

## 3. 平成 11 年度 総括研究報告

主任研究者 佐藤光源

## 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

### 平成 11 年度総括研究報告

主任研究者 佐藤光源 東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野教授  
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  
                  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

#### [研究の背景]

覚せい剤は日本で最も乱用の多い依存性薬物である。わが国での覚せい剤乱用が第3次のピークをむかえていること、米国やアジアでの覚せい剤乱用が広まりつつあることなどから、覚せい剤の害は深刻な社会問題になっている。従来は覚せい剤について精神依存(渴望)対策だけが研究課題とされてきたが、最近では薬物の長期乱用で起きる二次性脳障害(遅発性精神病や長期持続性の後遺症)が注目されている。この二次性脳障害の存在は長年にわたる日本での覚せい剤精神病の臨床研究によって明らかにされたものであった。特に精神病への発展経過を逆耐性現象(逆耐性)で説明できること、さらにそれを動物に再現できるという主任研究者の研究報告は、その後の国際的な研究活動の起点となった。現在(1)覚せい剤で容易に精神依存が起きるのはなぜか、(2)乱用が長期化すると精神分裂病(分裂病)類似の精神病が起きるのはなぜか、(3)覚せい剤精神病が再発しやすさを残すのはなぜか、という3点の解明が急がれている。覚せい剤精神病で分裂病類似の症状が再発する脳の脆弱性が解明されれば、分裂病の最大の問題である再発しやすさと難治化のメカニズムの解明に応用できる。

#### [研究目的]

上記の(1)はかなり解明できたが、(2)と(3)の原因となる脳の神経可塑性変化が不明である。逆耐性は長期持続性の機能変化なので、覚せい剤の長期乱用中に起きる蛋白合成の変化が注目されている。本研究ではわが国で最も乱用の多い覚せい剤(メタンフェタミン: MAP)による逆耐性現象の分子生物学的発生機序を下記の(1)~(3)の研究によって解明することを目的とした。

- (1) 逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究  
    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)
- (2) 逆耐性現象形成に伴う脳コルチコステロン受容体の変化  
    佐藤 光源 (東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野)
- (3) 新規ラット遺伝子mrt1の単離と解析:メタンフェタミン行動感作成立の分子カスケード  
    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)

## [研究方法, 結果, 考察]

### (1) 逆耐性獲得機構における G 蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究 (菊池周一)

G 蛋白質自体のシグナル伝達を百日咳毒素で阻止すると逆耐性が起きない, MAP 逆耐性と G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの発現が関連する, また, G 蛋白質  $\beta 1$  サブユニット antisense oligonucleotide 脳室内投与が, コカイン逆耐性を抑制する等の知見がある. 本分担研究では, MAP 逆耐性形成における G 蛋白質  $\beta \gamma$  サブユニットを介する情報伝達機構の関与を明らかにすることを目的とした.

昨年度までの検討で, 中脳腹側被蓋野の G  $\beta 1$  サブユニットの発現反応性が逆耐性形成前後で異なっていることを見出した. この変化は逆耐性の維持に関連している可能性が高いものと思われたので, G  $\beta 1$  サブユニットのアンチセンスを中脳腹側被蓋野に注入して蛋白発現を抑制し, MAP を 1 週間連続投与して行動の変化を追った. MAP 5 mg/kg 慢性投与による常同行動はアンチセンス群で第 1 日から増大して早期に逆耐性が形成されたことから,  $\beta 1$  ノックダウンが逆耐性形成に促進的な効果を有することが明らかとなった. 以上から, 逆耐性の形成には中脳腹側被蓋野 G  $\beta 1$  が抑制的な役割を演じており, 同蛋白の機能低下が逆耐性の維持機構の基盤にあると推察された.

### (2) 逆耐性現象形成に伴う脳コルチコステロン受容体の変化 (佐藤光源)

副腎摘出で逆耐性の形成が阻止される, グルココルチコイド合成阻害薬でコカイン逆耐性が阻止される, グルココルチコイドの慢性投与でアンフェタミンへの過敏反応性が形成されるなどの先行研究がある. これらは MAP がドパミンだけではなくコルチコステロン (CS) も介して脳に作用することを示唆している. 本分担研究では CS を介した MAP への脳内遺伝的応答の神経機序を明らかにすることを目的とした. 昨年度までは逆耐性への感受性, ストレスへの視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) 反応性に対照的な性質を有する遺伝的に同一な近交系ラット, Fischer 344/N, Lewis/N について MAP 連日投与により,

- (a) LEW は早期に逆耐性を形成するのに対し, F344 は有意に遅く, 逆耐性抵抗性である
- (b) F344 では線条体で CS 受容体 mRNA が増加, LEW では減少する
- (c) 尾状核, 側坐核 DNA メチラーゼ mRNA は F344 で増加, Lewis で減少する

という結果を得た. HPA axis の negative feedback の強い F344 では, CS が減少, 受容体の mRNA は増加, さらに線条体で部位特異的に CS 応答性, 遺伝子発現の長期持続性変化に関連する DNA メチラーゼ mRNA が増加していると考えられる. LEW はその逆で, この差が逆耐性への感受性に関連している可能性があると考えた.

本年度は上記 2 系統のラットで MAP 慢性投与時の血中 ACTH, CS 量の変化, 線条体 CS 受容体 type I (MR), type II (GR), HSP90 蛋白について解析した. MAP 慢性投与終了から 3, 24 時間の血中 ACTH 量には両系統で差を認めなかった. 血中 CS 量は F344 では MAP 急性に対して慢性投与で有意に増加したが LEW では不変で, F344 は MAP による HPA axis 刺激作用に抵抗性を示すことが示唆された. しかし MAP 慢性投与では両系統共に有意に上昇したことから, 線条体 CS 受容体 mRNA の転写調節には CS 以外の因子が関与している可能性が示唆された. MAP 慢性投与後 24 時間の線条体 MR, GR 蛋白は不変だ

ったが、HSP90 蛋白はMAP 急性、慢性投与により F344 で LEW より有意の上昇を認めた。HSP90 蛋白の変化は mRNA レベルで認められた変化と一致しており、同蛋白を介して GR の機能が調節される可能性が示唆された。

### (3) 新規ラット遺伝子mrt1の単離と解析: メタンフェタミン行動感作成立の分子カスケード (梶井 靖)

ラットでは生後21日の前後で MAP 逆耐性の形成が左右される。この前後で MAP に反応して出現する遺伝子群を比較し、逆耐性が形成される生後21日以降だけに現れる遺伝子、つまり逆耐性に特異的な遺伝子を特定することを目的とした。逆耐性が起きる生後発達の臨界期を境に、MAP 急性投与で脳内発現が変化する候補遺伝子を RNA フィンガープリント法で単離した。これらの遺伝子の mRNA が、上記の臨界期の前後で変化するか、定量的な RT-PCR 法で調べたところ、3つの候補遺伝子 (mrt 1, 2 and 3) が見つかり、その全長を決定して mrt 1 に関して詳細な検討を行った。

定量的 RT-PCR 法の結果、MAP 急性投与で大脳新皮質の mrt 1 mRNA 量は臨界期前では変化せず、臨界期後に初めて mRNA が増加した。従って mrt 1 は、逆耐性が形成される臨界期を境に、MAP により脳内に発現する未知の遺伝子であることが示された。mrt 1 遺伝子上からは長短4種の mRNA、2種の相同性の高い蛋白質が翻訳されることが示された。

mrt 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを浸透圧ポンプで脳内に持続注入して蛋白の発現を阻害した条件下でMAPを反復投与し、行動変化を観察した。前者の蛋白に特異的なアンチセンス注入下では、MAP 反復投与による行動変化は生じなかった。これに対して、C末端にグルタミン酸に富む部位をもつ蛋白に特異的なアンチセンスは、逆耐性の形成を阻止した。従って、mrt 1 から生じる2種の蛋白の内、一方が逆耐性の形成に密接に関与していることが明らかにされた。

Mrt 1 蛋白の内在性の存在を確認するため、N末端15aaに特異的な抗体を作成した。ウェスタンブロット法で、蛋白質発現ベクターで大腸菌に発現させた Mrt 1 と、ラット大脳皮質から抽出した蛋白分画の両者で同サイズのバンドを検出し、今回発見した遺伝子が、ラットの脳で発現していることを見出した。

今年度は in situハイブリダイゼーションによる解析の結果、mrt1は脳内に広く発現し、ニューロンでの発現が顕著であることが明らかとなった。N末端領域のペプチドに対するポリクローナル抗体を用いたラット脳（大脳新皮質）免疫沈降物は抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体4G10によって認識され、mrt1遺伝子産物がチロシン残基リン酸化による制御を受けていることが示唆された。MAP投与30分前にドーパミンD1受容体遮断薬 SCH23390を投与することでこの応答が抑制された。一方、1日1回のMAP投与を5日間連続したラットでは、最終投与から2週間後においてもmrt1の発現が急性投与1時間後と同じ高いレベルに維持されていた。この繰り返し投与の各30分前にSCH23390を投与することによって行動感作の成立が阻害され、その条件においては最終投与2週間後の発現レベルはコントロールと同程度であった。

[成果のまとめ]

今年度の各研究課題に関する成果は、以下の通りである。

- (1) 逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究  
中脳腹側被蓋野のGβ1ノックダウンが逆耐性形成に促進的な効果を有することから、逆耐性の形成には中脳腹側被蓋野Gβ1が抑制的な役割を演じており、同蛋白の機能低下が逆耐性の維持機構の基盤にあると推察された。
- (2) 逆耐性現象形成に伴う脳コルチコステロン受容体の変化  
F344ラットはMAPによるHPA axis刺激作用に抵抗性を示すこと、線条体CS受容体mRNAの転写調節にはCS以外の因子が関与していること、MAP急性、慢性投与下では線条体HSP90蛋白はF344でLEWより有意の上昇を認め、同蛋白を介してGRの機能および逆耐性への感受性が調節される可能性が示唆された。
- (3) 新規ラット遺伝子mrt1の単離と解析: メタンフェタミン行動感作成立の分子カスケード  
Methamphetamine-related transcript 1 (mrt 1) を単離し、遺伝子の構造を決定。mrt1はD1受容体依存的にMAPによる発現増強を示し、この発現増強が行動感作成立によって長期的に維持されることが判明した。行動感作成立条件下での長期的な遺伝子発現レベルの変動はこれまでに報告がないものであり、覚醒剤による長期持続性脳機能変化を分子レベルで解明する上で極めて重要な知見が得られた。また、mrt1遺伝子産物がチロシンリン酸化蛋白であることが示され、ニューロン内シグナル伝達における役割が注目される。  
上記研究課題をさらに進めることにより、覚せい剤精神病で分裂病類似の症状が再発する脳の脆弱性が解明され、分裂病の最大の問題である再発しやすさと難治化のメカニズムの解明、乱用薬物の長期乱用による脳障害の臨床研究に道を開くことが期待される。

## 4. 平成 11 年度 分担研究報告

## 逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系 の変化に関する研究

－アンチセンスオリゴヌクレオチド脳内投与による  
腹側被蓋野におけるG蛋白質β1サブユニットの機能解析－

分担研究者: 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

研究協力者 岩佐 博人<sup>1)</sup>、宮城島大<sup>1)</sup>、佐藤 美緒<sup>2)</sup>

1) 千葉大学医学部精神医学教室

2) 国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部

### (研究要旨)

本研究では、覚せい剤精神病の再発脆弱性の脳内機構を解明するために、メタンフェタミン逆耐性モデルを用い、G蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系に注目して研究を進めてきた。これまで、メタンフェタミン慢性投与による行動感作において、脳内のいくつかの部位におけるG蛋白質のβ1サブユニットやγサブユニットの発現の変動およびその効果器であるGIRK, Rasの発現の変動が重要であることを明らかにした。特に、腹側被蓋野におけるG蛋白質β1サブユニットは、逆耐性前後でメタンフェタミンチャレンジによる発現の反応性が異なっており、逆耐性の維持に関連している可能性が高いと考えられる。そこで、今年度はG蛋白質β1サブユニットの蛋白発現をアンチセンスオリゴヌクレオチド脳内局所投与方法を用いてβ1サブユニット発現を抑制し、急性効果および逆耐性形成に及ぼす影響を検討した。その結果、アンチセンス投与群において1) 急性効果として常同行動を増強する、2) 常同行動における逆耐性形成を促進する、3) 運動量における逆耐性形成には顕著な影響は与えない。以上の結果から、メタンフェタミンによる行動感作の形成機序において、G蛋白質β1サブユニットが逆耐性形成に重要な分子であり、機能として、逆耐性形成に抑制的に作用することが示唆された。逆耐性形成後のメタンフェタミンチャレンジでGβ1の発現は急性効果と異なり相対的に低下するため、Gβ1の機能低下が逆耐性の維持機構の基盤にあると推察された。

### A.研究目的

覚せい剤の反復使用によって発症する覚せい剤精神病においては、覚せい剤の再使用、ストレスや飲酒による幻覚妄想状態の再燃が臨床上市しばしば問題となる。動物に覚せい剤を反復投与した際に認められる逆耐性現象は、ほぼ永続的に少量の覚せい剤の再投与により増強した異常行動が再現されることから、覚せい剤精神病の

再発脆弱性のモデルとみなされている。本研究では、覚せい剤精神病の再発機構を解明するために、逆耐性動物における脳内薬物受容体共役G蛋白質伝達系に注目して研究を進めてきた。

G蛋白質はドーパミン受容体など7回膜貫通型受容体に共役し、受容体情報を細胞内に伝達するトランスデューサーの役割を担っている。これまで依存性薬物の強化効果や逆耐性形成にG蛋白質の関与が指摘されてきた。しかし、G蛋白質サブ

ユニットの組み合わせは $\beta\gamma$ だけで50種以上になるため、これまでの知見は $\alpha$ サブユニットに限られていた。また、細胞内効果器についてもサブユニット特異性が高いと言われながら $\alpha$ サブユニットにリンクする効果器以外はほとんど検討されていなかった。したがって、多様なG蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットのいずれが逆耐性に関与しているかを絞り込むことが解明の糸口となる。本研究ではこの点をふまえ、これまでG蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットについてサブタイプごとにスクリーニングを行い、逆耐性に重要な $\beta\gamma$ のサブタイプ、細胞内伝達系を発見することを目的としてきた。これまで、腹側被蓋野・側坐核におけるG $\beta$ 1、 $\gamma$ 3、前頭前野や側坐核におけるGIRK1、Rasの変化を検出した<sup>1,2</sup>。特に、A10ドーパミン神経の起始核である腹側被蓋野はドーパミンのみならず種々の受容体を介する情報伝達が逆耐性に関与していることから、本年度は、腹側被蓋野のG蛋白質 $\beta$ 1サブユニットの機能変化を解明することを目的として、G $\beta$ 1遺伝子発現のアンチセンスノックダウン法を用いて逆耐性における意義を検討した。

## B.研究方法

### 1. 動物作成

成年雄性Sprague-Dawleyラット(10週齢)を用い、Krugerらのアトラス<sup>3</sup>をもとにラット腹側被蓋野にガイドカニューレ1本をstereotaxicに両側腹側被蓋野の midpoint に挿入し (bregma後方7.5mm、脳表からの深さ8.0mm)、背部皮下に留置したアルザ浸透圧ミニポンプ(14日間連続投与用; 0.5  $\mu$ l/hr, total 200 $\mu$ l) に接続した。

ミニポンプ内には、rGbeta1に対するS化アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは、ミスセンスオリゴヌクレオチドを生食に溶解し気泡が入らぬように満たした。アンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列はWangら<sup>4</sup>の翻訳開始部位付近の配列を参考にした。

antisense; 5'-TTCACCTCATCTTCACGTC-3'

missense; 5'-ATCGCTCGTCATCTCGTC-3'

### 2. 投与スケジュール (Fig.1)

手術後5日目より、MAP (5 mg/kg/day, i.p.)を1日1回9日間亜急性投与し、1週間の休業期間の後、MAP同量を再投与して逆耐性形成の有無を確認した。対照はミスセンス連続投与下において同一条件でMAPを投与した。MAP投与1日目、6日目、9日目および再投与日に投与直後から投与後3時間まで15分ごとに視察的に観察し、氏家らの行動スケールを用いて行動評価を行い、各観察日のスコアの経時変化および観察

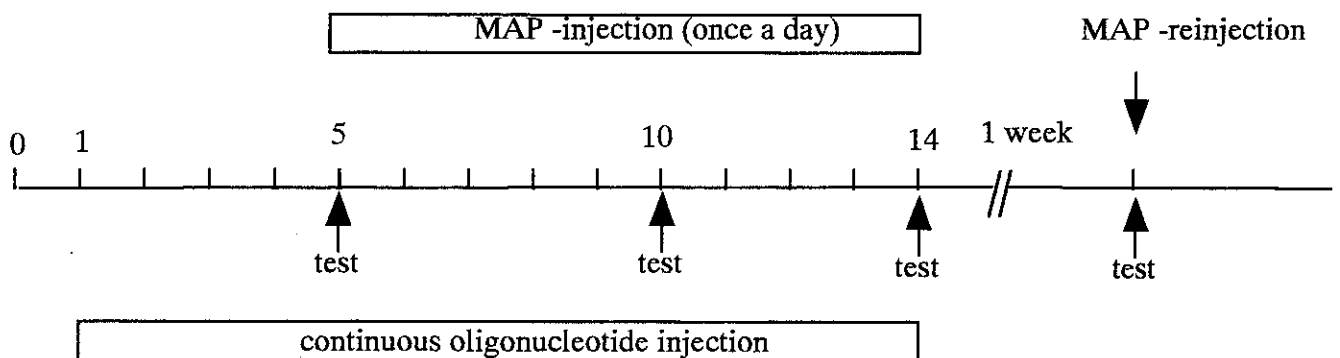


Fig.1 Schedule of oligonucleotide treatments, methamphetamine administrations, and behavioral testing.

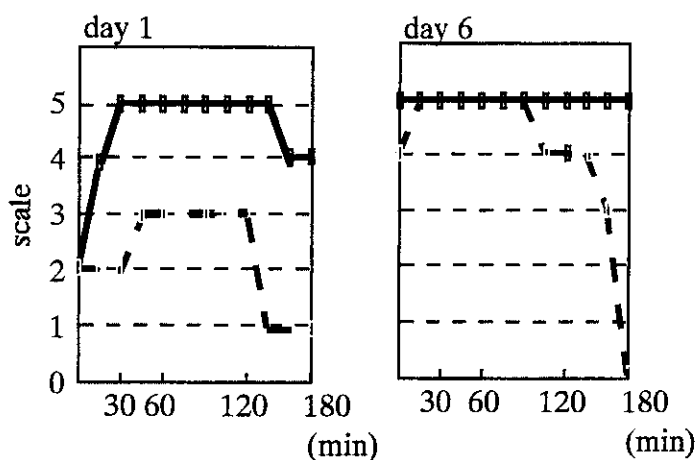


日すべての総スコアを算出して分析に供した。分析には、one way-ANOVA およびFisher-PLSD post hoc testを用いた。

また、MAP (1 mg/kg/day, i.p.)を1日1回9日間亜急性投与し、Scanet(Neuroscience社、東京)にて運動量を測定し、Gβ1アンチセンスの効果を検索した。

### C. 結果

#### A Stereotypy (MAP 5 mg/kg)



#### B Hyperactivity (MAP 1 mg/kg)

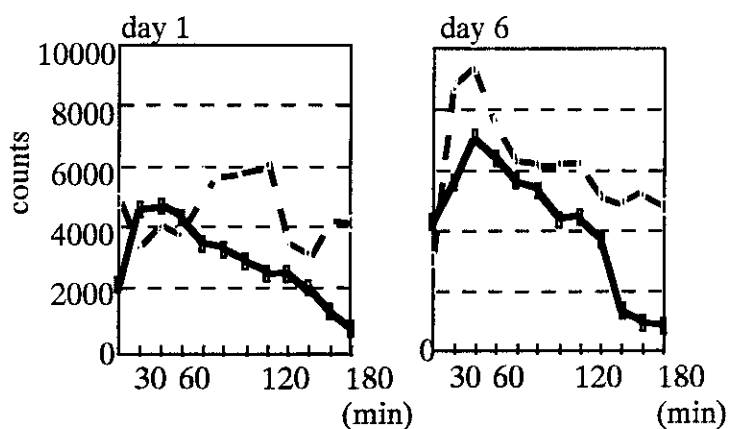


Fig. 2 Typical time course of MAP-induced abnormal behaviors. (A)stereotypy observed in antisense group and missense group on day 1 and day 6. (B) hyperactivity in antisense group and missense group on day 1 and day 6.

MAP (5 mg/kg, i.p.)の初回投与後、アンチセンス群、ミスセンス群のいずれにおいてもsniffingやhead movementなどの常同行動が出現したが、アンチセンス群において出現潜時が短縮する傾向が認められた。ミスセンス群と比較してアンチセンス群における出現潜時の短縮は、亜急性投与期間中継続して認められた(Fig 2A)。

常同行動の総スコアは対照群と比較してアンチセンス群において有意に増大していた。いずれの群においても再投与時には逆耐性形成が認められた(Fig 3)。特にアンチセンス群においてはミスセンスより増強した異常行動が、再投与時のアンチセンス非存在下においても、ミスセンス群より増強したまま維持されていた。

また、Gβ1アンチセンスの腹側被蓋野への局所注入による運動量に対する効果について予備的に検討したところ、MAPの急性効果による運動量増大に対するアンチセンスの効果は若干の抑制傾向であった (Fig 2B)。また、運動量の逆耐性形成についても現段階では一定の傾向を見い出せなかった。

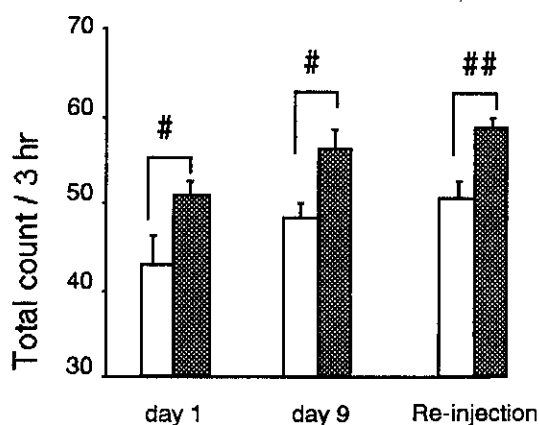


Fig.3 Cumulative score of stereotypy

□ missense ■ antisense

#P<0.05, ##P<0.01 vs. missense group

#### D. 考察

本研究では、腹側被蓋野においてGβ1サブユニットアンチセンス投与によりメタンフェタミン慢性投与による常同行動の増強が促進されたことから、Gβ1そのものは逆耐性形成に抑制的な役割を果たしていることが示唆された。前年度までにわれわれは、腹側被蓋野のGβ1蛋白質およびmRNAは常同行動の逆耐性形成前に増大がみとめられたが逆耐性形成後において消失する、いわば発現の不应性を検出した<sup>1,2</sup>。本知見を考え併せると、腹側被蓋野におけるGβ1は逆耐性形成・維持に抑制性の意義を有し、Gβ1発現の制御の破たんにより逆耐性維持の抑制機構を減弱させている可能性が考えられた。また、メタンフェタミンの運動量増強に対するGβ1の効果は常同行動ほど明瞭ではなく、常同行動と運動量両者の逆耐性形成に異なるメカニズムが想定された。

VTAニューロンに発現しているG蛋白質のメタンフェタミン逆耐性における意義については、これまでコレラ毒素によるGsαにリンクする情報伝達系の持続的機能増強により、逆耐性形成は増強されるという報告<sup>6</sup>、PTXによるGi系の情報伝達の遮断により、行動感作は増強される報告<sup>7</sup>などあるが、今回の報告は後者の知見に関連すると思われる。PTXは、Giα/Goαをターゲットとして3量体G蛋白質の解離を阻害して情報伝達を遮断する。このとき、βγはαと結合しており、情報伝達は行われない。この状態はアンチセンスでβ1発現を抑制したのと同様の状態である。一方、コレラ毒素はαのGTPase活性を抑制しαとβγを解離した状態に保ち、アンチセンス投与時とは逆の状態である。したがってGβ1アンチセンスのPTXに類似した抑制効果を考えると、Gβ1はGsよりもむしろGiα/Goαを介する系に関連している可能性が考えられる。

Gβ1の機能については、コカインによる逆耐性においては本報告とは逆に、側坐核で促進的であるとする報告があり<sup>4</sup>、Gβ1の意義の解釈には慎重

を要する。G蛋白質αサブユニットについての発現変化もコカインとメタンフェタミンとは異なっており、両者の作用機序の相違が影響している可能性もある<sup>8</sup>。

Gβ1の効果器について、昨年度までの本研究などでGIRK、Ras、その他アデニレートサイクラーゼタイプII、β-ARKなどの検索を行ったが、VTAにおける発現の変動を呈した分子は見いだせなかった<sup>2</sup>。未検索の分子としてPLC-βサブユニットやアデニレートサイクラーゼタイプI, IVなどがある<sup>9</sup>。これらの関与については今後検討が必要であるが、PLCはメタボトロピックグルタミン酸受容体に共役し、Goにリンクしている。グルタミン酸ニューロンは前頭前野から腹側被蓋野に投射しており、腹側被蓋野におけるメタボトロピックグルタミン酸受容体、NMDA受容体<sup>10</sup>、AMPA受容体<sup>11</sup>のいずれもが逆耐性形成に関与する。PLC系の変化はキンドリングのような長期の神経可塑性モデルでも観察されており、逆耐性のような可塑的变化においても重要な役割を果たしている可能性がある。

#### E. 結論

アンチセンスノックダウン法によるG蛋白質β1サブユニットの機能解析の結果、腹側被蓋野におけるGβ1は、逆耐性形成に抑制的に作用していると考えられる。前年度までの知見と考え併せると、Gβ1は、常同行動の発現、逆耐性形成に関与し、再投与時の発現増大の欠如により抑制性が相対的に弱まり、常同行動の増強を表出させていると考えられた。Gβ1を介する系を賦活することにより、逆耐性形成を抑制する可能性も考えられ、今後G蛋白質βγサブユニットを介する系のさらなる解明が期待される。

## 参考文献

1. 菊池周一、逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究—メタンフェタミンまたはフェンシクリジン投与動物におけるG蛋白質βサブユニットの発現の変化を中心に—平成9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：佐藤光源）平成9年度研究報告書.pp7-14,1999.
2. 菊池周一、逆耐性獲得機構におけるG蛋白質介在脳内薬物受容体伝達系の変化に関する研究—メタンフェタミン投与動物におけるG蛋白質エフェクターの発現の変化について—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：佐藤光源）平成10年度研究報告書.pp5-15,1999.
3. Kruger L, Saporta, S, Swanson LW; Photographic atlas of the rat brain. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
4. Wang, X-B, Funada, M, Imai, Y, Revay, RS, Ujike, H, Vandenberg, DJ, Uhl GR, rGb1:A psychostimulant-regulated gene essential for establishing cocaine sensitization. J Neurosci 17, 5993-6000, 1997.
5. Ujike H, Onoue, T, Akiyama K, Hamamura, T, Otsuki S; Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behaviroal sensitization. Psychopharmacol 98, 89-92,1989.
6. Byrnes, JJ, Wallace, LJ; Amphetamine-induced sensitization and release of dopamine in slices from the ventral tegmental area of rats is enhanced following administration of cholera toxin into the ventral tegmental area. Neurosci Lett 223, 45-48, 1997.
7. Narayanan, S, Wallace, LJ, Uretsky NJ; Enhanced responses to direct acting dopaminergic agonists after pretreatment with pertussis toxin in the ventral tegmental area, Soc Neurosci Abstr, 21, 971,1995.
8. 氏家寛；中枢興奮薬による精神障害の生物学的機序。薬物依存研究の最前線（加藤真、鈴木勉、高田孝二編著）星和書店、東京、1999.
9. Clapham, DE, Neer, EJ ; G protein βγ subunits. Annu Rev Pharmacol Toxycol. 37.167-203.1997.
10. Wolf ME, Xue C-J; Amphetamine-induced glutamate efflux in the rat ventral tegmental area is prevented by MK-801, SCH 23390, and ibotenic acid lesions of the prefrontal cortex. J Neurochem. 73, 1529-1538, 1999.
11. Zhang XF, Hu XT, White FJ, Wolf ME Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors. J Pharmacol Exp Ther, 281:699-706,1997 .

## F. 研究業績

### 論文

1. Shiuchi Kikuchi, Hiroto Iwasa, and Toshio Sato; Lasting changes in NMDAR1 mRNA level in various regions of cerebral cortex in epileptogenesis of amygdaloid-kindled rat. *Psychiatr Clin Neurosci* (submitted)
2. Shuichi Kikuchi, Hiroto Iwasa, Mio Sato, Chizu Ishida-Hiraiwa, Shigeru Ozaki, Kiyoshi Wada; Changes of G protein beta 1 subunit in behavioral sensitized rat to methamphetamine. (準備中)
3. Hiroto Iwasa, Shuichi Kikuchi, Hiro Miyagishima, Seiichiro Mine, Toshio Sato and Shuji Hasegawa; Involvement of stimulatory GTP binding protein in hippocampus is associated with kindling-elicited epileptogenesis. *Psychiatr Clin Neurosci* (in press).
4. Hiroto Iwasa, Shuichi Kikuchi, Hiro Miyagishima, Seiichiro Mine, Toshio Sato and Shuji Hasegawa; Up-regulation of type II adenylyl cyclase mRNA in kindling model of epilepsy. *Neurosci Lett* (in press).
5. 岩佐博人, 菊池周一, 峯清一郎, 宮城島大, 三枝敬史, 岡信夫, 山浦晶, 古関啓二郎: てんかんにおける G protein-gated inward rectifier potassium channel(GIRK)およびG蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットの関与について. 第33回日本てんかん学会, 仙台, 1999.10.22-23.
6. 菊池周一, 佐藤美緒, 尾崎 茂, 和田 清, 岩佐博人: 覚せい剤精神病の再発脆弱性におけるGタンパク質介在伝達系の変化の意義-第2報; Gprotein $\beta\gamma$ サブユニット および効果器系について-. 第1005回千葉医学会例会 第17回千葉精神科集談会, 千葉, 2000.1.29.
7. 佐藤美緒, 菊池周一, 平岩 智瑞, 尾崎 茂, 和田 清: 覚せい剤精神病の再発脆弱性におけるGタンパク質介在伝達系の変化の意義-第3報; 低分子量Gタンパク質Rasの関与-. 第1005回千葉医学会例会 第17回千葉精神科集談会, 千葉, 2000.1.29.
8. 宮城島大, 岩佐博人, 菊池周一, 峯清一郎, 長谷川修司: てんかんにおける G protein-gated inward rectifier potassium channel (GIRK2)および3量体G蛋白質 $\beta\gamma$ サブユニットの変化について. 第1005回千葉医学会例会 第17回千葉精神科集談会, 千葉, 2000.1.29.
9. 菊池周一, 岩佐博人, 宮城島大, 峯清一郎: てんかんの難治化とアポトーシス: Over-kindlingによる検討を中心に. 第1005回千葉医学会例会 第17回千葉精神科集談会, 千葉, 2000.1.29.
10. 菊池周一, 岩佐博人, 宮城島大, 平岩智瑞, 佐藤美緒, 峯清一郎, 尾崎茂, 和田清: てんかん発作発現機構とアポトーシス現象. 平成10年度精神保健研究所研究報告会, 2000.3.13.

### 学会発表

1. Kikuchi,S, Iwasa, H, Hiraiwa, C, Yamaki, M, Wada, K, Changes in GTP-binding protein ( G protein) subunit and Ras protein expression in behavioral sensitization to methamphetamine. 70th College on problems of drug dependence, 61st annual scientific meeting. Acapulco. June 12-17, 1999.
2. Ozaki, S, Kikuchi, S, Wada, K, Fukui, S, Lifetime prevalence of drug use in general population of Japan. College on problems of drug dependence, 61st annual scientific meeting. Acapulco. June 12-17, 1999.
3. 菊池周一, 岩佐博人, 山木雅高, 平岩智瑞, 宮城島大, 和田清: メタンフェタミンによる逆耐性現象とG蛋白質介在伝達系の変化-三量体G蛋白質サブユニットおよび低分子量G蛋白質 Ras 発現の変動について. 第21回日本生物学的精神医学会, 仙台, 1999.4.21.-23.
4. 菊池周一, 岩佐博人, 宮城島大, 峯清一郎: てんかんの難治化とアポトーシス- Over-Kindlingによる検討を中心に-. 第33回日本てんかん学会, 仙台, 1999.10.22-23.

## 分担研究報告書

### メタンフェタミン投与に伴うコルチコステロンとその受容体蛋白の変化

主任研究者 佐藤光源 (東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野)  
研究協力者 吉田 寿美子、沼知陽太郎  
(東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野)

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(CS)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。昨年度までは逆耐性への感受性、ストレスへの視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) 反応性に対照的な性質を有する遺伝的に同一な近交系ラット、Fischer 344/N, Lewis/N についてメタンフェタミン (MAP) 連日投与により、

(a) LEWは早期に逆耐性を形成するのに対し、F344は有意に遅く、逆耐性抵抗性である

(b) F344 では線条体で CS 受容体 mRNA が増加、LEW では減少する

(c) 尾状核、側坐核 DNA メチラーゼ mRNA は F344 で増加、Lewis で減少する

という結果を得た。HPA axisのnegative feedbackの強いF344では、CSが減少、受容体のmRNAは増加、さらに線条体で部位特異的に CS 応答性、遺伝子発現の長期持続性変化に関連するDNAメチラーゼmRNAが増加していると考えられる。LEWはその逆で、この差が逆耐性への感受性に関連している可能性があると考えた。

本年度は上記2系統のラットで MAP 慢性投与時の血中 ACTH, CS 量の変化、線条体 CS 受容体 type I (MR), type II (GR), HSP90 蛋白について解析した。MAP 慢性投与終了から 3, 24 時間の血中 ACTH 量には両系統で差を認めなかった。血中 CS 量は F344 では MAP 急性に対して慢性投与で有意に増加したが LEW では不変で、F344 は MAP による HPA axis 刺激作用に抵抗性を示すことが示唆された。しかし MAP 慢性投与では両系統共に有意に上昇したことから、線条体 CS 受容体 mRNA の転写調節には CS 以外の因子が関与している可能性が示唆された。MAP 慢性投与後 24 時間の線条体 MR, GR 蛋白は不変だった。mRNA の変動を認めた時間帯は 3 時間で、今回は蛋白への合成を考慮した時間帯としたが、さらに早い時間帯での検討も必要と思われた。HSP90 蛋白は MAP 急性、慢性投与により F344 で LEW より有意の上昇を認めた。HSP90 蛋白の変化は mRNA レベルで認められた変化と一致しており、同蛋白を介して GR の機能が調節される可能性が示唆された。

#### [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>に对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 (CS) 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 CS 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 CS を介している可能性がある。合成 CS 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、CS が逆耐性の形成を促進する可能性が示唆されている。CS 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。

昨年度までは逆耐性への感受性、ストレスへの視床下部-下垂体-副腎系 (HPA axis) 反応性に对照的な性質を有する遺伝的に同一な近交系ラット、

Fischer 344/N, Lewis/N についてメタンフェタミン (MAP) 連日投与により、

(a) LEW は早期に逆耐性を形成するのに対し、F344 は有意に遅く、逆耐性抵抗性である

(b) F344 では線条体で CS 受容体 mRNA が増加、LEW では減少する

(c) 尾状核、側坐核 DNA メチラーゼ mRNA は F344 で増加、Lewis で減少する

という結果を得た。HPA axis の negative feedback の強い F344 では、CS が減少、受容体の mRNA は増加、さらに線条体で部位特異的に CS 応答性、遺伝子発現の長期持続性変化に関連する DNA メチラーゼ mRNA が増加していると考えられる。LEW はその逆で、こ

の差が逆耐性への感受性に関連している可能性があると考えた。

本年度は F344 と LEW の HPA axis の差異とその逆耐性現象への関与についてさらに詳しく検討するため、上記 2 系統のラットで MAP 慢性投与時の血中 ACTH, CS 量の変化、線条体 CS 受容体 type I (MR), type II (GR), HSP90 蛋白について解析した。

#### [研究方法]

##### 1. 動物

7週令の近交系 Fischer 344/CRI (120-151g, 以後 F344 と略) ラットと、近交系 Lewis/CRI (180-220g, 以後 Lew と略) 雄性ラットを用い、1週間の予備飼育後に各々 3群に分けた。1群には MAP (4mg/kg) を 1日 1回、明期に連続して 21日間腹腔内投与した (F344, LEW: FC, LC)。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 (F344, LEW: FA, LA)。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 (F344, LEW: FS, LS)。

##### 2. 血中 ACTH, cortisol の測定及びウェスタン・ブロットニング

上記 3群のラットについて、最終投与後 3時間、24時間後に体幹から採血し、RIA キット (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) にて血中 ACTH を測定した。最終投与後 3時間で断頭した群については RIA キット (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) にて血中 cortisol を測定した。さらに薬物投与開始前、投与 7, 14, 21日目に薬物または生食投与 24時間後に尾静脈から採血、血中 cortisol を測定した。

ウェスタン・ブロットニングのため、全群のラットについて薬物または生食最終投与後 24時間後に断頭し、氷上で脳組織から線条体を分画して、-80°C で保存した。サンプル調整は既報<sup>15)</sup>に従った。具体的には氷冷下に TEDGM バッファー (10mM Trizma Base, 10mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA, 5mM DTT, 10% glycerol, 5μg/ml leupetin, 10μg/ml aprotinin, 60μg/ml trypsin inhibitor, 1nM PMSF, pH7.6) 0.5 ml を脳組織に加え、ガラスホモジナイザーにて組織を完全に破碎し、4°C, 112,000 g にて 120 分間遠心した。上清を分取し、loading dye (4X, 0.4% Bromophenol Blue, 8% SDS, 500 mM Tris, 40% glycerol, 20% β-Mercaptoethanol) を加えて 5分間煮沸

処理して、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に用いた。SDS-PAGE は 7% lower gel (0.375 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS), 4.75% upper gel (0.125 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS) にて、running buffer (50mM Tris, 0.2M Glycine, 0.1% SDS) 中で氷冷下に 40 V, 7 mA で 45 分間、続いて 120 V, 1 mA で 120 分間行った。定量化のためにあらかじめ各サンプルについて蛋白濃度を測定し (Bio-Rad protein assay agent, Hercules, CA, USA), 1レーン当たり 50 $\mu$ gの蛋白を含むサンプルを泳動した。ゲル蛋白の PVDF 膜 (Millipore Immobilon TM-P Transfer Membranes, Bedford, MA, USA) は氷冷下に transfer buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 10% methanol) 中で 200 V, 5-10 mA, 120 分間行った。

10% スキムミルクを含む TBS-T buffer (20mM Trizma base, 150mM NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.4) にてブロッキングした PVDF 膜を TBS-T buffer で洗浄した後、一次抗体と室温で 1時間反応させた (GR: BuGR2 monoclonal antibody, Affinity Bioreagents, Neshanic Station, NJ, USA, MR: MR214, monoclonal antibody kindly supplied from Dr. Huda Akil, MHRI, The University of Michigan, MI, USA, HSP90: mouse anti-Hsp90 monoclonal antibody, Stressgen, Victoria, BC, Canada)。TBS-T buffer で洗浄後、horseradish peroxidase 標識二次抗体を用いて室温で 1時間反応させた。ECL (MR については ECL-Plus) Western blotting detection reagent (Amersham, Bucks, UK) を用いた蛍光反応を Hyperfilm ECL (Amersham) にて感光させた。CCD カメラでコンピューターに画像を取り込み、NIH image Ver. 1.62 にてフィルム上のシグナルの黒化度を数値化した。

統計解析は、血中 ACTH, cortisol 値の比較には ANOVA (post-hoc: Scheffe's F test) もしくは two group paired t-test, ウェスタンの結果に関しては ANOVA (post-hoc: Scheffe's F test) を用いた。

#### [結果]

##### 1. 血中 ACTH

F 344 と LEW における MAP 反復投与による血中 ACTHは、各々コントロールと比較して有意な変化を認めず、両系統間でも差はなかった。

##### 2. 血中 cortisol

MAP 最終投与後 3時間の血中 cortisol は F344 では MAP 急性に対して慢性投与で有意に増加したが LEW では不変だった (Figure 1)。MAP 最終投与後

24時間では、生食、急性投与群で投与開始前、投与 7, 14, 21日目の血中 cortisol は不変だった (Figure 2A, B)。慢性投与群では投与 21日目の血中 cortisol が投与前に比べて有意に増加していた (Figure 2C)。

##### 3. 線条体 GR, MR, HSP90

MAP 慢性投与後 24 時間の線条体MR, GR 蛋白は不変だった。HSP90 蛋白はMAP 急性、慢性投与により F344 で LEW より有意の上昇を認めた (Figure 3)。

#### [考察]

アンフェタミンは、SD ラットで用量依存性に血中 CS 量を増加させる<sup>16)</sup>。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>17)</sup>ことから、MAP 反復投与による CS 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、CS は最終的には減少、これが一昨年度認められた線条体 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。今年度は F344 と LEW で MAP 慢性投与による HPA axis の変化を調べた。MAP 慢性投与終了から 3, 24 時間の血中 ACTH 量には両系統で差を認めなかった。血中 CS 量は F344 では MAP 急性に対して慢性投与で有意に増加したが LEW では不変で、F344 は MAP による急性の HPA axis 刺激作用に抵抗性を示すことが示唆された。一方、MAP 慢性投与では両系統共に有意に CS の上昇を認め、系統差はなかった。CS 受容体の転写調節は CS そのものによるフィードバックが最も大きな影響をもつとされているが、今回の結果から F344 と LEW の線条体 GR mRNA の転写調節には CS の変動以外の因子が関与している可能性が示唆された。MAP 慢性投与後 24 時間の線条体MR, GR 蛋白は不変だった。mRNA の変動を認めた時間帯は 3 時間で、今回の検討では蛋白合成にかかる時間を考慮して 24 時間後としたが、さらに早い時間帯での検討も必要と思われた。また、HSP90 蛋白は MAP 急性、慢性投与により F344 で LEW より有意の上昇を認め、mRNA レベルと一致した変動を示した。HSP90 はシャペロン蛋白として GR の機能を調節することが知られている<sup>15)</sup>ので、F344 と LEW の脳内 GR の機能が、MAP 慢性投与に伴う HSP 90 の変化を介して調節される可能性が示唆された。

#### [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) Caamano, C.A., Morano, M.I., Dalman, F.C., et al. A conserved proline in the hsp90 binding region of the glucocorticoid receptor is required for hsp90 heterocomplex stabilization and receptor signaling. *J Biol Chem*, 32, 20473-80, 1998
  - 16) Knych, E.T., Eisenberg, R.M. (1979) Effect of amphetamine on plasma corticosterone in the conscious rat. *Neuroendocrinology*, 29, 110-118.
  - 17) 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.
- [論文発表]
- Numachi, Y., Yoshida, S., Toda, S., Matsuoka, H., Sato, M.: Two inbred strains of rats, Fischer 344 and Lewis, showed differential behavior and brain expression of corticosterone receptor mRNA induced by methamphetamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, in press.
- Yoshida, S., Numachi, Y., Matsuoka, H., Sato, M.: The absence of impairment of cliff avoidance reaction induced by subchronic methamphetamine treatment in mice. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, in press.
- 沼知陽太郎, 吉田寿美子, 松岡洋夫, 佐藤光源: 興奮剤. *別冊日本臨床, 領域別症候群シリーズ27*, 523-526, 1999
- 戸田重誠, 吉田寿美子, 沼知陽太郎, 松岡洋夫, 佐藤光源 (分担執筆): 分裂病のストレス脆弱性と逆耐性現象. *精神医学レビューNo.33 精神障害における心因* (高橋徹編), p.13-20, ライフ・サイエンス, 2000
- [学会発表]
- Numachi, Y., Yoshida, S., Sato, M: Two inbred strains of rats, Fischer 344 and Lewis, showed differential behavior and brain expression of corticosterone receptor mRNA induced by methamphetamine. *ISN/ESN Satellite Meeting, Copenhagen, Denmark, 1999.*



Figure 1 corticosterone: 3hrs after acute or chronic MAP in F344 and LEW rats

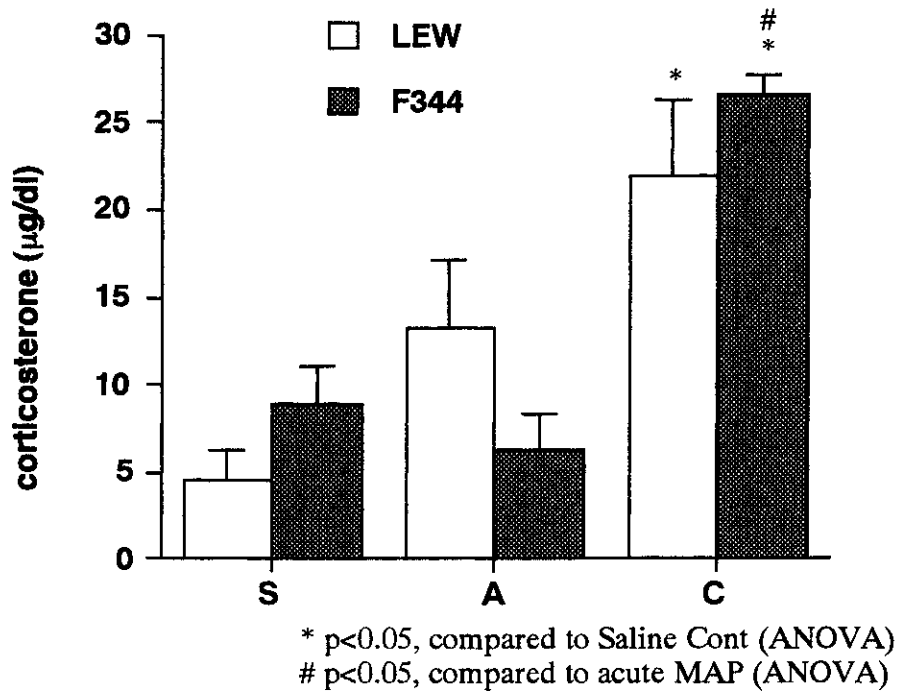


Figure 2A corticosterone: 24hrs after saline in F344 and LEW rats

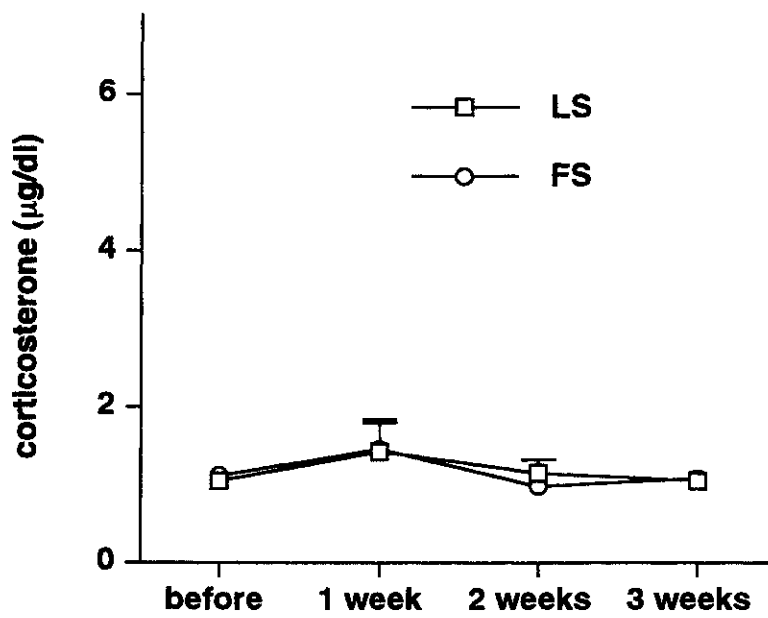


Figure 2B corticosterone: 24hrs after acute MAP in F344 and LEW rats

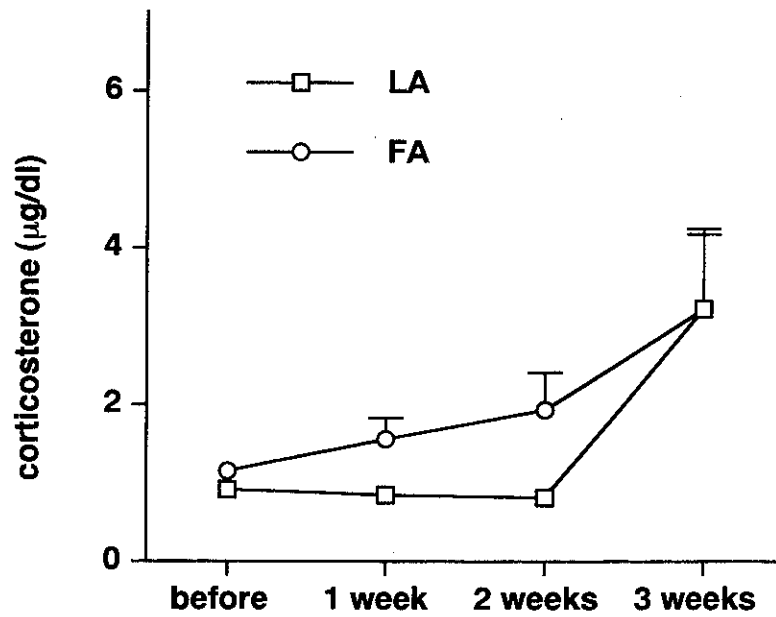
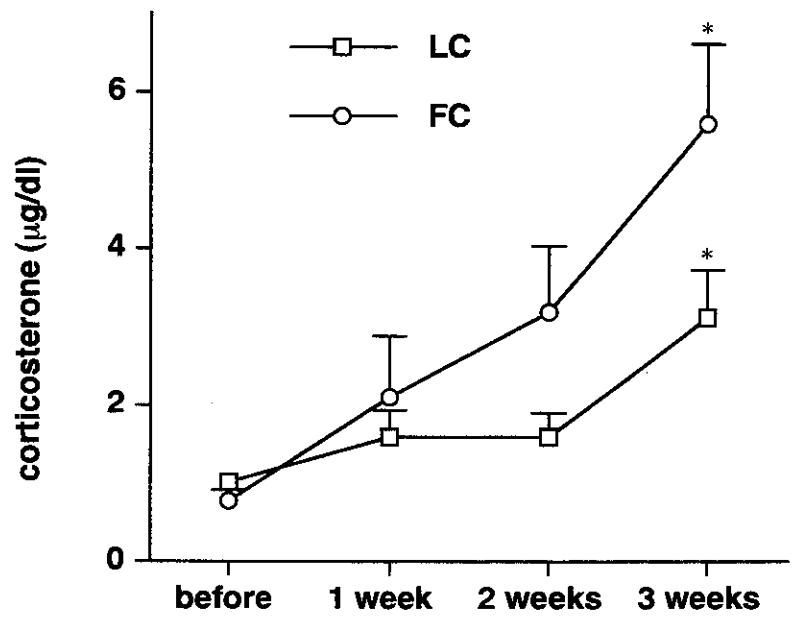
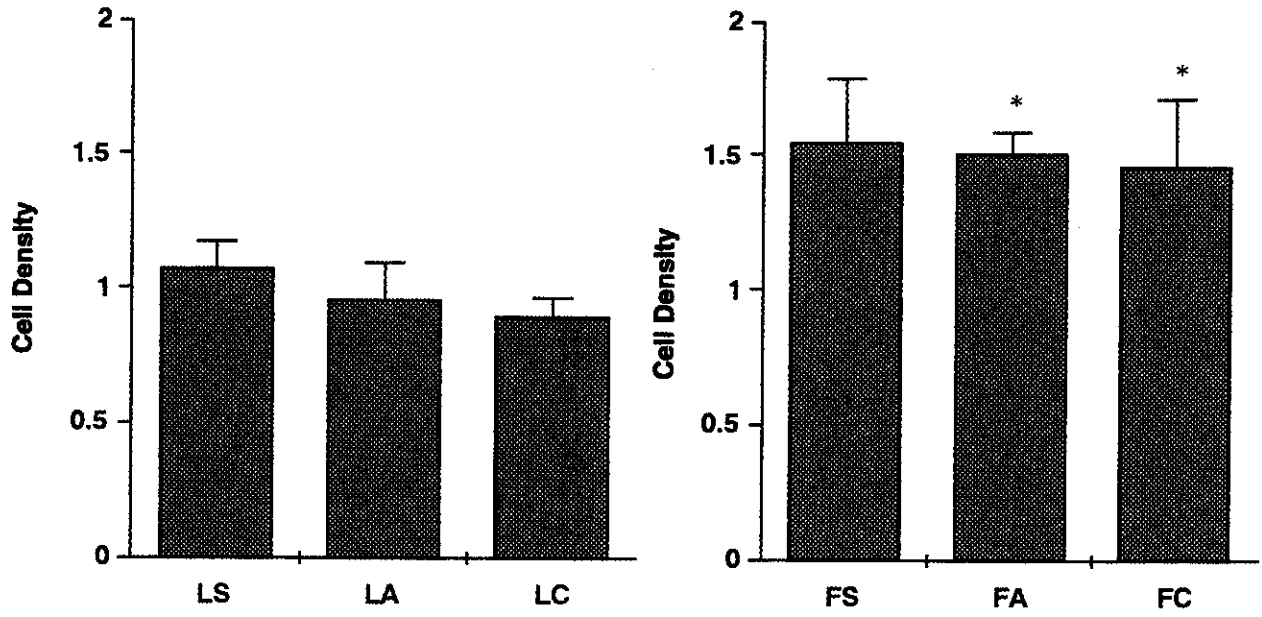


Figure 2C corticosterone: 24hrs after chronic MAP in F344 and LEW rats



\* P<0.05, compared to 'before injection' (t-test)

Figure 3 Striatal HSP90 by acute or chronic MAP in F344 and LEW rats



\* P<0.05, compared to LEW (t-test)

# チロシンリン酸化PDZ蛋白質をコードする*mrt1*の行動感作成立ラットにおける長期持続性発現増強

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：村岡新一郎<sup>1</sup>、藤山 航<sup>1,2</sup>、西川 徹<sup>3</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)

*mrt1*は、メタンフェタミン (MAP)、コカインに応答してラット大脳新皮質における発現が増強し、MAPによる発現増強が行動感作成立の臨界期である生後3週以降に特異的な新規遺伝子である。*mrt1*の発現は脳の各部位で広く認められ、ニューロンで顕著であった。*mrt1*遺伝子産物は、N末端近くにGlyに富む領域とこれに続くPDZドメインを持ち、チロシン残基リン酸化による修飾を受けていることが示唆された。MAP急性単回投与による大脳新皮質での*mrt1*発現増強は投与後1時間をピークとした一過性の現象であり、24時間後にはコントロールレベルに戻るが、MAP投与30分前にドーパミンD1受容体遮断薬SCH23390を投与することでこの応答が抑制された。一方、1日1回のMAP投与を5日間連続したラットでは、最終投与から2週間後においても*mrt1*の発現が急性投与1時間後と同じ高いレベルに維持されていた。この繰り返し投与の各30分前にSCH23390を投与することによって行動感作の成立が阻害され、その条件においては最終投与2週間後の発現レベルはコントロールと同程度であった。以上のように、新規チロシンリン酸化PDZ蛋白質をコードする*mrt1*は、ドーパミンD1受容体依存的にMAPに反応してニューロンにおける発現が一過性に増強されるが、行動感作の成立によってその増強が長期的に維持されるようになることが明らかとなった。

## 【目的】

覚醒剤による行動感作の成立は発達段階に依存し、ラットにおいては生後3週以降に特異的であり、また、コカイン等の他の薬物との交叉を示す。この現象は遺伝子発現を必要とし、長期持続性である[1]。覚醒剤であるアンフェタミン、メタンフェタミン (MAP) や麻薬であるコカインによって脳内の様々な遺伝子発現が変動することが知られているが、行動感作を成立させる分子カスケードは依然としてその実態が明らかではない[2]。*mrt1*はMAP急性単回投与で大脳新皮質での発現が増強される新規ラット遺伝子であり、昨年度までの解析結果から、1) MAPへの応答が行動感作成立の臨界期以降に特異的である、2) MAP同様に行動感作を成立させるコカインにも応答する

が、行動感作成立を阻害するドーパミンD1受容体遮断薬SCH23390には応答しない、3) *mrt1*翻訳開始点特異的なアンチセンスオリゴマーによって行動感作成立が阻害される、といった点が明らかになり、行動感作成立への関与が示唆されている。

本年度は、まず*mrt1*の機能を理解することを目的として、1) *in situ*ハイブリダイゼーションによる*mrt1*の脳内における発現様式の解析、2) 特異的抗体を用いた*mrt1*遺伝子産物の解析、を行い、また、行動感作との関係をより理解することを目的として、3) MAP急性単回投与による*mrt1*発現増強のドーパミンD1受容体依存性の検討、4) 行動感作成立の有無による*mrt1*発現レベル変動の解析、を行った。