

発現では、少なくとも側坐核ならびに扁桃体での CRF が、また MAP priming 投与による MAP 探索行動発現では側坐核での CRF が促進的な役割を演じている事が分かった。今回、扁桃体内への α -helical CRF_{9,41} 微量注入によって、MAP priming 投与による MAP 探索行動は抑制されなかった。また同様にリドカインの扁桃体内微量注入によっても MAP priming 投与による MAP 探索行動発現は影響を受けない³⁾。これらの知見は MAP priming による MAP 探索行動発現には扁桃体の関与がない事を示している。さらに、CRF 単独投与による MAP 探索行動の発現には、側坐核ならびに扁桃体が重要である事が示唆された。この CRF による MAP 探索行動は、 α -helical CRF_{9,41} によって抑制されたが、コルチコステロン合成酵素阻害薬では抑制されなかった。CRF はストレスに呼応して HPA 系を活性化し、ACTH やグルココルチコイド (コルチゾール/コルチコステロン) の遊離を増加させる事が知られている。しかし、本実験では CRF による MAP 探索行動はメチランポンで抑制されなかった。この事から、MAP 探索行動は、コルチコステロンを介した反応ではない事が示唆される。この事は、CRF が“ニューロモデレーター”として働いている可能性を示唆するものである²⁾。一方、MAP 関連刺激による MAP 探索行動の発現には CRF₁ ならびに CRF₂ の両受容体が、また MAP priming 投与による MAP 探索行動の発現には CRF₁ 受容体が促進的に関与する事を明らかにした。我々はこれまで MAP 関連刺激による MAP 探索行動の責任部位が扁桃体及び前頭前皮質であり³⁾、また MAP priming 投与によるそれが前頭前皮質である事を指摘した³⁾。一方、CRF₁ 受容体の脳内分布は扁桃体ならびに前頭前皮質の両部位に、また CRF₂ 受容体のそれは扁桃体に多く発現している事が知られている¹⁾。MAP 探索行動の発現における CRF 受容体サブタイプの関与の相違は、この CRF 受容体の脳内分布の違いに

基因する事が推察される。

2. ストレス誘発性 MAP 探索行動の発現における CRF の関与

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 CRF_{9,41} 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⁵⁾。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⁹⁾。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、その割合は扁桃体の方が高いと考えられている⁸⁾。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¹⁰⁾。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¹⁰⁾。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、Raimie 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⁷⁾。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。

3. 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

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¹⁰⁾、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⁴⁾。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

薬物関連刺激、MAP priming ならびにストレスにより誘発される MAP 探索行動は、共通して CRF 受容体の活性化により発現する事が分かった。また、その反応はコルチコステロンの生成を介していない事が示唆される。一方、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) Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B.: Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.*, 15: 6340-6350, 1995.
- 2) Dautzenberg, F.M., Hauger, R.L.: The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23: 71-77, 2002.
- 3) Hiranita, T., Nawata, Y., Sakimura, K., et al.: Craving killers in methamphetamine dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103: 8523-8527, 2006.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

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*, 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.
5. Hiranita, T., Nawata, Y., Sakimura, K., Yamamoto, T.: Methamphetamine-seeking behavior is due to inhibition of nicotinic cholinergic transmission by activation of cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology*, 55: 1300-1306, 2008.
6. Sakae, N., Yamasaki, N., Kitaichi, K., Fukuda, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Hiranita, T., Tatsumi, Y., Kira, J., Yamamoto, T., Miyakawa, T., Nakayama, K.I.: Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyperactivity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum. Mol. Genet.*, 17: 3191-203, 2008.
7. Shigematsu, N., Fukuda, T., Yamamoto, T.,

- Nishioku, T., Yamaguchi, T., Himeno, M., Nakayama, K., Tsukuba, T., Kadowaki, T., Okamoto, K., Higuchi, S., Yamamoto, K.: Association of Catepsin E deficiency with the increase territorial aggressive response in mice. *J. Neurochemistry*, 105: 1394-1404, 2008.
8. 山本経之, 縄田陽子: 大脳基底核と脳内報酬 ; ドパミン伝達の観点から. *分子精神医学*, 8: 314-320, 2008.
 9. 縄田陽子, 山本経之: 薬物自己投与実験法を用いての薬物依存研究. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, 43: 158-165, 2008.
 10. 山本経之, 縄田陽子, 當原真奈美: 脳内 endocannabinoid の異常性に基づくマウスの知的機能障害. *分子精神医学*, 7: 83-84, 2007.
 11. 山本経之: 行動薬理額の側面からみた動物モデルの意義・役割・問題点. *日薬理誌*, 130: 94-96, 2007.
 12. 山本経之: カンナビノイド受容体—中枢神経系における役割. *日薬理誌*, 130: 135-140, 2007.
- ## 2. 学会発表
1. Yamamoto, T., Hiranita, T., Nawata, Y., Kagamiishi Y.: The role of corticotrophin-releasing factor in cue- and methamphetamine-induced reinstatement of methamphetamine-seeking in rats, CINP 50th Annual Meeting (Munich, Germany, 2008, July)
 2. Hiranita, T., Nawata, Y., Anggadiredja, K., Yamamoto, T.: Attenuation of methamphetamine-seeking behavior by a cannabinoid CB1 receptor antagonist via the activation of nicotinic transmission in the prelimbic cortex, The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 69th Annual Meeting (Quebec City, Canada, 2007, June)
 3. Nawata, Y., Hiranita, T., Kitaichi, K. and Yamamoto, T.: The involvement of the cannabinoid system in drug-seeking behavior and cognitive impairment after MDMA withdrawal, The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 69th Annual Meeting (Quebec City, Canada, 2007, June)
 4. 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)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 山本経之: 大麻/カンナビノイドの医薬品開発に向けての価値と問題点. 第2回東京フォーラム in 東京—九州からの情報発信 (東京、2008 年12月)
 8. 北市清幸, 縄田陽子, 濱崎直孝, 山本経之: アニオン交感輸送タンパク AE3 欠損マウスの行動薬理学的特性. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会 合同年会 (品川、2008年10月)
 9. 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: 合成麻薬 MDMA退薬時に認められる認知機能障害における脂質過酸化とカンナビノイドシステムの関与. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会 合同年会 (品川、2008 年10月)
 10. 山本経之, 縄田陽子, 平仁田尊人: シンポジウム「薬物療法による渴望感制御の可能性: 基礎と臨床の接点」、薬物自己投与実験法を用いて

のメタンフェタミン探索行動の発現における
CB1受容体ならびにニコチン性ACh受容体の関
与. アルコール・薬物依存関連合同学術総会（横
浜、2008年9月）

11. 縄田陽子, 平仁田尊人, 山本経之: 選択的
CRF₁受容体拮抗薬による覚せい剤メタンフェ
タミン探索行動の抑制. アルコール・薬物依存
関連合同学術総会（横浜、2008年9月）
12. 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: 認知機能障
害における内因性カンナビノイドならびにア
ラキドン酸カスケードの関与、第29回日本生物
学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会
合同年会（札幌、2007年7月）
13. 山本経之: シンポジウム:「鎮痛ターゲットと
してのカンナビノイドレセプタの可能性」、内
在性カンナビノイドの役割とその破綻—創薬
としての可能性—を探る、第28回鎮痛薬・オピ
オイドペプチドシンポジウム（札幌、2007年8
月）
14. 山本経之: シンポジウム:カンナビノイド—
毒変じて薬となる?—行動薬理学的側面から
みた中枢神経系における内因性カンナビノイ
ドの機能的役割、平成19年度北陸大学学術フロ
ンティア公開シンポジウム（金沢、2007年9月）
15. 山本経之, 平仁田尊人: MAP探索行動の発現
における前頭前皮質/側坐核でのACh受容体な
らびにCB1受容体の関与、平成19年度北陸大学
学術フロンティア公開シンポジウム（金沢、
2007年9月）

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2007-091379「薬物依存症治療薬 [エダラ
ボン]; (2007年3月30日)
- 2) 特願 EP1815853「薬物依存症治療薬
[(-)-BPAP]»; (2007年8月8日: ヨーロッパ広
域)

「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」
3年間のまとめ

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]

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。

A. 研究目的

オーファンレセプターの内因性リガンドとして同定された orexin は、前駆体タンパク質である prepro-orexin から生成され、7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体に結

合し、摂食や覚醒などの生理作用を示す神経ペプチドとして知られている。また、leptin は主として脂肪組織より循環血液中中に分泌される16 kDa のタンパク質であり、摂食量

抑制・体重増加抑制作用により生体のエネルギー代謝調節や神経内分泌調節に関与することが知られている。Leptin はトランスポーターを介して脳内に移行し、主に視床下部において leptin receptor (Ob-R) に結合することによりその作用を発現すると考えられている。一方、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が、これまでに orexin ならびに leptin をはじめとした神経ペプチドと dopamine 神経系の相互作用を示唆する報告は少ない。また、依存性薬物による中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化に対する orexin および leptin の介在に関しては報告がほとんどなされていないのが現状である。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ック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、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、これら視床下部神経ペプチドが脳内報酬系に及ぼす影響について多角的な検討を行った。さらに、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制御

について解析を行った。

B. 研究方法

実験には、SD 系雄性ラット、ICR 系雄性マウス、ob/ob マウス、db/db マウス、orexin knockout マウス、CCR2 knockout マウスおよびその野生型マウス C57BL/6J 系雄性マウスを使用した。薬物により誘発される報酬効果は conditioned place preference 法により測定し、自発運動量は tilting cage 法に従って評価した。逆耐性は 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形成させ、最終投与 24 hr 後にサンプル採取を行った。さらに、最終投与 5 weeks 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。In vivo microdialysis 法は、ペントバルビタール麻酔下、動物を動物脳定位固定装置に固定し、ステレオ用ガイドを用いてガイドカニューレを目的とする脳部位に植え込み、固定した後、ダミーカニューレを挿入した。カニューレ挿入 3-5 日後、orexin (1nmol/0.3 μ L) または leptin (2 μ g/0.3 μ L) を腹側被蓋野領域に微量注入し、HPLC-ECD システムを用いて側坐核領域における dopamine およびその代謝物の分離定量を行った。また、各種遺伝子発現の変化は 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、DNA メチル化の変化は ChIP on chip 法に従い検討した。一方、orexin 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化は fluo-3 法に従い測定した。さらに、orexin 誘発 G タンパク質活性化作用は、 $[^{35}S]GTP \gamma S$ binding assay 法に従って測定し

た。また、脳神経回路の解析は、イソフルラン (3%, 吸入) 麻酔下において神経軸索輸送物質である fluoro-gold (FG) を側坐核に注入することにより行った。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、脳内報酬系における orexin ならびに leptin の役割について多角的な検討を行った。まず、依存性薬物による精神依存形成や情動行動発現に重要な役割を果たすことが知られている帯状回、側坐核、腹側被蓋野、扁桃体および視床下部、ならびに疼痛制御に重要な役割を果たす橋/延髄および脊髄における orexin の発現分布を RT-PCR 法により検討した。その結果、orexin の前駆体である prepro-orexin mRNA の発現はいずれの部位においても認められるものの、特に視床下部における発現が顕著であった。そこで、これらの部位における機能的 orexin receptor の分布について検討を行う目的で、orexin A および orexin B による G タンパク質活性化作用を検討したところ、各脳部位において有意な orexin A および B 誘発 G タンパク質活性化作用が認められた。さらに、腹側被蓋野を含む中脳領域における orexin 受容体の発現分布を RT-PCR 法に従い検討したところ、腹側被蓋野被蓋野を含む中脳領域において orexin 1 receptor、orexin 2 receptor の発現が認められた。また、腹側被蓋野における orexin 1 receptor の分布を

確認する目的で、FG を側坐核領域に微量注入し、dopamine 生合成の律速段階酵素である tyrosine hydroxylase (TH) ならびに orexin 1 receptor の特異的抗体を用い、免疫染色を行った。その結果、腹側被蓋野領域において側坐核領域から逆行性に輸送されてきた FG の自家発光ならびに TH、orexin 1 receptor 陽性細胞がそれぞれ認められた。さらに、FG 陽性反応を有する TH 陽性細胞上に orexin 1 receptor の発現が認められた。この結果より、腹側被蓋野から側坐核に投射する dopamine 神経上に orexin 1 receptor が発現していることが明らかとなった。次に、TH 陽性のマウス由来初代培養神経細胞を用いて、orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定したところ、orexin の処置により濃度依存的かつ著明な神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた。一方、グリア細胞の一つであるアストロサイトにおける $[Ca^{2+}]_i$ の変化について検討したところ、orexin の処置ではいずれの濃度によってもアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ に変化が認められなかった。そこで次に、初代培養神経細胞を用いて orexin による神経細胞内 Ca^{2+} 応答における G タンパク質の関与について検討した。その結果、orexin A は $G_{q11}\alpha$ サブユニットを、orexin B は $G\beta$ サブユニットを介して $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示した。また、この orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、phospholipase C (PLC) 阻害薬 1-[6-[[[(17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U-73122)、protein kinase C (PKC) 阻害薬 chelerythrine の前処置により有意に抑制された。しかしながら、これらの反応は、extracellular signal-regulated kinase kinase

(MEK) 阻害薬である 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059) を前処置しても対照群と比較して有意な変化は認められなかった。一方、orexin による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、小胞体 Ca^{2+} 枯渇薬である thapsigargin ならびに電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬である nifedipine の前処置によっても有意に抑制された。そこで次に、orexin による報酬効果発現ならびに dopamine 遊離機構に PKC が関与するか否かについて検討を行ったところ、orexin A ならびに orexin B 誘発報酬効果発現ならびに側坐核における dopamine 遊離は、chelerythrine の前処置により有意に抑制された。以上の結果から、腹側被蓋野における orexin は、 $G_{q/11}\alpha$ あるいはおそらく G_i タンパク質の $G\beta\gamma$ サブユニットを介して PLC/PKC 経路を活性化させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで、中脳辺縁 dopamine 神経系の活動性を直接的かつ促進的に調節し、dopamine 神経が関与する情動行動の発現を一部調節している可能性が明らかとなった。次に、orexin を腹側被蓋野内へ処置した時の側坐核における dopamine ならびにその代謝物量の変化を検討したところ、有意な dopamine ならびにその代謝物量の増加が認められた。以上の結果から、脳内 orexin 神経系は中脳辺縁 dopamine 神経系の機能を促進的に調節し、dopamine の遊離を増加させていることが明らかとなった。一般的に、依存性薬物 morphine は中脳辺縁 dopamine 神経系を活性化させることにより、精神依存を形成することが知られている。そこで本研究では、morphine 誘発報酬効果の発現における腹側被蓋野内 orexin 神経系の役割を検討

した。まず、選択的 orexin 受容体拮抗薬 1-(2-methylbenzoxazol-6-yl)-3-[1.5]-naphthyridin-4-yl urea (SB334867A) を用いて morphine 誘発報酬効果発現に対する影響を検討したところ、morphine 誘発報酬効果は SB334867A を腹側被蓋野へ前処置することにより有意に抑制された。しかしながら、黒質へ SB334867A を前処置してもこのような抑制は認められなかった。さらに、prepro-orexin-knockout マウスを用いて morphine 誘発報酬効果発現の有無を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる morphine の用量に依存した報酬効果の発現は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて全く認められなかった。また、lithium 誘発嫌悪効果についても検討したところ、prepro-orexin-knockout マウスにおいて認められる lithium 誘発嫌悪効果の発現は、野生型マウスと比較してなんら変化は認められなかった。そこで、prepro-orexin-knockout マウスを用いて側坐核における morphine 誘発 dopamine 遊離の増加を検討したところ、野生型マウスにおいて認められる側坐核での DA 遊離量の増加は、prepro-orexin-knockout マウスにおいて有意に抑制された。これらのことから、中脳辺縁 dopamine 神経系を介した morphine 誘発報酬効果の発現には、腹側被蓋野に投射する orexin 神経系の活性化も関与している可能性が明らかとなった。また、morphine 誘発報酬効果ならびに自発運動促進作用の発現に対して、脳内 orexin 神経系が促進的に調節を行っている可能性が示唆された。

さらに、生体のエネルギー代謝調節や神経内分泌調節に関与する leptin に着目し

検討を行った。まず、腹側被蓋野を含む中脳領域における leptin 受容体の発現分布を RT-PCR 法に従い検討した。その結果、腹側被蓋野被蓋野を含む中脳領域において Ob-Ra、Ob-Rb の発現が認められた。そこで次に、腹側被蓋野から側坐核に投射している dopamine 神経が leptin により活性化されるか否かを *in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、腹側被蓋野に leptin を微量注入したところ、側坐核において dopamine 遊離量の増加が認められた。以上の結果より、腹側被蓋野から側坐核に投射している dopamine 神経が leptin により活性化される可能性が示唆された。また、morphine 誘発自発運動量促進作用に対する leptin の影響を 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* マウスを用いて検討した。その結果、wild type (WT) 群で認められた morphine 誘発自発運動量促進作用は、*ob/ob* マウスならびに *db/db* マウスにおいて有意に抑制された。この結果より、morphine 誘発自発運動量促進作用に対して脳内 leptin は促進的な調節を行っている可能性が示唆された。

そこで次に、その他の視床下部神経ペプチドが脳内報酬系の変化に関与しているか否かを検討した。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 法に従い検討したところ、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。そこで次に、神経-グリア細胞間ネットワークに着目し、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、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 (glial fibrillary acidic protein) 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 免疫活性の増強が認められた。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。以上の結果より、methamphetamine 誘発逆耐性形成には 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。そこで次に methamphetamine ならびに morphine 逆耐性形成時にエピジェネティクスな変化が引き起こされているか否かを詳細に検討する目的で ChIP 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、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、側坐核領域におけるエピジェネティクス修飾因子の遺伝子発現変化を検討したところ、saline 処置群と methamphetamine 処置群との間の各種エピジェネティクス修飾因子に有意な変化は認められなかった。以上の結果より、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一部関与している可能性が示唆された。さらに、CCR2 の発現変化が methamphetamine 誘発逆耐性の形成および維持に及ぼす影響を CCR2 knockout マウスを用いて検討した。その結果、wildtype マウスで認められる methamphetamine 誘発逆耐性は薬物最終投与 5 weeks 後に methamphetamine を再び投与しても維持されていたのに対し、CCR2

knockout マウスで形成された逆耐性は最終投与 5 weeks 後の methamphetamine の再投与において有意に抑制された。以上の結果より、methamphetamine 誘発逆耐性の維持に CCR2 が関与している可能性が示唆された。そこで次に、methamphetamine 逆耐性形成時の側坐核における DNA メチル化の網羅的解析を ChIP on chip 法に従い検討した。その結果、DC-STAMP domain containing 1、neurofibromatosis 1、S100 calcium binding protein A4、protease (serine 32)、HECT, UBA and WWE domain containing 1、sideroflexin 2、Ubiquitin-like 5 ならびに IL-11 receptor alpha chain 1 の DNA メチル化の増加ならびに 0.833 倍以下の遺伝子発現の減少が認められた。この他にもメチル化が増加し、発現が低下している遺伝子の数が約 120 個検出された。以上の結果より、methamphetamine 投与によりメチル化され発現量が低下している遺伝子数が多いことが明らかとなった。

D. 結論

本研究の結果より、脳内 orexin ならびに leptin は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、報酬効果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が示唆された。一方、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。また、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。さらに、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]

Fulton, S., Pissios, P., Manchon, R.F., et al.: Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*, 51: 811-822, 2006

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.

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.

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Narita, M., Nagumo, Y., Miyatake, M., Ikegami, D., Kurahashi, K. and Suzuki, T.: Implication of protein kinase C in the orexin-induced

elevation of extracellular dopamine levels and its rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.*, 25, 1537-1545 (2007)

2. Shiokawa, M., Narita, M., Nakamura, A., Kurokawa, K., Inoue, T. and Suzuki, T.: Usefulness of the dopamine system-stabilizer aripiprazole for reducing morphine-induced emesis. *Eur. J. Pharmacol.*, 570, 108-110 (2007)

3. Suzuki, T., Shindo, K., Miyatake, M., Kurokawa, K., Higashiyama, K., Suzuki, M. and Narita, M.: Lack of development of behavioral sensitization to methylphenidate in mice: correlation with reversible astrocytic activation. *Eur. J. Pharmacol.*, 574, 39-48 (2007)

4. Kato, H., Narita, M., Suzuki, M., Yoshimoto, K., Yasuhara, M. and Suzuki, T.: Role of tyrosine kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in morphine reward. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence*, 42, 13-20 (2007)

5. 葛巻直子, 成田 年, 鈴木 勉: 痛みシグナルによる情動障害と帯状回領域の変化. *医学のあゆみ*, 223, 713-716 (2007)

6. Niikura, K., Narita, M., Okutsu, D.,

- Tsurukawa, Y., Nanjo, K., Kurahashi, K., Kobayashi, Y. and Suzuki, T.: Implication of endogenous b-endorphin in the inhibition of the morphine-induced rewarding effect by the direct activation of spinal protein kinase C in mice. *Neurosci. Lett.*, 433, 54-58 (2008)
7. Niikura, K., Narita, M., Narita, M., Nakamura, A., Okutsu, D., Ozeki, A., Kurahashi, K., Kobayashi, Y., Suzuki, M. and Suzuki, T.: Direct evidence for the involvement of endogenous b-endorphin in the suppression of the morphine-induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state. *Neurosci. Lett.*, 435, 257-262 (2008)
8. Narita, M., Takei, D., Shiokawa, M., Tsurukawa, Y., Matsushima, Y., Nakamura, A., Takagi, S., Asato, M., Ikegami, D., Narita, M., Amano, T., Niikura, K., Hashimoto, K., Kuzumaki, N. and Suzuki, T.: Suppression of dopamine-related side effects of morphine by aripiprazole, a dopamine system stabilizer. *Eur. J. Pharmacol.*, 600, 105-109 (2008)
9. Ito, R., Miura, N., Iguchi, H., Nakamura, H., Ushiro, M., Wakui, N., Nakahashi, K., Iwasaki, Y., Saito, K., Suzuki, T. and Nakazawa, H.: Determination of tris(2-ethylhexyl)trimellitate released from PVC tube by LC-MS/MS. *Int. J. Pharm.*, 360, 91-95 (2008)
10. Narita, M., Suzuki, M., Kuzumaki, N., Miyatake, M. and Suzuki, T.: Implication of activated astrocytes in the development of drug dependence: differences between methamphetamine and morphine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1141, 96-104 (2008)
11. 塩川 満, 成田 年, 武井大輔, 松島勇紀, 高木茂実, 橋本敬輔, 池上大悟, 朝戸めぐみ, 平山重人, 成田道子, 新倉慶一, 葛巻直子, 鈴木 勉: モルヒネの副作用対策における新規抗精神病薬アリピプラゾールの有用性. *日本緩和医療薬学会雑誌*, 1, 83-94 (2008)
12. 成田 年, 葛巻直子, 新倉慶一, 鈴木 勉: 慢性疼痛と情動 -慢性疼痛と脳高次機能の歪み-. *ペインクリニック*, 29, 189-195 (2008)
13. 成田 年, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存形成の分子機構に及ぼす神経 - グリア相互作用の関与. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, 43, 13-18 (2008)

14. 成田 年: これからの痛み研究、オピオイド研究のあり方を考える -次世代の本物のトランスレーショナルリサーチを実現するために-. ペインクリニック, 29, 715-716 (2008)
15. 成田 年, 宮竹真由美, 鈴木雅美, 新倉慶一, 葛巻直子, 鈴木 勉: 3. オピオイド適正の有用性と安全性の科学的根拠: 医療用麻薬に対する誤解と覚醒剤との根本的相違点. ペインクリニック, 29, S371-S379 (2008)
16. 葛巻直子, 成田 年, 新倉慶一, 鈴木 勉: 痛みストレスによる帯状回領域の機能変化. ストレス科学, 23, 36-42 (2008)
17. 成田 年, 朝戸めぐみ, 新藤恵子, 葛巻直子, 鈴木 勉: メチルフェニデートとメタンフェタミンの細胞毒性の分子機構 -その相違とメチルフェニデートの安全性-. 日本神経精神薬理学雑誌, 29, 115-120 (2009)
18. 成田 年, 葛巻直子, 新倉慶一, 井関雅子, 稲田英一, 鈴木勉: オピオイドトランスレーショナルリサーチの最前線: μ 受容体の多様性と疼痛下でのオピオイド依存不形成機構. *Anesthesia 21 Century*, 11, 66-75 (2009)
19. 成田 年, 池上大悟, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉: エピジェネティクスの視点からみた薬物依存の新たな分子メカニズム. *Medical Bio*, 7, 18-23 (2009)
2. 学会発表
1. Suzuki,T., Ikegami,D., Asato,M., Narita,M., Saeki,M., Kuzumaki,N and Narita,M.: 「Distinct mechanism of methamphetamine- and methylphenidate-induced dopamine related-neurotoxicity」, The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 71th Annual Scientific meeting (2009)
2. Narita,M., Suzuki.T.: 「Mechanism of suppression of the morphine-induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state in rodents」, The International Narcotics Research Conference (INRC) (2009)
3. 生田和之, 成田 年, 成田道子, 新倉慶一, 三好 歓, 南雲康行, 橋本敬輔, 高津美和, 榎本紗耶香, 倉橋香菜, 鈴木雅美, 鈴木 勉: 「薬物依存の研究 (第 427 報): Morphine 誘発報酬効果発現時における側坐核細胞内情報伝達系の変化」, 第 16 回 神経行動薬理若手研究者の集い (2007)
4. 鈴木雅美, 成田 年, 南雲康行, 新倉慶一, 尾関あゆみ, 鈴木 勉: 「脳内報酬系における視床下部ネットワークに關与する神経ペプチドの役

- 割], 第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会合同年会(2007)
5. 新倉慶一, 成田 年, 成田道子, 中邨篤史, 葛巻直子, 南條加奈, 倉橋香菜, 小林泰久, 鈴木雅美, 鈴木 勉:「疼痛制御機構に関する研究 (第 66 報): 神経障害性疼痛によるモルヒネ精神依存不形成機構における内因性オピオイド神経系の関与」, 第 30 回日本神経科学大会 (2007)
 6. 松島勇紀, 成田 年, 新倉慶一, 成田道子, 朝戸めぐみ, 高木茂実, 葛巻直子, 鈴木 勉:「薬物依存の研究 (第 435 報): オピオイドによる報酬効果の発現に対する腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経の関与」, 第 82 回日本薬理学会年会 (2009)
 7. 鳥越一宏 1, 成田 年 1, 武井大輔 1, 塩川 満 1, 2, 松島勇紀 1, 高木茂実 1, 成田道子 1, 天野託 1, 3, 葛巻直子 1, 鈴木 勉:「モルヒネによるドパミン運動性副作用に対する非定型抗精神病薬の有用性の包括的解析」, 日本薬学会第 129 年会 (2009)
 8. 鳥越一宏, 成田 年, 武井大輔, 塩川 満, 成田道子, 天野 託, 余宮きのみ, 葛巻直子, 鈴木 勉:「モルヒネの副作用対策における非定型抗精神病薬の有用性の包括的解析」, 名古屋ペイン・有限責任中間法人日本ペインクリニック学会 第 43 回大会 (2009)
 9. 中原加恵, 成田 年, 松島勇紀, 成田道子, 高木茂実, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻 直子, 鈴木 勉:「薬物依存の研究 (第 437 報): μ オピオイド受容体作動薬による報酬効果発現および維持における腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経系の関与」, 平成 22 年度アルコーン・薬物依存関連学会合同学術総会 (2009)
 10. Nakahara,K., Narita,M., Matsushima,Y., Narita,M., Takagi,S., Niikura,K., Imai,S., Kuzumaki,N and Suzuki,T.:「IMPLICATION OF THE DOPAMINERGIC NEURON PROJECTING FROM THE VENTRAL TEGMENTAL AREA TO THE CINGULATE CORTEX IN THE μ -OPIOID RECEPTOR AGONIST-INDUCED REWARDING EFFECT」, 2nd Joint Symposium on Future Prospect of Pharmaceutical Sciences (2009)
 11. 鳥越一宏, 成田 年, 松島勇紀, 高木茂実, 中原加恵, 吉澤一巳, 葛巻直子, 天野 託, 鈴木 勉:「モルヒネによる中脳辺縁ドパミン神経系の活性化に対する各種抗精神病薬の効果」, 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 (2009)
 12. 高木茂美, 成田 年, 鳥越一宏, 松島勇紀, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉:「側坐核におけるモルヒネ誘発ドパミン遊離量の変化に対する各種抗精神病薬の影響」, 第 20

回マイクロダイアリス研究会
(2009)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
なし
なし

3. その他
なし

「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」
3年間のまとめ

乱用薬物に共通の依存症発症因子に対する新規 Ca^{2+} 動態調節剤の治療への応用

分担研究者：大熊誠太郎

研究協力者：芝崎真裕、黒川和宏

(川崎医科大学薬理学教室)

[研究要旨]

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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 動態調節機構の一端を担っている VGCC に着目し、新規 Ca^{2+} 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 α_{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 α_{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 α_{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 Ca^{2+} 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、本研究成果より、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 Ca^{2+} 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。

A. 研究目的

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。薬物依存モデル動物および薬物依存症患者にみられる症候、症状の一部は、使用された依存性薬物により症状や症候の発現の強さに違いは認められるものの、その精神依存性の形成・発現機序は共通の神経科学的機序を介していると考えられる。

動物実験の結果から、METH や morphine は慢性投与により脳の高次機能の非可逆的な変化、いわゆる神経の可塑的变化を生じることが明らかとなっている。精神依存形成時には、依存性薬物により種々の脳部位における形態的機能的変化が誘導され、神経伝達経路や効率が変化し、

異常なニューロンネットワークが構築されると考えられる。また、種々の薬物依存症において、腹側被蓋野から側坐核へと投射する中脳辺縁 dopamine (DA) 神経系が重要な役割を果たすことが、数多く報告されている^{14, 17, 25)}。こうした背景から、精神依存形成時における DA 神経系の変化について多くの検討が行われているが、それらの変化を誘導し、維持していると考えられる細胞内情報伝達系の機能変化に関する詳細な検討は十分ではない。

一方、電位開口性カルシウムチャンネル (VGCC) は興奮性細胞および非興奮性細胞の多くの細胞で発現しており、神経細胞を含む多くの活動性細胞の機能維持や炎症・感染などの病態生理学的変化に伴う細胞の機能変化に大きく関与している³⁾。このカルシウムチャンネルの活性化を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の調節機構には、細胞膜脱分極と細胞内情報伝達経路の大きく 2 経路により相互的に調節されている⁶⁾。細胞の多様性を調節する Ca^{2+} による生理作用の発現には、カルシウムチャンネル構成蛋

白の細胞内での局在が重要と考えられている^{3, 6)}。VGCCは細胞膜上にCa²⁺を透過させる $\alpha 1$ と呼ばれるpore形成subunitと、これに付随する $\alpha 2/\delta$ 、 β および γ subunitから構成されている。この中でも $\alpha 2/\delta$ subunitはカルシウムチャネルの局在や活性調節などの生理的機能調節に関与していると考えられている³⁾。カルシウムチャネルを介して細胞内に流入したCa²⁺は、生体物質の調節機能の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に関与している。一般に、定常状態の細胞内のCa²⁺濃度は100 nM程度に保たれており、細胞外からの刺激を受けると細胞外からのCa²⁺流入あるいは細胞内ストアである小胞体からのCa²⁺放出が生じる。この小胞体からのCa²⁺放出調節機構の一つがryanodine受容体である。Ryanodine受容体は、分子量400kDa以上の膜蛋白質が単一分子4量体を形成し構成されている。さらに、遺伝子クローニングの成果から、哺乳動物には別々の遺伝子にコードされる1型/骨格筋型(RyR1)、2型/心筋型(RyR2)、3型/脳型(RyR3)とよばれる3種類のryanodine受容体サブタイプが存在し、いずれのサブタイプも脳に発現が認められる。またryanodine受容体はCa²⁺誘導性Ca²⁺放出(CICR)を惹起し、多彩な標的を持つCa²⁺シグナルに変換する。しかしながら、依存性薬物による精神あるいは身体依存形成における、これら細胞内Ca²⁺動態の関連性については明らかとなっていない。

現在までにMETHの長期投与はDA神経におけるCa²⁺流入増加を誘発するこ

と²⁴⁾、METHの強化効果や報酬効果がdihydropyridine系薬物により抑制されることが報告されている^{8, 23)}。これらの事実は、METHによる精神依存形成機序に、VGCCの機能亢進を伴う細胞内Ca²⁺濃度の上昇が関与し、そのCa²⁺動態の変化が神経機能の変化を誘導していると推察される。一方、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知られている⁵⁾。神経細胞間における情報伝達はsynapseを介することが知られているが、synapseの形成には、actin・微小管など細胞骨格系が重要な働きをしており、actin結合蛋白質によりactinの重合・脱重合が調節されている。したがって、METHによる精神依存時に認められる細胞内Ca²⁺応答の変化はactin dynamicsの制御に重要な働きをしていることが推察される。現在までに細胞骨格の制御に関し、actin結合蛋白質である非筋型cofilin、筋型cofilin、actin depolymerizing factor (ADF)、などが同定されており、これらはfibrous (F)-actinに対する脱重合活性とactin filamentの切断活性を有することが明らかになっている⁷⁾。しかしながら、METH誘発精神依存におけるactin dynamics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、METHによる精神依存における脳内でのL型カルシウムチャネルを始めとする細胞内Ca²⁺動態の変化と細胞骨格の変化について、行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

実験には 6 週齢の ddY 系雄性マウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan)、C57BL/6J 系雄性マウスあるいは ADF 変異型動物である C57BL/6J *Smn-Dstn^{com1-2J}*/J 系雄性マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)、B6.129P2-*Cacna1c^{tm1Dgen}*/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) を使用した。マウスは恒温室 (22±1°C) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取させた。

2. 精神依存の評価

METH による精神依存は conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。実験装置は白および黒からなる compartment box を使用した。条件付けの前日あるいは翌日に、白および黒の区画を自由に往来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これをそれぞれ pre-test 値および post-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (1 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間放置し、2 日目には saline を投与し、もう一方の区画に 60 分間放置する操作を行い、この一連の操作を 1 session として、合計 3 session 行った。Saline のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。Post-test 値と pre-test 値の差をスコア (sec) として算出した。また、L 型 VGCC 拮抗薬である nifedipine (10-100nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA))、ryanodine 受容体拮抗薬である dantrolene (1-10nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA))、

$\alpha 2/\delta$ subunit 阻害薬である gabapentin (3-30nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA))、actin 重合阻害薬である cytochalasin D (0.3-3nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA))、actin 脱重合阻害薬である phalloidin (0.3-3nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA)) は METH 処置 30 分前に脳室内に投与した。

3. 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、自発運動測定装置 (Actimo-100 system, Shintechno Ltd., Fukuoka, Japan) を使用した。測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適応させるための時間とし、その後薬物を投与して自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間にわたり連続的に測定した。

4. 逆耐性形成モデルの作成

METH 誘発自発運動量促進作用の増強における逆耐性形成モデルの作製のために、マウスに 96 時間毎に METH (2 mg/kg, s.c.) を計 5 回間欠投与し、その投与毎に自発運動量を測定した。 $\alpha 2/\delta$ subunit 阻害薬である gabapentin (30nmol/mouse) は METH 処置 30 分前に脳室内に投与した。

5. 免疫組織学的染色法

METH 誘発報酬効果獲得動物および対照群のマウスを用いて、sodium pentobarbital (70 mg/kg, i.p.) 麻酔下、4% paraformaldehyde (pH 7.4) で灌流固定した。灌流後、脳を摘出し帯状回、側坐核を含む脳切片を 4% paraformaldehyde で 2 時間固定し、次いで sucrose にて置換した。この脳切片を液体窒素にて凍結後、クライオスタットにより 8 μ m に薄切し、poly-L-lysine コート化スライドガラスに