

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

---

覚醒剤・麻薬依存の  
分子機構の解明と治療法開発に関する研究

---

総括研究報告書  
（平成12年度）

主任研究者 西川 徹

平成13年3月

# 総括研究報告書（平成12年度）

## 目 次

### I. 総括研究報告

覚醒剤・麻薬依存の分子機構の解明と治療法開発に関する研究

西川 徹 . . . . . 1

### II. 分担研究報告

覚醒剤・麻薬による依存形成と  
精神病様状態の分子病態と治療法開発に関する研究

西川 徹 . . . . . 15

研究協力者 山本直樹、梶井 靖、村岡新一郎、  
海野麻未、土田英人、黒田安計

逆耐性現象形成に伴う脳 DNA メチラーゼの発現変化

佐藤光源 . . . . . 22

研究協力者 沈 昊偉、藤山 航、戸田重誠、  
吉田寿美子、沼知陽太郎

ノックアウトマウスを用いた薬物依存の分子遺伝学的研究

曾良一郎 . . . . . 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧 . . . . . 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 39

V. 平成12年度分担研究者氏名一覧 . . . . . 187

## I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
総括研究報告書

覚醒剤・麻薬依存の分子機構の解明と治療法開発に関する研究

主任研究者 西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学分野 教授  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長

**研究要旨：** 本研究では、医学的・社会的に重大な問題となっている、覚醒剤や麻薬が引き起こす依存形成および精神病様状態の原因と病態にかかわる分子異常を明らかにし、診断や予後判定の生物学的マーカーや、画期的な治療・予防法の手がかりを得ることをめざしている。このため、1)覚醒剤や麻薬を経験した実験動物やヒトにおいて、これら薬物に対する感受性が増大して異常が出現し易くなる変化である逆耐性現象は、薬物を渴望することや薬物による精神異常の発症・再燃のモデルと考えられていること、2)ヒトにおいて、思春期以前には覚醒剤や麻薬を経験しても依存形成や精神病様状態が生じ難く、齧歯類では生後3週以降に逆耐性現象が形成されるようになること、等の点に着目し、覚醒剤・麻薬依存に関連する候補遺伝子として、ラットの脳で、生後3週以降に覚醒剤や麻薬に応答するようになる未知および既知の遺伝子を検索・同定した。このうち新規遺伝子 $mnt-1$ の詳細な解析が進行し、1)逆耐性現象との関連が覚醒剤・麻薬によりD1ドーパミン受容体刺激を介して発現誘導が生じ、この誘導を阻害すると逆耐性の形成が抑制される、2)逆耐性が形成されたラットの大脳皮質では持続的な基礎的発現の上昇が見られる、等の所見から、逆耐性の形成や維持に関与することがわかった。また、 $prt-1$ 遺伝子は麻薬が引き起こす分裂病様の陰性症状に関係する可能性が示唆された。そこで、薬物依存患者における変化を検討するため、これらのヒト相同遺伝子を検出し構造解析を進めた。一方、逆耐性現象が成立し易い系統のラットの海馬では、覚醒剤投与後に、グルココルチコイド受容体の調節を受けるDNAメチラーゼ mRNAの増加が見られるのに対して、成立し難い系統には認められず、覚醒剤・麻薬乱用におけるストレス脆弱性との関連が推測された。さらに、遺伝子操作動物を用いた研究より、コカインの報酬作用にはドーパミントランスポーター以外にもセロトニントランスポーター、モノアミン小胞トランスポーター等が大きな役割を果たすことが示唆され、 $\mu$ オピオイド受容体がモルヒネのみならずエタノールの報酬にも関係することが明らかになった。

**分担研究者**

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

曾良 一郎

東京都精神医学総合研究所精神薬理研究部門  
副参事（指定）研究員

も社会的にも急務となっている。そこで本研究では、覚醒剤や麻薬が引き起こす依存形成および精神病様状態の原因と病態にかかわる分子異常を明らかにし、診断や予後判定の生物学的マーカーや、画期的な治療・予防法の手がかりを得ることをめざす。

このため、1)覚醒剤や麻薬を経験した実験動物やヒトにおいて、これら薬物に対する感受性が増大して異常が出現し易くなる変化である逆耐性現象は、薬物を渴望することや薬物による精神異常の発症・再燃のモデルと考えられていること、2)ヒトにおいて、思春期以前には覚醒剤や麻薬を経験しても依存形成や精神病様状態が生じ難く、齧歯類では生後3週以降に逆耐性現象が形成されるようになること、

**A. 研究目的**

近年、国内外で、強い依存性を示す覚醒剤・麻薬等の薬物の乱用が増加の一途をたどり、乱用がもたらす精神障害や各種犯罪・事故の誘発が深刻な事態を招いているため、薬物依存の克服は、医学的に

などの点に着目し、覚醒剤・麻薬依存に関連する候補遺伝子として、ラットの脳で、生後3週以降に覚醒剤 (methamphetamine: MAP) またはフェンサイクリジン (phencyclidine: PCP) に応答ようになる未知および既知の遺伝子を検索する。検出された遺伝子群およびそれらの産物について、構造・局在・機能・種々の向精神薬に対する応答、発現抑制時の逆耐性形成への影響等を解析し、逆耐性現象に特異的に関係する分子とそれらを含む神経回路を同定する。また、薬物依存患者を含む精神疾患患者において、これらの逆耐性現象関連遺伝子のヒト相同遺伝子の変化を調べ、覚醒剤・麻薬による依存形成および精神病様状態の原因あるいは病態形成因子、または治療法開発の標的分子としての意義を検討する。

一方、覚醒剤・麻薬乱用患者および逆耐性が形成された動物におけるストレス脆弱性の分子機構や、従来から薬物依存への関与が示唆されている情報処理系の役割を明らかにする目的で、グルココルチコイド受容体とその制御下にある遺伝子群の依存性薬物による発現変化や、種々のモノアミントランスポーターあるいはオピオイド受容体の遺伝子ノックアウトマウスにおける薬物の報酬効果の変化および情報伝達分子の変化等を調べる。さらに、覚醒剤や麻薬が引き起こす脳内物質や行動の異常を抑制する内在性物質D-セリンの代謝および機能に関連する脳内分子の同定も進め、依存性薬物による脳機能障害に対する新しい治療法開発への応用の可能性を検討する。

## B. 研究方法

今回報告した動物実験は、主任および分担研究者が所属する各施設の倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。データの統計学的解析においては、2群間の比較にStudent's t-testまたはMann-Whitneyを用いた。3群以上の比較は、一元分散分析またはKruskal-Wallis testにもとづく多重比較テストにより行った。個々の研究方法は、以下に示す通りである。

### 1. 覚醒剤・麻薬による依存形成と精神病様状態の分子病態と治療法開発に関する研究

#### (1) RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) による RNA finger printing

生後8日齢または50日齢の動物に薬物または生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質より total RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO II, TAKARA) で解析してfingerprintを得た。覚醒剤や麻薬の投与実験では、fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。D-, L-セリンまたは生理食塩水を生後8日令のラットに全身投与する実験では、大脳新皮質における発現がD-セリン選択的に変化する遺伝子転写産物を解析した。これらのRAP-PCRクローンにもとづいて、ラット脳cDNAライブラリーのスクリーニング、RACE法 (rapid amplification of cDNA ends)、Cap site hunting法等により、全長mRNAに対応するcDNAの構造を決定した。

#### (2) 定量的RT-PCR

RAP-PCR法で検出された遺伝子の種々の薬物に対する反応性は、competitive RT-PCR法やco-amplification RT-PCR法等により、定量的に解析した。co-amplification RT-PCR法では、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28Sの増幅のカイネティックスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCRを行った。増幅産物を制限酵素

処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

#### (3)ノーザンブロット分析・サザンブロット分析

ノーザンブロット分析は、ラットの脳各部位と各末梢臓器から調整したpoly(A)-positive fractionを用い、32Pで標識したcDNAプローブにより行った。また、サザンブロット分析は、BamHI、EcoRIあるいはHindIIで消化した大脳新皮質ゲノムDNAサンプルに同様のプローブを作用させて行った。

#### (4)アンチセンスオリゴマーを用いた実験

mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスS-オリゴマー（phosphorotation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 $\mu$ /lhで溶液を放出）を用いて動物に持続的に投与した。対照群には同じ塩基組成、塩基数で配列をランダムに並べ替えたミスセンスS-オリゴマーを用いた。各オリゴマーを150mM NaClに溶解して0.5、1.0、または2.5 $\mu$ g/ $\mu$ l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（4.0mg/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した。Mrt-1蛋白の検討は、アンチセンスS-オリゴマー注入開始3日目に行った。

#### (5)抗Mrt1抗体の作製

mrt1の塩基配列から、少なくとも2種類の蛋白質（Mrt1AおよびMrt1B）がコードされていることが予想されたため、1)双方の蛋白質に共通、2)Mrt1Aに特異的、あるいは3)Mrt1Bに特異的なアミノ酸配列に対する3種類の抗体を作製した。それぞれに対応するペプチドを合成し、keyhole limpet hemocyaninに結合させた後、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。力価の高い抗血清をアフィニティカラムで精製して実験に用いた。

#### (6)ウェスタンブロット分析

ラット大脳新皮質から、0.125% SDS、0.625%

sodium deoxycholate、1.25% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA と Complete Mini (Roche)を含む緩衝液で蛋白を抽出した。蛋白は7.5% または10% SDS-PAGEによって分離した後、Immun-Blot polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad)にトランスファーし、種々の蛋白に対する抗体と反応させた。

## 2. 逆耐性現象形成に伴う脳 DNA メチラーゼの発現変化

### (1)動物

7週令の近交系 Fischer 344 系雄性ラット（110-130g、船橋農場）と近交系 Lewis 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 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度50 $\pm$ 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。

### (2)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 の常同行動評価法を用いて6段階評価を行い、マン-ホイットニーのU検定を用いて統計解析を行った：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。

### (3)逆耐性モデル動物の作成及び in situ hybridization

F344 と LEW を各々3群（各群 n=5-6）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24時間後に断頭、氷上にて脳を採取した。採取した脳はドライアイスパウダーにて速やかに凍結し標本切片を作成するまで-80℃にて保存した。

各脳標本はクリオスタットで14  $\mu$ mの暑さにスライスし、poly-L-lysineコートしたスライドガラスに1スライドガラスあたり4切片をマウントした。脳は海馬や線状体を含む矢状断にスライスした。これら切片は実験に供するまで-80℃にて保存した。

切片は4% paraformaldehyde にて1時間固定した後、2xSSC (1xSSC; 150mM sodium chloride, 15mM sodium citrate) で5分間3回洗浄した。その後、切片は0.25%のacetic anhydride を含む triethanolamine (0.1M, pH 8) 中に室温で10分間インキュベートした。超純水で洗浄し、50, 75, 85, 95そして100%エタノールを用いて切片を乾燥した。風乾してエタノールを蒸発させた後35S標識したcRNAプローブをもちいてハイブリダイゼーションを行った。プローブを作成するため、ラット DNA cytosine 5 methyltransferase (Dnmt1, AB012214) に相応した492bpの断端をプラスミドにサブクローニングした。プラスミド1  $\mu$ gを1本化し、5xtranscription buffer (Promega, Madison, WI USA), 125  $\mu$  Ci [35S]UTP (Amersham, Tokyo), 125  $\mu$  Ci[35S]CTP (Amersham, Tokyo), 150  $\mu$  M ATP, 150  $\mu$  M GTP, 12.5 mM dithiothreitol, 20U RNAase inhibitor (Promega, Madison, WI USA), 6U T7 RNA polymerase (Promega, Madison, WI USA)を37℃で90分インキュベートし、カラムにてアンチセンス鎖cRNAプローブを精製した。作成したプローブはハイブリダイゼーションバッファー(50% formamide, 10% dextran sulfate, 3xSSC, 50mM sodium phosphate, 1x Dehardt's solution, 0.1 mg/ml yeast tRNA, 10mM dithiothreitol, pH 7.4)を加え、1.5 x 10<sup>6</sup>dpm/70  $\mu$ lとなるように調整した。

切片には1スライドガラスあたり、上記のハイブリダイゼーションバッファー70  $\mu$ lを滴下しカバーガラスで表面を覆った。50% formamide で湿らせたタイトボックスにスライドガラスを配置し、55℃オーバーナイトでハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション後、2xSSC 5分間3回洗浄し

た後、RNase (200  $\mu$ g/ml, 0.5M NaCl Tris buffer, pH 8)で1時間処理した。2xSSC, 1xSSC, 0.5xSSCで各々5分間洗浄、62℃の0.1xSSCで1時間熱変性を行った。超純水で洗浄し、50, 75, 85, 95そして100%エタノールを用いて切片を乾燥した。これらの切片をKodak XAR フィルムに10日間暴露した。ネガティブコントロールとしては、同じプラスミドから得たセンス鎖のcRNAプローブを用いた。画像解析にはコンピューターソフトMCID (Imaging Research Inc)を用いてフィルムから海馬CA1, CA2, CA3, 歯状回領域、手綱核の黒化度 (optical density; OD) を半定量的に計測した。

### 3. ノックアウトマウスを用いた薬物依存の分子遺伝学的研究

ダブルノックアウトマウスを含むモノアミントランスポーター (ドーパミン、セロトニン、シナプス小胞トランスポーター)、 $\mu$ オピオイド受容体ノックアウトマウスは、遺伝型判別をサザンブロッティングあるいはPCR法により行った後に行動薬理学的、神経生化学解析を行った。行動薬理学的解析としては移所運動量を自発運動量測定装置を用いて、報酬を場所条件づけ試験を用いて測定した。神経化学的解析としてはモノアミンとその代謝物含量をHPLC、モノアミンのトランスポーターや受容体数を放射性リガンド結合実験より測定した。

## C. 研究結果

### 1. 覚醒剤・麻薬による依存形成と精神病様状態の分子病態と治療法開発に関する研究

#### (1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子mrt-1の解析

逆耐性現象は、MAPを含む中枢刺激薬の乱用によって出現する薬物の渴望や精神病状態の発症・再燃のモデルと考えられ、齧歯類では生後3週以降に形成されるようになる。RAP-PCRにより、MAPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子群のひとつとして、大脳新皮質からmrt-1 (MAP responsive transcript-1) が検出され、シナプスに局在を示すPDZ蛋白をコードすることがわかった。定量的解析によりmrt-1は、1)生後3週以降にMAP投与後の発現誘導が見られる、2)逆耐性を引き起こす他の薬物

のコカインでも発現が増加する、3)MAP反復投与後、逆耐性が成立したラットの大脳新皮質で基礎的発現量が上昇するが、MAPを再投与しても発現誘導は認められない、4)MAP反復投与時に、D1ドーパミン受容体遮断薬を併用して逆耐性形成を阻害した動物の脳では基礎的発現の上昇は見られない、等が明らかになった(2)~(4)は成熟期における解析)。

Mrt-1蛋白については、mrt1の塩基配列から、PDZドメインとPXドメインをひとつずつ備えた、少なくともC末端領域が異なる2種類のイソフォーム(Mrt1AおよびMrt1B)が存在すると考えられた。今年度の抗体を用いたMrt1蛋白の解析結果は、cDNAの塩基配列から予想されるMrt1蛋白の特徴を支持した。Mrt1AおよびMrt1Bの双方に反応する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、免疫反応が62kDa付近のバンドとして検出され、コーディングフレームから期待される蛋白のサイズと一致することが確認された。

mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを脳室内に持続注入することにより、MAPを反復投与しても逆耐性の形成が阻害された。しかし、ミスセンスオリゴマー、翻訳開始コドンを含まない配列に対するアンチセンスオリゴマーあるいは溶媒を注入しても、逆耐性の形成は抑制されなかった。アンチセンスオリゴマーを注入している条件下では、線条体のMrt1蛋白(Mrt1AとMrt1B)の基礎的発現量が低下していた。また、ミスセンスオリゴマーを投与した対照群の線条体では、MAP投与時にMrt1蛋白量が増加したが、アンチセンスオリゴマー投与群では変化がなかった。(2)PCPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子prt-1の検討

RAP-PCRにより、PCPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子群のひとつとして、大脳新皮質からPDZ蛋白をコードするprt-1(PCP responsive transcript-1)を検出した(PCPにより発現増加)。定量的解析によりprt-1は、成熟動物の脳において、1)ドーパミン作動薬であるMAPおよびコカイン、GABA-A受容体を賦活するpentobarbital等の投与では有意な変化を示さないが、PCPと同じくNMDA受容体遮断作用をもつdizocilpineの投与後には発現が増

加する、2)PCPによる発現の増加はドーパミン受容体遮断薬のhaloperidolによって抑制を受けない、等の特徴をもつことがわかった。

### (3)D-セリン選択的に応答する遺伝子dsr-1の検討

大脳新皮質から、脳内D-セリン濃度の上昇に应答して発現が増加する新規遺伝子dsr-1(D-serine-responsive transcript 1)をクローニングした。dsr-1 mRNAは、3'末端側に既知のvacuolar type proton-ATPase subunitをコードするM9.2遺伝子mRNAと同じ631の塩基配列をもつことがわかったが、5'末端側は新規配列であった。塩基配列上、2つのORF(open reading frame)があり、3'末端側にコードされる蛋白は1つの膜貫通構造をもつことが予想された。ノーザンブロットでは、予想されるサイズの単一バンドが確認された。また、サザンブロットから、dsr-1遺伝子は、ゲノム上一コピー存在することが示された。RT-PCRにより発現分布を検討したところ、脳、肺、精巣等に高く、相対的に脳での発現量が少ないM9.2とは異なることがわかった。また、dsr-1はD-セリンの腹腔内投与後には発現が有意に増加するが、L-セリンには有意な反応を示さなかった。M9.2はいずれの異性体にも反応せず、dsr-1の変化は非特異的でないことが明らかになった。

## 2. 逆耐性現象形成に伴う脳 DNA メチラーゼの発現変化

### (1)常同行動の逆耐性現象

F 344 と LEW における MAP 反復投与による常同行動の変化は、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

DNA メチラーゼ mRNA は、脳内では海馬、手綱核、梨状皮質、脳質周囲のsubventricular zone (SVZ)に高い発現を認めた。センス鎖のcRNAプローブではシグナルを認めなかった。

MAP 単回、複数回投与から 24時間後の海馬CA1, CA2, CA3, 歯状回領域、手綱核で認められた DNA



メチラーゼ mRNA 発現量を定量化した結果を Figure 1 に示す。MAP 単回投与により、F344 では海馬 DNA メチラーゼ mRNA は不変、手綱核では生理食塩水を投与した対照群に比べて有意に増加していた。LEW では海馬 CA1 領域で対照群に比べて有意に増加していた。MAP 複数回投与により、F344 では海馬、手綱核で DNA メチラーゼ mRNA は変化せず、LEW では海馬 CA1, CA3 領域で対照群に比べて有意に増加していた。

また、MAP の投与に拘わらず、海馬歯状回領域の DNA メチラーゼ mRNA の発現量は、F344 に比べて LEW で 2 倍程度高かった。

### 3. ノックアウトマウスを用いた薬物依存の分子遺伝学的研究

#### (1)モノアミントランスポーター ノックアウトマウス

抗うつ薬は通常、依存性を持たないとされているが、DAT, NETノックアウトマウスにおいて選択的 5-HT取り込み阻害剤(SSRI)による場所条件付け試験を行ったところ、両者ともにSSRIの報酬効果が観察される予備的な結果が得られた。DATノックアウトマウスにおいて場所条件付け試験によるコカインの報酬作用は保たれていた。コカインの報酬作用の他の候補としては 5-HTT が考えられたが、5-HTT ノックアウトマウスにおいてもコカインの報酬は減少するどころかむしろ増加する結果が得られた。そこで DATと5-HTTのダブルノックアウトマウスを新たに作製し、コカインの報酬が保持あるいは消失するかを検討した。幸いにこのダブルノックアウトマウスは成体まで成長し、行動薬理学的、神経化学的解析を行うことができた。ダブルノックアウトマウスはDAT単独ノックアウトマウスを上回る基礎運動量の著しい増加がみられたが、コカイン投与による運動量の増加は消失していた。場所条件付け試験を行ったところ、ダブルノックアウトマウスではコカインの報酬が消失していた。5-HTT (-/-)DAT (-/-) および5-HTT(+/-) DAT (-/-)では消失、5-HTT(-/-) DAT (+/-)では保持された。ダブルノックアウトマウスの神経化学的解析では、モノアミントランスポーターの発現量は遺伝子量に依存していた。

#### (2)Muオピオイド受容体ノックアウトマウス

Muオピオイド受容体ノックアウトマウス（以下 Muノックアウトマウス）を用いてモルヒネの報酬作用へのMuオピオイド受容体の関与を検討した。ホモマウスでは、場所条件づけ試験、静脈内自己投与試験ともにモルヒネの報酬作用は消失していた。一方、ヘテロマウスでは、場所条件づけ試験におけるモルヒネの報酬作用は遺伝背景により違いが見られた。C57/129系の混合遺伝背景のヘテロマウスでは、モルヒネの報酬作用は増加していたが、C57 コンジェニック系ではモルヒネの報酬作用は野生型と比較して半減していた。Muノックアウトマウスではモルヒネのみならず $\mu$ オピオイド受容体に直接の親和性を持たないエタノールの報酬も減弱していた。

### D. 考察

#### 1. 覚醒剤・麻薬による依存形成と精神病様状態の分子病態と治療法開発に関する研究

##### (1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子mrt-1の解析

本研究から、新規遺伝子mrt-1の薬物反応性は逆耐性現象の薬理学的特徴と一致していることがわかった。すなわち、1)覚醒剤に対する応答が生後3週頃以降に出現する、2)覚醒剤ばかりでなくコカインにも応答する（交叉反応性）、3)MAP反復投与後において基礎的発現量が持続的な変化を示し、この変化はD1ドーパミン受容体遮断薬を併用投与して逆耐性の形成を阻害すると認められなくなる、等の特徴があった。逆耐性が成立した動物の脳新皮質では、MAPに対する応答性が見られないことを考えあわせると、mrt-1は逆耐性現象の形成と維持に必要な分子カスケードに含まれると推測された。

この推測は、アンチmrt1オリゴヌクレオチドを脳室内に注入した実験でも支持された。注入開始3日目では、ミスセンスオリゴマー投与対照群に比してMrt1蛋白（Mrt1AとMrt1B）の発現量が有意に低下していることから、アンチオリゴマーが有効に作用しmrt1遺伝子の発現を抑制していることが確認された。また、この条件下では、MAPによる発現上昇が完全に抑制され、逆耐性現象が成立しなくなることがわかった。したがって、逆耐性の形成には、mrt1遺伝子が翻訳され、Mrt1B蛋白が増加することが必

要と考えられる。

mnt-1にコードされる蛋白質については、1)蛋白-蛋白間相互作用に関係しPDZおよびPXドメインをひとつずつ持つこと、2)少なくともMnt1AとMnt1Bの2種類のイソフォームがあること、等がわかった。Mnt1BをコードするバリエーションがMAPやコカインに選択的に応答することや、他のPDZ蛋白には、神経伝達物質の受容体・トランスポーター・遊離装置等と細胞骨格蛋白等を結合させる働きをもつものが多く知られていることから、Mnt1Bは、膜受容体の配置変化等のシナプスの再構築をもたらすことにより、逆耐性のような可塑的な現象の成立に関与する可能性がある。今後は、Mnt1蛋白の局在や相互作用をもつ蛋白の検索を行い、逆耐性現象の分子カスケードを明らかにする予定である。また、薬物依存の素因や病態に関する可能性と、新しい薬物性精神障害の治療薬の標的分子となる可能性があり、現在ヒト相同遺伝子を解析中である。

#### (2)PCPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子prt-1の検討

PCPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子群のひとつとしてクローニングされたprt-1は、PDZドメインをもつことよりシナプスで機能する受容体、トランスポーター、伝達物質遊離機構等の蛋白と相互作用をもつと考えられる。ドーパミン受容体またはGABA受容体作動薬では有意な発現誘導が生じず、選択的NMDA受容体遮断薬によってPCPと同様の発現誘導が見られることは、prt-1がNMDA受容体を介するグルタミン酸伝達に関与することを示唆している。また、PCPによる発現の増加はドーパミン受容体遮断薬のhaloperidolによって抑制を受けない特徴をもつことから、NMDA受容体遮断作用をもつ麻薬が引き起こす、抗精神病薬抵抗性の分裂病様精神障害に関与する可能性がある。

#### (3)D-セリン選択的に応答する遺伝子dsr-1の検討

ラット大脳新皮質から、脳内D-セリン濃度の上昇に応答して発現が変化する未知遺伝子群があることを見出し、そのうちdsr-1のcDNAの塩基配列を同定した。推定される産生蛋白質は、一回の膜貫通構造を含むproton-ATPaseサブユニットM9.2蛋白と類似の構造をもつことや、proton-ATPaseはアセチルコリン

やモノアミンの遊離や取り込みとの関連が知られていることから、Dsr-1蛋白は内在性D-セリンの遊離や取り込みの機構に関与している可能性がある。また、D-セリンはラットにおいて、抗MAP作用および抗PCP作用を示し、抗精神病薬抵抗性の異常行動も改善することから、Dsr-1蛋白が、従来より治療効果の高い新しい薬物性精神障害の治療薬開発の標的分子となることが期待される。

#### 2. 逆耐性現象形成に伴う脳 DNA メチラーゼの発現変化

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。

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。DNAメチラーゼは脳内に広く分布していることが知られているが、今回のin situ hybridizationでは海馬、手綱核、梨状皮質、脳質周囲のsubventricular zone (SVZ)に高い発現を認めた。海馬歯状回とSVZは、ラット脳では神経細胞の新生が確認されている部位である。DNAメチラーゼは発生、分化、組織特異的な転写制御に関わるとされていることから、上記2部位でのDNAメチラーゼは神経幹細胞の分化に何らかの関連を持つ可能性が考えられる。

以前我々は、DNAメチラーゼmRNAの脳内発現がMAP投与後3時間後に変化していることを報告した。この時は海馬全体でのmRNAを定量したが、今回in situ hybridizationにて検討した結果、LEWの海馬CA1領域で特異的な変化を見出し、なおかつこ

の変化が MAP の最終投与から24時間後まで持続していることが示唆された。F344 と LEW で認められた系統差の詳細な機序は不明だが、DNA メチラーゼは CS 受容体を介して肝臓で誘導されることが知られているので、両系統の HPA axis の反応性の差異が関連している可能性も考えられる。

今回の実験は mRNA レベルの検討なので、DNA メチラーゼの活性、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。次年度以降は、MAP 投与ラットの脳で、

- (i) 脳 DNA メチル化が変化するか。
- (ii) メチル化が変化する部位の下流に存在する遺伝子は何か。
- (iii) メチル化が変化する遺伝子の機能と MAP の脳内作用との関連

などに関して検討する予定である。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。

### 3. ノックアウトマウスを用いた薬物依存の分子遺伝学的研究

抗うつ薬は通常、依存性を持たないとされているが、DAT、NETノックアウトマウスにおいて選択的 5-HT取り込み阻害剤(SSRI)による場所条件付け試験を行ったところ、両者ともにSSRIの報酬効果が観察されたことからモノアミントランスポーター単独欠損マウスにおいては報酬系のメカニズムに変化が起こっていることが考えられる。

DATノックアウトマウスは過剰なドーパミン伝達を反映し基礎運動量が著しく増加していたことから、DATを標的とする覚醒剤の作用機序のみならず、緊張型精神分裂病、多動児症候群等の病態解明の動物モデルとして期待されている。コカインやアンフェタミンなどの覚醒剤投与による運動量の増加が消失したことから、DATがコカインやアンフェタミンの作用部位であることが明らかとなった。一方、運動量の増加が消失しているにもかかわらず、DATノックアウトマウスにおいて場所条件付け試験によるコカインの報酬作用は保たれていた。コカインの報酬作用の他の候補としては 5-HTT が考えられたが、5-HTTノックアウトマウスにおいてもコカインの報酬

は減少するどころかむしろ増加する結果が得られた。米国デューク大学のグループによりNETノックアウトマウスにおいてもコカインの報酬は増加する結果が得られている(Xu et al. Nature Neurosci. 2000)。これより5-HTT, DAT, NETがそれぞれ単独に欠損しても、一方のトランスポーターが補い、コカインの報酬が保持されることが推測された。DATと5-HTTのダブルノックアウトマウスでは、コカインの報酬が消失したことから、コカイン報酬にはDATと5HTTが重要な役割を果たしていると考えられる。

Muノックアウトマウスを用いてモルヒネの報酬作用への Muオピオイド受容体の関与を検討したところ、ホモマウスでは、場所条件づけ試験、静脈内自己投与試験ともにモルヒネの報酬作用は消失していた。一方、ヘテロマウスでは、場所条件づけ試験におけるモルヒネの報酬作用は遺伝背景により違いが見られたことから、モルヒネ報酬においてもMuオピオイド受容体の複雑な関与が考えられる。

### E. 結論

1. 乱用薬物による脳機能障害の分子機構にアプローチする目的で、乱用の対象となる薬物による依存形成および精神症状が思春期以前には生じにくく、実験動物においても、これらの薬物による異常行動や脳の活動異常のパターンが生後発達に伴って変化することに注目し、ラット大脳新皮質より、MAPまたはPCPに一定の発達段階から成熟期における応答性を獲得する遺伝子のスクリーニングと解析を継続した。

2. 覚醒剤・麻薬が引き起こす依存形成や分裂病様の幻覚・妄想状態の発症・再燃のモデルである逆耐性現象が形成され始める生後3週頃からMAPに応答性を示すmrt1遺伝子は、蛋白間の相互作用に関与するPDZおよびPXドメインをもつ、少なくとも2種類の蛋白質(Mrt1AおよびMrt1B)をコードすることが明らかになった。MAP投与後に発現が誘導されるMrt1Bバリエーションは、逆耐性を誘発するコカインにも応答性をもち、逆耐性現象と同様にMAP反復投与後に基礎的発現量が持続的に増加することや、アンチmrt1オリゴヌクレオチドがMrt1蛋白の基礎的発現とMAP応答性および逆耐性の形成を阻害する

ことより、Mnt1Bバリエーションが逆耐性の形成と維持に必須の分子カスケードに含まれることが示唆された。

3. 大脳新皮質から、PCPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子としてクローニングされたprt-1は、PDZ蛋白をコードしており、薬理的性質から、NMDA受容体を介するグルタミン酸伝達の調節と、NMDA受容体遮断作用をもつ麻薬による抗精神病薬抵抗性の分裂病様症状の発現に関与する可能性が示唆された。

4. D-セリンに応答する新規遺伝子dsr-1をクローニングした。脳に高い分布を示すことやvacuolar type proton-ATPase subunitと類似の構造をもつことからD-セリンの放出や取り込みに関与する可能性があり、今後、新規抗精神病薬として期待される内在性D-セリンシグナルの調節薬開発の標的分子としての意義を検討する。

5. 依存性薬物への嗜好性、逆耐性への感受性、ストレスへの視床下部・下垂体・副腎系の反応性において、過敏性を示すFischer 344 (F344) 系ラットと抵抗性を有するLewis (LEW) 系ラットで、MAP 単回、複数回投与から24時間後の脳 DNA メチラーゼ mRNA の発現を in situ hybridization 法で検討したところ、1) DNA メチラーゼ mRNA は、脳内では海馬、手綱核、梨状皮質、脳質周囲の subventricular zone (SVZ) に高い発現を認める、2) MAP 単回投与により、F344 では海馬 DNA メチラーゼ mRNA は不変、手綱核では生理食塩水を投与した対照群に比べて有意に増加する。LEW では海馬 CA1 領域で対照群に比べて有意に増加する、3) MAP 複数回投与により、F344 では海馬、手綱核で DNA メチラーゼ mRNA は変化せず、LEW では海馬CA1、CA3 領域で対照群に比べて有意に増加する、等の結果を得た。したがって、MAP投与に伴い、脳DNA メチル化及び下流の遺伝子の発現変化がF344 とLEW 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。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Murata M, Kashiwa A, Oshima A, Umino A, Kurachi M and Nishikawa T: Normifensine-induced c-fos mRNA expression in the discrete brain areas of the developing rat. *Neurosci Lett*, in press
2. Sora I, Elmer G, Funada M, Pieper J, Li X-F, Hall S, Uhl G R. Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacol*, in press
3. Hall S, Sora I, Uhl G R. Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacol*, in press
4. Sora I, Hall S, Andrews A M, Itokawa M, Li X-F, Wei H-B, Wichems C, Lesch K, Murphy D L, Uhl G R. Molecular Mechanisms of Cocaine Reward: Combined Dopamine and Serotonin Transporter Knockouts Eliminate Cocaine Place Preference. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press
5. Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A and Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dsr-1 from the rat cerebral cortex. *Biochem Biophysiol Res Com*, 280: 1189-1196, 2001
6. Shen, H, Numachi, Y, Yoshida, S, Toda, S, Awata, S, Sato, M: ECS Regulates Serotonin Transporter mRNA Expression in Rat Raphe Nucleus. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 55, 75-77, 2001
7. Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GR, E Mignot E, Edgar DM: Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci*, 21: 1787-1794, 2001
8. Toda S, Kajii Y, Sato M, and Nishikawa T: Reciprocal expression of infant- and adult-preferring transcripts of CDCrel-1/septin gene in the rat neocortex. *Biochem Biophysiol Res Com* 273: 723-726, 2000
9. Shirayama Y, Mitsushio H, Takahashi K and Nishikawa T: Differential effects of haloperidol on phencyclidine-induced reduction in substance P contents in rat brain regions. *Synapse* 35: 292-299, 2000
10. 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*, 190, 205-212, 2000

11. 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*, 914, 33-45, 2000

12. Uhl GR, Li S, Takahashi N, Itokawa K, Lin Z, Hazama M, Sora I: The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J* 14: 2459-2465, 2000

13. Qiu Q, Sora I, Ren K, Uhl GR, Dubner R: Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol*, 387: 163-169, 2000

14. Hosohata Y, Vanderah TW, Burkey TH, Ossipov MH, Kovelowski CJ, Bian D, Sora I, Uhl GR, Zhang X, Rice KC, Roeske WR, Hruby VJ, Yamamura HI, Porreca F: Delta opioid receptor agonists produce antinociception and [35S]GTPγS binding in mu-opioid receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 388: 241-248, 2000

15. LaBuda CJ, Sora I, Uhl GR, Fuchs PN: Stress-induced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice reveals normal function of the delta-opioid receptor system. *Brain Res* 869:1-5, 2000

## (2) 著書

1. Kajii Y, Toda S, Umino A and Nishikawa T: A molecular approach to identify essential factors for establishment of psychostimulant-induced behavioral sensitization. In *Contemporary Neuropsychiatry (Proceedings of the 3rd International Congress of Neuropsychiatry)*, Springer-Verlag, Tokyo, in press

2. 村岡新一郎、西川 徹: VII. モデル動物のゲノム解析によるアプローチ. *臨床精神医学講座 S11巻 精神疾患と遺伝*, 中山書店, 東京, pp. 77-89, 2000

3. 曾良 一郎: モノアミントランスポーター (KEY WORD精神 第2版、樋口輝彦、神庭重信、染矢俊幸、宮岡等編) 先端医学社, 東京, pp 214-217, 2000

## (3) 総説

1. 黒田安計、西川 徹: DNAチップ. *臨床精神医学*, 印刷中

2. 柏 淳、西川 徹: メタアンフェタミン、コカイン 特集1「薬物依存の分子機構」 *脳* 21 4: 印刷中

3. 車地暁生、西川 徹: 精神分裂病の神経発達障害仮説から見た新薬開発の可能性 *臨床精神薬理学*, 4: 189-196, 2001

4. 佐藤光源, 沼知陽太郎, 藤山 航: ニューロサイエンスの進歩は画期的な向精神薬をもたらすか. *臨床精神薬理*, 4(2): 177-88, 2001

5. 曾良一郎: 特集: 精神分裂病へのアプローチ 次世代への展望、遺伝子改変による精神分裂病モデル動物の開発. *分子精神医学*, 1: 27-34, 2001

6. 那波宏之、任海学、染矢俊幸、曾良一郎: 連載講座: 脳・神経系実験動物モデル ~テクニック・方法論~, 精神疾患モデルとしての遺伝子改変動物. *分子精神医学* 1: 159-163, 2001

7. 西川 徹: 精神疾患の克服 脳を守る 21世紀生命科学の展望. *生体の科学* 51: 68-73, 2000

8. 西川 徹: 不安の薬物療法ー不安の神経生物学と新しい抗不安薬. *医学のあゆみ* 192: 1133-1137, 2000

9. 西川 徹、山本直樹、土田英人、海野麻未、川口直恵: 哺乳類脳における内在性D-セリン. *日本神経精神薬理学雑誌* 20: 33-39, 2000

10. 村岡新一郎、西川 徹: 薬理学的精神分裂病モデル動物の分子病態. 特集「精神分裂病へのアプローチー次世代への展望ー」. *分子精神医学* 1: 19-26, 2000

11. 西川 徹: 精神分裂病の分子メカニズムを探る *脳* 21 3: 171-176, 2000

12. 柏 淳、西川 徹: グルタミン酸と精神疾患 *Brain Medical* 12: 181-186, 2000

13. 佐藤光源, 吉田寿美子, 沼知陽太郎: ストレス脆弱性モデルによる精神分裂病の病因と予防. *臨床精神医学*, 29(4): 375-80, 2000

## 2. 学会発表

### (1) 特別講演、シンポジウム

1. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 土田英人, 梶井

- 靖, 柏 淳: 哺乳類脳の内在性D-セリンの代謝および機能の解析と精神神経疾患の治療への応用. 文部省科学研究費基盤研究C 企画調査「哺乳類におけるD-アミノ酸の生理機能に関する総合研究」研究班シンポジウム, 東京, 2.28, 2001
  2. 西川 徹: 精神分裂病の分子病態について. 第24回栃木県「臨床と薬理」研究会, 宇都宮, 1.18, 2001
  3. 梶井 靖, 村岡新一郎, 藤山 航, 平岡秀一, 橋本隆紀, 金田小幸, 海野麻未, 西川 徹: 逆耐性現象における神経回路機能変化に関する分子生物学的解析. 第30回日本神経精神薬理学会年会, 仙台, 10.27, 2000
  4. 西川 徹: 神経化学からみた精神分裂病について 神戸大学医学部 特別講義, 神戸, 9.27, 2000
  5. 西川 徹: 精神分裂症 ヒューマンサイエンス振興財団 将来動向調査ワーキンググループ勉強会, 7.21, 2000
  6. 西川 徹: 精神分裂病症状の発現機序の分子薬理学的解析, 第276回精神研セミナー, 東京, 6.26, 2000
  7. 西川 徹: 精神分裂病 自治医科大学特別講義, 栃木, 6.13, 2000
  8. 西川 徹: 精神分裂病の神経伝達異常と新しい治療法の開発, 第3回 多摩精神科臨床研究会, 5.24, 2000.
  9. Nishikawa T: A molecular pharmacological approach to the pathophysiology of schizophrenia. Annual Meeting: Society of Biological Psychiatry, Chicago USA 5.13, 2000
  10. Nishikawa T: A pharmacological approach to the molecular mechanisms of schizophrenia 理化学研究所脳科学総合研究センター BSI Forum, 5.8, 2000
  11. Nishikawa T, Tschida H, Umino A, Kawaguchi N, Yamamoto N: NMDA Receptors and Endogenous D-Serine. Implications for a Novel Pharmacotherapy for Schizophrenia. The 3rd International Congress of Neuropsychiatry. 4.13, 京都, 2000
  12. Kajii Y, Hiraoka S, Fujiyama K, Muraoka S, Toda S, Nishikawa T: Psychostimulant-Induced Behavioral Sensitization and A Novel Rst Gene MRT1. The 3rd International Congress of Neuropsychiatry. 4.11, 京都, 2000
  13. Sora I. (2000) Functional genomics and gene knockout strategy. U.S.-Japanese Society of Biological Psychiatry Joint Symposium. Functional Genomics, Bio-informatics, and Psychiatric Research: From Differential Cloning to DNA Microarrays. Chicago, IL, USA May 13
- (2) 国際学会
1. Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, Kaneda K, Nishikawa T: A novel rat gene mrt1 expressed in neurons are responsive to psychostimulants in a dopamine D1 receptor-dependent manner. 30th Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 10.5, 2000
  2. Numachi, Y., Shen, H., Yoshida, S., Toda, S., Sato, M.: Effects of methamphetamine on brain expression of DNA methyltransferase mRNA in two inbred strains of rats. The XXII<sup>nd</sup> Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Congress, Brussels, 2000.
  3. Shen, H., Numachi, Y., Yoshida, S., Toda, S., Awata, S., Matsuoka, H., Sato, M.: Electroconvulsive shock regulates serotonin transporter mRNA expression in rat raphe nucleus. 30th Annual meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2000.
  4. Numachi, Y., Shen, H., Yoshida, S., Toda, S., Matsuoka, H., Sato, M.: Alterations in brain DNA methyltransferase mRNA by methamphetamine in two inbred strains of rats. 30th Annual meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2000.
  5. Yoshida, S., Numachi, Y., Kabaj, M., Caamano, C., Watson, S.J., Akil, H., Ueda, T., Sato, M.: Changes in brain corticosterone receptors type I and II by methamphetamine in two inbred strains of rats. 30th Annual meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2000.
  6. Itokawa K, Sora I, Hall FS, Takahashi N, Li X-F, Ookuma A, Shimizu K, Uhl GR: Aging of vesicular monoamine transporter (VMAT2) knockout mice and dopamine transporter (DAT) knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000
  7. Mizoguchi H, Wu H-E, Narita M, Nakao K, Sora I,

Uhl GR, Nagase H, LF. Tseng LF: Beta-endorphin-stimulated g-protein activation in mu-opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

8. Randic M, Youn D-H, Sora I, Sonea I, Uhl GR: Altered spinal dorsal horn synaptic plasticity in mice lacking the mu-opioid receptor. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

9. Liu Q, Hall S, Lesch HP, Murphy D, Sora I, Uhl GR: DAT, SERT and DATSERT knockout mice: microarray analyses of gene expression. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

10. Raja SN, Mansikka H, Shet R N, Sora I, Uhl GR: Enhancement of mechanical hyperalgesia after nerve injury in the mu-opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

11. Hall S, Sora I, Li X-F, Uhl GR: Nisoxetine and fluoxetine become rewarding in dopamine transporter knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

12. Nukada T, Kametani F, Miura R, Yamamoto T, Sora I, Yamamoto H: Purification of type-1 sigma receptor (sigmaR1)-associated protein from the rat brain using GST-sigmaR1 fusion protein. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

13. Yamamoto T, Yuyama K, Kato T, Sora I, Yamamoto H: Neuroprotection by ascorbic acid on nitric oxide (NO)-induced cell death. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

14. Yamamoto H, Yamamoto T, Nukada T, Sagi N, Shinohara K, Takahashi S, Karasawa J, Okuyama S, Sora I: Sigma-1 receptor ligands are preferentially uptaken into the neuronal cells compared to glial cells. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9, 2000

### (3) 一般学発表

1. 平岡秀一, 梶井 靖, 西川 徹: Phencyclidine および各種向精神薬投与時における97kDa Synapse-Associated 遺伝子の発現. 第22回日本生物学的精神医学会, 東京, 4.1, 2000

2. 村岡新一郎, 梶井 靖, 西川 徹: メタンフェタミンに対する1 の応答はD-1受容体に依存する. 第22回日本生物学的精神医学会, 東京, 4.1, 2000

3. 今井哲治, 成田年, 矢島義識, 溝口広一, 曾良一郎, Leon FTseng, 鈴木勉:  $\mu$  受容体遺伝子各種エクソンのアンチセンス前処理による  $\mu$  受容体作動薬誘発数種薬理効果に対する影響. 第21回 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム 長崎, 8. 25, 2000

4. 山本直樹, 富田 麗, 海野麻未, 金田小幸, 川口直恵, 岩間久行, 土田英人, 西川 徹: 大脳皮質シナプトソーム文画における [3H] D-セリンの取り組みと放出の解析. 第43回日本神経化学会, 金沢, 10.18, 2000

5. 山本秀子, 山本敏文, 鷲直樹, 高橋真司, 堀込和利, 唐沢淳一, 奥山茂, 額田敏秀, 曾良一郎:  $\sigma$  1受容体リガンドの神経細胞への取り込みには複数の経路が存在する. 第43回日本神経化学会, 金沢, 10.18, 2000

6. 曾良一郎, 糸川かおり, 高橋信行, 篠原慶子, 萩野洋子, George R.Uhl 山本 敏文, 山本 秀子: モノアミントランスポーターノックアウトマウスにおける神経細胞障害 文部省特定領域研究A「神経細胞死制御」班会議 東京, 12.5, 2000

7. 梶井 靖, 村岡新一郎, 藤山 航, 平岡秀一, 海野麻未, 西川 徹: PDZタンパク質をコードする新規ラット遺伝子 *mrt1* の同定: メタンフェタミン逆耐性への関与. 第23回日本分子生物学会年会, 神戸, 12.14, 2000

8. 曾良一郎, 山本秀子, 萩野洋子, 篠原慶子, 野中良一, 山本敏文, 池田和隆, Fei Xu, Scott Hall, George R.Uhl, 松下正明: 精神神経疾患モデルとしてのノックアウトマウス 第33回精神神経系薬物治療研究報告会 大阪, 12.15, 2000

9. 曾良一郎, 萩野洋子, 野中良一, 篠原慶子, 糸川かおり, 池田和隆, George R.Uhl, 山本敏文, 山本秀子: モノアミントランスポーターノックアウトマウスにおける報酬系の変化と遺伝子発現プロファイリング 文部省特定領域研究C「先端脳」班会議 東京, 12.23, 2000

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特記すべきことなし



## II. 分担研究報告

**厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）**  
**分担研究報告書**

**覚醒剤・麻薬依存の分子機構の解明と治療法開発に関する研究**

分担研究課題（西川分担分）：

覚醒剤・麻薬による依存形成と精神病様状態の分子病態と治療法開発に関する研究

主任研究者 西川 徹

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科精神行動医科学分野 教授  
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 部長

研究協力者 山本直樹、梶井 靖、村岡新一郎、海野麻未、土田英人、黒田安計

**研究要旨：**本研究では、医学的・社会的に重大な問題となっている、覚醒剤や麻薬が引き起こす依存形成および精神病様状態の原因と病態にかかわる分子異常を明らかにし、診断や予後判定の生物学的マーカーや画期的な治療・予防法の手がかりを得ることをめざしている。このため、1)覚醒剤や麻薬を経験した実験動物やヒトにおいて、これら薬物に対する感受性が増大して異常が出現し易くなる変化である逆耐性現象は、薬物を渴望することや薬物による精神異常の発症・再燃のモデルと考えられていること、2)ヒトにおいて、思春期以前には覚醒剤や麻薬を経験しても依存形成や精神病様状態が生じ難く、齧歯類では生後3週以降に逆耐性現象が形成されるようになること、等の点に着目し、覚醒剤・麻薬依存に関連する候補遺伝子としてラットの脳で、生後3週以降に覚醒剤や麻薬に応答するようになる未知および既知の遺伝子を検索・同定した。このうち新規遺伝子mrt-1の詳細な解析が進行し、1)逆耐性現象との関連が覚醒剤・麻薬によりD1ドーパミン受容体刺激を介して発現誘導が生じ、この誘導を阻害すると逆耐性の形成が抑制される、2)逆耐性が形成されたラットの大脳皮質では持続的な基礎的発現の上昇が見られる、等の所見から、逆耐性の形成や維持に関与することがわかった。また、prt-1遺伝子は麻薬が引き起こす分裂病様の陰性症状に関係する可能性が示唆された。さらに、抗覚醒剤・抗麻薬作用を示す内在性物質D-セリンの代謝関連分子をコードする候補遺伝子として、ラット大脳新皮質においてD-セリン選択的に発現が誘導されるdsr-1遺伝子をクローニングした。

**A. 研究目的**

近年、国内外で、強い依存性を示す覚醒剤・麻薬等の薬物の乱用が増加の一途をたどり、乱用がもたらす精神障害や各種犯罪・事故の誘発が深刻な事態を招いているため、薬物依存の克服は、医学的にも社会的にも急務となっている。そこで本研究では、覚醒剤や麻薬が引き起こす依存形成および精神病様状態の原因と病態にかかわる分子異常を明らかにし、診断や予後判定の生物学的マーカーや、画期的な治療・予防法の手がかりを得ることをめざす。

このため、1)覚醒剤や麻薬を経験した実験動物やヒトにおいて、これら薬物に対する感受性が増

大して異常が出現し易くなる変化である逆耐性現象は、薬物を渴望することや薬物による精神異常の発症・再燃のモデルと考えられていること、2)ヒトにおいて、思春期以前には覚醒剤や麻薬を経験しても依存形成や精神病様状態が生じ難く、齧歯類では生後3週以降に逆耐性現象が形成されるようになること、などの点に着目し、覚醒剤・麻薬依存に関連する候補遺伝子として、ラットの脳で、生後3週以降に覚醒剤（methamphetamine: MAP）またはフェンサイクリジン（phencyclidine: PCP）に応答するようになる未知および既知の遺伝子を検索する。検出された遺伝子群およびそれらの産物について、構造・局在・機能・種々の向精神薬

に対する応答、発現抑制時の逆耐性形成への影響等を解析し、逆耐性現象に特異的に関係する分子とそれらを含む神経回路を同定する。また、薬物依存患者を含む精神疾患患者において、これらの逆耐性現象関連遺伝子のヒト相同遺伝子の変化を調べ、覚醒剤・麻薬による依存形成および精神病様状態の原因あるいは病態形成因子としての意義を明らかにすることをめざす。

これらの研究とともに、覚醒剤・麻薬による異常行動を抑制する内在性物質D-セリンの代謝および機能に関連する脳の内在性分子の同定も進め、依存性薬物による脳機能障害に対する新しい治療薬の標的としての可能性を検討する。

## B. 研究方法

今回報告した研究は、東京医科歯科大学および国立精神・神経センターの倫理委員会の承認を得た上、ガイドラインを遵守して行った。

### 1. RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) による RNA finger printing

生後8日齢または50日齢の動物に薬物または生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質より total RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO II, TAKARA) で解析してfingerprintを得た。覚醒剤や麻薬の投与実験では、fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクロニングし塩基配列を決定した。D-、L-セリンまたは生理食塩水を生後8日令のラットに全身投与する実験では、大脳新皮質における発現がD-セリン選択的に変化する遺伝子転写産物を解析した。これらのRAP-PCRクローンにもとづいて、ラット脳cDNAライブラリーのスクリーニング、RACE法 (rapid amplification of cDNA ends)、Cap site hunting法等により、全長mRNAに対応するcDNAの構造を決定した。

### 2. 定量的RT-PCR

RAP-PCR法で検出された遺伝子の種々の薬物に対する反応性は、competitive RT-PCR法やco-amplification RT-PCR法等により、定量的に解析した。co-amplification RT-PCR法では、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28sの増幅のカイネティックスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCRを行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

### 3. ノーザンブロット分析・サザンブロット分析

ノーザンブロット分析は、ラットの脳各部位と各末梢臓器から調整したpoly(A)-positive fractionを用い、32Pで標識したcDNAプローブにより行った。また、サザンブロット分析は、BamHI、EcoRIあるいはHindIIIで消化した大脳新皮質ゲノムDNAサンプルに同様のプローブを作用させて行った。

### 4. アンチセンスオリゴマーを用いた実験

mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスS-オリゴマー (phosphorotation型: DNAのリン酸ジエステル結合の酸素原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  $\mu$ l/hで溶液を放出) を用いて動物に持続的に投与した。対照群には同じ塩基組成、塩基数で配列をランダムに並べ替えたミセンスS-オリゴマーを用いた。各オリゴマーを150mM NaClに溶解して0.5、1.0、または2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l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 (4.0mg/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した。Mrt-1蛋白の検討は、アンチセンスS-オリゴマー注入開始3日目に行った。

#### 5. 抗Mrt1抗体の作製

mrt1の塩基配列から、少なくとも2種類の蛋白質 (Mrt1AおよびMrt1B) がコードされていることが予想されたため、1)双方の蛋白質に共通、2)Mrt1Aに特異的、あるいは3)Mrt1Bに特異的なアミノ酸配列に対する3種類の抗体を作製した。それぞれに対応するペプチドを合成し、keyhole limpet hemocyaninに結合させた後、ウサギに免疫することにより抗血清を得た。力価の高い抗血清をアフィニティカラムで精製して実験に用いた。

#### 6. ウェスタンブロット分析

ラット大脳新皮質から、0.125% SDS、0.625% sodium deoxycholate、1.25% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA と Complete Mini (Roche)を含む緩衝液で蛋白を抽出した。蛋白は7.5% または10% SDS-PAGEによって分離した後、Immun-Blot polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad)にトランスファーし、種々の蛋白に対する抗体と反応させた。

#### 7. 統計学的解析

2群間の比較にStudent's t-testまたはCochran-Cox t-testを用いた。3群以上の比較は、一元分散分析またはKruskal-Wallis testにもとづく多重比較テストにより行った。

### C. 研究結果

#### 1. MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子mrt-1の解析

逆耐性現象は、MAPを含む中枢刺激薬の乱用によって出現する薬物の渴望や精神病状態の発症・再燃のモデルと考えられ、齧歯類では生後3週以降に形成されるようになる。RAP-PCRにより、MAPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子群のひとつとして、大脳新皮質からmrt-1 (MAP responsive transcript-1) が検出され、シナプスに局在を示すPDZ蛋白をコードすることがわかった。定量的解析

によりmrt-1は、1)生後3週以降にMAP投与後の発現誘導が見られる、2)逆耐性を引き起こす他の薬物のコカインでも発現が増加する、3)MAP反復投与後、逆耐性が成立したラットの大脳新皮質で基礎的発現量が上昇するが、MAPを再投与しても発現誘導は認められない、4)MAP反復投与時に、D1ドーパミン受容体遮断薬を併用して逆耐性形成を阻害した動物の脳では基礎的発現の上昇は見られない、等が明らかになった (2)~4)は成熟期における解析)。

Mrt-1蛋白については、mrt1の塩基配列から、PDZドメインとPXドメインをひとつずつ備えた、少なくともC末端領域が異なる2種類のイソフォーム (Mrt1AおよびMrt1B) が存在すると考えられた。今年度の抗体を用いたMrt1蛋白の解析結果は、cDNAの塩基配列から予想されるMrt1蛋白の特徴を支持した。Mrt1AおよびMrt1Bの双方に反応する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、免疫反応が62kDa付近のバンドとして検出され、コーディングフレームから期待される蛋白のサイズと一致することが確認された。

mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを脳室内に持続注入することにより、MAPを反復投与しても逆耐性の形成が阻害された。しかし、ミスセンスオリゴマー、翻訳開始コドンを含まない配列に対するアンチセンスオリゴマーあるいは溶媒を注入しても、逆耐性の形成は抑制されなかった。アンチセンスオリゴマーを注入している条件下では、線条体のMrt1蛋白 (Mrt1AとMrt1B) の基礎的発現量が低下していた。また、ミスセンスオリゴマーを投与した対照群の線条体では、MAP投与時にMrt1蛋白量が増加したが、アンチセンスオリゴマー投与群では変化がなかった。

#### 2. PCPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子prt-1の検討

RAP-PCRにより、PCPに対する応答が発達依存的に獲得される遺伝子群のひとつとして、大脳新皮質からPDZ蛋白をコードするprt-1 (PCP responsive transcript-1) を検出した (PCPにより発現増加)。定量的解析によりprt-1は、成熟動物の脳において、1)ドーパミン作動薬であるMAPおよびコカイン、GABA-A受容体を賦活するpentobarbital等の投与では