



報道機関 各位

2023 年 4 月 5 日
学校法人 国際医療福祉大学

覚醒剤による脳神経変化の時期を毛 1 本から検出することに成功

研究成果のポイント

- ・覚せい剤の服用は生体に投与を予知させる神経回路を出現させるが、その効果をヒゲ 1 本のサンプルから検出することに成功した。
- ・この予知行動リズムは毛の時計遺伝子 *Period 1 (Per 1)* の発現変化により検出でき、今後の覚せい剤関連研究に大きく貢献できる。

研究成果の概要

毎日一定時刻にマウスやラットに覚醒剤を投与すると、投与の数時間前から活動量が増加し、体が何時に覚醒剤を投与されていることを予知しているような予知行動リズムが誘発される。予知行動は覚醒剤投与により脳内に新たな神経回路が形成され発現すると考えられ、覚醒剤の脳神経に作用する機構解明にもつながる。予知行動形成には時計遺伝子の発現誘導が伴うことが報告されているが詳細な機構は明らかとなっていない。今回、簡易的かつ非侵襲的に予知行動形成を毛 1 本から解析する計測システムを開発し、予知行動形成時期は毛の時計遺伝子 *Period1 (Per1)* 発現変化で検出でき、覚醒剤投与 3 日目に形成されることを明らかにしました。今後、覚醒剤による予知行動形成機構および覚醒剤関連研究に大きく貢献できる可能性が考えられます。この研究成果は国際医療福祉大学薬学部の浜田俊幸 准教授が中心となって実施し、*cells* 誌に発表されました。

論文発表の概要

研究論文名：

Analysis of the Anticipatory Behavior Formation Mechanism Induced by Methamphetamine Using a Single Hair (毛 1 本をもちいたメタンフェタミン投与により誘発される予知行動形成機構の解析)

著者, 所属 : Sato R¹, Kanai M¹, Yoshida Y¹, Fukushima S¹, Nogami M¹, Yamaguchi T¹, Iijima N¹, Sutherland K², Haga S², Ozaki M², Hamada K¹, Hamada T^{1,2,3} (佐藤璃育¹, 金井恩熙¹, 吉田幸那¹, 福島汐里¹, 野上将太¹, 山口剛史¹, 飯島典生¹, ケネス・リー・サザーランド², 芳賀早苗², 尾崎倫孝², 浜田和子¹, 浜田俊幸^{1,2}, ¹国際医療福祉大学、²北海道大学)

公表雑誌 : *cells* 12(4), 654, 2023

(背景)

覚醒剤メタンフェタミン(MAP)を毎日一定時刻に投与すると、投与の数時間前から行動が活発になる予知行動¹が出現する。MAP 投与休止後の継続性から脳内に神経回路が形成されたことが考えられる。予知行動形成には、線条体などの組織で *Perio1*(*Per1*) 発現が MAP 投与により惹起され発現リズムの位相変化がともなうことが報告されているが、予知行動を誘発する神経回路がいつ形成されるかは不明である。本研究では毛 1 本から簡易かつ非侵襲的に時計遺伝子発現変化をとらえる実験系を確立し、MAP 投与から神経回路がいつ形成されるか検討した。

(研究手法)

我々は、時計遺伝子 *Period1* (*Per1*) プロモーターと *luciferase* (*luc*) 遺伝子を連結したものをもつ *Per1-luc* トランスジェニックマウスをもちいて糖尿病の発症時期および重篤化のステージ判定が、毛の *Per1* 発現計測で可能であること報告している (Hamada et al., BBRC, 2021)。糖尿病を誘発するストレプトゾトシン(STZ)を単回腹腔内投与した時に、 μ PMT²をもちいて頭毛とひげの *Per1* 遺伝子発現が変化³する過程を調べることで糖尿病未病段階、発症初期段階、重篤化を判定できる。今回、本システムをもちいて、一定時刻(am11 時: ZT3)に MAP 投与し投与時刻に生体リズムが同調する過程において 毛 1 本から生物発光計測⁴を利用し、簡易かつ非侵襲的に時計遺伝子発現変化をとらえる実験系を確立し、MAP 投与から神経回路がいつ形成されるか検討した。同時に赤外線センサーにより睡眠行動リズムを計測した。

(結果)

MAP 投与後、予知行動リズムが発現し、その後 MAP の投与無しの時期にも観測された¹。頭毛およびひげの毛囊付近に *Per1* 遺伝子が、強く発現していることを免疫組織学的に確認した後、発現量の定量を生物発光計測で行った。サンプリングした頭毛およびひげの細胞抽出液からそれぞれ MAP 投与 4 日後、3 日後で *Per1* 遺伝子発現有意な上昇を検出できた。さらにひげ 1 本をサンプリングして直接計測する直接法も確立した。形成された予知行動リズムは MAP 投与中止後少なくとも 9 日間継続した。

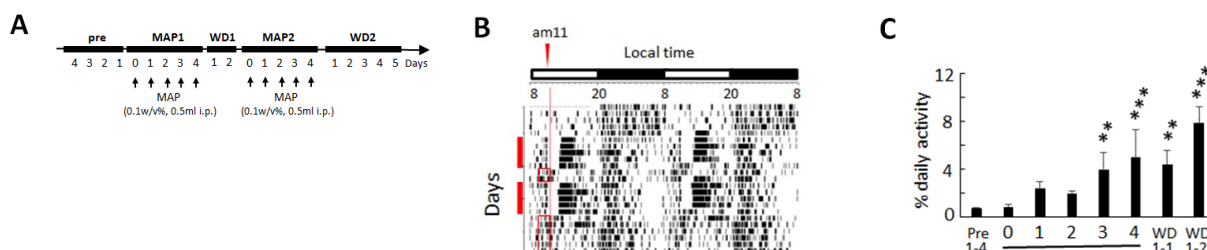
(考察)

MAP 投与による予知行動形成機構を毛 1 本から解析するシステム構築に成功した。*Per1* 発現の結果より神経回路形成は MAP 投与から 3 日で形成される可能性が考えられた。またサンプリングから 5 分で解析できる直接法は、毛を利用した様々な疾患発症解明研究に応用できるものと考えられる。

[用語説明]

1. メタンフェタミン投与による予知行動形成 (Sato et al., cells, 2023)

メタンフェタミンを図 A のスケジュールで am11 時に投与した行動リズムを図 B に示す。メタンフェタミン投与前は活動量が夜高く、昼低い活動リズムがみられる。メタンフェタミン投与後は活動量増加が、投与後 6 時間ほど続き、昼活動量が高く、夜低い活動リズムに変化する。しかしながらこの活動量増加はメタンフェタミン投与を休止すると消失するため、メタンフェタミン直接作用によるものと考えられる。対照的にメタンフェタミンの投与を続けると、投与時刻の am11 時より数時間前に活動量が増加し、メタンフェタミンの投与を休止しても活動量の増加は誘発され、少なくとも 9 日間には継続する (図 B の赤口部位)。1 日の総活動量に対する am9-11 時の活動量 (%) を図 C に示す。メタンフェタミン投与 3 日目から有意に活動量が増加する。メタンフェタミン投与休止からの行動量の増加の継続性とメタンフェタミンの血中半減期を考慮すると、メタンフェタミン投与による予知行動形成には、脳内に新たな神経回路などの形成が関与している可能性が考えられる。



メタンフェタミン投与による予知行動形成

- A メタンフェタミン(MAP)投与スケジュール メタンフェタミンはam11時に腹腔内投与している。投与初日をday0としている。
Pre:メタンフェタミン投与前、MAP1, MAP2:メタンフェタミン投与、WD1, WD2:メタンフェタミン投与無
- B 12時間明、12時間暗の明暗サイクル (am8時にライトON, pm20時にライトOFF) 条件下でのダブルプロット行動リズム (赤外線センサーにより計測) を示し、横軸は連続した日の時刻を、縦軸は日を表す。縦軸の赤棒部位にメタンフェタミンを投与している。黒い部位はマウスが活動していることを示す。メタンフェタミン投与時刻であるam11時から活動量が増加している。活動量増加はメタンフェタミン投与無しの場合も発現する (赤色口)。
- C メタンフェタミン投与による予知行動形成。1日の総活動量に対するam9-11の2時間の活動量を%で示している。

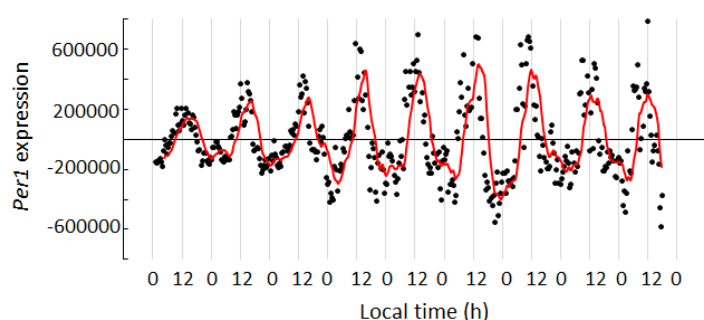
2. 世界最少光電子増倍管 (micro PMT: μ PMT, 浜松ホトニクス)

光電子増倍管は光センサーの中でも極めて高感度、高速応答な光検出器です。 μ PMT は、シリコン基板を 2 枚のガラス基板で挟み込んだ 3 層構造で構成されているため小型 PMT の形状をとることができる。1mmx4mm の光電面を介して光量を計測する。

我々は μ PMT をもちいて、*Per1* 遺伝子発現を *in vivo* 及び *in vitro* の実験で、計測することに成功している。

In vivo 計測: 自由行動マウスの背中皮膚における *Per1* 遺伝子発現リズム計測

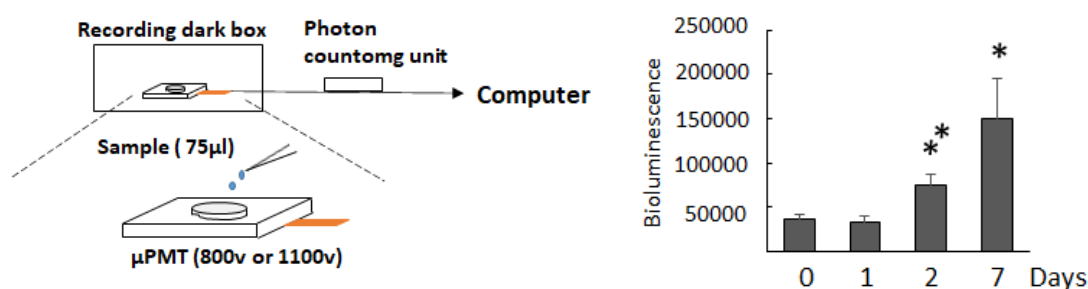
μ PMT をマウス皮下に移植し、*Per1* 遺伝子発現を自由行動しているマウスから計測したものを以下に示す。マウスの行動に影響を与えることなく長期間 *Per1* 遺伝子発現をリアルタイムに計測している (Hamada K et al., Biophys. Res. Commun. 577, 64-70. 2021)



In vitro 計測：マウス毛からの *Per1* 遺伝子発現計測

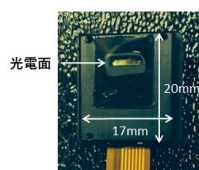
我々は毛の *Per1* 遺伝子発現を計測することで、糖尿病の進行度を検出することが可能であることを報告した (Hamada K et al., Biophys.Res.Comm. 577, 64–70. 2021)。左下図は μ PMT をもちいた毛の *Per1* 遺伝子発現計測システムを示している。毛からの細胞抽出液を μ PMT 光電面にのせて *Per1* 遺伝子発現を計測した。

右下図は μ PMT によるヒゲ 1 本からの *Per1* 遺伝子発現を定量化したものを示す。糖尿病誘発薬ストレプトゾシン(STZ)を投与した日を day0 としている。Day2 は血糖値が 400mg/dl 付近になり糖尿病を発症する時期である。ひげの *Per1* 発現は糖尿病発症時期に増加する。

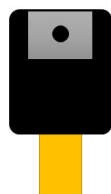


3. *Per1* 遺伝子発現解析によるメタンフェタミン投与による予知行動形成機構の解析

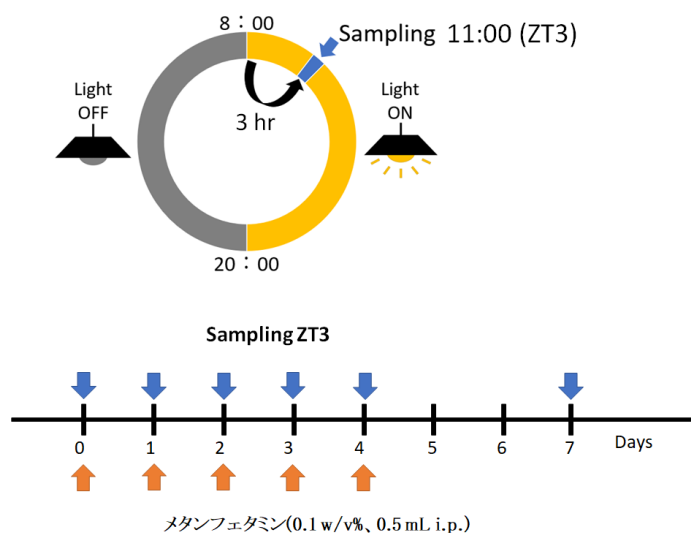
A



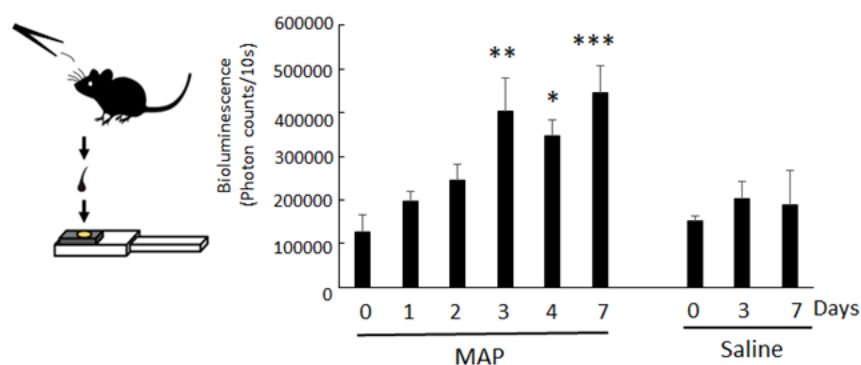
B



C



D



μPMTを用いた毛の*Per1*遺伝子発現の解析

- A μPMT (H12400-00-21, 浜松ホトニクス)。
- B 本研究に使用したμPMT。AのμPMT光電面上に丸穴をもつものを取り付けた。サンプリングした毛（あるいは細胞抽出液）を入れ、*Per1*遺伝子発現量を計測した。
- C メタンフェタミン投与と毛サンプリングスケジュール。毛のサンプリングはメタンフェタミン投与直前に行った。
- D サンプリングした毛を直接計測する直接法による*Per1*遺伝子発現計測。
メタンフェタミン投与3日目に有意な発現上昇が検出された。

4. 生物発光計測

ホタルの光に代表される生物発光を用いた計測手法。ルシフェラーゼ（発光酵素）と発光基質ルシフェリンによる反応により発光が生じる。

国際医療福祉大学

「『共に生きる社会』の実現」を建学の精神とし、1995年に栃木県大田原市に国内初の医療福祉の総合大学として開学。現在、大田原市、千葉県成田市、東京都港区、神奈川県小田原市、福岡県大川市の5キャンパスに10学部26学科を持ち、大学院生を含め約1万人の学生が学んでいます。これまでに約3万2000人の卒業生を輩出し、高い国家試験合格率や就職率で日本屈指の実績を挙げてきております。2017年4月、千葉県成田市に医学部を新設。1 学年140人のうち20人が留学生であることや1、2年次の大半の科目で英語授業を実施するなど、これまでにない革新的な医学教育を行い、国内外で活躍できる総合診療能力を持った医師を育成しています。今年3月に1期生が卒業し、同月に発表された医師国家試験で留学生15人を含む124人が合格。大学別の合格率は99.2%で全国2位となりました。

■本件についてのお問い合わせ先■

国際医療福祉大学 東京事務所 広報部

担当：赤津

TEL：03-5574-3828

E-mail：press@iuhw.ac.jp

国際医療福祉大学 薬学部 年齢軸生命機能解析学分野准教授

浜田 俊幸（はまだ としゆき）

TEL：0287-24-3481

E-mail：toshi-ha@iuhw.ac.jp