

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461716

研究課題名(和文) 神経接着因子NrCAMが形成する依存脳の神経ネットワークと依存表現型の解明

研究課題名(英文) NrCAM develops brain neural network and behavioral phenotypes of addiction.

研究代表者

石黒 浩毅 (ISHIGURO, Hiroki)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：20375489

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)：依存とは薬物嗜好にも新奇求性や社会性、強迫性、うつ・不安の易罹患性などの行動特性があるが、病態理解に基づいた薬物治療は存在しない。先行研究で明らかにした依存症関連遺伝子NrCAMは神経接着因子であるためNrCAMが依存の形成にあたり脳神経ネットワークを構築している可能性がある。本研究課題においてはまず、Nrcam遺伝子の低発現の有無および覚せい剤依存形成前後で変化する神経関連分子群を選出した。このうちの5つの遺伝子はコカイン依存形成により発現の違いが認められることを確認した。これらグルタミン酸神経系、GABA神経系およびドパミン神経系分子は依存症治療薬のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Substance dependence shows certain behavioral characteristics, such as novelty seeking sociability, obsessiveness, depression and anxiety besides preference. However, there is no medicine developed by understanding of the disease. Our previous study evaluated NrCAM that works in vulnerability to addiction. We therefore evaluated several neural molecules that changed their gene expression by methamphetamine administration, in addition, differently by low Nrcam expression. Among those, 5 genes were differently changed their expression also by cocaine administration in mice. Those glutaminergic, GABAergic, dopaminergic molecules could be new therapeutic targets for substance non-specific addiction.

研究分野：精神医学、遺伝医学、神経科学

キーワード：NrCAM 脳神経ネットワーク グルタミン酸神経 GABA神経 ドパミン神経 覚せい剤依存 コカイン依存

1. 研究開始当初の背景

薬物依存症は多因子疾患であり、物質嗜好や性格行動に関わる遺伝子が依存の獲得・易罹患性を決定することに加えて、依存性物質の影響下で働く疾患感受性遺伝子の機能の差異が依存症の進行・重症化に関わると我々は考えている。

先行研究にて網羅的ゲノム関連解析 (GWAS) とモルヒネ投与ラット脳の遺伝子発現プロファイリングで薬物反応性に変化を来たす遺伝子を探索し、物質依存に神経細胞接着因子 NrCAM が働くことを明らかとした。NrCAM 遺伝子の遺伝子多型は cis-acting に低発現を引き起こすことをヒト死後脳で明らかとなったため、Nrcam ノックアウトマウスをモデルとする行動解析を行った。ノックアウトマウスはアンフェタミン、モルヒネ、コカインに嗜好を形成しにくい特性を示し (Ishiguro et al. Neuropsychopharmacology 31:572-84, 2006)、前科研費研究課題においてはアルコール嗜好性獲得にも同様の働きを持っていることを明らかとしている。

NrCAM は成人脳の神経をガイド・接着することで依存脳を形成する。ヒトの薬物依存とは当該薬物の報酬効果以外、不安抑うつなどの精神、認知機能、性格傾向などの様々な臨床学的表現型が認められる。NrCAM は脳神経の発達・伸長、コンタクトとネットワークの機能を持つ分子であり、高次精神機能に関与することでこれらの依存関連性格行動を形成すると考えることが出来る。前科研費研究課題においては、非薬物影響下でも NrCAM 発現量の違いによりグルタミンアーゼの脳内発現が変化しており、グルタミンアーゼの阻害により物質嗜好性形成や不安惹起といった表現型が変化すること、しかし新奇求性や社交性、強迫性などには影響を与えないという解析結果を得た。NrCAM が依存形成に関わる働きの一部がグルタミンアーゼを介したものであることと結論づけた。さらに

Nrcam ノックアウトマウスに覚せい剤依存を形成した後の脳試料のトランスクリプトーム解析によって Nrcam の発現量を背景として覚せい剤投与によって異なる発現変化 (1.5 倍以上) を示す遺伝子を検索し、グルタミン神経分子 1 つと GABA 神経系分子 2 つを同定した。

2. 研究の目的

依存形成には NrCAM が key molecule として働くが、NrCAM へ直接作用する薬物は現在なく、また存在しても広範な影響が想像できるため依存症治療に応用は難しい。臨床ではグルタミン酸受容体および GABA 受容体に作用するアカンプロセートが臨床応用されており、先行研究にて得た知見は矛盾しない。しかしその臨床効果は限定的である。

本研究課題を含めた一連の科研費研究の目的は、異なる物質の依存形成に共通して NrCAM が働くメカニズムについて、共通した脳内の分子群あるいは異なる分子群が NrCAM を介してネットワークを形成し依存症を進展させることを解明することである。個々の当該分子の働きが、いずれのヒトの依存症の中核あるいは周辺症状・表現型に関わるかを同時に明らかにする。

国内においては昨今、芸能界や学生にまで薬物中毒が広がっている。またアルコール依存やうつに関連した自殺問題も深刻であり、これらの問題が引き起こす社会的損失は数千億円は下らない。NrCAM が制御する神経ネットワークと個々の分子が関与する表現型を明らかにできれば、それぞれへの作用薬剤を新規治療薬として依存症患者の各人の臨床症状に応じた薬物療法を施行し、より効果的な治療を行える可能性がある。新規治療薬の開発、診断技術の発展などの臨床応用に寄与することを目的とする。

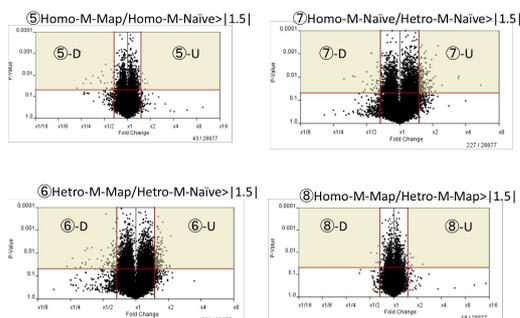
3. 研究の方法

(1) 依存症形成において NrCAM 低発現に影

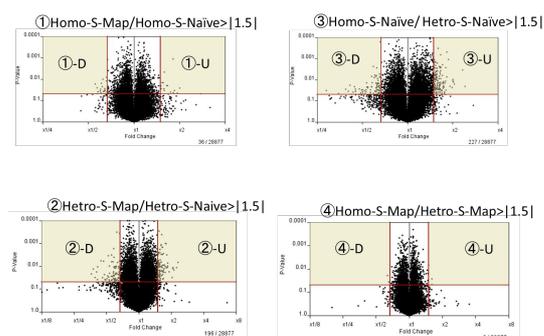
響を受ける遺伝子群を明らかにするために、*Nrcam* ノックアウトマウス抽出脳組織（線条体と腹側中脳）から抽出する RNA 試料中の遺伝子発現プロファイリングを行った。解析対象は、ノックアウトマウスは生理食塩水を投与した naïve あるいはメタンフェタミンあるいはコカインを投与した依存モデルを作成した。

(2) 覚せい剤依存群と Naïve 群とを比較し、網羅的遺伝子発現解析アレイ（Affymetrix）を用い、*Nrcam* 遺伝子型 × 依存の有無の 4 群を比較した。アレイにて統計学的に多重比較補正を行わない nominal P value で 0.05 以下の変化を示した遺伝子を選出した。

中脳



線条体



(3) モノアミン系、グルタミン酸系、GABA 神経系に関連した分子について個別に TaqMan realtime PCR 法にて追試を行った。各神経系に分けてパスウェイアナリシス解析を行い、*Nrcam* を介して依存形成に関連した神経ネットワークを明らかにした。

(4) (3)の解析で示唆された遺伝子についてコカイン依存群と Naïve 群との比較で同様の変化が認められるかを TaqMan realtime PCR 法にて確認を行った。

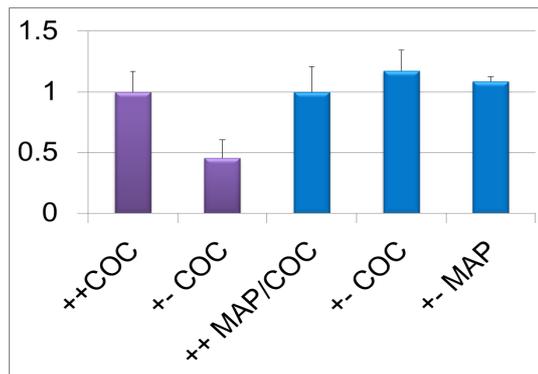
(5) (3)(4)にて依存関連分子であると示唆された *Grm2* 受容体については ligands をマウスに投与して、*Nrcam* ノックアウトマウスと行動比較中である。

4. 研究成果

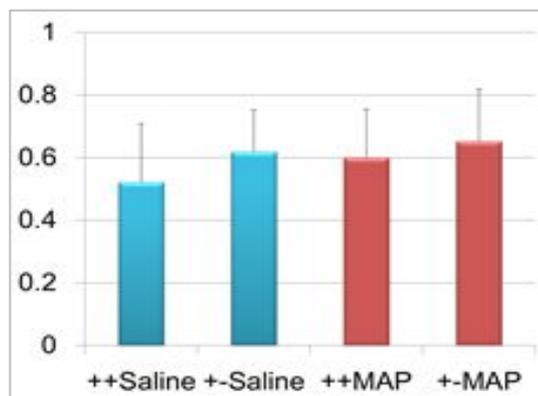
Nrcam ノックアウトマウスの遺伝子型と覚せい剤依存形成の有無について図のように網羅的遺伝子発現解析遺伝子発現に差（nominal P value で 1 つ以上の 0.05 以下を示す）があった遺伝子候補を得た（図 1）。

この中で概ね 1.2 倍以上の遺伝子発現差が認められる 6 遺伝子に着目した。コカイン依存を形成したマウスの脳試料を用いて、これらの遺伝子について TaqMan 遺伝子発現解析を行った結果、*Grm2*、*Gabrg2* は有意な遺伝子発現差が認められ、*Slc17a7* と *Drd5* は遺伝子発現差の傾向（ $P = 0.08$ 程度）が示唆される結果を得た。しかし、*Gabrg2* 遺伝子発現の変化は覚せい剤とコカインで異なるパターンを示しており、物質特異的な変化であるかどうか更なる検討が必要である。

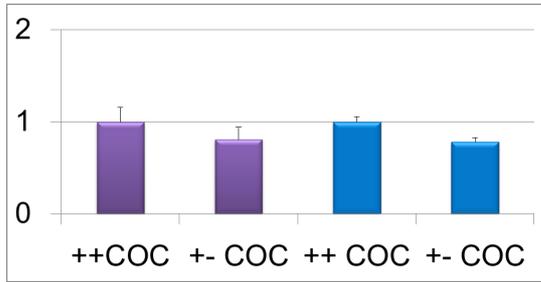
Gabrg2



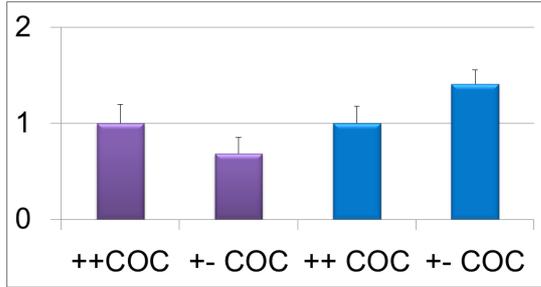
Gabrg2



Slc17a7



Drd5



さらに、統計的に有意ではなかった Slc17a7 と Drd5 については検体数を増やして検討する必要がある。また同様にモルヒネ依存を形成したマウス脳を用いて解析を行い、共通した分子メカニズムの有無について検討をすることで、これらの神経系遺伝子群の依存症における作用を明らかにできると考えている。Grm2 同様にそれらの分子のリガンドを用いて薬理行動解析を進めることで、依存症の薬物療法確立への知見集積を行っている。

図 1
relative gene expression between difference genotypes after MAP treatment

relative expression		Heterozygote/Homozygote			
		MIDBRAIN		STRIATUM	
		Saline	MAP	Saline	MAP
Glutamatergic	Adcy2	ns	ns	0.68	ns
	Adcy3	0.84	ns	0.78	ns
	Adcy5	0.89	ns	0.93	ns
	Adcy8	ns	ns	0.82	ns
	Adcy9	ns	ns	0.85	1.04
	Dlgap1	ns	1.15	0.75	ns
	Eaat	ns	0.88	ns	ns
	Glns	ns	ns	0.89	ns
	Grik2	ns	ns	1.31	ns
	Grik3	0.84	1.04	0.69	ns
	Grik4	ns	0.96	0.72	ns
	Grik5	ns	ns	0.83	ns
	Grin2d	ns	ns	0.84	ns
	Grm1	1.21	ns	1.11	ns
	Grm2	0.78	ns	0.62	ns
Grm5	ns	ns	1.26	ns	
Homer2	ns	ns	0.81	ns	
Shank2	ns	ns	0.77	ns	
Shank3	ns	ns	0.73	ns	
Slc17a7	ns	1.77	0.29	3.5	
Slc1a1	1.24	0.88	1.32	ns	
Slc38a1	1.47	ns	ns	ns	
Trpc1	ns	ns	1.23	1.04	
GABAergic	Gabra1	1.25	ns	ns	ns
	Gabra3	1.39	ns	ns	ns
	Gabra4	ns	ns	1.39	ns
	Gabrb2	1.22	ns	ns	0.91
	Gabrg1	1.37	ns	1.32	0.89
	Gabrg2	1.35	ns	ns	ns
	Gabrg3	1.17	ns	1.12	ns
	Gad1	ns	0.89	ns	ns
Gad2	1.21	0.91	1.2	ns	
Src	0.81	ns	0.8	ns	
Dopaminergic	Akt2	0.76	ns	0.88	ns
	Comt	0.88	ns	ns	ns
	Creb1	0.77	ns	ns	ns
	Drd1a	ns	ns	1.2	ns
	Drd3	1.51	ns	0.95	ns
	Drd5	0.74	ns	0.87	ns
Maob	1.27	ns	1.25	ns	

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)

[学会発表](計 3件)

Ishiguro H, Sakurai T, Motohashi N, Onaivi ES. NrCAM regulating neural

systems in addiction vulnerability.
Neuroscience 2016. 2016年11月16日
San Diego Convention Center (San
Diego, USA)

石黒浩毅、神経接着因子 NrCAM が形成
する依存脳の神経ネットワークと依存表
現型の解明 平成 27 年度アルコール・薬
物依存関連学会合同学術総会:第 50 回日
本アルコール・薬物医学会 ・ 第 37 回日
本アルコール関連問題学会・第 27 回日本
依存神経精神科学会、シンポジウム 11
アルコール・薬物依存症の神経生物学・
遺伝学的研究の動向—若手精神科医を中
心に— 平成 25 年 10 月 13 日、神戸国際
会議場 (神戸)

Ishiguro H, Onaivi ES, Tabata K,
Nakayama S, Sogabe H, Sakurai T,
Kubota T, Motohashi N. NRCAM
related neural system in an animal
model of addiction. 4th APSAAR/5th
IDARS. 2015 年 8 月 18 日、The Westin,
Sydney (Sydney, Australia)

〔その他〕

ホームページ等 (近日掲載予定)

<http://seishin-shinkei.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石黒 浩毅 (ISHIGURO, Hiroki)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号 : 2 0 3 7 5 4 8 9