

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 3 月 31 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22592066
 研究課題名（和文）ニコチンによるノルアドレナリントランスポーター遺伝子発現の転写・転写後修飾
 研究課題名（英文）Transcriptional and post-transcriptional regulation of noradrenaline transporter gene expression by nicotine
 研究代表者
 大山 和美 (OHYAMA KAZUMI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手
 研究者番号：00253021

研究成果の概要（和文）：

ラット褐色細胞腫株 PC12 細胞とヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞, およびラット組織におけるニコチンのヒトノルアドレナリントランスポーター(NET)発現に対する影響を検討した。その結果, ヒト NET 遺伝子をどちらの細胞に一過性に導入しても, ニコチンは転写活性に影響しなかったが, SK-N-SH 細胞において短期で NET mRNA 発現および蛋白質量を抑制する一方, PC12 細胞では短期で NET mRNA 発現および蛋白質量を増加させた。また, ラットに対するニコチン単回投与では, 副腎および脳幹において NET mRNA 発現は増加したが, 2 週間にわたる慢性投与では, NET mRNA 発現は逆に減少した。以上の結果から, ニコチンは転写後の機構を介して NET 発現を増加させたり減少させたりする可能性が示唆された。なお, このニコチン慢性投与による NET 発現の減少は, ニコチンの薬理学的作用との関連から臨床的に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effects of nicotine on noradrenaline transporter(NET) expression in PC12 cells derived from rat pheochromocytoma, human neuroblastoma SK-N-SH cells, and rat tissues. Nicotine had no influence on the transcriptional activity of human NET gene constructs transiently transfected in SK-N-SH and PC12 cells. However, nicotine decreased NET mRNA levels within several hours in SK-N-SH cells. In contrast, nicotine up-regulated the mRNA and protein of NET in PC12 cells. A single administration of nicotine increased NET mRNA levels in the adrenal medulla and brain stem of the rat, whereas chronic nicotine treatment for 2 weeks decreased NET mRNA levels. These results suggest that nicotine up- and down-regulates the expression of NET through a posttranscriptional mechanism. The decrease in NET expression induced by nicotine may be of particular clinical relevance to the pharmacological action of nicotine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯科薬理学・ニコチン

1. 研究開始当初の背景

煙草主成分のニコチンは多彩な薬理作用を持ち、歯科臨床においても喫煙に係わる歯周病増悪因子として考えられているが、一方で鎮痛効果を持つことから、その鎮痛機序が新しい疼痛制御の開発に繋がるものと期待されていた。

喫煙が疼痛緩和に働くことは臨床の現場においてもよく経験されることであり、基礎的研究においても種々の疼痛モデルにおいてニコチンが鎮痛作用を有することが示されていたが、その機序については不明な点が多かった。ニコチン様アセチルコリン受容体(nAChR)を介したその作用は、脊髄・中枢レベルで研究されており、当時、侵害受容伝達の制御機構への関与が報告されていた。我々は、脊髄レベルにおいてニコチンがグリア細胞に存在する $\alpha 7$ nAChR を介して神経因性疼痛の症状の一つであるアロディニアの発生を抑制することを報告した(Abdin MJ et al., Life Sci., 80; 9-16, 2006)が、この脊髄レベルでの疼痛制御機構としてはノルアドレナリン(NA)神経系が司る下降性抑制路の存在がよく知られており、抗炎症薬が効かない慢性疼痛治療の第一選択薬である抗うつ薬はその神経伝達物質NAの再取り込みを担うノルアドレナリントランスポーター(NET)を阻害することによりシナプス間隙でのNA濃度の上昇をもたらし、侵害受容伝達の抑制を強めると考えられている。

一方、末梢神経系においてニコチンは神経節 nAChR を介して初期の交感神経系の興奮と持続的な刺激による抑制効果をもたらすことから、その痛みの制御に交感神経系の活動修飾が関与する可能性も示唆されていた。ニコチンによる交感神経系の修飾作用として、NA遊離と受容体応答に関わる種々の蛋白とそれをコードする遺伝子(例えば、NA合成を司るチロシン脱水素酵素(TH)並びにドパミン水酸化酵素(DBH)や α/β アドレナリン受容体等)についてはよく研究がなされていたが、遊離されたNAの再取り込みにより神経伝達を終結させる役割を担う NET についてはほとんど報告がなく不明のままであった。この再取り込み機構の理解なくしては神経伝達の調節を完

全に解明したことにはならないのは当然であり、それゆえ、ニコチンによる NET 発現調節とその機序を明らかにすることは、交感神経系に対するニコチンの作用を理解する上で欠かせない課題であった。

2. 研究の目的

本研究は、ニコチンによる NET 遺伝子の転写・転写後修飾のメカニズムを明らかにし、その NET 発現調節による交感神経系への影響が持つ病態生理学的意義を確立することである。そのため、ニコチンによる(1)NET 遺伝子転写活性の促進、(2)NET transcript からの翻訳促進、のサブテーマに基づき、*in vitro*モデル系として既に確立した上記細胞系と、*in vivo*個体レベルでのモデル動物系において、NET 発現に対するニコチンの作用を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 実験

実験動物としてSD系ラット(♂; 6-7週齢)を用い、ニコチン(0.8mg/kg)を腹腔内に投与した。ニコチンのNET mRNA発現に対する急性効果を検討するための単回投与においては、ニコチン投与30分、2時間、6時間および24時間後に麻酔下にて交感神経節、脳幹および副腎髄質を採取した。さらに、ニコチンの慢性効果を検討するための連続投与においては、1日2回(8:00-9:00, 17:00-18:00)、1週間および2週間連続してニコチンを腹腔内に投与し、ニコチン最終投与24時間後に上記組織を採取した。採取した組織からAcid guanidinium-Phenol-Chloroform法で総RNAを抽出し、逆転写反応後、PCR法およびリアルタイムPCR法にてNET mRNAの発現解析を行った。

(2) *in vitro* 実験

①NET mRNA 発現

検討には、ラット褐色細胞腫由来PC12細胞およびヒト神経細胞由来SK-N-SHを用いた。実験では、細胞を播種し、24時間後にニコチ

ン(10 μ M)を添加して経時的に細胞総 RNA を回収した。なお、NET mRNA の発現変動は回収した細胞を *in vivo*組織と同じ方法で処理し、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。

②NET 蛋白質発現

検討には、ヒト神経細胞由来 SK-N-SH を用いた。実験では、細胞を播種し、24 時間後にニコチン(10 μ M)を添加して経時的に細胞を回収し、抗ヒト NET モノクローナル抗体を用いて、Western blotting 法にて検討した。

③NET 遺伝子の転写・転写後調節におけるニコチンの影響の検討

ヒト NET 遺伝子プロモーター領域を含む約 9kb の NET 遺伝子 5' 領域を挿入したレポーターコンストラクトを SK-N-SH および PC12 細胞に一過性に導入し、レポーターアッセイをおこなった。

4. 研究成果

(1) *in vivo*実験

ニコチン投与によるラット副腎と脳幹の rNET mRNA 発現量は、ニコチン単回投与の急性モデルでは、ニコチン投与 30 分後に増加し、6 時間で通常レベルにまで減少した。一方、慢性投与モデルでは、逆に rNET mRNA 量は減少した。

(2) *in vitro*実験

①ヒト神経細胞由来 SK-N-SH 細胞

ニコチン添加後 30 分から 6 時間まで hNET mRNA レベルは減少したが、24 時間ではコントロールレベルにまで回復した。また hNET 蛋白質量を測定したところ、ニコチン添加後 6 時間ではコントロールと比較して減少したが、24 時間以降では両者に変化は認められなかった。

②ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞

SK-N-SH 細胞とは対照的に、ニコチン処理により短時間では rNET mRNA 発現が増加した。ニコチン添加 30 分後に増加が認められ、2 時間でピークに達し、6 時間後にコントロールレベルに戻ったが、数日単位での長期では逆に減少した。rNET 蛋白質量はニコチン添加 6 時間後に増加したが、24 時間後ではコントロールとの差は認められなかった。

③NET 遺伝子の転写・転写後調節におけるニコチンの影響の検討

SK-N-SH細胞およびPC12細胞のいずれにおいても、ニコチンは hNET 遺伝子転写活性に

影響しなかった。

以上の結果から、ニコチンは短期では NET 発現を上昇させるが、慢性投与では NET 発現を減少させること、また転写活性には影響しないことから転写後修飾に関与する可能性が示唆された。

これまで報告されてきた喫煙におけるニコチンの作用並びに脳でのノルアドレナリンレベルの上昇を考慮すると、ニコチン慢性投与による NET 発現の減少は、臨床的に重要であると考えられる。

一方、本検討ではニコチンによる NET mRNA 発現に対する抑制機序は明確になっていない。したがって、今後はニコチンによる NET mRNA 発現に対する抑制機序を明確にしておく必要がある。

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 4 件)

- ① K. Ohyama et al. Nicotine stimulates transcriptional activity of the human dopamine transporter gene. *Neurosci Lett.* 査読有、471、2010、34-37
- ② C. Sogawa et al. Expression and function of variants of human catecholamine transporters lacking the fifth transmembrane region encoded by exon 6. *PLoS ONE*、査読有、5、2010、e11945
- ③ Sogawa N, Hazehara Y, Kunitomo M, Morita Y, Yoo B, Ohyama K, Sogawa C, Kitayama S. Age-dependent changes in the susceptibility to thiopental anesthesia in mice: analysis of the relationship to the functional expression of GABA transporter, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*、査読有、2012、267-272
- ④ Sogawa N, Hirai K, Sogawa C, Ohyama K, Miyazaki I, Tsukamoto G, Asanuma M, Sasaki A, Kitayama S. Protective effect of cepharranthin on cisplatin-induced renal toxicity through metallothionein

expression. Life Sciences、査読有、
2013. 727-732

[学会発表] (計 7 件)

- ① S. Kitayama, Transcriptional and post-transcriptional regulation of the dopamine and norepinephrine transporters by nicotine. NeuroTalk2010、June 25-28, 2010、Singapore
- ② Chiharu Sogawa, Kazumi Ohyama, Xue-fang Wen, Norio Sogawa, Shigeo Kitayama, Nicotine regulation of the expression of noradrenaline transporter gene, The 11th Biennial Meeting of Asian-Pacific Society for Neurochemistry 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry、2012年09月29日～2012年10月02日、神戸市
- ③ 北山滋雄, 十川千春, 大山和美, 十川紀夫、ヒトノルアドレナリントランスポーター遺伝子5'プロモーター領域の解析、第122回近畿部会、2012年11月16日、豊中市
- ④ 大山和美, 十川千春, 文学方, 森田克也, 十川紀夫, 北山滋雄、ニコチンによるノルアドレナリントランスポーター発現の調節、第122回近畿部会、第122回近畿部会、2012年11月16日、豊中市
- ⑤ 十川紀夫, 十川千春, 文学方, 大山和美, 秦泉寺紋子, 宮脇卓也, 北山滋雄、ヒスタミンH3受容体によるノルアドレナリントランスポーターの機能および発現抑制、第33回岡山歯学会、2012年11月25日、岡山市
- ⑥ Chiharu Sogawa, Kazumi Ohyama, Norio Sogawa, Shigeo Kitayama, Characterization of human noradrenaline transporter gene at 5'-flanking region、第86回日本薬理学会年会、2013年03月21日～2013年03月23日、福岡市
- ⑦ Kazumi Ohyama, Chiharu Sogawa, Xue-fang Wen, Katsuya Morita, Norio Sogawa, Shigeo Kitayama, Post-transcriptional regulation of noradrenaline transporter by nicotine 第86回日本薬理学会年会、2013年03月21日～2013年03月23日、福岡市

[図書] (計 2 件)

- ① Sogawa C, Sogawa N, Kitayama S, Immunocytochemical approaches to the identification of membrane topology of the Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. Applications of Immunocytochemistry. 2012, 17
- ② Kitayama S, Sogawa C, Sogawa N, Molecular and Genetic Basis of the Regulation of Dopamine Transporter. Dopamine: Functions, Regulation and Health Effects. Nova Science, Publishers, 2012. 27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 和美 (OHYAMA KAZUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手
研究者番号：00253021

(2) 研究分担者

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80177873

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30236153

十川 千春 (SOGAWA CHIHARU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10253022

(3) 連携研究者

なし