

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430076

研究課題名(和文) アルコールによる脳内神経の可塑的变化に対する脂質代謝系の機能解析

研究課題名(英文) Mechanisms of lipid metabolism system on neural plasticity in brain by ethanol

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) 3,900,000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、長期多量摂取によって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、エタノールを慢性処置した動物では腹側被蓋野領域において、脂質代謝酵素(ホルモン感受性リパーゼ:HSL)の有意な増加が認められた。さらに同条件下では、ホスファチジルイノシトール(PI)の有意な増加が認められ、これらの経路に対する阻害薬を処置することによりエタノールに対する依存性が抑制された。したがって、エタノールの慢性処置は腹側被蓋野領域における脂質代謝系を変化させ、ドパミン神経系の反応性に影響を与えている可能性が示唆された。

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 3% ethanol for 5 days induced up-regulation of hormone-sensitive lipase (HSL) in ventral tegmental area (VTA) of mice. Moreover, phosphatidylinositol were also increased by chronic treatment with ethanol in VTA. Under the condition, the enhanced ethanol-induced place preference after chronic treatment with ethanol was significantly decreased by the intracerebroventricular administration of disulfiram. These results suggest that chronic treatment with ethanol induces amenability to excitation of the mesolimbic dopamine system, which is mediated by changed lipid metabolism. These changes induced by ethanol may influence the susceptibility to drug dependence.

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 神経可塑性 脂質代謝 モルヒネ

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/kenko2111/b5.html#A51>)。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おり(Penick et al. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1289-1293)、また、アルコール依存症既往歴がある患者では疼痛管理において morphine に対する依存症が形成されやすくなるなど、臨床での治療の弊害が報告されている(Ballantyne & LaForge, *Pain* 2007;129: 235-255)。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(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。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わることが報告されている(Zimatkin et al., *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30: 1500-1505)。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、脳内における細胞においても同様の脂質代謝が起こり得ると考えられる。

脂肪酸やグリセロール 3-リン酸およびこれらの代謝産物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。特にグリセロール 3-リン酸は、情報伝達系に重要なジアシルグリセロールや細胞膜の構成成分であるホスファチジルコリン等に代謝されることが報告されている(Shindou & Shimizu, *J Biol Chem*. 2009;284:1-5)。ジアシルグリセロールは protein kinase C 等のセリン/スレオニンキナーゼを直接的に活性化するだけでなく、プロスタグランジン類へ変換され各種情報伝達系への影響が考えられる。一方、グリセロール 3-リン酸はホスファチジルコリンを始め数種の細胞膜成分へも変換されることから、細胞膜構成成分の変化により、脂質ラフトへ影響を及ぼし機能性タンパク質の集積や細胞接着、細胞内小胞輸送に影響を与える可能性が考えられる。このように、脳内における脂質代謝異常は、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脂質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、morphine に対する反応性の変化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脂質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

本研究申請者は現在までの検討からアルコール依存動物では、BDNF や細胞骨格系、AMPA 受容体、NMDA 受容体、CaMKII、Cdk5 など薬物依存に重要な因子の DNA プロモーター領域において Histone H3 のアセチル化が亢進し、神経の可塑的变化が誘導されている可能性を見出している(Shibasaki et al., *Alcohol Clin Exp Res*. 2012;36:1385-1396, Shibasaki et al., *Synapse*. 2011;65:1244-1250)。このような条件下、リン酸化 CREB や CaMKIV、PKA が増加することを報告しており、予試験において神経の可塑的变化に重要なリン酸化 Akt が減少することを確認している。したがって本研究では、多量飲酒がどのような細胞内情報伝達経路を介して上記の神経可塑性関連遺伝子およびその他の神経可塑性関連因子(Guan et al., *Nature*. 2009;459:55-60)を誘導するのかを明らかにする。その後、関連性が認められた情報伝達経路に対し、どのように脂質代謝経路が関与するかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 使用動物：実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウス(Tokyo Laboratory Animals

Science Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。マウスは恒温室(22±1)において飼育し、明暗条件は8:00点燈、20:00消燈の12時間サイクルとした。摂餌(固形試料 MF; オリエンタル酵母工業)および飲水(水道水)はともに自由摂取させた。

(2) エタノール慢性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。

(3) ドパミン応答性の評価は自発運動促進作用あるいは conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。自発運動促進作用は、tilting cage 法を用いて行った。水平移動による傾きから3つのマイクロスイッチを介して ambulometer により運動量を自動的に計測する直径20 cmの円形ケージを使用した。実験動物は ICR 雄性マウスを用い、まずマウスを新奇環境に慣れさせる目的で30分間の habituation を行った。その後マウスに薬物を投与し、180分間自発運動量の測定を行った。5% エタノールを5日間処置後、3日間休薬し、モルヒネ(5 mg/kg, s.c.)誘発自発運動促進作用により、ドパミン応答性の変化について検討した。CPP 法は、白および黒からなる compartment box を使用した。5% エタノールを5日間処置後、3日間休薬した後、白および黒の区画を自由に往来させ、それぞれの区画における滞在時間を測定し、これをそれぞれ 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エタノール(1 g/kg, p.o.)あるいはモルヒネ(5 mg/kg, s.c.)を投与したマウスを30分間あるいは60分間放置し、2日目には saline を投与し、もう一方の区画に60分間放置する操作を、合計2 session 行った。Saline のみで条件づけを行った群を溶媒対照群とした。条件づけの翌日に pre-test 値と同様の操作を行い post-test 値とした。Post-test 値と pre-test 値の差をスコア(sec)として算出した。

(4) Western blot 法:5%エタノールを5日間処置した群を0時間とし、その後休薬6、12、24時間あるいは対照群のマウスより全脳を摘出して脳アトラスに従い腹側被蓋野を含む領域を分画した。組織を lysis buffer と共に、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。サンプルに electro-phoresis sample buffer を加え、SDS-PAGE 法に従って、ポリアクリルアミドゲル中の各レーンに標品 20 µg 蛋白を適

用し分離した。分離後、PVDF メンブランに転写させた。メンブランを5% nonfat dried milk を含む phosphate-buffered saline (PBS)中でブロッキングし、各種特異的の一次抗体と共に、反応させるため、1時間室温で反応させた後、二次抗体を加え室温にて更に1時間反応させた。反応後、ケミルミノエッセンス法に従い、目的とするタンパク質を同定した。

(5) 統計解析:すべてのデータは平均値 ± 標準誤差(mean ± S.E.M.)で示した。有意性の評価には二元配置分散分析を用い、各値は Bonferroni/Dunnett's test あるいは Student's t-検定を用いて評価した。

4. 研究成果

まず始めに、エタノール摂取時における神経可塑性関連因子について検討した。慢性摂取時および休薬後における可塑性にかかわる因子の変化について検討したところ、精神依存に重要な腹側被蓋野領域において、神経可塑性に重要な glycogen synthase kinase 3 (GSK3) の活性化が認められたことから(図1)エタノール慢性摂取により神経の可塑的变化が誘導されていると考えられる。そこで GSK3 の阻害薬であるリチウムを前処置したところ、エタノール慢性摂取により認められる、モルヒネに対するドパミン関連行動の増強は有意に抑制された(図2)。

図 1

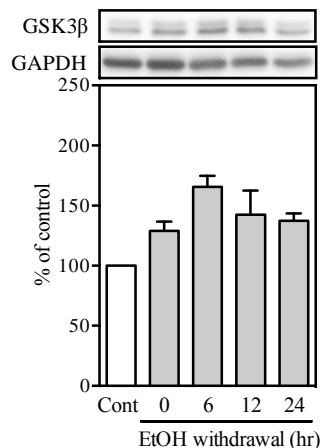
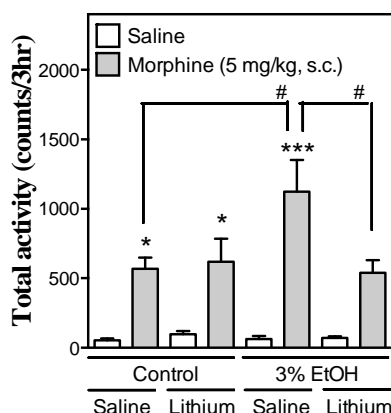


図 2



以上の結果より、エタノール慢性摂取により細胞内情報伝達系の変化に伴う神経の可塑的变化が誘導され、依存症や再燃が引き起こされたと推察される。

次に、脂質代謝酵素や細胞膜構成成分の変化とエタノール慢性処置の関連性について検討を行った。アルコール慢性処置時におけるエタノール代謝酵素である ALDH2 の変化について検討したところ、対照群に比べアルコール慢性処置動物の腹側被蓋野領域では ALDH2 蛋白質の有意な発現増加が認められた (図 3)。実際に、ALDH2 阻害薬である disulfiram の脳室内処置により、エタノール慢性処置後に認められるエタノール誘発報酬効果の増強は、有意に抑制された (図 4)。また、脳内でのアルコール摂取による脂質代謝系の変化についても検討を行った。その結果、上記の ALDH2 の変化が認められた腹側被蓋野領域において、アルコールを慢性処置した動物では脂質代謝酵素 (ホルモン感受性リパーゼ:HSL) の有意な増加が認められた。そこで、アルコール慢性処置時における腹側被蓋野領域での脂質の変化について、LC-MS/MS を用いて検討した。ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) ならびにホスファチジ

図 3

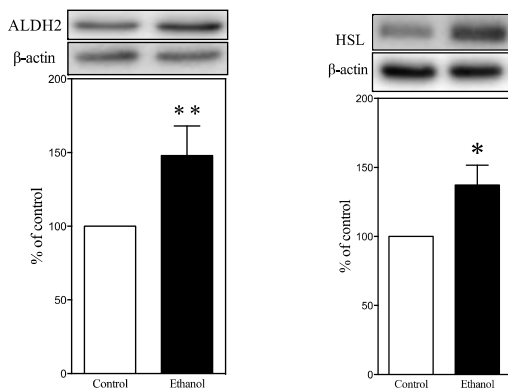


図 4

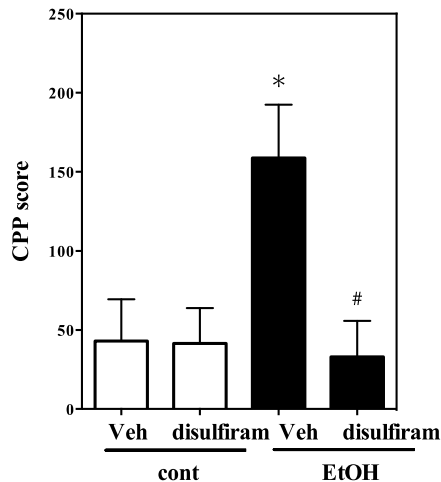


図 5

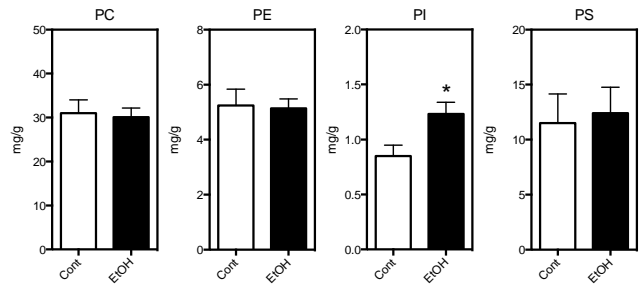


図 6

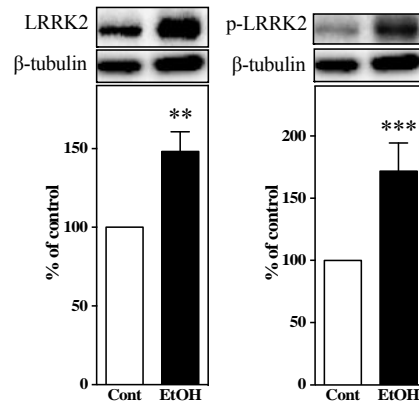


図 7

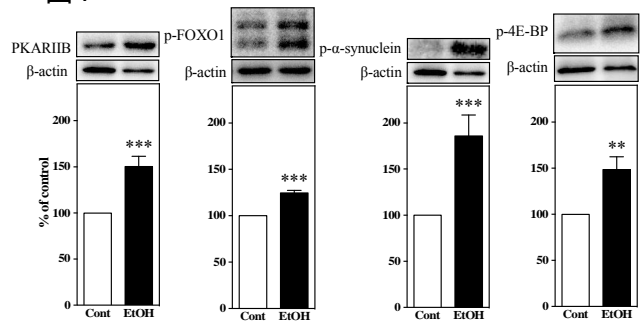
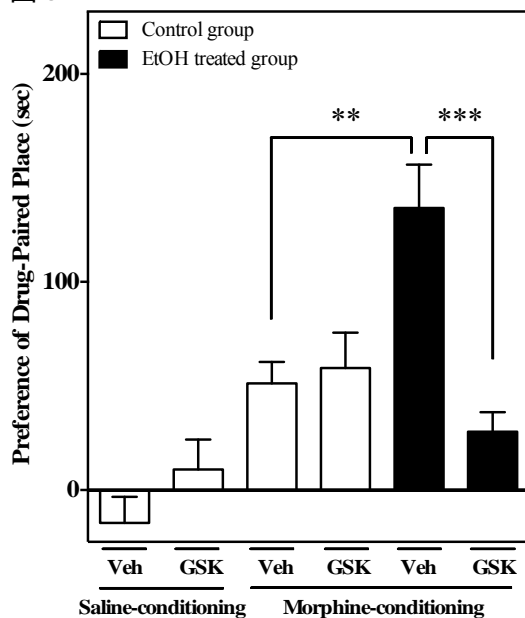


図 8



ルイノシトール (PI) について検討したところ、アルコール慢性処置したマウスの腹側被蓋野領域において、PI の有意な増加が認められた (図 5)。以上の結果より、アルコール慢性処置により腹側被蓋野において脂質代謝系が変化する可能性が示唆された。

ここまでの結果を基に、実際にドパミン神経の機能変化に関わる因子について検討した。現在までに dopamine 神経系の可塑的变化への関連因子として、leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) が報告されている。そこで、ethanol 慢性処置モデルにおける LRRK2 の関与について検討したところ、LRRK2 および p-LRRK2 は腹側被蓋野領域においてタンパク質発現量の有意な増加が認められた (図 6)。さらに、同部位において情報伝達系で LRRK2 の下流に位置する γ -synuclein、eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4E-BP) および forkhead box protein O1 (FOXO1) のリン酸化レベルの有意な増加が認められた (図 7)。そこで、ethanol 慢性処置による dopamine 神経機能への影響を検討するために、LRRK2 阻害剤である GSK2578215A (10 nmol/mouse, i.c.v.) を ethanol 慢性処置時に 5 日間投与し、休薬後、morphine (5 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果への影響を検討した。その結果、ethanol 慢性処置により認められる morphine 誘発報酬効果の増強は、LRRK2 阻害剤の処置により有意に減弱した (図 8)。以上、本研究の結果より、ethanol 慢性処置により腹側被蓋野領域において、脂質代謝系に変化が生じ、ドパミン神経系の反応性の亢進に影響を与えている可能性が示唆された。

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 14 件)

1. 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) 771:220-8. 査読有
2. MORI T, ITOH T, YOSHIZAWA K, ISE Y, MIZUO K, SAEKI T, KOMIYA S, MASUKAWA D, SHIBASAKI M, SUZUKI T. Involvement of μ - and δ -opioid receptor function in the rewarding effect of (\pm)-pentazocine. *Addict Biol*. (2015) 4:724-32. 査読有
3. MORI T, OHYA J, ITOH T, ISE Y, SHIBASAKI M, SUZUKI T. Effects of (+)-pentazocine on the antinociceptive effects of (-)-pentazocine in mice. *Synapse*. (2015) 3:166-71. 査読有
4. SHIBASAKI M, TSUYUKI, T.,

ANDO, K., OTOKOZAWA, A., UDAGAWA, Y., WATANABE, K., SHIBASAKI, Y., MORI, T. AND SUZUKI, T.: Implication of KCC2 in the sensitization to morphine by chronic ethanol treatment in mice. *Synapse*, 68, 39-43 (2014) 査読有

5. NAKAMURA, A., FUJITA, M., ONO, H., HONGO, Y., KANBARA, T., OGAWA, K., MORIOKA, Y., NISHIYORI, A., SHIBASAKI M, MORI, T., SUZUKI, T., SAKAGUCHI, G., KATO, A. AND HASEGAWA, M.: G protein-gated inwardly rectifying potassium (KIR3) channels play a primary role in the antinociceptive effect of oxycodone, but not morphine, at supraspinal sites. *Br. J. Pharmacol*, 171, 253-64 (2014) 査読有

6. MORI, T., KOMIYA, S., OHYA, J., UZAWA, N., SUGIYAMA, K., SAITOH, Y., SHIBASAKI M AND SUZUKI, T.: Involvement of 5-HT₂ receptors in the expression of withdrawal diarrhea in morphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol*, 740, 160-7 (2014) 査読有

7. SHIBASAKI M, ISHII, K., MASUKAWA, D., ANDO, K., IKEKUBO, Y., ISHIKAWA, Y., SHIBASAKI, Y., MORI, T. AND SUZUKI, T.: Implication of mGlu5 receptor in the enhancement of morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem. *Eur. J. Pharmacol*, 738, 360-7 (2014) 査読有

8. MORI, T., UZAWA, N., KAZAWA, H., WATANABE, H., MOCHIZUKI, A., SHIBASAKI M, YOSHIZAWA, K., HIGASHIYAMA, K. AND SUZUKI, T.: Differential substitution for the discriminative stimulus effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and methylphenidate in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 350, 403-11 (2014) 査読有

9. MORI, T., RAHMADI, M., YOSHIZAWA, K., ITOH, T., SHIBASAKI M AND SUZUKI, T.: Inhibitory effects of SA4053 on the rewarding effects of abused drugs. *Addict. Biol*, 19, 362-9 (2014) 査読有

10. SHIBASAKI M, MASUKAWA, D., ISHII, K., YAMAGISHI, Y., MORI, T. AND SUZUKI, T.: Involvement of the K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 in the sensitization to morphine-induced hyperlocomotion under chronic treatment with zolpidem in the mesolimbic system. *J. Neurochem*, 125(5), 747-55 (2013) 査読有

11. SHIBASAKI M, WATANABE, K., TAKEDA, K., ITOH, T., TSUYUKI, T., NARITA, M., MORI, T. AND SUZUKI, T.: Effect of chronic ethanol treatment on μ -opioid receptor function, interacting proteins and

morphine-induced place preference. *Psychopharmacology*, 228, 207-215 (2013) 査読有

12. KUROKAWA, K., MIZUNO, K., SHIBASAKI, M., HIGASHIOKA, M., OKA, M., HIROUCHI, M. AND OHKUMA, S.: Acamprosate suppresses ethanol-induced place preference in mice with ethanol physical dependence. *J. Pharmacol. Sci.*, 122(4), 289-98 (2013) 査読有

13. MORI, T., SHIBASAKI, M., OGAWA, Y., HOKAZONO, M., WANG, TC., RAHNADI, M. AND SUZUKI, T.: Comparison of the behavioral effects of bupropion and psychostimulants. *Eur. J. Pharmacol.*, 713(1-3), 370-5 (2013) 査読有

14. MORI, T., SHIBASAKI, Y., MATSUMOTO, K., SHIBASAKI, M., HASEGAWA, M., WANG, E., MASUKAWA, D., YOSHIZAWA, K., HORIE, S. AND SUZUKI, T.: Mechanisms that underlie μ -opioid receptor agonist-induced constipation: Differential involvement of μ -opioid receptor sites and responsible regions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 347(1), 91-9 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計10件)

1. 薬物依存に関する研究(第489報): エタノール慢性処置による脳内におけるエタノール代謝系の変化. 石川 緩, 芝崎真裕, 安藤光史, 池窪結子, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森 友久, 鈴木 勉. 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19-21日, 仙台

2. 薬物依存に関する研究(第488報): Lipopolysaccharides (LPS) による methamphetamine 誘発報酬効果の抑制に対する CB2 受容体の関与. 池窪結子, 芝崎真裕, 安藤光史, 石川 緩, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森 友久, 鈴木 勉. 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19-21日, 仙台

3. 薬物依存の研究(第493報): エタノール慢性処置による低分子量 GTP 結合タンパク質の変化. 男澤杏美, 芝崎真裕, 安藤光史, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森 友久, 鈴木 勉. 第134回日本薬学会年会 2014年3月27-30日, 熊本

4. Change in aldehyde dehydrogenase by chronic treatment with ethanol in the mouse brain. Shibasaki, M., Ishikawa, Y., Ando, K., Ikekubo, Y., Mori, T. and Suzuki, T. 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting 2014年10月2-6日, 横浜

5. 薬物依存の研究(第497報): アルコール慢性処置における LRRK2 を介し

た FOXO1 の変化. 菊田奨之, 芝崎真裕, 安藤光史, 岩瀬祥之, 池窪結子, 石川 緩, 男澤杏美, 岡部賢司, 東あかね, 森 友久, 鈴木 勉. 第131回日本薬理学会関東部会 2014年10月11日, 横浜

6. アルコール慢性処置における LRRK2 の変化. 安藤光史, 芝崎真裕, 菊田奨之, 岩瀬祥之, 池窪結子, 石川 緩, 岡部賢司, 東あかね, 森 友久, 鈴木 勉. 第44回日本神経精神薬理学会 2014年11月20-22日, 名古屋

7. Chronic treatment with ethanol enhanced morphine-induced hyperlocomotion. Ando, K., Shibasaki, M., Tsuyuki, T., Otokozaawa, A., Mori, T. and Suzuki, T. 75th Annual Meeting-College on Problems of Drug Dependence 2013年6月15-20日, San Diego, CA

8. エタノール慢性処置によるモルヒネ誘発 dopamine 遊離量への影響. 安藤光史, 芝崎真裕, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉. 生体機能と創薬シンポジウム 2013 2013年8月29-30日, 福岡

9. Ethanol 慢性処置による morphine 誘発報酬効果増強作用に対する GRK2 の関与. 芝崎真裕, 安藤光史, 男澤杏美, 露木智久, 森友久, 鈴木勉. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013年8月31日, 熊本

10. エタノール慢性処置によるモルヒネ誘発自発運動促進作用の増強効果に対する β -エンドルフィン神経系の関与. 安藤光史, 芝崎真裕, 男澤杏美, 岡部賢司, 菊田奨之, 東あかね, 森友久, 鈴木勉. アルコール・薬物依存関連学会合同学術学会 2013年10月3-5日, 岡山

〔図書〕(計2件)

1. Masahiro Shibasaki, Tomohisa Mori, Tsutomu Suzuki. The Neuropathology Of Drug Addictions And Substance Misuse: The K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 and zolpidem. ELSEVIER, 2016

2. 芝崎真裕, 鈴木 勉 (分担執筆) 新しい診断と治療の ABC83 最新医学社, 2014

〔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