

#### D. 考察

アルコール曝露動物の側坐核において、H3K27me3 の低下を伴った KCC2 の発現上昇が認められ、METH による逆耐性獲得動物では H3K4me3 の増加を伴った CCR2 の発現上昇が認められた。したがって、薬物処置による KCC2 が細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度調節機構の不均衡を引き起こし、神経活動調節系に対し直接的な影響を与える可能性が考えられる。さらに、CCR2 の knockout により METH による逆耐性現象の消失が認められたことから、CCR2 が依存症における再燃の治療の標的となる可能性が示唆された。

#### E. 結論

エピジェネティクスの網羅的解析は、依存性薬物による後生的遺伝子修飾を知る手がかりとして極めて重要な手続きであると考えられる。薬物依存のフェノミクス解析に基づく分子メカニズム探索には、時間軸、細胞特異性などを考慮したマルチプルなアプローチが必要であることは疑いないが、今後は細胞-細胞間コミュニケーションとネットワークを融合したマイクロフェノミクス解析が重要であると考えられる。さらに、本研究における脳内神経の可塑的变化を結びつけるアプローチは、アルコールや METH をはじめとする依存性薬物の精神依存形成やその維持機構の複雑さを紐解く重要な鍵になると考えられ、今後もさらなる多角的な検討を行っていく予定である。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Niikura K, Narita M, Butelman ER, Kreek MJ and Suzuki T: Neuropathic and chronic pain stimuli downregulate central  $\mu$ -opioid and dopaminergic transmission. *Trends Pharmacol Sci*, 31,299-305 (2010)
- 2) Ikegami D, Narita M, Imai S, Miyashita K, Tamura R, Narita M, Takagi S, Yokomizo A, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Kuzumaki N, Ushijima T and Suzuki T: Epigenetic modulation at the CCR2 gene correlates with the maintenance of behavioral sensitization to methamphetamine. *Addict Biol*, 15, 358-361 (2010)
- 3) Narita M, Matsushima Y, Niikura K, Narita M, Takagi S, Nakahara K, Kurahashi K, Abe M, Saeki M, Asato M, Imai S, Ikeda K, Kuzumaki N and Suzuki T: Implication of dopaminergic projection from the ventral tagmental area to the anterior cingulate cortex in  $\mu$ -opioid-induced place preference. *Addict Biol*, 15, 434-447 (2010)
- 4) 今井哲司, 成田 年, 鈴木 勉: 側坐核. *分子精神医学*, 10, 54-58 (2010)
- 5) 今井哲司, 成田 年, 池上大悟, 田村理絵, 佐伯麻衣, 葛巻直子, 鈴木 勉: 覚せい剤の依存性形成機序. *医薬ジャーナル*, 46, 73-77 (2010)

- 6) 吉澤一巳, 成田 年, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉: 疼痛下におけるモルヒネの精神依存形成抑制とその機序. *ペインクリニック*, 31, 1434-1439 (2010)
- 7) 鈴木 勉: 乱用防止と適正使用. *ファルマシア*, 46, 825 (2010)
- 4) 今井哲司, 成田 年, 新倉慶一, 堀内浩, 佐伯麻衣, 古谷雅治, 成田道子, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 441 報): 慢性疼痛下での中脳辺縁 dopamine 神経系における miRNA の発現プロファイリング - Opioid 精神依存不形成に関する分子機構の解析. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 40 回日本精神神経薬理学会合同年会 (2010)

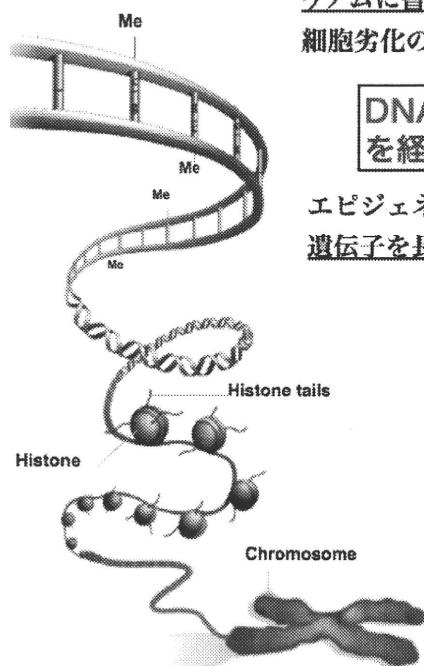
## 2. 学会発表

- 1) Nakahara K, Narita M, Matsushima Y, Narita M, Takagi S, Niikkura K, Imai S, Kuzumaki N and Suzuki T: Is dopaminergic neuron projecting from the ventral tegmental area to the cingulate cortex critical for the morphine -induced rewarding effect? The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 72th Annual Scientific meeting (2010)
- 2) Yoshizawa K, Aoki K, Mori T, Kuzumaki N, Narita M and Suzuki T: Discriminative stimulus effects of various classes of psychoactive compounds in ketamine-trained rats. The College on Problems of Drug Dependence (CPDD) 72th Annual Scientific meeting (2010)
- 3) 田村理絵, 成田 年, 池上大悟, 成田道子, 竹島秀幸, 今井哲司, 葛巻直子, 牛島俊和, 鈴木 勉: Ethanol 慢性曝露による脳内エピジェネティクス修飾の変化. *Neuro2010*, 第 33 回日本神経科学大会, 第 53 回日本神経化学大会, 第 20 回日本神経回路学会合同大会 (2010)
- 5) 田村理絵, 成田 年, 今井哲司, 池上大悟, 成田道子, 鈴木 翔, 宮下和彦, 葛巻直子, 五十嵐勝秀, 菅野 純, 牛島俊和, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 444 報): Ethanol あるいは methamphetamine 処置による依存形成時のエピジェネティック修飾を伴った脳内遺伝子発現変動の解析. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 40 回日本精神神経薬理学会合同年会 (2010)
- 6) 吉澤一巳, 成田 年, 磯谷香奈, 葛巻直子, 長瀬 博, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 444 報):  $\kappa$  オピオイド受容体作動薬 U-50,488H の弁別刺激効果に関する行動薬理的解析. 第 20 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 40 回日本精神神経薬理学会合同年会 (2010)
- 7) 鈴木智子, 成田 年, 今井哲司, 吉澤一巳, 鳥越一宏, 佐伯麻衣, 武田弘太郎, 阿部美奈子, 磯谷香奈, 葛巻直子, 鈴木 勉: 新規鎮痛補助薬として期待

されるカンナビノイド製剤の依存性  
形成能に関する基礎的検討. 第 4 回  
日本緩和医療薬学会年会 (2010)

- 8) 葛巻直子, 成田 年, 今井哲司, 成田  
道子, 田村理絵, 池上大悟, 牛島俊和,  
鈴木 勉: 依存性薬物の細胞記憶なら  
びに細胞分化に対する影響. 第 45  
回日本アルコール・薬物医学会, 第  
22 回日本アルコール精神医学会,  
第 13 回ニコチン・薬物依存研究フ  
ォーラム, アルコール・薬物依存関  
連学会合同学術総会 (2010)
- 9) 中原加恵: モルヒネ誘発報酬効果の維  
持における腹側被蓋野-前帯状回  
dopamine 神経の役割. 第 45 回日本  
アルコール・薬物医学会, ニコチン薬  
物依存研究フォーラム奨励賞受賞  
(2010)

## 〈図1〉 エピジェネティクス解析の重要性



[Qui, Nature, 441:143, 2006]

ゲノムに書かれた遺伝情報が変更されことなく、細胞分化や細胞劣化の過程において後生的に遺伝子発現が制御される現象

DNA塩基配列に変化を伴わずに、細胞分裂を経ても伝達される情報

エピジェネティクス修飾は、DNA の高次構造を変化させ、遺伝子を長期的に活性化あるいは不活性化する。

Epigenetic = epi + genetic

「後に」を表す接頭語

DNA methylation → Silencing

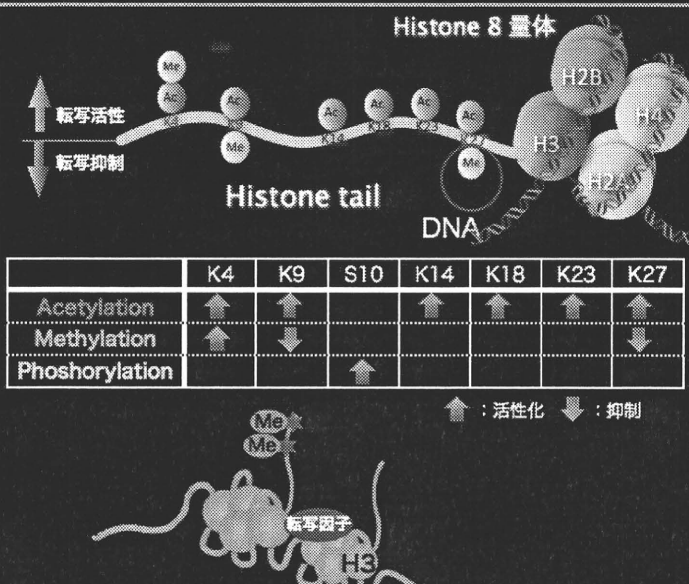
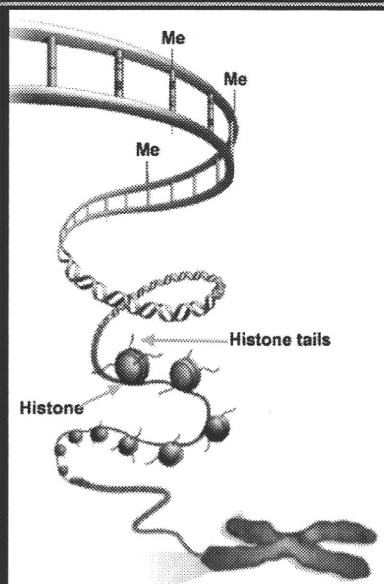
Histone modification



A combination of different molecules can attach to the "tails" of protein called histone. These alter the activity of the DNA wrapped around them.

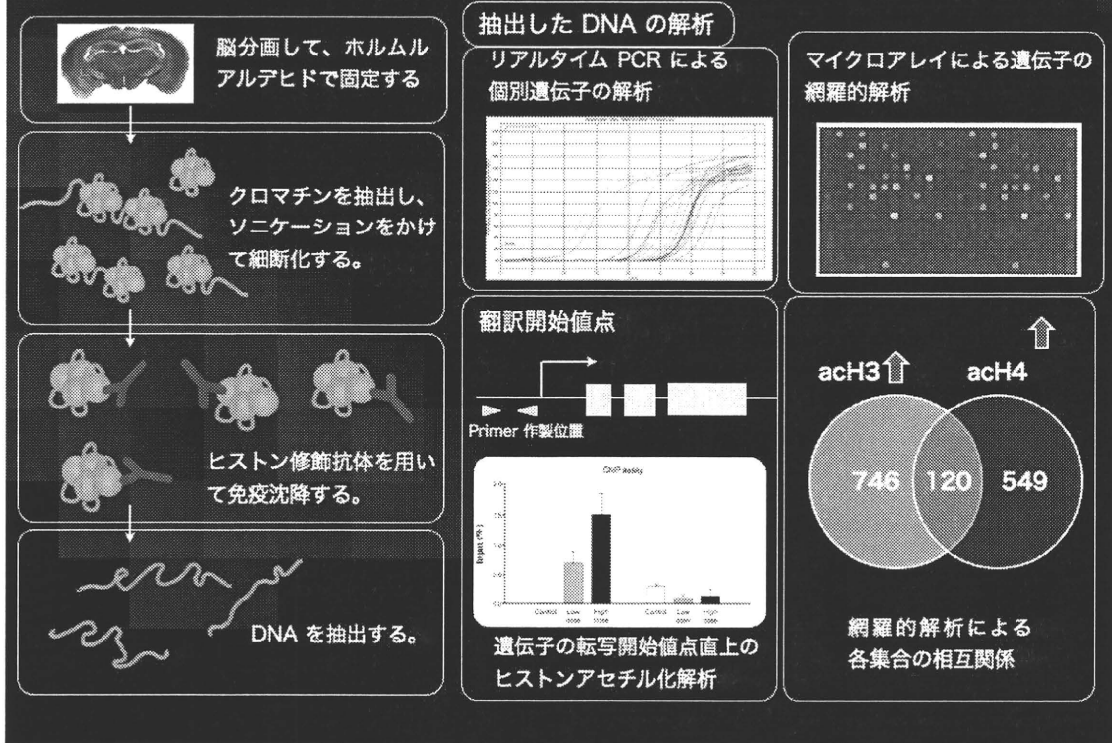
## 〈図2〉

## ヒストン修飾

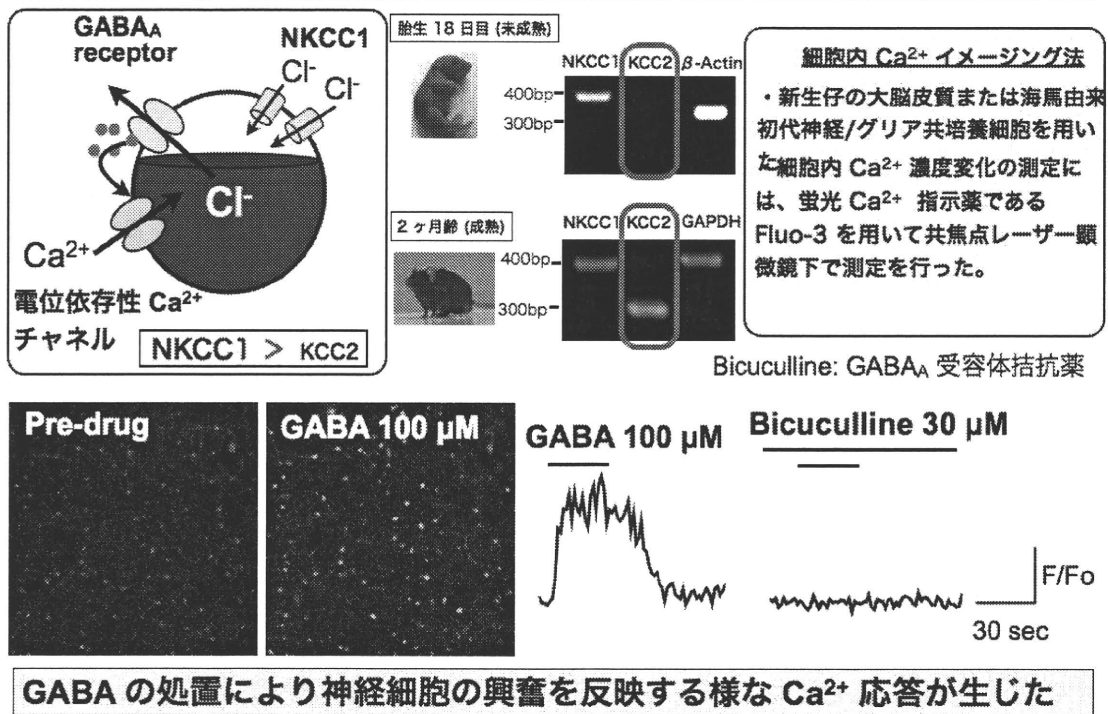


コアヒストンは H2A・H2B・H3・H4 の各2つずつの8量体から成り、ヒストンのアミノ末端（ヒストンテール）は中心のコア領域から突出しておりアセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を受ける。これらの修飾は特定のタンパクにより認識されて転写活性や転写抑制の目印となる。

### 〈図3〉クロマチン免疫沈降法を用いたクロマチン制御の解析



### 〈図4〉KCC2 未発現神経細胞における GABA 誘発 Ca<sup>2+</sup> 応答



〈図5〉

## Ethanol 依存ラットの作成

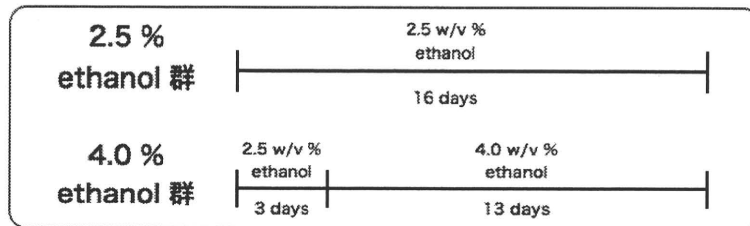
動物：Fischer 344 系雄性ラット (8 週齢)



Ethanol 処置：液体飼料法に従って、2.5w/v% ethanol 液体試料を 16 日間適用した群、および 2.5w/v% ethanol 液体試料を 3 日間適用後、4.0w/v% ethanol 液体試料に切り替え 13 日間適用した群を作製した。

Control 群には同カロリーーの ethanol を含まない液体試料を適用した。

スケジュール



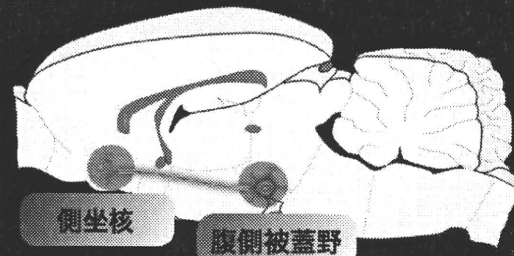
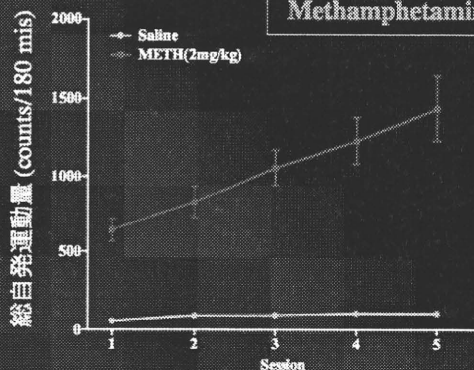
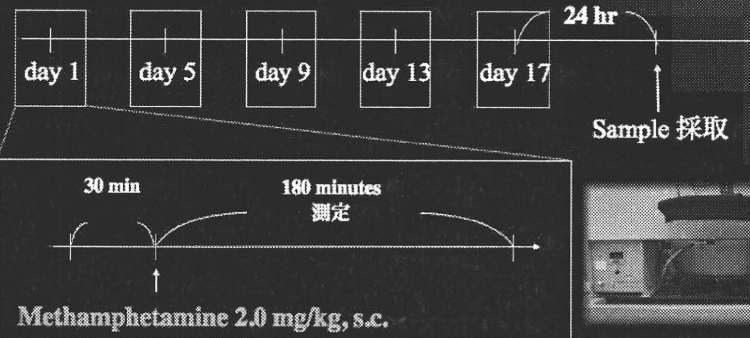
〈図6〉 Methamphetamine 投与スケジュール

◆使用動物  
C57BL/6J 雄性マウス

◆自発運動量の測定  
Tilting cage 法

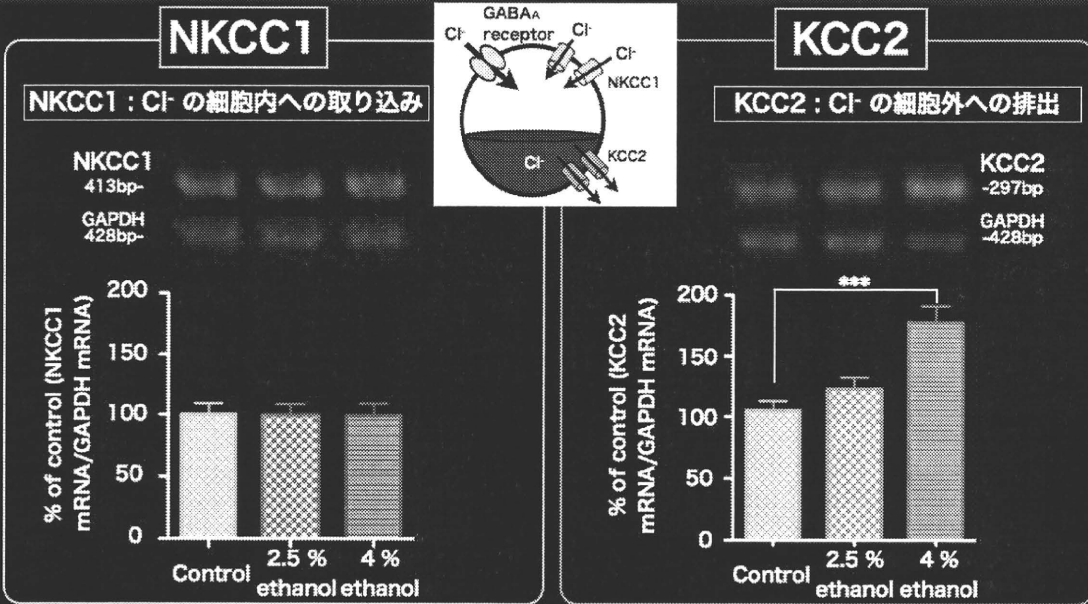
◆薬物  
Saline  
Methamphetamine  
2.0 mg/kg, s.c.

### Schedule



中脳辺縁 dopamine 神経系

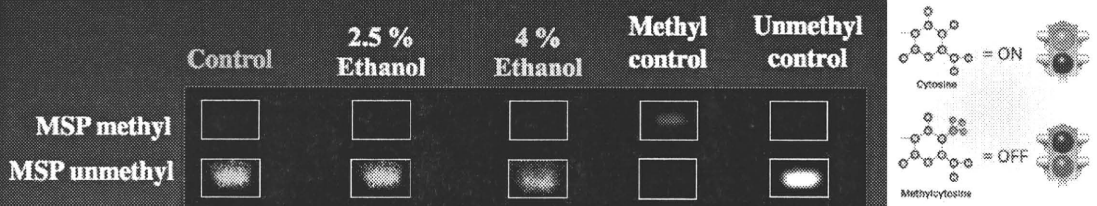
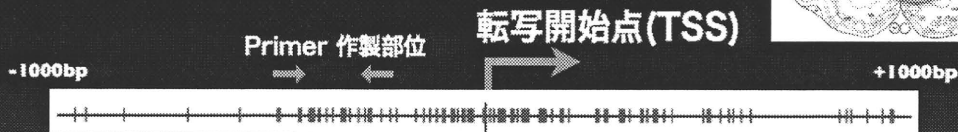
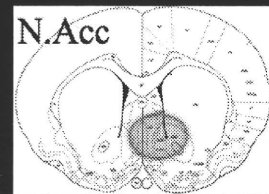
〈図7〉 Ethanol 慢性曝露による Cation-chloride cotransporter mRNA 発現の変化



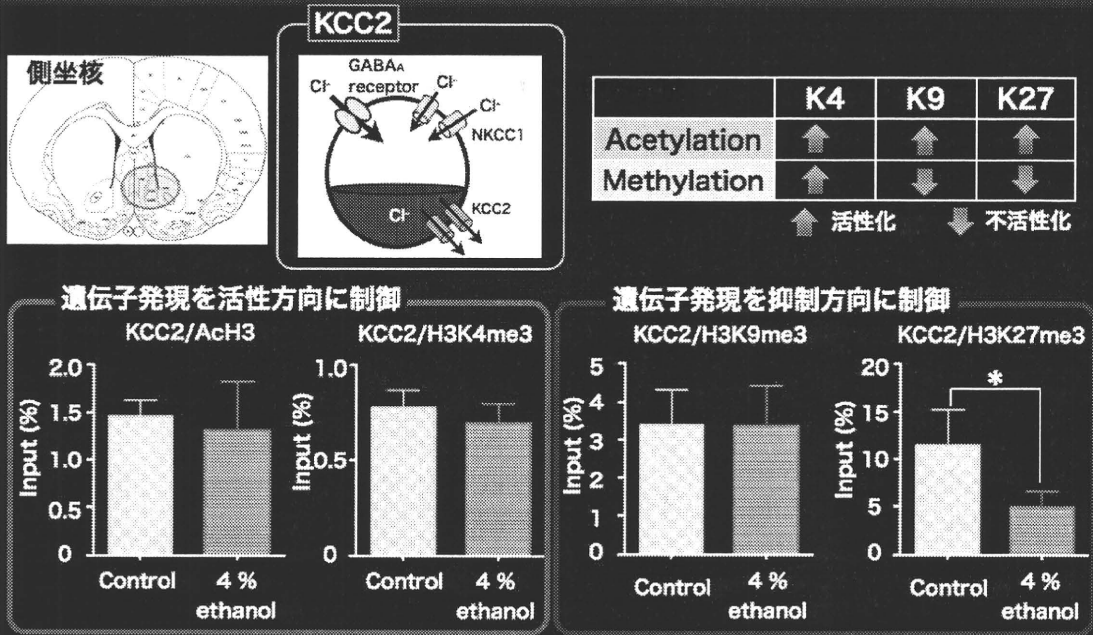
〈図8〉 Ethanol 処置による KCC2 遺伝子の DNA メチル化状態の検討

Bisulfite MSP 法に従い DNA のメチル化状態を検討した。

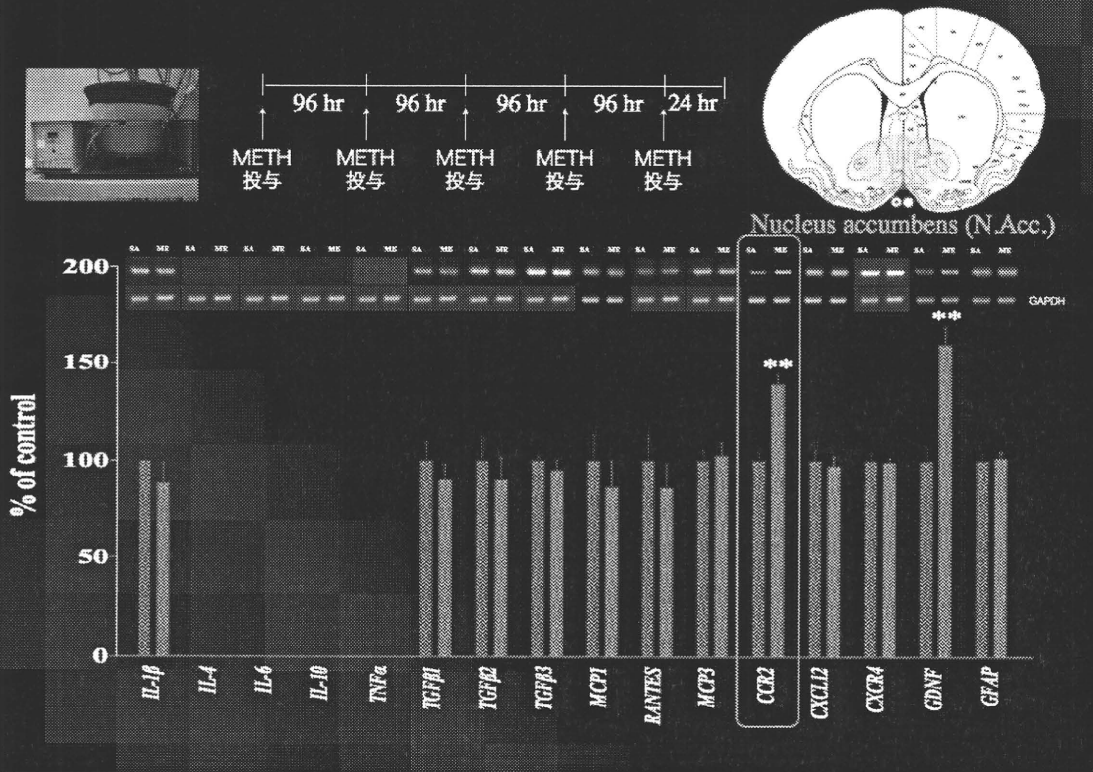
*KCC2* gene



〔図9〕 Ethanol 慢性曝露による KCC2 遺伝子のエピジェネティクス修飾の変化



〔図10〕 Methamphetamine 逆耐性形成時における脳内 cytokine/chemokine の発現変動

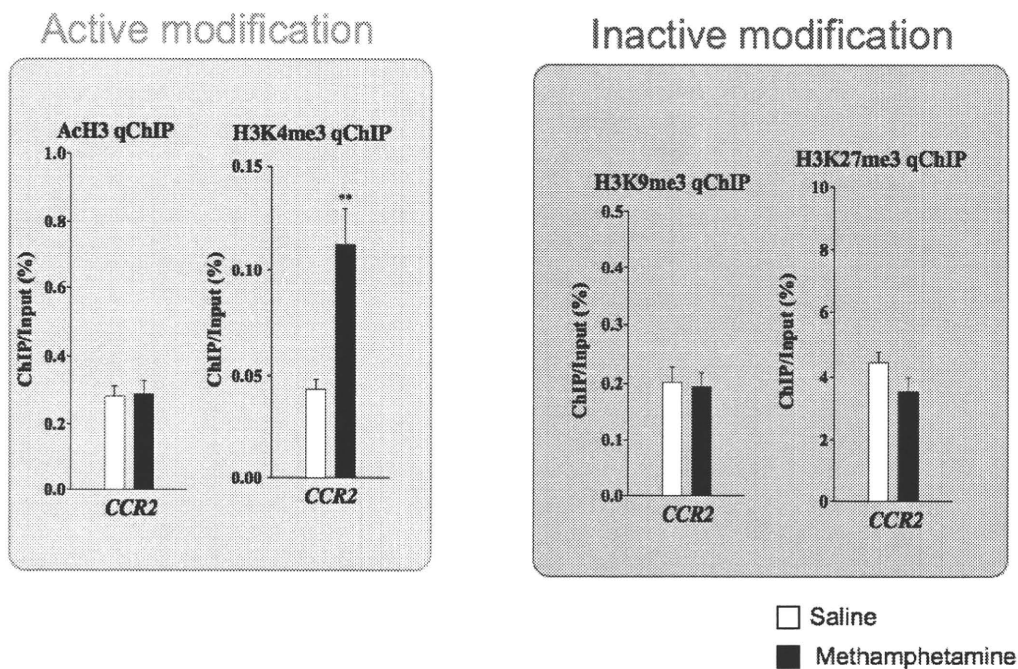




<図 1 1>

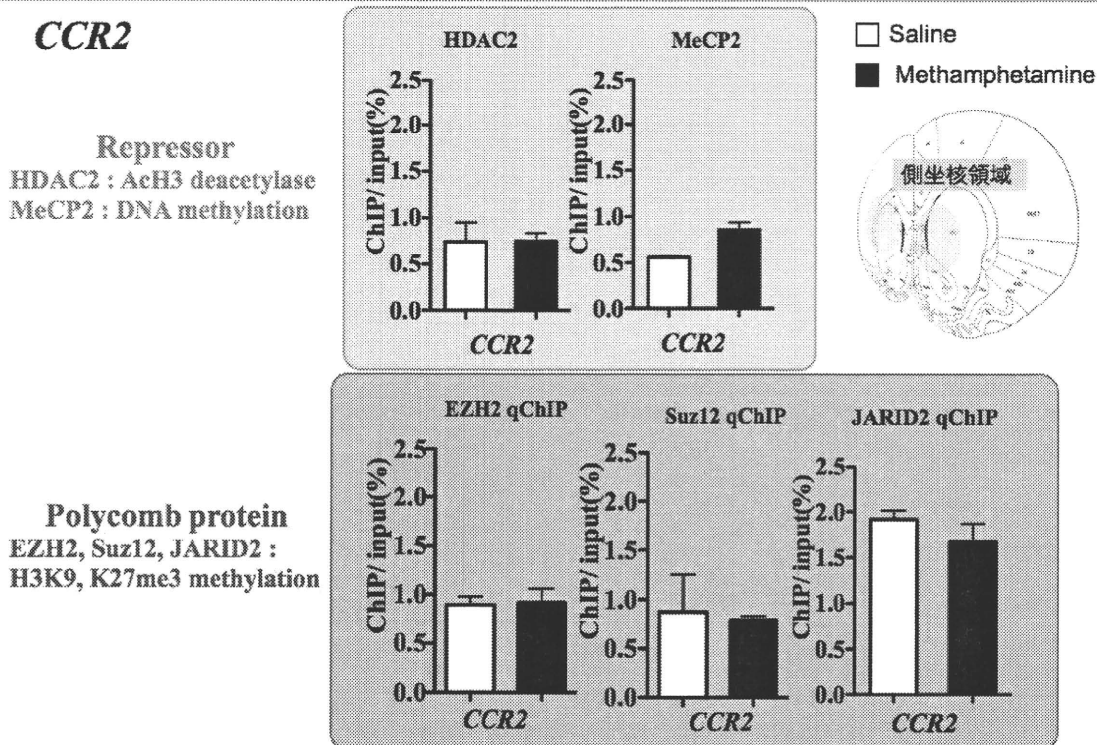
Methamphetamine 逆耐性形成時におけるヒストン修飾の変化

CCR2 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン修飾の変化



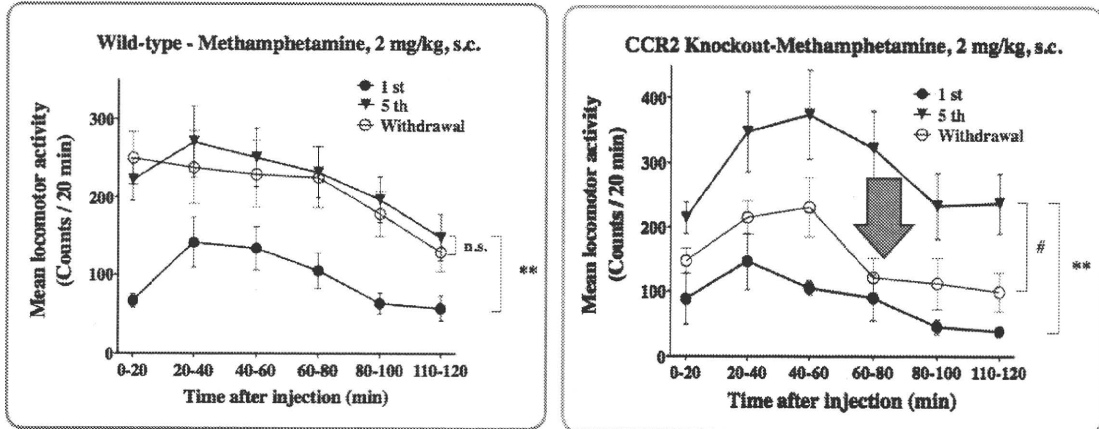
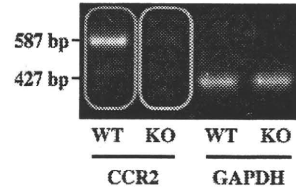
<図 1 2>

Methamphetamine 逆耐性形成時におけるヒストン修飾因子の変化



### 〈図 1 3〉 Methamphetamine 逆耐性維持におけるCCR2の関与

CCR2 knockout マウスを用いて逆耐性維持におけるCCR2 の関与を検討した。



## 覚せい剤精神病の分子遺伝学的機序

研究分担者：曾良一郎<sup>1</sup>

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

(<sup>1</sup>東北大学大学院精神・神経生物学分野，<sup>2</sup>東京都精神医学総合研究所・精神生物学研究分野，<sup>3</sup>同・統合失調症・うつ病プロジェクト，<sup>4</sup>Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA))

### [研究要旨]

メタンフェタミン(METH)依存の形成機序としてドーパミン神経系が重要な役割を果たしていると考えられているが、セロトニン神経伝達系の関与も示唆されている。我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰なセロトニントランスポーター欠損(SERT KO)マウスではMETH行動感作が形成されないことを確認し、SERT KOマウスに5-HT1B受容体阻害薬を前処置すると、METH行動感作が形成された。さらに5-HT1B受容体ホモKOマウスではMETH反復投与による移所運動量の増加が野生型マウスに比べて大きく行動感作形成が増強していた。そこで脳内微小透析法を用いてMETH投与による細胞外ドーパミンの変化を測定した。5-HT1B受容体ホモ欠損マウスにおいて、METH投与による細胞外ドーパミンは野生型マウスに比べて有意に増加していた。このことから、METHによる行動感作形成には、5-HT1B受容体を介するセロトニン神経伝達が重要な役割を担うと考えられる。

Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2)はセロトニン合成の律速酵素である。そこでTPH2の遺伝子多型がMETH依存・精神病と相関するかどうかについて検討した。162例のMETH依存・精神病患者と243例の健常人においてTPH2の遺伝子多型について解析したが、TPH2の遺伝子多型とMETH依存・精神病患者とは有意な相関がみられなかった。これらの結果は、TPH2の遺伝子多型はメタンフェタミン依存への脆弱性には関与していない可能性が示唆された。

### A. 研究目的

依存性薬物は、脳内の生理的な報酬と同じ神経回路を活性化し効果を示すことが知られている。特に、中脳腹側被蓋野から側坐核、および前頭前野皮質に投射する中脳辺縁系ドーパミン作動性神経は報酬回路を構成する重要な神経系である<sup>1,3)</sup>。中枢刺激薬のメタンフェタミン (METH) やコカインはきわめて激しい快情動を起こすこと

から、薬物常用に伴う神経回路の異常興奮が長期間継続すると、報酬回路と行動を構成する重要な神経系に異常な可塑的变化が生じ、報酬効果や運動促進効果が亢進することがわかっている<sup>2)</sup>。METHを含む中枢刺激薬の反復投与は、薬物への反応の増強を生じ、行動感作を形成する。ヒトでもMETHの逆耐性現象として長時間持続し、休薬期間後も容易に再燃に繋がることから、薬物依

存治療を難しくする一因となっている。行動感作の形成には報酬系と同様にドーパミン神経系が重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし我々のドーパミントランスポーター欠損マウスを使用しての解析より、ドーパミン神経伝達以外の関与が示唆されている。

我々はセロトニン (5-HT) 神経伝達が過剰であるセロトニントランスポーター (SERT) 欠損マウスにおいて METH 反復投与による行動感作の形成が認められないことを見出した。更に薬理学的な手法により 5-HT<sub>1B</sub> 受容体を阻害することで SERT 欠損マウスの行動感作の形成が為されることを確認した。以上のことから METH 行動感作形成には 5-HT<sub>1B</sub> 受容体を介したセロトニン神経伝達が重要であると推察されたため、5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウスを使用して行動感作の形成を検討したところ、5-HT<sub>1B</sub> ホモ欠損マウスでは 1mg/kg METH 投与時の移所運動量が野生型マウスよりも多く、行動感作形成が促進されていた。一方で 5HT<sub>1B</sub> ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスよりも移所運動量が少なく、行動感作形成は見られなかった (Fig.1)。これらの知見より、行動感作形成におけるセロトニン神経伝達系、特に 5-HT<sub>1B</sub> 受容体シグナル伝達系の役割を詳細に解明する目的で、METH 投与時の 5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウスにおける細胞外モノアミン放出を、脳内微小透析法を用いて解析した。

一方で、METH の慢性や急性投与で Tryptophan Hydroxylase の活性が著しく低下することが知られている<sup>10)11)</sup>。Tryptophan Hydroxylase はセロトニン合成の律速酵素である<sup>12)</sup>。Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) 遺伝子は Tryptophan Hydroxylase の 2 つ目のアイソフォームとして 2003 年に見つかった酵素であり、別名 Neuronal TPH とも呼ばれている<sup>13)14)</sup>。それまで知られていた TPH1 が松果体と末梢に主として発現していたのに対し、TPH2 は Raphe

Nuclei に主として発現していることから、この分子が中枢神経系の Tryptophan Hydroxylase 活性の主体であると考えられている<sup>13)</sup>。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物および薬物

1) 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウス、およびその同腹子を含む野生型マウスを用いた METH 投与時の線条体における細胞外モノアミン量の測定

#### 1. 実験動物

C57BL6/129Sv 混合遺伝背景を持つ 5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウス、およびその同腹子を含む野生型マウス (雄性ならび雌性)、実験開始時 7~14 週齢、体重 20~32g を用いて実験を行った。

#### 2. 薬物

メタフェタミン (大日本住友製薬) を 0.9% 生理食塩水 (大塚製薬) で溶解し、10ml/kg の容量にて腹腔内投与した。

#### 3. 脳内微小透析法

マウスを麻酔下において左線条体 (AP+0.6, ML+1.8, DV-4.0) に透析用プローブを挿入した。24 時間後、透析用プローブを還流した人工脳脊髄液を回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC-500、エイコム、京都) により液中のドーパミン、セロトニン量を測定した。透析された細胞外ドーパミン、セロトニン量が 2 時間以上安定したことを確認し、METH (1mg/kg あるいは 3mg/kg, i.p.) または生理食塩水 (10ml/kg, i.p.) を投与した。

2) TPH2 の遺伝子多型が METH 依存・精神病と相関するかどうかについて検討

#### 1. 被験者

162 例の METH 依存・精神病患者 (男性 130 例、女性 32 例、年齢 37.4±12.0 歳) および 243

例の健常人（男性 168 例、女性 75 例、年齢  $35.4 \pm 11.5$  歳）にて遺伝子多型の解析を行った。METH 依存・精神病患者は ICD-10-DCR にて診断を行い、精神科の外来患者および入院患者である。健常対照者は薬物依存および精神疾患の個人・家族歴ともになく、大部分は医療関係者である。被験者は全て日本人で、北九州、瀬戸内、中京、東海、関東地方に在住している。

## 2. 遺伝子多型解析

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

最初に 16 例の METH 依存・精神病患者の DNA サンプルを用いて Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) 遺伝子 (GenBank accession number AC090109) 多型の特定を行った。全てのコーディング Exon (Exon1 から 11) および Exon と Intron の境界領域について PCR 法にて増幅し、BigDye terminators (Applied Biosystems) と ABI Genetic analyzer 3100 (Applied Biosystems) を使用して遺伝子配列を決定した。16 例について全て連鎖不平衡にあった 3 ヶ所の領域についてはそれぞれ 1 つの多型部位を代表とし、あわせて 9 ヶ所の多型部位について全てのサンプルについて多型の特定を行った。

## C. 研究結果

1) 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウス、およびその同腹子を含む野生型マウスを用いた METH 投与時の線条体における細胞外モノアミン量の測定

行動感作形成において、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスでは 1mg/kg METH 反復投与による移所運動量の増加（行動感作）が野生型マウスに比べて大きいものに対して、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ヘテロ欠

損マウスの行動感作形成は野生型マウスより減弱することを既に見出している。

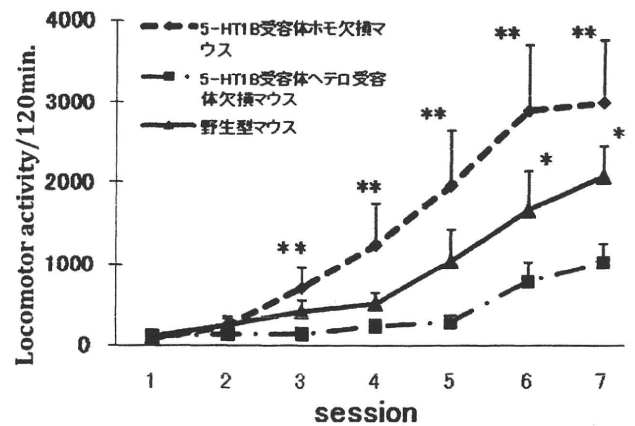


Fig.1: 5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウスにおける METH 誘発性行動感作の形成

1 回目から 7 回目までの 1mg/kg METH 反復投与後における総移所運動量のセッションの比較、遺伝子型間の比較の結果。値表示は薬物投与後 120 分間の総移所運動量の平均値±標準誤差。各遺伝子型につき N=19~23。\* (セッション 1 と各セッションとの移所運動量の比較 \*\* p < 0.01 \* p < 0.1 Sidak の方法)。

そこで、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ、ヘテロ欠損マウスおよび同腹子を含む野生型マウスに METH (1mg/kg あるいは 3mg/kg, i.p.) または Saline (10ml/kg, i.p.) を腹腔内投与し、マイクロダイアリス法を用いて左線条体の細胞外ドーパミン量 (DA<sub>ex</sub>)、細胞外セロトニン量 (5-HT<sub>ex</sub>) を測定した結果、コントロール群 (Saline) では遺伝子型間で DA<sub>ex</sub>、5-HT<sub>ex</sub> 量に有意な差はなかった。一方、1 mg/kg METH 投与による 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損、ヘテロ欠損マウスの DA<sub>ex</sub> は、野生型マウスに比べて 1.5 倍程度に増加していた (Fig.2)。また、5-HT<sub>ex</sub> についても 1 mg/kg METH 投与時において、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損、ヘテロ欠損マウスの両方において 2 倍程度に増加していた (Fig.3)。一方で、METH 1mg/kg 投与

時と 3mg/kg 投与時の細胞外モノアミン量に注目すると (Fig.4, Fig.5)、3mg/kg METH 投与時は全ての遺伝子型において DAex, 5-HTex レベルが 1mg/kg METH 投与時に比して増加していたが、特に 5-HT1B ホモ欠損マウスにおいてその傾向が顕著であり、他の遺伝子型に比較して有意に高い値となっていた。5-HT1B 受容体ホモ欠損マウスでより顕著な 3mg/kg METH 投与時に細胞外モノアミン量の変化が見られたことは、METH 高負荷時における何らかの脆弱性を有する可能性も考えられる。

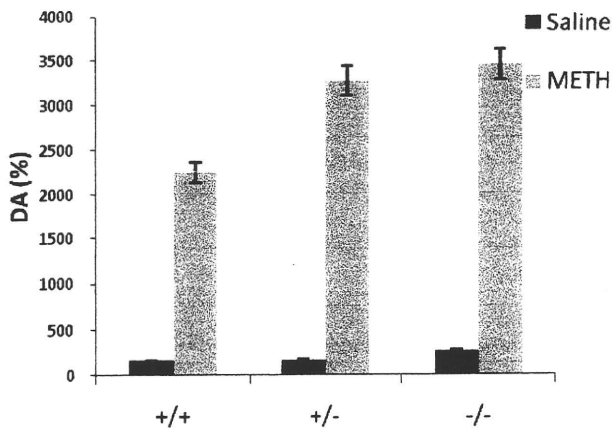


Fig.2: 5-HT1B 受容体欠損マウスにおける METH (1mg/kg) 投与による細胞外 DA 濃度の変化

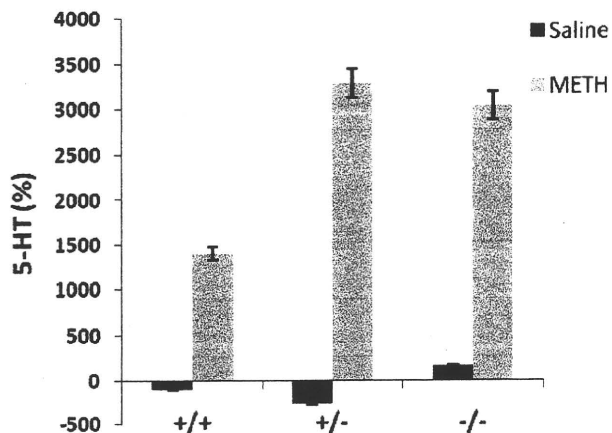


Fig.3: 5-HT1B 受容体欠損マウスにおける METH (1mg/kg) 投与による細胞外 5-HT 濃度の変化 (Fig.2&3: saline, n=9, METH 1mg/kg, n=9; \*\*p < 0.01, \*p < 0.1 Sidak の方法)。

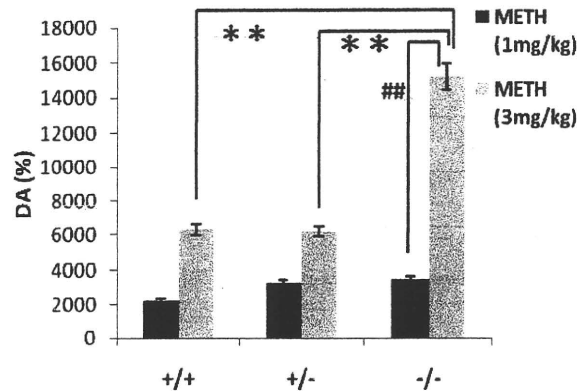


Fig.4: 5-HT 1B 受容体欠損マウスにおける METH 1mg/kg 投与群と 3mg/kg 投与群による細胞外 DA 濃度の比較

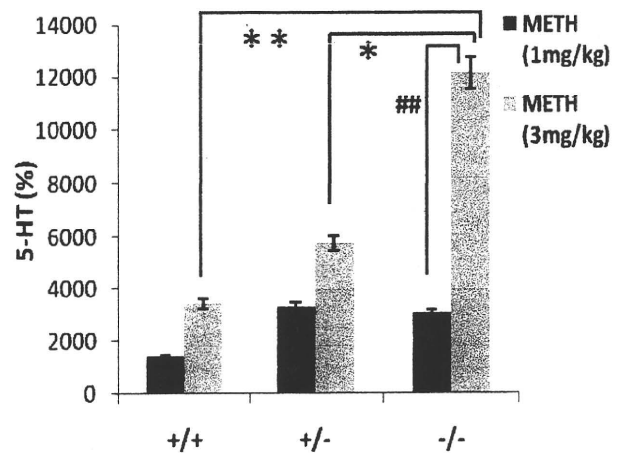


Fig.5: 5-HT 1B 受容体欠損マウスにおける METH 1mg/kg 投与群と 3mg/kg 投与群による細胞外 5-HT 濃度の比較

(Fig.4&5: METH 1mg/kg, n=9, METH 3mg/kg, n=14; \*\*, ## p < 0.01, \*, # p < 0.1 Sidak の方法)。

2) TPH2 の遺伝子多型が METH 依存・精神病と相関するかどうかについて検討

最初に 16 例の METH 依存・精神病患者の DNA サンプルを用いて TPH2 遺伝子多型の特定を行ったところ、10 個の一塩基多型(SNPs)と 2 個の挿入欠失多型を特定し、そのうちの 1 個は新規で

あった(Exon11+(C3)500(C2))。162例の METH 依存・精神病患者および243例の健常人に対して、それぞれ TPH2 遺伝子の多型と METH 依存・精神病との相関解析を行った。ジェノタイプ頻度、アレル頻度について、健常群と METH 依存・精神病患者群で有意な違いは見られなかった。また、ハプロタイプ解析でも有意な違いは見られなかった。METH 依存・精神病患者君についてさらに症状別 (latency of psychosis, prognosis of psychosis, spontaneous relapse) に分けてジェノタイプ頻度について健常群との比較を行ったが、有意な違いは見られなかった。以上のことから TPH2 の遺伝子多型と METH 依存・精神病とは有意な相関がないと考えられた。

#### D. 考察

我々は 5-HT 神経伝達の中でも 5-HT<sub>1B</sub> 受容体と中枢刺激薬との関連に注目し 5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウスを用い METH 行動感作形成の有無を検討した。今回の実験結果より、METH による行動感作形成には、5-HT<sub>1B</sub> 受容体を介するセロトニン神経伝達と細胞外 DA<sub>ex</sub>、5-HT<sub>ex</sub> のバランスが重要な役割を担っているといえる。

依存性薬物は、直接的または間接的に側坐核ニューロンに働き、過分極を引き起こし側坐核のニューロン活動を抑制することにより効果を引き起こす。METH とコカインは、DA ニューロンの終末から DA を遊離させるが、それぞれの作用点は異なる<sup>8)</sup>。METH は細胞膜モノアミントランスポーターに取り込まれる際にモノアミンを放出するとともに、シナプス小胞内のモノアミンの細胞質内への放出を促進する 2 つの作用機序を持っている。一方、コカインはモノアミントランスポーターに結合した再取り込みを阻害し、シナプス間隙に放出されたモノアミンの濃度の増加を持続させることにより強い報酬効果を生じさせ

る<sup>9)</sup>。SERT 欠損マウスを用いた解析から過剰の細胞外セロトニンは行動感作の形成を妨げることおよび 5-HT<sub>1B</sub> 受容体の拮抗によって再び行動感作が形成されることを見出している。5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスは 3mg/kg METH 投与時において他の遺伝子型に比較して有意に高い細胞外ドーパミン量を呈した。このことが 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスで見られた行動感作形成の促進に寄与していると推察される。5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスは細胞外セロトニン量も同様に高値を呈しているが、セロトニンによる行動感作形成抑制効果に重要であると考えられる 5-HT<sub>1B</sub> 受容体が欠損しているために、その効果が認められないことが考えられる。一方で、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ヘテロ欠損マウスは 1mg/kg、3mg/kg 投与の両方において 5-HT<sub>ex</sub> が高い傾向にあり、行動感作形成を抑制するよう機能している可能性がある。特に、5-HT<sub>1B</sub> 受容体は後シナプス受容体としての発現に加えて、5-HT 作動性ニューロンに発現し自己受容体としての放出を抑制する機能を有する。よって、5-HT<sub>1B</sub> 受容体ヘテロ欠損マウスが 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスとは異なり行動感作形成が消失し、DA<sub>ex</sub> 量に有意な差があったことは、ヘテロ欠損マウスでは自己受容体を介する 5-HT 神経伝達に 5-HT<sub>1B</sub> 受容体ホモ欠損マウスと有意な違いがあると示唆され、今後の検討を要する。

さらに、薬物依存の初期と維持期では神経制御メカニズムが異なると考えられ、薬物依存の維持期段階を検討するため、MAP を 7 日間連続投与し、最終投与後の線条体と側坐核で透析された DA<sub>ex</sub>、5-HT<sub>ex</sub> 量の測定を 5-HT<sub>1B</sub> 受容体欠損マウスで行う予定である。

一方で、日本人の集団を対象に TPH2 遺伝子多型の解析により、10 個の SNP と 2 個の挿入欠失多型を同定し、METH 依存・精神病との相関を解析した。TPH2 は中枢におけるセロトニン合成の

律速酵素であることから何らかの相関を期待したものの、相関を見つけることは出来なかった。今回見つかった多型のうち Exon2+C18A は、Linらにより中国人のサンプルで C2755A 多型と報告されたものに相当し、非同義置換の SNP であり、アミノ酸が Ser から Tyr に置換される (S41Y)<sup>15)</sup>。Lin らはさらに SH-SY5Y 細胞を用いてこの多型によるセロトニン合成量の違いについて調べ、41Y では 41S に比べ 36%少ないと報告している。しかし我々はこのようなセロトニン合成量に関わる多型についても疾患との相関を見つけることは出来なかった。他のドーパミン神経に作用する薬物についてはコカインが調べられている。アフリカ人について Dahl らの報告によると、コカインについても相関は見られていない<sup>16)</sup>。今回調べた METH も含め、ドーパミン神経に主として作用すると考えられる薬物と TPH2 の遺伝子多型は相関がないと考えられる。

## E. 結論

今回の実験結果より、5-HT1B 欠損マウスでは METH 投与時の細胞外モノアミン量が変化していることが明らかになった。このことは行動感作形成や覚せい剤依存症の病態解明につながると同時に METH を含む中枢刺激薬の反復投与(覚せい剤依存)あるいは精神病の治療に 5-HT1B 受容体を介してのモノアミン系の制御が役立つ可能性を示している。

また、遺伝子多型解析の結果から、METH 依存・精神病と TPH2 との間に有意な相関が見られなかったことから、中枢神経におけるセロトニン合成の律速酵素である TPH2 は覚せい剤依存あるいは精神病の脆弱性因子ではないことが考えられた。

## [参考文献]

1) Taku Nagai: Study on the mechanism of

neuropsychological abnormalities induced by drugs of abuse. *Folia Pharmacol, Japan* (129) 354-359, 2007.

- 2) Neil E. Paterson, Allison Fedolak, Berend Olivier, Taleen Hanania, Afshin Ghavami, Barbara Caldarone: Psychostimulant-like discriminative stimulus and locomotor sensitization properties of the wake-promoting agent modafinil in rodents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (95) 449-456, 2010.
- 3) Yolanda Mateo, Evgeny A. Budygin, Carrie E. John, and Sara R. Jones: Role of serotonin in cocaine effects in mice with reduced dopamine transporter function. *PNAS* (101) 372-377, January 6, 2004.
- 4) Ichiro Sora, BingJin Li, Moe Igari, F. Scott Hall, Kazutaka Ikeda: Transgenic mice in the study of drug addiction and the effects of psychostimulant drug. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*,218-246, 2010.
- 5) Ichiro Sora, BingJin Li, Setsu Fumushima, Asami Fukui, Yosefu Arime, Yoshiyuki Kasahara, Hiroaki Tomita, and Kazutaka Ikeda: Chapter 3 Monoamine Transporter as a Target Molecule for Psychostimulants. *International Review of Neurobiology* (85) 29-33, 2009.
- 6) Scott J. Russo, David M. Dietz, Dani Dumitriu, et al.: The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Neurosciences* (33) 267-276, 2010.
- 7) 曾良一郎. *実験医学*. 2010; 28(5): 674-678.
- 8) Nestler, E.J: Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*(47) 24-32, 2004.
- 9) 曾良一郎, 小林秀昭. *自律神経*.2003; 40: 238-243.
- 10) Hotchkiss AJ, Gibb JW: Long-term effects of multiple doses of methamphetamine on triptophan hydrodoroxyase and tyrosine hydroxylase activity



in rat brain. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 214(2), 257-262. 1980.

- 11) Knapp S, Mandell AJ, Geyer MA. Effects of amphetamines on regional tryptophan hydroxylase activity and synaptosomal conversion of tryptophan to 5-hydroxytryptamine in rat brain. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 189(3), 676-689. 1974.
  - 12) Cooper JR, Melcer I. The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 132, 265-268. 1961.
  - 13) Patel PD, Pontrello C, Burke S. Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry* 55(4) 428-433. 2004.
  - 14) Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603), 76, 2003.
  - 15) Lin YM, Chao SC, Chen TM, Lai TJ, Chen JS, Sun HS. Association of functional polymorphisms of the human tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder in Han Chinese. *Arch. Gen. Psychiatry.* 64(9), 1015-1024. 2007.
  - 16) Dahl JP, Cubells JF, Ray R, Weller AE, Lohoff FW, Ferraro TN, Oslin DW, Kamnman KM, Berrettini WH. Analysis of variations in the tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene in cocaine dependence. *Addict. Biol.* 11(1), 76-83. 2006.
- F. 健康危険情報  
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
  1. 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. **Neuropharmacology.** 58(1):241-247 (2010)
  2. Kishi T, Tsunoka T, Ikeda M, Kitajima T, Kawashima K, Okochi T, Okumura T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ujike H, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Iwata N. Serotonin 1A receptor gene is associated with Japanese methamphetamine-induced psychosis patients. **Neuropharmacology.** 58(2):452-456 (2010)
  3. Li B, Arime Y, Hall FS, Uhl GR, Cui R, Sora I. Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knock out mice. **Eur J Pharmacol.** 25:628(1-3):104-107 (2010)
  4. Frye CA, Sora I. Progesterone reduces hyperactivity of female and male dopamine transporter knockout mice. **Behav Brain Res.** 209(1):59-65 (2010)
  5. Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Nishida A, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry.** 67(6):589-97 (2010)
  6. Tsunoka T, Kishi T, Kitajima T, Okochi T, Okumura T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Naitoh H, Inada T, Ujike H, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Iwata N. Association analysis of GRM2 and HTR2A with methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia in the Japanese

- population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 34(4):639-44. (2010)
7. Kobayashi H, Ujike H, Iwata N, Inada T, Yamada M, Sekine Y, Uchimura N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Sora I. The adenosine A2A receptor is associated with methamphetamine dependence/psychosis in the Japanese population. **Behav Brain Funct.** 6 : 50(2010)
  8. Ide S, Fujiwara S, Fujiwara M, Sora I, Ikeda K, Minami M, Uhl GR, Ishihara K. Antidepressant-like effect of venlafaxine is abolished in  $\mu$ -opioid receptor-knockout mice. **Journal of Pharmacological Sciences.** 114(1):107-110 (2010)
  9. Kishi T, Kitajima T, Tsunoka T, Okumura T, Okochi T, Kawashima K, Inada T, Ujike H, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Iwata N. PROKR2 is associated with methamphetamine dependence in the Japanese population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 34(6):1033-6(2010)
  10. Kobayashi H, Ujike H, Iwata N, Inada T, Yamada M, Sekine Y, Uchimura N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Sora I. Association analysis of the Tryptophan Hydroxylase 2 gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. **Current Neuropharmacology** 9:176-182 (2011)
  11. 曾良一郎, 氏家寛. 物質依存の神経化学. 脳とこころのプライマリケア第8巻 依存 (福居顯二編集) : 50-59, シナジー, 東京(2011)
  12. 曾良一郎. 薬物依存の脆弱性要因. 実験医学 28(5) : 38-42(2010)
  13. 曾良一郎, 佐々木一益. 痛みがあると薬物依存になりやすいというのは本当か?. **Clinical Neuroscience 別冊** 28(5) ; 581(2010)
  14. 曾良一郎, 内海修. シナプスの病態 薬物依存症. **Clinical Neuroscience** 28(8) ; 982-930 (2010)
  15. 笠原好之, 有銘預世布, 福井麻美, 内海修, 曾良一郎. コカイン依存研究の動向. 薬物依存の臨床各論-最新動向-, 日本臨床 68 (8) ; 1479-1485(2010)
2. 学会発表
    1. (国際学会での発表)
      - 1) Igari M, Shen H, Hagino Y, Lesch K, Murphy D, Hall S, Uhl GR, Ikeda K, Yaegashi N, Sora I. Role of Serotonin 1B Receptor in Serotonergic Prevention From Methamphetamine-Induced Behavioural Sensitisation In Serotonin Transporter Knockout Mice. 7th Fens Forum European neuroscience .Amsterdam the Netherlands . [2010/7/3-7]
      - 2) Igari M, Shen H, Hagino Y, Lesch K, Murphy D, Hall S, Uhl GR, Ikeda K, Yaegashi N, Sora I. Role of Serotonin 1B Receptor in Serotonergic Prevention From Methamphetamine-Induced Behavioural Sensitisation In Serotonin Transporter Knockout Mice. Serotonin Club 2010 Conference.Montreal Canada [2010/7/9-11]
      - 3) Yamamoto H, Kamegaya E, Sawada W, Yamamoto T, Han W, Sora I, Yanagawa Y, Ikeda K. The dopaminergic modulation of mu-opioid receptor in the primary cultured brain stem cells. Neuroscience 2010 40th Annual Meeting. San Diego, USA [2010/11/16]
    2. (国内学会での発表)
      - 4) 笠原好之, 有銘預世布, 久保有美子, 福井麻美, 曾良一郎. ドーパミン神経伝達過剰マウスモデルにおける神経発達. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台[2010/9/15]
      - 5) 曾良一郎. 覚せい剤依存症の生物学的メカニ

ズム. 3学会合同シンポジウム5: 依存と離脱のメカニズム. 平成22年度アルコール・薬物関連学会合同学術総会, 小倉[2010/10/8]

- 6) 曾良一郎. 特別講演: モノアミン神経伝達と高次神経機能. 第3回東北ニューロモデュレーション研究会学術講演会, 仙台[2010/10/22]
- 7) 山本秀子, 亀ヶ谷悦子, 澤田和可子, 山本敏文, 韓文華, 曾良一郎, 柳川右千夫, 池田和隆. メタンフェタミン処理による初代培養脳幹由来神経細胞の $\mu$ -オピオイド受容体の発現低下. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台[2010/9/15-17]
- 8) 高松幸雄, 佐藤敦志, 曾良一郎, 池田和隆. 幼若期 DAT 遺伝子欠損マウスの多動とメチルフェニデートによる多動亢進. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会, 仙台[2010/9/15-17]

#### 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

## 依存性薬物による精神障害発症の分子機構解明と治療・予防法の開発

分担研究者：西川 徹<sup>1</sup>

研究協力者：村岡新一郎<sup>1</sup>、梶井 靖<sup>1,2</sup>、海野麻未<sup>1</sup>、山本直樹<sup>1</sup>、車地暁生<sup>1</sup>、沼知陽太郎<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野, <sup>2</sup>田辺三菱製薬研究本部, <sup>3</sup>グラクソ・スミスクライン開発本部)

### [研究要旨]

依存性薬物による精神障害発症の分子機構の手がかりを得る目的で、樹状突起に発現してシナプス機能に関係し、統合失調症患者死後脳や、統合失調症様症状発現薬や抗精神病薬の投与動物の脳における変化が報告されてきたspinophilinについて、ラット大脳新皮質における覚せい剤・methamphetamine (MAP)の影響を調べた。MAPは、cocaine、nomifensineなどのドーパミン作動薬とともに、薬物による易再発性精神病状態のモデルと考えられている逆耐性現象を引き起こすことが知られているが、4.8ng/kgの急性投与60分後にspinophilin mRNAの発現を有意に減少させたが、120分以降24時間後までは変化を生じさせなかった。コカイン (30mg/kg) およびnomifensine (40mg/kg) でも投与60分後に同様の減少が認められた。また、MAP (4ng/kg) を5日間、1日1回反復投与した後19日間休薬した、逆耐性現象が確認される動物の大脳新皮質では、基礎的発現が有意に低下したが、生理食塩水を反復投与した対照群にMAP (1.6ng/kg) をチャレンジしたときに見られるspinophilin mRNA発現の抑制が消失することがわかった。以上の結果は、MAPによる逆耐性現象以外の長期持続性の変化の維持と形成に、大脳新皮質のspinophilinが関与することを示唆しており、薬物性精神障害が樹状突起異常と関係する可能性が注目される。

### A. 研究目的

本研究課題では、依存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、予後などの分子マーカーを見出すことを目指している。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<sup>9,10,11</sup>、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<sup>9,10</sup>、などの点に着目して、依存性薬物の脳内物質への作用とその発達変化等について分子生物学的研究を進める。以上の事実は、DA作動薬やNMDA受容体遮断薬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 (神経回路とそこに含まれる分子カスケード) 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おり<sup>9,10</sup>、次の所見からも支持される。すなわち、MAPやPCP投与ラットの脳の活動異常のパターンは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<sup>9,10,12</sup>。そこで、これまでの研究に