

機関番号： 24701
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008 年度 ～ 2010 年度
 課題番号： 20591376
 研究課題名（和文） ニコチン依存およびアルコール依存におけるオピオイド神経系の関与
 研究課題名（英文） Involvement of opioid system in nicotine and alcohol dependence
 研究代表者
 岸岡 史郎（KISHIOKA SHIROH）
 和歌山県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 60137255

研究成果の概要（和文）：本研究ではニコチン、アルコールの身体的および精神的依存における内因性オピオイドシステムの役割について検討した。マウスにニコチンを1日2回5-9日間反復皮下投与し、その後オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンを投与すると退薬症状が発現した。ニコチンによる身体的依存形成はオピオイド受容体拮抗薬であるナルトレキソンの併用により抑制された。一方で、1%エタノールを含む飲料水をマウスに与え、ナロキソンを投与すると退薬症状が認められた。上記の結果より、ニコチンおよびアルコールにより形成される身体的依存には、内因性オピオイドシステムが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of endogenous opioid system in physical dependence induced by nicotine or alcohol. Treatment of opioid receptor antagonist, naloxone caused withdrawal symptoms in mice administered nicotine twice a day for 5-9 days. Nicotine dependence was suppressed by opioid receptor antagonist, naltrexone. On the other hand, treatment of naloxone caused withdrawal symptoms in mice given water including ethanol (1%). These results suggest that endogenous opioid system plays an important role in physical dependence induced by nicotine or alcohol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：精神神経科学

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：ニコチン、アルコール、オピオイド、コルチコステロン、依存

1. 研究開始当初の背景

オピオイド鎮痛薬を除く薬物の依存形成に関する研究は十分な進展が得られていない。特に、嗜癖薬物として日常生活に密接に関連するニコチンおよびアルコールによる依存症は社会的に重要な精神疾患であり、その分子基盤の解明が求められている。

これまでに我々はニコチンが内因性オピオイドシステムを活性化させ、鎮痛効果を発現することを報告してきた（Kiguchi N et al., *Brain Res.* 2008）。他の基礎研究ならびに臨床研究でも、喫煙ならびにアルコール依存における内因性オピオイドの関与が示唆されている。また米国においては、オピオイド受容

拮抗薬がアルコール依存の治療薬として承認されている事実もある。すなわち、ニコチンおよびアルコールによる依存形成には、共通してオピオイド神経系が関与する可能性が考えられる。しかしながら、その詳細な分子機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

薬物依存は身体的依存と精神的依存に分類され、各々は異なる分子機構を有する。身体的依存は休薬または拮抗薬により誘発される退薬症状の発現を特徴とし、精神的依存は薬物への渴望と探索行動を特徴とする。中枢神経興奮薬であるニコチンと中枢神経抑制薬であるアルコールは相反する作用を有するにも関わらず、それらの身体的および精神的依存形成においては共通の分子基盤の存在が示唆されている。本研究ではニコチン、アルコールの身体的および精神的依存における内因性オピオイドシステムの役割について検討した。

3. 研究の方法

実験動物：ICR系雄性マウス(25-30g)を用いた。12時間毎の明暗サイクルにて飼育し、餌および水は自由に摂取させた。

薬物投与：使用薬物はいずれも生理食塩水に溶解し、皮下または腹腔内に液量0.2ml/10gを投与した。

血清コルチコステロン(SCS)測定：マウスの体幹血を採取し、遠心分離にて血清を得た。蛍光法(Zenker N et al., *J. Biol. Chem.* 1958)により血清中のコルチコステロン濃度を測定した。これまでの我々の報告に基づき、SCS濃度の上昇を身体的依存形成の定量的指標とした(Kishioka S et al., *Jpn. J. Pharmacol.* 1994)。

アルコール暴露：0.1-1%エタノールを含む飲料水をマウスに与えた。一方では、透明なケージにマウスを入れ、空气中濃度を6-7mg/Lとしてエタノールを噴霧した。エタノール暴露期間中には、アルコール脱水素酵素阻害薬であるピラゾール(1mmol/kg)を1日1回、腹腔内に投与した。

新生仔ラット脳切片共培養：生後2日齢のラット脳より中脳辺縁系(前頭葉皮質、側坐核、腹側被蓋野)をそれぞれ含む脳切片を作製し、FBS含有DMEM/F-12培地にて培養した。これまでの我々の報告に従い、*in vitro*にて再構築した脳内報酬系を精神的依存の評価に用いた(Maeda T et al., *Brain Res.* 2004)。

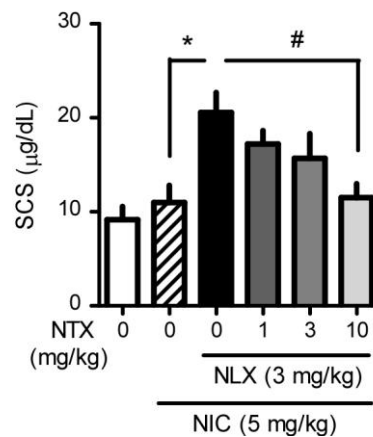
4. 研究成果

ニコチンによる身体的依存形成における内因性オピオイドシステムの関与

ニコチン(1-5mg/kg)をマウスに1日2回、3-9日間反復皮下投与し、身体的依存を

形成させた。最終投与翌日にオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン(0.1-5mg/kg)を皮下投与し、その30分後におけるSCS濃度を測定した。ニコチン反復投与群では、ナロキソンによりSCS濃度が有意に上昇した。その上昇度すなわち身体的依存形成の強度はニコチンの投与量および投与期間、ならびにナロキシンの投与量に依存していた。またニコチン投与の15分前にオピオイド受容体拮抗薬であるナルトレキソン(10mg/kg)を併用投与すると、ニコチンによる身体的依存形成が有意に抑制された(図1)。

図1: ニコチン投与後の身体的依存に及ぼすオピオイド受容体拮抗薬の影響



ニコチン(5mg/kg)を単回皮下投与すると、30分後においてSCS濃度の上昇が観察された。この効果はニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンの併用により抑制されるが、ナロキソンでは抑制されなかった。

これらの結果より、ニコチンの反復投与により身体的依存が形成され、その強度は与えられるニコチンの量と期間に依存することが明らかとなった。またニコチンにより活性化される内因性オピオイドシステムが、身体的依存形成に重要な役割を担うことが示唆された。

アルコールによる身体的依存形成における内因性オピオイドシステムの関与

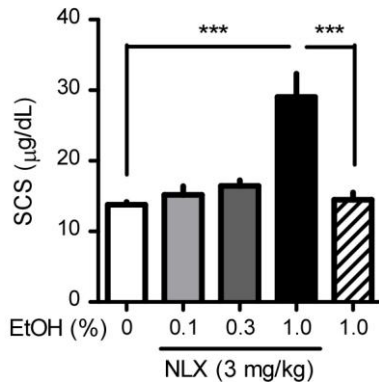
エタノール(0.1-1%)を含む飲料水を9日間マウスに与え、身体的依存を形成させた。暴露終了翌日にナロキソン(3mg/kg)を皮下投与、その30分後におけるSCS濃度を測定した。1%エタノール飲水群では、ナロキソンによりSCS濃度が有意に上昇した。その上昇度はアルコールの濃度に依存しており、0.5%以下では身体的依存が形成されなかった(図2)。

一方では、吸入によるエタノール暴露を14日間行い、退薬症状の指標である体重変化を観察した。暴露終了の24時間後において、

体重の有意な減少が認められた。

これらの結果より、アルコールの飲水および吸入暴露により身体的依存が形成され、その強度は与えられるアルコールの量に依存することが明らかとなった。さらにアルコールにより活性化される内因性オピオイドシステムが、身体的依存形成に重要な役割を担うことが示唆された。

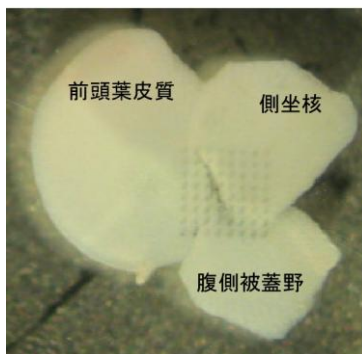
図2: エタノール飲水後の身体的依存に及ぼすナロキソンの影響



ニコチンおよびアルコールによる精神的依存形成の評価系確立

生後2日齢のラット脳より、前頭葉皮質、側坐核および腹側被蓋野の3部位を含む切片をそれぞれ作製し、多電極培養ディッシュ上で共培養を行った。依存性薬物であるコカインを適用すると、側坐核におけるグルタミン酸神経シナプス応答 (EPSP) の抑制が認められた。現在、ニコチンおよびアルコール適用が *in vitro* 脳内報酬系に及ぼす影響ならびに内因性オピオイドシステムの関与について評価中である。

図3: 中脳辺縁系脳切片共培養



まとめ

本研究において、ニコチンおよびアルコールによる身体的依存のモデルを確立し、SCS測定によりその程度を定量的に評価することが可能となった。またこれらの薬物による

依存形成の分子基盤には内因性オピオイドシステムが重要な役割を果たしていることを薬理的アプローチにより明らかにした。また精神的依存の評価系もほぼ確立できていると、今後引き続いて各種解析を行う予定である。本研究の知見より、薬物依存の新たな治療戦略に繋がる足がかりを得られたといえる。

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 14 件)

- ① Ueno K, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M, Kishioka S: Availability of serum corticosterone level for quantitative evaluation of morphine withdrawal in mice. *Drug Discov. Ther.*, 5(2), 71-75, 2011. (査読有り)
- ② Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y and Kishioka S: Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 beta up-regulation. *Pain*, 149 (2), 305-315, 2010. (査読有り)
- ③ Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M and Kishioka S: Increment of activated serine/threonine protein phosphatase in brain membrane fraction synchronized with antinociceptive effect of morphine in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 33 (6), 1011-1014, 2010. (査読有り)
- ④ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Saika F and Kishioka S: CC-chemokine MIP-1 α in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, 484, 17-21, 2010. (査読有り)
- ⑤ 前田武彦: 覚せい剤精神病および覚せい剤依存の基礎研究における現状. 和歌山医学: 61 (2), 36-41, 2010. (査読無し)
- ⑥ Fukazawa Y, Maeda T, Kishioka S: The pharmacological mechanisms of electroacupuncture. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 10(1), 62-69, 2009. (査読有り)
- ⑦ Toda N, Kishioka S, Hatano Y, Toda H: Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling. *Anesthesiology*, 110(1), 166-181, 2009. (査読有り)
- ⑧ Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ikuta T, Ozaki M, Kishioka S: Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(31), 13076-13081, 2009. (査読有り)

- ⑨ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, **Kishioka S**: Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3), 311-315, 2009. (査読有り)
- ⑩ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, **Kishioka S**: Activation of extracellular signal-regulated kinase in sciatic nerve contributes to neuropathic pain after partial sciatic nerve ligation in mice. *Anesth. Analg.*, 109(4), 1305-1311, 2009. (査読有り)
- ⑪ Kiguchi N, Maeda T, Tsuruga M, Yamamoto A, Yamamoto C, Ozaki M, **Kishioka S**: Involvement of spinal Met-enkephalin in nicotine-induced antinociception in mice. *Brain Res.*, 1189, 70-77, 2008. (査読有り)
- ⑫ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Kondo T, Ozaki M, **Kishioka S**: The critical role of invading peripheral macrophage-derived interleukin-6 in vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 592 (1-3), 87-92, 2008. (査読有り)
- ⑬ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, **Kishioka S**: Up-regulation of tumor necrosis factor-alpha in spinal cord contributes to vincristine-induced mechanical allodynia in mice. *Neurosci. Lett.*, 445, 140-143, 2008. (査読有り)
- ⑭ Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ozaki M, **Kishioka S**: Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. *J. Pharmacol. Sci.*, 108 (3), 341-347, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計 11 件)

- ① **Kishioka S**, Ueno K, Yamamoto A, Yamamoto C, Kobayashi Y, Kiguchi N and Maeda T: Serum corticosterone increase is a useful indicator to quantify the magnitude of naloxone-precipitated morphine withdrawal in mice. Neuroscience 2010, November 15, 2010, San Diego, USA.
- ② **Kishioka S** and Maeda T: Leptin and neuropathic pain. Molecular Targets for Novel Pain Therapeutics From basic research to clinical translation, September 24, 2010, Calabria, Italy.
- ③ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y and **Kishioka S**: Role of macrophage inflammatory protein-1 in the pathogenesis of neuropathic pain. Molecular Targets for Novel Pain Therapeutics From basic research to clinical translation, September 24,

2010, Calabria, Italy.

- ④ **Kishioka S**, Ueno K, Yamamoto C, Yamamoto A, Saika F, Iwai S, Kobayashi Y, Kiguchi N and Maeda T: Nicotine stimulates opioid system through the activation of nicotinic acetylcholine receptor. The International Narcotics Research Conference 2010, July 13, 2010, Malmo, Sweden.
- ⑤ **Kishioka S**, Ueno K, Yamamoto C, Yamamoto Y, Saika F, Iwai S, Kobayashi Y, Kiguchi N, Maeda T: Development of tolerance to nicotine-induced corticosterone increase and antinociception in mice. The 1st meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, November 14, 2009, Kyoto.
- ⑥ Iwai S, Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, **Kishioka S**: Inhibition of morphine tolerance under the several pain conditions in mice. The 1st meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology, November 14, 2009, Kyoto.
- ⑦ **Kishioka S**, Ueno K, Yamamoto C, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y: Involvement of endogenous opioid system in the development of physical dependence on nicotine in mice. The International Narcotics Research Conference 2009, July 15, 2009, Portland, Oregon.
- ⑧ Maeda T, **Kishioka S**: Adipokines regulate development of neuropathic pain. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 18 日, 横浜.
- ⑨ Kobayashi Y, Ueno K, Kiguchi N, Maeda T, Yamamoto C, **Kishioka S**: Involvement of endogenous opioid system in nicotine-induced antinociception and physical dependence in mice. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 16 日, 横浜.
- ⑩ **Kishioka S**, Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y: Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on the neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in mice. Japan - China Medical Workshop on Drug Discoveries and Therapeutics 2008, September 29, 2008, Tokyo.
- ⑪ Maeda T, **Kishioka S**: The activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) suppresses the neuropathic pain due to partial sciatic nerve ligation in mice. XI Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, September 13, 2008, Sendai.

[図書] (計 4 件)

- ① Maeda T, **Kishioka S**: Chapter 13 PPAR and Pain. *Int. Rev. Neurobiol.*, 85, pp165-177,

2009.

- ② Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S: Chapter 14 Involvement of inflammatory mediators in neuropathic pain caused by vincristine. *Int. Rev. Neurobiol.*, 85, pp179-190, 2009.
- ③ 前田武彦, 岸岡史郎: シナプス伝達 (分担訳), 第II部 ニューロン. 「エッセンシャル神経科学」前田正信 監訳, 丸善, pp. 94-104, 2008.
- ④ 岸岡史郎: 神経伝達物質 (分担訳), 第II部 ニューロン. 「エッセンシャル神経科学」前田正信 監訳, 丸善, pp. 105-133, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160416/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸岡 史郎 (KISHIOKA SHIROH)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60137255

(2)研究分担者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50271010
木口 倫一 (KIGUCHI NORIKAZU)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：90433341