

日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウスにおける Shati/NAT81 のメタンフェタミン応答性作用メカニズムについて. 日本薬学会北陸支部第 124 回例会, 2012, 11, 18, 富山.

- 21) 新田淳美 : PBL チュートリアル教育プログラムの現状と取り組み. 日本薬学会第 133 年会, 2013, 3, 27-30, 横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特許出願: 精神疾患関連遺伝子 shati/nat81 の遺伝子修飾による精神疾患診断方法
発明者: 新田淳美、宇野恭介
出願人: 国立大学法人富山大学
出願日: 2013 年 2 月 19 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

- 1) 新田淳美.: 6 年生実務実習へのお礼 ; いよいよ薬学部 6 年制の学生一期生が卒業します. 病薬会報, 富山県病院薬剤師会, NO.118, 11-12.
- 2) 家垣典幸, 宮本嘉明, 石川雄大, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 新田淳美.: 新規分子 Shati の脳部位特異的過剰発現はマウスの情動行動に影響する. 日本神経薬理学雑誌, 32, 119-120, AsCNP2011 発表報告 2012, 4.
- 3) 齊鹿絵里子, 宮本嘉明, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 新田淳美.: 新規分子“shati”のジストニアモデル動物における役割. 日本神経薬理学雑誌, 32, 121-122, AsCNP 発表報告, 2012, 4.
- 4) 新田淳美.: 6 年生実務実習 3 年目を迎えて— 大学から地域への情報発信—・病薬会報 (富

山県病院薬剤師会) 119, 24, 2012, 7.

- 5) 新田淳美.: 「薬物中毒防止について」平成 24 年度富山大学学生団体アルコール等講習会, 2012, 10, 3, 富山大学.
- 6) 新田淳美.: 薬学教育モデル・コアカリキュラム改訂について. 病薬会報, 富山県病院薬剤師会, 120, 24, 2012, 11.
- 7) 新田淳美.: 『覚せい剤依存や精神疾患の発症と関係する 3 つの分子について』薬事研究会主催, 薬事講演会 (招待講演), 2012, 12, 13, 富山.
- 8) 新田淳美.: 『覚せい剤の怖さ・なぜ、手を出すのか、やめられないのか』平成 24 年度「薬物乱用防止教室」講習会, 富山県教育委員会スポーツ・保健課食育安全班, (招待講演), 2012, 12, 18, 富山.
- 9) [新聞記事] 心の病関係タンパク質 脳の線条体作用. 2013, 1, 15, 富山新聞

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

研究分担者：疋田貴俊^{1,2}

(¹ 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

² 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所システムズ生物学部門)

[研究要旨]

本研究では、乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する大脳基底核において主要な神経回路である直接路と間接路に対する可逆的神経回路伝達阻止法を開発し、薬物依存形成における大脳基底核神経回路制御機構を解析している。これまでに直接路あるいは間接路の中型有棘細胞にドキシサイクリン依存的に破傷風菌毒素を発現させることによって直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスに乱用薬物を投与し、行動観察を行うことによって、薬物依存行動への大脳基底核神経回路伝達遮断の影響を解析し、乱用薬物の慢性投与による依存形成には直接路が重要であることを示した。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。

A. 研究目的

大脳基底核は乱用薬物による依存形成や精神障害に関与する重要な脳部位である。研究分担者は昨年度までに大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発した³⁾。本方法を用いて直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスに乱用薬物を投与し、行動観察を行うことによって、薬物依存行動への大脳基底核神

経回路伝達遮断の影響を解析し、乱用薬物による急性誘発行動には直接路と間接路の両方が必要な事、乱用薬物の慢性投与による依存形成には直接路が重要であることを示した³⁾。さらに報酬関連学習と忌避学習で直接路と間接路の役割の違いを見だし、大脳基底核神経回路の制御機構が乱用薬物による依存形成や精神障害の病態解明に重要であることを示した³⁾。今年度は可逆的神

経伝達阻止法と薬理的処置を組み合わせること
 で、薬物依存と報酬・忌避学習における神経回
 路特異的な分子機構の解析を進めた。

B. 研究方法

1. 実験動物

全ての動物実験は京都大学大学院医学研究科
 と公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所の
 動物実験に関する指針に従った。TN トランスジ
 ェニックマウス⁹⁾とその同胞野生型マウス(wt)を
 用いた。サブスタンス P 遺伝子 β -preprotachykinin
 A(PPTA)あるいはエンケファリン遺伝子
 preproenkephalin A(PPE)の上流域のプロモーター
 約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子
 tetracycline-repressive transcription factor (tTA)を持
 つアデノ随伴ウイルス(AAV)を既発表論文に従い
 定位的にマウス側坐核の両側あるいは片側に投
 与を行った^{3), 10)}。

2. 薬理的処置

充分な麻酔下にて、一側の側坐核に AAV を投与
 後、反対側の側坐核に 26 ゲージのガイドカニ
 ューラの先端が来るように歯科用セメントにて固
 定した¹⁰⁾。側坐核への薬物注入はハミルトンシリ
 ンジに連結したインターナルカニューラをガイ
 ドカニューラに挿入し、1 μ l の量を 2 分間かけて
 行った¹⁰⁾。薬物濃度は SCH23390(100 μ M),
 SKF81297(300 μ M), quinpirole(1mM),
 eticlopride(400 μ M), aripiprazole (100 μ M)に
 調整した^{4), 10)}。

3. 行動解析

行動解析は AAV 投与およびカニューラ設置手術
 の 2-3 週間後から開始した。条件付け場所嗜好試験
 (CPP)と一嗜好による抑制性回避試験は既発表論
 文に従った³⁾。抑制性回避試験は、狭い明室と広
 い暗室を連結した装置を用いた。条件付け前には、
 マウスを明るい小部屋に入れると、マウスの好む
 環境である暗室に速やかに移動する。マウスが暗

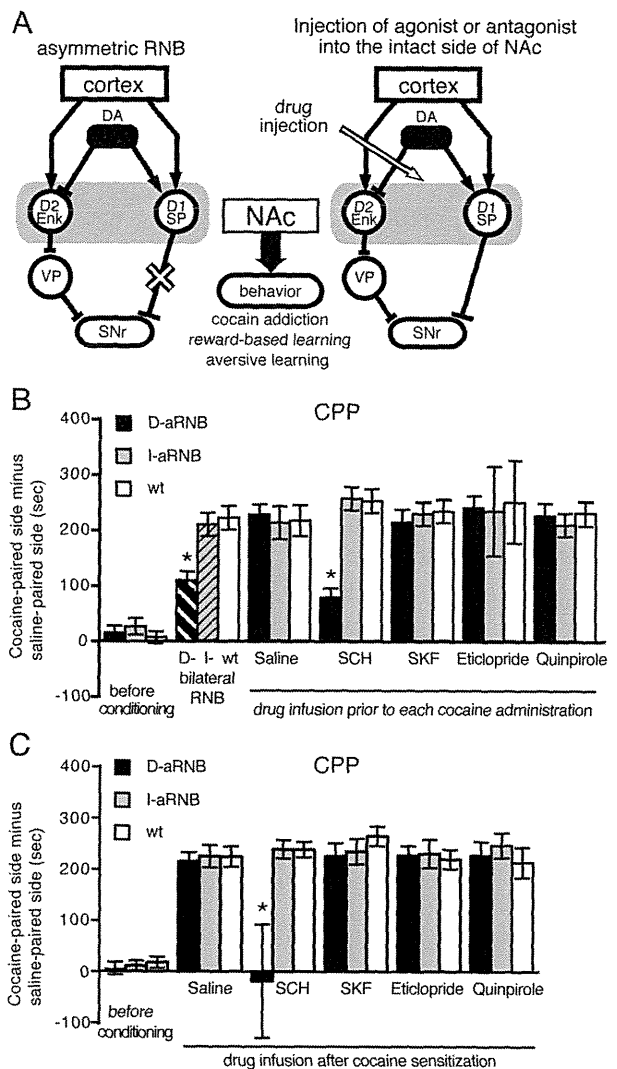


図 1. (A) asymmetric RNB 法の概略図。(B) コカイン条件付け
 20 分前に薬物投与を行った。コカインによる場所条件付けを 3
 日間行い、4 日目に場所嗜好性を測定した。(C) 3 日間のコカ
 イン条件付けを行い、4 日目に薬物投与し、20 分後に場所嗜好
 性を測定した。それぞれ 5-6 匹の平均と標準誤差を示す。

* $p < 0.05$ 。文献 4 より引用。

室に 4 つの脚全てを入れた時点で、2 部屋を区切
 る扉を閉じ、床に 0.5mA, 60 Hz, 1 sec の電流を
 流すことで電気ショックを与えた。24 時間後に忌
 避学習の保持を測定するために、電気ショック無
 しで同様の手順を行い、暗室に入るまでの時間を
 測定した。

C. 研究結果

1. 薬物依存形成と病態発現における直接路 D1 受容体の役割

直接路の中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路の中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk) がそれぞれ特異的に発現する⁵⁾。SP 遺伝子あるいは Enk 遺伝子上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA) を導入した遺伝子組み換え AAV を、tetracycline-responsive element (TRE) の下流に CMV をプロモーターとして GFP と破傷風菌毒素 tetanus neurotoxin (TN) の融合タンパクを発現させる遺伝子を持つ TN トランスジェニックマウス⁹⁾ の側坐核に打ち込むことによって、直接路神経細胞あるいは間接路神経細胞に特異的にかつ可逆的に破傷風菌毒素を発現させた³⁾。破傷風菌毒素 TN はシナプス小胞関連蛋白質である VAMP2 を切断し、シナプス小胞を介した神経伝達を遮断する⁹⁾。この直接路あるいは間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法 (Reversible Neurotransmission Blocking: RNB) を片側側坐核に適応し (D-aRNB あるいは I-aRNB)、反対側の側坐核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の行動を観察することで、薬物依存行動や報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構を調べた (図 1A: asymmetric RNB 法)⁴⁾。D1 アゴニストとして SKF81297 (SKF)、D1 アンタゴニストとして SCH23390 (SCH)、D2 アゴニストとして quinpirole、D2 アンタゴニストとして eticlopride を投与した。3 日間のコカイン (10mg/kg) 投与による場所条件付けの際に予めカニューラから薬物投与を行うと、片側直接路遮断 (D-aRNB) と D1 アンタゴニストである SCH の投与の組み合わせでのみ、両側直接路遮断と同等の場所嗜好性の抑制が見られた (図 1B)⁴⁾。次に、3 日間のコカインによる場所条件付けを行った後に、第 4 日目に、カニューラから側坐核へ薬物投与を行い、

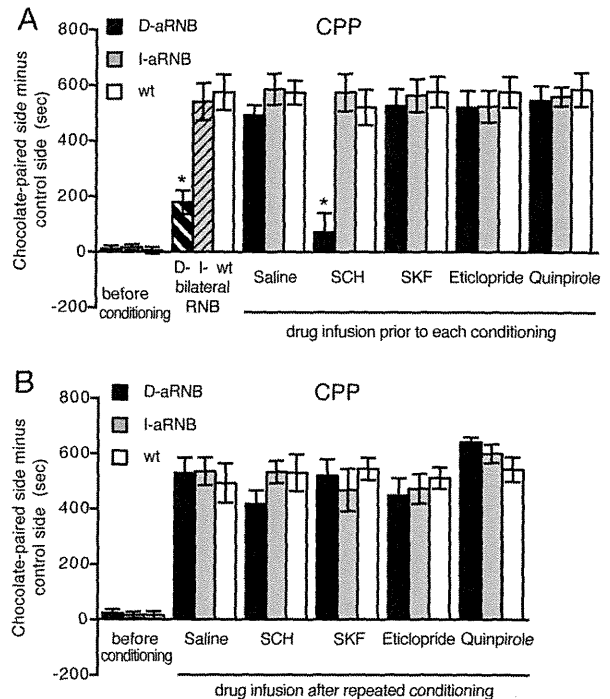


図 2. (A) チョコレートによる場所条件付け 20 分前に薬物投与を行った。この条件付けを 3 日間行い、4 日目に薬剤投与無しで場所嗜好性を測定した。(B) 3 日間のチョコレートによる場所条件付けを行い、4 日目に薬剤投与を行った。その 20 分後に場所嗜好性を測定した。それぞれ 5-6 匹の平均と標準誤差を示す。* $p < 0.05$ 。文献 4 より引用

20 分後に場所嗜好性を測定した。この場合も D-aRNB と SCH 投与の組み合わせでのみ、コカインで条件付けされた場所嗜好性の発現を抑制した (図 1C)⁴⁾。これらの結果から、乱用薬物依存の形成と病態発現において、直接路の D1 受容体の活性化が必須であることを示した。

2. 報酬学習における直接路 D1 受容体の役割

次に、報酬学習をチョコレートによる条件付け場所嗜好性試験で測定した。3 日間のチョコレートによる場所条件付けの際に予めカニューラから薬物投与を行うと、片側直接路遮断 (D-aRNB) と D1 アンタゴニストである SCH の投与の組み合わせでのみ、両側直接路遮断と同等の場所嗜好性

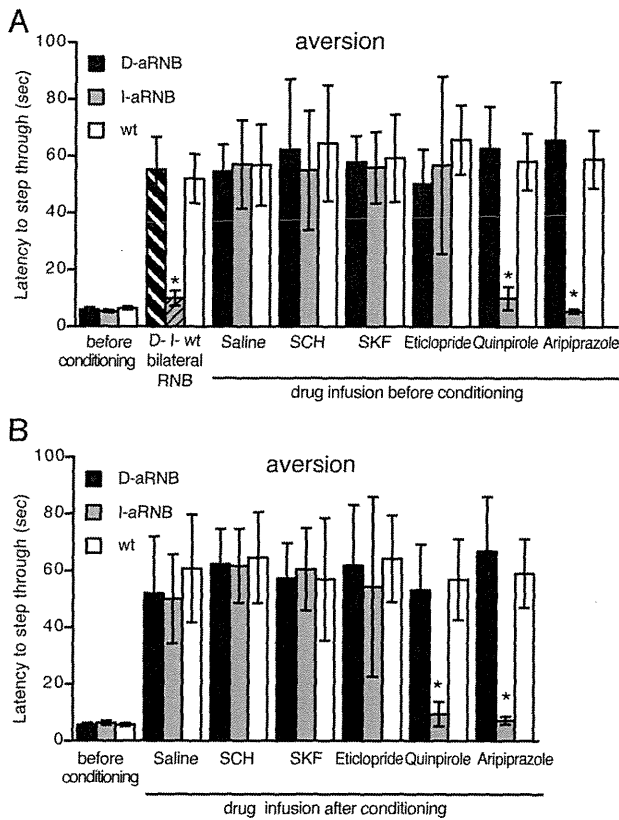


図 3. (A) 暗室での電気ショック 20 分前に薬物投与を行った。24 時間後に薬剤投与無しで暗室に入室するまでの時間を測定した。(B) 電気ショックによる条件付けを行い、24 時間後に薬剤投与を行った。その 20 分後に暗室に入室するまでの時間を測定した。それぞれ 4-6 匹の平均と標準誤差を示す。* $p < 0.05$ 。文献 4 より引用。

の抑制が見られた (図 2A)⁴⁾。この結果から、報酬関連学習の獲得においても薬物依存形成と同様に直接路の D1 受容体の活性化が必須であることを示した。しかしながら、D-aRNB は 3 日間の場所条件付けにより報酬関連学習を獲得すると、SCH をはじめとする薬剤投与は場所嗜好性の発現には影響を与えなかった (図 2B)⁴⁾。

3. 忌避行動における間接路神経伝達の役割

忌避学習を一試行による抑制性回避試験で測定した。この試験では、マウスが明室から暗室に移動した時に電気ショックを与えた。24 時間後に再び明室にマウスを入れ、暗室に移動するまでの

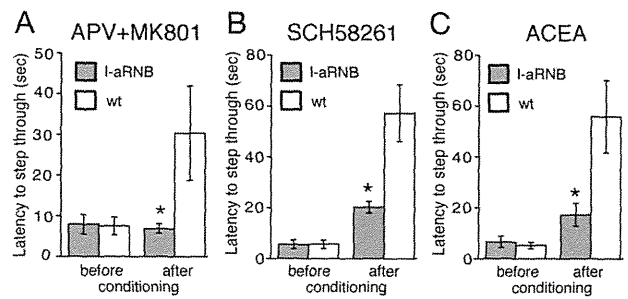


図 4. 暗室での電気ショック 20 分前に薬物投与を行った⁴⁾。24 時間後に薬剤投与無しで暗室に入室するまでの時間を測定した。各 5 匹の平均と標準誤差を示す。* $p < 0.05$

時間を測定した。電気ショックによる条件付けの直前に薬剤投与を行うと、片側間接路遮断 (I-aRNB) と D2 アゴニストである quinpirole あるいは aripiprazole の組み合わせでのみ、両側間接路遮断と同等の忌避行動の抑制が観測された (図 3A)⁴⁾。同様に、電気ショックを与えた 24 時間後に薬剤投与を行い、その 20 分後に明室に入れた場合も、片側間接路遮断 (I-aRNB) と D2 アゴニストである quinpirole あるいは aripiprazole の組み合わせでのみ忌避行動の発現が抑制された (図 3B)⁴⁾。これらの結果は忌避学習の獲得と発現の両方に間接路の D2 受容体の不活性化が重要であることを示す。

D2 受容体はプレシナプスとポストシナプスの両方に存在する。D2 受容体には alternative splicing により D2S と D2L の 2 種類が存在する¹⁾。D2L ノックアウトマウスは D2S が担うプレシナプス機能は保存されたまま、ポストシナプス機能が障害される⁸⁾。D2L ノックアウトマウスは恐怖反応を維持したまま、忌避学習の障害を認めた⁴⁾。この表現型は両側間接路遮断マウスや I-aRNB と D2 アゴニスト投与の組み合わせの表現型と一致しており、D2 アゴニストがポストシナプスの D2L 受容体に作用して忌避行動を抑制していることが示された。

抑制性 D2 受容体の不活性化は間接路細胞のグ

ルタミン酸伝達において長期増強を誘導することが知られている^{2), 6)}。そこで間接路細胞の長期増強に関与する NMDA 受容体、アデノシン A2a 受容体、カンナビノイド CB1 受容体の関与を調べた。片側間接路遮断マウス I-aRNB の反対側側坐核に、NMDA 受容体アンタゴニストのカクテル (APV+MK801)、A2a 受容体アンタゴニスト SCH58261 あるいは CB1 受容体アゴニスト ACEA を投与した。20 分後に明室に入れ、暗室に移動した時に電気ショックを与えた。24 時間後に明室に入れ暗室に入るまでの時間を測定したところ、いずれも忌避行動が抑制された(図 4)⁴⁾。これらの結果は、間接路の神経可塑性に重要な受容体群である NMDA 受容体と A2a 受容体の活性化および CB1 受容体の不活性化が、忌避行動に必須であることを示している。

D. 考察

乱用薬物摂取や報酬予測の提示による側坐核でのドーパミン濃度の上昇が、ドーパミン低結合能をもつ D1 受容体に働き直接路細胞で神経可塑性による伝達効率の上昇がなされると考えられる^{2), 6)}。一方、忌避刺激は腹側被蓋野のドーパミン細胞の発火を抑制するため⁷⁾、ドーパミン高結合能をもつ D2 受容体からドーパミンが離れ、結果的に間接路が活性化されると考えられる。間接路の活性化にも神経可塑性に関与する神経伝達物質受容体群が必須であった⁴⁾。今後さらに、神経回路を基盤とした神経可塑性に関与する分子機構の解明をすすめることによって薬物依存形成と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。

E. 結論

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、薬物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。

[参考文献]

- 1) Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., et al.: The dopamine D2 receptor: Two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.*, 8: 4025-4034, 1989.
- 2) Gerfen, C.R., Surmeier, D.J.: Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Ann. Rev. Neurosci.*, 34: 441-466, 2011.
- 3) Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., et al.: Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66: 896-907, 2010.
- 4) Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., et al.: Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 342-347, 2013.
- 5) Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289: 633-637, 2000.
- 6) Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., et al.: Dichotomous dopaminergic control of striatal plasticity. *Science*, 321: 848-851, 2008.
- 7) Tan, K.R., Yvon, C., Turiault, M., et al.: GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*, 73: 1173-1183, 2012.

- 8) Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., et al.: Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alteration in striatum-dependent functions J. Neurosci., 20: 8305-8314, 2000.
- 9) Yamamoto, M., Wada, N., Kitabatake, Y., et al.: Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. J. Neurosci., 23: 6759-6767, 2003.
- 10) Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., et al.: Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptor in the nucleus accumbens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 12764-12769, 2012.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Hikida, T., Nakanishi, S.: Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptor in the nucleus accumbens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 12764-12769 (2012)
2. Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., Nakanishi, S.: Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110: 342-347 (2013)
3. Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Tankou, S., Seshadri, S., Hikida, T., Matsumoto, Y., Cascella, N.G., Kano, S., Ozaki, N., Nabeshima, T., Sawa, A.: Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. Science, 339: 335-339 (2013)
4. Hikida, T., Gamo, N.J., Sawa, A.: DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. Expert

Opin. Ther. Targets, 16: 1151-1160 (2012)

5. 疋田貴俊、友田利文：精神疾患モデル動物の作製と治療法スクリーニング. 実験医学増刊, 30: 2074-2079 (2012)
6. 疋田貴俊：大脳基底核の直接路と間接路の機能分離. Annual Review 神経 2013、(鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆編)、中外医学社、東京、pp.10-16 (2013)

2. 学会発表

1. 疋田貴俊：運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構. 第27回日本大脳基底核研究会、東京、2012年6月
2. 疋田貴俊：Basal ganglia circuit regulation in reward and aversive behavior and drug addiction. 平成24年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ「シナプス病態」「脳内環境」「自己制御精神」脳疾患関連3領域合同シンポジウム、仙台、2012年7月
3. 木村健介、疋田貴俊、矢和多智、山口隆司、中西重忠：コカイン誘発行動における黒質網様部での ephrinA5-EphA4/A5 システムの回路特異的な働き. 第35回日本神経科学大会、名古屋、2012年9月
4. 疋田貴俊：意思決定と薬物依存における大脳基底核神経回路機構. 平成24年度日本生物学的精神医学会若手研究者育成プログラム、神戸、2012年9月
5. 疋田貴俊、木村健介、矢和多智、山口隆司、中西重忠：意思決定と薬物依存における大脳基底核神経回路機構. 第34回日本生物学的精神医学会、神戸、2012年9月
6. 疋田貴俊：報酬・忌避行動と柔軟性における大脳基底核神経回路機構. 順天堂大学大学院医学研究科神経生理学セミナー、東京、2012年10月
7. 疋田貴俊：直接路と間接路の機能分離. 第6

回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、
京都、2012年10月

8. 疋田貴俊：運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構. 科学技術振興機構さきがけ「脳神経回路の形成・動作と制御」領域研究報告会、名古屋、2012年11月
9. 疋田貴俊：報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
10. 矢和多智、山口隆司、檀上輝子、疋田貴俊、中西重忠：報酬学習と行動柔軟性における大脳基底核回路の解析. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
11. 疋田貴俊：報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 大阪大学蛋白研セミナー「中枢神経研究を拓く新しい潮流」、大阪、2013年3月

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

疋田貴俊、中西重忠：大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法、特願 2012-51542（国内移行）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究

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

研究分担者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直、毛利彰宏

（名城大学大学院薬学研究科 薬品作用学）

[研究要旨]

近年、脱法ドラッグと呼ばれる覚せい剤（METH）に類似した薬物による乱用事件が多発している。METH は、連続摂取によって精神依存症状を誘発し、また、幻覚・妄想などの統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害に加え、認知障害も惹起する。一方、内因性ペプチドのコレシストキニン（CCK）が作用する受容体には CCK1 および CCK2 受容体の 2 つのサブタイプがあり、CCK2 受容体は主に脳内（皮質や辺縁系）に分布している。CCK アナログの脳内投与によってアンフェタミンによる条件付け場所嗜好性が増強することや、CCK2 受容体を介した側坐核でのドパミン遊離を調節しているとの報告がある。これらのことは、覚せい剤による薬物依存に対して CCK2 受容体拮抗薬が治療薬となり得る可能性を示している。そこで選択的 CCK2 受容体拮抗薬、CI-988 を用いて METH 連続投与による依存症状の形成や発現に対するその有効性について行動薬理学的および生化学的に解析し、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。行動量測定試験において、METH 投与（1 mg/kg, s.c.）の 30 分前に CI-988（0.2 および 2 mg/kg i.p.）を投与したところ、CI-988 は用量依存的に METH による行動過多を抑制した。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。免疫組織化学的手法により側坐核における CCK2 受容体の発現を観察したところ、神経細胞上においてその発現が認められ、また主にドパミン D1 受容体との共局在が観察された。これらのことから、(i) CCK2 受容体はドパミン受容体と相互作用を有しており、CI-988 は METH による依存性行動の形成を抑制すること、(ii) 前脳 CCK2R 発現増加は METH

誘発行動障害を増悪すること、(iii) 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。

薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究

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

研究分担者：間宮隆吉

研究協力者：古関竹直

(名城大学大学院薬学研究科 薬品作用学)

A. 研究目的

近年、大麻や脱法ドラッグなどの薬物乱用が若い世代に確実に広まってきている。大麻はタバコよりも無害などとの誤った情報から、使用する学生もあり、依存性薬物に対する適切な情報提供が必要であると考えられる。また、このような軽はずみに大麻を摂取したことがきっかけで、さらに強い依存性薬物に興味を持ち、覚せい剤 (METH) などを摂取するようになることも多い。そのため、こうした依存性薬物を投与した動物を用いて依存性薬物による精神障害に対する治療薬を評価する研究は社会的要求性も高い。METH は幻覚・妄想といった統合失調症の急性期に酷似した陽性症状を中心とした精神障害のみならず認知障害も惹起する^{1, 2)}。

一方、内在性ペプチドのコレシストキニン (CCK) が作用する受容体には CCK1 および CCK2 受容体の 2 つのサブタイプがあり、CCK2 受容体は主に脳内 (皮質や辺縁系) に分布している³⁾。CCK アナログの脳内投与によってアンフェタミンによる条件付け場所嗜好性が増強する⁴⁾ことや、CCK2 拮抗薬がモルヒネによる条件付け場所嗜好性を抑制する⁵⁾こと、また CCK2 受容体を介した側坐核でのドーパミン遊離を調節している

との報告がある。これらのことは、覚せい剤による薬物依存に対して CCK2 受容体拮抗薬が治療薬となり得る可能性を示している。そこで、本研究では METH による精神依存性症状および精神症状に対する CCK2 拮抗薬の有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には 7~8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本 SLC、浜松) 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。動物は室温 24 ± 1 °C、湿度 55 ± 5 %、8:00~20:00 明期の明暗サイクルの恒温室でプラスチック製ケージを用いて飼育した。水および飼料 (CE-2、CLEA Japan) は自由に摂取させた。なお、本研究は名城大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。メタンフェタミン (1 mg/kg 大日本住友製薬 (株) 大阪) および CI-988 (トクリスバイオサイエンス、2 mg/kg) は、それぞれ生理食塩液に溶解し、0.1 mL/10 g BW の割合で投与した。

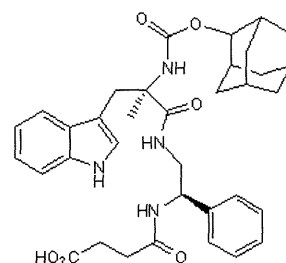


図 1 CI-988 の構造式

2. 行動量測定

透明アクリル製ケージ (45 × 26 × 40 cm) と黒色のつや消しプラスチック製の床からなる

装置を用いた。ケージ内での行動量測定装置 (Scanet SV-20、メルクエスト、富山) により測定した。マウスを装置に馴化させるため、1 日目にマウスを無処置で装置に入れ、1 時間の行動量を測定した (順化)。2~8 日目に METH (1 mg/kg 大日本住友製薬 (株) 大阪) または生理食塩水 (10 ml/kg, s.c.) 投与の 30 分前に CI-988 (トクリスバイオサイエンス、0.2 および 2 mg/kg) 投与した。2, 4, 6, 8 日目に METH 投与後直ちにマウスを装置に入れ、行動量を 1 時間測定した。METH を連続投与することによって生じる行動量増加の亢進を行動感作の指標とした。

3. 条件付け場所嗜好性試験

透明なプラスチック製の箱 (明室) と黒色のプラスチック製の箱 (暗室) (各 15 × 15 × 15 cm) からなり、スライド式の仕切り (10 × 15 cm) で区切られている装置を用いた。マウスがこの 2 つの部屋を区別できるように、明室の床は白色プラスチック製メッシュで覆い、暗室の床はプラスチック製の平板で覆った。明室の上方には白熱電灯 (6 W、20 cm) を設置し、各部屋の滞在時間を測定するため、これを Scanet SV-20LD (メルクエスト、富山) 内に設置した。1 日目と 2 日目に 2 区画の間の仕切りを外してマウスが両方の部屋を自由に移動できるようにし、マウスを装置内に入れて 15 分間自由に探索させた。3 日目にマウスを同様にして装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (preconditioning test: pre test)。4 日目から 9 日にかけて、METH の条件付けを行った (conditioning)。4, 6, 8 日目に、METH (10 mg/kg, s.c.) または生理食塩液をマウスに投与し、その直後にどちらか一方の部屋に 20 分間閉じ込めた。5, 7, 9 日目には、生理食塩水を投与した後に METH で条件付けを行っていないもう一方の部屋にマウスを 20 分間閉じ込めた。なお、条件付

けする部屋は、カウンターバランス法により各群において pre test における各部屋での滞在時間が均等になるように割り付けた。最終条件付け終了 24 時間後の 10 日目に、3 日目の pre test と同様にしてマウスに装置内を 15 分間自由に探索させ、明室と暗室に滞在した時間をそれぞれ測定した (post-conditioning test: post test)。3 日目の pre test において、METH 投与側の部屋に滞在した時間から生理食塩水投与側の部屋に滞在した時間を引いたものを pre-conditioning 値とし、10 日目の post-conditioning 値も同様にして求めた。さらに post-conditioning 値から pre-conditioning 値を引いた値を conditioned place preference 値とし、METH の精神的依存性の指標とした。

4. 情動及び認知機能関連試験

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

新奇物体認識試験 (NORT)：実験装置にはプレキシグラス製のオープンフィールド箱 (W50 x L50 x H20 cm) を用い、装置の底には木屑を敷いた。NORT は馴化試行、訓練試行および保持試行からなり、1 および 2 日目の馴化試行では、実験装置にオブジェクトを設置せず、装置に 10 分間マウスを慣らした。3 日目の訓練試行では、装置内に 2 つのオブジェクトを設置し、マウスを 10 分間自由に探索させた。その 40 分後の保持試行では、片方のオブジェクトを新奇オブジェクトに置換し、再びマウスを装置内に入れ、10 分間自由に探索させた。各オブジェクトの探索時間および 2 つのオブジェクトを探索している総探索時間を

測定した。訓練試行においては総探索時間に対するいずれかのオブジェクトへの探索時間の割合 (%) を、保持試行においては探索時間に対する新奇オブジェクトに対する探索時間の割合 (%) を探索嗜好率として算出し、認知機能の指標とした。

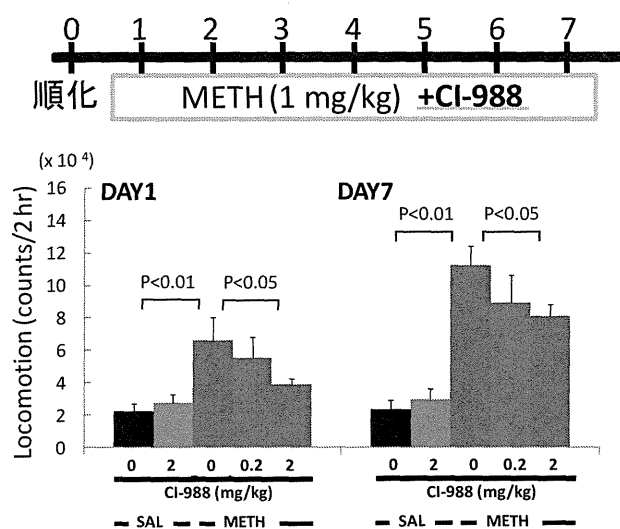


図2 METH連続投与による行動感作に対するコレストキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と行動感作に対する CI-988 (0.2 および 2 mg/kg ip) の影響。

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

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

4. 統計解析

結果は平均値 ± 標準誤差として示した。得られた結果は、one-way による分散分析を行い、各群間比較には、Bonferroni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率が 5% 以下の場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

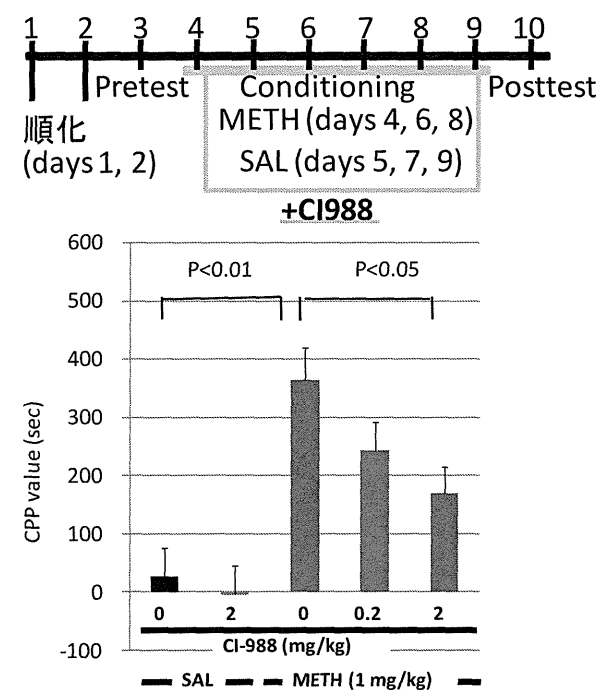


図3 METH連続投与による条件付け場所嗜好性に対するコレストキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と条件付け場所嗜好性に対する CI-988 (0.2 および 2 mg/kg ip) の影響。

行動量: 図 2 上段に示したスケジュールに従って薬物投与の前日に装置に馴化させた。1 日目に METH 処置 (1 mg/kg, s.c.) の 30 分前に CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) を投与し行動量を測定した。その結果、CI-988 は用量依存的に METH による行動過多を抑制した (図 2 左)。なお、CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) 自身は溶媒投与群と比較して特に影響しなかった。7 日目にも薬物処置後に行動量を測定し、METH による行動感作を確認した。

この行動感作に対しても CI-988 (2 mg/kg i.p.) は有意に抑制作用を示した (図 2 左)。

条件付け場所嗜好性試験： 図 3 上段に示すように METH (1 mg/kg, s.c.) 条件付けの 30 分前に CI-988 (0.2 および 2 mg/kg i.p.) を併用投与したところ、CI-988 は用量依存的に METH による場所嗜好性の形成を抑制した (図 3 下段)。一方、6 日間の METH (1 mg/kg, s.c.) 条件付けによる場所嗜好性形成後の発現に対して 10 日目に post test を行った CI-988 を急性投与しても何ら影響しなかった (データ示さず)。

側坐核細胞外ドーパミンレベル： メタンフェタミンの急性投与後に観察される側坐核でのドーパミンレベルの上昇が、CI-988 の 30 分前処置によって有意に抑制された (図 4)。

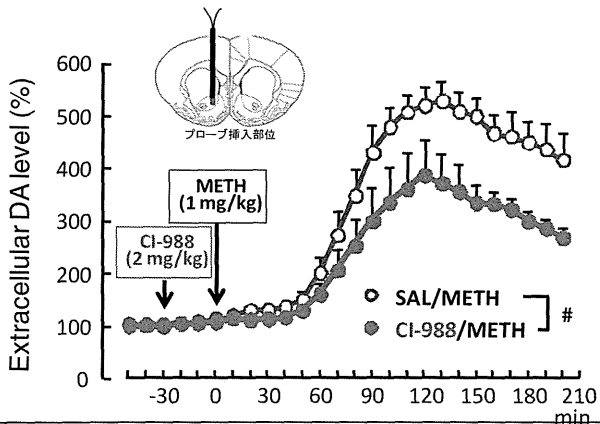


図 4 メタンフェタミン誘発側坐核細胞外ドーパミンレベル増加に対するコレシストキニン受容体拮抗薬の作用

2 周辺症状に対する CI-988 の作用

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

明暗箱試験： CCK2tg マウスの明室滞在時間は、野生型マウスに対し、少なかったが有意ではなかった。一方、メタンフェタミン投与後はどちらの群も明室滞在時間が短くなったが、CCK2tg マウ

スは統計学的に有意であった。この CCK2tg マウスで観察された明室滞在時間の短縮は、CI-988 (2 mg/kg) の投与によって有意に緩解された (データ示さず)。

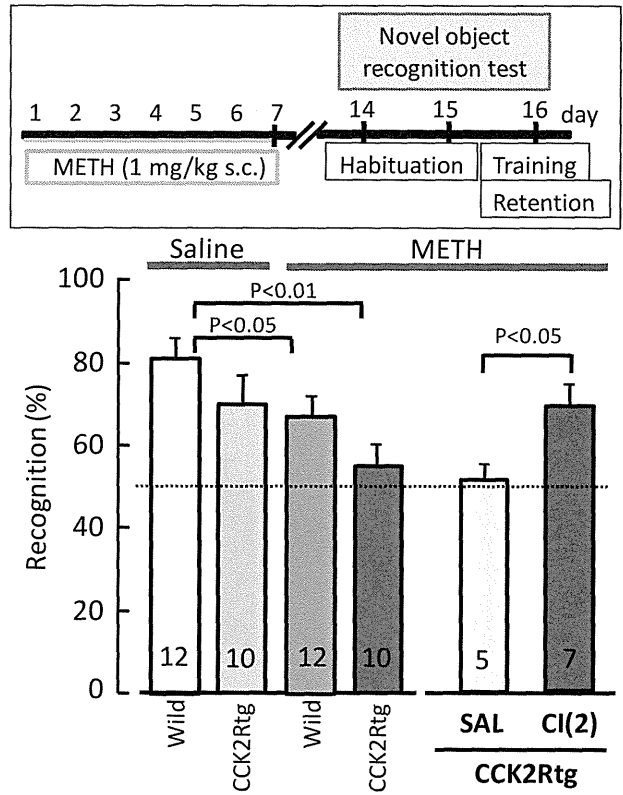


図 5 メタンフェタミン連続投与による新奇物体認識障害に対するコレシストキニン受容体拮抗薬の作用 実験スケジュール (上段) と新奇物体認識試験における野生型マウスおよび CCK2Rtg マウスにおける反応。また CI-988 (2 mg/kg ip) の作用。

新奇物体認識試験： 訓練試行時の探索嗜好率は、各群間で有意な差は認められなかった (データ示さず)。一方、保持試行時では野生型および CCK2Rtg マウスにおいてメタンフェタミン投与群で有意に障害され、その障害は CCK2Rtg マウスの方が強かった。この CCK2Rtg マウスで観察された障害に対し、CI-988 (2 mg/kg) を投与すると有意に緩解した (図 5 下段)。

社会性行動試験： 10 分間の相手に対する追尾、身繕い時間 (社会性行動時間) は、生理食塩液を処置後の CCK2Rtg マウスで有意な短縮が認められた。さらにメタンフェタミン投与によって野生型

および CCK2Rtg マウスの両群で生理食塩投与群と比べて社会性行動時間が短縮した。さらに、この CCK2Rtg マウスにおける短縮は、CI-988 (2 mg/kg) を投与すると有意に緩解した (図 6)。一方、相手から受ける社会性行動の差は各群間で認められなかった (データ示さず)。

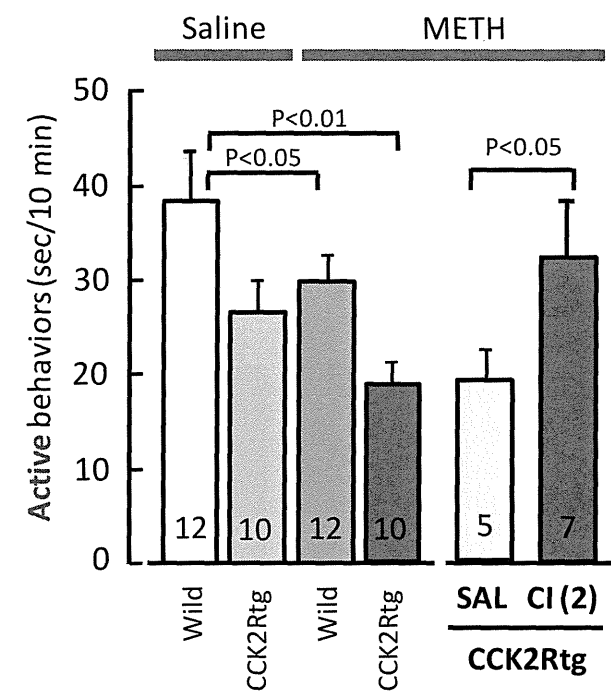


図6 メタンフェタミン連続投与による(積極的)社会性行動障害に対するコレシストキニン受容体拮抗薬の作用。社会性行動における野生型マウスおよび CCK2Rtg マウスにおける反応、および CI-988 (2 mg/kg ip) の作用。

D. 考察

METH 依存に陥ると、幻覚・妄想や認知障害など覚せい剤精神病を発症し⁶⁾、動物においても同様な症状が観察される。症状が発現する前に一刻も早く依存形成を抑制することが、覚せい剤にとどまらず薬物依存症の治療を行う上で非常に重要なポイントであり、研究のターゲットとなる。

3年間の研究期間では、METH による精神依存性行動について確認し、それら指標に対するコレシストキニン2受容体拮抗薬の作用を行動薬理的に検討した。コレシストキニン2受容体拮抗薬

CI-988 それ自身は 2 mg/kg までの用量では、行動に何ら影響しなかった。一方、METH との併用処置によって METH による行動過多および CPP 法による METH 条件付け場所嗜好性に対しては、どちらも抑制した(図2および3)。このことはMETH のドパミンに対する作用を脳内のコレシストキニン受容体が直接あるいは間接的に抑制する可能性があることを示している。そうしたドパミンシステムとコレシストキニンシステムの相互作用について直接的な可能性を確認するために、免疫組織化学的手法により側坐核における CCK2 受容体の発現を観察したところ、神経細胞上においてその発現が認められ、また主にドパミン D2 受容体ではなく、D1 受容体との共局在が観察された。そこで、精神依存性行動に重要な役割を果たしている側坐核における細胞外ドパミン量を測定した。すると、METH によって誘発されるドパミン量の増大が CI-988 (2 mg/kg) の前処置によって部分的ではあるが、有意に抑制された。このことから、CCK2 受容体は側坐核のドパミン神経系に対し、直接あるいは間接的にドパミン遊離作用を調節することによって METH による行動過多あるいは精神依存様症状を緩解していることが明らかとなった。

一方、認知機能、不安様症状、社会性行動など周辺症状についても CI-988 有効性を検討した。METH は野生型マウスにおいて、上記周辺症状を誘発した。CCK2Rtg マウスにおいてはそれらの症状がより強く観察された。こうした症状に対し、CI-988 は有意に拮抗作用を示し、緩解した。また、海馬や前頭皮質において、電気刺激に対する細胞応答性を検討した。METH を連続処置したマウスから摘出した組織において、細胞応答性が減弱していた。この減弱は CI988 の添加で有意に抑制されていた (データ示さず)。したがって、この点

においても、CI988の有用性が示された。

以上のことは、①CCK2受容体は、METH誘発行動障害に重要な役割を果たしていること、②CCK2受容体は、ドーパミン神経系に対する調節作用を有すること、③CI-988はMETHによる行動障害を抑制することを示しており、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。

E. 結論

CCK2受容体はドーパミン受容体と相互作用を有しており、CCK2受容体拮抗薬がMETH誘発依存性行動の形成を抑制する可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Srisurapanont M, Ali R, Marsden J, Sunga A, Wada K and Monterio M: Psychotic symptoms in methamphetamine psychotic in-patients. **Int J Neuropsychopharmacol.** 6: 347-352 (2003).
- 2) Robinson TE and Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal model of amphetamine psychosis. **Brain Res Rev.** 11: 157-198 (1986).
- 3) Daugé V and Léna I: CCK in anxiety and cognitive processes. **Neurosci Biobehav Rev.** 22: 815-25, 1998.
- 4) Pettit HO and Mueller K.: Infusions of cholecystokinin octapeptide into the ventral tegmental area potentiate amphetamine conditioned place preferences. **Psychopharmacology (Berl).** 99: 423-6 (1989).
- 5) Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Horwell DC, Hökfelt T.: CI-988, a selective antagonist of cholecystokininB receptors, prevents morphine tolerance in the rat. **Br J Pharmacol.** 105(3):591-6 (1992).
- 6) Ujike H, Sato M. Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. **Ann N Y Acad Sci.** 1025:279-87 (2004).

F. 研究発表

論文発表

1. Lu L, Mamiya T, Lu P, Toriumi K, Mouri A, Hiramatsu M, Zou LB, Nabeshima T. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. **Behav Brain Res.** 220(1):132-139 (2011).
2. Lu P, Mamiya T, Lu L, Mouri A, Ikejima T, Kim HC, Zou LB, Nabeshima T. Xanthoceraside attenuates amyloid β peptide₂₅₋₃₅-induced learning and memory impairments in mice. **Psychopharmacology (Berl).** 219(1):181-90 (2012).
3. Imai S, Mamiya T, Tsukada A, Sakai Y, Mouri A, Nabeshima T, Ebihara S. Ubiquitin-specific peptidase 46 (Usp46) regulates mouse immobile behavior in the tail suspension test through the GABAergic system. **PLoS One.** 7(6):e39084 (2012).
4. Espallergues J, Mamiya T, Vallée M, Koseki T, Nabeshima T, Tamsamani J, Laruelle C, Maurice T. The antidepressant-like effects of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor trilostane in mice is related to changes in neuroactive steroid and monoamine levels. **Neuropharmacology.** 62(1):492-502 (2012).
5. 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(13):4562-80 (2012).
6. Toriumi K, Mouri A, Narusawa S, Aoyama Y, Ikawa N, Lu L, Nagai T, Mamiya T, Kim HC, Nabeshima T. Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor, leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology.** 37(6):1387-96 (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(10):1489-501 (2012).
 8. Mouri A, Koseki T, Narusawa S, Mamiya T, Kano S, Sawa A, Nabeshima T. Mouse strain differences in phencyclidine-induced behavioural changes. **Int J Neuropsychopharmacol.** 15(6):767-79 (2012).
 9. 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* (2013)
 10. Alkam T, Kim HC, 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.** *In press* (2013)
 1. 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本莊龍輝、毛利彰宏、古関竹直、間宮隆吉、宮本嘉明、新田淳美、福島健、鍋島俊隆：薬物依存関連分子 shati 遺伝子欠損マウスにおける行動異常と脳内の生化学的な変化 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23.)
 2. 青山雄紀、毛利彰宏、鳥海和也、古関竹直、成澤志穂、井川夏実、間宮隆吉、鍋島俊隆：フェンサイクリジンによる異常行動に対するクロザピンのエピジェネティックな作用と GABA 関連遺伝子発現 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23.)
 3. 毛利彰宏、肥田裕丈、安藤雄、間宮隆吉、永井拓、山田清文、鍋島俊隆、野田幸裕：新生児期の PolyI:C 投与はフェンシクリジン投与によるグルタミン酸作動性神経伝達を障害し、異常行動を増悪させる 第 84 回日本薬理学会年会（横浜）(H22.3.23.)
 4. Toshitaka Nabeshima, Takenao Koseki, Akihiro Mouri, Takayoshi Mamiya, Taku Nagai, Kazuya Toriumi, Y. Aoyama, Takuma Yamada, Sizuka Suzuki, Azusa Nakajima.: Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviors associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Stockholm (Sweden) (H24.6.5.)
 5. 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）(H24.9.18.)
 6. 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エピキチン化を介したうつ様行動に関与する 第 35 回

学会発表

日本神経科学会年会（名古屋）(H24.9.18.)

7. Kazuya Toriumi, Akihiro Mouri, Siho Narusawa, Yuki Aoyama, Yumi Ikawa, Linling Lu, Taku Nagai, Takayoshi Mamiya, Hyoun-Chun Kim, Toshitaka Nabeshima.: Prenatal NMDA receptor antagonism impaired proliferation of neuronal progenitor、 leading to fewer glutamatergic neurons in the prefrontal cortex. SFN Neuroscience2012 New Orleans (USA) (H24.10.16)
8. 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：コレスチ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）(H24.10.25.)
9. 大橋玄季、間宮隆吉、鶴岡裕生、宮村美嵩、古関竹直、毛利彰宏、鍋島俊隆、平松正行：胎児期ストレスとコレスチトキニンシステム 第 86 回日本薬理学会年会（福岡）(H25.3.21.)

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：「新規ステロイド誘導体及びその製造方法、並びにその新規ステロイド誘導体を含む有する医薬」

出願番号：PCT/JP2010/052656

発明者：小鹿一、間宮隆吉、鍋島俊隆

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

分担研究者：曾良一郎¹

研究協力者：山崎圭太¹，森屋由紀¹，花尻瑠理²，合田幸広²，池田和隆³，笠原好之¹

(¹ 東北大学大学院精神・神経生物学分野，² 国立医薬品食品衛生研究所生薬部，

³ 東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト)

[研究要旨]

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、死亡例も報告され、昨年、麻薬指定を受けた。カチノン誘導体は中枢刺激薬と類似の構造を有することから、モノアミン輸送体を標的分子としていることが報告されている。メフェドロンはドーパミントランスポーター (DAT) やセロトニントランスポーター (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。

A. 研究目的

カチノン (2-amino-1-phenylpropan-1-one) を元に合成される中枢刺激薬の1種であるメフェドロン (4-methylmethcathinone) は欧州を中心に乱用が拡大している。この薬剤は 2009 年頃から、街頭やインターネットで手軽に購入することができる「脱法ドラッグ」として世界中に爆発的に広がったが、長期間規制も行われてこなかった[1]。本邦においても「安全な薬物」という大きな誤解のもとに安易な使用が拡大し、きわめて深刻な社会問題となっている。ゲートウェイ・ドラッグと

しての使用をきっかけに麻薬等の使用に発展する危険性も増大している。メフェドロンは欧州、米国、日本においても重大な社会問題となっており指定薬物とされていたが、日本では 2012 年 7 月から麻薬指定を受け法律で規制されることとなった。現在までにメフェドロンの単独摂取または他の麻薬や薬物との共摂取による死亡者も報告されている[2, 3]が、メフェドロンの毒性に関する報告は少ない。

メフェドロンなどのカチノン誘導体は中枢刺激薬であるメタンフェタミン、MDMA と類似の

構造を示す。メフェドロンの中樞神経系への作用メカニズムは他の中樞刺激薬と同じく、ドーパミントランスポーター (DAT) やセロトニントランスポーター (SERT) の再取り込みを阻害することで、各細胞外モノアミン濃度を上昇させることが分かっている[4]。メフェドロンは DAT と SERT に対する親和性が DAT/SERT=1/2.5 程度だとされ、親和性が DAT/SERT=150/1 と主に DAT の再取り込みを阻害するメタンフェタミンのような薬物よりも、親和性が DAT/SERT=1/1 と DAT と SERT に均等に作用する MDMA のような薬物に近いことが動物実験で確認された[4, 5]。

本研究においてはメフェドロンの詳細な神経毒性を調査するため、中樞刺激薬の神経毒性と強い相関があるとされる体温の変化について、モノアミン輸送体の欠損マウスや薬理学的手法を用いて検討を行った。また野生型マウスを用いて精神興奮や報酬と相関関係のある行動量の変化および依存などの精神毒性の指標となる行動感作について解析した。さらにメフェドロンのドーパミン神経系への毒性を調べるために、メフェドロンに薬理効果や構造が近いとされる MDMA とともに、ES 細胞から分化させたドーパミン神経細胞への毒性についても検討を行った。

B. 研究方法

1. メフェドロン投与時の体温の変化

1) 実験動物

全ての実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可のもとに行った。実験には C57BL6 と 129Sv/J の混合遺伝背景を持つ野生型マウス、DAT 欠損マウス[6]、SERT 欠損マウス[7]を使用し、全て生後 10 週齢の雄マウスを用いた。マウスの遺伝子型は、尻尾断片組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて判別した。

2) 薬剤

メフェドロンは国立医薬品食品衛生研究所生薬部で合成したものをを用いた。0.9%生理食塩水で溶解し、10 mg/kg の用量に調整し、腹腔内投与した。コントロールには 0.9%生理食塩水を用いた。セロトニン 1A 受容体拮抗薬である WAY100635 (Sigma) は 3 mg/kg の用量になるように 0.9%生理食塩水で調整し腹腔内投与を行った。コントロールには 0.9%生理食塩水を用いた。

3) 体温測定

3)-1 メフェドロンによる体温変化の測定

体温の測定には、マルチパーパスサーモメーター-BAT-10 (Physitemp Instruments, New Jersey, 米国) を使用し、直腸に挿入するプローブはインターチェンジアルプローブ RET-3 (Physitemp Instruments, New Jersey, 米国) を用いた[8]。測定の 30 分前にマウスを測定場所へと移動させ、体重を測定した。体重の測定から 30 分後に 10 mg/kg メフェドロンを投与し、投与 15 分後、30 分後、45 分後および 60 分後の体温を測定した。全ての測定は 14-15 時の間に行った。

3)-2 セロトニン 1A 受容体拮抗薬 WAY100635 前投与時のメフェドロン投与による体温変化の測定

体温測定機器は全てメフェドロン単独投与時と同じものを用いた。10 mg/kg メフェドロン投与の 30 分前に WAY100635 を 3 mg/kg の用量で投与し、メフェドロン投与 15 分後、30 分後、45 分後および 60 分後の体温を測定した。全ての測定は 14-15 時の間に行った。

2. 移所運動量の測定

すべての移所運動量の計測は、Supermex システム (室町機械) を用いて行った。マウスの水平方向の運動量は、測定用チャンバー (40 x 30 x 26 cm) の上方に設置されたセンサーによって計測され、5 分ごとの値がコンピュータに記録された。

マウスは、メフェドロン投与 60 分前に測定用チャンバーに移し、馴化を行った。メフェドロン (3 mg/kg) 投与後、マウスの移所運動量は 120 分間測定した[9]。全ての測定は 14-17 時の間に行った。

行動感作の測定は上記のセッションを 1 日おきに 7 回継続し、7 日間の休薬期間を経て同量 (3 mg/kg) のメフェドロンを投与し、再燃の有無を検討した[9]。

3. 細胞毒性の測定

1) ES 細胞からのドーパミン神経細胞の作製および薬剤処理

メフェドロンの細胞毒性の測定には、マウス ES 細胞を分化誘導させたドーパミン神経細胞を使用した。ES 細胞からドーパミン神経細胞への分化は SDIA (Stromal cell-Derived Inducing Activity) 法を用いた[10]。分化誘導を 14 日間行い、ドーパミン神経細胞を分化させたあと、15 日目に生理食塩水および各濃度のメフェドロン (3 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM) および MDMA (3 mM, 10 mM, 30 mM, 100 mM) を培地に添加し、24 時間処理した。その後、速やかに 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、免疫染色に用いた。

2) 免疫染色

固定した細胞に対して免疫染色を行った。一次抗体には神経細胞のマーカーとして Neuronal Nuclei (NeuN) 抗体 (1:1000, mouse, MILLIPORE) を使用し、ドーパミン神経細胞のマーカーには Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体 (1:1000, rabbit, MILLIPORE) を用いた。二次抗体には Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体および Alexa 594 標識抗マウス IgG 抗体 (ともに 1:500, goat, Invitrogen) を用いた。観察にはツァイス共焦点レーザー顕微鏡 (PASCAL) および BZ-9000 (キーエンス) を用いた。観察には TH および NeuN の両方が陽性の細胞をドーパミン神経細胞とみなした。

C. 研究結果

1. メフェドロン投与時の体温の変化

1-1. メフェドロン単独投与時の体温変化

検討した 4 つの遺伝子型マウスについて、10 mg/kg メフェドロン投与において、体温の変化に対して時間×遺伝子型の間に有意な相関関係が見られた (ANOVA, $F(12, 139) = 4.042, p < 0.0005$)。

通常、メタンフェタミンなどの中枢刺激薬の投与では体温の上昇が認められる。しかし、野生型マウスに 10 mg/kg のメフェドロンを腹腔内投与したところ、投与 15 分後において、測定開始時 ($37.7 \pm 0.7^\circ\text{C}$) から 1.8°C の体温低下が見られた ($p < 0.025$)。投与 30 分後においても 0.9°C の体温低下が見られたが、投与前に比べて有意な差ではなく、投与 45 分後には投与前と同じ程度に体温が回復した。

SERT ホモ欠損マウスに対して 10 mg/kg のメフェドロンを腹腔内投与したところ、野生型マウスの場合と同様に体温の低下が生じた。メフェドロン投与 15 分後には体温が 2.0°C 低下し ($p < 0.0005$)、投与 30 分後においても 2.3°C 低下していた ($p < 0.0005$)。

DAT ヘテロ欠損マウスでは体温の変化が、メフェドロン投与 15 分後において投与前に比較して 1.5°C の体温低下が見られた ($p < 0.01$)。しかし、野生型マウスと比べるとメフェドロン投与による体温低下は有意に抑えられており ($p < 0.002$)、SERT ホモ欠損マウスと比べても同様の結果が得られた ($p < 0.05$)。この傾向はメフェドロン投与 30 分後においても同様で、DAT 欠損マウスでは野生型マウス ($p < 0.03$) や SERT ホモ欠損マウス ($p < 0.002$) に比べて有意に体温の低下が抑えられていた。

DAT ホモ欠損マウスは、野生型マウスと異なりメフェドロン投与による体温の低下が認められなかった。メフェドロン投与 15 分後において、