

令和元年6月22日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07070

研究課題名(和文) アルコール依存症における脳内代謝異常による神経機能変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of neuronal function on energy metabolism in brain of alcoholism

研究代表者

芝崎 真裕 (Shibasaki, Masahiro)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80412162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：エタノールは古くから嗜好性飲料として広く親しまれているが、長期多量摂取により依存症を引き起こすことが知られている。本研究結果より、エタノールの慢性処置は、脳内の報酬系の起始核である腹側被蓋野にあるドーパミン神経系の中で、特に、mTORを含有するドーパミン神経の活性変動を変化させ、タンパク質合成を変化させることにより、ドーパミン神経の応答性に影響を及ぼし依存症を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

依存症は薬で完全に治すことが難しい病気である。未だに依存症の病態は不明な点が多く、これが治療薬開発を遅らせている原因ともなっている。本研究結果は、様々な依存症で指摘されているドーパミン神経系のアルコール依存症への関与を明らかにし、さらにmTORとよばれるエネルギー代謝に深く関わる因子を含むドーパミン神経をアルコールが特異的に活性化させ、依存症発現に関与する可能性を示唆する結果であり、依存症の脳機能変化の一端を明らかにするとともに依存症治療薬開発の基盤になるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chronic consumption of ethanol has been reported to modify several molecular events in the central nervous system. In this study, chronic treatment with ethanol changes the activity of dopaminergic system containing mTOR, which is projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens as rewarding system. It is suggested that mTOR regulated by ethanol changes protein synthesis in the brain and causes addiction with synaptic plasticity.

研究分野：神経科学、神経薬理学

キーワード：アルコール 依存症 mTOR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルコールは古くから嗜好性飲料として、我々の生活・文化の一部として広く親しまれているが、一方で、健康という観点から見ると他の一般食品にはない特性を有する。我が国における21世紀の国民一人ひとりの健康の実現を理念とした「健康日本21」(第1次・第2次)では、アルコールによる致酔性や慢性影響による臓器障害、依存性、未成年者への影響・妊婦を通じた胎児への影響について指摘されており、アルコールに起因する疾病のための医療費やアルコール乱用による本人の収入減等を含め、社会全体では約6兆6千億円の社会的費用になるとの推計が成され、総合的な取り組みが必要とされている。「健康日本21」(第1次・第2次)では、「節度ある適度な飲酒」は、1日平均純アルコールで約20g程度(ビール中瓶1本500mL、清酒1合180mL)とし、また、1日当たり平均純アルコールで約60gを「多量飲酒者」としているが、平成21年の国民健康・栄養調査結果では多量飲酒者は成人男性においては4.8%、成人女性においては0.4%であるとの報告がある(厚生労働省ホームページ:http://www1.mhlw.go.jp/toics/kenko21_11/b5.html)。特に、長期多量飲酒は依存症のみならず気分障害などの併存疾患を併発することが知られている(Penick et al. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1289-1293)。現在、世界各国において精神疾患が社会に及ぼす影響が問題となっており、日本においても健康被害の指標である disability adjusted life years (DALY) は、精神疾患が第一位(19%)であり、がん・心血管障害と並ぶ三大疾病と言われている。精神疾患には、うつ病や統合失調症、認知症、アルコール依存症などが含まれるが、これらはいずれもドパミン神経系が関与すると考えられており、このような背景から、アルコールによる依存症および関連疾患による問題は、今後も増加すると考えられる。

一般に、摂取したアルコールは主に肝細胞のミトコンドリア内に局在するアルコール脱水素酵素(ADH)やアルデヒド脱水素酵素(ALDH)、肝ミクロゾームエタノール酸化酵素(MEOS:主にCYP2E1)により代謝され無毒化される(Helmut et al., *Nature Reviews Cancer* 2007;7:599-612)。この過程で NADH_2^+ が産出され、TCA回路での代謝や脂肪酸分解(β-酸化)が抑制される。これにより、細胞内における脂肪酸の増加やトリグリセリド合成促進によるグリセロール3-リン酸の合成が促進することが知られている。その結果、肝内では脂肪酸が蓄積され、アルコール性脂肪肝、線維症、肝炎、肝硬変などアルコール性肝障害が引き起こされると考えられている。また、この細胞の活動に必要なエネルギー産生は、ほとんどがミトコンドリアより供給されることから、アルコールの多量摂取は細胞におけるエネルギー産生系にも多大な影響を及ぼすと考えられる。一方、脳内においてもこれらの酵素はアルコール代謝に関与することが報告されている(Kim et al., *Science*. 2015; 350: 102-106)。すなわち、アルコールの代謝はその殆どが肝臓で行われるが、多量飲酒により肝代謝系が飽和した場合、脳内における神経細胞やグリア細胞においても同様の代謝が起こり得ると考えられる。

現在までに本申請者は、アルコール依存マウスの腹側被蓋野において、細胞膜構成成分である Phosphatidylinositol (PI) が増加することを見出している。PIは細胞の脂質二重膜を形成するリン脂質の重要な構成要素であり、さらには細胞に様々な情報を伝えるメディエーターとしての役割を有する事が知られている。PIは、ジアシルグリセロールと IP_3 へと変換される事が知られているが(Shindou & Shimizu, *J Biol Chem*. 2009;284:1-5)、これらはPKCを活性化することが知られており、PKCはアルコールを始め、種々の薬物依存に関与することが報告されている。このように、脳内における各種代謝異常は、受容体応答を含めた細胞内情報伝達系への直接的な影響が考えられる。したがって、多量飲酒時には、脳内においてこのような代謝異常による細胞内情報伝達系の変化、すなわち神経の可塑的变化が誘導され、上述の様なアルコール依存症形成・再発や気分障害が引き起こされる可能性が考えられる。しかし、脳内におけるアルコール代謝系を中心とした代謝異常の観点からの神経の可塑的变化については殆ど検討が成されていないのが現状である。

2. 研究の目的

現在までに本申請者はアルコール依存モデルマウスのドパミン神経系において、アルコール依存時、特に休薬時に mammalian target of rapamycin (mTOR)の活性化が増加することを見出している。mTORはインスリンや成長因子、栄養・エネルギー状態、酸化還元状態など細胞内外の環境情報を統合し、転写、翻訳あるいはオートファジーを誘導し、それらに応じた細胞の分裂、生存などを調節することが知られている。したがって本研究では、多量飲酒による脳内での糖質、脂質、タンパク質、エネルギー代謝がどのように変化するのか、また、アルコールによる脳内での代謝異常が神経機能にどのような経路でどのような変化をもたらすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

1. 実験動物飼育条件

実験には、25-30gのICR雄性マウス(東京実験動物(株)、東京)およびB6.129(Cg)-Fos^{tm1.1(cre/ERT2)Luo/J}(c-Fos-cre)マウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)とB6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(EGFP/Rp110a)Amc/J}マウス(The Jackson Laboratory)を交配させて樹立した、cFos-TRAPマウスを使用した。動物は恒温恒湿室(23±1℃、55±5%)にて飼育し、明暗条件は8:00点灯、20:00消灯の12時間サイクルの明暗条件で飼育し、摂餌(固

形飼料 MF; オリエンタル酵母工業、東京)、及び飲水 (水道水) はともに自由摂取とした。

2. 使用薬物

実験には rapamycin (和光純薬工業 (株)、大阪) を使用した。Rapamycin は dimethyl sulfoxide (和光純薬工業 (株)、大阪) に溶解した後に、chremophor (ナカライテスク (株)、京都) を用い生理食塩液に 1:1:8 (DMSO : chremophor : saline) の比率で溶解し、3 nmol/mouse の濃度で脳室内投与した。

3. Ethanol 急性処置モデルの作製

Ethanol (和光純薬工業 (株)、大阪) を 2 g/kg になるように経口投与し、10 分後に脳サンプルの作製を行った。Control 群には ethanol の代わりに水道水を経口投与した。

4. Ethanol 慢性処置モデルの作製

Ethanol 処置は液体飼料法に従い、以下のスケジュールで行った。Ethanol (和光純薬工業 (株)、大阪) 濃度 5 w/v % の液体飼料を 5 日間処置した群を 5% ethanol 処置群とした。液体飼料は市販の脱脂粉乳 (Co-op スキムミルク、明治乳業、東京) を水道水で溶かしたものを主成分とし、ethanol 及び sucrose (和光純薬、大阪) を加え、総カロリーは常に 857 kcal/L となるように調整した。また、control 群には ethanol を含まない同カロリーの液体飼料を 5 日間処置した。

5. Ethanol 慢性処置における活性化細胞の分取方法

Ethanol 慢性処置したマウスの脳を採取し、腹側被蓋野領域を分画した後に、Adult Brain Dissociation Kit を用いて単細胞懸濁液へと組織を分散した。次に、Lineage Cell Depletion Kit を用いて血球系細胞を磁気ビーズにて標識し、magnetic-activated cell sorter (MACS) により取り除き、Neuron isolation kit によりグリアなどの non-neural cells を標識し、MACS により分離した。その後、negative fraction に対し、APC 結合型抗 Thy1 抗体を用いて神経を標識し、fluorescence-activated cell sorter (FACS) (以上全て Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NW, DE) により、Thy1⁺/GFP⁺ 細胞 および Thy1⁺/GFP⁻ の分取を行った。

6. Real - time RT-PCR 法

マウスより全脳を摘出し、脳アトラス (Keith and George, 1997) に従い腹側被蓋野領域を分画し、SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA) を用いて total RNA を抽出した。First standard cDNA 作成のために、抽出した total RNA を oligo (dt)12-18 および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水と共に 70 °C で 10 分間インキュベーションした。その後、氷上で 2 分間急冷し、このサンプルに RT buffer 10 μL、0.1 M DTT 10 μL、25 mM MgCl₂ 10 μL、10 mM dNTP mix 1 μL (以上全て Invitrogen, CA, USA) を加え、70 °C で 5 分間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、逆転写酵素である reverse transcriptase II (RT II; Invitrogen, CA, USA) 1 μL を加え、42 °C で 45 分間および 70 °C で 5 分間のインキュベーションをそれぞれ行った。

また、分取した Thy1⁺/GFP⁺ 細胞と Thy1⁺/GFP⁻ 細胞を、PicoPure RNA Isolation Kit (Thermo, Rockford, IL, USA) を用いて total RNA を抽出し、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo) を用いて cDNA の作成を行った。次に、Fluidigm protocol に従って pre-amplification を行った後、Fast SYBR Green を用いた real-time PCR 法にて各種遺伝子発現量を定量した。なお、データ解析は 2^{-CT} 法にて行った。

7. Western blot 法

マウスより全脳を摘出し、脳アトラス (Keith and George, 1997) に従い各領域を分画した。組織を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% SDS, 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Inc., MO, USA), a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), 1% NP-40 (ナカライテスク (株)、東京)) と共に、テフロン-ガラスホモジナイザー (Brandel, Inc., MD, USA) にてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10% glycerol with 0.2 M dithiothreitol) を加え、SDS-PAGE 法により、ポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 10 μg のタンパク質量を注入し抗原タンパク質を電気泳動法を用いて分子量の差により分離した。分離完了後、速やかにゲルを取り出し、電気泳動した抗原タンパク質をブロッティングバッファー (ナカライテスク (株)、東京) に浸した FILTER PAPER (ADVANTEC、東京) に trans-blot turbo システム (バイオラッドラボラトリーズ (株)、東京) を用い電氣的に移行させた。メンブランを tris-buffered saline (TBS) で希釈した、0.1% tween (Sigma-Aldrich, Inc) を含む 5% nonfat dried milk (ナカライテスク (株)、京都)、5% bovine serum albumin (BSA; 和光純薬工業 (株)、大阪) もしくは、Super Block (Thermo) でブロッキングし、さらに 0.1% tween を含む 5% nonfat dried milk に 5,000 倍希釈した p-ULK1 抗体 (CST ジャパン (株)、東京)、PINK1 抗体 (abcam, Inc., CB, UK)、Parkin 抗体 (Sigma-Aldrich, Inc)、20,000 倍希釈した -actin 抗体 (abcam, Inc)、-tubulin 抗体 (CST ジャパン (株)、東京)、0.1% tween を含む 5% BSA に 3,000 倍希釈した p-mTOR 抗体 (CST ジャパン (株)、東京)、p-4E-BP 抗体 (CST ジャパン (株)、東京)、p-LRRK2 抗体 (abcam, Inc)、p-FOXO1 抗体 (CST ジャパン (株)、東京)、Super Block に 3,000 倍希釈した p-S6K 抗体を一晩 4 °C で反応させた。その後、0.05% Tween 20 を含む TBS (TTBS) で洗浄し、メンブラン上で抗原と結合した抗体を 0.1% Tween 20 及び 5% nonfat dried milk を含む TBS 中で 10,000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体を常温 1 時間反応させ

た。TTBS で洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い、蛍光発色性の基質 (Thermo) で発光させ、Fluor Chem 3 system (Laboratory & Medical Supplies、東京) で読み取り、解析を行った。

8. 報酬効果の測定

Ethanol による報酬効果は conditioned place preference (CPP) 法を用いて、評価した。実験装置は幅 15 cm、長さ 30 cm、高さ 15 cm の白及び黒からなる 2-compartment box を使用した。Box は仕切り版によって 2 つの区画に分けられており、それぞれ白側の区画は凹凸のある床で、黒側の区画は平面の床で構成されている。条件づけはプレ方式に従って行った。なお、5 日間アルコール慢性処置後、休薬 3 日間に mTOR 阻害剤である Rapamycin (3 nmol/mouse, i.c.v.) もしくは溶媒を同時に 1 日 1 回処置したマウスを使用した。休薬後、box 中央に設置したプラットホームにマウスをのせ、プラットホームを降りた時点より 900 秒間、白及び黒の区画を自由に行き来させ、それぞれの区画における滞在時間を infrared beam sensor (KN-80, 株式会社夏目製作所、東京) で測定し、これを pre-test 値とした。条件づけは 1 日 1 回行い、1 日目には pre-test 値の低い方の区画に ethanol (1.0 mg/kg, p.o.) を投与したマウスを 1 時間閉じ込め、2 日目には溶媒を投与し、もう一方の区画に 1 時間閉じ込める操作を行った。溶媒のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。この一連の操作を 1 session とし、合計 2 sessions 行った。4 日目の条件づけが終了した翌日に post-test を行い、pre-test と同様にそれぞれの box における滞在時間を測定し、試験時における薬物処置区画への滞在時間と溶媒処置区画への滞在時間との差をスコア (sec) として算出し、報酬効果の指標とした。

9. 灌流固定法

マウスを isoflurane 吸入麻酔下、左心室より 0.6% heparine を含む生理食塩液 50 mL を注入し、右心房に切り込みを入れて脱血させた。その後、4% paraformaldehyde を含む phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) に置き換え、10 分間全身灌流固定を行った。その後マウスの脳を摘出し、腹側被蓋野領域を含む切片を脳アトラスに従い作成した。同固定液により 2 時間固定を行い、その後 PB で置換した。その後本切片を VT1200 S (Leica, Nussloch, DE) にて 30 μ m に薄切し、免疫染色を行った。

10. 免疫組織学的染色法

切片を 0.1% BSA (和光純薬工業 (株)、大阪) で 1 時間ブロッキングした。その後、切片に 0.1% BSA を含む 0.1 M PBS で 1:5,000 倍希釈した p-S6 (CST ジャパン (株)、東京) に対する特異的抗体、1:10,000 倍希釈した tyrosine hydroxylase (Millipore, Inc., MA, USA) に対する特異的抗体に切片を浸し、4 \times で 24 時間インキュベートした。その後、PBS で 5 分間 3 回洗浄し、0.1% BSA を含む 0.1 M PBS に 1:500 倍希釈した ALEXATM488 標識抗 rabbit IgG 抗体、ALEXATM 546 標識抗 mouse IgG 抗体 (Molecular Probes Inc., OR, USA)、ALEXATM 546 標識抗 goat IgG 抗体 (Molecular Probes Inc., OR, USA) に切片を浸し、室温で遮光しながら 4 日間インキュベート後、遮光下にて 0.1 M PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。その後、スライドガラス上に封入剤 (Perma Fluor Aqueous mounting medium; Immunon, PA, USA) を加え、カバーガラスをのせて封入した。これらのサンプルの画像処理は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV 1200; Olympus (株)、東京) を用いて行った。

11. 統計処理

すべての測定値は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.E.M.) で示し、有意差検定は一元配置分散分析を行った後、Tucky 法または Mann-Whitney 法を用いて行った。データ分析には、専用ソフト Prism 5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA) を用いた。

4. 研究成果

5% ethanol を液体飼料法に従い 5 日間慢性処置したマウスの腹側被蓋野における p-mTOR のタンパク質発現量を Western Blot 法を用いて検討を行った。その結果、ethanol 慢性処置により、p-mTOR タンパク質発現量は有意な増加が認められた。次に、免疫組織学的手法を用い、mTOR が腹側被蓋野における dopamine 神経上に存在するか否かについて検討する目的で、mTOR カスケードの下流に存在する p-S6 を指標に検討した。その結果、p-S6 と dopamine 神経のマーカーである Tyrosine hydroxylase (TH) で染色したところ、p-S6 の大部分は TH 陽性細胞と共同在していることが確認された。さらに、ethanol 慢性処置した cFos-TRAP マウスの腹側被蓋野領域から分取した Thy1⁺/GFP⁺ 細胞と Thy1⁺/GFP⁻ 細胞を用いて、TH および mTOR の mRNA 発現量の変化について real-time PCR 法を用いて検討を行った。その結果、ethanol 慢性処置により活性化された細胞は、TH および mTOR の発現量の多い細胞であることが認められ、ethanol 慢性処置は mTOR を含有する dopamine 神経細胞を活性化させることが明らかとなった。そこで、ethanol 慢性処置による ethanol 誘発報酬効果増強における mTOR の関与を検討する為に、ethanol 慢性処置後、休薬期間を 3 日おき、その時に mTOR 阻害剤である Rapamycin (3 nmol/mouse) を 1 日 1 回脳室内投与し、条件づけ場所嗜好性試験法を用いて検討を行った。その結果、vehicle 処置群では著明な報酬効果の増強が認められたのに対し、mTOR 阻害薬を処置した群では、5% ethanol 処置による報酬効果の増強作用は有意に抑制された。最後に、どのような経路で mTOR が活性化されるかについて検討するために、GC-MS/MS を用いて、腹側被蓋野での ethanol 慢性処置時における糖質やアミノ酸の変化について検討した。その結果、ガラクトースが対照群に比べ ethanol 処置群において著明に増加していた。この増加は ethanol 休薬 10 時間および 3 日後において、対照群程度まで減少した。そこで生体での代謝の変化も考

慮し、同条件の肝臓サンプルを用いて検討したところ、脳サンプルと同様にガラクトースは ethanol 処置群において著明な増加が認められ、アルコール休薬により速やかに減少した。Ethanol の代謝時間を勘案すると、この増加は ethanol の直接作用である可能性が考えられる。また、現在までに、ガラクトースの慢性処置により mTOR のリン酸化が亢進することが報告されている。したがって、ethanol の慢性処置は、脳内のガラクトース量を増加させ、mTOR の活性化を引き起こし、依存症を惹起する可能性が示唆された。以上、本研究の結果より、ethanol 慢性処置は、腹側被蓋野領域における mTOR 活性変動を変化させ、タンパク質合成を変化させることにより、dopamine 神経の反応性の亢進に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Suda Y, Kuzumaki N, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, Iwasawa C, Shibasaki M, Maekawa A, Matsuo M, Akamatsu W, Hattori N, Okano H, Narita M. Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain*. (2018) 6. 査読有

Suda Y, Kuzumaki N, Narita M, Hamada Y, Shibasaki M, Tanaka K, Tamura H, Kawamura T, Kondo T, Yamanaka A, Narita M. Effect of ghrelin on the motor deficit caused by the ablation of nigrostriatal dopaminergic cells or the inhibition of striatal dopamine receptors. *Biochem Biophys Res Commun*.(2018) 1102-8. 査読有

Matsumoto K, Umemoto H, Mori T, Akatsu R, Saito S, Tashima K, Shibasaki M, Kato S, Suzuki T, Horie S. Differences in the morphine-induced inhibition of small and large intestinal transit: Involvement of central and peripheral μ -opioid receptors in mice. *Eur J Pharmacol*. (2016) 220-8. 査読有

Hori N, Narita M, Yamashita A, Horiuchi H, Hamada Y, Kondo T, Watanabe M, Igarashi K, Kawata M, Shibasaki M, Yamazaki M, Kuzumaki N, Inada E, Ochiya T, Iseki M, Mori T, Narita M. Changes in the expression of IL-6-Mediated MicroRNAs in the dorsal root ganglion under neuropathic pain in mice. *Synapse*. (2016) 317-24. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

腹側被蓋野における依存性薬物による活性化細胞の同定と解析. 若井涼輔、芝崎真裕、佐藤大介、濱田祐輔、成田道子、葛巻直子、成田年 第92回薬理学会年会 2019

アルコールによる脳内報酬系における活性化細胞の解析. 若井涼輔、芝崎真裕、岩澤千鶴、青木萌、新井理沙、濱田祐輔、成田道子、葛巻直子、成田年 日本薬学会 第138年会 2018

Ethanol 摂取時における腹側被蓋野領域の活性化細胞の解析. 糸満盛尚、芝崎真裕、青木萌、新井理沙、若井涼輔、濱田祐輔、渡邊萌、岩澤千鶴、佐藤大介、成田道子、葛巻直子、手塚裕之、成田年 第47回日本神経精神薬理学会年会 2017

Ethanol 慢性処置による mTOR 活性変動に対する dopamine 神経応答の変化. 芝崎真裕、古谷絵菜里、青木萌、新井理沙、成田道子、葛巻直子、成田年 第134回薬理学会関東部会 2016

アルコール慢性処置による中脳辺縁領域における mTOR 活性変動の役割. 芝崎真裕、古谷絵菜里、葛巻直子、岩澤千鶴、成田道子、成田年 第51回日本アルコール・アディクション医学会学術総会 2016

Changes in mTOR activity related to dopamine response by chronic treatment with ethanol in mice. 芝崎真裕、古谷絵菜里、青木萌、新井理沙、成田道子、葛巻直子、成田年 第46回日本神経精神薬理学会年会 2016

〔図書〕(計1件)

依存症における一細胞レベルでの変化. 芝崎真裕、森友久、葛巻直子、成田年 分子精神医学 先端医学社 2018, 36-41

〔その他〕

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/yakuri/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし