

20020902

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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14年度)

主任研究者 西川 徹

平成15年3月

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

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14年度)

主任研究者 西川 徹

平成15年3月

総括研究報告書（平成14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 …………… 13

研究協力者 柏 淳、伊藤 卓、黒田安計、山本直樹、海野麻未、
桜井新一郎、嶋津 奈、谷口 豪、石井澄和

覚醒剤依存の分子生物学的研究

沼知陽太郎 …………… 20

研究協力者 山下元康、藤山 航、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 …………… 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 47

V. 平成14年度分担研究者氏名一覧 …………… 215

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

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

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とこれらと相互作用をもつ分子の検索を進めた。第二年度までに検出された新規遺伝子 *mrt1* (methamphetamine responsive transcript 1)、*mrt3*、*prt1*~3 (phencyclidine responsive transcript 1) に加え、大脳新皮質から、*prt4* を新たに検出した。このうち、覚醒剤による精神病状態や依存の発症・再燃のモデルである逆耐性現象と関連する *mrt1b* のヒトカウンターパート *MRT1b* のコード蛋白については、酵母 Two hybrid 法を用いて、相互作用する分子 *mip1*~6 (*mrt1* interacting protein 1~6) を検出した。これらは、*mrt1* とともに薬物依存と関係する分子カスケードを構成する可能性がある。さらに、*mrt1* と *prt1* のゲノム配列の多型と、覚醒剤依存や他の精神疾患との関連の検討を続けた。一方、ドーパミントランスポーター (DAT) の部分欠損マウスでは MAP 逆耐性の発達が抑制されていること、DAT、あるいはセロトニントランスポーター (SERT) の完全欠損は逆耐性形成を阻害することを見出し、逆耐性の形成には DAT および SERT が重要な役割を果たすことを確認した。また、覚醒剤投与ラットの脳を用いて、学習、記憶、薬物依存等の脳機能の長期的変化に関与すると推測される視床、海馬、尾状核、側坐核、嗅結節等の部位で、神経の可塑的变化に関連する分子であるスピノフィリン mRNA の発現変化を見出し、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

沼知陽太郎

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

東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野

教授

東京都精神医学総合研究所精神薬理研究部門

併任研究員

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、乱用を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探索する。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、樹状突起

に発現する神経可塑性関連分子スピノフィリンをコードする遺伝子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遺伝子ノックアウトマウスにおける、薬物の報酬効果、神経伝達系、逆耐性形成等の変化を調べる。

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。ヒト検体を用いた遺伝子解析研究は、科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」に基づき、東京医科歯科大学並びに関連諸施設の倫理委員会の承認を得て遂行した。検体の提供者には、研究の目的や意義、生じうる危険性、研究の協力の有無によって診療上の不利益が生じないこと、同意を撤回することが可能であることなどを十分に説明し、文書によって同意を得た。

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)DNA アレイ

マウス大脳新皮質 (neocortex) から total RNA を抽出 (RNeasy RNA extraction Kit, QIAGEN) した。このうち、0.4 ug を用いて、random hexamer priming による逆転写反応によって cDNA を合成し、8,374 クローンに対する DNA チップ (IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を使って、生後 56 日と 540 日の間で薬物応答に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、この結果を定量的 RT-PCR により確認した。

(2)遺伝子発現の定量的解析

上記のように調整した、マウスまたはラット大脳新皮質 cDNA を、10 倍量の TE buffer で希釈した (SuperScript 2 Reverse Transcription Kit, Invitrogen)。この cDNA 溶液 5 μ l を以後の定量的 PCR のテンプレートとして用いた。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。PCR 増幅産物の量は Syber Green の蛍光強度として、各サイクルの伸長反応の終わりの時点で測定した。得られた PCR 増幅曲線から LightCycler Software を用いて、GAPDH および標的遺伝子の mRNA 量の相対値を算出した。標的遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量に対する比として補正した後、統計解析を行った。なお、PCR 産物の特異性の検討は、PCR 後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。

(3) ヒト MRT1 の解析

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 (human brain marathone cDNA library (クロンテック)) 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' 領域の解析を行い、ヒト MRT1a および MRT1b をクローニングした。

次に、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、BAC (bacterial artificial chromosome) クローン解析とデータベースの検索によって、MRT1 遺伝子のゲノム上の位置や exon-intron の境界を決定

した。これらの結果を元に、コーディング領域並びにその近傍の変異を、direct sequencing 法や SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism) 法を用いて検索した。引き続きプロモーター領域約 3 Kb の解析も進めた。

(4) Two Hybrid Screening

新たにクローニングされたヒト MRT1b の coding 領域全長 (528 アミノ酸に相当する) を bait として pGBKT7 ベクターにサブクローニングし、pACT2 ベクターに入ったヒト脳ライブラリー (クロンテック) をスクリーニングした。4.1x10⁸cfu を -Trp-Leu-His-Ade+10mM 3-aminotriazole+ α -gal の条件下でスクリーニングし、得られたクローンをすべてシーケンシングした上で独立クローンに分類した。ベクター同志を交換して再度 Two Hybrid 反応を見ることにより一次検証を行った。

(5) 細胞内強制発現と免疫共沈降

human MRT1b 全長を HA タグのついた pCMV-HA 発現ベクターへ、Two Hybrid で得られたクローンを各々 Myc タグのついた pCMV-Myc 発現ベクターへそれぞれサブクローニングして、HEK293 細胞に lipofectamine 法により共強制発現させた。蛍光ラベルした抗 HA 抗体による免疫蛍光染色により、human MRT1b の細胞内分布を確認した。また、抗 HA 抗体にて免疫沈降を行い、RIPA バッファーで洗った後 SDS-PAGE / ウェスタンブロットを行い、抗 Myc 抗体にて免疫共沈降を確認した。

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

本実験は雄性、10-12 週齢、体重 18-25 g の 129/C57 混合遺伝背景の KO マウスを用いた。DAT/SERT ダブル KO マウスは、既報に従い DAT 単独 KO マウスと SERT 単独 KO マウスを交配して作製した (Sora et al, 2001)。KO マウス遺伝型判別は、尻尾断片組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて判別した。

野生型、DAT ヘテロ KO (DAT^{+/-})、DAT-KO (DAT^{-/-})、SERT ヘテロ KO (SERT^{+/-})、SERT-KO (SERT^{-/-})、DAT/SERT ダブル KO(DAT^{-/-}SERT^{-/-})マウス計 6 群、各群 n=7~15 として以下の実験に供した。

(2) 移所運動量計測

MAP(1mg/kg)をマウスに隔日皮下投与し、7回 MAP 投与後一週間休養した後に、8 回目の MAP を再投与した。マウスは MAP 投与 3 時間前にホームケージより行動量測定装置(Supermex、室町機械)内に移し、馴化過程における移所運動量の変化および MAP 投与後 3 時間の移所運動量の変化を 5 分ごとに計測した。

3. 覚醒剤投与による脳スピノフィリン遺伝子の発現変化

(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 (MAP, 4mg/kg, i.p., 大日本製薬、大阪)を投与、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。

(2) in situ hybridization

クリオスタットで厚さ 14 μm に海馬や線条体を含む冠状断で脳切片を作成した。これら切片について、35S 標識した cRNA プローブを用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。切片は 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、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。

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) PCP に発達依存的応答を示す遺伝子の検索

PCP に発達依存的応答を示す遺伝子として、マウスおよびラット大脳新皮質から、PCP (5mg/kg) 急性投与後において、生後 8 日齢では発現が変化しないが、生後 56 日齢では明らかに増加する遺伝子 prt4 (phencyclidine responsive transcript 4) を、新たに検出した。予備的実験では、生後 56 日齢における PCP 誘発性増加は抗精神病薬 haloperidol により有意な影響を受けなかった。

(2) ヒト MRT1b 蛋白と相互作用をもつ分子の検索

RACE 法により、ヒト MRT1a, MRT1b に相当する遺伝子のクローンをそれぞれ得た。ヒト mrt1b はラット mrt1b と遺伝子レベルで 92.9%、アミノ酸レベルで 98.1%の相同性を持つことがわかった。細胞内強制発現では、mrt1b は細胞質に広く分布するパターンを示した。このヒト Mrt1b を bait にした Two Hybrid Screening により、140 個の陽性クローンを得、すべてをシークエンスした結果、独立クローンは 63 種類であった。ferritin などの高頻度偽陽性を除外した上で、現在までに 13 クローンを免疫共沈降にかけ、うち 6 つのクローンで免疫共沈降が確認された。これらを mrt1b-interacting proteins (mips) と命名し、mip1-mip6 と番号をつけた。2 つが既知蛋白、4 つが未知蛋白であった。残りのクローンについても、順次免疫共沈降により検討中である。

(3) ヒトゲノムにおける薬物性精神障害候補遺伝子の解析

MAP あるいは PCP に対して、それぞれ発達依存的応答を示す薬物性精神障害候補遺伝子 mrt1 および prt1 のヒト相同遺伝子について、薬物依存患者を含む精神疾患と多型との関連の解析を続けた。なお、MRT1 のプロモーター領域約 3 Kb の解析から、計 6 個の SNP が発見された。

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)馴化過程

野生型マウス及び各種 KO マウスの MAP 初回投与前後の移所運動量の経時的变化を調べた。初回投与前、新奇環境における 1 時間目の移所運動量については、既報と一致し、DAT 完全欠損マウスは野生型より活発な自発運動量を呈した。また、SERT が部分或いは完全欠損したマウスは新奇環境における 1 時間目の移所運動量が野生型に比べて有意に低かった。

(2)MAPの急性投与による移所運動量の変化

野生型 (n=14) と SERT+/-マウス群では、初回投与後の 1 時間運動量は投与前に比べて有意に増加した。DAT-/-と DAT-/-SERT-/-マウス群では、初回投与後の 1 時間運動量は投与前に比べて有意に減少した。DAT+/-と SERT-/-マウス群では、投与前後の 1 時間運動量は有意に変化しなかった。

(3)MAPの反復投与による移所運動量の変化

i)野生型マウス群では、2 回目投与から、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて運動量は増加していた。また、一週間の休薬後に MAP を 8 回目再投与した際にも同様に運動量が増加し、野生型マウス群の逆耐性形成を認めた。

ii)DAT+/-マウス群では、3 回目投与してから、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて運動量は増加していた。1 週間休薬後も、再投与後の 1 時間運動量は初回投与後より有意に高かった(p<0.01)。DAT+/-マウス群の逆耐性形成を認めた。

iii)SERT+/-マウス群では、4 回目投与以降、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて運動量は増加していた。また、1 週間休薬後、再投与後の 1 時間運動量は初回投与後より有意に高かった。SERT+/-マウス群の逆耐性形成を認めた。

iv) DAT-/-、SERT-/-或いは DAT-/-SERT-/-マウス群では、初回投与後と反復投与後の 1 時間運動量は有意な変化がなかった。

v) 野生型、DAT+/-と SERT+/-マウスでは逆耐性形成を認めた為、逆耐性が発展する際の直線回帰の傾きを算出したところ、野生型と SERT+/-マウスの逆耐性が発展の傾きには有意な差が認められなかったが、DAT+/-マウスは野生型マウスより低かった。この結果は、野生型と SERT+/-マウスの逆耐性の発展について差がないが、DAT+/-マウスの逆耐性の発展は野生型マウスと比べて遅れていることを示唆している。

3. 覚醒剤投与による脳スピノフィリン遺伝子の発現変化

プローブの特異性を確認するためにラット海馬を用いて行ったノザンプロットで、アンチセンス cRNA プローブにより既報 (Allen, 1997) と一致した 4.6kb のバンドが認められた。さらにセンス cRNA プローブを用いた in situ hybridization では、シグナルが認められなかった。アンチセンス cRNA プローブを用いた in situ では、前頭葉皮質、尾状核、梨状葉皮質、海馬、視床内側部、手綱核にスピノフィリン mRNA の高い発現を認めた。MAP を投与して 24 時間後には、スピノフィリン mRNA は尾状核、側坐核、嗅結節で 20-25% の有意な発現減少を認めた。海馬 CA1-3 領域、視床外側部では、覚醒剤投与後 9 時間後で 25% の有意な発現増加を認めた。視床内側部では、覚醒剤投与後のスピノフィリン mRNA は徐々に増加し、投与後 24 時間では約 2 倍の有意な増加を認めた。

D. 考察

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

今年度は、PCP 投与に対する mRNA の発現変化が成熟期には見られるが幼若期には認められない遺伝子が、ラットおよびマウスの大脳新皮質に発現していることが明らかになり、prt4 と呼ぶこととした。この遺伝子の成熟期における PCP 誘発性発

現増加は haloperidol により抑制されなかったことから、抗精神病薬抵抗性の精神症状に関与することが示唆された。

一方、覚醒剤に発達に伴う応答変化を示す *mrt1* については、ヒト相同遺伝子がコードする蛋白と相互作用を示す分子の検索が進んだ。これまでの研究により、*mrt1b* は①覚醒剤に対する応答性が逆耐性成立と同じく生後3週頃以降に出現する、②COC に対する交叉逆耐性を有する、③MAP 反復投与後基礎発現量の持続的上昇を見る、などの点で逆耐性現象と薬理学的特徴が一致することがわかっている。*mrt1* は神経伝達物質の受容体・トランスポーター・遊離装置等と細胞骨格蛋白等を結合させる働きを持つ分子に多く見られる PDZ ドメイン、細胞内の蛋白局在に関与すると考えられる PX ドメイン、細胞膜上での分子の安定化や整列に関わる B41 ドメイン(*band4.1 homologue3*)を一つずつ持つ。これらのドメイン構造より、*mrt1* はシナプス膜上において受容体等の膜分子のダイナミックな動的変化を司る物質であることが想定される。すなわち、逆耐性現象というシナプスの可塑性にかかわると考えられる膜上のダイナミックな変化を引き起こす一連の分子カスケードの一部をなすと考えられる。

この分子カスケードを明らかにすることが逆耐性現象の分子メカニズム解明への端緒となることを期待し、*mrt1b* 蛋白と相互作用を持つ分子のクローニングを行った。これまでに得られた分子には PDZ、B41、WW などを含む分子があり、*mrt1* とともにこれらのドメインを介して情報伝達を行うアダプター分子と考えられる。今後はこの分子カスケードの全容を明らかにすることで、逆耐性現象の分子メカニズムにアプローチしていく予定である。

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

これまで、DAT^{-/-}マウスの活発な自発運動量が、アンフェタミン、選択的セロトニン (5-HT) 取り込み阻害薬、5-HT の前駆体である L-トリプトファン の投与などの 5-HT 神経伝達を増強させる薬物によって抑制されたことから、5-HT の上昇が DAT^{-/-}マウスの活発な運動に抑制すると推測されてきた。しかし、我々の研究では、上記の薬物のターゲット分子が欠損した DAT^{-/-}SERT^{-/-}マウスの運動量に対しても MAP の抑制効果が見られたことから、単純なセロトニン神経伝達の増強だけでは MAP の多動に対する抑制効果を説明できない。このメカニズムは MAP 類縁のメチルフェニデートの注意欠陥多動性障害に対する奏効機序にも関連すると考えられることから、注意欠陥多動性障害の病態解明にも結びつく課題と考えられる。

一方、SERT が一部或いは完全欠損したマウスは新奇環境での自発運動量が有意に低下していた。SERT が完全欠損した場合は、細胞外 5-HT が著しく上昇し *hyperserotonergic* となっている。また、SERT が一部欠損した場合は、たとえ細胞外 5-HT 濃度が正常であっても 5-HT 神経伝達のなんらかの変化が想定される。新奇環境における SERT 欠損マウスの探索行動の抑制は、セロトニン神経伝達の変化が新奇環境への適応性に関わっている可能性が考えられる。

DAT^{+/-}マウスは MAP 初回投与による運動量の増加は見られず、しかも MAP に対する感受性は低く、逆耐性の発現は野生型マウスより遅れていた。しかし、反復投与によって、逆耐性の形成を認めた。これまでの我々の研究においては、MAP とは異なり、コカインの投与では DAT^{+/-}マウスにおける移所運動量の増加は野生型マウスと変わらなかった。この差異は、DAT^{+/-}マウスにおいて、コカインの投与による細胞外 DA の増加は野生型マウスと変わらないのに対して、MAP の場合は、コカインとの作用機序の違いによってトランスポーター経由の DA 放出が野生型に比べて減少するためではないか

と推測され、現在検討中である。

SERT+/-と SERT-/-マウスは新奇環境での自発運動量が同じく低下していたが、SERT+/-マウスは MAP 初回投与後運動量の増加を観察され、しかも反復投与によって野生型マウスと同じ発展過程で逆耐性が形成した。しかし、SERT-/-マウスは MAP 初回投与後運動量の変化と、反復投与によって感受性の増加を観察されなかった。SERT が部分欠損しても、MAP による 5-HT の放出は減少せず、細胞外 5-HT 基礎濃度は正常である。SERT が欠損した場合は、高濃度の細胞外 5-HT は野生型マウスの約 10 倍である。高濃度の細胞外 5-HT を示す SERT-/-マウスは複数種類の 5-HT 受容体が down-regulation か desensitization になっていることがすでに報告されている。従って、SERT-/-マウスにおける逆耐性形成の阻害は、高濃度の細胞外 5-HT か二次的な 5-HT 受容体の機能低下によるものと考えられる。

3. 覚醒剤投与による脳内スピノフィリン遺伝子の発現変化

今回我々が行った予備的検討でのノザンブロットティングの結果は既報と一致しており、我々が作成したプローブがスピノフィリンに特異的であることが確認された。

スピノフィリンは、DAD2 受容体や、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体と機能的関連をもつ。一方 MAP は、DA 神経系と興奮性アミノ酸神経系双方の神経伝達を増強する。スピノフィリン mRNA は、MAP を投与して 24 時間後に尾状核、側坐核、嗅結節で有意に減少、視床で有意に増加した。これらの脳部位には、黒質線条体 DA 系、中脳辺縁 DA 系、興奮性アミノ酸系の終末が存在する。一方、前頭葉では MAP 投与後 9 時間でスピノフィリン mRNA の増加傾向を認めたが、有意な変化ではなかった。前頭葉には中脳皮質 DA 系の終末が存在するが、興奮性アミノ酸系の神経終末はない。従って MAP は、DA 系と興奮性アミノ酸系の双方

を介してスピノフィリン mRNA の脳内発現に影響を与える可能性がある。

今回、発現変化が認められた脳部位のうち、視床、特に内側部で最も大きな変化が観察された。視床内側部は大脳皮質と双方向性の神経連絡をもち、limbic subcircuit と motor subcircuit の中継部位で、学習、記憶、薬物依存の形成に重要な役割を果たす。今回の結果から、覚醒剤が視床内側部で神経の可塑的变化を引き起こすこと、これが覚醒剤依存の再発脆弱性の形成に関与することが示唆される。

E. 結論

1. 覚醒剤・麻薬による依存および精神病状態の分子機構にアプローチする目的で、これらの障害が小児期には生じにくく、実験動物においても、薬物性精神病の発症や再発のモデルである覚醒剤・COC が引き起こす逆耐性現象や PCP 誘発性の異常行動が特定の生後発達段階以降に出現するようになることに注目し、ラット大脳新皮質において、MAP または PCP に一定の生後発達時期から成熟期における応答性を獲得する遺伝子およびそれらが構築する分子カスケードの検索を継続した。
2. PCP に発達依存的応答を示す遺伝子 *prt4* を、マウスおよびラットの大脳新皮質から新たに検出した。
3. 覚醒剤に発達依存的応答を示す新規逆耐性関連遺伝子群のうち、*mrt1* が関与する分子カスケードを明らかにするため、ヒト相同遺伝子 *MRT1* がコードする *MRT1b* 蛋白と直接相互作用をもつ蛋白 *mips1~6* (*mrt1* interacting proteins 1-6) を、yeast two-hybrid 法を用いて検出した。
4. *DAT*、もしくは *SERT* の部分欠損は、逆耐性の形成に影響しないが、*DAT* の部分欠損は逆耐性の発展を抑制する。*DAT*、或いは *SERT* の完全欠損は逆耐性形成を阻害する。これらの結果により、逆耐性の形成には *DAT* の正常な発現は非常に重要であ

り、また SERT も重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 依存性薬物による神経細胞の遺伝子発現の変化と神経細胞の可塑的变化は、断薬後も長期に持続する薬物依存の再発への脆弱性として考えられてきた。本研究では、覚醒剤投与ラットの脳を用いて、学習、記憶、薬物依存の形成に重要な役割を果たす部位である視床内側部で、神経の可塑的变化に関連する分子であるスピノフィリン mRNA の発現変化を見出した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 原著

1. Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu S-H, Kennedy MB, Kinoshita M, Longtine M, Low C, Maltais LJ, McKenzie L, Mitchison T, Nishikawa T, Noda M, Petty EM, Peifer M, Pringle JR, Robinson PJ, Roth D, Russell SEH, Stuhlmann H, Tanaka M, Tanaka T, Trimble WS, Ware J, Zeleznik-Le NJ, and Zieger B: Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell* 13: 4111-4113, 2002.
2. Kakeyama M, Umino A, Nishikawa T, Yamanouchi K: Decrease of serotonin and metabolite in the forebrain and facilitation of lordosis by dorsal raphe nucleus lesions in male rats. *Endocrine Journal*, 49: 573-579, 2002.
3. Oda K, Okubo Y, Ishida R, Murata Y, Ohta K, Matsuda T, Matsushima E, Ichimiya T, Suhara T, Shibuya H and Nishikawa T: Regional cerebral blood flow in depressed patients with white matter magnetic resonance hyperintensity, *Biol Psychiatry* 53:150-156, 2003.
4. Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, and Nishikawa T: A developmentally-regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry*, in press.
5. Ogawa M, Shigeto H, Yamamoto T, Oya Y, Wada K, Nishikawa T, and Kawai M: D-Cycloserine for the treatment of ataxia in spinocerebellar degeneration. *J Neurological Sci*, in press
6. Mikami T, Naruse N, Furuya Y, Ohkubo H, Ohkubo T, Matsuura M, Moriya H, Nishikawa T, Kojima T: Vulnerability to schizophrenia in methamphetamine psychosis — using exploratory eye movements. *Psychiatry Clinical Neurosci*, in press.
7. Fujiyama K, Kajii Y, Hiraoka S and Nishikawa T: Differential regulations by stimulants of neocortical expression of *mrt1*, *arc* and *homer1a* mRNA in the rats treated with repeated methamphetamine. *Synapse*, in press.
8. 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: 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, 2002.
9. Zhou Y, Spangler R, Schlussman SD, Yuferov VP, Sora I, Ho A, Uhl GR, Kreek MJ: Effects of acute "binge" cocaine on preprodynorphin, preproenkephalin, proopiomelanocortin, and corticotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the striatum and hypothalamic-pituitary-adrenal axis of mu-opioid receptor knockout mice. *Synapse*. 45(4): 220-9, 2002.
10. Mizoguchi H, Wu HE, Narita M, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Nagase H, Tseng LF: Antagonistic property of buprenorphine for putative epsilon-opioid receptor-mediated G-protein activation by beta-endorphin in pons/medulla of the mu-opioid

receptor knockout mouse. *Neuroscience*. 115(3): 715-21, 2002.

11. Hall FS, Li XF, Sora I, Xu F, Caron M, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR: Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience*. 115(1):153-61, 2002.
12. Karasawa J, Yamamoto H, Yamamoto T, Sagi N, Horikomi K, Sora I: MS-377, a selective sigma receptor ligand, indirectly blocks the action of PCP in the N-methyl-D-aspartate receptor ion-channel complex in primary cultured rat neuronal cells. *Life Sci*. 70(14): 1631-42, 2002.

(2) 著書

1. 西川 徹、融 道男：精神分裂病の生物学—最近の進歩 脳を知る・創る・守る 「脳の世紀」推進会議編 クバプロ、東京、pp.160-183, 2002.
2. 安宅勝弘、岩間久行、西川 徹：精神分裂病。看護のための最新医学講座 第12巻:pp266-284、中山書店、東京、2002
3. 黒田 安計、西川 徹、ドパミン・興奮性アミノ酸仮説、佐藤光源編『精神分裂病の治療—臨床と基礎』(3. 原因と病態モデル 3-3、精神分裂病の概念)、印刷中、朝倉書店。
4. Sora I, Ikeda K, Mishina Y: Receptor knockout and gene targeting - Generation of knockout mice, in *Opioid Research: Methods and Protocols*, edited by Zhizhong Z. Pan, Humana Press (in press)
5. Ikeda K, Yoshii M, Sora I, Kobayashi T: Opioid receptor coupling to GIRK channel: in vitro studies using a *Xenopus* oocyte expression system and in vivo studies on weaver mutant mice, in *Opioid Research: Methods and Protocols*, edited by Zhizhong Z. Pan, Humana Press (in press)

(3) 総説

1. 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
2. 西川 徹: 分裂病の分子メカニズムを探る. ころのクリニック (東京精神神経科診療所協会誌) 2号: 76-91, 2002
3. 車地暁生, 西川 徹: ストレス関連遺伝子. 特集「PTSD の分子生物学」 *分子精神医学* 2: 205-210, 2002.
4. 西川 徹: 薬理学的モデルを用いた分裂病の発症および再燃に関する遺伝子の探索精神神経学雑誌 104: 487-492, 2002
5. 西川 徹: 精神分裂病(統合失調症)の分子メカニズム. *Pharma Medica* 20(11): 25-33, 2002
6. 西川 徹: 統合失調症—動物モデルからのアプローチ 特集「精神疾患の分子医学」 *Molecular Medicine* 40: 270-278, 2003
7. 柏 淳、西川 徹: 統合失調症の病態・治癒機転と神経可塑的变化 特集「分子薬理学の進歩—新しい仮説の提言」 *分子精神医学* 3: 1-7, 2003
8. 曾良一郎, 池田和隆, 三品裕司: 実験技術: オピオイド受容体ノックアウトマウスの作製・解析の概要. *日本薬理学雑誌* 120: 47-54, 2002
9. Uhl G R, Hall F S, Sora I: Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Molecular Psychiat* 7: 21-26, 2002
10. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, Yano R, Sora I, Niki H: Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: is the GIRK channel one of the keys? *Neuroscience Research* 44: 121-131, 2002
11. Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T, Sora I, Narita M: Differential mechanism of G-protein activation induced by endogenous mu-opioid peptides, endomorphin and beta-endorphin. *Jpn J Pharmacol* 89 (3):229-34, 2002

2. 学会発表

(1) 特別講演, シンポジウム

1. 西川 徹、梶井 靖、村岡新一郎、海野麻未、黒田安計: 心と行動を分子で読む, 「精神分裂病研究の新しい芽生え」, 第 45 回日本神経科学学会, 札幌, 7.17, 2002
2. 山本直樹、土田英人、海野麻未、嶋津 奈、櫻井新一郎、谷口 豪、西川 徹: 神経伝達物質「ラット大脳皮質において D-セリンによって発現調節される遺伝子の解析」, 第 45 回日本神経化学会, 札幌, 7.18, 2002
3. 西川 徹: 精神分裂病研究の最前線, 第 25 回日本神経科学大会, 東京, 7.8, 2002
4. 西川 徹、海野麻未、梶井 靖、黒田安計、柏 淳、伊藤 卓、車地暁生: ストレス脆弱性モデルとしての逆耐性現象と遺伝子発現. 「ストレスの脳科学:モデル動物における遺伝子発現」 第 53 回千里神経懇話会, 大阪, 7.23, 2002
5. 西川 徹、車地暁生、伊藤 卓、海野麻未: 急性ストレス反応およびストレス脆弱性に関する分子の発達神経科学的研究. 「ストレス性機能障害とその修復過程の分子機構解明および治療法の開発」研究, 平成 14 年度研究報告会, 東京, 9.6, 2002
6. 西川 徹: 精神科における薬物療法. 第 11 回関東地区精神科研修医合同研修会, 東京, 9.14, 2002
7. 西川 徹: 新規抗精神病薬開発のターゲットタンパク質の探索. 第 32 回日本神経精神薬理学会年会, 前橋, 10.17, 2002
8. 西川 徹: 統合失調症 (スキゾフレニア) の分子病理. 「統合失調症 (スキゾフレニア) 研究の最前線」 精神医学 21 世紀シンポジウム in 福島, 福島, 11.16, 2002
9. 西川 徹: 精神分裂病の病因論. 第 12 回地域精神保健講座, 東京, 11.22, 2002
10. 西川 徹: 覚醒剤による逆耐性現象に関わる脳回路と遺伝子について. テーマ「前頭葉・その機能とネットワーク」, 第 12 回神経科学の基礎と臨床プログラムセミナー, 大阪, 12.14, 2002
11. G.R. Uhl, N. Ozaki, H. Ujike, I. Sora (Chairperson): Symposium: Molecular Genetics of Drug Addiction Vulnerability, XII World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 8.25, 2002
12. Sora, S.F. Hall, P.K. Lesch, D.L. Murphy, G.R. Uhl: Cocaine and monoamine transporters, Symposium: Molecular Genetics of Drug Addiction Vulnerability, XII World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 8.25, 2002
13. Sora: Monoamine function and psychostimulants , Workshop: Sensitization in methamphetamine psychosis and schizophrenia, XII World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 8.25, 2002
14. 曾良一郎: 精神疾患への分子遺伝学的アプローチ-遺伝子改変動物モデルを用いて-. 第 87 回東北医学会総会, 仙台, 5.24, 2002
15. 曾良一郎, 沈昊偉, 萩野洋子, 小林秀昭, 池田和隆: 遺伝子改変動物モデルと創薬. シンポジウム: 中枢神経系作動薬~創薬のための新しい薬理学モデルの可能性, 第 106 回日本薬理学会関東部会シンポジウム, 東京, 6.28, 2002
16. 曾良一郎: 薬物依存の分子精神薬理. つくばブレインサイエンスセミナー, 筑波, 7.16, 2002
17. 曾良一郎: カテコラミントランスポーターと高次神経機能. シンポジウム: カテコラミントランスポーター, 第 55 回日本自律神経学会総会, 大宮, 10.31, 2002
18. 曾良一郎, 沈昊偉, 萩野洋子, 小林秀昭, 沼陽太郎, 池田和隆: 精神疾患モデルとしての遺伝子変異マウス. 第 25 回日本分子生物学会年会ワークショップ, 横浜, 12.12, 2002
19. 池田和隆, 高松幸雄, 畑春実, 高橋雄大, 井手聡一郎, 二木宏明, 曾良一郎: 遺伝子変異マウ

スから知る鎮痛および快情動の分子メカニズム,
第 25 回日本分子生物学会年会ワークショップ,
横浜, 12.12, 2002

20. Numachi, Y. Methamphetamine-induced Alteration in mRNA for DNA methyltransferase. XII World Congress of Psychiatry Symposium: 'Epigenetics of Psychiatric Disorders', Yokohama, 8.25, 2002
21. Numachi, Y. Japanese Concept of Methamphetamine Psychosis. XII World Congress of Psychiatry Symposium: 'Neurobiological Basis of Acute Psychotic Episodes', Yokohama, 8.25, 2002

(2) 国際学会

1. Nakamura M, Uchida S, Maehara T, Hirai N, Nakabayashi T, Nishikawa T: Sellp Spindle in Human Prefrontal Cortex: An Electrographic Study. XII WORLD CONGRESS OF PSYCHIATRY. partnership for Mental Health. Yokohama, Japan, 8.28, 2002.
2. Yamamoto N, Tomita U, Umino A, Tsuchida H, Sakurai S, Shimazu D, Taniguchi G, Nishikawa T: Uptake and release of D-serine in the rat cortical synaptosome. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orlando, FL, USA, 11.4, 2002.
3. Tsuchida H, Yamamoto N, Kajii Y, Umino A, Fukui K, Nishikawa T: Cloning of a D-serine-regulated transcript dsr-1 from the rat cerebral cortex. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orlando, FL, USA, 11.4, 2002.
4. Yamashita M, Yoshida S, Numachi Y, Fujiyama K, Toda S, Matsuoka H, Kajii Y, Nishikawa T: Methamphetamine altered the expression of EphA5 mRNA in memory-related brain regions. 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting. Orlando, FL, USA, 11.6, 2002.
5. Numachi, Y., Yoshida, S., Fujiyama, K., Yamashita, M., Toda, S., Matsuoka, H., Kajii, Y., Nishikawa, T. Methamphetamine increased spinophilin mRNA in medio-dorsal thalamus. 32nd Annual meeting of Society for Neuroscience, Orlando, USA, 11.6, 2002
6. 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: Association between dopamine D1 receptor family (DRD1, DRD5) gene polymorphisms and methamphetamine psychoses. XXIII CINP Congress, Montreal, Canada, 6.23-27, 2002
7. Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Ikeda K, Yamamoto T, Yamamoto H, Sora I: Cocaine-induced alteration of monoamine neurotransmission in mice lacking monoamine transporter. XII World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 8.25, 2002
8. Hall FS, Li XF, Drzonova J, Goeb M, Sora I, Hen R, Uhl GR: Serotonin receptor 1B knockout complements dopamine transporter knockout effects on basal - and cocaine - stimulated locomotion. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.13, 2002
9. Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Gonzales RA: Ethanol - induced extracellular dopamine in the ventral striatum is decreased in - opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.3, 2002
10. Nishizaki I, Yamamoto H, Ikeda K, Nukada T, Sora I, Furuya S, Hirabayashi Y, Takahashi K, Okuyama S, Yamamoto T: Characterization of [3h] serine uptake into the primary neuron and glia derived from rat telencephalon. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.3, 2002
11. Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Shinohara-Tanaka K, Ikeda K, Yamamoto H, Yamamoto

- T, Lesch KP, Murphy DL, Hall FS, Uhl GR, Sora I: Associations between extracellular monoamines and cocaine reward in mice lacking dopamine or/and serotonin transporters. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.5, 2002
12. Yamamoto H, Kametani F, Namiki Y, Yamamoto T, Karasawa J, Shen HW, Ikeda K, Hagino Y, Kobayashi H, Sora I, Nukada T: Identification of grp78 as a type - 1 sigma receptor (sigma1) - associated protein. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.7, 2002
 13. Ikeda K, Sora I, Takamatsu Y, Uhl GR, Niki H: Increased intracranial self - stimulation (ICSS) in mu - opioid receptor knockout mice. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11.7, 2002
 14. Numachi, Y., Yoshida, S., Fujiyama, K., Yamashita, M., Toda, S., Matsuoka, H., Kajii, Y., Nishikawa, T. Methamphetamine increased spinophilin mRNA In medio-dorsal thalamus. 32nd Annual meeting of Society for Neuroscience, Orlando, USA, 11.6, 2002
 15. Yamashita, M., Yoshida, S., Numachi, Y., Fujiyama, K., Toda, S., Matsuoka, H., Kajii, Y., Nishikawa, T. Methamphetamine altered the expression of EphA5 mRNA In memory-related brain regions. 32nd Annual meeting of Society for Neuroscience, Orlando, USA, 11.6, 2002

(3) 一般学会

1. 山本直樹、土田英人、海野麻未、嶋津 奈、櫻井新一郎、谷口 豪、西川 徹: 神経伝達物質「ラット大脳皮質において D-セリンによって発現調節される遺伝子の解析」 第 45 回日本神経化学会, 札幌, 7.18, 2002
2. 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: 抗精神病薬 Haloperidol および MS-377 の VMAT2 に対する作用. 第 24 回日本生物学的精神医学会, 大宮,

4.11, 2002

3. 沈昊偉, 萩野洋子, 小林秀昭, 田中慶子, 池田和隆, 山本敏文, 山本秀子, 曾良一郎: モノアミントランスポーター欠損マウスにおけるモノアミン神経伝達の変化. 第 24 回日本生物学的精神医学会, 大宮, 4.11, 2002
4. 野口孝則, 山田真久, 萩野洋子, 河野真子, 沈昊偉, 曾良一郎, 糸原重美, ウェス・ユーグン, 小川正晴: ムスカリン受容体 M5 欠損マウスにおける脳循環と神経学的行動. 日本神経科学大会, 東京, 7.7-9, 2002
5. 山本秀子, 亀谷富由樹, 並木芳子, 山本敏文, 唐沢淳一, 曾良一郎, 額田敏秀: Identification of GRP78 as a type-1 sigma receptor (sigmaR1) -associated protein. 第 45 回日本神経化学会, 札幌, 7.18, 2002
6. 沈昊偉, 萩野洋子, 小林秀昭, Uhl GR, 池田和隆, 山本敏文, 山本秀子, 曾良一郎: モノアミントランスポーター欠損マウスにおける逆耐性形成の変化. 第 32 回日本神経精神薬理学会, 前橋, 10.17-18, 2002
7. 高松幸雄, 池田和隆, 二木宏明, Uhl GR, 曾良一郎: ミューオピオイド受容体遺伝子欠損マウスにおけるうつ様行動の低下. 第 32 回日本神経精神薬理学会, 前橋, 10.17-18, 2002

II. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記すべきことなし

II. 分担研究報告

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

研究協力者：柏 淳、伊藤 卓、黒田安計、山本直樹、海野麻未、桜井新一郎、嶋津 奈、
谷口 豪、石井澄和

研究要旨：覚醒剤・麻薬による依存形成と精神病様状態の分子機構を明らかにする目的で、関連候補分子として、覚醒剤・麻薬に対して発達段階によって応答性を変える遺伝子群を検索した。このうち、覚醒剤精神病の発症・再発のモデルである逆耐性現象に関連する候補分子として、ラット大脳新皮質から検出された *mrt1* (methamphetamine responsive transcript 1) について、ヒトカウンターパートをクローニングし、ヒト *MRT1b* と相互作用する分子を酵母 two hybrid 法を用いて検索した。免疫共沈降法による検証の結果、これまでに既知蛋白 2 つ、未知蛋白 4 つの計 6 つのクローンが得られ、*mip* (*mrt1b* interacting protein) 1~6 と命名した。*mips* は、*mrt1b* とともに逆耐性現象の成立に関わる分子カスケードを構成していることが考えられるため、さらに、これらの機能解析と相互関係を検討中である。また、ヒト *MRT1* のプロモーター領域約 3 Kb の解析を行うとともに、ヒト薬物依存関連候補遺伝子 *MRT1* および *PRT1* の多型と、薬物依存患者を含む精神疾患との関連の解析を続けた。一方、代表的麻薬のひとつである *phencyclidine* に発達依存的応答を示す遺伝子 *prt4* を、マウスおよびラットの大脳新皮質から新たに検出した。

A. 研究目的

近年、国内外で、強い依存性を示す覚醒剤・麻薬等の薬物の乱用が増加の一途をたどり、乱用を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目的としている。

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、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コード蛋白について、構造・局在・機能・種々の向精神薬に対する応答等を調べるとともに、相互作用を持つ分子を探索し同様の検討を行う。さらに、これらの遺伝子または蛋白について、発現を抑制した時の逆耐性形成への影響等を解析することにより、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、以上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。本年度は、MAP や PCP に対して発達依存的応答を示す候補遺伝子の探索を続けると同時に、昨年度までに検出した *mrt1* (MAP-responsive transcript 1) を対象に、ヒト相同遺伝子 *MRT1* と相互作用をもつ分子の探索を開始した。*mrt1* に関して私たちは、①C 末端の異なる少なくとも2種類の isoform(*Mrt1a*, *Mrt1b*)をコードし、そのうち *mrt1b* のみが覚醒剤急性投与により発現が誘導され逆耐性の成立と平行して基礎的発現が高値を示すこと、②構造からは PX、PDZ ドメインをもち protein-protein interaction を介して細胞内情報伝達に関与すると考えられること、③PSD 分画に存在せず synaptosome 分画に存在することから presynapse に局在する可能性が高いこと等を示す実験結果を得ている。したがって、ヒト *MRT1b* 遺伝子の産物である *Mrt1b* 蛋白を含む分子カスケードの同定のため、Two Hybrid 法を用いて、*Mrt1b* と相互作用する蛋白の探索を行った。

B. 研究方法

今回の動物実験は東京医科歯科大学および国立精神・神経センターの実験動物委員会の審査・承認を得た上、その倫理規定を遵守して行った。ヒト検体を用いた遺伝子解析研究は、科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原

則について」に基づき、東京医科歯科大学並びに関連諸施設の倫理委員会の承認を得て遂行した。検体の提供者には、研究の目的や意義、生じうる危険性、研究の協力の有無によって診療上の不利益が生じないこと、同意を撤回することが可能であることなどを十分に説明し、文書によって同意を得た。

(1)DNA アレイ

マウス大脳新皮質 (neocortex) から total RNA を抽出 (RNeasy RNA extraction Kit, QIAGEN) した。このうち、0.4 ug を用いて、random hexamer priming による逆転写反応によって cDNA を合成し、8,374 クローンに対する DNA チップ (IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) を使って、生後 56 日と 540 日の間で薬物応答に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、この結果を定量的 RT-PCR により確認した。

(2)遺伝子発現の定量的解析

上記のように調整した、マウスまたはラット大脳新皮質 cDNA を、10 倍量の TE buffer で希釈した (SuperScript 2 Reverse Transcription Kit, Invitrogen)。この cDNA 溶液 5ul を以後の定量的 PCR のテンプレートとして用いた。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしては GAPDH を用いた。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアーにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。PCR 増幅産物の量は Syber Green の蛍光強度として、各サイクルの伸長反応の終わりの時点で測定した。得られた PCR 増幅曲線から LightCycler Software を用いて、GAPDH および標的遺伝子の mRNA 量の相対値を算出した。標的遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量に対する比として補正した後、統計解析を行った。なお、PCR 産物の特異性の検討は、PCR 後の融解曲線解析お

よびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。

(3)ヒト MRT1 の解析

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 (human brain marathone cDNA library (クロンテック)) 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' 領域の解析を行い、ヒト MRT1a および MRT1b をクローニングした。

次に、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、BAC (bacterial artificial chromosome) クローン解析とデータベースの検索によって、MRT1 遺伝子のゲノム上の位置や exon-intron の境界を決定した。これらの結果を元に、コーディング領域並びにその近傍の変異を、direct sequencing 法や SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism) 法を用いて検索した。引き続きプロモーター領域約 3 Kb の解析も進めた。

(4)Two Hybrid Screening

新たにクローニングされたヒト MRT1b の coding 領域全長 (528 アミノ酸に相当する) を bait として pGBKT7 ベクターにサブクローニングし、pACT2 ベクターに入ったヒト脳ライブラリー (クロンテック) をスクリーニングした。4.1x10⁸cfu を -Trp-Leu-His-Ade+10mM 3-aminotriazole+ α -gal の条件下でスクリーニングし、得られたクローンをすべてシークエンスした上で独立クローンに分類した。ベクター同志を交換して再度 Two Hybrid 反応を見ることにより一次検証を行った。

(5)細胞内強制発現と免疫共沈降

human MRT1b 全長を HA タグのついた pCMV-HA 発現ベクターへ、Two Hybrid で得られたクローンを各々 Myc タグのついた pCMV-Myc 発現ベクターへそれぞれサブクローニングして、HEK293 細胞に lipofectamine 法により共強制発現させた。蛍光ラベルした抗 HA 抗体による免疫蛍光染色により、human MRT1b の細胞内分布を確認した。また、抗 HA 抗体にて免疫沈降を行い、RIPA バッファーで洗った後 SDS-PAGE/ウエスタンブロットを行い、抗 Myc 抗体にて免疫共沈降を確認した。

C. 研究結果

(1)PCP に発達依存的応答を示す遺伝子の検索

PCP に発達依存的応答を示す遺伝子として、マウスおよびラット大脳新皮質から、PCP (5mg/kg) 急性投与後において、生後 8 日齢では発現が変化しないが、生後 56 日齢では明らかに増加する遺伝子 *prt4* (phencyclidine responsive transcript 4) を、新たに検出した。予備的実験では、生後 56 日齢における PCP 誘発性増加は抗精神病薬 haloperidol により有意な影響を受けなかった。

(2)ヒト MRT1b 蛋白と相互作用をもつ分子の検索

RACE 法により、ヒト MRT1a, MRT1b に相当する遺伝子のクローンをそれぞれ得た。ヒト *mrt1b* はラット *mrt1b* と遺伝子レベルで 92.9%、アミノ酸レベルで 98.1% の相同性を持つことがわかった。細胞内強制発現では、*mrt1b* は細胞質に広く分布するパターンを示した。このヒト *Mrt1b* を bait にした Two Hybrid Screening により、140 個の陽性クローンを得、すべてをシークエンスした結果、独立クローンは 63 種類であった。*ferritin* などの高頻度偽陽性を除外した上で、現在までに 13 クローンを免疫共沈降にかけ、うち 6 つのクローンで免疫共沈降が確認された。これらを *mrt1b*-interacting proteins (mips) と命名し、*mip1*-*mip6* と番号をつけた。2 つが既知蛋白、4 つが未知蛋白であった。残りのクローンについても、順次免疫共沈降により検討中である。