

1. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of striatonigral and striatopallidal transmission in reward and aversive behavior. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2010年11月
2. Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Tankou, S., Huang, B., Pou, S., Ozaki, N., Hikida, T., Kamiya, A., Nabeshima, T. and Sawa A.: Dopaminergic disturbance and behavioral deficits in a novel genetic model of DISC1, which are highly influenced by social isolation stress. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2010年11月
3. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. 平成22年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ, 札幌市、2010年7月

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称: 大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法
2010年4月30日国際出願(PCT/JP2010/003089)
出願人: 財団法人大阪バイオサイエンス研究所
発明者: 足田貴俊、中西重忠

2. 実用新案登録

なし

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¹

研究協力者：毛利彰宏^{1,2,3}、小林万佑子²、古関竹直¹、野田幸裕³、山田清文²

(¹名城大学薬学部薬品作用学,²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学,³名城大学薬学部病態解析学)

[研究要旨]

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 の効果について詳細な検討を行った。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 はモルヒネによる精神依存形成を抑制する効果を有するが、一旦形成された精神依存に対する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。

A. 研究目的

モルヒネは臨床において全世界で繁用されている強力な麻薬性鎮痛薬である。一方、モルヒネ慢性投与は薬物依存を形成する危険性があるため、モルヒネの依存形成機構を正しく理解することが、モルヒネの適正使用を推進する上で不可欠である。実験動物において、モルヒネの慢性投与により精神依存の指標となる行動変化を生じることが報告されており、場所嗜好性の発現、行動

量の増加および行動感作が認められる (Kuribara, 1995; Ribeiro *et al.*, 2005; Fenu *et al.*, 2006; Valjent *et al.*, 2010)。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との報告がある (Suzuki *et al.*, 1993; Langroudi *et al.*, 2005)。しかし、モルヒネ誘発性行動感作に対するシクロスポリン A の効果など他の精神依存の指標となる行動試験を用いた報告がなく、体系的な評価はされていない。そこで本研究では、

モルヒネによる精神依存に対するシクロスポリン A の効果について体系的に評価することを目的とし、モルヒネによる精神依存の形成に対するシクロスポリン A の効果、およびモルヒネにより一旦形成された精神依存に対するシクロスポリン A の効果について行動学的解析を行った。さらに、モルヒネ誘発性精神依存の形成機構におけるシクロスポリン A と強い親和性を有するシクロフィリン D の関与を解明するため、シクロフィリン D の脳内での局在を検討し、シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスにおけるモルヒネによる精神依存形成について行動学的解析および生化学的解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には体重 20~30 g の雄性 C57BL/6J マウス (Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan) および雄性 Cyp D (-/-) マウスを用いた。Cyp D (-/-) マウスは Nakagawa ら (2005) が作製し、C57BL/6J とヘテロ型シクロフィリン D 遺伝子欠損 [Cyp D (+/-)] マウスを F10 まで交配させ、99.99 % の C57BL/6J の遺伝的背景をもつマウスを用いた。動物は室温 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、8:00~20:00 明期の明暗サイクルの恒温室でプラスチック製ケージを用いて飼育した。水および飼料 (CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) は自由に摂取させた。なお、本研究は名城大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。

2. 行動量測定試験

透明なアクリル製のケース (45 × 26 × 40 cm) と黒色のつや消しプラスチック製の床からなる装置を用いた。ケース内での行動量を Scanet 装置 (SV-10, Melquest, Toyama, Japan) により測定した。マウスを装置に馴化させるため、1 日目にマウスを無処置で装置に入れ、1 時間の行動量を

測定した (habituation)。2 日目から 8 日目にかけて、モルヒネまたは生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) 投与の 30 分前に投与した。2, 4, 6, 8 日目にモルヒネ投与後直ちにマウスを装置に入れ、行動量を 1 時間測定した (test)。5 日間の休薬後、14 日目にモルヒネ (10 mg/kg, s.c.) を投与した後、直ちに行動量を 1 時間測定した (challenge)。モルヒネを連続投与することによって生じる行動量増加の亢進を行動感作の指標とした。

3. 条件付け場所嗜好性試験

透明なプラスチック製の箱 (明室) と黒色のプラスチック製の箱 (暗室) (どちらも 15 × 15 × 15 cm) の 2 つの部屋からなっており、スライド式の仕切り (10 × 15 cm) で区切られている装置を用いた。マウスがこの 2 つの部屋を区別できるように、明室の床は白色プラスチック製の凹凸のある網で覆い、暗室の床はプラスチック製の平らな板で覆った。明室の上方には白熱電灯 (6 W, 20 cm) を設置した。各部屋の滞在時間を測定するため、この装置を Scanet 装置 (SV-20 LD, Melquest, Toyama, Japan) 内に設置した。1 日目と 2 日目に 2 区画の間の仕切りを外してマウスが両方の部屋を自由に移動できるようにし、マウスを装置内に入れて 15 分間自由に探索させ、馴化させた (habituation)。3 日目にマウスを同様に装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (preconditioning test: pre test)。4 日目から 9 日目にかけて、モルヒネの条件付けを行った (conditioning)。4, 6, 8 日目に、モルヒネ (10 mg/kg, s.c.) または生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) をマウスに投与し、その直後にどちらか一方の部屋に 20 分間閉じ込めた。5, 7, 9 日目には、生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) を投与した後にモルヒネで条件付けを行っていないもう一方の部屋にマウスを 20 分間閉じ込めた。なお、条件付けする部屋は、カウンターバランス法により各群

投与群と比較して有意に認められた (データ示さず, $p < 0.01$)。その後、5日間の生理食塩水投与後の post test における MOR/saline 投与群において、モルヒネによる場所嗜好性が saline/saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 4, $p < 0.01$)。MOR/CsA (10 mg/kg) 投与群および MOR/CsA (20 mg/kg) 投与群において、5日間の CsA 投与の MOR 誘発性場所嗜好性への影響は MOR/saline 投与群と比較して認められなかった (Fig. 4)。また、saline/CsA (10 mg/kg) 投与群および saline/CsA (20 mg/kg) 投与群において、CsA の5日間投与による場所嗜好性への影響は saline/saline 投与群と比較して認められなかった (Fig. 4)。

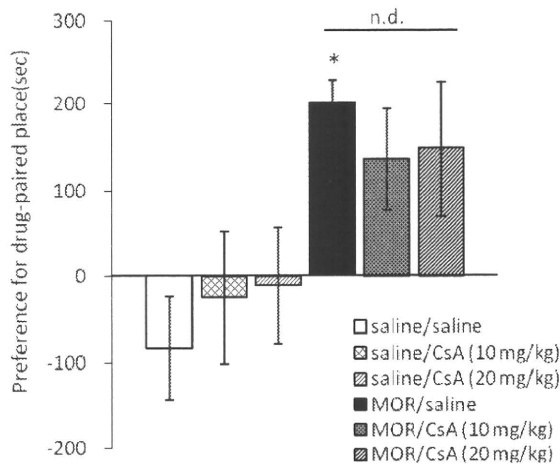


Fig. 4. Post-treatment with CsA did not attenuate the MOR-induced place preference after its development. Values are means \pm S.E. ($n = 7-11$). Results with the two-way ANOVA were: F MOR (1, 43) = 14.965, $p < 0.01$, F CsA (2, 43) = 0.052, $p = 0.95$, F MOR \times CsA (2, 43) = 0.628, $p = 0.54$. * $p < 0.05$ vs saline/saline-treated group. CsA: cyclosporin A, MOR: morphine, n.d., no difference.

3.1. シクロフィリン D および μ オピオイド受容体の脳内局在の確認

雄性 C57BL/6J マウスの腹側被蓋野 (VTA) におけるシクロフィリン D (Cyp D) および μ オピオイド受容体 (μ OR) の抗体を用いた免疫染色像を Fig. 5 に示した。VTA において、Cyp D と μ OR は共局在が認められた (Fig. 5)。

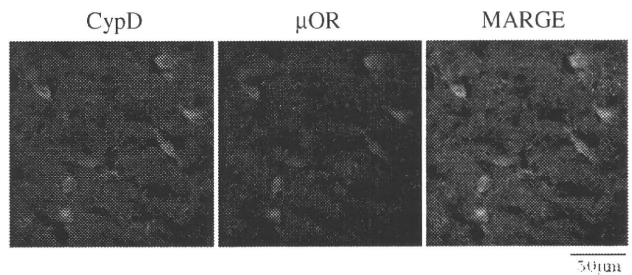


Fig. 5. Cyp D and μ OR were colocalized in the ventral tegmental area of mice. Cyp D: cyclophilin D, μ OR: μ opioid receptor.

3.2. シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスにおけるドパミン遊離量の測定

シクロフィリン D 遺伝子欠損マウス [Cyp D (-/-)] 群の側坐核 (NAc) におけるモルヒネにより誘発される細胞外ドパミン遊離量の変化を Fig. 6 に示した。野生型マウス (WT) 群の NAc において、モルヒネ誘発性細胞外ドパミン量の増加が認められた。一方、Cyp D (-/-) 群の NAc において、モルヒネ誘発性細胞外ドパミン量増加に対する低下が WT 群と比較して有意に認められた (Fig. 6, $p < 0.01$)

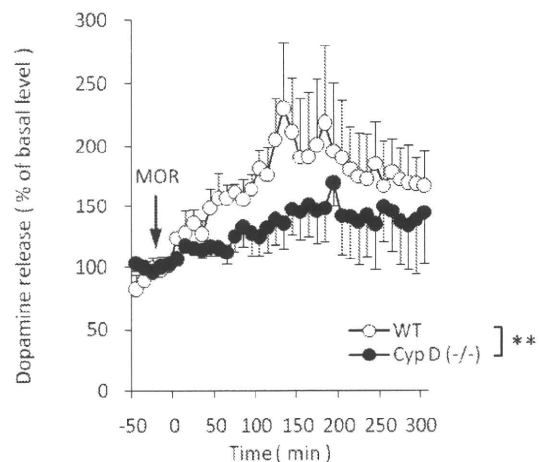


Fig. 6. MOR-induced dopamine release was decreased in the nucleus accumbens of Cyp D (-/-) mice. Values are means \pm S.E. ($n = 3$). Results with the two-way ANOVA were: F Cyp D (-/-) (1, 124) = 27.130, $p < 0.01$, F time (30, 124) = 0.799, $p = 0.76$, F Cyp D (-/-) \times time (30, 124) = 0.190, $p = 1.00$. ** $p < 0.01$ vs WT group. WT: wild-type, Cyp D: cyclophilin D, MOR: morphine.

3.3. シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスにおけるモルヒネ誘発性行動感作の検討

各測定日における1時間あたりの行動量を Fig.

において pre test における各部屋での滞在時間が均等になるように割り付けた。最終条件付け終了 24 時間後の 10 日目に、3 日目の pre test と同様にしてマウスに装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (postconditioning test: post test)。3 日目の pre test において、モルヒネ投与側の部屋に滞在した時間から生理食塩水投与側の部屋に滞在した時間を引いたものを preconditioning 値とし、10 日目の postconditioning 値も同様にして求めた。さらに postconditioning 値から preconditioning 値を引いた値を conditioned place preference 値とし、場所嗜好性の指標とした。

4. 免疫染色法

マウスをウレタン (1.5 g/kg, i.p.) で麻酔し、リン酸緩衝液食塩水 (PBS) で灌流し、その後 PBS に溶解した 4 % パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。脳を取り出し、4 % パラホルムアルデヒドに漬けて再度固定を行った。ショ糖を PBS に溶解させ、5 %、10 %、20 %、30 % (w/v) に調製したものに、脳を低濃度から順に漬けた。コンパウンドに封入した脳をクリオスタット装置 (Cryostar HM560 cryostat, Microm International, GmbH, Walldorf, Germany) で冠状面方向に厚さ 20 μ m で切り、切片を作製した。切片をスライドガラスに貼り付け、メタノールおよび antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて抗原賦活化を行った。一次抗体には μ オピオイド受容体に対する抗体 (polyclonal rabbit anti- μ opioid receptor antibody, 1:500; Millipore Corporation, Billerica, MA) およびシクロフィリン D に対する抗体 (monoclonal mouse anti-Cyp D (E11AE12BD4) antibody, 1:500; Calbiochem, San Diego, CA) を用いた。それぞれの一次抗体に対する二次抗体には donkey anti-rabbit

IgG (H+L) Alexa Fluor 546 および donkey anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (1:1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。染色像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss, Jena, Germany) により観察した。

5. In vivo マイクロダイアリシス法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下のマウスを脳固定器に固定し、脳地図 (Franklin and Paxinos, 1997) を参考に、ガイドカニューレ (AG-6, EICOM Corp., Kyoto, Japan) を NAc (A: -1.7, L: +0.75, V: -4.0 mm) に挿入した。ガイドカニューレを歯科用セメント (SHOFU Inc., Kyoto, Japan) により頭蓋骨に固定した。手術翌日にガイドカニューレからダイアリシスプローブ (A-I-6-1, 1 mm membrane length, EICOM Corp.) を NAc に挿入した実験動物をアクリルケース (30 cm \times 30 cm \times 35 cm) の中に入れ、自由に行動できるようにした。人工脳脊髄液 (NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl₂: 2.3 mM) を 1.0 μ l/min の流速にてプローブ内に灌流した。灌流液は 10 分ごとに回収し、液中のドパミン含量を高速液体クロマトグラフィー (HTEC-500, EICOM Corp.) により定量した。移動相は 1 % メタノール、デカンサルホン酸ナトリウム (SDS, 500 mg/L) および EDTA \cdot 2Na (50 mg/L) を含む 99 % 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を使用し、流速 500 μ l/min で通液した。分離カラム (EICOMPAK PP-ODS, 30 \times 4.6 mm ϕ , EICOM Corp.)、プレカラム (EICOM PREPAKSET CA-ODS, EICOM Corp.) を用いて分析し、検出には作用電極にグラフィイト電極 (WE-3G) を備えた電気化学検出器を用い、設定加電圧を +400 mV vs Ag/AgCl に設定した。細胞外ドパミン遊離量が安定した後、モルヒネ (10 mg/kg, s.c.) を投与し、その後 5 時間の細胞外ドパミン遊離量を測定した。

C. 研究結果

1.1. モルヒネ誘発性行動感作の形成に対するシクロスポリン A の効果

各測定日における 1 時間あたりの行動量を Fig. 1 に示した。装置に対する馴化を行った 1 日目において、各群の行動量に有意な差はみられなかった。2, 4, 6, 8 日目および休薬後の 14 日目のモルヒネ (MOR/saline) 投与群において、モルヒネ誘発性行動量増加が比較対照 (saline/saline) 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 1, $p < 0.01$)。4, 6, 8 日目の MOR/saline 投与群において、行動感作が 2 日目の同群と比較して有意に認められた (Fig. 1, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。MOR とシクロスポリン A (CsA) [MOR/CsA (10 mg/kg) および MOR/CsA (20 mg/kg)] 併用投与群においても MOR 誘発性行動量増加および行動感作が saline/saline 投与群と比較して有意に認められたが (Fig. 1, $p < 0.01$)、MOR/CsA (10 mg/kg) 投与群においては CsA の併用投与による MOR 誘発性行動量増加および行動感作に対する抑制が MOR/saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 1, $p < 0.01$)。一方、MOR/CsA (20 mg/kg) 投与群ではそのような抑制は認められなかった (Fig. 1)。Saline/CsA (10 mg/kg) 投与群および saline/CsA (20 mg/kg) 投与群において、生理食塩水と CsA の併用投与による行動量への影響は saline/saline 投与群と比較して認められなかった (Fig. 1)。

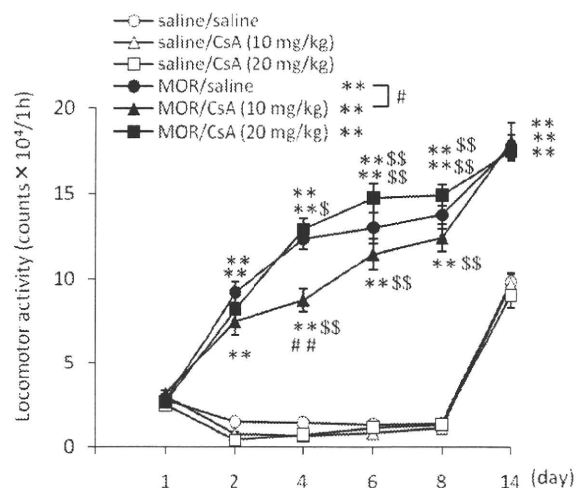


Fig. 1. CsA suppressed MOR-induced sensitization in mice. Values are means \pm S.E. ($n = 9-15$). Results with the repeated ANOVA were: F group (5, 201) = 172.081, $p < 0.01$, F duration (3, 201) = 55.809, $p < 0.01$, F group \times duration (15, 201) = 10.947, $p < 0.01$. ** $p < 0.01$ vs saline/saline-treated group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs MOR/saline-treated group. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs day 2. CsA: cyclosporin A, MOR: morphine.

1.2. モルヒネ誘発性場所嗜好性の形成に対するシクロスポリン A の予防効果

Pre test と post test から求めた conditioned place preference 値を Fig. 2 に示した。MOR/saline 投与群において、NOR による場所嗜好性が saline/saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 2, $p < 0.01$)。MOR/CsA 投与群において、CsA (10 mg/kg) の併用投与により MOR 誘発性場所嗜好性は saline/saline 投与群と比較して認められず、MOR 誘発性場所嗜好性の抑制が MOR/saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 2, $p < 0.05$)。また、saline/CsA 投与群において、生理食塩水と CsA の併用投与による場所嗜好性への影響は saline/saline 投与群と比較して認められなかった (Fig. 2)。

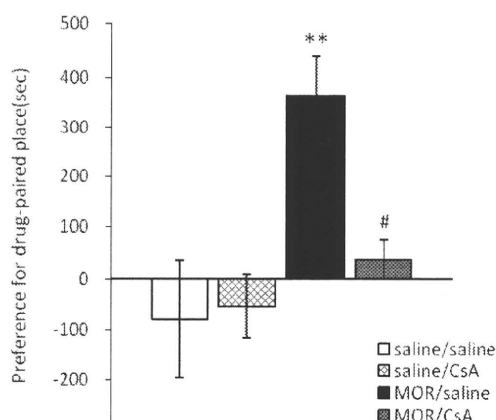


Fig. 2. CsA suppressed MOR-induced place preference in mice. Values are means \pm S.E. (n = 6). Results with the two-way ANOVA were: F MOR (1, 20) = 11.788, $p < 0.01$, F CsA (1, 20) = 3.683, $p = 0.07$, F MOR \times CsA (1, 20) = 5.087, $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ vs saline/saline-treated group. # $p < 0.05$ vs MOR/saline-treated group. CsA: cyclosporin A, MOR: morphine.

2.1. 一旦形成されたモルヒネ誘発性行動感作に対するシクロスポリン A の効果

各測定日における 1 時間あたりの行動量を Fig. 3 A, B に示した。装置に対する馴化を行った 1 日目において、各群の行動量に有意な差はみられなかった。2, 4, 6, 8 日目の MOR 投与群において、MOR 誘発性行動量増加が saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 3A, $p < 0.01$)。4, 6, 8 日目の MOR 投与群において、行動感作が 2 日目の MOR 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 3A, $p < 0.01$)。5 日間のシクロスポリン A 投与後の 14 日目における MOR/saline 投与群、MOR/CsA (10 mg/kg) 投与群および MOR/CsA (20 mg/kg) 投与群において、MOR 誘発性行動量増加は saline/saline 投与群と比較して有意に認められた (Fig. 3B, $p < 0.01$)。MOR/CsA (10 mg/kg) 投与群および MOR/CsA (20 mg/kg) 投与群において、5 日間の CsA の投与による MOR 誘発性行動量増加への影響は MOR/saline 投与群と比較して認められなかった。また、saline/CsA (10 mg/kg) 投与群および saline/CsA (20 mg/kg) 投与群において、CsA

の 5 日間投与による行動量への影響は saline/saline 投与群と比較して認められなかった (Fig. 3B)。

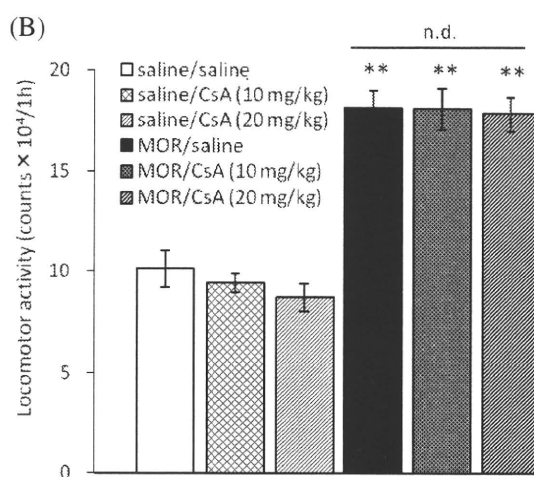
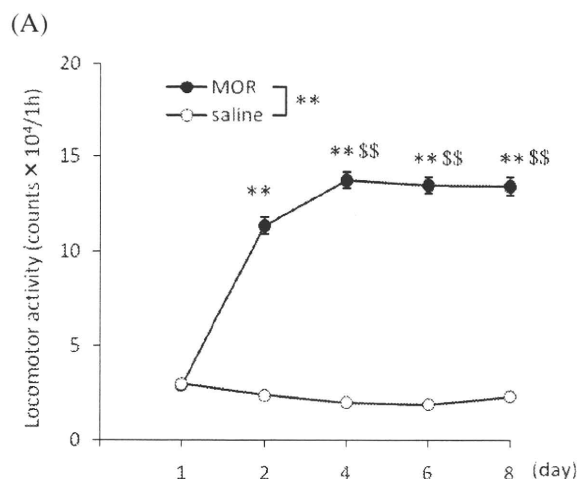


Fig. 3 Post-treatment with CsA did not attenuate the MOR-induced sensitization after its development. (A) MOR developed sensitization in mice. Values are means \pm S.E. (n = 24, 28). Results with the repeated ANOVA were: F group (1, 150) = 637.776, $p < 0.01$, F duration (3, 150) = 10.038, $p < 0.01$, F group \times duration (3, 150) = 14.765, $p < 0.01$. ** $p < 0.01$ vs saline-treated group. \$\$ $p < 0.01$ vs day 2. CsA: cyclosporin A, MOR: morphine. (B) Treatment with CsA without MOR for 5 days after the development of MOR-induced sensitization did not affect its development. Values are means \pm S.E. (n = 8-10).

2.2. 一旦形成されたモルヒネ誘発性場所嗜好性に対するシクロスポリン A の効果

Pre test と条件付け後から 5 日間の CsA 投与から 1 日後の 2 回目の post test から求めた conditioned place preference 値を Fig. 4 に示した。条件付け後の 1 回目の post test における MOR 投与群において、MOR による場所嗜好性が saline

7に示した。装置に対する馴化を行った1日目において、各群の行動量に有意な差はみられなかった。2, 4, 6, 8日目および休業後の14日目のMOR/WT群において、モルヒネ誘発性行動量増加がsaline/WT群と比較して有意に認められた (Fig. 7., $p < 0.01$)。4, 6日目のMOR/WT群において、行動感作が2日目のMOR/WT群と比較して有意に認められた (Fig. 7., $p < 0.05$, $p < 0.01$)。MOR/Cyp D (-/-) 群においてもモルヒネ誘発性行動量増加および行動感作がsaline/Cyp D (-/-) 群と比較して有意に認められたが (Fig. 7., $p < 0.01$)、Cyp D 遺伝子欠損によるモルヒネ誘発性行動量増加に対する抑制がMOR/WT群と比較して有意に認められた (Fig. 7., $p < 0.01$)。また、saline/Cyp D (-/-) 群においてCyp D 遺伝子欠損による行動量への影響はsaline/WT群と比較して認められなかった (Fig. 7)。

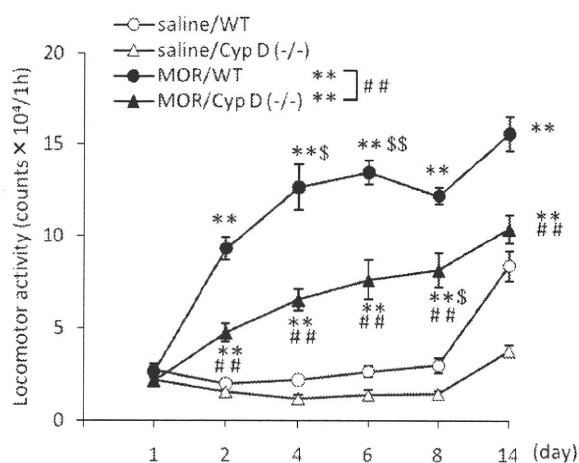


Fig. 7. MOR-induced sensitization was decreased in Cyp D (-/-) mice. Values are means \pm S.E. ($n = 6$). Results with the repeated ANOVA were: F group (3, 60) = 99.556, $p < 0.01$, F duration (3, 60) = 17.047, $p < 0.01$, F group \times duration (9, 60) = 5.309, $p < 0.01$. ** $p < 0.01$ compared to respective saline-treated group. # $p < 0.01$ compared to MOR/WT group. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ compared to day 2. WT: wild-type, Cyp D: cyclophilin D, MOR: morphine.

3.4 シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスにおけるモルヒネ誘発性場所嗜好性の検討

Pre test と post test から求めた conditioned place preference 値を Fig. 8 に示した。MOR/WT 群にお

いて、MOR による場所嗜好性が saline/WT 群と比較して有意に認められた (Fig. 8, $p < 0.01$)。MOR/Cyp D (-/-) 群において、MOR 誘発性場所嗜好性は saline/Cyp D (-/-) 群と比較して認められず、Cyp D 遺伝子欠損による MOR 誘発性場所嗜好性の抑制が MOR/WT 群と比較して有意に認められた (Fig. 8, $p < 0.05$)。また、saline/Cyp D (-/-) 群において、Cyp D 遺伝子欠損による場所嗜好性への影響は saline/WT 群と比較して認められなかった (Fig. 8)。

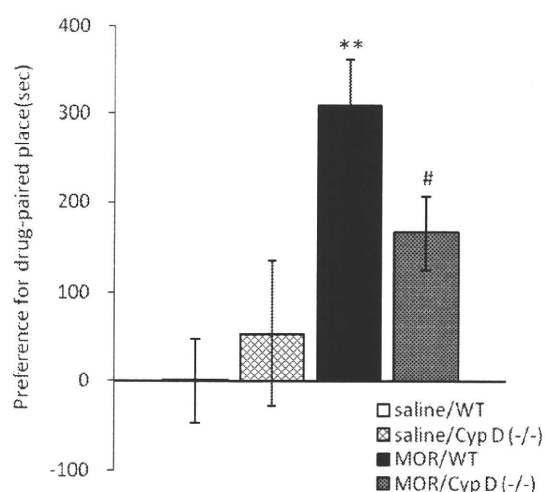


Fig. 8. MOR-induced place preference was decreased in Cyp D (-/-) mice. Values are means \pm S.E. ($n = 12-14$). Results with the two-way ANOVA were: F MOR (1, 50) = 12.458, $p < 0.01$, F Cyp D (-/-) (1, 50) = 0.493, $p = 0.49$, F MOR \times Cyp D (-/-) (1, 50) = 2.832, $p = 0.10$. ** $p < 0.01$ compared to respective saline-treated group. # $p < 0.05$ compared to MOR/WT group. WT: wild-type, Cyp D: cyclophilin D, MOR: morphine.

D. 考察

シクロスポリン A のモルヒネ依存に対する効果についての報告はあるが、体系的な検討は未だされていない (Suzuki et al., 1993; Langroudi et al., 2005)。そこで本研究では、モルヒネの精神依存に対するシクロスポリン A の効果について、条件付け場所嗜好性試験ならびに行動量測定試験を用いて検討を行った。条件付け場所嗜好性試験において、シクロスポリン A をモルヒネと併用投与することにより、モルヒネ誘発性場所嗜好性の形成

を有意に抑制したことから、シクロスポリン A はモルヒネにより惹起される精神依存の形成を抑制することが示唆された。この結果は、シクロスポリン A がモルヒネ誘発性場所嗜好性の形成を抑制するという Suzuki ら (1993) の以前の報告を支持するものである。依存性薬物の連続投与による行動感作の形成は、条件付け場所嗜好性試験とともに精神依存形成の指標の一つとされている。行動量測定試験において、10 mg/kg のシクロスポリン A の併用投与はモルヒネ誘発性の行動感作を抑制した。シクロスポリン A はモルヒネ誘発性の場所嗜好性とともに行動感作の形成に対しても抑制効果を示したと考えられる。一方、20 mg/kg のシクロスポリン A の併用投与ではそのような抑制効果は認められなかった。シクロスポリン A はシクロフィリン D 以外にカルシニューリンに対しても親和性を示し、それを阻害することが知られている。カルシニューリン遺伝子過剰発現マウスではモルヒネによる行動量増加が減弱することが知られている (Biala et al., 2005)。20 mg/kg のシクロスポリン A の併用投与によりシクロフィリン D だけでなくカルシニューリンも阻害したために、モルヒネ誘発性行動感作に抑制効果が認められなかったことが考えられる。一方、一旦形成された条件付け場所嗜好性試験におけるモルヒネ誘発性場所嗜好性および行動量測定試験におけるモルヒネ誘発性行動感作は休薬中にシクロスポリン A を連続投与しても変化が認められなかったことから、シクロスポリン A はモルヒネにより一旦形成された精神依存に対して効果を有さないことが示唆された。

シクロスポリン A はミトコンドリア内膜に存在するシクロフィリン D の阻害作用およびカルシニューリン阻害作用をもつことが知られている (Galat, 1993; Crompton et al., 1998)。このようにシクロスポリン A は複数の標的分子をもつため、モルヒネ誘発性の精神依存の形成機序における

シクロスポリン A の作用点は不明である。腹側被蓋野を起始核として側坐核に投射するドパミン作動性神経系は脳内報酬系として知られており、薬物依存において重要な役割を果たしていることが知られている (McBride et al., 1999; Hyman and Malenka, 2001)。免疫染色法において、モルヒネが標的とする μ オピオイド受容体およびシクロフィリン D は腹側被蓋野において共局在が認められた。また、モルヒネ投与により側坐核での細胞外ドパミン遊離量が用量依存的に増加し (Ventura et al., 2005)、モルヒネによる行動感作および場所嗜好性にはドパミン D1 および D2 受容体の活性化が必要であり (Manzanedo et al., 2005)、ドパミン欠損マウスにおいてモルヒネによる行動量増加の減弱が認められる (Hnasko et al., 2005)。シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスの側坐核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。本知見から、シクロフィリン D はモルヒネが標的とする μ オピオイド受容体を発現する細胞に発現し、モルヒネによる脳内報酬系ドパミン作動性神経系の活性化に関与していることが示唆された。シクロフィリン D 遺伝子欠損により、条件付け場所嗜好性試験および行動量測定試験におけるモルヒネ誘発性の場所嗜好性および行動感作がそれぞれ有意に抑制された。これらの知見は、シクロスポリン A によるモルヒネ誘発性の精神依存に対する抑制効果がシクロフィリン D の阻害作用を介した作用である可能性を示唆するものである。

E. 結論

シクロスポリン A はシクロフィリン D の阻害によりモルヒネによる精神依存の形成を抑制したと考えられ、シクロフィリン D がモルヒネによる脳内報酬系である腹側被蓋野を起始核として側坐核に投射するドパミン作動性神経系の活性化

に参与している可能性が示唆された。シクロスポリン A はカルシニューリン阻害作用を介した免疫抑制作用があり、本作用がモルヒネの安全使用としてのシクロスポリンの応用において、副作用の原因となる可能性が高い。今後の臨床応用を目指した検討において、免疫抑制作用のないシクロスポリン A 誘導体を用いることが必要となる。本研究で得られた結果が、依存性薬物による依存形成機構の解明の一助となり、また薬物依存症に対する治療薬の開発、および薬物依存症の治療法の確立につながることを期待したい。

[参考文献]

1. Biala G, Betancur C, Mansuy IM, Giros B. (2005) The reinforcing effects of chronic D-amphetamine and morphine are impaired in a line of memory-deficient mice overexpressing calcineurin. *Eur J Neurosci.* 21: 3089-3096
2. Crompton M, Virji S, Ward JM. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258; 729-735
3. Fenu S, Spina L, Rivas E, Longoni R, Di Chiara G. (2006) Morphine-conditioned single-trial place preference: role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology.* 187; 143-153
4. Franklin KBJ, Paxinos G. (1997) The mouse brain in Stereotaxic coordinates. San Diego. Academic press.
5. Galat A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem.* 216; 689-707
6. Hnasko TS, Sotak BN, Palmiter RD. (2005) Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature.* 438: 854-857
7. Hyman SE, Malenka RC. (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci.* 2; 695-703
8. Kuribara H. (1995) Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol.* 275; 251-258
9. Langroudi RM, Khoshnoodi MA, Abadi NYF, Fahadan PT, Ghahremani MH, Dehpour AR. (2005) Effect of cyclosporine A on morphine-induced place conditioning in mice: involvement of nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 507; 107-115
10. Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. (2005) Sensitization to the rewarding effects of morphine depends on dopamine. *Neuroreport.* 16: 201-205
11. McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res.* 101; 129-152
12. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K., Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 434; 652-658
13. Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. (2005) Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res.* 1050: 53-63
14. Suzuki T, Yoshiike M, Funada M, Mizoguchi H, Kamei J, Misawa M. (1993) Effect of cyclosporine A on the morphine-induced place preference. *Neurosci Lett.* 160; 159-162
15. Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Aubier B,

- Greengard P, Hervé D, Girault JA. (2010) Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology*. 35: 401-415
16. Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S. (2005) Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. *Cereb Cortex*. 15: 1877-1886
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
1. Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Yoshimi A, Yamada K, Ozaki N, Mouri A, Nabeshima T. Galantamine ameliorates the impairment of recognition memory in mice repeatedly treated with methamphetamine: involvement of allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors and dopaminergic-ERK1/2 systems. *Int J Neuropsychopharmacol*, 13, 1343-1354 (2010).
 2. 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*, 13, 877-889 (2010).
 3. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo KI, 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, 480-489 (2010).
 4. 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) .
 5. Prasanth S Ariyannur, John R Moffett, Pachiappan Manickam, Nagarajan Pattabiraman, Peethambaran Arun, Atsumi Nitta,Toshitaka Nabeshima, Chikkathur N Madhavarao, Aryan M Namboodiri. Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Research*, 1335, 1-13 (2010)
 6. 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*. 207, 235-243 (2010).
 7. Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The Role of Cyclophilin D in Learning and Memory. *Hippocampus*, 20, 293-304 (2010).
 8. Shin EJ, Whang WK, Kim S, Bach JH, Kim JM, Nguyen XK, Nguyen TT, Jung BD, Yamada K, Nabeshima T, Kim HC, Parishin C. Attenuates Phencyclidine-Induced Schizophrenia-Like Psychosis in Mice: Involvements of 5-HT(1A) Receptor. *J Pharmacol Sci*. 113,404-408 (2010).

9. Mizoguchi H, Ibi D, Takuma K, Toth E, Sato J, Itohara S, Nabeshima T, Yamada K. Alterations of Emotional and Cognitive Behaviors in Matrix Metalloproteinase-2 and -9-Deficient Mice. *The Open Behavioral Science Journal*, 4, 19-25 (2010)
 10. Hagino Y, Kasai S, Han W, Yamamoto H, Nabeshima T, Mishina M, Ikeda K. Essential Role of NMDA Receptor Channel ϵ 4 Subunit (GluN2D) in the Effects of Phencyclidine, but Not Methamphetamine. *PLoS ONE*. 5, e13722 (7 pages) (2010).
 11. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. *Behav Brain Res*. 220:132-139 (2011).
 12. Alkam T, Hiramatsu M, Mamiya T, Aoyama Y, Nitta A, Yamada K, Kim HC, Nabeshima T. Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res*. 220: 185-193 (2011).
 13. Niwa M, Matsumoto Y, Mouri A, Ozaki N, Nabeshima T. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the etiopathology of psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, In press (2011).
 14. Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem*. In press (2011).
 15. Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Torii Y, Yamada S, Waki Y, Noda Y, Furukawa H, Nabeshima T, Ozaki N. Immunohistochemical study of vesicle monoamine transporter 2 in the hippocampal formation of PCP-treated mice. *Neurosci Res*. In press (2011).
 16. 安藤 雄, 野田幸裕, 毛利彰宏, 鍋島俊隆: 統合失調症モデル動物に認められる行動異常. *アニテックス*. 22, 20-25, 2010
 17. 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 実験薬理学シリーズ 第1巻, 日本薬理学会編集, 金芳堂, 東京, pp.79-93, 2010
- 2. 学会発表**
1. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *CINP 2010 WORLD CONGRESS*, 香港 (2010.6.7)
 2. Nitta A, Alkam T, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T. *CINP 2010 WORLD CONGRESS*, 香港 (2010.6.7)
 3. Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. Effect of antipsychotics on the behavioral deficits in human dominant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment. *International Behavioral Neuroscience Society*, サルディニア, (2010.6.10)
 4. Mouri A, Noda Y, Wang D, Ando Y, Waki Y, Yamada S, Nabeshima T. *The College on Problem of Drug Dependence (CPDD) 72nd Annual Meeting*, アリゾナ (H2010.6.14)
 5. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic

- maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer impaired postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and adult behaviors. コペンハーゲン (H2010.7.20)
6. 鍋島俊隆、間宮隆吉、毛利彰宏、野田幸裕: ニコチン性コリン受容体の細胞内情報伝達系を介する認機能の調節機構 喫煙科学財団報告会、東京 (2010.7.28)
 7. 永井拓、衣斐大祐、鍋島俊隆、澤明、山田清文: 周産期の免疫異常が神経精神発達におよぼす影響 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
 8. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤雄、鍋島俊隆、野田幸裕: 新生仔期の免疫異常は若年期フェンシクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 Neuro2010、神戸 (2010.9.2)
 9. 山田清文、衣斐大祐、中島晶、鍋島俊隆、永井拓: Poly:C 誘発性神経発達障害モデル: 統合失調症動物モデルとしての有用性と発症機構 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)
 10. 衣斐大祐、永井拓、中島晶、鍋島俊隆、山田清文: 発達期疑似ウイルス感染モデル動物の神経発達障害における Ifitm3 の役割 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台 (2010.9.15)
 11. 野田幸裕、毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、山田清文、鍋島俊隆: 新生期の Poly:C 投与は若年期フェンサイクリジン投与による情動・認知機能の障害を増強する 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会 合同年会、仙台(2010.9.15)
 12. Nabeshima T, Niwa M, Kamiya A, Kubo K, O'Donnell P, Nakajima K, Kohda K, Noda Y, Sawa A. Impairment of postnatal dopaminergic maturation and adult behavior in disc1 knockdown mice by utero gene transfer. The International Symposium of Pharmacology-The 3rd Mainland, Taiwan and Hongkong Symposium of Pharmacology, 瀋陽 (2010.9.25)
 13. 毛利彰宏、鍋島俊隆: ガランタミンは覚せい剤連続投与マウスに認められる認知障害を緩解する 平成 22 年度アルコール薬物依存関連学会合同学術総会、小倉 (2010.10.8)
 14. 鍋島俊隆: 遺伝子とストレスの関わりによる精神障害モデル動物 フォーラム富山「創薬」第 32 回研究会、富山 (2010.10.14)
 15. 鍋島俊隆: 薬物依存抑制遺伝子の発見とその機能 日本薬学会北陸支部特別講演会、富山 (2010.10.15)
 16. 野田幸裕、肥田裕丈、毛利彰宏、荻野由里恵、関壮史、鍋島俊隆: 第二世代抗精神病薬と認知機能: 統合失調症モデル動物を用いたプロナンセリンの薬効の評価. DS フォーラム 2011 東京 (2011. 3. 12)
 17. 肥田裕丈、毛利彰宏、安藤 雄、鶴飼真由、荻野由香里、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕: 新生仔期の免疫異常と若年期における精神異常発現薬の複合負荷が情動・認知機能に与える影響. 第 20 回神経行動薬理若手研究者の集い 東京 (2011. 3. 21)
 18. 衣斐 大祐、永井 拓、中島 晶、鍋島 俊隆、山田 清文: 神経発達期の免疫応答誘発性脳機能障害における IFITM3 の役割. 第 20 回神経行動薬理若手研究者の集い. 東京 (2011. 3. 21)
 18. 大橋美月、山田真之亮、吉見陽、石原良子、永井拓、山田清文、野田幸裕、尾崎紀夫: 統合失調症および双極性障害の発症脆弱性因

子探索のためのプロテオーム解析. 第 84 回
日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 24)

19. 安藤雄、毛利彰宏、肥田裕丈、脇由香里、吉見陽、鍋島俊隆、尾崎紀夫、野田幸裕：幼若期における社会敗北ストレスは、脳内モノアミン量変化を伴う社会性行動の障害を惹起する. 第 84 回日本薬理学会年会横浜 (2011. 3. 24)
20. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 24)
21. 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による異常行動に対するクロザピンのエビジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 23)
22. 渡辺 裕之、鳥海 和也、宋 梓瑜、葛 丹、本荘 龍輝、毛利 彰宏、古関 竹直、間宮 隆吉、宮本 嘉明、新田淳美、福島 健、鍋島 俊隆：薬物依存関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 23)
23. 松本 友里恵、丹羽 美苗、毛利 彰宏、Hanna Jaaro-Peled、澤 明、鍋島 俊隆：遺伝子-環境の相互作用：Disrupted-In-Schizophrenia1 遺伝子変異と社会隔離飼育ストレスによるグルタミン酸作動性神経系への相乗的な影響. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 24)
24. 丹羽 美苗、松本 友里恵、毛利 彰宏、尾崎 紀夫、鍋島 俊隆：生後発達期の母子分離・隔離飼育に対する脆弱性が成熟後の行動障害の原因となる. 第 84 回日本薬理学会年会 横浜 (2011. 3. 24)

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」出願番号：特願 2009-039770 ※現在 PCT 出願準備中 発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

研究協力者：古関竹直

（名城大学大学院薬学研究科 薬品作用学）

[研究要旨]

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 は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を抑制した。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。

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

研究協力者：古関竹直

(名城大学大学院薬学研究科 薬品作用学)

A. 研究目的

近年、大学生の大麻売買・栽培・使用などによる摘発される報道が後を絶たない。名門大学でも摘発され、学力とは関係なく薬物乱用が若い世代に確実に広まってきている。大麻はタバコよりも無害などとの誤った情報から、使用する学生もあり、依存性薬物に対する適切な情報提供が必要であると考えられる。また、このような軽はずみに大麻を摂取したことがきっかけで、さらに強い依存性薬物に興味を持ち、覚せい剤 (METH) などを摂取するようになることも多い。そのため、こうした依存性薬物を投与した動物を用いて依存性薬物による精神障害に対する治療薬を評価する研究は社会的要求性も高い。METH は幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害のみならず認知障害も惹起する^{1, 2)}。

一方、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³⁾。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⁴⁾ことや、CCK2 拮抗薬がモルヒネによる条件付け場所嗜好性を抑制する⁵⁾こと、また 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、本研究では METH による条件付け場所嗜好性に対する CCK2 拮抗薬の作用について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には 7~8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本 SLC、浜松) を用いた。動物は室温 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、8:00~20:00 明期の明暗サイクルの恒温室でプラスチック製ケージを用いて飼育した。水および飼料 (CE-2、CLEA Japan) は自由に摂取させた。なお、本研究は名城大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。

2. 行動量測定

透明アクリル製ケージ (45 × 26 × 40 cm) と黒色のつや消しプラスチック製の床からなる装置を用いた。ケージ内での行動量測定装置 (Scanet SV-10、メルクエスト、富山) により測定した。マウスを装置に馴化させるため、1 日目にマウスを無処置で装置に入れ、1 時間の行動量を測定した (順化)。2~8 日目にメタンフェタミン (1 mg/kg 大日本住友製薬 (株) 大阪) または生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) 投与の 30 分前に CI-988 (トクリスバイオサイエンス、0.2 および 2 mg/kg) 投与した。2, 4, 6, 8 日目にメタンフェタミン投与後直ちにマウスを装置に入れ、行動量を 1 時間測定した。メタンフェタミンを連続投与することによって生じる行動量増加の亢進を行動感作の指標とした。

3. 条件付け場所嗜好性試験

透明なプラスチック製の箱 (明室) と黒色のプラスチック製の箱 (暗室) (各 15 × 15 × 15 cm) からなり、スライド式の仕切り (10 × 15 cm) で区切られている装置を用いた。マウスがこの 2

つの部屋を区別できるように、明室の床は白色プラスチック製メッシュで覆い、暗室の床はプラスチック製の平板で覆った。明室の上方には白熱電灯 (6 W、20 cm) を設置し、各部屋の滞在時間を測定するため、これを Scanet SV-20LD (メルクエスト、富山) 内に設置した。1 日目と 2 日目に 2 区画の間の仕切りを外してマウスが両方の部屋を自由に移動できるようにし、マウスを装置内に入れて 15 分間自由に探索させた。3 日目にマウスを同様にして装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (preconditioning test: pre test)。4 日目から 9 日目にかけて、メタンフェタミンの条件付けを行った (conditioning)。4, 6, 8 日目に、メタンフェタミン (10 mg/kg, s.c.) または生理食塩水をマウスに投与し、その直後にどちらか一方の部屋に 20 分間閉じ込めた。5, 7, 9 日目には、生理食塩水を投与した後にメタンフェタミンで条件付けを行っていないもう一方の部屋にマウスを 20 分間閉じ込めた。なお、条件付けする部屋は、カウンターバランス法により各群において pre test における各部屋での滞在時間が均等になるように割り付けた。最終条件付け終了 24 時間後の 10 日目に、3 日目の pre test と同様にしてマウスに装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (post-conditioning test: post test)。3 日目の pre test において、メタンフェタミン投与側の部屋に滞在した時間から生理食塩水投与側の部屋に滞在した時間を引いたものを pre-conditioning 値とし、10 日目の post-conditioning 値も同様にして求めた。さらに post-conditioning 値から pre-conditioning 値を引いた値を conditioned place preference 値とし、メタンフェタミンの精神的依存性の指標とした。

4. 統計解析

結果は平均値 ± 標準誤差として示した。得ら

れた結果は、one-way による分散分析を行い、各群間比較には、Bonferroni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

行動量: 図 1 上段に示したスケジュールに従って薬物投与の前日に装置に順化させた。1 日目にメタンフェタミン処置 (1 mg/kg, s.c.) の 30 分前に CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) を投与し行動量を測定した。その結果、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 (図 1 左)。なお、CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) 自身は溶媒投与群と比較して特に影響しなかった。7 日目にも薬物処置後に行動量を測定し、メタンフェタミンによる行動感作を確認した。この行動感作に対しても CI-988 (2 mg/kg i.p.) は有意に抑制作用を示した (図 1 左)。

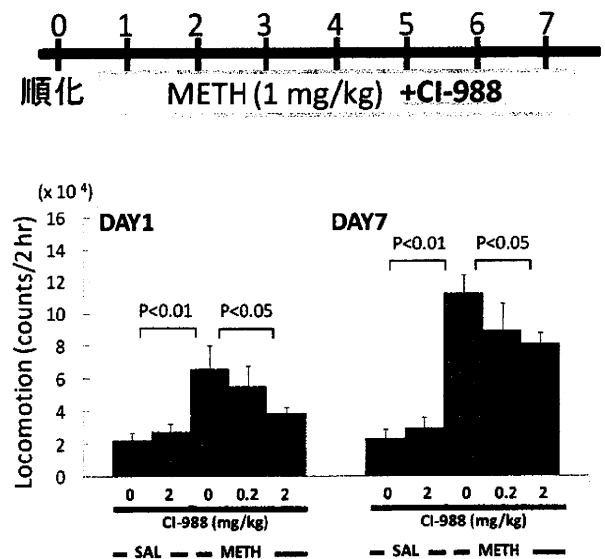


図 1 メタンフェタミン連続投与による行動感作に対するコレシストキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール(上段)と行動感作に対する CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) の影響。

条件付け場所嗜好性試験: 図 2 上段に示すようにメタンフェタミン (1 mg/kg, s.c.) 条件付けの 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 は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を抑制した (図 2 下段)。一方、6 日間のメタンフェタミン (1 mg/kg, s.c.) 条件付けによる場所嗜好性形成後の発現に対して 10 日目に post test を行った CI-988 を急性投与しても何ら影響しなかった (データ示さず)。

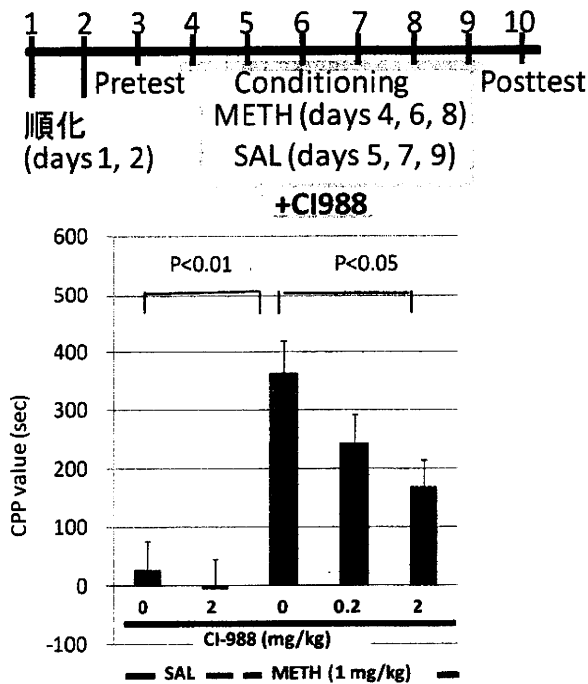


図 2 メタンフェタミン連続投与による条件付け場所嗜好性に対するコレスチキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と条件付け場所嗜好性に対する CI-988 (0.2 および 2 mg/kg ip) の影響。

D. 考察

METH 依存に陥ると、幻覚・妄想や認知障害など覚せい剤精神病を発症する⁶⁾。このような症状が出る前に一刻も早く依存形成を抑制することが、覚せい剤にとどまらず薬物依存症の治療を行う上で非常に重要なポイントとなる。

本年度は METH による行動過多と精神依存性について確認し、それら行動指標に対するコレスチキニン 2 受容体拮抗薬の作用を行動薬理的に検討した。コレスチキニン 2 受容体拮抗薬

CI-988 それ自身は何ら影響しない濃度で、METH との併用処置によって METH の作用をどちらも抑制した (図 1 および 2)。このことは METH のドパミンに対する作用を脳内のコレスチキニン受容体が直接あるいは間接的に抑制する可能性があることを示している。そうしたドパミンシステムとコレスチキニンシステムの相互作用について直接的な可能性を確認するために、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。しかしドパミン D2 受容体との共局在は認められなかった。このことから、今後は両機能について直接的な作用があるのかを中心に検討が必要と思われる。

一方、CPP 法による METH 条件付け場所嗜好形成直後 CI-988 を処置し、CI-988 の覚せい剤依存症の治療薬となりうるかどうか調べた。このスケジュール下では CI-988 は何ら作用を示さなかった。次年度はヒトにおける環境を反映させるべく嗜好形成の数日後における嗜好性を抑制しうるか検討したい。

E. 結論

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。

[参考文献]

- 1) 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).
- 2) Robinson TE and Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and

- evaluation of animal model of amphetamine psychosis. **Brain Res Rev.** 11: 157-198 (1986).
- 3) Daugé V and Léna I.: CCK in anxiety and cognitive processes. **Neurosci Biobehav Rev.** 22: 815-25, 1998.
 - 4) Pettit HO and Mueller K.: Infusions of cholecystokinin octapeptide into the ventral tegmental area potentiate amphetamine conditioned place preferences. **Psychopharmacology (Berl).** 99: 423-6 (1989).
 - 5) Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Horwell DC, Hökfelt T.: CI-988, a selective antagonist of cholecystokininB receptors, prevents morphine tolerance in the rat. **Br J Pharmacol.** 105(3):591-6 (1992).
 - 6) Ujike H, Sato M. Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. **Ann N Y Acad Sci.** 1025:279-87 (2004).

F. 研究発表

論文発表

- Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. **Behav Brain Res.** 220(1):132-139 (2011).

学会発表

1. 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本荘龍輝、毛利彰宏、古関竹直、間宮隆吉、宮本嘉明、新田淳美、福島健、鍋島俊隆：薬物依存関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)
2. 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による異常行動に対するクロザピンのエピジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)

3. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23)

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含むする医薬」

出願番号：PCT/JP2010/052656

発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究協力者：縄田陽子、北市清幸

（長崎国際大学薬学部薬理学研究室）

[研究要旨]

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。

薬物への渴望に関する実験はラットの薬物自己投与実験法を用い渴望再燃の誘発因子の1つに挙げられるストレスの側面から検討した。本実験では、ラットがレバーを1回押せば音と光の薬物関連刺激（cue）と共に、MAP（0.02 mg/0.1 mL）が微量注入される実験を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）。レバー押し行動の減少を確認した上、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）発現の有無を調べた。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、コルチコステロン合成阻害薬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training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、認められなかった。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無い事が示唆された。

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類似する興