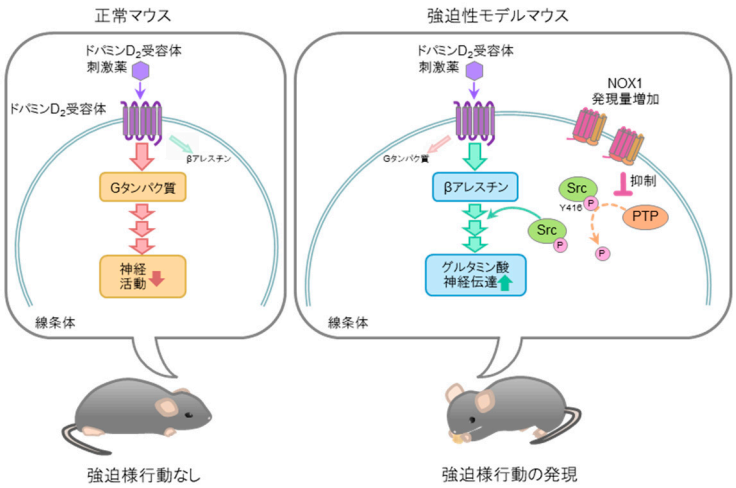
229　強迫的意思決定に着目したアルコール依存症治療法開発	浅岡　希美

【目的】アルコール依存症は、飲酒行動に対して自己コントロールが失われた状態と定義され、アルコール過量摂取による中毒症状のみならず、高血圧、糖尿病、認知症などの多種多様な生活習慣病発症の深刻なリスク因子となる。しかし、アルコール依存症の直接的な治療薬は存在せず、認知行動療法などの心理社会的治療が一般的であるが再発率は非常に高く、有効な治療法の開発が切望されている。こうした、治療の困難さや再発率の高さには精神依存の形成が関与しており、飲酒をやめたくても自らの意志では止めることができない、『強迫性』はその主要な要素となっている。強迫性の発現には、ドパミン神経系、特に、ドパミン D_2 受容体のシグナル異常の関与が示唆されているが、ドパミンシグナル異常が強迫性を引き起こすメカニズムは依然として未解明である。一方で、我々は活性酸素産生酵素の 1 種である NADPH オキシダーゼ 1（NOX1）が様々な神経機能異常に関与することを報告してきた。中枢神経系においても、ドパミンシグナルの異常が関与するうつ病の病態モデル動物において、NOX1 の発現亢進が快情動の消失などのうつ病様症状の発現に寄与していることを報告していることから、NOX1 はドパミン神経系の異常に起因するその他の中枢神経症状の発現にも関与することが示唆される。そこで、本研究では、アルコール依存症をはじめ、強迫性を呈する疾患に共通するドパミン D_2 受容体のシグナル異常を模した、独自の強迫性モデルマウスを用いて、強迫症状が発現する神経メカニズム、および NOX1 の関与について、検討を行った。

【方法】強迫性モデルマウスは、マウスにドパミン D_2 受容体のアゴニストである quinpirole（1 mg/kg）を毎日腹腔内投与することによって作製し、7〜12 回の投与を受けたマウスを強迫性モデルマウスとして実験に使用した。強迫性は飼育ケージにおける自発的行動や T 字迷路を用いた逆転学習試験により評価した。電気生理学的検討には、quinpirole を 8 回投与したマウスを用い、最後の投与の翌日に、線条体や眼窩前頭皮質を含む急性単離切片を作製して whole-cell patch-clamp 法による記録を行った。

【結果】*Nox1* ノックアウトマウスや NOX1 阻害薬の急性投与により、quinpirole 反復投与による強迫様行動が有意に減弱した。また、強迫性モデルマウス線条体中央部において、*Nox1* 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。電気生理学的検討から、強迫性モデルマウスでは、D2 受容体刺激時に線条体中央部の間接路中型有棘神経において、興奮性シナプスの長期増強が引き起こされており、この現象には、NOX1、および β アレスチンを介したシグナルが関与することを見出した。以上の結果から、*Nox1* 発現上昇に起因する、線条体におけるドパミンシグナル異常が依存症における強迫性発現に関与することが明らかとなり、アルコール依存症を始めとする様々な依存症への新規治療標的として NOX1 が有望である可能性が示唆された。

研究成果の概念図



229. 強迫的意思決定に着目したアルコール依存症治療法開発

浅岡　希美

*京都府立医科大学 大学院医学研究科 病態分子薬理学教室

Key words：依存症，強迫性，線条体，ドパミン，活性酸素

緒　言

アルコール依存症は、飲酒に対する自己コントロールが失われた状態と定義され、アルコール中毒症状のみならず、多種多様な生活習慣病発症の深刻なリスク因子となる。アルコール依存症の直接的治療薬は存在せず、心理社会的治療が一般的であるが再発率は非常に高く、有効な治療法の開発が切望されている。こうした治療の困難さや再発率の高さには精神依存の形成が関与しており、理性的な抑制が効かずに飲酒行動に『駆り立てられる』状態となる。こうした『強迫性（Compulsivity）』は、アルコール依存症に特異的なものではなく、他の依存症や、強迫性障害、神経性過食症といった精神疾患に共通し、行動の反復や物事への固執を引き起こす要因となっており、共通の神経機構の存在が示唆されている［1］。中でも、ドパミン神経系、特にドパミン D_2受容体のシグナル異常は、上記の疾患患者に共通して報告されている神経機能異常であるが、ドパミンシグナル異常が強迫性を引き起こすメカニズムは依然として未解明である。

一方で、我々は活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼ 1（NOX1）が様々な神経機能異常に関与することを報告してきた。NOX1 の遺伝子発現は正常状態では非常に低いものの、多くの疾患状態で発現量が著しく増加し、産生された活性酸素種が病態の増悪に関与することを見出している。中枢神経系においても、ドパミンシグナルの異常が関与するうつ病の病態モデル動物において、NOX1 の発現亢進が快情動の消失などのうつ病様症状の発現に寄与していることを報告している［2］。こうした知見より、NOX1 はドパミン神経系の以上に起因するその他の中枢神経症状に関しても、その発現に関与することが示唆される。

そこで本研究ではアルコール依存症をはじめ、強迫性を呈する疾患に共通するドパミン D_2受容体のシグナル異常を模した独自の強迫性モデルマウスを用いて、強迫症状の神経メカニズムおよび NOX1 の関与について検討を行った［3］。

方　法

1. 動物実験

実験には、6～24 週齢の雄性 C57BL/6J マウス、および、C57BL/6J バックグラウンドの *Nox1* 欠損マウスを使用した。強迫性モデルマウスは、マウスにドパミン D_2受容体のアゴニストである quinpirole（QNP：1 mg/kg）を毎日腹腔内投与することによって作製し、7～12 回の投与を受けたマウスを強迫性モデルマウスとして実験に使用した。

2. 強迫様行動の評価

強迫的な反復行動は、QNP 投与後のマウスを飼育ケージに戻し、投与 20～30 分後の自発的行動を観察することで評価した。固執性の評価には、T 字型迷路を使用した左右弁別学習とその逆転学習試験を行った。

3. 電気生理学的検討

電気生理学的検討には、QNP を 8 回投与したマウスを用い、最後の QNP 投与の翌日に、線条体や眼窩前頭皮質を含む急性単離切片を作製して whole-cell patch-clamp 法による記録を行った。

4. 統計解析

統計検定は Prism8 ソフトフェアを用いて行い、P 値が 0.05 を下回る場合、統計的に有意な差があるとみなした。

*現在の所属：京都大学 大学院医学研究科 システム神経薬理学分野

結果および考察

1. NOX1 は D_2 受容体反復刺激による強迫性発現に関与する。

初めに、*Nox1* の欠損が強迫性モデルマウスの行動異常に与える影響を検討した。QNP 反復投与によるモデルマウスでは、QNP 投与初回では鎮静作用が強く表れる一方で強迫様行動は発現しないが、7 回以上の反復投与を行うことで鎮静作用が減弱し、代わりに反復行動や固執性といった強迫様行動が出現する［4］。*Nox1* 欠損マウスに QNP の反復投与を行ったところ、初回に現れる鎮静作用は野生型のマウスと同程度であったのに対し、反復行動は有意に減少した（図 1A）。また、野生型マウスで QNP の反復投与を行ったのち、反復行動の評価前にのみ、NOX1 阻害薬（ML171：50 mg/kg）を腹腔内投与しても、反復行動が有意に減弱することが明らかとなった（図 1B）。

また、強迫性モデルマウスが示す、もう一つの強迫様行動異常である固執性についても評価を行った。T 字型迷路を用いた左右弁別学習とその逆転学習において、QNP 投与を行っていない、無処置の *Nox1* 欠損マウスは、同じく無処置の野生型マウスと同程度の試験成績を示したことから、*Nox1* 欠損自体は学習や固執性の発現に影響しないことが示唆された（図 1C）。一方で、QNP 反復投与を行った野生型マウスでは、逆転学習時の正答率の上昇が遅延するが、*Nox1* 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して有意に逆転学習時の正答率が改善された（図 1D）。

こうした結果より、NOX1 は D2 受容体の反復刺激に起因する強迫様行動に関与することが示唆された。

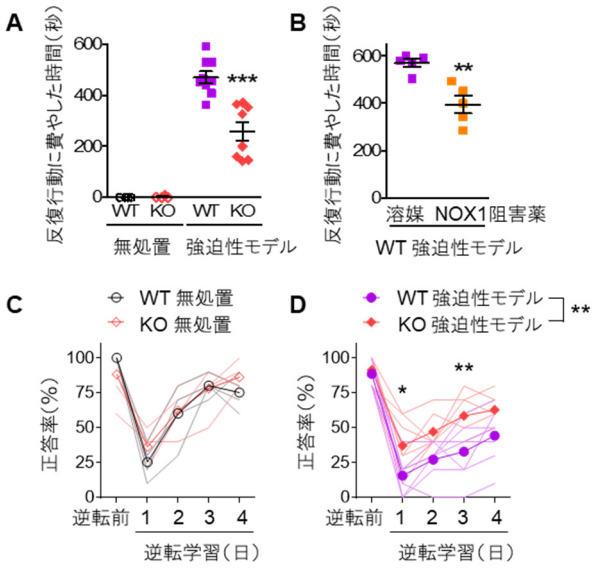


図 1. 強迫様行動への NOX1 の関与

A） 野生型（WT）および *Nox1* 欠損マウス（KO）における反復行動。N＝4～9、***P＜0.001 vs. WT 強迫性モデル（one-way ANOVA 及び Tukey's multiple comparison test）。

B） NOX1 阻害薬（ML171）腹腔内投与の反復行動への影響。N＝5、**P＜0.005 (unpaired t-test with Welch's correction)。

C、D） 野生型（WT）および *Nox1* 欠損マウス（KO）における逆転学習試験。N＝4～7；*P＜0.05、**P＜0.01（two-way repeated measures ANOVA 及び Bonferroni post-test）。

2. D_2 受容体反復刺激により線条体中央部の *Nox1* 遺伝子発現が亢進する。

依存症患者などの脳画像研究より、強迫性への関与が示唆される脳領域が明らかとされつつある。そこで、こうした

脳領域のうち、NOX1 の関与が強い脳領域を検討するため、*Nox1* 遺伝子発現量の検討を行った。強迫性への関与が示唆される脳領域（眼窩前頭皮質（OFC）、背側線条体（DS）、線条体中央部（CS）、視床、海馬、腹側被蓋野）のうち、Nox1 の発現は DS と CS で有意に高く、その他の領域と比較して 10～70 倍高い発現量を示した（図 2A）。こうした、領域間での明らかな発現量の偏りは、同じ活性酸素産生酵素である NOX2 や NOX4 では認められなかった。

Nox1 は様々な疾患状態において、発現誘導が起こることがこれまでの検討より示唆されているため、QNP 反復投与による強迫性モデルマウスの DS や CS において *Nox1* 遺伝子が発現誘導されるか否かに関しても検討を行った。すると、DS においては、野生型とモデルマウスとの間で有意な *Nox1* 遺伝子の発現変動は見られなかった一方で、CS では、モデルマウスにおいて、有意に *Nox1* 遺伝子の発現誘導が起こっていることが明らかとなった（図 2B、C）。

以上の結果より、D_2受容体の反復刺激は、CS において *Nox1* 遺伝子の発現を更新させることで強迫様の行動異常の発現に寄与していることが示唆された。

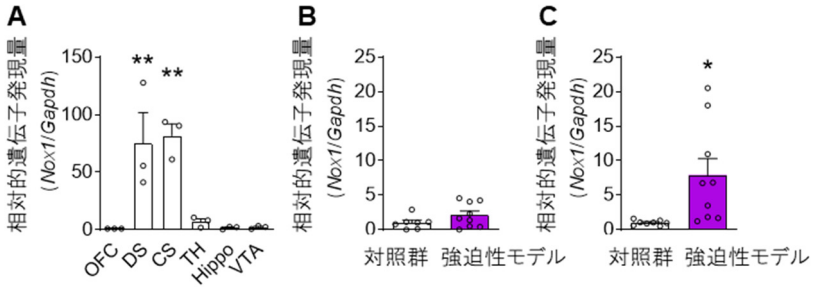


図 2. 強迫性に関連する脳領域における *Nox1* 遺伝子発現量

A） 各脳領域の Nox1 遺伝子発現量。（OFC : 眼窩前頭皮質、DS : 背側線条体、CS : 線条体中央部、TH : 視床、Hippo : 海馬、VTA : 腹側被蓋野）値は OFC を 1 とした時の相対値。N＝3、**P＜0.01 vs. OFC（one-way ANOVA 及び Tukey's multiple comparison test）。

B、C） 強迫性モデルマウスの DS および CS における Nox1 遺伝子発現量。N＝7～9、*P＜0.05 (Student's t-test (B) 及び unpaired t-test with Welch's correction (C))。

3. D_2受容体反復刺激により線条体中央部で NOX1 依存的に興奮性シナプス増強が引き起こされる。

臨床、基礎研究の両面において、OFC - 線条体経路は強迫性に関与する神経経路として知られている。そこで、強迫性モデルマウスの CS における神経機能異常とそれに対する NOX1 の関与について、電気生理学的な検討を行った。

以前の検討より、強迫性モデルマウスでは CS の iMSN において測定中に QNP による D_2受容体の追加刺激を行った際に、興奮性入力の指標である AMPA／NMDA 比が有意に増大し、興奮性シナプスが増強することを見出している。そこで、この D_2受容体の追加刺激によるシナプス増強における NOX1 の関与を検討した。追加刺激前は、QNP 反復投与の有無や遺伝子型による AMPA／NMDA 比の有意な差は認められなかった。一方、追加刺激後では、QNP 無処置のマウス由来の iMSN の AMPA／NMDA 比は、野生型、*Nox1* 欠損マウスともに変動しなかったのに対し、野生型の強迫性モデルマウス由来の iMSN では AMPA／NMDA 比の有意な増大が認められた。*Nox1* 欠損の強迫性モデルマウス由来の iMSN では、AMPA／NMDA 比の有意な変動は認められなかった（図 3A、B）。また、野生型のモデルマウス由来の iMSN でも、NOX1 阻害薬 ML171 を添加した状態では、追加刺激による AMPA／NMDA 比の上昇が認められなくなった。一方で、CS に存在するもう 1 つの中型有棘細胞である dMSN においては、QNP 添加による AMPA／NMDA 比の変動もすべての群で認められなかった（図 3C）。以上の結果より、強迫性モデルマウス由来の iMSN では、D_2受容体シグナルを介した興奮性シナプス増強が起こっており、その誘導には NOX1 が必要であることが示唆された。

D_2受容体は、Gi/o 共役型の GPCR であり、多くの神経細胞においてそのシグナルは神経活動を抑制することが知ら

れている。無処置の野生型マウス由来の iMSN で AMPA／NMDA 比の上昇が認められなかった点と合わせて考えると、Gi/o タンパク質由来の細胞内シグナルを介して、モデルマウス由来の iMSN で認められた AMPA／NMDA 比の上昇が起こったとは考えにくい。そこで、GPCR の内在化と、G タンパク質とは別種の細胞内シグナルの誘導に関与することが知られている、βアレスチンを介したシグナルの関与について検討を行った。この検討では、D_2受容体のアゴニストとして機能するが、G タンパク質のシグナルを流しにくく、βアレスチンを介したシグナルが流れやすいといった特性を持つ、バイアスドアゴニスト（UNC9994）を QNP の代わりに測定液に添加して先ほどと同様の検討を行った。その結果、QNP による追加刺激と同様に、野生型の強迫性モデルマウス由来の iMSN では UNC9994 の処置により AMPA／NMDA 比の有意な増大が認められた。一方で、*Nox1* 欠損の強迫性モデルマウス由来の iMSN では、測定液に UNC9994 を添加しても、AMPA／NMDA 比の有意な変動は認められなかった。

以上の結果より、強迫性モデルマウス由来の iMSN では、D_2受容体刺激時にβアレスチンシグナルを介した興奮性シナプス増強が起こっており、その誘導には NOX1 が必要であることが示唆された。

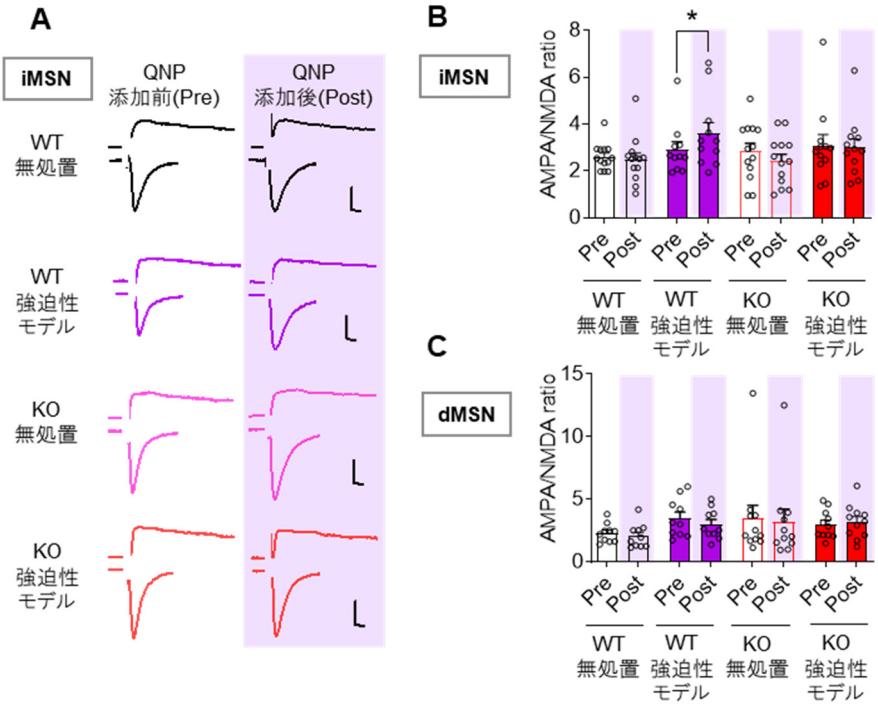


図 3. D_2受容体刺激時の CS 神経細胞における AMPA／NMDA 比の変動

A） CS の iMSN における AMPA/NMDA 比記録の代表例。

B、C） CS における iMSN（B）および dMSN（C）の AMPA/NMDA 比の変動。N＝10～13、*P＜0.05（three-way repeated measures ANOVA 及び Sidak's multiple comparisons test）。

4. NOX1 は D2 受容体反復刺激による活性化型 Src キナーゼの集積が必要である。

先述の通り、βアレスチンシグナルには、Src キナーゼ活性が必要である。Src キナーゼの活性化には、チロシン残基のリン酸化が必要であるため、NOX1 による PTP の抑制は、結果として活性型 Src キナーゼ量に影響を与える可能性がある。そこで、ウエスタンブロッティング法により、活性型 Src キナーゼ量を評価した。野生型および *Nox1* ノックアウトの強迫性モデルマウスに QNP および溶媒を投与し、回収した CS サンプル中の活性型 Src キナーゼ／総 Src キナーゼの割合を比較したところ、野生型においては、溶媒投与群と比較して QNP 投与群では活性型 Src キナーゼが有意に増加していることが明らかとなった。一方で、*Nox1* ノックアウトマウス由来のサンプルでは、溶媒投与群と QNP

投与群との間に有意な差は認められなかった（図 4）。こうした結果より、野生型の強迫性モデルマウスでは、NOX1 由来の活性酸素による PTP 抑制が起こっており、D_2受容体の刺激時に活性型の Src キナーゼが集積しやすくなっていることが示唆され、その結果、βアレスチンを介したシグナルが増強されていると考えられる。

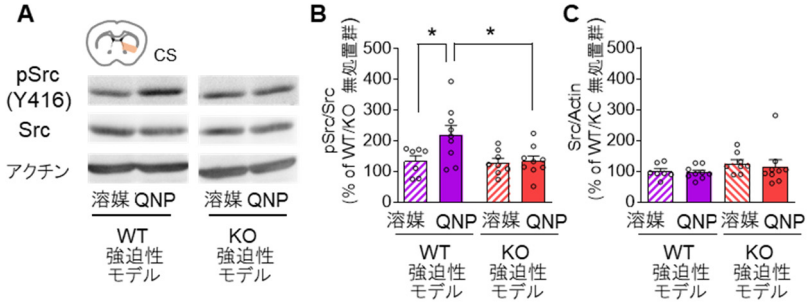


図 4. D_2受容体刺激時の CS における活性化型 Src キナーゼの集積

A）ウエスタンブロッティング像の代表例。

B、C）CS のリン酸化型 Src キナーゼ（pSrc：B）及び総 Src キナーゼ（Src：C）量の変動。各サンプルは溶媒または QNP の投与 5 分後に回収した。各値は各遺伝子型の無処置群の値を 100％とした値である。N＝7～9、*P＜0.05（two-way ANOVA 及び Bonferroni post-test）。

5. 線条体の NOX1 が D_2受容体反復刺激による強迫様行動の発現に関与する。

最後に、線条体の NOX1 がモデルマウスの強迫様行動の発現に寄与しているか否かを検討した。強迫性モデルマウスの線条体へ薬物局所投与用のインジェクションカニューレを留置し、反復行動試験の直前にβアレスチン阻害薬（barbadin）や NOX1/4 阻害薬（setanaxib）を局所投与したところ、反復行動は有意に減少した。また、NOX1 に対する miRNA を神経細胞選択的に発現させるアデノウイルスベクターを線条体内に投与した強迫性モデルマウスにおいて、反復行動の評価を行ったところ、コントロール miRNA を発現させた群と比較して、反復行動に費やす時間が有意に減少した（図 5A）。同じく、線条体の神経細胞選択的に *Nox1* をノックダウンした強迫性モデルマウスにおいて、逆転学習試験の正答率を比較したところ、こちらも、*Nox1* ノックダウン群において有意な正答率の改善が認められた（図 5B）。以上の結果より、線条体の NOX1 が D_2受容体の反復刺激時の強迫様行動に関与することが明らかとなった。

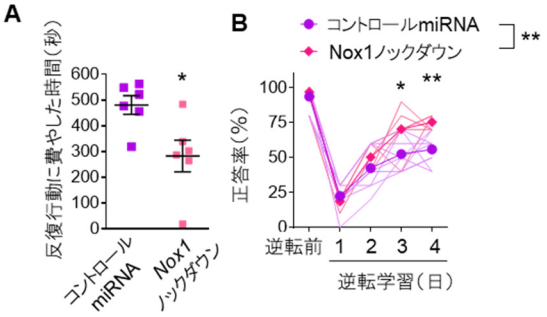


図 5. 線条体神経選択的 *Nox1* 欠損による強迫様行動の改善

A） 線条体神経選択的 *Nox1* 欠損による反復行動の改善。N＝6、*P＜0.05（Student's t-test）。

B） 線条体神経選択的 *Nox1* ノックダウンによる逆転学習試験の正答率の改善。N＝6～9；*P＜0.05、**P＜0.01（two-way repeated measures ANOVA 及び Bonferroni post-test）。

以上、本研究結果より、D_2受容体が繰り返し刺激されることで、CS における D_2受容体刺激時のシグナルが G タンパク質を介したものからβアレスチンを介したシグナルへと変動していることが明らかとなった。こうしたシグナルの変動には CS における NOX1 の発現亢進と NOX1 由来活性酸素による PTP の抑制、それに伴う、D_2受容体刺激時の活性化型 Src キナーゼの集積が関与していることが示唆される。また、強迫性モデルマウスの作製後であっても NOX1 阻害薬の単回投与や処置によって、強迫様行動や iMSN におけるシナプス増強が改善したことから、NOX1 阻害は依存症における強迫性における新規の創薬ターゲットとなることが示唆される。

文　献

1） Robbins TW, Vaghi MM, Banca P. Obsessive-Compulsive Disorder: Puzzles and Prospects. Neuron. 2019 Apr 3;102(1):27-47. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.046. PMID: 30946823.

2） Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T, Yabe-Nishimura C. Depressive-Like Behaviors Are Regulated by NOX1/NADPH Oxidase by Redox Modification of NMDA Receptor 1. J Neurosci. 2017 Apr 12;37(15):4200-4212. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2988-16.2017. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28314819

3） Asaoka N, Ibi M, Hatakama H, Nagaoka K, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Kaneko S, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH Oxidase Promotes Synaptic Facilitation Induced by Repeated D2 Receptor Stimulation: Involvement in Behavioral Repetition. J Neurosci. 2021 Mar 24;41(12):2780-2794. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2121-20.2021. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33563722.

4） Asaoka N, Nishitani N, Kinoshita H, Nagai Y, Hatakama H, Nagayasu K, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. An Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis. eNeuro. 2019 Feb 27;6(1):ENEURO.0366-18.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0366-18.2019. PMID: 30834304.