

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860394

研究課題名(和文) アルコール依存・再燃の予防および治療に関わるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic regulation of alcohol dependence

研究代表者

水尾 圭祐 (Mizuo, Keisuke)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90459735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルコールを慢性処置したマウスは依存形成が確認された。アルコール慢性処置後の脳内におけるCdk5の有意な発現上昇が認められた。また、HDAC5の核外移行についてもアルコール慢性処置によって有意に増加した。また、Cdk5阻害薬の投与によって、アルコール慢性処置による離脱症状の発現は有意に抑制された。一方、離脱3日後における脳内のPP2Aの発現量は有意な増加が認められた。そこで、アルコール離脱1日後から10日間の休薬中にPP2A阻害薬を脳室内投与すると再燃形成が抑制された。本研究の結果、Cdk5やPP2AによるHDAC5のリン酸化調節がアルコールの依存および再燃に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mice chronically treated with ethanol revealed severe withdrawal signs. Under these conditions, the expression of Cdk5 was significantly increased in limbic forebrain. The i.c.v. treatment of roscovitine, a Cdk5 inhibitor, during chronic ethanol treatment was completely blocked the development of ethanol dependence. Ten days after withdrawal, we performed a conditioned place preference to evaluate ethanol relapse. At the dose of 0.5 g/kg of ethanol, which produced neither place preference nor aversion in control group, the alcohol group showed significant rewarding effects. PP2A was increased in limbic forebrain (containing nucleus accumbens) at ethanol relapse state. Moreover, i.c.v. treatment of the PP2A inhibitor cantharidic acid during ethanol withdrawal significantly suppressed the ethanol-induced rewarding effect. Our findings suggest that the increase in PP2A caused the dephosphorylation of HDAC5, resulting in the increase of HDAC5 nuclear transport in ethanol relapse.

研究分野：神経科学・薬理学

キーワード：アルコール PP2A Cdk5 HDAC5

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再燃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。このようなアルコールの依存形成時には神経の可塑的变化が生じることが報告されているが(Robinson and Kolb, 2004; Kauer and Malenka, 2007; Mulholland and Chandler, 2007)、その詳細な機序については未だ明らかではない。

我々はこれまでにこのアルコール依存および再燃現象に関わるいくつかの知見を得ている。アルコールの依存時においてヒストン H3 のアセチル化が増加することを報告した(Mizuo et al., 2012)。その一方でアルコール依存形成後の離脱時、再燃時にはヒストンアセチル化は逆に減弱することを報告している(Mizuo et al., 2012)。また、再燃時においてヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)5 の有意な上昇が認められていることから、アルコールの依存及び離脱、再燃時においては HDAC5 を介したヒストンアセチル化の変化が重要であると考えられる。HDAC5 はサイクリン依存性キナーゼ(Cdk)5 によりリン酸化され核外に存在するが、プロテインホスファターゼ(PP)2A によって脱リン酸化されると核内移行し、ヒストンの脱アセチル化を起こすことが知られている(Sucharov et al., 2006, Taniguchi et al., 2012)。この PP2A による脱リン酸化による核内移行の変化がコカインの依存を調節していることが報告されている(Taniguchi et al., 2012)。

これらのことから、Cdk5 および PP2A による HDAC5 のリン酸化、脱リン酸化の変化がアルコールの依存形成ならびに再燃形成に関わっていると考えた。

2. 研究の目的

研究においては、アルコールを用い、薬物依存モデルを liquid diet 法にて作成する。薬物依存を形成し 10 日間の休薬期間を設けた後、再び薬物を投与することによって再燃モデル

を作成する。これらのモデル動物を用い、以下のことを明らかにする。

エタノールの依存及び再燃形成における HDAC5 の役割

エタノールの依存および再燃形成時における Cdk5 ならびに PP2A の役割

エタノールの依存および再燃形成時における Cdk5 ならびに PP2A を介した HDAC5 の核内移行調節機構

Cdk5 阻害薬、PP2A 阻害薬のアルコール依存予防および治療薬としての可能性

3. 研究の方法

すべての実験動物には 5-6 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いた。

(1) エタノール処置

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 4%まで漸増し、1%:1日、3%:2日、4%:7日の計 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。再燃モデルは離脱後 10 日間の休薬期間の後 conditioned place preference 法にてエタノールの報酬効果を評価することで作成した。

(2) 細胞分画

摘出した脳に 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、得られた沈渣を核画分とした。得られたサンプルは、蛋白定量を行った後、30 µg/19µl の濃度に希釈し、-80 °C にて保存した。

(3) Western blot 法

核画分のタンパク質 20 µg を 2% SDS、10% glycerol と 0.2 M β-mercaptoethanol を含む sample buffer 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 glycine を含む Tris-glycine buffer 中で電氣的に移行させた。メンブランを 5% bovine serum albumin (Sigma, CO, USA) を含む 0.05% Tween 20-tris-buffered saline (TTBS) 中でブロッキ

グした後、特異的抗体 (1:1000 for HDAC5, Cdk5, PP2A; Cell signaling., CA, 1:1000 for phospho-Cdk5; Santa Cruz, CA) を加え、一晚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 1,000 倍希釈された house radish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体と室温にて 2 時間インキュベーション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。

(4) 統計学的処理

western 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±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は分散分析を行った。

4. 研究成果

マウスにエタノールを含む液体試料を 10 日間摂取させた後、脳を摘出した。エタノールを慢性処置したマウスは休薬後、著明な離脱症状を示し、依存形成が確認された。エタノール慢性処置後の脳内における Cdk5 の発現については、側坐核を含む limbic forebrain において Cdk5 の有意な発現上昇が認められた。また、Cdk5 のリン酸化についても同様に検討したところ、エタノール慢性処置によって Cdk5 のリン酸化は有意に増加した。次に Cdk5 阻害作用を有する roscovitine をエタノール処置期間にマウスに投与し、エタノール依存形成における Cdk5 の役割について検討した。その結果、roscovitine の投与によって、エタノール慢性処置による離脱症状の発現は有意に抑制された。また、roscovitine の投与によって、Cdk5 のリン酸化は有意に抑制されていた。さらに、エタノールの慢性処置によって、HDAC5 の核内での局在は有意に減少し、細胞質での HDAC5 の局在の増加が認められた。この HDAC5 の核外への移行は roscovitine の投与によってほぼ完全に抑制されていた。Cdk5 のリン酸化は、HDAC5 の核外輸送を増加させ、核内におけるヒストンアセチル化の増加を生じると考えられる。これらのことより、エタノール慢性処置による Cdk5 のリン酸化の増加が HDAC5 のリン酸化を引き起こし、エタノールの依存形成に関与する可能性が示唆された。次に、アルコール依存を形成させたマウスにおいて、離脱 3 日後における脳内の PP2A の発現量を検討した結果、コントロール群と比較して有意な増加が認められた。さらに、再燃形成時においてもこの PP2A の増加は維持されており、離脱により PP2A の持続的な活性化が生じることが明らかとなった。一方、protein phosphatase 1 の発現については離脱時および再燃時と

もにコントロール群と比較して有意な変化は認められなかった。そこで、エタノール離脱 1 日後から 10 日間の休薬中に Can を脳室内投与することでエタノールの再燃形成における PP2A の役割について検討した。その結果、vehicle 群は低用量のエタノールによって著明な報酬効果を示し、再燃が形成されたのに対し、休薬中に Can を投与したマウスはエタノールに対する報酬を示さず、再燃形成が抑制された。また、vehicle 群において増加が認められた PP2A は Can 投与群においてはほぼ通常レベルまで回復していた。さらに、vehicle 群において認められる HDAC5 の増加も休薬中の Can 投与により完全に抑制された。これらのことより、エタノール離脱による PP2A の持続的な増加が HDAC5 の核内移行を促進し、アルコールの再燃形成を一部担っていると考えられる。本研究の結果、アルコール依存および再燃形成には Cdk5 および PP2A を介した HDAC5 の核外、核内への移行が重要である可能性が示唆された。

<引用文献>

Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.

Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844-858.

Mulholland PJ, Chandler LJ (2007) The thorny side of addiction: adaptive plasticity and dendritic spines. *Scientific World Journal* 7:9-21.

Mizuo K, Katada R, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, Matsumoto H (2012) Epigenetic regulation of MIR-124 under ethanol dependence and withdrawal. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 47:155-163.

Sucharov CC, Langer S, Bristow M, Leinwand L (2006) Shuttling of HDAC5 in H9C2 cells regulates YY1 function through CaMKIV/PKD and PP2A. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1029-1037.

Taniguchi M, Carreira MB, Smith LN, Zirlin BC, Neve RL, Cowan CW (2012) Histone deacetylase 5 limits cocaine reward through cAMP-induced nuclear import. *Neuron* 73:108-120.

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 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

水尾 圭祐 Cdk5 阻害薬はアルコール依存形成を抑制する 第 88 回日本薬理学会 2015 年 3 月 18-20 日 名古屋国際会議場(名古屋市)

Keisuke Mizuo Chronic ethanol consumption changes expression of cyclin-dependent kinase 5 in mouse brain Neuroscience 2014 2014 年 11 月 15-19 日 Washington DC (USA)

水尾 圭祐 Protein phosphatase 2A 阻害薬はアルコールの再燃を抑制する平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2014 年 10 月 2-5 日 パシフィコ横浜(横浜市)

Keisuke Mizuo Changes in the expression of protein phosphatases in ethanol withdrawal International Symposium on Advances in Legal Medicine 2014 年 6 月 16-20 日 福岡国際会議場(博多市)

Keisuke Mizuo Role of pretein phosphatase 2A in the development of ethanol relapse Alcoholism and Stress 2014 2014 年 5 月 6-9 日 Volterra, (Italy)

Keisuke Mizuo Changes in the expression of protein phosphatase 2A in ethanol relapse Neuroscience 2013 2013 年 11 月 9-13 日 San Diego (USA)

水尾 圭祐 エタノール依存形成における Cdk5 の役割 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2013 年 10 月 03-05 日 岡山コンベンションセンター(岡山市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

水尾 圭祐 (Keisuke Mizuo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：90459735

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：