

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08603

研究課題名(和文) 脳ヒスタミン不活性化経路と薬物依存治療

研究課題名(英文) Inactivation pathway of brain histaminergic system and pharmacotherapy for methamphetamine addiction and abuse

研究代表者

北中 純一 (Kitanaka, Junichi)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10278830

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)：「ヒスタミン神経系活性化による覚せい剤作用の抑制効果」仮説に基づき、その神経終末でのヒスタミン含量増加作用を作用力価の指標に、脳内ヒスタミン神経系活性化効果を持つ化合物の探索を行った。その結果、agmatine、pitolisant、JNJ-10181457が脳ヒスタミン神経系を、視床下部からヒスタミンを遊離することで、活性化する薬物であることを確認した。ヒスタミン神経系と常同行動治療については、メマンチン(中等度から重度アルツハイマー型認知症の治療薬)がマウスにおいて常同行動を引き起こすことを発見し、それをヒスタミン受容体活性化作用を持つ薬物betahistineが抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that methamphetamine (METH)-induced abnormal behaviors such as hyperlocomotion and stereotypy in rodents are attenuated by treatment with histamine inactivating enzyme inhibitor HMT (histamine N-methyltransferase) which increases brain histamine levels. In this project, we have searched chemical compounds which effectively release histamine in brain and activate brain histaminergic neuronal system, and found that three compounds (agmatine, pitolisant, and JNJ-10181457) effectively released histamine in the hypothalamus, and that they attenuated METH-induced hyperlocomotion and stereotypy in mice. These compounds did not exhibit unexpected side effects so that they might be candidates of pharmacotherapy for METH addiction and abuse. A possible association of histaminergic activation with suppression of stereotypy is also found in this project using mice showing memantine-induced stereotyped behavior.

研究分野：薬物依存の薬理学

キーワード：覚せい剤 中枢ヒスタミン神経系 アグマチン ヒスタミンH3受容体逆作動薬 ヒスタミンNメチル基転移酵素 視床下部 過運動 高速液体クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳のヒスタミン作動性神経は、後部視床下部・結節乳頭核を起始核として線維を脳構造のあらゆる領域へ投射していることが解剖学的に知られている。ヒスタミン神経終末は他の神経細胞にシナプス結合するだけでなく、ノルアドレナリン神経と似たバリコシティー (en passant 型のシナプス) を形成してそこからヒスタミンを放出する。その広範なヒスタミン神経系ネットワークのため、様々な脳機能を調節・修飾していると推定されており、事実ヒスタミン神経系の「覚醒維持」や「摂食/飲水活動」、「ACTH、プロラクチン、バソプレシン内分泌機能」への強い関与は特によく研究されている。一般的にはヒスタミン神経は個別の感覚/運動情報を伝達するのではなく、別の入力に対する感度を調節している可能性が考えられている。

情報伝達物質としてのヒスタミンは、必須アミノ酸の一つである L-ヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase; HDC と略する) により合成されて脳内に供給される。脱分極性刺激などによりシナプス終末やバリコシティーから放出されると、 H_1 ~ H_4 の 4 サブタイプのヒスタミン受容体と結合して生理反応を引き起こす。反応後のヒスタミンは情報伝達を終了するために、有機カチオントランスポーター3 (OCT3) やモノアミントランスポーター PMAT といった多様な基質を細胞内に取り込むトランスポーターを介してシナプス間隙から細胞内へ取り込まれ、次いで細胞内に存在する分解酵素であるヒスタミン *N*-メチル基転移酵素 (histamine *N*-methyltransferase; HMT と略する) によって代謝されて、ヒスタミンは完全に情報伝達物質として消去される。HMT は中枢神経系に局在する酵素で (後述の通り、機能不明ながら腎臓に mRNA の強い発現が知られている) 脳内のヒスタミンを代謝する主要酵素である。一方末梢ではヒスタミン代謝はジアミン酸化酵素 (diamine oxidase; DAO と略する) がヒスタミン代謝経路の初発酵素である。

(2) これまでに私たちは、ヒスタミン不活性化経路に関与する酵素群 (HMT、DAO) の遺伝子クローニングと構造決定、その中枢および末梢組織局在を明らかにしてきた。その結果脳においては HMT が唯一のヒスタミン代謝酵素であることを示した。実際に脳 HMT 酵素活性によってヒスタミン受容体情報伝達系が調節されていることを報告し、ヒスタミン不活性化経路の分子生物学をリード

してきた。ヒスタミン神経系の活性化は、中枢神経疾患において他の神経伝達物質に比べて研究が少ない。その中で、治療効果が示唆されている多くの知見は H_3 受容体を介した話題である。 H_3 受容体アンタゴニスト (あるいは、 H_3 受容体逆作動薬) において脳内ヒスタミン量は増え、ヒスタミン受容体への結合が増すと考えられる。精神病や薬物依存といった脳の疾患にヒスタミン神経が関与する可能性が近年提唱されている。一般的にはヒスタミンの脳内含量が上昇する方向に治療効果が認められていることから、ヒスタミン合成を高めたり遊離を促進したり、あるいはヒスタミン代謝を阻害する薬物の、抗精神病薬としての可能性が研究されているが、脳移行性が良くなかったり副作用がある薬物が多く臨床応用にはいまだ遠いのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 私たちはこれまで HMT 阻害薬としての metoprine や SKF-91488、あるいはヒスタミン前駆物質としての L-ヒスチジンに、覚せい剤 (*d*-メタンフェタミン、METH と略する) 誘発異常行動を寛解することを動物実験によって報告してきた。またプレシナプスの自己受容体である H_3 受容体の作動薬によって視床下部ヒスタミン含量を低下させると METH 誘発異常行動を増悪することを報告した。特に視床下部ヒスタミン含量 (低下方向) と異常行動の発現頻度 (増加方向) との間には強い負の相関関係があり、脳内ヒスタミン神経系の活性化は METH をはじめとする薬物依存を治療する可能性を強く示唆する。マウスの実験ではヒスタミンの脳内含量を調節する薬物として HMT 阻害薬が、用量反応性に優れて調節性があり適用しやすい。一方で、HMT mRNA は腎臓にも機能不明ながら発現しており、中枢移行性の高い薬物を用いたとしても「末梢性副作用」発現が否定できない。そのため、HMT 阻害薬を核とした実験と並行し、HMT と同様の薬理学的効果 (= 中枢組織でのヒスタミン含量の増加) を示す薬物での、ヒスタミン神経系活性化を第一とした薬物依存治療方法の探索を中心課題に、副作用のより少ない、中枢移行性の優れた薬物を検索して薬物依存を治療する可能性を追求・研究することを本計画課題の目的とした。

(2) これまでの研究業績を踏まえて、以下の点を明らかにする：

新規 HMT 阻害薬の検索 ~ アグマチン系構造類似体を中

心に

脳でヒスタミン含量を増加させるヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストの、METH 誘発異常行動に対する抑制効果
薬物依存モデル動物に対するヒスタミン神経系活性化の治療効果

まず、 に関しては HPLC-蛍光検出法によりポリアミン前駆物質であるアグマチン (= 脱炭酸アルギニン) が視床下部ヒスタミン含量を増加させることを見出した (日本ヒスタミン学会第 18 回学術集会(2014 年)にて成果の一部を発表)。その含量変化は metoprine 作用と極めて似ておりアグマチン及び代謝産物であるポリアミン類が HMT を抑制している可能性がある。事実 10 mg/kg の METH 作用 (常同行動) に対するアグマチン効果は metoprine のそれと同一であった。HMT 阻害薬は 1970 年代に報告された metoprine を最後に比較的 HMT に選択的とされる中枢移行性化合物の報告はないので、agmatine の薬理作用について、生化学的・行動学的に評価する。 では METH 誘発異常行動、特に過運動と常同行動に対するヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストの作用を metoprine と比較し、また副作用 (記憶障害や不安惹起作用、攻撃性増大、腎障害) の発現程度を検証する。(3) ではモルヒネ依存におけるヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストの寛解作用を検証し、その分子機構を関与するヒスタミン受容体サブタイプの究明をはじめとして解明する。ヒスタミン受容体情報伝達系の治療への関与は報告例が少ないがそのほとんどはポジティブであり、実用化可能性が高いと想定され、新規な神経経路での脳疾患治療の例として精神科領域に広く波及する効果があると考えられる。

3. 研究の方法

研究期間 (3 年) を通じて研究分担者に役割分担を仰ぎ、2015 年度にまず agmatine (新規な HMT 阻害薬としての可能性がある) を既知の metoprine と比較しながら評価する。主たる実験手技は高速液体クロマトグラフィー (HPLC と略する) (ヒスタミン系は蛍光検出、モノアミン類は ECD 検出) である。2016 年度には、研究協力者の参画を仰ぎ、agmatine やヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニスト (特に pitolisant) の主作用 (METH 依存に対する寛解作用)・副作用を、行動実験と血圧測定、生化学実験を並行して網羅的に検討し、metoprine との比較、その有用性について検証する。2017 年度はヒスタミン_{H₃}受容体アンタゴニストとして知られる別の JNJ-10181457 の主

作用を追求し、さらには METH 以外の依存薬物、特にモルヒネを取り上げ、治療薬としての汎用性について行動実験を中心に観察し、薬物依存治療薬としての実現可能性を考察する。

(1) 実験には ICR 系雄性マウス (購入時週齢 9~11 週) を用いた。一週間以上飼育室にて飼育・馴化したのち実験に供した。飼育環境は、温度 22±2、湿度 50±10%、照明は午前 7 時点灯~午後 7 時消灯、飲料水として水道水、食餌として実験動物用飼料 BF を自由に摂取できるようにした。取り扱いには NIH ガイドライン (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed.) を遵守した。

(2) 常同行動観察 (併せて水平方向運動量測定): METH による常同行動の発現頻度と深刻度合いを再現良く定量化するため、以下の実験プロトコルを確立した: 常同行動が 100% のマウスで確認されることから、METH は腹腔内投与で 10 mg/kg とする。METH 投与前、マウスは観察用の透明アクリルボックス (縦 30×横 30×高さ 35 cm; 床面に約 25 グラム分の床敷き用木チップを敷く。上面には、換気孔が空いており、かつ水平方向の運動量を自動計測するためのセンサー (室町機械製 Supermex®) が取り付けられたアクリル製ふたが設置されている) へ入れて 30 分から 1 時間その環境・空間に馴化させる。METH 投与後ただちにマウスをアクリルボックスへ戻し、観察を開始する。観察者はあらかじめ「典型的」な常同行動カテゴリーを PC 動画として視聴して訓練したのち実験に臨むが、投与内容はデータ解析時まで知らされない (ブラインド・テスト)。このような私たちの方法によれば、常同行動のカテゴリー (行動様式) はマウスでは主に反復匂いかぎ行動、反復噛み行動で、まれに (~1%) 首ふり運動や旋回が認められる。優勢カテゴリーは METH 用量依存的であり、5 mg/kg では反復匂いかぎ行動が優勢だが、10 mg/kg ではほぼ反復噛み行動が観察される。従って反復匂いかぎ行動よりも反復噛み行動の方が常同行動としてより深刻な症状と考えられる。症状の深刻度については、選択的ドーパミン D₂ 受容体遮断薬スルピリドやハロペリドールを用いたとき、METH 誘発常同行動の行動カテゴリーが反復噛み行動から反復匂いかぎ行動へ遷移することからも支持される。まとめると、マウスにおいて METH の作用は

(低用量側)報酬効果 過運動 反復匂いかぎ 反復噛み行動 自傷行動 死亡(高用量側)という遷移をたどって深刻さを増してゆく。観察時間は1時間とし、観察中に水平方向の運動量を併せて自動計測する。

4. 研究成果

(1) agmatine の薬理作用: 実験的にマウスに対して高用量の METH (10 mg/kg) を腹腔内急性投与すると、速やかに異常行動、特に常同行動 (stereotypy) が発現することが観察された。ポリアミン類の前駆物質である agmatine (= 脱炭酸アルギニン) の前投与はその METH 作用を抑制することを見出しており、2015 年度にその抑制メカニズムの解明に着手した。agmatine と構造類似体を中心に化合物の中枢移行性を検討するため ICR 系雄性マウスを利用して、in vivo において腹腔内投与して視床下部におけるヒスタミン代謝を HPLC-蛍光検出法で定量評価した。その結果、agmatine が視床下部ヒスタミン含量を有意に増加させることを見出した。その含量変化はヒスタミンの代謝酵素の一つであり中枢神経系で優勢に働く HMT の阻害薬として知られる metoprine の作用 (= ヒスタミン含量増加) と極めて似ており、agmatine 及び代謝産物であるポリアミン類が HMT を抑制している可能性が考えられた。この「ヒスタミン神経系活性化による METH 作用の抑制効果」仮説は、アルツハイマー型痴呆症症状の進行を抑えることが知られている NMDA 受容体拮抗薬 memantine の単独投与により引き起こされるマウス常同行動を、ヒスタミン H₁ 受容体作動薬/H₃ 受容体拮抗薬作用を持つ betahistine によって抑制されたことから支持される。以上の成績より、agmatine と類似の骨格を持つ化合物は、中枢ヒスタミン神経系に作用して METH 作用を改善する薬物を開発するリード化合物になり得ることを示している。一方、予備実験では本課題申請当初想定していた、agmatine と H₃ 受容体アンタゴニストとの併用による METH 作用への抑制効果には単独使用と大差なかった。

(2) ヒスタミン H₃ 受容体アンタゴニストと METH 異常行動: 2016 年度前半の検討において、agmatine 以外の化合物での有意な視床下部ヒスタミン含量増加は確認されなかった。そこで、「ヒスタミン神経系活性化による METH 作用の抑制効果」仮説に基づき、ヒスタミン H₃ 受容体ア

ンタゴニストに着目し、その神経終末でのヒスタミン含量増加作用を指標に、本研究課題に合致する程度の脳内ヒスタミン神経系活性化効果を持つ化合物の探索を並行して行った。その結果、ピペリジン誘導体のひとつ BF2.649 (一般名 pitolisant) が脳ヒスタミン神経系を活性化する薬物であることを確認した。中枢ヒスタミン神経系に作用して METH 作用を改善する薬物を開発するリード化合物になり得ることを行動薬理的に示した。具体的には、pitolisant は単独投与で自発運動に影響しなかった。METH (3 mg/kg) 誘発過運動を、pitolisant は用量依存的に抑制した。pitolisant による抑制効果は、ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬で完全に抑制され、H₂ 受容体拮抗薬で部分的に抑制された。すなわち、METH による過運動が H₁ 受容体拮抗薬では完全に「復活」した。ヒスタミン H₃ 受容体作動薬と同時投与すると、pitolisant の METH 抑制効果はさらに強められて、約半数のマウスにおいて常同行動の発現が観察された。自動計測の運動量はそれを反映しており、METH 投与後一過性に強い過運動が認められたのち、速やかに運動量が減少し、常同行動のパターンを呈した。

また、2015 年度に予備試験を行った、agmatine とヒスタミン H₃ 受容体アンタゴニストとの併用による METH 作用への抑制効果には、pitolisant は相加的な効果を示し、今後さらに詳細な検討を継続する。

さらに、「げっ歯類血圧測定装置」を用いて、metoprine (HMT 阻害薬) 投与によるマウス血圧には変化は認められず、また非動物式攻撃性検定装置を用いた実験により、攻撃性発現も認められなかった。この研究については、pitolisant の場合も引き続き検討する。

(3) 中枢ヒスタミン神経系の活性化と METH 作用の寛解効果: 非イミダゾール系化合物のひとつ JNJ-10181457 が新たに脳ヒスタミン神経系を視床下部からヒスタミンを遊離することで、活性化する薬物であることを確認した。中枢ヒスタミン神経系に作用して METH 作用を改善する薬物を開発するリード化合物になり得ることを行動薬理的に示した。また JNJ-10181457 は METH 作用を pitolisant と同様、寛解することが行動薬理的に示された (図1)。

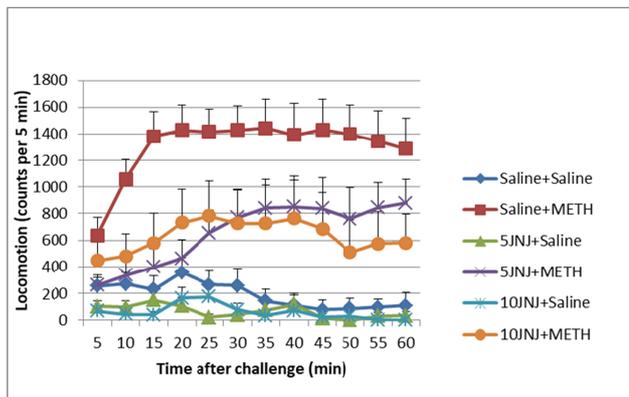


図1 METH(3 mg/kg)投与による過運動に対する、ヒスタミン H₃ 受容体アンタゴニスト JNJ-10181457 の抑制効果

さらに、METHとは作用メカニズムは異なるが、依存薬物のひとつであるモルヒネによる過運動に対して、JNJ-10181457がMETHの場合と同様に抑制的に作用することを明らかにした(図2)。このことは、ヒスタミン H₃ 受容体アンタゴニストが、依存薬物の諸症状を引き起こす共通な神経機構に作用して緩和する可能性を示唆する。

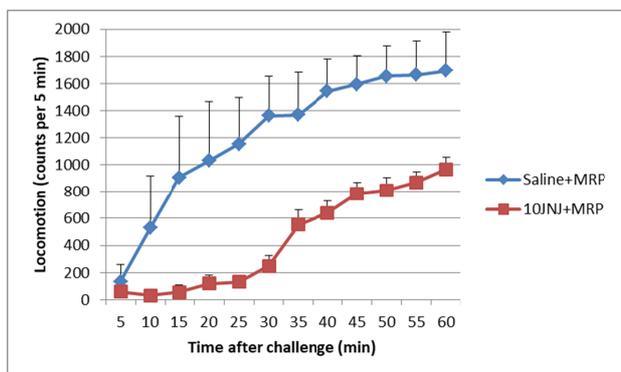


図2 モルヒネ(30 mg/kg)投与による過運動に対する、ヒスタミン H₃ 受容体アンタゴニスト JNJ-10181457 の抑制効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- N. Kitanaka, J. Kitanaka, F.S. Hall, Y. Kubota, Y. Mimura, S. Ogura, Y. Okada, G.R. Uhl, M. Takemura: Psychotomimetic-like behavioral effects of memantine in the mouse. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 100, 116-123 (2018) 査読有
- N. Kitanaka, J. Kitanaka, F.S. Hall, S. Okumura, T. Sakamoto, G.R. Uhl, M. Takemura: How the histamine N-methyltransferase inhibitor metoprine alleviates methamphetamine reward.

Journal of Addiction Medicine and Therapeutic Science 3(2)16-23 (2017) 査読有

J. Kitanaka, N. Kitanaka, F.S. Hall, G.R. Uhl, M. Takemura: Brain histamine N-methyltransferase as a possible target of treatment for methamphetamine overdose. *Drug Target Insights* 10, 1-7 (2016) 査読有

[学会発表](計12件)

北中純一、北中順恵、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. アグマチンは脳ヒスタミンレベルを上昇し覚せい剤によるマウスの過運動や常同行動を減弱する. 第41回日本神経科学大会 2018. 7.26-29 神戸(演題採択)

北中順恵、北中純一、天津優紀恵、大澤礼奈、佐藤実歩、橋本紘卓、久富衣璃菜、喜多尾衣莉、三村真梨、中村美裕、田上健太、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. ヒスタミン H₃ 受容体逆作動薬は覚せい剤によるマウスの異常行動を改善する. 第41回日本神経科学大会 2018. 7.26-29 神戸(演題採択)

Kitanaka J., Kitanaka N., Kubota Y., Mimura Y., Okada Y., Ogura S., Tanaka K., Tomita K., Tsukahara T., Sato T., Nishiyama N., Hall F.S., Uhl G.R., & Takemura M. Memantine induces stereotyped behaviors in mice. *18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology* 2018.7.1-7.6 Kyoto, Japan (演題採択)

Kitanaka N., Kitanaka J., Amatsu Y., Ozawa R., Sato M., Hashimoto K., Hisatomi E., Kitao E., Mimura M., Nakamura M., Tagami K., Tanaka K., Tomita K., Tsukahara T., Sato T., Nishiyama N., Hall F.S., Uhl G.R., & Takemura M. Histamine H₃ receptor inverse agonists alleviate methamphetamine-induced behavioral abnormalities in mice via histamine H₁ receptors. *18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology* 2018.7.1-7.6 Kyoto, Japan (演題採択)

北中順恵、北中純一、中野多絵、神取恭史、村谷和樹、村上綾香、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. VMAT2 阻害薬テトラベナジンはマウスにおけるモルヒネ誘導過運動を減弱するが鎮痛効果には影響しない. 第40回日本神経科学大会 2017. 7.20-23 千葉

北中純一、北中順恵、天津優紀恵、佐藤実歩、久富衣璃菜、喜多尾衣莉、中村美裕、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. ヒスタミン H₃ 受容体逆作動薬ピトリサントは、マウスにおいて H₁ 受容体を介して覚せい剤誘導過運動を減弱する. 第40回日本神経科学大会 2017. 7.20-23 千葉

北中純一、北中順恵、中野多絵、神取恭史、村谷和樹、村上綾香、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. テトラベナジンはマウスにおけるモルヒネ誘導過運動を減弱する. 第90回日本薬理学会年会 2017. 3.15-17 長崎

北中順恵、北中純一、三村有美、久保田義朗、小倉沙耶香、岡田行矢、田中康一、富田和男、塚原飛央、佐藤友昭、西山信好、竹村基彦. マウスに対するメマンチンの中枢作用および末梢作用. 第90回日本薬理学会年会 2017. 3.15-17 長崎

北中純一、北中順恵、村上綾香、村谷和樹、神取恭史、中野多絵、田中康一、西山信好、竹村基彦. 覚せい剤誘発過運動と常同行動に対する VMAT 阻害薬の作用. 第39回日本神経科学大会 2016. 7.20-22 横浜

北中順恵、北中純一、小倉沙耶香、岡田行矢、三村有美、久保田義朗、田中康一、西山信好、竹村基彦. メマンチンはマウスにおいて常同嗅ぎ行動を引き起こし、ハロペリドールやベタヒスチンにより抑制される. 第39回日本神経科学大会 2016. 7.20-22 横浜

北中順恵、北中純一、岡田行矢、小倉沙耶香、久保田義朗、三村有美、田中康一、西山信好、竹村基彦. メマンチンが誘導する常同行動の特徴. 第89回日本薬理学会年会 2016. 3.9-11 横浜

北中純一、北中順恵、阪本知瞭、奥村智司、田中康一、西山信好、竹村基彦. 覚せい剤作用に対するヒスタミン Nメチル基代謝酵素阻害薬メトプリンの抑制効果. 第89回日本薬理学会年会 2016. 3.9-11 横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/mshcm/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北中 純一 (KITANAKA, JUNICHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10278830

(2) 研究分担者

北中 順恵 (KITANAKA, NOBUE)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30340954

(3) 研究協力者

(五十音順、敬称略)

天津 優紀恵 (AMATSU, YUKIE)

橋本 紘卓 (HASHIMOTO, KOTAKU)

久富 衣璃菜 (HISATOMI, ERINA)

神取 恭史 (KANDORI, TAKASHI)

喜多尾 衣莉 (KITAO, ERI)

三村 真梨 (MIMURA, MARI)

村上 綾香 (MURAKAMI, AYAKA)

村谷 和樹 (MURATANI, KAZUKI)

中村 美裕 (NAKAMURA, MIYU)

中野 多絵 (NAKANO, TAE)

大澤 礼奈 (OZAWA, RENA)

佐藤 実歩 (SATO, MIHO)

田上 健太 (TAGAMI, KENTA)