

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870974

研究課題名(和文) アルコール依存症形成後に対するニコチン刺激のフラッシュバック現象の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of nicotine dependence and relapse after ethanol vapor inhalation

研究代表者

黒川 和宏 (kurokawa, kazuhiro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30454846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール依存症者における喫煙率は80%を超え、逆に喫煙者におけるアルコール使用障害のリスクは非喫煙者と比較して有意に高く、アルコール依存とニコチン依存は共存することが知られている。本研究では、アルコールおよび nicotine 依存との科学的関連性、特にアルコール身体依存獲得動物を用いて、nicotine 誘発報酬効果形成時における腹側被蓋野の RyRs の機能的関連性について検討した。その結果、アルコール身体依存獲得後における nicotine 誘発報酬効果の亢進には、後部腹側被蓋野の nAChRs  $\alpha 7$  を介した RyR-2 の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ethanol (EtOH) and nicotine have been frequently reported to be co-abused in humans, because EtOH and nicotine are legal and readily available. Several studies have showed that approximately 80% of EtOH-dependent people are smokers and EtOH use is a risk factor for nicotine use. The present study investigated whether the development of nicotine-induced place preference could be modified by exposure of EtOH vapor inhalation prior to nicotine administration and how RyRs participate in the sensitization of nicotine-induced place preference in mice after continuous EtOH vapor inhalation. These results suggest that the facilitated nicotine-induced place preference after 3 days of withdrawal from EtOH inhalation for 6 days is due to up-regulated RyRs-2 via  $\alpha 7$  nAChR activation in dopaminergic neurons of the posterior VTA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬物依存 ニコチン アルコール 細胞内カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

アルコール (EtOH) 依存と nicotine 依存は共存することが知られている。EtOH 依存の発症率は、非喫煙者と比べて喫煙者は 2~3 倍高いことが報告されている。また、EtOH 依存症と診断される患者の約 90% は、喫煙者および nicotine 依存者である。EtOH 依存症者の喫煙本数は、EtOH 飲用量および EtOH 依存症の重症度に相関している。現在までのげっ歯類を用いた研究においても EtOH と nicotine に相互関係があり、EtOH に感受性が高い系統の動物は、nicotine に対しても高い感受性を示し、慢性的に EtOH を自発摂取させることにより、nicotine 誘発自発運動量が亢進する。また、nicotine の反復投与後、EtOH の自発摂取を増加させることが報告されている。

一般に薬物依存症において中脳辺縁 dopamine 神経系が重要な役割を果たしていることが知られている。EtOH および nicotine は、dopamine 神経系の起始核である腹側被蓋野を直接的あるいは間接的に作用することにより、dopamine 神経系を活性化させる。また、腹側被蓋野は解剖学的に前部および後部に分かれ、それぞれ役割が異なっており、特に後部腹側被蓋野は、報酬効果の形成に関与している。このような報告から、後部腹側被蓋野において EtOH と nicotine が作用することにより報酬効果が形成される可能性が考えられるが、その詳細な細胞内情報伝達機構についてはほとんど明らかになっていない。

現在までに本研究申請者は、EtOH の長期投与により L 型高電位開口性カルシウムチャネルである Cav1.2 および Cav1.3 の蛋白質量の増加を伴った細胞内への  $Ca^{2+}$  流入増加が生じ、さらに細胞内小胞体膜上にある ryanodine receptors (RyRs) の蛋白質量の増加を伴った  $Ca^{2+}$  誘導性  $Ca^{2+}$  放出 ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release : CICR) が身体依存形成に関与していることを明らかにしている。また、RyRs は、依存性薬物である覚せい剤およびコカイン誘発報酬効果形成にも重要な役割を担っていることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

上記の観点を踏まえて、アルコール依存時の nicotine の精神依存はどのように変化し、RyRs がどのように関与するのかを明らかにし、薬物治療薬を探索することである。

### 3. 研究の方法

(1)使用動物: 実験には 6~8 週齢の ddy 系雄性マウス (Japan SLC, Hamamatsu, 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 (固形飼料 MF; オリエンタル酵母工業) および飲用水 (水道水) はともに自由摂取と

した。

(2) EtOH 噴霧慢性処置モデル動物の作製  
EtOH: 身体依存動物は Goldstein の方法に従い、EtOH 蒸気 (10-16 mg/L) を 4 あるいは 6 日間持続吸入させることにより作製した。対照群には EtOH を含まない空気を同様の条件で処置した。また、EtOH 脱水素酵素阻害薬である pyrazol (68 mg/kg, i.p.) を 1 日 1 回腹腔内投与し、EtOH の血中濃度を維持した。休薬後に発現する強直性・間代性けいれんをスコア化し、退薬症候の強度を評価した。

(3)精神依存の評価: EtOH を 4 あるいは 6 日間持続吸入させ、3 日間休薬後における nicotine の精神依存形成の変化を conditioned place preference (CPP) 法を用いて報酬効果により評価した。Pre 法に従い nicotine (0.1, 0.3 g/kg, s.c.) あるいは生理食塩水による conditioning を 2 sessions 行った。また、neuronal acetylcholine nicotinic receptors  $\alpha 7$  subunit (nAChRs  $\alpha 7$ ) の阻害薬である methyllycaconitine および RyRs の拮抗薬である dantrolene は、conditioning 時の 30 分前に前部および後部腹側被蓋野に微量注入した。

(4) Western blot 法: EtOH 蒸気曝露直後、EtOH 休薬 3 日後および nicotine の条件づけにより報酬効果が認められたマウスあるいは対照マウスより全脳を摘出し、脳アトラスに従い、腹側被蓋野を含む中脳底部を分画した。組織をホモジナイズした後、SDS-PAGE 法により分離後、ニトロセルロースメンブランに転写させた。メンブランを一次抗体である anti-RyR-1、anti-RyR-2 および anti-RyR-3 と共に 12 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、蛍光法に従い、蛍光発色性基質を用いて目的とする蛋白質を発色させた。

(5) 免疫組織学的染色法: 麻酔はマウスに pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) を投与することにより行った。麻酔下の動物に 21 G の注射針を用いて左心室より 0.4% heparin (Aventis Pharma (株)、東京) を含む生理食塩液を 40 mL 注入し、右心房に切り込みを入れ、脱血させた。その後、4.0% paraformaldehyde を含む PBS に置き換え、20 分全身灌流固定を行った。その後マウス脳を摘出して腹側被蓋野を含む切片を作成し、同固定液により 24 時間固定を行い、その腹側被蓋野を含む切片は、振動式ミクロトームにより 50  $\mu$ m に薄切した。切片をブロックングするため、切片を 1% bovine serum albumin (BSA) に 1 時間浸した。その後 1% BSA で 1000 倍希釈した nAChRs  $\alpha 7$ 、RyR-2 および TH に対する特異的抗体を 1 次抗体として加え、20 °C で 2 晩インキュベートした。その後 PBS で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、1% BSA で 200 倍希釈した cy3 および fitc 標識抗マウス IgG 抗体

を二次抗体として加え、20 °C で 2 時間インキュベートし、PBS で 10 分間の洗浄を 3 回行った。その後切片をスライドグラス上に貼付し、封入した。このスライドグラスを共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

(6)統計処理: すべてのデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.M.) で示した。統計学的有意性は Tukey's multiple comparison test あるいは Student's t-test を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

EtOH 蒸気を 4 日間噴霧後、休薬におけるけいれんの有無を観察した。その結果、EtOH 蒸気 4 日間噴霧後休薬ではけいれんは認められなかった。次に、EtOH 蒸気 4 日間曝露後休薬による nicotine 誘発報酬効果形成の変化について CPP 法を用いて検討

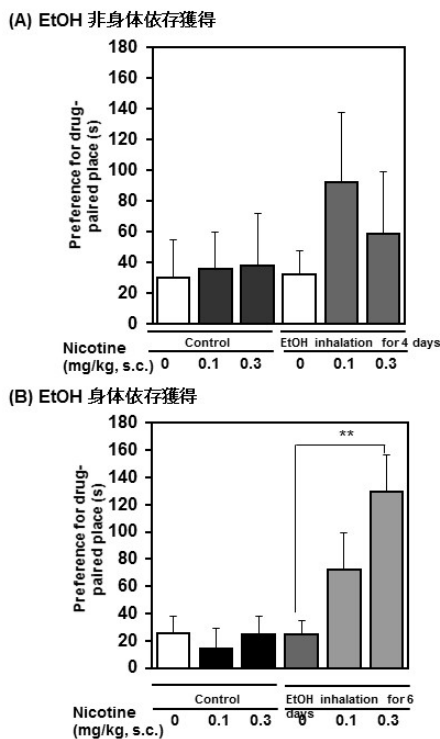


図1 EtOH 噴霧処置後における nicotine 誘発報酬効果の影響

した。その結果、EtOH を処置していない対照群および EtOH 処置群において、nicotine (0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.) による条件づけに、いずれも有意な変化は認められなかった (図 1A)。一方、EtOH 蒸気を 6 日間噴霧後、休薬により、EtOH を曝露したすべてのマウスに強度の強直性・間代性けいれんが認められ、EtOH 身体依存の形成が認められた。そこで、EtOH 身体依存獲得後休薬による nicotine 誘発報酬効果形成の変化について検討したところ、EtOH 無処置の対照群においては、nicotine (0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.) による条件づけに、いずれも有意な変化は認められなかったが、EtOH 身体依存獲得後休薬したマウスでは、nicotine (0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.) 処置により用量依存的かつ有意な報酬効果の形成が認められた (\*\* $p < 0.05$  vs saline conditioning) (図 1B)。nAChRs  $\alpha 7$  の阻害薬

である methyllycaconitine (0.1, 1, 3  $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{L}$ ) を conditioning の 30 分前に前部および後部腹側被蓋野に微量注入し、EtOH 身体依存獲得後休薬における EtOH 誘発報酬効

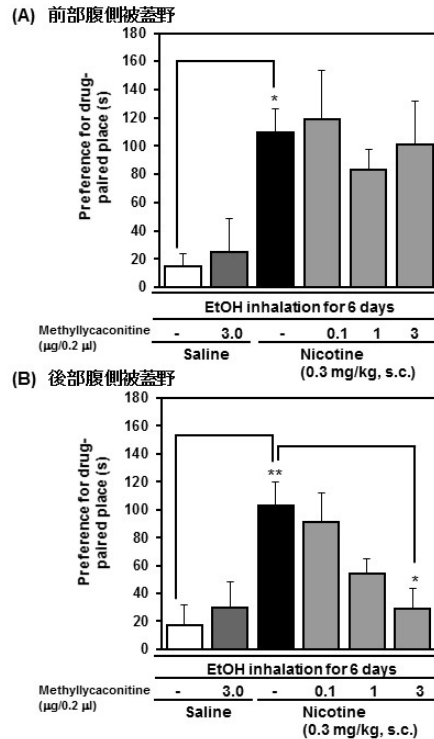


図2 EtOH 身体依存獲得後休薬時における nicotine 誘発報酬効果の増強に対する前部および後部腹側被蓋野の nAChRs  $\alpha 7$  の役割

果形成の感受性亢進に対する効果について検討した。EtOH 休薬後に認められる nicotine 誘発報酬効果の増強は、

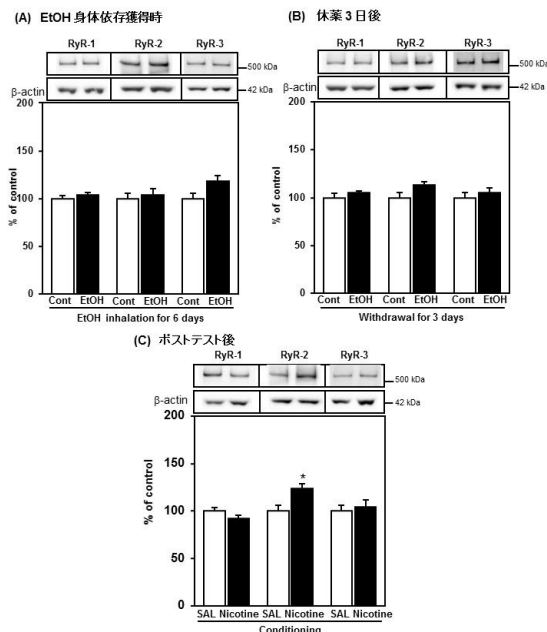


図3 EtOH 身体依存獲得時、休薬時および nicotine 誘発報酬効果が認められたマウスの腹側被蓋野における RyRs の変化

methyllycaconitine を後部腹側被蓋野に微量注入することにより有意に抑制された ( $p < 0.05$  vs vehicle-nicotine group: 図 2B)。しかしながら、methyllycaconitine の前部腹側被蓋野への微量注入は抑制を生じなかつ

た (図 2A)。次に EtOH 身体依存獲得時ならびに休薬時における腹側被蓋野での RyRs の蛋白質量の変化について検討した。EtOH 身体依存獲得時ならびに休薬時において各サブタイプの RyRs に変化は認められなかった(図

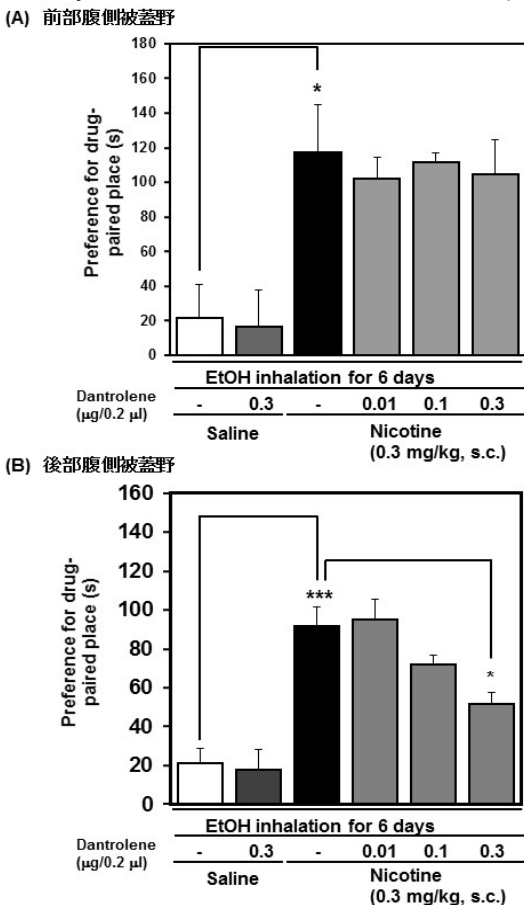


図4 EtOH 身体依存獲得後休薬時における nicotine 誘発報酬効果の

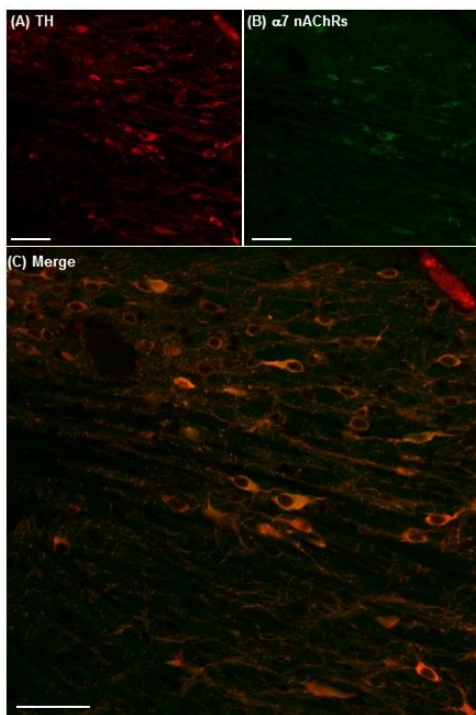


図5 後部腹側被蓋野の dopamine 神経における nAChRs α7 の局在

3A-B)。しかしながら、EtOH 休薬後の nicotine 誘発報酬効果が認められたマウスにおいて、RyR-2 の蛋白質現増加が認められた。一方、type-1 および -3 RyRs の蛋白質現に変化はなかった (図 3C)。

RyRs 阻害薬である dantrolene (0.01, 0.1, 0.3 μg/0.2 μl) を conditioning の 30 分前に前部および後部腹側被蓋野に微量注入し、EtOH 身体依存獲得後休薬における nicotine 誘発報酬効果の増強に対する効果について検討した。EtOH 休薬後に認められる nicotine 誘発報酬効果の増強は、dantrolene を後部腹側被蓋野に微量注入することにより有意に抑制された ( $p < 0.05$  vs vehicle-nicotine group: 図 4B)。一方、dantrolene を前部腹側被蓋野に微量注入してもこの抑制は認められなかった (図 4A)。後部腹側被蓋野における dopamine 神経のマーカーである TH と nAChRs α7 ならび

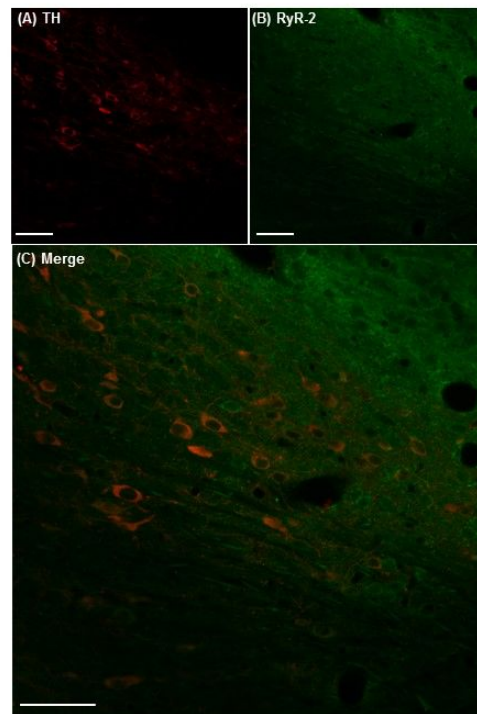


図6 後部腹側被蓋野の dopamine 神経における RyR-2 の局在

に RyR-2 の局在について免疫組織学的染色を用いて二重染色をおこなった。その結果、dopamine 神経のマーカーである TH (図 5A, 6A) と nAChRs α7 (図 5B) あるいは RyR-2 (図 6B) の共局在が認められた (図 5C, 6C)。

本研究成績より、EtOH 身体依存獲得後における nicotine 誘発報酬効果の亢進には、後部腹側被蓋野の nAChRs α7 を介した RyR-2 の活性化が重要な役割を果たしている可能性が推察される。

## 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 6 件)

Kurokawa K., Mizuno K., Ohkuma S. Sensitization of ethanol-induced place preference as result of up-regulation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse nucleus accumbens. J Neurochem. 131: 836-847, 2014 査読有 DOI: 10.1111/jnc.12945

Kurokawa K., Mizuno K., Ohkuma S. Increase of type 2 ryanodine receptors in mouse nucleus accumbens in the development and expression of morphine-induced place preference. J Pharmacol Sci. 126: 285-290, 2014.査読有 DOI: 10.1254/jphs.14147SC

Kurokawa K., Mizuno K., Ohkuma S. Dopamine D1 receptor signaling system regulates ryanodine receptor expression in ethanol physical dependence. Alcohol Clin Exp Res, 37: 771-783, 2013.査読有 DOI: 10.1111/acer.12036

Kurokawa K., Mizuno K., Shibasaki M., Higashioka M., Oka M., Hirouchi M., Ohkuma S. Acamprosate suppresses ethanol-induced place preference in mice with ethanol physical dependence. J Pharmacol Sci. 122: 289-298, 2013.査読有 DOI: 10.1254/jphs.13056FP

Mizuno K., Kurokawa K., Ohkuma S. Regulation of type 1 IP<sub>3</sub> receptor expression by dopamine D2-like receptors via AP-1 and NFATc4 activation. Neuropharmacology. 71: 264-272, 2013. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuropharm

Mizuno K., Kurokawa K., Ohkuma S. Activation of GABAA receptors suppresses ethanol-induced up-regulation of type 1 IP<sub>3</sub> receptors. Synapse. 67:51-55. 2013, 査読有 DOI: 10.1002/syn.21610

〔学会発表〕(計 6 件)

Kurokawa K., Mizuno K., Ohkuma S. Implication of calmodulin in nucleus accumbens in the development of sensitization to ethanol-induced place preference after chronic ethanol treatment. The 88th Annual Meeting of the Japanese pharmacology society. (Nagoya Congress Center, Nagoya, 2015.3.18-20)

黒川和宏, 水野晃治、大熊誠太郎. Nicotine 慢性曝露後の EtOH 誘発報酬効果の逆耐性形成における L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルの関与. 第 24 回 日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会 合同年会. (名古屋国際会議場、名古屋, 2014.11.20-22)

黒川和宏, 水野晃治、大熊誠太郎: 依存性薬物誘発報酬効果形成における細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態の関与とその役割 (シンポジウ

ム). 平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (パシフィコ横浜、横浜, 2014.10.3-4)

黒川和宏, 水野晃治、大熊誠太郎: アルコール慢性曝露後における nicotine 誘発報酬効果形成における腹側被蓋野の ryanodine 受容体の関与. 第 23 回 日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会. (沖縄コンベンションセンター、沖縄, 2013.10.24-26)

黒川和宏, 水野晃治、大熊誠太郎: 薬物依存形成における細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態変化の役割 (シンポジウム). 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. (岡山コンベンションセンター、岡山, 2013.10.4-5)

黒川和宏, 水野晃治、大熊誠太郎: アルコール身体依存獲得後における nicotine 誘発報酬効果形成における ryanodine 受容体の関与. 第 123 回日本薬理学会近畿部会 (ウインクあいち、名古屋, 2013.7.12)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒川 和宏 (KUROKAWA KAZUHIRO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30454846

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし