

貼付した。切片は10%正常ロバ血清に室温で1時間浸した。一次抗体として、anti- $\alpha 2/\delta$ subunit (Alomon Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、を0.01M PBSで100倍希釈し、4°Cで1晩反応させた。0.01M PBSで洗浄し、切片に0.01M PBSで500倍希釈した二次抗体 Alexa 488-cojugated donkey anti IgG を切片上に数滴加え、2時間遮光して室温で反応させた。その後、切片にカバーガラスをのせ、これらの画像は Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope で観察・撮影した。

6. Western blot 法

METH 誘発報酬効果獲得動物あるいは対照群のマウスより全脳を摘出して脳アトラスに従い帯状回、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 法に従って、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 蛋白を適用し分離した。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、一次抗体として、それぞれ 1000-5000 倍希釈した anti- $\alpha 1c$ subunit (Alomon Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、

anti- $\alpha 2/\delta$ subunit (Alomon Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、anti-dopamine D1-R (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)、anti-ADF (Sigma Co., St. Louis, USA) と共に、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、ケミルミノエッセンス法に従い、蛍光発色性基質を用いて目的とするタンパク質を同定した。

7. mRNA の測定

METH 誘発報酬効果獲得動物あるいは対照群のマウスより全脳を摘出して脳アトラスに従い帯状回、側坐核を含む領域を分画し、TRIzol reagents (Invitrogen K.K., Japan)を用いて total RNA を抽出した。その後、下記のプライマーを使用し、One SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR kit II (Takara)を用いて、7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster city, USA)により目的とする mRNA の発現量を測定した。 $\alpha 2/\delta$ subunit; Forward Primer: CAAAGAGGCCGGAGAAAA, Reverse Primer: AAAGTAGGGCGCAGTGAAAA.

8. [³⁵S]GTP γ S 結合実験

METH 誘発報酬効果獲得動物あるいは対照群のマウスより全脳を摘出して脳アトラスに従い側坐核を含む領域を分画し、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM MgCl₂ および 1 mM EGTA を含む ice-cold Tris-Mg²⁺ buffer を加え、これらの組織をテフロン・ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした後、遠心 (48,000 g、15 分間、4 °C) した。得られた沈渣に 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、

5 mM MgCl₂ および 1 mM EGTA および 100 mM NaCl を含む [³⁵S]GTPγS binding assay buffer を加えて再懸濁させた。膜ホモジネート (5 μg protein/assay) は 3x10⁻⁸-3x10⁻⁵ M dopamine (Sigma Co., St. Louis, USA)、30 μM guanosine-5'-diphosphate (GDP)、50 pM [³⁵S]GTPγS (1000 Ci mM⁻¹) を含む 200 μL の assay buffer にて、2 時間、25 °C で反応させた。この反応には cell harvester を使用し、Whatman GF/B glass filter で濾過することにより反応を終了させた。Filter 上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、非特異的結合は非放射性の 10 μM GTPγS を共存させることにより得た。

9. 統計解析

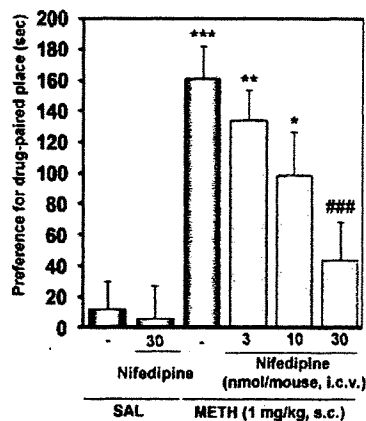


Fig. 1 Effect of a L-type VGCC antagonist nifedipine on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Nifedipine (NIF. 3, 10 and 30 nmol/mouse) or vehicle (V) was intracerebroventricularly administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) or METH (1 mg/kg). **p*<0.05. ***p*<0.01 ****p*<0.001 vs saline-conditioned mice. ###*p*<0.001 vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean ± S.E.M. obtained from 8 animals.

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M.) で示した。有意性の評価には二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 nifedipine の影響

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 L 型 VGCC 拮抗薬 nifedipine 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、nifedipine 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)。

2. METH 誘発報酬効果獲得動物における脳内 α1c subunit 蛋白量の変化

METH 誘発報酬効果獲得マウスの帯状回を含む frontal cortex 領域ならびに側坐区を含む limbic forebrain 領域における α1c subunit 蛋白量の変化について検討し

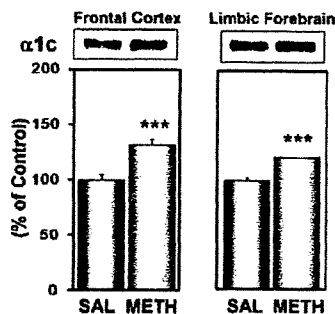


Fig. 2 Changes in protein levels of Cav1.2 from the frontal cortex and the limbic forebrain during the conditioned place preference to methamphetamine (METH). The column represents the mean ± S.E.M. of 4 animals. ****p*<0.001 vs. saline-conditioned group.

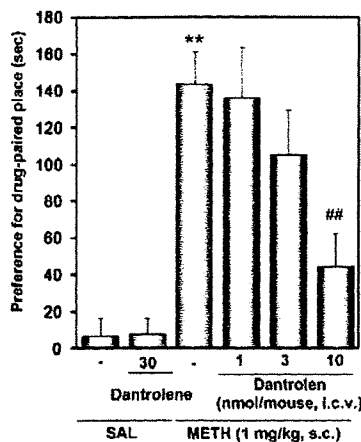


Fig. 3 Effect of a ryanodine receptor antagonist dantrolene on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Dantrolene (1, 3 and 10 nmol/mouse) or vehicle (V) was intracerebroventricularly administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) or METH (1 mg/kg). ** $p < 0.01$ vs. saline-conditioned mice. ## $p < 0.01$ vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

た。その結果、対照群に比し METH 誘発報酬効果獲得マウスの frontal cortex 領域ならびに limbic forebrain 領域において、 $\alpha 1c$ subunit 蛋白質量の有意な増加が認められた (Fig. 2)。

3. METH 誘発報酬効果に対する dantrolene の影響

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 ryanodine 受容体拮抗薬 dantrolene の影響について検討した。その結果、METH による報酬効

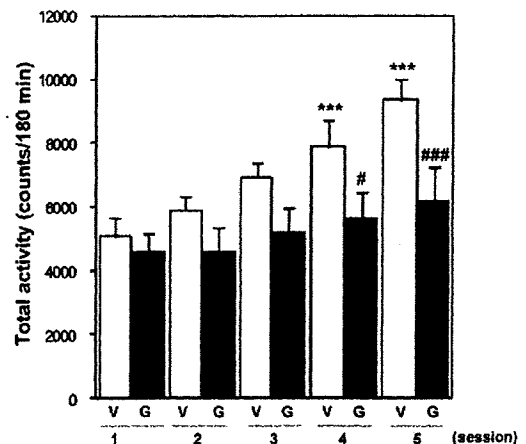


Fig. 4 Blockade of the development of sensitization to methamphetamine (METH)-induced hyperlocomotion by co-treatment with gabapentin (GBP). Groups of mice were given fifth times with METH (2 mg/kg, s.c.) every 96 hr. Groups of mice were pretreated with vehicle or GBP (30 nmol/mouse, i.c.v.) 30 min before METH injection. Total activity was counted for 180 min after each treatment. The data represent the mean with S.E.M. of 10 mice. *** $p < 0.001$ vs. the 1st drug administration, # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs. vehicle-METH group, each session.

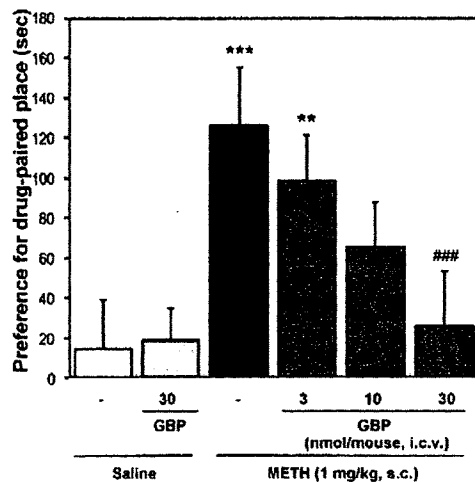


Fig. 5 Effect of gabapentin (GBP) on the methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Chronic s.c. administration of METH (1 mg/kg, s.c.) produced a significant place preference in mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice. Mice were pretreated with vehicle or GBP (3, 10 or 30 nmol/mouse, i.c.v.) before s.c. administration of saline or METH. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. vehicle-saline group. ### $p < 0.001$ vs. vehicle-METH group.

果の形成は、dantrolene 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. 3)。

4. METH 誘発逆耐性形成に対する gabapentin の効果

METH 誘発逆耐性形成機構に対する効果について検討したところ、vehicle 前処置群

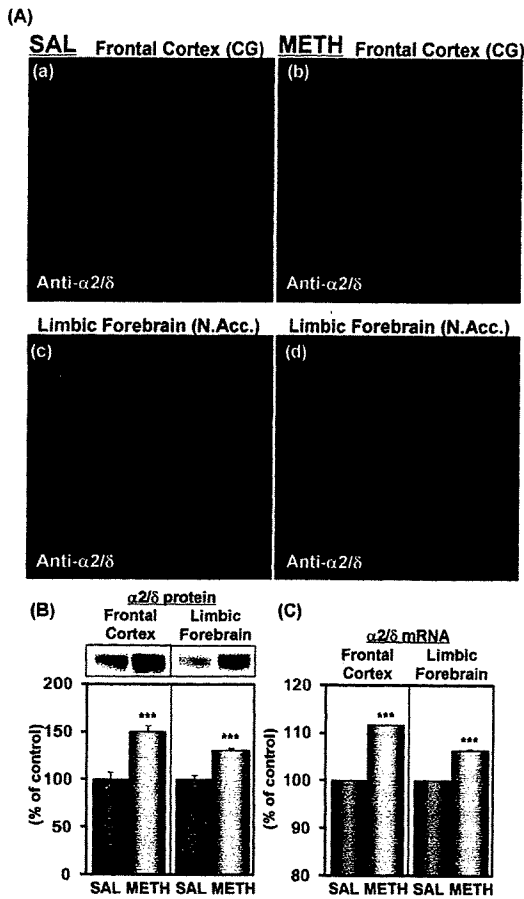


Fig. 6 $\alpha 2/\delta$ -1 subunit immunoreactivity in the cingulate cortex and nucleus accumbens of mice by repeated *in vivo* treatment with methamphetamine (METH). (A) The density of $\alpha 2/\delta$ -1 subunit immunoreactivity was increased in the cingulate cortex (b) and nucleus accumbens (d) of mice treated with METH as compared to saline treated treatment (a, c). (B) Changes in the protein levels of $\alpha 2/\delta$ -1 subunit in membrane fractions of the mouse frontal cortex and limbic forebrain obtained from METH-conditioned mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of 4 samples. *** $p < 0.001$ vs. saline group. (C) Change in mRNA levels of $\alpha 2/\delta$ -1 subunit in the frontal cortex and limbic forebrain obtained from methamphetamine-sensitized mice. The sample was prepared at 24 hr after the last injection. The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 samples. *** $p < 0.001$ vs. saline group.

で認められる METH の投与回数に依存した自発運動量の有意な増加は、gabapentin の脳室内前処置により完全に抑制された (Fig. 4)。

5. METH 誘発報酬効果に対する gabapentin の影響

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 gabapentin の影響について検討した。METH による報酬効果の形成は、gabapentin の脳室内前処置により用量依

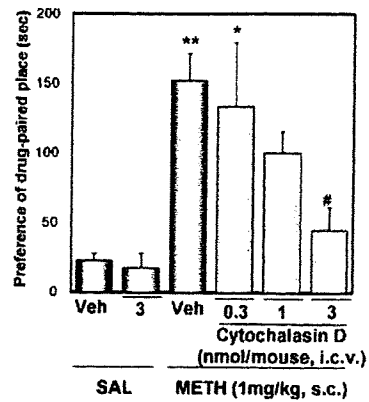


Fig. 7 Effect of an actin polymerization inhibitor cytochalasin D on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Cytochalasin D (0.3, 1 and 3 nmol/mouse) or vehicle (Veh) was *i.c.v.* administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) and methamphetamine (METH; 1 mg/kg). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline-conditioned mice. # $p < 0.05$ vs. vehicle pre-treatment. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

存的かつ有意に抑制された (Fig. 5)。

6. METH 誘発報酬効果獲得動物における $\alpha 2/\delta$ subunit の発現変化

METH 誘発報酬効果を獲得した動物の帯状回および側坐核における $\alpha 2/\delta$ subunit の発現変化について免疫染色法を用いて検討を行った。対照群に比し METH 誘発報酬効果獲得マウスの帯状回および側坐核のいずれの脳部位においても $\alpha 2/\delta$ subunit 免疫活性の増加が観察された。そこで、Western blotting により蛋白発現量の変化について検討したところ、METH 誘発報酬効果を獲得した動物の frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域では、対照群に比し $\alpha 2/\delta$ subunit 蛋白量の有意な発現増加が認められた。さらに、mRNA 発現量の変化についても検討したところ、METH を処置した動物では、frontal cortex および側坐核を含む limbic forebrain 領域において、 $\alpha 2/\delta$ subunit mRNA の有意な発現増加が認められた (Fig. 6)。

7. METH 誘発報酬効果に対する

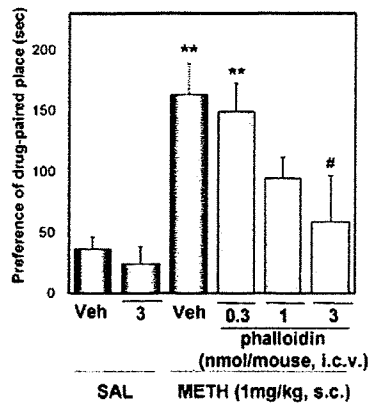


Fig. 8 Effect of an actin depolymerization inhibitor phalloidin on methamphetamine (METH)-induced place preference in mice. Phalloidin (0.3, 1 and 3 nmol/mouse) or vehicle (Veh) was i.c.v. administered 30 min before subcutaneous treatment with saline (SAL) and methamphetamine (METH; 1 mg/kg). ** $p 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

cytochalasin D の影響

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。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. 7)。

8. METH 誘発報酬効果に対する phalloidin の影響

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。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. 8)。

9. 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。野生型マウスでは METH の

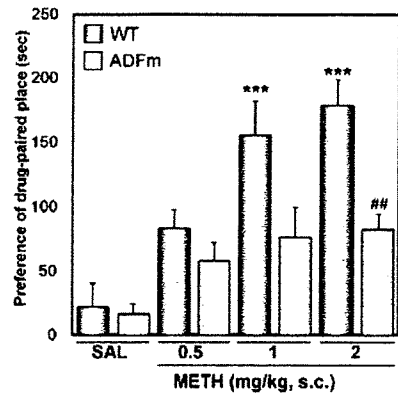


Fig. 9 Suppression of the methamphetamine- (METH) induced place preference by wild-type (WT) and actin depolymerizing factor mutant (ADFm) mice. Both genotypes of mice were conditioned by saline or methamphetamine (0.5, 1 and 2 mg/kg s.c.) *** $p < 0.001$ vs. saline. ## $p < 0.01$ vs. wild-type mice group. The data represent the mean \pm S.E.M. obtained from 8 animals.

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し有意な減少が認められた (Fig. 9)。

10. 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 の投与回数に依存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. 10)。

11. 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の側坐核を含む limbic forebrain 領域では、対照群に比し ADF 蛋白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 蛋白の発現は認められなかった (Fig. 11)。

12. METH 誘発報酬効果獲得動物における dopamine D1 受容体の機能変化

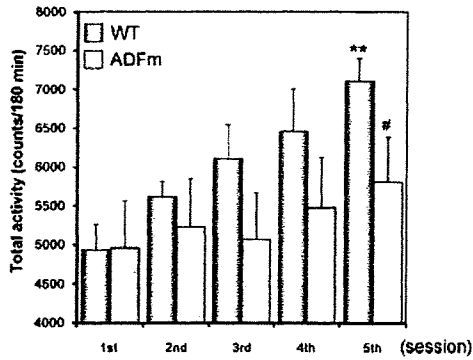


Fig. 10 No development of behavioral sensitization to methamphetamine-induced hyperlocomotion in actin depolymerizing factor mutant (ADFm) mice. Groups of mice were given five intermittent treatments with methamphetamine (2mg/kg, s.c.) every 96 h. Total activity was counted for 3 h after each treatment. The data represent the mean with SEM of seven to 8 mice. * $p < 0.05$ vs. the first administration. # $p < 0.05$ vs. wild-type mice.

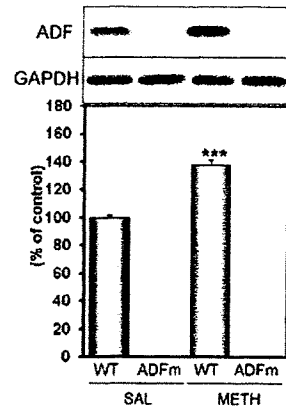


Fig. 11 Changes in protein levels of actin depolymerizing factor ADF from the limbic forebrain during the conditioned place preference to methamphetamine. The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals. *** $p < 0.001$ vs. wild-type groups.

[³⁵S] GTP γ S 結合実験により、METH 誘発報酬効果を獲得した ADF 変異型マウスおよび野生型マウスの側坐核領域における dopamine D1 受容体機能変化について検討した。野生型マウスおよび ADF 変異型マウスのいずれにおいても、側坐核を含む limbic forebrain 領域において、METH 処置により dopamine D1 受容体の有意な機能亢進が認められた。しかしながら、ADF 変異型マウスでは野生型マウスに比し、dopamine D1 受容体機能亢進の有意な減弱が認められた。そこで、Western blotting により dopamine D1 受容体蛋白発現量の変化について検討したところ、野生型マウスならびに ADF 変異型マウスでは、METH 処置により dopamine D1 受容体蛋白量の有意な増加が認められた。しかしながら、ADF 変異型マウスでは野生型マウスに比べ dopamine D1 受容体蛋白量の有意な減少が認められた (Fig. 12)。

13. $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスならびにその野生型マウスにおける METH 誘発報酬効果形成の相違

METH 誘発報酬効果形成に対する $\alpha 1c$

subunit の関与および ADF の変化について検討する目的で、 $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウス ($\alpha 1c (+/-)$)ならびにその野生型マウス (wild type) を用いて検討した。野生型マウスで認められる METH 誘発報酬効果の形成は、 $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスにおいて有意に減少した (Fig. 13)。

14. $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスならびにその野生型マウスを用いた METH 誘発報酬効果獲得動物における ADF の変化

METH 誘発報酬効果を獲得した $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウス ($\alpha 1c (+/-)$)ならびにその野生型マウス (wild type) における、 $\alpha 1c$ subunit および ADF の発現変化について検討した。 $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスでは野生型マウスに比べ $\alpha 1c$ subunit 蛋白発現量の著明な減少が認められたが、METH の処置は $\alpha 1c$ subunit 蛋白発現量を有意に増加させた。このような条件下において、ADF 蛋白量の変化について検討したところ、 $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスでは、saline ならびに METH のいずれの処置においても、野生型マウス

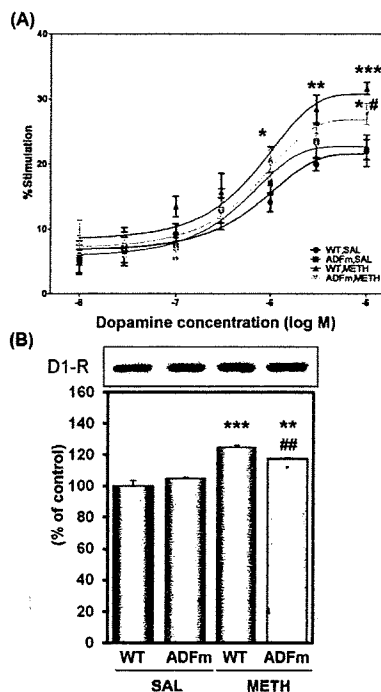


Fig. 12 (A) Changes in the dopamine receptor function to activate G-proteins in the mouse limbic forebrain with methamphetamine (METH) treatment. Dopamine (1 nM-10 μ M) produced a concentration-dependent increase in [³⁵S]GTP γ S binding to limbic forebrain membranes from ADF mutant (ADFM) mice and wild-type (WT) mice with both saline- and METH-treated mice. The data are shown as the percentage of basal [³⁵S]GTP γ S (50 pM) binding measured in the presence of GDP (30 pM) and absence of dopamine. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. saline treated groups. #p<0.05 vs. wild-type groups. (B) Changes in protein levels of dopamine D1 receptor from the limbic forebrain of ADF mutant (ADFM) mice or wild-type (WT) mice during the conditioned place preference to methamphetamine (METH). The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals. ***p<0.001 vs. wild-type groups.

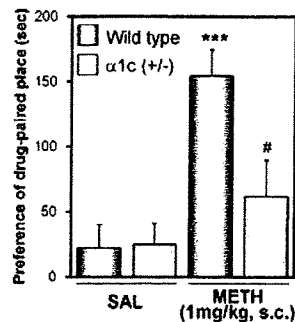


Fig. 13 Suppression of the methamphetamine (METH)-induced place preference by a half-deletion of Cav 1.2 gene. Both genotypes of mice were conditioned by saline or METH (1 mg/kg, s.c.). The data represent the mean with S.E.M. of 8 mice. ***p<0.001 vs. saline. #p<0.05 vs. wild-type mice group.

に比べ、ADF 蛋白発現量の有意な減少が認められた (Fig. 14)。

D. 考察

METH 誘発精神依存における細胞内 Ca²⁺ 動態の関与について検討する目的で、METH 誘発報酬効果形成に対する L 型 VGCC 拮抗薬である nifedipine、ryanodine 受容体拮抗薬である dantrolene の効果について検討したところ、いずれの前処置においても、METH 誘発報酬効果は用量依存的かつ有意に抑制された。覚せい剤の強化効果や報酬効果が、 α 1c subunit の拮抗薬である dihydropyridine 系薬物により抑制

されることがすでに報告されており^{8, 23)}、当教室においても同様の結果が得られたことから²²⁾、METH による精神依存では、L 型 VGCC による ryanodine 受容体を介した CICR の亢進により細胞内 Ca²⁺ 応答の増強が誘導され、薬物依存形成における神経の可塑的变化を引き起こしていると推察される。また当教室において、METH、cocaine、morphine 誘発報酬効果が nifedipine により抑制され、さらに精神依存に重要な脳内の側坐核領域および帯状回領域において L 型 VGCC を構成する α 1c subunit ならびに α 1d subunit 蛋白量が増加することを見出している²²⁾。したがって、依存性薬物による精神依存には共通の機構として L 型 VGCC を介した細胞内 Ca²⁺ 動態の調節機構が関与していると考えられる。さらに、細胞内における遊離 Ca²⁺ は Ca²⁺ 結合蛋白質と結合することにより種々の作用を誘導することに加え、calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) や protein kinase C (PKC) が、薬物依存形成における神経可塑的变化に重要な役割を担っていることが報告されている^{12, 13)}。一方、CaMKII や PKC

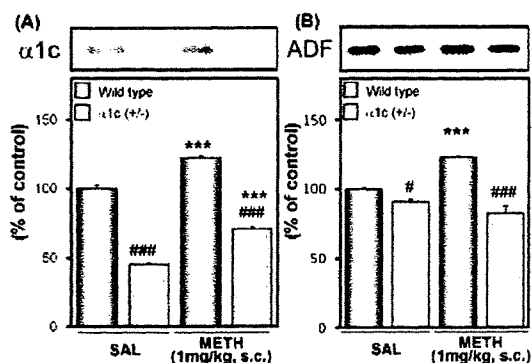


Fig. 14 Changes in protein levels of Cav1.2 α 1c subunit (A) and actin depolymerizing factor (ADF; B) from the limbic forebrain during the conditioned place preference to methamphetamine (METH). The column represents the mean \pm S.E.M. of 4 animals. *** $p < 0.001$ vs. wild-type groups

などは細胞内情報伝達系において重要な役割を担っていることがよく知られており、また中枢神経系における神経細胞の樹状突起伸展伸長や spine 形成などのニューロンネットワークの構築にも重要な役割を担っており、これらが神経の可塑的変化の現象を調節していると考えられる^{4, 10}。したがって、VGCC-ryanodine 受容体系を介した細胞内 Ca^{2+} 動態の調節機構は、脳内神経細胞における多彩な機能に大きく関与しており、耽溺・薬物依存形成における神経の可塑的変化に、極めて重要な役割を担っていると考えられる。

本研究結果より、METH 誘発報酬効果獲得動物の frontal cortex および limbic forebrain において、 α 2/ δ subunit 蛋白質の有意な発現増加が認められたことから、METH による精神依存形成には α 1c subunit 蛋白質の発現増加のみならず、 α 2/ δ subunit 蛋白質の増加を伴う L 型 VGCC の機能亢進を介した細胞内への Ca^{2+} 流入上昇が関与している可能性が高いものと考えられる。当教室において、METH および morphine 誘発報酬効果において、 α 2/ δ subunit が関与することを明らかにしてい

ることから^{10, 21}、 α 2/ δ subunit も依存性薬物による精神依存に、共通の機構として働いていると考えられる。一方、 α 1c ならびに α 2/ δ subunit 蛋白質発現増加の調節機序については、今後更なる検討が必要ではあるが、現在までに、細胞内小胞輸送に関係する Vps34 が VGCC の up-regulation 調節に関与する結果を得ており、また、Vps34 は PKC γ により調節されることを明らかにしている²⁰。さらに、METH 処置により PKC γ が活性化されることが報告されていることから¹¹、VGCC α 1c ならびに α 2/ δ subunit の発現増加に、PKC γ -Vps34 経路が関与するものと推定される。

α 2/ δ subunit は、 α 1 subunit の機能修飾因子として知られており、 α 1 subunit による細胞内への Ca^{2+} 流入を調節していると考えられているが、その詳細な機序については不明な点が多い⁷。また、覚せい剤の自発運動促進作用に対し、P/Q 型や N 型 VGCC の関与が報告されていることから¹⁵、 α 2/ δ subunit と他の subunit の関連性や調節機序を含めた詳細な検討が必要であると考えられる。しかしながら、本研究結果を含む神経薬理的検討から、METH による L 型 VGCC 機能亢進とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} 動態変化が、神経細胞における機能変化を引き起こしている可能性は高い物と考えられる。

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。すでに METH 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¹⁸。これらの実験成績から、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ものと推察される。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も関与している可能性が考えられる。

報酬効果ならびに逆耐性形成のいずれにおいても 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 蛋白質量の有意な増加が認められた。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¹⁹⁾。これらの結果から、METH や cocaine の精神依存形成には、ADF などの actin 結合蛋白質を介した細胞内情報伝達系が関与している物と思われる。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 蛋白である RhoA が調節を担うこと²⁾、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⁹⁾。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示唆されるが、詳細な機序については今後の検討課題であると思われる。

上述のように、METH 誘発報酬効果において $\alpha 1c$ subunit の発現増加を伴った機能亢進が認められた。さらに、野生型マウスで認められる METH 処置による ADF 蛋白質発現量の増加は、 $\alpha 1c$ subunit 遺伝子半欠損マウスにおいて減少するのが認められた。

また、神経細胞における 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おり⁹⁾、METH による VGCC $\alpha 1c$ subunit 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 の変化に関与している可能性が示唆される。

E. 結論

本研究結果より、 $\alpha 1c$ および $\alpha 2/\delta$ subunit ならびに ryanodine 受容体が、乱用薬物に共通の依存症発症因子として重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、本研究結果より、nifedipine などのカルシウム拮抗薬や dantrolene および gabapentin が薬物依存の治療薬となり得る可能性が示唆された。また、METH による精神依存に対して L 型 VGCC を介した ADF 発現調節機構が関与し、細胞内 actin 重合・脱重合調節機構に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) Calin-Jageman, I. and Lee, A.: Ca(v)1 L-type Ca^{2+} channel signaling complexes in neurons. *J. Neurochem.*, 105, 573-583 (2008).
- 4) Colbran, R.J.: Protein

- phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, 24, 8404-8409 (2004).
- 5) 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).
- 6) Green, E.M., Barrett, C.F., Bultynck, G., et al.: The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel CaV1.2. *Neuron*, 55, 615-632 (2007).
- 7) Gurnett, C.A., De Waard, M. and Campbell, K.P.: Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron*, 16, 431-440 (1996).
- 8) Johnson, B.A., Roache, J.D., Ait-Daoud, N., et al.: Effects of isradipine, a dihydropyridine-class calcium-channel antagonist, on d-methamphetamine's subjective and reinforcing effects. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, 203-213 (2005).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., et al.: Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron-glia communication during the development of methamphetamine-induced psychological dependence. *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1476-1488 (2005).
- 12) Narita, M., Matsumura, Y., Ozaki, S., et al.: Role of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase ii (CaMKII) in the morphine-induced pharmacological effects in the mouse. *Neuroscience*, 126, 415-421 (2004).
- 13) Narita, M., Mizuo, K., Shibasaki, M., et al.: Up-regulation of the G(q/11alpha) protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience*, 111, 127-132 (2002).
- 14) Nestler, E.J.: Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat. Neurosci.*, 8, 1445-1449 (2005).
- 15) Ogura, H., Furuya, Y., Teramoto, T., et al.: Peptide N- and P/Q-type Ca²⁺ blockers inhibit stimulant-induced hyperactivity in mice. *Peptides*, 19, 1017-1022 (1998).
- 16) Pilpel, Y. and Segal, M.:

Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 3151-3164 (2004).

17) 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).

18) 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).

19) Shen, H.W., Toda, S., Moussawi, K., et al.: Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J. Neurosci.*, 29, 2876-2884 (2009).

20) Shibasaki, M., Kurokawa, K., Katsura, M., et al.: Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse*, 63, 365-368 (2009).

21) Shibasaki, M., Kurokawa, K. and Ohkuma, S.: Role of α 2/delta subunit in the development of morphine-induced rewarding effect and behavioral sensitization. *Neuroscience*, 163, 731-734 (2009).

22) 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).

23) Suzuki, T., Shiozaki, Y., Masukawa, Y., et al.: Effects of calcium antagonists on the cocaine- and methamphetamine-induced conditioned place preference. *Arukoro Kenkyuto. Yakubutsu Ison*, 27, 81-90 (1992).

24) 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).

25) 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. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎：依存性薬物による精神依存および身体依存形成機序の相違. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*. 42: 481-486, 2007
2. Katsura, M., Shibasaki, M., Kurokawa, K., Tsujimura, A. and Ohkuma, S.: Up-regulation of L-type high voltage-

- gated calcium channel subunits by sustained exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 103: 2518- 2528, 2007
3. Shibasaki, M., Katsura, M., Kurokawa, K., Torigoe, F. and Ohkuma, S.: Regional differences of L-type high voltage-gated calcium channel subunit expression in the mouse brain after chronic morphine treatment. *J. Pharmacol. Sci.* 105: 177-183, 2007.
 4. Shibasaki, M., Katsura, M., Torigoe, F., Honda, T., Sumimoto, A., Tsujimura, A. and Ohkuma, S.: Increase in diazepam binding inhibitor expression by sustained morphine exposure is mediated via μ -opioid receptors in primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 85: 2971-2980, 2007.
 5. 桂 昌司、大熊誠太郎：【薬理学・毒性学】ベンゾジアゼピン系薬物依存の新知見。医学のあゆみ。223: 187, 2007.
 6. 桂 昌司、大熊誠太郎：【アルコール医学・医療の最前線】アルコール依存症、アルコール依存症病態発現の神経薬理学的機序。医学のあゆみ。222: 677-684, 2007.
 7. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：細胞内カルシウム動態変化からみたアルコール精神および身体依存形成。日本アルコール・薬物医学会雑誌。42: 59-66, 2007.
 8. Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse.* 63: 365-368. 2009
 9. 大熊誠太郎、芝崎真裕、黒川和宏。GABA_A 受容体。日本薬理学雑誌 131: 388-390. 2008
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse.* 63: 365-368. 2009
2. 学会発表
 1. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：Morphine (MOR) 精神依存形成における脳内リアノジン受容体活性化を介したL型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) 機能亢進作用について。第80回日本薬理学会年会。名古屋。2007年3月。
 2. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：Methamphetamine による IP₃ 受

- 容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能変化. 第 111 回日本薬理学会近畿部会. 名古屋. 2007 年 6 月.
3. 桂 昌司、芝崎真裕、大熊誠太郎：精神依存における細胞内 Ca^{2+} 動態変化の解析と治療への応用. 第 37 回日本神経精神薬理学会年会. 札幌. 2007 年 7 月.
 4. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、横枝大貴、大熊誠太郎： β -アドレナリン受容体 (β -AR) 拮抗薬の連続曝露に伴う β -AR の機能変化. 第 7 回創薬・薬理フォーラム岡山. 岡山. 2007 年 7 月.
 5. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：アルコール精神依存形成機序：L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) β サブユニットの機能変化を中心として. 第 42 回日本アルコール・薬物医学会総会. 大津. 2007 年 9 月.
 6. Hori, T., Komiyama, T., Katsura, M., Ohkuma, S., Kanemoto, K. and Saitoh, O.: Biological research on the protracted withdrawal syndrome (PWS) – Relationship between CSF level of DBI, CRH and score of clinical symptom evaluation scale –. Neuroscience 2007. San Diego. 2007 年 11 月.
 7. 芝崎真裕、桂 昌司、黒川和宏、大熊誠太郎：Ethanol 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) $\beta 3$ サブユニットならびにリアノジン受容体の機能変化について. 第 8 回創薬・薬理フォーラム岡山. 岡山. 2007 年 12 月.
 8. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Morphine による IP₃ 受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) 機能変化. 第 17 回神経行動薬理若手研究者の集い. 横浜. 2008 年 3 月.
 9. 桂 昌司、芝崎真裕、黒川和宏、大熊誠太郎：Alcohol (EtOH) 精神依存形成における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCC) β サブユニットの機能的関連性について. 第 81 回日本薬理学会年会. 横浜. 2008 年 3 月.
 10. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Morphine による IP₃ 受容体活性化を介した L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の機能変化. 第 17 回神経行動薬理若手研究者の集い. 横浜. 2008 年 3 月.
 11. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Morphine 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の機能亢進に対する PI 3-kinase の関与. 第 113 回日本薬理学会近畿部会. 岡山. 2008 年 6 月.
 12. 黒川和宏、芝崎真裕、桂 昌司、大熊誠太郎：Methamphetamine 誘発逆耐性形成機構における L 型高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) の関与： $\alpha 2/\delta$ サブユニットを中心に. 第 113 回日本薬理学会近畿部会. 岡山. 2008 年 6 月.
 13. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Methamphetamine 誘発精神依存形成機構における高電位開口性カルシウムチャンネル (HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の役割. 第 43 回日本アルコール・薬物医学会総会. 横浜. 2008 年 9 月.

14. 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎：Morphine 誘発精神依存形成における L 型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) 機能亢進に対する PI 3-kinase の調節機序. 第 38 回日本神経精神薬理学会. 品川. 2008 年 10 月.
15. 黒川和宏、芝崎真裕、桂 昌司、大熊誠太郎：Methamphetamine 誘発逆耐性形成機構における高電位開口性カルシウムチャネル (HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の関与. 第 38 回日本神経精神薬理学会. 品川. 2008 年 10 月.
16. 黒川和宏、芝崎真裕、大熊誠太郎：Ethanol 誘発身体依存における gabapentin の有用性. 第 114 回日本薬理学会近畿部会. 神戸. 2008 年 11 月.
17. 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.
18. 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ネル (HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.
19. 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.
20. 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ネル (HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の関与. 第 82 回日本薬理学会年会. 横浜. 2009 年 3 月.
21. 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.
22. 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同一性. 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会. 横浜. 2009 年 9 月.
23. 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 の関与. 第 39 回日本神経精神薬理学会. 京都. 2009 年 11 月.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

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

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、丹羽美苗^{2,3}、Cen Xiabo²、衣斐大祐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]

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

さらに、両遺伝子の過剰発現マウスと shati 遺伝子の遺伝子欠損マウスを作成し、両遺伝子の生理機能について検討した。また、shati タンパクの定量系を作成し、精神疾患患者の血液濃度の測定を行う予定である。

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た⁽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、薬物依存形成のメカニズムの詳細な解明を試みた。

さらに、両遺伝子の遺伝子組み換えマウスを作成し、生理機能の検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および薬物

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

2. PCR-select cDNA サブトラクション

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

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

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

で行った。Shati mRNA については、リアルタイム RT-PCR 法にて、定量を行った。

4. In vivo マイクロダイアリシス

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

5. 条件性場所嗜好 (Conditioned Place Preference; CPP) 試験^{11,12)}

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

6. 遺伝子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ィルス (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おこっ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。

7. 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。

8. 強制水泳試験法

25°C の水を 15cm の水深で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。

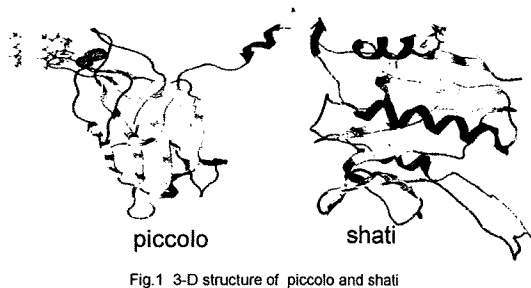
9. 統計処理

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

C. 研究結果

1. PCR select cDNA サブトラクション
PCR select cDNA サブトラクションを行い、メタンフェタミン投与群マウス側坐核で増加していた 2 つの遺伝子 shati とピッコロについて三次元立体構造を Fig.1 に示した。遺伝子配列については、NCBI アクセスナンバー ABA54615 および NCBI アクセスナンバー BAC53724 にそれぞれ掲載されている。Shati については、我々が本研究を行っている最中にマウスゲノムプロジェクトの一部として、NAC81 として

NCBIに完全長が記載されたが、フレームは我々が見出していたものと完全に一致していた。ピッコロはインスリン分泌関連遺伝子としてすでに同定されていた⁽¹³⁾。



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

1) Shati

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

2) ピッコロ

メタンフェタミン (1mg/kg) を3日間投与した後、最終投与後 240 分間のドパミン遊離量を測定した。側坐核に人工脳脊髄液またはスクランブルヌクレオチドを持続注入したマウスでは、ドパミン遊離量がメタンフェタミン投与後約 380%まで増加し

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

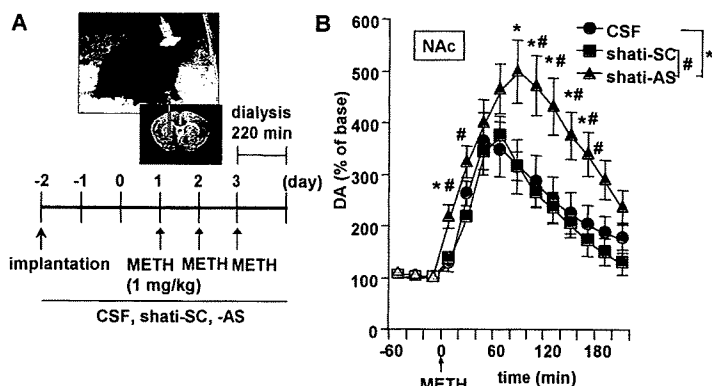


Fig.2 A. Experimental schedule for the measurement of overflow of DA using *in vivo* microdialysis in shati-AS-treated mice. B. Basal levels of DA were 0.30 ± 0.08 , 0.31 ± 0.05 , and 0.30 ± 0.04 nM for the CSF-, shati-SC-, and shati-AS-treated mice, respectively. Values are means \pm SE (n=5-6). * $p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

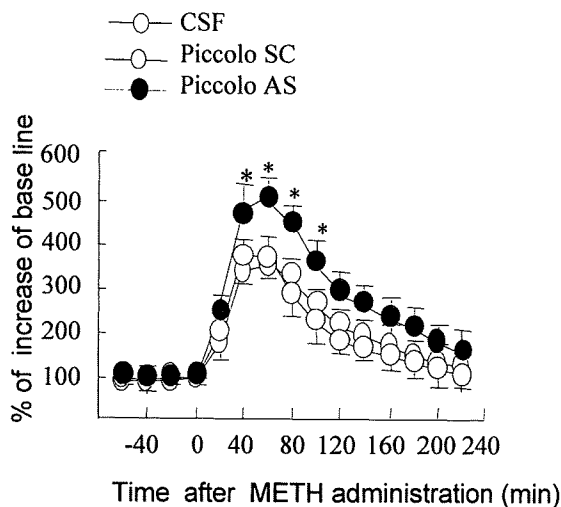


Fig.3 Basal levels of DA were 0.30 ± 0.08 , 0.31 ± 0.05 , and 0.30 ± 0.04 nM for the CSF-, piccolo-SC-, and piccolo-AS-treated mice, respectively. Values are means \pm SE (n=5-6). * $p < 0.05$ vs. CSF-treated mice. # $p < 0.05$ vs. shati-SC-treated mice.

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

1) Shati

メタンフェタミンによって条件づけされた

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

2) ピッコロ

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

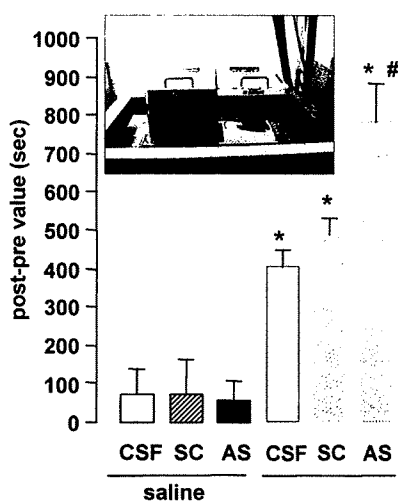


Fig.4 Values are means \pm SE (n=5-12). * p <0.05 vs. saline-treated mice. # p <0.05 vs. shati-SC-treated mice.

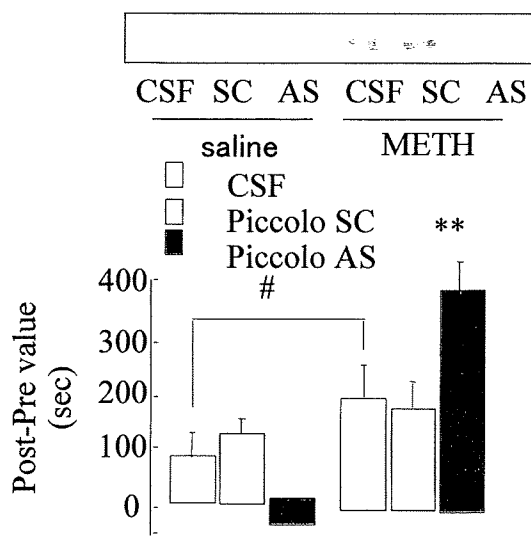


Fig.5 Values are means \pm SE (n=5-12). * p <0.05 vs. saline-treated mice. # p <0.05 vs. piccolo-SC-treated mice.

4. 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、産まれてきたマウスの尾から DNA を抽出し、その中で PiccoloC2A ドメイン過剰発現マウスの場合には C2A ドメイン、Shati 過剰発現マウスの場合には 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。