

[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**
1. 論文発表
 1. Mouri A, Koseki T, Narusawa S, Niwa M, Mamiya T, Kano SI, Sawa A, Nabeshima T. Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioural changes. **Int J Neuropsychopharmacol** (2012) *in press*.
 2. 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).
 3. Lu L, Mamiya T, Koseki T, Mouri A, Nabeshima T. : Genetic animal models of schizophrenia related with the hypothesis of abnormal neurodevelopment. **Biol Pharm Bull**. 34, 1358-1363 (2011)
 2. 学会発表
 1. Akihiro Mouri, Takenao Koseki, Shiho Narusawa, Minae Niwa, Takayoshi Mamiya, Shin-ichi Kano, Akira Sawa, Toshitaka Nabeshima Mouse Strain Differences in Phencyclidine-induced Behavioral Changes. The 2nd congress of Asian college of Neuropsychopharmacology (Seoul, 2011.9.24)
 2. Takeonao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya., Yuki Aoyama, Kazuya Toriumi, Shizuka Suzuki, Azusa nakajima, Takuma Yamada, Taku Nagai, Toshitaka Nabeshima : "Enriched Environment in Adolescent Prevents Abnormal Behavior Associated with Histone Deacetylation in Phencyclidine-treated Mice. The 2nd congress of Asian college of Neuropsychopharmacology (Seoul, 2011.9.24)
 3. 古関竹直、毛利彰宏、鈴木静香、中島杏紗、間宮隆吉、鍋島俊隆：メタンフェタミン依存に対するガラントミンの抑制作用. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(名古屋, 2011.10.13)
 4. 濱 みなみ、箕浦由里絵、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆:メタンフェタミン依存に対するコレシストキニン2受容体拮抗薬CI-988の抑制作用. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(名古屋, 2011.10.13)
 5. 本荘龍輝、鳥海和也、渡辺裕之、宋 梓瑜、近藤水生、武藤瑛里子、間宮隆吉、新田淳美、福島 健、鍋島俊隆 shati遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の神経化学的な変化 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(名古屋, 2011.10.13)
 6. 近藤水生、鳥海和也、本荘龍輝、武藤瑛里子、古関竹直、間宮隆吉、永井 拓、新田淳美、山田清文、鍋島俊隆 新規薬物依存抑制因子shati結合タンパク質の探索 平成23年度

アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
(名古屋, 2011.10.13)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

7. 布目貴大、毛利彰宏、青山雄紀、鳥海和也、古関竹直、間宮隆吉、鍋島俊隆:依存性薬物による精神障害への冬季出産の影響. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(名古屋, 2011.10.13)

8. 古関竹直、毛利彰宏、鈴木静香、中島杏紗、間宮隆吉、鍋島俊隆: ガランタミンのメタンフェタミン依存形成抑制作用におけるニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン受容体の関与. 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会(東京, 2011.10.27)

9. 鍋島俊隆、間宮隆吉: 隔離飼育およびDISC1遺伝子発現抑制による新たな精神疾患モデル動物の作製. 第44回精神神経系薬物治療研究会報告会(大阪, 2011.12.2)

10. 鳥海和也、毛利彰宏、成澤志穂、青山雄紀、井川夏美、陸玲玲、永井拓、間宮隆吉、鍋島俊隆:胎生期におけるフェンサイクリジンの投与は神経前駆細胞の分裂を障害し、前頭前皮質内グルタミン酸作動性神経細胞数の減少を生じる. 第85回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.14)

11. 布目貴大、毛利彰宏、青山雄紀、松本友里恵、鳥海和也、古関竹直、間宮隆吉、澤明、山田清文、鍋島俊隆:妊娠期における温度および日照環境の変化は依存性薬物および遺伝子変異による統合失調症様行動変化に対して脆弱化させる. 第85回日本薬理学会年会(京都, 2012.3.15)

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

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、山口 拓

（長崎国際大学薬学部薬理学研究室）

[研究要旨]

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）ならびに知的機能障害の発現機序を、エンドカンナビノイド（特にanandamide）ならびにカンナビノイドシステムとの関連性が示唆されているアラキドン酸カスケードの観点から追究した。

依存性薬物への渴望の評価は、ラットを用いた薬物自己投与実験法によって実施した。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日間施行し、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呈示またはMAP少量投与（priming）によるMAP探索行動（saline注入）の発現の有無を検討した。cue呈示ならびに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呈示によって誘発されるMAP探索行動は、MAP退薬時におけるanandamide分解酵素（fatty acid amide hydrolase; FAAH）阻害薬URB597の退薬時での反復投与（1日1回、計5日間）により有意に抑制された。さらに、cue呈示前の単回投与（1時間前処置）によっても抑制された。しかしながら、MAP-priming投与によって誘発されるMAP探索行動は抑制されなかった。また、MAP退薬時におけるURB597単回投与では、MAP探索行動は誘発されなかった。一方、MAP探索行動におけるプロスタノイド受容体の関与を追究した。プロスタノイドEP1およびEP3受容体拮抗薬は、cueならびにMAP-priming投与によって誘発されるMAP探索行動を有意に抑制した。

認知機能はマウスを用いた新奇物体探索試験によって検討した。本試験は同一の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。しかし、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受容体拮抗薬AM251およびCOX阻害薬meloxicamによって改善された。一方、MAP退薬は本課題における認知機能を障害し、このMAP退薬による認知機能障害はCOX阻害薬diclofenacによって有意に改善された。

以上の結果から、cue呈示によって誘発されるMAP探索行動は、脳内カンナビノイドシステムの活性化（anandamideの増加）によって抑制されることが明らかとなり、anandamide分解酵素阻害薬は渴望を抑える覚せい剤依存症の治療薬候補として期待される。また、MAP退薬時での認知機能障害は、CB₁受

容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現している可能性が考えられる。今後は、MAP退薬時に認められる認知機能障害におけるエンドカンナビノイドの関与を検討する必要がある。

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。上記の誘発因子は、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 CB_1 受容体は、大麻の主要活性成分 tetrahydrocannabinol (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 CB_1 受容体の役割に焦点を当て追究してきた¹⁾。今回は、渴望再燃の治療ターゲットとして主要なエンドカンナビノイドの1つである anandamide ならびに、 CB_1 受容体との密接な関連性が示唆されているアラキドン酸カスケード⁸⁾に着目して検討した。また、依存性薬物の退薬時に認められる知的機能障害にも焦点を当て、その発現機序を追究した。

B. 研究方法

1. 実験動物

薬物自己投与実験には 300-350g の雄性 Wistar/ST 系ラット (日本エスエルシー株式会社) を使用した。認知機能に関する実験には 30-40g の雄性 ICR 系マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) ならびに CB_1 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) 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、静脈内へ注入した。MAP-priming には 1.0 mg/kg の用量を腹腔内に投与した。anandamide 分解酵素 (fatty acid amide hydrolase; FAAH) 阻害薬 URB597 (Tocris, Inc.) は、DMSO、Tween ならびに生理食塩液の混合液 (1:1:8) に溶解し腹腔内に投与した。ONO-8713 (EP1 受容体拮抗薬)、ONO-AE3-240 (EP3 受容体拮抗薬) ならびに ONO-AE3-208 (EP4 受容体拮抗薬) は (全て小野薬品工業株式会社より供与)、蒸留水と DMSO の混合溶液 (1:1) に溶解し、脳室内に投与した。COX 阻害薬 diclofenac (SIGMA, Inc.) は生理食塩液に、meloxicam (Wako, Inc.) は 5% carboxymethyl cellulose 液に溶解し腹腔内に投与した。

3. 餌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 Inc.) 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

餌ペレットを正強化子としてレバー押し行動を獲得させたラットを用いて、MAP 自己投与訓練を実施した。レバー押し行動の獲得後、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; 株式会社カネカメディクス) を使用し、ラットの右頸静脈から挿入し、先端を右心耳への入り口直前に留置した。実験には、レバー押しに伴って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 ;株式会社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 μL/infusion) が薬物関連刺激 (cue, 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自己投与実験 (cue 呈示なし) を続けた (消去過程)。退薬 6 日目に cue 呈示または MAP-priming 投与による“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. 新奇物体探索試験

新奇物体探索試験は、URB597 の急性投与後、または、MAP 反復投与後の退薬 7 日目に実施した。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 時間馴化させた (habituation 試行)。次の日に訓練施行として 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、すなわち物体へのアプローチ時間を 10 分間測定した (pre 試行)。物体認識における保持試行として pre 試行の 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、pre 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から除外した。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.)。

6. 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. MAP 探索行動の発現におけるエンドカンナビノイドの関与

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、5 日目のレバー押し回数は 5.4 ± 0.7 回となった。退薬 6 日目の cue 呈示によりラットのレバー押し回数は 31.7 ± 3.9 回と増加し、MAP 探索行動が発現した (Fig. 1)。この MAP 探索行動は、MAP 退薬時における URB597 (3.2 mg/kg) の反復投与 (1 日 1 回、計 5 日間) によりレバー押し回数が 16.5 ± 3.3 回となり、有意に抑制された ($p < 0.05$, Fig. 1)。

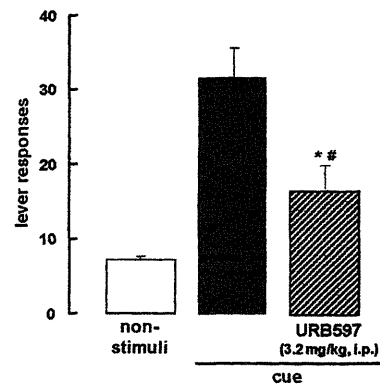


Fig. 1 Effects of URB597 administered during the extinction phase on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by MAP-associated cues. Rats were administered with URB597 (3.2 mg/kg) after each session during extinction period (days 1-5 of extinction). Data represent mean (\pm S.E.) number of lever responses. * $p < 0.05$ compared with MAP associated cues alone. # $p < 0.05$ compared with non-stimuli group.

この cue 呈示により誘発される MAP 探索行動は、anandamide 分解阻害薬 URB597 (3.2 mg/kg, i.p.) の単回投与 (薬物探索行動のテスト開始 1 時間前) により、そのレバー押し行動は 11.3 ± 5.5 回まで抑制された ($p < 0.01$; Fig. 2)。また、cue 呈示と同様に、MAP-priming 投与によっても MAP 探索行動が誘発された (38.6 ± 15.1 回; Fig. 2)。しかしながら、MAP-priming 投与により誘発される MAP 探索行動は、URB597 の 3.2 および 10 mg/kg の用量において抑制されなかった (Fig. 2)。

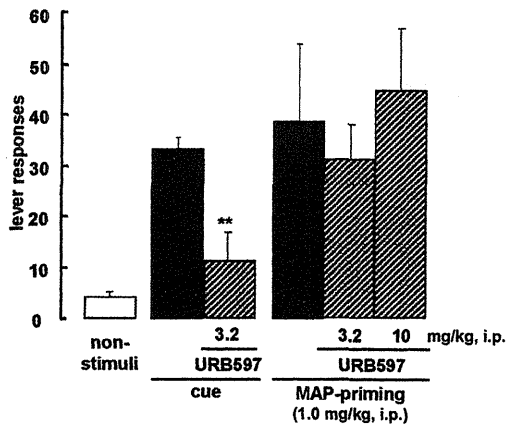


Fig. 2 Effects of URB597, a FAAH inhibitor, on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by MAP-priming injection or MAP-associated cues in MAP self-administered rats. URB597 (3.2 mg/kg) was administered 1 hr before the reinstatement test. Data represent mean (\pm S.E.) of number of lever responses. ** $p < 0.01$ compared with MAP associated cues alone.

一方、退薬時での URB597 (3.2, 10 mg/kg) の単回投与は、MAP 探索行動を誘発しなかった (レバー押し回数; 9.2 ± 2.3 回) (Fig. 3)。

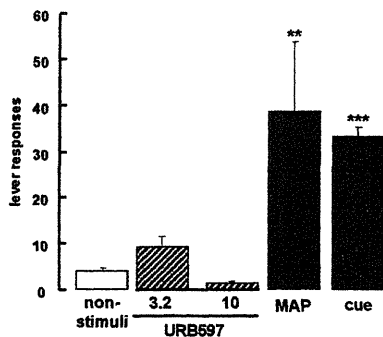


Fig. 3 Effects of URB597 on lever pressing behavior in MAP self-administered rats. Data represent mean (\pm S.E.) of number of lever responses. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with non-stimuli group.

2. MAP 探索行動発現におけるプロスタノイド EP 受容体の関与

cue 呈示ならびに MAP-priming 投与により誘発される MAP 探索行動は、EP1 受容体拮抗薬 ONO-8713 ならびに EP3 受容体拮抗薬 ONO-AE3-240 の脳室内投与 (100 μ g/side) によって有意に抑制された。しかしながら、EP4 受容体拮抗薬 ONO-AE3-208 の脳室内投与 (32 μ g/side) はいず

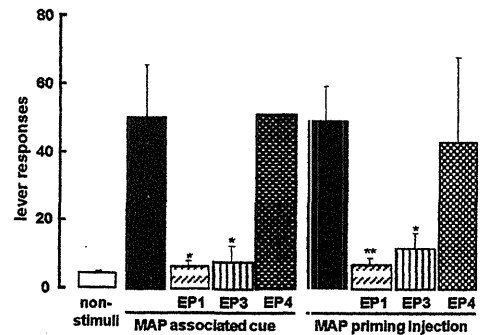


Fig. 4 Effects of a prostanoid EP receptor antagonists on reinstatement of MAP-seeking behavior in MAP self-administered rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with MAP-associated cue or MAP-priming alone, EP1: EP1 receptor antagonist (ONO-8713; 100 μ g/side), EP3: EP3 receptor antagonist (ONO-AE3-240; 100 μ g/side), EP4: EP4 receptor antagonist (ONO-AE3-208; 32 μ g/side).

れの MAP 探索行動も抑制しなかった (Fig. 4)。

3. 認知機能障害におけるエンドカンナビノイドの役割

vehicle 群における test 試行での新奇物体へのアプローチ時間 (41.0 \pm 10.8 秒) は、既存物体へのそれ (9.3 \pm 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、79.5 \pm 4.6 %であった (Fig. 5A)。これに対して、マウスの test 試行における新奇物体へのアプローチ時間は、pre 試行 30 分前の URB597 投与 (0.32 mg/kg, i.p.) によって既存物体へのそれと比べて変化がなく、アプローチ率は 56.0 \pm 4.2 %まで低下した ($P < 0.01$ vs. vehicle 群; Fig. 5A)。この URB597 によるアプローチ率の低下は、CB₁ 受容体拮抗薬 AM251 によって拮抗された ($P < 0.05$ vs. URB597 群; Fig. 5A)。一方、CB₁ 受容体遺伝子欠損 (CB1KO) マウスを用いた検討において、vehicle 群の新奇物体へのアプローチ率は 74.1 \pm 7.6 %となり野生型マウスの vehicle 群と比較して差はなかった (Fig. 5B)。また、URB597 を投与した CB1KO マウスのアプローチ率は、野生型マウスに投与した場合と異なり、全く低下しなかった。

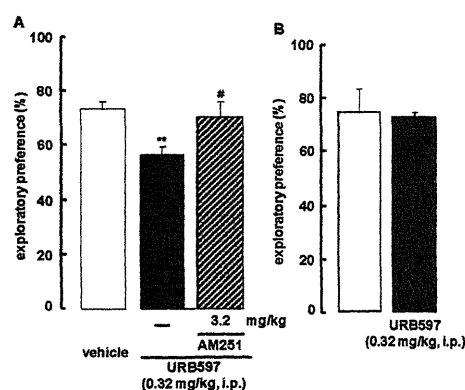


Fig. 5 Effect of URB597 on recognition performance in mice. A, AM251, a CB₁ receptor antagonist, was administered before 15min of URB597 administration. B, Effect of URB597 on recognition performance in CB1KO mice. Data represent the mean \pm SEM. ** p <0.01 compared with vehicle-treated mice; # p <0.05 compared with URB597-treated mice.

さらに、URB597 によるアプローチ率の低下は、COX阻害薬 meloxicam の投与によって抑制された (P <0.05 vs. URB597 群 ; Fig. 6)。

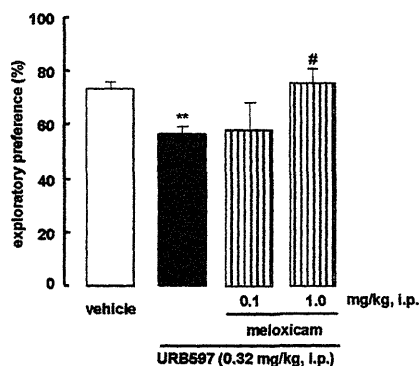


Fig. 6 Effect of meloxicam, a COX inhibitor on cognitive impairment induced by URB597 in mice. Data represent the mean \pm SEM. ** p <0.01 compared with vehicle-treated mice; # p <0.05 compared with URB597-treated mice.

4. MAP 退薬時に認められる認知機能障害におけるアラキドン酸カスケードの関与

7日間の MAP (1.0 mg/kg) 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、 $52.5 \pm 7.4\%$ となり、vehicle 群 (アプローチ率 $80.3 \pm 3.3\%$) と比較して有意に低下していた (p <0.001 vs. vehicle 群 ; Fig. 7)。この MAP 退薬時でのアプローチ率

の低下は、MAP 退薬 7日目における pre 試行 30分前での COX 阻害薬 diclofenac (10 mg/kg) の単回投与により改善された ($70.0 \pm 3\%$, p <0.05 vs. MAP 退薬群 ; Fig. 7A)。また、MAP 投与時に diclofenac (10 mg/kg) を併用投与することによって、退薬時に認められるアプローチ率の低下は観察されなかった ($78.3 \pm 4.9\%$, p <0.01 vs. MAP 退薬群 ; Fig. 7B)。

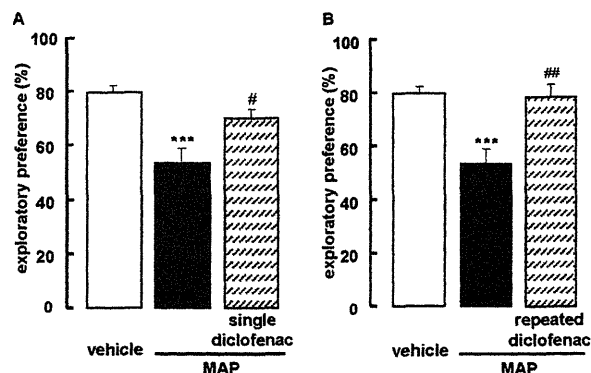


Fig. 7 Effect of diclofenac, a COX inhibitor on cognitive impairment on the 7th day of MAP withdrawal in mice. A, Diclofenac (10 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the training trial. B, Diclofenac was co-administered with MAP. Data represent the mean \pm SEM. *** p <0.001 compared with vehicle-treated mice; # p <0.05, ## p <0.01 compared with MAP-treated mice.

D. 考察

我々は MAP 探索行動の発現が、CB₁ 受容体拮抗薬 SR141716A により抑制され、逆に CB₁ 受容体作動薬 HU210 により誘発される事を明らかにしている^{1),3)}。また、MAP 退薬時に Δ^8 -THC を反復投与することにより MAP 探索行動の発現が抑制されることも見出している¹⁾。これらの知見から、MAP 探索行動の発現要因は、①MAP 退薬時でのカンナビノイドシステムの不活性化、および②MAP 探索行動発現時における CB₁ 受容体の活性化であると推察される。URB597 は、anandamide 分解酵素 FAAH を阻害する事により脳内での anandamide を増加させ²⁾、間接的に CB₁ 受容体を活性化する薬理作用を有する。この URB597 は、

今回用いた用量ではその単独投与によって MAP 探索行動を誘発しないことから、CB₁ 受容体活性化作用は HU210 と比較して緩やかである事が推察される。従って、MAP 退薬時における URB597 の反復投与は、不活性化された脳内カンナビノイドシステムを賦活させる事で MAP 探索行動の発現を抑制したと考えられる。また、誘発因子を負荷する直前での URB597 の単回投与は、MAP 探索行動を誘発しない程度にカンナビノイドシステムを賦活させ、誘発因子による急激な CB₁ 受容体の活性化を阻止する事により MAP 探索行動の発現を抑制した可能性が考えられる。一方、URB597 による MAP 探索行動の抑制作用は cue 呈示による場合に限定されており、誘発因子による相違が認められた。MAP 探索行動の発現は、誘発因子によって脳内発現機序が異なる事が、その脳内責任部位の検討により示唆されている。事実、我々はリドカインを用いた実験から、cue 呈示による MAP 探索行動の発現に扁桃体が促進的に関わるが、MAP-priming 投与によるそれには関与しない事を明らかにしている⁴⁾。しかしながら、この扁桃体における特異的な anandamide の分布は報告されておらず、少なくとも今回得られた結果は、扁桃体以外の責任部位の相違に基づく可能性もあり、本件についてはさらなる検討が必要である。

一方、我々はこれまでに THC によるレバー押し行動の抑制作用は、アラキドン酸カスケードならびにプロスタグランジン EP3 受容体を介して発現する事を報告した⁸⁾。また、MAP 探索行動は COX 阻害薬により抑制される事も明らかにしている¹⁾。これらを背景に、MAP 探索行動の発現における EP 受容体の関与を調べた。その結果、MAP 探索行動の発現には、EP1 あるいは EP3 受容体が促進的に関わっている事が明らかとなった。EP 受容体は EP1~EP4 の 4 つのサブタイプが同定されており、特に EP3 受容体は青斑核などのノルアドレナリン神経核に発現していることが明らか

にされている⁷⁾。また、EP1 受容体も近年、薬物探索行動の発現に関わるドーパミン神経系との関連性が指摘されている⁵⁾。EP1 あるいは EP3 受容体の活性化による MAP 探索行動発現の抑制作用は、EP 受容体の下流にて働くカテコラミン神経系の関与が考えられる。

認知機能の検討では、URB597 は新奇物体探索試験において認知機能障害を誘発し、この障害は CB₁ 受容体ならびに COX を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現する事が明らかとなった。また、MAP 反復投与後の退薬時においても同様に認知機能障害が認められ、この障害もまたアラキドン酸カスケードの活性化により発現する事が明らかとなった。これまでに乱用性薬物 MDMA⁶⁾ならびに MAP (unpublished data) 退薬時に認められる認知機能障害は CB₁ 受容体の活性化を介して発現する事を報告している。これらの結果を考慮すると、MAP 退薬時に認められる認知機能障害は、CB₁ 受容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化に基づき発現している可能性が示唆される。

E. 結論

cue 呈示によって誘発される MAP 探索行動は、脳内カンナビノイドシステムの活性化 (anandamide の増加) によって抑制されることが明らかとなり、anandamide 分解酵素阻害薬は渴望を抑える覚せい剤依存症の治療薬候補として期待される。また、MAP 退薬時での認知機能障害は、CB₁ 受容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現している可能性が考えられる。今後は、MAP 退薬時に認められる認知機能障害におけるエンドカンナビノイドの関与を検討する必要がある。

【参考文献】

1) 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.
- 2) Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D.: Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl -3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 313: 352- 358, 2005.
- 3) Hiranita, T., Nawata, Y., Sakimura, K., Yamamoto, T.: Methamphetamine-seeking behavior is due to inhibition of nicotinic cholinergic transmission by activation of cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology*, 55: 1300-1306, 2008.
- 4) Hiranita T., Sakimura K., Nawata Y., Anggadiredja K., Yamamoto T.: The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103: 8523-8527, 2006.
- 5) Kitaoka, S., Furuyashiki, T., Nishi, A., Shuto, T., Koyasu, S., Matsuoka, T., Miyasaka, M., Greengard, P., Narumiya, S.: Prostaglandin E2 acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum. *J Neurosci.*, 27: 12900-12907, 2007.
- 6) 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.
- 7) Sugimoto, Y., Narumiya, S.: Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.*, 282: 11613-11617, 2007.
- 8) Yamaguchi, T., Kubota, T., Watanabe, S., Yamamoto, T.: Activation of brain prostanoid EP3 receptors via arachidonic acid cascade during behavioral suppression induced by Delta8-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem.*, 88: 148-54, 2004.
- F. 健康危険情報**
なし
- G. 研究発表**
- 1. 論文発表**
1. Nawata, Y., Kitaichi, K., Yamamoto, T.: Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock. *Pharmacol Biochem Behav.*, 101: 297-302, 2012.
2. 山本経之, 縄田陽子.: 16. 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, pp264-280, シナジー, 東京, 2011.
3. 縄田陽子, 北市清幸, 山本経之.: footshockにより誘発される覚せい剤メタンフェタミン探索行動における副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) の促進的関与. *日本神経精神薬理学雑誌* 31: 73-5, 2011
4. 山口 拓, 濱館直史, 菅原 絢, 富樫廣子, 山本経之, 吉岡充弘.: 一過性脳虚血による脳機能障害に対する人工酸素運搬体の改善効果. *日本神経精神薬理学雑誌*. 2012 *in press*
5. 縄田陽子, 山口拓, 山本経之.: 覚せい剤メタンフェタミン退薬時に認められる認知機能障害に対するカンナビノイド CB1 受容体拮抗薬ならびに COX 阻害薬による改善. *日本神経精神薬理学雑誌*. 2012 *in press*
- 2. 学会発表**
- 1) Yamaguchi, T., Hamadate, N., Sugawara, A., Togashi, H., Yamamoto, T., Yoshioka M.: Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates brain dysfunction after cerebral ischemia in rats. 2nd

Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (Seoul, September 24, 2011)

2) Nawata, Y., Yamaguchi T., Yamamoto, T.: Improvement of cognitive impairments on withdrawal after repeated methamphetamine by administration of a cannabinoid CB₁ receptor antagonist and a COX inhibitor. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (Seoul, September 24, 2011)

3) Nawata, Y., Kitaichi, K., Yamamoto, T.: Activation of the corticotropin-releasing factor (CRF) system in the amygdala is responsible for the reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 73rd Annual Meeting (Hollywood, USA, June 23, 2011)

4) 縄田陽子、北市清幸、山本経之: Activation of the corticotropin-releasing factor (CRF) system in the amygdala is responsible for the reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock stress. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (名古屋、2011年10月)

5) Nawata, Y. and Yamamoto, T.: The involvement of the cannabinoid CB₁ receptor in the reinstatement of MDMA-seeking behavior and cognitive impairment during withdrawal from MDMA (Ecstasy). 第32回内藤コンファレンス (北杜、2011年10月)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明者 山本経之 (出願人 九州大学/藤本製薬) 出願 EP20050809728 ; 特許公報 EP1815853 (2009-4-22 ; ヨーロッパ 15 ヶ国) : 「薬物依存症治療剤」

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：疋田貴俊

(財団法人大阪バイオサイエンス研究所 システムズ生物学部門)

[研究要旨]

本研究では、乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する大脳基底核において主要な神経回路である直接路と間接路に対する可逆的神経回路伝達阻止法を開発し、薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構を解析している。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。

A. 研究目的

大脳基底核は乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する重要な脳部位である^{2), 3)}。大脳基底核神経回路は、黒質網様部あるいは腹側被蓋野に行く直接路と、淡蒼球を介する間接路に投射先の違いによって大きく二分されているにもかかわらず、直接路と間接路の情報処理やそれに関与する分子の違いについては、未解明のままであった。研究分担者は昨年度までに大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発した²⁾。本方法を用い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、乱用薬物による急性誘発行動には直接路と間接路の両方が必要な事、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²⁾。さらに報酬関連学習と忌避学習で直接路と間接路の役割の違いを見だし、大脳基底核神経回路の制御機構が乱用薬物による依存形成や精神障害の病態解明に重要であることを示した²⁾。しかしながら、直接路と間接路が乱用薬物誘発行動に関与する分子機構は未解明であった。そこで、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することで、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した。

B. 研究方法

1. 実験動物と行動解析

全ての動物実験は財団法人大阪バイオサイエンス研究所の動物実験に関する指針に従った。TN トランスジェニックマウス⁷⁾とその同胞野生型マウス(wt)を用いた。サブスタンス P 遺伝子 β -preprotachykinin A(PPTA)あるいはエンケファリン遺伝子 preproenkephalin A(PPE)の上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA)を持つアデノ随伴ウイルス(AAV)を既発表論文に従い定位的にマウス側坐核に投与を行った²⁾。コカインは 10 mg/kg 腹腔内投与し、行動量測定は既発表論文に従った²⁾。

2. 黒質網様部の分離

コカインあるいは生理食塩水の腹腔内投与 1 時間後にすばやく脳を取り出し OCT コンパウンド内で急速凍結した。キシレンに漬けた黒質を含む 40 μ m 冠状切片に対して、エッペンドルフ社の Micro Dissector PPMD システムを用いて、黒質網様部を切り出し分離した。

3. マイクロアレイ解析

分離した黒質網様部からキアゲン社の RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、Affymetrix マイクロアレイ解析を行った。シグナルは Microarray Suite 5.0 (Affymetrix)、GeneSpring GX 11.0 (Agilent Technology)、Ingenuity Pathway Analysis 6.0 (Ingenuity Systems)にて解析した。

4. 定量 RT-PCR

SuperScript First-Strand Synthesis System (Affymetrix)を用いて T7-oligo(dT) primer による逆転写を行った後、MEGAscript High Yield Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて増幅、cDNA 合成を行った。ephrinA5, EphA4, EphA5 mRNA の 3' 領域に対する primer を用いて、

定量 PCR を行った。 β アクチン mRNA の定量値で内部補正を行った。

5. 免疫組織化学

20 μ m の凍結冠状脳切片に対して報告論文に従って行った⁵⁾。一次抗体として ephrinA5 (Abcam), EphA4, EphA5 (Abcam あるいは Santa Cruz), pErk1/2 (Santa Cruz), gephyrin (Synaptic Systems), GFAP (Sigma Aldrich)抗体を、二次抗体として Alexa488- or Alexa594-conjugated goat IgG (Molecular Probes)を用いた。

6. イムノアドヘジンをを用いた解析

ephrinA5, EphA4, EphA5 の結合部位をヒト IgG の Fc 領域に融合させたイムノアドヘジン (R&D Systems)を蛍光ミクロスフェア (Lumafuor)に報告論文に従って付着させた⁶⁾。イムノアドヘジンは野生型マウスの稜側黒質網様部に定位的に投与した。イムノアドヘジン投与 4 日後より、4 日間のコカイン誘発行動量を測定した。行動解析後、イムノアドヘジンの投与位置をミクロスフェアの蛍光観察によって確認した。

C. 研究結果

1. コカイン投与時の黒質網様部における大脳基底核神経回路特異的な遺伝子発現の変化

直接路の中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路の中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk)がそれぞれ特異的に発現する³⁾。SP 遺伝子あるいは Enk 遺伝子の上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA)を導入した遺伝子組み換え AAV を、tetracycline-responsive element (TRE) の下流に CMV をプロモーターとして GFP と破傷風菌毒素 tetanus neurotoxin (TN)の融合タンパクを発現させる遺伝子を持つ TN トランスジェニックマウス⁷⁾の側坐核に打ち込むことによって、直接路神経細胞あるいは間接路神経細胞に特異的にかつ可逆

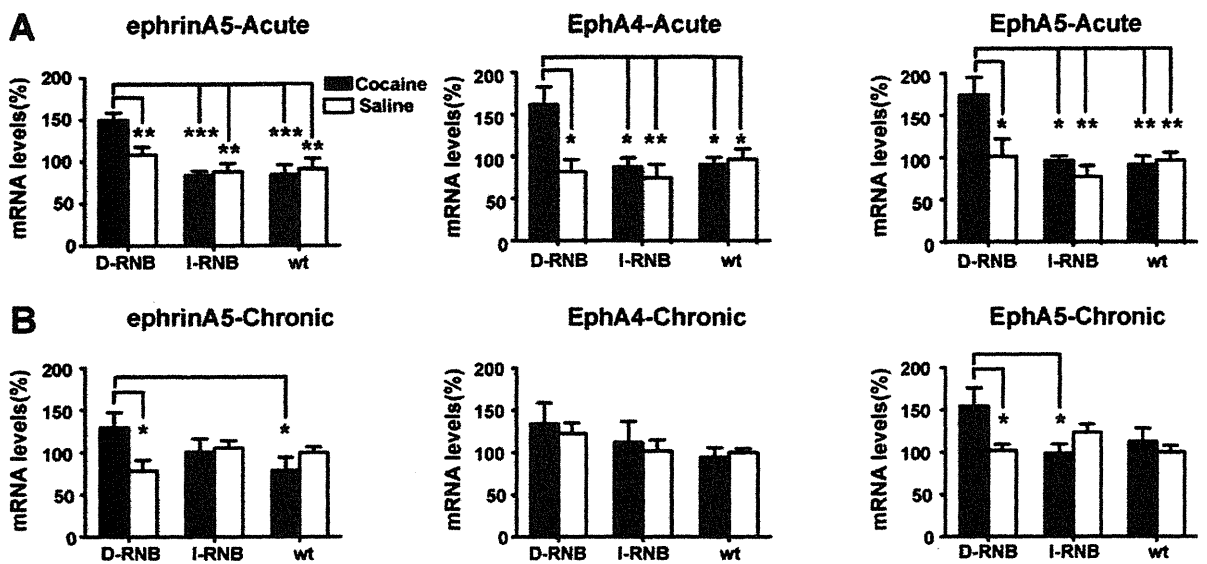


図 1. (A) 10mg/kg のコカインを投与 1 時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。D-RNB と I-RNB は直接路遮断と間接路遮断マウス群 (各 6 匹)、wt は野生型マウス群 (12 匹) の平均値と標準誤差を示す。(B) 10mg/kg のコカインを 5 日間連日投与し、5 日目のコカイン投与 1 時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。各 6 匹の平均と標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

的に破傷風菌毒素を発現させた²⁾。破傷風菌毒素 TN はシナプス小胞関連蛋白質である VAMP2 を切断し、シナプス小胞を介した神経伝達を遮断する⁷⁾。AAV を両側側坐核に投与 2 週後のマウスに 10mg/kg のコカインあるいは生理食塩水を投与し、直後から 10 分間の行動量を測定すると、既発表論文の通り、直接路遮断(D-RNB)によっても間接路遮断(I-RNB)によってもコカインによる急性行動量賦活作用は消失した²⁾。D-RNB, I-RNB, 野生型マウスに対してコカインあるいは生理食塩水を腹腔内投与 1 時間後に黒質網様部を分離した。分離した黒質網様部から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った⁴⁾。D-RNB あるいは I-RNB に特異的にコカイン投与群で生理食塩水投与群に対して 1.4 倍以上の遺伝子発現量の変化がみられるものに対して、定量 RT-PCR によって再現性を確認したところ、ephrinA5, EphA4, EphA5 の 3 遺伝子の mRNA 発現がコカインを投与した D-RNB でのみ上昇していた (図 1A)。これらの遺伝子発

現上昇は生理食塩水を投与した RNB では見られなかったため、直接路遮断かつコカイン投与に特異的な現象であった。コカインの慢性投与に対する行動は直接路遮断と間接路遮断で異なるため、コカインを 5 日間連日投与した後の黒質網様部の ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量を定量 RT-PCR によって解析した (図 1B)。ephrinA5 と EphA5 の mRNA 量はコカイン投与した D-RNB で有意に上昇していた。EphA4 は D-RNB で多い傾向はあったものの有意差はなかった。これらの結果はコカイン急性および慢性投与によって、ephrin-Eph シグナル分子の発現上昇が直接路依存的に起きていることを示す。

2. 黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の局在観察

同定した ephrinA5, EphA4, EphA5 が黒質網様部に局在しているかを調べるために、それぞれに対する抗体と GABA 作動性神経細胞マーカー

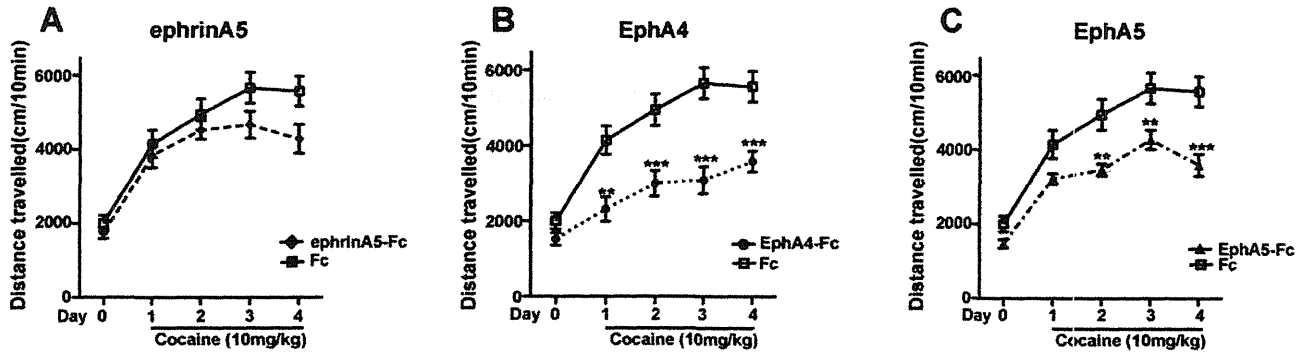


図 2. 黒質網様部の EphA4 と EphA5 によるコカイン誘発行動の抑制効果。野生型マウスの両側黒質網様部に ephrinA5-Fc (A), EphA4-Fc (B), EphA5-Fc (C) を付着させた蛍光マイクロスフェアを投与し、4 日目よりコカイン 10mg/kg 腹腔内投与後の行動量を測定した。それぞれ 6-14 匹の行動量の平均と標準誤差を示す。** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

Gephyrin あるいはアストロサイトのマーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗体との二重免疫染色を行った。Gephyrin 陽性 GABA 作動性神経細胞は ephrinA5, EphA4, EphA5 のすべてを発現していた⁴⁾。これらの 3 分子はほとんどの神経細胞に共発現していた⁴⁾。それに対して、GFAP 陽性アストロサイトは EphA4, EphA5 を発現するが、ephrinA5 を持っていなかった⁴⁾。

3. 乱用薬物誘発行動への ephrinA5, EphA4, EphA5 の影響

直接路遮断マウスで ephrinA5, EphA4, EphA5 の発現上昇が見られることから、これらの分子シグナル活性化によって、直接路遮断マウスと同様にコカイン誘発行動が抑制できるのではないかと調べた。この目的のために、ephrinA5, EphA4, EphA5 の細胞外結合部位とヒト IgG の Fc 領域を融合させたイムノアドヘジンをを用いた。イムノアドヘジンは二量化されており、結合相手の分子を活性化させる⁶⁾。イムノアドヘジンあるいはコントロールとしてのヒト IgG は蛍光マイクロスフェアに付着させ、野生型マウスの両側側坐核に投与した。投与 4 日後よりコカインを 10mg/kg 腹腔内投与し直後の行動量を測定した。コカインの連日投与は次第に行動量を増加させる感受性亢進を引き起

こす。EphA4-Fc と EphA5-Fc は、ヒト IgG を投与した対照群と比較して優位に行動感受性亢進を抑制した(図 2)⁴⁾。これらの結果はコカイン誘発行動において黒質網様部の EphA4 と EphA5 が重要な役割を担っていることを示す。

4. 直接路遮断マウス特異的なコカイン投与による黒質網様部神経細胞における ephrinA5 下流シグナルの活性化

EphA4 と EphA5 は共に ephrinA5 に結合し、ephrinA5 の下流シグナルとして MAP キナーゼ (Erk1 と Erk2) のリン酸化を引き起こす¹⁾。そこで D-RNB マウスの黒質網様部の ephrinA5 陽性細胞において Erk1/2 のリン酸化がコカイン投与によって増強されているかを調べるために、黒質網様部スライス標本に対して ephrinA5 抗体とリン酸化 Erk1/2 抗体の二重免疫染色を行った(図 3A-I)⁴⁾。ephrinA5 陽性細胞におけるリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合を計測したところ、コカインを単回投与した D-RNB マウスで黒質網様部におけるリン酸化 1/2 陽性細胞の割合が増加していた(図 3J)。同様に、コカインを連日投与した D-RNB マウスの黒質網様部においてもリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合が増加した(図 3K)。このリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合は生理食塩水投与によっては変

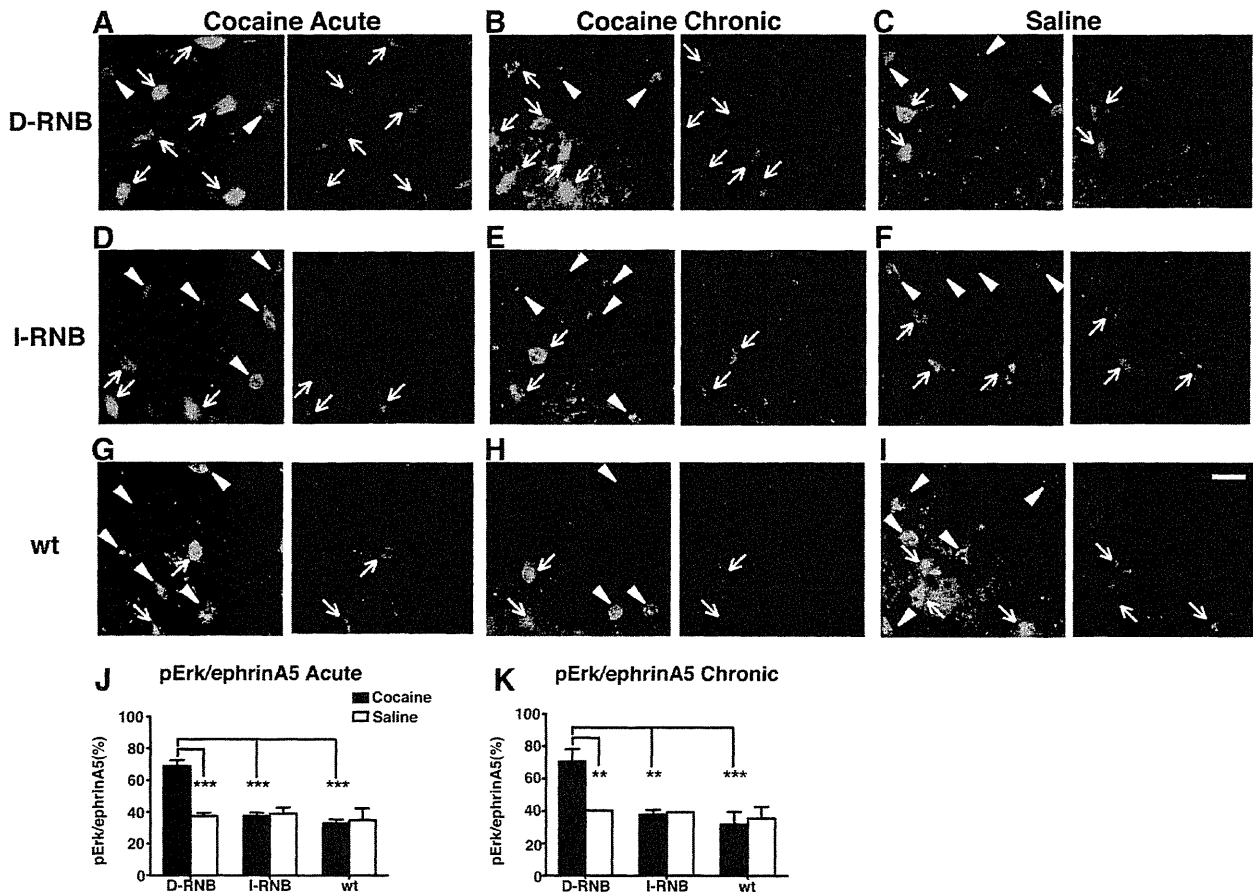


図 3. D-RNB マウス特異的な黒質網様部 ephrinA5 陽性神経細胞における Erk1/2 の活性化。コカイン単回投与群(A, D, G)と生理食塩水投与群(C, F, I)は D-RNB, I-RNB, WT マウスに腹腔内投与し、6 時間後に黒質網様部を分離した。コカイン連日投与群(B, E, H)では 10mg/kg のコカインを 5 日間腹腔内投与し、最終コカイン投与後 1 時間で黒質網様部を分離した。A-I は黒質網様部を ephrinA5 (それぞれの左のパネル)と pErk1/2(それぞれの右のパネル)の抗体で二重免疫染色像を示す。矢印は ephrineA5 と pErk1/2 の二重陽性細胞を、矢頭は pErk1/2 陰性である ephrinA5 陽性細胞を示す。スケールバー、50 μ m。J と K は ephrinA5 陽性細胞の内、pErk1/2 陽性である細胞の割合を示す(各 n=4)。**p<0.01; ***p<0.001。

化を示さなかった (図 3J, K)。これは D-RNB マウスでのみ、コカイン投与による ephrinA5-EphA4/A5 の発現上昇が見られており (図 1)、またコカイン誘発行動が抑制される²⁾ こととよく相関しており、黒質網様部での ephrinA5 の下流シグナルである Erk1/2 のリン酸化がコカイン誘発行動に重要であることを示す。

D. 考察

乱用薬物による急性反応には直接路と間接路

の両方が関与しているのに対し、コカイン連日投与による依存形成においては直接路が必須である²⁾。今回、直接路と間接路が統合される黒質網様部において、直接路依存的にコカイン投与により発現上昇する ephrinA5-EphA4/A5 分子群を同定した⁴⁾。これらの分子が発現上昇する機構は未解明である。さらに分子変化や Erk1/2 リン酸化シグナルが黒質網様部の神経細胞にどのような変化を起こしているかが不明なままである。今後さらに、神経回路を基盤とした分子機構の解明をすす

めることによって薬物依存症の病態解明と治療法開発へつながることが期待できる。

E. 結論

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、免疫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が必要である。

[参考文献]

- 1) Davy, A., Robbins, S.M.: Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J.*, 19: 5396-5405, 2000.
- 2) Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., et al.: Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66: 896-907, 2010.
- 3) Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289: 633-637, 2000.
- 4) Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., et al.:

Pathway-specific enlargement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108: 9981-9986, 2011.

- 5) Schneider Gasser, E.M., Straub, C.J., Panzanelli, P., et al.: Immunofluorescence in brain sections: simultaneous detection of presynaptic and postsynaptic proteins in identified neurons. *Nat. Protoc.*, 1: 1887-1897, 2006.
- 6) Riddle D.R., Katz, L.C., Lo, D.C.: Focal delivery of neurotrophins into the central nervous system using fluorescent latex microspheres. *Biotechniques*, 23: 928-934, 936-937, 1997.
- 7) Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., et al.: Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *J. Neurosci.*, 23: 6759-6767, 2003.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T. and Nakanishi, S.: Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108: 9981-9986 (2011)
2. 疋田貴俊：精神疾患の分子遺伝学：最近の知見。脳神経外科速報, 21: 1250-1254 (2011)

2. 学会発表

1. Jaaro-Peled, H., Tankou, S., Murai, R., Niwa, M., Foss, C.A., Hikida, T., Gallagher, M., Gullarte, T.R., Nabeshima, T., Pomper, M.G., Sawa, A.:

- Dopaminergic abnormalities in DISC1 mouse models. The 13th International Congress on Schizophrenia Research, Colorad Springs, CO, 2011年4月
2. 中西重忠、疋田貴俊：神経機能の分子メカニズム：報酬と薬物依存. 第28回日本医学会総会、東京（誌上開催）2011年4月
 3. 疋田貴俊：報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 平成23年度生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子細胞基盤」、岡崎、2011年6月
 4. 疋田貴俊：報酬・忌避行動の大脳基底核神経回路機構. 平成23年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ JST セッション、神戸、2011年8月
 5. 疋田貴俊、木村健介、矢和多智、山口隆司、中西重忠：黒質網様部における大脳基底核神経回路特異的な情報処理機構の解析. 平成23年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、神戸、2011年8月
 6. 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-based and aversive learning. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月
 7. 疋田貴俊：薬物依存と意思決定における大脳基底核神経回路の制御機構. 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、名古屋、2011年10月
 8. 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. The 32nd NAITO CONFERENCE on biological basis of mental functions and disorders, 山梨、2011年10月
 9. Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T. and Nakanishi, S.: ephrin-Eph signaling in cocaine-induced responses. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
 10. 疋田貴俊：可逆的神経伝達阻止法を用いた大脳基底核神経回路機構の解析. 基礎生物学研究所セミナー、岡崎、2012年1月
 11. 疋田貴俊：運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路機構の解明に向けて. 合同シンポジウム「高次生命制御研究のニューフロンティア」、京都、2012年1月

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

依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発

分担研究者：西川 徹¹

研究協力者：石渡小百合¹、海野麻未¹、海野真一¹、嶋津 奈¹、山本直樹¹、車地暁生¹、金野柳一²

(¹東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野、国際医療福祉大学薬学部ゲノム・分子生物学²)

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受容体機能を抑制する亜鉛イオンを内側前頭葉皮質に局所灌流すると同部位の細胞外液中D-セリン濃度が低下した。D-セリン合成能をもつセリンラセマーゼ遺伝子欠損マウスでは、内側前頭葉皮質において細胞外D-セリン濃度が有意に低下した。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であり、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で細胞外D-セリン濃度が上昇することや、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検出されたdsm-1遺伝子 (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter 1) が脳内でD-セリンと類似した発現分布を示すこと等を考慮すると、以上の所見は、細胞外D-セリン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。

A. 研究目的

本研究は、精神異常発現作用および依存性をもつ、覚醒剤 (amphetamine、methamphetamine (MAP) 等)、コカイン、フェンサイクリジン (phencyclidine: PCP) 等による脳機能障害の分子病態を解明し、新しい治療法・予防法開発の標的となる神経機構や、臨床診断、経過、予後などのマーカー物質を見いだすことを目的としている。このため、私たちはNMDA (N-methyl-D-aspartate) 型グルタミン酸受容体グリシン調節部位の、脳における内在性リガンドであるD-セリンが、以上の依存性薬物の作用に影響する点に注目した。すなわち、D-セリンおよび他のグリシン調節部位の作動薬は、PCP

またはMAPが動物に引き起こす異常行動を抑制し(文献3), 12), 14), 15)および未発表データ)、ヒトでは統合失調症症状を改善する^{6, 12)}、また、コカインがconditioned place preferenceを誘発する作用を減弱し^{9, 16)}、コカインによる行動感作の形成に影響する¹⁾。さらに、D-セリンの分解活性をもつD-アミノ酸酸化酵素の活性化因子をコードする遺伝子と覚せい剤精神病患者の相関が見られる¹⁰⁾。したがって、内在性D-セリンの代謝および機能の分子機構を明らかにすることにより、薬物乱用または統合失調症における精神病態の病態や治療法の手がかりが得られると考えられる。

そこで、本研究では、D-セリンが NMDA 受容体のコアゴニストとして作用することから、特にその細胞外液中濃度調節機構に注目した。これまでに、細胞外液中D-セリンが、神経伝達物質とは著しく異なる制御を受けており⁴⁾、ニューロンとグリア細胞の双方の活動性変化に影響されること⁷⁾を明らかにしてきた。今年度は、主にD-セリン合成酵素のセリンラセマーゼ欠損や、NMDA 受容体の重要な調節因子の一つで薬物依存への関与も指摘されている亜鉛イオンの効果を検討した。

B. 研究方法

1. 動物および試薬

動物実験は、東京医科歯科大学のガイドラインを遵守し実験動物委員会の承認を得て行った。実験には、8週令のオスのwistarのラット(clea Japan, Japan)、およびserine racemaseの遺伝子操作を行った8-12週オスのC57BL/6J系マウスを使用した。動物は、8時から20時を明期とする明暗サイクルと、 24.0 ± 0.5 hに調節され、餌、水とも自由に摂取できる条件下で飼育された。また、すべての試薬は市販の特級品を使用した。

2. マイクロダイアリシス

内側前頭葉の細胞外液中のD-セリンおよび他のアミノ酸は、既報^{4,7)}に従ってマイクロダイアリシス法により測定した。すなわち、ペントバルビタール(40mg/kg、腹腔内注射(i.p.))麻酔下で、ステレオタキシーを使い、直管型透析プローブ(エイコム社製)、透析膜部位の長さが3mm(ラット)または2mm(マウス)のものを内側前頭葉皮質に埋め込んだ。薬物投与実験は、手術2日後に遂行した。動物を飼育ケージから実験用ケージに移し、プローブ内へのRinger液(NaCl, 147mM; KCl 4mM; CaCl₂, 1.3mM; pH 7.3)の持続的灌流を開始した(流速2 μ l/min)。脳内の細胞外液中の低分子を含む灌流液は、マイクロフラクショ

ンコレクターにより0.8mlバイアル内へ蓄積して20分毎に回収し、 -80°C で保存した。

亜鉛イオンの影響を検討する実験では、40分間基底値測定のためのサンプルを採取した後、Ringer液中に溶解した塩化亜鉛(100、200、500 μ M:各濃度に応じて灌流液内の塩素イオン濃度が変化しないように調整した)を、透析プローブを通じて内側前頭葉皮質内に20-60分の40分間灌流した。対照群の動物には、Ringer液のみ(vehicle)の灌流を続けた。

3. アミノ酸分析

各サンプル中の遊離型アミノ酸は、既報^{3,7)}に従い、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)によって測定した。凍結保存しておいたサンプルは、測定時に融解し、キラルアミノ酸の分離のため、Bos-L-Cysを加えて誘導体化した後、さらに蛍光測定用誘導体化のためOPAを添加した。前処理が終わったサンプル中のアミノ酸を、逆相カラム(Nova-PakC18(300 \times 3.9mm,i.d,Waters, Japan))で分離した後、蛍光検出器(821-FPS spectrofluorometer (Jasco international CO. Ltd, Japan))により、励起光波長344nm、検出波長433nmで定量した^{4,7,12)}。

4. データ解析

各アミノ酸の各時間における濃度は、基底値測定40分間の3サンプル中の各アミノ酸濃度の平均値を100%とした相対値としてパーセント表示した。これらの値の統計的解析には、Matthewsらのsummary measure法¹¹⁾を用いた。すなわち、各固体について、薬物投与開始以降の経時変化曲線の下側の面積AUC(area under the curve)を算出して統計量とした。また、各測定時点の各アミノ酸濃度についても比較した。平均値の差は、Student's t-testまたはCochran-Cox t-testにより検定し、3群以上の比較では、Bonferroni法による補正を行った。

C. 研究結果

1. 亜鉛イオン灌流による内側前頭葉皮質細胞外アミノ酸濃度の変化

塩化亜鉛の灌流により、細胞外 D-セリンは濃度依存的で、最大基底値の 50%程度に減少した。減少傾向は灌流開始後、直ちに生ずるのではなく、灌流終了後 60 分頃より見られ特徴があった (図 1)。これに対して、細胞外の L-セリン (160 分頃より)、および L-グルタミン酸 (80 分頃より) は有意に上昇した。タウリン、グリシン、L-アラニンも上昇した (500 μ M のみ検討)。一方、vehicle を還流した対照群では細胞外 D-セリン濃度にほとんど変化は見られなかった。

いずれの亜鉛イオン濃度においても、明らかな行動変化は認めなかった。

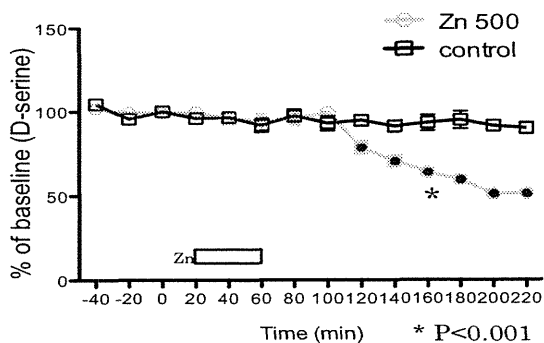


図1. 内側前頭葉皮質における亜鉛イオンの細胞外 D-セリン濃度への影響: データは亜鉛イオン 500 μ M の効果 (黄色線) のみ示す。

2. Serine racemase ノックアウトマウスにおける内側前頭葉皮質細胞外アミノ酸濃度の変化

Serine racemase ノックアウトマウスの実験では、ホモ欠失マウスと同腹のワイルドタイプマウスの結果を比較した。ホモマウスの内側前頭葉皮質における細胞外 D-セリン濃度は、ワイルドタイプマウスのおよそ 40%まで低下していた (図 2)。同部位のグリシンおよび L-セリンの細胞外液中

濃度には有意な変化は認められなかった。

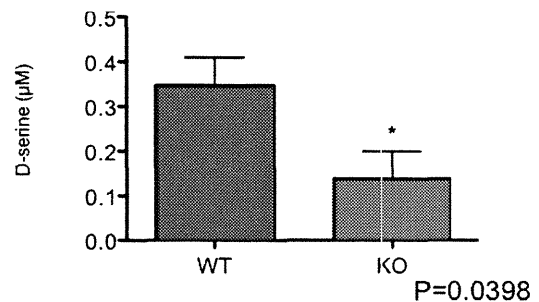


図2. Serine racemase ノックアウトマウス内側前頭葉皮質における細胞外 D-セリン濃度: ノックアウトマウス (KO) と同腹の野生型 (WT) を比較。

D. 考察

本実験から、内側前頭葉皮質の細胞外液中 D-セリン濃度が亜鉛イオンにより低下することが初めて明らかになった。亜鉛イオンの灌流後、L-セリン、L-グルタミン、L-セリン、タウリン、グリシン、L-アラニン等の濃度は上昇した点から、非特異的な現象に基づく変化ではないと考えられる。

亜鉛イオンが細胞外 D-セリンレベルを抑制するメカニズムは、現在検討中であるが、NMDA 受容体に対する亜鉛イオンの作用に関係する可能性がある。これまでに、亜鉛イオンがグリア細胞に発現するグルタミン酸トランスポーター-GLT-1 を阻害するという報告があること¹⁷⁾や、本研究グループの別の実験で、AMPA 型グルタミン酸受容体刺激で細胞外 D-セリンが低下する結果が得られていること (未発表データ) から、亜鉛イオンのグルタミン酸トランスポーター阻害により、シナプスのグルタミン酸濃度が上昇し、AMPA 受容体を介した D-セリン放出の低下が生ずるとも考えられる。実際に、本実験では細胞外グルタミン酸濃度の増加が見られた。この増加が D-セリンのシグナルを減弱し、NMDA 受容体の過剰な刺激を回避するフィードバック系としての役割を果た