

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590601

研究課題名（和文） エピジェネティックな機構による薬物依存形成の研究

研究課題名（英文） A mechanism analysis for the formation of drug dependence

研究代表者

入江 康至 (IRIE YASUYUKI)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70303948

研究成果の概要（和文）：本研究は、覚醒剤など薬物依存の分子機構を解明し、これを防止あるいは治療する可能性を探ることを目的として開始された。神経系の培養細胞 Neuro2a に、クロマチンリモデリング複合体構成蛋白質である Amida およびその関連蛋白質を発現させたところ、細胞の増殖速度および接着能に変化があることがわかり、これらの細胞機能に関わる遺伝子の発現量が変化したためと考えられた。一方、中枢性ドパミン作動ニューロン由来の細胞株 CATH.a 細胞では METH 処理により小胞体ストレスを介した細胞死が起こることがわかった。

研究成果の概要（英文）：This study was initiated for the purpose to explore the possibility to elucidate the molecular mechanism of drug dependence, such as psychostimulants, to treat or prevent this. When Neuro2a cells were transfected by Amida, a component of the chromatin remodeling complex, and its related proteins, it turned out that the proliferation rate and adhesion ability were affected. These results were caused because the expression of genes for specific cellular functions were altered. Meanwhile, it was revealed that cell death through the endoplasmic reticulum stress was induced by methamphetamine treatment of the CATH.a cells, a cell line derive from dopaminergic neurons in central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2500000	750000	3250000
2010 年度	700000	210000	910000
2011 年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3700000	1110000	4810000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基盤 C

キーワード：遺伝子、神経科学、脳・神経、薬理学、薬物依存

## 1. 研究開始当初の背景

依存性薬物の乱用は、乱用者個人に留まらず、家族、地域社会、国家にまでおよぶ深刻な問題である。近年、わが国でも依存性薬物の乱用が急増し、乱用者が低年齢化している。また、覚醒剤などの依存性薬物の乱用による刑

事事件が多発し、深刻な社会問題となっている。したがって、薬物依存の形成機構の解明とその診断、予防および治療方法の確立は社会的な要請であり、薬理学者に課せられた責務である。薬物乱用の一つの大きな特徴として、再犯率の高さが指摘されるが、その背景

には中枢神経系における長期的な変化およびニューロンの遺伝子発現の変容が想定されている。このような分子レベルでの長期的変化の機構を解明し、薬物依存を防止あるいは治療する可能性を探ることが求められている。

## 2. 研究の目的

これまでに多くの最初期遺伝子が同定されているが、それらは種々の刺激に反応して速やかに誘導される。その遺伝子産物の多くは転写因子であり、他の遺伝子発現の調節を介して成長、分化、発達などの長期的細胞応答に関与すると考えられている。覚醒剤によってラット線条体において急速に発現誘導される神経特異的最初期遺伝子 *arc* は遺伝子産物が DNA 結合部位を持たない「エフェクター最初期遺伝子」と考えられ、mRNA が樹状突起に分布することから、これまでシナプスの機能調節を行うことにより、薬物依存をはじめとする神経系の長期的変化を担うと考えられてきた。しかし、申請者が報告したように (Irie et al., *J Biol Chem*, 275, 2647-2653, 2000) Arc 蛋白質は核にも存在することに加え、今回 Arc の結合蛋白質である Amida が INO クロマチンリモデリング複合体に局在する機構が明らかになったことから、Arc のもう一つの機能としてクロマチンリモデリング複合体の機能調節という可能性が大きく浮上してきた。INO クロマチンリモデリング複合体は転写因子と機序は異なるが、やはり転写調節に大きく影響するので、「エフェクター最初期遺伝子」としてのみ捉えられてきた Arc が、*c-fos* など他の最初期遺伝子と同様に遺伝子発現の調節にも関わっている可能性が高いと考えられる。Arc はアクチンフィラメントと相互作用することが知られているが、INO クロマチンリモデリング複合体にもその構成要素としてアクチンおよび Arp (アクチン関連タンパク質) が存在することもこの考えを支持すると思われる。

申請者は、これまでに、Arc と結合する蛋白質として two-hybrid screening を用いて Amida を単離し、細胞周期や細胞死に関与していることを見いだした。また、Arc は Amida との共発現で核に移行し、Amida の細胞死誘導活性を抑制することも報告した。(Irie et al., *J Biol Chem*, 275, 2647-2653, 2000) Amida は新規核移行シグナルと DNA 結合活性をもつ核蛋白質であり、フローサイトメトリ解析の結果、Amida を適量発現させると G2/M 期での細胞周期の停止がおこるので、これが過剰発現での細胞死に繋がると考えられた。また Amida は DNA 結合能を持ち、これが細胞周期の停止や細胞死に必須であること、この領域にある Serine180 が

Cdc2/cyclinB によって特異的にリン酸化され、DNA 結合活性が減少することがわかった。(Gan Y, Taira E, Irie Y et al., *Mol. Cell. Biochem.*, 246, 179-185, 2003)

本研究では、依存性薬物の中でも特に問題となっているメタンフェタミンなどの覚醒剤によって誘発される精神障害の機構を解明し、その診断、予防および治療方法の確立に寄与することを目指す。具体的には覚醒剤により急速に発現誘導される最初期遺伝子産物 Arc の機能に注目し、その結合蛋白質 Amida と協調したエピジェネティックな機構を介した遺伝子発現調節メカニズムについて細胞レベル、個体レベルでのモデルを用いて解析し、薬物依存を防止あるいは治療する可能性を探ることを研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、特に Arc および Amida の SUMO 化修飾に着目し、核内ドメインや DNA との関係などについて形態学的、分子生物学的、生化学的手法を用いて詳しく解析することにより、これらの分子が INO クロマチンリモデリング複合体の機能をどのように調節しているかを明らかにする。このような機構が薬物依存を引き起こす機序を解明する。

研究体制としては、岩手医科大薬理学講座に所属する 3 人が連携しつつ役割分担をして解析を進める。研究代表者の入江は研究全般を統括すると同時に、大学院生とともに培養細胞系を用いた細胞生物学的解析を行う。分担研究者の平は研究全般の助言を行うとともに薬物処理をした動物の解析を行う。分担研究者の近藤は種々の遺伝子について定量 PCR 解析を主に担当する。

### 1) Arc の SUMO 化修飾解析

Arc はアミノ酸配列上に種を越えて保存されている 2 箇所の SUMO 化モチーフを持つ。しかし、その SUMO 化は確認されていないので、培養細胞内で HA-tag をつけた SUMO1, 2 あるいは 3 と Arc を共発現させ、ウエスタンブロッティング法、免役沈降法を用いて SUMO 化修飾が起こることを確認する。SUMO1, 2, 3 の違いについても検討する。また、SUMO と EGFP-Arc を共発現させ、Tip49B 抗体で染色して共焦点顕微鏡で共局在について解析する。Arc、Amida をそれぞれ別の蛍光蛋白質につないで SUMO とともに共発現させ、FRET 法を用いて相互作用についても解析する。以上の解析を、Arc の SUMO 化部位のリジンアルギニンに換えて修飾を受けないようにした変異体でも検討し、Arc の SUMO 化修飾部位を決定する。

(入江)

### 2) INO クロマチンリモデリング複合体のアッセイ系の確立

in vitro でクロマチンリモデリング複合体の機能を解析する系は既にいくつかのものが確立されている。(Jin et al., J Biol Chem, 280, 41207 - 41212, 2005 ほか) これらを改変して Arc および Amida の機能解析に適したアッセイ系を確立する。具体的には、SUMO および Amida を共発現した細胞から Flag-tag を用いて INO クロマチンリモデリング複合体を精製し、これに Arc を加えてアッセイを行う。(入江)

3) ラット線条体における遺伝子発現の網羅的解析

メタンフェタミンを投与したラットあるいは対照ラットの線条体から RNA を抽出し、マイクロアレイ法で遺伝子発現について網羅的に解析する。Arc によって発現調節を受ける遺伝子群を見出すために、薬物投与 24 時間後の late genes を中心に解析する。シンドビスウイルスベクターなど、ウイルスベクターを用いてラット線条体に Arc を強制発現させ、同様に網羅的解析を行う。このような両方の処置により発現調節を受ける遺伝子が Arc の下流にあると考えられる。(平)

4) 定量 PCR 法

AGS3 や BDNF のように既にいくつかの遺伝子が薬物投与後に線条体で発現が変化することが報告されている。(Renthal and Nestler, Trends Mol Med 14, 341-350, 2008) これらに加え、上記の網羅的解析で抽出された遺伝子群を定量 PCR 法で検討する。(近藤)

5) 培養細胞系において Arc, Amida 系により調節される遺伝子発現の検討

培養細胞系(ラット線条体あるいは神経系の培養細胞)に Amida, SUMO, Arc を発現させ、あるいは特異的な siRNA を用いてノックダウンし、上記遺伝子群について定量 PCR 法で検討する。(入江、近藤)

6) Amida のコンディショナル・ノックアウトマウス細胞を用いた検討

外注している Amida のコンディショナル・ノックアウトマウスは現在、サザンブロッティングで相同組み換えが確認された ES 細胞が作成された段階にあり、以降のステップに対する支払いは終了している。このノックアウトマウスの線条体から得た初代培養ニューロンに Cre Recombinase を導入して Amida をノックアウトした後 Arc を発現誘導し、5) の遺伝子群について検討する。(入江・平・近藤)

7) Amida のコンディショナル・ノックアウトマウスの行動学的解析

Amida のコンディショナル・ノックアウトマウスを神経系に Cre Recombinase を発現するトランスジェニックマウスとかけあわせ、覚醒剤による逆耐性現象がみられるどうか行動学的に検討する。(平)

8) in vivo における Arc および Amida の翻訳後修飾についての検討

これまでの予備的実験の結果から、培養細胞に発現させた Amida は、SUMO 化修飾を受けたものも含めて、ほとんどが不溶性の核マトリクス分画に存在する。SUMO 化修飾を受けた Arc も不溶性の核マトリクス分画に存在する可能性が高いと考えられる。ラット脳から核マトリクス分画を調整し、Arc および Amida の翻訳後修飾について解析する。Arc および Amida はリン酸化により機能調節されることがわかっているため、二次元電気泳動とウエスタンブロット法あるいは MALDI-TOFMS による分析を組み合わせる。内臓性 Arc および Amida の翻訳後修飾について詳しく検討する。また、このような翻訳後修飾と INO クロマチンリモデリング複合体の他の構成要素との関係についても調べる。(入江・平)

9) 定量 PCR 法による解析の結果、再現性を持って確認された陽性遺伝子・蛋白質については、メタンフェタミンを投与したマウスで、定量 PCR、in situ hybridization、ウエスタンブロッティング、免疫組織科学の手法を用いた解析を行う。メタンフェタミンは投与方法(量、反復)によって臨床症状や神経毒性発現のしかたが変わってくるので、特に少量反復投与モデルとフラッシュバックモデルに着目し、行動学的解析を行いながら陽性遺伝子、蛋白質の解析を進める。(入江・平)

4. 研究成果

本研究では、Arc および Amida が SUMO 化を介してどのように INO クロマチンリモデリング複合体と関わり、その機能を調節するのかを明らかにすることにより、覚醒剤など薬物依存の分子機構を解明し、これを防止あるいは治療する可能性を探ることを目的とする。これまでに以下のように検討を進めた。

① Amida の Cre-loxP 系によるコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。繁殖後、線条体から得た初代培養ニューロンに Cre Recombinase を導入して Amida をノックアウトする系を作成する。また、タモキシフェンにより Cre Recombinase を発現誘導できるトランスジェニックマウスも既に納入されており、両者を交配して形態観察、行動学的解析を行う系を準備している。

② Arc, Amida 他いくつかの遺伝子について、薬物投与後に線条体での発現の経時的变化を定量 PCR 法で検討した。

③ Arc はアミノ酸配列上に種を越えて保存されている 2 箇所の SUMO 化モチーフを持つ。培養細胞内で HA-tag をつけた SUMO1, 2 あるいは 3 と Arc を共発現させ、ウエスタンブロッティング法を用いて SUMO 化修飾が起こるかどうか検討した。SUMO1, 2, 3 の違い

についてはこれまでの実験では認められなかった。また、現在 SUMO と EGFP-Arc を共発現させ、Tip49B 抗体で染色して共焦点顕微鏡で共局在について解析を進めている。

④ 2 種類の神経系培養細胞系 Neuro2a および PC12 細胞において、Amida と SUMO1, SUMO2 あるいは SUMO3 の安定的発現株を作成し、増殖速度、悪性度、分化誘導時の形態変化について検討した。

⑤ 神経系の培養細胞 Neuro2a に Amida, SUMO, Arc を安定的に発現させたところ、細胞の増殖速度および接着能に差異があることがわかったため、同細胞株の接着機能について、京都大学再生医科学研究所組織修復材料学分野岩田博夫教授、広島大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学加藤功一教授の研究グループと共同研究を行い、同グループが開発した細胞アレイ法を用いて細胞表面の接着分子について検討した。その結果、Amida と SUMO を共発現させた細胞では laminin-1 への接着性が極端に低下していることがわかり、Amida および SUMO1~3 の導入によってインテグリンの発現頻度やそのパターンが変化しているものと思われた。そこで、このような細胞接着因子の遺伝子を定量 PCR 法により解析した。その結果、いくつかの細胞接着因子は、Amida の発現や SUMO 化修飾によって発現量が調節されていることがわかった。同様に、いくつかの細胞周期関連蛋白質の発現も Amida の発現やその SUMO 化修飾によって調節されていることが明らかになり、このような機構を介して細胞増殖速度が調節されていることが示唆された。Neuro2a 細胞は発生母胎である A/J 系マウスに移植することにより腫瘍を生じるが、in vivo における腫瘍の増殖速度も Amida の発現によって抑制されることがわかった。現在、SUMO 化による腫瘍抑制効果の検討ならびに生体内において蛍光蛋白質を撮像する機器を用いて、腫瘍内における Amida 蛋白質の発現量の経時的変化の検討を行っている。

## 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 2 件)

Yukiko Kondo, Eiichi Tachikawa, Shinpei Ohtake, Kenzo Kudo, Kenzo Mizuma, Takeshi Kashimoto, Yasuyuki Irie, Eiichi Taira

Inflammatory cytokines decrease the expression of nicotinic acetylcholine receptor during the cell maturation.

Mol Cell Biochem. 333, 57-64, 2010

Irie, Yasuyuki; Saeki, Makio; Tanaka, Hidekazu; Kanemura, Yonehiro; Otake, Shinpei; Ozono, Yoshiyuki; Nagai, Toshisaburo; Kondo, Yukiko; Kudo, Kenzo; Kamisaki, Yoshinori; Miki, Naomasa; Taira, Eiichi

Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene

CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells. Cell and Tissue Research Vol. 345:2, 231-241, 2011

いずれも査読あり。

[学会発表] (計 17 件)

国際学会招待講演 (計 2 件)

Yasuyuki Irie

Methamphetamine induced dopamine terminal toxicity involves endoplasmic reticulum stress.

International Workshop on Signal Transduction, July 23, 2009, Shanghai

Yasuyuki Irie

Searching a Substrate for Denitrase, an Activity that Reduces Nitrotyrosine Immunoreactivity in Proteins

9th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology

November 5, 2011, Shenzhen

国際学会一般演題 (計 3 件)

Yasuyuki Irie, Makio Saeki, Hidekazu Tanaka, Yonehiro Kanemura, Yoshiyuki Ozono, Toshisaburo Nagai, Yasuhiro Tsukamoto, Hidenori Kato, Yukiko Kondo, Kenzo Kudo, Kenzo Mizuma, Shinpei Otake, Yoshinori Kamisaki, Naomasa Miki, Eiichi Taira

Toxic dose of methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic neural cells.

The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010)

21 July 2010, Copenhagen

Yukiko Kondo, Eiichi Tachikawa, Shinpei Ohtake, Kenzo Kudo, Kenzo Mizuma, Takeshi Kashimoto, Yasuyuki Irie, Eiichi Taira

Expression change in nicotinic receptor according to cellular maturity of antigen presenting cell line

The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharma 2010)

20 July 2010, Copenhagen

Yukiko Kondo, Yasuyuki Irie, Eiichi Taira

Expression Change of Nicotinic Receptor by

the Cell Maturity in the APC Cell Line  
9th Annual Congress of International Drug  
Discovery Science and Technology  
November 5, 2011, Shenzhen

国内学会 (計 12 件)

入江康至、佐伯万騎男、近藤ゆき子、大竹伸平、  
水間謙三、上崎善規、平英一

Psychostimulant によって発現調節される遺伝子  
第 60 回日本薬理学会北部会 2009 富山

大竹伸平、入江康至、近藤ゆき子、水間謙三、平  
英一

IGF-1 によるギゼリン発現の制御

第 83 回日本薬理学会年会 2010 大阪

近藤ゆき子、大竹伸平、水間謙三、入江康至、平  
英一

血管平滑筋細胞の周期性伸展培養による生理活性  
物質受容体の発現変化

第 83 回日本薬理学会年会 2010 大阪

水間謙三、近藤ゆき子、入江康至、大竹伸平、平  
英一、鈴木健二

局所麻酔薬が副腎髄質細胞に及ぼす影響

第 83 回日本薬理学会年会 2010 大阪

入江康至、佐伯万騎男、近藤ゆき子、大竹伸平、  
水間謙三、上崎善規、平英一

新規細胞死関連蛋白質 Amida の機能解析

第 61 回日本薬理学会北部会 2010 札幌

入江康至

新規細胞死関連蛋白質 Amida の機能解析

岩手医科大学未来医療開発プロジェクトキックオ  
フミーティング 2010 盛岡

入江康至、佐伯万騎男、加藤功一、近藤ゆき子、  
大竹伸平、水間謙三、岩田博夫、上崎善規、平英  
一

新規成長抑制因子 Amida の機能解析

第 84 回日本薬理学会年会 2011 横浜

近藤ゆき子、水間謙三、入江康至、平英一

血管平滑筋細胞の周期性伸展培養と生理活性物質  
刺激による形質変換

第 84 回日本薬理学会年会 2011 横浜

入江康至、佐伯万騎男、近藤ゆき子、上崎善規、  
平英一

Methamphetamine は、ドパミン作動性ニューロ  
ン由来細胞に小胞体ストレスを引き起こす。

第 62 回日本薬理学会北部会 2010 仙台

近藤ゆき子、入江康至、平英一

Phenotypic change of vascular smooth muscle  
cells by cyclic stretch and vasoactive substances

effect.

第 85 回日本薬理学会年会 2012 京都

栗岡恭子、佐伯万騎男、入江康至、上崎善規

Monad regulates stability of Amphiregulin  
mRNA.

第 85 回日本薬理学会年会 2012 京都

入江康至、佐伯万騎男、近藤ゆき子、上崎善規、  
平英一

Methamphetamine induces endoplasmic  
reticulum stress related gene

CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells.

第 85 回日本薬理学会年会 2012 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 康至 (Irie Yasuyuki)

岩手医科大学・医学部薬理学講座・准教授  
研究者番号 : 70303948

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平 英一 (Taira Eiichi)

岩手医科大学・医学部薬理学講座・教授  
研究者番号 : 60263240

近藤 ゆき子 (Kondo Yukiko)  
岩手医科大学・医学部薬理学講座・助教  
研究者番号：70347847