

のいくつかの蛋白が取り上げられているため^{3,9,10}、そしてこれらの蛋白がシナプス小胞と膜蛋白への癒合(docking and fusion)による exocytosis に於いて大きな役割を演じているためである。本研究で取り上げた synaphin 1, synaphin 2, SNAP25a, SNAP25b は精神刺激薬投与の影響について報告はなく、synaptotagmin I, synaptotagmin IV についてはコカイン急性投与の報告³があるのみである。

SNAP25 は神経終末上の細胞膜側にあり軸策の伸長や神経伝達物質放出に関与することが示唆されている²。SNAP25 は alternative splicing によって SNAP25a, SNAP25b の isoform として存在する²。SNAP25a の mRNA の発現は出生から3週間までの期間内に増加し、この時期に於けるシナプス結合の増強を反映すると考えられている²。in vitro の系ではドパミンを線条体スライスに処置すると synaptobrevin, syntaxin, SNAP25 からなる SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) core complex が増加すると報告されている⁵。本研究では、内側前頭皮質、線条体、海馬歯状回に於いて METH 急性投与から3時間後で SNAP25a の mRNA の増加を認めた。METH 急性投与から 24 時間の時点では正常域に復していたが、METH 反復投与から3週間を経た steady state (MS 群) に於いて線条体と側坐核で SNAP25a の mRNA の有意な増加が持続していた。

synaptotagmin はシナプス小胞側に位置し、Ca²⁺流入に伴う神経伝達物質の放出に関与することが示唆されている¹¹。synaptotagmin にも9つの isoform が存在する¹¹。先行研究ではコカイ

ンの急性投与によって線条体の synaptotagmin IV の mRNA が増加することが報告³されているが、いずれの精神刺激薬でも反復投与の成績はこれまで報告されていない。METH 反復投与から3週間を経た METH のチャレンジ (MM 群) は METH 急性投与 (SM 群) を上回る synaptotagmin IV の mRNA の増加をいくつかの脳部位で引き起こした。6-hydroxydopamine で黒質線条体系のドパミンを枯渇させて後シナプスドパミン受容体の過感受性をもたらした条件でドパミン D1 受容体作動薬を投与すると傷害側線条体に於いて synaptotagmin IV の mRNA が著明に増加することが報告されている⁵。以上の傍証も含めると、METH の反復投与による神経可塑性に SNAP25a 及び synaptotagmin IV の発現が何らかの形で関与することが示唆される。

Nurr1 は nuclear receptor superfamily のひとつでリガンドは不明なオーファン核内受容体とされる。zinc-finger DNA binding domain をもつ転写因子であり、中脳ドパミン作動性神経の生存分化¹³あるいは神経終末の伸長¹¹に必須とされる。成熟動物では黒質緻密層、腹側被蓋野のドパミンニューロンに存在するが、大脳皮質、海馬錐体細胞層、claustrum でも発現し、これらの脳部位での機能は不明とされている^{12,13}。本研究では、広汎な大脳皮質と腹側被蓋野に於いて METH 急性投与から1時間—3時間後で Nurr 1 の mRNA の増加を認めた。METH 急性投与から 24 時間の時点では正常域に復していたが、METH 反復投与から3週間を経た steady state (MS 群) でもこれらの脳部位で有意な増加が持続していた。この成績の現時点の

意味づけは明確ではないが、Nurr1 がドパミン神経終末の伸長に必須であるとの報告¹¹⁾を合わせると逆耐性現象による神経可塑性との関連性が示唆される。

E. 結論

以上から、SNAP25a, synaptotagmin IV、Nurr I の mRNA は METH 急性投与、反復投与に伴うシナプス結合のパターンなど持続的な構造変化を基礎とした神経可塑性関連遺伝子として発現を変化させることが示唆される。今後、ミクロのレベルでの解析が必要と考えられる。

【引用文献】

1. Berton F., Iborra C., Boudier J.-A., et al.: Developmental regulation of synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAs in the rat CNS. *J. Neurosci.*, 17:1206-1216, 1997.
2. Boschert U., O'shaughnessy C., Dickinson R., et al.: Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 367:177-193, 1996.
3. Denovan-Wright E.M., Newton R.A., Armstrong J.N., et al.: Acute administration of cocaine, but not amphetamine, increases the level of synaptotagmin IV mRNA in the dorsal striatum of rat. *Mol. Brain Res.*, 55:350-354, 1998.
4. Fisher H., and Braun J.E. : Modulation of the SNARE core complex by dopamine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78:856-859, 2000.
5. Glavan G., Zorec R., Babic K., et al.: Dopaminergic regulation of synaptotagmin I and IV mRNAs in hemiparkinsonian rats. *Neuroreport* 11:4043-4047, 2000.
6. Honkaniemi J., and Sharp F.R. : Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur. J. Neurosci.*, 11:10-17. 1999.
7. Ishizuka T., Saisu H., Odani S., et al. : Distinct regional distribution in the brain of messenger RNAs for the two isoforms of synaphin associated with the docking/fusion complex. *Neurosci.*, 88:295-306, 1999.
8. Robinson T.E., and Kolb, B.: Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.*, 17:8491-8497, 1997.

9. Subramaniam S., Marcotte E.R., and Srivastava L.K.: Differential changes in synaptic terminal protein expression between nucleus accumbens core and shell in the amphetamine-sensitized rat. *Brain Res.*, 901:173-183, 2001.
10. Takaki M., Ujike H., Kodama M., et al.: Increased expression of synaptophysin and stathmin mRNAs after methamphetamine administration in rat brain. *Neuroreport*, 12:1055-1060, 2001.
11. Witta J., Baffi J.S., Palkovits M. et al.: Nigrostriatal innervation is preserved in *Nurr1*-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. *Mol. Brain Res.*, 84:67-78, 2000.
12. Xiao Q., Casillo S.O. and Nikodem, V.M. : Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors *Nurr1* and *Nur77* (NGF1-B) in adult rat brain using in situ hybridization. *Neurosci.*, 75:221-230, 1996.
13. Zetterstrom, R.H., Williams, R., Perlmann, T. et al.: Cellular expression of the immediate early transcription factors *Nurr1* and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.*, 41:111-120, 1996.

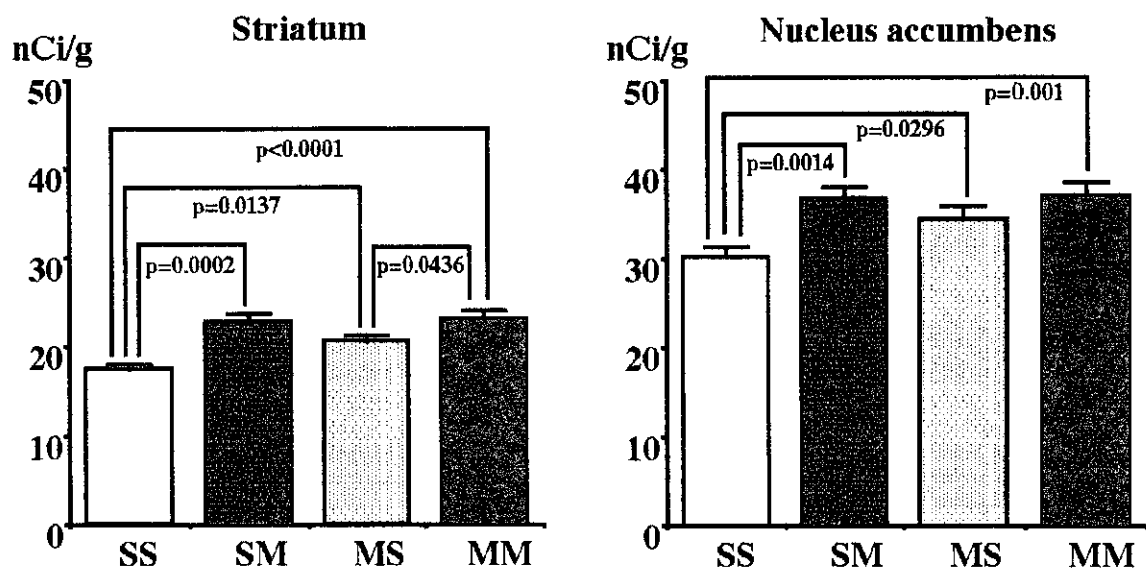


Fig 1: METH 慢性投与による SNAP25a の mRNA の変化

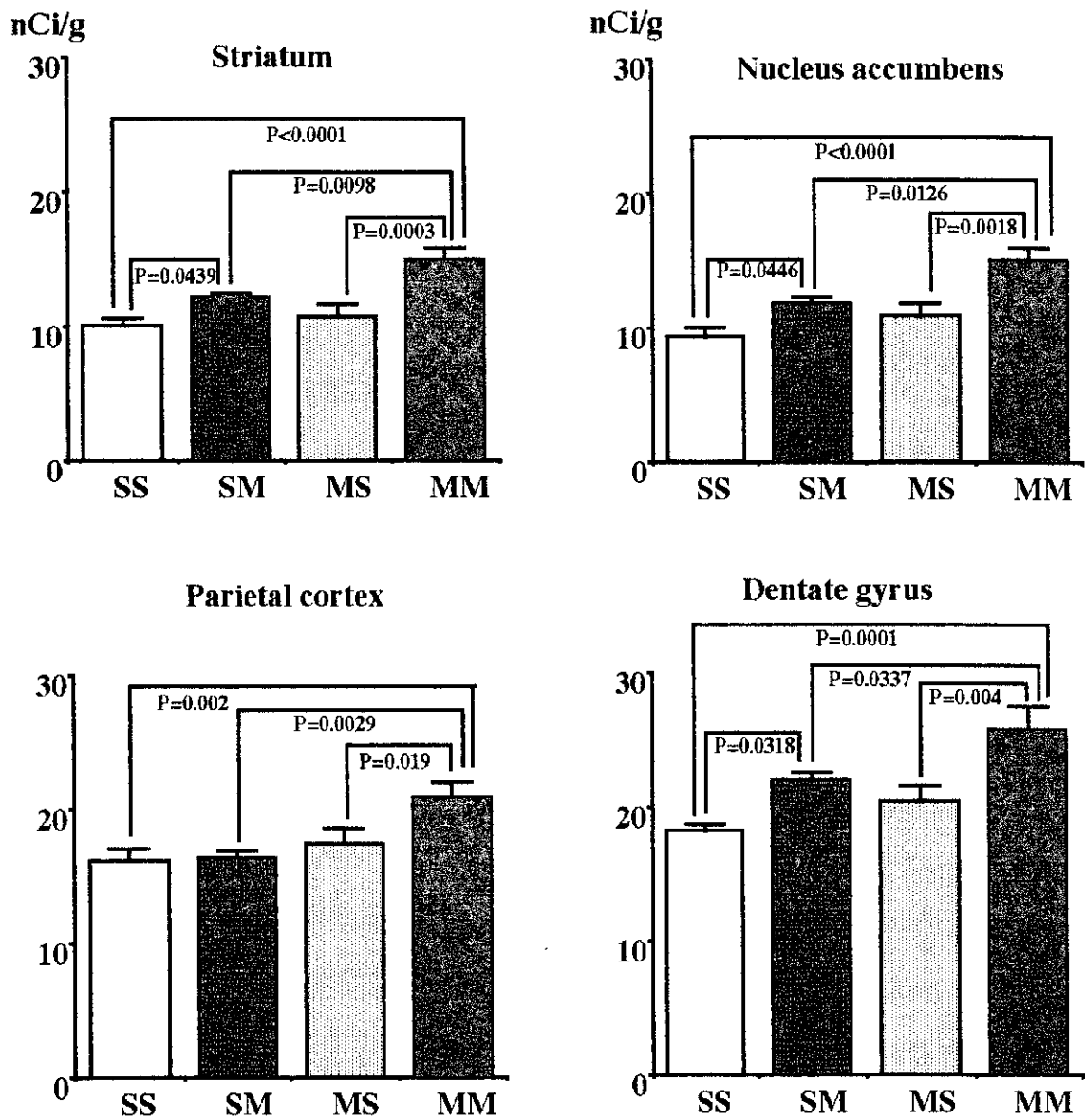
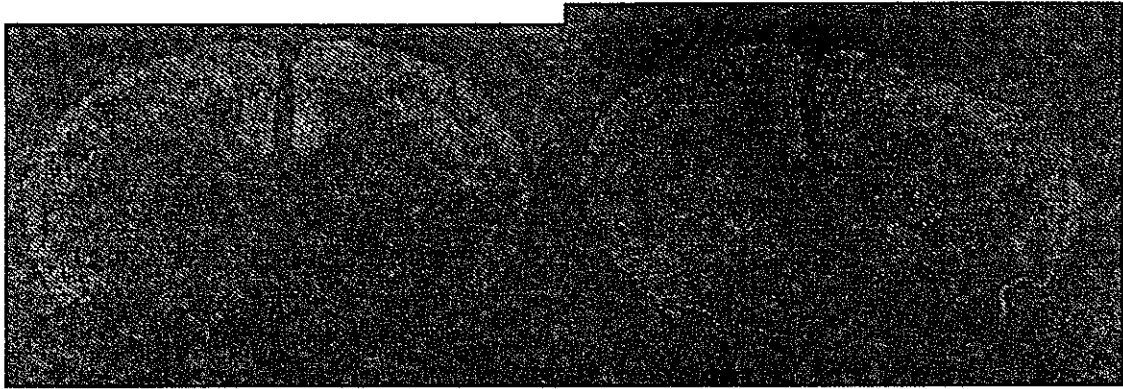
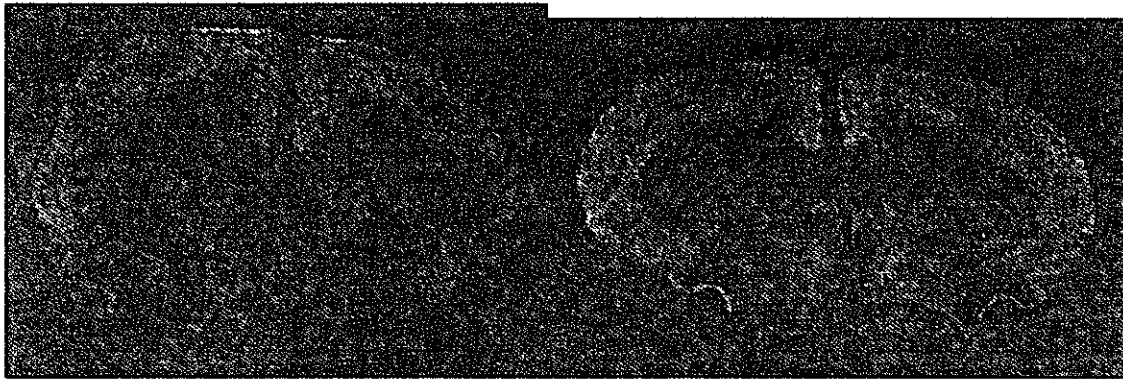


Fig 2 : METH 慢性投与による synaptotagminIV の mRNA の変化



SS

SM



MS

MM

Fig 3 METH 慢性投与による synaptotagminIV の mRNA の変化(線条体、側坐核レベルでの代表画像)

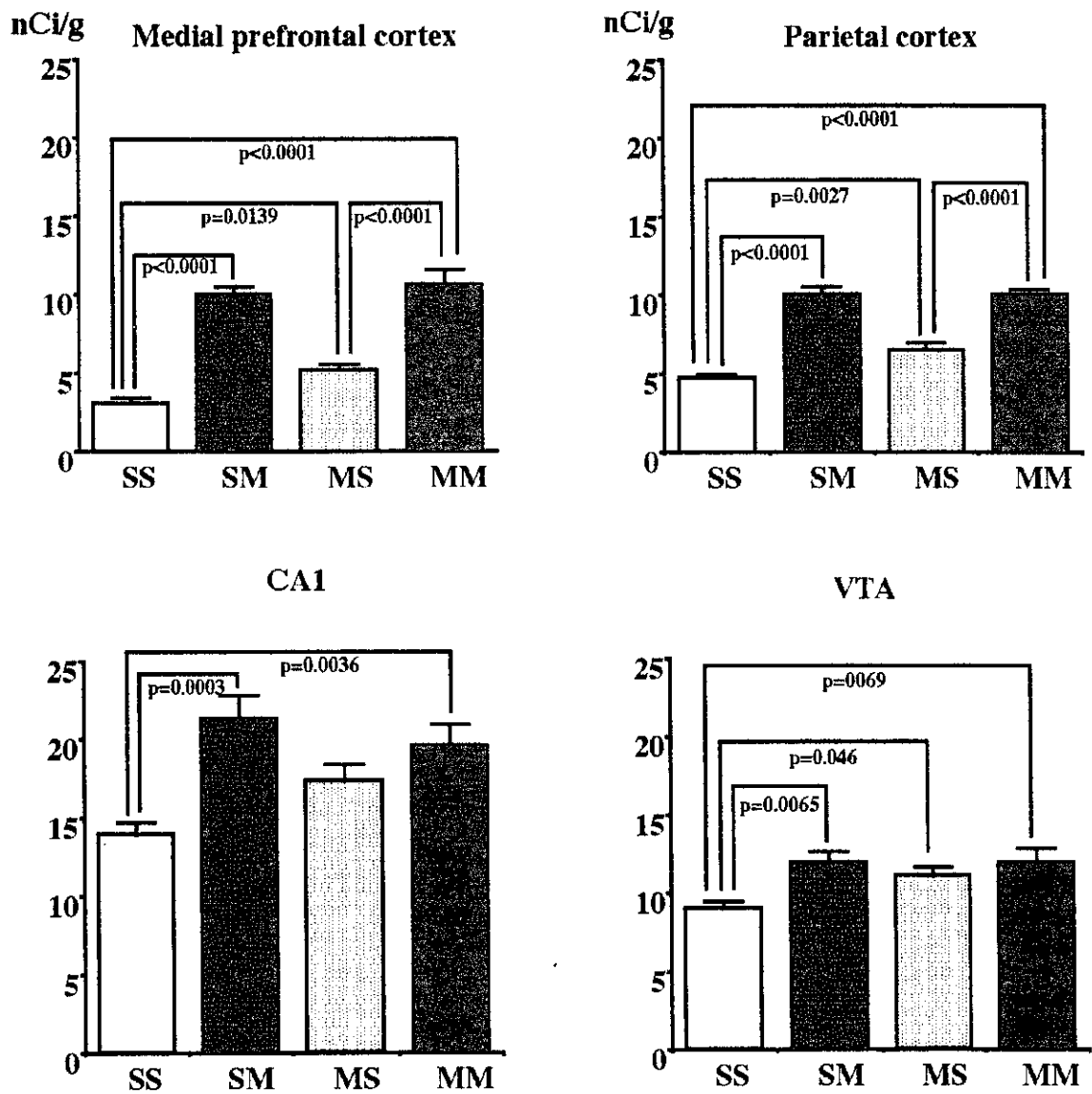


Fig 4 METH 慢性投与による Nurr1 の mRNA の変化

覚せい剤の神経毒性に対するグルタチオンの役割に関する研究

分担研究者：伊豫雅臣（千葉大学大学院医学研究院精神医学）

共同研究者：橋本謙二、清水栄司（千葉大学大学院医学研究院精神医学）

【要旨】：覚せい剤長期使用に伴う精神障害の発現予防薬の開発という観点から、酵素免疫法（ELISA）を用いた DNA 断片化検出により、ヒト神経芽腫培養細胞株 SK-N-SH の 6-hydroxydopamine (6-OH DA) による神経細胞死 (apoptosis) に対する抗酸化剤の神経細胞死抑止効果を検討した。6-OHDA によって引き起こされる神経細胞死は、還元型グルタチオン (GSH) によって用量依存的に抑制された。逆に、グルタチオン合成阻害剤 DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) による内在性グルタチオン濃度の低下は、6-OHDA 誘発神経細胞死を有意に増強した。グルタチオン前駆体 2 剤のうち、N-acetylcysteine (NAC) は、用量依存的に神経細胞死を阻害し、L-cystine も神経細胞死を有意に減弱した。以上の結果より、外因性および内因性グルタチオンが、6-OHDA 誘発神経細胞死に対する神経防護機構において重要な役割を果たすことが示唆された。

A. 目的

本研究の目的は、覚せい剤 (methamphetamine) によって惹起されるドパミン神経系の細胞死 (apoptosis) の機序を明らかにし、その予防薬を開発することにある。apoptosis は、プログラムされた神経細胞死とも言われ、神経系の正常発達に必須の役割を果たす。一方で、不適切な部位と時期に起こる過剰な apoptosis が、パーキンソン病やアルツハイマー病のような神経変性疾患の病理に深く関与していると考えられている。細胞の抗酸化機構は、神経細胞死に重要であることが知られている¹⁾。酸化ストレス、すなわち、活性酸素の生成増加あるいは抗酸化機構の破綻から、細胞の脂質、タンパク、DNA に傷害を与え、神経変性

疾患の病因に重大な役割を果たす²⁾。覚せい剤と同様に、再取り込み部位であるトランスポーターを通して、選択的にカテコールアミン系ニューロンを傷害する 6-hydroxydopamine (6-OH DA) は、神経変性疾患であるパーキンソン病の実験動物を作製するために用いられる神経毒である。その神経傷害作用は、ドパミンキノンや活性酸素などの酸化ストレスを引き起こす物質の生成^{1, 4)}およびミトコンドリア機能の阻害³⁾によって説明されており、そのため、抗酸化剤による神経傷害抑止作用が期待される。脳における主要な抗酸化機構は、ビタミン E (トコフェロール)、ビタミン C (アスコルビン酸)、グルタチオンである^{2, 5)}。グルタチオン (GSH) は、グルタミン酸、システイン、グリシ

ンからなる内因性のトリペプチドであり、非タンパク質性のSH成分として細胞内に多量に存在し、過酸化脂質の生成を抑制したり、活性酸素から細胞を守る効果により注目されている^{2, 6, 8)}。内因性のグルタチオンの欠如が臓器傷害を引き起こすことは、DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) のような γ -glutamylcysteine synthetase を非可逆的に阻害してグルタチオン合成を阻害する薬剤を用いた研究などで知られている⁹⁾。一方、グルタチオンの前駆体である N-acetylcysteine (NAC) および L-cystine の補充は、細胞内のグルタチオンの濃度を増加させることから、グルタチオンそれ自体と同様に、酸化ストレスによる細胞傷害を防ぐことが期待される。神経細胞死の誘発と防護メカニズムは、現在、完全には明らかになっていない。本研究において、ヒト神経芽腫培養細胞 SK-N-SH における 6-OH DA による神経細胞死 (apoptosis) に対する抗酸化物質グルタチオンの抑止効果の検討と、さらに、内因性と外因性のグルタチオンの効果を比較するために、同じ神経細胞死モデルにおいて、グルタチオン合成阻害剤 BSO およびグルタチオン前駆体 NAC および L-cystine の作用の検討した。

B. 方法

1. 細胞培養

ヒト神経芽腫細胞 SK-N-SH は、2 mM L-グルタミン、1.5 g/L 炭酸二ナト

リウム調製 Earle's BSS, 0.1 mM 非必須網アミノ酸、1.0 mM ビルビン酸ナトリウム、10% 仔牛血清 (fetal bovine serum) を含む Eagle minimum essential medium (培養液) 中で、37 °C、5% CO₂ の加湿条件下で培養された。6-OH DA は、0.1% アスコルビン酸を含む培養液に溶解され、24 時間、12.5 μ M あるいは 25 μ M の濃度で添加された。酸化型グルタチオン (GSSG) と還元型グルタチオン (GSH) は、6-OH DA とともに 24 時間添加された。BSO、NAC および L-cystine は、6-OH DA 添加 18 時間前に前処置され、その後、6-OH DA とともに 24 時間添加された。

2. 神経細胞死の測定法

形質膜破壊の数時間前に見られる DNA 断片化を検出するために、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IL, USA) を用いた。このアッセイは、DNA に対するマウス・モノクローナル抗体とヒストンに対するそれぞれの抗体を用いた定量的サンドウィッチ酵素免疫法の原理に基づいている。これによって、細胞質分画に存在するヒストンに関与する DNA 断片 (モノおよびオリゴのヌクレオソーム) の特異的検出が可能となっている。

3. 全グルタチオン濃度の測定

6-OH DA (25, 50, 100 μ M) の添加し 24 時間後、細胞内の全グルタチオン濃度を Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD,

USA)を用いて定量した。また、タンパクは Bradford 法によって定量した。

4.統計解析

データは、4つの実験の平均±標準偏差として示した。統計解析ソフトウェア StatView (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用いて解析し、個々の差の統計学的有意を、一元分散分析(ANOVA)で有意であった後、Scheffe 法によって評価した。

C.結果

1. 6-OH DA による apoptosis

SK-N-SH 細胞において観察された 25 μ M の 6-OH DA による apoptosis は、コントロールの約 5 倍強かった (Fig.1)。

2. 6-OH DA に対する GSH の抗細胞死作用

6-OH DA による apoptosis は、酸化型グルタチオン (GSSG、0.3-10 mM) 前処置による影響を全く受けなかったが、還元型グルタチオン (GSH、0.1-10 mM)によって、3-10 mM の濃度で用量依存的に抑制された (Fig.1) ($p < 0.001$ by Scheffe test)。

3. BSO は、6-OH DA による apoptosis を増悪させる

BSO (0.01-0.1 mM)は、12.5 μ M および 25 μ M の濃度の 6-OH DA による apoptosis を、それぞれの濃度で有意に増悪させた (Fig.2) ($p < 0.001$ by Scheffe test)。BSO によって内因性 GSH の枯渇した細胞は、より脆弱であったが、BSO 単独では 0.01-0.1 mM の各濃度で apoptosis は見られなかった。BSO それ自身が神経細胞死を起こす

ことはないが、6-OH DA の神経毒性を増強することが明らかになった。

4. NAC は、6-OH DA による apoptosis をブロックし、L-cystine は、有意に減弱させる

NAC(0.01-10 mM)単独の前処置では、apoptosis は無変化であったが、NAC(1-10 mM)は、25 μ M の 6-OHDA による apoptosis を用量依存的にブロックした (Fig.3) ($p < 0.001$ by Scheffe test)。特に、10mM の NAC は、apoptosis の程度を コントロールとほぼ同じ基底レベルにまで抑制した。L-cystine(0.01-1 mM)単独の前処置は、NAC 同様、apoptosis に影響を与えなかった。高濃度の L-cystine(1 mM) 添加は、apoptosis を有意に減弱させた (Fig.4) ($p = 0.0155$ by Scheffe test)。

5. 6-OHDA 添加後の全グルタチオン濃度

10 - 20% の弱い apoptosis を引き起こすにとどまる低濃度(25 μ M および 50 μ M)の 6-OH DA は、添加 24 時間後に、細胞内グルタチオン濃度を上昇させることが判った (Fig. 5)。しかし、強い apoptosis を引き起こすにとどまる濃度(100 μ M)の 6-OH DA は、残存している細胞の全グルタチオン濃度には影響を与えなかった。

D.考察

本研究において、ヒトドパミン作働性細胞 SK-N-SH におけるグルタチオンおよびグルタチオン関連化合物の抗細胞死効果を検討した。25 μ M の 6-OH DA による apoptosis は、酸化

型グルタチオン (GSSG) 前処置による影響を全く受けなかったが、還元型グルタチオン (GSH) によって、用量依存的に抑制された。これは、外因性グルタチオンが抗酸化剤として神経保護作用を有することを示唆している。対照的に、グルタチオン合成阻害剤である BSO は、有意に 6-OH DA の神経毒性を増強させた。これは、内因性グルタチオンの枯渇によるものと考えられる。グルタチオンの前駆体に関しては、*N*-acetylcysteine (NAC) は、完全に apoptosis を阻害し、一方、*L*-cystine は、apoptosis を有意に減弱させた。我々の報告は、グルタチオンとその前駆体の中では、NAC が最も効果的な神経保護剤であることを示した最初の報告である。酸化ストレスに暴露された神経細胞に関しても、NAC は、GSH や他の前駆体より細胞内への高い透過性を有することが知られている。以上の結果より、外因性および内因性グルタチオンがドパミン神経細胞死に対する神経防護機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

6-OH DA の神経毒性は、Reactive Oxygen Species (ROS) の産生によって説明される。ドパミンの酸化によって生じる反応性の高いドパミン・キノンやフリーラジカルは、パーキンソン病などの神経変性疾患に関与する酸化ストレスへの寄与が大きいと言われている。ドパミン・キノンは、GSH のシステインの SH 基と反

応し、GSH 濃度を低下させることが知られている。GSH の抗細胞死効果は、ドパミン系神経細胞を選択的に傷害する電子欠乏性、高反応性のドパミン・キノンとの直接反応による可能性がある。

今回の研究において、我々は NAC がニューロンを apoptosis から防護するのに最も有用である薬剤であることを示した。グルタチオン前駆体 NAC の効果は、SH 基による活性酸素やドパミン・キノンの解毒作用および内因性 GSH の補充によるものと考えられる。我々のデータは、抗酸化物質グルタチオン (GSH)、特にその前駆体 NAC が、Redox 機構により、ドパミン神経傷害を抑える作用を有し、覚せい剤長期使用者の精神症状発現に対して治療的予防薬となる可能性を有することを明らかにした。今後は、覚せい剤投与による異常行動惹起作用および神経毒性における抗酸化物質 NAC による抑止効果を詳細に検討していく予定である。

参考文献

- 1) Cohen G., and Heikkila R.E.: The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249: 2447-2452, 1974
- 2) Dringen R., Gutterer J.M., and Hirrlinger J.: Glutathione metabolism in brain. *Metabolic interaction*

- between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* 267: 4912-4916, 2000.
- 3) Glinka Y.Y., and Youdim M.B.: Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 292: 329-332, 1995.
- 4) Graham D.G., Tiffany S.M., Bell W.R. Jr., et al.: Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* 14: 644-653, 1978.
- 5) Kosower N.S., and Kosower E.M.: The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160, 1978
- 6) Reed D.J.: Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 495-502, 1990.
- 7) Reiter R.J.: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9: 526-533, 1995.
- 8) Schulz J.B., Lindenau J., Seyfried J., et al.: Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 267: 4904-4911, 2000
- 9) Si F., Ross G.M., and Shin S.H.: Glutathione protects PC12 cells from ascorbate- and dopamine-induced apoptosis. *Exp. Brain. Res.* 123: 263-268, 1998.
- 平成 13 年度発表論文
- 1: Matsunaga T, Tsukada H, Nishiyama S, Sekine Y, Kakiuchi T, Iyo M, Mori N.: Yohimbine increases the binding potential for [¹¹C]flumazenil in the monkey brain. *J Neural Transm.* 2001;108(12):1375-82.
- 2: Tani K, Iyo M, Matsumoto H, Kawai M, Suzuki K, Iwata Y, Won T, Tsukamoto T, Sekine Y, Sakanoue M, Hashimoto K, Ohashi Y, Takei N, Mori N.: The effects of dentate granule cell destruction on behavioural activity and Fos protein expression induced by systemic methamphetamine in rats. *Br J Pharmacol.* 2001 Dec;134(7):1411-8.
- 3: Tsukamoto T, Iyo M, Tani K, Sekine Y, Hashimoto K, Ohashi Y, Suzuki K, Iwata Y, Mori N.: The effects of FK506, a specific calcineurin inhibitor, on methamphetamine-induced behavioral change and its sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2001 Nov;158(2):107-13.
- 4: Nagatsuka Si S, Fukushi K, Shinotoh H, Namba H, Iyo M, Tanaka N, Aotsuka A, Ota T, Tanada S, Irie T.: Kinetic analysis of [(11)C]MP4A using a high-radioactivity brain region that represents an integrated input function for measurement of cerebral acetylcholinesterase activity without arterial blood sampling. *J Cereb Blood*

Flow Metab. 2001 Nov;21(11):1354-66.

5: Shinotoh H, Namba H, Yamaguchi M, Fukushi K, Nagatsuka S, Iyo M, Asahina M, Hattori T, Tanada S, Irie T. In vivo mapping of brain cholinergic function in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Adv Neurol.* 2001;86:249-55.

6: Sekine Y, Iyo M, Ouchi Y, Matsunaga T, Tsukada H, Okada H, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Takei N, Mori N.: Methamphetamine-related psychiatric symptoms and reduced brain dopamine transporters studied with PET. *Am J Psychiatry.* 2001 Aug;158(8):1206-14.

7: Sekine Y, Takei N, Iyo M, Mori N, Minami M, Ohta T.: Effective

risperidone treatment for simple deteriorative disorder (simple schizophrenia): a case report. *Schizophr Res.* 2001 Jul 1;50(3):213-4.

8: Tanaka N, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Namba H, Iyo M, Aotsuka A, Ota T, Tanada S, Irie T. Positron emission tomographic measurement of brain acetylcholinesterase activity using N-[(11)C]methylpiperidin-4-yl acetate without arterial blood sampling: methodology of shape analysis and its diagnostic power for Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Mar;21(3):295-306.

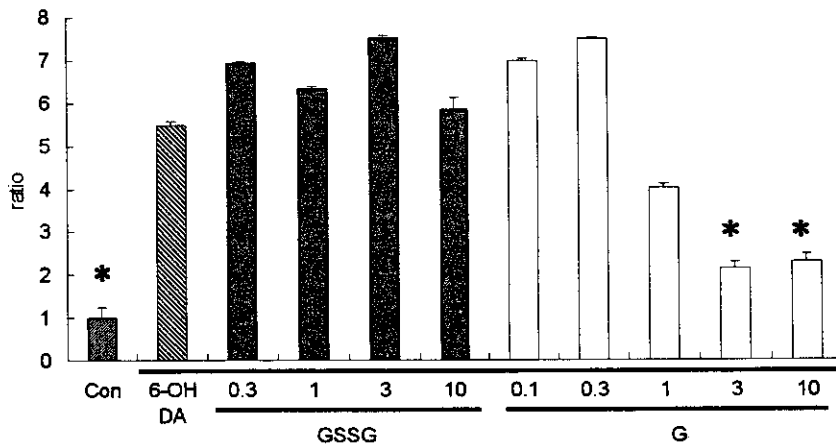


FIG. 1. Apoptosis after exposure to 6-OH DA (25 μ M) alone, or 6-OHDA with various concentrations of GSSG (0.3-10 mM) and GSH (0.1-10 mM). SK-N-SH cells were exposed to 25 μ M of 6-OH DA with either GSSG or GSH at the indicated concentrations for 24 hours. The degree of apoptosis is expressed as a ratio of sample to control. Data are shown as the mean \pm SD of four experiments. # $p < 0.001$, compared with no treatment, * $p < 0.001$, compared with 6-OH DA alone.

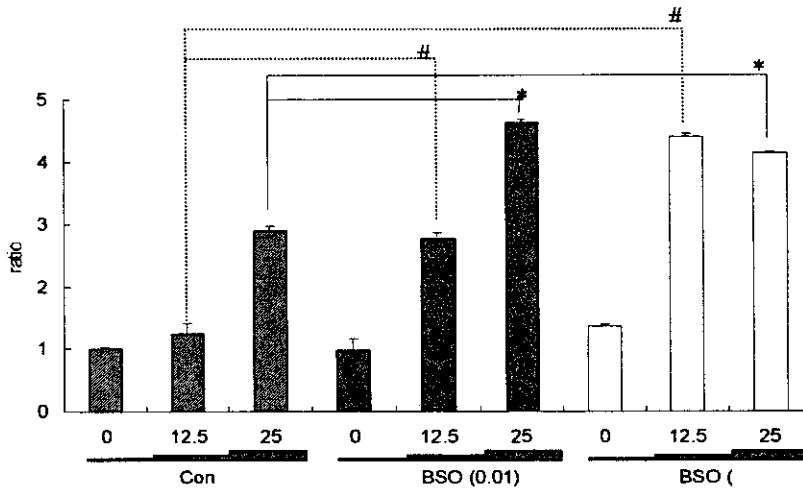


FIG. 2. Apoptosis after exposure to 6-OH DA (12.5 μ M or 25 μ M) alone, or 6-OH DA with various concentrations of BSO (0.01-0.1 mM). SK-N-SH cells were preincubated to the indicated concentrations of BSO for 18 hours and treated with 6-OH DA at the indicated concentrations for 24 hours. The degree of apoptosis is expressed as a ratio of sample to control. Data are shown as the mean \pm SD of four experiments. Among three groups treated by the same concentration of 6-OH DA, differences between 6-OH DA alone and 6-OH DA with BSO were statistically significant at 0.01 mM and 0.1 mM of BSO, respectively. # $p < 0.001$, compared with 12.5 μ M of

6-OH DA alone,

* $p < 0.001$, compared with 25 μM of 6-OH DA alone.

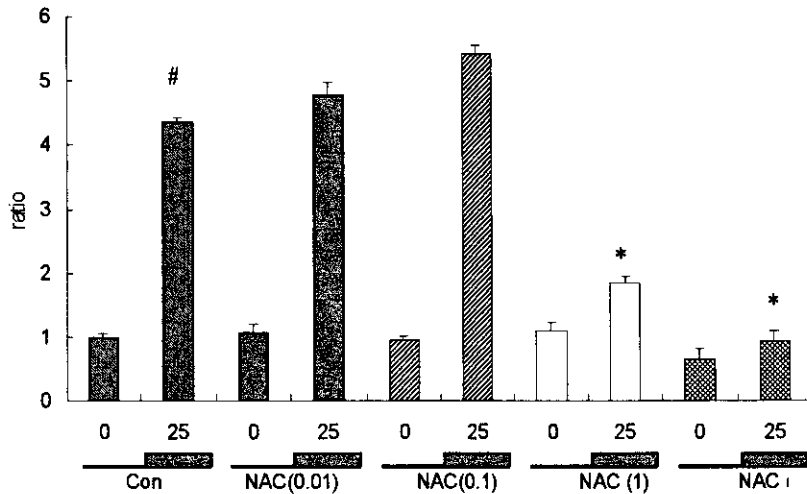


FIG. 3. Apoptosis after exposure to 6-OH DA (25 μM) alone, or 6-OH DA with various concentrations of NAC (0.01-10 mM). SK-N-SH cells were preincubated to the indicated concentrations of NAC for 18 hours and treated with 6-OH DA at the indicated concentrations for 24 hours. The degree of apoptosis is expressed as a ratio of sample to control. Data are shown as the mean \pm SD of four experiments. # $p < 0.001$, compared with no treatment, * $p < 0.001$, compared with 6-OH DA alone.

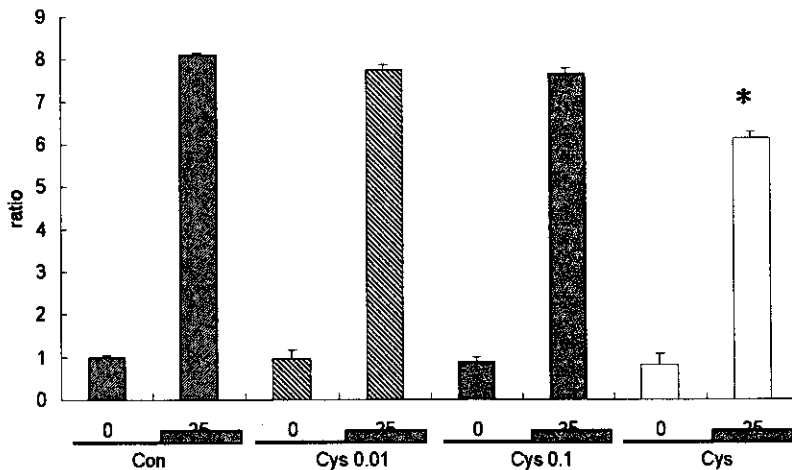


FIG. 4. Apoptosis after exposure to 6-OH DA (25 μM) alone, or 6-OH DA with various concentrations of L-cystine (0.01-1 mM). SK-N-SH cells were preincubated to the indicated concentrations of L-cystine for 18 hours and treated with 6-OH DA at the indicated concentrations for 24 hours. The degree of apoptosis is expressed as a ratio of sample to control. Data are shown as the mean \pm SD of four experiments. # $p < 0.001$, compared with no treatment, * $p = 0.0155$, compared with 6-OH DA alone.

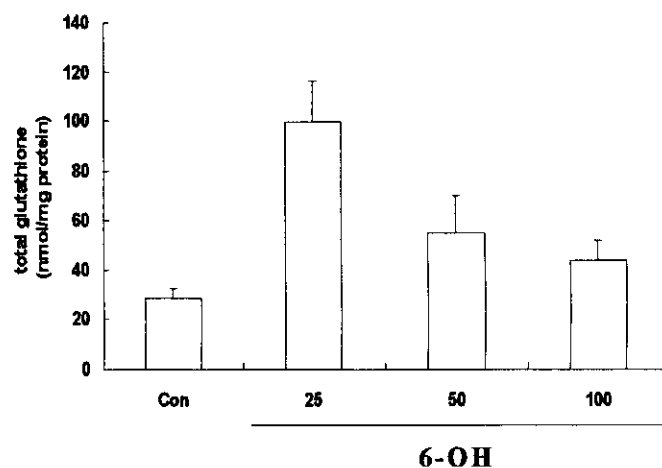


Fig. 5. Total glutathione concentrations at 24 hours after adding 25 , 50, and 100 μM of 6-OH DA. Data are shown as the mean \pm SD of six experiments. Differences in glutathione concentrations were statistically significant at 25 μM (** $p < 0.001$) and 50 μM (* $p = 0.0091$) of 6-OHDA, compared with control.

厚生科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：覚醒剤精神病におけるヒスタミン神経の役割：画像医学的研究と小動物モデルの薬理学的研究

分担研究者 谷内一彦¹⁾

共同研究者 遠藤雅俊¹⁾、田代学¹⁾、加藤元久¹⁾、岩淵健太郎^{1) 2)}、櫻井映子³⁾、鹿野理子^{1) 4)}、本郷道夫⁴⁾、岩田錬⁵⁾、井戸達雄⁵⁾、伊藤正敏⁵⁾、渡邊建彦³⁾

東北大学大学院医学系研究科病態薬理学分野¹⁾、東北大学医学部精神神経学分野²⁾、東北大学医学部細胞薬理学分野³⁾、東北大学医学部心療内科学分野⁴⁾、東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター⁵⁾

研究要旨

1. 覚醒剤精神病の発症にはストレスが関係している。慢性ストレスにおけるヒスタミン神経系の役割を明かにするために activity stress モデルを用いて研究した。食餌制限下にラットに回転ケージ内に拘束すると、拘束後 1 週間あたりから次第に回転運動が亢進し体重が減少した。いわゆるストレス・ハイ（ダイエット・ハイ）と呼ばれる状況に近いモデルを作成することができる。この時、脳内ヒスタミン含量は増加し、H₁、H₃ 受容体量は低下した。ストレス・ハイの時にヒスタミン神経系の機能低下がおきていることが示唆された。低下したヒスタミン神経系の機能を増大させるために、ヒスチジンやカルノシン（ヒスチジン含有ジペプチド）を投与すると回転運動の増加を有意に抑制することができた。また逆に FMH により脳内ヒスタミンを減少させるとストレスによる異常興奮は増悪して死亡率が亢進した。ヒスタミン神経系を介してストレスによる異常興奮の治療が可能であることが示唆された。

2. ラット慢性ストレスモデルにおいてヒスタミン H₁ 受容体の減少が認められたことから、軽症うつ病患者と健常人におけるヒスタミン神経系の動態の相違を明らかにすることを試みた。H₁ 受容体の放射性リガンドである [¹¹C]ドキセピンを用いて PET による脳内 H₁ 受容体の測定を行った。SSRI 単剤内服うつ病患者群と健常者群との比較において、うつ病患者の前頭葉皮質、前帯状回、前頭前野などにおいて H₁ 受容体結合能の低下を認め、うつ病の病態にヒスタミン神経系の機能低下が関与することが PET によっても示唆された。

A. 研究目的

ストレスは深く精神疾患の発症に関係する。ストレスにより様々な神経伝達に変化することが知られているが、十分にストレスによる異常を防止する方法が開発されてきたとはいえない。我々は以前より、ストレスによる過興奮をヒスタミン神経系賦活により防止できることを提唱している。多くの治療薬が開発されてきているセロトニン神経系やノルアドレナリン神経系と比較してヒスタミン神経系に作用する薬はほとんどないのが現状である。ヒスタミン神経系は

後部視床下部にその細胞体を持ち、上位・下位方向にその線維を投射している。最近、ヒスタミン受容体として、H₁、H₂、H₃、H₄ 受容体が同定された。ヒスタミン受容体の性質として intrinsic activity が存在し、そのアンタゴニストには neutral antagonists と inverse agonists があることが最近わかってきた。様々なヒスタミン・システムのノックアウトマウスが開発され小動物における病態生理研究の新たな進展が生じた。ヒスタミン H₁ 受容体ノックアウトマウス研究から、H₁ 受容体は、覚醒・日内リズム、情動、

攻撃性、痛みの受容、けいれんなどに関与していることがわかってきた。このような観点からヒスタミン神経系は薬物依存、うつ病、神経症、心身症、精神分裂病に関係し、その作用薬は臨床的有用であることが期待される。本研究の目的はノックアウトマウスを含む小動物モデルにおいて、慢性ストレスによるうつ病や覚醒剤精神病におけるヒスタミン神経系の役割を明らかにすることである。さらに、その成果をヒトに外挿するためにPET（ポジトン・エミッション・トモグラフィ）を用いたヒト被験者研究の方法論的開発と応用を行った。 ^{11}C -ドキセピン（強力な H_1 アンタゴニスト）を合成し慢性ストレス病態であるうつ病において H_1 受容体量がどう変化しているか明らかにすることを試みた。

B. 方法

1-1. 動物

ラットを回転ケージに拘束してその運動量を計測した。ラットの食餌飲水時間は1日2時間のみでそれ以外は回転ケージに拘束した。連続的に30分ごとに回転運動量を計測し、10-14日後に脳と血液を取りだして、ヒスタミン含量を測定した。ヒスチジン、ヒスタミン合成酵素阻害剤である α -fluoromethylhistidine (FMH)、イミプラミン、メタアンフェタミン、カルノシンの自発運動量に対する効果を調べた。温度と湿度はそれぞれ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ および $65\% \pm 5\%$ に保った室内で、12時間の明暗周期下で飼育した。

1-2. 薬物および測定

ラットの腹腔内に、MAP(ヒロボン、大日本製薬) 3 mg/kg を1日1回7日間連続投与し、30分毎に回転運動量を運動量測定装置(SUPER-MEX、室町機械)と運動量解析システム(CompAct AMS、室町機械)を用いて自発運動量を測定した。同様にイミプラミン(10 mg/kg)、ヒスチジン(500 mg/kg、ヒスタミン前駆体)、FMH(100 mg/kg、ヒスタミン前合成酵素阻害薬)を腹腔内に投与した。カルノシン(β -アラニルヒスチジン)は食餌中に0.01%含有させるように特殊な餌を用意して実験開始1週間前から摂取させ、実験を開始した。

2-1. PET 検査対象

患者群は、DSM-IV の診断基準に基づき、うつ病と診断された男性10名(平均39.9歳)と、

健常ボランティア男性10名(平均41.5歳)であり、全員に前もって十分に説明し、書面での同意を得た。患者群は全員が抗うつ薬であるSSRI(フルボキサミン)のみを継続的に内服していた。それ以外の内服薬は服用していなかった。研究プロトコールについては東北大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

2-2. PET 測定および解析

H_1 受容体の放射性リガンドである ^{11}C ドキセピンを用いて、PETによる脳内 H_1 受容体の測定を行った。 ^{11}C ドキセピンを静脈内投与した後、SET2400W(島津製作所)PET装置を用いて、3D-modeで90分間のダイナミックスキャンを行った。ドキセピンの H_1 受容体結合能($\text{BP}=\text{Bmax}/\text{Kd}$)は、Loganらによるgraphical analysis法により、 H_1 受容体の少ない小脳を参照部位として各ボクセル毎に算出した。統計解析ソフトのSPM(statistical parametric mapping) 99を用いて、TalairachとTournouxの脳アトラスに基づいた空間的な脳画像の標準化を行った後、 H_1 受容体結合能の画像的な比較を行った。SPM99における空間的標準化のための血流テンプレートとしては、ダイナミックスキャンの早期加算画像を用いた。

C. 結果

1. 慢性ストレスによる過運動とヒスタミン神経系(図1)。

食餌制限下にラットに回転ケージ内に拘束すると、拘束後1週間あたりから次第に回転運動が亢進し体重が減少した。慢性ストレスによる過興奮のモデルを作成することができた。このモデルは覚醒剤のメタアンフェタミンによる逆耐性モデルにたいへん近似している。この時、脳内ヒスタミン含量は増加し、 H_1 、 H_3 受容体量は低下した。慢性ストレスに過興奮時にヒスタミン神経系の機能低下がおきていることが示唆された。

低下したヒスタミン神経系の機能を増大させるために、ヒスチジンを投与すると回転運動の増加を有意に抑制することができた。逆にFMHによりヒスタミン含量を減少させると過運動はさらに亢進して死亡率が増加した。イミプラミンやMAPは影響を与えなかった。ヒスチジンを含有するジペプチドであるカルノシンを

食餌中に入れるとヒスチジン同様に慢性ストレスによる過回転運動を抑制した。ヒスタミン神経系の賦活を介してストレスに過興奮の治療が可能であることが示唆された。

2. PETによるうつ病患者の脳内 H₁ 受容体の測定 (図2)。

健常者群との比較において、うつ病患者の前頭葉皮質、前帯状回、前頭前野などにおいて H₁ 受容体結合能の低下を認めた。(Fig. 3) 低下が確認された脳部位は、うつ病に関係するといわれている前頭葉を中心に広く観察された。うつ病の症状の SDS スコアと逆相関する部位も主に前頭葉・帯状回を中心に認められた。

D. 考察

ヒスタミンは神経伝達物質や神経修飾因子として、脳内においても多様な生理機能に関連しており、環境からのストレスにも関連して変動することが知られている。ラットを慢性ストレス状態に置くと、ヒスタミンの前駆体であるヒスチジンを好んで摂取することが知られている。

食事制限下に回転ケージに拘束された状態 (food-deprived activity stress) のラットにおいて出現する過活動はうつ病態モデルとして知られて、覚醒剤の MAP と同様に次第に過運動になることが知られている。我々は、ラットにおいて強制水泳によるストレス負荷中に、視床下部からのヒスタミン遊離量が増加することや、ヒスタミンの脳室内投与により、food-deprived activity stress による過活動が有意に抑制されることを示し、ストレスによる過活動に対してヒスタミン神経系が抑制的に作用している可能性を示した。さらに、薬物による、ヒスタミン神経系をはじめとするモノアミン神経系の賦活効果を、同様のモデルを用いて検討した。

ストレスによって誘発される過活動に対して、ヒスチジンが抑制効果を、 α -フルオロメチルヒスチジンが増強効果を示したことから、ヒスタミン神経系が、いわゆるストレス・ハイや不安状態に対して、抑制的に作用している可能性がある。メタンフェタミンやイミプラミンの投与によっては変化がなかったことから、ドパミン神経系やセロトニン神経系はストレス誘発性の過活動には影響を及ぼさないが、慢性のストレスにより、過活動状態から活動低下状態、ひい

ては抑うつ状態に到る過程においては重要な役割を果たしている可能性があり、今後さらに検討が必要と思われる。

MAP はドパミントランスポーターを阻害することにより、シナプス間隙におけるドパミン濃度を上昇させ、過活動や常同運動を引き起こすことが知られているが、中枢におけるヒスタミン含有量を増加させる L-ヒスチジンは、ラットにおける、MAP による常同行動の誘発や逆耐性の形成を減弱させ、また反対に、HDC の阻害薬である α -フルオロメチルヒスチジン (α -FMH) は、それらを増強させることが報告されている。これらの事から、ヒスタミン神経系が、MAP による急性および慢性の効果に対して抑制的に作用することが示唆され、われわれが今回おこなったヒスタミン神経系の慢性ストレスによる過運動の抑制効果もほぼ同じであった。

カルノシンはヒスチジンを含有するジペプチドであり、吸収しやすく経口のヒスタミン神経系賦活薬と考えられている化合物である。生体内にも存在して毒性の面でも問題ない。本研究で preliminary ながらカルノシンの慢性ストレスによる過興奮の抑制効果を証明できたことから、ヒスタミン神経系を介する覚醒剤による逆耐性形成抑制に僅かながら道が開けてきたと考えている。

臨床的には、うつ病の病態に対するヒスタミン神経系の関与を [¹¹C]ドキセピンを用いた PET による脳内 H₁ 受容体の測定を行った結果、うつ病患者群の前頭葉、帯状回、前頭前野などにおいて H₁ 受容体結合能の低下を認めた。フルボキサミンはほとんど抗ヒスタミン作用がなく、[¹¹C]ドキセピンの結合には影響しないと考えられる。Drug-free が望ましいが倫理的な問題もあり今回は SSRI であるフルボキサミンのみ可能とした。ヒスタミン H₁ 受容体は構造的に intrinsic activity を持ち、発現量が H₁ 受容体を介する情報伝達量を意味していると考えられている。よってうつ病において H₁ 受容体結合が低下していたことから、うつ病における症状、たとえば認知機能低下や日内リズムの低下に、ヒスタミン神経系の減弱が関係している可能性を指摘したい。

文献

1. J. I. Mobarakeh, S. Sakurada, T. Hayashi, T. Orito, K. Okuyama, T. Sakurada, A. Kuramasu, T. Watanabe, T. Watanabe and K. Yanai. Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1 receptor gene knockout mice. *Neuropharmacology* in press
2. R. Iwata, C. Pascali, A. Bogni, K. Yanai, M. Kato, T. Ido and K. Ishiwata. A combined loop-SPE method for the automated preparation of [¹¹C]doxepin. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 45: 271-280 (2002)
3. T. Watanabe and K. Yanai. Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku. J. Exp. Med.* 195: 197-217 (2001)
4. S. Nishino, N. Fujiki, B. Ripley, E. Sakurai, M. Kato, T. Watanabe, E. Mignot and K. Yanai. Decreased brain histamine contents in hypocretin/orexin receptor 2-mutated narcoleptic dogs. *Neurosci. Lett.* 313: 125-128 (2001)
5. M. Tagawa, M. Kano, N. Okamura, M. Higuchi, M. Matsuda, Y. Mizuki, H. Arai, R. Iwata, T. Fujii, S. Komemushi, T. Ido, M. Itoh, H. Sasaki, T. Watanabe, and K. Yanai. Neuroimaging of histamine H1-receptor occupancy in human brain by positron emission tomography (PET): A comparative study of ebastine, a second-generation antihistamine, and d-chlorpheniramine, a classical antihistamine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52(5): 501-509 (2001)
6. M. Endou, K. Yanai, E. Sakurai, S. Fukudo, M. Hongo and T. Watanabe. Food-deprived activity stress decreased the activity of the histaminergic neuron system in rats. *Brain Res.* 891: 32-41 (2001)
7. M. Higuchi, K. Yanai, N. Okamura, K. Meguro, H. Arai, M. Itoh, R. Iwata, T. Ido, T. Watanabe, and H. Sasaki. Histamine H1 receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography (PET). *Neuroscience* 99: 721-729 (2000)
8. L. Z. Son, K. Yanai, J. I. Mobarakeh, A. Kuramasu, Z. Y. Li, E. Sakurai, Y. Hashimoto, T. Watanabe and T. Watanabe. Histamine H1 receptor-mediated inhibition of potassium-evoked release of 5-hydroxytryptamine from mice forebrains. *Behav. Brain Res.* 124: 113-120 (2001)
9. Cho, A.K., Segal, D.S.: *Amphetamine and its analogs.* Academic Press, California, 1994.
10. Kalivas, P.W., Stewart, J.: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.*, 16:223-244, 1991.
11. Robinson TE; Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.*, 396: 157-98, 1986.
12. Seiden LS; Sabol KE; Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 33: 639-77, 1993.
13. Watanabe T, Wada H: *Histaminergic Neurons: Morphology and Function.* Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991.
14. Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H: Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol*; 42(6): 685-702, 1994.
15. Inoue I, Yanai K, Kitamura D, Taniguchi I, Kobayashi I, Watanabe T and Watanabe T: Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13316-13320, 1996.
16. Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, et al. Histamine H1 receptors in human brain visualized in vivo by [¹¹C]doxepin and positron emission tomography. *Neurosci Lett*; 137: 145-148, 1992.
17. Talairach J, Tournoux P. *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain.* New York: Theime. Medical Publishers, Inc., 1988.
18. Ito C, Onodera K, Watanabe T and Sato M: Effects of histaminergic agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 130, 362-367, 1997.
19. Ito C, Sato M, Onodera K and Watanabe T: The role of brain histaminergic neuron system in methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *Ann N Y Acad Sci* 801, 353-360, 1996.