

201034059A

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)

乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

Study on mechanism, preservation,
diagnosis, and therapy of abuse drugs dependence

Annual Report

Research on Pharmaceutical and Medical Safety

Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2010

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 23 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）

乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

Study on mechanism, preservation,
diagnosis, and therapy of abuse drugs dependence

Annual Report
Research on Pharmaceutical and Medical Safety
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare,
Japan in 2010
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 23 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

平成 22 年度 研究報告書の刊行にあたって

研究代表者 鍋島 俊隆

厚生労働省発薬食 0526 第 59 号をもって交付決定の通知をうけた平成 22 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「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究」について、その総括研究報告書、分担研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 23 年 3 月吉日

目次

1. 平成 22 年度総括研究報告	1
2. 平成 22 年度分担研究報告	11
薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構	13
(大阪バイオサイエンス研究所 疋田 貴俊)	
モルヒネの精神依存形成におけるシクロフィリン D の役割	19
(名城大学大学院薬学研究科 研究員 毛利彰宏)	
(名城大学大学院薬学研究科 鍋島俊隆)	
薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究	32
(名城大学薬学部薬品作用学研究室 間宮 隆吉)	
乱用薬物への渴望再燃機構の解明とその治療薬開発に関する研究	37
(長崎国際大学薬学部薬理学 山本経之)	
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索	45
(富山大学大学院医学薬学研究部 薬物治療学講座 新田淳美)	
薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析	55
(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)	
覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序	68
(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)	
依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発	77
(東京医科歯科大学大学院 精神行動医科学分野 西川 徹)	
覚せい剤関連精神障害と活性型ミクログリア密度との関連性に関する研究	85
(千葉大学社会精神保健教育研究センター 関根吉統)	
(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)	
薬物依存の再発防止に関する研究	90
(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)	

3. 刊行物一覧(平成 22 年度).....	101
4. 研究代表者・研究分担者一覧	425

平成 22 年度 総括研究報告

研究代表者 鍋島俊隆

乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究

総括

本研究班の目的は、覚せい剤をはじめとする乱用薬物による神経毒性や依存症に対する予防・治療薬を開発し、薬物依存者の診断法を確立することであり、国際的な依存・乱用防止の啓発に役立て、研究成果を社会に還元することである。平成 22 年度の研究の目的は、これまでの事業で行ってきた乱用薬物の依存および精神行動障害の分子機序の解明およびそれに基づいた予防・治療および診断法に関する研究をさらに発展させ、基礎研究と臨床研究のクロストークによる臨床応用を目指すことである。すなわち乱用薬物の依存および精神行動障害動物モデルを用いて候補薬物のスクリーニングをさらに進めるとともに、有力な候補物質に関しては臨床研究で確立した診断法でその有効性を検討する。一方で、臨床知見で報告されている現象について動物モデルを用いて再現し、薬物に対する依存や精神毒性の発生機序や精神病の発症脆弱性を分子生物学的なレベルでさらに解明する。本研究では、基礎研究は鍋島俊隆が責任者となり、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、平成 22 年度において、すでに多くの研究成果が得られたので、その概要について報告する。

(I) 基礎研究

大脳基底核において主要な神経回路である直接路と間接路に対する可逆的神経回路伝達阻止法を開発し、大脳基底核神経回路の制御機構が乱用薬物による依存形成や精神障害の発症に関与していることを明らかにした。大脳基底核の主要な構成部位である側坐核においてのみ shat i を過剰発現もしくはドパミン D2 受容体を発現低下させ、これら分子が覚せい剤による依存形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。覚せい剤の連続投与後におけるストレスによる薬物に対する渴望および認知障害の発現において、カンナビノイド CB1 受容体の関与を明らかにした。コレシストキニン 2 受容体がドパミン受容体と共局在し、覚せい剤による依存形成においてコレシストキニンが重要な役割を果たす可能性を明らかにした。モルヒネによる依存形成においてシクロフィリン D が関与し、その分子を標的とするシクロスポリン A が依存形成を抑制することを明らかにした。覚せい剤ならびにエタノールによる依存とケモカイン受容体・NMDA 受容体サブユニット発現変化の関連について検討するとともに、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。

(II) 臨床研究

基礎研究において薬物依存への関与が明らかになった G タンパク質活性化型内向き整流性カリウムチャンネルの遺伝子多系が覚せい剤精神病への発症脆弱性と関与することを見出し

た。薬物再使用リスク評価尺度のフランス語版の作成をはじめ、この尺度を諸外国でリスク評価をするために使用し、データの収集に着手した。基礎研究において覚せい剤による行動変化におけるセロトニン1B受容体の関与を明らかにするとともに、臨床研究でセロトニン合成律側酵素（トリプトファン水酸化酵素）の遺伝子変異と覚せい剤精神病の関連を検討し、覚せい剤依存におけるセロトニン作動性神経系の関与について明らかにした。覚せい剤使用者の精神病症状と前頭葉の活性型ミクログリアの密度の増加の関連性について明らかにした。覚せい剤乱用による精神障害と樹状突起異常の関連性について、樹状突起に発現しシナプス機能に関与する spinophilin の大脳新皮質における発現変化を指標として、検討した。

本年度の成果および状況

1. 薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構

研究分担者：疋田貴俊（財団法人大阪バイオサイエンス研究所システムズ生物学部門）

本研究では、乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する大脳基底核において主要な神経回路である直接路と間接路に対する可逆的神経回路伝達阻止法を開発し、薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構を解析した。直接路あるいは間接路の中型有棘細胞にドキシサイクリン依存的に破傷風菌毒素を発現させることによって、マウス生体において直接路と間接路のそれぞれに特異的に可逆的神経伝達阻止ができる系を確立した。直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスに乱用薬物を投与し、行動観察を行うことによって、薬物依存行動への大脳基底核神経回路伝達遮断の影響を解析した。乱用薬物の急性投与による行動賦活作用には直接路と間接路が共に必須であった。それに対し、乱用薬物の慢性投与による依存形成には直接路が重要であることを示した。さらに報酬関連学習と忌避学習で直接路と間接路の役割の違いを見だし、大脳基底核神経回路の制御機構が乱用薬物による依存形成や精神障害の病態解明に重要であることを示した。

2. モルヒネの精神依存形成におけるシクロフィリンDの役割

研究分担者：鍋島俊隆（名城大学大学院薬学研究科）

モルヒネは強力な麻薬性鎮痛薬として繁用されているが、精神依存を惹起する危険性がある。一方、動物実験において免疫抑制剤であるシクロスポリンAがモルヒネにより惹起される場所嗜好性を抑制することが報告されている。そこで、本研究ではモルヒネにより惹起される精神依存に対するシクロスポリンAの予防・治療効果について検討した。シクロスポリンAの併用投与により、モルヒネによる行動量測定試験における行動感作および条件付け場所嗜好性試験における場所嗜好性の形成は抑制された。一方、モルヒネにより形

成された行動感作および場所嗜好性に対して、シクロスポリン A を投与しても影響を及ぼさなかった。次にシクロスポリン A はシクロフィリン D と強い親和性を有することから、モルヒネにより惹起される精神依存におけるシクロフィリン D の関与について検討を行った。免疫染色法により、シクロフィリン D および μ オピオイド受容体は腹側被蓋野 (VTA) において共局在が認められた。モルヒネによる行動感作および場所嗜好性の形成は、野生型マウスと比較してシクロフィリン D 遺伝子欠損マウスにおいては減弱した。また、シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスの側坐核 (NAc) におけるモルヒネによる細胞外ドパミン遊離量の増加は、野生型マウスのそれと比較して有意な低下が認められた。これら結果から、シクロスポリン A はモルヒネの精神依存に対する予防効果を有するが、治療効果は有さないことが示唆された。また、シクロフィリン D はモルヒネによる精神依存の形成に重要な役割を持ち、シクロスポリン A がそれを阻害することにより精神依存形成を抑制することが示唆された。

3. 薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究

～コレシストキニン受容体拮抗薬による覚せい剤依存症の治療の可能性～

研究分担者：間宮隆吉（名城大学薬学部）

コレシストキニン (CCK) が作用する受容体には CCK1 および CCK2 受容体の 2 つのサブタイプがあり、CCK2 受容体は主に脳内 (皮質や辺縁系) に分布している。CCK アナログの脳内投与によってアンフェタミンによる条件付け場所嗜好性が増強することや、CCK2 受容体を介した側坐核でのドパミン遊離を調節しているとの報告がある。これらのことは、覚せい剤による薬物依存に対して CCK2 受容体拮抗薬が治療薬となり得る可能性を示している。そこで初年度は選択的 CCK2 受容体拮抗薬、CI-988 を用いてメタンフェタミン連続投与による依存症状の形成や発現に対してその有効性について行動薬理学的および生化学的に検討した。

実験には C57BL/6J 雄性マウス (6-7 週齢) を使用した。条件付け場所嗜好性試験において、メタンフェタミン条件付け (1 mg/kg, s.c.) の 30 分前に CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) を併用投与したところ、CI-988 の用量依存的にメタンフェタミンによる場所嗜好性の形成が抑制された。一方、メタンフェタミン連続投与による場所嗜好性形成後の発現に対して CI-988 を急性投与しても何ら影響しなかった。また、行動量測定試験において、メタンフェタミン投与 (1 mg/kg, s.c.) の 30 分前に CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) を投与したところ、CI-988 は用量依存的にメタンフェタミンによる行動過多を抑制した。免疫組織化学的手法により側坐核における CCK2 受容体の発現を観察したところ、神経細胞上においてその発現が認められ、また主にドパミン D1 受容体との共局在が観察された。以上の結果より、CCK2 受容体はドパミン受容体と相互作用を有しており、CCK2 受容体拮抗薬がメタンフェタミンによる依存性行動の形成を抑制する可能性が示唆された。

4. 乱用薬物への渴望再燃機構の解明と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）

本研究では、覚せい剤 methamphetamine (MAP) 退薬時に発現する薬物への渴望（薬物探索行動）ならびに認知機能障害の発現機序を、脳内報酬系との関連性が示唆されているカンナビノイドシステムの観点から追究した。薬物への渴望は、特に渴望再燃の誘発因子の1つに挙げられるストレスに着目し実験を行った。

薬物への渴望は、ラットの薬物自己投与実験法を用いて検討した。まず、ラットがレバーを1回押せば音と光の薬物関連刺激（cue）と共に、MAP（0.02 mg/0.1 mL）が微量注入される実験を10日間行い、MAP摂取行動を獲得させた。その後、MAPをsalineに切り替え自己投与実験（cue呈示なし）を続けるとそのレバー押し行動は経日的に減弱した（消去過程；MAP退薬）。レバー押し行動の低下時に、オペラント装置の床面の金属性グリッドからのfootshock（0.8 mA；ON：1秒，OFF：10-70秒，15分間）ストレス負荷によるMAP探索行動（saline注入）のテストを行った。footshock負荷は、ラットのレバー押し行動を増加させMAP探索行動を誘発した。このMAP探索行動は、カンナビノイドCB₁受容体拮抗薬AM251（3.2 mg/kg, i.p.）により有意に抑制された。また、ストレス反応に伴うコルチコステロンの関与を調べる目的で、その合成阻害薬metyraponeを投与したが、MAP探索行動は抑制されなかった。一方、認知機能はマウスのnovel object recognition課題を用いて検討した。本課題は同一の2つの物体を設置して行うpre試行ならびにその3時間後に片方の物体を新奇物体に置き換えて行うtest試行からなる。vehicle投与マウスのtest試行での新奇物体へのアプローチ時間は、既存物体へのそれと比較し有意に長かった。7日間のMAP（1.0 mg/kg, i.p.）反復投与後の退薬時では、test試行における新奇物体へのアプローチ時間は有意に低下し、認知機能障害が認められた。この認知機能障害は、AM251（3.2 mg/kg, i.p.）のMAPとの併用反復投与により拮抗され、改善された。また、カンナビノイドCB₁受容体遺伝子欠損マウスでは、MAP退薬時に野生型マウスで認められた認知機能障害は全く認められなかった。

以上より、MAP退薬時に認められるストレス誘発性MAP探索行動、ならびに認知機能障害は、いずれもCB₁受容体の活性化により発現する事が明らかになった。また、少なくともfootshock誘発性のMAP探索行動の発現にはコルチコステロンの関与は低い事が示唆された。現在、マイクロダイアリシス法により、薬物探索行動発現時における脳内ドパミン遊離量の変容を追究している。次年度は、CB₁受容体の活性化に基づく薬物探索行動の発現機序におけるドパミン神経系の関与を検討する。

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索

分担研究者：新田淳美（富山大学大学院医学薬学研究部）

薬物乱用は世界各国で大きな問題となっており、その対策が講じられているにも拘らず、状況は悪化の一途をたどっている。本邦においては、覚せい剤メタンフェタミンや麻薬による犯罪事例の若年化が進んでおり、薬物乱用による薬物依存に対して医学的見地からの対処法の確立が求められている。そのためには薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、予防や治療法の開発に繋がる研究が必須である。これまでに薬物依存の形成には側坐核でのドパミン神経伝達が重要な役割を果たしていることが明かにされているが、その形成メカニズムは複雑で未だ不明な点が多く、未知の遺伝子が依存形成の鍵を握っている可能性が考えられる。本プロジェクトでは、覚せい剤の依存形成に関連する新規遺伝子を同定するとともに、その作用メカニズムの解明を試みてきた。昨年度までの本研究課題では、shati および piccolo という2つの分子が薬物依存に深く関与していることを明らかにした。特に、shati は覚せい剤による依存形成を抑制すること、ドパミン再取り込みを調節することを報告した。本年度は、薬物依存の形成メカニズムにおける側坐核でのドパミン神経機能の役割をより詳細に解明するために、側坐核においてのみ shati を過剰発現させたマウスを作製し、その生理機能および覚せい剤への反応性を検討した。さらに、側坐核においてのみドパミン D2 受容体を発現低下させたマウスも作製し、覚せい剤への反応性を検討した。

6. 薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析

研究分担者：鈴木 勉（星薬科大学薬品毒性学教室）

近年、大麻や覚せい剤などによる薬物乱用が度々報道され、大きな社会問題となっている。このような背景から薬物依存症の機序解明や治療薬の開発を目的とした研究が急務となっている。薬物の精神依存形成能の予測法のひとつである薬物弁別法は、薬物の摂取体験をもとに得られる自覚効果を実験動物で評価する方法である。一般的に、報酬効果や嫌悪効果の発現には脳内ドパミン神経系、特に中脳辺縁ドパミン神経系が重要な役割を果たしていることが知られており、薬物弁別法を用いた検討においても methamphetamine (METH) の自覚効果発現に中脳辺縁ドパミン神経系が深く関与していると考えられている。しかしながら、この精神依存形成の入り口とも言える依存性薬物の自覚効果発現のメカニズムはほとんど明らかにされていない。

一方、近年、cell memory をはじめとした神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが知られている。これまでの研究から、我々は、覚せい剤による逆耐性現象にエピジェネティック修飾を伴ったケモカイン受容体の一つである CCR2 の mRNA 発現量の長期的な増加が関与していることを見出している。そこで本研究では、METH の精神依存形成を制御する機能分子の活性変化やエピジェネティック修飾を伴った遺伝子発現変化の包括的理解を目的として、METH の弁別学習が完成された動物の脳組織標本を用いて多角的な分子生物学的検討を行った。

METH の弁別獲得後の脳内における各種機能分子の活性変化について、Western-blot 法を用いて検討を行った結果、側坐核ならびに扁桃体領域において、遺伝子発現を制御することが知られる、CREB、p38、ERK および Akt の有意な活性増加が認められた。このような条件下で、TaqMan PCR 法に従い、エピジェネティクス制御に深く関与する miRNA に着目し、その発現プロファイリングを行った。しかしながら、本研究では METH の弁別獲得動物の側坐核ならびに扁桃体領域において、著明な発現変動を示した miRNA は確認されなかった。

本研究では、METH の弁別刺激効果発現を制御する miRNA の発現変化は確認されなかったが、情動に基づく弁別刺激効果発現と脳内神経の可塑的变化を結びつけるアプローチは、METH の精神依存形成の複雑さを紐解く重要な鍵になると考えられ、今後、さらなる多角的な検討を行っていく予定である。

7. 覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

研究分担者：曾良一郎（東北大学大学院医学系研究科）

メタンフェタミン (METH) 依存の形成機序としてドーパミン神経系が重要な役割を果たしていると考えられているが、セロトニン神経伝達系の関与が示唆されている。我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰なセロトニントランスポーター欠損 (SERT KO) マウスでは METH 行動感作が形成されず、SERT KO マウスに 5-HT_{1B} 受容体阻害薬を前処置すると、METH 行動感作が形成された。さらに 5-HT_{1B} 受容体ホモ KO マウスでは METH 反復投与による移所運動量の増加が野生型マウスに比べて大きく行動感作形成が増強していた。そこで脳内微笑透析法を用いて METH 投与による細胞外ドーパミンの変化を測定した。5-HT_{1B} 受容体 KO マウスにおいて、METH 投与による細胞外ドーパミンは野生型マウスに比べて有意に増加していた。このことから、METH による行動感作形成には、5-HT_{1B} 受容体を介するセロトニン神経伝達が重要な役割を担うと考えられる。

Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) はセロトニン合成の律速酵素である。そこで TPH2 の遺伝子多型が METH 依存・精神病と相関するかどうかについて検討した。162 例の METH 依存・精神病患者と 243 例の健常人において TPH2 の遺伝子多型について解析したが、TPH2 の遺伝子多型と METH 依存・精神病患者とは有意な相関がみられなかった。これらの結果は、TPH2 の遺伝子多型はメタンフェタミン依存への脆弱性には関与していない可能性が示唆された。

8. 依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発

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）

依存性薬物による精神障害発症の分子機構の手がかりを得る目的で、樹状突起に発現してシナプス機能に関係し、統合失調症患者死後脳や、統合失調症様症状発現薬や抗精神病薬の投与動物の脳における変化が報告されてきた spinophilin について、ラット大脳新皮質

における覚せい剤・methamphetamine (MAP) の影響を調べた。MAP は、コカイン、nomifensine 等のドーパミン作動薬とともに、薬物による易再発性精神病状態のモデルと考えられている逆耐性現象を引き起こすことが知られているが、4.8ng/kg の急性投与 60 分後に spinophilin mRNA の発現を有意に減少させたが、120 分以降 24 時間後までは変化を生じさせなかった。コカイン (30mg/kg) および nomifensine (40mg/kg) でも投与 60 分後に同様の減少が認められた。また、MAP (4ng/kg) を 5 日間、1 日 1 回反復投与した後 19 日間休薬した、逆耐性現象が確認される動物の脳新皮質では、基礎的発現が有意に低下したが、生理食塩水を反復投与した対照群に MAP (1.6ng/kg) をチャレンジしたときに見られる spinophilin mRNA 発現の抑制が消失することがわかった。以上の結果は、MAP による逆耐性現象その他の長期持続性の変化の維持と形成に、脳新皮質の spinophilin が関与することを示唆しており、薬物性精神障害が樹状突起異常と関係する可能性が注目される。

9. 覚醒剤関連精神障害と活性型ミクログリア密度との関連性に関する研究

研究分担者：伊豫雅臣（千葉大学大学院医学研究院）

研究協力者：関根吉統（千葉大学社会精神保健教育研究センター）

従来、我々は覚醒剤（メタンフェタミン）の使用が、ヒトの脳内においてミクログリアの過剰な活性化を惹起することを明らかにした。しかし、それらが覚醒剤により引き起こされる精神症状と関係するか否かは不明である。そこで本年は、覚醒剤使用者の活性型ミクログリア密度と精神症状についての関連性を検討した。対象は覚醒剤使用者で現在同薬を断薬しているもの 12 名である。精神症状の評価には簡易精神症状評価尺度陽性症状下位スコア（精神病症状が大きいほどスコアが高くなる）を用いた。統計解析には Kendall's tau を用いた。その結果、前頭葉の活性型ミクログリアの密度と簡易精神症状評価尺度陽性症状下位スコアとの間に負の相関が認められた。従って、前頭葉における活性型ミクログリアの増加が覚醒剤使用者の精神病症状と関連していることが示唆された。このことから、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリン等の抗炎症剤が覚醒剤関連精神障害に有効であることが推測された。

10. 薬物依存の再発防止に関する研究

研究分担者：池田和隆（東京都精神医学総合研究所精神生物学分野）

乱用薬物に対する依存や乱用薬物による精神病症状は、治療が難しく再発率が極めて高い。本研究では、乱用薬物によるこれらの精神障害の再発を防止することを目的としている。第一に、乱用薬物に対する感受性や乱用薬物による精神病発症脆弱性の遺伝的要因を明らかにし、ゲノム解析により再発リスクを予測する技術の開発を目指している。今年度は、覚せい剤依存患者のゲノム DNA および覚せい剤精神病に関わる臨床情報を 200 セット以上導入し、ドーパミンやオピオイドのシグナル伝達で重要な G 蛋白質活性型内向き整流性カリ

ウム(GIRK)チャンネルに関して、遺伝子多型と発症脆弱性との関連解析を開始した。その結果、GIRK3 サブユニットの遺伝子多型が覚せい剤依存脆弱性と関連することを見出した。第二に、今までに開発した薬物再使用リスク評価尺度を用いることで、再発と関連する認知や行動の特徴を把握し、再発防止に繋げる技術の開発を目指している。今年度は、フランス人の精神科医が6ヶ月間研究に加わり、再飲酒リスク評価尺度のフランス語版を作成した。また、法務機関で薬物再使用リスク評価尺度が実施された際のデータを収集し、解析を開始した。

平成 22 年度 分担研究報告

薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構

研究分担者：疋田貴俊

(財団法人大阪バイオサイエンス研究所 システムズ生物学部門)

[研究要旨]

本研究では、乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する大脳基底核において主要な神経回路である直接路と間接路に対する可逆的神経回路伝達阻止法を開発し、薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構を解析した。直接路あるいは間接路の中型有棘細胞にドキシサイクリン依存的に破傷風菌毒素を発現させることによって、マウス生体において直接路と間接路のそれぞれに特異的に可逆的神経伝達阻止ができる系を確立した。直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスに乱用薬物を投与し、行動観察を行うことによって、薬物依存行動への大脳基底核神経回路伝達遮断の影響を解析した。乱用薬物の急性投与による行動賦活作用には直接路と間接路が共に必須であった。それに対し、乱用薬物の慢性投与による依存形成には直接路が重要であることを示した。さらに報酬関連学習と忌避学習で直接路と間接路の役割の違いを見だし、大脳基底核神経回路の制御機構が乱用薬物による依存形成や精神障害の病態解明に重要であることを示した。

A. 研究目的

大脳基底核は乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する重要な脳部位である。研究分担者はこれまでにイムノトキシン細胞標的破壊法を用いて側坐核のアセチルコリン産生細胞を除去したマウスにコカインおよびモルヒネを連続投与すると、薬物依存の感受性が顕著に高まることを明らかにした¹⁾²⁾。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤がコカイン依存、モルヒネ依存の改善に効果があり、その効果点が側坐核のアセチルコリン産生細胞であることを示した²⁾。さらに、報酬関連学習においてもアセチルコリン産生細胞の関与を示した³⁾。このように、アセチルコリン産生細胞の機能を解明することによって、薬物依存形成に関与する大脳基底核局所神経回路の制御機構を探求してきた。一方、大脳基底核においてドーパミンやアセチルコリンの入力を受け

る中型有棘細胞については、黒質網様部あるいは腹側被蓋野に行く直接路と、淡蒼球を介する間接路に投射先の違いによって大きく二分されているにもかかわらず、形態に違いがないことから、直接路と間接路での中型有棘細胞の情報処理やそれに関与する分子の違いについては、未解明のままであった。本研究では、大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発し、薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構を同定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 実験動物

TN トランスジェニックマウス⁶⁾とその同胞野生型マウス(wt)を用いた。ドキシサイクリン(DOX)投与は DOX を 6 mg/g 混入させた餌と 2 mg/ml の DOX と 10% の sucrose を含有する水をマウスに与

えることによって行った⁶⁾。全ての動物実験は財団法人大阪バイオサイエンス研究所の動物実験に関する指針に従った。

2. アデノ関連ウイルスの作製

サブスタンス P 遺伝子 β -preprotachykinin A (PPTA) あるいはエンケファリン遺伝子 preproenkephalin A (PPE) の上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA) をアデノ随伴ウイルスベクター pAAV (Stratagene) に組み込んだ。AAV は AAV Helper-Free System (Stratagene) を用いてマニュアルに従い作製した。AAV は既発表論文に従い定位的に線条体あるいは側坐核に投与を行った^{1),5)}。

3. 免疫組織染色およびウエスタンブロット法

AAV 感染 2 週間後に、既発表論文に従い 40 μ m の線条体冠状切片に対して免疫染色を行った^{1),6)}。GFP および VAMP2 に対するウエスタンブロット法は既発表論文に従い行った⁶⁾。

4. 行動実験

回転行動観察は既発表論文に従った⁴⁾。メタンフェタミンは 2 mg/kg を腹腔内投与し、60 分間の移行行動量を調べた。コカインは 10 mg/kg 腹腔内投与し、依存行動試験は既発表論文に従った¹⁾。抑制性回避試験は、狭い明室と広い暗室を連結した装置を用いた。条件付け前には、マウスを明るい小部屋に入れると、マウスの好む環境である暗室に速やかに移動する。マウスが暗室に 4 つの脚全てを入れた時点で、2 部屋を区切る扉を閉じ、床に 0.5mA, 60 Hz, 1 sec の電流を流すことで電気ショックを与えた。24 時間後に忌避学習の保持を測定するために、電気ショック無しで同様の手順を行い、暗室に入るまでの時間を測定した。

C. 研究結果

1. 大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法の開発

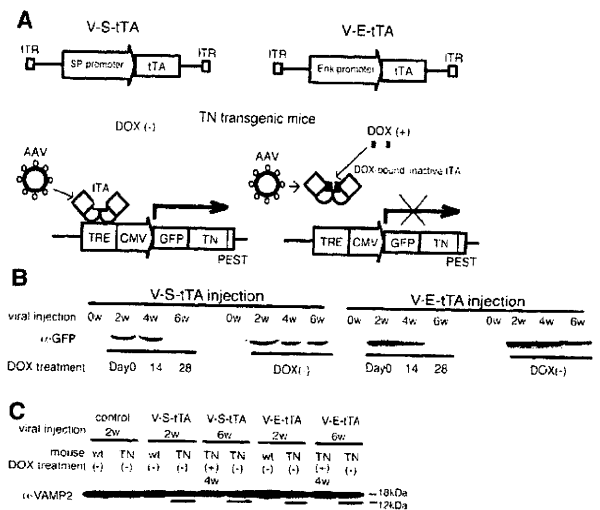


図 1. (A) AAV コンストラクトと可逆的神経伝達阻止法。(B) GFP 抗体によるウエスタンブロット像。(C) VAMP2 抗体によるウエスタンブロット像。18kDa は全長 VAMP2、12kDa は切断された N 末断片を示す。

直接路の中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路の中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk) がそれぞれ特異的に発現する⁴⁾。そこで、SP 遺伝子あるいは Enk 遺伝子上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA) をアデノ随伴ウイルスベクターに導入した (図 1A 上, V-S-tTA と V-E-tTA)。作製した遺伝子組み換え AAV を tetracycline-responsive element (TRE) の下流に CMV をプロモーターとして GFP と破傷風菌毒素 tetanus neurotoxin (TN) の融合タンパクを発現させる遺伝子を持つ TN トランスジェニックマウス⁶⁾の線条体に打ち込み、線条体神経細胞に感染させた (図 1A 下)。破傷風菌毒素 TN はシナプス小胞関連蛋白質である VAMP2 を切断し、シナプス小胞を介した神経伝達を遮断する⁶⁾。このマウスにドキシサイクリン (DOX) を与えると、tTA は不活性型となり、GFP-TN の発現は消失し、PEST 配列を介して、GFP-TN は分解され、やがて新生した VAMP2 によって神経伝達は再開する (図 1A 下)。これにより DOX 依存的な可逆的神経伝達阻

止を行う。直接路と間接路への本方法の特異的な適応は AAV ベクター内の SP と Enk のプロモーター活性に依存する。直接路と間接路の中型有棘細胞特異的に GFP-TN が発現しているかは、感染させた線条体を GFP と SP, Enk の前駆体である PPTA, PPE の抗体で二重免疫組織染色を行い、GFP-TN は目的の神経細胞に特異的に発現していることを確認した³⁾。可逆的な TN の発現は GFP 抗体に対するウエスタンブロット法で行った (図 1B)。AAV 投与 2 週以降に継続的な GFP-TN の発現を確認した。この GFP-TN は DOX 投与 4 週間 (Day 28) で消失した。TN が神経伝達を遮断していることは VAMP2 の N 末に対する抗体で確認した (図 1C)。TN マウスの線条体への AAV 投与 2 週以降に VAMP2 の N 末切断断片 (12kDa) を確認した。この VAMP2 の N 末切断断片は DOX 投与 4 週間で消失した。次に、片側線条体に AAV を感染させた TN マウスは、直接路遮断では感染線条体同側方向への回転行動が、間接路遮断では反対方向に回転行動が見られた (図 2)。これらの異常回転行動は DOX 4 週投与で消失した。すなわち、DOX ON/OFF によって、可逆的に神経伝達を阻止する方法を大脳基底核の直接路あるいは間接路において特異的に確立した³⁾。

2. 乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構

直接路あるいは間接路に特異的な可逆的神経伝達遮断を行ったマウスに対して、覚せい剤あるいはコカインを全身投与し移所行動量を測定することによって、乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構を解析した (図 3)。線条体の直接路遮断 (図 3A, D-RNB) と間接路遮断 (図 3B, I-RNB) は共にメタンフェタミン投与による急性移所行動量増加を完全に抑制した。DOX 投与による神経伝達再開によるメタンフェタミンによる移所行動量増

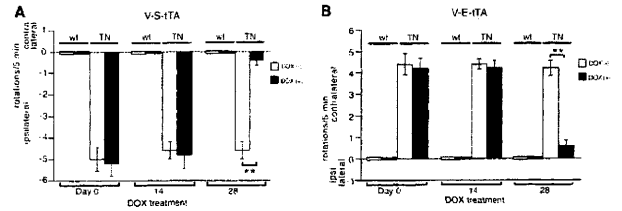


図 2. V-S-tTA (A) または V-E-tTA (B) を左線条体に投与された TN マウスと野生型マウス (wt) が示す異常回転行動。各 5 匹の平均回転数と標準誤差を示す。** $p < 0.01$ 。

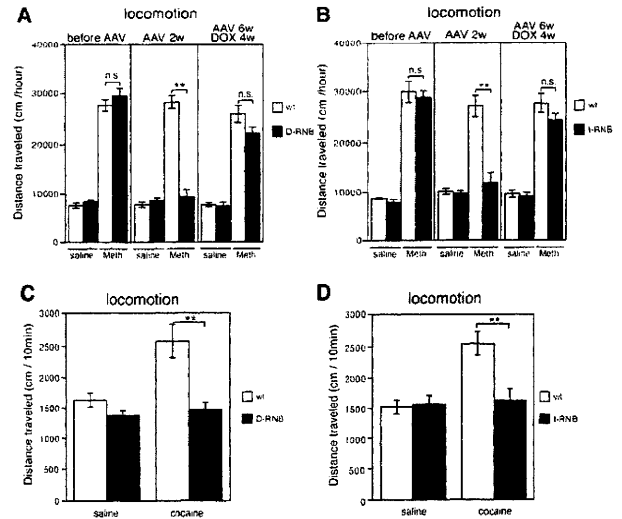


図 3. 乱用薬物による急性反応への神経遮断の影響 (A, B) V-S-tTA (A) または V-E-tTA (B) を両側線条体に投与された TN マウス (D-RNB または I-RNB) と野生型マウス (wt) が示す生理食塩水 (saline) または 2mg/kg のメタンフェタミン (Meth) 腹腔内投与後 1 時間の移動距離 ($n=5-6$)。 (C, D) 両側側坐核への AAV 投与 2 週後、生理食塩水または 10mg/kg のコカインを腹腔内投与後 10 分間の移動距離 ($n=8$)。** $p < 0.01$; n.s., 有意差なし。

加は再発した (図 3A, B)。側坐核の直接路遮断と間接路遮断は共にコカインによる移所行動量を抑制した (図 3C, D)。これらから乱用薬物の急性投与による行動賦活作用において、直接路と間接路は共に必須であることを示した³⁾。

3. 乱用薬物の慢性投与による薬物依存形成への直接路と間接路の神経伝達の役割

野生型マウスは乱用薬物の連日投与により行

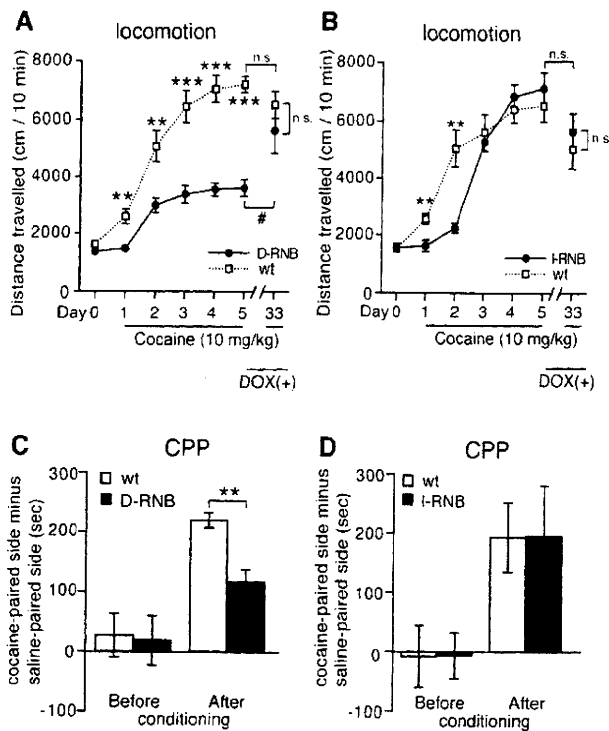


図 4. 薬物依存形成における神経遮断の影響。両側側坐核に AAV を投与し直接路遮断 D-RNB (A,C) または間接路遮断 I-RNB (B,D) を行った。(A,B) 生理食塩水を 3 日間投与した翌日より、10mg/kg のコカインを連日腹腔内投与し 10 分間の移動距離を測定した (n=8)。Day6 から DOX 投与を行い Day33 にコカイン再投与を行った。(C,D) 3 日間 10mg/kg のコカインにより条件付けを行い、Day4 に条件付け場所嗜好性を測定した (n=6-8)。**p<0.01; ***p<0.001; #p<0.05; n.s., 有意差なし。

動量を増大させる増感現象を引き起こす。側坐核の間接路遮断したマウスはコカイン反復投与による行動量増感に遅れを生じたが、第 3 日以降に野生型マウスと同等の高い移所行動量に達した (図 4B)。それに対して、側坐核の直接路遮断マウスは行動量増感を大幅に抑制した (図 4A)。また、乱用薬物の慢性投与による精神依存形成を調べるためにコカインの連日投与による条件付け場所嗜好性試験を行うと、側坐核の直接路遮断マウスでは条件付け場所嗜好性は有意に減少したが、側坐核の間接路遮断マウスは野生型マウスと

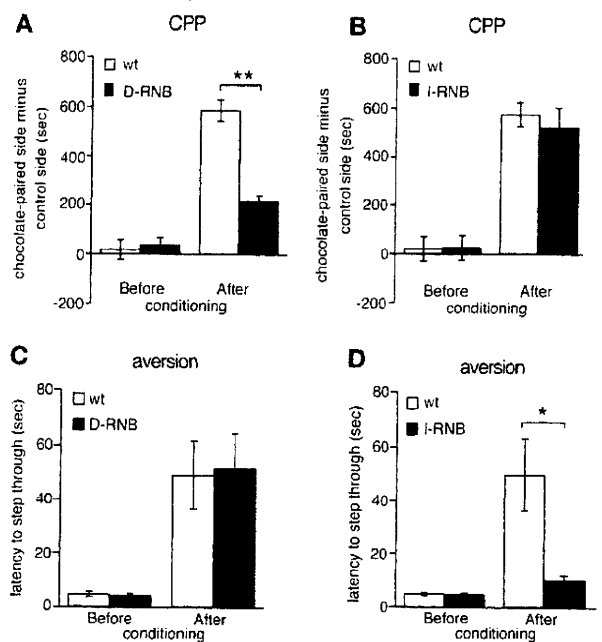


図 5. 報酬関連学習と忌避学習における神経遮断の影響。両側側坐核に AAV を投与し直接路遮断 D-RNB (A,C) または間接路遮断 I-RNB (B,D) を行った。(A,B) 3 日間チョコレート自由摂取により条件付けを行い、Day4 に条件付け場所嗜好性を測定した (n=6)。(C,D) 一試行による抑制性回避試験において、暗室に入るまでの時間を測定した (n=6-7)。**p<0.01; *p<0.05。

同等の条件付け場所嗜好性を示した (図 4C, D)。これらの結果から、直接路の神経伝達が乱用薬物の慢性投与による依存形成に重要であることを示した³⁾。

4. 報酬関連学習と忌避学習における神経伝達遮断の影響

乱用薬物による精神障害における大脳基底核神経回路を考察するにあたり、高次脳機能における直接路あるいは間接路の神経伝達遮断の影響を調べた。チョコレートによる条件付け場所嗜好性試験では、直接路遮断でのみ報酬関連学習が阻害された (図 5A, B)。次に、忌避学習における神経伝達遮断の影響を一試行による抑制性回避試

験を用いて調べた(図 5C, D)。野生型マウスは、前日に電気ショックを受けた暗室への入室時間が延長した。この忌避学習は直接路遮断マウスにおいても保たれていた(図 5C)。それに対して、間接路遮断マウスは忌避学習の保持が見られず、電気ショック前後で有意差なく暗室に入室した(図 5D)。これらの結果から、報酬関連行動には直接路の神経伝達が、忌避学習には間接路の神経伝達がそれぞれに必須であることがわかった³⁾。

D. 考察

乱用薬物による急性反応には直接路と間接路の両方が関与しているのに対し、コカイン連日投与による依存形成においては直接路が必須であった。報酬関連学習と忌避学習で直接路と間接路の役割の違いを見いだしたことより、乱用薬物による依存症状と精神症状における直接路と間接路のそれぞれが独自の役割を担っていることが示唆された。

E. 結論

大脳基底核神経回路の直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発した。本方法により、乱用薬物の急性投与による行動賦活作用には直接路と間接路が共に必須であった。それに対し、乱用薬物の慢性投与による依存形成には直接路が重要であることを示した。乱用薬物による依存形成や精神障害の病態を知る際に神経回路制御機構の解明が求められる。

[参考文献]

- 1) Hikida, T., Kaneko, S., Isobe, T., et al.: Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 13351-13354, 2001.
- 2) Hikida, T., Kitabatake, Y., Pastan, I., et al.:

Acetylchline enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 6169-6173, 2003.

- 3) Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., et al.: Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66: 896-907, 2010.
- 4) Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289: 633-637, 2000.
- 5) Kitabatake, Y., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 7965-7970, 2003.
- 6) Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., et al.: Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J. Neurosci.*, 23: 6759-6767, 2003.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66: 896-907 (2010)
2. 疋田貴俊、神谷篤：精神疾患モデル動物の可能性 -遺伝子から神経回路へ。 *実験医学*, 28: 2205-2210 (2010)

2. 学会発表