

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08888

研究課題名(和文)覚醒剤反復投与による小胞体ストレスと神経障害：黒質線条体路障害の解明に向けて

研究課題名(英文)Analysis to the nigrostriatal pathway of the low-dose methamphetamine preadministration.

研究代表者

武市 敏明 (TAKEICHI, Toshiaki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90460360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：少量の覚せい剤を反復投与した動物を濫用初期モデル動物とした。このモデル動物に10 mg/kgの覚せい剤を投与後の中脳および線条体の細胞ストレス、神経細胞および神経活動のマーカー蛋白の変化を解析した。その結果、中脳では、抑制性神経のGABA作動性神経のマーカー(GAD67)の有意な増加を認め、線条体では小胞体ストレスマーカーおよびGAD67だけでなく、興奮性神経のグルタミン酸作動性神経のマーカーと、神経活動の指標となるc-fosの有意な増加を認めた。以上の結果より我々のモデル動物では、黒質線条体路だけでなく線条体視床路にも影響し、線条体の神経細胞の易活性化が惹起されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of administering low-dose Methamphetamine (METH) prior to the administration of high-dose METH on the neural activity of rats were examined. The rats were administered a low dose of METH or saline for 5 consecutive days (m5 and s5 groups), followed by a high dose of METH on Day 6 (m5M and s5M groups). Markers of neuronal cells, such as vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT) in the striatum and glutamate decarboxylase 67 (GAD67) in the midbrain and striatum, were analyzed by western blotting. The expression of c-fos, a marker of neural activity, in the striatum was analyzed using immunohistochemistry. The expression levels of VGLUT and GAD67 were significantly higher in the m5M than in the s5M group. The numbers of c-fos-positive cells were significantly higher in m5M than in the other groups. These results suggest that preadministration of low-dose METH prior to high-dose METH administration in rats may alter thalamostriatal pathway as well as nigrostriatal pathway.

研究分野：法医学

キーワード：覚せい剤 モデル動物 濫用初期 黒質線条体路 線条体 GAD67 c-fos VGLUT2

## 1. 研究開始当初の背景

少量の覚せい剤を5日間反復投与したラットの中脳では、小胞体ストレスが惹起される、一方、細胞障害を示すマーカーに変化を認めない。また、多量の覚せい剤を投与したラットの中脳では、酸化ストレスの増加および細胞障害が引き起こされる。しかしながら、少量の覚せい剤を5日間反復投与後に多量の覚せい剤を投与した場合、酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスが有意に増加し、細胞障害のマーカーの変化が抑制される。

この動物モデルは、少量の覚せい剤の比較的短期間の反復投与であることと、神経障害のマーカーに変化を認めないことが特徴であり、これはヒトの覚せい剤中毒死例における線条体のドーパミン作動性神経のマーカーの減少や、炎症時に増加するマイクログリアの増加といった細胞傷害のマーカーの変化を認めない程度の状態、すなわち覚せい剤濫用の初期に近いモデルと考える。この動物モデルは、これまでの覚せい剤中毒のモデルとは異なる新しいモデル動物であり、このモデル動物を解析することで、覚せい剤濫用の脳神経障害や、覚せい剤中毒の神経学的メカニズムについての知見が深まると考えられる。

## 2. 研究の目的

我々の作成したモデル動物について、中脳および線条体の細胞ストレスの程度、細胞障害や神経細胞のマーカーについて解析することにより、ヒトでは解析不可能な、軽度の覚せい剤濫用又は覚せい剤濫用初期の脳内の変化について、特に黒質線条体路への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成：ラットへ少量(1 mg/kg/day)の覚せい剤(METH)を5日間反復投与し、6日目に多量(10 mg/kg)のMETHを投与した。

(2) 実験方法：蛋白質の発現解析(Western blotting): METHの最終投与から1時間後に脳を取り出し、黒質を含む中脳と線条体を切り出した。切り出したサンプルは、蛋白抽出用バッファーとステレンスピースを入れたサンプルチューブに内にて、400 rpm, 30秒, 4 で破碎した。その後、10,000 g, 10分, 4 で遠心し上清をサンプルとしたSDS-PAGEを行った。SDS-PAGEにて分離した蛋白は、PVDF膜に転写し、酸化ストレスのマーカーであるSuperoxide dismutase 1 (SOD1)、小胞体ストレスのマーカーであるGlucose-regulated protein 78 (Grp78)、ドーパミン作動性神経のマーカーであるTyrosine hydroxylase (TH)、GABA作動性神経のマーカーであるGlutamate

decarboxylase 67 (GAD67)、グルタミン酸作動性神経のマーカーであるVesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2)、アストロサイトのマーカーであるGlial fibrillary acidic protein (GFAP)に対する1次抗体の反応後HRPを標識した2次抗体を反応させた。洗浄後、化学発光基質Luminata Forteによる発光をスキャナー型イメージャーC-Digitにより計測した。

蛋白質の発現解析(Immunohistochemistry): METHの最終投与1時間後に深麻酔下にて冷PBSで環流後、脳を取り出した。取り出した脳は、4%パラホルムアルデヒドにて浸潤固定を行った後、パラフィン包埋ブロックを作成し、厚さ3 μmで薄切した。親水化後に、神経活動の指標となる、c-fosと神経細胞のマーカーであるNeuronal nucleiの1次抗体との反応後、蛍光色素を標識した2次抗体を反応させた。その後封入し、蛍光顕微鏡BZ-X700で観察および写真撮影を行った。

行動解析：加速度を検知する小型の運動量計測装置であるNanoTagを用いて、METH投与直後から30分間の活動量を計測した。

## 4. 研究成果

線条体における小胞体ストレスおよび酸化ストレスは有意に増加していた。これらの細胞ストレスの惹起は、中脳の小胞体ストレスのみ惹起されるという解析結果と差異を認め、黒質線条体路の部位によって細胞ストレスの惹起状態に差異があることが明らかとなった。

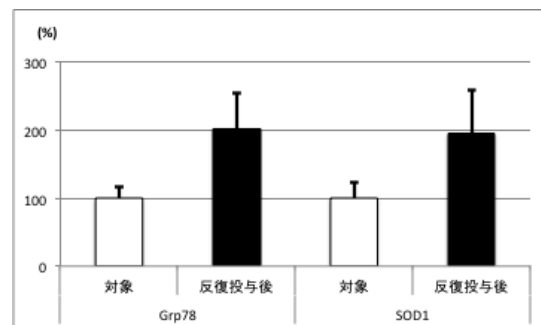


図1. 線条体における小胞体ストレス(Grp78)および酸化ストレス(SOD1)マーカーの変化

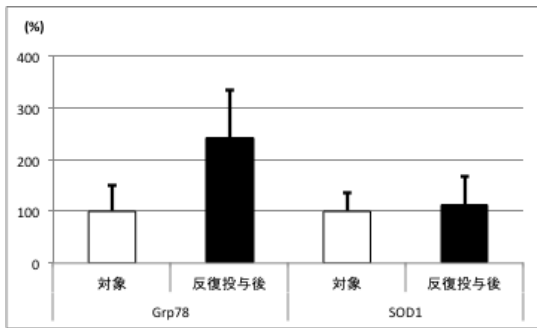


図2 . 中脳における小胞体ストレス (Grp78)および酸化ストレス(SOD1) マーカーの変化

神経細胞への影響を明らかにする目的で、神経細胞のマーカー蛋白のWestern blottingによる半定量を行った。その結果、THやGFAPに変化を認めなかったことから、神経障害は引き起こされていないと考えた。一方、GAD67の有意な増加を認めた。これらの結果は、黒質線条体路の直接経路において、反復するドーパミン刺激により神経回路の改変が引き起こされていると考えた。

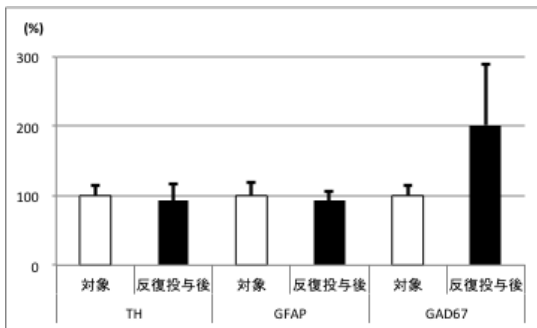


図3 . 線条体におけるドーパミン作動性神経 (TH)、アストロサイト(GFAP)および GABA 作動性神経(GAD67)のマーカーの変化

この神経回路の改変が、実際に神経活動へ影響していることを明らかとする目的で、線条体における神経活動の指標となる c-fos の発現数および量を計測した。その結果、10 mg/kg の METH の単回投与のみにおいて認める増加よりも、反復投与後に 10 mg/kg の METH を投与すると、c-fos の発現細胞数のさらなる有意な増加を認めた。これは、線条体の神経細胞に易活性化状態が惹起されているものとする。しかしながら GAD67 は、抑制性の GABA 作動性神経のマーカーであり、線条体の神経細胞への易活性化状態を GAD67 だけでは十分に説明出来ない。

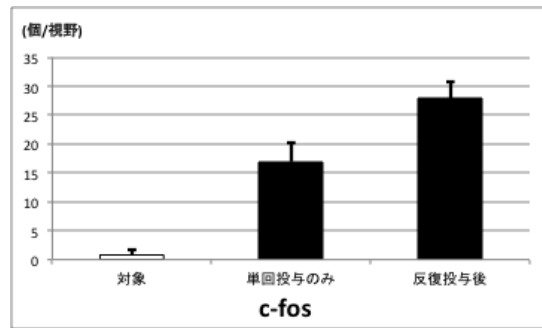


図4 . 線条体における1視野当たりの c-fos 発現細胞数

そこで、興奮性の神経の1つであるグルタミン酸作動性神経の神経終末について解析を行った。その結果、線条体において VGLUT2 の有意な増加を認めた。この VGLUT2 は、視床から線条体へ軸索を伸ばしているグルタミン酸作動性神経の神経終末に発現している分子であることから、線条体の易活性化状態の惹起に線条体視床路の活性化が関与していることが明らかとなった。

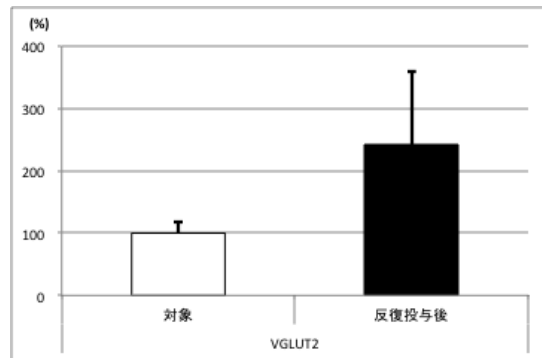


図5 . 線条体におけるグルタミン酸作動性神経(VGLUT2)マーカーの変化

Nanotag を用いた行動量の解析では、多量の METH の単回投与では行動量の増加を観察しない。しかしながら、少量の METH の反復投与後に多量の METH を投与すると行動量の有意な増加を認め、線条体の神経細胞の活性化が個体の活動量にまで影響することが示唆された。

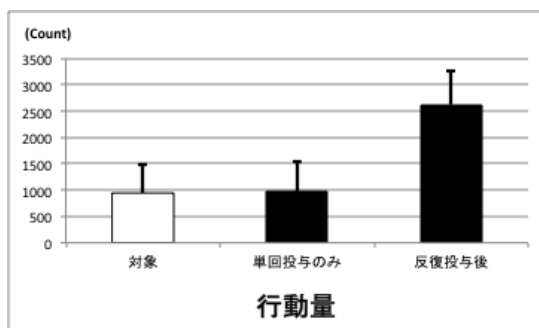


図6 . Nanotag を用いた METH 投与後のケージ内におけるラットの行動量

以上の結果より少量の METH の反復投与は、黒質線条体路の改変だけでなく線条体視床路の改変を介して、線条体の神経細胞の易活性化状態が惹起されている事が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

武市 敏明, 北村 修, 王 璐, 塚 正彦、Methamphetamine 反復投与における線条体のストレス応答についての基礎的検討、第 100 次日本法医学会学術全国集会、東京 ( きゅりあん )、平成 28 年 6 月 15 日 ~ 17 日 .

武市 敏明, 北村 修, 王 璐, 塚 正彦、Methamphetamine 反復投与における線条体および中脳の神経マーカーと運動量の解析、第 101 次日本法医学会学術全国集会、岐阜 ( 長良川国際会議場 )、平成 29 年 6 月 7 日 ~ 9 日 .

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

武市 敏明 ( TAKEICHI, Toshiaki )  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号 : 90460360

### (2) 研究分担者

北村 修 ( KITAMURA, Osamu )  
 杏林大学・医学部・教授  
 研究者番号 : 70266609

### (2) 研究分担者

桐生 京佳 ( KIRYU, Kyoka ) ( 王 璐 )  
 杏林大学・医学部・准教授  
 研究者番号 : 60555051