

による AcH3K9 の減少は 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 2).

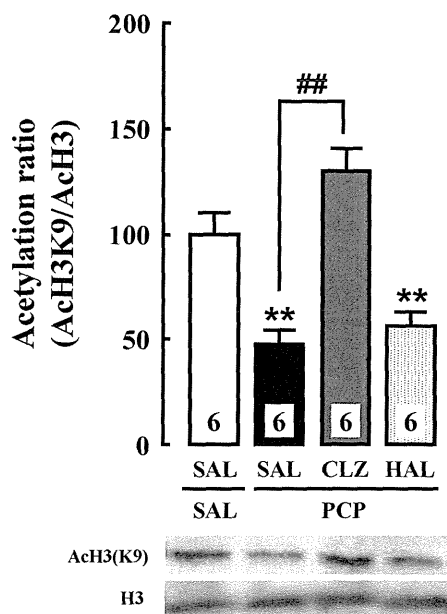


Figure 2 Clozapine but not haloperidol attenuated phencyclidine-induced decrease of the acetylation level of histone H3 at lysine 9 residues in the prefrontal cortex. \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. ## $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, HAL: haloperidol, CLZ: clozapine.

### 3. フェンサイクリジン連続投与による行動障害に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果

PCP 連続投与により物体認知記憶および社会性行動障害とともに前頭前皮質において AcH3K9 が減少し、それらは CLZ の投与により緩解された。そこで、PCP 連続投与による行動障害とヒストンアセチル化の関連を検討するため、PCP 連続投与による行動障害に対する HDAC 阻害剤 (酪酸ナトリウム: SB 0.2, 1.0, 2.0 g/kg, *i.p.*) の作用を新奇物体認識試験および社会性行動試験を用いて評価した。PCP 連続投与による物体認知機能および社会性行動障害は SB (1.0, 2.0 g/kg, *i.p.*) の投与により共に緩解した (Figure 3A, B)。一方、SB 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 3A, B)。

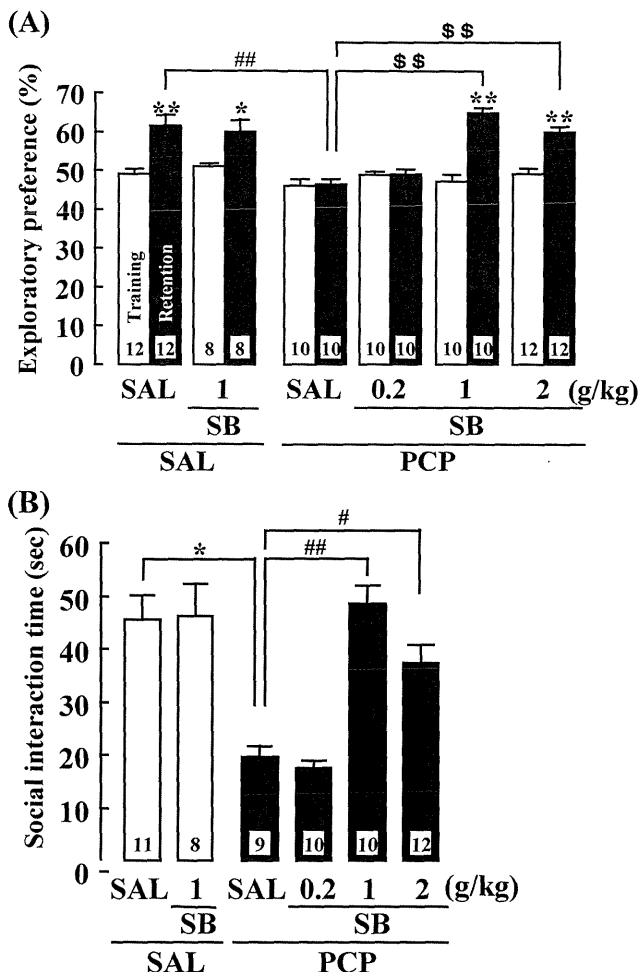
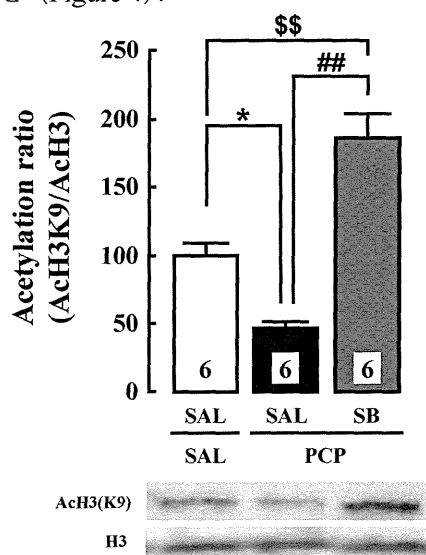


Figure 3. Histone deacetylase inhibitor: sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced behavioral impairments. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced cognitive dysfunction in novel object recognition test (A). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs training. ## $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. \$\$ $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced social deficit in social interaction test (B). \* $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  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, SB: sodium butyrate.

#### 4. 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の減少に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果

PCP 連続投与による前頭前皮質における AcH3K9 の減少に対する SB の作用について検討するため、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 連続投与による AcH3K9 の減少は SB の投与により有意に緩解した (Figure 4)。

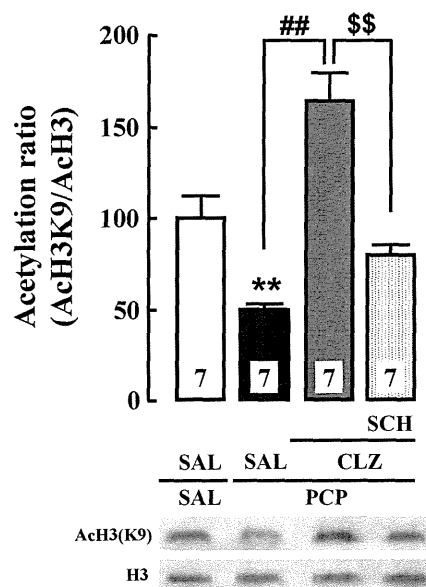


**Figure 3. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced decrease of the acetylation level of histone H3 at lysine 9 residues in the prefrontal cortex.**

\* $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. ## $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. \$\$ $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, SB: sodium butyrate.

#### 5. 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の減少に対するクロザピンの緩解作用におけるドパミン D1 受容体の関与

PCP 連続投与による AcH3K9 の減少に対する CLZ の緩解作用にドパミン D1 受容体が関与するかどうか検討するため、ウェスタンブロット法を用いて CLZ とドパミン D1 受容体拮抗薬: SCH-23390 (SCH) の併用投与時の前頭前皮質 AcH3K9 量について評価した。PCP 連続投与による AcH3K9 の減少に対する CLZ の緩解作用は SCH の併用投与により有意に拮抗された (Figure 4)。

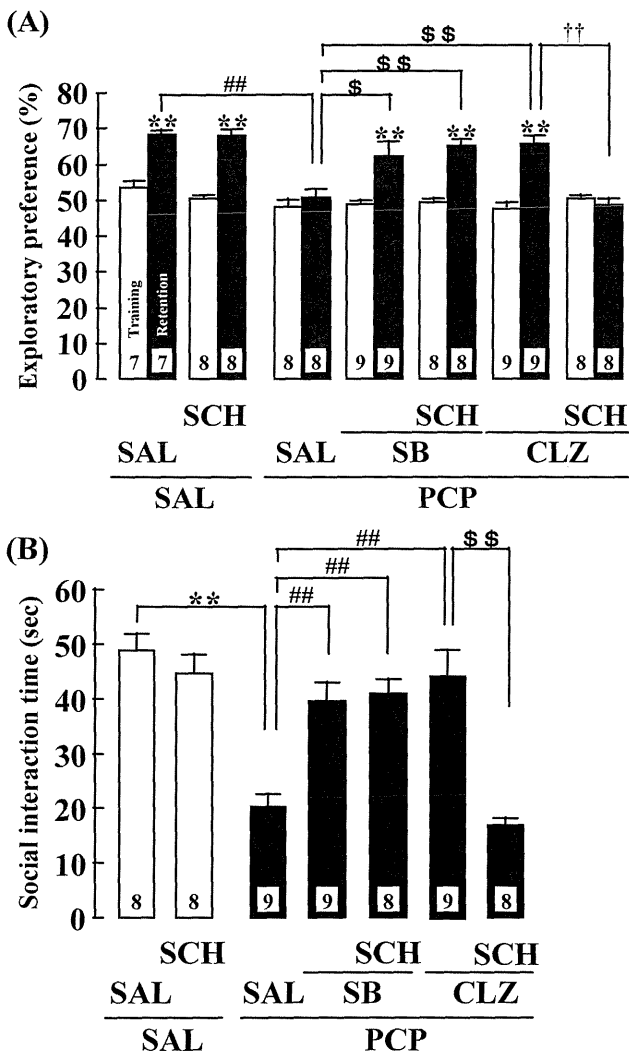


**Figure 4. Dopamine D1-receptor was involved in the ameliorating effect of clozapine on phencyclidine-induced decrease of acetylation level of histone H3 at lysine 9 residues in the prefrontal cortex.**

\*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. ## $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. \$\$ $p < 0.01$  vs phencyclidine/clozapine-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, CLZ: clozapine, SCH: SCH-23390.

#### 6. フェンサイクリジン連続投与による行動障害に対するクロザピンおよびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の緩解作用におけるドパミン D1 受容体の関与

PCP 連続投与による物体認知記憶および社会性行動障害に対する CLZ および SB の緩解作用におけるドパミン D1 受容体の役割を検討するため、SCH を CLZ または SB と併用投与し、新奇物体認識試験および社会性行動試験を行った。その結果、PCP 連続投与による物体認知記憶および社会性行動の障害に対する CLZ の緩解作用は SCH によりなくなったが、SB の緩解作用には影響を与えなかった (Figure 5A, B)。

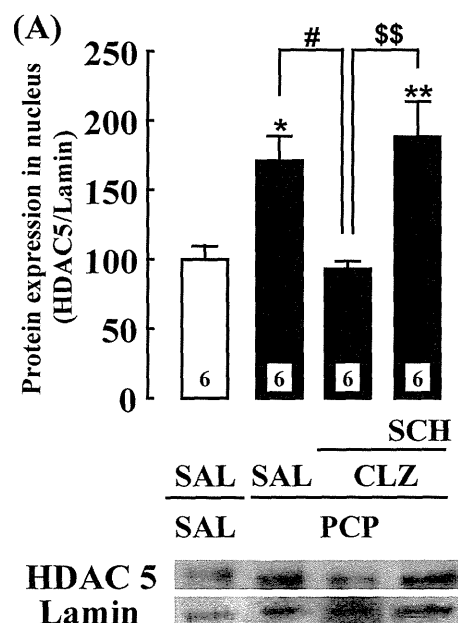


**Figure 5. Dopamine D1-receptor was involved in the ameliorating effect of clozapine but not sodium butyrate on the behavioral impairments induced by phencyclidine.**

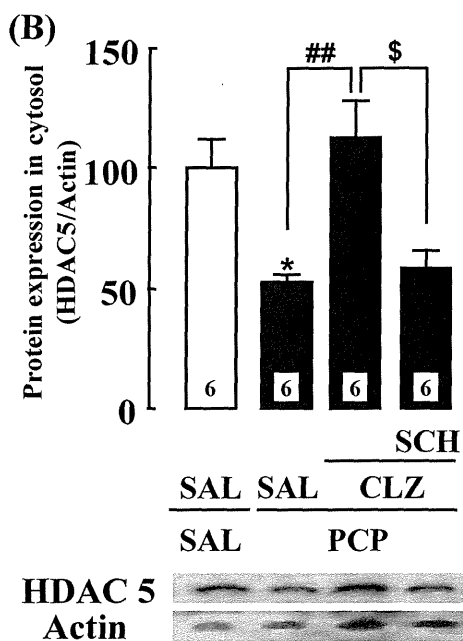
Dopamine D1-receptor was involved in the ameliorating effect of clozapine but not sodium butyrate on object recognition memory impairment induced by phencyclidine in novel object recognition test (A). \*\* $p < 0.01$  vs training. ## $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. \$ $p < 0.05$ , \$\$ $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. †† $p < 0.01$  vs phencyclidine/clozapine-treated mice. Dopamine D1-receptor was involved in the ameliorating effect of clozapine but not sodium butyrate on social deficit induced by phencyclidine in social interaction test (B). \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. ## $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. \$\$ $p < 0.01$  vs phencyclidine/clozapine-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, SB: sodium butyrate, CLZ: clozapine, SCH: SCH-23390.

## 7. 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ヒストン脱アセチル化酵素：HDAC5の細胞内局在変化に対するクロザピンの効果とその機序

ヒストン脱アセチル化酵素の細胞内局在変化によりアセチル化ヒストンの量に変化する。そこで、ヒストン脱アセチル化酵素：HDAC5の細胞内局在に対するPCP連続投与の影響、およびそれに対するドパミンD1受容体を介したCLZの作用について検討するため、マウスの脳をサンプル化し、ウェスタンブロット法を用いて前頭前皮質の核内および細胞質内のHDAC5量について評価した。PCP連続投与により前頭前皮質の核内HDAC5の有意な増加が認められ (Figure 6A)、細胞質内HDAC5の有意な減少が認められた (Figure 6B)。PCP連続投与による核内および細胞質内HDAC5の変化はCLZの投与により緩解するが、その緩解作用はSCHの併用投与により拮抗された (Figure 6A, B)。



(次ページ続く)



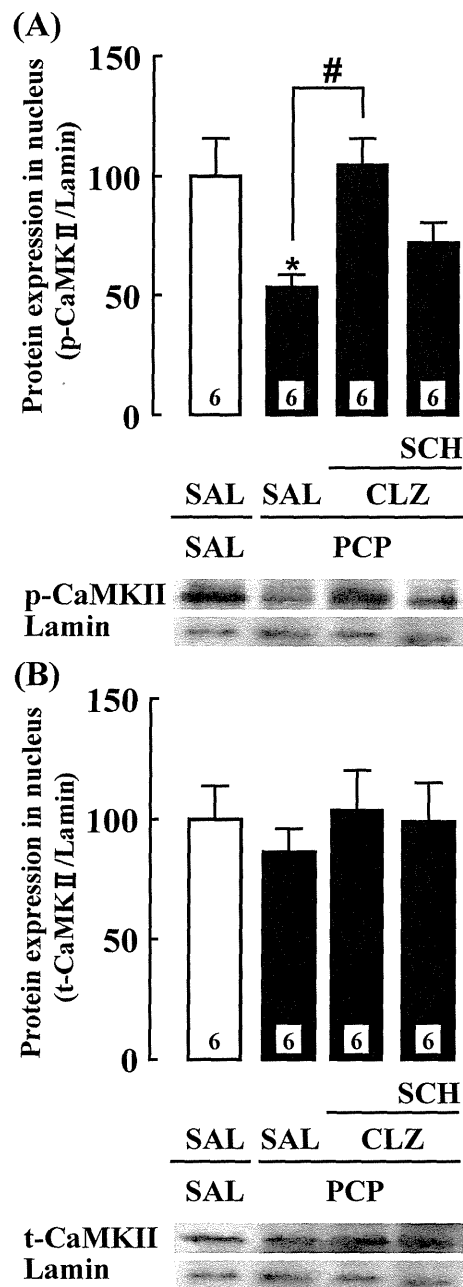
**Figure 6. Clozapine attenuated phencyclidine-induced change in intracellular localization of HDAC5 through dopamine D1-receptor.**

Clozapine attenuated phencyclidine-induced increase of nuclear localization of HDAC5 through dopamine D1-receptor (A). \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. # $p < 0.05$  vs phencyclidine/saline-treated mice. \$\$ $p < 0.01$  vs phencyclidine/clozapine-treated mice. Clozapine attenuated phencyclidine-induced decrease of cytoplasmic localization of HDAC5 through dopamine D1-receptor (B). \* $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. ## $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. \$ $p < 0.05$  vs phencyclidine/clozapine-treated mice. Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. SAL: saline, PCP: phencyclidine, CLZ: clozapine, SCH: SCH-23390.

### 8. 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核内リン酸化 CaMKII の減少に対するクロザピンの効果とその機序

HDAC5 の細胞内局在は核内リン酸化 CaMKII により調節されている。そこで、核内のリン酸化 CaMKII に対する PCP 連続投与の影響、およびそれに対するドパミン D1 受容体を介した CLZ の作用について検討するため、マウスの脳をサンプル化し、ウェスタンブロット法を用いて前頭前皮質の核内リン酸化 CaMKII 量について評価した。PCP 連続投与により前頭前皮質の核内リン酸化 CaMKII が有意に減少した (Figure 7A)。PCP 連続投与による核内リン酸化 CaMKII の減少は CLZ の投与により緩解されたが、SCH の併用投与により拮抗された (Figure 7A)。また、すべての群にお

いて核内総 CaMKII 発現量に差はなかった (Figure 7B)。



**Figure 7. Clozapine attenuated phencyclidine-induced decrease of phosphorylated but not total CaMKII level in nucleus through dopamine D1-receptor.**

Clozapine attenuated phencyclidine-induced decrease of phosphorylated CaMKII level in nucleus through dopamine D1-receptor (A). \* $p < 0.05$  vs saline/saline-treated mice. # $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. There was no difference in total CaMKII level in nucleus among all groups (B). Values indicate the mean  $\pm$  s.e.m. The number of animals was indicated within the columns. p-CaMKII: phosphorylated CaMKII, t-CaMKII: total CaMKII, SAL: saline, PCP: phencyclidine, CLZ: clozapine, SCH: SCH-23390.

9. フェンサイクリジン連続投与による前頭前皮質 GABA 作動性神経系関連遺伝子発現の減少に対するクロザピンの効果

ヒストンのアセチル化は転写活性に関与している。また、PCP 連続投与は前頭前皮質の GABA 作動性神経系の機能を低下させる。そこで、転写活性に対する PCP 連続投与の影響、およびそれに対する CLZ の作用について検討するため、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて GABA 作動性神経系関連遺伝子 mRNA を定量した。PCP 連続投与により前頭前皮質における *Gad1*, *Gabra1* および *Pvalb* mRNA が有意に減少した。PCP 連続投与による *Pvalb* mRNA の減少は CLZ の投与により緩解したが、*Gad1* および *Gabra1* mRNA の減少は CLZ の投与では緩解しなかった。*Gabrb2* mRNA においては、PCP 連続投与による減少およびそれに対する CLZ による緩解の傾向があった (Figure 8A-D)。

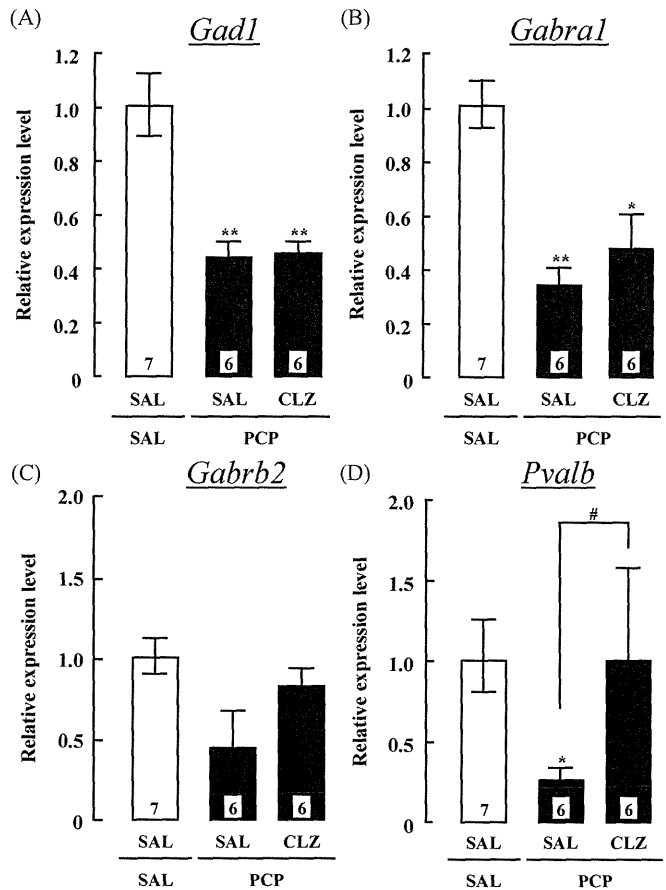
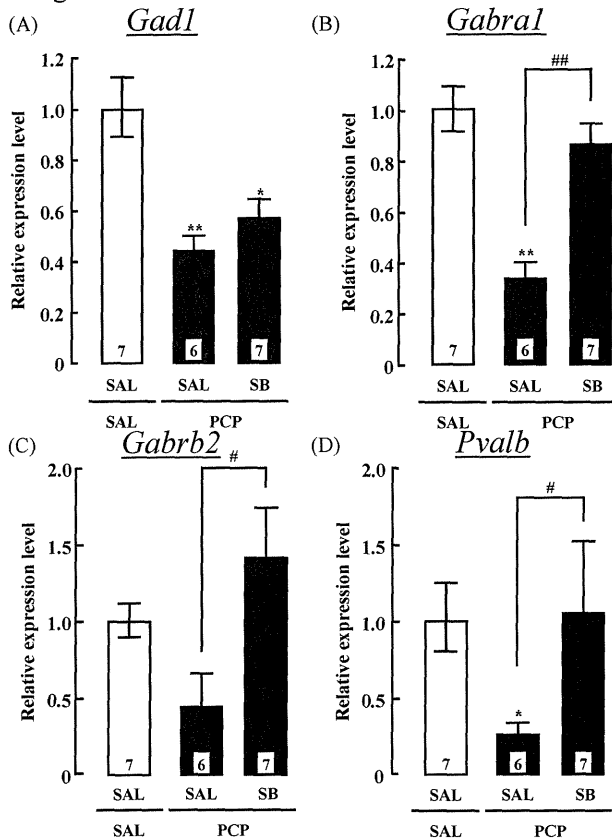


Figure 8. Clozapine attenuated phencyclidine-induced decrease of Parvalbumin (*Pvalb*) but not Glutamic acid decarboxylase 1 (*Gad1*) or GABA A receptor subunit alpha 1 (*Gabra1*) mRNA level. Clozapine did not attenuate phencyclidine-induced decrease of *Gad1* mRNA level (A). \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. Clozapine did not attenuate phencyclidine-induced decrease of *Gabra1* mRNA level (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. There was no difference in *Gabrb2* mRNA level among all groups (C). Clozapine attenuated phencyclidine-induced decrease of *Pvalb* mRNA level (D). \* $p < 0.05$  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, CLZ: clozapine, *Gabrb2*: GABA A receptor subunit beta 2

10. フェンサイクリジン連続投与による前頭前皮質 GABA 作動性神経系関連遺伝子発現の減少に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の効果

転写活性に対する PCP 連続投与の影響、およびそれに対する SB の作用について検討するため、マウスの脳をサンプル化し、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて GABA 作動性神経系関連遺伝子 mRNA を定量した。PCP 連続投与により惹起された *Gabra1*, *Gabrb2* および *Pvalb* mRNA の減少

は SB の投与により緩解したが、PCP 連続投与による *Gad1* の減少は SB の投与では緩解しなかった (Figure 9A-D).



**Figure 9. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced decrease of GABA A receptor subunit alpha 1 (*Gabra1*), GABA A receptor subunit beta 2 (*Gabrb2*) or Parvalbumin (*Pvalb*) but not Glutamic acid decarboxylase 1 (*Gad1*) mRNA level.**

Sodium butyrate did not attenuate phencyclidine-induced decrease of *Gad1* mRNA level (A). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced decrease of *Gabra1* mRNA level (B). \*\* $p < 0.01$  vs saline/saline-treated mice. ### $p < 0.01$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Sodium butyrate increased *Gabrb2* mRNA level (C). # $p < 0.05$  vs phencyclidine/saline-treated mice. Sodium butyrate attenuated phencyclidine-induced decrease of *Pvalb* mRNA level (D). \* $p < 0.05$  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, SB: sodium butyrate

#### D. 考察

ヒストン修飾をはじめとするエピジェネティックな変化は依存性薬物による精神依存の形成やその再発に深く関与していると考えられる (6). 一方、抗精神病薬は依存性薬物による精神障害に対して、有効であることが臨床および基礎研究において示唆されている (7, 8). 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。

PCP 連続投与による行動障害は抗精神病薬に応答性であり、第一世代抗精神病薬は行動量増加に緩解作用を示し、第二世代抗精神病薬は社会性行動障害や認知機能障害に対しても緩解作用を示す (4). 本研究では PCP 連続投与により物体認知記憶および社会性行動が障害され、それら行動障害に対して第二世代抗精神病薬である CLZ の投与により緩解作用が認められたが、第一世代抗精神病薬である HAL の投与では緩解作用が認められなかった。本研究結果は既存の報告と一致していた。

抗精神病薬の動物への投与によりエピジェネティックな変化が認められる (9). 本研究では、PCP 連続投与により行動障害とともに前頭前皮質における AcH3K9 が有意に減少し、その減少は CLZ の投与により緩解されたが、HAL では緩解されなかった。また、HDAC 阻害剤である SB の投与により PCP 連続投与による行動障害とともに AcH3K9 の減少は緩解された。これら結果から、PCP 連続投与による行動障害およびそれに対する抗精神病薬の作用はエピジェネティックな変化が関与していることが示唆され、HDAC 阻害剤の依存性薬物による精神障害に対する治療薬としての有効性が示唆された。

PCP 連続投与により前頭皮質のドーパミン作動性神経系の機能が低下し、それによる潜在学習障害は前頭皮質へのドーパミン D1 受容体作動薬の微量注入により緩解する (10). また培養細胞実験におい

て、PCP による神経毒性はドパミン D1 受容体作用薬により緩解する(11)。本研究において、PCP 連続投与による行動障害および AcH3K9 の減少に対する CLZ の緩解作用はドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH により拮抗されたことから、CLZ の緩解作用はドパミン D1 受容体を介していることが示唆された。一方、ヒストン修飾を直接亢進させる SB の行動障害および AcH3K9 の減少に対する緩解作用はドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH の併用投与では拮抗されなかったことから、SB の作用発現にはヒストンのアセチル化が重要であることが示唆され、ドパミン D1 受容体の活性化を介していないことが示唆された。

ヒストンがアセチル化されると転写が活性化され、その後続くタンパク質合成が促進される。ヒストンのアセチル化はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (Histone acetyl transferase: HAT) や HDAC により制御され、学習・記憶などの脳高次機能の調節にも深く関与している(12)。HDAC のサブタイプである HDAC4 と HDAC5 は AcH3K9 を脱アセチル化する(13)。HDAC5 は Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II (CaMKII) によりリン酸化されると、核内から核外へ移行し、その細胞内局在が調節されている(14)。一方、PCP 連続投与マウスの前頭前皮質において、NMDA 受容体機能が低下し、それに伴い CaMKII の活性が低下する(10)。本研究において、PCP 連続投与により HDAC5 が核内で増加し、細胞質内で減少した。PCP 連続投与によりリン酸化 CaMKII が核内で減少するが、核内総 CaMK II には変化が認められなかった。これらの PCP 連続投与により引き起こされる細胞内局在の変化は CLZ の投与によりドパミン D1 受容体依存的に緩解された。以上の結果から、PCP 連続投与による核内でのリン酸化 CaMKII の減少により、HDAC5 の核内局在が促進されることでヒストンの脱アセチル化が亢進し AcH3K9 が減少するが、CLZ の投与によりドパミ

ン D1 受容体依存的にこれら変化が緩解されることが示唆された。

統合失調症の患者において、GABA 作動性神経の脱落や機能低下が認められる(15)。一方、DNA マイクロアレイ解析から、PCP 連続投与により大脳皮質において GABA receptor  $\alpha 1$  (*Gabra1*) や GABA receptor  $\beta 2$  (*Gabrb2*) といった GABAA 受容体のサブユニットの mRNA の減少が認められ、GABA 作動性神経系の機能低下が示唆されている(16)。本研究では、PCP 連続投与により前頭前皮質において *Gad1*, *Gabra1*, *Gabrb2*, *Pvalb* の mRNA の発現が有意に減少および減少傾向を示した。CLZ の投与により PCP 連続投与による *Pvalb* の mRNA 発現の減少が緩解されたことから、CLZ の投与により PCP 連続投与による GABA 作動性神経系の機能低下が緩解されたことが示唆された。一方、SB の投与により PCP 連続投与による *Gabra1*, *Gabrb2*, *Pvalb* の mRNA 発現の減少が緩解されたことから、PCP 連続投与による GABA 作動性神経系の機能低下にヒストンのアセチル化の減少が関与していることが示唆された。

本研究より、PCP 連続投与による行動障害は核内でリン酸化 CaMKII が減少し、HDAC5 の核内局在が増加するため、AcH3K9 が減少し、遺伝子発現が低下すること、および第二代抗精神病薬である CLZ は PCP 連続投与によるこれら異常をドパミン D1 受容体依存的に緩解することが示唆された。また、SB の投与においても PCP 連続投与によるこれら異常を緩解した。以上の結果から、依存性薬物による精神障害の病態および抗精神病薬の効果にヒストン修飾変化が関与していることが示唆された。エピジェネティクスを指標とした統合失調症の診断への応用が期待される。また、抗精神病薬の作用機序にヒストン修飾変化に伴うタンパク発現の変化が重要であることが示唆されたことから、ヒストン修飾や DNA 修飾な

どのエピジェネティクスを直接的に制御するような薬剤を依存性薬物による精神障害の新規治療薬として開発することが期待される。本研究から得られた成果が依存性薬物による精神障害の克服の一助となれば幸いである。

## E. 結論

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。

### 【参考文献】

1. Hyman SE, Malenka RC, and Nestler EJ: Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci.* 29.565-598 (2006)
2. Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, and Nestler EJ: Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron.* 56.517-529 (2007)
3. Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, and Nestler EJ: Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron.* 48.303-314 (2005)
4. Mouri A, Noda Y, Enomoto T, and Nabeshima T: Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int.* 51.173-184 (2007)
5. Koseki T, Mouri A, Mamiya T, Aoyama Y, Toriumi K, Suzuki S, Nakajima A, Yamada T, Nagai T, and Nabeshima T: Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 15.1489-1501 (2012)
6. Robison AJ, and Nestler EJ: Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci.* 12.623-637 (2011)
7. Farren CK, Hameedi FA, Rosen MA, Woods S, Jatlow P, and Kosten TR: Significant interaction between clozapine and cocaine in cocaine addicts. *Drug Alcohol Depend.* 59.153-163 (2000)
8. Nagai T, Takuma K, Dohniwa M, Ibi D, Mizoguchi H, Kamei H, Nabeshima T, and Yamada K: Repeated methamphetamine treatment impairs spatial working memory in rats: reversal by clozapine but not haloperidol. *Psychopharmacology (Berl).* 194.21-32 (2007)
9. Dong E, Nelson M, Grayson DR, Costa E, and Guidotti A: Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105.13614-13619 (2008)
10. Mouri A, Noda Y, Noda A, Nakamura T, Tokura T, Yura Y, Nitta A, Furukawa H, and Nabeshima T: Involvement of a dysfunctional dopamine-D1/N-methyl-d-aspartate-NR1 and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II pathway in the impairment of latent learning in a model of schizophrenia induced by phencyclidine. *Mol Pharmacol.* 71.1598-1609 (2007)



(2007)

11. Lei G, Anastasio NC, Fu Y, Neugebauer V, and Johnson KM: Activation of dopamine D1 receptors blocks phencyclidine-induced neurotoxicity by enhancing N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic strength. *J Neurochem.* 109.1017-1030 (2009)

12. Levenson JM, and Sweatt JD: Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.* 6.108-118 (2005)

13. Kazantsev AG, and Thompson LM: Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 7.854-868 (2008)

14. Chawla S, Vanhoutte P, Arnold FJ, Huang CL, and Bading H: Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem.* 85.151-159 (2003)

15. Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, and Woo TU: Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 46.616-626 (1999)

16. Toyooka K, Usui M, Washiyama K, Kumanishi T, and Takahashi Y: Gene expression profiles in the brain from phencyclidine-treated mouse by using DNA microarray. *Ann N Y Acad Sci.* 965.10-20 (2002)

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Song Z, Ge D, Ishii K, Yamada H, Toriumi K, Watanabe H, Nabeshima T, Fukushima T. Determination of N-acetylaspartic acid concentration in the mouse brain using HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* 26(2), 147-151 (2012)
2. Shin EJ, Duong CX, Nguyen XK, Li Z, Bing G, Bach JH, Park DH, Nakayama K, Ali SF, Kanthasamy AG, Cadet JL, Nabeshima T, Kim HC : Role of oxidative stress in methamphetamine-induced dopaminergic toxicity mediated by protein kinase C $\delta$ . *Behav Brain Res.* 232, 98-113 (2012)
3. Alkam T., Kim H-C, Hiramatsu M., Mamiya T., Aoyama Y., Nitta A., Yamada K. Nabeshima T. Evaluation of emotional behaviors in young offspring of C57BL/6J mice after gestational and/or perinatal exposure to nicotine in six different time-windows. *Behav Brain Res.* 239, 80-89 (2012)
4. Nakamoto K, Kawasaki S, Kobori T, Fujita-Hamabe W, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T, Tokuyama S. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in the development of morphine tolerance. *Eur J Pharmacol.* 683, 86-92 (2012)
5. Tran HY, Shin EJ, Saito K, Nguyen XK, Chung YH, Jeong JH, Bach JH, Park DH, Yamada K, Nabeshima T, Yoneda Y, Kim HC. Protective potential of IL-6 against trimethyltin-induced neurotoxicity in vivo. *Free Radic Biol Med.* 52, 1159-74 (2012)
6. Mouri A, Koseki T, Narusawa S., Niwa M., Mamiya T., Kano S., Sawa A., Nabeshima T. Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioral changes *Int J Neuropsychopharmacol.* 15, 767-779 (2012)
7. Koseki T, Mouri A, Mamiya T, Aoyama Y, Toriumi K, Suzuki S, Nakajima A, Yamada T, Nagai T, Nabeshima T. Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int J*

- Neuropsychopharmacol. 15, 1489-1501(2012)
8. Mouri A, Sasaki A, Watanabe K, Sogawa C, Kitayama S, Mamiya T, Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Nabeshima T. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation. *J Neurosci.* 32, 4562-4580 (2012)
  9. Nagai T, Yu J, Kitahara Y, Nabeshima T, Yamada K. D-Serine ameliorates neonatal PolyI:C treatment-induced emotional and cognitive impairments in adult mice. *J Pharmacol Sci.* 120, 213-27(2012)
  10. Espallergues J, Mamiya T, Vallè M, Koseki T, Nabeshima T, Temsamani J, Laruelle C, Maurice T. : The antidepressant-like effects of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane in mice is related to changes in neuroactive steroid and monoamine levels. *Neuropharmacology.* 62, 492-502 (2012)
  11. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A.: Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science.* 339:335-339(2013)
  12. Jaaro-Peled H, Niwa M, Foss CA, Murai R, de Los Reyes S, Kamiya A, Mateo Y, O'Donnell P, Cascella NG, Nabeshima T, Guilarte TR, Pomper MG, Sawa A.: Subcortical dopaminergic deficits in a DISC1 mutant model: a study in direct reference to human molecular brain imaging. *Hum Mol Genet.* ( In press)
  13. Koseki T, Mouri A, Suzuki S, Nakajima A, Mamiya T, Yan Y, Nabeshima T. Galantamine attenuates reinstatement of cue-induced methamphetamine-seeking behavior in mice. *Addict Biol.* ( In press)
  14. Miyazaki M, Noda Y, Mouri A, Kobayashi K, Mishina M, Nabeshima T, Yamada K. Role of convergent activation of glutamatergic and dopaminergic systems in the nucleus accumbens in the development of methamphetamine psychosis and dependence. *Int J Neuropsychopharmacol* (In press)
  15. Yan Y, Miyamoto Y, Nitta A, Muramatsu SI, Ozawa K, Yamada K, Nabeshima T: Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* (In press)
  16. 古関 竹直, 毛利 彰宏, 間宮 隆吉, 青山 雄紀, 鳥海 和也, 鈴木 静香, 中島 杏紗, 山田 卓摩, 永井 拓, 鍋島 俊隆: 青年期の豊かな環境はフェンシクリジン連続投与マウスのヒストンアセチル化に関連した行動異常を予防する *日本神経精神薬理学雑誌* 32, 87-89 (2012)
  17. 鳥海 和也, 鍋島 俊隆: 注目の遺伝子(第17回) 新規薬物依存抑制因子 shati 分子精神医学 12(2), 133-135 (2012)

## 2. 学会発表

### 国際学会

1. Kiyofumi Yamada, D. Ibi, T. Nabeshima, A. Sawa, T. Nagai : Animal model of treatment-resistant schizophrenia. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (Stockholms, 2012.6.4)
2. Atsumi Nitta, Y. Ishikawa, N. Iegaki, S.-i. Miuramatsu, T. Nabeshima, Y. Furukawa-Hibi, K. Uno, Y. Miyamoto: Overexpression of shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (Stockholms, 2012.6.4)
3. Toshitaka Nabeshima, T. Koseki, A. Mouri, T. Mamiya, T. Nagai, K. Toriumi, Y. Aoyama, T. Yamada, S. Suzuki, A. Nakajima. Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (Stockholms, 2012.6.5)
4. Masayuki Hiramatsu, M. Miwa, M. Tsuboi, Y. Noguchi, A. Enokishima, T. Nabeshima : Protective effects of betaine on

- lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of gaba transporter
2. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology( Stockholm, 2012.6 .6)
  5. Taku Nagai,Daisuke Ibi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada :Role of astroglial IFITM3 in the neurodevelopmental impairments following neonatal polyI: C treatment. 21th Century Frontier R & D Program in Neuroscience , Brain Reserch Center Korea:BRC International Conference 2012@Jeju, (Jeju, 2012.6 .28)
  6. Toshitaka Nabeshima, Kazuya Toriumi, Atumi Nitta: A new psysiologincal functions of drug dependence regulating molecule, shati.21th Century Frontier R & D Program in Neuroscience , Brain Reserch Center Korea :BRC International Conference 2012 @Jeju, (Jeju, 2012.6 .28)
  7. 鍋島俊隆:シンポジウム7: 新規依存治療薬の探索-候補標的分子の解析から臨床試験まで. 平成 24 年度 アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (札幌,2012.9 .8 )
  8. Nabeshima Tosithaka:Physiological function of shati (NAT8L), a new molecule ihibits drug dependence. The 16th Congress of International Sociery for Biomedical Research on Alcoholosm (Sapporo, 2012.9 .10 )
  9. Toshitaka Nabeshima, Kazuya Toriumi, Minae Niwa, Atumi Nitta: A nobel molecule "SHATI" inhibiting Methamphetamine dependence. The 16th Congress of International Sociery for Biomedical Research on Alcoholosm Sapporo, 2012.9 .10)
  10. Toshitaka Nabeshima, Takenao Koseki, Yukihiko Noda:Suppressive effects of Galantamine on Methamphetamine dependence and psychosis in mice.The 16th Congress of International Sociery for Biomedical Research on Alcoholosm by converting pro-BDNF to mature BDNF. SFN Neuroscience2012 (New Orleans/ USA, 2012.10 .15 )
  11. Daisuke Ibi, Taku Nagai, Akira Nakajima, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada: IFITM3 mediates neuronal and behavioral impairments following neonatal immune challenge. SFN Neuroscience2012 (New Orleans/ USA, 2012.10 .15)
  12. Taku Nagai, Juesuk Yu, Daisuke Ibi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada:Nicotine ameliorates emotional and cognitive impairments induced by neonatal polyI:C treatment in mice. SFN Neuroscience2012 (New Orleans/ USA, 2012.10 .15)
  13. Kazuya Toriumi, Akihiro Mouri, Siho Narusawa, Yuki Aoyama, Yumi Ikawa, Linling Lu, Taku Nagai, Takayoshi Mamiya, Hyoung-Chun Kim, Toshitaka Nabeshima :Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor, leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex .SFN Neuroscience 2012 (New Orleans/ USA, 2012.10 .16)
  14. Toshitaka Nabeshima:Animal Model of Schizophrenia Induced by Phencyclidine. The 28th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium/The Progress in Neuroscience for Novel Neurological Therapeutics.(Kumamoto, 2012.11 .15)
  15. 家垣典幸、宮本嘉明、宇野恭介、日比陽子、鍋島俊隆、新田淳美 :マウスにおける Shati 過剰発現は社会性行動およびメタンフェタミン反応性に影響する。第 63 回日本薬理学会北部会 (新潟 2012.9 .14 )
  16. 永井 拓, 鍋島 俊隆, 山田 清文: 新生仔期 polyI:C 処置による神経発達障害にはアストロサイトの IFITM3 が関与している。第 35 回日本神経科学学会年会(名古屋,2012.9 .18)
  17. 磯野 俊成, 山下 直也, Tursun Alkam, 新田 淳美, 鍋島 俊隆, 五嶋 良郎: 脳室内にベータアミロイドを投与したアルツハイマー病モデルマウスでは collapsin response mediator protein 2 のリン酸化が上昇する。第 35 回日本神経科学学会年会(名古屋,2012.9 .18)
  18. 今井 早希, 間宮 隆吉, 鍋島 俊隆, 海老原 史樹文:Usp46 KO マウスにおける行動学的解析。第 35 回日本神経科学学会年会 (名古屋,2012.9 .18 )

19. 國澤 和生, 坪井 純子, 小川 麻子, 春日井 悠司, 木戸 究, 鍋島 俊隆, 平松 正行: 拘束水浸ストレス負荷による記憶障害に対する betaine の改善作用:GABA 作動性神経系の関わり. 第 35 回日本神経科学学会年会(名古屋,2012.9 .18)
20. 毛利 彰宏, 佐々木 文, 渡辺 研, 十川 千春, 北山 滋雄, 間宮 隆吉, 宮本 嘉明, 岩田 仲生, 山田 清文, 野田 幸裕, 鍋島 俊隆: MAGE-D1 はセロトニントランスポーターのユビキチン化を介したうつ様行動に関与する. 第 35 回日本神経科学学会年会(名古屋,2012.9 .18)
21. 山田清文, Yan Yijin, 古関 竹直, 新田 淳美, 鍋島俊隆 :覚せい剤依存動物モデルにおける TNF- $\alpha$  の抑制効果. 第 35 回日本神経科学学会年会(名古屋,2012.9 .19)
22. 家垣典幸、宮本嘉明、宇野恭介、日比陽子、鍋島俊隆、新田淳美 :Shati 過剰発現マウスにおける行動解析.第 22 臨床精神薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会 (宇都宮,2012.10 .19)
23. 平松正行、松倉拓哉、山梨航、鍋島俊隆:コルチコステロン投与モデルマウスに対する適合溶質 betaine の作用.第 22 臨床精神薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会(宇都宮, 2012.10 .19)
24. 宇野恭介、永村美由紀、玉地亜衣、鍋島俊隆、尾崎紀夫、宮本嘉明、新田淳美:精神疾患患者の血清サンプルにおける新規分子 SHATI 濃度測定法の開発. 第 22 臨床精神薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会(宇都宮, 2012.10 .19)
25. 石川雄大、宮本嘉明、鷺見和之、家垣典幸、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、宇野恭介、新田淳美:シャチの側坐核特異的過剰発現は代謝型グルタミン酸受容体 3 を介してマウスにおけるメタンフェタミン誘発性ドパミン遊離量増加を抑制する. 第 22 臨床精神薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会(宇都宮, 2012.10 .20)
26. 肥田裕丈 , 毛利彰宏 , 古屋敷智之, 鈴木守人 , 鶴飼麻由, 谷口将之, 山田清文, 尾崎紀夫, 成宮 周、鍋島俊隆、野田幸裕:新生仔期の免疫異常により惹起される行動障害におけるプロスタグランジン E2 の関与. 第 22 臨床精神薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会(宇都宮, 2012.10 .20)
27. 新田淳美 , 石川雄大, 鷺見和之, 家垣典幸, 宇野恭介 , 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆 , 宮本嘉明:マウス側坐核での Shati の過剰発現によるメタンフェタミンの毒性の増強は代謝型グルタミン酸受容体 3 によって調節されている.フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10 .25)
28. 國澤和生, 坪井純子 , 小川麻子, 春日井悠司 , 鍋島俊隆 , 平松正行:拘束水浸ストレス負荷による記憶障害に対する betaine の改善作用 :GABA 作動性神経系の関わり. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10 .25)
29. 中島菜月, 木下沙織, 鍋島俊隆, 平松正行: 拘束水浸ストレスおよびホモシステイン投与により誘発される記憶障害に対するベタインの改善作用. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー(名古屋, 2012.10 .25)
30. 肥田裕丈 , 毛利彰宏 , 古屋敷智之, 鈴木守人 , 鶴飼麻由, 谷口将之, 山田清文, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆:神経発達期の PolyI:C 投与により惹起される行動障害におけるプロスタグランジン E2 の関与フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10 .25)
31. 松本友里恵, 丹羽美苗 , 毛利彰宏, 尾崎紀夫 , 野田幸裕 , 鍋島俊隆:生後発達期における母子分離・隔離飼育に対する脆弱性は成熟後の行動異常の原因となる. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10 .25)
32. 野田幸裕 , 谷口将之 , 肥田裕丈, 荻野由里恵, 鶴飼麻由, 山田清文, 尾崎紀夫, 田中光一, 毛利彰宏, 鍋島俊隆:マウスの発達過程におけるグリア型グルタミン酸トランスポーター阻害による神経毒性は成体期の認知機能を障害する. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10 .25)
33. 毛利彰宏, 野田幸裕, 松本友里恵, 丹羽美苗,

新田淳美, 山田清文, 古川照栄, 鍋島俊隆 :3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) による精神毒性発現における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の関与. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10.25)

34. 間宮隆吉, 大橋玄季, 鶴岡裕生, 宮村美嵩, 古関竹直, 毛利彰宏, 鍋島俊隆, 平松 正行: コレシストキニンシステムは心理的ストレス負荷誘発行動障害を緩解する. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋, 2012.10.25)
35. 鍋島俊隆: セロトニントランスポーターの代謝を標的としたうつ病の診断・治療薬開発. 中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会 (名古屋, 2012.12.4)
36. 鍋島俊隆: 新規うつ病バイオマーカーおよび創薬ターゲットとしてのユビキチン化セロトニントランスポーター. 2012 バイオビジネスアワード (大阪, 2013.2.15)

## H 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

- 1) 発明の名称: うつ病決定方法及び血中ユビキチン化セロトニントランスポーター分析キット  
出願番号: 特願 2011-228055  
追加出願: ノルアドレナリントランスポーターの発現・就職を指標とするうつ病診断キットの作成 (出願手続き中、2012年12月25日)  
出願人: 学校法人名城大学  
発明者: 鍋島俊隆, 毛利彰宏, 野田幸裕

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 乱用薬物への渴望再燃機構の解明とその治療薬開発に関する研究

分担研究者：山本経之

研究協力者：縄田陽子、山口 拓

（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）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有意に増加した（MAP探索行動）。cue呈示およびfootshock負荷によって誘発される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認識試験によって、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対照群と差がなく、認知障害は認められなかった。

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。

---

## 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ならびに知的機能障害の発現機序における  $CB_1$  受容体の役割に焦点を当て追究してきた<sup>1, 2)</sup>。前年度は、渴望再燃の治療ターゲットとしてエンドカンナビノイドの1つである anandamide の役割について、anandamide 分解酵素 (fatty acid amide hydrolase; FAAH) 阻害薬である URB597<sup>3)</sup> を用いて検討した。その結果、薬物関連刺激によって誘発される覚せい剤 methamphetamine (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った。また、URB597 はマウスを用いた新奇物体認識試験における認知機能において抑制的に働くことも明らかとした。一方、エンドカンナビノイドには anandamide とは別に 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) も同定されており、これらの2つのエンドカンナビノイドは、共に  $CB_1$  受容体に対する内因性リガンドとして、THC の薬理作用に類似した生理機能を示すことが知られていた。しかしながら、近年、anandamide と 2-AG の生理・薬理的機能は、必ずしも同一の作用を示すわけではなく、一部異なっている事が報告されている<sup>4)</sup>。そこで今年度は 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) に焦点を当て、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、2-AG 分解酵素 (Monoacylglycerol lipase; MAGL) 阻害薬 JZL184<sup>5)</sup> を用いて追究した。また、生殖機能 (繁殖能および精子細胞機能) 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。

## 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) 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。2-AG 分解酵素阻害薬である JZL184 (Chemical Company) は、etanol、cremofor 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。 $\Delta^9$ -THC は、etanol、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。

### 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回押しせば(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. 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. 新奇物体認識試験

新奇物体認識試験は、JZL184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.)。

## 7. 生殖機能試験

実験群は1)♂♀共Saline投与群、2)♂ $\Delta^9$ -THC一♀Salin投与群、3)♂saline-♀ $\Delta^9$ -THC投与群、4)♂♀共 $\Delta^9$ -THC投与群の4群に分けて行った。大麻活性成分 $\Delta^9$ -THC(3.2 mg/kg)は30日間反復皮下投与した。退薬10日目に雄1匹に対し雌2匹を小ケージに入れ交配させた。その後、朝夕に膣栓(vaginal plug)の有無を観察した。出産を確認後、産仔の観察と体重を計測した。退薬35日後、雄の精巣と副精巣尾部の精子の形態を観察した。

## 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。ただし、生殖機能の結果解析にはStudent *t*-testを用いた。

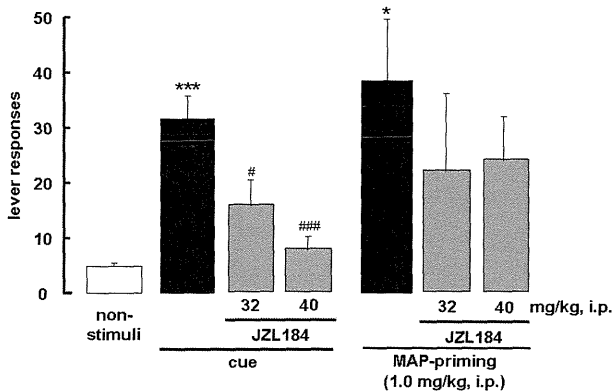
## C. 研究結果

### 1. MAP探索行動の発現におけるエンドカンナビノイド2-AGの関与

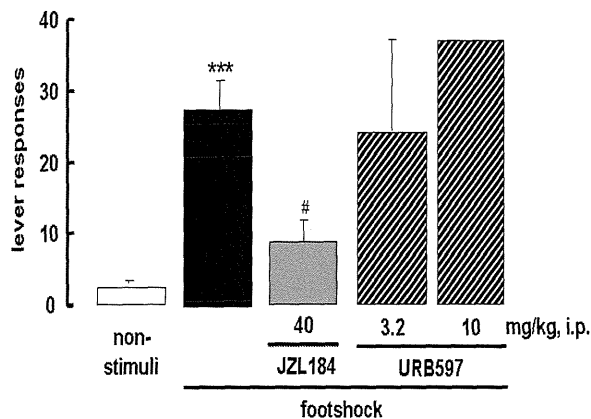
MAP自己投与後の退薬時にMAPを生理食塩液に置換するとそのレバー押し回数は徐々に低下し、5日目のレバー押し回数は $4.6 \pm 0.6$ 回となった。退薬6日目のcue呈示によりラットのレバー押し回数は $31.7 \pm 3.9$ 回と増加し、MAP探索行動が発現した(Fig. 1)。このMAP探索行動はMAP



退薬時における 2-AG 分解酵素阻害薬 JZL184 (40 mg/kg, i.p.) の急性投与 (薬物探索行動のテスト開始 60 分前) によりレバー押し回数は、 $7.8 \pm 2.5$  回となり有意に抑制された ( $p < 0.001$ , Fig. 1)。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 ( $38.5 \pm 11.2$  回; Fig. 1)。



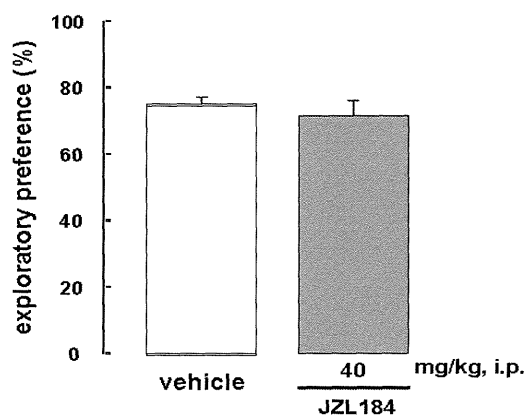
**Fig. 1** Effects of JZL184, a monoacylglycerol lipase inhibitor, on reinstatement of MAP-seeking behavior induced by MAP-priming injection or MAP-associated cues in MAP self-administered rats. JZL184 (32 or 40 mg/kg) was administered 1 hr before the reinstatement test. Data represent mean ( $\pm$  S.E.) of number of lever responses. \*\*  $p < 0.01$  compared with MAP associated cues alone



**Figure 2** Effects of endocannabinoid-metabolizing enzyme inhibitors, JZL184 and URB597 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 JZL184 (40 mg/kg, i.p.) or URB597 (3.2 and 10 mg/kg, i.p.) 1 hr before the start of the test of reinstatement. \*\*  $p < 0.01$  versus non-shock; #  $p < 0.05$  versus footshock alone.

しかしながら、MAP-priming 投与により誘発される MAP 探索行動は、JZL184 の 32 および 40 mg/kg の用量において抑制されなかった (Fig.1)。

さらに、footshock 負荷によって誘発される MAP 探索行動についても検討した。退薬 10 日目の footshock 負荷により、ラットのレバー押し回数は  $26.9 \pm 4.1$  回と有意に増加し、MAP 探索行動が発現した (Fig. 2)。このストレス誘発 MAP 探索行動は、JZL184 (40 mg/kg, i.p.) の単回投与によりレバー押し回数が  $8.8 \pm 3.0$  回となり、有意に抑制された ( $p < 0.05$ , Fig. 2) が、anandamide 分解酵素阻による有意な変化はなかった (Fig. 2)。



**Figure 3** Effect of JZL184 on recognition performance in mice. JZL184 was administered 120 min prior to the training trial. Data represent the mean  $\pm$  SEM.

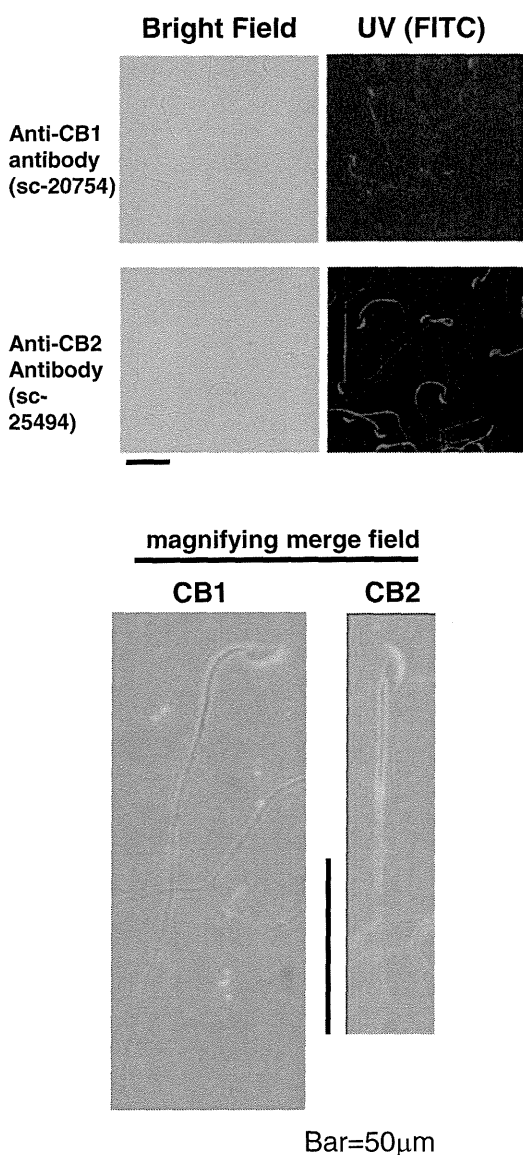
## 2. エンドカンナビノイド 2-AG の認知機能における関与

vehicle 群における test 試行での新奇物体へのアプローチ時間 ( $45.1 \pm 8.8$  秒) は、既存物体へのそれ ( $15.7 \pm 5.6$  秒) と比較して有意に長かった ( $p < 0.001$  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、 $75.8 \pm 2.3$  %であった (Fig. 3)。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 120 分前の JZL184 投与 (40 mg/kg, i.p.) によってもアプローチ率は  $71.8 \pm 4.2$  %となり、vehicle 群と比較して差はなかった (Fig. 3)。

### 3. 生殖機能に及ぼす大麻活性成分 $\Delta^9$ -THC の反復投与による作用

#### 1) 精子での $CB_1$ 受容体および $CB_2$ 受容体の発現について

$CB_1$  受容体および  $CB_2$  受容体に対するそれぞれの特異的抗体を用いて追究した。その結果、 $CB_2$  受容体は先体 (Acrosome)、中片部 (Mid piece)、尾部 (Tail) を含む鞭毛全体に発現し、 $CB_1$  受容体は先体と中片部に発現することが明らかになった (Fig.4)。



**Figure 4** Localization of  $CB_1$  and  $CB_2$  receptors on sperm. Signals indicated  $CB_1$  and  $CB_2$  on sperm.

2)  $\Delta^9$ -THC (3.2 mg/kg, s.c. ; 30 日間) の反復投与マウスの生殖機能に及ぼす  $\Delta^9$ -THC (3.2 .mg/kg, s.c. ; 30 日間) 反復投与の影響について調べた。その結果、以下の事が明らかになった。①  $\Delta^9$ -THC の反復投与を行った雌雄の mating によって、いずれの♀マウスも膣栓が観察され、妊娠期間に有意な差もなかった。また、② 産仔 (pup) 数や仔の成長に有意な差は見られなかった (Table 1)。しかし、③  $\Delta^9$ -THC 反復投与の♂と Saline 反復投与♀ (1 組) の産仔において、奇形を伴う死産が観察され (Fig.5)、④  $\Delta^9$ -THC 反復投与の♀ (2 組) が育仔期間に死亡した。

**Table 1** Body weight and pups of  $\Delta^9$ -THC-treated mice

	$\Delta^9$ -THC		No. of pup /mother (ave $\pm$ SD)	body weight (g; ave $\pm$ SD)		No. of death (up to Feb.9th)
	♂(No.)	♀(No.)		2 days	10 days	
I	- (5)	- (10)	12.3 $\pm$ 2.5	2.19 $\pm$ 0.28	5.36 $\pm$ 0.75	0
II	+ (5)	- (10)	12.4 $\pm$ 3.4 <sup>*1</sup>	1.91 $\pm$ 0.19	5.03 $\pm$ 0.93	7
III	- (5)	+ (10)	12.8 $\pm$ 4.9 <sup>*2</sup>	1.98 $\pm$ 0.23	4.91 $\pm$ 0.49	10
IV	+ (6)	+ (12)	12.3 $\pm$ 2.2 <sup>*3</sup>	1.86 $\pm$ 0.12	5.43 $\pm$ 0.82	17

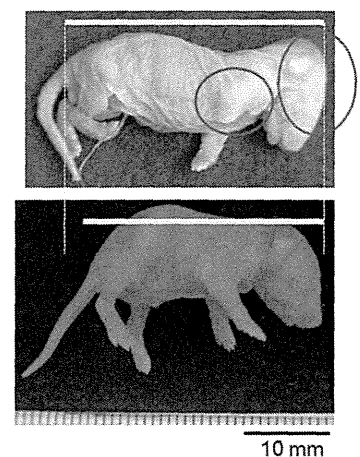
※1 deformity, Stillbirth (N=5)

※2 mother-death (N=2)

※2 pup-killing/eating (N=11)

No.5-2-②;  
♂:THC (+) /♀:THC (-)

♂:THC (-) /♀:THC (-)



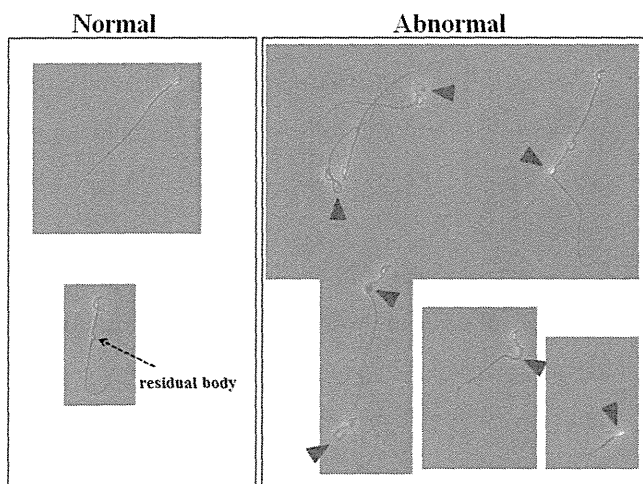
**Figure 5** Morphological defect on pups from THC-treated mice.  $\Delta^9$ -THC (3.2mg/kg, s.c.) administrated once per day for 30 days. Red circles indicated defective positions.

また、精巣 (Testis)、精巣上部尾部 (cauda epididymidis)、精嚢腺 (seminal vesicle) には異常は観察されなかったが (Table 2)、⑤正常な成熟精子では残余小体 (residual body) が離脱しているが、 $\Delta^9$ -THC 反復投与のみの精子は残余小体が付着した未成熟なものが多かった。また精子の中には、鞭毛が中片部を境にほぼ直角に屈曲しているものや三日月型の精子の頭部が円形に変形し形態異常を有するものが数多く観察された (Table 3, Fig. 6)。

**Table 2 Weights of organs**

	Body	Testis	Epididymis	Seminal Vesicle
Vehicle	38.0±3.6	0.15±0.015	0.02±0.000	0.40±0.036
THC	36.7±1.5	0.14±0.020	0.02±0.005	0.40±0.092

$\Delta^9$ -THC : 3.2 kg/mg, s.c. for 30 days: withdrawal 3-4 weeks: All values (g) are means ±S.D.



**Figure 6 Abnormal sperm from  $\Delta^9$ -THC-treated mouse.** Normal mature sperm and immature sperm with residual body were shown in left panel. Abnormal sperm were shown in right panel. Red arrowheads indicated defective position (flagellum or head in sperm).

**Table 3 Sperm**

	Number	Abnormal (%)	Immature (%) (with residual body)
Vehicle	194±82.1	10±6.4	12±10.3
THC	178±46.2	21±5.8*	32±12.6*

$\Delta^9$ -THC : 3.2 kg/mg, s.c. for 30 days: withdrawal 3-4 weeks: All values (g) are means ±S.D.

\*p<0.05 vs. vehicle-treated group

## D. 考察

エンドカンナビノイドの1つである2-AGに着目して、MAP探索行動の発現機序ならびに2-AG分解酵素阻害薬の薬物依存症治療薬としての可能性を探索した。

2-AGはanandamideと同様の生理学的役割を演じている事が示唆されているが、両者の作用は必ずしも同一ではない。Busquets-Garciaらは、anandamideと2-AGのそれぞれの分解酵素阻害薬であるURB597とJZL184を用いて、抗不安作用と鎮痛作用は共通に発現するが、鎮痛作用に関してはJZL184がより低用量にて発現することから、2-AGを介した疼痛制御機構が生理的であると示唆している<sup>4)</sup>。

2-AG分解酵素阻害薬JZL184は、anandamide分解酵素阻害薬URB597と同様にcue呈示によるMAP探索行動に対し著明な抑制作用を示したが、MAP-priming投与によるMAP探索行動には両薬物は抑制作用を示さなかった。しかしながら、footshock負荷によるMAP探索行動に対してJZL184は抑制作用を示したが、URB597では作用がなかった。このようにストレス負荷によるMAP探索行動に対して、2-AG及びanandamide間に作用態度の相違が示唆された。これまで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を、リドカインを用いた我々の実験から明らかにしてきた<sup>1)</sup>。その結果、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<sup>1)</sup>。さらに我々は、ストレス負荷によるMAP探索行動の発現には、扁桃体のコルチコトロピン遊離因子(CRF)の関与を指摘した<sup>6)</sup>。この扁桃体におけるanandamideや2-AGの分布の相違は未だ報告されていないので明言できないが、少なくとも扁桃体以外に責任部位がある可能性が指摘される。

一方、新奇物体認識試験において、URB597は

認知機能障害を誘発したが、JZL184 は認知機能に影響を与えなかった。Busquets-Garcia らも anandamide および 2-AG は記憶の制御機構において全く異なった反応を示すことを指摘している<sup>4)</sup>。URB597による anandamide の増加を介した記憶障害には、 $\Delta^9$ -THC による CB<sub>1</sub> 受容体を活性化した場合と同様の神経伝達あるいは細胞内情報伝達を誘引すること<sup>7,8)</sup>が報告されており、2-AG ではこれらの経路を介さないことが明らかにされている<sup>4)</sup>。したがって、JZL184 は、2-AG の増加を介した CB<sub>1</sub> 受容体の活性化に関連する薬理作用を期待した医薬品開発において、記憶障害などの有害作用のない有用な化合物候補となることが考えられた。

ヒトにおいて大麻喫煙は精子形成に異常を与え、精子の成熟と運動性にも重大な影響を与えることが報告されている<sup>9)</sup>。近年、CB<sub>1</sub> 受容体および CB<sub>2</sub> 受容体が同定され、リガンドを用いた動物での研究が進められ、ラットやマウスを用いた動物実験で $\Delta^9$ -THC の投与が精子形成、特に精子の核形成に異常を与えることが示唆されている<sup>10,11)</sup>。本実験において、まずマウス精子に CB<sub>1</sub> および CB<sub>2</sub> 受容体が発現していることを明らかにし、 $\Delta^9$ -THC を 30 日間反復投与後の雄マウスの精子形態の異常が多数観察された。このことから $\Delta^9$ -THC は、直接的、間接的に精子形成に影響を与えることが明らかになり、退薬後の回復が期待できるのか否か、また産仔の行動障害等の発現の有無等の追究に興味を持たれる。また、雄の $\Delta^9$ -THC 投与群の産仔に発生異常が見られたことから $\Delta^9$ -THC によるエピゲノミックな異常や遺伝子変異の可能性についての追究も必須である。

## E. 結論

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、特に 2-AG の増加

によって抑制されることが明らかとなった。2-AG 分解酵素阻害薬そのものに認知機能障害を引き起こすことはないことから、2-AG 分解酵素の阻害作用を有する薬物は渴望を抑制する覚せい剤依存症の治療薬候補として期待される。

また、大麻活性成分 $\Delta^9$ -THC は、雄において精子形成障害、また雌においては育仔行為に障害を与えることが示唆された。

## 【謝 辞】

生殖機能（繁殖能および精子細胞機能）の技術指導においてご協力を頂きました田中宏光 博士（長崎国際大学薬学部分子生物学研究室・准教授）に感謝致します。

## 【参考文献】

- 1) Hiranita T, Sakimura K, Nawata Y, Anggadiredja K, Yamamoto T. (2006) The possibility of nicotinic activators as craving killers in methamphetamine dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8523-8527.
- 2) Nawata, Y, Kitaichi K. Yamamoto T. (2012) Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior induced by footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 101:297-302.
- 3) Fegley D, Gaetani S, Duranti A, et al. (2005) 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.
- 4) Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, et al. (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biol Psychiatry* 70:479-86.
- 5) Long JZ, Li W, Booker L, et al. (2009) Selective