

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di zocilpine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応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。ノーザンプロットでは、予想されるサイズの単一バンドが確認された。また、サザンプロットから、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。

## D. 考察

### 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DI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大脳新皮質では、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。

mrt-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つこと、2)少なくともMrt1AとMrt1Bの2種類のイソフォームがあること、等がわかった。Mrt1B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、Mrt1B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、Mrt1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dser-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dser-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。

## 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を行った。

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、Mrt1B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dser-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。

## 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: Nomifensine-induced c-fos mRNA expression in the discrete brain areas of the developing rat. *Neurosci Lett*, in press
- 2)Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A and Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dser-1 from the rat cerebral cortex. *Biochem Biophysiol Res Com*, 280: 1189-1196, 2001
- 3)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
- 4)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

#### (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) 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)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

5)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

6)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

7)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~次世代への展望~」. 分子精神医学 1: 19-26, 2000

8)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

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

### (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 areresponsive to psychostimulants in a dopamine D1 receptor-dependent manner. 30th

Annual Meeting: Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 10.5, 2000

(3) 一般学発表

- 1) 平岡秀一, 梶井 靖, 西川 徹: Phencyclidine および各種向精神病薬投与時における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) 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
- 4) 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

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

## 分担研究報告書

### 逆耐性現象形成に伴う脳 DNA メチラーゼの発現変化

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)  
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 (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。動物に覚せい剤を反復投与した際に観察される逆耐性現象 (以下逆耐性と略) は、精神病状態の成因を研究する重要な動物モデルとされ、その基盤には脳遺伝子の持続性の発現変化が想定されている。

我々はこれまでに、覚せい剤であるメタンフェタミン (MAP) を投与したラットで、

(a) コルチコステロン (CS) は逆耐性の形成に促進的に作用する。

(b) 転写制御因子である CS 受容体で発現誘導される DNA シトシンメチル化酵素 (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。

という結果を得ている。DNA メチラーゼは、DNA 上の 5'-CG-3' 配列のシトシンを特異的にメチル化する酵素である。シトシンのメチル化は脊椎動物のゲノムを直接的に修飾する唯一の機構で、転写因子の DNA 結合部位への接触の阻害によって遺伝子発現を調節し、発生、分化、発癌など、細胞機能の制御に直結していることが示されている。

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。本分担研究では上記 2 系統の近交系ラットについて、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。

という結果を得た。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、*in situ hybridization* では特に神経細胞の新生が生ずる海馬 (歯状回)、SVZ に強い発現を認めることが明らかとなった。また、上記 (b) で述べた MAP 投与後 3 時間で認められた発現変化が、24 時間後まで持続していることが示唆された。

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。

#### A. 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、反応内容の進行性的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 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>に対照的な性質を有することが報告されている。我々はこれまで、F344, LEW について、

- (a) MAP 慢性投与により 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) MAP 慢性投与により F344 では線条体で CS 受容体 mRNA が増加、LEW では減少する
- (c) 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 LEW では不変だったが、慢性投与では両系統で上昇し、系統差は消失する
- (d) MAP 慢性投与後 24 時間の線条体 HSP90 蛋白は MAP 急性、慢性投与により F344 で LEW に比べて有意に上昇する
- (e) MAP 慢性投与により尾状核、側坐核 DNA メチラーゼ mRNA は F344 で増加、LEW で減少するという結果を得ている<sup>9</sup>。

DNA メチラーゼは、DNA 上の 5'-CG-3' 配列のシトシンを特異的にメチル化する酵素である。シトシンのメチル化は脊椎動物のゲノムを直接的に修飾する唯一の機構で、転写因子の DNA 結合部位への接触の阻害によって遺伝子発現を調節し、発生、分化、発癌など、細胞機能の制御に直結していることが示されている。本分担研究では上記 2 系統の近交系ラットについて、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。

## B. 研究方法

### 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 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  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 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。

(倫理面への配慮)

全ての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. 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>10</sup>) 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  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。各脳標本はクリオスタットで  $14\mu\text{m}$  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  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。

切片は 4% paraformaldehyde にて 1 時間固定した後、 $2\times\text{SSC}$  ( $1\times\text{SSC}$ ; 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  $^{35}\text{S}$  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 [ $^{35}$ S]UTP (Amersham, Tokyo), 125 $\mu$ Ci [ $^{35}$ S]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°C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°C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、カバーガラスを除去、2xSSC 5で分間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°C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。

ハイブリダイゼーションの間、同じプラスミドから得たセンス鎖のcRNAプローブをインサイツハイブリダイゼーションのネガティブコントロールとした。

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。統計解析は、ANOVA (post-hoc: Scheffe's F test) を用いた。

## C. 研究結果

### 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、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。

## D. 考察

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>11)</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>11)</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。

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<sup>12)</sup>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<sup>13)</sup>。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<sup>9)</sup>。この時は海馬全体での mRNA を定量化したが、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<sup>14)</sup>、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。

## E. 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、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。

という結果を得た。MAP投与に伴って、脳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. *精神経誌*, 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) 佐藤光源, 沈昊偉, 藤山 航, 戸田重誠, 吉田寿美子, 沼知陽太郎: 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. 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年度研究報告書, 平成9-11年度3年間のまとめ, 17-29, 2000年4月
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Brooks, P.J., Marietta, C., and Goldman, D. (1996) DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J. Neurosci.*, 16, 939-45.
- 13) Tao, Y., Black, I.B., and DiCicco-Bloom, E.J. (1996) Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). *J. Comp. Neurol.*, 23, 653-63.
- 14) Kudriashova, I.B., Vaniushin, B.F. (1976) Rat liver methylation of nuclear DNA following hydrocortisone induction. *Biokhimiia*, 41, 215-222.

F. 健康危険情報  
特になし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

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.

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.

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巻4号, 375-80, 2000年4月

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巻2号, 177-88, 2001年

### 2. 学会発表

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.

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.

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.

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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

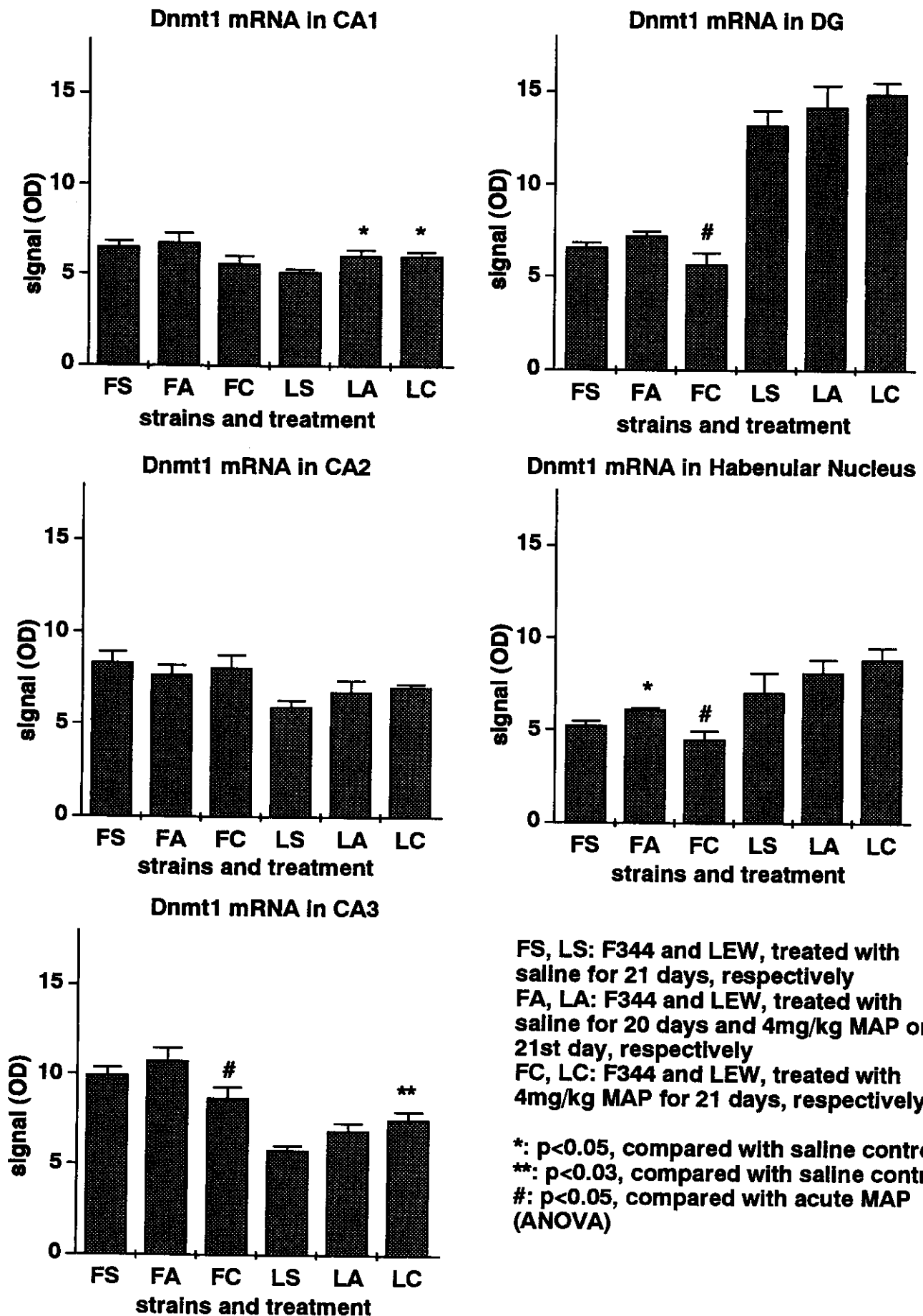
1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

1~3 とも, 特になし

**Figure 1 Changes in Dnmt1 mRNA by acute or chronic Methamphetamine in hippocampus and habenular nucleus of F344 and LEW rats**



## 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

分担研究者 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

### 研究要旨

薬物依存や薬物性精神病の発症脆弱性に遺伝負因を示唆する多くの報告がなされているが、その詳細な機序はいまだ解明されていない。依存性薬物の脳内薬物受容体遺伝子が欠損した変異マウスは、依存性薬物の標的分子の生体内での役割を明らかにする上で貴重な動物モデルを提供する。これらの遺伝子変異マウスの、薬理的・生化学的解析を行うことにより、薬物依存や薬物性精神病の新しい治療・予防法が開発できることが期待される。

### A. 研究目的

覚醒剤や麻薬等の脳内薬物受容体であるモノアミントランスポーターや Mu オピオイド受容体遺伝子にジーン・ターゲティング法により変異を導入したノックアウトマウス（以下 KO マウス）を動物モデルとして用いて、薬物依存の分子遺伝学的研究を行うのが目的である。本研究により従来の古典的な精神薬理学的方法では明確にすることが困難であった知見が得られ、治療法の開発に貢献できると考えられる。

### B. 研究方法

ダブル KO 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 KO 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的、神経生化学解析を行った。行動薬理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。

### （倫理面への配慮）

上記の動物実験計画は、東京都精神医学総合研究所動物実験倫理委員会にて承認された。

### C. 研究結果

モノアミントランスポーター-KO 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, NETKO 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。DATKO 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-HTTKO 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 KO マウスは成体まで成長し、行動薬理的、神経化学的解析を行うことができた。ダブル KO マウスは DAT 単独 KO 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。場所条件づけ試験を行ったところ、ダブル KO 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 KO 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。

#### Muオピオイド受容体KOマウス

Mu オピオイド受容体 KO マウス (以下 MuKO 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。MuKO 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

抗うつ薬は通常、依存性を持たないとされているが、DAT, NETKO マウスにおいて選択的 5-HT 取り込み阻害剤(SSRI)による場所条件づ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

が起きていることが考えられる。

DATKO 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、DATKO マウスにおいて場所条件づ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-HTTKO 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 NETKO 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。

MuKO 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

遺伝子改変動物であるノックアウトマウスを用いて、代表的な依存性薬物の報酬効果について検討した。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が大きな役割を果たすことを示す結果が得られた。さらに Mu オピオイド受容体はモルヒネのみならずエタノールなどの報酬にも影響を与え、Mu オピオイド受容体の報酬系への複雑な関与が考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文

1. 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)
2. Hall S, Sora I, Uhl G R. Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacol* (in press)
3. 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)
4. Wisor J P, Nishino S, Sora I, Uhl G R, E Mignot E, Edgar D M. (2001) Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci* 21: 1787-1794
5. Uhl G R, Li S, Takahashi N, Itokawa K, Lin Z, Hazama M, Sora I. (2000) The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J* 14: 2459-2465
6. Qiu Q, Sora I, Ren K, Uhl G R, Dubner R. (2000) Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 387: 163-169
7. Hosohata Y, Vanderah T W, Burkey T H, Ossipov M H, Kovelowski C J, Bian D, Sora I, Uhl G R, Zhang X, Rice K C, Roeske W R, Hruby V J, Yamamura H I, Porreca F. (2000) Delta opioid receptor agonists produce antinociception and [35S]GTPγs binding in mu-opioid receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 388: 241-248
8. LaBuda CJ, Sora I, Uhl GR, Fuchs PN. (2000) Stress-induced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice reveals normal function of the delta-opioid receptor system. *Brain Res* 869:1-5
9. 曾良一郎. (2001) 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* Vol. 1, pp. 27-34
10. 那波宏之、任海学、染矢俊幸、曾良一郎. (2001) 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* Vol. 1, pp. 159-163
11. 曾良一郎 (2000) 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) pp 214-217、先端医学社、東京

## 2. 学会発表

1. Sora I. (2000) Functional genomics and gene knockout strategy. U.S.-Japanese Society of Biological Psychiatry Joint Symposium. Functional Genomics, Bioinformatics, and Psychiatric Research: From Differential Cloning to DNA Microarrays. Chicago, IL, USA May 13
2. Itokawa K, Sora I, Hall F S, Takahashi N, Li X-F, Ookuma A, Shimizu K, Uhl G R. (2000) Aging of vesicular monoamine transporter (VMAT2) knockout mice and dopamine transporter (DAT) knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
3. Mizoguchi H, Wu H-E, Narita M, Nakao K, Sora I, Uhl G R, Nagase H, L.F. Tseng L F. (2000) Beta-endorphin-stimulated g-protein activation in mu-opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
4. Randic M, Youn D-H, Sora I, Sonea I, Uhl G R. (2000) Altered spinal dorsal horn synaptic plasticity in mice lacking the mu-opioid receptor. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
5. Liu Q, Hall S, Lesch H P, Murphy D, Sora I, Uhl G R. (2000) DAT, SERT and DATSERT knockout mice: microarray analyses of gene expression. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
6. Raja S N, Mansikka H, Shet R N, Sora I, Uhl G R. (2000) Enhancement of mechanical hyperalgesia after nerve injury in the mu-opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
7. Hall S, Sora I, Li X-F, Uhl G R. (2000) Nisoxetine and fluoxetine become rewarding in dopamine transporter knockout mice. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
8. Nukada T, Kametani F, Miura R, Yamamoto T, Sora I, Yamamoto H. (2000) 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
9. Yamamoto T, Yuyama K, Kato T, Sora I, Yamamoto H. (2000) Neuroprotection by ascorbic acid on nitric oxide (NO)-induced cell death. Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 4-9
10. Yamamoto H, Yamamoto T, Nukada T, Sagi N, Shinohara K, Takahashi S, J. Karasawa J, Okuyama S, Sora I. (2000) 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
11. 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 (2000)  $\sigma$ 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. 神経化学 39, 311
12. 今井哲治、成田年、矢島義識、溝口広一、曾良一郎、Leon F. Tseng、鈴木勉 (2000)  $\mu$  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

13. 曾良一郎、糸川かおり、高橋信行、  
篠原慶子、萩野洋子、George Uhl 山  
本 敏文、山本 秀子 (2000) 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
14. 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 (2000) 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
15. 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 Uhl、山本敏文、山本秀子  
(2000) 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予 定を含む。)

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 特になし |
| 2. 実用新案登録 | 特になし |
| 3. その他    | 特になし |

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧



[西川 徹]

1. 論文発表

(1) 原著

1. Murata M, Kashiwa A, Oshima A, Umino A, Kurachi M and Nishikawa T: Nomifensine-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～次世代への展望～」. 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

[佐藤光源]

1. 論文発表

(1) 原著

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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 卷 4 号, 375-80, 2000 年 4 月
5. 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 卷 2 号, 177-88, 2001 年