

201235008A-B

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業)

乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法についての研究

## 平成 24 年度 総括研究報告書

## 平成 22 - 24 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

Annual Report

Research on Pharmaceutical and Medical Safety

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

Japan in 2010-2012

(Chief ; Toshitaka Nabeshima)

平成 25 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業）

乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法についての研究

## 平成 24 年度 総括研究報告書

### 平成 22-24 年度 3 年間のまとめ・総合研究報告書

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

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

平成 25 年 3 月

研究代表者 鍋島俊隆

発刊にあたって

研究代表者 鍋島俊隆

厚生労働省発薬食第 0613 第 75 号をもって交付決定の通知をうけた平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）課題名「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究」について、その総括研究報告書、分担研究報告書、および平成 22 年度から 3 年間の研究をまとめた総合研究報告書を作成したことを報告いたします。

平成 25 年 3 月吉日

## 目次

1. 平成 24 年度総括研究報告 .....	1
2. 平成 24 年度分担研究報告 .....	13
フェンサイクリジンにより誘発される行動障害に対する抗精神病薬およびエピジェネティクス制御による治療効果 .....	15
(名城大学薬学部 鍋島俊隆)	
(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)	
乱用薬物への渴望再燃機構の解明とその治療薬開発に関する研究 .....	32
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)	
薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析 .....	40
(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)	
乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検索 .....	50
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)	
乱用薬物依存における大脳基底核神経回路制御の分子機構 .....	60
(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 正田貴俊)	
依存性薬物の連続投与による精神疾患様症状とその治療薬開発に関する基礎研究 .....	67
～コルシトキン受容体拮抗薬による覚せい剤依存症の治療の可能性～	
(名城大学薬学部 間宮隆吉)	
覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序 .....	76
(東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野 曾良一郎)	
物質使用のリスクとなるパーソナリティ測定尺度 Substance Use Risk Profile Scale-Japanese version の確立に関する研究 .....	86
(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)	
(研究協力者：千葉大学大学院医学研究院 関根吉統、大宮宗一郎)	
依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発 .....	96
-メタンフェタミンによる感受性亢進と dual specificity phosphatase 1 (Dusp1) 遺伝子-	
(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)	
薬物依存の再発防止に関する研究 .....	105
(東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト 池田和隆)	
3. 平成 22～24 年度 3 年のまとめ総合研究報告 .....	117
4. 平成 22～24 年度 3 年のまとめ 研究分担者総合研究報告 .....	129
乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法についての研究 .....	131
(名城大学薬学部 鍋島俊隆)	
(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)	
乱用薬物への渴望再燃機構の解明とその治療薬開発に関する研究 .....	166
(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)	

メタンフェタミンおよびモルヒネの精神依存形成に関与する脳内エピジェネティック制御機構に関する研究	181
ー薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析ー	
(星薬科大学薬品毒性学教室 鈴木 勉)	
薬物依存治療薬の開発および関連遺伝子に関する研究	200
ー乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検索ー	
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)	
覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割	219
(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)	
薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究	233
ーコレシストキニン受容体拮抗薬による覚せい剤依存症の治療の可能性ー	
(名城大学薬学部 間宮隆吉)	
覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序	242
(東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野 曾良一郎)	
覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究	255
ー物質使用のリスクとなるパーソナリティ測定尺度 Substance Use Risk Profile Scale-Japanese version の開発および確立に関する研究ー	
(千葉大学大学院医学研究院精神医学 伊豫雅臣)	
依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発	278
(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)	
薬物依存の再発防止に関する研究	299
(東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト 池田和隆)	
5. 平成 22～24 年度刊行物一覧及び関連論文別刷	329
6. 研究代表者・研究分担者一覧	659

平成 22～24 年度 3 年のまとめ 総合研究報告

平成 22～24 年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業)

「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法に関する研究」

研究代表者 鍋島俊隆

### 総合研究報告

本研究班の目的は、覚せい剤をはじめとする乱用薬物による神経毒性や依存症に対する診断法を確立するとともに、発症の機序を解明し、それらを用いて予防・治療薬を開発することであり、国際的な依存・乱用防止の啓発に役立て、研究成果を社会に還元することである。本研究では、平成 22 年から 24 年度の 3 年間にわたり、基礎研究は鍋島俊隆が責任者となり、乱用薬物による依存および精神行動障害動物モデルを用いて病態発現機序の解析ならびに候補薬物のスクリーニングを行った。また、臨床研究は曾良一郎教授が責任者となり、乱用薬物の再使用リスク評価尺度、および物質関連障害になりやすさを検出する心理検査法の日本語版の確立、ならびに患者サンプルを用いた薬物依存関連因子の探索を行った。さらに、基礎研究と臨床研究のクロストークとして、基礎研究において有力な治療候補物質に関しては臨床研究で確立した診断法でその有効性を評価し、臨床知見で報告されている現象について動物モデルを用いて再現し、薬物に対する依存や精神毒性の発生機序や精神病の発症脆弱性を分子生物学的なレベルでさらに解明した。3 年間の本推進事業で当初設定した目標を超える成果を挙げることができたので、その概要について報告する。

## 平成22～24年度 総合研究報告

### (I) 基礎研究

薬物依存に深く関与する大脳基底核神経回路の直接路と間接路に対する可逆的神経伝達阻止法を開発し、乱用薬物による依存形成と病態に必須の神経回路とその制御に関与する分子機構を解明した。覚せい剤による精神依存に中脳辺縁ドーパミン神経系のエピジェネティクス制御を介した免疫応答が深く関与することが明らかにし、免疫系の活性化が覚せい剤精神依存の形成を抑制することを明らかにした。覚せい剤退薬時に発現する薬物への渴望ならびに認知機能障害の発現機序にカンナビノイドシステムが関与することを明らかにするとともに、大麻活性成分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を指摘した。免疫抑制剤がモルヒネによる精神依存形成を抑制していることを明らかにした。選択的コレスチキニン2受容体拮抗薬、豊かな発育環境および抑制系神経系の活性化や、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は、依存性薬物による行動障害を抑制することを明らかにした。薬物依存形成に shati/nat8l、transmembrane protein 168 および piccolo という3つの新規分子が関与していることを発見し、側坐核における shati/nat8l の覚せい剤依存の新たな治療薬開発の標的となることを明らかにした。これらの基礎研究から、臨床応用が可能な多くの治療薬候補物質を示した。

### (II) 臨床研究

前頭葉における活性型ミクログリアの増加が覚せい剤使用者の精神病症状と関連し、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリン等の抗炎症剤が覚せい剤関連精神障害に有効であることを明らかにした。日本語版 Substance Use Risk Profile Scale (SURPS-J) は物質関連障害の予防法確立に関連して物質乱用のリスクとなるパーソナリティに注目した心理尺度(SURPS)と同様に物質障害を予防する上で有用なツールであり、物質依存症者への介入にあたっては不安感受性と絶望感が高い群に注目する必要性を明らかにした。G 蛋白質活性型内向き整流性カリウム(GIRK)チャネルの遺伝子多型が覚せい剤依存発症脆弱性と関連することを見出した。また、CREB1 近傍の多型が様々な依存性物質に対する感受性と関連することを見出した。後方視的研究と前方視的研究の両者において、GIRK チャネル阻害能を有する処方薬が再使用リスク評価尺度のスコアを改善させることを見出した。新たに麻薬指定されたメチロンとメフェドロンはモノアミン輸送体を標的分子としているが、ドーパミン神経伝達のみならず、セロトニン1Aあるいは1B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ことを明らかにした。大脳新皮質の spinophilin、海馬および側坐核・嗅結節・中隔領域の Dusp1 の発現変化が依存性薬物による精神障害発現作用と関連していることを明らかにした。依存性薬物による行動異常を改善する内在性物質 D-セリンの細胞外シグナルの調節に serine racemase や亜鉛イオンが関与することを見出した。

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

(名城大学薬学部 鍋島俊隆)

(研究協力者：名城大学薬学部 毛利彰宏)



依存性薬物による精神依存および精神障害の発症の機序解明ならびに予防及び治療法の開発について検討を行った。平成 22 年度は、臨床において全世界で繁用されている強力な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネの適正使用を推進する上で、モルヒネの依存形成の機序について詳細な検討を行った。シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスとシクロフィリン D に強い親和性を有するシクロスポリン A を用いた知見により、シクロフィリン D はモルヒネによる精神依存の形成およびそれに関連した脳内報酬系であるドパミン作動性神経系の活性化を促進していることを明らかにした。また、依存性薬物による精神障害は断薬後も持続的に惹起されるため、乱用者の社会復帰への大きな妨げとなり、このような精神障害の克服は急務である。平成 23 年度は、幼若期におけるエンリッチ環境飼育によるエピソード制御および GABA 作動性神経前駆細胞移植はフェンサイクリジン (PCP) により誘発される行動障害に対して予防効果を示すことを明らかにした。さらに、平成 24 年度は、PCP による精神障害の病態およびそれに対する抗精神病薬の効果にヒストンアセチル化の低下と回復がそれぞれ関与していることを明らかにした。

## 2. 乱用薬物への渴望再燃機構の解明とその治療薬開発に関する研究

(長崎国際大学薬学部薬理学研究室 山本経之)

本研究では、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) ならびに認知機能障害の発現機序を、脳内報酬系との関連性が示唆されているカンナビノイドシステム (カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体ならびにエンドカンナビノイドの観点から追究した。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。

初年度は、薬物への渴望に関する実験はラットの薬物自己投与実験法を用い渴望再燃の誘発因子の 1 つに挙げられるストレスの側面から CB<sub>1</sub> 受容体に着目して検討した。本実験では、footshock 負荷による MAP 探索行動を指標に検討した。このストレス誘発 MAP 探索行動は、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) により有意に抑制された。また、ストレス反応に伴うコルチコステロンの関与を調べる目的で、コルチコステロン合成阻害薬 metyrapone を投与したが、MAP 探索行動は抑制されなかった。一方、認知機能はマウスの新奇物体認識試験を用いて検討した。7 日間の MAP (1.0 mg/kg, i.p.) 反復投与後の退薬時では、test 試行における新奇物体へのアプローチ時間は有意に低下し、認知機能障害が認められた。この認知機能障害は、AM251 (3.2 mg/kg, i.p.) の MAP との併用反復投与により拮抗された。また、カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体遺伝子欠損マウスでは、MAP 退薬時に野生型マウスで認められた認知機能障害は全く認められなかった。

2 年目は、エンドカンナビノイド、特に anandamide ならびにカンナビノイドシステムとの関連性が示唆されているアラキドン酸カスケードの観点から追究した。薬物関連刺激 (cue) によって誘発される MAP 探索行動は、MAP 退薬時における anandamide 分解酵素 (fatty acid amide hydrolase; FAAH) 阻害薬 URB597 の退薬時での反復投与 (1 日 1 回、計 5 日間) により有意に抑制された。さらに、cue 呈示前の単回投与 (1 時間前処置) によっても抑制された。しかしながら、MAP-priming 投与によって誘発される MAP 探索行動は抑制されなかった。また、MAP 退薬時に

における URB597 単回投与では、MAP 探索行動は誘発されなかった。さらに、MAP 探索行動におけるプロスタノイド受容体の関与を追究した。プロスタノイド EP1 および EP3 受容体拮抗薬は、cue ならびに MAP-priming 投与によって誘発される MAP 探索行動を有意に抑制した。一方、新奇物体認識試験において、URB597 の pre 試行前での単回投与群では、新奇物体へのアプローチ時間の有意な増加は認められず、認知機能障害が誘発された。この障害はカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 AM251 および COX 阻害薬 meloxicam によって改善された。また、MAP 退薬は本課題における認知機能を障害し、この MAP 退薬による認知機能障害は COX 阻害薬 diclofenac によって有意に改善された。

3年目は、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。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 を誘発因子負荷に単回投与 (1 時間前処置 ; 40 mg/kg, i.p.) すること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。また、新奇物体認識試験において、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。一方、大麻活性成分・<sup>9</sup>-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・<sup>9</sup>-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。

以上のことから、①MAP 退薬時に認められるストレス誘発性 MAP 探索行動ならびに認知機能障害は、いずれも CB<sub>1</sub> 受容体の活性化により発現する事が明らかになった。また、footshock 誘発性の MAP 探索行動の発現にはコルチコステロンの関与は無い事が示唆された。②cue 呈示によって誘発される MAP 探索行動は、脳内 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、MAP 退薬時での認知機能障害は、CB<sub>1</sub> 受容体を介したアラキドン酸カスケードの活性化により発現している可能性が考えられる。③cue 呈示およびストレス負荷によって誘発されるは、脳内 2-AG の増加を伴うカンナビノイドシステムの活性化によって抑制されることが明らかとなった。④・<sup>9</sup>-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。これらの知見を総括すると、渴望の誘発因子による相違が存在するが、MAP 探索行動の発現機序には CB<sub>1</sub> 受容体を介した脳内カンナビノイドシステムの調節機構が関与し、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最も有力な治療薬候補として期待することができると考えられた。

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

(星薬科大学 薬品毒性学教室 鈴木 勉)

覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ド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。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報告されている。そこでまず methamphetamine (METH) 誘発逆耐性獲得動物の側坐核よりサ

ンプルを作製し、エピジェネティクス制御について網羅的解析を行った。その結果、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核では Chemokine (C-C motif) 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が明らかとなった。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。そこで免疫系を活性化させる目的で、lipopolysaccharides (LPS) を用いて検討を行ったところ、LPS を処置することにより METH 誘発報酬効果および逆耐性の有意な抑制が観察された。そこで、LPS 処置時における各種インターロイキン類の変化について、RT-PCR 法を用いて検討したところ、末梢血を用いた検討では、LPS 処置 1 時間後において CCR2 のアゴニストである CCL2 mRNA 量の有意な増加が認められた。一方、側坐核領域では、対照群に対し LPS を処置したマウスにおいて IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 量の著明な増加が観察された。そこで、脳における免疫系を担うミクログリアについて検討したところ、LPS 処置によりミクログリアの活性化が認められた。さらに免疫細胞の関与について検討する目的で、マウスより採取した脾臓細胞を培養し、LPS を 1 時間曝露した後、その培養上清を脳室内投与したところ、METH 誘発自発運動促進作用が有意に抑制されたのに対して、同上清の静脈内投与では METH 誘発自発運動促進作用に変化は認められなかった。したがって、LPS による作用は免疫反応を介し中枢神経に影響を及ぼしている可能性が示唆された。現在までに免疫細胞上に cannabinoid receptor 2 (CB2R) が存在することや、CB2R が cocaine の依存に関与することが報告されていることから、これらの変化に CB2R が関与する可能性が考えられる。そこで LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用における CB2R の関与について検討したところ、LPS を前処置することにより抑制される METH 誘発報酬効果は、CB2R 拮抗薬である AM630 を前処置することにより有意に消失したことから、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 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 CB2Rs-TIMP1 を介し、METH による依存形成の抑制に一部関与している可能性が示唆された。

#### 4. 薬物依存治療薬の開発および関連遺伝子に関する研究

(富山大学大学院医学薬学研究部薬物治療学研究室 新田淳美)

薬物乱用は世界各国で大きな問題となっており、本邦においては、覚せい剤メタンフェタミンや麻薬による犯罪事例の若年化が進んでいる。したがって、薬物依存の形成メカニズムを解明し、その予防および治療法の開発が急務となっている。しかし、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た。そして、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

を明らかにした。

Shati/nat8l については、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明らかにした。さらに、その抑制メカニズムとして、側坐核において *N*-acetylaspartate (NAA) 合成酵素 shati/nat8l は、NAA を生合成し、続いて産生された代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 3 の選択的アゴニスト *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) の作用を介して、ドパミン遊離量を減少させることにより、メタンフェタミン応答性に対して抑制的に働くことを解明した。つまり、shati/nat8l 関連システムは覚せい剤依存の新たな治療薬開発の標的となることを示唆した。

一方、Tmem168 については、覚せい剤およびニコチンの両方の薬物依存形成メカニズムに関与していることを解明した。つまり、初期作用機序の異なる依存性薬物による薬物依存を治療するための共通の標的分子と成り得ることを示唆した。

我々が見出した3つの分子は、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り、今後、これらの発現を調節する化合物を見出され、薬物依存の治療薬創生につながることを期待される。

## 5. 覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割

(京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター 疋田貴俊)

本研究では、覚せい剤、コカインといった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、乱用薬物による病態形成と発現における大脳基底核神経回路制御機構を解析した。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、マウス生体において直接路と間接路のそれぞれに特異的に可逆的神経伝達阻止ができる系を確立した。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た。乱用薬物の急性投与による行動賦活作用には直接路と間接路が共に必須であった。それに対し、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、さらに回路特異的な神経伝達により制御されていることを示した。これらの結果から、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。直接路と間接路が統合される黒質網様部に着目し、乱用薬物投与時の神経回路特異的な分子変化を探索し、直接路依存的に乱用薬物投与により発現上昇する分子として ephrin-Eph 分子群 (ephrinA5, EphA4, EphA5) を同定した。これらの分子は黒質網様部の GABA 作動性抑制性神経細胞に共存しており、イムノアドヘジンによるこれらの分子の活性化は乱用薬物連日投与による行動量増加を抑制した。さらに直接路遮断時にのみ乱用薬物投与による ephrinA5 下流シグナルの増強 (黒質網様部でのリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の増加) がみられた。今後さらに、神経回路を基盤とした分子機構の解明をすすめることによって乱用薬物による依存と病態の解明と治療法開発へつながることが期待できる。

## 6. 薬物依存形成機構の解明および治療薬の開発研究

(名城大学薬学部 間宮隆吉)

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。

## 7. 覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

(東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野 曾良一郎)

覚せい剤であるメタンフェタミン (METH) や 2007 年 2 月に本邦で麻薬指定されるに至った 2-Methylamino-1-(3,4-methylenedioxy-phenyl)propan-1-one (メチロン)、2012 年に麻薬指定されたメフェドロンは、依存の形成と毒性の発揮には、機序としてドーパミン神経系が重要な役割を

果たす[1]とされているが、セロトニン神経伝達系の関与も示唆されている。本研究では METH、メチロン、メフェドロンについて標的分子である細胞膜モノアミントランスポーター、受容体やに着目し、マウスモデルや培養細胞を使用しての検討から毒性や依存の作用機序について解析を進めた。同時にセロトニンの合成酵素である Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) 遺伝子について、TPH2 の遺伝子多型が METH 依存、精神病と相関するかどうかについて検討を行った。

## 8. 覚せい剤誘発性神経障害の修復および逆耐性現象の治療に関する研究

(千葉大学大学院医学研究院 精神医学 伊豫雅臣)

① 平成 22 年度、我々は覚せい剤使用者の活性型ミクログリア密度と精神症状についての関連性を覚せい剤使用者で現在同薬を断薬しているもの 12 名調べた。その結果、前頭葉の活性型ミクログリアの密度と簡易精神症状評価尺度陽性症状下位スコアとの間に負の相関が認められ、前頭葉における活性型ミクログリアの増加が覚せい剤使用者の精神病症状と関連していることが示唆された。このことから、ミクログリアの活性化を抑制するミノサイクリン等の抗炎症剤が覚せい剤関連精神障害に有効であることが推測された。

② 平成 23-24 年度は、日本語版 Substance Use Risk Profile Scale (SURPS-J) の開発及びそれを用いて薬物依存者のパーソナリティの特徴を調べた。近年、物質関連障害の予防法確立に関連して物質乱用のリスクとなるパーソナリティに注目した心理尺度(SURPS)が世界的に使用されている。そこで我々は平成 23 年度は SURPS-J を開発し、その妥当性と信頼性について検討し、平成 24 年度は、アルコール・薬物専門治療病院の入院患者 27 名に対して SURPS-J を施行し、物質使用関連障害罹患者の診断名別の SURPS-J の得点を比較し、SURPS-J と同調傾向、問題解決スキルの関連について検証を行った。その結果、統計分析に基づく比較が可能であった使用薬物間での SURPS-J の得点には有意差はみられなかった。SURPS-J と同調傾向、問題解決スキルの関連については、不安感受性が高いと問題解決への自信が低下し、絶望感が高いと問題解決に伴う感情や行動をコントロールできるという自信が低下する傾向が窺えた。一方、刺激志向性と衝動性が高くとも、本研究で使用した問題解決尺度で測定される問題解決スキルに変化がないことが窺われた。また、SURPS-J および不安感受性の得点が高い群では低い群に比べて問題解決への自信が有意に低かった。これらの研究から、SURPS-J は SURPS と同様に物質障害を予防する上で有用なツールであることが示唆され、物依存症者への介入にあたっては、不安感受性と絶望感が高い群に注目する必要があると示唆された。

## 9. 依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発

(東京医科歯科大学医学部精神行動医科学 西川 徹)

依存性薬物による精神障害発症の分子機構の手がかりを得る目的で、(i) 樹状突起に発現してシナプス機能に関係し、乱用される統合失調症様症状発現薬の影響が報告されてきた脳の spinophilin

に対する、覚せい剤・methamphetamineの作用、(ii)乱用薬物による精神病症状のモデルと考えられる逆耐性現象やその再発を誘導するストレスと関係する海馬や中脳辺縁系ドーパミンニューロンの投射領域におけるmethamphetamineの遺伝子発現に対する影響、および(iii)乱用の対象とされるドーパミン作動薬やNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬の異常行動発現作用を抑制する内在性物質D-セリンのシグナル調節機構、等について実験動物を用いて検討した。これらの研究から、(i)大脳新皮質のspinophilinがmethamphetamineその他のドーパミン作動薬による逆耐性現象以外の長期持続性の変化の維持と形成に関与すること、(ii)海馬や中脳辺縁領域のdual-specificity protein phosphatase 1 (Dusp1)遺伝子が逆耐性現象の維持に関与すること、(iii)細胞外D-セリン濃度がD-セリン合成酵素の一つのセリンラセマーゼの活性に影響されることやNMDA受容体に特異的結合部位をもつ亜鉛イオンが制御に関係すること、等が示唆された。以上の分子は、依存性薬物による精神病状態の発症や再発の、基盤となる分子異常の解析や、新たな治療・予防法開発の標的となる可能性があると考えられる

## 10. 薬物依存の再発防止に関する研究

(東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト 池田和隆)

乱用薬物に対する依存や乱用薬物による精神病症状は、治療が難しく再発率が極めて高い。本研究では、乱用薬物によるこれらの精神障害の再発を防止することを目的とした。第一に、乱用薬物に対する感受性や乱用薬物による精神病発症脆弱性の遺伝的要因を明らかにし、ゲノム解析により再発リスクを予測する技術の開発を目指した。その結果、覚せい剤依存患者のゲノムDNAおよび覚せい剤精神病に関わる臨床情報を200セット以上導入し、ドーパミンやオピオイドのシグナル伝達で重要なG蛋白質活性化型内向き整流性カリウム(GIRK)チャンネルに関して、遺伝子多型と発症脆弱性との関連を見出した。さらに、オピオイド感受性に関するゲノムワイド関連解析を行い、CREB1遺伝子の近傍にある一塩基多型(SNP)が強く関連することを見出した。このSNPは、覚醒剤依存患者、アルコール依存患者、摂食障害患者のそれぞれにおいて依存重症度と関連していること、健常者における性格テストにおいて「報酬依存」と関連すること、死後脳サンプルにおいてCREB1遺伝子発現量と関連することが明らかとなった。第二に、上記のゲノム科学研究での知見と今までに開発した薬物再使用リスク評価尺度を用いることで、再発防止に繋げる技術の開発を目指した。独自に開発した尺度は、日、英、仏、中、韓、インドネシア、ペルシャ、ウルドゥの言語のバージョンが作成され、国内外で活用されるようになった。また、2つの後方視的研究により、GIRKチャンネル阻害能を有する処方薬(パロキセチン、イフェンプロジル、サートラリン、クロロプロマジンなど)を投与されている患者群では投与されていない患者群と比べて有意に再使用リスク評価尺度のスコアが改善していることを見出した。さらに、ビタミンCを対照薬としたイフェンプロジルのランダム割り付けクロスオーバー臨床試験においても、イフェンプロジルに再使用リスク評価尺度スコアを改善させる可能性が示唆された。これら、ゲノム科学での研究成果と臨床試験の成果を組み合わせることで、依存症治療を向上させることができると期待される。

平成 22～24 年度 3 年のまとめ 総合研究報告  
(分担研究者)



# 「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断 及び治療法についての研究」

平成 22 年度～平成 24 年度総合研究報告書

## 乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断及び治療法についての研究

分担研究者：鍋島俊隆<sup>1</sup>

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

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

### [研究要旨]

依存性薬物による精神依存および精神障害の発症の機序解明ならびに予防及び治療法の開発について検討を行った。平成 22 年度は、臨床において全世界で繁用されている強力な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネの適正使用を推進する上で、モルヒネの依存形成の機序について詳細な検討を行った。シクロフィリン D 遺伝子欠損マウスとシクロフィリン D に強い親和性を有するシクロスポリン A を用いた知見により、シクロフィリン D はモルヒネによる精神依存の形成およびそれに関連した脳内報酬系であるドーパミン作動性神経系の活性化を促進していることを明らかにした。また、依存性薬物による精神障害は断薬後も持続的に惹起されるため、乱用者の社会復帰への大きな妨げとなり、このような精神障害の克服は急務である。平成 23 年度は、幼若期におけるエンリッチ環境飼育によるエピジェネティクス制御および GABA 作動性神経前駆細胞移植はフェンサイクリジン (PCP) により誘発される行動障害に対して予防効果を示すことを明らかにした。さらに、平成 24 年度は、PCP による精神障害の病態およびそれに対する抗精神病薬の効果にヒストンアセチル化の低下と回復がそれぞれ関与していることを明らかにした。

### A. 研究目的

薬物依存は薬物乱用の繰り返しの結果として生じた脳の慢性的な異常状態であり、その薬物の使用をやめようと思っても、渴望を自己コントロールできずに薬物を乱用してしまう状態である。モルヒネは臨床において全世界で繁用されている強力な麻薬性鎮痛薬であるが、モルヒネ慢性投与は薬物依存を形成する危険性があるため、モルヒネの依存形成機構を正しく理解することが、モルヒネの適正使用を推進する上で不可欠

である。平成 22 年度は、モルヒネによる精神依存に対するシクロスポリン A の効果について体系的に評価することを目的とし、モルヒネによる精神依存の形成に対するシクロスポリン A の効果、およびモルヒネにより一旦形成された精神依存に対するシクロスポリン A の効果について行動学的解析を行った。さらに、モルヒネ誘発性精神依存の形成機構におけるシクロスポリン A と強い親和性を有するシクロフィリン D の関与を解明するため、シクロフィリン D の脳

内での局在を検討し、シクロフィリンD 遺伝子欠損マウスにおけるモルヒネによる精神依存形成について行動学的解析および生化学的解析を行った。

また、薬物依存患者を一般社会に復帰させるには、薬物乱用による精神依存だけでなく精神・認知障害に対する予防・治療が必須となっている。平成23年度は、依存性薬物による精神障害の発現を抑制できる予防法を開発することは社会的要求性の高いものになると考えられることから、発達期において養育環境や神経機能を強化するため、大きいサイズのケージに様々なオブジェクトを設置したエンリッチ環境と呼ばれる飼育環境でのエピジェネティクス制御やGABA作動性前駆神経細胞の移植を行い、抑制性神経機能の亢進がフェンサイクリジン(PCP)による精神障害の発現に対して与える影響について検討を行った。平成24年度は、依存性薬物による行動障害およびそれに対する抗精神病薬の緩解効果にエピジェネティクスが関与しているか、PCP連続投与マウスにおけるエピジェネティクス異常およびそれに対する抗精神病薬の作用について検討を行った。さらに、エピジェネティクス修飾に作用するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の治療薬としての有用性についてPCP連続投与マウスを用いて評価を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物および薬物

実験にはICR系雄性マウス、C57BL/6J系雄性マウス(Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan)および雄性Cyp D (-/-)マウスを用いた。Cyp D (-/-)マウスはNakagawaら

(2005) (1)が作製し、C57BL/6Jとヘテロ型シクロフィリンD遺伝子欠損[Cyp D (+/-)]マウスをF10まで交配させ、99.99%のC57BL/6Jの遺伝的背景をもつマウスを用いた。動物は室温 $24 \pm 1$  °C、湿度 $55 \pm 5$  %, 8:00~20:00明期の明暗サイクルの恒温室でプラスチック製ケージを用いて飼育した。水および飼料(CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, 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。

### 2. 使用薬物

フェンサイクリジン塩酸塩(PCP)は名城大学大学院薬学研究科の古川宏教授が合成、供与された。モルヒネ(MOR)は武田薬品工業(大阪)、シクロスポリンA注射液(CsA)はNovartis Pharmaceutical (Basel, Switzerland), クロザピン(CLZ)はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ハロペリドール(HAL)は田辺三菱製薬(大阪), 酪酸ナトリウム(SB)は和光純薬工業(大阪), ドパミンD1受容体拮抗薬であるSCH-23390 hydrochloride (SCH)はResearch Biochemicals International (MA, USA)よりそれぞれ購入した。MOR, PCP, HAL, SB, SCHは生理食塩水(SAL)に溶解・希釈し、CLZは1N塩酸で溶解後、SALで希釈し、マウスに投与した。

### 3. エンリッチ環境

透明なアクリル製の特製ケージ(50×70×20 cm)内に木製のソフトチップを敷き、トンネル、シーソー、ランニングホイールなどの様々なオブジェクトを加え、エンリッチ環境とした。ランニングホイールはケージ内に2つ設置し、他のオブジェクトを含め計7つのオブジェクトを設置した。新奇

な環境を保つため、毎日オブジェクトの配置を変え、5つのオブジェクトのうち2つは交換するようにした。水および飼料を自由摂取できるよう、給水ビンと飼料箱をケージ内に設置した。本実験では、マウスを3週齢より4週間、1日12時間(20:00-8:00)エンリッチ環境下で飼育した。

#### 4. GABA 作動性神経前駆細胞移植

胎生13.5日目のGFP発現C57BL6/Jマウス(CAG-GFP)の胎児より、GABA作動性神経前駆細胞を豊富に含む領域であるMedial Ganglionic Eminence (MGE)を切り出し、その細胞群を生後1日目のICRマウスの前頭前皮質内に移植した。その後、生後42日目において、PCPを急性投与し行動学的解析を行った。

#### 5. 行動量測定試験

透明なアクリル製のケース(45×26×40cm)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。ケース内での行動量をScanet装置(SV-10, Melquest, Toyama, Japan)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(habituation)。2日目から8日目にかけて、薬物を投与した。2, 4, 6, 8日目に薬物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(test)。5日間の休薬後、14日目に薬物を投与した後、直ちに行動量を1時間測定した(challenge)。薬物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。

#### 6. 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)(どちらも15×15×15cm)の2つの部屋からなっ

ており、スライド式の仕切り(10×15cm)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の凹凸のある網で覆い、暗室の床はプラスチック製の平らな板で覆った。明室の上方には白熱電灯(6W, 20cm)を設置した。各部屋の滞在時間を測定するため、この装置をScanet装置(SV-20 LD, Melquest, Toyama, Japan)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、馴化させた(habituation)。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日目にかけて、薬物による条件付けを行った(conditioning)。4, 6, 8日目に、薬物または生理食塩水をマウスに投与し、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薬物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(postconditioning test: post test)。3日目のpre testにおいて、薬物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preconditioning値とし、10日目のpostconditioning値も同様

にして求めた。さらに postconditioning 値から preconditioning 値を引いた値を conditioned place preference 値とし、場所嗜好性の指標とした。

## 7. 社会性行動試験

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

## 8. 新奇物体認識試験

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

## 9. ウェスタンブロッティング解析

マウスを断頭し、氷冷下で前頭皮質を摘出

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