

- 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 μ -opioid-induced place preference. *Addict Biol* 15, 434-447, 2010.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Torigoe, K., Mori, T., Shibasaki, M., Yoshizawa, K., Narita, M., Suzuki, T.: Olanzapine suppresses the rewarding and discriminative stimulus effects induced by morphine. *Synapse*, 66(2), 174-179, 2012.
10. Mori, T., Yoshizawa, K., Nomura, M., Isotani, K., Torigoe, K., Tsukiyama, Y., Narita, M., Suzuki, T.: Sigma-1 receptor function is critical for both the discriminative stimulus and aversive effects of the kappa-opioid receptor agonist U-50488h. *Addict Biol* 17(4), 717-724, 2012.
11. Shibasaki, M., Kurokawa, K., Mizuno, K., Suzuki, T., Ohkuma, S.: Actin dynamics in development of behavioral sensitization after withdrawal from long-term ethanol administration to mice. *Alcohol Clin Exp Res* 36(8), 1385-1396, 2012.
12. Mori, T., Shimizu, N., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Involvement of the arachidonic acid cascade in the hypersusceptibility to pentylentetrazole-induced seizure during diazepam withdrawal. *Biol. Pharm. Bull* 35(12), 2243-2246, 2012.
13. Mori, T., Shibasaki, M., Abe, M., Udagawa, Y., Suzuki, T.: Effects of dronabinol on morphine-induced dopamine-related behavioral effects in animals. *Synapse* 66(11), 931-937, 2012.
14. Ise, Y., Mori, T., Katayama, S., Nagase, H., Suzuki, T.: Rewarding effects of ethanol combined with low doses of morphine through Dopamine D1 receptors. *J Nippon Med Sch.* (In Press)
15. Yoshizawa, K., Narita, M., Mori, T., Isotani, K., Suzuki, T.: Role of dopamine D2 and D3 receptors in mediating the U-50,488h discriminative Cue: Comparison with methamphetamine and cocaine. *Addict Biol* 17, 949- 955, 2012
16. Kuzumaki, N., Suzuki, A., Narita, M., Hosoya, T., Nagasawa, M., Imai, S., Yamamizu, K., Morita, H., Suzuki, T., Okada, Y., Hirotaoka J. O., Yamashita J. K., Okano H., Narita, M.: Multiple analyses of G-Protein Coupled Receptor (Gpcr) expression in the development

of Gefitinib-Resistance in transforming Non-Small-Cell Lung Cancer. *Plos One* 7(10), E44368, 2012.

17. Mori, T., Yoshizawa, K., Masahiro, S., Suzuki, T.: Discriminative stimulus effects of hallucinogenic drugs: A Possible relation to reinforcing and aversive effects. *J Pharmacol. Sci* 120(2), 70-76, 2012.

18. Mori, T., Rahmadi, M., Yoshizawa, K., Shibasaki, M., Ito, T., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Inhibitory effects of Sa4053 on the rewarding effects of abused drugs. *Addiction Biology* (In Press)

19. Shibasaki, M., Watanabe, K., Takeda, K., Itoh, T., Tsuyuki, T., Narita, M., Mori, T., Suzuki, T.: Effect of chronic ethanol treatment on μ -opioid receptor function, interacting proteins and morphine-induced place preference. *Psychopharmacology* (in press)

1. 今井哲司, 成田 年, 鈴木 勉: 側坐核. *分子精神医学* 10, 54-58, 2010.

2. 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.

3. 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.

4. 鈴木 勉: 乱用防止と適正使用. *ファルマシア* 46, 82, 2010.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. 森友久, 鈴木勉: A. オピオイドとは何か1. オピオイドについて. *ペインクリニック* 33, s231-s238, 2012.

11. 芝崎真裕: コカインは持続的な興奮性伝達亢進を起こして精神依存を形成する. *ファルマシア* 48(7), 685, 2012.

12. 鈴木勉: オピオイド鎮痛薬のやくりがくNo.6 *Pharma Tribune* 4 (2), 2012.

13. 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉: オピオイドと GABA 作動性ニューロン *Clinical Neuroscience* 30, 12, 2012.

2. 学会発表

(国際学会)

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 72th Annual Scientific meeting (Arizona,USA, 2010.6.12-17)

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 72th Annual Scientific meeting (Arizona,USA, 2010.6.12-17)

3. Shibasaki, M., Tsuyuki, T., Takeda, K., Mori, T., Suzuki, T.: Effects of chronic treatment with alcohol on the morphine-induced rewarding effects. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (California, 2012.6.9-14)

4. Ogawa, Y., Mori, T., Hokazono, M., Uzawa,

N., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Evaluation of the bupropion-induced sensitization to the locomotor activity in mice. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (California, 2012.6.9-14)

Masukawa, D., Shibasaki, M., Mori, T., Ishii, K., Saitoh, Y., Yamagishi, Y., Suzuki, T.: Effect of benzodiazepines on morphine-induced hyperlocomotion accompanied by the changes of KCC2 in the nucleus accumbens. 74th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence (California, 2012.6.9-14)

5. Masukawa, D., Shibasaki, M., Mori, T., Ishii, K., Yamagishi, Y., Suzuki, T.: Influence Of Chronic Treatment Of Zolpidem On Activation Of Dopaminergic System In Nucleus Accumbens. 16th Congress of International Society for Biomedical research on Alcoholism (札幌, 2012.9.12)

6. Tsuyuki, T., Shibasaki, M., Takeda, K., Mori, T., Suzuki, T.: Chronic Ethanol Treatment Alters Morphine-Induced Rewarding Effect Through Mor Receptor- Mediated Functional Changes. 16th Congress of International Society for Biomedical research on Alcoholism (札幌, 2012.9.12)

(国内学会)

1. 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 (神戸, 2010.9.2-4)

2. 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 (仙台, 2010,9-15-17)

3. 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 (仙台, 2010,9-15-17)

4. 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): κ 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学的解析. 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 (仙台, 2010,9-15-17)

5. 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 (鹿児島, 2010.9.25-26)

6. 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 (小倉, 2010.10.7)

7. 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: 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)

8. 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)

9. 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)

10. 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)

11. 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)

12. 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)

13. 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)

14. 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)

15. 上野碧美, 森友久, 吉澤一巳, 西脇瑞紀, 芝崎真裕, 成田年, 鈴木勉: 薬物依存の研究 (第465報) k オピオイド受容体作動薬 U-50, 488H の弁別刺激効果における dopamine D2 受容体 signal cascade の影響. 第126回関東薬理学会 (東京, 2012.7.14)

16. Mahardian Rahmadi, Tomohisa Mori, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki:

Involvement of sigma 1 receptor on the effects of SSRI on methamphetamine-induced behavioral sensitization and rewarding effects in mice. 第126回関東薬理学会 (東京, 2012.7.14)

17. 森友久, 芝崎真裕, 成田年, 鈴木勉: モルヒネ依存と機能性タンパク. 第22回日本臨床精神神経薬理学会 第42回日本神経精神薬理学会 (栃木, 2012.10.18-20)

18. 真柄詩織, 森友久, Teruo Hayashi, Tsung-Ping Su, 鈴木勉: ミトコンドリアにおける sigma 1 受容体による細胞保護機構の解明 Cytoprotective effect of sigma 1 receptor chaperone at mitochondria. 第22回日本臨床精神神経薬理学会 第42回日本神経精神薬理学会 (栃木, 2012.10.18-20)

19. 露木智久, 芝崎真裕, 安藤光史, 男澤杏美, 森友久, 鈴木勉: アルコール慢性処置のモルヒネ誘発報酬効果における GSK3 β signal cascade の影響. 第127回日本薬理学会関東部会 (東京, 2012.10.20)

20. 佐伯朋哉, 森友久, 芝崎真裕, 阿部美奈子, 宇田川雄哉, 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及ぼす影響. 第23回マイクロダイアリシス研究会 (東京, 2012.12.10)

21. 増川太輝, 芝崎真裕, 森友久, 石井一典, 山岸ゆい, 鈴木勉: Zolpidem の慢性処置による morphine 誘発報酬効果への影響. 第86回日本薬理学会年会 (福島, 2013.3.21-23)

22. Iwata, N., T. Mori., Murata, A., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Differential antagonizing effects of clozapine and haloperidol on the methamphetamine- and morphine-induced behavioral changes. 第86回日本薬理学会年会 (福島, 2013.3.21-23)

23. Andou, K., Shibasaki, M., Tsuyuki, T., Otokozaawa, A., Mori, T., Suzuki, T.: Chronic treatment of ethanol enhanced morphine-induced hyperlocomotion. 第86回日本薬理学会年会 (福島, 2013.3.21-23)

24. Aikawa, D., Mori, T., Saeki, T., Shibasaki, M., Suzuki, T.: Genetic background reflecting the conversion from discriminative stimulus to rewarding effects of psychostimulants in rats. 第 86 回日本薬理学会年会 (福島, 2013.3.21-23)
25. 今井敏雄, 芝崎真裕, 森友久, 鈴木勉: 薬物依存の研究 (第 473 報): Methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する lipopolysaccharides の影響. 日本薬学会第 133 年会 (横浜, 2013.3.27-30)

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

「乱用薬物による薬物依存の発症メカニズム・予防・診断 及び治療法についての研究」

平成 22 年度～平成 24 年度総合研究報告書

乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検索

分担研究者：新田淳美¹

研究協力者：宇野恭介¹、石川雄大¹、齊鹿絵里子¹、高山華南子¹、家垣典幸¹、日比陽子²、
村松慎一³、鍋島俊隆⁴、宮本嘉明¹

(¹富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)・薬物治療学研究室、²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学講座・医学部附属病院薬剤部、³自治医科大学神経内科学講座、⁴名城大学薬学部地域医療薬局学講座)

【研究要旨】

薬物乱用は世界各国で大きな問題となっており、本邦においては、覚せい剤メタンフェタミンや麻薬による犯罪事例の若年化が進んでいる。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、乱用薬物による薬物依存形成メカニズムには、多種多様な分子が関与しており、その詳細は未だ不明のままである。本プロジェクトでは、薬物依存に関連する新規分子を探索および同定するとともに、その機能を解明することによって、薬物依存の新たな治療薬の創生につなげることを目標とした。そして、我々は、shati/nat8l、transmembrane protein 168 (Tmem168) および piccolo という3つの新規分子が薬物依存形成に関与していることを明らかにした。

Shati/nat8l については、側坐核における本分子の過剰発現によって、覚せい剤メタンフェタミン誘発運動過多および場所嗜好性が抑制されることを明らかにした。さらに、その抑制メカニズムとして、側坐核において *N*-acetylaspartate (NAA) 合成酵素 shati/nat8l は、NAA を生合成し、続いて産生された代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 3 の選択的アゴニスト *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) の作用を介して、ドパミン遊離量を減少させることにより、メタンフェタミン応答性に対して抑制的に働くことを解明した。つまり、shati/nat8l 関連システムは覚せい剤依存の新たな治療薬開発の標的となることを示唆した。

一方、Tmem168 については、覚せい剤およびニコチンの両方の薬物依存形成メカニズムに関与していることを解明した。つまり、初期作用機序の異なる依存性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ことを示唆した。

我々が見出した3つの分子は、いずれも薬物依存に対して重要な役割を果たしている可能性があり、今後、これらの発現を調節する化合物を見出され、薬物依存の治療薬創生につながることを期待される。

A. 研究目的

薬物依存および薬物乱用は世界各国で予防対策が講じられているにも拘らず、その状況は悪化の一途を辿っている。現在、本邦は第3次薬物乱用期にあり、薬物事犯は社会的問題のひとつとなっている。薬物事犯の大半は、覚せい剤であるメタンフェタミン (methamphetamine: MAP) またはその誘導体の乱用によるものであり、特に最近では若年層への波及および再犯率の増加が問題となってきている。このような社会状況を打破するためには、薬物依存の形成メカニズムを明らかにし、予防や治療法の確立に繋がる研究を行う必要がある。これまでに、薬物依存の形成には側坐核 (nucleus accumbens: NA) におけるドパミン神経伝達が重要な役割を果たしていることが明らかにされている^{2, 6)}。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、本研究では、薬物依存形成に関連する新規分子を探索および同定するとともに、その機能を解明することによって、薬物依存に対する新たな治療薬の創生につなげることを目標としている。

これまでに、我々は、覚せい剤を連続投与したマウスの NA (腹側被蓋野からのドパミン神経投射部位) 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、shati/nat8l、Transmembran protein 168 (Tmem168) および Piccolo の3つの候補遺伝子を見いだした。そのうち shati/nat8l および Piccolo の2つの遺伝子については、覚せい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^{4, 11, 12)}。本研究では、特に新規分子 shati/nat8l に着目し、NA におけるその生理的役割の解明と覚せい剤への反応性メカニズムを検討した。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/nat8l および Piccolo に続く、第3の薬物依存関連分子 Tmem168 についても、その依存性薬物への反応性を検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、8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/nat8l 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⁷⁾。標的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 = ± 0.8, ventral = + 3.8 from Bregma) もしくは両側 dS (anterior = + 0.5, lateral = ± 2.0, ventral = + 2.8 from bregma) に注入して3週間経過後から行動実験を行った。なお、これらの遺伝子組み換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、富山大学の DNA 実験に関する委員会で承認された上で行った。

3. *Shati/nat8l* および *Tmem168* mRNA 発現量の測定

Shati/nat8l 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/nat8l*: 5'-GTGATTCTGGCCTACCTGGA-3' (forward), 5'-CCACTGTGTTGCCTCCTCA-3' (reverse)、*Tmem168*: 5'-GACAGAATCATGGCATC CAAAGG-3' (forward), 5'-TTGTCTTGCCGCTGG AGTCCAT-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。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. 自発的交替行動試験 (Y-maze test)

マウスを Y 字型迷路アームの先端に置いた後、8 分間自由に行動させ、マウスが進入したアームを順番に記録した。アームへの総進入回数 (total arm entries) と連続して異なるアームに進入した回数 (交替行動回数: number of alternations) を計算し、自発的交替行動率 [alternation behavior (%) = (number of alternations / total arm entries-2) × 100] を算出した。

6. 新奇物体認知試験 (Novel object recognition test)

連続した 2 日間、マウスをアクリル製の箱 (30×30×35 cm) に 1 日 30 分間入れた。3 日目に箱内に 2 つの物体を置きマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を 10 分間測定した

(Training)。24 時間後に、箱内の片方を新規物体に変えて同様にマウスを入れ、各物体にマウスがアプローチした時間を 10 分間測定した (Retention)。

7. 社会性行動試験 (Three chamber social interaction test)

アクリル製の 3 つのチャンバーから成る実験装置 (60×40×22 cm) を使用した。連続した 2 日間、マウスを装置の中で 20 分間自由に行動させた。3 日目に左右チャンバーの片側に、物体を入れたワイヤーケージを置き、もう一方のチャンバーには何も入っていない空のワイヤーケージを置いた。そして、中央のチャンバーにマウスを 10 分間入れた後、左右チャンバーへの移動を可能にし、さらに 10 分間 3 つのチャンバー内を自由に行動させ、各ワイヤーケージにアプローチした時間を測定した (Test 1)。続く 4 日目に左右チャンバーの片側に、3 日目とは異なる物体を入れたワイヤーケージを置き、もう一方のチャンバーには普段、異なるホームケージで飼育されているマウス (ストレンジャーマウスとする) をワイヤーケージ内に入れ、3 日目と同様にして各ワイヤーケージにアプローチした時間を測定した (Test 2)。

8. 明暗箱試験 (Light/dark box test)

2 つのコンパートメントからなる明暗箱のなかでマウスを 10 分間自由に行動させ、Scanet MV-40 LD を用いて明箱に滞在した時間を測定した。

9. 強制水泳試験 (Forced swimming test)

深さ約 15 cm で 25°C の水を張った円筒形の水槽にマウスを入れ、6 分間の強制水泳を行った。そのうち、後半 5 分間における無動時間を Scanet MV-40 AQ を用いて測定した。

10. 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¹³⁾。MAP (1 mg/kg, s.c.)およびsaline投与は、条件付けの直前に行った。

11. 脳内ドパミン遊離量の測定¹²⁾

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。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 = +0.8, ventral = +3.0 from Bregma) もしくは左側dS (anterior = +0.5, lateral = +2.0, ventral = +2.3 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、リングル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) 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。薬物投与は、透析プローブ挿入から約2時間後から開始した。

12. NAA および NAAG 含量の測定

既報^{9, 10)}に若干の変更を加え、HPLCを用いてNAAおよびNAAGを測定した。抽出した脳組織を、その重量の10倍容量0.1 M HClO₄を用いてホモジナイズした。13,000 gで10分間遠心し上清を採取後、2 M Na₂CO₃を加え、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で1 mLにメスアップした。次に、Bond Elut SAX anion exchange columns (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて、5.88 mL/L 85%リン酸溶液1 mLを用いて抽出した。HPLC カラムは ZORBAX SB-C18

(4.6 × 150 mm, Agilent Technologies) を用いた。測定は移動相に0.5% MeOHを含む1.18 mL/L リン酸水溶液、測定波長に215 nmを用いて室温で行った。

13. Glutamate carboxypeptidase II (GCPII) および NAAG synthase (NAAGS) のタンパク発現量測定

GCPII および NAAGS タンパク質量の測定は、Western Blotting 法で行った。抗体は、anti-GCPII (abcam ab80554, Cambridge, UK)、anti-NAAGS (abcam ab74284) および内部標準として anti-glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (MBL M171-3, Nagoya, Japan) 抗体を使用した。

14. 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/nat8l* mRNA 発現

NA-Shati および dS-Shati マウスのNAおよびdSにおける *Shati/nat8l* 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)。

2. NA-Shati マウスの行動解析

a) 自発的運動量

AAV-mock または AAV-shati ベクターをNA

に注入したマウスの自発的運動量を、60 分間測定した。両群における自発的運動量に、有意な差はなかった (Fig. 2A)。

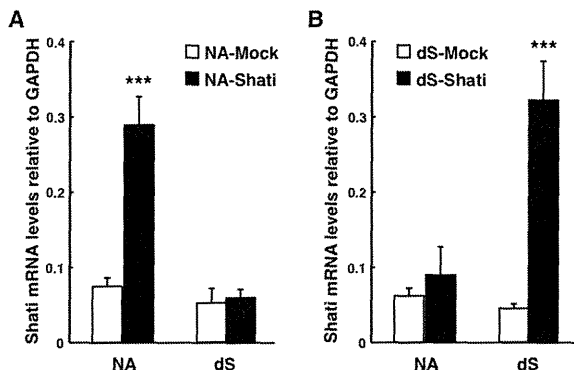


Fig. 1 *Shati* mRNA expression in the NA and dS of NA- and dS-Shati mice. *Shati* mRNA levels were measured by Real-Time RT-PCR and were presented as relative to GAPDH. NA: nucleus accumbens, dS: dorsal striatum. *** $P < 0.001$ vs Mock.

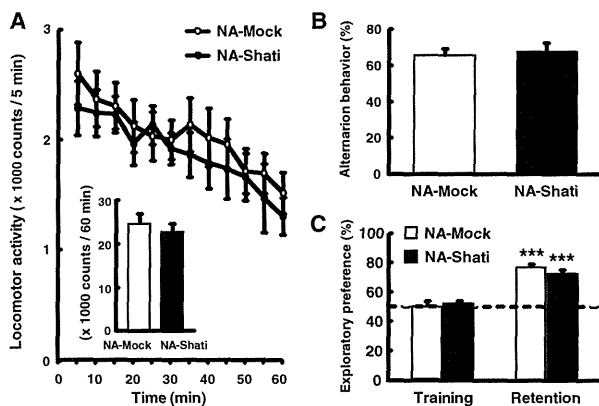


Fig. 2 Locomotor activity, Y-maze test and novel object recognition test in NA-Shati mice. A: The locomotor activity was measured every 5 min for 60 min. B: The alternation behavior in Y-maze test was calculated from the arm entries for 8 min. C: The exploratory preference in novel object recognition test was calculated from approach time to each object for 10 min. *** $P < 0.001$ vs training.

b) 短期作業記憶および物質認知能力

NA-Mock および NA-Shati マウスにおける Y 字型迷路試験での交替行動を、作業記憶の指標として測定した。2 群間における交替行動率すなわち短期作業記憶能力に差はなかった (Fig. 2B)。

次に、新奇物体認知試験を用いて、NA-Shati マウスの物体認知能力の変化について検討した。NA-Mock および NA-Shati マウスの両群において、Training では2つの物質に対してほぼ等しいアプローチ時間を示した (Fig. 2C)。24 時間後の Retention では、NA-Shati マウスは新規物体に

対してより長いアプローチ時間を示した。Retention でのアプローチ時間に 2 群間における差はなかった (Fig. 2C)。

したがって、NA-Shati マウスの学習記憶能力には障害がないことが示唆された。

c) 社会性行動

NA-Shati マウスにおける社会性行動に変化があるかどうかを検討するために、three chamber social interaction test を行った。最初に、物体の入ったワイヤーケージと空のケージを使って実験を行った (Test 1)。NA-Mock および NA-Shati マウスの両群において、物体の入ったワイヤーケージへのアプローチ時間は、空のワイヤーケージへのアプローチ時間と比べて、有意に増加した (Fig. 3 上図)。この時、NA-Mock および NA-Shati マウス間でアプローチ時間に違いはなかった (Fig. 3 下図)。次に、別の物質の入ったワイヤーケージとストレンジャーマウスが入ったワイヤーケージを使って実験を行った (Test 2)。NA-Mock マウスでは、物質よりもストレンジャーマウスへのアプローチ時間が有意に増加した (Fig. 3 下図)。一方、NA-Shati

マウスでは、ストレンジャーマウスと物質へのアプローチ時間に有意な差は観察されなかった (Fig. 3 下図)。これらのことから、NA-Shati マウスでは社会性行動に障害があることが示唆された。

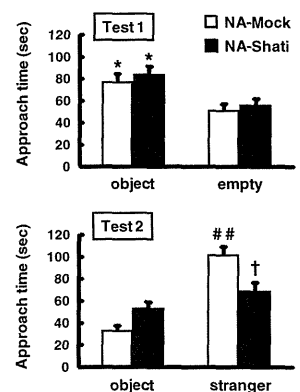


Fig. 3 Three chamber social interaction test in NA-Shati mice. The approach time was measured for 10 min. * $P < 0.05$ vs empty. ** $P < 0.01$ vs object. † $P < 0.05$ vs NA-Mock group.

d) 不安様行動および抑うつ様行動

NA-Shati マウスが不安様行動を示すかどうかを検討するために、light/dark box test を行った。

両群における明箱に滞在した時間に、有意な違いはなかった (Fig. 4A)。

次に、NA-Shati マウスが抑うつ様行動を示すかどうかを検討するために、forced swimming test (Fig. 4B) および tail suspension test (データ示さず) を行った。NA-Shati マウスの無動時間は、NA-Mock マウスのそれと比べて差はなかった (Fig. 4B)。

これらの結果により、NA-Shati マウスの不安および抑うつ様症状はコントロールマウスと同等であることが示唆された。

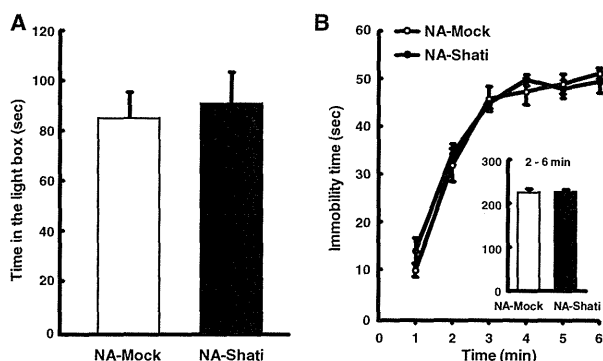


Fig. 4 Light / dark box test and forced swimming test in NA-Shati mice. A: The time spent in the light and dark boxes were measured for 10 min. B: The immobility time in water tank was measured every 1 min for 6 min.

3. 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. 5A)。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. 5B)。

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. 6A)。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. 6B)。

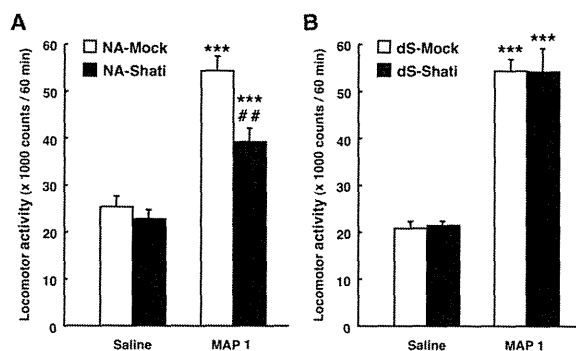


Fig. 5 MAP-induced locomotor activity in NA- and dS-Shati mice. The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg s.c.) was measured for 60 min. NA: nucleus accumbens, dS: dorsal striatum. *** $P < 0.001$ vs Saline, ** $P < 0.05$ vs Mock.

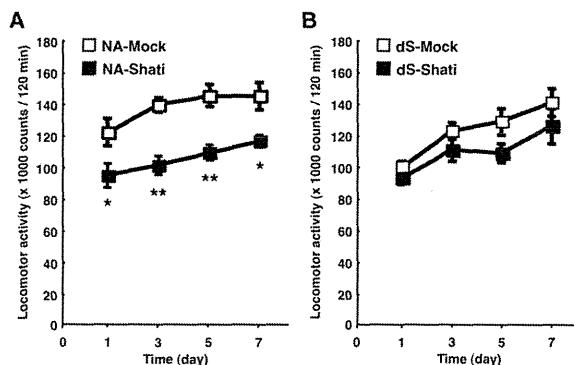


Fig. 6 MAP-induced locomotor sensitization in NA- and dS-Shati mice. The locomotor activity after MAP treatment (1 mg/kg/day s.c.) for 7 days was measured for 120 min. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Mock (Bonferroni's post-hoc test).

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を示した (Fig. 7A)。

dS-Mock および dS-Shati マウスでは、両群に MAP 誘発場所嗜好性が観察された (Fig. 7B)。

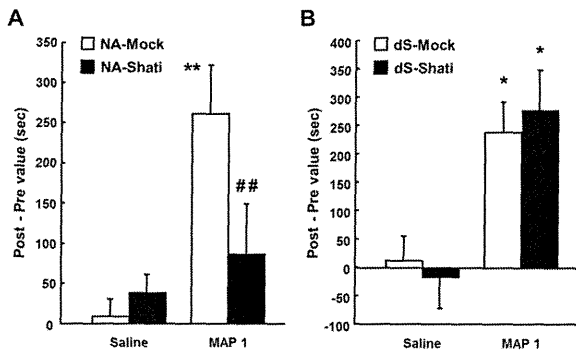


Fig. 7 MAP-induced place preference in NA- and dS-Shati mice. MAP (1 mg/kg s.c.) was administered during the conditioning of the place conditioning test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Saline. ## $P < 0.05$ vs Mock.

4. NA-ShatiおよびdS-ShatiマウスにおけるNAAおよびNAAG含量

NA-ShatiマウスのNAおよびdS-ShatiマウスのdSにおけるNAAおよびNAAG含量をHPLC法を用いて検討した。NA-ShatiマウスのNAにおけるNAAおよびNAAG含量は、NA-Mockマウスと比較して、有意に増加していた (Fig. 8A)。一方、dS-ShatiマウスのdSにおけるNAAおよびNAAG含量は、共にdS-Mockマウスと比較して、減少していた (Fig. 8B)。

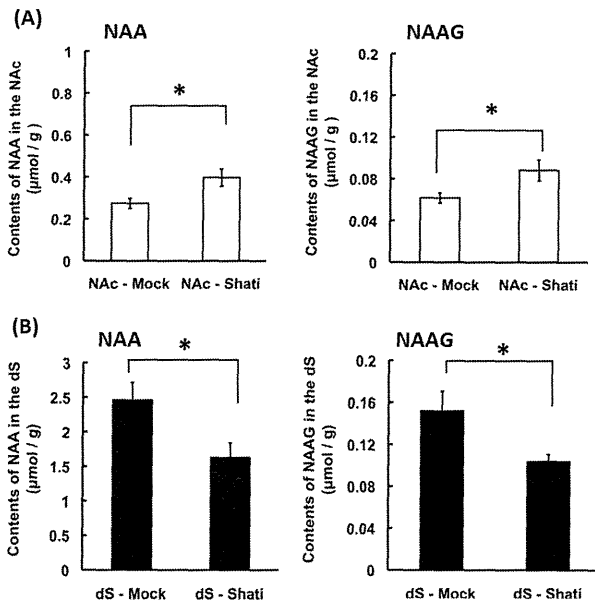


Fig. 8. Contents of NAA and NAAG in the NAc (A) or dS (B) of AAV-shati/nat8l vector-injected mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. $N=7$ for NAc-Mock; $N=6$ for NAc-Shati; $N=5$ for dS-Mock; $N=6$ for dS-Shati. * $p < 0.05$ vs. NAc-Mock or dS-Mock mice (Student- t test).

5. NA-ShatiマウスにおけるMAP誘発ドパミン遊離量

In vivo マイクロダイアリス法を用いて、NAにおけるドパミン遊離量を検討した。NA-ShatiマウスのNAにおけるドパミン基礎遊離量は、NA-Mockマウスと比較して有意な減少が観察された (Fig. 9A)。さらに、MAP 1 mg/kg, s.c. 投与によりNA-Mockマウスではドパミン遊離量が顕著に上昇したが、NA-Shatiマウスでは、その上昇がほとんど観察されず、NA-Mockマウスと比較して有意な減少を示した (NA-Shati Group \times Time, $F_{(11,66)} = 9.423$, $P < 0.0001$: repeated ANOVA) (Fig. 9B)。

また、NA-Shatiマウスにおいて、MAP投与の30分前にmGlu3アンタゴニストであるLY341495 (0.1 mg/kg, i.p.) を前投与すると、上述の有意な減少が阻害された (Fig. 10)。

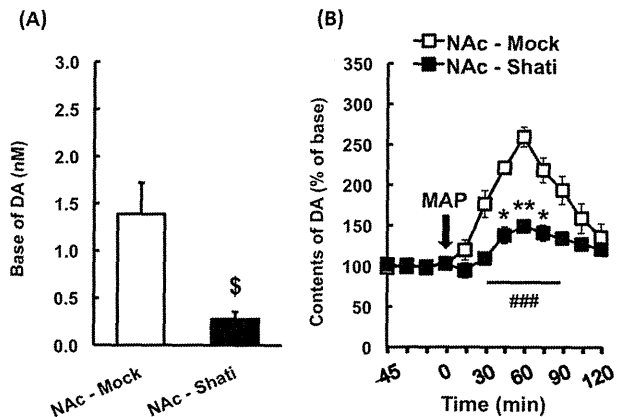


Fig. 9. DA release in the NAc of NAc-Shati mice. (A) Base levels of DA in the NAc. * $P < 0.05$ vs. NAc-Mock. (B) MAP-induced DA elevation in the NAc. $N=4$ for NAc-Mock; $N=4$ for NAc-Shati. Each column represents the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. base of NAc-Shati in the same group (Student- t test). ### $P < 0.001$ vs. Meth-treated NAc-Mock group (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

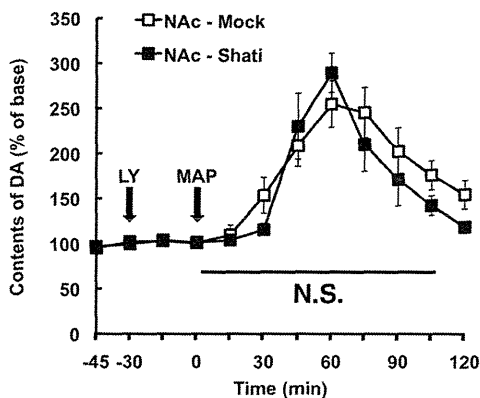


Fig. 10. Effect of LY341495 on the DA release in the NAc of NAc-Shati mice. Pretreatment with LY341495 (0.1 mg/kg, *i.p.*, 30 min prior to MAP treatment) canceled the effect of Shati overexpression. N=4. Each column represents the mean \pm S.E.M. N.S.: no significance (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

6. AAV を注入していないマウスにおけるドパミン基礎遊離量への NAAG の作用

次に、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて、mGluR3 アゴニストである NAAG のドパミン遊離量に対する影響を検討した。NAAG 分解酵素 glutamate carboxypeptidase II (GCPII) の阻害剤 2-(phosphonomethyl) pentanedioic acid (2-PMPA: 30 mg/kg, *i.p.*) を野生型マウスに処置すると NA におけるドパミン基礎遊離量は有意に減少した (Fig. 11A)。さらに、透析用リンゲル液を介して、NAAG (0.1 mg/ml) を 15 分間、環流したところ、野生型マウスの NA におけるドパミン基礎遊離量は有意に減少した (Fig. 11B)。

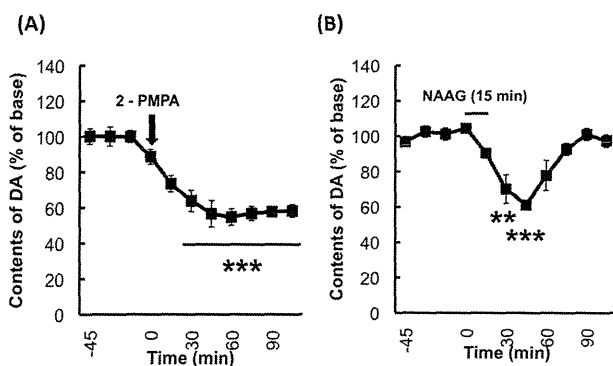


Fig. 11. Effect of NAAG on the DA release in the NAc of wild-type mice. (A) Effect of 2-PMPA (30 mg/kg, *i.p.*) on the extracellular DA levels in the NAc of wild-type mice. *** $P < 0.001$ vs. the base level of DA. (B) Effect of NAAG perfusion (0.1 mg/ml, 15 min) on the extracellular DA levels in the NAc of wild-type mice. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the basal level of DA. N=3. Each column represents the mean \pm S.E.M. (ANOVA with repeated measures followed by the Bonferroni's post-hoc test).

7. 野生型、NA-Shati および dS-Shati マウスにおける NAAG synthase (NAAGS)、GCPII 発現量

NA-Shati および dS-Shati マウスにおける MAP 反応性の差異メカニズムを検討するために、NAAG 合成酵素 NAAGS および分解酵素 GCPII のタンパク質レベルでの発現を Western Blot 法で測定した。

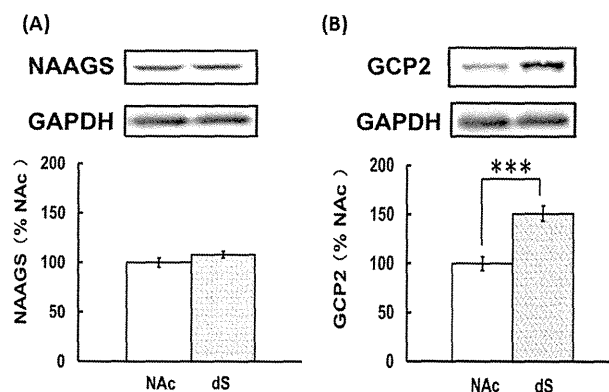


Fig. 12. The expression levels of NAAGS (A) and GCP2 (B) in the NAc or dS of wild-type mice. Each values were normalized by GAPDH. N=6-8. Each column represents the mean \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ vs. the value of the NAc (Student-t test).

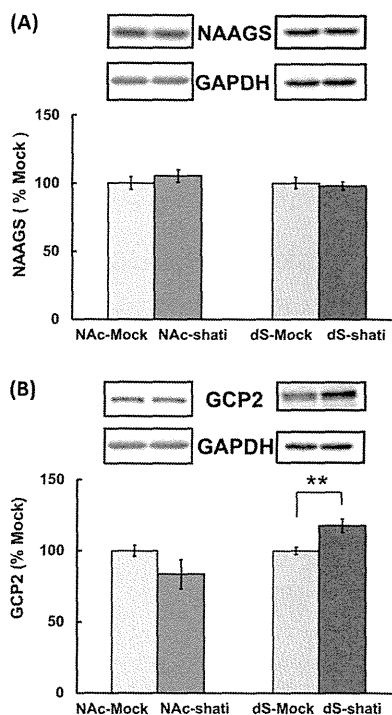


Fig. 13. The expression levels of NAAGS (A) and GCP2 (B) in the NAc and dS of NAc- and dS-Shati mice, respectively. Each values were normalized by GAPDH. N=6. Each column represents the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs. the value of the each NAc- and dS-Mock mice (Student-t test).

まず、野生型マウスでの NA と dS における NAAGS および GCPII の発現レベルを比較した。その結果、NAAGS 発現量は、NA と dS の間に変化は観察されなかったが (Fig. 12A)、GCPII 発現量は、NA と比較して dS では有意な増加が観察された (Fig. 12B)。NA-Shati および dS-Shati マウスと各々のコントロール群との比較では、NAAGS 発現量は共に変化が認められなかった (Fig. 13A)。一方、GCPII 発現量においては、NA-Mock と NA-Shati マウスとの間に差はなく、dS-Shati マウスは dS-Mock マウスと比較して、有意に増加していた (Fig. 13B)。

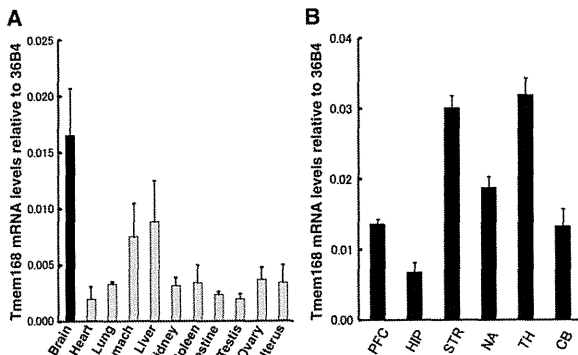


Fig. 14 *Tmem168* mRNA expression in the various organs (A) and brain regions (B) of mice. *Tmem168* mRNA levels were measured by RT-PCR and were presented as relative to 36B4. PFC: prefrontal cortex, HIP: Hippocampus, STR: striatum, NA: nucleus accumbens, TH: thalamus, CB: cerebellum.

8. 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. 14A)。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. 14B)。

9. 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. 15)。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. 15)。

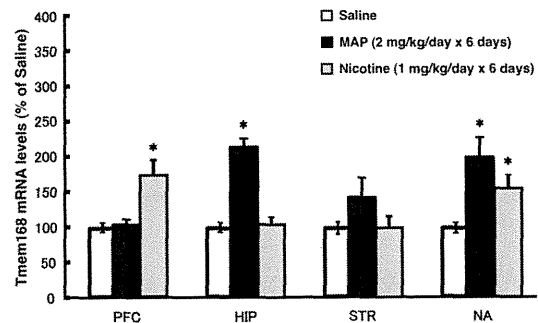


Fig. 15 *Tmem168* mRNA expression in the brain regions of mice after repeated MAP or Nicotine treatment.

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

本研究において、NA-Shati マウスは、自発的運動量、学習記憶、不安様行動および抑うつ様行動に変化はなく、社会性行動の減少を示した。これまでに、新規遺伝子 *shati/nat8l* については、その生理機能を検討するために、培養細胞を用いた *shati/nat8l* 遺伝子導入による機能解析を行い、*shati/nat8l* がドパミン・トランスポーターの再取り込み機能に影響を与えることを報告している¹¹⁾。以上のことから、NA における *shati/nat8l* は、社会性行動に関連する中枢神経機能、特にドパミン神経機能の調節において重要な役割を果たしていることが示唆される。また、社会性行動の異常を示す自閉症患者では、NA を含む尾状核-被殻においてドパミン神経機能に異常があることが報告されていることから⁹⁾、自閉症の発症原因に *shati/nat8l* が関与している可能性も示唆される。

覚せい剤 MAP への反応性における検討では、NA-Shati マウスは、MAP 誘発運動過多の減少および 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、MAP への反応性において、いずれも変化を示さなかった。これらの行動実験結果を支持する結果として、NA-Shati マウスの NA における MAP 誘発ドパミン遊離量の減少を得た。以上のことから、NA における shati/nat8l は、MAP の薬理的な作用に対して抑制的に働くことが明らかとなり、覚せい剤による薬物依存形成メカニズムにおいて、NA の shati/nat8l が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、上述の NA-Shati マウスにおける減少は、mGluR3 アンタゴニスト LY341495 の前処置によって阻害されるとともに、野生型マウスへの mGluR3 アゴニスト NAAG および NAAG 分解酵素 GCPII 阻害剤 2-PMPA 処置により、NA でのドパミン基礎遊離量が減少した。さらに、NA-Shati マウスにおける NA での NAA および NAAG 含量の増加も観察された。したがって、NA-Shati マウスの NA では、shati/nat8l の過剰発現によって、その合成産物である NAA さらには NAAG が増加していると考えられる。これに伴って、細胞外 NAAG 量も増加し、Gi タンパク質共役型 mGluR3 を活性化させて、ドパミン遊離を抑制している (Fig. 16)^{1, 2, 8, 10}。

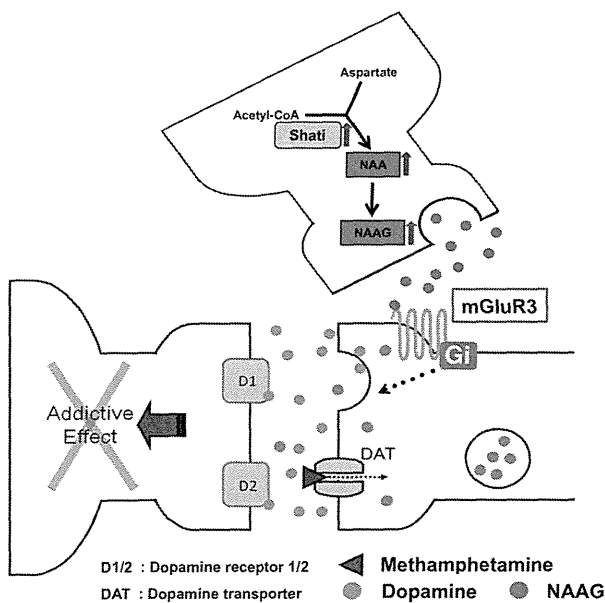


Fig. 16. Inhibitory mechanism of shati/nat8l on MAP-induced DA release.

このことは、NA-Shati マウスにおける NA でのドパミン基礎遊離量が減少していたことによって裏付けられる。つまり、NA-Shati マウスへの MAP 投与時には、見かけ上、MAP のドパミン・トランスポーター逆回転によるドパミン遊離増強作用が阻害されることとなり、NA-Shati マウスにおける行動学的 MAP 反応性が低下することが示唆された。以上のことから、NA における shati/nat8l 関連システムは、覚せい剤による薬物依存形成メカニズムにおいて重要な働きをしているとともに、薬物依存治療薬開発の新たな標的となることが示唆された。

一方、dS-Shati マウスの dS では、NAA および NAAG 含量の低下が観察された。その理由として元々、野生型マウスにおいて dS での NAAG 分解酵素 GCPII の発現量が NA と比べて多いうえに、shati/nat8l の過剰発現によって、更に GCPII 発現量が増加したために、shati/nat8l 関連システムに障害が起きたのではないかと考えられる (Fig. 17)。つまり、永続的な shati/nat8l 過剰発現によって、過度のホメオスタシスバランスが働き、NAA および NAAG 合成機能よりも、その NAAG 分解機能の方が上回るようになってしまったのかもしれない。この差異メカニズムについては、shati/nat8l の過剰発現初期では、NAA および NAAG 合成機能の方が、NAAG 分解機能を上回っている可能性もあり、外因性 shati/nat8l 発現増加プロセスにおける経時的な検討が必要である。

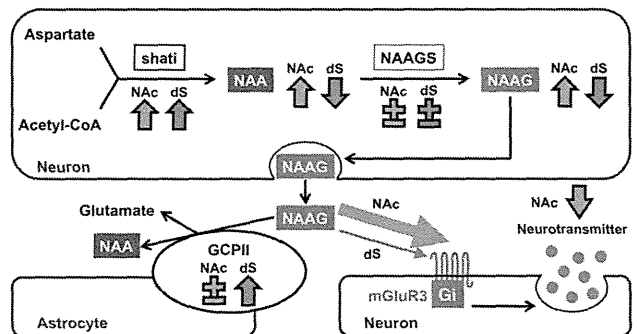


Fig. 17. Differential effect of shati/nat8l overexpression between the NAc and dS.

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¹³⁾ 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¹⁶⁾ 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せい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、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、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、覚せい剤の薬物依存形成メカニズムにおいては、黒質-線条体系ではなく、中脳-辺縁系ドパミン・システムに働く NAA 合成酵素 shati/nat8l に始まる関連システムが重要な役割を果た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、我々が見出した shati/nat8l および Tmem168 の発現を調節する化合物を見出し、治療薬の創生につながることを期待している。

[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) 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.
- 4) 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.
- 5) Gerfen, C.R.: The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 285-320, 1992.
- 6) 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.
- 7) Krzysosiak, 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.
- 8) Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., et al.: N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, 81: 89-131, 2007.
- 9) Nakamura, K., Sekine, Y., Ouchi, Y., et al.: Brain serotonin and dopamine transporter bindings in

adults with high-functioning autism. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 67: 59-68, 2010.

- 10) Neale, J.H., Olszewsk, R.T., Zuo, D., et al.: Advances in understanding the peptide neurotransmitter NAAG and appearance of a new member of the NAAG neuropeptide family. *J. Neurochem.*, 118: 490-498, 2011.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Reynolds, L.M., Cochran, S.M., Morris, B.J., et al.: Chronic phencyclidine administration induces schizophrenia-like changes in N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in rat brain. *Schizophr. Res.*, 73:147-152, 2005.
- 15) Takanashi, J., Saito, S., Aoki, I., et al.: Increased N-acetylaspartate in model mouse of pelizaeus-merzbacher disease. *J. Magn. Reason. Imaging*, 35: 418-425, 2012.
- 16) 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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ibi, D., Nagai, T., Koike, H., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Nitta, A., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Sawa, A., and Yamada, K.: Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav. Brain Res.*, 206: 32-37, 2010.
- 2) Ibi, D., Nitta, A., Ishige, K., Cen, X., Ohtakara, T., Nabeshima, T., and Ito, Y.: Piccolo knockdown-induced impairments of spatial learning and long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurochem. Int.*, 56: 77-83, 2010.
- 3) Ohki, M., Ohki, Y., Ishihara, M., Nishida, C., Tashiro, Y., Akiyama, H., Komiyama, H., Lund, L.R., Nitta, A., Yamada, K., Zhu, Z., Ogawa, H., Yagita, H., Okumura, K., Nakauchi, H., Werb, Z., Heissig, B., and Hattori, K.: Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*, 115: 4302-4312, 2010.
- 4) Katsuno, M., Adachi, H., Minamiyama, M., Waza, M., Doi, H., Kondo, N., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yamada, K., Banno, H., Suzuki, K., Tanaka, F., and Sobue, G.: Disrupted TGF-beta signaling in spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurosci.*, 30: 5702-5712, 2010.
- 5) Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Manickam, P., Pattabiraman, N., Arun, P., Nitta, A., Nabeshima, T., Madhavarao, C.N., and Namboodiri, A.M.: 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.
- 6) Alkam, T., Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., Niwa, M., Mizoguchi, H., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Oral supplementation with Leu-Ile, a hydrophobic dipeptide, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of extracellular signal-regulated kinase. *Behav. Brain Res.*, 210: 184-190, 2010.
 - 7) Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., Yoneyama, M., Ogita, K., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Nagai, T., and Yamada, K.: Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.*, 114: 1840-1851, 2010.
 - 8) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Furukawa, S., Nabeshima, T., and Yamada, K.: Over expression of Piccolo C2A domain induces depression-like behavior in mice. *NeuroReport*, 21: 1177-1181, 2010.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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- β in mice. *Behav Brain Res.* 225, 222-229, 2011.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.*, 221: 427-436, 2012.
 - 15) Furukawa-Hibi, Y., Nitta, A., Fukumitsu, H., Somiya, H., Toriumi, K., Furukawa, S., Nabeshima, T., and Yamada, K.: Absence of SHATI/Nat81 reduces social interaction in mice. *Neurosci Lett.*, 526: 79-84, 2012.
 - 16) Alkam, T., Kim, H.C., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., and Nabeshima, T. : Evaluation of emotional behaviors in young offspring of C57BL/6J mice after gestational and/or perinatal exposure to nicotine in six different time-windows. *Behav. Brain Res.*, 239: 80-89, 2013.
 - 17) Yan, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A., Muramatsu,

S., Ozawa, Y., Yamada, K., and Nabeshima, T.: Intrastratial gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int. J. Neuropharmacol.* in press 2013.

- 18) 新田淳美、日比陽子、宮本嘉明、鍋島俊隆：薬物依存におけるピッコロの役割。日本アルコール・薬物医学会雑誌。45: 525-529, 2010.
- 19) 入江徹美, 新田淳美, 赤池昭紀：国立大学法人における模擬患者養成及び問題立脚型チュートリアル学習の現状。薬学雑誌, 132; 337-363, 2012.

2. 学会発表

- 1) Nitta, A., Alkam, R., Furukawa-Hibi, Y., Niwa, M., Mizoguchi, H., Yamada, K., and Nabeshima, T.: A dipeptide, Leu-Ile, prevents the impairment of memory induced by amyloid beta in mice via restraining the hyperphosphorylation of ERK in the hippocampus. XXVII CINP congress, Hong Cong, China, 2010, 6, 6-10.
- 2) Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., Yamada, K., and Nabeshima, T.: The hydrophobic dipeptide Leu-Ile inhibits immobility induced by repeated forced swimming via the induction of BDNF. 70th FIP (International Pharmaceutical Federation) World Congress of Pharmacy/Pharmaceutical Sciences, Lisboa, Portugal, 2010, 8, 2-9, 2.
- 3) Nitta, A., Niwa, M., and Nabashima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of TNF- α in PC12 cells. 13th International TNF Conference, 2011, 5, 15-18, Awaji.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 9) 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. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 10) Nitta, A., Furukawa-Hibi, Y., and Nabeshima, T.: Over Expression of Piccolo C2A Domain

- Induces Depression-Like Behavior in Mice. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
- 11) Miyamoto, Y., Muramatsu, S., and Nitta, A.: Knockdown of dopamine D2 receptor in the nucleus accumbens attenuates methamphetamine-induced behavioral responses in mice. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
 - 12) 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. 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, 2011, 9, 23-24, Seoul.
 - 13) Nitta, A., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Furukawa-Hibi, Y., Uno, K., Miyamoto, Y.: Overexpression of shati in the nucleus accumbens affects the abnormal behavior induced by methamphetamine in mice. The 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, 2012, 6, 3-7, Stockholm.
 - 14) Nitta, A., Muramatsu, S., Miyamoto, Y.: Lower sensitivity to methamphetamine in accumbal dopamine D2 receptor knockdown mice by using AAV vector. The college of Problems of Drug Dependence, 2012, 6, 9-14, Palm Springs, CA.
 - 15) Takaoka, K., Uno, K., Inagaki, R., Nagakura, M., Tamaji, A., Ozaki, N., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Involvement of Shati on depression-like behavior in the postpartum period in human and mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10,2, Kobe.
 - 16) Sumi, K., Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Muramatsu, S., Hibi, Y., Nabeshima, T., Uno, K., Nitta, A.: The differences of the action of shati between the nucleus accumbens and dorsal striatum on the methamphetamine-induced addictive behaviors in mice. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2012, 9, 29-10, 2, Kobe.
 - 17) Nitta A.: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in the nucleus accumbens and dorsal striatum in mice. The 3rd International Symposium on Life Science in Toyama — Joint Symposium of ” Physiological roles of novel molecules, related to the psychological and neuronal diseases, and trials for the clinical use” and “Toyama Support Center for Young Principal Investigators in Advanced Life Sciences The special program adopting Tenure-track system” — 2013. 3. 14. Toyama.
 - 18) 新田淳美：「神経栄養因子と創薬」（招待講演）．平成 21 年度生命融合科学教育部シンポジウム 富山発医療・創薬イノベーションにむけて，富山，2010，3，8.
 - 19) 尹在錫、永井拓、日比（古川）陽子、小池宏幸、新田淳美、黒田啓介、貝淵弘三、山田清文：LiCl による neuro 2 a cell 神経分化に対する Npas4 の作用．第 83 回日本薬理学会年会，大阪，2010，3，16-18.
 - 20) 日比（古川）陽子、新田淳美、鍋島俊隆、山田清文：新規蛋白質 Shati をノックアウトしたマウスの行動解析．第 83 回日本薬理学会