

201132036A

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 23 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 2011

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 24 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 23 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 2011

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 24 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

平成 23 年度 研究報告書の刊行にあたって

研究代表者 鍋島 俊隆

平成 23 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災により被災された方々に、衷心より哀悼の意を表します。当研究班においても、東北・関東方面の研究分担者においては研究活動が大きく妨げられる中、一徹して課題遂行にご尽力をいただきましたことに、心より御礼を申し上げます。

ここに、厚生労働省発薬食 0613 第 52 号をもって交付決定の通知をうけた平成 23 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 23 年度総括研究報告	1
2. 平成 23 年度分担研究報告	11
依存性薬物の連続投与による精神疾患様症状とその治療薬開発に関する基礎研究	13
(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	20
(長崎国際大学薬学部薬理学 山本 経之)	
乱用薬物誘発行動における大脳基底核神経回路制御の分子機構	28
(大阪バイオサイエンス研究所 疋田 貴俊)	
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	35
(東京医科歯科大学大学院 精神行動医科学分野 西川 徹)	
フェンサイクリジンにより誘発される行動障害に対するエピジェネティクス制御および GABA 作動性神経前駆細胞移植による予防効果	43
(名城大学大学院薬学研究科 毛利彰宏・鍋島俊隆)	
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	58
(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)	
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	65
(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)	
覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序	76
(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)	
物質使用のリスクとなるパーソナリティ測定尺度 Substance Use Risk Profile Scale Japanese version の開発に関する研究	87
(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 大宮宗一郎・伊豫 雅臣)	
薬物依存の再発防止に関する研究	99
(東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト 池田 和隆)	

3. 刊行物一覧(平成 23 年度)	109
4. 研究代表者・研究分担者一覧	457

平成 23 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23年度の研究の目的は、昨年度の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・細胞モデルを用いて再現し、薬物に対する依存や神経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、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、昨年度の成果を発展させ、本年度はさら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

依存形成には大脳基底核神経回路の間接路よりも直接路が重要な役割を果たしており、依存性薬物により直接路依存的に黒質網様部の GABA 作動性神経の erphrin-Eph 分子群が発現増加し、それら分子の活性化が依存性薬物による行動変化を抑制することを明らかにした。Shati の各脳部位への特異的な過剰発現による解析から、shati は脳部位依存的な機能を持ち、大脳基底核の主要な構成部位である側坐核において依存形成ならびに関連するドーパミン遊離を調節していることを明らかにした。覚せい剤に対する薬物関連刺激による渴望の発現をエンドカンナビノイド分解阻害薬が抑制する効果を有することを明らかにした。コレシストキニン 2 受容体の過剰発現およびその拮抗薬の効果から、覚せい剤による精神依存および精神障害に対するコレシストキニン 2 受容体拮抗薬の有用性を明らかにした。幼若期エンリッチ環境によるエピジェネティクス制御および新生児期 GABA 作動性神経前駆細胞の移植による GABA 作動性神経系の活性化が依存性薬物による精神障害の発現を抑制することを明らかにした。ケモカインとその受容体の発現増加とミクログリア活性化に関連した免疫系の活性化が覚せい剤による依存形成を抑制することを明らかにした。

(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 タンパク質活性型内向き整流性カリウムチャンネル (GIRK) 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、GIRK 阻害作用のあるイフェンプロジルがアルコール再使用リスクを抑制すること明らかにした。健常人における物質関連障害になりやすさを検出する心理検査法である Substance Use Risk Profile Scale 日本語版を開発し、その妥当性と信頼性を実証した。違法ドラッグであるメフェドロン・メチロンなどのカチノン誘導体のモノアミントランスポーターを標的とした薬理効果は、覚せい剤や MDMA とは異なる作用を持つことを明らかにした。依存性薬物による精神障害を抑制する効果を有する D-セリン脳内濃度の調節機構を明らかにし、それに関連する因子として 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter 1 遺伝子を検出した。

本年度の成果および状況

1. 依存性薬物の連続投与による精神疾患様症状とその治療薬開発に関する基礎研究

研究分担者：間宮隆吉（名城大学薬学部 薬品作用学研究室）

本研究では、依存性薬物（メタンフェタミン（METH））をマウスに処置した際に観察される精神疾患様症状に対する化合物の治療薬としての可能性を検討した。実験には、野生型（C57BL/6J）雄性マウスおよび前脳特異的コレシストキニン 2 受容体過剰発現（CCK2Rtg）マウスを使用した。条件付け場所嗜好性試験において、野生型マウスに対しMETH条件付け（1 mg/kg, s.c.）の30分前にCI-988（コレシストキニン 2 受容体拮抗薬：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METHによる条件付け場所嗜好性の形成が抑制された。また、METH（1 mg/kg, s.c.：1日1回7日間）投与後に観察される情動行動（明暗箱試験）、社会性行動および認知行動（新奇物体認知試験）の変化に対するCI-988の影響を検討した。その結果、野生型マウスでは上記行動の障害が観察され、CCK2Rtgマウスではそれら障害の程度がより強かった。また、CCK2Rtgマウスにおける行動障害は、CI-988（2 mg/kg i.p.）によって有意に緩解された。これらのことから(i)前脳でのCCK2R発現増加はMETH誘発行動障害を増悪すること、また(ii)CI-988はMETH誘発行動障害の治療薬となる可能性が示唆された。

2. 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

研究分担者：山本経之（長崎国際大学薬学部薬理学研究室）

本研究は、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）の発現機序を、特にanandamideに着目し、脳内カンナビノイドシステムの観点から検討した。また、依存性薬物の退薬時に認められる知的機能障害を念頭に、知的機能障害におけるカンナビノイドシステムの関与を調べた。

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、cueまたはMAP少量投与（priming）によるMAP探索行動（saline注入）の発現の有無を調べた。cueならびにMAP-priming投与によって、ラットのレバー押し行動は増加しMAP探索行動が誘発された。cue呈示により誘発されるMAP探索行動は、エンドカンナビノイド分解阻害薬URB597（anandamide分解阻害薬）の単回投与（1時間前処置）により抑制された。一方で、MAP-priming投与により誘発されるMAP探索行動は抑制されなかった。また、cue呈示によるMAP探索行動はMAP退薬時でのURB597の1日1回、計5日間の反復投与により有意に抑制された。しかしながら、MAP退薬時でのURB597単独投与では、MAP探索行動は誘発されなかった。

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。一方、URB597 の pre 試行前での単回投与群では、新奇物体へのアプローチ時間の有意な増加は認められず、認知機能障害が誘発された。この障害はカンナビノイド CB₁ 受容体遺伝子欠損マウスでは認められないことから、CB₁ 受容体を介する障害である事が示唆される。

以上のように、cue により誘発される MAP 探索行動は脳内カンナビノイドシステムの活性化（エンドカンナビノイド anandamide の増加）によって抑制される可能性が示唆された。今後は、MAP 退薬時での URB597 投与による認知機能障害の発現の有無を検討する必要がある。

3. 乱用薬物誘発行動における大脳基底核神経回路制御の分子機構

研究分担者：足田貴俊（財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ている。これまでに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、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。乱用薬物誘発行動における大脳基底核神経回路制御の分子機構を解析するために、直接路と間接路が統合される黒質網様部に着目をし、コカイン投与時の神経回路特異的な分子変化を探索した。コカインを投与した直接路遮断マウスと間接路遮断マウスの黒質網様部の遺伝子発現を調べると、直接路依存的にコカイン投与により発現上昇する分子として ephrin-Eph 分子群（ephrinA5, EphA4, EphA5）を同定した。これらの分子は黒質網様部の GABA 作動性抑制性神経細胞に共存しており、イムノアドヘジンによるこれらの分子の活性化はコカイン連日投与による行動量増加を抑制した。さらに直接路遮断時にのみコカイン投与による ephrinA5 下流シグナルの増強（黒質網様部でのリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の増加）がみられた。さらに薬物依存症におけるこれらの分子の役割の解析を進めている。

4. 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

研究分担者：西川 徹（東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野）

NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）のコアゴニストであり、脳優位で NMDA 受容体様の分布を示す D-セリンは、フェンシクリジン、メタンフェタミン等の依存性の統合失調症様症状発現薬を急性投与した動物の異常行動を抑制する。したがって、

脳内 D-セリンの代謝や機能の分子機構が、薬物依存の形成やそれによる精神症状の病態に関与する可能性がある。本研究では、NMDA 受容体グリシン調節部位の部分作動薬の D-サイクロセリンを全身的に投与したラットの内側前頭葉皮質において、細胞外 D-セリン濃度の選択的上昇が観察された。また、NMDA 受容体機能を抑制する亜鉛イオンを同部位に局所灌流すると細胞外液中 D-セリン濃度が低下した。一方、アフリカツメガエルの卵母細胞の発現実験系で D-セリンの細胞内外の濃度を変化させる因子として dsm-1 遺伝子 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter 1) を検出し、脳内で D-セリンと類似した発現分布を示すことを明らかにした。細胞外 D-セリンの濃度調節は NMDA 受容体機能発現に極めて重要なことを考慮すると、以上の所見は、この濃度調節に係わる分子機構の脳における存在を支持しており、薬物依存の病態解析や治療法開発の標的として注目される。

5. フェンサイクリジンにより誘発される行動障害に対するエピジェネティクス制御および GABA 作動性神経前駆細胞移植による予防効果

研究代表者：鍋島俊隆（名城大学薬学部薬品作用学）

依存性薬物による精神障害は断薬後も持続的に惹起されるため、乱用者の社会復帰への大きな妨げとなり、このような精神障害に対する予防法の開発は急務である。依存性薬物の一つであるフェンサイクリジン (PCP) は、ヒトにおいて統合失調症に類似した精神症状を惹起することが知られている。一方、依存性薬物による精神障害に対する脆弱性には発達期の環境要因が関わっていることが知られている。特に、転写の活性化、その後続くタンパク質合成に対するヒストン修飾をはじめとするエピジェネティクス制御は生育環境により変化し、依存性薬物による精神障害の発症やその病態に深く関与していると考えられる。また、PCP 連続投与により γ -aminobutyric acid (GABA) 作動性神経の機能低下が報告されている。本研究では、エピジェネティクス制御および GABA 作動性神経機能の活性化が PCP 連続投与による行動障害の発現を抑制するかを検討した。PCP 連続投与によりヒストンのアセチル化 (AcH3K9) の低下を伴った行動障害が認められた。また、幼若期におけるエンリッチ環境下での飼育およびヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) 阻害剤である酪酸ナトリウムの投与は、成体期において PCP 連続投与により誘発される行動障害および AcH3K9 の低下を抑制した。さらに、新生児期における GABA 作動性神経前駆細胞の前頭皮質への移植は、成体期において PCP 急性投与により誘発される行動障害を抑制した。これら知見から、エピジェネティクス制御および GABA 作動性神経前駆細胞移植は PCP により誘発される行動障害に対して予防効果を示すことが示唆された。

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）

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。現在までに、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報告されている。昨年度の報告において、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核では CCR2 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、CCR2 が METH の逆耐性に関与することを報告した。CCR2 は 7 回膜貫通型三量体 G タンパク質共役型受容体であり、免疫応答に関与することが知られていることから、METH の精神依存に免疫応答の関与が考えられる。一方、近年、依存症患者における細菌感染への抵抗性低下が報告されており、その回復も依存症患者の治療において重要な課題となっている。さらに、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドパミン関連行動が増強されることも報告されており、中枢神経系における免疫系の抑制が薬物依存症に深く関与している可能性が考えられる。しかしながら、その詳細な検討はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、薬物依存症における神経免疫系のメカニズム解明を目的として、免疫系を活性化する lipopolysaccharides (LPS) を用いて METH 誘発報酬効果の変化について検討した。実験には C57BL/6J 系雄性マウスを用い、METH 誘発報酬効果の変化は conditioned place preference 法により評価した。その結果、METH により認められる報酬効果の形成は LPS を前処置することで有意に且つほぼ完全に抑制された。このような条件下、CCR2 mRNA 発現量の変化について検討したところ、METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核領域では CCR2 mRNA 量の有意な増加が認められ、この増加は LPS 処置により有意に減少した。そこで LPS 処置時における各種インターロイキン類の変化について、RT-PCR 法を用いて検討した。まず末梢血を用いて検討を行ったところ、LPS 処置 1 時間後において CCR2 のアゴニストである CCL2 mRNA 量の有意な増加が認められた。一方、側坐核領域では、対照群に対し LPS を処置したマウスにおいて IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 量の著明な増加が観察された。そこで、脳における免疫系を担うミクログリアについて検討したところ、LPS 処置においてミクログリアの活性化が認められた。以上、本研究の結果より、LPS による免疫系の活性化が METH による精神依存形成の抑制に一部関与している可能性が示唆された。また、本研究における細胞間相互作用によ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る。

7. 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

研究分担者：新田淳美（富山大学大学院医学薬学研究部・薬物治療学研究室）

依存性薬物による薬物乱用は世界各国で大きな社会問題となっており、本邦においても、覚醒剤メタンフェタミンによる犯罪事例が若年層にまで波及し始めている。したがって、薬物依存の形成メカニズムを解明し、その予防および治療法の開発が急務となっている。しかし、その形成メカニズムには未だ不明な点が多く、多種多様な分子が関与していると考えられている。本プロジェクトでは、薬物依存に関連する新規

分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いる。これまでに、shati および piccolo という2つの分子が薬物依存の形成に深く関与していることを明らかにしてきた。昨年度は、側坐核でのみ shati を過剰発現させたマウスを作製し、その覚醒剤反応性の低下を報告した。今年度は、その神経作用メカニズムを解明するために、新たに線条体でのみ shati を過剰発現させたマウスを作製し、それらの覚醒剤への反応性を比較検討するとともに、脳内ドーパミンおよびセロトニン神経系における shati の機能的役割を検討した。さらに、我々が見いだした shati および piccolo に続く、第3の薬物依存関連分子 transmembrane protein 168 (TMEM168) について、その生理機能解析にも着手したので、併せて報告する。

8. 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（東北大学大学院精神・神経生物学分野）

違法ドラッグの中でもメフェドロン (4-methylmethcathinone)、メチロン (3,4-methylenedioxy-methcathinone) などのカチノン誘導体はデザイナードラッグと呼ばれ、国内外において乱用されている危険な薬物である。メフェドロン、メチロンなどのカチノン誘導体は中枢刺激剤であるメタンフェタミン、MDMA と類似の構造を有し、死亡例も報告されている。カチノン誘導体は中枢刺激剤と類似の構造を有することから、モノアミン輸送体を標的分子としていることが推測される。

モノアミントランスポーターを発現させた培養細胞においてメチロンはドーパミン、セロトニンと比較してノルエピネフリンの取り込み阻害効果が強かった。一方、メフェドロンはセロトニンと比較してドーパミン、ノルエピネフリンの取り込み阻害効果が強かった。メチロンの急性投与は野生型マウスの体温を上昇させたが、ドーパミントランスポーターの欠損により体温の上昇は減弱した。一方、メフェドロンの急性投与はラットにおいては体温を上昇させることが報告されているが、野生型マウスでは体温を下降させる結果が得られた。セロトニントランスポーターの欠損ではメフェドロンの急性投与は野生型同様に体温を下降させたが、ドーパミントランスポーターの欠損では体温は下降しなかった。さらにメフェドロンの急性投与は移所運動量を増加させたが、反復投与により移所運動量が減少し耐性を示した。これらの結果は、カチノン誘導体はメタンフェタミン、MDMA などの中枢刺激剤とは異なる薬理効果を持つ可能性が示唆された。

9. 物質使用のリスクとなるパーソナリティ測定尺度 Substance Use Risk Profile Scale-Japanese version の開発に関する研究

研究分担者：伊豫雅臣（千葉大学大学院医学研究院精神医学）

近年、違法性薬物の乱用や依存に加え、それに伴って惹起される精神病状態を含む物質関連障害が大きな社会問題となっている。この問題を克服するためには、その再発予防法と治療法の研究開発が急務である。一方で、物質関連障害に至る前段階として

の新たな予防法を確立することも重要である。このためには、健常人における物質関連障害になりやすさを検出する心理検査法の開発が必須である。欧米、アジアの一部では、このような検査法である Substance Use Risk Profile Scale (SURPS) が標準的に使用され、物質関連障害の予防に貢献している。しかしながら、わが国では未だ物質関連障害の予防法は確立されていない。本年度は Substance Use Risk Profile Scale 日本語版 (SURPS-J) を開発し、その妥当性と信頼性について検討することを目的とした。SURPS-J は、不安感受性、絶望感、刺激志向性、衝動性の 4 つの因子で構成される。本研究では、まず、これら 4 つの因子について健常人約 600 名を対象に、探索的因子分析および確認的因子分析を行った。結果として、SURPS-J は SURPS 同様の 4 因子構造からなることが明らかとなった。次に、SURPS-J の各 4 因子に対応している既存の心理検査を健常人約 180 名に実施し、相関分析を施行した。その結果、SURPS-J は SURPS 同様の構成概念を有していることが示された。さらに、健常人約 70 名を対象に、同一人物に対して SURPS-J を 2 回施行、測定結果間の信頼性を検証した。得られた結果から SURPS-J は時期を変えて測定しても同様な結果が得られることが確認された。従って、SURPS-J は、SURPS と同様な因子構造を有し、有意な妥当性および信頼性があることが実証された。このことから、SURPS-J は SURPS と同じく、物質関連障害を予防する上で有用なツールであることが示唆された。

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（東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト）

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。前年度までに、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) チャネルに関して、遺伝子多型と発症脆弱性との関連を見出した。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、これらの尺度が実施された 2 つの医療施設において依存症患者のカルテ調査を行い、GIRK チャネル阻害能を有する処方薬 (パロキセチン、イフェンプロジル、サートラリン、クロロプロマジンなど) を投与されている患者群と投与されていない患者群に関して、尺度のスコアや再使用率などを比較した。その結果、GIRK 阻害能を有する処方薬を投与されている群では投与されていない群と比べて有意に再使用リスク評価尺度のスコアが改善していることが、2 つの医療施設の両者においてそれぞれ明らかとなった。また、イフェンプロジルの依存治療効果の臨床試験を立案し、試験を開始した。

平成 23 年度 分担研究報告

依存性薬物の連続投与による精神疾患様症状と その治療薬開発に関する基礎研究

-コレス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、毛利彰宏

（名城大学大学院薬学研究科 薬品作用学）

[研究要旨]

本研究では、依存性薬物（メタンフェタミン（METH））をマウスに処置した際に観察される精神疾患様症状に対する化合物の治療薬としての可能性を検討した。実験には、野生型（C57BL/6J）雄性マウスおよび前脳特異的コレスストキニン2受容体過剰発現（CCK2Rtg）マウスを使用した。条件付け場所嗜好性試験において、野生型マウスに対しMETH条件付け（1 mg/kg, s.c.）の30分前にCI-988（コレスストキニン2受容体拮抗薬：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METHによる条件付け場所嗜好性の形成が抑制された。また、METH（1 mg/kg, s.c.：1日1回7日間）投与後に観察される情動行動（明暗箱試験）、社会性行動および認知行動（新奇物体認知試験）の変化に対するCI-988の影響を検討した。その結果、野生型マウスでは上記行動の障害が観察され、CCK2Rtgマウスではそれら障害の程度がより強かった。また、CCK2Rtgマウスにおける行動障害は、CI-988（2 mg/kg i.p.）によって有意に緩解された。これらのことから、(i) 前脳でのCCK2R発現増加はMETH誘発行動障害を増悪すること、また(ii) CI-988はMETH誘発行動障害の治療薬となる可能性が示唆された。

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、コレスストキニン（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は33個のアミノ酸からなり、その活性体とされているCCK-4

や CCK-8 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ー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、覚せい剤による精神疾患様症状や薬物依存に対して 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 誘発精神依存症状および周辺症状に対する CCK2 受容体の関与やその拮抗薬の作用について検討した。

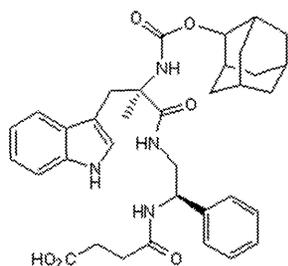


図1 CI-988の構造式

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には3~4ヶ月齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本SLC、浜松)および前脳特異的CCK2受容体過剰発現(CCK2Rtg)マウスを用いた。動物は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、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。

メタンフェタミン(1 mg/kg 大日本住友製薬(株)大阪)およびCI-988(トクリスバイオサイエンス、2 mg/kg)は、それぞれ生理食塩液に溶解し、0.1 mL/10 g BWの割合で投与した。

2. 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 $15 \times 15 \times 15\text{ cm}$)からなり、スライド式の仕切り($10 \times 15\text{ cm}$)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.)または生理食塩液をマウスに投与し、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。

3. 情動及び認知機能関連試験

明暗箱試験：実験装置にはプレキシグラス製のシャトルボックス (W15 x L30 x H15 cm) を用いた。一方の明室は透明で、床面は凹凸のある白色、もう一方の暗室は黒色で、床面は直径 1 mm のステンレス製グリッドが 1 cm おきに設置してある。マウスを透明コンパートメント側に静かに入れ、5 分間各コンパートメントに滞在する時間を測定した。

新奇物体認識試験 (NORT)：実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱 (W50 x L50 x H20 cm) を用い、装置の底には木屑を敷いた。NORT は馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1 および 2 日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に 10 分間マウスを慣らした。3 日目の訓練試行では、装置内に 2 つのオブジェクトを設置し、マウスを 10 分間自由に探索させた。その 40 分後の保持試行では、片方のオブジェクトを新奇オブジェクトに置換し、再びマウスを装置内に入れ、10 分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および 2 つのオブジェクトを探索している総探索時間を測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合 (%) を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合 (%) を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

社会性行動試験：1 日目に装置に対して 10 分間の馴化を行い、2 日後に社会性行動試験を行った。それぞれ異なるケージ内で飼育していた同系統の 2 匹のマウスを同時に装置中央に入れ、その直後から 10 分間、社会性行動として、お互いに嗅ぎ合う行動 (sniffing)、相手の動物を追いかける行動 (following)、相手の動物の上に乗るかかる行動 (mounting)、相手の動物の下に潜ろうとする行動 (scrawling) のいずれかを示している時間を測

定した。

血中コレシストキニン濃度の測定：行動実験終了後、断首により血液を採取し、EDTA 入りチューブに入れて 1600 x g で 15 分間遠心し上清を得た。抽出および測定は Protocol for CCK (26-33) EIA kit (EK-069-04; Phoenix Pharmaceuticals, INC, USA) に従って行った。

4. 統計解析

結果はすべて平均値 \pm 標準誤差として示した。得られた結果は、one-way 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%未満の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1 精神依存様症状に対する CI-988 の作用

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 11 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)。

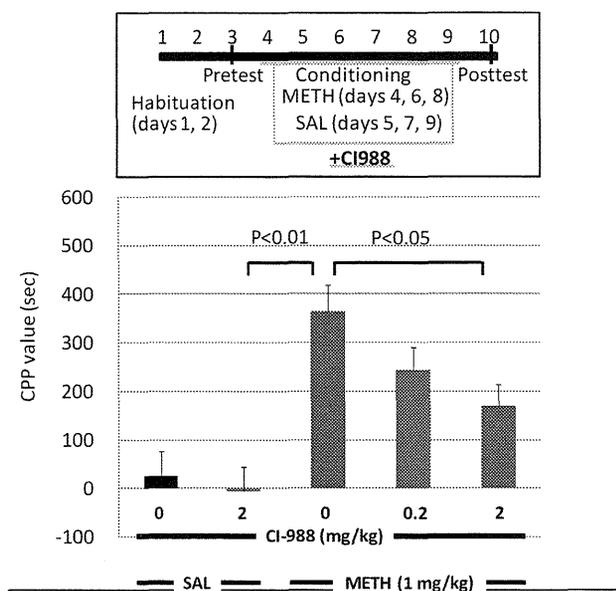


図 2 メタンフェタミン連続投与による条件付け場所嗜好性に対するコレシトキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と条件付け場所嗜好性に対する CI-988 (0.2 および 2 mg/kg ip) の影響。

側坐核細胞外ドーパミンレベル: メタンフェタミンの急性投与後に観察される側坐核でのドーパミンレベルの上昇が、CI-988 の 30 分前処置によって有意に抑制された (図 3)。

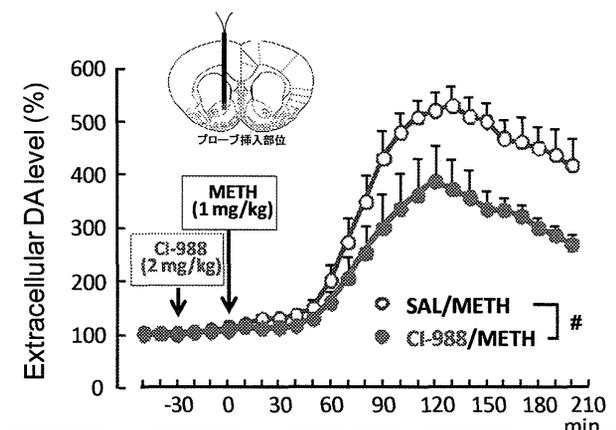


図 3 メタンフェタミン誘発側坐核細胞外ドーパミンレベル増加に対するコレシトキニン受容体拮抗薬の作用

2 周辺症状に対する CI-988 の作用

メタンフェタミンを 1 日 1 回 7 日間投与し、7 日間の休薬後、明暗箱試験、新奇物体認識試験および社会性行動試験を行った (図 4 上段)。

明暗箱試験: CCK2tg マウスの明室滞在時間は、野生型マウスに対し、少なかったが有意ではなかった。一方、メタンフェタミン投与後はどちらの群も明室滞在時間が短くなったが、CCK2tg マウスは統計学的に有意であった。この CCK2tg マウスで観察された明室滞在時間の短縮は、CI-988 (2 mg/kg) の投与によって有意に緩解された (データ示さず)。

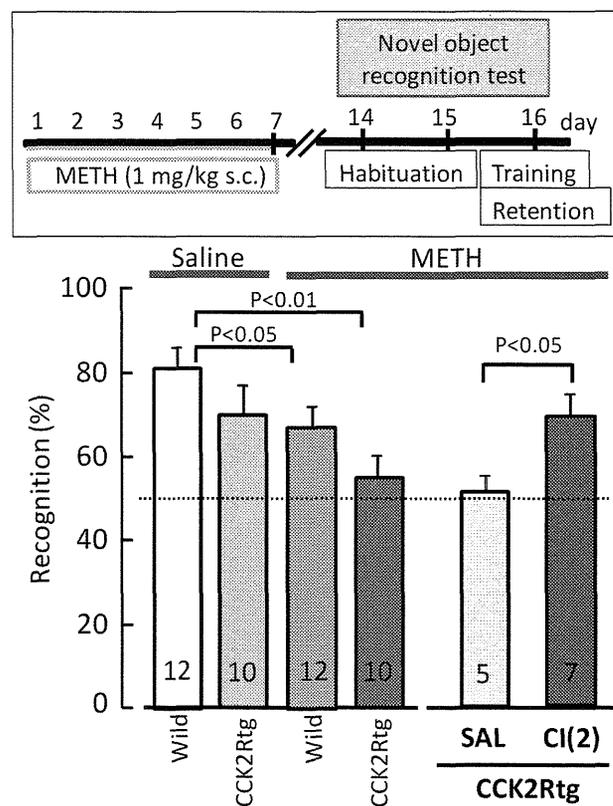


図 4 メタンフェタミン連続投与による新奇物体認識障害に対するコレシトキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と新奇物体認識試験における野生型マウスおよび CCK2Rtg マウスにおける反応。また CI-988 (2 mg/kg ip) の作用。

新奇物体認識試験: 訓練試行時の探索嗜好率は、各群間で有意な差は認められなかった (データ示さず)。一方、保持試行時では野生型および CCK2Rtg マウスにおいてメタンフェタミン投与群で有意に障害され、その障害は CCK2Rtg マウスの方が強かった。この CCK2Rtg マウスで観察された障害に対し、CI-988 (2 mg/kg) を投与すると有意に緩解した (図 4 下段)。

社会性行動試験：10 分間の相手に対する追尾、身縊り時間（社会性行動時間）は、生理食塩液を処置後の CCK2Rtg マウスで有意な短縮が認められた。さらにメタンフェタミン投与によって野生型および CCK2Rtg マウスの両群で生理食塩投与群と比べて社会性行動時間が短縮した。さらに、この CCK2Rtg マウスにおける短縮は、CI-988（2 mg/kg）を投与すると有意に緩解した（図 5）。一方、相手から受ける社会性行動の差は各群間で認められなかった（データ示さず）。

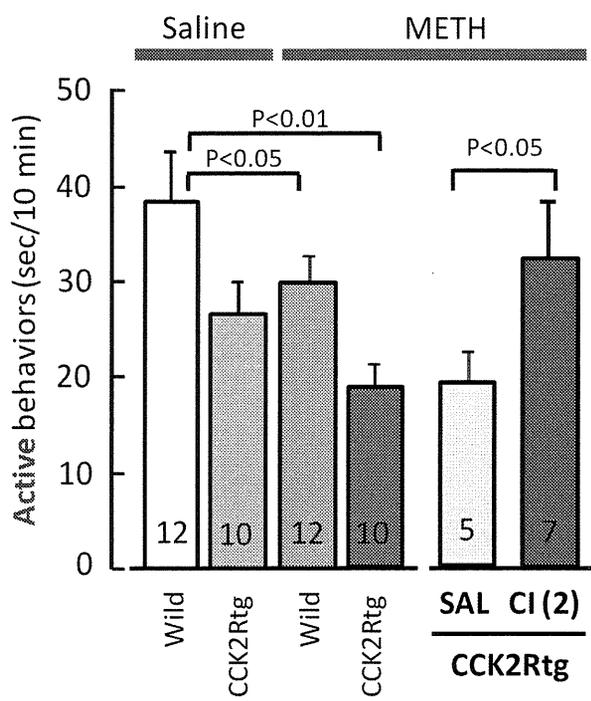


図5 メタンフェタミン連続投与による（積極的）社会性行動障害に対するコレシストキニン受容体拮抗薬の作用。社会性行動における野生型マウスおよび CCK2Rtg マウスにおける反応、および CI-988 (2 mg/kg ip) の作用。

D. 考察

METH 依存によって、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。

本年度はメタンフェタミンによる精神依存性と情動行動障害について確認し、それら行動指標

に対する CCK2R の関与と拮抗薬の作用を行動薬理的に検討した。CCK2R 拮抗薬 CI-988 それ自身は何ら影響しない濃度で、メタンフェタミンとの併用処置によってメタンフェタミンによる精神依存用症状を有意に抑制した（図 2）。メタンフェタミンはドーパミントランスポーター阻害作用を有することから、脳内 CCK2R がメタンフェタミンのドーパミンに対する作用を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。そうしたドーパミンシステムとコレシスト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 CCK2R 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、また主にドーパミン D1 受容体との共局在が観察された（昨年度報告済）。側坐核においてメタンフェタミンによる細胞外ドーパミン量の増加が CI-988 (2 mg/kg) によって有意に抑制された。このことから、メタンフェタミンによる精神依存を CI-988 が抑制する可能性が示唆された。今後は治療薬として活用可能かどうかを中心に検討が必要と思われる。

一方、メタンフェタミンによる情動障害や認知機能障害に対する CI-988 の作用を調べた。その結果、いずれも CCK2Rtg における障害の緩解作用が認められた。したがって、メタンフェタミン誘発行動障害に脳内 CCK2R が関与していることおよび CI-988 が治療薬となり得る可能性が示唆された。

E. 結論

CCK2R はドーパミン受容体と相互作用を有しており、CCK2R 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。