

- channels in dependence on ethanol and sedatives/hypnotics. *Pharmac. the.* 50: 347-365, 1991.
- 7) Corcoran E.E. and Means A.R.: Defining Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 2975-2978, 2001.
 - 8) Ohkuma S., Katsura M., Higo A., et al.: Peroxynitrite affects Ca^{2+} influx through voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.* 76: 341-350, 2001.
 - 9) Katsura M., Higo A., Tarumi C., et al.: Mechanism for increase in expression of cerebral diazepam binding inhibitor mRNA by nicotine: involvement of L-type voltage-dependent calcium channels. *Mol. Brain Res.* 80: 132-141, 2000.
 - 10) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., et al.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 293: 265-275, 1951.
 - 11) Rowell P.P. and Li M.: Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotine receptors. *J. Neurochem.* 68: 1982-1989, 1987.
 - 12) Miao B.M., Liu C., Bishop K., et al.: Nicotine exposure during a critical period of development leads persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *J. Neurochem.* 70: 752-762, 1998.
 - 13) Bencherif M., Fowler K., Lukas R.J., et al.: Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 987-994, 1995.
 - 14) Warpman U., Friberg L., Gillespie A., et al.: Regulation of nicotinic receptor subtypes following chronic nicotinic agonist exposure in M10 and SH-SY5Y neuroblastoma cells, *J. Neurochem.* 70: 2028-2037. 1998.
 - 15) Peng X., Anand R., Whiting P., et al.: Nicotine-induced upregulation of neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of turnover, *Mol. Pharmacol.* 46: 523-530, 1994.
 - 16) Gopalakrishnan M., Molinara E.J., Sullivan J.P.: Regulation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathway. *Mol. Pharmacol.* 52: 524-534. 1997.
 - 17) Fenster C.P., Whitworth T.L., Sheffield E.B., et al.: Upregulation of surface $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J. Neurosci.* 19: 4804-4814, 1999.

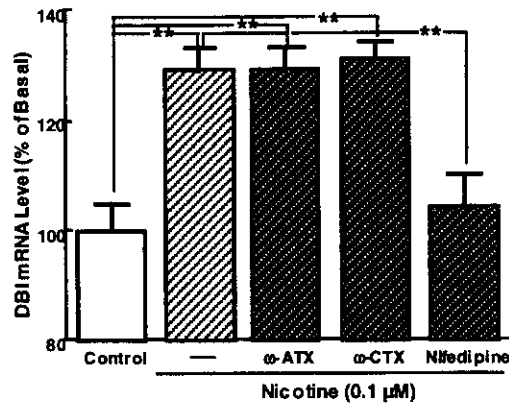


Fig.1 Effects of various inhibitors for HVCCs on DBI mRNA expression induced by long term (72 hr) exposure to nicotine (0.1 μM).

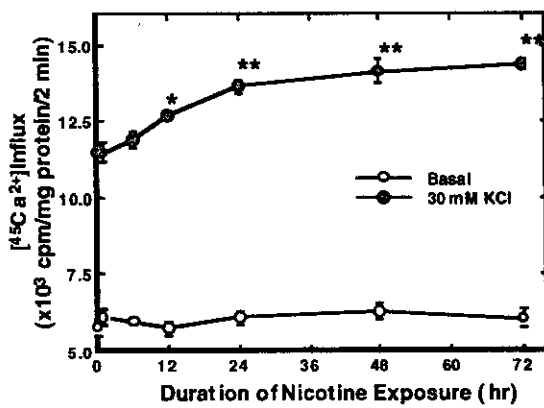


Fig.2 Time course of changes in 30 mM KCl-stimulated [45Ca²⁺]influx. *p<0.05 and **p<0.01, compared with the control value (without treatment of nicotine, Dunnett's test).

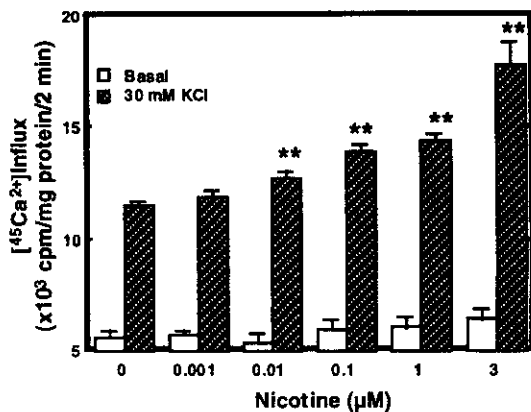


Fig.3 Changes in 30 mM KCl-stimulated [45Ca²⁺]influx following exposure to various concentrations of nicotine. **p<0.01, compared with the control value (without treatment of nicotine, Dunnett's test).

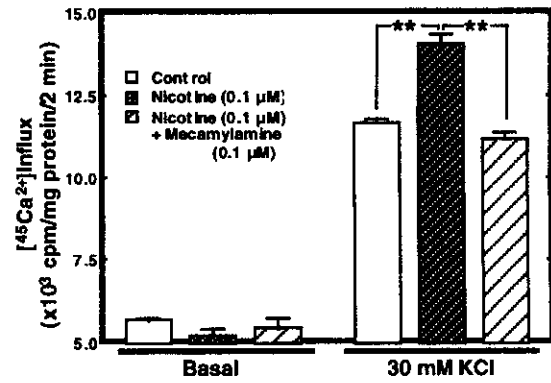


Fig.4 Effect of mecamylamine on 30 mM KCl-stimulated [45Ca²⁺]influx. **p<0.01, Bonferroni's test.

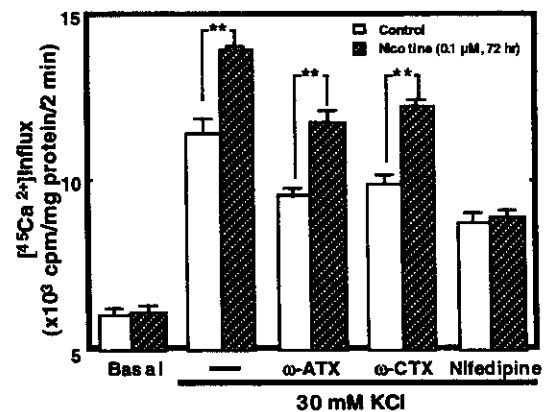


Fig. 5 Effects of HVCC inhibitors on 30 mM KCl-stimulated [45Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. **p<0.01, Bonferroni's test. Drug concentrations: ω-agatoxin VIA (ω-ATX), 1 μM; ω-conotoxin GIVA (ω-CTX), 1 μM; nifedipine, 1 μM.

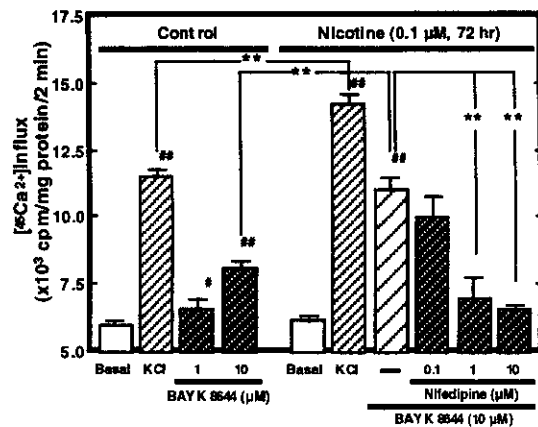


Fig. 6 Effect of nifedipine on Bay k 8644-stimulated [45Ca²⁺]influx into cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. #p<0.05 and ##p<0.01, compared with each control value (Bonferroni's test, n=4). **p<0.01, Bonferroni's test.

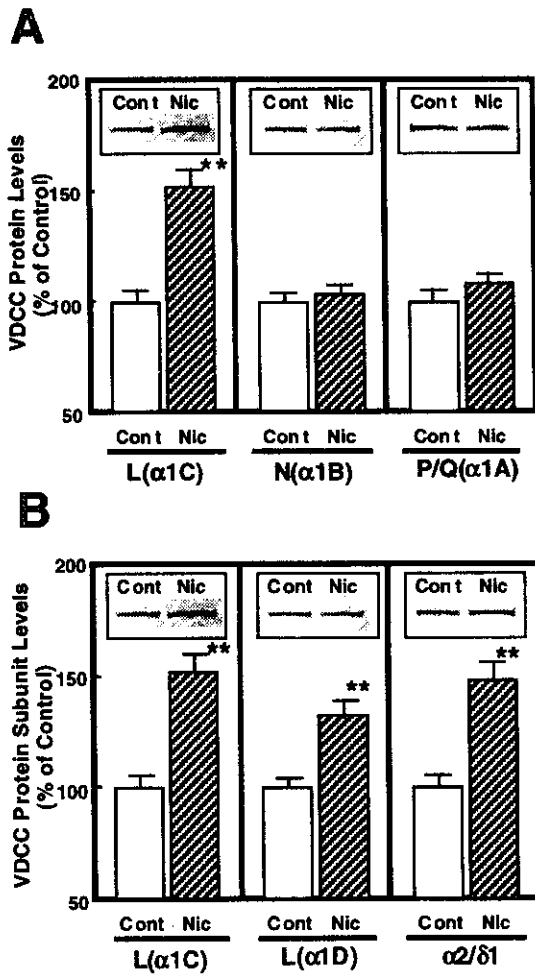


Fig. 7 Effect of nicotine exposure on expression of VDC subunits in cerebral cortical neurons. (A) and (B) Expression of proteins of VDC subunits after nicotine exposure for 3 days. ****p**<0.01, compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Cont, control (non-treated neurons); Nic, nicotine-treated neurons. L, N, and P/Q represent L-, N-, and P/Q-type VDCs, respectively.

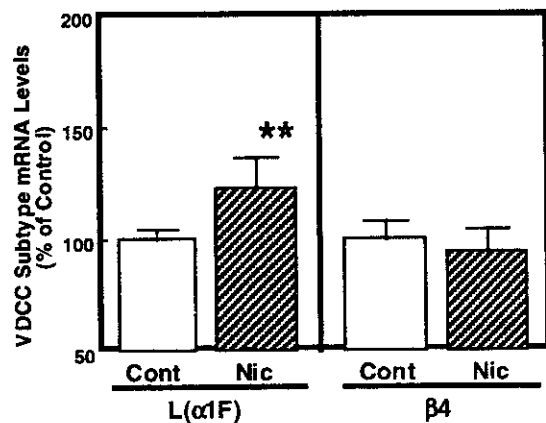


Fig. 8 Expression of mRNA for subunits (α1F and β4 of L-type VDCs) after nicotine exposure for 3 days. ****p**<0.01, compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Cont, control (non-treated

neurons); Nic, nicotine-treated neurons. L represents L-type VDCs.

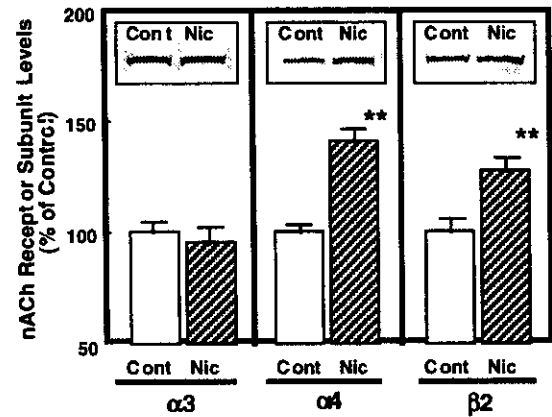


Fig. 9 Effect of nicotine exposure on expression of nAChR subunits in cerebral cortical neurons. ****p**<0.01, compared with each control value (without treatment of nicotine, Bonferroni's test). Cont, control (non-treated neurons); Nic, nicotine-treated neurons.

	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (nM)
[³H]nicotine binding		
control	9.3 ± 0.3	6.2 ± 0.6
nicotine (72 hours)	13.7 ± 0.7 **	6.3 ± 0.5
[³H]verapamil binding		
control	96.0 ± 6.1	22.0 ± 1.1
nicotine (72 hours)	132.1 ± 1.1 **	21.3 ± 1.7
nicotine (72 hours) + mecamylamine	98.2 ± 4.2	23.1 ± 1.3

Table 1 Changes in Bmax and Kd values of [³H]nicotine and [³H]verapamil bindings to particulate fractions from cerebral cortical neurons in primary culture following exposure to nicotine. ****p**<0.01, compared with the control value (without nicotine treatment, Bonferroni's test).

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

メタンフェタミン神経毒性における核内 p53 関連分子
の関与と細胞内小器官での標的分子の検索

分担研究者 浅沼 幹人

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教授

研究要旨

メタンフェタミン(METH)投与によるドパミン神経終末の障害がアポトーシス関連蛋白 p53 ノックアウトマウスにおいて軽減されることから、METH による神経障害過程に p53 が強く関与していると考えられている。p53 により誘導されアポトーシスを惹起する遺伝子であり神経系に高発現している p53-activated gene 608 (PAG608)に着目し、PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株ならびに PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入ドパミン系神経細胞株を用いて、METH による神経毒性発現における PAG608 の関与について検討した。対照細胞において METH 添加により惹起される細胞死が、PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株ではほぼ完全に抑制されていた。また、METH 添加により惹起されるアポトーシス様の形態変化が、PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入により抑制できた。以上のことから、METH により P53 ならびに PAG608 が活性化されることで、下流のアポトーシス関連因子が活性化され神経細胞死が惹起される可能性を明らかにできた。また、METH を添加された培養神経細胞を用いた cDNA array でのプロファイリングにより、METH で発現が誘導あるいは抑制される細胞内小器官（小胞体-ゴルジ体輸送系，ユビキチン-プロテアソーム系およびシナプス小胞系）での標的候補分子を検索できた。

A. 研究目的

覚醒剤メタンフェタミン(METH)は有機溶剤とならんで本邦で最も乱用されている薬剤である。特に近年若年層まで乱用が拡大しており、第三次覚醒剤乱用期といわれ社会的に問題となっている。METH の乱用はドパミン神経終末の変性をもたらすとともに遅発性の神経障害を惹起するが、その神経毒性のメカニズムは十分に解明されていない。METH のドパミン神経細胞の障害機構について、フリーラジカルや二次情報伝達系を介する障害機構の他に、アポトーシスの関与する神経細胞障害機構の存在も注目されている。METH 投

与によるドパミン神経終末の障害がアポトーシス関連蛋白 p53 ノックアウトマウスにおいて軽減されることから(1)、METH による神経障害過程に p53 が強く関与していると考えられている。また、われわれはフリーラジカルや二次情報伝達系を介さない METH のドパミン神経細胞の障害機構として、METH 自体が細胞質のみならず核内にも侵入し、核内転写因子の DNA 結合を直接修飾していることを報告した(2)。さらに METH が核内において p53 の転写因子活性を高めていることを報告した。

p53-activated gene 608 (PAG608)は p53

により誘導されアポトーシスを惹起する遺伝子であり(3,4), 神経系に高発現していること, 脳虚血において脳内でその発現が誘導されることが報告されているが(5-7), その神経細胞死に関する役割については未だ明らかでない。そこで本年度は, この p53 関連分子である PAG608 に着目し, PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株(PC12/PAG608AS)ならびに PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入ドパミン系神経細胞株 B65 を用いて, METH による神経毒性発現における PAG608 の関与について検討した。

また, METH 自体は細胞質のみならず核内にも移行・集積し, p53, AP-1 等の核内転写因子の DNA 結合を直接修飾するが, 核周囲(perinuclear)の細胞内小器官にも集積が認められた(2)。このことは METH が核周囲の細胞内小器官に局在する分子に作用あるいは結合している可能性を示している。そこで, METH により発現が誘導あるいは抑制される細胞内小器官の標的候補分子を検索するために, METH を添加された培養神経細胞 B65 を用いた cDNA array でのプロファイリングを行った。

B. 研究方法

1. PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株での METH による神経毒性

Sprague Dawley 系雄性ラット脳から total RNA を抽出し, PAG608 cDNA に特異的な primer set による reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)を行い, PAG608 cDNA を得て, pcDNA3.1 (+) vector に逆向きに挿入し, PAG608 アンチセンス cDNA 発現 vector を作製した。10 μ g PAG608 アンチセンス cDNA 発現 vector ならびに非挿入 vector をリン酸カルシウム法により PC12 細胞株に導入し, 細胞を継代し, 400 μ g/ml geneticin を含む培養液でのスクリーニングを行い, geneticin 耐性の PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株

(PC12/PAG608AS)ならびに対照細胞株(PC12/control)を得た。PC12/PAG608AS における PAG608 蛋白の発現抑制は抗 PAG608 抗体を用いた Western blot analysis により確認した。

PC12/PAG608AS ならびに PC12/control を, 96 穴プレートに播き(2×10^4 cells/well)24 時間培養した後, METH (250 μ M-5 mM)にさらに 24 時間暴露させ, 細胞生存率を MTT assay の変法である WST-1 assay により測定した。

2. PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入神経細胞株における METH 神経毒性

PAG608 mRNA の翻訳開始点を含む PAG608 センスあるいはアンチセンスオリゴヌクレオチド(17 mer)を合成し, 20 μ M PAG608 センス/アンチセンスオリゴヌクレオチド 10 μ l をリポソーム(Oligofectamine)3 μ l に取り込ませた。この複合体をドパミン系神経細胞株 B65(2.3×10^4 cells/cm²)に添加し, 24 時間培養した後, METH (500 μ M)をさらに 2 時間暴露し, 10 μ g/ml Hoechst33342 による核染色を行い, アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

3. METH 標的候補分子の cDNA array によるプロファイリング

B65細胞(2.4×10^4 cells/cm²)を継代24時間後に, METH (250 μ M)あるいは対照に暴露させ2時間後に total RNA を抽出し, DNase 処理を行った。METH 添加群, 対照群の total RNA (30 μ g)から poly A+ RNA を分離し, RT による逆転写を行い 32P で標識した。各群の標識 cDNA プローブをそれぞれラット cDNA array メンブラン (Atlas Rat 1.2 Array, CLONTECH)と常法に従い, 42°C で 24 時間 hybridize させた。メンブランを phosphor screen に露光させ, 得られたオートラジオグラムのシグナル強度を解析用ソフトウェアにより計測し, house keeping genes の発現量による補正を行い, シグナル強度の METH 添

加群/対照群比を算出した。METH 添加群/対照群比が 1.5 以上, 0.66 以下の cDNA をそれぞれ METH により発現が誘導されたもの、抑制されたものとして、カテゴリー別に分類しプロファイリングを行った。

C. 研究結果

1. PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株での METH による神経毒性

対照 PC12 細胞(PC12/control), PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株(PC12/PAG608AS)の total cell lysate を用いて, 抗 PAG608 抗体による Western blot analysis を行い, PC12/PAG608AS において PAG608 の発現が抑制されていることを確認した。METH (1-5 mM)添加 24 時間後の対照 PC12 細胞の細胞生存率は有意に減少するのに対し, PC12/PAG608AS では METH によ

る細胞生存率の減少がほぼ完全に抑制されていた (図 1)。

2. PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入神経細胞株における METH 神経毒性

PAG608 センスオリゴヌクレオチドを導入(lipofection)した対照のドパミン系神経細胞 B65 では, METH (500 μ M)添加により 2 時間後より著明な神経細胞死が認められた。また, Hoechst33342 による核染色では核クロマチンの凝縮, 核の分葉化・断片化, 細胞質の濃縮といったアポトーシス様の形態変化がみられた (図 2)。これに対して, PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しておいた B65 細胞では, METH (500 μ M)添加による神経細胞死が抑制されており, METH 添加によるアポトーシス様の形態変化も抑制されていた (図 2)。

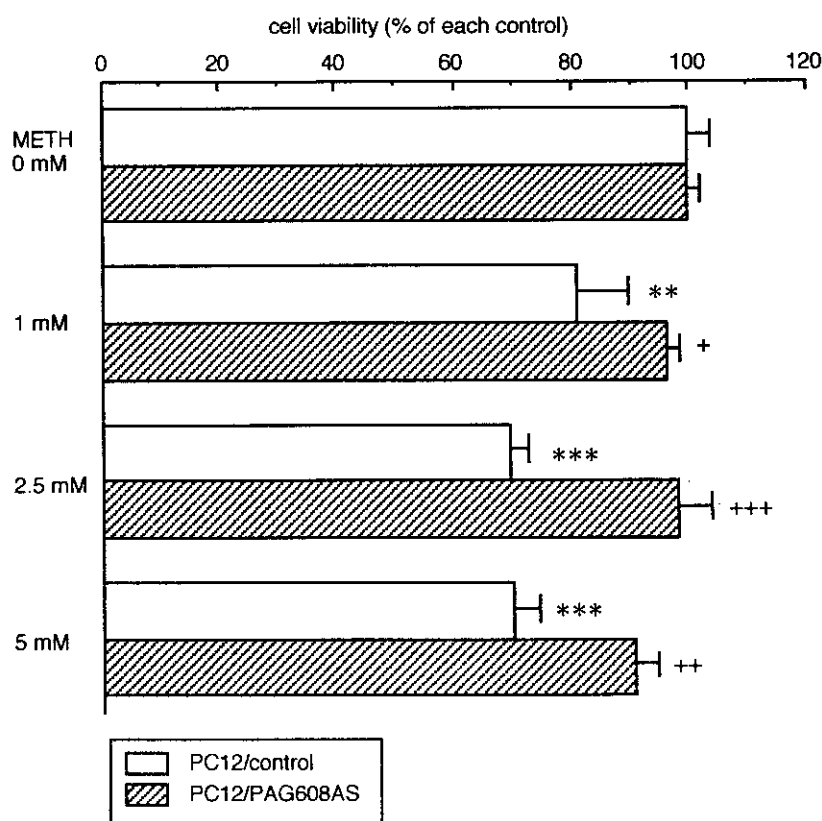


図 1 PAG608アンチセンスcDNA高発現細胞株(PC12/PAG608AS)ならびに対照細胞株(PC12/control)におけるMETH添加24時間後の細胞生存率。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with each non-treated cells.

+ $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ compared with dose-matched PC12/control cells.

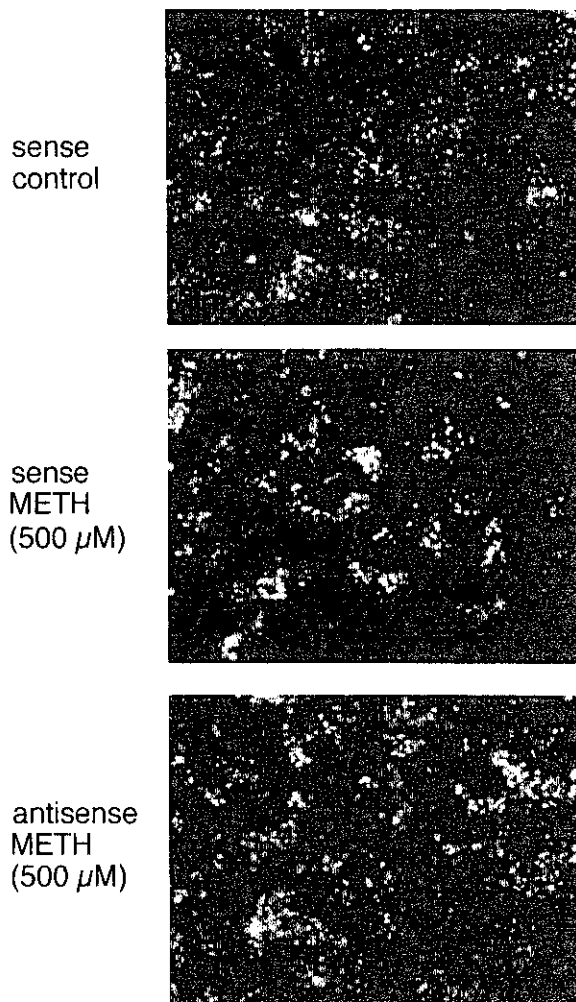


図2 PAG608センス/アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したドパミン神経細胞株B65におけるMETH(500 μ M)添加2時間後の細胞核の形態学的変化(Hoechst33342による核染色)。

3. METH 標的候補分子の cDNA array によるプロファイリング

METH (250 μ M)あるいは対照を2時間暴露させた B65細胞を用いて cDNA array での解析を行い、METH 添加により発現が誘導された cDNA、抑制された cDNA を検索し、カテゴリー別に分類しプロファイリングを行った(表1)。cDNA array メンブランには1176の cDNA がプロットされているが、そのうち METH 添加により発現が増減する cDNA は103あり、誘導されるものあるいは抑制されるものは、それぞれ56、47個あった。カテゴリー別では、特に蛋白などの細胞内小器官での「小胞輸送・蛋白代謝」に関するもの、「細胞内情報伝達系」に関するものが多く

METH により増減していた。

D. 考察

PAG608はp53により誘導され末梢のリンパ系細胞においてアポトーシスを惹起することが報告されているが(3,4)、中枢神経系においては脳虚血により脳内特に海馬においてその発現が誘導されることが報告されているのみで(5-7)、p53の関与するアポトーシスカスケードにおいてどのような役割を果たしているのか、また脳虚血以外の神経障害過程にどのように関与しているのか不明であった。今回、METHによる神経細胞のアポトーシス発現過程におけるPAG608の関与について明らかにするために、PAG608 アンチセンス cDNA の神経細胞への遺伝子導入を行い、PAG608 発現抑制の METH 神経毒性への影響について検討した。その結果、対照 PC12 細胞において METH (1-5 mM) 添加により惹起される24時間後の細胞死が、PAG608の発現が抑制された PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株ではほぼ完全に抑制されていた。また、B65細胞において METH (500 μ M) 添加により惹起されるアポトーシス様の形態変化ならびに細胞死が、あらかじめ PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入しPAG608の発現を抑制しておくことで阻止された。また、われわれはドパミン神経毒6-hydroxydopamineにより惹起されるアポトーシス様の神経細胞死も同様にPAG608の発現を抑制しておくことで阻止されることを見いだしている。以上のことから、METH 神経障害において、p53のみならずPAG608がそのアポトーシス発現過程に関与することを明らかにできた。METHによりP53ならびにPAG608が活性化されることで、下流のアポトーシス関連因子が活性化され神経細胞死が惹起される可能性が示唆された。また、われわれはPAG608-GFPの細胞内分布の検討から、PAG608蛋白が仁に限局することも見いだしている。今後、PAG608のア

表1 METH添加により発現が誘導あるいは抑制されたcDNA

Category	Up-regulated	Down-regulated	Changed
Cell surface antigens	0	1	1
Transcription factors & DNA-binding proteins	2	0	2
Cell cycle regulators	5	3	8
Immune system proteins	3	1	4
Oncogenes & tumor suppressors	1	3	4
Stress response proteins	3	0	3
Ion channels & transport proteins	3	4	7
Trafficking & protein turnover	9	10	19
Metabolic pathways	11	2	13
Transmitters & Receptors	7	1	8
Growth factors, cytokines	7	4	11
Modulators, effectors & intracellular transducers	5	18	23
Total	56	47	103

METH (250 μ M)あるいは対照を2時間暴露したB65細胞からpoly A RNAを分離し、逆転写を行い標識した。各群の標識cDNAプローブをそれぞれラットcDNA arrayメンブランに、42°Cで24時間hybridizeさせた。得られたオートラジオグラムのシグナル強度を計測し、シグナル強度のMETH添加群/対照群比を算出し、METH添加群/対照群比が1.5以上、0.66以下のcDNAをそれぞれMETHにより発現が誘導、抑制されたものとした。

ポトシス過程での詳細な作用機構の解明と、マウスへのPAG608アンチセンスオリゴヌクレオチド投与のMETH神経障害に対する保護効果についての検討を行う予定である。

一方、われわれはMETH自体が細胞質のみならず核内にも移行・集積し、核内の転写因子(AP-1, CREB, p53)のDNA結合を直接修飾することを発見し報告したが(2)、この際の共焦点レーザー顕微鏡によるMETHの細胞下局在の検討により、核周囲(perinuclear)の細胞内小器官にもMETHが集積することが判明した。このことから、われわれはMETHが核周囲の細胞内小器官に局在する分子に作用あるいは結合している可能性を想定した。そこで、細胞内小器官におけるMETHの標的候補分子を検索するために、METHを添加された培養神経細胞B65を用いてcDNA array assayを行い、METHにより発現が誘導あるいは抑制されるcDNAのプロファイリングを行った。その結果、特に蛋白などの細胞内小器官での「小胞輸送・蛋白代謝」、「細胞内情報伝達系」に関するcDNA群がMETH添加により数多く増減することが明らかになった。とりわけ、細胞内小器官(小胞体-ゴルジ

体輸送系、ユビキチン-プロテアソーム系およびシナプス小胞系)に関係したMETHの標的候補分子をいくつか得ることができた。現在、METHのこれら標的候補分子への作用について、蛋白レベルでの変化をWestern blot analysisや免疫染色などで確認するとともにMETHのこれらの蛋白への作用機構について解析している。

E. 結論

METH神経障害におけるPAG608の関与を明らかにできた。METHによりP53ならびにPAG608が活性化されることで、下流のアポトシス関連因子が活性化され神経細胞死が惹起される可能性が考えられた。また、METHで発現が誘導あるいは抑制される遺伝子・分子のプロファイリングにより、細胞内小器官での標的候補分子を得ることができた。

F. 参考文献

- Hirata, H. and Cadet, J.L., p53-knockout mice are protected against the long-term effects of methamphetamine on dopaminergic

- terminals and cell bodies, J. Neurochem., 69: 780–790, 1997.
- 2) Asanuma, M., Hayashi, T., Ordonez, S.V., Ogawa, N. and Cadet, J.L.: Direct interactions of methamphetamine with the nucleus. Mol. Brain Res., 80: 237–243, 2000.
 - 3) Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A. and Oren, M.: A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. EMBO J., 16: 4384–4392, 1997.
 - 4) Varmeh-Ziaie, S., Okan, I., Wang, Y., Magnusson, K.P., Warthoe, P., Strauss, M., Wiman, K.G.: Wig-1, a new p53-induced gene encoding a zinc finger protein. Oncogene, 15: 2699–2704, 1997.
 - 5) Tomasevic, G., Shamloo, M., Israeli, D. and Wieloch, T.: Activation of p53 and its target genes p21^{WAF1/Cip1} and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. Mol. Brain Res., 70: 304–313, 1999.
 - 6) Gillardon, F., Spranger, M., Tiesler, C. and Hossmann, K.-A.: Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia. Mol. Brain Res., 73: 138–143, 1999.
 - 7) Hermann, D.M., Kuroiwa, T., Hata, R., Gillardon, F., Ito, U. and Mies, G.: Expression of *redox factor-1*, *p53-activated gene 608* and *caspase-3* messenger RNAs following repeated unilateral common carotid artery occlusion in gerbils—relationship to delayed cell injury and secondary failure of energy state. Neuroscience, 102: 779–787, 2001.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - ① Hayashi, T., Hirata, H., Asanuma, M., Ladenheim, B., Tsao, L.I., Cadet, J.L. and Su, T.P.: Delta opioid peptide [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin causes a near complete blockade of the neuronal damage induced by a single high dose of methamphetamine: examining the role of p53. Synapse, 39: 305–312, 2001.
 - ② Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. J. Neurochem., 76: 1895–1904, 2001.
 - ③ Kondo, F., Asanuma, M., Miyazaki, I., Kondo, Y., Tanaka, K., Makino, H. and Ogawa, N.: Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. Neurosci. Res., 39: 339–346, 2001.
 - ④ Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Haque, Md. E., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Molecular mechanism in activation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D2 agonist. Neurochem. Res., 26: 31–36, 2001.
 - ⑤ Aoki Sogawa, C., Asanuma, M., Sogawa, N., Miyazaki, I., Nakanishi, T., Furuta, H. and Ogawa, N.: Localization, regulation, and function of metallothionein-III/ growth inhibitory factor in the brain. Acta Med. Okayama, 55: 1–9, 2001.

- ⑥ 浅沼幹人, 小川紀雄: フリーラジカルと脳障害, *Clinical Neuroscience*, 19: 555-559, 2001.
- ⑦ 小川紀雄, 浅沼幹人: 酸化ストレスと神経細胞死, *Clinical Neuroscience*, 19: 665-667, 2001.
- ⑧ 浅沼幹人, 小川紀雄: 酸化ストレスによる神経障害とその防御, 酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線(吉川敏一編), pp177-181, 医歯薬出版, 東京, 2001.
2. 学会発表
- ① Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Direct redistribution and accumulation of dopaminergic drugs in the nucleus. 9th International Catecholamine Symposium, 2001.
- ② 浅沼幹人, 東洋一郎, 宮崎育子, 田中健一, 小川紀雄: ニューロメラニン合成酵素チロシナーゼとドパミン神経障害の相互連関に関する検討-II, 第42回日本神経学会総会, 2001.
- ③ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東洋一郎, 小川紀雄: Metallothionein-I, II ノックアウトマウスにおける 6-hydroxydopamine によるドパミン神経毒性の増悪. 第28回日本脳科学会, 2001.
- ④ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東洋一郎, 小川紀雄: アストロサイトにおけるドパミンレセプターおよびトランスポーターの発現. 第44回日本神経化学会・第24回日本神経科学合同大会, 2001.
- ⑤ 東洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 小川紀雄: 6-hydroxydopamine 誘導神経細胞死における PAG608 の関与. 第44回日本神経化学会・第24回日本神経科学合同大会, 2001.
- ⑥ 浅沼幹人, 東洋一郎, 宮崎育子, 辻武史, 田中健一, 小川紀雄: メタンフェタミン神経毒性における p53 関連遺伝子の関与. 第31回日本神経精神薬理学会年会, 2001.
- ⑦ Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Expression of tyrosinase, melanin synthetic enzyme, in hemi-parkinsonian model. 31st Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2001.
- ⑧ 東洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 小川紀雄: 6-OHDA 誘導神経細胞死における PAG608 の関与. 第24回日本分子生物学会年会, 2001.

研究協力者

宮崎 育子

(岡山大学大学院医歯学総合研究科
脳神経制御学講座神経情報学)

東 洋一郎

(岡山大学大学院医歯学総合研究科
脳神経制御学講座神経情報学)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：メタンフェタミンの精神毒性に関する神経精神薬理学的研究：
メタンフェタミンの精神神経毒性における TNF- α の役割

分担研究者：鍋島俊隆¹⁾

研究協力者：山田清文¹⁾、中島 晶¹⁾、永井 拓¹⁾、内山武久¹⁾、宮本嘉明¹⁾、
野田幸裕¹⁾、北市清幸²⁾、長谷川高明²⁾、齋藤邦明³⁾

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・病院薬剤¹⁾、名古屋大・医・保健・検査技術科学²⁾、岐阜大・医・臨床検査医学³⁾

研究要旨

TNF- α はマクロファージ等で産生される炎症性サイトカインであるが、近年、中枢神経系においても合成され、脳機能調節に関与していることが明らかになっている。本研究では、メタンフェタミン(MAP)の逆耐性、精神依存および神経毒性における TNF- α の役割を検討した。MAP を急性投与してもラット脳内における TNF- α mRNA は変化しなかった。一方、5 日間の連続投与後には側坐核、線条体、海馬および扁桃体における TNF- α mRNA が著明に増加した。MAP による TNF- α の発現誘導はドパミン (DA) D1 および D2 受容体アンタゴニストにより拮抗された。次に、MAP の精神神経毒性における TNF- α の役割を行動薬理的に検討した。ラットの薬物弁別試験において、TNF- α は MAP の弁別刺激効果を用量依存的に抑制した。マウスでは MAP の運動量増加作用および線条体 DA 作動性神経系に対する神経毒性を抑制した。一方、TNF- α 遺伝子欠損マウスにおいては、MAP の逆耐性、条件付け場所嗜好反応および DA 作動性神経系に対する神経毒性が増強された。最後に、MAP の精神神経毒性に対する TNF- α の抑制作用のメカニズムについて検討した。TNF- α はマウス線条体切片からの DA の基礎遊離量を減少し、脳シナプトゾームへの DA 取込みを促進した。以上の結果より、(1) MAP の連続投与により脳部位特異的に TNF- α が誘導されること、(2) TNF- α は MAP の精神神経毒性に対して抑制的に作用し、(3) その作用の一部には DA 取込みの促進作用が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

メタンフェタミン(MAP)はドパミントランスポーター(DAT)に作用して細胞外ドパミン(DA)を増加する覚醒剤である^{2,4,17)}。ヒトではMAPの乱用により精神的依存が形成され、妄想型精神分裂病に類似した精神病状態が形成される¹⁵⁾。一方、マウスやラットなどの小動物においては、MAPの連続投与によりMAPに対する感受性が長期間にわたり持続的に増加する逆耐性現象が認められる^{5,16)}。さらに、MAPの大量集中投与によりDA作動性神経終末部では非可逆的な神経毒性が惹起される^{14,16)}。

我々は、MAPにより誘発される神経精神毒性のメカニズムを解明するために、ラットへのMAPの連続投与により発現が変化する遺伝子をDNAアレイを用いて検討した。その結果、薬物依存に重要な役割を果たしている側坐核において、MAPの連続投与によりTNF- α の受容体TNFR1の発現が増加することを見出した。

TNF- α はマクロファージなどで産生される炎症性サイトカインの一種であり、中枢神経系に対しては神経毒性と神経保護作用を有し、神経突起の伸展を抑制することが報告されている¹¹⁾。我々は、TNF- α 遺伝子欠損マウス(TNF-KOマウス)では不安様行動が増加し¹⁸⁾、ネズミのレトロウイルスであるLPBM-5の感染に伴う

認知障害(AIDS 痴呆症の動物モデル)の発症が抑制されることを明らかにしている³⁾。これらの結果は、TNF- α が脳機能の調節および神経精神疾患の病態生理に関与している可能性を示唆している^{6,13)}。

本研究では、脳内TNF- α の発現に及ぼすMAPの効果を検討するとともに、MAPに対する依存形成と逆耐性およびMAPの神経毒性におけるTNF- α の役割について神経精神薬理的に検討した。

B. 方法

動物および薬物

実験には7~8週齢のWistar系雄性ラット(日本チャールズリバー)、TNF-KOマウスおよびその野生型マウス(C57BL6マウス、日本チャールズリバー)を使用した。なお、TNF-KOマウスは岐阜大学医学部臨床検査医学の齋藤邦明先生より供与していただいた。実験を開始する前少なくとも1週間、動物は明暗サイクル(明期9時~21時)の室内(室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$)で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。MAPは塩酸メタンフェタミン(ヒロポン、大日本製薬)を使用した。DAD1受容体アンタゴニストSCH-23390およびD2受容体アンタゴニストracloprideはSIGMA社(USA)から購入した。ヒトTNF- α は大日本

製薬より供与していただいた。

なお、本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に準じて行った。

リアルタイム PCR 法による TNF- α mRNA の定量

MAP (1-4 mg/kg) は、1日1回連続5日間ラットに投与した。SCH23390 (0.1 mg/kg) と raclopride (2 mg/kg) は MAP 処置の30分前に毎日投与した。MAP の最終投与から2時間後にラットを屠殺し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷下で前頭皮質 (FC)、側坐核 (NAc)、線条体 (STR)、海馬 (HIP)、中脳腹側被蓋野 (VTA) および扁桃体 (AMY) に分割し、 -80°C で冷凍保存した。脳サンプルから total mRNA を抽出し、Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) を用いて cDNA を合成した。TNF- α mRNA は Realtime-PCR 法 (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Perkin-Elmer, USA) により定量した。なお、使用したプライマーおよびプローブ、PCR の条件および内在性コントロールは以下に示した。

TNF- α primer probe: Pre-Developed TaqMan Assay Reagents Rat TNF alpha (PE Applied Biosystems, USA)

PCR の条件: 95°C , 15 sec (変性); 60°C , 60 sec (アニーリングおよび相補鎖合成)

Control: TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent (PE Applied Biosystems)

MAP 逆耐性と自発運動量の測定

TNF-KO マウスおよびその野生型マウスである C57BL6 マウスを使用した。MAP 1 mg/kg を1日1回連続9日間皮下投与し、投与直後から1時間の自発運動量を運動量解析システム (ニューロサイエンス社) を用いて測定した。さらに、MAP の断薬から7日目に MAP 1mg/kg を再投与し、運動量を測定した。

条件性場所嗜好 (Conditioned Place Preference; CPP) 試験

TNF-KO マウスおよびその野生型を用いた。CPP 試験には 2-compartment box を使用し、すでに報告した方法に準じて試験した⁷⁾。条件付けには MAP 1 mg/kg を用いた。

薬物弁別試験

摂餌制限したラットを fixed ratio 20 (FR-20) 餌強化スケジュールで訓練し、

レバー押しを学習させた。その後、常法に従って⁹⁾、MAP 0.5 mg/kg と saline による弁別訓練を行った。MAP の薬物弁別を獲得した動物を用いて MAP の弁別刺激効果に対する TNF- α の作用を検討した。TNF- α は薬物弁別試験の 1 時間前に腹腔内投与した。

DA 作動性神経系に対する MAP の神経毒性

TNF-KO マウスおよびその野生型マウスを使用した。MAP 4 mg/kg を 2 時間毎に計 4 回皮下投与し、3 日後にマイクロウェーブ照射により動物を殺した。TNF- α (4 μ g/mouse) は、1 回目および 3 回目の MAP 投与の 1 時間前に腹腔内投与した。脳内モノアミンの定量は既報に準じて行った⁸⁾。

線条体切片からの³H]DA 遊離の測定
C57BL6 マウスの線条体切片を作製し、内在性の DA を³H]DA (NEN Life Science Products) で標識した後、Krebs-Ringer 液で灌流した。以前に報告した方法に準じて⁸⁾、基礎³H]DA 遊離および MAP (1 μ M) 誘発性³H]DA 遊離に対する TNF- α (100 ng/ml) の作用を検討した。

線条体シナプトゾームへの³H]DA 取込み

C57BL6 マウスの線条体シナプトゾームを調製し、既報に準じて¹⁴⁾ ³H]DA 取込みを測定した。Ex vivo における TNF- α (4 μ g/mouse, i.p.) および MAP (4 mg/kg, s.c.) の作用を検討する場合には、それぞれ薬物を投与してから 2 時間後および 1 時間後に線条体シナプトゾームを調製し、³H]DA 取込み活性を測定した。

統計処理

実験結果は、平均 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は 1 元配置分散分析の後、Bonferroni's test を用いて行った。2 群間比較の場合には Student's t-test を用いて検定した。

C. 結果

MAP により誘発されるラット脳内 TNF- α mRNA の発現変化

MAP (2 mg/kg) を単回投与しても、ラット脳内の TNF- α mRNA レベルは変化しなかった。しかし、連続投与により NAc, STR, HIP および AMY において TNF- α mRNA 量が有意に増加した (Fig. 1)。MAP の TNF- α mRNA 誘導効果は 2 mg/kg で最も強く、4 mg/kg では誘導効果は認められなかった。また、MAP の連続投与による TNF- α mRNA の増加は、DA D1 受容体アンタゴニストの SCH23390 および D2 受容体アンタゴニストの raclopride により拮抗さ

れた (Fig. 2)。

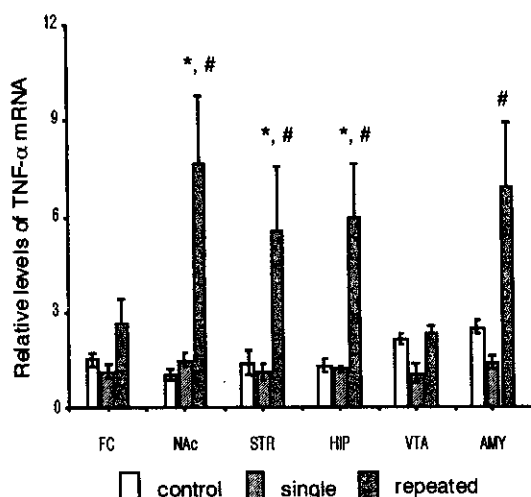


Fig. 1. TNF- α mRNA expression in the brain after single and repeated MAP treatment in rats. Rats were killed 2 hr after single (2 mg/kg, s.c.) or repeated MAP treatment once a day for 5 days. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs single treatment.

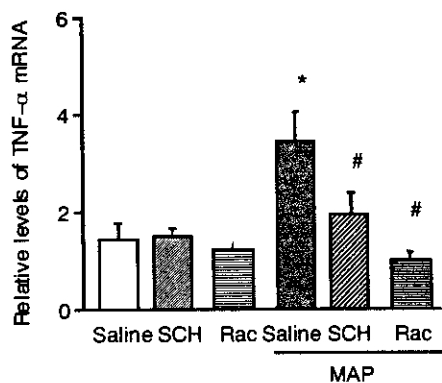


Fig. 2. Effects of dopamine D1 and D2 receptor antagonists on MAP-induced increase in TNF- α mRNA expression in the nucleus accumbens of rats. Dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 (SCH; 0.1 mg/kg) or D2 receptor antagonist raclopride (2 mg/kg) was administered 30 min before MAP (2 mg/kg) treatment every day. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs single treatment.

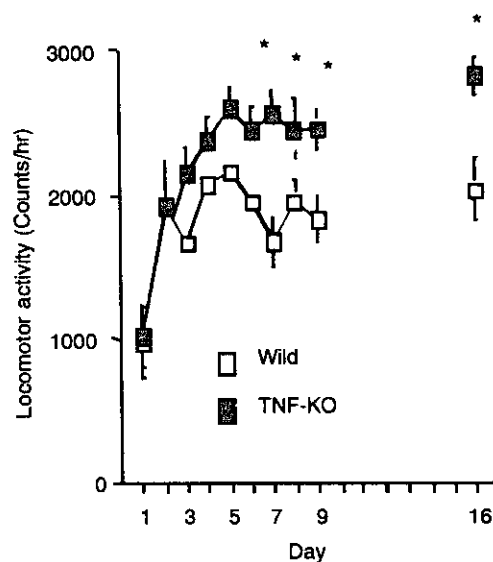


Fig. 3. MAP-induced hyperlocomotion and the sensitization in TNF-KO mice. MAP was administered at a dose of 1 mg/kg. * $P < 0.05$ vs MAP-treated wild-type mice.

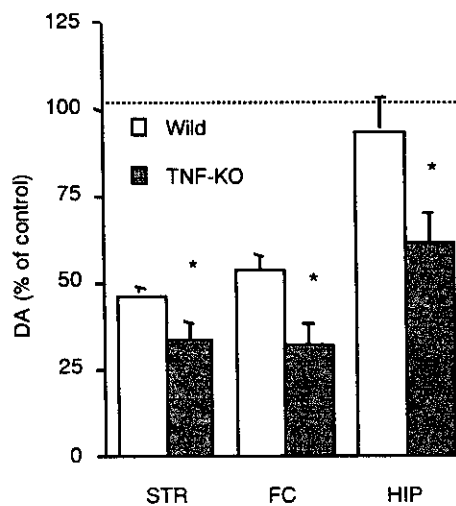


Fig. 4. MAP-induced neurotoxicity in wild and TNF-KO mice. MAP (4 mg/kg) was injected 4 times at 2-hr intervals. The animals were killed 3 days after MAP treatment. STR: striatum, FC: frontal cortex, HIP: hippocampus. * $P < 0.05$ vs wild-type mice.

MAP により誘発される精神神経毒性における TNF- α の役割

MAP により誘発される自発運動増加作用の逆耐性 (Fig. 3)、CPP (data

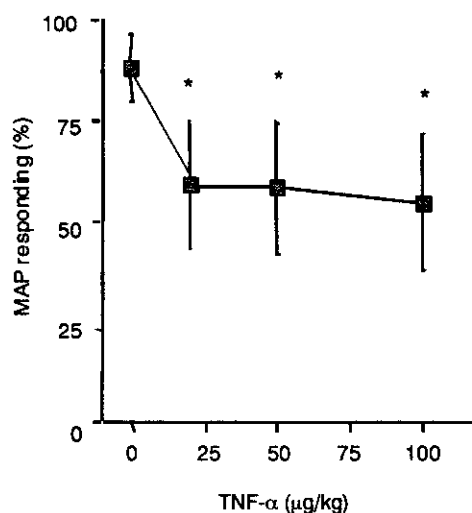


Fig. 5. Effect of TNF- α on discriminative stimulus effects of MAP in rats. TNF- α was injected i.p. 1 hr before treatment with MAP (0.5 mg/kg). *P<0.05 vs control.

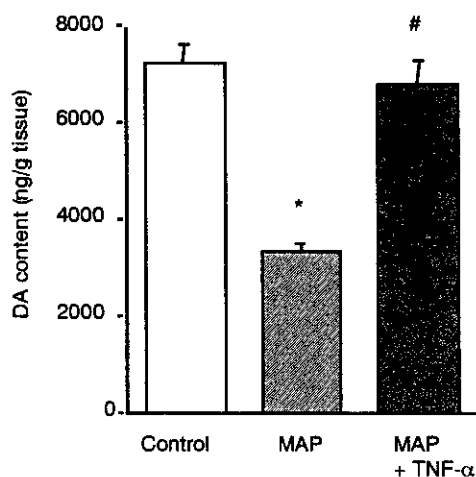


Fig. 6. Effect of TNF- α on MAP-induced neurotoxicity in mice. MAP (4 mg/kg) was injected 4 times at 2-hr intervals. TNF- α (4 μ g/mouse) was administered twice, 1 hr before the 1st and 3rd injections of MAP. The animals were killed 3 days after MAP treatment. *P<0.05 vs control. #P<0.05 vs MAP-treated group.

not shown) および DA 作動性神経系に対する神経毒性 (Fig. 4) は、野生型マウスに比較して TNF- α 遺伝子欠損マウスでは増強していた。一方、ラットにおける MAP の薬物弁別刺激効果 (Fig. 5) とマウスでの DA

作動性神経系に対する神経毒性 (Fig. 6) は、TNF- α の投与により著明に抑制された。

DA 遊離および DA 取込みに対する TNF- α の作用

MAP により誘発される精神神経毒性に対する TNF- α の抑制効果のメカニズムを解明するために、線条体からの DA 遊離と DA 取込みに対する TNF- α の作用について検討した。in vitro において、TNF- α は線条体シナプトゾームへの [3 H]DA 取込みを促進し (Fig. 7)、線条体切片からの [3 H]DA 遊離量を減少した (data not shown)。

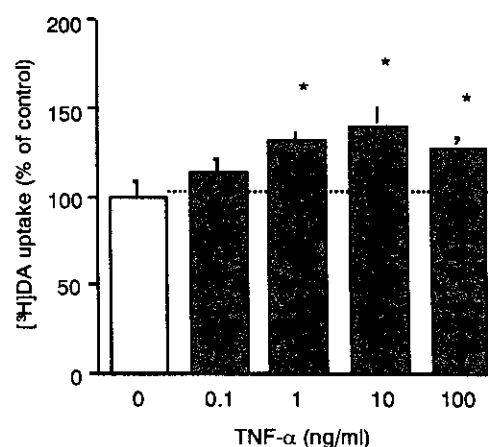


Fig. 7. Effect of TNF- α on DA uptake in vitro. *P<0.05, **P<0.01 vs control

さらに、TNF- α 4 μ g を投与したマウスから調製した線条体シナプトゾームへの [3 H]DA 取込み活性は、saline を処置したコントロールに比較して有意に増加した (data not shown)。

D. 考察

MAP の連続投与により、TNF- α の遺伝子発現が NAc, STR, HIP および AMY など薬物依存と関連が深い脳部位^{1,10)}において顕著に増加した。この反応は DA D1 および D2 受容体アンタゴニストの併用により拮抗されたことから、これら DA 受容体を介した反応であると思われる。

MAP 連続投与後の TNF- α の発現増加の病態生理学的意義を検討するために、MAP の逆耐性、報酬効果および神経毒性が TNF-KO マウスでどのように変化するか検討した。さらに、ラットにおける MAP の弁別刺激効果およびマウスでの DA 神経毒性が TNF- α の処置により変化するかどうかについても検討した。その結果、MAP により誘発されるこれらの精神神経毒性は、TNF-KO マウスでは増強され、野生型動物への TNF- α の処置により減弱した。したがって、MAP の連続投与により誘導される TNF- α は、MAP の精神神経毒性に対して抑制的に作用することが示唆された。

最後に、MAP の精神神経毒性に対する TNF- α の抑制効果のメカニズムについて検討した。MAP は DAT に作用して細胞外 DA を増加し、その急性薬理効果を発揮することが知られている^{2,4,16)}。そこで、DA 遊離および DA 取込みに対する TNF- α の

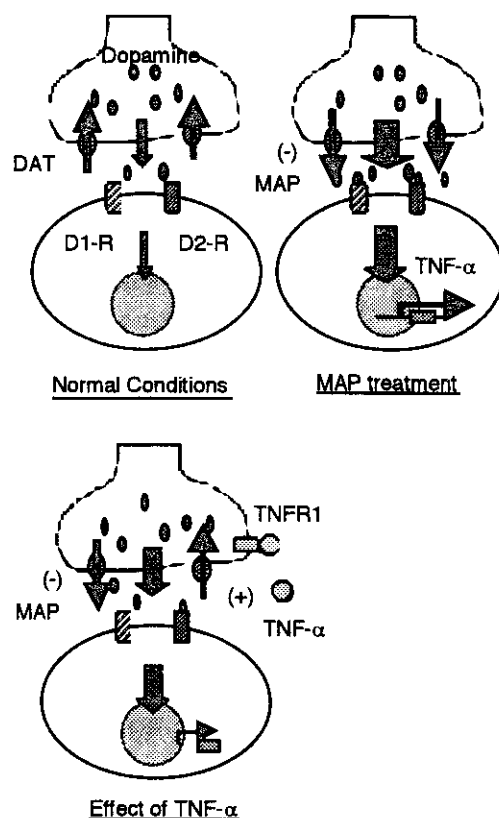


Fig. 8. Hypothetical mechanism of action of TNF- α on MAP-induced activation of dopaminergic neurotransmission. DAT: dopamine transporter, D1-R: dopamine D₁ receptor, D2-R: dopamine D₂ receptor, MAP: methamphetamine, TNFR1: TNF- α receptor 1, (+): activation, (-): inhibition

作用を調べた。その結果、TNF- α は DA 取込みを促進し、細胞外 DA 量を減少することが明らかとなった。

以上の結果より、TNF- α は DA 取込みを促進して細胞外 DA を減少することにより、MAP の弁別刺激効果や DA 神経毒性に対して抑制的に働くことが示唆された (Fig. 8)。一方、MAP の連続投与により誘発される逆耐性は、細胞外 DA 量の変化のみでは説明することが困難であり、中枢神経系のシナプス可塑性が関与していると推定されている^{1,10,12)}。これに関連

して、TNF- α は神経細胞の突起の伸展や分岐形成を抑制することが報告されており¹¹⁾、シナプスの可塑的構造変化に対して抑制的に作用することが考えられる。したがって、TNF-KO マウスで観察された MAP の逆耐性の増強は、シナプス可塑性に対する抑制因子としての作用を有する TNF- α の欠損により、シナプスの再構築が促進された結果であるかも知れない。この点については今後さらに検討する予定であると思われる。

K. 結論

本研究において、(1) MAP の連続投与により DA D1 および D2 受容体を介して脳部位特異的に TNF- α の遺伝子発現が増加すること、(2) TNF- α は MAP の精神神経毒性に対して抑制的に作用し、(3) その作用の一部には DA 取込みの促進作用が関与していることが示唆された。

引用文献

1. Berke J, Hyman SE: Addiction, dopamine, and molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25: 515-532, 2000.
2. Giros B, Jaber M, Jones SR et al: Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606-612, 1996
3. Iida R, Saito K, Yamada K, Basile AS, Sekikawa K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Seishima M and Nabeshima T: Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5 infected mice with a targeted deletion of the TNF α gene. *FASEB J.* 14: 1023-1031, 2000.
4. Jones SR, Gainetdinov RR, Wightman RM et al: Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.* 18: 1979-1986, 1998
5. Kalivas PW: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.* 16: 223-244, 1991
6. Maier SF and Watkins LR: Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol. Rev.* 105: 83-107, 1998
7. Miyamoto Y, Noda Y, Komori Y, Sugihara H, Furukawa H, Nabeshima T: Involvement of nitric oxide in phencyclidine-induced place aversion and preference in mice. *Behav. Brain Res.* 116: 187-196, 2000.
8. Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M and Nabeshima T: Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking NMDA receptor $\epsilon 1$ subunit. *J.*

- Neurosci.* 21: 750-757, 2001.
9. Mori A, Noda Y, Mamiya T, Miyamoto Y, Nakajima A, Furukawa H and Nabeshima T: Phencyclidine-induced discriminative stimulus is mediated via phencyclidine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex, not via sigma₁ receptors. *Behav. Brain Res.* 119: 33-40, 2000.
 10. Nestler EJ: Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Neurosci.* 2: 119-128, 2001.
 11. Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H and Brade YA: Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Pho-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 22: 854-862, 2002
 12. Robinson TE 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
 13. Rothwell NJ and Hopkins SJ: Cytokines and the nervous system. II. Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18: 130-136, 1995
 14. Sandoval V, Riddle E, Ugarte YV, Hanson GR and Fleckenstein AE: Methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporter function: an in vitro model. *J. Neurosci.* 21: 1413-1419, 2001
 15. Sato M, Chen CC and Akiyama K: Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol. Psychiatry* 18: 429-440, 1983
 16. Seiden LS, Sabol KE and Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Res. Pharmacol. Toxicol.* 33: 639-677, 1993
 17. Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S and Ewing A: Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.* 15: 4102-4108, 1995
 18. Yamada K, Iida R, Miyamoto Y, Saito K, Sekikawa K, Seishima M and Nabeshima T: Neurobehavioral alterations in mice with a targeted deletion of the tumor necrosis factor- α gene: implications for emotional behavior. *J. Neuroimmunol.* 111: 131-18, 2000.

分担研究課題名: **覚醒剤による神経毒性と精神病の発現下における覚醒剤体内動態の変化に関する基礎的検討**

分担研究者: **長谷川 高明**

共同研究者: **高木 健三、柴田 英治、高木 健次、北市 清幸**
名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

研究要旨

我々は、これまでの検討で、覚醒剤依存動物モデルであるメタンフェタミン(MAP)逆耐性動物(R-MAP)では MAP の体内動態および脳移行が変化することを明らかにしてきた。また、R-MAP では MAP 腎排泄能および MAP 組織分布が低下していること、脳、腎、肺で薬物輸送担体(OCT3)の発現が低下していることを見出してきた。以上の結果と、OCT3 が神経細胞外に局在するという知見を考え合わせると、R-MAP における MAP 体内動態および脳移行の変化には神経細胞外における覚醒剤輸送機構の変化が関与していることが示唆された。したがって、このような変化は覚醒剤による神経毒性や精神病の発現にも一部関与しているものと推察される。

本年度は、これまでの研究を推し進めるために、MAP 体内動態に関与する可能性がある因子をさらに評価することを試みた。すなわち、R-MAP において、MAP の代謝能、再吸収機構の変化について検討すると共に、OCT3 の機能制御に重要であることが報告されている血漿中コルチゾール量に変化しているかどうかについて検討を行った。

R-MAP はラットに MAP (6 mg/kg)を1日1回5日間投与した後21日間休薬することによって作成した。対照には生理食塩水を1日1回5日間投与した後21日間休薬したラット(Control)を使用した。覚醒剤の代謝能を確認する実験では、両群の肝臓を取り出し、RT-PCR 法によって MAP の代謝に重要な代謝酵素であるヒト CYP2D6 に相当するラット CYP2D1/5 および CYP2D2MAP の mRNA の発現を評価した。その結果、CYP2D1/5 および CYP2D2MAP の mRNA の発現は両群間で差が見られなかった。腎臓における薬物再吸収機構に関しては、受動的再吸収、能動的再吸収の両面から検討を行った。すなわち、尿アルカリ化による受動的再吸収の変化と MAP の能動的再吸収に重要な OCTN2 mRNA の発現を両群間で比較検討した。しかしながら、MAP の受動的再吸収および OCTN2 mRNA の発現においては Control および R-MAP の両群間で有意な差は見られなかった。血漿中コルチゾール量は、非刺激時では R-MAP は Control に比して有意に高値を示した。一方、MAP (5 mg/kg, iv)刺激では Control で著明な血漿中コルチゾールの上昇が観察されたが、R-MAP ではその効果が見られなかった。

以上の結果より、MAP 逆耐性動物では MAP の代謝能および再吸収能には変化がないことが明らかになった。したがって、昨年、我々が報告した OCT3 の発現変化が R-MAP における MAP 体内動態および脳移行の変化における重要な因子であることが明らかになった。さらに、血漿中コルチゾール基礎量の上昇や MAP 刺激時の反応性の変化が、何らかの形で R-MAP における MAP 体内動態や OCT3 発現の変化に関与している可能性が示唆された。今後は OCT3 を分子標的とした MAP 体内動態の制御とステロイドホルモンによる薬物輸送担体の発現調節のメカニズムについてさらに検討を加える予定である。