

## (2) 脳を守る

### 依存性薬物により誘発される精神障害の機構の解明の研究

#### I 試験研究の全体計画

##### 1. 研究の趣旨

依存性薬物の乱用は、乱用者個人に留まらず、家族、地域社会、国家にまでおよぶ深刻な問題である。近年、わが国でも依存性薬物の乱用が急増し、乱用者が低年齢化している。また、覚醒剤などの依存性薬物の乱用による刑事事件が多発し、深刻な社会問題となっている。一方、麻薬性鎮痛薬の場合には依存形成機構を解明し、その予防治療方法を確立することによりモルヒネなどの医療用麻薬を安心して使用できるようになり、国民の健康と医療福祉に大きく貢献できるものと考えられる。したがって、薬物依存の形成機構の解明とその診断、予防および治療方法の確立は社会的な要請であり、薬理学者に課せられた責務である。

本プロジェクトでは、依存性薬物の中でも特に問題となっているメタンフェタミンなどの精神刺激薬と医療上の波及効果の大きいモルヒネなどのオピオイド系鎮痛薬に焦点を絞り、これら依存性薬物によって誘発される精神障害の機構を解明し、その診断、予防および治療方法の確立を目指す。

##### 2. 研究内容及び目標

###### 1. 分子生物学的研究

(1) 依存性薬物による精神病発症の分子生物学的研究

① Pur  $\alpha$  に関する研究（大阪大学大学院医学研究科）

② Amida および Mieg に関する研究（大阪大学大学院医学研究科）

(2) 麻薬依存形成時におけるオピオイド神経-グルタミン酸神経相互作用の可塑的变化

① モルヒネ依存動物を用いた組織化学的、神経化学的、行動薬理学的解析（京都大学大学院薬学研究科）

② 培養細胞を用いた細胞生物学的解析（京都大学大学院薬学研究科）

③ 脳切片標本および急性単離単一神経細胞を用いた *in vitro* 電気生理学的解析（京都大学大学院薬学研究科）

(3) モルヒネ依存と神経回路可塑的応答の分子生物学

① モルヒネ耐性・依存に関するアンチオピオイド神経系に対する薬理作用に関する研究（長崎大学薬学部）

② モルヒネ耐性・依存時の神経回路変調の可視化に関する研究（長崎大学薬学部）

③ モルヒネ耐性・依存に働く遺伝子の同定と機能解析に関わる研究（長崎大学薬学部）

(4) 依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン動態への影

響とその生理作用

① 依存性薬物の脳発達へ与える影響に関する研究（新潟大学脳研究所）

② 成体動物における依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン脳内動態に対する効果に関する研究（新潟大学脳研究所）

2. 神経薬理学的研究

(1)  $\kappa$ 受容体作動薬による精神症状とその発現機構（星薬科大学）

(2) オピオイド系鎮痛薬と精神刺激薬に共通した薬物依存の形成機構

① 遺伝子改変動物を用いたモルヒネおよび精神刺激薬の依存形成の神経機構に関する研究（名古屋大学大学院医学研究科）

② 精神刺激薬の弁別刺激効果の神経機構に関する研究（名古屋大学大学院医学研究科）

③ モルヒネ耐性および依存の薬物療法に関する研究（名古屋大学大学院医学研究科）

(3) ノックアウトマウスを用いた精神刺激薬による異常行動および依存形成に対する中枢ヒスタミン神経系の役割の解明（東北大学医学部）

(4) 精神刺激薬の作用における細胞内神経伝達の役割に関する研究（浜松医科大学）

(5) 脳内報酬系に関与する物質の探索（藤田保健衛生大学医学部）

3. 薬化学研究

(1) オピオイド受容体選択的化合物の合理的設計と合成（東レ株式会社医薬研究所）

4. 臨床医学研究

(1) 脳画像診断法を用いた薬物依存の臨床研究（浜松医科大学）

(2) 遺伝子多型解析を用いた薬物依存の臨床研究（厚生省国立精神・神経センター精神保健研究所）

(3) 薬物依存の候補遺伝子の多型解析（藤田保健衛生大学医学部）

##### 3. 年次計画

本プロジェクトでは、依存性薬物により誘発される神経精神障害の機構を解明し、これを診断、予防または治療する方法の確立を目指す。

第I期では、依存性薬物による可塑的応答と神経障害の機構を単一神経レベルおよび神経回路を介する多細胞レベルで解明する。さらに、精神障害の画像診断方法を考案す

る。  
第Ⅱ期では、精神障害の画像診断方法を確立する。さら

に、精神刺激薬およびオピオイド系鎮痛薬の薬物依存の神経機構を解明し、その予防、治療方法を確立する。

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
1. 分子生物学的研究					
(1) 依存性薬物による精神病発症の分子生物学的研究					
① Puraに関する研究	遺伝子発現系の検索	見出した遺伝子の発現に対するモルヒネ慢性投与の効果		KOマウスの作製と解析	
② AmidaおよびMiegに関する研究	抗体作製/免疫組織化学		遺伝子発現の解析	KOマウスの作製と解析	
(2) 麻薬依存形成時におけるオピオイド神経-グルタミン酸神経相互作用の可塑的变化					
① モルヒネ依存動物を用いた組織化学的、神経化学的、行動薬理学的解析	グルタミン酸トランスポーター (GLAST GLT-1) の発現解析			GLAST GLT-1のKOマウスの作製と解析	
② 培養細胞を用いた細胞生物学的解析	情報伝達系の解析	GLAST GLT-1の発現解析		GLAST GLT-1の機能解析	
③ 脳切片標本および急性単離単一神経細胞を用いた in vitro 電気生理学的解析	グルタミン酸に対する神経応答の解析			メカニズムの解析	
(3) モルヒネ依存と神経回路可塑的応答の分子生物学					
① モルヒネ耐性・依存に関与するアンチオピオイド神経系に対する薬理作用に関する研究	行動薬理学的解析			KOマウスを用いた解析	
② モルヒネ耐性・依存時の神経回路変調の可視化に関する研究	ベクターの作製	Tgマウスの作製	変調の可視化	Caイメージング	回路解析
③ モルヒネ耐性・依存に働く遺伝子の同定と機能解析に関わる研究	アンチオピオイド受容体の解析		遺伝子クローニング	KOマウスの作製と評価	
(4) 依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン動態への影響とその生理作用					
① 依存性薬物の脳発達へ与える影響に関する研究	遺伝子発現の解析	行動解析	KOマウスを用いた解析		拮抗物質の探索
② 成体動物における依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン脳内動態に対する効果に関する研究	神経栄養因子の発現解析	サイトカインの発現解析	培養細胞での検討	培養細胞でのメカニズムの解析	

研究項目	12年度	13年度	14年度	15年度	16年度
2. 神経薬理学的研究					
(1) $\kappa$ 受容体作動薬による精神症状とその発現機構	薬物弁別試験	行動薬理学的解析		免疫組織化学的解析	神経化学的解析
(2) オピオイド系鎮痛薬と精神刺激薬に共通した薬物依存の形成機構	TH CBP Nociceptin 受容体-KO マウス	NMDA 受容体 TNF-KO マウス	ニューロン新生の解析	Pura Amida Mieg その他 研究班で作製する KO マウス	
① 遺伝子改変動物を用いたモルヒネおよび精神刺激薬の依存形成の神経機構に関する研究	PCP の弁別刺激の解析	MAP の弁別刺激の解析	脳内自己刺激による解析	依存の神経回路形成に関する機能分子の解析	
② 精神刺激薬の弁別刺激効果の神経機構に関する研究	情報伝達系に作用する化合物の行動薬理学、 組織化学および神経化学的評価			薬化学研究の担当研究者が 合成した化合物の評価	
③ モルヒネ耐性および依存の薬物療法に関する研究	HDC-KOマウス	H1受容体-KOマウス	H2受容体-KOマウス		
(3) ノックアウトマウスを用いた精神刺激薬による異常行動および依存形成に対する中枢ヒスタミン神経系の役割の解明	イムノフィリンの役割の解析			細胞内情報伝達の解析	
(4) 精神刺激薬の作用における細胞内神経伝達の役割に関する研究	c-Fos とエンドルフィンの二重免疫染色による組織化学的評価		DNA チップによる遺伝子探索		
(5) 脳内報酬系に関する物質の探索	選択的化合物の設計・合成	薬効評価	構造-活性 相関の解析	依存性のない鎮痛薬の開発研究	
3. 薬化学研究	覚醒剤使用者の ドパミントランスポーター解析	サルでの PET 研究	MRS による覚醒剤 使用者の脳機能解析	PET による覚醒剤使用者のセロト ニントランスポーター解析	
(1) オピオイド受容体選択的化合物の合理的設計と合成	MAP 精神病とドパミン 神経の遺伝子多型解析		MAP 精神病とドパミン神経以外の遺伝子多型解析		
4. 臨床医学研究	モノアミン, GABA 神 経系遺伝子の多型解析		NMDA 受容体および前年度まで に明らかにした遺伝子の多型解析		自己刺激関連遺 伝子の多型解析
(1) 脳画像診断法を用いた薬物依存の臨床研究					
(2) 遺伝子多型解析を用いた薬物依存の臨床研究					
(3) 薬物依存の候補遺伝子の多型解析					
所要経費(合計)	102百万円				

#### 4. 平成12年度における実施内容と達成目標

##### 1. 分子生物学的研究

##### (1) 依存性薬物による精神病発症の分子生物学的研究

###### ① Pur $\alpha$ に関する研究

モルヒネ依存におけるCa/カルモジュリン(CaM)とPur  $\alpha$ 系による遺伝子発現の役割を解明するため、培養神経細胞株を用いてモルヒネなどの薬物刺激により、Ca/CaMとPur  $\alpha$ を介する典型的な遺伝子発現系を見出し、その調節機構を明らかにする。

###### ② Amida および Mieg に関する研究 (大阪大学大学院医学研究科)

Amidaについては、まず抗体を作製する。この抗体を用いて免疫組織化学的実験を実施し、メタンフェタミンおよびモルヒネを慢性投与したマウス脳におけるArcおよびAmidaの変化と細胞死との関連を調べる。

##### (2) 麻薬依存形成時におけるオピオイド神経-グルタミン酸神経相互作用の可塑的变化

###### ① モルヒネ依存動物を用いた組織化学的、神経化学的、行動薬理学的解析

麻薬依存形成時におけるオピオイド神経・グルタミン酸神経系の可塑的变化に対してグリア細胞が果たす役割を明らかにするため、麻薬依存ラット脳内におけるグリア細胞特異的なグルタミン酸トランスポーターの発現をnorthern blot法、in situ hybridization法により検討し、正常ラット脳内での発現との違いを明らかにする。

###### ② 培養細胞を用いた細胞生物学的解析

クローン化オピオイド受容体を発現する細胞を用いて、麻薬性鎮痛薬持続的処置時にその発現量が変化する細胞内情報伝達因子を見つけ、オピオイド受容体情報伝達系に与える影響を示す。

###### ③ 脳切片標本および急性単離単一神経細胞を用いた in vivo 電気生理学的解析

麻薬依存形成におけるグルタミン酸神経系の可塑的变化を電気生理学的に解析するための準備として、膜電位感受性色素を用いて、麻薬依存形成時や禁断症状発現時にグルタミン酸による神経応答に変化が生じている領域を見出す。

##### (3) モルヒネ依存と神経回路可塑的応答の分子生物学

###### ① モルヒネ耐性・依存に関与するアンチオピオイド神経系に対する薬理作用に関する研究

ノシセプチン及びNMDA神経系のモルヒネ耐性・依存に対する作用機構を解明するため、ノシセプチン及びNMDA受容体の各種アンタゴニスト及びノックアウトマウスを用いて、耐性・依存性形成の行動薬理学的実験を実施し、これらアンチオピオイド神経系がオピオイド神経系に影響を及ぼし、耐性・依存性形成に関わっていることを確認する。

###### ② モルヒネ耐性・依存時の神経回路変調の可視化に関する

###### 研究

オピオイド神経系、アンチオピオイド神経系回路網を可視化するための小麦胚芽レクチンWGA発現用ベクター、トランスジェニックマウス作製用ベクターを構築する。

###### ③ モルヒネ耐性・依存に働く遺伝子の同定と機能解析に関する研究

モルヒネ耐性・依存性形成によるアンチオピオイド受容体遺伝子発現に対する影響を解明するため、各受容体の中枢神経系各部位における発現変化をRT-PCR法及びin situ hybridization法を用いて解析を行うとともに、ノシセプチン受容体ノックアウトマウスに導入された $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子産物の活性変化の測定を行い、耐性・依存性形成時にこれら受容体遺伝子発現が変化することを確認する。

##### (4) 依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン動態への影響とその生理作用

###### ① 依存性薬物の脳発達へ与える影響に関する研究

依存性薬物の脳発達へ与える影響を調べる目的で、発達時期の各段階で実験動物ラット/マウスに各種依存性薬物(フェンシクリジン、アンフェタミン等)を慢性投与し、脳内神経栄養因子・サイトカインの遺伝子発現を中心に神経機能分子発達への影響をDNAアレイ等による遺伝子発現プロファイリングにより評価する。

###### ② 成体動物における依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン脳内動態への効果に関する研究

精神刺激薬の神経栄養因子発現に対する効果を調べる目的で、各種依存性薬物(フェンシクリジン、アンフェタミン等)を成熟した実験動物ラット/マウスに投与し、ニューロトロフィン群を中心とする神経栄養因子の脳内発現変化をELISA法やin situハイブリダイゼーション法により調べる。

##### 2. 神経薬理学的研究

##### (1) $\kappa$ 受容体作動薬による精神症状とその発現機構

$\kappa$ 受容体作動薬による精神症状を明確にするため、薬物弁別試験を実施し、 $\kappa$ 受容体作動薬であるU-50488HとTRK-820による弁別刺激効果の有無を確認するとともに、既存のオピオイド作動薬および覚醒剤の弁別刺激効果と比較する。さらに、条件づけ場所嗜好性試験を実施し、上記の $\kappa$ 受容体作動薬の動機づけ効果を確認する。

##### (2) オピオイド系鎮痛薬と精神刺激薬に共通した薬物依存の形成機構

###### ① 遺伝子改変動物を用いたモルヒネおよび精神刺激薬の依存形成の神経機構に関する研究

モルヒネ、メタンフェタミンおよびフェンシクリジンの連続投与により誘発される精神障害の機構の解明のため、チロシン水酸化酵素(TH)、CREB結合蛋白(CBP)およびノシセプチン受容体の遺伝子ノックアウトマウスを用いて、耐性/逆耐性および依存性について行動薬理学的実験

を実施し、依存性薬物の耐性/逆耐性および依存性の発現におけるこれら機能性蛋白質の役割を明らかにする。

#### ② 精神刺激薬の弁別刺激効果の神経機構に関する研究

フェンシクリジンの薬物弁別刺激効果の神経機構の解明のため、オペラント薬物弁別試験法を用いてフェンシクリジンの薬物弁別行動に対する種々の神経伝達物質受容体関連化合物の作用および特定の脳部位への微量注入の効果を解析し、フェンシクリジンの薬物弁別刺激効果の発現に重要な役割を果たしている神経系および脳部位を確認する。

#### ③ モルヒネ耐性および依存の薬物療法に関する研究

モルヒネ耐性および依存の薬物療法を確立するため、フォスホジエステラーゼ阻害薬、ニューロステロイドおよびNMDA受容体拮抗薬を用いた行動薬理試験およびc-Fos蛋白質の免疫組織化学実験を実施し、モルヒネ耐性および依存発現におけるこれら化合物の効果を明らかにする。

(3) ノックアウトマウスを用いた精神刺激薬による異常行動および依存形成に対する中枢ヒスタミン神経系の役割の解明

メタンフェタミンおよびフェンシクリジンの依存形成および二次的脳障害における中枢ヒスタミンの役割を解明するため、ヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)遺伝子ノックアウトマウスを用いて行動薬理試験を実施するとともに、脳内のモノアミンおよびアミノ酸含量、受容体、セカンドメッセンジャ・などの変化を調べ、中枢ヒスタミンの調節する薬物依存形成に関連する神経回路網を同定する。

(4) 精神刺激薬の作用における細胞内神経伝達の役割に関する研究

メタンフェタミンにより引き起こされる急性の行動変化、及び覚醒剤反復投与により形成される逆耐性現象に及ぼすFK506(免疫抑制剤)の作用を検討し、覚醒剤の作用におけるイムノフィリンの役割を確認する。

(5) 脳内報酬系に關与する物質の探索

脳内報酬系に關与する神経伝達物質と脳内部位を解明するため、脳内自己刺激行動後のラット脳におけるc-Fos蛋白質の発現を免疫組織染色により解析し、自己刺激行動に伴って活性化される強化ニューロンを直接的に同定する。さらに、c-Fos蛋白質を発現するニューロンをエンケファリ

ン、エンドルフィン、エンドモルフィン、CRH等の抗体を用いて二重染色することにより、強化ニューロンの伝達物質が何であり、それがどの部位にどの程度含まれるかを同定する。

#### 3. 薬化学研究

(1) オピオイド受容体選択的化合物の合理的設計と合成  
オピオイド受容体選択的アゴニストの設計と合成をため、オピオイド分野におけるメッセージアドレスの概念とアクセサリー部位の考えを基にして、オピオイド受容体選択的アゴニストの合理的設計を行う。合成した化合物に関しては、オピオイド受容体選択性ならびにアゴニスト活性の評価を行い、オピオイド受容体選択的アゴニストの合理的設計の基となる構造活性相関を確認する。

#### 4. 臨床医学研究

(1) 脳画像診断法を用いた薬物依存の臨床研究

覚醒剤使用に伴う脳内ドパミントランスポーター(DAT)密度の変化を解明するため、PET検査を実施し、線条体、側坐核、前頭前野におけるDAT密度の変化と精神症状との関連について確認する。また、脳内セロトニントランスポーター測定用PETトレーサを開発するために、サルまたは人への使用が可能なトレーサを放射性同位元素(炭素11など)にて標識合成する方法を確立する。

(2) 遺伝子多型解析を用いた薬物依存の臨床研究

依存性薬物による精神障害の遺伝子レベルでの機構を解明するため、覚醒剤惹起性の精神症状とドパミン神経伝達に関連する遺伝子座位(ドパミンD2, D3, D4受容体, ドパミントランスポーターなど)の多型について検討し、これらの多型が覚醒剤惹起性の精神症状や依存をひき起こしやすい病前性格などにどのような影響を及ぼすか多角的に確認する。

(3) 薬物依存の候補遺伝子の多型解析

依存性薬物による精神障害の遺伝子レベルでの機構を解明するため、脳内報酬系に關与していること明らかになっているモノアミンおよびGABA作動性神経系に関連する遺伝子上の多型検索を薬物依存症患者から得たDNAを鋳型として実施する。

II 平成12年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
<p>1. 分子生物学的研究</p> <p>(1) 依存性薬物による精神病発症の分子生物学的研究</p> <p>① Pura に関する研究</p> <p>② Amida および Mieg に関する研究</p> <p>(2) 麻薬依存形成時におけるオピオイド神経-グルタミン酸神経相互作用の可塑的变化</p> <p>① モルヒネ依存動物を用いた組織化学的, 神経化学的, 行動薬理学的解析</p> <p>② 培養細胞を用いた細胞生物学的解析</p> <p>③ 脳切片標本および急性単離単一神経細胞を用いた in vitro 電気生理学的解析</p> <p>(3) モルヒネ依存と神経回路可塑的応答の分子生物学</p> <p>① モルヒネ耐性・依存に関与するアンチオピオイド神経系に対する薬理作用に関する研究</p> <p>② モルヒネ耐性・依存時の神経回路変調の可視化に関する研究</p> <p>③ モルヒネ耐性・依存に働く遺伝子の同定と機能解析に関わる研究</p> <p>(4) 依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン動態への影響とその生理作用</p> <p>① 依存性薬物の脳発達へ与える影響に関する研究</p> <p>② 成体動物における依存性薬物の神経栄養因子・サイトカイン脳内動態に対する効果に関する研究</p>	<p>大阪大学大学院医学研究科 大阪大学大学院医学研究科</p> <p>京都大学大学院薬学研究科 京都大学大学院薬学研究科 京都大学大学院薬学研究科</p> <p>長崎大学薬学部 長崎大学薬学部 長崎大学薬学部</p> <p>新潟大学脳研究所 新潟大学脳研究所</p>	<p>三木直正 三木直正</p> <p>佐藤公道 佐藤公道 佐藤公道</p> <p>植田弘師 植田弘師 植田弘師</p> <p>那波宏之 那波宏之</p>
<p>2. 神経薬理学的研究</p> <p>(1) <math>\kappa</math>受容体作動薬による精神症状とその発現機構</p> <p>(2) オピオイド系鎮痛薬と精神刺激薬に共通した薬物依存の形成機構</p> <p>① 遺伝子改変動物を用いたモルヒネおよび精神刺激薬の依存形成の神経機構に関する研究</p> <p>② 精神刺激薬の弁別刺激効果の神経機構に関する研究</p> <p>③ モルヒネ耐性および依存の薬物療法に関する研究</p> <p>(3) ノックアウトマウスを用いた精神刺激薬による異常行動および依存形成に対する中枢ヒスタミン神経系の役割の解明</p>	<p>星薬科大学</p> <p>名古屋大学大学院医学研究科 名古屋大学大学院医学研究科 名古屋大学大学院医学研究科</p> <p>東北大学医学部</p>	<p>鈴木勉</p> <p>山田清文 山田清文 山田清文</p> <p>伊藤千裕</p>

研究項目	担当機関	研究担当者
(4) 精神刺激薬の作用における細胞内神経伝達の役割に関する研究	浜松医科大学	伊 豫 雅 臣
(5) 脳内報酬系に関する物質の探索	藤田保健衛生大学医学部	尾 崎 紀 夫
3. 薬化学研究		
(1) オピオイド受容体選択的化合物の合理的設計と合成	東レ(株)医薬研究所	長 瀬 博
4. 臨床医学研究		
(1) 脳画像診断法を用いた薬物依存の臨床研究	浜松医科大学	伊 豫 雅 臣
(2) 遺伝子多型解析を用いた薬物依存の臨床研究	厚生省国立精神・神経センター精神保健研究所	稲 田 俊 也
(3) 薬物依存の候補遺伝子の多型解析	藤田保健衛生大学医学部	尾 崎 紀 夫
5. 研究管理	名古屋大学大学院医学研究科 教授	鍋 島 俊 隆

### Ⅲ リエゾン会議

委員	所 属
○鍋 島 俊 隆	名古屋大学院 医学研究科教授
伊 豫 雅 臣	浜松医科大学 助教授
伊 藤 千 裕	東北大学 医学部助手
稲 田 俊 也	厚生省 国立精神・神経センター精神保健研究所室長
植 田 弘 師	長崎大学 薬学部教授
尾 崎 紀 夫	藤田保健衛生大学 医学部教授
佐 藤 公 道	京都大学大 学院薬学研究科教授
鈴 木 勉	星薬科大学 教授
長 瀬 博	東レ(株) 医薬研究所副部長
那 波 宏 之	新潟大学 脳研究所教授
降 矢 朗 行	第一製薬(株) 理事 開発企画部長
三 木 直 正	大阪大学 大学院医学研究科教授

(注：○は研究管理統括者)