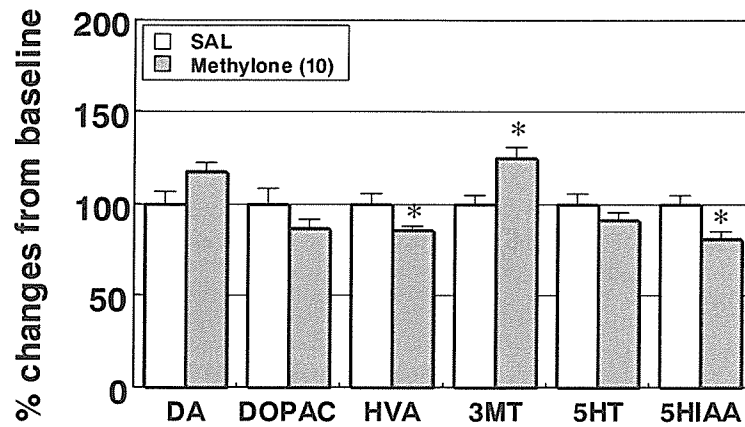


### (A) Limbic forebrain



### (B) Striatum

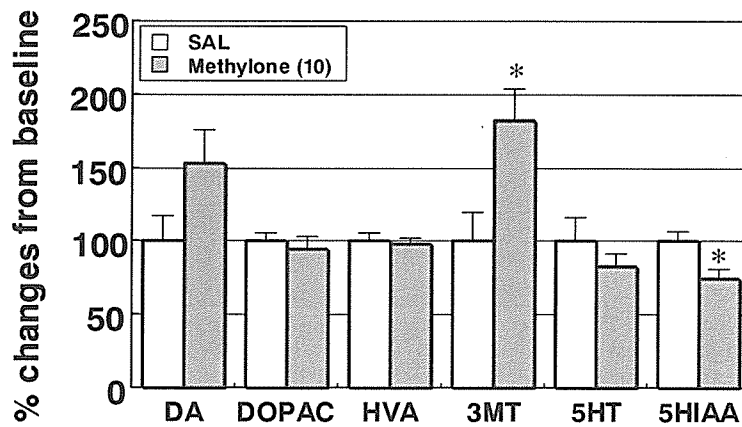
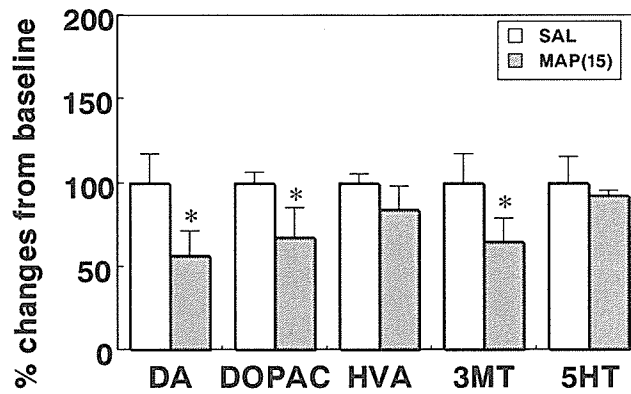


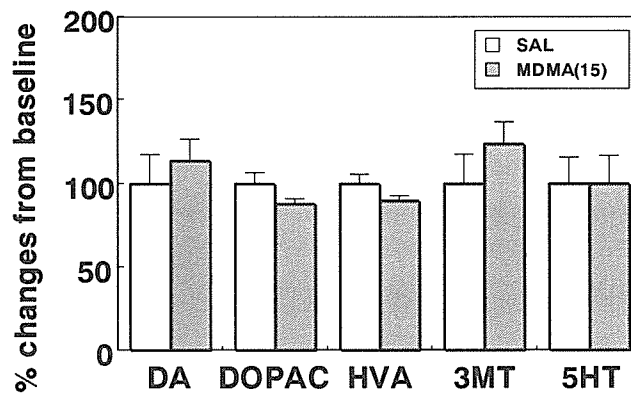
Fig. 5. Effects of methylone on monoamine levels in the mouse limbic forebrain and striatum. Mice were sacrificed 60 min after methylone (10 mg/kg, i.p.) injection. The contents of monoamines (dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), 3-methoxytyramine (3-MT), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) ) were analyzed using a HPLC system. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals.

\*P<0.05 vs. saline(SAL)-treated group.

(A) MAP



(B) MDMA



(C) Methylone

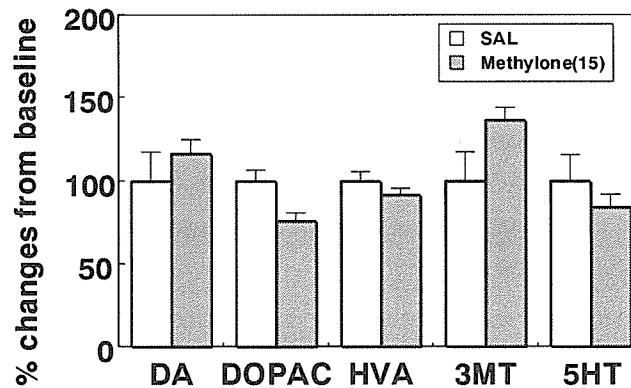


Fig. 6. Effects of treatment with (A) MAP, (B) MDMA and (C) methylone on monoamine levels in the striatum. Mice received three injections of each drug (15 mg/kg, i.p.) or saline (SAL) at 3-h intervals. Mice were sacrificed 3 days after drug treatment. The contents of dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), 3-methoxytyramine (3-MT) and serotonin (5-HT) were analyzed. Each column represents the mean with S.E.M. of 6-8 animals.

\*P<0.05 vs. saline(SAL)-treated group.

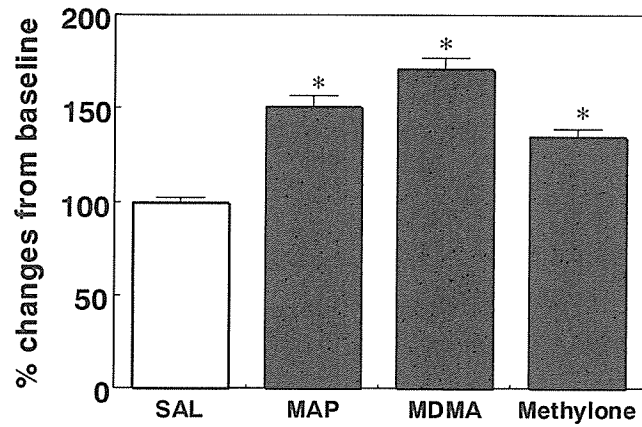


Fig. 7. Profiling of drug-induced changes in glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression in the mouse limbic forebrain. Mice were sacrificed 240 min after MAP (4 mg/kg), MDMA(10 mg/kg), and methylone (10 mg/kg). Changes of GILZ mRNA level were examined using RT-PCR assay. Each column represents the mean with S.E.M. of 6 animals.

\*P<0.05 vs. saline-treated group.

## 脱法ドラッグ（違法ドラッグ）の構造修飾に基づく神経毒性発現の研究

分担研究者：浅沼幹人（岡山大学大学院医歯薬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（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助手）

### 【研究要旨】

研究目的：メチロンは規制薬物である MDMA の benzylic position がケトン基に修飾されたもので、未規制薬物であり脱法ドラッグ（違法ドラッグ）として流通している。MDMA の構造修飾体であるメチロンのドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への毒性ならびに MDMA あるいはメタンフェタミン(METH)との併用による神経毒性の変化を明らかにするために、ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン系培養神経細胞 B65 細胞を用いて、メチロンの添加ならびに MDMA あるいは METH との同時添加を行い、24 時間後の細胞毒性（LDH 放出量測定）、形態学的変化を検討した。結果：メチロン単独暴露によりいずれの細胞においても著明な LDH 放出量の増加は認められず、2mM ではじめて有意に増加した。MDMA および METH 単独暴露では、1 mM 以上で一部にアポトーシス様形態変化および LDH 放出量の増加が認められた。メチロンの MDMA あるいは METH との併用暴露では、B65 細胞において、単独では LDH 放出量増加のみられないメチロン (500  $\mu$ M, 1 mM)+MDMA (500  $\mu$ M-1 mM)および METH (500  $\mu$ M-1 mM)の同時暴露により、LDH 放出量の有意な増加がみられた。しかし、CATH.a 細胞では相乗効果はほとんどみられなかった。B65 細胞での形態学的変化については、単独では障害性の低いメチロン (500  $\mu$ M)は、MDMA (500  $\mu$ M, 1 mM) および METH (500  $\mu$ M, 1 mM)との併用により、細胞死ならびにアポトーシス様形態変化を増強した。結論：セロトニン系培養神経細胞では、メチロンと MDMA もしくは METH との同時併用暴露により、細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることが判明した。この結果から、メチロンは MDMA に比して、その構造修飾によりドパミン系およびセロトニン系神経に対して単独暴露では強い毒性は示さないものの、MDMA もしくは METH との同時乱用では強いセロトニン神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。

### A. 研究目的

これまでに、脱法ドラッグ（違法ドラッグ）として乱用が社会問題となっている 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5MeO-DIPT) および植物由来の脱法ドラッグ（ハルマラ）の催幻覚成分である harmaline および harmine のモノアミン神経毒性について検討し、これらの薬剤が比較的低濃度でアポトーシス様細胞死を惹起しうること、さらに合成麻薬 MDMA および覚醒剤メタンフェタミン (METH)との同時併用により細胞毒性ならび

にアポトーシスが相乗的に増強されることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。

MDMA の構造類似体で benzylic position がケトン基に修飾されているメチロンは脱法ドラッグ（違法ドラッグ）として最近広く流通し、乱用されている。今回、MDMA の構造修飾体であるメチロンのドパミン系神経あるいはセロトニン系神経への毒性ならびに MDMA あるいは METH との併用による神経毒性の変化を明らかにするために、ドパミン系培養神経細胞 CATH.a 細胞とセロトニン系培養神経細胞 B65 細胞を用いて、メチロンの

添加ならびに MDMA あるいは METH との同時添加を行い、細胞毒性ならびに形態学的変化をアポトーシスの有無も含め評価した。

## B. 研究方法

### 1. モノアミン系培養神経細胞へのメチロン暴露

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) およびラットモノアミン系セロトニン含有神経細胞株 B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を用いて、継代 24 時間後に、メチロン標準品および流通品 (最終濃度 50  $\mu$ M ~ 2 mM) を添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を培地中への LDH 放出量を測定した。

### 2. メチロンの神経細胞毒性への MDMA 同時添加の効果

CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) および B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) をそれぞれ 24 時間培養した。メチロン標準品 (最終濃度 500  $\mu$ M、1 mM) を MDMA (最終濃度 50  $\mu$ M ~ 2 mM) と同時に添加し、24 時間培養し、形態学的変化を観察し、細胞毒性を LDH 放出量の測定により評価した。また、4% paraformaldehyde による固定の後、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. メチロンの神経細胞毒性への METH 同時添加の効果

CATH.a 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) および B65 細胞 ( $3.1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を継代 24 時間後に、メチロン標準品 (最終濃度 500  $\mu$ M、1 mM) を METH (最終濃度 250  $\mu$ M ~ 4 mM) と同時に添加した。添加後 24 時間培養し、形態学的変化を観察し、LDH 放出量を測定し細胞毒性を評価し、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。

## C. 研究結果

### 1. ドパミン系培養神経細胞へのメチロン暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

ドパミン含有培養神経細胞 CATH.a 細胞にメチロン標準品を単独添加したところ、1 mM まで細胞障害性の指標となる LDH 放出量は不変で、2 mM においてはじめて有意な増加が認められた (Fig. 1A)。形態学的には、1 mM から障害がみられ、2 mM で細胞死が惹起された。また、メチロン流通品においても同様の結果であった (Fig. 1B)。CATH.a 細胞にメチロン (標準品: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM)+MDMA (0-2 mM)、メチロン (標準品: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM)+METH (0-4 mM) を 24 時間暴露し、LDH 放出量を測定した。MDMA 単独添加の場合、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した (Fig. 1C)。METH 単独暴露では、MDMA 単独添加の場合と同様に、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した (Fig. 1D)。しかし、メチロン+MDMA では、メチロンによる MDMA の神経毒性に対する相乗効果はわずかに認められたが、メチロン+METH の同時暴露では、メチロンによる METH の神経毒性に対する相乗効果は認められなかった (Fig. 1C & 1D)。

### 2. モノアミン系セロトニン含有神経細胞へのメチロン暴露と MDMA、METH 同時添加の効果

セロトニン含有培養神経細胞 B65 細胞にメチロン標準品を添加したところ、1 mM まで LDH 放出量は不変で、2 mM ではじめて LDH 放出量の有意な増加が認められた (Fig. 2A)。また、メチロン流通品も同様の細胞毒性を呈した (Fig. 2B)。次に、B65 細胞にメチロン (標準品: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM)+MDMA (0-2 mM)、メチロン (標準品: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM)+METH (0-4 mM) を 24 時間暴露し、LDH 放出量を測定した。MDMA 単独添加の場合、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した (Fig. 2C)。単独では LDH 放出量の

増加がみられないメチロン (500  $\mu$ M, 1 mM) + MDMA (500  $\mu$ M)の同時暴露で、LDH 放出量の有意な増加 (細胞障害) がみられた(Fig. 2C)。METH 単独暴露では、MDMA 単独添加の場合と同様に、1 mM 未満では LDH 放出量は不変で、1 mM 以上で有意に増加した(Fig. 2D)。単独では LDH 放出量の増加がみられないメチロン (500  $\mu$ M, 1 mM)+METH (500  $\mu$ M, 1 mM)の同時添加では、LDH 放出量の用量依存的な増加が認められた(Fig. 2D)。

また形態学的には、メチロン単独では 1 mM から障害がみられ、2 mM で細胞死が惹起された(Figs. 3 & 5)。MDMA 単独では、1 mM 以上の高濃度の暴露で細胞死がみられた。メチロン+MDMA の同時添加では、単独では障害性の低いメチロン (500  $\mu$ M)を MDMA (500  $\mu$ M, 1 mM)と併用すると、MDMA 単独に比べ細胞障害がさらに増強された(Fig. 3)。アポトーシスに特徴的な核の形態変化を見るために B65 細胞で Hoechst 染色 (核蛍光染色) を行った(Fig. 4)。メチロン単独添加では、核の凝縮、分葉化といったアポトーシス様の形態変化は認められなかった。MDMA 単独暴露での細胞死についても、高濃度(500  $\mu$ M, 1 mM)添加の場合の一部と同様のアポトーシス様の核の形態変化がみられた。単独ではアポトーシス様変化がみられないメチロン (500  $\mu$ M)を MDMA (500  $\mu$ M, 1 mM)と同時暴露すると、MDMA 単独でのアポトーシス様変化がさらに増悪された(Fig. 4)。METH 単独添加での形態学的変化では、1 mM より細胞死が見えはじめ、2 mM 以上の高濃度の暴露ではじめて明らかな細胞死が認められた(Fig. 5)。単独では障害性の低いメチロン (500  $\mu$ M)を METH (500  $\mu$ M, 1 mM)と併用すると、METH 単独でみられる細胞障害がさらに増強された(Fig. 5)。B65 細胞へのメチロンと METH 添加後の Hoechst 染色での核の形態学的変化についても検討した(Fig. 6)。METH 単独暴露では高濃度(1 mM)で一部に核の凝縮などのアポトーシス様の形態変化がみられた。単独では障害のみられないメチロン (500  $\mu$ M)を METH

(500  $\mu$ M, 1 mM)と併用すると、METH 単独でのアポトーシス様変化が増強された。

#### D. 考察

MDMA の構造類似体で benzylic position がケトン基に修飾されているメチロンのドパミン系神経細胞とセロトニン系神経細胞への添加および MDMA あるいは METH との同時添加を行い、細胞毒性ならびに形態学的変化について検討した。

ドパミン系およびセロトニン系培養神経細胞では、メチロンの低濃度単独暴露では細胞毒性はみられないが、高濃度暴露により細胞毒性ならびに細胞死が惹起されることを明らかにした。このメチロンの毒性は MDMA とほぼ同程度であった。また、核染色による形態学的観察から、メチロン単独では核の凝縮、分葉化などのアポトーシス様形態変化を惹起しないことがわかった。

さらに、メチロンの MDMA あるいは METH との併用暴露では、セロトニン系の B65 細胞において、単独では障害性の低い濃度のメチロンは MDMA あるいは METH による細胞障害 (LDH の放出量) ならびにアポトーシス様の細胞死を相乗的に増強することが判明した。しかし、このようなメチロンによる MDMA あるいは METH の神経毒性の増強効果は、ドパミン系 CATH.a 細胞では認められなかった。これらの結果から、メチロンは単独では強い毒性を示さないものの、MDMA あるいは METH との同時乱用はセロトニン系神経細胞に強い神経毒性をもたらす危険性があると考えられる。さらに、規制薬物の一部の構造を修飾した多種の類似体を用いて神経毒性について同様の検討を行うことにより、特定の構造毒性相関を明らかにすることができると考えられる。

#### E. 結論

MDMA の構造修飾体であるメチロンが、ド

パミン系およびセロトニン系培養神経細胞において、規制薬物の MDMA と同程度の神経毒性を惹起しうることを明らかにした。また、セロトニン系神経細胞においては、メチロンと MDMA もしくは METH との同時併用により、細胞毒性ならびにアポトーシスが相乗的に増強されることが判明した。これらの結果から、メチロンは、モノアミン系神経に対して毒性を有しており、特に MDMA もしくは METH との同時乱用は強いセロトニン神経毒性をもたらす危険性を有することが判明した。さらに、規制薬物の構造修飾による神経毒性変化を検討することにより、特定の構造毒性相関を明らかにし、薬物乱用の危険性および神経毒性を予測することが可能になると考えられる。

#### F. 参考文献

- 1) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P15-24, 2004.
  - 2) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
  - 3) 浅沼幹人, 宮崎育子: MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性発現に関する研究. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「MDMA 及び脱法ドラッグの神経毒性ならびに精神依存発現メカニズムの解明」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P15-24, 2004.
  - 4) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
  - 5) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
  - 6) 浅沼幹人, 宮崎育子: 植物由来催幻覚成分の神経細胞毒性発現に関する研究. 平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業) 「植物由来催幻覚成分の薬物依存性および細胞毒性の評価」研究報告書 (主任研究者: 船田正彦). P21-42, 2005.
- 1) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience*, 133: 117-135, 2005.
  - 2) Machida, Y., Chiba, T., Takayanagi, A., Tanaka, Y., Asanuma, M., Ogawa, N., Koyama, A., Iwatsubo, T., Ito, S., Jansen, P.H., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y. and Hattori, N.: Common anti-apoptotic roles of parkin and  $\gamma$ -synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 233-240, 2005.
  - 3) Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Shimizu, M., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Pramipexole has ameliorating effects on levodopa-induced abnormal dopamine turnover in parkinsonian striatum and quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Neurol. Res.*, 27: 533-539, 2005.
  - 4) Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Clin. Neuropharmacol.*, 28: 155-160, 2005.
  - 5) Ogawa, A., Nakamura, K., Matsubara, H., Fujio, H., Ikeda, T., Kobayashi, K., Miyazaki, I., Asanuma, M., Miyaji, K., Kusano, F., Date, H. and Ohe, T.: Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 112: 1806-1812, 2005.
  - 6) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Centrosome overduplication induced by rotenone treatment affects the cellular distribution of p53 tumor suppressor protein in the neuroblastoma B65 cell line. *Psychiat. Clin. Neurosci.*, 60: S26-34, 2006.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of

- 7) Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Fukuda, M., Kitaichi, K., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules. *FASEB J.*, 10.1096/fj.05-4996fje. Published online January 10, 2006.
  - 8) Narimatsu, S., Yonemoto, R., Saito, K., Takaya, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Asanuma, M., Funada, M., Kiryu, K., Naito, S., Yoshida, Y., Yamamoto, S. and Hanioka, N.: Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
  - 9) Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Miyoshi, K.: L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection: Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurol.*, 252 (Suppl 4): iv23-iv31, 2005.
  - 10) 浅沼幹人, 宮崎育子: 薬物依存・毒性発現にかかわる分子の分子生物学的検索法—網羅的プロファイリングを中心に. *日本薬理学雑誌*, 126: 30-34, 2005.
  - 11) 浅沼幹人: ドパミン受容体アゴニストによるドパミンニューロン死の制御. *Clinical Neuroscience*, 23: 1342-1343, 2005.
  - 12) 浅沼幹人, 小川紀雄: 酸化ストレスによる神経障害と神経保護療法—ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのキノン体毒性. *医学のあゆみ*, 215: 785-792, 2005.
2. 学会等発表
- 1) Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Diaz-Corrales, F.J.: Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. 9th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New Orleans, 2005, 3, 7.
  - 2) Francisco J. Diaz-Corrales, 浅沼幹人, 宮崎育子, 三好 耕, 小川紀雄: ロテノンのドパミン神経毒性における中心体-微小管構成異常の関与. 第 13 回カテコールアミンと神経疾患研究会, 東京, 2005, 4, 23.
  - 3) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体に特異的な L-DOPA 誘発キノン体生成. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005, 5, 26.
  - 4) 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 過剰ドパミンおよびメタンフェタミン誘発ドパミン神経障害における共通因子としてのキノン体生成. 第 32 回日本脳科学会, 千葉, 2005, 6, 3.
  - 5) 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのドパミンキノンに対するシステイン基含有分子の消去作用. 第 32 回日本脳科学会, 千葉, 2005, 6, 3.
  - 6) 浅沼幹人: ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのドパミンキノン生成. 第 27 回日本生物学的精神医学会・第 35 回日本神経精神薬理学会合同年会, シンポジウム 2「ドパミン神経の脆弱性とその保護」, 大阪, 2005, 7, 6.
  - 7) 宮崎育子, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 清水雅子, 北市清幸, 小川紀雄: キノン生成体のメタンフェタミン急性ドパミン神経毒性発現における関与. 第 27 回日本生物学的精神医学会・第 35 回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 7.
  - 8) 田中健一, 福原薫子, 浅沼幹人, 小川紀雄: レボドパは 6-ヒドロキシドパミン由来の小胞体ストレスを増悪するがドパミンアゴニスト併用は抑制する. 第 27 回日本生物学的精神医学会・第 35 回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 7.
  - 9) Francisco J. Diaz-Corrales, Masao Asanuma,



- Ikuko Miyazaki, Ko Miyoshi and Norio Ogawa: Aggregation of proteins in the centrosome and its importance in the neurodegenerative process. 第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会, 大阪, 2005, 7, 8.
- 10) 浅沼幹人, 清水雅子, 宮崎育子, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 小川紀雄: パーキンソン病モデルへのL-DOPA投与により誘発されるアポトーシス促進因子PAG608の運動ニューロンでの特異的発現. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 26.
- 11) 三好 耕, 大西一成, 浅沼幹人, 宮崎育子, Francisco J. Diaz-Corrales, 小川紀雄: 発達期マウスにおけるpericentrinの発現解析. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 26.
- 12) 宮崎育子, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 清水雅子, 三好 耕, 小川紀雄: メタンフェタミン神経毒性発現におけるキノン生成の関与. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005, 7, 27.
- 13) 浅沼幹人, 宮崎育子, 清水雅子, 小川紀雄: p53関連アポトーシス促進因子PAG608のパーキンソン病モデル線条体でのL-DOPA投与による特異的誘導と脳神経核運動ニューロンでの特異的局在. 第3回神経科学研究会, 東京, 2005, 9, 17.
- 14) 浅沼幹人, 宮崎育子, Francisco J. Diaz-Corrales, 難波正義, 小川紀雄: Transplantation of tyrosinase cDNA-transfected hepatocytes into the striatum of hemi-parkinsonian model. 第48回日本神経化学会, 福岡, 2005, 9, 28.
- 15) 宮崎育子, 辻 武史, 浅沼幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 小川紀雄: Mechanism of protective effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on methamphetamine-induced neurotoxicity. 第48回日本神経化学会, 福岡, 2005, 9, 28.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得  
 特になし  
 実用新案登録  
 特になし  
 その他  
 特になし

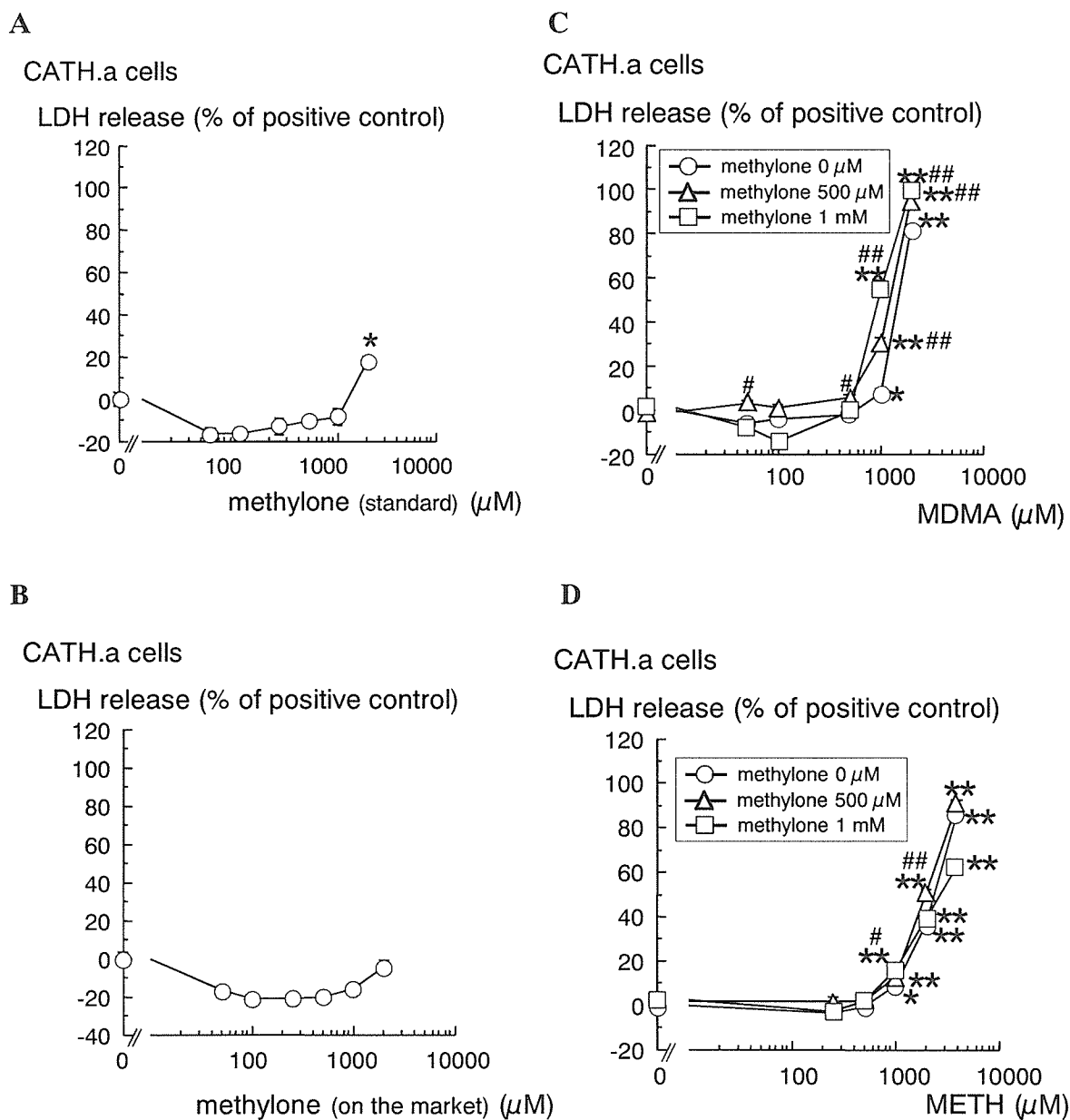


Fig. 1. Changes in released LDH from dopaminergic CATH.a cells after exposure to methylone (A: standard compound; B: compound on the market), or methylone (standard)+MDMA (C) or +METH (D) for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. each control group without MDMA or METH. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. MDMA/METH-dose-matched control group without methylone.

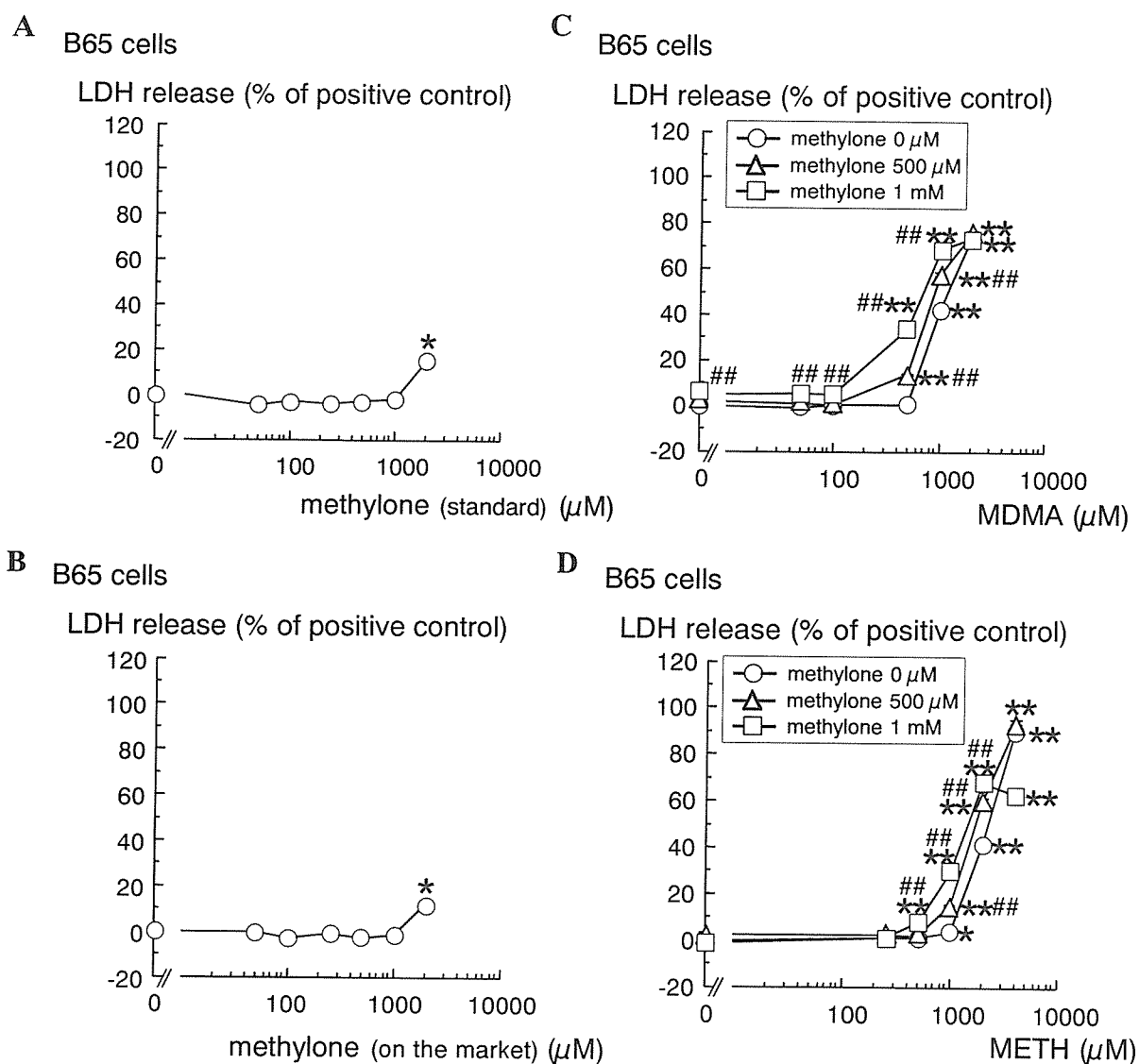


Fig. 2. Changes in released LDH from serotonergic B65 cells after exposure to methylone (A: standard compound; B: compound on the market), or methylone (standard)+MDMA (C) or +METH (D) for 24 hours. Each value mean  $\pm$  SEM of released LDH expressed as percentage of Tween-20-treated positive control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. each control group without MDMA or METH. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. MDMA/METH-dose-matched control group without methylone.

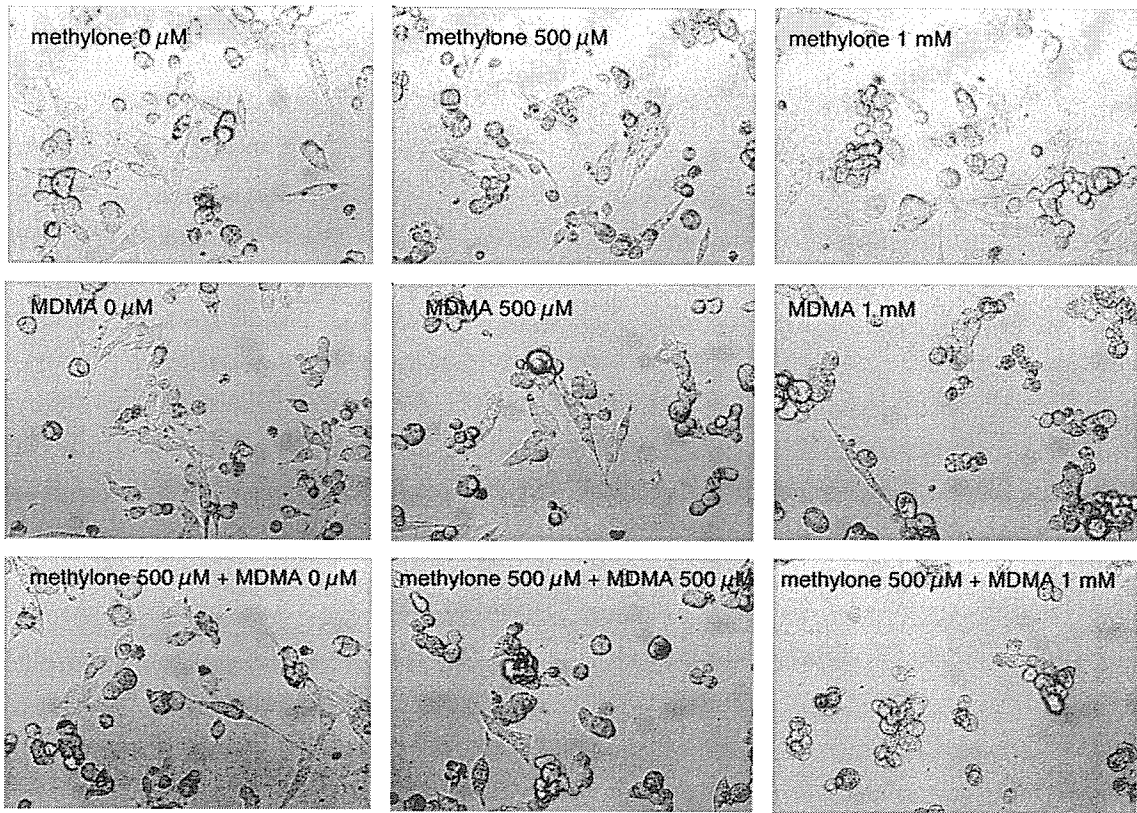


Fig. 3. Photographs of B65 cells treated with methylone and/or MDMA (final concentration: 0, 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM) for 24 hours.

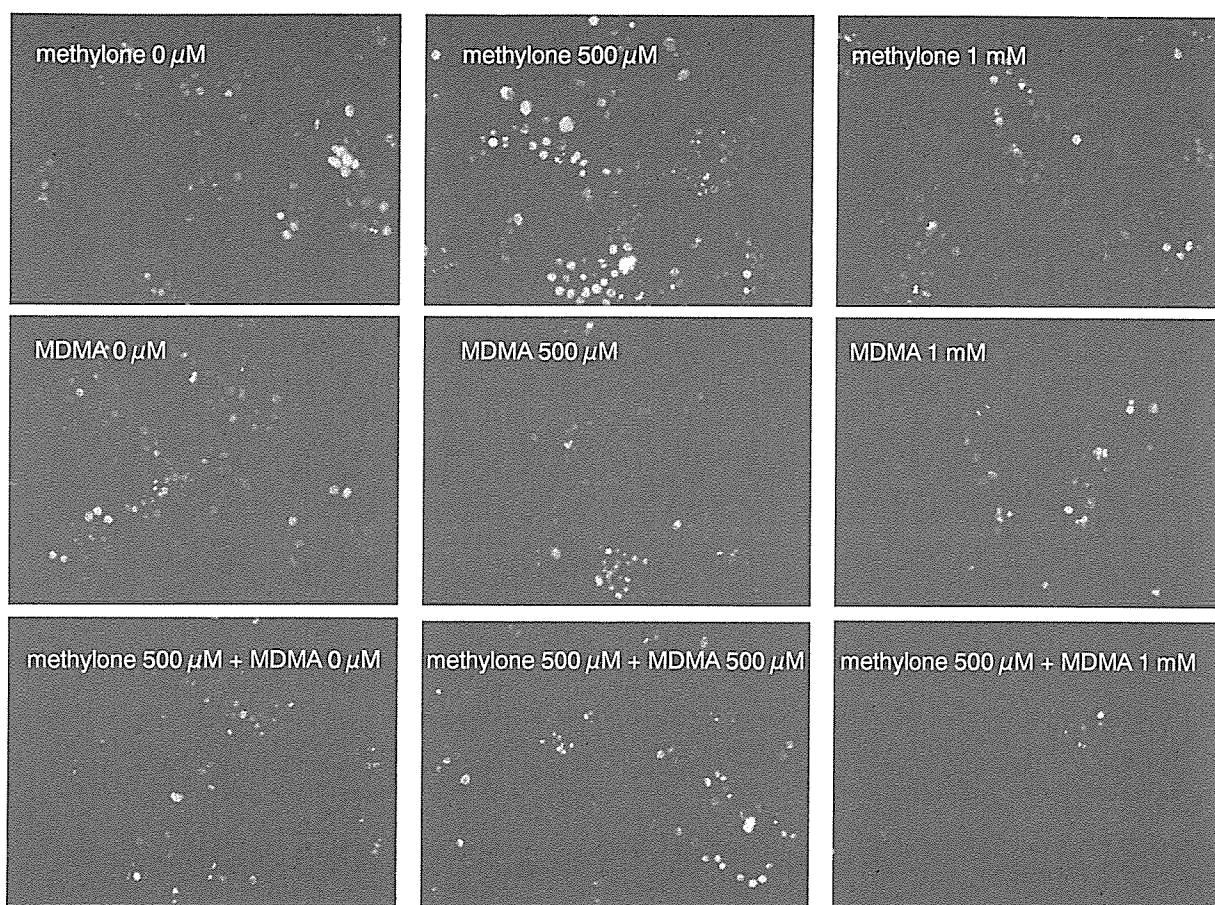


Fig. 4. Nuclear staining of B65 cells treated with methylene and/or MDMA (final concentration: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours. Nuclei were visualized by incubation with Hoechst33342 dye.

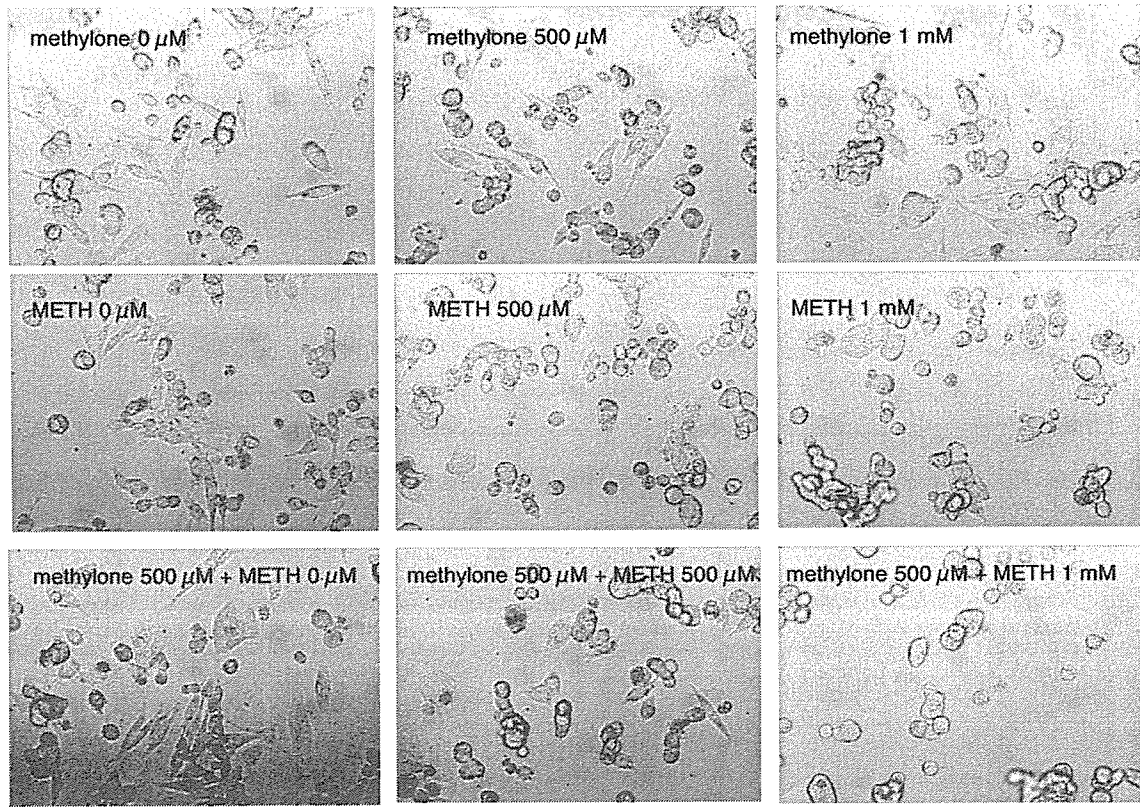


Fig. 5. Photographs of B65 cells treated with methylone and/or METH (final concentration: 0, 500  $\mu$ M, 1 mM) for 24 hours.

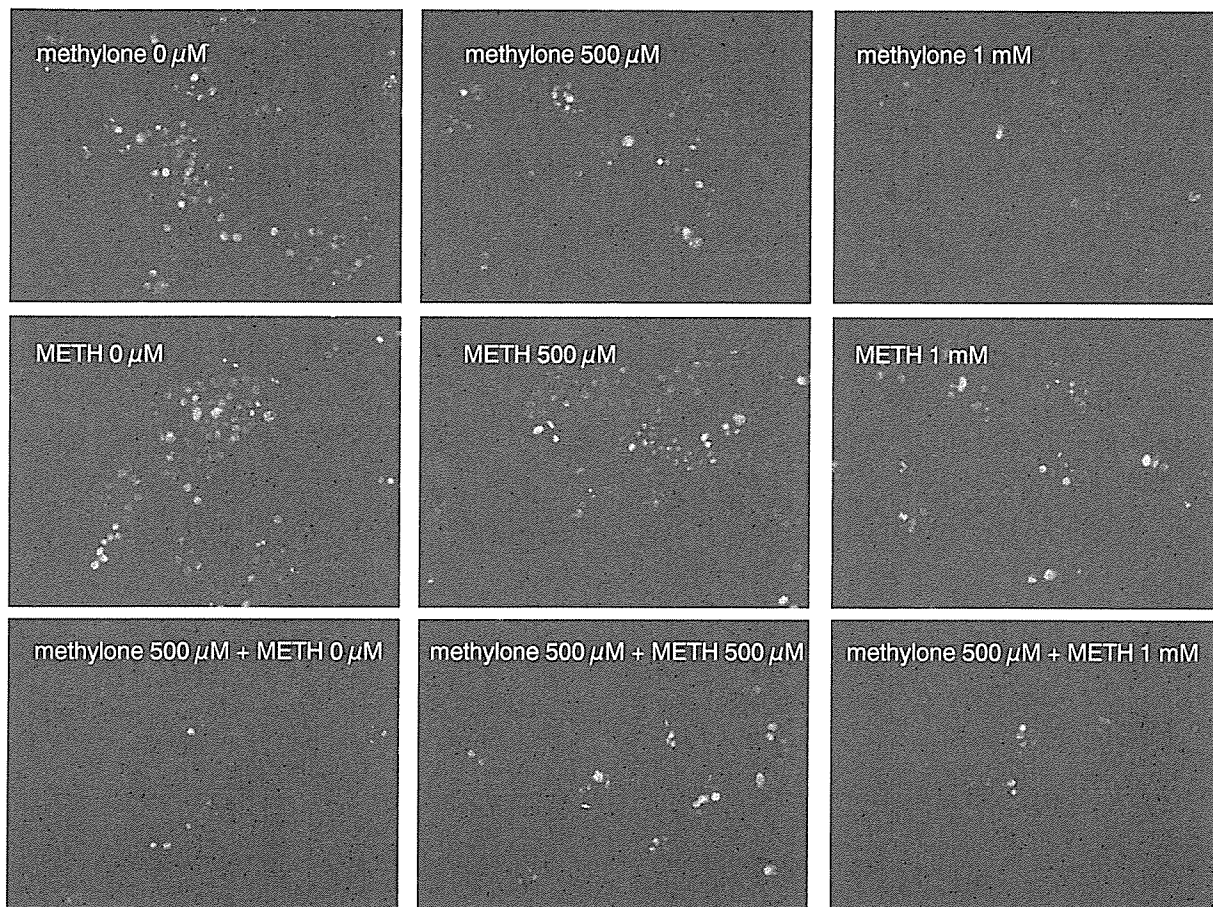


Fig. 6. Nuclear staining of B65 cells treated with methylene and/or METH (final concentration: 0, 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM) for 24 hours. Nuclei were visualized by incubation with Hoechst33342 dye.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
船田 正彦	条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価：基礎と応用	日薬理誌	126	10-16	2005
Sato M, Wada K, Funada M.	Barium potentiates the conditioned aversion to, but not the somatic signs of, morphine withdrawal in mice.	Eur J Pharmacol.	519	215-222	2005
船田正彦, 佐藤美緒, 周曉華, 金井裕子, 和田清.	揮発性有機溶剤の精神依存形成メカニズム	日本神経精神薬理学雑誌	25	1-9	2005
船田正彦, 佐藤美緒, 青尾直也, 和田清	依存性薬物による脳内遺伝子群の発現調節	生体の科学	56	323-327	2005
Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.	Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration.	Neuroscience	133	117-135	2005
Machida, Y., Chiba, T., Takayanagi, A., Tanaka, Y., Asanuma, M., Ogawa, N., Koyama, A., Iwatsubo, T., Ito, S., Jansen, P.H., Shimizu, N., Tanaka, K., Mizuno, Y. and Hattori, N.	Common anti-apoptotic roles of parkin and $\gamma$ -synuclein in human dopaminergic cells.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	332	233-240	2005
Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Shimizu, M., Tanaka, K. and Ogawa, N.	Pramipexole has ameliorating effects on levodopa-induced abnormal dopamine turnover in parkinsonian striatum and quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro.	Neurol. Res.	27	533-539	2005
Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Miyoshi, K. and Ogawa, N.	Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro.	Clin. Neuropharmacol.	28	155-160	2005
Ogawa, A., Nakamura, K., Matsubara, H., Fujio, H., Ikeda, T., Kobayashi, K., Miyazaki, I., Asanuma, M., Miyaji, K., Kusano, F., Date, H. and Ohe, T.	Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.	Circulation	112	1806-1812	2005
Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.	Centrosome overduplication induced by rotenone treatment affects the cellular distribution of p53 tumor suppressor protein in the neuroblastoma B65 cell line.	Psychiat. Clin. Neurosci.	60	S26-34	2006



Miyazaki, I., Asanuma, M., Diaz-Corrales, F.J., Fukuda, M., Kitaichi, K., Miyoshi, K. and Ogawa, N.	Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules.	FASEB J.	online January 10	10.1096/fj.05-4996fje	2006
Narimatsu, S., Yonemoto, R., Saito, K., Takaya, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Asanuma, M., Funada, M., Kiryu, K., Naito, S., Yoshida, Y., Yamamoto, S. and Hanioka, N.	Oxidative metabolism of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes.	Biochem. Pharmacol.			In press
Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J. and Miyoshi, K.	L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection: Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease.	J. Neurol.	252 (Suppl 4)	iv23-iv31	2005
浅沼幹人, 宮崎育子	薬物依存・毒性発現にかかわる分子の分子生物学的検索法—網羅的プロファイリングを中心に.	日薬理誌	126	30-34	2005
浅沼幹人	ドパミン受容体アゴニストによるドパミンニューロン死の制御.	Clinical Neuroscience	23	1342-1343	2005
浅沼幹人, 小川紀雄	酸化ストレスによる神経障害と神経保護療法—ドパミン神経特異的酸化ストレスとしてのキノン体毒性.	医学のあゆみ	215	785-792	2005

## 特集

## 脳の遺伝子—どこでどのように働いているのか

## 依存性薬物による脳内遺伝子群の発現調節

船田正彦 佐藤美緒 青尾直也 和田 清

規制薬物および未規制薬物(脱法ドラッグ)の乱用は、若年層への拡大が表面化しており、わが国において大きな社会問題となっている。特に、覚せい剤であるメタンフェタミン(METH)の乱用は深刻化しており、METHの慢性的な使用により精神疾患を発症することが知られている。医療施設における薬物関連精神疾患に関する調査から、その発病に至る薬物としてMETHが50%程度を占め主要な原因薬物になっているのが現状である<sup>1)</sup>。こうした薬物関連精神疾患、薬物依存症の治療法の確立およびその治療薬の開発のために、依存性薬物による精神依存形成機構の解明が必要である。

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、さら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チップ法(マイクロアレイ法)が注目されている<sup>2,3)</sup>。マイクロアレイ法は同一条件下で多種類の遺伝子発現の解析が可能である。さらに、迅速にデータ解析ができるという特徴を有する。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、薬物依存形成の原因遺伝子の同定にも応用が期待できる。マイクロアレイ法を用いて、覚せい剤であるMETHの急性投与

もしくはMETHの慢性投与によって変動する脳内遺伝子群の比較検討を行うことは興味深い。本稿では、現在までに行ったマイクロアレイ法を利用したMETHによる遺伝子発現の変動に関する解析結果について紹介する。

## 1 薬物による遺伝子発現の網羅的解析とマイクロアレイ法

様々な病態の発症機構を解明する目的で、遺伝子発現の解析は重要である。DNAコード領域を反映するmRNAの変動解析は、遺伝子多型の同定および遺伝子発現定量の手段として利用される。個々のmRNA発現レベルはストレス、熱および光などの外部環境因子と薬物やホルモンなどの化学物質により影響を受けるため、生体が有する遺伝的な多様性のみならず、その機能に関する特性を反映する情報として利用できる。また、近年の遺伝子改変動物などを利用した研究から、睡眠などの生理現象とmRNA発現変化の関連性が解明されている<sup>4)</sup>。すなわち、遺伝子発現の差異に基づく生理作用発現メカニズムの解明および疾患の原因遺伝子の探索に応用されるに至ったわけである。

ヒトゲノム配列の決定により、これを有効に利用するためにマイクロアレイ法による遺伝子発現の網羅的解析が注目されている<sup>2-4)</sup>。マイクロアレイ法では、スライドガラスもしくはシリコン基板上に標的となるDNAのcDNA(オリゴヌクレオ

## Modifications of gene expression by the abused drug

Masahiko Funada, Mio Sato, Naoya Aoo, Kiyoshi Wada  
薬物依存研究部(〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1)

[著者連絡先] 国立精神・神経センター 精神保健研究所

チドや PCR 産物)がスポットされた cDNA チップを利用する。既製品の cDNA チップに加え、カスタム作製が可能でありその用途は幅広い。動物や培養細胞を利用して、特定のリガンドの刺激により変動する mRNA をプロファイリングするためにマイクロアレイ法は有用である。例えば医薬品の開発分野では、薬物代謝経路に関係する遺伝子の誘導を調べることにより、その薬物の毒性と薬物動態(薬物代謝)を評価するプロセスで応用されている。薬物依存の研究領域においても、依存性薬物による脳内の mRNA 発現レベルの変動比較を行う目的で、マイクロアレイ法(cDNA チップ)を利用した網羅的な解析が行われるようになった<sup>3)</sup>。

## 2 薬物依存形成に関連する脳内神経系

薬物の精神依存形成メカニズムの解明には、精神依存動物モデルを確実かつ安定して獲得することが必須である。条件付け場所嗜好性試験(conditioned place preference, CPP 法)は、国内および海外の多くの研究施設において、薬物の精神依存形成能を予測する方法として利用されている<sup>5)</sup>。本法は薬物による快感などの感覚効果と滞在する区画の特性を条件付けさせることにより、薬物の報酬効果(rewarding effect)から薬物の精神依存性を評価するものである<sup>5)</sup>。この CPP 法の原理に従って薬物を慢性投与することにより、確実に精神依存動物が獲得できる。さらに、「薬物の脳内微量注入による条件付け」の技術を導入することで、精神依存形成の責任脳部位に関する研究も進展している。

こうした研究を通じて、薬物精神依存形成には腹側被蓋野(ventral tegmental area: VTA)から側坐核に投射している中脳辺縁ドパミン神経系の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになっている<sup>6,7)</sup>。つまり、依存性薬物の投与によって中脳辺縁ドパミン神経系の投射先である側坐核においてドパミン遊離は著明に増加し、これが薬物精神依存形成に関与しているとされる<sup>6,7)</sup>。さらに、依存性薬物を連続投与後、薬物の再投与により行動発現の増感現象すなわち逆耐性

現象が発現することが知られている。この依存性薬物によって引き起こされる逆耐性についても、中脳辺縁ド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>6,7)</sup>。以上の知見から、薬物の精神依存形成メカニズムを解明するために中脳辺縁ドパミン神経系に関連する脳部位、すなわち細胞体である VTA 含有部位および主要な投射先にあたる側坐核に着目した研究が有効であると考えられる。

## 3 依存性薬物による遺伝子発現

中脳辺縁ドパミン神経系は薬物による精神依存形成に関与すると考えられる。この脳部位に着目して、薬物の急性処置後に変動する遺伝子群を同定することは興味深い。そこで、依存性薬物である METH と若年層での乱用が問題になっている「エクスタシー」と称される MDMA について、薬物投与による遺伝子発現変動を検討した。

遺伝子発現の網羅的解析は cDNA マイクロアレイ IntelliGene(Mouse CHIP Set II, 宝酒造: <http://bio.takara.co.jp/catalog>)を用いて行った。METH (4 mg/kg) および MDMA (10 mg/kg) 投与 4 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含む前脳辺縁部を分画し、mRNA の抽出を行った。ラベル方法としては、プライマーとしてオリゴ dT (18) プライマーを使用し、ポリ A 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 ポリ A RNA 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マウス由来既知遺伝子 4277 種の解析が可能である IntelliGene(Mouse CHIP Set II, 宝酒造: <http://www.takara-bio.co.jp/>)を用いて行った。Cy3 および Cy5 の各波長は Afymetrix 428 アレイスキャナーにより検出した。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スキャッタープロットを作製し、内部標準物質として加えた lambda およびハウスキーピング( $\beta$ -アクチン)遺伝子の発現

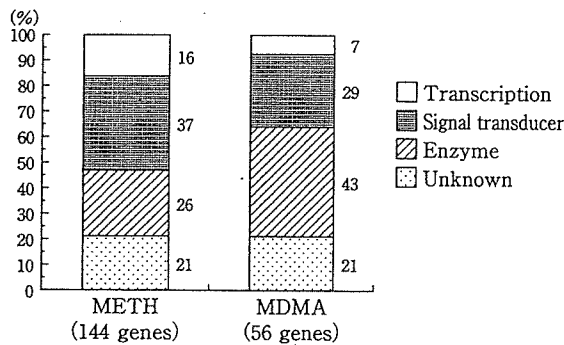


図1 メタンフェタミンおよびMDMA処置後の遺伝子発現変動

メタンフェタミン(METH, 4 mg/kg)およびMDMA (10 mg/kg)によるmRNA発現増加。薬物投与4時間後、側坐核における変動を解析した。METHでは144種、MDMAでは56種が変動していた。それぞれの薬物において変動が認められたものを機能別にその内訳を%表示した。

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。METHおよびMDMA投与4時間後の前脳辺縁部における遺伝子発現変動を検討し、安定した発現量が認められた遺伝子群について、その変化率を算出した。

その結果、METH投与によって144個の遺伝子が増加(1.5倍以上)していた。変動が確認された遺伝子群を機能から四つに分類したところ、転写因子関連遺伝子:16%、シグナル変換関連遺伝子:37%および酵素関連遺伝子:26%であった。また、機能が明確でない遺伝子が21%含まれていた(図1)。MDMA投与では、56個の遺伝子が増加(1.5倍以上)していた。変動が確認された遺伝子群を機能から四つに分類したところ、転写因子関連遺伝子:7%、シグナル変換関連遺伝子:29%および酵素関連遺伝子:43%であった。機能が明確でない遺伝子が21%あった(図1)。さらに、薬物間で比較したところMETHおよびMDMAの投与で共通して変動する遺伝子 glucocorticoid-induced leucine zipper(GILZ)を見出した。RT-PCR法にてGILZ mRNA発現量を確認したところ、有意な増加が認められた。

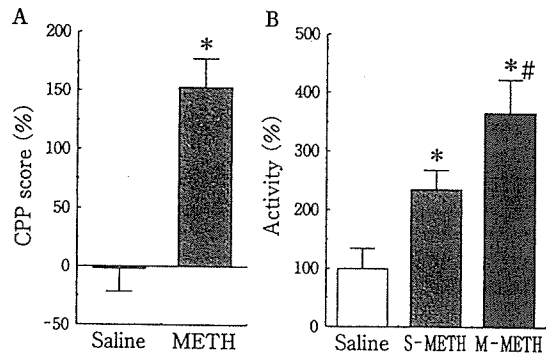


図2 メタンフェタミンの処置マウスの行動解析

A. メタンフェタミン(METH)による報酬効果(CPP)の発現。METH(2 mg/kg)は1日1回7日間にわたって投与した。B. METHによる運動促進作用における逆耐性の発現。急性投与群(S-METH)はMETH(2 mg/kg)投与後120分間の運動量を測定した。慢性投与群(M-METH)はMETHを1日1回6日間にわたって投与し、最終投与24時間後にMETHを再度投与し、120分間の運動量を測定した。(文献14より引用)

#### 4 精神依存と脳内遺伝子発現

薬物依存形成に関連する遺伝子群を同定するにあたり、依存性薬物を処置した薬物依存動物の作製が必須である。当研究部では、前述したように薬物の条件付けを利用したCPP法により薬物精神依存モデルを作製している。実験にはマウスを使用し、CPP法に従い白黒2区画のCPP装置(ENS-CPP, Neuroscience社)を用いて、METH(2 mg/kg)を1日1回投与し、白もしくは黒区画に閉じ込め、7日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である生理食塩液を投与し、METH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時間後に薬物および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。その結果、METHの条件付けにより有意な場所嗜好性の発現(報酬効果)が認められた(図2A)。さらに、同様な薬物処置のスケジュールで運動量の変化を測定した。METH(2 mg/kg)は1日1回7日間にわたって慢性投与した。METH慢性投与終了後、24時間後にMETH(2 mg/kg)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