

薬物依存の研究 (第 485 報) ; Dopamine による細胞死に対する sigma-1 receptor chaperone の GSK-3β を介した細胞保護作用

原田真季, 森友久, 大屋順平, 小林実奈代, 芝崎真裕, 鈴木勉

第 24 回 マイクロダイアリシス研究会

平成 25 年 12 月 14 日, 東京

OA-1 受容体拮抗薬 DOPA cyclohexyl ester の methamphetamine 誘発 dopamine 遊離に及ぼす影響

岩瀬祥之, 森友久, 中村美聖, 肥田野翔, 芝崎真裕, 東山公男, 五嶋良郎, 鈴木勉

第 23 回 神経行動薬理若手研究者の集い

平成 26 年 3 月 18 日, 仙台

MDMA および methylphenidate 誘発弁別刺激効果の差異

鶴澤直生, 森友久, 渡辺京彦, 加澤春世, 望月綾乃, 内田匡志, 芝崎真裕, 鈴木勉

第 87 回 日本薬理学会

平成 26 年 3 月 19-21 日, 仙台

薬物依存に関する研究 (第 488 報) : Lipopolysaccharides (LPS) による methamphetamine

誘発報酬効果の抑制に対する CB2 受容体の関与  
池窪結子, 芝崎真裕, 安藤光司, 石川緩, 男澤杏美, 岡部健司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

薬物依存に関する研究 (第 489 報): エタノール慢性処置による脳内におけるエタノール代謝系の変化

石川緩, 芝崎真裕, 安藤光史, 池窪結子, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

第 134 回 日本薬学会年会

平成 26 年 3 月 27-30 日, (熊本)

薬物依存の研究(第 492 報) : Ketamine による抗不安作用における細胞骨格系の変化

庄條育子, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉

Ⅱ 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

## メチルフェニデート等による依存性の形成機序の解明

分担研究者 池田和隆

（公財）東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨：メチルフェニデートは、モノアミントランスポーターを阻害することから、覚せい剤であるメタンフェタミンと類似の作用機序を有しており、ゲートウェイドラッグとなるリスクを秘めている。そこで本分担研究課題では、メチルフェニデートの重要な作用標的であるドーパミントランスポーター(DAT)に注目し、その遺伝子を欠損させた DAT-KO マウスにおけるメチルフェニデートの効果を検討し、メチルフェニデートの作用機序を明らかにすることを目的とした。平成 25 年度は、DAT マウスが多動および学習障害を示すことを見出した。また、メチルフェニデートがこれらの障害を改善させることも見出し、DAT-KO マウスは典型的な注意欠如多動性障害(ADHD)モデル動物であると考えられた。また、脳内微量透析法により、メチルフェニデートが DAT を介さずに前頭前野でドーパミン量を上昇させることが明らかになり、メチルフェニデートによる ADHD 治療効果のメカニズムの一端が解明された。ADHD 患者で依存リスクが高いことから、今回の治療メカニズムは依存性の形成機序にも関係すると考えられる。

### A. 研究目的

メチルフェニデートは、注意欠如多動性障害(ADHD: Attention-Deficit/Hyperactive Disorder)およびナルコレプシーの治療薬として広く用いられている。メチルフェニデートは、ドーパミントランスポーター(DAT)およびノルエピネフリントランスポーター(NET)を阻害することから、覚せい剤であるメタンフェタミンと類似の作用機序を有しており、ゲートウェイドラッグとなるリスクを秘めている。

そこで本研究では、メチルフェニデートの作用機序を詳細に明らかにするために、メチルフェニデートの重要な作用標的である DAT を欠損させたマウス(DAT-KO)におけるメチルフェニデートの効果を検討した。

### B. 研究方法

#### 実験動物

DAT-KO マウスのヘテロ接合体同士の交配により、野生型、ヘテロ接合体、ホモ欠損型マウスを準備

した。

#### 移所運動量測定

室町機械社製のスーパーメックスを用いた。測定ケージ内で 30 分間または 60 分間移所運動量を測定した後、メチルフェニデートを投与し、その後 3 時間移所運動量を測定した。

#### テールサスペンション試験

ニューロサイエンス社製の測定装置を用いた。測定装置でマウスを尾から吊るし、30 分間運動量を測定した。メチルフェニデート投与後、引き続き数時間尾から吊るしたままマウスの運動量を測定した。

#### 能動回避試験

室町機械社製の刺激グリッド付シャトルボックス装置を用いた。ランプ点灯と音によるフットショックの予告を 5 秒間行い、この間に反対側の部屋に移動した場合はフットショックを回避できるようにした。20 分間で 40 回の試行を 1 セッションとして 1 日に 2 セッション行なった。それぞれのセッションの間には少なくとも 3 時間のインターバ

ルを設け、5日間連続で合計10セッションを行なった。

### マイクロダイアリシス法

マウスの線条体あるいは前頭皮質に半透膜プローブを植え込み、翌日エイコム社製の測定装置(HPLC-ECD)を用いて、遊離ドーパミン量を測定した。

#### (倫理面への配慮)

当研究は、Replacement(代替)「Reduction(削減)」「Refinement(改善)」の3つを検討することで動物愛護上の配慮を十分に行い、公益財団法人東京都医学総合研究所動物実験委員会の承認を得て実施されたものである。

## C. 研究結果

### (1) 移所運動量測定

DAT-KO マウスは、多動を示した。メチルフェニデートは、野生型マウスとヘテロ接合体の移所運動量を上昇させたのに対して、DAT-KO マウスの多動を顕著に抑制した(図1)。

### (2) テールサスペンション試験

メチルフェニデートは、野生型マウス、ヘテロ接合体マウス、DAT-KO マウスの何れにおいても、テールサスペンション試験における運動量を増加させた(図2)。

### (3) 能動回避試験

野生型マウスとヘテロ接合体では、10セッションの間に回避成功率が約80%まで徐々に上昇したが、DAT-KO マウスでは全く上昇しなかった。メチルフェニデート投与後に能動回避試験を行ったところ、DAT-KO マウスにおいても回避成功率が30%以上に上昇した(図3)。

### (4) マイクロダイアリシス解析

野生型マウスでは線条体、前頭皮質の何れにおいてもメチルフェニデートによって遊離ドーパミン量が上昇したが、DAT-KO マウスの線条体では上昇が見られず、前頭皮質では上昇が認められた(図

4)。

これらの結果より、DAT-KO マウスが多動および学習障害を示すと考えられる。また、メチルフェニデートがこれらの障害を改善させることも見出した。一方、メチルフェニデートによってテールサスペンションテストでの運動量がDAT-KO マウスにおいても増加したことから、メチルフェニデートはDATを介さずに意欲レベルを上昇させると考えられる。脳内マイクロダイアリシス法により、メチルフェニデートがDATを介さずに前頭前野でドーパミン量を上昇させることが明らかになり、メチルフェニデートによるADHD治療効果などの作用機序の一端が解明された。メチルフェニデートのADHD治療効果と報酬効果の作用機序の解明は、治療効果を高め、乱用問題を低下させる上で、極めて重要であると考えられる。

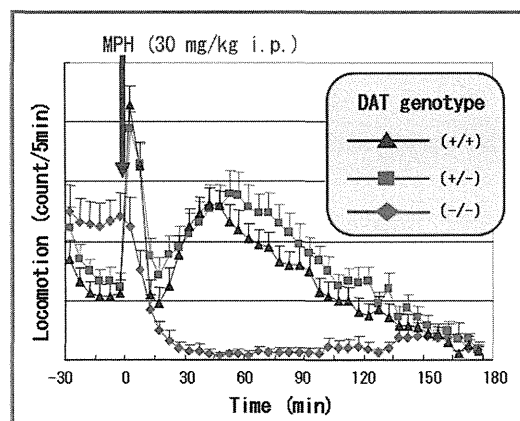


図1: 移所運動量試験におけるメチルフェニデートの効果

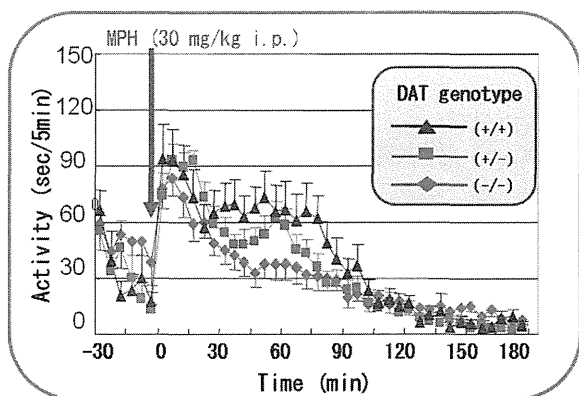


図 2: 尾懸垂試験におけるメチルフェニデートの効果

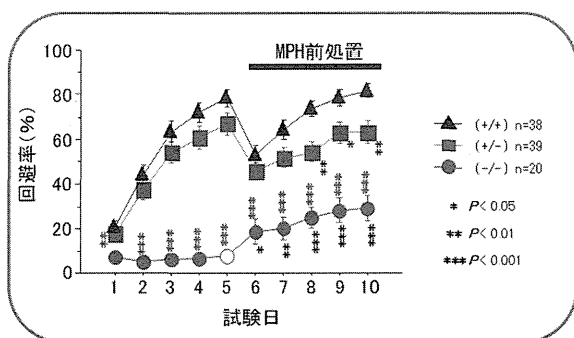


図 3: 能動回避試験におけるメチルフェニデートの効果

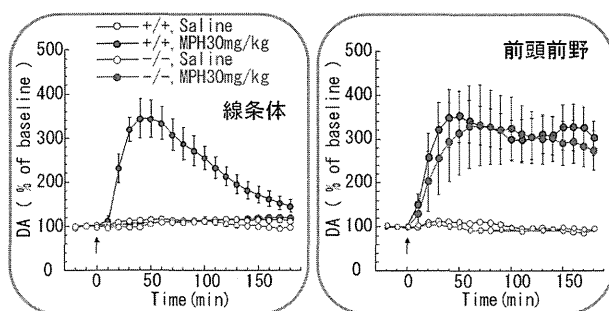


図 4: メチルフェニデート効果のマイクロダイアリス分析

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Nishizawa D, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Yano-Umeda S, Takeda M,

\*Ikeda K. Association between genetic polymorphism rs2952768, close to the METTL21A and CREB1 genes, and intellectual ability in healthy subjects. *J Addict Res Ther* in press. (査読有)

2. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Aoki Y, Nishi A, Saita N, Koukita Y, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Higuchi S, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara K, Itokawa M, Koga M, Arinami T, Kaneko Y, Hayashida M, \*Ikeda K (2014) Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Mol Psychiatry* 19:55-62. (doi: 10.1038/mp.2012.164) (査読有)

3. \*Yamamoto H, Kamegaya E, Sawada W, Hasegawa R, Yamamoto T, Hagino Y, Takamatsu Y, Imai K, Koga H, Mishina M, Ikeda K (2013) Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor GluN2D subunit in phencyclidine-induced motor impairment, gene expression, and increased Fos immunoreactivity. *Mol Brain* 6:56.

(doi:10.1186/1756-6606-6-56) (査読有)

4. Kobayashi D, Nishizawa D, Takasaki Y, Kasai S, Kakizawa T, \*Ikeda K, Fukuda K (2013) Genome-wide association study of sensory disturbances in the inferior alveolar nerve after bilateral sagittal split ramus osteotomy. *Mol Pain* 9:34. (査読有)

5. Kasai S, \*Ikeda K (2013) Reduced supraspinal nociceptive responses and distinct gene expression profile in CXBH recombinant inbred mice. *J Pain* 14:648-661. (査読有)

6. Ide S, Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Hayashida M, Minami M, \*Ikeda K (2013) Association between genetic polymorphisms in Cav2.3 (R-type) Ca<sup>2+</sup> channels and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. *PLoS*

ONE 8:e70694. (査読有)

7. Aoki Y, Nishizawa D, Kasai S, Fukuda K, Ichinohe T, Yamashita S, \*Ikeda K (2013) Association between the variable number of tandem repeat polymorphism in the third exon of the dopamine D4 receptor gene and sensitivity to analgesics and pain in patients undergoing painful cosmetic surgery. *Neurosci Lett* 542:1-4. (査読有)

8. Seo S, Takayama K, Uno K, Ohi K, Hashimoto R, Nishizawa D, Ikeda K, Ozaki N, Nabeshima T, Miyamoto Y, \*Nitta A (2013) Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene. *PLoS ONE* 8(10):e76960. (査読有)

9. Shinohara M, \*Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M (2013) ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 80:1571-1576. (査読有)

10. 成田心, 永堀健太, 吉原英児, 西澤大輔, 池田和隆, 川合厚子, \*岩橋和彦 (2013) BDNF 遺伝子多型とアルコール依存症との関連研究. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 48(6):407-414. (査読有)

11. 成田心, 永堀健太, \*岩橋和彦, 沼尻真紀, 吉原英児, 西澤大輔, 池田和隆, 石郷岡純 (2013) 喫煙行動とセロトニン 2A 受容体遺伝子多型とのハプロタイプ解析. *日本神経精神薬理学雑誌* 33:237-240. (査読有)

12. 沼尻真紀, 西澤大輔, 池田和隆, 吉原英児, \*岩橋和彦 (2013) GSK-3beta-1727A/T・-50T/C 遺伝子多型とニコチン依存症との関連. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 48(5):293-299. (査読有)

13. 沼尻真貴, \*岩橋和彦, 西澤大輔, 池田和隆, 吉原英児, 石郷岡純 (2013) 喫煙行動と GSK-3beta 遺伝子多型とのハプロタイプ解析. *日本神経精神薬理学雑誌* 33:175-178. (査読有)

14. \*岩橋和彦, \*西澤大輔, 深間内文彦, 沼尻真貴, 池田和隆, 石郷岡純 (2013) 双極性障害のリチウム感受性における GSK-3beta 遺伝子多型のハプロタイプ解析. *精神医学* 55:797-801. (査読有)

## (2) 総説

1. 天野功二郎, 西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, \*池田和隆 (2014) オピオイド感受性関連遺伝子多型を考慮した疼痛治療. *日本臨床* 72:613-617. (査読無)

2. Sugaya N, Kobayashi T, \*Ikeda K (2013) Role of GIRK channels in addictive substance effects. *J Drug Alcohol Res* 2:1-11. (査読有)

3. Sato A, Mizuguchi M, \*Ikeda K (2013) Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol Exchange* (doi:10.1038/protex.2013.046.) (査読無)

4. 菅谷渚, 大谷保和, 合川勇三, 梅野充, 妹尾栄一, 樋口進, \*池田和隆 (2013) 依存重症度評価ツールの臨床応用. *精神神経学雑誌* 第 108 回総会シンポジウム特集号:SS505-515. (査読無)

5. 西澤大輔, \*池田和隆 (2013) 様々な依存性物質の感受性に共通して関連する遺伝子多型. *日本神経精神薬理学雑誌* 33:205-209. (査読無)

6. \*池田和隆, 高松幸雄, 曾良一郎 (2013) ADHD の精神薬理学—モデル動物研究から—. *最新医学* 68:2126-2133. (査読無)

7. \*福田謙一, 青木謙典, 西澤大輔, 林田眞和, 一戸達也, 池田和隆 (2013) テーラーメイド疼痛治療を開始して. *臨床薬理* 44:229-232. (査読無)

8. 西澤大輔, 笠井慎也, 長谷川準子, 佐藤直美, 谷岡書彦, 梶村春彦, \*池田和隆 (2013) ゲノムワイド関連解析による日本人におけるニコチン依存脆弱性関連座位の同定. *日本神経精神薬理学雑誌* 33:77-79. (査読無)

9. 菅谷渚, 大谷保和, 垣渕洋一, 妹尾栄一, \*池田和隆 (2013) 日本のアルコール依存症の入院患者

における再飲酒リスクに GIRK チャネル阻害剤が与える影響. *日本神経精神薬理学雑誌* 33:57-58. (査読無)

### (3) 著書、訳書

1. 菅谷渚, \*池田和隆 [訳] (2014) タバコ使用. In: 青年期発達百科事典 第3巻 精神病理と非定型プロセス(子安増生・二宮克美監訳, 青年期発達百科事典編集委員会編), pp256-263. 東京: 丸善出版. (査読無)
2. \*池田和隆, 田中美歩, 佐藤敦志 (2013) 自閉症の遺伝子解析. In: *メンタル医療—原因解明と診断, 治療の最前線—*(糸川昌成監修), pp68-76. 東京: 株式会社シーエムシー出版. (査読無)

### (4) 研究報告書

1. \*西澤大輔, 池田和隆, 梶村春彦 (2014) 肥満・生活習慣病易罹患性個人差におけるオピオイド系関連遺伝子多型の役割及び喫煙行動等の環境要因との相互作用の解明. 2012 公益財団法人 鈴木謙三記念医科学応用研究財団研究報告:364-367. (査読無)

#### 2. 学会発表

##### (1) 招待講演

1. \*池田和隆, 西澤大輔. オピオイド性鎮痛薬感受性と P 糖タンパク質遺伝子多型との関連. 日本薬学会第 134 年会, 2014.03.29, 熊本.
2. \*池田和隆, 高松幸雄, 曾良一郎. ドーパミントランスポーター欠損による AD/HD 様行動の発現. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.26, 宜野湾.
3. \*佐藤敦志, 高松幸雄, 笠井慎也, 田中美歩, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウス Tsc1, Tsc2 ヘテロ欠失マウスおよび Tsc1-Tsc2 ダブルヘテロ欠失マウスの自閉症様行動. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43

回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.

4. \*山本秀子, 亀ヶ谷悦子, 萩野洋子, 高松幸雄, 山本敏文, 三品昌美, 池田和隆. GluN2D サブユニットノックアウトマウスの情動行動異常. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
5. \*西澤大輔, 池田和隆. 様々な依存性物質の感受性に共通して関連する遺伝子多型. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 2013.10.05, 岡山.
6. \*Ikeda K. Involvement of G protein-activated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel in substance dependence. CINP Special Congress on Addiction and Mental Health, 2013.10.02, Kuala Lumpur, Malaysia. (基調講演)
7. \*Ikeda K, Hagino Y, Kasai S, Yamamoto H. NMDA receptor channel subunit GluN2D as a key target of phencyclidine. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 2013.09.13, Beijing, China.
8. \*池田和隆, 西澤大輔. 依存性物質作用個人差の遺伝子メカニズムから探る依存のメカニズム. Neuro2013, 2013.06.21, 京都.

##### (2) その他

1. \*山西嘉晴, 高松幸雄, 池田和隆. 実験的疼痛モデルマウスでのドネペジルの鎮痛作用. 日本薬学会第 134 年会, 2014.03.28, 熊本.
2. \*山西嘉晴, 高松幸雄, 池田和隆. コリン系薬物の 3 種類の疼痛モデルでの鎮痛作用. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014.03.19, 仙台.
3. \*池田和隆. メチルフェニデート等による依存性の形成機序の解明. 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)「違法ドラッグ等の薬物依存のトレンドを踏まえた病態の解明と診断・治療法

- の開発」平成 25 年度研究成果報告会, 2014.02.20, 東京.
4. \*池田和隆. 喫煙関連遺伝子多型の同定とその機能解析. 財団法人喫煙科学研究財団, 特定研究「ヒト発がん遺伝子多型、喫煙との関連」第 2 回検討会, 2014.01.20, 東京.
5. \*Kasai S, Ikeda K. Reduced supraspinal nociceptive responses and distinct gene expression profile in CXBH recombinant inbred mice. Asian Pain Symposium 2013, 2013.12.18-20, 岡崎.
6. \*佐藤敦志, 笠井慎也, 高松幸雄, 小林敏之, 樋野興夫, 池田和隆, 水口雅. 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動に対するラパマイシンの治療効果. 第 1 回日本結節性硬化症学会学術総会, 2013.11.01, 東京.
7. \*吉田香織, 西澤大輔, 一宮尚志, 林田眞和, 福田謙一, 池田和隆. 遺伝子多型判定によるオピオイド性鎮痛薬必要量の予測式の構築と検証. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.26, 宜野湾.
8. \*宇野恭介, 徐承姫, 松村祥平, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美. セロトニン 2A 受容体遺伝子多型と喫煙行動との関連研究. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
9. \*成田心, 永堀健太, 岩橋和彦, 沼尻真貴, 吉原英児, 西澤大輔, 池田和隆, 石郷岡純. セロトニン 2A 受容体遺伝子多型と喫煙行動との関連研究. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
10. \*高松幸雄, 佐藤敦志, 久保由美子, 長澤セーラ幸恵, 田中美歩, Uhl GR, 曾良一郎, 池田和隆. ドーパミントランスポーター欠損マウスが示す多動に対するメチルフェニデートの抑制効果には臨界期がある. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
11. \*山西嘉晴, 高松幸雄, 池田和隆. 寒冷ストレスによる疼痛過敏に対するコリン系薬物の鎮痛作用. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
12. \*山本秀子, 萩野洋子, 池田和隆. フェンサイクリジン作用機序における GluN2D サブユニットの役割. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013.10.25, 宜野湾.
13. \*Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Nagashima M, Satoh Y, Higuchi S, Ujike H, Arinami T, Hayashida M, Ikeda K. Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. XXIst World Congress of Psychiatric Genetics (WCPG2013 : 第 21 回精神科遺伝学国際会議), 2013.10.17-21, Boston, USA.
14. \*Sugaya N, Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Takahama M, Tanaka M, Haraguchi A, Umeno M, Ikeda K. A randomized, rater blinded, crossover study of ifenprodil effect on relapse risk in patients with alcohol dependence. CINP Special Congress on Addiction and Mental Health, 2013.10.02, Kuala Lumpur, Malaysia.
15. \*Sato A, Kasai S, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M. Causal role of unregulated mTOR signaling in autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 2013.9.13, Beijing, China.
16. \*Takamatsu Y, Kubo Y, Nagasawa SY, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Critical period of inhibitory effect of methylphenidate on hyperactivity in dopamine transporter knockout mice. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 2013.9.13, Beijing, China.

17. \*Kasai S, Nishizawa D, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Ikeda K. Association between an opioid receptor-related gene polymorphism and smoking in Japanese. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 2013.09.13, Beijing, China.
18. \*山本秀子, 亀ヶ谷悦子, 萩野洋子, 高松幸雄, 山本敏文, 三品昌美, 池田和隆. N-methyl-D-aspartate 受容体の GluN2D サブユニットを欠損したマウスにおけるアンヘドニアと感覚情報処理機能障害. 第 86 回日本生化学会大会, 2013.09.11. 横浜.
19. \*佐々木一益, 住吉晃, 野中博意, Hall FS, Uhl GR, 渡辺雅彦, 笠原好之, 池田和隆, 川島隆太, 曾良一郎. ミューオピオイド受容体欠損(MOR-KO)による脳形態変化の観察-MRI/Voxel based morphometry 法と組織染色による解析-. 第33回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2013.09.07, 神戸.
20. \*笠井慎也, 西澤大輔, 林田眞和, 長島誠, 佐藤泰雄, 田上恵, 加藤良二, 池田和隆. 鎮痛薬感受性と関連するオピオイドペプチド遺伝子多型の解析. 第33回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2013.09.07, 神戸.
21. \*青木謙典, 吉田香織, 西澤大輔, 笠井慎也, 林田眞和, 池田和隆, 福田謙一. IV-PCA 使用状況から分る手術後鎮痛に影響を与える因子の検討. 第33回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2013.09.06, 神戸.
22. \*Kasai S, Ikeda K. Reduced supraspinal nociceptive responses and distinct gene expression profile in CXBH recombinant inbred mice. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議, 2013.08.29, 名古屋.
23. \*池田和隆. ドーパミンシグナルを介した精神疾患病態に関するマイクロエンドフェノタイプの解明 Microphenotypes of psychiatric disorders involving dopamine signal impairment. 新学術領域「マイクロ精神病態」班会議, 2013.08.29, 名古屋.
24. \*Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Hall FS, Uhl GR, Watanabe M, Kasahara Y, Ikeda K, Kawashima R, Sora I. Increased regional gray matter volume in the mu-opioid receptor knockout mice determined by mri voxel-based morphometry. INRC2013, 2013.07.18, Cairns, Australia.
25. \*Moriya Y, Kasahara Y, Hagino Y, Hall SF, Hen R, Ikeda K, Uhl GR, Sora I. Methamphetamine induced changes of monoamine neurotransmission in 5-HT1B KO mice. WFSBP, 2013.06.27, 京都.
26. \*山本秀子, 亀ヶ谷悦子, 萩野洋子, 高松幸雄, 山本敏文, 三品昌美, Hansen KB, Traynelis SF, 池田和隆. NMDA 受容体の GluN2D サブユニットの遺伝子欠損は PCP によりおこる落胆した状態と類似したアンヘドニアと鬱状態をひきおこす. Neuro2013, 2013.06.22, 京都.
27. \*宇野恭介, 高山佳奈子, 徐承姫, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美. セロトニンおよびドパミントランスポーターを過剰発現させた PC12 および HEK293 細胞において、PCLO の SNP はモノアミン取り込みを制御する. Neuro2013, 13.06.21, 京都.
28. \*Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J; Aoki Y, Nishi A, Saita N, Koukita Y, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Higuchi S, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara K, Itokawa M, Koga M, Arinami T, Kaneko Y, Hayashida M, Ikeda K. Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. European Human Genetics Conference 2013, 2013.06.08-11, Paris, France.
29. \*住谷昌彦, 池田和隆, 西澤大輔, 山田芳嗣, 厚生労働省 TR-Cancer Pain 研究班. がん開腹術後痛とがん性疼痛患者の疼痛強度にはレジスチン遺伝子多型が関与する. 日本麻酔科学会 第 60 回学術



集会, 2013.05.23-25, 札幌.

性の評価方法 [成立] 特許庁, 特願 2007-221298  
[2013/06/10]

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
1. 池田和隆, 林田真和, 西澤大輔, 曾良一郎  
(2013) GIRK チャネル遺伝子解析による薬物感受

2. 実用新案登録  
なし

## 覚せい剤依存症および併存疾患における脳内機能変化の解析

研究代表者：鈴木 勉

研究協力者：芝崎真裕

（星薬科大学薬品毒性学教室）

### [研究要旨]

近年、脱法ハーブをはじめ、乱用や健康被害が報告されている脱法ドラッグが若年層にも広がっており社会的問題となっている。特に脱法ドラッグは覚せい剤へのゲートウェイドラッグであることが指摘されている。脱法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドは、カンナビノイド受容体に結合し、多幸感などを引き起こす。一方、覚せい剤 (methamphetamine: METH) による精神依存の調節因子の一つとしてカンナビノイド (CB) 受容体が報告されている。現在までに、CB2 受容体の刺激はコカインのドパミン応答を抑制することが報告されており、精神依存形成を抑制する可能性が示唆されている。一般に、CB2 受容体は CB1 受容体に比べ、マクロファージなどの免疫細胞に非常に多く存在することが明らかにされていることから、これらの反応は免疫応答を介する可能性が示唆される。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、lipopolysaccharide (LPS) による METH 誘発報酬効果抑制作用機序について CB2 受容体およびその情報伝達系の変化を中心に検討した。

METH 誘発報酬効果に対する LPS の影響について検討したところ、METH による報酬効果は LPS の処置により有意に抑制された。この作用は、CB2 受容体拮抗薬である AM630 により有意に消失した。そこで、内因性カンナビノイドである 2-AG を脳室内前処置したところ、METH による報酬効果の形成は有意に抑制された。一方、CB2 受容体を介し 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。そこで TIMP1 の変化について検討したところ、LPS 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められた。

本研究結果より、LPS および 2-AG 処置により METH 誘発報酬効果の抑制が認められ、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 CB2 受容体が関与することが明らかとなった。したがって、活性化された免疫細胞により、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。また、CB2 受容体を介して産生された TIMP1 が細胞外マトリックスを調節することから、LPS により活性化した免疫細胞は CB 受容体を介して TIMP1 の産生を促し、細胞外マトリックスを調節することにより報酬効果を抑制したと考えられる。以上本研究の結果より、METH による依存形成に対する治療因子として、免疫系における CB2 受容体が有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

近年、脱法ハーブをはじめ、乱用や健康被害

が報告されている脱法ドラッグが若年層にも広がっており社会的問題となっている。特に脱法ドラッグは覚せい剤へのゲートウェイドラッグであることが指摘されている。覚せい剤は強力な精神依存を形成することから、再発率が高いため、覚せい剤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。

脱法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドは、カンナビノイド受容体に結合し、多幸感などを引き起こす。一方、覚せい剤 (methamphetamine: METH) 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が<sup>1,2)</sup>、その調節因子の一つとしてカンナビノイド (CB) 受容体が報告されている。したがって、METH の精神依存にカンナビノイド受容体は密接に関わると推測される。

カンナビノイド受容体は CB1、CB2 受容体に分類されるが、興味深いことに CB2 受容体の刺激はコカインのドーパミン応答を抑制することが報告されており、精神依存形成を抑制する可能性が示唆されている。一般に、CB2 受容体は CB1 受容体に比べ、マクロファージなどの免疫細胞に非常に多く存在することが明らかにされていることから、これらの反応は免疫応答を介する可能性が示唆される。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<sup>3)</sup>。また、当教室では免疫系を活性化させることが知られている lipopolysaccharide (LPS) が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告している。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<sup>4)</sup>。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 CB2 受容体およびその情報伝達系の変化を中心に検討した。

## 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℃) 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. 報酬効果の測定

METH による報酬効果は conditioned place preference (CPP) 法を用いて、評価した。実験装置は幅 15 cm、長さ 30 cm、高さ 15 cm の白および黒からなる 2-compartment box を使用した。Box は仕切り版によって 2 つの区画に分けられており、それぞれ白側の区画は凹凸のある床で、黒側の区画は平面の床で構成されている。条件づけはプレ方式に従って行った。条件づけを行う前日に、薬物あるいは溶媒のいずれも処置せずに box 中央に設置したプラットホームにマウスをのせ、プラットホームを降りた時点より 900 秒間、白および黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画における滞在時間を infrared beam sensor (KN-80, 株式会社夏目製作所、東京) で測定し、これを pre-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (1 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間閉じ込め、2 日目には溶媒を投与し、もう一方の区画に 60 分間閉じ込める操作を行った。溶媒のみで条件づけを行

った群を溶媒対照群とした。この一連の操作を 1 session とし、合計 3 sessions 行った。6 日目の条件づけが終了した翌日に post-test を行い、pre-test と同様にそれぞれの box における滞在時間を測定し、試験時における薬物処置区画への滞在時間と溶媒処置区画への滞在時間との差をスコア (sec) として算出し、報酬効果の指標とした。

### 3. 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、ポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20  $\mu$ g の蛋白量を注入し分離した。分離後、PVDF 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、anti-phospho-p38 あるいは anti-phospho-JNK) と反応させた後、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。

### 4. Real time 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 °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 MgCl<sub>2</sub> 10mL、10 mM dNTP mix 1mL (以上全て Invitrogen, CA, USA) を加え、70 °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 °C で 45 分間および 70 °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 および陽性対照として GAPDH の DNA 配列に基づいた primer により、SYBR Green を用いて  $\Delta\Delta$ CT 法に従い解析した。

### 5. 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. LPS による METH 誘発報酬効果の抑制作用および CB2 受容体の関与

METH 誘発報酬効果に対する LPS の影響について条件づけ場所嗜好性試験を用いて検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は LPS の処置により有意に抑制された。この作用に対する CB2 受容体の関与について検討する目的で、CB2 受容体拮抗薬である AM630 を併用処置したところ、LPS により認められる METH 誘発報酬効果の形成は有意に消失した (Fig. 1)。そこで、内因性カンナビノイドである 2-AG を脳

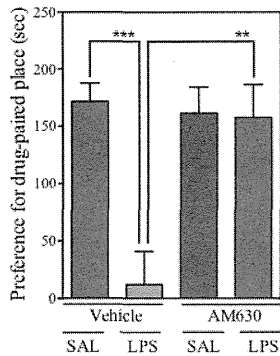


Fig. 1 Effect of LPS (1mg/kg, i.p.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects with or without AM630 (10 nmol/mouse, i.c.v.) in mice. \*\*<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. each groups.

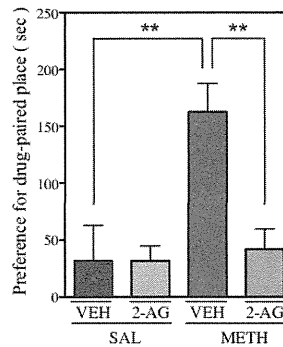


Fig. 2 Effect of 2-AG (10 nmol/mouse, i.c.v.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects in mice. \*\*<0.01 vs. each groups.

室内前処置したところ、METH による報酬効果の形成は有意に抑制された (Fig. 2)。

## 2. LPS による側坐核領域における MAP キナーゼの変化

そこで次に CB 受容体による細胞内情報伝達

系の変化について検討する目的で、リン酸化 ERK1/2、p38 および JNK の変化について検討した。その結果、LPS 処置により ERK2 および p38 の著明な増加が観察された (Fig. 3)。

## 3. 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

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<sup>5)</sup>。一方、CB2 受容体を介し 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<sup>6)</sup>。そこで TIMP1 の変化について検討したところ、LPS 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められた (Fig. 4)。一方、TIMP2 に有意な変化は認められなかったことから、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。

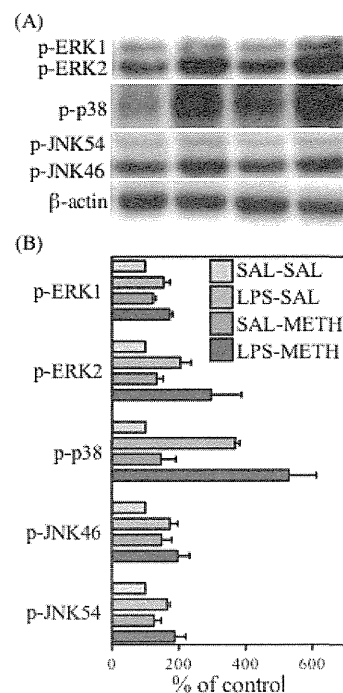


Fig. 3 Changes in protein levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), phospho-p38 and phospho-JNK 46/54 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

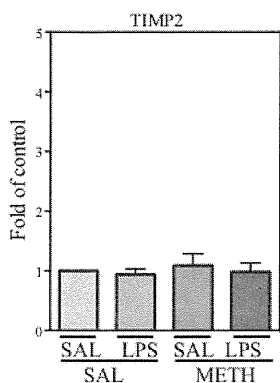
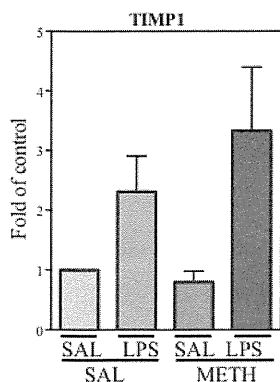


Fig. 4 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

#### D. 考察

本研究結果より、LPS および 2-AG 処置により METH 誘発報酬効果の抑制が認められ、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 CB2R が関与することが明らかとなった。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いる<sup>4)</sup>。また、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<sup>6)</sup>、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、CB2

受容体欠損動物では cocaine の精神依存が増強されることが報告されている<sup>7)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。本研究結果から、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。したがって、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が重要である可能性が示唆され、さらに、LPS は活性化したミクログリアは CB 受容体を介して TIMP1 の産生亢進を促し、これら細胞外マトリックスを調節することにより報酬効果を抑制したと考えられる。

#### E. 結論

以上本研究の結果より、METH による依存形成に対する治療因子として、免疫系における CB2 受容体が有効である可能性が示唆された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) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itoharu, 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)

6) 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)

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<sub>2</sub> 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. Shibasaki M, Tsuyuki T, Ando K, Otokozawa A, Udagawa Y, Watanabe K, Shibasaki Y, Mori T, Suzuki T. Implication of KCC2 in the sensitization to morphine by chronic ethanol treatment in mice. *Synapse*. (2014) 68: 39-43.

2. Nakamura A, Fujita M, Ono H, Hongo Y, Kanbara T, Ogawa K, Morioka Y, Nishiyori A, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, Kato A, Hasegawa M. G protein-gated inwardly rectifying potassium (KIR 3) channels play a primary role in the antinociceptive effect of oxycodone, but not morphine, at supraspinal sites. *Br J Pharmacol*. (2014) 171:253-264.

3. Yoshizawa K, Narita M, Suzuki T. Psychological dependence on opioid analgesics. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. (2013) 142: 22-27.

4. Narita M, Imai S, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Rahmadi M, Sudo Y, Hojo M, Uezono Y, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T. Possible involvement of prolonging spinal  $\mu$ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to  $\mu$ -opioids under a neuropathic pain-like state. *Addict Biol*. (2013) 18: 614-622.

5. Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, James Okano H, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemoattractant protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain*. (2013) 136: 828-843.

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. (2013) 80: 34-41.

7. Nakamura A, Hasegawa M, Minami K, Kanbara T, Tomii T, Nishiyori A, Narita M, Suzuki T, Kato A. Differential activation of the  $\mu$ -opioid receptor by oxycodone and morphine in pain-related brain regions in a bone cancer pain model. Br J Pharmacol. (2013) 168: 375-388.

8. Shibasaki M, Watanabe K, Takeda K, Itoh T, Tsuyuki T, Narita M, Mori T, Suzuki T. Effect of chronic ethanol treatment on mu-opioid receptor function, interacting proteins and morphine-induced place preference. Psychopharmacology (Berl) (2013) 228: 207-215.

9. Shibasaki M, Masukawa D, Ishii K, Yamagishi Y, Mori T, Suzuki T. Involvement of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 in the sensitization to morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem in the mesolimbic system. J Neurochem. (2013) 125: 747-755.

## 総説

1. 池上大悟、伊達明利、鈴木 勉、成田年：疼痛下のモルヒネ依存・耐性不形成機構. Anesthesia Network 17, 28-32, 2013

2. 吉澤一己、成田 年、鈴木 勉：医療用麻薬の適正使用のために：オピオイド鎮痛薬と精神依存 日薬理誌 142, 22-27, 2013

## 2. 学会発表

### 国際学会

75th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence. 平成 25 年 6 月 15-20 日, San Diego, CA

CHRONIC TREATMENT WITH ETHANOL ENHANCED MORPHINE-INDUCED HYPERLOCOMOTION.

Kouji Andoh, Masahiro Shibasaki, Tomohisa Tsuyuki, Ami Otokozawa, Tomohisa Mori, Tsutomu Suzuki

EFFECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDES ON DOPAMINE-RELATED BEHAVIOR OF METHAMPHETAMINE

Masahiro Shibasaki, Daiki Masukawa, Toshio Imai, Tomohisa Mori, Tsutomu Suzuki

International narcotic research conference ( INRC ) 2013. 平成 25 年 7 月 14-19 日, Australia

INVOLVEMENT OF  $\sigma$ - AND  $\kappa$ -OPIOID RECEPTOR FUNCTION IN THE REWARDING EFFECT OF ( $\kappa$ )-PENTAZOCINE.

Tsutomu Suzuki, Toshimasa Itoh, Tomoya Saeki, Daiki Masukawa, Masahiro Shibasaki and Tomohisa Mori.

INVOLVEMENT OF SUPRASPINAL AND PERIPHERAL NALOXONAZINE- INSENSITIVE OPIOID RECEPTOR SITES IN THE EXPRESSION OF  $\kappa$ -OPIOID RECEPTOR AGONIST-INDUCED PHYSICAL DEPENDENCE

Naoki Uzawa, Tomohisa Mori, Koichi Sugiyama, Yusuke Saitou, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki.

INVOLVEMENT OF SIGMA-1 RECEPTOR CHAPERONE ON THE EXPRESSION OF WITHDRAWAL SIGNS IN MORPHINE-DEPENDENT MICE

Junpei Ohya, Tomohisa Mori, Naoki Uzawa, Koichi Sugiyama, Yusuke Saitoh, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

DIFFERENTIAL EFFECTS OF MORPHINE AND METHAMPHETAMINE ON THE ACTIVATION OF MESOLIMBIC AND NIGROSTRIATAL DOPAMINERGIC SYSTEMS.

Yoshiyuki Iwase, Tomohisa Mori, Tomoya Saeki,



Noriyuki Iwata, Asami Murata,  
Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

国内学会

第 86 回日本薬理学会年会

平成 25 年 3 月 21-23 日, 福島

DIFFERENTIAL ANTAGONIZING EFFECTS OF  
CLOZAPINE AND HALOPERIDOL ON THE  
METHAMPHETAMINE- AND  
MORPHINE-INDUCED BEHAVIORAL  
CHANGES.

Noriyuki Iwata, Tomohisa Mori, Asami Murata,  
Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

CHRONIC TREATMENT OF ETHANOL  
ENHANCED MORPHINE-INDUCED  
HYPERLOCOMOTION.

Koji Ando, Masahiro Shibasaki, Tomohisa Tsuyuki,  
Ami Otokozawa, Tomohisa Mori, Tsutomu Suzuki

GENETIC BACKGROUND REFLECTING THE  
CONVERSION FROM DISCRIMINATIVE  
STIMULUS TO REWARDING EFFECTS OF  
PSYCHOSTIMULANTS IN RATS.

Daisuke Aikawa, Tomohisa Mori, Tomoya Saeki,  
Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

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

今井敏雄, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉

生体機能と創薬シンポジウム 2013

平成 25 年 8 月 29-30 日, 福岡

エタノール慢性処置によるモルヒネ誘発  
dopamine 遊離量への影響

安藤光史, 芝崎真裕, 男澤杏美, 岡部健司, 菊田  
奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム

平成 25 年 8 月 31 日, 熊本

Ethanol 慢性処置による morphine 誘発報酬効

果増強作用に対する GRK2 の関与

芝崎真裕, 安藤光史, 男澤杏美, 露木智久, 森友  
久, 鈴木勉

アルコール・薬物依存関連学会合同学会

平成 25 年 10 月 3-5, 岡山

MDMA 誘発報酬効果ならびに弁別刺激効果に  
おけるオレキシン神経系の役割

鵜澤直生, 森友久, 外園真由奈, 宇田川雄也, 芝  
崎真裕, 鈴木勉

エタノール慢性処置によるモルヒネ誘発自発運  
動促進作用の増強効果に対する  $\beta$ -エンドルフ  
イン神経系の関与

安藤光史, 芝崎真裕, 男澤杏美, 岡部健司, 菊田  
奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

第 57 回日本薬学会関東支部大会

平成 25 年 10 月 26 日, 東京

Lipopolysaccharide が methamphetamine 誘発  
dopamine 関連行動に与える影響

芝崎真裕, 今井敏雄, 池窪結子, 石川ゆとり, 安  
藤光史, 森友久, 鈴木勉

第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日  
本神経精神薬理学会合同年会

平成 25 年 10 月 24-26 日, 沖縄

薬物依存の研究 (第 483 報) ; Methamphetamine  
および morphine による中脳辺縁ならびに黒質線  
条体 dopamine 神経系の活性化

村田麻美, 森友久, 岩瀬祥之, 岩田典之, 芝崎真  
裕, 鈴木勉

薬物依存の研究 (第 478 報) ; アルコール誘発弁  
別刺激効果に対する GABAA および 5-HT<sub>1A</sub>  
受容体作動薬の般化

望月綾乃, 森友久, 鵜澤直生, 加澤春世, 芝崎真  
裕, 鈴木勉

薬物依存の研究 (第 480 報) ; Methylphenidate  
の弁別刺激効果に対するモノアミン神経系の関  
与

加澤春世, 森友久, 望月綾乃, 鵜澤直生, 芝崎真

裕, 鈴木勉

薬物依存の研究 (第 477 報); MDMA の弁別刺激効果発現における serotonin 神経系の役割  
鵜澤直生, 森友久, 渡辺京彦, 加澤春世, 望月綾乃, 芝崎真裕, 鈴木勉

薬物依存の研究 (第 485 報); Dopamine による細胞死に対する sigma-1 receptor chaperone の GSK-3 $\beta$  を介した細胞保護作用

原田真季, 森友久, 大屋順平, 小林実奈代, 芝崎真裕, 鈴木勉

第 24 回 マイクロダイアリス研究会

平成 25 年 12 月 14 日, 東京

OA-1 受容体拮抗薬 DOPA cyclohexyl ester の methamphetamine 誘発 dopamine 遊離に及ぼす影響

岩瀬祥之, 森友久, 中村美聖, 肥田野翔, 芝崎真裕, 東山公男, 五嶋良郎, 鈴木勉

第 23 回 神経行動薬理若手研究者の集い

平成 26 年 3 月 18 日, 仙台

MDMA および methylphenidate 誘発弁別刺激効果の差異

鵜澤直生, 森友久, 渡辺京彦, 加澤春世, 望月綾乃, 内田匡志, 芝崎真裕, 鈴木勉

第 87 回 日本薬理学会

平成 26 年 3 月 19-21 日, 仙台

薬物依存に関する研究 (第 488 報): Lipopolysaccharides (LPS) に よ る

methamphetamine 誘発報酬効果の抑制に対する CB2 受容体の関与

池窪結子, 芝崎真裕, 安藤光司, 石川緩, 男澤杏美, 岡部健司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

薬物依存に関する研究 (第 489 報): エタノール慢性処置による脳内におけるエタノール代謝系の変化

石川緩, 芝崎真裕, 安藤光史, 池窪結子, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉

第 134 回 日本薬学会年会

平成 26 年 3 月 27-30 日, (熊本)

薬物依存の研究(第 492 報): Ketamine による抗不安作用における細胞骨格系の変化  
庄條育子, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉

## 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

違法ドラッグ等、薬物依存のトレンドを踏まえた病態の解明と診断・治療法の開発

〔分担研究課題〕 覚せい剤関連精神障害に対する薬物療法の開発

分担研究者 橋本謙二（千葉大学社会精神保健教育研究センター・教授）

研究協力者 任 乾（千葉大学大学院医学薬学府・大学院生）

研究協力者 馬 敏（千葉大学大学院医学薬学府・大学院生）

---

研究要旨：覚せい剤の乱用により様々な精神障害（うつ症状、認知機能障害など）が引き起こされるが、根本的な治療法が無い。脳由来神経栄養因子（BDNF）はうつ病をはじめとする様々な精神障害の病態に関わっている。今回、BDNFの受容体である TrkB のアゴニスト 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF)は、覚せい剤の投与によって引き起こされる行動異常や神経障害を抑制することが判った。また覚せい剤の繰り返し投与は、うつ症状を呈し、長期間持続することを見出した。

---

A. 研究目的

覚せい剤の乱用はヒトに依存を形成し、様々な精神障害（うつ症状、認知機能障害など）を引き起こすことが知られているが、現在のところ、根本的に治療する薬剤は無い。

これまで我々は、脳由来神経栄養因子（BDNF）およびその受容体 TrkB を介するシグナル伝達系は、気分障害を含む多くの精神神経疾患の病態および治療メカニズムに関わっていることを報告した（1-4）。

本研究では、覚せい剤投与によって引き起こされる行動異常における BDNF-TrkB シグナル系の役割を調べた。

B. 研究方法

神経障害に対する試験

実験には 10 週齢の Balb/c 雄性マウス（日本エスエルシー株式会社）を使用した。急性の行動試験では、溶媒あるいは TrkB アゴニストである 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF; 3, 10, or 30 mg/kg, IP)を投与し、30 分後に覚せい剤（3 mg/kg, SC）を投与し行動評価を行った。逆耐性の形成に対する

試験では、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP)を投与し、30 分後に溶媒あるいは覚せい剤（3 mg/kg, SC）を 1 日 1 回 5 日間を投与した。最終投与から 1 週間断薬した後、全てのマウスに覚せい剤（1 mg/kg, SC）を投与し、運動量を測定した。

ドパミン神経系に対する神経障害の試験では、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP)を投与し、30 分後に溶媒あるいは覚せい剤（3 mg/kg, SC）を 3 時間間隔で 3 回投与した。引き続き、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP)を 12 時間間隔で 1 日 2 回 2 日間投与し、翌日にかん流固定して、ドパミントランスポーター（DAT）および MAC1 (activated microglia)の免疫組織化学を行った。

うつ症状に対する試験

実験には 8 週齢の C57/B6 雄性マウス（日本エスエルシー株式会社）を使用した。溶媒あるいは覚せい剤（3 mg/kg, SC）を 1 日 1 回 5 日間を投与した。最終投与の 3 日後から、2 週間後まで、尾懸垂試験、強制水泳試験、ショ糖飲水試験を用いて、うつ症状の評価を実施した。

## 【倫理面への配慮】

動物を用いる研究については、千葉大学実験動物委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

TrkB アゴニスト 7,8-DHF の前投与は、覚せい剤投与によって引き起こされる急性の行動異常を用量依存的に抑制した。また 7,8-DHF は覚せい剤の繰り返し投与による逆耐性の形成を有意に抑制した。さらに 7,8-DHF は覚せい剤の繰り返し投与で引き起こされる脳内ドパミン神経障害およびミクログリアの活性化を有意に抑制した。

覚せい剤を繰り返し投与したマウスでは、尾懸垂試験、強制水泳試験における無働時間が有意に延長し、ショ糖飲水試験では有意に減少し、うつ症状を呈した。また覚せい剤投与後のうつ症状は、最終投与 2 週間後でも観察された。

## D. 考察

今回の研究結果から、覚せい剤の繰り返し投与による行動異常や神経障害は、TrkB アゴニストの前投与で抑制されることから、TrkB アゴニストは覚せい剤精神障害の予防薬として有効かもしれない。また、覚せい剤の繰り返し投与によって引き起こされるうつ症状は、断薬後も長期間持続することが判明した。BDNF-TrkB シグナル系はうつ病の病態に深く関わっていることから、次年度は覚せい剤投与後に観察されるうつ症状における BDNF-TrkB シグナルの役割を明らかにし、新しい治療法の開発の可能性を探る。

## E. 結論

本研究から、BDNF-TrkB シグナル系は、覚せい剤の投与によって引き起こされる精神障害の病態に関わっていると考えられ、BDNF-TrkB シグナル系は覚せい剤関連障害の予防薬・治療薬の新規ターゲットとして有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 【英文雑誌】

[1] Hashimoto, K. (2013) Sigma-1 receptor chaperone and brain-derived neurotrophic factor: emerging links between cardiovascular disease and depression. *Prog. Neurobiol.* 100, 15-29.

[2] Ren, Q., Zhang, J.C., Fujita, Y., Ma, M., Wu, J., and Hashimoto, K. (2013) Effects of TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone on sensory gating deficits in mice after administration of methamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 106, 124-127.

[3] Niitsu, T., Ishima, T., Yoshida, T., Hashimoto, T., Matsuzawa, D., Shirayama, Y., Nakazato, M., Shimizu, E., Hashimoto, K., and Iyo, M. (2014) A positive correlation between serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor and negative symptoms in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 215, 268-273.

[4] Södersten, K., Pålsson, E., Beneroso, K.L.F., Ishima, T., Landén, M., Funa, K., Hashimoto, K., and Ågren, H. (2014) Abnormality in serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in mood-stabilizing patients with bipolar disorder: A study from two independent sets. *J. Affect. Dis.* 160, 1-9.

[5] Hashimoto, K. (2014) Serum brain-derived neurotrophic factor as a predictor of incident dementia. *JAMA Neurol.* in press.

[6] Ren, Q., Zhang, J.C., Ma, M., Fujita, Y., Wu, J., and Hashimoto, K. (2014) Protective effects of TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone on the behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Psychopharmacology* 231,