

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19278

研究課題名(和文)乱用薬物のLong Interspersed Element 1転移機構の解析

研究課題名(英文)Long interspersed element-1 retrotransposition induced by abuse drugs

研究代表者

奥平 准之(OKUDAIRA, Noriyuki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：10635585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノム解読以降、ジャンク配列とされてきたtransposable遺伝子(転移遺伝子)の機能解明に様々な分野から注目が集まっている。中でも、1細胞中に約52万コピー(全ゲノムの約17%)存在するLong Interspersed Element-1(LINE-1以下L1)は特徴的で、80-100コピーは正常細胞中でも転移機能を有している(retrotransposition以下RTP)。L1-RTP誘導のメカニズムは不明な点が多く、疾患発症との繋がりも指摘されている。本研究では、社会問題化している乱用薬物の依存形成にL1が関与している可能性を考え、薬物とL1-RTP誘導能を解析した。

研究成果の概要(英文)：The human genome consists of interspersed repeats, sequences that mark the long-standing activities and high preservative quality of mobile DNA. Long interspersed element-1 (LINE-1 or L1), a highly active autonomous retrotransposon (RTP), is the most abundant endogenous retroelement in humans accounting for approximately 17% of the human genome, approximately 10% of which are "hot L1" copies primed for jumping within the genome. The aim of this study was to identify the mechanism by which abuse drugs induce L1-RTP. We found that methamphetamine, cocaine, morphine, fentanyl and imipramine induced L1-RTP. Results revealed that imipramine induced L1-RTP in neuronal cell lines. This effect was found to be reverse transcriptase-dependent, but not accompanied by the induction of double-strand breaks. Overall, L1-RTP induced by abuse drugs is a novel type of genomic instability, and analysis of this phenomenon might be a novel approach to elucidate the mechanism of substance-use disorders.

研究分野：ゲノム医化学

キーワード：LINE-1 ゲノム不安定性 乱用薬物 レトロエレメント

## 1. 研究開始当初の背景

世界の先進国で薬物乱用は、犯罪に結びつく可能性や若者の精神発達を妨げることが指摘され社会問題となっている。また、職場環境等による精神的ストレスからうつ病や統合失調症患者、アルコール中毒者も増加傾向にある。実際、法医学の現場でも、ご遺体から覚せい剤等の薬物を検出する事例が増加している。また、薬物乱用者による交通事故などの犯罪事例も増加している。このような薬物の薬理作用は、広く世界でも行われているが、ゲノムへの影響については明らかにされていない点が多い。

これまでの生命科学研究は、主として蛋白質をコードする遺伝子とその機能解析が行われてきた。2001年にヒトゲノムの全配列が発表され、ヒトゲノム全配列中の蛋白質をコードする領域は約1%にすぎず、「動き回り得る遺伝子」(TP 遺伝子: トランスポゾン)が半分近くを構成している事が明らかになった(*Nature* 409, 860-921, 2001)。中でも1細胞中に約52万コピー(全ゲノムの約17%)存在する Long Interspersed Element-1 (LINE-1 以下 L1) は特徴的で、80-100 コピーは正常細胞中でも転移機能を有している (retrotransposition 以下 RTP) (*PNAS* 100, 5280-5285, 2003)。L1 をはじめとするレトロエレメントは、個人によって様々な場所に点在していることから、個人識別の領域でも着目されている。L1 は ORF1 と ORF2 の2つの蛋白質から構成され、全長は約6kb である(図1A)。L1 はヒトとチンパンジーが分かれる4000 万年以上前から、1つの遺伝子として維持されてきた。650 万年前にヒトとチンパンジーが分かれた後、チンパンジーでは複数のグレードに分岐し、ヒトでは1つの遺伝子として保存されてきた。さらにヒト L1 全体の30%が機能性発現に必要な約6 kb であるのに対して、チンパンジーL1 の90%以上は1 kb 以下に変化している(図1B) (*Gene* 390, 18-27,

2007)。L1 が生物進化の過程に関与していることも指摘されており、ヒトの高度な脳機能獲得に関与している可能性も高い。近年の研究によって、ヒト海馬組織中の L1 コピー数が増加していることや、神経幹細胞がニューロン等の細胞に分化する際に L1-RTP が誘導されることが明らかになった(図1C)。さらに、統合失調症の発症にも L1 の活性化が関与していることが報告された(*Neuron* 81, 306-13, 2014)。このように、L1 の動きが中枢神経系(CNS)機能に連関している可能性が考えられる。また、L1 の RTP 誘導(L1-RTP)によって、Interferon- $\beta$  産生を介した組織傷害が誘発されることが報告され(*Cell* 134, 587-598, 2008)、CNS でも L1 による機能異常の誘発が考えられる。

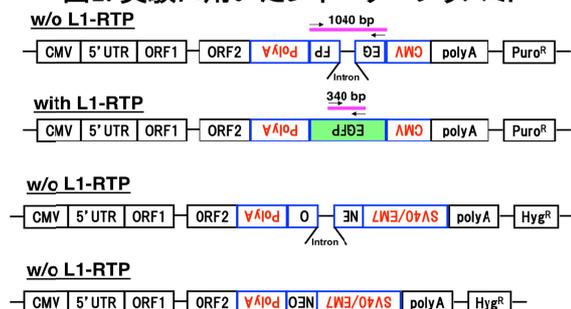
## 2. 研究の目的

L1 は、様々な疾患発症に関与することが報告されており、中枢神経疾患にも影響している。乱用薬物によって、海馬でランダムな L1-RTP が誘導されることで記憶形成機能の攪乱が起こり、精神障害を誘発する可能性がある。そこで、本研究では様々な乱用薬物の L1-RTP 誘導機序を細胞レベルで検証し、CNS 機能異常に L1 が関与するの否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

L1-RTP を検証するレポータープラスミド(L1-neoR)を培養細胞に導入後(図1)、薬物や siRNA を作用させて、薬物の L1-RTP 機序を解析する。培養細胞には、SH-SY5Y (ヒト神経芽細胞腫)、SK-N-SH (ヒト神経芽細胞

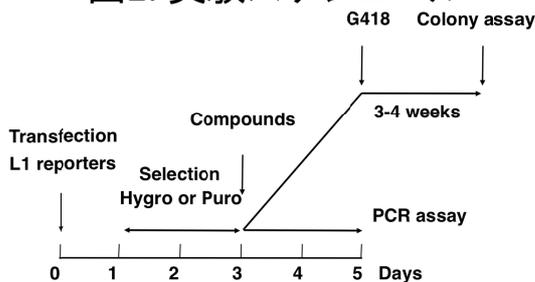
図1. 実験に用いたレポータープラスミド



腫) PC12 (ラット褐色細胞腫) HeLa (ヒト子宮頸癌) HuH-7 (ヒト肝臓癌) を用いた。SH-SY5Y の培養液は、EMEM + F-12 + 非必須アミノ酸カクテルに 15% 牛血清で、37 5%CO<sub>2</sub> で培養した。SK-N-SH と PC12 は、DMEM に 10% 牛血清で、37 5%CO<sub>2</sub> で培養した。細胞へのプラスミド導入には、リポフェクタミン 2000 を使用し、siRNA の導入には RNAiMAX を用いた。

L1-RTP 解析は、L1-neoR を培養細胞に導入後に hygromycin 50 µg/ml で薬剤選択を行った後、10cm プレートに 1×10<sup>5</sup> 個ずつ細胞を播種し、薬物を添加した (図 2 に実験スケジュールを示した)。その後、ネオマイシンで L1-RTP を誘導した細胞を選択的に培養する。コロニー形成後に、アルコール固定しメチレンブルーで染色してコロニーをカウントした。アッセイは N=6 で行った。

図2. 実験スケジュール



タンパク質解析には、ウエスタンブロット解析を用いた。RIPA beffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.5 % deoxycholic acid, 1 % NP-40) にプロテアーゼ阻害剤を添加し、細胞抽出液を作成した。リン酸化タンパク質解析の場合は、phosphatase 阻害剤も添加した。細胞抽出液は、タンパク定量後に SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した後、抗体反応を行い検出した。細胞染色は、細胞を 1%パラホルムアルデヒドで固定後に 5 %牛アルブミン (TBST: 20 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 0.1 %

TritonX-100) でブロッキング後、1 次抗体を -H2AX、2 次抗体を Alexa555 で染色し、核染色にはヘキストを用いた。観察には、蛍光顕微鏡を用いた。

統計解析は、ノンパラメトリック法の U-検定を用いた。P 値 0.05 以下を有意差有りとした。

#### 4. 研究成果

これまでに、私たちは、乱用薬物としてメタンフェタミンとコカインは MAPK 下流の転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) 依存的に L1-RTP を誘導し、DSB には依存しないことを報告した (2014 年)。一方で、エタノールとバルビツール酸ナトリウムは、L1-RTP を誘導しなかった。

2015 年以降は、クエン酸フェンタニル、モルヒネ、イミプラミン、ハロペリドールについて L1 との関連性を実験した。まず、上記 4 つの L1-RTP 誘導能について、解析した。その結果、クエン酸フェンタニル、モルヒネ、イミプラミン、ハロペリドールは L1-RTP は神経細胞で L1-RTP を誘導した (図 3)。しかし、神経細胞以外の HuH-7 や HeLa 細胞では、いずれも L1-RTP を誘導しなかった。また、L1-RTP が誘導される際の、L1 の mRNA の増減有無を解析した。図 4 のようにレポータープラスミドの逆向き CMV プロモーターを欠損させたプラスミドを導入した後に、モルヒネとクエン酸フェンタニルを作用させ

図3. モルヒネとクエン酸フェンタニルはL1-RTPを誘導する

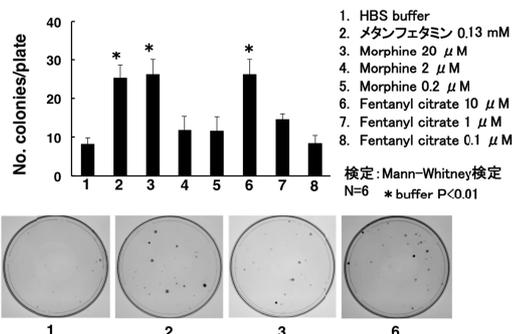
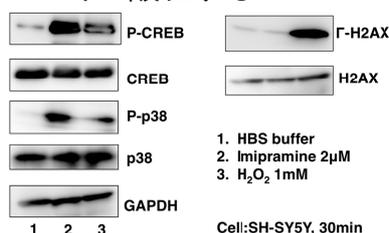


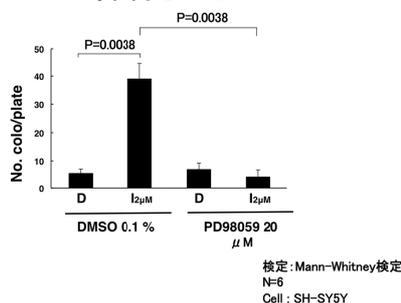


図8. ImipramineはMAPK関連因子をリン酸化する



そこで、MAPK の阻害剤でイミプラミンの L1-RTP が抑制されるのか否か実験を行った。実験の結果、MAPK の阻害剤でイミプラミンの L1-RTP は抑制された (図 9)。

図9. MAPK阻害剤でIMPのL1-RTPは抑制される



以上のことから、イミプラミンの L1-RTP には、NR2A と MAPK が関与することが示唆された。

本研究では、様々な乱用薬物のゲノム不安定機構を解析してきた。覚せい剤、コカイン、モルヒネ、クエン酸フェンタニル、イミプラミンは L1-RTP を神経細胞特異的に誘導することが示唆された。一方で、エタノールとバルビツール酸は L1-RTP を誘導しなかった。また、化合物の種類によって、L1-RTP を誘導する際の宿主側因子の違いがあることも新規の知見となった。共通するシグナルとして、MAPK の活性化を伴い L1-RTP の誘導を行うことが本研究では示唆された。

本研究では、乱用薬物の薬物依存とヒト内在性レトロエレメントの関連性を明らかにすることを目的としていたが、薬物依存と

レトロエレメントとの関連までは、明らかにすることはできなかった。しかし、少なくとも、依存性薬物の一部にはゲノムに内在しているレトロエレメントを活性化させ、ゲノム不安定性を誘導することが示唆された。このようなゲノム不安定性から突発的に中枢神経系関連遺伝子群や転写ネットワークに変異が生じ、薬物依存状態になる可能性も考えられる。薬物依存のメカニズムについて、今後は動物実験も加えて研究を行いたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H, Sakagami H. Morphine and Fentanyl Citrate Induce Retrotransposition of Long Interspersed Element-1. In Vivo. 30, 113-118, 2016 査読有り . <http://iv.iiarjournals.org/content/30/2/113.full.pdf+html>

[学会発表](計4件)

1. 奥平准之、西口美紀、主田英之、大塚洋輔、西尾元、鎮痛薬の Long Interspersed Element 1 転移機構、第 99 回日本法医学会、高知 (高知市文化プラザ かるぼーと)、2015 年 6 月 11 日
2. 奥平准之、坂上宏. Analysis of long interspersed element 1 Retrotransposition in various drugs、第 89 回日本薬理学会年会、横浜 (パシフィコ横浜)、2016 年 3 月 11 日

3. 奥平准之、坂上宏. Involvement of long interspersed element 1 Retrotransposition induced by imipramine. 第 90 回日本薬理学会年会、長崎（長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホールアストピア）、2017 年 3 月 16 日

4. 奥平准之 体細胞における LINE-1 レトロトランスポジションの転移機構、日薬レトロポゾン研究会、東京（日本薬科大学お茶の水キャンパス 1 号館）、2017 年 3 月 25 日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥平 准之 (OKUDAIRA, Noriyuki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：10635585

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし