

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390176

研究課題名(和文) 視床下部ペプチドー扁桃体モノアミン神経性協調動態からみた習慣飲酒形成の機序解明

研究課題名(英文) Habitual alcohol-drinking behavior associated with active ghrelinergic and serotonergic neurons in the lateral hypothalamus and amygdala

研究代表者

吉本 寛司 (Yoshimoto, Kanji)

広島工業大学・その他部局等・教授

研究者番号：70111903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,700,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミン-セロトニン放出とグレリン神経系の相互関係について習慣飲酒モデル動物を用いて検討した。習慣モデルマウスは1、3月齢マウスにおいてアルコール投与により血中グレリン濃度は有意に増加した。習慣飲酒モデルマウスの視床下部外側野GHSR mRNA発現は対照群に比較して有意に増加した。習慣飲酒形成マウスの視床下部外側野GHSRタンパク量はGHSR mRNA発現量同様に増加した。習慣群はアルコール投与により視床下部外側野DA及び5-HT放出が有意に増加した。習慣飲酒モデルマウスは視床下部外側野GHSR抗体陽性細胞の増加が認められ、扁桃体中心GHSR抗体陽性細胞の増加も認められた。

研究成果の概要(英文)：Plasma ghrelin levels decreased following EtOH treatment in 1- and 3-month-old 1-day alcohol vapor-exposed mice (non-habitual alcohol-drinking [NHAD] models). Conversely, EtOH administration increased plasma ghrelin levels in 1- and 3-month-old 20-day alcohol vapor-exposed mice (habitual alcohol-drinking [HAD] models). In vivo ghrelin release in the lateral hypothalamus (LH) increased in NHAD and HAD mice after EtOH perfusion through the brain microdialysis probe membrane. EtOH increased in vivo dopamine (DA), but not serotonin (5-HT), release in the LH in NHAD mice; both DA and 5-HT release increased in the LH in HAD mice. GHS-R1A mRNA expression in the LH and GHS-R1A protein levels increased in HAD mice. GHS-R1A-immunoreactive cells were more numerous in the amygdala and LH of HAD mice. These findings support the neurobiologic correlation between the development of habitual drinking behavior and the activation of ghrelinergic and serotonergic neurons in the LH.

研究分野：アルコール依存形成機序解明の神経化学的研究

キーワード：グレリン ドパミン セロトニン 脳報酬系 グレリン受容体 視床下部 扁桃体 アルコール

1. 研究開始当初の背景

(1) グレリンは新しい消化管ホルモンであり、成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性アゴニストとして同定された。グレリンの主要な産生部位は胃分泌細胞であり、胃から分泌されたグレリンは、血中ホルモンとして GH 分泌促進(老化防止、小人症の治療)、食欲の増進(拒食症の治療)、血管系保護(心筋梗塞、心不全名と治療)の作用を有する。グレリンは、脂肪蓄積などエネルギー代謝系や血管拡張、心機能亢進などの循環器系において機能することも明になった。グレリンは、食欲体重増加作用に加えサイトカインの産生抑制や成長ホルモンを介する同化作用が報告されている。一方グレリンは視床下部弓状核の神経細胞にも存在し中枢 GH 分泌調節や摂食調節に関わっている。

(2) 脳腸ペプチドであるグレリンは、食行動調節に影響するだけでなく、各種薬物依存形成にも関与しているがこれらの統一の見解はない。

2. 研究の目的

(1) ヒト習慣飲酒モデル動物を作成し、アルコール行動形成ステージの相違によるグレリンの放出変化を研究する。

(2) 習慣飲酒モデルマウスにおける脳視床下部グレリン放出変化を研究する。

(3) 習慣飲酒モデルマウス視床下部外側野、扁桃体におけるグレリン受容体 mRNA 発現、タンパク質量を研究する。

(4) 以上の研究目的をアルコール行動、依存形成における脳報酬系側坐核-視床下部外側野-扁桃体のドーパミン、セロトニン放出とグレリン神経系の相互関係について習慣飲酒モデル動物を用いて神経化学的に検討する。

3. 研究の方法

(1) アルコール投与による血漿グレリン量変化

アルコールナীবの C57BL/6J 雄マウス(10週齢)にアルコール 2 g/kg 腹腔投与した。アルコール投与 0.5, 1, 2, 4 及び 8 時間後に血液を採取し血漿を分画した。血漿中グレリンは三菱化学 Active Ghrelin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) キットを用いプレートリーダーにより定量した。

(2) アルコール投与による血漿グレリン量変化-加齢による変動

アルコールナীবの C57BL/6J 雄マウス(1, 3 及び 10 月齢)にアルコール 2 g/kg 腹腔投与した。アルコール投与 2 時間後に血液を採取し血漿を分画した。血漿中グレリンは三菱化学 Active Ghrelin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) キットを用いプレートリーダーにより定量した。

(3) 1 日-、2 0 日-アルコール蒸気吸引モデル作成

アルコールナীবの C57BL/6J 雄マウス(1, 3 及び 10 月齢)を用いた。95%エチルアルコールを 85℃ に加温し、アルコール蒸気同時にエアポンプで動物飼育チャンパーに送風する(1.5 L/min)。1 日-アルコール蒸気吸引モデルは、1 日 8 時間のみアルコール蒸気を吸引飼育する。これらのモデルを non-habitual alcohol drinking model (NHAD) とする。一方 1 日 4 時間の吸引から徐々に 6, 8 時間とアルコール蒸気吸引を延長し連続 20 日間アルコール蒸気吸引飼育モデルを作成した。これらのモデルを habitual alcohol drinking model (HAD) とする。HAD モデルマウスは、アルコール蒸気吸引実験終了後 2-ボトル法によりアルコール嗜好性が増加していることを既に確認報告している。引用文献

(4) HAD 及び NHAD モデルにおけるアルコール投与による視床下部外側野グレリン放出変化

HAD および NHAD モデルを上記の方法により作成する。各群 C57BL/6J マウスに抱水クロラク麻酔を行い、視床下部外側野に push-pull プロブガイドカニューレを埋め込みデンタルセメントで固定する。実験当日 push-pull プロブを挿入し視床下部外側野を 0.15% BSA 人工脊髄液で灌流(1 ul/min)し安定させる。プロブ挿入約 3 時間後アルコール 2g/kg 腹腔投与し灌流液を回収する。回収した灌流液は上記の方法に準じてグレリン ELISA キットで定量分析した。

(5) NHAD 及び HAD モデルマウスのグレリン受容体 growth hormone secretagogue receptor 1A の mRNA 発現変化

NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野のグレリン受容体 growth hormone secretagogue receptor 1A の mRNA をリアルタイム PCR 法により定量し受容体タンパク量も同時に定量した。引用文献

(6) アルコール投与による NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野ドーパミン及びセロトニン放出変化

NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野に脳微小透析膜プロブガイドカニューレを挿入しデンタルセメントで固定した。人工脊髄液で灌流し視床下部外側野ドーパミンおよびセロトニン放出の安定を確認し 2-3 時間後に脳微小透析膜プロブを挿入した。200mM アルコール灌流液でプロブ膜を介して視床下部外側野を刺激した。アルコール刺激によるドーパミン及びセロトニン放出変化を電気化学検出器接続高速液体クロマトグラフで定量した。650 mV に設定し灌流液 0.8 mL/min で測定した。引用文献

(7) NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野及び扁桃体のグレリン受容体 growth hormone secretagogue receptor 1A の免疫組織化学

NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野及び扁桃体を採取し 16µm 薄切試料を作

成した。グレリン受容体 growth hormone secretagogue receptor 1A 抗体を用いて視床下部外側野及び扁桃体のグレリン受容体の免疫組織化学的陽性細胞の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 習慣飲酒モデル動物作成装置：2000mL フラスコにペリスタポンプを応用しホットプレートに純エタノールを滴下させる。フラスコ内で蒸気となったアルコールをエアポンプでシールドチャンバーに送風する。このチャンバーに送るアルコール蒸気をタイマーで制御し、アルコール感受性と耐性を把握し習慣飲酒モデル動物を作成する (Fig.1)

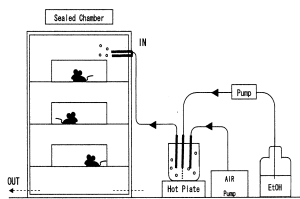


Fig.1 アルコールモデル作成装置

(2) アルコール腹腔投与によりアルコールニープ対照マウスの血漿グレリンは減少した。投与8時間後には対照群レベルに回復した。アルコール投与0.5時間から減少傾向が認められた (Fig.2)

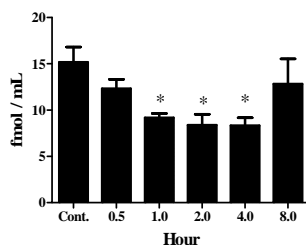


Fig.2 アルコール投与と血漿グレリン量

(3) NHADモデルマウス1M、3M及び10M月齢を用い、アルコール腹腔投与(2 g/kg)後の血漿グレリンの変化を示した。(2)同様に血漿グレリン量は減少した。特に1M及び3Mマウスに有意な減少が認められた。また10M月齢対照マウスの血漿グレリン量は1M月齢群に比較した減少しており、加齢による食欲(食行動)の減少が示唆される(Fig.3)

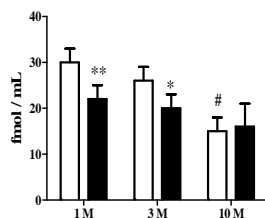


Fig. 3 NHAD の加齢とアルコール誘導グレ

リン量

(4) HADモデルマウス1M、3M及び10M月齢を用い、アルコール腹腔投与(2 g/kg)後の血漿グレリン量の相対変化を示した。NHADモデルマウスと異なり、HADモデル1M及び3M群マウスの血漿グレリンは有意に増加した。10M月齢HADモデルマウスには変化が認められなかった (Fig.4)

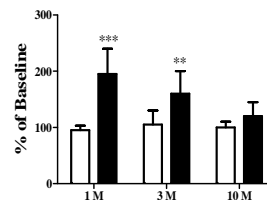


Fig.4 HAD の加齢とアルコール誘導グレリン量

(5) アルコール腹腔投与によるNHAD及びHADモデルマウス視床下部外側野グレリン放出変化:アルコール(2 g/kg, i.p.)投与によりNHAD視床下部外側野グレリン放出は増加した。増加変動は4時間継続し6時間後には対照群レベルに回復した。同様にHAD視床下部外側野グレリン放出も増加したが3時間後には対照群ベースラインに回復した。増加変動はHADに比べてNHAD群が大きい。モデル動物におけるアルコール誘導視床下部外側野グレリン神経系の活性変化が示唆される(Fig.5)。

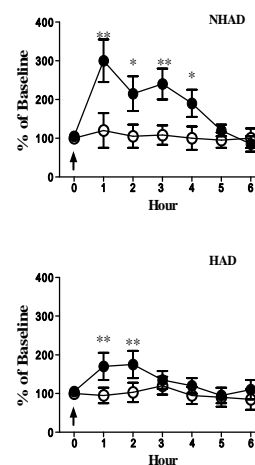


Fig.5 アルコール誘導視床下部グレリン放出量

(6) NHAD及びHADモデルマウスの視床下部外側野グレリン受容体(GHS-R)mRNA発現とそのタンパク量変化:習慣飲酒モデルマウスHADにおいて視床下部外側野のGHS-RmRNA発現は対照群に比較して有意

に増加した(Fig. 6)。

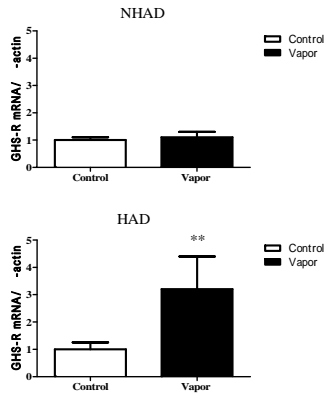


Fig.6 アルコール投与とグレリン受容体 mRNA 発現量

タンパク量変化を検討した結果、HAD 群の受容体 mRNA 発現同様増加しており、習慣飲酒形成にグレリン受容体増加変動が認められた。

(7) アルコールナীবマウス視床下部外側野アルコール灌流刺激によるドパミン及びセロトニン放出変化：アルコールナীবマウスにおけるアルコール刺激(200 mM)誘導において、視床下部外側野ドパミン放出増加が認められた。視床下部外側野のセロトニン放出に有意な変化は認められなかった(Fig. 7)。

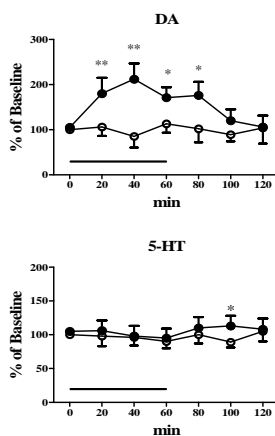


Fig.7 対照群の視床下部 DA,5-HT 放出量

視床下部外側野のセロトニン神経系とドパミン神経系におけるアルコール薬理作用の相違が示唆された。

(8) NHAD 及び HAD モデルマウス視床下部外側野アルコール灌流刺激によるドパミン

及びセロトニン放出変化：アルコールナীবマウスの結果同様(Fig. 7)、NHAD マウス視床下部外側野においてアルコール灌流刺激誘導ドパミン放出変動のみ認められセロトニン放出変動は見られなかった(Fig. 8)。

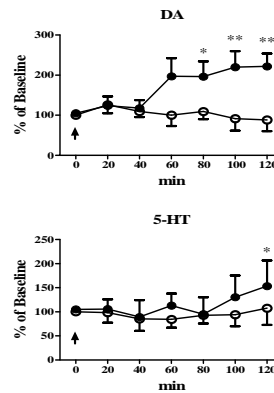


Fig.8 NHAD の視床下部 DA,5-HT 放出量

一方 HAD モデルマウスにおいて、視床下部外側野アルコール灌流誘導刺激によりドパミン及びセロトニン同時放出増加が認められた(Fig. 9)。

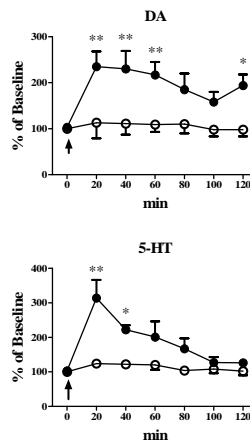


Fig.9 HAD の視床下部 DA,5-HT 放出量

習慣飲酒形成過程において視床下部外側野セロトニン神経系活性が関与していることが示唆された。

(10)NHAD 及び HAD モデルマウスの視床下部外側野及び扁桃体におけるグレリン受容体陽性細胞の免疫組織化学的検討：HAD 視床下部外側野におけるグレリン受容体免疫抗体陽性細胞は著明に増加していた。同様に HAD 扁桃体におけるグレリン受容体免疫抗体陽性細胞も著明に増加していた。

以上、習慣飲酒形成過程における視床下部外側野グレリン神経系活性はアルコール誘導脳報酬系セロトニン神経活性との協調が認められた。引用文献 一部飲酒習慣形成に扁桃体グレリン神経系の関与も示唆された。

引用文献

Yoshimoto, K., Watanabe, Y., Tanaka, M., Kimura, M., 2012. Serotonin 2c receptors in the nucleus accumbens are involved in enhanced alcohol-drinking behavior. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1368-1380

Watanabe, Y., Ikegawa, M., Tanaka, M., 2009. A novel splicing variant from suppresses the activity of full-length signal transducer and activator of transcription 5A. *FEBS. J.* 276, 6312-6323.

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T, Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K. Habitual alcohol drinking behavior associated with active ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and lateral hypothalamus. *Eur Neuropsychopharm* 25 (2) s597-598 (2015)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Arima Y, Yoshimoto K, Namera A, Murata R, Makita R and Nagao M. The sarin-like organophosphorus agent bis (isopropyl methyl) phosphonate induces apoptotic cell death and COX-2 expression in SK-N-SH cells. *Hiroshima J Med Sci* 査読有 65(1) 1-8 (2016)

Aoki M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Tsujimura A, Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M. Involvement of 5-HY2c R RNA editing in accumbal NPY expression and behavior despair. *Eur J Neurosci* 査読有 43 1219-1228 (2016) doi:10.1111/ejn.13233

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T, Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K. Habitual alcohol drinking behavior associated with active ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and lateral hypothalamus. *Eur Neuropsychopharm* 査読有 25 (2) s597-598 (2015)

Yoshimoto K, Namera A, Arima Y, Nagao T, Sahi H, Takasaka T, Uemura T, Watanabe Y, Ueda S and Nagao M. Experimental studies of remarkable monoamine releases and neural resistance to the transient ischemia and reperfusion. *Pathophysiology* 査読有 21 (2014) 309-316.

<http://dx.org/10.1016/j.pathophys.2014.08.005>

Uemura T, Tanaka Y, Higashi K, Miyamori D, Takasaka T, Nagano T, Toida T, Yoshimoto K, Igarashi K and Ikegaya H. Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. *Toxicology* 査読有 310: 1-7(2013)

Inden M, Takata K, Nishimura K, Kitamura, Ashihara E, Yoshimoto K, Ariga H, Honmou O and Shimohama S. Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic stem cells on rotenone-treated parkinsonian mice. *J Neurosci Res*. 査読有

91:62-72 (2013)

〔学会発表〕(計 3 件)

Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Yamaguchi T, Ueda S, Hiraga Y, Nagao M, Ochi K.: Habitual alcohol drinking behavior associated with active ghrelin and serotonin neurons in the amygdala and lateral hypothalamus. 28th European College Neuropsychopharmacology, Aug 31 – Sep 2, 2015, Amsterdam, Netherland

Watanabe Y, Yoshimoto K, Tanaka M.: Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. FEBS-ENBO 2014, 30 Aug-4, September, Paris, France

K. Yoshimoto, S. Ueda, Y. Kitamura, M. Inden, R. Iizuka, K. Ikimura, Y. Watanabe, M. Tanaka, H. Ikegaya.: Effects of alcohol ingestion on levels of plasma ghrelin and in vivo release of ghrelin in the lateral hypothalamus of C57BL/6J mice. 2012 ISBRA World Congress September 9-12, 2012 Sapporo, Japan 98A, P025, Alcoholism Clinical and Experimental Research, Supplement 36(9) (2012)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 寛司 (YOSHIMOTO, Kanji)
広島工業大学・生命学部・教授
研究者番号：70111903

(2) 研究分担者

上田 秀一 (UEDA, Shuichi)
独協医科大学・医学部・教授
研究者番号：60150570

渡邊 義久 (WATANABE, Yoshihisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：50363990

上村 公一 (UEMURA, Koichi)

東京医科歯科大学・医歯薬総合研究科(系)研究科・教授
研究者番号：30244586

長尾 正崇 (NAGAO, Masataka)

広島大学・医歯薬看護総合研究科(系)・教授
研究者番号：80227991