

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21542

研究課題名(和文) 青年期ニコチン慢性曝露によるアルコール飲酒増加に対する分子機構と薬物治療薬の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and search for medication for increased alcohol drinking after adolescent chronic nicotine treatment

研究代表者

黒川 和宏 (Kurokawa, Kazuhiro)

国際医療福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：30454846

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)：喫煙者は、アルコール(EtOH)依存と診断される確率が、非喫煙者よりも大きいことが報告されている。本研究では、青年期にニコチン慢性処置した動物を用いて、EtOH誘発報酬効果形成およびEtOH自発摂取量におけるL-type Cav1 channelsの関与について検討を行った。その結果、青年期にニコチン曝露歴があるとEtOH誘発報酬効果の亢進ならびにEtOH自発摂取の増加が認められ、その増加機構には側坐核領域のdopamine D1 receptor陽性神経細胞におけるL-type Cav1.2 channelsの活性化が深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nicotine and Ethanol (EtOH) have been frequently reported to be co-abused in humans. It is reported that smoker are more likely to be diagnosed with alcoholism than non-smokers. In this study, we investigated the involvement of L-type Cav1 channels in EtOH-induced place preference and EtOH intake using animals chronically treated with nicotine in adolescence. These results suggest that the facilitated EtOH-induced place preference and EtOH intake, when nicotine exposure history existed in adolescence, is due to up-regulated L-type Cav1.2 channels in dopamine D1 receptor-expressing nucleus accumbens neurons.

研究分野：神経薬理学

キーワード：喫煙 アルコール依存症 L型カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

アルコール (EtOH) 依存症と診断される患者の約 90% は、喫煙者およびニコチン依存者である。また、EtOH 依存の発症率は、非喫煙者と比べて喫煙者は 2~3 倍高いことが報告されている (Grant BF et al. Arch. Gen. Psychiatry, 2004)。さらに、ニコチンの反復投与後、EtOH の自発摂取を増加させることが報告されている (Blomqvist O et al. Eur. J. Pharmacol., 1996)。一方、日本における喫煙者数は減少にあるが、青年期である中高生の喫煙率は依然として高い数値を示している。

EtOH および nicotine の依存には、中脳辺縁 dopamine 神経系が重要な役割を果たしていることが知られており、特にこの dopamine 神経系の投射先である側坐核領域の神経細胞の活性化により依存が生じると考えられている。しかしながら、青年期のニコチン曝露により、EtOH の依存形成にどのような影響を及ぼすか否かならびにその詳細な細胞内情報伝達機構についてはほとんど明らかになっていない。

これまでに本研究申請者は、EtOH の長期投与により L 型高電位開口性カルシウムチャネル (L-type Cav1 channels) である Cav1.2 および Cav1.3 の蛋白質量の増加を伴った細胞内への Ca^{2+} 流入増加が精神依存および身体依存形成に関与していることを明らかにしている。また、L-type Cav1 channels は、依存性薬物である覚せい剤およびコカイン誘発報酬効果形成にも重要な役割を担っていることを明らかにしている。

2. 研究の目的

上記の観点を踏まえて、青年期での nicotine 曝露によって EtOH の精神依存および EtOH の飲酒量はどのように変化し、L-type Cav1 channels がどのように関与するのかを明らかにし、薬物治療薬を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 実験には 4 週齢の C57BL/6J マウス (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を使用した。マウスは恒温室 (22±1) において飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。摂餌 (固形飼料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲用水 (水道水) はともに自由摂取とした。

(2) ニコチン慢性処置モデル動物の作製: ニコチン慢性処置モデル動物は、浸透圧ミニポンプ (ALZET®) を使用し、ニコチン (24 mg/kg/day) を 14 日間皮下に埋め込み処置した。また、ニコチンの血漿濃度は、0.06 ~ 0.3 μ M になるように調製した。

(3) 精神依存の評価: ニコチンを 14 日間処置後、3 日間休薬後における EtOH の精神依存形成の変化を conditioned place preference (CPP) 法を用いて報酬効果により評価した。Pre 法に従い EtOH (1, 2 g/kg,

i.p.) あるいは生理食塩水による conditioning を 2 sessions 行った。また、L-type Cav1 channels の阻害薬である nifedipine は、conditioning 時の 30 分前に脳室内に投与した。

(4) 2 bottle free choice 法: ニコチンを 14 日間処置後、3 日間の休薬期間を経て、EtOH の自発摂取量の変化を 2 bottle free choice 法を用いて評価した。EtOH の濃度は、2% から開始し、3 日間ごとに 2% ずつ増加させ、最終濃度が 8% になるように調製した。

(5) 1 bottle free choice (8% EtOH) 4 hr limited-access 法: 2 bottle free choice 法に従い、マウスの EtOH 自発摂取量が安定した後、8% EtOH の 1 bottle choice 法における 4 時間の EtOH 自発摂取量を測定した。さらに、nifedipine を EtOH の 1 bottle choice の開始 30 分前に脳室内に投与した。

(6) Western blot 法: 2 bottle free choice 法が終了したマウスより全脳を摘出し、脳アトラスに従い、側坐核領域を分画した。組織をホモジナイズした後、SDS-PAGE 法により分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを一次抗体である anti-Cav1.2 および anti-Cav1.3 と共に 12 時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に 1 時間反応させた。反応後、蛍光法に従い、蛍光発色性基質を用いて目的とする蛋白質を発色させた。

(7) RNAscope® Assay 法: 7 週齢の正常マウスをイソフルラン吸入麻酔下、左心室より PBS を注入し、右心房に切り込みを入れて脱血を行った。その後、4% paraformaldehyde を含む PBS に置き換え、10 分間全身還流固定を行った。その後マウスの脳を摘出し、側坐核領域を含む切片を作製し、同固定液により 2 時間の固定を行い、10% sucrose を含む PBS に置換して、その後、20% sucrose、30% sucrose で置換した。切片は OCT compound 内に包埋し、-80 で保存した。クライオスタットにて、側坐核切片は 18 μ m に薄切した。その後、RNAscope® Fluorescent Multiplex Reagent Kit (Advanced Cell Diagnostics) に従い、HybEZ™ Hybridization System (Advanced Cell Diagnostics) を用い染色を行った。Probe は、RNAscope® Probe-Mm-Cacna1c、RNAscope® Probe-Mm-Drd1a-C2、RNAscope® Probe-Mm-Drd2-C3 (Advanced Cell Diagnostics 社) を用いた。サンプルの観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

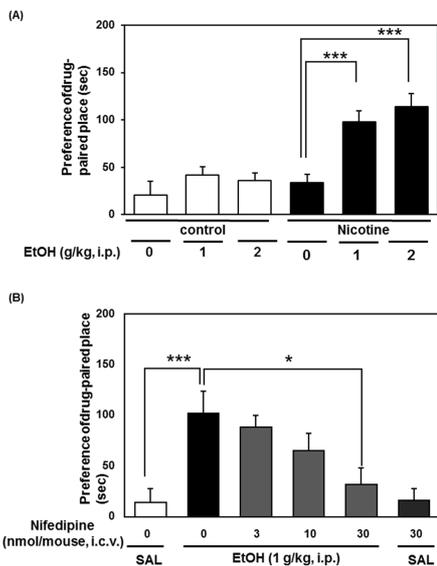
(7) 統計処理: すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M.) で示した。統計学的有意性は Tukey's multiple comparison test あるいは Student's t-test を用いて評価した。

4. 研究成果

4 週齢のマウスにニコチン (24 mg/kg/day) を 14 日間処置後休薬による

EtOH 誘発報酬効果形成の変化について CPP 法を用いて検討した。その結果、ニコチン無処置の対照群においては、EtOH (1 and 2 g/kg, i.p.) による条件づけに、いずれも有意な変化は認められなかったが、ニコチン慢性処置後休薬したマウスでは、EtOH (1 and 2 g/kg, i.p.) 処置により用量依存かつ有意な報酬効果の形成が認められた (図 1A)。次に、L-type Cav1 channels の阻害薬である nifedipine (3, 10 or 30 nmol/mouse) を conditioning の 30 分前に脳室内に投与し、ニコチン慢性処置後休薬における EtOH 誘発報酬効果形成の感受性亢進に対する効果について検討した。ニコチン休薬後に認められる EtOH 誘発報酬効果の増強は、nifedipine を脳室内に前処置することにより濃度依存かつ有意に抑制された (図 1B)。

図 1



ニコチン慢性処置後休薬による EtOH 自発摂取量を 2 bottle free choice 法に従い測定した。その結果、ニコチン慢性処置後休薬群では、4%、6% および 8% の EtOH 濃度において対照群と比較して、有意な EtOH 自発摂取量の増加が認められた (図 2A)。さらに、ニコチン慢性処置後休薬群では、EtOH 自発摂取量の増加に伴い、飲水量の有意な減少が認められた (図 2B)。また、ニコチン慢性処置後休薬群では、EtOH の嗜好性の有意な増加が認められた (図 2C)。さらに、2 bottle free choice 法に従い、マウスの EtOH 自発摂取量が安定した後、8% の EtOH を 1 bottle choice 法に従い、4 時間の EtOH 自発摂取量を測定した。その結果、ニコチン慢性処置後休薬群では、1 bottle choice 法開始、30 分および 60 分後において対照群と比較して有意に 8% EtOH の自発摂取量の有意な増加が認められた (図 3B)。また、ニコチン慢性処置後休薬群は、対照群と比較して 4 時間の総 EtOH 自発摂取量の有意な増加が認められた (図 3C)。そこで、ニコチン慢性処置後における 2 bottle free choice 法後による 4 時間の 8% EtOH 自発摂取量増加に対する

図 2 2 bottle free choice (H₂O, 2%-8% EtOH)

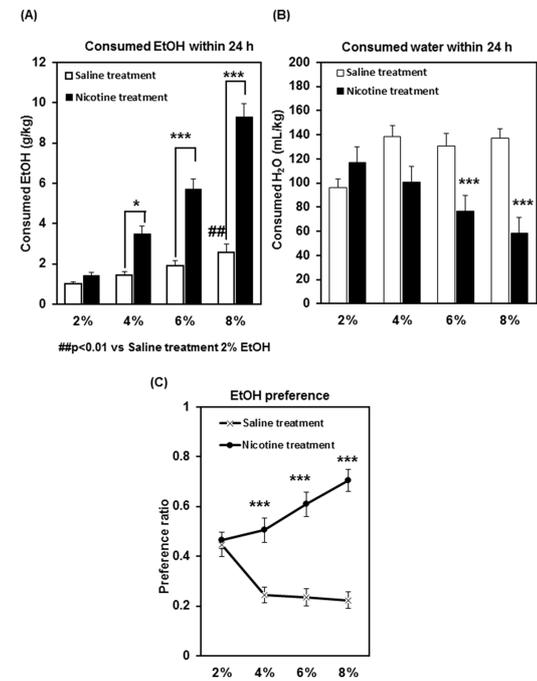
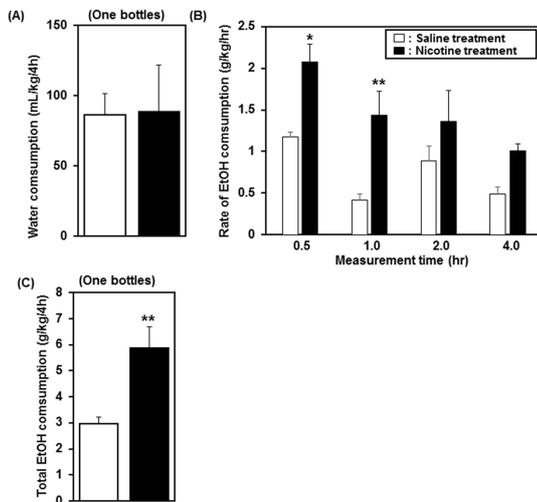


図 3

1 bottle choice (8% EtOH) 4 hr Limited-access procedure



nifedipine の影響について検討した。対照群およびニコチン慢性処置後休薬群の両群における 1 bottle choice 法の 4 時間の飲水量は、1 bottle choice 法の開始 30 分前に nifedipine を脳室内投与に影響を及ぼさなかった (図 4A-B)。このような条件下で、ニコチン慢性処置後休薬群で認められる 8% EtOH の自発摂取量の増加は、nifedipine を脳室内に投与することにより有意に抑制された (図 4D, E)。しかしながら、対照群に nifedipine を処置しても影響は認められなかった (図 4C)。

次に、2 bottle free choice 法が終了したマウスの側坐核領域での L 型 VDCC の α_1 subunit である Cav1.2 および Cav1.3 のタンパク質量の発現量の変化について検討した。その結果、ニコチン慢性処置後休薬群では、ポストシナプスのマーカーである PSD-95 が豊富な画分において、対照群と比較して Cav1.2 のタンパク質量の有意な増加が認め

られた。一方、プレシナプスマーカーである SYP が豊富な画分では、対照群とニコチン慢性処置休薬群ともに差は認められなかった(図 5)。さらに、側坐核領域における Cav1.2、dopamine D1 receptor ならびに dopamine D2 receptor の局在を RNAscope *in situ hybridization* 法に従い、側坐核領域の神経細胞における Cav1.2 と dopamine D1 receptor (DD1R) ならびに dopamine D2

図4

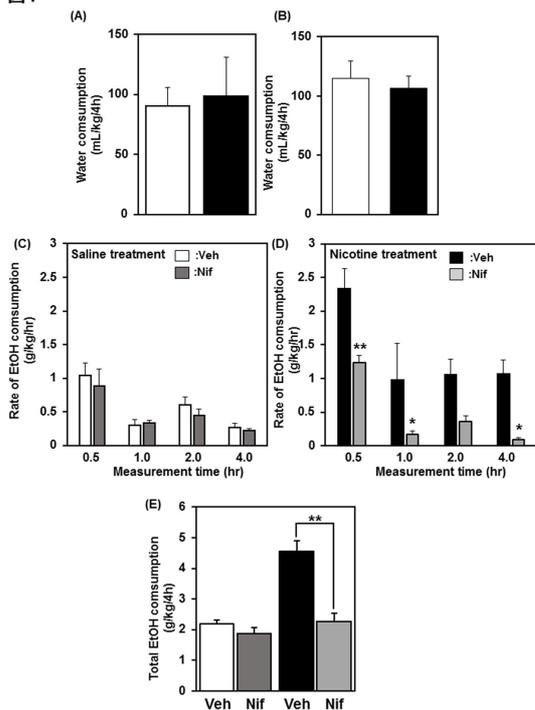


図5

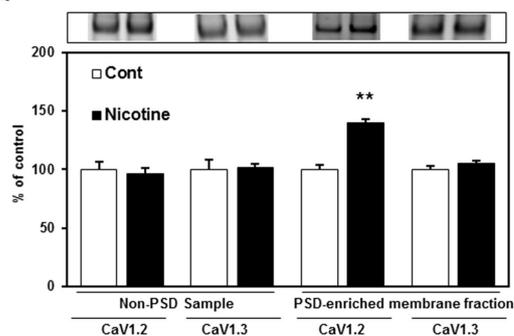
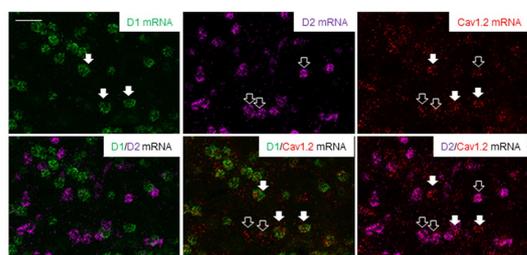


図6



receptor (DD2R) の mRNA 局在を検討した。その結果、Cav1.2 mRNA は、DD1R mRNA および DD2R mRNA 陽性神経細胞それぞれに共局在していることが確認された(図 6)。このような条件下において、1 bottle free choice (8% EtOH) 4 hr limited-access 法終了時のマ

ウス側坐核領域の c-fos 発現が、DD1R ならびに DD2R mRNA 陽性細胞に発現しているか否かを RNAscope *in situ hybridization* 法に従い triple 蛍光染色を行い検討した。その結果、EtOH 自発摂取の増加が認められたマウス群では側坐核領域の DD1R 陽性神経細胞での有意な c-fos 発現の増加が認められた。

本研究成績より、青年期にニコチン曝露歴があると EtOH 誘発報酬効果の亢進ならびに EtOH 自発摂取の増加が認められ、その増加機構には側坐核領域の L-type Cav1 channels の活性化が深く関与し、特に DD1R 陽性神経細胞を活性化することで調節されていることが示唆された。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 3 件)

黒川和宏、斎藤淳美、宮岸寛子、宮川和也、辻稔、武田弘志：ストレス誘発情動変化と脳内過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル 第 33 回日本ストレス学会学術総会(大阪, 2017.10.21)

黒川和宏、山本昇平、大熊誠太郎。アルコール依存時のアルコール自発摂取に対する nifedipine の効果。第 134 回日本薬理学会関東部会 (栃木, 2016.7.9)

Kazuhiro Kurokawa, Shohei Yamamoto, Seitaro Ohkuma : Implication of L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in nucleus accumbens on EtOH-drinking The 89th Annual Meeting of the Japanese pharmacology society. (Yokohama, 2016.03.11)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 和宏 (KUROKAWA KAZUHIRO)

国際医療福祉大学・薬学部・講師

研究者番号： 30454846

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし