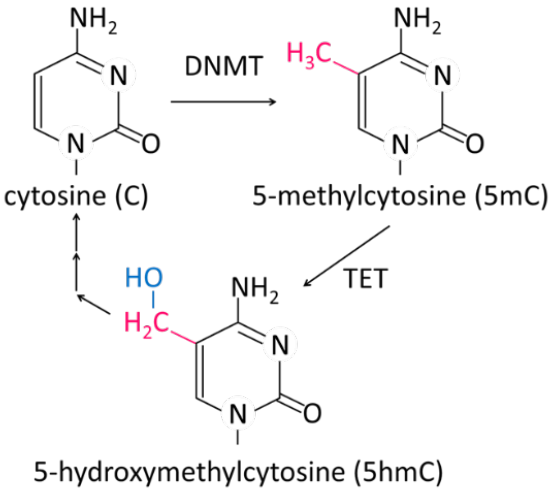
10	*SHATI/NAT8L*遺伝子修飾の覚醒剤依存形成に対する影響	新田　淳美

【目的】芸能人や元スポーツ選手、あるいは社会的地位のある政治家や医師が覚醒剤や大麻を使用する薬物事犯が頻繁に報道され、薬物乱用に対する国民からの注目度は非常に高く、啓蒙活動が活発になされながらも、覚醒剤・大麻の乱用問題は引き続き残っている（図）。乱用薬物依存を疾病として捕らえ、予防・治療法の確立を目指すことが、我々、薬学研究者の責務となることが近い将来に予想される。今までにも、乱用者の多くで観察される遺伝子変異について報告されているが、それらの経過を予防に活用するには至っていない。特定のがんの治療と同様に乱用薬物依存になった人が特定遺伝子に変異があることが明確になれば、薬物乱用予防に対して新たな啓蒙活動につながる。その因果関係を明確にすることができれば、早期より薬物乱用防止への徹底した教育を施すことが可能となる。我々は、覚醒剤の 1 つであるメタンフェタミンをマウスに投与した時に発現量が増加する分子である SHATI/NAT8L に着目し、そのプロモーター部位での遺伝子修飾の変化を検討し、薬物乱用に陥る可能性の高いヒトを検出する方法を確立し、科学的で確実な薬物乱用治療・防止政策につなげたいと考えている。

【方法】1. 覚醒剤乱用者の遺伝子については、東京都医学総合研究所が現有している覚醒剤乱用患者の遺伝子を使用した（承認番号 17-43）。2. 遺伝子修飾については、*SHATI/NAT8L* のプロモーター部位でのメチル化の検討を行った。バイサルファイト処理を行った。PCR プライマーは reverse 側にビオチン化プライマーを使用した。3. PyroMark を用いて、パイロシークエンス法にて実施した。

【結果】覚醒剤使用者 193 名（平均年齢 37.4±0.88 歳）および健常者 60 名（同 50.55±2.49 歳）の血液から抽出した DNA を使用した。翻訳開始点から下流へ 1,480 番から 1,714 番目の CpG サイトのメチル化を測定した。その結果、-1700、-1532、-1509、-1492、-1482、-1480 の DNA メチル化が増加していることが分かった。これらの結果から、覚醒剤使用者の遺伝子では、SHATI/NAT8L の発現が減少していることが示唆される。覚醒剤乱用との関連が深いと考えられている Shati/Nat8l の生理機能の良質な抗体を得ることができず、SHATI/NAT8L の発現量を直接的に測定できない現状では、本遺伝子修飾を指標として、乱用者や乱用可能性の高い患者を検出するための方法に大きく前進したと考えられる。

DNA のメチル化



10. *SHATI/NAT8L* 遺伝子修飾の覚醒剤依存形成に対する影響

新田　淳美

*富山大学 大学院医学薬学研究部 薬物治療学研究室

Key words：Shati/Nat8l，ヒト DNA，覚醒剤乱用，メチル化，パイロシークエンス法

緒　言

我々は、覚醒剤を連続投与されたマウス脳で発現量が増加している分子として、Shati/Nat8l を見いだしている。本分子は、覚醒剤依存や精神活動との深い関係を示唆する多くの研究成果が報告されている。一方、芸能人や元スポーツ選手が覚醒剤や大麻を使用する薬物事犯が頻繁に報道され、薬物乱用に対する国民からの注目度は非常に高い。我が国では、戦後から今世紀初頭までの約 50 年間にわたり、覚醒剤が反社会勢力団体の資金源であったことから、「覚醒剤・大麻」＝悪＝さらに重要な犯罪につながる」と図式化され、国民も同様に受け止めている。現在では、政府関係機関の力強い政策のおかげで、反社会的勢力の多くは一掃されたが、覚醒剤・大麻の乱用問題は引き続き残っている（図 1）。海外では大麻成分の使用が合法となった地域が出現したことから、それらが入り口となって、まったく普通に生活をしている社会人・学生等が覚醒剤を使用している事例が多くなった。今までは、『覚醒剤・大麻＝悪』で処理されてきた問題であるが、最近の精神科の診断基準では、物質依存（薬物依存を含む）は、精神疾患の 1 つととらえられている。乱用薬物依存を疾病として捕らえ、予防・治療法の確立を目指すことが、我々、薬学研究者の責務となることが将来的に予想される。今までにも、乱用者の多くで観察される遺伝子変異について報告されているが、それらの経過を予防に活用するには至っていない。薬物依存になった人が特定遺伝子の修飾があることが明確になれば、薬物　乱用予防に対して新たな啓蒙活動につながる。その因果関係を明確にすることができれば、早期より薬物乱用防止への徹底した教育を施すことが可能となる。我々は、薬物依存と関連が深いことが数多く報告されてきている *SHATI/NAT8L* 遺伝子修飾について、覚醒剤使用患者のヒト DNA を用い、そのプロモーター部位での薬物乱用に陥る可能性の高いヒトを検出する方法を確立し、科学的で確実な薬物乱用治療・防止政策につなげたいと考え研究を行った。Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse（JGIDA）によって、東京都医学総合研究所に集積された覚醒剤使用患者の血液から単離した DNA を用い、パイロシークエンス法で *SHATI/NAT8L* 遺伝子のプロモーター部位を解析したところ、メチル化が有意に増加していた［1］。

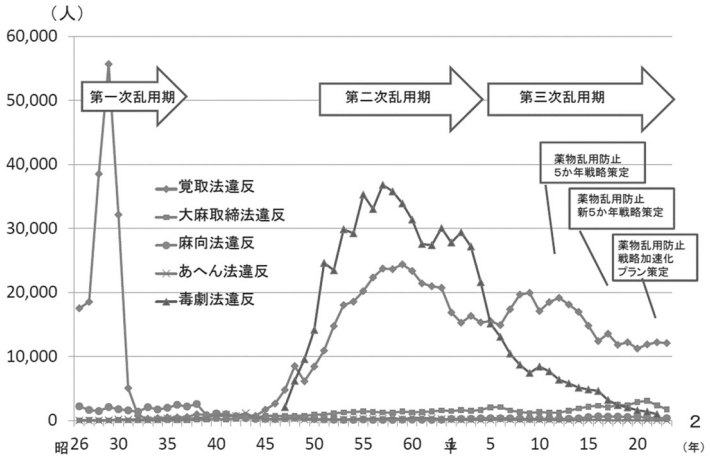


図 1. 薬時犯罪検挙者数の経緯
厚生労働省ホームページより

*現在の所属：富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 薬物治療学研究室

方　法

1.　被験者およびDNAの単離

本研究の被験者は、メタンフェタミン使用者 193 名と健常者 60 名である。これらの被験者は、Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse（JGIDA）に所属する医療機関によって集められ、非連結匿名化を行った［2，3］。採取された血液から単離された DNA は、Tris-EDTA 中で保管した。

2.　バイサルファイト処理

DNA のバイサルファイト処理は Epitec Fast DNA Bisulfite Kit（Quiagen 社）を用いて行った。その後、PCR Thermal Cycle Dice Gradient（Takara 社）を用いて、増幅を行った。

3.　パイロシークエンス法

以下の配列のプライマーを用いて、バイサルファイト処理を行った DNA の *SHATI/NAT8L* 遺伝子のプロモーター部位の遺伝子配列を解析した。数字は翻訳開始点からの塩基数を示している。

5'-GGAGTATGTGGGATTTTTAAAGATTA-3' and 5'-AAAAAAACAAAATACC TTCCAACAATTACC-3' as primers for the CpG sites from the transcription start sites（TSSs）-1714, -1700, and -1696 bp（upstream and downstream）

5'-GGGTAATTGTTGGAAGGTATT-3' and 5'- CCCCCTCAATATCTAAAACC-3' as primers for the CpG sites from the TSSs -1532, -1509, -1492, -1482, and -1480 bp（upstream and downstream）

増幅後、PyroMarkQ24 を用い、以下の配列のビオチン化プライマーを用いて、解析を行った。

5'-AGAGATATTTGAGTATAGGGTTTTAGT-3' as the primer for CpG sites from TSSs -1714, -1700, and -1696 bp

5'-ATTTTTGGTGAATTTAGGAG-3' as the primer for CpG sites from TSSs -1532,-1509, -1492, and -1480 bp

4.　統計処理

覚醒剤使用患者と健常者の 2 群間について、各 CpG サイトのメチル化の割合を Student's *t*-test で検定を行った。Cohen's-d によって、effect size の検定を行った。Cohen's-d によって、effect size が small（d = 0.2）、medium（d = 0.5）および large（d = 0.8）に分類し、ROC 曲線解析を行った。

結　果

1. DNA メチル化の割合

メタンフェタミン使用者と健常者の血液から単離した DNA の間での *SHATI/NAT8L* のプロモーター領域のメチル化の程度を比較した。表 1 に結果を示す。健常者およびメタンフェタミン使用者血液から単離した DNA では、*SHATI/NAT8L* のプロモーター領域の中の 6 つの CpG サイトで DNA メチル化の割合が増加していた。翻訳開始点を 0 として、-1700（p = 0.00042, t = 3.57）、-1532（p = 0 .0077, t = 4.77）、-1509（p = 0.00016, t = 6.32）、-1492（p = 0.0067, t = 4.81）、-1482（p = 0.043, t = 2.04）、-1480（p = 0.036, t = 2.11）bp であった。

考　察

本研究では、メタンフェタミン使用者の DNA において、*SHATI/NAT8L* のプロモーター領域でのメチル化が増加していることを示した。193 名の覚醒剤使用者の DNA を用いた本研究の実施は、非常に貴重なものであり、その研究成果は、意義深いものである。Shati/Nat8l については、マウスを用いた実験結果から、薬物依存との関連が示唆されている［4，5］。ヒト DNA を用いて、メタンフェタミン使用者との関連を示した本研究成果は、今後の薬物依存関連研究に貢献できるものである。

我々は、メタンフェタミンを投与されたマウス脳や血液における *Shati/Nat8l* プロモーター領域の CpG 領域でのメチル化の割合を報告している［6］。マウスの脳・側坐核の組織中から単離した DNA において、生理食塩水投与マウスと比較して、メタンフェタミンを投与したマウスは *Shati/Nat8l* プロモーター領域での CpG 領域でメチル化が

減少していた。つまり、マウスの脳・側坐核の DNA を使用した研究と、ヒト血液の DNA を使用した場合では、*Shati/Nat8l* プロモーター領域でのメチル化の割合が、前者では減少し、後者では増加し、結果が一致しなかった。マウスを用いた実験では、他の脳部位や血液から単離した DNA では *Shati/Nat8l* プロモーター領域でのメチル化の程度に変化がなかった。ヒトとマウスでは、プロモーター部位の塩基配列が異なること、血液と脳組織から単離した DNA の相関が不明なこと、また、ヒト DNA は血液以外から採取することができないことから、結果を容易には比較できない。

遺伝子修飾を指標として、覚醒剤使用の有無や、将来的な可能性を示すことができれば、啓蒙活動による乱用防止や薬事犯罪の防止にも繋がると考えられる。

表 1. 健常者とメタンフェタミン使用者 DNA における SHATI/NAT8L プロモーター領域のメチル化の割合

		subjects		*p*	*df* value	*t*	Cohen's d effect size
		Healthy subjects	**METH users**				
CpG site (position from the transcription start site)	**-1714**	77.9±0.97	77.9±0.30	0.97	248	0.038	0.006
	-1700	50.0±0.27	51.3±0.18***	0.0004	248	3.57	0.56
	-1696	32.7±0.27	33.3±0.19	0.072	248	1.81	0.29
	-1532	33.6±0.33	35.5±0.19**	0.007	243	4.77	0.75
	-1509	35.8±0.23	37.4±0.12***	0.0002	243	6.32	0.96
	-1492	42.0±0.36	43.9±0.19**	0.0067	240	4.81	0.72
	-1482	46.8±0.39	47.8±0.34*	0.043	128	2.04	0.37
	-1480	29.8±0.29	30.7±0.26*	0.036	128	2.11	0.38

各データは平均±標準偏差で表している。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

共同研究者・謝辞

本研究は、公益財団法人東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野長依存性物質プロジェクトリーダー池田和隆参事研究員、西澤大輔主席研究員ならびに JGIDA との共同研究である。

文　献

1) Yuka K, Nishizawa D, Hasegawa J, Uno K, Miyanishi H, Ujike H, Ozaki N, Inada　T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Yamada M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Ikeda K, Nitta A. A single medical marker for diagnosis of methamphetamine addiction - DNA methylation of SHATI/NAT8L promoter sites from patient blood. Curr Pharm Des. 2020;26（2):260-264. DOI: 10.2174/1381612826666200110111703.

2) 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 MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama 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. Mol Psychiatry. 2014 Jan;19（1):55-62. Epub 2012 Nov 27. PMID: 23183491; DOI: 10.1038/mp.2012.164.

3) Ujike H, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Sora I, Iyo M, Katsu T, Nomura A, Nakata K, Ozaki N. Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. Pharmacogenomics J. 2003;3（4):242-7. PMID: 12931138 DOI: 0.1038/sj.tpj.6500189

4) Niwa M, Nitta A, Mizoguchi H, Ito Y, Noda Y, Nagai T, Nabeshima T. A novel molecule "shati" is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. J Neurosci. 2007 Jul 11;27（28):7604-15. PMID: 17626222 DOI: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1575-07.2007

5) 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. 2014 Aug;17（8):1283-94. Epub 2014 Feb 24. DOI: 10.1017/S146114571400011X

6) Uno K, Kikuchi Y, Iwata M, Uehara T, Matsuoka T, Sumiyoshi T, Okamoto Y, Jinno H, Takada T, Furukawa-Hibi Y, Nabeshima T, Miyamoto Y, Nitta A. Decreased DNA methylation in the Shati/Nat8l promoter in both patients with schizophrenia and a methamphetamine-induced murine model of schizophrenia-like phenotype. PLoS One. 2016 Jun 27;11（6): e0157959. PMID: 27348532 DOI: 10.1371/journal.pone.0157959