

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25年 6月 6日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590636

研究課題名（和文） 酪酐による神経性因子および認知機能への影響—ノックアウトマウスによるモデル研究

研究課題名（英文） Neurotrophic factors and cognitive function after alcohol intoxication in mice model

研究代表者 ジャーナル モストファ(JAMAL MOSTOFA)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50418802

研究成果の概要（和文）：

中枢神経系のコリン作動性神経系(ChNS)は学習や記憶に基本的に重要な役割を果たしている。エタノール(EtOH)およびアセトアルデヒド(AcH)による行動学的な影響、c-fos、神経成長因子(NGF)や脳由来神経栄養因子(BDNF)を含むニューロトロフィンがChNSの活性維持への影響について、アルデヒドログナーゼ(Aldh)2ノックアウト(KO)、アポリポロテイン(Apo)E-KO、野生型(WT)の各マウスを用いて検討した。

Eight-arm radial maze と Morris water maze による行動学的実験では、1)EtOH2.0g/kg 投与はAldh2-KO、ApoE-KO、WTの各マウスで著しい認知機能を低下させ0.5g/kg、1.0g/kg 投与は各遺伝子型間で影響が異なり、2)2.0g/kg 投与は全遺伝子型で長期記憶を低下させ、3)学習能力はAldh2-KOマウスが高く、次いでWT、ApoE-KOマウスの順にくく、遺伝子型により差がある。2.EtOH投与後30分のマウス海馬の各種mRNA発現をReal-time PCR法で検討した。1)c-fosはEtOH(1.0、2.0g/kg)投与Aldh2-KOマウス、EtOH(2.0g/kg)投与WTマウスで強い発現があり、高濃度のEtOHやAcHは発現を促進する。2)(1)EtOH2.0g/kg投与では、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)発現はAldh2-KOマウスで抑制し、アセチルコリンエステラーゼの発現はWTマウスで促進し、(2)EtOHによるNGFやBDNF発現への影響はない、(3)Aldh2-KOはWTマウスに比較してChAT発現は著明に低く、NGFの発現はかなり高い。高濃度のEtOHやAcHは、マウス海馬のChNSの諸因子を変動させるが、NGFやBDNFの発現変動を伴わない。

研究成果の概要（英文）:Here we investigated the effects of ethanol (EtOH) and acetaldehyde (AcH) on behavior, and mRNA levels of nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and c-fos at 30 min after EtOH in Aldehyde dehydrogenase 2 knock (Aldh2-KO), Apolipoprotein E knockout (ApoE-KO) and wild type (WT) mice.

Eight-arm-radial maze and Morris-water maze showed that 1) 2.0 g/kg EtOH impaired spatial memory in all three strains, while lower doses did not have consistent memory effects, 2) a probe trial (drug-free state) showed a sustained memory impairment in mice that had received 2.0 g/kg EtOH previously, regardless of strain, 3) ApoE-KO mice learned more

slowly than WT mice, and the Aldh2-KO mice learned more quickly.

Real time PCR showed that 1) EtOH increased c-fos mRNA expression in ALDH2-KO (1 and 2g/kg) and WT (2.0 g/kg), 2) 2.0 g/kg of EtOH decreased ChAT mRNA in Aldh2-KO mice, while acetylcholinesterase mRNA expression was increased in both strains, 3) acute EtOH failed to alter the mRNA levels of NGF and BDNF and 4) Aldh2-KO mice showed a distinctly lower level of ChAT mRNA and a higher level of NGF mRNA versus WT mice.

Our observation suggests that high EtOH and Ach can alter cholinergic markers and this effect did not modify the levels of NGF and BDNF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医学

科研費の分科・細目：法医学 アルコール

キーワード：

- ① Neurotrophic factor ② Ethanol ③ Acetaldehyde ④ Knockout mice
⑤ Memory

1. 研究開始当初の背景

神経組織栄養因子は脳において通常の神経機能やその可塑性を維持するタンパク質の一群である。これらはストレス下において、中枢神経のコリン作動性神経活動の保護においても重要な役割を果たしている。エタノールは世界で最もよく乱用されている薬物であり、精神や運動機能に影響し、その結果として事故や傷害を誘引し死に至る場合も多い。

われわれはエタノールを投与された動物実験により、脳におけるコリン作動性神経活動に関係する諸因子が著しく抑制がみられることを報告している。これまでに、エタノールにより障害を受けた神経細胞を回復させる薬物は報告されていない。しかしながら、

神経組織栄養因子がエタノールによる神経細胞死を抑制するメカニズムに関与するとする報告がある。そこで、エタノールと神経組織栄養因子との関係に着目した。

2. 研究の目的

アルコール摂取とニューロトロフィンとは密接な関係があることが知られ、特に、慢性投与との関係について動物実験を用いた研究が良く知られている。本研究では、アルコールおよびアセトアルデヒドの急性投与とニューロトロフィン(nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-1and-3, and neurotrophin-4/5)への影響、ニューロトロフィン投与がアルコール誘引による学習や記憶障害を改善するか否かについて動物モデル実験を行う。ニ

ニューロトロフィン投与がアルコール誘引による学習や記憶障害を改善するならば、新しい治療法に道を開く可能性があるものと考えている

3. 研究の方法

この研究では、アルコールを投与し、マウス脳(cortex, hippocampus)のニューロトロフィンとそのレセプターの発現について、リアルタイムPCRと免疫染色法を用いて検討する。

- ① 雄性的 Aldh2 (-/-)、apoE (-/-) および wild-type (C57B2/6J) マウスを用いる。
- ② 実験グループは各マウスについて、生食投与、アルコール (1, 2 and 4 g/kg, 20% [v/v]) 投与で行う。
- ③ アルコール投与後 40 分と 120 分で屠殺し、脳試料を採取し、リアルタイム PCR 及び免疫染色用試料とする。同時に血液を採取しアルコール及びアセトアルデヒド濃度を測定する。

4. 研究成果

Eight-arm radial mazeとMorris water mazeによる行動学的実験では、1) EtOH 2.0g/kg投与はAlhd2-KO、ApoE-KO、WTの各マウスAlhd2-/-マウスはヒトのaldehyde dehydrogenase2 欠損型のモデルとして、ApoE-/-マウスはAlzheimer病のモデルとして用い、エタノール (EtOH) 投与量の違いによるAlhd2-/- およびApoE-/-マウスによる空間認知への影響を調べた。

材料と方法 : Eight arm radial maze (RAM)およびMorris water maze (MWM)を用い、EtOH (20%w/v) 投与量 (0.5-2.0g/kg) の群で行った。

結果と考察 : EtOH投与前の空間認知の記憶はAlhd2-/-マウス、wild type (WT)マウス、ApoE-/-マウスの順で低下し、遺伝子による影響が示唆された。2.0 g/kg EtOH投与では、Alhd2-/-、ApoE-/- およびWTマウスともエラーやエスケープが増加し、空間認知の記憶に失調がみられた。特に Alhd2-/-

マウスはWTマウスと比較して著明であった。両群の脳内EtOH濃度はほとんど差がなく、Alhd2-/-マウスの脳内アセトアルデヒド (AcH) が高濃度であり、EtOHとAcHの相乗作用と考えられる。1.0 g/kg EtOH投与では、Alhd2-/-はRAMでエラーが、WTマウスはMWMでエスケープが増加し、一方、ApoE-/-マウスはRAMあるいはMWMにおいても有意な影響を認めなかった。1.0 g/kg EtOH投与では、EtOHによる空間認知の記憶プロセスによる遺伝子の影響が示唆される。一方、0.5 g/kg EtOH投与群では、3種のマウス群で有意差を認めなかった。

EtOH投与によるおおよそAcHが高濃度で空間認知の記憶は遺伝子の違いが背景にあること、また空間認知のプロセスに対する遺伝子の違いのあることも示唆された。

中枢神経系のコリン作動性神経系 (ChNS) は学習や記憶に基本的に重要な役割を果たしている。エタノール (EtOH) およびアセトアルデヒド (AcH) による行動学的な影響、c-fos、神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) を含むニューロトロフィンがChNSの活性維持への影響について、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (Alhd) 2ノックアウト (KO)、アポリポロタン (Apo) E-KO、野生型 (WT) の各マウスを用いて検討した。

まず著しい認知機能を低下させ 0.5g/kg、1.0g/kg 投与は各遺伝子型間で影響が異なり、2) 2.0g/kg 投与は全遺伝子型で長期記憶を低下させ、3) 学習能力は Alhd2-KO マウスが高く、次いで WT、ApoE-KO マウスの順にく、遺伝子型により差がある。2. EtOH 投与後 30 分のマウス海馬の各種 mRNA 発現を Real-time PCR 法で検討した。1) c-fos は EtOH (1.0、2.0g/kg) 投与 Alhd2-KO マウス、EtOH (2.0g/kg) 投与 WT マウスで強い発現があり、高濃度の EtOH や AcH は発現を促進する。2) (1) EtOH 2.0g/kg 投与では、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 発現は Alhd2 -KO マウスで抑制し、アセチルコリンエステラーゼの発現は WT マウスで促進し、(2) EtOH による NGF や BDNF 発現への影響はない、

(3)Aldh2-KO は WT マウスに比較して ChAT 発現は著明に低く、NGF の発現はかなり高い。高濃度の EtOH や AcH は、マウス海馬の ChNS の諸因子を変動させるが、NGF や BDNF の発現変動を伴わない。

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 5 件)

① Mostofa Jamal

Effects of systemic nicotine, alcohol or their combination on cholinergic markers in the frontal cortex and hippocampus of rat

Neurochemical Research 査読有、35 巻 2010 P1064-1070

② Mostofa Jamal, Kyioshi Ameno, Takanori Miki, Naoko Tanaka, Junichiro Ono, Gatoro Shirakami, Ruby Sultana, Yu Nakamura, Hiroshi Kinoshita

High ethanol and acetaldehyde impair spatial memory in mouse models: opposite effects of aldehyde dehydrogenase 2 and apolipoprotein E on memory、Pharmacol Biochem Behav、

査読有、101 (3)、2012、443-9

③Ruby Sultana, Kyioshi Ameno, Mostofa Jamal, Takanori Miki, Naoko Tanaka, Junichiro Ono, Hiroshi Kinoshita, Yu Nakamura

Low-dose nicotine facilitates spatial memory in ApoE-knockout mice in the radial arm maze

Neurol Sci、査読有、2012 無掲載論文の DOI(デジタルオブジェクト識別子)10.1007/s10072-012-1149-z

④Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Takanori Miki, Ruby Sultana, Naoko Tanaka, Junichiro Ono, Yu Nakamura and Hiroshi Kinoshita.

High ethanol and acetaldehyde increase c-fos mRNA expression in the hippocampus of Aldh2- knockout mice

J Biochem Mol Toxicol、査読有、なし、2013、Under revision

⑤Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Takanori Miki, Naoko Tanaka, Mostofa Ruby, Yu Nakamura, Mitsuru Kumihashi and Hiroshi Kinoshita.

High ethanol- and acetaldehyde-induced cholinergic imbalance in the hippocampus of Aldh2- knockout mice does not affect on mRNA levels of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor

Neurosci Lett、査読有、なし、2013、Under revision、

[学会発表] (計 6 件)

① Mostofa Jamal

Acute alcohol exposure in mice models: impact on memory (94th Japanese Society of Legal Medicine 23-25, June, 2010 Chiba, Japan)

② Mostofa Jamal

Acute alcohol effects and role of acetaldehyde in memory in mice models (International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) 13-16, September, 2010 France, Paris)

③ Mostofa Jamal

Effects of acute ethanol and nicotine on radial-arm maze performance in m

ice models (International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) 13-16, September, 2010 France, Paris)

④ Mostofa Jamal

Effects of ethanol and acetaldehyde on hippocampal c-fos and cholinergic expression in mice models. (95th Congress of Japanese Society of Legal Medicine, June 15-17, 2011, Fukushima, Japan)

⑤ Mostofa Jamal, Ruby Sultana, Kiyoshi Ameno, Naoko Tanaka, Hiroshi Kinoshita, Yu Nakamura

Effects of nicotine on radial-arm maze spatial memory in Apo-E knockout mice (The 50th Annual Meeting the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) (招待講演)2012年06月03日~2012年06月08日 Hamamatsu)

⑥ Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Naoko Tanaka, Mitsuru Kumihashi, Hiroshi Kinoshita

Brain ethanol and acetaldehyde formation, and their central effects in the brain of Aldh2-knockout mice (International Society for Biomedical Research on Alcoholism (ISBRA) (招待講演)2012年09月09日~2012年09月12日 Sapporo)

[図書] (計1件)

Mostofa Jamal, Kiyoshi Ameno, Naoko Tanaka, Mitsuru Kumihashi, and Hiroshi Kinoshita In:
Nicotine Addiction: Prevention, Health effects and Treatment options
Nova Science Publishers Inc., NY, USA

<http://www.novapublishers.com>

2012, 1-23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジャーナル モストファ (JAMA L
MOSTOFA)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50418802