

域精神保健講座, クボタ心理福祉研究所, 東京, 2009年11月27日.

7. 西川 徹. 抗精神薬はなぜ効くのか. 特別講演 第24回皮膚科心身医学研究会, 東京, 2010年2月14日

#### 国内学会：一般発表

1. 車地暁生, 西川 徹. マウス海馬における新環境ストレスに反応する分子機構の生後発達. 第52回日本神経化学会(伊香保)大会, 2009年6月23日.
2. 大島一成, 岡泰央, 吉池卓也, 石川洋世, 奥住祥子, 治徳大介, 光定博生, 稲垣美里, 森岡あすか, 正木秀和, 車地暁生, 西川 徹. 難治性のうつ状態を呈する患者に対する外来小集団精神療法の試み. 第105回日本精神神経学会学術総会, 神戸, 2009年8月21日.
3. 竹内 崇, 石川洋世, 吉池卓也, 藤田宗久, 上里彰仁, 行実知昭, 熱田英範, 西多昌規, 大島一成, 柏 淳, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹. 自殺関連行動によりERセンター救急科に入院した患者の抗うつ薬の服薬状況. 第105回日本精神神経学会学術総会, 神戸, 2009年8月22日.
4. 車地暁生, 大島一成, 行実知昭, 古田 光, 正木秀和, 熱田英範, 平沢俊行, 新垣 浩, 寺田倫, 川上礼子, 吉池卓也, 西多昌規, 藤田宗久, 上里彰仁, 西川 徹. 気分障害入院患者の精神診断学的研究. 第29回日本精神科診断学会, 東京, 2009年10月16日.
5. 車地暁生, 大島一成, 行実知昭, 古田 光, 正木秀和, 熱田英範, 平沢俊行, 新垣 浩, 寺田倫, 川上礼子, 吉池卓也, 柏 淳, 西川 徹. 気分障害入院患者の退院時における向精神薬に関する研究. 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. Yamamoto N, Tsutsui K, Yamamoto M, Arakaki H,

Kurumaji A, Nishikawa T: Adult-onset citrullinemia with repeated stereotyped behavior: a pitfall for antiepileptic drug usage. First Meeting of the Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 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14日

7. 竹内 崇, 上里彰仁, 藤田宗久, 筒井啓太, 片岡宗子, 白井聖子, 周山祐大, 熱田英範, 西多昌規, 行実知昭, 成島健二, 大島一成, 山本直樹, 車地暁生, 西川 徹. 手術前の精神科介入は術後せん妄の発症予防になりうるか. 第22回日本総合病院精神医学会総会, 大阪, 2009年11月28日.
8. 海野真一, 山本直樹, 荒木 誠, 海野麻未, 上里章仁, 車地暁生, 西川 徹. メトアンフェタミンを用いた統合失調症の分子病態への発達薬理学的アプローチ. 第5回日本統合失調症学会, 大阪, 2010年3月27日.

#### H 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

## 薬物依存における薬物再使用危険度評価尺度の開発と候補治療薬の探索

研究分担者：池田和隆<sup>1</sup>

研究協力者：高松幸雄<sup>1</sup>、大谷保和<sup>1</sup>、原口彩子<sup>1</sup>、西澤大輔<sup>1</sup>、笠井慎也<sup>1</sup>、小林徹<sup>2</sup>、妹尾栄一<sup>3</sup>、堀達<sup>4</sup>、氏家寛<sup>5</sup>、曾良一郎<sup>6</sup>

(<sup>1</sup> 東京都精神医学総合研究所・精神生物学研究分野、<sup>2</sup> 新潟大学脳研究所、<sup>3</sup> 東京都精神医学総合研究所・社会精神医学研究分野、<sup>4</sup> 長谷川病院、<sup>5</sup> 岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野、<sup>6</sup> 東北大学大学院医学研究科精神神経生物学分野)

### [研究要旨]

本研究では、薬物依存における薬物再使用リスクを客観的な指標によって評価するシステムを構築すると同時に、モデル動物を用いて薬物依存治療薬を探索し、最終的にこれらを組み合わせて、治療薬の開発・評価ならびに治療プログラムの改善を目指している。3年間の研究計画の最終年度である今年度は、開発した再使用リスク評価尺度を用いて、モデル動物において薬物依存治療効果が期待された治療薬の効果を、ヒトにおいて検討した。マウスにおいて、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)であるフルオキセチンとパロキセチンは覚せい剤嗜好性を減弱させたが、SSRIであるフルボキサミンは減弱させなかった。アフリカツメガエル卵母細胞実験系を用いてこれらのSSRIの作用機序を検討した結果、フルオキセチンとパロキセチンはG蛋白質活性型内向き整流性カリウム(GIRK)チャネルを阻害したが、フルボキサミンは阻害しなかった。また、動物において依存性物質に対する嗜好性を減弱させることが報告されている脳循環・代謝改善薬のイフェンプロジルもGIRKチャネルを阻害することが明らかになった。さらに、覚せい剤依存患者の遺伝子多型解析の結果、GIRKチャネル遺伝子多型が覚せい剤依存脆弱性と関連することが明らかになった。そこで、アルコール依存患者に対して、再飲酒リスク評価尺度を縦断的に実施し、処方されていた治療薬との関係を予備的に解析したところ、GIRK阻害能を持つ治療薬が投与されていた患者群では、他の患者群と比べて断酒率が向上する傾向が認められた。GIRK阻害能を有する薬物は、依存治療薬として期待できる。

### A. 研究目的

薬物乱用は、乱用者本人の精神を蝕むだけでなく、乱用者による通り魔などの凶悪事件の引き金や暴力団の資金源となるなど、多くの犯罪の温床となっており、極めて深刻な社会問題と言える。

日本における2002年新受刑者(31,355人)の中で、覚せい剤取締法違反者が、全体の21.6%(6,774人)を占めていることから、問題の大きさが窺える。また覚せい剤取締法違反者の半数は再犯者であり、覚せい剤乱用者の更正がいかに困難かを

示している。このように深刻な社会問題と化している薬物乱用に対して、行政・医療・研究・司法などが一体となって緊急に対策をとる必要がある。

しかしながら、日本において薬物依存症をターゲットとした治療には、①臨床評価を行う評価系の確立が不十分であるため、依存患者の重症度の診断・評価が担当医師の臨床経験のみに基づいて行われることが多く、統一的な評価に基づいた研究が進んでいない②依存症への薬物治療は覚せい剤精神病に伴う幻覚・妄想を抑制するものが中心であり、薬物依存の依存自体をターゲットにした薬物治療法が確立されていないという問題があった。

このような状況において、本研究では、基礎研究・臨床研究を組み合わせる形で研究を進めている。臨床研究としては、依存症重症度を評価する尺度や薬物再使用リスクを測定する尺度など、薬物依存症患者の状態評価に必要なシステムの開発および標準化を行い、このシステムを用いて依存症患者の状態を多面的・定量的に把握できるようにする(①)。一方基礎研究としては、薬物依存の基礎的なメカニズムを、遺伝子欠損マウスなどを用いた先端的な手法によって解明し(②)、この研究で得られた知見から、再使用を抑制する治療薬の候補をリストアップし、候補薬の治療効果を動物を用いて検討する(③)。その後最終的に、基礎研究と臨床研究の成果を組み合わせる新たな研究を行う。具体的には、依存症患者を対象として、依存症評価システムを用いた新候補治療薬の効果検討を行い、治療・再発予防プログラムの改善を目指す(④)。以上が本研究の大目的である。

3年間の研究計画の最終年度である今年度は、モデル動物において薬物依存治療効果が期待された治療薬のヒトにおける効果を、開発した再使用リスク評価尺度を用いて検討し、候補治療薬の有用性を明らかにすることを具体的な目的とし

た。

## B. 研究方法

### 1. 薬物条件付け場所嗜好性試験

#### (1) 実験動物

動物は、生後9週齢以降のC57BL/6J雄性マウス(日本クレア)を使用した。

#### (2) 化合物

メタンフェタミン(METH)は大日本製薬、フルオキセチンはトクリス、パロキセチンとフルボキサミンはトロントリサーチからそれぞれ購入した。

#### (3) 行動テスト

マウス用薬物条件付け場所嗜好性試験装置は、株式会社ニューロサイエンス社製のものを使用した。購入後1週間以上飼育したマウスを装置に入れ、2つの部屋の滞在時間を15分間測定した。翌日、同様の測定を行った。第3日に、20 mg/kgフルオキセチン、20 mg/kgパロキセチン、100 mg/kgフルボキサミンまたは生理食塩水を腹腔内投与し、1時間後にメタンフェタミン2 mg/kgを皮下投与し、装置の1方の部屋に50分間閉じ込めた。第4日に、同様にフルオキセチン、パロキセチン、フルボキサミンか生理食塩水を投与した後、1時間後に生理食塩水を皮下投与して、前日とは違う部屋に50分間閉じ込めた。第5,6日に第3,4日と同様の条件付けを行った。第7日に、20 mg/kgフルオキセチン、20 mg/kgパロキセチン、100 mg/kgフルボキサミンまたは生理食塩水を腹腔内投与し、1時間後に生理食塩水を腹腔内投与して、第1日目と同様に各部屋の滞在時間を測定した。薬物条件付けした部屋について、第2日目と第7日目の滞在時間を比較し(対応のあるt検定)、嗜好性を判定した。マウス群間の比較は繰り返しのある分散分析を行い、下位検定としてフィッシャーPLSDを行った。

## 2. アフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現実験

### (1) 特異的 mRNA の調製

GIRK1, GIRK2, GIRK4 サブユニットの全翻訳領域の塩基配列を PCR 法により増幅し、pSP35T ベクターに挿入した。制限酵素によって線状化させた後、mMESSAGE mMACHINE 生体外転写キットを用いて、それぞれ特異的な mRNA を合成した。

### (2) 電気生理学的解析

ステージ V または VI のアフリカツメガエル卵母細胞を卵巣より採取し、バース液に浸けてその後の操作を行った。結合組織を切り分けて卵母細胞を個別にして、GIRK1/GIRK2 または GIRK1/GIRK4 の組み合わせの mRNA を注入した（各サブユニットの量は卵当たり 0.4 ng）。卵母細胞は、0.8 mg/ml コラゲナーゼ処理後にフォリキュール膜を除去し、19°C でバース液中において 2-10 日間保管した。

電気生理学的解析には 2 電極電位クランプ法を用いた。膜電位は -70 mV とし、電極には 3 M KCl を充填した。卵母細胞を 0.05 ml の小さなチャンバーに入れ、高濃度カリウム液（hK 液：96 mM KCl, 2 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES）を 2.5 ml/min で還流した。

### (3) 化合物

フルオキセチン、フルボキサミン、パロキセチンはトクリスより、イフェンプロジルは RBI 社よりそれぞれ購入した。これらの試薬は、ジメチルスルフォキシドまたは蒸留水に溶解させ、-30°C で保管した。それぞれの試薬は、実験直前に hK 液で希釈して用いた。

## 3. 覚せい剤依存と遺伝子多型との関連解析

メタンフェタミン依存患者 208 名（ICD-10 の F15.2 と 15.5 を満たすもの）と健常者 360 名を対象とした。血液よりゲノム DNA を抽出し、

スタンダードな方法でゲノム DNA を抽出し、以後の解析に使用した。GIRK3 サブユニット遺伝子多型（C1339T）の近傍領域を、プライマー ttggggcaaatggagaagacacgag および ggacccctccctccatactggttt を用いて増幅し、遺伝子多型を判定した。

### （倫理面への配慮）

研究の実施にあたっては、厚生労働・文部科学・経済産業省合同の「ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守した。下記の項目の倫理的配慮を適切に行うために、研究実施計画書を作成し、共同研究機関の各倫理委員会の承認を受け、研究を進めた。

- 1) 試料等は匿名化し、個人情報機関の外部に持ち出すことを原則として禁止した。
- 2) 文書にて研究の目的および方法を十分に説明し了解を得た後、提供者の自由意思に基づき書面によるインフォームド・コンセントを得て試料等の提供を受けた。
- 3) 遺伝カウンセリングの体制を必要に応じて用意した。
- 4) 研究状況の定期報告・実地調査、半数以上の外部委員で構成される倫理審査委員会での研究計画の事前審査を行った。

## 4. アルコール依存患者における薬効評価

### (1) 研究計画

GIRK チャネル阻害能を持つ治療薬の投与・非投与（事後測定）を独立変数、2 回の断酒状況および再飲酒リスクの変動を従属変数とする混合モデルとした。

### (2) 研究参加者

東京都内のアルコール依存外来を有する専門病院（国立・精神神経センター武蔵病院）に通院するアルコール依存症患者のうち、研究協力に同意した 68 名が研究に参加した。このうち、継続的な質問紙への回答がなされないなどデータ上

不備のある 24 名を除いた 44 名を解析の対象とした。性別は男性 32 名、女性 12 名、平均年齢は 50.27 ± 11.04 歳であった。

### (3) 変数の測定

GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬（独立変数）：診療の中で処方された治療薬を医師の協力のもとに記録し、GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬を処方された群と処方されていなかった群に参加者を分類した。ここでは、パロキセチン、イフェンプロジル、ハロペリドールの 3 種を、GIRK チャンネル阻害能を持つ薬物としてカテゴリー化した。調査期間内の処方薬の投与量は一定だった。

断酒状況（従属変数）：各測定時点で飲酒が止まっているかどうかを、対象者本人の自己報告および担当医師からの聞き取りによって測定した。

再飲酒リスク（従属変数）：各測定時点でどのくらい再飲酒のリスクが高いかどうかを、アルコール再飲酒リスク尺度 (Alcohol Relapse Risk Scale: ARRS; [文献 1]) を用いて測定した。ARRS は 36 項目から構成される 3 件法の Likert 尺度であり、刺激脆弱性、感情面の問題、飲酒への衝動性、飲酒へのポジティブ期待、酒害認識不足の 5 下位尺度から構成される。

### (4) 手続き

同意を得た参加者に、約 60 日間を空けて、2 回

自己報告式の質問紙調査を行った。1 回目と 2 回目の測定の際に、断酒状況、再飲酒リスク、過去 30 日のストレスイベントの有無、Visual Analogue Scale による飲酒への渴望感を併せて測定した。質問紙への回答の際には臨床心理士 1 名が立ち会った。同時に、調査期間中に参加者に処方されている薬物の記載、および参加者の断酒状況を担当医師が記録した。

## C. 研究結果

### 1. 薬物条件付け場所嗜好性試験

曾良らは、ドーパミントランスポーター欠損マウスがコカイン嗜好性を示し、この嗜好性はさらにセロトニントランスポーターを欠損あるいは半減させることで消失することを報告している [文献 2]。ドーパミントランスポーター欠損マウスは、ドーパミン神経伝達が亢進しており、依存性薬物を摂取した時と類似していることを考慮すると、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) によってセロトニントランスポーターの機能を抑制することによって中枢刺激薬への嗜好性が減弱される可能性が考えられる。そこで、薬物条件付け場所嗜好性試験を行ったところ、SSRI であるフルオキセチン (商品名：プロザック) とパロキセチン (商品名：パキシル) の前処置により、覚せい剤 (メタンフェタミン) に対する嗜好性が消

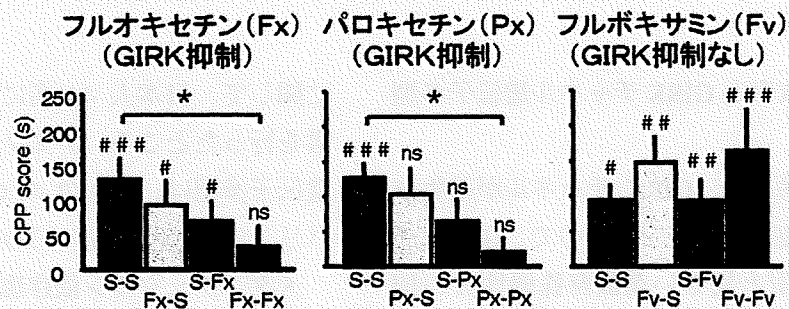


Fig. 1 : SSRI の種類による覚せい剤嗜好性減弱効果の違い  
薬物条件付け場所嗜好性試験におけるメタンフェタミン嗜好性 (CPP score)。条件付け前とテスト前の生理食塩水投与群 (S-S)、条件付け前の SSRI とテスト前の生理食塩水投与群 (Fx-S, Px-S, Fv-S)、条件付け前の生理食塩水とテスト前の SSRI 投与群 (S-Fx, S-Px, S-Fv)、条件付け前とテスト前の SSRI 投与群 (Fx-Fx, Px-Px, Fv-Fv)。

失することを見出した (Fig. 1)。セロトントランスポーター阻害能を有する化合物は薬物依存治療薬の候補として考えられる。

一方、フルオキセチンやパロキセチンと同じ SSRI に分類されるフルボキサミン (商品名: ルボックス、デプロメール) には、メタンフェタミン嗜好性を減弱させる効果が見られないことを見出した (Fig. 1)。このことは、セロトントランスポーター以外の分子も薬物嗜好性減弱効果に関与することを示唆している。

## 2. アフリカツメガエル卵母細胞実験系

我々は、G 蛋白質活性化型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネルがモルヒネやアルコールの作用機序において重要な役割を果たすことを報告

してきた [文献 3]。また、GIRK チャネル遺伝子欠損マウスでは、コカインの自己投与が消失することが報告されている [文献 4]。そこで、SSRI の GIRK チャネルへの作用をアフリカツメガエル卵母細胞実験系で電気生理学的に解析したところ、フルオキセチンとパロキセチンには GIRK 阻害能があるが、フルボキサミンには無いことを見出した (Fig. 2)。さらに、依存性薬物への嗜好性を減弱させることが知られている脳循環・代謝改善薬のイフェンプロジル (商品名: セロクラール) [文献 5] も GIRK チャネルを阻害することを見出した。以上より、GIRK チャネル阻害能を有する化合物が薬物依存の候補治療薬になる可能性が考えられた。

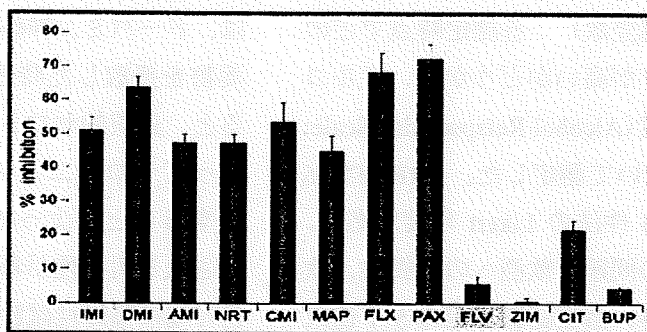


Fig. 2: 各種抗うつ薬のGIRK1/GIRK2チャネル阻害能

アフリカツメガエル卵母細胞実験系による解析の結果。各試薬の濃度は100  $\mu$ M。  
IMI: イミプラミン、DMI: デシプラミン、AMI: アミトリプチリン、NRT: ノルトリプチリン、  
CMI: クロミプラミン、MAP: マプロチリン、FLX: フルオキセチン、PAX: パロキセチン、  
FLV: フルボキサミン、ZIM: ジメリジン、CIT: シタロプラム、BUP: プロピオン

## 3. 覚せい剤依存と GIRK チャネル遺伝子多型との関連解析

上記の実験結果より、GIRK チャネルが薬物依存と関連する可能性が考えられたので、GIRK チャネル遺伝子多型と覚せい剤依存脆弱性との関連を解析した。GIRK チャネルサブユニットは、GIRK1 から GIRK4 まで 4 つが知られており、その内 GIRK1 から GIRK3 の 3 つは脳での発現が強い。そこで、GIRK1 から GIRK3 の 3 つの遺伝子

に関して、日本人 48 名における遺伝子多型の検索を行ったところ、アミノ酸配列の差異を生じる遺伝子多型は、GIRK3 の C1339T (アラニンからバリンに変わる多型) のみであった。

メタンフェタミン依存患者群は、健常者群に比べて、非同義置換である GIRK3 サブユニット遺伝子多型 (C1339T) のマイナーアレル (T) 頻度が有意に高かった (Table 1)。

Table 1

健常者とメタンフェタミン依存患者における  
GIRK3 C1339T多型の遺伝子型及び対立遺伝子頻度の比較

遺伝子多型名: GIRK3 C1339T						
サンプル名	(サンプル数)	遺伝子型頻度(%)			対立遺伝子頻度	
		C/G	C/T	T/T	C	T
健常者	(360)	207	133	20	0.760	0.240
		(57.5%)	(36.9%)	(5.6%)		
メタンフェタミン 依存患者	(208)	104	81	23	0.695	0.305
		(50.0%)	(38.9%)	(11.1%)		

\* (P=0.034)      \* (P=0.017)

また、GIRK チャンネル遺伝子多型と覚醒剤精神病遷延化に関する薬物感受性との相関を調べるため、覚醒剤精神病が遷延化（1ヶ月以上）した患者群と健常者群とを比較した。その結果を Table 2 に示す。ここで、メタンフェタミン依存患者を、妄想・幻覚の持続時間が1ヶ月未満であった早期

消退型と、妄想・幻覚の持続時間が1ヶ月以上であった遷延・持続型の2群に分類した。Table 2 から分かるように、遺伝子多型(C1339T)に関して、遺伝子型頻度およびアレル頻度のいずれにおいても顕著な頻度差が認められた。

Table 2

健常者と妄想・幻覚の持続時間により分類したメタンフェタミン依存患者における  
GIRK3 C1339T多型の遺伝子型及び対立遺伝子頻度の比較

遺伝子多型名: GIRK3 C1339T						
サンプル名	(サンプル数)	遺伝子型頻度(%)			対立遺伝子頻度	
		C/G	C/T	T/T	C	T
健常者	(360)	207	133	20	0.760	0.240
		(57.5%)	(36.9%)	(5.6%)		
メタンフェタミン 依存患者	妄想・幻覚の持続時間 早期消退型 (105)	55	43	7	0.729	0.271
	(52.4%)	(41.0%)	(6.7%)			
	遷延・持続型 (70)	34	23	13	0.650	0.350
	(48.6%)	(32.9%)	(18.6%)			

\* (P=0.0009)      \* (P=0.0066)

#### 4. アルコール依存患者における GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬の効果の検討

上記の研究より候補治療薬として選定された GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬が、アルコール依存患者において再飲酒を抑制するか否かを、

我々が開発した尺度[文献 1, 6]などを用いて評価した。アルコール依存外来患者 44 名を対象に、約 60 日間隔を空けて処方薬、飲酒状況、再発リスクを測定する探索的な縦断調査を行った。

繰り返しのある分散分析の結果、GIRK チャン

ル阻害能を持つ治療薬の非投与群 (N = 32) では 3 ヶ月後の断酒率が低下したのに対して、GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬 (パロキセチン、イフェンプロジル、ハロペリドール) の投与群 (N = 12) では約 60 日後の断酒率が上昇する傾向が認められた ( $p < .10$ ) (Fig. 3)。なお、他の処方薬を事後分類して [抗うつ剤 (SERT ブロッカー)、抗精神病薬 (ドーパミンブロッカー)、抗不安剤、抗酒剤]、断酒率に及ぼす影響も検討したが、GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬のような断酒率上昇効果は確認できなかった。

再発リスクについては、酒害認識不足においてのみ、断酒率と同様のパターンが認められ、GIRK チャンネル阻害能を持つ治療薬による抑制効果が確認できた ( $p < .05$ )。また、同時に測定した各回の断酒状況と ARRS 平均および下位尺度の刺激脆弱性と酒害認識不足との間に関連する傾向が認められ ( $r_s = .287-.342$ )、尺度と再飲酒が連動している可能性が示唆された。

以上より、動物実験で得られた GIRK チャンネル阻害能仮説に矛盾しない予備的知見が臨床現場においても得られ、候補薬の薬効評価に向けた次

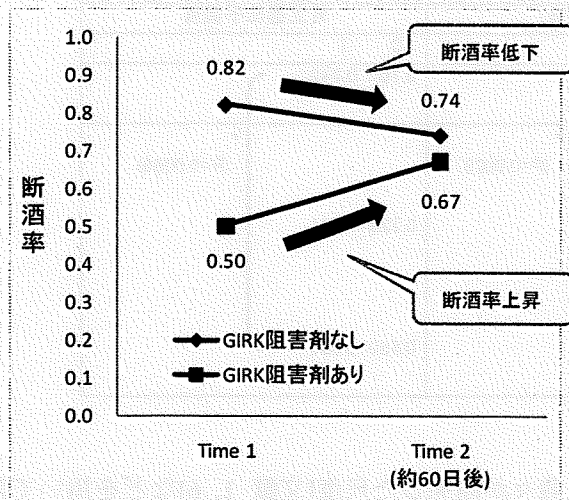


Fig. 3 : GIRK 阻害能を持つ治療薬の投与群での断酒率の上昇

なるステップへの展望が得られた。

#### D. 考察

今回の研究により、GIRK チャンネルサブユニットの遺伝子多型が覚せい剤依存脆弱性と関連することが示唆された。また、GIRK チャンネル阻害能を有するフルオキセチンとパロキセチンは、マウスにおける覚せい剤嗜好性を減弱させたが、GIRK チャンネル阻害能を持たないフルボキサミンには、覚せい剤嗜好性を減弱させる効果は認められなかった。依存性薬物嗜好性を減弱させることが知られているイフェンプロジルが GIRK チャンネルを阻害することも今回明らかになった。さらに、GIRK チャンネル阻害能を有するパロキセチンやイフェンプロジルなどを処方されているアルコール依存患者群では、処方されていない患者群と比べて、断酒率が上昇する傾向が認められた。これら一連の研究結果は、GIRK 阻害能を有する薬物が、薬物依存の治療薬として期待できることを示唆している。GIRK チャンネルの特異的な阻害薬はまだ開発されていないが、開発されれば、薬物依存治療における GIRK チャンネルの役割の解明や、新規薬物依存治療薬の開発に繋がると考えられる。

#### E. 結論

GIRK チャンネル阻害能を有する薬物は、薬物依存に対して治療効果を発揮する可能性が考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Ogai Y, Yamashita M, Endo K, Haraguchi A, Ishibashi Y, Kurokawa T, Muratake T, Suga R, Hori T, Umeno M, Asukai N, Senoo E, Ikeda K.: Application of the relapse risk scale to alcohol-dependent individuals in Japan: comparison with stimulant abusers. *Drug Alcohol Depend* 101:20-26, 2009.



- 2) Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR.: Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 98:5300-5305, 2001.
- 3) Kobayashi T, Ikeda K.: G protein-activated inwardly rectifying potassium channels as potential therapeutic targets. **Curr Pharm Des**, 12:4513-4523, 2006.
- 4) Morgan AD, Carroll ME, Loth AK, Stoffel M, Wickman K.: Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. **Neuropsychopharmacology** 28:932-938, 2003.
- 5) Suzuki T, Kato H, Tsuda M, Suzuki H, Misawa M.: Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ifenprodil on the morphine-induced place preference in mice. **Life Sci** 64:PL151-156, 1999.
- 6) Ogai Y, Haraguchi A, Kondo A, Ishibashi Y, Umeno M, Kikumoto H, Hori T, Komiyama T, Kato R, Aso K, Asukai N, Senoo E, Ikeda K.: Development and validation of the stimulant relapse risk scale for drug abusers in Japan. **Drug Alcohol Depend** 88:174-181, 2007.

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Kobayashi, T., Washiyama, K., Ikeda, K.: Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by the selective norepinephrine reuptake inhibitors atomoxetine and reboxetine. **Neuropsychopharmacology**, in press.
2. Ide, S., Sora, I., Ikeda, K., Minami, M., Uhl, GR., Ishihara, K.: Reduced emotional and corticosterone responses to stress in mu-opioid receptor knockout mice. **Neuropharmacol**, 58:241-247 (2010)
3. Koide, T., Catanesi, CI., Nishi, A., Shiroishi, T., Kasai, S., Ikeda, K., Takahashi, A.: Systematic mapping of pain-related QTL using consomic mouse strains: Advantage of using wild-derived strains. **Brain Res J**, 2(4):231-250 (2009)
4. Watanabe, T., Ogai, Y., Koga, T., Senoo, E., Nakamura, K., Mori, N., Ikeda, K.: Assessment of Japanese stimulant control law offenders using the Addiction Severity Index-Japanese version: comparison with patients in treatment settings. **Int J Environ Res Public Health**, 6:3056-3069 (2009)
5. Fukuda, K., Hayashida, M., Ide, S., Saita, N., Kokita, Y., Kasai, S., Nishizawa, D., Ogai, Y., Hasegawa, J., Nagashima, M., Tagami, M., Komatsu, H., Sora, I., Koga, H., Kaneko, Y., Ikeda, K.: Association between OPRM1 gene polymorphisms and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. **Pain**, 147:194-201 (2009)
6. Nishizawa, D., Nagashima, M., Katoh, R., Satoh, Y., Tagami, M., Kasai, S., Ogai, Y., Han, W., Hasegawa, J., Shimoyama, N., Sora, I., Hayashida, M., Ikeda, K.: Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. **PLoS ONE**, 4:e7060 (2009)
7. Haraguchi, A., Ogai, Y., Senoo, E., Saito, S., Suzuki, Y., Yoshino, A., Ino, A., Yanbe, K., Hasegawa, M., Murakami, M., Murayama, M., Ishikawa, T., Higuchi, S., Ikeda, K.: Verification of the addiction severity index Japanese version

- (ASI-J) as a treatment-customization, prediction, and comparison tool for alcohol-dependent individuals. *Int J Environ Res Public Health*, 6:2205-2225 (2009)
8. Kobayashi, T., Washiyama, K., Ikeda, K.: Pregnenolone sulfate potentiates the inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir2.3. *PLoS ONE*, 4:e6311 (2009)
  9. Yasumoto, S., Tamura, K., Karasawa, J., Hasegawa, R., Ikeda, K., Yamamoto, T., Yamamoto, H.: Inhibitory effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the vesicular monoamine transporter 2. *Neurosci Lett*, 454:229-232 (2009)
  10. Ogai, Y., Yamashita, M., Endo, K., Haraguchi, A., Ishibashi, Y., Kurokawa, T., Muratake, T., Suga, R., Hori, T., Umeno, M., Asukai, N., Senoo, E., Ikeda, K.: Application of the relapse risk scale to alcohol-dependent individuals in Japan: comparison with stimulant abusers. *Drug Alcohol Depend*, 101:20-26 (2009)
  11. Kobayashi, T., Hirai, H., Iino, M., Fuse, I., Mitsumura, K., Washiyama, K., Kasai, S., Ikeda, K.: Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying  $K^+$  channels. *Neuropharmacology*, 56:499-506 (2009)
  12. Asada, M., Ebihara, S., Numachi, Y., Okazaki, T., Yamanda, S., Ikeda, K., Yasuda, H., Sora, I., Arai, H.: Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter. *Int J Cancer*, 123:511-518 (2008)
  13. 青木淳, 林田眞和, 田上恵, 長島誠, 福田謙一, 西澤大輔, 大谷保和, 笠井慎也, 池田和隆, 岩橋和彦: 開腹手術の術後鎮痛における鎮痛薬必要量と5-HT<sub>2A</sub>受容体遺伝子多型との関連研究. *臨床精神薬理*, 12:1159-1164 (2009)
- (2) 総説
    1. Sora, I., Li, B., Igari, M., Hall, FS., Ikeda, K.: Transgenic mice in the study of drug addiction and the effects of psychostimulant drugs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, in press.
    2. Sora, I., Li, B., Fukushima, S., Fukui, A., Arime, Y., Kasahara, Y., Tomita, H., Ikeda, K.: Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants. *Int Rev Neurobiol*, 85:29-33 (2009)
    3. 池田和隆: 痛みと鎮痛における個人差の遺伝子メカニズム. *医学のあゆみ*, 232(1):38-42 (2009)
    4. 森山彩子, 西澤大輔, 池田和隆: 痛みや鎮痛における個人差の遺伝的要因. *日本緩和医療薬学雑誌*, 2:99-110 (2009)
    5. 井手聡一郎, 南雅文, 池田和隆: ブトルファノールの鎮痛効果とオピオイド受容体. *生体の科学*, 60:456-457 (2009)
    6. 青木淳, 池田和隆, 岩橋和彦: セロトニン受容体遺伝子多型と鎮痛薬感受性. *麻酔*, 58:1130-1135 (2009)
    7. 井手聡一郎, 南雅文, 池田和隆: ATP受容体遺伝子多型と疼痛感受性. *麻酔*, 58:1122-1129 (2009)
    8. 曾良一郎, 小松浩, 猪狩もえ, 池田和隆, 下山直人: 遺伝子多型とオピオイドの副作用. *麻酔*, 58:1109-1111 (2009)
    9. 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆: 口腔外科手術の術後痛管理におけるオピオイド必要量の多様性—ミューオピオイド受容体の多型は影響を与えるか—. *麻酔*, 58:1102-1108 (2009)
    10. 西澤大輔, 長島誠, 佐藤泰雄, 田上恵, 池田和隆: 遺伝子多型と疼痛感受性, オピオイド

感受性—基礎および臨床のデータから—。麻酔, 58:1093-1101 (2009)

11. 曾良一郎, 福井麻美, 池田和隆, 笠原好之: Atomoxetine のプロフィールと薬理作用. 臨床精神薬理, 12:1951-1956 (2009)
12. 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)
13. 山本秀子, 高松幸雄, 池田和隆: 依存治療薬とマーカーの探索. Medical Bio, 6:42-47 (2009)
14. 池田和隆: 総論 依存症の生物学:最近の最新展開—特集にあたって. Medical Bio, 6:14-17 (2009)
15. 曾良一郎, 笠原好之, 内海修, 久保有美子, 富田博秋, 池田和隆: AD/HD の遺伝要因解明の現状. 分子精神医学, 9:262-267 (2009)
16. 高松幸雄, 池田和隆: 分子精神医学からみた覚せい剤依存症の治療薬に関する展望. 最新精神医学, 14:113-120 (2009)

### (3) 著書

1. Nishizawa, D., Hayashida, M., Nagashima, M., Koga, H., Ikeda, K.: Genetic polymorphisms and human sensitivity to opioid analgesics. In: Methods in Molecular Biology (Arpad Szallasi, ed), The humana press Inc., Totowa, in press.
2. Ide, S., Minami, M., Sora, I., Ikeda, K.: Combination of cell culture assays and knockout mouse analyses for the study of opioid partial agonism. In: Methods in Molecular Biology (Arpad Szallasi, ed), The humana press Inc., Totowa, in press.
3. Koide, T., Citanesi, C.I., Nishi, A., Shiroishi, T., Kasai, S., Ikeda, K., Takahashi, A.: Advantage of using wild-derived mouse strains for a variety of

pain-related studies: Genetic diversity and new genetic tools. In: Acute Pain (Sam D'Alonso, Katherine L. Grasso, ed), pp79-99. Nova Science Publishers, New York, 2010.

4. Kobayashi, D., Nishizawa, D., Kasai, S., Hasegawa, J., Nagashima, M., Katoh, R., Satoh, Y., Tagami, M., Hayashida, M., Fukuda, K., Ikeda, K.: Association between analgesic requirements after major abdominal surgery and polymorphisms of the opioid metabolism-related gene *ABCB1*. In: Acute Pain (Sam D'Alonso, Katherine L. Grasso, ed), pp101-110. Nova Science Publishers, New York, 2010.
5. Nishizawa, D., Kobayashi, T., Ikeda, K.: Potassium channels. In: Peripheral receptor targets for analgesia: Novel approaches to pain treatment (Brian E. Cairns, ed), pp93-110. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, 2009.
6. 林田眞和, 池田和隆: ミューオピオイド受容体遺伝子とオピオイド感受性—癌性疼痛オピオイド治療の将来へ向けて. In: 癌性疼痛 (花岡一雄編). 克誠堂出版, 東京, in press.
7. 池田和隆: 心の分子メカニズムの探索: 気持ちよさの生まれ方. In: こころの働きと病・覚醒剤(NPO 法人脳の世紀推進会議編), pp7-44. 株式会社クパプロ, 東京, 2010.

## 2. 学会発表

### (1) 国際学会

1. Nishizawa, D., Nagashima, M., Katoh, R., Satoh, Y., Tagami, M., Kasai, S., Ogai, Y., Han, W., Hasegawa, J., Shimoyama, N., Sora, I., Hayashida, M., Ikeda, K.: Association between *GIRK2* gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. The 1st Meeting of Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan

- [2009/11/14].
2. Takamatsu, Y., Shiotsuki, H., Kasai, S., Sato, S., Hattori, N., Ikeda, K.: Parkin knockout mice show enhanced MDMA-induced hyperthermia. The 1st Meeting of Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan [2009/11/13].
  3. Han, W., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Endo, S., Shira, T., Kojima, N., Ikeda, K.: Involvement of the inducible cAMP early repressor (ICER) gene in behavioral sensitization to methamphetamine. The 1st Meeting of Asian College of Neuropsychopharmacology, Kyoto, Japan [2009/11/13].
  4. Nishizawa, D., Fukuda, K., Kasai, S., Han, W., Hasegawa, J., Nishi, A., Koga, M., Arinami, T., Hayashida, M., Ikeda, K.: A genome-wide association study on opioid analgesic sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, Honolulu, USA [2009/10/22].
  5. Hagino, Y., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Iwamura, T., Murphy, DL., Uhl, GR., Sora, I., Ikeda, K.: Effect of MDMA on extracellular dopamine and serotonin levels in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  6. Yamamoto, H., Takamatsu, Y., Imai, K., Kamegaya, E., Hagino, Y., Watanabe, M., Yamamoto, T., Sora, I., Koga, H., Ikeda, K.: Reduced expression of MOP in the frontal cortex after long-term methamphetamine withdrawal was restored by chronic post-treatment with fluoxetine. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  7. Kasai, S., Yamamoto, H., Kamegaya, E., Uhl, GR., Sora, I., Watanabe, M., Ikeda, K.: Mu-opioid peptide receptors (MOPs) are detected as broad bands around 65 kDa in western blotting: analyses using MOP knockout mice. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  8. Kobayashi, T., Nishizawa, D., Ikeda, K.: Inhibition of GIRK channels by phencyclidine. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  9. Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Hagino, Y., Markou, A., Ikeda, K.: The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine conditioned place preference in mice. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  10. Takamatsu, Y., Shiotsuki, H., Kasai, S., Sato, S., Hattori, N., Ikeda, K.: Enhanced hyperthermia induced by MDMA in parkin knockout mice. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].
  11. Nishizawa, D., Gajya, N., Ikeda, K.: Identification of selective agonists and antagonists to G protein-activated inwardly

rectifying potassium channels: candidate medicines for drug dependence and pain. The Second Annual International Drug Abuse Research Society and International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, Seoul, Korea [2009/08/18-19].

12. Ogai, Y., Kakibuchi, Y., Senoo, E., Ikeda, K.: Influences of medicines, stress events, and narcissistic personality on relapse risk in Japanese alcohol-dependent inpatients. The College on Problems of Drug Dependence 71st Annual Meeting, Reno, USA [2009/06/23].

## (2) 国内学会

13. Han, W., Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Endo, S., Shirao, T., Kojima, N., Ikeda, K.: Regulation of methamphetamine-induced locomotor sensitization and gene expression by ICER. 研究交流会 首都大バイオコンファレンス 2009, 八王子 [2009/11/06].
14. 池田和隆: 痛み感受性および鎮痛薬感受性における個人差の遺伝子メカニズム。「感覚刺激・薬物による快・不快情動生成機構とその破綻」平成 21 年度生理学研究所研究会, 岡崎 [2009/10/02].
15. 西澤大輔, 福田謙一, 笠井慎也, 韓文華, 長谷川準子, 西明紀, 古賀農人, 有波忠雄, 林田眞和, 池田和隆: ゲノムワイド関連解析によるオピオイド鎮痛薬感受性関連遺伝子多型の網羅的探索. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京 [2009/09/24].
16. 曾良一郎, 池田和隆: ニコチン依存とその他の薬物依存における遺伝要因の共通点と相違点. 第 12 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム, 平成 21 年度合同学術総会, 横浜

[2009/09/08].

17. 池田和隆: 覚せい剤及びメチルフェニデートの乱用. 日本健康科学学会第 25 回学術大会, 東京 [2009/08/30].
18. 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枢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 [2009/07/07].
19. 池田和隆, 高松幸雄, 萩野洋子, 曾良一郎: AD/HD モデル動物における報酬系機能障害. 第 51 回日本小児神経学会総会 夜間集会, 米子 [2009/05/29].

## H 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称: POMC 遺伝子解析による薬物感受性の評価方法  
2007 年 04 月 25 日出願 (特願 2007-114968)  
2008 年 04 月 25 日 PCT 出願 (PCT-JP2008-058083)  
2009 年 10 月 23 日出願 (特願 2009-511918)  
出願人: 財団法人東京都医学研究機構 東京都精神医学総合研究所  
発明者: 池田和隆, 笠井慎也, 林田眞和, 樋口進

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 薬物依存の新たな治療開発のための候補分子の探索

### NMDA 受容体遺伝子, GRIN1, 2A, 2B の覚せい剤精神病での解析

分担研究者：氏家 寛<sup>1,2</sup>

研究協力者：岡久祐子<sup>1</sup>, 小高辰也<sup>1</sup>, 高木 学<sup>1</sup>, 近藤直樹<sup>2</sup>, 元 武俊<sup>2</sup>, 稲田俊也<sup>2</sup>, 山田光彦<sup>2</sup>, 曾良一郎<sup>2</sup>, 岩田仲生<sup>2</sup>, 伊豫雅臣<sup>2</sup>, 尾崎紀夫<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野、<sup>2</sup> Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA))

#### [研究要旨]

薬物依存の新たな治療開発のための候補分子を探索してきて、昨年度までに精神病性障害合併脆弱性を規定する遺伝子候補として、Dysbindin 遺伝子, D 体アミノ酸酸化酵素活性因子遺伝子 (G72, DAOA), セリンラセマーゼ遺伝子 (SRR) の関与を発見してきた。これらの遺伝子産物はいずれもグルタミン酸神経伝達, 特に NMDA 受容体を介したシグナリングに関わっている。そこで, 本年度では NMDA 受容体遺伝子である GRIN1, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子を覚せい剤精神病で解析した。GRIN1 では rs6560665, rs2301363, hcv184019 多型を, GRIN2A では 5 ‘上流の (GT)<sub>n</sub> 繰り返し多型を, GRIN2B では rs1019385, rs1805502 多型を覚せい剤精神病 (N=220) と健常者群 (N=291) で解析した。その結果, GRIN1 遺伝子は相関がなかったが, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子が相関を示した。臨床表現型での解析では GRIN1 遺伝子の rs2301363 がフラッシュバックの生じにくさと相関を示した。今回解析した多型の中では GRIN2A 遺伝子の (GT)<sub>n</sub> 繰り返し多型は生理作用が確認されており, リピート数が多いと転写活性が低下し, NMDA 受容体結合が低下するが, 覚せい剤精神病患者では健常者に比べて有意にリピート数が多かった。従って, NMDA 受容体を介したシグナリングが低下する状態が覚せい剤乱用による精神病症状の合併しやすさを生じると考えられた。この知見は統合失調症での結果と一致しており, 昨年までの成果と同様に, グルタミン酸神経伝達異常は疾患を超えて, 精神病症状自体の発症脆弱性に関わると考えられた。

#### A. 研究目的

われわれはこれまで薬物依存症の新たな治療開発のための基礎データとして, 遺伝子解析により, 個体側の発症脆弱性を検討してきた。一昨年は Dysbindin をコードする DTNBP1 遺伝子多型の

P1655 (rs2619539) と SNPA (rs2619538) が覚せい剤精神病と強く相関すること, また, リスクアレルである P1635 の G アレルは, 精神病症状が治療後も遷延する因子であることを明らかにした<sup>1)</sup>。昨年は D 体アミノ酸酸化酵素活性因子遺伝子 (G72, DAOA), セリンラセマーゼ遺伝子 (SRR)

遺伝子を解析し、DAOA 遺伝子 m22 (rs778293) 多型の G アレルが有意な覚せい剤精神病発症危険因子であること、オッズ比が G アレルで 1.6 倍、G/G 遺伝子型で 5.7 倍であること、また、m12-m15 および m23-m24 から形成されるハプロタイプも強い相関をすることを示した<sup>2)</sup>。SRR 遺伝子ではプロモーター領域の SNP 3 (rs2224770) が精神病の自然再燃に、SNP5 (rs408067) が精神病の遷延化および多剤乱用に相関することをみいだした。この他、我々のグループは glycine の中枢神経での細胞内取り込み部位である glycine transporter type1 の遺伝子多型も覚せい剤精神病に優位に相関することを報告している<sup>3)</sup>。これら覚せい剤精神病的発症に相関する一連の遺伝子の翻訳産物はグルタミン酸、特に NMDA 受容体を介した神経伝達に関与している。すなわち、DTNBP1 遺伝子がコードする dysbindin はグルタミン酸の放出促進作用が *in vitro* で確認されている<sup>4)</sup>。glycine transporter type 1 はシナプス間隙での glycine 濃度を規定するが、glycine は NMDA 受容体の co-agonist として作用し、NMDA 受容体を活性化する。DAOA は D-アミノ酸の酸化酵素を活性化する分子であり、やはり NMDA 受容体の co-agonist である D 体 serine の代謝に関わっている。また、SRR は L 体 serine から D 体 serine を生合成する酵素である。これらのことは NMDA 受容体の活性化不全が覚せい剤精神病的危険因子となることを一貫して示唆していると考えられる。NMDA 受容体はヘテロ 4 量体であり、GRIN1 サブタイプと GRIN2 サブタイプがそれぞれ 2 分子からなり、GRIN2 サブタイプは GRIN2A, 2B, 2C, 2D に分かれる。本年度では NMDA 受容体で機能的に重要と考えられる GRIN1, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子と覚せい剤精神病的発症脆弱性の個体差との関係を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象者は、日本人の覚せい剤精神病患者 220 人と健常対照者 290 人である。覚せい剤精神病患者については、薬物依存ゲノム解析研究グループ (JGIDA: Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse) の各施設での入院または外来患者から、ICD-10 の診断基準に基づき経験のある 2 人の精神科医によって診断された。健常対照者は年齢、性別、居住地をマッチングした、精神疾患の既往歴、家族歴のないものである。この研究は JGIDA の各施設での倫理委員会で承認され、すべての対象者はインフォームドコンセントに基づいて書面で同意を得た。

患者群に関しては、いくつかの臨床特性に応じ分類し検討を行った。それらは、1) 初回乱用年齢、2) 薬物使用から精神病発現までの潜時、3) 治療後の予後 (遷延性精神病的の有無)、4) 自然再燃の有無、5) 多剤乱用の 5 項目である

### 2. 遺伝子相関解析

GRIN1 は 22 エクソンからなる全長 29Kb、GRIN2A は 15 エクソンからなる全長 429Kb、GRIN2B は 13 エクソンからなる全長 418Kb であり、いずれも多く遺伝子多型が登録されているが、missense や nonsense 変異で多型頻度が確認されているものはない。そこで、これまでに精神疾患との相関が報告されている多型を解析対象に選択した。GRIN1 遺伝子では、rs6560665、rs2301364、hcv1840191 を解析対象としたが、これらの領域の haplotype が統合失調症と相関したと報告されている<sup>5)</sup>。GRIN2A では約 3 Kb 上流の (GT)*n* 繰り返し多型を解析したが、この多型は日本人において統合失調症と相関が報告されており<sup>6)</sup>、また、この多型が生理機能を有していることも確認されている。GRIN2B では統合失調症と相関が報告された 5' flanking の rs101938<sup>7)</sup>と、双極性障害で相関がみられた 3' 非翻訳領域の rs1805502<sup>7)</sup>を解析した。

表 1. GRIN1 遺伝子と覚せい剤精神病との相関解析

GRIN1-Rs6560665									
Group	N	Genotype			p value	Allele			p value
		G/G (%)	G/A (%)	A/A (%)		G (%)	A (%)		
Control	289	251 (86.9)	36 (12.5)	2 (0.7)		538 (93.1)	40 (6.9)		
METH	219	188 (85.8)	30 (13.7)	1 (0.5)	0.87	406 (92.7)	32 (7.3)	0.81	

GRIN1-Rs2301363									
Group	N	Genotype			p value	Allele			p value
		C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)		C (%)	T (%)		
Control	286	156 (54.5)	115 (40.2)	15 (5.2)		427 (74.7)	145 (25.3)		
METH	212	108 (50.9)	85 (40.1)	19 (9.0)	0.25	301 (71.0)	123 (29.0)	0.20	

GRIN1-Hcv184019									
Group	N	Genotype			p value	Allele			p value
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)		A (%)	G (%)		
Control	289	167 (57.8)	105 (36.3)	17 (5.9)		439 (75.6)	139 (24.4)		
METH	220	119 (54.1)	87 (39.5)	14 (6.4)	0.71	325 (73.9)	115 (26.1)	0.45	

表 2. 覚せい剤精神病臨床表現型と GRIN1 遺伝子との相関解析(上から A, B, C)

GRIN1-Rs6560665									
Age of First Use	N	Genotype			p value	Allele			p value
		G/G (%)	G/A (%)	A/A (%)		G (%)	A (%)		
20y<	116	100(86.2)	15(12.9)	1(0.9)		215(92.7)	17(7.3)		
20y>=	101	88(85.1)	15(14.9)	0(0)	0.60	187(92.6)	15(7.4)	0.97	

GRIN1-Rs2301363									
Age of First Use	N	Genotype			p value	Allele			p value
		C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)		C (%)	T (%)		
20y<	110	57(51.8)	43(39.1)	10(9.1)		157(71.4)	63(28.6)		
20y>=	100	51(51.0)	41(41.0)	8(8.0)	0.94	143(71.5)	57(28.5)	0.98	

GRIN1-Hcv184019									
Age of First Use	N	Genotype			p value	Allele			p value
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)		A (%)	G (%)		
20y<	114	64(56.1)	42(36.8)	8(7.0)		170(74.6)	58(25.4)		
20y>=	103	54(52.4)	43(41.7)	6(5.8)	0.75	151(73.3)	55(26.7)	0.77	

表 3. 覚せい剤精神病での GRIN 遺伝子ハプロ構造とハプロタイプ解析

	rs6560665	rs2301363	hcv1840191	r-square
rs6560665		0.0164	0.0764	
rs2301363	0.8024		0.0237	
hcv1840191	0.2279	0.2279		

	Single	Two-loci	Three-loci
rs6560665	0.81		
rs2301363	0.2	0.21	
hcv1840191	0.46	0.33	0.44

ゲノム DNA は末梢血白血球から標準的な方法で抽出した。遺伝子型の同定は GRIN1, GRIN2B 遺伝子は TaqMan assay で, GRIN2A の (TG)<sub>n</sub> 多型は fragment length を測定し、リピート数を算出した。統計学的解析については、ハーディーワインベルグ平衡、ケースコントロール関連解析での有意差の判定にカイ二乗検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。連鎖不平衡の判定にはカイ二乗検定の他に連鎖不平衡係数として D'値、r<sup>2</sup> を用いた。ハプロタイプ解析には EM アルゴリズムを使用し permutation p 値を求めた。統計解析ソフトは SNPALyze プログラム (ダイナコム社、日本)、STATview V5 を用いた。

### C. 研究結果

検討した GRIN1, GRIN2B 遺伝子多型における遺伝子型の分布は、ハーディーワインベルグ平衡から逸脱していなかった。

GRIN1 遺伝子では検索した 3 遺伝子多型、rs6560665、rs2301364、hcv1840191 はアレル頻度、遺伝子型分布共に覚せい剤精神病と健常コントロール群で差は認めなかった (表 1)。臨床表現型との検討では rs6560665 (表 2A)、hcv1840191 (表 2C) は相関を認めなかったが、rs2301364 (表 2B) では精神病の自然再燃 (いわゆるフラッシュバック) にお



いて遺伝子型 ( $p=0.042$ ), アレル頻度 ( $p=0.032$ ) で有意な相関を認め、マイナーアレルである T アレル、および TT 遺伝子型を有する個人では自然再燃が生じにくくなり、オッズ比はそれぞれ 0.62、0.23 であった。GRIN1 の 3 遺伝子多型のハプロ構造をかいせきしたところ、この 3 つの多型は D' が 0.7 以上もしくは  $r^2$  が 0.3 以上であり、互いに連鎖不平衡にあることが明らかになったので、ハプロタイプ解析を行ったが、2 遺伝子間、3 遺伝子間でも統合失調症発症脆弱性とは相関は示さなかった(表 3)。

表 4. GRIN2B 遺伝子と覚せい剤精神病の相関解析

GRIN2B Rs1019385								
Group	N	Genotype				Allele		
		T/T (%)	T/G (%)	G/G (%)	p value	T (%)	G (%)	p value
Control	290	88 (30.3)	142 (49.0)	60 (20.7)		318 (54.8)	262 (45.2)	
METH	217	68 (31.3)	86 (39.6)	63 (29.0)	0.049	222 (51.2)	212 (48.8)	0.25

GRIN2B Rs1805502								
Group	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
Control	276	164 (59.4)	93 (33.7)	19 (6.9)		421 (76.3)	131 (23.7)	
METH	208	112 (53.8)	86 (41.3)	10 (4.8)	0.18	310 (74.5)	106 (25.5)	0.53

GRIN2B の rs1019385、rs1805502 では前者の遺伝子型分布が覚せい剤精神病患者と健常コントロールで  $p=0.049$  と弱い有意差を認めた(表 4)。マイナーアレル G のホモ接合 GG 遺伝子型はオッズ比 1.57 と弱い危険因子であった。しかし、アレル頻度では差はなかった。臨床表現型との検討では、rs1019385 の遺伝子型で危険因子であった GG 遺伝子型がフラッシュバックに有意傾向を認めた。

表 5. 覚せい剤精神病臨床表現型と GRIN2B 遺伝子との相関解析 (上; 5A、下; 5B)

GRIN2B Rs1019385								
Age of First Use	N	Genotype				Allele		
		T/T (%)	T/G (%)	G/G (%)	p value	T (%)	G (%)	p value
20y<	115	34(29.6)	44(38.3)	37(32.2)		112(48.7)	118(51.3)	
20y>=	100	33(33.0)	41(41.0)	26(26.0)	0.61	107(53.5)	93(46.5)	0.32

GRIN2B Rs1805502								
Age of First Use	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
20y<	115	34(29.6)	44(38.3)	37(32.2)		112(48.7)	118(51.3)	
20y>=	100	33(33.0)	41(41.0)	26(26.0)	0.61	107(53.5)	93(46.5)	0.32

GRIN2B Rs1019385								
Latency of Psychosis	N	Genotype				Allele		
		T/T (%)	T/G (%)	G/G (%)	p value	T (%)	G (%)	p value
3y<	97	25(25.8)	39(40.2)	33(34.0)		89(45.9)	105(54.1)	
3y>=	93	34(36.6)	35(37.6)	24(25.8)	0.23	103(55.4)	83(44.6)	0.064

GRIN2B Rs1019385								
Prognosis of Psychosis	N	Genotype				Allele		
		T/T (%)	T/G (%)	G/G (%)	p value	T (%)	G (%)	p value
Transient	110	39(35.5)	41(37.3)	30(27.3)		119(54.1)	101(45.9)	
Prolonged	89	25(28.1)	34(38.2)	30(33.7)	0.47	84(47.2)	94(52.8)	0.171

GRIN2B Rs1019385								
Spontaneous Relapse	N	Genotype				Allele		
		T/T (%)	T/G (%)	G/G (%)	p value	T (%)	G (%)	p value
No	115	37(32.2)	51(44.3)	27(23.5)		125(54.3)	105(45.7)	
Yes	92	28(30.4)	30(32.6)	34(37.0)		86(46.7)	98(53.3)	0.12

GRIN2B Rs1805502								
Multisubstance abuse	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
No or mild	129	44(34.1)	47(36.4)	38(29.5)		135(52.3)	123(47.7)	
Heavy	81	22(27.2)	34(42.0)	25(30.9)	0.55	78(48.1)	84(51.9)	0.41

GRIN2B Rs1805502								
Age of First Use	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
20y<	108	60(55.6)	41(38.0)	7(6.5)		161(74.5)	55(25.5)	
20y>=	98	51(52.0)	44(44.8)	3(3.1)	0.37	146(74.5)	50(25.5)	0.99

GRIN2B Rs1805502								
Latency of Psychosis	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
3y<	94	51(54.3)	38(40.4)	5(5.3)		140(74.5)	48(25.5)	
3y>=	89	50(56.2)	34(38.2)	5(5.6)	0.95	134(75.3)	44(24.7)	0.86

GRIN2B Rs1805502								
Prognosis of Psychosis	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
Transient	105	57(54.3)	41(39.0)	7(6.7)		155(73.8)	55(26.2)	
Prolonged	86	47(54.7)	36(41.9)	3(3.5)	0.60	130(75.6)	42(24.4)	0.69

GRIN2B Rs1805502								
Spontaneous Relapse	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
No	111	66(59.5)	40(36.0)	5(4.5)		172(77.5)	50(22.5)	
Yes	88	42(47.7)	41(46.6)	5(5.7)	0.26	125(71.0)	51(29.0)	0.140

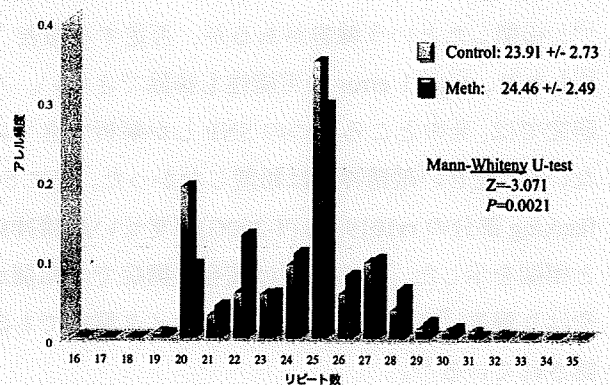
  

GRIN2B Rs1805502								
Multisubstance abuse	N	Genotype				Allele		
		A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	p value	A (%)	G (%)	p value
No or mild	123	71(57.7)	44(35.8)	8(6.5)		186(75.6)	60(24.4)	
Heavy	78	37(47.4)	39(50.0)	2(2.6)	0.092	113(72.4)	43(27.6)	0.48

rs1805502 は有意な相関を示した臨床表現型はなかった(表 5A、表 5B)。

GRIN2A の(GT)n 繰り返し多型では 16 リピートから 35 リピートまでみられ、25 リピートが最も多く、これまでの日本人での報告<sup>6,8)</sup>とほぼ一致する。各リピートアレル頻度の分布は覚せい剤精神病は健常コントロールと有意な差がみられた ( $p=0.002$ , 図 1)。平均リピート数は健常コントロールが  $23.9 \pm 2.73$  で、覚せい剤精神病では  $24.46 \pm 2.49$  と患者群でリピート数が有意に多かった。この(GT)n 繰り返し多型と臨床表現型では特に有意な相関を示したものはなかった。

図 1. 覚せい剤精神病と GRIN2A の(GT)n リピート多型のアレル分布



#### D. 考察

NMDA 受容体サブタイプの 3 つの遺伝子、GRIN1、2A、2B を覚せい剤精神病で相関解析した結果、

GRIN1 遺伝子の rs2301364 が精神病のフラッシュバックに相関し、マイナーアレルの T アレル、およびそのホモ接合の TT 遺伝子型のオッズ比はそれぞれ 0.62、0.23 と予防因子であることがわかった。また、GRIN2B の rs1019385 多型が覚せい剤精神病の発症脆弱性と弱いながら有意な相関を示し、GG 遺伝子型のオッズ比は 1.57 と危険因子であった。GRIN2A の(GT)n 繰り返し多型では覚せい剤精神病と強い相関がみられた。平均リピート数は覚せい剤精神病患者が健常コントロール群と比べて有意に多いことが明らかになった。

GRIN1 遺伝子と精神疾患の検討では 2003 年に Begni ら<sup>9)</sup>が 5' の rs11146020 と統合失調症との相関をはじめ報告したが、Zhao ら<sup>5)</sup>は、この多型を含む 5' 領域の 5 SNP を解析し、これら各々と rs2301363 を中心とするハプロタイプで強い相関を報告している。本研究では覚せい剤精神病自体には有意な相関は認めなかったが、フラッシュバックで相関することがわかり、マイナーアレルの T アレルが予防因子であった。Zhao ら<sup>5)</sup>の報告では、この rs2301363 の T アレルは統合失調症では防禦因子となっており、薬剤性と内因性精神病になんらかの共通した予防効果を示すと考えられる。

GRIN2B 遺伝子と精神疾患では 3' 非翻訳領域が双極性障害<sup>7)</sup>、アルコール依存症<sup>10, 11)</sup>、統合失調症<sup>12)</sup>と相関したという報告があるが、否定する報告<sup>13, 14)</sup>もあり、type I error の可能性も排除できない。本研究では、今のところ一つの SNP しか解析できていないが、覚せい剤精神病は相関しなかった。逆に 5' flanking 部分の rs1019385 (T-200G)が覚せい剤精神病と相関を示した。この多型は統合失調症での相関がやはり報告<sup>7)</sup>されているが、これはメタ解析でも確認されている<sup>14)</sup>。

GRIN2A の (GT) n リピート多型は Itokawa ら<sup>6)</sup>が日本人統合失調症で相関することを最初に報告し、注目されており、その後の追跡解析でも相関が確認されている<sup>8)</sup>。Itokawa ら<sup>6)</sup>は GRIN2A の全域のエク

ソンとその周辺部の多型サーチを行い、(GT) n リピート多型を含め 5 つの多型しか存在しないこと、そして、統合失調症とは (GT) n リピート多型のみが相関したことを見いだした。更に、この多型は Luciferase assay で転写活性に影響することを見いだしており、リピート数が 0 回、12 回、25 回、42 回と多くなるほど、転写活性が低下することを見いだしている。また、死後脳での MK-801 結合活性も低下することを明らかにしている。彼らの統合失調症の場合では、(GT) n リピート数が有意に健常者より多いと報告しており、今回の覚せい剤精神病と同じ方向である。従って、(GT) n リピート数が多い個体では、NMDA 受容体数が生来的に少なく、NMDA 受容体を介した神経伝達が不良で、それが統合失調症や覚せい剤誘発性精神病の危険因子になるということがいえる。これまで、グルタミン酸神経伝達や NMDA 受容体関連の解析で DTNBP1, DAOA, GLYT-1, SRR といった一連の遺伝子が覚せい剤精神病に相関することがわかった。また、その結果の一部は統合失調症や精神病症状を伴う双極性障害<sup>15, 16)</sup>と共通している。遺伝子型と生理機能が確認されているのは GRIN2A の (GT) n リピート多型のみであるが、これまでの知見を総合すると、DTNBP1 多型によりグルタミン酸放出が低下することや、DAOA, GLYT-1, SRR 多型により NMDA 受容体の co-agonist である glycine や D-serine が低下すること、もしくは NMDA 受容体の GRIN2A サブタイプの発現低下などのどこかの異常により、最終的に NMDA 受容体活性化が減少し、この系のシグナル伝達が低下することが、内因性、薬剤性を問わず精神病の合併危険性を増加させ、また、精神病の遷延やフラッシュバックの合併など予後にも影響すると考えられた。

## E. 結論

NMDA 受容体サブユニットの GRIN1, GRIN2A, GRIN2B 遺伝子を覚せい剤精神病で解析し、これら

いずれもが覚せい剤精神病発症脆弱性や臨床表現型に影響し、特に、GRIN2A 遺伝子の転写活性を減少する遺伝子多型が発症の個体差に強く影響することが明らかとなった。従って、NMDA 受容体神経伝達を改善する薬剤が新しい治療薬、予防薬となる可能性がある。

#### [参考文献]

1. Kishimoto M, Ujike H, Motohashi Y, Tanaka Y, Okahisa Y, Kotaka T, et al. (2008): The dysbindin gene (DTNBP1) is associated with methamphetamine psychosis. *Biol Psychiatry* 63: 191-6.
2. Kotaka T, Ujike H, Okahisa Y, Takaki M, Nakata K, Kodama M, et al. (2009): G72 gene is associated with susceptibility to methamphetamine psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1046-9.
3. Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Kotaka T, et al. (2008): The glycine transporter 1 gene (GLYT1) is associated with methamphetamine-use disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147 :54-8.
4. Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, et al (2004): Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet* 13:2699-2708.
5. Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, et al. (2006): Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:747-53.
6. Itokawa M, Yamada K, Yoshitsugu K, Toyota T, Suga T, Ohba H, et al (2003): A microsatellite repeat in the promoter of the N-methyl-D-aspartate receptor 2A subunit (GRIN2A) gene suppresses transcriptional activity and correlates with chronic outcome in schizophrenia. *Pharmacogenetics* 13:271-8.
7. Martucci L, Wong AH, Trakalo J, Cate-Carter T, Wong GW, Macciardi FM, et al (2003): N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) in schizophrenia: TDT and case-control analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 119B:24-7.
8. Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JM, Minabe Y, et al. (2005): Extended analyses support the association of a functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neurosci Lett* 378:102-5.
9. Begni S, Moraschi S, Bignotti S, Fumagalli F, Rilloso L, Perez J, et al (2003): Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53:617-9.
10. Kim JH, Park M, Yang SY, Jeong BS, Yoo HJ, Kim JW, et al (2006): Association study of polymorphisms in N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunits (GRIN2B) gene with Korean alcoholism. *Neurosci Res* 56:220-3.
11. Wernicke C, Samochowiec J, Schmidt LG, Winterer G, Smolka M, Kucharska-Mazur J, et al (2003): Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits. *Biol Psychiatry* 54:922-8.
12. Di Maria E, Gulli R, Begni S, De Luca A, Bignotti S, Pasini A, et al. (2004): Variations in the NMDA receptor subunit 2B gene (GRIN2B) and schizophrenia: a case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 128B:27-9.

13. Tadic A, Dahmen N, Szegedi A, Rujescu D, Giegling I, Koller G, et al. (2005): Polymorphisms in the NMDA subunit 2B are not associated with alcohol dependence and alcohol withdrawal-induced seizures and delirium tremens. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 255:129-35.
  14. Li D, He L. (2007): Association study between the NMDA receptor 2B subunit gene (GRIN2B) and schizophrenia: a HuGE review and meta-analysis. *Genet* 9:4-8.
  15. Raybould R, Green EK, MacGregor S, Gordon-Smith K, Heron J, Hyde S, et al (2005): Bipolar disorder and polymorphisms in the dysbindin gene (DTNBP1). *Biol Psychiatry* 57:696-701.
  16. Williams NM, Preece A, Morris DW, Spurlock G, Bray NJ, Stephens M, et al (2004): Identification in 2 independent samples of a novel schizophrenia risk haplotype of the dystrobrevin binding protein gene (DTNBP1). *Arch Gen Psychiatry* 61:336-344.
- F. 研究発表
1. 論文発表
    1. 氏家 寛, 岡久祐子. 覚せい剤依存症・精神病ゲノム因子の最新知見 最新精神医学, 14; 127-132, 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, 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.* 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, Mori N. An association study of monoamine oxidase A (MAOA) gene polymorphism in methamphetamine psychosis. *Neurosci Lett.* 455(2):120-3, 2009.
    4. 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, Iwata N. A functional polymorphism in estrogen receptor alpha gene is associated with Japanese methamphetamine induced psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(5):895-8, 2009.
    5. 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, Iwata N. Genetic association analysis of NRG1 with methamphetamine-induced psychosis in a Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(5):903-5, 2009.
    6. 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, Kuroda S. G72 gene is associated with susceptibility to methamphetamine psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(6):1046-9, 2009.
    7. Okahisa Y, Ujike H, Kotaka T, Morita Y, Kodama M, Inada T, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Association between neuropeptide Y gene and its receptor Y1 gene and methamphetamine dependence. *Psychiatry Clin Neurosci.* 63(3):417-22, 2009.
    8. 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