

ゲートウェイドラッグによる依存性形成機序解明

研究代表者：森 友久

研究協力者：鈴木 勉

（星薬科大学薬品毒性学教室）

[研究要旨]

ヒトにおいて MDMA や methylphenidate などの種々の精神刺激薬は独特な自覚効果を示すことが知られており、動物においても MDMA と methylphenidate は amphetamine や cocaine などの精神刺激薬の弁別刺激効果に対して般化することも知られている。これらの結果は、MDMA と methylphenidate が動物において類似の弁別刺激効果を示す可能性があることを示唆している。しかしながら、MDMA と methylphenidate の類似性についての検討は未だなされていない。そこで本研究では、MDMA および methylphenidate と生理食塩液の弁別を獲得したラットを用いて、その類似性について検討を行った。約 80% 体重（約 220g）に摂餌制限した Fischer 344 系雄性ラットを用い、餌を強化子としてレバー押し訓練を行った。レバー押し確立後、MDMA (2.5 mg/kg, s.c.) もしくは methylphenidate (5.0 mg/kg, i.p.) と生理食塩液による弁別訓練を行った。弁別獲得後、精神刺激薬を用いて般化試験および拮抗試験を行った。

般化試験において、MDMA の弁別刺激効果に対して paroxetine は般化を示さなかったが、fluoxetine および fluvoxamine は部分般化を示した。次に、5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH DPAT および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を用いて、MDMA の弁別刺激効果への影響を検討したところ、両薬物とも完全に般化した。また、拮抗試験において、fluvoxamine の MDMA の弁別刺激効果に対する部分般化は、シグマ 1- 受容体拮抗薬である NE-100 の処置により完全に抑制された。また、MDMA の弁別刺激効果は、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬である WAY では、抑制されずに 5-HT₂ 受容体拮抗薬である ritanserin の処置により有意に抑制された。Methamphetamine および bupropion は methylphenidate の弁別刺激効果に対して般化を示した。さらに、dopamine 受容体作動薬である apomorphine は methylphenidate の弁別刺激効果に対して部分般化を示し、noradrenaline の放出作用を示す ephedrine は完全に般化した。D₁ 受容体拮抗薬 (+)-SCH23390 および D₂ 受容体拮抗薬 haloperidol を用いて拮抗試験を行ったところ、methylphenidate の弁別刺激効果を部分的に抑制し、さらに (+)-SCH23390、haloperidol および prazocine を用いて拮抗試験を行った結果、methylphenidate の弁別刺激効果を有意に抑制した。交差般化試験において、MDMA および methylphenidate は、全く交差般化を示さなかった。非常に興味深いことに methamphetamine は、MDMA の弁別刺激効果に般化を示さなかった。さらに、NE-100 は、MDMA および methylphenidate の弁別刺激効果に影響をおよぼさなかった。

本研究結果より、MDMA の弁別刺激効果発現には、serotonin 5-HT_{1A}/5-HT₂ 受容体活性化、特に、5-HT₂ 受容体を介して発現していることが明らかとなった。また、一部のセロトニン再取り込み阻害薬は、一部、MDMA 様の弁別刺激効果を示すものの、この効果の発現には、セロトニンを介するのではなく、シグマ 1-受容体を介していることが示唆された。一方、methylphenidate の弁別刺激効果には、dopamine および noradrenaline 両神経系の活性化、特に、noradrenaline 神経系の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Methylphenidate ならびに MDMA は、精神刺激薬として、乱用が問題となっているが、それぞれの弁別刺激効果の発現機序が異なると共に、得られる弁別刺激効果は明らかに異なることが明らかとなった。

A. 研究目的

ヒトにおいて中枢作用薬は、自覚効果を示し、依存形成薬物は、特に、多幸感などと関連する独特の自覚を示すことが知られている。この自覚効果は動物において、弁別刺激効果と定義され、依存形成薬物の弁別刺激効果を検討することは、その依存性薬物の機序解明に非常に役立つことが知られている。特に、ゲートウェイドラッグとして知られている MDMA や methylphenidate などの種々の精神刺激薬は独特な自覚効果を示すことが知られており、動物においても MDMA と methylphenidate は amphetamine や cocaine などの精神刺激薬の弁別刺激効果に対して般化することも知られている。これらの結果は、MDMA と methylphenidate が動物において類似の弁別刺激効果を示す可能性があることを示唆している。しかしながら、MDMA と methylphenidate の類似性、さらには、その発現の機序についての検討は未だなされていない。そこで本研究では、MDMA および methylphenidate と生理食塩液の弁別を獲得したラットを用いて、その類似性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物及び飼育条件

Fischer344 系雄性ラット（オリエンタル酵母）を約 80% 体重(210-230g) に摂餌制限を行ったものをそれぞれ 7 匹使用した。ラットは室温 23 ± 1 の恒温室にて飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。なお、飲水は自由とした。

2. 実験装置

実験にはオペラント・ボックス (model: GT8810, 小原医科産業, 東京) を使用した。オペラント・ボックス (20 × 25 × 20 cm) の床はグリットとし、ボックス内には 2 つのレバーを、また各レバー上には弁別刺激として 2 つの条件提示用ランプおよびレバー間には強化子の給餌皿を 1

つ設置しているものを用いた。また強化子として精密錠剤型飼料 (20mg: 小原医科産業, 東京) を用いた。オペラント・ボックスは換気扇と蛍光灯を備え付けた防音の施された直方体のボックス内に設置し、実験中、ボックス内部に蛍光灯で点灯した。

3. 弁別訓練

Methylphenidate もしくは MDMA と生理食塩液との弁別訓練を開始する前に、全てのラットにレバー押し訓練を行った。レバー押し訓練には、左右どちらかのレバーが提示され、LLRLLRR (L=左, R=右) の順序でまず fixed ratio (FR) 1 強化スケジュールにおいてレバー押し訓練を行い、1 セッション 15 分としレバーを押すと強化子 (20mg 錠剤型飼料) が与えられるスケジュールを用いた。レバー上の条件提示ランプは給餌時に点灯する様にした。1 セッションのレバー押し数が 60 に達したときに FR1 におけるレバー押しが確立されたものとし、徐々に FR2、FR4、FR6、FR8 および FR10 と増加させた。FR10 での反応率 (response rate) が安定した後、methylphenidate (5mg/kg) もしくは MDMA (2.5mg/kg) と生理食塩液との弁別訓練を FR10 スケジュール下で行った。尚、1 セッションは 15 分とした。弁別訓練開始 30 分前に薬物あるいは生理食塩液 (1mg/kg) を腹腔内投与した。各セッションの投与順序は DDSS...とし、薬物もしくは生理食塩液投与時のレバーの選択は動物の嗜好性による片寄り (バラツキ) を避けるために、カウンターバランス法を使用した。弁別獲得の基準は最初の強化子を得るためのレバー押しの回数を First Food Pellet (FFP) として測定し、訓練において 5 日間連続して FFP 12 (正反応率 83% 以上) とし、弁別訓練は弁別獲得後も継続した。

4. 般化試験・拮抗試験・併用試験

薬物および生理食塩液の弁別獲得後、般化試験および併用試験を、弁別訓練を続けながら週に

1~2 回行った。テストセッションではラットがオペラント・ボックス内の左右いずれかのレバーを合計 10 回押したとき終了とした。**3.5. 解析**

テストセッションにおいては、総レバー押し回数に対する薬物側レバー押し数の割合 (%) で求めた。訓練薬物の弁別刺激効果に対し 80% を超えて薬物側レバー押し反応を示したものを般化とし、50-79% の範囲を部分般化とし、50% を下回る薬物側レバー押し反応を示したものを般化を示さなかったとした。また反応率 (response rate) はレバーを問わず、10 回反応するまでの時間を 1 分間あたりのレバー押し数に換算して求めた。

これらの結果は Bonfferoni 法に従い、2 元配置分散分析で群×用量の 2 因子を比較し検討を行った。

6. 薬物

実験には apomorphine hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)、haloperidol (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)、desipramine hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)、(+)-pentazocine (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)、(R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepinehydrochloride (SCH23390;Sigma)、N,N-Dipropyl-2-[4-methyl-3-(2-phenylethoxy)phenyl]-ethylamine monohydrochloride (NE-100; Taisho Pharmaceutical Co., Ltd, Omiya, Japan)、methamphetamine (Dainippon-Sumitomo Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan)、bupropion hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)、ephedrine (Nichi-Iko Co., Toyama, Japan)、3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) hydrochloride (synthesized by Prof. Higashiyama; Hoshi Univ., Tokyo, Japan)、prazosin hydrochloride (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)、paroxetine hydrochloride (Medichem, Japan)、fluoxetine hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries. Ltd., Osaka,

Japan)、fluvoxamine、(+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT; Sigma-Aldrich Co.)、(+)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI; Sigma-Aldrich Co.)を使用した。

薬物は生理食塩水中に、但し、haloperidol、desipramine、(+)-pentazocine、SCH23390 および prazosin は 1% Tween 80 中に溶解した。Apomorphine の溶解液には、L-ascorbic acid 濃度が 10% となるように酸化防止剤の L-ascorbic acid を加えた。全ての薬物は 1 ml/kg の用量で投与した。

C. 研究結果

ラットは約 27 セッションで薬物と生理食塩液間の弁別を獲得した。その後用量反応試験を行い、用量に依存した薬物側のレバー押し反応を確認した。

般化試験において、MDMA の弁別刺激効果に対して paroxetine は般化を示さなかったが、fluoxetine および fluvoxamine は部分般化を示した。次に、5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH DPAT および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を用いて、MDMA の弁別刺激効果への影響を検討したところ、両薬物とも完全に般化した。また、拮抗試験において、fluvoxamine の MDMA の弁別刺激効果に対する部分般化は、シグマ 1- 受容体拮抗薬である NE-100 の処置により完全に抑制された。また、MDMA の弁別刺激効果は、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬である WAY では、抑制されずに 5-HT₂ 受容体拮抗薬である ritanserin の処置により有意に抑制された。

Methamphetamine および bupropion は methylphenidate の弁別刺激効果に対して般化を示した。さらに、dopamine 受容体作動薬である apomorphine は methylphenidate の弁別刺激効果に対して部分般化を示し、noradrenaline の放出作用を示す ephedrine は完全に般化した。D₁ 受容体拮抗薬 (+)-SCH23390 および D₂ 受容体拮抗薬 haloperidol を用いて拮抗試験を行ったところ、methylphenidate の弁別刺激効果を部分的に抑制し、さらに (+)-SCH23390、haloperidol および prazosin を用いて拮抗試験を行った結果、methylphenidate の弁別刺激効果を有意に抑制した。

交差般化試験において、MDMA および methylphenidate は、全く交差般化を示さなかつ

た。非常に興味深いことに methamphetamine は、MDMA の弁別刺激効果に般化を示さなかった。さらに、NE-100 は、MDMA および methylphenidate の弁別刺激効果に影響をおよぼさなかった。

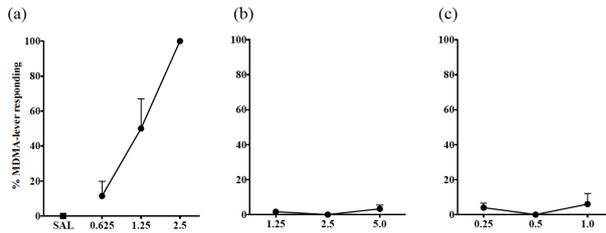


Fig. 1 Dose-response (a) and substitution tests of methylphenidate (b) and methamphetamine (c) for the discriminative stimulus effects of MDMA in rats that had been trained to discriminate between 2.5 mg/kg MDMA and saline. Each point represents the mean percentage of MDMA-appropriate responding with S.E.M. of seven animals.

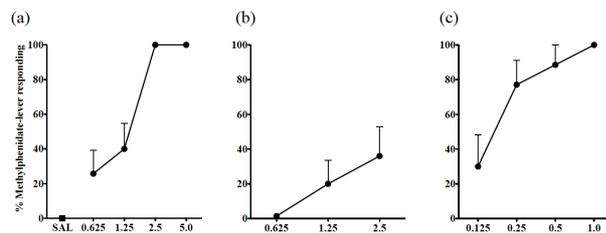


Fig. 2 Dose-response (a) and substitution tests of MDMA (b) and methamphetamine (c) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate in rats that had been trained to discriminate between 5.0 mg/kg methylphenidate and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding with S.E.M. of seven animals.

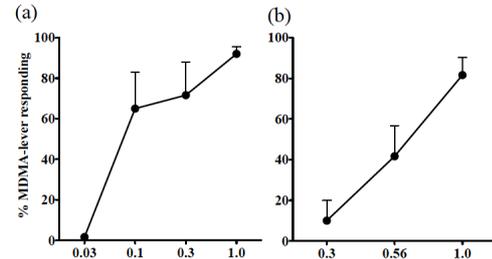


Figure 3 Substitution tests of 8-OH-DPAT (a) and DOI (b) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate in rats that had been trained to discriminate between 2.5 mg/kg MDMA and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding with S.E.M. of six animals.

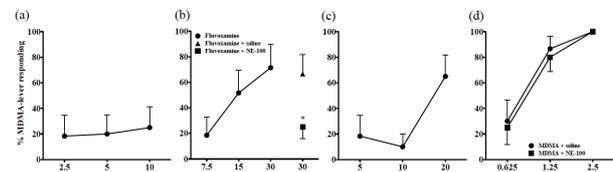


Fig. 4 Substitution tests of paroxetine (a), fluvoxamine (b) and fluoxetine (c), and an antagonism test with NE-100 3mg/kg (d) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate in rats that had been trained to discriminate between 2.5 mg/kg MDMA and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding with S.E.M. of six animals. *P<0.05 versus saline pretreatment group.

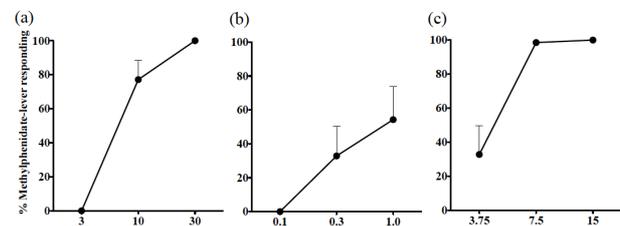


Fig. 5 Substitution tests of bupropion (a), apomorphine (b) and ephedrine (c), desipramine (10mg/kg) plus apomorphine (1mg/kg) (d) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate in rats that had been trained

to discriminate between 5.0 mg/kg methylphenidate and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding with S.E.M. of seven animals.

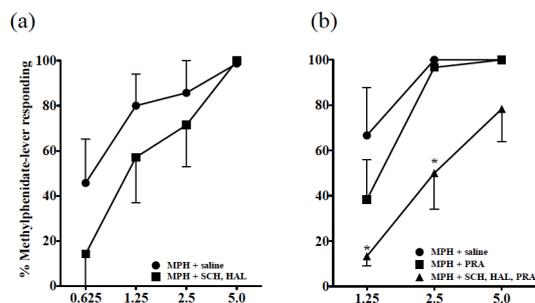


Figure 6 Antagonism tests with SCH23390 (0.03mg/kg: SCH) plus haloperidol (0.1mg/kg: HAL)(a) or prazosin 3mg/kg (PRA)(b), SCH23390 plus haloperidol and prazosin(b), or NE-100 (3mg/kg)(c) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate (MPH) in rats that had been trained to discriminate between 5.0 mg/kg methylphenidate and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding with S.E.M. of seven animals. *P<0.05 versus saline pretreatment group.

D. 考察

本研究結果より、MDMA の弁別刺激効果発現には、5-HT_{1A}/5-HT₂ 受容体活性化、特に、5-HT₂ 受容体を介して発現していることが明らかとなった。また、一部のセロトニン再取り込み阻害薬は、一部、MDMA 様の弁別刺激効果を示すものの、この効果の発現には、セロトニンを介するのではなく、シグマ1-受容体を介していることが示唆された。一方、methylphenidate の弁別刺激効果には、dopamine および noradrenaline 両神経系の活性化、特に、noradrenaline 神経系の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Methylphenidate ならびに MDMA は、精神刺激薬として、乱用が問題となっているが、それぞれの弁別刺激効果の発現機序が異なると共に、得られる弁別刺激効果は明らかに異なることが明らかとなった。

来年度以降は、MDMA の弁別刺激効果に特に着

目し、カンナビノイドとの類似性、さらに他の幻覚誘発薬との類似性に関する検討を行い、違法ドラッグの依存性の機序を解明して行く予定である。

E. 結論

以上本研究の結果より、MDMA と methylphenidate は、いずれも強い依存形成能があるにも関わらず、その感覚効果の発現機序が明らかに異なることが明らかとなった。また、これらの機序は、覚せい剤がドパミン神経系を主に介することが明らかとなっているが、MDMA は 5-HT 神経系の活性化が重要であり、methylphenidate はノルアドレナリン神経系が重要であることも明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mori T, Funada M, Tsuda Y, Maeda J, Uchida M, Suzuki T, Dopaminergic hyperactivity accompanied by hyperlocomotion in C57BL/6J-bg^J/bg^J (beige-J) mice . J. Pharmacol Sci (in press)
Synapse. (2014) 68: 39-43.
- 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.
- Ise Y, Mori T, Katayama S, Suzuki T, Wang TC. Genetic background influences nicotine-induced conditioned place preference and place aversion in mice. J Nippon Med Sch.(2014) 81:53-56.
- Mori T, Rahmadi M, Yoshizawa K, Itoh T, Shibasaki M, Suzuki T. Inhibitory effects of SA4503 on the rewarding effects of abused drugs. Addict. Biol. (2014) 16, 362-369
- Mori T, Hayashi T, Hayashi E, Su T-P, [Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface](#)

[mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival](#). PLoS One (2013) 8:e76941.

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. Mori T, Shibasaki M, Ogawa Y, Hokazono M, Wang TC, Rahmadi M, Suzuki T. [Comparison of the behavioral effects of bupropion and psychostimulants](#). Eur J Pharmacol. (2013) 718:370-375

8. Mori T, Yoshizawa K, Ueno T, Nishiwaki M, Shimizu N, Shibasaki M, Narita M, Suzuki T. [Involvement of dopamine D2 receptor signal transduction in the discriminative stimulus effects of the \$\kappa\$ -opioid receptor agonist U-50,488H in rats](#). Behav Pharmacol. (2013) 24:275-281.

9. Mori T, Komiya S, Uzawa N, Inoue K, Itoh T, Aoki S, Shibasaki M, Suzuki T. [Involvement of supraspinal and peripheral naloxonazine-insensitive opioid receptor sites in the expression of \$\mu\$ -opioid receptor agonist-induced physical dependence](#). Eur J Pharmacol. 2013 Sep 5;715(1-3):238-45.

総説

1. 森 友久、鈴木 勉：薬学的に見たオピオイドの依存と乱用．ペインクリニック 35, 49-57, 2014

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 μ - AND δ -OPIOID RECEPTOR FUNCTION IN THE REWARDING EFFECT OF (\pm)-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 μ -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 α -エンドルフィン神経系の関与

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_{1A} 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 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

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。

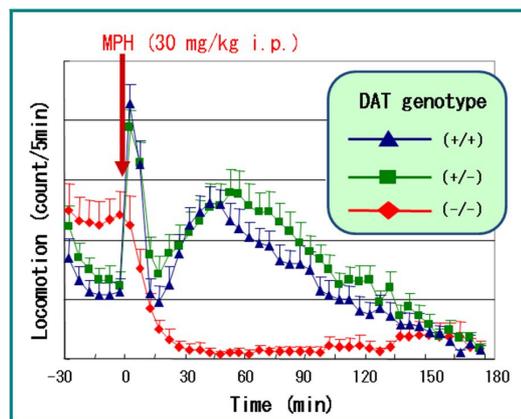


図1: 移所運動量試験におけるメチルフェニデートの効果

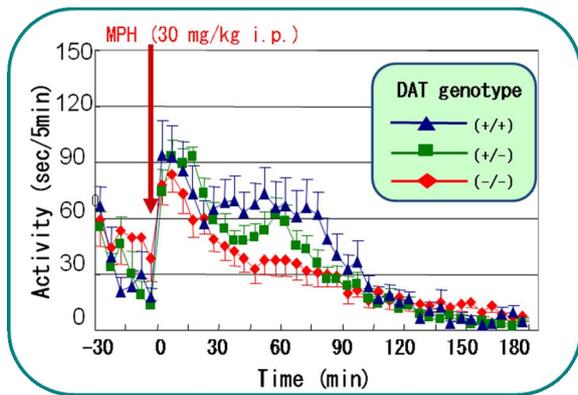


図 2: 尾懸垂試験におけるメチルフェニデートの効果

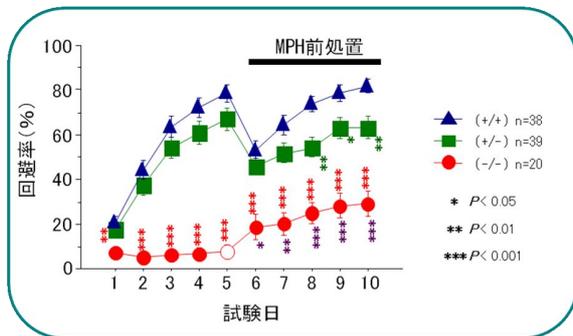


図 3: 能動回避試験におけるメチルフェニデートの効果

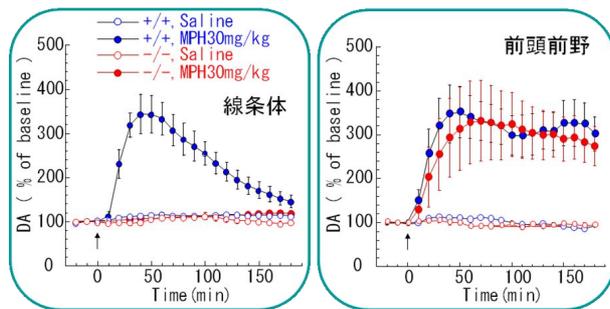


図 4: メチルフェニデート効果のマイクロダイアリシス分析

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) Ca²⁺ 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 チャンネル阻害剤が

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, 林田眞和, 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、中脳辺縁ドパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られているが^{1,2)}、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³⁾。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⁴⁾。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歩き来させ、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 μ 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 $^{\circ}$ 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 MgCl₂ 10mL、10 mM dNTP mix 1mL (以上全て Invitrogen, CA, USA) を加え、70 $^{\circ}$ 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 (RT ; Invitrogen, CA, USA) 1mL を加え、42 $^{\circ}$ C で 45 分間および 70 $^{\circ}$ 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

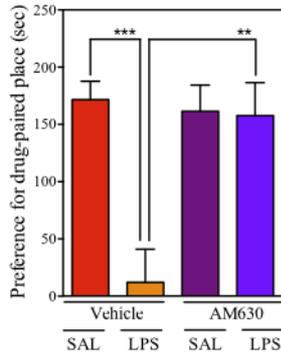


Fig. 1 Effect of LPS (1mg/kg, i.p.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects with or without AM630 (10 nmol/mouse, i.c.v.) in mice. **<0.01, ***p<0.001 vs. each groups.

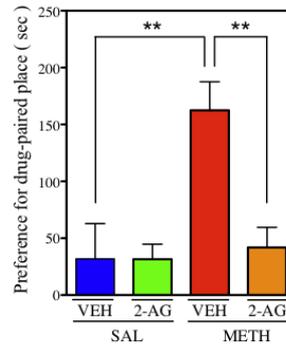


Fig. 2 Effect of 2-AG (10 nmol/mouse, i.c.v.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects in mice. **<0.01 vs. each groups.

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⁵⁾。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⁶⁾。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。

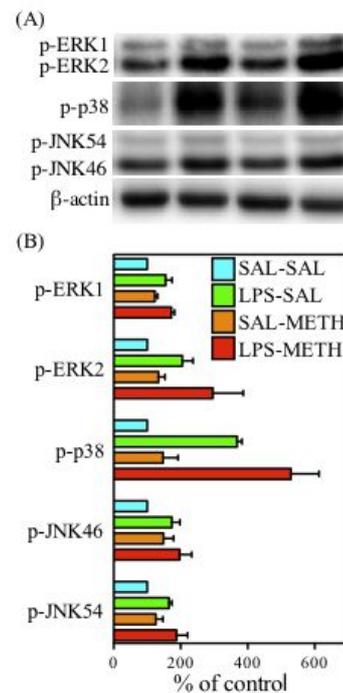


Fig. 3 Changes in protein levels of phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), phospho-p38 and phospho-JNK 46/54 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

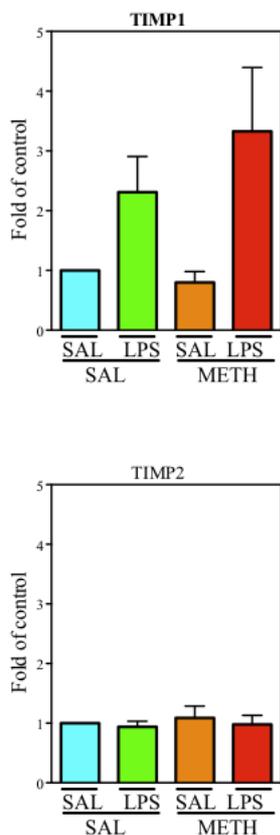


Fig. 4 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and TIMP2 in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.) and/or METH (1 mg/kg, s.c.).

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⁴⁾。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⁶⁾、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⁷⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。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., Itohara, 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 CB₁ 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 μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -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 μ -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⁺-Cl⁻ 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 δ - AND κ -OPIOID RECEPTOR FUNCTION IN THE REWARDING EFFECT OF (κ)-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 κ -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

鶴澤直生, 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 α -エンドルフィン神経系の関与

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_{1A} 受容体作動薬の般化

望月綾乃, 森友久, 鶴澤直生, 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, 鶴澤直生, 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 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,

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・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的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*-acetylasparyl- glutamate: NAAG) へと変換されて細胞外へ放出され、グルーブ 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.) 麻酔下で脳定位装置に固定した。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、リンゲル液 (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。透析用リングル液を介して、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 環流後に 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。

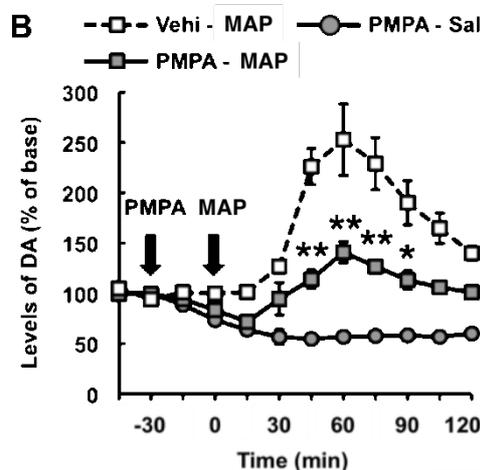
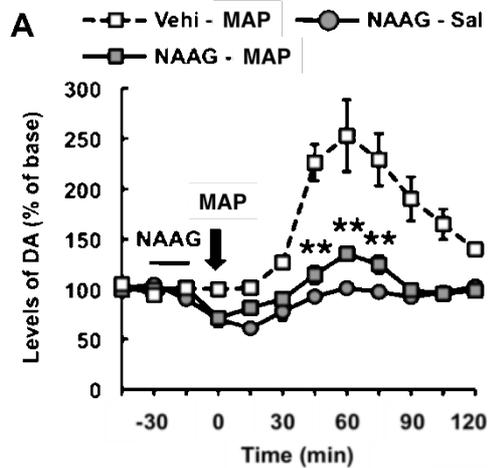


Fig. 1 Effect of NAAG on MAP-induced dopamine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with NAAG perfusion (0.1 mg/ml, during 15 min prior to MAP) (A) and 2-PMPA (30 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) (B) and inhibited MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=4. * $P < 0.05$, **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

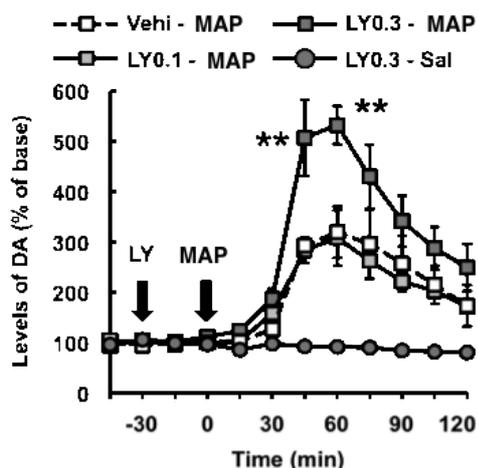


Fig. 2 Effect of LY341495 on MAP-induced dopamine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with LY341495 (0.1 or 0.3 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) enhanced MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=6. ** $P < 0.01$ vs vehicle-MAP.

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)。

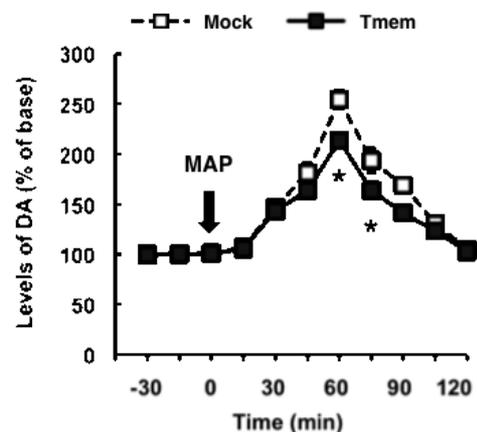


Fig. 3 Effect of MAP on extracellular dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens of Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered in time 0 min. N=9. * $P < 0.05$ vs MAP-treated Mock.

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)。

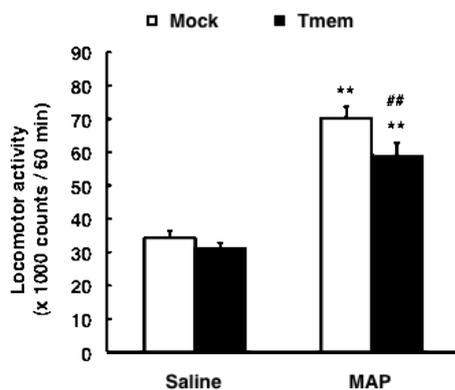


Fig. 4 Effect of MAP on locomotion in Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered immediately before the measurement of locomotor activity. N=8. ** $P < 0.01$ vs Saline, ** $P < 0.01$ vs Mock-MAP.

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)。

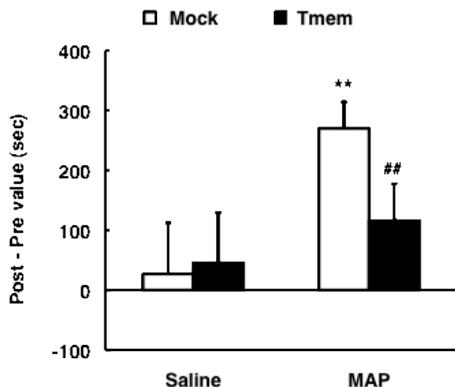


Fig. 5 Effect of MAP on conditioned place preference in Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning in the conditioned place preference task. N=8. * $P < 0.05$ vs Saline. * $P < 0.05$ vs Mock-MAP.

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。

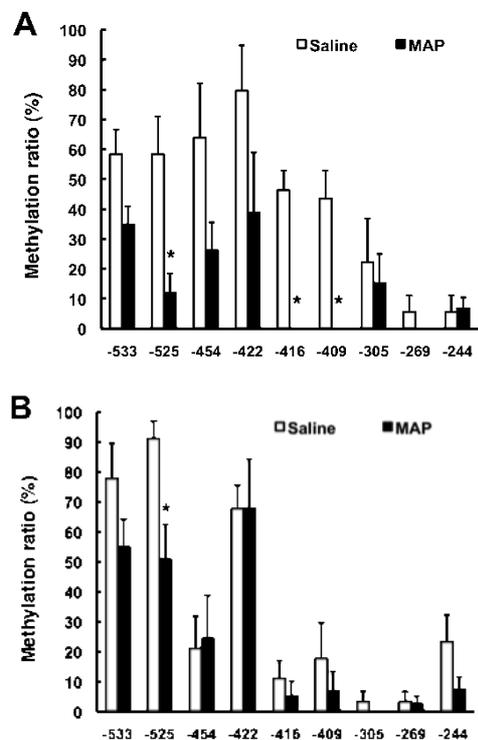


Fig. 8 Methylation profiles of Shati/Nat8l DNA from the nucleus accumbens and blood in MAP-treated wild-type mice. The methylation ratios of each CpG units from the nucleus accumbens (A) and blood (B). N=3. * $P < 0.05$ vs Saline.

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 の薬理的な作用に対して抑制的に働く

ことを明らかにしてきた⁹⁾。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で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) Ariyanur, 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-acetylaspartyl-glutamate 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- β 25-35 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) 鷲見和之, 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, 鷲見和之, 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, 鷲見和之, 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) 鷲見和之, 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, 鷲見和之, 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¹⁾。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, MMRRC, 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。

イムノプロット解析

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、イムノプロット法により 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プ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 試験にはギロチンド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、ギロチンド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 Bonnferroni/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。

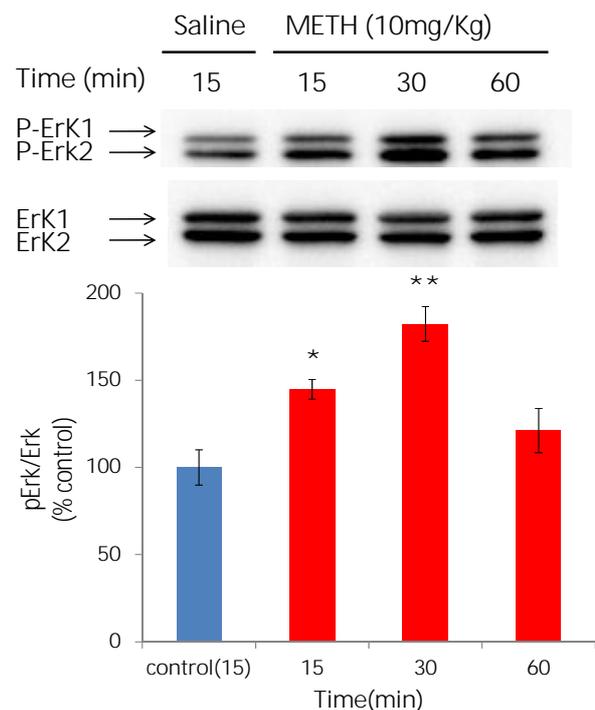


Fig. 1. Effect of methamphetamine on phosphorylated Erk1/2 levels in the nucleus accumbens of mice.

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。

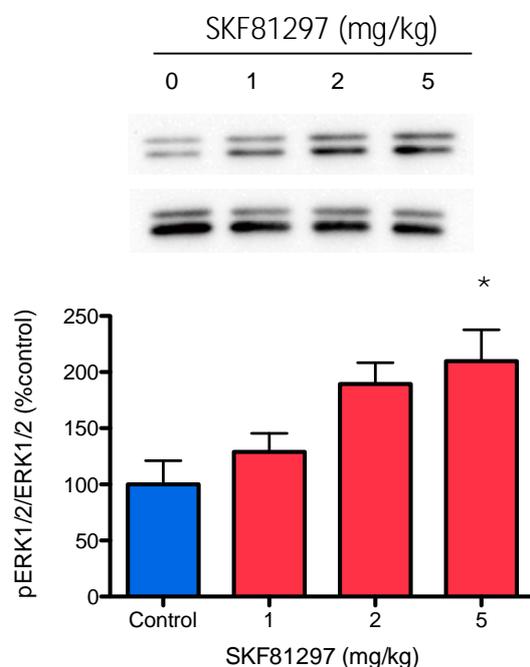


Fig. 2. Effect of dopamine D1 receptor agonist SKF81297 on phosphorylated Erk1/2 levels in the nucleus accumbens of mice.

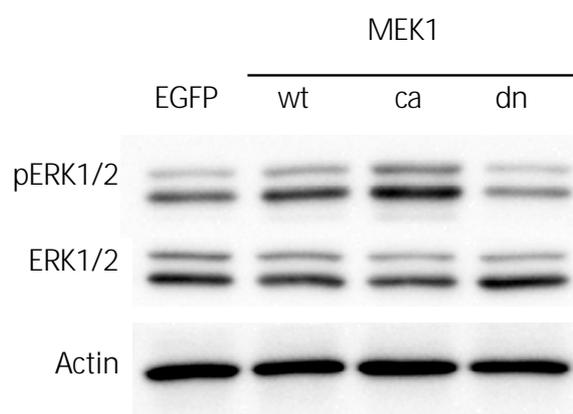
Each value represents mean \pm S.E. (n=5).

*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プロットで調べた。AAV ベクター注入 3 週間後の免疫染色およびイムノプロット解析の結果、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。

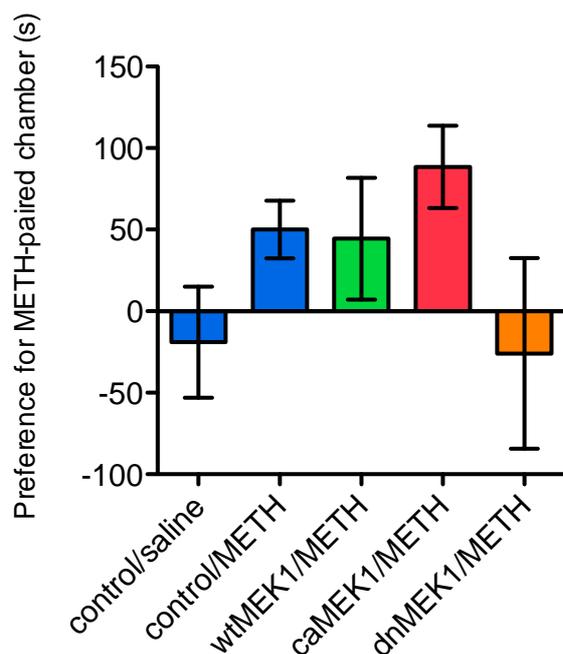


Fig. 4 Methamphetamine-induced conditioned place preference in AAV-wtMEK1, caMEK1 and dnMEK1-transfected mDrd1-Cre mice.

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的作用

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

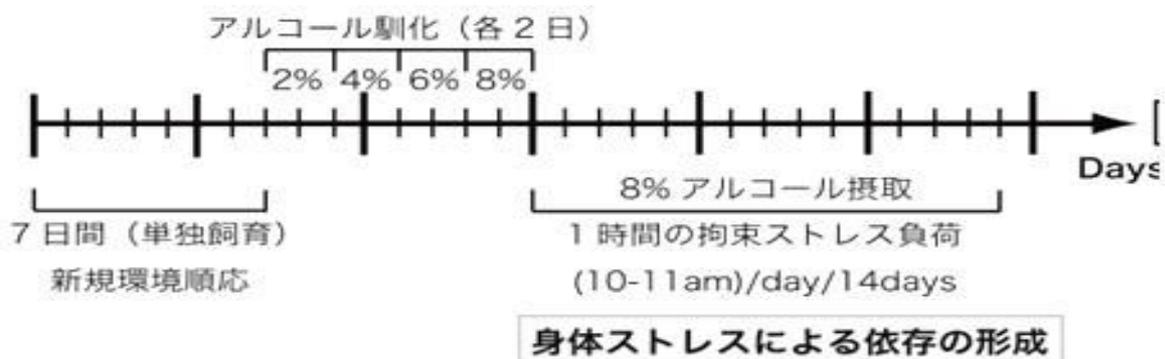
全ての実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可のもとに行った。

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。

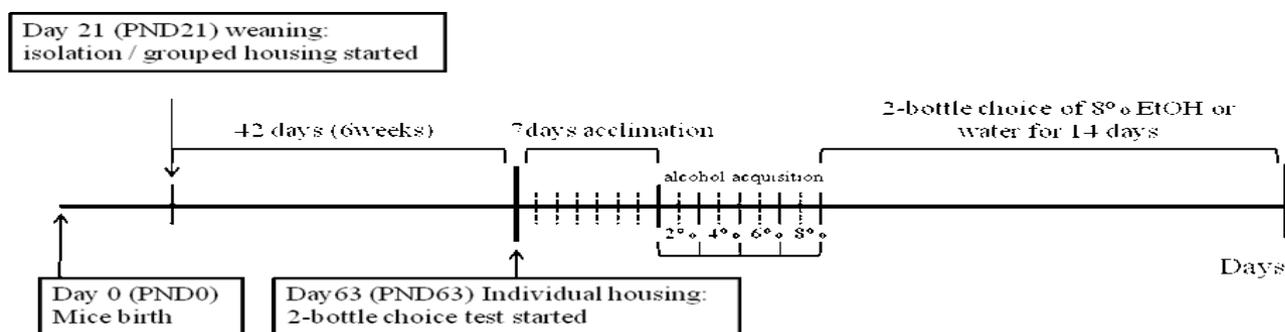
2) 身体ストレス

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。



3) 心理社会的ストレス

離乳後(生後3週間)のマウスを同胞マウスと隔離し単独にて飼育し、社会的隔離ストレスを6週間、負荷した。多頭飼いまウスは1ケージ(28x17x15cm³)に3~5匹で飼育したのに対して、単頭飼いまウスは同じ大きさのケージに1匹で飼育した。grouped-housed (集団飼育)は生後3週間で親から引き離し、同腹仔3~5匹での集団飼育を42日間行った。isolated-housed (単頭飼育)は生後3週間で親から引き離し、42日間の単頭飼育を行った。



4) 二瓶選択実験

拘束ストレスあるいは社会的隔離ストレス負荷後、二瓶選択実験を実施した。15mlのガラス瓶に8%エタノールあるいは水を入れ、14日間の飲水量を測定した。嗜好性を避けるため水とエタノールを日毎に差し替えた。飲水量と同時に、摂餌量と体重も同じ時間に毎日測定した。



C. 研究結果

1. 拘束ストレス

雌性 MOR KO マウスでは、アルコール摂取量はストレス負荷の有無に関わらず雌性野生型マウスと比較して少ない傾向が見られた。ストレス負荷時では雌性野生型マウスにおいてアルコール摂取量が有意に低値であった (Fig. 1a)。飲水量は雌性野生型マウスにおいて、ストレス負荷により増加傾向にあった。一方で雌性 MOR KO マウスにおいて、飲水量はストレス負荷の有無で変化がないが、雌性野生型マウスに比べ雌性 MOR KO マウスでは飲水量は高かった (Fig.1b)。

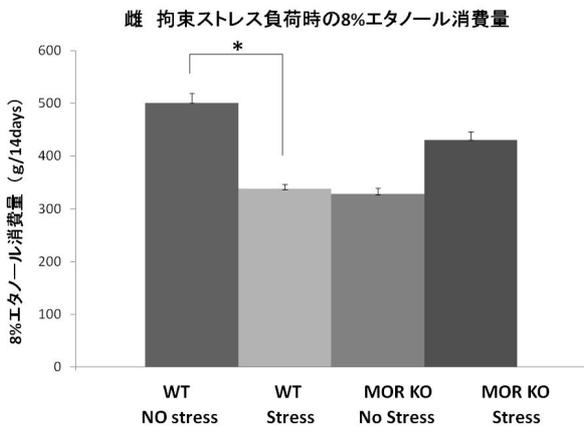


Fig.1: a) 雌性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける拘束ストレス負荷時のエタノール消費量

雌性野生型マウス(n=17)、MOR KO マウス (n=17)
*; p < 0.05。

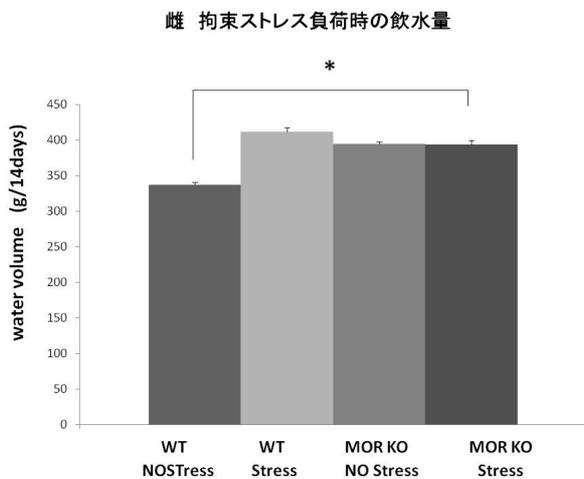


Fig.1: b) 雌性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける拘束ストレス負荷時の飲水量

雌の野生型マウス(n = 17)、MOR KO マウス (n = 17)。*; p < 0.05。

2. 社会的隔離ストレス

集団飼育下において、雄性 MOR KO マウスは雄性野生型マウスと比較してアルコール摂取量が有意に低値であった(Fig.2a)。社会的隔離ストレ

ス負荷により雄性 MOR KO マウスでは集団飼育条件に比較してアルコール摂取量が有意に高値であった(Fig.2a)。雄性とは逆に雌性 MOR KO マウスでは社会的隔離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った(Fig.3a)。

一方で、野生型マウスでは性別に関わらずストレス負荷の有無によるアルコール摂取量の変化はなかった(Fig.2a&3a)。実験初日から終日、雌は雄よりアルコールの消費量が高いという結果が得られた。(Fig.2b&3b, Table.1)。社会的隔離ストレス負荷時の MOR KO マウスにおけるアルコール摂取量に性差はなかった(Table.1)。

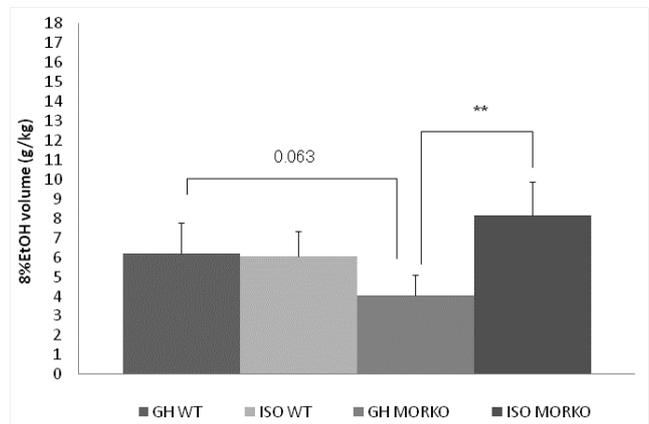
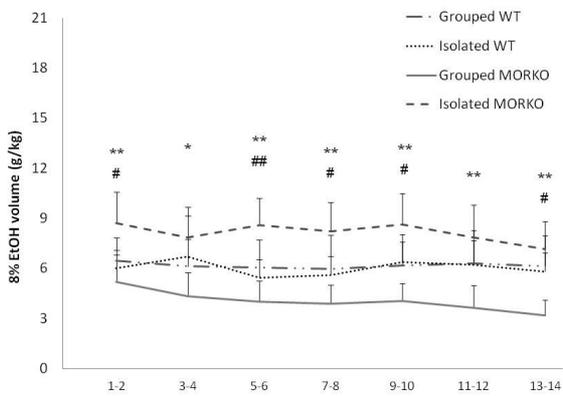


Fig.2: a) 雄性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける社会的隔離ストレス負荷時の 8%エタノール消費量 (gram/kilogram BW) 雄性集団飼育野生型マウス(n=15)、単独飼育野生型マウス(n=10) 集団飼育 MOR KO マウス(n=10)、単独飼育 MOR KO マウス(n=10)。*; p < 0.05, **p < 0.01.



2b) 14 日間のタイムコース：雄性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける社会的隔離ストレス負荷時の 8%エタノール消費量 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 、ストレス間で比較。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 、遺伝子型間で比較。

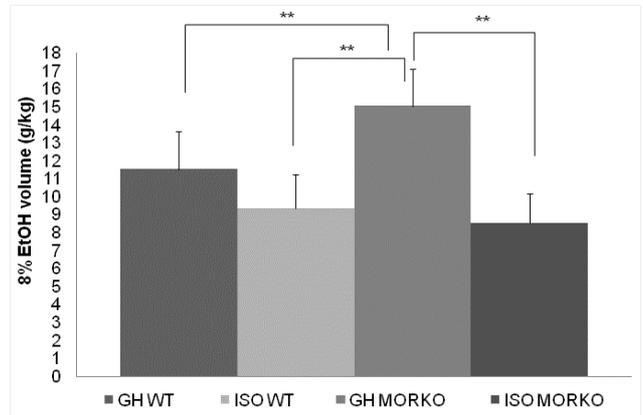
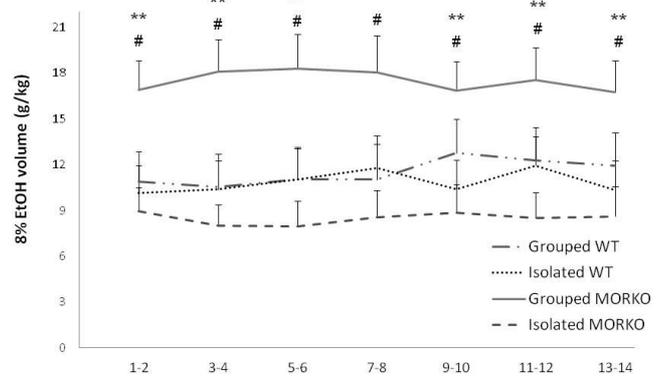


Fig.3:a) 雌性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける社会的隔離ストレス負荷時の 8%エタノール消費量 (gram/kilogram BW) 雌性集団飼育野生型マウス(n=10)、単独飼育野生型マウス(n=10) 集団飼育 MOR KO マウス(n=8)、単独飼育 MOR KO マウス(n=6)。*; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



3b) 14 日間のタイムコース：雌性野生型マウスおよび MOR KO マウスにおける社会的隔離ストレス負荷時の 8%エタノール消費量 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 、ストレス間で比較。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 、遺伝子型間で比較。

Table.1 性差によるエタノール消費量

Genotype of mice	Group-housed conditions		Social-isolation conditions	
	Male	Female	Male	Female
WT mice	6.18 ± 1.60	11.51 ± 2.14**	6.03 ± 1.32	9.35 ± 1.90*
MOR KO mice	4.04 ± 1.04	15.03 ± 2.06**	8.14 ± 1.74	8.51 ± 1.68

Values are given as mean ± standard error of the mean.

*Significant post hoc difference using Bonferroni corrections, male vs female, *p<0.05

**p<0.01

Table.2 飲水量

Genotype of mice	Group-housed conditions		Social-isolation conditions	
	Male	Female	Male	Female
WT mice	11.71 ± 1.87	11.43 ± 2.15	12.26 ± 1.68	10.60 ± 1.98
MOR KO mice	16.42 ± 2.02*#	10.77 ± 2.19	10.91 ± 2.06	14.34 ± 2.46

Values are given as mean ± standard error of the mean.

*Significant post hoc difference using Bonferroni corrections, male GH vs ISO, p<0.05.

#Significant post hoc difference using Bonferroni corrections, male WT vs MOR, p<0.05.

Table.3 摂餌量

Genotype of mice	Group-housed conditions		Social-isolation conditions	
	Male	Female	Male	Female
WT mice	4.49 ± 0.32	4.47 ± 0.39	4.56 ± 0.33	4.28 ± 0.42
MOR KO mice	4.50 ± 0.30	3.63 ± 0.23	3.92 ± 0.25	4.23 ± 0.45

Values are given as mean ± standard error of the mean.

Table.4 体重

Genotype of mice	Group-housed conditions		Social-isolation conditions	
	Male	Female	Male	Female
WT mice	25.26 ± 1.26*	21.77 ± 0.87	25.70 ± 0.92*	22.11 ± 1.13
MOR KO mice	26.40 ± 1.71*	21.11 ± 1.13	26.77 ± 1.84*	23.27 ± 1.11

Values are given as mean ± standard error of the mean.

*Significant post hoc difference using Bonferroni corrections, male vs female, *p<0.05

D. 考察

今回の拘束ストレス実験の結果より、雌性野生型マウスでは拘束ストレス負荷時によりアルコール摂取量が減少したため、今回の条件下においては依存よりもむしろ嫌悪形成に対して寄与した可能性が考えられる。このことはラットで行われた先行研究結果と一致している(Haleem, 1996; Chester, 2004)。一方、MOR KO マウスでは拘束ストレス負荷時におけるアルコール摂取量に変化は見られなかった。このことは拘束ストレスなどの身体ストレス負荷時において、MOR の欠損によりアルコールに対する嫌悪形成が減弱している可能性を示唆し、アルコールに対する行動パターンの変化に MOR が関与する可能性が考えられる。

大規模災害ストレスでは災害による直接の身体ストレスよりも社会孤立などの中長期にわたる心理社会ストレスが主体となると考えられる。集団飼育した雄性 MOR KO マウスは野生型マウスよりもアルコール摂取量が有意に低値であった結果は、オピオイド受容体への拮抗作用を有する薬剤がアルコール依存症の治療薬として用いられていることと矛盾はなく、薬剤奏功機序の解明に寄与する可能性がある。一方で単独飼育の社会的隔離ストレス負荷によって雄性 MOR KO マウスでアルコール摂取量が有意に高値であった結果は、社会的隔離ストレスがアルコールに対する行動パターンの変化に与える影響における MOR の関与を示唆するとともに、オピオイド受容体への拮抗作用を社会的隔離ストレス負荷が上回った可能性も考えられる。加えて、雌性 MOR KO マウスでは雄とは逆に心理社会ストレスが無くともアルコール摂取量が有意に高値であったため、アルコール摂取量の変化に性差があったことを示した。このことから雌雄の違いにより心理社会ストレス負荷の効果が異なることが考えられた。雌性集団飼育 MOR KO マウスにおいてアルコール摂取量が単頭飼育マウスに比べ高いのは、離乳直後の早い時期での隔離よりも、測定が始まる時期(ヒトの思春期に当たる時期)の隔離飼育がストレスとして雌性 MOR KO マウスに影響した可能性が考えられる。

E. 結論

ストレスは薬物依存の発症のみならず再燃の脆弱性に関わっていることが知られている(Sinha, 2001)。今後、アルコール依存への罹患リスク、情動障害や生体の機能障害に関連した精神疾患や遺伝子背景としての性差、ストレスがもたらす生体機能への影響とその性差におけるメカニズムにおける MOR の機能的な役割を詳細に研究し、得られた知見を臨床研究につなげることで未充足な医療ニーズへの対応に結び付くと考えられる。

本研究では、ストレスとアルコール依存に対するオピオイド神経伝達の機能的役割の解析研究として MOR の機能を確認したが、他のオピオイド受容体(δ 、

κ 受容体)に関してもストレス反応との関連を示唆する報告があり、これらの受容体の機能解析もストレス関連疾患やアルコール依存の病態解明に重要であると考えられる。

[参考文献]

15. Chester JA, Blose A M, Zweifel M, Froehlich J C 2004. Effects of stress on alcohol consumption in rats selectively bred for high or low alcohol drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 385-393.
16. Haleem DJ. 1996. Adaptation to repeated restraint stress in rats: failure of ethanol-treated rats to adapt in the stress schedule. *Alcohol Alcohol*, 31: 471-477.
17. Hall FS, Sora I, Uhl GR. 2001. Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154:43-9
18. Komatsu H, Ohara A, Sasaki K, Abe H, Hattori H, et al. 2011. Decreased response to social defeat stress in mu-opioid-receptor knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav* 99:676-82
19. Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, et al. 1994a. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 350:412-38
20. Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. 1994b. mu-Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 643:245-65
21. Sinha R. 2001. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology(Berl)*158:343-59.
22. Sora I, Funada M, Uhl GR. 1997. The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 324:R1-2

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Moriya Y, Hall FS, Sora I. The role of serotonin in the effects of psychostimulant drugs: Behavioral studies of addiction-and abuse-related phenotypes. In: Hall FS (ed.) *Serotonin: Biosynthesis, Regulation and Health Implications*. New York: Nova Science Publishers. 189-210 (2013)
2. Uchiumi O, Kasahara Y, Fukui A, Hall FS, Uhl GR, Sora I. Serotonergic involvement in the amelioration of behavioral abnormalities in dopamine transporter knockout mice by nicotine. *Neuropharmacology* 64(1): 348-356 (2013)
3. Berrocoso E, Ikeda K, Sora I, Uhl GR,

- Sánchez-Blázquez P, Mico JA. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. **Int J Neuropsychopharmacol** 16(1): 151-62 (2013)
4. Ohara A, Kasahara Y, Yamamoto H, Hata H, Kobayashi H, Numachi Y, Miyoshi I, Hall FS, Uhl GR, Ikeda K, Sora I. Exclusive expression of VMAT2 in noradrenergic neurons increases viability of homozygous VMAT2 knockout mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 432(3):526-532 (2013)
 5. Yamashita M, Sakakibara Y, Hall F, Numachi Y, Yoshida S, Kobayashi H, Uchiyumi O, Uhl GR, Kasahara Y, Sora I. Impaired cliff avoidance reaction in dopamine transporter knockout mice. **Psychopharmacology** 227(4):741-749 (2013)
 6. Ikeda M, Okahisa Y, Aleksic B, Won M, Kondo N, Naruse N, Aoyama-Uehara K, Sora I, Iyo M, Hashimoto R, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, Takeda M, Sasaki T, Tokunaga K, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Evidence for shared genetic risk between methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia. **Neuropsychopharmacology** 38: 1864-1870 (2013)
 7. Hayashizaki S, Hirai S, Ito Y, Honda Y, Arime Y, Sora I, Okado H, Kodama T, Takada M. Methamphetamine increases locomotion and dopamine transporter activity in dopamine d5 receptor-deficient mice. **PLoS One** 8(10): e75975 (2013)
 8. Hall FS, Itokawa K, Schmitt A, Moessner R, Sora I, Lesch KP, Uhl GR. Decreased vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) function in knockout mice affects aging of dopaminergic systems. **Neuropharmacology** 76 PartA:146-155 (2014)
 9. 曾良一郎、岡崎賢志、笹田徹. (第1部)物質使用障害とアディクションの生物学中毒性精神病の生物学. **精神科治療学** 28(増刊号)「物質使用障害とアディクション 臨床ハンドブック」; 31 - 34 (2013)
 10. Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Watanabe M. GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. **Eur J Neurosci** *in press*

2. 学会発表

国際学会

1. Moriya Y, Kasahara Y, Hagino Y, Hall FS, Hen R, Ikeda K, Uhl GR, Sora I. Methamphetamine induced changes of monoamine neurotransmission in 5-HT1B KO mice. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto [2013/6/23-27]
2. Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Hall F.S., Uhl G.R., Watanabe M, Kasahara Y, Ikeda K, Kasashima R, Sora I. Increased regional gray matter volume in μ -opioid receptor knockout mice as determined by mri-voxel-based morphometry. International Narcotics Research Conference (INRC) 2013, Cairns, Australia [2013/7/14-19]
3. Sora I. Genetic vulnerability of drug addiction. In Symposium 4: Japanese Society for Neuroscience of Dependence. CINP Special Congress on Addiction, Kuala Lumpur [2013/10/2]

国内学会

1. 曾良一郎. 薬物依存の病態機序と向精神薬の依存リスク. 第2回日本精神科医学会学術大会 大宮 [2013/11/15]

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・治療法の開発に関する研究

分担研究者

成瀬暢也	埼玉県立精神医療センター
研究協力者	
田中朋子	埼玉県立精神医療センター
合川勇三	埼玉県立精神医療センター
小川嘉恵	埼玉県立精神医療センター
深井美里	埼玉県立精神医療センター
岸 達也	埼玉県立精神医療センター
山神智子	埼玉県立精神保健福祉センター

研究要旨

本研究では、依存症専門医療機関において、薬物依存のトレンドを踏まえた病態である違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）依存症及び処方薬（睡眠薬・抗不安薬）依存症の診断を適切に行い、有効で現実的な認知行動療法プログラムを開発して、その効果判定を行うことを目的とする。平成23年6月～平成26年4月までに、研究分担者が直接診察した新規薬物関連患者は303名であり、内訳は覚せい剤138名（45.5%）、脱法ドラッグ103名（34.0%）、向精神薬38名（12.5%）、有機溶剤11名（3.6%）、鎮咳剤5名（1.7%）、鎮痛剤4名（1.3%）などであった。さらに、平成22年4月～平成25年10月までに当センター救急病棟に入院となった物質関連障害患者は135名で全入院患者の17.5%であった。その内訳は、覚せい剤53名（39.3%）、アルコール38名（28.1%）、脱法ドラッグ17名（12.6%）、有機溶剤13名（9.6%）、向精神薬11名（8.1%）であった。初年度は、違法ドラッグ依存症および処方薬依存症患者に対する理解を深め適切な治療的対応ができるための小冊子、および依存症治療の基礎となる治療的対応に関する小冊子を作製した。次年度は、これに加え、これまで薬物依存症全般に対して実際に治療的介入を行ってきたワークブックなどの治療介入ツールを組み合わせた、有効な認知行動療法プログラムを具体化し、有効性評価を行う。

A. 研究目的

本研究では、依存症専門医療機関において、薬物依存のトレンドを踏まえた病態である違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）依存症及び処方薬（睡眠薬・抗不安薬）依存症の診断を適切に行い、有効で現実的な認知行動療法プログラムを開発して、その効果判定を行うことを目的とする。

当センターにおいて、平成20年より実施している薬物依存症全般に対する週1回9ヵ月間の外来集団認知行動療法「LIFE」において、有効性評価を行っているが、覚せい剤依存症を主体としたものであった。違法ドラッグ、処方薬などの依存症に対する認知行動療法の独自のモデルを開発し有効性を証明することができれば、わが国における初めてのトレンドを踏まえた依存症治療の標準モデルとして提供できる。

B. 研究方法

本研究の対象は、依存症専門病棟をもつ埼玉県

立精神医療センターを受診する患者で、DSM-TRの「物質依存」の診断を満たす違法ドラッグ依存症、処方薬依存症患者である。

対象者について、プログラム登録時に精神病性障害と物質使用障害に関する評価を行い、介入開始後3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月終了時、終了後3ヶ月の時点で、薬物再使用の有無、治療継続性、自助グループ参加状況などを評価する。また、プログラムへの参加をしない患者を対照群とし比較評価する。

（倫理面への配慮）

上記、有効性評価に関する研究については、埼玉県立精神医療センター・埼玉県立精神保健福祉センター倫理委員会の承認を得ている。承認に際しては、個人情報秘密保持、人権擁護上の配慮、非侵襲性の遵守を守り、被験者からは説明に基づいた同意書をとることを前提として、関連倫理指針に従うことを明示し、体制を整えている。

C. 研究結果

平成23年6月～平成26年3月までに、研究分

担者が直接診察した新規薬物関連患者は 303 名であり、内訳は覚せい剤 138 名(45.5%)、脱法ドラッグ 103 名(34.0%)、向精神薬 38 名(12.5%)、有機溶剤 11 名(3.6%)、鎮咳剤 5 名(1.7%)、鎮痛剤 4 名(1.3%)などであった。さらに、平成 22 年 4 月～平成 25 年 10 月までに当センター救急病棟に入院となった物質関連障害患者は 135 名で全入院患者の 17.5%であった。その内訳は、覚せい剤 53 名(39.3%)、アルコール 38 名(28.1%)、脱法ドラッグ 17 名(12.6%)、有機溶剤 13 名(9.6%)、向精神薬 11 名(8.1%)であった。

初年度は、違法ドラッグ依存症および処方薬依存症患者に対する理解を深め適切な対応ができるための小冊子、および依存症治療の基礎となる治療的対応に関する小冊子を作製した。これら 3 点の成果物については別途提出する。臨床の各場面において、その用途に応じて他の既存の薬物依存症介入ツールと組み合わせて活用することで、有効な治療的介入を実施しやすくなることが予想される。専門家や経験が豊富でなくても、薬物依存症とくに対応が難しいとされる違法ドラッグや処方薬(向精神薬)の治療を提供できる。初年度は、これらツールの開発を実施したものであり、次年度はこれらを使った有効性評価の段階に移る予定である。

D. 健康危険情報

特記すべき事項は認めない。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 成瀬暢也：精神科救急の最新知識 . 症候・精神疾患に対する対応 薬物乱用・依存. 臨床精神医学 43(5):729-735, 2014

2. 学会発表

1) 成瀬暢也：「薬物依存症専門外来における脱

法ドラッグ使用障害患者の臨床的特徴と治療」

第 10 回日本司法精神医学会(5/16-17, 那覇)

2) 成瀬暢也：「埼玉県立精神医療センター依存症専門病棟における脱法ドラッグ使用障害入院患者の推移」第 10 回日本司法精神医学会(5/16-17, 那覇)

3) 成瀬暢也：「薬物依存症外来からみた脱法ドラッグ患者の臨床的特徴と問題点」平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(10/3-5, 岡山)

4) 成瀬暢也：「当事者中心の薬物依存症治療～『ようこそ外来』と『ごほうび療法』の提案～」

第 110 回日本精神神経学会(6/26-28, 横浜)

5) 成瀬暢也：「脱法ドラッグ使用障害患者の臨床的特徴と治療～薬物依存症専門外来からの報告～」

第 110 回日本精神神経学会(6/26-28, 横浜)

6) 成瀬暢也：「精神科救急病棟における薬物依存症治療の標準化に向けて～治療パッケージの導入～」

第 110 回日本精神神経学会(6/26-28, 横浜)

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

G. 本研究による成果物

1. 薬物依存症の理解と治療的対応

「薬物依存症」の理解と治療的対応のためのハンドブック第 1 版(B5 全 47 ページ)

2. 脱法ドラッグ問題の理解と対応

「脱法ドラッグ」の理解と治療的対応のためのハンドブック第 1 版(B5 全 27 ページ)

3. 処方薬問題の理解と対応

「処方薬乱用・依存」の理解と治療的対応のためのハンドブック第 1 版(B5 全 27 ページ)

以上