

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19483

研究課題名(和文)新規薬物の依存性や報酬効果の予測が可能なin vivo評価系の構築

研究課題名(英文)Development an in vivo real-time analytical system that can predict dependency and rewarding effects of novel compounds

研究代表者

永井 拓(Nagai, Taku)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10377426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規薬物の依存性や報酬効果の予測は行動薬理学的試験が実施されているが、これらの行動試験では特殊技術や実験装置が必要であるため、より簡便に薬物の依存性や報酬効果を予測できる実験手法の開発が望まれている。本研究では依存性薬物による脳内の転写活性をin vivoで、簡易に、且つリアルタイムに可視化してモニターできるシステムの構築を目指した。コカインを処置したマウスではPKAを介するシグナル経路が活性化することを確認した。PKAの下流に存在する転写因子の応答配列CREとルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウスを作製し、このマウスを用いて依存性薬物の反応を検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

依存性は薬物の化学構造で規定されるものではないため、分析機器や試薬反応を応用した検出システムでは予測不能である。本システムは画像として結果を取得でき、感度の高さ、広いダイナミックレンジ、迅速で簡便な定量操作が可能である。医薬品開発において化合物の依存性は重要な問題であり、本研究構想の実現により医薬品開発の日・米・EU 医薬品規制調和国際会議ガイドラインに変革をもたらすことが予想され、前臨床試験の時間的短縮および経済的削減の効果は計り知れない。さらに、本システムは違法ドラッグなどの新規化合物の依存性を検出することに役立ち、乱用薬物の規制にも多大なる貢献をもたらすことが予測される。

研究成果の概要(英文)：Behavioral pharmacological tests are carried out to predict dependency and rewarding effects of novel compounds. It is desirable to develop analytical methods that can more easily predict drug dependence and rewarding effects because special techniques and experimental apparatuses are required to perform behavioral tests. The aim of this research project is to develop an in vivo real-time analytical system that can easily visualize and monitor the transcriptional activity in the brain in response to addictive drugs. Cocaine treatment stimulated PKA-mediated signaling pathway in the brain of mice. We generated the mice carrying genes encoding luciferase under the control of transcription response element CRE downstream of PKA, and detected the response to the addictive drugs using these mice.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：薬理学 可視化 薬物反応性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規薬物の依存性や報酬効果の予測は薬物自己投与試験、薬物弁別試験あるいは条件づけ場所嗜好性試験などの行動薬理的試験が実施されている。しかしながら、これらの行動薬学的試験を実施するためには熟練された技術や各行動解析に特化した実験装置が必要である。また、一連の行動解析データを得るには数週間から数ヶ月の実験期間を要することから、より簡便に薬物の依存性や報酬効果を予測できる実験手法の開発が望まれている。

依存性薬物は脳内の報酬回路を活性化して報酬効果を示すことが知られており、中脳腹側被蓋野から側坐核に投射する中脳辺縁系ドーパミン作動性神経系は報酬回路を構成する重要な神経系の一つである (Nestler 2001)。細胞外に放出されたドーパミンは側坐核の投射神経である中型有棘神経細胞 (medium spiny neurons, MSNs) に作用する。MSNs は GABA 作動性の抑制性神経であり、ドーパミン D1 受容体 (D1R) を発現する D1R-MSNs とドーパミン D2 受容体 (D2R) を発現する D2R-MSNs の異なる 2 種類の神経細胞が存在する。これら MSNs は、複数の神経入力を統合して情報を出力するインテグレーターとして機能しており、D1R-MSNs の活性化は報酬効果 (快感) に関する情報を制御していることが示されている (Nagai et al. *Neuron* 2016; Nagai et al. *Trends Pharmacol Sci* 2016)。

コカイン、覚醒剤はいずれも強力なドーパミン作動薬として作用し、ドーパミン作動性神経終末に存在するドーパミントランスポーターを介して細胞外ドーパミン量を増加させる (Ritz et al. 1987; Sulzer et al. 1995)。また、モルヒネは腹側被蓋野に存在する μ オピオイド受容体を介して GABA 作動性介在神経を抑制し、ドーパミン作動性神経系の活性化を引き起こす (Johnson et al. 1992)。これら以外の依存性薬物であるアルコールは NMDA 受容体および GABA_A 受容体、大麻はカンナビノイド 1 型受容体を刺激し、間接的にドーパミン作動性神経を活性化させる (Nestler 2005)。依存性薬物の作用部位はそれぞれ異なるが、いずれの薬物もドーパミン作動性神経と D1R-MSNs 間の神経伝達の亢進を引き起こし、報酬回路の異常興奮を引き金となって精神依存を形成する。したがって、培養細胞を用いた *in vitro* 試験では、依存性や報酬効果を予測することは困難である。

2. 研究の目的

生物学的観点から依存症は薬物の使用により報酬回路の病的な適応状態であると考えられている。この神経回路の病的な適応状態は、薬物の使用を中断しても維持されているために遺伝子の転写を介した脆弱性が形成されるためと推測される。遺伝子の転写量はプロモーターやシグナル応答配列などの転写調節領域によって調節され、転写量の調節を測定する方法には RT-PCR 法による mRNA の定量やウエスタンブロッティング法による蛋白質の測定が用いられる。これらの方法では死後変化に伴う mRNA や蛋白質の分解の影響を完全に排除できないことや同一個体で経時変化を測定することが困難であるという問題点がある。一方、レポーターアッセイは転写因子の応答配列をルシフェラーゼや蛍光蛋白質などのレポーター遺伝子に付加することで転写活性を容易に測定することができる実験系であり、培養細胞系で汎用されている方法である。この手法をマウスに応用し、生きた状態で特定の神経細胞集団のレポーターアッセイを行えるシステムを開発すれば新規薬物の依存性や報酬効果を予測できると考えられる。以上のことを鑑み、本研究では D1R-MSNs の転写活性を *in vivo* で、簡易に、且つリアルタイムに可視化してモニターできるシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) シグナル経路解析 (永井拓/研究代表者、伊藤教道/研究分担者): リン酸化基質の情報を管理するデータベース KANPHOS を用いてドーパミンシグナルを調査し、コカインを投与したマウスから側坐核を摘出して、C57BL/6 マウスの線条体で起こるリン酸化反応を解析した。

(2) 転写因子応答配列のスクリーニング (永井拓/研究代表者、伊藤教道/研究分担者、朱悠韻/研究協力者): シグナル経路解析から同定された転写シグナルの情報を基に、転写因子の応答配列をリストアップした。応答配列とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ plasmid を作製し、培養細胞を用いて *in vitro* のスクリーニングを実施した。スクリーニングの結果を基に、転写因子応答配列の候補を絞り込み、至適化を行った。

(3) *in vivo* 解析系の開発 (永井拓/研究代表者、伊藤教道/研究分担者、朱悠韻/研究協力者): 至適化が完了した候補については、アデノ随伴ウイルス (AAV) を作製した。作製した AAV をマウスの線条体に注入し、ルシフェラーゼを発現するマウスを作製した。さらに、このマウスにコカインを投与して *in vivo* イメージャーによる化学発光測定を行い、線条体のルシフェラーゼ活性を時空間的にモニターできるように *in vivo* レポーターアッセイの実験条件を確立した。

(4) 薬物反応性のモニタリング (永井拓/研究代表者、朱悠韻/研究協力者): 評価系としての妥当性を検証するために、依存性が確認されている薬物を作製したマウスに投与して薬物反応性をモニターした。

4. 研究成果

(1) シグナル経路解析：マウスの側坐核で起こるリン酸化反応を探索し、コカインを処置した際に PKA を介するシグナル経路が活性化されることを確認した。

(2) 転写因子応答配列のスクリーニング：リン酸化解析から同定された転写シグナルの情報を基に、転写因子の応答配列をリストアップし、cyclic AMP response element (CRE) promoter の下流でルシフェラーゼを発現する plasmid (CRE-Luc) を作製した。Neuro2A 細胞を用いて *in vitro* のスクリーニングを実施し、24 時間後に基質であるルシフェリンを処置した後の発光を検出した。Neuro2A を用いた *in vitro* における転写活性は CRE-Luc を発現させた細胞において遺伝子導入無しの対照群に比べルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。スクリーニングの結果を基に、転写因子応答配列の候補を絞り込み、至適化を行うため、CRE の活性化によるルシフェラーゼの経時的な発現変化の検討を行った。CRE-Luc を導入した HEK 細胞にフォルスコリン (10 nM) を 30 分処理すると、ルシフェラーゼの発現は刺激前に比べ刺激 3 時間後から発現の上昇が認められ、刺激 6 時間後に発現のピークを示した (図 1)。コントロールと比較した相対的ルシフェラーゼの発現量は、フォルスコリン刺激 3 時間後で約 3 倍であり、刺激 6 時間後では約 5 倍の上昇が認められた。

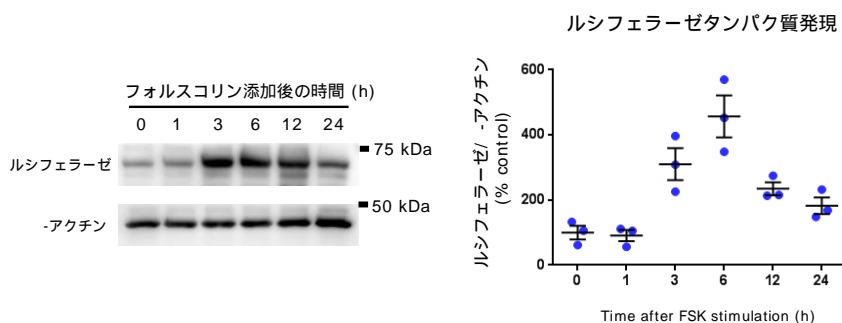


図1. HEK細胞におけるフォルスコリンの短期刺激によるルシフェラーゼの発現変化

(3) *in vivo* 解析系の開発：マウスにおけるルシフェリンの体内動態を測定した結果、ルシフェリン投与 15 分後にピークを示し、投与 2 時間後には完全に脳内から消失していることを確認した。これらの結果を基に、6-10 週齢のマウス線条体に CRE-ルシフェラーゼ遺伝子をパッケージングした AAV (AAV-CRE-Luc) を感染させ、3 週間後に *in vivo* イメージングを行った。なお、各測定時間における評価はルシフェリン投与 15 分後とした。CRE-Luc を発現させたマウスにコカイン (30 mg/kg) を投与した結果、コカイン投与 5 時間後および 6 時間後においてルシフェリンの発光強度が生理食塩水投与群に比べて増加した (図 2)。

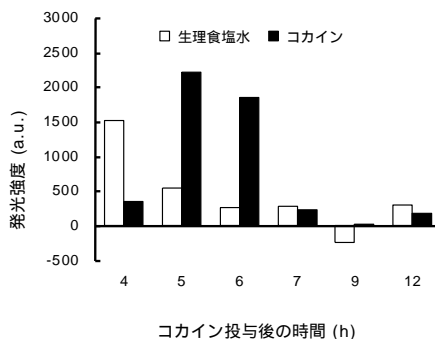


図2. コカイン投与マウスにおけるルシフェラーゼ活性の経時的変化

(4) 薬物反応性のモニタリング：マウスにモルヒネ (5 または 10 mg/kg) を投与した結果、投与 6 時間後においてルシフェリンの発光強度が生理食塩水投与群に比べて増加した。この時、モルヒネの用量に依存してルシフェリンの発光強度が増加し、10 mg/kg の用量で有意な増加が認められた (図 3)。一方、メタンフェタミン (1 または 2 mg/kg) を投与したマウスでは、投与 3 時間後にルシフェリンの発光強度が生理食塩水投与群に比べて増加した。以上の結果から、本研究により構築された新規依存性薬物の評価系は、コカインに限らず他の依存性薬物の中枢効果を的確に評価できる実験系となり得ると考えられる。

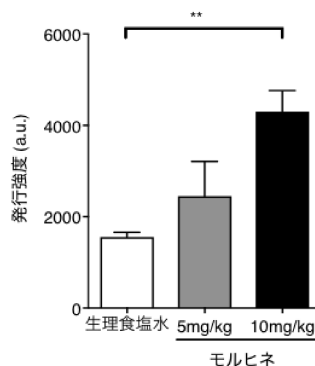


図3. モルヒネ投与マウスにおけるルシフェラーゼ活性の経時的変化

<引用文献>

1. Nagai, T., Nakamuta, S., Kuroda, K., Nakauchi, S., Nishioka, T., Takano, T., Zhang, X., Tsuboi, D., Funahashi, Y., Nakano, T., Yoshimoto, J., Kobayashi, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Miura, M., Nishi, A., Kobayashi, K., Yamada, K., Amano, M., Kaibuchi, K. Phosphoproteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo. **Neuron** 89, 550–565, 2016.
2. Nagai, T., Yoshimoto, J., Kannon, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K. Phosphorylation signals in striatal medium spiny neurons. **Trends Pharmacol. Sci.** 37, 858–871, 2016.
3. Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. **Science** 237, 1219–1223, 1987.
4. Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S., Ewing, A. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. **J. Neurosci.** 15, 4102–4108, 1995.
5. Johnson, S.W., North, R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. **J. Neurosci.** 12, 483–488, 1992.
6. Nestler, E.J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nat. Neurosci.** 8, 1445–1449, 2005.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Kitagawa, K., Nagai, T.*, Yamada, K. Pharmacological and proteomic analyses of neonatal polyI:C-treated adult mice. **Neurosci. Res.** in press. doi: 10.1016/j.neures.2018.10.007. (*co-first author).
2. Zhang, X., Nagai, T.#, Ahammad, R.D., Kuroda, K., Nakamuta, S., Nakano, T., Yukinawa, N., Funahashi, Y., Yamahashi, Y., Amano, M., Yoshimoto, J., Yamada, K., Kaibuchi, K. Balance between dopamine and adenosine signals regulates the PKA/Rap1 pathway in striatal medium spiny neurons. **Neurochem. Int.**, 122, 8–18, 2019. doi: 10.1016/j.neuint.2018.10.008. (#corresponding author).
3. Yamada, S., Itoh, N., Nagai, T.*, Nakai, T., Ibi, D., Nakajima, A., Nabeshima, T., Yamada, K. Innate immune activation of astrocytes impairs neurodevelopment via upregulation of follistatin-like 1 and interferon-induced transmembrane protein 3. *J. Neuroinflammation.*, 15, 295, 2018. doi: 10.1186/s12974-018-1332-0. (*co-first author).
4. Saifullah, M.A.B., Nagai, T.*#, Kuroda, K., Wulaer, B., Nabeshima, T., Kaibuchi, K., Yamada, K. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinase in D1 receptor-expressing neurons of the nucleus accumbens potentiates stimulus-reward learning in mice. **Sci. Rep.**, 8, 14413, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-32840-1. (*co-first author, #corresponding author).
5. Sobue, A., Kushima, I., Nagai, T.*, Shan, W., Kohno, T., Aleksic, B., Aoyama, Y., Mori, D., Arioka, Y., Kawano, N., Yamamoto, M., Hattori, M., Nabeshima, T., Yamada, K., Ozaki, N. Genetic and animal model analyses reveal the pathogenic role of a novel deletion of RELN in schizophrenia. **Sci. Rep.**, 8, 13046, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-31390-w. (*co-first author).
6. Imai, K., Kotani, T., Tsuda, H., Nakano, T., Ushida, T., Iwase, A., Nagai T., Toyokuni, S., Suzumura, A., Kikkawa, F. Administration of molecular hydrogen during pregnancy improves behavioral abnormalities of offspring in a maternal immune activation model. **Sci Rep.**, 8, 9221, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-27626-4.
7. Wulaer, B., Nagai T.*#, Sobue, A., Itoh, N., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Nabeshima, T., Yamada, K. Repetitive and compulsive-like behaviors lead to cognitive dysfunction in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice. **Gene Brain Behav.**, e12478, 2018. doi: 10.1111/gbb.12478. (*co-first author, #corresponding author).
8. Sobue, A.*, Ito, N.*, Nagai, T.*, Shan, W., Hada, K., Nakajima, A., Murakami, Y., Mouri, A., Yamamoto, Y., Nabeshima, T., Saito, K., Yamada, K. Astroglial major histocompatibility complex class I following immune activation leads to behavioral and neuropathological changes. **Glia**, 66, 1034–1052, 2018. doi: 10.1002/glia.23299. (*co-first author).
9. Shan, W., Nagai, T.*#, Tanaka, M., Itoh, N., Furukawa-Hibi, Y., Nabeshima, T., Sokabe, M., Yamada, K. Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) controls neuronal homeostasis in pentylenetetrazole-induced epilepsy through the induction of Homer1a. **J. Neurochem.**, 145, 19–33, 2018. doi: 10.1111/jnc.14274. (*co-first author, #corresponding author).
10. Itoh, N., Nagai, T., Watanabe, T., Taki, K., Nabeshima, N., Kaibuchi, K., Yamada, K. Valocin-containing protein (VCP) is a novel IQ motif containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1) interacting protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 493, 1384–1389, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.159.
11. Kubo, K.I., Deguchi, K., Nagai, T., Ito, Y., Yoshida, K., Endo, T., Benner, S., Shan, W., Kitazawa, A., Aramaki, M., Ishii, K., Shin, M., Matsunaga, Y., Hayashi, K., Kakeyama, M., Tohyama, C., Tanaka, K.F., Tanaka, K., Takashima, S., Nakayama, M., Itoh, M., Hirata, Y., Antalffy, B.,

- Armstrong, D.D., Yamada, K., Inoue, K., Nakajima, K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. **JCI Insight**, 2. pii: 88609, 2017. doi: 10.1172/jci.insight.88609
12. Konishi, A., Ohgami, N., Matsushita, A., Kondo, Y., Aoyama, Y., Kobayashi, M., Nagai, T., Ugawae, S., Yamada, K., Kato, M., Kiyama, H. Exposure to diphtheria toxin during the juvenile period impairs both inner and outer hair cells in C57BL/6 mice. **Neuroscience**, 351, 15-23, 2017. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.028.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Nagai T. Striatal phosphorylation signals regulating reward and aversive behaviors. (Symposium). The 22nd Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology. (Osaka, Japan). (2019.3.16).
2. 永井拓, 尾崎紀夫, 山田清文. ゲノムのコピー数変化から統合失調症の診断治療標的を探る. (シンポジウム). 第 92 回日本薬理学会年会. (大阪). (2019.3.14-16).
3. 永井拓, 貝淵弘三. Role of striatal phosphorylation signaling in emotional behaviors. ワークショップ. 第 41 回日本分子生物学会年会. (横浜). (2018.11.28-30).
4. 永井拓, 尾崎紀夫, 山田清文. 統合失調症の克服を目指したリバーストランスレーショナルリサーチ. (シンポジウム). 第 28 回日本医療薬学会年会. (神戸). (2018.11.23-25).
5. 永井拓, 祖父江顕, 久島周, 尾崎紀夫, 山田清文. 統合失調症患者から同定された Reelin 遺伝子変異の病態生理学的意義. (シンポジウム). 第 28 回日本臨床精神神経薬理学会・第 48 回日本神経精神薬理学会 合同年会. (東京). (2018.11.14-16).
6. 永井拓, 祖父江顕, 山田清文. 自然免疫系の過剰な活性化はアストロサイト由来主要組織適合抗原 I 型を介して異常行動を引き起こす. (シンポジウム). 第 34 回日本ストレス学会学術総会. (名古屋). (2018-10.27-28).
7. 永井拓. 免疫活性化によって誘導されるアストロサイト由来 MHC class I の病態生理学的役割. (シンポジウム). 第 61 回日本神経化学学会大会・第 40 回日本生物学的精神医学会. (神戸). (2018.9.6-8).
8. Nagai, T., Shan, W., Tanaka, M., Itoh, N., Furukawa-Hibi, Y., Nabeshima, T., Sokabe, M., Yamada, K. Npas4-Homer1a pathway regulates neuronal homeostasis in animal model of epilepsy. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. (Kyoto). (2018.7.1-6).
9. 永井拓, Shan Wei, 山田清文. ホメオスタシスの観点から考えるてんかん治療の標的分子. (シンポジウム). 日本薬学会第 138 年会 (金沢). (2018.3.25-28).
10. 永井拓, 貝淵弘三. Phosphorylation signals in reward-motivated behaviors. (シンポジウム). 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). (神戸). (2017.12.6-9).
11. 永井拓, Shan Wei, 田中基樹, 鍋島俊隆, 曾我部正博, 山田清文. ペンチレンテトラゾール誘発てんかん発作における Npas4 の役割. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会. (札幌). (2017.9.28-30).
12. 永井拓. 脳機能を制御するリン酸化シグナルの解明に関する研究. (優秀賞受賞講演) 第 60 回日本神経化学学会大会. (仙台). (2017.9.7-9).
13. 永井拓, Shan Wei, 田中基樹, 鍋島俊隆, 曾我部正博, 山田清文. Npas4 mediates pentylentetrazole-induced Homer1a expression in the hippocampus. 第 60 回日本神経化学学会大会. (仙台). (2017.9.7-9).
14. 永井拓, 黒田啓介, 貝淵弘三. ドパミン神経伝達により引き起こされる神経興奮と報酬関連行動の細胞内シグナル. (シンポジウム) 第 40 回日本神経科学学会大会 (千葉). (2017.7.20-23).

〔図書〕(計 2 件)

1. 永井拓. 自閉スペクトラム症. 臨床薬学テキストシリーズ 神経・筋/精神/麻酔・鎮痛, 中山書店, 2019, 印刷中.
2. 永井拓. 最初期遺伝子カスケードと神経可塑性. 依存嗜癖の基礎と臨床, 朝倉書店, 2019, 印刷中.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学ホームページ

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/clinical-pharma/clinical-pharma/neuropsychopharmacology/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 教道

ローマ字氏名：Itoh Norimichi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：30726310

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：朱 悠韻

ローマ字氏名：Zhu Youyun

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。