

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K01943

研究課題名(和文) 依存性薬物による脳白質・髄鞘の機能的変化とその機序の解明

研究課題名(英文) Functional changes in brain white matter caused by exposure of addictive drugs

研究代表者

山崎 良彦 (YAMAZAKI, Yoshihiko)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：10361247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：依存性のある薬物の脳白質機能に対する影響を、オリゴデンドロサイトおよび軸索伝導での変化に着目して検討した。メタンフェタミン・コカイン・ニコチンを投与してその効果を調べたところ、これらの薬物で共通する変化としない変化が存在し、さらに、同じ薬物でも急性投与と慢性投与で反対の効果を示すことなどを見出した。有髄線維における軸索伝導の変化を機能的に検討したことにより、依存性薬物が神経系にもたらすこれまで知られてこなかった作用とその多様性を見つけることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

依存性のある薬物の乱用や心身にもたらす不利益については、現代においても理解が十分であるとは言えず、多くの未解決の問題を包含している。今回の研究では、複数の薬物の効果を検討し、脳白質機能に対する薬物作用の新しい側面を見出すことができた。これにより、依存性薬物の神経系に対する影響の理解が進むと考えられることから、本研究成果は今後の依存性薬物問題に関する対応の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of addictive drugs on the white matter by focusing on changes in oligodendrocytes and axonal conduction. The effects of methamphetamine, cocaine, and nicotine were studied. We found that there were changes that were common to these drug administrations and changes that were not common. Moreover, we observed that acute and chronic exposure of same drug oppositely affect the axonal conduction. By functional examination of the changes in axonal conduction in myelinated fibers, we discovered the previously unappreciated effects of addictive drugs on the nervous system with their diversity.

研究分野：神経生理学

キーワード：オリゴデンドロサイト 活動電位 伝導速度 海馬 依存性薬物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物依存・乱用は、世界全体における医療および健康の重要な問題である。薬物使用による依存性の成立や身体機能変化に関する理解は十分であるとは言えず、したがって、種々の対策・治療がなされているにも関わらず未解決な問題が多く残っている。そのため、依存性を引き起こす薬物の作用を、これまでとは異なる視点から検討する必要がある。

神経生理学の領域では、多くの依存性薬物が神経伝達物質受容体に結合したり、神経伝達物質の放出・取り込みを修飾したりすることによってその薬理作用を示すため、ニューロン・シナプスでの研究が多くなされてきた。しかし、グリア細胞が学習の成立・正常な認知機能・精神神経疾患の病理に関係していることが明らかになってきたことに加え、近年では薬物の依存・乱用との関連性も注目されている。実際、米国 NIH の National Institute on Drug Abuse (NIDA) が公募する研究助成において、グリア細胞に関する研究を対象とした研究助成金プログラムが開始されており、薬物依存とグリア細胞との関連に対する理解の必要性が大きくなっている。また、著しく発展している脳画像研究やゲノム解析によって、依存性薬物の摂取が、白質(グリア細胞の一つであるオリゴデンドロサイトによって髄鞘化された軸索を主な構成要素とする)に構造的変化をもたらすことや、オリゴデンドロサイト・髄鞘に関連する遺伝子に異常を生じさせることがわかってきた。しかし、ヒトを対象とした白質画像研究では、複数の薬物の使用や精神疾患の合併が高確率であるため、特定の薬物と白質変化との相関を正確に評価することは困難である。また、ヒト脳機能イメージングは、脳血流変化や酸素消費変化などの代謝情報に基づいており、場所によっては代謝の情報と神経活動が必ずしも相関しない。動物実験では、培養グリア細胞を用いた依存性薬物の効果の報告が散見されるが、形態的変化の検出にとどまっており、白質の機能的変化を調べたものはほとんどない。依存性薬物による変化を直接的に検証するためには、動物実験による細胞レベルでの機能的測定を用いた検討が必要である。

これまでに申請者は、

- ・オリゴデンドロサイトによる跳躍伝導以外の伝導速度促進
- ・脳白質の機能的可塑性
- ・有髄線維における活動電位の軸索伝導の量子的解析

を発見し報告した。これらにより、白質の機能的変化を正確にとらえ、オリゴデンドロサイト・髄鞘による神経活動修飾効果を評価する方法を確立してきた。また、ラットへのニコチン投与によるシナプス可塑性の変化について報告しており、依存性薬物による神経機能変容についての研究経験を有している。以上のことから、薬物依存による白質機能変化を細胞レベルでとらえることができるのではないかと、その変化の性質・機序を解明することが新しい視点での薬物作用の理解につながるのではないかと、そして、多くの問題を包含している薬物依存への対応に貢献できるのではないかと考え、本研究の提案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、依存性薬物として、ニコチン、メタンフェタミン、コカインを使用する。以下の目標に段階的に到達することを目指す。

- ・急性投与によるオリゴデンドロサイトの膜電位変化・錐体細胞の軸索を伝導する活動電位の変化を明らかにする。
- ・慢性投与によるオリゴデンドロサイトの髄鞘形成突起長の変化・細胞膜の電気的性質の変化・細胞外  $K^+$  緩衝能変化、活動電位の軸索伝導変化を明らかにする。

以上により、オリゴデンドロサイトの変化と有髄線維での軸索機能変化の所見を総合して、薬物依存 - オリゴデンドロサイト・髄鞘の変化 - 軸索伝導の変化 - 白質の機能的変化の関係性を示すことが具体的な研究目的である。

### 3. 研究の方法

本研究では、ラットおよびマウス脳の薄切片(スライス標本)を用い、以下の項目を検討する。

#### (1) 急性投与の効果

オリゴデンドロサイトでの変化の検討

海馬 CA1 領域の白板(白質に含まれる)に位置するオリゴデンドロサイトの細胞体よりホールセル記録をする。薬物を灌流投与し、オリゴデンドロサイトの膜電位および入力抵抗の変化を調べる。また、海馬白板を電気刺激したときに生じる脱分極性反応の振幅を算出することにより、軸索周囲の  $K^+$  バッファリング機能を評価する。

#### 活動電位の軸索伝導変化の検討

海馬 CA1 領域の錐体細胞の細胞体よりホールセル記録し、海馬采側の白板に刺入した刺激電極によって軸索を電気刺激し、逆行性に伝導してくる活動電位を記録する。このとき、活動電位の潜時を伝導速度のパラメーターとして測定する。細胞体での薬物の効果を除外するために、2点で活動電位を発生させ、その潜時差を用いて検討する。

#### 活動電位同調作用の変化の検討

海馬白板の線維束に刺激電極と記録電極を刺入する。細胞外記録法にて、海馬錐体細胞の軸索束より複合活動電位を記録する。複合活動電位の振幅をパラメーターとして測定し、薬物投与で生じる複合活動電位の波形変化を評価する。これにより、複数の活動電位の同調性に変化が生じるかどうか検討する。

#### (2) 慢性投与の効果

依存性薬物を以下の要領で慢性投与する。

- ・ニコチン：2 mg/kg/day の皮下投与，7 日間。
- ・メタンフェタミン：5 mg/kg/day の皮下投与，8 日間。
- ・コカイン：15 mg/kg/day の腹腔内投与，7 日間。

コントロール群に対しては、薬物投与時と同容量の PBS を皮下投与あるいは腹腔内投与する。

#### オリゴデンドロサイトでの変化の検討

オリゴデンドロサイトでホールセル記録し、急性投与時と同様の項目について調べる。その際、電極内溶液にバイオサイチンを加え、電気生理学的実験後に DAB 発色あるいは蛍光染色し、形態変化の有無を確認する。海馬白板を電気刺激したときに生じる脱分極性反応については、異なる個体間（慢性投与群 vs コントロール群）での比較となるため、電気刺激強度などを一定にして比較する。

#### 活動電位の軸索伝導変化の検討

異なる個体間・標本間での比較となるため、刺激強度や刺激位置を変えて1つのホールセル記録（CA1 錐体細胞）から複数の潜時を得る。これを用いて潜時差を算出し、さらに複数の錐体細胞および個体からのデータを集合させてヒストグラムを作成することにより潜時差分布を調べる。これまでの研究によって、潜時差分布が量子分布を示すことがわかっており、量子的解析の適用が可能である。

### 4. 研究成果

#### (1) 依存性薬物の急性投与によるオリゴデンドロサイトの変化

##### オリゴデンドロサイトの電気的性質に対する効果

メタンフェタミンの投与では、静膜電位が平均 2.90 mV (n = 6) 過分極側にシフトしたのに対し、コカインおよびニコチンでは、それぞれ平均 1.73 mV (n = 12) と 3.98 mV (n = 6) 脱分極した(コカインは、電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネルを阻害することによる麻酔作用を有するため、10 μM では電位依存性ナトリウムチャネルを阻害しないことを確認し、以後の実験ではその濃度で行った)。ニコチンについては、微量局所投与も行ってみたが、膜電位の変化がみられなかった。記録したオリゴデンドロサイトが存在する海馬白板では脱感作しないタイプのニコチン性受容体を発現している介在ニューロンの軸索が分布している。このため、ニコチンによって介在ニューロンが持続的に発火し、それに伴う細胞外 K<sup>+</sup> 濃度の増加に反応して、オリゴデンドロサイトが脱分極した可能性が考えられた。入力抵抗は、いずれの薬物でも有意な変化はみられなかった。

##### 軸索活動に対するオリゴデンドロサイト反応の変化

海馬白板での -バースト電気刺激（海馬の生理的活動を模した刺激プロトコール）により、同部に位置するオリゴデンドロサイトで脱分極性の変化が起こるが、薬物の投与により、その反応の大きさはそれぞれ投与前の 74.5% (メタンフェタミン, n = 6), 84.7% (コカイン, n = 8), 81.3% (ニコチン, n = 5) に抑制された。この反応は、神経活動によって増加した細胞外 K<sup>+</sup> 濃度を緩衝する能力を反映している可能性があるため、薬物によりその緩衝能が減弱している可能性が考えられた。しかし、軸索興奮性に対する薬物の効果も除外できないため、今後ニューロンの発火閾値への影響も調べる必要がある。

#### (2) 依存性薬物の急性投与による伝導速度の変化

ニコチンでは、活動電位の潜時差（細胞体およびその近傍における薬物の影響を除外して伝導速度を評価することが可能）が、灌流投与前の約 92% に短縮していた。メタンフェタミンでは、潜時は平均では投与前の 103.7 ± 2.0% (n = 24) と有意な変化はみられなかった。しかし、短い潜時（神経細胞体に近い部分）の場合は有意に延長（109.8 ± 1.8%, n = 14）し、長い潜

時（神経細胞体から離れた部位）の場合は短縮する（ $95.2 \pm 1.9\%$ ,  $n = 10$ ）傾向がみられたため、軸索の部位によってメタンフェタミンの効果が変わっている可能性が示唆された。コカインでは、有意に潜時が延長していたが、短い潜時よりも長い潜時での変化の方が顕著であった。

### （３）依存性薬物の急性投与による軸索興奮性および活動電位同調作用の変化

海馬白板から複合活動電位の記録を行い、その振幅の変化を測定して薬物効果の指標とした。コカインでは投与前の  $98.7 \pm 2.4\%$  ( $n = 7$ ) と変化は認めなかったのに対し、メタンフェタミンでは  $108.9 \pm 5.7\%$  ( $n = 6$ )、ニコチンでは  $107.7 \pm 3.2\%$  ( $n = 10$ ) と振幅が増大していた。さらにニコチンによる効果の機序について検討した。ニコチンによりオリゴデンドロサイトが脱分極すること、オリゴデンドロサイトの脱分極は複合活動電位の振幅を大きくすること、ニコチンにより海馬白板領域に軸索を伸ばしている介在ニューロンが持続的に発火し同領域で GABA を放出し続けること、オリゴデンドロサイトは GABA<sub>A</sub> 受容体活性化により脱分極すること、が知られているため、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬存在下でニコチンを投与した。しかし、 $109.6 \pm 5.8\%$  ( $n = 4$ ) とニコチンによる増大効果は阻害されなかったことから、GABA を介した効果ではないことがわかった。

### （４）依存性薬物の慢性投与によるオリゴデンドロサイトの変化

#### オリゴデンドロサイトの電気的性質および形態に対する効果

メタンフェタミン慢性投与群では、オリゴデンドロサイトの静止膜電位には変化がみられなかったものの、入力抵抗が大きくなっていた。これに対し、ニコチンおよびコカインでは、オリゴデンドロサイトの静止膜電位、入力抵抗ともに有意な変化はみられなかった。

また、記録電極を通じて注入したバイオサイチン染色により、軸索形成突起の長さを調べたが、いずれの薬物でも変化はみられなかった。しかし、光学顕微鏡レベルでの解析なので微細構造に対する影響を否定することはできない。

#### 軸索活動に対するオリゴデンドロサイト反応の変化

急性投与と実験とは異なり、コントロール群とは異なる個体間での比較となるため、軸索電気刺激の刺激強度および記録しているオリゴデンドロサイトと刺激電極間距離を一定にして、パースト電気刺激による反応を記録した。いずれの薬物でも、脱分極性応答は有意に増大しており、急性投与とは反対の効果がみられた。

### （５）依存性薬物の慢性投与による伝導速度の変化

慢性投与の効果の検討では、異なる個体間・標本間での比較となるため、刺激強度や位置を変えて潜時差を算出し、ヒストグラムを作成して潜時差分布（コントロール群では、0.25-0.3 ミリ秒を量子とし、そのほぼ整数倍にピークを有する量子分布を示す）の変化を検討した。メタンフェタミン投与では、潜時差の量子分布が乱れる傾向にあり、このことは、メタンフェタミンの急性投与による軸索伝導への修飾効果が、軸索の部位によって反対の効果を示すことに関連すると考えられた。ニコチンでは、潜時差の量子分布はほぼ保たれているものの、量子サイズが小さくなる傾向を示した。コカインでは、潜時差の量子分布の乱れが顕著であった。

### （６）今後の展望

オリゴデンドロサイトや有髄線維での軸索伝導に対し、メタンフェタミン・コカイン・ニコチンの３種の薬物投与で共通する変化としない変化が存在し、さらに、同じ薬物でも急性投与と慢性投与で反対の効果を示すことなどを見出した。依存性薬物が神経系にもたらすこれまでに知られていない作用について、その多様性にも言及することができた。しかし、作用機序の解明に至っていないものもあるため、機序に関する検討が今後必要である。また、若年者での薬物乱用問題も合わせて考えると、今回観察された効果が薬物投与時期によって異なってくるかどうか検討することも重要になってくる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamazaki Y	4. 巻 1190
2. 論文標題 Oligodendrocyte physiology modulating axonal excitability and nerve conduction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Myelin - Basic and Clinical Advances, Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-32-9636-7_9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山崎良彦	4. 巻 37
2. 論文標題 オリゴデンドロサイトによる軸索伝導とシナプス機能の促進	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 2968 ~ 2976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Y, Abe Y, Shibata S, Shindo T, Fujii S, Ikenaka K, Tanaka KF	4. 巻 39
2. 論文標題 Region- and Cell Type-Specific Facilitation of Synaptic Function at Destination Synapses Induced by Oligodendrocyte Depolarization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4036 ~ 4050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1619-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Y, Hozumi Y, Kaneko K, Fujii S	4. 巻 43
2. 論文標題 Modulatory Effects of Perineuronal Oligodendrocytes on Neuronal Activity in the Rat Hippocampus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 27 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2278-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Y, Sumikawa K	4. 巻 113
2. 論文標題 Nicotine-induced neuroplasticity counteracts the effect of schizophrenia-linked neuregulin 1 signaling on NMDAR function in the rat hippocampus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 386 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2016.10.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山崎良彦
2. 発表標題 Modulatory effects of the changes in membrane potential of oligodendrocytes on axonal conduction and synaptic responses in the hippocampus
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamazaki Y
2. 発表標題 Effects of oligodendrocyte depolarization on the synaptic function at destination synapses in the hippocampus
3. 学会等名 14th Biennial joint ISN/ASN Satellite Meeting on Myelin Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎良彦
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトによる活動電位伝播の調節
3. 学会等名 第4回イオンチャネル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 良彦, 金子 健也, 藤原 浩樹, 後藤 純一, 藤井 聡
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトの膜電位変化による出力先シナプス伝達に対する修飾効果
3. 学会等名 第50回東北生理談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎良彦, 金子健也, 藤原浩樹, 後藤純一, 藤井 聡
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトのアデノシンA1受容体活性化による活動電位の軸索伝導の修飾
3. 学会等名 第48回東北生理談話会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山崎良彦
2. 発表標題 アデノシンA1受容体活性化による活動電位の軸索伝導の修飾
3. 学会等名 第2回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山崎良彦
2. 発表標題 Modulatory effects of the changes in membrane potential of oligodendrocytes on axonal conduction and synaptic responses in the hippocampus
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学医学部生理学講座ホームページ  
<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/PhysiologyII/Physiol2-J.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	金子 健也  (KANEKO Kenya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------