

中枢神経系疾患モデルを用いた 脳血管疾患に関する薬理学的研究

2019 年1月

山 本 康 晴

中枢神経系疾患モデルを用いた 脳血管疾患に関する薬理学的研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士(生物工学)学位論文

山本康晴

目次

緒言	p1
第1章 各種薬物の脳虚血／グルタミン酸負荷に対する脳保護作用に関する検討	p2
第1節 脳虚血負荷／グルタミン酸負荷による海馬 CA1 電場電位低下に対する薬物の作用	p2
I. ビタミン B12(メチルコバラミン)の CA1 電場電位低下に対する作用	p2
1 実験材料ならびに飼育方法	p3
2 実験結果	p6
小括	p13
II. ドーパミン関連薬物の CA1 電場電位低下に対する作用	p16
1 実験材料ならびに飼育方法	p17
2 実験結果	p18
小括	p21

第2章 アルコール禁断における皮質-線条体グルタミン酸神経伝達に関する電気生理学的、神経化学的検討	p23
---	-----

第1節 アルコール禁断モデルラットの作製	p26
----------------------	-----

1 実験材料ならびに飼育方法	p26
----------------	-----

2 実験結果	p28
--------	-----

第2節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンのグルタミン酸受容体の変化に関する検討	p30
---	-----

1 実験材料ならびに実験方法	p30
----------------	-----

2 実験結果	p34
--------	-----

第3節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンのドーパミン受容体の変化に関する検討	p42
--	-----

I. 白質刺激により誘発される線条体での反応へのドーパミン神経系の関与	P42
-------------------------------------	-----

1 実験材料ならびに実験方法	p42
----------------	-----

2 実験結果	p43
--------	-----

第4節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンの電氣的膜特性の変化に関する検討

p46

1 実験材料ならびに実験方法

p46

2 実験結果

p47

小括

p49

第3章 脳虚血モデル、アルコール禁断モデルの有用性検証

p53

第1節 脳虚血モデル

p53

第2節 アルコール禁断モデル

p59

第4章 総括

p67

参考文献

p70

謝辞

p95

略語表

APV	:DL-2-amino-5-phosphonovareic acid
BAPTA	: <i>bis</i> -(<i>o</i> -aminophenoxy)-ethane- <i>N, N, N', N'</i> , -tetraacetic acid
BBB	: blood-brain barrier
cAMP	:cyclic adenosine monophosphate
7-Cl-KYN	:7-chlorokynurenic acid
CNQX	:6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2, 3-dione
DA	:dopamine
EPSP	:excitatory postsynaptic potentiation
GABA	:gamma-amino-butyric acid
Glu	:glutamate
LTD	:long-term depression
LTP	:long-term potentiation
mGlu	:metabotropic glutamate receptor
MCPG	:(RS)- α -methyl-4-carboxyphenyl-glycine
MK-801	:dibenzocyclohepteneimine
NMDA	:N-methyl-D-aspartate
PS	:population spikes
PTP	:post-tetanic potentiation
SAM	:S-adenosylmethionine
TTX	:tetrodotoxin

緒言

本邦における3大疾患のひとつである脳血管疾患(脳卒中)は、死亡者数が2004年の12万人から2016年には10万人となり、大幅に減少しつつあるものの、その罹患者数は、2014年に117万人で、依然多い。脳血管疾患の背景因子として、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などとともに、アルコール依存症、肥満というファクターも否めない。第1章では脳梗塞を誘発する脳虚血モデルに細胞外電極を用いた電気生理学的検討を、第2章ではアルコール禁断モデルに細胞内電極を用いた電気生理学的検討を、それぞれ薬理学的見地から追究して、その病態の誘発因子に関する基盤研究を実施した。さらに、第3章では、中枢神経系の薬理分野で扱われてきた当モデルがどのように活用され、新しい知見を生んで産業イノベーションに貢献できたかと、今後、新しく注目される中枢神経系疾患モデルがどのように創薬に結びつく可能性が出てきているか、*in vitro*、*ex vivo*と*in vivo*の評価モデルの価値について言及したい。

第 1 章 各種薬物の脳虚血／グルタミン酸負荷に対する脳保護作用に関する検討

第1節 脳虚血／グルタミン酸負荷による海馬 CA1 電場電位低下に対する薬物の作用

I. ビタミン B₁₂（メチルコバラミン）の CA1 電場電位低下に対する作用

ビタミン B₁₂ は、組織の代謝において重要な補酵素機能を持つ必須栄養素である。脳はヒトのビタミン B₁₂ が比較的豊富であり(Inada et al., 1982)、これはビタミン B₁₂ が血液脳関門を通して輸送できることを示している。ビタミン B₁₂ 欠損の神経学的病変の原因となるメカニズムはあまり理解されていないが、メチルコバラミンを含むビタミン B₁₂ 類縁体は、末梢神経系だけでなく中枢神経系の神経疾患の治療に広く使用されている(Chanarin et al., 1985)。虚血性神経損傷におけるグルタミン酸受容体および NMDA 受容体の関与に関しては、NMDA 受容体拮抗薬の保護効果について報告している(Simon et al., 1984)。低酸素／低グルコース溶液に曝露された海馬スライスの CA1 前シナプス線維スパイクが減少し、プロテインキナーゼ C 阻害剤および NMDA 受容体拮抗薬を含む Ca²⁺ を含まない溶液との同時処理によってこの現象が減弱することを報告している(Shibata et al., 1992a, Shibata et al., 1992b, Shibata et al., 1995a)。

さらに、私は一酸化窒素(NO) 合成阻害剤がこの現象を減弱させることを実証している(Shibata et al., 1995b)。NMDA 受容体の活性化に応答して後シナプスニューロンにおいて合成された NO が前シナプス末端に拡散してスパイクを阻害すると考えた。したがって、シナプス前終末の一斉発火を反映した陰性電位である線維斉射(fiber volley)は、前シナプス機能の機序を評価する良いマーカーとして示唆されている

る(Dunwiddie and Miller, 1993)。最近、Akaike ら(1993)は、メチルコバラミンが NMDA 受容体をトリガーとする NO 合成系を介した細胞毒性に対して皮質ニューロンの保護作用を示すことを報告した。

しかし、メチルコバラミンが低酸素／低グルコース状態によって誘導されている神経毒性に対して神経保護作用を有するかどうかは、現在のところ知られていない。したがって、本研究では、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘発性の海馬スライスにおける CA1 前シナプス電位低下に対するメチルコバラミンの効果を調べた。さらに、陽性対照としてシアノコバラミンを使用した。

1 実験材料ならびに飼育方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

本実験に使用した動物は、Wistar 系雄性ラット 5 週齢(Sea/Wistar、成和実験動物研究所)である。恒温($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、恒湿(相対湿度 60%)および 12 時間の明暗サイクル下(7:00AM 点灯)の動物飼育室でプラスチック製ホームケージ(30x35x17cm)内で、1 ケージあたり 5~6 匹ずつの群飼育を行った。餌および水は自由に与えた。

1-2 使用薬物ならびに調製法

Krebs Ringer 溶液の組成は表 1 に示す通りである。NaCl、KCl、 CaCl_2 、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 、 NaHCO_3 、d-glucose はすべて和光純薬特級試薬を用いた。 37°C 恒温槽中で $95\%\text{O}_2/5\%\text{CO}_2$ 混合ガスを 30 分以上通気し、酸素を飽和させた。その後、0.6N HCl を用いて pH を 7.3~7.4 の間に調製した。なお、特に明記しない限り pH 調製後の Krebs Ringer 溶液は実験期間中、常に $95\%\text{O}_2/5\%\text{CO}_2$ 混合ガスを通気した。

低酸素／低グルコース負荷には、低酸素／低グルコース溶液を用いた。組成は表2に示すように Krebs Ringer 溶液中の d-glucose を Sucrose (和光純薬特級試薬) 10mM で置換し、95%N₂／5%CO₂ 混合ガスで飽和させた。本実験に用いた水は、すべて自動蒸留装置 (Yamato WG25) によって蒸留精製したものを超純粋製造装置 (Milli Q, Millipore) に通したものである。

表1 Krebs Ringer 溶液の組成表

NaCl	129.0 mM
KCl	4.2 mM
MgSO ₄	1.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	1.5 mM
NaHCO ₃	22.4 mM
d-glucose	10.0 mM

(95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガス)

表2 低酸素／低グルコース溶液の組成表

NaCl	129.0 mM
KCl	4.2 mM
MgSO ₄	1.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	1.5 mM
NaHCO ₃	22.4 mM
Sucrose	10.0 mM

(95% N₂ / 5% CO₂ 混合ガス)

1-3 実験方法

1-3-1 海馬切片の作製方法および保生法

ラットの頸部と胸部を強打し、断頭した後にすばやく頭頂部を開頭して脳組織を損傷しないように1分以内に脳を摘出し、Krebs Ringer 溶液(4℃)中にて十分冷却した。脳底部を水平面に切断した後、脳梁より左右2つに分割した。中心線より外側へ約15度の角度で tissue sectioner (TC-2, SORVALL)にて厚さ450 μ m の薄切片を作製した。作製した脳切片は Krebs Ringer 溶液(4℃)中にて眼科用ハサミで海馬だけを切り出しディスクタイプチャンバー内に保持した。脳切片を入れたチャンバーは、37℃に保温した Krebs Ringer 中で30分以上プレインキュベーションした後、以下の実験に用いた。

1-3-2 使用電極

刺激電極として先端直径 0.1mm, 両極間の距離が 0.3mm のステンレス製双極電極を用いた。記録用電極には外径 1.3~1.8mm の二重ガラス管で電極作製機(成茂製作所:PE-2)を用いて作製したガラス微小電極を使用した。実験時に注射筒を用いて 3M NaCl 液を充填し、先端直径 20~50 μ m、Krebs Ringer 溶液中での抵抗 0.5~1.0M Ω の電極を使用した。

1-3-3 実験装置

本実験に使用した灌流装置の概略を示す。灌流および電位記録用の容器を用いて、海馬切片は海馬支脚および海馬采のうち測定に直接影響のない部分に銀片を載せることにより灌流槽内に固定した。この灌流槽は温度を一定に保つための恒温水槽の中に設置されており、温度調節装置によって温められた温湯を循環させて

36℃に保っている。灌流槽はポリエチレンチューブにより2種の灌流液瓶に接続されている。また、コックにより Krebs Ringer 溶液と低酸素／低グルコース溶液と切り替えられるようになっている。Krebs Ringer 溶液と低酸素／低グルコース溶液にはそれぞれ前述の組成を有する混合ガスが飽和されている。灌流液は吸引管により吸引除去し、灌流液の液面を常に一定の高さに保った。

1－3－4 電場電位の記録法

顕微鏡下で刺激電極を CA3 領域 (Schaffer 側枝) に、記録電極を CA1 領域の錐体細胞上に設置した。得られる電場電位は小さいので16回の加算を行った。刺激条件は、Duration time は 0.09msec、Delay time は 5msec、Interval time は 2,500msec(0.4Hz)で行った。

1－3－5 実験スケジュール

実験は、低酸素／低グルコースを15分負荷した後、Krebs Ringer 溶液で3時間洗浄し、刺激強度を0.9mAとしたときのCA1電場電位を測定した。薬物は低酸素／低グルコース負荷20分前から15分の負荷中にかけて Krebs Ringer 溶液中に添加応用した。

1－4 統計学的処理

2群間のデータの統計学的解析には Student t-test、3群以上のデータに関しては一要因分散分析後、Duncan test により個別間の比較を行った。

2 実験結果

メチルコバラミンまたはシアノコバラミンの低酸素／低グルコース状態またはグ

グルタミン酸誘発性の海馬スライスにおける CA1 前シナプス電位低下に対する効果を調べた。15分間の低酸素／低グルコース状態に曝されたスライスの CA1 前シナプス電位は、3時間のウォッシュアウト後、約 50～60%減少した (Shibata et al., 1992a)。したがって、低酸素／低グルコース状態の10分前から15分間の低酸素／低グルコース状態にかけて、海馬スライスは薬物を含む Krebs Ringer 溶液に25分間負荷した。次いで、海馬スライスを標準 Krebs Ringer 溶液に3時間戻して安定化させて、電場電位測定に供した。図 1 の典型例Bは、低酸素／低グルコース処置後の応答の一例であり、典型例Aは正常な応答の一例である。典型例Cはメチルコバラミンによる機能回復の例であるが、典型例Dではシアノコバラミンにより機能回復を示さない。メチルコバラミンは、グルタミン酸誘発性の前シナプス電位の低下 ($F(5,43) = 3.48, P < 0.01$) および低酸素／低グルコース状態による前シナプス電位の低下 ($F(4,68) = 3.61, P < 0.01$) による海馬 CA1 前シナプスの機能障害を回復させた。

しかし、シアノコバラミンは、低酸素／低グルコースまたはグルタミン酸によって誘導された CA1 前シナプスの機能障害から回復をさせることはなかった (図2)。*In vitro* でシアノコバラミンが機能不全障害に対して無効であったのに対して、*in vivo* におけるシアノコバラミン (0.5mg/kg i.p./日) の3日間連続投与により、低酸素／低グルコース状態 ($F(2,31) = 5.36, P < 0.01$) またはグルタミン酸受容体 ($F(2,28) = 5.45, P < 0.01$) 誘導性の CA1 前シナプス電位減少を減弱させた (図3)。

また、同様にメチルコバラミン (0.5mg/kg i.p./日) を3日間連続投与したところ、CA1 前シナプス電位の低酸素／低グルコース症またはグルタミン酸誘発性機能障害も減弱した (図3)。しかしながら、メチルコバラミンまたはシアノコバラミンの繰り返し投与は、正常な Krebs Ringer 溶液中の CA1 前シナプス電位には影響を与えることはなかった (図 3)。

NO 合成酵素の基質である $100 \mu\text{M}$ の L-アルギニンは、単独で処置をしても、

低酸素／低グルコース状態によって誘導される CA1 前シナプス電位の低下に影響しなかった。一方、低酸素／低グルコース状態によって誘発された CA1 前シナプス電位の低下に対するメチルコバラミン ($1\ \mu\text{M}$ または $10\ \mu\text{M}$) の回復効果は、L-アルギニンとの同時処置によって有意に減弱した ($P < 0.01$, Duncan's test) (図4)。

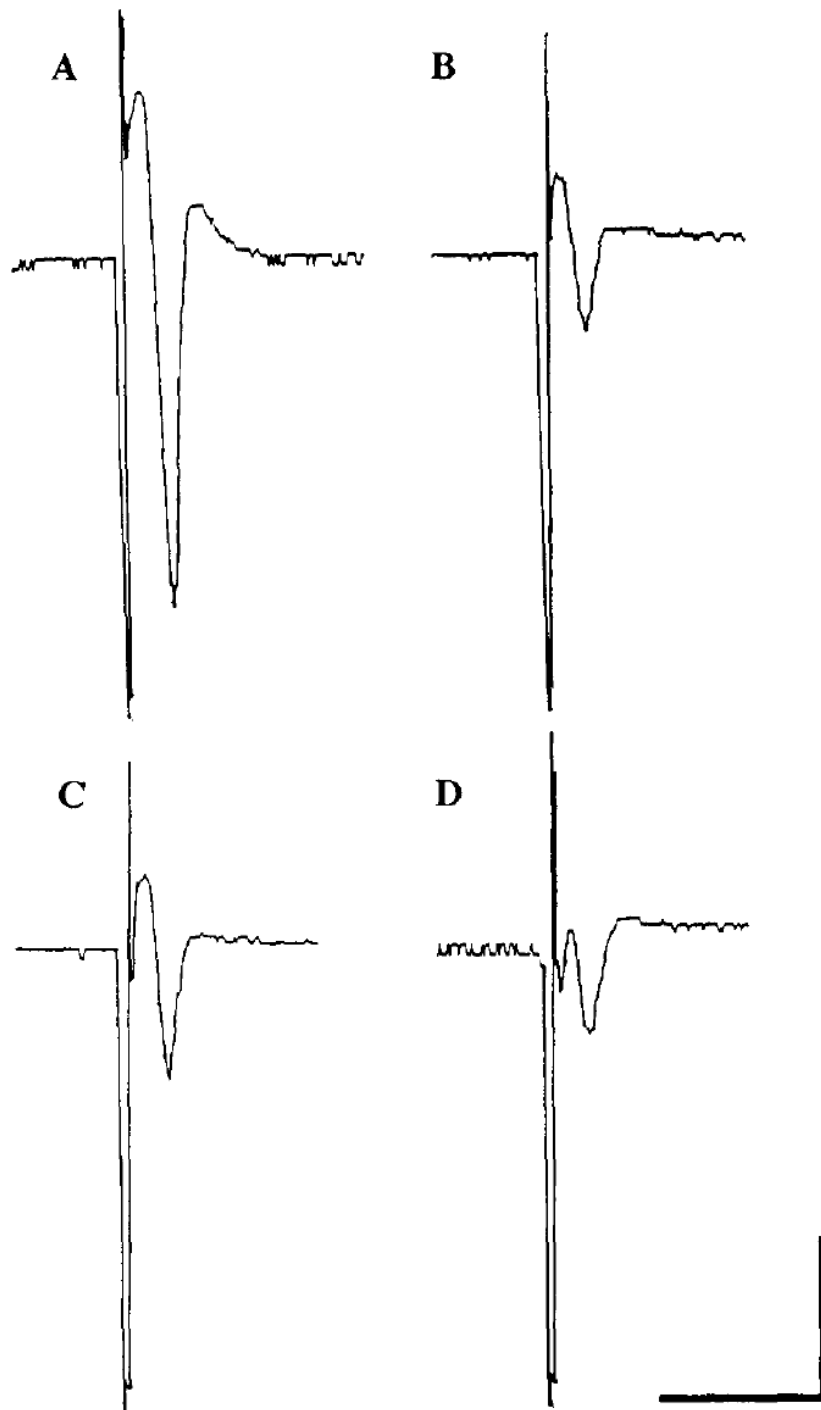


図 1 ラット海馬切片における低酸素／低グルコースによる CA1 前シナプス電場電位の低下に対するメチルコバラミン、シアノコバラミンの影響

A : Normal 群、 B : 低酸素／低グルコース群、 C : メチルコバラミン群、
D : シアノコバラミン群

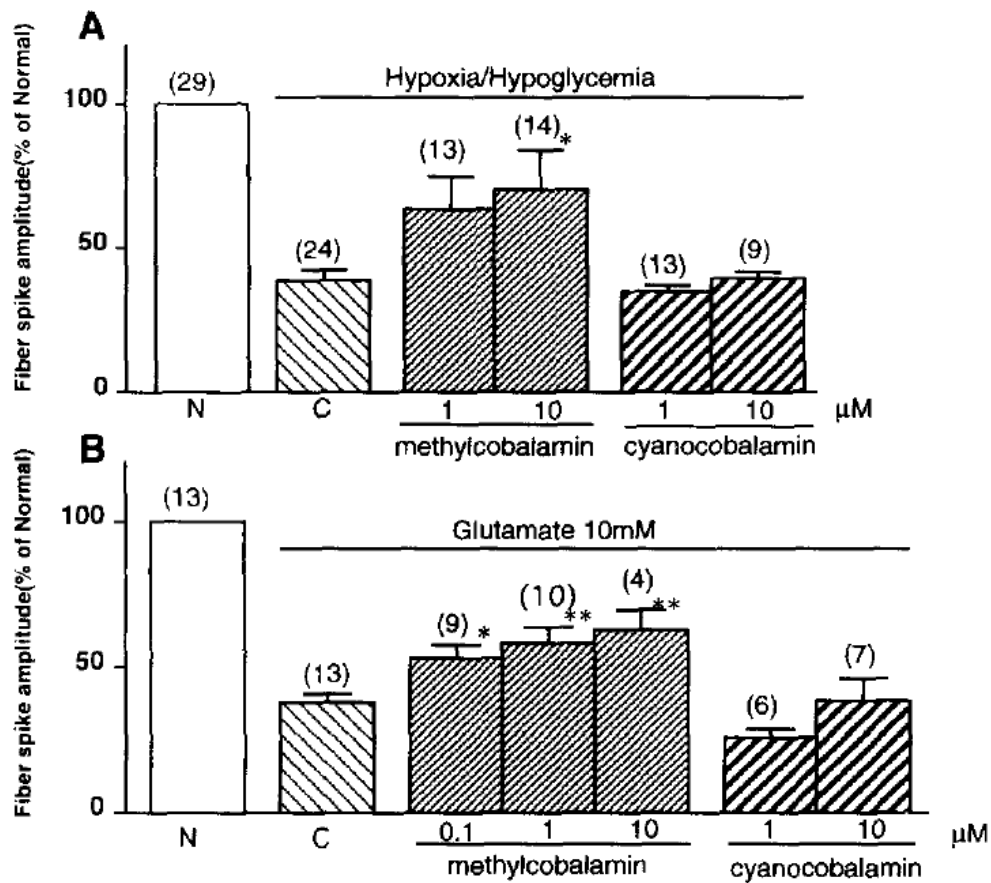


図2 低酸素／低グルコースないしグルタミン酸負荷による海馬 CA1 前シナプス電場電位の低下に対するメチルコバラミン、シアノコバラミンの作用

A: 低酸素／低グルコース(15min) 負荷に対するメチルコバラミン、シアノコバラミンの作用

B: グルタミン酸(10mM) 負荷に対するメチルコバラミン、シアノコバラミンの作用

N: Normal 群、C: 低酸素／低グルコース Control 群

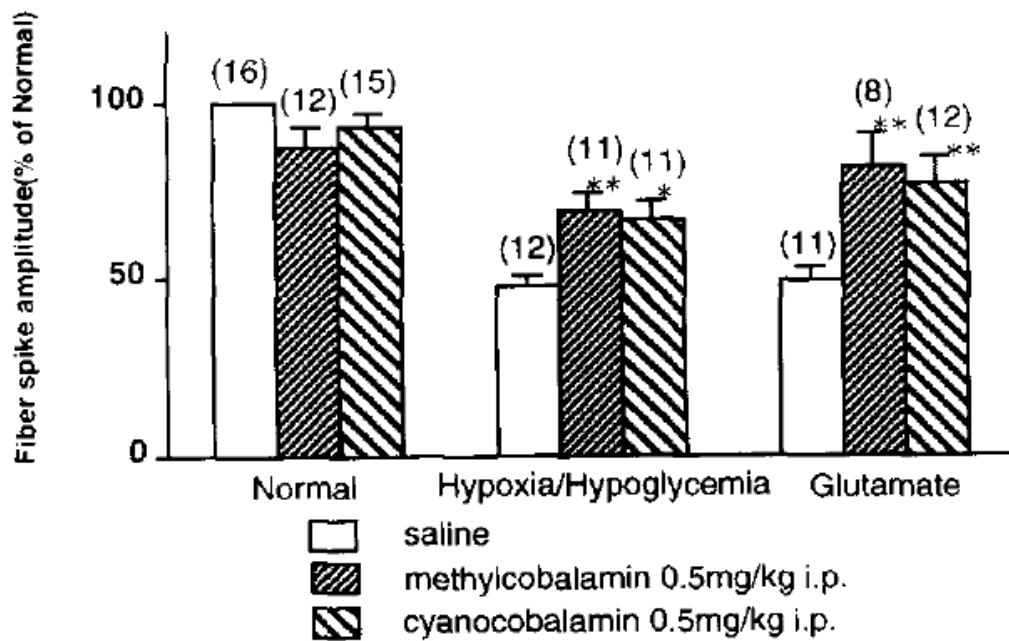


図3 低酸素／低グルコース(15min)ないしグルタミン酸(10mM)負荷による海馬 CA1 前シナプス電場電位の低下に対する *in vivo* でメチルコバラミン、シアノコバラミンを3日間腹腔内投与した作用

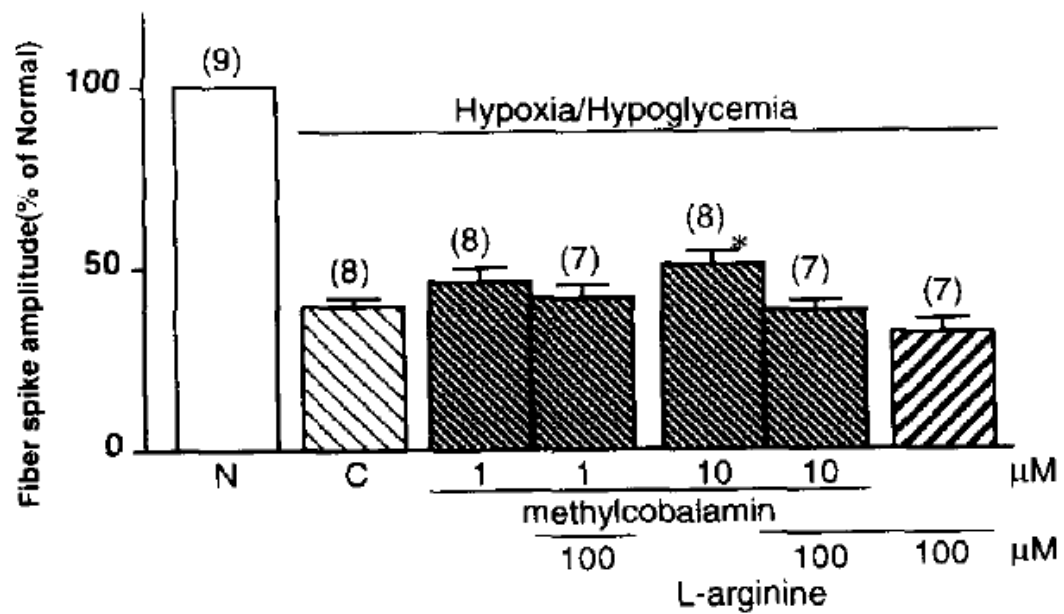


図4 低酸素／低グルコース(15min)負荷による海馬 CA1 前シナプス電場電位の低下に対するメチルコバラミンによる神経保護作用に対する L-アルギニンの作用

N:Normal 群、C:低酸素／低グルコース Control 群

小括

今回、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸による海馬切片にて誘導された CA1 前シナプス線維のスパイク減少に対して、*in vitro* で負荷した場合、メチルコバラミンは保護効果を示す一方、シアノコバラミンは何ら効果を示さなかった。この結果は、メチルコバラミンが、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘発性の海馬スライスにおける前シナプス機能障害からの機能的回復を誘導することを示す。低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘発性の前シナプス繊維抑制作用の神経的なメカニズムは、現在のところ分かっていない。Schaffer 側枝の伝導ブロックまた CA3 ニューロン興奮性の喪失の可能性は考えられる。以前の研究で、これらの障害が Ca^{2+} フリー状態、プロテインキナーゼ C 阻害剤、NO 合成酵素阻害剤、グルタチオンのような酸化還元剤および NMDA 受容体拮抗薬によって減弱することを明らかにしている (Shibata et al., 1992a, Shibata et al., 1992b, Shibata et al., 1995a)。しかしながら、現在のところ、メチルコバラミンによって誘導される機能的回復の神経的なメカニズムの詳細は分かっていない。

シアノコバラミンは、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘導性の前シナプス繊維抑制作用によって海馬スライスに誘導された CA1 前シナプス線維スパイクの減少を減弱させなかったため、メチルコバラミンはメチル基供与体として作用することによって機能回復を引き起こした可能性がある (図2)。コリン作動性神経の機能は、動物の学習および記憶において重要な役割を果たすことが見出されている (Levin and Bowman., 1986, Ridley et al., 1984, Spangler et al., 1986)。Hall (1990) は、メチルコバラミンが、皮質培養を用いてホモシステインからメチオニンへの変換のためのメチル基供与体として作用することを明らかにした。メチオニンは、メチオニン代謝経路において S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) に変換される。メチオニンおよびその

生成物 SAM は、細胞内メチル化反応を促進する。SAM は、細胞膜のリン脂質層にホスファチジルコリンを形成する反応においてメチル供与体として作用する (Gibson et al., 1961)。SAM は、虚血誘導性のニューロン変性に有益な効果を有する (Matsui et al., 1987)。これは、SAM が虚血性脳内で起こるリン脂質の障害を防止する作用に起因する可能性がある。したがって、SAM がリン脂質の合成を促進する役割は、神経毒性の改善に関与する可能性がある。メチルコバラミンは、SAM の産生を介して CA1 前シナプス電位の低酸素／低グルコース誘発性の機能的低下状態からの回復を誘導し得る。

ホモシステインは、ニューロン活動および痙攣発作の増加をもたらすことが示されている (Blennow et al., 1979, Dewhurst et al., 1983, Wuerthele et al., 1982)。このようにホモシステインは中枢神経系の毒性物質であると考えられている (Hall., 1990)。最近、ホモシステインレベルはメチルコバラミンによって減少し、メチルコバラミン欠乏により増加することが報告されている (Araki et al., 1993)。ホモシステインはアデノシンレベルを低下させると報告されている (Sciotti and Van Wylen., 1993)。また、アデノシン受容体作動薬が興奮性神経伝達物質の放出を抑制することによって神経保護を引き起こすことを明らかにされている (Dunwiddie and Haas., 1985)。したがって、メチルコバラミンは、ホモシステインレベルの減少およびアデノシンレベルの増加を介して神経保護作用を生じ得ると考える。

最近、Dawson ら (1991) は、皮質培養を用いて、一酸化窒素 (NO) がグルタミン酸の NMDA 受容体誘発性神経毒性を媒介することを明らかにしている。また、NO 産生の刺激が虚血性損傷の発生に有害な役割を果たすことを示した (Shibata et al., 1995b)。N^G-nitro-L-arginine methyl ester 処置で CA1 前シナプス電位の低酸素／低グルコース誘発性の低下が減弱し、神経保護効果を示すものの、N⁶-nitro-D-arginine methyl ester では神経保護効果を示さない。低酸素／低グルコ

ース状態によって誘導される CA1 前シナプス電位の低下に対するメチルコバラミンの保護効果は L-arginine によって増悪させたため(図4)、メチルコバラミンによる CA1 シナプス前電位の低酸素／低グルコース誘導低下に対する神経保護効果には、NO 産生が関与する。今回の結果は、海馬の前シナプス線維のスパイクを減少させるメカニズムはまだ不明であるものの、ヒドロキシおよび NO₂ を有さない NO 関連ラジカルが、虚血誘導神経毒性において重要な役割を果たすかもしれないことを示唆した (Shibata et al., 1995b)。

メチルコバラミンを脳スライス実験に供する3日前から、毎日腹腔内投与したところ、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸によって誘導される CA1 前シナプス電位低下を減弱させることも明らかとなった(図3)。シアノコバラミンを用いた *in vitro* 実験では、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸によって誘導される海馬の機能不全から保護することができなかったが、シアノコバラミンの *in vivo* 連続投与はメチルコバラミンと同様の神経保護効果を示した(図3)。 *In vitro* 条件下では、シアノコバラミンはメチルコバラミンに変換することができなかった。しかし、*in vivo* で連続投与したシアノコバラミンは、肝細胞においてメチルコバルメチルコバラミンに容易に変換されることが報告されている (Allen., 1976)。

したがって、メチル化がいかんして中枢神経系における保護効果に関連するかは明らかではないものの、メチルコバラミンはメチル基供与体として作用することによって神経保護を引き起こすことが示された。結論として、本研究は、メチルコバラミンが、低酸素／低グルコース誘発性またはグルタミン酸誘導性機能不全に対して海馬スライスにおける神経保護効果を有することを明らかにした。

II. ドーパミン関連薬物の CA1 電場電位低下に対する作用

海馬は、脳虚血性損傷に対して脆弱性の高い脳領域である (Pulsinelli et al., 1982)。グルタミン酸ならびにアスパラギン酸のような神経伝達物質の放出は、感受性の高い脳領域における虚血性障害において主要な役割を果たすことが示唆されている (Baker et al., 1991, Choi, 1987, Globus et al., 1988a, b)。背側海馬はドーパミン神経終末を含み (Ishikawa et al., 1982)、腹側被蓋野および黒質の A9 領域からのドーパミン投射を受ける (Scatton et al., 1980)。虚血中のドーパミンの過剰放出 (Brannan et al., 1987) により、線条体および海馬における有害な作用を誘発する (Bhardwaj et al., 1990, Chang et al., 1993, Slivka et al., 1988)。

ドーパミン D1 受容体リガンドに対する親和性およびドーパミン D2 受容体に対する結合部位の数は、虚血後、線条体において減少した。これらの知見は、虚血によるドーパミン放出が、細胞死のプロセスでのドーパミンによる神経伝達を介するドーパミン D1 および D2 受容体の一過性の変化に関連することを示唆している。中枢神経系にはドーパミン D1 および D2 受容体の両方が存在しており (Dawson et al., 1986, Dewar and Reader, 1989, Mansour et al., 1990, Wamsley et al., 1989)、これら2つのタイプの受容体は、G タンパク質に結合することによってその生物学的効果を発揮する。ドーパミン D1 受容体はアデニレートシクラーゼを活性化し、ドーパミン D2 受容体は、反対に、アデニレートシクラーゼ活性を阻害し、相互作用してドーパミン機能を制御し得る (Wachtel et al., 1989, Sibley and Monsma., 1992)。ドーパミン D2 受容体は、 K^+ および Ca^{2+} チャンネルと同様に、イノシトールリン酸 (IP) 系の Ca^{2+} 放出にも関与することが示唆されている。カルシウムイオンを介した細胞応答は、cAMP によって調製され得る (Tiberi et al., 1991)。細胞内のカルシウムイオンの増加は、虚血性細胞死における重要な誘因であると考えられている (Deshpande et al., 1987, Meyer., 1989)。これらは、

ドーパミン受容体拮抗薬によって虚血性障害の誘発を予防され得るが、ドーパミン受容体作動薬によって増強され得ることからも示唆している (Shibata et al., 1992b, Tanaka et al., 1994)。

最近、私は、低酸素／低グルコース(脳虚血)が、海馬スライスを用いて Schaffer 側枝(SC)の刺激によって誘発された CA1 前シナプス線維の振幅を減少させることを報告した。本研究では、*in vitro* での脳虚血によって誘発された海馬 CA1 前シナプス線維スパイクの障害に対するドーパミン受容体作動薬または拮抗薬の効果を検討した。

1 実験材料ならびに飼育方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1-1と同様に行った。

1-2 使用薬物ならびに調製法

使用薬物ならびに調製法は、第1章第1節1-2と同様に行った。

1-3 実験方法

実験方法は、第1章第1節1-3と同様に行った。

1-4 統計学的処理

統計学的処理は、第1章第1節1-4と同様に行った。

2 実験結果

低酸素／低グルコース性の振幅減少は、濃度依存的にドーパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 処置によって弱められた(図5および6A)が、ドーパミン D2 受容体拮抗薬であるスルピリドは、低酸素／低グルコースによる CA1 電場電位誘発の障害に対しては効果を示さなかった(図6A)。

D1 ドーパミン受容体拮抗薬とは対照的に、ドーパミン D1 受容体作動薬 SKF38393 は、低酸素／低グルコースによる CA1 前シナプス繊維の電位低下を増強し、一方で、ドーパミン D2 受容体作動薬のブロモクリプチンは増強しなかった。(図6B)

SCH23390 を SKF38393 の存在下で灌流すると、SCH23390 の保護効果およびSKF38393の低酸素／低グルコースにより誘導された減少した CA1 前シナプス電位に対する増悪作用の両方が消失した(図6C)

通常の Krebs Ringer 溶液を使用した場合、3時間のウォッシュアウト後、正常な非低酸素／低グルコース溶液中でこれらの薬物を25分間処理しても CA1 前シナプス電位に影響を与えなかった。SCH23390 (100 μ M)、SKF38393 (100 μ M)、スルピリド (100 μ M) およびブロモクリプチン (100 μ M) で 25 分間処置した海馬スライスにおける CA1 前シナプス電位の振幅は、 $103 \pm 6.7\%$ (n=5)、 $105 \pm 3.0\%$ (n=5)、 $108 \pm 6.1\%$ (n=4) および $111 \pm 6.9\%$ (n=5) であった。

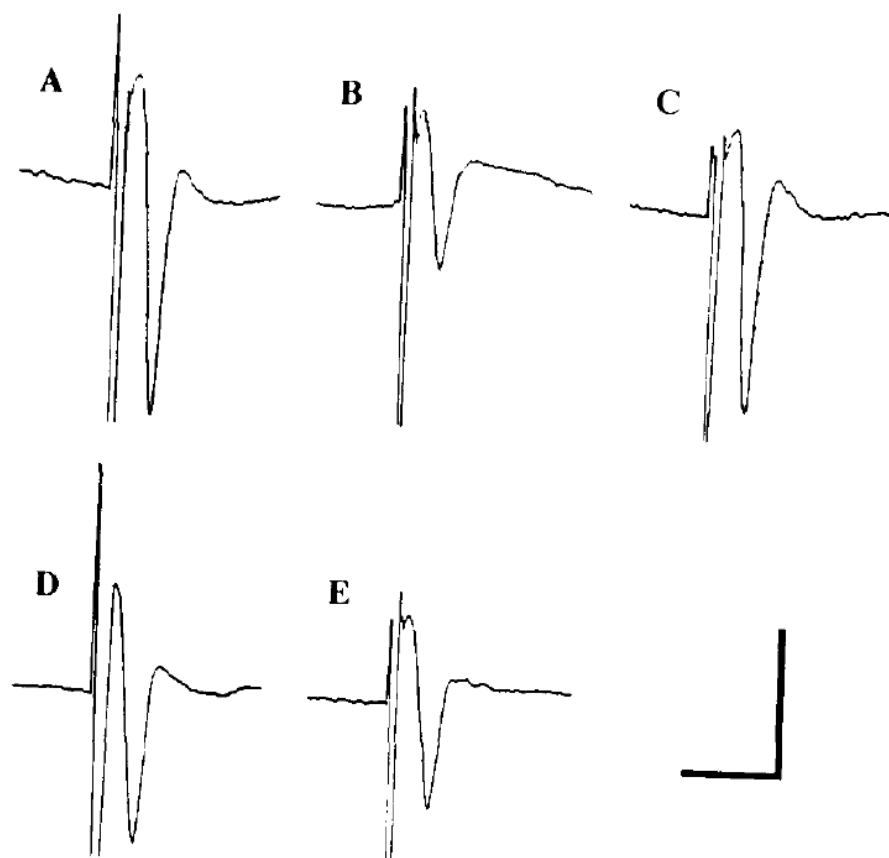


図 5 低酸素／低グルコース(15min)負荷によるラット海馬 CA1 前シナプス電場電位の低下に対するドーパミン受容体作動薬、拮抗薬の作用

A : Normal、B : SKF38393 (100 μ M)、C : SCH23390 (10 μ M)、D : SCH23390 (10 μ M)+SKF38393 (100 μ M)、E : 低酸素／低グルコース

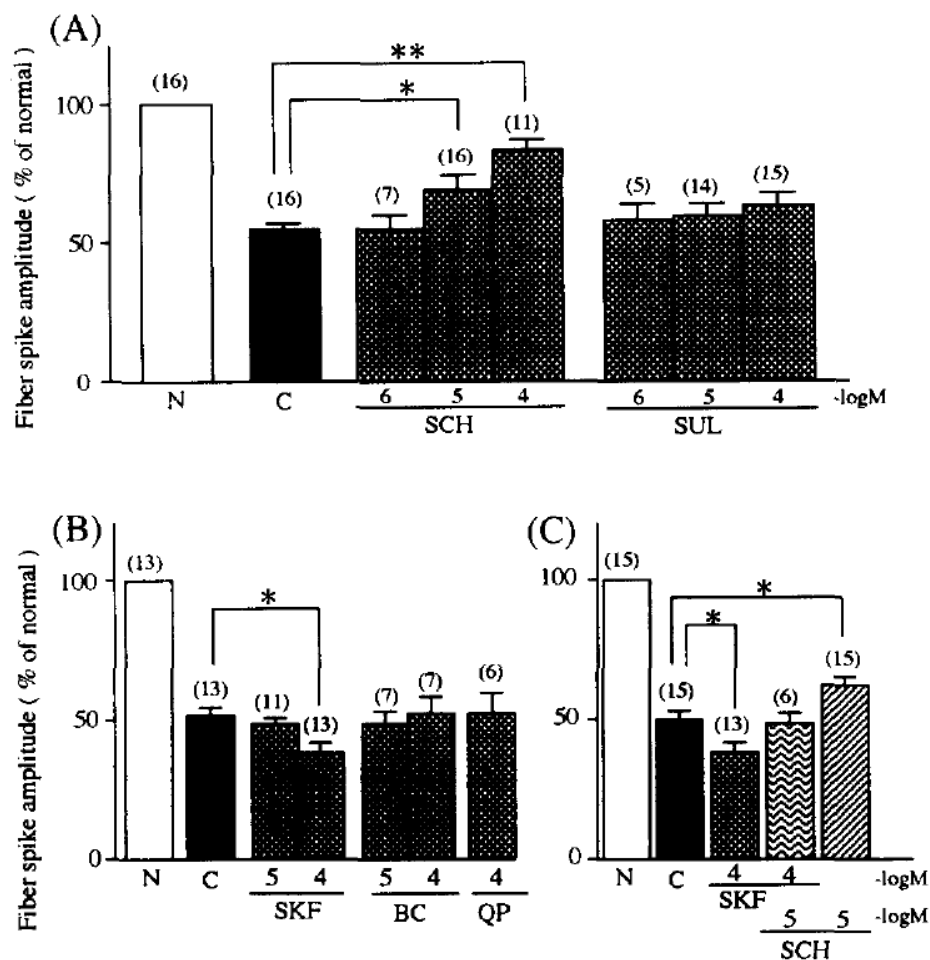


図6 低酸素／低グルコース(15min)負荷による海馬 CA1 前シナプス電場電位の低下に対するドーパミン受容体作動薬、拮抗薬の作用

A: 低酸素／低グルコース(15min)負荷に対する SCH23390、sulpiride の作用

B: 低酸素／低グルコース(15min)負荷における SKF38393 の増悪作用に対する bromocriptin、quinpirole の作用

C: 低酸素／低グルコース(15min)負荷における SKF38393 の増悪作用に対する SCH23390 の作用

N: Normal 群、C: 低酸素／低グルコース Control 群、SCH: SCH23390、SUL: sulpiride、SKF: SKF38393、BC: bromocriptin、QP: quinpirole

小括

この結果は、ドーパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 が、虚血によって誘発された海馬スライスにおける CA1 前シナプス線維スパイクの減少を減弱させたが、ドーパミン D1 受容体での処理によって増強され、線条体における cAMP 含量を増加させることを示している。cAMP 含量の変化は、細胞内 Ca^{2+} 調節機構への影響を通して Ca^{2+} 動員に関連する応答に顕著な影響を及ぼすことが考えられる。高められた cAMP 含量の変化は、 Ca^{2+} 動員を有意に増強する (Akerman and Heikkila, 1990)。細胞性カルシウムイオンの増加は、虚血性細胞死における重要なトリガーであると考えられている (Deshpande et al., 1987, Meyer, 1989)。したがって、ドーパミン D1 受容体拮抗薬は、虚血誘導性機能障害に対して阻害作用を発揮し得る。実際に、アドレナリン受容体拮抗薬が神経保護作用を有することも見出されている (Shibata et al., 1992b)。

線条体同様、背側海馬もまた虚血に非常に脆弱であり、またドーパミン神経終末を含む (Ishikawa et al., 1982, Scatton et al., 1980)。一時的な虚血時の海馬における急性かつ大量のドーパミン放出に関する直接的証拠がある (Bhardwaj et al., 1990)。一般に、ドーパミン受容体 mRNA の局在化は、ドーパミン D1 受容体結合の局在的な分布に関する情報とよく相関する (Dewar and Reader, 1989)。最も多く発現する領域は、尾状核、側坐核および嗅結結節であり、海馬では低発現である (Sibley and Monsma, 1992)。しかし、最近の実験では、ドーパミン D1 受容体 mRNA の領域分布が、海馬に見られる最も高い発現領域を有するドーパミン D5 受容体の発現と非常によく一致することを示唆している (Dawson et al., 1986, Sunahara et al., 1991, Tiberi et al., 1991, Sibley and Monsma, 1992)。したがって、SCH23390 による神経保護作用および SKF38393 による有害作用は、ドーパミン D5/D1 受容体の活性化によるものである可能性が示唆される。SCH23390 が SKF38393 と同時に負荷されると、低酸素／低グル

コースにより誘導された CA1 前シナプス電位の低減に対して、SCH23390 の保護効果も SKF38393 のさらなる改善効果も打ち消した。これは、SCH23390 誘発神経保護が、この薬剤の副作用ではなく、ドーパミン D1 受容体の減少に起因することを示す。

ドーパミン D1 受容体作動薬、拮抗薬とは異なり、ドーパミン D2 受容体作動薬も拮抗薬も、神経保護作用も神経障害作用も示さない。したがって、これらの薬物は、海馬スライス標本における虚血毒性とはほとんど関係のないドーパミン D2 受容体を介して作用し得る。脳におけるドーパミン D2 受容体タンパク質またはドーパミン D2 受容体 mRNA の最も分布の高い領域は、尾状突起被殻、側坐核および嗅結節などの主要ドーパミン作動性投射領域にあたる (Mansour et al., 1990)。海馬のドーパミン D2 受容体分布は低い (Mansour et al., 1990)。ニューロン壊死におけるドーパミン神経系の関与は、ドーパミン合成阻害ないし遊離阻害によるドーパミン量の枯渇を通して、線条体壊死を防ぎ (Globus et al., 1987)、神経終末の損傷を減弱させる結果 (Weinberger et al., 1985) によって支持される。

本研究では、アデニル酸シクラーゼ活性の増加と関連するドーパミン D1 受容体刺激により、虚血誘導性の損傷を促進する結果を示した。ドーパミン D1 受容体の遮断は、これらの障害を減弱させる可能性がある。したがって、私の結果は、*in vitro* での虚血後の神経損傷における海馬におけるドーパミンの促進的役割を示唆している。

第 2 章 アルコール禁断における皮質 - 線条体グルタミン酸神経伝達に関する電気生理学的、神経化学的検討

エタノールの長期摂取の中断は、痙攣、振戦、中枢神経系の過剰興奮などの徴候を特徴とするエタノール禁断(EW: ethanol withdrawal)症候群をもたらすとよく言われる(Davidson et al., 1995, Grant et al., 1990, Gulya et al., 1991)。臨床での重要性は明らかであるにも関わらず、禁断症候群の生理学的根拠への理解は十分ではない。

N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体がエタノール禁断症候群の発症に関与しているというエビデンスが増えてきている。エタノール禁断時には、NMDA 受容体の数を増加させ(Grant et al., 1990, Gulya et al., 1991)、海馬における NMDA 受容体を介したシナプス応答(Morrisett., 1994)ならびに NMDA 興奮毒性(Grant., 1990)を促進させる。さらに、エタノール禁断発作は NMDA 拮抗薬であるマレイン酸ジゾシルピン(MK-801)の全身投与によって効果的に抑制される(Grant., 1990)。

線条体スライスでの High K^+ 刺激により惹起される $[^3H]$ ドーパミン遊離はエタノール禁断により減少することから、エタノール禁断症候群の発症にドーパミン受容体も関与していると考えられている(Darden, 1977)。エタノール禁断後のドーパミン代謝は、線条体を含むさまざまな脳領域で減少することが報告されている(Eisenhofer et al., 1990)。中脳辺縁系ドーパミン作動性ニューロン活性は、エタノール禁断後に著しく低下している(Diana et al., 1993)。ハロペリドールの投与によりエタノール禁断による発作は増加するものの、L-DOPA ならびにドーパミンの頭蓋内注入によりこれらの発作を減少させる(Blum et al., 1976)。

興奮性、抑制性神経の要である NMDA 受容体とドーパミン受容体の両方が

行動に影響を及ぼし得る主な脳部位の候補は線条体である。線条体は a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 受容体と NMDA 受容体の両方によって媒介される豊富な皮質入力を受け取る (Cherubini et al., 1988, Herrling., 1985, Jiang and North., 1991, Kita., 1996)。大幅に皮質入力がしきい値レベルに近いニューロンを脱分極させるのに十分なほど強い場合には、NMDA 受容体を介した応答はスパイクを誘発するのに十分貢献し得る。一方で、皮質入力が小さい閾値下の興奮性シナプス後電位 (EPSPs) を誘発した場合、NMDA 受容体を介する応答は小さくなる (Cherubini et al., 1988, Jiang and North., 1991, Kita., 1996)。

また、線条体には主要な中位線条体ドーパミン求心性神経が投射されている。ドーパミンは、線条体ニューロンにさまざまな生理学的作用を及ぼす (Calabresi et al., 1997, Calabresi et al., 1996)。線条体の中型有棘細胞の発火活動に対するドーパミンの直接的な作用は、一般的に抑制的であるものの、非常に多くのメカニズムがその阻害作用に関わっていると考えられている (Calabresi et al., 1997, Calabresi et al., 1996)。

また、ドーパミンは皮質入力を調節することによって、線条体ニューロンの活性を制御すると考えられている。皮質入力のドーパミン調整機構に関して 2 つのメカニズムが報告されている。1 つは、ドーパミンが前シナプスからのグルタミン酸放出メカニズムに影響を及ぼし、興奮性シナプス伝達を抑制する (Garcia-Munoz et al., 1991, Hsu et al., 1995, Maura et al., 1988)。もう 1 つは、ドーパミンがシナプス後のドーパミン受容体を介して線条体の興奮性シナプス伝達を抑制する (Calabresi et al., 1987, Surmeier et al., 1995)。皮質-線条体系の入力の高頻度な活性化は、長期抑制 (LTD) あるいは長期増強 (LTP) をもたらす (Calabresi et al., 1997, Calabresi et al., 1996)。線条体ニューロンのグルタミン酸作動性シナプスにおけるこれらの可塑的現象は線条体の運動制御ならびに認知機能に関与すると考えられている。LTD および LTP を誘

発する条件ならびに誘発する機序は依然として不明である。線条体スライスでは、皮質入力の高頻度刺激により LTD を誘発する。Calabresi らは、長期抑制現象の誘発には、ドーパミン D1 受容体および D2 受容体が同時に活性化される必要があると考えている (Calabresi et al., 1992a, Calabresi et al., 1992b)。

電位依存性 NMDA チャンネルが除去されたとき (Calabresi et al., 1992c, Calabresi et al., 1996, Calabresi et al., 1997)、またはドーパミンが高周波刺激中にニューロンに局所的に適用されたとき (Wickens et al., 1996) に、線条体スライスにおける LTP が誘発されることが報告されている。シナプス後線条体ニューロンの細胞内脱分極と運動皮質野の高周波皮質刺激とを組み合わせると、記録ニューロンにおいて LTP を誘発した (Charpier and Deniau., 1997)。LTD の誘発は GABA_A 受容体、AMPA 受容体、NMDA 受容体の遮断により影響を受けない (Calabresi et al., 1992a, Lovinger et al., 1993, Walsh and Dunia., 1993)。

また、代謝調節型受容体の活性化は、線条体におけるグルタミン酸作動性および GABA 作動性のシナプス後電位を低下させる (Calabresi et al., 1992d, Colwell and Levine., 1994, Lovinger et al., 1993, Stefani et al., 1994)。代謝調節型受容体の LTP への関与は報告されていないが、代謝調節型受容体の活性化は、線条体における LTD の誘発メカニズムにおいて重要な役割があることが見出されている (Calabresi et al., 1992c, Calabresi et al., 1996)。本研究ではエタノール禁断ラットの *in vitro* スライス標本を用いて、線条体ニューロン上の皮質グルタミン酸作動性シナプスにおける可塑性への影響を検討することを目的とした。

第1節では自発運動量およびアルコール禁断症状の行動指標をもとにアルコール禁断動物の作製を検討すると同時に、第2節において、アルコール禁断に伴う線条体ニューロンのグルタミン酸受容体の変化ならびにグルタミン酸神経毒性に対する感受性の変化についての検討を行った。線条体はこのグルタミン酸性入力以外に主

要な入力として黒質からのドーパミン性入力を有する。ドーパミン性入力は線条体における運動機能の制御において中心的な役割を果たすとともに、皮質からのグルタミン酸性入力と相互作用することが知られている。そこで、第3節ではアルコール禁断に伴う線条体ニューロン機能変化におけるドーパミン性神経の関与について検討した。第4節では細胞内記録法を用いてアルコール禁断に伴う線条体ニューロンの膜特性の変化について検討した。

第1節 アルコール禁断モデルラットの作製

ラットにアルコール溶液を普通に飲ませただけでは、アルコールの代謝や中枢神経系の感受性の問題があり、アルコール禁断症状を観察することは非常に困難である。そこで、固体飼料の代わりにアルコールを含む液体飼料を処置する方法 (Freund., 1969) やアルコールを蒸気として吸引させる方法 (Lieber and De Carli., 1973) などが、アルコール禁断モデル作製に頻繁に用いられている。これまでの方法ではアルコールの処置期間に体重の減少を引き起こすため、Miller ら (1980) が体重減少を起こさないように考慮した液体飼料とその処置方法を開発した。今回の実験においては、Miller らの方法をさらに改良してより簡便な方法とした Lieber ら (1982) の方法を用いた。そこで、第1節では Lieber らの方法を用いて作製されたアルコール禁断ラットを行動薬理学的側面から検討した。

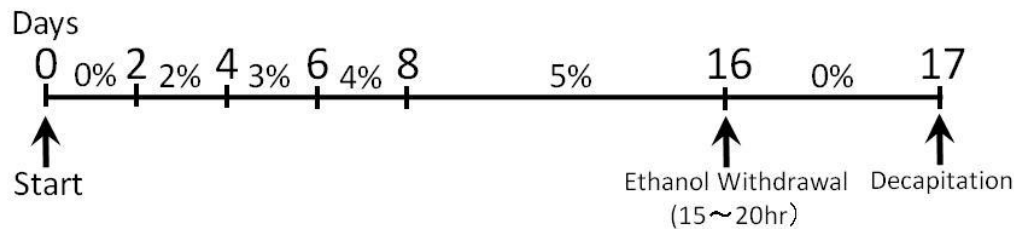
1 実験材料ならびに飼育方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

本実験に使用した動物は、Wistar 系雄性ラット5週齢 (Sea/Wistar、成和実験動物研究所) である。恒温 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、恒湿 (相対湿度60%) および12時間の明暗

サイクル下 (7:00AM 点灯) の動物飼育室でステンレス製アイソレーションボックス (20x20x20cm) 内で1匹ずつ飼育を行った。その間、Lieberら(1982)の方法によりアルコール禁断ラット群においては表3のスケジュールで2%から始めて4%まで2日ごとにエタノールの濃度を上げていき、その後8日間、5%のエタノールを含む液体飼料を与え、8日目の夕刻にエタノールを含まない液体飼料に置き換え、15～20時間の休薬を行った。これに対し対照群においては、Sucrose でカロリー調節を行った液体飼料を与えた。

表3 アルコール禁断ラットモデル作製スケジュール



1-2 使用薬物

使用した薬物は、99.5%エタノールならびに Sucrose である。いずれも林純薬工業特級試薬を用いた。液体飼料用の粉末はオリエンタル酵母社製のものを用い、表4の割合で混合し、溶解しにくい原料があるので家庭用ハンドミキサーを用いて高速回転にて攪拌した。

表4 アルコール用液体飼料の作製

EtOH濃度	飼料粉体量	添加Sucrose量	99.5%EtOH量	H ₂ O
Control(0%)	215.33g	-	-	full up 1 litter
2%	124.33g	54.6g	25.2mL	
3%		36.4g	37.8mL	
4%		18.2g	50.4mL	
5%		-	63.1mL	

1-3 実験方法

1-3-1 自発運動量測定法

自発運動量の測定は、62x50x50cmのボックス内に30x35x17cmのケージを置き、この中にラットを入れ、点灯下、赤外線エリアセンサー(Omuron社製)により休薬直後から15~20時間行った。このセンサーは動物の水平、垂直方向の運動量を測定でき、磁場変化量測定型自発運動量簡易測定センサー(アニメックス型/株式会社ニューロサインス)により測定できる運動の種類と類似している。

1-3-2 アルコール禁断モデルの行動評価法

行動評価は、ラット断頭前30分間、Danyszら(1992)ならびにDavidsonら(1995)が用いている表5に記した行動指標を用いて観察した。

1-4 統計学的処理

値はすべて平均±標準誤差で表し、データの有意差検定はStudent's t-testあるいはrepeated measure ANOVAを用いて行った。

2 実験結果

2-1 アルコール休薬に伴う自発運動量低下

アルコール休薬後の自発運動量変化の時間経過を示した。慢性投与直後から自発運動量低下が著しく、2~13時間後に有意な減少が認められた(データは示されていない)。また、表5に示すように、それぞれの群の自発運動量の総和の平均が、対照ラットならびにアルコール禁断ラットではそれぞれ 116.0 ± 16.9 count/hour (N=19)、

24.8±5.8 count/hour (N=31)で、対照ラットに比べて有意に減少していた ($p<0.001$ vs 対照ラット, Student's t-test)。

2-2 アルコール禁断モデルの行動評価

15～20時間エタノールを飲ませたすべてラットは、驚愕反応の増加や自発発作を含む興奮性亢進の明らかな行動症状を示した。31匹のエタノール禁断ラットのうち2匹は緊張性発作を起こし、その後呼吸停止し、そして死亡した。アルコール禁断の行動指標に該当するスコアのみを加算したものの平均が表5に示してあるが、対照ラット群と比較して有意に行動指標は上昇していた ($p<0.001$ vs 対照ラット, Student's t-test)。

表5 アルコール休薬後の単位時間あたりの総自発運動量および行動指標による評価

	対照ラット	エタノール禁断ラット
自発運動量 (Count/hour)	116.0±16.9(19)	24.8±5.8(31) ^{***}
行動指標 (15～20hr)	1.3±0.2(19)	9.6±0.1(31) ^{***}

^{***} $p<0.001$ vs 対照ラット

行動指標

- 0: 変化なし
- 1: 猫背、激しい震え、立毛、同一場所回転、歯をガタガタさせる、怯えてジャンプ、ケージの周りをゆっくり回転
- 2: 高活動性、ケージの周りを早く回転、連続した激しい震え、発声
- 3: 横転し続けている、暴れ回る、立ち上がり立ちすくみ、中等度の回避行動
- 4: 強直間代発作、強い逃避反応
- 5: 死亡

第 2 節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンのグルタミン酸受容体の変化に関する検討

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第2章第1節1-1と同様に行った。

1-2 人工栄養液の調製方法

スライス標本の人工栄養液として Krebs Ringer 液を用いたが、表1と一部異なるため、化学的組成を表6に示す。 KH_2PO_4 、d-glucose は林純薬工業、NaCl、KCl、 MgSO_4 、 NaHCO_3 、 CaCl_2 は和光純薬のいずれも特級試薬を用いた。この Krebs Ringer 液は、37℃恒温槽中で保温しながら95% O_2 /5% CO_2 混合ガスを30分以上通気し、酸素を飽和させた。この操作で出来上がった溶液は pH 約 7.4、浸透圧は約 307mOsm となり、生体内とほぼ同一の値となる。なお、特に明記しない限り Krebs Ringer 液は実験期間中、常に95% O_2 /5% CO_2 混合ガスを通気した。また、本実験に用いた水は、すべて自動蒸留装置 (Yamato WG25) によって蒸留精製したものを超純水製造装置 (Milli Q、Millipore) に通したものである。

表6 Krebs Ringer 液の組成表

Compound	Concentration
NaCl	126.0 mM
KCl	5.0 mM
KH ₂ PO ₄	1.3 mM
MgSO ₄	1.3 mM
CaCl ₂	2.4 mM
NaHCO ₃	26.0 mM
d-glucose	10.0 mM

(95% O₂ / 5% CO₂ gas)

1-3 線条体スライス標本の作製方法ならびに保生法

ラットの胸部および頸部を殴打した後、頭頂部を開頭して脳組織を損傷しないようにすばやく脳を摘出し、約4℃の Krebs Ringer 溶液中に入れ、数分間冷却した。この操作により、神経細胞の代謝および酵素活性を一時的に低下させ、酸素供給不足による損傷を防ぐとともにスライス標本作製が容易となる。脳底部を水平面に切断した後、上下の不要脳部位を切断し、さらに正中線で切断することにより2分した。このように作製した脳組織を平面より約 15 度の角度で傾けたカミソリ刃をもつビブラトーム (Vibroslice, 752M, Campden. Instrument) の試料台に寒天ブロック (寒天末を蒸留水に4%となるように加熱溶解し、約4℃に冷却して作製したものとともに瞬間接着剤 (アロンアルファ) で接着固定した。次に試料台内を約4℃に冷却した Krebs Ringer 液を満たし厚さ 400 μm の前額断面スライス標本作製し、さらにカミソリ刃でトリミングする

ことにより線条体の核群のみを含むスライス標本とした。このようにして作製したスライス標本は95%O₂と5%CO₂の混合ガスで通気した Krebs Ringer 液の中で少なくとも 30 分以上保生した。

1-4 実験装置

スライス容器はアクリル製で記録用槽と水槽より成っている。水槽内の水はヒーターによって35℃に保たれており、灌流液はこの水槽を通過した後、流速 3.5mL/min のスピードで記録用槽に入る。記録容器の底面はやや傾いており、このため灌流液はスライス標本の底面を通過した後に自然落下し、これをペリスタポンプによって吸引除去した。また、スライス容器内に水分を飽和し、35℃に保たれた95%O₂と5%CO₂の混合ガスを満たすことによりスライス標本の表面の乾燥ならびに酸素欠乏を防いだ。

1-5 記録電極作製（細胞外記録）

細胞外記録電極にはガラス電極を用いた。外径 1.5mm のΩ型ガラス毛細管（成茂製）を微小電極作製機（成茂）によって細く引き、resin desk（日本ディスク）の破片を用いてガラス電極の先端を折り、先端の外径を 20～30 μm とし、この中に Krebs Ringer 液を満たした（電気抵抗2～6MΩ）。

1-6 記録電極作製ならびに細胞内記録法

記録電極は外径 1.2mm、内径 0.6mm の型ガラス毛細管（Frederick Haer）より Brown-Flauring 電極作製器（Sutter Inst. Co., Model P-80/PC）を充填し、このうち整流作用のないものを選んで用いた。細胞内記録には、ブリッジバランス回路を備え、同一電極で記録ならびに通電のできる高入力インピーダンスの微小電極用増幅器

(Neurodate, IR183)を用いた。記録用ガラス電極から誘導される電気的变化は微小電極増幅器で増幅した後、ブラウン管オシロスコープ(VC-10、日本光電)にて観察するとともに X-Y プロッターを用いて記録した。

1-7 刺激電極作製ならびに刺激方法

刺激電極には直径 0.25mm のステンレススチール線の先端約 0.5mm を残してポリウレタンで絶縁した双極電極を用いた。実態顕微鏡下で操作しながら刺激電極(STIM)を白質(White Matter)上に設置した。刺激にはパルス幅 0.2msec、刺激強度 1-15V、刺激頻度 0.1Hz の矩形波を用いた。また記録は線条体内より行った。

1-8 試薬ならびに調製方法

実験に用いた薬物は以下の通りであり、それぞれの所要濃度に Krebs Ringer 溶液中に溶解し灌流適用した。

6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dione (CNQX, Research Biochemical. Ltd.), Dibenzocycloheptenimine (MK-801, Research Biochemical Inc.), DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, SIGMA), 7-Chlorokynurenic acid (7-Cl-KYN, Research Biochemical. Inc.), (RS)-Methyl-4-carboxyphenyl-glycine((RS)-MCPG, TOCRIS COOKMAN)

1-9 統計学的処理

値はすべて平均±標準誤差で表し、データの有意差検定は repeated measure ANOVA あるいは Student's t-test を用いて行った。

2 実験結果

2-1 高頻度刺激により誘発される後シナプス電位へのアルコール禁断の影響

図7 A、B では対照ラット、アルコール禁断ラット間での 200Hz, 35msec の高頻度刺激によるシナプス電位の変化を比較検討した。アルコール禁断ラットにおける減衰時間の増加は APV ($50\mu\text{M}$) で著明に抑制された (図7 B)。対照ラットのスライスに記録されたすべての線条体ニューロンにおいて、皮質下の白質での高頻度刺激 (50Hz, 20 秒) により、1~5 分間持続した抑制性シナプス後電位 (DPSP) の高頻度刺激後の増強現象 (PTP) を誘発し、その後、DPSP の振幅が減少した (図8 A)。DPSP の振幅の減少は 20 分を超えて持続したことから LTD 現象が誘発されたと考える。高頻度刺激の 20 分後に測定された DPSP の相対振幅は $92.9 \pm 14.3\%$ ($n=5$) であった。対照的に、エタノール禁断ラットの線条体スライスでは、高頻度刺激は非常に顕著な PTP を誘発し、PTP の後に少なくとも 20 分間持続した DPSP の LTP 現象が誘発された。増加した PTP および LTP は、エタノール禁断ラットから記録された6つの線条体ニューロンのうち5つにおいて観察された (図8B)。試験した6つのニューロンのうちの1つは、DPSP の振幅の変化は示されなかった。

高頻度刺激の 20 分後に測定された DPSP の相対振幅は $120.5 \pm 2.7\%$ ($n=6$) であった。顕著な PTP および LTP のために、エタノール禁断ラットからの高頻度刺激後に線条体ニューロンに記録された DPSP の平均相対振幅は、対照ラットより有意に大きかった (図8C)。DPSP の LTP は静止膜電位またはニューロンの入力抵抗の変化と関連していなかった。以前の研究では皮質の高頻度刺激が母集団の LTD を誘発することを示していた (Calabresi et al., 1992a, Lovinger et al., 1993, Walsh., 1993) ので、エタノール禁断ラットの線条体でも同様の試験を行った。対照ラットの線条体スライス

において、population spikes の振幅は高頻度刺激後に有意に減少し(図9、表7)、線条体におけるLTD 現象に関するこれまでの結果と一致していた。すなわち、高頻度刺激により population spikes において異なるパターンの変化を誘発した。population spikes の振幅は一過性に低下し、高頻度刺激後に徐々に増加した。高頻度刺激後約30 分で、population spikes の振幅は安定したレベルで増強を形成する LTP に達した(図9)。高頻度刺激後の population spikes の相対振幅は、対照ラットからのものより有意に大きかった(図9B、表7)。

細胞内記録において、高頻度刺激により線条体ニューロンにおいて DPSP の振幅の一過性 PTP を誘導したものの、電場電位測定においては、同じ高頻度刺激により population spikes の振幅の一過性の低下を誘発した。細胞内電流パルス通電に関する実験は、線条体ニューロンのスパイク閾値が高頻度刺激後に一時的に上昇することを示した(データは示さず)。これらの結果より、population spikes の短期的な抑制は、高頻度短発刺激後に誘発される細胞内トランスミッターの放出の減少によるものではない(Lovinger et al, 1993)という報告とも一致する。

表7 対照ラット、エタノール禁断ラット線条体スライスにおける各種薬物の population spikes の振幅への影響

	Conditions	Relative population spike amplitude (%)
Naive	Standard	93.3 ± 3.0 (4)
	Mg ²⁺ -free	100.1 ± 6.6 (9)
EW	Standard	122.5 ± 2.0 (6)*
	Mg ²⁺ -free	127.8 ± 11.8 (5)†
	APV (50 μM)	97.5 ± 0.8 (5)‡
	7-Cl-KYN (30 μM)	101.9 ± 4.6 (4)§
	MCPG (250 μM)	138.5 ± 16.0 (4)
	DA (30 μM)	94.8 ± 4.5 (5)‡
	DA (30 μM) + SCH23390 (1 μM)	95.9 ± 2.4 (4)‡
	DA (30 μM) + sulpiride (1 μM)	122.8 ± 5.4 (4)

すべての値は平均値±標準誤差。電場電位の振幅は、高頻度刺激30分後に測定された。カッコ内には各例数を示す。*p<0.001、†p<0.01 vs 無処置群

(Naive/Standard)、‡p<0.001、§p<0.01 vs エタノール禁断群 (EW/Standard)。すべての有意差検定は repeated measure ANOVA で行った。

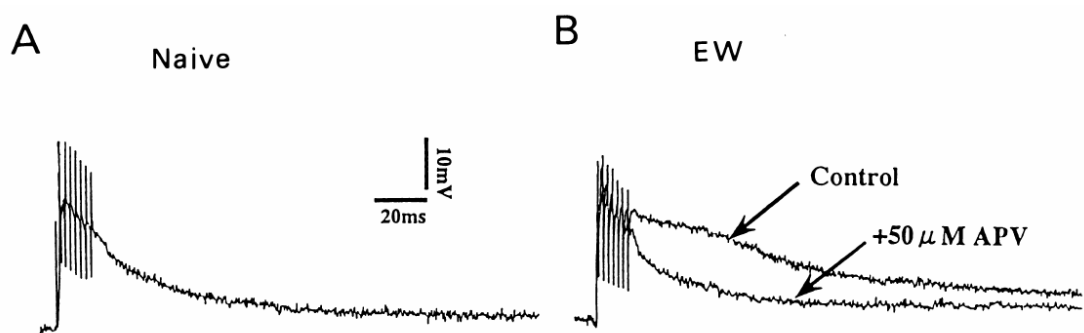


図7 白質単発刺激により誘発されるシナプス電位に及ぼす NMDA 受容体拮抗薬の影響

A: 対照ラット、B: エタノール禁断ラット

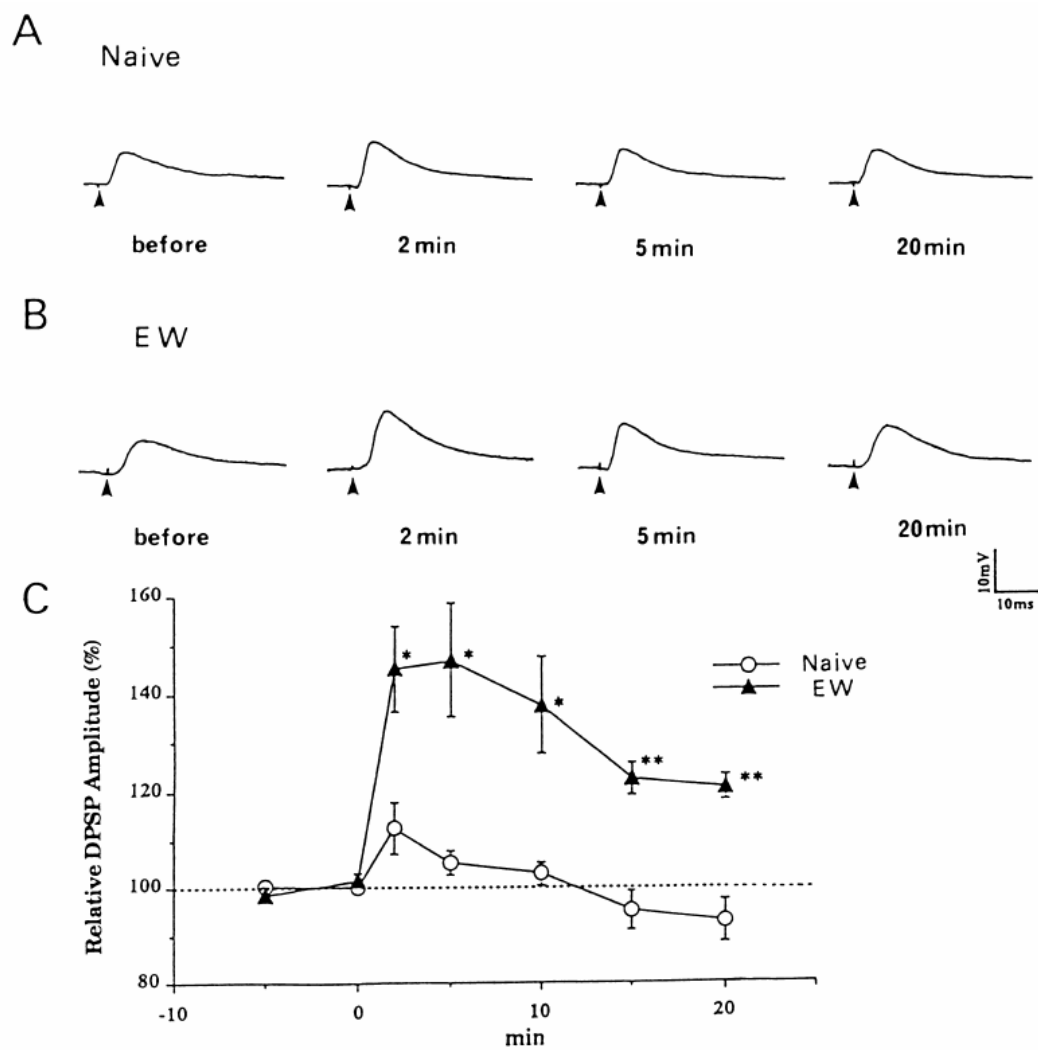


図8 高頻度刺激により誘発される DPSP の振幅の経時的変化の比較

A: 対照ラット群の高頻度刺激後の DPSP 典型例

B: エタノール禁断ラット群の高頻度刺激後の DPSP 典型例

C: 対照ラット群、エタノール禁断ラット群の高頻度刺激後の DPSP の振幅の経時的変化

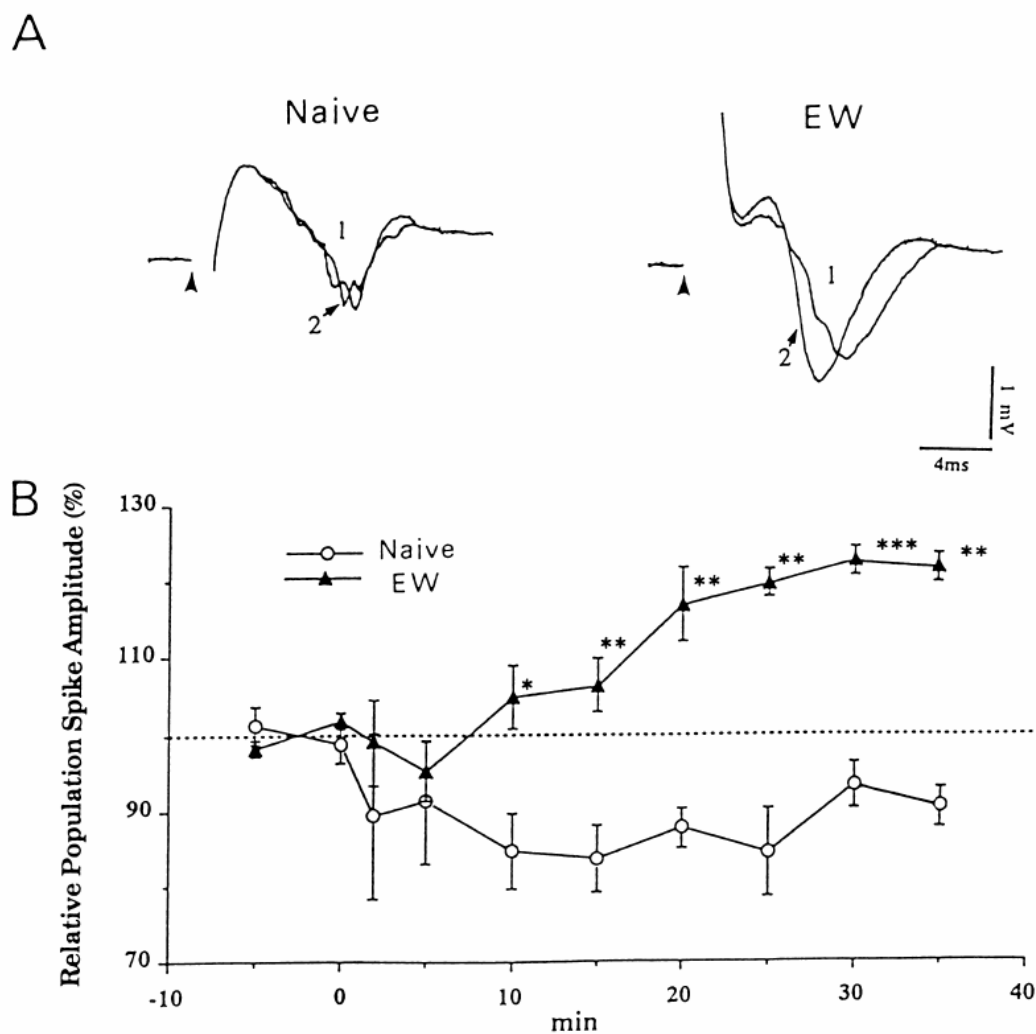


図9 高頻度刺激により誘発される population spikes の振幅の経時的変化の比較

A: 対照ラット群の高頻度刺激後の population spikes 典型例

B: エタノール禁断ラット群の高頻度刺激後の population spikes 典型例

C: 対照ラット、エタノール禁断ラット群の高頻度刺激後の population spikes の振幅の経時的変化

2-2 アルコール禁断ラットにおいて高頻度刺激により誘導される後シナプス電位の長期増強現象とその増強現象に対するグルタミン酸受容体関連薬物の作用

脳領域の主要な部位では、LTP の形成へのグルタメート受容体の関与は十分証明されている(Nicoll et al, 1988)。ラット線条体における LTD に関する以前の研究でもグルタメート拮抗薬の効果が扱われている(Calabresi et al, 1992a, Lovinger et al, 1993, Walsh, 1993)。そこで、エタノール禁断ラットの線条体切片における LTP の誘発に対するグルタミン酸受容体拮抗薬の作用を検討した。高頻度刺激 30 分前に拮抗薬を灌流する Krebs Ringer 液中に適用した。APV (50 μ M) の適用中に高頻度刺激を加えたところ、線条体スライスにおける population spikes の LTP の誘発は完全に抑制された(図10、表7)。

また、NMDA 受容体グリシン部位の拮抗薬である 7-Cl-KYN (30 μ M) を高頻度刺激の間に適用したところ、LTP の誘導が完全に抑制された(図10、表7)。高頻度刺激の直後に Krebs Ringer 溶液に戻しても、population spikes の振幅の LTP は誘発されなかった。population spikes の一過性抑制の誘発は、APV または 7-Cl-KYN のいずれによっても影響を受けなかった。代謝型グルタミン酸受容体が LTP の誘発に関与している可能性を評価するために、代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬である MCPG の効果を調べた。MCPG の適用により、高頻度刺激後の一過性抑制および population spikes の誘発を阻害せず顕著な PTP を抑制したものの、LTP の誘発には影響を受けなかった(図10、表7)。

上記の NMDA 拮抗薬を用いた実験の結果は、エタノール禁断ラットにおける LTP の誘発が NMDA 受容体を介する応答の増加に起因し得ることを示唆している。この可能性を確認するために、NMDA 受容体を介するシナプス応答成分を完全に活性化することが知られている、 Mg^{2+} を含まない条件下で対照ラットから得た線条体切片を

用いて高頻度皮質刺激の効果を調べた。高頻度皮質刺激により、顕著な PTP および高頻度刺激後 20 分まで継続する population spikes の振幅増強を誘発した。しかしながら、population spikes の振幅は、高頻度刺激後 30 分以内に高頻度刺激前のレベルに戻った(図10C、表7)。この結果より、観察された現象は LTP ではなく短期間の増強作用であったことから、LTP を誘発するには NMDA 応答成分の増強だけでは十分ではないことが明らかとなった。エタノール禁断ラットの線条体スライスでは、高頻度皮質刺激により顕著な PTP が惹起され、その後 population spikes の LTP が誘発された(図10C)。

高頻度刺激の30分後に測定された相対的 population spikes の振幅は、対照ラットでの Mg^{2+} を含んだ Krebs Ringer 溶液で得られたものと同様であった(表7)。これらの観察より、NMDA 受容体の活性化がエタノール禁断ラットの線条体スライスにおける population spikes の LTP の大きさを顕著に増強するが、対照ラットから得られたスライス線条体において LTP を誘導するには不十分であることを示している。

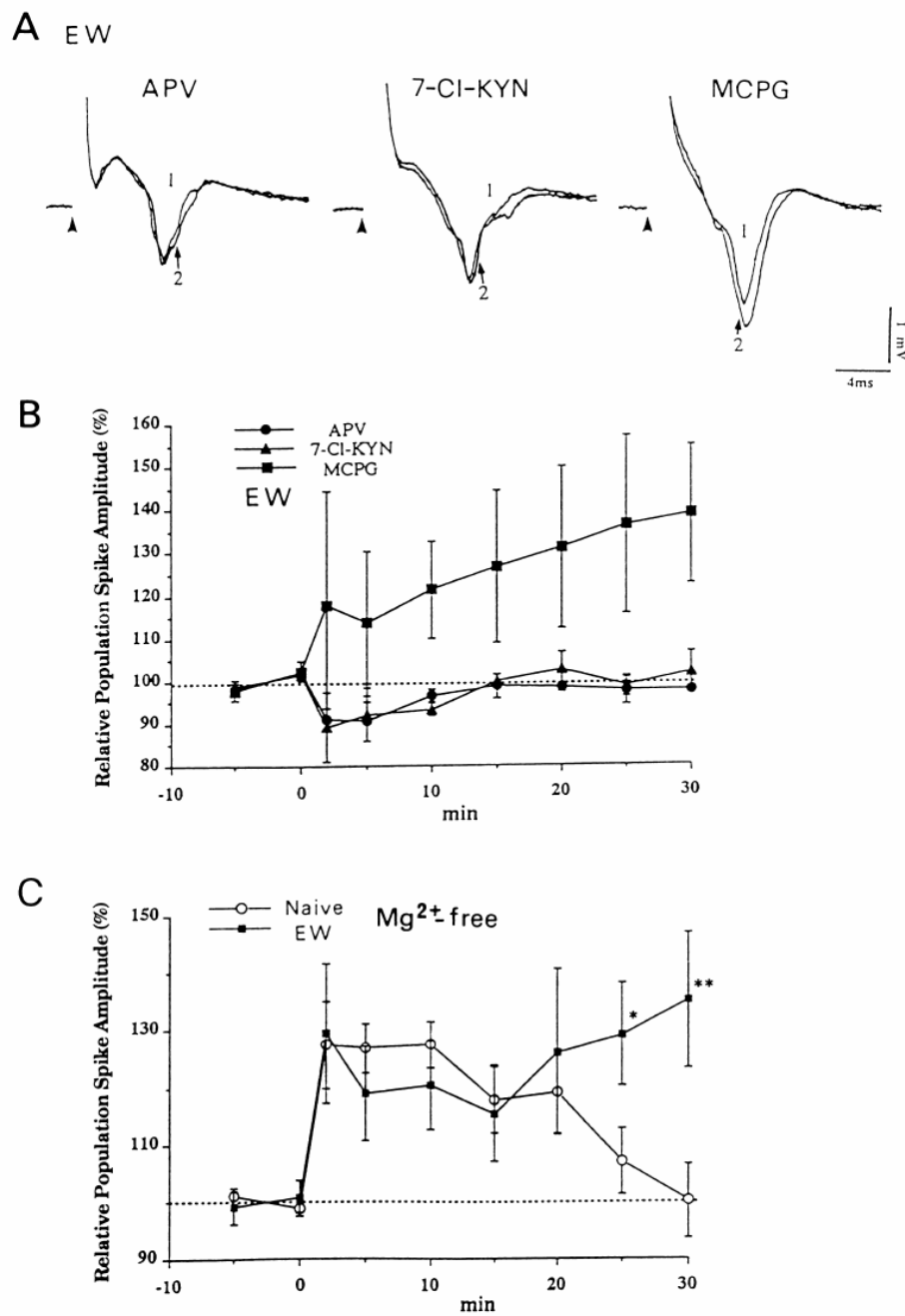


図10 高頻度刺激により誘発される population spikes の振幅の経時的変化の比較

A: エタノール禁断ラットにおける APV (50 μ M)、7-Cl-KYN (30 μ M)、MCPG (250 μ M) 群の典型例

B: 高頻度刺激後の各群の population spikes の振幅の経時的変化

C: Mg^{2+} free 条件下での高頻度刺激後の各群の population spikes の振幅の経時的変化

第3節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンのドーパミン受容体の変化に関する検討

I. 白質刺激により誘発される線条体での反応へのドーパミン神経系の関与

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第2章第1節1-1と同様に行った。

1-2 人工栄養液の調製方法

人工栄養液の調製方法は、第2章第2節1-2と同様に行った。

1-3 スライス標本の作製ならびに保生法

スライス標本の作製ならびに保生法は、第2章第2節1-2と同様に行った。

1-4 実験装置

実験装置は、第2章第2節1-2と同様の装置で行った。

1-5 記録電極作製ならびに細胞内記録法

記録電極作製ならびに細胞内記録法は、第2章第2節1-2と同様に行った。

1-6 刺激電極作製ならびに刺激方法

刺激電極作製ならびに刺激方法は、第 2 章第2節1-2と同様に行った。

1-7 試薬ならびに調製方法

実験に用いた薬物は以下の通りであり、それぞれの所要濃度は Krebs Ringer 液中に溶解し灌流適用した。

nomifensine malate (RBI)、L-ascorbic acid (林純薬)、Dopamine (Sigma)、
R(+)-SCH23390 (Research Biochemical Inc)、(±)Sulpiride (Sigma)、
DL-2-amino-5-phosphonobaleric acid (APV, Sigma)

1-8 統計学的処理

値はすべて平均±標準誤差で表し、データの有意差検定は repeated measure ANOVA あるいは Student's t-test を用いて行った。

2 実験結果

対照ラットから得られた線条体スライスにおける LTD の誘導にはドーパミン受容体の活性化に依存しており (Calabresi et al, 1992a., Calabresi et al., 1992b, Calabresi et al., 1997)、これまでの実験でも、比較的低い周波数 (20Hz、5 秒) で刺激すると、線条体スライスにおいてドーパミン放出が長期的に増強されることを示している (Ochi et al., 1995) ことから、エタノール禁断ラットの線条体における LTP の誘発に対するドーパミンの効果を調べた。高頻度刺激の 30 分前に、最終濃度 $30 \mu\text{M}$ になるようにアスコルビン酸 $300 \mu\text{M}$ 含有の灌流 Krebs Ringer 溶液に溶解したドーパミンとノミフェンシン ($1 \mu\text{M}$) を適用した。ドーパミンの適用により、population spikes の振幅を約 10% 抑制したものの有意なものではなかった。ドーパミンの適用中に高頻度刺激を加えたところ、エタノール禁断ラットの線条体スライスにおける LTP の誘発は有意に

抑制された(図11、表7)。同時に、高頻度刺激によって誘発された一過性の抑制の程度は、ドーパミンの適用により有意に増加した($P < 0.05$, Student's *t*-test)。LTPの誘導に対するドーパミン抑制効果に関与する受容体サブタイプを決定するために、D1受容体拮抗薬 R(+)-SCH23390、または D2 受容体拮抗薬 L-Sulpiride をドーパミンと共に適用した。R(+)-SCH23390 ($1 \mu\text{M}$) は、LTPの誘導に対するドーパミンの抑制効果に有意な影響を及ぼさなかった(図11、表7)。ドーパミンの抑制効果は、L-Sulpiride ($1 \mu\text{M}$) によって有意に拮抗された(図11、表7)。

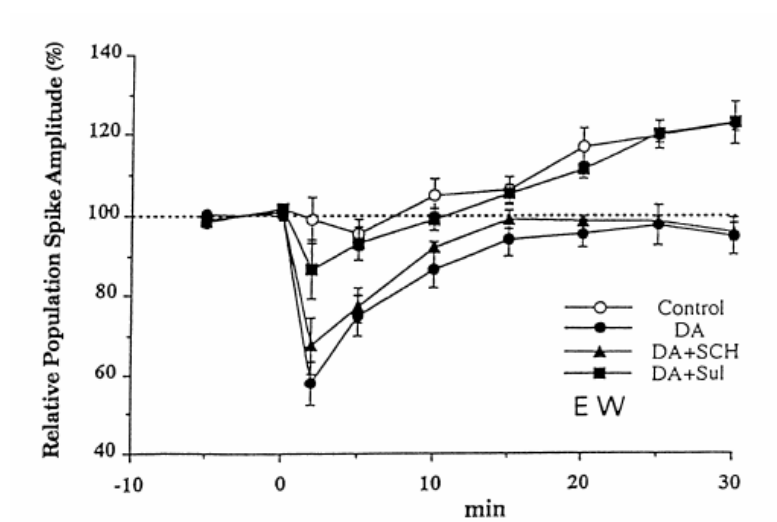


図11 アルコール禁断ラットにおいて高頻度刺激により誘発されるLTP形成へのドーパミン関連薬物の影響

DA:dopamine、SCH: SCH-23390、Sul:L-Sulpiride

第4節 アルコール禁断に伴う線条体ニューロンの電氣的膜特性の変化に関する検討

1 実験材料ならびに実験方法

1-1 実験動物ならびに飼育方法

実験動物ならびに飼育方法は、第1章第1節1-1と同様に行った。

1-2 人工栄養液の調製方法

人工栄養液の調製方法は、第2章第2節1-2と同様に行った。

1-3 スライス標本の作製ならびに保生法

スライス標本の作製ならびに保生法は、第2章第2節1-3と同様に行った。

1-4 実験装置

実験装置は、第2章第2節1-4と同様に行った。

1-5 記録電極作製ならびに細胞内記録法

記録電極作製ならびに細胞内記録法は、第2章第2節1-5と同様に行った。

1-6 刺激電極作製ならびに刺激方法

刺激電極作製ならびに刺激方法は、第2章第2節1-6と同様に行った。

1-7 試薬ならびに調製方法

実験に用いた薬物は以下の通りであり、それぞれの所要濃度に Krebs Ringer 溶液中に溶解し灌流適用した。

tetraethylammonium bromide (TEA, Sigma)、tetrodotoxin (TTX, Sankyo)、1,2-*bis*-(*o*-aminophenoxy)-ethane-*N, N, N', N'*, -tetraacetic acid acetoxymethyl ester (BAPTA-AM, Calbiochem-Novabiochem Corporation), biocytin (Sigma)

2 実験結果

対照ラットおよびエタノール禁断ラットとの間で、静止膜電位および線条体ニューロンの入力抵抗などの受動的膜特性には有意な差は認められなかった(表8)。対照ラットおよびエタノール禁断ラットの線条体ニューロンにおける皮質下の白質での単発サブスパイク刺激によって誘発された脱分極シナプス後電位(DPSP)の平均潜時および振幅の間にも有意差はなかった(表8)。対照ラットおよびエタノール禁断ラットの線条体ニューロンにおいて誘発されたDPSPは、CNQX (4 μ M) によってほぼ完全に抑制された(データは示さず)。これらの観察は、皮質-線条体線維での伝導時間および線条体ニューロンの閾値が、対照ラットおよびエタノール禁断ラットで類似していたことを示している。

皮質下の白質での反復サブスパイク電気刺激(5 ms のスパイク間隔で8回刺激)により、線条体ニューロンのシナプス後応答は対照ラットとエタノール禁断ラットの間で明らかに異なっていた。対照ラットから得られたスライスにおいて、反復刺激により線条体ニューロンにおいてゆっくりとした下降相を有するDPSPを誘導した(図7A)。対照的に、エタノール禁断ラットのスライスでは、反復刺激によって誘発されたDPSPの後にプラトー様の電位が続いた(図7B)。したがって、エタノール禁断ラットのニューロンから記録されたDPSP

の半減期は、対照ラットのそれよりも有意に長かった（表 8）。

競合的 NMDA 拮抗薬である APV ($50 \mu\text{M}$) を適用しても、対照ラットで観察された反復刺激によって誘発される DPSP に対して有意な効果を及ぼさなかったものの、エタノール禁断ラットの線条体で観察されたプラトー様の電位を有意に減少させた。結果として、エタノール禁断ラットにおける DPSP の半減期は、対照ラットの 55.6% ($n=4$) まで減少した（図 7 B）。

表 8 エタノール禁断による膜電位および膜抵抗への影響

	Naive	EW
Resting membrane potential, mV	-75.4 ± 0.8 (5)	-74.1 ± 1.7 (7)
Input resistance, $M\Omega$	24.4 ± 1.6 (5)	23.2 ± 1.7 (6)
DPSPs		
latency, ms	2.3 ± 0.2 (6)	2.7 ± 0.1 (6)
amplitude, mV	15.4 ± 1.4 (5)	15.6 ± 0.8 (6)
Half duration of DPSPs evoked by repetitive stimulation, ms	28.2 ± 4.0 (6)	50.7 ± 8.4 (6)*

すべての値は平均値 \pm 標準誤差。* $p<0.05$ vs 無処置群。すべての有意差検定は Student's t-test で行った。カッコ内には各例数を示す。

小括

今回はエリアセンサーで評価できる常同行動を含む総行動量を自発運動量として測定した。エタノールによる自発運動量の低下には、主に中枢ドーパミン神経系が関与していると考えられる (Carlsson et.al., 1989, Criswell et al., 1993)。さらに、行動指標によるアルコール禁断モデルの評価では、アルコール休薬後に、過興奮、けいれん、振戦などが観察され行動指標に有意な差が出ており、Danysz ら (1992) ならびに Davidson ら (1995) の結果とも一致していた。

本研究では、比較的低頻度 (50Hz、20 秒) の高頻度刺激によりエタノール禁断ラットの線条体において NMDA 受容体依存性の LTP 現象を誘発することを見出されたことが大きな進捗である。電気生理学的研究は、皮質-線条体入力が AMPA/kainate および NMDA 受容体の両方を介していることを示唆している。線条体ニューロンが通電によって (Cherubini et al., 1988) または強力な反復皮質刺激によって (Kita., 1996) 完全に脱分極する際には、NMDA 受容体を介した応答は重要な要素となる。反復または高頻度刺激により、複雑なメカニズムによって NMDA 応答を増強する可能性がある。

細胞外 K^+ 濃度の増加は、膜の脱分極をもたらし、そして NMDA チャネルの電位依存性 Mg 遮断を除去することによって NMDA 受容体を介する応答の増強に寄与することが考えられる。細胞外 K^+ の蓄積も $GABA_A$ 受容体を介した阻害の効果を低下させ (McCarren et al., 1985)、ニューロンの脱分極にさらに寄与する可能性がある。最近、Morrisett (1994) は、ラット歯状回における NMDA 受容体依存性の後放電がインビトロでのエタノール禁断後に増強されることを報告した。この結果は、エタノール禁断ラットの海馬において $GABA_A$ 受容体機能が低下した報告 (Durand et al., 1984, Rogers et al., 1992) ならびに NMDA 受容体の数が増加した報告 (Grant et al., 1990, Gulya et

al., 1991)と一致していた。エタノール禁断ラット線条体で同様の変化が起こるかどうかはこれまでのところ確認されていない。

そこで、NMDA 受容体を介する応答の増加のみで LTP を誘発し得る可能性について検討した。対照ラット線条体では、 Mg^{2+} を含まない溶媒の灌流により、強い PTP を誘発した後、LTP を誘発した。この結果は、Walsh & Dunia(1993)らによる報告と非常に類似しており、彼らは Mg^{2+} を含まない条件下での線条体ニューロンにおける脳梁の高頻度刺激後の LTP を誘発することはなく、短期間の増強の発現傾向が見られた程度であったことを示していた。すなわち、シナプス応答の NMDA 受容体を介する成分はエタノール禁断ラット線条体において増強されたが、その増強は高頻度皮質刺激後の LTP の誘発には十分ではなかったと推測する。

高頻度皮質刺激後のエタノール禁断ラット線条体における LTP 現象の誘発は、D2 受容体活性化によって有意に抑制された。エタノール禁断ラット線条体におけるドーパミン作動性神経伝達が損なわれていることが報告されている。線条体スライス標本における High K^+ 刺激によって誘発される $[3H]$ ドーパミンの遊離は減少している(Darden et al., 1977)。線条体を含む様々な脳領域でのドーパミンの代謝率もエタノール禁断後に減少している(Eisenhofer., 1990)。このように、ドーパミン作動性神経伝達の回復は、LTP 現象の誘発における中心的な役割であると強く支持されている。

最近、Calabresi ら(1997)は、10～20 秒間隔での高頻度皮質刺激(100 Hz、1～3 秒間)の通電は、D2 受容体ノックアウトマウスの線条体スライスにおいて NMDA 受容体を介するLTPを誘発することが報告されている。さらに、野生型マウスの線条体スライスにおいてLTPを誘発したものの、誘発された LTP の振幅は D2 受容体拮抗薬である L-Sulpiride によって有意に増加した。これらの結果に基づき、D2 受容体の活性化は通常、NMDA 受容体依存性の LTP 現象の誘発に対して負の制御を及ぼすと推測された。

比較的低周波 (20 Hz、5 秒) での高頻度刺激により、線条体におけるドーパミン遊離の長期増強を生じ、その増強現象には NMDA 受容体の活性化された成分を含むことを以前に示した (Ochi et al., 1995)。これらの報告より、線条体における LTP を制御するためのメカニズムにさらに考察を加えることができる。対照ラット線条体では、ドーパミン遊離の長期増強現象には D2 受容体を活性化し、NMDA 受容体を介した皮質-線条体系の興奮性入力を抑制していると考えられる。NMDA 受容体の応答性の低下により、皮質の高頻度刺激後の LTP の誘発を阻害している。エタノール禁断ラットでは、黒質-線条体ドーパミン作動性神経伝達は部分的に損なわれており、さらに LTP の発現において D2 受容体の負の制御機構を失った結果、LTP を誘発するのに必要なシナプス応答の強力な増強により LTP 現象は形成される。アルコール禁断ラットの線条体スライスにて誘発される population spikes の振幅の一過性の強い抑制現象のメカニズムは不明のままである。

代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬である MCPG は、一時的な抑制現象を部分的に回復させた。線条体ニューロンにおける NMDA と代謝型グルタミン酸受容体との間の相互作用は依然として論争的になっている (Colwell et al., 1994, Pisani et al., 1997) が、高頻度皮質刺激による代謝型グルタミン酸受容体活性化により、NMDA 受容体の応答性の一過性の抑制ならびに population spikes の振幅の減弱をもたらすと推測できる。一過性の抑制現象は、LTP の誘発を減少させるように作用し得る。一過性の抑制現象は、 Mg^{2+} を含まない条件下では完全に打ち消された。 Mg^{2+} を含まない条件下では、完全に活性化された NMDA 受容体により、一過性の抑制現象に代わって代謝型グルタミン酸受容体を介した抑制ならびに PTP の誘発を優先させる可能性がある。

皮質-線条体系のグルタミン酸作動性ニューロン投射は、大脳基底核の運動機能ならびに認知機能において主要な役割を果たすと考えられている。本研究は、対

照ラットとエタノール禁断ラットの線条体において、皮質下の高頻度白質刺激後の PSP および population spikes の短期、長期のさまざまな現象の誘発において、顕著な違いを示すことができた。したがって、線条体における異常なシナプス可塑性の発達がエタノール禁断症候群の一因となると仮定することが合理的であると考ええる。高頻度刺激によるさまざまな現象は、線条体における NMDA 受容体ならびにドーパミン作動性神経伝達の変化によるものと思われる。線条体における黒質-線条体系のドーパミンの喪失とそれに伴う NMDA 受容体を介した皮質-線条体系の神経伝達の過興奮は、パーキンソン病の運動症状において極めて重要な役割を果たすことが示唆されてきた (Calabresi et al., 1997, Calabresi et al., 1996)。エタノール禁断ラットにおいても2つの主要な神経入力系の類似する不均衡の症状があるのかもしれない。

第3章 脳虚血モデル、アルコール禁断モデルの有用性検証

第1章、第2章で用いた *in vitro* 低酸素／低グルコース負荷モデルは、*ex vivo* アルコール禁断モデルともに脆弱性の高い海馬ならびに線条体を用いたハイスループット型モデルである。さらに、用いた電気生理学的手法は、中枢の切片を用いることから中枢神経系の薬理学的研究を進める上で、断片的であっても神経変化をダイナミックに捉えることが可能となる。創薬に繋げるためのモデルとして両者を捉えた場合、虚血性脳卒中、アルコール性脳卒中病態の的確な再現性、有用性、汎用性の面で大変興味深い。そこで、脳虚血モデル、アルコール摂取障害モデルという切り口で、モデルの有用性、汎用性ならびにここ約 20 年間の当該疾患領域の創薬研究の進展について調べた。同時に、最近の疾患モデルのトレンドと橋渡し研究としての意義について言及する。

第1節 脳虚血モデル

血管障害を主因とする虚血性脳卒中は、本邦における死因第3位であり、脳に進入する血管を閉塞させる血餅によって引き起こされ、重篤な血流障害をもたらす神経細胞死にいたる。抗血小板作用あるいは既存の凝血塊を分解する抗血栓症薬は神経保護作用を有するものの、これらは主として脳血管系を標的とするため、外因性または間接的な神経保護剤と見なされる (Ginsberg., 2008)。脳虚血後、グルタミン酸受容体活性化、興奮毒性、細胞への Ca^{2+} 流入などの複雑な生化学的事象が誘導され、最終的には神経細胞死を招くことから、多くの分子標的薬を用いて神経保護を目的とした薬理学的な検討が試みられてきた (Sutherland et al., 2012)。前臨床試験では、神

神経保護作用を有する数種の分子標的に対して1,000以上の神経保護試験が試された。しかし、残念ながら、ほぼ200回を数えるさまざまな臨床試験が繰り返されたが、臨床的に虚血性脳卒中に対する神経保護を確認する試験の成果は限定的であった (Minnerup et al., 2012)。

1-1 脳虚血に対する薬物療法と疾患モデルの変遷

脳虚血後の血流が減少した脳領域の中心では、血流が枯渇し、ニューロンは数分以内に不可逆的な細胞死を経験する。潜在的なパーキンソン病、外傷性脳損傷ならびに虚血性脳卒中などの疾患誘発に関わる脳損傷部位を保護するためのアプローチ (Kincses and Vecsei, 2011, Kelso and Pauly, 2011, Sutherland et al., 2012)として、これまでに「神経細胞の保護」を目的としたニューロン自体への直接的な作用を有する神経保護剤の探索が後を絶たない。多数の前臨床試験が行われ、急性脳卒中の治療のために検討された潜在的な神経保護作用を有する候補化合物が見出された (表9)。しかし、そのほとんどは、臨床試験で有効性あるいは安全性を証明できていない (Minnerup et al., 2012)。これらの中でも、1) NMDA 受容体、2) 活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species)、3) 低酸素誘導因子 (HIF: hypoxia-inducible factor) が創薬の可能性が高い作用機作として挙げられているものの、その分子標的が明確になっていない。

これまでの NMDA 受容体拮抗薬研究の失敗は、NMDA 受容体に関連するイオンチャンネルおよび生存に不可欠なシグナル伝達経路遮断による副作用に由来する (Ikonomidou and Turski., 2002)。有望な分子標的として NMDA 受容体関連タンパク質 PSD-95 の阻害は、NMDA 受容体 / PSD-95 / nNOS 複合体の形成を妨げ、それによって有害な NO の生成を減少させる。そのため、PSD-95 阻害による NMDA 受容体

によって媒介される中枢神経系の他の重要な生理学的機能は影響を受けない(Aarts et al., 2002, Soriano et al., 2008)。

また、活性酸素は有害な作用の他に血管緊張、酸素張力およびエリスロポエチン産生の調節などの重要なシグナル伝達機能も示すため、生理学的意義および病理学的損傷を分離する分子標的が期待されてきた(Bjelakovic et al., 2007)。中でも、食細胞の NADPH オキシダーゼの触媒サブユニットである Nox4 阻害は有望な分子標的で、脳梗塞モデルマウスにおいて遺伝子ノックアウトないし薬理的検討で、Nox4 阻害により著しく神経機能を長期に改善し、死亡率減少に繋がる神経保護作用を示している(Kleinschnitz et al., 2010)。

HIF は低い酸素濃度条件下で活性化され、血管緊張、赤血球生成および血管新生などの多くの生物学的経路を刺激する(Pugh and Ratcliffe., 2003)。HIF を安定化させることにより、血管内皮増殖因子(VEGF)、内皮一酸化窒素合成酵素(eNOS) およびエリスロポエチンなどの経路全てを活性化すると、脳卒中後の神経保護の可能性が高まる(Minnerup et al., 2009, Endres et al., 2004, Hermann and Zechariah., 2009)。

これまでとは異なる分子標的で、薬理学的特性の改善、サブタイプに対する特異性、安全性プロファイルを適切な *in vivo* ないし *in vitro* モデルを用いることで、おそらく近い将来に臨床試験が実現すると考える。生体外で虚血を模した事象を誘発するには、酸素とグルコースの欠乏、細胞代謝の化学・酵素的遮断の 2 つが主要な方法があるが、最も頻繁に使用される脳虚血の *in vitro* モデルは、酸素・グルコース欠乏/再酸素負荷モデルである。*In vivo* モデルは、ヒト疾患の病態生理学への大きな洞察を可能にし、脳卒中の理解において重要なツールであった。遺伝的に改変された系統が利用可能であるため、げっ歯類はしばしば実験モデルとして選択された。しかし、約 7,000 万年の進化がヒトをげっ歯類から分離し、ゲノムの 10% の違いは、約 3,000 個の

遺伝子が異なることを意味している(Mestas and Hughes., 2004)。マクロ構造の相違に加えて、多くの細胞および分子の違いが存在する。例えば、血液脳関門(BBB: blood-brain barrier)に寄与する輸送体およびポンプの発現レベル、およびアストロサイトの機能的多様性および豊富さの観点では、ヒト BBB はげっ歯類とでは大きな格差がある(Syvanen et al., 2009)。興奮毒性の持続時間も、ヒトとマウスの間で著しく異なることが実証されている(Davalos et al., 1997)。

In vitro モデル系では、培養細胞または脳スライスを有するインキュベーター内の酸素とグルコースを、通常の CO₂/O₂ 平衡化溶媒を、CO₂/N₂ 培地からグルコースを除いた低酸素チャンバー内で平衡化された培地に変更して実験に供する(Sommer., 2017)。また、虚血-再灌流は、標準的な培養条件への復帰によって達成することができ、神経細胞死への過程は、グルタミン酸受容体の断続的な過活性化を伴う伝達物質グルタミン酸の増加に起因する興奮毒性である(Choi., 1993)。多数の *in vitro* モデルが存在する中で、特に *in vitro* でのヒトシステムは、費用対効果の高いハイスループットスクリーニングアッセイを可能にする一方で、薬物の安全性に関して非常に貴重な情報を提供する可能性がある(Antonic et al., 2012)。しかしながら、2011 年に研究された脳卒中に関する 10 万件の研究のうち、ヒト *in vitro* システムはわずか 5 回しか実施されなかった(Antonic et al., 2012)。新しい細胞技術と遺伝的および分子操作の出現により、*in vitro* システムの開発が脳卒中をモデル化し、創薬パイプラインを改善する大きなチャンスがあるものの十分活用されていない。

動物モデルを使った脳卒中の研究は新薬を直接的に産生した例は少ないが、将来の治療法の道を拓く虚血性脳卒中の複雑な病態生理学において重要な洞察を提供してきている。さらに、臨床試験へ進める上で、*in vitro* のハイスループット性を活用して、神経保護作用を有する候補化合物を絞り込む評価系は多数用意されている。一方で、高品質で洗練された評価系構築に加え、*in vitro* から *in vivo* モデルへの円滑

な移行を通して臨床試験の成功確率を担保する必要があり、前臨床研究の実用性に関しては、高等霊長類におけるげっ歯類実験の結果の検証が合理的であり、げっ歯類とヒトの研究の間のギャップを埋める可能性を持つ。しかし、霊長類実験は、脳卒中が重篤な傷害および不能状態であることを考慮すると倫理的懸念がある。実用上の問題として、霊長類のコストが高いこともあって、特にヨーロッパでは霊長類施設はわずかしか存在しない(Holloway and Gavins., 2016)。脳卒中の新薬開発が将来、成功するためには、前臨床試験のさらなる新しい概念の創出と脳卒中の病態生理のより深い理解に基づく革新的なアプローチの双方が必要となる。医薬品の成功確率を高める鍵は、前臨床試験から臨床試験への有効性、安全性情報のシームレスな移行であると言っても過言ではない。そのための有用な策として、トランスレーショナルリサーチがあり、基礎研究の領域で見出された有用なバイオマーカーを基盤技術として開発して、ヒトでの POC に繋がる作用機作解析を早い段階で実施して理論構築することになると考える。

表9 最近の Ph II、III 臨床試験で検討された神経保護治療薬

Treatment	Mode of Action
Magnesium Sulfate	Anti-excitotoxic, NMDA ion channel blocker
Albumin	Antioxidant, Hemodiluting agent
Cyclosporin A	Anti-inflammatory, anti-excitotoxic
Dapsone(diamino-diphenyl sulfone, DDS)	Anti-inflammatory, antioxidant
Deferoxamine mesylate	Iron chelator, antioxidant
Ebselen	Antioxidant, free radical scavenger
GM602	Anti-apoptotic and anti-inflammatory
Hypothermia	Reduce cerebral oxygen metabolism, synaptic inhibitor
Lovastatin	Antioxidant, HMGC CoA inhibitor
Minocycline	Anti-inflammatory, antioxidant
PG2(Polysaccharides of Astragalus membranaceus)	Chinese Herb, assumed antioxidative and anti-inflammatory
Simvastatin	Antioxidant, HMGC CoA inhibitor
Spheno-Palatine Ganglion(SPG) stimulation	Induction of cerebral vasodilatation
THR-18	Synthetic plasminogen activator inhibitor
Transcranial laser therapy	Mitochondrial stimulation
Information on ongoing clinical studies gathered from the databases Clinicaltrials.gov (August 2012) and Strokecenter.org(August 2012)	

Jens M et al., Int. J. Mol. Sci. 2012, 13より抜粋して編集

1-2 他疾患モデルへの応用や橋渡し研究

単細胞または脳組織切片を用いた *in vitro* 系においては、複雑な神経血管ユニットを構成できないため、無傷の血管、血流ならびに白血球の浸潤をモデルとして再現することには限界がある。それにもかかわらず、*in vitro* モデルが有用なのは、壊死性細胞死、プログラムされた細胞死、自食作用のような基本的な生化学的経路および分子メカニズムを *in vitro* 環境下で限定して研究することができるためである (Holloway and Gavins., 2016)。器官型脳スライスで、海馬スライスを使用する場合、ニューロン形態の保存およびグリア細胞および神経ネットワークを保持した機能的システムを有する利点がある。

一方で、脳スライスにおける灌流血管の欠如は脳血管システムからの影響を分離して神経組織の虚血性環境下での障害状態を再現している (Dong et al., 1988)。低酸素／低グルコース培地は脳スライスにのみ局所的に適用され、残りは通常の酸素添加培地に保持される。興味深いことに、低酸素／低グルコース状態に曝された部位に隣接するニューロンは、漸進的に脱分極し、*in vivo* で部分的に観察される現象で、焦点性脳虚血の状況に近づく (Richard et al., 2010)。低酸素／低グルコース状態のようなストレスに対する細胞特異的応答を研究するために、初代ニューロンおよびグリア細胞を使用することは、脳卒中の病態生理で見え隠れする特定の役割を理解するために非常に有益であると考えられる。

In vitro モデルで無視されてきた BBB が、マイクロ流体システムの開発によってモデル化されただけでなく、神経ニューロン間の相互作用から血液疾患における血栓症、微小血管閉塞に関する研究を可能にした (Holloway and Gavins., 2016)。新技術の開発により、*in vitro* システムで、創薬におけるハイスループット性を維持しながら、低コストでの臨床予測を可能にする研究が始まっており、新薬の創出につながるこ

が期待される。

第2節 アルコール禁断モデル

2018年の世界保健機関(WHO)報告では、世界的にはアルコール摂取障害の推計患者数は男性2億3,700万人、女性4,600万人に上る。そのうち、年間300万人は飲酒が原因で死亡しており、その数はエイズ、暴力、交通事故による死者数の合計を上回る(News Release from WHO.,2018)。現在、欧州以外でのアルコール消費量は増え続けており、特に顕著な伸びをみせている中国とインドを抱えるアジアでその傾向が強い(Global status report on alcohol and health., 2018)。しかし、アルコール依存症の創薬研究は顕著な伸びは見られず、画期的な新薬創出につながっていない中、基礎研究において遺伝学的なアプローチが進んでいることが特徴的である。

2-1 アルコール摂取障害に対する薬物療法と疾患概念の変遷

精神神経疾患の疾患モデルの改良は、これまでの長い歴史の中で、水平展開(病態ならびに疾患モデルの追究)と垂直展開(*in vitro*、*in vivo*ならびにヒトモデル)の融合によって、創薬という観点での困難な試みが続くものの大きく促進されてきた(図12)。1948年、米国食品医薬品局(FDA)はアルコール依存症を治療するためにジスルフィラムを承認した。ジスルフィラムの有効性は、アルコール摂取でアセトアルデヒドの血中濃度を急激に上昇させるアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性を遮断する能力に依存する(Fuller et al., 1986)。しかし、ジスルフィラムの有用性の面では、服薬コンプライアンスが一般に不良であるため限定されており、アルコール摂取障害の

治療には多くの行動療法が効果的で、行動療法と薬物療法との間に相乗効果が存在することが明確でないことから評価は高くなかった (Principles of Drug Addiction Treatment: A research-Based Guide from NIH., 2015)。

1960年に抗不安薬として FDA の承認を受けたベンゾジアゼピンは、アルコール摂取障害の際に生じる睡眠の困難や発汗を含む他の症状を軽減する作用は、精神安定剤として一般的だったプロマジン塩酸塩よりも顕著に良好な結果 (Sereny and Kalant, 1965) が支持され、ベンゾジアゼピン、クロルメチアゾール、 β 遮断薬および抗けいれん薬など多数のアルコール禁断のための安全性と有効性を評価した結果、これらの薬剤の中でも特に抗けいれん性カルバマゼピンの数種がアルコール依存症において有用であり得ると同時に、一貫してベンゾジアゼピンの使用を堅持するとの結論が得られた (Williams and McBride., 1998)。

1980年代には、アルコール依存症によく関連する精神障害の診断と治療に焦点を当てた新しい研究パラダイムが浮上した (Myers et al., 1986)。重度の飲酒を再発させる負の気分状態から生じる精神障害に対して、三環系抗うつ薬 (Ciraulo and Jaffe., 1981, Brown and Schuckit., 1988, Nunes and Levin., 2004) や非ベンゾジアゼピン抗不安薬 (Goa and Ward., 1986, Tollefson et al., 1992) などの薬物治療に焦点が移った。

1990年代における神経生物学の発展は、アルコール依存症を治療するためのオピオイド拮抗薬ナルトレキソンの FDA による1994年の承認を経て、脳内におけるアルコールの効果に根ざす特定の神経伝達物質系関与の証明に結びつけた (Anton et al., 2001, Anton et al., 2008)。神経細胞のアルコール馴化モデルでは、脳神経細胞のアルコール順応が進むと、アルコールの欠如は恒常性のバランスを乱し、渴望を生じる。当時、渴望を測定するための新しい心理測定器が開発され、欲望の数多くの生物学的モデルが精緻化され、数々の知見が明らかになった (Anton., 1999)。

2006年には、FDA はナルトレキソンの長期作用型製剤を承認した。また、最近、オピオイド受容体拮抗薬であるナルメフェンが、過度の飲酒を減らすために必要とされる使用のために欧州で承認された。1989年にフランスで最初に承認されたアミノ酸誘導体である Acamprosate は、2004年に FDA 承認を受けた。

このように、1948年以来、アルコール依存症を治療するために4つの医薬品が米国で承認された。他の医薬品は欧州でのみ承認されている。残念なことに、これらの薬剤はいずれも適度な有効性の割に副作用もあって広く処方されていない。本邦でも、大塚製薬(株)が2019年1月8日に承認取得したセリンクロ®錠(ナメルフェン)は、飲酒量を低減させる治療薬として国内初めてとなる。今後の神経薬理学な研究を考えると、アルコール依存症を治療するための新規候補化合物の同定が急務である。堅実な治療薬開発の進歩には、遺伝学の研究も併せて必要とされており、アルコール依存症を発症するリスクに影響を及ぼす変異体の同定をさらに進めることと、医薬品開発における遺伝子レベルでの潜在的なターゲット選定と薬物治療のための潜在的な薬理遺伝学的な機能解明が期待されている(Zindel and Kranzler., 2014)。しかしながら、アルコール依存症の治療への薬理遺伝学の応用はまだ初期段階であり、ほとんどの研究は医薬品探索に直結することなく、比較的安易な薬理ツール探索に特化しており、研究進捗は芳しくない。



図12 アルコール禁断モデルの変遷(概略)

2-2 他疾患モデルへの応用や橋渡し研究

近年、アルコール禁断症状を引き起こす神経生理学および行動の変化を惹起し維持させる分子メカニズムの解明が進んできている。中でも、ショウジョウバエは、人間のアルコールに対する行動反応によく似た症状を示すだけでなく、根底にある神経適応も発症することから、アルコール中毒を研究するのに有益な生物学的モデルであることが証明されてきている (Guarnieri and Heberlein., 2003, Devineni and Heberlein., 2013, Park et al., 2017, Lin and Rankin., 2012)。また、アルコールへの反復暴露で、アルコール耐性を形成して、アルコールへの嗜好を増大し、禁断症状を示す (Cowmeadow et al., 2006, Devineni and Heberlein., 2009, Kaun et al., 2011, Ghezzi et al., 2014)。2005年には、ショウジョウバエのアルコール耐性形成を助ける新しい遺伝子として“hangover 遺伝子”も発見されており、アルコールなどのストレスへの対処に関わるものとして注目されている (Scholz et al., 2005)。

これらのメカニズムには、アルコール摂取障害を調節する特定のニューロン回路の転写再プログラミングにおける遺伝子発現の変化が深く関与することが明らかになっており、特定の遺伝子セットを発現する能力が、クロマチン構造およびDNAアクセシビリティを変化させるエピジェネティックな修飾に依存することが、現在、よく知られている (Ramirez-Roman et al., 2018)。多くの異なる生物学的経路をカバーする100近くの遺伝子が、ショウジョウバエにおけるアルコールの神経適応に関連しており (Park et al., 2017, Rodan and Rothenfluh., 2010)、エピジェネティックなヒストン修飾は、遺伝子発現の調節におけるその複雑な役割のために、この分野における研究の焦点となっている。

代表的なヒストン修飾として、ヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1、ヒストンアセチル基転移酵素 CREB 結合タンパク質 (CBP)、JmJc ドメインヒストン脱メチル化酵素ファ

ミリーが挙げられるが、いずれもアルコール耐性の機能の一部を担う可能性が高い。また、ショウジョウバエでの slo BK 型 Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル遺伝子の神経細胞における発現増加により、ベンジルアルコールの鎮静作用に対する機能的寛容を惹起する。薬物クリアランス後、この変化は、アルコール禁断の表現型を模倣して依存症発作の感受性を増加させる (Li et al., 2013)。アルコール依存状態を捉える上で、アルコールの「寛容」と「禁断」という2つの重要な要素は無視できない (Littleton., 1998, Koob and Le Moal., 2001, Ghezzi and Atkinson., 2011)。

これらのアルコールの神経細胞への馴化は、永続的な転写変化に依存する、多数の遺伝子ネットワークの協調調節メカニズムと考えられている。ショウジョウバエと哺乳類の双方において、多数の遺伝子転写の神経細胞馴化の例が示されており、とりわけ、クロマチン状態の再構成 (Ghezzi et al., 2013, Kyzar and Pandey., 2015)、miRNA 発現の調節 (Ghezzi et al., 2016, Teppen et al., 2016) および神経免疫シグナル伝達カスケードの活性化 (Blednov et al., 2012, Troutwine et al., 2016) が重要なメカニズムとなっている。ヒストン修飾は、遺伝子発現の重要な調整役として浮上しており、シングルの遺伝子転写変化によるのではなく、マルチ遺伝子ネットワークの発現を調整し維持するものと考えられている。

これまでに、「寛容」に寄与する遺伝子は、アルコール暴露後のヒストン H4 アセチル化がアルコール誘導変化を示すものとして同定されている (Ghezzi et al., 2017)。アルコール耐性および依存症発現を経て脳内で起こるエピジェネティックな変化として、連合学習の中心的役割を果たすラット扁桃体におけるクロマチンリモデリングがエタノール曝露による不安緩和、禁断による不安惹起効果に関与し得る重要な機構であることが示されている (Subhash C et al., 2008)。酪酸ナトリウムのようなヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤による治療は、ヒストン H3 および H4 のアセチル化を増加させ、海馬における樹状突起の発芽を誘発し、マウスモデルにおける学習行動を

回復させる (Fischer et al., 2007)。また、HDAC 阻害剤はコカイン中毒、統合失調症およびハンチントン病の分子メカニズムにおいてヒストンアセチル化の役割で使用されている (Ferrante et al., 2003, Colvis et al., 2005, Kumar et al., 2005, Sharma., 2005)。

これらの結果は、ヒストン修飾の中でもアセチル化機構がアルコール摂取障害において重要な役割を担うとともに、HDAC 阻害剤のような脱アセチル化を通してアルコール依存症治療にも有益に働く可能性を示唆している。マルチ遺伝子ネットワークの調製機能を追究していく上では、さらに、動物モデルおよびヒトにおける研究は、急性および慢性アルコール消費が全脳における転写体を有意に変化させることを示している点にも注目していかなければならない (Morozova et al., 2006, Mulligan et al., 2006, Morozova et al., 2011, Ponomarev et al., 2012, Marballi et al., 2016)。転写調節因子 LIM-only 4 (LMO4) がマウス側底扁桃で、中毒を含む多くの精神病理の根底にある刺激報酬型学習において重要な役割を果たすことが明らかになっている (Maiya et al., 2015)。

King ら (2011) によって同定された *dtao* 遺伝子は、機能喪失突然変異として働き、エタノールに対するハエの活動亢進応答をほぼ完全になくす (Kapfhammer et al., 2013)。哺乳動物においては、*dtao* はオーソログ遺伝子 TAOK1、TAOK2 及び TAOK3 として表現される (Yustein et al., 2003)。アクチンおよびチューブリン動態の調節における推定上の役割に加えて TAOK2、細胞接着分子アルカドリンおよび N-カドヘリンの輸送や p38 の活性化を介して神経細胞の可塑性を調節する (Yamagata et al., 1999, Yasuda et al., 2007)。

GCK-1 サブファミリーの哺乳動物 Ste20 ファミリーキナーゼと強い相同性を示す Hppy (Happyhour) タンパク質は、経路の阻害剤として機能し、表皮成長因子 (EGF) シグナリング経路を介してショウジョウバエのエタノール感受性を調節することが明らかになっている (Corl et al., 2009)。成熟したハエで研究された 2 つの EGFR 阻害剤、エ

ルロチニブ(タルセバ)およびゲフィチニブ(イレッサ)は FDA 承認の薬物であり、血液脳関門を通過することが知られており、耐容性が高いため、ヒトにおけるアルコール摂取障害の治療のために使用される(Corl et al., 2009)。

アルコール摂取障害の発症に寄与する遺伝的および環境的要因のさらなる理解を深めることを通して、世界的に見ても取り残され、ストレス社会に苦しむ人々に大きな利益をもたらすと考える。アルコール消費に伴う認知面あるいは行動面の変化は多くの人に知られているものの、アルコールが中枢神経系のマルチ遺伝子ネットワークに影響を及ぼして、これらの作用を引き起こすメカニズムに関する私の知見は未開拓であるといって過言ではない。アルコール摂取障害だけでなく、薬物中毒などの精神病理学の治療のための新薬ターゲットの発見を可能にする発見が、薬物遺伝子研究の進展を通してさらに加速することを期待する。

第4章 総括

脳血管疾患(脳卒中)が誘発される背景として、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血などとともに、アルコール依存症、肥満というファクターが特定されてきているものの、特定の有用なモデルはない。本邦の死因第3位である虚血性脳卒中でさえ、数年間で多数の分子標的薬を用いた試験が繰り返されてきたものの、脆弱性の高い中枢神経系の保護が確認出来た試験は限られる。

第1章では、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘発性の海馬スライスにおける CA1 前シナプス電位低下に対する神経保護作用があるメチルコバラミンならびに神経症状の作用の要であるドーパミン受容体作動薬、拮抗薬の効果を調べた。今回の結果では、メチルコバラミンが、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸誘発性の海馬スライスにおける前シナプス機能障害からの機能的回復を誘導することを示した。また、メチルコバラミン、シアノコバラミンを脳スライス実験に供する前に、*in vivo*でラットに3日間腹腔内投与したところ、低酸素／低グルコース状態またはグルタミン酸によって誘導される CA1 前シナプス電位低下をともに減弱させた。当評価系で、メチル化が中枢神経系における保護効果を示すメカニズムは明らかではないものの、メチルコバラミンはメチル基供与体として作用することによって神経保護を引き起こすことが示された。さらに、ドーパミン受容体作動薬 SKF38393、拮抗薬 SCH23390 の結果では、アデニル酸シクラーゼ活性の増加と関連するドーパミン D1 受容体刺激により、虚血誘導性の損傷を促進する結果を示した。また、ドーパミン D1 受容体の遮断は、これらの障害を減弱させる可能性を併せて示し、*in vitro*での虚血後の神経損傷における海馬のドーパミンの促進的役割が示唆された。

第2章では、アルコール禁断ラットを用いて、アルコール禁断時における LTP 現象への NMDA 受容体、ドーパミン神経系の関与を調べた。今回の結果では、高頻

度刺激により通常は認められない NMDA 受容体を介したシナプス伝達が増強されていることが示された。さらに、population spikes においても、高頻度刺激により LTP 現象が誘導され、この population spikes の長期増強は NMDA 受容体拮抗薬で遮断され、代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬では、さらに増強する傾向が見られた。また、アルコール禁断時における LTP 現象にドーパミン神経系が関与していると同時に、ドーパミンが D2 受容体を介して LTP を抑制することが示唆された。これらの結果より、アルコール禁断により線条体で誘発される NMDA 受容体を介した LTP 現象は、ドーパミン受容体および代謝型グルタミン酸受容体を介した抑制機構との相互作用の結果、誘導されるものと考えられる。

第3章では、脳虚血疾患モデルならびにアルコール摂取障害モデルの経年的な変遷と創薬イノベーションへの貢献について調べた。脳虚血後、グルタミン酸受容体活性化、興奮毒性、細胞への Ca^{2+} 流入などの複雑な生化学的事象が誘導され、最終的には神経細胞死を招くことから、多くの分子標的薬を用いて神経保護を目的とした薬理学的な検討が試みられたものの、創薬へ繋がった事例は少ない。現在、あらためて NMDA 受容体、活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species)、低酸素誘導因子 (HIF: hypoxia-inducible factor) といった神経細胞死の機能と新たな分子標的が注目されており、これまでとは異なる分子標的で、薬理学的特性の改善、サブタイプに対する特異性、安全性プロファイルを適切な *in vivo* ないし *in vitro* モデルを用いることで、創薬に繋がる可能性が出てきている。また、1948 年以来、アルコール依存症を治療するために4つの医薬品が米国で承認され、他の医薬品は欧州でのみ承認されているが、これらの薬剤はいずれも適度な有効性の割に副作用もあって広く処方されていない。堅実な治療薬開発の進歩には、遺伝学の研究も併せて必要とされている。アルコール依存症を発症するリスクに影響を及ぼす変異体の同定をさらに進め、医薬品開発における遺伝子レベルでの潜在的な目標と薬物治療の潜在的なモデレーター提供

としての役割が期待される。その一例として示したショウジョウバエのアルコール摂取障害モデルは、人間のアルコールに対する行動反応によく似た症状を示すだけでなく、根底にある神経適応も発症することから、アルコール中毒を研究するのに有益な生物学的モデルであることが証明されてきている。特に、エピジェネティックなヒストン修飾は、遺伝子発現の調節におけるその複雑な役割のために、この分野における研究の焦点となる可能性がある。

以上、中枢神経系疾患モデルとして、脳虚血モデル、アルコール禁断モデルの薬理的検討を紐解いてきたが、一義的には病態を解析する有益な情報を提供して活用されたところもあるものの、動物の一つの個体を表現する上で多面的な評価の手段ではないため、脳卒中の根本的な治療薬創出には繋がっていない。トランスレショナルリサーチも1つのアプローチであるとともに、10数年前は実験手技、遺伝子情報の欠如から取り組めなかったエピジェネティックなアプローチが今後の創薬研究において、新しい突破口を開くことが期待される。

参考文献

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846-850.
- Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T (1993) Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *European journal of pharmacology* 241:1-6.
- Akerman KE, Heikkila JE (1990) 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and forskolin modify muscarinic receptor-linked Ca^{2+} mobilization in SH-SY5Y neuroblastoma cells through different mechanisms. *Journal of neurochemistry* 54:497-504.
- Allen RH (1976) The plasma transport of vitamin B12. *British journal of haematology* 33:161-171.
- Anton RF (1999) What is craving? Models and implications for treatment. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 23:165-173.
- Anton RF, Moak DH, Latham PK, Waid LR, Malcolm RJ, Dias JK, Roberts JS (2001) Posttreatment results of combining naltrexone with cognitive-behavior therapy for the treatment of alcoholism. *Journal of clinical psychopharmacology* 21:72-77.
- Anton RF, Oroszi G, O'Malley S, Couper D, Swift R, Pettinati H, Goldman D (2008) An evaluation of mu-opioid receptor (OPRM1) as a predictor of naltrexone response in the treatment of alcohol dependence: results from the Combined

- Pharmacotherapies and Behavioral Interventions for Alcohol Dependence (COMBINE) study. Archives of general psychiatry 65:135–144.
- Antonic A, Sena ES, Donnan GA, Howells DW (2012) Human *in vitro* models of ischaemic stroke: a test bed for translation. Translational stroke research 3:306–309.
- Araki A, Sako Y, Ito H (1993) Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. Atherosclerosis 103:149–157.
- Baker AJ, Zornow MH, Scheller MS, Yaksh TL, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA, Kuczenski R (1991) Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. Journal of neurochemistry 57:1370–1379.
- Benfenati F, Pich EM, Grimaldi R, Zoli M, Fuxe K, Toffano G, Agnati LF (1989) Transient forebrain ischemia produces multiple deficits in dopamine D1 transmission in the lateral neostriatum of the rat. Brain research 498:376–380.
- Bhardwaj A, Brannan T, Martinez-Tica J, Weinberger J (1990) Ischemia in the dorsal hippocampus is associated with acute extracellular release of dopamine and norepinephrine. Journal of neural transmission General section 80:195–201.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. Jama 297:842–857.
- Blednov YA, Ponomarev I, Geil C, Bergeson S, Koob GF, Harris RA (2012) Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes

- obtained from genomic studies. *Addiction biology* 17:108–120.
- Blennow G, Folbergrova J, Nilsson B, Siesjö BK (1979) Cerebral metabolic and circulatory changes in the rat during sustained seizures induced by DL-homocysteine. *Brain research* 179:129–146.
- Blum K., Eubanks J. D., Wallace J. E. and Schwertner H. A. (1976) Suppression of ethanol withdrawal by dopamine. *Experientia* 32, 493–495.
- Brannan T, Weinberger J, Knott P, Taff I, Kaufmann H, Togasaki D, Nieves-Rosa J, Maker H (1987) Direct evidence of acute, massive striatal dopamine release in gerbils with unilateral strokes. *Stroke* 18:108–110.
- Brown SA, Schuckit MA (1988) Changes in depression among abstinent alcoholics. *Journal of studies on alcohol* 49:412–417.
- Calabresi P., De Murtus M. and Bernardi G. (1997) The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence. *Neuroscience* 78, 39–60.
- Calabresi P., Mercuri N. B. and Bernardi G. (1992d) Activation of quisqualate metabotropic receptors reduces glutamate and GABA-mediated synaptic potentials in the neostriatum. *Neurosci. Lett.* 139, 41–49.
- Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G (1992a) Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neuroscience letters* 142:95–99.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992b) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:4224–4233.
- Calabresi P, Mercuri N, Stanzione P, Stefani A, Bernardi G (1987) Intracellular studies

- on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons *in vitro*: evidence for D1 receptor involvement. *Neuroscience* 20:757-771.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992c) Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *The European journal of neuroscience* 4:929-935.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends in neurosciences* 19:19-24.
- Calabresi P., Saiardi A., Pisani A., Baik J.-H., Centonze D., Mercuri N. B., Bernardi G. and Borrelli E. (1997) Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J. Neurosci.* 17, 4536-4544.
- Carlsson M, Carlsson A (1989) Dramatic synergism between MK-801 and clonidine with respect to locomotor stimulatory effect in monoamine-depleted mice. *Journal of neural transmission* 77:65-71.
- Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Muir M, Perry J (1985) Cobalamin-folate interrelations: a critical review. *Blood* 66:479-489.
- Chang CJ, Ishii H, Yamamoto H, Yamamoto T, Spatz M (1993) Effects of cerebral ischemia on regional dopamine release and D1 and D2 receptors. *Journal of neurochemistry* 60:1483-1490.
- Charpier S. and Deniau J. M. (1997) *In vivo* activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7036-7040.
- Cherubini E, Herrling PL, Lanfumey L, Stanzione P (1988) Excitatory amino acids in

- synaptic excitation of rat striatal neurones *in vitro*. The Journal of physiology 400:677–690.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 7:369–379.
- Choi DW (1993) NMDA receptors and AMPA/kainate receptors mediate parallel injury in cerebral cortical cultures subjected to oxygen–glucose deprivation. Progress in brain research 96:137–143.
- Ciraulo DA, Jaffe JH (1981) Tricyclic antidepressants in the treatment of depression associated with alcoholism. Journal of clinical psychopharmacology 1:146–150.
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. The Journal of Neuroscience 25:10379–10389.
- Colwell CS, Levine MS (1994) Metabotropic glutamate receptors modulate N-methyl-D-aspartate receptor function in neostriatal neurons. Neuroscience 61:497–507.
- Corl AB1, Berger KH, Ophir-Shohat G, Gesch J, Simms JA, Bartlett SE, Heberlein U (2009) Happyhour, a Ste20 family kinase, implicates EGFR signaling in ethanol-induced behaviors. Cell 137, 949–960.
- Cowmeadow RB, Krishnan HR, Ghezzi A, Al’Hasan YM, Wang YZ, Atkinson NS (2006) Ethanol tolerance caused by slowpoke induction in Drosophila. Alcoholism, clinical and experimental research 30:745–753.
- Criswell HE, Johnson KB, Mueller RA, Breese GR (1993) Evidence for involvement of brain dopamine and other mechanisms in the behavioral action of the

- N-methyl-D-aspartic acid antagonist MK-801 in control and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 265:1001-1010.
- Darden JH, Hunt WA (1977) Reduction of striatal dopamine release during an ethanol withdrawal syndrome. *Journal of neurochemistry* 29:1143-1145.
- Davalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997) Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke* 28:708-710.
- Davidson M, Shanley B, Wilce P (1995) Increased NMDA-induced excitability during ethanol withdrawal: a behavioural and histological study. *Brain research* 674:91-96.
- Dawson TM, Gehlert DR, McCabe RT, Barnett A, Wamsley JK (1986) D-1 dopamine receptors in the rat brain: a quantitative autoradiographic analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6:2352-2365.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:6368-6371.
- Deshpande JK, Siesjo BK, Wieloch T (1987) Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7:89-95.
- Devineni AV, Heberlein U (2009) Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Current biology : CB* 19:2126-2132.

- Devineni AV, Heberlein U (2013) The evolution of *Drosophila melanogaster* as a model for alcohol research. *Annual review of neuroscience* 36:121–138.
- Dewar KM, Reader TA (1989) Distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rabbit cortical areas, hippocampus, and neostriatum in relation to dopamine contents. *Synapse* 4:378–386.
- Dewhurst IC, Hagan JJ, Morris RG, Griffiths R (1983) Hippocampal electrical activity and gamma-aminobutyrate metabolism in brain tissue following administration of homocysteine. *Journal of neurochemistry* 40:752–757.
- Diana M., Pistis M., Carboni S., Gessa G. L. and Rossetti Z. L. (1993) Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7966–7969.
- Dong WQ, Schurr A, Reid KH, Shields CB, West CA (1988) The rat hippocampal slice preparation as an *in vitro* model of ischemia. *Stroke* 19:498–502.
- Dunwiddie TV, Haas HL (1985) Adenosine increases synaptic facilitation in the *in vitro* rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *The Journal of physiology* 369:365–377.
- Dunwiddie TV, Miller KK (1993) Effects of adenosine and cadmium on presynaptic fiber spikes in the CA1 region of rat hippocampus *in vitro*. *Neuropharmacology* 32:1061–1068.
- Durand D, Carlen PL (1984) Decreased neuronal inhibition *in vitro* after long-term administration of ethanol. *Science* 224:1359–1361.
- Eisenhofer G., Szabo G. and Hoffman P. L. (1990) Opposite changes in turnover of noradrenaline and dopamine in the CNS of ethanol-dependent mice.

- Neuropharmacology 29, 37-45.
- Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA (2004) Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in neurosciences* 27:283-289.
- Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *The Journal of Neuroscience* 23:9418 -9427.
- Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447:178 -182.
- Freund G (1969) Alcohol withdrawal syndrome in mice. *Archives of neurology* 21:315-320.
- Fuller RK, Branchey L, Brightwell DR, Derman RM, Emrick CD, Iber FL, James KE, Lacoursiere RB, Lee KK, Lowenstam I, et al. (1986) Disulfiram treatment of alcoholism. A Veterans Administration cooperative study. *Jama* 256:1449-1455.
- Garcia-Munoz M., Young S. J. and Groves P. M. (1991) Terminal excitability of the corticostriatal pathway. I. Regulation by dopamine receptor stimulation. *Brain Res.* 551, 195-206.
- Ghezzi A, Atkinson NS (2011) Homeostatic control of neural activity: a *Drosophila* model for drug tolerance and dependence. *International review of neurobiology* 99:23-50.
- Ghezzi A, Krishnan HR, Atkinson NS (2014) Susceptibility to ethanol withdrawal seizures is produced by BK channel gene expression. *Addiction biology* 19:332-337.

- Ghezzi A, Krishnan HR, Lew L, Prado FJ, 3rd, Ong DS, Atkinson NS (2013) Alcohol-induced histone acetylation reveals a gene network involved in alcohol tolerance. *PLoS genetics* 9:e1003986.
- Ghezzi A, Li X, Lew LK, Wijesekera TP, Atkinson NS (2017) Alcohol-Induced Neuroadaptation Is Orchestrated by the Histone Acetyltransferase CBP. *Frontiers in molecular neuroscience* 10:103.
- Ghezzi A, Zomeno M, Pietrzykowski AZ, Atkinson NS (2016) Immediate-early alcohol-responsive miRNA expression in *Drosophila*. *Journal of neurogenetics* 30:195–204.
- Gibson KD, Wilson JD, Udenfriend S (1961) The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *The Journal of biological chemistry* 236:673–679.
- Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363–389.
- Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD (1988a) Effect of ischemia on the *in vivo* release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry* 51:1455–1464.
- Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD (1988b) Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neuroscience letters* 91:36–40.
- Globus MY, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R, Scheinberg P (1987) Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum. *Neuroscience letters* 80:251–256.

- Goa KL, Ward A (1986) Buspirone. A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an anxiolytic. *Drugs* 32:114–129.
- Grant KA, Snell LD, Rogawski MA, Thurkauf A, Tabakoff B (1992) Comparison of the effects of the uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist (+-)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (ADCI) with its structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine on ethanol withdrawal seizures. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 260:1017–1022.
- Grant KA, Valverius P, Hudspeth M, Tabakoff B (1990) Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *European journal of pharmacology* 176:289–296.
- Grome JJ, McCulloch J (1981) Effect of chloral hydrate anaesthesia on the cerebral metabolic response to apomorphine administration. *European neurology* 20:176–179.
- Guarnieri DJ, Heberlein U (2003) *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *International review of neurobiology* 54:199–228.
- Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B (1991) Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain research* 547:129–134.
- Hall CA (1990) Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. *American journal of hematology* 34:121–127.
- Hermann DM, Zechariah A (2009) Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow*

- and Metabolism 29:1620–1643.
- Herrling P. L. (1985) Pharmacology of the corticocaudate excitatory postsynaptic potential in the cat: evidence for its mediation by quisqualate or kainate receptors. *Neuroscience* 14, 417–426.
- Holloway PM, Gavins FN (2016) Modeling Ischemic Stroke *In vitro*: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* 47:561–569.
- Hosokawa S, Kato M, Shima F, Tobimatsu S, Kuroiwa Y (1984) Local cerebral glucose utilization altered in rats with unilateral electrolytic striatal lesions and modification by apomorphine. *Brain research* 324:59–68.
- Hsu K.-S., Huang C.-C., Yang C.-H. and Gean P.-G. (1995) Presynaptic D2 dopaminergic receptors mediate inhibition of excitatory synaptic transmission in rat neostriatum. *Brain Res.* 690, 264–268.
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *The Lancet Neurology* 1:383–386.
- Inada M, Toyoshima M, Kameyama M (1982) Brain content of cobalamin and its binders in elderly subjects. *Journal of nutritional science and vitaminology* 28:351–357.
- Ishikawa K, Ott T, McGaugh JL (1982) Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus. *Brain research* 232:222–226.
- Jay TM, Jouvett M, des Rosiers MH (1985) Local cerebral glucose utilization in the free moving mouse: a comparison during two stages of the activity–rest cycle. *Brain research* 342:297–306.
- Jiang ZG, North RA (1991) Membrane properties and synaptic responses of rat striatal neurones *in vitro*. *The Journal of physiology* 443:533–553.

- Kapfhamer D, Taylor S, Zou ME, Lim JP, Kharazia V, Heberlein U (2013) Tao2 controls behavioral response to ethanol in mice. *Genes Brain Behav* 12(1): 87-97.
- Kato M, Malamut BL, Caveness WF, Hosokawa S, Wakisaka S, O'Neill RR (1980) Local cerebral glucose utilization in newborn and pubescent monkeys during focal motor seizures. *Annals of neurology* 7:204-212, 230-202.
- Kaun KR, Azanchi R, Maung Z, Hirsh J, Heberlein U (2011) A *Drosophila* model for alcohol reward. *Nature neuroscience* 14:612-619.
- Kelso ML, Pauly JR (2011) Therapeutic targets for neuroprotection and/or enhancement of functional recovery following traumatic brain injury. *Progress in molecular biology and translational science* 98:85-131.
- Kennedy C, Sakurada O, Shinohara M, Jehle J, Sokoloff L (1978) Local cerebral glucose utilization in the normal conscious macaque monkey. *Annals of neurology* 4:293-301.
- Kincses ZT, Vecsei L (2011) Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection. *CNS neuroscience & therapeutics* 17:345-367.
- King I, Tsai LT, Pflanz R, Voigt A, Lee S, Jackle H, Lu B, Heberlein U (2011) *Drosophila* tao controls mushroom body development and ethanol-stimulated behavior through par-1. *The Journal of Neuroscience* 31:1139-1148.
- Kita H. (1996) Glutamatergic and GABAergic postsynaptic responses of striatal spiny neurons to intrastriatal and cortical stimulation recorded in slice preparations. *Neuroscience* 70, 925-940.
- Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, Barit D, Schwarz T, Geis C, Kraft P, Barthel K, Schuhmann MK, Herrmann AM, Meuth

- SG, Stoll G, Meurer S, Schrewe A, Becker L, Gailus-Durner V, Fuchs H, Klopstock T, de Angelis MH, Jandeleit-Dahm K, Shah AM, Weissmann N, Schmidt HH (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS biology* 8.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 24:97–129.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DEH, Truong HT, Russo SJ, LaPlant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, SelfDW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303–314.
- Kyzar EJ, Pandey SC (2015) Molecular mechanisms of synaptic remodeling in alcoholism. *Neuroscience letters* 601:11–19.
- Levin ED, Bowman RE (1986) Scopolamine effects on Hamilton search task performance in monkeys. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 24:819–821.
- Li X, Ghezzi A, Pohl JB, Bohm AY, Atkinson NS (2013) A DNA element regulates drug tolerance and withdrawal in *Drosophila*. *PloS one* 8:e75549.
- Lieber CS, De Carli LM (1973) Ethanol dependence and tolerance: a nutritionally controlled experimental model in the rat. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 6:983–991.
- Lieber CS, DeCarli LM (1982) The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcoholism, clinical and experimental research* 6:523–531.

- Lin CH, Rankin CH (2012) Alcohol addiction: chronic ethanol leads to cognitive dependence in *Drosophila*. *Current biology* : CB 22:R1043–1044.
- Littleton J (1998) Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal. *Alcohol health and research world* 22:13–24.
- Lovinger DM (1993) Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcoholism, clinical and experimental research* 17:19–27.
- Lovinger D. M., Tyler E., Fidler S. and Merritt A. (1993) Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J. Neurophysiol.* 69, 1236–1244.
- Lovinger D. M., Tyler E. and Merritt A. (1993) Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J. Neurophysiol.* 70, 1937–1949.
- Maiya R, Mangieri RA, Morrisett RA, Heberlein U, Messing RO (2015) A Selective Role for Lmo4 in Cue-Reward Learning. *The Journal of Neuroscience* 35(26):9638 -9647.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10:2587–2600.
- Marballi K, Genabai NK, Blednov YA, Harris RA, Ponomarev I (2016) Alcohol consumption induces global gene expression changes in VTA dopaminergic neurons. *Genes, brain, and behavior* 15:318–326.
- Matsui Y, Kubo Y, Iwata N (1987) S-adenosyl-L-methionine prevents ischemic neuronal death. *European journal of pharmacology* 144:211–216.

- Maura G, Giardi A, Raiteri M (1988) Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 247:680-684.
- McCarren M. and Alger B. E. (1985) Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 53, 557-571.
- Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738.
- Meyer FB (1989) Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain research Brain research reviews* 14:227-243.
- Miller SS, Goldman ME, Erickson CK, Shorey RL (1980) Induction of physical dependence on and tolerance to ethanol in rats fed a new nutritionally complete and balanced liquid diet. *Psychopharmacology* 68:55-59.
- Minamoto Y, Tanaka T, Shibata S, Watanabe S (1994) Neuroprotective effect of cholecystokininB receptor antagonist on ischemia-induced decrease in CA1 presynaptic fiber spikes in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters* 167:81-84.
- Minnerup J, Heidrich J, Rogalewski A, Schabitz WR, Wellmann J (2009) The efficacy of erythropoietin and its analogues in animal stroke models: a meta-analysis. *Stroke* 40:3113-3120.
- Minnerup J, Sutherland BA, Buchan AM, Kleinschnitz C (2012) Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *International journal of molecular sciences* 13:11753-11772.
- Morozova TV, Anholt RR, Mackay TF (2006) Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*. *Genome biology* 7:R95.

- Morozova TV, Mackay TF, Anholt RR (2011) Transcriptional networks for alcohol sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 187:1193–1205.
- Morrisett RA (1994) Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent afterdischarges in rat dentate gyrus following *in vitro* ethanol withdrawal. *Neuroscience letters* 167:175–178.
- Morrisett RA, Rezvani AH, Overstreet D, Janowsky DS, Wilson WA, Swartzwelder HS (1990) MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats. *European journal of pharmacology* 176:103–105.
- Mulligan MK, Ponomarev I, Hitzemann RJ, Belknap JK, Tabakoff B, Harris RA, Crabbe JC, Blednov YA, Grahame NJ, Phillips TJ, Finn DA, Hoffman PL, Iyer VR, Koob GF, Bergeson SE (2006) Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6368–6373.
- Myers RD, Borg S, Mossberg R (1986) Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey. *Alcohol* 3:383–388.
- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1991) Intracellular study of rat entopeduncular nucleus neurons in an *in vitro* slice preparation: response to subthalamic stimulation. *Brain research* 549:285–291.
- Nakanishi H., Tamura A., Kawai K. and Yamamoto K. (1997) Electrophysiological studies of rat substantia nigra neurons in an *in vitro* slice preparation after middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 77, 1021–1028.
- Nakanishi H. and Yamamoto K. (1991) NMDA receptor-mediated neurotransmission in the basal ganglia and limbic system of the rat. In *NMDA Receptor Related Agents: Biochemistry, Pharmacology and Behavior* (eds Kameyama T.,

- Nabeshima T. and Domino E. F.), pp. 141-151, NPP Books, Ann Arbor.
- Newman GC, Hospod FE, Wu P (1989) Glucose utilization of ischemic hippocampal slices. *Journal of neuroscience methods* 28:23-34.
- Nicoll R. A., Kauer J. A. and Malenka R. C. (1988) The current excitement in long-term potentiation. *Neuron* 1, 97-103.
- Nunes EV, Levin FR (2004) Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *Jama* 291:1887-1896.
- Ochi M, Inoue H, Koizumi S, Shibata S, Watanabe S (1995) Long-term enhancement of dopamine release by high frequency tetanic stimulation via a N-methyl-D-aspartate-receptor-mediated pathway in rat striatum. *Neuroscience* 66:29-36.
- Osterndorff-Kahanek EA, Becker HC, Lopez MF, Farris SP, Tiwari GR, Nunez YO, Harris RA, Mayfield RD (2015) Chronic ethanol exposure produces time- and brain region-dependent changes in gene coexpression networks. *PloS one* 10:e0121522.
- Park A, Ghezzi A, Wijsekera TP, Atkinson NS (2017) Genetics and genomics of alcohol responses in *Drosophila*. *Neuropharmacology* 122:22-35.
- Pisani A., Calabresi P., Centonze D. and Bernardi G. (1997) Enhancement of NMDA responses by group I metabotropic glutamate receptor activation in striatal neurones. *Br. J. Pharmac.* 120, 1007-1014.
- Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:1884-1897.

- Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine* 9:677–684.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Annals of neurology* 11:491–498.
- Ramirez-Roman ME, Billini CE, Ghezzi A (2018) Epigenetic Mechanisms of Alcohol Neuroadaptation: Insights from *Drosophila*. *Journal of experimental neuroscience* 12:1179069518779809.
- Richard MJ, Saleh TM, El Bahh B, Zidichouski JA (2010) A novel method for inducing focal ischemia *in vitro*. *Journal of neuroscience methods* 190:20–27.
- Ridley RM, Bowes PM, Baker HF, Crow TJ (1984) An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset. *Neuropsychologia* 22:253–263.
- Rodan AR, Rothenfluh A (2010) The genetics of behavioral alcohol responses in *Drosophila*. *International review of neurobiology* 91:25–51.
- Rogers C. J. and Hunter B. E. (1992) Chronic ethanol treatment reduces inhibition in CA1 of the rat hippocampus. *Brain Res. Bull.* 28, 587–592.
- Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S (1980) Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neuroscience letters* 18:125–131.
- Scholz H, Franz M, Heberlein U (2005) The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* 436:845–847.
- Sciotti VM, Van Wylen DG (1993) Attenuation of ischemia-induced extracellular adenosine accumulation by homocysteine. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13:208–213.

- Sereny G, Kalant H (1965) Comparative Clinical Evaluation of Chlordiazepoxide and Promazine in Treatment of Alcohol-Withdrawal Syndrome. *British medical journal* 1:92-97.
- Sharma RP (2005) Schizophrenia, epigenetics, and ligand-activated nuclear receptors. *Schizophr Res* 72:79 -90.
- Shibata S, Kagami-Ishi Y, Tominaga K, Kodama K, Ueki S, Watanabe S (1992a) Ischemia-induced impairment of 2-deoxyglucose uptake and CA1 field potentials in rat hippocampal slices: protection by 5-HT_{1A} receptor agonists and 5-HT₂ receptor antagonists. *European journal of pharmacology* 229:21-29.
- Shibata S, Kodama K, Tominaga K, Ueki S, Watanabe S (1992b) Assessment of the role of adrenoceptor function in ischemia-induced impairment of 2-deoxyglucose uptake and CA1 field potential in rat hippocampal slices. *European journal of pharmacology* 221:255-260.
- Shibata S, Tominaga K, Kagami-ishi Y, Watanabe S (1992c) Neuroprotective effect of protein kinase C inhibitors on oxygen/glucose free-induced decreases in 2-deoxyglucose uptake and CA1 field potentials in rat hippocampal slices. *Brain research* 594:290-294.
- Shibata S, Tominaga K, Watanabe S (1995a) Glutathione protects against hypoxic/hypoglycemic decreases in 2-deoxyglucose uptake and presynaptic spikes in hippocampal slices. *European journal of pharmacology* 273:191-195.
- Shibata S, Yamamoto Y, Tanaka T, Watanabe S (1995b) NG-nitro-L-arginine protects against hypoxia/hypoglycemia-induced decrease in CA1 presynaptic spikes in rat hippocampal slices. *European journal of pharmacology* 273:223-228.

- Shindou T, Watanabe S, Yamamoto K, Nakanishi H (1993) NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an *in vitro* slice preparation. Brain research bulletin 31:667-672.
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr. (1992) Molecular biology of dopamine receptors. Trends in pharmacological sciences 13:61-69.
- Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS (1984) Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 4:350-361.
- Slivka A, Brannan TS, Weinberger J, Knott PJ, Cohen G (1988) Increase in extracellular dopamine in the striatum during cerebral ischemia: a study utilizing cerebral microdialysis. Journal of neurochemistry 50:1714-1718.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. Journal of neurochemistry 28:897-916.
- Sommer CJ (2017) Ischemic stroke: experimental models and reality. Acta neuropathologica 133:245-261.
- Soriano FX, Martel MA, Papadia S, Vaslin A, Baxter P, Rickman C, Forder J, Tymianski M, Duncan R, Aarts M, Clarke P, Wyllie DJ, Hardingham GE (2008) Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. The Journal of neuroscience : the official journal of

- the Society for Neuroscience 28:10696–10710.
- Subhash C. Pandey, Rajesh Ugale, Huaibo Zhang, Lei Tang, and Anand Prakash (2008) Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism, *The Journal of Neuroscience*, 28(14):3729 -3737
- Spangler EL, Rigby P, Ingram DK (1986) Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 25:673–679.
- Stefani A., Pisani A., Mercuri N. B., Bernardi G. and Calabresi P. (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons. *J. Neurosci.* 14, 6734-6743.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614–619.
- Surmeier D. J., Bargas J., Hemmings H. G., Nairn A. C. and Greengard P. (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14, 385-397.
- Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C (2012) Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 7:407–418.
- Syvanen S, Lindhe O, Palner M, Kornum BR, Rahman O, Langstrom B, Knudsen GM, Hammarlund-Udenaes M (2009) Species differences in blood–brain barrier

- transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 37:635–643.
- Tanaka T, Shishido Y, Shibata S, Watanabe S (1994) Facilitatory effect of vasopressin on the ischemic decrease of the CA1 presynaptic fiber spikes in rat hippocampal slices. *Brain research* 644:343–346.
- Teppen TL, Krishnan HR, Zhang H, Sakharkar AJ, Pandey SC (2016) The Potential Role of Amygdaloid MicroRNA-494 in Alcohol-Induced Anxiolysis. *Biological psychiatry* 80:711–719.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Freneau RT, Jr., Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7491–7495.
- Tollefson GD, Montague-Clouse J, Tollefson SL (1992) Treatment of comorbid generalized anxiety in a recently detoxified alcoholic population with a selective serotonergic drug (buspirone). *Journal of clinical psychopharmacology* 12:19–26.
- Tominaga K, Shibata S, Watanabe S (1992) A neuroprotective effect of adenosine A1-receptor agonists on ischemia-induced decrease in 2-deoxyglucose uptake in rat hippocampal slices. *Neuroscience letters* 145:67–70.
- Troutwine BR, Ghezzi A, Pietrzykowski AZ, Atkinson NS (2016) Alcohol resistance in *Drosophila* is modulated by the Toll innate immune pathway. *Genes, brain, and*

behavior 15:382–394.

Wachtel SR, Hu XT, Galloway MP, White FJ (1989) D1 dopamine receptor stimulation enables the postsynaptic, but not autoreceptor, effects of D2 dopamine agonists in nigrostriatal and mesoaccumbens dopamine systems. *Synapse* 4:327–346.

Walsh JP (1993) Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons. *Brain research* 608:123–128.

Walsh JP, Dunia R (1993) Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors induces short-term potentiation at excitatory synapses in the striatum of the rat. *Neuroscience* 57:241–248.

Wamsley JK, Gehlert DR, Filloux FM, Dawson TM (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 2:119–137.

Weinberger J, Nieves-Rosa J, Cohen G (1985) Nerve terminal damage in cerebral ischemia: protective effect of alpha-methyl-para-tyrosine. *Stroke* 16:864–870.

Wickens J. R., Begg A. J. and Arbuthnott G.W. (1996) Dopamine reverses the depression of rat corticostriatal synapses which normally follows high-frequency stimulation of cortex *in vitro*. *Neuroscience* 70, 1–5.

Williams D, McBride AJ (1998) The drug treatment of alcohol withdrawal symptoms: a systematic review. *Alcohol Alcohol* 33:103–115.

Wuerthele SE, Yasuda RP, Freed WJ, Hoffer BJ (1982) The effect of local application of homocysteine on neuronal activity in the central nervous system of the rat. *Life sciences* 31:2683–2691.

Yamagata K, Andreasson KI, Sugiura H, Maru E, Dominique M, Irie Y, Miki N, Hayashi

- Y, Yoshioka M, Kaneko K, Kato H, Worley PF (1999) Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J Biol Chem* 274:19473-19479.
- Yamamoto Y, Nakanishi H, Takai N, Shimazoe T, Watanabe S, Kita H (1999) Expression of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation in the neostriatal neurons in an *in vitro* slice after ethanol withdrawal of the rat. *Neuroscience* 91:59-68.
- Yamamoto Y, Shibata S, Hara C, Watanabe S (1995) Methylcobalamin attenuates the hypoxia/hypoglycemia- or glutamate-induced reduction in hippocampal fiber spikes *in vitro*. *European Journal of Pharmacology* 281 335-340
- Yamamoto Y, Tanaka T, Shibata S, Watanabe S (1994) Involvement of D 1 dopamine receptor mechanism in ischemia-induced impairment of CA1 presynaptic fiber spikes in rat hippocampal slices. *Brain Research* 665:151-154
- Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K (2007) Activity-induced protocadherin arcadlin regulates dendritic spine number by triggering N-cadherin endocytosis via TAO2beta and p38 MAP kinases. *Neuron* 56:456-471.
- Yustein JT, Xia L, Kahlenburg JM, Robinson D, Templeton D, Kung HJ (2003) Comparative studies of a new subfamily of human Ste20-like kinases: homodimerization, subcellular localization, and selective activation of MKK3 and p38. *Oncogene* 22:6129-6141.
- Zindel LR, Kranzler HR (2014) Pharmacotherapy of alcohol use disorders: seventy-five years of progress. *Journal of studies on alcohol and drugs Supplement* 75 Suppl

17:79-88.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対し終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻深水昭吉教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の計画進行にあたり、多大なる御援助と御指導を賜りました生命環境科学研究科生物機能科学専攻長、田中俊之教授に深謝いたします。併せて本研究に対し、多大な御協力をいただきましたその他生物機能科学専攻の諸氏に感謝いたします。