

- 年会, 大阪, 2010, 3, 16-18.
- 21) 新田淳美: 向精神薬と鎮痛剤の依存リスク. スタディグループ7. 第20回日本臨床精神薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台, 2010, 9, 15-17.
  - 22) 新田淳美: 麻薬・覚せい剤依存の怖さを知る. 薬物乱用防止指導員大会, 富山, 2010, 11, 29.
  - 23) 宮川泰宏、石黒陽子、大熊瑞穂、新田淳美、永井拓、山田清文: 術後せん妄に対するベンゾジアゼピン系薬物の影響. 日本臨床薬理学会, 京都, 2010, 12, 1-3.
  - 24) 渡辺裕之、鳥海和也、宋梓瑜、葛丹、本荘龍輝、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, 2011, 3, 22-24.
  - 25) 小林資正、赤池昭紀、平田収正、新田淳美: 先導的薬剤師養成に向けた実践的アドバンス教育プログラムの共同開発 (シンポジウム S12). 第131回日本薬学会年会, 静岡, 2011, 3, 28-31.
  - 26) 宮本嘉明、家垣典幸、石川雄大、日々陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: 精神病関連遺伝子 Shati の脳部位特異的過剰発現マウスにおける行動解析. 第12回 Pharmaco-Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18, 富山.
  - 27) 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: “ジストニア”モデル動物における新規遺伝子 Shati の役割. 第12回 Pharmaco-Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18, 富山.
  - 28) 入江徹美、新田淳美、赤池昭紀: 薬学教育における SP 養成および PBL チュートリアル教育の現状. 第43回日本医学教育学会大会, 2011, 7, 22-23, 広島.
  - 29) 新田淳美、日比陽子、宇野恭介、鍋島俊隆、宮本嘉明: 覚せい剤精神病マウス側坐核から単離された精神病関連分子について. 第54回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 30) 高山華南子、宮本嘉明、宇野恭介、徐承姫、新田淳美: 複数回膜貫通タンパク質 TMEM168 はメタンフェタミン連続投与によりマウス側坐核において誘導される. 第54回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 31) 宮本嘉明、村松慎一、新田淳美: 側坐核ドパミン D2 受容体ノックダウンマウスにおける覚せい剤への低感受性. 第54回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 32) 宮本嘉明、村松慎一、新田淳美: 側坐核ドパミン D2 受容体の発現低下は、メタンフェタミン誘発行動異常を抑制する. 第62回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
  - 33) 石川雄大、宮本嘉明、家垣典幸、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: マウス覚せい剤応答性に対する新規遺伝子シャチの脳部位特異的過剰発現の影響. 第21回医療薬学会年会, 2011, 10, 1-2, 神戸.
  - 34) 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がマウスの情動行動に及ぼす影響. 第21回臨床精神薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
  - 35) 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: 新規遺伝子 Shati の“ジストニア”モデル動物に対する影響. 第21回臨床精神薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
  - 36) 和田惇子、石川雄大、前田憲邦、中田美由貴、藤秀人、新田淳美: 実務実習先の2局を比較して学んだこと -総合病院隣接と住宅地域の調剤薬局との違い-. 日本薬学会北陸支

- 部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.
- 37) 新田淳美、宮本嘉明、宇野恭介：富山大学薬学部・病院実務実習 23 年度 1 期における成果. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.
- 38) 高山華奈子、宮本嘉明、宇野恭介、徐承姫、松村祥平、和田淳子、新田淳美：覚醒剤投与マウスの側坐核より見出された TMEM168 の細胞内局在と脳内分布. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- 39) 家垣典幸、宮本嘉明、宇野恭介、日比陽子、鍋島俊隆、新田淳美：遺伝子組み換えマウスを用いた新規分子“Shati”の情動行動への影響. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
- 40) 長倉美由紀、玉地亜衣、宇野恭介、宮本嘉明、鍋島俊隆、尾崎紀夫、新田淳美：精神疾患関連遺伝子 shati の産じょく期うつ病診断マーカーとしての可能性. 第 132 回日本薬学会年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.

- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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果たしているか?: 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.
- 55) 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.: 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.
- 56) 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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 特許取得: 精神障害関連遺伝子及びその利用

発明者: 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋島俊隆

出願人: 国立大学法人名古屋大学 (米国を除くすべての指定国), 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋島俊隆 (米国のみ)

2011 年 取得特許 (特願 2007-505883)

- 2) 特許出願: 精神障害の診断方法および診断薬キット

発明者: 新田淳美

出願人: 国立大学法人富山大学

出願日: 2011 年 6 月 6 日 (特願 2011-126100)

- 3) 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: 2015 年 2 月 19 日

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

- 1) 新田淳美: - 依存症の現状 - アルコールおよび向精神薬の乱用について. ファルマシア, 47 巻, 839-843, 2011, 9.
- 2) 新田淳美: 覚せい剤の怖さ; どうして再び手を出すのか. 高岡市保護司会講演会 (招待講演). 2011, 6, 21, 高岡.
- 3) 新田淳美: 自殺防止のための診断ツールの作成. 富山大学コラボフェスタ 2011, 2011, 9, 28, 富山.
- 4) 新田淳美.: こころの病気に苦しむ患者さんの助けになるために: 財団報, 公益財団法人アステラス病態代謝研究会発行 2011 年 9 月 No.4.
- 5) 新田淳美: となみ政経塾第 13 回例会講演会 (招待講演). 2011, 10, 4, 砺波.
- 6) 新田淳美: 未病予防からみた効果的な服薬行動「第 3 回未病予防システム研究会」平成

- 23年度知的クラスター地域プロジェクト事業の講演会(招待講演). 2011.11, 9, 株式会社 広貫堂呉羽工場, 富山.
- 7) 新田淳美: こころの病気の薬(招待講演). 2011, 11, 24, 小杉南中学PTA講演会, 小杉.
- 8) 新田淳美: 覚せい剤の怖さ; なぜやめられないのか. 高岡市更生保護女性会(招待講演). 2012, 2, 24, 高岡.
- 9) 新田淳美: 薬物中毒防止について. 平成23年度富山大学学生団体アルコール等講習会(招待講演). 2012, 3, 21, 富山.
- 10) 新田淳美: 富山大学薬学部実務実習(病院)報告ポスターの作成. 病薬会報(富山県病院薬剤師会)No.117, 32-33頁, 2011. 11.
- 11) [新聞記事] 心の病に特定タンパク質. 測定キットを開発: マウス実験作用確認. 早期発見に期待. 2011, 5, 4, 富山新聞.
- 12) [新聞記事] 覚せい剤 脳に損傷: 新田富山大教授が講演. 2011, 11, 11, 北日本新聞.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) [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

## 覚せい剤精神病におけるセロトニン神経伝達の役割

分担研究者： 疋田貴俊<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 京都大学大学院医学研究科、<sup>2</sup> 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、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。

### 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。研究分担者はこれまでにイムノトキシン細胞標的破壊法を用いて側坐核のアセチルコ

リン産生細胞を除去したマウスにコカインおよびモルヒネを連続投与すると、薬物依存の感受性が顕著に高まることを明らかにした<sup>2),3)</sup>。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤がコカイン依存、モルヒネ依存の

改善に効果があり、その効果点が側坐核のアセチルコリン産生細胞であることを示した<sup>3)</sup>。さらに、報酬関連学習においてもアセチルコリン産生細胞の関与を示した<sup>8)</sup>。このように、アセチルコリン産生細胞の機能を解明することによって、薬物依存形成に関与する大脳基底核局所神経回路の制御機構を探求してきた。一方、大脳基底核においてドーパミンやアセチルコリンなどの神経伝達物質による入力を受ける中型有棘細胞については、黒質網様部あるいは腹側被蓋野に行く直接路と、淡蒼球を介する間接路に投射先の違いによって大きく二分されているにもかかわらず、形態に違いがないことから、直接路と間接路での中型有棘細胞の情報処理やそれに関与する分子の違いについては、未解明のままであった。本研究では、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、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同定することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

TN トランスジェニックマウス<sup>10)</sup>とその同胞野生型マウス(wt)を用いた。ドキシサイクリン(DOX)投与は DOX を 6 mg/g 混入させた餌と 2 mg/ml の DOX と 10% の sucrose を含有する水をマウスに与えることによって行った<sup>10)</sup>。全ての動物実験は財団法人大阪バイオサイエンス研究所と京都大学大学院医学研究科の動物実験に関する指針に従った。

### 2. アデノ関連ウイルスの作製

サブスタンス P 遺伝子  $\beta$ -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)をアデノ随伴ウイルスベクター pAAV (Stratagene) に組み込んだ。AAV は AAV Helper-Free System (Stratagene)を用いてマニュアルに従い作製した。AAV は既発表論文に従い定位的に線条体あるいは側坐核に投与を行った<sup>2),8)</sup>。

### 3. 免疫組織染色およびウエスタンブロット法

AAV 感染 2 週間後に、既発表論文に従い 40 $\mu$ m の線条体冠状切片に対して免疫染色を行った<sup>2),10)</sup>。GFP および VAMP2 に対するウエスタンブロット法は既発表論文に従い行った<sup>10)</sup>。

### 4. 行動実験

回転行動観察は既発表論文に従った<sup>6)</sup>。メタンフェタミンは 2 mg/kg を腹腔内投与し、60 分間の移所行動量を調べた。コカインは 10 mg/kg 腹腔内投与し、依存行動試験は既発表論文に従った<sup>2)</sup>。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。

### 5. 片側側坐核への薬理的処置

十分な麻酔下にて、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。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 $\mu$ lの量を2分間かけて行った。薬物濃度はSCH23390 (100 $\mu$ M), SKF81297 (300 $\mu$ M), quinpirole (1mM), eticlopride (400 $\mu$ M)に調整した。

## 6. 黒質網様部の分離と遺伝子解析

コカインあるいは生理食塩水の腹腔内投与1時間後にすばやく脳を取り出しOCTコンパウンド内で急速凍結した。キシレンに漬けた黒質を含む40 $\mu$ m冠状切片に対して、エッペンドルフ社のMicro Dissector PPMDシステムを用いて、黒質網様部を切り出し分離した。分離した黒質網様部からキアゲン社のRNeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出し、Affymetrixマイクロアレイ解析を行った。シグナルはMicroarray Suite 5.0 (Affymetrix)、GeneSpring GX 11.0 (Agilent Technology)、Ingenuity Pathway Analysis 6.0 (Ingenuity Systems)にて解析した。

## 7. 定量 RT-PCR

SuperScript First-Strand Synthesis System (Affymetrix) を用いて T7-oligo(dT) primer による逆転写を行った。MEGAscript High Yield Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いて増幅、cDNA合成を行った。ephrinA5, EphA4, EphA5 mRNA の3'領域に対するprimerを用いて、定量PCRを行った。 $\beta$ アクチンmRNAの定量値で内部補正を行った。

## 8. イムノアドヘジンをを用いた解析

ephrinA5, EphA4, EphA5の結合部位をヒトIgGのFc領域に融合させたイムノアドヘジン(R&D Systems)を蛍光ミクロスフェア

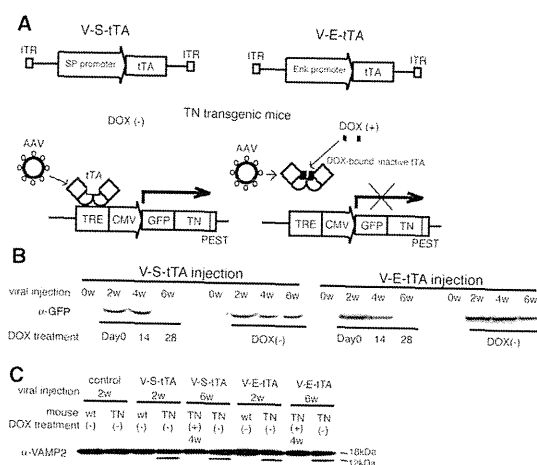


図 1. (A) AAV コンストラクトと可逆的神経伝達阻止法。(B) GFP 抗体によるウエスタンブロット像。(C) VAMP2 抗体によるウエスタンブロット像。18kDa は全長 VAMP2、12kDa は切断された N 末断片を示す。文献 4 より引用。

(Lumafuor)に報告論文に従って付着させた<sup>9)</sup>。イムノアドヘジンは野生型マウスの稜側黒質網様部に定位的に投与した。イムノアドヘジン投与4日後より、4日間のコカイン誘発行動量を測定した。行動解析後、イムノアドヘジンの投与位置をミクロスフェアの蛍光観察によって確認した。

## C. 研究結果

### 1. 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の開発

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<sup>6)</sup>。そこで、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)をアデノ随伴ウイルスベクターに導入した(図 1A 上, V-S-tTA と V-E-tTA)。作製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<sup>10)</sup>の線条体に打ち込み、線条体神経細胞に感染させた(図 1A 下)。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<sup>10)</sup>。このマウスにドキシサイクリン(DOX)を与えると、tTA は不活性型となり、GFP-TN の発現は消失し、PEST 配列を介して、GFP-TN は分解され、やがて新生した VAMP2 によって神経伝達は再開する(図 1A 下)。これにより DOX 依存的な可逆的神経伝達阻止を行う。直接路と間接路への本方法の特異的な適応は AAV ベクター内の SP と Enk のプロモーター活性に依存する。直接路と間接路の中型有棘細胞特異的に GFP-TN が発現しているかは、感染させた線条体を GFP と SP, Enk の前駆体である PPTA, PPE の抗体で二重免疫組織染色を行い、GFP-TN は目的の神経細胞に特異的に発現していることを確認した<sup>4)</sup>。可逆的な TN の発現は GFP 抗体に対するウエスタンブロット法で行った(図 1B)。AAV 投与 2 週以降に継続的な GFP-TN の発現を確認した。この GFP-TN は DOX 投与 4 週間(Day 28)で消失した。TN が神経伝達を遮断していることは VAMP2 の N 末に対する抗体で確認した(図 1C)。TN マウスの線条体への AAV 投与 2 週以降に VAMP2 の N 末切断断片(12kDa)を確認した。この VAMP2 の N 末切断断片は DOX 投与 4 週間で消失した。次に、片側線条体に AAV を感染させた TN マウスは、直接路遮断では感染線条体同側方向への回転行動が、

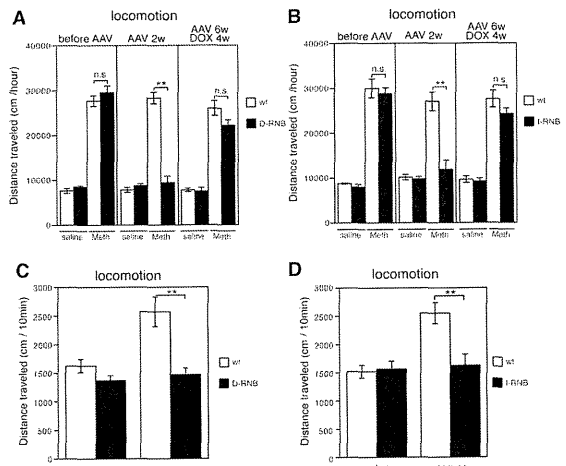


図 2. 乱用薬物による急性反応への神経遮断の影響<sup>4)</sup> (A, B) V-S-tTA (A)または V-E-tTA (B)を両側線条体に投与された TN マウス (D-RNB または I-RNB) と野生型マウス(wt)が示す生理食塩水 (saline)または 2mg/kg のメタンフェタミン(Meth)腹腔内投与後 1 時間の移動距離(n=5-6)。 (C, D) 両側側坐核への AAV 投与 2 週後、生理食塩水または 10mg/kg のコカインを腹腔内投与後 10 分間の移動距離(n=8)。 \*\*p<0.01; n.s.有意差なし。

間接路遮断では反対方向に回転行動が見られた。これらの異常回転行動は DOX 4 週投与で消失した。すなわち、DOX ON/OFF によって、可逆的に神経伝達を阻止する方法を大脳基底核の直接路あるいは間接路において特異的に確立した<sup>4)</sup>。

## 2. 乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構

直接路あるいは間接路に特異的な可逆的神経伝達遮断を行ったマウスに対して、覚せい剤あるいはコカインを全身投与し移所行動量を測定することによって、乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構を解析した(図 2)<sup>4)</sup>。線条体の直接路遮断(図 2A, D-RNB)



と間接路遮断(図 2B, I-RNB)は共に覚せい剤メタンフェタミン投与による急性移所行動量増加を完全に抑制した。DOX 投与による神経伝達再開によるメタンフェタミンによる移所行動量増加は再発した(図 2A, B)。側坐核の直接路遮断と間接路遮断は共にコカインによる移所行動量を抑制した(図 2C, D)。これらから乱用薬物の急性投与による行動賦活作用において、直接路と間接路は共に必須であることを示した。

### 3. 乱用薬物の慢性投与による薬物依存形成への直接路と間接路の神経伝達の役割

野生型マウスは乱用薬物の連日投与により行動量を増大させる増感現象を引き起こす。側坐核の間接路を遮断したマウスはコカイン反復投与による行動量増感に遅れを生じたが、第3日以降に野生型マウスと同等の高い移所行動量に達した(図 3B)<sup>4)</sup>。それに対して、側坐核の直接路遮断マウスは行動量増感を大幅に抑制した(図 3A)<sup>4)</sup>。また、乱用薬物の慢性投与による精神依存形成を調べるためにコカインの連日投与による条件付け場所嗜好性試験を行うと、側坐核の直接路遮断マウスでは条件付け場所嗜好性は有意に減少したが、側坐核の間接路遮断マウスは野生型マウスと同等の条件付け場所嗜好性を示した(図 3C, D)<sup>4)</sup>。これらの結果から、直接路の神経伝達が乱用薬物の慢性投与による依存形成に重要であることを示した。

### 4. 報酬関連学習と忌避学習における神経伝達遮断の影響

乱用薬物による精神障害における大脳基

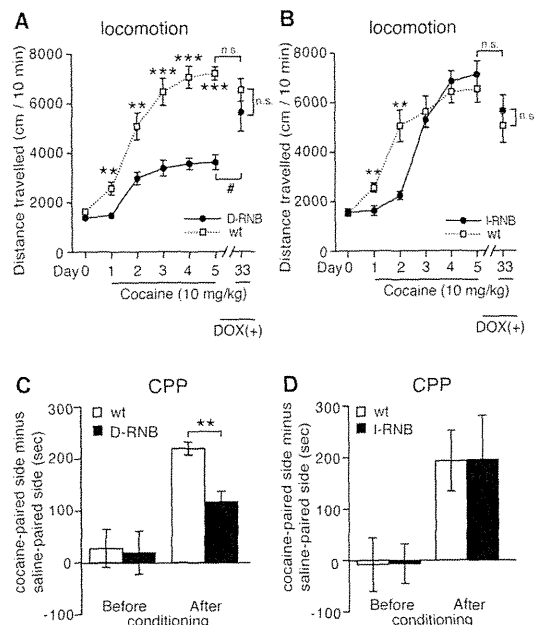


図 3. 薬物依存形成における神経遮断の影響<sup>4)</sup>。両側側坐核に AAV を投与し直接路遮断 D-RNB (A,C) または間接路遮断 I-RNB (B,D)を行った。(A,B)生理食塩水を3日間投与した翌日より、10mg/kg のコカインを連日腹腔内投与し10分間の移動距離を測定した(n=8)。Day6 から DOX 投与を行い Day33 にコカイン再投与を行った。(C,D)3日間10mg/kg のコカインにより条件付けを行い、Day4 に条件付け場所嗜好性を測定した(n=6-8)。\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; #p<0.05; n.s.,有意差なし。

底核神経回路を考察するにあたり、高次脳機能における直接路あるいは間接路の神経伝達遮断の影響を調べた。チョコレートによる条件付け場所嗜好性試験では、直接路遮断でのみ報酬関連学習が阻害された(図 4A, B)<sup>4)</sup>。次に、忌避学習における神経伝達遮断の影響を一試行による抑制性回避試験を用いて調べた(図 4C, D)。野生型マウスは、前日に電気ショックを受けた暗室への入室時間が延長した。この忌避学習は直

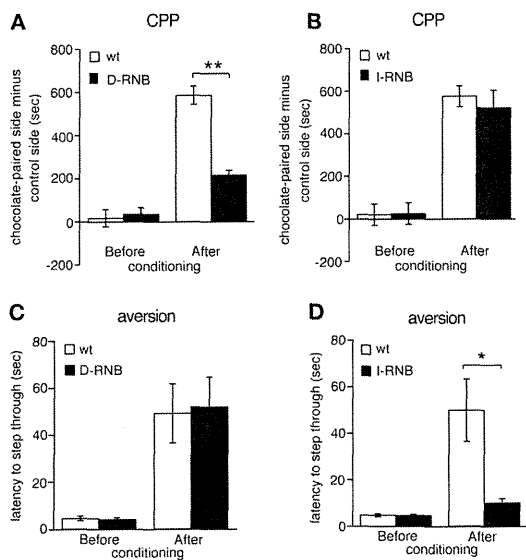


図 4. 報酬関連学習と忌避学習における神経遮断の影響<sup>4)</sup>。両側側坐核に AAV を投与し直接路遮断 D-RNB (A,C) または間接路遮断 I-RNB (B,D) を行った。(A,B) 3 日間チョコレートの自由摂取により条件付けを行い、Day4 に条件付け場所嗜好性を測定した (n=6)。(C,D) 一試行による抑制性回避試験において、暗室に入るまでの時間を測定した (n=6-7)。\*\*p<0.01; \*p<0.05。

接路遮断マウスにおいても保たれていた (図 4C)<sup>4)</sup>。それに対して、間接路遮断マウスは忌避学習の保持が見られず、電気ショック前後で有意差なく暗室に入室した (図 4D)<sup>4)</sup>。さらに、十字迷路を用いた学習課題を行うと、直接路遮断が本課題においても報酬関連学習に影響を与えるのに対して、間接路遮断マウスは逆転学習のみ成績が悪く、初期課題の正解への固執が見られた<sup>11)</sup>。これらの結果から、報酬関連学習には直接路の神経伝達が、忌避学習/逆転学習には間接路の神経伝達がそれぞれに必須であることがわかった。

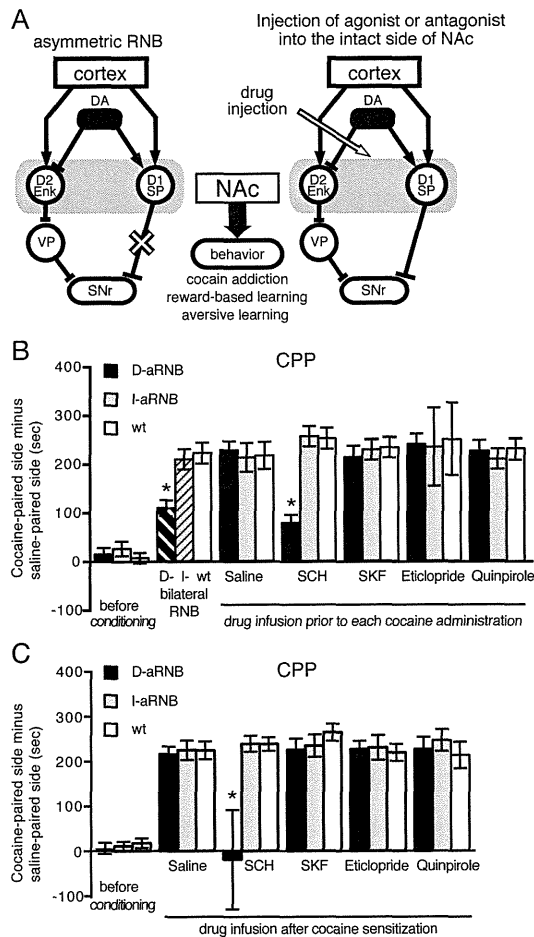


図 5. (A) asymmetric RNB 法の概略図。(B) コカイン条件付け 20 分前に薬物投与を行った。この場所条件付けを 3 日間行い、4 日目に場所嗜好性を測定した。(C) 3 日間のコカイン条件付けを行い、4 日目に薬物投与し、20 分後に場所嗜好性を測定した。それぞれ 5-6 匹の行動量の平均と標準誤差を示す。\*p<0.05。文献 5 より引用。

### 5. 薬物依存、報酬・忌避学習における側坐核神経回路依存的なドーパミンの役割

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 5A: asymmetric RNB 法)<sup>5)</sup>。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 および aripirazole、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 5B)<sup>5)</sup>。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、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 5C)<sup>5)</sup>。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。さらに、報酬学習獲得には直接路 D1 受容体の活性化が、忌避学習には間接路 D2 受容体、CB1 受容体の不活性化と A2a 受容体、NMDA 受容体の活性化が重要であることを示した<sup>5)</sup>。

## 6. 黒質網様部における側坐核神経回路依存的な遺伝子発現の変化

次に、直接路と間接路が統合される黒質網様部に着目をし、乱用薬物投与時の神経回路特異的な分子変化を探索することで、乱用薬物誘発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。D-RNB, I-RNB, 野生型マウスに対してコカインあるいは生理食塩水を腹腔内投与 1 時間後に黒質網様部を分離した。分離した黒質網様部から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った<sup>7)</sup>。D-RNB あるいは I-RNB に特異的

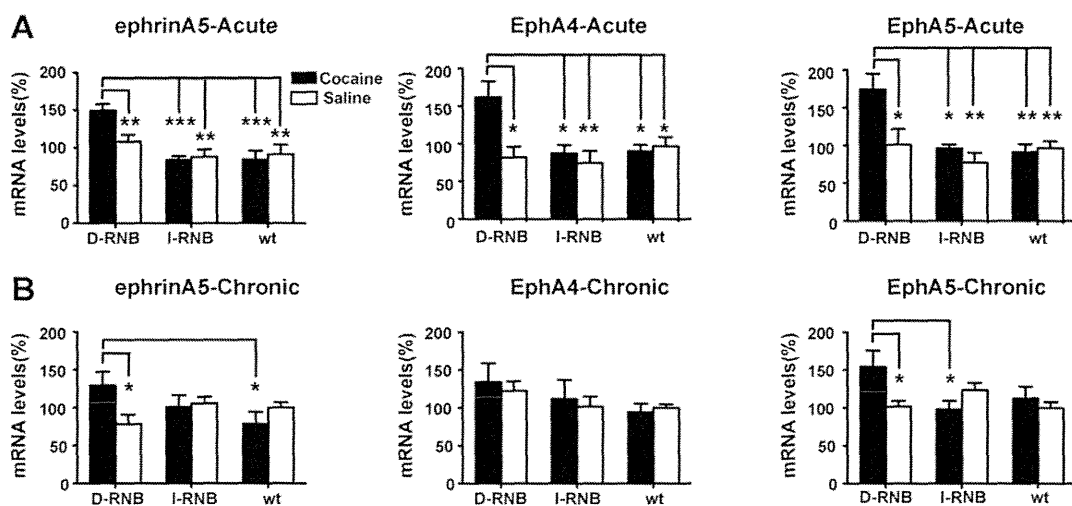


図 6. (A) 10mg/kg のコカインを投与 1 時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。D-RNB と I-RNB は直接路遮断と間接路遮断マウス群 (各 6 匹)、wt は野生型マウス群 (12 匹) の平均値と標準誤差を示す。(B) 10mg/kg のコカインを 5 日間連日投与し、5 日目のコカイン投与 1 時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。各 6 匹の平均と標準誤差を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

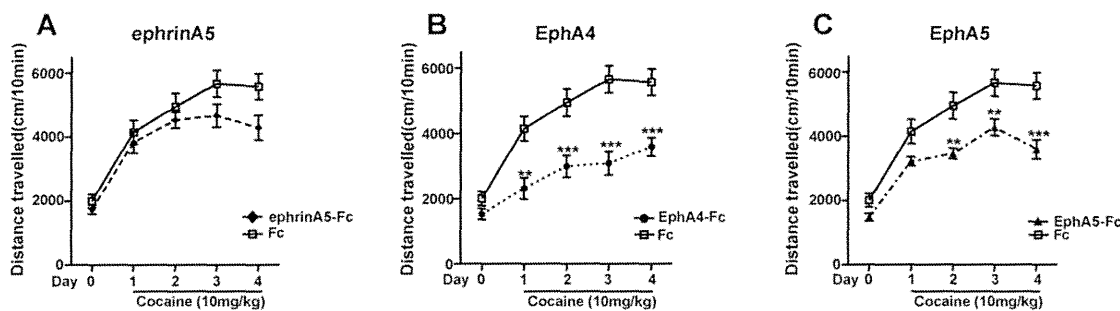


図 7. 黒質網様部の EphA4 と EphA5 によるコカイン誘発行動の抑制効果<sup>7)</sup>。野生型マウスの両側黒質網様部に ephrinA5-Fc (A), EphA4-Fc (B), EphA5-Fc (C) を付着させた蛍光マイクロスフェアを投与し、4 日目よりコカイン投与後の行動量を測定した。それぞれ 6-14 匹の行動量の平均と標準誤差を示す。\*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ 。

にコカイン投与群で生理食塩水投与群に対して 1.4 倍以上の遺伝子発現量の変化がみられるものに対して、定量 RT-PCR によって再現性を確認したところ、ephrinA5, EphA4, EphA5 の 3 遺伝子の mRNA 発現がコカインを投与した D-RNB でのみ上昇していた (図 6A)<sup>7)</sup>。これらの遺伝子発現上昇は生理食塩水を投与した RNB では見られなかったため、直接路遮断かつコカイン投与に特異的な現象であった。コカインの慢性投与に対する行動は直接路遮断と間接路遮断で異なるため、コカインを 5 日間連日投与した後の黒質網様部の ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量を定量 RT-PCR によって解析した (図 6B)<sup>7)</sup>。ephrinA5 と EphA5 の mRNA 量はコカイン投与した D-RNB で有意に上昇していた。EphA4 は D-RNB で多い傾向はあったものの有意差はなかった。これらの結果はコカイン急性および慢性投与によって、ephrin-Eph シグナル分子の発現上昇が直接路依存的に起きていることを示す。

## 7. 乱用薬物誘発行動への ephrinA5, EphA4, EphA5 の影響

直接路遮断マウスで ephrinA5, EphA4, EphA5 の発現上昇が見られることから、これらの分子シグナル活性化によって、直接路遮断マウスと同様にコカイン誘発行動が抑制できるのではないかと調べた。この目的のために、ephrinA5, EphA4, EphA5 の細胞外結合部位とヒト IgG の Fc 領域を融合させたイムノアドヘジンを用いた。イムノアドヘジンは二量化されており、結合相手の分子を活性化させる<sup>9)</sup>。イムノアドヘジンあるいはコントロールとしてのヒト IgG は蛍光マイクロスフェアに付着させ、野生型マウスの両側側坐核に投与した。投与 4 日後よりコカインを 10mg/kg 腹腔内投与し直後の行動量を測定した。コカインの連日投与は次第に行動量を増加させる感受性亢進を引き起こす。EphA4-Fc と EphA5-Fc は、ヒト IgG を投与した対照群と比較して優位に行動感受性亢進を抑制した (図 7)<sup>7)</sup>。これらの結果はコカイン誘発行動において黒質網様部の EphA4 と EphA5 が重要な役割を担っていることを示す。

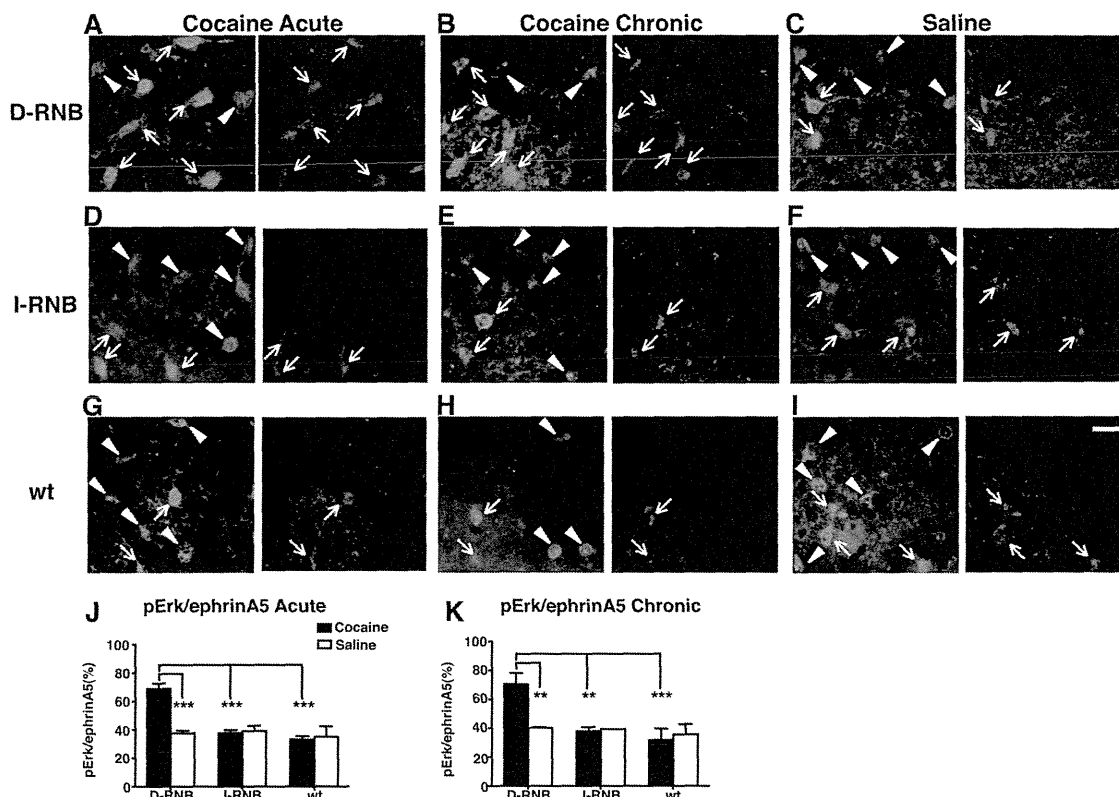


図 8. D-RNB マウス特異的な黒質網様部 ephrinA5 陽性神経細胞における Erk1/2 の活性化<sup>7)</sup>。コカイン単回投与群(A, D, G)と生理食塩水投与群(C, F, I)は D-RNB, I-RNB, WT マウスに腹腔内投与し、6 時間後に黒質網様部を分離した。コカイン連日投与群(B, E, H)では 10mg/kg のコカインを 5 日間腹腔内投与し、最終コカイン投与後 1 時間で黒質網様部を分離した。A-I は黒質網様部を ephrinA5 (それぞれの左のパネル) と pErk1/2(それぞれの右のパネル)の抗体で二重免疫染色像を示す。矢印は ephrineA5 と pErk1/2 の二重陽性細胞を、矢頭は pErk1/2 陰性である ephrinA5 陽性細胞を示す。スケールバー、50  $\mu$  m。J と K は ephrinA5 陽性細胞の内、pErk1/2 陽性である細胞の割合を示す(各 n=4)。\*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001。

## 8. 直接路遮断マウス特異的な乱用薬物投与による黒質網様部神経細胞における ephrinA5 下流シグナルの活性化

EphA4 と EphA5 は共に ephrinA5 に結合し、ephrinA5 の下流シグナルとして MAP キナーゼ(Erk1 と Erk2)のリン酸化を引き起こす<sup>1)</sup>。そこで D-RNB マウスの黒質網様部の ephrinA5 陽性細胞において Erk1/2 のリン酸化がコカイン投与によって増強されてい

るかを調べるために、黒質網様部スライス標本に対して ephrinA5 抗体とリン酸化 Erk1/2 抗体の二重免疫染色を行った(図 8A-I)<sup>7)</sup>。ephrinA5 陽性細胞におけるリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合を計測したところ、コカインを単回投与した D-RNB マウスで黒質網様部におけるリン酸化 1/2 陽性細胞の割合が増加していた(図 8J)<sup>7)</sup>。同様に、コカインを連日投与した D-RNB マウスの黒質網様部においてもリン酸化 Erk1/2

陽性細胞の割合が増加した (図 8K)<sup>7)</sup>。このリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合は生理食塩水投与によっては変化を示さなかった (図 8J, K)。これは D-RNB マウスでのみ、コカイン投与による ephrinA5-EphA4/A5 の発現上昇が見られており (図 6)、またコカイン誘発行動が抑制される<sup>4)</sup>こととよく相関しており、黒質網様部での ephrinA5 の下流シグナルである Erk1/2 のリン酸化がコカイン誘発行動に重要であることを示す。

#### D. 考察

乱用薬物による急性反応には直接路と間接路の両方が関与しているのに対し、コカイン連日投与による依存形成においては直接路が必須であった。さらに報酬関連学習と忌避学習/逆転学習で直接路と間接路の役割の違いを見いだしたことより、乱用薬物による依存症状と精神症状における直接路と間接路のそれぞれが独自の役割を担っていることが示唆された。さらに直接路と間接路が統合される黒質網様部における分子変化を解析することによって、直接路依存的に乱用薬物投与により発現上昇する ephrinA5-EphA4/A5 分子群を同定した。これらの分子が発現上昇する機構は未解明である。さらに分子変化や Erk1/2 リン酸化シグナルが黒質網様部の神経細胞にどのような変化を起こしているかが不明なままである。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。

#### E. 結論

大脳基底核神経回路の直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法

を開発した。本方法により、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。乱用薬物による依存形成や精神障害の病態を知る際にさらなる神経回路制御機構の解明が求められる。

#### [参考文献]

- 1) Davy, A., Robbins, S.M.: Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J.*, 19: 5396-5405, 2000.
- 2) Hikida, T., Kaneko, S., Isobe, T., et al.: Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 13351-13354, 2001.
- 3) Hikida, T., Kitabatake, Y., Pastan, I., et al.: Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 6169-6173, 2003.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Synaptic integration mediated by striatal

- cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289: 633-637, 2000.
- 7) Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., et al.: Pathway-specific enlargement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108: 9981-9986, 2011.
  - 8) Kitabatake, Y., Hikida, T., Watanabe, D., et al.: Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 7965-7970, 2003.
  - 9) Riddle, D.R., Katz, L.C., Lo, D.C.: Focal delivery of neurotrophins into the central nervous system using fluorescent latex microspheres. *Biotechniques*, 23: 928-934, 936-937, 1997.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
1. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66: 896-907 (2010)
  2. Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T. and Nakanishi, S.: Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 108: 9981-9986 (2011)
  3. 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)
  4. 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)
  5. 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)
  6. Hikida, T., Gamo, N.J., Sawa, A.: DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. *Expert Opin. Ther. Targets*, 16: 1151-1160 (2012)
  7. 疋田貴俊、神谷篤：精神疾患モデル動物
- F. 健康危険情報**  
なし
- G. 研究発表**
1. 論文発表

- の可能性 –遺伝子から神経回路へ。実験医学, 28: 2205-2210 (2010)
8. 疋田貴俊: 精神疾患の分子遺伝学: 最近の知見。脳神経外科速報, 21: 1250-1254 (2011)
  9. 疋田貴俊: 大脳基底核神経回路の制御機構解析。分子精神医学, 12: 50-51 (2012)
  10. 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)
  11. 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. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of striatonigral and striatopallidal transmission in reward and aversive behavior. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2010年11月
  2. Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Tankou, S., Huang, B., Pou, S., Ozaki, N., Hikida, T., Kamiya, A., Nabeshima, T. and Sawa A.: Dopaminergic disturbance and behavioral deficits in a novel genetic model of DISC1, which are highly influenced by social isolation stress. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, 2010年11月
  3. Jaaro-Peled, H., Tankou, S., Murai, R., Niwa, M., Foss, C.A., Hikida, T., Gallagher, M., Gullarte, T.R., Nabeshima, T., Pomper, M.G., Sawa, A.: Dopaminergic abnormalities in DISC1 mouse models. The 13<sup>th</sup> International Congress on Schizophrenia Research, Colorado Springs, CO, 2011年4月
  3. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. 平成22年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ, 札幌市、2010年7月
  4. 中西重忠、疋田貴俊: 神経機能の分子メカニズム: 報酬と薬物依存. 第28回日本医学会総会、東京(誌上開催) 2011年4月
  5. 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. 平成23年度生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子細胞基盤」、岡崎、2011年6月
  6. 疋田貴俊: 報酬・忌避行動の大脳基底核神経回路機構. 平成23年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ JSTセッション, 神戸、2011年8月
  7. 疋田貴俊、木村健介、矢和多智、山口隆司、中西重忠: 黒質網様部における大脳基底核神経回路特異的な情報処理機構の解析. 平成23年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、神戸、2011年8月
  8. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward-based and aversive learning. 第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月



9. 疋田貴俊:薬物依存と意思決定における大脳基底核神経回路の制御機構. 平成23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
10. Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S.: Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. The 32<sup>nd</sup> NAITO CONFERENCE on biological basis of mental functions and disorders, 山梨、2011年10月
11. Hikida, T.: Distinct roles of the direct and indirect pathways in the basal ganglia to reward and aversive behavior. IAS Research Conference 2011 on “Frontiers in Neuroscience: From Brain to Mind”, 京都、2011年12月
12. Kimura, K., Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T. and Nakanishi, S.: ephrin-Eph signaling in cocaine-induced responses. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
13. 疋田貴俊:可逆的神経伝達阻止法を用いた大脳基底核神経回路機構の解析. 基礎生物学研究所セミナー、岡崎、2012年1月
14. 疋田貴俊:運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路機構の解明に向けて. 合同シンポジウム「高次生命制御研究のニューフロンティア」、京都、2012年1月
15. 疋田貴俊:報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路機構. 第40回ホミニゼーション研究会「ドーパミンの役割:運動機能から高次機能へ」、犬山、2012年3月
16. 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回日本大脳基底各研究会、東京、2012年6月
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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

24. 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
25. 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
26. 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

- 1) 発明の名称：大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法

2010 年 4 月 30 日 国際出願  
(PCT/JP2010/003089)

2011 年 3 月 11 日 国際公開

2012 年 10 月 22 日 国内移行 (特願  
2012-512542)

出願人：公益財団法人大阪バイオサイエ  
ンス研究所

発明者：疋田貴俊、中西重忠

### 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<sup>1, 2)</sup>。

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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>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  $24 \pm 1$  °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) 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。

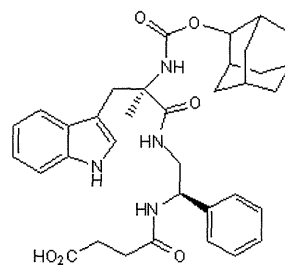


図1 CI-988の構造式

#### 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