

INVOLVEMENT OF m- AND d-OPIOID RECEPTOR FUNCTION IN THE REWARDING EFFECT OF (±)-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 m-OPIOID RECEPTOR AGONIST-INDUCED PHYSICAL DEPENDENCE

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

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

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

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

Yoshiyuki Iwase, Tomohisa Mori, Tomoya Saeki, Noriyuki Iwata, Asami Murata, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

国内学会

第 86 回日本薬理学会年会

平成 25 年 3 月 21-23 日, 福島

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

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

CHRONIC TREATMENT OF ETHANOL ENHANCED MORPHINE-INDUCED HYPERLOCOMOTION.

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

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

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

薬物依存の研究 (第 473 報): Methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する lipopolysaccharides

の影響

今井敏雄, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉

生体機能と創薬シンポジウム 2013

平成 25 年 8 月 29-30 日, 福岡

エタノール慢性処置によるモルヒネ誘発 dopamine 遊離量への影響

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

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム

平成 25 年 8 月 31 日, 熊本

Ethanol 慢性処置による morphine 誘発報酬効果増強作用に対する GRK2 の関与

芝崎真裕, 安藤光史, 男澤杏美, 露木智久, 森友久, 鈴木勉

アルコール・薬物依存関連学会合同学会

平成 25 年 10 月 3-5, 岡山

MDMA 誘発報酬効果ならびに弁別刺激効果におけるオレキシン神経系の役割

鵜澤直生, 森友久, 外園真由奈, 宇田川雄也, 芝崎真裕, 鈴木勉

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

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<sub>1A</sub> 受容体作動薬の般化

望月綾乃, 森友久, 鵜澤直生, 加澤春世, 芝崎真裕, 鈴木勉

薬物依存の研究 (第 480 報) ; Methylphenidate の弁別刺激効果に対するモノアミン神経系の関与  
加澤春世, 森友久, 望月綾乃, 鵜澤直生, 芝崎真裕, 鈴木勉

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

薬物依存の研究 (第 485 報) ; Dopamine による細胞死に対する sigma-1 receptor chaperone の  
GSK-3 $\beta$  を介した細胞保護作用  
原田真季, 森友久, 大屋順平, 小林実奈代, 芝崎真裕, 鈴木勉

第 24 回 マイクロダイアリシス研究会

平成 25 年 12 月 14 日, 東京

OA-1 受容体拮抗薬 DOPA cyclohexyl ester の methamphetamine 誘発 dopamine 遊離に及ぼす影響  
岩瀬祥之, 森友久, 中村美聖, 肥田野翔, 芝崎真裕, 東山公男, 五嶋良郎, 鈴木勉

第 23 回 神経行動薬理若手研究者の集い

平成 26 年 3 月 18 日, 仙台

MDMA および methylphenidate 誘発弁別刺激効果の差異

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

第 130 回日本薬理学会関東部会

平成 26 年 7 月 5 日、星薬科大学（東京都）

村田麻美、森友久、佐伯朋哉、岩田典之、芝崎真裕、鈴木勉、薬物依存に関する研究：  
Methamphetamine および morphine 誘発行動変化における部位特異的なモノアミン神経系の関与

アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会

平成 26 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜（神奈川県）

岩瀬祥之、森友久、中村美聖、肥田野翔芝崎真裕、増川太輝、東山公男、五嶋良郎、鈴木勉、  
DOPA の methamphetamine 誘発報酬効果形成における関与

第 37 回日本神経科学大会

平成 26 年 9 月 12 日パシフィコ横浜（神奈川県）

鵜澤直生、森友久、岩瀬祥之、平山重人、増川太輝、マハルディアン ラハマディ、外園真由  
奈、芝崎真裕、鈴木勉、オレキシン欠損マウスにおけるナルコレプシー様作用に対する 5-HT<sub>1A</sub>  
受容体作動薬の効果

第 88 回日本薬理学会年会

平成 27 年 3 月 18 日、名古屋国際会議場（愛知県）

小林実奈代、森友久、大屋順平、三塚有莉、Teruo Hayashi、Tsun-Ping Su、鈴木勉、Staurosporine  
誘発アポトーシスに対する Sigma-1 receptor の細胞保護作用における Bcl-2 と caspase-3 の関与

第 88 回日本薬理学会年会

平成 27 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知県）

鈴木勉、森友久、芝崎真裕、池上大悟、葛巻直子、成田年、薬物依存の研究（第 500 報）：2 系  
統の近交系ラットを使用したマイクロエンドフェノタイプ解析による覚せい剤の報酬効果獲得機  
構の探索：次世代型“依存研究”に寄せて

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

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）分担  
研究年度終了報告書

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。前年度までに、DAT-KO マウスが多動および学習障害を示すことを見出し、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を見出した。そこで平成 26 年度は、これらの異常やメチルフェニデート効果を発達期において検討し、DAT-KO マウスが生後 2 週齢から既に多動を示すことを見出すとともに、メチルフェニデートの効果は生後 20 週齢以降に顕著になることを見出した。また、脳内自己刺激によりメチルフェニデートの報酬系における役割を解析した結果、メチルフェニデートが自己刺激頻度を高めること、DAT-KO も自己刺激頻度を高めることを見出した。メチルフェニデート摂取によっても DAT-KO によっても細胞外ドーパミン量が上昇することから、細胞外ドーパミン量の上昇が脳内自己刺激の報酬効果を強めると考えられた。

## 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。従来の我々の研究により、DAT-KO マウスが顕著な多動や学習障害を示すこと、これらの異常をメチルフェニデートが緩和することを見出している。そこで、今年度は、これらの異常が生後いつ現れるのか、また、メチルフェニデートが発達初期から効果を発揮するのかを検討した。さらに、メチルフェニデートおよび DAT-KO が報酬系に与える影響を明らかにするため、脳内自己刺激試験を行った。

## 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。

### 活動量測定

室町機械社製のスーパーメックスを用いた。生後 2 週齢から 20 週齢までのマウスを用い、測定ケージ内で 60 分間、または 30 分間活動量を測定した後生理食塩水、メチルフェニデートあるいはアトモキセチンを投与しさらに 3 時間活動量を測定した。

### 脳内自己刺激試験

十分に麻酔を施した 10-11 週齢のマウスを脳定位固定装置に固定し、刺激電極を内側前脳束(外側視床下部: Bregma を基点に、A-P: -0.9mm, M-L: 1.3mm, D-V: 5.0mm)に刺入して歯科用セメントで固定した。手術後の回復期間は 1 週間以上とした。能動的行動を指標とするヘッドディッピング式の脳内自己刺激試験装置を用いた。二相性矩形パルス発生装置を用いて正負の 0.5 ms 矩形パルス (0.5ms 間隔) が発生するように設定し、1 回のヘッドディッピングごとに、100 mA、100Hz、200 ms の一連の矩形パルスが与えられた。

### 試薬

塩酸メチルフェニデート (シグマ)、アトモキセチン (LKT) を用いた。それぞれの用量は、15 または 30 mg/kg、20 mg/kg とした。

(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

DAT-KO マウスは、生後 2 週齢において既に顕著な多動を示した (図 1)。

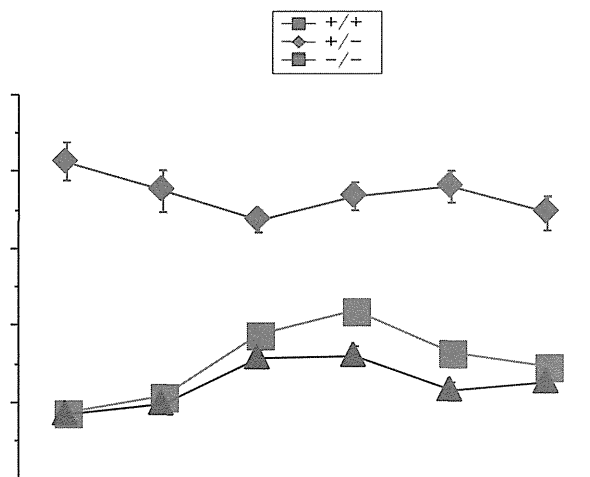


図 1 : 発達初期からの DAT-KO マウスの多動

発達初期の DAT-KO マウスの多動はメチルフェニデートによって抑制されず、メチルフェニデートの効果は生後 20 週齢以降に認められた。

脳内自己刺激試験において、DAT-KO マウスは自己刺激頻度の増加を示した。さらに、プログレッシブレイシヨースケジュールによって電気刺激報酬への固執を調べた結果、顕著な固執を示した (図 2)。

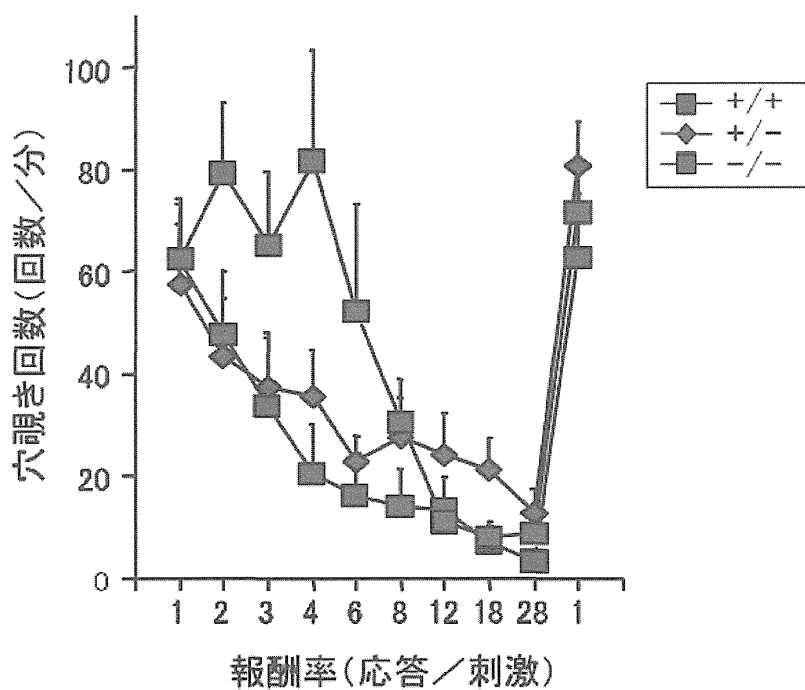


図 2: DAT-KO マウスにおける報酬への固執

図 2 : DAT-KO マウスにおける報酬への固執

一方野生型マウスでは、15 mg/kg のメチルフェニデートを投与した後に脳内自己刺激試験を行ったところ、30-40 分後に脳内自己刺激頻度がわずかに上昇した(n = 7)。30 mg/kg のメチルフェニデートを投与した後に脳内自己刺激試験を行った場合、投与の 10-40 分後の間は自己刺激頻度が減少し、40 分以降は計測した 100 分後まで高い刺激頻度が維持された(n = 7)。投与後 10-40 分には、装置内での行動量の増加および異常行動が観察された(図 3)。

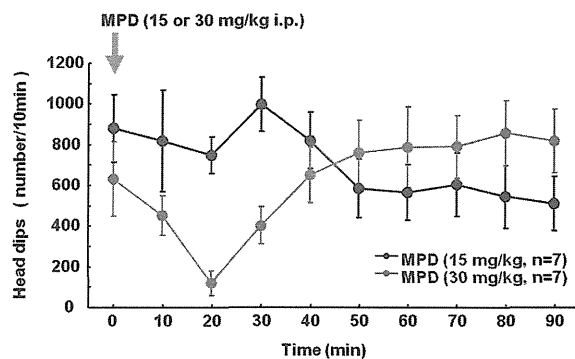


図 3 : メチルフェニデートの自己刺激への影響

メチルフェニデートの重要な脳内標的である DAT を欠損させると、発達初期から顕著な多動を示すことが明らかとなり、DAT が発達初期においても重要な行動制御分子であることが示唆される。ただし、メチルフェニデートは発達初期においては多動に対して有意な効果を示さないことから、メチルフェニデート感受性は発達後期に出現すると考えられる。

脳内自己刺激試験の結果、メチルフェニデートおよび DAT-KO により、脳内自己刺激頻度が上昇することが明らかとなり、メチルフェニデートが DAT を阻害することにより、報酬への固執が強まることが示唆された。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### (1) 原著

1. Aoki Y, Nishizawa D, Hasegawa J, Kasai S, Yoshida K, Koukita Y, Ichinohe T, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Hayashida M, Fukuda K, \*Ikeda K (2015) Association between the rs1465040 single-nucleotide polymorphism close to the transient receptor potential subfamily C member 3 (TRPC3) gene and postoperative analgesic requirements. *J Pharmacol Sci* 127:391-393. doi: 10.1016/j.jphs.2015.02.005. 査読有
2. Igari M, Shen HW, Hagino Y, Fukushima S, Kasahara Y, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, Uhl GR, Ikeda K, Yaegashi N, Sora I (2015) Attenuated methamphetamine-induced locomotor sensitization in serotonin transporter knockout mice is restored by serotonin 1B receptor antagonist treatment. *Behav Pharmacol* 26:167-179. doi: 10.1097/FBP.000000000000120. 査読有
3. \*Ogai Y, Senoo E, Chin Gardner F, Haraguchi A, Saito T, Morita N, Ikeda K (2015) Association between experience of maltreatment and severity of drug addiction measured by the



- Addiction Severity Index among Japanese drug-dependent patients. *Int J Environ Res Public Health* 12:2781-2792. 査読有 doi: 10.3390/ijerph120302781.
4. Yoshida K, Nishizawa D, Ichinomiya T, Ichinohe T, Hayashida M, Fukuda K, \*Ikeda K (2015) Prediction formulas for individual opioid analgesic requirements based on genetic polymorphism analyses. *PLoS ONE* 10:e0116885. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0116885.
  5. Hagino Y, Kasai S, Fujita M, Setogawa S, Yamaura H, Yanagihara D, Hashimoto M, Kobayashi K, Meltzer HY, \*Ikeda K (2015) Involvement of cholinergic system in hyperactivity in dopamine-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 40:1141-1150. 査読有 doi: 10.1038/npp.2014.295.
  6. Ide S, Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Hayashida M, Minami M, \*Ikeda K (2014) Haplotypes of P2RX7 gene polymorphisms are associated with both cold pain sensitivity and analgesic effect of fentanyl. *Mol Pain* 10:75. 査読有 doi: 10.1186/1744-8069-10-75.
  7. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, \*Ikeda K (2014) Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci* 126:253-263. 査読有 doi: 10.1254/jphs.14189FP.
  8. \*Iwahashi K, \*Nishizawa D, Narita S, Numajiri M, Murayama O, Yoshihara E, Onozawa Y, Nagahori K, Fukamauchi F, Ikeda K, Ishigooka J (2014) Haplotype analysis of GSK-3beta gene polymorphisms in bipolar disorder lithium responders and non-responders. *Clin Neuropharmacol* 37:108-110. 査読有 doi: 10.1097/WNF.0000000000000039.
  9. Koga M, Nakamoto Y, Nakamura K, Ikeda K, \*Yoshii M, Kawana S (2014) Stress sensitivity in patients with atopic dermatitis in relation to the translocator protein 18 kDa (TSPO). *J Nippon Med Sch* 81(3):148-156. 査読有 doi: 10.1272/jnms.81.148.
  10. Aoki Y, Yoshida K, Nishizawa D, Kasai S, Ichinohe T, \*Ikeda K, Fukuda K (2014) Factors that affect intravenous patient-controlled analgesia for postoperative pain following orthognathic surgery for mandibular prognathism. *PLoS ONE* 9:e98548. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0098548.
  11. Nishizawa D, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Yano-Umeda S, Takeda M, \*Ikeda K (2014) Association between genetic polymorphism rs2952768, close to the *METTL21A* and *CREB1* genes, and intellectual ability in healthy subjects. *J Addict Res Ther* doi: 10.4172/2155-6105.1000178. 査読有
  12. 成田心, 永堀健太, 西澤大輔, 吉原英児, 川合厚子, 村山洋, 池田和隆, \*岩橋和彦 (2014) /

ルエピネフリントランスポーター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* 49(6):330-339. 査読有

## (2) 総説

1. 宮田久嗣, 樋口進, 廣中直行, 池田和隆, 伊豫雅臣, 小宮山徳太郎, 松本俊彦, 鈴木勉, 高田孝二, 和田清, 齋藤利和 (2014) 物質関連障害および嗜癖性障害群. *精神神経学雑誌* 116(11):950-954. 査読無
2. 佐藤敦志, 池田和隆 (2014) mTOR. *分子精神医学* 14(4):50-51. 査読無
3. 西澤大輔, \*池田和隆 (2014) 多様な依存性物質の作用に共通して影響する遺伝子多型. *日本アルコール・薬物医学会雑誌* 49:83-91. 査読無
4. 笠井慎也, 西澤大輔, 長谷川準子, 佐藤直美, 谷岡書彦, 梶村春彦, \*池田和隆 (2014) 喫煙行動と相関するオピオイド受容体関連遺伝子多型の解析. *日本神経精神薬理学会雑誌* 34:53-54. 査読無
5. 佐藤敦志, 笠井慎也, 小林敏之, 高松幸雄, 樋野興夫, \*池田和隆, 水口雅 (2014) 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動における mTOR シグナル系の関与. *日本神経精神薬理学雑誌* 34:51-52. 査読無

## (3) 著書、訳書

1. 西澤大輔, 池田和隆 (2014) 痛みと遺伝子多型. In: 痛みのマネジメント update—基礎知識から緩和ケアまで—日本医師会雑誌 第 143 巻・特別号(1) (花岡一雄・田中栄監修・編集, 小川節郎・紺野慎一・下山直人・山本隆充編集), ppS46-S47. 東京: 日本医師会.
2. 池田和隆 (2014) 病態生理 1.神経科学. In: 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 83/精神 9 アルコール依存症(齋藤利和編), pp44-50. 大阪: 最新医学社.

## (4) 研究報告書

1. 池田和隆 (2014) 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 年度総括研究報告書 (主任研究者: 鈴木勉):19-26.
2. 学会発表

### (1) 招待講演

1. \*池田和隆 (2014) 歯科とゲノム医療. 第 4 回臨床ゲノム医療学会“東京水道橋大会”, 東京

[2014/11/30].

2. \*池田和隆 (2014) 依存性物質の作用機序解明と医療応用. 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
3. \*Ikeda K, Hagino Y, Kasai S, Yamamoto H (2014) Involvement of NMDA receptor GluN2D subunit in phencyclidine effects. ISAM2014, 横浜 [2014/10/03].
4. \*池田和隆 (2014) Genomic mechanisms underlying individual differences in sensitivity to pain and opioids. 第 8 回都医学研国際シンポジウムー痛みの調節とオピオイド機能ー, 東京 [2014/09/05].
5. \*Ikeda K, Nishizawa D, Hayashida M, Fukuda K (2014) Personalized pain control. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Soul, Korea [2014/06/20].

## (2) その他

1. \*笠井慎也, 萩野洋子, 池田和隆 (2015) 疾患モデルとしてのマウスとドーパミン関連遺伝子改変マウスの解析. 第 10 回日本統合失調症学会, 東京 [2015/03/27].
2. \*池田和隆 (2015) 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 26 年度研究成果報告会, 東京 [2015/03/05].
3. \*Sora I, Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kasahara Y, Ikeda K, Hall FS, Uhl GR, Watanabe M, Kawashima R (2014) Specific regions display altered grey matter volume in mu-opioid receptor knockout mice: mri voxel-based morphometry. The 53rd Annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology (ACNP 53rd Annual Meeting), Phoenix, USA [2014/12/07-11].
4. \*池田和隆 (2014) アジアにおける神経精神薬理学の発展と日本への波及効果. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/22].
5. \*永堀健太, 岩橋和彦, 成田心, 沼尻真貴, 吉原英児, 西澤大輔, 池田和隆, 石郷岡純 (2014) GSK3beta 遺伝子多型と若年者の喫煙習慣との関連. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
6. \*成田心, 岩橋和彦, 永堀健太, 吉原英児, 西澤大輔, 川合厚子, 池田和隆, 石郷岡純 (2014) ノルエピネフリントランスポーター遺伝子多型とアルコール依存症との関連研究. 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
7. \*萩野洋子, 笠井慎也, 藤田雅代, 瀬戸川将, 山浦洋, 柳原大, 橋本款, 小林和人, 池田和隆 (2014) ドーパミン欠損マウスの多動におけるアセチルコリン神経の関与. 第 24 回日本臨

- 床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
8. \*藤田雅代, 萩野洋子, 笠井慎也, 橋本款, 小林和人, 池田和隆 (2014) ドーパミン欠乏マウスモデルを用いたドーパミン非存在下の運動亢進メカニズムの解析. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
  9. \*長澤セーラ幸恵, 高松幸雄, 佐藤敦志, 柏井洋文, 久保有美子, 水口雅, 曾良一郎, 池田和隆 (2014) ドーパミントランスポーター欠損マウスにおけるメチルフェニデートとアトモキセチンの週齢別効果. 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋 [2014/11/21].
  10. \*Kubo Y, Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Takamatsu Y, Ikeda K, Uhl GR, Sora I, Tomita H (2014) Differences in responsiveness between methamphetamine, nisoxetine and methylphenidate may reflect specific developmental characteristics in juvenile DAT KO mice. Society for Neuroscience 2014, Washington DC, USA [2014/11/15-19].
  11. \*Nishizawa D, Kobayashi D, Takasaki Y, Kasai S, Aoki Y, Hasegawa J, Kakizawa T, Ikeda K, Fukuda K (2014) Genome-wide association study of sensory disturbances in the inferior alveolar nerve after bilateral sagittal split ramus osteotomy. The American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, San Diego, USA [2014/10/19]
  12. \*Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Umeno M, Sakakibara S, Kadowaki A, Saito T, Morita N, Ikeda K (2014) Prediction of relapse using implicit association test to Japanese alcohol dependence inpatients. ISAM2014, 横浜 [2014/10/06].
  13. \*Sugaya N, Ogai Y, Aikawa Y, Yumoto Y, Takahama M, Tanaka M, Haraguchi A, Umeno M, Ikeda K (2014) A randomized and rater-blinded study of the effect of ifenprodil on alcohol reuse in patients with alcohol dependence. ISAM2014, 横浜 [2014/10/06].
  14. \*西澤大輔, 笠井慎也, 佐藤直美, 谷岡書彦, 長島誠, 氏家寛, 橋本亮太, 田中雅嗣, 梶村春彦, 池田和隆 (2014) ゲノムワイド関連解析によるオレキシン2受容体遺伝子多型 Val308Ile とニコチン依存との関連の同定. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
  15. \*笠井慎也, 梶村春彦, 池田和隆 (2014) ニコチン依存脆弱性に影響を及ぼすオピオイド受容体関連遺伝子. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会, 横浜 [2014/10/03].
  16. \*Yamamoto H, Kamegaya E, Hagino Y, Takamatsu Y, Mishina M, Yamamoto T, Ikeda K (2014) Genetic deprivation of GluN2D subunit induced impairments of emotion and social recognition. 第57回日本神経化学会, 奈良 [2014/09/30].

17. \*久保有美子, 笠原好之, 富田博秋, 有銘預世布, 高松幸雄, 池田和隆, 曾良一郎 (2014) メチルフェニデートによるドーパミントランスポーター欠損マウスのADHD様行動の改善は発達段階によって異なる. 第37回日本神経科学大会, 横浜 [2014/09/13].
18. \*大谷保和, 合川勇三, 湯本洋介, 梅野充, 榊原聡, 門脇亜理紗, 斎藤環, 森田展彰, 池田和隆 (2014) アルコール依存症入院患者における潜在的態度と退院後再飲酒との関連. 日本心理学会第78回大会, 京都 [2014/09/11].
19. \*吉田香織, 西澤大輔, 高北義彦, 長谷川準子, 笠井慎也, 青木謙典, 一戸達也, 福田謙一, 池田和隆 (2014) 鎮痛関連遺伝子多型の情報に基づく術後24時間内フェンタニル投与量の個別化. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
20. \*天野功二郎, 吉田香織, 西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆 (2014) 遺伝子多型判定に基づくオピオイド必要量予測式の応用性の検証. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
21. \*村岡渡, 西澤大輔, 長谷川準子, 笠井慎也, 和嶋浩一, 中川種昭, 福田謙一, 池田和隆 (2014) 外科的顎矯正手術におけるUGT2B7遺伝子多型とフェンタニル薬剤感受性の関連について. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
22. \*曾良一郎, 佐々木一益, 住吉晃, 野中博意, 笠原好之, 池田和隆, 渡辺雅彦, 川島隆太 (2014) MRI画像解析によるmuオピオイド受容体欠損マウスの大脳灰白質体積の変化. 第34回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム(JNRC2014), 東京 [2014/09/06].
23. \*Yamawaki S, Hashimoto H, Ikeda K, Kato T, Kanba S, Ozaki N, Kusumi I (2014) A view on the new nomenclature from the perspective of the drugs developed in Japan. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/25].
24. \*Uno K, Nishizawa D, Seo S, Sasaki N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A (2014) PCLO SNP rs13438494 regulates DA and 5-HT uptake, accompanied with splicing efficiency and dependence-like behaviors in genomic association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/24].
25. \*Sato A, Takamatsu Y, Kasai S, Kobayashi T, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M (2014) Mouse models of tuberous sclerosis complex show autism-related behavioral deficits severer in Tsc2 than Tsc1 haploinsufficiency. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/24].
26. \*Kasai S, Ikeda K (2014) Reduced supraspinal nociceptive responses and distinct gene expression profile in CXBH recombinant inbred mice. 29th CINP World Congress of

- Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/23].
27. \*Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Nagashima M, Ujike H, Hashimoto R, Tanaka M, Sugimura H, Ikeda K (2014) Associations of an orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism with nicotine dependence found in genome-wide and following association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Vancouver, Canada [2014/06/23].
  28. \*Amano K, Yoshida K, Nishizawa D, Fukuda K, Hayashida M, Ikeda K (2014) Applicability of calculation formulas for opioid requirement estimation based on genetic polymorphisms. 2014 YONSEI BK21 PLUS-CBSM International Joint Symposium, Andong, Korea [2014/06/21].
  29. \*Hua J, Takamatsu Y, Ikeda K (2014) Altered reward system in dopamine transporter knock-out mice, a model for attention deficit/hyperactivity disorder. 2014 YONSEI BK21 PLUS-CBSM International Joint Symposium, Andong, Korea [2014/06/21].
  30. \*Amano K, Yoshida K, Nishizawa D, Fukuda K, Hayashida M, Ikeda K (2014) Applicability of calculation formulas for opioid requirement estimation based on genetic polymorphisms. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Seoul, Korea [2014/06/19-20].
  31. \*Hua J, Takamatsu Y, Ikeda K (2014) Altered reward system in dopamine transporter knock-out mice, a model for attention deficit/hyperactivity disorder. 2014 YONSEI BK21 PLUS-IGAKUKEN Joint Symposium, Seoul, Korea [2014/06/19-20].
  32. \*住谷昌彦, 西澤大輔, 池田和隆, 山田芳嗣, 厚生労働省 TR-Cancer Pain 研究班 (2014) がん性疼痛に対するオピオイド鎮痛薬感受性には GABA transaminase 遺伝子多型が関与する. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, 横浜 [2014/05/15-17].

E. 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

## 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、危険ハーブをはじめ、乱用や健康被害が報告されている危険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。特に危険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。危険ドラッグに含まれる合成カンナビノイドは、CB1 受容体に結合し、多幸感などを引き起こす。また CB1 受容体は、覚せい剤 (methamphetamine: METH) による精神依存の調節因子の一つとして報告されている。一方現在までに、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。さらに、昨年度までの報告において、lipopolysaccharide (LPS) による免疫系の活性化により覚せい剤の精神依存を抑制することを明らかにしている。そこで本研究では、薬物依存症ならびに LPS 処置による内因性カンナビノイド系の変化について検討した。まず、内因性カンナビノイド系との関連性を明らかにする目的で、LPS を連続処置したマウスの側坐核領域を用いて [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay を行った。その結果、内因性カンナビノイドである 2-AG による G 蛋白質活性は LPS を処置した群において対照群に比べ有意に増加した。また、METH による報酬効果の形成は 2-AG の脳室内前処置により有意に抑制された。現在までに 2-AG は 7 回膜貫通型受容体である GPR55 に高い親和性を有することが報告されている。また、昨年度までの報告において METH 誘発報酬効果の形成に tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が関与することを明らかにしている。そこで、GPR55 の作動薬である AM251 あるいは LPS を処置したマウスの側坐核における TIMP1 mRNA を測定した。その結果、AM251 あるいは LPS を処置したマウスの側坐核領域では対照群に比べ TIMP1 mRNA の有意な増加が認められた。以上本研究の結果より、METH による依存形成に、GPR55 を介した内因性カンナビノイド系が関与し、GPR55 が治療標的になる可能性が示唆された。

## A. 研究目的

近年、危険ハーブをはじめ、乱用や健康被害が報告されている危険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。特に危険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、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。

危険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 (CB) 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変化が誘導されることが知られているが<sup>1,2)</sup>、その調節因子の一つとしてカンナビノイド受容体が報告されている。したがって、METH の精神依存に CB 受容体は密接に関わると推測される。

一般に、CB1 受容体は神経細胞に多く分布するのに対し、CB2 受容体は、マクロファージなどの免疫細胞に非常に多く分布することが報告されている。CB1 受容体作動薬は精神症状を惹起することから、合成カンナビノイドによる多幸感、CB1 受容体を介すると考えられている。一方、昨年度までの報告において、lipopolysaccharide (LPS) ならびに内因性カンナビノイドである 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) を処置することにより、METH 誘発報酬効果が抑制されることを報告している。LPS は免疫細胞を活性化することから、免疫細胞に存在する CB2 受容体を変化させ、METH 誘発報酬効果を抑制した可能性が考えられる。すなわち、内因性カンナビノイド系を制御することが薬物依存症の治療に繋がる可能性が考えられるが、未だ明らかとなっていない。さらに、2-AG は CB1 および CB2 受容体の他に GPR55 にも作用しすることが報告されている。特に、2-AG は GPR55 に対し強く作用することが報告されている<sup>3)</sup>。また、GPR55 はミクログリアにも存在することが報告されているが、神経保護作用を示唆する報告も成されており、薬物依存治療の標的となる可能性が考えられる。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、LPS による METH 誘発報酬効果抑制作用機序について GPR55 受容体およびその情報伝達系の変化を中心に検討した。

## B. 研究方法

### 1. 使用動物

実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウスを使用した。マウスは恒温室 (22±1℃) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取とした。

### 2. 報酬効果の測定

METH による報酬効果は conditioned place preference (CPP) 法を用いて評価した。実験装置は幅 15 cm、長さ 30 cm、高さ 15 cm の白および黒からなる 2-compartment box を使用した。Box は仕切り版によって 2 つの区画に分けられており、それぞれ白側の区画は凹凸のある床で、黒側の区画は平面の床で構成されている。条件づけはプレ方式に従って行った。条件



づけを行う前日に、薬物あるいは溶媒のいずれも処置せずに box 中央に設置したプラットホームにマウスをのせ、プラットホームを降りた時点より 900 秒間、白および黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画における滞在時間を infrared beam sensor (KN-80, 株式会社夏目製作所、東京) で測定し、これを pre-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (1 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間閉じ込め、2 日目には溶媒を投与し、もう一方の区画に 60 分間閉じ込める操作を行った。溶媒のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。この一連の操作を 1 session とし、合計 3 sessions 行った。6 日目の条件づけが終了した翌日に post-test を行い、pre-test と同様にそれぞれの box における滞在時間を測定し、試験時における薬物処置区画への滞在時間と溶媒処置区画への滞在時間との差をスコア (sec) として算出し、報酬効果の指標とした。

### 3. [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay 法

薬物を処置したマウスの全脳を摘出し、limbic forebrain 領域を分画し、20 倍量 (w/v) の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl<sub>2</sub> および 1 mM EGTA を含む ice-cold Tris-Mg<sup>2+</sup> buffer を加え、Teflon pestle 付きの Potter-Elvehjem tissue grinder (Brandel, Inc., 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。得られた沈査は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EGTA および 100 mM NaCl を含む [<sup>35</sup>S]GTPγS 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。最終沈査に [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay buffer を加え再懸濁し、-70 °C で保存した。

膜ホモジネート (3-8 μg protein/assay) は 1 nM-1 μM の 2-AG と、30 μM guanosine-5'-diphosphate (GDP) および 50 pM [<sup>35</sup>S]GTPγS (Amersham Pharmacia Biotech, IL, USA) を含む 1 mL の assay buffer 中にて、2 時間 25 °C でインキュベーションを行った。その後、膜ホモジネートを Brandel cell harvester (Brandel, Inc.) を使用し、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) および 5 mM MgCl<sub>2</sub> に 2 時間 4 °C で浸した Whatman GF/B glass filter (Brandel, Inc., MD, USA) を用いて濾過した。Filter は 5 mL の ice-cold Tris-HCl buffer (pH 7.4) にて 3 回洗浄した後、シンチレーションカクテルを含む scintillation counting vial (Packard Instrument Company) に移し、12 時間室温にてインキュベーションを行った。膜標本の放射活性は液体シンチレーションカウンター (Packard Instrument Company) で測定し、非特異的結合は非放射性的の 10 μM GTPγS を共存させることにより測定した。

### 4. Real time RT-PCR 法

薬物を処置したマウスの側坐核により、SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA) を用いて total RNA を抽出した。First standard cDNA 作成のために、抽出した total RNA を oligo (dt)12-18 および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水と共に 70 °C で 10 分間インキュベーションした。その後、氷上で 2 分間急冷し、このサンプルに RT buffer 10mL、0.1 M DTT 10mL、25 mM MgCl<sub>2</sub> 10mL、10 mM dNTP mix 1mL (以上全て Invitrogen, CA, USA) を加え、70 °C で 5 分間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、逆転写酵素である reverse transcriptase II (RT II; Invitrogen, CA, USA) 1mL を加え、42 °C で 45 分間および 70 °C で 5 分間のインキュベーションをそれぞれ行った。PCR は TIMP-1 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  $\Delta\Delta\text{CT}$  法に従い解析した。

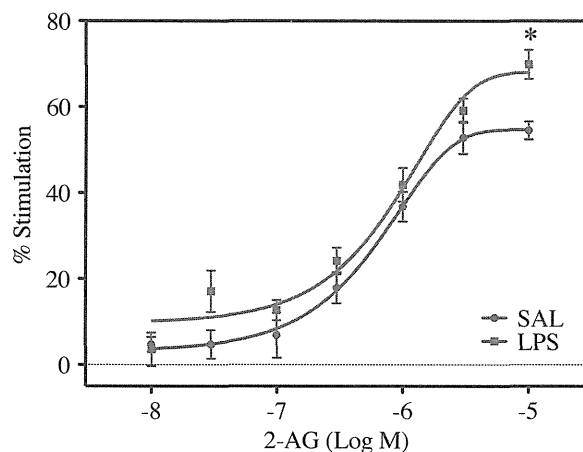


Fig. 1 Up-regulation of the cannabinoid receptor function to activate G-proteins in the mouse limbic forebrain with LPS treatment. 2-AG (1 nM-10  $\mu\text{M}$ ) produced a concentration-dependent increase in [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  binding to limbic forebrain membranes from both saline- and LPS-treated mice. The data are shown as the percentage of basal [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  (50 pM) binding measured in the presence of GDP (30 pM) and absence of 2-AG.

## 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 脳内 limbic forebrain 領域における cannabinoid 受容体の変化

LPS を処置したマウスの側坐核を含む limbic forebrain 領域における cannabinoid 受容体機能の変化について検討する目的で、[ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma\text{S}$  binding assay を行った。その結果、LPS を処置したマウスの limbic forebrain 領域において、cannabinoid 受容体作動薬である 2-AG 誘発 G 蛋白質活性化作用は、対照群に比べ有意に増加し

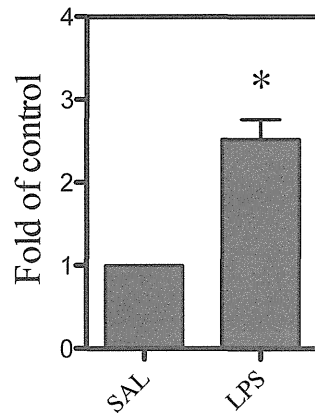


Fig. 2 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1 mg/kg, i.p.). \* $<0.05$  vs. saline (SAL)-treated groups.

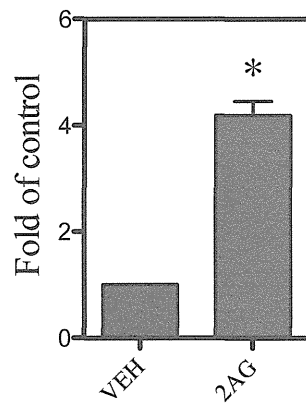


Fig. 3 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) in the limbic forebrain of mice after treatment with 2-AG (10 nmol/mouse, i.c.v.). \* $<0.05$  vs. vehicle (VEH)-treated groups.

た (Fig. 1)。

**2. LPS, 2-AG および AM251 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**

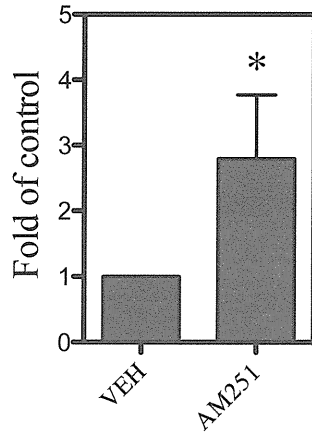


Fig. 4 Changes in mRNA levels of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) in the limbic forebrain of mice after treatment with AM251 (10 nmol/mouse, i.c.v.). \* $<0.05$  vs. vehicle (VEH)-treated groups.

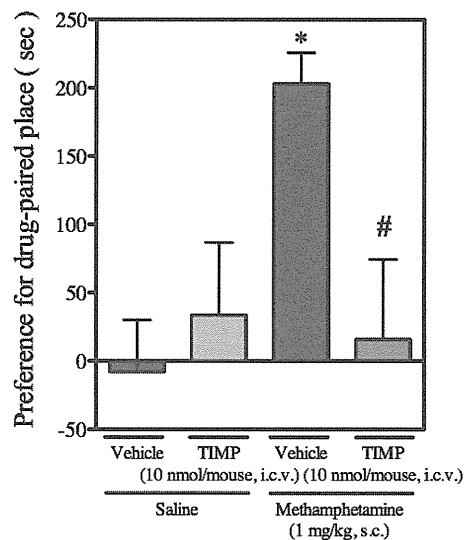


Fig. 5 Effect of TIMP1 recombinant protein (10 nmol/mouse, i.c.v.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects in mice. \*\* $<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. each groups.

現在までに、METH 誘発逆耐性および報酬効果に MMP2 が関与することが報告されている<sup>5)</sup>。一方、CB2 受容体を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている<sup>6)</sup>。そこで TIMP1 の変化について検討したところ、LPS および 2-AG 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められた (Fig. 2 and 3)。さらに、GPR55 の agonist である AM251 を用いて同様の検討を行ったところ、AM251 の処置により TIMP1 mRNA の有意な増加が認められた (Fig. 4)。

### 3. TIMP1 による METH 誘発報酬効果の抑制作用