

奮性薬物の使用 (priming 投与)、②薬物の使用に関連する環境刺激 (薬物関連刺激) および、③ストレス負荷の3つが挙げられる。臨床上の上記誘発因子は、薬物自己投与実験法を用いた渴望の動物モデルにおいても同様の薬物探索行動を誘発する事が知られている。

カンナビノイド CB₁ 受容体は、大麻の主要活性成分 Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) が特異的に結合する受容体である。我々はこれまでに渴望再燃における CB₁ 受容体の役割に焦点を当て、その解明を試みてきた。その結果、興奮薬の priming 投与ならびに薬物関連刺激により誘発される覚せい剤 methamphetamine (MAP) 探索行動が、カンナビノイド CB₁ 受容体の活性化により誘発される事を明らかにした²⁾。本研究では、ストレスにより誘発される MAP 探索行動の発現における CB₁ 受容体の関与について検討した。

一方、薬物依存症では断薬後長期にわたり認知機能障害が認められる事が報告されている⁷⁾。近年我々は、合成麻薬 MDMA 退薬時に認知機能障害が認められ、その発現に CB₁ 受容体の活性化が関与する事を明らかにした⁴⁾。そこで、MAP 退薬時に認められる認知機能障害における CB₁ 受容体の関与について追究した。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験には Wistar-ST 系雄性ラット [株日本エスエルシー、300-350g] を使用した。認知機能に関する実験には ICR 系雄性マウス [株チャールズ・リバー、30-40g] ならびに CB₁ 受容体遺伝子欠損マウス [ブリュッセル大学、Ledent 教授より供与、30-40g] を用いた。

2. 使用薬物

自己投与用の覚せい剤 methamphetamine (MAP、大日本住友製薬株式会社; 0.02 mg/0.1 mL) は生理

食塩液に溶解し、静脈内 (i.v.) へ注入した。MAP-priming 投与として 1 mg/kg の用量をテスト 30 分前に腹腔内に投与 (i.p.) した。コルチコステロン合成阻害薬 metyrapone (Tocris, Inc.; 100 mg/kg) は超純水 (2% Tween-80; WAKO, Inc. を含む) に溶解し、テスト 3 時間前に皮下に投与 (s.c.) した。カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 は、DMSO、Tween-80 および生理食塩液の混合液 (DMSO : Tween-80 : 生理食塩液 = 1 : 1 : 8) に溶解し、腹腔内投与した。

3. エサを正の強化子としたオペラント訓練

薬物自己投与実験に先立ち餌ペレット (45 mg; Holton Industries Co. LTD.) を正強化子としたオペラント訓練 (FR1) を実施した。訓練ではラットが 30 個の餌ペレットを獲得するまでの時間を測定し、3 回連続して 300 秒以内でペレットを獲得するまで繰り返した。

4. 薬物自己投与実験法

MAP 自己投与訓練に先立ち、あらかじめラットに餌ペレットを正強化子としたレバー押し行動を獲得させた。その後自己投与用のカテーテルの静脈内留置手術を行った。カテーテルはシラスティックカテーテル [外径 1.0 mm、内径 0.5 mm; 株カネカメディクス] を使用し、ラットの右頸静脈から挿入し、先端を心耳の入り口直前に留置した。実験には、レバー押しに伴い薬物が注入されるアクティブレバーと、薬物が得られないインアクティブレバーの 2 つのレバーが装着されたオペラント箱 [29 cm × 23 cm × 33 cm; 株ニューロサイエンス] を使用した。ラットがアクティブレバーを 1 回押せば (FR1)、MAP (0.02 mg/ 100 μ L/infusion) が薬物関連刺激 (音刺激; 85 dB/2.9 kHz, 光刺激; 200 lux) と共に微量注入される。10 日間の MAP 自己投与実験後、MAP を生理食塩液に置換した自己投与実験 (薬物関連刺激呈示な

し)を続けた(消去過程)。退薬10日目のレバー押し行動が減弱した時点で、ストレスを負荷し“渴望”の指標としてのMAP探索行動(生理食塩液自己投与下でのレバー押し反応)の変容を調べた。

5. ストレス負荷

ストレスとして footshock (0.8 mA, ON; 1 秒, variable interval; 10-70 秒) を、オペラントボックスの床面の金属性グリッドを通して 15 分間行った。

6. 血漿コルチコステロン濃度の測定

血漿コルチコステロン濃度は、Corticosterone EIA キット (500655 ; Cayman Chemical Com.) を用いて測定した。まず、血漿サンプルは EIA buffer で 200 倍希釈し測定に使用した。次に、rabbit polyclonal anti-sheep IgG 抗体が固定化された 96 穴プレートに、スタンダード/未知検体を入れた。次いで Corticosterone EIA Antiserum ならびに Corticosterone AChE Tracer を入れ、室温で 2 時間反応させた。この時、Corticosterone AChE Tracer はスタンダード/未知検体が結合していない未反応の antiserum と結合する。その後、Eliiman's 試薬 (AChE に対する基質を含む) を入れ室温遮光下で 60-90 分反応させた後、Multimode Detector (DTX880 ; Beckman Coulter) を用いて 412 nm の吸光度を測定した。

7. 新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は、MAP 反復投与後の退薬 7 日目にそれぞれ異なる動物を用いて実施した。本試験には、床面および壁面が黒色の Plexiglas の open field 装置 (直径 70 cm、高さ 40 cm) を用いた。認知させる物体として円錐形および球状の 2 種類の金属製物体を使用した。最初にマウスを open field 装置に 1 時間置き、装置に馴化させた

(habituation 試行)。次の日に open field 装置内に同一の球状物体を 2 つ置き、提示物体から 1cm 外側につけられた円内にマウスの前肢が触れた時間をアプローチ時間として 10 分間にわたり測定した (training 試行)。その 3 時間後に片方の物体を形状の全く異なる物体 (円錐状物体) に置き換え、同様に物体へのアプローチ時間を測定した (test 試行)。尚、training 試行において物体へのアプローチ時間が 10 秒未満の動物は実験には使用しなかった。マウスの自発運動量 (歩行数) はデジタルトラッキングシステムにて測定した (LimeLight, Actimetrics, Inc.)。

8. 統計学的処理

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

C. 研究結果

1. footshock 負荷による MAP 探索行動の発現

MAP 自己投与後の退薬時に MAP を生理食塩液に置換するとそのレバー押し回数は徐々に低下し、9 日目のレバー押し回数は 5.4 ± 0.7 回となった。退薬 10 日目の footshock 負荷により、ラットのレバー押し回数は 26.9 ± 4.1 回と有意に増加し、MAP 探索行動が発現した ($p < 0.001$ vs. non-shock ; Fig. 1)。一方、退薬 10 日目の血漿コルチコステロン値は、薬物自己投与実験を始める直前のそれと比較して差は認められなかった。footshock 負荷により、この血漿コルチコステロン値は約 3 倍にまで増加した (Fig. 3)。この footshock による血漿コルチコステロン濃度の増加は、コルチコステロン合成阻害薬 metyrapone (100 mg/kg, s.c.) の前処置により完全に抑制された (Fig. 3)。しかしながら、metyrapone によって footshock により誘発される MAP 探索行動は抑制されなかった。 ($p = 0.77$; Fig. 2)。

一方、footshockにより誘発されるMAP探索行動は、CB₁受容体拮抗薬AM251 (3.2 mg/kg)により有意に抑制された (Fig. 4)。

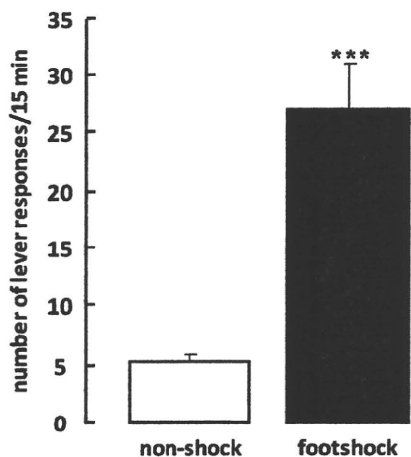


Figure 1 Intermittent footshock-induced reinstatement of MAP-seeking behavior. Time course of lever-pressing on the previously active lever in the non-stress, during exposure to 15 min intermittent footshock stress and after stress in rats. ***Different from non-stress, $p < 0.001$.

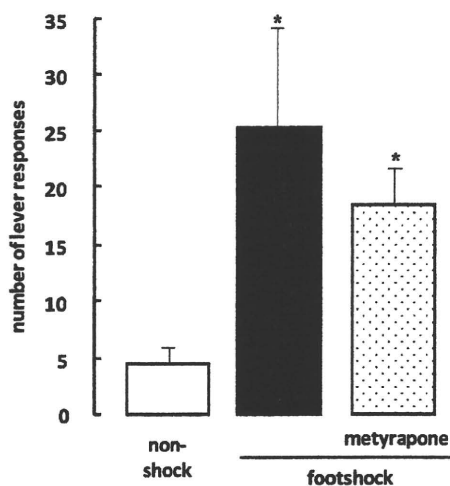


Figure 2 Effects of corticosterone synthesis inhibitor, metyrapone on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by footshock. Mean (\pm SEM) number of lever presses on the previously active lever during the 15 min exposure to footshock stress. Rats were pretreated with metyrapone (100 mg, s.c.) 3 hr before the start of the test of reinstatement. *Different from the non-shock condition, $p < 0.05$.

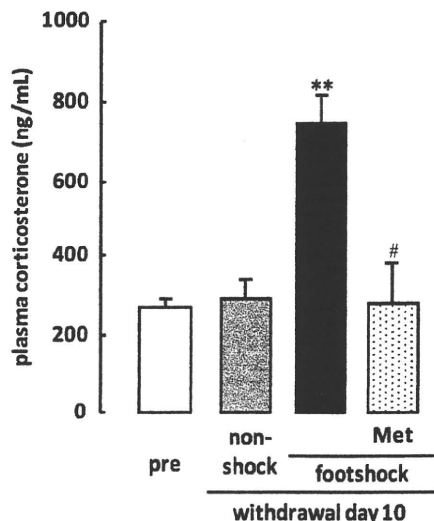


Figure 3 Effect of corticosterone synthesis inhibitor on footshock-induced increase in plasma corticosterone during MAP withdrawal. Mean (\pm SEM) corticosterone concentrations (ng/mL) in plasma. Rats were taken blood from orbital vein under inhalation anesthetic immediately after the end of each session. Metyrapone (Met; 100 mg/kg, s.c.) was administered 3 hr before the test of reinstatement. Data represent the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$ versus non-shock; # $p < 0.05$ versus footshock alone. Met: metyrapone.

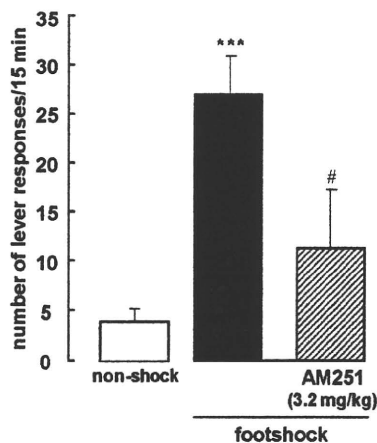


Figure 4 Effects of selective cannabinoid CB₁ receptor antagonist, AM251 on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by footshock. Mean (\pm SEM) number of lever presses on the previously active lever during the 15 min exposure to footshock stress. Rats were pretreated with AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) 30 min before the start of the test of reinstatement. ***Different from the non-shock condition, $p < 0.001$; #Different from the footshock condition alone, $p < 0.05$.

2. MAP反復投与後の退薬時に誘発される認知機能障害

vehicle群におけるtest試行での新奇物体へのアプローチ時間 (24.8 \pm 2.8秒) は、既存物体へのそ

れ (6.2±1.3 秒) と比較して有意に長かった ($p<0.0001$ vs. 既存物体へのアプローチ時間)。また、新奇物体へのアプローチ率は、80.3±3.3%であった。一方、MAP 反復投与後の退薬 7 日目の新奇物体へのアプローチ率は、1.0 mg/kg 投与群では 52.5±7.4%、3.2 mg/kg 投与群では 63.5±4.2%となり、vehicle 群と比較していずれも有意に低下していた ($p<0.05$ vs. vehicle 群; Fig. 5)。この時、テスト試行における MAP 退薬群の自発運動量 (歩行数) は、vehicle 群と比較して差はなかった ($p=0.11$)。

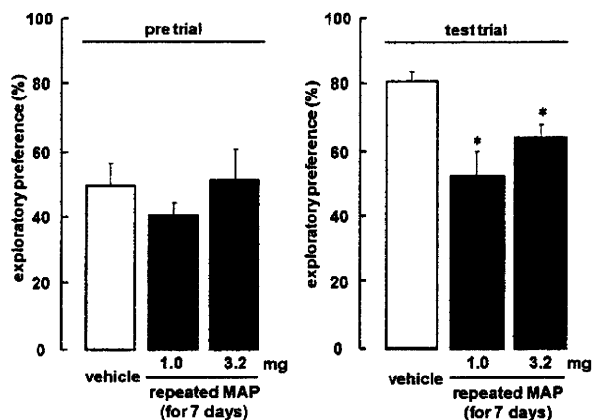


Figure 5 Novel object recognition performance in mice on the 7th day of withdrawal after repeated (daily for 7 days) MAP treatment (1.0 or 3.2 mg/kg, i.p.). Each graph shows the discrimination ratio in the test trial. Data represent the mean \pm SEM. * $p<0.05$ versus vehicle-treated mice. Vehicle includes results for mice administered saline repeatedly for 7 days.

MAP 退薬時に認められたアプローチ率の低下は、カンナビノイド CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 (3.2 mg/kg) と MAP との併用投与群では認められなかった ($p<0.01$ vs. MAP 反復投与群; Fig. 6)。一方、vehicle 群の新奇物体へのアプローチ率は、カンナビノイド CB₁ 受容体遺伝子欠損 (CB₁KO) マウスでは 74.1±7.6%となり野生型マウスと比較して差はなかった ($p=0.40$)。しかしながら、CB₁KO マウスのアプローチ率は、野生型マウスとは異なり MAP (1.0 mg/kg) 退薬時に全く低下しなかった (Fig. 7)。

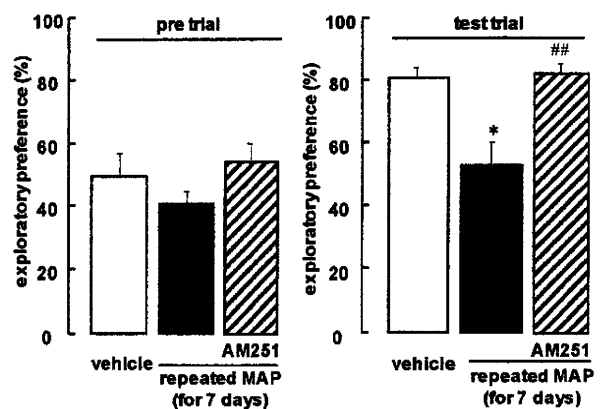


Figure 6 Effect of a cannabinoid CB₁ receptor antagonist, AM251, on cognitive impairment on the 7th day of MAP withdrawal (1.0 mg/kg, i.p., daily for 7 days) in mice. AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) was co-administered with MAP. Data represent the mean \pm SEM. * $p<0.05$ versus vehicle-treated mice; ## $p<0.01$ versus MAP (1.0 mg/kg)-treated mice. Vehicle means results for mice administered saline.

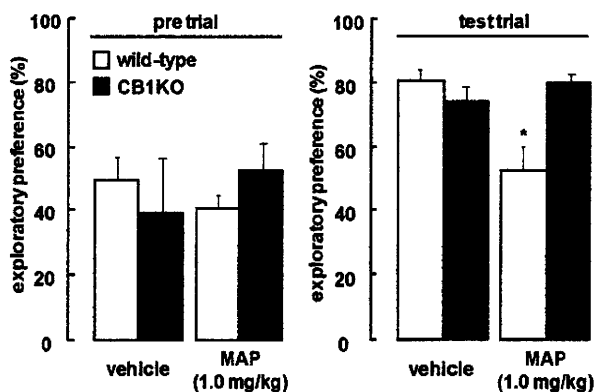


Figure 7 Comparison of novel object recognition performance in wild-type and CB₁ receptor knockout mice on the 7th day of MAP withdrawal (1.0 mg/kg, i.p., daily for 7 days). Each graph shows the discrimination ratio in the test trial. Data represent the mean \pm SEM. * $p<0.05$ versus vehicle-treated mice. Open and closed bars indicate wild-type and CB₁ receptor knockout mice, respectively. Vehicle means results for mice administered saline.

D. 考察

水迷路試験を用いてのラットの空間認知記憶の獲得は cold water ストレスにより促進されるが、この学習促進作用はコルチコステロン合成阻害により拮抗される事が Akirav らによって報告されている¹⁾。この事は、ストレスによる学習獲得促進作用にはコルチコステロンが促進的に関与

する事を示している。さらに、餌制限ストレスは、cocaine 単回投与によるラットの自発運動量亢進作用を増強する⁵⁾。この増強作用も、コルチコステロン合成阻害薬投与により拮抗される。このように、ストレスにより誘発される行動変化とコルチコステロンの増加とは、相関している事が分かる。しかしながら、本実験での footshock により誘発される MAP 探索行動は、コルチコステロン合成阻害薬 metyrapone の投与によって抑制されなかった。この事から、MAP 探索行動の発現に対して、コルチコステロンの直接的な関与は低い事が示唆される。

近年、ラットへの拘束ストレス負荷によりエンドカンナビノイドである 2-AG 量が扁桃体において増加する事が明らかにされている³⁾。本実験では、ストレスにより誘発される MAP 探索行動は CB₁ 受容体拮抗薬により抑制された。これらの事から考えると、MAP 探索行動の発現は、footshock による 2-AG の増加を介して、CB₁ 受容体が活性化される事によって発現している可能性が示唆される。

一方、ドパミン D₁ 受容体拮抗薬 SCH23390 ならびに D₂ 受容体拮抗薬 raclopride は、heroin-priming 投与により誘発される heroin 探索行動を抑制する事が知られている⁶⁾。しかしながら、footshock により誘発される heroin 探索行動は、これらの D₁ および D₂ 受容体拮抗薬では抑制されない⁶⁾。この事から、薬物探索行動の発現メカニズムは、誘発因子によって異なる事が示唆される。我々は、薬物関連刺激ならびに MAP-priming 投与により誘発される MAP 探索行動が footshock によるそれと同様に CB₁ 受容体の活性化を介して発現している事を報告した²⁾。これらの事から、薬物探索行動発現におけるドパミン神経系の関与とは異なり、CB₁ 受容体のそれは、3 種類の誘発因子に共通して促進的に関与している事が示唆される。

これとは別に、我々は、合成麻薬 MDMA 退薬

時に認められる認知機能障害が CB₁ 受容体拮抗薬と MDMA との併用投与により、また CB₁ 受容体遺伝子欠損マウスでは認められない事を報告した⁴⁾。さらに、MDMA 退薬時での認知機能障害は、退薬時での CB₁ 受容体拮抗薬の単回投与によっても改善される事も明らかにしている。これらの事から、MDMA 投与による認知機能障害は CB₁ 受容体の活性化によって発現している可能性が示唆される。言い換えれば、CB₁ 受容体は、MAP 退薬時に認められる認知機能障害の発現と共に、その維持にも促進的に関与している可能性が示唆される。

E. 結論

CB₁ 受容体拮抗薬は、MAP 反復投与後のストレスによって誘発される MAP への渴望抑制薬としての可能性が示唆された。また MAP 反復投与に基づく認知機能障害の発現には CB₁ 受容体の活性化が関与している事が明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., et al.: A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn. Mem.*, 11: 188-195, 2004.
- 2) Anggadiredja, K., Nakamichi, M., Hiranita, T., et al.: Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1470-1478, 2004.
- 3) Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Bingham, B., et al.: Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107: 9406-9411, 2010.
- 4) Nawata, Y., Hiranita, T., Yamamoto, T.: A cannabinoid CB₁ receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal

from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology*, 35: 515-520, 2010.

- 5) Rougé-Pont, F., Marinelli, M., Le Moal, M., et al.: Stress-induced sensitization and glucocorticoids. II. Sensitization of the increase in extracellular dopamine induced by cocaine depends on stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.*, 15: 7189-7195, 1995.
- 6) Shaham, Y. and Stewart, J.: Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology*, 125: 385-391, 1996.
- 7) Sofuoglu, M.: Cognitive enhancement as a pharmacotherapy target for stimulant addiction. *Addiction*, 105: 38-48, 2010.

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. 山本経之 (共著): エンドカンナビノイドと依存. *脳科学エッセンシャルー精神疾患の生物学的理解のために*, p234-235, 東京, 2010.
5. 山本経之 (共著): 第 I 編, 1 創薬に向けての動物モデルの役割と問題点. *実践行動薬理学*, p3-10, 京都, 2010.
6. 山本経之 (共著): 第 II 編, 第 4 章, 4 脳内報酬系における内因性/外因性カンナビノイドの作用. *実践行動薬理学*, p282-290, 京都, 2010.
7. 山本経之, 縄田陽子 (共著); 依存, VI. 薬物依存の基礎と臨床, 4. 大麻依存, a. 大麻依存の基礎. *脳とこころのプライマリケア* 第 8 巻, 2011, 印刷中.
8. 縄田陽子, 恐怖記憶の消去を司るエンドカンナビノイド: PTSD 治療への可能性. *ファルマシア*, 46: 895-896, 2010.

2. 学会発表

- 1) 北市清幸, 縄田陽子, 山本経之: Decreased expression of organic cation transporter3 with self-administration of methamphetamine in rats. 日本薬理学会西南部会 (鹿児島, 2010年11月)
- 2) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates cognitive impairment on withdrawal from abusive drugs. 日本薬理学会西南部会 (鹿児島, 2010年11月)
- 3) 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之: ストレス誘発性メタンフェタミン探索行動の発現における扁桃体内副腎皮質刺激ホルモン放出因子の役割. アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (北九州, 2010年10月)
- 4) 北市清幸, 縄田陽子, 山本経之: 覚醒剤依存症動物モデルにおける有機カチオントランスポーターOCT3 (SLC22A3) の発現変容. 第4会第4回トランスポーター研究会九州部会 (佐世保, 2010年9月)

- 5) Nawata Y, Kitaichi K, Yamamoto T: The facilitating role of corticotropin-releasing factor (CRF) in reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. The International College of Neuropsychopharmacology (CINP) 52nd Annual Meeting (Hong Kong, China, June, 2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

乱用薬物に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¹

研究協力者：宮本嘉明¹、家垣典幸¹、石川雄大¹、日比陽子²、村松慎一³、鍋島俊隆^{2,4}

(¹ 富山大学大学院医学薬学研究部・薬物治療学研究室、² 名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座・医学部附属病院薬剤部、³ 自治医科大学神経内科学講座、⁴ 名城大学比較認知科学研究所・大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室)

【研究要旨】

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ーパミン神経伝達が重要な役割を果たしていることが明らかにされているが、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。Shati については覚せい剤による依存形成を抑制すること、ドー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ー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ーパミン 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。

A. 研究目的

薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、情報の多様化や供給組織の巧妙化等に拠って拡大し、21世紀を迎えた今日も、状況の悪化が続いている。日本においてはメタンフェタミン（methamphetamine: MAP）を主とした覚せい剤や麻薬による事犯の若

年化が進み、薬物依存に対して法的、社会的な施策の充実と共に、医学的見地からの正しい対処法を見出す必要がある。このような状況を打破するために、薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究を行う必要がある。これまでに、薬物依存の形成には側坐核（nucleus accumbens: NA）におけるドーパミン神経

伝達が重要な役割を果たしていることが明らかにされている³⁾。そこで、我々は、覚せい剤またはモルヒネを投与したマウス NA で共通して発現が増加している遺伝子を検討することによって薬物依存形成メカニズムの解明を行ってきた^{4), 6)-8)}。また薬物依存の予防や治療に用いることの出来る化合物についても報告してきた¹²⁾⁻¹⁴⁾。しかし、薬物依存の形成メカニズムは複雑であり、未知の遺伝子が、薬物依存形成の key を握っている可能性が考えられる。本研究では、PCR select cDNA サブトラクション法を用いて覚せい剤依存の形成に関連する新規遺伝子の同定を試み、昨年度までに shati と piccolo の 2 つの遺伝子を見出した。さらに、両遺伝子とも覚せい剤による薬物依存を軽減する可能性を示唆する報告をしてきた^{1), 10), 11)}。本年度は、これらのうち、特に shati に着目し、NA の shati を過剰発現させた (NA-Shati) マウスを作製して、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、側坐核のドパミン D2 受容体を発現低下させた (NA-iD2R) マウスも作製して、覚せい剤への反応性を検討したので併せて報告する。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (日本 SLC、静岡) を使用した。本実験における動物実験は富山大学動物実験指針、文部科学省動物実験指針および the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan, 2006 に準じた動物実験委員会で承認された上で行った。行動実験に用いるマウスについては、午前 8 時から午後 8 時を明期とする部屋で飼育し、行動実験中以外は、餌および水は自由摂取とした。

2. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作成

Shati 遺伝子またはドパミン D2 受容体 siRNA を pAAV2 に組み込んだ。この pAAV2-shati または pAAV2-iD2R と pAAV-Rep/Cap および pHelper の 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞内で AAV2-shati または AAV2-iD2R ベクターを作製し、それを抽出および精製した⁵⁾。コントロールとして遺伝子組み換えを行っていない AAV ベクターを mock と表記し、使用した。各 AAV ベクターを、両側 NA (anterior = + 1.4, lateral = ± 0.6, ventral = + 4.2 from Bregma) に注入して 3 週間経過後、行動実験を開始した。

3. Shati, D2R および D1aR mRNA 発現量の測定

AAV ベクター注入マウスの脳内での shati, D2R および D1aR の各 mRNA 量の測定は、既報に従って Real Time RT-PCR 法で行った^{5), 11)}。

4. 運動量の測定

アクリル製の箱 (40×40×30 cm) の中で、マウスを 60 分間自由に行動させ、Scanet MV-40 (MELQUEST, 富山) を用いて運動量を測定した。覚せい剤誘発運動過多の測定では、実験の直前に MAP (1 mg/kg, s.c.) および生理食塩水 (Saline) 投与を行った。

5. 自発的交替行動試験 (Y-maze test)

マウスを Y 字型迷路アームの先端に置いた後、8 分間自由に行動させ、マウスが進出したアームを順番に記録した。アームへの総進入回数 (total arm entries) と連続して異なるアームに進出した回数 (交替行動回数: number of alternations) を計算し、自発的交替行動率 [alternation behavior (%) = (number of alternations / total arm entries-2) × 100] を算出した。

6. 新奇物体認知試験 (Novel object recognition)

test)

連続した2日間、マウスをアクリル製の箱(30×30×35 cm)に1日30分間入れた。3日目に箱内に2つの物体を置きマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を10分間測定した(Training)。24時間後に、箱内の片方を新規物体に変えて同様にマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を10分間測定した(Retention)。

7. 社会性行動試験 (Three chamber social interaction test)

アクリル製の3つのチャンバーから成る実験装置(60×40×22 cm)を使用した。連続した2日間、マウスを装置の中で20分間自由に行動させた。3日目に左右チャンバーの片側に、物体を入れたワイヤーケージを置き、もう一方のチャンバーには何も入っていない空のワイヤーケージを置いた。そして、中央のチャンバーにマウスを10分間入れた後、左右チャンバーへの移動を可能にし、さらに10分間3つのチャンバー内を自由に行動させ、各ワイヤーケージにアプローチした時間を測定した(Test 1)。続く4日目に左右チャンバーの片側に、3日目とは異なる物体を入れたワイヤーケージを置き、もう一方のチャンバーには普段、異なるホームケージで飼育されているマウス(ストレンジャーマウスとする)をワイヤーケージ内に入れ、3日目と同様にして各ワイヤーケージにアプローチした時間を測定した(Test 2)。

8. 明暗箱試験 (Light/dark box test)

2つのコンパートメントからなる明暗箱のなかでマウスを10分間自由に行動させ、Scanet MV-40 LDを用いて明箱に滞在した時間を測定した。

9. 強制水泳試験 (Forced swimming test)

深さ約15 cmで25℃の水を張った円筒形の水槽にマウスを入れ、6分間の強制水泳を行った。そのうち、後半5分間における無動時間をScanet MV-40 AQを用いて測定した。

10. 条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned place preference test)

条件付け場所嗜好性試験には2つのコンパートメントからなる明暗箱を用いて、既報に従って行った¹³⁾。MAP(1 mg/kg, s.c.)およびsaline投与は、実験の直前に行った。

11. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、分散分析の後、Student-Newmann-Keuls testを用いて行った。2群間比較には、Student's *t*-testを用いて検定した。

C. 研究結果

1. NAにおけるshati mRNA発現変化

NAにAAV2-shatiベクターを注入したNA-Shatiマウスにおいて、脳内shati mRNAの発現量をReal Time RT-PCR法にて検討した。その結果、対照群としてAAV2-mockベクター注入したNA-Mockマウスと比較して、NA-ShatiマウスのNAにおけるshati mRNA発現量は約4倍に増加していた(Fig. 1)。一方、背側線条体(dorsal striatum: dSTR)におけるshati mRNA発現量には、2群間に差異はなかった(Fig. 1)

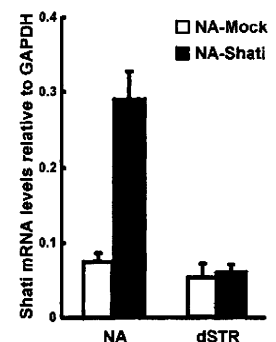


Fig. 1 Shati mRNA expression in NA and dSTR of NA-Shati mice. NA: nucleus accumbens, dSTR: dorsal striatum.

2. NA-Shatiマウスの行動解析

a) 自発的運動量

AAV2-mock または AAV2-shati ベクターを NA に注入したマウスの自発的運動量を、60 分間測定した。両群における自発的運動量に、有意な差はなかった (Fig. 2A)。

b) 短期作業記憶および物質認知能力

NA-Mock および NA-Shati マウスにおける Y 字型迷路試験での交替行動を、作業記憶の指標として測定した。2 群間における交替行動率すなわち短期作業記憶能力に差はなかった (Fig. 2B)。

次に、新奇物体認知試験を用いて、NA-Shati マウスの物体認知能力の変化について検討した。NA-Mock および NA-Shati マウスの両群において、Training では2つの物質に対してほぼ等しいアプローチ時間を示した (Fig. 2C)。24 時間後の Retention では、NA-Shati マウスは新規物体に対してより長いアプローチ時間を示した。Retention でのアプローチ時間に 2 群間における差はなかった (Fig. 2C)。

したがって、NA-Shati マウスの学習記憶能力には障害がないことが示唆された。

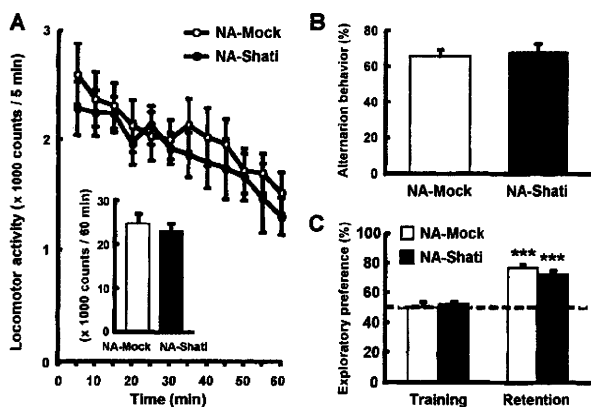


Fig. 2 Locomotor activity, Y-maze test and novel object recognition test in NA-Shati mice. A: The locomotor activity was measured every 5 min for 60 min. B: The alternation behavior in Y-maze test was calculated from the arm entries for 8 min. C: The exploratory preference in novel object recognition test was calculated from approach time to each object for 10 min. *** $P < 0.001$ vs training.

c) 社会性行動

NA-Shati マウスにおける社会性行動に変化が

あるかどうかを検討するために、three chamber social interaction test を行った。最初に、物体の入ったワイヤーケージと空のケージを使って実験を行った (Test 1)。NA-Mock および NA-Shati マウスの両群において、物体の入ったワイヤーケージへのアプローチ時間は、空のワイヤーケージへのアプローチ時間と比べて、有意に増加した (Fig. 3 上図)。この時、NA-Mock および NA-Shati マウス間でアプローチ時間に違いはなかった (Fig. 3 下図)。次に、別の物質の入ったワイヤーケージとストレンジャーマウスが入ったワイヤーケージを使って実験を行った (Test 2)。NA-Mock マウスでは、物質よりもストレンジャーマウスへのアプローチ時間が有意に増加した (Fig. 3 下図)。一方、NA-Shati マウスでは、ストレンジャーマウスと物質へのアプローチ時間に有意な差は観察されなかった (Fig. 3 下図)。これらのことから、NA-Shati マウスでは社会性行動に障害があることが示唆された。

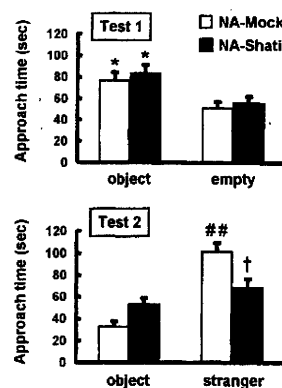


Fig. 3 Three chamber social interaction test in NA-Shati mice. The approach time was measured for 10 min. * $P < 0.05$ vs empty. ** $P < 0.01$ vs object. † $P < 0.05$ vs NA-Mock group.

d) 不安様行動および抑うつ様行動

NA-Shati マウスが不安様行動を示すかどうかを検討するために、light/dark box test を行った。両群における明箱に滞在した時間に、有意な違いはなかった (Fig. 4A)。次に、NA-Shati マウスが抑うつ様行動を示すかどうかを検討するために、forced swimming test (Fig. 4B) および tail suspension test (データ示さず) を行った。NA-Shati マウスの無動時間は、NA-Mock マウスのそれと比べて差はなかった (Fig. 4B)。

これらの結果により、NA-Shati マウスの不安および抑うつ様症状はコントロールマウスと同等であることが示唆された。

3. NA-Shati マウスの MAP 反応性

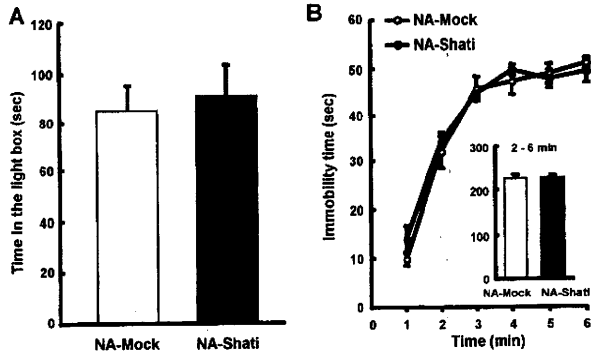


Fig. 4 Light / dark box test and forced swimming test in NA-Shati mice. A: The time spent in the light and dark boxes were measured for 10 min. B: The immobility time in water tank was measured every 1 min for 6 min.

a) MAP 誘発運動過多

NA-Mock および NA-Shati マウスに MAP 1 mg/kg を単回皮下投与した時の運動量を測定した。その結果、両群において有意な MAP 誘発運動過多が観察された (Fig. 5)。しかしながら、NA-Shati マウスにおける MAP 誘発運動過多は、NA-Mock マウスにおけるそれと比較して、有意に減少していた (Fig. 5)。

b) MAP 誘発場所嗜好性

NA-mock および NA-Shati マウスにおいて、MAP 条件付けによる場所嗜好性を測定した。NA-Mock マウスでは、MAP 1 mg/kg により有意な場所嗜好性が誘発された (Fig. 6)。一方、NA-Shati マウスでは、MAP によって条件付けされた場所嗜好性が観察されず、NA-Mock マウスのそれと比較して減少傾向 ($P=0.082$) を示した (Fig. 6)。

4. NA における D2R mRNA 発現変化

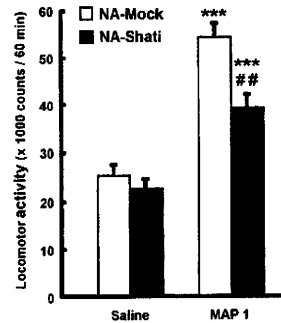


Fig. 5 MAP-induced locomotor activity in NA-Shati mice. The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was measured for 60 min. *** $P < 0.001$ vs Saline. ** $P < 0.01$ vs NA-Mock group.

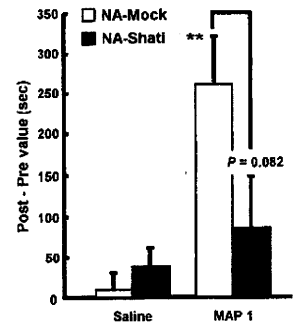


Fig. 6 MAP-induced place preference in NA-Shati mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning. ** $P < 0.01$ vs Saline. $P = 0.082$

NA に AAV2-iD2R ベクターを注入した NA-iD2R マウスにおいて、D2R および D1aR mRNA の発現量を Real Time RT-PCR 法にて測定した。その結果、対照群であり AAV2-imock ベクター注入した NA-iMock マウスと比較して、NA-iD2R マウスの NA における D2R mRNA 発現量は約 1/2 に減少していた (Fig. 7)。

一方、両群の NA における D1aR mRNA 発現量は変化していなかった (Fig. 7)。

5. NA-iD2R マウスの MAP 反応性

a) MAP 誘発運動過多および逆耐性現象

NA-iMock および NA-iD2R マウスに MAP 1 mg/kg を単回投与した時、いずれの群においても MAP 誘発運動過多が観察されたが、NA-iD2R マウスにおける MAP 誘発運動過多の程度は、NA-iMock マウスのそれと比較して有意に減少していた (Fig. 8A)。続けて、MAP 1 mg/kg を 7 日間連続投与し、その 3、5、7 日目に運動量を測定した。その結果、NA-iD2R マウスでは、NA-iMock マウスにおいて観察された MAP 誘発運動量逆耐性現象が抑制されていた (Fig. 8B)。

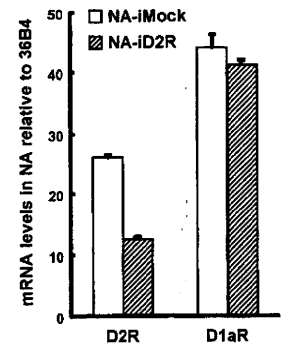


Fig. 7 D2R and D1aR mRNA expression in NA of NA-iD2R mice.

b) MAP 誘発場所嗜好性

NA-iMock および NA-iD2R マウスでは、MAP 1

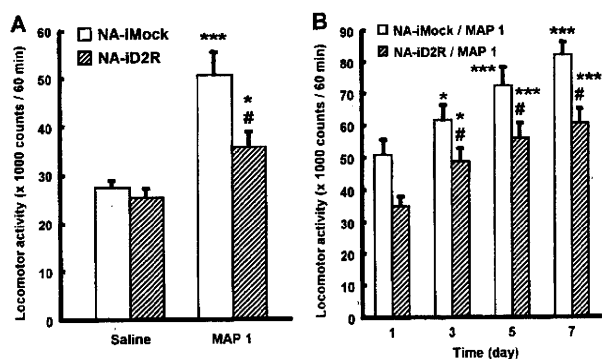


Fig. 8 MAP-induced locomotor activity and locomotor sensitization in NA-iD2R mice. A: The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was measured for 60 min. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Saline. # $P < 0.05$ vs NA-iMock group. B: The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg/day s.c.) for 7 days was measured for 60 min. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs day 1. # $P < 0.05$ vs NA-iMock group.

mg/kg の条件付けにより有意な場所嗜好性が観察された (Fig. 9)。しかしながら、NA-iD2R マウスにおける MAP によって条件づけされた場所嗜好性は、NA-iMock マウスのそれと比較して低かった (Fig. 9)。

D. 考察

本研究において、NA-Shatiマウスは、自発的運動量、学習記憶、不安様行動および抑うつ様行動に変化はなく、社会性行動の減少を示した。

これまでに、新規遺伝子shati については、その生理機能を検討するために、shati 遺伝子欠損および過剰発現マウスを作成し、その機能解析を行ってきている。Shati 遺伝子欠損マウスの行動解析では、探索行動意欲の増加および不安様行動の減少が観察された (未発表データ)。一方、shati 遺伝子過剰発現マウスでは、社会性行動の減少が観察された (未発表データ)。さらに、培養細胞を用いたshati遺伝子導入による機能解析では、Shatiがドパミン・トランスポーターの再取り込み機能に影響を与えることを報告している¹⁰⁾。以上

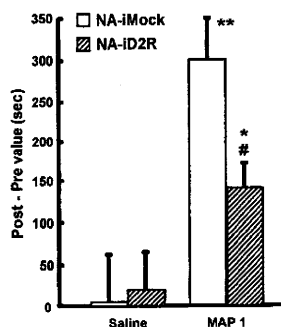


Fig. 9 MAP-induced place preference in NA-iD2R mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Saline. # $P < 0.05$ vs NA-iMock group

のことから、NAにおけるShatiは、社会性行動に関連する中枢神経機能、特にドパミン神経機能の調節において重要な役割を果たしていることが示唆される。また、社会性行動の異常を示す自閉症患者では、NAを含む尾状核-被殻においてドパミン神経機能に異常があることが報告されていることから⁹⁾、自閉症の発症原因にShatiが関与している可能性も示唆される。

覚せい剤MAPへの反応性における検討では、NA-Shatiマウスは、MAP誘発運動過多の減少およびMAP誘発場所嗜好性の減少傾向を示した。我々は、線条体背側部にAAV2-shatiベクターを注入した (dSTR-Shati) マウスも作成し、同様にMAPへの反応性を検討した。その結果、dSTR-Shatiマウスは、dSTR-Mockマウスと比較して、MAP誘発運動過多およびMAP誘発場所嗜好性に有意な変化が観察されなかった (データ示さず)。つまり、NAにおけるShatiは、MAPの薬理学的作用に対して抑制的に働くことが明らかとなり、覚せい剤による薬物依存の形成メカニズムにおいて、NAのShatiが重要な役割を果たしていることが示唆された。その抑制メカニズムとしては、前述した培養細胞での報告から、MAPによるドパミン再取り込み阻害作用に対する拮抗が考えられる。しかしながら、この機構については、in vivoレベルでの更なる検討が必要である。

ところで、薬物依存の形成メカニズムにおいては、NAのドパミン受容体が果たす役割は非常に大きなものであると考えられている³⁾。また、NAにおける神経細胞は、D1aR もしくは D2R を主に発現している細胞に大別できることが知られているが、それらの細胞比率については、報告によりまちまちである²⁾。本研究において、NA-iD2Rマウスは、MAPにより誘発される運動過多、運動量逆耐性現象および場所嗜好性の有意な減少を示した。これらのことから、NAにおいてD2Rを発現している神経細胞の機能変化が、覚せい剤

による薬物依存の形成メカニズムにおいて重要な働きをしていると示唆される。しかしながら、NA-iD2R マウスにおける MAP への反応性は、完全に抑制されているわけではないので、その原因が約 50 %の D2R 発現低下率によるものなのか、D1aR 発現細胞の関与によるものなのかは、今後の検討課題である。さらに、D2R 発現細胞における細胞内シグナル伝達について、その特異的経路の検討も必要である。

E. 結論

本研究は、薬物依存の形成メカニズムにおいて、中脳-辺縁系ドパミン・システムのプレシナプス側で shati が、ポストシナプス側で D2R が、それぞれ重要な働きをしていることを示した。つまり、我々が見出した新規遺伝子 shati は、薬物依存形成において、Key 分子となる可能性を秘めていることが明らかとなった。今後は、in vivo での shati の生理機能をより詳細に検討し、その機能が薬物依存形成にどのように寄与しているかを明らかにしていく予定である。

そして、これらの研究成果から、乱用薬物による薬物依存を治療するための新たな標的分子が見出されることが期待される。

[参考文献]

- 1) Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., et al.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry.*, 349: 451-463, 2008.
- 2) Gerfen, C.R.: The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 285-320, 1992.
- 3) Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J.: Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29: 565-598, 2006.
- 4) Ishikawa, K., Nitta, A., Mizoguchi, H., et al.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine in neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 9: 407-415, 2007.
- 5) Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzyk, M., et al.: Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 66: 908-920, 2010.
- 6) Mizoguchi, H., Yamada, K., Mouri, A., et al.: Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J. Neurochem.*, 102: 1548-1560, 2007.
- 7) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., et al.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. *J. Neurochem.*, 100: 1579-1588, 2007.
- 8) Nakajima, A., Yamada, K., Nagai, T., et al.: Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 24: 2215-2225, 2004.
- 9) Nakamura, K., Sekine, Y., Ouchi, Y., et al.: Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 67: 59-68, 2010.
- 10) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., et al.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor-alpha in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107: 1697-1708, 2008.
- 11) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., et al.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J.*

Neurosci., 27: 7604-7615, 2007.

- 12) Niwa, M., Nitta, A., Shen, L., et al.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.*, 179: 167-171, 2007.
- 13) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., et al.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor-alpha protects against methamphetamine-induced rewarding and sensitization. *Biol. Psychiatry.*, 61: 890-901, 2007.
- 14) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., et al.: Tumor necrosis factor and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry.*, 62: 658-668, 2007.
- 15) Noda, Y., Miyamoto, Y., Mamiya, T., et al.: Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286: 44-51, 1998.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ibi, D., Nagai, T., Koike, H., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Nitta, A., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Sawa, A., and Yamada, K.: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav. Brain Res.*, 206: 32-37, 2010.
- 2) Ibi, D., Nitta, A., Ishige, K., Cen, X., Ohtakara, T., Nabeshima, T., and Ito, Y.: Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochem. Int.*, 56: 77-83, 2010.

- 3) Ohki, M., Ohki, Y., Ishihara, M., Nishida, C., Tashiro, Y., Akiyama, H., Komiyama, H., Lund, L.R., Nitta, A., Yamada, K., Zhu, Z., Ogawa, H., Yagita, H., Okumura, K., Nakauchi, H., Werb, Z., Heissig, B., and Hattori, K.: Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*, 115: 4302-4312, 2010.
- 4) Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Doi, H., Kondo, N., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yamada, K., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., and Sobue, G.: Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.*, 30: 5702-5712, 2010.
- 5) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., Pattabiraman, N., Arun, P., Nitta, A., Nabeshima, T., Madhavarao, C.N., and Namboodiri, A.M.: Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res.*, 1335: 1-13, 2010.
- 6) Alkam, T., Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., Niwa, M., Mizoguchi, H., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. *Behav. Brain Res.*, 210: 184-190, 2010.
- 7) Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yoneyama, M., Ogita, K., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Nagai, T., and 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.*, 114:

1840-1851, 2010.

- 8) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Furukawa, S., Nabeshima, T., and Yamada, K.: Over expression of Piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *NeuroReport*, 21: 1177-1181, 2010.
- 9) 新田淳美、日比陽子、宮本嘉明、鍋島俊隆：薬物依存におけるピッコロの役割. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*. 45: 525-529, 2010.
- 10) Alkam, T., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., Kim, H.C., and Nabeshima, T.: Evaluation of object-based attention in mice. *Behav. Brain Res.*, 220, 185-193, 2011.
- 11) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Ikeda, T., Morishita, K., Liu, W., Ibi, D., Tursun, A., Nabeshima, T., and Yamada, K.: The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. *Behav. Brain Res.*, in press, 2011.

2. 学会発表

- 1) Nitta, A., Alkam, R., Furukawa-Hibi, Y., Niwa, M., Mizoguchi, H., Yamada, K., and Nabeshima, T.: A dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus. XXVII CINP congress, Hong Cong, China, 2010, 6, 6-10.
- 2) Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., Yamada, K., and Nabeshima, T.: The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. 70th FIP (International Pharmaceutical Federation) World Congress of Pharmacy/ Pharmaceutical Sciences, Lisboa, Portugal, 2010, 8, 2-9, 2.
- 3) 新田淳美：「神経栄養因子と創薬」(招待講演).

平成 21 年度生命融合科学教育部シンポジウム
富山発医療・創薬イノベーションにむけて、富山, 2010, 3, 8.

- 4) 尹在錫、永井拓、日比(古川)陽子、小池宏幸、新田淳美、黒田啓介、貝淵弘三、山田清文：LiCl による neuro 2 a cell 神経分化に対する Npas4 の作用. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010, 3, 16-18.
- 5) 日比(古川)陽子、新田淳美、鍋島俊隆、山田清文：新規蛋白質 Shati をノックアウトしたマウスの行動解析. 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010, 3, 16-18.
- 6) 新田淳美：向精神薬と鎮痛剤の依存リスク. スタディグループ 7. 第 20 回日本臨床精神薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010, 9, 15-17.
- 7) 新田淳美：麻薬・覚せい剤依存の怖さを知る(招待講演). 薬物乱用防止指導員大会, 富山, 2010, 11, 29.
- 8) 宮川泰宏、石黒陽子、大熊瑞穂、新田淳美、永井拓、山田清文：術後せん妄に対するベンゾジアゼピン系薬物の影響. 日本臨床薬理学会, 京都, 2010, 12, 1-3.
- 9) 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, 22-24.
- 10) 小林資正、赤池昭紀、平田収正、新田淳美：先導的薬剤師養成に向けた実践的アドバンスト教育プログラムの共同開発 (シンポジウム S12). 第 131 回日本薬学会年会, 静岡, 2011, 3, 28-31.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

新田淳美：「精神障害の診断方法および診断キット」 特願 2010-131881, 出願人 国立大学法人
富山大学, 2010, 6, 9.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究協力者：成田 年、今井 哲司、吉澤 一巳、葛巻 直子

(星薬科大学薬品毒性学教室)

[研究要旨]

アルコールや覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られている。しかしながら、このような依存形成のトリガーとなるシグナルの発火や、維持に関する詳細なメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。一方、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。そこで、本研究では、薬物依存形成の脳内分子機構を解明する一手として、アルコール曝露動物ならびに methamphetamine (METH) による逆耐性獲得動物を用い脳内エピジェネティクス制御を伴った長期的な遺伝子発現変動の多角的な検討を行った。

始めに、アルコール曝露動物を用い、薬物依存形成において重要とされる側坐核領域において、KCC2 の mRNA 発現変動について検討した。その結果、側坐核において KCC2 mRNA の発現上昇が認められた。そこで、遺伝子発現変動にエピジェネティクス修飾が関与しているか否かについて検討を行ったところ、CCR2 の転写開始地点直上において H3K27me3 の減少が認められた。しかしながら、KCC2 プロモーター領域上の DNA は非メチル化状態であった。次に、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核における cytokine/chemokine 発現量について検討したところ、CCR2 の増加が認められた。このような条件下、CCR2 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾の変化について検討したところ、ヒストン H3K9me3 およびヒストン H3K27me3 に変化は認められなかったが、H3K4me3 において有意な増加が認められた。そこで、CCR2 knockout マウスを用いて METH 誘発逆耐性形成の変化について検討したところ、野生型および CCR2 knockout マウスのいずれにおいても逆耐性の形成が認められ、両群間に有意な差は認められなかった。しかしながら、5 週間の休薬後、METH 再投与による逆耐性の維持について検討したところ、野生型については逆耐性の維持が認められたのに対し、CCR2 knockout マウスでは逆耐性現象の消失が認められた。

以上、本研究の結果より薬物処置による KCC2 が細胞内 Cl⁻ 濃度調節機構の不均衡を引き起こし、神経活動調節系に対し直接的な影響を与える可能性が考えられる。さらに、CCR2 の knockout により METH による逆耐性現象の消失が認められたことから、CCR2 が依存症における再燃の治療の標的となる可能性が示唆された。また、本研究における脳内神経の可塑的变化を結びつけるアプローチが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、更なる多角的な検討を今後も行っていく予定である。

A. 研究目的

アルコールや覚せい剤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。

動物実験の結果から、アルコールや覚せい剤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。現在までに、アルコールや覚せい剤などの依存性薬物を摂取することによる中脳辺縁多巴ミン神経系の長期的な可塑的变化に、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報告されている (図1)。近年ヒト疾患を引き起こす遺伝的異常として、ジェノタイプとともに、エピジェノタイプ (後生的遺伝子修飾) が注目されるようになった。エピジェネティクスはクロマチンの後

天的な化学修飾による遺伝子の発現制御機構であり、発生・分化における細胞の個性の獲得に必須である。個々の細胞内では、様々な刺激によって晩発的、後生的に遺伝子活用が制御され、DNA塩基配列には影響を与えることなく、特定の機能蛋白質の発現を強く、長期的に制御することにより難治性疾患の要因となり得る可能性が考えられる (図2, 3)。

一方、神経細胞特異的カリウムクロール共役担体 (K^+ - Cl^- cotransporter 2, KCC2) は神経細胞内 Cl^- 濃度の恒常性を保つ重要分子であり、 Cl^- チャネルを開く抑制性伝達物質である GABA およびグリシン応答を調節している。KCC2 は未熟脳には発現せず、成体においてのみ発現が認められることが知られており、細胞内 Ca^{2+} イメージング法を用いた検討では、GABA を処置することにより神経細胞の興奮を反映するような Ca^{2+} 応答が観察される (図4)。また、アルコールなど依存性薬物と GABA の関連性は数多く報告されていることから、薬物依存に KCC2 が関与する可能性が示唆される。そこで本研究では、アルコールを慢性投与することで作製したアルコール暴露動物の脳組織標本ならびに methamphetamine (METH) による自発運動促進作用に対する逆耐性が獲得された動物の脳組織標本を用いての精神依存形成ならびに維持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、多角的

な分子生物学的検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には Fischer 344 系雄性ラットあるいは C57BL/6J 雄性マウスを用いた。アルコール慢性曝露動物は液体飼料法に従い作製し、RT-PCR 法、ChIP on PCR 法ならびに MSP 法を用いて検討を行った (図 5)。

2. 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、tilting cage 法に従い自発運動量を測定した。測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適應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。

3. 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。維持の実験は、逆耐性形成後、休薬 5 週間後に METH を再投与し、誘発される自発運動量の変化について検討した。

さらに、弁別獲得後あるいは逆耐性獲得後休薬時における、脳内での各種 miRNA の発現変動について、TaqMan PCR 法に従い検討を行った。

C. 研究結果

アルコール曝露動物の側坐核において、細胞内 Cl^- 濃度調節を担う $\text{K}^+\text{-Cl}^-$

cotransporter 2 (KCC2) のヒストン H3K27me3 の有意な低下を伴った遺伝子発現の増加が認められた (図 7, 8)。しかしながら、KCC2 プロモーター領域上の DNA は非メチル化状態であった (図 9)。そこで、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核における cytokine/chemokine 発現量について検討したところ、CCR2 の増加が認められた (図 10)。このような条件下、CCR2 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾の変化について検討したところ、inactive modification となるヒストン H3K9me3 およびヒストン H3K27me3 に変化は認められなかったが、active modification となる H3K4me3 において有意な増加が認められた (図 11)。しかしながら、METH 誘発逆耐性動物の側坐核領域における AcH3 deacetylase である HDAC2 および DNA methylation を担う MeCP2、polycomb protein である EZH2、Suz12、JARID2 による CCR2 遺伝子への影響は認められなかった (図 12)。そこで、CCR2 knockout マウスを用いて METH 誘発逆耐性形成の変化について検討したところ、野生型および CCR2 knockout マウスのいずれにおいても逆耐性の形成が認められ、両群間に有意な差は認められなかった。しかしながら、5 週間の休薬後、METH 再投与による逆耐性の維持について検討したところ、野生型については逆耐性の維持が認められたのに対し、CCR2 knockout マウスでは逆耐性現象の消失が認められた (図 13)。