

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13年度）

主任研究者 西川 徹

平成14年3月

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13年度）

主任研究者 西川 徹

平成14年3月

# 総括研究報告書（平成13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、  
桜井新一郎、嶋津 奈、黒田安計、柏 淳

覚醒剤の急性投与による神経軸索ガイダンス関連分子の脳内発現変化

沼知陽太郎 …………… 22

研究協力者 山下元康、藤山 航、戸田重誠、  
吉田寿美子、松岡洋夫

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 …………… 29

研究協力者 沈 昊偉、萩野洋子、小林秀昭、田中（篠原）慶子、井手聡一郎、  
George R Uhl、池田和隆、山本敏文、山本秀子

III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 37

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 41

V. 平成13年度分担研究者氏名一覧 …………… 229

## 1. 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において、生後3週以降に覚醒剤や麻薬に応答ようになる未知および既知の遺伝子の検索を続けた。初年度までに検出された新規遺伝子mrt1 (methamphetamine responsive transcript 1)に加え、新たにmt3の全長mRNAに対応するcDNAの塩基配列を明らかにした。mrt3は、成熟ラットの大脳新皮質において、1)MAPと同様に逆耐性現象を引き起こすコカインの投与後にも発現誘導が生ずる、2)MAPによる発現誘導は逆耐性形成を阻害するD1ドーパミン受容体遮断薬によって阻害される、等の性質をもつことから、mrt1とともに、逆耐性の形成の分子機構に関与することが示唆された。また、初年度に続いて、覚醒剤・麻薬による異常行動を抑制する、内在性物質であるD-セリンに応答する新規遺伝子を同定した。mrt1とprt1 (phencyclidine responsive transcript 1)については、ヒト相同遺伝子のゲノム構造を明らかにし、覚醒剤依存や他の精神疾患との関連を検討するため変異の検索を進めた。一方、ダブルノックアウトマウスを用いた研究より、コカインの報酬作用には、ドーパミンおよびセロトニンのトランスポーターの相互作用と、細胞外液中のドーパミン濃度がコカイン投与後に上昇することが必要であることが示唆された。さらに、薬物依存には学習記憶に関わる神経機構の関与が示唆されていることから、空間学習や記憶に関連が深い神経軸索ガイダンス分子であるEphA5受容体について、覚醒剤投与ラットの脳でmRNAの変化を調べた。その結果、帯状回、前頭葉皮質、海馬CA1領域、手網核で有意に減少し、扁桃核で増加することがわかり、薬物依存形成に関与する可能性が示唆された。

分担研究者

沼知 湯太郎

東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野  
講師

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

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、

A. 研究目的

近年、国内外で、強い依存性を示す覚醒剤・麻薬

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。

さらに、従来から薬物依存あるいはその基盤にある脳の可塑的变化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やその制御下にあるDNAメチル化酵素遺伝子、*erithropoietin-producing human hepatocellular carcinoma* から新規の受容体型チロシンキナーゼとして見い出されたEph受容体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、<sup>32</sup>P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) ウェスタンブロット分析

ラット線条体から、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。シナプトゾーム画分はCarlinら<sup>2)</sup>の方法にしたがって調整した。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、Arc蛋白に対する抗体と反応させた。免疫反応は化学発光法によって検出し、LumiImager chemiluminescence detector (Roche)を用いて定量的に解析した。

### (5) アンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内注入

翻訳開始コドンを含むmrt1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、生体内での代謝を抑制するためフォスフォロチオエートによって修飾したものを合成した (phosphorotioate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)。アンチセンスS-オリゴマーは、浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2001, Alza, 7日間注入用: 1  $\mu$  /hで溶液を放出) を用い、ラットの右側脳室内に7日間にわたって持続的に注入した。注入部位はPaxinosとWatsonの図譜<sup>11)</sup>で、AP, -0.8 mm; V, +2.0; L, +1.5とした。対照群の動物には、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。

逆耐性の形成に対する影響を観察する実験では、注入開始3日目から7日目まで一日一回MAP (4mg/kg) を腹腔内に投与した。また、Mrt1蛋白発現を検討する場合は、注入開始3日目にMAP (4mg/kg) を投与し3時間後に脳組織サンプルを取り出した。

### (6) ヒト相同遺伝子の検索

ラットmrt1の翻訳領域をプローブとして、ヒト脳cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。また、得られたcDNAをもとに、RACE法 (rapid amplification of cDNA ends) によって5'領域、3'領域の解析を行った。さらにキャップサイトcDNA (NIPPON GENE社) を用いてCap site hunting法を行い、ヒトMRT1の翻訳開始点を検索した。また、得られたmrt1のヒト相同遺伝子MRT1のcDNA配列をpublic database上のゲノム配列と比較することによって、MRT1のゲノム構造を決定した。さらに、翻訳領域を中心に、Cap-site hunting法によって主要な転写開始点の決定を行った。同様な方法で、prt1のヒト相同遺伝子の解析を行った。

## 2. 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) 実験動物

DAT/SERTダブルKOマウスは、DAT単独KOマウスとSERT単独KOマウスより作製、繁殖させた。

### (2) 条件づけ場所嗜好試験

一方はwire mesh floor、もう一方はcorn cob bedding floorで両コンパートメント間は自由に移動できるPlexiglas chamber内にてマウスの各コンパートメントにおける滞在時間を測定した。条件付けとして嗜好性を示した側に20あるいは30分間置いた後生食塩水を投与し、嗜好性を示さなかった側に30分間置いた後依存性薬物を投与する試技を行った。最後の投与から24時間後における場所嗜好性の変化を見ることで、各薬物の報酬効果を検討した。

### (3) 静脈内自己投与試験

マウス静脈内にカニューレを埋め込む手術を行い、マウスがレバー押し行動を4回行う毎に、刺激光を

照射すると同時にモルヒネを5-8  $\mu$ l/15秒で静脈内投与する方法で検討を行った。各モルヒネ投与量でのレバー押し回数を測定し、3日間の試技の回数の平均を指標として、モルヒネの報酬効果を評価した。

#### (4)脳内微量透析法

ペントバルビタール麻酔下、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、透析プローブ（透析膜の長さ2 mm）をFranklin と Paxinosの脳アトラスに基づいて線条体（bregmaより前方0.6mm、側方1.8mm、深さ4.0mm）に挿入した。各マウスは、24時間後に実験に用いた。無拘束の条件下でRinger液を1  $\mu$ l/minの速度で灌流し、10分毎に自動的に液体高速クロマトグラフィシステムに注入した。DAと5-HTは逆相カラム（PP-ODS）で分離し、電気化学検出器（ECD-100）を用いて検出、定量した。移動相には、EDTA(50 mg/l)、デカンスルホン酸ナトリウム(500mg/l)および1%メタノールを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH5.5)を用いた。灌流開始3.5時間後、コカイン(10mg/kg)か生食塩水を皮下投与した。

### 3. 覚醒剤投与による脳 EphA5遺伝子の発現変化

#### (1)動物と薬物投与スケジュール

生後50日令の Wister 系雄性ラット（熊谷農場）を用いた。ラットは12時間の明暗周期（午前8時点灯）のもとプラスチック製のケージに3頭ずつ分け、餌と水は自由に摂取させて飼育した。ラットに塩酸メタンフェタミン（4mg/kg, i.p., 大日本製薬, 大阪）を投与し、1, 3, 9, 24時間後に断頭し氷上にて脳を採取した。無処置のラットを対照群として用いた。採取した脳はドライアイス・イソペンタン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。

尚、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)in situ hybridization

クリオスタットで厚さ 14  $\mu$ m に海馬や線条体を含む冠状断で脳切片を作成し、poly-L-lysine でコートしたスライドガラスに1 スライドガラスあたり 3 切片をマウントした。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、切片を 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, 100%エタノールを用いて切片を乾燥した。空乾してエタノールを蒸発させた後 35S 標識した cRNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。Eph A5 のプローブは各々ラット Eph A5 (Genbank accession X78689)に相応した404ベースのアンチセンス断端で、これらのcDNAはPCRサブクローニングした。これらのプローブは1  $\mu$ gの1本化したプラスミド、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 (DTT), 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 (Centri-cep, QIAGEN, USA) 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、カバーガラスを除去、2xSSC で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5-10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 in situ hybridization 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帯状回、前頭葉皮質、梨状葉皮質、海馬 (CA1-3, 歯状回)、手綱核、扁桃体の黒化度を半定量的に計測した。統計解析には、ANOVAを用いた。

### 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の解析

###### 1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する転写産物mrt3の検討

初年度に続き、MAPに対する応答が発達依存的に獲得される逆耐性現象関連候補遺伝子群の検索を行った。すなわち、RAP-PCRにより、MAP (4.8 mg/kg, s.c.) 急性投与1時間後のラットの大脳新皮質から、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる転写産物群をスクリーニングした。第二年度はこの中で、既に検討していたmrt1 (MAP responsive transcript 1) に加え、mrt3の構造解析と薬物反応性の定量的解析を進めた。

mrt3の完全長mRNAに相当するcDNAをクローニングして塩基配列を決定した結果、3803bpから成り、234bpのコーディングフレーム (78aa) をもつことがわかった。無処置の動物の脳各部位および各末梢臓器において、RT-PCRで相対的発現量を比較したところ、大脳新皮質と線条体で最も高く、小脳、海馬、視床、脾臓、肺などがこれについて比較的高いレベルを示した。これに対して、精巣、腎臓、肝臓などにおける発現は低レベルであり、心臓ではほとんど検出されなかった。

ラット大脳新皮質のサンプルにおける定量的RT-PCRを用いた検討から、mrt3のmRNAは、生後8、15および23日齢ではMAP投与群と生理食塩水を投与した対照群との間に発現量の差が認められなかったが、生後50日にはMAP投与群の方が有意に高くなることがわかった。生後50日において、mrt3はMAPばかりではなく、コカイン (30mg/kg, s.c.) およびノ

ミフェンシン (40mg/kg, s.c.) によっても発現が誘導された。これに対して、pentobarbital (50mg/kg, i.p.) 投与後には発現変化は認められなかった。MAPによる発現量の上昇は投与後1時間で最大となり、3時間後には対照群と同レベルまで低下した。また、MAP投与後の発現誘導は、D1ドーパミン受容体アンタゴニストのSCH23390 (0.5mg/kg, s.c.) を前処置することにより抑制された。

###### 2)mrt1およびMrt1蛋白の薬物応答の特異性に関する検討

初年度までに、mrt1 mRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドの持続的脳室内注入を行ったラットでは、MAPを反復投与しても逆耐性が形成されないことを明らかにしてきた。この時、MAP投与によるMrt1蛋白の発現増加が抑制されることもわかった。さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドのMrt1蛋白翻訳阻害効果の特異性を検討するため、MAPによって発現誘導が認められるArc蛋白の変化を調べた。線条体のArc蛋白はアンチセンスオリゴヌクレオチド処置群、非処置群の双方において、MAP投与後に増加し、Mrt1蛋白とは異なる変化を示した。

一方、大脳新皮質のmrt1bの発現は、MAPやコカインにより上昇するのに対して、pentobarbital投与後では有意な変化は見られなかった。

##### (2)MAPまたはPCPによる発現誘導が発達依存的に変化するラット遺伝子のヒト相同遺伝子の解析

ヒトMRT1遺伝子は少なくとも12個のエクソンで構成され、イントロンはいずれも5'側がGT、3'側がAGのいわゆるGT-AG イントロンであった。また、ヒトPRT1 (phencyclidine-responsive transcript 1) 遺伝子は24個のエクソンをもつことが明らかになった。

##### (3)D-セリン選択的に応答する遺伝子の検索

内在性D-セリンの代謝および機能の分子機構の手がかりを得るため、生後8日齢ラットの大脳新皮質において、脳内D-セリン濃度の上昇に応答して発現が増加する遺伝子の検索を続けた。初年度までに同定したdsr-1 (D-serine-responsive transcript 1) の他に、やはり新規遺伝子であるdsr-2をクローニングした。dsr-2 mRNAは、脳内L-セリンの上昇では、有意な発現変化を示さなかった。

## 2. 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)DAT/SERTダブルKOマウスにおける報酬効果の変化

コカインの報酬試験としての条件づけ場所嗜好試験を行ったところ、DAT(-/-) SERT(-/-)およびDAT(-/-) SERT(+/-)マウスではコカインの報酬が消失、DAT(+/-) SERT(-/-)マウスでは保持された。

### (2)シナプス間隙モノアミン基礎濃度

DATが完全に欠損したマウスのDAとSERTが完全に欠損したマウスの5-HTは有意に高かった。DAT(-/-) SERT(-/-)では、DAと5-HT両方とも有意に高かった。

### (3)コカインに対するDA反応性

DAT(-/-)SERT(+/-)マウスにおいて、野生型マウスほど強くないが、DAは有意に増加した。DAT(-/-)SERT(-/-)及びDAT(-/-)SERT(+/-)マウスでは、DA反応性は消失した。

### (4)コカインに対する5-HT反応性

DAT(-/-)SERT(+/-)マウスの5-HT反応性は、野生型マウスと変わらなかった。DAT(-/-)SERT(+/-)マウス及びDAT(-/-)SERT(-/-)マウスでは、5-HT反応性は消失した。

### (5) $\mu$ 受容体KOマウスにおける報酬効果の変化

モルヒネの報酬試験としての条件付け場所嗜好性試験において、 $\mu$ 受容体KOマウスではホモ体で野生型と比較して有意に報酬効果が減弱し、ヘテロ体でもその傾向がみられた(Fig. 5A) [7]。さらに、別のモルヒネ報酬試験として静脈内自己投与試験を行ったところ、レバー押し行動回数は、ヘテロ及びホモ体のKOマウスにおいて、0.1ないし0.3 mg/kg/injectionの際に野生型と比較し有意に少なかった。モルヒネ総摂取量は、いずれの試験においても野生型マウスの摂取量が最も大きな値を示した。

エタノールの報酬試験としての条件付け場所嗜好性試験において、雌性マウスでは、野生型でエタノールによる報酬効果が有意に観察され、ヘテロ体、並びにホモ体ではエタノールの報酬効果が減少していた。また、雄性マウスにおいてもその傾向は観察された。

## 3. 覚醒剤投与による脳 EphA5遺伝子の発現変化

EphA5 mRNA の in situ hybridization に用いたプローブの特異性を確認するため、ラット脳海馬から抽出したトータル RNA を用いてノザンプロットングを行ったところ、9, 5.8, 4.6kbの3本のバンドが観察された。また、センス鎖のcRNAプローブを用いた in situ hybridization では有意なハイブリダイゼーションシグナルは観察されなかった。

アンチセンス鎖 cRNA プローブによる in situ hybridization では、EphA5 mRNA はラット海馬(CA3>CA2>CA1>歯状回の順に)、手綱核、扁桃体などに強い発現を認めた。

帯状回、前頭葉皮質、梨状葉皮質、扁桃体、海馬(CA1-3, 歯状回)、手綱核で、ハイブリダイゼーションシグナルの半定量的計測を行った。梨状葉皮質、海馬CA2, CA3, 歯状回ではメタンフェタミン投与後24時間まで EphA5 mRNA の発現に有意な変化を認めなかった。これに対して帯状回と前頭葉皮質では、メタンフェタミン投与から24時間後になって EphA5 mRNA の発現が約20%、有意に減少していた(それぞれ  $p<0.05$ ,  $0.01$ )。海馬CA1領域ではメタンフェタミン投与後3時間、24時間でやはり約20%発現が減少していた( $p<0.02$ )。また手綱核ではメタンフェタミン投与後1時間から24時間にかけて約25%の持続的な発現減少を認めた( $p<0.005-0.05$ )。さらに扁桃体では、メタンフェタミン投与後9時間、24時間後に約25%の発現増加が観察された(それぞれ  $p<0.01$ ,  $0.005$ )。

## 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の解析

##### 1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する遺伝子mrt3の検討

今年度の研究より、MAPに対し発達依存的な応答を示す分子としてラット大脳新皮質から検出された新規遺伝子mrt3について、全長mRNAに対応するcDNAの塩基配列や薬理学的性質が明らかになった。大脳新皮質のmrt3 mRNAは、MAPだけでなく、同

様に逆耐性現象を引き起こすコカインによっても増加したが、逆耐性惹起作用のないpentobarbital投与後には有意な変化を示さなかった。また、逆耐性現象の成立を阻害するSCH23390は、mrt3のMAPによる発現誘導を抑制した。これらの現象は、mrt3が逆耐性現象に関与する分子カスケードに含まれる可能性を示唆している。ただし、mrt3が少なくとも生後23日齢までMAPへの応答性を獲得していない点は、生後23日にはMAPにより発現誘導が生ずるmrt1とは異なる。mrt3のMAP応答性の生後23日以降の発達に伴う変化をさらに詳細に検討する必要がある。

mrt3転写産物の発現量は、非翻訳領域に対する特異的プライマーを設計して測定すると、脳の各部位と脾臓・肺で多く、その他の末梢臓器では少なかった。mrt3のバリエーションが存在する可能性も否定的できず、さらに検討中である。コーディングフレームは比較的短く、推定されるアミノ酸配列に高い相同性を示す既知蛋白質は知られていない。mrt3がコードする分子の機能や局在を明らかにするため、現在、このような配列をもとに抗体を作製中である。

## 2)mrt1およびMrt1蛋白の薬物応答の特異性に関する検討

アンチmrt1オリゴヌクレオチドの注入実験では、MAPによるMrt1蛋白の増加が抑制されたのに対して、Arc蛋白の増加は影響を受けず、アンチmrt1オリゴヌクレオチドの効果は、脳内物質についても非特異的でないことが支持された。

## (2)MAPまたはPCPによる発現誘導が発達依存的に変化するラット遺伝子のヒト相同遺伝子の解析

mrt1およびprt1のヒト相同遺伝子のゲノム構造が明らかになり、今後、覚醒剤依存やその他の精神疾患との関連を調べるため、エクソンを中心に変異の検索を行っている。

## (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、既にクローニングしたdsr-1の他にも、脳内D-セリン濃度の上昇に応答して発現が変化する新規遺伝子dsr-2があることを見出した。大脳新皮質におけるdsr-2の発現は、D-セリンの脳内濃度上昇によって増加したが、L-セリンでは変

化がなかった。この立体選択的反応は、dsr-2がdsr-1とともに、ラットにおいて、D-セリン代謝に関わる分子である可能性を示唆している。

## 2. 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

我々はこれまでにモノアミントランスポーターが単独に欠損するとコカインの報酬効果が保持されることを報告している[10]。今回の研究では、DAT単独完全欠損にSERT欠損が加わることによりコカインの報酬効果が消失することを示した。これらの結果により、コカイン報酬効果にはDA神経伝達系と5-HT神経伝達系が共に関与していることが推測される。また、DAT(-/-)SERT(+/-)マウスではコカインの報酬が消失、DAT(+/-)SERT(-/-)マウスでは保持されたことから、SERTよりもDATがより重要な役割を果たしていると考えられる。

コカイン報酬効果におけるDAと5-HTの神経伝達系の相互作用をさらに詳しく検討するために、脳内微量透析法を用いて神経化学的な解析を行なった。DATあるいはSERTが単独欠損しても、コカインによる線条体の細胞外DAと5-HTが上昇し、報酬効果も保持されていた。一種類のモノアミントランスポーターが欠損しても、他のトランスポーターによる補完作用により、再取り込み機能は部分的に維持されている可能性がある。DAT単独完全欠損にSERT欠損が加わると、モノアミントランスポーター間の補完作用が崩れ、DAと5-HT反応性も、コカインの報酬効果も消失する可能性が考えられる。

DATが欠損した場合、5-HT神経伝達系が報酬作用を代償する可能性も考えられる。しかしDA反応性を示さないDAT(-/-)SERT(+/-)マウスの場合、5-HTが増加しても、コカインの報酬効果が消失していた。この結果より、5-HT神経伝達系が単独に報酬作用を担う可能性は少ないと考えられる。

また、 $\mu$ 受容体欠損マウスにおいて、報酬試験としての静脈内自己投与試験、場所条件付け試験では、モルヒネの報酬効果が消失していた。この結果は、モルヒネの報酬効果には $\mu$ 受容体の発現が必要であり、 $\mu$ 受容体では代償できないことを示している。エタノールの報酬効果にオピオイド系の関

与が示唆されているが、 $\mu$ 受容体欠損マウスではエタノールの報酬効果が減少していたことから $\mu$ 受容体の重要性が明らかとなった。モルヒネのみならずエタノールの報酬効果にも $\mu$ 受容体が関与していると考えられる。

### 3. 覚醒剤投与による脳 EphA5遺伝子の発現変化

今回我々が行った予備的検討でのノザンプロベイング及びin situ hybridizationの結果は、Taylorら(1994)とMaisonpierreら(1993)の結果とそれぞれほぼ一致しており、我々が作成したプローブがEphA5受容体に特異的であることが確認された。

EphA5 mRNAは帯状回、前頭葉皮質、海馬CA1領域、手綱核でメタンフェタミン投与後に20-25%有意に減少、唯一扁桃体でのみ約25%有意に増加していたので、メタンフェタミンのEphA5 mRNAの脳内発現に及ぼす効果には部位差があることが示された。さらに、手綱核ではメタンフェタミン投与後1時間からEphA5 mRNAの発現変化を認めたのに対して、他の脳部位では投与後9-24時間後に変化が認められた。手綱核で認められたような早期のEphA5 mRNAの変化はメタンフェタミンの直接的な、おそらくは神経伝達に及ぼす効果が関与していることが示唆される。これに対して、9-24時間後に現れるようなEphA5 mRNAの変化は、何らかの蛋白合成の変化を介している可能性が高い。従って、メタンフェタミンは複数の脳内機序によってEphA5 mRNAの発現を調節している可能性があるため、こうした機序に関連する神経伝達物質の検索が必須であろう。

また、今回発現変化が認められた脳部位のうち、大脳皮質、海馬、扁桃体はPapezやMacLean回路の重要な構成部位であり、記憶や情動と密接に関連している。特に海馬CA1領域は内嗅皮質から直接または歯状回、CA3領域を介しての神経投射や扁桃体から直接に神経投射を受け、最終的には前頭葉に出力し、記憶に重要な役割を果たすと考えられている。Eph受容体ファミリーは、そのリガンドであるEphrinと共役して脳内では神経軸索のガイダンス関与する分子であることを踏まえると、MAPはEphA5受容体の変化を介して、神経結合の変化、ひいては記憶や情動のメカニズムを変化させる可能性がある。

今後は、MAPがEphA5 mRNAに及ぼす影響の阻止条件や、Eph受容体のリガンドであるEphrinへの影響を検討する必要がある。

### 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、覚醒剤や麻薬に一定の発達段階から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. 覚醒剤に発達依存的応答を示す新規遺伝子として、従来から報告してきたmrt1に加え、新たにmrt3 mRNAの全長に対応するcDNA塩基配列を同定した。大脳新皮質mrt3は、覚醒剤ばかりでなく、他に逆耐性現象を誘起するコカインにより発現が増加し、逆耐性形成を阻害するD1ドーパミン受容体遮断薬を前処置しておくこと、覚醒剤への反応が消失することから、逆耐性現象の分子機構に関与することが示唆された。
3. 覚醒剤による逆耐性形成を阻害するアンチmrt1オリゴヌクレオチドを持続的に脳室内に注入したラットの線条体では、覚醒剤投与時において、Mrt1蛋白の増加が抑制されたが、中枢刺激薬に反応することが知られているArc蛋白の増加に影響しなかった。したがって、アンチmrt1オリゴヌクレオチドの抗逆耐性効果が非特異的な作用にもとづくものではなく、覚醒剤によるMrt1蛋白の発現誘導抑制作用を介する可能性が支持された。
4. 逆耐性関連候補遺伝子のひとつであるmrt1と、PCPが引き起こす依存や精神病状態との関連が考えられる候補遺伝子prt1のヒト相同遺伝子を同定しゲノム配列を明らかにした。
5. 大脳新皮質における発現が、D-セリン投与後に増加するが、L-セリンでは変化しない遺伝子として、dsr-1に加え、dsr-2をクローニングした。D-セリンの代謝や機能に関与する可能性があり、今後、新規向精神薬として期待されるD-セリンシグナル調節薬を開発するための標的分子としての意義を検討する。

6. 報酬効果が保持されている各種モノアミントランスポーター欠損マウスはコカインに対するDA反応性を示した。また、5-HT反応性の有無と関係なく、DA反応性を示さなかったマウスはコカインの報酬効果を失った。これらの結果は、コカイン報酬効果におけるDA神経伝達系の重要な役割を示唆する。また、 $\mu$ 受容体欠損マウスに関する報酬試験は、 $\mu$ 受容体が鎮痛作用以外、モルヒネ及びエタノールの報酬作用にも関与していることを示唆した。

7. MAP投与に伴うEphA5受容体 mRNA の発現変化を in situ hybridization 法で検討したところ、a) EphA5 mRNA は帯状回、前頭葉皮質、海馬CA1領域、手綱核でメタンフェタミン投与後に 20-25%有意に減少、唯一扁桃体でのみ約25%有意に増加していた、b)手綱核ではメタンフェタミン投与後1時間から EphA5 mRNA の発現変化を認めたのに対して、他の脳部位では投与後9-24時間後に変化が認められた、という結果を得た。大脳皮質、海馬、扁桃体はPapez やMacLean回路の重要な構成部位であり、記憶や情動と密接に関連することから、MAPはEphA5受容体の変化を介して、神経結合、ひいては記憶や情動に関与する神経回路の可塑的变化を引き起こす可能性がある。

## 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*, 303: 99-102, 2001

2) Yamamoto N, Tomita U, Umino A and Nishikawa T: Uptake of D-serine by synaptosomal P2 fraction isolated from rat brain. *Synapse*, 42: 84-86, 2001

3) 西川 徹, 平岡秀一, 梶井 靖, 海野麻未, 村岡新一郎, 白山幸彦, 黒田安計: Phencyclidineモデルを用いた抗精神病薬に抵抗性の精神分裂病症状の分子機構に関する研究. *精神薬療基金年報* 33: 43-48,

2001

4) 村岡新一郎, 梶井 靖, 平岡 秀一, 藤山 航, 海野麻未, 西川 徹: Methamphetamineに発達依存的応答を示す遺伝子の検索と逆耐性現象への関与. *精神薬療基金年報* 第34集 (印刷中)

5) 山本直樹, 土田英人, 海野麻未, 梶井 靖, 岩間久行, 村岡新一郎, 桜井新一郎, 嶋津 奈, 西川 徹: 内源性D-セリンの代謝機構の解明と難治性分裂病症状の治療への応用. *精神薬療基金年報* 第34集 (印刷中)

6) Hall S, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacol* 154:43-49

7) Sora I, Elmer G, Funada M, Pieper J, Li X, Hall FS, Uhl GR (2001) Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions. evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacol* 25(1): 41-54

8) Sora I, Hall S, Andrews AM, Itokawa M, Li X-F, Wei H-B, Wichems C, Lesch K, Murphy DL, Uhl GR (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5300-5305

9) Yamamoto H, Karasawa J, Sagi N, Takahashi S, Horikomi K, Okuyama S, Nukada T, Sora I, Yamamoto T (2001) Multiple pathways of sigma1 receptor ligand uptakes into primary cultured neuronal cells. *Eur J Pharmacol* 425: 1-9

10) Yuyama K, Yamamoto H, Nakamura K, Kato T, Sora I, Yamamoto T (2001) Resistance of PC12 cells against nitric oxide (NO)-induced toxicity in long-term culture: implication of neuronal NO synthase expression. *Neurosci Lett* 309: 169-172

11) Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, Sora I, Arellano J, DeFelipe J, Giménez-Amaya JM, Conciatori M, Marino R, Baldi A, Cabib S, Pascucci T, Uhl GR, Murphy DL, Lesch KP, Keller F (2001) Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci* 21(17): 6862-6873

12)岩橋和彦, 飴野清, 飴野節子, 井尻巖, 滝本高広, 寺山隼人, 末吉悟史, 福西勇夫, 曾良一郎, 原田勝二 (2002) ニコチン (タバコ) 依存とCCKおよびCYP2A6に関する分子生物学的研究. 臨床精神医学 31: 87-90

13)沈昊偉, 沼知陽太郎, 粟田圭一, 鈴木一正, 佐藤光源: 電気けいれんショックによるラット脳内セロトニントランスポーター発現の変化. 精神薬療研究年報, 第33集, 226-231, 2001

14)Yoshida, S., Iwabuchi, Y., Numachi, Y., Saito, H., Yamazaki, H., Sakai, H., Kimura, M., Matsuoka, H., Sato, M.: Clinical features and alterations in the inferior horn sizes in lateral ventricle in Alzheimer's patients with different apoE genotype in Japanese population. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25, 1377-1384, 2001

15)Saito, H., Yamazaki, H., Matsuoka, H., Matsumoto, K., Numachi, Y., Yoshida, S., Ueno, T., Sato, M. Visual event-related potential in mild dementia of the Alzheimer's type. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 55, 365-371, 2001

## (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 K. Miyoshi, C.M. Shapiro, M. Gaviria, Y. Morita (Eds.) *Contemporary Neuropsychiatry (Proceedings of the 3rd International Congress of Neuropsychiatry)*, pp. 341-346, Springer-Verlag, Tokyo, 2001.

2)曾良一郎, 池田和隆 (2001) 遺伝子欠損マウスを含む動物個体レベルでのオピオイドの作用機序. In: オピオイド治療 課題と新潮流 (鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会編), 77-84, エルゼビア・サイエンス株式会社ミクス, 東京

3)Numachi, Y., Yoshida, S., Toda, S., Matsuoka, H., Sato, M.: Alterations in corticosterone receptor mRNA induced by methamphetamine in two inbred strains of rats. in *Contemporary Neuropsychiatry* (K. Miyoshi, C.M. Shapiro, M. Gaviria, Y. Morita, eds.), p.347-352,

Springer-Verlag, 2001

## (3) 総説

1) 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.

2) 車地暁生, 西川 徹: ストレス応答関連遺伝子と神経回路-ストレスによるc-fosとCRHの遺伝子発現の変化. 特集「ストレスの脳科学」 *医学のあゆみ* 197: 263-266, 2001

3) 山本直樹, 西川 徹: 新たな抗精神病薬開発の未来 特集「抗精神病薬50年のあゆみ」. *Schizophrenia Frontier* 2: 99-106, 2001

4) 西川 徹: D体のアミノ酸が脳ではたらく. *科学* 71: 984-988, 2001

5) 西川 徹: 覚醒剤精神病の分子生物学. *Current Insights in Neurological Science* 9: 2-4 2001

6) 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: 30-34 2001

7) 黒田安計, 西川 徹: 覚せい剤による遺伝子発現. *分子精神医学* 2: 31-37 2002

8) Uhl G R, Hall F S, Sora I (2002) Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Molecular Psychiat* 7: 21-26

9) 曾良一郎 (2001) セロトニントランスポーターと精神疾患. セロトニン 最新の話 第4回神経伝達物質研究会記録集, 42-54

10) 曾良一郎, 山本秀子 (2001) 精神疾患の分子医学 -基礎と臨床、臨床: 薬物依存の分子医学. *現代医療* 33(11): 120-125

11) 曾良一郎 (2001) 遺伝子改変動物を用いた薬物依存の研究. *日本神経精神薬理学雑誌* 21: 163-164

12) 曾良一郎, 沈昊偉 (2001) 特集: 生物学的精神医学 最近の進歩、精神疾患の観点から見たノックアウトマウス. *最新精神医学* 6(6): 537-542

13) 池田和隆, 小林徹, 曾良一郎 (2001) アルコールと脳機能. *日本醸造協会誌* 97: 124-130

14) 沼知陽太郎: 薬による脳とこころの変化. *こころの科学*, 100号, 95-99, 2001年10月

## 2. 学会発表

(1) 特別講演, シンポジウム

- 1) Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, Nishikawa T: Possible involvement of neocortical expression of a novel rat gene for a synaptic PDZ molecule, Mrt1B, in stimulant-induced behavioral sensitization, Session S15 Stimulant-Induced Psychosis. The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, 4.3, 2001.
- 2) Nishikawa T, Kajii Y, Hiraoka S, Umino A, Hashimoto T, Muraoka S, Kuroda Y: Psychotomimetics and the molecular basis of schizophrenia, Session S23 Catecholamine and Neuropsychiatric Disorders. The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, 4.4, 2001.
- 3) 西川 徹: 精神分裂病への分子薬理学的アプローチ病態解明と新しい治療法開発を目指して— ライフサイエンス技術部会メディカル分科会講演会, 東京, 4.17, 2001
- 4) 西川 徹: 精神分裂病の分子病態 (2) . 第97回日本精神神経学会総会, 大阪, 5.18, 2001
- 5) 西川 徹: ゲノムサイエンスと精神医学: 分裂病で発現する遺伝子の研究. 第97回日本精神神経学会総会, 大阪, 5.19, 2001
- 6) Nishikawa T: Molecular Neurobiology of Schizophrenia. RIKEN BSI Summer Program, Wako, 7.6, 2001
- 7) 西川 徹: 覚せい剤による逆耐性現象と *mrt 1* 遺伝子. 「ここまで進んだ覚醒剤精神病の発症機序— よりよき治療を目指して」ニコチン・薬物依存研究フォーラム, 東京, 7.14, 2001
- 8) 西川 徹: 精神機能疾患の現在: 分子から画像まで 動物モデル. 新潟神経学夏期セミナー, 新潟, 7.27, 2001
- 9) Nishikawa T: Metabolism and functions of endogenous D-serine. Sanofi-Synthelabo Seminar, Bagnex, 8.7, 2001
- 10) 西川 徹: 「精神分裂病の分子病態を探る」— 病因解明と新しい治療薬剤開発を目指して— . 和風会講演会, 大阪, 8.31, 2001
- 11) 西川 徹: 分裂病の分子メカニズムを探る. 東京精神神経科診療所協会例会, 東京, 9.8, 2001
- 12) 西川 徹, 梶井 靖, 村岡新一郎, 藤山 航, 海野 麻未, 黒田安計: 中脳ドーパミンニューロンと精神機能「中脳ドーパミンニューロン: 21世紀における新展開」. 第24回日本神経科学学会・第44回日本神経化学会合同大会Neuro2001, 京都, 9.27, 2001
- 13) 西川 徹: 精神神経薬理についての最新情報—NMDA受容体と内在性D-セリンからみた分裂病の病態と治療法開発—. 2001年抗精神病薬研究会, 東京, 9.29, 2001
- 14) 西川 徹: 精神分裂病モデルにおける遺伝子発現と治療薬の開発. 第11回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー, 東京, 10.30, 2001
- 15) 西川 徹: 分裂病症状の分子機構への発達神経科学的アプローチ. 東京都神経科学総合研究所セミナー, 11.20, 2001
- 16) Nishikawa T: Gene expression in animal models of schizophrenia, Annual Meeting of Korean Society of Biological Psychiatry, Seoul, 3.22, 2002
- 17) Ishiguro H, Sora I, Liu Q, Uhl GR (2001) Genes and drug abuse. In Symposium: Genetic approaches to studying monoamine function. 7th World Congress of Biological Psychiatry (WCBP), Berlin, Germany [2001/7/3]
- 18) Sora I, Hall S, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (2001) Psychostimulants and monoamine function. In Symposium: Genetic approaches to studying monoamine function. 7th World Congress of Biological Psychiatry (WCBP), Berlin, Germany [2001/7/3]
- 19) Murphy D, Sora I, Li Q, Wichern C, Andrews A, Lesch KP (2001) Serotonin transporter knock-out mice show a spontaneous behavioral phenotype of increased stress and “anxiety”. In Symposium: 5-HT transporter in the pathogenesis and therapy of affective disorders: From bench to bedside and back. 7th World Congress of Biological Psychiatry (WCBP), Berlin, Germany [2001/7/6]
- 20) 曾良一郎 (2001) 招待講演: 遺伝子改変動物を用いた薬物依存の研究. ニコチン・薬物依存研究フォーラム第4回学術年会, 東京 [2001/7/14]
- 21) 曾良一郎 (2001) モノアミンと報酬系. シンポジウム: 適応と修飾物質, 2001神経情報科学研究会, 神

奈川 [2001/8/31]

22)曾良一郎 (2001) モノアミントランスポーターと精神疾患. 第12回高次脳機能障害シンポジウム, 富山 [2001/10/26]

23)曾良一郎 (2001)遺伝子変異動物を用いた疾患モデル. シンポジウム: 精神分裂病モデル動物と医薬品開発 (評価), 第31回日本神経精神薬理学会年会, 広島 [2001/10/4]

24)曾良一郎 (2001) 特別講演: 精神疾患モデルとしての遺伝子改変動物. 福島県立医科大学, 東京 [2002/3/4]

25)Numachi, Y., Sato, M.: Methamphetamine-induced behavioral sensitization and corticosterone receptors. the 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto, 2001.4

26)沼知陽太郎, 沈 昊偉, 藤山 航, 戸田重誠, 吉田寿美子, 松岡洋夫, 佐藤光源: 学習記憶と薬物依存の接点: 精神医学の視点から. 第31回日本神経精神薬理学会年会シンポジウム「学習記憶と薬物依存の接点」, 広島, 2001.10

## (2) 国際学会

1) Iwama H, Umino A, Hashimoto A, Takahashi K, Yamamoto N, Nishikawa T: Origin and regulation of extracellular D-serine in the rat brain: an in vivo microdialysis study. 7th International Congress on Amino Acid and Proteins, Vienna, 8.10, 2001

2) Yamamoto N, Tsuchida H, Umino A, Tomita U, Takahashi K, Hayashi F, Nishikawa T: Uptake and release of D-serine in rat brain synaptosomes. 7th International Congress on Amino Acid and Proteins, Vienna, 8.10, 2001

3)Yamamoto T, Yuyama K, Ikeda K, Sora I, Yamamoto H. (2001) Rat mesencephalon dopaminergic neuron is sensitive to nitric oxide (NO)-induced cytotoxicity. The 9th International Catecholamine Symposium, Kyoto [2001/4/3].

4)Ujike H, Nakata K, Takaki M, Harano M, Komiyama T, Mitsushio H, Sekine Y, Inada T, Maeda T, Iwashita S, Yamada M, Sora I, Iyo M, Ozaki N, JGIDA (Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse) (2001) Association

study between methamphetamine psychosis and the dopamine transporter gene polymorphisms. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologium (CINP) Regional Meeting Hiroshima, Japan [2001/10/2]

5)Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li X-F, Wei H-B, Yamamoto H, Yamamoto T, Ikeda K, Wichems C, Lesch K-P, Murphy DL, Uhl GR (2001) Molecular Mechanisms of Cocaine Reward: Combined Dopamine and Serotonin Transporter Knockouts Eliminate Cocaine Place Preference. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/13]

6)Mizoguchi H, Wu HE, Narita M, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Nagase H, Tseng LF (2001) Benzomorphans block opioid &  $\epsilon$ -receptor-mediated G-protein activation by  $\beta$ -endorphin in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/11]

7)Meilandt WJ, Barea-Rodriguez EJ, Jaffe DB, Sora I, Hall FS, Uhl GR, Martinez, Jr. (2001) Effects of mu-opioid receptor deletions on hippocampal dependent memory and synaptic plasticity. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/12]

8)Uhl GR, Li XF, Axelrad S, Sora I, Roff S, Hoggatt H, Hen R, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS (2001) Effects of cocaine in combined dopamine transporter (DAT)/serotonin transporter (SERT) and DAT/serotonin 1B receptor (5-HT1B) knockout (KO) mice. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/12]

9)Hall FS, Li XF, Sora I, Roff S, Hoggatt H, Xu F, Caron M, Lesch KP, Murphy DL, Rocha BA, Uhl GR (2001) Enhanced cocaine conditioned place preference (CPP) in combined norepinephrine transporter (NET)/serotonin transporter (SERT) knockout (KO) mice. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/12]

10)Eisch AJ, Harrist A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Nestler EJ (2001) Involvement of the  $\mu$  opioid receptor (MOR) in adult hippocampal neurogenesis. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/15]

11)Yuyama K, Yamamoto H, Kato T, Sora I, Yamamoto T (2001) A nitric oxide donor NOR3 induced cell death in PC12 cell through the formation of reactive oxygen species (ROS) not by caspase-dependent pathway. Society



for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/14]

12) Karasawa J, Yamamoto H, Nukada T, Takahashi S, Horikomi K, Sora I, Yamamoto T (2001) Vesicular monoamine transporter (VMAT2): one of the target molecules of antipsychotic agents. Society for Neuroscience, San Diego, USA [2001/11/11]

### (3) 一般学会

1) 織田健二, 大久保善朗, 石田竜二, 村田雄二, 太田克也, 松田哲也, 松島英介, 一宮哲哉, 須原哲也, 澁谷均, 西川 徹: 血管性うつ病患者の局所脳血流所見. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

2) 中村映里奈, 太田克也, 石井賢二, 伊澤良介, 西川 徹: PETを用いた全生活史健忘例における脳糖代謝の検討. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

3) 土田英人, 山本直樹, 梶井 靖, 海野麻未, 福井顕二, 西川 徹: D-セリンによって大脳皮質において誘導される遺伝子dsr-1の解析. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎, 4.11, 2001

4) 梶井 靖, 戸田重誠, 西川 徹: 成熟ラット海馬におけるCDCrel-1 septinアイソフォーム (CDCrel-1F/CDCrel-1A) の発現. 第44回日本神経化学会大会, 京都, 9.27, 2001

5) 山本直樹, 土田英人, 梶井 靖, 海野麻未, 西川 徹: ラット大脳皮質においてD-セリンによって誘導される遺伝子dsr-1の解析. 第44回日本神経化学会大会, 京都, 9.27, 2001

6) 任海学, 二村隆史, Saliva A, 小幡邦彦, 八木 健, 饗場 篤, 曾良一郎, 鍋島俊隆, 那波宏之 (2001) 音刺激驚愕反応によるミュータントマウスの精神分裂病モデルとしての評価. 第23回日本生物学的精神医学会, 長崎 [2001/04/13]

7) 山本敏文, 湯山耕平, 加藤武, 池田和隆, 曾良一郎, 山本秀子 (2001) 低濃度NOによる細胞種特異的毒性の発現とその保護因子. 第1回日本NO学会学術集会, 福岡 [2001/05/26]

8) 唐沢淳一, 山本秀子, 山本敏文, 高橋真司, 堀込和利, 池田和隆, 曾良一郎 (2001) VMAT2に対する抗精神病薬の作用. 第24回日本神経科学・第44回日本

神経化学 合同大会, 京都 [2001/09/]

9) 池田和隆, Moss S, Fowler S, 曾良一郎, 二木宏明 (2001) マウスにおける2つの脳内自己刺激解析方法の比較: ヘッドディッピング法と滞在学習法. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会, 京都 [2001/09/]

10) 湯山耕平, 山本秀子, 加藤武, 曾良一郎, 山本敏文 (2001) 一酸化窒素 (NO) によるPC12細胞死におけるミトコンドリア電子伝達酵素の活性低下とMAPキナーゼの関与. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学 合同大会, 京都 [2001/09/]

11) 曾良一郎, 萩野洋子, 沈昊偉, 田中 (篠原) 慶子, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, 池田和隆, 山本敏文, 山本秀子 (2001) コカイン報酬の分子機構. 第31回日本神経精神薬理学会年会, 広島 [2001/10/05]

12) Kikuchi K, Inada T, Iijima Y, Maeda T, Ujike H, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Ozaki N, Sekine Y, Iyo M, Iwashita S, Sora I, Yagi G, Kashima H (2001) Association between dopamine d1 receptor family (drd1, drd5) gene polymorphism and methamphetamine psychoses. 第31回日本神経精神薬理学会年会, 広島 [2001/10/05]

### H. 知的所有権の取得状況

#### 1. 研究方法

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、桜井新一郎、嶋津 奈、黒田安計、柏 淳

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において、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の検索を続けた。初年度までに検出された新規遺伝子mrt1 (methamphetamine responsive transcript 1)に加え新たにmrt3の全長mRNAに対応するcDNAの塩基配列を明らかにした。mrt3は、成熟ラットの大脳新皮質において、1)MAPと同様に逆耐性現象を引き起こすコカインの投与後にも発現誘導が生ずる、2)MAPによる発現誘導は逆耐性形成を阻害するD1ドーパミン受容体遮断薬SCH23390によって阻害される、3)逆耐性現象を引き起こさないpentobarbitalやSCH23390の投与では発現が変化しない等の性質をもつことから、mrt1とともに、逆耐性の形成の分子機構に関与することが示唆された。一方、初年度に続いて、覚醒剤・麻薬による異常行動を抑制する、内在性物質であるD-セリンに応答する新規遺伝子を同定した。mrt1とprt1 (phencyclidine responsive transcript 1)については、ヒト相同遺伝子のゲノム構造を明らかにし覚醒剤依存や他の精神疾患との関連を検討するため変異の検索を進めた。

#### 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. ノーザンプロット分析・サザンプロット分析

ノーザンプロット分析は、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、<sup>32</sup>Pで標識したcDNAプローブにより行った。また、サザンプロット分析は、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. ウェスタンプロット分析

ラット線条体から、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。シナプトゾーム画分はCarlénら<sup>2)</sup>の方法にしたがって調整した。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、Arc蛋白に対する抗体と反応させた。免疫反応は化学発光法に