

機関番号：20101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010年度  
 課題番号：21790611  
 研究課題名(和文) アルコール等濫用薬物のフラッシュバック現象の分子機構 -マイクロRNAの役割  
 研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ethanol dependence and relapse-role in the brain microRNA  
 研究代表者  
 水尾 圭祐 ( Keisuke Mizuo )  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90459735

研究成果の概要(和文)：  
 アルコールをはじめとする濫用薬物は長期の使用により依存を形成し、一度依存が形成されてしまうと断薬期間があっても再度の摂取により再び依存に陥るフラッシュバック現象を引き起こすことが知られている。また、飲酒者の死亡例については血中アルコール濃度とその中枢神経系に及ぼす影響を考慮しなければならず、アルコールの作用発現機序を考えることは重要である。本研究では、エタノール単回投与によってマイクロRNAが12時間以上におよぶ持続的な発現増加することを明らかにした。また、エタノール投与後の脳内においてヒストンアセチル化の増加が認められることを見だし、この現象がどの脳部位で生じているのかを明らかにした。さらに、依存モデル動物の脳内においてマイクロRNAの上昇が認められることを明らかにし、エタノールの依存にマイクロRNAが関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：

Prolonged ethanol intake leads to the development of ethanol dependence. Although a lot of study suggested several candidates, certain mechanism of ethanol action is still unclear. Here we show that acute ethanol administration increased the expression of microRNA in mouse brain at 12 hours after administration. We observed that the acute ethanol administration significantly increased the levels of acetylated histone H3 in nucleus accumbens, ventral tegmental area and amygdala. The expression of miR-124 was significantly increased in limbic forebrain and lower midbrain following chronic treatment of ethanol. These findings suggest that chronic ethanol consumption increase the microRNA expression via histone acetylation, resulting in development of ethanol dependence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール、マイクロRNA、依存

#### 1. 研究開始当初の背景

アルコールは古くから嗜好飲料として、社会生活に深く浸透しているが、我が国における

アルコール消費量は年々増加しており、それに伴いアルコール依存症患者も増加の一途をたどっている。また、我が国においては第三次濫用期とよばれ、覚せい剤やその他の薬物

の濫用が若年層を中心に広がっている。これらの濫用薬物は、薬物摂取によって得られる多幸感や満足感などをきっかけにその薬物に対する渴望や強迫的な薬物摂取が生じ、依存形成を引き起こす。依存が形成されてしまうと、断薬しても再度、薬物を摂取することで容易に依存に陥るフラッシュバック現象を生じることが知られている。

我々が行う法医実務においては、対象者が依存・濫用者であったり加害者が同様であったりすることが少なからずある。特にフラッシュバック現象が不幸な結果となった事例もある。したがって死因との因果関係はもちろんのこと、犯罪予防学的にもその機序を明らかにすることは重要である。

濫用薬物によって得られる多幸感や満足感とは動物においては報酬効果と定義され、実験結果から腹側被蓋野から側坐核に投射する中脳辺縁 dopamine 神経の活性化がその効果発現に非常に重要な役割を担っていることが知られている。特に、ドパミン D<sub>3</sub> 受容体は側坐核、calleja 島および嗅結節などの辺縁系に高密度に分布することから、依存性薬物との関連性が注目されている。実際に、ヒトにおいて D<sub>3</sub> 受容体と薬物依存との関連が指摘されている。また、ラットおよびマウスモデルにおいても D<sub>3</sub> 受容体作動薬の処置により薬物の自己投与が減少すること、D<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の処置により ethanol による報酬効果が増強することが報告されていた。また、研究代表者らもドパミン D<sub>3</sub> 受容体がドパミン D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> 受容体のシグナリングを調節し、モルヒネの報酬効果に影響を与えることを報告している

最近、Kim らにより、miR-133b が中脳の dopamine 神経に対し、負の調節をかけていることが報告された。また、データベースより let-7b が dopamine D<sub>3</sub> 受容体 mRNA の発現を調節する候補因子である可能性が示されている (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。さらに、dopamine 受容体を介した細胞内情報伝達の下流に存在する CREB の活性化によって miR-132 の発現が調節されることも報告されている。

これらのマイクロ RNA とは 22 塩基前後のタンパク質のコードを持たない small RNA であり、Ambros らによって線虫より発見された。マイクロ RNA は標的となる mRNA を分解または翻訳を阻害することにより、mRNA の転写後発現を抑制的に調節することが明らかになっている。神経系において、miR124a、miR9、miR128、miR131、mir178、miR125b などが多く発現していることが明らかにされている。

その一方で、これらの濫用薬物の依存について遺伝子変異が関与していないことも報告されている。

したがって、アルコール等濫用薬物の依存において、miR-132 や let-7b 等の microRNA が dopamine 神経系の機能変化に関与しており、それら microRNA の濫用薬物による発現誘導が保持されることが、フラッシュバック現象に関与していると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)アルコールによって中枢神経系のマイクロ RNA がどのように発現するかを明らかにすること、(2)アルコールの依存におけるマイクロ RNA の関与を明らかにすること、(3)アルコールによるマイクロ RNA の発現変化の機序について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

すべての実験動物には 6 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いた。

### (1) エタノール処置

単回投与はエタノールを 2 g/kg 皮下投与し、投与後 15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間および 24 時間に麻醉下にて断頭して脳を摘出した。同様に saline を投与した群をコントロール群とした。

依存モデルの作成は Lieber-Decarli の液体飼料を用いて行った。エタノールの濃度は 1% から 5% まで漸増し、1%:1 日、3%:2 日、4%:2 日、5%:5 日間の計 10 日間の処置を行い、依存を形成させた。その後、エタノールを含まない液体試料に交換し、生じる離脱症状を観察し、強度によって 5 段階にスコア化した。また、同様の条件でエタノールを含まない液体試料で行ったものをコントロール群とした。

### (2) 血中エタノール濃度測定

血中エタノール濃度の測定は得られた心臓血の血漿を用い、気化平衡 GC 法で行った。

### (3) Total RNA 抽出

脳組織からの total RNA の抽出は Trizol (Invitrogen, CA, USA) を用いた。組織 100 mg あたり 1.5 ml の Trizol を加え、4 °C にてホモジナイズ後、12,000 x g、10 分間遠心分離した。得られた上清に、加えた Trizol 1 ml あたり 0.2 ml のクロロホルムを加え、3 分間激しく浸透した。15 分間常温にて静置した後、

4 °C にて 12,000 x g、15 分間遠心分離した。得られた無色透明の上清を新しいチューブに移し、加えた Trizol 1 ml あたり 0.5 ml のイソプロパノール (関東化学、東京)を加え、攪拌した後、4 °C にて 12,000 x g、15 分間遠心分離した。得られた沈査に 75%エタノールを加え、攪拌した後、4 °C にて 7,000 x g、15 分間遠心分離した。得られた沈査を 50  $\mu$ l の DEPC 処理水にて溶解し、total RNA 溶液とした。抽出した total RNA は Nanodrop (ND-1000, Nanodrop tecqnologies Inc.,DE, USA) にて濃度測定後、1.05  $\mu$ g/ $\mu$ l になるように DEPC 処理水で希釈した。

#### (4) Northern blot

20  $\mu$ g の total RNA を 50%ホルムアミドを含むサンプルバッファーに溶解し、15% アクリルアミド-8M 尿素ゲルの各レーンに流し、200V の定電圧にて分離した。分離後、速やかにゲルを取り出し、セミドライ式プロット装置にて RNA をナイロンメンブランに電氣的に移行させた。その後、1200J、5 分間で UV クロスリンクを行い、ナイロンメンブランに RNA を固定した。ナイロンメンブランは、7%SDS を含む 200 mM チャーチリン酸バッファーで 37°C、30 分プレインキュベーションを行った後、<sup>32</sup>P にてラベリングした miR-132 に対するプローブを用いて 37°C で一晩ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションの後、0.1%SDS を含む SSPE で洗浄した後、イメージングプレートに暴露し、イメージングアナライザー (FLA-3000, Fuji Film、東京)で解析した。

#### (5) 細胞分画

抽出した脳に 20 mM Trizma base、2mM EDTA、0.5mM EGTA を含むサンプルバッファーを 10 倍量加え、200 rpm でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルを 1,000 x g で 10 分間遠心分離し、得られた沈査を核画分とした。得られたサンプルは、蛋白定量を行った後、30  $\mu$ g/19 $\mu$ l の濃度に希釈し、-80°C にて保存した。

#### (6) Western blot 法

核画分のタンパク質 20  $\mu$ g を 2 % SDS、10 % グリセロール と 0.2 M  $\beta$ -メルカプトエタノール を含むサンプルバッファーに溶解し、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) に従って、7.5 % の濃度勾配のゲルに注入し、抗原タンパクを分子量の差によって分離した。分離が完了後、速やかにゲルを取りだし、電

気泳動した抗原タンパクをニトロセルロースメンブランもしくは PVDF メンブランに、トランスブロットセル (Bio-Rad Laboratories, CA, U.S.A.) を用い 25 mM Trizma base と 192 mM グリシンを含む トリス-グリシンバッファー中で電氣的に移行させた。メンブランを 5 % ウシ血清アルブミン (Sigma, CO, USA) を含む 0.05 % Tween 20-tris-buffered saline (TTBS) 中でブロッキングした後、特異的抗体 (1:1000 for HDACs, acetylated histone H3; Cell signaling., CA) を加え、一晩インキュベーションを行った。その後、TTBS で洗浄し、膜上で抗原と結合した抗体を 1,0000 倍希釈された house radish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体と室温にて 2 時間インキュベートを行って反応させた。インキュベーション後、TTBS で洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い、蛍光発色性の基質を用いて目的とするタンパクを検出した。

#### (7) 統計学的処理

血中エタノール濃度については測定値を用い、western blot および northern blot についてはコントロール群を 100% としたときの割合を用いた。結果は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は二元配置分散分析を行ったのち、Bonferroni test を行った。

## 4. 研究成果

### (1) アルコールによる中枢神経系のマイクロ RNA の発現変化

エタノール単回投与によるマイクロ RNA の発現変動を検討した結果、エタノール投与後から miR-124、miR-132 の 12 時間以上におよぶ持続的な発現増加が認められた。一方、エタノール投与時における血中濃度の変化については投与後 30 分をピークとして上昇し、その後消失に向かう動態を示した。

これらの結果から、エタノール急性投与による脳におけるマイクロ RNA の発現は、血中エタノール濃度とは異なる挙動を示し、この持続的な発現増加がエタノールの依存形成に関わっている可能性が考えられる。

### (2) アルコール依存時におけるマイクロ RNA の発現変化

エタノール含有液体飼料を慢性処置されたマウスは、休薬後、振戦や痙攣などの離脱症状を発現し、アルコールによる依存が形成されていることが確認された (図 2)。この依存モデルの脳内におけるマイクロ RNA の発現変化を

miR-124, miR-132の2種のマイクロRNAに対するプローブを用いて northern blot 法にて検討した。その結果、依存モデル動物の側坐核を含む前脳辺縁部および腹側被蓋野を含む中脳底部においてmiR-124の有意な発現上昇が認められた。しかしながら、扁桃体領域および前頭皮質領域においては有意な変化は認められなかった。また、miR-132についてはこれらの領域から検出されなかった。このことより、エタノールの依存形成に中脳辺縁ドパミン神経系におけるマイクロRNA、特にmiR-124の上昇が関与する可能性が示唆された。

(3)アルコールによるマイクロRNAの発現変化の機序

近年、このようなマイクロRNAをはじめとするエピジェネティックな調節機構が様々な生理機能を担っていることが明らかとなっている。特にヒストンのアセチル化、脱アセチル化の反応はその後の遺伝子発現において重要な役割を担っている。また、いくつかのマイクロRNAの発現がヒストン脱アセチル化酵素によって調節されているという報告がなされており、エタノールが脳内におけるヒストンアセチル化を調節することでマイクロRNAの発現を調節している可能性も考えられる。そこで、エタノールによる脳内におけるヒストンアセチル化の変化をwestern blot法にて検討した。その結果、エタノール投与後の脳内においてヒストンアセチル化の増加が認められた。このことより、エタノール投与後の脳内におけるマイクロRNAの発現変動にヒストンのアセチル化が一部関与している可能性が示唆された。そこで、エタノールによるヒストンアセチル化の増加がどの脳部位で生じているのかを検討する目的で免疫染色を行った。その結果、エタノール単回投与12時間後の側坐核、腹側被蓋野および扁桃体領域においてヒストンアセチル化の増加が認められた。このことより、エタノール投与によるヒストンアセチル化の増加は腹側被蓋野を起始部とする中脳辺縁ドパミン神経において生じていると考えられる。次に、エタノール投与後の脳内ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の変化について検討した結果、エタノール投与12時間後におけるHDAC4の有意な減弱が認められた。さらに、HDAC阻害薬投与後のマウス脳内においてmiR-124の有意な上昇が認められた。これらのことより、エタノール投与後の脳内におけるマイクロRNAの発現変動にヒストンのアセチル化が一部関与している事を明らかにした。

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2件)

- ① Mizuo, K., Katada, R., Tateda, K., Okazaki, S., Watanabe, S. and Matsumoto, T., Effect of acute ethanol administration on histone deacetylases in mouse brain. *Alcohol Biomed. Res.*, (2011) In press. 査読なし
- ② Mizuo, K., Nishitani, Y., Katada, R., Tateda, K., Okazaki, S., Watanabe, S. and Matsumoto, T., Expression of miR-132 in murine brain after acute ethanol administration. *Alcohol Biomed. Res.*, 29 (2010) 52-54. 査読なし

〔学会発表〕(計8件)

- ① 水尾 圭祐 エタノール急性投与が脳内におけるヒストン脱アセチル化酵素に及ぼす影響アルコール医学生物学研究会 2010年11月26日久留米翠香園ホテル(久留米市)
- ② 水尾 圭祐 エタノール急性投与は脳内におけるヒストンアセチル化を促進する日本アルコール・薬物医学会 2010年10月9日リーガロイヤルホテル小倉(小倉市)
- ③ Keisuke Mizuo Acute ethanol administration changes in the expression of microRNAs in mouse brain. International Society for Biomedical Research on Alcoholism 2010年9月16日 CAPS15(パリ市)
- ④ 水尾 圭祐 エタノール急性投与が脳内におけるヒストンアセチル化に及ぼす影響日本神経科学学会2010年9月4日神戸コンベンションセンター(神戸市)
- ⑤ 水尾 圭祐 アルコールの急性投与は脳内におけるmicroRNA発現に影響を及ぼすか? 包括脳ネットワーク2010年7月28日、29日ホテルさっぽろ芸文館(札幌市)
- ⑥ 水尾 圭祐 エタノールの急性投与は脳内におけるmiR-124の発現を増加させる日本法医学会2010年6月24日タワーホール船堀(東京都)
- ⑦ 水尾 圭祐 アルコールによる中枢神

経系におけるmiR-132の発現動態 アル  
コール医学生物学研究会 2009年11月1  
3日 三井ガーデンホテル千葉(千葉市)

- ⑧ 水尾 圭祐 エタノール急性投与によ  
る脳におけるマイクロ RNA の発現変動  
日本アルコール・薬物医学会) 2009年9  
月9日 パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水尾 圭祐 ( Keisuke Mizuo )

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90459735