

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)

規制薬物の依存及び神経毒性の発現にかかわる仕組みの
分子生物学的解明に関する研究

平成 15年度 総括研究報告

平成 13-15 年度3年間のまとめ

**Neuroscientific Research on Mechanism of Dependence and Chronic
Psychotoxicity of Regulated Drug**

Annual Report

**Supported by Grant from the Ministry of Health
And Welfare, Japan in 2003**

(Chief ; Ichiro Sora)

平成 16 年 3 月

主任研究者 曾良一郎

1. 平成13年度～15年度のまとめ総括研究報告	曾良一郎	1
2. 3年のまとめ分担研究報告		
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		11
名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部 鍋島俊隆		
メタンフェタミンの細胞内小器官での標的分子への作用と神経細胞障害の抑制に関する研究		19
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経情報学 浅沼幹人		
メタンフェタミン反復投与後のニューロン活動調節変化におけるセロトニン神経系の関与		25
広島大学大学院医歯薬学総合研究科治療薬効学 石原 熊寿 ¹		
薬物依存発症時における覚醒剤の体内動態の変化に関する研究		30
名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 長谷川高明		
覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究		36
国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部 船田正彦		
覚醒剤依存における脳内高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化とその分子機構		39
川崎医科大学薬理学教室 大熊 誠太郎		
モノアミントランスポーター欠損マウスモデルを用いた覚醒剤の分子作用機序の検討		44
東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野 曾良一郎		
覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究		60
岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野 氏家 寛		
覚せい剤精神病の遺伝子多型と脳の形態に関する相関研究		66
久留米大学医学部 精神神経科 内村 直尚		

覚醒剤精神病の精神症状と統合失調症脆弱性素因に関する研究 日本大学医学部精神神経科学 小島卓也	68
覚せい剤による神経毒性発現機所の解明とその治療に関する研究 千葉大学大学院医学研究院精神医学 伊豫雅臣	71
逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明 東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野 西川 徹	76
メタンフェタミン、フェンシクリジン投与による前シナプス側関連蛋白 mRNA と転写因子 Nurr1 mRNA の変化 獨協医科大学精神神経医学 秋山一文	84
覚醒剤精神病におけるヒスタミン神経の役割：画像医学的研究と小動物モデルの薬理学的研究 東北大学大学院医学系研究科 細胞・病態薬理学分野 谷内一彦	86
薬物精神病および統合失調症における神経系の役割に関する研究 東北福祉大学大学院精神医学 佐藤光源	88
3. 平成 15 年度総括研究者報告 曾良一郎	97
4. 平成 15 年度分担研究者報告 曾良一郎	
メタンフェタミンの神経毒性に対する腫瘍壊死因子関連治療薬の開発 分担研究者：鍋島 俊隆 ¹ 研究協力者：新田 淳美 ¹ 、山田 裕一郎 ¹ 、丹羽 美苗 ¹ 、野田 幸裕 ¹ 、 齋藤 邦明 ² 、清島 満 ¹ 、山田 清文 ³ (¹ 名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部、 ² 岐阜大学医学部・臨床検査医学、 ³ 金沢大学薬学部・病院薬学)	107
メタンフェタミンによるドパミン神経毒性のチロシナーゼによる修飾 分担研究者： 浅沼 幹人 共同研究者： 宮崎 育子, Md. Emdadule Haque, 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)	115

- メタンフェタミン反復投与後の側坐核ニューロン活動調節変化におけるセロトニン神経系の関与 120
 分担研究者：石原 熊寿¹
 研究協力者：木村 丈司¹、笹 征史¹
 (¹ 広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態薬物治療学講座治療薬効学研究室、² 渚病院)
- 覚醒剤神経毒性モデルにおける覚醒剤脳移行性の経時的変化に関する検討 128
 分担研究者：長谷川 高明
 共同研究者：高木 健三、高木 健次、伊藤 佑希子、青山 渚、
 福田 昌也、北市 清幸
 (名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻)
- 覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究 135
 分担研究者：船田 正彦
 研究協力者：周 曉華、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)
- 低濃度セロトニン連続曝露に伴うL型高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化
 大脳皮質神経細胞を用いた解析 144
 分担研究者：大熊 誠太郎
 研究協力者：桂 昌司
 (川崎医科大学薬理学教室)
- 覚醒剤の分子作用機序におけるモノアミントランスポーターの役割 152
 分担研究者：曾良 一郎^{1,2}
 研究協力者：沈 昊偉¹、萩野 洋子¹、小林 秀昭^{1,2}、山下 元康¹、
 福島 攝¹、小原 可久¹、山本 敏文^{1,3}、山本 秀子¹、池田 和隆¹、
 沼知 陽太郎^{1,2}
 (¹ 東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野、² (財) 東京都医学研究機構・精神研・分子精神医学、³ 横浜市立大大学院総合理学研究科)

覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究 - prodynorphin および dihydropyrimidinase-like 2 遺伝子における相関研究 160

分担研究者：氏家 寛¹¹

共同研究者：野村 晃¹⁾、坂井 歩^{1,2)}、勝 強志¹⁾、稲田俊也³⁾、
原野 睦生⁴⁾、小宮山 徳太郎⁵⁾、山田 光彦⁶⁾、関根 吉統⁷⁾、曾良 一
郎⁸⁾、岩田 仲生⁹⁾、伊豫 雅臣¹⁰⁾、尾崎 紀夫³⁾、黒田 重利¹⁾、JGIDA¹¹⁾

(¹岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野、²笠岡病院、³
名古屋大学、⁴久留米大学、⁵国立精神・神経センター武蔵病院、⁶昭和大学
附属烏山病院、⁷浜松医科大学、⁸東北大学、⁹藤田保健衛生大学、¹⁰千葉
大学、¹¹Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse)

覚せい剤精神病のドーパミンレセプターD2 遺伝子 Taq I A 多型と脳MRI に関する相関研究 168

分担研究者：内村 直尚¹

共同研究者：原野 睦生^{1,11)}、上野 雄文¹、安倍 等思¹、石橋 正彦³、
飯田 信夫¹、田中 得雄⁵、前田 久雄¹、曾良 一郎^{6,11)}、伊豫 雅臣^{7,11)}、
橋本 謙二^{7,11)}、小宮山 徳太郎^{8,11)}、山田 光彦^{1,11)}、関根 吉統^{10,11)}、
稲田 俊也^{11,11)}、尾崎 紀夫^{11,11)}、岩田 仲生^{11,11)}、氏家 寛^{11,11)}

(¹久留米大学医学部 精神神経科、²同 放射線医学、³十全会 十全病院、
⁴同 回生病院、⁵大法山病院、⁶東北大学大学院医学系研究科 精神神経
生物学分野、⁷千葉大学医学部 精神科、⁸国立精神・神経センター武蔵
病院 精神科、⁹昭和大学附属烏山病院 精神神経科、¹⁰浜松医科大学 精
神神経科、

¹¹名古屋大学大学院医学系研究科 精神生物学分野、¹¹藤田保健衛生大学
医学部 精神医学教室、¹¹岡山大学大学院医歯学総合研究科 精神神経病態
学、¹¹薬物依存ゲノム解析研究グループ(JGIDA))

覚醒剤精神病の精神症状に関する研究

176

分担研究者：小島 卓也¹⁾

研究協力者：成瀬 暢也¹⁾、三上 智子³⁾、守屋 裕文¹⁾、福良 洋一¹⁾、
大久保 博美¹⁾、大久保 起延¹⁾、松浦 雅人¹⁾、松島 英介⁴⁾

(埼玉県立精神医療センター¹⁾、日本大学医学部精神神経科学教室¹⁾、東京
都職員共済組合青山病院³⁾、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科心
療・ターミナル医学分野¹⁾)

- 規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究 181
 分担研究者：伊豫雅臣（千葉大学大学院医学研究院精神医学）
 共同研究者：橋本 謙二¹、清水 栄司¹、西山 新吾¹、福元 大¹、
 垣内 岳春¹、塚田 秀夫¹
 （¹ 千葉大学大学院医学研究院・精神医学¹、浜松ホトニクス株式会社・中央研究所）
- 逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明 189
 分担研究者：西川 徹¹
 共同研究者：櫻井 新一郎¹、柏 淳¹、伊藤 卓¹、石井 澄和¹、
 海野 麻未¹、金子 雄二郎¹、山本 直樹¹
 （¹ 東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野）
- メタンフェタミン、フェンシクリジン投与による Nurr 1 mRNA の変化に及ぼす精神科治療薬の影響 194
 分担研究者 秋山 一文¹
 共同研究者 藤 武人¹、下田 和孝¹
 （¹ 獨協医科大学精神神経医学教室）
- メタンフェタミン逆耐性形成における中枢ヒスタミン神経系の影響 202
 分担研究者：谷内 一彦¹⁾
 研究協力者：奥田 友宏¹⁾、櫻井 映子¹⁾、岩渕 健太郎^{1, 2)}、代 紅梅¹⁾、
 中川 直人³⁾、菱沼 隆則³⁾、後藤 順一³⁾
 （¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科 細胞・病態薬理学分野、²⁾ 同 精神神経学分野、³⁾ 東北大学付属病院・薬剤部）
- 覚せい剤の神経毒性、体温変化に対するドーパミン・セロトニン神経系の関与 208
 分担研究者：佐藤 光源¹
 研究協力者：沼知 陽太郎¹、小原 可久¹、山下 元康¹、近江 香予¹、
 福島 攝¹、畑 春実¹、小林 秀昭¹、沈 昊偉¹、山本 秀子¹、池田 和隆³、曾良 一郎³⁾
 （¹ 東北福祉大学大学院精神医学、² 東北大学大学院医学系研究科・精神・神経生物学分野、³ (財) 東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学)

5. 分担研究者一覧

平成13～15年度 3年のまとめ総括研究報告

主任研究者 曾良 一郎

平成15年度厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

「規制薬物の依存及び神経毒性の発現にかかわる仕組みの分子生物学的解明に
関する研究」

主任研究者 曾良一郎

総括研究報告

（Ⅰ）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

1. 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

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部 鍋島俊隆

2. メタンフェタミンの細胞内小器官での標的分子への作用と神経細胞障害の抑制に関する研究

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経情報学 浅沼幹人

3. メタンフェタミン反復投与後のニューロン活動調節変化におけるセロトニン神経系の関与

広島大学大学院医歯薬学総合研究科治療薬効学 石原 熊寿¹

4. 薬物依存発症時における覚醒剤の体内動態の変化に関する研究

名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 長谷川高明

5. 覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究

国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部 船田正彦

6. 覚醒剤依存における脳内高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化とその分子機構

川崎医科大学薬理学教室 大熊 誠太郎

大熊誠太郎)

7. モノアミントランスポーター欠損マウスモデルを用いた覚醒剤の分子作用機序の検討

東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野 曾良一郎

（Ⅱ）薬物精神病の発症と再発の原因

1. 覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究
岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野 氏家 寛
 2. 覚せい剤精神病の遺伝子多型と脳の形態に関する相関研究
久留米大学医学部 精神神経科 内村 直尚
 3. 覚醒剤精神病の精神症状と統合失調症脆弱性素因に関する研究
日本大学医学部精神神経科学 小島卓也
 4. 規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究
千葉大学大学院医学研究院精神医学 伊豫雅臣
 5. 逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明
東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野 西川 徹
 6. メタンフェタミン、フェンシクリジン投与による前シナプス側関連蛋白 mRNA と転写因子 Nurr1 mRNA の変化
獨協医科大学精神神経医学 秋山一文
 7. 覚醒剤精神病におけるヒスタミン神経の役割：画像医学的研究と小動物モデルの薬理学的研究
東北大学大学院医学系研究科 細胞・病態薬理学分野 谷内一彦
 8. 薬物精神病および統合失調症における神経系の役割に関する研究
東北福祉大学大学院精神医学 佐藤光源
-

(I) 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依存と精神毒性については、遺伝子改変マウスを含む動物モデルを用いて分子生物学的に病態解明を行った。メタンフェタミン依存の基礎となる脳報酬系の機能変化については、モノアミン神経伝達に関連する遺伝子改変マウスの覚醒剤に対する報酬行動と脳内モノアミン動態の検討を行い、従来、報酬行動に中心的な役割を果たすと考えられてきたドーパミンに加えて、セロトニン神経伝達も関与することを明らかにした。

メタンフェタミン神経毒性モデルにおいては、メタンフェタミン体内動態が変化していることが明らかになり、有機カチオン輸送担体 OCT3 の発現が低下していることも明らかになった。メタンフェタミンの体温上昇作用には、ドーパミントランスポーター(DAT)とセロトニントランスポーター(SERT)も重要な役割を果たすことが示唆された。さらに急性毒性に対して DAT 欠損、SERT 欠損がほぼ同様の保護作用があることが示された。モノアミン神経伝達以外に関連する遺伝子群として腫瘍壊死因子である TNF- α に注目し、TNF- α 欠損マウスを用いてメタンフェタミンによる神経毒性に対して TNF- α が抑制的に働くことが示唆された。さらに TNF- α の産生を誘導する Leu-Ile 化合物も、メタンフェタミンの精神毒性に対して抑制的に働くことが示された。メタンフェタミン添加培養神経細胞を用いた DNA マイクロアレイ法でのプロファイリングにより、メタンフェタミンで発現が誘導あるいは抑制される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）での標的候補分子を検索できた。さらに、マウスモデルにおいて DNA マイクロアレイ法を用いてメタンフェタミン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い、900 種の遺伝子発現を検討し、安定した発現変動が維持される遺伝子 4（既知：1、未知 3）個を見出した。メタンフェタミン反復投与後における側坐核でのセロトニン性抑制の消失により、精神依存発現におけるセロトニン神経機能の変化の役割が示唆された。低濃度セロトニン (5-HT) 連続曝露により生じる L 型高電位開口性カルシウムチャネルの機能亢進は 5-HT 1、2 および 3 受容体が関与していることが明らかとなった。これらの遺伝子改変マウスモデルや DNA マイクロアレイ法を用いた結果により、メタンフェタミン依存と神経毒性の遺伝子発現による理解が可能となった。

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（鍋島）

マウスを用いた実験で、メタンフェタミンによる場所嗜好性の形成は腫瘍壊死因子 (TNF- α) を腹腔内投与すると抑制された。野性型マウスでは場所嗜好性が成立しないような、低用量のメタンフェタミンによっても TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、場所嗜好性が成立した。これらの結果から、メタンフェタミンによる神経毒性に対して TNF- α が抑制的に働くことが示唆された。しかし、TNF- α は、炎症性サイトカインであるため、メタンフェタミンによる神経毒性の予防または、治療薬として用いるのは不可能である。そこで、TNF- α の産生を誘導する低分子化合物の開発を試みた。Leu-Ile を投与したマウスの脳内各部位の TNF- α mRNA 発現量を測定したところ、いくつかの部位で、発現増加が観察された。マウスにメタンフェタミンを投与することによって起こる場所嗜好性や自発運動の亢進の形成を Leu-Ile は抑制した。また、メタンフェタミンの投与によって一旦、形成された場所嗜好性や自発運動量の亢進に対しても Leu-Ile は抑制作用を示した。場所嗜好性や自発運動の亢進の形成に対する Leu-Ile による抑制作用は、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは観察されなくなるため、Leu-Ile の作用の少なくとも一部は、TNF- α の産生誘導を介して

いると考えられる。本研究の結果から、Leu-Ile のような TNF- α の産生を誘導する化合物も、メタンフェタミンの精神毒性に対して抑制的に働くことを示した。今後、Leu-Ile が生体内結合するタンパクを解明し、詳細なメカニズムを明らかにすることによって、本研究成果が、メタンフェタミンの精神毒性に対する予防薬や治療薬の開発に繋がることが期待される。

メタンフェタミンの細胞内小器官での標的分子への作用と神経細胞障害の抑制に関する研究（浅沼）

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した。すなわち、メタンフェタミンにより 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と考えられる。さらに、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。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ほぼ完全に抑制され、6-OHDA 添加によって惹起されるカスパーゼ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。また、PAG608 は逆に p53 発現を誘導しうることを明らかにした。METH 添加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、メタンフェタミンで発現が誘導あるいは抑制される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）での標的候補分子を検索できた。

メタンフェタミン反復投与後の側坐核ニューロン活動調節変化におけるセロトニン神経系の関与（石原） 覚せい剤(メタンフェタミン)による中枢神経活動調節変化について、神経伝達物質受容体機能の変化の観点から解明を行うことを目的とし、メタンフェタミン投与によってシナプス領域での濃度が上昇し、伝達に変化するドパミンおよびセロトニン受容体を対象とし研究を行った。本研究では神経機能変化を直接ニューロン活動およびシナプス反応を *in vitro* スライス標本にて記録することによりメタンフェタミン連続投与後の影響を解析した。電気生理学的手法により、海馬あるいは側坐核スライス標本にて主として集合活動電位を記録し、セロトニンおよびドパミン系調節の変化について検討した。海馬および側坐核において、セロトニン性調節はメタンフェタミン投与中止 24 時間目にはほとんど変化はなく、生理食塩水投与群（コントロール群）と差が見られなかった。しかし、メタンフェタミン投与後 5 日目にはメタンフェタミン投与による影響が現れることが示された。すなわち、海馬においてはセロトニンの抑制が増強され、一方、側坐核ではセロトニン抑制が消失することが観察された。このセロトニン調節作用の変化は投与後 10 日目にも残存する傾向が観察された。ドパミン系は側坐核のみで検討し、メタンフェタミン連用後 24 時間目ではその抑制作用がわずかに減少するが、5 日目には抑制作用が

逆に増強されることが示された。メタンフェタミンを連用し、中止した場合に見られる長期的なニューロン活動調節変化において、脳部位および神経伝達物質の違いにより影響の方向性が異なることが明らかとなった。

覚醒剤神経毒性モデルにおける覚醒剤脳移行性の経時的変化に関する検討（長谷川）

3年間の研究より、メタンフェタミン神経毒性モデルにおいては、メタンフェタミン体内動態が変化していることが明らかになった。したがって、メタンフェタミン依存における神経機能の変化にはメタンフェタミン体内動態および脳内移行の変化が一部関与していることが示唆された。また、有機カチオン輸送担体 OCT3 の発現がモデル作成より1ヶ月を経過しても低下していることも明らかになった。先に我々はメタンフェタミン逆耐性モデルにおいても OCT3 が長期的に低下することを見出しており、この結果を考えあせると、OCT3 の発現低下が METH 依存の維持、再燃に関与している可能性が考えられる。OCT3 の発現調節機構および調節薬の探索を行うことが今後の課題となった。

覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究（船田）

メタンフェタミンによる精神依存および逆耐性動物モデルを作成し、マイクロアレイ法を用いてメタンフェタミン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。900種の遺伝子発現を検討し、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、MAP 急性投与から慢性投与で1.5倍の発現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 を作製しメタンフェタミン逆耐性および精神依存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 逆耐性形成および精神依存形成は抑制された。また、メタンフェタミン逆耐性の発現は Raf-1 拮抗薬 GW-5074 の前処置により有意に抑制された。メタンフェタミン慢性動物の limbic forebrain においてリン酸化 Raf-1 量の増加が認められ、この増加は GILZ antisense の前処置により抑制された。

低濃度セロトニン連続曝露に伴う L 型高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化? 大脳皮質神経細胞を用いた解析（大熊）

覚醒剤依存における神経細胞の HVCC 機能変化について、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度の dopamine (DA) およびセロトニン (5-HT) の連続曝露を行った場合の HVCC 機能変化を検討し、併せて依存性薬物の nicotine を連続した場合の変化とを比較検討した。nicotine 連続曝露により誘発される [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入の増加は L 型 HVCC を構成する? 1 サブユニットの発現増加に起因することが判明した。SKF38393 連続曝露後、神経細胞における各種 HVCC $\alpha 1$ サブユニットの発現変化についての検討結果から、P/Q 型、

N 型 HVCC の? 1 サブユニットのみならず、L 型 HVCC ? 1 サブユニットの発現も、非曝露群との間に有意な相違は認められなかった。SKF38393 連続曝露後の神経細胞から調製した顆粒画分への³H)diltiazem 結合は非曝露群に対し、有意な増加を示していた。5-HT (1 ? M) の連続曝露により 30 mM KCl 誘発性⁴⁵Ca²⁺流入は有意に増加し、この増加はそれぞれ 5-HT 1 および 2 受容体、および 5-HT3 受容体拮抗薬である methysergide (MSG) および MDL72222 (MDL) によって有意に抑制され、両拮抗薬を同時に 5-HT 曝露と共に神経細胞に曝露すると、⁴⁵Ca²⁺流入増加は完全に消失した。またこの流入増加は nifedipine によってのみ有意に抑制されたが、P/Q および N 型 HVCC 拮抗薬は影響を与えなかった。

身体依存を生じる nicotine の長期曝露では L 型 HVCC 機能亢進が誘発されるが、この亢進は L 型 HVCC の? 1 サブユニットの発現増加が原因となっていることが明らかとなった。なお、アルコールや morphine の場合も nicotine の場合と同様であった。一方、DA および 5-HT では L 型 HVCC 機能亢進が生じるが、この機能亢進には $\alpha 1$ サブユニットの発現増加が認められず、 $\alpha 1$ サブユニットの³H)diltiazem 結合に対する結合親和性の増加によることが判明した。これらの薬物群における L 型 HVCC 機能変化の機序の相違は、身体依存形成機序と精神依存形成機序の相違の解明に有用なデータである可能性が考えられる。

モノアミントランスポーター欠損マウスモデルを用いた覚醒剤の分子作用機序の検討(曾良)

本研究では、覚醒剤の分子作用機序を明らかにすることを目的に、脳内微量透析法を用いてモノアミントランスポーターKO マウスにおける覚醒剤投与の行動変化と一致する脳内のモノアミン放出部位を明らかにしようと試み、同族トランスポーターの補完作用が存在することを示唆する成果を得ることが出来た。さらにコカインの脳内局所投与という方法を用いて局所的な働きなのか神経ネットワークによるものなのか検討した。また、DAT あるいは SERT の欠損あるいは発現低下では覚醒剤逆耐性が形成されないか、遅延した。これらの結果は DAT のみならず SERT も逆耐性形成に関与していることを強く示唆し、覚醒剤による逆耐性形成過程における表出にはモノアミントランスポーターの発現量が影響することが示唆している。覚醒剤の分子作用機序におけるモノアミントランスポーターの役割は、従来想定されていた以上に複雑な分子機構が考えられた。

(II) 薬物精神病の発症と再発の原因

薬物精神病の発症と再発の原因解明については、覚醒剤依存・乱用患者におけるゲノム解析と脳画像解析や神経生理学的検討を行った。覚せい剤使用による薬物反応性の違い、特に依存形成、精神病形成における個々人の脆弱性を規定する因子、としてドーパミントランスポーター、ドーパミン受容体遺伝子の多型に注目し、脳内発現量の変化、フラッシュ

ユバック等の覚せい剤精神病の予後との関連が明らかとなった。さらに、ドーパミン受容体遺伝子の多型が前頭葉、側頭葉の形態変化と関連することが示された。また、覚醒剤精神病の発生および症状形成について探索眼球運動検査を用いて検討し、早期に症状が改善する群ではその発生および症状形成に覚醒剤の薬理学的作用の影響が大きく、遷延する群の一部では統合失調症の脆弱性素因の関与の強いことが示唆された。サルを対象にポジトロン断層撮影装置を用いた研究より、抗酸化物質 N-アセチル L-システイン (NAC) の投与は、覚せい剤投与によるドーパミントランスポーターの減少を有意に抑制することが判った。また、脳の内在性物質である D-セリン、前シナプス側の膜蛋白、中枢ヒスタミン受容体が覚醒剤の異常行動発現作用に関与することも明らかにされた。これら臨床症例による検討や動物モデルより得られた分子生物学的知見により、覚醒剤依存・乱用の発症脆弱性因子が明らかとなった。

1. 覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究 (氏家)

薬物依存や薬物誘発性精神病の形成は、その薬物自体の薬理特性が重要であることは言うまでもないが、この他にも環境因子、心理社会因子、遺伝以外の家族因子、そして遺伝要因も影響していることが指摘されている。覚せい剤使用による薬物反応性の違い、特に依存形成、精神病形成における個々人の脆弱性を規定する因子、すなわち遺伝要因を明らかにし、その薬物依存の発症や予後における影響を明らかにした。hDAT 遺伝子 VNTR 多型で 9 回リピート以下のアレルを有する個人では、脳内 DAT 発現が減少しており、覚せい剤精神病の治療後の予後が悪いことが予想され、遷延化しやすく、そのオッズ比は 4.24 と強力な危険因子であることがわかった。DRD2 遺伝子 TaqI A 多型では A1/A1 遺伝子型を持つものは、有意に覚せい剤使用から精神病発病までの潜時が長く、治療後は遷延型にはなりにくく、フラッシュバックも生じにくいことがわかった。

2. 覚せい剤精神病の遺伝子多型と脳の形態に関する相関研究(内村)

ドーパミンレセプター D2 遺伝子の Taq I A 多型が、覚せい剤精神病の発症・重篤化に深く係わる危険因子であること、左) 側頭葉の中側頭回と上側頭回前部、および中脳の被蓋が覚せい剤精神病患者では狭小であること、さらに、A2/A2 遺伝子型の覚せい剤精神病患者では、左) 前頭葉下面の内側眼窩回が狭小であることを明らかにした。それらのことから、左) 側頭葉の中側頭回と上側頭回前部、および中脳の被蓋が覚せい剤精神病の責任部位である可能性が、そして、それらの責任部位とは別に Taq I A 多型と係わりながら発症・重篤化に関与する責任部位が左) 前頭葉下面の内側眼窩回に存在する可能性が、示唆された。

3. 覚醒剤精神病の精神症状と統合失調症脆弱性素因に関する研究 (小島)

本研究では、覚醒剤精神病のうち、遷延例を中心に Brief Psychiatric Rating

Scale(BPRS)、DSM-IVの機能の全体的評価Global Assessment of Functioning(GAF) Scaleを採点、また探索眼球運動検査を施行し、統合失調症や健常対照と比較することによって、覚醒剤精神病と統合失調症の関係を総合的に検討した。覚醒剤精神病は単一の群ではなく、統合失調症の陰性症状を認めず、早期に症状が改善する群と、陰性症状に類似した症状を認め精神症状の遷延する群がある。これらの群の発生および症状形成について探索眼球運動検査を用いて検討した。早期に症状が改善する群ではその発生および症状形成に覚醒剤の薬理学的作用の影響が大きく、遷延する群の一部では統合失調症の脆弱性素因の関与の強いことが示唆された。

4. 規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究 (伊豫)

本研究では、生体内の酸化的ストレスにおいて重要な役割を果たしている抗酸化物質グルタチオンに注目し、細胞培養系を用いたドーパミン関連化合物による神経毒性における内在性グルタチオンの役割、実験動物(サル、ラット)を用いた抗酸化物質N-アセチル-L-システイン(NAC)の作用について検討した。外因性および内因性グルタチオンが、6-OHDA誘発神経細胞死に対する神経防護機構において重要な役割を果たすことが示唆された。NACの投与は、ラットにおける覚せい剤投与による異常行動(運動量亢進、逆耐性形成)およびドーパミン神経系の障害を有意に抑制することが判った。さらに、サルPETを用いた研究より、NACの投与は、覚せい剤投与によるDATの減少を有意に抑制することが判った。一方、NACは臨床の場でいろいろな疾患の治療に使用されており、また健康補助食品(サプリメント)として市販されているので、安全性は高いと思われる。それゆえ、NACは覚せい剤投与によるドーパミン神経障害の予防薬および治療薬になる可能性が示唆された。

5. 逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明 (西川)

覚醒剤によって異常を来す脳内情報処理系は、特定の発達段階に成熟して薬物の影響を受けるようになることを示唆していることから、このような情報処理系を構築する分子群を明らかにするため、覚醒剤が誘発する逆耐性現象や脳の活動性の異常が成熟期型のパターンを示す時期以後に、MAPに対して応答性を獲得する遺伝子群を検索した。ラット*mrt1*(MAP responsive transcript 1)については、既に構造やコード淡泊質、薬理学的性質等に関する解析を進めてきた。したがって、ヒト相同遺伝子(MRT1)をクローニングするとともに、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クローニングを行った。さらに脳の内在性物質であるD-セリンが、覚醒剤の異常行動発現作用を抑制することを明らかにしたことから、MAPが、大脳新皮質および線条体組織中のD-セリン濃度に及ぼす影響を調べた。同時に、MAPとは異なる統合失調症様異常を引き起こす麻薬であるPCP(phencyclidine)が作用するNMDA型興奮性アミノ酸受容体に結合するグルタミン酸、ア

スバラギン散、グリシンをはじめ、生理機能が解明されていないさまざまなアミノ酸の濃度も検討した。また、PCP や抗精神病薬の影響を調べ、MAP の効果と比較した。

6. メタンフェタミン、フェンシクリジン投与による前シナプス側関連蛋白 mRNA と転写因子 Nurr1 mRNA の変化 (秋山)

本研究では前シナプス側の膜蛋白として synaptotagmin IV 及び SNAP25 を取り上げ、Nurr1 とともに、それらの mRNA 発現の METH の急性・慢性投与による影響を検討した。また統合失調症の陽性・陰性症状のモデルとされるフェンシクリジン(PCP)の急性投与による Nurr1 mRNA 発現について検討した。METH 急性投与に於いて SNAP25a の mRNA は内側前頭皮質、線条体、海馬歯状回で、synaptotagminIV の mRNA は線条体で有意に増加した。METH 急性投与により Nurr1 の mRNA 発現は大脳皮質の広汎な部位、海馬 CA1、黒質緻密層、腹側被蓋野に於いて増加し、これは SCH23390 の前処置によって阻止された。PCP 急性投与による大脳皮質(内側前頭皮質、体性感覚皮質、視覚皮質、後部帯状回皮質)での Nurr1 の mRNA 発現増加は olanzapine, clozapine の前処置によってほぼ完全に阻止されたが、haloperidol, risperidone の前処置では阻止されなかった。なお、これらの抗精神病薬単独投与では生食投与と比較して有意な mRNA 発現の変化は引き起こされなかった。

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

H1、H2 受容体、HDC(histidine decarboxylase) knockout mouse を用いた研究から中枢ヒスタミン神経がメタンフェタミン(MAP)逆耐性形成などの有害な刺激に対して抑制的に作用することを示している。すなわちヒスタミン神経系の賦活は覚醒剤反復投与による逆耐性形成を遅延させることをヒスタミン受容体リガンドやヒスタミン受容体遺伝子欠損マウスおよびヒスタミン合成酵素遺伝子欠損マウスなどを使用して報告してきた。すなわちヒスタミン神経系の低下は覚醒剤による逆耐性を増強し、ヒスタミン神経系の賦活は抑制すると考えている。さらに覚醒剤精神病はまた、統合失調症と類似していることから、統合失調症の陰性症状のモデルである isolation stress モデルを作製し、MAP 逆耐性モデルの形成におけるストレスの役割を明らかにした。また併行して臨床研究を行い、¹¹C-doxepin-PET により統合失調症患者や薬物依存症患者脳において H1 受容体が低下していることを報告している。抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンによる MAP 増強効果は中枢及び代謝による効果が複雑に関連して増強効果を発現していると考えられた。ヒスタミン H3 受容体 (H3) KO マウスを用いて MAP 逆耐性形成への影響を調べた。H3KO では野生型と比較して MAP 投与初期では、行動への効果が有意に減弱していることが分かった。H3KO では MAP 逆耐性の形成が遅延することが明らかになった。

8. 薬物精神病および統合失調症における神経系の役割に関する研究（佐藤）

メタンフェタミン（MAP）の急性および慢性投与時における中枢ヒスタミン神経系の役割を調べる為に、 H_1 受容体、 H_2 受容体、 H_1/H_2 両受容体遺伝子のノックアウト（KO）マウスを用いて、MAP投与後の自発運動量を測定した。MAP（1mg/kg）を腹腔内に単回投与したところ、急性期の自発運動量増加作用は、 H_1/H_2 受容体遺伝子ダブルKOマウスにおいては、各々の野生型に比して増強していたが、 H_1 受容体および H_2 受容体KOマウスにおいては、同様の变化は認められなかった。また、MAP（1mg/kg）を7日間連続投与したところ、 H_1/H_2 受容体遺伝子ダブルKOマウスにおいては、野生型に比して迅速かつ明瞭に行動感作が形成されたが、 H_1 受容体および H_2 受容体KOマウスにおいては、同様の差は認められなかった。これらの結果から、ヒスタミン神経系は、 H_1 および H_2 受容体の両者を介して、MAPによる急性期の自発運動量増加および慢性期の行動感作形成に対して、抑制的に作用していることが示唆された。ドーパミントランスポーター（DAT）とセロトニントランスポーター（SERT）のノックアウト（KO）マウスにおけるMAPの神経毒性と体温上昇効果を調べた。野生型、DAT-KO、SERT-KOマウスではMAPで有意に体温が上昇、DAT/SERT-ダブルKOマウスでは、MAPにより逆に体温が有意に下降した。MAPの体温上昇作用には、DATだけではなくSERTも重要な役割を果たすことが示唆された。急性毒性に対してDAT欠損、SERT欠損がほぼ同様の保護作用があることが示された。これらの結果は、MAPの急性毒性に関しても、DAとセロトニンの相互作用を示唆するものと考えられた。

平成13～15年度 3年のまとめ 分担研究報告

「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」

3年間のまとめ

分担研究者：鍋島俊隆¹

共同研究者：新田淳美¹、山田清文^{1,2}、山田裕一郎¹、中島 晶¹、丹羽美苗¹、齋藤邦明³、清島 満³、野田幸裕¹

(¹名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部、²金沢大学薬学部・病院薬学、³岐阜大学医学部・臨床検査医学)

メタンフェタミンの乱用は我が国において、大きな社会問題であり、国家や社会に与える損失は計り知れない。しかし、精神毒性を起こすメカニズムの詳細は明らかにされていないため、メタンフェタミンを乱用している患者に対する治療法もほとんど確立していない。我々は、3年間の本科学研究補助金を活用し、メタンフェタミンによる精神毒性に対する腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α ; TNF- α)の役割について検討を行った。

メタンフェタミンが引き起こす精神毒性には、逆耐性や再燃が含まれるが、それらに関与する分子についての報告は、ほとんどなされていない。本研究の1年目には、メタンフェタミンによって発現調節されるタンパクを同定するために、cDNA マイクロアレイ法 (Clonetech, Atlas Rat 1.2 Array) を用いて検討を行った。メタンフェタミン (1.0mg/kg) を10日間連続投与したラットの側坐核を用いてコントロールラットと比較して1.8倍以上発現増加した遺伝子の1つにTNF- α 受容体1および2があった。そこで、TNF- α 受容体1,2およびTNF- α mRNAの発現量をリアルタイム RT-PCR法で検討したところ、側坐核を含むいくつかの部位でそれら分子のmRNAの発現が増加していた。そこで、リガンド側のTNF- α に着目して、メタンフェタミンの神経毒性への関与について、検討を始めた。側坐核におけるメタンフェタミンによるTNF- α mRNAの発現増加は、ドパミン受容体1および2の拮抗剤の併用投与で抑制された。これらのことは、ドパミン作動性神経系がTNF- α の産生誘導に関与していることを示唆している。第2年度には、免疫組織化学染色法を用いて、メタンフェタミンによって誘導されるTNF- α は、側坐核の神経細胞で産生されていることを明らかにした。さらに、メタンフェタミンは、神経細胞シナプスにおいてドパミン再取り込みを抑制し、ドパミンの遊離を促進することによって、シナプス間隙のドパミン遊離量を増加させると考えられている。トリチウム標識ドパミンの取り込み実験を行ったところ、TNF- α を脳組織に添加すると、メタンフェタミンによるドパミンの取り込み抑制が低下することを見出した。

さらに、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、脳内ドパミン遊離量の測定を行ったところ、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは、メタンフェタミン投与時に増加するドパミンの遊離量の増加率が増加していることを見出した。これらのことから、TNF- α は、メタンフェタミンによって誘導される神経間隙でのドパミン遊離量を低下させ、その結果、作用を発現していることが考えられる。一方、我々は、ラットを用いたメタンフェタミンによる弁別刺激には、c-Fosの発現増加が伴うことを明らかにしている。弁別刺激時にTNF- α を腹腔内投与するとc-Fosの発現増加が抑制された。また、マウスを用いた実験で、メタンフェタミンによる場所嗜好性の形成はTNF- α を腹腔内投与すると抑制された。野性型マウスでは場所嗜好性が成立しないような、低用量のメタンフェタミンによってもTNF- α 遺伝子欠損マウスでは、場所嗜好性が成立した。これらの結果から、メタンフェタミンによる神経毒性に対してTNF- α が抑制的に働くことが示唆された。しかし、TNF- α は、炎症性サイトカインであるため、メタンフェタミンによる神経毒性の予防または、治療薬として用いるのは不可能である。そこで、第3年度は、TNF- α の産生を誘導する低分子化合物の開発を試みた。Leu-Ileは、グリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell lined derived neurotrophic factor; GDN)の産生誘導作用を持つ低分子化合物として、Furukawaらのグループによって見出された。GDNFは、コカインの薬物依存に対して抑制的に働くことが報告されている。一方、培養細胞を用いた実験では、TNF- α の添加によって、GDNFの産生が誘導されることも報告されている。これらのことを考え合わせると、Leu-Ileが、TNF- α の産生誘導を介してGDNFの産生を増加させ、メタンフェタミンの神経毒性に対して抑制的に働く可能性が考えられる。そこで、Leu-Ileを投与したマウスの脳内各部位のTNF- α mRNA発現量を測定したところ、いくつかの部位で、発現増加が観察された。マウスにメタンフェタミンを投与することによって起こる場所嗜好性や自発運動の亢進の形成をLeu-Ileは抑制した。また、メタンフェタミンの投

与によって一旦、形成された場所嗜好性や自発運動量の亢進に対しても Leu-Ile は抑制作用を示した。場所嗜好性や自発運動の亢進の形成に対する Leu-Ile による抑制作用は、TNF- α 遺伝子欠損マウスでは観察されなくなるため、Leu-Ile の作用の少なくとも一部は、TNF- α の産生誘導を介していると考えられる。

薬物依存と免疫系が関与していることを示唆する報告は今までもなされているが、詳細なメカニズムについては、ほとんど分かっていない。本研究において、免疫系の細胞で産生されるサイトカインの1つの TNF- α がメタンフェタミンによる精神毒性に対して、抑制的に働き、少なくともその作用の一部に GDNF が関与することを明らかにした。本研究の結果から、Leu-Ile のような TNF- α の産生を誘導する化合物も、メタンフェタミンの精神毒性に対して抑制的に働くことを示した。今後、Leu-Ile が生体内結合するタンパクを解明し、詳細なメカニズムを明らかにすることによって、本研究成果が、メタンフェタミンの精神毒性に対する予防薬や治療薬の開発に繋がることが期待される。

【研究業績】

(1) 発表論文

- 1) Hamdy, M.H., Mamiya, T., Noda, Y., Sayed, M., Assi, A. A., Gomaa, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A selective phosphodiesterase IV inhibitor, rolipram blocks both withdrawal behavioral manifestations, and c-Fos protein expression in morphine dependent mice. *Behav. Brain Res.*, 118, 85-93 (2001)
- 2) Sayed, A-N. M., Noda, Y., Hamdy, M.H., Mamiya, T., Nagai, T., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Enhancement of immobility induced by repeated phencyclidine injection: association with c-Fos protein
- 3) 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 (2001)
- 4) Kim, H-C., Nabeshima, T., Jhoo, W-K., Ko, K.H., Kim, W-K., Shin, E-J., Cho, M. and Lee, P.H.: Anticonvulsant effects of new morphinan derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 1651-1654, (2001)
- 5) Mamiya, T., Noda, Y., Ren, X., Hamdy, M., Furukawa, S., Kameyama, T., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.*, 132, 1111-1117 (2001)
- 6) Nakamura, K., Manabe, T., Watanabe, M., Mamiya, T., Ichikawa, R., Kiyama, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Inoue, Y., Nabeshima, T., Mori, H. and Mishina, M.: Enhancement of hippocampal LTP, reference memory and sensorimotor gating in mutant mice lacking a telencephalon-specific cell adhesion molecule. *Eur. J. Neurosci.*, 13, 179-189 (2001)
- 7) Tran, M. H., Yamada, K., Olariu, A., Mizuno, M., Ren, X. H., Nabeshima, T.: Amyloid β -peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J.*, 15, 1407-1409 (2001)
- 8) Fukuta, T., Nitta, A., Itoh, A., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: Difference in toxicity of β -amyloid peptide with aging in relation to nerve growth factor content in rat brain. *J. Neural Transm.*, 108, 221-230 (2001)
- 9) Mamiya, T., Noda, Y., Ren, X., Nagai, T., Takeshima, H., Ukai, M. and Nabeshima, T.: Morphine tolerance and dependence in the nociceptin receptor knockout mice. *J. Neural Transm.*, 108, 1349-1361 (2001)
- 10) Olariu, A., Tran, M. H., Yamada, K., Mizuno, M., Hefco, V. and Nabeshima, T.: Memory deficits and increased emotionality induced by β -amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J. Neural Transm.*, 108, 1065-1079 (2001)
- 11) He, J., Yamada, K., Zou, L-B. and Nabeshima, T.: Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J. Neural Transm.*, 108, 1435-1443 (2001)
- 12) Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M. and Nabeshima, T.: Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor α 1 subunit. *J. Neurosci.*, 21, 750-757 (2001)
- 13) Noda, A., Noda, Y., Kamei, H., Ichihara, K., Mamiya, T., Nagai, T., Sugiura, S., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Phencyclidine impairs latent learning in mice: interaction between glutamatergic systems and sigma₁ receptors. *Neuropsychopharmacology*, 24, 451-460 (2001)
- 14) Qiao, H., Noda, Y., Kamei, H., Nagai, T., Furukawa, H., Miura, H., Kayukawa, Y., Ohta, T. and Nabeshima, T.: Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. *Neuroreport*, 12, 11-15 (2001)
- 15) He, J., Yamada, K., Nakajima, A., Kamei, H. and Nabeshima, T.: Learning and memory in two different reward tasks in a radial arm maze in rats. *Behav. Brain Res.*, 134, 139-148 (2002)
- 16) Olariu, A., Yamada, K., Mamiya, T., Hefco, V., and Nabeshima, T.: Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) involves downregulation of protein kinase C. *Brain. Res.*, 957, 278-286 (2002)
- 17) Hiramatsu, M., Hoshino, T., Kameyama, T., and Nabeshima, T.: Involvement of k-opioid receptors in short-term memory in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 453, 91-98 (2002)