

## メタンフェタミン投与に伴う脳内 DNA メチラーゼ mRNA の変化

主任研究者 佐藤光源 (東北大学医学部精神医学教室教授)  
研究協力者 沈 昊偉、戸田 重誠、吉田 寿美子、沼知陽太郎  
(東北大学医学部精神医学教室)

**研究要旨** 覚せい剤の長期乱用は、精神分裂病に酷似した幻覚、妄想を伴う精神病状態(覚せい剤精神病)を引き起こす。覚せい剤精神病の経過上の特徴は、覚せい剤の長期乱用中に生じた精神病エピソードへの逆耐性現象(以下逆耐性と略)として理解され、動物に覚せい剤を反復投与した際に観察される逆耐性は、精神病の成因を研究する重要な動物モデルとされている。逆耐性は長期持続性であり、その基盤には神経可塑性の変化が想定されており、コルチコステロンがそれに促進的に働くことが報告されている。

Fischer 344/N (F344), Lewis/N (LEW) 系は、覚せい剤への嗜好性、コカイン逆耐性への感受性やストレスへの視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) 反応性において、過敏性と抵抗性という対照的な特性をもつ遺伝的に均一な近交系ラットである。昨年度は、(1) MAP 反復投与及び拘束ストレス反復負荷による逆耐性の形成、及び(2) MAP 急性・慢性投与による脳内 GR, MR, heat shock protein (HSP) 90 mRNA 量の変化について検討した。その結果、実験(1)では、常同行動を指標とした MAP 逆耐性は LEW により早期に形成された。また、実験(2)では、1) MAP 反復投与による線条体 GR, MR mRNA 量の変化が両系統で相反し、F344 では有意に増加、LEW では有意に減少した。これは両系統で HPA axis 反応性の違いを反映するもので、線条体で GR, MR を介して発現調節を受ける何らかの遺伝子が、両系統間にみられる逆耐性形成の差の原因となっている可能性があり、コルチコステロンが逆耐性の形成を促進するものと考えた。

DNA (cytosine-5-)-methyltransferase (DNA メチラーゼ) は、DNA 鎖中の 5'-CG-3' 配列 (CpG アイランド) を認識し、シトシンの 5 位の炭素をメチル化する。CpG アイランドは主に調節領域に存在し、そのメチル化は下流に位置する遺伝子の発現に重要な役割を果たす。さらに DNA メチラーゼは、合成コルチコステロン投与ラットの肝臓で上昇し、コルチコステロンによって強力に発現調節を受けることも知られている。今年度は F344, LEW 両系統のラットを用いて、MAP 反復投与に伴う脳 DNA メチラーゼ mRNA の変化を検討した。その結果、MAP 反復投与により、尾状核、側坐核の両部位で、DNA メチラーゼ mRNA は F344 では有意に増加、LEW では有意に減少していた。これは GR, MR mRNA の挙動とほぼ一致した結果で、MAP 慢性投与に伴って、線条体 DNA メチル化及び下流の遺伝子の発現変化が F344 と Lewis では異なり、これが両系統の逆耐性感受性に関連する可能性があると考えた。

### [研究目的]

覚せい剤の長期乱用は、精神分裂病に酷似した幻覚、妄想を伴う精神病状態(覚せい剤精神病)を引き起こす。覚せい剤の使用中止や、治療によって精神病状態が消退した後も、覚せい剤の再使用や心理社会的ストレスによって容易に精神病状態が再発することや、発病には大きな個体差が存在することが知られている<sup>1,2,3</sup>。覚せい剤精神病の経過上の特徴は、覚せい剤の長期乱用中に生じた精神病エピソードへの逆耐性現象(以下逆耐性と略)として理解されている<sup>4,5</sup>。この逆耐性には、覚せい剤の急性薬理作用に対する増感現象だけでなく、反応内容の進行性の変化が含まれており、後者は乱用初期の非精神病性の反応

から次第に猜疑的、被害的となり幻覚妄想状態といった精神病性の反応に変化することを意味している。

動物に覚せい剤を反復投与した際に観察できる逆耐性は、覚せい剤精神病や精神分裂病でみられる精神病状態の脳内機序を研究する上で重要な動物モデルとされている。交雑系ラットである Sprague-Dawley (SD) 系ラットを母系統として、特徴的な性質を強めた遺伝的に同一な近交系ラットのうち、Fischer 344/N (F344), Lewis/N (LEW) 系は、覚せい剤を含めた依存性薬物への嗜好性<sup>6</sup>、コカイン逆耐性への感受性<sup>7</sup>、ストレスへの視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) 反応性<sup>8</sup>に對照的な性質を有することが報告されている。

一方覚せい剤精神病はストレスによって再燃（フラッシュバック）することが知られ、動物の逆耐性でも覚せい剤とストレスとの互換性が確認されている<sup>9)</sup>。ラットを一種のストレス環境である新奇な環境においた際のコルチコステロンの分泌の多寡と、アンフェタミン自己投与の獲得は相関すること<sup>10)</sup>や、副腎摘出でコルチコステロン分泌を抑制したラットではアンフェタミンによる移所運動量の増加が抑制されること<sup>11)</sup>から、中枢刺激薬の作用の一部はコルチコステロンを介している可能性がある。合成コルチコステロンの慢性投与がアンフェタミンへの過敏反応性をもたせること<sup>12,13)</sup>や、グルココルチコイド合成阻害剤によって、コカイン逆耐性の形成が阻止される<sup>14)</sup>ことも知られており、コルチコステロンが逆耐性の形成を促進する可能性が示唆されている。コルチコステロンは、グルココルチコイド受容体 (GR), ミネラルコルチコイド受容体 (MR) に結合し、これらの受容体が標的遺伝子の上流に存在する特異的な応答配列に結合し、転写制御因子として様々な生理活性を発揮することも明らかにされている。

昨年度は、(1) MAP 反復投与及び拘束ストレス反復負荷による逆耐性の形成、及び(2) MAP 急性・慢性投与による脳内 GR, MR mRNA 量の変化について検討した。その結果、実験(1)では、常同行動を指標とした MAP 逆耐性は LEW により早期に形成された。また、実験(2)では、MAP 反復投与による線条体 GR, MR mRNA 量が、F344 では有意に増加、LEW では有意に減少しているという結果を得た。これらの結果は、コルチコステロンによって、線条体で発現が変化するような何らかの遺伝子が、F344 と LEW の逆耐性感受性を調節していること示唆している。

今年度、コルチコステロン受容体を介して誘導され、細胞の長期持続性の機能変化をもたらす遺伝子の候補として、DNA メチラーゼに着目し、F344, LEW 両系統のラットを用いて、MAP 反復投与に伴う脳 DNA メチラーゼ mRNA の変化を検討した。

#### [研究方法]

##### 1. 動物

7週令の近交系 Fischer 344/N 系雄性ラット (110-130g, 船橋農場) と近交系 Lewis/N 系雄性ラット (205-220g, 船橋農場) を対象と

した。縦40cm、横35cm、高さ20cmの金網製ケージに3または2匹ずつ分け、温度24±1℃、湿度50±10%、明暗周期12時間(明期：午前8時～午後8時、暗期：午後8時～午前8時)のもとで、1週間の予備飼育を行った。薬物あるいは生理食塩水は午後5時～6時の間に投与した。実験実施以外は水と餌(製品名：F-2、船橋農場)は自由に与えた。1群は5～10匹として実験に供した。なお、本実験は東北大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

##### 2. 使用薬物

塩酸メタンフェタミン (ヒロポン, 大日本製薬, 大阪) を用いた。

##### 3. 常同行動の評価法

逆耐性形成を評価するための常同行動の観察はホームケージ内で行い、薬物または生理食塩水投与後30分に Creese and Iversen の常同行動評価法<sup>15)</sup>を用いて6段階評価を行った：0；眠っているか変化なし、1)；多動、2)；多動が優勢だが、突発的な臭いかぎ(sniffing)や後足立ち(rearing)を伴う、3)；例えばかごの中の固定した道筋に沿って臭いかぎをするような常同行動、4)；1カ所にとどまって臭いかぎや後足立ちをする常同行動、5)；1カ所での常同的行動で、かじったりなめたりする行動の突発を伴う、6)；持続的にかごの棒をかじったりなめたりする。

##### 4. 逆耐性モデル動物の作成及びノーザンブロットハイブリダイゼーション

F344 と LEW を各々3群(各群 n=8)に分けた。1群には MAP (4 mg/kg) を1日1回、明期に連続して21日間腹腔内投与した。1群には同等量の生理食塩水を1日1回、明期に連続して20日間腹腔内投与し、21日目に MAP (4mg/kg) を腹腔内投与した。残りの1群には対照群として同等量の生理食塩水を1日1回、明期に連続して21日間腹腔内投与した。全群のラットについて、最終投与後3時間後に断頭、氷上にて脳を採取し、尾状核、側坐核、海馬、小脳の4部位を速やかに分画した。RNA Zol B (TEL-TEST 社) を用いたチオシアン酸グアニジン法で全 RNA を抽出した。ホルムアルデヒド含有ゲルにて RNA を電気泳動した後に、ノーザンブロット法により、RNA をナイロンメンブレンフィルター (HyBond-N,

Amersham 社) にトランスファーした。このメンブレンを用いて、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法により DNA メチラーゼ mRNA の定量的解析をおこなった。ハイブリダイゼーションプローブとして、ラット DNA メチラーゼ、 $\beta$  アクチンの cDNA 断片 (各々、約 400bp) を用いた。Rediprime キット (Amersham 社), [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (Amersham 社) によるマルチプライム法でプローブを標識した。ハイブリダイゼーションシグナルの検出、定量には BAS-2000 イメージアナライザー (富士フィルム社) を用いた。DNA メチラーゼ mRNA の  $\beta$  アクチン mRNA に対するシグナル比をとり、これを統計学的な解析に用いた。

## 5. 統計処理

常同行動についてはマン-ホイットニーの U 検定を用い、その他の検討は分散分析を用い、 $P < 0.05$  を有意とした。

### [結果]

#### 1. 常同行動の逆耐性現象

F344 と LEW における MAP 反復投与による常同行動の変化は、昨年度の報告と同様に、F344, LEW は各々投与初日に比較し、MAP 投与 11 日目及び 2 日目から有意に常同行動評価得点が増加した。更に LEW は F344 に比較して 2 日目から 18 日目にかけて常同行動評価得点が高かった。しかし、LEW では 15 日目、F344 では 20 日目には評価得点 4 となり、最終的には両系統共に同じ定常状態に達した。

#### 2. DNA メチラーゼ mRNA の変化

MAP 投与後 3 時間の尾状核、側坐核での DNA メチラーゼ mRNA は、MAP 急性投与では両系統に変化は認められなかったが、反復投与により、F344 では有意に増加、LEW では有意に減少していた (Figure 1, 2)。海馬の DNA メチラーゼ mRNA は、MAP 急性投与によって F344 では有意に減少、LEW では有意に増加し、反復投与でも F344 では有意に減少していた (Figure 3)。小脳では急性投与によって F344 では有意に減少したのみであった (Figure 4)。

### [考察]

昨年度の結果に一致して、LEW は F344 に比較して、常同行動でみた逆耐性の形成が有意に早かった。これは、LEW はコカインによる移所運動でみた逆耐性を形成する

のに対し、F344 は形成しないという既報<sup>16)</sup>を支持する。LEW では 15 日、F344 では 20 日以降には常同行動がほぼ定常状態に達し、最終的には両系統の差異は認められなくなった。既報<sup>16)</sup>ではコカイン 7.5mg/kg を 5 日間のみ使用しており、今回の結果との差異は、投与薬物、薬物投与期間の違いに基づくものと思われる。

昨年度は、MAP 反復投与による線条体 GR, MR mRNA 量が、F344 では有意に増加、LEW では有意に減少しているという結果を得た。アンフェタミンは、SD ラットで用量依存性に血中コルチコステロン量を増加させる<sup>17)</sup>こと、新奇な環境、水泳、拘束などのストレスに対する HPA axis の反応性は、F344 で高く、LEW は低い<sup>18)</sup>ことから、MAP 反復投与によるコルチコステロン分泌刺激に対して、F344 では HPA axis を介した負のフィードバックが働き、コルチコステロンは最終的には減少、これが線条体 GR mRNA の増加、及び逆耐性形成遅延の原因となっていると推測した。これに対して LEW では、HPA axis のフィードバックが弱く、MAP 反復投与でコルチコステロンは増加し、線条体 GR mRNA が減少、逆耐性を速やかに形成するものと推察される。F344 はコカイン単独投与では逆耐性を形成せず、コルチゾールとコカインの併用投与で逆耐性を LEW と同様に形成する<sup>16)</sup>という報告、GR, MR は転写制御因子であることを考えると、線条体で GR, MR を介して発現調節を受けるような何らかの遺伝子が、F344 と LEW でみられる逆耐性形成の差の原因となっている可能性がある。

DNA メチラーゼは、DNA 鎖中の 5'-CG-3' 配列 (CpG アイランド) を特異的に認識して、シトシンの 5 位の炭素をメチル化する酵素である。多細胞生物では組織によってメチル化の程度が異なり、活性な遺伝子に比べ不活性な遺伝子ほど多くメチル化されている。CpG アイランドは主に調節領域に存在し、そのメチル化は下流に位置する遺伝子の発現調節に重要な役割を果たすと考えられている。

ラット肝 DNA のメチルシトシン量は、合成コルチコステロン投与後に増加することから、DNA メチラーゼはコルチコステロンで強く誘導されると考えられている<sup>19)</sup>。また、ラット脳神経細胞の核抽出液が DNA メチル化能を有することから、脳内に DNA メチラーゼが存在することが示唆されてい

る<sup>20)</sup>。DNAメチル化の変化をもたらす外来物質の例として、発癌物質のN-メチル-N-ニトロソウレア(MNU)をラットに腹腔内投与すると、DNAメチラーゼの活性がMNUによる発癌を生じやすい脳でのみ上昇し、MNUによる発癌を生じない肝臓では変化しないという報告がある<sup>21)</sup>。以上から、DNAメチラーゼは、コルチコステロン受容体を介して誘導され、脳神経を含めて細胞の長期持続性の機能変化をもたらす遺伝子と考えられる。

MAP反復投与によるラット脳DNAメチラーゼmRNA量の変化には系統差、部位差が認められた。尾状核、側坐核のDNAメチラーゼmRNAは、MAP反復投与でF344では有意に増加、LEWでは有意に減少と、MAP反復投与時の線条体GR、MR mRNA量の挙動と一致する変化を認めた。一方、海馬、小脳のDNAメチラーゼmRNAの変化は、必ずしも同部位のGR、MR mRNA量の変化とは一致しなかった。以上から、少なくとも尾状核、側坐核のDNAメチラーゼ遺伝子の転写調節に関しては、コルチコステロン受容体の関与が示唆された。今回の実験はmRNAレベルの検討なので、DNAメチラーゼの蛋白量、活性、あるいはDNAのメチル化がMAPで変化するかについて、更なる検討を要する。もし、DNAのメチル化までMAPの影響が及んでいれば、mRNAの結果から考えて、F344とLEWの線条体ではMAPによるCpGアイランドのメチル化、および下流遺伝子の発現が異なる可能性がある。このような遺伝子が単離できれば、F344とLEWの、おそらくはHPA axisを介した逆耐性感受性の差異を解明する上で有用な情報が得られることが期待される。

#### [結論]

依存性薬物への嗜好性、逆耐性への感受性、ストレスへのHPA axis反応性において、過敏性と抵抗性という対照的な性質を有する近交系ラットF344とLEWでは、(1)常同行動を指標としたMAP逆耐性は、LEWにより早期に形成され、明らかな系統差があった。(2)MAP反復投与により、尾状核、側坐核の両部位で、DNAメチラーゼmRNAはF344では有意に増加、LEWでは有意に減少していた。これはGR、MR mRNAの挙動とほぼ一致した結果で、MAP慢性投与に

伴って、線条体DNAメチル化及び下流の遺伝子の発現変化がF344とLewisでは異なり、これが両系統の逆耐性感受性に関連する可能性があると考えた。

#### [文献]

- 1) Ellinwood, E.H.Jr. and Sudilovski, A. (1973) Evolving behavior in the clinical and experimental amphetamine psychoses. *Am J Psychiatry*, 130, 1088-1093.
- 2) 佐藤光源(1979)少量の再注射で急性幻覚妄想状態の再現をみた慢性覚醒剤中毒の7症例. *精神医学*, 20, 543-548.
- 3) 佐藤光源, 柏原健一(1986)覚せい剤精神病—臨床と基礎—. 金剛出版, 東京.
- 4) 佐藤光源(1982)覚醒剤中毒における逆耐性現象—臨床と基礎. *精神誌*, 84, 836-841
- 5) 佐藤光源(1994)急性精神病臨界期における非随意体験に関する考察. (佐藤光源責任監修) *精神科症例集2, 精神分裂病II*. 中山書店, 東京, pp.237-254.
- 6) Nestler, E.J., Hope, B.T. and Widnell, K.L. (1993) Drug addiction: A model for the molecular review basis of neural plasticity. *Neuron*, 11, 995-1006.
- 7) Champ, D.M., Browdman, K.E., Robinson, T.E. (1994) The effects of methamphetamine and cocaine on motor behavior and extracellular dopamine in the ventral striatum of Lewis versus Fischer 344 rats. *Brain Res*, 668, 180-193.
- 8) Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., and Spencer, R.L. (1993) Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticosteroid-binding globulin level - a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*, 616, 89-98.
- 9) Antelman, J.S.M., Eichler, A.J., Black, C.A. et al. (1980) Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science*, 207, 329-331.
- 10) Piazza, P.V., Maccari, S., Deminiere, J.M. et al. (1991) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 2088-2092.
- 11) Cador, M., Dulluc, J., Mormede, P. (1993)

Modulation of the locomotor response to amphetamine by corticosterone. *Neuroscience*, 56, 981-988.

12) Deroche, V.D., Piazza, P.V., Maccari, S. et al. (1992) Repeated corticosterone administration sensitizes the locomotor response to amphetamine. *Brain Res*, 584, 309-313.

13) Pauly J.R., Robinson, S.F. and Collins, A.C. (1993) Chronic corticosterone administration enhance behavioral sensitization to amphetamine in mice. *Brain Res*, 620, 195-202.

14) Piazza, P.V., Malinelli, M., Jodogne, C. et al. (1994) Inhibition of corticosterone synthesis by metyrapone decreases cocaine-induced locomotion and relapse of cocaine self-administration. *Brain Res*, 658, 259-264.

15) Creese, I. and Iversen, S. (1973) Blockade of amphetamine induced motor stimulation and stereotypy in the adult rat following neonatal treatment with 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, 55, 369-382.

16) Ortiz, J., Decaprio, J.L., Kosten, T.A. et al. (1995) Strain-selective effects of corticosterone on locomotor sensitization to cocaine and level of tyrosine hydroxylase and glucocorticoid receptor in the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 67, 383-397.

17) Knych, E.T., Eisenberg, R.M. (1979) Effect of amphetamine on plasma corticosterone in the conscious rat. *Neuroendocrinology*, 29, 110-118.

18) Sternberg, E.M., Glowa, J.R., Smith, M.A. et al. (1992) Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res*, 570, 54-60.

19) Kudriashova, I.B., Vaniushin, B.F. (1976) Rat liver methylation of nuclear DNA following hydrocortisone induction. *Biokhimiia*, 41, 215-222.

20) Brooks, P.J., Marietta, C., Goldman, D. (1996) DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci*, 16, 939-945.

21) Pfohl-Leskowicz, A., Dirheimer, G. (1986) Changes in de novo DNA (cytosine-5)-methyltransferase activity in oncogenically susceptible rat target tissues induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res*, 46, 1110-1113.

[論文発表]

Yoshida, S., Numachi, Y., Matsuoka, H. Sato, M. Impairment of cliff avoidance reaction induced by subchronic methamphetamine administration and restraint stress: comparison between two inbred strains of rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, 22, 1023-1032, 1998.

沼知陽太郎, 佐藤光源. ストレス逆耐性仮説. *こころの臨床*, 17, 53-55, 1998.

佐藤光源. ストレス脆弱性をどうとらえるか. *臨床精神医学*, 28, 251-253, 1999.

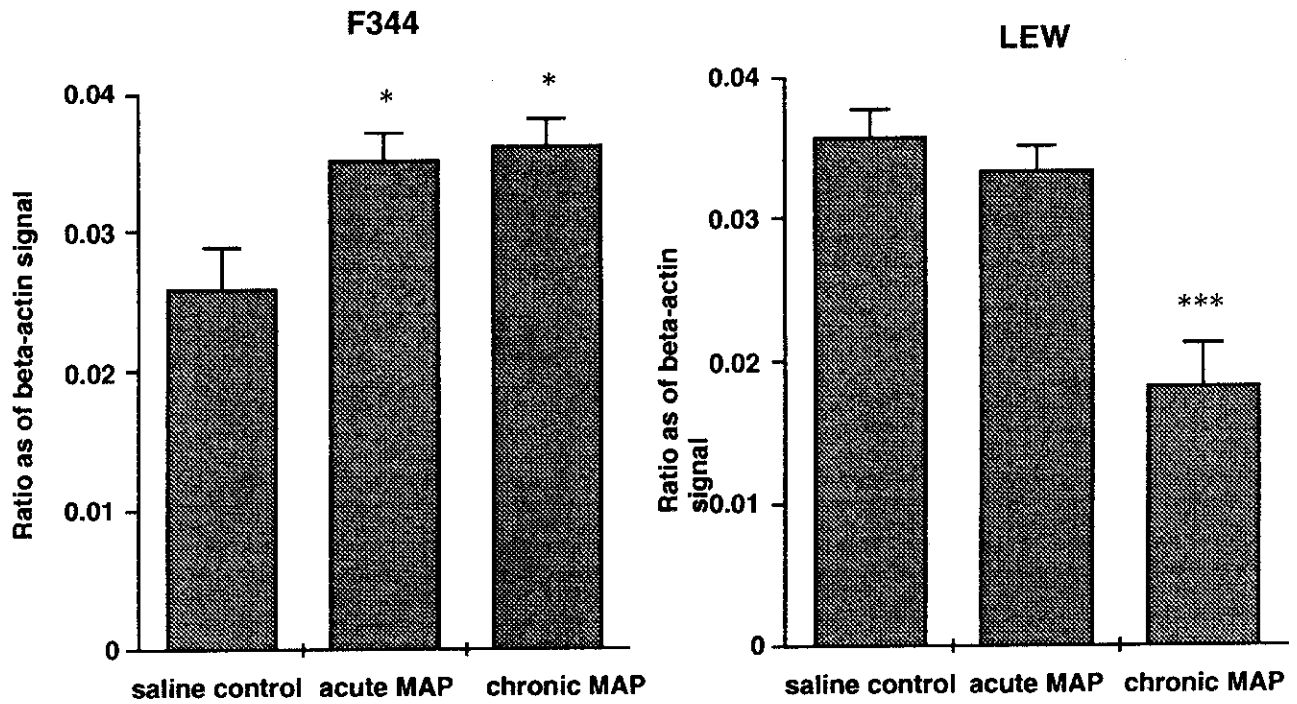
[学会発表]

Numachi, Y., Yoshida, S., Matsuoka, H. Sato, M. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs expression induced by methamphetamine in the brain of two inbred strains of rats. Society for Neurosciences 28th annual meeting, Los Angeles, 1998.

Yoshida, S., Numachi, Y., Matsuoka, H. Sato, M. Heat shock protein 90 mRNA expression induced by subchronic methamphetamine treatment in the rat brain. Society for Neurosciences 28th annual meeting, Los Angeles, 1998.

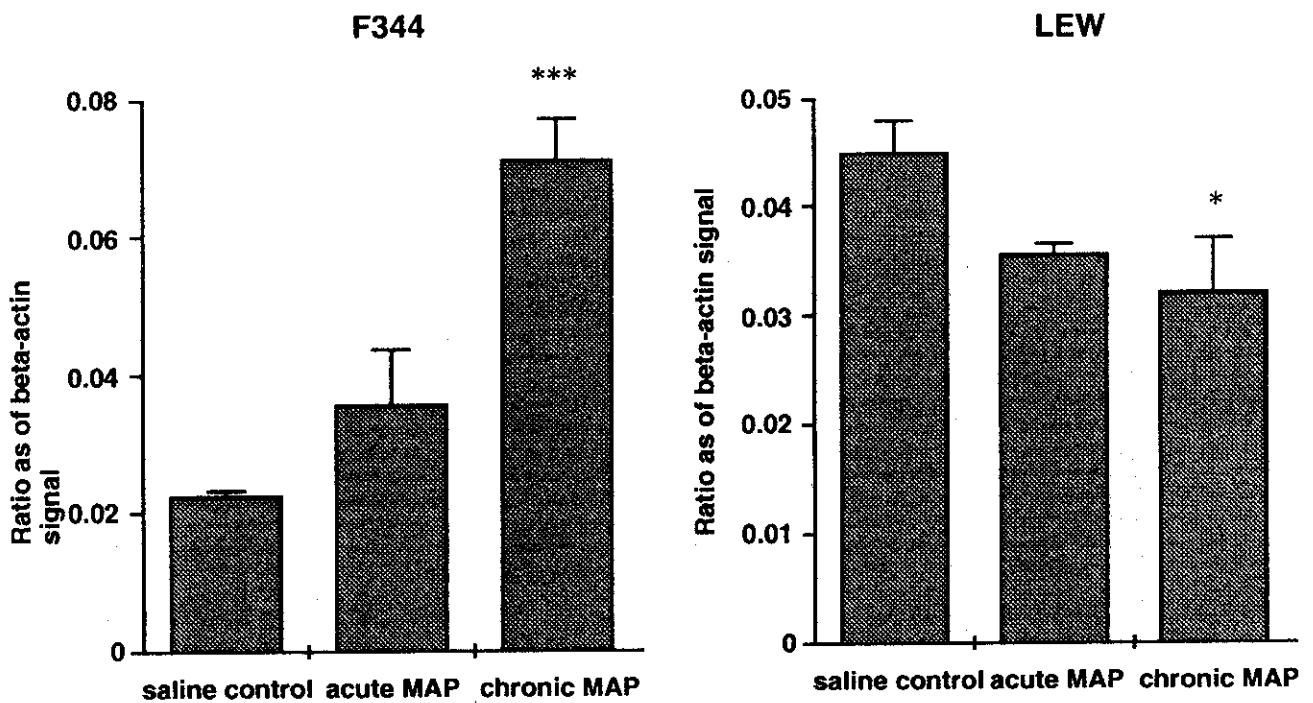
沼知陽太郎, 佐藤光源. 乱用薬物による脳内転写制御因子の変化. 第3回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム, 名古屋, 1998.

Figure 1 メタンフェタミン反復投与による尾状核 DNA メチラーゼ mRNA の変化



\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.0005$ , compared to saline control (ANOVA)

Figure 2 メタンフェタミン反復投与による側坐核 DNA メチラーゼ mRNA の変化



\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.0005$ , compared to saline control (ANOVA)

Figure 3 メタンフェタミン反復投与による  
海馬 DNA メチラーゼ mRNA の変化

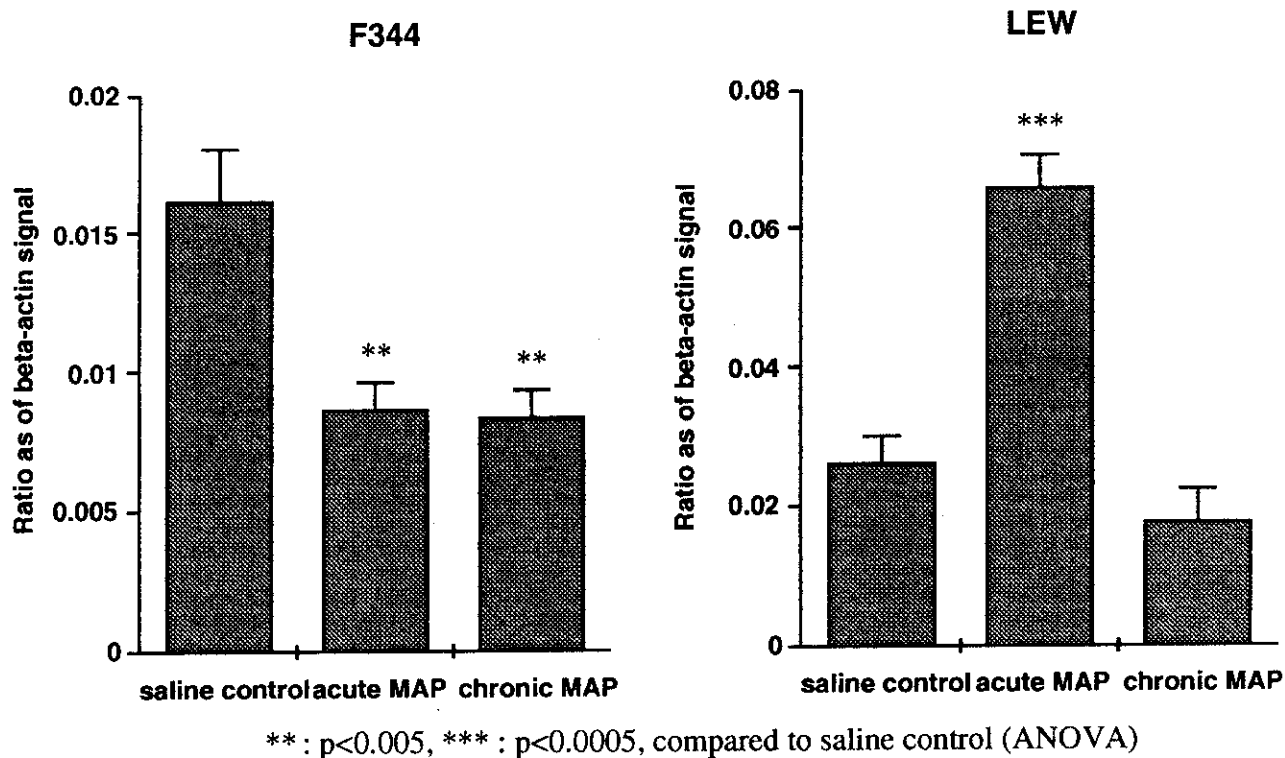
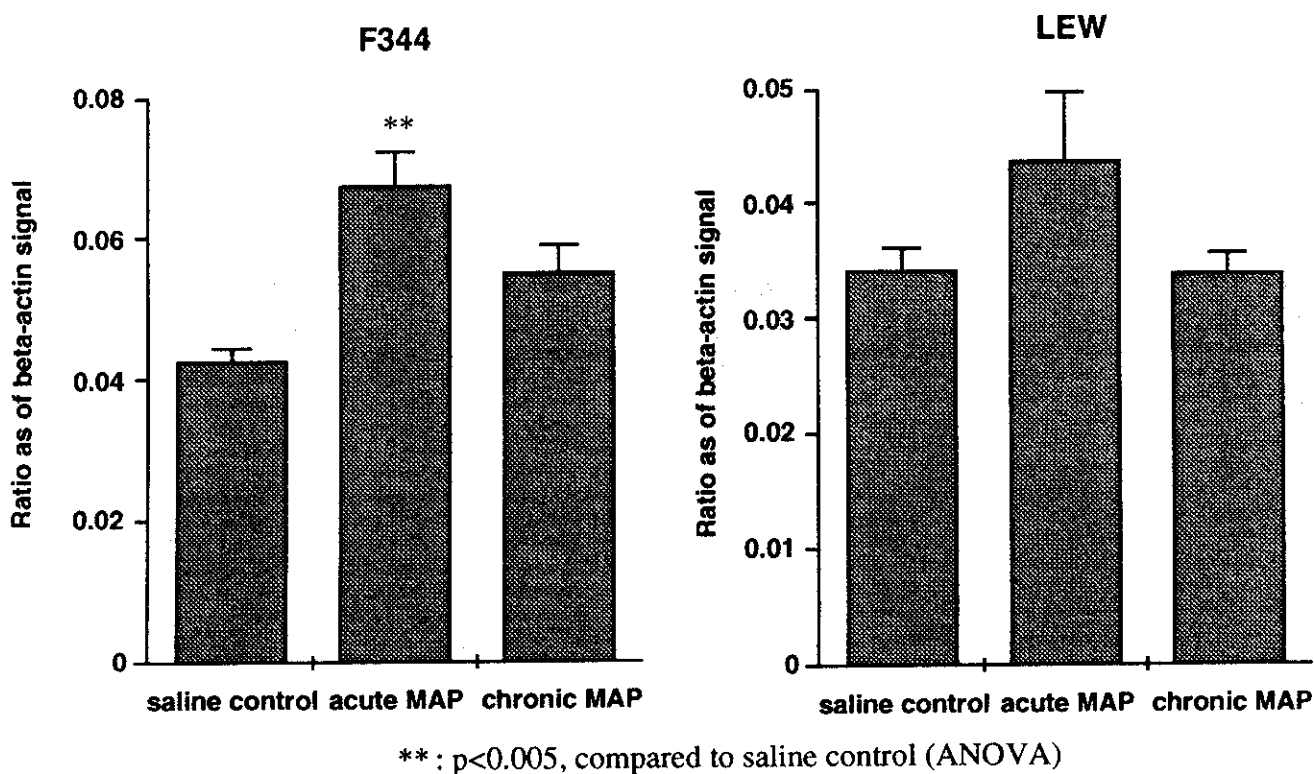


Figure 4 メタンフェタミン反復投与による  
小脳 DNA メチラーゼ mRNA の変化



# *mrt1*の解析：行動感作形成への関与について

分担研究者：梶井 靖 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部研究員

研究協力者：平岡秀一<sup>1</sup>、藤山 航<sup>1,2</sup>、西川 徹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部、<sup>2</sup>東北大学医学部精神医学教室)

メタンフェタミン (MAP) による行動感作形成は、ラットにおいて生後3週以降に認められ、*mrt1*はこの時期特異的にneocortexにおける発現がMAPで増強される新規遺伝子として昨年度同定された。ノーザンブロットにおいて脳特異的な発現が認められるスプライシングヴァリエーションについて、MAP同様に逆耐性を形成するコカインに対する応答を解析したところ、投与後1時間で有意に発現が増強していたが、D1 receptor antagonistであるSCH23390ではコントロールである生理食塩水投与群と同程度であった。cDNA構造解析から予想される*mrt1*遺伝子産物のN末端近傍のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを抗原として抗血清を作製し、neocortexで発現する蛋白質のウェスタンブロットを解析した結果、68kDaのバンドが確認された。この翻訳開始点に特異的なアンチセンスオリゴマーを浸透圧ミニポンプによって持続的に側脳室へ導入すると、MAPによる逆耐性の形成が配列特異的に阻害された。以上のデータより、*mrt1*がMAPによる逆耐性形成に関与することが示唆された。

## 【目的】

覚醒剤精神病における幻覚・妄想状態の出現メカニズムを解析する上で、メタンフェタミン (MAP) やコカインなどの中枢刺激薬による行動感作、あるいは逆耐性と呼ばれる現象は注目すべき特徴を備えている。これらの薬物を経験したヒトや動物では感受性が亢進し、異常行動が誘発されやすい状態が長期にわたって維持されるが、こうした状態が形成されるには一定の発達段階以降に薬物経験をすることが必要な点である。一方、中枢神経系の他の可塑的現象と同様に、この現象には遺伝情報の新たな誘

導が必要と考えられており、その同定と解析が分子レベルでの理解に重要である<sup>1)</sup>。そこで我々は、ラットにおいて生後3週以降に行動感作成立のための薬物経験が必要である点に着目し、この時期以降に特異的にMAPに反応する遺伝子として*mrt1* (methamphetamine responsive transcript 1)を単離、同定した。

本年度は、*mrt1*の行動感作形成への関与をより明らかにしていくために、1) MAPと同様に行動感作を誘導し、また、MAPによって成立した行動感作において交叉性を示すコカインに対する応答の解析、2) *mrt1*遺伝



子産物の同定、3) 翻訳開始点を含む配列に対するアンチセンスオリゴマーによる発現抑制が行動感作成立へ与える影響の解析、を行った。

## 【方法】

**動物:** 実験には生後7~8週の雄性ウイスターラットをアダルトとして用いた。

**急性投与実験:** コカイン、SCH23390をそれぞれ30mg/kg、0.5mg/kg、コントロール群には生理食塩水を皮下投与し、1時間後に断頭、neocortexを分取した。抽出した一定量の全RNAからランダムヘキサマーを用いて変換されるcDNA中に含まれるターゲットの量を、competitive RT-PCRにおいてクローン化したコンペティターと競合するコピー数として測定した。コンペティターにはポイントミューテーションを導入し、増幅産物の大きさ自体はターゲット由来のものと同じになるが、制限酵素処理後にアガロースゲル電気泳動で分離することによって識別し、定量した。

**抗血清の作成:** *mrt1*遺伝子産物のN末端領域のアミノ酸配列に基づくペプチド(4-19)をKLHに共有結合させて抗原とし、ウサギ2羽を免疫して抗血清を得た。

**組換えMrt1の大腸菌における発現とウェスタンブロットング:** pQE30(キアゲン)にMrt1<sup>a</sup>をコードするcDNAをin frameにクローニングし、大腸菌M15において6×His-Mrt1<sup>a</sup>を発現させた。6×His-Mrt1<sup>a</sup>の精製はNi-NTAアガロース(キアゲン)を用いたアフィニティー精製で行った。PBSに懸濁した大腸菌の菌体もしくは脳組織に等量の2×サンプルバッファー(125 mM Tris·HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 0.005% BPB, 4% SDS, 2% 2-ME)を加えて可容化して全タンパク試料とし、SDS-PAGEで分離後、PVDF膜(バイオラッド)に転写してウェスタンブロット

ングとした。シグナルの検出にはECLシステム(アマシャム-ファルマシア)を用いた。

## **アンチセンスオリゴマーを用いた発現抑制と行動感作形成:**

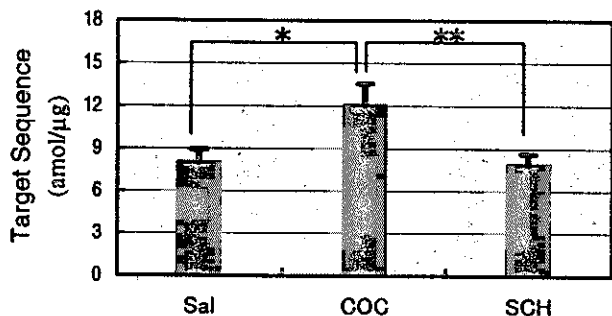
アンチセンスS-オリゴマー(phosphorotiation型: DNAのリン酸ジエステル結合の酸素分子を一つ硫黄残基に置換修飾)を合成し、脳室内注入用チューブ付の浸透圧ミニポンプ(7日間注入用: 1 μl/hで溶液を放出, Alzet社)を用いて動物に持続的に投与した。*mrt1*翻訳開始点より上流領域(-47から-28)および翻訳開始点を含む領域(-4から+18)に対応するオリゴマーをそれぞれAS1、AS2とし、コントロールにはAS2と同じ塩基組成、塩基数で配列をランダムに並べ替えたスクランブルオリゴマーを用いた。各オリゴマーを150mM NaClに溶解して2.5 μg/μlとして充填し、これをpentobarbital麻酔下で皮下に装着した(注入1日目)。注入開始3~7日目の5日間に、1日1回、MAP(4.0 mg/kg、腹腔内注射)または生理食塩水を反復投与し、9日目に麻酔下で浸透圧ポンプを取り出した。さらに19日間休薬した後、少量のMAP(1.6mg/kg)をチャレンジして行動変化を観察することにより行動感作の形成を判定した。

## 【結果】

### ***mrt1*はコカイン急性投与にも応答する。**

*mrt1*にはノーザンブロット上で5.2kbおよび6.0kbの2本のバンドとして確認され、cDNA構造解析より、前者がsplicing variant B/D、後者がvariant A/Cに対応することが示されている(昨年度報告)。脳の各部位および他の一般臓器由来のpoly(A)<sup>+</sup>RNAのノーザンブロットを解析した結果、variant A/Cが広く各臓器で同じような発現レベルを示すのに対して、variant B/Dは脳における発現が多臓器に比して顕著であ

り、脳の各部位で強く発現していることが明らかとなった。そこで、variant B/Dについてコカインに対する応答を解析した結果、neocortexにおいて投与後1時間でコントロール群に対して有意な発現増強が確認された。一方、D1受容体アンタゴニストであるSCH23390ではコントロールと同レベルで、応答性を示さなかった (Fig.1)。行動感作はMAPと同様にコカインによっても誘導され、また、それぞれによって成立した行動感作において、薬物応答の交叉性が認められる。したがって、行動感作の成立に関わる遺伝子発現カスケードの構成要素は両薬物に対して類似した応答パターンを示すと考えられる。*mrt1*はこの点においても行動感作への関与が示唆された。

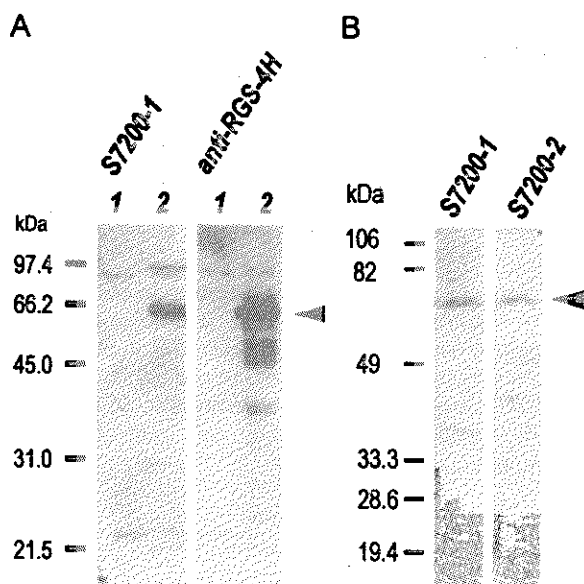


**Fig 1. Cocaine-induced expression of *mrt1* variant B/D in adult rat neocortex.** Animals were sacrificed 1hr after administration of cocaine (COC), SCH23390 (SCH) or saline (Sal). The amount of target sequence which competed with a cloned competitor of *mrt1*\_IVS was represented as the copy number per one micro gram of total RNA. \*P<0.05, \*\*P<0.01 (n=6).

***mrt1*遺伝子産物はneocortexにおいて68kDaの蛋白質として存在する。**

cDNA構造から予想されるORFにおけるN末端領域のアミノ酸配列に基づいて合成したペプチドに対する抗血清は、ウェスタンブロッティングにおいて大腸菌で発現させた組換えMrt1<sup>a</sup>を特異的に認識した (Fig. 2A)。この抗血清を用いてラットneocortexの

ウェスタンブロットを解析した結果、ORFから予想される分子量より7kDa程度大きい68kDaのバンドが認められた。cDNA塩基配列から予想されるORF上のアミノ酸配列において、糖鎖付加等の翻訳後修飾の可能性が考えられることから、この68kDaのバンドが*mrt1*遺伝子産物であると思われた。

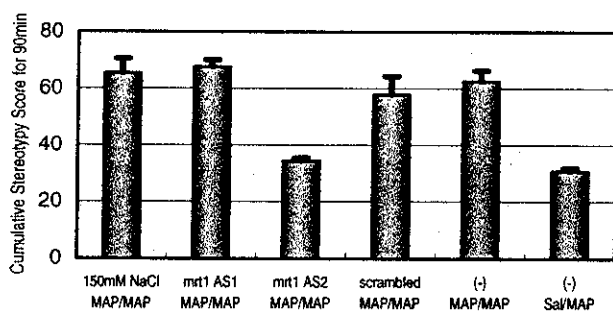


**Fig.2. Western blot analysis of Mrt1.** (A) Total protein of *E. coli* M15 with (lane 2) or without (lane 1) pM1\_EX1A was separated by SDS-PAGE and blotted onto PVDF membrane. The membrane was probed with anti-Mrt1 antiserum S7200-1 or anti-RGS-4H monoclonal antibody. (B) Total protein from rat neocortex was probed with anti-Mrt1 antiserum S7200-1 or S7200-2.

***mrt1*翻訳開始点に対するアンチセンスオリゴマーは配列特異的に行動感作形成を阻害する。**

アンチセンスSオリゴヌクレオチドとして*mrt1*翻訳開始点より上流の配列に対するAS1、翻訳開始点を含む配列に対するAS2、またはAS2と同じ塩基組成と長さで配列を無作為に並べ替えたスクランブルオリゴマーをそれぞれ脳室内に導入した条件下での行動感作の形成を解析した結果、薬物経験時に

AS2を導入された動物群でのみMAPによる行動感作の形成が阻害された(Fig. 3)。また、MAP前処理における異常行動の発現自体はアンチセンスオリゴマーによって影響を受けなかった。



**Fig 3. Sequence-specific inhibition of methamphetamine-induced behavioral sensitization by anti-sense oligomer continuously induced into lateral ventricle.** Animals were daily administered with methamphetamine and challenged with smaller amount of methamphetamine later (MAP/MAP) or daily administered with saline and challenged with methamphetamine later (Sal/MAP).

### 【考察】

行動感作(逆耐性)の特徴として、そのメカニズムを考える上で、次の3点が重要と考えられる。すなわち、1) long lasting (長期にわたって持続する現象である)、2) cross sensitization (薬物交叉性が認められる)、3) late developing (一定の発達段階以降に特異的な現象である)、という点である。この現象に関わる因子を同定するにあたっては、こうした特徴との関連を解析することが必要となる。*mrt1*は3)を指標として単離、同定された遺伝子であり、本年度のデータより、2)に関しても現象への関与が示唆された。

アンチセンスオリゴマーによる特定遺伝子の発現抑制は、標的mRNAとヘテロ2本鎖を形成することによって翻訳を阻害すると同

時に、ヌクレアーゼによるmRNA分解も促進すると考えられている。翻訳開始点を含む配列に対するアンチセンスオリゴマーはリボソームの会合そのものを阻害することによって最も効果的に標的遺伝子の発現を阻害すると考えられる<sup>2)</sup>。従って、*mrt1*に対するAS2が配列特異的に行動感作形成を阻害したことは、*mrt1*遺伝子産物の行動感作形成への関与を強く示唆している。しかしながら、脳室内へ導入したオリゴマーの効果については、なお慎重に検討すべき点が残されている。まず、導入したオリゴマーが脳のどの範囲まで浸透し、細胞内に取り込まれているかという点である。第2に、細胞内に取り込まれたオリゴマーによって、実際に蛋白質レベルでMrt1が減少しているかどうかを確認できるかどうかという点である。こうした点を次年度の検討課題の1つとしたい。

我々は最近、MAP投与後に起きる遺伝子発現の変化として、前頭前野におけるtissue-type plasminogen activator (tPA) 遺伝子の発現誘導を報告している<sup>3)</sup>。tPAは可塑的变化に関わることが示唆されており、線条体内側部へ投射するごく限られたニューロンにおいてMAP投与後に発現誘導が認められた。*mrt1*のMAP、コカインによる誘導がこれらのニューロンにおける変化と関連しているかどうかという点についても、組織学的に検討をしていきたい。また、*mrt1*は全く新規な遺伝子であり、その機能については全く不明であり、今後は蛋白質レベルでの解析を中心として、*mrt1*遺伝子産物の機能を明らかにしていく予定である。

## 【参考文献】

1) 梶井 靖, 戸田重誠, 橋本隆紀, 海野麻未, 西川 徹 (1996). 中枢刺激薬と遺伝子発現. *神経精神薬理* **18**, 557-563.

2) Stabdaert DG, Testa CM, Rudolf GD, and Hollingsworth ZR (1996). Inhibition of N-methyl-D-aspartate glutamate receptorsubunit expression by antisense oligonucleotides reveals their role in striatal motor regulation. *J Pharmacol Exp Ther* **276**, 342-352.

3) Hashimoto T, Kajii Y, and Nishikawa T (1998). Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in corticostriatal neurons in rat brain. *European J Neurosci* **10**, 3387-3399.

## 【論文発表】

1) Hashimoto T, Kajii Y, and Nishikawa T (1998). Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in corticostriatal neurons in rat brain. *European J Neurosci* **10**, 3387-3399.

## 【学会発表】

1) 掛山正心, 橋本隆紀, 平岡秀一, 梶井 靖, 新井康充, 西川 徹 (1998). Methamphetamine反復投与による行動変化に対するNMDA受容体遺伝子アンチセンスの影響. 第20回日本生物学的精神医学会大会.

2) 梶井 靖, 平岡秀一, 藤山 航, 戸田重誠, 金田小幸, 海野麻未, 西川 徹 (1998). 発達段階依存的にメタンフェタミンに応答する新規遺伝子mrt1のラット脳における発現. 第21回日本神経科

学・第41回日本神経化学合同大会.

3) 戸田重誠, 梶井 靖, 金田小幸, 海野麻未, 佐藤光源, 西川 徹 (1998). Pnut/Septin-like Protein遺伝子の成熟ラット脳における発現. 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会.

### 3. 平成10年度 分担研究者氏名一覧

依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する  
分子生物学的研究

区分	氏名	所属施設・部局・職名	所属施設所在地
主任	佐藤光源	東北大学医学部精神医学教室 教授	〒 980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 Tel 022-717-7260 Fax 022-717-7266
分担	梶井 靖	国立精神・神経センター神経 研究所疾病研究第3部研究員	〒 187-8551 小平市小川東町4-1-1 Tel 0423-46-1714 Fax 0423-46-1744
分担	菊池周一	国立精神・神経センター精神 保健研究所薬物依存研究部 研究員	〒 272-8516 市川市国府台1-7-3 Tel 047-372-0141 Fax 047-371-2900

#### 4. 平成10年度研究報告会プログラム

平成10年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
依存性薬物による脳内薬物受容体の機能変化に関する分子生物学的研究  
（主任研究者 東北大学医学部精神医学教室 佐藤光源）

## 平成10年度研究成果報告会

平成11年2月10日（水）午後3時～午後5時30分  
於：艮陵会館1階小研修室  
〒980-0873 宮城県仙台市青葉区広瀬町3-34  
TEL 022-227-2721

連絡先：〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1  
東北大学医学部精神医学教室 佐藤光源  
TEL 022 (717) 7260  
FAX 022 (717) 7266  
e-mail msato@psy.med.tohoku.ac.jp



## プログラム

- 15:00-15:10 主任研究者挨拶  
佐藤光源 (東北大学医学部精神医学教室)
- 15:10-15:30 事務連絡
- 15:30-16:00 mrt1の解析：行動感作形成への関与について  
梶井 靖 (国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第3部)
- 16:00-16:30 逆耐性獲得機構におけるG蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニット効果器系の関与に関する研究  
菊池周一 (国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部)
- 16:30-17:00 メタンフェタミン投与に伴う脳内DNAメチラーゼmRNAの変化  
佐藤光源 (東北大学医学部精神医学教室)
- 17:00-17:30 総合討論

5. 平成10年度研究成果刊行物一覧

19980386

報告書 P. 33-37は下記に掲載

**Altered expression levels of G protein subclass mRNAs in various seizure stages of the kindling model (Short communication)**

Hiroto Iwasa, Shuichi Kikuchi, Hiro Miyagishima, Seiichiro Mine, Keijirou Koseki, Shuji Hasegawa

Brain Research. Volume 818, pp.570-574, 1999

19980386

報告書 P. 38-43は下記に掲載

**注射薬物使用者における HIV 感染リスクの低減**

Don C. Des Jarlais, Samuel R. Friedman 著 和田清 翻訳

pp.233-235 (24章)

エイズ・パンデミック. 世界的流行の構造と予防戦略. Jonathan Mann,  
Daniel Tarantola 編. 山崎修道, 木原正博 監訳. 日本学会事務センター,  
1998