

blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5:37-44.

6) Nawata, Y, Hiranita T, Yamamoto T. (2010) A cannabinoid CB1 receptor antagonist ameliorates impairment of recognition memory on withdrawal from MDMA (Ecstasy). *Neuropsychopharmacology* 35:515-520.

7) Kim J, Alger BE. (2010) Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13:592-600.

8) Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, et al. (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.

9) Battista N, Rapino C, Di Tommaso M, et al. (2008) Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 286:S17-23.

10) Chioccarelli T, Cacciola G, Altucci L, et al. (2010) Cannabinoid Receptor 1 Influences Chromatin Remodeling in Mouse Spermatids by Affecting Content of Transition Protein 2 mRNA and Histone Displacement. *Endocrinology* 151:5017-5029.

11) Grimaldia P, Orlandob P, Siennaa DA, et al. (2009) The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11131-11136.

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. (2012) Increases of CRF in the amygdala are responsible for reinstatement of methamphetamine-seeking behavior

induced by footshock. *Pharmacol Biochem Behav* 101:297-302.

2) 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*. 31: 97-99, 2012

3) 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*. 231: 73-75, 2012

2. 学会発表

1) 縄田陽子, 山口 拓, 山本経之: 合成麻薬 MDMA 退薬時における薬物探索行動の再燃と認知機能障害におけるカンナビノイド CB1 受容体の関与 平成 24 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3. その他

なし

薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析

研究分担者：鈴木 勉

研究協力者：森 友久、芝崎真裕

（星薬科大学薬品毒性学教室）

[研究要旨]

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、methamphetamine (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て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 の依存に関わ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 処置により内因性カンナビノイド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消失が認められた。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。

A. 研究目的

Methamphetamine (METH) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序を解明するには至っていないのが現状である。

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变化が誘導されることが知られている^{1,2)}。現在までに、神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが知られている。一昨年度の報告において、METH 誘発逆耐性を獲得した動物の側坐核では CCR2 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、CCR2 が METH の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。近年、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドーパミン関連行動が増強されることも報告され、一方で、薬物依存症患者における細菌感染抵抗性の低下が報告されている³⁾。また、当教室では lipopolysaccharide (LPS) が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告しており、さらに昨年度の報告において LPS を処置することにより METH 誘発報酬効果が抑制されることを報告した。このように、薬物依存症に中枢神経系における免疫系が深く関与している可能性が考えられる。しかしながら、その詳細な検討はほとんどなされていないのが現状である⁴⁾。また昨年度の報告では、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制にカンナビノイド 2

受容体 (CB2R) が関与することを明らかにした。したがって、LPS による作用に内因性カンナビノイド情報伝達系が関与する可能性が考えられるが、これらの機序については未だ明らかとなっていないのが現状である。

現在までに CB2R を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている⁵⁾。一方、METH 誘発逆耐性および報酬効果に MMP2 が関与することが報告されている⁶⁾。したがって、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用に CB2R-TIMP1 経路が関与する可能性が考えられる。そこで本研究では、薬物依存症における神経免疫系のメカニズム解明を目的として、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用機序について CB2R-TIMP1 系を中心に検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウスを使用した。マウスは恒温室 (22±1°C) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取とした。

2. 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、自発運動測定装置 (小原医科産業: AMB-M1 型アンビュロメーター) を使用し、tilting cage 法に従って行った。この方法はマウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、マウスの動きに伴うケージの傾きをマイクロスイッチを介してカウントし、これを自発運動量として測定する方法である。この装置にパーソナルコンピュータを接続し、測定値を連続的に入力させた。測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適応させるための時間とし、その後 METH (2

mg/kg, s.c.)を投与して自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間にわたり連続的に測定した。また、LPS の影響については、LPS (1 μ g/kg, i.p) を METH 処置の 30 分前に前処置した。

3. 逆耐性形成モデルの作成

LPS の METH 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成への影響について検討する目的で、マウスに 96 時間毎に上述の自発運動量の測定を計 5 回行い評価した。

4. 脾臓細胞の培養

マウスより脾臓を摘出し、破碎後 3cm dish に播種し、DMEM にて培養した。培養 1 時間後、LPS (1 μ g/dish) を 1 時間曝露し、その後 DMEM に培地交換し、さらに 1 時間後に spleen cells-conditioned medium として、培養上清を回収し実験に使用した。

5. Western blot 法

METH 誘発報酬効果獲得マウスあるいは対照群のマウスより全脳を摘出し、脳アトラスに従い側坐核を含む領域を分画した。組織を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5mM EDTA, 10 mM NaF, 0.5 % Triton X-100 with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)) と共に、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer (2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 % glycerol with 0.2 M dithiothreitol) を加え、SDS-PAGE 法により、7.5% のポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20 μ g の蛋白量を注入し分離した。分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを 5 % nonfat dried milk を含む phosphate-buffered saline (PBS) 中でブロッキングし、一次抗体 (anti-phospho-ERK1/2 あるいは anti-phospho-p38) と 1 時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に 1 時間反応させた。反応後、蛍光法に従い、蛍光発色性の基質を用いて目的とするタン

パク質を発色させた。

6. RT-PCR 法

薬物を処置したマウスの側坐核により、SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA) を用いて total RNA を抽出した。First standard cDNA 作成のために、抽出した total RNA を oligo (dt)12-18 および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水と共に 70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションした。その後、氷上で 2 分間急冷し、このサンプルに RT buffer 10mL、0.1 M DTT 10mL、25 mM MgCl₂ 10mL、10 mM dNTP mix 1mL (以上全て Invitrogen, CA, USA) を加え、70 $^{\circ}$ C で 5 分間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、逆転写酵素である reverse transcriptase II (RT II; Invitrogen, CA, USA) 1mL を加え、42 $^{\circ}$ C で 45 分間および 70 $^{\circ}$ C で 5 分間のインキュベーションをそれぞれ行った。PCR は TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 および陽性対照として GAPDH の DNA 配列に基づいた primer を用いて増幅した。生成した PCR 産物の分析には、アガロースゲル電気泳動法を用いた。泳動終了後、ゲルを ethidium bromide 溶液にて反応させ、Fluor Chem 3 system で読み取り、GAPDH を陽性対照として、それぞれのバンドを補正した後に解析を行った。

7. 統計解析

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) で示した。有意性の評価には一元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test を用いて評価した。

C. 研究結果

1. METH 誘発逆耐性形成に対する LPS の効果

METH 誘発自発運動促進作用および逆耐性形成に対する LPS の効果について検討した。LPS を前処置することにより METH 誘発自発

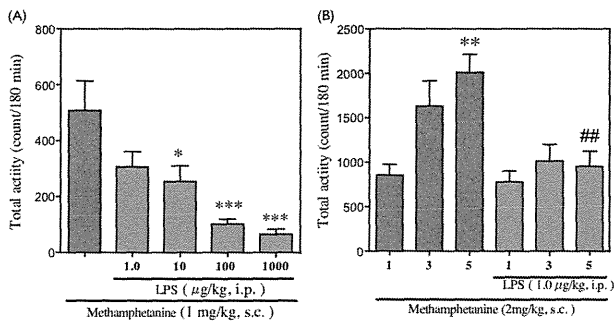


Fig. 1 Effect of LPS (1 µg/kg, i.p.) on the hyperlocomotion (A) and development of sensitization (B) by METH (1-2 mg/kg, s.c.) in mice.

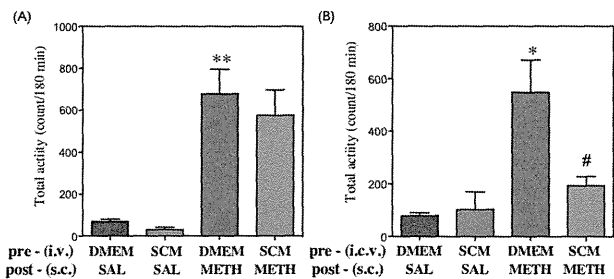


Fig. 2 Effects of spleen cells-conditioned medium (SCM, i.v. (A) or i.c.v. (B)) stimulated by LPS on the METH (2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion.

運動促進作用は用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 1A, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n = 7-8$).そこで METH 誘発逆耐性について検討したところ、対照群では METH の投与回数に比例した自発運動量の増加が認められたのに対し、LPS を前処置することにより、この増加は有意に抑制された (Fig. 1B, ** $p < 0.01$ vs. the first administration. ## $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n = 7-8$).

2. METH 誘発自発運動促進作用に対する LPS を曝露した培養脾臓細胞培養上清の効果

そこで次に、培養脾臓細胞を用いて METH 誘発自発運動促進作用に対する免疫細胞の影響に

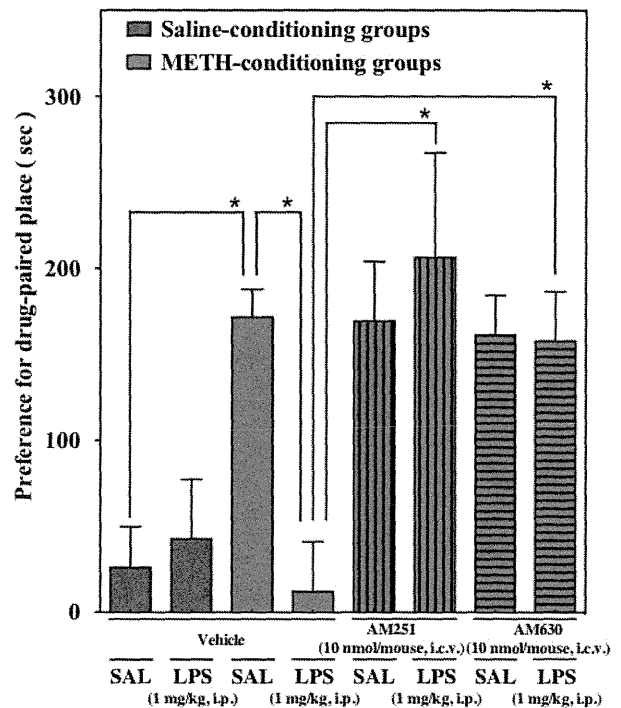


Fig. 3 Effect of LPS (1mg/kg, i.p.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects with or without AM251 (10 nmol/mouse, i.c.v.) and AM630 (10 nmol/mouse, i.c.v.) in mice.

ついて検討した。LPS あるいは溶媒を曝露した培養脾臓細胞の培養上清を静脈内投与したところ METH 誘発自発運動促進作用に影響は認められなかったが、脳室内投与した動物では METH 誘発自発運動促進作用は有意に抑制された (Fig. 2A and B, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline administration. # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n = 7-8$).したがって、LPS により活性化された末梢の免疫細胞が中枢に移行し作用を誘導している可能性が示唆された。

3. LPS による METH 誘発報酬効果の抑制作用に対する AM251 および AM630 の影響

LPS による METH 誘発報酬効果への抑制作用に対する CB1R および CB2R の関与について検討するために、CB1R の拮抗薬である AM251

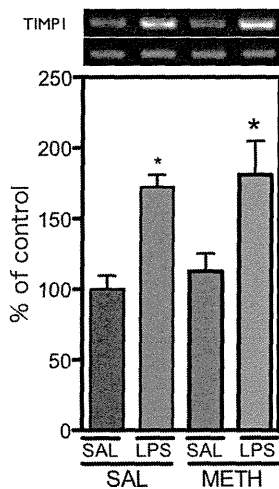


Fig. 4 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1mg/kg, i.p.) and/or METH (1mg/kg, s.c.).

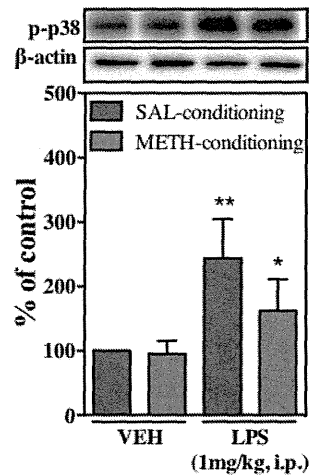


Fig. 6 Changes in protein levels of phospho-p38 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

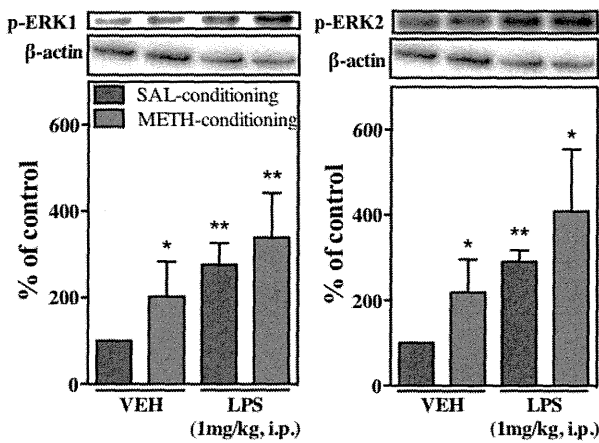


Fig. 5 Changes in protein levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

および CB2R の拮抗薬である AM630 を LPS 処置 10 分前に前処置し、その影響について検討した。その結果、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制は、AM251 および AM630 を前処置することによりいずれにおいても完全に消失した

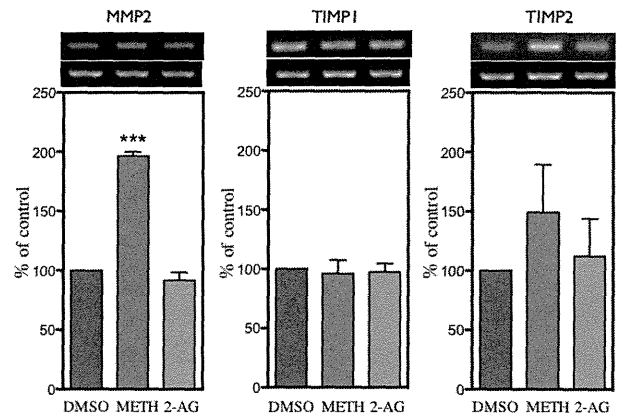


Fig. 7 Changes in mRNA levels of the matrix metalloproteinases 2 (MMP2), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in purified cortical astrocytes after treatment with METH (1 μ M for 24 hr) or 2-AG (0.1 μ M for 24 hr).

(Fig. 3, * $p < 0.05$ vs. each, The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n = 7-8$).

4. LPS による側坐核領域における the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) mRNA 発現量の変化

LPS 処置による METH 誘発報酬効果抑制作

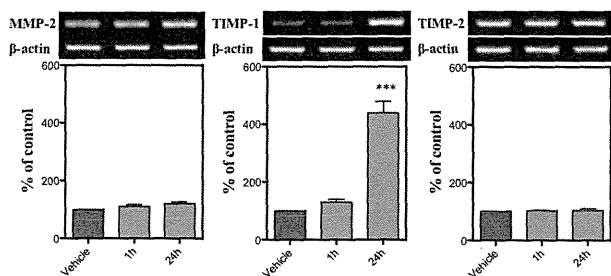


Fig. 8 Changes in mRNA levels of the matrix metalloproteinases 2 (MMP2), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in the limbic forebrain of mice after treatment with 2-AG (30 nmol/mouse, i.c.v.).

用について検討する目的で、LPS あるいは溶媒を処置した METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核領域における TIMP1 mRNA の発現変化について検討した。その結果、対照群および METH のみを処置した動物では TIMP1 mRNA に変化は認められないが、LPS を処置した動物において TIMP1 mRNA の有意な増加が認められた (Fig. 4, * $p < 0.05$ vs. saline administration, The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

5. LPS による側坐核領域におけるリン酸化 ERK1/2 および p38 蛋白発現量の変化

そこで次に TIMP1 の発現を調節するリン酸化 ERK1/2 および p38 の変化について検討したところ、LPS および METH の処置により ERK1/2 のリン酸化の有意な増加が認められた (Fig. 5, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。一方、p38 については LPS の処置によってのみ有意なリン酸化の増加が認められた (Fig. 6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

6. METH および 2-arachidonoylglycerol (2-AG)

連続曝露による初代培養アストロサイトおよび側坐核領域における MMP2, TIMP1 ならびに TIMP2 の変化

現在までに、METH 誘発報酬効果においてアストロサイトが関与することを報告している。そこで、初代培養アストロサイトを用いて、METH および内因性カンナビノイドである 2-AG の連続曝露による MMP2, TIMP1 および TIMP2 の変化について検討した。その結果、METH ならびに 2-AG の連続曝露において、TIMP1 および TIMP2 に有意な変化は認められなかったが、MMP2 は METH の連続曝露において有意な増加が認められた (Fig. 7, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。そこで、マウスに 2-AG (30 nmol/mouse, i.c.v.) を処置したときの MMP2, TIMP1 および TIMP2 の変化について検討した。その結果、MMP2 および TIMP2 に変化は全く認められなかったが、TIMP1 においては 2-AG 処置 24 時間後に有意な増加が認められた (Fig. 8, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=3$)。

D. 考察

本研究結果より、LPS 処置により METH 誘発逆耐性形成の抑制が認められた。当教室において、lipopolysaccharide (LPS) が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告しており⁴⁾、さらに昨年度の報告において LPS を処置することにより METH 誘発報酬効果が抑制されることを報告した。また昨年度および本年度の報告では、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制にカンナビノイド受容体である CB1R および CB2R が関与することが明らかとなった。CB2R は特に免疫細胞に多く存在することが報告されており⁵⁾、LPS によりミクログリアの増加および活性化が認めら

れることから、内因性カンナビノイドを介した反応が関与する可能性が示唆される。事実、CB2R 欠損動物では cocaine の精神依存が増強されることが報告されている⁷⁾。一方、2-AG の合成酵素である DAGL α はアストロサイトには殆ど存在せず、ミクログリアに存在することを見いだしている(データ未発表)。したがって、LPS により活性化されたミクログリアから、2-AG の遊離が引き起こされ、これが METH 誘発報酬効果の抑制を引き起こした可能性が考えられる。

現在までに、METH 誘発逆耐性および報酬効果に MMP2 が関与することが報告されている⁶⁾。一方、CB2R を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている⁵⁾。MMP は神経細胞間などの間隙を埋める足場蛋白である細胞外マトリックスを調節することが知られており、初代培養アストロサイトを用いた検討より、METH を連続曝露することにより MMP2 mRNA の有意な増加が認められた。また当教室の結果より、METH 誘発報酬効果の形成にアストロサイトが関与することを報告している⁸⁾。したがって、METH によるアストロサイトの活性化に伴った MMP2 の増加が METH 誘発報酬効果形成に重要な役割を果たすと考えられる。一方、LPS 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められたことから、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用は TIMP1 が関与していると考えられる。また内因性カンナビノイドである 2-AG を処置することにより TIMP1 mRNA の著明な増加が認められることから、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用に CB2R-TIMP1 経路が関与する可能性が考えられる。

E. 結論

以上本研究の結果より、METH による依存形成に対し、LPS による免疫系の活性化が CB2R

-TIMP1 を介し、抑制的に調整する可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Robinson, T.E. and Berridge, K.C.: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 18, 247-291 (1993).
- 2) Vanderschuren, L.J. and Kalivas, P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 151, 99-120 (2000).
- 3) Purohit, V., Rapaka, R., and Shurtleff, D.: Drugs of abuse, dopamine, and HIV-associated neurocognitive disorders/HIV-associated dementia. *Mol. Neurobiol.*, 44, 102-110 (2011).
- 4) Okutomi, T., Suzuki, T.: Immunomodulator as medicine for morphine and cocaine dependence. Especially effect of LPS. *Yakugaku Zasshi.*, 115, 42-51 (1995).
- 5) Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., Hinz, B.: Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem. Pharmacol.*, 79, 955-966 (2010)
- 6) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y., Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice. *J. Neurochem.*, 100, 1579-1588 (2007)
- 7) Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., Gardner, E.L.: Brain cannabinoid CB \square receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.*, 14, 1160-1166 (2011).
- 8) Narita M, Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Shindo K, Nakamura A, Kuzumaki N, Nagumo Y, Suzuki T.: Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. 31, 2476-2488 (2006)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Torigoe, K., Mori, T., Shibasaki, M., Yoshizawa, K., Narita, M., Suzuki, T.: Olanzapine Suppresses The Rewarding And Discriminative Stimulus Effects Induced By Morphine. *Synapse*, 66(2), 174-179 2012
2. Mori, T., Yoshizawa, K., Nomura, M., Isotani, K., Torigoe, K., Tsukiyama, Y., Narita, M., Suzuki, T.: Sigma-1 Receptor Function Is Critical For Both The Discriminative Stimulus And Aversive Effects Of The Kappa-Opioid Receptor Agonist U-50488h. *Addict Biol.*, 17(4), 717-724 2012
3. Shibasaki, M., Kurokawa, K., Mizuno, K., Suzuki, T., Ohkuma, S., Actin Dynamics In Development Of Behavioral Sensitization After Withdrawal From Long-Term Ethanol Administration To Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 36(8), 1385-1396 2012
4. Mori, T., Shimizu, N., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Involvement Of The Arachidonic Acid Cascade In The Hypersusceptibility To Pentylentetrazole-Induced Seizure During Diazepam Withdrawal. *Biol. Pharm. Bull.*, 35(12), 2243-2246 2012
5. Mori, T., Shibasaki, M., Abe, M., Udagawa, Y., Suzuki, T.: Effects Of Dronabinol On Morphine-Induced Dopamine-Related Behavioral Effects In Animals. *Synapse*, 66(11): 931-937 2012
6. Ise, Y., Mori, T., Katayama, S., Nagase, H., Suzuki, T.: Rewarding Effects Of Ethanol Combined With Low Doses Of Morphine Through Dopamine D1 Receptors. *J Nippon Med Sch.* (In Press)
7. Yoshizawa, K., Narita, M., Mori, T., Isotani, K., Suzuki, T.: Role Of Dopamine D2 And D3 Receptors In Mediating The U-50,488h Discriminative Cue: Comparison With Methamphetamine And Cocaine. *Addict Biol.* 17, 949- 955 2012
8. Kuzumaki, N., Suzuki, A., Narita, M., Hosoya, T., Nagasawa, M., Imai, S., Yamamizu, K., Morita, H., Suzuki, T., Okada, Y., Hirota J. O., Yamashita J. K., Okano H., Narita, M.: Multiple Analyses Of G-Protein Coupled Receptor (Gpcr) Expression In The Development Of Gefitinib-Resistance In Transforming Non-Small-Cell Lung Cancer. *Plos One* 7(10), E44368 2012
9. Mori, T., Yoshizawa, K., Masahiro, S., Suzuki, T.: Discriminative Stimulus Effects Of Hallucinogenic Drugs: A Possible Relation To Reinforcing And Aversive Effects. *J Pharmacol. Sci.*, 120(2), 70-76 2012
10. Mori, T., Rahmadi, M., Yoshizawa, K., Shibasaki, M., Ito, T., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Inhibitory Effects Of Sa4053 On The Rewarding Effects Of Abused Drugs. *Addiction Biology* (In Press)
11. Shibasaki, M., Watanabe, K., Takeda, K., Itoh, T., Tsuyuki, T., Narita, M., Mori, T., Suzuki, T.: Effect of chronic ethanol treatment on m-opioid receptor function, interacting proteins and morphine-induced place preference. *Psychopharmacology* (in press)
12. 森友久, 鈴木勉: A. オピオイドとは何か
1. オピオイドについて. *ペインクリニック* 33, s231-s238 2012
13. 芝崎真裕: コカインは持続的な興奮性伝達亢進を起こして精神依存を形成する *ファルマシア* 48(7), 685 2012
14. 鈴木勉: オピオイド鎮痛薬のやくりがく No.6 *Pharma Tribune* 4 (2) 2012
15. 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉: オピオイドと GABA 作動性ニューロン. *Clinical Neuroscience.* 30, 12 2012

2. 学会発表

国際学会

1. Shibasaki, M., Tsuyuki, T., Takeda, K., Mori, T., Suzuki, T.: Effects of chronic treatment with alcohol on the morphine-induced rewarding effects. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (Califolnia,2012.6.9-14)
2. Ogawa, Y., Mori, T., Hokazono, M., Uzawa, N., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Evaluation of the bupropion-induced sensitization to the locomotor activity in mice. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (Califolnia,2012.6.9-14)
3. Masukawa, D., Shibasaki, M., Mori, T.,

Ishii, K., Saitoh, Y., Yamagishi, Y., Suzuki, T.: Effect of benzodiazepines on morphine-induced hyperlocomotion accompanied by the changes of KCC2 in the nucleus accumbens. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (California,2012.6.9-14)

4. Masukawa, D., Shibasaki, M., Mori, T., Ishii, K., Yamagishi, Y., Suzuki, T.: Influence Of Chronic Treatment Of Zolpidem On Activation Of Dopaminergic System In Nuculeus Accumbence. 16th Congress of International Society for Biomedical research on Alcoholism (札幌,2012.9.12)

5. Tsuyuki, T., Shibasaki, M., Takeda, K., Mori, T., Suzuki, T.: Chronic Ethanol Treatment Alters Morphine-Induced Rewarding Effect Through Mor Receptor- Mediated Functional Changes. 16th Congress of International Society for Biomedical research on Alcoholism (札幌,2012.9.12)

国内学会

1. 上野碧美, 森友久, 吉澤一巳, 西脇瑞紀, 芝崎真裕, 成田年, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 465 報) k オピオイド受容体作動薬 U-50, 488H の弁別刺激効果における dopamine D2 受容体 signal cascade の影響. 第 126 回 関東薬理学会 (東京,2012.7.14)

2. Mahardian Rahmadi, Tomohisa Mori, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki: Involvement of sigma 1 receptor on the effects of SSRI on methamphetamine-induced behavioral sensitization and rewarding effects in mice. 第 126 回 関東薬理学会 (東京,2012.7.14)

3. 森友久, 芝崎真裕, 成田年, 鈴木勉: モルヒネ依存と機能性タンパク. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会 第 42 回日本神経精神薬理学会 (栃木,2012.10.18-20)

4. 真柄詩織, 森友久, Teruo Hayashi, Tsung-Ping Su, 鈴木勉: ミトコンドリアにおける sigma 1 受容体による細胞保護機構の解明 Cytoprotective effect of sigma 1 receptor chaperone at mitochondria. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会 第 42 回日本神経精神薬理学会 (栃木,2012.10.18-20)

5. 露木智久, 芝崎真裕, 安藤光史, 男澤杏美, 森友久, 鈴木勉: アルコール慢性処置のモルヒネ誘発報酬効果における GSK3 β signal cascade の影響. 第 127 回日本薬理学会関東部会 (東京,2012.10.20)

6. 佐伯朋哉, 森友久, 芝崎真裕, 阿部美奈子, 宇田川雄哉, 鈴木勉: カンナビノイド受容体作動薬のモルヒネ誘発精神依存および側坐核におけるドパミン遊離に及ぼす影響. 第 23 回マイクロダイアリシス研究会 (東京,2012.12.10)

7. 増川太輝, 芝崎真裕, 森友久, 石井一典, 山岸ゆい, 鈴木勉: Zolpidem の慢性処置による morphine 誘発報酬効果への影響. 第 86 回日本薬理学会年会 (福島,2013.3.21-23)

8. Noriyuki Iwata, Tomohisa Mori, Asami Murata, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki: Differential antagonizing effects of clozapine and haloperidol on the methamphetamine- and morphine-induced behavioral changes. 第 86 回日本薬理学会年会 (福島,2013.3.21-23)

9. Kouji Andou, Masahiro Shibasaki, Tomohisa Tsuyuki, Ami Otokozaawa, Tomohisa Mori, Tsutomu Suzuki: Chronic treatment of ethanol enhanced morphine-induced hyperlocomotion. 第 86 回日本薬理学会年会 (福島,2013.3.21-23)

10. Daisuke Aikawa, Tomohisa Mori, Tomoya Saeki, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki: Genetic background reflecting the conversion from discriminative stimulus to rewarding effects of psychostimulants in rats. 第 86 回日本薬理学会年会 (福島,2013.3.21-23)

11. 今井敏雄, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉: 薬物依存の研究 (第 473 報): Methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する lipopolysaccharides の影響. 日本薬学会第 133 年会 (横浜,2013.3.27-30)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3.その他
なし

乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検索

分担研究者：新田淳美¹

研究協力者：宇野恭介¹、石川雄大¹、齊鹿絵里子¹、高山華南子¹、家垣典幸¹、日比陽子²、
村松慎一³、鍋島俊隆⁴、宮本嘉明¹

（¹富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物治療学研究室、²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座・医学部附属病院薬剤部、³自治医科大学神経内科学講座、⁴名城大学薬学部地域医療薬局学講座）

【研究要旨】

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 という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。

Shati/nat8l については、昨年度、側坐核における本分子の過剰発現によって、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である N-acetylaspartylglutamate (NAAG) に生合成されることが明らかとなってきた。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、側坐核においてのみ 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方のアミノ酸が増加していた。In vivo マイクロダイアリス法を用いた側坐核におけるドパミン遊離量の測定では、shati/nat8l 過剰発現マウスにおいてドパミン基礎遊離量の減少およびメタンフェタミン誘発ドパミン遊離上昇の抑制が観察された。また、この shati/nat8l 過剰発現による抑制効果は、mGluR2/3 アンタゴニストである LY341495 の前処置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。よって、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ある。

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。

A. 研究目的

現在、我が国は第3次薬物乱用期にあり、薬物事犯は社会的問題のひとつとなっている。薬物事犯の大半は、覚せい剤であるメタンフェタミン (methamphetamine: MAP) またはその誘導体の乱用によるものであり、特に最近では再犯率の増加が問題となってきている。このような社会的背景から、乱用薬物による薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、その予防法や治療法の確立が求められている。しかしながら、各種乱用薬物による共通の薬物依存メカニズムとして、脳内ドパミン神経系の神経機能変化が重要な役割を果たしていることが明らかにされているものの、依存形成メカニズムは非常に複雑で、数多くの分子が関与している。そこで、本研究では、薬物依存形成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、薬物依存に対する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、MAPを連続投与したマウスの側坐核 [nucleus accumbens: NA (腹側被蓋野からのドパミン神経投射部位)] において、PCR select cDNA サブトラクション法による薬物依存関連遺伝子の同定を試みた。その結果、shati/nat81、Transmembrin protein 168 (Tmem168) およびPiccoloの3つの候補遺伝子を見いだした。そのうち shati/nat81 については、覚せい剤による薬物依存形成に対して抑制的に働く可能性を示唆した^{3, 7, 8)}。さらに、昨年度までの本研究において、NAもしくは背側線条体 [dorsal striatum: dS (黒質からのドパミン神経投射部位)] においてのみ shati/nat81 を過剰発現させたマウス (NA-Shati もしくは dS-Shati マウス) を作製し、MAP への反応性を検討した結果、NA で shati/nat81 を増加させた場合は、メタンフェタミンによる薬物依存形成を抑制することを明らかにした。また、最近、

shati/nat81 はアスパラギン酸から *N*-アセチルアスパラギン酸 (*N*-acetylaspartate: NAA) への変換酵素であることが報告された^{1, 5)}。Shati/nat81 により合成された NAA は、更に *N*-アセチルアスパラギン酸・グルタミン酸 (*N*-acetylaspartylglutamate: NAAG) へと変換され細胞外へと放出されることにより、グループ II 代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGluR3) に対する作動効果を有することも報告されている (Fig. 1)^{2, 6)}。

そこで、本年度は、引き続き、薬物依存における shati/nat81 の詳細なメカニズムを明らかにするために NA-Shati マウスを用いて、NAA および NAAG のドパミン遊離への影響について検討を行うとともに、dS-Shati マウスとのメタンフェタミンへの応答性への違いのメカニズムについても検討した。

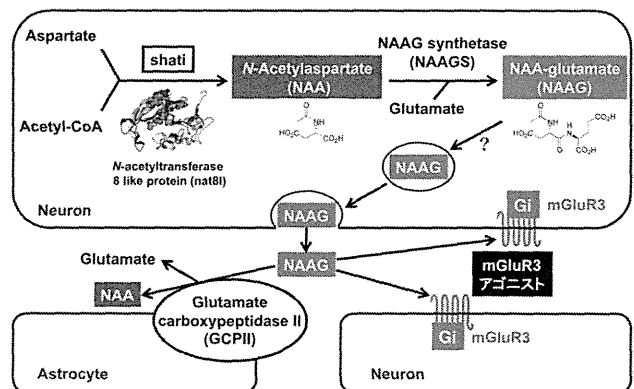


Fig. 1. Schematic presentation of shati / nat81. Shati/nat81 catalyzes the *N*-acetylation of aspartate, forming *N*-acetylaspartate (NAA). The condensation of NAA and glutamate is catalyzed by *N*-acetylaspartylglutamate synthetase (NAAGS). Released NAAG is degraded by glutamate carboxypeptidase II (GCP II) and bind to metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3) on synaptic membranes.

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、8週齢の C57BL / 6J 雄性マウス (日本 SLC、静岡) を使用した。本実験における動物実験は富山大学動物実験指針、文部科学省動物実験指針および the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan,

2006 に準じ、富山大学動物実験委員会で承認された上で行った。マウスは、午前8時から午後8時を明期とする部屋で飼育し、行動実験中以外は、餌および水は自由摂取とした。

2. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製およびマウス脳内への注入

Shati/nat8l 遺伝子を組み込んだ pAAV-shati、pAAV-Rep/Cap および pHelper の3種類のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞内で AAV-shati ベクターを作製させ、それを抽出し精製した⁴⁾。標的遺伝子を組み込んでいない AAV ベクターを mock コントロールとして使用した。各 AAV ベクターを、両側 NA (anterior = + 1.4, lateral = ± 0.8, ventral = + 3.8 from Bregma) もしくは両側 dS (anterior = + 0.5, lateral = ± 2.0, ventral = + 2.8 from Bregma) に注入して3週間経過後から行動実験を行った。なお、これらの遺伝子組み換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、富山大学の DNA 実験に関する委員会で承認された上で行った。

3. 脳内ドパミン遊離量の測定⁸⁾

In vivo マイクロダイアリス法を用いて、NA-Shati での NA または dS-Shati での dS からのドパミン遊離量を測定した。マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, s.c.) 麻酔下で脳定位装置に固定した。頭蓋を開口後、左側 NA (anterior = + 1.4, lateral = + 0.8, ventral = + 3.0 from bregma) もしくは左側 dS (anterior = + 0.5, lateral = + 2.0, ventral = + 2.3 from Bregma) にガイドカニューレを挿入し固定した。翌日、透析プローブをガイドカニューレより挿入し、リンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) を 0.5

μl/min で環流した。環流液は、NA では 15 分間隔、dS では 6 分間隔で収集し、環流液中のドパミン量を HPLC システム (HTEC-500, EICOM, 京都) を用いて分析した。マウスへの薬物の投与は、透析プローブ挿入から約 2 時間後から開始した。

4. NAA および NAAG 含量の測定

既報^{9, 10)}に若干の変更を加え、HPLC を用いて NAA および NAAG を測定した。抽出した脳組織を、その重量の 10 倍容量 0.1 M HClO₄ を用いてホモジナイズした。13,000 g で 10 分間遠心し上清を採取後、2 M Na₂CO₃ を加え、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 1 mL にメスアップした。次に、Bond Elut SAX anion exchange columns (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて、5.88 mL/L 85%リン酸溶液 1 mL を用いて抽出した。HPLC カラムは ZORBAX SB-C18 (4.6 × 150 mm, Agilent Technologies) を用いた。測定は移動相に 0.5% MeOH を含む 1.18 mL/L リン酸水溶液、測定波長に 215 nm を用いて室温で行った。

5. マウス NA および ds における Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) および NAAG synthase (NAAGS) のタンパク量の測定

GCPII および NAAGS タンパク量の測定は、Western Blotting 法で行った。抗体は、anti-GCP II (abcam ab80554, Cambridge, UK)、anti-NAAGS (abcam ab74284) および内部標準として anti-glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MBL M171-3, Nagoya, Japan) 抗体を使用した。

6. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。有意差

検定は、分散分析の後、post-hoc test を用いて行った。2 群間比較には、Student's *t*-test を用いて検定した。

C. 研究結果

1. NA-Shati および dS-Shati マウスにおける NA と dS における NAA および NAAG 含量

NA-Shati マウスの NA および dS-Shati マウスの dS における NAA および NAAG 含量を HPLC 法を用いて検討した。NA-Shati マウスの NA における NAA および NAAG 含量は、両方とも NA-Mock マウスと比較して、有意に増加していた (Fig. 2A)。一方、dS-Shati マウスの dS における NAA および NAAG 含量は、共に dS-Mock マウスと比較して、減少していた (Fig. 2B)。

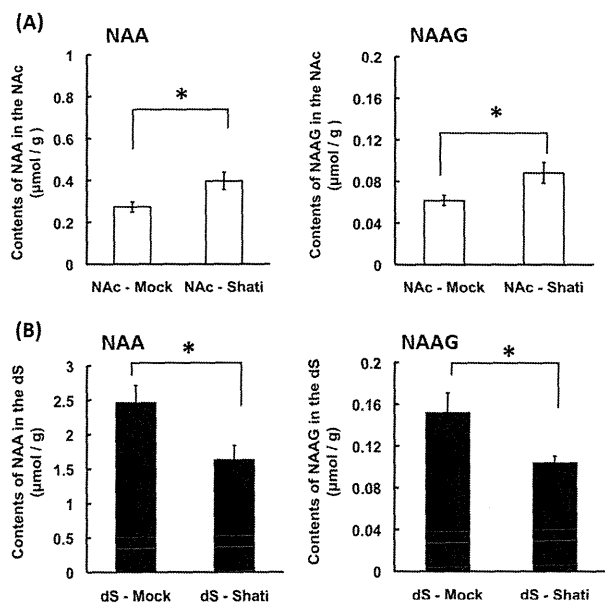


Fig. 2. Contents of NAA and NAAG in the NAc (A) or dS (B) of AAV-shati/nat8l vector-injected mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. N=7 for NAc-Mock; N=6 for NAc-Shati; N=5 for dS-Mock; N=6 for dS-Shati. **p* < 0.05 vs. NAc-Mock or dS-Mock mice (Student-*t*-test).

2. NA-Shati マウスにおける MAP 誘発ドパミン遊離量

In vivo マイクロダイアリス法を用いて、NA におけるドパミン遊離量を検討した。NA-Shati マウスの NA におけるドパミ

ン基礎遊離量は、NA-Mock マウスと比較して有意な減少が観察された (Fig. 3A)。さらに、MAP 1 mg/kg, s.c. 投与により NA-Mock マウスではドパミン遊離量が顕著に上昇したが、NA-Shati マウスでは、その上昇がほとんど観察されず、NA-Mock マウスと比較して有意な減少を示した (NA-Shati Group \times Time, $F_{(11,66)} = 9.423$, $P < 0.0001$: repeated ANOVA) (Fig. 3B)。また、NA-Shati マウスにおいて、MAP 投与の 30 分前に mGluR3 アンタゴニストである LY341495 (0.1 mg/kg, i.p.) を前処置すると、上述の有意な減少が阻害された (Fig. 4)。

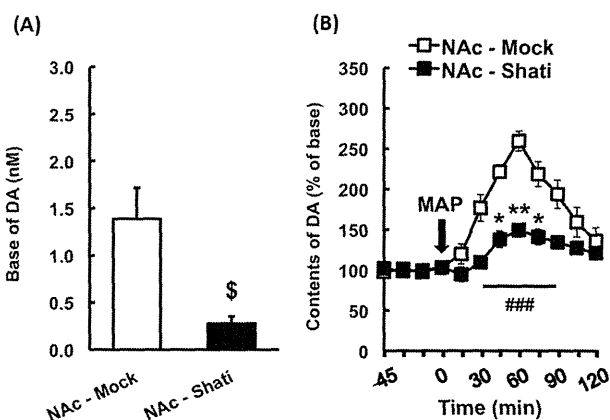


Fig. 3. DA release in the NAc of NAc-Shati mice. (A) Base levels of DA in the NAc. **P* < 0.05 vs. NAc-Mock. (B) MAP-induced DA elevation in the NAc. N=4 for NAc-Mock; N=4 for NAc-Shati. Each column represents the mean \pm S.E.M. ***P* < 0.01, **P* < 0.05 vs. base of NAc-Shati in the same group (Student-*t*-test). ###*P* < 0.001 vs. Meth-treated NAc-Mock group (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

3. マウスにおけるドパミン基礎遊離量への

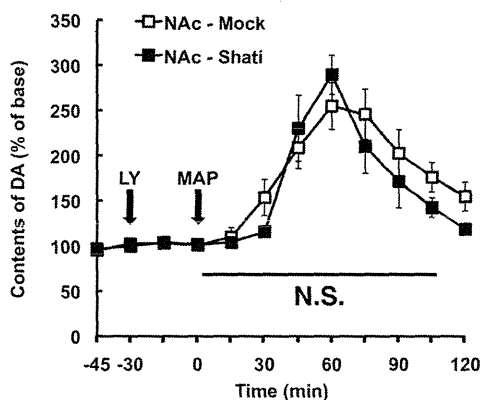


Fig. 4. Effect of LY341495 on the DA release in the NAc of NAc-Shati mice. Pretreatment with LY341495 (0.1 mg/kg, i.p., 30 min prior to MAP treatment) canceled the effect of Shati overexpression. N=4. Each column represents the mean \pm S.E.M. N.S.: no significance (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

NAAG の作用

次に、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、mGluR3 アゴニストである NAAG のドパミン遊離量に対する影響を検討した。NAAG 分解酵素 glutamate carboxypeptidase II (GCPII) の阻害剤 2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid (2-PMPA: 30 mg/kg, i.p.) を野生型マウスに投与すると NA におけるドパミン基礎遊離量は有意に減少した (Fig. 5A)。さらに、透析用リンゲル液を介して、NAAG (0.1 mg/ml) を 15 分間、環流したところ、マウスの NA におけるドパミン基礎遊離量は有意に減少した (Fig. 5B)。

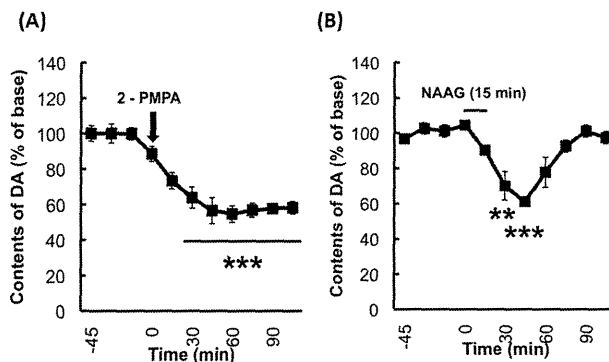


Fig. 5. Effect of NAAG on the DA release in the NAc of wild-type mice. (A) Effect of 2-PMPA (30 mg/kg, i.p.) on the extracellular DA levels in the NAc of wild-type mice. *** $P < 0.001$ vs. the base level of DA. (B) Effect of NAAG perfusion (0.1 mg/ml, 15 min) on the extracellular DA levels in the NAc of wild-type mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the basal level of DA. $N = 3$. Each column represents the mean \pm S.E.M. (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

4. 野生型、NA-Shati および dS-Shati マウスにおける NAAG synthase (NAAGS)、GCPII 発現量

NA-Shati および dS-Shati マウスにおける MAP 反応性の差に対するメカニズムを検討するために、NAAG 合成酵素 NAAGS および分解酵素 GCPII のタンパク質レベルでの発現を Western Blotting 法で測定した。まず、野生型マウスでの NA と dS における NAAGS および GCPII の発現レベルを比較した。その結果、NAAGS 発現量は、NA と dS の間に変化は観察されなかったが (Fig. 6A)、GCPII 発現量は、NA と比較して dS では有意な増加が観察された (Fig. 6B)。NA-Shati

および dS-Shati マウスと各々の対象群との比較では、NAAGS 発現量は変化が認められなかった (Fig. 7C)。一方、GCPII 発現量は、NA-Mock と対象群との間に差はなく、dS-Shati マウスは対象群と比較して、有意に増加していた (Fig. 7D)。

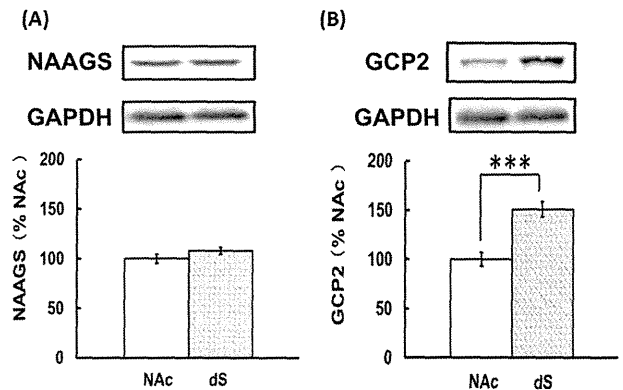


Fig. 6. The expression levels of NAAGS (A) and GCP2 (B) in the NAc or dS of wild-type mice. Each values were normalized by GAPDH. $N = 6-8$. Each column represents the mean \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ vs. the value of the NAc (Student-t test).

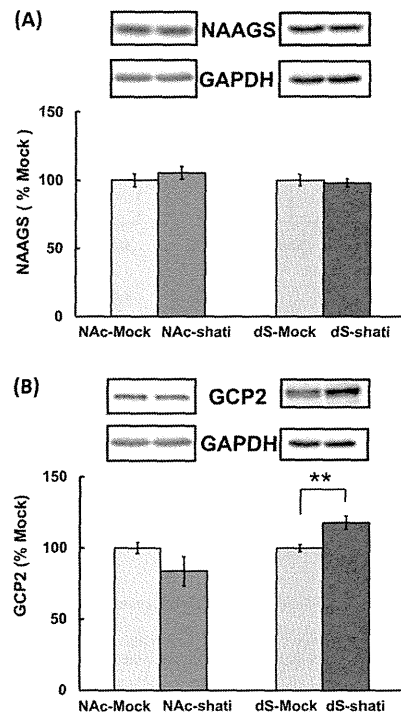


Fig. 7. The expression levels of NAAGS (A) and GCP2 (B) in the NAc and dS of NA- and dS-Shati mice, respectively. Each values were normalized by GAPDH. $N = 6$. Each column represents the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. the value of the each NA- and dS-Mock mice (Student-t test).

D. 考察

昨年度までの研究成果において、NA-Shati マウスは、MAP 誘発運動過多の減少および MAP 誘発

場所嗜好性の減少を示した。一方、dS-Shati マウスは、MAP への反応性において、いずれも変化を示さなかった。今年度、これらの行動実験結果を支援する結果として、NA-Shati マウスの NA における MAP 誘発ドパミン遊離量の減少を得た。また、この NA-Shati マウスにおける減少は、mGluR3 アンタゴニスト LY341495 の前処置によって阻害されるとともに、野生型マウスへの mGluR3 アゴニスト NAAG および NAAG 分解酵素 GCPII 阻害剤 2-PMPA 処置により、NA でのドパミン基礎遊離量が減少した。さらに、NA-Shati マウスにおける NA での NAA および NAAG 含量の増加も観察された。したがって、NA-Shati マウスの NA では、shati/nat8l の過剰発現によって、その合成産物である NAA さらには NAAG が増加していると考えられる。これに伴って、細胞外 NAAG 量も増加し、Gi タンパク質共役型 mGluR3 を活性化させて、ドパミン遊離を抑制していると考えられる (Fig. 8)。

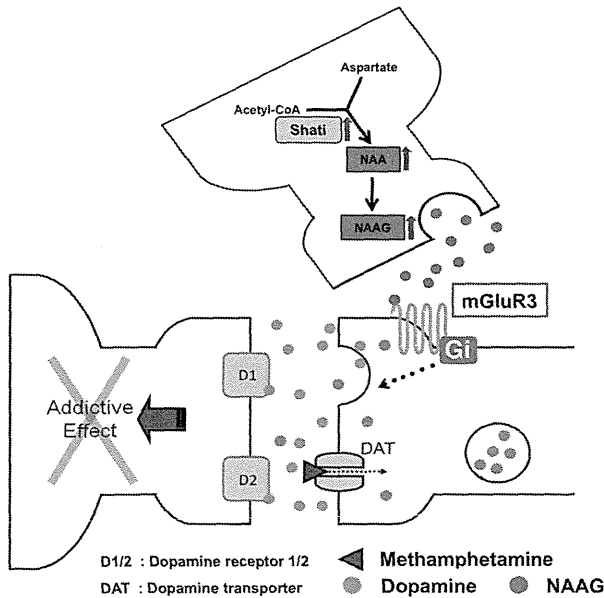


Fig. 8. Inhibitory mechanism of shati/nat8l on MAP-induced DA release.

このことは、NA-Shati マウスにおける NA でのドパミン基礎遊離量が減少していたことに

よって裏付けられる。つまり、NA-Shati マウスへの MAP 投与時には、見かけ上、MAP のドパミン・トランスポーター逆回転によるドパミン遊離増強作用が阻害されることとなり、NA-Shati マウスにおける行動学的 MAP 反応性が低下することが示唆された。以上のことから、NA における shati/nat8l 関連システムは、覚醒剤による薬物依存形成メカニズムにおいて重要な働きをしているとともに、薬物依存治療薬開発の新たな標的となることが示唆された。

一方、dS-Shati マウスの dS では、NAA および NAAG 含量の低下が観察された。その理由として元々、野生型マウスにおいて dS での NAAG 分解酵素 GCPII の発現量が NA と比べて多いうえに、shati/nat8l の過剰発現によって、更に GCPII 発現量が増加したために、shati/nat8l 関連システムに障害が起きたのではないかと考えられる (Fig. 9)。

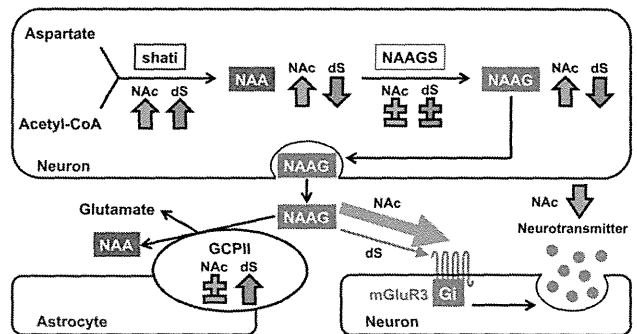


Fig. 9. Differential effect of shati/nat8l overexpression between the NAc and dS.

つまり、永続的な shati/nat8l 過剰発現によって、過度のホメオスタシスバランスが働き、NAA および NAAG 合成機能よりも、その NAAG 分解機能の方が上回るようになってしまったのかもしれない。この差異メカニズムについては、shati/nat8l の過剰発現初期では、NAA および NAAG 合成機能の方が、NAAG 分解機能を上回っている可能性もあり、外因性 shati/nat8l 発現増加プロセスにおける経時的な検討が必要である。また、shati/nat8l 過剰発現による NA および dS お

ける差異は、各々の脳部位におけるドパミン神経システム、すなわち腹側被蓋野-NA および黒質-dS 神経システムでのドパミン放出機能に対して、shati/nat8l 関連システムの寄与レベルが異なることを示唆しているのかもしれない。これは、野生型マウスにおける mGluR3 および GCPII 発現量が、NA と dS において異なっていることから示唆される。

E. 結論

本研究では、覚醒剤の薬物依存形成メカニズムにおいては、黒質-線条体系ではなく、中脳-辺縁系ドパミン・システムに働く NAA 合成酵素 shati/nat8l に始まる関連システムが重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後、我々が見出した shati/nat8l の発現を調節する化合物を見出し、治療薬の創生につながることを期待している。

[参考文献]

- 1) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., et al.: Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res.*, 1335: 1-13, 2010.
- 2) Becker, I., Lodder, J., Gieselmann, V., et al.: Molecular characterization of N-acetylaspartylglutamate synthetase. *J Biol Chem.*, 285: 29156-29164, 2010.
- 3) Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., et al.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry*, 349: 451-463, 2008.
- 4) Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzych, M., et al.: Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 66: 908-920, 2010.
- 5) Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., et al.: N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, 81: 89-131, 2007.
- 6) Neale, J.H., Olszewsk, R.T., Zuo, D., et al.: Advances in understanding the peptide neurotransmitter NAAG and appearance of a new member of the NAAG neuropeptide family. *J. Neurochem.*, 118: 490-498, 2011.
- 7) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., et al.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor-alpha in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107: 1697-1708, 2008.
- 8) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., et al.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J. Neurosci.*, 27: 7604-7615, 2007.
- 9) Reynolds, L.M., Cochran, S.M., Morris, B.J., et al.: Chronic phencyclidine administration induces schizophrenia-like changes in N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in rat brain. *Schizophr. Res.*, 73:147-152, 2005.
- 10) Takanashi, J., Saito, S., Aoki, I., et al.: Increased N-acetylaspartate in model mouse of pelizaeus-merzbacher disease. *J. Magn. Reson. Imaging*, 35: 418-425, 2012.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yan, Y., Nitta, A., Koseki, T., Yamada, K., and Nabeshima, T. : Dissociable role of tumor necrosis factor alpha gene deletion in methamphetamine self-administration and cue-induced relapsing behavior in mice.

- Psychopharmacology., 221: 427-436, 2012.
- 2) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Toriumi, K., Furukawa, S., Nabeshima, T., and Yamada, K.: Absence of SHATI/Nat8l reduces social interaction in mice. *Neurosci Lett.*, 526: 79-84, 2012.
 - 3) Alkam, T., Kim, H.C., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., and 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, 2013.
 - 4) Yan, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A., Muramatsu, S., Ozawa, Y., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Intrastratial gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int. J. Neuropharmacol.* in press 2013.
 - 5) 入江徹美, 新田淳美, 赤池昭紀: 国立大学法人における模擬患者養成及び問題立脚型チュートリアル学習の現状. *薬学雑誌*, 132: 337-363, 2012.
- ## 2. 学会発表
- 1) Nitta, A., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Furukawa-Hibi, Y., Uno, K., Miyamoto, Y.: Overexpression of shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. The 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2012, 6, 3-7, Stockholm.
 - 2) Nitta, A., Muramatsu, S., Miyamoto, Y.: Lower sensitivity to methamphetamine in accumbal dopamine D2 receptor knockdown mice by using AAV vector. The college of Problems of Drug Dependence, 2012, 6, 9-14, Palm Springs, CA.
 - 3) Takaoka, K., Uno, K., Inagaki, R., Nagakura, M., Tamaji, A., Ozaki, N., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Involvement of Shati on depression-like behavior in the postpartum period in human and mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10,2, Kobe.
 - 4) Sumi, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Hibi, Y., Nabeshima, T., Uno, K., Nitta, A.: The differences of the action of shati between the nucleus accumbens and dorsal striatum on the methamphetamine-induced addictive behaviors in mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10, 2, Kobe.
 - 5) Nitta A.: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in the nucleus accumbens and dorsal striatum in mice. The 3rd International Symposium on Life Science in Toyama — Joint Symposium of ” Physiological roles of novel molecules, related to the psychological and neuronal diseases, and trials for the clinical use” and “Toyama Support Center for Young Principal Investigators in Advanced Life Sciences The special program adopting Tenure-track system” — 2013. 3. 14. Toyama.
 - 6) 新田淳美, 宇野恭介, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明.: 統合失調症精神疾患関連の3つの新規遺伝子について. *統合失調症学会*, 2012, 3, 16-17, 名古屋.
 - 7) 入江徹美, 赤池昭紀, 新田淳美.: 国立大学法

- 人薬学部における PBL チュートリアル教育の現状と取り組み. 第 44 回日本医学教育学会大会, 2012, 7, 24-28. 東京.
- 8) 新田淳美, 宇野恭介, 宮本嘉明.: 新規薬物依存関連遺伝子の生理機能の解明および治療開発にむけての研究. 平成 24 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (シンポジウム), 2012, 9, 7-9, 札幌.
 - 9) 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, 2012, 9, 14, 新潟
 - 10) 新田淳美.: 薬物依存関連新規分子の生理機能解明について.: 薬物依存の関与するタンパク性分子の発現と機能. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会 (シンポジウム), 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 11) 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 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 12) 笹谷晴恵, 林慧洋, 宮本嘉明, 宇野恭介, 手塚康弘, 門田重利, 新田淳美.: マウスうつ様行動に対する GDNF 産生促進作用を介した細辛の効果. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 13) 齊鹿絵里子, 宮本嘉明, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス側坐核における精神疾患関連分子 transmembrane protein 168 の過剰発現が行動に与える影響. 第 22 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 14) 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 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 15) 宇野恭介, 長倉美由紀, 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 回日本臨床精神神経薬理学会・第 42 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2012, 10, 18-20, 宇都宮.
 - 16) 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, 2012, 10, 25-26, 名古屋.
 - 17) 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, 2012, 10, 25-26, 名古屋.
 - 18) 和田淳子, 田辺公一, 新田淳美, 大久保純, 池崎友明, 田中真衣, 村上望, 北条英徳.: モルヒネ塩酸塩注射剤との混合によるオクトレオチド酢酸塩の安定性への影響, 第 22 回日本医療薬剤師学会, 2017, 10, 27-28, 新潟.
 - 19) 大嶋耐之, 灘井雅行, 新田淳美.: 現場に求められる薬剤師像を、現行の薬剤師教育はみたしているか?: 第 22 回日本医療薬剤師学会 (ラウンドテーブル), 2017, 10, 27-28, 新潟.
 - 20) 石川雄大, 宮本嘉明, 鷺見和之, 家垣典幸,