

セロトニンおよびドパミン含有量を、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。なお、中脳切片培養系で得られたセロトニン遊離量に関する結果は、処置を行う前日に測定したbasalレベルでの5-HIAA遊離量で補正した。

## 5. cRNA注入卵母細胞の調製

ラット由来SERT、ヒト由来DATをコードするプラスミドDNAより、SP6あるいはT7 RNAポリメラーゼを用いて、各々のcRNAを合成した。低温麻酔を施したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の腹腔内より卵巣を摘出し、コラゲナーゼを含む培養液中で18°C、60分、緩やかに振とうして、卵母細胞を覆う濾胞を除去した。Dummont分類のV~VI相(直径が1mm以上)のもので、動物極と植物極の境界が鮮明な卵を選択し、SERTまたはDATのcRNAをそれぞれ一卵母細胞あたり25ng注入し、3~4日培養した。

## 6. 電気生理学的測定

記録溶液には通常、Frog Ringer溶液 (in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, pH 7.4)、もしくはBa<sup>2+</sup> Frog Ringer溶液 (in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 2.5 BaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4)を用い、Na<sup>+</sup> free条件下にはNa<sup>+</sup>をN-methyl d-glucamineで置換したNMDG<sup>+</sup> Frog Ringer溶液を用いた。卵母細胞をチャンバーの溝に静置し、重力を利用して記録溶液を流速1.5ml/minで灌流した。Whole-cell膜電流の測定は、膜電位固定用増幅器に接続された、3 M KClを充填した2本のガラス電極(抵抗: 1-2 MΩ)を細胞内に刺入し、膜電位を-80 mVに固定して行った。全ての薬物は記録溶液に溶解して用いた。

## 7. セロトニン取り込み実験

cRNAを注入した卵母細胞を100nMの[<sup>3</sup>H]セロトニン(722 GBq/mmolを加えた10μMセロトニン)を含むFrog Ringer溶液中で10分間インキュベートした。氷冷したNMDG<sup>+</sup> Frog Ringer溶液で3回洗浄した後、2% SDSを加えて可溶化し、卵母細胞に取り込まれた[<sup>3</sup>H]標識体の放射活性を、液体シンチレーションカウンタにより測定した。トランスポーター特異的な取り込みはcRNAを注入していない卵母細胞での測定値を差し引くことで求めた。

## C. 研究結果

### 1. 縫線核含有中脳切片培養系を用いた検討

#### a) セロトニン神経毒性評価系の検討

縫線核セロトニン神経を含有する中脳切片培養系に対して、セロトニン神経選択的神経毒5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)によるセロトニン神経毒性と、その毒性に対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)であるシタロプラムの効果を検討した(Fig.2)。本中脳切片培養系に5,7-DHT(200μM)を48時間処置することにより、細胞内のセロトニンおよびその代謝産物である5-HIAA含有量は著明に減少した。この5,7-DHTによるセロトニン神経毒性は、シタロプラム(1および10μM)の同時処置により、濃度依存的に抑制された。なお、シタロプラム(10μM)の単独処置では、セロトニンおよび5-HIAA含有量に顕著な影響は見られなかった。

#### b) MDMAおよびMETHによるセロトニン遊離

本中脳切片培養系に、MDMAおよびMETHを30分間処置し、細胞外に遊離されるセロトニン量を測定した。その結果、MDMA(0.1-1000μM)を30分間処置することにより濃度依存的にセロトニン遊離量が増加した。

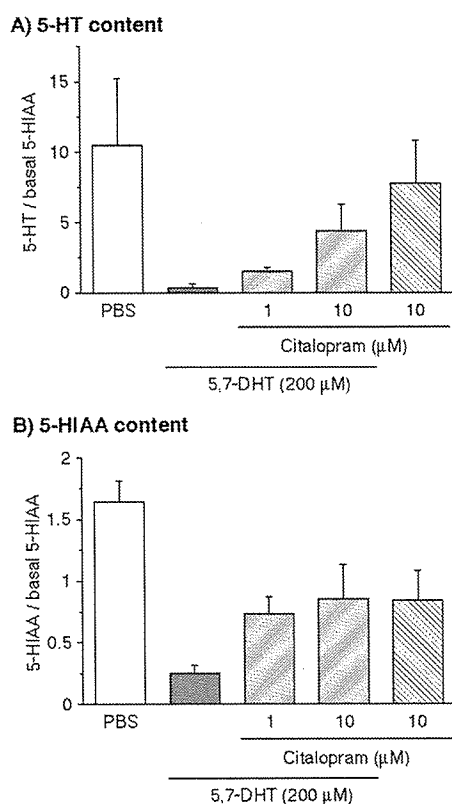


Fig.2 5,7-DHTによるセロトニン神経毒性に対するシタロプラムの効果

縫線核含有中脳切片培養系に、5,7-DHT (200μM) およびシタロプラム (1および10μM) を48時間処置し、細胞内に含有されるセロトニンおよび5-HIAA量をHPLCにより測定した。得られた結果は、処置前日に測定した5-HIAA遊離量で補正した。n=3

1-100μMにおいても濃度依存的な遊離促進が認められたが、1000μMという高濃度を処置することにより、顕著な遊離促進が見られた (Fig.3A)。また、METH (0.1-1000μM) の処置によっても濃度依存的なセロトニン遊離促進が見られたが、同様に1000μMという高濃度によって顕著な作用が認められた (Fig.3B)。

#### c) MDMA及びMETHによるセロトニン神経毒性

本中脳切片培養系に、MDMA及びMETHを48時間処置し、細胞内セロトニンおよび5-HIAA含有量を測定した。今回の検討では、コントロールとなるべきPBS処置により、セロトニンおよび5-HIAA含有量が予期せず少ないものとなり、十分な解析は困難であった

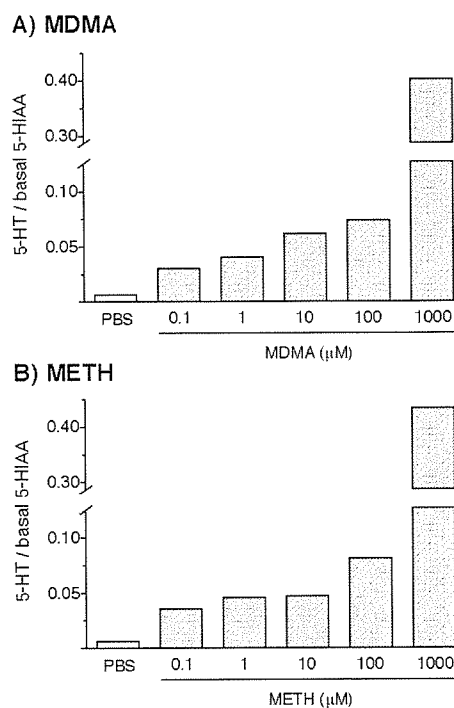


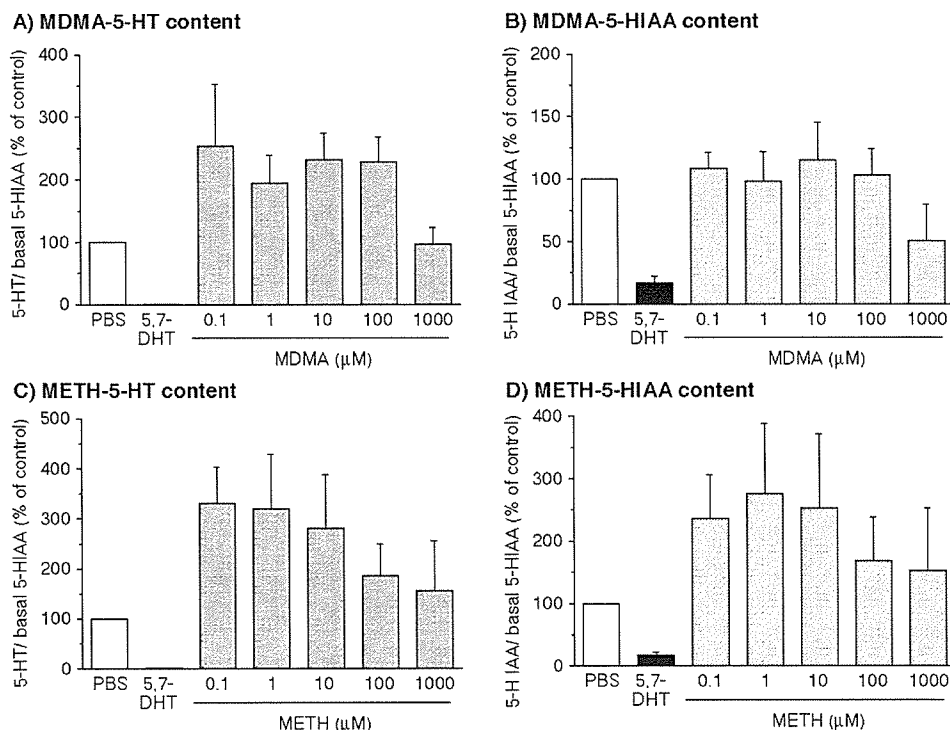
Fig.3 MDMAおよびMETHによるセロトニン遊離

縫線核含有中脳切片培養系に、MDMA (0.1-1000μM) あるいはMETH (0.1-1000μM) を30分間処置し、遊離されるセロトニン量を測定した。得られた結果は、処置前日に測定した5-HIAA遊離量で補正した。n=2

め、MDMA、METHの効果をその傾向で判断した。まず、ポジティブコントロールとなる5,7-DHTの処置によっては、a)と同様にセロトニンおよび5-HIAA量は顕著に減少した。また、MDMA (0.1-1000μM) を48時間処置することにより、1000μMという高濃度においてのみ、セロトニンおよび5-HIAA量の減少傾向が見られた。また、METH (0.1-1000μM) の処置により、100および1000μMにおいてセロトニンおよび5-HIAA量の減少傾向が見られた (Fig.4)。

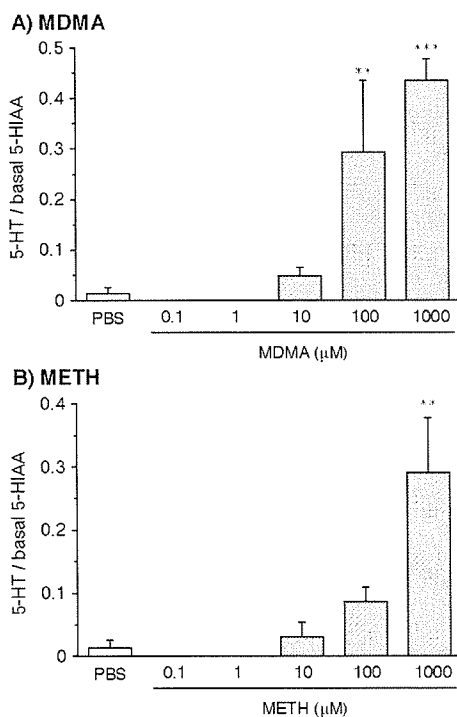
#### d) MDMAおよびMETHの48時間処置後におけるセロトニン基礎遊離促進

各濃度のMDMAおよびMETH (共に0.1-1000μM) を48時間処置した後のセロトニン神経活動を観察する目的で、処置後、薬物をリングル液で15分間洗浄除去し、何も薬物を



**Fig.4 MDMAおよびMETHによるセロトニン神経毒性**

縫線核含有中脳切片培養系に、5,7-DHT (200μM)、MDMA (0.1-1000μM) あるいはMETH (0.1-1000μM) を48時間間処置し、細胞内に含有されるセロトニンおよび5-HIAA量をHPLCにより測定した。得られた結果は、処置前日に測定した5-HIAA遊離量で補正した。n=3



**Fig.5 MDMAおよびMETH48時間処置後のセロトニン基礎遊離量**

縫線核含有中脳切片培養系に、MDMA (0.1-1000μM) あるいはMETH (0.1-1000μM) を48時間処置し、洗浄後、遊離される基礎セロトニン量を測定した。得られた結果は、処置前日に測定した5-HIAA遊離量で補正した。\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs PBS, n=4

添加しないリングル液で30分間インキュベーションして、遊離されるセロトニン量を測定した。その結果、MDMAおよびMETHの48時間処置後のセロトニン基礎遊離量は、薬物を洗浄除去した後であるにも拘わらず、濃度依存的に増加し、100および1000μMにおいて、顕著な作用が認められた (Fig.5)。

## 2. 中脳皮質辺縁脳切片共培養系を用いた検討

### a) ドパミン神経の確認

それぞれVTA、NAc、mPFCを含む3枚の切片を隣接させて共培養させた中脳皮質辺縁脳切片共培養系に対して、THに対する免疫染色を施したところ、中脳切片のVTAおよび黒質周辺に多数のTH陽性の細胞体が観察され、またその軸索がNAcおよびmPFCに対して投射していることが確認できた (Fig.6)。

### b) METHおよびMDMAによるドパミン遊離

本脳切片共培養系に、METHおよびMDMAを30分間処置し、細胞外に遊離されるド

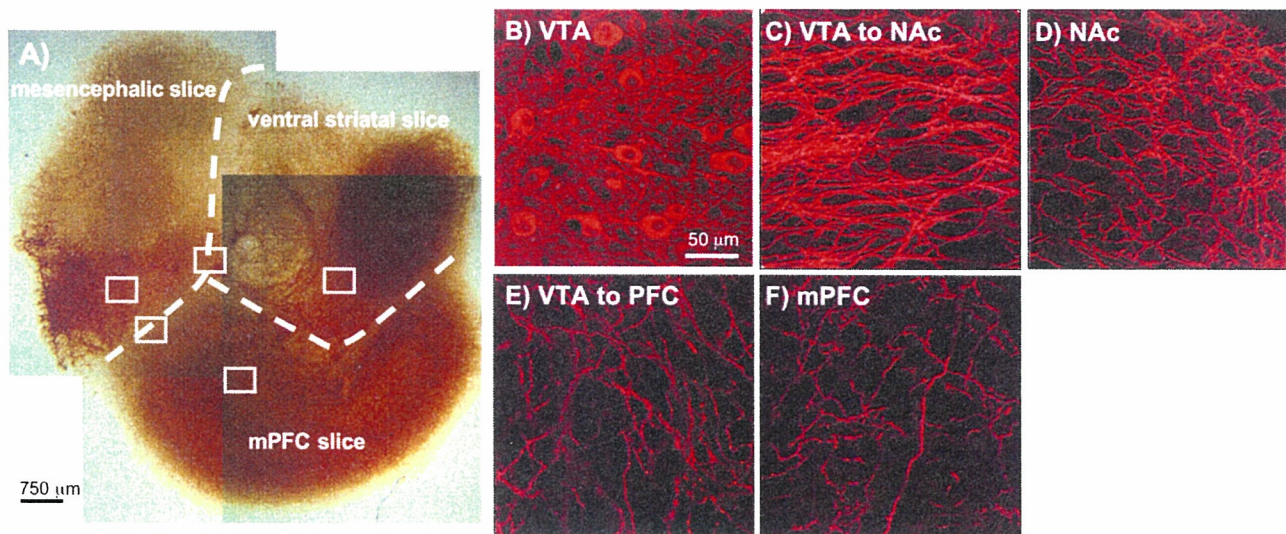


Fig.6 中脳皮質辺縁脳切片共培養系のTH免疫染色像

A) TH抗体による免疫染色を行った共培養切片全体の写真 (DAB 発色)、B-F) 枠内の拡大図 (蛍光免疫染色)

パミン量を測定した。その結果、METH (0.1-1000 $\mu$ M) を30分間処置することにより、10 $\mu$ Mからドパミン遊離量が増加しはじめ、100および1000 $\mu$ Mにより、顕著な遊離促進が見られた (Fig.7A)。また、MDMA (0.1-1000 $\mu$ M) の処置によっても濃度依存的なドパミン遊離促進作用が見られたが、METHと比較して弱いものであった (Fig.7B)。

#### c) METH 反復処置によるドパミン遊離増強現象

次に、METH 反復処置によるドパミン遊離への影響を検討した。反復処置するMETHは、比較的低濃度で、予備実験において細胞毒性がほとんど生じないことが確認できた10 $\mu$ Mを選択し、1日30分間の処置を6日間連続して反復処置した。その結果、METH 反復処置により、ドパミン遊離量は日を追う毎に増加していき (Fig.8A)、7日目にMETH 反復処置群およびPBS 反復処置群両者に対してMETH (10 $\mu$ M) をチャレンジしたところ、PBS 反復処置群と比較してMETH 反復処置群では、METHによるドパミン遊離作用が有意に増強された (Fig.8B)。

d) METH 反復処置によるドパミン遊離増強現象におけるmPFC由来グルタミン酸神経の関与  
次に、METH 反復処置によるドパミン遊離増強現象のメカニズムとして、mPFC由来

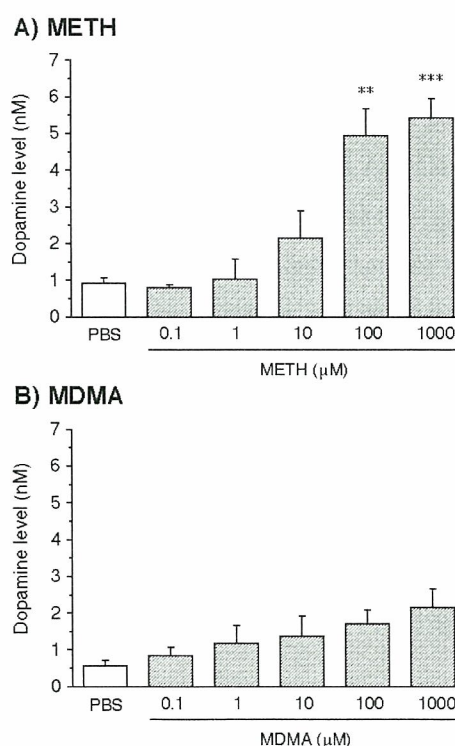
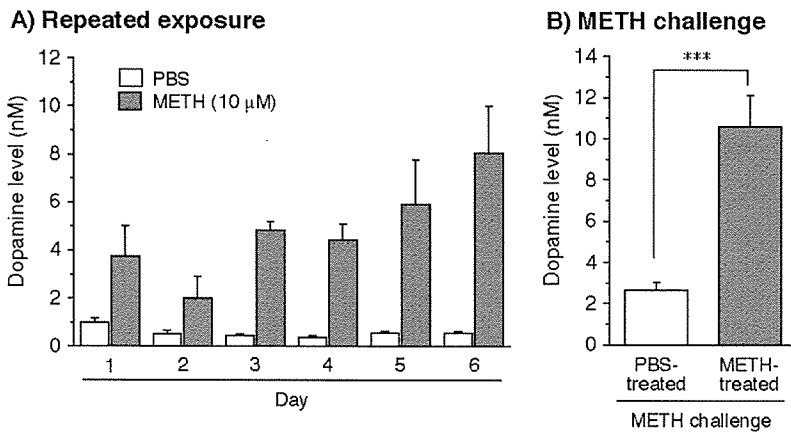


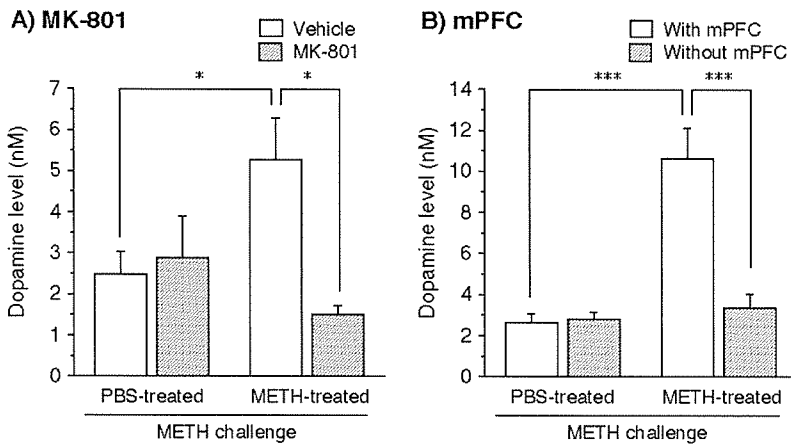
Fig.7 METHおよびMDMAによるドパミン遊離

中脳皮質辺縁脳切片共培養系に、METH (0.1-1000 $\mu$ M) あるいはMDMA (0.1-1000 $\mu$ M) を30分間処置し、遊離されるドパミン量を測定した。\*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs PBS,  $n$ =3-7.



**Fig.8 METH反復処置によるドーパミン遊離増強現象**

A) 中脳皮質辺縁脳切片共培養系に対して、PBSあるいはMETH (10μM) の30分間処置を6日間繰り返し、その都度、遊離されるドーパミン量を測定した。B) 6日間の反復処置後、7日目にMETH challengeとして、各群にMETH (10μM) を30分間処置し、遊離されるドーパミン量を測定した。\*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3-4$



**Fig.9 METH誘発ドーパミン遊離増強現象におけるmPFC由来グルタミン酸神経の関与**

A) PBSあるいはMETH (10μM) の6日間反復処置時にvehicleあるいはMK-801 (10μM) を同時に処置した。B) mPFCを含まないVTA/NAcの2枚の脳切片共培養系に対して、PBSあるいはMETH (10μM) を6日間反復処置した。ともに、7日目にMETH (10μM) をchallengeし、遊離されるドーパミン量を測定した。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3-7$

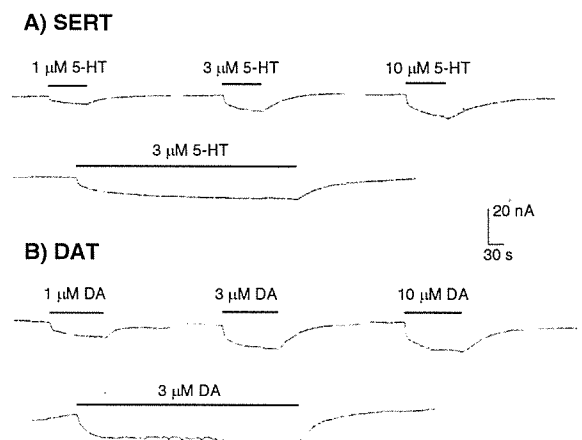
のグルタミン酸神経の関与を明らかにするため、NMDA受容体拮抗薬を用いた検討とmPFC切片の有無による影響を検討した。まず、MK-801 (10μM) を6日間METHと同時に反復処置したところ、ドーパミンの遊離増強現象は有意に抑制された (Fig.9a)。また、mPFCを含まないVTA/NAcの2枚のみの共培養切片に対して、同様の反復処置を行ったところ、METH反復処置によるドーパミン遊離増強現象は観察されず、mPFCを含有している場合と比べて有意な差が認められた (Fig.9b)。

### 3. *Xenopus* 卵母細胞発現系を用いた検討

#### a) 基質輸送に関連した電流応答

SERTを発現させた卵母細胞に対してセロトニンを適用すると、濃度依存的な、且つ持続的

な内向き電流応答が見られた。DATを発現させた卵母細胞に対してドーパミンを適用すると、同様の電流応答が見られた (Fig.10)。またこれ



**Fig.10 SERTおよびDATを発現させた卵母細胞での基質輸送に伴う内向き電流応答**

SERT (A) あるいはDAT (B) のcRNAを注入した*Xenopus*卵母細胞に、セロトニン (1, 3, 10μM) あるいはドーパミン (1, 3, 10μM) を処置し、whole cell電流応答を記録した。

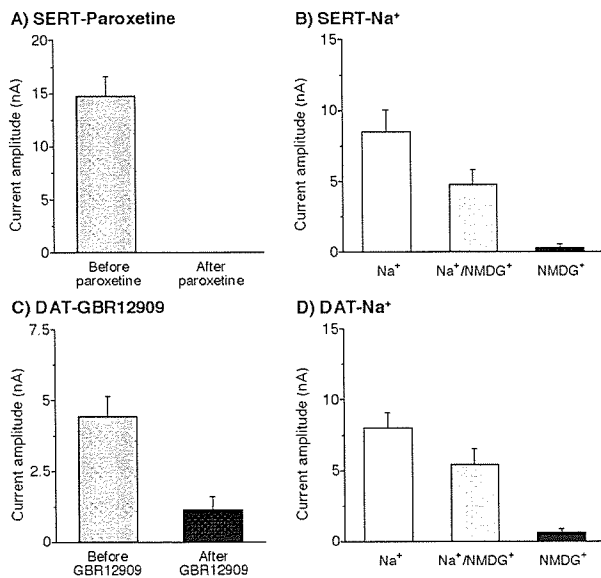


Fig.11 SERTおよびDATにおける基質輸送電流に対する選択的取り込み阻害薬および細胞外Na<sup>+</sup>フリーの影響

SERT (A,B)あるいはDAT (C,D)において、それぞれセロトニン(3 $\mu$ M)あるいはドパミン(3 $\mu$ M)による内向き電流応答に対して、(A,C)それぞれの選択的取り込み阻害薬paroxetine (1 $\mu$ M)およびGBR12909 (1 $\mu$ M)を処置し、処置前後での電流応答を比較した。また、Frog Ringer溶液中でのNa<sup>+</sup>をNMDG<sup>+</sup>で置換し、基質電流応答に対する影響を検討した。

らの電流応答は、SERTにおいてはparoxetine、DATにおいてはGBR12909を1 $\mu$ Mの濃度で3分間前処置することにより抑制された。また細胞外のNa<sup>+</sup>をNMDG<sup>+</sup>に置換した条件においても、電流応答が抑制された (Fig.11)。

### b) SERTおよびDATの基質選択性

SERTにおいて、ノルアドレナリンは輸送されにくく、またドパミンは親和性は低いものの高濃度では大きい電流応答を引き起こした。DATにおいては、セロトニン、ノルアドレナリン、ドパミンの順で電流応答が大きくなっていった (Fig.12)。

### c) MDMAによる基質輸送電流

SERTにおいて、MDMAによってもセロトニンと同様の内向き電流応答が見られた。こ

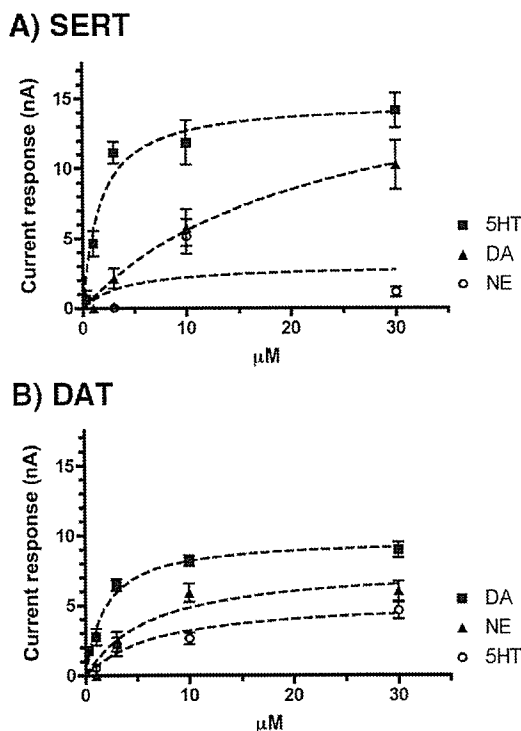


Fig.12 SERTおよびDATの輸送電流の基質特異性  
SERT (A)あるいはDAT (B)において、セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリン (1, 3, 10, 30 $\mu$ M) による内向き電流応答を測定した。

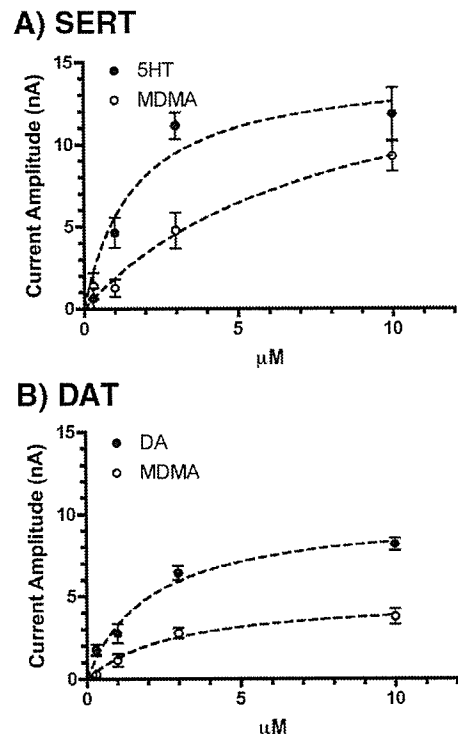
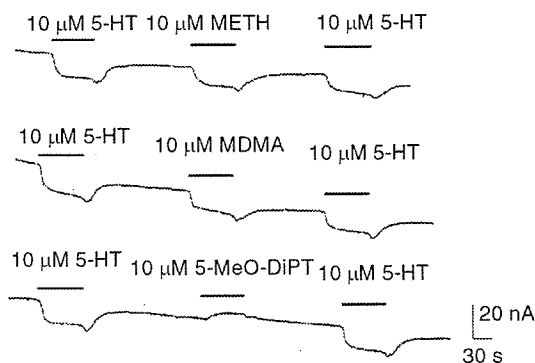


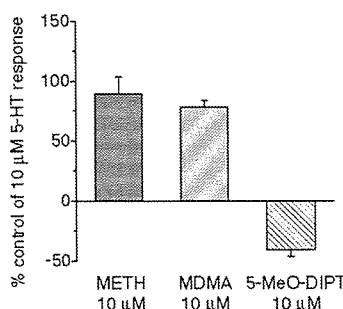
Fig.13 SERTおよびDATにおけるMDMAによる電流応答

SERT (A)あるいはDAT (B)において、MDMA (0.1, 1, 3, 10 $\mu$ M) による内向き電流応答を測定した。

### A) SERT



### A) SERT



### B) DAT

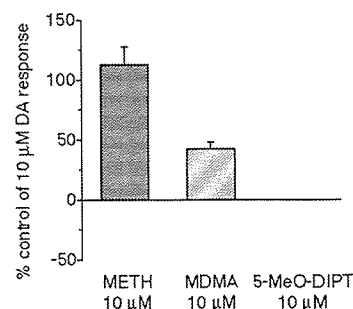


Fig.14 SERTおよびDATに対するMETH、MDMAおよび5-MeO-DiPTによる電流応答

SERT(A)あるいはDAT(B)において、METH、MDMAおよび5-MeO-DiPT(それぞれ10μM)を処置し、電流応答を測定した。

の電流応答はparoxetineの前処置、細胞外の $\text{Na}^+$ の置換によって抑制された。DATにおいても、MDMAによる内向き電流応答が見られた(Fig.13)。

#### d) 5-MeO-DiPTによる電流応答

SERTに、METHおよびMDMA(それぞれ $10^6\text{M}$ )を適用すると、セロトニンと同様の内向きの基質輸送電流が見られるのに対し、5-MeO-DiPT( $10^6\text{M}$ )の適用では外向きの濃度依存的な電流応答が観察された。一方、DATに対しては、5-MeO-DiPTを適用しても電流応答に変化は観察されなかった(Fig.14)。

#### e) MDMAと5-MeO-DiPTの $^3\text{H}$ セロトニンの取り込み阻害

SERTに対して、 $^3\text{H}$ セロトニンを含む $1\mu\text{M}$ のセロトニン存在下で、MDMAを加えていくと、セロトニンの取り込みが阻害された。また5-MeO-DiPTを加えた場合にも、弱いながらも阻害傾向が見られた(Fig.15)。

### D. 考察

まず、昨年度、樹立した縫線核セロトニン神

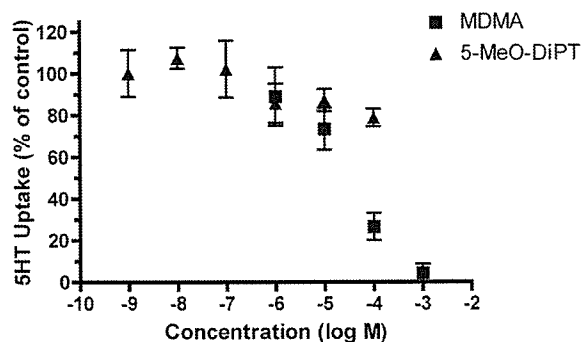


Fig.15 SERTによるセロトニン取り込みに対するMDMAおよび5-MeO-DiPTの影響

SERTを発現させた卵母細胞を用いて、 $^3\text{H}$ セロトニンによる取り込み実験を行い、MDMAおよび5-MeO-DiPTによる影響を検討した。

経を含有する中脳切片培養系が、セロトニン神経毒性の評価系として妥当であるかを検討するため、セロトニン神経毒5,7-DHTとSSRIシタロプラムを組み合わせた検討を行ったところ、5,7-DHTの処置によるセロトニン神経毒性(セロトニンおよび5-HIAA含有量減少)がシタロプラムにより抑制された。両薬物の作用点はSERTであることから、本中脳切片中に、機能的なSERTが発現しており、セロトニンおよび5-HIAA含有量を指標としてセロトニン神経毒性を評価することが可能であると考えられた。また、MDMAおよびMETHの30分処置によって、濃度依存的なセロトニン遊離促進が確認で



きたことから、本中脳切片が、これらの依存性薬物によるSERTを介したセロトニン遊離機能を正常に有していることが示される。しかしながら、MDMAおよびMETHの48時間処置によって、低濃度ではほとんどセロトニン神経毒性は見られず、1000 $\mu$ Mという非常に高濃度においてのみセロトニン神経毒性が認められた。特にMDMAは*in vivo*においては、比較的低濃度から選択的なセロトニン神経毒性が惹起されることから<sup>2,5,9)</sup>、何らかのさらなる要因が関与していることが考えられる。MDMAは、体温を上昇させることが知られているが、予備実験において、本脳切片共培養系を39°CでMDMAとインキュベートしたところ、セロトニン神経毒性が増強されることを見出している。今後、このような温度や、セロトニン神経毒性の要因の一つと考えられているドパミンやチロシン<sup>1)</sup>の関与など様々な条件下における神経毒性について検討し、そのメカニズムを追求していく。一方、MDMAおよびMETHを48時間処置した後、セロトニンの基礎遊離量を測定したところ、100 $\mu$ Mの濃度から遊離量の増加が認められた。この結果は、SERTから取り込まれ、セロトニン神経に残存している両薬物が細胞内から作用し、セロトニン遊離を促進しているものではないかとも考えられるが、両薬物の長時間処置によりセロトニン神経の活動が亢進している可能性も考えられる。今後、この現象についてもそのメカニズムを明らかにしていく。

次に、今回、VTA、NAc、mPFCの3枚の切片からなる中脳皮質辺縁脳切片共培養系を作製した。本脳切片共培養系において、中脳からNAcおよびmPFCに対してTH陽性のドパミン神経が投射していることが確認できたことから、中脳皮質辺縁ドパミン神経系を*in vitro*で再構築することができたと考えられる。一方、

前田らは、同じ中脳皮質辺縁脳切片共培養系において、逆行性神経トレーサーおよびMEDシステムを用いて、グルタミン酸神経がmPFCからNAcへ投射することを確認しており<sup>6)</sup>、中脳皮質辺縁ドパミン-グルタミン酸神経が再構築できたのではないかと考えられる。本共培養系において、METHの30分処置により、濃度依存的なドパミン遊離量の増加が確認できた。このことは、今回作製した脳切片共培養系がMETHによるドパミン遊離機能を正常に有していることを示している。また、比較的細胞毒性の影響が少ないと思われる濃度のMETH(10 $\mu$ M)を6日間反復処置することにより、ドパミン遊離作用が有意に増強された。この結果は、薬物依存時に見られる中脳皮質辺縁ドパミン神経の過剰促進、すなわちドパミン神経感作を*in vitro*で再現できたものであり、ドパミン遊離増強を指標にした*in vitro*薬物依存モデルの構築に初めて成功したものと考えられる。また、NMDA受容体拮抗薬MK-801の同時処置およびmPFCを含まないVTA/NAc切片のみの共培養系では、このドパミン遊離増強現象が認められなかった。METH依存形成には、mPFCからNAcおよびVTAへ投射するグルタミン酸神経が寄与していることが報告されているが<sup>7,12)</sup>、本研究結果は、ドパミン神経感作にmPFC由来グルタミン酸神経の存在が必須であることを直接示したものであると考えられる。

*Xenopus*卵母細胞発現系において、SERTあるいはDATのcRNAを導入した卵母細胞において、それぞれの基質輸送に伴う内向き電流応答を検出し、また、それらが各々の阻害剤により抑制されることを確認した。また細胞外のNa<sup>+</sup>をNMDG<sup>+</sup>に置換した条件においても電流応答が抑制されたことから、細胞外Na<sup>+</sup>依存的で持続的な基質輸送電流が見られることが確認



できた。またMDMAの適用により、SERTあるいはDAT卵母細胞において基質輸送電流応答が確認できたことから、MDMAがSERTとDATの両方によって輸送されることが示された。MDMAの適用により $^3\text{H}$ セロトニン取り込み阻害作用が見られたが、これは基質としてMDMAがセロトニンに競合して取り込まれるためであると考えられる。一方、5-MeO-DIPTの適用によっては、SERTにおいてのみ、濃度依存的な外向きの電流応答が観察された。このような外向きの電流応答はSERTに再取り込み阻害薬を適用した場合に見られることが報告されている<sup>3)</sup>。5-MeO-DIPTの適用により $^3\text{H}$ セロトニン取り込み阻害傾向が見られていることから、5-MeO-DIPTの電流応答も再取り込み阻害薬と同様に、 $^3\text{H}$ セロトニン取り込み阻害に伴うSERTの自発活動を抑制に起因していることが示唆される。

## E. 結 論

本研究において、縫線核セロトニン神経を含む中脳切片培養系において、MDMAおよびMETHによるセロトニン遊離促進作用およびセロトニン神経毒性を確認し、それらの分子メカニズムを*in vitro*で評価していくことを可能にした。また、中脳皮質辺縁共培養切片培養系を用いて、MDMAおよびMETHによるドパミン遊離促進作用を確認し、さらにMETH反復処置によりドパミン遊離増強現象が引き起こされることを見だし(ドパミン神経感作)、*in vitro*薬物依存モデルの構築に初めて成功した。また、このMETH誘発ドパミン神経感作には、mPFC由来のグルタミン酸神経の存在が必須であることを示した。また、*Xenopus*卵母細胞発現系において、基質輸送電流応答を指標とした電気生理学的解析と、放射標識リガンドを用いた

取り込み実験により、MDMA、METHおよび5-MeO-DIPTのSERTおよびDATに対する作用解析を行うことができた。

## 【参考文献】

- 1) Breier, J.M., Bankson, M.G. and Yamamoto, B.K.: L-tyrosine contributes to (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletions. *J. Neurosci.*, 26: 290-299, 2006.
- 2) Cole, J.C. and Sumnall, H.R.: The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27: 199-217, 2003.
- 3) Galli, A., Petersen, C.I., DeBlaquiere, M., Blakely, R.D., DeFelice, L.J.: Drosophila serotonin transporters have voltage-dependent uptake coupled to a serotonin-gated ion channel. *J. Neurosci.*, 17: 3401-3411, 1997.
- 4) Leonardi, E.T. and Azmitia, E.C.: MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10: 231-238, 1994.
- 5) Lyles, J. and Cadet, J.L.: Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res. Rev.*, 42: 155-168, 2003.
- 6) Maeda, T., Fukazawa, Y., Shimizu, N., Ozaki, M., Yamamoto, H. and Kishioka, S.: Electrophysiological characteristic of corticoaccumbens synapses in rat mesolimbic system reconstructed using

- organotypic slice cultures. *Brain Res.*, 1015: 34-40, 2004.
- 7) Pierce, R.C. and Kalivas, P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res. Rev.*, 25: 192-216, 1997.
- 8) Rudnick, G. and Wall, S.C.: The molecular mechanism of "Ecstasy" [3,4-methylenedioxy methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1817-1821, 1992.
- 9) Schmidt, C.J.: Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxy methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 1-7, 1987.
- 10) Simantov, R.: Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). *Life Sci.*, 74: 803-814, 2004.
- 11) Stone, D.M., Stahl, D.C., Hanson, G.R. and Gibb, J.W.: The effects of 3,4-methylenedioxy -methamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 22: 128: 41-48, 1986.
- 12) Vanderschuren, L.J. and Kalivas, P.W.: Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151: 99-120, 2000.
- 13) Wall, S.C., Gu, H. and Rudnick, G.: Biogenic amine flux mediated by cloned transporters stably expressed in cultured cell lines: amphetamine specificity for inhibition and efflux. *Mol. Pharmacol.*, 47: 544-550, 1995.
- 14) Yamamoto, B.K., Nash, J.F. and Gudelsky, G.A.: Modulation of methylenedioxy methamphetamine -induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma- aminobutyric acid in the substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273:1063-1070, 1995.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujio, M., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Satoh, M. and Kaneko, S.: Facilitative effect of a glutamate transporter inhibitor (2S,3S)-3-{3-[4-(trifluoro methyl)benzoylamino]benzyloxy}aspartate on the expression of methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *J. Pharmacol. Sci.*, 99: 415-418, 2005.
- 2) Fujio, M., Nakagawa, T., Sekiya, Y., Ozawa, T., Suzuki, Y., Minami, M., Satoh, M. and Kaneko, S.: Gene transfer of GLT-1, a glutamate transporter, into the nucleus accumbens shell attenuates methamphetamine- and morphine-induced conditioned place preference in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 2744-2754, 2005.
- 3) Nakagawa, T., Yamamoto, R., Fujio, M., Suzuki, Y., Minami, M., Satoh, M. and Kaneko, S.: Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis activated by the central nucleus of the amygdala in the negative affective component of morphine withdrawal in rats. *Neuroscience*, 134: 9-19, 2005.

## 2. 学会発表

- 1) 中川貴之, 佐藤公道, 金子周司: 薬物依存におけるグリア細胞の役割. 第26回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 岐阜, 平成17年6月
- 2) 鈴木祐一, 中川貴之, 南 雅文, 金子周司: Effects of methamphetamine on in vitro mesocorticolimbic dopaminergic system reconstructed using organotypic slice co-cultures. 第28回日本神経科学大会, 横浜, 平成17年7月
- 3) 中川貴之, 金子周司: 薬物依存時の中脳辺縁ドパミン神経活動亢進における前頭前皮質由来側坐核内グルタミン酸神経の役割. 第9回神経伝達物質研究会, 東京, 平成17年9月
- 4) Nakagawa, T., Fujio, M., Suzuki, Y., Satoh, M. and Kaneko, S.: Glial glutamate transporter GLT-1 plays an inhibitory role in the conditioned rewarding effects of morphine and psychostimulants. Neuroscience2005, Washington DC, 平成17年11月
- 5) 山内陽介, 金子周司: モノアミントランスポーターに対する非合法薬物MDMAの作用の検討. 第4回ファーマ・バイオフィオーラム2005, 西宮市, 平成17年12月
- 6) 山内陽介, 泉 貴也, 中川貴之, 金子周司: Effects of MDMA and 5-MeO-DiPT on serotonin transporter and dopamine transporter. 第29回日本神経科学大会, 京都, 平成18年7月(予定)
- 7) 鈴木祐一, 中川貴之, 樋口 萌, 金子周司: Effects of MDMA on serotonergic neurons in rat organotypic mesencephalic slice culture including the raphe nuclei. 第29回日本神経科学大会, 京都, 平成18年7月(予定)

## メタンフェタミンにより誘発される認知障害の 機構の解明と治療法の確立

分担研究者：山田清文

研究協力者：永井 拓, 田熊一敏

(金沢大学大学院自然科学研究科病院薬学)

---

### 【研究要旨】

覚醒剤乱用者では認知障害が認められるが、この認知障害を反映した動物モデルの報告は少ない。本研究では、ラットの空間作業記憶に対するmethamphetamine (METH) の影響について評価した。さらに、METH誘発性作業記憶障害に対する非定型抗精神病薬clozapine (CLOZ) および定型抗精神病薬haloperidol (HAL) の治療効果について検討した。

実験には、7週齢の雄性Wistar系ラットを使用した。空間作業記憶は、放射状迷路を用いたdelayed spatial win-shift (SWSH) 課題により評価した。モデル動物はMETH (2mg/kg, s.c.) を7日間反復投与することにより作製した。METH投与終了から1, 4, 7および14日後にdelayed SWSH課題を行った。また、CLOZ (3, 10 mg/kg, p.o.) およびHAL (1mg/kg, p.o.) の投与は、METH (2 mg/kg, s.c.) を反復投与した翌日より7日間反復投与し、delayed SWSH課題をCLOZおよびHAL投与開始から1, 4, 7および14日後に行った。

METHの反復投与により、遅延時間の延長に伴う空間作業記憶の障害が認められた。METH誘発性作業記憶障害はMETH休薬14日後まで認められた。METHによる作業記憶障害は非定型抗精神病薬であるCLOZを7日間反復投与することにより改善したが、その効果は7日間の休薬により消失した。一方、定型抗精神病薬であるHALにはMETH誘発性作業記憶障害に対する改善効果は認められなかった。正常ラットの海馬において、訓練試行後にextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性化が認められた。METHを連続投与したラットでは、正常ラットで観察されたようなERK1/2の活性化は認められなかった。さらに、MEK阻害薬であるPD98059 (2 $\mu$ g/1 $\mu$ l/side) を正常ラットの海馬へ微量注入すると、空間作業記憶が障害された。

以上の結果より、METH誘発性作業記憶障害には海馬におけるERK1/2の機能障害が関与していることが示唆された。さらに、METH誘発性作業記憶障害に対するCLOZの有効性が示唆された。Delayed SWSH課題を用いたMETH誘発性作業記憶障害モデルは覚醒剤精神病の認知障害を反映した動物モデルとして有用性が高いと考えられる。

---

## A. 研究目的

覚醒剤精神病患者および統合失調症患者において認知・記憶障害がみられることから、記憶障害を反映した覚醒剤精神病モデルの開発が望まれている。ラットに4mg/kgのmethamphetamine (METH) を2時間間隔で4回投与し、1週間後に空間記憶の指標であるMorris水迷路試験と非空間記憶の指標である新奇オブジェクト探索試験を行った場合、空間記憶は障害されていないが非空間記憶に障害がみられる。この障害はMETH投与から3週間後にも認められ、持続的であると報告されている。また、METH処置から3週間後では、線条体ドパミントランスポーターと海馬セロトニントランスポーターが減少していることから、これらトランスポーターの減少がMETH誘発性記憶障害に関わっていることが示唆されている<sup>1, 2)</sup>。しかし、これまでに報告されたMETHによる認知記憶障害は、ドパミン作動性神経系やセロトニン作動性神経系の神経変性を伴うような高用量のMETHの短期間処置により誘発したものである。したがって、現段階では覚醒剤精神病やMETH依存患者の記憶障害を反映した有用な動物モデルはほとんどない。

我々は、新奇オブジェクト探索試験において低用量のMETHの反復投与により非空間記憶が障害されることを証明した<sup>3)</sup>。さらに、METH誘発性非空間記憶障害には前頭前皮質におけるドパミンD1受容体-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 経路の機能障害が関与していることを明らかにした<sup>3)</sup>。本研究では、放射状迷路課題を用いて空間作業記憶に対するMETHの影響について評価した。さらに、METH誘発性作業記憶障害に対する非定型抗精神病薬clozapine (CLOZ) および定型抗精神病薬haloperidol (HAL) の治療効果について検

討した。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

実験には7週齢の雄性Wistar系ラットを使用した。動物は実験を開始する前、少なくとも1週間は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ で、9:00AM-9:00PM明期の明暗サイクルの部屋で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。なお、本研究は金沢大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。

### 2. Delayed spatial win-shift (Delayed SWSH) 課題

空間作業記憶は、放射状迷路を用いたdelayed SWSH課題により評価した。Delayed SWSH課題は、delayを挟んでtraining phaseとtest phaseより成る。Training phaseは、8本のアーム全てに餌を置き、毎回ランダムに4ヶ所のアームのギロチンドアを閉め、ラットが残り4ヶ所すべてのアームに進入して餌を食べるか、5分経過するまで行った。Training phase終了後、ラットをホームケージに戻し、5-120分後にtest phaseを行った。Test phaseは全てのギロチンドアを開放し、training phaseで餌を食べたアームに進入した回数を across phase error、test phaseで一度進入したアームに再び進入した回数を within phase errorとして記録した。この2つのerrorの合計をtest phase errorとした。また、各phaseにおいて課題遂行に要した時間をアームに侵入した回数で除した値を response timeとして記録した。

### 4. Western blotting 法

Training phase終了5分および60分後に海馬を摘出し、リン酸化ERK1/2をWestern blotting

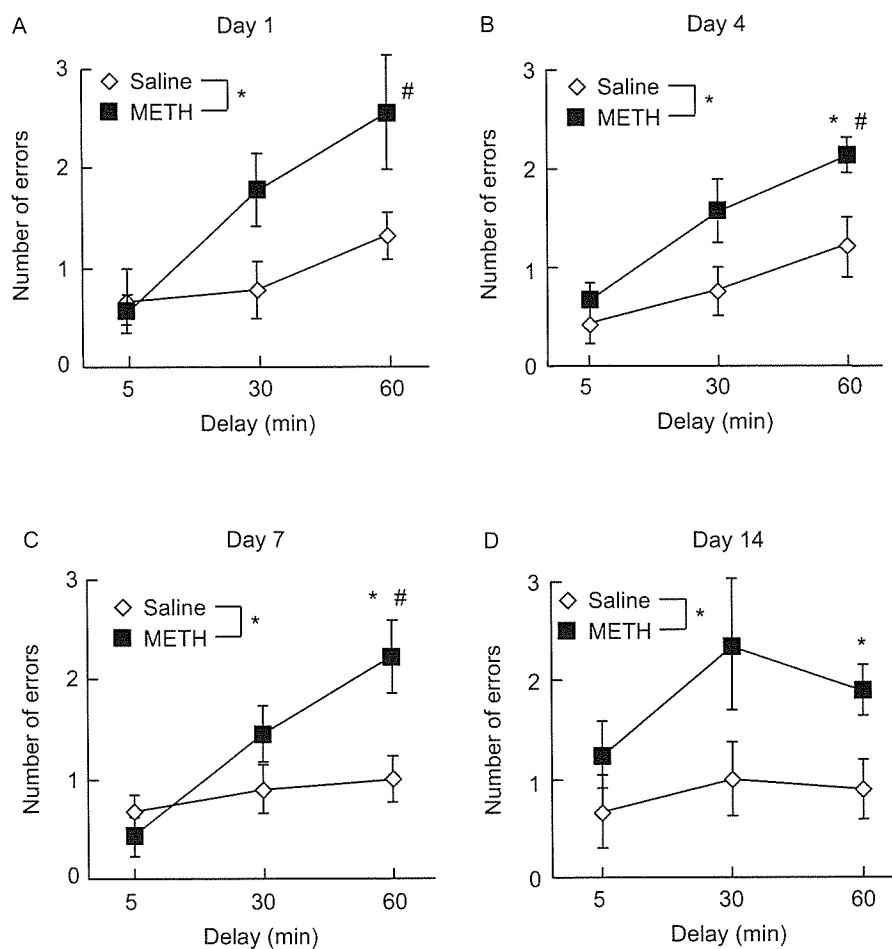


Fig. 1.

Effect of repeated METH treatment on performance in the test phase of the delayed SWSh task. Delayed SWSh task was carried out 1 day (A), 4 days (B), 7 days (C) and 14 days (D) after the last treatment with saline or METH. Test phase performance was examined 5 to 60 min after the training phase. \* $p < 0.05$  compared to the corresponding saline-treated group. # $p < 0.05$  compared to the corresponding 5-min delay group.

法により解析した。

## 5. 統計解析

結果はすべて平均値と標準誤差で示した。独立多試料間の比較は分散分析法を用い、さらに各群の比較はBonferroni多重比較検定法を行った。2群間の比較はMann-Whitney U検定法を行った。いずれの検定においても、危険率5%以下で差が認められる場合を有意差有りと判定した。

## C. 研究結果

### 1. 空間作業記憶に対するMETHの作用

METH (2mg/kg, s.c.)を7日間反復投与した後、

投与終了日より1、4、7および14日後にdelayed SWSh課題を行った。METH投与終了1から14日までのtraining phaseにおけるerror数およびresponse timeは、METH処置群とsaline処置群との間に有意な変化は認められなかった。

Test phaseにおいてsaline処置群のerror数は遅延時間を60分まで延長しても有意な変化は認められなかった。一方、METH処置群では、遅延時間延長に伴いerror数の増加が認められ、METH休薬14日まで作業記憶障害が認められた (Fig. 1)。さらに、test phaseの結果をwithin phase errorとacross phase errorに分けて解析した。METH処置群のacross phase error数

は、saline処置群に比べ有意に増加した。一方、METH処置群およびsaline処置群のwithin phase error数に有意な差は認められなかった。なお、METH処置群とsaline処置群のresponse timeに有意な差は認められなかった。

## 2. METH誘発性作業記憶障害に対する抗精神病薬の効果

はじめに、METH誘発性空間作業記憶に対するCLOZの効果を検討した(Fig. 2)。Training phaseにおいて各群のerror数に有意な変化は認められなかった(Fig. 2A)。METHによるtest phase error数の増加は、CLOZの反復投与により有意に改善した(Fig. 2B)。また、CLOZの改善作用は反復投与7日目において用量依存的かつ顕著に認められたが、CLOZ休薬7日後では作業記憶障害改善作用が消失した(Fig. 2B)。Test phaseの結果をwithin phase errorとacross phase errorに分けて解析した。各群のwithin phase error数に有意な変化は認められなかった(Fig. 2C)のに対し、METH-CLOZ処置群では、METH-vehicle処置群に比べacross phase error数が有意に減少した(Fig. 2D)。Training phaseおよびtest phaseにおけるresponse timeに有意な変化は認められなかった(Fig. 2E, F)。

次に、METH誘発性空間作業記憶に対するHALの効果を検討した(Fig. 3)。Training phaseにおいて各群のerror数に有意な変化は認められなかった(Fig. 3A)。また、METHによるtest phase error数の増加は、HALを反復投与しても変化しなかった(Fig. 3B)。Test phaseの結果をwithin phase errorとacross phase errorに分けて解析したが、両error数に有意な変化は認められなかった(Fig. 3C, D)。HALはtraining phaseおよびtest phaseにおけるresponse timeを有意に延長し、運動障害を誘

発した(Fig. 3E, F)。

## 3. リン酸化ERK1/2に対するMETHの影響

Training phase終了後、saline処置群とMETH処置群の海馬におけるリン酸化ERK1/2の発現量の変化を検討した。Training phaseから5分および60分後において、saline処置群の海馬におけるリン酸化ERK 1/2の発現量はcontrol群に比較して有意に増加した(Fig. 4)。一方、METH処置群ではtraining phaseから5分および60分後の海馬におけるリン酸化ERKの発現量に有意な変化は認められなかった(Fig. 4)。さらに、training phaseから60分後においてMETH処置群の海馬リン酸化ERKの発現量はsaline処置群に比べ有意に減少していた(Fig. 4B)。

## 4. MEK阻害剤による空間作業記憶障害

選択的MEK阻害剤のPD98059 (2 $\mu$ g/1 $\mu$ l)を両側海馬内に微量注入しdelayed SWSh課題を行った(Fig. 5A)。PD98059を投与した群では、溶媒投与群に比べtest phase errorおよびacross phase errorが有意に増加した(Fig. 5B)。一方、within phase errorおよびresponse timeに有意な変化は認められなかった(Fig. 5B, C)。

## D. 考 察

Delayed SWSh課題はtraining phase、遅延時間およびtest phaseより成り立っており、within phase errorとacross phase errorを指標として記憶を評価する行動試験である。Within phase errorは同一試行内に同じアームに進入した回数を示すものであり、ラットの作業記憶を反映している。しかし、test phaseの餌取り行動は非常に短時間で終了することから、記憶を保持すべき時間が短く、そのために脳機



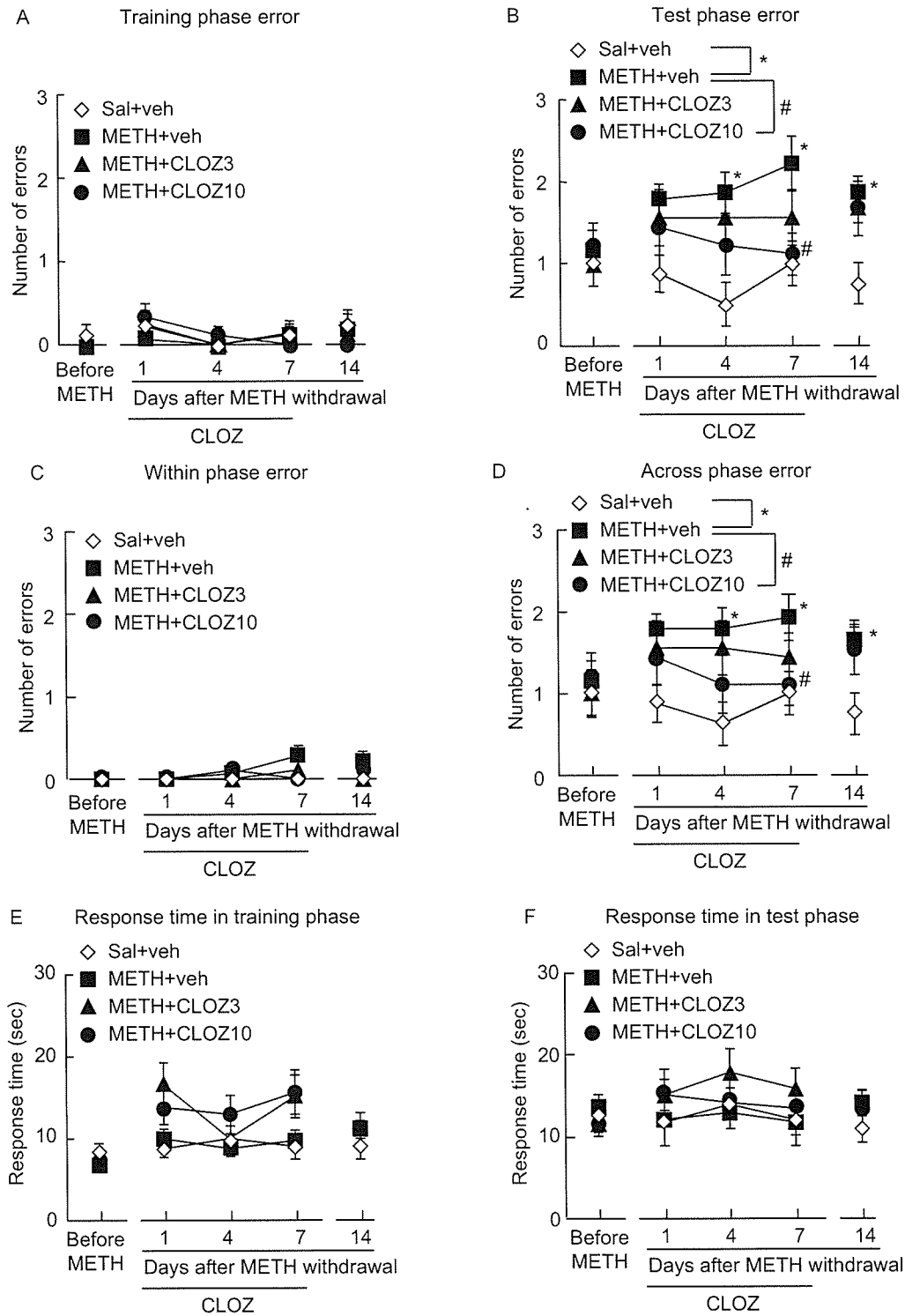
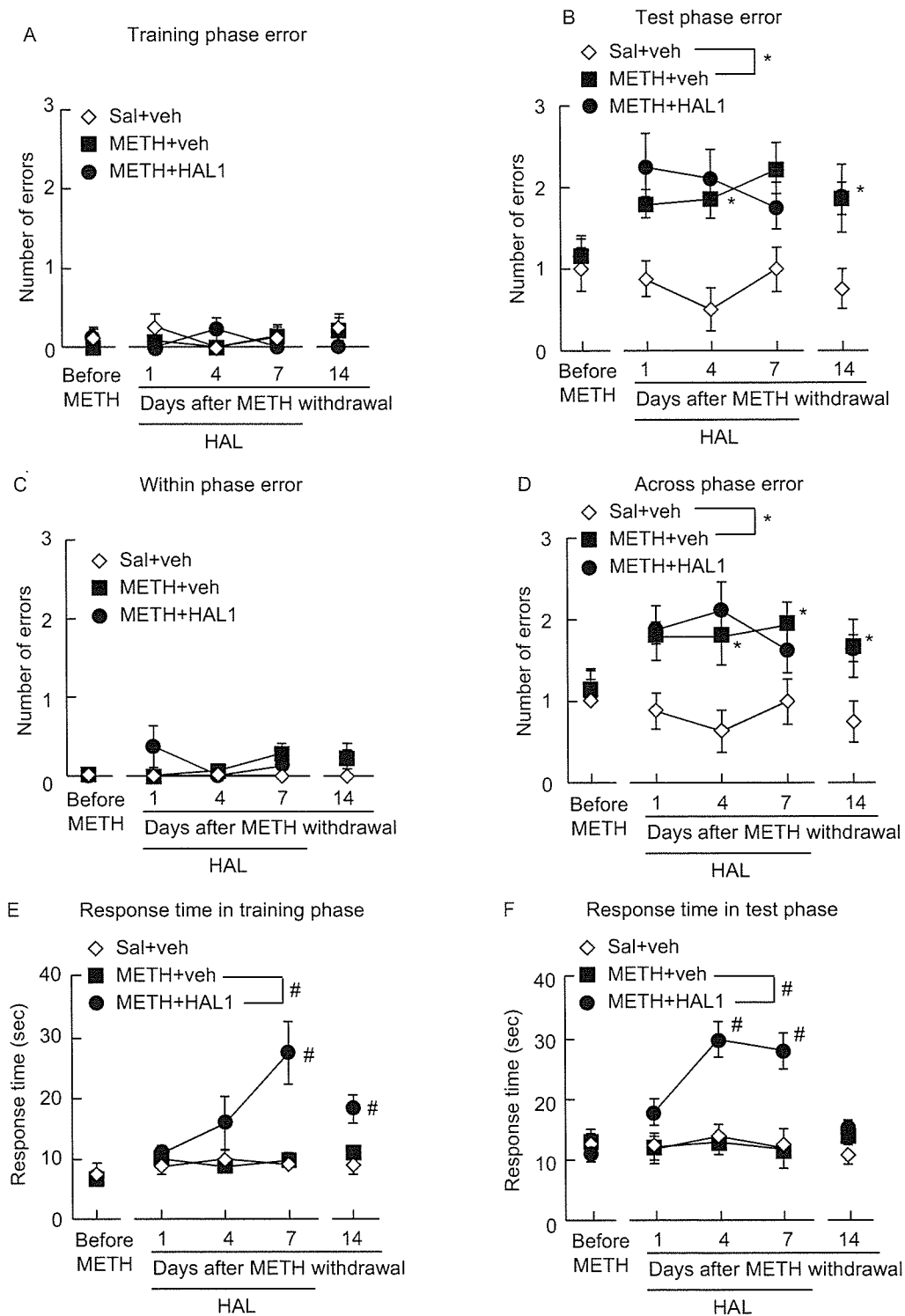


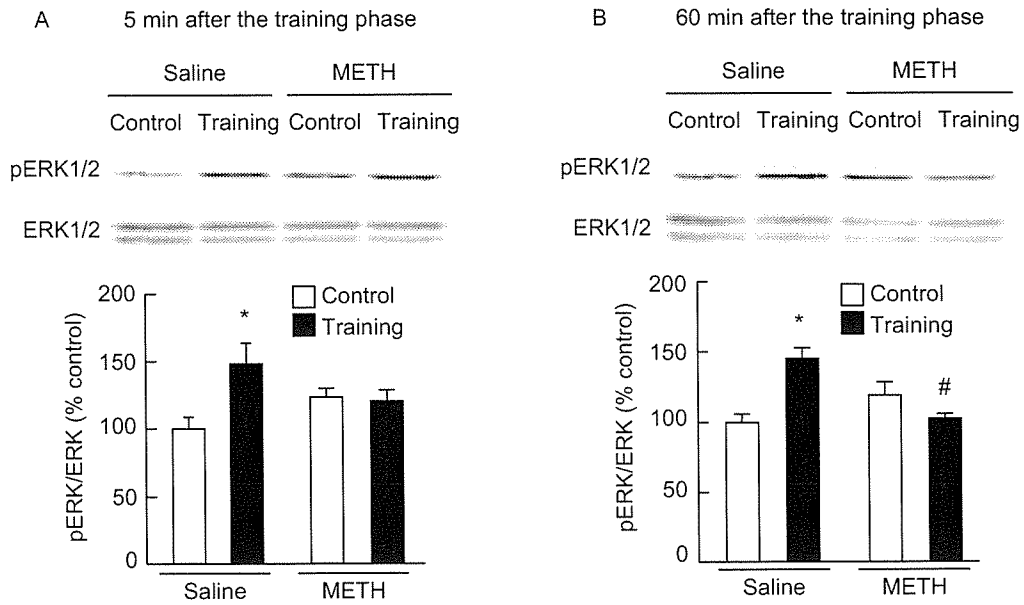
Fig. 2.

Effect of CLOZ on METH-induced memory impairment in the delayed SWSH task. CLOZ (3 or 10 mg/kg, p.o., 7 days) was administered repeatedly after the cessation of repeated METH treatment. (A) Training phase error. (B) Test phase error. (C) Within phase error. (D) Across phase error. (E) Response time in the training phase. (F) Response time in the test phase. Values indicate the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8-14). \*p<0.05 compared to saline-vehicle-treated group. #p<0.05 compared to METH-vehicle-treated group.



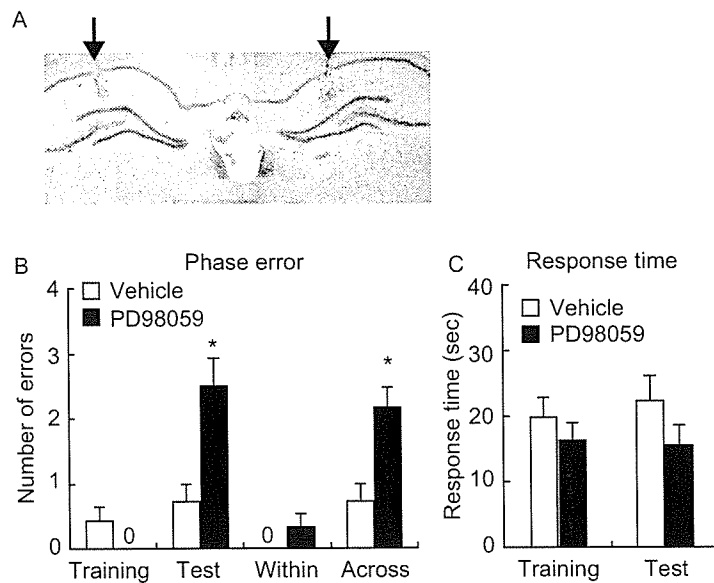
**Fig. 3.**

Effect of HAL on METH-induced memory impairment in the delayed SWSH task. HAL (1 mg/kg, p.o., 7 days) was administered repeatedly after the cessation of repeated METH treatment. (A) Training phase error. (B) Test phase error. (C) Within phase error. (D) Across phase error. (E) Response time in the training phase. (F) Response time in the test phase. Values indicate the mean  $\pm$  S.E.M. (n=8-14). \*p<0.05 compared to saline-vehicle-treated group. #p<0.05 compared to METH-vehicle-treated group.



**Fig. 4.**

Effect of repeated METH treatment on phosphorylation of ERK1/2 in the hippocampus 5 min (A) and 60 min (B) after the training phase of the delayed SWSh task. Values indicate the mean  $\pm$  S.E.M. (n=7). \*p<0.05 compared to the saline-treated control group. #p<0.05 compared to the saline-treated training group.



**Fig. 5.**

Effect of PD98059 on performance in the delayed SWSh task. PD98059 (2 $\mu$ g) was bilaterally microinjected, in a volume of 1 $\mu$ l/site, into the CA1 subfield of the hippocampus 20 min before the training phase. Test phase performance was examined 5 min after the training phase. (A) A representative photograph indicating the microinjection sites. (B) Number of errors. (C) Response time. Values indicate the mean  $\pm$  S.E.M. (n=6-7). \*p<0.05 compared to the vehicle-injected group.

能障害の影響を受けにくいと考えられる。一方、test phaseにおける餌取り行動を効率よく行うためには、training phaseの情報を遅延時間の間記憶している必要があり、その指標が across phase errorである。Across phase errorも作業記憶を反映していると考えられるが、遅延時間があるために、within phase errorよりも脳機能障害に対して鋭敏な指標となる。また、response timeはラットの放射状迷路1アームあたりの滞在時間を示したものであり、ラットの運動機能にも影響を受ける。本研究において、METHの反復投与により training phase error数は変化せず、test phase error数が増加した。また、METHによる test phase error数の増加は across phase error数とほぼ一致していた。さらに、METHによるこの障害は休薬14日後まで観察された。したがって、METHは作業記憶を障害し、その障害は長期持続性であると考えられる。

CLOZはMETH誘発性作業記憶障害を改善したが、HALには改善効果が認められなかった。この結果は、新奇オブジェクト探索試験においてCLOZはMETH誘発性認知記憶障害を改善し、HALは効果がないという我々の報告<sup>3)</sup>および統合失調症の認知障害に対してCLOZが改善効果を示すという臨床報告<sup>4)</sup>と一致するものであった。したがって、本研究において作製した作業記憶障害モデルは、覚醒剤依存のみならず統合失調症の認知障害を反映した動物モデルとして有用性が高いと考えられる。

ERK1/2は神経可塑に関与し、記憶と学習に重要であることが知られている<sup>5)</sup>。Morris水迷路試験において訓練後に海馬のリン酸化ERK1/2が増加すること、リン酸化ERK1/2の抑制は空間記憶を障害することが報告されている<sup>6)</sup>。本研究において、海馬のリン酸化

ERK1/2の増加は、training phase終了60分後まで認められた。これは、ラットがtraining phase終了60分後までtraining phaseの情報を保持できるという行動実験の結果と一致している。一方、MEK阻害剤であるPD98059を両側海馬に微量注入すると、across phase errorが有意に増加した。したがって、delayed SWSh課題における空間作業記憶の保持に海馬でのERK1/2の活性化が関与していることが示唆された。

我々は、METHの連続投与によりドパミンD1受容体が慢性的に刺激され、その結果、前頭皮質においてドパミンD1受容体-ERK 1/2シグナルの機能不全が生じ、認知記憶障害が起こることを提唱している<sup>3)</sup>。本研究においてもMETHを反復投与したラットではtraining phase後のリン酸化ERK1/2の増加が認められなかった。したがって、METHによる作業記憶障害についてもERK1/2シグナルの機能不全が関与している可能性がある。

ERK1/2シグナルの機能不全の関与が示唆されるものの、METH誘発性作業記憶障害の詳細な分子メカニズムは不明である。METHは海馬の長期増強(long-term potentiation: LTP)を障害することが報告されている<sup>7)</sup>。一方、LTPの誘導にはNMDA受容体を介したERK1/2の活性化が関与していることが示唆されている<sup>8)</sup>。また、海馬神経細胞においてドパミンD1受容体はNMDA受容体と複合体を形成し、ドパミンD1受容体がNMDA受容体の機能を制御することも報告されている<sup>9)</sup>。したがって、METH誘発性認知記憶障害と同様、ドパミンD1受容体-ERK 1/2シグナルの機能不全がMETH誘発性作業記憶障害に関与している可能性があるが、この点については今後の課題である。

## E. 結論

METH誘発性作業記憶障害には海馬におけるERK1/2の機能障害が関与していることが示唆された。さらに、METH誘発性作業記憶障害に対するCLOZの有効性が示唆された。Delayed SWS課題を用いたMETH誘発性作業記憶障害モデルは覚醒剤精神病の認知障害を反映した動物モデルとして有用性が高いと考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Bisagno, V., Ferguson, D. and Luine, V.N.: Short toxic methamphetamine schedule impairs object recognition task in male rats. *Brain Res.*, 940: 95-101, 2002.
- 2) Schroder, N., O'Dell, S.J. and Marshall, J.F.: Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse*, 49: 89-96, 2003.
- 3) Kamei, H., Nagai, T., Nakano, H., et al.: Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. *Biol. Psychiatry*, 59: 75-84, 2006.
- 4) Lee, M.A., Jayathilake, K. and Meltzer, H.Y.: A comparison of the effect of clozapine with typical neuroleptics on cognitive function in neuroleptic-responsive schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 37: 1-11, 1999.
- 5) Adams, J.P. and Sweatt, J.D.: Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 135-163, 2002.
- 6) Blum, S., Moore, A.N., Adams, F., et al.: A mitogen-activated protein kinase cascade

in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial learning. *J. Neurosci.*, 19: 3535-3544, 1999.

- 7) Onaivi, E.S., Ali, S.F., Chirwa, S.S., et al.: Ibogaine signals addiction genes and methamphetamine alteration of long-term potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 965: 28-46, 2002.
- 8) Schmitt, J.M., Guire, E.S., Saneyoshi, T., et al.: Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 25: 1281-1290, 2005.
- 9) Lee, F.J., Xue, S., Pei, L., et al.: Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, 111: 219-230, 2002.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Chen, L., Yamada, K., Nabeshima, T. and Sokabe, M.:  $\alpha 7$  Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in  $\beta$ -amyloid infused rats. *Neuropharmacology*, in press, 2006. [Epub 2005 Nov 30]
- 2) Ishikawa, K., Nitta, A., Mizoguchi, H., Mohri, A., Murai, R., Miyamoto, Y., Noda, Y., Kitaichi, K., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in