

159-166.

【邦文雑誌】

[1] 橋本謙二 (2013) うつ病の病態における BDNF-TrkB 受容体シグナル系の役割. 医学のあゆみ: 244 (5): 471-475.

2. 学会発表

【国際学会】

[1] Soderstein, K., Palsson, E., Le Gal Beneroso, K., Funa, K., Landen, M., Hashimoto, K., and Agren H. (2013) Mature BDNF versus proBDNF in serum from two independent sets of euthymic bipolar patients and healthy controls: New biomarkers for bipolar disorders. The 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan. June 23 -27, 2013.

[2] Ren, Q., Zhang, J., Ma, M., Fujita, Y., and Hashimoto, K. (2013) 7,8-Dihydroxyflavone attenuates behavioral abnormalities and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine The 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. November 9-13, 2013.

[3] Zhang, J., Wu, J., Ren, Q., Li, S., Shirayama, Y., and Hashimoto, K. (2013) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behaviors and dendritic changes after inflammation. The 43th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. November 9-13, 2013.

[4] Hashimoto, K., Zhang, J., Wu, J., Ren, Q., Li, S., and Shirayama, Y. (2013) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behaviors and dendritic changes after inflammation. 51st Annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology, Hollywood, Florida. December 8-12, 2013.

【シンポジウム・招待講演】

[1] 橋本謙二 (2013) 炎症性うつ病の新規治療ターゲットとしての BDNF-TrkB シグナリング. トピックス・フォーラム 10 酸化ストレス・炎症から解く精神神経疾患: 病態解明から治療戦略へ. 第 109 回日本精神神経学会学術総会. 平成 25 年 05 月 24 日. 福岡市.

[2] 橋本謙二 (2013) うつ病の新規治療ターゲットとしての BDNF-TrkB シグナル. 平成 25 年度生理学研究所研究会「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」. 平成 25 年 09 月 2 日. 岡崎市.

【一般演題】

[1] 任 乾、橋本謙二 (2013) 覚せい剤関連精神障害に対する BDNF-TrkB シグナルの役割. 第 40 回日本脳科学会. 平成 25 年 9 月 28-29 日. 静岡県浜松市.

[2] 任 乾、張 継春、馬 敏、藤田有子、呉 勁、橋本謙二 (2013) 覚せい剤関連精神障害に対する BDNF-TrkB シグナルの役割. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 平成 25 年 10 月 3-5 日. 岡山県岡山市.

[3] 橋本謙二、張 継春 (2013) 炎症性うつ病における BDNF-TrkB シグナルの役割. 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学会. 平成 25 年 10 月 24-26 日. 沖縄.

3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

違法ドラッグ等の薬物依存における覚せい剤依存関連分子の関与と 診断および治療法の開発

研究分担者： 新田淳美¹

研究協力者： 宇野恭介¹、傅柯荃¹、宮崎杜夫¹、菊地佑¹、日比陽子²、村松慎一³、
鍋島俊隆⁴、宮本嘉明¹

¹ 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）・薬物治療学研究室

² 名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座・医学部附属病院薬剤部

³ 自治医科大学神経内科学講座

⁴ 名城大学薬学部地域医療薬局学講座

【研究要旨】

近年、覚せい剤（methamphetamine: MAP）使用へと繋がるゲートウェイ・ドラッグの乱用が、大きな社会的問題となってきた。そこで、我々は、その移行を阻止するための診断法や治療法の開発を目的として本研究を開始した。MAP 連続投与によりマウス側坐核において遺伝子発現が増加するものとして、我々が見出した薬物依存関連分子 Shati/*N*-acetyltransferase 8-like protein (Nat8l)、transmembrane protein 168 (Tmem168) および Piccolo に焦点を当て、ゲートウェイ・ドラッグによる神経系への影響や依存形成のメカニズムを解明するとともに、治療薬開発のための標的分子を検討した。これまでに、我々は、側坐核における Shati/Nat8l が MAP 投与により誘発される行動学および神経化学的異常に対して抑制的に作用していることを明らかにしてきた。一方、Tmem 168 の生理機能は、ほとんど分かっていないが、MAP およびニコチンの 2 種類の依存性薬物により側坐核での発現量が増加していることを報告してきた。今年度は、Shati/Nat8l の産生物の下流システムとなる代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGluR3) を介した神経伝達が、薬物依存抑制機能を有することを明らかにした。また、MAP を投与することによる Shati/Nat8l 遺伝子発現増加のメカニズムについて、その転写・産生機序を推定した。さらに、Tmem168 は依存形成に抑制的な作用を持つことも明らかにした。つまり、今年度の研究成果から、Shati/Nat8l が関連する mGluR3 介在神経伝達システムおよび Tmem168 関連システムは、薬物依存の新たな治療薬開発の標的となる可能性が示唆される。今後、ゲートウェイ・ドラッグにより誘発される依存形成に対しても、mGluR3 や Tmem168 が治療薬開発の新たな標的分子としての可能性を検証していく。

A. 研究目的

現在、我が国は第3次薬物乱用期にあり、覚せい剤であるメタンフェタミン (methamphetamine: MAP) またはその誘導体による薬物事犯が後を絶たず、社会的問題となっている。特に、近年の乱用薬物の多様化にともない、様々な違法ドラッグや処方薬などのゲートウェイ・ドラッグの乱用から、より強力な作用の薬物を求めることによって MAP 乱用へと移行することが指摘されている。このような社会的背景から、ゲートウェイ・ドラッグを含む乱用薬物による薬物依存形成のメカニズムを解明し、その予防法や治療法を確立することが求められている。しかしながら、薬物依存形成には脳内側坐核におけるドパミン神経伝達が重要な役割を果たしていることが明らかにされているものの^{4, 11)}、そのメカニズムは非常に複雑であり、未知の分子の関与も示唆されている。これまでに、我々は、MAP を連続投与したマウスの側坐核において、PCR cDNA サブトラクション法を利用して、発現が増加する遺伝子同定を試み、Shati/*N*-acetyltransferase 8-like protein (Nat8l)¹⁰⁾、transmembrane protein 168 (Tmem168) および Piccolo³⁾ の3つの覚せい剤依存関連分子を見出している。そこで、本研究では、我々が見出した上述の薬物依存関連分子に焦点を当て、違法ドラッグ等から MAP への移行を阻止する治療法開発のために、ゲートウェイ・ドラッグによる神経機能変化メカニズムを解明するとともに、その標的分子を検討する。

既に、我々は、側坐核における Shati/Nat8l が、MAP の薬理学的作用に対して抑制的に働くことを明らかにしてきた^{6, 10)}。すなわち、側坐核で Shati/Nat8l を過剰発現させたマウスを作製し、MAP への反応性を検討した結果、MAP の効果が行動学および神経化学的に有意に減弱された。一方、Shati/Nat8l はアスパラギン酸を基質とした *N*-アセチルアスパラギン酸 (*N*-acetylaspartate:

NAA) 合成酵素であること¹⁾、さらに、Shati/Nat8l により合成された NAA は、*N*-アセチルアスパラギン酸・グルタミン酸 (*N*-acetylaspartyl- glutamate: NAAG) へと変換されて細胞外へ放出され、グループ II 代謝型グルタミン酸受容体 3 (mGluR3) に対して神経伝達物質として働くことが報告されている^{2, 9)}。

Tmem168 は、アミノ酸残基 697 個から成り、推定膜貫通領域を有するタンパク質であるが、その生理機能に関する報告はほとんどない。我々は、Tmem168 mRNA 発現量が脳内において高いことを明らかにした。作用機序が異なる依存性薬物である MAP およびニコチンの連続投与により、側坐核においてその mRNA 発現量が増加することも見出している。

本年度の研究では、薬物依存抑制分子 Shati/Nat8l の産生物の下流にあたる mGluR3 を介在する神経伝達の役割について、神経化学的に検討した。また、MAP を投与することによる Shati/Nat8l 遺伝子発現調節を *in vivo* と *in vitro* で検討した。また、MAP による依存形成メカニズムにおける機能未知分子 Tmem168 の役割について、神経化学的および行動学的に検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物

本実験には、8週齢の C57BL / 6J 雄性マウス (日本 SLC、静岡) を使用した。マウスは、午前 8 時から午後 8 時を明期とする部屋で飼育し、行動実験中以外は、餌および水は自由摂取とした。

2. 試薬

メタンフェタミン塩酸塩 (MAP hydrochloride) は大日本住友製薬株式会社 (大阪) より、NAAG、2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid (2-PMPA)、および LY341495 は Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA) より購入した。その他の一般的な試薬

は、Wako（大阪）もしくは Nakalai tesque（京都）より購入した。

3. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの作製およびマウス脳内への注入

Tmem168 遺伝子を組み込んだ pAAV-Tmem168、pAAV-Rep/Cap および pHelper の 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞内で AAV-Tmem ベクターを作製させ、それを抽出し精製した^{5,8)}。標的遺伝子を組み込んでいない AAV ベクターを Mock コントロールとして使用した。各 AAV ベクターを、両側 NA (anterior = + 1.4, lateral = ± 0.8, ventral = + 3.8 from Bregma) に注入した（各々を、Tmem マウスおよび Mock マウスとする）。その後、3 週間が経過してから各種の実験を行った。

4. *Tmem168* mRNA 発現量の測定

Tmem168 mRNA 発現量の測定は、常法に従って Real-Time RT-PCR 法も用いて行った。PCR プライマーについては、以下の塩基配列を使用した。5'-GACAGAATCATGGCATCCAAAGG-3' (forward), 5'-TTGTCTTGCCGCTGGAGTCCAT-3' (reverse)。

5. 運動量の測定

Tmem マウスまたは Mock マウスを用いて実験を行った。アクリル製の箱 (40×40×30 cm) の中で、マウスを自由に行動させ、Scanet MV-40 (MELQUEST, 富山) を用いて運動量を測定した⁷⁾。MAP 誘発運動過多の測定では、測定の直前に MAP (1 mg/kg) または Saline を皮下投与した。

6. 条件付け場所嗜好性 (Conditioned Place Preference: CPP) 試験

Tmem マウスまたは Mock マウスを用いて実験

を行った。条件付け場所嗜好性試験は、2 つのコンパートメントからなる明暗箱を用いて既報に従って行った^{7, 10)}。すなわち、マウスを 3 日間、実験装置に慣らし、3 日目に滞在時間の Pre 値を測定した。続けて、MAP (1 mg/kg) または Saline の皮下投与による条件付けを 1 日 1 回 20 分間、合計 6 回行った。その翌日 (10 日目)、滞在時間の Post 値を測定し、Post-Pre 値を CPP スコアとして算出し、場所嗜好性の指標とした。

7. 細胞外ドパミン遊離量の測定

Tmem マウスまたは Mock マウスを用いて実験を行った。*In vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、マウス側坐核での細胞外ドパミン遊離量を測定した¹⁰⁾。マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, s.c.) 麻酔下で脳定位置に固定した。頭蓋を開口後、左側 NA (anterior = + 1.4, lateral = + 0.8, ventral = + 3.0 from Bregma) にガイドカニューレを挿入し固定した。翌日、透析プローブをガイドカニューレより挿入し、リング液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) を 0.5 μl/min で灌流した。灌流液は、15 分間隔で収集し、灌流液中のドパミン量を HPLC システム (HTEC-500, EICOM, 京都) を用いて分析した。薬物処置は、透析プローブ挿入から約 2 時間後から開始した。

9. ゲノム DNA のメチル化解析

MAP (1 mg/kg) または生理食塩水 (Saline) を

6 日間連続皮下投与したマウスの側坐核および全血から *Shati/Nat8l* ゲノム DNA を抽出し、メチル化DNAを判別可能とするために bisulfite 処置を行った。その DNA について、大腸菌を用いたクローニングおよびシーケンス解析を行い、転写開始点上流 (-562 から -135bp) のプロモーター領域における DNA メチル化率を算出した。

10. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群間の比較では、Student's *t*-test を用いて行った。3 群間以上の比較には、分散分析の後、Bonferroni's post-hoc test を用いて行った。

11. 倫理面への配慮

本研究における動物実験は、富山大学動物実験指針、文部科学省動物実験指針および Principal of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985) に準じ、富山大学の動物実験委員会で承認されたうえで行った。遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、富山大学の遺伝子組換え生物等使用実験安全管理委員会で承認されたうえで行った。

C. 研究結果

1. マウスへ MAP を投与した時のドパミン遊離量増加に対する NAAG の抑制作用

マウスへ MAP を投与することにより、側坐核でのドパミン遊離量が増加することは、よく知られている現象であり、この増加が薬物依存形成に重要な役割を果たしていると考えられている¹¹⁾。そこで、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、*Shati/Nat8l* の産生物の下流にある mGluR3 が、本現象に関与しているかどうかを検討した。まず、mGluR3 生体内アゴニスト NAAG の MAP による

ドパミン遊離量増加に対する影響を検討した。透析用リンゲル液を介して、側坐核に NAAG (0.1 mg/ml) を 15 分間環流したところ、野生型マウスの側坐核におけるドパミンの基礎遊離量は減少した。NAAG 還流後に MAP (1 mg/kg) を皮下投与すると、MAP 単独投与の時と比較して MAP 投与によるドパミン遊離量増加の有意な減少が観察された (Fig. 1A)。さらに、NAAG 分解酵素である glutamate carboxypeptidase II (GCPII) の阻害剤 2-PMPA (30 mg/kg) を野生型マウスに腹腔内投与すると、NAAG 環流時と同様に、側坐核におけるドパミン基礎遊離量が減少した。2-PMPA 投与 30 分後に MAP (1 mg/kg) を皮下投与すると、同様に、MAP だけを投与した時と比較して MAP によるドパミン遊離量増加の有意な減少が観察された (Fig. 1B)。次に、mGluR2/3 アンタゴニスト LY 341495 の MAP 誘発ドパミン遊離量に対する影響を検討した。LY341495 を野生型マウスに腹腔内投与しても、側坐核におけるドパミン基礎遊離量に変化は観察されなかった。しかし、LY341495 (0.3 mg/kg) の投与 30 分後に MAP (1 mg/kg) を皮下投与すると、MAP 単独投与と比較して MAP 投与によるドパミン遊離量増加の有意な上昇が観察された (Fig. 2)。

以上のことから、側坐核での MAP 末梢投与によるドパミン遊離量の増加メカニズムには、mGluR3 介在神経伝達が抑制的に関与していることが明らかとなった。

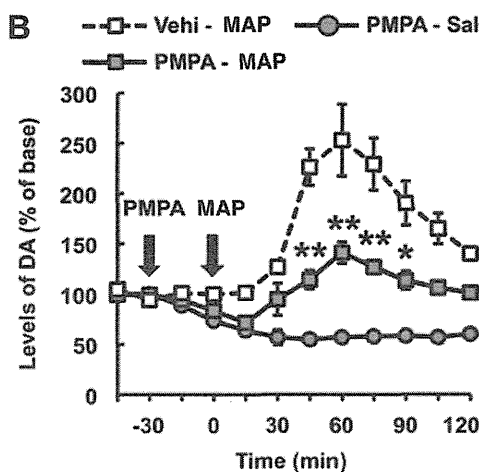
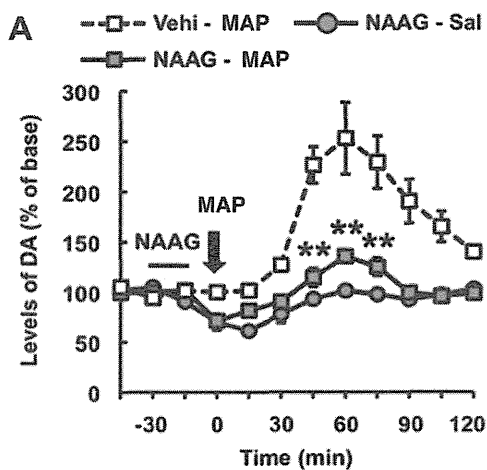


Fig. 1 Effect of NAAG on MAP-induced dopamine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with NAAG perfusion (0.1 mg/ml, during 15 min prior to MAP) (A) and 2-PMPA (30 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) (B) and inhibited MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle-MAP.

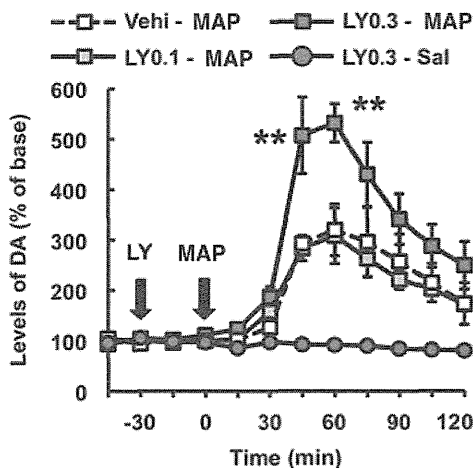


Fig. 2 Effect of LY341495 on MAP-induced dopamine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with LY341495 (0.1 or 0.3 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) enhanced MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=6. ** $P < 0.01$ vs vehicle-MAP.

2. MAP 投与によるドパミン遊離上昇への側坐核での Tmem168 過剰発現の影響

まず初めに、Tmem マウスの側坐核における *Tmem168* mRNA の発現量を検討した結果、それは、Mock マウスと比較して、約 10 倍に増加していた (Data not shown)。次に、*in vivo* マイクロダイアリス法を用いて、側坐核におけるドパミン遊離量を検討した。Tmem マウスのドパミン基礎遊離量は、Mock マウスと比較して変化は観察されなかった (Data not shown)。MAP (1 mg/kg) の皮下投与により Mock および Tmem マウスではドパミン遊離量が顕著に上昇したが、Tmem マウスと Mock マウスとの比較では、Tmem マウスの MAP 投与によるドパミン遊離量の増加は有意に抑制されていた (Fig. 3)。

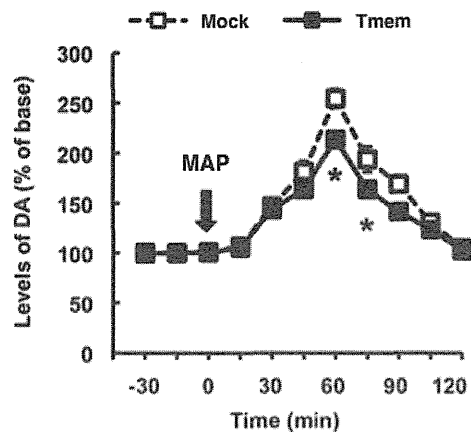


Fig. 3 Effect of MAP on extracellular dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens of Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered in time 0 min. N=9. * $P < 0.05$ vs MAP-treated Mock.

3. マウスへの MAP 投与による運動過多への側坐核での Tmem168 過剰発現の影響

MAP (1 mg/kg) をマウスに皮下投与すると Tmem マウスと Mock マウスの両方で、運動過多が観察された。しかしながら、Tmem マウスにおける MAP 投与による運動過多は、対照群の Mock マウスと比較して有意に減少していた (Fig. 4)。

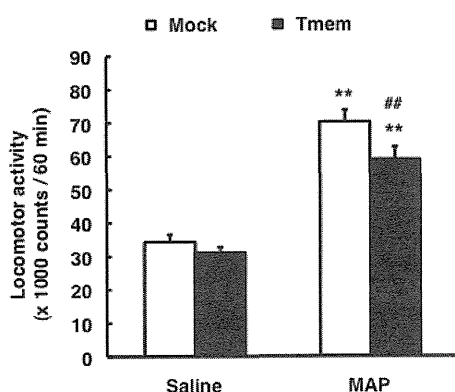


Fig. 4 Effect of MAP on locomotion in Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered immediately before the measurement of locomotor activity. N=8. ** $P < 0.01$ vs Saline, ## $P < 0.01$ vs Mock-MAP.

4. マウスへの MAP 投与による場所嗜好性への側坐核での Tmem168 過剰発現の影響

マウスを MAP 投与で条件付けすることによって、Mock マウスでは場所嗜好性が観察されたが、Tmem マウスでは場所嗜好性が観察されなかった (Fig. 5)。

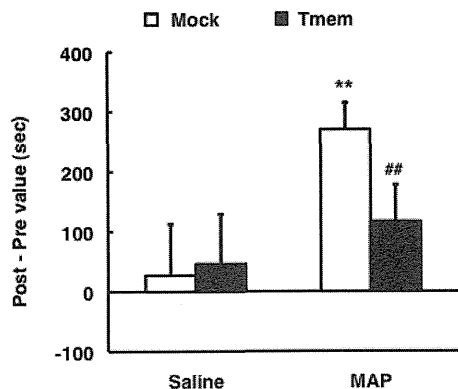


Fig. 5 Effect of MAP on conditioned place preference in Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning in the conditioned place preference task. N=8. * $P < 0.05$ vs Saline, # $P < 0.05$ vs Mock-MAP.

5. マウスへの MAP 連続投与による Shati/Nat8l プロモーター領域のメチル化の検討

MAP 連続投与後におけるマウス側坐核と血中の Shati/Nat8l ゲノム DNA プロモーター領域のメチル化解析では、対照群と比較して MAP 連続投与により側坐核・血中由来の両方の DNA で -562 から -135bp の数か所のメチル化率および本領域全体での平均メチル化率が有意に減少していた (Fig. 6A and B)。つまり、MAP 投与による Shati/Nat8l 遺伝子発現増加は、DNA メチル化の減少が、関与していることが明らかとなった。

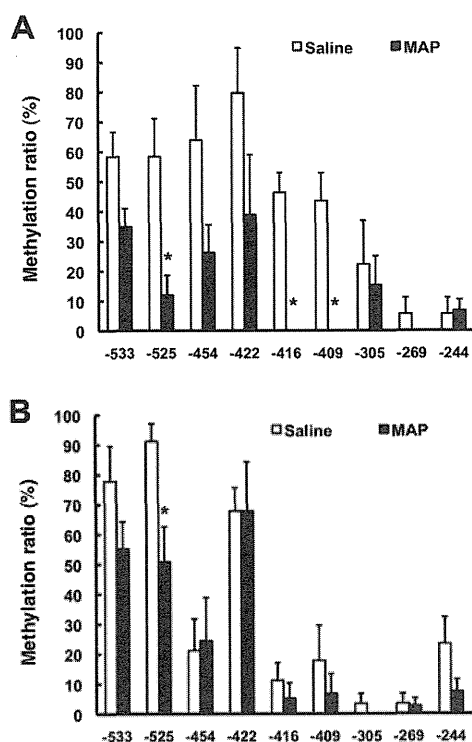


Fig. 8 Methylation profiles of Shati/Nat8l DNA from the nucleus accumbens and blood in MAP-treated wild-type mice. The methylation ratios of each CpG units from the nucleus accumbens (A) and blood (B). N=3. * $P < 0.05$ vs Saline.

D. 考察

これまでの我々の研究においては、側坐核で Shati/Nat8l を過剰発現させた遺伝子改変マウスを用いて、側坐核での Shati/Nat8l、さらには、その最終産物 NAAG が結合する mGluR3 介在神経伝達が、MAP の薬理学的作用に対して抑制的に働く

ことを明らかにしてきた⁶⁾。しかし、本研究では、インタクトな野生型マウスを用いて、側坐核での mGluR3 を介した神経伝達が、MAP の細胞外ドパミン遊離上昇作用に対して抑制的に働くことを観察した。このことは、Gi タンパク質共役型 mGluR3 の活性化が薬物依存形成を抑制する可能性を示しており、mGluR3 アゴニストが治療薬開発の標的分子となることを強く示唆するものである。しかしながら、今回の実験結果は、神経化学的な側面のみのアプローチであることから、今後、マウスを用いた依存性薬物による行動学的変化を mGluR3 アゴニストが改善できるかどうかを検討していく必要がある。

さらに、MAP の刺激または投与による Shati/Nat8l 遺伝子発現調節メカニズムには、細胞内シグナル伝達が関与していることが示唆された。これらの機序が解明されれば、特異的に Shati/Nat8l の遺伝子発現を上昇させることで NAA および NAAG 含量の増加による mGluR3 の活性化が期待され MAP の薬理学的作用を抑制する標的分子を探索できる可能性が高い。一方、興味深いことに、Shati/Nat8l ゲノム DNA プロモーター領域におけるメチル化解析では、側坐核および血中から抽出した DNA のメチル化率が MAP 連続投与によって低下した。このことは、脳内と血中の Shati/Nat8l DNA メチル化の変化が連動している可能性を示しており、臨床への展開を考えた時に、患者から採血したサンプルをもとに Shati/Nat8l DNA メチル化率を解析し、血中 NAA および NAAG を測定することで薬物依存状態を把握する診断方法となるかもしれない。今後、更なる詳細な検討が必要ではあるが、薬物依存の程度を客観的に判断する指標としては、今までに例をみないものである。また、我々が見出している新たな薬物依存関連分子 Tmem168 は、アミノ酸残基 697 個から成る複数回の膜貫通領域を有するタンパク質であるが、その生理的機能はほとん

ど報告されていない。我々は、これまでに、Tmem168 mRNA がマウス脳内に多く存在し、MAP およびニコチンの連続投与によって、その発現が増加することを見出している。さらに、今回の解析において、Tmem マウスでは側坐核での MAP 投与によるドパミン遊離量の増加を抑制する結果を得た。また、このドパミン遊離量の増加抑制効果に繋がる結果として、Tmem マウスは、MAP 投与による運動過多の抑制および MAP によって条件付けされた場所嗜好性の減少という行動学的変化を示した。つまり、Tmem168 は薬物依存形成メカニズムにおいて抑制的な役割を担っていることが示めされた。今後、Tmem168 の生理的機能を明らかにしていくことによって、薬物依存を治療するための新たな標的機構を提唱することを目指すつもりである。

E. 結論

本研究では、覚せい剤の薬物依存形成メカニズムにおいて、側坐核における NAA 合成酵素である Shati/Nat8l を起点とした mGluR3 介在神経伝達システムが重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、我々が見出した機能未知の Tmem168 が、薬物依存抑制分子として薬物依存形成メカニズムに関与していることが明らかとなった。今後、ゲートウェイ・ドラッグにより誘発される依存形成に対して、mGluR3 アゴニストの効果を検討するとともに、Tmem168 の生理的機能を解明し、治療薬開発の新たな標的分子としての可能性を検証していく。これにより、薬物依存の治療薬創生につながることを期待される。

[参考文献]

- 1) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., et al.: Methamphetamine-induced neuronal protein

- NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res.*, 1335: 1-13, 2010.
- 2) Becker, I., Lodder, J., Gieselmann, V., et al.: Molecular characterization of N-acetylglutamate synthetase. *J Biol Chem.*, 285: 29156-29164, 2010.
- 3) Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., et al.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry*, 349: 451-463, 2008.
- 4) Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J.: Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29: 565-598, 2006.
- 5) Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietzych, M., et al.: Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 66: 908-920, 2010.
- 6) Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., et al.: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in press 2014.
- 7) Miyamoto, Y., Yamada, K., Nagai, T., et al.: Behavioural adaptations to addictive drugs in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 151-158, 2004.
- 8) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., et al.: A phase 1 study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.*, 18: 1731-1735, 2010.
- 9) Neale, J.H., Olszewsk, R.T., Zuo, D., et al.: Advances in understanding the peptide neurotransmitter NAAG and appearance of a new member of the NAAG neuropeptide family. *J. Neurochem.*, 118: 490-498, 2011.
- 10) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., et al.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J. Neurosci.*, 27: 7604-7615, 2007.
- 11) Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., et al.: Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog. Neurobiol.*, 75: 406-433, 2005.
- F. 研究発表
1. 論文発表
- 1) Yan, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A., Muramatsu, S., Ozawa, K., Yamada, K., Nabeshima, T.: Intrastratial gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16: 1559-1567, 2013.
- 2) Tanabe, K., Ohkubo, J., Ikezaki, T., Kitayama, S., Tsuneda, Y., Nitta, A., Imamura, L., To, H., Shimada, M., Murakami, N., Kitazawa, H.: Effect of sodium bisulphate on the stability of octreotide acetate: compatibility study with dexamethasone injection. *Palliative Care Research*, 8: 177-183, 2013.
- 3) Isono, T., Yamashita, N., Obara, M., Araki, T., Nakamura, F., Kamiya, Y., Alkam, T., Nitta, A., Nabeshima, T., Mikoshiba, K., Ohshima, T., Goshima, Y.: Amyloid-β25-35 induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci. Res.*, 77: 180-185, 2013.
- 4) Toriumi, K., Ikami, M., Kondo, M., Mouri, A., Koseki, T., Ibi, D., Furukawa-Hibi, Y., Nagai, T.,

- Mamiya, T., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T.: SHATI/NAT8L regulates neurite outgrowth via microtubule stabilization. *J. Neurosci. Res.*, 91: 1525-1532, 2013.
- 5) Pessentheiner, A.R., Pelzmann, H.J., Walenta, E., Schweiger, M., Groschner, L.N., Graier, W.F., Kolb, D., Uno, K., Miyazaki, T., Nitta, A., Rieder, D., Prokesch, A., Bogner-Strauss, J.G.: NAT8L (*N*-Acetyltransferase 8-Like) accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 288: 36040-36051, 2013.
- 6) Seo, S., Takayama, K., Uno, K., Ohi, K., Hashimoto, R., Nishizawa, D., Ikeda, K., Ozaki, N., Nabeshima, T., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene. *PLoS One*. 8: e76960, 2013.
- 7) Toriumi, K., Kondo, M., Nagai, T., Hashimoto, R., Ohi, K., Song, Z., Tanaka, J., Mouri, A., Koseki, T., Yamamori, H., Furukawa-Hibi, Y., Mamiya, T., Fukushima, T., Takeda, M., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T.: Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17:1-11, 2013.
- 8) Tanabe, K., Ikezaki, T., Takano, A., Suzuki, T., Kitazawa, H., Terasaki, T., Tanaka, M., Takeuchi, M., Yamatani, K., Ohkubo, J., Handa, A., Nitta, A., Kashii, T., Murakami, N.: A case report of organophosphorus pesticide poisoning resulted in delayed severe lower intestinal hemorrhage. *Science Postprint*, 1: e00011, 2013.
- 9) Nakayama, C., Oshima, T., Kato, A., Nishii, M., Kamimura, T., Nitta, A., Yamaguchi, M.: Questionnaire Survey on Patient Satisfaction at Community Pharmacies. *Science Postprint*, 1: e00012, 2014.
- 10) Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Sumi, K., Fu, K., Sato, K., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K., Nitta, A.: Overexpression of Shati/Nat8l, an *N*-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in press 2014.
- 11) Tanabe, K., Takahata, H., Takata, K., Ikezaki, T., Ohkubo, J., Takeuchi, M., Handa, A., Hirutani, K., Nitta, A., Kashii, T., Murakami, N., Kitazawa, H.: Causative agents and risk factors for nasal irritation symptoms observed during chemotherapy in breast cancer patients. *Science Postprint*, 1: e00017, 2014.
- 12) 宮本嘉明, 齋鹿絵里子, 堀悦郎, 家垣典幸, 石川雄大, 鷺見和之, 鍋島俊隆, 村松慎一, 西条寿夫, 宇野恭介, 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. *日本神経精神薬理学雑誌*, 33: 167-173, 2013.
- 13) 新田淳美.: 悲しいとなぜ涙がでるのでしょうか?. *月刊臨床神経科学*, 13: 4, 2013.

2. 学会発表

- 1) Oshima, T., Nakayama, C., Kato, A., Atsumi, R., Nitta, A.: A study of pharmacist-patient communication: Development of a communication learning program for pharmacists. *World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2013; 73rd International Congress of FIP*. 2013, 8, 31-9, 5, Dublin, Ireland.
- 2) Nitta, A., Ishikawa, Y., Sumi, K., Iegaki, N., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K., Miyamoto, Y.: The role of

- shati/nat8l in the addicted mice brain. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2013; 73rd International Congress of FIP. 2013, 8, 31-9, 5, Dublin, Ireland.
- 3) Nitta, A.: The mechanisms of Shati/Nat8L-overexpression in the nucleus accumbens on the responses to methamphetamine. XXVIII CINP congress, 2013, 10, 1-3, Kuala Lumpur, Malaysia.
 - 4) Sumi, K., Uno, K., Iwamoto, R., Nabeshima, T., Furukawa-Hibi, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A.: The relationship between Shati/Nat8l and NAA in various age stage in mice brain. Neuroscience 2013, 2013, 11, 9-13, San Diego, USA.
 - 5) Nitta, A., Sumi, K., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K., Miyamoto, Y.: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in of the nuclus accumbens and dorsal striatum in mice. Neuroscience 2013, 2013, 11, 9-13, San Diego, USA.
 - 6) 鷺見和之, 宇野恭介, 岩本諒, 鍋島俊隆, 日比陽子, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス発達過程における神経特異的分子 shati/nat8l の発現変化. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 7) 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. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 8) 林慧洋, 宮本嘉明, 宇野恭介, 呉春福, 楊静玉, 新田淳美.: Ocotillol 型サポニン pseudoginsenoside-F11 はマウスにおけるメタフェタミン誘発中毒を抑制する. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 9) 宮本嘉明, 家垣典幸, 鷺見和之, 石川雄大, 古田幸也, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス背側線条体における shati/nat8l 過剰発現は、セロトニン作動性神経系の機能障害を介して情動行動に影響を与える. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 10) 新田淳美, 石川雄大, 家垣典幸, 鷺見和之, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 宮本嘉明.: マウス側坐核または線条体へ shati/nat8l を過剰発現させた場合のメタフェタミン応答性の差異とそのメカニズム. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 11) 高岡和也, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス線条体での Shati/Nat8l 過剰発現は妊娠期ストレスへの感受性および産褥期におけるうつ様行動を誘導する. 第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム・医療薬学フォーラム 2013, 2013, 7, 20-21, 金沢.
 - 12) 松村祥平, 高山華南子, 徐承姫, 宇野恭介, 酒井規雄, 池田和隆, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: PCLO の一塩基多型が双極性障害に関連する精神・神経機能に対する分子生物学的検討. 医療薬学フォーラム 2013, 2013, 7, 20-21, 金沢.
 - 13) 鷺見和之, 宇野恭介, 宮本嘉明, 岩本諒, 鍋島俊隆, 古川-日比陽子, 新田淳美.: マウス前頭前皮質における Shati/Nat8l の神経機能解析. 日本薬理学会北部会, 2013, 9, 13, 旭川.
 - 14) 高岡和也, 宇野恭介, 鷺見和之, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核 Shati/Nat8l 過剰発現はニコチンによる側坐核からのドパミン遊離量の変化に影響する. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術集会, 2013, 10, 3-5, 岡山.
 - 15) 新田淳美, 林慧洋, 傅柯荃, 宇野恭介, 呉春

福, 楊 静 玉, 宮 本 嘉 明 .: Pseudoginsenoside-F11 は、マウスにおけるメタンフェタミンの行動変化を抑制する. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術集会, 2013, 10, 3-5, 岡山.

- 16) 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.: 精神疾患に関連する PCLO SNP rs13438494 の分子生物学的検討. 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, 24-26, 沖縄.
- 17) 稲垣良, 宮本嘉明, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス前頭前皮質における piccolo ノックダウンは情動および認知機能に影響を与える. 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, 24-26, 沖縄.
- 18) 松村祥平, 宇野恭介, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: 培養マウス神経細胞における精神疾患関連遺伝子 Shati/Nat8l の細胞内機能についての研究. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会, 2013, 11, 17, 金沢.
- 19) 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: ニコチンによって誘発される側坐核ドパミン遊離量に対する Shati/Nat8l の影響. 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2013, 3, 18, 仙台.
- 20) 傅柯荃, 宮本嘉明, 斎鹿絵里子, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: Overexpression of TMEM168 in the nucleus accumbens of mice induces anxiety- and schizophrenia-like behavior. 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2013, 3, 18, 仙台.
- 21) 宇野恭介, 西澤大輔, 徐承姫, 高山佳奈子, 松村祥平, 酒井規雄, 大井一高, 鍋島俊隆,

橋本亮太, 尾崎紀夫 池田和隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: Piccolo の SNP である rs13438494 は遺伝子関連解析において依存性関連疾患と関連がありドパミンおよびセロトニンの取り込みを制御する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.

- 22) 佐藤慶治, 宇野恭介, 笹谷晴枝, 宮本嘉明, 門田重利, 新田淳美.: マウスにおけるうつ様行動に対するサイシンの効果. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 23) 傅柯荃, 宮本嘉明, 斎鹿絵里子, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: Anxiety and schizophrenia-like behaviors induced by TMEM168 overexpression in the nucleus accumbens of mice. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 24) 宮崎杜夫, 宇野恭介, 菊池佑, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウスにおける Shati/Nat8l 転写開始点上流のメチル化の減少はメタンフェタミンの連続投与によって誘導される. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 25) 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核での Shati/Nat8l の過剰発現はニコチン誘発性ドパミン遊離量を変化させる. 日本薬学会第 134 回年会, 2013, 3, 27-30, 熊本.

G. 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
 - 1) 新田淳美.: 平成 25 年 3 月の 6 年制卒業生の

就職状況と実務実習. 病薬会報 (富山県病院
薬剤師会), 122: 50-51, 2013.

- 2) 新田淳美.: 安全で豊かな社会で健康を守り
育てるための喫煙・飲酒・薬物乱用防止教育.
北陸三県学校保健研究協議会, 2013, 8, 1, 富
山.
- 3) 新田淳美.: 医療薬学フォーラム 2013 (第 21
回 クリニカルファーマシーシンポジウム) に
参加して. 富山県薬剤師会広報誌 富薬,
35: 290, 2013.
- 4) 新田淳美.: 6年制学生に対する薬学部での
教育内容および教員の意識の変化. 日病薬誌,
49: 2013.

薬物依存の細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する検討

分担研究者 山田清文 名古屋大学医学部附属病院 教授

研究要旨

違法ドラッグがゲートウェイドラッグとなり、メタンフェタミン(METH)等の覚せい剤の乱用を経て薬物依存につながると考えられている。これまでに薬物依存に関わる多くのシグナル分子が報告されているが、薬物報酬効果に直接的に関わる分子基盤については未だ不明な点が多い。本分担研究課題では、薬物報酬効果のプロセスで中心的役割を果たしているドーパミン受容体シグナルに着目し、その細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する基礎研究を推進する。

本年度は MEK1 シグナルを中心に解析を行った結果、METH による ERK1/2 の活性化（リン酸化レベルの増加）がドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘細胞に特異的な反応であることを明らかにした。さらに、細胞特異的な MEK1 活性の制御法について検討した結果、活性を有する MEK1 が側坐核特異的に発現して ERK1/2 をリン酸化することを確認した。次に、Flex システムを用いて側坐核のドーパミン D1 受容体発現細胞にのみ MEK1 の変異体を発現させたマウスにおける METH の報酬効果を条件付け場所嗜好性（CPP）試験により調べた。その結果、METH の報酬効果は恒常的活性化型 MEK1 (caMEK1) により増強され、ドミナントネガティブ型 MEK1 (dnMEK1) により抑制された。本研究結果は、細胞特異的な MEK1 活性の制御により METH の報酬効果を修飾できる可能性を示唆している。

A. 研究目的

違法ドラッグがゲートウェイドラッグとなり、メタンフェタミン (METH) 等の覚せい剤の乱用を経て薬物依存につながると考えられている。これまでに薬物依存に関わる多くのシグナル分子が報告されているが、薬物報酬効果に直接的に関わる分子基盤については未だ不明な点が多い。薬物報酬効果の細胞内シグナル分子の同定は、薬物依存症に対する治療薬の開発に貴重な情報を提供すると思われる。本分担研究課題では、薬物報酬効果のプロセスで中心的役割を果たしているドーパミン受容体シグナルに着目し、その細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する基礎研究を推進する。

B. 研究方法

実験動物

実験には 7 週齢の雄性 C57BL/6N マウスを使用した。さらに、ドーパミン D1 受容体プロモーターの下流でそれぞれ YFP と Cre recombinase を発現する mDrd1-YFP マウス（理研 BRC）、mDrd1-Cre マウス（Mutant Mouse Regional Resource Centers supported by NIH, MMRRRC, 米国）を使用した。本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

イムノブロット解析

METH (2-10 mg/kg)、SKF81297 (1-5 mg/kg)、quinpirole (0.2-1.0 mg/kg) または生理食塩水を腹腔

内投与し、投与後 15、30 または 60 分後に側坐核および線条体を摘出した。各組織を 1% SDS 溶液中でホモジナイズし、熱処理 (99°C, 10 分) および遠心分離した上清をサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離後、イムノブロット法により ERK1/2 (Thr202/Tyr204)、CaMKII (T286) および MARCKS (S152/156) のリン酸化レベルを解析した。

組織化学的解析

mDrd1-YFP マウスに SKF81297 (5 mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、投与後 15 分後に 4% paraformaldehyde で還流固定を行った。脳を摘出後、凍結切片を作成して抗 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体によりリン酸化 ERK1/2 の免疫染色を行った。

Adeno-associated virus (AAV) を用いた遺伝子導入
野生型 (wtMEK1)、ドミナントネガティブ型 (dnMEK1) あるいは恒常的活性化型 MEK1 (caMEK1) を組み込んだ AAV ベクターを作製し、HEK293FT 細胞を用いてウイルス液を調製した。調製したウイルス液をマウス側坐核へ注入し、抗 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体によりリン酸化 ERK1/2 の免疫染色およびイムノブロット解析を行った。

条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験

Flex system を応用し、AAV ベクターを用いてマウス側坐核のドーパミン D1 受容体発現細胞に wtMEK1, dnMEK1 および caMEK1 を発現させ、METH の報酬効果を CPP 試験で解析した。具体的には、mDrd1-Cre マウスの両側側坐核に上記 3 種類の MEK1 あるいは EGFP を組み込んだ AAV ベクターを注入し、3 週間後に CPP 試験を行った。

CPP 試験にはギロチンピアで仕切られた白黒 2 区画からなる CPP 装置を用いた。CPP 試験は 5 日間行い、day1 はプレテスト、day2-4 は条件付け、day5 にポストテストを行った。プレテストおよびポストテストでは、ギロチンピアを開放して装置内を自由に探索させ、白黒 2 区画にそれぞれ滞在

した時間を測定した。Day2-4 の 3 日間は、午前と午後の 1 日 2 回条件付けを行った。METH 群では、午前は saline を投与し、白黒 2 区画のどちらか一方に一定時間閉じ込めた (溶媒区画)。午後は METH を投与し、溶媒区画とは反対側の区画に閉じ込めた (薬物区画)。コントロールマウスの場合、午前、午後ともに saline を投与する以外、METH 群と同じ操作を行った。報酬効果の指標として、ポストテスト時における薬物区画での滞在時間を測定した。

統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) または反復測定分散分析法 (repeated measures ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。2 群間の比較は Student t-test を用いて行った。危険率 5% 以下の場合、有意差ありと判定した。

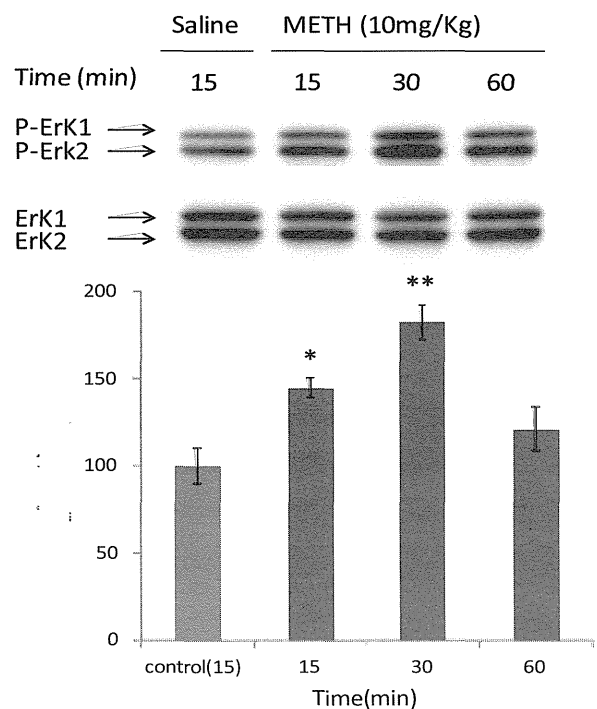


Fig. 1. Effect of methamphetamine on phosphorylated Erk1/2 levels in the nucleus accumbens of mice.

Each value represents mean ± S.E. (n=5).

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs control.

C. 研究結果

METH (10 mg/kg) を投与したマウスの側坐核では ERK1/2 のリン酸化レベルがコントロールマウスに比べて有意に亢進し、投与 30 分後で最大となり、その後コントロールレベルまで減少した (Fig. 1)。METH 投与 30 分後のリン酸化 ERK1/2 レベルの増加は用量依存的であり (2-10 mg/kg)、同様の変化が線条体でも観察された。一方、pCaMKII および pMARCKS については METH を投与しても有意な変化は観察されなかった。

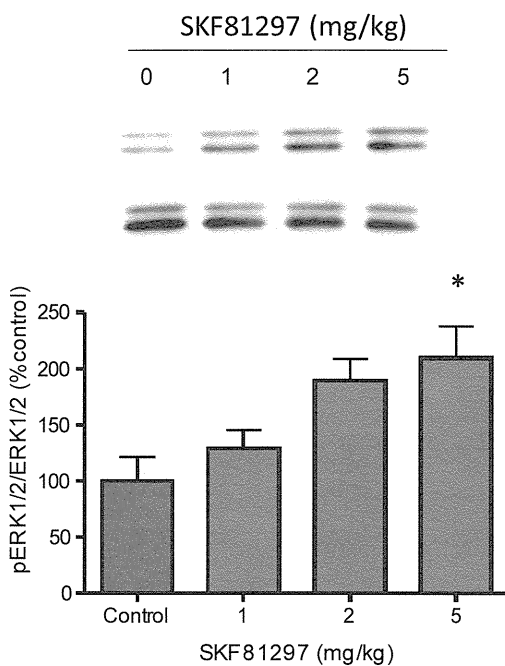


Fig. 2. Effect of dopamine D1 receptor agonist SKF81297 on phosphorylated ERK1/2 levels in the nucleus accumbens of mice.

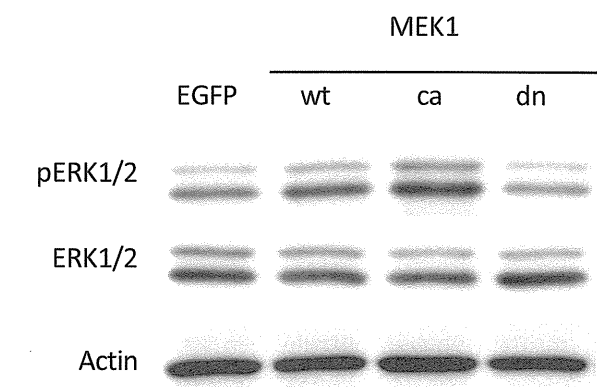
Each value represents mean \pm S.E. (n=5).

* $p < 0.05$ vs control.

ドーパミン D1 受容体作動薬 SKF81297 (1-5 mg/kg) の投与 30 分後、マウスの側坐核ではリン酸化 ERK1/2 のレベルが用量依存的に増加した (Fig. 2)。また、SKF81297 (5mg/kg) を投与した mDrd1-YFP マウスの側坐核では、リン酸化 ERK1/2 の免疫活

性が YFP 発現細胞で認められた。一方、ドーパミン D2 受容体作動薬 quinpirole (0.2-1.0 mg/kg) を投与してもリン酸化 ERK1/2 の有意な変化は認められなかった。

次に、MEK1 の変異体を組み込んだ AAV ベクターを作製し、個体レベルで発現・機能することをリン酸化 ERK1/2 の免疫組織化学およびイムノブロットで調べた。AAV ベクター注入 3 週間後の免疫染色およびイムノブロット解析の結果、caMEK1 の過剰発現により pERK1/2 レベルが増加、逆に dnMEK1 の発現により pERK1/2 レベルの減少が観



察された (Fig.3)。

Fig. 3. Alterations of phosphorylated ERK1/2 levels by the AAV-mediated overexpression of wt-, ca- and dnMEK1 in the nucleus accumbens.

最後に、METH の報酬効果における ERK1/2 活性化の役割を明らかにするために、Flex システムを用いて側坐核のドーパミン D1 受容体発現細胞特異的に MEK1 を過剰発現するマウスを作製し、METH の報酬効果を CPP 試験により調べた。

Fig.4 に示したように、CPP 試験のポストテストにおいて、METH 処置群は、コントロール群に比較して条件付けされた薬物区画への滞在時間が延長し、METH の報酬効果が認められた。METH の効果は、側坐核への caMEK1 の発現により増強

され、dnMEK1 の発現により抑制されたが、統計学的な有意差は認められなかった。

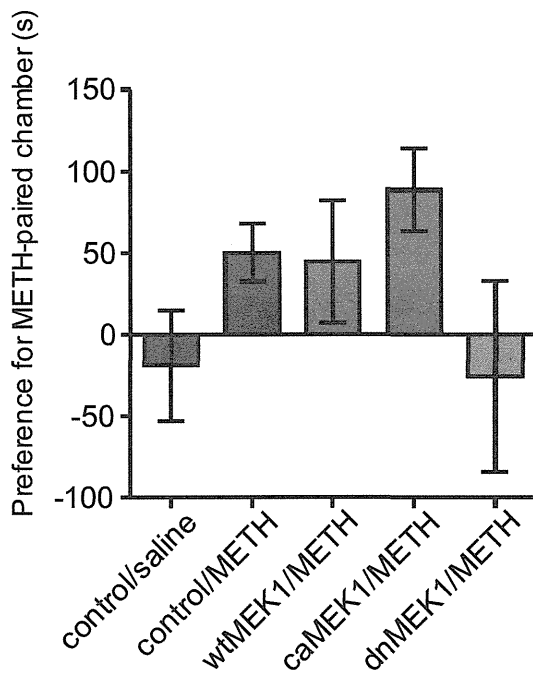


Fig. 4 Methamphetamine-induced conditioned place preference in AAV-wtMEK1, caMEK1 and dnMEK1-transfected mDrd1-Cre mice.

Each value represents mean \pm S.E. (n=7-12).

考察

これまでの研究により、METH が側坐核において ERK1/2 を活性化し、これが METH の報酬効果や記憶障害作用に関連することが示唆されている^{2,3)}。本研究において我々は、METH による ERK1/2 の活性化（リン酸化レベルの増加）がドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘細胞に特異的な反応であることを明らかにした。一方、従来の薬理学的実験により MEK 阻害剤が METH の報酬効果を減弱することが示唆されている²⁾。しかし、MEK1 などの MAP キナーゼシグナルは細胞増殖を含む多様な生理機能に重要な役割を果たすために、MEK 阻害剤の依存症治療薬としての応用は進ん

でいないのが現状である。

そこで本研究では、細胞特異的な MEK1 活性の制御法について検討した。まず、MEK1 の変異体を発現させる AAV ベクターを作製し、個体レベルの解析を行った結果、活性を有する MEK1 が側坐核特異的に発現して ERK1/2 をリン酸化することが確認できた。次に、Flex システムを用いて側坐核のドーパミン D1 受容体発現細胞にのみ MEK1 の変異体を発現させたマウスにおける METH の報酬効果を調べた。その結果、METH の報酬効果は caMEK1 により増強され、dnMEK1 により抑制される傾向が認められた。今後、例数を増やしてこの結果を確認する必要があるが、本研究結果は、細胞特異的な MEK1 活性の制御により METH の報酬効果を修飾できる可能性を示唆している。

次年度以降、より特異性の高い創薬標的を同定するために、MEK1 の下流でリン酸化を受け、且つ METH の報酬効果に関与する分子の探索を行う予定である。また、MEK1 変異体の効果に関連して、摂食行動などの自然報酬に及ぼす影響を調べる必要がある。さらに、違法ドラッグが METH と同様に ERK1/2 を活性化するかどうか調べることにより、MAP キナーゼシグナルが薬物乱用から薬物依存へのゲートウェイシグナルとして機能するかどうかかわかると思われる。

参考文献

- 1) Yamada K: Endogenous modulators for drug dependence. *Biol. Pharm. Bull.* 31:1635-1638, 2008.
- 2) Mizoguchi H, Yamada K, Mizuno M, Mizuno T, Noda Y, Nitta A and Nabeshima T: Regulation of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. *Mol. Pharmacol.* 65:1293-1301, 2004.
- 3) Kamei H, Nagai T, Nakano H, Togan Y, Takayanagi M, Takahashi K, Kobayashi K, Yoshida S,

Maeda K, Takuma K, Nabeshima T and Yamada K: Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK 1/2 activation in the prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry* 59:75-84, 2006.

D. 健康危険情報
なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Shinnosuke Yamada, Taku Nagai, Tsuyoshi Nakai, Daisuke Ibi, Akira Nakajima, Kiyofumi Yamada: Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. *Brain, Behavior, and Immunity* 38:272-282, 2014

2. 学会発表

1) Kiyofumi Yamada: Chronic methamphetamine treatment induces myopic decision-making in rats. CINP2013 Special congress on addiction, Malaysia 2013.10.1-4.

2) 永井拓、鍋島俊隆、山田清文: 依存性薬物による脳機能障害の分子機構. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 岡山, 2013.10.3-5.

3) 山田清文: 精神疾患の病因仮説モデルを用いた創薬標的の探索研究. 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014.3.27-30.

F. 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

アルコール依存におけるストレス要因とオピオイド神経伝達の役割

分担研究者：曾良一郎¹

研究協力者：森屋由紀², 笠原好之², 富田博秋²

(¹神戸大学大学院 精神医学分野, ²東北大学災害科学国際研究所 災害精神医学分野)

[研究要旨]

様々なストレスによりアルコール依存への罹患が増大することが知られる。阪神淡路大震災、東日本大震災の被災地の疫学調査でもストレスによる飲酒量の増加や飲酒習慣の変化が示されている。現在までにオピオイド受容体（MOR）がストレス応答や依存形成・鎮痛において重要な役割を果たすことを明らかにしてきたが、ストレス下でのアルコール依存の病態における機能的役割は不明であった。本研究ではストレス下におけるアルコール依存形成、病態機序にオピオイド神経伝達がどのように関与しているかについて、MOR欠損(KO)マウスモデルを用いて解析することを目的とした。この目的を達成するために研究1として慢性身体ストレス負荷時におけるアルコール摂取量の変化を、研究2として心理社会ストレス負荷時のアルコール摂取量の変化について検討を行った。慢性身体ストレス負荷試験においては、雌性野生型マウスにおいてアルコール摂取が有意に低値であった。またストレス負荷の有無に関わらず雌性MOR KOマウスはアルコール摂取量が雌性野生型マウスに比較して少ない傾向が見られた。一方で心理社会ストレス負荷試験においては、雌性MOR KOマウスにおいてはストレス負荷がないとアルコール摂取量が有意に高値であるのに対し、雄性MOR KOマウスではストレス負荷によりアルコール摂取量が高値であった。以上の結果は、オピオイド神経伝達がストレスによるアルコール摂取量の変化に寄与することを示唆するとともに、その機能が性別によって異なることを示していると考えられる。

A. 研究目的

ストレスは、アルコール依存を始め多くの精神疾患の症状の増悪や発症の誘因となることが知られており、ストレスが脳機能に与える影響は、基礎レベルから臨床レベルにわたり、様々な領域で研究がなされている。これまでに、様々なストレスによりアルコール依存への罹患が増大し、阪神淡路大震災、東日本大震災の被災地の疫学調査でもストレスによる飲酒量の増加や飲酒習慣の変化が示されている。しかし、ストレスに起因するアルコール依存の発症や増悪についての詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

オピオイドの標的受容体は μ 、 δ 、 κ の3種類のサブタイプが存在することが知られている。オピオイド神経伝達の機能的役割は鎮痛、報酬との関連について多数の報告がなされてきた。また、アルコール依存症の治療薬としてオピオイド受容体拮抗薬が用いられている。 μ オピオイド受容体（MOR）は脊髄後角のほかに、大脳皮質、線条体、海馬、青斑核、視床下部、中脳など、ストレス応答や依存形成に深く関わる脳領域に発現していることが分かっている(Mansour et al 1994a; Mansour et al 1994b)。我々はこれまでにMORの欠損が心理社会的ストレスへの反応を変化させる

ことを報告した(Komatsu et al 2011)。以上より MOR はストレス応答に重要な役割を果たすとともに、アルコール依存において機能することは示唆されるが、ストレスによるアルコール依存形成、病態機序において MOR が果たす役割は十分に明らかにされていない。従って本研究ではストレス下におけるアルコール依存形成、病態機序にオピオイド神経伝達がどのように関与しているのかについて、MOR KO マウスモデルを用いて解析することを目的とした。本研究では、MOR のストレス下でのアルコール依存形成、病態機序への関与を明らかにするために、研究1として慢性身体ストレス負荷時におけるアルコール摂取量の変化、研究2として心理社会的ストレス負荷時のアルコール摂取量の変化について MOR KO マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物および測定方法

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。

雌性マウスはアルコール依存に脆弱であることを報告(Hall et al 2001)していることから、実験開始時 9~13 週齢、体重 15~23g の雌性 C57BL/6 系統の野生型マウス及び雌性 MOR KO マウス(Sora et al 1997)を用いて実験を行った。

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。本実験で用いた全てのマウスは東北大学医学部附属動物実験施設内の飼育室[一定の温度(21℃)で、12 時間の明暗サイクル(AM8:00 照明 PM8:00 消灯)で制御され、常時固形飼料を水とともに十分量供給された環境で飼育した。

2) 身体ストレス

拘束ストレスは 50ml のプラスチックチューブの先端および側面に径 1cm 程度の換気用の穴を数か所空け、マウスをチューブの先端にマウスの頭部が設置されるように挿入してキャップを閉め、チューブの入り口を下向きに立てた。慢性ストレスによる影響を評価するために同じ時間帯に 1 時間の拘束ストレス負荷を 14 日間連続で実施した。

