

- norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3, 465-71 (2000).
6. Sora, I. et al. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5300-5. (2001).
  7. Seiden, L. S., Sabol, K. E. & Ricaurte, G. A. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 639-77 (1993).
  8. Ellinwood, E. H., Jr., Sudilovsky, A. & Nelson, L. M. Evolving behavior in the clinical and experimental amphetamine (model) psychosis. *Am J Psychiatry* 130, 1088-93 (1973).
  9. Sato, M., Numachi, Y. & Hamamura, T. Relapse of paranoid psychotic state in methamphetamine model of schizophrenia. *Schizophr Bull* 18, 115-22 (1992).
  10. Robinson, T. E. & Becker, J. B. 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).
  11. Kalivas, P. W. & Stewart, J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16, 223-44 (1991).
  12. Pierce, R. C. & Kalivas, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 192-216. (1997).
  13. Badiani, A., Anagnostaras, S. G. & Robinson, T. E. The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. *Psychopharmacology (Berl)* 117, 443-52 (1995).
  14. Bardo, M. T. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 12, 37-67 (1998).
  15. Kelley, A. E. & Berridge, K. C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22, 3306-11 (2002).
  16. Freed, C. et al. Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 359, 340-9 (1995).
  17. Sesack, S. R., Hawrylak, V. A., Matus, C., Guido, M. A. & Levey, A. I. Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* 18, 2697-708. (1998).
  18. Di Chiara, G., Tanda, G. L., Frau, R. & Carboni, E. Heterologous monoamine reuptake: lack of transmitter specificity of neuron-specific carriers. *Neurochem Int* 20 Suppl, 231S-235S. (1992).
  19. Tanda, G., Pontieri, F. E., Frau, R. & Di Chiara, G. Contribution of blockade of

- the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* 9, 2077-85. (1997).
20. Yamamoto, B. K. & Novotney, S. Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71, 274-80. (1998).
  21. Berridge, C. W., Stratford, T. L., Foote, S. L. & Kelley, A. E. Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse* 27, 230-41. (1997).
  22. Giros, B. et al. Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269, 15985-8 (1994).
  23. Gu, H., Wall, S. C. & Rudnick, G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* 269, 7124-30 (1994).
  24. Tzschentke, T. M. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol* 63, 241-320. (2001).
  25. Sekine, Y. et al. Methamphetamine-related psychiatric symptoms and reduced brain dopamine transporters studied with PET. *Am J Psychiatry* 158, 1206-14 (2001).
  26. Rioux, A. et al. Adaptive changes of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in mice lacking the serotonin transporter. *Neurosci Lett* 262, 113-6. (1999).
  27. Li, Q., Wichems, C., Heils, A., Lesch, K. P. & Murphy, D. L. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT<sub>1A</sub>) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. *J Neurosci* 20, 7888-95. (2000).
  28. Fabre, V. et al. Altered expression and functions of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci* 12, 2299-310. (2000).

Table 1. The basal levels (fmol/10min) of extracellular DA and 5-HT in the CPu and NAc.

genotype		NAc			PFC		
DAT	SERT	n	DA	5-HT	n	DA	5-HT
+/+	+/+	16	17.79±1.69	1.19±0.08	10	2.11±0.11	3.05±0.36
+/+	-/-	15	16.23±2.23	15.50±4.20*	9	2.52±0.35	25.55±3.18*
-/-	+/+	14	188.17±23.00*	1.19±0.43	9	2.32±0.32	3.28±0.47
-/-	-/-	14	275.34±38.47*.*	13.42±2.36*	9	2.22±0.15	17.06±2.61*

Values are mean ( $\pm$ SEM) of basal levels. \*,  $P < 0.0001$  compared to wildtype mice; #,  $P < 0.001$  compared to DAT<sup>-/-</sup> mice.

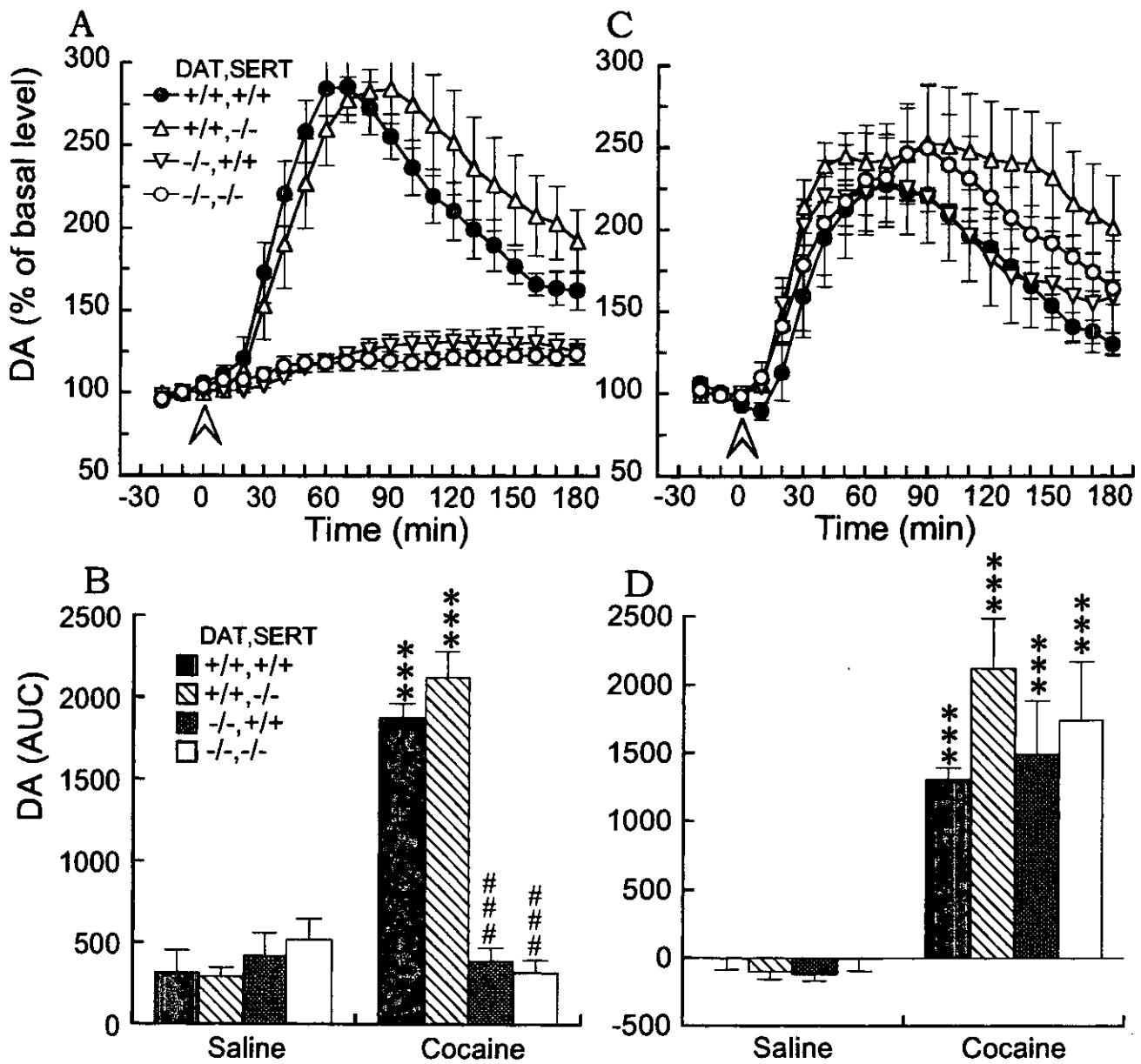


Fig. 1. A and C: Temporal pattern of DA response to cocaine (1 mg/kg, s.c.) in the NAc and PFC. Each point represents mean ( $\pm$ SEM) of the percentage of basal DA level. The time of injections is indicated with an arrow. B and D: Histogram represents mean AUC ( $\pm$ SEM) of DA response to saline or cocaine in the NAc and PFC during 180 min interval after injection. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to saline group of same genotype; ###,  $P < 0.001$  compared to cocaine-treated wildtype group.

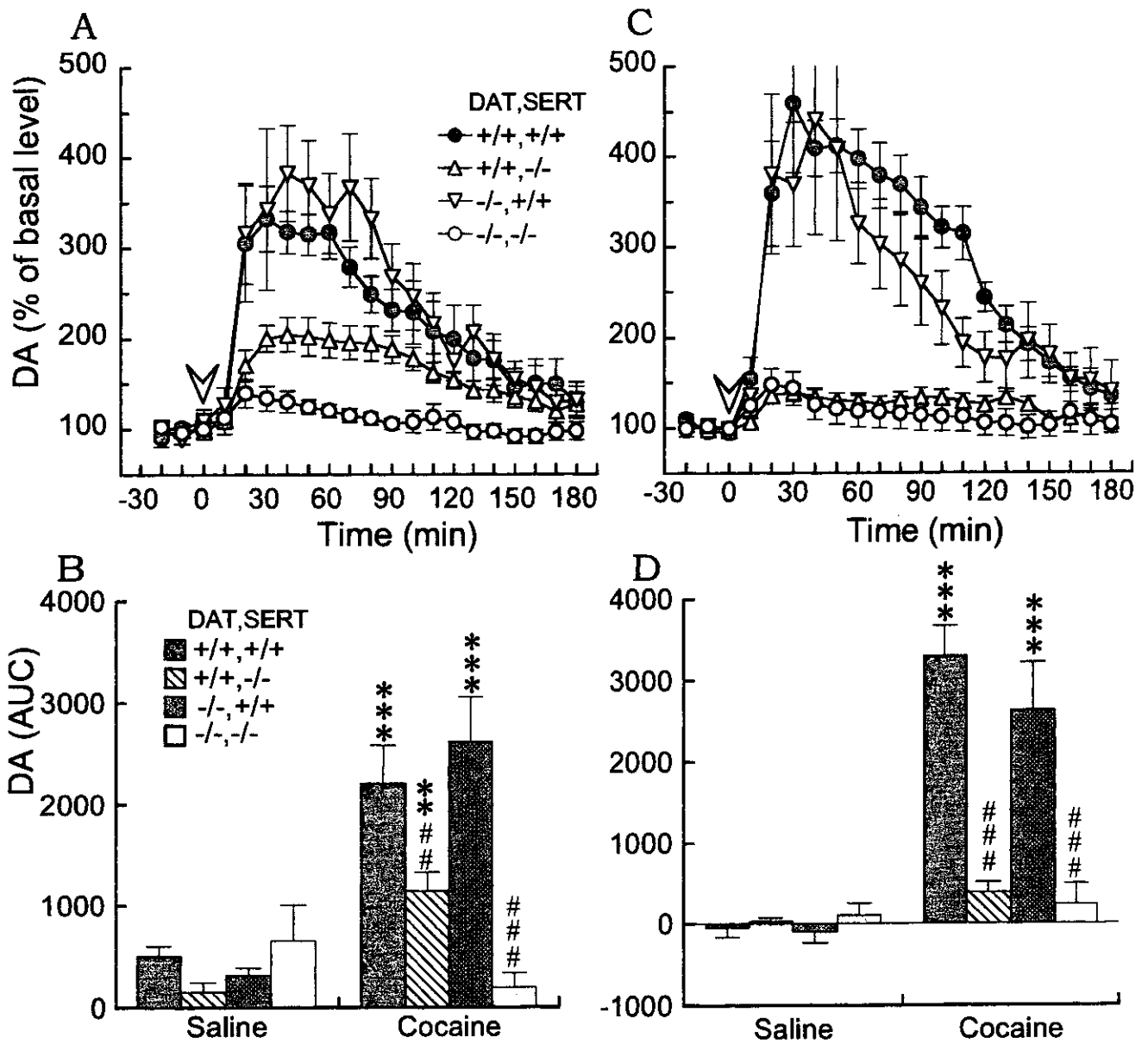


Fig. 2. A and C: Temporal pattern of 5-HT response to cocaine (1 mg/kg, s.c.) in the NAc and PFC. B and D: Histogram represents mean AUC ( $\pm$ SEM) of 5-HT response to saline or cocaine in the NAc and PFC during 180 min interval after injection. \*\*,  $P < 0.05$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to saline group of same genotype; ##,  $P < 0.01$ , ###,  $P < 0.001$  compared to cocaine-treated wildtype group.

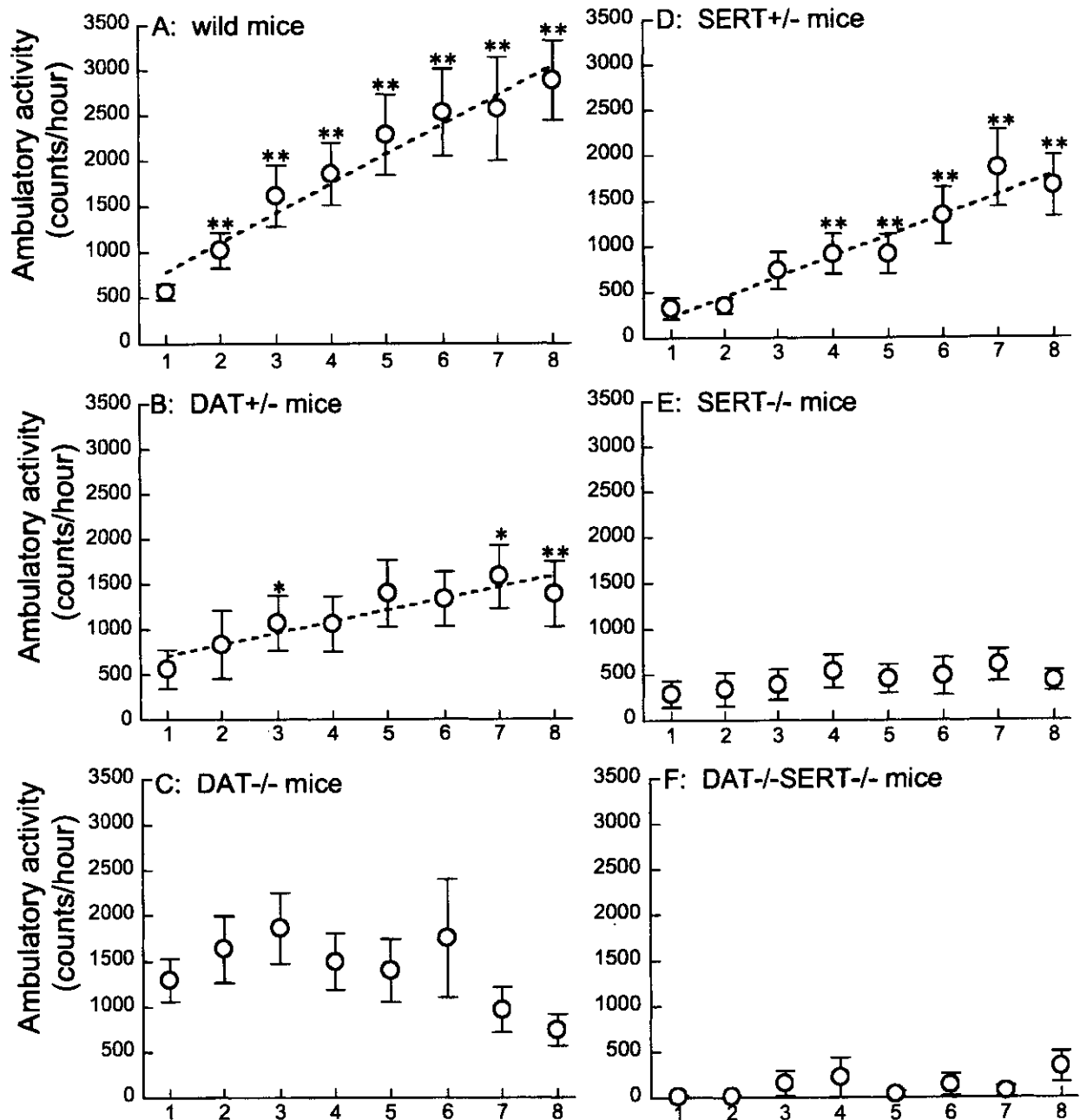


Fig. 3. The ambulatory activity during 60 min (mean  $\pm$  S.E.M) post-repeated injections of MAP (1mg/kg, s.c.) at intervals of 2 days (session 1 to 7), and re-challenge after a break of 1 week (session 8). Repeated injections caused locomotor sensitization in wild, DAT+/- and SERT+/- mice (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. post-initial injection, respectively; paired t-test). The dashed line represents linear regression of the average ambulatory activity during 60 min after injections. The slopes of linear regressions in DAT+/- mice is lower than that in wild mice ( $p < 0.05$ , Student's t-test).

## 分担研究報告書

### 覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究

分担研究者 船田正彦  
研究協力者 周暁華、佐藤美緒、和田清

国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部

#### [研究要旨]

薬物投与による遺伝子発現の変動を探索する方法として、近年開発された DNA chip 法（マイクロアレイ法）が注目されている。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依存形成の責任遺伝子の同定にも応用が期待できる。そこで、本研究では覚せい剤である methamphetamine (MAP) 慢性投与による逆耐性および精神依存動物モデルを作成し、同一条件で多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、MAP 慢性投与後および休薬時において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを行った。

ICR 系雄性マウスを使用し、MAP (2 mg/kg, s.c.) は1日1回7日間に渡って慢性投与した。運動活性に対する影響を検討したところ、MAP 慢性投与群では、MAP 投与による自発運動亢進作用の増感作用が認められ、この効果は MAP 慢性投与終了7日後においても持続していた。同様に、conditioned place preference (CPP)法により精神依存形成の評価を行ったところ、MAP (2 mg/kg, s.c., 1日1回) 7日間の条件付けで place preference の発現が認められた。この効果は、条件付け終了7日間後においても維持されていた。以上の結果から、今回用いた MAP 投与スケジュールでは、MAP の精神依存および運動活性における逆耐性が形成されていることを確認した。

この MAP 慢性投与スケジュールに従って、MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与24時間後、MAP (2 mg/kg, s.c., 7日間) 慢性投与24時間後および MAP 慢性投与7日後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である腹側被蓋野を含有する midbrain を分画し、mRNA の抽出を行った。マイクロアレイ法により、900種の遺伝子の発現を検討し、安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した。MAP 休薬群での変動は、21個の遺伝子が増加(1.5倍以上)し、4個の遺伝子が低下(1.5倍以下)していた。一方、MAP 休薬群と MAP 急性投与群および MAP 慢性投与群を比較解析したところ、MAP 急性投与から休薬期間まで変動が維持される遺伝子4(既知:1, 未知:3)個を見出した。既知遺伝子である glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) は、MAP 急性投与24時間後から休薬後までの長期間に渡り持続した増加が認められた。そこで、GILZ antisense を作製し MAP 逆耐性形成に対する影響を検討したところ、GILZ antisense の前処置により、MAP 逆耐性形成は抑制された。また、GILZ は corticosterone により誘導されることが知られている。そこで、MAP 慢性投与群に MAP を再投与した場合の血中 corticosterone 量を測定したところ有意な増加が認められた。さらに、MAP 逆耐性の発現は glucocorticoid 受容体拮抗薬 mifepristone および Raf-1 拮抗薬 GW-5074 の前処置により有意に抑制された。

今回用いた MAP 投与スケジュールでは、MAP の精神依存および運動活性における逆耐性が形成されていることを確認した。この MAP 精神依存マウスの midbrain における遺伝子発現変化を検討し、MAP 急性投与後から休薬時まで変動が維持されている遺伝子 GILZ を見出した。MAP 慢性投与により下垂体副腎系の制御に障害が生じ、MAP による corticosterone 分泌の増加が GILZ の誘導を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、GILZ はプロテインキナーゼカスケードのうち Raf-1 の機能を調節し、MAP 逆耐性の発現に関与していると推察された。

#### A. 目的

近年、薬物依存の発症機序やその病態について、脳内の遺伝子発現の変化という観点から精力的な研究がなされている。薬物依存関連遺伝子の同定は、薬物依存の診断の指標となり、更には原因遺伝子をターゲットにした遺伝子治療および新規治

療薬開発への応用が可能になると予想される。

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、近年開発された DNA chip 法（マイクロアレイ法）が注目されている<sup>8)</sup>。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依

存形成の原因遺伝子の同定にも応用が期待できる。

本研究では同時に多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、覚せい剤である methamphetamine (MAP) の急性投与、慢性投与および休薬時において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを試みた。

## B. 方法

使用動物：すべての実験には、ICR 系雄性マウス (20 - 25g) を使用した。

### 1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (2 mg/kg, s.c.) は1日1回7日間に渡って慢性投与した。MAP 慢性投与終了後、24 時間および7日後に MAP (1 mg/kg, s.c.) 投与により誘発される運動活性を自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて検討した (Table 1)。

Table 1. MAP 投与スケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	○	○

↑ : MAP (2 mg/kg, s.c.)

○ : MAP (2 mg/kg, s.c.)

### 2. MAP 精神依存形成の評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP)法を用いた。白黒2区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、MAP (2 mg/kg, s.c.) を1日1回投与し、50 分間装置内に閉じ込め、7 日間にわたって条件付けを行った (Table 2)。対照群は溶媒である生理食塩水を投与し、MAP および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした。テストセッションとしては、条件付け 24 時間および7日後に薬物溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 2. MAP 条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	T	T

↑ : MAP (2 mg/kg, s.c.)、溶媒

T : テスト

### 3. マイクロアレイ法

MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間後、MAP 慢性投与 (7 日間) 24 時間後および休薬後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である ventral tegmental area (VTA) を含有する midbrain を分画<sup>2)</sup>し、mRNA の抽出を行った (Figure 1)。ラベル方法としては、プライマーとして oligo dT(18) primer (300 pmol) を

使用し、polyA RNA を鋳型として reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3-dUTP および Cy5-dUTP を取込ませた。また、内部標準物質として lambda polyA RNA (50 pg) を反応時に等量ずつ添加した。遺伝子発現のスクリーニングは IntelliGene (Mouse CHIP Set I, 宝酒造: <http://bio.takara.co.jp/catalog>) を用いて行った。Cy3 および Cy5 の各波長は、Affymetrix 428 Array Scanner により検出した。データの解析には、BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2.を用いた。Cy3-dUTP および Cy5-dUTP ラベルによる蛍光強度から scatter plot を作製し、内部標準物質として加えた lambda および house keeping ( $\beta$ -actin) 遺伝子の発現蛍光強度に対する変化率を算出し、1.5 倍以上の変動が認められた遺伝子群を抽出した。

### MAPによる遺伝子発現の変化

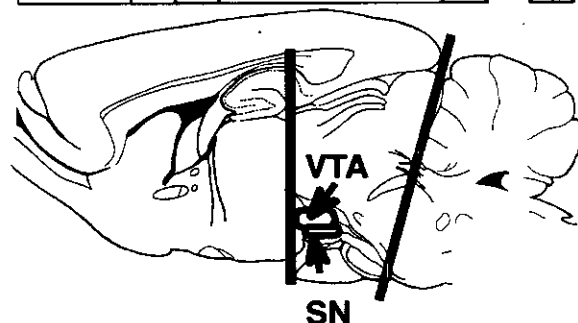
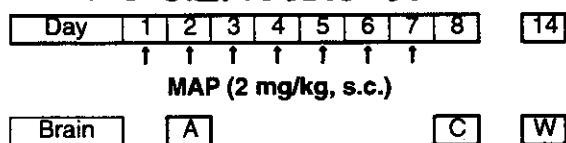


Figure 1. Schedule of MAP treatment and diagram showing location of coronal sections of midbrain tested. A: Acute treatment of MAP, C: Chronic treatment of MAP, W: MAP withdrawal

### 4. MAP 逆耐性形成およびその発現における glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割

GILZ antisense 前処置の影響 : GILZ S 化 antisense を設計し、MAP (2 mg/kg, s.c., 7 日間) 慢性投与により発現する逆耐性形成に対する影響を検討した。GILZ antisense (5 nmol/icv) は MAP 投与開始前 3 日間および MAP 慢性投与期間中 1 日置きに投与した。また、GILZ mRNA の変動は RT-PCR 法にて確認した。Glucocorticoid 受容体の役割 : MAP (2 mg/kg, s.c.) 6 日間投与後、glucocorticoid 受容体拮抗薬である mifepristone (15 mg/kg, i.p.) を MAP (2 mg/kg, s.c.) 再投与 30 分前に処置し、MAP 逆耐性発現に対する影響を検討した。Corticosterone 定量 : MAP (2 mg/kg, s.c.) 6



日間投与後、MAP (2 mg/kg, s.c.) を再投与し 20 分後に採血し、血中 corticosterone 濃度を EIA 法にて測定した。Raf-1 の役割: MAP (2 mg/kg, s.c.) 6 日間投与後、選択的 Raf-1 拮抗薬である GW-5074 (2 nmol/icv) を MAP (2 mg/kg, s.c.) 再投与 15 分前に処置し、MAP 逆耐性発現に対する影響を検討した。

### C. 結果

#### 1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (2 mg/kg, s.c.) 急性投与により、有意な自発運動亢進作用が認められた (Figure 2A)。MAP 慢性投与群では、MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与による自発運動亢進作用が認められ、この効果は MAP 急性投与群に比較して有意に増加していた。MAP 慢性投与群におけるこの効果は MAP 慢性投与終了 7 日後においても持続していた。

#### 2. MAP 精神依存形成の評価

生理食塩液により条件付けしたマウスでは place preference および place aversion の発現は認められなかった (Figure 2B)。一方、MAP の条件付け終了 24 時間後にテストを行ったところ有意な place preference の発現が認められた (139.4±36.7 sec)。この効果は、条件付け終了後、7 日目においても維持されていた (150.8±51.3 sec)。

#### 3. 遺伝子発現の変化

マイクロアレイ法により 900 種の遺伝子の発現変化を検討した結果、MAP 急性投与群では 708 種、MAP 慢性投与群では 698 種および MAP 休薬群では 696 種の遺伝子において安定した発現量が認められた。安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した (Figure 3, Table 3)。MAP 休薬群においては、21 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、4 個の遺伝子が低下 (1.5 倍以下) していた。また、MAP 休薬群を中心に MAP 急性投与群および慢性投与群を比較解析したところ、慢性投与から休薬時まで変動が維持される遺伝子は 7 (増加 3、減少 4) 個であった。MAP 急性投与、慢性投与および休薬時まで変動が維持されている遺伝子としては、glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) および未知遺伝子 3 個であった。

#### 4. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割

MAP 慢性投与時に GILZ antisense を前処置したところ、MAP 逆耐性形成が有意に抑制された (Figure 4)。また、MAP 慢性投与後、MAP を再投与したところ血中 corticosterone 量は有

意に増加していた (Figure 5A)。さらに、MAP 慢性投与後、glucocorticoid 受容体拮抗薬である mifepristone を MAP 再投与前に処置したところ MAP 逆耐性の発現は有意に抑制された (Figure 5B)。同様に、MAP 慢性投与後、選択的 Raf-1 拮抗薬である GW-5074 を MAP 再投与前に処置したところ MAP 逆耐性の発現は有意に抑制された (Figure 6)。

### D. 考察

MAP (2 mg/kg, s.c.) の 7 日間慢性投与による行動変化について検討したところ、MAP 自発運動亢進作用において増感現象、すなわち逆耐性の形成が確認された。また、この効果は休薬 7 日後においても維持されていた。さらに、同様の MAP 投与スケジュールで条件付けを行い、MAP 報酬効果を評価したところ、MAP による place preference の発現が確認され、この効果は条件付け 7 日後においても維持されていた。したがって、今回用いた MAP 投与スケジュールで、MAP の逆耐性および精神依存モデル動物の作成が可能であることを確認した。

覚せい剤による逆耐性および精神依存形成には中脳辺縁系ドパミン神経系の関与が示唆されている<sup>7,10)</sup>。そこで、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である VTA を含有する midbrain を標的部位として、マイクロアレイによる遺伝子発現の変動を検討した。MAP 休薬群を中心に解析を行い、(1) MAP 休薬のみ、(2) MAP 慢性投与および休薬で変化が維持されるもしくは(3) MAP 急性から休薬時まで変化が維持される遺伝子を同定した。今回の解析で特に興味深いものとして、MAP 急性投与 24 時間後から休薬時まで長期間 mRNA レベルの増加が認められた glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割について検討した。GILZ antisense の前処置により MAP 逆耐性形成が抑制されることから、GILZ mRNA の誘導は MAP 逆耐性の形成に関与することが明らかになった。一方、GILZ は glucocorticoid によりその発現が誘導される遺伝子群として同定された経緯があることから、MAP 逆耐性発現における glucocorticoid 受容体の役割および血中 corticosterone 変動について検討した。その結果、glucocorticoid 受容体の遮断により MAP 逆耐性発現は抑制された。同時に、MAP 慢性投与群では MAP の再投与により血中 corticosterone 量が増加しており、glucocorticoid 受容体の活性化を介して、逆耐性が発現していることが明らかになった。また、MAP 急性投与では、血中 corticosterone 量に有意な影響は認められなかったことから、MAP 慢性投与によって下垂体副腎系の制御に異常が生じている可能性が示唆され

た。MAP の逆耐性形成において中脳辺縁ドーパミン神経系が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>7,10</sup>。生体内の corticosterone 量の変動は中脳辺縁ドーパミン神経系に影響を与えることが報告されていることから<sup>8</sup>、おそらく、MAP 慢性投与によって生じる下垂体副腎系の異常がドーパミン神経系に影響を与えているものと考えられる。

最近になって、GILZ が Raf-1 結合能を有することが報告され、GILZ の作用点として Raf-1 が注目されている<sup>9</sup>。そこで、MAP 逆耐性発現における Raf-1 の役割を検討した。選択的 Raf-1 拮抗薬の前処置により、MAP 逆耐性発現は抑制された。したがって、MAP 逆耐性発現に Raf-1 が関与していることが明確になった。Raf-1 は MAP スーパーファミリーの一員であり特に、ERK1/2などのMAPK上流に位置するMAPKKKである。MAPKは、MAP逆耐性の発現に関与することが報告されている<sup>9</sup>。したがって、GILZによるRaf-1の制御はMAPKの機能に影響を与えているものと考えられる。一方、以前の研究では、MAPが転写因子であるAP-1の活性を増加させること<sup>4</sup>、さらに依存性薬物の慢性投与によりc-FosとAP-1の複合体機能が長期間に渡り変化していることが明らかにされている<sup>3</sup>。GILZの役割としてAP-1の転写機能を調節することが報告されている<sup>6</sup>。したがって、MAP慢性投与によるGILZの増加は、MAP精神依存形成およびその維持に関与するAP-1などの各種転写過程の適応を引き起こす重要な因子であるかもしれない。

今後は、中脳辺縁系ドーパミン神経系の主要投射先である limbic forebrain (nucleus accumbens) における mRNA 変動に関する詳細な検討も加え、GILZ の機能解析を行う予定である。

## E. 結論

マイクロアレイ法は多数の遺伝子群から薬物の慢性投与で特異的な変動を示す遺伝子を同定し、行動や細胞内情報伝達系の変化を含めて、解析すべき遺伝子の決定に有用である。今回の解析結果から MAP 急性投与から休業時までの長期間変動が維持される GILZ を見い出し、MAP 逆耐性形成に関与することを明らかにした。今後は、中脳辺縁系ドーパミン神経系の主要投射先である limbic forebrain (nucleus accumbens) における mRNA 変動に関する詳細な検討も加え、MAP 精神依存および逆耐性形成に関与する遺伝子候補を抽出する予定である。

## [参考文献]

1) Ayroldi E., Zollo O., Macchiarulo A., et al.: Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase

pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol.*, 22(22): 7929-7941, 2002.

- 2) Franklin K.B.J., Paxinos G.: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego 1997.
- 3) Hope H.E., Nye M.B., Kelz D.W. et al.: Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of the altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatment. *Neuron*, 13, 1235-1244, 1994.
- 4) Lee Y.W., Hennig B., Yao J. et al.: Methamphetamine induces AP-1 and NF-kappaB binding and transactivation in human brain endothelial cells. *J Neurosci Res*, 66: 583-591, 2001.
- 5) Louk J. M., Vanderschuren J., Donne Schmidt, E., et al.: A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J. Neurosci.*, 19(21): 9579-9586, 1999.
- 6) Mittelstadt P.R., Ashwell J.D.: Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*, 276, 29603-29610, 2001.
- 7) Pierce R.C., Kalivas P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 192-216, 1997.
- 8) Tanaka T., Jaradat S.A., Lim M.K.: Genomic-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 9127-9131, 2000.
- 9) Ujike H., Takaki M., Kodama M., et al.: Gene expression related to synaptogenesis, neuriteogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. *Ann N Y Acad Sci.*, 965: 55-67, 2002.
- 10) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*, 51: 141-153, 1998.

## F. 研究業績

### [論文発表]

Funada M., Sato M., Makino Y., Wada K: Evaluation of rewarding effect of toluene by the conditioned place preference procedure in mice. *Brain Res Proto* 10(1): 47-57, (2002).

Sato M., Wada K., Funada M.: Alternation of kappa opioid receptor protein following the administration of phencyclidine. *J. Mental Health*, 48, 59-66, (2002).

Matsui M., Funada M.: Recent progress in the research of the muscarinic acetylcholine receptor subtypes and related diseases. *J. Mental Health*, 48, 43-51, (2002).

### [学会発表]

Funada M., Sato M., Makino Y., Wada K: Role of the dopamine receptor on the abused solvent toluene-induced rewarding effect in mice. College on Problems of Drug Dependence, 64th Annual Scientific Meeting, Quebec City, (2002).

船田正彦、佐藤美緒、周曉華、和田清：トルエン精神依存形成におけるドーパミン神経系の役割。第32回日本神経精神薬理学会年会、前橋, (2002)。

Funada M.: Conditioned place preference paradigm: a simple and effective method for assessing the rewarding effect of drug. Jpn. Medical society of alcohol & drug studies. Annual Scientific Meeting, Tokyo, (2002).

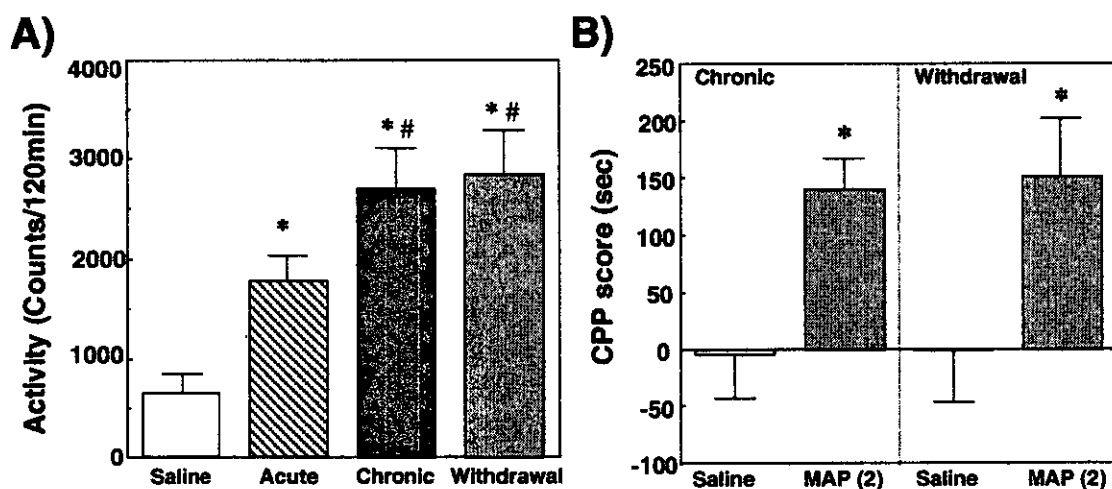


Figure 2. A) Effect of acute or chronic treatment with methamphetamine on methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice. Total locomotor activity changes in methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice by chronic treatment with MAP (2 mg/kg, s.c.) for 7 days. Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 14 animals for 120 min after MAP treatment. B) Place conditioning produced by methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.). Conditioning sessions (7 for MAP; 7 for saline) were conducted. On day 8 (Chronic) or 14 (Withdrawal), test of conditioning was performed. Conditioning scores represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 12 - 14 animals. A) \*P<0.05 vs. saline control. #P<0.05 vs. acute administration of MAP, B) \*P<0.05 vs. saline control.

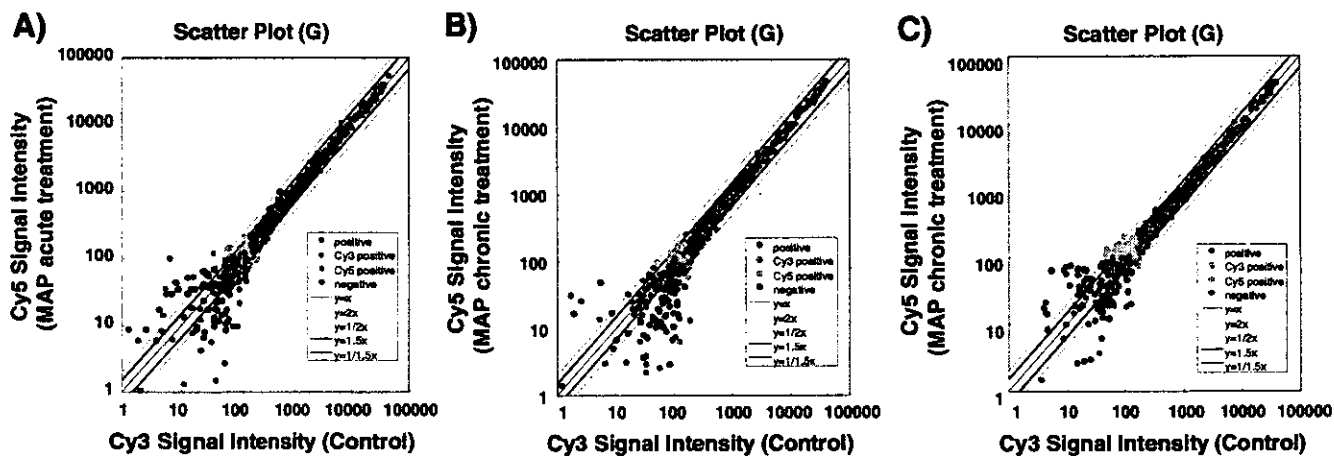


Figure 3. Expression profiling of 900 genes between methamphetamine (MAP) treatment and saline (Control) treatment. For each gene, average expression levels were calculated from two independent hybridization for midbrain, and displayed on a scatter plot. A) Effect of acute treatment with MAP, B) Effect of chronic treatment with MAP, C) Effect of MAP withdrawal.

Table 3. List of genes increased expression and decreased expression in the mouse midbrain.

Gene	GeneBank	Fold change		
		A	C	W
inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa	U52044	1.08	1.96	2.19
SH3-domain binding protein 1	X87671	0.99	1.09	2.07
adenylate cyclase 7	U12919	1.18	0.91	2.06
mastocytoma N-deacetylase/N-sulfotransferase	U02304	1.18	1.14	2.00
procollagen, type XI, alpha 1	D88182	0.65	1.34	1.65
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	U34920	1.00	1.54	1.54
Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	D37674	1.25	1.39	1.70
Mouse gene for beta-1-globin	V00722	1.58	1.13	1.56
neuropeptide nociceptin 1	D82868	1.21	1.23	1.65
regulator of G-protein signaling 5	U87188	1.08	1.08	1.57
erythrocyte protein band 7.2	U17297	0.87	0.92	1.48
zinc finger protein 100	U22396	0.95	0.87	1.45
galactokinase	AB027012	0.95	1.06	1.33
splicing factor (SRp20)	X91858	0.98	1.14	1.52
glucocorticoid-induced leucine zipper	NM 010298	1.50	1.53	1.50
ret finger protein	L46856	0.93	0.87	1.50
ESTs	AI324037	1.5	1.23	1.71
ESTs	AI464960	0.89	1.00	1.43
ESTs	AW414348	1.07	1.09	1.55
ESTs	AA049357	0.99	1.01	1.52
ESTs	AJ787266	1.12	1.17	1.61
Increase				21(16)

Gene	GeneBank	Fold change		
		A	C	W
ESTs	AW012359	0.68	0.66	0.65
ESTs	AI327145	0.61	0.61	0.64
ESTs	AI314061	0.50	0.46	0.61
ESTs	AW556570	0.43	0.46	0.60
Decrease				4

List of genes increased expression (A) and decreased expression (B) in the mouse midbrain. A: Acute treatment with methamphetamine. C: Chronic treatment with methamphetamine. W: methamphetamine withdrawal. A) The number of specific genes in methamphetamine withdrawal group was 16.

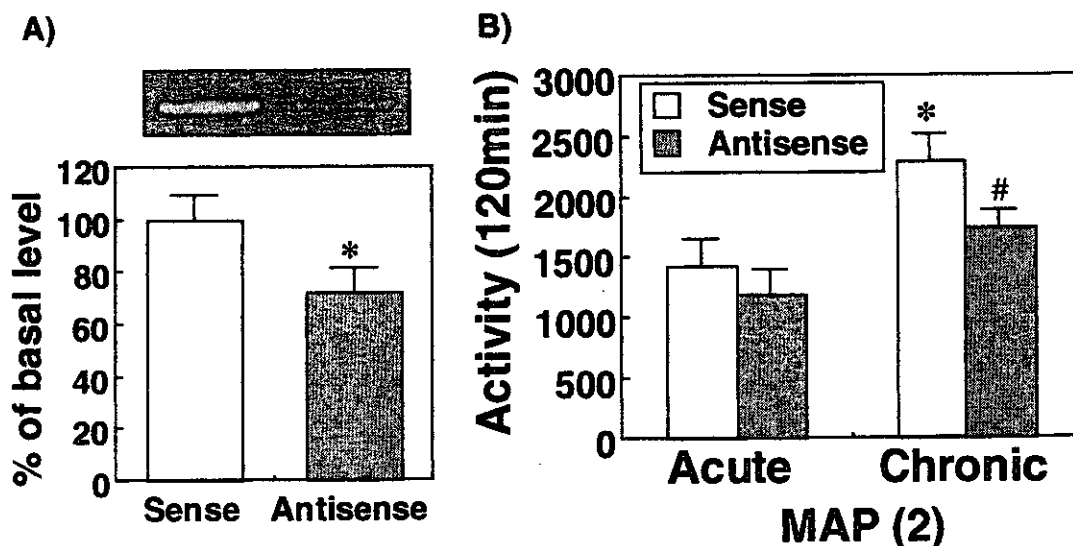


Figure 4. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) on the expression of methamphetamine-induced sensitization in mice. A) Effect of treatment with GILZ antisense (5 nmol/icv, 3 days) on the GILZ mRNA in the mouse midbrain. B) Effect of pretreatment with GILZ antisense on the expression of methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice. \*P<0.05 vs. sense-pretreated acute treatment with MAP group, #P<0.05 vs. sense-pretreated chronic treatment with MAP group.

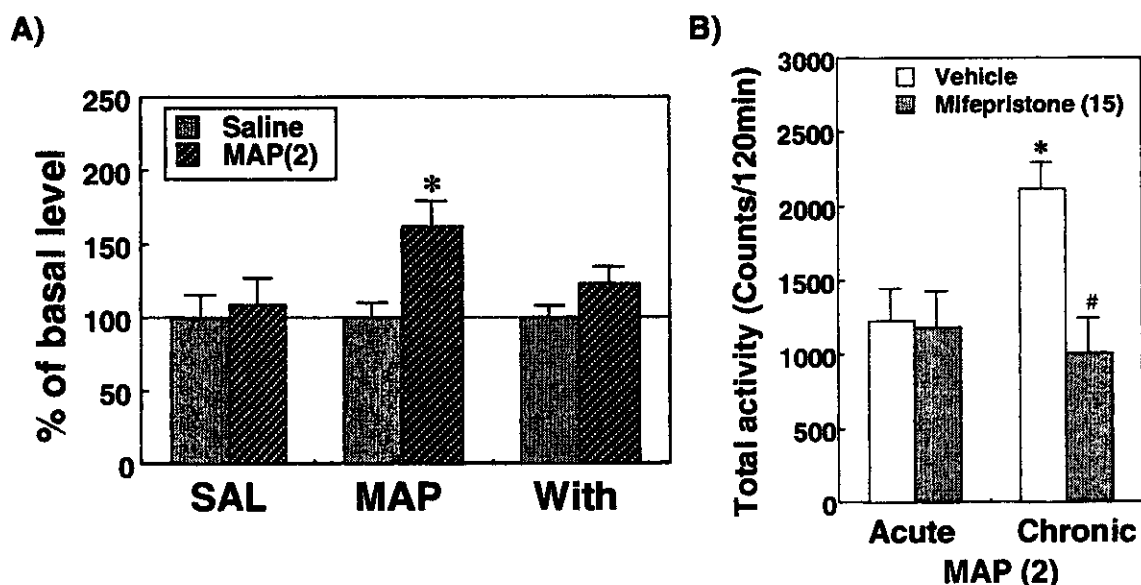


Figure 5. A) Effect of the administration of methamphetamine on the plasma concentrations of corticosterone. Plasma concentrations of corticosterone in chronic treatment with methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.) for 7 days. Each column represents the mean plasma concentrations of corticosterone with S.E.M. of 6 animals at 20 min after MAP treatment. SAL: saline, MAP: Chronic treatment with MAP, With: MAP withdrawal. \* $P < 0.05$  vs. Sal-treated MAP group. B) Effect of glucocorticoid receptor antagonist mifepristone (15 mg/kg, i.p.) on the expression of MAP (2 mg/kg, s.c.)-induced sensitization in mice. \* $P < 0.05$  vs. vehicle-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$  vs. vehicle-pretreated chronic treatment with MAP group.

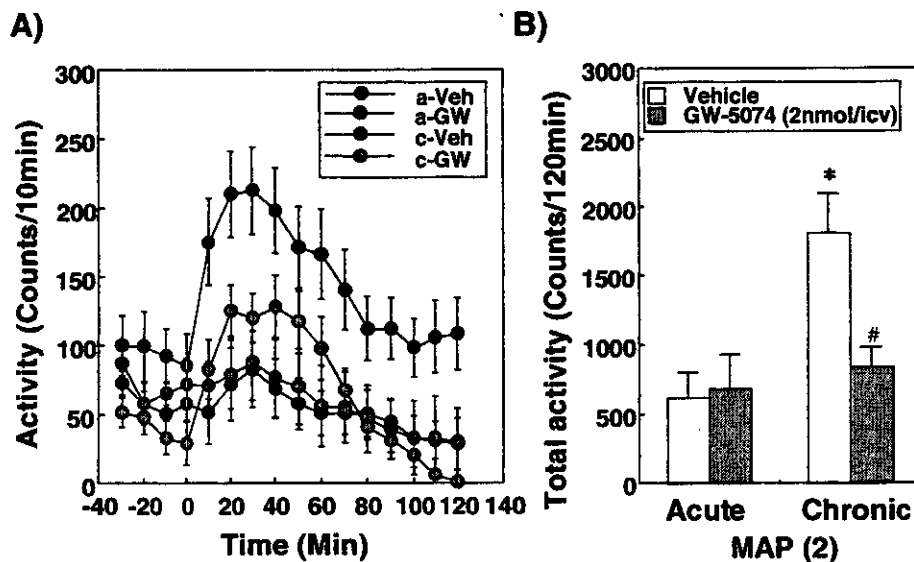


Figure 6. Effect of pretreatment with Raf-1 inhibitor GW-5074 on the expression of methamphetamine-induced sensitization in mice. A) Time course changes in methamphetamine (MAP 2 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice by chronic treatment with MAP (2 mg/kg, s.c.) for 6 days. Each plot represents the mean locomotor activity counts with S.E.M. of 12 - 14 animals. B) Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 12 - 14 animals for 120 min after MAP treatment. a-Veh: vehicle-pretreated acute MAP group, a-GW: GW-5074-pretreated acute MAP group, c-Veh: vehicle-pretreated chronic MAP group, c-GW: GW-5074-pretreated chronic MAP group. \* $P < 0.05$  vs. vehicle-pretreated acute treatment with MAP group, # $P < 0.05$  vs. vehicle-pretreated chronic treatment with MAP group.

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

メタンフェタミンによるドパミン神経毒性に關与する PAG608 の  
作用機構の解析と非ステロイド性消炎鎮痛薬投与の効果に関する検討

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

研究協力者：宮崎育子，東 洋一郎，辻 武史，小川紀雄

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

研究要旨

アポトーシス関連蛋白 p53 により誘導される分子であり，昨年度その発現抑制によりメタンフェタミン(METH)によるドパミン神経毒性が抑制されることを明らかにできた p53-activated gene 608 (PAG608) の，酸化ストレスによる培養神経細胞のアポトーシスにおける作用機構について検討した。

PAG608 の発現抑制により 6-hydroxydopamine (6-OHDA)によるアポトーシスがほぼ完全に抑制され，6-OHDA 添加によって惹起されるミトコンドリアの膜電位の低下，p53, Bax 発現の誘導が著明に抑制されること，PAG608 は逆に p53 発現を誘導しうることを明らかにし，元来 p53 によって誘導される分子とされている PAG608 は酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて，ミトコンドリア障害より上流の過程で，逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し，ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起している可能性を示した。

METH 大量投与によって惹起されるマウス線条体のドパミン神経終末の障害に対する非ステロイド性消炎鎮痛薬投与の影響について検討した。METH 大量投与による線条体ドパミントランスポーターの脱落ならびにミクログリアの増殖に対してインドメタシン，イブプロフェン，ケトプロフェン投与が保護・阻止効果を有することを明らかにできた。アスピリン投与では高用量でも保護効果がみられないことから，これら 3 剤の METH 急性ドパミン神経毒性に対する保護効果はシクロオキシゲナーゼ抑制効果によるものではなく，ミクログリアの増殖抑制による炎症性サイトカインや NO の生成抑制あるいは NO 消去能に基づくものと考えられる。

A. 研究目的

覚醒剤メタンフェタミン(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 自体が核内転写因子の DNA 結合を直接修飾し (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(3)。

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(4,5)、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 (6-8)。昨年度は、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 を用いた PAG608 遺伝子の発現制御により、METH 添加により惹起される細胞死ならびにアポトーシス様の形態変化が抑制されることを明らかにした。これらの結果は、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分子が活性化され神経細胞死が惹起される可能性を示している。しかし、PAG608 のドパミン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、本年度は酸化ストレスとして 6-hydroxydopamine (6-OHDA)を用い、培養ドパミン系神経細胞のアポトーシスにおける PAG608 の作用機構について検討した。

また、昨年度は METH を添加された培養神経細胞 B65 を用いて cDNA array でのプロファイリングを行い、サイトカイン類や細胞内小器官 (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)でのいくつかの標的候補分子の発現が METH により誘導あるいは抑制されることを見出した。われわれは、METH 大量投与によるドパミン神経障害時に、活性酸素種により活性化

される転写因子 NF- $\kappa$ B の線条体での DNA 結合活性が亢進することを報告した(9)。また、NF- $\kappa$ B は誘導性 NO 合成酵素(iNOS)ならびにシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 の遺伝子発現を誘導し、NO や細胞障害性サイトカイン類の生成を促進させることが知られており、METH によるドパミン神経障害時には、NO 生成が障害性に働くこと(10,11)、さらに COX 活性が亢進する(12)ことが報告されている。われわれは、いくつかの非ステロイド性消炎鎮痛薬(NSAIDs)が直接 NO 消去能を有し、NO によるドパミン神経細胞のアポトーシスを抑制することを見出している(13)。そこで、サイトカイン類の発現制御の METH 神経細胞障害への効果をみるために、マウスへの METH 大量投与によるドパミン神経終末の障害に対する NSAIDs 投与の効果について検討した。

## B. 研究方法

### 1. PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株での 6-OHDA 誘発神経毒性

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、PAG608 アンチセンス cDNA 発現 vector を作製した。10  $\mu$ 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  $\mu$ 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 細胞、PC12 細胞、PC12/CTL 細胞に、100  $\mu$ M 6-OHDA を添加し、4 時間後に蛋白質を抽出し 0.2 mM acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilide と



反応させ、これから分離されるパラニトロアニリンの吸光度を測定することでカスパーゼ-3活性を定量した。添加8時間後に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、ビオチン標識ヌクレオチドと、Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を反応させDNAの断片化を検出した(TUNEL法)。また、ミトコンドリアの膜電位の指示薬であるJC-1 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加し、正常膜電位(赤色~黄色の蛍光)と膜電位が低下している状態(緑色の蛍光)を蛍光顕微鏡により検出した。さらに、添加24時間後の細胞生存率をMTT assayの変法であるWST-1 assayにより測定した。

PC12/CTL細胞またはPC12/PAG608AS細胞に6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ )を添加し、経時的に蛋白質をRIPAバッファーで抽出した。定法に従いPAG608, p53, Bax, Bcl-2のウェスタンブロット解析をそれぞれに対する特異的抗体を用いて行った。

## 2. PAG608 過剰発現による p53 発現

PC12細胞, B65細胞にHis-野生型PAG608 (2  $\mu\text{g}$ ) をリポフェクション法によって遺伝子導入し、導入24, 48時間後に細胞より蛋白質を抽出した。PAG608ならびにp53のウェスタンブロット解析を行った。

## 3. 変異型 PAG608 導入による 6-OHDA 誘発神経細胞死と PAG608 の細胞下分布

PC12細胞にPAG608の各ドメインを欠失したHis-変異型PAG608発現ベクター

( $\Delta\text{C}582$ ,  $\Delta\text{C}741$ ,  $\Delta\text{N}207$ ,  $\Delta\text{N}522$ ) (2  $\mu\text{g}$ ) をGFP発現ベクター (1  $\mu\text{g}$ ) と共にリポフェクション法によって遺伝子導入し、24時間後から100  $\mu\text{M}$  6-OHDAを24時間暴露してGFP陽性細胞数を蛍光顕微鏡で解析した。

GFP-野生型PAG608発現ベクター(1  $\mu\text{g}$ ) をHis-野生型, 変異型PAG608発現ベクターまたは空ベクター(2  $\mu\text{g}$ )と共にリポフェクション法によってPC12細胞に遺伝子導入した。導入24時間後に細胞を4%パラホルムア

ルデヒドで固定し、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342で核染色した。GFPとHoechst33342の蛍光シグナルは蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. METH 大量投与によるドパミン神経障害に対する NSAIDs 投与の効果

雄性BALBcマウス(9週齢)にMETH (4 mg/kg, i.p.  $\times$  4回, 2時間毎)を投与し、各METH投与30分前にメチルセルロースに懸濁させたNSAIDs(低用量, 高用量のNSAIDs: インドメタシン (2 or 5 mg/kg  $\times$  4), ケトプロフェン (2 or 5 mg/kg  $\times$  4), アスピリン (40 or 100 mg/kg  $\times$  4), イブuproフェン (10 or 20 mg/kg  $\times$  4)を皮下投与した。3日後に灌流固定し、脳冠状断凍結切片を得た。ドパミン神経終末の変性は抗ドパミントランスポーター(DAT)抗体を用いた免疫染色により評価した。また、ミクログリアを抗CD11b抗体による免疫染色で検出した。

## C. 研究結果

### 1. PAG608 発現抑制の 6-OHDA 誘発アポトーシスに対する効果

PAG608 アンチセンスcDNA発現ベクターを遺伝子導入したPC12/PAG608AS細胞株ではPAG608発現が抑制されていることをウェスタンブロット法により確認した。PC12/CTL細胞, PC12/PAG608AS細胞に6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ )を24時間暴露したところ、PC12細胞とPC12/CTL細胞の細胞生存率は、それぞれ52.6%, 31.8%にまで減少した。しかし、PC12/PAG608AS細胞においては6-OHDAによる細胞生存率の低下がほぼ完全に抑制されていた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>暴露によるアポトーシスに対してもPC12/PAG608AS細胞は抵抗性であったが、p53を介さないMPP<sup>+</sup>暴露によるアポトーシスに対しては影響しなかった。6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ )添加によりPC12細胞ではカスパーゼ-3の活性化とDNAの断片化の増加, ミトコンドリアの膜電位の低下, さらにp53蛋白質またはBax蛋白質の発現増

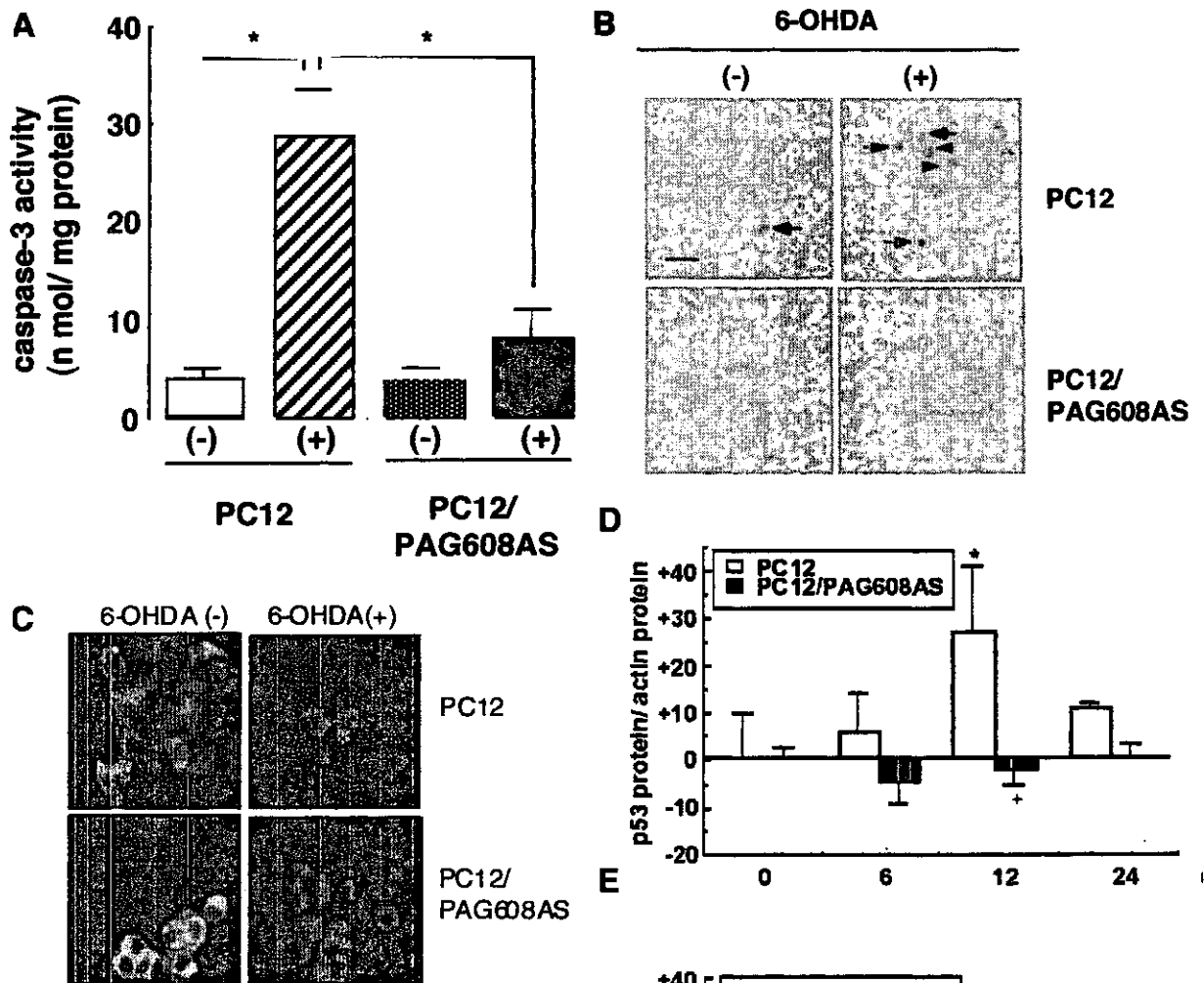


図1 PC12細胞, PAG608発現抑制  
PC12/PAG608AS細胞における6-OHDA (100  $\mu$ M) 添加4時間後のcasapase-3活性の変化(A)と8時間後のDNA断片化を示すTUNEL陽性細胞(B). 6-OHDA (100  $\mu$ M)添加8時間後のミトコンドリア膜電位の変化(C). ミトコンドリアの膜電位の変化はその指示薬JC-1 (10  $\mu$ g/ml)添加により得られる蛍光色の変化で評価した. 6-OHDA (100  $\mu$ M)添加6, 12, 24時間後のp53 (D)およびBax (E)の変化.

加が認められたが, 6-OHDA を添加された PC12/PAG608AS 細胞ではそれらの有意な変化はみられなかった (図 1) .

## 2. PAG608 過剰発現による p53 発現誘導

His-野生型 PAG608 発現ベクターを PC12 細胞, B65 細胞に導入したところ, p53 蛋白質の発現が His-PAG608 の発現増加に伴って増加していた (図 2) . 一方, C6 グリオーマ細胞に His-野生型 PAG608 を導入しても p53 蛋白質の増加はみられなかった.

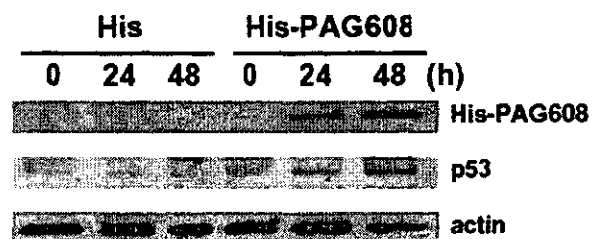


図2 PC12細胞におけるHis-PAG608過剰発現によるp53発現の経時的変化

3. 変異型 PAG608 導入による 6-OHDA 誘発神経細胞死と PAG608 の細胞下分布  
空ベクターを遺伝子導入した GFP 陽性 PC12 細胞数は 6-OHDA 添加によって減少したが、N 末端の第一ジンクフィンガードメインを欠失させた His- $\Delta$ N522 発現ベクターを導入した GFP 陽性細胞では 6-OHDA による細胞数の減少が抑制されていた。しかし、他のドメインを欠失させた変異型 PAG608 ベクターでは細胞死に影響しなかった。

空ベクターを導入した PC12 細胞では、GFP-野生型 PAG608 のシグナルが Hoechst33342 で染色された核と核小体を集積していた。一方、His- $\Delta$ N522 を導入した PC12 細胞では、GFP のシグナルがび慢性に細胞全体に認められ、PAG608 の核への局在が阻害されていた。

4. METH 投与によるドパミン神経障害に対する NSAIDs 投与の効果

METH 投与による 3 日後の線条体での DAT の脱落は、高用量のケトプロフェン、低・高用量のイブプロフェンにより軽度～中等度抑制され、低・高用量のインドメタシン投与によりほぼ完全に阻止された。しかし、アスピリンは低用量・高用量ともに METH による線条体 DAT の脱落には影響しなかった。さらに、METH 投与により惹起される線条体での著明なミクログリアの増殖は、DAT 脱落に対する効果と同様に、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン投与により抑制されたが、アスピリン投与では不変であった。

#### D. 考察

##### METH によるドパミン神経毒性に関与する PAG608 の作用機構の解析

PAG608 は p53 により誘導されアポトーシスを惹起することが報告されているが(4,5)、中枢神経系での 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

ているのか不明であった。昨年度は、アンチセンス PAG608 の遺伝子導入による PAG608 の発現制御により、METH 添加により惹起されるアポトーシスが抑制されることを明らかにし、METH により p53 ならびに PAG608 が活性化されることで、アポトーシスが惹起される可能性を示した。本年度はドパミン関連酸化ストレスによる培養神経細胞のアポトーシスにおける PAG608 の作用機構を明らかにするために、酸化ストレスとして 6-OHDA を用い検討した。アンチセンス PAG608 cDNA の導入による PAG608 の発現抑制により、6-OHDA または過酸化水素によるアポトーシスが抑制され、6-OHDA によるカスパーゼ 3 の活性化や DNA の断片化、ミトコンドリアの膜電位の低下、p53、Bax 発現の誘導が著明に抑制された。6-OHDA および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるアポトーシスでは、ミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ-3 の活性化、DNA の断片化が惹起されることが知られている。これらの結果より、6-OHDA によるアポトーシスにおいて、PAG608 はミトコンドリアの膜電位の低下の過程よりも上流で関与していることを明らかにできた。

さらに、野生型 PAG608 cDNA 発現ベクターをカテコールアミン系の PC12 細胞、B65 細胞へ導入すると p53 の発現が増加したことから、元来 p53 によって誘導される分子とされている PAG608 は酸化ストレスによるカテコールアミン系神経細胞のアポトーシスにおいては、逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していると考えられる。

また、GFP 標識野生型 PAG608 発現ベクターの PC12 細胞への遺伝子導入により、PAG608 が核と核小体を集積し分布していることを明らかにできた。さらに、PAG608 の第一ジンクフィンガードメインを欠失させた変異型 PAG608 発現ベクターの導入実験で、6-OHDA によるアポトーシスが阻止され、野

生型PAG608の核や核小体への集積が阻止されたことから、PAG608はそれ自身または他の分子と第一ジンクフィンガードメインを介して結合することで核や核小体に移行し、p53発現を誘導しアポトーシスを惹起していることが示唆された。

### METH 投与によるドパミン神経障害に対する NSAIDs 投与の効果

METH (4 mg/kg, i.p.×4回, 2時間毎)大量投与によって惹起されるマウス線条体のドパミン神経終末の障害に対する NSAIDs 投与の影響について DAT を指標にして検討したところ、NSAIDsのうちインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェンが METH 大量投与による DAT の減少ならびにミクログリアの増殖に対して保護・阻止効果があることを明らかにできた。METH によるドパミン神経障害時には、COX 活性が亢進することが知られている(12)。しかし、アスピリン投与では高用量でも保護効果がみられなかったことから、METH 急性毒性に対するインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェンの保護効果は COX 抑制効果によるものではないと考えられる。

METH大量投与時には活性酸素種で活性化される転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化され(9)、iNOS 発現が誘導され、生成された NO が神経障害性に働く(10,11)。われわれは既に、NSAIDs が NF- $\kappa$ B, COX, iNOS を阻害するだけでなく、直接 NO 消去能を有し、NO によるドパミン神経細胞のアポトーシスを抑制することを報告したが(13)、とくに NO 誘発アポトーシスに対してはインドメタシン > ケトプロフェン、メフェナム酸が高い保護効果を発揮することを見いだしている。また、ミクログリアが様々な炎症性サイトカインや NO を生成することはよく知られている。METH によるドパミン神経障害が IL-6 ノックアウトマウスでは阻止されることも報告されている(14)。したがって、今回のインドメ

タシン、イブプロフェン、ケトプロフェンの METH 急性毒性に対する保護効果は、ミクログリアの増殖抑制による炎症性サイトカインや NO 生成抑制あるいは NO 消去能に基づくものかもしれない。また、最近インドメタシン、イブプロフェンが peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist として働き、炎症性サイトカイン類の発現を抑制し、COX を介さず $\beta$ -amyloid の神経毒性を抑制することが知られている。今後、METH 投与による線条体での NF- $\kappa$ B, iNOS, PPAR $\gamma$  蛋白の誘導とそれに対する NSAIDs の効果について検討する。

### E. 結論

METH によるドパミン神経障害に関与し、p53 によって誘導される分子とされている PAG608 が、酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害より上流の過程で、逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していることを示した。また、METH 大量投与による線条体ドパミン神経変性ならびにミクログリアの増殖に対してインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン投与が保護・阻止効果を有することを明らかにした。

### F. 参考文献

- 1) 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.