

201427015A

平成26年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

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

課題番号：H25-医薬-一般-020

研究報告書

平成27年6月

主任研究者：鈴木 勉

平成26年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

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

課題番号：H25-医薬-一般-020

研究報告書

平成27年6月

主任研究者：鈴木 勉

目次

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
(課題番号：H25-医薬-一般-020)

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

I. 総括研究報告書

鈴木 勉 (星薬科大学・薬品毒性学教室)

II. 分担研究報告書

- | | |
|---|--------|
| 研究1：ゲートウェイドラッグによる依存性形成機序解明
森 友久 (星薬科大学・薬品毒性学教室) | ... 1 |
| 研究2：メチルフェニデート等による依存性の形成機序の解明
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) | ... 20 |
| 研究3：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
鈴木 勉 (星薬科大学・薬品毒性学教室) | ... 30 |
| 研究4：覚せい剤関連精神障害に対する薬物療法の開発
橋本 謙二 (千葉大学社会精神保健教育研究センター) | ... 41 |
| 研究5：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
新田 淳美 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬物治療学研究室) | ... 45 |
| 研究6：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
山田 清文 (名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部) | ... 61 |
| 研究7：違法ドラッグの依存における遺伝学的要因に関する研究
曾良一郎 (神戸大学大学院精神医学分野) | ... 67 |
| 研究8：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
成瀬 暢也 (埼玉県立精神医療センター) | ... 75 |

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書 (H25-医薬-一般-020)

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

主任研究者：鈴木 勉
(星薬科大学薬品毒性学教室)

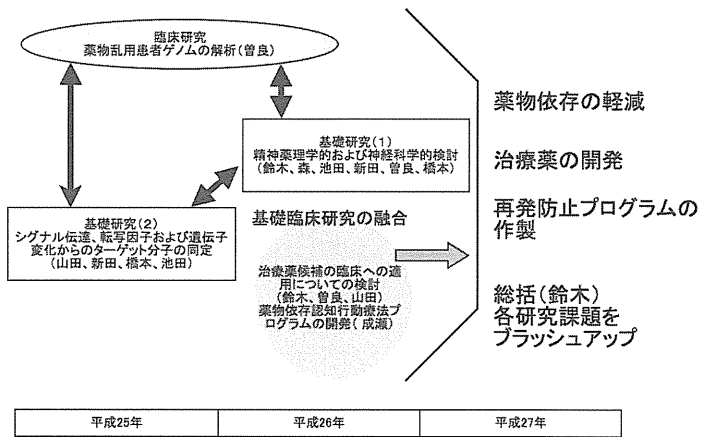
[研究要旨]

【研究目的】近年、薬物乱用の多様化に伴い、様々な違法ドラッグや処方精神薬といったゲートウェイドラッグの使用から、より強い作用の薬物を求めることになり、それが覚せい剤などの乱用に繋がっていることが指摘されている。これまでに、覚せい剤依存の作用機序に関する研究が数多く行なわれてきているが、まだまだ不明な点が多く残されている。さらに、ゲートウェイドラッグの作用機序に関する研究に至っては、殆ど行なわれていないのが現状である。一方、これらの薬物依存者の診断・治療も大きな進歩はみられていない。これらの背景から、図のような組織を作製し、本研究では違法ドラッグのリード化合物 (MDMA やカンナビノイド等) や覚せい剤依存の病態解明、さらにはこれらの薬物依存のトレンドを踏まえた依存症の薬物療法ならびに有効で現実的な診断および認知行動療法プログラムについて検討を行うことを目的とした。

【研究結果】オレキシン欠損マウスにおいて、通常強い依存性を示さない MDMA の報酬効果

は逆に増加していることを見出し、オレキシンの欠損により MDMA の感覚がメタンフェタミン様に変化することも見出した。さらに、メチルフェニデートの作用部位とされるドパミントランスポーターの欠損マウスにおいても前頭前野でドーパミン量を増加させること、このメチルフェニデートによる多動抑制効果は生後 20 週齢以降に認められることを見出した。これらのことは、危険ドラッグにおいて問題になりつつあるカチノン系の薬剤の作用機序をさらに詳細に検討する必要があることが示唆された。

シグナル分子としてRasGRP2を同定し、コカイン投与によりRasGRP2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することを見出した。また、覚せい剤連続投与によりShati/Nat81が、D1受容体を介したPKA/CREBシグナル経路によって発現制御されていることを明らかにした。この様にRasGRP2およびShati/Nat81といった2分子が依存形成に関与していることが明らかとなり、治療ならびに診断のターゲットになりうると期待される。さらに、覚せい剤の離脱症状の治療には、TrkB拮抗薬が有用であり、依



存の形成の抑制には、脳内のカンナビノイドの機能を促進することにより抑制しうることが明らかとなった。

危険ドラッグによる入院となった依存症患者の内、全5回各10～15分間の短期介入ワークブックであるLIFE-miniを使った介入群（22例）の方が非介入群（17例）より、退院後3か月の治療継続率が1%水準で有意に高かった。また、3か月以上の断薬率についても同様の傾向が認められた。非専門医が介入して依存症治療に繋げられる簡便な治療手法として有効であることを示唆している。次年度はLIFE-miniを改良しより効果的なツールとプロトコールを開発する。

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かった。昨年度は、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。その結果、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。この様に、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。一方、orexin 受容体拮抗薬の依存症治療薬としての有用性が報告されている。また、我々は、orexin 欠損(KO)マウスで依存性薬物の行動が大きく変化することを報告してきている。そこで orexin KO マウスにおける依存性薬物、特に、MDMA および methylphenidate の感覚効果の変化に着目し、また、得られた結果を、行動薬理学ならびに神経科学的主砲を用いて包括的に検証を行なった。Methylphenidate により弁別訓練を行ったマウスを用いて、methylphenidate の摂取感覚効果に対する類似性について検討した。その結果、MDMA は WT マウスでは般化せず、orexin KO マウスでは般化を示した。このことから orexin の欠損によって MDMA の摂取感覚効果が methylphenidate 様に変化している可能性が考えられた。この変化が脳内のモノアミン遊離量の変化に由来している可能性が考えられたため、側坐核における MDMA による DA および 5-HT 遊離量を *in vivo* microdialysis 法に従って検討したところ、MDMA により 5-HT の放出量の増加が観察されたが、両群間で差は認められなかった。そこで、シナプス後膜の monamine 受容体に着目し、側坐核における受容体機能を検討するために、RT-PCR および [³⁵S]GTPγS 結合実験を行った。ここで、5-HT_{1A}、5-HT₂、D₁ および D₂ 受容体 mRNA 量に関して、WT および orexin KO マウス間で認められなかった。しかしながら、orexin KO マウスにおいて、定常状態の G タンパク質活性は有意に増強していた。そこで、条件付け場所嗜好性試験によって orexin の欠損による MDMA 誘発報酬効果への影響を検討した。その結果、MDMA は WT マウスにおいて報酬効果の形成は全く認められず、orexin KO マウスでのみで報酬効果が形成された。一方、methylphenidate の報酬効果は両マウスで形成された。これまでの結果より、orexin 欠損時には、シナプス後膜における神経伝達

物質に対する感受性の変化、特に、5-HT 受容体に対する感受性亢進に伴い、MDMA 関連薬物の依存性が高まる可能性が考えられた。また、orexin は依存形成に必須の神経伝達物質でないことも明らかとなった。

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、多幸感などに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、その薬物の依存形成の作用機序ならびに他の依存形成薬物との類似性を検討することは、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。我々は昨年度、methylphenidate ならびに MDMA は、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。一方、orexin 受容体拮抗薬の依存症治療薬としての有用性が報告されている。また、我々は、orexin 欠損(KO)マウスで依存性薬物の行動が大きく変化することを報告してきている。そこで orexin KO マウスにおける依存性薬物、特に、MDMA および methylphenidate の感覚効果の変化に着目して研究を行なった。

B. 研究方法

1. 実験動物及び飼育条件

【方法】

実験には、orexin 遺伝子欠損 (KO) マウスおよびその野生型 (WT) マウスを使用した。行動薬理学的手法として、薬物弁別法および条件付け場所嗜好性試験を用いた。神経科学的手法として、*in vivo* microdialysis 法により 5-HT および DA の遊離量の測定を行った。生化学的手法として RT-PCR 法および^[35S]GTPγS 結合実験法を用いた。

2. 実験動物

C57BL/6J 系雄性マウス (7-8週齢) および orexin 欠損マウス (7-8週齢) を約 80 % 体重 (23-25g) に摂食制限を行ったものを各 8 匹使用した。マウスは室温 23 ± 1 °C 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。

2-1. 薬物弁別訓練

餌を強化子として nose-poke 訓練を行った。Nose-poke 確立後、10 回 nose-poke すること (Fixed ratio : FR10) で強化子が得られる定率餌強化スケジュール (FR10 餌強化スケジュール) に従い、methylphenidate (5mg/kg s.c.) と生理食塩水液による弁別訓練を行った。般化試験: 弁別獲得後、methylphenidate に対する methamphetamine、MDMA、5-HT 受容体作用薬の般化について検討を行った。

2-2.Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

無処置の C57BL/6J 系雄性マウスおよびオレキシン欠損マウスの視床下部、前頭皮質、腹側被蓋野、側坐核ならびに縫線核領域を摘出し、SV Total RNA Isolation System (Promega Co., WI, USA) を用いて total RNA を抽出した。First standard cDNA 作製のために、抽出した total RNA 1 µg を oligo (dt)₁₂₋₁₈ および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水と共に 70 °C で 10 分間インキュベーションした。その後、氷上で 2 分間急冷し、このサンプルに RT buffer 10 µL、0.1M DTT 10 µL、25 mM MgCl₂、10 mM dNTPmix 1 µL (以上全て Invitrogen, Van Allen Way, CA, USA) を加え、70 °C で 5 分間のインキュベーションを行った。

インキュベーション後、逆転写酵素である reverse transcriptase II (RTII; Invitrogen, Van Allen Way, CA, USA) 1 µL を加え、42 °C で 45 分間および 70 °C で 5 分間のインキュベーションを行った。

次に、PCR は以下に示す 5-HT_{1A}R、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}R、D₁R、D₂R および内標準として β-actin の DNA 配列に基づいた primer を用いて、それらを加えた first standard cDNA 3 µL、Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) 10 µL、DNase および RNase を含まない超純水 6 µL からなる混水を用いて、サーマルサイクラー (The Minicycler, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) により増幅した。以下のスケジュールに従い、denature、annealing および extension を行い、34 cycles にかけて特異的な塩基配列を有する cDNA を増幅した。1 cycle 目は denature を 94 °C で 5 分間、annealing を 55 °C で 1 分間、extension を 72 °C で 1 分間行い、2-33 cycles 目は denature を 94 °C で 30 秒間、annealing を 55 °C で 1 分間および extension を 72 °C で 1 分間、34 cycles 目は denature を 94 °C で 30 秒間、annealing を 55 °C で 1 分間、extension を 72 °C で 7 分間の条件下で行った。生成した PCR 産物の分析には、アガロースゲル電気泳動法を用いた。Trizma base (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA)、0.2 M 酢酸 (和光純薬工業 (株)、東京) および 0.5 M EDTA (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) の混液 (TAE 溶液) を溶媒として 5 × 10⁻⁵ % ethidium bromide 溶液を添加した 2% アガロースゲル溶液を作製し、室温で約 40 分間放置しゲルを固めた。固まったゲルは、TAE 溶液を電気泳動バッファーとして満たした電気泳動槽 (Gel Mate; TOYOBO (株)、東京) に入れ、34 cycles 目における PCR 産物 8.5 µL をそれぞれウェルに流し込み、100V にて 30 分間電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルの蛍光高度を Fluor Chem 3 system (Laboratory & Medical Supplies、東京) で読み取り、β-actin を内標準として、それぞれのバンドを補正した後に解析を行った。

5-HT_{1A} receptor; sense: 5'-CCC CCC AAG AAG AGC CTG AA-3'

antisense: 5'-GGC AGC CAG CAG AGG ATG AA-3'

5-HT_{2A} receptor; sense: 5'-TCA CCT ACT TCC TGA CTA TC-3'

antisense: 5'-TGT CTG TAC ATC TCT CTT CC-3'

5-HT_{2C} receptor; sense: 5'-CTC ACT CCT TGT GCA CCT-3'

antisense: 5'-CCC ACC AGC ATA TCA GCA ATG-3'

D₁ receptor; sense: 5'-CCT CCC TGA ACC CCA TTA TT-3'

antisense: 5'-GGG TAA CGG GTT GGA TCT TT-3'

D₂ receptor; sense: 5'-GAG AAG GCT TTG CAG ACC AC-3'

antisense: 5'-AGG ACA GGA CCC AGA CAA TG-3'

β -actin; sense: 5'-CCC AGA GCA AGA GAG GTA TC-3'

antisense: 5'-AGA GCA TAG CCC TCG TAG AT-3'

2-3. 条件づけ場所嗜好性試験 (CPP) 法

報酬効果は条件づけ場所嗜好性試験 (CPP) 法を用いて評価した。条件づけには幅 15 cm、長さ 30 cm、高さ 15 cm の白・黒 2-compartment box を使用した。Box は仕切り板によって 2 つの区画に分けられており、白側の区画は凹凸のある床で、一方、黒側の区画は平面になっている。条件づけはプレ方式に従い行った。条件づけを行う前日に pre-test を行い、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乗せ、プラットホームから降りた時間から 15 分間、白および黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これを pre-test 値とした。MDMA (10mg/kg,s.c.) あるいは溶媒である生理食塩液を投与することにより条件づけを、1 日 1 回行い、1 日目に薬物を投与したマウスは pre-test 値の低い方の区画へ、溶媒を投与したマウスは pre-test 値の高い方の区画にそれぞれ 60 分間閉じ込め、2 日目にはそれぞれ逆の操作を行った。この一連の操作を 1 session とし、合計 3 session 行った。また、薬物の代わりに、その溶媒のみの投与を続け、条件づけを行った群を溶媒対照群とした。6 日間の条件づけが終了した翌日に post-test を行い、pre-test 同様にそれぞれの区画における滞在時間を測定し、薬物を処置した区画における post-test 値と pre-test 値の差を CPP スコア (sec) として算出し、報酬効果の指標とした。

2-4. Guanosine-5'-*o*-(3-[³⁵S]thio)triphosphate ([³⁵S]GTPgS) 結合実験

Ethanol 慢性処置モデルを作製後、断頭し、腹側被蓋野領域を分画した。組織は 20 倍量 (w/v) の 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (pH 7.4)、5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) および 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) を含む ice-cold Tris-Mg²⁺ buffer を加え、teflon pestle 付きの Potter-Elvehjem tissue grinder (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) を用いてホモジナイズした。これらのホモジネートは、48,000 × g で 10 分間、4 °C で遠心した。得られた沈渣は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、1 mM EGTA および 100 mM NaCl (和光純薬、大阪) を含む [³⁵S]GTPgS binding assay buffer に加え再懸濁し、再度 48,000 × g で 10 分間、4 °C で遠心した。最終沈渣に [³⁵S]GTPgS binding assay buffer を加えて再懸濁し、-80 °C で保存した。

膜ホモジネート (3-8 mg protein/assay) は 10⁻⁸-10⁻⁵ M の [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵] -enkephalin (DAMGO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) と 30 mM の guanosine-5'-diphosphate (GDP) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) および 50 pM の [³⁵S]GTPgS (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA) を含む 1 mL の assay buffer にて、2 時間 25 °C でインキュベートした。その後、膜ホモジネートを Brandel cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) を使用し、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) および 5 mM MgCl₂ に 2 時間 4 °C で浸した Brandel GF/B glass filter (Brandel, Gaithersburg, MD,

USA) を用いて濾過し、反応を停止させた。Filter は 5 mL の ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) にて 3 回洗浄した後、3 mL の Clear-sol II (ナカライテスク、京都) を含む scintillation counting vial (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) に移し、12 時間室温にてインキュベートした。膜標本の放射活性は液体シンチレーションカウンター (ALOKA、東京) で測定し、非特異的結合は非放射性的の 10 mM GTP γ S を共存させることにより測定した。

3. 薬物

実験には methamphetamine (Dainippon-Sumitomo Pharmaceutical Co. Ltd, Osaka, Japan)、methylphenidate、MDMA、(±)-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溶解した。

C. 【結 果および考察】

Methylphenidate により弁別訓練を行ったマウスを用いて、methylphenidate の摂取感覚効果に対する類似性について検討した。その結果、MDMA は WT マウスでは般化せず、orexin KO マウスでは般化を示した。このことから orexin の欠損によって MDMA の摂取感覚効果が methylphenidate 様に変化している可能性が考えられた。また、本研究で用いた 5-HT 関連薬物の内、5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH-DPAT のみが orexin KO マウスにおいて methylphenidate に側のレバー押し反応を示した。これらの結果は、MDMA の methylphenidate 様の弁別刺激効果の発現に 5-HT_{1A} 受容体の活性化が関与している可能性が考えられた。また、この変化が脳内のモノアミン遊離量の変化に由来している可能性が考えられたため、側坐核における MDMA による DA および 5-HT 遊離量を *in vivo* microdialysis 法に従って検討した。MDMA により側坐核における 5-HT および dopamine の放出量の増加が観察されたが、両群間で差は認められなかった。次に、シナプス後膜の monoamine 受容体に着目し、側坐核における受容体機能を検討した。弁別で使用したマウスを用いて自発運動に与える影響を検討したところ、8-OH-DPAT ならびに DOI により、自発運動の著明な低下が orexin KO マウスにおいてのみ観察された。一方、8-OH-DPAT と DOI とを併用したところ、WT マウスにおいてのみ自発運動の有意な低下が認められた。さらに、RT-PCR および [³⁵S]GTP γ S 結合実験を行ったところ、5-HT_{1A}、5-HT₂、D₁ および D₂ 受容体 mRNA 量に関して、WT および orexin KO マウス間で認められなかった。しなしながら、orexin KO マウスにおいて、側坐核を含む limbic forebrain において定常状態の G タンパク質活性は有意に増強していた。以上の結果より、orexin KO マウスでは、受容体のタンパク量には変化を与えずに、シナプス後膜の 5-HT_{1A} および 5-HT₂-受容体刺激におけるシグナル伝達に変化していることが示唆された。そこで、条件付け場所嗜好性試験によって orexin の欠損による MDMA 誘発報酬効果への影響を検討した。その結果、MDMA は WT マウスにおいて報酬効果の形成は全く認められず、orexin KO マウスでのみ報酬効果が形成された。一方、methylphenidate および methamphetamine の報酬効果は両マウスで形成された。これまでの結果より、orexin 欠損時には、シナプス後膜における神経伝達物質に対する感受性の変化、特に、5-HT 受容体に対する感受性亢進に伴い、MDMA 関連薬物の依存性が高まる可能性が考えられた。また、orexin は依存形成に必須の神経伝達物質でないことも明らかとなった。

今後は、危険薬物が社会問題していることから MDMA と大麻の弁別刺激効果を検討し、カチノン系薬物およびカンナビノイド系薬物の類似性の検討、さらには、市場に出回っている危険ドラッグの機序解析について柔軟に対応する体制を取っていく。また、ゲートウェイドラッグは単剤よりも多剤により併用されることから、ゲートウェイドラッグの多剤併用による依存性の増強についても検討していく予定である。

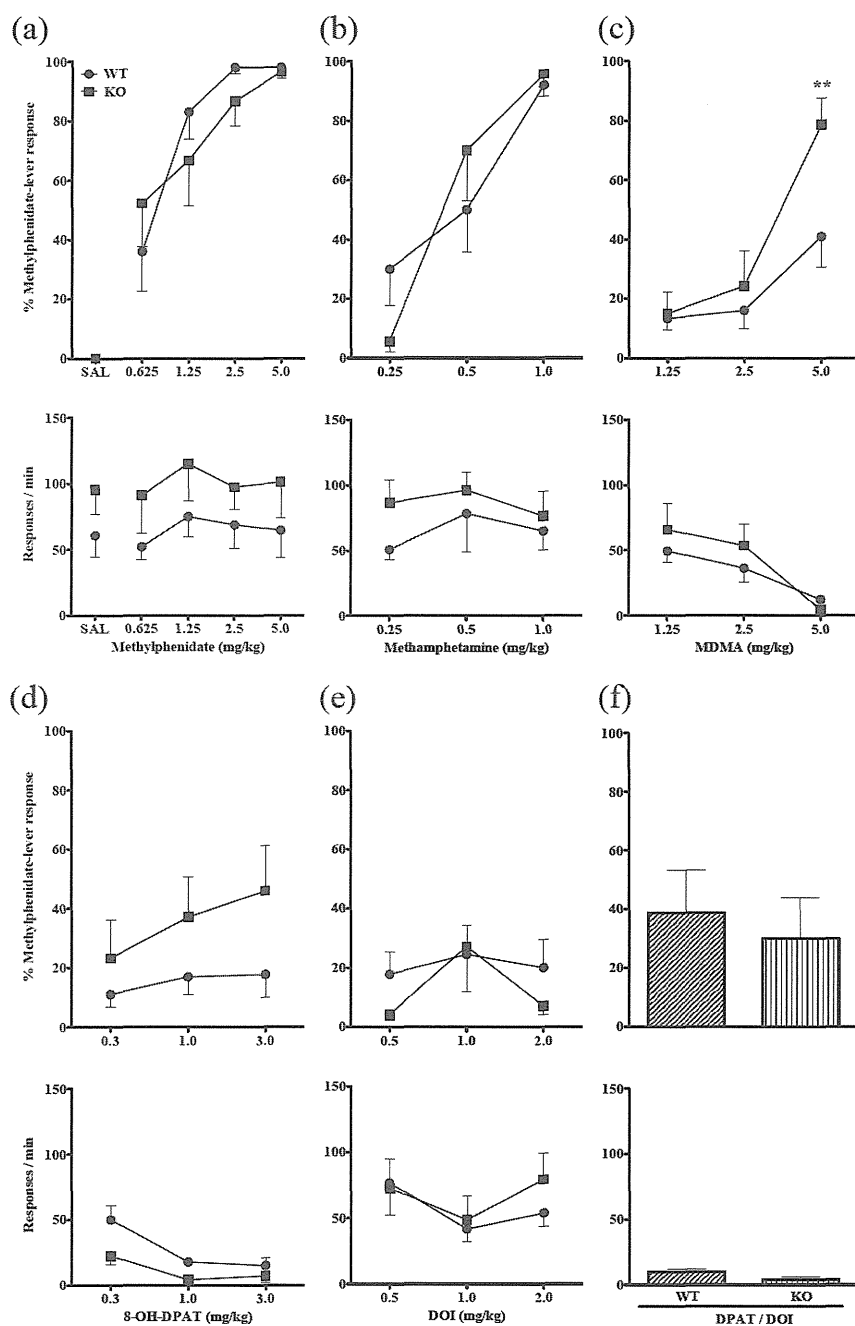


Figure 1. Dose-response (a) and substitution tests of methamphetamine (b), MDMA (c), 8-OH-DPAT (d), DOI (e), and 8-OH-DPAT plus DOI (f) for the discriminative stimulus effects of methylphenidate in wild-type (WT) and prepro-orexin knock-out (KO) mice that had been trained to discriminate between 5 mg/kg methylphenidate and saline. Each point represents the mean percentage of methylphenidate-appropriate responding (top panel) and the mean response rates (bottom panel) with

S.E.M. of 5-10 animals. $F(1,43) = 5.06$, $**P < 0.01$ versus WT group.

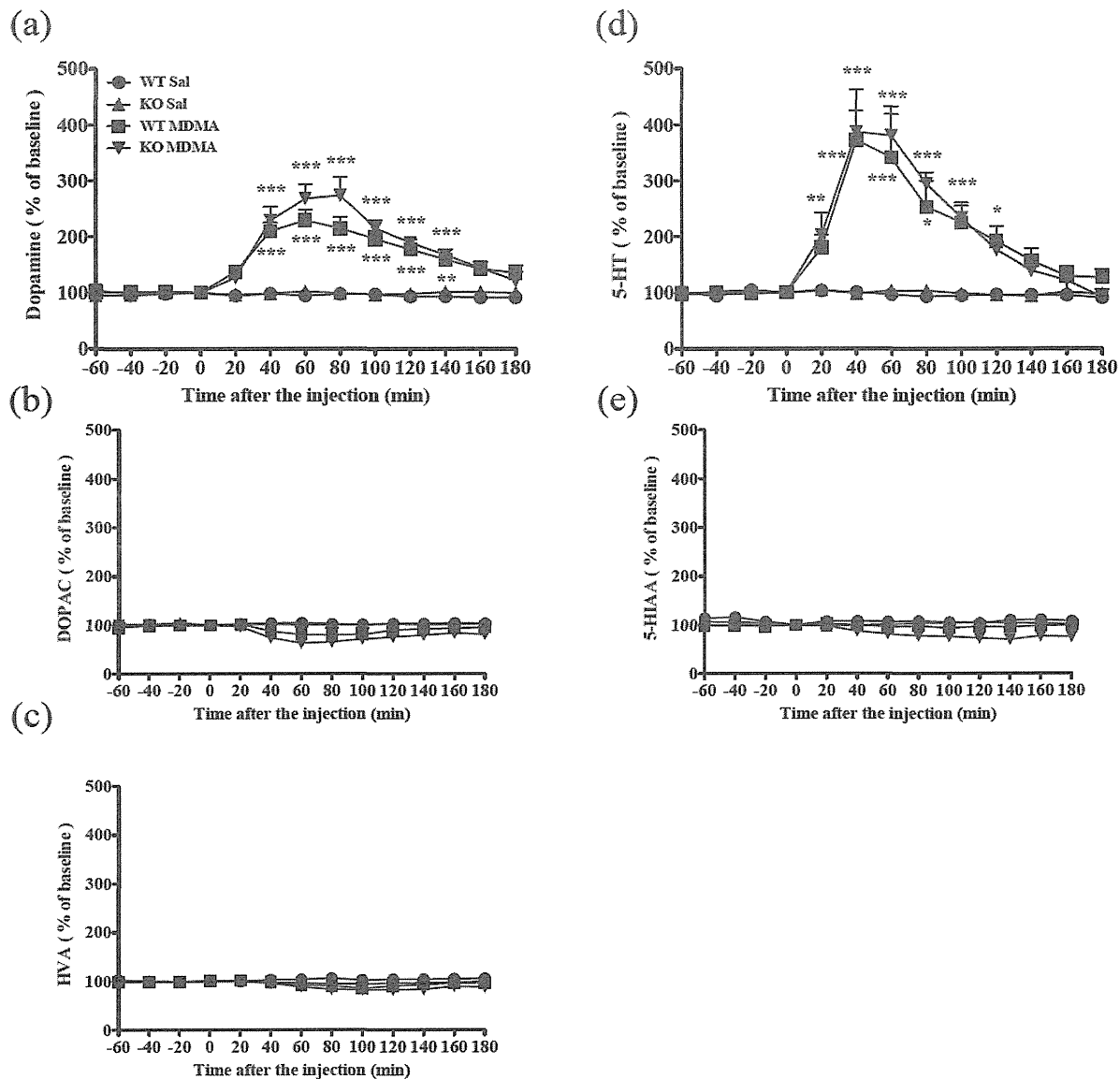
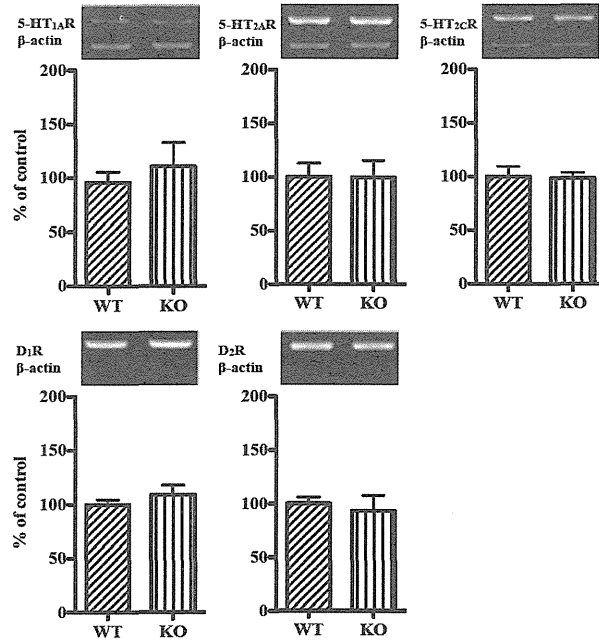


Figure 2. Effects of treatment with MDMA on the dialysate dopamine (A) or 5-HT (B) and its metabolites (C, D, E) levels in the nucleus accumbens in wild-type (WT) and prepro-orexin knock-out (KO) mice. MDMA (5mg/kg, s.c.) or saline (Sal) was injected at time 0. The data are expressed as percentages of the corresponding baseline levels with S.E.M. of five to eight mice. $F(3, 247) = 114.66$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ versus saline treatment group.

LFB



VTA

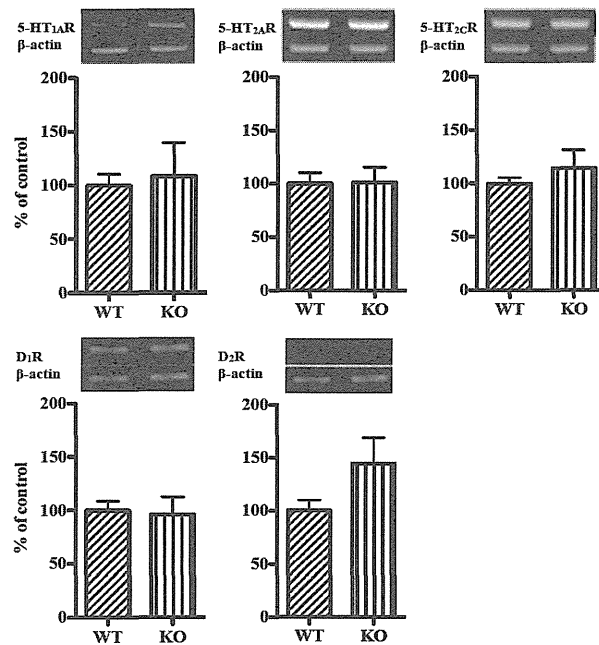


Figure 3. Changes of 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, 5-HT_{2C} receptor, D₁ receptor and D₂ receptor mRNA expression in the limbic forebrain (LFB) (A), and ventral tegmental area (VTA) (B) of wild-type (WT) and prepro-orexin knock-out (KO) mice. Upper panel : Representative RT-PCR for 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} and D₁ and D₂ receptor mRNA in the limbic forebrain and ventral tegmental area from WT and orexin KO mice. Bottom panel : The values for each mRNAs were normalize by the value for internal standard β -actin mRNA. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 5 sample.

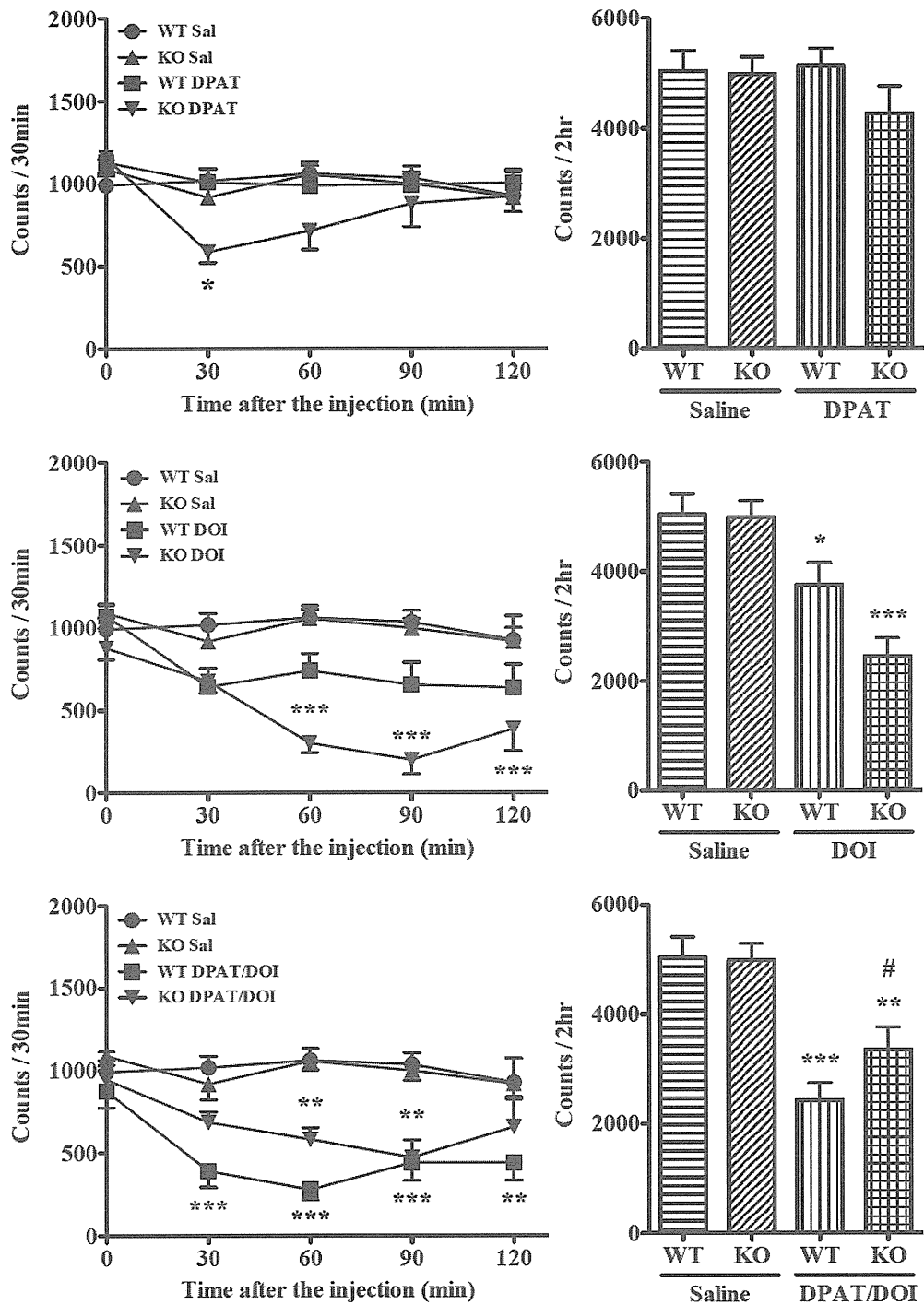


Figure 4. Effect of 8-OH-DPAT (DPAT; 1 mg/kg, s.c (A)) and DOI (2 mg/kg, s.c.) on locomotor activities in wild-type (WT) mice and prepro-orexin knock-out (KO) mice. Each point represents the mean counts for every 30 min (left panel) and 2hr (right panel) with S.E.M of 7 mice. *P < 0.05, **P < 0.01, versus saline treated mice.

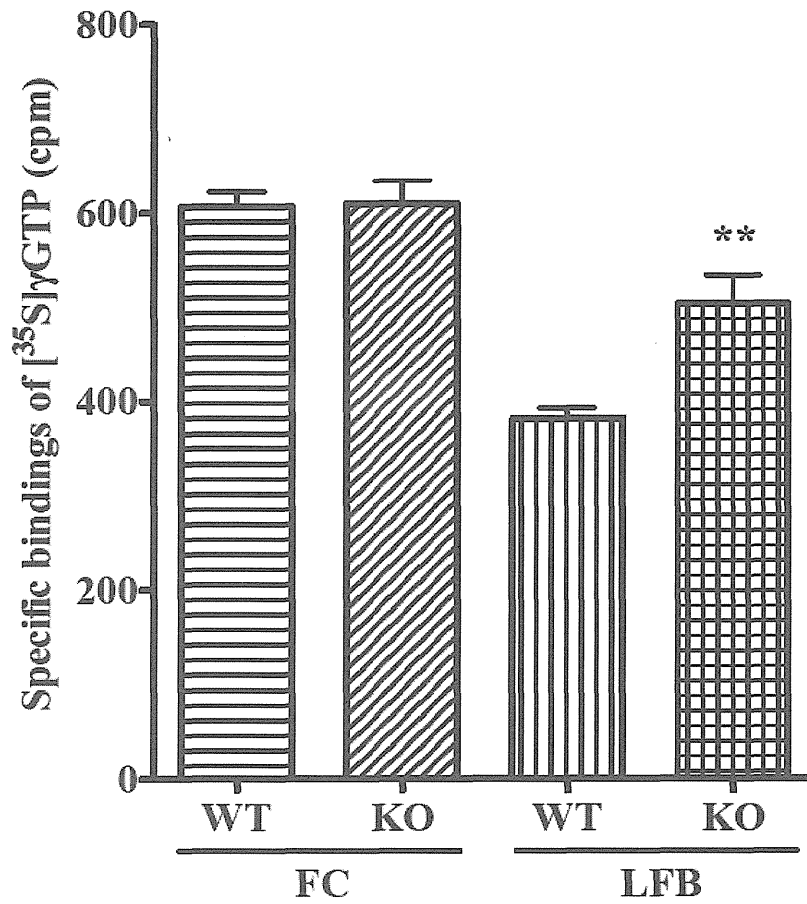


Figure 5. Specific binding of [³⁵S]γGTP to the each brain region membrane of wild-type (WT) and prepro-orexin knock-out (KO) mice. Each column represents the mean ± S.E.M. of 5 sample. **P < 0.01, versus WT mice.

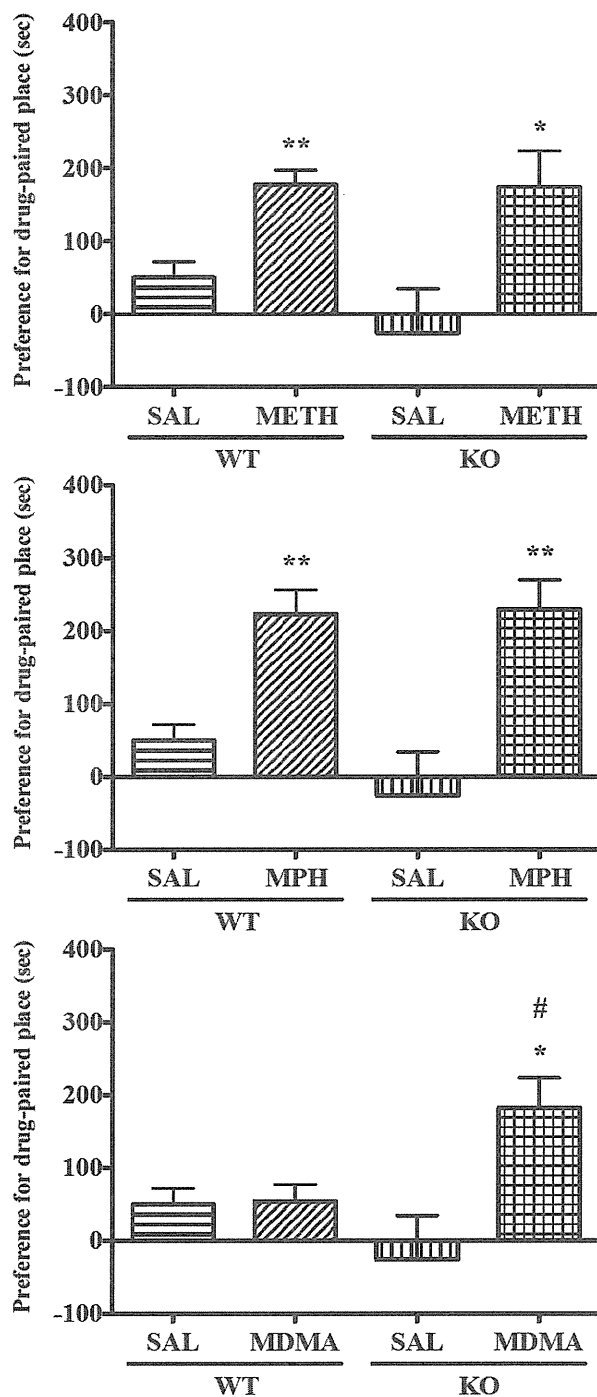


Figure 6. Methamphetamine (METH), methylphenidate (MPH) and MDMA-induced place preference in wild-type (WT) and prepro-orexin knock-out (KO) mice using conditioned place preference assay. Ordinate, Preference for drug-paired place, as defined by the post-conditioning test score minus pre-conditioning test score in the drug treatment side. Each point represents the mean conditioning score with S.E.M. of 6-8 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus saline treated mice. # $P < 0.05$, versus drug treated WT mice.

D. 結論

以上本研究の結果より、orexin 欠損時には、シナプス後膜における神経伝達物質に対する感受性の変化、特に、5-HT 受容体に対する感受性亢進に伴い、MDMA 関連薬物の依存性が高まる可能性が考えられた。また、orexin は依存形成に必須の神経伝達物質でないことも明らかとなった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori T, Itoh T, Yoshizawa K, Ise Y, Mizuo K, Saeki T, Komiya S, Masukawa D, Shibasaki M, Suzuki T, Involvement of μ - and δ -opioid receptor function in the rewarding effect of (+/-)-pentazocine. *Addict Biol* (2015) 20: 724-732.
- 2 Mori T, Ohya J, Itoh T, Ise Y, Shibasaki M, Suzuki T, Effects of (+)-pentazocine on the antinociceptive effects of (-)-pentazocine in mice. *Synapse* (2015) 69: 166-71.
3. Takasu K, Ogawa K, Nakamura A, Kanbara T, Ono H, Tomii T, Morioka Y, Hasegawa M, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G. Enhanced GABAergic synaptic transmission at VLPAG neurons and potent modulation by oxycodone in a bone cancer pain model. *Br J Pharmacol.* (2015) 172: 2148-2164.
- 4 Mori T, Kanbara T, Harumiya M, Iwase Y, Masumoto A, Komiya S, Nakamura A, Shibasaki M, Kanemasa T, Sakaguchi G, Suzuki T. Establishment of Opioid-Induced Rewarding Effects Under Oxaliplatin- and Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats. *J Pharmacol Sci* 126: 47-55
- 5 Mori T, Komiya S, Ohya J, Uzawa N, Sugiyama K, Saitoh Y, Shibasaki M, Suzuki T, Involvement of 5-HT₂ receptors in the expression of withdrawal diarrhea in morphine-dependent mice. *Eur J Pharmacol* (2014) 740: 160-167
- 6 Kanbara, T., Nakamura, A., Shibasaki, M., Mori, T., Suzuki, T., Sakaguchi, G. and Kanemasa, T.: Morphine and oxycodone, but not fentanyl, exhibit antinociceptive effects mediated by G-protein inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in an oxaliplatin-induced neuropathy rat model. *Neurosci Lett* (2014) 580: 119-124
- 7 Kanbara, T., Nakamura, A., Takasu, K., Ogawa, K., Shibasaki, M., Mori, T., Suzuki, T., Hasegawa, M., Sakaguchi, G. and Kanemasa, T.: The Contribution of Gi/o Protein to Opioid Antinociception in an Oxaliplatin-Induced Neuropathy Rat Model. *J Pharmacol Sci* 126, 264-73 (2014)
- 8 Funada M, Mori T, Maeda J, Tsuda Y, Komiya S, Shimizu N, Kamei J, Suzuki T. Splenectomy modifies hyperactive states of the dopaminergic system induced by morphine in C57BL/6J-bg(J)/bg(J) (beige-J) mice. *Eur J Pharmacol.* 2014 Nov 5;742:89-93.

- 9 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.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 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
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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
- 16 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 κ -opioid receptor agonist U-50,488H in rats. *Behav Pharmacol.* (2013) 24:275-281.
- 17 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 μ -opioid receptor agonist-induced physical dependence. *Eur J Pharmacol.* (2013) 715(1-3):238-245.
18. Kanbara T, Nakamura A, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, Kanemasa T. Morphine and oxycodone, but not fentanyl, exhibit antinociceptive effects mediated by G-protein inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in an oxaliplatin-induced neuropathy rat model. *Neurosci Lett* (2014) 580: 119-124.
19. Kanbara T, Nakamura A, Takasu K, Ogawa K, Shibasaki M, Mori T, Suzuki T, Sakaguchi G, Kanemasa T. *J Pharmacol. Sci* (2014) 126: 264-273
20. Shibasaki M, Ishii K, Masukawa D, Ando K, Ikekubo Y, Ishikawa Y, Shibasaki Y, Mori T, Suzuki T. Implication of mGlu5 receptor in the enhancement of morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem. *Eur. J. Pharmacol.* (査読あり) (2014) 738: 360-367
21. Namakura A et al., Protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels play a primary role in the antinociceptive effect of oxycodone, but not morphine, at supraspinal sites. *Br. J. Pharmacol.* 171: 253-264 (2014).
22. 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* 68: 39-43 (2014)
23. Funada M, Mori T, Maeda J, Tsuda Y, Komiya S, Shimizu N, Kamei J, Suzuki T. Splenectomy modifies hyperactive states of the dopaminergic system induced by morphine in C57BL/6J-bgJ/bgJ (beige-J) mice. *Eur. J Pharmacol* (2014) 42: 89-93
24. 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.* 19, 362-369 (2014)
25. Mori T, Uzawa N, Kazawa H, Watanabe H, Mochizuki A, Shibasaki M, Yoshizawa K, Higashiyama K, Suzuki T. Differential substitution for the discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and methylphenidate in rats. *J. Pharmacol Exp. Ther.* (2014) 350: 403-411
26. Mori T, Komiya S, Ohya J, Uzawa N, Sugiyama K, Saitoh Y, Shibasaki M, Suzuki T. Involvement of 5-HT₂ receptors in the expression of withdrawal diarrhea in morphine-dependent mice. *Eur. J Pharmacol.* (2014) 740: 160-167
27. Mori T, Funada M, Tsuda Y, Maeda J, Uchida M, Suzuki T. Dopaminergic Hyperactivity Accompanied by Hyperlocomotion in C57BL/6J-bgJ/bgJ (beige-J) Mice. *J Pharmacol Sci* (査読あり) (2014) 125: 233-236

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