

synaptic transmission. *Neurosci Lett.* 451: 270-273, 2009

2) Hashimoto, K., Amano, T., Kasakura, A., Uhl GR, Sora, I., Sakai, N., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Narita, M.: μ -Opioid receptor-independent fashion of the suppression of sodium currents by μ -opioid analgesics in thalamic neurons. *Neurosci Lett.* 453: 62-67, 2009

3) Fujii, H., Watanabe, A., Nemoto, T., Narita, M., Miyoshi, K., Nakamura, A., Suzuki, T., Nagase, H.: Synthesis of novel twin drug consisting of 8-oxaendoethanotetrahydromorphides with a 1,4-dioxane spacer and its pharmacological activities: μ , κ , and putative epsilon opioid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 19: 438-441, 2009

4) Furuta, S., Shimizu, T., Narita, M., Matsumoto, K., Kuzumaki, N., Horie, S., Suzuki, T., Narita, M.: Subdiaphragmatic vagotomy promotes nociceptive sensitivity of deep tissue in rats. *Neuroscience.* 164: 1252-1262, 2009

5) Taketa, Y., Niikura, K., Kobayashi, Y., Furuya, M., Shimizu, T., Narita, M., Imai, S., Kuzumaki, N., Maitani, Y., Yamazaki, M., Inada, E., Iseki, M., Suzuki, T., Narita, M.: Direct evidence for the ongoing brain activation by enhanced dynorphinergic system in the spinal cord under inflammatory noxious stimuli. *Anesthesiology.* 112: 418-431, 2009

6) Minami, K., Hasegawa, M., Ito, H., Nakamura, A., Tomii, T., Matsumoto, M., Orita, S., Matsushima, S., Miyoshi, T., Masuno, K., Torii, M., Koike, K., Shimada, S., Kanemasa, T., Kihara, T., Narita, M., Suzuki, T., Kato, A.: Morphine, oxycodone, and

fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J Pharmacol Sci.* 111: 60-72, 2009

7) Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Sasaki, T., Niikura, K., Narita, M., Miyashita, K., Imai, S., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T., Suzuki, T., Narita, M.: Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. *Synapse.* in press, 2009

8) Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Hareyama, N., Imai, S., Narita, M., Torigoe, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T., Suzuki, T., Narita, M.: Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene is involved in enriched environment-induced neurogenesis. *Hippocampus.* in press, 2009

9) Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., Suzuki, A., Miyashita, K., Takeshima, K., Ando, T., Ushijima, T., Suzuki, T., Narita, M.: Enhanced IL-1 β production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Addict Biol.* in press, 2009

10) Kumakura, K., Nomura, H., Toyoda, T., Hashikawa, K., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H., Tsunoda, M., Funatsu, T., Ikegami, D., Narita, M., Suzuki, T.: Hyperactivity in novel environment with increased dopamine and impaired novelty preference in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-deficient mice. *Neurosci Res.* 66: 313-320, 2010

11) Ikegami, D., Narita, M., Imai, S., Miyashita, K., Tamura, R., Narita, M., Takagi, S., Yokomizo, A., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Kuzumaki, N., Ushijima, T., Suzuki, T.: Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. *Addiction Biology*, in press, 2010

12) 今井哲司、成田 年、鈴木 勉: 側坐核. 分子精神医学. 10: 54-58, 2010

13) 成田 年、朝戸めぐみ、新藤恵子、葛巻直子、鈴木 勉: メチルフェニデートとメタンフェタミンの細胞毒性の分子機構 -その相違とメチルフェニデートの安全性-. *日本神経精神薬理学雑誌*. 29: 115-120, 2009

14) 成田 年、池上大悟、新倉慶一、今井哲司、葛巻直子、鈴木 勉: エピジェネティクスの視点からみた薬物依存の新たな分子メカニズム. *Medical Bio*. 7: 18-23, 2009

15) 成田 年、葛巻直子、新倉慶一、井関雅子、稲田英一、鈴木 勉: オピオイドトランスレーションリサーチの最前線: μ 受容体の多様性と疼痛下でのオピオイド依存不形成機構. *Anesthesia 21 Century*. 11: 66-75, 2009

2. 学会発表

1. The College on Problems of Drug Dependence 71th Annual Scientific meeting, Reno/Sparks, USA.: Distinct mechanism of methamphetamine- and methylphenidate-induced dopamine related-neurotoxicity. : Tsutomu Suzuki, Daigo Ikegami, Megumi Asato, Michiko Narita, Mai Saeki, Naoko Kuzumaki and Minoru Narita

2. 薬物依存の研究 (第 435 報): オピオイドによる報酬効果の発現に対する腹側被蓋野-前帯状

回 dopamine 神経の関与 : 松島勇紀, 成田 年, 新倉慶一, 成田道子, 朝戸めぐみ, 高木茂実, 葛巻直子, 鈴木 勉

3. 薬物依存の研究 (第 436 報): Methamphetamine ならびに methylphenidate 誘発神経毒性発現機序の相違 : 池上大悟, 成田年, 朝戸めぐみ, 鶴川百合, 新倉慶一, 成田道子, 浅沼幹人, 喜多大三, 葛巻直子, 鈴木 勉

4. 薬物依存の研究 (第 437 報): μ オピオイド受容体作動薬による報酬効果発現および維持における腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経系の関与 : 中原加恵, 成田 年, 松島勇紀, 成田道子, 高木茂実, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
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索

分担研究者：新田淳美^{1,2}

研究協力者：日比陽子²、山田清文²、鍋島俊隆³

（¹富山大学大学院医学薬学研究部・薬物治療学研究室、²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、³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）

【研究要旨】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、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、薬物依存形成のメカニズム解明を行ってきた。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。昨年度までの本研究課題において、shati および piccolo という2つの分子が薬物依存に深く関わっていることを明らかにした。本年度は、両分子を過剰発現しているマウスならびに shati 遺伝子欠損マウスの作成を行い解析を行った。CMV プロモーターを使用した shati および piccolo の発現過剰マウスでは、胎児期のみ発現が増加するが、生後 6-10 週令で行動試験を行うとワイルド型と比較して差異が観察された。また Shati 遺伝子欠損マウスを用いて行動実験を行っても情動性についてワイルド型との差異が観察された。

今年度の結果から、我々が見出した shati および piccolo は、精神活動に影響を与えていることが明らかになった。今後、これらの遺伝子組み換えマウスを用いて、新規分子の生理的役割および薬物依存への形成との関係について検討する予定である。

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⁽¹⁻⁵⁾。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^(1,6-8)。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、昨年度までに *shati* と *piccolo* の2つの遺伝子を見出した。両遺伝子とも覚せい剤による薬物依存を軽減する可能性を示唆する報告をしている^(9,10,11)。両遺伝子とも覚せい剤を培養細胞の投与した場合に見出されるドパミントランスポーターの内在化による不活化を阻止することから、新たな遺伝子として非常に興味深い。本年度は、両遺伝子の遺伝子過剰発現マウスと *shati* の遺伝子欠損マウスの作成に着手し、その中から得られた情動性や薬物依存への効果について報告する。

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) および遺伝子組み換えマウスの作成には同一バックグラウンドの系統を使用した。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 *the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan, 2006* 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9時から午後9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. 組み換え動物の作成

Piccolo 遺伝子の一部である C2A ドメインまたは *Shati* 遺伝子の翻訳部分を pDEST26 ベ

クターに組み込んだ。本ベクターはサイトメガウイルス (CMV) プロモーターを含んでおり、その下流に、*Piccolo* C2A ドメインまたは *shati* を組み込んだ。C2A ドメイン遺伝子の前には *myc* を、*shati* 遺伝子の前には GFP をそれぞれ組み込み、共発現するようにした。図1に示すベクターを線形にし、受精卵に注入した。今回用いた CMV プロモーターは、図2に示すように、発達または増殖過程にある細胞のみで過剰発現することがわかっている。そのため、本マウスでも、胎生期および生後1週間程度の間のみ該当蛋白質の増加が起きていると考えられる。このベクターが遺伝子にランダムに組み込まれることで、染色体上のどのような位置に配置されるか不明であり、元来存在していた機能遺伝子の転写が阻害される可能性があるという不確定な部分がある。

Shati 遺伝子欠損マウスは図1に示すように相同組み換えにより作成した。

3. Social interaction 試験

実験を行う前2日間、観察箱にマウスを入れ10分間慣れさせた。観察の際には、マウスを普段同じケージで飼育していない未知のマウスと共に実験箱に入れ、10分間にお互いが接触する時間を計測した。

4. 強制水泳試験法

25°Cの水を15cmの水深で水を張った円筒形の水槽にマウスを投入し6分間の強制水泳を行い、後半5分間における無動時間を赤外線装置により測定した。無動時間が長いほどうつ様症状を示していると考えられる。

5. 小脳プルキニエ細胞の細胞数の計数

エーテル麻酔下のマウスの心臓から4%パラホルムアルデヒドを含む生理食塩水を注入し、100ml程度灌流固定を行った。その後30%シュクロースで置換を行い、ドライアイスで

急速凍結を行った。クリオスタットで $20\mu\text{m}$ の切片を作成した。Calbindin と Parvalbumin で染色を行い、細胞数を計数した。

5. shati, TNF- α および GDNF mRNA 発現量の比較

shati 遺伝子欠損マウスの脳内での shati、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) の各タンパクの mRNA 量の測定は既報に従い RT-PCR 法で行った^{1,9,11)}。

6. 統計処理

実験結果は平均 \pm 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. 遺伝子過剰発現マウスの選別

受精卵にそれぞれの遺伝子を含むベクターを注入した後、メスマウスの子宮に入れ、着床および妊娠させた。その結果、得られた子供を F1 として、便宜上、由来受精卵ごとに系統に番号をつけ、いずれの系統が過剰にそれぞれの蛋白質を発現しているかを比較し、実験に用いるマウスの系統を決定した。そのために、同じ番号の系統の F1 のオスとメスを交配させ、生まれてきたマウスの尾から DNA を抽出し、その中で Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスの場合は C2A ドメイン、Shati 過剰発現マウスの場合は GFP について、それぞれ発現量のチェックを行い、発現が観察されたものを選択した。この操作は、遺伝子過剰発現マウスの場合、挿入された外来遺伝子のコピー数が系統毎に異なること、また染色体の位置によっては、交配を続けている間に外来遺伝子が失われる可能性があるためである。Piccolo C2A ドメインでは 111 と番号をつけた系統が当該遺伝子の発現量が多かったため、

その生後 1 日目のマウス脳を用いて Piccolo C2A ドメインの発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定したところ、mRNA が 1.5 倍に増加していた。以降の実験は、本マウスを用い、またコントロールには、Piccolo C2A 過剰発現マウスと同腹の野生型マウスを用いた。同様に、Shati 過剰発現マウスについても選別を行い、コントロールと比較して生後 1 日目に 1.3 倍の Shati mRNA を発現していた 011 の系統を実験に用いた。生育が早く、行動実験可能な数のマウスが確保できた Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスの結果を示す。

Shati 遺伝子欠損マウスの脳各部位での shati mRNA 量を図 2 に示す。

2. Social interaction 試験

図 3 に示すようにコントロールマウスと比較して Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは、未知のマウスとの接触時間が有意に減少し、他者との社会性が減少していた。

3. 強制水泳試験法

図 4 に示すように 10 分間の強制水泳をコントロールマウスと Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスに課したところ、コントロールマウスと比較して Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは無動時間の有意な延長が観察された。このことから、Piccolo C2A ドメイン過剰発現マウスは、うつ様症状を示すことが考えられる。

4. Shati 遺伝子過剰発現マウスにおける小脳プルキニエ細胞数

Shati 遺伝子過剰発現マウスの小脳プルキニエ細胞数を計数した。プルキニエ細胞特異的な calbindin ならびに parvalbumin 陽性細胞数の計数を行った。Shati 遺伝子過剰発現マ

ウスでは、小脳プルキニエ細胞数が減少していた (図 5)。

D. 考察

昨年度までに、shati とピッコロという 2 つの薬物依存形成に関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-アセチルトランスフェラーゼと類似の構造を持つことから NATI8 としても NCBI に登録されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db =nucore&id=134288911>)。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。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、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。

Shati 遺伝子欠損マウスでは、神経細胞数などを種々検討したが、前脳では著しい差異は観察されず、小脳プルキニエ細胞の減少が観察された。本マウスの脳構造については、今後の詳細な検討が必要である。

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。CMV プロモーターを用いた shati とピッコロ遺伝子過剰発現マウスでの情動行動について検討した。しかしながら、CMV プロモーターを使用しているため、脳での発現増加は細胞分裂が起こっている胎生期から生後 1 週間の間に限られる。そのため情動性の変化の観察が難しくなった可能性がある。今後、誕生後、成長しても遺伝子過剰発現しているマウスを作成して検討を行う予定である。

Shati 遺伝子欠損マウスについて、shati 遺伝子の発現が mRNA レベルで全く観察されなかったことから、適正に遺伝子組み換えマウスが作成されたと考えられる。本年度は同マウスの情動性について検討を行い、不安を感じ辛い難い行動を示していることが示された。今後、本マウスの薬物依存の形成について野生型マウスとの差異について検討を行う予定である。

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。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。

これらの遺伝子改変マウスを用いた研究成果から shati やピッコロの生理機能が解明されることが期待される。

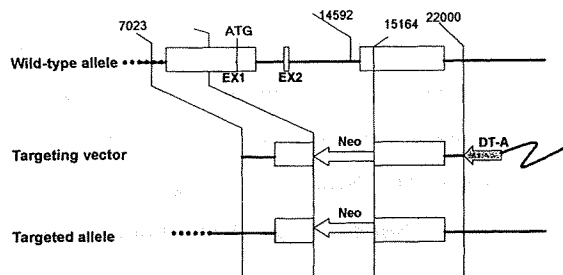


图1. The scheme of procedure for production of shati-KO mice.

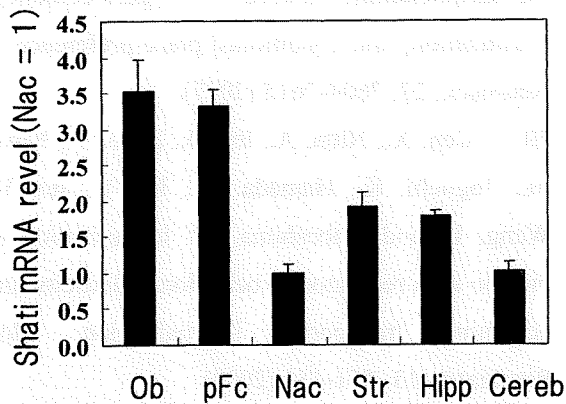


图2. Expression level of Shati mRNA in various brain regions.

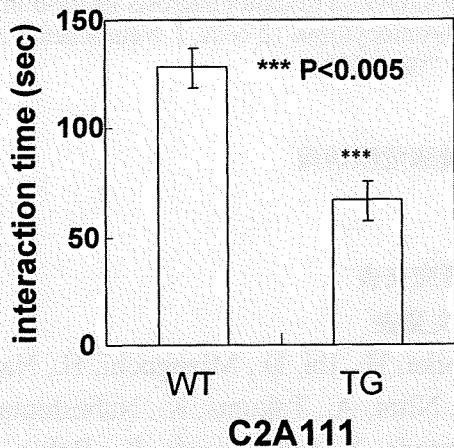
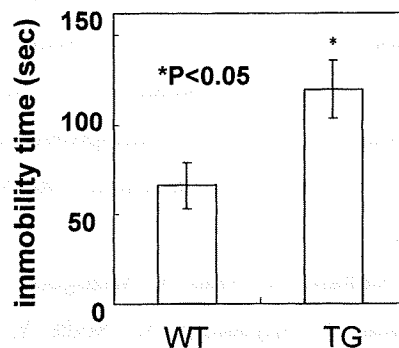


图3. C2A tg mice showed lower social interaction than wild type mice.



C2A111 N=12

图4. Increase of the immobility time in C2A Tg mice.

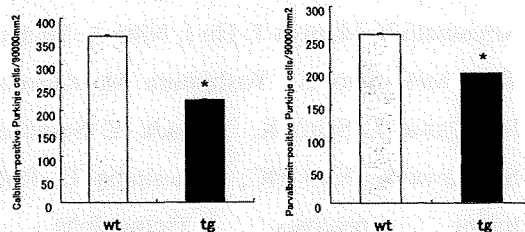


图5. There are significant decrease in the number of calbindin, Parvalbumin-positive neurons at 13 weeks in the Shati011 mouse cerebellum Prukinje cell between WT and TG. The error bars indicate SD. *p<0.005, **p<0.001 t-test.

[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- α 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- α protects against methamphetamine-induced rewarding and sensitization. *Biol. Psychiatry* 61 (7): 890-901 (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. 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*, 13, 451-454 (2008)

11. Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., Kitaichi, K., Ozaki, N., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107, 1697-1708 (2008)

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koike, H., Ibi, D., Mizoguchi, H., Nagai, T., Nitta, A., Takuma, K., Nabeshima, T., Yoneda, Y. and Yamada, K.: Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav. Brain Res.*, 202, 114-121 (2009)
2. Villard, V., Espallergues, U., Keller, E., Alkam, T., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T., Vamvakides, A. and Maurice, T.: Anti-amnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid β 25-35-induced toxicity in mice.

- Neuropsychopharmacology, 34, 1552-1566 (2009)
3. Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Koike, H., Shiraki, A., Takuma, K., Kamei, H., Noda, Y., Nitta, A., Nabeshima, T., Yoneda, Y. and Yamada, K.: Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Res.*, 64, 297-305 (2009)
 4. Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K.: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. **Behav Brain Res.** 2009 Aug 28. [Epub ahead of print], 206, 32-37 (2010) *Neurochem Int.* 2010 Jan;56(1):77-83. Epub 2009 Sep 17.
 5. Ibi D, Nitta A, Ishige K, Cen X, Ohtakara T, Nabeshima T, Ito Y: Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Int.* 2009 Sep 17. [Epub ahead of print]
 6. Kurata K, Maruyama S, Kato S, Sato W, Yamamoto J, Ozaki T, Nitta A, Nabeshima T, Morita Y, Mizuno M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Tissue-type plasminogen activator deficiency attenuates peritoneal fibrosis in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Dec;297(6):F1510-7.
 7. Alkam T, Nitta A, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T. Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. *Behav Brain Res.* 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
 8. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood.* 2010 Jan 28. [Epub ahead of print]
- ## 2. 学会発表
1. Nitta, A.: Two novel genes-related neuronal degeneration and psychiatric disease. The Next Generation Japanese Technology Showcase (New York, NY, U.S.A., January 14, 2009)
 2. Yun, J., Nagai, T., Hibi, Y., Koike, H., Nitta, A. and Yamada, K.: Methamphetamine-induced increase in the expression of neuronal PAS domain 4 (NPAS4): a potential role in synaptic plasticity. 1st Global COE International Symposium "Signaling of Cancer Cell" (Nagoya, Japan, January 23, 2009)
 3. Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Nitta, A. and Yamada, K.: Development of behavioral and neurochemical abnormalities and the changes in the expression level of schizophrenia-related genes in a perinatal viral infection model. 1st Global COE International Symposium "Signaling of Cancer Cell"

- (Nagoya, Japan, January 23, 2009)
4. Yun J, Nagai T, Hibi Y, Koike H, Nitta A and Yamada K,: Npas4 a neuronal pas domain 4, is increased by methamphetamine treatment and a possible role in neuronal differentiation. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & international Society for Neurochemistry Satellite Meeting in Association with Korian Society for Drug Abuse Research (Seoul, S. Korea, August 17-21)
 5. Yun J, Nagai T, Ibi D, Kitahara Y, Nitta N, Nabeshima T, Yamada K : NMDA receptor co-agonist D-serine ameliorates polyI:C-induced emotional and cognitive impairment in mice 6 th Nagoya Nanjing Shenyang pharmacology science symposium(第 6 回名古屋・南京・瀋陽薬学学術 シンポジウム) (Meijo University, September 14,15,2009)
 6. Hib Y, Nitta A, Ikeda T, Morishita K, Nabeshima T and Yamada K : Dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via induction of BDNF, 6 th Nagoya Nanjing Shenyang pharmacology science symposium(第 6 回名古屋・南京・瀋陽薬学学術シンポジウム) (Meijo University, September 14,15,2009)
 7. Liu W, Nitta A, Hibi Y, Nabeshima T and Yamada K : Shati-over-expressed mice shows similar symptoms to the autism, 6 th Nagoya Nanjing Shenyang pharmacology science symposium(第 6 回名古屋・南京・瀋陽薬学学術シンポジウム) (Meijo University, September 14,15,2009)
 8. Nitta A, Yamada K, Nabeshima T : Piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. The 32nd Annual Meeting the Japan Neuroscience Society. (Neuroscience 2009) (Nagoya, September, 16-18, 2009) (シンポジウム)
 9. Ibi D, Nagai T, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K. : The effect of polyI:C treatment on endophenotypes in dominant-negative DISC1 transgenic mice. The 32nd Annual Meeting the Japan Neuroscience Society. (Neuroscience 2009) (Nagoya, September, 16-18, 2009)
 10. Ibi D, Nagai T, Mizoguchi H, Nitta A, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K : Synergistic influence of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2009) (Chicago, U.S.A., October 17-21, 2009)
 11. Ariyannur P S, Pataabiramann N, Rarun P, Moffett J R, Madhavarao C N, Nitta A, Namboodiri A M A : Evidence that the methamphetamine induced protein called Shati is the biosynthetic enzyme of N-acetylaspartate (Neuroscience 2009) (Chicago, U.S.A., October 17-21, 2009)
 12. Yun J, Nagai T, Hibi Y, Koike H, Nitta A, Yamada K : Methamphetamine-induced Npas4, a neuronal PAS domain 4 expression and a possible role in neuronal differentiation (Neuroscience 2009) (Chicago, U.S.A., October 17-21, 2009)
 13. Yamada K, Ibi D, Koike H, Jaesuk Y, Mizoguchi H, Nitta A, Nabeshima T, Nagai T : Influence of chronic restraint stress on hippocampal neurogenesis and

- hippocampus-dependent fear memory in mice. (Neuroscience 2009) (Chicago, U.S.A., October 17-21, 2009)
14. Alkam T, Nitta A, Furukawa-Hibi Y, Niwa M, Yamada K, Nabeshima T; A neuroprotective dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus (Neuroscience 2009) (Chicago, U.S.A., October 17-21, 2009)
 1. 山崎太, 安田公夫, 土屋照雄, 新田淳美, 吉村知哲, 岡安伸二: ラウンドテーブルディスカッション「薬剤師の医療マネジメント教育に求めること」
岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科特別講演会「医療専門職のための医療マネジメント教育発展のために」(岐阜, 2009.2.21)
 2. 新田淳美 (座長): 一般口頭発表「中枢 5-アミロイド・神経変性 1」
第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009.3.16-18)
 3. 尹在錫, 永井拓, 日比陽子, 小池宏幸, 新田淳美, 山田清文: マウス脳内における neuronal PAS domain 4 (NPAS4) の発現に対するメタンフェタミン慢性投与の影響.
第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009. 3.16-18)
 4. 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009.3.16-18)
 5. 北原裕子, 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 小池宏幸, YU, Jinghua, 新田淳美, 米田幸雄, 鍋島俊隆, 山田清文: 周産期ウイルス感染により誘発される統合失調症の神経発達モデルにおける行動およびグルタミン酸神経伝達異常. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009. 3.16-18)
 6. ALKAM Tursun, 新田淳美, 溝口博之, 伊東亜紀雄, 村井里菜, 永井拓, 山田清文, 鍋島俊隆: Abeta の i.c.v.投与により引き起こされる記憶障害マウスの海馬におけるニューロフィラメント L の機能的な変化. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009. 3.16-18)
 7. 小池宏幸, 尹在錫, 衣斐大祐, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文: 海馬歯状回における Npas4 および Nurr1 発現に対する拘束ストレスの効果. 第 82 回日本薬理学会年会 (横浜, 2009. 3.16-18)
 8. 小池宏幸, YUN Jaesuk, 衣斐大祐, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文: 慢性拘束ストレス負荷マウスの神経新生障害. 第 18 回神経行動薬理若手研究者の集い (横浜, 2009.3.19)
 9. 久保田亜希, 富田章裕, 満間綾子, 島田和之, 林亜希子, 仲井麻記, 柿本美彩子, 新田淳美, 葛谷孝文, 木下朝博, 直江知樹, 山田清文: R-CHOP パス入院における病棟薬剤師の役割～内服アドヒアランス向上を目指して～. 第 7 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (名古屋, 2009.3.20-21)
 10. 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile は抗うつ様効果を示す. 日本薬学会第 129 年会 (京都, 2009.3.26-28)
 11. 水上将典, 根本清光, 安田隆宏, 関本征史, 西川秋佳, 吉田緑, 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 山田清文, 下位香代子, 小林章夫, 出川雅邦: 薬剤誘発性ラット肥大肝と脳由来神経栄養因子遺伝子の発現亢進との関連性について.
日本薬学会第 129 年会 (京都, 2009.3.26-28)
 12. 新田淳美: 神経栄養因子産生促進をする低分子化合物を用いた実用化への道 (みんな

も特許をだしてみよう!)。(若手育成セミナー; 統合テーマ2「アミノ酸と低分子化合物」) 第52回日本神経化学学会大会(渋川, 2009.6.21-24)

13. 塚本尚, 永井義隆, 新田淳美(パネリスト): シンポジウム5「基礎研究と創薬を結び付ける Translational Research」. 第52回日本神経化学学会大会(渋川, 2009.6.21-24)
14. 日比(古川)陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile による抗うつ効果の解析. 第115回日本薬理学会近畿部会(金沢, 2009.6.26)
15. 松山明裕, 新田淳美, 日比陽子, Tursun ALKAM, 山田清文: アミロイドβタンパク注入による認知症モデルにおける選択的ブチルコリンエステラーゼ阻害剤 PEC の記憶障害改善効果. 第115回日本薬理学会近畿部会(金沢, 2009.6.26)
16. 戸嶋彩乃, 加藤勝義, 安藤幸子, 山崎ゆり恵, 倉地茜, 小倉佳奈, 太田真美, 新田淳美, 山田清文, 長谷川好規: 治験普及・啓発活動における市民公開講座の有用性の検討. 医療薬学フォーラム2009・第17回クリニカルファーマシーシンポジウム(京都, 2009.7.11-12)
17. 日比陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 衣斐大祐, アルカムトルソン, 鍋島俊之, 山田清文: 疎水性ジペプチド Leu-Ile の抗うつ薬としての可能性 第19回日本医療薬学会年会~医療薬学の創る未来: 科学と臨床の融合~(長崎, 2009.10.24-25)
18. Kitahara Y, Nagai T, Ibi D, Nitta A, Sawa A, Nabeshima A, Yamada K: Functional analysis of glutamatergic System iDopaminant-negative DISC1 transgenic mice with neonatal polyI:C treatment 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会(京都, 2009.11.13-15)

19. Hibi (Furukawa) Y, Nitta A, Matsuyama A, Alkam T, Yamada K: Acetylcholinesterase inhibitor reduces the tyrosine nitration induced by amyloid beta peptide. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会合同年会(京都, 2009.11.13-15)
20. 宮川康宏, 石黒陽子, 山本雅人, 新田淳美, 山田清文: イオスファミドによる出血性膀胱炎と輸液量の相関性. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会(三重, 2009.11.23)
21. 山本雅人, Michael Z Wincor, 新田淳美, 山田清文: 米国南カルフォルニア大学病院における感染症治療に対する薬剤師の役割 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会(三重, 2009.11.23)
22. 衣斐大祐, 永井 拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤 明, 鍋島俊隆, 山田清文: 遺伝子-環境相互作用に基づく統合失調症モデルマウスの作成 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会(三重, 2009.11.23)

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称: 「意欲向上剤」
発明者: 新田淳美, 日比陽子, 池田武史, 酒井康
出願人: 協和発酵バイオ株式会社, 国立大学法人名古屋大学
2009年5月15日出願(特願2009-118772)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

乱用薬物に共通の依存症発症因子に対する

新規 Ca^{2+} 動態調節剤の治療への応用

分担研究者：大熊誠太郎

研究協力者：芝崎真裕、黒川和宏

（川崎医科大学薬理学教室）

[研究要旨]

これまでに、methamphetamine による精神依存において、L 型カルシウムチャネル $\alpha 1c$ subunit が重要な役割を担っていることを明らかにしており、更に昨年度の報告においては、 $\alpha 2/\delta$ subunit の変化と細胞内 Ca^{2+} 応答の重要性を報告した。一方、細胞内アクチン骨格は重合・脱重合の制御により神経成長円錐等の伸展・退縮などを流動的に調節しており、この脱重合に関連する因子として actin depolymerizing factor (ADF) が知られている。神経細胞において Ca^{2+} の局所的な上昇はアクチン重合を誘導することから、methamphetamine による精神依存時に認められる細胞内 Ca^{2+} 応答の変化はアクチン動態の制御に重要な働きをしていることが推察されるが、methamphetamine 誘発精神依存における ADF の関与については、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、methamphetamine による精神依存における ADF の関与を、ADF 変異動物を用いて行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。その結果、methamphetamine 誘発報酬効果を獲得したマウスの側坐核を含む領域において、ADF 蛋白量の有意な増加が認められた。また、ADF 変異型マウスおよび野生型マウスを用いて、methamphetamine 誘発報酬効果の変化について検討したところ、野生型マウスで認められる報酬効果は、ADF 変異型マウスにおいて有意な減弱が認められた。以上の成績より、methamphetamine による精神依存において ADF を介する細胞内アクチン動態の変化が関与することが示唆された。

A. 研究目的

Methamphetamine (METH) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考えられ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序の本体を解明するには至っていないのが現状である。薬物依存モデル動物および

薬物依存症患者にみられる症候の一部は、使用された依存性薬物により症状の発現程度に違いは認められるが、その精神依存性の形成・発現機序は共通の神経科学的機序を介していると考えられる。

種々の薬物依存症において、腹側被蓋野から側坐核へと投射する中脳辺縁 dopamine (DA) 神経系が重要な役割を果たすことが、数多く報告されている^{6, 12)}。また、覚せい剤の長期投与は DA 神

経における Ca^{2+} 流入増加を誘発することが報告されており¹¹⁾、当教室においても、METH や cocaine の精神依存形成において $\alpha 1c$ subunit や $\alpha 2\delta$ subunit の機能亢進が関与することを報告している^{5, 9, 10)}。これらの事実は、METH による精神依存形成機序に、Cav1.2 の機能亢進を伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与し、その Ca^{2+} 動態の変化が神経機能の変化を誘導していると推察される。

一方、神経細胞において Ca^{2+} の局所的な上昇は actin の重合を誘導することが報告されている³⁾。一般に、神経細胞間における情報伝達は synapse を介することが知られているが、synapse の形成には、actin・微小管など細胞骨格系が重要な働きをしており、actin 結合蛋白質により actin の重合・脱重合が調節されている。したがって、METH による精神依存時に認められる細胞内 Ca^{2+} 応答の変化は actin dynamics の制御に重要な働きをしていることが推察される。現在までに細胞骨格の制御において、actin 結合蛋白質である非筋型 cofilin、筋型 cofilin、actin depolymerizing factor (ADF) の存在が同定されており、fibrous (F)-actin に対する脱重合活性と actin filament の切断活性を有することが明らかになっている¹⁾。しかしながら、METH 誘発精神依存における actin dynamics の関与については、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、METH による精神依存における ADF の関与を、ADF 変異動物を用いて行動薬理学的および神経化学的観点から検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

実験には 6 週齢の C57BL/6J 系雄性マウスあるいは ADF 変異型動物である C57BL/6J *Smn-Dstn^{com1-2J}*/J 系雄性マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) を使用した。マウス

は恒温室 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形試料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲水 (水道水) はともに自由摂取とした。

2. 精神依存の評価

METH による精神依存は conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。実験装置は白および黒からなる compartment box を使用した。条件づけの前日あるいは翌日に、白および黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これをそれぞれ pre-test 値あるいは post-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に METH (0.5-2 mg/kg, s.c.) を投与したマウスを 60 分間閉じ込め、2 日目には saline を投与し、もう一方の区画に 30 分間閉じ込める操作を行い、この一連の操作を 1 session として、合計 3 session 行った。Saline のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。Post-test 値と pre-test 値の差をスコア (sec) として算出した。また、actin 重合阻害薬である cytochalasin D (0.3-3nmol)、actin 脱重合阻害薬である phalloidin (0.3-3nmol) は METH 処置 30 分前に脳室内に投与した。

3. 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、自発運動測定装置 (Actimo-100 system, Shintechno Ltd., Fukuoka, Japan) を使用した。測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適応させるための時間とし、その後薬物を投与して自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間にわたり連続的に測定した。

4. 逆耐性形成モデルの作成

METH 誘発自発運動量促進作用の増強における逆耐性形成モデルの作製のために、マウスに 72 時間毎に METH (2 mg/kg, s.c.) を計 5 回間欠投与し、その投与毎に自発運動量を測定した。

5. Western blot 法

METH 誘発報酬効果獲得マウスあるいは対照群のマウスより全脳を摘出し、脳アトラスに従い側坐核を含む領域を分画した。組織を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5mM EDTA, 10 mM NaF, 0.5 % Triton X-100 with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)) と共に、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer (2 % sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10 % glycerol with 0.2 M dithiothreitol) を加え、SDS-PAGE 法により、7.5% のポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20 μ g の蛋白量を注入し分離した。分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを 5 % nonfat dried milk を含む phosphate-buffered saline (PBS) 中でブロッキングし、一次抗体と共に anti-ADF (Sigma Co., St. Louis, USA: 5000 倍希釈)、反応させるため、1 時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に 1 時間反応させた。反応後、蛍光法に従い、蛍光発色性の基質を用いて目的とするタンパク質を発色させた。

6. 統計解析

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) で示した。有意性の評価には一元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test あるいは Student's t-検定を用いて評価した。

C. 研究結果

1. METH 誘発報酬効果に対する cytochalasin D の効果

条件づけ場所嗜好性試験を用いて、METH 誘発報酬効果に対する actin 重合阻害薬である cytochalasin D の影響について検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は、cytochalasin D の脳室内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 1; * p <0.05, ** p <0.01 vs. saline-conditioned mice. # p <0.05 vs. vehicle

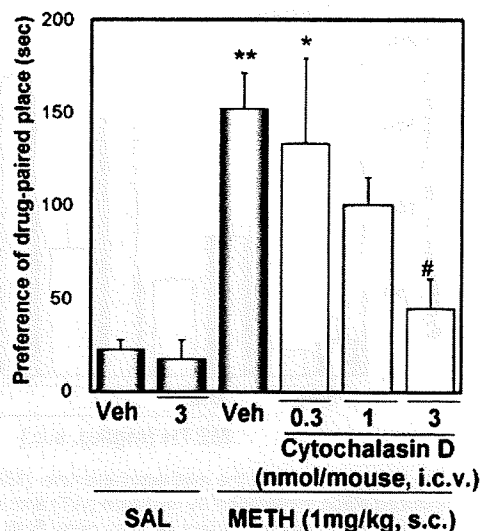


Fig. 1 Effect of an actin polymerization inhibitor cytochalasin D on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Cytochalasin D (0.3, 1 and 3 nmol/mouse) or vehicle (Veh) was i.c.v. administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) and methamphetamine (METH; 1 mg/kg). * p <0.05, ** p <0.01 vs. saline-conditioned mice. # p <0.05 vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

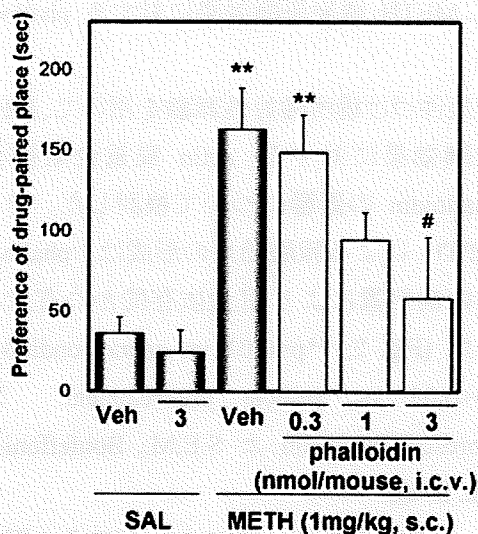


Fig. 2 Effect of an actin depolymerization inhibitor phalloidin on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Phalloidin (0.3, 1 and 3 nmol/mouse) or vehicle (Veh) was i.c.v. administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) and methamphetamine (METH; 1 mg/kg). ** p <0.01 vs. saline-conditioned mice. # p <0.05 vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

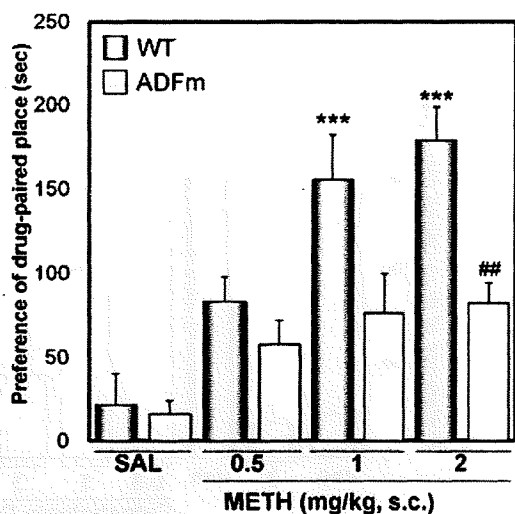


Fig. 3 Suppression of the methamphetamine- (METH) induced place preference by wild-type (WT) and actin depolymerizing factor mutant (ADFM) mice. Both genotypes of mice were conditioned by saline or methamphetamine (0.5, 1 and 2 mg/kg, s.c.). *** $p < 0.001$ vs. saline. ## $p < 0.01$ vs. wild-type mice group. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

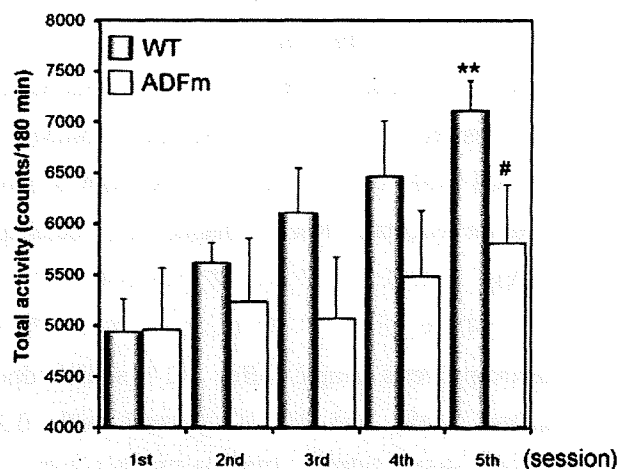


Fig. 4 No development of behavioral sensitization to methamphetamine-induced hyperlocomotion in actin depolymerizing factor mutant (ADFM) mice. Groups of mice were given five intermittent treatments with methamphetamine (2mg/kg, s.c.) every 96 h. Total activity was counted for 3 h after each treatment. The data represent the mean with SEM of seven to 8 mice. ** $p < 0.01$ vs. the first administration. # $p < 0.05$ vs. wild-type mice.

pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=8$).

2. METH 誘発報酬効果に対する phalloidin の効果

条件づけ場所嗜好性試験を用いて、METH 誘発報酬効果に対する actin 脱重合阻害薬である phalloidin の影響について検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は、phalloidin の脳室内前処置により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 2; ** $p < 0.01$ vs. saline-conditioned mice. # $p < 0.05$ vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=8$).

3. ADF 変異型マウスならびにその野生型マウスにおける METH 誘発報酬効果の相違

条件づけ場所嗜好性試験を用いて、ADF 変異型マウスならびにその野生型マウスにおける METH 誘発報酬効果の相違について検討した。その結果、野生型マウスでは METH の用量に依存

した報酬効果の有意な形成が認められたが、ADF 変異型マウスでは対照群に比べ有意な減少が認められた (Fig. 3; *** $p < 0.001$ vs. saline. ## $p < 0.01$ vs. wild-type mice group. The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=8$).

4. ADF 変異型マウスならびにその野生型マウスにおける METH 誘発逆耐性形成の相違

METH 誘発逆耐性形成機構に対する効果について ADF 変異型マウスならびにその野生型マウスを用いて検討したところ、野生型マウスで認められる METH の投与回数に比例した自発運動量の有意な増加は、ADF 変異型マウスでは有意に減弱した (Fig. 4, ** $p < 0.01$ vs. the first administration. # $p < 0.05$ vs. wild-type mice., The data represent the mean \pm S.E.M., Bonferroni/Dunnett's test, $n=8$).

5. METH 誘発報酬効果獲得動物における ADF の発現変化

METH 誘発報酬効果を獲得した野生型マウス

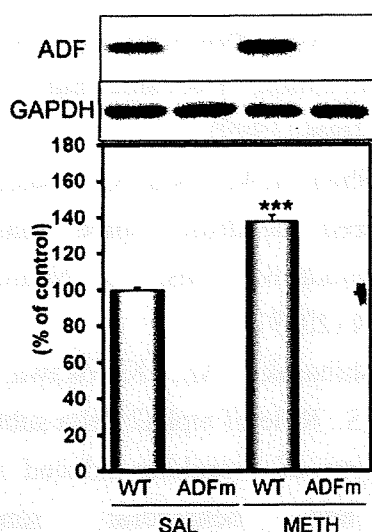


Fig. 5 Changes in protein levels of actin depolymerizing factor ADF from the limbic forebrain during the conditioned place preference to methamphetamine. The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 samples. *** $p < 0.001$ vs. wild-type groups.

の側坐核を含む limbic forebrain 領域では、対照群に比べ ADF 蛋白質の有意な発現増加が認められた。一方、ADF 変異型マウスでは ADF 蛋白質の発現は認められなかった (Fig. 5; The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 samples. *** $p < 0.001$ vs. wild-type groups. The data represent the mean \pm S.E.M., Student's t test)。

D. 考察

本研究結果より、actin 重合あるいは脱重合阻害薬である cytochalasin D あるいは phalloidin を処置することにより METH 誘発報酬効果の抑制が認められた。現在までに methamphetamine の慢性処置により側坐核神経細胞における spine 数が増加することが報告されている⁷⁾。したがって、actin の重合・脱重合による spine 形成を介した神経細胞間の情報伝達系の亢進あるいは変化が、METH による精神依存において重要な役割を果たすと推察される。さらに、細胞内物質輸送にお

いて細胞骨格が重要であることから、本研究結果で認められた actin 重合・脱重合機構は、細胞骨格機能を調節し、METH 精神依存に認められる各種受容体の up-regulation や蛋白質の局在変化に関与している可能性が考えられる。

一方、ADF 変異型マウスを用いた検討では、報酬効果ならびに逆耐性形成といずれにおいても ADF 変異型マウスは野生型マウスに比べ有意な減少が認められた。さらに、報酬効果を獲得したマウスの側坐核を含む領域では、ADF 蛋白質の増加が認められた。また、cocaine の処置により actin 結合蛋白質である cofilin に変化が認められることが報告されている⁸⁾。これらの結果から、METH や cocaine の精神依存形成には、ADF 等の actin 結合蛋白質を介した細胞内情報伝達系が関与すると想定される。ADF の調節機構については未だ明らかとなっていないが、現在までに低分子量 G 蛋白質である RhoA が調節を担うことが報告されている²⁾。さらに、METH により側坐核における RhoA の情報伝達系が亢進することが報告されている⁴⁾。したがって、METH は RhoA カスケードにより ADF を調節する可能性が考えられるが、METH がどのように ADF を調節・制御するかについては今後の検討課題であると思われる。

昨年度の報告では、METH 誘発報酬効果ならびに逆耐性形成機構において、Cav $\alpha 2/\delta$ subunit が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、METH 誘発報酬効果において Cav1.2 の発現増加を伴った機能亢進が認められることを明らかにしている¹⁰⁾。また、神経細胞において Ca^{2+} の局所的な上昇は actin の重合を誘導することが報告されていることから³⁾、METH による Cav1.2 の発現増加を伴った機能亢進による Ca^{2+} 応答の亢進が、本研究結果で得られた actin dynamics の変化に一躍を担っている可能性が考えられる。

E. 結論

本研究より、METH による精神依存に対して ADF が関与し、細胞内 actin 重合・脱重合調節機構が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

[参考文献]

- 1) Bamburg, J.R., McGough, A. and Ono, S.: Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.*, 9, 364-370 (1999).
- 2) Bernard, O.: Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 1071-1076 (2007).
- 3) Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Takemoto-Kimura, S., et al.: Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 14458-14463 (2002).
- 4) Kim, W.Y., Shin, S.R., Kim, S., et al.: Cocaine regulates ezrin-radixin-moesin proteins and RhoA signaling in the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 163, 501-505 (2009).
- 5) Kurokawa, K., Shibasaki, M. and Ohkuma, S.: Methamphetamine-induced up-regulation of alpha2/delta subunit of voltage-gated calcium channels is regulated by dopamine receptors. *Synapse*, in press, (2010).
- 6) Robinson, T.E. and Berridge, K.C.: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 18, 247-291 (1993).
- 7) Robinson, T.E. and Kolb, B.: Alterations in the morphology of dendrites and

dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 1598-1604 (1999).

- 8) Shen, H.W., Toda, S., Moussawi, K., et al.: Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J. Neurosci.*, 29, 2876-2884 (2009).
- 9) Shibasaki, M., Kurokawa, K. and Ohkuma, S.: Role of alpha2/delta subunit in the development of morphine-induced rewarding effect and behavioral sensitization. *Neuroscience*, 163, 731-734 (2009).
- 10) Shibasaki, M., Kurokawa, K. and Ohkuma, S.: Upregulation of L-type Ca(v)1 channels in the development of psychological dependence. *Synapse*, 64, 440-444 (2010).
- 11) Uramura, K., Yada, T., Muroya, S., et al.: Ca²⁺ oscillations in response to methamphetamine in dopamine neurons of the ventral tegmental area in rats subchronically treated with this drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 914, 316-322 (2000).
- 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 (Berl)*. 151, 99-120 (2000).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurokawa K, Shibasaki M, Ohkuma S. Methamphetamine-induced up-regulation of

- alpha2/delta subunit of voltage-gated calcium channels is regulated by dopamine receptors. Synapse. in press
2. Shibasaki M, Kurokawa K, Ohkuma S. Up-regulation of L-type Ca(v)1 channels in the development of psychological dependence. Synapse. 64: 440-444. 2010
 3. Shibasaki M, Kurokawa K, Ohkuma S. Role of alpha2/delta subunit in the development of morphine-induced rewarding effect and behavioral sensitization. Neuroscience. 163: 731-734. 2009
 4. Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKCγ during short-term treatment with morphine. Synapse. 63: 365-368. 2009
- Methamphetamine 誘発精神依存形成における actin depolymerizing factor の関与. 第 39 回日本神経精神薬理学会. 京都. 2009 年 11 月.
6. 黒川和宏、芝崎真裕、水野晃治、大熊誠太郎 : Ethanol 誘発身体依存形成における β 受容体の関与. 第 116 回日本薬理学会近畿部会. 滋賀. 2009 年 11 月
 7. 黒川和宏、芝崎真裕、水野晃治、大熊誠太郎 : Methamphetamine 誘発報酬効果形成における高電位開口性 L 型カルシウムチャンネル機能亢進機序に対する ryanodine receptor の関与. 第 83 回日本薬理学会年会. 大阪. 2010 年 3 月.
 8. 芝崎真裕、黒川和宏、水野晃治、大熊誠太郎 : Methamphetamine 誘発精神依存形成における actin depolymerizing factor の役割. 第 83 回日本薬理学会年会. 大阪. 2010 年 3 月.

2. 学会発表

1. 芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎 : Morphine 誘発報酬効果形成における高電位開口性 L 型カルシウムチャンネル機能亢進機序に対する Vps34 の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.
2. 黒川和宏、芝崎真裕、大熊誠太郎 : Methamphetamine 誘発逆耐性形成における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) α2/δ subunit の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.
3. 黒川和宏、芝崎真裕、水野晃治、大熊誠太郎 : 依存性薬物誘発精神依存形成における gabapentin の有用性. 第 115 回日本薬理学会近畿部会. 金沢. 2009 年 6 月.
4. 芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎 : アルコール性障害としてのうつ病と自殺 : うつ病とアルコール依存症の生物学的相同性. 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会. 横浜. 2009 年 9 月.
5. 芝崎真裕、黒川和宏、水野晃治、大熊誠太郎 :

H. 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

メタンフェタミン依存へのセロトニン 1B、アデノシン A2 受容体の関与

研究分担者：曾良一郎¹

研究協力者：小林秀昭¹，石原佳奈¹，有銘預世布¹，萩野洋子²，池田和隆²，糸川昌成³，岩田仲生⁴，稲田俊也⁴，山田光彦⁴，関根吉統⁴，内村直尚⁴，伊豫雅臣⁴，尾崎紀夫⁴，氏家寛⁴，笠原好之¹

(¹東北大学大学院精神・神経生物学分野，²東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究チーム，³同・統合失調症研究チーム，⁴Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA))

[研究要旨]

メタンフェタミン(METH)依存の形成機序としてドーパミン神経系が重要な役割を果たしていると考えられているが、他の神経伝達系の関与も示唆されている。我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰なセロトニントランスポーター欠損(SERT KO)マウスではMETH行動感作が形成されず、SERT KOマウスに5-HT1B受容体阻害薬を前処置すると、METH行動感作が形成されることを確認した。このことから、5-HT1B受容体の行動感作形成への関与が示唆された。そこで、本研究では、METH行動感作形成への5-HT1B受容体の関与をより詳細に解析するため、5-HT1B受容体KOマウスにおいてMETH行動感作形成について検討した。5-HT1B受容体ホモKOマウスではMETH反復投与による移所運動量の増加が野生型マウスに比べて大きく行動感作形成が増強していた。一方、5-HT1B受容体ヘテロKOマウスでは野生型マウスにより移所運動量の増加が少なく、行動感作形成は減弱していた。このことから、METHによる行動感作形成には、5-HT1B受容体を介するセロトニン神経伝達が重要な役割を担うと考えられる。

ドーパミン神経伝達にアデノシン受容体が関与していることが知られている。そこでアデノシン受容体の遺伝子多型がMETH依存・精神病と相関するかどうかについて検討した。171例のMETH依存・精神病患者と229例の健常人においてアデノシンA2受容体の遺伝子多型について解析した。女性のMETH依存・精神病患者とアデノシンA2A受容体の遺伝子多型に有意な相関がみられた。これらの結果は、女性ではメタンフェタミンをより若年齢で使用し始めメタンフェタミン依存になりやすいが、治療によく反応することに関連している可能性が考えられる。

A. 研究目的

メタンフェタミン(METH)を含む中枢刺激薬の反復投与は、薬物への反応の増強を生じ、行動感作を形成する。ヒトでもMETHの行動感作は、逆耐性現象として長期間持続し、休薬期間後も容易

に再燃へつながることから、薬物依存治療を妨げる一因になっている。

行動感作の機序として、薬物の反復摂取による脳内の可塑的变化や、中枢刺激薬の他の作用である報酬効果と同様にドーパミン神経伝達が重要な役割を果たしていると考えられてきた⁵⁾。しか