

し、ドーパミントランスポーター (DAT) 欠損マウスにおいてコカインの報酬効果が確認されたこと¹²⁾などから、ドーパミン神経伝達以外の関与が示唆されている。

我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰であるセロトニントランスポーター (SERT) 欠損マウスにおいて、METH 反復投与による行動感作の形成が認められないことを見出した。更に、抗うつ薬として用いられる選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) 投与による、中枢刺激薬の行動感作維持の抑制や、報酬効果の減弱が報告されている⁹⁾¹³⁾。しかし、5-HT 受容体には数多くのサブタイプがあることから我々は行動感作形成に重要な受容体を特定する目的で SERT KO マウスに各受容体の阻害薬を投与したところ、5-HT₂ 受容体の阻害では SERT KO マウスは行動感作を形成しないままであったが、5-HT_{1B} 受容体の阻害により SERT KO マウスが行動感作を形成することを見出した。従って 5-HT 神経伝達による行動感作形成における機能発現には 5-HT_{1B} 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。

そこで、本研究では 5-HT_{1B} 受容体ホモ欠損マウスおよび 5-HT_{1B} 受容体ヘテロ欠損マウスを用いて、METH 行動感作形成に与える 5-HT_{1B} 受容体発現量の影響を検討した。

一方で、ドーパミン神経伝達にはアデノシン受容体が関与していることが知られている⁴⁾。ドーパミン D₁ 受容体および D₂ 受容体はアデノシン A₁、A_{2A} 受容体とそれぞれヘテロダイマーを形成しており、受容体の反応性を調節している。またアデノシン A_{2A} 受容体は METH の効果を阻害する役割を果たしている。アデノシン A_{2A} 受容体欠損マウスはアンフェタミンに対する移所運動増加の反応が減弱しており、行動感作が形成されない²⁾³⁾。これらの知見を受けて、本研究ではアデノシン受容体の遺伝子多型と METH 依存・精神病との相関について検討した。

B. 研究方法

1) 5-HT_{1B} 受容体ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウスを用いた METH 行動感作形成についての検討

1. 実験動物

C57BL6/129Sv 混合遺伝背景を持つ7雄性および雌性の5-HT受容体ホモKOマウス、5-HT受容体ヘテロKOマウスおよび同腹子を含む野生型マウスを用いて実験を行った。

2. 薬物

METH (大日本住友製薬) は生理食塩水 (大塚製薬) を用いて溶解した。薬物は、10ml/kg の容量にて腹腔内に投与された。

3. 移所運動量の計測

すべての移所運動量の計測は、Supermexシステム (室町機械) を用いて行った。マウスの水平方向の運動量は、測定用チャンバー (40 x 30 x 26 cm) の上方に設置されたセンサーによって計測され、5分ごとの値がコンピュータに記録された。

マウスはMETH (1 mg/kg) 投与120分前に測定用チャンバーに移し、馴化を行った。そして、METH投与後、マウスの移所運動量を125分間測定した。投与直後の5分間の値は、分析から除外した。

上記のセッションを1日~2日間隔で7回継続し、7日間の休薬期間を経て同量 (1 mg/kg) のMETHを全てのマウスに投与し、再燃の有無を検討した (セッション8)。

2) アデノシン受容体の遺伝子多型とMETH依存・精神病と相関についての検討

1. 被験者

171例のMETH依存・精神病患者 (男性138例、女性38例、年齢37.5±12.0歳) および229例の健康人 (男性119例、女性110例、年齢41.2±12.3歳)

にて遺伝子多型の解析を行った。METH依存・精神病患者はICD-10-DCRにて診断を行い、精神科の外来患者および入院患者である。健常対照者は薬物依存および精神疾患の個人・家族歴ともになく、大部分は医療関係者である。被験者は全て日本人で、北九州、瀬戸内、中京、東海、関東地方に在住している。

2. 遺伝子多型解析

各被験者から血液サンプルを提供して頂き、その血液からフェノールクロロホルム法を用いてgenomic DNAを抽出した。

最初に16例のMETH依存・精神病患者のDNAサンプルを用いてアデノシン受容体A2A遺伝子多型の特定を行った。Exon1,2およびExonとIntronの境界領域についてPCR法にて増幅し、BigDye terminators (Applied Biosystems) とABI Genetic analyzer 3100 (Applied Biosystems) を使用して遺伝子配列を決定した。各多型の遺伝子型決定については、Exon1+179 (rs13306114)、Exon+219、Exon2+751 (rs57517876)、IVS2+28 (rs34923252) はPCR法にて増幅後、遺伝子配列を決定することで判別し、IVS1+64 (rs13306116) はPCRにて増幅後、制限酵素BclIで消化することにより判別した。

C. 研究結果

1) 5-HT1B 受容体ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウスを用いた METH 行動感作形成についての検討

今回の実験では5-HT1B受容体欠損マウスにおいてMETHを反復投与し、行動感作の形成と維持を検討した。行動感作形成において、5-HT1B受容体ホモ欠損マウスでは、METH (1 mg/kg) 反復投与により野生型マウスに比べ、移所運動量が多く、行動感作形成が促進していた。一方、5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスより移所運動量が少なく、行動感作形成は見られなかった。

また、5-HT1B受容体ホモ欠損マウスと5-HT1Bヘテロ欠損マウスの各セッションでの移所運動量を比較したところ、セッション3以降では5-HT1B受容体ホモ欠損マウスの移所運動量が有意に多かった(Fig.1)。

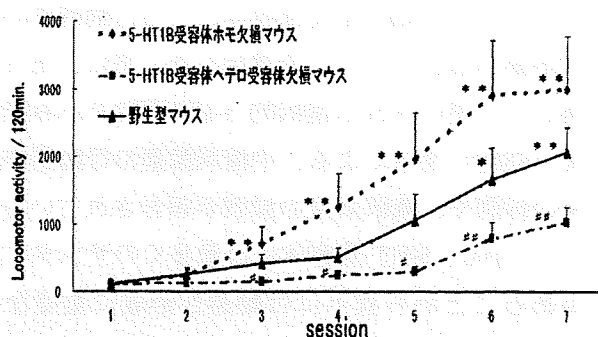


Fig.1: 5-HT1B受容体欠損マウスにおけるMETH誘発性行動感作の形成

1回目から7回目までのMETH反復投与における総移所運動量のセッション比較、遺伝子型間の比較の結果。値表示は薬物投与後120分間の総移所運動量の平均値±標準誤差。各遺伝子型につきN=19-23。

行動感作の維持において、5-HT1B受容体ホモ欠損マウスと野生型マウスの増加した移所運動量は、7日間の休薬期間後も維持された。5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスでも7日間の休薬期間後の移所運動量は休薬前の移所運動量と変化はなかった。また、5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスと野生型マウスで移所運動量を比較したところ、休薬期間後のMETH投与時に5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスで移所運動量が有意に少なかった(Fig.2)。これらのことから、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。

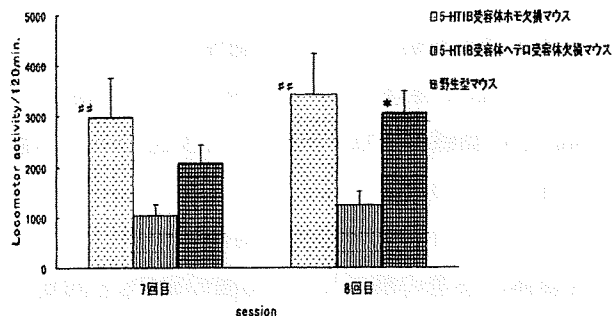


Fig.2: 休薬期間前後での行動感作の維持

7回目と休薬期間をおいた8回目のMETH反復投与後における総移所運動のセッションの比較、遺伝子型間の比較の結果。値表示は薬物投与後120分間の総移所運動量の平均値±標準誤差。各遺伝子型につきN=19-23。5-HT1B受容体ホモ欠損マウスと野生型マウスでは増加した移所運動量は、7日間の休薬期間後も保持された。

2) アデノシン受容体の遺伝子多型とMETH依存・精神病と相関についての検討

最初に16例のMETH依存・精神病患者のDNAサンプルを用いてアデノシン受容体A2A遺伝子多型の特定を行ったところ、6個の一塩基多型(SNPs)を特定し、そのうちの1個は新規であった(Exon1+219)。171例のMETH依存・精神病患者および229例の健常人に対して、アデノシン受容体A2AのSNPsとMETH依存・精神病患者との相関解析を行ったところ、Exon2+751 (rs57517876) に関して、遺伝子型 (P=0.018) およびアレル出現頻度 (P=0.0057) で有意な相関が見られた(Table 1.)。

性別ごとにMETH依存・精神病患者と健常人に対して相関解析を行ったところ、Exon2+751 (rs57517876) に関して、遺伝子型 (P=0.0078) およびアレル出現頻度 (P=0.014) で有意な相関が見られた(Table 2.)。

Table 1. 各多型の遺伝子型とアデノシンA2A受容体のSNPsのアレル出現頻度

SNP	Group	N	Genotype (%)	P	Allele (%)	P	
Exon1-179 (rs13306114)	C/C		C/T	T/T	C	T	
	Control	229	229 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	458	
	METH	171	168 (98.2%)	3 (1.8%)	0 (0.0%)	339	0.132
Exon1-219	C/C		C/T	T/T	C	T	
	Control	229	228 (99.6%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	457	
	METH	171	169 (98.8%)	2 (1.2%)	0 (0.0%)	340	0.701
IVS1-64 (rs13306116)	G/G		G/A	A/A	G	A	
	Control	229	219 (95.6%)	10 (4.4%)	0 (0.0%)	448	
	METH	171	162 (94.7%)	8 (4.7%)	1 (0.6%)	332	0.504
Exon2-751 (rs57517876)	T/T		T/C	C/C	T	C	
	Control	229	70 (30.6%)	114 (49.8%)	45 (19.7%)	254	
	METH	171	35 (20.5%)	85 (49.7%)	51 (29.8%)	155	0.018
IVS2-28 (rs34923352)	T/T		T/A	A/A	T	A	
	Control	229	181 (79.0%)	45 (19.8%)	5 (2.2%)	405	
	METH	171	144 (84.2%)	26 (15.2%)	1 (0.6%)	314	0.258

*1 METH sample: Hardy-Weinberg Equilibrium p=0.0214

N: Number of samples

P: Significance values between METH samples and controls.

Table 2. Exon2+751 (rs57517876)の性差

Gender	Group	N	Genotype (%)	P	Allele		
Male	T/T		T/C	C/C	T	C	
	Control	119	31 (26.1%)	59 (49.6%)	29 (24.4%)	121	
	METH	138	27 (19.6%)	73 (52.9%)	38 (27.5%)	127	0.456
Female	T/T		T/C	C/C	T	C	
	Control	110	39 (35.5%)	55 (50.0%)	16 (14.5%)	133	
	METH	33	8 (24.2%)	12 (36.4%)	13 (39.4%)	28	0.0078

N: Number of samples

P: Significance values between METH samples and controls.

D. 考察

我々は精神刺激薬の報酬効果においてドーパミンのみならずセロトニン神経伝達も関与している結果が得られている¹¹⁾。DAT欠損に加え、SERT遺伝子が欠損したマウスではコカインの報酬効果が見られなかった。コカインの報酬作用がみられなかったDAT/SERT ダブルKOマウスでは、黒質線条体の5-HT1B受容体の有意な減少がみられ、5-HT1B受容体が精神刺激薬の報酬効果の発現に関与している可能性が示唆された⁹⁾。また、我々はこれまでに5-HT神経伝達が過剰なSERT欠損マウスではMETH行動感作の形成が認められなかったことから、過剰な5-HT神経伝達が行動感作の形成を抑制することを示唆している。さらにこのSERT欠損マウスに対して5-HT1B受容体阻害薬SB216641の前処置によってMETH行動感作の形成を確認している。一方で野生型マウスでは

5-HT1B受容体によるコカインの作用の減弱が報告され、5-HT1B受容体欠損マウスにおいては側坐核のDA遊離量のベースラインの有意な増加¹⁰⁾や、薬物自己投与の増強⁸⁾が報告されている。上記のように、5-HT神経伝達の中でも5-HT1B受容体と中枢刺激薬との関連が注目されているため、我々は5-HT1B受容体欠損マウスを用いMETH行動感作の有無を検討した。

今回の実験結果より、5-HT1B受容体ホモ欠損マウスではMETHによる行動感作形成が野生型マウスよりも促進していることが示され、METHによる行動感作形成における5-HT1B受容体の関与がより明らかになった。しかし、5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスではMETHによる行動感作形成が見られなかった。

5-HT1B受容体ホモ欠損マウスではベースラインの側坐核細胞外ドーパミン遊離量、コカイン誘発性の側坐核細胞外ドーパミン遊離量が増加し、ドーパミンD1受容体発現量が増加しているとの報告⁷⁾があることから5-HT1B受容体ホモ欠損マウスではドーパミン神経伝達が増強していると予想される。このことが5-HT1B受容体ホモ欠損マウスで見られたMETHによる行動感作形成の促進の一因であることが考えられる。

一方で5-HT1B受容体は神経終末上の自己受容体も存在している。5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスが5-HT1B受容体ホモ欠損マウスとは異なり行動感作の形成が消失していたことは、ヘテロ欠損マウスでは自己受容体も介するセロトニン神経伝達にホモ欠損マウスと違いがある可能性が考えられる。5-HT1B受容体作動薬は軸索終末からのGABAの放出を抑制する¹⁾ため、GABA作動性神経終末上の5-HT1B受容体刺激はGABA放出を抑制し、その結果ドーパミン神経のGABAによる抑制が解除されて、ドーパミン放出を間接的に活性化する。5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスはこのヘテロ受容体としての機能が抑制されて、ドーパミン

神経伝達が減弱している可能性があり、このことが5-HT1B受容体ヘテロ欠損マウスで見られたMETH行動感作形成の消失を引き起こした可能性も考えられる。

一方で、日本人の集団を対象にアデノシンA2A受容体の多型の解析により6個のSNPsを同定し、そのうちの一つであるExon2+751 (rs57517876) はMETH依存・精神病患者との間に有意な相関が見られた。その相関は特に女性において見られた。これはアデノシンA2A受容体遺伝子の多型と薬物依存との間に相関を見出した最初の知見である。アデノシンA1受容体、A2A受容体とドーパミンD1受容体、D2受容体はそれぞれヘテロダイマーを形成しているとの報告から、アデノシンA2A受容体の多型がこのヘテロダイマー複合体の形成に影響を与えている可能性がある。

Exon2+751 (rs57517876) の多型とMETH依存・精神病患者との間に有意な相関が見られたことは、女性ではMETHをより若年齢で使用し始めMETH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。

これらの結果から、アデノシンA2A受容体の多型は、METH依存・精神病患者において脆弱性因子となっている可能性が考えられる。Exon2+751 (rs57517876) SNPやこれと関連したアデノシンA2A受容体のバリエーションはアデノシンシステムとドーパミンシステムのクロストークに影響を与えていることが示唆される。

E. 結論

今回の実験結果より5-HT1B受容体を介したセロトニン神経伝達がMETH行動感作形成に関与していることが示された。従って、覚せい剤依存あるいは精神病の治療に5-HT1B受容体を介するセロトニン神経伝達への働きかけが役立つ可能性が考えられる。また、遺伝子多型解析の結果からMETH依存・精神病患者とアデノシンA2A受容体

のExon2+751 (rs57517876) SNPとの間に有意な相関が見られ、これは女性で顕著であった。従ってアデノシンA2A受容体のバリエーションは覚せい剤依存あるいは精神病の脆弱性因子であることが考えられ、このことは依存リスク同定や治療を行う上で重要となる可能性がある。

F. 参考文献

- 1) Cameron, DL., Williams, JT.: Cocaine inhibits GABA release in the VTA through endogenous 5-HT. *J. Neurosci.*, 14:6763-7, 1994.
- 2) Chen, JF., Beilstein, M., Xu, YH., et al.: Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience.*, 97 (1):195-204, 2000.
- 3) Chen, JF., Moratalla, R., Yu, R., et al.: Inactivation of adenosine A2A receptors selectively attenuates amphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology.*, 28 (6):1086-95, 2003.
- 4) Ferre, S., Fredholm, BB., Morelli, M., et al.: Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.*, 20 (10):482-7, 1997.
- 5) Kalivas, P. W., Sorg, B. A, and Hooks, M. S.: The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol.*, 4(4): 315-334, 1993.
- 6) Kaneko, Y., Kashiwa, A., Ito, T., et al.: Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacology.*, Mar;32(3): 658-64, 2007.
- 7) Rocha, BA., Fumagalli, F., Gainetdinov, RR., et al.: Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat. Neurosci.*, 1:132-7, 1998.
- 8) Rocha, B. A., Scearce-Levie, K., Lucas, J. J., Hiroi, N., et al.: Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature.*, May 14;393(6681): 175-8, 1998.
- 9) Rocha, B. A.: Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacol.*, Oct 31;479(1-3): 107-15, 2003.
- 10) Shippenberg TS, Hen R, He M.: Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor. *J Neurochem.*, Jul;75(1): 258-65, 2000.
- 11) Sora, I., Hall, F. S., Andrews, A. M., et al.: Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Apr 24;98(9): 5300-5, 2001.
- 12) Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., et al.: Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jun 23;95(13): 7699-704, 1998.
- 13) Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Ogai, Y., et al.: Fluoxetine as a potential pharmacotherapy for methamphetamine dependence: studies in mice. *Ann N Y Acad Sci.*, Aug: 1074:295-302, 2006.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanahara, N., Miyatake, R., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iyo, M. and Hashimoto, K.: Association study between the PIK4CA gene and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5;150B(2):233-8 (2009)
- 2) Ujike, H., Katsu, T., Okahisa, Y., Takaki, M., Kodama, M., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Kuroda, S.: Genetic variants of D2 but not D3 or D4 dopamine receptor gene are associated with rapid onset and poor prognosis of methamphetamine psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 15;33(4):625-9 (2009)
- 3) Nakamura, K., Sekine, Y., Takei, N., Iwata, Y., Suzuki, K., Anitha, A., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Ujike, H. and Mori, N.: An association study of monoamine oxidase A (MAOA) gene polymorphism in methamphetamine psychosis. *Neurosci Lett.* 15;455(2):120-3 (2009)
- 4) Okochi, T., Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okumura, T., Tsunoka, T., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Ujike, H. and Iwata, N.: Genetic association analysis of NRG1 with methamphetamine-induced psychosis in a Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1;33(5):903-5 (2009)
- 5) Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okochi, T., Tsunoka, T., Okumura, T., Inada, T., Ujike, H., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Iwata, N.: A functional polymorphism in estrogen receptor alpha gene is associated with Japanese methamphetamine induced psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1;33(5):895-8 (2009)
- 6) Okahisa, Y., Ujike, H., Kotaka, T., Morita, Y., Kodama, M., Inada, T., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. and Kuroda, S.: Association between neuropeptide Y gene and its receptor Y1 gene and methamphetamine dependence. *Psychiatry Clin Neurosci.* 63(3):417-22 (2009)
- 7) Kotaka, T., Ujike, H., Okahisa, Y., Takaki, M., Nakata, K., Kodama, M., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Kuroda, S.: G72 gene is associated with susceptibility to methamphetamine psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(6):1046-9 (2009)
- 8) Hall, FS., Li, XF., Randall-Thompson, J., Sora, I., Murphy, DL., Lesch, KP., Caron, M. and Uhl, GR.: Cocaine conditioned locomotion in dopamine transporter, norepinephrine transporter and 5-HT transporter knockout mice. *Neuroscience.* 162(4):870-80(2009)
- 9) Nishizawa, D., Nagashima, M., Katoh, R., Satoh, Y., Tagami, M., Kasai, S., Ogai, Y., Han, W., Hasegawa, J., Shimoyama, N., Sora, I., Hayashida, M. and Ikeda, K.: Association between *KCNJ6 (GIRK2)* Gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. *Plos one.* 16; 4(9):e7060 (2009)
- 10) Ide, S., Sora, I., Ikeda, K., Minami, M., Uhl, GR.

- and Ishihara, K.: Reduced emotional and corticosterone responses to stress in m opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 58(1):241-247 (2010)
- 11) Kishi, T., Tsunoka, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Kawashima, K., Okochi, T., Okumura, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Ujike, H., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Iwata, N.: Serotonin 1A receptor gene is associated with Japanese methamphetamine-induced psychosis patients. *Neuropharmacology*. 58(2):452-456 (2010)
- 12) Li, B., Arime, Y., Hall, FS., Uhl, GR., Cui, R. and Sora, I.: Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knock out mice. *Eur J Pharmacol*. 25;628(1-3):104-107 (2010)
- 13) Sora, I., Li, B., Fumushima, S., Fukui, A., Arime, Y., Kasahara, Y., Tomita, H. and Ikeda, K.: Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants. *International Review Of Neurobiology*. 85: 29-33 (2009)
- 14) Sora, I., Li, B., Igari, M., Hall, FS. and Ikeda, K.: Transgenic mice in the study of drug addiction and the effects of psychostimulant drugs. *in Ann. N.Y. Acad. Sci. Addiction Reviews 2009, edited by George R. Uhl*, Boston, MA (USA): Wiley-Blackwell.
- 15) Hall, FS., Sora, I., Perona, MTG. and Uhl, GR.: The role of the serotonin transporter in drug reward: Gene knockout studies. In: Kaluev A (ed.) *Experimental models in serotonin transporter research*. New York: Nova Science Publishers. *in press*
- 16) Kobayashi, H., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T., Yamada, M., Sekine, Y., Uchimura, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M. and Sora, I.: Association analysis of the Adenosine A1 receptor gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. *Current Neuropharmacology*. *in press*
- 17) Kobayashi, H., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T., Yamada, M., Sekine, Y., Uchimura, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M. and Sora, I.: Association analysis of the Tryptophan Hydroxylase 2 gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. *Current Neuropharmacology* *in press*
- 18) 池田和隆、高松幸雄、萩野洋子、曾良一郎: メチルフェニデートの精神神経系に及ぼす影響. *日本神経精神薬理学雑誌*. 29: 121-123 (2009)
- 19) 小林秀昭、曾良一郎: メタンフェタミン依存. ~特集 精神疾患の遺伝子は、本当に見つかったのか?~ *分子精神医学*. 10(1):17-26 (2010)
2. 学会発表
- 1) Yokobayashi, E., Ujike, H., Kotaka, T., Okahisa, Y., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. and Kuroda, S.: Association study of the serine racemase gene with methamphetamine psychosis. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 2) Yamamoto, H., Takamastu, Y., Imai, K., Kamegaya, E., Hagino, Y., Watanabe, M., Yamamoto, T., Sora, I., Koga, H. and Ikeda, K.: Reduced Expression of MOP in the frontal cortex after long-term methamphetamine withdrawal was restored by chronic post-treatment with fluoxetine. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for

Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]

- 3) Ujike, H., Kishimoto, M., Okahisa, Y., Kodama, M., Takaki, M., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I. and Ozaki, N.: Association between 5HT1B receptor gene and methamphetamine dependence. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 4) Tsunoka, T., Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okochi, T., Okumura, T., Inada, T., Ujike, H., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Iwata, N.: No association between GRM3 and Japanese methamphetamine induced psychosis. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 5) Okumura, T., Okochi, T., Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Tsunoka, T., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Ujike, H. and Iwata, N.: Genetic association analysis of NOS1 with methamphetamine induced psychosis in a Japanese population. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 6) Okochi, T., Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okumura, T., Tsunoka, T., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Ujike, H. and Iwata, N.: Association study of NOS3 and methamphetamine-induced psychosis in a Japanese population. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 7) Okahisa, Y., Kodama, M., Takaki, M., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. and Ujike, H.: Association between the regulator of G-protein signaling 9 gene and patients with methamphetamine use disorder and Schizophrenia. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 8) Kobayashi, H., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T., Yamada, M., Sekine, Y., Uchimura, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M. and Sora, I.: Association analysis of the tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 9) Kobayashi, H., Ujike, H., Iwata, N., Inada, T., Yamada, M., Sekine, Y., Uchimura, N., Iyo, M., Ozaki, N., Itokawa, M. and Sora, I.: Association analysis of the adenosine A1 receptor gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. 2nd

- Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 10) Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okochi, T., Tsunoka, T., Okumura, T., Inada, T., Ujike, H., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Iwata, N.: Association study between prokineticin 2 (PROK2) and Japanese methamphetamine dependence. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 11) Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Yamanouchi, Y., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Okochi, T., Tsunoka, T., Okumura, T., Inada, T., Ujike, H., Yamada, M., Uchimura, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N. and Iwata, N.: Association study between orphan nuclear receptor *reverb* alpha gene (NR1D1) and Japanese methamphetamine dependence. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 12) Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I. and Kitayama, S.: Methylenedioxymethamphetamine and the monoamine transporters: Correlation to its toxicity. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 13) Hagino, Y., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Iwamura, T., Murphy, DL., Uhl, GR., Sora, I. and Ikeda, K.: Effect of MDMA on extracellular dopamine and serotonin levels in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 14) Kasai, S., Yamamoto, H., Kamegaya, E., Uhl, GR., Sora, I., Watanabe, M. and Ikeda, K.: Mu-opioid peptide receptors (MOP) are detected as broadbands around 65 kDa in western blotting: analyses using MOP knockout mice. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 15) Okahisa, Y., Kodama, M., Takaki, M., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N. and Ujike, H.: Association study of two cannabinoid receptor genes, CNR1 and CNR2, with methamphetamine dependence. 2nd Annual International Drug Abuse Research Society & International Society for Neurochemistry Satellite Meeting in association with Korean Society for Drug Abuse Research. Seoul, S.Korea. [2009/8/17-21]
- 16) 池田和隆、高松幸雄、曾良一郎：発達期における依存性物質の中樞作用と注意欠如多動性障害：ドパミントランスポーター欠損マウスの知見を中心に。第36回日本トキシコロジー学会，盛岡 [2009/7/7]
- 17) 曾良一郎：教育講演・基底核の進化と役割の

- 変化. モノアミン系の役割と相互作用. 第 24 回日本大脳基底核研究会, 東京 [2009/8/1]
- 18) 曾良一郎: 特別講演; 報酬・ストレスにおけるドーパミン・オピオイド神経伝達の役割. 第 70 回日本心身医学会東北地方会, 仙台 [2010/2/27]
- 19) 大河内智、奥村武則、岸太郎、池田匡志、北島剛、木下葉子、川島邦裕、角鹿智子、稲田俊也、山田光彦、内村直尚、伊豫雅臣、曾良一郎、尾崎紀夫、氏家寛、岩田仲生: NOS1 遺伝子多型とメタンフェタミン使用障害との関連解析. 第 31 回 日本生物学的精神医学会, 京都 [2009/4/25]
- 20) 岡久祐子、氏家寛、児玉匡史、高木学、小高辰也、中田謙二、稲田俊也、内村直尚、山田光彦、岩田仲生、伊豫雅臣、曾良一郎、尾崎紀夫、黒田重利: カンナビノイド CB1 受容体および CB2 受容体遺伝子多型と覚せい剤依存症の関連研究. 第 31 回 日本生物学的精神医学会, 京都 [2009/4/25]
- 21) 林崎誠二、平井志伸、伊東由美、本多芳子、有銘預世布、曾良一郎、児玉亨、岡戸晴生、高田昌彦: D5 ドーパミン受容体のドーパミントランスポーター機能への関与. *Neuroscience 2009* 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋 [2009/9/18]
- 22) 十川千春、十川紀夫、大山和美、花尻(木倉)瑠理、合田幸広、曾良一郎、北山滋雄: メチロンのモノアミントランスポーター阻害効果と細胞毒性. 第 116 回日本薬理学会近畿部会, 大津 [2009/11/13]
- 23) 石原佳奈、猪狩もえ、笠原好之、曾良一郎: メタンフェタミンによる行動感作へのセロトニン 1B 受容体の関与. 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, 京都[2009/11/14]
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

覚せい剤関連精神障害に対する治療法の研究

分担研究者：伊豫 雅臣^{1,2}

研究協力者：谷淵 由布子^{1,2}、藤田 有子²、橋本 謙二²

（¹千葉大学大学院医学研究院，²千葉大学社会精神保健教育研究センター）

[研究要旨]

覚せい剤関連精神障害の治療薬の開発を目的として、第二世代抗生物質ミノサイクリンの効果を検討した。場所嗜好試験より、ミノサイクリンが覚せい剤投与による依存形成を抑制する事が判った。さらに、覚せい剤関連精神障害患者に対してミノサイクリンが著効を示した症例を報告した。以上の結果より、ミノサイクリンは世界中で幅広く使用されている安全な薬剤（抗生物質）であるため、覚せい剤関連精神障害の新しい治療薬として期待されるであろう。

A. 研究目的

覚せい剤(Methamphetamine: METH)の乱用により依存が形成されるが、現在のところ、根本的に治療する薬剤は無い。私たちは、第二世代抗生物質の一つであるミノサイクリンが覚せい剤の投与によって引き起こされる様々な障害に対して治療効果を示すことを報告した(1-4)。今回我々はMETH投与による薬物依存におけるミノサイクリンの効果を検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

実験には9~12週齢のC57BL/6J雄性マウス(日本エスエルシー株式会社)を使用した。場所嗜好性試験(CPP)の測定は、Saline(10 ml/kg)あるいはミノサイクリン(40 mg/kg)を投与し30分後にMETH(1 mg/kg)あるいはSaline(10 ml/kg)を投与し、その後白または黒のボックスに30分間閉じ込め、条件付けを行った。薬物処置側ボックスの滞在時間から溶媒処置側ボックスの滞在時間を差し引いた値をCPPスコアとした。

C. 研究結果

場所嗜好性試験(CPP)より、METH投与による場所嗜好性の増加が観察され、ミノサイクリン(40 mg/kg)の前投与は、METH投与による場所嗜好性の増加を有意に抑制した。一方、ミノサイクリン単独投与は、生理食塩水投与群と同等であった(Figure 1)。

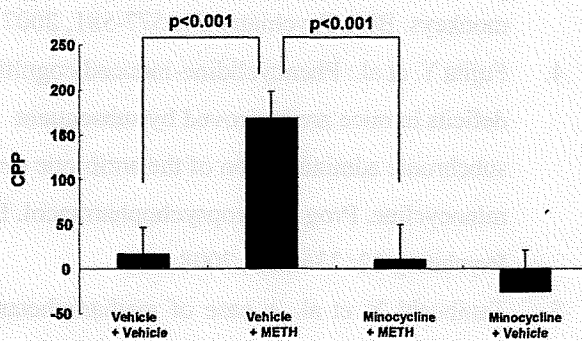


Figure 1. Effect of minocycline on development of dependence by repeated administration of METH

D. 考察

本研究の結果より、ミノサイクリンは覚せい剤

乱用によって引き起こされる覚せい剤依存の治療薬となる可能性が示唆された。さらに覚せい剤精神病患者におけるミノサイクリン投与による改善作用の症例を報告した (5)。

E. 結論

以上の結果より、ミノサイクリンは世界中で幅広く使用されている安全な薬剤（抗生物質）であるため、覚せい剤関連精神障害の新しい治療薬として期待されるであろう。

[参考文献]

1. Zhang L. et al. Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry* 30: 1381-1393, 2006.
2. Zhang L. et al. Protective effects of minocycline on MDMA-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. *Eur. J. Pharmacol.* 544: 1-9, 2006.
3. Hashimoto K. et al. Protective effects of minocycline on the reduction of dopamine transporters in the striatum after administration of methamphetamine: A PET study in conscious monkeys. *Biol. Psychiatry* 61: 577-581, 2007.
4. Fujita Y. et al.: Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the antibiotic drug minocycline. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32: 336-339, 2008.
5. Tanibuchi Y. et al. A case of methamphetamine use disorder treated with the antibiotic drug minocycline. *Gen. Hospital Psychiatry* in press, 2010.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Kanahara N, Miyatake R, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M, Hashimoto, K. Association study between the PIK4CA gene and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am. J. Med. Genet. Part B.* 2009; 150B: 233-238.
- 2). Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Mithramycin protects dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 2009; 1301: 189-196.
- 3). 橋本謙二、伊豫雅臣. 薬物依存症の脳画像研究と新しい治療法. *医学のあゆみ* 2009; 231: 1079-1082.
- 4). Tanibuchi Y, Shimagami M, Fukami G, Sekine Y, Iyo M, Hashimoto K. A case of methamphetamine use disorder treated with the antibiotic drug minocycline. *Gen. Hospital Psychiatry* 2010; in press.

2. 学会発表

1. 谷渕由布子、島上 寛、深見悟朗、関根吉統、伊豫雅臣、橋本謙二. 覚せい剤関連障害にミノサイクリンが奏功した一症例. 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学会. 2009年11月14日. 京都市.

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 発明の名称
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

乱用薬物による易再発性精神病様状態および依存症の予防・治療法開発に関する研究

分担研究者：西川 徹

研究協力者：平岡秀一、黒田安計、海野麻未、山本直樹、車地暁生
東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野

[研究要旨]

乱用薬物による精神障害の分子機構を明らかにする目的で、(1) phencyclidine (PCP)、ケタミン等のNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬による依存や精神病状態が小児期には生じにくいことや、(2) 実験動物において一定の発達期（生後21～25日：臨界期）以降に成熟期タイプの異常行動が生ずるようになることに注目し、PCP精神病関連候補分子として、ラットの脳において臨界期前後でPCPへの応答が異なる遺伝子を探索している。RAP-PCR、RT-PCR等により、シナプスの足場タンパクをコードするSAP97遺伝子の転写産物が、大脳新皮質において、PCP投与により臨界期後の生後50日には有意に増加するが臨界期前の生後8日には変化が見られないことがわかった。この増加は、NMDA受容体遮断薬dizocilpineでも認められたが、ドーパミン (DA) 作動薬・GABA作動薬・D1およびD2DA受容体遮断薬等では生じず、強いD2DA受容体遮断作用をもつ抗精神病薬haloperidolを前処置しても影響を受けなかった。これらの所見は、SAP97がPCP精神病に見られる抗精神病薬抵抗性の統合失調症様症状の病態に関与することを示唆しており、SAP97遺伝子やコード蛋白を含む分子カスケードが薬物性精神病状態に対する新しい予防・治療法開発の分子標的になる可能性がある。

A. 研究目的

本研究は、乱用が問題となっている覚醒剤（アンフェタミン、メトアンフェタミン (MAP) など）、コカインなどのドーパミン (DA) 作動薬や、フェンサイクリジン (PCP)、ケタミンなどのNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬による易再発性の統合失調症様精神病状態の分子機構を解明し、新しい治療法開発の標的となる神経機構や、臨床診断、経過、予後などのマーカー物質を見いだすことを目的としている。このため、1) DA 作動薬やNMDA 受容体遮断薬の精神機能に及ぼす影響が思春期前後では異なり、小児期までは依存形成や精神症状が生じ難いことが知られている^{8,10)}、2) 齧歯類では、上記の薬物が引き起こす行動変化お

よびその易再発性状態（逆耐性現象）がヒトの統合失調症型精神病状態のモデルと考えられているが、こうした行動異常は一定の生後発達期（臨界期）以降に見られるようになる⁹⁾、などの点に着目して分子生物学的研究を進めた。以上の事実は、これらの乱用薬物が惹起する依存あるいは精神病状態に特異的に関与する脳内情報処理系は、特定の発達段階に成熟して薬物の影響を受けるようになることを示唆している。実際、MAP やPCP投与ラットの脳の活動異常のパターンも生後発達に伴って変化し、上述した行動異常の臨界期頃から成熟期のパターンとなる^{8,9,11)}。したがって、こうした変化が著しい脳部位が、これらの薬物による精神障害に特異的に関与する情報処理系に

含まれる可能性が高い^{4,5,8,9,13}。

そこで、このような情報処理系を構築する分子群を明らかにするため、臨界期以後に、MAP³⁾やPCP^{4,13)}に対する応答性を獲得する遺伝子群を検索している。本年度は、PCP投与後の活動性異常の生後発達期における変化が最も顕著な部位のひとつである大脳新皮質から、PCPに発達依存的応答示す遺伝子として、SAP97 (synapse-associated protein 97) を検出し薬理的解析を行った²⁾。

B. 研究方法

今回報告した研究は、東京医科歯科大学の実験動物委員会の承認を得た上、倫理ガイドラインを遵守して行った。

1. 実験動物および薬物²⁾

動物実験には、生後8-50日令のWistar系雄性ラットを用いた。動物は25.0±0.5℃、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。PCPは山之内製薬(現、アステラス製薬)のご好意で合成・分与していただいた。そのほかの試薬は、すべて市販のものを用いた。

薬物投与は、皮下(s.c.)あるいは腹腔内(i.p.)への注射により行った。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

2. Differential cloning法によるPCP応答性遺伝子の検索²⁾

生後8日齢および50日齢のラットにPCPまたは生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamerによって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、SYBR Green I (Molecular Probes)で染色後、蛍光イメージアナライザー(FMBIO II, HITACHI)で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が

変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。さらに、RAP-PCRクローンに基づいてoligo dT-primed cDNAをクローニングし、対応する遺伝子の構造を解析した。

3. 遺伝子発現の定量的解析²⁾

上記のように調整した、ラット大脳新皮質cDNAを、10倍量のTE bufferで希釈した。このcDNA溶液5ulを以後の定量的PCRのテンプレートとして用いた。標的遺伝子の発現量補正のための内因性コントロールとしてはGAPDHを用いた。

FingerprintやDNAアレイによる結果を確認するため、5-7個体のRNAサンプルのプールからrandom hexamerを用いて合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下で対照群と薬物投与群の相対的な発現量を比較した。

このため、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28sの増幅のカイネティクスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。

また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCR⁹⁾を行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

RT-PCRには、次のように制限酵素作用部位挿入した(N*または下線部分)プライマーを用いた

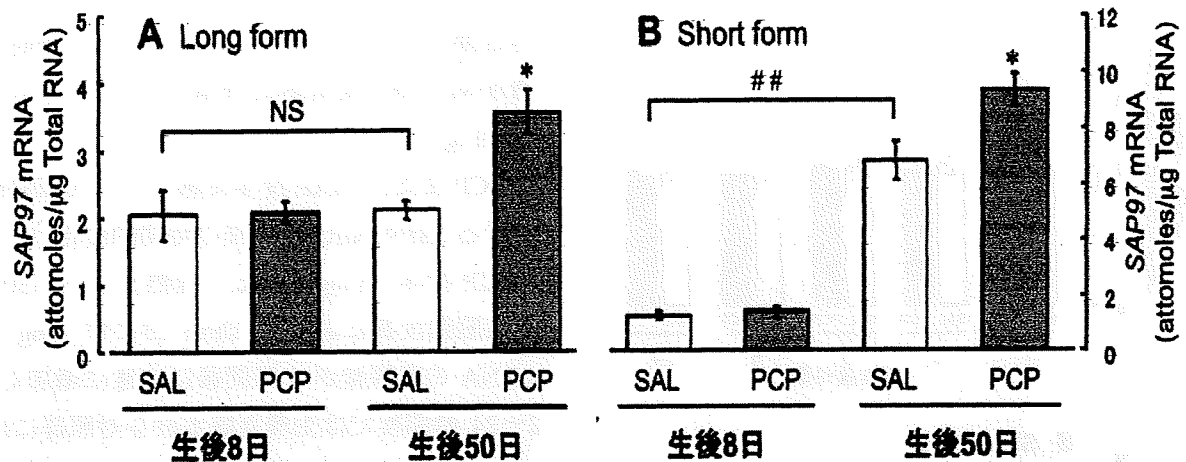


Fig1: 生後 8 日齢および 50 日齢ラットの大脳新皮質における PCP の *SAP97* mRNA 発現量に対する効果. SAL, saline

(short と long は cDNA 長の違いを示す) : *SAP97 long*, 制限酵素, *Xho I*; *SAP97 long sense 1* (5'-CTC-ACC-CAT-AAA-GCC-CAC-AGA-AG-3', nucleotides 922-944), *SAP97 long antisense 1* (5'-GTT-TCC-AAC-ACC-TCG*-AGC-AAT-G-3', nucleotides 1444-1465), *SAP97 long sense 2* (5'-GCA-TTG-CTC*-GAG-GTG-TTG-GAA-3', nucleotides 1443-1463), *SAP97 long antisense 2* (5'-CCA-AGT-ATG-AAG-ACG-GGC-TAA-CA-3', nucleotides 1738-1760); *SAP97 short*, 制限酵素, *Xho I*, *SAP97 short sense 1* (5'-ATC-TCA-CCC-ATA-AAG-GCA-AAT-C-3', nucleotides 920-934 flanked with 1034-1040), *SAP97 short antisense 1* (5'-GTT-TCC-AAC-ACC-TCG*-AGC-AAT-G-3', nucleotides 1444-1465), *SAP97 short sense 2* (5'-GCA-TTG-CTC*-GAG-GTG-TTG-GAA-3', nucleotides 1443-1463), *SAP97 short antisense 2* (5'-CCA-AGT-ATG-AAG-ACG-GGC-TAA-C-3', nucleotides 1739-1760).

4. 統計解析²⁾

データの統計的解析においては、2 群間の平均値の比較は Student's t-test または Cokran-Cox t-test を使って行った。多群間 (3 群以上) の比較には、

一元分散分析 (one-way ANOVA) にもとづく、多重比較 (Scheffe's test) を用いた。異なる日齢間における *SAP97* の PCP に対する反応の差異は、二元分散分析 (two-way ANOVA) により検討した。

C. 研究結果

1. PCP に対し発達依存的応答を示す遺伝子 *SAP97* のスクリーニング²⁾

DNA アレイにより、生後 8 日と 50 日における PCP (5mg/kg) および生理食塩水 (対照群) の投与 60 分後の各遺伝子発現量を比較し、50 日齢で増加指数 1.5 以上の変化を示し、8 日齢では変化を示さない転写産物をスクリーニングした。この結果、VGF, myelin-associated oligodendrocytic basic protein (MOBP), glutamate receptor interacting protein (GRIP) および *SAP97* が候補となり、成熟期における増加率が大きい *SAP97* を今回の解析対象とした。*SAP97* 遺伝子からは少なくとも 2 種のスプライシングバリエントが転写され、クローニングした cDNA 長の違いにより、「short form (short)」および「long form (long)」と名付けた。双方とも、L27、3 つの PDZ、SH3、および GK の各ドメインをもつタンパク質をコードすると推測された。

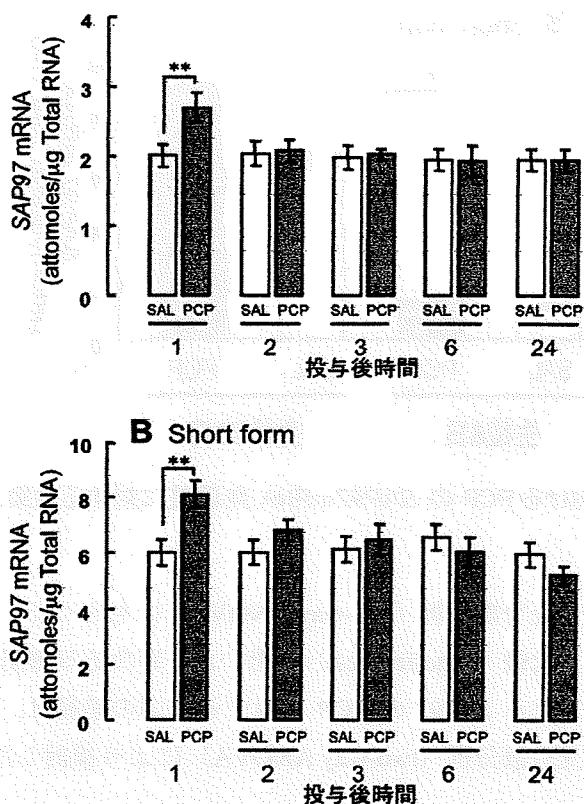


Fig.2: 生後 50 日齢ラットの大脳新皮質における PCP の *SAP97* mRNA 増加作用の時間経過

RT-PCR を用いた定量的解析から、PCP 投与後の *SAP97* mRNA の short および long は、成熟期に对照群のそれぞれ 169%・138%に達するのに対し、

幼若期では 102%・112%にとどまり、両時期間の増加率の差は統計的に有意であることがわかった (Fig.1)。

2. PCP または MAP 投与成熟ラット大脳親皮質における *SAP97* mRNA 発現の時間的変化²⁾

PCP 投与 (5 mg/kg, s.c.) 成熟ラット (50 日齢) の大脳親皮質において short および long *SAP97* mRNA の発現量が 1 時間後に有意に増加したが、2~24 時間後では生理食塩水投与对照群に比べて変化は見られなかった (Fig.2)。これに対して、MAP 投与 (4.8 mg/kg, s.c.) ラットの大脳親皮質では、*SAP97* mRNA の発現量は short・long とともに、いずれの時間においても有意な変化を示さなかった (データ省略)。

3. 異なる用量の PCP による成熟ラット大脳親皮質 *SAP97* mRNA 発現の変化²⁾

PCP 投与成熟ラット (50 日齢) における大脳親皮質 short および long *SAP97* mRNA 発現量の平均値は、10mg/kg の方が 5mg/kg より高かったが、両群間に統計的有意差認められなかった。

4. Dizocilpine, cocaine, pentobarbital, SCH23390 および haloperidol の成熟ラット大脳親皮質の *SAP97* mRNA 発現に与える影響²⁾

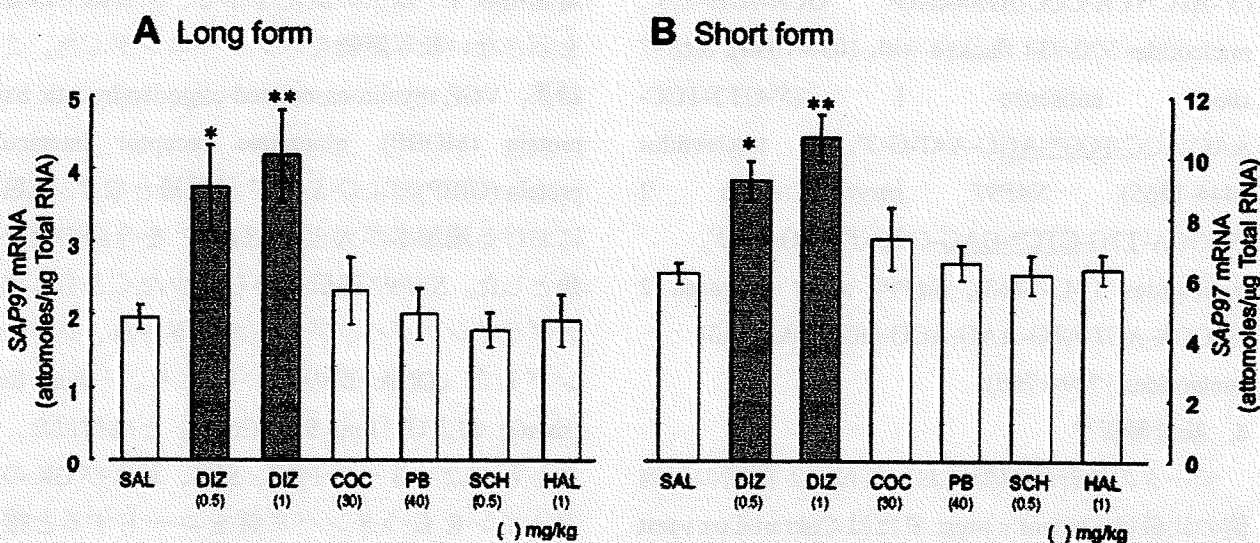


Fig.3: 生後 50 日齢ラットの大脳新皮質における *SAP97* mRNA の発現に対する種々の向精神薬の効果. 選択的 NMDA 受容体遮断薬 dizocilpine (DIZ) が有意に上昇させる. SAL, saline; COC, cocaine; PB, pentobarbital, SCH, SCH23390; HAL, haloperidol

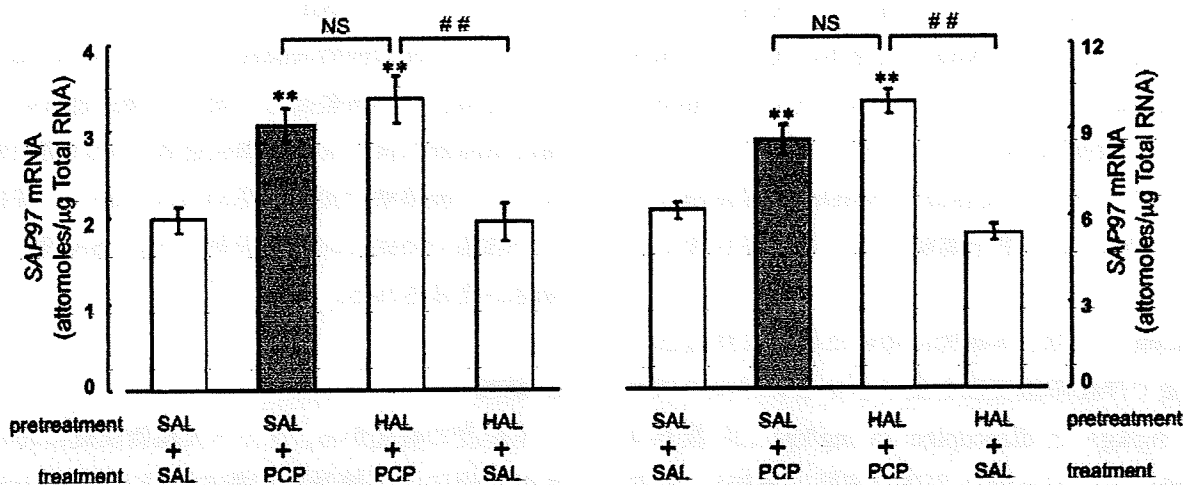


Fig.4: PCPを投与した生後50日齢ラットの大脳新皮質におけるSAP97 mRNAの増加はhaloperidol (HAL)の前処置により有意な影響を受けない. SAL: saline

成熟期ラットに NMDA 受容体の選択的な非競合的遮断薬 dizocilpine (0.5~1.0mg/kg) を投与した1時間後においては、大脳新皮質 short および long SAP97 mRNA は著明に増加したが (Fig.3)、間接的ドーパミン作動薬 cocaine (30 mg/kg)、GABAA 受容体作動薬の pentobarbital (40 mg/kg)、D1 型選択的 DA 受容体遮断薬の SCH23390 (0.5 mg/kg)、および D2 型優位の DA 受容体遮断薬 haloperidol (1 mg/kg) はいずれも short・long SAP97 mRNA の発現量に有意な影響を与えなかった (Fig.3)。
5. PCPによる成熟ラット大脳新皮質 SAP97 mRNA 発現の増加に対する haloperidol 前処置の影響²⁾

成熟ラットにおいて、PCP 投与30分前に haloperidol (1 mg/kg, i.p.) を前処置しても、PCP による short および long SAP97 mRNA の増加は影響を受けなかった (Fig.4)。

D. 考察

本研究により、以前から RNA arbitrarily primed PDR 法を用いて PCP に発達依存的応答を示す遺伝子候補として検出していた *prt1* (PCP-responsive transcript 1) が、SAP97 であり、cDNA の構造と薬理的反応性が明らかになった²⁾。この結果は、研究目的で述べた、精神異常発現薬に反応する神

経回路 (情報処理システム) の中に、一定の発達期に成熟するものがあるという仮説をさらに支持するとともに、その回路で作動する分子カスケードの構成因子群の手がかりを与えている。

前年度に報告したように、生後8日と50日の間でPCP投与後1時間における遺伝子の応答性に差があるのは、PCPの薬物動態の発達による違いを反映したものではない。すなわち、PCP投与後1時間において、生後8日ラットの脳で発現に変化がなく、生後50日には著明な発現誘導が見られる遺伝子は、生後8日に薬物投与後6時間まで観察しても、発現に変化は生じなかった¹³⁾。

SAP97 mRNA の発現誘導は、PCP が引き起こす DA 伝達亢進と関係する可能性もあるが、MAP、コカイン等の DA 作動薬が発現に影響せず、PCP 誘発性の SAP97 遺伝子応答が D2DA 受容体遮断薬では抑制されない点は、この可能性は支持されない。一方、本実験で、NMDA 受容体選択的遮断薬の dizocilpine が PCP と同様の SAP97 mRNA の増加作用をもち、(1)SAP97 がシナプスの足場タンパクとして、NMDA 受容体 GluN2A および GluN2B サブユニットと結合する²⁾、(2)この2つのサブユニットの脳内分布が発達に伴って著しく変化し臨界期頃に成熟期のパターンに近づく¹⁵⁾、等の報

告があることから、*SAP97* 遺伝子の発達依存的応答と、発達に伴う NMDA 受容体の変化との関連が示唆される。*SAP97* は AMPA・カイニン酸型グルタミン酸受容体と結合することも知られているため²⁾、これらの受容体と NMDA 受容体相互作用が *SAP97* の応答を調節している機序も考えられる。

Linden ら⁶⁾は、本研究に用いた用量よりはるかに大量で神経細胞変性を生じさせるレベルの PCP (15 mg/kg) と dizocilpine (5 mg/kg) が投与4時間後に *SAP97* mRNA が内嗅皮質で増加し、新皮質では変化しないことを報告した。こうした異常の発現は本実験より遅く、観察される脳部位も一致しないが、投与薬物の用量より、本実験における *SAP97* mRNA の変化が統合失調症様症状のモデルとしての異常行動と関係するのとは異なり、神経変性に関係していると推測される。

統合失調症患者の死後脳では、(a)*SAP97* タンパクが前頭前野では非神経精神疾患対照群に比して低下しているが海馬では変化がない¹⁴⁾、(b) 前頭前野の *SAP97* mRNA 発現量には差が見られない¹⁾、等の所見が報告され、代表的抗精神病薬の haloperidol を慢性投与したラットの脳では *SAP97* タンパクの発現が変化しないこと¹⁴⁾から、前頭前野の *SAP97* タンパクが統合失調症の病態に関与する可能性が指摘されている。また、私たちが最近ヒト血液から調整したゲノム解析を行ったところ、*SAP97* 遺伝子の SNP (一塩基多型) あるいはハプロタイプが統合失調症と相関している結果が得られた¹²⁾。

以上の研究結果と、本研究で、PCP が引き起こす *SAP97* mRNA 発現量の上昇に haloperidol が影響しない点を考え合わせると、*SAP97* は乱用薬物で生じる統合失調症様精神病状態の、抗精神病薬抵抗性症状の発症に関係する分子カスケードに含まれる可能性がある。Fingerprinting において、PCP への発達依存的応答が示唆された、VGF³⁾、

MOBP⁷⁾、および GRIP¹⁾の mRNA またはタンパクも、それぞれ精神病前駆症状をもつ患者の脳脊髄液、薬物依存の病歴をもつ統合失調症患者の背外側前頭前野白質、統合失調症患者の背外側前頭前野および後頭葉で変化が認められており、薬物依存の病態や発症における役割やその *SAP97* との関連が注目される。

E. 結論

本年度の研究から、ラット大脳新皮質において、乱用薬物による精神病状態や依存のモデルが成立しにくい離乳期前では、PCP に対して有意な応答を示さないが、これらのモデルとなる異常が見られる成熟期には PCP による発現誘導が生じる遺伝子 *SAP97* が検出された。成熟ラット大脳新皮質の *SAP97* mRNA は、PCP と同様に NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬であり、統合失調症様の陰性・陽性双方の症状を引き起こす dizocilpine でも発現増加が引き起こされたが、統合失調症様の陽性症状を引き起こす DA 受容体作動薬では有意な影響を受けず、本症の陽性症状を改善する抗精神病薬によって、PCP 誘発性の増加が抑制されなかった。以上の結果から、*SAP97* は乱用薬物が惹起する統合失調症様の陰性症状の発症に関与する可能性が示唆された。

[参考文献]

1. Dracheva, S., McGurk, S.R. and Haroutunian, V.: mRNA expression of AMPA receptors and AMPA receptor binding proteins in the cerebral cortex of elderly schizophrenics. *J. Neurosci. Res.* 79, 868-878, 2005.
2. Hiraoka S., Kajii Y., Kuroda Y. et al.: The development- and phencyclidine- regulated induction of synapse-associated protein-97 gene in the rat neocortex. *Eur Neuropsychopharmacol*, 20: 176-186, 2010.

3. Huang J.T., Leweke F.M., Tsang T.M., et al.: CSF metabolic and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PLoS One*. 2:e756, 2007.
 4. Ito T., Hiraoka S., Kuroda Y., et al.: Effects of schizophrenomimetics on the expression of the CCN1 (CYR 61) gene encoding a matricellular protein in the infant and adult neocortex of the mouse and rat. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 10, 717-725, 2007.
 5. Kajii Y., Muraoka S., Hiraoka S., et al.: A developmentally regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Molecular Psychiatry* 8, 434-444, 2003.
 6. Linden, A.M., Vasanen, J., Storvik, M., et al.: Uncompetitive antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors alter the mRNA expression of proteins associated with the NMDA receptor complex. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 98-105, 2001.
 7. Mitkus S.N., Hyde T.M., Vakkalanka R., et al.: Expression of oligodendrocyte-associated genes in dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 98:129-138, 2008.
 8. 西川 徹: 統合失調症の分子薬理学的解析—ドーパミン受容体および NMDA 受容体作用薬を用いたアプローチ— *脳* 21, 8: 9-15, 2005.
 9. Nishikawa T., Umino A., Kashiwa A., et al.: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. In: Toru M (Eds.), *Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders* (pp. 53-62). Tokyo: Excerpta Medica, 1993.
 10. Paus T., Keshavan M. and Giedd J.N.: Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci.* 9:947-957, 2008.
 11. Sato D., Umino A., Kaneda K., et al.: Developmental changes in distribution patterns of phencyclidine-induced c-Fos in rat forebrain. *Neuroscience Letters* 239, 21-24, 1997.
 12. Sato, J., Shimazu, D., Yamamoto, N., et al.: An association analysis of synapse-associated protein 97 (SAP97) gene in schizophrenia. *J. Neural Transm.* 115, 1355-1365, 2008.
 13. Takebayashi H., Yamamoto N., Umino A., et al.: Developmentally-regulated and thalamus-selective induction of *leiomodrin 2* gene by a schizophrenomimetic, phencyclidine, in the rat. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12: 1111-1126, 2009.
 14. Toyooka, K., Iritani, S., Makifuchi, T., et al.: Selective reduction of a PDZ protein, SAP97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J. Neurochem.* 83, 797-806, 2002.
 15. Watanabe M., Inoue Y., Sakimura K., et al.: Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138-1140, 1992.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表 2
1. 論文発表
[原著]
 1. Nagase Y, Uchiyam M, Kaneita Y, Li L, Kaji T, Takahashi S, Konno M, Mishima K, Nishikawa T, Ohida T. Coping strategies and their correlates with depression in the Japanese general population. *Psychiatry Research* 168: 57-66, 2009.
 2. Takebayashi H, Yamamoto N, Umino A, Nishikawa T. Developmentally-regulated and thalamus-selective induction of *leiomodrin 2* gene by a schizophrenomimetic, phencyclidine, in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 1111-1126, 2009.
 3. Hattori E, Toyota T, Ishitsuka Y, Iwayama Y, Yamada K, Ujike H, Morita Y, Kodama M, Nakata

- K, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Takei N, Mori N, Naitoh H, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Kato T, Nishikawa T, Kashiwa A, Suzuki M, Shioe K, Shinohara M, Hirano M, Nanko S, Akahane A, Ueno M, Kaneko N, Watanabe Y, Someya T, Hashimoto K, Iyo M, Itokawa M, Arai M, Nankai M, Inada T, Yoshida S, Kunugi H, Nakamura M, Iijima Y, Okazaki Y, Higuchi T, Yoshikawa T. Preliminary genome-wide association study of bipolar disorder in the Japanese population. *Am J Med Genet Part B (Neuropsychiatr Genet)* 150B: 1110-1117, 2009.
4. Hiraoka S, Kajii Y, Kuroda Y, Umino A, Nishikawa T. The development- and phencyclidine-regulated induction of synapse-associated protein-97 gene in the rat neocortex. *Eur Neuropsychopharmacol*, 20: 176-186, 2010.
5. Shioiri A, Kurumaji A, Takeuchi T, Matsuda H, Arai H, Nishikawa T. White matter abnormalities as a risk factor for postoperative delirium revealed by diffusion tensor imaging. *Am J Geriatric Psychiatry*, in press.
6. Okamoto N, Nakai T, Sakamoto K, Nagafusa Y, Higuchi T, Nishikawa T. Rapid antidepressant effect of ketamine anesthesia during electroconvulsive therapy of treatment-resistant depression: comparing ketamine and propofol anesthesia. *J ECT*, in press.

[総説]

1. 西川 徹. 統合失調症とグルタミン酸伝達系. *精神神経学雑誌*. 111: 859-867, 2009.
2. 西川 徹. Critical period. 特集1「統合失調症は神経発達障害か、神経変性疾患か?」. *脳* 21 12: 185-190, 2009.
3. 西川 徹.. D-セリンの脳機能の関与. 特集「D-アミノ酸の科学」. *BIOINDUSTRY*. 27: 13-20,

2010.

2. 学会発表

国際学会

1. Nishikawa T, Yamamoto N, Umino A, Kanematsu S, Fujihira T, Iwama H, Shimadu D, Hashimoto A, Kurumaji A. Regulation of extracellular D-Serine contents in the rat brain, The 1st International Conference of D-Amino Acid Research, Awaji, July 1, 2009.
2. Yamamoto N, Taniguchi G, Umino M, Umino A, Nishikawa T: Expression and characterization of D-serine-regulated genes in the rat cerebral cortex. The 1st International Conference of D-Amino Acid Research, Awaji, July 3, 2009.

国内学会：特別講演・シンポジウム

1. 西川 徹.. グルタミン酸伝達系からみた統合失調症の病態と治療薬開発. 特別講演 ジブレキサ米子学術講演会, 鳥取, 2009年4月10日.
2. 西川 徹. 脳のはたらきとこころの病. 第12回市民フォーラムー医学講座とピアノ演奏会ー, 東京医科歯科大学ピアノの会. 東京, 2009年6月13日.
3. 西川 徹. 新しい抗精神病薬開発戦略とその現状. 特別講演 第12回東北臨床精神薬理研究会. 仙台, 2009年7月18日.
4. 西川 徹. 神経発達から見た統合失調症—思春期発症の分子機構—. 教育講演 第105回日本精神神経学会学術総会, 神戸, 2009年8月23日.
5. 西川 徹. NMDA受容体-D-セリン系を標的とした新規統合失調症治療薬の開発. 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年11月13日.
6. 西川 徹. 統合失調症の病因論. 第19回地