

## 薬物依存形成における脳内エピジェネティクス制御機構の解析

研究分担者：鈴木 勉

研究協力者：森 友久、芝崎真裕

(星薬科大学薬品毒性学教室)

### [研究要旨]

アルコールや覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドーパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られている。現在までに、神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが報告されている。昨年度の報告において、METH 誘発逆耐性獲得動物の側坐核では CCR2 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、CCR2 が METH の逆耐性に関与することを報告した。CCR2 は 7 回膜貫通型三量体 G タンパク質共役型受容体であり、免疫応答に関与することが知られていることから、METH の精神依存に免疫応答の関与が考えられる。一方、近年、依存症患者における細菌感染への抵抗性低下が報告されており、その回復も依存症患者の治療において重要な課題となっている。さらに、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドーパミン関連行動が増強されることも報告されており、中枢神経系における免疫系の抑制が薬物依存症に深く関与している可能性が考えられる。しかしながら、その詳細な検討はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、薬物依存症における神経免疫系のメカニズム解明を目的として、免疫系を活性化する lipopolysaccharides (LPS) を用いて METH 誘発報酬効果に対する影響を検討した。実験には C57BL/6J 系雄性マウスを用い、METH 誘発報酬効果は conditioned place preference 法により評価した。その結果、METH により認められる報酬効果の形成は LPS を前処置することで有意に、且つほぼ完全に抑制された。このような条件下、CCR2 mRNA 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側坐核領域では CCR2 mRNA 量の有意な増加が認められ、この増加は LPS 処置により有意に減少した。そこで、LPS 処置時における各種インターロイキン類の変化について、RT-PCR 法を用いて検討した。まず、末梢血を用いて検討を行ったところ、LPS 処置 1 時間後において CCR2 のアゴニストである CCL2 mRNA 量の有意な増加が認められた。一方、側坐核領域では、対照群に対し LPS を処置したマウスにおいて IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 量の著明な増加が観察された。そこで、脳における免疫系を担うミクログリアについて検討したところ、LPS 処置によりミクログリアの活性化が認められた。以上、本研究の結果より、LPS による免疫系の活性化が METH による精神依存形成の抑制に一部関与している可能性が示唆された。また、本研究における細胞間相互作用による脳内神経の可塑的变化を結びつけるアプローチが精神依存形成の複雑さを紐解く重要な鍵になると考えられる。

### A. 研究目的

Methamphetamine (METH) などの依存性薬物による精神依存の形成ならびに発現機序を明らかにすることは、社会医学的にも重要な問題と考え

られ、従来から神経行動薬理学的および臨床医学的側面からの確な診断法・治療法の開発に向けて精力的な検討が行われている。しかしながら、未だ依存形成機序を解明するには至っていないの

が現状である。

覚せい剤などの依存性薬物を摂取することにより、中脳辺縁ドーパミン神経系の長期的な可塑的变化が誘導されることが知られている<sup>1,2)</sup>。現在までに、神経可塑的变化などの細胞の長期的な変化に、クロマチンの再構築を伴った遺伝子のエピジェネティックな修飾が重要な役割を担っていることが知られている。昨年度の報告において、METH 誘発逆耐性を獲得した動物の側坐核では CCR2 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 の有意な増加が認められ、CCR2 が METH の依存症に関与することを報告した。CCR2 は 7 回膜貫通三量体 G タンパク質共役型受容体であり、免疫応答に関与することが知られていることから、METH の依存症に免疫応答が関与する可能性が考えられる。近年、HIV タンパク (Tat) により cocaine によるドーパミン関連行動が増強されることも報告され、一方で、薬物依存症患者における細菌感染抵抗性の低下が報告されている<sup>3)</sup>。また、当教室では lipopolysaccharide (LPS) が cocaine 誘発報酬効果を抑制することを報告しており、薬物依存症に中枢神経系における免疫系が深く関与している可能性が考えられる。しかしながら、その詳細な検討はほとんどなされていないのが現状である<sup>4)</sup>。そこで本研究では、薬物依存症における神経免疫系のメカニズム解明を目的として、免疫系を活性化する lipopolysaccharides (LPS) を用いて METH 誘発報酬効果に対する影響を検討した。

## B. 研究方法

実験には、ICR 系雄性マウスを使用した。薬物により誘発される報酬効果は conditioned place preference 法により測定した。また、mRNA の変化は RT-PCR 法、局在および形態変化は、免疫染色法に従い確認した。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

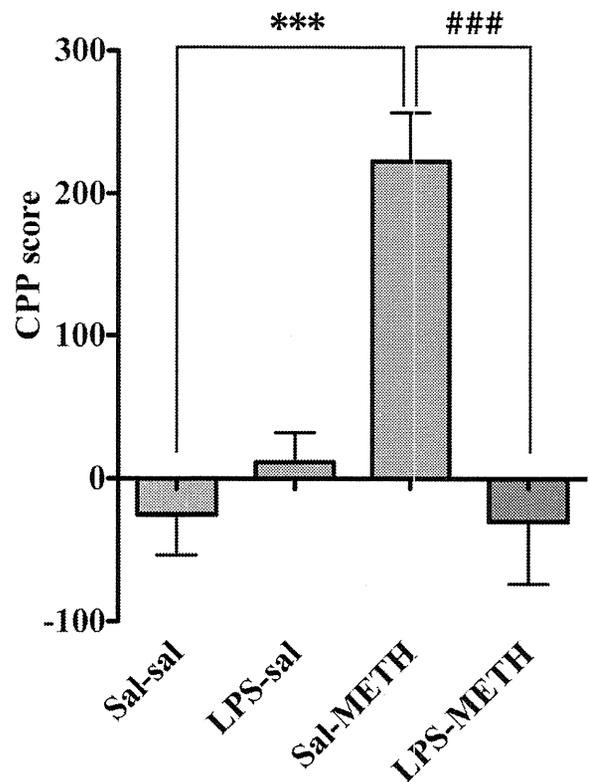


Fig. 1 Effect of LPS (1mg/kg, i.p.) on the METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effects in mice. The data represents the mean ± SEM of eight mice. \*\*\* $p < 0.001$  vs. saline conditioned group, ### $p < 0.001$  vs. saline pre-treated group.

価には一元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test を用いて評価した。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得た上で、動物に対する倫理面を十分に考慮して全ての実験を行った。

## C. 研究結果

### 1. METH 誘発報酬効果に対する LPS の影響

LPS (1mg/kg, i.p.) を前処置し METH (1mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に対する影響について条件づけ場所嗜好性試験法に従い検討した。その結果、METH による報酬効果の形成は LPS を前処置することにより有意に抑制された (Fig. 1)。

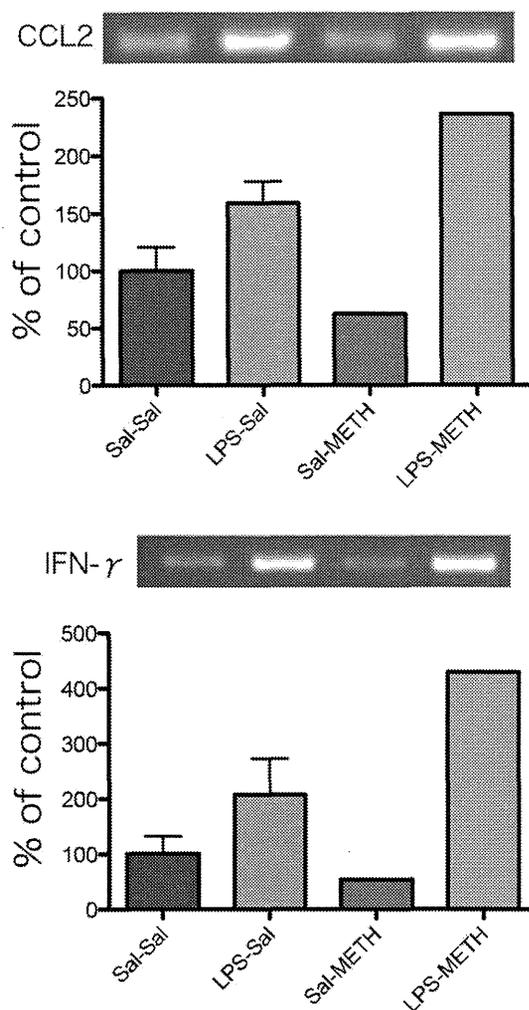


Fig. 2 Changes in mRNA levels of CCL2 and IFN- $\gamma$  in the peripheral blood of mice after treatment with LPS (1mg/kg, i.p.) and/or METH (1mg/kg, s.c.).

## 2. LPS による末梢血液および側坐核領域におけるサイトカイン/ケモカイン mRNA 発現量の変化

LPS 処置による影響について検討する目的で、LPS 処置 1 時間後の末梢血液における cytokine および chemokine mRNA の変化について検討した。その結果、CCR2 のリガンドである Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) および Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の増加が認められた (Fig. 2)。また、同様の条件下、側坐核領域についても検討

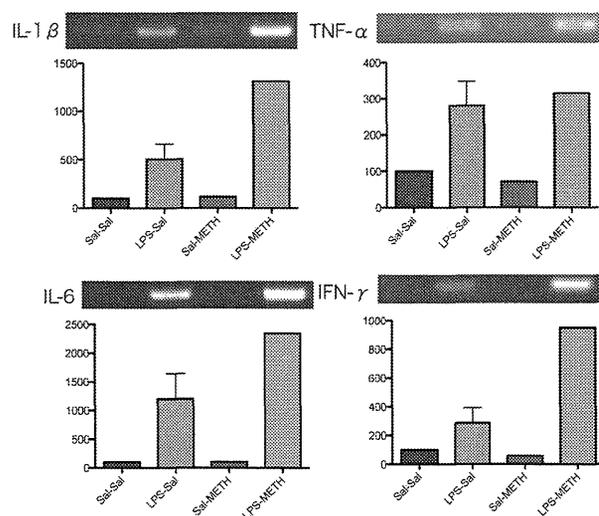


Fig. 3 Changes in mRNA levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1mg/kg, i.p.) and/or METH (1mg/kg, s.c.).

を行ったところ、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IFN- $\gamma$  mRNA の増加が認められ、脳内においても免疫応答の亢進が確認された (Fig. 3)。

## 3. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核領域における GDNF mRNA 発現量の変化および LPS の影響

METH 誘発報酬効果による側坐核領域における glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) の発現変化に対する LPS の影響について検討を行った。その結果、METH により認められる GDNF mRNA の増加は LPS の処置により減少が認められた (Fig. 4)。

## 4. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核でのミクログリアの変化および LPS の影響

Fig. 4 においてグリア細胞の関与が示唆されたため、ミクログリアおよびアストロサイトの変化について免疫組織染色法を用いて検討を行った。LPS の処置によりミクログリアの活性化が認められ (Fig. 5)、METH 誘発報酬効果を獲得した動物の側坐核において認められるアストロサイトの星状化は、LPS を共処置した動物では明らかな

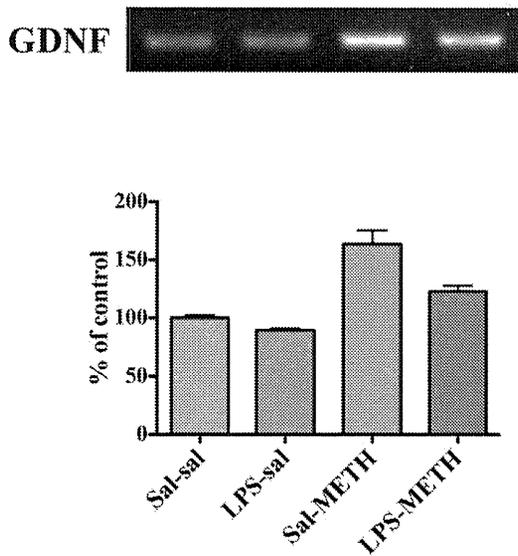


Fig. 4 Changes in mRNA levels of GDNF in the limbic forebrain of mice after treatment with LPS (1mg/kg, i.p.) and/or METH (1mg/kg, s.c.).

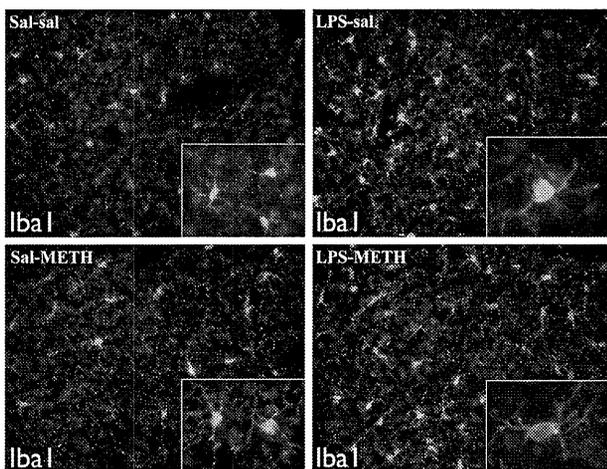


Fig. 5 Iba1-like immunoreactivity (IR) in the nucleus accumbens of mice after METH-induced place preference with or without cotreatment of LPS. The density of Iba1-IR was increased in the nucleus accumbens of mice treated with LPS.

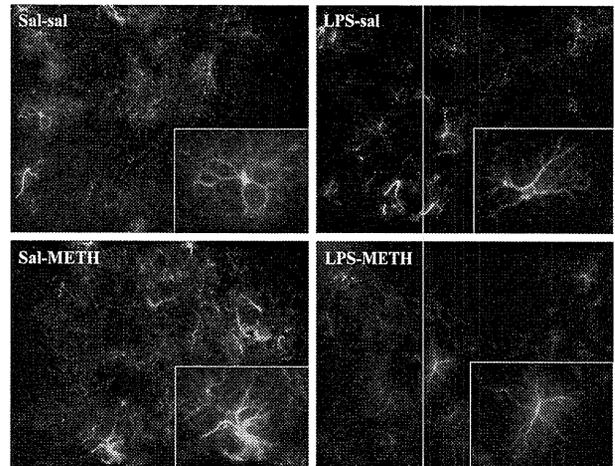


Fig. 6 GFAP-like immunoreactivity (IR) in the nucleus accumbens of mice on METH-induced place preference with or without cotreatment of LPS. The density of GFAP-IR was increased in the nucleus accumbens of mice during the development of rewarding effect of METH. There were no changes in the density of GFAP-IR in the nucleus accumbens of mice treated with METH in combination with LPS as compared to saline treatment.

抑制が認められた (Fig. 6)。

##### 5. METH 誘発報酬効果獲得動物の側坐核でのアストロサイトの変化および LPS の影響

現在までにアストロサイト上に CB2R が存在し、アストロサイトの機能に影響を及ぼすことが報告されている<sup>5)</sup>。そこで、初代培養アストロサイトを用い、CB2R の関与について検討を行った。METH 曝露により認められるアストロサイトの星状化は、CB2R の作動薬であり内因性リガンドである 2-a rachidonoylglycerol (2-AG) を共処置することにより明らかな抑制が認められた (Fig. 7)。

##### 6. LPS による METH 誘発報酬効果の抑制作用に対する AM630 の影響

LPS による METH 誘発報酬効果への抑制作用に対する CB2R の関与について検討するために、CB2R の拮抗薬である AM630 を LPS 処置 10 分前に前処置し、その影響について検討した。

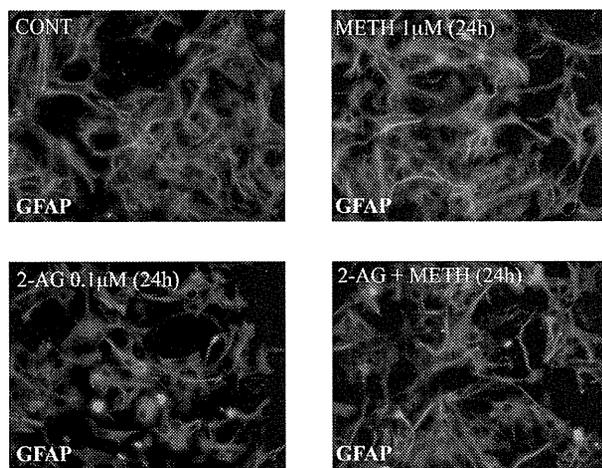


Fig. 7 Treatment with methamphetamine (METH, 1μM) for 1 days caused astrocytic activation in purified cortical astrocytes. These activation of astrocytes induced by METH were inhibited by 2-AG (0.1μM).

その結果、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制は、AM630 を前処置することにより完全に消失した (Fig. 8)。

#### D. 考察

本研究結果より、LPS 処置により METH 誘発報酬効果の抑制が認められた。また、LPS を処置することにより、末梢血液において CCL2 および IFN-γ mRNA の発現増加が認められたことから、これらの変化が中枢神経系に影響を及ぼすと推察される。また、昨年度の研究成果より、CCR2 欠損動物では METH による逆耐性が維持されないことから、過剰な CCL2 の刺激により CCR2 のダウンレギュレーションが誘導され、これらの応答の破綻が METH による精神依存を抑制した可能性が示唆されるが、詳細については今後の検討課題である。

側坐核領域において METH により誘導されるアストロサイトの星状化および GDNF mRNA の増加は LPS により抑制された。一方、初代培養アストロサイトを用いた検討より、METH に

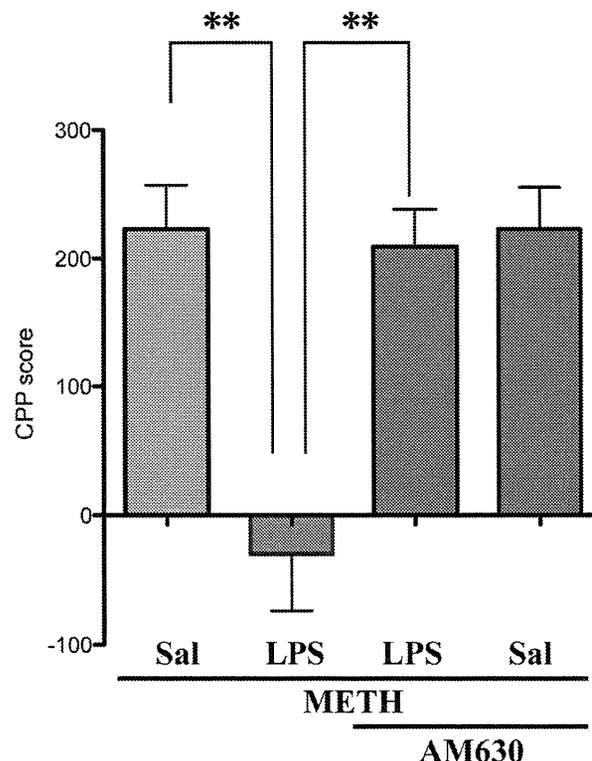


Fig. 8 Effect of AM630, a CB2R antagonist, on inhibition of METH (1mg/kg, s.c.)-induced rewarding effect by LPS in mice. The data represent the mean ± SEM of eight mice. \*\*p < 0.01 vs. drug-treated group.

よるアストロサイトの星状化が 2-AG の共処置により抑制された。また、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制が AM630 により消失したことから、これらの反応に CB2R が関与するものと推察される。当教室の研究成果より、アストロサイトが METH の依存に深く関与することを報告している<sup>6)</sup>。また、CB2R はミクログリアやアストロサイトなどのグリア細胞に多く存在することが報告されており<sup>5)</sup>、さらに、CB2R 欠損動物では cocaine の精神依存が増強されることが報告されている<sup>7)</sup>。一方、2-AG の合成酵素である DAGLα はアストロサイトには殆ど存在せず、ミクログリアに存在することを見いだしている (データ未発表)。したがって、LPS によりミクログリアが活性化され、2-AG の遊離が引き起

され、CB2R を介したアストロサイトの抑制を誘導することにより、METH 誘発報酬効果の抑制が引き起こされた可能性が考えられる。しかしながら、現在までに、ミクログリアを抑制することにより、METH による報酬効果が抑制されるなど、本研究結果と相反する結果が報告されている<sup>8)</sup>。恐らくは、介する受容体および情報伝達系さらには細胞間相互作用の相違が深く関与するものと考えられることから、今後、中枢におけるミクログリアやアストロサイトおよび神経細胞における細胞間相互作用について検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

以上本研究結果より、免疫応答を活性化させることにより、METH による精神依存が抑制される可能性が示唆された。

#### [参考文献]

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) Purohit, V., Rapaka, R., and Shurtleff, D.: Drugs of abuse, dopamine, and HIV-associated neurocognitive disorders/HIV-associated dementia. *Mol. Neurobiol.*, 44, 102-110 (2011).
- 4) Okutomi, T., Suzuki, T.: Immunomodulator as medicine for morphine and cocaine dependence. Especially effect of LPS. *Yakugaku Zasshi.*, 115, 42-51 (1995).
- 5) Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R.M., Ramos, J.A., Guzmán, M.: Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.*, 28, 39-45 (2007).
- 6) Narita, M., Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Shindo, K., Nakamura, A., Kuzumaki, N., Nagumo, Y., Suzuki, T.: Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2476-2488 (2006).
- 7) Xi, Z.X., Peng, X.Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.Y., Liu, Q.R., Yang, H.J., Bi, G.H., Li, J., Gardner, E.L.: Brain cannabinoid CB2 receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.*, 14, 1160-1166 (2011).
- 8) Fujita, Y., Kunitachi, S., Iyo, M., Hashimoto, K.: The antibiotic minocycline prevents methamphetamine-induced rewarding effects in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 101, 303-306 (2012).

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Imai, S., Saeki, M., Yanase, M., Horiuchi, H., Abe, M., Narita, M., Kuzumaki, N., Suzuki, T., Narita, M.: Change in microRNAs associated with neuronal adaptive responses in the nucleus accumbens under neuropathic pain. *J. Neurosci.* 31, 15294-15299, 2011.
2. Rahmadi M, Narita M, Yamashita A, Imai S, Kuzumaki N, Suzuki T: Sleep disturbance associated with an enhanced orexinergic system induced by chronic treatment with paroxetine and milnacipran. *Synapse* 65, 652-657, 2011.
3. Yoshizawa K, Narita M, Saeki M, Narita M, Isotani K, Horiuchi H, Imai S, Kuzumaki N, Suzuki T.: Activation of extracellular signal-regulated kinase is critical for the discriminative stimulus effects induced by U-50488H. *Synapse* 65, 1052-1061, 2011.
4. Torigoe K, Nakahara K, Rahmadi M, Yoshizawa K, Horiuchi H, Hirayama S, Imai S, Kuzumaki N, ITOH T, Yamashita A, Shakunaga K, Yamasaki M, Nagase H, Matoba M, Suzuki T, Narita M: Usefulness of olanzapine as an adjunct to opioid treatment and for the treatment of neuropathic pain. *Synapse*, 66, 174-179, 2011.
5. Torigoe K, Nakahara K, Rahmadi M, Yoshizawa K, Horiuchi H, Hirayama S, Imai S, Kuzumaki N, Itoh T, Yamashita A, Shakunaga K, Yamasaki M, Nagase H,

Matoba M, Suzuki T, Narita M: Usefulness of olanzapine as an adjunct to opioid treatment and for the treatment of neuropathic pain. *Anesthesiology*. 116, 159-169, 2012.

6. 成田年: 「第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経薬理学会合同年会」印象記. *精神医学* 53: 302-303, 2011.

7. 荒川和彦, 鳥越一彦, 葛巻直子, 鈴木 勉, 成田年: 抗がん剤による末梢神経障害の特徴とその作用機序. *日本緩和医療薬学雑誌*, 4: 1-13, 2011.

8. 吉澤一巳, 成田年, 今井哲司, 葛巻直子, 成田年: 慢性疼痛治療におけるオピオイド鎮痛薬の適正使用. *臨床整形外科* 46: 317-325, 2011.

9. 吉澤一巳, 鳥越一宏, 鈴木 勉, 成田年: 3.オピオイドの副作用とその対策. *ライフ・サイエンス* 5: 33-42, 2011.

10. 鳥越一彦, 吉澤一巳, 鈴木 勉, 成田年: 神経障害性疼痛の治療・対策. *神経障害性疼痛の治療・対策*. 31: 71-75, 2011.

## 2. 学会発表

1. 磯谷香奈, 吉澤一巳, 長瀬博, 芝崎真裕, 佐伯麻衣, 成田道子, 今井哲司, 成田年, 鈴木勉:  $\kappa$  オピオイド受容体作動薬 U-50,488H の弁別刺激効果発現における ERK 経路の役割. 第 124 回日本薬理学会関東部会 (東京,2011.6.4)

2. 武田弘太郎, 芝崎真裕, 露木智久, 森友久, 鈴木勉: アルコール慢性処置によるモルヒネ誘発報酬効果の変化. アルコール精神依存関連学会合同学術総会 (名古屋,2011.10.13-15)

3. 増川太輝, 芝崎真裕, 森友久, 石井一典, 齊藤祐輔, 山岸ゆい, 鈴木勉: Benzodiazepine 系薬物の中脳辺縁系に及ぼす影響. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会 (東京,2011.10.27-29)

4. 秋田由花子, 芝崎真裕, 増川太輝, 森友久, 鈴木勉: Methamphetamine 誘発報酬効果に対する lipopolysaccharides (LPS) の影響と脳内 mRNA 発現変動の解析. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会年会 (東京,2011.10.27-29)

5. 阿部美奈子, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉: Morphine 誘発報酬効果に対する cannabinoid 1 受容体作動薬の影響. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会年会 (東

京, 2011.10.27)

6. 増川太輝, 芝崎真裕, 秋田由花子, 三竹真里子, 森友久, 鈴木勉: Lipopolysaccharides (LPS) によるミクログリアの活性化が methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす影響. 第 21 回神経行動薬理若手研究者の集い (京都, 2012.3.13)

7. 佐伯朋哉, 芝崎真裕, 森友久, 阿部美奈子, 宇田川雄也, 上園保仁, 的場元弘, 鈴木勉: カンナビノイド受容体作動薬のモルヒネ誘発精神依存および側坐核におけるドパミン遊離に対する影響. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都, 2012.3.14-16)

8. 露木智久, 芝崎真裕, 武田弘太郎, 森友久, 鈴木勉: アルコール慢性処置に対するモルヒネの報酬効果と鎮痛効果の影響. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都, 2012.3.14-16)

## 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

## 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<sup>1</sup>

研究協力者：宮本嘉明<sup>1</sup>、家垣典幸<sup>1</sup>、石川雄大<sup>1</sup>、宇野恭介<sup>1</sup>、日比陽子<sup>2</sup>、村松慎一<sup>3</sup>、鍋島俊隆<sup>2,4</sup>

（<sup>1</sup> 富山大学大学院医学薬学研究部・薬物治療学研究室、<sup>2</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座・医学部附属病院薬剤部、<sup>3</sup> 自治医科大学神経内科学講座、<sup>4</sup> 名城大学比較認知科学研究所・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】

依存性薬物による薬物乱用は世界各国で大きな社会問題となっており、本邦においても、覚醒剤メタンフェタミンによる犯罪事例が若年層にまで波及し始めている。したがって、薬物依存の形成メカニズムを解明し、その予防および治療法の開発が急務となっている。しかし、その形成メカニズムには未だ不明な点が多く、多種多様な分子が関与していると考えられている。本プロジェクトでは、薬物依存に関連する新規分子を同定するとともに、その作用メカニズムの解明を試みている。これまでに、Shati および Piccolo という2つの分子が薬物依存の形成に深く関与していることを明らかにしてきた。昨年度は、側坐核でのみ Shati を過剰発現させたマウスを作製し、その覚醒剤反応性の低下を報告した。今年度は、その神経作用メカニズムを解明するために、新たに線条体でのみ Shati を過剰発現させたマウスを作製し、それらの覚醒剤への反応性を比較検討するとともに、脳内ドパミンおよびセロトニン神経系における Shati の機能的役割を検討した。さらに、我々が見いだした Shati および Piccolo に続く、第3の薬物依存関連分子 Transmembrane protein 168 (Tmem168) について、その生理機能解析にも着手したので、併せて報告する。

---

### A. 研究目的

精神刺激薬および麻薬などの依存性薬物による薬物乱用は、世界各国で対策が講じられているにも拘らず、その状況は悪化の一途を辿っており大きな社会問題となっている。本邦においては、覚醒剤であるメタンフェタミン (methamphetamine: MAP) の乱用が問題となっており、覚醒剤

の関連した犯罪事例が若年層にまで波及し始めている。このような社会的背景から、乱用薬物による薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、その予防法や治療法の確立が求められている。これまでに、各種乱用薬物の共通の薬物依存形成メカニズムにおいて、脳内ドパミン神経系の神経機能変化が重要な役割をしていることが明らか

にされている<sup>5)</sup>。しかし、薬物依存の形成メカニズムは非常に複雑であり、未知の遺伝子が依存形成には関与していることも考えられている。そこで、我々は、覚醒剤を連続投与したマウスの側坐核 (nucleus accumbens: NA、主要なドパミン神経投射部位のひとつ) において、PCR select cDNA サブトラクション法による薬物依存関連遺伝子の同定を試みた。その結果、いくつかの候補遺伝子を見だし、そのうち Shati および Piccolo の2つの遺伝子については、覚醒剤による薬物依存を軽減する可能性を示唆する報告を行った<sup>3, 8, 9)</sup>。昨年度は、新規遺伝子 *shati* の生理機能を検討するために、NA で Shati を過剰発現させた (NA-Shati) マウスを作製して、行動学的実験を行った。本年度は、同様に重要なドパミン神経投射部位である線条体、特に側坐核と区別するために背側線条体 (dorsal striatum: dS) で Shati を過剰発現させた (dS-Shati) マウスを作製して、NA-Shati マウスとの覚醒剤への反応性を比較検討した。また、全身性に恒常的に Shati を過剰発現させた (Shati-TG) マウスを作製し、覚醒剤への反応性を検討した。さらに、前述の PCR select cDNA サブトラクション法により見いだした Shati および Piccolo に続く、第3の薬物依存関連分子 Transmembrane protein 168 (Tmem168) について、その生理機能解析も開始したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

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富山大学動物実験指針、文部科学省動物実験指針および the Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments Science Council of Japan, 2006 に準じ、動物実験委員会で承認された上で行った。マウスは、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. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製およびマウス脳内への注入

*Shati* 遺伝子を組み込んだ pAAV-*shati*、pAAV-Rep/Cap および pHelper の3種類のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、細胞内で AAV-*shati* ベクターを作製させ、それを抽出し精製した<sup>6)</sup>。*Shati* 遺伝子を組み込んでいない AAV ベクターを mock コントロールとして使用した。各 AAV ベクターを、両側 NA (anterior = + 1.4, lateral = ± 0.6, ventral = + 4.2 from Bregma) もしくは両側 dS (anterior = + 0.5, lateral = ± 2.0, ventral = + 3.5 from Bregma) に注入して3週間経過後から行動実験を行った。

### 3. Shati-TG マウスの作製

6 x His 遺伝子を5'側に融合させた *shati* 遺伝子を構築し、CAGプロモーターにより駆動するプラスミドに組み込んだ。このプラスミドを制限酵素処理により線状化ベクターとし、マイクロインジェクションによりマウス前核期受精卵に注入した。ベクター注入受精卵を仮親マウスの卵管内に移植し妊娠させ、仔マウスを得た。仔マウス尾部よりDNAを抽出し、PCR法により導入遺伝子の確認を行い、ヘミ接合体である Shati-TG マウス・ファウンダー(F0)を選別した。ファウンダーマウス同士の交配によりホモ接合体を作製した。行動実験は、10週齢の Shati-TG マウスを用いて行った。

### 3. *Shati* および *Tmem168* mRNA 発現量の測定

*Shati* および *Tmem168* mRNA 量の測定は、常法に従って Real-Time RT-PCR 法で行った。PCRプライマーについては、以下の塩基配列を使用した。

*Shati*: 5'-GTGATTCTGGCCTACCTGGA-3' (forward), 5'-CCACTGTGTTGTCCTCCTCA-3' (reverse), *Tmem168*: 5'-GACAGAATCATGGCATCCA AAGG-3' (forward), 5'-TTGTCTTGCCGCTGGAG TCCAT-3' (reverse)。MAP (2 mg/kg, s.c.) およびニコチン (1 mg/kg, s.c.) 連続投与後の脳組織サンプルは、最終投与の2時間後に採取した。

#### 4. 運動量の測定

アクリル製の箱 (40×40×30 cm) の中で、マウスを自由に行動させ、Scanet MV-40 (MELQUEST, 富山) を用いて運動量を測定した。覚醒剤誘発運動過多の測定では、実験の直前に MAP (1 mg/kg, s.c.) および生理食塩水 (Saline) 投与を行った。

#### 5. 条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned place preference test)

条件付け場所嗜好性試験は、2つのコンパートメントからなる明暗箱を用いて既報に従って行った<sup>10)</sup>。MAP (1 mg/kg, s.c.) および saline 投与は、条件付けの直前に行った。

#### 6. 脳内ドパミン遊離量の測定

*In vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、マウス NA および dS におけるドパミン遊離量を測定した<sup>9)</sup>。マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, s.c.) 麻酔下で脳定位装置に固定した。頭蓋を開口後、左側 NA (anterior = +1.4, lateral = +0.6, ventral = +4.2 from Bregma) もしくは左側 dS (anterior = +0.5, lateral = ± 2.0, ventral = +3.5 from Bregma) にガイドカニューレを挿入し固定した。翌日、透析プローブをガイドカニューレより挿入し、リンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>) を 0.5 μl/min で灌流した。灌流液は、NA では 15 分間隔、dS では 6 分間隔で収集し、

灌流液中のドパミン量を HPLC システム (HTEC-500, EICOM, 京都) を用いて分析した。MAP (1 mg/kg, s.c.) は、透析プローブ挿入から約 2 時間後に投与した。

#### 7. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、分散分析の後、post-hoc test 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. NA-Shati および dS-Shati マウスにおける *shati* mRNA 発現

NA-Shati および dS-Shati マウスの NA および dS における *shati* mRNA の発現量を検討した。NA-Shati マウスの NA における *shati* mRNA 発現量は、NA-Mock マウスと比較して、約 4 倍に増加していた (Fig. 1A)。一方、dS-Shati マウスの dS における *shati* mRNA 発現量は、dS-Mock マウスと比較して、約 6 倍に増加していた (Fig. 1B)。

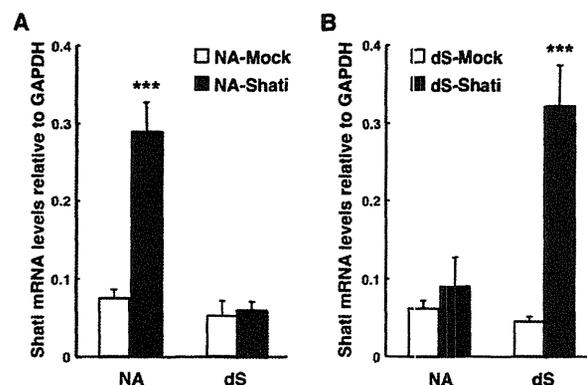


Fig. 1 *Shati* mRNA expression in the NA and dS of NA- and dS-Shati mice. *Shati* mRNA levels were measured by Real-Time RT-PCR and were presented as relative to GAPDH. NA: nucleus accumbens, dS: dorsal striatum. \*\*\**P* < 0.001 vs Mock.

#### 2. NA-Shati および dS-Shati マウスにおける MAP への反応性

##### a) MAP 誘発運動過多

MAP 1 mg/kg の単回投与により、いずれの群のマウスも有意な MAP 誘発運動過多を示した。し

かしながら、NA-Shati マウスの MAP 誘発運動過多は、NA-Mock マウスと比較して有意に減少していた (Fig. 2A)。一方、dS-Mock および dS-Shati マウスでは有意な MAP 誘発運動過多が観察され、両群に差はなかった (Fig. 2B)。

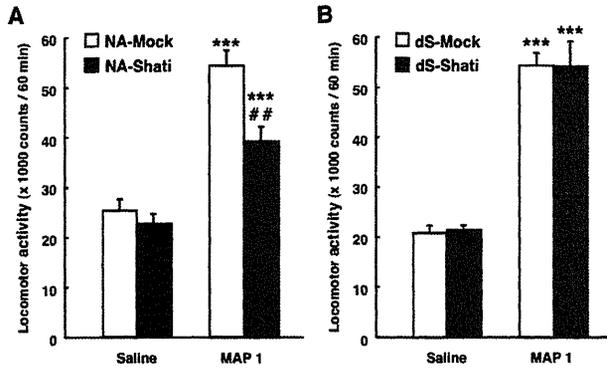


Fig. 2 MAP-induced locomotor activity in NA- and dS-Shati mice. The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was measured for 60 min. NA: nucleus accumbens, dS: dorsal striatum. \*\*\* $P < 0.001$  vs Saline, \*\* $P < 0.05$  vs Mock.

#### b) MAP 誘発逆耐性現象

前述の MAP 単回投与に続けて、MAP 1 mg/kg を 7 日間連続投与し、1、3、5、7 日目に運動量を測定した。NA-Mock および NA-Shati マウスは MAP 誘発運動過多における逆耐性現象を示した。両群の逆耐性形成過程には有意な差はなかったが、各測定時における NA-Shati マウスの MAP 誘発行動量に有意な減少が観察された (Fig. 3A)。また、dS-Mock および dS-Shati マウスにおいても、MAP 誘発運動過多における逆耐性現象が観察されたが、両群に差はなかった (Fig. 3B)。

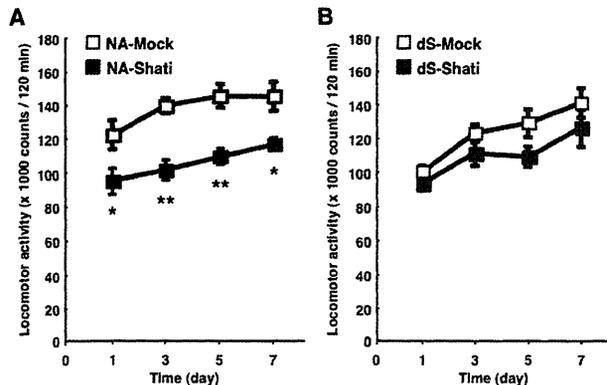


Fig. 3 MAP-induced locomotor sensitization in NA- and dS-Shati mice. The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg/day s.c.) for 7 days was measured for 120 min. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Mock (Bonferroni's post-hoc test).

#### c) MAP 誘発場所嗜好性

MAP 1 mg/kg による条件付けにより、NA-Mock マウスでは場所嗜好性が誘発されたが、NA-Shati マウスでは場所嗜好性が観察されず、MAP 誘発場所嗜好性の減少傾向 ( $P = 0.082$ ) を示した (Fig. 4A)。一方、dS-Mock および dS-Shati マウスでは、両群とも有意な MAP 誘発場所嗜好性が観察され、両群に差はなかった (Fig. 4B)。

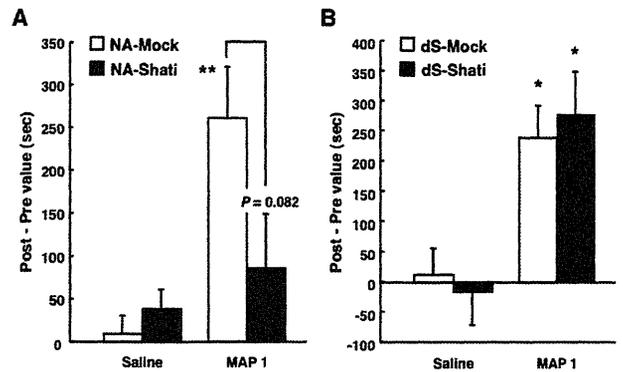


Fig. 4 MAP-induced place preference in NA- and dS-Shati mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning of the place conditioning test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Saline.

#### d) MAP 誘発ドパミン遊離量

*In vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、脳内ドパミン遊離量を検討した。NA-Mock および NA-Shati マウスの NA におけるドパミン基礎遊離量に有意な差は観察されなかった。しかし、MAP 1 mg/kg 投与後、NA-Mock マウスの NA において、ドパミン遊離量が約 150%に上昇することに対し、NA-Shati マウスの NA では、その上昇がほとんど観察されず有意な差を示した (NA Group  $\times$  Time,  $F_{(14,140)} = 2.5$ ,  $P < 0.01$ : repeated ANOVA) (Fig. 5A)。一方、dS-Mock および dS-Shati マウスの dS におけるドパミン基礎遊離量にも有意な差は観察されなかった。さらに、MAP 1 mg/kg 投与では、dS-Mock および dS-Shati マウスの両群とも、ドパミン遊離量が約 250%に上昇し有意な差はなかった (Fig. 5B)。

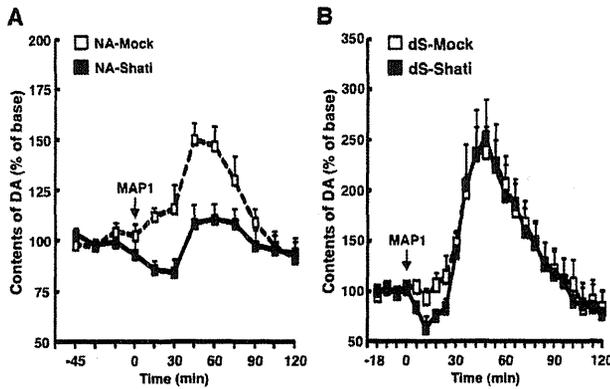


Fig. 5 MAP-induced dopamine release in NA- and dS-Shati mice.  
 A: MAP-induced dopamine release in the NA of NA-Shati mice using *in vivo* microdialysis.  
 B: MAP-induced dopamine release in the dS of dS-Shati mice using *in vivo* microdialysis.  
 MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was performed on time 0 min.

### 3. Shati-TG マウスにおける *shati* mRNA 発現

Shati-TG マウスの各脳部位における *shati* mRNA の発現量を測定した。その結果、対照群の野生型マウスと比較して、雄の Shati-TG マウスでは中脳において、雌では前頭皮質において、約 1.5 倍の *shati* mRNA 発現量の増加が観察された (Fig. 6A and F)。また、他の脳部位においては、*shati* mRNA の発現量に顕著な変化は見られなかった (Fig. 6B-E)。

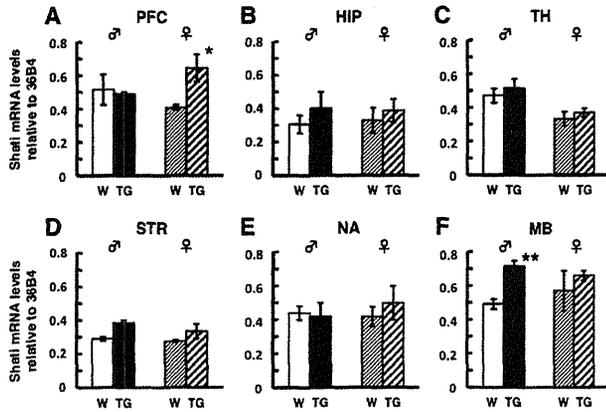


Fig. 6 *Shati* mRNA expression in the various brain regions of Shati-TG mice.  
*Shati* mRNA levels were measured by Real-Time RT-PCR and were presented as relative to 36B4. W: Wild-type, TG: Shati-TG, PFC: Prefrontal cortex, HIP: Hippocampus, TH: Thalamus, STR: Striatum, MB: Midbrain. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Wild-type.

### 4. Shati-TG マウスにおける MAP への反応性

#### a) MAP 誘発運動過多

Shati-TG マウスに Saline を単回投与したところ、雌の Shati-TG マウスでは、野生型を比較して有意な行動量の増加が観察された (Fig. 7B)。MAP

1 mg/kg を単回投与では、全ての群において MAP 誘発運動過多が観察された。しかし、雌雄両群の Shati-TG マウスにおいて、MAP 誘発運動過多が、野生型マウスのそれと比較して有意に増加していた (Fig. 7A and B)。

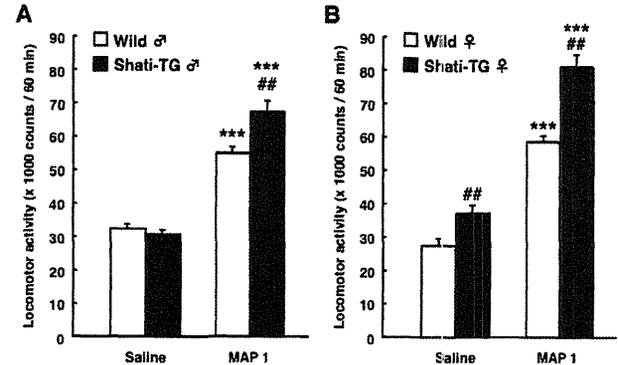


Fig. 7 MAP-induced locomotor activity in Shati-TG mice.  
 The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was measured for 60 min. \*\*\* $P < 0.001$  vs Saline, \*\* $P < 0.01$  vs Wild-type.

#### b) MAP 誘発逆耐性現象

前述の MAP 単回投与に続けて、MAP 1 mg/kg を 7 日間連続投与した。その結果、雄の Shati-TG マウスでは、野生型と比較して MAP 誘発逆耐性現象の形成過程に減少傾向が観察された (Fig. 8A)。一方、雌では Shati-TG および野生型マウスにおける MAP 誘発逆耐性現象に差は観察されなかった (Fig. 8B)。

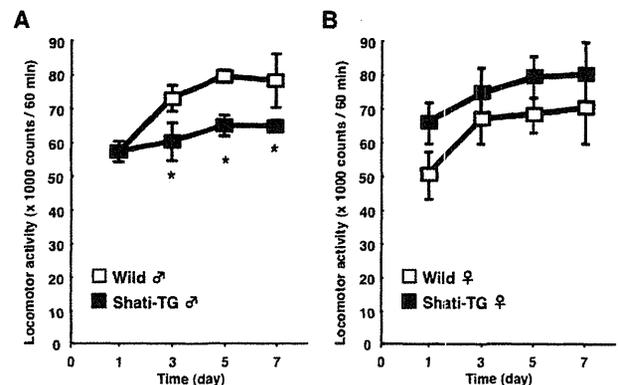


Fig. 8 MAP-induced locomotor sensitization in Shati-TG mice.  
 The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg/day s.c.) for 7 days was measured for 120 min. \* $P < 0.05$  vs Mock (Bonferroni's post-hoc test).

#### c) MAP 誘発場所嗜好性

Shati-TG および野生型マウスの雄では、MAP 1

mg/kg の条件付けにより有意な場所嗜好性の増加が観察された (Fig. 9A)。Shati-TG および野生型マウスの雌では、MAP によって条件づけされた嗜好性の増加傾向が観察された (Fig. 9B)。雌雄いずれにおいても、Shati-TG および野生型マウスの間に有意な差は見られなかった。

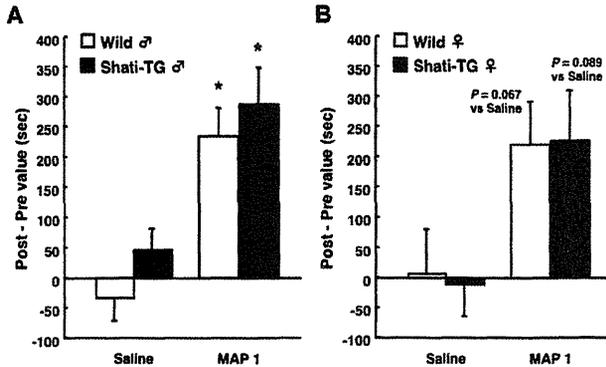


Fig. 9 MAP-induced place preference in Shati-TG mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning of the place conditioning test. \* $P < 0.05$  vs Saline.

#### 5. マウス組織における *Tmem168* mRNA 発現

野生型マウスの各組織における *Tmem168* mRNA の発現量を Real-Time RT-PCR 法を用いて測定した。*Tmem168* mRNA は、全身に発現しているものの、比較的、脳組織に高く発現していた (Fig. 10A)。また、各脳部位における測定では、線条体と視床において、高い *Tmem168* mRNA 発現が認められた (Fig. 10B)。

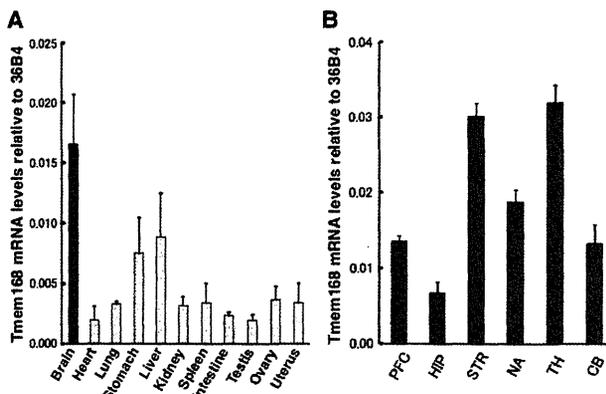


Fig. 10 *Tmem168* mRNA expression in the various organs (A) and brain regions (B) of mice. *Tmem168* mRNA levels were measured by RT-PCR and were presented as relative to 36B4. PFC: prefrontal cortex, HIP: Hippocampus, STR: striatum, NA: nucleus accumbens, TH: thalamus, CB: cerebellum.

6. 依存性薬物による *Tmem168* mRNA 発現変化  
野生型マウスに MAP (2 mg/kg, s.c.) を 6 日間連続投与した際の各脳部位における *Tmem168* mRNA の発現変化を検討した。その結果、*Tmem168* mRNA 発現量は、海馬および側坐核において有意に増大した (Fig. 11)。さらに、ニコチン (1 mg/kg, s.c.) を 6 日間連続投与した際には、前頭皮質および側坐核において *Tmem168* mRNA 発現量が有意に増大した (Fig. 11)。

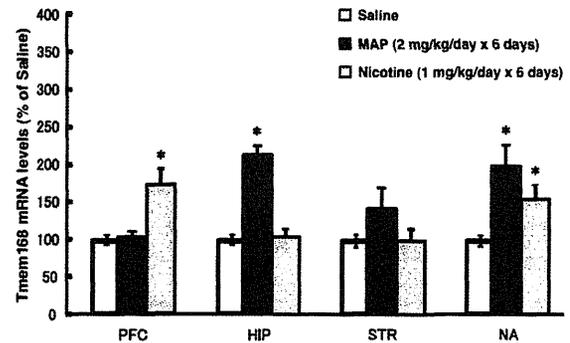


Fig. 11 *Tmem168* mRNA expression in the brain regions of mice after repeated MAP or Nicotine treatment.

*Tmem168* mRNA levels were measured by Real-Time RT-PCR and were presented as relative to % of saline-control group. MAP (2 mg/kg/day) or Nicotine (1 mg/kg/day) was administered for 6 days. PFC: prefrontal cortex, HIP: Hippocampus, STR: striatum, NA: nucleus accumbens. \* $P < 0.05$  vs Saline.

#### D. 考察

昨年度からの研究成果において、NA-Shatiマウスは、MAP誘発運動過多の減少、MAP誘発逆耐性現象の減少およびMAP誘発場所嗜好性の減少傾向を示した。一方、dS-Shatiマウスは、いずれのMAPへの反応性にも変化を示さなかった。さらに、これらの行動実験結果を裏付けるように、MAP誘発ドパミン遊離量は、NA-ShatiマウスのNAにおいて減少したが、dS-ShatiマウスのdSにおいては変化が見られなかった。以上のことから、NAにおけるShatiは、MAPの薬理学的作用に対して抑制的に働くことが明らかとなり、覚醒剤による薬物依存形成メカニズムにおいて、NAのShatiが重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、この詳細な機序については、更なる検討が必要である。

Shati-TG マウスでは、雌雄の脳内*shati* mRNA 発現量に違いが見られ、雄性マウスでは中脳において、雌性マウスでは前頭皮質において、その増加が確認された。その原因については不明であるが、Shati-TG マウスでは、全身性に恒常的に*shati* 遺伝子を発現させたために、ホルモン・バランスの異常が引き起こされ、副次的に脳内の遺伝子発現に性差が現れたかもしれない。したがって、Shati-TG マウスについては、別系統のShati-TG マウスを用いるなどの再検討が必要である。しかしながら、少なくとも雄性Shati-TG マウスにおけるMAP誘発運動過多の増強およびMAP誘発逆耐性現象の減少傾向から、前頭皮質におけるShatiが覚醒剤による薬物依存形成に関与していることが示唆される。

Shatiは、別名*N*-acetyltransferase 8 like protein (Nat8l) として、アスパラギン酸から*N*-アセチルアスパラギン酸への変換を触媒する酵素であることが報告されている<sup>1)</sup>。Shatiによって生成される*N*-アセチルアスパラギン酸は、脳内において高濃度に存在するものの、その生理機能については不明な点が多い<sup>7)</sup>。最近では、神経細胞内で*N*-アセチルアスパラギン酸からジペプチドである*N*-アセチルアスパラギン酸・グルタミン酸へと更に変換され、細胞外へ放出されることにより神経伝達物質として働くことが報告されている<sup>2)</sup>。そこで、今後は、Shatiの機能的役割を明らかにするために、*N*-アセチルアスパラギン酸および*N*-アセチルアスパラギン酸・グルタミン酸のドーパミンおよびグルタミン酸神経機能への影響について検討していく必要がある。

我々が見いだした新たな薬物依存関連分子の候補であるTmem168は、アミノ酸残基697個から成り、推定膜貫通領域を有するタンパク質である。このTmem168については、その遺伝子が、前立腺癌におけるlong-range epigenetic silencing領域の近傍に位置して

いるが、その抑制機能に関与していないこと<sup>4)</sup>およびホルモン反応性の乳癌細胞においてレチノイン酸により誘導される転写因子TFAP2Cの標的遺伝子であること<sup>11)</sup>が報告されている。しかしながら、その生理機能の報告はほとんどない。しかし、本研究結果より、Tmem168は、脳内において発現が高く、依存性薬物である覚醒剤およびニコチンの連続投与により、そのmRNAが増加した。これらのことから、Tmem168は、薬物依存形成メカニズムに関与していることが示唆され、特に、初期作用機序の異なる依存性薬物に対して同様の遺伝子発現反応を示していることから、その役割は重要なものであると考えられる。つまり、乱用薬物による薬物依存を治療するための共通の標的分子と成り得るかもしれない。

#### E. 結論

本研究では、薬物依存形成メカニズムにおける黒質-線条体系ではなく、中脳-辺縁系ドーパミン・システムに働くShatiが重要な役割をしていることを明らかにした。また、我々が見出したTmem168は、薬物依存関連分子として新たな薬物依存形成メカニズムを提唱する可能性を秘めていることが明らかとなった。今後は、ShatiおよびTmem168の生化学的および神経化学的機能をより詳細に検討し、その機能が薬物依存形成にどのように寄与しているかを明らかにしていく予定である。

#### [参考文献]

- 1) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., et al.: Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme: implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS. *Brain Res.*, 1335: 1-13,

- 2010.
- 2) Becker, I., Lodder, J., Gieselmann, V., et al.: Molecular characterization of N-acetylaspartyl-glutamate synthetase. *J Biol Chem.*, 285: 29156-29164, 2010.
  - 3) Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., et al.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol. Psychiatry*, 349: 451-463, 2008.
  - 4) Coolen, M.W., Stirzaker, C., Song, J.Z., et al.: Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat. Cell Biol.*, 12: 235-246, 2010.
  - 5) Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J.: Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29: 565-598, 2006.
  - 6) Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzyk, M., et al.: Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 66: 908-920, 2010.
  - 7) Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., et al.: N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, 81: 89-131, 2007.
  - 8) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., et al.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor-alpha in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107: 1697-1708, 2008.
  - 9) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., et al.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J. Neurosci.*, 27: 7604-7615, 2007.
  - 10) Noda, Y., Miyamoto, Y., Mamiya, T., et al.: Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286: 44-51, 1998.
  - 11) Woodfield, G.W., Chen, Y., Bair, T.B., et al.: Identification of primary gene targets of TFAP2C in hormone responsive breast carcinoma cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 49: 948-962, 2010.
- F. 研究発表
1. 論文発表
    - 1) Alkam, T., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., Kim, H.C., and Nabeshima, T.: Evaluation of object-based attention in mice. *Behav Brain Res.* 220, 185-193, 2011.
    - 2) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Ikeda, T., Morishita, K., Liu, W., Ibi, D., Tursun, A., Nabeshima, T., and Yamada, K.: The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. *Behav Brain Res.* 220, 271-280, 2011.
    - 3) Furukawa-Hibi, Y., Alkam, T., Nitta, A., Matuyama, A., Mizoguchi, H., Suzuki, K., Mossaoui, S., Yu, Q., Greig, N., Nagai, T., and Yamada, K.: Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- $\beta$  in mice. *Behav Brain Res.* 225, 222-229, 2011.
    - 4) Nakatani M., Shinohara Y., Takii M., Mori H., Asai N., Nishimura S., Furukawa-Hibi Y., Miyamoto Y. and Nitta A. : Periocular injection of in situ hydrogels containing Leu-Ile, an inducer for neurotrophic factors, promotes retinal ganglion cell survival after optic nerve injury. *Exp Eye Res.* 93, 873-879, 2011.
    - 5) Oyagia, A., Moriguchi, S., Nitta, A., Murata, K.,

- Oida, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Fukunaga, K., and Hara, H. : Heparin-binding EGF-like growth factor is required for synaptic plasticity and memory formation. *Behav Brain Res.* 1419, 97-104, 2011.
- 6) Yan, Y., Nitta, A., Koseki, T., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Dissociable role of tumor necrosis factor alpha gene deletion in methamphetamine self-administration and cue-induced relapsing behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. in press, 2012.
2. 学会発表
- 1) Nitta, A., Niwa, M., and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of TNF- $\alpha$  in PC12 cells. 13th International TNF Conference, 2011, 5, 15-18, Awaji.
- 2) Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., Uno, K., Nabeshima, T., and Miyamoto, Y.: New three molecules related to psychiatric diseases. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- 3) Ishikawa, Y., Miyamoto, Y., Iegaki, N., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., and Nitta, A.: Overexpression of Shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- 4) Iegaki, N., Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., and Nitta, A.: Emotional behaviors are regulated by the overexpression of shati in the dorsal striatum or nucleus accumbens of mice. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- 5) Miyamoto, Y., Muramatsu, S., and Nitta, A.: Role of dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens on methamphetamine-induced behavioral responses in mice. International Conference for Neurons and Brain Disease 2011, 2011, 8, 3-5, Toyama.
- 6) Iegaki, N., Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, Y., Nabeshima, T., and Nitta, A.: Overexpressions of "shati" in the dorsal striatum or nucleus accumbens affect emotional behaviors in mice. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 7) Saika, E., Miyamoto, Y., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., and Nitta, A.: Role of a novel molecule "shati" in animal model of dystonia. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 8) Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., and Nabeshima, T.: Over Expression of Piccolo C2A Domain Induces Depression-Like Behavior in Mice. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 9) Miyamoto, Y., Muramatsu, S., and Nitta, A.: Knockdown of dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens attenuates methamphetamine-induced behavioral responses in mice. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 10) Takayama K., Miyamoto Y., Uno K., Seo S. and Nitta, A.: Expression of TMEM168, a multi-pass membrane protein, is induced in the nucleus accumbens by methamphetamine treatment in mice. 2<sup>nd</sup> Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 11) 宮本嘉明、家垣典幸、石川雄大、日々陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美：精神病関連遺伝子 Shati の脳部位特異的過剰発現マウスにお

- ける行動解析. 第 12 回 Pharmac-Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18, 富山.
- 12) 齊鹿絵里子、宮本嘉明、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: “ジストニア” モデル動物における新規遺伝子 Shati の役割. 第 12 回 Pharmac-Hematology Symposium, 2011, 6, 17-18, 富山.
  - 13) 入江徹美、新田淳美、赤池昭紀: 薬学教育における SP 養成および PBL チュートリアル教育の現状. 第 43 回日本医学教育学会大会, 2011, 7, 22-23, 広島.
  - 14) 新田淳美、日比陽子、宇野恭介、鍋島俊隆、宮本嘉明: 覚せい剤精神病マウス側坐核から単離された精神病関連分子について. 第 54 回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 15) 高山華南子、宮本嘉明、宇野恭介、徐承姫、新田淳美: 複数回膜貫通タンパク質 TMEM168 はメタンフェタミン連続投与によりマウス側坐核において誘導される. 第 54 回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 16) 宮本嘉明、村松慎一、新田淳美: 側坐核ドパミン D2 受容体ノックダウンマウスにおける覚せい剤への低感受性. 第 54 回日本神経化学会, 2011, 9, 26-28, 加賀.
  - 17) 宮本嘉明、村松慎一、新田淳美: 側坐核ドパミン D2 受容体の発現低下は、メタンフェタミン誘発行動異常を抑制する. 第 62 回日本薬理学会北部会, 2011, 9, 29-30, 仙台.
  - 18) 石川雄大、宮本嘉明、家垣典幸、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: マウス覚せい剤応答性に対する新規遺伝子シャチの脳部位特異的過剰発現の影響. 第 21 回医療薬学会年会, 2011, 10, 1-2, 神戸.
  - 19) 家垣典幸、宮本嘉明、石川雄大、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: 新規分子 Shati の脳部位特異的過剰発現がマウスの情動行動に及ぼす影響. 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
  - 20) 齊鹿絵里子、宮本嘉明、日比陽子、村松慎一、鍋島俊隆、新田淳美: 新規遺伝子 Shati の“ジストニア”モデル動物に対する影響. 第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011, 10, 27-29, 東京.
  - 21) 和田惇子、石川雄大、前田憲邦、中田美由貴、藤秀人、新田淳美: 実務実習先の 2 局を比較して学んだこと -総合病院隣接と住宅地域の調剤薬局との違い-. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.
  - 22) 新田淳美、宮本嘉明、宇野恭介: 富山大学薬学部・病院実務実習 23 年度 1 期における成果. 日本薬学会北陸支部第 123 回例会, 2011, 11, 27, 金沢.
  - 23) 高山華奈子、宮本嘉明、宇野恭介、徐承姫、松村祥平、和田惇子、新田淳美: 覚醒剤投与マウスの側坐核より見出された TMEM168 の細胞内局在と脳内分布. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
  - 24) 家垣典幸、宮本嘉明、宇野恭介、日比陽子、鍋島俊隆、新田淳美: 遺伝子組み換えマウスを用いた新規分子“Shati”の情動行動への影響. 日本薬理学会第 85 回年会, 2012, 3, 14-16, 京都.
  - 25) 長倉美由紀、玉地亜衣、宇野恭介、宮本嘉明、鍋島俊隆、尾崎紀夫、新田淳美: 精神疾患関連遺伝子 shati の産じょく期うつ病診断マーカーとしての可能性. 第 132 回日本薬学会年会, 2012, 3, 28-31, 札幌.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
  - 1) 特許取得: 精神障害関連遺伝子及びその利用  
発明者: 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋島俊隆  
出願人: 国立大学法人名古屋大学 (米国を除くすべての指定国), 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋

島俊隆（米国のみ）

2011年 取得特許（特願 2007-505883）

2) 特許出願：精神障害の診断方法および診断薬  
キット

発明者：新田淳美

出願人：国立大学法人富山大学

出願日：2011年6月6日（特願 2011-126100）

報告ポスターの作成．病薬会報（富山県病院  
薬剤師会）No.117, 32-33 頁, 2011. 11.

10) [新聞記事] 心の病に特定タンパク質．測定  
キットを開発：マウス実験作用確認．早期発  
見に期待．2011, 5, 4, 富山新聞．

11) [新聞記事] 覚せい剤 脳に損傷：新田富山大  
教授が講演．2011, 11, 11, 北日本新聞．

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

- 1) 新田淳美：- 依存症の現状 - アルコールおよ  
び向精神薬の乱用について．ファルマシア，  
47 巻, 839-843, 2011, 9.
- 2) 新田淳美：覚せい剤の怖さ；どうして再び手  
を出すのか．高岡市保護司会講演会（招待講  
演）. 2011, 6, 21, 高岡.
- 3) 新田淳美：自殺防止のための診断ツールの  
作成．富山大学コラボフェスタ 2011, 2011, 9,  
28, 富山.
- 4) 新田淳美：となみ政経塾第 13 回例会講演会  
（招待講演）. 2011, 10, 4, 砺波.
- 5) 新田淳美：未病予防からみた効果的な服薬  
行動「第 3 回未病予防システム研究会」平成  
23 年度知的クラスター地域プロジェクト事  
業の講演会（招待講演）. 2011.11, 9, 株式会社  
広貫堂呉羽工場，富山.
- 6) 新田淳美：こころの病気の薬（招待講演）.  
2011, 11, 24, 小杉南中学 PTA 講演会，小杉.
- 7) 新田淳美：覚せい剤の怖さ；なぜやめられな  
いのか．高岡市更生保護女性会（招待講演）.  
2012, 2, 24, 高岡.
- 8) 新田淳美：薬物中毒防止について．平成 23  
年度富山大学学生団体アルコール等講習会  
（招待講演）. 2012, 3, 21, 富山.
- 9) 新田淳美：富山大学薬学部実務実習（病院）

## 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：山崎圭太<sup>1</sup>，森屋由紀<sup>1</sup>，笠原好之<sup>1</sup>，十川千春<sup>2</sup>，北山滋雄<sup>2</sup>，花尻瑠理<sup>3</sup>，  
合田幸広<sup>3</sup>，池田和隆<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院精神・神経生物学分野，<sup>2</sup>岡山大学大学院歯科薬理学分野，

<sup>3</sup>国立医薬品食品衛生研究所生薬部，<sup>4</sup>東京都医学総合研究所・依存性薬物プロジェクト

---

### [研究要旨]

違法ドラッグの中でもメフェドロン (4-methylmethcathinone)、メチロン (3,4-methylenedioxymethcathinone) などのカチノン誘導体はデザイナードラッグと呼ばれ、国内外において乱用されている危険な薬物である。メフェドロン、メチロンなどのカチノン誘導体は中枢刺激薬であるメタンフェタミン、MDMAと類似の構造を有し、死亡例も報告されている。カチノン誘導体は中枢刺激剤と類似の構造を有することから、モノアミン輸送体を標的分子としていることが推測される。

モノアミントランスポーターを発現させた培養細胞においてメチロンはドーパミン、セロトニンと比較してノルエピネフリンの取り込み阻害効果が強かった。一方、メフェドロンはセロトニンと比較してドーパミン、ノルエピネフリンの取り込み阻害効果が強かった。メチロンの急性投与は野生型、ドーパミントランスポーター (DAT) KO、セロトニントランスポーター (SERT) KOマウスにおいて体温上昇を引き起こした。一方、メフェドロンの急性投与はラットにおいては体温を上昇させることが報告されているが、野生型マウスでは体温を下降させる結果が得られた。SERTの欠損ではメフェドロンの急性投与は野生型同様に体温を下降させたが、DATの欠損では体温は下降しなかった。さらにメフェドロンの急性投与は移所運動量を増加させたが、反復投与により移所運動量が減少し耐性を示した。これらの結果は、カチノン誘導体はメタンフェタミン、MDMAなどの中枢刺激薬とは異なる薬理効果を持つ可能性が示唆された。

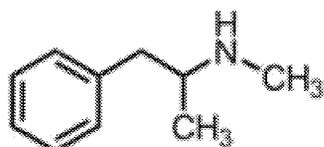
---

### A. 研究目的

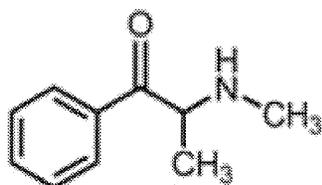
近年、本邦でも薬事法違反（無承認無許可医薬品）である疑いが強いにもかかわらず、公然と販売されている違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）が、青少年を中心に乱用が拡大している。違法ドラッグの情報がインターネット上で交換され、「安全な薬物」という大きな誤解のもとに安

易な使用が拡大し、きわめて深刻な社会問題となっている。さらに違法ドラッグの乱用拡大に伴い、死亡事故を含む健康被害が発生し、ゲートウェイ・ドラッグとしての使用をきっかけに麻薬等の使用に発展する危険性も増大している。

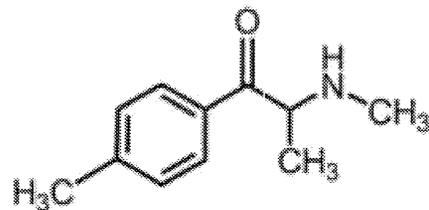
違法ドラッグの中でもメフェドロン、メチロンなどのカチノン誘導体はデザイナードラッグと



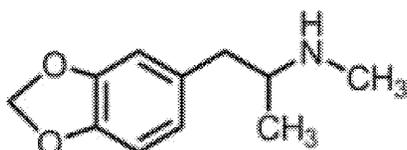
Methamphetamine



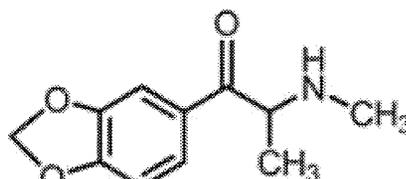
Methcathinone



Mephedrone (4MMC)



MDMA



Methylone (MDMC)

呼ばれ、国内外において乱用されている危険な薬物の一つである[1]。メフェドロン、メチロンなどのカチノン誘導体は中枢刺激剤であるメタンフェタミン、MDMA と類似の構造(上図)を有し、ここ数年、中枢刺激剤に代わる依存性薬物として蔓延してきている。一昨年、英国ではカチノン誘導体乱用による多数の死亡例が疑われた。しかし、カチノン誘導体の依存・神経毒性に関する薬理学的研究は限られており、速やかな検討が急務である。

中枢刺激薬はドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリンなどのモノアミンの神経細胞への再取り込み分子であるモノアミン輸送体を阻害することによりモノアミン神経伝達を増強することが薬理作用と考えられている。カチノン誘導体は中枢刺激剤と類似の構造を有することから、モノアミン輸送体を標的分子とすることが推測される。本研究においては代表的カチノン誘導体であるメフェドロン、メチロンの神経細胞でのモノアミン輸送の機序に加えて動物実験における神経毒性を中枢刺激剤と比較し、その分子基盤を解明する。

## B. 研究方法

### 1. カチノン誘導体のモノアミン輸送機能阻害の解析

#### 1) 薬剤

メフェドロン、メチロンは国立医薬品食品衛生研究所生薬部で合成したものをを用いた。カチノン誘導体の構造、純度については質量分析、各磁気共鳴装置により確認した[2]。メタンフェタミンは大日本住友製薬より、 $[^3\text{H}]$ モノアミンは Perkin Elmer Life Science より購入した。

#### 2) 神経伝達物質トランスポーター発現細胞系の構築

ラットドパミントランスポーター(DAT)、ノルエピネフリントランスポーター(NET)、セロトニントランスポーター(SERT)、マウスGABAトランスポーター1 (GAT-1) cDNAをCHO細胞に遺伝子導入し、G418にて選択してこれらトランスポーターを安定発現する細胞株を作成した。

#### 3) トランスポーター輸送機能の解析

トランスポーター輸送活性は、 $[^3\text{H}]$ ラベルしたそれぞれの基質をトレーサーとして用い、既報に準拠して行った[3]。

## 2. 行動解析

### 1) 実験動物

全ての実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可のもとに行った。薬物による