

- 44) Ikeda M, Ozaki N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kishi T, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Iwata N. Possible association of beta-arrestin 2 gene with methamphetamine use disorder, but not schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 6 (1):107-112 (2007)
- 45) Yamamoto H, Kamegaya E, Hagino Y, Imai K, Fujikawa A, Tamura K, Enokiya T, Yamamoto T, Takeshima T, Koga H, Uhl GR, Ikeda K, Sora I. Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture. *Neurochemistry International.* 51: 237-244(2007)
- 46) Numachi Y, Ohara A, Yamashita M, Fukushima S, Kobayashi H, Hata H, Watanabe H, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I. Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur J Pharmacol.* 572: 120-128(2007)
- 47) Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales RA. Mu opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis. *Biol Psychiatry* 62 (6): 627-634 (2007)
- 48) 曾良一郎, 猪狩 もえ, 山本 秀子, 池田和隆. 依存性薬物の分子標的としてのモノアミントランスポーター. *日本薬理学雑誌* 130:450-454 (2007)
- 49) 曾良一郎. 薬物依存の分子病態. *実験医学* 25(13):179-184(2007)
- 50) 曾良一郎, 朴英善. モノアミン神経伝達と「こころの病」. *Bionics* 24(11):40-45(2006)
- (2) 学会発表
- 1) 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]
- 2) 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]
- 3) 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]
- 4) 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]

- 5) 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]
- 6) 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]
- 7) 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]
- 8) 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]
- 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 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]
- 10) 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]
- 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 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]
- 12) 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]
- 13) Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I. and Kitayama, S.: Methylone 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]
- 14) 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]
- 15) Kasai, S., Yamamoto, H., Kamegaya, E., Uhl, GR., Sora, I., Watanabe, M. and Ikeda, K.: Mu-opioid peptide receptors (MOPR) 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]
- 16) 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]
- 17) 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]
- 18) 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]
- 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]
- 24) Sora, I., Ikeda, K., Uhl, GR., and JGIDA.: Human genetics of psychostimulant dependence. Genetics and Genomics in Drug Addiction Steve LaForge Memorial Symposium, The 39th meeting of the International Narcotics Research Conference (INRC), Charleston, SC, USA [2008/7/15]
- 25) Arime, Y., Hall, FS., Uhl, GR., and Sora, I.: Prefrontal net blockade ameliorates prepulse inhibition deficits in dopamine transporter knockout mice: involvement of cortical-subcortical pathways. Tohoku Neuroscience GCOE summer retreat, Matsushima, Japan [2008/8/20-21]
- 26) Igari, M., Ishihara, K., and Sora, I.: Effect of serotonin 2a receptor antagonist ketanserin on behavioral sensitization in serotonin transporter knockout mice induced by methamphetamine. Tohoku Neuroscience GCOE summer retreat, Matsushima, Japan [2008/8/20-21]
- 27) Arime, Y., and Sora, I.: The Effects of Monoaminergic Regulation on Cognitive Dysfunction and How It Exerts One's Action. Joint Symposium : Clues to the Pathophysiology and Treatment of Psychiatric Disorders..., 2nd WFSBP Asia-Pacific Congress and 30th Annual Meeting of JSBP, Toyama, Japan [2008/9/13]
- 28) Sora, I.: Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants. Workshop on Apoptosis in biology and medicine, Sendai, Japan [2008/9/12-14]
- 29) Yamamoto, H., Takamatsu, Y., Imai, and K.: Kamegaya, E., Hagino, Y., Watanabe, M., Yamamoto, T., Sora, I., Koga, H., and Ikeda, K.: Mop reduction during long-term methamphetamine withdrawal was restored by chronic post-treatment with fluoxetine. The 2nd United States-Japan Joint Workshop on Alcohol-Related Problems, Yokohama [2008/9/15-19]
- 30) Okahisa, Y., Ujike, H., Kotaka, T., Kishimoto, M., Inada, T., Harano, M., Uchimura, N., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., and Kuroda, S.: Association study between the cannabinoid receptor 2 gene and patients with methamphetamine dependence/psychosis, XIV WPA World Congress of Psychiatry, Prague, Czech Republic [2008/9/ 19-25]
- 31) Kotaka, T., Okahisa, Y., Ujike, H., Takaki, M., Nakata, K., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N., and Kuroda, S.: The association study between the G72 gene and methamphetamine psychosis. □□ World Congress on Psychiatric Genetics (WCPG 2008)

- Osaka, Japan [2008/10/ 11-15]
- 32) Okahisa, Y., Ujike, H., Kotaka, T., Takaki, M., Nakata, K., Inada, T., Uchimura, N., and Yamada, M.: Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Association between the cannabinoid receptor 1 gene and patients with methamphetamine dependence. XVI World Congress on Psychiatric Genetics (WCPG 2008) Osaka, Japan [2008/10/ 11-15]
- 33) Usui, H., Yoshimura, T., Yoshimi, A., Takahashi, N., Saito, S., Aleksic, B., Ishihara, R., Ujike, H., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., and Ozaki, N.: Association study between GDNF and methamphetamine dependence in the Japanese population. XVI World Congress on Psychiatric Genetics (WCPG 2008) Osaka, Japan [2008/10/11-15]
- 34) Okochi, T., Kishi, T., Ikeda, M., Kitajima, T., Kinoshita, Y., Kawashima, K., Tsunoka, T., Okumura, T., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Ujike, H., and Iwata, N.: Genetic association study between NRG1 and Japanese methamphetamine use disorder. XVI World Congress on Psychiatric Genetics (WCPG 2008) Osaka, Japan [2008/10/11-15]
- 35) Kasahara, Y., Li, B.J., Arime, Y., Yamashita, M., Sora, I.: Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of dopamine transporter knockout mice. Neuroscience Workshop for Young Scientists. GCOE. Shanghai [2008/10/17]
- 36) Nishizawa, D., Hasegawa, J., Kasai, S., Ujike, H., Ozaki, N., Sekine, Y., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Iyo, M., Iwata, N., Sora, I., Higuchi, S., and Ikeda, K.: Association of *GIRK3* gene polymorphisms with methamphetamine and alcohol dependence. The American Society Of Human Genetics 58th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA [2008/11/ 11-15]
- 37) Arime, Y., Hall, FS., Uhl, GR., and Sora, I.: Prefrontal NET blockade ameliorates prepulse inhibition deficits in dopamine transporter knockout mice: involvement of cortical-subcortical pathways. The Society for Neuroscience (SFN) 38th Annual Meeting, Washington, DC, USA [2008/11/ 16]
- 38) Moe, I., Piao, YS., Ito, M., Ohara, A., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Hall, FS., Uhl, GR., Lesch, KP., Murphy, D L., and Sora, I.: Toxicity induced by MDMA analogue 'methylone'. The Society for Neuroscience (SFN) 38th Annual Meeting, Washington, DC, USA [2008/11/ 19]
- 39) 曾良一郎: 精神疾患モデルとしてのモノアミン輸送体欠損マウス. シンポジウム 精神疾患とそのモデル小動物の表現型解析 社) 日本実験動物学会第 55 回総会/日本実験動物技術者協会第 42 回総会 合同大会, 仙台 [2008/5/15]
- 40) 曾良一郎: 精神疾患の分子基盤. 第 2 回ソニーコンピュータサイエンス研究所 (CSL) 設立 20 周年記念連続講演会, 東京 [2008/5/26]
- 41) 曾良一郎: シンポジウム 17 AD/HD の薬物療法 -メチルフェニデートを巡って- 薬物依存とメチルフェニデート. 第 104 回 日本精神神経学会総会, 東京 [2008/5/30]
- 42) 福島攝、沈昊偉、畑春実、小原可久、近江香子、猪狩もえ、池田和隆、沼知陽太郎、小林秀昭、曾良一郎: モノアミントランスポーター欠損が覚せい剤による逆耐性現象形成に与える影響. トランスポーター研究会. 京都 [2008/6/7-8]
- 43) 岡久祐子、氏家寛、小高辰也、高木学、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：RGS9 遺伝子多型と統合失調症および覚せい剤依存症の関連研究. 第 30 回日本生物学的精神医学会, 富山 [2008/9/12]
- 44) 小高辰也、氏家寛、岡久祐子、高木学、中田謙二、稲田俊也、山田光彦、内村直尚、岩田仲生、曾良一郎、伊豫雅臣、尾崎紀夫、黒田重利：G72 遺伝子と覚せい剤精神病との関連. 第 30 回日本生物学的精神医学会, 富山 [2008/9/13]
- 45) 臼井比奈子、吉村智子、吉見陽、高橋長秀、齋藤真一、Branko Aleksic、石原良子、氏家寛、稲田俊也、山田光彦、内村直尚、岩田仲生、曾良一郎、伊豫雅臣、尾崎紀夫：GDNF 遺伝子とメタンフェタミン使用障害との関連解析. 第 30 回日本生物学的精神医学会, 富山 [2008/9/13]
- 46) 橋本佐、宮武良輔、伊豫雅臣、橋本謙二、関根吉統、稲田俊也、尾崎紀夫、岩田仲生、原野陸生、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、氏家寛：日本人における覚せい剤精神障害とグルタミン酸関連遺伝子多型の相関研究. 第 43 回日本アルコール・薬物医学会, 第 20 回日本アルコール精神医学会, 第 11 回ニコチン・薬物依存研究フォーラム, 第 28 回アルコール医学生物学会, 平成 20 年度合同学術総会, 横浜 [2008/9/15]
- 47) 高松幸雄、萩野洋子、山本秀子、曾良一郎、池田和隆：ドーパミントランスポーター欠損マウスの注意と学習に対する methylphenidate の効果. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会, 東京 [2008/10/1]
- 48) Nishizawa D, Hasegawa J, Kasai S, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Sora I, Higuchi S, Ikeda K: GIRK
- チャンネル遺伝子 *GIRK3* の遺伝子多型とメタンフェタミン依存症及びアルコール依存症との関連. 第 38 回日本神経精神薬理学会 (JSNP), 東京 [2008/10/1-3]
- 49) 猪狩もえ、石原佳奈、曾良一郎：メタンフェタミン誘発性逆耐性形成へのセロトニン受容体の関与. Effects of selective serotonin receptor antagonists on methamphetamine induced behavioral sensitization in serotonin transporter knockout mice. 第 38 回日本神経精神薬理学会 (JSNP), 東京 [2008/10/2]
- 50) Sora I. Monoamine function in mental disorders. 5th International Receptor Symposium 2007, Development of Novel Therapy to Specific Disease in Organ. Shizuoka [2007/12/13] 第 4 回国際産学連携フォーラム
- 51) Perona MTG, Waters S, Hall FS, Sora I, Murphy DL, Lesch KP, Caron MG, Uhl GR. The effects of DAT, NET and SERT gene knockout in animal models of depression. The Society for Neuroscience (SFN) 37th Annual Meeting, San Diego, USA [2007/11/6]
- 52) Arime Y, Fukushima S, Hall FS, Uhl GR, Sora I. The local administration of a selective NET blocker ameliorates prepulse inhibition deficits in DAT knockout mice. The Society for Neuroscience (SFN) 37th Annual Meeting, San Diego, USA [2007/11/3]
- 53) Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N, Iwata N. No association between Prostate apoptosis response 4 gene (PAWR) and Methamphetamine use disorder in the Japanese population. The First Annual International Drug Abuse Research Society

Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]

- 54) Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N, Iwata N. No association between Glutamate cysteine ligase modifier (GCLM) subunit gene and Methamphetamine use disorder in the Japanese population The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
- 55) Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N, Iwata N. No association between alpha4 and beta2 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors genes and Methamphetamine use disorder in the Japanese population. The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
- 56) Kinoshita Y, Ikeda M, Ujike H, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kishi T, Kawashima K, Ohkouchi T, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Aleksici B, Iwata N. Association study of the calcineurin A gamma subunit gene (PPP3CC) and methamphetamine use disorder in the Japanese

population. The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]

- 57) Okahisa Y, Ujike H, Kishimoto M, Kotaka T, Morita Y, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. association study between the neuropeptide y gene and patients with methamphetamine dependence/psychosis The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
- 58) Kotaka T, Ujike H, Morita Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. association study between the casein kinase 1 epsilon gene and methamphetamine dependence The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]
- 59) Ezaki N, Nakamura K, Sekine Y, Iyo M, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Mori N. association analysis of 5-HT1PR variants with methamphetamine psychosis in Japanese populations. The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting in collaboration with The International Society for Neurochemistry / The American

Society for Neurochemistry, Hyatt Regency Merida, Merida, Mexico[2007/8/14-17]

- 60) 氏家寛, 岸本真希子, 本橋靖子, 岡久祐子, 小高辰也, 原野睦生, 稲田俊也, 山田光彦, 小宮山徳太郎, 堀達, 関根吉統, 岩田仲生, 曾良一郎, 伊豫雅臣, 尾崎紀夫, 黒田重利. 覚せい剤精神病の DTNBP1 遺伝子防禦ハプロタイプは統合失調症と同じである. 第 15 回日本精神・行動遺伝医学会, 東京 [2007/11/17]
- 61) 曾良一郎. 機能性精神疾患におけるモノアミン神経伝達. 東北大学脳科学 GCOE 発足シンポジウム, 東京 [2007/10/13]
- 62) 曾良一郎, 福島攝, 山本秀子, 池田和隆. ADHD 動物モデルとしてのドーパミントランスポーター欠損マウス. シンポジウム 4 AD/HD 研究の新機軸-基礎と臨床のクロストーク. 第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会, 札幌 [2007/7/11-13]
- 63) 曾良一郎. モノアミン神経伝達と機能性精神疾患. 第 13 回 PharmaScience フォーラム「こころ」の神経科学-精神疾患・情動障害のより良い治療をめざして-, 札幌 [2007/6/4]
- 64) 糸川昌成, 土井永史, 星詳子, 新井誠, 古川愛造, 氏家寛, 曾良一郎, 吉川武男. 統合失調症と neuropeptideY 遺伝子の機能性多型 -485C>T との関連-疾患脆弱性・抵抗性遺伝子モデルの検証-第 2 回統合失調症学会, 富山 [2007/3/25]
- 65) 曾良一郎, 山本秀子, 池田和隆. 依存性薬物の分子標的としてのモノアミントランスポーター. シンポジウム「神経伝達物質トランスポーター研究の新しい展開」第 80 回日本薬理学会年会, 名古屋 [2007/3/14-16]
- 66) 小高辰也, 氏家寛, 岸本真希子, 岡久祐子, 森田幸孝, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 堀達, 山田光彦, 関根吉統, 岩田仲生, 伊豫雅臣, 曾良一郎, 尾崎紀夫, 黒田重利. Casein Kinase 1 Epsilon 遺伝子と覚醒剤依存症との関連研究. 第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会, 札幌 [2007/7/11-13]
- 67) 岸本真希子, 氏家寛, 岡久祐子, 小高辰也, 森尾亜希子, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 堀達, 山田光彦, 関根吉統, 岩田仲生, 伊豫雅臣, 曾良一郎, 尾崎紀夫, 黒田重利. FZD3 遺伝子は精神病に関連する. 第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会, 札幌 [2007/7/11-13]
- 68) 岡久祐子, 氏家寛, 岸本真希子, 小高辰也, 森尾亜希子, 稲田俊也, 原野睦生, 小宮山徳太郎, 堀達, 山田光彦, 関根吉統, 岩田仲生, 伊豫雅臣, 曾良一郎, 尾崎紀夫, 黒田重利. ニューロペプチド Y 遺伝子多型と覚せい剤依存症/精神病の関連研究. 第 29 回日本生物学的精神医学会・第 37 回日本神経精神薬理学会, 札幌 [2007/7/11-13]

(3) 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

乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究
3年間のまとめ

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：藤田 有子²、萩原 裕子^{1,2}、谷淵 由布子^{1,2}、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、抗腫瘍抗生物質ミタラマイシンおよび第二世代抗生物質ミノサイクリンの効果を調べた。ミタラマイシンは覚せい剤投与による逆耐性形成やドパミン神経系の障害を抑制することを見出した。またミノサイクリンが、覚せい剤投与による依存形成を抑制する事を場所嗜好試験にて明らかにした。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)の乱用により脳内ドパミン(DA)神経系の障害が起こり、薬物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投与による行動異常やDA神経傷害に対する抗腫瘍抗生物質ミタラマイシンの効果を検討した。さらにMETH投与による薬物依存の形成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□：実験には7~8週齢のBalb/C雄性マウス(日本チャールズ・リバー社)を使

用した。急性の移所行動量の測定は、生理食塩水(10 ml/kg)もしくはミタラマイシン(300 µg/kg)を投与し30分後にMETH(3 mg/kg)を投与し、2時間の移所行動量を測定した。逆耐性形成への効果の実験では、METH(3 mg/kg)投与の30分前に生理食塩水(10 ml/kg)もしくはミタラマイシン(300 µg/kg)をi.p.処置した。投与は1日1回、5日間連続で投与した。その後1週間を休薬期間としMETH(1mg/kg)をチャレンジ投与し、その後2時間の移所行動量を測定した。METH誘発性DA神経系神経傷害の実験ではMETH(3 mg/kg x3, 3-hr interval)を投与しモデルとし、生理食塩水(10 ml/kg)あるいはミタラマイシン(75, 150, 300 µg/kg)を投与し、30分後にMETH(3 mg/kg x 3)を3時間毎に3回投与した。METH投与3日後に脳を摘出し線条体におけるDAおよび代謝物DOPACの含量を高速液体クロマトグラ

フィーで測定した。更に METH 投与3日後のドーパミン・トランスポーター (DAT) の免疫組織化学を行った。

実験□: 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、生理食塩水 (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)あるいは生理食塩水 (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

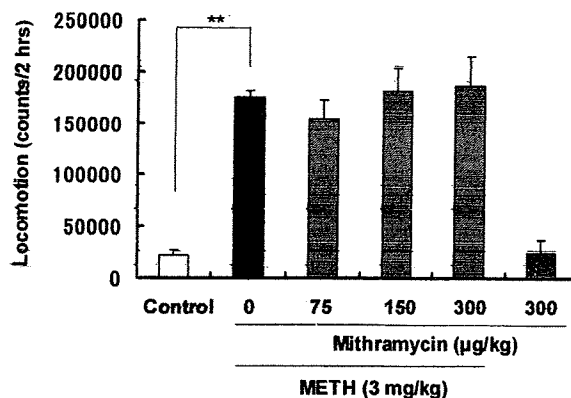
ミタラマイシンの前投与は、METH 単回投与による急性の移所行動量の増加に影響を与えなかったが (Figure 1)、METH 投与の繰り返し投与による逆耐性形成を有意に抑制した (Figure 2)。ミタラマイシンの前投与は、METH の繰り返し投与による体温上昇を有意に抑制し、METH 投与によるマウス線条体における DA 及び DOPAC の減少を用量依存的に抑制した。さらに、ミタラマイシンの前投与は METH 投与によるマウス脳内 DAT 密度の低下を有意に抑制した (Figure 3)。

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 (Figure 4)。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 4)。

D. 考察

本研究の結果より、ミタラマイシンは覚せい剤乱用によって引き起こされる神経傷害の治療薬となる可能性が示唆された。さらに、覚せい剤関連障害の治療薬として

Figure 1



可能性があるミノサイクリンは METH 投与による依存形成を抑制する事が判った。さらに最近、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。

Figure 2

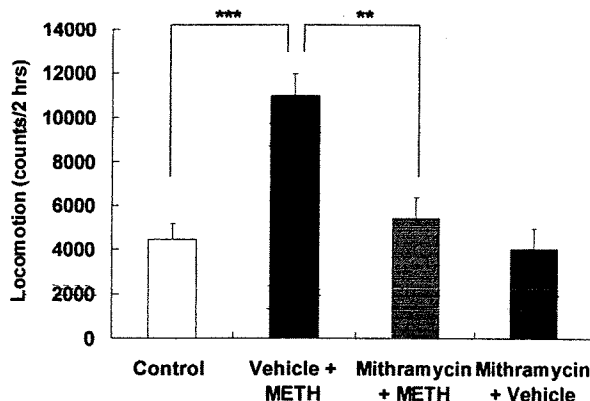


Figure 3

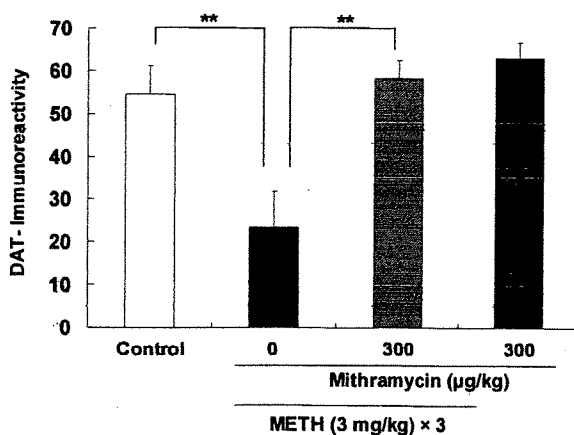
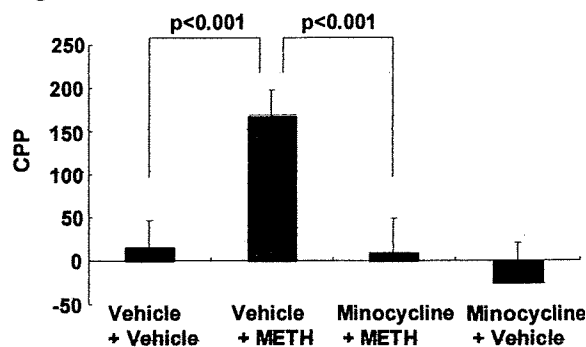


Figure 4



E. 結論

本研究の結果より、安全な抗生物質であるミノサイクリンは覚せい剤関連精神障害の新しい治療薬になるであろう。

[参考文献]

1. Zhang L, Kitaichi K, Fujimoto Y, Nakayama H, Shimizu E, Iyo M, Hashimoto K. 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, Shirayama Y, Shimizu E, Iyo M, Hashimoto K. 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, Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Iyo M. 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, Ishima T, Kunitachi S, Hagiwara H, Zhang L, Iyo M, Hashimoto K. 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. Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Mithramycin protects dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 2009; 1301: 189-196.
6. 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* in press.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu, E., Watanabe, H., Kojima, T., Hagiwara, H., Fujisaki, M., Miyatake, R., Hashimoto, K. and Iyo, M. Combined intoxication with methylone and 5-MeO-MIPT. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 288-291, 2007.
2. Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T. and Iyo, M. 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.
3. Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Miyatake, R., Shirayama, Y., Shimizu, E., Maeda, K., Suzuki, Y., Mashimo, Y., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Hata, A., Sawa, A. and Iyo, M. Identification of functional polymorphisms in the promoter region of the human PICK1 gene and their association with methamphetamine psychosis. *Am. J. Psychiatry* 164, 1105-1114, 2007.
4. Zhang, L., Shirayama, Y., Iyo, M. and Hashimoto, K. Minocycline attenuates hyperlocomotion and prepulse inhibition deficits in mice after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacology* 32, 2004-2010, 2007.
5. Hashimoto, K., Ishima, T., Fujita, Y., Matsuo, M., Kobashi, T., Takahagi, M., Tsukada, H., Iyo, M.: Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of the novel selective $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist SSR180711. *Biol. Psychiatry*, 63: 92-97, 2008.
6. Fujita, Y., Ishima, T., Kunitachi, S., Hagiwara, H., Zhang, L., Iyo, M., Hashimoto, K.: 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.
7. Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Kishimoto, M., Okahisa, Y., Kotaka, T., Harano, M., Inada, T., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S.: The glycine transporter 1 gene (GLYT1) is associated with methamphetamine-use disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B.*, 147B: 54-58, 2008.
8. Hashimoto, T., Hashimoto, K., Miyatake, R., Matsuzawa, D., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iyo, M.: Association study between polymorphisms in glutathione-related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population. *Am. J. Med. Genet. Part B.*, 147B: 1040-1046, 2008.
9. Otani, K., Ujike, H., Sakai, A., Okahisa, Y., Kotaka, T., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Hori, T., Yamada, M., Sekine, Y., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., Kuroda, S.: Reduced CYP2D6 activity is a negative risk factor for methamphetamine dependence. *Neurosci. Lett.*, 434: 88-92, 2008.
10. Uhl, G.R., Drgon, T., Liu, Q.R., Johnson, C., Walther, D., Komiyama, T., Harano, M., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iyo, M., Iwata, N., Yamada, M., Sora, I., Chen, C.K., Liu, H.C., Ujike, H., Lin, S.K.: Genome-wide association for methamphetamine dependence: convergent results from 2 samples. *Arch. Gen. Psychiatry*, 65: 345-355, 2008.
11. Kishimoto, M., Ujike, H., Okahisa, Y., Kotaka, T., Takaki, M., Kodama, M., Inada, T., Yamada, M., Uchimura, N., Iwata, N., Sora, I., Iyo, M., Ozaki, N., Kuroda, S.: The Frizzled 3 gene is associated with methamphetamine psychosis in the Japanese population. *Behav. Brain Funct.*, 4: 37, 2008.

12. 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.

13. Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Mithramycin protects dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 2009; 1301: 189-196.

14. 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.

15. 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. 松澤大輔、橋本謙二、宮武良輔、白山幸彦、清水栄司、前田和久、鈴木洋一、真下陽一、関根吉統、稲田俊也、尾崎紀夫、岩田仲生、原野睦夫、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、氏家 寛、羽田 明、澤 明、伊豫雅臣 (2007) PICK1機能的遺伝子多型と覚せい剤精神病との関連. 第34回日本脳科学学会、6月8日、9日、出雲市.

2. 萩原裕子、藤田有子、石間環、伊豫雅臣、橋本謙二 (2007) フェインサイクリジン投与による認知機能障害に及ぼす非定型抗精神病薬ペロスピロンの効果. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会 合同年会

3. 石間環、藤田有子、松尾昌昭、小橋達弘、高萩誠、塚田秀夫、伊豫雅臣、橋本謙二 (2007) フェインサイクリジン投与による認知機能障害に及ぼす $\alpha 7$ ニコチン受容体アゴニストSSR 180711の効果. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会 合同年会

4. 藤田有子、石間環、茶木茂之、伊豫雅臣、橋本謙二 (2007) フェインサイクリジン投与による認知機能障害に及ぼすグリシントランスポーター1阻害薬NFPSの効果. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会 合同年会

5. 萩原裕子、藤田有子、石間環、伊豫雅臣、橋本謙二: フェインサイクリジン投与による認知機能障害に及ぼす非定型抗精神病薬ペロスピロンの効果. 第13回日本行動薬理研究会. 千葉市、2008年6月6日.

6. 金原信久、清水栄司、大掛真太郎、藤田有子、橋本謙二、伊豫雅臣: MK-801によるプレパルス抑制障害に対するNMDA受容体グリシンサイトアゴニストの改善作用. 第13回日本行動薬理研究会. 千葉市、2008年6月6日.

7. 藤田有子、石間 環、河野眞美、萩原裕子、伊豫雅臣、橋本謙二: フェンサイクリジン投与による認知機能障害に及ぼすフルボキサミンの改善作用: シグマ-1受容体の関与. 第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同学会. 東京都、平成20年10月1日.

8. 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。

9. Hashimoto, K., Ishima, T., Fujita, Y., Matsuo, M., Kobashi, T., Takahagi, M., Tsukada, H. and Iyo, M. Phencyclidine-induced cognitive deficits are ameliorated by subsequent subchronic administration of the selective $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist SSR180711. The 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA. November 3-7, 2007.

10. Kunitachi, S., Fujita, Y., Ishima, T., Kohno, M., Hagiwara, H., Shirayama, Y., Iyo, M. and Hashimoto, K.: Phencyclidine-induced cognitive deficits are ameliorated by subsequent subchronic administration of donepezil: role of sigma-1 receptors. The 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, USA. November 15-19, 2008.

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

「乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究」

3年間のまとめ

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：柏 淳、金子雄二郎、伊藤 卓、竹林裕直、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、(i) 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、(ii)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、DNAマイクロアレイ、RAP-PCR、RT-PCR等の方法を用いて探索した。その結果、細胞外マトリックスタンパクをコードするCCNI遺伝子や、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、また、アクチン重合に関与するタンパクをコードする*leiomodlin 2*遺伝子が視床において、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り、遺伝子転写産物の構造、薬理学的反応性、神経解剖学的特徴等の解析を行った。これらの解析データより、上記3種類の遺伝子が、NMDA受容体遮断薬による精神病状態の発症に関与する神経回路または分子カスケードにおいて機能していることが示唆され、乱用薬物が引き起こす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と考えられた。

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、MAP や PCP に対する応答性を獲得する遺伝子群を検索している。平成 19 年度から 21 年度までの 3 年間に、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および視床から、PCP に発達依存的応答示す遺伝子として、*CCNI* (connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma over-expressed または cystein-rich protein 61 (*CYR61*)) 遺伝子⁴)、*leiomodlin 2* 遺伝子 (*Lmod2*)¹³)、および *SAP97* (synapse-associated protein 97) 遺伝子²)を検出し、転写産物の構造、薬理学的反応性、神経解剖学的特徴等の解析を行った²)。

B. 研究方法

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

動物実験には、生後 8-56 日令の Wistar 系雄性ラットまたは C57BL/6 系雄性マウスを用いた。動物は 25.0±0.5°C、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. DNA アレイ^{4,13})

PCP または生理食塩水を投与した、生後 8 日齢および 56 日齢のマウスまたはラットの大脳新皮質から total RNA を抽出した。このうち、0.4 ug を用いて、random hexamer priming による逆転写反応によって cDNA を合成し、8,374 クローンに対する DNA チップ (マウス用: IncyteGenomics, Inc (Genome Systems Inc.)) または約 28,000 遺伝子の 30,000 転写産物以上に対する DNA チップ (ラット用: Affymetrix GeneChip^R Rat Genome 230 2.0 Array) を使って、生後 8 日と 56 日の間で薬物応答に差のある遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、この結果を定量的 RT-PCR により確認した。

3. Differential cloning 法: RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)^{2,5})

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。

4. ノーザンブロット分析^{4,13)}

各ラット大脳親皮質より全 RNA を、RNeasy Midi Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)を用いて抽出した。それぞれのサンプル 15 µg をアガロース-ホルムアルデヒドゲル(6.3% formaldehyde, 1% agarose, 1x 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid (MOPS) buffer (0.4 M MOPS, 0.1 M sodium acetate, 0.01 M EDTA: pH 7.0)) を使った電気泳動によって分離した。これをナイロンメンブレイン (Hybond N+, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) に転写し、紫外線照射により固定した。

ラジオアイソトープを用いる方法では、42°C に保ったハイブリダイゼーションバッファー(ULTRAhyb, Ambion, Texas, U.S.A.)中で 30 分間インキュベーションした後、³²P 標識の cDNA プローブ(ラット *CCNI* cDNA, 1140 bases (nucleotides 186-1325, GenBank Accession No. NM031327); ラット GAPDH cDNA, 609 bases (nucleotides 331-939, GenBank Accession No. X02231) と 42°C において 16 時間反応させた。0.1%(w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) を含む 0.2× 標準生理食塩水-クエン酸ナトリウムバッファー(SSC)による high stringency 条件下、68°C で 60 分間洗浄の後風乾し、放射線感受性プレート(Fuji Image Plate)に暴露した。このプレートをデンシトメトリックイメージアナライザー (Fuji BAS 2000 Image Analyzer) によりシグナル強度を定量的に解析した。測定値の比較は、the optical densities of the bands of the *CCNI* と GAPDH の mRNA のバンドの電子密度の比について行った。

ラジオアイソトープを用いない方法では、プレハイブリダイゼーションを 68°C に保ったバッファー(DIG-Easy Hyb buffer, Roche)中で 2 時間行った後、ハイブリダイゼーションとして、digoxigenin (DIG)で標識した RNA プローブ (ラット *Lmod2* cDNA, 335 bases (nucleotides 1549-1883, GenBank Accession No. AB331240); ラット GAPDH cDNA, 609 bases (nucleotides 331-939, GenBank Accession No. X02231)) を、同じバッファー中において一晩反応させた。0.1%(w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) を含む、2× 標準生理食塩水-クエン酸ナトリウムバッファー(SSC)により室温で 1 時間、さらに 0.1×SSC/0.1%SDS により 68°C で 1 時間洗浄した。ハイブリダイゼーションはアルカリフォスファターゼに結合させた抗 DIG 抗体によって免疫反的に検出し、化学発光物質 CDP-Star (Roche)で可視化した。ラット各臓器間の発現を比較する実験では、各臓器から抽出された mRNA を吸着させたメンブレインの Rat Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Takara Bio/Clontech)をハイブリダイゼーションに用いた。

5. 遺伝子発現の定量的解析

(1)*CCNI*⁴⁾および *Lmod2*¹³⁾

上記のように調整した、ラットまたはマウス大脳新皮質 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。標的遺伝子 mRNA および GAPDH mRNA に特異的なプライマーペアにより、LightCycler (Roche) を用いてリアルタイム PCR (LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 Kit) を行った。PCR 増幅産物の量は Syber Green の蛍光強度として、

各サイクルの伸長反応の終わりの時点で測定した。RT-PCRには、次のプライマーセットを用いた： *CCNI*, 5'-AGTGCCGCCTGGTCAAAGAGA-3' と 5'-CACGCAGGAGCCGCAGTATTT-3'; *GAPDH*, 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3' と 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' ; *Lmod2*, 5'-AATGGAAGAAAGCTCCCGG-3' と 5'-CCACCCTCCGTAGCTGTCTTAT-3'; *Tmod1*, 5'-GACAGTGATGGCTCAAAAGCTG-3' と 5'-CGATGCCACTCTAGTTACCCTG-3'; *Tmod2*, 5'-CGTTTCCGTTAACCATATCCG-3' と 5'-TGTACAAGCCACCAAGCGTGT-3'。得られたPCR増幅曲線からLightCycker Softwareを用いて、*GAPDH* および標的遺伝子のmRNA量の相対値を算出した。標的遺伝子のmRNA発現量は*GAPDH* mRNA量に対する比として補正した後、統計解析を行った。なお、PCR産物の特異性の検討は、PCR後の融解曲線解析およびアガロースゲル電気泳動による単一バンドの確認により行った。mRNA発現の定量は、mRNAの濃度に比例した測定値が得られる条件下におけるRT-PCRによっても検討した。

(2) *SAP97*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(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).

6. In situハイブリダイゼーション¹³⁾

Northernで用いたのと同じcRNAプローブをDIG^{11,14}または³⁵Sで標識^{23,24}し、木山らの方法に従い生後50日齢の脳切片に対してin situハイブリダイゼーションを行った。いずれも、スライドグラスに凍結脳切片(厚さ16 μ m)を貼り付け、次の過程の順に処理した後、ハイブリダイゼーションを行った: 1) 自然乾燥、2) 4% パラフォルムアルデヒドを含むリン酸バッファー生理的食塩水(PBS)中で20分間固定、3) PBSで2分間リンスを2回、4) 5rSSCで15分間処置。

7. 統計解析^{2,4,5,13)}

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. *CCNI*⁴⁾

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

DNA アレイにより、生後8日と56日における PCP (10mg/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、56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、*CCNI* と transthyretin が候補となり、成熟期における増加率が大きい *CCNI* を今回の解析対象とした。

RT-PCR を用いた定量的解析から、PCP 投与後の *CCNI* mRNA は成熟期に対照群の398%に達するのに対し、幼若期では140%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: 56日齢, saline 100 \pm 11%, PCP 398 \pm 11**, **p<0.01 vs saline-treated controls; 8日齢, saline 100 \pm 7%, PCP 140 \pm 10, p>0.05 vs saline-treated controls; 生後日齢 X PCP 処置の交互作用, $F_{1,16}=40.813$, $P<0.0001$ 。

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

PCP 投与成熟ラット(56日齢)の大脳親皮質 *CCNI* 発現量は、10mg/kgの方が5mg/kgより高いが、20mg/kg投与時には10mg/kgより低下することが、RT-PCRにより明らかになった。

PCP10mg/kg投与時の大脳親皮質 *CCNI* 発現の増加は、ノーザンブロット分析でも確認された: saline 100 \pm 1%, PCP 317 \pm 4%**,**p<0.01 vs saline-treated controls。

(3) PCP, dizocilpine および MAP の成熟ラット大脳親皮質の *CCNI* 発現に与える影響

成熟期ラットに PCP (7.5mg/kg), NMDA 受容体の選択的な非競合的遮断薬 dizocilpine

(MK801: 1.0mg/kg) または間接的ドーパミン作動薬 MAP (4.8mg/kg) を投与した 60 分後においては、いずれの薬物でも、大脳新皮質 *CCNI* mRNA は著明に増加していた: saline $100 \pm 7\%$, PCP $452 \pm 5^*$, dizocilpine $396 \pm 9\%^*$, methamphetamine $564 \pm 9\%^*$, * $p < 0.01$ vs saline-treated controls.

2. *Lmod2*¹³⁾

(1) PCP に対し発達依存的応答を示す遺伝子 *Lmod2* のスクリーニング

成体ラットの視床において、PCP 投与により、その発現が 2 倍以上増加する遺伝子として 5 個の既知遺伝子と 3 個の未確立の遺伝子転写産物が検出された。未確立の 3 個の遺伝子に注目したところ、この中の一つがクローニングにより既知遺伝子 *Lmod2*² のラット ortholog であることが明らかになった。本研究で得られたラット *Lmod2* 遺伝子 cDNA から予測されるアミノ酸配列はマウスと 97% の相同性が見られた。*Lmod2* 遺伝子は、主として心筋に発現し、アクチンキャッピングドメインで細胞骨格蛋白と相互作用する蛋白をコードすることが知られているが、他に検出された 5 つの既知遺伝子への PCP の作用は報告があるのに対し、これまで脳における研究報告がなく、その機能も十分に解明されていないため、本研究の解析対象とした。

ノーザンブロット解析において、成熟ラット *Lmod2* mRNA は、主として心筋に発現し骨格筋でも認められたが、脳全体では検出できなかった。RT-PCR を使って脳の部位別発現を検討したところ、ほぼ視床に限局していることがわかった。

(2) *Lmod2* の PCP に対する応答

Lmod2 遺伝子の発現が、生後 50 日齢の視

床では PCP の急性投与により増加し、8 日齢の視床では増加しないという DNA アレイの結果は、RT-PCR によっても確認された。*Lmod2* 遺伝子は tropomodulin (*Tmod*) 遺伝子ファミリーに属しているが、脳で同定されている他の *Tmod* アイソフォームの *Tmod1*、*Tmod2* は、*Lmod2* とは対照的に、脳全体に広く発現しており、視床において、成熟期 (50 日齢)、新生仔期 (8 日齢) とともに PCP による影響は受けなかった。また、心筋の *Lmod2* 遺伝子は、視床と同一の塩基配列をもっていたが、その反応性は視床とは異なり、PCP 投与後も有意な変化を示さなかった。生後発達の観察では、*Lmod2* 遺伝子の基礎発現は生後 26 日まで増加し、PCP への応答性は生後 32 日以降に出現することが明らかになった。これらの結果から、*Lmod2* 遺伝子は発達依存的で視床選択的な PCP による発現誘導を受けることが示唆された。

さらに、成熟期において、PCP 投与後の *Lmod2* mRNA 発現は、1-3 時間でピークを迎え 6 時間後には saline 投与と同じレベルにまで低下した。これに対して、新生仔期 (生後 8 日) では、投与 1、2、3、6 時間後のいずれでも、有意な変化は観察されなかった (データ省略)。すなわち、発達による PCP の影響の差異は、PCP の代謝などの薬物動態の変化によるものではないと推測された。

In situ hybridization においても、視床の *Lmod2* 遺伝子は PCP により発現が増加することを確認した。また、その基礎的発現や PCP に対する応答は、生後 50 日齢の脳において、視床前核群 (前内側核、前腹側核、前内側間核)、視床腹前外側核群、腹内側視床核、菱形核、髄板内核群 (中心内側核、傍中心核、中心外側核)、外側および腹側視床後核等に限