

効果を獲得したマウス脳内では、特に心筋型 RyR2 の蛋白発現量が増加していた。一般に、RyR は筋小胞体膜上に存在する CICR チャネル蛋白であり、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の調節に重要な役割を担っていることが知られている<sup>3)</sup>。今回得られた成績は、RyR が一部 dihydropyridine 受容体と共役していること、dantrolene は心筋型 RyR2 を介した CICR に対して抑制効果を示さないが中枢神経系に存在する RyR2 に対しては抑制効果を示すこと、さらに CICR の促進剤であり、RyR の active modulator として知られている caffeine の効果はいずれの subtype の RyR についても効果がみられること、等の報告とよく相関している<sup>3)</sup>。さらに、平滑筋や骨格筋における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の調節には骨格筋型 RyR1 および心筋型 RyR2 の2種類のアイソフォームが存在しないと正常な応答がみられないことも報告されていることから<sup>1)</sup>、今回の我々の研究で認められた RyR-2 の活性は他の subtype の機能変化に影響を及ぼしていることは十分に考えられる。したがって、今回得られた成績から、精神依存形成時には CICR による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が生化学的機序として重要な役割を示していることが推測されるが、RyR の活性化機序については相反する成績も多いことから、その詳細な役割については今後の研究課題と考えられる。

L 型 HVCC 機能変化とそれに続く CICR を介した細胞内  $Ca^{2+}$  動態の変化は、その後の神経細胞内における多彩な機能変化に大きく関与することは周知の事実である。本研究で得られた我々の成果を含む多くの神経薬理学的研究から、神経細胞内への  $Ca^{2+}$  流入、特に L 型 HVCC の機能変化が薬物依存形成機序の極めて早い段階に関与していることは間違いないものと考えられる。また、L 型 HVCC 拮抗薬は実験動物のみならず、ヒトにおいても退薬症候の軽減をもたらすことが報告されていることから<sup>10)</sup>、細胞内  $Ca^{2+}$  流入動態に連

関する諸種の生理的機構が、精神および身体依存形成の区別は現段階では不明であるが、依存性薬物の長期作用によって修飾されている可能性は高いと考えられる。

## E. 結論

METH による精神依存の形成過程では、① L 型 HVCC  $\alpha 1C$  および  $\alpha 2/\delta$  subunits 膜蛋白の発現増加を伴った、L 型 HVCC  $\alpha$  subunits への [<sup>3</sup>H]PN200-110 結合の亢進作用が生じること、② 細胞内 ryanodine 受容体の up-regulation を介した L 型 HVCC up-regulation の調節機序が存在すること、③ ryanodine 受容体拮抗薬は精神依存の形成および発現のいずれに対しても有効な治療薬となりうること、が明らかとなった。

## [参考文献]

- 1) Coussin, F., Macrez, N., Morel, J.L. et al.: Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for  $Ca^{2+}$ - induced  $Ca^{2+}$  release in vascular myocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 9596-9603, 2000.
- 2) Faiggold, C.L., N'Gouemo, P. and Riaz, A.: Ethanol and neurotransmitter interactions - from molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.* 55: 509-535, 1998.
- 3) Fill, M. and Copello, J.A.: Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82: 893-922, 2002.
- 4) Grueter, C.E., Abiria, S.A., Dzhura, I. et al.: L-type  $Ca^{2+}$  channel facilitation mediated by phosphorylation of the  $\beta$  subunit by CaMKII. *Mol. Cell* 23: 641-650, 2006.
- 5) He, M., Bodi, I., Mikala, G. et al.: Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. *J. Biol. Chem.* 272: 2629-2633, 1997.
- 6) Johnson, B.A., Roache, J.D., Ait-Daoud, N. et al.:

- Effects of isradipine, a dihydropyridine-class calcium-channel antagonist, on d-methamphetamine's subjective and reinforcing effects. *Int. J. Neuroscychopharmacol.* 8: 203-213, 2005.
- 7) Katsura, M., Shibasaki, M., Hayashida, S. et al.: Increase in expression of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2/\delta 1$  subunits of L-type high voltage-gated calcium channels after sustained ethanol exposure in cerebral cortical neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 102: 221-230, 2006.
- 8) Katsura, M., Torigoe, F., Hayashida, S. et al.: Ethanol physical dependence is accompanied by up-regulated expression of L-type high voltage-gated calcium channel  $\alpha 1$  subunits in mouse brain. *Brain Res.* 1039: 211-215, 2005.
- 9) Kuriyama, K. and Ohkuma, S.: Alteration in the function of cerebral neurotransmitter receptors during the establishment of alcohol dependence: neurochemical aspects. *Alcohol Alcoholism* 25: 239-249, 1990.
- 10) Little H.J.: The role of neuronal calcium channels in dependence on ethanol and other sedatives/hypnotics. *Pharmac. Ther.* 50: 347-365, 1991.
- 11) Ohkuma, S., Katsura, M., Hibino, Y. et al.: Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 54: 133-140, 1998.
- 12) Ogura H., Furuya Y., Teramoto T. et al.: Peptide N- and P/Q-type  $Ca^{2+}$  blocker inhibit stimulant-induced hyperactivity in mice. *Peptides* 56: 165-174, 1998.
- 13) Uramura K., Yada T., Muroya S. et al.:  $Ca^{2+}$  oscillations in response to methamphetamine in dopamine neurons of the ventral tagmental area in rats subchronically treated with this drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 914: 583-592, 2000.
- 14) West, A.E., Griffith, E.C. and Greenberg, M.E.: Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 921-931, 2002.
- 15) Yoshida, A., Ogura, A., Imagawa, T. et al.: Cyclic AMP- dependent phosphorylation of the rat brain ryanodine receptor. *J. Neurosci.* 12: 1094-1100, 1992.
- F. 研究発表
1. 論文発表
1. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎：依存性薬物による精神依存および身体依存形成機序の相違. *日本アルコール・薬物医学会雑誌.* 42: 481-486, 2007
2. Katsura, M., Shibasaki, M., Kurokawa, K., Tsujimura, A. and Ohkuma, S.: Up-regulation of L-type high voltage- gated calcium channel subunits by sustained exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 103: 2518- 2528, 2007
3. Shibasaki, M., Katsura, M., Kurokawa, K., Torigoe, F. and Ohkuma, S.: Regional differences of L-type high voltage-gated calcium channel subunit expression in the mouse brain after chronic morphine treatment. *J. Pharmacol. Sci.* 105: 177-183, 2007.
4. Shibasaki, M., Katsura, M., Torigoe, F., Honda, T., Sumimoto, A., Tsujimura, A. and Ohkuma, S.: Increase in diazepam binding inhibitor expression by sustained morphine exposure is mediated via  $\mu$ -opioid receptors in primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 85: 2971-2980, 2007.
5. 桂 昌司、大熊誠太郎：【薬理学・毒性学】ベンゾジアゼピン系薬物依存の新知見. *医学のあゆみ.* 223: 187, 2007.

6. 桂 昌司、大熊誠太郎：【アルコール医学・医療の最前線】アルコール依存症、アルコール依存症病態発現の神経薬理的機序. 医学のあゆみ. 222: 677-684, 2007.
  7. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：細胞内カルシウム動態変化からみたアルコール精神および身体依存形成. 日本アルコール・薬物医学会雑誌. 42: 59-66, 2007.
2. 学会発表
1. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：Morphine (MOR) 精神依存形成における脳内リアノジン受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能亢進作用について. 第 80 回日本薬理学会年会. 名古屋. 2007 年 3 月.
  2. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：Methamphetamine による IP<sub>3</sub> 受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能変化. 第 111 回日本薬理学会近畿部会. 名古屋. 2007 年 6 月.
  3. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：精神依存における細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態変化の解析と治療への応用. 第 37 回日本神経精神薬理学会年会. 札幌. 2007 年 7 月.
  4. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、槇枝大貴、大熊誠太郎：β-アドレナリン受容体 (β-AR) 拮抗薬の連続曝露に伴う β-AR の機能変化. 第 7 回創薬・薬理フォーラム岡山. 岡山. 2007 年 7 月.
  5. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：アルコール精神依存形成機序：L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) β サブユニットの機能変化を中心として. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会総会. 大津. 2007 年 9 月.
  6. Hori, T., Komiyama, T., Katsura, M., Ohkuma, S., Kanemoto, K. and Saitoh, O.: Biological research on the protracted withdrawal syndrome (PWS) – Relationship between CSF level of DBI, CRH and score of clinical symptom evaluation scale –. Neuroscience 2007. San Diego. 2007 年 11 月.
  7. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：Ethanol 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) β 3 サブユニットならびにリアノジン受容体の機能変化について. 第 8 回創薬・薬理フォーラム岡山. 岡山. 2007 年 12 月.
  8. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Morphine による IP<sub>3</sub> 受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能変化. 第 17 回神経行動薬理若手研究者の集い. 横浜. 2008 年 3 月.
  9. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎：Alcohol (EtOH) 精神依存形成における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) β サブユニットの機能的関連性について. 第 81 回日本薬理学会年会. 横浜. 2008 年 3 月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得  
特願 2007-249462 (平成 19 年 9 月 26 日)  
発明者：大熊誠太郎  
発明の名称：薬物依存症治療剤
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討

分担研究者：新田淳美<sup>1</sup>

研究協力者：丹羽美苗<sup>1,2</sup>、Cen Xiabo<sup>1</sup>、衣斐大祐<sup>1</sup>、日比陽子<sup>1</sup>、山田清文<sup>1</sup>、鍋島俊隆<sup>1,2,3</sup>

名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部、<sup>2</sup>名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室、<sup>3</sup>特定非営利活動法人 医薬品適正使用推進機構

### [研究要旨]

薬物依存の形成に寄与すると考えられるいくつかの遺伝子が報告されている。薬物依存の形成は多くのファクターが複雑に絡み合い、未知の遺伝子が関与している可能性も高い。そこで、我々は、覚せい剤であるメタンフェタミンを連続投与したマウス脳において発現量の高い2つの遺伝子を cDNA サブトラクション法を用いて見出した。cDNA 断片から全長をクローニングしたところ、1つは、すでに既知のタンパクでありピッコロと命名され、インシュリン分泌に関係するタンパクとして研究がなされていたが、脳での生理機能については、ほとんど分かっていなかった。もう一方は、新規の遺伝子であったことから、shati と命名し、全長の単離・同定に成功した。両タンパクの遺伝子配列にもとづいて作成したアンチセンスヌクレオチドを脳に注入し、各タンパクの発現を減少させてマウスでは、覚せい剤による場所嗜好性や自発運動の亢進が促進されたことから、両遺伝子は薬物依存形成を抑制すると考えられる。*in vivo* マイクロダイアリス法による実験では、これらマウスにメタンフェタミンを 7-10 日間連続投与し、最終投与後のドパミン遊離量を測定したところ、遊離量増大が促進された。これらの結果から、両遺伝子の薬物依存形成抑制作用は、ドパミン遊離の調節を受けていると考えられた。さらに培養細胞や *ex vivo* の実験によって、両遺伝子が、ドパミントランスポーターの機能調節に関係しているという新しい知見を得た。

### A 研究目的

薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、情報の多様化や供給組織の巧妙化等に拠って拡大し、21 世紀を迎えた今日も、状況の悪化が続いている。日本においてはメタンフェタミンを主とした覚せい剤や麻薬による事犯の若年化が進み、薬物依存に対して法的、社会的な施策の充実と共に、医学的見地からの正しい対処法を見出す必要がある。このような状況を打破するために、薬物依存の形成メカニ

ズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究を行う必要がある。メタンフェタミンまたはモルヒネを投与したマウス側坐核で共通して発現が増加している遺伝子を検討することによって薬物依存形成メカニズムの解明を行ってきている<sup>(1-5)</sup>。また薬物依存の予防や治療に用いることの出来る化合物についても報告している<sup>(1,6-8)</sup>。しかし、薬物依存の形成機構は複雑であり、未知の遺伝子が、薬物依存形成の key を握っている可能性が考えられる。本研究では、PCR select cDNA

サブトラクション法を用いて覚せい剤依存の形成に関連する新規遺伝子の同定を試み、薬物依存形成のメカニズムの詳細な解明を試みた。

## B 研究方法

### 1. 実験動物

実験には、7週齢の c57BL/6J 雄性マウス（日本 SLC、静岡）を使用した。本実験における動物実験は名古屋大学医学部動物実験指針、文部科学省動物実験指針および Principle of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985) に準じ動物実験委員会で承認された上で行った。行動および生化学実験に用いるマウスについては、午前 8 時から午後 8 時を明期とする部屋で飼育し、行動実験中以外は、餌および水は自由摂取とした。

### 2. PCR-select cDNA サブトラクション

PCR-select cDNA サブトラクションは、Clontech 社 (Palo Alto, CA) のキットを使用して、既報を改変して行った<sup>(9,10)</sup>。10 日間メタンフェタミン (2mg/kg/day, s.c.) または生理食塩水のみを投与したマウスの側坐核を最終投与 2 時間後に取り出し、mRNA を抽出し、逆転写を行い cDNA とし、アダプター配列を結合させ、サブトラクションを行った。PCR 反応後、メタンフェタミン投与マウス側坐核でコントロールマウスと比較して発現量が増加している遺伝子約 1,000 個を T/A クローニングキットを用いて pCRII ベクターに組み込み、DNA シークエンサーで遺伝子配列を確認した。その中で、オープンリーリングフレームを持つ 25 遺伝子について、メタンフェタミンまたは生理食塩水のみを投与したマウスの側坐核の mRNA とハイブリダイゼーションを行い、メタンフェタミンを投与したマウス側坐核での発現量が生理食塩水群と比べて 20 倍以上に増加している 2 つの遺伝子を確認・同定した。

3. 新たに単離した 2 つの遺伝子のアンチヌクレオチドによる脳局所的ノックダウンマウスの作成

ミニ浸透圧ポンプでマウス側坐核に 2 つの遺伝子のアンチセンスヌクレオチドまたはそれぞれに対応するアミノ酸によって構成されたスクランブルヌクレオチドを持続注入し、それぞれのタンパクまたは mRNA 発現量を測定して該当タンパクがノックダウンされていることを確認した。ピッコロのタンパク量の定量には Synaptic Systems 社製の抗体を用いてウエスタンブロット法で行った。shati mRNA については、リアルタイム RT-PCR 法にて、定量を行った。

### 4. *In vivo* マイクロダイアリシス

*In vivo* マイクロダイアリシスは既報に従って行い<sup>(1,6,8)</sup>、3 で作成したそれぞれの遺伝子発現ノックダウンマウスの側坐核からのドパミン遊離量を測定した。

### 5. 条件性場所嗜好 (Conditioned Place Preference; CPP) 試験<sup>(11,12)</sup>

CPP 試験には 2-compartment box を用いて、既報に従って行った<sup>4)</sup>。メタンフェタミン (2 mg/kg) の投与は実験の直前および 1 時間前に行った。

### 6. 統計処理

実験結果は平均±標準誤差で示した。有意差検定は一元配置分散分析の後、Bonferroni's テストを用いて行った。2 群間比較には、Student's *t*-test を用いて 検定した。

## C 研究結果

### 1. PCR select cDNA サブトラクション

PCR select cDNA サブトラクションを行い、メタンフェタミン投与群マウス側坐核で増加していた 2 つの遺伝子 shati とピッコロについて三次

元立体構造を Fig.1 に示した。遺伝子配列については、NCBI アクセスナンバー ABA54615 および NCBI アクセスナンバー BAC53724 にそれぞれ掲載されている。shati については、我々が本研究を行っている最中にマウスジェノムプロジェクトの一部として、NAC8I として NCBI に完全長が記載されたが、フレームは我々が見出していたものと完全に一致していた。ピッコロはインスリン分泌関連遺伝子としてすでに同定されていた<sup>(13)</sup>。

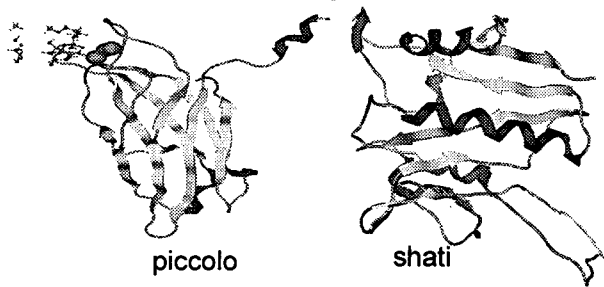


Fig.1 3-D structure of piccolo and shati

2. メタンフェタミン投与によって増加するドパミン遊離量に対する shati またはピッコロ発現量ノックダウンの影響

1) shati

メタンフェタミン (1mg/kg) を3日間投与した後、最終投与後 200 分間のドパミン遊離量を測定した。側坐核に人工脳脊髄液またはスクランブルヌクレオチドを持続注入したマウスでは、ドパミン遊離量がメタンフェタミン投与後約 380%に増加した。一方、shati アンチセンスヌクレオチドを注入したマウスでは、ドパミン遊離量がメタンフェタミン投与後約 500%まで増加した (Fig.2)。

2) ピッコロ

メタンフェタミン (1mg/kg) を3日間投与した後、最終投与後 240 分間のドパミン遊離量を測定した。側坐核に人工脳脊髄液またはスクランブ

ルヌクレオチドを持続注入したマウスでは、ドパミン遊離量がメタンフェタミン投与後約 380%まで増加した。一方、ピッコロアンチセンスヌクレオチドを注入したマウスでは、ドパミン遊離量がメタンフェタミン投与後約 520%に増加した。(Fig.3)

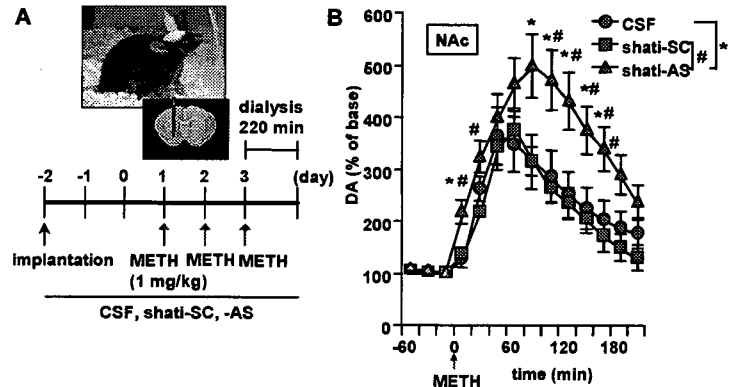


Fig.2 A. Experimental schedule for the measurement of overflow of DA using *in vivo* microdialysis in shati-AS-treated mice. B. Basal levels of DA were  $0.30 \pm 0.08$ ,  $0.31 \pm 0.05$ , and  $0.30 \pm 0.04$  nM for the CSF-, shati-SC-, and shati-AS-treated mice, respectively. Values are means  $\pm$  SE (n=5-6). \* $p < 0.05$  vs. CSF-treated mice. # $p < 0.05$  vs. shati-SC-treated mice.

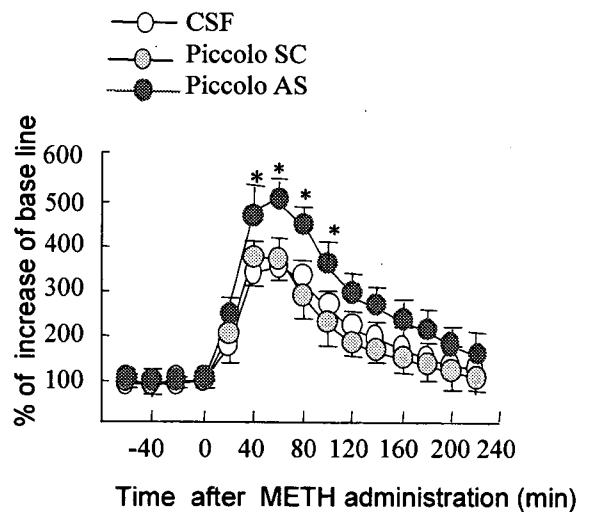


Fig.3 Basal levels of DA were  $0.30 \pm 0.08$ ,  $0.31 \pm 0.05$ , and  $0.30 \pm 0.04$  nM for the CSF-, piccolo-SC-, and piccolo-AS-treated mice, respectively. Values are means  $\pm$  SE (n=5-6). \* $p < 0.05$  vs. CSF-treated mice. # $p < 0.05$  vs. shati-SC-treated mice.

3. メタンフェタミンによる場所嗜好性条件づけに対する shati またはピッコロ発現量ノックダウンの影響

1) shati

メタンフェタミンによって条件づけされた場所嗜好試験において、側坐核に人工脳脊髄液またはスクランブルヌクレオチドを持続注入したマウスでも場所嗜好性は成立したが、shati アンチセンスヌクレオチドを注入したマウスでは、有意に強い場所嗜好性が観察された。またメタンフェタミンで条件づけを行わない場合には、人工脳脊髄液、スクランブルヌクレオチドまたはアンチセンスヌクレオチドのいずれを注入した場合は場所嗜好性は観察されなかった (Fig.4)

## 2) ピッコロ

メタンフェタミンによって条件づけされた場所嗜好試験において、側坐核に人工脳脊髄液またはスクランブルヌクレオチドを持続注入したマウスでも場所嗜好性は成立したが、ピッコロアンチセンスヌクレオチドを注入したマウスでは、より強い場所嗜好性が観察された。またメタンフェタミンで条件づけを行わない場合には、人工脳脊髄液、スクランブルヌクレオチドまたはアンチセンスヌクレオチドのいずれを注入した場合には場所嗜好性は観察されなかった (Fig.5)

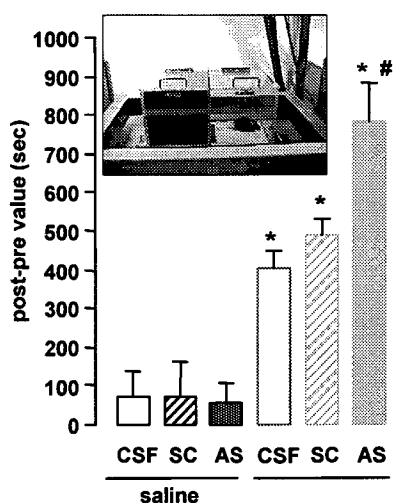


Fig.4 Values are means  $\pm$  SE (n=5-12). \* $p$ <0.05 vs. saline-treated mice. # $p$ <0.05 vs. shati-SC-treated mice.

## D 考察

本研究において、shati とピッコロという2つの薬物依存形成に参与する可能性の高いタンパク

を同定および見出した。shati は、N-アセチルト

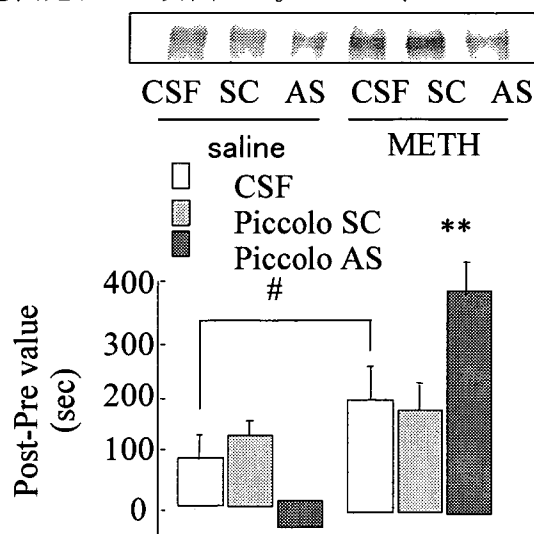


Fig.5 Values are means  $\pm$  SE (n=5-12). \* $p$ <0.05 vs. saline-treated mice. # $p$ <0.05 vs. piccolo-SC-treated mice.

ランスフェラーゼと類似の構造を持つことから NAT18 としても NCBI に登録されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=134288911>)<sup>(13)</sup>。しかし、生理活性についての研究はほとんどなされていない。N-アセチルトランスフェラーゼは重要な神経伝達物質の1つであるアセチルコリンの合成に不可欠な酵素であり、本タンパクがアセチルコリンの合成・分泌に関与している可能性も考えられる。薬物依存の形成にはドパミンだけでなく記憶・学習も重要なファクターの1つであることから、shati のドパミンとアセチルコリン産生・分泌への影響については今後の検討課題である。特に本研究でピッコロは、インシュリン分泌を調節するタンパクとして報告されているが<sup>(14)</sup>、ドパミンの遊離量も調節している可能性が本研究から示された。ピッコロのドパミン遊離量調節には、生合成よりも再取り込みに関わっている、即ち、ドパミントランスポーターの細胞内局在化を示唆する研究成果も得ており、今後は、培養細胞を用いてこれらの仮説を証明したいと考えている。

## E 結論

今までも薬物依存形成に関連することが報告されているタンパクはいくつかあるが、Keyタンパクとなるものについての統一した見解は得られていないが、本研究で見出した2つのタンパクが薬物依存形成にどのように寄与しているかについて今後検討を重ねる予定である。特に、両タンパクともドパミン分泌に関係している可能性が高く、分泌制御タンパクとしての生理機能に焦点を絞って研究を行うつもりである。

### [参考文献]

1. Niwa M, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T.: The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, tumor necrosis factor-alpha, and an inducer of these factors in drug dependence. *J. Pharmacol. Sci.*, 104 (2): 116-121, 2007
2. Mizoguchi H, Yamada K, Mouri A, Niwa M, Mizuno T, Noda Y, Nitta A, Itohara S, Banno Y, Nabeshima T.: Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J. Neurochem.* 102 (5): 1548-1560, 2007
3. Mizoguchi H, Yamada K, Niwa M, Mouri A, Mizuno T, Noda Y, Nitta A, Itohara S, Banno Y, Nabeshima T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice: *J. Neurochem.* 100 (6): 1579-1588, 2007
4. Ishikawa K, Nitta A, Mizoguchi H, Mohri A, Murai R, Miyamoto Y, Noda Y, Kitaichi K, Yamada K, Nabeshima T.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine in neuroglycan C gene expression in the rat brain: *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9 (4): 407-415, 2007
5. Nakajima A, Yamada K, Nagai T, Uchiyama T, Miyamoto Y, Mimiya T, He J, Nitta A, Mizuno M, Tran MH, Seto A, Yoshimura M, Kitaichi K, Hasegawa T, Saito K, Yamada Y, Seshima M, Sekikawa K, Kim HC, Nabeshima T.: Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity: *J Neurosci* 24 (9): 2215-2225, 2004
6. Niwa M, Nitta A, Shen L, Noda Y, Nabeshima.: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine -induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.* 179 (1) 167-171 (2007)
7. Niwa M., Nitta A., Yamada Y, Nakajima A, Saito K, Seshima M, Noda Y, Nabeshima T.: Tumor Necrosis factor and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry.* 62 (6): 658-668 (2007)
8. Niwa M, Nitta A, Yamada Y, Nakajima A, Saito K, Seshima M, Shen L, Noda Y, Furukawa S, Nabeshima T.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor-alpha protects against methamphetamine-induced rewarding and sensitization. *Biol. Psychiatry* 61 (7): 890-901 (2007)
9. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025- 6030 (1996)
10. Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED.: Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of



Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240: 90–97. (1996)

11. Noda Y, Miyamoto Y, Mamiya T, Kamei H, Furukawa H, Nabeshima T., Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 44–51. (1998)

12. Schechter MD, Calcagnetti DJ Continued trends in the conditioned place preference literature from 1992 to 1996, inclusive, with a crossindexed bibliography. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 827–846. (1998)

13. Shibasaki T, Sunaga Y, Seino S.: Integration of ATP, cAMP, and Ca<sup>2+</sup> signals in insulin granule exocytosis. *Diabetes* 53: S59-62 (2004)

14. Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G., Lee K, Fraioli RE, Cho SH., Yung R, Asch E, Ohno-Machado,., Wong WH. Cepko, C.L.: Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol.* 2 (9), E247 (2004)

## F 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Niwa, M., Nitta, A., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Involvement of glial cell-line derived neurotrophic factor inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu- I le on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.*, 179, 167-171 (2007)
- 2) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A $\beta$ <sub>25-35</sub>. *Behav. Brain Res.*, 180, 139-145 (2007)
- 3) Murai, R., Noda, Y., Matsui, K., Kamei, H., Mouri, A., Matsuba, K., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by

repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMK II signaling. *Behav. Brain Res.*, 180, 152-160 (2007)

- 4) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, 61, 890-901 (2007)
- 5) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, 62, 658-668 (2007)
- 6) Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial cell line-derived neurotrophic factor mutant mice. *FASEB J.*, 21, 1994-2004 (2007)
- 7) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. *J. Neurochem.*, 100, 1579-1588 (2007)
- 8) Mizoguchi, H., Yamada, K., Mouri, A., Niwa, M., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and Reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J. Neurochem.*, 102, 1548-1560 (2007)
- 9) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., Ito, Y., Noda, Y., Nagai, T. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J. Neurosci.*, 27, 7604-7615 (2007)
- 10) Amioka, K., Kuzuya, T., Kushihara, H., Ejiri, M., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Carvedilol increases

- ciclosporin bioavailability by inhibiting P-glycoprotein-mediated transport. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59, 1383-1387 (2007)
- 11) Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Zhou, Y., Miyazaki, M., Senzaki, K., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Role of NMDA receptors in antidepressant-like effects of sigma<sub>1</sub> receptor agonist SA-4503 in olfactory bulbectomized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322, 1305-1314 (2007)
  - 12) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and an inducer of these factors in drug dependence. *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 116-121 (2007)
  - 13) Mouri, A., Noda, Y., Noda, A., Nakamura, T., Tokura, T., Yura, Y., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Involvement of a dysfunctional dopamine-D1/NMDA-NR1 and CaMKII pathway in the impairment of latent learning in a model of schizophrenia induced by phencyclidine. *Mol. Pharmacol.*, 71, 1598-1609 (2007)
  - 14) Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Nitta, A., Furukawa H. and Nabeshima, T.: Synergistic effect of combined treatment with risperidone and galantamine on phencyclidine-induced impairment of latent visuospatial learning and memory: role of nAChR activation-dependent increase of dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated neurotransmission. *Neuropharmacology*, 53, 379-389 (2007)
  - 15) Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Mouri, A., Mizoguchi, H., Nitta, A., Chen, W. and Nabeshima, T.: The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25-35</sub> i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1261-1271 (2007)
  - 16) Yan, Y., Yamada, K., Mizoguchi, H., Noda, Y., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Reinforcing effects of morphine are reduced in tissue plasminogen activator (tPA)-knockout mice. *Neuroscience*, 146, 50-59 (2007)
  - 17) Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., Zhao, Y., Niwa, M., Taguchi, K., Hamada, M., Ito, Y., Ito, Y., Wang, L. and Nabeshima, T.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry*, in press.
  - 18) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Saito, K., Seshima, M., Itoh, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the Abeta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.*, in press.
  - 19) Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H. and Suzumura, A.: Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.*, in press.
- ## 2. 学会発表
- 1) Nitta, A., Cen, X., Niwa, M., Ohya, Y., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Suzuki, M., Saito, K., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: The blocking mechanisms of Leu-1 le against methamphetamine and morphine dependence in mice. 69th Annual Meeting of College on Problems of Drug Dependence (Quebec City, Canada, June 16-21, 2007)
  - 2) Nabeshima, T., Niwa, M., Yamada, K., Saito, K., Seishima, M., Noda, Y. and Nitta, A.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its inducer inhibit drug-induced dependence. 69th Annual Meeting of College on Problems of Drug Dependence (Quebec City, Canada, June 16-21, 2007)
  - 3) Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Ito, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward, but not cognitive impairment, in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
  - 4) Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial cell line-derived neurotrophic factor mutant mice. 37th Annual Meeting of Society

- for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 5) Nitta, A., Ishikawa, K., Mizoguchi, H., Mouri, 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. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 6) Kushida, S., Hori, N., Kimoto, K., Nitta, A., Nabeshima, T. and Onozuka, M.: Changes of masticatory activity influenced the dopamine release levels in the hippocampus. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 7) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrite, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 8) Furukawa-Hibi, Y., Ito, Y., Matsumoto, M., Iemura, S.-I., Natsume, T., Watanabe, K., Nitta, A. and Motoyama, N.: Oxidative stress induces the FOXO activation by dephosphorylation. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 9) Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Inhibitory effects of TNF- $\alpha$  and its inducer on morphine-induced rewarding effects and behavioral sensitization. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)
- 10) Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial cell line-derived neurotrophic factor mutant mice. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)
- 11) Wang, D., Noda, Y., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25-35</sub> i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. 第 111 回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)
- 12) 串田祥生, 堀紀雄, 木本克彦, 豊田實, 新田淳美, 鍋島俊隆, 小野塚実: 軟性食餌飼育がドパミン遊離量に及ぼす影響. (Effect of Semi-fluid diet breeding on the hippocampal dopamine release.) 第30回日本神経科学大会, 第50回日本神経化学会大会, 第17回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007.9.10-12)
- 13) Tursun Alkam, Atsumi Nitta, Hiroyuki Mizoguchi, Akio Itoh, Toshitaka Nabeshima: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). 第30回日本神経科学大会, 第50回日本神経化学会大会, 第17回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007.9.10-12)
- 14) 溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 糸原重美, 坂野喜子, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連続投与による異常行動とマトリクスメタロプロテアーゼの生理活性変化. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会, 第 19 回日本アルコール精神医学会, 第 10 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成 19 年度合同学術総会 (大津, 2007.9.28-29)
- 15) 新田淳美, 奥野友香, 曾南, 丹羽美苗, 宮崎雅之, 野田幸裕, 鍋島俊隆: ストレス誘発うつ病・モデル動物におけるニコチン連続投与による抗うつ作用. 第42回日本アルコール・薬物医学会, 第19回日本アルコール精神医学会, 第10回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成19年度合同学術総会 (大津, 2007.9.28-29)
- 16) 新田淳美, 古川昭栄, 山田清文, 鍋島俊隆: 疎水性ジペプチドによる神経栄養因子誘導と精神・神経疾患治療薬への可能性. 第 35 回薬物活性シンポジウム (広島, 2007.11.29-30)

## G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
  - 1) 発明の名称: Akt 活性化剤

(2006年8月31日国際公開)

2007年8月7日国内移行(特願2007-504648)

出願人: 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 鍋島俊隆

2) 発明の名称: 精神障害関連遺伝子及びその利用

(2006年9月8日国際公開)

2007年8月16日国内移行(特願2007-505883)

2007年9月4日米国移行(番号未定)

出願人: 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋島俊隆

3) 発明の名称: 脳内酸化抑制剤およびその使用

2007年10月23日国際出願

(PCT/JP2007/070628)

出願人: 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 鍋島俊隆

4) 発明の名称: 抗うつ・抗不安剤

2008年1月24日出願(特願2008-013630)

出願人: 協和醗酵工業株式会社, 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 日比陽子, 鍋島俊隆, 森下幸治, 池田武史

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 依存性薬物の精神神経毒性と標的分子への作用機序の解明

分担研究者：曾良一郎<sup>1</sup>

研究協力者：李 炳錦<sup>1</sup>，十川千春<sup>2</sup>，十川紀夫<sup>2</sup>，猪狩もえ<sup>1</sup>，北山滋雄<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>東北大学大学院精神・神経生物学分野，<sup>2</sup>岡山大学大学院歯科薬理学分野)

### [研究要旨]

最近、我が国での乱用が増加しているメチロン(2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxy-phenyl]propan-1-one)は、3,4-methylenedioxy-methamphetamine(MDMA)のベンジル位がケトン基に修飾された薬物である。メチロンのモノアミン神経伝達系への機序を解明するため、メチロンの神経伝達物質トランスポーター輸送機能に及ぼす効果と細胞毒性を検討した。

モノアミントランスポーター発現 CHO 細胞におけるモノアミン輸送活性に対するメチロンの効果を検討したところ、DAT, NET, SERT いずれの輸送活性を濃度依存性に抑制した。阻害の IC<sub>50</sub> は NET に対して最も低く、続いて DAT, SERT の順であった。メタンフェタミン(MAP)との作用強度を比較すると、DAT, NET はいずれも MAP の方が低い IC<sub>50</sub> を示したのに対し、SERT ではメチロンの方が MAP より低い IC<sub>50</sub> の値を示した。

メチロンの細胞毒性を LDH 細胞外遊離量で評価した。メチロンは濃度依存性に細胞毒性を示し、DAT 発現 CHO 細胞により強く現れた。また、メチロンは高濃度において SERT 発現 CHO 細胞で特に強い細胞毒性を示したのに対し、NET 発現 CHO 細胞ではほとんど細胞毒性を示さなかった。

メチロンが DAT 発現 CHO 細胞で細胞毒性を示した今回の結果は、DAT 欠損によりメチロンの神経毒性が低下したマウスモデルと一致する。メチロンによる神経毒性におけるドーパミンおよびセロトニン神経伝達の関与が *in vivo* のデータだけではなく、モノアミントランスポーター発現 CHO 細胞を用いた *in vitro* の結果からも示唆された。

### A. 研究目的

従来、我が国の乱用薬物は、覚醒剤と有機溶媒が多数を占めていた。しかし最近になって、メチレンジオキシメタンフェタミン(MDMA)や、平成19年2月に違法ドラッグとして規制の対象と認定されたメチロン(2-methylamino-1-[3,4-methylenedioxy-phenyl]propan-1-one)の乱用が増加し、深刻な社会問題となっている[1]。覚醒剤であるメタンフェタミン(MAP)が主にドーパミン

(DA)作動性神経に作用するのに対して、MDMA はドーパミン(DA)に加えてセロトニン(5-HT)作動性神経にも作用する。メチロンはMDMAのベンジル位がケトン基に修飾された薬物であることから、DA、5-HT神経ともに作用を及ぼすと考えられている(Fig. 1)。今年度は、神経伝達物質トランスポーター発現培養細胞を用いてメチロンのモノアミン取り込み阻害作用を測定し、モノアミントランスポーターを介する神経毒性を解析した。

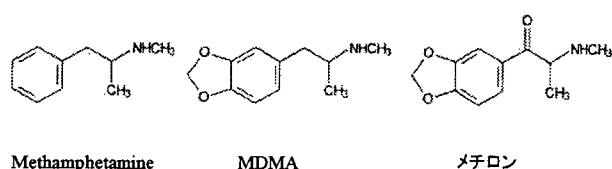


Fig. 1 メタンフェタミン、MDMA、メチロンの構造式

## B. 研究方法

### 1. 神経伝達物質トランスポーター発現細胞系の構築

ラットドパミントランスポーター (DAT), ノルエピネフリントランスポーター (NET), セロトニントランスポーター (SERT), マウス GABA トランスポーター 1 (GAT-1) cDNA を CHO 細胞に遺伝子導入し, G418 にて選択してこれらトランスポーターを安定発現する細胞株を作成した。

### 2. 輸送機能の解析

トランスポーター輸送活性は,  $[^3\text{H}]$  ラベルしたそれぞれの基質をトレーサーとして用い, 文献 (1) に準拠して行った。

### 3. 毒性試験

各細胞株は, 96 ウェルプレートに,  $1 \times 10^4$  個/ウェルで播種し, 通常培養条件で 24 時間培養後, PBS で洗浄し, 試験薬含有・不含フェノールレッド不含  $\alpha$  MEM (1% BSA を添加) に置き換えさらに 24 時間培養した。その後, 培養液中に遊離した LDH 量を測定し, 細胞毒性の評価とした。

## C. 研究結果

### 1. 神経伝達物質トランスポーター輸送機能に及ぼすメチロンの効果

モノアミントランスポーター発現 CHO 細胞におけるモノアミン輸送活性に対するメチロンの効果を methamphetamine (MAP) と比較して調べた。対照として, GAT-1 を用いた。メチロンは, DAT, NET,

SERT いずれの輸送活性も濃度依存性に抑制した (Fig. 2a, b)。阻害の IC50 は, NET に対してが最も低く, 続いて DAT, SERT の順であった。MAP との作用強度を比較すると, DAT, NET はいずれも MAP の方が低い IC50 を示したのに対し, SERT ではメチロンの方が MAP より低い IC50 の値を示した。一方, メチロンは GAT 輸送活性に対しては用いたいずれの濃度においても影響しなかった。

これらの結果は, これまでラット脳シナプトゾーム, ヒト血小板, DAT/NET 遺伝子導入発現培養細胞で監察報告された結果と概ね一致する。

### 2. メチロン細胞毒性と神経伝達物質トランスポーター発現との関係

メチロンの細胞毒性を, LDH 細胞外遊離量で評価した。Fig. 3 は, DAT 並びに GAT-1 発現 CHO 細胞におけるメチロン 24 時間曝露の効果, DAT 特異的ドパミン (DA) 神経毒 MPP+ の効果と比較したものである。メチロンは濃度依存性に細胞毒性を示した。高濃度では, GAT-1 発現 CHO 細胞に対しても毒性を示したが, DAT 発現 CHO 細胞により強く現れた。一方, MPP+ は DAT 発現細胞に特異的な細胞毒性を示した。また, メチロンは高濃度において SERT 発現 CHO 細胞で特に強い細胞毒性を示したのに対し, NET 発現 CHO 細胞ではほとんど細胞毒性を示さなかった (Fig. 4)。

次に, メチロンと MAP の細胞毒性発現における相互作用について検討した。SERT 発現 CHO 細胞に比較的低濃度の両者を同時曝露すると, 相加・相乗的に細胞毒性が出現した (Fig. 5a, b)。

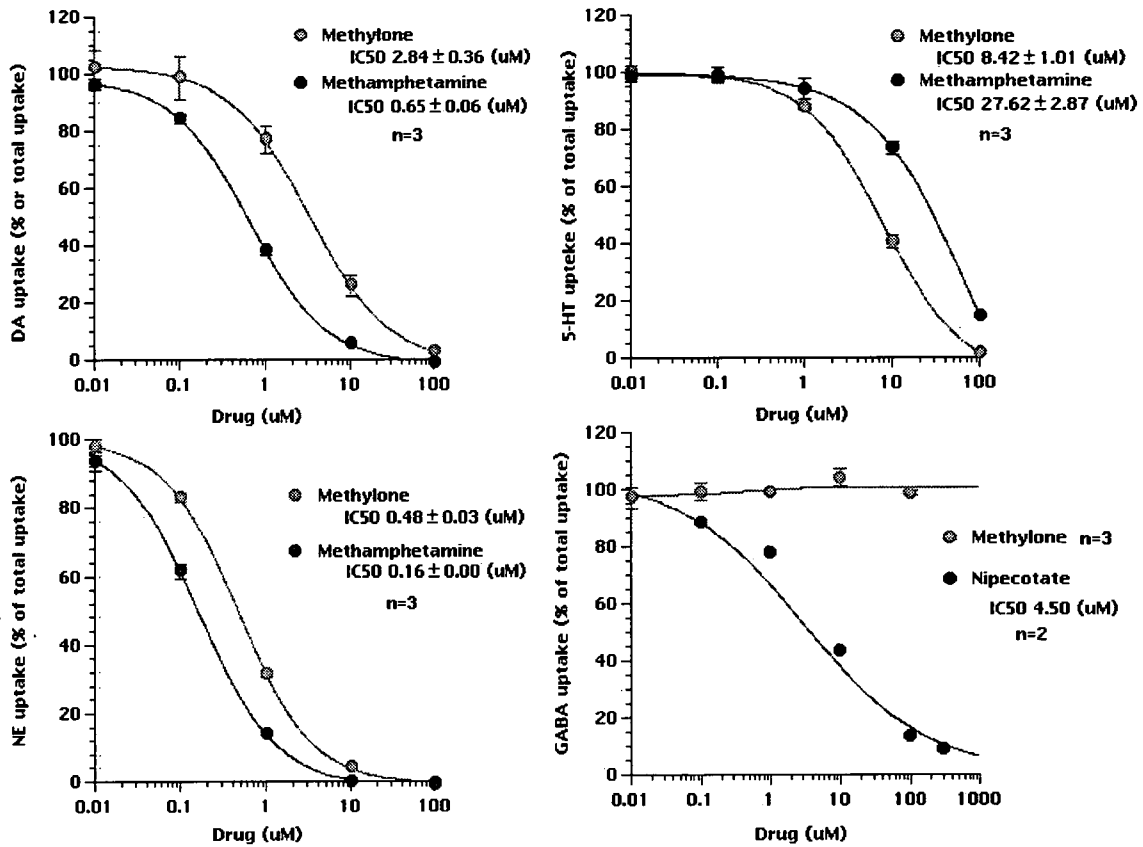


Fig. 2a 各種トランスポーター発現 CHO 細胞におけるメチロン, methamphetamine の輸送活性阻害

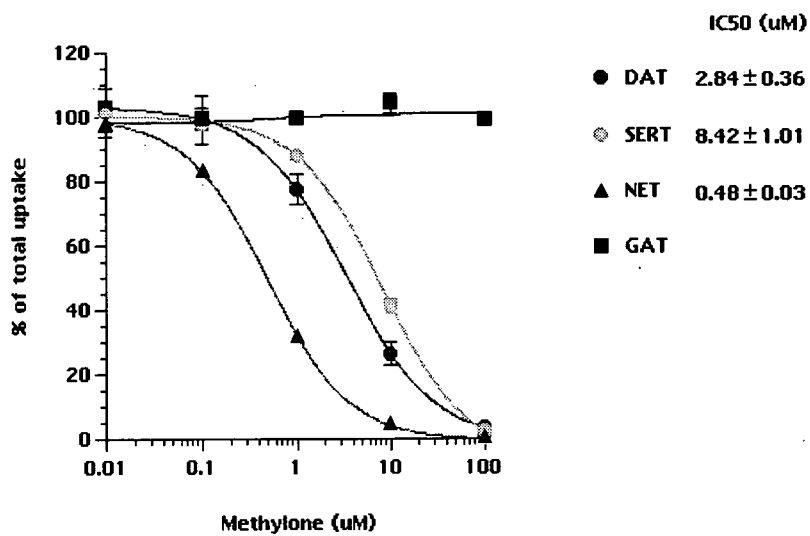


Fig. 2b 各種トランスポーター発現 CHO 細胞におけるメチロンの輸送活性阻害の比較

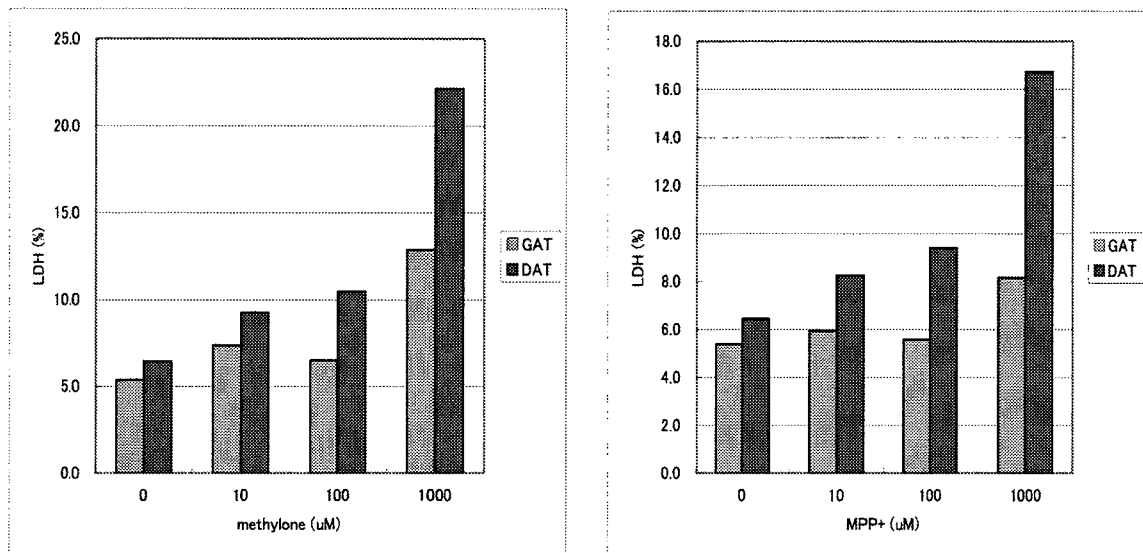


Fig. 3 DAT, GAT 発現 CHO 細胞におけるメチロン, MPP+の細胞毒性

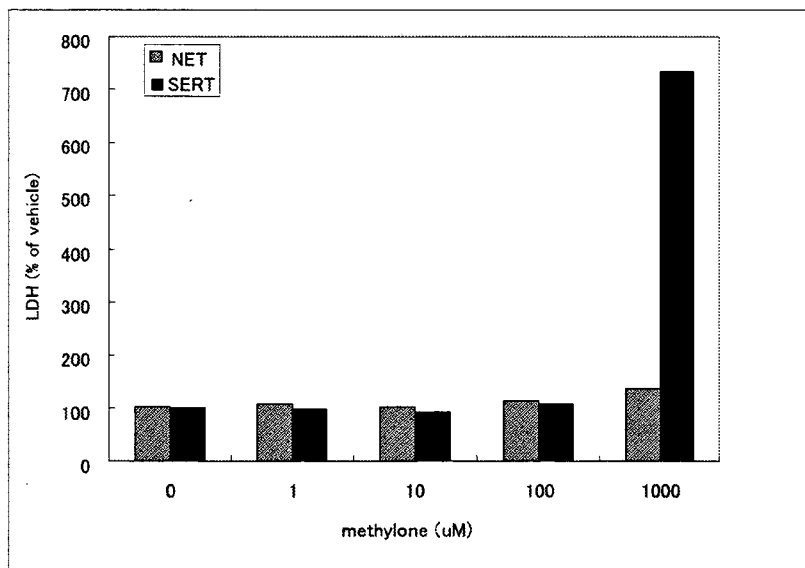


Fig. 4 NET, SERT 発現 CHO 細胞におけるメチロン細胞毒性



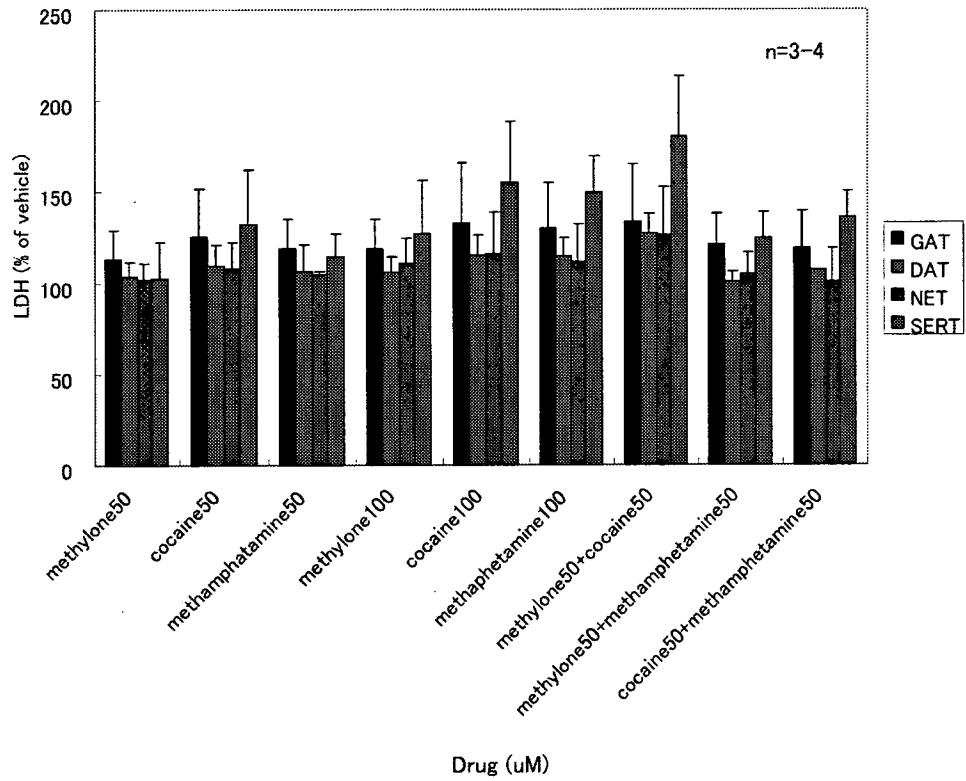


Fig. 5a 各種神経伝達物質トランスポーター発現 CHO 細胞におけるメチロン, methamphetamine の細胞毒性の比較

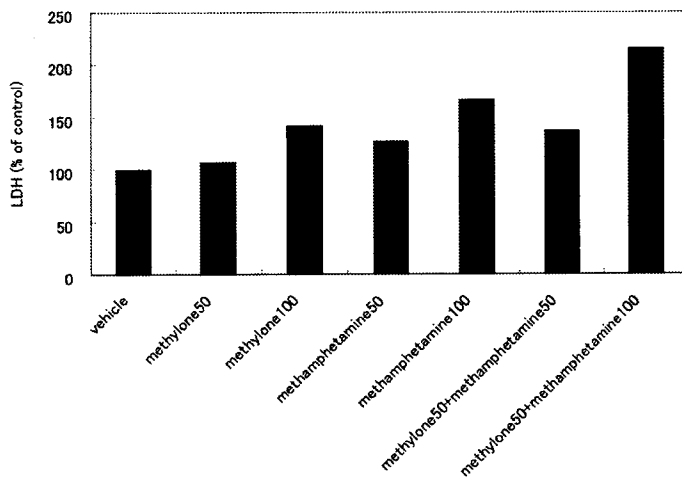


Fig. 5b SERT 発現 CHO 細胞におけるメチロン, methamphetamine の細胞毒性の比較

#### D. 考察

今回、各種モノアミントランスポーターの輸送活性に対するメチロンのIC<sub>50</sub>はNETに対して最も低く、続いてDAT, SERTの順であった。メタンフェタミン(MAP)と比較すると、DAT, NETに対していずれもMAPの方が低いIC<sub>50</sub>を示したのに対し、SERTではメチロンの方がMAPより低いIC<sub>50</sub>であった。今回の各種モノアミントランスポーターの輸送活性に対するメチロンの効果は、これまでに報告されているCozziらの結果(2)と概ね一致していた。しかし、今回の結果からはNETに対するメチロンの抑制作用が最も強く認められたのに対し、Cozziらの結果ではメチロンはDAT, NETに同程度の抑制作用が認められている。これは遺伝子導入発現細胞系を用いているものの、発現させた細胞の違い、あるいは一過性発現と安定発現の違いに起因するかもしれない。

メチロンはDAT発現細胞において用量依存的に細胞毒性を示した。また、Nagaiらの報告ではメチロンはDA, 5-HTそしてNAの順においてモノアミンの遊離を著明に増加した。一方、今回の*in vivo*の実験においてメチロンの細胞毒性はDAT欠損に伴って減弱したことからDATがメチロンの主な神経毒性の標的分子の一つと考えられた。メチロンがDAT発現CHO細胞で細胞毒性を示した今回の結果は、DAT欠損によりメチロンの神経毒性が低下したマウスモデルと一致する。さらに、メチロンの投与後に見られる体温上昇およびメチロンの投与による顕著な運動促進は選択的D1受容体遮断薬を前投与することで有意に抑制されたと報告されている(3)。これらの結果からメチロンの神経毒性はドーパミン神経系の関与が大きいと考えられる。

SERT発現細胞においてメチロンは低濃度ではなく高濃度において細胞毒性を示した。低濃度

で毒性を示さないのはSERTへのIC<sub>50</sub>がDAT, NETよりも高いことによる可能性が考えられる。メチロンのNET輸送活性に対する抑制効果は試したモノアミントランスポーター中で最も大きかったにもかかわらず、その細胞毒性はNET発現CHO細胞ではほとんどみられなかった。これらの結果はメチロンの神経毒性にセロトニン神経系も関与も示していると考えられる。

#### E. 結論

メチロンによる神経毒性におけるドーパミンおよびセロトニン神経伝達の関与が*in vivo*のデータだけではなく、モノアミントランスポーター発現CHO細胞を用いた*in vitro*の結果からも示唆された。

#### [参考文献]

1. C. Sogawa, N. Sogawa, J. Tagawa, A. et al.: 5-Methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy), a selective and high affinity inhibitor of serotonin transporter. *Toxicol. Lett.*, 170; 75-82. 2007
2. N.V. Cozzi, M.K. Sievert, A.T. Shulgin, et al.: Ruoho Inhibition of plasma membrane monoamine transporters by  $\alpha$ -ketoamphetamines. *Eur. J. Pharmacol.*, 381; 63-69; 1999.
3. 船田正彦: 脱法ドラッグの構造修飾特性とその依存性および神経毒性発現の関連性. 平成17年厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学研究事業)総括研究報告書(H17-特別-033) 1-21. 2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Numachi, Y., Shen, H., Yoshida, S., Fujiyama, K., Toda, S., Matsuoka, H., Sora, I., and Sato, M.: Methamphetamine alters expression of DNA methyltransferase 1 mRNA in rat brain. *Neuroscience Letters*. 414: 213–217(2007)
- 2) Fukushima, S., Shen, H., Hata, H., Ohara, A., Ohmi, K., Ikeda, K., Numachi, Y., Kobayashi, H., Hall, FS., Uhl, GR., and Sora, I.: Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice. *Psychopharmacology*. 193(1):55-62(2007)
- 3) Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Miyatake, R., Shirayama, Y., Shimizu, E., Maeda, K., Suzuki, Y., Mashimo, Y., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Hata, A., Sawa, A., and Iyo, M.: Identification of functional polymorphisms in the promoter region of the human PICK1 gene and their association with methamphetamine psychosis. *American Journal of Psychiatry*. 164: 1105-1114(2007)
- 4) Ikeda, M., Ozaki, N., Suzuki, T., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kishi, T., Sekine, Y., Iyo, M., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Inada, T., and Iwata, N.: Possible association of beta-arrestin 2 gene with methamphetamine use disorder, but not schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 6 (1):107-112 (2007)
- 5) Yamamoto, H., Kamegaya, E., Hagino, Y., Imai, K., Fujikawa, A., Tamura, K., Enokiya, T., Yamamoto, T., Takeshima, T., Koga, H., Uhl, GR., Ikeda, K., and Sora, I.: Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture. *Neurochemistry International*. 51: 237–244(2007)
- 6) Numachi, Y., Ohara, A., Yamashita, M., Fukushima, S., Kobayashi, H., Hata, H., Watanabe, H., Hall, FS., Lesch, KP., Murphy, DL., Uhl, GR. and Sora, I.: Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur J Pharmacol*. 572: 120-128(2007)
- 7) Kishimoto, M., Ujike, H., Motohashi, Y., Tanaka, Y., Okahisa, Y., Kotaka, T., Harano, M., Inada, T., Yamada, M., Komiyama, T., Hori, T., Sekine, Y., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N., and Kuroda, S.: The dysbindin gene (*DTNBP1*) is associated with methamphetamine psychosis. *Biol Psychiatry*. 15;63(2):191-196 (2008)
- 8) Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Kishimoto, M., Okahisa, Y., Kotaka, T., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., and Kuroda, S.: The glycine transporter 1 gene (*GLYT1*) is associated with methamphetamine-use disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 5;147(1):54-8 (2008)
- 9) Kasai, S., Hayashida, M., Sora, I., and Ikeda, K.: Candidate gene polymorphisms predicting individual sensitivity to opiates. *Archives of Pharmacology in press*
- 10) Uhl, GR., Drgon, T., Liu, QR., Johnson, C., Walther, D., Ujike, H., Komiyama, T., Harano, M., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iyo, M.,

- Iwata, N., Yamada, M., Sora, I., Chen, CK., Liu, HC., and Lin, SK.: Genome-wide association for methamphetamine dependence: convergent results from two samples. *Arch Gen Psychiatry. in press*
- 11) Otani, K., Ujike, H., Sakai, A., Okahisa, Y., Kotaka, T., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., and Kuroda, S.: Reduced CYP2D6 activity is a negative risk factor for methamphetamine dependence. *The American Journal of Psychiatry in press*
  - 12) Hashimoto, T., Hashimoto, K., Miyatake, R., Matsuzawa, D., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., and Iyo, M.: Association study between polymorphisms in glutathione-related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. in press*
  - 13) 曾良一郎：オピオイド受容体 Opioid receptor. In: KEY WORD 精神, 第4版, (樋口輝彦, 神庭重信, 染矢俊幸, 宮岡等編) : 150-151, 先端医学社, 東京 (2007)
  - 14) 曾良一郎：薬物依存の分子病態. *実験医学* 25(13):179-184(2007)
  - 15) 曾良一郎、猪狩もえ、山本秀子、池田和隆：依存性薬物の分子標的としてのモノアミントランスポーター. *日本薬理学雑誌* 130(6):450-454(2007)
  - 16) 曾良一郎、福島攝、山本秀子、池田和隆：ADHD 動物モデルとしてのドーパミントランスポーター欠損マウス. シンポジウム4 AD/HD 研究の新機軸-基礎と臨床のクロストーク-. *脳と精神の医学* 18(4):279-283(2007)
2. 学会発表
    - 1) Ezaki, N., Nakamura, K., Sekine, Y., Iyo, M., Ozaki, N., Inada, T., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., and Mori, N.: Association analysis of 5-httlpr variants with methamphetamine psychosis in Japanese populations. The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
    - 2) Kotaka, T., Ujike, H., Morita, Y., Kishimoto, M., Okahisa, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S.: Association study between the casein kinase 1 epsilon gene and methamphetamine dependence The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
    - 3) Okahisa, Y., Ujike, H., Kishimoto, M., Kotaka, T., Morita, Y., Morio, A., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S.: Association study between the neuropeptide y gene and patients with methamphetamine dependence/psychosis The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry,