

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791154

研究課題名 (和文) 薬物依存症の治療法開発：逆耐性を消失させるドーパミン D1 受容体シグナル

研究課題名 (英文) Development of treatment for drug addiction: Reversal of sensitization by dopamine D1 receptor signaling

研究代表者

首藤 隆秀 (SHUTO TAKAHIDE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70412541

研究成果の概要 (和文)：ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与が、薬物依存症の動物モデルである逆耐性現象を消失させる。タンパク質の発現量・リン酸化状態の解析を行った結果、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与は、逆耐性形成ラットにおいて減弱しているドーパミン D1 受容体シグナルを増強することにより逆耐性を消失させるという可能性が考えられる。これらの研究結果は、薬物依存症の治療においてドーパミン D1 受容体刺激薬が有用である可能性を示す。

研究成果の概要 (英文)：Repeated administration of the dopamine D1 receptor agonist induces the reversal of established behavioral sensitization to methamphetamine, which is thought as a model of drug addiction. These findings raise a plausible mechanism that chronic dopamine D1 receptor agonism counteracts the decreased dopamine D1 receptor signaling in the sensitized state, leading to the reversal of sensitization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：精神薬理学、薬物依存、ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

薬物依存症患者の治療・社会復帰を妨げる最大の原因は、依存性薬物に対する渴望や精神病様症状が長期にわたり再燃をくり返す点、すなわち再燃準備性の持続にある。従って、再燃準備性の消失を目的とした新規治療法の確立が望まれる。

実験動物に覚せい剤メタンフェタミンを反復投与すると、惹起される自発運動量が次第に増加していく逆耐性 (薬物に対する感受性亢進) が形成される。逆耐性は断薬後も半

永久的に持続し、少量のメタンフェタミンの再投与で自発運動量の増大が再現される。このため逆耐性は薬物依存症患者における薬物への渴望や精神病様症状の再燃準備性の持続を表す動物モデルと考えられている。

従来、一旦形成した逆耐性の消失は非常に困難であるため逆耐性は不可逆的であると考えられてきた。しかし我々は近年、メタンフェタミン逆耐性を形成させたラットに、ドーパミン D1 受容体刺激薬 R-(+)-SKF38393 を反復投与すると、逆耐性が消失することを明

らかとした。本研究では、ドーパミン D1 受容体刺激薬の反復投与による逆耐性消失の機序を解明する。

2. 研究の目的

本研究では、逆耐性消失の機序を解明し、ドーパミン D1 受容体刺激薬の、薬物依存症の新規治療薬としての発展の基盤となる研究を行う。計画している研究項目は以下の通りである。

(1) ドーパミン D1 受容体シグナルを中心とした細胞内シグナル伝達の解析

逆耐性の形成にはドーパミン D1 受容体/プロテインキナーゼ A (PKA) シグナルが重要である。線条体に豊富に存在するタンパク質 DARPP-32 (dopamine -and cAMP -regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) は、34 番目のスレオニン残基 (Thr34) がリン酸化されると PKA のリン酸化効率を増大するが、75 番目のスレオニン残基 (Thr75) がリン酸化されると PKA 活性を抑制する。このようにリン酸化される部位の違いにより PKA 活性を制御することから、メタンフェタミンの作用発現および逆耐性に重要な分子と考えられている。また、DARPP-32 のリン酸化は、ドーパミン D1 受容体/PKA シグナルを始め、様々なシグナル伝達系による調節を受けているので、DARPP-32 リン酸化解析により、リン酸化に寄与している各シグナルの強度を知ることができる。つまり、DARPP-32 のリン酸化解析は、様々な細胞内シグナル伝達の変容を解明することができる有用な評価系でもある。逆耐性形成動物と、逆耐性形成後にドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与を行った動物とで DARPP-32 リン酸化状態を解析し、細胞内シグナル伝達の変容を解明する。

(2) ドーパミン D1 受容体およびドーパミン D2 受容体の、ドーパミンに対する親和性の解析

ドーパミン受容体 D1 および D2 受容体は、ドーパミンに対し高親和性、低親和性のいずれかの状態で存在する。高親和性状態と低親和性状態は互いにシフトし、生体におけるドーパミン作用の発現には高親和性状態のドーパミン受容体が重要である。我々は既に、逆耐性獲得ラットの線条体では高親和性ドーパミン D1 および高親和性ドーパミン D2 受容体の割合が増加しているが、ドーパミン D1 受容体反復投与により正常レベルに回復することを報告している本研究では、前頭前皮質、側坐核など線条体以外の脳部位における解析を行い、各脳部位でのドーパミン受容体の機能的変化を解明する。

(3) クロマチンのリモデリングを介した遺伝子発現制御機構の解析

アセチル化やメチル化、リン酸化などのヒ

ストン修飾は、クロマチンとよばれる DNA 高次構造の変換 (リモデリング) を起こし、遺伝子配列を伴わない遺伝子発現の制御 (エピジェネティクス) を行っている。近年、ドーパミン D1 受容体シグナルは DARPP-32 を介しクロマチンリモデリングを起こすことや、薬物依存にエピジェネティクスが関与していることが知られてきている。本研究では、逆耐性形成動物と、逆耐性形成後にドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与を行った動物とで、ヒストン修飾を指標として、エピジェネティクスにおける変化を解明する。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成

ラットまたはマウスにメタンフェタミンを 3 日に 1 度、計 5 回反復投与する。休薬 7 日目に少量のメタンフェタミン投与を行い、自発運動量を測定する。対照である生理食塩液反復投与群に対する有意な増大をもって逆耐性の獲得とする。逆耐性を獲得したラットに、選択的ドーパミン D1 受容体刺激薬 R-(+)-SKF38393 を 7 日間反復投与する。最終投与から 3 日後および 14 日後に再び少量のメタンフェタミンを投与し、自発運動量を測定する。逆耐性獲得後生理食塩液を反復投与した群と比較し、有意な自発運動量増大作用の抑制をもって逆耐性の消失とする。

(2) ウェスタンブロット法による、細胞内シグナル伝達の解析

① in vivo 条件での DARPP-32 リン酸化状態の解析

ラットまたはマウスを用いて、逆耐性形成後およびドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与後に実験動物用マイクロウェーブ照射装置を用いて実験動物の頭部にマイクロウェーブを照射し、脳内の酵素活性を瞬時に不活性化させる。DARPP-32 リン酸化状態もこの操作により固定される。前頭前皮質、線条体、側坐核を分離し、ウェスタンブロット法により DARPP-32 リン酸化状態をはじめ各タンパク質の解析を行う。生前の薬物投与の影響を動物個体レベルで捉えることを目的としており、脳全体の神経回路を介した薬物の作用を解明する。

② 脳スライスを用いた DARPP-32 リン酸化状態の解析

ラットまたはマウスを用いて、逆耐性形成後およびドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与後に断頭し、各脳部位のスライスを作成する。脳スライスをインキュベーションしながら薬物付加を行い、その後、ウェスタンブロット法により DARPP-32 リン酸化状態をはじめ各タンパク質の解析を行う。各脳部位に限局した変化を捉えるとともに、前述の in vivo 条件でのリン酸化解析では解析できない、薬

物付加直後の即時的な反応を解明する。また、この方法は、薬物付加後の時間経過に伴う反応の変化や、様々な試薬の併用付加による反応を捉えることが可能なので、シグナル伝達の変化をより詳細に解析できる。

(3) DARPP-32 遺伝子改変マウスを用いた行動解析

DARPP-32 ノックアウトマウスおよび、DARPP-32 のリン酸化部位 (Thr34, Thr75) のいずれかをアラニンに置換しリン酸化を阻害したポイントミュータントマウスを用いた行動解析を行う。逆耐性の形成およびドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与における、DARPP-32 リン酸化によるドーパミン D1 受容体/PKA シグナル伝達制御の関与を解明する。

(4) ドーパミン D1 受容体およびドーパミン D2 受容体の機能的変化の解明

ラットを用いて、逆耐性形成後およびドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与後に断頭し、前頭前皮質、線条体、側坐核を分離する。受容体結合実験により、ドーパミン D1 受容体ならびにドーパミン D2 受容体の発現数および親和性の変化を解析する。既に線条体での結果は得られているが、他の脳部位あるいは様々な時間経過による変化を、ドーパミン D1 受容体およびドーパミン D2 受容体について検討する。

(5) ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御機構における変化の解明

真核生物の DNA は八量体のヒストン (H2A, H2B, H3, H4 それぞれ 2 個ずつ) に巻き付いたヌクレオソーム構造を形成する。ヌクレオソームはヒストン H1 を介して複合体となりさらに凝集してクロマチンとよばれる高次構造を形成している。ヒストンはアセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を受け、クロマチン構造を変化させる。どのヒストンのどのアミノ酸残基がどのような修飾を受けているか、またその組み合わせが一種の暗号のようになり、転写、DNA 複製、有糸分裂など様々な機能が発揮される。例えば、ヒストン H3 の 9 番目または 14 番目のリシン残基のアセチル化は、転写活性をそれぞれ抑制、促進する。

本研究では、ラットまたはマウスを用いて、逆耐性形成後およびドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与後に断頭し、前頭前皮質、線条体、側坐核を分離する。ウエスタンブロット法によりヒストン H3 および H4 のアセチル化、メチル化、リン酸化レベルの測定を行う。各々のヒストン修飾の解析により遺伝子発現制御機構の変容を解明する。

4. 研究成果

メタンフェタミン単回投与では線条体におけるドーパミン D1 受容体シグナルが増強されるが、メタンフェタミン反復投与後、つまり逆耐性形成後ではドーパミン D1 受容体シグナルの減弱を示唆する実験結果が得られた。従って、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与は、逆耐性形成ラットにおいて減弱しているドーパミン D1 受容体シグナルを増強することにより逆耐性を消失させるのではないかという可能性が示唆される。

我々の報告した、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与によるメタンフェタミン逆耐性の消失という現象は、薬物依存症の再燃に対して「予防」のみならず「治癒」の可能性を示唆する新しい動物モデルであると考えられる。従って、本研究の成果は、薬物依存症の病態の解明および、ドーパミン D1 受容体シグナルを標的とした新規治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

今後は、薬物依存症に関連するドーパミン D1 受容体シグナル以外のシグナル伝達が、ドーパミン D1 受容体刺激薬反復投与にどのように影響を受けるのかタンパク質レベル、メッセンジャーRNA レベルで解析を行う。さらに、薬物依存症の症状を示すモデルにおける治療効果を検討する。

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 1 件)

- ① Shuto T, Nishi A. Treatment of the psychostimulant-sensitized animal model of schizophrenia. 査読有, CNS Neurosci Ther. 17(2011)133-139.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 古賀 夕貴, 首藤 隆秀, 黒岩 真帆美, 豊増 功次, 西 昭徳, sirtuin を活性化する resveratrol のコカイン逆耐性現象に対する影響, 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日, 誌上開催

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 隆秀 (SHUTO TAKAHIDE)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 70412541

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：