METH 誘発報酬効果に対する TIMP1 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 により有意な報酬効果の形成が認められたのに対し、この報酬効果は TIMP1 リコンビナントプロテインを処置することにより有意に抑制された (Fig. 5)。

D. 考察

本研究結果より、LPS は limbic forebrain 領域における CB 受容体機能の活性化を引き起こし、TIMP1 を介して METH 誘発報酬効果を抑制する可能性が示唆された。さらに、GPR55 の agonist である AM251 の処置により TIMP1 mRNA の増加が認められた。GPR55 は Gα13 蛋白質を介し、p38 経路を活性化することが知られている[4]。したがって、LPS により GPR55 の活性化が促進され、Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) の増加が引き起こされると考えられる。

現在までに、METH 誘発報酬効果において、matrix metalloproteinases (MMPs) が関与することが報告されている[5]。MMPs は細胞外マトリックスの分解や、細胞表面に発現する蛋白質の分解、生理活性物質のプロセシングを行うことが知られており、いわゆる神経の可塑的変化に深く関わると考えられている。TIMP1 は、MMPs を阻害することから[6]、GPR55 を介した TIMP1 の増加が、MMP を抑制し、METH 誘発報酬効果を抑制した可能性が考えられる。また、GPR55 はミクログリアにも存在することが報告されており、また、神経保護作用を有することが報告されている[7]。したがって、LPS はミクログリアを介し、GPR55 受容体の機能亢進を引き起こし、TIMP1 の産生亢進を促し、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標的として、内因性カンナビノイド、特に GPR55 受容体を介する経路が有効である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) Br J Pharmacol. 2007 Dec;152(7):1092-101. Epub 2007 Sep 17. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Ryberg E1, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ.
4) Pineiro R, Maffucci T, Falasca M. 2011. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. Oncogene 30:142–152.
5) J Neurochem. 2007 Sep;102(5):1548-60. Epub 2007 May 1. Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. Mizoguchi H1, Yamada K, Mouri A, Niwa M, Mizuno T, Noda Y, Nitta A, Itohara S, Banno Y, Nabeshima T.
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) Glia. 2013 Nov;61(11):1822-31. doi: 10.1002/glia.22560. Epub 2013 Sep 3. The G protein-coupled receptor 55 ligand l-α-lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. Kallendrusch S1, Kremzow S, Nowicki M, Grabiec U, Winkelmann R, Benz A, Kraft R, Bechmann I, Dehghani F, Koch M.

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表
1. 論文発表

1. Chiba, N., Aiuchi, T., Suzuki, T., Mori, T., Shibasaki, M., Kawahito, Y. and Shioda, S.: Comparison of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory/Analgesic Effects of Essential Oils in Experimental Animal Models. Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci. 7, 63-70 (2014)
2. Funada, M., Mori, T., Maeda, J., Tsuda, Y., Komiya, S., Shimizu, N., Kamei, J. and 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 742, 89-93 (2014)
3. Hiroshima, Y., Miyamoto, H., Nakamura, F., Masukawa, D., Yamamoto, T., Muraoka, H., Kamiya, M., Yamashita, N., Suzuki, T., Matsuzaki, S., Endo, I. and Goshima, Y.: The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitarii. British Journal of Pharmacology 171, 403-14 (2014)
4. Ise, Y., Mori, T., Katayama, S., Suzuki, T. and Wang, T.C.: Genetic background influences nicotine-induced conditioned place preference and place aversion in mice. Journal of Nippon Medical School 81, 53-6 (2014)
5. 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 580, 119-24 (2014)
6. 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)
7. Mori, T., Funada, M., Tsuda, Y., Maeda, J., Uchida, M. and Suzuki, T.: Dopaminergic hyperactivity accompanied by hyperlocomotion in C57BL/6J-bg(J)/bg(J) (beige-J) mice. J Pharmacol Sci 125, 233-6 (2014)
8. Mori, T., Kanbara, T., Harumiya, M., Iwase, Y., Masumoto, A., Komiya, S., Nakamura, A., Shibasaki, M., Kanemasa, T., Sakaguchi, G. and Suzuki, T.: Establishment of Opioid-Induced Rewarding Effects Under Oxaliplatin- and Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats. J Pharmacol Sci 126, 47-55 (2014)
9. Mori, T., Komiya, S., Ohya, J., Uzawa, N., Sugiyama, K., Saitoh, Y., Shibasaki, M. and Suzuki, T.: Involvement of 5-HT2 receptors in the expression of withdrawal diarrhea in morphine-dependent mice. Eur J Pharmacol 740, 160-7 (2014)
10. Mori, T., Rahmadi, M., Yoshizawa, K., Itoh, T., Shibasaki, M. and Suzuki, T.: Inhibitory effects of SA4503 on the rewarding effects of abused drugs. Addiction Biology 19, 362-9 (2014)
11. Mori, T., Uzawa, N., Kazawa, H., Watanabe, H., Mochizuki, A., Shibasaki, M., Yoshizawa, K.,

Higashiyama, K. and Suzuki, T.: Differential substitution for the discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and methylphenidate in rats. J Pharmacol Exp Ther 350, 403-11 (2014)

12. 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. and Hasegawa, M.: G protein-gated inwardly rectifying potassium (KIR3) channels play a primary role in the antinociceptive effect of oxycodone, but not morphine, at supraspinal sites. British Journal of Pharmacology 171, 253-64 (2014)
13. Shibasaki, M., Ishii, K., Masukawa, D., Ando, K., Ikekubo, Y., Ishikawa, Y., Shibasaki, Y., Mori, T. and Suzuki, T.: Implication of mGlu5 receptor in the enhancement of morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem. Eur J Pharmacol 738, 360-7 (2014)
14. Shibasaki, M., Tsuyuki, T., Ando, K., Otokozawa, A., Udagawa, Y., Watanabe, K., Shibasaki, Y., Mori, T. and Suzuki, T.: Implication of KCC2 in the sensitization to morphine by chronic ethanol treatment in mice. Synapse 68, 39-43 (2014)
15. Mori, T., Itoh, T., Yoshizawa, K., Ise, Y., Mizuo, K., Saeki, T., Komiya, S., Masukawa, D., Shibasaki, M. and Suzuki, T.: Involvement of μ- and δ-opioid receptor function in the rewarding effect of (+/-)-pentazocine. Addict Biol, (in press)

総説

1. 鈴木　勉：オピオイド鎮痛薬のやくりがく No.15 オピオイド鎮痛薬の中止による退薬症候. Pharma Tribune, 62, 20, 2014
2. 鈴木　勉：オピオイド鎮痛薬のやくりがく No.16 アルコールの豆知識とオピオイド受容体との関連. Pharma Tribune, 64, 34-35, 2014
3. 鈴木　勉：オピオイド鎮痛薬のやくりがく No.17 アルコールがオピオイド鎮痛薬の効果に及ぼす影響. Pharma Tribune, 67, 12-13, 2014
4. 鈴木　勉：オピオイド鎮痛薬のやくりがく No.18 オピオイド鎮痛薬の鎮痛耐性とその機序. Pharma Tribune, 68, 30-31, 2014
5. 国分秀也、富安志郎、丹田　滋、上園保仁、加賀谷　肇、鈴木　勉、的場元弘: メサドンの臨床薬物動態. Palliative Care Research, 9, 301-311, 2014
6. 鈴木　勉: オピオイドの副作用対策−退薬症候の評価と対策−, Locomotive Pain Frontier, 3, 50-51, 2014
7. 鈴木　勉: 痛みに対して用いられる薬剤(全体的な概略). レジデント, 7, 23-32, 2014

2. 学会発表

国際学会

1. Tsutomu Suzuki, Daisuke Aikawa, Asuka Takanohashi, Tomoya Saeki, Masahiro Shibasaki, and Tomohisa Mori、Genetic background influences the change from the discriminative stimulus to the rewarding effects of psychostimulants in rats、College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 76th Annual Meeting, 2014, June 14-19、Caribe Hilton, San Juan, Puerto Rico (USA)
2. Masahiro Shibasaki, Kazunori Ishii, Tomohisa Mori and Tsutomu Suzuki、Involvement of mGlu5 receptor signal cascade in the enhancement of morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem、College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 76th Annual Meeting, 2014, June 14-19、Caribe Hilton, San Juan, Puerto Rico (USA)

国内学会

1. 小林実奈代、森友久、大屋順平、三塚有莉、Teruo Hayashi、Tsung-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 18 日、名古屋国際会議場（愛知県）
2. 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ミ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、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）
3. 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 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
4. 薬物依存に関する研究 (第 490 報)：ラットにおけるオキサリプラチンおよびパクリタキセル誘発神経障害性疼痛下に対する σ1 受容体作動薬である SA4503 の効果 Aki Masumoto, Tomohisa Mori, Masato Harumiya, Oya Jumpei, Mika Fukase, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki、第 87 回 日本薬理学会、平成 26 年 3 月 19-21 日, 仙台
5. オピオイド鎮痛薬による μ オピオイド受容体に対する分解機構、松田昌憲, 森友久, 杉山絃一, 大屋順平, 芝崎真裕, 鈴木勉、第 134 回 日本薬学会年会平成 26 年 3 月 27-30 日, (熊本)
6. Tramadol 誘発悪心・嘔吐の評価系確立と制吐薬の探索王 恵理佳, 森友久, 小宮幸子, 宇田川雄也, 芝崎真裕, 鈴木勉、第 134 回　日本薬学会年会平成 26 年 3 月 27-30 日, (熊本)
7. 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、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）
8. 菊田奨之、芝崎真裕、安藤光史、岩瀬祥之、池窪結子、石川緩、岡部賢司、東あかね、古谷絵茉里、森友久、鈴木勉、アルコール慢性処置における LRRK2 を介した FOXO1 の変化、第 131 回日本薬理学会関東部会、平成 26 年 10 月 11 日、横浜市立大福浦キャンパス（神奈川県）
9. 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、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）
10. 安藤光史、芝崎真裕、菊田奨之、岩瀬祥之、池窪結子、石川緩、岡部賢司、東あかね、森友久、鈴木勉、アルコール慢性処置における LRRK2 の変化、第 44 回日本神経精神薬理学会、平成 26 年 11 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知県）
11. 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-HT1A 受容体作動薬の効果、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）
12. 東あかね、芝崎真裕、岩瀬祥之、宇田川雄也、野田友人、森友久、鈴木勉、Caffeine と morphine 併用処置による dopamine 関連行動の変化、第 88 回日本薬理学会、平成 27 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場（愛知県）
13. 大西永里子、芝崎真裕、横田智美、高橋友里、宇田将人、安藤光史、佐々木美理、森友久、鈴木勉、Morphine の副作用に対する aprepitant の有用性、第 135 回日本薬学会年会、平成 27 年 3 月 28 日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（兵庫県）
14. 佐々木美理、芝崎真裕、王恵理佳、大西永里子、横田智美、森友久、鈴木勉、中枢性 morphine 誘発大腸輸送能低下作用に関わる脳部位の検討、第 135 回日本薬学会年会、

平成27年3月28日、デザイン・クリエイティブセンター神戸（兵庫県）

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

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等ﾚｷﾞ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

覚せい剤関連精神障害に対する薬物療法の開発

研究分担者　橋本謙二　千葉大学社会精神保健教育研究センター教授

研究要旨

覚せい剤を長期に使用すると、断薬後も長期にわたり離脱症状（うつ病、行動感作など）が生じることが知られているが、この離脱症状に対する治療薬は現在のところ無い。今回、マウスに覚せい剤を1日1回5日間投与すると、断薬2週間後においても、うつ症状および行動感作が認められた。うつ病の病態に関わっている脳由来神経栄養因子（BDNF）のタンパク発現を調べた結果、覚せい剤を投与したマウスの側坐核において、BDNF量がコントロールマウスに比較して有意に高い事を見出した。一方、前頭皮質や海馬におけるBDNF量は変化無かった。次に、BDNFの受容体であるTrkBの拮抗薬 ANA-12 を投与すると、覚せい剤投与後の離脱症状（うつ症状および行動感作）が改善することを見出した。一方、TrkB作動薬である7,8-dihydroxyflavone (DHF)は効果が無かった。この知見は、側坐核におけるBDNF-TrkBシグナルの亢進が、覚せい剤離脱症状に関わっており、TrkB受容体拮抗薬が、覚せい剤の離脱症状の治療薬として有用である可能性を示唆した。

~~別紙３~~

A．研究目的

覚せい剤の乱用はヒトに依存を形成し、様々な精神障害を引き起こすことが知られている。特に、覚せい剤の乱用後にみられる離脱症状（うつ病など）は、覚せい剤依存症患者で認められるが、現在のところ有効な治療薬は無い。このように、覚せい剤関連精神障害に対する治療法については、現在のところ、根本的に治療する薬剤は無いことから、新しい病態仮説に基づいた新規治療薬の開発が必要である。

これまでの多くの研究から、報酬系（腹側被蓋野－側坐核回路）における脳由来神経栄養因子（BDNF: Brain-derived neurotrophic factor）およびその受容体 TrkB を介するシグナル伝達は、うつ病や薬物依存の病態に関わっていることが知られている。

本研究では、覚せい剤の繰り返し投与によって引き起こされる離脱症状（うつ病、行動感作）における BDNF-TrkB シグナル系の役割を調べ、新しい治療ターゲットとしての可能性を検討した。

B．研究方法

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、うつ症状を評価した。次に、覚せい剤投与後のうつ症状における BDNF-TrkB シグナル系の役割を調べるために、脳各部位（前頭皮質、海馬、側坐核）における BDNF のウェスタンブロット解析およびゴルジ染色を行った。

次に、覚せい剤投与後の離脱症状に対する治療効果を調べるために、TrkB 受容体アゴニスト 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF)および TrkB 受容体拮抗薬 ANA-12 の効果を調べた。行動感作の試験は、覚せい剤の低用量（1 mg/kg）を投与して、運動量の総計として評価した。

【倫理面への配慮】

今回の動物実験の実施については、千葉大学動物実験委員会の承認を得た。

C．研究結果

覚せい剤を１日１回５日間投与したマウスでは、尾懸垂試験、強制水泳試験の無動時間が有意に延長し、ショ糖飲水試験では有意に減少し、アンヘドニアを含むうつ症状を

呈した。覚せい剤投与後のうつ症状は、断薬2週間後でも観察された。

ウェスタンブロット解析より、側坐核における BDNF 量が、覚せい剤投与により有意に増加した。しかしながら、他の部位（前頭皮質、海馬）では変化が無かった。ゴルジ染色においても、覚せい剤を投与した側坐核において、スパイン密度の有意な増加が観察されたが、他の部位では差は無かった。

TrkB 受容体拮抗薬 ANA-12 の2週間投与は、覚せい剤投与によるうつ症状および行動感作を有意に改善したが、TrkB 受容体アゴニスト 7,8-DHF の2週間投与は効果が無かった。

以上の結果より、覚せい剤投与後の離脱症状には、側坐核における BDNF-TrkB シグナルの亢進が関わっている可能性が示唆された。興味深いことに、TrkB 受容体拮抗薬の投与は、覚せい剤の離脱症状を改善したことから、TrkB 受容体拮抗薬は、覚せい剤関連障害の治療薬として有用であることが示唆された。

D. 健康危険情報：該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

【英文雑誌】

[1] 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.

[2] Yang, C., and Hashimoto, K. (2014) Rapid antidepressant effects and abuse liability of ketamine. Psychopharmacology 231, 2041-2042.

[3] Li, S.X., Zhang, J.C., Wu, J., and Hashimoto, K. (2014) Antidepressant effects of ketamine on depression-like behaviors in juvenile mice after neonatal dexamethasone exposure. Clin. Psychopharmacol. Neurosci. 12, 124-127.

[4] Dang, Y.H., Ma, X.C., Zhang, J.C., Ren, Q., Wu, J., Gao, G.G., and Hashimoto, K. (2014). Targeting of the NMDA receptors for the treatment of major depression. Curr. Pham. Des. 20, 5151-5159.

[5] Hashimoto, K. (2015) Targeting the sigma-1 receptor chaperone in the treatment of perinatal brain injury. Exp. Neurol. 265, 118-121.

[6] Hashimoto, K. (2015) Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. J. Pharmacol. Sci. 127, 6-9.

[7] Zhang, J.C., Wu, J., Fujita, Y., Yao, W., Ren, Q., Yang, C., Li, S.X., Shirayama, Y., and Hashimoto, K. (2015) Antidepressant effects of TrkB ligands on depression-like behavior and dendritic changes in the hippocampus and nucleus accumbens after inflammation. Int. J. Neuropsychopharmacol. 18, pyu077.

[8] Yang, C., Shirayama, Y., Zhang, J.C., Ren, Q., and Hashimoto, K. (2015) Regional

differences in brain-derived neurotrophic factor and dendritic spine density confer resilience to inescapable stress. Int. J. Neuropsychopharmacol. 18, pyu121.
[9] Matsuura, A., Fujita, Y., Iyo, M., and Hashimoto K. (2015) Effects of sodium benzoate on prepulse inhibition deficits and hyperlocomotion in mice after administration of phencyclidine. Acta. Neuropsychiatr. 27, 159-167.

【邦文雑誌】

[1] 橋本謙二（2014）NMDA受容体拮抗薬ketamineの即効性の抗うつ作用．臨床精神薬理 17: 1495-1500.

2．学会発表

【国際学会】

1. Ren, Q., Ma, M., Yang, C., Yao, W., Zhang, J.C., and Hashimoto, K. (2014) Role of BDNF-TrkB signaling in depression-like behavior in mice after withdrawal from repeated administration of methamphetamine. The 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 15 - 19, 2014.

【国内学会】

1. 任　乾、馬　敏、張　継春、楊　春、橋本謙二（2014）覚せい剤の繰り返し投与後のうつ症状におけるBDNF-TrkBシグナルの役割．平成26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3-4日．横浜市．

F．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

3. 橋本謙二：薬物依存症の治療薬としての TrkB 受容体拮抗薬．特願 2014-230008 号 (2014 年 11 月 12

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療器機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

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]、宮﨑杜夫[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）の使用へとつながるゲートウェイ・ドラッグの乱用が、大きな社会的問題となってきている。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行った。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そのメカニズムを解明するとともに、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 は機能は、ほとんど分かってないが、MAP およびニコチンの２つの精神刺激薬で、側坐核での発現量が増加していることを報告している今年度は、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検討した。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、その転写因子を推定し、合成・産生メカニズムの検討を行った。さらに、Tmem168 は依存形成に抑制的な作用を持つことを明らかにした。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ある。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、mGluR3 アゴニストや Tmem168 を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 乱用へに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た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 Piccolo[3] 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 の効果が行動学的および神経化学的に有意に減弱した。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*-acetyl- aspartate: 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*-acetylaspartylglutamate: NAAG）へと変換され細胞外へ放出され[2, 9]、グループ *II* 代謝型グルタミン酸受容体 3（mGluR3）に対して神経伝達物質として働くことが報告されている。←参考文献あれば、いれてください

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 発現量がそれぞれ増加することも見出している。←参考文献（学会抄録）あれば、いれてください

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 を刺激することによる Shati/Nat8l 遺伝子発現調節を *in vivo* と *in vitro* で検討した。また、MAP によるマウスでの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、マウス側坐核に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 $CaCl_2$）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 8. ルシフェラーゼ・レポーター解析

マウス *Shati/Nat8l* ゲノム DNA の転写開始点上流（-1100bp）から順次欠失した遺伝子配列を組み込んだ各種ルシフェラーゼ・レポーター・プラスミドを作製した。それらを PC12 細胞にトランスフェクションした後、MAP（1 μM）で 1 時間刺激した。その細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

5. 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クエンス解析を行い、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

マウスを MAP を投与することにより、側坐核でのドパミン遊離量が増加することは、よく知られている現象であり、この増加が薬物依存形成に重要な役割を果たしていると考えられている [11]。そこで、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、Shati/Nat8l の産生物の下流にある mGluR3 が、本現象に関与しているかどうかを検討した。まず、mGluR3 生体内アゴニスト NAAG の MAP によるドパミン遊離量増加に対する影響を検討した。透析用リンゲル液を介して、側坐核に NAAG（0.1 mg/ml）を 15 分間環流したところ、野生型マウスの側坐核におけるドパミンの基礎遊離量は減少した。NAAG 還流後に MAP（1 mg/kg）を皮下投与すると、MAP 単独投与の時と比較して MAP 投与によるドパミン遊離量増加と比べて有意な減少が観察された（Fig. 1A）。

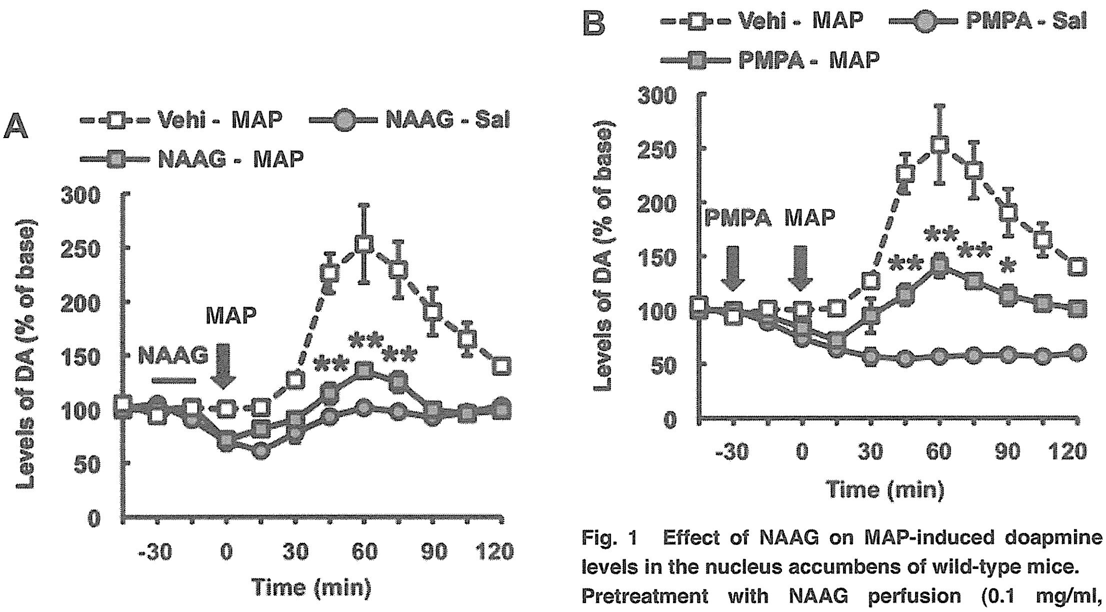

Fig. 1 Effect of NAAG on MAP-induced doapmine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with NAAG perfusion (0.1 mg/ml, during 15 min prior to MAP) (A) and 2-PMPA (30 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) (B) and inhibited MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=4. *P < 0.05, **P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

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 だけを単独で投与した時と比較して MAP によるドパミン遊離量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 LY341495 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。

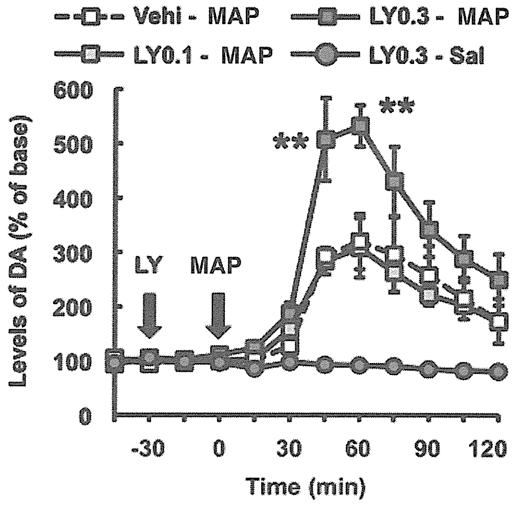

Fig. 2 Effect of LY341495 on MAP-induced doapmine levels in the nucleus accumbens of wild-type mice. Pretreatment with LY341495 (0.1 or 0.3 mg/kg, i.p. 30 min prior to MAP) enhanced MAP (1 mg/kg s.c.)-induced DA elevation. N=6. **P < 0.01 vs vehicle-MAP.

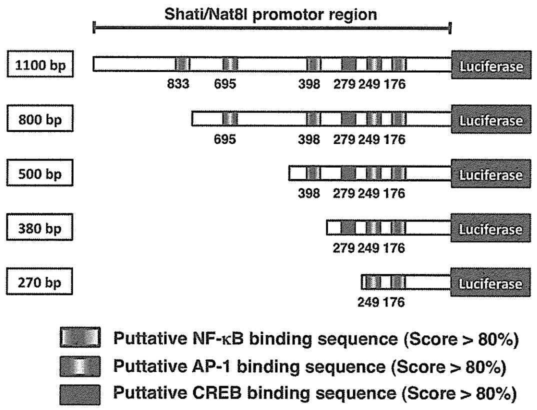

Fig. 4 Diagram of Shati/Nat8l promotor region.

4. 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* マイクロダイアリシス法を用いて、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. 6）。

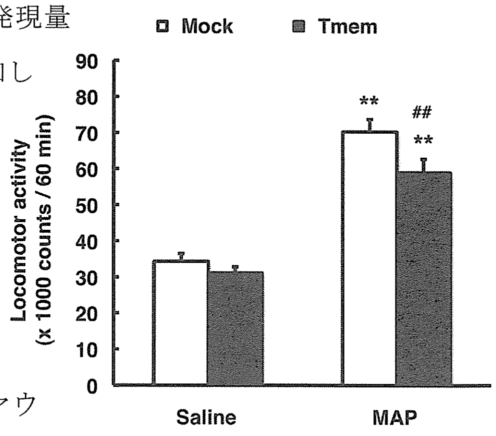

Fig. 6 Effect of MAP on locomotion in Tmem mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered immediately before the measurement of locomotor activity. N=8. **P < 0.01 vs Saline, ##P < 0.01 vs Mock-MAP.

5.　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. 7）。

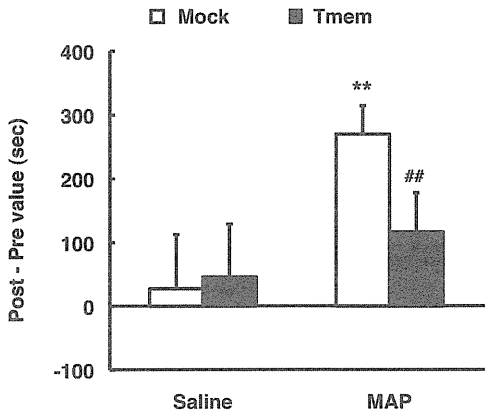

Fig. 7　Effect of MAP on conditioned place preference in Tmem mice.
MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning in the conditioned place preference task. N=8. *P < 0.05 vs Saline. #P < 0.05 vs Mock-MAP.

6.　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 投与で条件付けをすることによって、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. 8）。→データがちがう？？

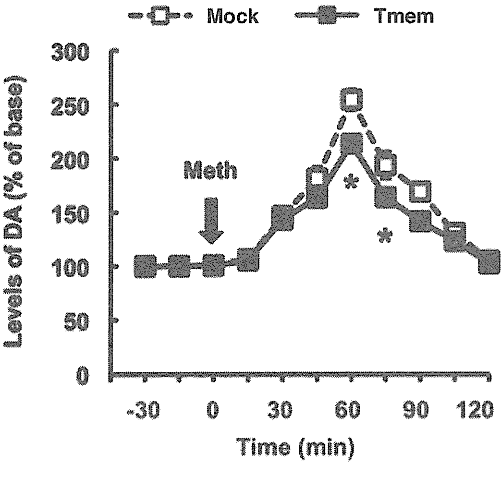

Fig. 8 Effect of MAP on extracellular doapmine (DA) levels in the nucleus accumbens of Tmem mice.
MAP (1 mg/kg s.c.) was administered in time 0 min.
N=9. *P < 0.05 vs MAP-treated Mock.

2.　MAP 刺激による Shati/Nat8l プロモーター領域の活性化

PC12 細胞を用いてマウス Shati/Nat8l ゲノム DNA の-1100、-800 および-500bp 配列プラスミドを導入したレポーター解析では、MAP 刺激によるルシフェラーゼ活性の著しい増加が観察された。しかし、-380bp 配列では、その増加が減少し、-270bp 配列では、有意な増加が観察されなかった (Fig. 3)。Shati/Nat8l の遺伝子発現調節領域 が-500 から -270bp であることが推察されたため、*in silico* 解析による転写因子結合配列の検討を行った。その結果、発現調節に重要と考えらえる配列として NF-kB および CREB 結合配列が推定された (Fig. 4) 。

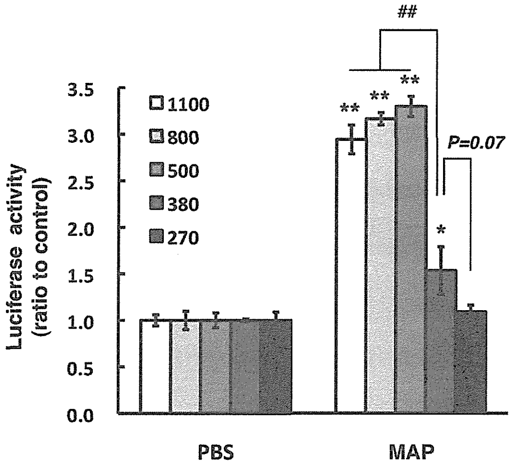

Fig. 3 MAP-induced luciferase activity in Shati/Nat8l promotor-expressed PC12 cells.
MAP (1 μM, 1 hr) was treated with PC12 cells transfecting several Shati/Nat8l promotor-inserted luciferase reportor plasmids. N=6. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ vs PBS, ##$P < 0.01$ vs 380.

3. マウウへの 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. 5A 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。

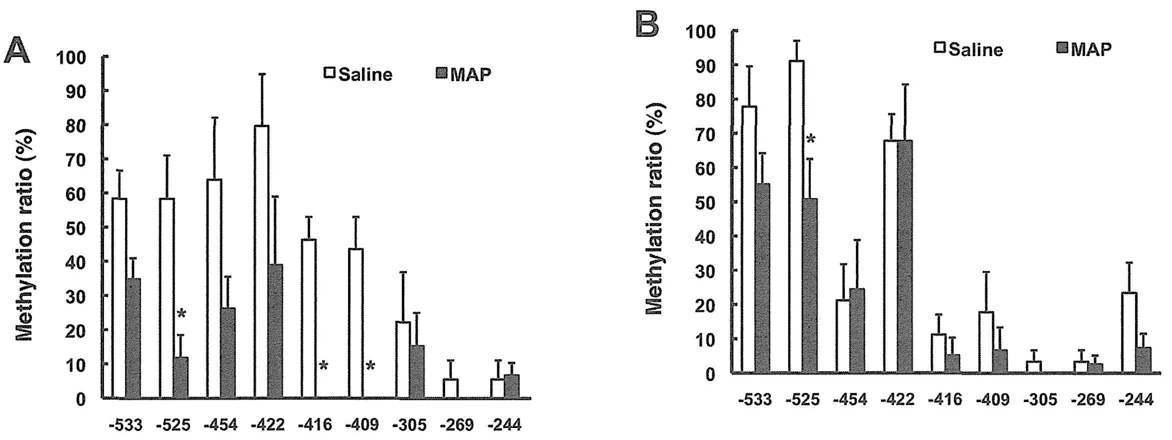

Fig. 5 Methylation profiles of Shati/Nat8l DNA from the nucleus accumbens and blood in MAP-treated wild-type mice.
The methylation ratios of each CpG units from the nucleus accumbens (A) and blood (B). N=3.
*$P < 0.05$ vs Saline.

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、その最終産生物が結合するの mGluR3 介在神経伝達が、MAP の薬理学的作用に対して抑制的に働くことを明らかにしてきた [6]。しかし、本研究では、インタクトな野生型マウスを用いて、側坐核での mGluR3 を介した神経伝達が、MAP の細胞外ドパミン遊離上昇作用に対して抑制的に働くことを観察した。このことは、Gi タンパク質共役型 mGluR3 の活性化が薬物依存形成を抑制する可能性を示しており、mGluR3 アゴニストが治療薬開発の標的分子となることを強く示唆するものである。しかしながら、今回の実験結果は、神経化学的な側面のみのアプローチであることから、今後、マウスを用いた依存性薬物による行動学的変化を mGluR3 アゴニストが改善できるかどうかを検討していく必要がある。←橋本謙一先生がされていないかチェックお願いします。

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、NF-kB および CREB を活性化する細胞内シグナル伝達が関与していることが示唆された。これらのことが解明されれば、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単離した 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、患者から採血したもんををもとに 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、更なる詳細な検討は必要ではあるが、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。さらに、このドパミン遊離用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 によってコンディショニング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が期待される。

［参考文献］

1) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., et al.: Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. Brain Res., 1335: 1-13, 2010.
2) Becker, I., Lodder, J., Gieselmann, V., et al.: Molecular characterization of N-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.