

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37104
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791359
 研究課題名（和文）ドーパミン D1 受容体シグナルに着目した薬物依存および統合失調症の治療法開発
 研究課題名（英文）Dopamine D1 receptor agonists may be useful therapeutic agents for the treatment of drug addiction and schizophrenia.
 研究代表者
 首藤 隆秀（SHUTO TAKAHIDE）
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：70412541

研究成果の概要（和文）：ドーパミン D1 受容体刺激薬の反復投与は、薬物依存症および統合失調症のモデル動物において治療効果を示した。また、モデル動物の線条体において増強のみられたドーパミン D1 受容体シグナル伝達が、ドーパミン D1 受容体刺激薬の反復投与により正常化することを示唆する結果を得た。本研究の結果より、ドーパミン D1 受容体刺激薬の、薬物依存症および統合失調症に対する治療薬としての有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Chronic activation of dopamine D1 receptors induces the persistent reversal of behavioral sensitization to methamphetamine. The biochemical analyses suggest that chronic dopamine D1 receptor agonism adjusts the enhanced dopamine D1 receptor signaling in the striatum of methamphetamine-sensitized rats. The study provides experimental evidence that dopamine D1 receptor agonists may be useful as pharmacotherapeutic agents for the treatment of drug addiction and schizophrenia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：中枢神経薬理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：薬物依存、統合失調症、ドーパミン、メタンフェタミン、コカイン

1. 研究開始当初の背景

薬物依存症および統合失調症において治療・社会復帰を妨げる最大の原因は、症状が長期にわたり再燃をくり返す点、すなわち再燃準備性の持続にある。従って、対症療法ではなく再燃準備性の消去を目的とした新規治療法の確立が望まれる。

実験動物にコカインあるいは覚せい剤メタンフェタミンといった精神刺激薬を反復投与すると、惹起される自発運動量が次第に増加していく逆耐性（薬物に対する感受性亢進）が形成される。逆耐性は断薬後も半永久的に持続し、少量の薬物再投与で自発運動量の増大が再現される（逆耐性の発現）。この

ため逆耐性は薬物依存症や統合失調症の再燃準備性の持続を表す動物モデルと考えられているが、従来、一旦形成した逆耐性の消失は非常に困難であるため逆耐性は不可逆的であると考えられてきた。

しかし申請者らは近年、メタンフェタミン逆耐性を形成させたラットに、ドーパミン D1 受容体刺激薬 R-(+)-SKF38393 を反復投与すると、一旦形成した逆耐性が消失することを明らかとした。

一旦形成された逆耐性の消失は、疾患の根本的治療という重要性から注目されており、逆耐性消失に成功した薬物処置の報告が増えつつある。現在までに、ドーパミン D1 受

容体刺激薬、ドーパミン D1/D2 刺激薬と NMDA 受容体遮断薬あるいはセロトニン (5-HT_{2A} または 5-HT₃) 受容体遮断薬の併用、セロトニン受容体作用薬 (5-HT_{1A} 受容体刺激薬、5-HT_{2A} または 5-HT₃ 受容体遮断薬) が、逆耐性を消失させたという結果が報告されているが、いずれの薬物処置も、逆耐性を消失に至らしめた機序は解明されておらず、新規治療法開発のためには、その解明が望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、薬物依存症および統合失調症の再燃モデルである逆耐性を消失させるドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与の作用機序の解明ならびに、行動薬理学的実験により、薬物依存症および統合失調症の症状そのものに対する治療効果の評価を行うことを目的としている。

具体的な実験内容としては以下のものを計画した。

(1) ドーパミン D1 受容体シグナルを中心とした細胞内シグナル伝達の解析

タンパク質 DARPP-32 (dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) は、分子内にいくつかのリン酸化部位を持っており、34 番目のスレオニン残基 (Thr34) がリン酸化されるとプロテインキナーゼ A (PKA) のリン酸化作用効率を増大するが、75 番目のスレオニン残基 (Thr75) がリン酸化されると PKA 活性を抑制する。このように、リン酸化される部位の違いによりドーパミン D1 受容体/PKA 活性を制御することから、逆耐性の形成・消失において重要な分子であると考えられる。また、DARPP-32 の各リン酸化は、様々なシグナル伝達系による調節を受けているので、DARPP-32 リン酸化状態の解析により、各シグナルの強度を知ることができる。すなわち、DARPP-32 は、様々な細胞内シグナル伝達の解析において有用な評価系でもある。本研究では、DARPP-32 リン酸化解析により、逆耐性を消失させたシグナル伝達を解明する。

(2) 遺伝子発現制御機構 (エピジェネティクス) の解析

アセチル化やメチル化、リン酸化などのヒストン修飾は、クロマチンとよばれる DNA 高次構造の変換 (リモデリング) を起こし、遺伝子配列を伴わない遺伝子発現の制御 (エピジェネティクス) を行っている。近年、ドーパミン D1 受容体シグナルは DARPP-32 を介しクロマチンリモデリングを起こすことや、逆耐性形成にエピジェネティクスが関与していることが知られてきている。本研究では、エピジェネティクス解析により逆耐性消失

機序を解明する。

(3) 薬物依存症・統合失調症の症状に対する治療効果の検討

薬物依存症モデルである条件付け場所嗜好性試験および統合失調症の認知機能障害モデルであるブレパルスインヒビションテストを行い、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与およびその他の薬物処置の、これらの疾患の症状に対する治療効果を検討する。

3. 研究の方法

逆耐性形成後または逆耐性消失後の実験動物 (ラット、マウス) の大脳皮質、線条体、側坐核等各脳部位におけるシグナル伝達の変化を、タンパク質発現レベルおよび遺伝子情報発現制御レベルにおいて解析し、逆耐性消失機序の解明を行う。

さらに、行動薬理学的実験により、ドーパミン D1 受容体刺激薬の、薬物依存症および統合失調症の症状そのものに対する治療効果を検討し、薬物依存症および統合失調症の新規治療薬としての発展基盤となる研究を行う。

具体的な方法は、以下の通りである。

(1) モデル動物の作成

ラットまたはマウスにメタンフェタミンを 3 日に 1 度、計 5 回反復投与する。休薬 7 日目に少量のメタンフェタミン投与を行い、自発運動量を測定する。対照である生理食塩液反復投与群に対する有意な増大をもって逆耐性の獲得とする。逆耐性を獲得したラットに、選択的ドーパミン D1 受容体刺激薬 R-(+)-SKF38393 を 7 日間反復投与する。最終投与から 3 日後および 14 日後に再び少量のメタンフェタミンを投与し、自発運動量を測定する。逆耐性獲得後生理食塩液を反復投与した群と比較し、有意な自発運動量増大作用の抑制をもって逆耐性の消失とする。

(2) in vivo 条件での DARPP-32 リン酸化状態の解析

逆耐性形成後および消失後に実験動物の頭部にマイクロウェーブを照射し、脳内の酵素活性を瞬時に不活性化させる。DARPP-32 リン酸化状態もこの操作により固定される。前頭前皮質、線条体、側坐核を分離し、ウエスタンブロット法により DARPP-32 リン酸化状態をはじめ各タンパク質の解析を行う。生前の薬物投与の影響を動物個体レベルで捉えることを目的としており、脳全体の神経回路を介した薬物の作用を解明する。

(3) 脳スライスを用いた DARPP-32 リン酸化

状態の解析

逆耐性形成後および消失後に実験動物を断頭し、各脳部位のスライスを作成する。脳スライスをインキュベーションしながら薬物付加を行い、その後、ウエスタンブロット法により DARPP-32 リン酸化状態をはじめ各タンパク質の解析を行う。前述の *in vivo* 条件でのリン酸化解析では解析できない、薬物付加直後の即時的な反応を解明する。また、この方法は、薬物付加後の時間経過に伴う反応の変化や、様々な試薬の併用付加による反応を捉えることが可能である。

(4) ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御機構における変化の解明

逆耐性形成後および消失後に実験動物を断頭し、前頭前皮質、線条体、側坐核を分離する。クロマチン免疫沈降法 (ChIP)、ウエスタンブロット法、比色試験法によりヒストン H3 のアセチル化、メチル化、リン酸化レベルの測定、またはヒストン H4 のアセチル化レベルの測定を行う。各々のヒストン修飾の解析により遺伝子発現制御機構の変容を解明する。

また、ヒストンアセチル化に作用 (亢進あるいは抑制) する薬物を使用し、ヒストンアセチル化の、逆耐性形成・消失における役割を解明する。

(5) 条件付け場所嗜好性試験およびプレパルスインヒビションテスト

条件付け場所嗜好性試験 (CPP) とは、白と黒の 2 コンパートメントボックスに、薬物投与後に一方の区画へ、溶媒投与で他方の区画へ入れ一定の条件付けを行い、その後の試験試行において薬物側区画での滞在時間を測定する試験法であり、精神依存のモデルとして用いられている。

プレパルスインヒビション (PPI) とは、音刺激に対する驚愕反応が、音刺激の直前に驚愕反応を起こさない弱い音刺激を与えることにより抑制される現象であり、感覚運動情報制御機能 (sensorimotor gating) の指標と考えられている。PPI の低下は統合失調症における認知機能障害のモデルとして用いられている。

これらの試験法を用いて、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与およびその他の薬物処置が、再燃準備性の消失のみならず、各疾患の症状の抑制効果を示すか否かを検討する。

(6) DARPP-32 遺伝子改変マウスを用いた検討

DARPP-32 ノックアウトマウスおよび、DARPP-32 のリン酸化部位 (Thr34, Thr75) のいずれかをアラニンに置換しリン酸化を阻害したポイントミュータントマウスを用い

て上記の行動解析ならびに生化学的解析を行う。逆耐性の形成および消失における、DARPP-32 リン酸化によるドーパミン D1 受容体/PKA シグナル伝達制御の関与を解明する。

4. 研究成果

研究期間中に以下の研究成果を得た。

(1) メタンフェタミン急性作用では線条体におけるドーパミン D1 受容体/PKA シグナルが増強されるが、メタンフェタミンを反復投与した薬物依存症および統合失調症のモデルラットの線条体では、ドーパミン D1 受容体/PKA シグナルの反応性が減弱していた。このシグナル反応性の減弱は、ドーパミン D1 受容体刺激薬を反復投与することで正常に近づくという結果が得られた。

(2) DARPP-32 遺伝子改変マウスを用いた検討により、メタンフェタミン逆耐性の形成には、DARPP-32 Thr34 残基のリン酸化を介したドーパミン D1 受容体/PKA シグナルが必要であるという結果が得られた。

(3) ヒストン脱アセチル化薬レスベラトロールを用いた検討により、コカイン逆耐性の形成にはヒストンのアセチル化レベルの変化が関与していることが示唆された。

(4) 自発運動量を指標とした行動解析では、ラットと比べてマウスではドーパミン D1 受容体刺激薬による十分な治療効果が得られなかった。そのため、薬物依存症の精神依存の動物モデルである条件付け場所嗜好性試験においてラット用の実験装置の増設を行い、最適な実験条件を設定した。

(5) 統合失調症の認知機能障害の動物モデルであるプレパルスインヒビションテストでは、ドーパミン D1 受容体/PKA シグナルの増強が認知機能を亢進させるという結果を得た。

(6) 本研究を進める際、ヒストン脱アセチル化薬として広く用いられているレスベラトロールが、ドーパミン神経伝達に対して急性投与で増強作用を示すことを明らかとした。

以上の結果より、ドーパミン D1 受容体刺激薬の、薬物依存症および統合失調症に対する治療薬としての有用性が示唆された。

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 4 件)

(1) Shuto T, Kuroiwa M, Koga Y, Kawahara Y, Sotogaku N, Toyomasu K, Nishi A. Acute effects of resveratrol to enhance cocaine-induced dopamine neurotransmission in the striatum. Neuroscience Letters. 2013;542:107-112. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.050. 査読有り

(2) Kuroiwa M, Hamada M, Hieda E, Shuto T, Sotogaku N, Flajolet M, Snyder GL, Hendrick JP, Fienberg A, Nishi A. Muscarinic receptors acting at pre- and post-synaptic sites differentially regulate dopamine/DARPP-32 signaling in striatonigral and striatopallidal neurons. Neuropharmacology. 2012;63:1248-1257. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.046. 査読有り

(3) Kuroiwa M, Snyder GL, Shuto T, Fukuda A, Yanagawa Y, Benavides DR, Nairn AC, Bibb JA, Greengard P, Nishi A. Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex. Psychopharmacology (Berl). 2012;219:1065-1079. doi: 10.1007/s00213-011-2436-8. 査読有り

(4) Shuto T, Nishi A. Treatment of the psychostimulant-sensitized animal model of schizophrenia. CNS Neurosci Ther. 2011;17:133-139. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00218.x. 査読有り

[学会発表] (計4件)

(1) 首藤 隆秀、黒岩 真帆美、古賀 夕貴、河原 幸江、外角 直樹、西 昭徳
コカインで増強される線条体ドーパミン情報伝達に対するレスベラトロールの急性薬理作用
第86回日本薬理学会年会(2013/2/21-23 福岡)

(2) 黒岩 真帆美、浜田 美保、稗田 恵理子、首藤 隆秀、外角 直樹、西 昭徳
線条体におけるムスカリン受容体を介したDARPP-32リン酸化調節
第86回日本薬理学会年会(2013/2/21-23 福岡)

(3) 首藤 隆秀、黒岩 真帆美、古賀 夕貴、西 昭徳
コカインにより活性化される線条体ドーパミン神経伝達に対するレスベラトロールの急性作用
第65回日本薬理学会西南部会(2012/11/23 熊本)

(4) 首藤 隆秀、黒岩 真帆美、古賀 夕貴、西 昭徳
コカインにより活性化される線条体ドーパミン D1 受容体シグナルに対するレスベラトロールの影響
第85回日本薬理学会年会(2012/3/14-16 京都)

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
首藤 隆秀 (SHUTO TAKAHIDE)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 70412541

(2) 研究分担者 ()
研究者番号:

(3) 連携研究者 ()
研究者番号: