

- 5) Krzyzosiak, A., Szyszka-Niagolov, M., Wietrzych, M., et al.: Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron*, 66: 908-920, 2010.
- 6) Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., et al.: Overexpression of Shati/Nat8l, an *N*-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in press 2014.
- 7) Miyamoto, Y., Yamada, K., Nagai, T., et al.: Behavioural adaptations to addictive drugs in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *Eur. J. Neurosci.*, 19: 151-158, 2004.
- 8) Muramatsu, S., Fujimoto, K., Kato, S., et al.: A phase 1 study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.*, 18: 1731-1735, 2010.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., et al.: Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog. Neurobiol.*, 75: 406-433, 2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yan, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A., Muramatsu, S., Ozawa, K., Yamada, K., Nabeshima, T.: Intrastratial gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16: 1559-1567, 2013.
- 2) Tanabe, K., Ohkubo, J., Ikezaki, T., Kitayama, S., Tsuneda, Y., Nitta, A., Imamura, L., To, H., Shimada, M., Murakami, N., Kitazawa, H.: Effect of sodium bisulphate on the stability of octreotide acetate: compatibility study with dexamethasone injection. *Palliative Care Research*, 8: 177-183, 2013.
- 3) Isono, T., Yamashita, N., Obara, M., Araki, T., Nakamura, F., Kamiya, Y., Alkam, T., Nitta, A., Nabeshima, T., Mikoshiba, K., Ohshima, T., Goshima, Y.: Amyloid-b25-35 induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci. Res.*, 77: 180-185, 2013.
- 4) Toriumi, K., Ikami, M., Kondo, M., Mouri, A., Koseki, T., Ibi, D., Furukawa-Hibi, Y., Nagai, T., Mamiya, T., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T.: SHATI/NAT8L regulates neurite outgrowth via microtubule stabilization. *J. Neurosci. Res.*, 91: 1525-1532, 2013.

- 5) Pessentheiner, A.R., Pelzmann, H.J., Walenta, E., Schweiger, M., Groschner, L.N., Graier, W.F., Kolb, D., Uno, K., Miyazaki, T., Nitta, A., Rieder, D., Prokesch, A., Bogner-Strauss, J.G.: NAT8L (*N*-Acetyltransferase 8-Like) accelerates lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 288: 36040-36051, 2013.
- 6) Seo, S., Takayama, K., Uno, K., Ohi, K., Hashimoto, R., Nishizawa, D., Ikeda, K., Ozaki, N., Nabeshima, T., Miyamoto, Y., Nitta, A.: Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCLO gene. *PLoS One*. 8: e76960, 2013.
- 7) Toriumi, K., Kondo, M., Nagai, T., Hashimoto, R., Ohi, K., Song, Z., Tanaka, J., Mouri, A., Koseki, T., Yamamori, H., Furukawa-Hibi, Y., Mamiya, T., Fukushima, T., Takeda, M., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T.: Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 17:1-11, 2013.
- 8) Tanabe, K., Ikezaki, T., Takano, A., Suzuki, T., Kitazawa, H., Terasaki, T., Tanaka, M., Takeuchi, M., Yamatani, K., Ohkubo, J., Handa, A., Nitta, A., Kashii, T., Murakami, N.: A case report of organophosphorus pesticide poisoning resulted in delayed severe lower intestinal hemorrhage. *Science Postprint*, 1: e00011, 2013.
- 9) Miyamoto, Y., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Sumi, K., Fu, K., Sato, K., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K., Nitta, A.: Overexpression of Shati/Nat8l, an N-acetyltransferase, in the nucleus accumbens attenuates the response to methamphetamine via activation of group II mGluRs in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, in press 2014.
- 10) Tanabe, K., Takahata, H., Takata, K., Ikezaki, T., Ohkubo, J., Takeuchi, M., Handa, A., Hirutani, K., Nitta, A., Kashii, T., Murakami, N., Kitazawa, H.: Causative agents and risk factors for nasal irritation symptoms observed during chemotherapy in breast cancer patients. *Science Postprint*, 1: e00017, 2014.
- 11) 宮本嘉明, 齋鹿絵里子, 堀悦郎, 家垣典幸, 石川雄大, 鷺見和之, 鍋島俊隆, 村松慎一, 西条寿夫, 宇野恭介, 新田淳美.: 薬物依存関連新規分子の生理機能解明について. *日本神経精神薬理学雑誌*, 33: 167-173, 2013.

2. 学会発表

- 1) Oshima, T., Nakayama, C., Kato, A., Atsumi, R., Nitta, A.: A study of pharmacist-patient communication: Development of a communication learning program for pharmacists. *World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2013; 73rd International Congress of FIP*. 2013, 8, 31-9, 5, Dublin, Ireland.
- 2) Nitta, A., Ishikawa, Y., Sumi, K., Iegaki, N., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K.,

- Miyamoto, Y.: The role of shati/nat8l in the addicted mice brain. World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2013; 73rd International Congress of FIP. 2013, 8, 31-9, 5, Dublin, Ireland.
- 3) Nitta, A.: The mechanisms of Shati/Nat8L-overexpression in the nucleus accumbens on the responses to methamphetamine. XXVIII CINP congress, 2013, 10, 1-3, Kuala Lumpur, Malaysia.
 - 4) Sumi, K., Uno, K., Iwamoto, R., Nabeshima, T., Furukawa-Hibi, Y., Miyamoto, Y., Nitta, A.: The relationship between Shati/Nat8l and NAA in various age stage in mice brain. Neuroscience 2013, 2013, 11, 9-13, San Diego, USA.
 - 5) Nitta, A., Sumi, K., Ishikawa, Y., Iegaki, N., Furukawa-Hibi, Y., Muramatsu, S., Nabeshima, T., Uno, K., Miyamoto, Y.: Different effects of shati/nat8l-overexpression on the responses to methamphetamine between in of the nuclus accumbens and dorsal striatum in mice. Neuroscience 2013, 2013, 11, 9-13, San Diego, USA.
 - 6) 鷺見和之, 宇野恭介, 岩本諒, 鍋島俊隆, 日比陽子, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス発達過程における神経特異的分子 shati/nat8l の発現変化. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 7) 宇野恭介, 高山佳奈子, 徐承姫, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: セロトニンおよびドパミントランスポーターを過剰発現させた PC12 および HEK293 細胞において、PCLO の SNP はモノアミン取り込みを制御する. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 8) 林慧洋, 宮本嘉明, 宇野恭介, 呉春福, 楊静玉, 新田淳美.: OcotilloI 型サポニン pseudoginsenoside-F11 はマウスにおけるメタンフェタミン誘発中毒を抑制する. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 9) 宮本嘉明, 家垣典幸, 鷺見和之, 石川雄大, 古田幸也, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス背側線条体における shati/nat8l 過剰発現は、セロトニン作動性神経系の機能障害を介して情動行動に影響を与える. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 10) 新田淳美, 石川雄大, 家垣典幸, 鷺見和之, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 宮本嘉明.: マウス側坐核または線条体へ shati/nat8l を過剰発現させた場合のメタンフェタミン応答性の差異とそのメカニズム. Neuro 2013, 2013. 6. 20-23, 京都.
 - 11) 高岡和也, 宇野恭介, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス線条体での Shati/Nat8l 過剰発現は妊娠期ストレスへの感受性および産褥期におけるうつ様行動を誘導する. 第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム・医療薬学フォーラム 2013, 2013, 7, 20-21, 金沢.
 - 12) 松村祥平, 高山華南子, 徐承姫, 宇野恭介, 酒井規雄, 池田和隆, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: PCLO の一塩基多型が双極性障害に関連する精神・神経機能に対する分子生物学的検討. 医療薬学フォーラム 2013, 2013, 7, 20-21, 金沢.
 - 13) 鷺見和之, 宇野恭介, 宮本嘉明, 岩本諒, 鍋島俊隆, 古川-日比陽子, 新田淳美.: マウス前頭前皮質における Shati/Nat8l の神経機能解析. 日本薬理学会北部会, 2013, 9, 13, 旭川.

- 14) 高岡和也, 宇野恭介, 鷺見和之, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核 Shati/Nat81 過剰発現はニコチンによる側坐核からのドーパミン遊離量の変化に影響する. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術集会, 2013, 10, 3-5, 岡山.
- 15) 新田淳美, 林慧洋, 傅柯荃, 宇野恭介, 吳春福, 楊静玉, 宮本嘉明.: Pseudoginsenoside-F11 は、マウスにおけるメタンフェタミンの行動変化を抑制する. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術集会, 2013, 10, 3-5, 岡山.
- 16) 宇野恭介, 徐承姫, 松村祥平, 大井一高, 橋本亮太, 西澤大輔, 池田和隆, 酒井規雄, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.:精神疾患に関連する PCLO SNP rs13438494 の分子生物学的検討. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013, 10, 24-26, 沖縄.
- 17) 稲垣良, 宮本嘉明, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宇野恭介, 新田淳美.: マウス前頭前皮質における piccolo ノックダウンは情動および認知機能に影響を与える. 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2013, 10, 24-26, 沖縄.
- 18) 松村祥平, 宇野恭介, 日比陽子, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: 培養マウス神経細胞における精神疾患関連遺伝子 Shati/Nat81 の細胞内機能についての研究. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会, 2013, 11, 17, 金沢.
- 19) 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.:ニコチンによって誘発される側坐核ドーパミン遊離量に対する Shati/Nat81 の影響. 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2013, 3, 18, 仙台.
- 20) 傅柯荃, 宮本嘉明, 齋鹿絵里子, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: Overexpression of TMEM168 in the nucleus accumbens of mice induces anxiety- and schizophrenia-like behavior. 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2013, 3, 18, 仙台.
- 21) 宇野恭介, 西澤大輔, 徐承姫, 高山佳奈子, 松村祥平, 酒井規雄, 大井一高, 鍋島俊隆, 橋本亮太, 尾崎紀夫, 池田和隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: Piccolo の SNP である rs13438494 は遺伝子関連解析において依存性関連疾患と関連がありドーパミンおよびセロトニンの取り込みを制御する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 22) 佐藤慶治, 宇野恭介, 笹谷晴枝, 宮本嘉明, 門田重利, 新田淳美.: マウスにおけるうつ様行動に対するサイシンの効果. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 23) 傅柯荃, 宮本嘉明, 齋鹿絵里子, 村松慎一, 宇野恭介, 新田淳美.: Anxiety and schizophrenia-like behaviors induced by TMEM168 overexpression in the nucleus accumbens of mice. 第 87 回日本薬理学会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.
- 24) 宮崎杜夫, 宇野恭介, 菊池佑, 日比陽子, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.:マウスにおける Shati/Nat81 転写開始点上流のメチル化の減少はメタンフェタミンの連続投与によって誘導される. 第 87 回日本薬

理会年会, 2013, 3, 19-21, 仙台.

- 25) 宇野恭介, 高岡和也, 村松慎一, 鍋島俊隆, 宮本嘉明, 新田淳美.: マウス側坐核での Shati/Nat8l の過剰発現はニコチン誘発性ドパミン遊離量を変化させる. 日本薬学会第 134 回年会, 2013, 3, 27-30, 熊本.

G. 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

- 1) 新田淳美.: 平成 25 年 3 月の 6 年制卒業生の就職状況と実務実習. 病薬会報 (富山県病院薬剤師会), 122: 50-51, 2013.
- 2) 新田淳美.: 安全で豊かな社会で健康を守り育てるための喫煙・飲酒・薬物乱用防止教育. 北陸三県学校保健研究協議会, 2013, 8, 1, 富山.
- 3) 新田淳美.: 医療薬学フォーラム 2013 (第 21 回 クリニカルファーマシーシンポジウム) に参加して. 富山県薬剤師会広報誌 富薬, 35: 290, 2013.
- 4) 新田淳美.: 6 年制学生に対する薬学部での教育内容および教員の意識の変化. 日病薬誌, 49: 2013.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究年度終了報告書

薬物依存の細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する検討

分担研究者 山田清文 名古屋大学医学部附属病院 教授

研究要旨

違法ドラッグがゲートウェイドラッグとなり、メタンフェタミン（METH）等の覚せい剤の乱用を経て薬物依存につながると考えられている。これまでに薬物依存に関わる多くのシグナル分子が報告されているが、薬物報酬効果に直接的に関わる分子基盤については未だ不明な点が多い。本分担研究課題では、薬物報酬効果のプロセスで中心的役割を果たしているドパミン受容体シグナルに着目し、その細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する基礎研究を推進する。本年度はドパミン受容体の下流で機能する PKA 経路に着目し、コカインの報酬効果が遺伝子導入により制御可能か否かを検討した。PKA 基質スクリーニングの結果、PKA 活性化薬およびドパミン D1 受容体作動薬によりリン酸化される蛋白質として Rasgrp2 および Rap1gap を同定した。コカインの投与またはドパミン D1 受容体発現細胞特異的に constitutively active PKA 触媒サブユニットを強制発現させたマウスの側坐核では、Rasgrp2 および Rap1gap のリン酸化レベルがコントロールマウスに比べて有意に亢進した。また、コカインによる条件付け場所嗜好性はドパミン D1 受容体発現細胞特異的に constitutively active PKA 触媒サブユニットを強制発現することにより有意に亢進した。一方、Rasgrp2 および Rap1gap が相互作用することが知られている活性化型 Rap1 のレベルはコカインを投与したマウスの側坐核で亢進した。コカインによる条件付け場所嗜好性は側坐核のドパミン D1 受容体発現細胞特異的に constitutively active Rap1 変異体（F28L 変異体）を導入することにより亢進し、ドパミン D1 受容体発現細胞特異的に Rap1 を欠損させることにより減少した。以上の結果から、ドパミン D1 受容体により制御される PKA および Rap1 シグナルが報酬シグナルとして必要であることが示された。本研究結果は、細胞特異的な PKA-Rap1 シグナルの制御によりコカインの報酬効果を修飾できる可能性を示唆している。

A. 研究目的

違法ドラッグがゲートウェイドラッグとなり、メタンフェタミンやコカイン等の乱用を経て薬物依存につながると考えられている。これまでに薬物依存に関わる多くのシグナル分子が報告されているが、薬物報酬効果に直接的に関わる分子基盤については未だ不明な点が多い。薬物報酬効果の細胞内シグナル分子の同定は、薬物依存症に対する治療薬の開発に貴重な情報を提供すると思われる。本分担研究課題では、薬物報酬効果のプロセスで中心的役割を果たしているドパミン受容体シグナルに着目し、平成 25 年度は細胞特異的な MEK1 活性の制御によりメタンフェタミンの報酬効果を修飾できる可能性を示唆した。平成 26 年度はドパミン受容体の下流で機能する PKA 経路に着目し、コカインの報酬効果が遺伝子導入により制御可能か否かを検討した。

B. 研究方法

PKA 基質スクリーニング

実験には 7 週齢の雄性 C57BL/6N マウスを使用した。PKA 活性化薬またはドパミン受容体作動薬を処置したマウス線条体スライスよりタンパク質抽出液を調製し、アフィニティーカラムでリン酸化蛋白質を濃縮した。蛋白質およびリン酸化部位は LC-MS/MS により同定した。

実験動物

実験には 7 週齢の雄性 C57BL/6N マウスを使用した。さらに、ドパミン D1 受容体プロモーターの下流で mVenus を発現する mDrd1- mVenus マウス（理研 BRC）および Rap1 コンディショナルノックアウトマウス（理研 BRC）を使用した。

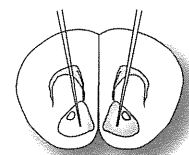
本実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部実験動物指針に準じて行った。

イムノブロット解析

7 週齢の雄性 C57BL/6 マウスにコカイン（10、

A

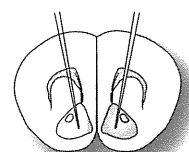
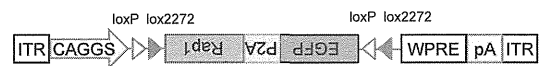
AAV-CAGGS::DIO-EGFP
AAV-CAGGS::DIO-EGFP-P2A-wtPKA
AAV-CAGGS::DIO-EGFP-P2A-caPKA



C57BL/6 mouse

B

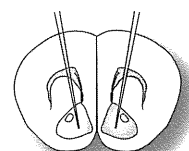
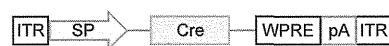
AAV-CAGGS::DIO-EGFP
AAV-CAGGS::DIO-EGFP-P2A-wtRap1
AAV-CAGGS::DIO-EGFP-P2A-caRap1



Drd1-Cre mouse

C

AAV-SP::Cre



Rap1^{flx/flx} mouse

図 1. 側坐核ドパミン D1 受容体発現細胞特異的遺伝子変異マウス作成の概略

A. PKA 遺伝子変異体過剰発現マウス. B. Rap1 変異体過剰発現マウス. C. Rap1 遺伝子欠損マウス.

30 mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、投与後 15 分後に側坐核を摘出した。各組織をホモジナイズし、熱処理および遠心分離した上清をサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離後、Rasgrp2 (S116/117, S554, S586)、Rap1gap (S548, S563) のリン酸化レベルを解析した。

組織化学的解析

mDrd1-mVenus マウスにコカイン (30 mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、投与後 15 分後に 4% paraformaldehyde で還流固定を行った。脳を摘出後、凍結切片を作成して抗 Rasgrp2 (S116/117) 抗体または抗 Rap1gap (S563) 抗体により免疫染色を行った。

Adeno-associated virus (AAV) を用いた遺伝子導入

Substance-P プロモーターの下流に Cre recombinase 遺伝子を挿入した AAV ベクター (AAV-SP::Cre) または CAGGS プロモーターの下流で Cre recombinase 依存的に PKA または Rap1 変異体を発現する AAV ベクター (AAV-CAGGS::DIO-EGFP-P2A-wtPKA, caPKA, wtRap1 または caRap1) を作製し、HEK293FT 細胞を用いてウイルス液を調製した。調製したウイルス液をマウス側坐核へ注入した (図 1)。

条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験

AAV ベクターを用いてマウス側坐核のドパミン D1 受容体発現細胞に EGFP, wtPKA および caPKA を発現させ、コカインの報酬効果を CPP 試験で解析した。具体的には、マウスの両側側坐核に AAV-SP::Cre および AAV-PKA 変異体を注入し、3 週間後に CPP 試験を行った。

CPP 試験にはギロチンドアで仕切られた白黒 2 区画からなる CPP 装置を用いた。CPP 試験は 5 日間行い、day1 はプレテスト、day2-4 は条件付け、day5 にポストテストを行った。プレテストおよびポストテストでは、ギロチンドアを開放して装置内を自由に探索させ、白黒 2 区画にそれぞれ滞在した時間を測定した。Day2-4 の 3 日間は、午前と午後の 1 日 2 回条件付けを行った。コカイン群では、午前は saline を投与し、白黒 2 区画のどちらか一方に一定時間閉じ込めた (溶媒区画)。午後はコカイン (10 mg/kg, i.p.) を投与し、溶媒区画とは反対側の区画に閉じ込めた (薬物区画)。コントロールマウスの場合、午前、午後ともに saline を投与する以外、コカイン群と同じ操作を行った。報酬効果の指標として、ポストテスト時における薬物区画での滞在時間を測定した。

統計解析

データは平均±標準誤差で示した。独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance,

ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Tukey の検定を用いた。2 群間の比較は Student t-test を用いて行った。危険率 5% 以下の場合、有意差ありと判定した。

C. 研究結果

PKA 基質スクリーニングの結果、PKA 活性化薬 forskolin およびドパミン D1 受容体作動薬 SKF81297 によりリン酸化される蛋白質として Rasgrp2 (S116/117, S554, S586)、Rap1gap (S548, S563) を同定した。Rasgrp2 および Rap1gap の脳内発現を免疫染色法により調べた結果、マウスの側坐核および線条体で Rasgrp2 および Rap1gap がともに高発現しており、前頭皮質を含む他の脳部位では Rasgrp2 および Rap1gap の発現が僅かに認められた。次に、コカインを腹腔内投与したマウスの側坐核において Rasgrp2 および Rap1gap がリン酸化されるかどうかをイムノブロット法により調べた。コカイン (10 mg/kg または 30 mg/kg) 投与 15 分後では、pS116/117 Rasgrp2, pS554 Rasgrp2、pS586 Rasgrp2、pS548 Rap1gap および pS563 Rap1gap のリン酸化レベルが生理食塩水を投与したコントロールマウスに比べて有意に亢進した。この時、コカイン 30 mg/kg を投与したマウスにおけるリン酸化レベルはコントロールマウスの 1.5 倍 (pS116/117 Rasgrp2、pS554 Rasgrp2、pS548 Rap1gap、pS563 Rap1gap) から 2.0 倍程度 (pS586 Rasgrp2) にまで亢進した。コカインがドパミン D1 受容体発現細胞で Rasgrp2 および Rap1gap のリン酸化を亢進するかどうかを調べるため、D1 受容体プロモーターの下流で mVenus を発現する mDrd1-mVenus トランスジェニックマウスにコカインを腹腔内投与して組織化学的解析を行った。コカインを投与したマウスの側坐核では抗 pS116/117 Rasgrp2 抗体および抗 pS563 Rap1gap 抗体の免疫活性が mVenus 陽性細胞で観察された。したがって、コカインはドパミン D1 受容体を発現する中型有棘細胞を刺激して Rasgrp2 および Rap1gap のリン酸化を促進すると考えられる。

次に、PKA を発現する AAV ベクターを側坐核に導入し、Rasgrp2 および Rap1gap のリン酸化が亢進するかどうかを評価した。その結果、AAV ベクターを用いてドパミン D1 受容体発現細胞特異的に constitutively active PKA 触媒サブユニットを発現させたマウスの側坐核では、pS554 Rasgrp2、pS586 Rasgrp2、pS548 Rap1gap および pS563 Rap1gap のリン酸化レベルがコントロールマウスの 1.5 倍まで亢進し、コカインによる条件付け場所嗜好性もコントロールマウスの 2 倍まで増加した。これらの結果か

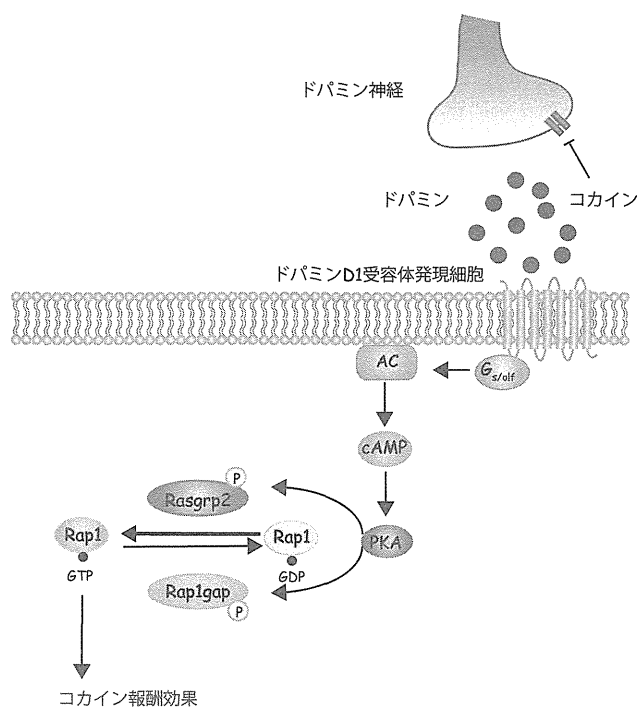


図 2. コカイン報酬効果における PKA-Rap1 シグナルの関与

らドパミン D1 受容体受容体発現細胞特異的な PKA の活性化は Rasgrp2 および Rap1gap のリン酸化を亢進し、コカインの報酬効果を増加させると考えられる。

Rasgrp2 および Rap1gap は Rap1 の低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性調節を担っていることが報告されていることから、活性化型 Rap1 の発現を pull-down assay により調べた。コカイン(10 および 30 mg/kg) を投与したマウスの側坐核では活性化型 Rap1 のレベルが生理食塩水を投与したコントロールマウスの 1.5 倍に亢進した。コカインによる条件付け場所嗜好性は側坐核のドパミン D1 受容体発現細胞特異的に constitutively active Rap1 変異体 (F28L 変異体) を導入することによりコントロールマウスの 2 倍まで亢進し、constitutively active Rap1 変異マウスに生理食塩水を投与しても嗜好性の変化は認められなかった。逆に、Rap1 コンディショナルノックアウトマウスを用いてドパミン D1 受容体発現細胞特異的に Rap1 を欠損させたマウスでは、コカインに対する場所嗜好性が認められなかった。以上の結果から、ドパミン D1 受容体により制御される PKA および Rap1 シグナルがコカインの報酬効果として必要であることが示された (図 2)。来年度は危険ドラッグの作用を検出するスクリーニング系の開発を検討する予定である。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada, S., Nagai, T., Nakai, T., Ibi, D., Nakajima, A., Yamada, K. Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. *Brain Behav. Immun.*, 38, 272-282, 2014.
- 2) Nakai, T., Nagai, T., Wang, R., Yamada, S., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Yamada, K. Alterations of GABAergic and dopaminergic systems in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene. *Neurochem. Int.*, 74, 74-83, 2014.
- 3) Nakajima, A., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, S., Nabeshima, T., Yamada, K. Induction of interferon-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 745, 166-175, 2014.
- 4) Nakai, T., Nagai, T., Tanaka, M., Itoh, N., Asai, N., Enomoto, A., Asai, M., Yamada, S., Saifullah, A.B., Sokabe, M., Takahashi, M., Yamada, K. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. *J. Neurosci.*, 34, 14995-15008, 2014.

- 5) Nakajima, A., Aoyama, Y., Shin, E.J. Nam, Y., Kim, H.C. Nagai, T., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Yokoi, T., Ohizumi, Y., Yamada, K. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). Behav. Brain Res. 289, 69-77, 2015.
- 6) Aoyama, Y., Toriumi, K., Mouri, A., Hattori, T., Ueda, E., Shimato, A., Sakakibara, N., Soh, Y., Mamiya, T., Nagai, T., Kim, H.-C., Hiramatsu, M., Nabeshima, T., Yamada, K. Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology, in press.

2. 学会発表

- 1) 永井拓. 脳内報酬系の分子基盤. 第 49 回日本アルコール・薬物医学会、第 36 回日本アルコール関連問題学会、第 26 回日本依存神経精神科学会合同学術総会. (横浜), (2014. 10. 3-4). (シンポジウム)
- 2) 永井拓. Intracellular signal transduction in the brain reward system. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2015.3.18-20). (シンポジウム)
- 3) Md. Ali B. Saifullah, 永井拓, 山田清文. Dopamine D1 receptor dependent activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the nucleus accumbens facilitates reward-associated learning and memory. 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋), (2015.3.18-20). (ポスター)

F. 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

違法ドラッグの依存における遺伝学的要因に関する研究

分担研究者：曾良一郎

研究協力者：岡崎賢志，大塚郁夫，毛利健太朗，朴秀賢，菱本明豊
(神戸大学大学院 医学研究科 精神医学分野)

[研究要旨]

近年、危険ドラッグ使用による健康被害が増加し、社会問題化している。しかし危険ドラッグの成分と臨床症状の関連は十分に明らかにされていない。危険ドラッグが臨床症状にどのように関与しているかを検討し、また臨床応用可能なバイオマーカーの探索を行った。この目的を達成するために、研究1として、危険ドラッグ乱用歴のある入院患者を対象に入院記録を後方視的に解析した。研究2として、危険ドラッグ乱用者と、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、オピオイド受容体1 (OPRM1)、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 (5-HTT) の既知の機能的遺伝子多型について関連解析を行った。研究3として、危険ドラッグ乱用者の血液および尿試料を用いて、モノアミンおよびその代謝産物をバイオマーカー候補として検討した。調査期間中において、入院に至った精神症状の特徴がアップー系、またはダウンナー系の単一症状であったものが、次第に混合系に変化していた。危険ドラッグに含まれる依存性薬物が複雑性を増し、向精神作用が強いものが求められ、市場に流れていることが示唆された。多剤乱用者と危険ドラッグのみ使用のものとの臨床症状に大きな差は認めないが、危険ドラッグのみ乱用者では就労者、大卒者の割合が多かった。危険ドラッグは単にゲートウェイドラッグとしての位置づけではなく、覚醒剤、大麻に続く第三のハードドラッグとして考える必要があるであろう。BDNF、OPRM1、NETでは有意差は認めなかったが、serotonin-transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) については有意差を認めた。5-HTTLPRが危険ドラッグ乱用と関連している可能性が示唆された。しかし症例数が少なく、今後も症例を集積してさらなる解析を行う必要がある。現在、健康被害の強い危険ドラッグの使用における治療が精神科から身体科救急に移ってきているとの指摘もある。救急科との連携を深め、早期に危険ドラッグによる精神症状、意識障害等の診断治療に役立てるための診断治療ガイドラインやバイオマーカーの確立が必要である。

A. 研究目的

近年、危険ドラッグ使用による健康被害が増加し、社会問題化している。危険ドラッグは合成カンナビノイド類、カチノン系薬物などの成分が報告されているが、臨床症状との関連は十分に明らかにされていない。危険ドラッグが臨床症状にどのように関与しているかを解明し、また臨床応用可能なバイオマーカーの探索が望まれている。

研究1として、危険ドラッグ乱用者の入院時における臨床症状を調査し検討した。研究2として、危険ドラッグ乱用者の血液からDNAを抽出し、脆弱性遺伝子の多型との関連解析を行った。研究3として危険ドラッグ乱用者の血液および尿検体から、モノアミンおよびその代謝産物などバイオマーカー候補と、臨床症状との関連を検討した。

B. 研究方法

研究1. 臨床症状調査

神戸大学医学部附属病院および関連精神科病院において臨床症状の調査を行った。対象は、危険ドラッグ乱用歴のある入院患者で、平成24年1月～平成26年12月に退院したものとした。入院記録を後方視的に解析し、危険ドラッグのみ乱用者(n=20)と多剤物質乱用者(n=38)について、患者背景および臨床症状を比較検討した。

研究2. 遺伝子多型解析

危険ドラッグ乱用歴のある入院患者より同意を得て、血液試料を採取、DNAを抽出し、TaqMan法もしくはPolymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)法により解析した。項目はこれまでに機能的多型が報告されているものとし、脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子のSNPであるrs6265:Val66Met, オピオイド受容体1(ORPM1)遺伝子のSNPであるrs1799971:Asn40Asp, ノルエピネフリントランスポーター(NET)遺伝子の一塩基多型(SNP)であるrs2242446:T-182C, セロトニントランスポーター遺伝子のserotonin-transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR)を選定した。

研究3. モノアミンおよび代謝産物の解析

危険ドラッグ乱用歴のある入院患者より同意を得て、入院期間中1ヶ月おきに血液および尿試料を採取し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によりモノアミンとその代謝産物を測定した。項目は、血液試料ではアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニン、3-methoxy-4-hydroxyphenyl-ethylene glycol (MPHG), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), 尿試料ではアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、HVA, 5-HIAAとした。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学大学院医学研究科遺伝子解析研究倫理委員会および神戸大学大学院医学研究科医学倫理委員会の承認を受けている。血液サンプル提供に関する同意は、文書による十分な説明の上、提供者の同意が得られている。プライバシーの擁護に最大限の注意を払い、全ての試料は匿名化され研究成果についても個人情報情報を公開しない。患者個人に関する身体的、精神的不利益はない。個人情報情報を厳重に管理するという条件下で、患者個人および家族・血縁者その他関係者への精神的、社会的不利益も生じない。

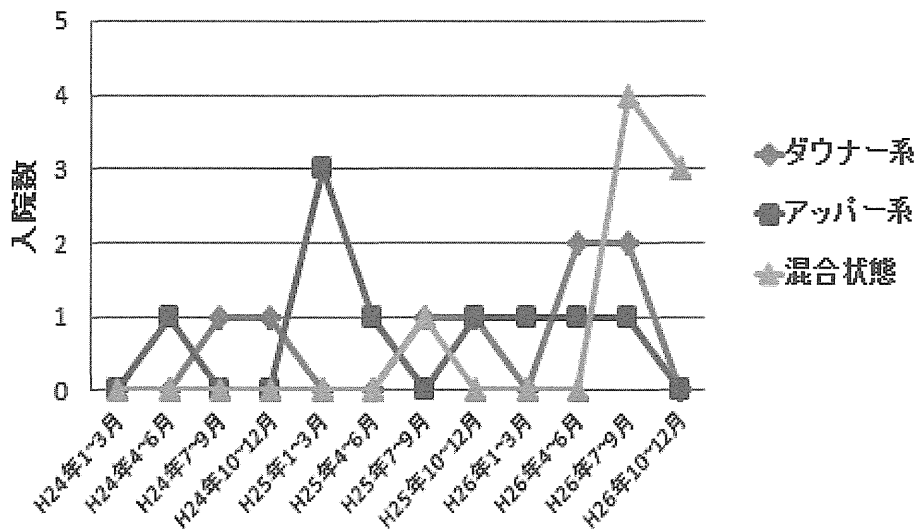
C. 研究結果

研究1: 臨床症状調査

危険ドラッグ乱用が原因と推定される状態像および症状は、いわゆるダウン系とアップ系、

およびそれらの混合状態に三分されることが確認された。調査対象の3年間に於いて、継時的に混合状態を呈して入院するケースの増加傾向が認められた。危険ドラッグのみ使用した群と他剤物質使用群において性別、年齢、危険ドラッグ使用開始年齢、使用期間、入院期間に差は認められなかった。危険ドラッグのみ乱用者群において就労者・大卒者の割合が比較的高かった。

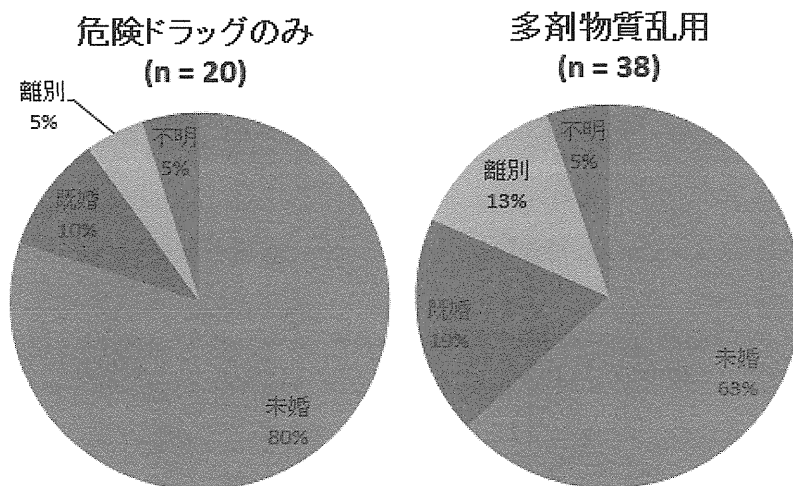
危険ドラッグのみ乱用者の状態像の経年変化



主な状態像により、三分

- ダウンナー系: 離脱時の不安焦燥状態、意識変容、意識障害、記憶障害が主体
- アッパー系: 幻覚妄想、精神運動興奮、躁状態が主体
- 混合状態: 意識障害と幻覚妄想を合併するなど、両者の症状が混然とした状態

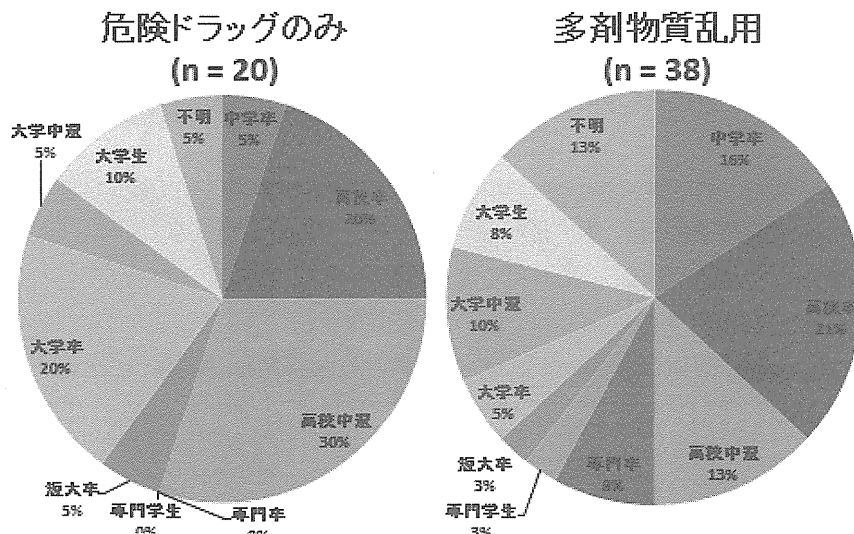
結婚歴



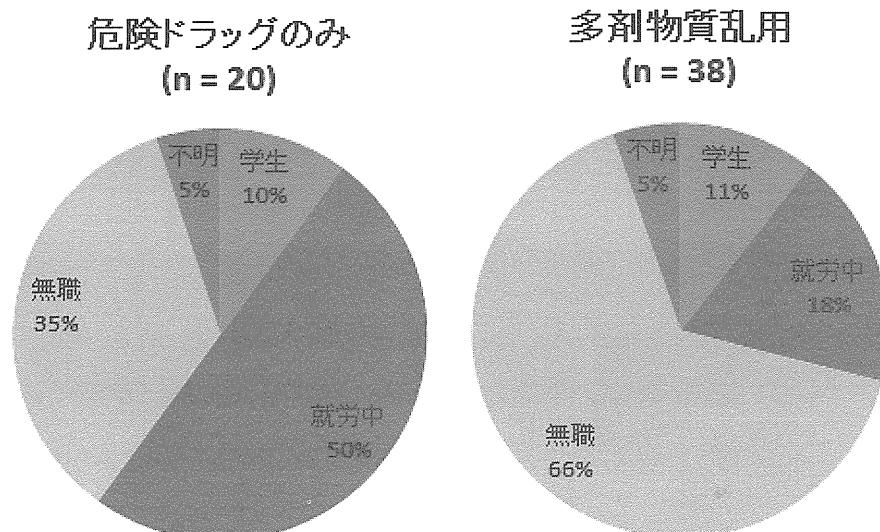
	危険ドラッグのみ (n = 20)	多剤物質乱用 (n = 38)	P値
使用開始年齢(歳)	25.4 ± 8.4	28.4 ± 8.6	0.23
使用期間(年)	2.3 ± 1.7	2.2 ± 1.6	0.80
使用頻度	毎日:6 隔日:2 週1回:1 3ヶ月に1回:1 不明:10	毎日:10 週1回:2 6ヶ月ぶり:1 不明:25	

	危険ドラッグのみ (n = のべ25)	多剤物質乱用 (n = のべ49)	P値
入院期間(日)	42.9 ± 32.0	47.6 ± 35.7	0.59

学歴



職歴



研究 2：遺伝子多型解析

今年度に同意を得られた患者 (n=4) について解析を行った。健常対照群は、HAPMAP (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36) および先行研究の日本人データより引用した (Matsushita et al. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004)。臨床症状と関連分子の遺伝子多型との関連解析は、BDNF、OPRM1、NET では有意差は認めなかったが、5-HTTLPR については有意差を認めた。5-HTTLPR が危険ドラッグ乱用と関連している可能性が示唆された。

しかし症例数は n=4 と少なく、今後も症例を集積してさらなる解析を行う必要がある。

多型解析の結果

Gene	Polymorphism	Phenotype	Genotype distribution			MAF	P value	
			M/M	M/m	m/m		Genotype	Allele
BDNF	rs6265	Case	1	3	0	0.375	0.956	0.955
	G/A; Val66Met	Control	45	49	19	0.385		
ORPM1	rs1799971	Case	3	1	0	0.125	0.061	0.055
	A118G; Asn>Asp	Control	33	54	26	0.469		
NET	rs2242446	Case	3	1	0	0.125	0.160	0.149
	T-182C	Control	45	50	17	0.375		
5-HTT	5-HTTLPR	Case	0	3	1	0.625	0.022	0.019
	S>L	Control	163	105	22	0.257		

研究 3：モノアミンおよび代謝産物の解析

今年度に同意を得られた患者 (n=4) について解析を行った。臨床症状とモノアミンおよびその代謝産物との関連は、統計的に有意な結果は得られなかった。今後、症例数を増やして検討する予定である。

D. 考察

3年の調査期間中において入院に至った精神症状の特徴がアップー系、またはダウンナー系の単一症状であったものが、平成26年4月以降、混合系に変化していることは、精神作用が強いものが求められ、市場に流れている可能性が考えられる。多剤乱用者と危険ドラッグのみ使用のものとの臨床症状に大きな差は認めないが、危険ドラッグのみ乱用者では就労者、大卒者の割合が多かったという結果から、危険ドラッグは単にゲートウェイドラッグとしての位置づけではなく、覚醒剤、大麻に続く第三のハードドラッグとして考える必要がある。

現在、神経毒性の強い危険ドラッグ使用における急性期の治療が精神科から身体科救急に移ってきているとの指摘もあり、救急科との連携を深め、早期に危険ドラッグによる精神症状、意識障害等の診断治療に役立てるための診断治療ガイドラインやバイオマーカーの確立が必要である。

E. 結論

危険ドラッグは合成カンナビノイド類、カチノン系薬物などの成分が報告されているが、臨床症状との関連は十分に明らかにされていない。危険ドラッグが臨床症状にどのように関与しているかを解明し、また臨床応用可能なバイオマーカーの探索が望まれている。今後、危険ドラッグ乱用・依存への罹患リスク、情動障害や生体の機能障害に関連した遺伝子背景、危険ドラッグがもたらす生体機能への影響とそのメカニズムを詳細に研究し、得られた知見を臨床応用につなげることで、危険ドラッグ乱用への対応に結び付くと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Aoki Y, Nishi A, Saita N, Koukita Y, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Higuchi S, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won M, Naruse N, Uehara K, Itokawa M, Koga M, Arinami T, Kaneko Y, Hayashida M, Ikeda K. Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Molecular Psychiatry* 19(1):55-62 (2014)
2. Hall FS, Itokawa K, Schmitt A, Moessner R, Sora I, Lesch KP, Uhl GR. Decreased vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) function in knockout mice affects aging of dopaminergic systems. *Neuropharmacology* 76 PartA:146-155 (2014)
3. Sakakibara Y, Kasahara Y, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I. Developmental alterations in anxiety and cognitive behavior in serotonin transporter mutant mice. *Psychopharmacology* 231(21):4119-4133 (2014)
4. Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kasahara Y, Ikeda K, Hall FS, Uhl GR, Watanabe M, Kawashima R, Sora I. Specific regions display altered grey matter volume in μ -opioid receptor knockout mice: MRI voxel-based morphometry. *Br J Pharmacol* 172(2):654-667 (2015)
5. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, Tomita H. Therapeutic Concentration of Lithium Stimulates Complement C3 Production in Dendritic Cells and Microglia via GSK-3 Inhibition. *Glia* 63(2):257-270 (2015)
6. Igari M, Shen H, Hagino Y, Fukushima S, Kasahara Y, Lesch K, Murphy D, George R Uhl, Ikeda K, Yaegashi N, Sora I. Attenuated methamphetamine-induced locomotor sensitization in serotonin transporter knockout mice is restored by serotonin 1B receptor antagonist treatment. *Behav Pharmacol* 26(1-2):167-179 (2015)
7. Moriya Y, Kasahara Y, Hall FS, Sakakibara Y, Uhl GR, Tomita H, Sora I. Sex differences in the effects of adolescent social deprivation on alcohol consumption in μ -opioid receptor knockout mice. *Psychopharmacology* 232(8):1471-82 (2015)

8. Uno K, Nishizawa D, Seo S, Takayama K, Matsumura S, Sakai N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Fukuda K, Higuchi S, Ujike H, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Yamada M, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A. The Piccolo Intronic Single Nucleotide Polymorphism rs13438494 Regulates Dopamine and Serotonin Uptake and Shows Associations with Dependence-like Behavior in Genomic Association Study. *Curr Mol Med in press*
9. Kasahara Y, Arime Y, F. Scott Hall, George R. Uhl, Sora I. Region-specific dendritic spine loss of pyramidal neurons in dopamine transporter knockout mice. *Curr Mol Med in press*
10. Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Yukie S, Kubo Y, Mizuguchi M, George R. Uhl, Sora I, Ikeda K. Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. *Curr Mol Med in press*
11. Piao Y, Hall FS, Moriya Y, Ohara A, Ito M, Kikura-Hanajiri R, Goda Y, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I. Methylone-induced hyperthermia and lethal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Behav Pharmacol in press*
12. Hall FS, Sora I, Hen R, Uhl GR. Serotonin/dopamine interactions in a hyperactive mouse: reduced serotonin receptor 1B activity reverses effects of dopamine transporter knockout. *PLoS One in press*

2. 学会発表

国際学会

1. Sora I. Genetic vulnerability of drug addiction. Plenary lecture, 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting, Yokohama[2014/10/2-6]
2. Moriya Y, Kasahara Y, Hall FS, Uhl GR, Tomita H, Sora I. Sex differences in the effects of adolescent social deprivation on alcohol consumption in μ -opioid receptor knockout mice. The Society for Neuroscience (SFN) 43th Annual Meeting. Washington DC, USA [2014/11/15-19]
3. Kubo Y, Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Takamatsu Y, Ikeda K, Uhl GR, Sora I, Tomita H. Differences in responsiveness between methamphetamine, nisoxetine and methylphenidate may reflect specific developmental characteristics in juvenile DAT KO mice. The Society for Neuroscience (SFN) 43th Annual Meeting. Washington DC, USA [2014/11/15-19]
4. Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Uhl GR, Tomita H, Sora I. Region-specific dendritic spine loss of pyramidal neurons in dopamine transporter knockout mice. The Society for Neuroscience (SFN) 43th Annual Meeting. Washington DC, USA [2014/11/15-19]

国内学会

1. 曾良一郎. 特別講演：危険ドラッグの精神毒性. 第10回播州精神医療研究会, 姫路[2014/8/28]
2. 曾良一郎. 報酬系と薬物依存. シンポジウム1『学習, 報酬, 依存と基底核』第29回日本大脳基底核研究会, 青森[2014/8/23-24]

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

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

違法ドラッグ等、薬物依存のトレンドを踏まえた

病態の解明と診断・治療法の開発に関する研究

分担 研究年度終了報告書

研究分担者 成瀬暢也 埼玉県立精神医療センター副病院長

研究要旨

本研究では、依存症専門医療機関において、薬物依存のトレンドを踏まえた病態である危険ドラッグ依存症及び処方薬（睡眠薬・抗不安薬）依存症の診断を適切に行い、有効で現実的な認知行動療法プログラムを開発して、その効果判定を行うことを目的とする。平成23年6月～平成26年11月までに、研究分担者が直接診察した新規薬物関連患者は357名であり、内訳は覚せい剤161名（45.1%）、危険ドラッグ127名（35.6%）、向精神薬43名（12.0%）、有機溶剤12名（3.4%）、鎮咳剤5名（1.4%）、鎮痛剤4名（1.1%）などであった。この結果から、トレンドとしては危険ドラッグが最初に挙げられる。初年度は、危険ドラッグ依存症および処方薬依存症患者に対する理解を深め適切な治療的対応ができるための小冊子、および依存症治療の基礎となる治療的対応に関する小冊子を作製した。本年度は、中毒性精神病で精神科救急病棟に入院となった危険ドラッグ依存症患者に対して、短期介入ツールであるLIFE-miniを使って介入を行い、その有効性を評価した。この結果をもとに、危険ドラッグ依存症および処方薬依存症に対する効果的な治療介入ツールを作成する。