

原 著

平成 25 年度 第一薬科大学・若手研究者奨励金
研究計画報告書

研究課題：体内時計に着目した THC 誘発性精神障害発症メカニズムの解明

池田 恵理子

第一薬科大学 分子生物学分野、〒815-8511 福岡県福岡市南区玉川町 22-1

Eriko IKEDA

*Department of Molecular Biology, Daiichi University of Pharmacy, 22-1 Tamagawa-cho,
Minami-ku, Fukuoka 815-8511, Japan*

1. 緒言

大麻乱用者は世界的に増加傾向にあり、それに伴う刑事犯罪や医療費、薬物規制に関する司法関係経費が増大し、深刻な社会問題となっている。わが国でも、インターネットの普及によってネットワークを介した大麻の密売買が横行し、若年層への大麻汚染は拡大し、憂慮すべき状況にある。大麻の乱用は、その主成分である Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(Δ^9 -THC)による幻覚作用をはじめとし、多様な有害作用を発現させる。特に、抑うつや不安を主症状とする精神障害は、断薬時の退薬症候として表れ、精神依存を強化させるため問題視されている。また、近年、若年期の精神障害は、統合失調症やうつ病の発症を高めることが報告され、公衆衛生の観点からも Δ^9 -THC 惹起性精神障害に対する有効な治療法の開発が求められている。これまでに、 Δ^9 -THC による精神障害は、カンナビノイド受容体(CB1)を介したドパミン神経系の機能低下や線条体領域のドパミン受容体の機能異常が原因と考えられてきた¹⁾。しかしながら、未だその分子メカニズムの解明や責任因子の同定には至っていない。

一方、ヒトをはじめ地球上の多くの生物には、体内時計が存在し、地球の自転に伴う外部環境の周期的変化に生体機能を自律的に同調させることで恒常性維持を図っている。近年、体内時計の本体は、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が形成する転写・翻訳のフィードバックループ機構であることが明らかになってきている²⁻⁶⁾。時計遺伝子 CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーは、同じく時計遺伝子である *Per*, *Cry* の各遺伝子の転写活性調節領域における特定の塩基配列(E-box)に結合することで、その遺伝子発現を促進させる。これにより生じた PER, CRY の蛋白は複合体を形成し CLOCK/BMAL1 による自らの転写活性を抑制し、自身の発現に約 24 時間周期の増減

を引き起こしている。さらに、CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーは他の遺伝子の転写活性調節領域に存在する E-box にも結合し、その発現に約 24 時間周期の変動(日周リズム)を生じさせる⁷⁾。哺乳動物の生体リズムの中樞は脳の視交叉上核(suprachiasmatic nuclei; SCN)に位置し、神経伝達物質や液性因子を介して末梢組織における体内時計のリズムを制御している⁸⁻¹⁰⁾。この階層的な制御システムによって、肝臓や小腸などの末梢組織に発現している受容体や代謝酵素、トランスポーターなどの機能分子の発現リズムを制御することが明らかとなっている¹¹⁻¹²⁾。

近年、遺伝子改変動物を用いた解析や疫学研究から、体内時計が様々な疾患(睡眠障害、循環器疾患、がん、関節リウマチなど)の発症リスクに関わっていることが明らかとなってきた¹¹⁻¹⁵⁾。精神疾患領域においては、精神疾患患者で、体内時計の周期短縮や外部環境との脱同調を示すことや、症状に日周リズムが認められることから、体内時計の異常が指摘されている¹⁶⁻¹⁷⁾。そのため、体内時計は精神障害の病態解明および創薬ターゲットの新たなアプローチとして期待されている。しかしながら、 Δ^9 -THC 惹起性精神障害と体内時計との関連性は不明である。

そこで本研究では、体内時計の観点から Δ^9 -THC 惹起性精神障害発症メカニズムを解明することを目的として、 Δ^9 -THC 慢性投与の体内時計に及ぼす影響について検討した。

2. 方法

1)実験動物

4 週齢 ICR 雄性マウス (Charles River Japan, Kanagawa, Japan)を用いた。自由摂食・摂水、明暗周期(明期: 7:00-19:00)、恒温(温度: 24±1 °C) 条件下で飼育した。 Δ^9 -THC は、1% Tween80 および saline で懸濁調製し、3 週間、毎日 9 時に腹腔内に投与した。

2)RNA の定量

線条体から RNA を抽出し、 β -actin を内部標準として、Real-time PCR 法により RNA の発現量を測定した。

3)自発行動量の測定

自発行動は、赤外線ビーム方式運動量測定装置 ACTIMO-10 (Shinfactory, Fukuoka, Japan)を用いて解析した。行動量を 30 分間ごとに算出し、マウスをケージに入れてから 1 週間の行動量の測定を行った。ケージは横; 291 mm、縦; 487 mm、高さ; 206 mm の透明ケージを用いた。測定匹数は 1 匹につき 1 ケージとした。

3. 結果および考察

ドパミン受容体の発現に及ぼす Δ^9 -THC の影響

ドパミン受容体 D2 は、 Δ^9 -THC による精神障害の発症に寄与していると考えられ

ている。そこで、 Δ^9 -THC を 1mg/kg, 10mg/kg に調製し、3 週間腹腔内に投与した後の D2 発現量におよぼす影響について検討した。その結果、vehicle 群では明期に低値、暗期に高値を示す有意な日周リズムが認められた。一方、 Δ^9 -THC 投与群では、D2 の日周リズムが低値を示す 13 時に測定を行ったところ、いずれの濃度においても有意な差異は認められなかった。さらに、同時刻におけるカンナビノイド受容体 CB1、各時計遺伝子の発現量においても両群間に有意な差異は認められなかった。

行動量に及ぼす Δ^9 -THC の影響

続いて、 Δ^9 -THC 慢性投与による自発行動量におよぼす影響について検討した。自発行動量は、 Δ^9 -THC の投与終了後、1 週間測定した。その結果、vehicle 群、 Δ^9 -THC 投与群ともに暗期に高値を示す行動リズムが認められた。明期における自発行動量には両群間で差異は認められなかったが、暗期では、vehicle 投与群と比較して Δ^9 -THC 投与群で濃度依存的に増加した。

今回の検討では、13 時における自発行動量および各遺伝子の発現量に、vehicle 投与群および Δ^9 -THC 投与群間で変化が認められなかった。しかし、線条体に発現する D2 が行動制御の一因であることを考慮すると、暗期における Δ^9 -THC 投与群で認められた自発行動量の増加は、D2 を含む各遺伝子の発現変化に起因している可能性が考えられる。今後の検討課題としては、1 日を介した、特に暗期における各遺伝子の発現および機能評価を行う必要がある。

本研究は、まだ始まったばかりで課題も多く残っているが、本研究で行っている研究手法は、従来までの脳の器質的な変化に主眼を置いたメカニズム研究と大きく異なる。今後、体内時計の観点から Δ^9 -THC 惹起性精神障害に関わる因子の同定や病態発症のメカニズムを明らかにし、薬物依存症に対する新たな治療法の開発や創薬ターゲットの同定につなげることを目指していきたい。

4. 参考文献

- 1) Ginovart N, Tournier BB, Moulin-Sallanon M, Steimer T, Ibanez V, Millet P. (2012) Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol exposure induces a sensitization of dopamine D2/D3 receptors in the mesoaccumbens and nigrostriatal systems. *Neuropsychopharmacology*. 37: 2355-2367.
- 2) Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, and Sakaki Y. (2003) Circadian oscillation of mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*. 389: 512-516
- 3) Ripperger JA, Shearman LP, Reppert SM, and Schibler U. (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev* 14: 679-689.
- 4) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, and Weitz CJ. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280: 1564-1569.

- 5) Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, and Reppert SM. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96: 57-68.
- 6) Yamaguchi S, Mitsui S, Miyake S, Yan L, Onishi H, Yagita K, Suzuki M, Shibata S, Kobayashi M, and Okamura H. (2000) The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *10*: 873-876.
- 7) Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, and Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110: 251-260
- 8) Kalsbeek A, van Heerikhuize JJ, Wortel J, and Buijs RM. (1996) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci* 16: 5555-5565.
- 9) Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N, and Hamdan A. (2011) Molecular basis of chronopharmaceutics. *J Pharmaceutics Science* 100: 3560-3573.
- 10) Paul P, Etienne C. (2011) Melatonin: Both master Clock output and internal time-giver in the circadian Clocks network. *J Physiology* 105: 170-182.
- 11) Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, and Reppert SM. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96: 57-68.
- 12) Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atumi G, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, et al. (2003) Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*. 278: 41519-41527.
- 13) Filipinski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont MC, Liu X, Claustrat B, Hastings MH, and Lévi F. (2002) Host circadian Clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 94: 690-697.
- 14) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, and Bass J. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*. 308: 1043-1045.
- 15) Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, Ivanova G, Omura C, Mo S, Vitaterna MH, Lopez JP, Philipson LH, Bradfield CA, Crosby SD, JeBailey L, Wang X, Takahashi JS, and Bass J. (2010) Disruption of the Clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631
- 16) Healy D, and Waterhouse JM. (1995) The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. *Pharmacol Ther*. 65: 241-263
- 17) Wirz-Justice A. (2008) Diurnal variation of depressive symptoms. *Dialogues Clin Neurosci*. 10: 337-343.