

201235008A-B

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・診断及び治療法についての研究

## 平成 24 年度 総括研究報告書

## 平成 22 - 24 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

Annual Report

Research on Pharmaceutical and Medical Safety

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

Japan in 2010-2012

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 25 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・診断及び治療法についての研究

## 平成 24 年度 総括研究報告書

### 平成 22-24 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

Annual Report  
Research on Pharmaceutical and Medical Safety  
Supported by Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare  
Japan in 2010-2012  
(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 25 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

発刊にあたって

研究代表者 鍋島俊隆

厚生労働省発薬食第 0613 第 75 号をもって交付決定の通知をうけた平成 24 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、および平成 22 年度から 3 年間の研究をまとめた総合研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 25 年 3 月吉日

## 目次

1. 平成 24 年度総括研究報告	1
2. 平成 24 年度分担研究報告	13
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抗精神病薬およびエピジェネティクス制御による治療効果	15
(名城大学薬学部 鍋島俊隆)	
(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)	
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	32
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)	
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	40
(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	50
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)	
乱用薬物依存における大脳基底核神経回路制御の分子機構	60
(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)	
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	67
～コレシトキエン受容体拮抗薬による覚せい剤依存症の治療の可能性～	
(名城大学薬学部 間宮隆吉)	
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 の確立に関する研究	86
(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)	
(研究協力者：千葉大学大学院医学研究院 関根吉統、大宮宗一郎)	
依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発	96
-メタンフェタミンによる感受性亢進と dual specificity phosphatase 1 (Dusp1)遺伝子-	
(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)	
薬物依存の再発防止に関する研究	105
(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. 平成 22～24 年度 3 年のまとめ総合研究報告	117
4. 平成 22～24 年度 3 年のまとめ 研究分担者総合研究報告	129
乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法についての研究	131
(名城大学薬学部 鍋島俊隆)	
(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)	
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	166
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)	

マタンフェタミンおよびモルヒネの精神依存形成に関与する脳内エピジェネティック制御機構に関する研究	181
ー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ー	
(星薬科大学薬品毒性学教室 鈴木 勉)	
薬物依存治療薬の開発および関連遺伝子に関する研究	200
ー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ー	
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)	
覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割	219
(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)	
薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究	233
ーコレシストキニン受容体拮抗薬による覚せい剤依存症の治療の可能性ー	
(名城大学薬学部 間宮隆吉)	
覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序	242
(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)	
覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究	255
ー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 の開発および確立に関する研究ー	
(千葉大学大学院医学研究院精神医学 伊豫雅臣)	
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	278
(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)	
薬物依存の再発防止に関する研究	299
(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)	
5. 平成 22～24 年度刊行物一覧及び関連論文別刷	329
6. 研究代表者・研究分担者一覧	659

## 平成 24 年度総括研究報告

平成 24 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・診断及び治療法についての研究」

研究代表者 鍋島俊隆

総括研究報告

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診断法を確立するとともに、発症の機序を解明し、それらを用いて予防・治療薬を開発することであり、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 24 年度の研究の目的は、これまでの 2 年間に行ってきた乱用薬物の依存および精神行動障害の分子機序の解明およびそれに基づいた予防・治療および診断法に関する研究をさらに発展させ、基礎研究と臨床研究のクロストークによる臨床応用を目指すことである。すなわち乱用薬物の依存および精神行動障害動物モデルを用いて候補薬物のスクリーニングをさらに進めるとともに、有力な治療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評価した。一方で、臨床知見で報告されている病態について動物モデルを用いて再現し、薬物に対する依存や精神毒性の発生機序や精神病の発症脆弱性を分子生物学的なレベルでさらに解明する。本研究では、基礎研究は鍋島俊隆が責任者となり、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、平成 24 年度においても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

1. 乱用薬物による薬物依存の発症機構・予防・診断および治療法についての研究  
(名城大学薬学部 鍋島俊隆)  
(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)
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  
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)
3. マンフェタミンおよびモルヒネの精神依存形成に関与する脳内エピジェネティック制御機構に関する研究  
(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)
4. 薬物依存治療薬の開発および関連遺伝子に関する研究  
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)
5. 覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割  
(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)
6. 薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究  
(名城大学薬学部 間宮隆吉)

## (II) 臨床研究

### 1. 覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

(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)

### 2. 覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究

(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)

### 3. 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

(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)

### 4. 薬物依存の再発防止に関する研究

(東京都精神医学総合研究所 分子精神医学研究部門 池田和隆)

---

## 平成 24 年度における各グループの研究概要

### (I) 基礎研究

乱用薬の精神毒性や抗精神病薬の作用に大脳基底核直接路やエピジェネティクス制御が関連していることを明らかとし、治療薬としてエピジェネティクス修飾に作用するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、また、覚せい剤の精神毒性にはコレシストキニン 2 受容体拮抗薬や、Shati/nat8l システムを活性化する薬物が有効であることを明らかとした。覚せい剤の精神依存形成や渴望に脳内カンナビノイドシステムの活性化が関与しており、エンドカンナビノイド、2-Arachidonoylglycerol の分解阻害剤 JZL184 は、cue による渴望を抑制すること、 $\Delta^9$ -THC は胎児の発育異常、催奇形性、育児異常を惹起することを明らかとした。

### (II) 臨床研究

メフェドロンは覚せい剤類似の神経毒性を示すこと、覚せい剤の精神毒性に dual specificity phosphatase 1 が関連していることを明らかとした。物質関連障害になりやすさを検出する方法 Substance Use Risk Profile Scale の日本語版を作成し、妥当性と信頼性を検証し、物質関連障害を予防する上で有用であることを確認した。物質依存者の重症度には CREB1 遺伝子の近傍の SNP が関連しており、今までに開発した薬物再使用リスク評価尺度を持ちいることで、再発防止や治療薬の評価が可能になった。



1. 乱用薬物による薬物依存の発症機構・予防・診断および治療法についての研究

(名城大学薬学部 鍋島俊隆)

(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)

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る。このような精神障害に対する病態解明および治療薬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依存や精神障害の発症やその病態には、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が深く関与していると考えられている。昨年度は、発達期におけるエピジェネティクス制御および $\gamma$ -aminobutyric acid (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ことを明らかにした。本年度は、依存性薬物による行動障害およびそれに対する抗精神病薬の緩解効果におけるエピジェネティクス変化の関与について、PCP 連続投与マウスにおけるエピジェネティクス異常およびそれに対する抗精神病薬の作用について検討を行った。さらに、エピジェネティクス修飾に作用するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が治療薬としての有用性が、PCP 連続投与マウスを用いて評価を行った。PCP 連続投与により惹起される行動障害は核内でのリン酸化 CaMKII の減少およびヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) の核内局在の増加により、ヒストンのアセチル化 (AcH3K9) が低下し、GABA 作動性神経系関連遺伝子が発現低下することによっていた。抗精神病薬であるクロザピンはドパミン D1 受容体を介して PCP 連続投与により惹起されるこれら異常を緩解することで作用を示すことが示唆された。HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウムも PCP 連続投与により惹起されるこれら異常を緩解した。これら知見から、抗精神病薬およびエピジェネティクス制御は PCP により誘発される行動障害に対して治療効果を示すことが示唆された。

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

(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)

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についてエンドカンナビノイド、2-Arachidonoylglycerol (2-AG) に焦点を当てて検討した。さらに、生殖機能に及ぼす大麻活性成分 $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) の反復投与による作用についても検討した。

依存性薬物への渴望の評価は、ラットを用いたMAP (0.02 mg/0.1 mL) 自己投与実験法によって実施した。MAP摂取行動を獲得後、MAPをsalineに切り替え自己投与実験を続けた (消去過程；MAP退薬)。レバー押し行動の低下時に、cue呈示、MAP-priming投与あるいはfootshock負荷によって、ラットのレバー押し行動は増加した (MAP探索行動)。cue呈示およびfootshock負荷によつ

て誘発されるMAP探索行動は、MAP退薬時における2-AG分解酵素（Monoacylglycerol lipase; MAGL）阻害薬JZL184のcue呈示前の単回投与（1時間前処置；40 mg/kg, i.p.）によって抑制された。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。一方、マウスを用いた新奇物体探索試験によって、JZL184の認知機能に及ぼす影響を検討した。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増加した。JZL184のpre試行前での単回投与（40 mg/kg, i.p.）では、新奇物体へのアプローチ時間は増加し、対照群と差がなかった。

また、大麻活性成分 $\Delta^9$ -THC (3.2 mg/kg, s.c.)の30日間反復投与によるマウスの生殖機能に及ぼす影響を検討した。その結果、雌雄共に $\Delta^9$ -THCを反復投与された群では、妊娠は正常に認められたが、死産、奇形、産後の育仔異常が一部認められた。

以上の結果から、cue呈示およびストレス負荷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、少なくとも2-AGの増加によって抑制されることが明らかとなった。また、 $\Delta^9$ -THCの反復投与により、胎仔の発育障害や催奇形性ならびに育仔異常を誘発する可能性が示唆された。

### 3. マンフェタミンおよびモルヒネの精神依存形成に関与する脳内エピジェネティック制御機構に関する研究

(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)

覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドーパミン神経系の長期的な可塑的変化が誘導されることが知られている。現在までに、神経可塑的変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。一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 C-C chemokine receptor type 2 (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 の依存症に関与することを報告した。CCR2 は 7 回膜貫通三量体 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 の依存症に免疫応答が関与する可能性が考えられる。また、昨年度の報告において、lipopolysaccharides (LPS) で免疫系を活性化することにより METH 誘発報酬効果が有意に抑制される事を報告した。そこで本年度は免疫系による METH 誘発精神依存形成抑制機序について検討した。まず METH 誘発自発運動促進作用ならびに逆耐性形成への LPS の影響について tilting cage 法を用いて検討したところ、METH 誘発自発運動促進作用ならびに逆耐性形成は LPS の前処置により有意に抑制された。そこでマウスより採取した脾臓細胞を培養し、LPS を 1 時間曝露した後、その培養上清を脳室内投与したところ、METH 誘発自発運動促進作用が有意に抑制されたのに対して、同上清の静脈内投与では METH 誘発自発運動促進作用に変化は認められなかった。したがって、LPS による作用は免疫反応を介し中枢神経に影響を及ぼしている可能性が示唆された。現在までに免疫細胞上に cannabinoid receptor 2 (CB2R) が存在することや、cocaine の依存に関与することが報告されていることから、これらの変化に CB2R が関与する可能性が考えられる。そこで LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用における CB2R の関与につ

いて検討したところ、LPS を前処置することにより抑制される METH 誘発報酬効果は、CB2R 拮抗薬である AM630 を前処置することにより有意に阻害されたことから、LPS 処置により内因性 cannabinoid の関与が推定される。そこで、CB1R の関与についても同様に検討したところ、CB1R 拮抗薬である AM251 の前処置においても LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用の有意な阻害が認められた。次に CB1R および CB2R を介する細胞内情報伝達系の変化について検討を行ったところ、LPS を処置した動物の脳内において内因性マトリックスメタロプロテアーゼ阻害因子である、tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) mRNA の有意な増加が認められた。以上本研究の結果より、LPS による免疫系の活性化が CBRs-TIMP1 を介し、METH による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。

#### 4. 薬物依存治療薬の開発および関連遺伝子に関する研究

(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)

乱用薬物による薬物依存形成メカニズムには、多種多様な分子が関与しており、その詳細は未だ不明のままである。本プロジェクトでは、薬物依存に関連する新規分子を探索および同定するとともに、その機能を解明することによって、薬物依存の新たな治療薬の創生につなげることを目標としている。これまでに、我々は、shati/nat8l、transmembrane protein 168 (Tmem168) および piccolo の3つの新規分子が薬物依存形成に関与していることを明らかにしてきた。

昨年度までに、Shati/nat8l を側坐核で過剰発現させたマウスでは、覚せい剤メタンフェタミン誘発運動過多および場所嗜好性が抑制されることを報告した。また、最近、shati/nat8l は *N*-acetylaspartate (NAA) の生合成酵素であること、さらに、合成された NAA は代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 3 の選択的アゴニストの *N*-acetyl aspartylglutamate (NAAG) へ生合成されることも分かってきている。そこで、今年度は、メタンフェタミン応答性に対する shati/nat8l の抑制メカニズムを解明するために、側坐核で shati/nat8l を過剰発現させたマウスにおける神経機能変化を検討した。HPLC 法を用いた NAA および NAAG 含量の測定では、shati/nat8l 過剰発現マウスの側坐核において両アミノ酸とも増加していた。shati/nat8l 過剰発現マウスでは側坐核でのドパミン基礎遊離量が減少し、メタンフェタミン投与時のドパミン遊離量の増加が抑制されていることを *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いた実験で明らかにした。また、この shati/nat8l 過剰発現マウスでのメタンフェタミンによる側坐核でのドパミン遊離増加への抑制効果は、mGluR2/3 アンタゴニストである LY341495 の前投与によって阻害された。これらのことから、側坐核における shati/nat8l は NAA を生合成し、続いて産生された NAAG の mGluR3 への作用を介して、ドパミン遊離量を減少させることによって、メタンフェタミン応答性に抑制的に働くと考えられる。これらの結果から、shati/nat8l 関連システムは覚せい剤依存の新たな治療標的となる可能性が考えられる。

我々が見出した3つの分子は、上述の shati/nat8l のように、いずれも薬物依存に対して重要な役割を果たしている可能性があることから、今後、これらの発現を調節する化合物を見出し、治療薬の創生につなげたいと考えている。

## 5. 覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割

(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)

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。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てきた。大脳基底核は両側の神経回路が傷害されてはじめて機能不全となる。そこで、片側の大脳基底核神経回路に可逆的神経伝達阻止法を導入して、直接路あるいは間接路を遮断し、さらに反対側に神経伝達物質受容体のアゴニストあるいはアンタゴニストを投与した後に、行動観察を行うことによって、乱用薬物依存および報酬関連行動・忌避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。その結果、乱用薬物依存および報酬関連行動には直接路 D1 ドーパミン受容体の活性化が、忌避行動には間接路 D2 受容体の不活性化が、それぞれ重要であることを示した。さらに忌避行動には間接路のシナプス可塑性に関与する神経伝達物質受容体(NMDA, A2a, CB1 各受容体)の関与が認められた。これらの結果から、乱用薬物依存および報酬関連行動・忌避行動において、直接路と間接路の情報伝達効率の可塑性によるスイッチングが、大脳基底核神経回路制御機構として働いていることが分かった。神経回路制御の分子機構のさらなる解析によって、乱用薬物による依存形成や精神障害の病態解明と治療法開発へつながることが期待できる。

## 6. 薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究

(名城大学薬学部 間宮隆吉)

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。

## 7. 覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

(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)

カチノン誘導体の一つであるメフェドロン(4-methylmethcathinone)は中枢刺激薬であるメタンフェタミン、MDMA と類似の構造を有し、中枢刺激薬に代わる依存性薬物として蔓延してきていることから麻薬の指定を受けた。カチノン誘導体はモノアミン輸送体を標的分子としていることが報告されている。メフェドロンは Dopamine Transporter (DAT) や Serotonin Transporter (SERT) への親和性を有することから、DAT, SERT の欠損マウスを用いて神経毒性を検討した。メフェドロンは SERT が欠損しても野生型マウスと同様に体温を低下させたが、DAT の欠損では体温を低下させなかった。さらにセロトニン 1A 受容体の阻害薬の前投与によりメフェドロンの体温低下作用は拮抗された。これらの結果はメフェドロンの体温低下作用は、DAT を介するドーパミン神経伝達およびセロトニン 1A 受容体を介したセロトニン神経伝達が重要な役割を果たしていると考えられた。メフェドロンは急性投与により移所運動量を増加させたが、反復投与では行動感作は形成せず、逆に移所運動量は耐性を示した。メフェドロンの神経細胞への毒性を、マウス胚性幹(ES)細胞から分化させたドーパミン神経細胞を用いて検討した。メフェドロンは MDMA と同様に濃度依存的に ES 細胞から分化させたドーパミン神経細胞に神経毒性を示した。これらの結果により、カチノン誘導体であるメフェドロンはメタンフェタミン、MDMA などの中枢刺激薬に近い神経毒性を有することが示唆された。

## 8. 覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究

(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)

違法性薬物の乱用や依存、あるいは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は、依然として大きな社会問題となっている。したがって、その治療と再発予防の方法論の確立とともに、物質使用の予防法を確立することは重要な課題である。物質使用には個人要因（パーソナリティなど）および環境要因（家族、友人など）が複雑に絡み合っているが、近年、物質使用とパーソナリティの関連が有力視されている。海外の研究によれば、物質乱用のリスクとなるパーソナリティに注目した心理尺度 Substance Use Risk Profile Scale (SURPS) が開発され、この心理尺度を用いた予防教育介入が有効であることが実証されている。そこで、昨年度は物質使用のリスクとなるパーソナリティを測定する尺度である日本語版 SURPS (SURPS-J) を開発し、その信頼性と妥当性の検証を行った。

今年度の研究では、先行研究を踏まえて、アルコール・薬物専門治療病院の入院患者 27 名に対して SURPS-J を施行し、物質使用関連障害罹患者の診断名別 SURPS-J の得点の比較、SURPS-J と同調傾向、問題解決スキルの関連について検証を行った。その結果、統計分析に基づく比較が可能であった薬物依存者、覚せい剤精神病症者、脱法ハーブによる中毒性精神障害者、ア

ルコール依存症者の SURPS-J の得点間に有意差はみられなかった。SURPS-J と同調傾向、問題解決スキルの関連については、不安感受性が高いと問題解決への自信が低下し、絶望感が高いと問題解決に伴う感情や行動をコントロールできるという自信が低下する傾向が窺えた。一方、刺激志向性と衝動性が高くとも、本研究で使用した問題解決尺度で測定される問題解決スキルに変化がないことが窺われた。また、SURPS-J および不安感受性の得点を高群と低群に分けた場合、高群が低群に比べて問題解決への自信が有意に低いことが窺われた。以上の結果を踏まえると、物質使用者への介入にあたっては、不安感受性と絶望感が高い群に注目する必要があると示唆された。

## 9. 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

(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)

依存性薬物メタアンフェタミン(MAP)による精神障害発症の分子基盤を明らかにする目的で、C57BL の成熟雄性マウスに MAP を反復投与して、移所運動量を指標とした感受性亢進を惹起させ、少量の MAP を断薬後に再投与し、運動量の感受性亢進を確認すると同時に、MAP の感受性亢進においても重要な役割を果たす可能性が指摘されている、海馬における遺伝子発現量の変化を調べた。この実験では、C57BL の成熟雄性マウスを用いて、1.0 mg/kg/day の MAP を10回反復皮下投与し、24ないし25日間断薬して、0.24 mg/kg の MAP を皮下投与した。マウスは、薬物投与後60分間、Supermex Instrument (Muromachi-kikai Co.Ltd)を用いて移所運動量を測定し、終了後直ちに海馬を取り出した。mRNA は、既報方法に準じて、定量的 RT-PCR 法で測定した。対照群には、生理食塩水(SAL)を投与し、遺伝子発現量の標準化には、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase を用いた。

MAP の反復投与群においては、少量の MAP の再投与時に、dual specificity phosphatase 1 (Dusp1)遺伝子の mRNA 量が、SAL チャレンジ群や、SAL 反復投与群に少量 MAP をチャレンジした群に比較し、有意に増加した。一方、SAL 反復投与群では、少量の MAP チャレンジ後に、SAL チャレンジに対する有意な変化はなく、その発現量は、いずれの値も、MAP 反復投与群に SAL を再投与したものと同等であった。すなわち、MAP の反復投与後に、少量の MAP による移所運動量増加亢進が見られるのと類似して、海馬における Dusp1 の MAP に対する応答が増強することがわかった。以上の結果から、海馬における Dusp1 を含む分子機構が MAP に対する感受性亢進に関与する可能性が示唆された。

## 10. 薬物依存の再発防止に関する研究

(東京都精神医学総合研究所 分子精神医学研究部門 池田和隆)

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症状脆弱性の遺伝的要因を明らかにし、ゲノム解析により再発リスクを予測する技術の開発を目指している。今年度は、オピオイド感受性に関するゲノムワイド関連解析を行い、CREB1 遺伝子の近傍にある一塩基多型(SNP)が強く関連することを見出

した。さらにこの SNP は、覚醒剤依存患者、アルコール依存患者、摂食障害患者のそれぞれにおいて依存重症度と関連していること、健常者における性格テストにおいて「報酬依存」と関連すること、死後脳サンプルにおいて CREB1 遺伝子発現量と関連することが明らかとなった。第二に、上記のゲノム科学研究での知見と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、再発防止に繋げる技術の開発を目指している。前年度までの2つの後方視的研究により、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では投与されていない患者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を見出した。そこで今年度は、ビタミンCを対照薬としたイフェンプロジルのランダム割り付けクロスオーバー臨床試験を実施した。77名の外来通院しているアルコール依存患者を対象に実施し、この内44名は6ヶ月間にわたる試験を完遂した。得られたデータは、イフェンプロジルの依存治療効果の判定に供すると考えられる。

## 平成24年度 分担研究報告



## 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抗精神病薬およびエピジェネティクス制御による治療効果

研究代表者：鍋島俊隆<sup>1,3</sup>

研究協力者：毛利彰宏<sup>2,3</sup>，青山雄紀<sup>3</sup>，古関竹直<sup>3</sup>，鳥海和也<sup>3</sup>，間宮隆吉<sup>3</sup>，野田幸裕<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>名城大学薬学部地域医療薬局学，<sup>2</sup>名城大学薬学部病態解析学，<sup>3</sup>名城大学薬学部薬品作用学）

### [研究要旨]

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る。このような精神障害に対する病態解明および治療薬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依存や精神障害の発症やその病態には、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が深く関与していると考えられている。昨年度は、発達期におけるエピジェネティクス制御および $\gamma$ -aminobutyric acid（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ことを明らかにした。本年度は、依存性薬物による行動障害およびそれに対する抗精神病薬の緩解効果におけるエピジェネティクス変化の関与について、PCP連続投与マウスにおけるエピジェネティクス異常およびそれに対する抗精神病薬の作用について検討を行った。さらに、エピジェネティクス修飾に作用するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が治療薬としての有用性か、PCP連続投与マウスを用いて評価を行った。PCP連続投与により惹起される行動障害は核内でのリン酸化CaMKIIの減少およびヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の核内局在の増加により、ヒストンのアセチル化（AcH3K9）が低下し、GABA作動性神経系関連遺伝子が発現低下することによっていた。抗精神病薬であるクロザピンはドパミンD1受容体を介してPCP連続投与により惹起されるこれら異常を緩解することで作用を示すことが示唆された。HDAC阻害剤である酪酸ナトリウムもPCP連続投与により惹起されるこれら異常を緩解した。これら知見から、抗精神病薬およびエピジェネティクス制御はPCPにより誘発される行動障害に対して治療効果を示すことが示唆された。

### A. 研究目的

依存性薬物による長期乱用が進むと、薬物摂取の制御ができなくなり、薬物中心の生活となってしまう。薬物依存の形成には脳内報酬系の神経における遺伝子発現が関与し(1)、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）やヒストンアセチル化酵素

（HAT）などによるエピジェネティクス制御による遺伝子発現が重要な役割をもつことが明らかになっている(2,3)。依存性薬物の長期乱用は、様々な情動障害・認知障害など健康上の問題も引き起こす。現在の薬物依存に関する研究は、依存形成や再発の抑制に注目がおかれており、情動お

よび認知機能の障害に対する治療法の開発は少ない。依存性薬物であるフェンサイクリジン (PCP) は統合失調症様の精神障害を示す事が知られている(4)。昨年度において、我々は 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ること、および幼若期におけるエンリッチ環境下での飼育および 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 の低下を抑制することが認められることから、エピジェネティクス制御が生育環境により変化し、PCP による精神障害の発症やその病態に深く関与していることを明らかにした(5)。本研究では、依存性薬物による行動障害およびそれに対する抗精神病薬の緩解効果におけるエピジェネティクス変化の関与について検討を行うために、PCP 連続投与マウスにおけるエピジェネティクス異常およびそれに対する抗精神病薬の作用について検討を行った。さらに、エピジェネティクス修飾に作用するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の治療薬としての有用性について PCP 連続投与マウスを用いて評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

ICR 系雄性マウス (6 週齢) を日本エスエルシー (静岡) より購入し、使用した。マウスは室温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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 (ホームケージ;  $27 \times 44 \times 18 \text{ cm}$ ) にて飼育し、水および飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) は自由に摂取させた。なお、本実験計画は Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った。

### 2. 使用薬物

フェンサイクリジン塩酸塩 (PCP) は名城大学大

学院薬学研究科の古川宏教授が合成、供与された。クロザピン (CLZ) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、ハロペリドール (HAL) は田辺三菱製薬 (大阪)、酪酸ナトリウム (SB) は和光純薬工業 (大阪)、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH-23390 hydrochloride (SCH) は Reseach Biochemicals International (MA, USA) よりそれぞれ購入した。PCP, HAL, SB, SCH は生理食塩水 (SAL) に溶解し、CLZ は 1N 塩酸で溶解後、SAL で希釈し、マウスに投与した。

### 3. 社会性行動試験

実験装置には灰色の亚克力製ボックス ( $25 \times 25 \times 30 \text{ cm}$ ) を使用した。マウスを装置に馴化させるため、最初の 2 日間はマウスを 1 匹ずつ装置に入れ、10 分間自由に探索させた。3 日目にテストするマウスと、異なるケージ内で飼育した同系統のマウスを同時に装置に入れ、テストするマウスの未知マウスに対して行う匂いを嗅ぐ、追いかける、上に乗りかかる、下に潜るなどの行動を社会性行動とし、10 分間測定した。

### 4. 新奇物体認識試験

実験装置には黒いビニールで被われたプラスチック製の箱 ( $30 \times 30 \times 35 \text{ cm}$ ) に木製のソフトチップを敷いて使用した。マウスを装置に馴化させるため、最初の 3 日間はマウスを装置に入れ、10 分間自由に探索させた。訓練試行では、2 つの異なる形をした物体を装置内に設置し、マウスを装置内に入れて各物体に対する探索時間を 10 分間測定した。訓練試行 24 時間後の保持試行では、片方の物体を形の異なる新奇な物体と置換し、マウスを装置内に入れて各物体に対する探索時間を 10 分間測定した。訓練試行では 2 つの物体のうち新奇物体に置換する物体に対する探索時間を、保持試行では新奇物体に対する探索時間を各々の物体に対する探索時間の合計で割り、Exploratory preference を算出して認知機能の指標とした。

## 5. ウェスタンブロッティング解析

マウスを断頭し、氷冷下で前頭皮質を摘出後、すぐに凍結させ、使用するまで-80°Cで保管した。サンプル化は以下のように行った。氷冷したHypotonic buffer (25 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM NaF, 20 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml aprotinin, and 20 µg/ml leupeptin) を用いてホモジナイズし、遠心分離した。その後、上清を回収し、ペレットはphosphate-buffered saline (PBS) で洗い、氷冷したLysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10% Glycerol, 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml aprotinin, and 20 µg/ml leupeptin) で懸濁後、遠心分離し再びPBSでペレットを洗った。氷冷したRIPA buffer (20mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 % SDS, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 20 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml aprotinin, and 20 µg/ml leupeptin) でペレットを超音波処理によりソニケーションし、核画分とした。先に回収した上清は遠心分離し、細胞質画分とした。得られた核および細胞質画分の粗蛋白量をBCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) を用いてタンパク定量し、サンプルバッファ (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % 2-mercaptoethanol, 4 % sodium diphosphate decahydrate, 10 % sucrose and 0.0004 % bromophenol blue) を加え調製した。電気泳動は15 % ポリアクリルアミドゲルで行い、PVDF膜へ蛋白を転写した後、膜をDetector Block Kit (KPL, Gaithersburg, MD) または3 % BSA を用いてブロッキングし、一次抗体と反応させた。二次抗体と反応させた後、PVDF膜と化学発光液 (ECL Plus western blotting detection system, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に反応させ、ChemiDoc XRS (Bio-rad Laboratories Inc, CA, USA) を用いて検出した。

## 6. 定量的リアルタイム RT-PCR 解析

Total RNA 抽出は RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。その後、SuperScript™ III First-Strand System for RT-PCR Kit (Invitrogen) を用いて、cDNA への逆転写を行い、Table 1 に示したプライマーおよびTaqMan probeを使用し、定量化した。PCR反応はiCycle iQ Detection System (BioRad Laboratories, Inc., CA, USA) を用いて95°C 5分加熱後、95°C 30秒 (変性) 59°C 40秒 (アニーリング) 72°C 1分 (伸長) を1サイクルとし、これを40サイクルの条件で行った。発現量は $\Delta\Delta$ Ct法により計算した。

## 7. 免疫組織化学的解析

抱水クロラール (200 mg/kg, i.p.) を投与してマウスを麻酔し、左心室よりSalineを還流し、その後氷冷した4%パラホルムアルデヒドを還流して脳を固定した。脳を摘出し、固定液に浸して固定したのち、PBSで調製した30%スクロース液に浸した。凍結切片は、脳組織を包埋し、クリオスタット (HM 560M, Carlzeiss, Jena, Germany) を用いて薄切した。切片に4%パラホルムアルデヒド液を添加して室温で静置し、PBSで洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬工業) を含んだメタノール (和光純薬工業) を添加して室温で静置した後、メタノールを乾燥させた。0.3% Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 含有0.1 M Tris-HCl buffer と37°Cでインキュベートし、その後antigen unmasking solution (Vector Laboratories) にスライドガラスを浸し、100°Cで2分間インキュベートした。PBSで洗浄後、Diluted normal blocking serumを添加して室温でインキュベートし、さらにPBSで洗浄後、1次抗体を添加して4°Cで一晩インキュベートした。PBSで洗浄後、ビオチンもしくはAlexa Fluor 488 および546を付加した2次抗体を添加して室温でインキュベートした。PBSで洗浄後、ビオチン付加2次抗体を用いたサンプルに対してはVECTASTAIN ABC reagentを用いて可視化した。

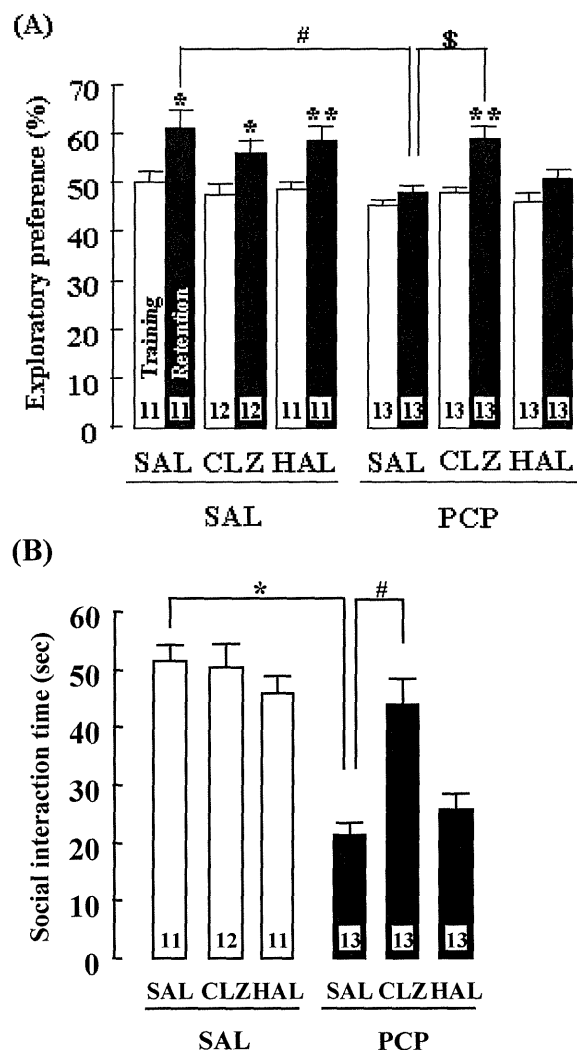
## 8. 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。データの統計解析は、一元配置分散分析 [one-way analysis of variance (ANOVA)], 二元配置分散分析 [two-way analysis of variance (ANOVA)] および重複分析 [repeated analysis of variance (ANOVA)] を用いて行った。Post hoc テストは Tukey test の多重比較検定に従い、危険率 5% 未満 ( $P < 0.05$ ) の場合に、統計的有意差があったとした。

## C. 研究結果

### 1. フェンサイクリジン連続投与による行動障害に対する抗精神病薬の効果

PCP連続投与による行動障害に対する抗精神病薬の作用を検討するため、新奇物体認識試験および社会性行動試験を行った。新奇物体認識試験の訓練試行において、片方の物体に対する exploratory preference はすべての群間に有意な差が認められなかった。保持試行において、PCP連続投与マウスの新奇物体に対する exploratory preference は SAL連続投与マウスのそれと比較して有意に低下したことから、PCP連続投与による物体認知記憶障害が示唆された (Figure 1A)。PCP連続投与による物体認知記憶障害は CLZ (10 mg/kg, *p.o.*) の投与により有意に緩解されたが、HAL (1.0 mg/kg, *p.o.*) の投与では緩解されなかった (Figure 1A)。また、社会性行動試験において、PCP連続投与マウスの社会性行動時間は SAL連続投与マウスそれと比較して有意に短縮したことから、PCP連続投与による社会性行動障害が示唆された (Figure 1B)。PCP連続投与による社会性行動障害は CLZ の投与により有意に緩解されたが、HAL の投与では緩解されなかった (Figure 1B)。一方、CLZ および HAL の投与は SAL連続投与マウスの物体認知記憶および社会性行動には影響を与えなかった (Figure 1A, B)。



**Figure 1 Clozapine but not haloperidol attenuated phencyclidine-induced behavioral impairments.** Clozapine but not haloperidol attenuated phencyclidine-induced cognitive dysfunction in novel object recognition test (A). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs training. # $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. \$ $p < 0.05$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Clozapine but not haloperidol attenuated phencyclidine-induced social deficit in social interaction test (B). \* $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. # $p < 0.05$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, HAL: haloperidol, CLZ: clozapine.

### 2. フェンサイクリジン連続投与による前頭前皮質におけるアセチル化ヒストン H3K9 (AcH3K9) への影響及びそれに対する抗精神病薬の効果

PCP連続投与によるエピジェネティックな変化を検討するため、ウェスタンブロット法を用いて前頭前皮質における AcH3K9 量について評価した。PCP連続投与により前頭皮質において AcH3K9 が有意に減少した (Figure 2)。また、PCP連続投与