

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 19～21 年度 3 年のまとめ 総合研究報告

平成 19 年～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

総合研究報告

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。本研究では、平成 19 から 21 年度の 3 年間にわたり、基礎研究は鍋島俊隆が責任者となり、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病態解析ならびに候補薬物のスクリーニングを行い、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、乱用薬物の再使用リスク評価の確立ならびに患者サンプルを用いた薬物依存関連因子の探索を行った。さらに、基礎研究と臨床研究のクロストークとして、基礎研究において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し、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した。3 年間の本推進事業で当初設定した目標を超える成果を挙げることであったので、その概要について報告する。

(I) 基礎研究

摂食関連ペプチドである orexin や leptin を中心に広範な神経ペプチドについて薬物依存との関連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。覚せい剤によるカルシウムチャンネルサブユニットの発現変化ならびに、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 (actin depolymerizing factor) の精神依存の形成機序への関与を明かにし、カルシウムチャンネル拮抗薬が薬物依存治療薬の可能性を見出すことができた。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、そのモデルにおける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タミンが乱用薬物による精神障害、認知障害および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、新規薬物依存関連遺伝子 *shati* および *piccolo* を発見し、それらの生理的役割についても明らかにした。

(II) 臨床研究

薬物依存における薬物再使用リスクを評価するシステムである ASI(Addiction Severity Index)日本語版 (ASI-J)と SRRS(Stimulant Relapse Risk Scale)の法務機関などの患者への応用を図った。また、再飲酒リスク評価尺度 ARRS(Alcohol Relapse Risk Scale)を作成・標準化した。G蛋白質活性型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネル阻害能を有する薬物が覚せい剤依存治療薬となる可能性を見出し、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開発したリスク評価を用いて明らかにした。動物実験において腫瘍抗生物質ミタラマイシンおよび抗生物質ミノサイクリンが覚せい剤による精神障害に対して有効性を示すとともに、覚せい剤関連精神障害患者に対してもその有効性を明かにした。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 *CCNI*や *SAP97*などの発見や覚せい剤による精神障害におけるセロトニン1B受容体の関与を明かにした。また、覚せい剤精神病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遺伝子群およびアデノシンA2A受容体遺伝子の変異について網羅的な解析を行い覚せい剤精神病の発症脆弱性や遷延化などとの関連性を見出した。

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臨床薬学専攻 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)

ガランタミンの依存性薬物による精神障害および精神依存に対する治療薬としての評価およびその作用機序について検討を行った。平成19年度は、統合失調症に類似した精神症状を惹起することが知られている依存性薬物フェンサイクリジン (PCP) を連続投与した動物の休薬後に認められる社会性行動の低下および水探索試験における注意障害がガランタミン、リスペリドンおよびガランタミンとリスペリドンの低用量の併用投与により緩解すること、この緩解効果はニコチン性アセチルコリン受容体 (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ことを明らかにした。平成20年度は、現在わが国で最も乱用されている依存性薬物であるメタンフェタミン (METH) を連続投与した動物の休薬後に認められる新奇

物体認知試験における認知障害はガラントミンの投与による緩解すること、この緩解効果は 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 受容体を介した細胞内シグナル Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase の活性化によることを明らかにした。平成 21 年度は、精神依存の指標となる 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がガラントミンの投与において抑制が認められること、この効果は nAChR ならびにムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) の刺激によることを明らかにした。

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)

薬物依存症患者はストレス負荷により薬物への渴望を誘発し、薬物探索行動を誘発する事が知られている。本研究ではこの点に着目し、覚せい剤 methamphetamine (MAP) への渴望の再燃に対するストレスならびに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) の関与を追究した。加えて、MAP 反復投与によって減少する事が知られている有機カチオントランスポーター OCT3 に着目し、MAP 自己投与ならびに退薬時における OCT3 タンパク発現の変容を調べた。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 自己投与実験を行い (獲得過程)、その後 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、薬物関連刺激の呈示または少量の MAP 投与によりレバー押し行動が再発するが、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。合わせて、ストレス誘発性薬物探索行動のモデル確立を試みた。

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、脳内報酬系における orexin や leptin といった視床下部神経ペプチドの役割ならびに methamphetamine などの依存性薬物の投与によるエピジェネティクス修飾を伴った遺伝子発現の長期的変動について行動薬理学、分子生物学および機能解剖学的手法を用い多角的な検討を試みた。まず、prepro-orexin-knockout マウスにおける morphine 誘発報酬効果発現の変化ならびに dopamine 遊離量の変化を検討した。また、腹側被蓋野に leptin を微量注入した際の側坐核における dopamine 遊離量の変化および leptin 欠損マウスである ob/ob マウスならびに leptin 受容体欠損マウスである db/db マウスにおける morphine 誘発自発運動量促進作用の変化の検討を行った。これらの検討より、脳内 orexin ならびに leptin が腹側被蓋野領域に存在する orexin ならびに leptin 受容体を介して直接的かつ促進的に dopamine 神経系の活性を調節し、その投射先である側坐核領域において dopamine の遊離を促すことで、精神依存や自発運動量などの dopamine 関連行動の発現を一部調節している可能性を明らかにした。さらに、methamphetamine 逆耐性形成におけるエピジェネティクス修飾を介した遺伝子発現の変化を検討する目的で RT-PCR 法ならびに CHIP on PCR 法に従い網羅的な解析を行った。これらの解析により、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を明らかにした。また、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おり、この CCR2 の増加が methamphetamine 誘発逆耐性の維持に一部関与してい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)

Methamphetamine (METH) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序の本体を解明するには至っていないのが現状である。一方、電位開口性カルシウムチャネル (VGCC) は興奮性細胞、非興奮性細胞を問わず多くの細胞で発現し、VGCC を介して細胞内に流入した Ca²⁺ は、生理機能の調節機能の 1 つとして作用しており、筋収縮をはじめ神経伝達物質やホルモンの放出、遺伝子転写、細胞の増殖や分化など、生体機能の制御・維持に大きく関与している。そこで本研究では、乱用薬物に共通の依存症発症因子として、細胞内 Ca²⁺ 動態調節機構の一端を担っている VGCC に着目し、新規 Ca²⁺ 動態調節剤の治療への応用と依存症発症機序解明を目的として検討した。条件づけ場所嗜好性試験を用いて、METH 誘発報酬効果に対する L 型 VGCC $\alpha 1c$ subunit 拮抗薬である nifedipine、 $\alpha 2/\delta$ subunit 阻害薬である gabapentin、および ryanodine 受容体拮抗薬である dantrolene の影響について検討したところ、いずれの薬物においても METH 誘発報酬効果の形成は用量依存的かつ有意に抑制された。次に、精神依存に重要な帯状回を含む frontal cortex 領域および側坐核を含む limbic forebrain 領域における VGCC $\alpha 1c$ subunit および $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白発現量の変化について検討した。その結果、METH 誘発報酬効果獲得マウスの frontal cortex 領域および limbic forebrain 領域では、対照群に比べ $\alpha 1c$ および $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白の有意な発現増加が認められた。神経細胞において Ca²⁺ の局所的な上昇は actin の重合を誘導することが報告されている。そこで、METH 誘発報酬効果に対する actin 重合阻害薬 cytochalasin D および脱重合阻害薬 phalloidin の影響について検討したところ、いずれの薬物においても METH 誘発報酬効果は用量依存的かつ有意に抑制された。次に、actin 脱重合調節因子である actin depolymerizing factor (ADF) の関与について検討する目的で、ADF 蛋白の発現変化について検討したところ、METH 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 蛋白量の有意な増加が認められた。そこで、ADF 変異型マウスおよび野生型マウスを用いて、METH 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。一方、VGCC $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスでは野生型マウスに比べ、METH 誘発報酬効果の有意な減弱が認められたが、このような条件下、野生型マウスで認められる METH による ADF 蛋白の発現増加は、VGCC $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスにおいて有意に減少した。以上の成績より、VGCC $\alpha 1c$ および $\alpha 2/\delta$ subunit ならびに ryanodine 受容体が、乱用薬物に共通の依存症発症因子として重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、本研究結果より、nifedipine などのカルシウム拮

抗薬や dantrolene および gabapentin が薬物依存の治療薬となり得る可能性が示唆された。また、METH による精神依存に対して L 型 VGCC を介した ADF 発現調節機構が関与し、細胞内 actin 重合・脱重合調節機構に重要な役割を果たすことが明らかとなり、今後細胞内 Ca²⁺動態調節作用を有する薬物あるいは細胞内骨格機能調節作用のある薬物の開発は依存性薬物による精神依存の治療に有用となると考えられる。

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

(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

薬物依存の形成に寄与すると考えられるいくつかの遺伝子が報告されている。薬物依存の形成は多くのファクターが複雑に絡み合い、未知の遺伝子が関与している可能性も高い。そこで、我々は、覚せい剤であるメタンフェタミンを連続投与したマウス脳において発現量の高い 2 つの遺伝子を cDNA サブトラクション法を用いて見出した。cDNA 断片から全長をクローニングしたところ、1 つは、すでに既知のタンパクであり piccolo と命名され、インシュリン分泌に関係するタンパクとして研究がなされていたが、脳での生理機能については、ほとんど分かっていなかった。もう一方は、新規の遺伝子であったことから、shati と命名し、全長の単離・同定に成功した。両タンパクの遺伝子配列にもとづいて作成したアンチセンスヌクレオチドを脳に注入し、各タンパクの発現を減少させてマウスでは、覚せい剤による場所嗜好性や自発運動の亢進が促進されたことから、両遺伝子は薬物依存形成を抑制すると考えられる。In vivo マイクロダイアリス法による実験では、これらマウスにメタンフェタミンを 7-10 日間連続投与し、最終投与後のドパミン遊離量を測定したところ、遊離量増大が促進された。これらの結果から、両遺伝子の薬物依存形成抑制作用は、ドパミン遊離の調節を受けていると考えられた。さらに培養細胞や ex vivo の実験によって、両遺伝子が、ドパミントランスポーターの機能調節に関係しているという新しい知見を得た。さらに、両遺伝子の過剰発現マウスと shati 遺伝子の遺伝子欠損マウスを作成し、両遺伝子の生理機能について検討した。また、shati タンパクの定量系を作成し、精神疾患患者の血液濃度の測定を行う予定である。

(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)

覚せい剤であるメタンフェタミン (METH) やメチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) に加え、2005 年 4 月にケミカル系違法ドラッグとして規制された 5-Methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) や、2007 年 2 月に麻薬指定された 2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxy-phenyl)propan-1-one (メチロン) はカテコールアミン神経に作用し毒性・依存性を発揮すると考えられている。その中でも我々は METH、メチロンにつ

いて標的分子である細胞膜モノアミントランスポーター、受容体、または中枢性シナプス小胞モノアミントランスポーター (VMAT2) に着目し、毒性や依存の作用機序について検討した。同時に遺伝子多型と METH 依存・精神病と相関についての検討しアデノシン A2A 受容体を、有意に相関を持つ因子として特定した。

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)

覚せい剤関連精神障害の治療薬の開発を目的として、抗腫瘍抗生物質ミタラマイシンおよび第二世代抗生物質ミノサイクリンの効果を調べた。ミタラマイシンは覚せい剤投与による逆耐性形成やドパミン神経系の障害を抑制することを見出した。またミノサイクリンが、覚せい剤投与による依存形成を抑制する事を場所嗜好試験にて明らかにした。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。

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)

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、(i) phencyclidine (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、(ii) 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、DNA マイクロアレイ、RAP-PCR、RT-PCR 等の方法を用いて探索した。その結果、細胞外マトリックスタンパクをコードする *CCNI* 遺伝子や、シナプスの足場タンパクをコードする *SAP97* 遺伝子の転写産物が、大脳新皮質において、また、アクチン重合に関与するタンパクをコードする *leiomodlin 2* 遺伝子が視床において、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り、遺伝子転写産物の構造、薬理的反応性、神経解剖学的特徴等の解析を行った。これらの解析データより、上記 3 種類の遺伝子が、NMDA 受容体遮断薬による精神病状態の発症に関与する神経回路または分子カスケードにおいて機能していることが示唆され、乱用薬物が引き起こす精神病状態に対する新しい予防・治療法開発の分子標的になる可能性があると考えられた。

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)

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た。再使用リスク評価尺度に関しては、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)の法務機関などへの応用を図った。また、再飲酒リスク評価

尺度 ARRS(Alcohol Relapse Risk Scale)を作成し、標準化した。モデル動物を用いた治療薬の探索では、ドーパミントランスポーター欠損マウス、セロトニントランスポーター欠損マウス、ウィーバーミュータントマウスなどを用いて、メタンフェタミンやメチルフェニデートの作用機序を解析し、G 蛋白質活性型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネル阻害能を有する薬物が覚せい剤依存治療薬となる可能性を見出した。また、ヒトゲノム解析により、GIRK チャネルなどが、オピオイド感受性や覚せい剤依存と関連することを見出した。さらに、基礎研究と臨床研究の組み合わせでは、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を見出した。GIRK 阻害能を有する薬物は、依存治療薬として期待できる。

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)

薬物依存における大きな問題の1つが慢性中毒と呼ばれる神経精神毒性であり、それによる精神病性障害の合併である。その合併しやすさや重症度には個人差が強く、ゲノム要因が大きいことが推定されるが、その具体的な遺伝子因子や発現機序は不明な部分が多い。これらの解明は、特に慢性中毒の予防や治療法の開発に有用と考えられる。この点の解明に向けて、覚せい剤精神病 (N=210) と健常者群 (N=290) にて関連解析により検討した。対象とした遺伝子は dysbindin をコードする DTNBP1 遺伝子、D 体アミノ酸酸化酵素活性因子 (D-amino acid oxidase activator ; DAOA)、セリンラセマーゼ (serine racemase; SRR) 遺伝子、NMDA 受容体サブユニット遺伝子である GRIN1, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子とした。その結果、DTNBP1 遺伝子多型の P1655 (rs2619539) と SNPA (rs2619538) で有意な相関を認め、また、P1635 の G アレルは、精神病の治療予後の悪さとも相関した。P1655 - P1635 - SNPA でのハプロタイプ解析では C-A-A ハプロタイプが防禦因子 (P=0.0013、オッズ比 0.62、95%信頼区間 0.51-0.77) であった。この C-A-A ハプロタイプは O' Donovan らのグループが示した精神病性双極性障害の防禦ハプロタイプ、統合失調症の防禦ハプロタイプと一致していた。DAOA 遺伝子では解析した 6 遺伝子座位のうち m22 多型 (rs778293) で有意な相関がみられ、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り、オッズ比は G アレルで 1.6 倍であり、G/G 遺伝子型で 5.7 倍であった。これはアジア人統合失調症の危険因子と同じであった。SRR 遺伝子のプロモーター領域の SNP 3 (rs2224770) が精神病の自然再燃に、SNP5 (rs408067) が精神病の遷延化および多剤乱用と相関した。NMDA 受容体サブタイプ遺伝子では GRIN2A の 5' 上流の (GT)_n 繰り返し多型が強く相関し、覚せい剤精神病ではリピート数が有意に多かった。これも日本人統合失調症での報告と同じであった。(GT)_n リピート数が多いと GRIN2A 遺伝子の転写活性が低下し、NMDA 受容体結合が低下する事が知られており、このことが覚せい剤精神病の発症に関わると考えられる。これら一連の研究で明らかになったことは、グルタミン酸神経伝達、特に NMDA 受容体の活性化に関わる複数の分子の遺伝子多型が覚せい剤精神病の発症脆弱性に関わること、DTNBP1、DAOA、GRIN2A の相関アレルやハプロタイプは統合失調症のそれと同一であり、これらは疾患の種類を超えて、精神病症状の出現しやすさに関わる可能性が推測された。

平成 19～21 年度 3 年のまとめ 分担研究者総合報告

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

研究代表者：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]

ガランタミンの依存性薬物による精神障害および精神依存に対する治療薬としての評価およびその作用機序について検討を行った。平成19年度は、統合失調症に類似した精神症状を惹起することが知られている依存性薬物フェンサイクリジン（PCP）を連続投与した動物の休薬後に認められる社会性行動の低下および水探索試験における注意障害がガランタミン、リスペリドンおよびガランタミンとリスペリドンの低用量の併用投与により緩解すること、この緩解効果はニコチン性アセチルコリン受容体（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ことを明らかにした。平成20年度は、現在わが国で最も乱用されている依存性薬物であるメタンフェタミン（METH）を連続投与した動物の休薬後に認められる新奇物体認知試験における認知障害はガランタミンの投与による緩解すること、この緩解効果は 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 受容体を介した細胞内シグナル Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase の活性化によることを明らかにした。平成21年度は、精神依存の指標となる 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がガランタミンの投与において抑制が認められること、この効果は nAChR ならびにムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）の刺激によることを明らかにした。

1. はじめに

現在、一般人への依存性薬物汚染の実態は深刻になってきている。薬物依存患者を一般社会に復帰させるには、薬物乱用による精神・認知障害および精神依存に対する治療が必須となっている。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・認知障害および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。依存性薬物であるフェンサイクリジン（PCP）や日本

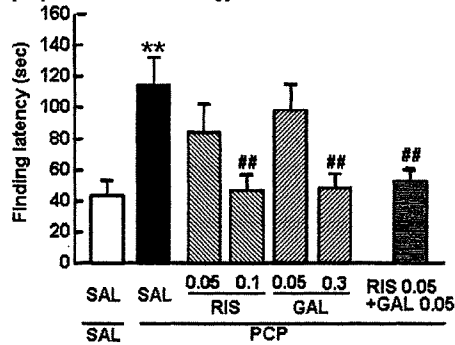
で最も乱用されている覚せい剤であるメタンフェタミン（METH）は統合失調症の症状に類似した精神・認知障害とともに精神依存も惹起する^{1,2)}。一方、ガランタミンは、ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対するアロステリックモデュレーターであり、また弱いコリンエステラーゼ阻害作用を併せ持つアルツハイマー病の治療薬である³⁾。ガランタミンが統合失調症患者に認められる感情鈍磨などの陰性症状や注意力低下などの認知障害の改善効果を示したとの臨床報告

があることから^{4,5)},平成19および20年度においてガランタミンのPCPおよびMETHによる精神・認知障害に対しての有効性およびその作用機序について検討を行った⁶⁻⁸⁾。また,ガランタ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ことから,平成21年度においてガランタミンのMETH投与により認められる精神依存に対する有効性および作用機序について検討を行った。

2. フェンサイクリジン (PCP) による精神障害に対するガランタミンの作用 (平成19年度)

PCP連続投与マウスに認められる水探索試験における潜在学習障害および社会性行動試験における社会性の低下に対するガランタミンおよびリスペリドンの高用量の単独投与は緩解効果を示し,ガランタミンとリスペリドンの低用量の併用投与においても緩解作用を示すことから (Fig. 1), これら薬物の併用投与により相乗効果が認められる事が示唆された。

(A) Water finding test



(B) Social interaction test

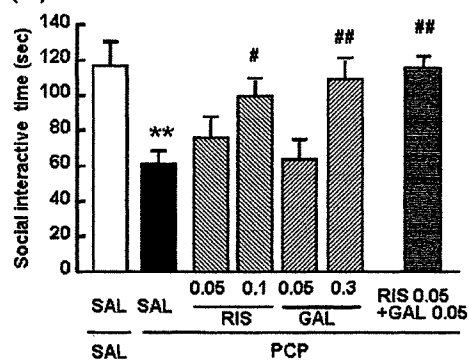
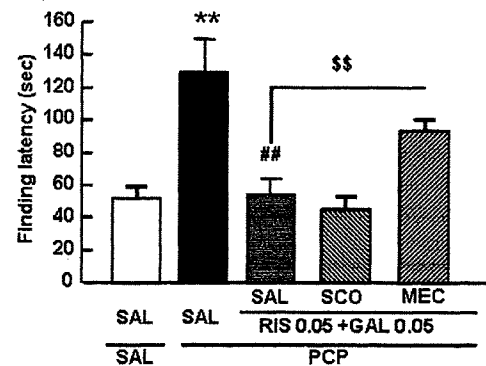


Fig. 1. Synergistic effect of galantamine with risperidone on impairment of latent learning in PCP-treated mice in water finding test (A) and social interaction test (B). PCP (10 mg/kg, s.c.) was injected for 14 days. Control groups were treated with same volume of saline (SAL). Galantamine (0.05 mg/kg, p.o.) and risperidone (0.05 mg/kg, p.o.) were administered 1 h before the training trial in water finding test (A) and social interaction test (B). Results are expressed as means \pm SEM, n=12-17. **p < 0.01, compared to Sal/Sal-treated group. #p < 0.05, ##p < 0.01, compared to PCP/Sal-treated group.

これらのガランタミンによる緩解作用は nAChR 拮抗薬であるメカミラミンにより拮抗されたが, ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) 拮抗薬であるスコポラミンでは拮抗されなかった (Fig. 2)。

(A) Water finding test



(B) Social interaction test

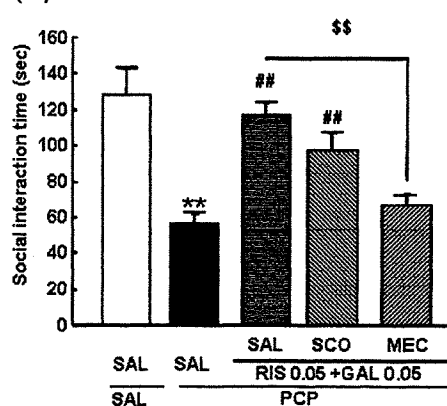


Fig. 2. Nicotinic, but not muscarinic, AChRs are critical for the synergism of galantamine (GAL) with risperidone (RIS) in water finding test (A) and social interaction test (B). PCP (10 mg/kg, s.c.) was injected for 14 days. Control groups were treated with same volume of saline (Sal). Galantamine (0.05 mg/kg, p.o.) and risperidone (0.05 mg/kg, p.o.) were administered 1 h before the training trial in water finding test (A) and social interaction test (B), and mecamylamine (3 mg/kg, s.c.) or scopolamine (0.1 mg/kg, s.c.) was injected 20 min after the co-administration. Results are expressed as means \pm SEM, n=10-12, and analyzed by a one-way ANOVA, followed by the modified Tukey test for multiple comparisons. **p < 0.01, compared to Sal/Sal-treated group. ##p < 0.01, compared to PCP/Sal-treated group. \$\$p < 0.01, compared to PCP/Risp/Galan-treated group.

ガラントミンとリスペリドンの低用量の併用投与による相乗効果は前頭皮質における細胞外ドパミン遊離量の増加作用を示し、このような相乗効果はメカミラミンにより拮抗された (Fig. 3). この相乗作用は、リスペリドンによるアセチルコリンの遊離を介した間接的 nAChR の活性化とガラントミンのアロステリック作用による nAChR の活性化により、細胞外ドパミン遊離量が増加したものと考えられる。

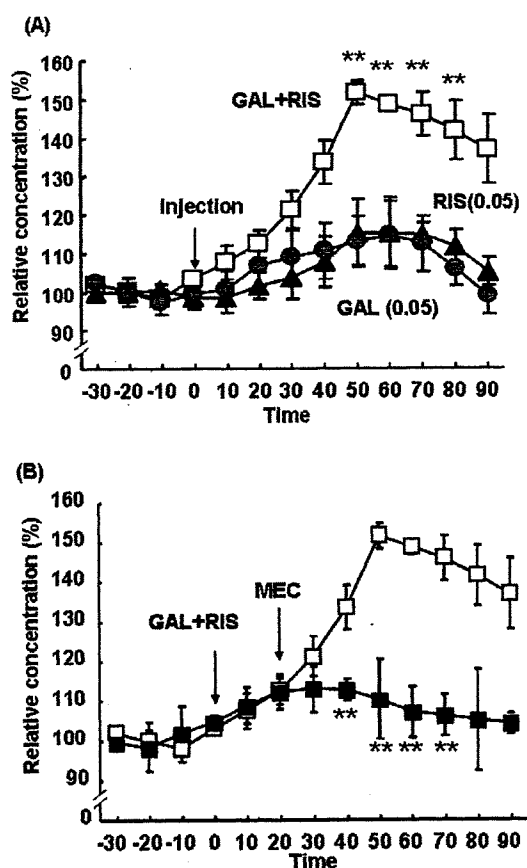


Fig. 3. Synergistic effect of galantamine with risperidone on extracellular concentration of dopamine in mPFC of PCP-treated mice (A). PCP (10 mg/kg, s.c.) was injected for 14 days. Galantamine (GAL: 0.05 mg/kg, p.o.) and/or risperidone (RIS: 0.05 mg/kg, p.o.) were administered 3 days after the withdrawal of PCP. Results are expressed as means \pm SEM, $n=4-5$. ** $p < 0.01$, compared to PCP/RIS-treated group. Mecamylamine blocked synergistic effect of galantamine with risperidone on extracellular concentration of dopamine in mPFC of PCP-treated mice (B). Mecamylamine (Mec, 3 mg/kg, s.c.) was injected 20 min after the coadministration. Results are expressed as means \pm SEM, $n=4-5$. ** $p < 0.01$, compared to PCP/RIS+GAL-treated group.

ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 はガラントミンとリスペリドンの併用投与による PCP 連続投与マウスに認められる精神障害に対する緩解効果を抑制した (Fig. 4). ガラントミンとリスペリドンの併用投与による PCP 連続投与マウスに認められる精神障害に対する緩解効果はドパミン D1 受容体が刺激された結果であると考えられる。

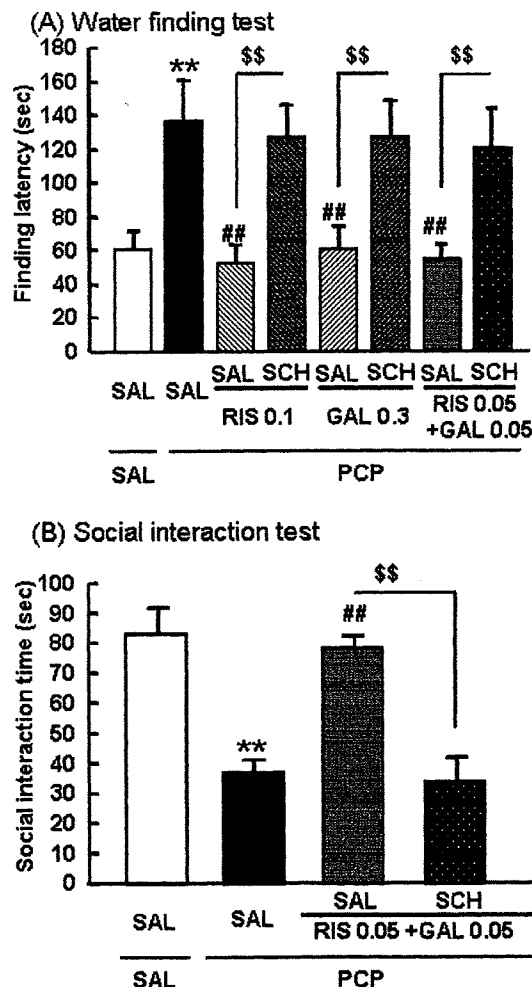


Fig. 4. Synergistic effect of galantamine with risperidone is mediated by D1 receptors in water finding test (A) and social interaction test (B). PCP (10 mg/kg, s.c.) was injected for 14 days. Control groups were treated with same volume of saline (SAL). Galantamine (GAL, 0.05 and 0.3 mg/kg, p.o.) and/or risperidone (RIS, 0.05 and 0.1 mg/kg, p.o.) were administered 1 h before the training trial. The dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 was s.c. injected at the dose of 0.02 mg/kg 30 min after the co-administration. Results are expressed as means \pm SEM, $n=11-17$. ** $p < 0.01$, compared to SAL/SAL-treated group, ## $p < 0.01$, compared to PCP/SAL-treated group, \$\$ $p < 0.01$, compared to PCP/RIS+GAL-treated group.

以上の結果より、ガラントアミンおよびリスペリドンの単独および併用投与による PCP 連続投与マウスに認められる精神障害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 (Table. 1).

Table.1

フェンサイクリジン(PCP)による精神障害に対するガラントアミンの作用

PCP連続投与による精神障害	社会的行動低下	注意力低下
ガラントアミン(0.1)	○	○
リスペリドン(0.3)	○	○
ガラントアミン(0.05)+リスペリドン(0.05)	○	○
+メカミラミン(3)	×	×
+スコポラミン(0.1)	×	×
+SCH23390(0.02)	×	×

前頭皮質におけるドーパミン遊離	変化
ガラントアミン(0.05)	↑
リスペリドン(0.05)	↑
ガラントアミン(0.05)+リスペリドン(0.05)	↑
+メカミラミン(3)	→

○: 緩解 ×: 効果なし

↑: 増加 →: 変化なし

3. メタンフェタミン(METH)による認知障害に対するガラントアミンの作用 (平成 20 年度)

ガラントアミンの投与は METH 連続投与マウスに認められる新奇物体認知試験における認知障害に対する緩解効果を示した (Fig. 5).

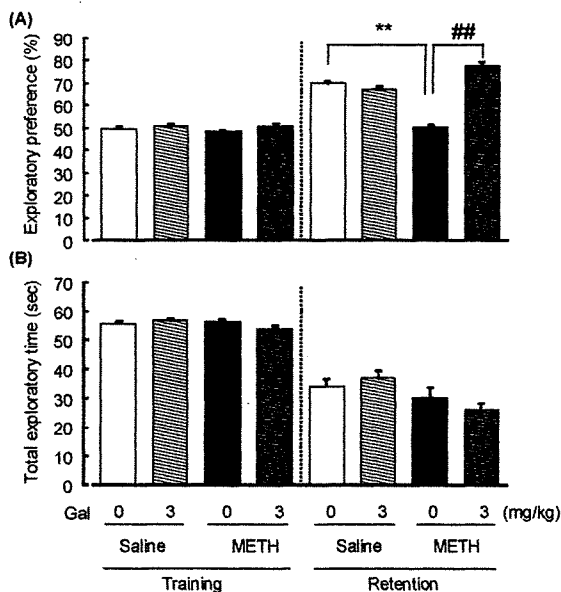


Fig. 5. The effect of galantamine on cognitive impairment in METH-treated mice. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) were administered 1hr before the training trial. Values indicate the mean \pm S.E. ($n = 10$). ** $p < 0.01$ compared with (saline + saline)-treated group (Bonferroni test). ## $p < 0.01$ compared with (METH + saline)-treated group.

このガラントアミンによる緩解効果は nAChR 拮抗薬であるメカミラミンにより拮抗されたが (Fig. 6), スコポラミンでは拮抗されなかった (Fig. 7).

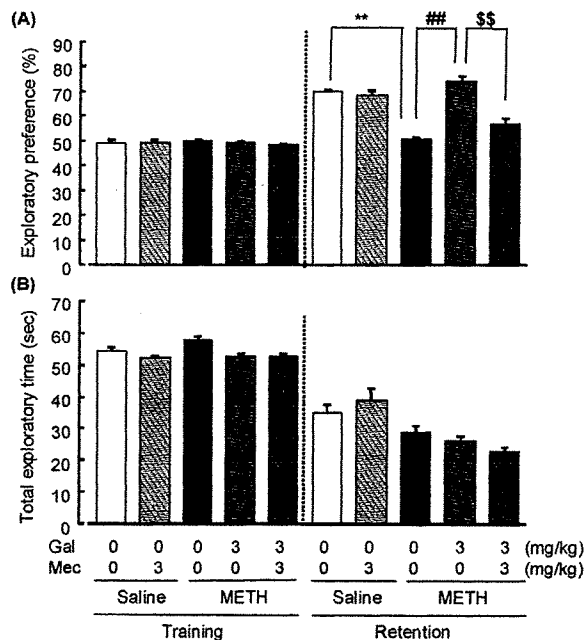


Fig. 6. Nicotinic AChRs are critical for the alternative effect of galantamine. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) and mecamylamine (Mec: 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. ## $p < 0.01$ compared with (METH + saline/saline)-treated group. \$\$ $p < 0.01$ compared with (METH + Gal/saline)-treated group.

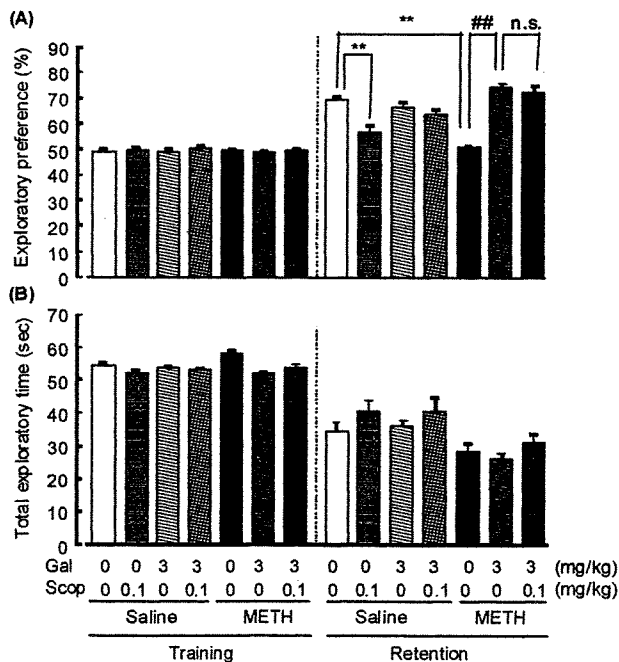


Fig. 7. Muscarinic AChRs are not critical for the alternative effect of galantamine. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) and scopolamine (Scop: 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. ##p < 0.01 compared with (METH + saline/saline)-treated group. n.s.: not significant.

ガラントミンの投与は METH 連続投与マウスの前頭皮質のドーパミンの遊離を亢進させ、この効果は nAChR 拮抗薬であるメカミラミンにより拮抗された (Fig. 8). そのため、ガラントミンのアロステリック作用による nAChR の活性化により、細胞外ドーパミン遊離量が増加されたものと考えられる。

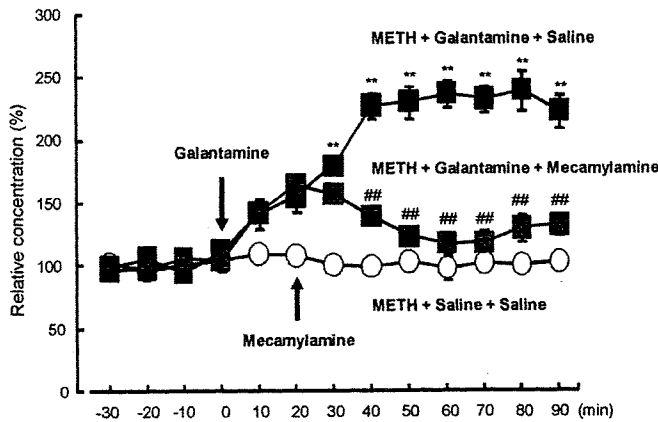


Fig. 8. The effect of galantamine on extracellular concentration of dopamine in mPFC of METH-treated mice. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Galantamine (3 mg/kg, p.o.) was administered 3 days after the withdrawal of METH. Mecamylamine (3 mg/kg, s.c.) was injected 20 min 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.

また、ドーパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 はガラントミンの投与による METH 連続投与マウスに認められる認知障害に対する緩解効果を抑制した (Fig. 9). 従ってガラントミンの投与による METH 連続投与マウスに認められる認知障害に対する緩解効果はドーパミン D1 受容体が刺激された結果であると考えられる。

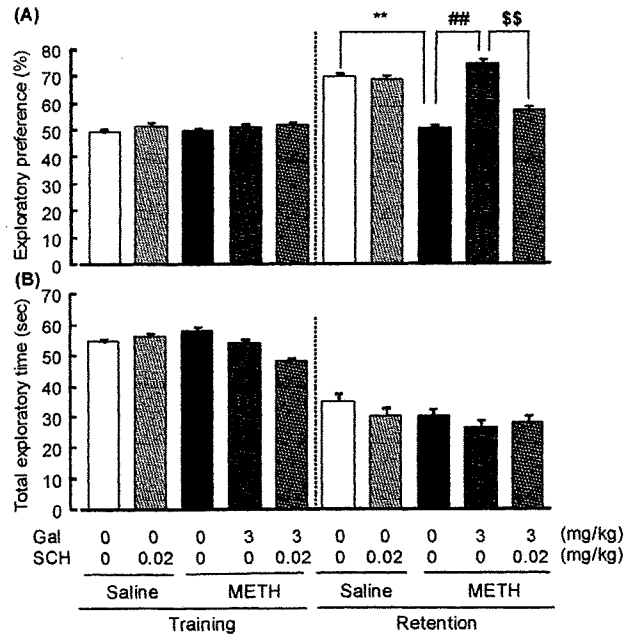


Fig. 9. Attenuative effect of galantamine is mediated by D1 receptors. (A): Exploratory preference, (B): Total approach time. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) and SCH 23390 (SCH: 0.02 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. ##p < 0.01 compared with (METH + saline/saline)-treated group. \$\$\$p < 0.01 compared with (METH + galantamine/saline)-treated group.

METH 連続投与マウスに認められた Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) 活性化の障害はガラントミン投与により有意に緩解され、この緩解作用は SCH23390 によって拮抗された (Fig. 10).

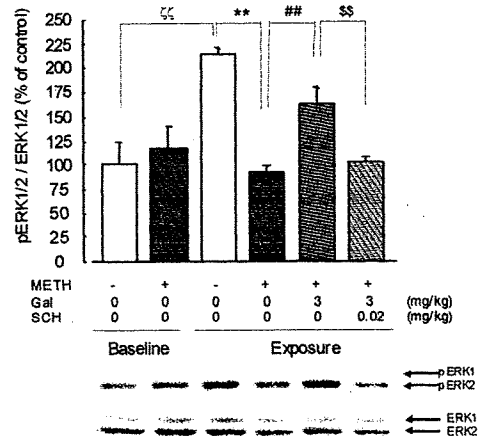


Fig.10. Effect of galantamine on impairment of learning-associated ERK phosphorylation is mediated by D1 receptors. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) and SCH 23390 (SCH: 0.02 mg/kg, s.c.) were administered 1hr and 30 min before the training trial, respectively. Immediately after the training trial, mice were sacrificed by decapitation and ERK phosphorylation and expression in the prefrontal cortex were detected by Western blotting. The phosphorylation ratio was calculated as ERK phosphorylation vs ERK expression. Values indicate the mean \pm S.E. (n = 5). **p< 0.01 compared with (saline + saline/saline)-treated group that was exposed to novel objects (exposure). ##p<0.01 compared with (METH + saline/saline)-treated group (exposure). \$\$\$p<0.01 compared with (METH + Gal/saline)- treated group (exposure).

さらに、新奇物体認識試験において、ガラランタミンの認知障害緩解作用は、ERK1/2 阻害剤である PD98059 によって拮抗された (Fig.11).

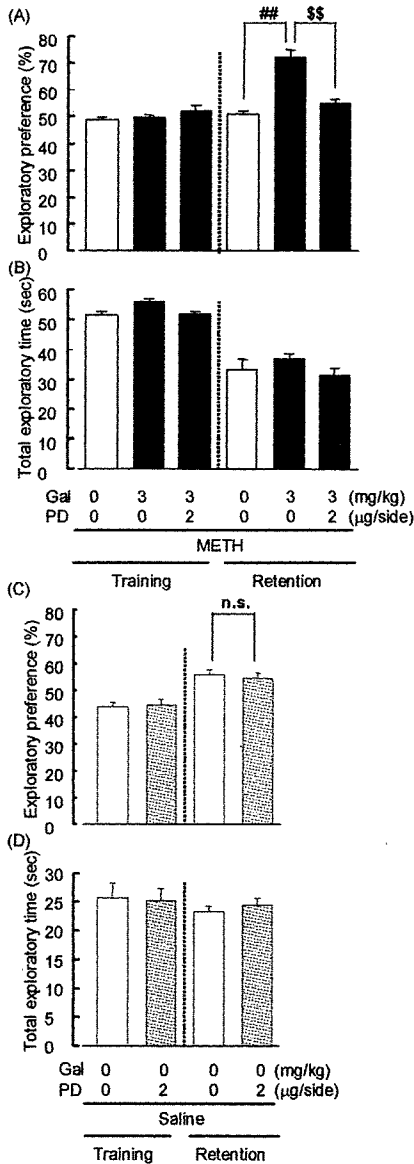


Fig. 11. Attenuative effect of galantamine is mediated by ERK signaling. (A, C): Exploratory preference, (B, D): Total approach time. Methamphetamine (METH: 1 mg/kg, s.c.) was injected for 7 days. Control groups were treated with same volume of saline. Galantamine (Gal: 3 mg/kg, p.o.) was administered 1 hr before the training trial. PD98059 (PD) was infused into the prefrontal cortex (2 μ g /side) 30 min before the training trial. A: Values indicate the mean \pm S.E. (n = 6-8). ##p< 0.01 compared with (METH + saline/vehicle)-treated group (Bonferroni test). \$\$\$p< 0.01 compared with (METH + galantamine/vehicle)-treated group (Bonferroni test). C: Values indicate the mean \pm SE (n = 10-11). n.s.: not significant.

したがって、ガラランタミンはドパミン D1 受容体を介して、前頭皮質における ERK1/2 のリン酸化を増加させ、このドパミン D1 受容体-ERK1/2 シグナル経路の活性化が認知障害の緩解に重要な役割を果たしていることが示唆された (Table.2).

Table.2
メタンフェタミンによる認知障害に対するガラランタミンの作用

薬物処置	メタンフェタミン連続投与とマウス		
	認知障害 新奇物体 認識試験	細胞外 ドパミン量	ERK1/2 リン酸化 蛋白発現
ガラランタミン (3 mg/kg)	↑	↑	↑
+ メカミラミン (3 mg/kg)	↓	↓	n.d.
+ スコボラミン (0.1 mg/kg)	N.S.	n.d.	n.d.
+ SCH23390 (0.02 mg/kg)	↓	n.d.	↓

↑: 改善・促進 ↓: 拮抗 N.S.: 拮抗しない n.d.: 検討せず

The diagram illustrates the D1 receptor signaling pathway. Methamphetamine (METH) and Galantamine (Gal) act on the D1 receptor, leading to the activation of the Adenylate cyclase system. This system converts ATP to cAMP, which then activates PKA. PKA phosphorylates ERK1 and ERK2, leading to their activation. Galantamine is shown to inhibit this pathway. PD98059 (PD) is shown to inhibit the ERK1/2 pathway, leading to a decrease in ERK1/2 phosphorylation and protein expression. This inhibition is shown to be overcome by Galantamine. The diagram also shows that Galantamine inhibits the action of METH on the D1 receptor. The diagram is labeled with 'Test trial' and 'Novel!'.

4. メタンフェタミン(METH)による精神依存性に対するガラランタミンの作用 (平成 21 年度)

マウスに依存性薬物を単回投与すると運動量増加が認められ、さらに連続投与するに伴い運動量増加が亢進する (行動感作)。この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 の単回投与による運動量増加ならびに、7 日間連続投与による行動感作の形成はガラランタミンの前投与により抑制した (Fig. 12)。