

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591671

研究課題名(和文) 神経接着因子関連の脳神経ネットワークから依存を解明する

研究課題名(英文) NrCAM associated neural network underlying addiction

研究代表者

石黒 浩毅 (ISHIGURO, Hiroki)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20375489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：依存とは薬物へ執着以外にも多様な性格やうつなどの行動特性があり、心理社会的側面への精神療法に加えて、薬物治療が必要である。依存症新規治療薬の開発に寄与するために、先行研究で明らかにした依存症関連遺伝子NrCAMの遺伝子ノックアウトマウスと覚せい剤投与マウスの脳組織における遺伝子発現プロファイリングを行った。Nrcam遺伝子の低発現および覚せい剤投与によって遺伝子発現が変化する分子には、グルタミン酸神経、GABA神経およびストレス関連遺伝子などを検出した。これらは依存症治療薬のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Substance dependence shows certain personality or behavioral characteristics, besides compulsiveness to drugs. Therefore, patients need effective medication in addition to psychotherapy to the psychosocial aspects of addiction. We therefore attempted to clarify NrCAM-related neural molecule network to contribute to the development of new therapeutics, because there is a few effective drugs used in present clinics. Result from the gene expression analysis using Nrcam knock-out mice treated with/without methamphetamine indicated several candidate genes involved in methamphetamine abuse. They included glutamatergic, GABAergic molecules and also stress-related molecules, which may be new therapeutic targets for addiction and its related personality behaviors.

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：NrCAM 神経接着因子 依存 遺伝子発現プロファイリング グルタミン酸神経 GABA神経 ストレス

1. 研究開始当初の背景

多因子疾患である薬物依存症については研究代表者の元所属研究室で全ゲノム関連解析 (GWAS) を行い、多数の接着因子関連遺伝子が候補となった。特に研究代表者は GWAS ならびにモルヒネ投与ラット脳の遺伝子発現解析から依存に神経細胞接着因子 NrCAM を同定し、*Nrcam* ノックアウトマウスは依存低形成となることを突き止めた (Ishiguro et al. *Neuropsychopharmacology* 31:572-84, 2006)。なお、依存とは報酬効果以外、不安抑うつなどの精神、認知機能、性格傾向などの様々な臨床学的表現型が認められる。NrCAM は脳神経の発達・伸長、コンタクトとネットワークの機能を持つ分子であり、これら多くの高次精神機能に関与していると考えられる。

しかし、NrCAM に直接作用する薬物はなく、また存在しても広範な影響が想像できるため依存症治療に応用は難しそうである。一方、現代医療においては、グルタミン酸受容体および GABA 受容体に作用するアカンプロセートが臨床応用されているが、その臨床効果は限定的である。NrCAM が制御する神経ネットワークの少なくとも複数の分子が依存という複合的な表現型を形成するならば、それら個々の分子の同定とそれぞれへの作用薬剤を用いることによる物質依存に有効な薬物療法が増える可能性がある。

2. 研究の目的

NrCAM には多くの神経分子が制御を受けているため、依存におけるそれら複数の分子の相互作用を網羅的に明らかにすることが目的である。同時に臨床にて認められる依存症関連の表現型や合併する (家系内に発症リスクの上がる) うつ病などの基盤をなす脳内分子を網羅的に明らかにする。

国内においては昨今、芸能界や学生にまで薬物中毒が広がっている。またアルコール依

存やうつに関連した自殺問題も深刻であり、これらの問題が引き起こす社会的損失は数千億円は下らない。新規治療薬の開発、診断技術の発展などの臨床応用に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NrCAM 低発現に影響を受ける遺伝子群を明らかにするために、*Nrcam* ノックアウトマウス摘出脳組織 (線条体と腹側中脳) から抽出する RNA 試料中の遺伝子発現プロファイリングを行う。ノックアウトマウスは生理食塩水を投与した naïve あるいはメタンフェタミンを投与した依存モデルを作成して用いる。遺伝子網羅的発現解析のためにアレイ (Affymetrix) を用い、アレイにて 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子に関して個別に TaqMan realtime PCR 法にて確認を行う。それらはパスイアナリシス解析にてグルタミン酸神経系や GABA 神経系分子、ドパミン神経系やセロトニン神経系に分類し、変化のネットワークを明らかにする。

(2) 依存症の表現型としてうつや不安、認知機能などの行動特性に果たす役割を野生型ならびにヘテロ型間にて観察し、前述の発現プロファイリングにて明らかにした分子への作用薬をマウスに投与して行動解析してヘテロ型の行動と同等になることを確認し、当該分子が作用する依存表現型を明らかにする。行動解析は①novelty-seekingテストによる性格行動測定、②ゼロ迷路、強制水泳テスト、ビー玉埋没テストによる不安・抑うつ・強迫行動の測定を行う。また、2週間軽度慢性ストレス負荷 (CMS) を行ったマウスから脳RNAを抽出し、遺伝子発現解析の試料とした。

4. 研究成果

(1) 先行研究の siRNA を用いて NrCAM 遺

伝子発現を低下させた培養細胞における遺伝子発現プロファイリングにて着目していたグルタミンナーゼ (GLS) 遺伝子については、*Nrcam* ノックアウトマウスにおいても *Gls* 遺伝子発現が低下することを追認した。そこでグルタミンナーゼの阻害剤を用いて、*Nrcam* ノックアウトマウスが示す行動との相違を明らかにし、論文発表や論文発表を行った。阻害剤は *Nrcam* ノックアウトマウスと同様に依存形成を阻害する。

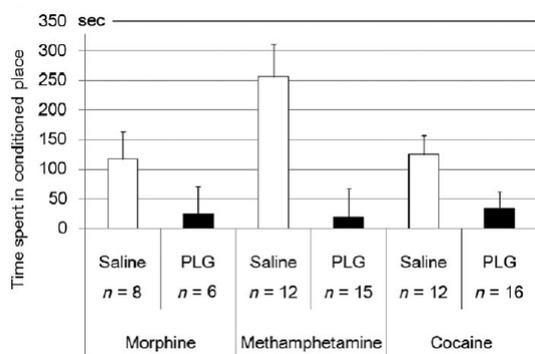


図 1 場所嗜好性試験におけるモルヒネ、メタンフェタミン、コカインに対するグルタミンナーゼ阻害剤の効果

新奇求性や不安に関しては *GLS* が関与しているが、主にセロトニン系に関わるビー玉埋没テストに見られる強迫行動には影響を認めなかった。以て、グルタミン酸神経系が部分的影響を与える依存関連表現型が明らかにできた。

(2) 中脳組織から抽出した RNA を試料としたアレイによる遺伝子発現解析にて、依存性薬物を投与していない *Nrcam* ノックアウトマウスの遺伝子型間にて遺伝子変化を起こしている分子を検出した。GABA、グルタミン酸神経、セロトニン神経系の分子に加えて、*Fkbp5* 遺伝子が検出できた。*FKBP5* はストレス関連遺伝子であることや気分障害の候補遺伝子であることが他施設研究から示唆されている。本研究の CMS 試料における発現解析でも、ストレス負荷マウスにて *Fkbp5* 遺伝子の発現低下を認めることを確認した。

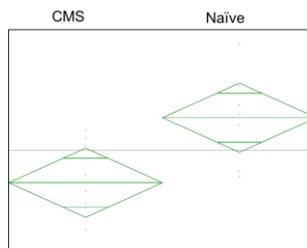


図 2 軽度慢性ストレス負荷と *Fkbp5* 遺伝子発現

これらの知見は、*Nrcam* が関与する依存の生物学的基盤の一部に、慢性ストレスへの脆弱性が関わっていることを示唆する。

(3) 次に、アレイによる遺伝子発現解析にて、覚せい剤投与の有無、および *Nrcam* 遺伝子型 2 タイプの 2x2 比較解析を行い、特に *Nrcam* ヘテロ型だけに覚せい剤投与による遺伝子型発現変化が有意に変化している遺伝子に着目した。

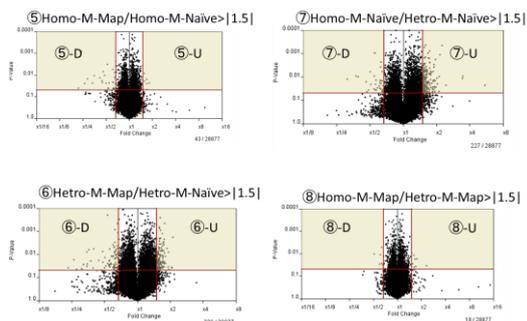


図 3 中脳における $p < 0.05$ 、1.5 倍以上変化した遺伝子

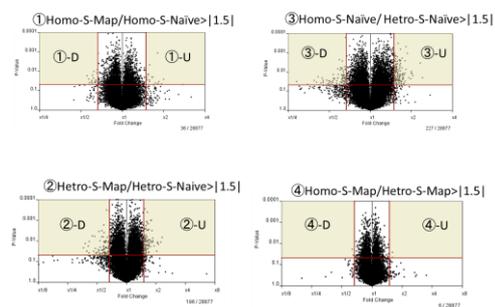


図 4 線条体における $p < 0.05$ 、1.5 倍以上変化した遺伝子

1.5 倍以上かつ少数サンプルの比較にて統計的有意差を持つ変化を示すマーカーは中脳で 88 個、線条体で 102 個であり、うち既知の遺伝子は 40 個、70 個であった。なお脳神経関連遺伝子は少数であり、グルタミン神経

分子1つと GABA 神経系分子2つは TaqMan gene expression 解析にて確認された。(現時点では名称未発表とさせていただきます)。これらの分子については、薬物依存治療薬候補として、アゴニストあるいはアンタゴニストによるマウスを用いた行動解析が進行中である。

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)

①Ishiguro H, Hall FS, Horiuchi Y, Sakurai T, Hishimoto A, Grumet M, Uhl GR, Onaivi ES, Arinami T.、NrCAM-regulating neural systems and addiction-related behaviors.、Addiction Biology、査読有、19 巻、2014 年、345-353

DOI: 10.1111/j.1369-1600

[学会発表] (計1件)

①石黒浩毅、アルコール・薬物依存のゲノム研究、第33回日本アルコール関連問題学会、平成23年7月23日、佐賀

[その他]

ホームページ等 (近日掲載予定)

<http://seishin-shinkei.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 浩毅 (ISHIGURO, Hiroki)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20375489