

アルコール依存症の診断基準を用いて実施された調査によると、わが国のアルコール依存症患者数は約80万人であると推計されており²⁹⁾、アルコール依存症を含めたアルコール関連疾患の発現機序の解明とその予防・治療法を確立することは、社会医学上重要な問題と考えられている³⁰⁾。これからの研究においてアルコール依存形成に関わる遺伝子が特定できれば、例えば、遺伝子多型解析により個人の遺伝的背景の特徴をつかみ早期の予防および治療ということに繋がるのではないかと考えられる。今後はそのようなテーラーメイド医療構築の一助となることを目的とし、本研究で新たに考えられた課題についての解析を行うことで、NET 遺伝子多型がアルコール依存症に与える影響や5-HTT 遺伝子多型との相互作用（組み合わせ）の影響についてより詳細に検討していきたい。

要 約

本研究では依存性物質の一つであるアルコールのメカニズムと何らかの関連があると予測されるノルエピネフリントランスポーター (NET) 遺伝子に注目し、その一塩基多型 (SNP) である1287G/A, -182T/Cおよび-3081A/Tがアルコール依存症と関連があるかどうかを検討を行った。さらに、NETおよびセロトニントランスポーター (5-HTT) 遺伝子多型 (5-HTT3'UTR) の相互作用 (組み合わせ) の影響についても検討した。

インフォームド・コンセントの得られたアルコール依存症患者64人、健常者73人を対象として解析を行った。

解析の結果、アルコール依存症患者群と健常者群間においてNET 遺伝子多型および5-HTT3'UTRの遺伝子型、対立遺伝子頻度に有意な差異は認められなかった。また、NET 遺伝子多型に関するハプロタイプ解析の結果、すべてのハプロタイプにおいて両群間での出現頻度に有意な関連は認められなかった。さらに、NET 遺伝子多型と5-HTT3'UTRの相互作用 (組み合わせ) において、アルコール依存症との有意な関連は認められなかった。

今後、同様の研究を進める上では、アルコール依存症患者をサブグループに分類した解析や、過去にアルコール依存症との関連が報告されているイントロン領域のNET 遺伝子多型と5-HTT 遺伝子多型との相互作用 (組み合わせ) の影響について詳細に検討していくことで、母集団の臨床的に重要な差を見出せる可能性が考えられる。

結論として、NET 遺伝子多型の1287G/A, -182T/Cおよび-3081A/Tがアルコール依存症に関連する可能性は低く、5-HTT3'UTRとの相互作用 (組み合わせ) の影響についても関連は認められなかった。

謝 辞

この研究は、麻布大学により支援を受けて行ったものである。

文 献

- 1) 土肥敏博, 北山滋雄, 熊谷 圭, 橋本 亘, 森田克也: モノアミントランスポーターの薬理学. 日本薬理学雑誌, 120: 315-326, 2002.
- 2) 木内祐二: セロトニントランスポーター遺伝子多型と抗うつ薬. 医学のあゆみ, 195: 523-526, 2000.

- 3) Boyce-Rustay, J.M., Palachick, B., Hefner, K., Chen, Y.C., Karlsson, R.M., Millstein, R.A., Harvey-White, J. and Holmes, A.: Desipramine potentiation of the acute depressant effects of ethanol: modulation by alpha2-adrenoreceptors and stress. *Neuropharmacology*, 55: 803-811, 2008.
- 4) Hwang, B.H., Wang, G.M., Wong, D.T., Lumeng, L. and Li, T.K.: Norepinephrine uptake sites in the locus coeruleus of rat lines selectively bred for high and low alcohol preference: a quantitative autoradiographic binding study using [3H]-tomoxetine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 24: 588-594, 2000.
- 5) Clarke, T.K., Dempster, E., Docherty, S.J., Desrivieres, S., Lourdsamy, A., Wodarz, N., Ridinger, M., Maier, W., Rietschel, M. and Schumann, G.: Multiple polymorphisms in genes of the adrenergic stress system confer vulnerability to alcohol abuse. *Addict. Biol.*, 17: 202-208, 2012.
- 6) Bruss, M., Kunz, J., Lingen, B. and Bonisch, H.: Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter. *Hum. Genet.*, 91: 278-280, 1993.
- 7) Porzgen, P., Bonisch, H. and Bruss, M.: Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 1145-1150, 1995.
- 8) Fritz, J.D., Jayanthi, L.D., Thoreson, M.A. and Blakely, R.D.: Cloning and chromosomal mapping of the murine norepinephrine transporter. *J. Neurochem.*, 70: 2241-2251, 1998.
- 9) Stober, G., Nothen, M.M., Porzgen, P., Bruss, M., Bonisch, H., Knapp, M., Beckmann, H. and Propping, P.: Systematic search for variation in the human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and study of association with major psychiatric disorders. *Am. J. Med. Genet.*, 67: 523-532, 1996.
- 10) Zill, P., Engel, R., Baghai, T.C., Juckel, G., Frodl, T., Muller-Siecheneder, F., Zwanzger, P., Schule, C., Minov, C., Behrens, S., Rupprecht, R., Hegerl, U., Moller, H.J. and Bondy, B.: Identification of a naturally occurring polymorphism in the promoter region of the norepinephrine transporter and analysis in major depression. *Neuropsychopharmacology*, 26: 489-493, 2002.
- 11) Kim, C.H., Hahn, M.K., Joung, Y., Anderson, S.L., Steele, A.H., Mazei-Robinson, M.S., Gizer, I., Teicher, M.H., Cohen, B.M., Robertson, D., Waldman, I.D., Blakely, R.D. and Kim, K.S.: A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103: 19164-19169, 2006.
- 12) Huang, S.Y., Lu, R.B., Ma, K.H., Shy, M.J. and Lin, W.W.: Norepinephrine transporter polymorphisms T-182C and G1287A are not associated with alcohol dependence and its clinical subgroups. *Drug Alcohol Depend.*, 92: 20-26, 2008.
- 13) Samochowiec, J., Kucharska-Mazur, J., Kaminski, R., Smolka, M., Rommelschpacher, H., Wernicke, C., Tymicz, A. and Schmidt, L.G.: Norepinephrine transporter gene polymorphism is not associated with susceptibility to alcohol dependence. *Psychiatry Res.*, 111: 229-233, 2002.
- 14) Hall, F.S., Li, X.F., Sora, I., Xu, F., Caron, M., Lesch, K.P., Murphy, D.L. and Uhl, G.R.: Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience*, 115: 153-161, 2002.
- 15) Kelai, S., Aissi, F., Lesch, K.P., Cohen-Salmon, C., Hamon, M. and Lanfumey, L.: Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol Alcohol.*, 38: 386-389, 2003.
- 16) Lesch, K.P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B.L., Murphy, D.L. and Riederer, P.: Organization of the human serotonin transporter gene. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.*, 95: 157-162, 1994.
- 17) Ramamoorthy, S., Bauman, A.L., Moore, K.R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A.S., Ganapathy, V. and Blakely, R.D.: Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 90: 2542-2546, 1993.

- 18) Battersby, S., Ogilvie, A.D., Blackwood, D.H., Shen, S., Muqit, M.M., Muir, W.J., Teague, P., Goodwin, G.M. and Harmar, A.J.: Presence of multiple functional polyadenylation signals and a single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the human serotonin transporter gene. *J. Neurochem.*, **72**: 1384-1388, 1999.
- 19) Kent, L., Doerry, U., Hardy, E., Parmar, R., Gingell, K., Hawi, Z., Kirley, A., Lowe, N., Fitzgerald, M., Gill, M. and Craddock, N.: Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Mol. Psychiatry.*, **7**: 908-912, 2002.
- 20) Suzuki, A., Matsumoto, Y., Ishii, G., Oshino, S., Goto, K. and Otani, K.: No association between the -3081A/T polymorphism in the norepinephrine transporter gene promoter and personality traits in healthy subjects. *Neurosci. Lett.*, **425**: 192-194, 2007.
- 21) Aoki, J., Ikeda, K., Murayama, O., Yoshihara, E., Ogai, Y. and Iwahashi, K.: The association between personality, pain threshold and a single nucleotide polymorphism (rs3813034) in the 3'-untranslated region of the serotonin transporter gene (SLC6A4). *J. Clin. Neurosci.*, **17**: 574-578, 2010.
- 22) 山崎信也: なるほど統計学とおどろきExcel統計処理, 医学図書出版, 東京, 2010.
- 23) Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J.: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.*, **21**: 263-265, 2005.
- 24) Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. and Sham, P.C.: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**: 559-575, 2007.
- 25) Jonsson, E.G., Nothen, M.M., Gustavsson, J.P., Neidt, H., Bunzel, R., Propping, P. and Sedvall, G.C.: Polymorphisms in the dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter genes and their relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *Psychiatry Res.*, **79**: 1-9, 1998.
- 26) Kim, C.H., Kim, H.S., Cubells, J.F. and Kim, K.S.: A previously undescribed intron and extensive 5' upstream sequence, but not Phox2a-mediated transactivation, are necessary for high level cell type-specific expression of the human norepinephrine transporter gene. *J. Biol. Chem.*, **274**: 6507-6518, 1999.
- 27) Sora, I., Hall, F.S., Andrews, A.M., Itokawa, M., Li, X.F., Wei, H.B., Wichems, C., Lesch, K.P., Murphy, D.L. and Uhl, G.R.: Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **98**: 5300-5305, 2001.
- 28) Matsushita, S., Yoshino, A., Murayama, M., Kimura, M., Muramatsu, T. and Higuchi, S.: Association study of serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and alcoholism. *Am. J. Med. Genet.*, **105**: 446-450, 2001.
- 29) 尾崎米厚, 松下幸生, 白坂知信, 廣 尚典, 樋口 進: わが国の成人飲酒行動およびアルコール症に関する全国調査. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, **40**: 455-470, 2005.
- 30) 桂 昌司, 芝崎真裕, 黒川和宏, 大熊誠太郎: 依存性薬物による精神依存および身体依存形成機序の相違. *日本アルコール・薬物医学会雑誌*, **42**: 481-486, 2007.

[AsCNP2013 発表報告]

結節性硬化症モデルマウスの自閉症様行動における mTOR シグナル系の関与*

佐藤 敦志^{*1-3} 笠井 慎也^{*1} 小林 敏之^{*4} 高松 幸雄^{*1}
樋野 興夫^{*4} 池田 和隆^{*1} 水口 雅^{*3}

^{*1} 東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト, ^{*2} 東京大学大学院 小児科学,

^{*3} 東京大学大学院 発達医科学, ^{*4} 順天堂大学 分子病理病態学

自閉症スペクトラム障害 (以下, 自閉症) の治療において, 中核症状である社会的相互交流の障害を改善する治療薬はいまだに開発途上である。自閉症の一部は遺伝子異常に伴って発症することが知られている。元となる疾患の病態解明は, その疾患に合併する自閉症の治療法開発にも有用であると考えられる。

結節性硬化症 (TSC) は, *TSC1* および *TSC2* 遺伝子のヘテロ変異によって発症し, 最も頻度が高い自閉症の原因疾患のひとつである。TSC の分子病態はシグナル伝達系の下流で生じる mTOR シグナル系の亢進であり, その異常を是正する mTOR 阻害剤は, TSC に合併する腫瘍に有効である (Krueger et al, 2010)。TSC に合併する自閉症も, mTOR シグナル系の亢進が原因で生じており, mTOR 阻害剤を用いて改善できるのではないかと期待される (de Vries and Howe, 2007)。

我々は 2011 年の AsCNP にて, TSC モデルマウスが社会的相互交流の異常を呈し, これがラパマイシン (mTOR 阻害剤) の短期投与で正常化することを報告した。今回は, この治療効果に伴う mTOR シグナル系の変化を検討した。*TSC1* と *TSC2* の異常によって, 生じる自閉症症状に差があるかも比較した。

方 法

1. マウス

遺伝子発現解析および Western blotting にはオス *Tsc2*^{+/+} マウスを用いた。行動解析では *Tsc1*^{+/+} マウスと *Tsc2*^{+/+} マウスを交配して得られた野生型, *Tsc1*^{+/+}, *Tsc2*^{+/+} および *Tsc1*^{+/+}; *Tsc2*^{+/+} マウス (ダブルヘテロマウス) を用いた。いずれも生後 3 か月齢を超えた成獣を対象とした。実験は動物実験等の実施に関する基本指針に従い, 東京都医学総合研究所において承認を受けて行った。

2. ラパマイシン

ラパマイシンは 10% DMSO に溶解し, 5 mg/kg の用量で 1 日 1 回, 2 日間腹腔内投与した。3 日目に脳採取または行動解析を行った。

3. 遺伝子発現解析

全脳から総 RNA を抽出し, 増幅, cDNA 合成の後,

MouseRef-8 Expression BeadChips (Illumina 社) とハイブリダイズさせ, Illumina iScan reader を用いて検出した。

4. Western blotting

全脳をホモゲナイズしてタンパク質を抽出し, SDS-PAGE, 転写の後, Hamartin (*Tsc1* 産物), Tuberin (*Tsc2* 産物), 総 S6K, リン酸化 S6K, 総 Akt およびリン酸化 Akt を抗体を用いて検出した。ImageJ を用いたバンド強度の測定により, 蛋白量を定量した。

5. Social interaction test

マウスをホームケージで単独にして, 15 分慣らした。同性の新奇マウス (C57BL/6J) をケージに入れ, マウスの行動を 10 分間録画した。新奇マウスに対して探索行動を示した時間を計測した。

6. 統計解析

StatView 5.0 (SAS Institute) を用い, $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

1. 遺伝子発現の変化

Tsc2^{+/+} マウス脳において, *Tsc2* mRNA の発現が野生型マウス脳に比べて低下しており, ラパマイシン投与後にはさらに低下した。*Tsc1* mRNA の発現は亢進し, ラパマイシンで低下傾向を示した。*Tsc1* および *Tsc2* の上流の遺伝子では, *Gsk3b* (GSK3β をコードする遺伝子) と *Mapk1* (ERK2 をコードする遺伝子) の mRNA 発現が亢進しており, ラパマイシン投与後に正常化した。mTORC1 下流の遺伝子の中では, *Ulk1*, *Igfbp1*, *Rps6* (S6 をコードする遺伝子), *Eef2k* の発現が亢進していた。ラパマイシン投与後, *Ulk1* と *Eef2k* の発現は抑制されたが, *Igfbp1* はされなかった。mTORC1 と mTORC2 の成分中では *Deptor* の発現が亢進しており, ラパマイシン投与後正常化した。

2. 蛋白質発現, リン酸化の変化

Tsc2^{+/+} マウス脳では, S6K のリン酸化が亢進していたが, ラパマイシン投与後に野生型と同程度まで抑制された。総 S6K 蛋白量は, 遺伝子型および投薬によって変化しなかった。Tuberin 発現は軽度に低下していたが, ラパマイシン投与によっても改善しなかった。Hamartin 蛋白量には変化がなかった。Akt リン酸化は軽度に低下して

いたが、S6K とは異なりラパマイシン投与に反応しなかった。総 Akt 蛋白量は、遺伝子型および投薬によって変化しなかった。

3. *Tsc1* 欠失と *Tsc2* 欠失による自閉症症状の比較

Tsc1^{+/+}マウス、*Tsc2*^{+/+}マウスおよびダブルヘテロマウスにおいて、新奇マウスへの探索行動が野生型マウスに比べて有意に低下しており、低下の程度は遺伝子型によって差がなかった。2 日間のラパマイシン投与後、変異マウスの探索行動はいずれの遺伝子型においても正常化した。野生型マウスでは、ラパマイシン投与後も新奇マウスへの探索行動は変化しなかった。

考 察

我々が以前に報告したとおり、*Tsc1*^{+/+}および *Tsc2*^{+/+}マウスの自閉症様行動は、2 日間のラパマイシン投与で改善する。*Tsc2*^{+/+}マウスを用いた先行研究によると、4 日間のラパマイシン投与によって、記憶学習の異常と mTOR シグナル系の亢進が正常化する (Ehninger et al, 2008)。より短期間の投薬でも mTOR シグナル系が是正されるか、遺伝子発現や蛋白質発現およびリン酸化へ予期せぬ影響を及ぼしていないか、検討しておく必要があった。

mTOR シグナル系において、遺伝子発現、蛋白質発現およびリン酸化が異常をきたしており、ラパマイシン投与によって、自閉症様行動の改善とともに正常化することが明らかとなった。mTOR シグナル系の活性指標であるリン酸化 S6K の変化は、ラパマイシンは 2 日間の投与によって脳内で有効に作用することを示している。一方、mTOR から negative feedback を受ける Akt のリン酸化には影響がなかった。Akt の上流にある遺伝子 *PTEN* のヘテロ変異も、ヒト自閉症と関連する。神経細胞特異的 *Pten* ノックアウトマウスに生後早期よりラパマイシンを継続投与すると、Akt および mTOR シグナル系の亢進が抑えられ、自閉症症状も現れない (Zhou et al, 2009)。今回の結果をあわせると、自閉症症状は Akt のリン酸化によらず、mTOR シグナル系の亢進のみによって生じるといえるだろう。

Tsc1 および *Tsc2* の上流で、*Gsk3b* と *Mapk1* の遺伝子発現が変化していたことは興味深い。*Gsk3b* は脆弱 X 症候群 (FXS)、*Mapk1* は神経線維腫症 (NF1) の分子病態に関係する。両疾患とも原因遺伝子が判明しており、自閉症を高率に合併することも分かっている。両疾患とも細胞あるいはモデル動物において、mTOR シグナル系の亢

進が観察されている (Sharma et al, 2010; Johannessen et al, 2005)。mTOR シグナル系が、個々の疾患を超えて自閉症の病態に深く関与していることが示唆される。

また、TSC の臨床的特徴として、*TSC2* 変異をもつ症例は症状が重篤になる傾向があり、自閉症も合併しやすい (Numis et al, 2011)。Astrocyte 特異的ノックアウトマウスにおいては、けいれんなどの神経症状が、*Tsc1* 欠失マウスに比べて *Tsc2* 欠失マウスで重症であるが (Zeng et al, 2011)、よりヒトに近いヘテロ欠失マウスでは、*Tsc1* 欠失と *Tsc2* 欠失における神経学的な相違の報告はほとんどない。今回の検討では、*Tsc1*^{+/+}、*Tsc2*^{+/+}およびダブルヘテロマウスの social interaction 低下は、遺伝子型によらず同程度であった。TSC の表現型が *Tsc2* 欠失によってより重篤となる機序はいまだに不明であり、今後はまず、モデルマウスの表現型をより多角的に比較検討する必要がある。

以上、本研究により、ヒト疾患 TSC のモデルマウスに合併する自閉症症状が、mTOR シグナル系の抑制によって治療可能であることが示された。

文 献

- De Vries, P.J. and Howe, C.J. (2007) The tuberous sclerosis complex proteins: a GRIPP on cognition and neurodevelopment. *Trends Mol Med*, 13: 319-326.
- Ehninger, D. (2008) Reversal of learning deficits in a *Tsc2*^{+/+} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med*, 14: 843-848.
- Johannessen, C.M. (2005) The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *PNAS*, 102: 8573-8578.
- Krueger, D.A. (2010) Everolimus for subependymal giant-cell astrocytoma in tuberous sclerosis. *N Eng J Med*, 363: 1801-1811.
- Numis, A.L. (2011) Identification of risk factors for autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Neurology*, 76: 981-987.
- Sharma, A. (2010) Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J Neurosci*, 30: 694-702.
- Zeng, L.H. (2011) *Tsc2* gene inactivation causes a more severe epilepsy phenotype than *Tsc1* inactivation in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet*, 68: 64-80.
- Zhou, J. (2009) Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific *Pten* knock-out mice. *J Neurosci*, 29: 1773-1783.

*本稿は JSNP Excellent Presentation Award for AsCNP2013 (Beijing) を受賞した報告である。

JSNP Excellent Presentation Award for AsCNP2013: Causal role of unregulated mTOR signaling in autism-related behavioral deficits in mouse models of tuberous sclerosis complex.

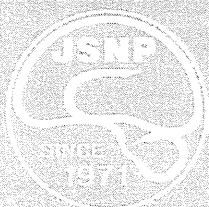
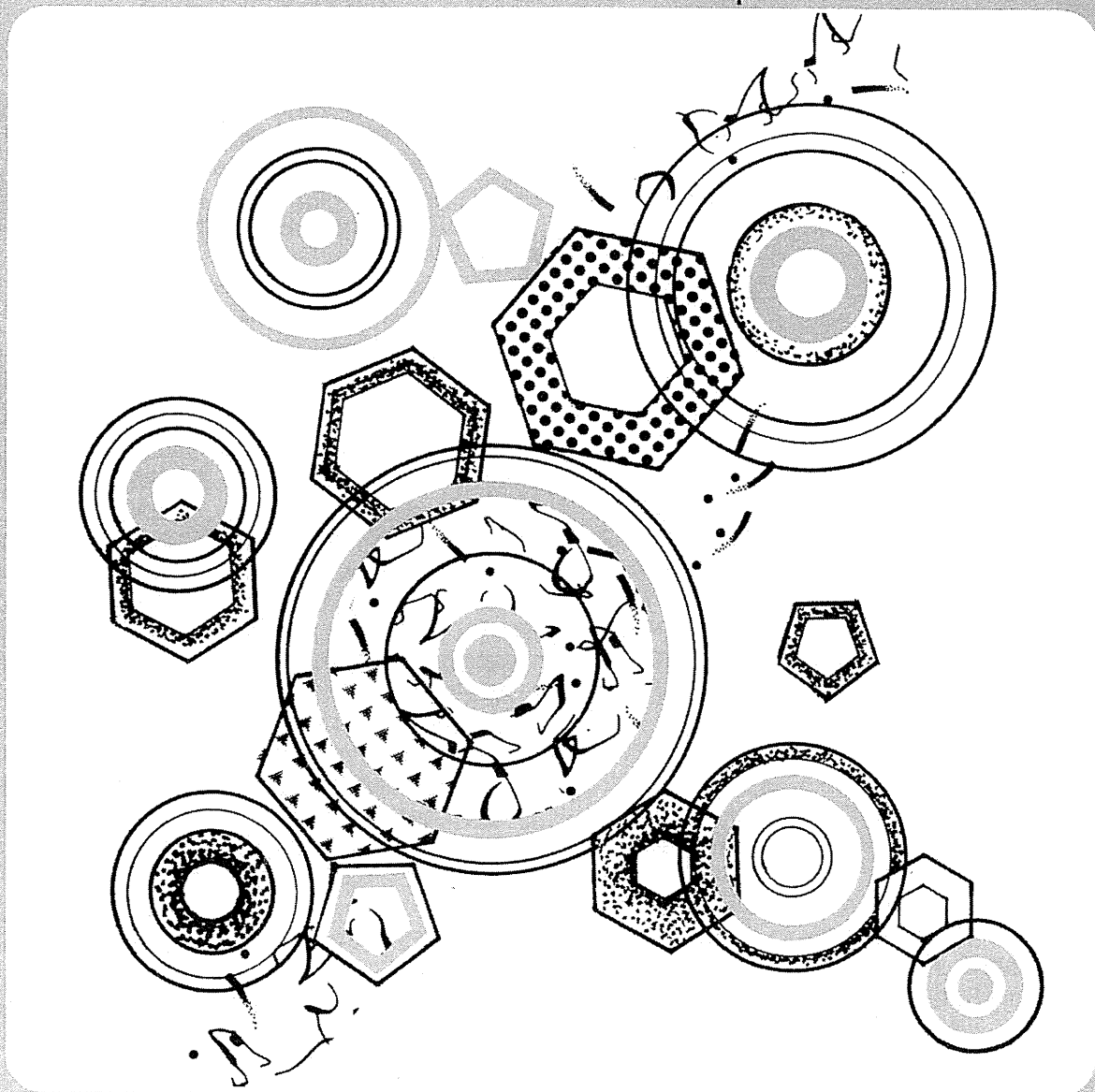
Sato A, S. Kasai A, Kobayashi T, Takamatsu Y, Hino O, Ikeda K, Mizuguchi M.

Japanese Journal of Neuropsychopharmacology

日本神経精神薬理学雑誌

Vol.34
Apr.

No.2
2014



日本神経精神薬理学会発行

Published by the Japanese Society of Neuropsychopharmacology

日 神 精 薬 理 誌

Jpn. J. Neuropsychopharmacol.

[AsCNP2013 発表報告]

喫煙行動と相関するオピオイド受容体関連遺伝子多型の解析*

笠井 慎也^{*1} 西澤 大輔^{*1} 長谷川 準子^{*1} 佐藤 直美^{*2}
 谷岡 書彦^{*3} 梶村 春彦^{*4} 池田 和隆^{*1}

^{*1}公益財団法人 東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト, ^{*2}浜松医科大学 臨床看護学講座,

^{*3}磐田市立総合病院 病理診断科, ^{*4}浜松医科大学 腫瘍病理学講座

タバコの使用は世界的に最も疾病罹患率や死亡率に影響を及ぼす要因の一つである。世界保健機関により2009年に報告されたThe Global Health Riskの中でタバコ使用による死亡率が推定されており、中所得および低所得国では7.2%、高所得国では17.9%にも及ぶ。また、日本では第二次世界大戦以降、タバコの使用に起因する死亡が著しく増加しており、1990年代前半におけるタバコ使用に関連する死亡率は男性で27.8%、女性で6.7%と推定されている。そのため、日本におけるタバコ使用やタバコ・ニコチン依存に関連する要因を明らかにし、タバコ使用抑制への取り組みを推進することは将来の死亡率低下につながると考えられる。

タバコ使用は環境要因や遺伝子要因など様々な要因に影響される(Munafò and Johnstone, 2008)。こういった要因は、喫煙行動における個人差を生み出していると考えられている。欧米では一卵性双生児と二卵性双生児の罹患率の違いから遺伝子要因の寄与率(heritability, h^2)を推定する双子研究が多く行われており、 $h^2=0.11-0.78$ (喫煙開始)、 $h^2=0.11-0.74$ (喫煙持続性)、 $h^2=0.33-0.77$ (ニコチン依存)、 $h^2=0.40-0.75$ (Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) score)、 $h^2=0.45-0.70$ (一日の喫煙本数)等、喫煙行動に関わるほとんどの要因で遺伝子要因が約半分程を占める。これまでに様々なヒト遺伝子多型とタバコ・ニコチン依存との関連解析が報告されている(Ray et al, 2009)。

オピオイド受容体拮抗薬であるnaltrexoneは起床後の喫煙本数を減らし、禁煙持続率はnaltrexone投与群の方がコントロール群と比較して高いことが報告されている。また、脱ニコチン状態にある喫煙者ではオピオイド受容体の結合能が非喫煙者に比べて低いことも報告されている。これら結果は、内因性のオピオイドシステムがニコチンの薬理作用と密接に関わり、ニコチン依存形成に伴って変化することを示唆している。

内因性オピオイドシステムは、 μ , δ および κ オピオイド受容体と、エンドルフィン、ダイノルフィンおよびエンケファリンの内因性オピオイドリガンドによって構成される。またノシセプチン/オーファニンFQ受容体は塩基配列・アミノ酸配列でオピオイド受容体と同源性が高いが、オピオイドリガンドとは結合しない。ヒト μ オピオイド受容体遺伝子OPRM1上の遺伝子多型のいくつかはタバコ依存と関連することが欧米人において報告され

ている(Kasai and Ikeda, 2011)。しかし、ヒト δ および κ オピオイド受容体遺伝子OPRD1, OPRK1, ノシセプチン/オーファニンFQ受容体遺伝子OPRL1上の遺伝子多型については、喫煙との関連性は報告されていない。

本研究では、オピオイド受容体関連遺伝子(OPRM1, OPRD1, OPRK1, OPRL1)に焦点を当て、日本人におけるタバコ・ニコチン依存の遺伝的脆弱性について解析を行った。

方 法

1. 患者および臨床データ

解析に用いた遺伝子試料・臨床データは、2003年から2008年に磐田市立総合病院に通院して治療を受けたがん・糖尿病・高血圧患者1,000名から採取・収集された。臨床データには、がん・糖尿病・高血圧の各疾患病歴、喫煙歴および喫煙情報が含まれる。喫煙情報は喫煙期間、一日の喫煙本数、FTND score, Tobacco Dependence Screener (TDS) score, 禁煙回数を含む。これら遺伝子試料・臨床データは、個人情報管理者により匿名化されて管理されている。本研究は所属機関のヒトゲノム解析研究倫理委員会の承認を得て行われた。

2. 遺伝子型解析

OPRM1 遺伝子上の4遺伝子多型(rs1799971, rs2075572, rs599548, rs9384179), OPRD1 遺伝子上の2遺伝子多型(rs2236861, rs4654327), OPRK1 遺伝子上の1遺伝子多型(rs6473799), OPRL1 遺伝子上の1遺伝子多型(rs2229205)について解析した。提供を受けたゲノムDNAを用いて、TaqMan PCR法, アレル特異的PCR法およびシーケンシング法により上記の計8遺伝子多型の遺伝子型解析を行った。

3. 統計解析

すべての統計解析はSPSS software v.12.0 for Windows (SPSS Japan)を用いて行った。各遺伝子多型の分布と臨床データの各パラメーターとの相関解析は、Spearman's rank correlation test, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test および χ^2 testにより検定を行った。 $P < 0.05$ を統計的有意と判定した。

結 果

今回解析を行った患者1,000名の内訳は、男性612名、

女性 388 名で、男女間で BMI (kg m^{-2}) の分布に有意な差異は見られず、統制のとれた検体群であると考えられる。喫煙履歴についても様々で、392 名の過去喫煙者、130 名の現在喫煙者、477 名の非喫煙者が含まれる。喫煙者から収集した喫煙情報（喫煙期間、一日の喫煙本数、FTND score、TDS score、禁煙回数）の各要因間では、一日の喫煙本数と FTND score ($p = 0.689, P < 0.001$, Spearman's rank correlation test) および TDS score と禁煙回数 ($p = 0.553, P < 0.001$, Spearman's rank correlation test) 間の相関係数が高く関連性が強かった。

遺伝子多型と喫煙歴・喫煙情報との関連解析では、検体を 2 群に分け、探索的解析 (288 検体) の後に再現性確認 (712 検体) する 2 段階解析を行った。非喫煙者における 8 遺伝子多型の遺伝子型分布は Hardy-Weinberg 平衡に従うことを確認している。探索的解析において、OPRM1 遺伝子 rs2075572 多型のアレル分布が、過去喫煙者と非喫煙者間で有意に異なっていた ($\chi^2 = 4.032, P = 0.045, \chi^2$ test)。また、OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型の遺伝子型分布 ($\chi^2 = 7.385, P = 0.025$)、アレル分布 ($\chi^2 = 6.830, P = 0.009$)、ドミナントモデルの遺伝子型分布 ($\chi^2 = 7.343, P = 0.007$) は現在喫煙者と非喫煙者の間で有意に異なっていた。さらに、OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型のドミナントモデルの遺伝子型分布は過去喫煙者と非喫煙者との間でも有意に異なっていた ($\chi^2 = 3.910, P = 0.048$)。その他の遺伝子多型と喫煙歴との間には有意な関連は見られず、解析を行った 8 遺伝子多型と喫煙情報との間にも有意な相関関係は確認できなかった。

探索的解析において有意な関連が認められた 2 遺伝子多型 5 解析について、後半 712 検体による再現性確認解析を行った。OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型のアレル分布およびドミナントモデルの遺伝子型分布と喫煙歴との関連は、Holm's 多重検定補正後においても有意であったことから、日本人における喫煙行動において OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型の関与が示唆された。

考 察

今回の解析では、OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型の遺伝子型およびアレル分布は現在喫煙者と非喫煙者の間で有意に異なり、過去喫煙者と非喫煙者との間で差異は認められなかった。解析に用いた患者の大半は FTND score < 7.0 および TDS score < 5.0 であることから、重度のタバコ・ニコチン依存ではない中程度以下の喫煙者を主体とする患者群であると考えられる。FTND score については有意な差異は見られなかったが、喫煙期間と TDS score

は過去喫煙者と比較して、現在喫煙者で有意に高い ($U = 9209.00, P < 0.001$; $U = 18652.50, P < 0.001$, Mann-Whitney U test)。このことから、OPRL1 遺伝子 rs2229205 多型は、重度のニコチン依存ではないが精神的にタバコに依存している喫煙者において、喫煙歴に影響を及ぼしていると考えられる。

これまでに OPRL1 遺伝子上の遺伝子多型がオピオイド依存やアルコール依存と関連することが欧米人において報告されている (Briant et al, 2010; Huang et al, 2008)。しかし、喫煙や喫煙情報との関連解析は報告されていない。OPRL1 遺伝子がコードするノシセプチン/オーファニン FQ 受容体は侵害受容性反応に関わることが良く解析されているが、脳内報酬系に関わることが近年報告されている。Oppl1 遺伝子欠損マウスでは、食餌嗜好性の変化、覚醒剤による細胞毒性の低下、オピオイド耐性の低下やニコチンに対する感受性の亢進が引き起こされることが報告されている。

タバコ・ニコチン依存に対する遺伝子要因の寄与は人種や民族によって異なると考えられており、OPRL1 遺伝子多型が及ぼす影響を詳細に明らかにするためには、異なる人種や民族において十分な検体数を用いた解析が必要である。本研究で明らかにした OPRL1 遺伝子多型が喫煙歴に影響を及ぼす作用機序を明らかにすることにより、タバコ・ニコチン依存脆弱性における個人差の理解や治療法確立につながるものが期待される。

文 献

- Briant, J.A., Nielsen, D.A., Proudnikov, D., Londono, D., Ho, A., Ott, J. and Kreek, M.J. (2010) Evidence for association of two variants of the nociceptin/orphanin FQ receptor gene OPRL1 with vulnerability to develop opiate addiction in Caucasians. *Psychiatr Genet*, 20: 65-72.
- Huang, J., Young, B., Pletcher, M.T., Heilig, M. and Wahlestedt, C. (2008) Association between the nociceptin receptor gene (OPRL1) single nucleotide polymorphisms and alcohol dependence. *Addict Biol*, 13: 88-94.
- Kasai, S. and Ikeda, K. (2011) Pharmacogenomics of the human μ -opioid receptor. *Pharmacogenomics*, 12:1305-1320.
- Ray, R., Schnoll, R.A. and Lerman, C. (2009) Nicotine dependence: biology, behavior, and treatment. *Annu Rev Med*, 60: 247-260.
- Munafò, M.R. and Johnstone, E.C. (2008) Genes and cigarette smoking. *Addiction*, 103: 893-904.

* 本稿は JSNP Excellent Presentation Award for AsCNP2013 (Beijing) を受賞した報告である。

JSNP Excellent Presentation Award for AsCNP2013: Association between an opioid receptor-related gene polymorphism and smoking in Japanese.

Kasai S, Nishizawa D, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Ikeda K.

総説

多様な依存性物質の作用に共通して影響する遺伝子多型

西澤大輔, 池田和隆*

東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト
(受付:平成25年12月24日;受理:平成26年1月30日)

Genetic polymorphisms commonly influencing efficacy of
diverse addictive substances

Daisuke NISHIZAWA and Kazutaka IKEDA *

Addictive Substance Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science,
Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

(Received : December 24, 2013 ; Accepted : January 30, 2014)

Summary

Opioids, such as morphine and fentanyl, are widely used as effective analgesics for the treatment of acute and chronic pain. In addition, the opioid system has a key role in the rewarding effects of morphine, ethanol, cocaine and various other drugs.

The authors have focused on G-protein-activated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel subunits, GIRK2 and GIRK3, that are important molecules in opioid transmission, and found that the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *GIRK2* and *GIRK3* gene regions were significantly associated with postoperative requirements of analgesics including opioids in patients who underwent abdominal surgery and mRNA expression of these genes in postmortem specimens, one of which was also associated with vulnerability to methamphetamine (METH) dependence.

Further, by conducting a multistage genome-wide association study (GWAS) in healthy subjects, the authors found that genetic polymorphisms within a linkage disequilibrium block that spans 2q33.3-2q34 were strongly associated with the requirements for postoperative opioid analgesics after painful cosmetic surgery. The C allele of the best candidate SNP, rs2952768, was associated with more analgesic requirements, and consistent results were obtained in

* 責任著者: 池田和隆, 東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト 〒156-8506東京都世田谷区上北沢2-1-6 mail: ikeda-kz@igakuken.or.jp

※本論文は, 平成25年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会(岡山)での座長推薦論文として執筆された。

patients who underwent abdominal surgery. In addition, carriers of the C allele in this SNP exhibited less vulnerability to severe drug dependence in patients with methamphetamine dependence, alcohol dependence, and eating disorders and a lower 'Reward Dependence' score on a personality questionnaire in healthy subjects. Furthermore, the C/C genotype of this SNP was significantly associated with the elevated expression of a neighboring gene, *CREB1*. The results show that SNPs in this locus are the most potent genetic factors associated with human opioid sensitivity known to date, affecting both the efficacy of opioid analgesics and liability to severe substance dependence.

These outcomes provide valuable information for the personalized treatment of pain and drug dependence.

Key words: analgesia, dependence, opioids, GIRK channel, GWAS

鎮痛, 依存, オピオイド, GIRKチャネル, ゲノムワイド関連解析

はじめに

その報酬効果により依存症の成因となり得る物質は、覚せい剤、大麻、コカイン、アヘン類（オピオイド）などの違法薬物以外に、アルコール、ニコチン等の合法の依存性物質など、様々である。報酬効果に関与する神経伝達系としてはドーパミン系以外に、オピオイド系も重要であることが明らかになっている。オピオイドシステムは様々な依存性薬物の作用発現において重要であることは、オピオイド受容体のノックアウトマウスにおいて、モルヒネ¹⁾、エタノール²⁾、コカイン³⁾、その他の依存性薬物⁴⁾、等の様々な依存性物質の報酬効果や鎮痛作用が減弱するなどの知見からも、実際に示されている。筆者らは、オピオイド受容体の下流のエフェクターとして関与する幾つかの分子の中でも、特にGタンパク質活性型内向き整流性カリウム（GIRK）チャネルに注目して研究を行っている。GIRKチャネルのノックアウトマウスではモルヒネの鎮痛効果が減弱し^{7,11)}、コカインの強化・報酬効果が減弱することが報告されており¹²⁾、GIRKチャネルはオピオイド受容体と同様、鎮痛・報酬効果に関与することが知られている。

また、モルヒネ等のオピオイドは強力な鎮痛薬としても広く利用されている一方で、その報酬・依存作用により用法・用量によっては依存症の原因となることが知られている。従って、オピオイド感受性の個人差に関係する遺伝要因は、薬物依存症を含め物質依存症脆弱性の個人差にも寄与する可能性があると考えられる。

本稿では、そのように多様な依存性物質の作用の個人差に共通して影響し得るオピオイドの感受性個人差に関する遺伝要因の探索研究として、GIRKチャネル遺伝子多型を対象とした候補遺伝子多型関連解析及びヒトゲノム全体の網羅的多型解析手法であるゲノムワイド関連解析（GWAS）における研究成果を具体的に紹介する。

依存性物質感受性とGIRKチャネル遺伝子多型との関連

ヒトのGIRKチャネルのサブユニットには主に脳で発現するGIRK1～GIRK3と、主に心臓で発現するGIRK4があるが、その脳型の方のGIRKチャネルのうち、特にGIRK2とGIRK3に関する研究成果を述べる。

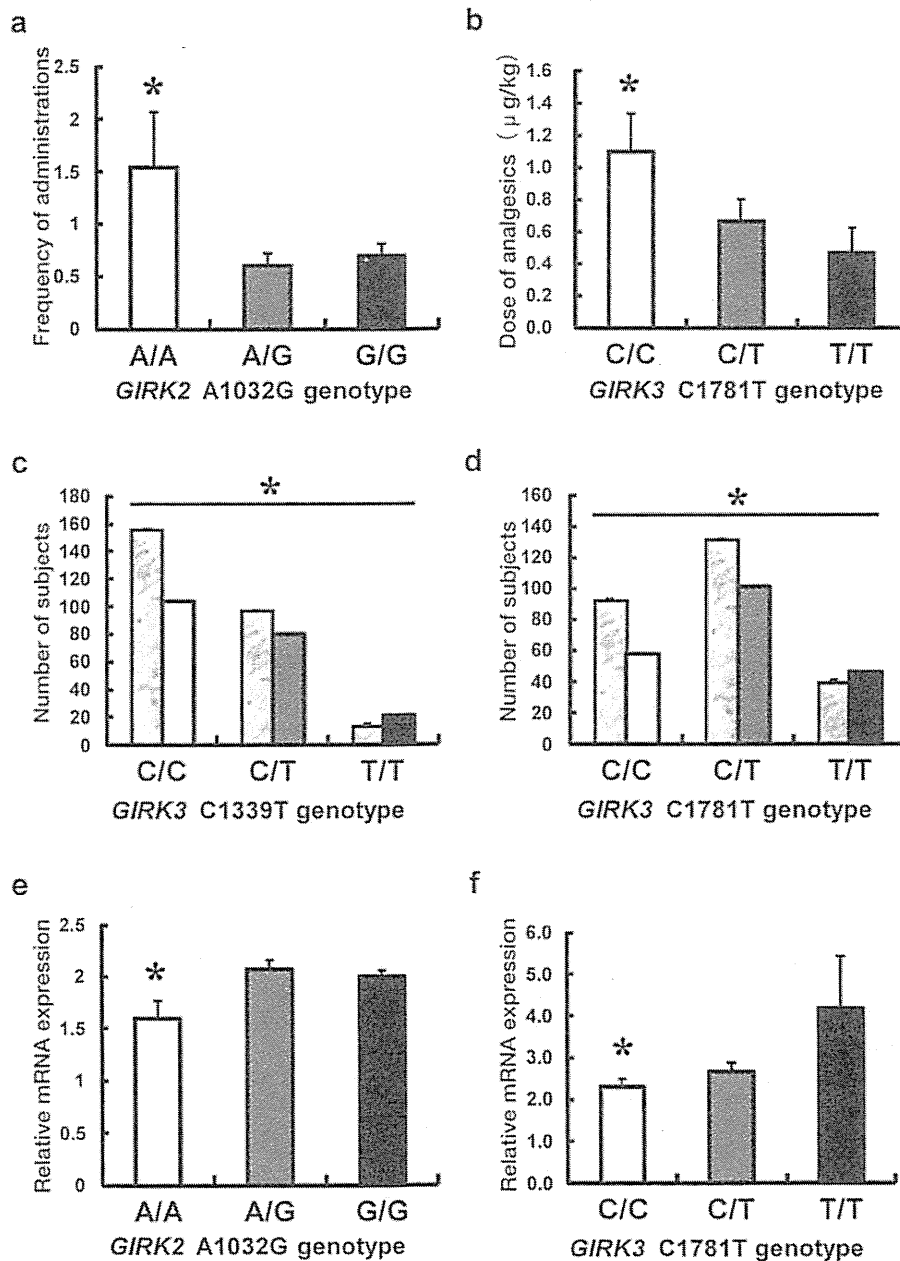


Fig. 1 Association analysis between *GIRK* SNPs and requirements for rescue analgesics, vulnerability to methamphetamine (METH) dependence, and gene expression levels in post-mortem brains¹³. (a) The results for the frequency of analgesic administration during the 24 h postoperative period are shown for the *GIRK2* (*KCNJ6*) A1032G SNP. *: significantly more frequent administration for the A/A genotype compared with the A/G and G/G genotypes. (b) The results for the dose of analgesic administration per body weight ($\mu\text{g kg}^{-1}$) during the 24 h postoperative period are shown for the *GIRK3* (*KCNJ9*) C1781T SNP. *: significantly greater administration for the C/C genotype compared with the C/T and T/T genotypes in all subjects. (c, d) The results for the distribution of patient and control subjects stratified by the genotypes of *GIRK3* C1339T and C1781T SNP. The white, gray, and filled boxes indicate results for patient subjects and marble boxes indicate those for control subjects. *: significantly greater T allele frequency in patient subjects compared with that in control subjects. (e, f) The results for the relative mRNA expression level of the *GIRK2* and *GIRK3* gene stratified by the genotypes of *GIRK2* A1032G and *GIRK3* C1781T SNP, respectively. *: significantly less level of mRNA expression in the A/A genotype compared with the A/G and G/G genotypes in the *GIRK2* A1032G SNP and significantly less level of mRNA expression in the C/C genotype compared with the T/T genotypes in the *GIRK3* C1781T SNP. The data are expressed as mean \pm s.e.m. in (a), (b), (e), and (f).

まず最初に多型探索のため、*GIRK2*の遺伝子の全エクソン及びプロモーター領域、エクソンとイントロンの境界領域などに関してダイレクトシーケンスを行ったところ、プロモーター領域に5個、エクソンに3個、またイントロンに1個、合計9個の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) を同定した。その後連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium ; LD) 解析を行ったところ、プロモーター領域の3個のSNPの間において絶対連鎖不平衡 ($D'=1$, $r^2=1$) となっていることが分かった。そのLDブロックを代表するSNPであるTagSNPと呼ばれる多型G-1250Aと、エクソン中でアレル頻度の比較的高い同義置換多型A1032Gを解析多型として選出した。*GIRK3*の遺伝子についても、*GIRK2*の遺伝子と同様の領域に関してダイレクトシーケンス法により多型探索を行ったところ、5'フランキング領域に4個、エクソンに6個、合計10個のSNPを同定した。その後連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium ; LD) 解析を行ったところ、プロモーター領域の2個のSNPの間及びエクソン領域の2個のSNPの間において絶対連鎖不平衡 ($D'=1$, $r^2=1$) となっていることが分かった。それぞれのLDブロックを代表するTagSNPとしてC-968G及びG2069Aを、また非同義多型C1339TにC1781T及びC1817Tを加えた、エクソン中でアレル頻度の比較的高い3個の多型、を解析多型として選出した。その後、Polymerase Chain Reaction (PCR) - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法、ダイレクトシーケンス法、またはTaqMan法 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) のいずれかの方法を用いて選出した多型に関してジェノタイピングを行った。

東京大学医科学研究所附属病院及び東邦大学医療センター佐倉病院において外科的な開腹手術後の疼痛に対して主としてオピオイド鎮痛薬を投与された患者合計129名を対象として、遺伝子多型と鎮痛薬感受性との関連を調べるための解析を行った。その結果、*GIRK2*のA1032G多型において、A/Aの遺伝子型の患者では他の遺伝子型の患者に比べ、有意に術後追加鎮痛薬の投与必要回数が多いことが分かった¹⁹⁾ (図1a)。*GIRK3*のC1781T多型においても同様の解析を行ったところ、Tアレルの保有者では他の遺伝子型の患者に比べ、有意に術後追加鎮痛薬の投与必要回数及び必要量が少ないことが分かった (図1b)。さらに、この多型及びC1339T多型及びC1781T多型に関して、物質依存症患者を対象として検討を行ったところ、覚せい剤依存症患者では、いずれも対照群と比較してTアレルの保有者が有意に多いことが分かり、このアレルの保有者では覚せい剤依存脆弱性が高いことが示唆された (図1c, d)。

さらに、スタンレー財団脳バンクより提供を受けた死後脳組織サンプル¹⁰⁾を用いて、A1032G多型及びC1781T多型と、それぞれ*GIRK2*及び*GIRK3*のmRNA発現量との関連性を調べた。その結果、A1032G多型におけるAアレルのホモの保有者では、非保有者と比べて*GIRK2*のmRNA発現量が少なく¹⁹⁾、またC1781T多型におけるCアレルのホモの保有者では、Tアレルのホモの保有者と比べて*GIRK3*のmRNA発現量が少ないことがわかった (図1e, f)。従って、これらの多型はオピオイド感受性個人差に寄与する多型であり、多型の効果により*GIRK*チャネルの遺伝子発現が低下することにより鎮痛作用が減弱し、逆に上昇することにより報酬効果及び物質依存症脆弱性が亢進している可能性が示唆された。

オピオイド感受性関連遺伝子多型のGWASによる探索

近年の遺伝子多型解析技術の進歩は目覚ましく、個別の遺伝子多型のみならず様々な遺伝子領域及び遺伝子間領域における100万単位のSNPの遺伝子型判定を短期間で行うことも可能になったため、それを基にして各種疾患または様々な形質との関連性を解析するGWASが盛んに

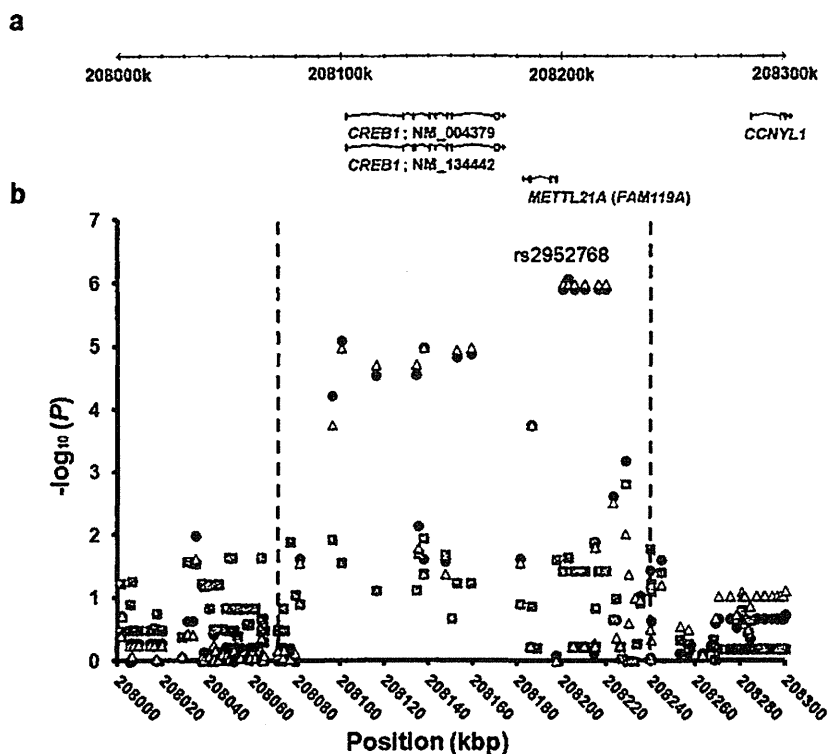


Fig. 2 Candidate locus possibly associated with human opioid sensitivity¹⁵⁾. (a) Illustration of the genes in the genomic region from position 208000000 to 208300000 on chromosome 2 in the HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.ja>; accessed 1 March 2012). (b) Fine mapping of the candidate region after the imputation-based association analysis. The circle, square and triangle plots represent the results from the additive, dominant and recessive models, respectively. The area between the dotted vertical lines represents the genomic position from 208070000 to 208240000 on chromosome 2.

行われている。筆者らは、この手法によりオピオイド感受性個人差に関する遺伝要因のヒトゲノム全体に渡る網羅的探索を行った¹⁵⁾。

主に咀嚼効率向上・顔面の審美性の改善等の目的で、侵襲が大きい術式であり画一的な術後疼痛が生じる下顎枝矢状分割術 (SSRO法) を受け、術後の疼痛管理目的でオピオイド鎮痛薬であるフェンタニルを投与された健常者を対象とし、多段階GWASを行った。この対象者はヒトでのオピオイド感受性個人差研究に最適と考えられる。フェンタニルは、患者自己調節鎮痛 (Patient-controlled analgesia: PCA) 法により1回当たり 20 μ g投与 (ロックアウト時間: 10分間) された。全ゲノムジェノタイピングはHuman1M-Duo等のビーズアレイを用いてのIllumina社のプラットフォームにより行った。また、多段階GWASにおいては、合計30万以上のSNPを対象としてAdditive, Dominant, 及びRecessive, の各種遺伝様式モデルごとに術後24時間のフェンタニル投与必要量との関連性を検討した。その結果、術後24時間のフェンタニル必要量と強い関連を示す遺伝子多型が二番染色体の長腕領域 (2q33.3-2q34) に同定され (図2), 最上位候補である rs2952768 多型のCアレルのホモの保有者では、他の遺伝子型の患者に比べ、多重検定の補正後も鎮痛薬必要量が有意に多かった¹⁵⁾。また、別術式である開腹手術を受けた患

Table 1. Summarized effects of carrying C allele of the polymorphism rs2952768

Phenotype	Effect of C allele
(Expected opioid sensitivity)	(↓)
Postoperative analgesic requirements after cosmetic orthognathic surgery [§]	↑*
Postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery [§]	↑*
Polydrug use in methamphetamine dependence/psychosis patients	↓*
Drug use in alcohol dependence patients	↓*
Drug dependence in eating disorder patients	↓*
Alcohol dependence in eating disorder patients	↓ [†]
'Reward Dependence' score on a personality questionnaire in healthy subjects	↓*
CREBI mRNA expression	↑*

§: Opioids were directly administered to the subjects recruited for the study.

*: $P < 0.05$, †: $0.05 < P < 0.1$.

者（前述）においても検討を行ったところ、やはりこの多型のCアレルのホモの保有者では、他の遺伝子型の患者に比べ術後24時間の鎮痛薬必要量が有意に多いという、SSRO法の症例の場合と同様の傾向が認められた¹⁵⁾。従って、この多型のCアレルのホモの保有者では、オピオイド感受性が低下している可能性が示された（表1）。

オピオイド感受性の低下は、オピオイド系は鎮痛作用以外に報酬効果にも関与することから鑑みると、様々な依存性物質の報酬効果の低下をもたらす可能性もあり、深刻な依存に陥る可能性が低いと考えられる。筆者らは、この仮説を確かめるために、覚せい剤依存患者、アルコール依存患者、摂食障害患者等の各種物質依存症患者を対象として、rs2952768多型の物質依存脆弱性への寄与を調べた。その結果、症例対照研究における、各患者群と対照群との間で多型頻度を比較する解析では有意な関連は認められなかったが、患者群をサブグループに分類した解析によりさらに詳細に検討を行ったところ、この多型のCアレルの保有者では、覚せい剤依存症患者において多剤乱用者の割合が単剤乱用者と比較して有意に少ないことがわかった。同様に、やはりCアレルの保有者では、アルコール依存症患者において薬物の非乱用者と比較して乱用者の割合が少ないことがわかった。さらに、摂食障害患者においては、Cアレルの保有者では、薬物依存症を合併していない患者と比較して合併している患者の割合が少なく、かつアルコール依存症を合併していない患者と比較してアルコール依存症を合併している患者の割合が少ない傾向であった。すなわち、この多型のCアレルの保有者では、いずれも物質依存重症度の低下を示す結果となった（表1）。

一方、物質依存症患者ではなく、別の健常者の集団において、オピオイド感受性と関連することが示唆されたこのrs2952768多型がパーソナリティに影響を及ぼす可能性を検討した。気質と性格の次元の要因となるパーソナリティの構造及び発達の精神生物学的なモデルとして Cloninger et al.¹⁶⁾により開発された、TCI (Temperament and Character Inventory) のパーソナリティ質問紙における、新奇性追求 (Novelty Seeking: NS), 損害回避 (Harm Avoidance: HA), 報酬依存 (Reward Dependence: RD), 固執 (Persistence: P), 自己志向 (Self-Directedness: SD), 協調 (Cooperativeness: C), 自己超越 (Self-Transcendence: ST), の7次元のパーソナリティのスコアを用いて検討を行った結果、これらの7次元の因子のうち、報酬

依存 (Reward Dependence: RD) の次元のみに関してこの多型との有意な関連が認められ、Cアレル保有者では、そのコピー数に応じてRDスコアが低くなることがわかった¹⁵⁾。

ところで、GWASによりオピオイド感受性に関連する最有力座位として同定された2q33.3-2q34のゲノム領域には、*CREB1*及び*METTL21A* (*FAM119A*) の2遺伝子が位置しているが(図2)、それらはrs2952768多型と強い連鎖不平衡状態にある7個のSNPをいずれも包含するLDブロック上に存在する¹⁵⁾。筆者らは、前述のスタンレー財団脳バンクの死後脳組織サンプルを用いて、これらの近傍遺伝子のmRNA発現量に対するrs2952768多型の効果を調べた。その結果、Cアレルのホモの保有者では、非保有者と比べて*CREB1*のmRNA発現量が有意に多いことが分かった¹⁵⁾。従って、この多型が鎮痛薬感受性及び物質依存重症度に影響するメカニズムの一端としては、*CREB1*の遺伝子発現量の影響の可能性が考えられた(表1)。

おわりに

本稿では、多様な依存性物質の報酬効果や鎮痛作用の機序において共通するメカニズムの一つであるオピオイド系に着目し、オピオイド感受性個人差に関する遺伝要因の探索研究の具体例として、GIRKチャネル遺伝子多型を対象とした候補遺伝子多型関連解析及びGWASにおける最近の研究成果を紹介した。その他では、ドーパミン系に関与する分子なども、様々な依存性物質の感受性に共通して関連する分子として考えられるが、本稿のGWAS研究において紹介した遺伝子多型のように鎮痛作用及び様々な物質依存の症状の個人差に共通して関連する遺伝子多型は、これまで報告が無いであろう。今後もそのような研究の進展により、多様な依存性物質の感受性に共通して関連する新たな候補遺伝子多型が同定されるのみならず、関連分子によるその作用メカニズムの解明が促進されることが期待される。一方、そのような遺伝子多型の臨床応用により、事前に依存性物質感受性を予測して個々人の体質に合わせた早期からの適切な治療を行うなど、個別化疼痛治療や個別化依存症治療の発展が加速すると考えられる。

要 約

モルヒネ及びフェンタニル等のオピオイドは強力な鎮痛薬としても広く利用されているが、一方でその報酬・依存作用により用法・用量によっては依存症の原因となり得る。従って、オピオイド感受性の個人差に関係する遺伝要因は、薬物依存症を含め物質依存症脆弱性の個人差にも寄与する可能性が示唆される。

実際、筆者らはこれまでの探索的な研究において、オピオイド受容体の下流の重要なエフェクター分子である、Gタンパク質活性化型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネル遺伝子*GIRK2*及び*GIRK3*の遺伝子多型が、開腹手術後におけるオピオイド鎮痛薬感受性と有意に関連することを見出したが¹⁵⁾、その遺伝子多型の中には、覚せい剤依存症脆弱性と有意な関連を示すものも認められた。

さらに演者らは近年、主に美容目的で下顎形成術を施術予定であり、かつ依存症等の疾患及び慢性疼痛下でない健常者を対象としてオピオイド鎮痛薬感受性に対するゲノムワイド関連解析 (GWAS) も行い、最有力候補となるrs2952768多型を同定した。この多型に関しては、開腹術症例においても同様の関連性が再現され、また、覚せい剤依存、アルコール依存、及び摂食障害等の様々な物質依存症患者において重症度との関連を示し、さらに健常者においてはパー

ソナリティの質問紙である TCI (Temperament and Character Inventory) の報酬依存 (Reward Dependence: RD) のスコアとの関連も認められた¹⁹⁾。

このような基礎研究により得られた知見を臨床の現場に応用することにより、個々人の体質に合わせた個別化疼痛治療及び個別化薬物依存症治療が加速するものと期待される。

文 献

- 1) Sora, I., Elmer, G., Funada, M., Pieper, J., Li, X. F., Hall, F. S. and Uhl, G. R.: μ Opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential *in vivo* μ receptor reserve. *Neuropsychopharmacology*, 25: 41-54, 2001.
- 2) Hall, F. S., Sora, I., Uhl, G. R.: Ethanol consumption and reward are decreased in μ -opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 154: 43-49, 2001.
- 3) Hall, F. S., Goeb, M., Li, X. F., Sora, I., Uhl, G. R.: μ -Opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 121: 123-130, 2004.
- 4) Contarino, A., Picetti, R., Matthes, H. W., Koob, G. F., Kieffer, B. L. and Gold, L. H.: Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 446: 103-109, 2002.
- 5) Berrendero, F., Kieffer, B. L., Maldonado, R.: Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in μ -opioid receptor knock-out mice. *J. Neurosci.*, 22: 10935-10940, 2002.
- 6) Shen, X., Purser, C., Tien, L. T., Chiu, C. T., Paul, I. A., Baker, R., Loh, H. H., Ho, I. K. and Ma, T.: μ -Opioid receptor knockout mice are insensitive to methamphetamine-induced behavioral sensitization. *J. Neurosci. Res.*, 88: 2294-2302, 2010.
- 7) Blednov, Y. A., Stoffel, M., Alva, H., Harris, R. A.: A pervasive mechanism for analgesia: activation of GIRK2 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 277-282, 2003.
- 8) Marker, C. L., Cintora, S. C., Roman, M. I., Stoffel, M., Wickman, K.: Hyperalgesia and blunted morphine analgesia in G protein-gated potassium channel subunit knockout mice. *Neuroreport*, 13: 2509-2513, 2002.
- 9) Marker, C. L., Stoffel, M., Wickman, K.: Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. *J. Neurosci.*, 24: 2806-2812, 2004.
- 10) Marker, C. L., Lujan, R., Loh, H. H., Wickman, K.: Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of μ - and δ - but not κ -opioids. *J. Neurosci.*, 25: 3551-3559, 2005.
- 11) Mitrovic, I., Margeta-Mitrovic, M., Bader, S., Stoffel, M., Jan, L. Y. and Basbaum, A. I.: Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and α -adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 271-276, 2003.
- 12) Morgan, A. D., Carroll, M. E., Loth, A. K., Stoffel, M., Wickman, K.: Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 28: 932-938, 2003.
- 13) Nishizawa, D., Nagashima, M., Katoh, R., Satoh, Y., Tagami, M., Kasai, S., Ogai, Y., Han, W., Hasegawa, J., Shimoyama, N., Sora, I., Hayashida, M. and Ikeda, K.: Association between *KCNJ6* (*GIRK2*) gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal

- surgery. *PLoS One*, 4: e7060, 2009.
- 14) Torrey, E. F., Webster, M., Knable, M., Johnston, N., Yolken, R. H.:The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophr. Res.*, 44: 151-155, 2000.
 - 15) 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.J., Naruse, N., Uehara-Aoyama, K., Itokawa, M., Koga, M., Arinami, T., Kaneko, Y., Hayashida, M. and Ikeda, K.:Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Mol. Psychiatry*, 19: 55-62, 2014.
 - 16) Cloninger, C. R., Svrakic, D. M., Przybeck, T. R.:A psychobiological model of temperament and character. *Arch. Gen. Psychiatry*, 50: 975-90, 1993.

第2章 病理・病態生理

病態生理 1. 神経科学

要旨

アルコールは報酬効果を持つことで依存症を引き起す。また、睡眠、痛覚、認知、運動制御など、さまざまな脳神経機能に影響する。アルコールは γ -アミノ酪酸（GABA）受容体チャネルやGタンパク質活性化型内向き整流性カリウム（GIRK）チャネルを開口させ、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体チャネルを阻害する。このほか、さまざまな酵素の活性に影響して、細胞内シグナル伝達を変化させ、神経細胞の形態や神経新生に影響する。

はじめに

アルコールは脳神経系に作用し、さまざまな脳神経機能に影響する。アルコールの脳神経系への作用機序を知ることは、アルコール依存症を理解するうえで重要な基盤である。本稿では、着々と進む脳科学、ゲノム科学、オミックス解析などの最近の成果を交えて、アルコール依存症の神経科学を概説する。

アルコールの脳神経機能への影響

アルコールは血中濃度0.1%ほどの低濃度では、多幸感や判断力の低下を引き起す。0.1~0.4%ほどの中程度の血中濃度では、抑制の喪失、歩行障害、言語障害、易刺激性の亢進が見られる。0.4%を超える高濃度では、昏睡や死に至る。また、慢性的にアルコールを摂取すると、精神依存や身体依存が形成され、急に飲酒をやめると離脱症状が現れる。このようなアルコールの急性効果と慢性効果の多くは、アルコールの脳機能への影響によるものである。これらのアルコールの効果には大きな個人差があり、アルコール代謝酵素の活性の個人差が大きく影響している。アルコールは、アルコール脱水素酵素により

● キーワード

GABA受容体チャネル
NMDA受容体チャネル
GIRKチャネル
報酬系
シナプス

アセトアルデヒドになり、アセトアルデヒドはアセトアルデヒド脱水素酵素により酢酸になり、排泄される。日本人では約半数でアセトアルデヒド脱水素酵素 2 が半減あるいは機能しておらず、アルコールの作用よりもアセトアルデヒドによる不快感などが強く現れる。アルコール脱水素酵素 1B についても低活性型、活性型、高活性型の 3 群に分かれるので、低活性型ではアルコールが長く生体内にとどまることで、アルコールの効果が強く現れる。また、最近ではアルコールの脳神経系への作用と遺伝子配列との関連解析や遺伝子組換え動物におけるアルコール作用の解析などにより、代謝酵素以外のさまざまな分子がアルコール依存症と関係していることが明らかになってきた。

脳神経系のアルコール標的分子

アルコールはさまざまな脳機能に影響することから、長らくアルコールには特異的な標的は無く、神経細胞の細胞膜の流動性に影響していると考えられてきた。しかしながら、膜の流動性に影響するアルコール濃度よりも、低濃度で特定のタンパク質の機能に影響することが次々と明らかになってきた。

γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体チャネルはアルコールの主要な標的である²⁾。GABA 受容体チャネルには α , β , γ , δ , ρ の 5 つのサブユニットが知られており、 α サブユニットには、 α_1 から α_6 の 6 種類、 β サブユニットには β_1 から β_4 の 4 種類、 γ サブユニットには γ_1 から γ_3 の 3 種類、 δ サブユニットと ρ サブユニットは 1 種類ずつが存在する。GABA 受容体チャネルはベンゾジアゼピン系やバルビツール酸系の睡眠薬や抗不安薬の主要標的であり、これらの薬物と同様、アルコールも GABA 受容体チャネルを作動することにより、睡眠誘導、抗不安作用を引き起すと考えられる。また、これらの薬物が精神依存および重度の身体依存を引き起すことから、アルコール依存症発症においても、アルコールによる GABA 受容体チャネルの活性化が、中心的な役割を果たしていると考えられている。アルコールによる GABA 受容体チャネルの活性化が報酬効果をもたらすメカニズムとして、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞 (DA) を通常抑制している抑制性ニューロンがアルコールにより抑制されて、脱抑制により DA が興奮し、側坐核でドーパミンが放出されると考えられている (図 1)。

図1 アルコールの報酬効果の概念図

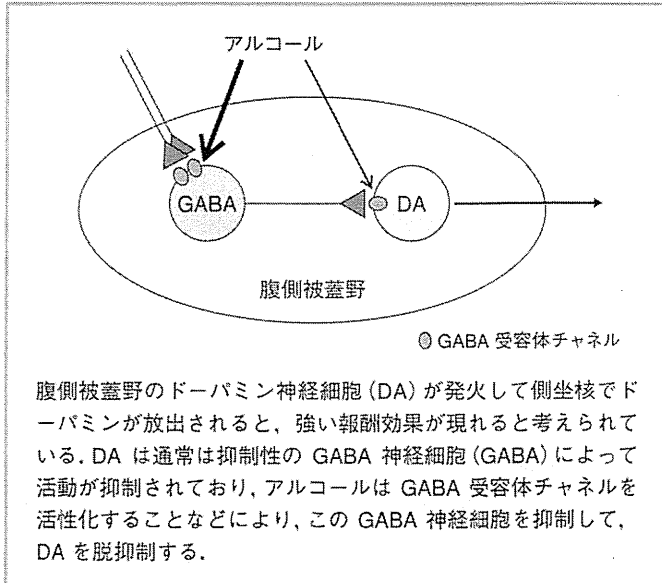
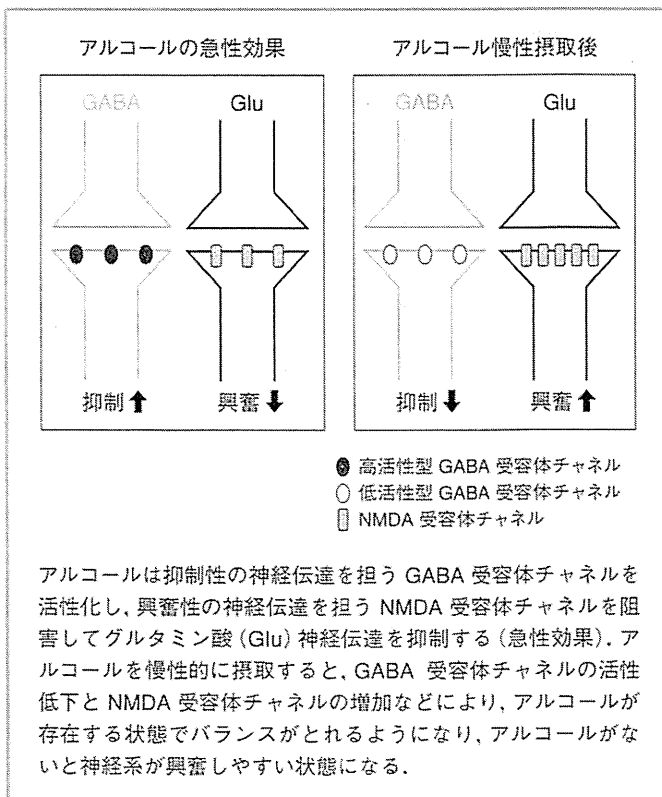


図2 神経伝達におけるアルコールの急性効果と慢性効果



GABA 受容体チャネルを人為的な変異によって高活性型にすると、側坐核の活動が上昇し、マウスがアルコールをより好むようになる³⁾。これは、GABA 受容体チャネルの β_1 サブユニットの L285R と P228H という 2 ヶ所の変異のいずれの場合にも観察される。

グルタミン酸は、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体チャネル、非 NMDA 型受容体チャネル、および代謝型グルタミン酸受容体に作用して主要な興奮性神経伝達を担う。アルコールが NMDA 受容体チャネルを阻害することも示されている⁴⁾。乱用薬物であるフェンサイクリジンは NMDA 受容体チャネルの阻害薬であり、側坐核における細胞外ドーパミン量を上昇させることから⁵⁾⁶⁾、NMDA 受容体チャネルの阻害はアルコールによる側坐核における細胞外ドーパミン量の上昇のメカニズムの1つとしても考えられている。

アルコールの急性効果は、GABA 受容体チャネルの活性化により神経細胞が抑制され、NMDA 受容体チャネルの阻害により神経細胞が興奮することなどによると考えられる (図2)。