

機関番号：35303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791153

研究課題名 (和文) 覚せい剤・麻薬依存での Ca²⁺ 動態変化における調節機序とその機能的意義の解明研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms and functions in Ca²⁺ response regulated by methamphetamine and morphine on drug dependence

研究代表者

芝崎 真裕 (SHIBASAKI MASAHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80412162

研究成果の概要 (和文)：

覚せい剤ならびに麻薬による精神依存形成は nifedipine により用量依存的かつ有意に抑制され、側坐核において L 型 HVCC 蛋白質の有意な発現増加が認められた。この発現増加に、Vps34 による細胞内小胞輸送の促進が重要な役割を担うことを明らかとした。さらに、L 型 HVCC を介した細胞内 Ca²⁺ 応答の亢進による、ADF 発現の促進が覚せい剤誘発精神依存形成に重要な役割を果たすことを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

Administration of nifedipine dose-dependently reduced the development of methamphetamine- and morphine-induced rewarding effect. Under the conditions, protein levels of L-type VDCC in the limbic forebrain were significantly increased on methamphetamine- and morphine-induced rewarding effects. The up-regulation was regulated by Vps34 relating intracellular vesicular traffic. Furthermore, enhancement of Ca²⁺ response by L-type VDCC induced increase of ADF and development of dependence on methamphetamine and morphine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：精神神経薬理学

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：覚せい剤、麻薬、精神依存、L 型カルシウムチャンネル、細胞内 Ca²⁺ 動態

1. 研究開始当初の背景

現在、第 3 次薬物乱用期を迎えた我が国では、依存性薬物の乱用が若年層にまで及び、社会問題となっている。依存性薬物として、覚せい剤や大麻、cocaine、heroin、シンナーなどの有機溶剤が知られている。また、最近では、覚せい剤や麻薬へのゲートウェイドラッグと言われる、いわゆる違法ドラッグの乱用も問題となっている。これらの薬物を摂取すると、多幸感や快感を惹起し、精神依存

を形成する。近年、違法ドラッグの規制や対策が強化されているものの、乱用者は後を絶たず、今後、薬物乱用問題はより一層深刻化する恐れがある。

動物実験の結果から、覚せい剤である methamphetamine や麻薬である morphine は慢性投与により脳の高次機能が非可逆的な変化、いわゆる神経の可塑的变化を生じることが明らかとなっている。精神依存形成時には、依存性薬物により様々な脳部位にお

る形態的機能的変化が誘導され、神経伝達経路や効率が変化し、異常なニューロンネットワークが構築されていると考えられる。特に、精神依存形成においては dopamine (DA) 含有ニューロンが重要な役割を果たしているとの見解が数多く報告されている。こうした背景から、精神依存形成時における DA 神経系の変化については多くの検討が行われているが、それらの変化を惹起し、維持していると考えられる細胞内情報伝達系の機能変化に関する詳細な検討はほとんど行われていない。

一方、voltage-dependent calcium channel (VDCC) は興奮性細胞、非興奮性細胞を問わず多くの細胞で発現しており、多種多様な生理機能の調節・制御において中心的な役割を果たしている。VDCC は細胞膜の脱分極を感知し、細胞外に高濃度で存在する Ca^{2+} を選択的に透過させる。VDCC を介した細胞内 Ca^{2+} 動態の変化は、脳内神経細胞における多彩な機能に大きく関与しており、耽溺・薬物依存形成における神経の可塑的变化に、極めて重要な役割を担っていると考えられる。現在までに本研究申請者は、細胞内での物質輸送に深く関わる言われている phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) class III である vacuolar protein sorting34 (Vps34) が PKC γ により調節を受けることを報告している。したがって、覚せい剤や麻薬などの薬物依存は、PKC-Vps34 カスケード亢進により VDCC の up-regulation が誘導され、それに伴う細胞内 Ca^{2+} 応答の増強と細胞内情報伝達経路の変化に連関性があり、これら細胞内 Ca^{2+} 動態とその機能的な変化が、神経細胞の樹状突起伸展伸長を誘導し、精神依存形成における神経の可塑的变化を惹起しているのではないかと考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

Methamphetamine (METH) や morphine (MRP) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序の本体を解明するには至っていないのが現状である。

動物実験の結果から、METH や MRP は慢性投与により脳の高次機能の非可逆的な変化、いわゆる神経の可塑的变化を生じることが明らかとなっている。種々の薬物依存症において、腹側被蓋野から側坐核へと投射する中脳辺縁 dopamine (DA) 神経系が重要な役割を果たすことが、数多く報告されている。精神依存形成時における DA 神経系の変化について多くの検討が行われているが、それ

らの変化を誘導し、維持していると考えられる細胞内情報伝達系の機能変化に関する詳細な検討は十分ではない。

一方、電位開口性カルシウムチャンネル (VDCC) は細胞膜上に Ca^{2+} を透過させる $\alpha 1$ と呼ばれる pore 形成 subunit と、これに付随する $\alpha 2/\delta$, β および γ subunit から構成されている。カルシウムチャンネルを介して細胞内に流入した Ca^{2+} は、生体物質の調節機能の 1 つとして作用しており、筋収縮をはじめ神経伝達物質やホルモンの放出、遺伝子転写、細胞の増殖や分化などに関与している。VDCC を介した細胞内 Ca^{2+} 動態の変化は、脳内神経細胞における多彩な機能に大きく関与することが報告されており、耽溺・薬物依存形成における神経の可塑的变化に、極めて重要な役割を担っていると考えられる。

現在までに METH の長期投与は DA 神経における Ca^{2+} 流入増加を誘発すること、METH の強化効果や報酬効果が dihydropyridine 系薬物により抑制されることが報告されている。これらの事実は、METH による精神依存形成機序に、VDCC の機能亢進を伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与し、その Ca^{2+} 動態の変化が神経機能の変化を誘導していると推察される。一方、神経細胞において Ca^{2+} の局所的な上昇は actin の重合を誘導することが知られている。神経細胞間における情報伝達は synapse を介することが知られているが、synapse の形成には、actin・微小管など細胞骨格系が重要な働きをしており、actin 結合蛋白質により actin の重合・脱重合が調節されている。したがって、METH による精神依存時に認められる細胞内 Ca^{2+} 応答の変化は actin dynamics の制御に重要な働きをしていることが推察される。現在までに細胞骨格の制御に関し、actin 結合蛋白質である非筋型 cofilin、筋型 cofilin、actin depolymerizing factor (ADF)、などが同定されており、これらは fibrous (F)-actin に対する脱重合活性と actin filament の切断活性を有することが明らかになっている。しかしながら、METH 誘発精神依存における actin dynamics の関与については、未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、METH あるいは morphine による精神依存に対する VDCC の関与と細胞骨格の変化による神経可塑性への関与について、行動薬理学的および神経科学的観点から検討した。

3. 研究の方法

(1.) 使用動物

実験には 6 週齢の ddY 系雄性マウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan)、C57BL/6J 系雄性マウスあるいは ADF 変

Fig. 1A

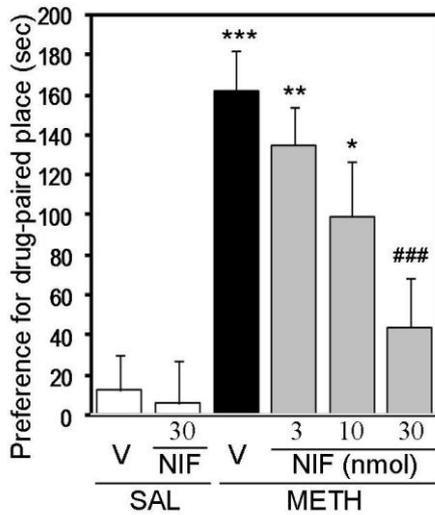


Fig. 1B

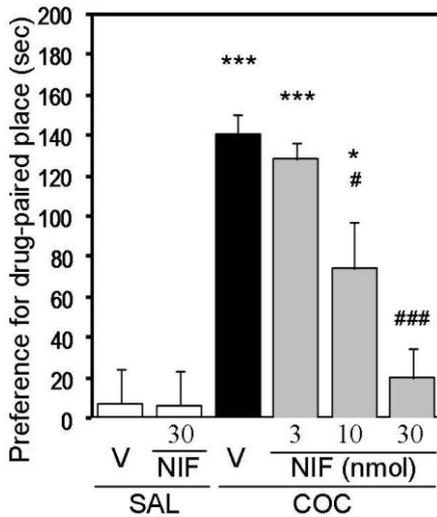


Fig. 1C

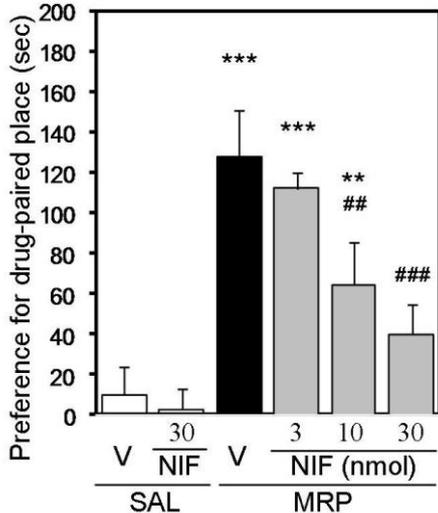
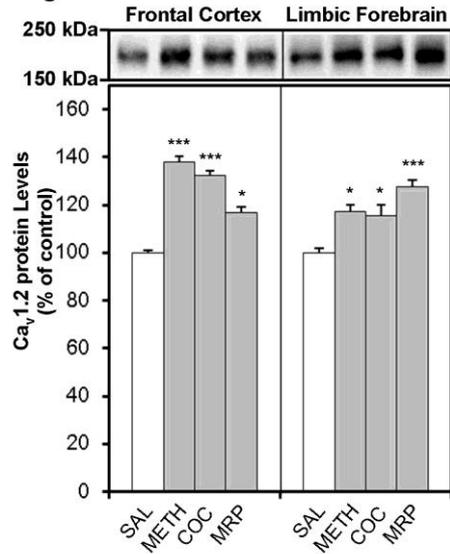


Fig. 2



異型動物である C57BL/6J *Smn-Dstn^{corn1-2J}/J* 系雄性マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)、B6.129P2-*Cacna1c^{tm1Dgen}/J* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) を使用した。マウスは恒温室 (22±1°C) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取させた。

(2.) 精神依存の評価

METH あるいは MRP による精神依存は conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。実験装置は白および黒からなる compartment box を使用した。条件付けの前日あるいは翌日に、白および黒の区画を自由に往来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これをそれぞれ pre-test 値および post-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (1 mg/kg, s.c.) あるいは MRP (5 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間放置し、2 日目には saline を投与し、もう一方の区画に 60 分間放置する操作で、合計 3 session 行った。Saline のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。Post-test 値と pre-test 値の差をスコア (sec) として算出した。また、L 型 VDCC 拮抗薬である nifedipine (10-100nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA))、Vps34 阻害薬である wortmannin (1-10nmol, (Sigma Co., St. Louis, USA)) は METH あるいは MRP 処置 30 分前に脳室内に投与した。

(3.) Western blot 法

Fig. 3A

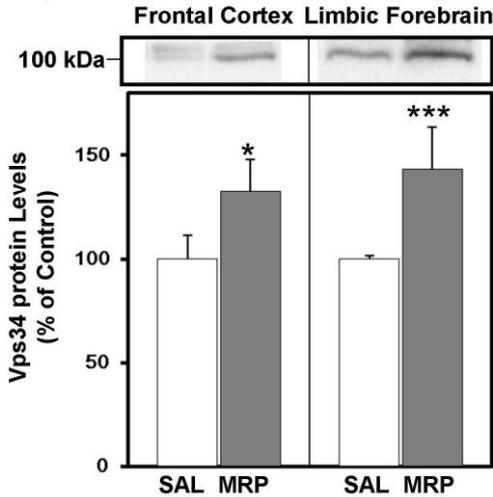
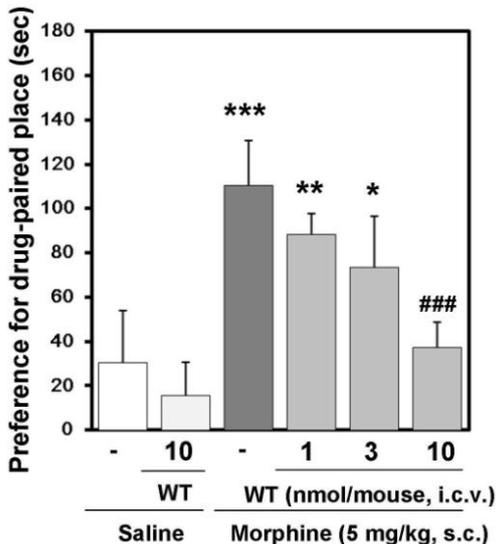


Fig. 3B



METH 誘発報酬効果獲得動物あるいは对照群のマウスより全脳を摘出して脳アトラスに従い帯状回、側坐核を含む領域を分画した。組織を lysis buffer と共に、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer を加え、SDS-PAGE 法に従って、7.5%のポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20 μ g 蛋白を適用し分離した。分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを 5% nonfat dried milk を含む phosphate-buffered saline (PBS) 中でブロッキングし、一次抗体として、それぞれ 1000-5000 倍希釈した anti- α 1c subunit (Alomon Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、anti- α 2/8 subunit (Alomon Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、anti-dopamine D1-R (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)、anti-ADF (Sigma Co., St.

Fig. 4A

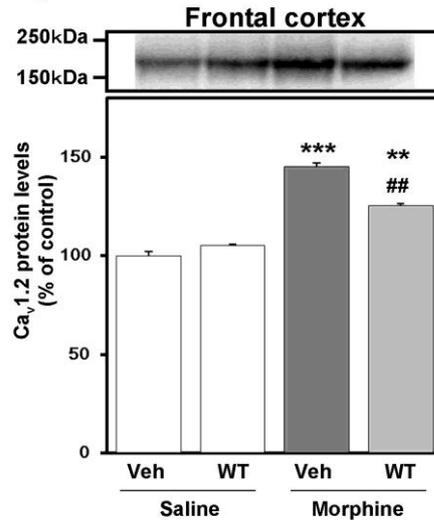
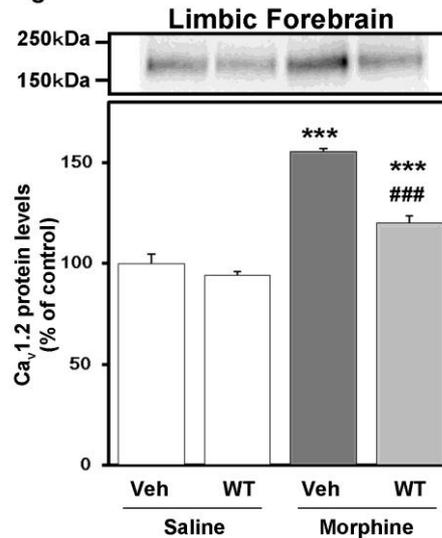


Fig. 4B



Lousi, USA) と共に、反応させるため、1時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に1時間反応させた。反応後、ケミルミノエッセンス法に従い、蛍光発色性基質を用いて目的とするタンパク質を同定した。

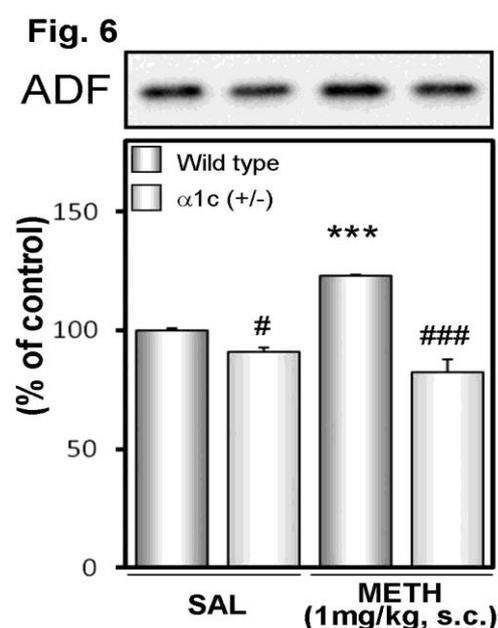
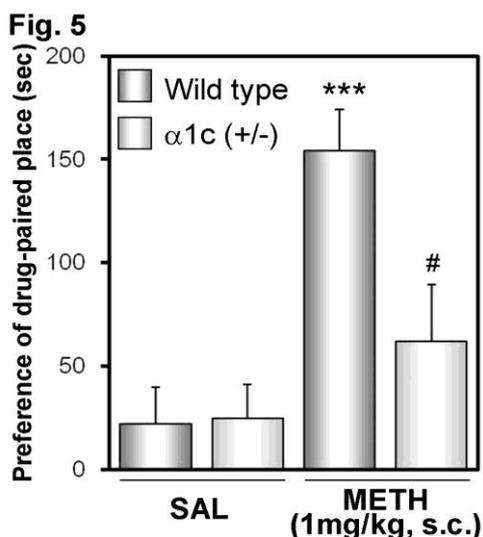
(4.) 統計解析

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) で示した。有意性の評価には二元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test あるいは Student's t-検定を用いて評価した。

4. 研究成果

(1.) Methamphetamine (METH)、cocaine (COC)、morphine (MRP) 誘発報酬効果に対する nifedipine (NIF) の影響

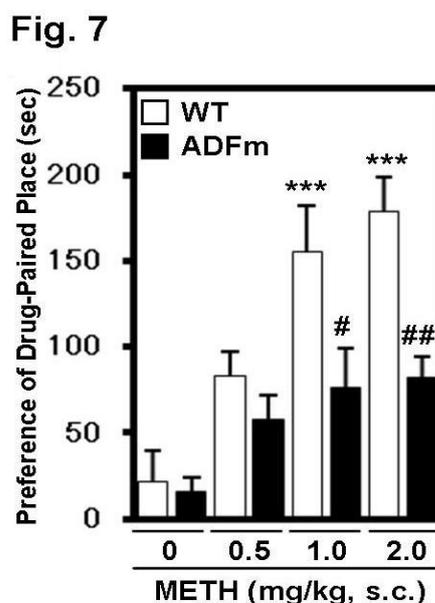
条件づけ場所嗜好性試験を用いて、METH、



COC、MRP 誘発報酬効果に対する L 型 VGCC 拮抗薬 nifedipine の影響について検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は、nifedipine の脳室内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 1A-C)。

(2.) Methamphetamine (METH)、cocaine (COC)、morphine (MRP) 誘発報酬効果獲得動物における脳内 $\alpha 1c$ subunit 蛋白質量の変化

METH、COC、MRP 誘発報酬効果獲得マウスの帯状回を含む frontal cortex 領域ならびに側坐核を含む limbic forebrain 領域における $\alpha 1c$ subunit 蛋白質量の変化について検討した。その結果、対照群に比し METH、COC、MRP 誘発報酬効果獲得マウスの frontal cortex 領域ならびに limbic forebrain 領域において、 $\alpha 1c$ subunit 蛋白質



量の有意な増加が認められた (Fig. 2)。

(3.) Morphine (MRP) 誘発報酬効果における Vps34 の関与

MRP 誘発報酬効果獲得マウスの帯状回を含む frontal cortex 領域ならびに側坐核を含む limbic forebrain 領域における Vps34 蛋白質量の変化について検討した。その結果、対照群に比し MRP 誘発報酬効果獲得マウスの frontal cortex 領域ならびに limbic forebrain 領域において、Vps34 蛋白質量の有意な増加が認められた (Fig. 3A)。そこで、条件づけ場所嗜好性試験を用いて、報酬効果形成への関与について検討した。Vps34 の阻害薬である wortmannin (WT) を脳室内前処置することにより、MRP 誘発報酬効果は用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 3B)。このような条件下、frontal cortex 領域ならびに limbic forebrain 領域での MRP による $\alpha 1c$ subunit 蛋白質量の有意な増加は、WT の処置により有意に抑制された (Fig. 4A, B)。

(4.) Methamphetamine (METH) 誘発報酬効果に対する actin depolymerizing factor (ADF) の関与

L 型 VDCC を構成する $\alpha 1c$ サブユニット半欠損マウス ($\alpha 1c (+/-)$) を用いて、条件づけ場所嗜好性試験を行ったところ、野生型で認められる報酬効果の形成は $\alpha 1c (+/-)$ マウスにおいて有意な減少が認められた (Fig. 5)。このような条件下において、アクチン動態を制御する ADF の変化について検討したところ、 $\alpha 1c (+/-)$ マウスでは、saline ならびに METH のいずれの処置においても、野生型マウスに比べ、ADF 蛋白質発現量の有意な減少が認められた (Fig. 6)。そこで、ADF の機能が欠損した ADF 変異マウス (ADFm) を用いて条件づけ場所嗜好性試験を行ったところ、METH 誘発報酬効果の形成は有意に

抑制した (Fig. 7)。以上の結果から、依存性薬物により L 型 VDCC の発現増加が誘導され、それに伴った ADF の発現変化がシナプス形成等の神経可塑的变化を引き起こし、精神依存形成が誘導されると推察される。

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 6 件)

① Shibasaki M, Mizuno K, Kurokawa K, Ohkuma S. Enhancement of histone acetylation in midbrain of mice with ethanol physical dependence and its withdrawal. *Synapse*. 査読有 2011 (in press)

② Shibasaki M, Kurokawa K, Mizuno K, Ohkuma S. Up-regulation of Ca(v)1.2 subunit via facilitating trafficking induced by Vps34 on morphine-induced place preference in mice. *Eur J Pharmacol*. 査読有 2011. 651. 137-145.

③ Shibasaki M, Inoue M, Kurokawa K, Ogou S, Ohkuma S. Expression of serotonin transporter in mice with ethanol physical dependency. *J Pharmacol Sci*. 査読有 2010. 114. 234-237.

④ Shibasaki M, Kurokawa K, Ohkuma S. Upregulation of L-type Ca(v)1 channels in the development of psychological dependence. *Synapse*. 査読有 2010. 64. 440-444.

⑤ Shibasaki M, Kurokawa K, Ohkuma S. Role of alpha2/delta subunit in the development of morphine-induced rewarding effect and behavioral sensitization. *Neuroscience*. 査読有 2009. 163. 731-714.

⑥ Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKCgamma during short-term treatment with morphine. *Synapse*. 査読有 2009. 63. 365-368.

[学会発表] (計 8 件)

① 芝崎真裕、水野晃治、黒川和宏、大熊誠太郎、エタノール身体依存におけるアクチン動態、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 2 月 15 日 (誌上開催)

② 芝崎真裕、黒川和宏、水野晃治、大熊誠太郎、アルコール依存形成における actin depolymerizing factor の役割、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010 年 11 月 19 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

③ 芝崎真裕、大熊誠太郎、アルコール依存症

の離脱メカニズム、平成 22 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、2010 年 10 月 8 日、リーガロイヤルホテル小倉 (福岡県)

④ 芝崎真裕、大熊誠太郎、アルコール依存症と気分障害の機能的相関性、平成 22 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、2010 年 10 月 7 日、リーガロイヤルホテル小倉 (福岡県)

⑤ 芝崎真裕、Study Groups 7: 抗精神薬や鎮痛剤の依存リスク、第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、2010 年 9 月 16 日、仙台国際センター (宮城県)

⑥ 芝崎真裕、黒川和宏、水野晃治、大熊誠太郎、Methamphetamine 誘発精神依存形成における actin depolymerizing factor の役割、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日、大阪国際会議場 (大阪府)

⑦ 芝崎真裕、黒川和宏、水野晃治、大熊誠太郎、Methamphetamine 誘発精神依存形成における actin depolymerizing factor の関与、第 39 回日本神経精神薬理学会、平成 21 年 11 月 14 日、国立京都国際会館 (京都府)

⑧ 芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎、アルコール性障害としてのうつ病と自殺：うつ病とアルコール依存症の生物学的相同性、第 21 回日本アルコール精神医学会、平成 21 年 9 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 3 件)

① 芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎、脳とこころのプライマリ・ケア 第 8 巻 依存 VI. 薬物依存の基礎と臨床 2. ベンゾジアゼピン依存 a. ベンゾジアゼピン依存の基礎、Synergy、2011、223-235

② 大熊 誠太郎、芝崎 真裕、黒川 和宏、ストレス百科事典 [ベンゾジアゼピン]、武田弘志・辻 稔/編、丸善株式会社、2009、310-316

③ 大熊 誠太郎、黒川 和宏、芝崎 真裕、ストレス百科事典 [興奮性アミノ酸]、武田弘志・辻 稔/編、丸善株式会社、2009、970-975

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=205>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝崎 真裕 (SHIBASAKI MASAHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80412162