2 mRNA 発現量の変化についても検討を行ったところ methamphetamine または morphine 処置によりこれら遺伝子発現量の変化は認められなかった。しかしながら、側坐核領域において、COX-2 ならびに prodynorphin (PDYN) の遺伝子発現変化を検討した結果、methamphetamine 処置により



COX-2 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。

そこで次に methamphetamine 逆耐性形成時に認められる各種分子の遺伝子発現変化がエピジェネティック修飾の変化に起因しているかを詳細に検討する目的で

ChIP on PCR 法に従い中脳領域および側坐核領域における各種神経ペプチド、chemokine ならびに DAT、PDYN のヒストン修飾の変化を検討した。その結果、RT-PCR の実験結果と相関して、側坐核領域において、methamphetamine 処置により CCR2 H3K4me3 の有意な増加が認められた。



一方、morphine 処置によるヒストン修飾の変化は認められなかった。また、側坐核領域において、saline 処置群と methamphetamine 処置群との間に各種神経ペプチド、MCP-1、DAT および PDYN のヒストン修飾に有意な変化は認められなかった。

D. 結論

本研究の結果より、methamphetamine により引き起こされる逆耐性には VIP といった神経ペプチドや MCP-3、CCR2 などの chemokine ならびに GDNF といったグリア由来神経栄養因子を介した神経-グリア細胞間ネットワークが一部関与

している可能性が示唆された。一方、methamphetamine 逆耐性形成時の側坐核領域で認められる CCR2 mRNA 発現量の増加は H3K4me3 の増加に起因したエピジェネティクス修飾が関与している可能性が示唆された。さらに、methamphetamine 誘発逆耐性の維持に CCR2 が一部関与している可能性が示唆された。また、methamphetamine 処置により多くの遺伝子はメチル化され発現量が低下していることが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.F., et al.: Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*, 51: 811-822, 2006
- 2) Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., et al.: Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J. Neurosci.*, 26: 398-405, 2006.
- 3) Narita, M., Nagumo, Y., Miyatake, M., et al.: Implication of protein kinase C in the orexin-induced elevation of extracellular dopamine levels and rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.*, 25: 1537-1545, 2007.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto, K, Amano T, Sakai, N, Suzuki, T, Narita, M.: Cell-dependent physiological synaptic action of morphine in the rat habenular nucleus: morphine both inhibits and facilitates excitatory