

遺伝子が誘導, 389個の遺伝子が抑制され, カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して577個の遺伝子が誘導され, 382個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く, 他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4剤に共通して17個の遺伝子が誘導され, 33個の遺伝子が抑制された。

ヒト・オリゴデンドロサイト由来のOL細胞にリチウム, パルプロ酸, カルバマゼピン, ラモトリジンを投与した結果, 各々838個, 1820個, 869個, 931個の遺伝子が20%以上発現誘導され, 3101個, 3693個, 4051個, 3529個の遺伝子が20%以上発現を抑制された。SK-N-SH細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導(上段)または

抑制(下段)される遺伝子の数を図1右下に示す。リチウムとパルプロ酸との間に共通して300個の遺伝子が誘導され, 1062個の遺伝子が抑制され, カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して278個の遺伝子が誘導され, 1601個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く, 他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4剤に共通して17個の遺伝子が誘導され, 208個の遺伝子が抑制された。

3種の細胞種に見られるリチウムとパルプロ酸との間の高い共通性とカルバマゼピンとラモトリジンとの間の高い共通性は完全連結法による階層的クラスタリング解析によっても確認された(図2)。図2のクラスタリング解析の結果は各薬剤投与に

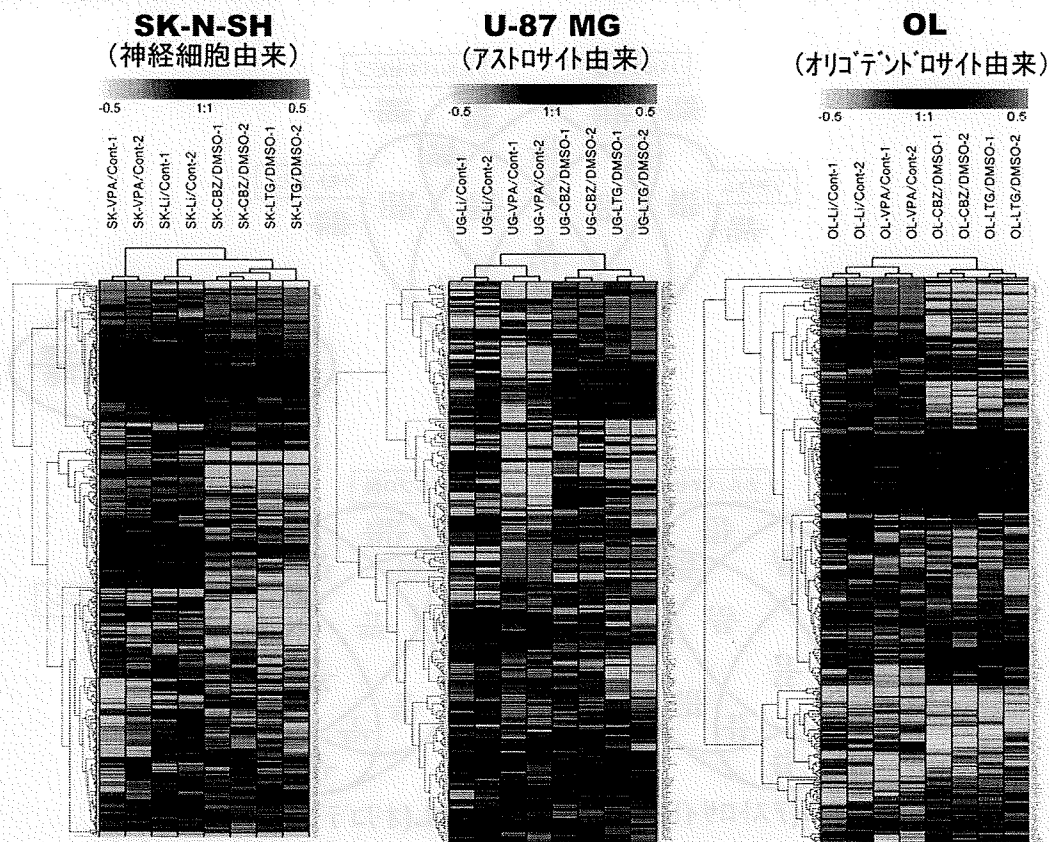


図2 4剤の気分安定薬投与による遺伝子発現変化パターンの完全連結法による階層的クラスタリング解析

つき2回の培養・アレイ実験を行った繰り返し実験間で緊密な類似プロファイルを示し、その次に、リチウム投与によるプロファイル変化とバルプロ酸投与によるプロファイル変化との間と、カルバマゼピン投与によるプロファイル変化とラモトリジン投与によるプロファイル変化との間の類似性が高いことを示している。

一方、各薬剤投与により神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト間に共通して発現が誘導、または抑制される遺伝子数を図3に示す。リチウム投与によってヒトの神経細胞由来のSK-N-SH細胞、ヒト・アストロサイト由来のU-87 MG細胞、ヒト・オリゴデンドロサイト由来のOL細胞に共通して3個の遺伝子が誘導され、41個の遺伝子が抑制された。バルプロ酸投与では3種の細胞種共通に208個の遺伝子が誘導され、301個の遺伝子が抑制された。カルバマゼピン投与によ

って3種の細胞種共通に7個の遺伝子が誘導され、89個の遺伝子が抑制された。バルプロ酸は他の気分安定薬に比べて、細胞種間に共通して遺伝子発現に顕著に大きな影響を持っていた。

各気分安定薬投与により発現変化を受ける遺伝子群がどのような機能カテゴリ、細胞分画に属するかをExpression Analysis Systematic Explorer (EASE) で解析した結果を表に示す。ヒトの神経細胞由来SK-N-SH細胞、ヒト・アストロサイト由来U-87 MG細胞、ヒト・オリゴデンドロサイト由来OL細胞の全てにおいて、リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンの4剤に共通して、発現変化を受ける遺伝子群が有意に高頻度に属する遺伝子機能カテゴリ・細胞分画カテゴリにつき、各細胞、各薬剤投与により発現変化する遺伝子数の観測値の発生確率 (EASE値) を示している。表のEASE値の右側に*印を付して

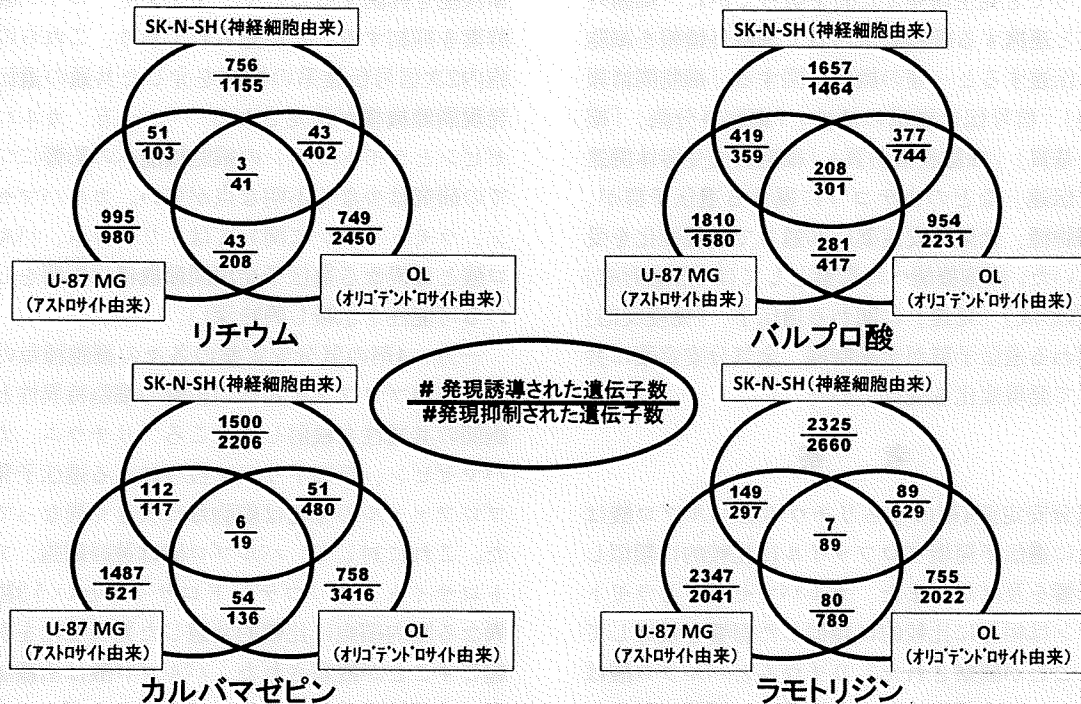


図3 各気分安定薬投与に対してヒト脳由来細胞間で共通に発現が誘導または抑制された遺伝子数

表 気分安定薬4剤に共通して発現変化を受ける遺伝子カテゴリの各細胞, 各薬剤投与により発現変化する遺伝子数の観測値の発生確率

遺伝子カテゴリ	SK-N-SH(神経細胞由来)				U-87 MG(アストロサイト由来)				OL(オリゴデントロサイト由来)			
	Li	VPA	CBZ	LTG	Li	VPA	CBZ	LTG	Li	VPA	CBZ	LTG
細胞間情報交換	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.05	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *
信号伝達機構の活性	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.001 *	<0.01
細胞外分画	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *
細胞外基質	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *
細胞膜蛋白	<0.001 *	<0.001 *	<0.05	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.01	<0.001 *	<0.05	<0.01	<0.001 *	<0.05
細胞表面受容体関連信号伝達	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.01	<0.05	<0.001 *	<0.01
形態形成	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.05	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.01	<0.01
器官形成	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.05	<0.001 *	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
発達	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *
免疫反応	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.001 *	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01

Li: リチウム, VPA: バルプロ酸, CBZ: カルバマゼピン, LTG: ラモトリジン

いるカテゴリは多重比較のボンフェローニ補正法を行っても発生確率が0.05を切っていた。細胞外基質と連携する細胞膜蛋白質で細胞外情報を細胞内に伝達すると一連の機能に関する「細胞間情報交換」「信号伝達機構の活性」「細胞外分画」「細胞外基質」「細胞膜蛋白質」「細胞表面受容体関連信号伝達」などのカテゴリに属する遺伝子群が、全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。細胞機能への影響としては「形態形成」「器官形成」「発達」に関わる遺伝子、「免疫反応」に関わる遺伝子群が全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。

考 察

気分安定薬4剤のうちリチウムとバルプロ酸は相互に遺伝子発現プロファイルに比較的類似した影響を及ぼし、また、カルバマゼピンとラモトリジンは相互に比較的類似した影響を及ぼしていることが観察された。リチウムとバルプロ酸は従来から脳内細胞に及ぼす影響への解明が試みてきておられ、これまでにグリコーゲン合成酵素リ

ン酸化酵素3のリン酸化部位の調節を介して、酵素機能を抑制することや、イノシトールリン酸化酵素を抑制することが知られており、これらの細胞内2次信号伝達系の抑制を介した共通の遺伝子発現調節機構が推定される^{2,3,8)}。一方、カルバマゼピンとラモトリジンの細胞機能への影響についての研究は少なく不明な点が多い。カルバマゼピン、ラモトリジンに関しては、リチウム、バルプロ酸とは異なる遺伝子発現調節機構に影響をしている可能性を示唆し興味深い。

一方、4剤の気分安定薬の各々の細胞種毎の遺伝子発現プロファイルへの影響の細胞特異性と細胞間の共通性を検討したところ、リチウム、カルバマゼピン、ラモトリジン投与による遺伝子発現プロファイルの変化は細胞毎に大きく異なっていた。これに対して、バルプロ酸は神経細胞、アストロサイト、オリゴデントロサイトという3種の異なる脳内細胞に比較的共通した発現変化を引き起こすことが観察された。バルプロ酸は治療域濃度で中枢神経系組織においてのみならず、心血管系組織や骨組織においてもヒストン脱アセチル化

酵素を抑制する効果があり、このエピジェネティックな調節機構を介した遺伝子発現調節は、妊娠中にバルプロ酸を服用した際に高頻度に認められる先天奇形に関連することが想定されている¹⁵⁾。バルプロ酸が細胞種間で比較的共通の遺伝子発現変化を引き起こすことはむしろ催奇形性に関連する現象である可能性があり、気分安定薬の奏功機序に関わる遺伝子発現変化はリチウム、カルバマゼピン、ラモトリジン投与による影響として観察されたように細胞種特異的なものと推測される。

4種気分安定剤投与により共通に遺伝子発現変化を受ける遺伝子群が属するカテゴリには細胞外基質と連携する細胞膜蛋白質で細胞外情報を細胞内に伝達する機能に関するものと、形態・器官の形成、発達に関するものが多く、気分安定薬が細胞外から細胞内に伝わる情報伝達系に関わる遺伝子群の発現調節を調節することで、脳内細胞の構造・機能のフォーメーションを変化させることが、気分安定薬の奏功機序に関わる可能性を示している。また、免疫反応に関わる遺伝子群も全細

胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。従来の研究から気分安定薬はモノサイト系細胞やミクログリアに影響し、サイトカイン放出能を調節することが知られ、免疫系を介した奏功機序が示唆されているが、今回の研究で神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにおいても免疫反応に関連する遺伝子発現が大きく変化を受けることは興味深い。

今後、本研究により観察された複数の気分安定薬に共通してみられる神経細胞や各種グリア細胞に特異的に起きる発現変化を受ける遺伝子群の機能を解析し、また、発現変化を引き起こす機序を解明することで、気分安定薬の奏功機序が明らかになり、これらの分子機構を標的とするより合理的な薬剤開発が可能になることが期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究費の助成を頂きました財団法人臨床薬理研究振興財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Schou M. The early European lithium studies. *Aust N Z J Psychiatry* 1999; **33** Suppl: S39-47.
- 2) Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci* 2003; **24**: 441-443.
- 3) Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 8455-8459.
- 4) Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36734-36741.
- 5) Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH, Manji HK. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem* 1999; **72**: 879-882.
- 6) Manji HK, Moore GJ, Chen G. Bipolar disorder: leads from the molecular and cellular mechanisms of action of mood stabilizers. *Br J Psychiatry Suppl* 2001; **41**: s107-119.
- 7) Zarate CA, Jr., Singh J, Manji HK. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006; **59**: 1006-1020.
- 8) Agam G, Livne A. Inositol-1-phosphatase of human erythrocytes is inhibited by therapeutic lithium concentrations. *Psychiatry Res* 1989; **27**: 217-224.
- 9) Harwood AJ. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatry* 2005; **10**: 117-126.
- 10) Rapoport SI, Bosetti F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? *Arch Gen Psychiatry* 2002; **59**: 592-596.
- 11) Bosetti F, Seemann R, Bell JM, Zahorchak R, Friedman E, Rapoport SI, Manickam P. Analysis of gene expression with cDNA microarrays in rat brain after 7 and 42 days of oral lithium administration. *Brain Res Bull* 2002; **57**: 205-209.
- 12) Niculescu AB, 3rd, Kelsoe JR. Convergent functional genomics: application to bipolar disorder. *Ann Med* 2001; **33**: 263-271.
- 13) Chetcuti A, Adams LJ, Mitchell PB, Schofield PR. Microarray gene expression profiling of mouse brain mRNA in a model of lithium treatment. *Psychiatr Genet* 2008; **18**: 64-72.
- 14) Wang JF, Bown CD, Chen B, Young LT. Identification of mood stabilizer-regulated genes by differential-display PCR. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001; **4**: 65-74.
- 15) Gurvich N, Berman MG, Wittner BS, Gentleman RC, Klein PS, Green JB. Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo. *FASEB J* 2005; **19**: 1166-1168.

気分障害の網羅的遺伝子発現解析

Comprehensive gene expression analysis into mood disorder



富田 博秋

Hiroaki TOMITA

東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野

◎気分障害の成因を解明するうえで、近年急速に発達を遂げたマイクロアレイをはじめとする網羅的遺伝子発現解析技術を用いて双極性障害、大うつ病性障害罹患者や健常対照者の死後脳組織の遺伝子発現を解析することは有効かつ必須のアプローチと考えられ、これまでに複数の研究グループが解析結果の報告を行ってきている。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血は死後脳組織に比べて採取を行いやすく、同一罹患者の病相、病状の違いによる遺伝子発現変化の評価も可能であることから、罹患者や健常人から採取した末梢血全血や血液中のリンパ球などを対象とする網羅的遺伝子発現解析も試みられてきている。本稿では気分障害成因解明に向けての死後脳組織、末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析のこれまでの成果と今後の課題・展望について検討を行う。



双極性障害、大うつ病、死後脳、免疫細胞、マイクロアレイ

気分障害とは顕著な気分の変動を中心症状とする疾患を総称し、うつ病相と躁病相の両方を呈する双極性障害と、うつ病相のみを呈する大うつ病性障害はその中核となる疾患である。ゲノムの塩基配列情報は脳組織特異的に mRNA へと転写され、さらに蛋白質に翻訳され、翻訳後修飾を受け、他の分子と相互作用することではじめて脳・精神機能に影響を及ぼすものであり、死後脳組織の網羅的遺伝子発現解析は精神疾患の病態解明には必須のアプローチである。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血由来の細胞を対象とする網羅的遺伝子発現解析も、精神疾患成因解明において有効なアプローチとなりうる(図 1)。

本稿では、気分障害の病態解明に向けた死後脳と末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析研究のこれまでの成果と今後の課題・展望につい

て検討したい。

死後脳における遺伝子発現研究

死後脳を対象とする双極性障害と大うつ病性障害の網羅的遺伝子発現研究の、これまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害の死後脳では MAG, ERBB, TF, PLP1, MOG, MOBP, MOG などの、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトに関連する遺伝子発現が低下しており、この知見は統合失調症や大うつ病性障害罹患者の脳にも共通した現象として観察されている¹⁻³⁾。また、双極性障害ではミトコンドリア機能⁴⁻⁸⁾、受容体・チャネル^{9,10)}、ストレス・免疫反応^{9,10)}、シャペロン機能⁹⁾、ユビキチン系¹⁰⁾、糖代謝^{6,11)}に関連する遺伝子発現変化が報告されている。これまでに報告のある双極性障害の死後脳研究の多くは、スタンレー脳バンクが世界

の研究施設に供給した死後脳を解析したものである。スタンレー脳バンクの双極性障害死後脳に基づく12の研究の生データを統合したメタ解析が行われており、酸化リジン、ユビキチン系、RNA スプライシング、細胞内蛋白輸送、熱ショック蛋白質、主要組織適合遺伝子複合体クラスⅡ受容体活性、メタロチオネインという遺伝子カテゴリが双極性障害罹患者の脳で顕著に発現調節を受けていることや、個別の遺伝子としてPENK、GRK3、BDNF、HSPA5、LARS2、APO-L、HINT1、UBE2N、RELNなどの発現が低下していることが報告されている¹²⁾。このほか、双極性障害の自殺既遂者とそれ以外の死因による死亡者との比較でPLSCR4、EMX2の発現量に差があるとする報告¹³⁾や、双極性障害、大うつ病性障害を含めた精神疾患罹患者脳組織では、神経細胞周囲のオリゴデンドロサイト数やカルビンディン陽性介在神経密度の減少と、神経発達やアポトーシスに関連した遺伝子の発現量が相関するという報告がなされている¹⁴⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害を対象とする死後脳マイクロアレイ解析研究は、著者が運営に参加したアメリカのカリフォルニア大学アーバイン校脳バンクのほか、前述のスタンレー財団、エール大学、コロンビア大学、カナダのマギル大学などの脳バンクで集積された死後脳を対象として行われている。著者らのグループは、大うつ病性障害罹患者の前頭前野、前帯状回などのアレイ解析を行い、GABA神経伝達^{15,16)}、グルタミン酸神経伝達¹⁵⁾、線維芽細胞成長因子システム¹⁷⁾、G蛋白結合受容体信号伝達システム(投稿中)に関連する遺伝子発現の顕著な変化を観察した。このほか、これまでにミエリン¹⁸⁾、ポリアミン代謝^{19,20)}、細胞増殖^{14,17,21)}、細胞代謝^{14,16)}、ストレス反応²²⁾、転写^{16,22)}に関する遺伝子群が大うつ病性障害、または大うつ病性障害に伴う自殺の影響により発現変化を受ける遺伝子群として報告されている。大うつ病性障害の病態特異的な発現変化として報告される遺伝子群が双極性障害以上に論文ごと異なる傾向にあるのは、本質的に大うつ病性障害の成因の異質性が高いと考えられること、準拠する脳バンクの数が多

いことなども要因として考えられるが、かならずしもデータそのものの再現性が低いことを意味するものではなく、ただ単にデータ解析や論文化する際の焦点の当て方が異なる面もあると考えられる。

3. 死後脳研究の今後の課題

死後脳研究には、罹患者の病型、病歴、死亡時の病勢、合併症などの多様性に加え、罹患者、健康人ともに共通する問題として喫煙、飲酒、薬剤服用歴、死亡時の年齢、死亡時の状況、死後の脳の摘出・保管状況の多様性などの問題が大きい。これに対し、各脳バンクで集積する症例数の数が現在までのところ少ないことから、今後、交絡因子に関する詳細な情報とともに、より多くの死後脳を集積を可能にする脳バンク制度の充実を急ぐ必要がある^{23,24)}。また、これまでの死後脳研究は、おもに欧米の脳バンクで集積された白人からの死後脳提供によるものが多く、アジア人、日本人との遺伝学的バックグラウンドの相違を考えると日本独自の脳バンク制度の整備が望まれる。技術的にも今後、次世代シーケンサーが普及し、より詳細かつ多様な遺伝子転写制御にかかわる現象の評価が可能になることが期待される。また脳は、さまざまな種類の神経細胞やグリア細胞の複合体であるが、これまでの研究の多くは組織ブロックから抽出されたRNAを解析しており、組織ブロックにおける細胞種の混合比率のばらつきに起因する偽陽性や特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されないなどの可能性があり、細胞種特異的現象の評価は今後の課題となる。

末梢血などにおける遺伝子発現研究

死後脳研究に比べて末梢血は採取が行いやすく、また、同一の罹患者から複数の時点で採血を行うことで病相の影響を直接観察することが可能であることから有用な研究の対象となる。血液の遺伝子発現解析が精神疾患の病態解明に有用である可能性として、①脳細胞と血液細胞のゲノム塩基配列は、プロモーターなどの遺伝子発現調節にかかわる領域も含めてほぼ同一であることから、遺伝子発現調節にもある程度相関があると考え

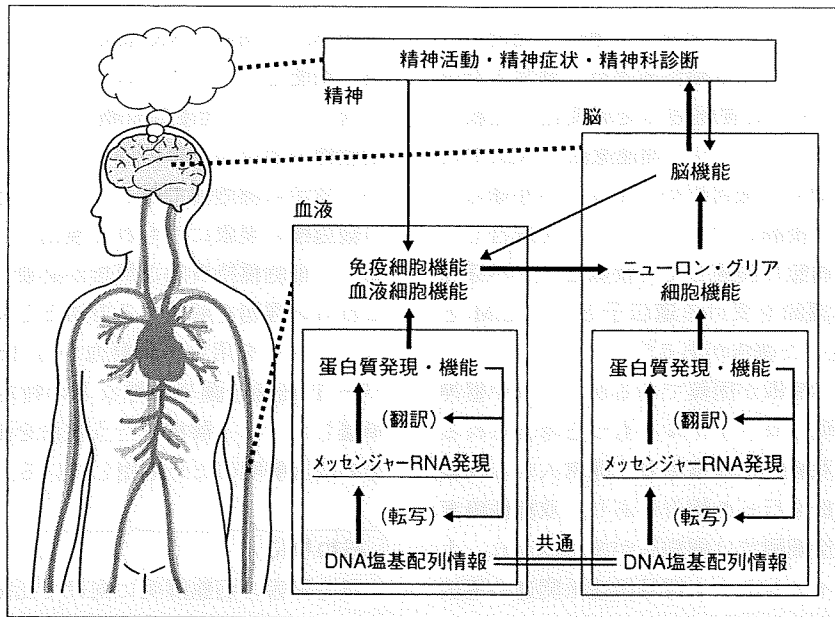


図 1 精神疾患を対象とした死後脳組織および末梢血細胞の網羅的遺伝子発現解析の意義

脳機能や精神活動と各種免疫細胞の機能は密接に相関し、また、脳内細胞と末梢血細胞は発現調節領域を含めてほぼ同一塩基配列のゲノム DNA を有する。精神疾患の成因解明には、死後脳組織を解析することにより生前脳内で精神疾患の病態特異的に起こった分子遺伝学的現象を特定するアプローチと、末梢血細胞を解析することで疾患罹患感受性にかかわる素因や病相・病状に関連して起こる分子遺伝学的現象を特定するアプローチが、ともに有効と考えられる。

えられる。②脳と末梢組織はある程度同様にストレス、ホルモン、神経調節因子などの曝露を受けると考えられる。③モノアミン、サイトカイン等、共通の分子が脳内と末梢細胞で重要な働きをもち、末梢の現象が脳の現象と相関することが報告されている。④神経精神免疫相関、すなわち精神活動から免疫細胞への影響、免疫細胞から脳活動への影響がある、などのことが考えられる(図 1)。血液などを対象とする気分障害の網羅的遺伝子発現研究のこれまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害における末梢血由来細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った研究として統合失調症、双極性障害と健常人の全血をアレイ解析し、APOEC3B, ADSS, ATM, CLC, CTBP1, DATF1, CXCL1, S100A9 の 8 つの遺伝子発現パターンにより統合失調症と双極性障害とを識別できる可能性を示唆する報告や²⁵⁾、躁・うつ病相が短期間のうちに交代する急

速交代型双極性障害罹患者の躁病相時とうつ病相時に複数回採血して単核球層をアレイ解析し、うつ病相時にプロスタグランジン関連遺伝子 PTGDS と AKR1C3 の発現の上昇を認めた報告がある²⁶⁾。また、双極性障害罹患者と健常人由来のリンパ球を 5 日間低糖条件下での培養前後でアレイ解析を行い、低糖培養後のリンパ球中のミトコンドリア電子伝達系遺伝子発現は健常人では上昇するのに対し、罹患患者では低下するという報告もある²⁷⁾。

双極性障害罹患に関して不一致(1 人が双極性障害に罹患し、もう 1 人が健常)である一卵性双生児同胞から樹立した B リンパ芽球培養細胞のアレイ解析を行い XBP1 などの発現変化を報告した研究は注目を集め²⁸⁾、その後、XBP1 の機能解析や双極性障害との相関研究など、さまざまな方向からの研究が行われている²⁹⁻³²⁾。一方、別のグループが同様に双極性障害罹患に関して不一致の一卵性双生児の B リンパ芽球のアレイ解析を行った研究では XBP1 の発現変化は追認できず、WNT シ

グナルやアポトーシスに関連する遺伝子発現が上昇していた³³⁾。また、双極性障害群と健常人群由来の B リンパ芽球培養細胞の発現変化を比較した研究としてミトコンドリア関連遺伝子 NDUFV2 の発現変化を認めた報告³⁴⁾や、B リンパ芽球のアレイデータと死後脳のアレイデータとを統合し、双極性障害の病態に関連して死後脳とリンパ芽球で共通に発現調節を受ける遺伝子として LIM と HSPF1 を特定した報告がある⁹⁾。

末梢血に比べ採取が困難であるが、より中枢神経系に近い発現プロファイルをもつと考えられる嗅上皮細胞を双極性障害罹患者と健常人から採取してアレイ解析を行った報告があり、双極性障害罹患者の嗅上皮細胞では細胞死が多くみられ、ホスファチジルイノシトール信号伝達系関連の遺伝子発現の発現変化が認められている³⁵⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害の末梢血を対象とする網羅的遺伝子発現解析研究はこれまでのところ少なく、抑うつ状態の罹患者のリンパ球にセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤である抗うつ剤ベンラファキシンを投与したものと非投与の細胞をアレイ解析し、イオンホメオスタシス、細胞生存、神経可塑性、信号伝達などに関する遺伝子発現を観察した報告³⁶⁾、大うつ病性障害罹患者と健常人の血液を多数のストレス関連遺伝子に特異的なプローブを載せたカスタムアレイで解析し、十数種の遺伝子の発現変化を観察したとする報告³⁷⁾などがある程度である。

3. 末梢血研究の今後の課題

気分障害の成因解明のための末梢血を対象とする網羅的発現解析研究は端緒についたところで、現在のところ再現性の高い知見が得られるに至っていない。これまで末梢血を対象として行われている研究は、新鮮血からの全血、単核球層、またはリンパ球を対象とするものか、B リンパ芽球培養細胞を対象とするものである。B リンパ芽球培養細胞は EB ウイルスがホストのゲノム DNA に挿入されることでリンパ球を株化細胞に形質転換させるが、この工程がランダムに発現調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。新鮮血の場合、全血、単核球層はいうに及ばず、リンパ球にしても

B 細胞、T 細胞、NK 細胞、さらにさまざまな性格・機能をもつそれぞれのサブクラスの免疫細胞を含んでおり、死後脳組織ブロックの解析と同様、細胞種の混合の比率のばらつきに起因する偽陽性や、特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されない可能性があり、細胞種特異的な解析が必要と考えられる。これらの課題を解決する方法として著者らは、セルソーターを用いて新鮮血から Th1 や Th2 ヘルパー T 細胞分画や単球などの特定の免疫細胞を単離してアレイ解析を行う技法を確立し、精神疾患の成因解明のため応用している。

おわりに

気分障害の病態解明に向けて死後脳、末梢血を対象にした網羅的遺伝子発現解析研究が複数の研究グループで行われ一定の成果は上がっているが、今後の課題は多い。死後脳研究に関しては、今後より多くの検体を用いて、より有効に交絡因子を考慮に入れた解析を行うことを可能にするような研究体制の拡充が望まれる。欧米の既存の脳バンクは症例数の集積に向けて活発に活動しており、さらにあらたな脳バンクが欧米やアジア諸国で新設されてきている。日本でも死後脳バンク体制構築の必要性についての認識が広まり、日本生物学的精神医学会にブレインバンク設立委員会が設けられるなど、複数の施設で連携して倫理的にも技術的にも信頼に足る死後脳バンクの制度を構築する準備が進んできており、今後のわが国における死後脳研究の発展が期待される。末梢血を対象とする精神疾患の分子遺伝学的研究もまだ端緒についたところで、今後より多くの症例を対象に細胞種や表現型を絞り込んだ研究がなされることで、有益な知見が集積されることが期待される。

文献

- 1) Tkachev, D. et al. : *Lancet*, **362** : 798-805, 2003.
- 2) Sokolov, B. P. : *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **10** : 547-555, 2007.
- 3) MacDonald, M. L. et al. : *Bipolar Disord.*, **8** : 255-264, 2006.
- 4) Iwamoto, K. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **14** : 241-253, 2005.
- 5) Quiroz, J. A. et al. : *Neuropsychopharmacology*, **33** :

- 2551-2565, 2008.
- 6) Sun, X. et al. : *J. Psychiatry Neurosci.*, **31** : 189-196, 2006.
 - 7) Kato, T. et al. : *Can. J. Psychiatry*, **52** : 763-771, 2007.
 - 8) Vawter, M. P. et al. : *Mol. Psychiatry*, **11** : 615, 663-679, 2006.
 - 9) Iwamoto, K. et al. : *Mol. Psychiatry*, **9** : 406-416, 2004.
 - 10) Ryan, M. M. et al. : *Mol. Psychiatry*, **11** : 965-978, 2006.
 - 11) Bezchlibnyk, Y. B. et al. : *Brain Res.*, **1147** : 213-217, 2007.
 - 12) Elashoff, M. et al. : *J. Mol. Neurosci.*, **31** : 221-243, 2007.
 - 13) Kim, S. et al. : *BMC Genomics*, **8** : 413, 2007.
 - 14) Kim, S. and Webster, M. J. : Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*, 2008, Sep 2. [Epub ahead of print]
 - 15) Choudary, P. V. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 15653-15658, 2005.
 - 16) Sequeira, A. et al. : *Mol. Psychiatry*, **12** : 640-655, 2007.
 - 17) Evans, S. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 15506-15511, 2004.
 - 18) Aston, C. et al. : *Mol. Psychiatry*, **10** : 309-322, 2005.
 - 19) Klempan, T. A. et al. : Profiling brain expression of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 2009, Jan 16. [Epub ahead of print]
 - 20) Sequeira, A. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, **63** : 35-48, 2006.
 - 21) Tochigi, M. et al. : *Neurosci. Res.*, **60** : 184-191, 2008.
 - 22) Kang, H. J. et al. : *J. Neurosci.*, **27** : 13329-13340, 2007.
 - 23) Tomita, H. et al. : *Biol. Psychiatry*, **55** : 346-352, 2004.
 - 24) 富田博秋 : 分子精神医学, **6** : 243-250, 2006.
 - 25) Tsuang, M. T. et al. : *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **133B** : 1-5, 2005.
 - 26) Begemann, M. et al. : *Mol. Med.*, **14** : 546-552, 2008.
 - 27) Naydenov, A. V. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, **64** : 555-564, 2007.
 - 28) Kakiuchi, C. et al. : *Nat. Genet.*, **35** : 171-175, 2003.
 - 29) Kakiuchi, C. et al. : *J. Neurochem.*, **97** : 545-555, 2006.
 - 30) Hayashi, A. et al. : *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **12** : 33-43, 2009.
 - 31) Cichon, S. et al. : *Nat. Genet.*, **36** : 783-784, author reply 784-785, 2004.
 - 32) Chen, W. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319** : 866-870, 2004.
 - 33) Matigian, N. et al. : *Mol. Psychiatry*, **12** : 815-825, 2007.
 - 34) Washizuka, S. et al. : *Bipolar Disord.*, **7** : 146-152, 2005.
 - 35) McCurdy, R. D. et al. : *Schizophr. Res.*, **82** : 163-173, 2006.
 - 36) Kalman, J. et al. : *Neurochem. Res.*, **30** : 1429-1438, 2005.
 - 37) Ohmori, T. et al. : *J. Med. Invest.*, **52**(Suppl.) : 266-271, 2005.

* * *

III. 肥満症の疫学・病態・診断学の進歩

症候性肥満—病因, 病態, 管理法—
遺伝性肥満

Bardet-Biedl 症候群

Molecular mechanisms of obesity and Bardet-Biedl syndrome

富田博秋

Key words : Bardet-Biedl 症候群, 肥満, 一次絨毛, BBSome, レプチン

はじめに

Bardet-Biedl 症候群 (Bardet-Biedl syndrome: BBS) は肥満・耐糖能障害のほかにも高血圧, 網膜変性, 認知・学習の障害などの年齢とともに進行する病態と, 多指, 腎奇形, 心奇形, 性腺機能低下などの先天奇形を特徴とする常染色体劣性または二遺伝子性の遺伝性疾患で, これまでに 14 の責任遺伝子が特定されている。有病率は欧米で 15 万人に 1 人前後 (中近東ではより高頻度) と推定され, 比較的まれな疾患である。一般に希少な遺伝性疾患の病因・病態の解明が肥満・糖尿病・高血圧など, 多くの人に関係のある健康要因の成因を解明する有用な足がかりになることがあるが, BBS の分子遺伝学的成因の解明の試みも一般的肥満の成因解明とも関連しながら着実に成果を上げてきている好例の一つといえる。

本稿では BBS にみられる肥満の特徴, 本症候群の責任遺伝子の本症候群および一般的肥満の病因・病態にかかわる分子遺伝学的メカニズムに関してのこれまでに集積されている知見について概説する。

1. Bardet-Biedl 症候群の分子遺伝学的病態

a. Bardet-Biedl 症候群の責任遺伝子の同定と絨毛疾患としての認識の確立

BBS は常染色体劣性遺伝または二遺伝子性の遺伝形式で家族性にみられる先天奇形 (多指, 腎奇形, 心奇形, 性腺機能不全) と, 生後進行する肥満, 網膜変性, 精神発達遅滞を特徴とするが, 奇形, 症状の表出の程度は症例ごとに大きく異なる。連鎖解析などにより少なくとも 14 の責任遺伝子がポジショナルクローニングやその相同遺伝子の解析から同定され¹⁾, *BBS1* 遺伝子から *BBS14* 遺伝子まで命名がなされている。これらの遺伝子は微小管 (microtubule) が形成され細胞内の各領域に向けて伸長する元になっている中心体 (centrosome) や絨毛 (cilium) の土台となる基底小体 (basal body) の構成タンパク質をコードしており, 絨毛の機能や細胞内や絨毛の微小管に沿ったタンパク質や小胞の輸送に重要な役割を有し, BBS は遺伝性絨毛疾患として認識されるに至った。近年, *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS8* と *BBS9* の 7 つの遺伝子から翻訳される BBS タンパク質は安定した複合体を形成することがわかり, BBSome

Hiroaki Tomita: Department of Biological Psychiatry, Graduate School of Medicine, Tohoku University 東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野

0047-1852/10/¥40/頁/JCOPY

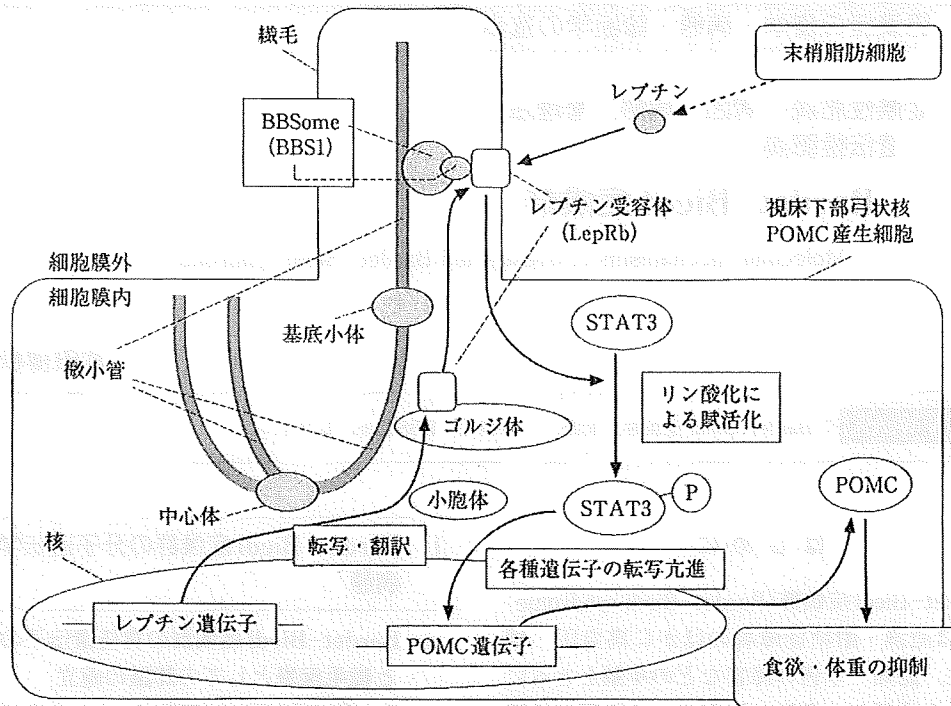


図1 視床下部弓状核 POMC 産生細胞における BBSome 複合体とレプチン信号伝達

視床下部弓状核 POMC (proopiomelanocortin) 産生細胞において Bardet-Biedl 症候群 (BBS) 責任遺伝子から翻訳される BBS タンパク質の複合体である BBSome はその構成タンパクの一つである BBS1 がレプチン受容体 LepRb と結合してゴルジ体から細胞表面、繊毛まで輸送を行う。末梢脂肪細胞から分泌されるレプチンは受容体を刺激することで STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) をリン酸化して賦活化し、POMC の転写、産生を活性化することで食欲を抑制する。BBS 遺伝子の変異はレプチン受容体などのタンパク質の細胞表面への輸送の障害とそれに伴うレプチン信号伝達などの障害を引き起こすことで肥満など BBS の症状を発現させる。

III

肥満症の疫学・病態・診断学の進歩

と命名された。BBSome は繊毛へのタンパク質や小胞の輸送を調整すると推定される (図 1)²⁾。

b. 一次繊毛と食欲・体重の調節

繊毛とは細胞体から突き出した尾のような構造物で、一方方向に高速の波動運動を行う運動性繊毛 (motile cilium) とアンテナ様の感覚小器官として働く非運動性繊毛 (non-motile cilium)、別名一次繊毛 (primary cilium) とに分けられる。運動性繊毛は外周を囲む 9 本の微小管と中央を通る 2 本の微小管からなりモータータンパク質であるダイニン (dynein) を有するのに対し、一次繊毛は外周 9 本の微小管を有するが中央 2 本の微小管とダイニンを欠いている³⁾。脊椎動物では神経細胞を含むほとんどの細胞が一次繊毛

を有することが知られているがその機能には不明の点が多い^{4,5)}。一次繊毛の基底部から先端部間の双方向的なタンパク質輸送をつかさどる *Ift88* (intraflagellar transport 88, 別名 *Tg737*) 遺伝子や、*Kif3a* (kinesin family member 3A) 遺伝子を欠失させた遺伝子改変マウスは、胎生期のうちに嚢胞腎病変を伴い死亡するが、成獣に達した後でこの 2 つの遺伝子を欠失させると全身の細胞から一次繊毛が消失した状態で生存するため、一次繊毛を欠くことが生体に及ぼす影響を評価できる。一次繊毛を欠いたマウスでは嚢胞腎のほかに摂食量の亢進、肥満が認められることから、一次繊毛は全身の細胞の中でも腎臓の尿細管の水流のセンサーとして働いているほ

か、食欲・体重の調節に重要な働きを有することが示唆された。更に食欲・体重の調節を行う視床下部弓状核(arcuate nucleus)のプロオピオメラノコルチン(proopiomelanocortin: POMC)産生神経細胞において、同様の方法で特異的に一次繊毛を消失させたマウスにおいても同様に、摂食亢進、肥満を呈し、POMC産生細胞における一次繊毛が食欲・体重調節に重要な役割を有することが示された⁶⁾。BBSのほかにもAlström症候群などの肥満を呈する疾患の責任遺伝子も繊毛に発現することも繊毛は摂食・体重の調節に関連することを示唆している⁷⁾。

c. Bardet-Biedl 症候群責任遺伝子と食欲・体重の制御機構

前項で取り上げたとおりのポジショナルクローニングの成果によりBBSは遺伝性繊毛疾患として認識されるに至り、一次繊毛の障害が肥満を引き起こすことがわかったが、更に近年、BBSタンパク質が視床下部のレプチン(leptin)受容体信号伝達を介して食欲・体重の調節に重要な役割をもつことがわかってきた^{8,9)}。2008年、BBS2遺伝子、BBS4遺伝子、BBS6遺伝子を完全に欠失する遺伝子改変マウスは肥満となり、肥満は摂食量の亢進、活動量の減少、血中レプチン濃度の上昇に伴うことが報告された。レプチンは末梢の脂肪細胞(adipocyte)から分泌されるホルモンで、体内を循環して視床下部の弓状核に発現するレプチン受容体に作用することで、脳に末梢の脂肪貯蔵の状態を知らせる働きをもつ³⁾。レプチンは弓状核のPOMC産生神経細胞のレプチン受容体を賦活化し、細胞内信号伝達下流の転写因子STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)をリン酸化して活性化するなどの機序でPOMC産生を促進するなど、POMC産生細胞の活動を促進することで食欲を抑制に導く。レプチンは神経ペプチドY(neuropeptide Y: NPY)産生神経細胞にも作用するが、NPY産生細胞においてはNPY産生や細胞活動を抑制する方向に働く^{4,10,11)}。POMC産生細胞におけるレプチン受容体を選択的に欠失させたマウスは、摂食が亢進し肥満することが報告されている¹²⁾。また、BBSタンパク質を産生

しない遺伝子改変マウスでは、視床下部のNPY発現には変化がないのに対してPOMC産生が顕著に減少していることから、BBSタンパク質はPOMC産生細胞におけるレプチン信号伝達の方に重要な働きをもっていることが示唆された⁹⁾(図1)。

一般にレプチンは体脂肪量の増加に比例して分泌されて血中濃度が上昇し、摂食量や体重を減少させる負のフィードバック効果をもたらす。肥満の結果として血中レプチン値が持続的に高値となることによりレプチンに反応して食欲の抑制や体重減少が起こらなくなる現象が知られており、レプチン抵抗性(leptin resistance)と呼ばれる。先述のBBSタンパク質を完全に欠失した遺伝子改変マウスにも血中レプチン高値とレプチン抵抗性が認められたが、これらが単に肥満による2次的な現象であるのかどうかを検討するために、BBS遺伝子欠失マウスにカロリー制限を行うことで体重を正常レベルに抑える研究が行われた。カロリー制限により正常体重を示すBBS遺伝子欠失マウスは正常の血中レプチン濃度を示すことから、BBS遺伝子欠失マウスの高レプチン血症は肥満に対して2次的に起こったものと考えられた。一方、興味深い発見として、カロリー制限を行い正常の体重を示すBBS遺伝子欠失マウスにレプチン投与を行っても、BBSタンパク質を発現する野生型マウスに対するレプチン投与でみられる摂食量や体重の減少が起こらず、このことはBBS遺伝子欠失マウスのレプチン耐性は肥満に対する2次的なものではなく、レプチン耐性こそがBBS遺伝子欠失マウスの肥満の原因であることが示された。更に、カロリー制限したBBS遺伝子欠失マウスでは、通常レプチン投与により視床下部のレプチン受容体活性化により細胞内で賦活されるSTAT3の活性も減少していることから、BBS遺伝子欠失マウスのレプチン耐性はレプチン受容体による細胞内へのシグナル伝達が障害されていることに起因することが示された⁹⁾。

更にタンパク質や小胞の輸送にかかわることが想定されるBBSome複合体を構成するBBSタンパク質のうち、BBS1タンパク質のみが6種

のレプチン受容体のうち唯一細胞内へのシグナル伝達ドメインを有する LepRb (leptin receptor, isoform b) タンパク質の細胞内ドメインに結合することが示された。本症の遺伝子変異として最も高頻度に見られる *BBS1* 遺伝子の M390R 変異 (390 番目のアミノ酸残基がメチオニンからアルギニンに置換するミスセンス変異) は *BBS1* タンパク質の LepRb タンパク質への結合を大きく減弱させる。*BBS1* タンパク質は LepRb のほかにも Rabin8 (rab8-specific guanine nucleotide exchange factor) などのタンパク質にも結合することが知られ²⁾、*BBSome* 複合体により輸送されるタンパク質と結合するサブユニットの役割を果たしていると考えられる。また、*BBSome* 複合体のうち少なくとも *BBS1* もしくは *BBS2* のタンパク質発現が消失すると、細胞内で構成された LepRb タンパク質のゴルジ体から細胞膜および繊毛への輸送が障害されることも確認された⁸⁾。以上のことから、*BBS* 遺伝子の変異により、レプチン受容体が合成された後ゴルジ体から微小管に沿って細胞表面、繊毛に輸送される機構が障害され、視床下部 POMC 産生細胞においてレプチン受容体による STAT3 などの細胞内シグナル伝達が低下することで POMC 産生や細胞機能が低下することにより、本症の肥満が引き起こされていると考えられる (図 1)。

2. 一般的肥満への関与

一般的肥満 (common obesity) は多くの遺伝子と環境の相互作用によって起こるもので、一般的肥満の成因にかかわる遺伝子の探索が行われてきている。*BBS* 遺伝子は前項のとおり、繊毛機能やレプチン受容体をはじめとするタンパク質輸送への役割から一般的肥満の成因にも何らかの関係をしている可能性が想定されるが、*BBS* 遺伝子が一般的肥満に関与することを示唆する *BBS* 家系を対象とした興味深い研究が行われた。*BBS* 遺伝子変異を両アレルともにホモ接合に有することで *BBS* を発症する罹患者では発

達早期から肥満を認めることは前述のとおりである。*BBS* 遺伝子変異を片アレルにのみヘテロ接合に有する家族構成員は、*BBS* 罹患者に特徴的にみられる先天奇形や多岐にわたる臨床症状を示さずキャリアとなるが、これらの *BBS* 遺伝子変異アレルをヘテロ接合にもつキャリアの家族構成員は、*BBS* 遺伝子変異アレルを全くもたない家族構成員よりも肥満を呈することが報告されている¹⁰⁾。

BBS 遺伝子の多型が一般的肥満の成因に関与しているかどうかを検討するための相関研究が幾つか行われている^{11,15)}。2006 年の Benzinou らのフランス系白人を対象とした相関研究によれば、*BBS1* 遺伝子の多型は肥満との相関を示さなかったが、*BBS4* 遺伝子と *BBS6* 遺伝子の多型は小児肥満、成人肥満ともに有意な相関を示した。*BBS2* 遺伝子は小児肥満とは相関を示さなかったが成人肥満と有意な相関を示した¹¹⁾。一方、2005 年の Andersen らのデンマーク系白人を対象とした、*BBS6* 多型と一般的肥満との相関研究では、*BBS6* 多型が一般的肥満の主要な成因となっている根拠は見いだせなかった¹⁵⁾。*BBS* 遺伝子群の一般的肥満への関与に関しては、今後、更に対象を広げた相関研究などにより検討していく必要があると考えられる。

おわりに—Bardet-Biedl 症候群と肥満の病態解明の展望—

今後、各 *BBS* 遺伝子機能の更なる解明が進み、各 *BBS* タンパク質間の相互作用や他の繊毛の構造・機能や微小管輸送機能にかかわるタンパク質との相互作用が解明されることで、*BBS* にみられる肥満などの症状の発現機序の解明が進むものと思われる。また、*BBS* 遺伝子群の分子遺伝学的機序の解明や *BBS* 遺伝子群多型と一般的肥満との相関研究などが進むことで、体重調節における繊毛機能の役割や一般的肥満への *BBS* 遺伝子群の関与の実態や機序の解明が進むことが期待される。

III

■ 文 献

- 1) Leitch CC, et al: Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40: 443-448, 2008.
- 2) Nachury MV, et al: A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129: 1201-1213, 2007.
- 3) Eggenschwiler JT, Anderson KV: Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 345-373, 2007.
- 4) Veland IR, et al: Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111: 39-53, 2009.
- 5) Satir P: Cilia biology: stop overeating now! *Curr Biol* 17: R963-965, 2007.
- 6) Davenport JR, et al: Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 17: 1586-1594, 2007.
- 7) Hearn T, et al: Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 1581-1587, 2005.
- 8) Seo S, et al: Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 18: 1323-1331, 2009.
- 9) Rahmouni K, et al: Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J Clin Invest* 118: 1458-1467, 2008.
- 10) Morton GJ, et al: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295, 2006.
- 11) Coll AP, et al: The hormonal control of food intake. *Cell* 129: 251-262, 2007.
- 12) Balthasar N, et al: Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42: 983-991, 2004.
- 13) Croft JB, et al: Obesity in heterozygous carriers of the gene for the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55: 12-15, 1995.
- 14) Benzinou M, et al: Bardet-Biedl syndrome gene variants are associated with both childhood and adult common obesity in French Caucasians. *Diabetes* 55: 2876-2882, 2006.
- 15) Andersen KL, et al: Variation of the McKusick-Kaufman gene and studies of relationships with common forms of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 225-230, 2005.

MONOAMINE TRANSPORTER AS A TARGET MOLECULE FOR PSYCHOSTIMULANTS

Ichiro Sora,* Binglin Li,* Setsu Fumushima,* Asami Fukui,* Yosefu Arime,*
Yoshiyuki Kasahara,* Hiroaki Tomita,* and Kazutaka Ikeda[†]

*Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine,
Sendai 980-8574, Japan

[†]Molecular Psychiatry Research, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo 156-8585, Japan

- I. Introduction
- II. MAP-Induced Behavioral Sensitization
- III. MAP-Induced Hyperthermia and Neuronal Toxicity
- References

Methamphetamine (MAP), a drug of abuse known worldwide for its addictive effects and neurotoxicity, causes somatic and psychiatric disorders. MAP enters terminals/neurons via monoamine transporters, displaces both vesicular and intracellular monoamines, and facilitates the release of monoamines into the extraneuronal space through synaptic transport via the monoamine transporters. Chronic psychostimulant abusers exhibit psychotic features, including delusions and auditory hallucinations. The dopamine transporter (DAT) and the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) play pivotal roles in the action of MAP, including locomotor effects. The deletion of DAT attenuates the locomotor effects of MAP and may play larger role in behavioral responses to MAP compared to the deletion of VMAT2. MAP produces hyperthermia and/or neuronal toxicity in most species. The effects of MAP in DAT or serotonin transporter (SERT) single knockout (KO) mice and DAT/SERT double KO mice suggested that DAT and SERT are key molecules for hyperthermia and neuronal toxicity of MAP.

I. Introduction

Methamphetamine (MAP) is a psychostimulant that induces enhanced arousal and euphoria acutely, and psychosis and addiction chronically. MAP enters the terminals/neuron via the monoamine transporters (dopamine transporter: DAT, serotonin transporter: SERT, or norepinephrine transporter: NET), displaces

both vesicular and intracellular monoamines, and facilitates release of monoamines into the extraneuronal space by synaptic transport in the monoamine transporters (Seiden *et al.*, 1993). The large release of monoamine produced by psychostimulant is thought to contribute to the drug's effects in the brain.

II. MAP-Induced Behavioral Sensitization

The acute and chronic pharmacological consequences of MAP in human users have been observed in behavioral experiments in animals, including both hyperactivity and sensitization of locomotor responses (Segal and Schuckit, 1983). Behavioral sensitization is a phenomenon whereby repeated intermittent exposure to MAP-like psychostimulant elicits a progressive enhancement of those responses, which persists for extended time periods following withdrawal from the drug and are easily reinstated by exposure to the drug or psychosocial stress (Robinson and Becker, 1986). This process closely resembles the course of the relapse in MAP-induced psychosis or schizophrenia, thus sensitization in animals has been suggested to model these psychoses (Sato *et al.*, 1983). Behavioral sensitization is thought to be an early and enduring manifestation of neuronal plasticity associated with changes in mesolimbic dopamine neurotransmission (Kalivas *et al.*, 1993). MAP induces dopamine release through exchange diffusion of plasma membrane DAT (Seiden *et al.*, 1993), and release of vesicular dopamine into the cytosol by acting on the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) (Sulzer *et al.*, 2005). The dopamine releasing effect of MAP has been postulated to mediate its locomotor stimulant and rewarding effects (White and Kalivas, 1998). Therefore, DAT and VMAT2 should play pivotal roles in the mechanisms underlying the actions of MAP.

DAT knockout (KO) mice and VMAT2 KO mice have been used to investigate the roles of DAT and VMAT2 in dopamine neurotransmission and pharmacological mechanisms underlying the actions of psychostimulants. Homozygous deletion of the DAT gene has been reported to produce a 10-fold increase (Shen *et al.*, 2004) or fivefold elevation (Jones *et al.*, 1998) of extracellular dopamine concentrations in the striatum measured by *in vivo* microdialysis, while heterozygous deletion of DAT was not found to significantly increase extracellular dopamine (Shen *et al.*, 2004) or to produce a smaller twofold elevation (Jones *et al.*, 1998) of dopamine in the striatum. Homozygous DAT KO mice show growth retardation and hyperactivity, whereas heterozygous DAT KO mice did not show gross abnormalities in either development or baseline behavioral parameters (Sora *et al.*, 1998). Habituated homozygous DAT KO mice do not show any significant cocaine-induced increase in locomotion (Sora *et al.*, 1998, 2001; Uhl *et al.*, 2002).

We examined locomotor activity and sensitization in heterozygous DAT KO ($\text{DAT}^{+/-}$), heterozygous VMAT2 KO ($\text{VMAT2}^{+/-}$), double heterozygous DAT/VMAT2 KO ($\text{DAT}^{+/-}$ $\text{VMAT2}^{+/-}$), and wild-type (WT) mice to evaluate the roles of DAT and VMAT2 in MAP-induced locomotor behavior (Fukushima *et al.*, 2007). In $\text{DAT}^{+/-}$ $\text{VMAT2}^{+/-}$ mice, all of MAP-induced behavioral responses were similar to those in $\text{DAT}^{+/-}$, but not $\text{VMAT2}^{+/-}$ mice. The behavioral effects of both acute and chronic MAP administration were suppressed in heterozygous DAT KO mice, whether or not it was combined with heterozygous VMAT2 KO. Contrary to the effect observed in heterozygous DAT KO mice, acute MAP administration produced greater locomotor responses in heterozygous VMAT2 KO mice. These findings indicate that the half deletion of DAT plays a major role in both acute and chronic behavioral responses to MAP, while the effect of the half deletion of VMAT2 is less prominent.

III. MAP-Induced Hyperthermia and Neuronal Toxicity

MAP abuse causes serious health hazards including irreversible neuronal degeneration, seizures, hyperthermia, and death in human and experimental animals (Davidson *et al.*, 2001). Among these side effects, MAP produces hyperthermia and/or dopaminergic neurotoxicity in most species. Clinical reports and animal studies indicate that lethality by MAP closely correlates with hyperthermia, which may be the primary cause of death. Animal studies suggest that dopamine receptor activation is crucial for MAP-induced hyperthermia (Broening *et al.*, 2005) and lethality (Bronstein and Hong, 1995). There has also been an assumption that the hyperthermia that follows MAP administration is serotonin receptor-mediated (Green *et al.*, 2003).

We examined hyperthermic and lethal toxic effects of MAP in DAT, SERT, and DAT/SERT double KO mice to elucidate the role of these two transporters in MAP-induced hyperthermia and lethality (Numachi *et al.*, 2007). MAP caused significant hyperthermia even in the mice with a single DAT gene copy and no SERT copies ($\text{DAT}^{+/-}$ $\text{SERT}^{-/-}$ mice). Mice with no DAT copies and a single SERT gene copy ($\text{DAT}^{-/-}$ $\text{SERT}^{+/-}$ mice) showed significant but reduced hyperthermia when compared to WT mice after MAP. These results demonstrate that MAP exerts a hyperthermic effect via DAT, or via SERT, in the absence of DAT. DAT gene deletion in mice strikingly increased LD_{50} of MAP by 1.7–1.8 times that of WT mice, suggesting that the lethal toxic effect of MAP is mainly dependent on DAT. Although DAT and SERT were shown here to be involved in both the effects of MAP on temperature as well as MAP lethal toxicity, the mechanisms are nonetheless different; DAT single KO mice exhibited hyperthermia but greatly reduced MAP lethality, and the lethality was no different from

DAT/SERT double KO mice that had hypothermic responses to MAP. Thus, although the lethal toxic effect of MAP is mainly dependent on DAT, with some contribution from SERT, hyperthermia is not prerequisite for MAP-induced lethality.

In conclusion, these findings lead us to hypothesize that DAT variants may have more profound effects than VMAT2 or SERT variants on the clinically important consequences of acute and chronic MAP abuse in humans.

Acknowledgments

This study was supported in part by Grant-in-Aid for Health and Labor Science Research (Research on Pharmaceutical and Medical Safety) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; by Grants-in-Aid for Scientific Research (B), Scientific Research on Priority Areas—System study on higher order brain functions and Research on Pathomechanisms of Brain Disorders, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- Broening, H. W., Morford, L. L., and Vorhees, C. V. (2005). Interactions of dopamine D1 and D2 receptor antagonists with D-methamphetamine-induced hyperthermia and striatal dopamine and serotonin reductions. *Synapse*, **56**, 84–93.
- Bronstein, D. M., and Hong, J. S. (1995). Effects of sulpiride and SCH 23390 on methamphetamine-induced changes in body temperature and lethality. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**, 943–950.
- Davidson, C., Gow, A. J., Lee, T. H., and Ellinwood, E. H. (2001). Methamphetamine neurotoxicity: Necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **36**, 1–22.
- Fukushima, S., Shen, H., Hata, H., Ohara, A., Ohmi, K., Ikeda, K., Numachi, Y., Kobayashi, H., Hall, F. S., Uhl, G. R., and Sora, I. (2007). Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **193**, 55–62.
- Green, A. R., Mechan, A. O., Elliott, J. M., O'Shea, E., and Colado, M. I. (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol. Rev.* **55**, 463–508.
- Jones, S. R., Gainetdinov, R. R., Jaber, M., Giros, B., Wightman, R. M., and Caron, M. G. (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4029–4034.
- Kalivas, P. W., Sorg, B. A., and Hooks, M. S. (1993). The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav. Pharmacol.* **4**, 315–334.
- Numachi, Y., Ohara, A., Yamashita, M., Fukushima, S., Kobayashi, H., Hata, H., Watanabe, H., Hall, F. S., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Uhl, G. R., and Sora, I. (2007). Methamphetamine-

- induced hyperthermia and lethal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **572**, 120–128.
- Robinson, T. E., and Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* **396**, 157–198.
- Sato, M., Chen, C. C., Akiyama, K., and Otsuki, S. (1983). Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol. Psychiatry* **18**, 429–440.
- Segal, D. S., and Schuckit, M. A. (1983). Animal models of stimulant-induced psychosis. In "Stimulants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives" (I. Grees, ed.), pp. 131–167. Raven, New York.
- Seiden, L. S., Sabol, K. E., and Ricaurte, G. A. (1993). Amphetamine: Effects on catecholamine systems and behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 639–677.
- Shen, H. W., Hagino, Y., Kobayashi, H., Shimohara-Tanaka, K., Ikeda, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Hall, F. S., Uhl, G. R., and Sora, I. (2004). Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by *in vivo* microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1790–1799.
- Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X. F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., and Uhl, G. R. (1998). Cocaine reward models: Conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7699–7704.
- Sora, I., Hall, F. S., Andrews, A. M., Itokawa, M., Li, X. F., Wei, H. B., Wichems, C., Lesch, K. P., Murphy, D. L., and Uhl, G. R. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5300–5305.
- Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W., and Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog. Neurobiol.* **75**, 406–433.
- Uhl, G. R., Hall, F. S., and Sora, I. (2002). Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol. Psychiatry* **7**, 21–26.
- White, F. J., and Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend.* **51**, 141–153.