

令和元年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08913

研究課題名(和文)機能性RNAネットワーク解析に基づくアルコール依存・再燃制御機構の解明

研究課題名(英文)Clarify the mechanisms in development of alcohol dependence by functional RNA analysis

研究代表者

水尾 圭祐 (Mizuo, Keisuke)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90459735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスを用いてアルコール依存モデルを作成し、microRNAの発現変化を網羅的に解析した。アルコール依存時の脳内におけるmicroRNAの発現は、側坐核において47種の有意な増加が認められた。一方、腹側被蓋野においてはmicroRNAの発現低下が認められた。次にアルコール依存時における脳内TLR4およびTLR7の発現変化を検討した結果、TLR4およびTLR7ともに腹側被蓋野領域において有意な発現上昇が認められた。本研究の結果、microRNAの発現変動を介したTLRの変化がアルコール依存形成に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではアルコール依存時において特異的に変化するマイクロRNAを見出した。この結果はアルコール依存の診断においてマイクロRNAが有用である可能性を示している。また、マイクロRNAのターゲット分子としてTLR4がアルコール依存形成に深く関わっていることを見出したことは、未だ有用な治療薬が存在しないアルコール依存症の治療薬の開発に寄与できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Alcoholism is a complex disorder resulting from multiple interaction between genetic, epigenetic and environmental factors. Alcohol dependence, a major symptom in the alcoholism, has spread worldwide, and the number of the patient is over a million in Japan. In the present study, we investigated the expression of miRNAs in mouse ethanol dependence model. The mice chronically treated with ethanol revealed severe withdrawal signs after discontinuation of ethanol. Total RNA was extracted from mouse limbic forebrain (containing nucleus accumbens). Comprehensive analysis of miRNA expression in ethanol dependence was performed by miRNA array. The miRNA array analysis showed 47 upregulated miRNAs in the ethanol dependence. These findings suggest that the upregulation of miRNAs may associate with the development of ethanol dependence.

研究分野：アルコール・濫用薬物医学

キーワード：アルコール RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、アルコールは依存が形成されてしまうと、断酒しても再度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。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。

我々はこれまでにアルコールの急性投与が脳における miRNA のうち、miR-124 および miR-132 を持続的に増加させることを報告した。

この miR-124 および miR-132 は脳内における主要な microRNA であり、神経の可塑性に大きく関わっていることが報告されている。

また、let-7b は Toll-like receptor 7 の発現調節に関わっていることが報告されている (Lehmann et al. 2012)。これらの microRNA は細胞内での機能制御にとどまらず、エクソソームと呼ばれる細胞外顆粒を介して細胞間を移動していることが報告された (Kosaka et al. 2010)。事実、miR-124 は虚血や心停止後に血中に遊離されることが報告されている (Gilje et al. 2014, Liu et al. 2014)。

これらのことから、アルコール依存時および再燃時において脳脊髄液中および血中に miR-124 を中心とした miRNA が分泌され、細胞間を移動していると推察される

2. 研究の目的

本研究においては、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時における脳内、血中および肝臓での miR-124, let-7b を中心とした miRNA の発現変動

miRNA を介したエタノールの依存および再燃形成機構における toll-like receptor 7 を中心とした自然免疫の関与と神経-免疫連関

miRNA アンチセンスを用いた新たなアルコール依存予防および治療薬の探索

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。

(2) 採血および組織摘出

マウスにイソフルラン麻酔をかけ、十分な麻酔深度において断頭し、氷上において脳を摘出した。摘出した脳は氷上でそれぞれ側坐核、腹側被蓋野、扁桃核、前頭皮質に分画し、 -80°C にて保存した。採血においては十分な麻酔深度において開胸し、酢酸ナトリウムで湿したシリンジを用い右心室より採血した。

(2) Real-time RT-PCR

RT-PCR における脳組織からの total RNA の抽出は QuickGene-800 (Fuji Film) を用い、QuickGene RNA tissue kit SII (KURABO) を使用して行った。得られた total RNA は Nanodrop (ND-1000, Nanodrop technologies Inc., DE, USA) にて濃度測定後、 $2.0\text{ ng}/\mu\text{l}$ になるように Nuclease-free 水で希釈した。cDNA の作成は 10 ng の total RNA を各 microRNA に対応した RT primer, 50U MultiScribe Reverse Transcriptase と混合し、サーマルサイクラーで逆転写させた。作製した cDNA $1.33\text{ }\mu\text{l}$ を各 microRNA に対応した 20x Taqman Small RNA assay probe, 2x Taqman Universal Master Mix II と混合し、CFX connect Real time system (Bio-rad) にて Real-time RT-PCR を行った。定量は内在性 Control として sno202 を用い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法にて行った。

(3) 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 $1,000 \times g$ 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、 $30\text{ }\mu\text{g}/19\mu\text{l}$ の濃度に希釈し、 -80 にて保存した。

(4) Western blot 法

核画分のタンパク質 20 μ g 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) 中でブロッキングした後、特異的抗体 (1:1000 for toll-like receptor 4, toll-like receptor 7; Santa Cruz., CA) を加え、一晩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 1,0000 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。

(5) microRNA array

MicroRNA array における total RNA の抽出は mirVana miRNA Isolation kit (Ambion) を用いて行った。得られた total RNA は Nanodrop (ND-1000, Nanodrop technologies Inc., DE, USA) にて濃度測定後、50 ng/ μ l になるように Nuclease-free 水で希釈した。100 ng の total RNA を calf intestine alkaline phosphatase および Labeling Spike-in 溶液と混合し、37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートし、RNA を脱リン酸化させた。次に脱リン酸化させた RNA に DMSO を加え、100 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした後氷冷し、RNA を熱変性させた。この RNA に T4 RNA Ligase、Cyanine3-pCp を混合し、16 $^{\circ}$ C、120 分間インキュベートすることで RNA に Cy3 を ligation させた。サンプルをカラム精製後濃縮し、8x15K の miRNA array (SurePrint G3 Mouse miRNA r21 Array Kit, Agilent Technologies) 上で 37 $^{\circ}$ C、20 時間ハイブリダイゼーションさせた。その後、0.005% Triton X-102 を含む Gene Expression Buffer にて洗浄し、SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies) でスキャンした後、GeneSpring (Agilent Technologies) にて解析した。

(6) 統計学的処理

RT-PCR および 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 \pm 標準誤差で表示し、統計学的有為差検定は分散分析を行った。

4. 研究成果

本研究では、マウスを用いてアルコール依存モデルを作成し、依存時および離脱時の microRNA の発現変化を様々な脳部位において検討した。アルコール依存時の脳内における microRNA の発現をこれらの部位において、それぞれ、miR-124, miR-132, miR-212, miR-146a, miR-29a, let-7b について real-time RT-PCR にて行った。アルコ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。アルコール依存時の脳内における microRNA の発現は、過去の研究と同様に側坐核において miR-124 の有意な増加が認められた。一方、腹側被蓋野において、miR-212, miR-146a の発現低下が認められた。次に、アルコール依存形成後、アルコールを含まない飼料に置き換えて離脱させた離脱モデルの microRNA 発現変化を検討した結果、アルコール離脱 9 時間後の腹側被蓋野において、microRNA の発現低下が維持されていた。さらに、扁桃体において、miR-212, miR-146a, miR-29a の発現が有意に低下した。以上の結果より、アルコール依存時における脳での microRNA の発現は部位によって異なることが明らかとなり、特に腹側被蓋野および扁桃体における microRNA の持続的な低下がアルコール依存形成に一部関与している可能性が示唆された。

次にアルコール依存形成動物の血中より得られたエクソソームを用いて miR-132, miR-212, miR-146a および let-7b の発現変化を real-time PCR にて行った。しかしながら、いずれの microRNA においても有意な変化が認められなかった。次に、脳内の腹側被蓋野にて変化が認められた miR-146a ならびに miR-212 のターゲットをデータベースより探索した結果、toll-like receptor (TLR) 4 および TLR7 の 2 遺伝子を候補として見出した。そこで、アルコール依存時における脳内 TLR4 および TLR7 の発現変化をウェスタンブロット法にて検討した。その結果、TLR4 および TLR7 とともに腹側被蓋野領域において有意な発現上昇が認められた。このことから、腹側被蓋野における TLR4 および TLR7 の活性化がアルコール依存の形成に関与している可能性が示唆される。そこで、アルコール依存形成における TLR4 および TLR7 の役割を検討するため、まず、TLR4 の阻害薬である TAK-242 を一日一回脳室内投与し、アルコール依存形成に及ぼす影響を検討した。しかしながら、TAK-242 の一日一回脳室内投与ではアルコール依存形成後の離脱症

状を抑制することができなかった。また、アルコール依存時に腹側被蓋野で認められた TLR4 の増加は TAK-242 の一日一回脳室内投与によっても抑制が認められなかった。そこでアルコール処置時に TAK-242 を持続的に注入するとアルコール依存形成後の離脱症状は有意に減弱した。以上の結果より、アルコール依存形成に TLR4 が一部関与することが明らかとなった。

また、アルコール依存時におけるマイクロ RNA のさらなる発現変化を検討するためにマイクロ RNA アレイを用いた網羅的な解析を行った。これまでの研究で確立しているアルコール依存動物を用いて脳を摘出し、total RNA を抽出し、Cy3 をライゲーションした後に 15000 個のマイクロ RNA プローブをもつアレイスライドにハイブリダイゼーションさせ、マイクロアレイリーダーで検出した。その結果、前年度までに得られたマイクロ RNA とは別のマイクロ RNA 47 種について有意な発現増加が認められた。そこで、得られた 47 種のマイクロ RNA についてデータベースからターゲットスクランを行い、1019 種の候補遺伝子を同定した。その候補遺伝子の中で miR-3063-3p のターゲットである histone deacetylase (HDAC) 7 に着目した。HDAC7 はクラス II の HDAC であり、脳内にも発現しているが脳における機能は明らかではない。一方、HDAC7 はマクロファージにおいて TLR4 を介した炎症反応に関わっていることが報告されている (Shakespeare et al, 2013)。また、我々は以前非選択的クラス II HDAC 阻害薬であるトリコスタチン A がアルコールの再燃形成を抑制することを明らかにしている。これらのことからアルコール依存形成における miR-146a を介した TLR4 の活性化において miR-3063-3p を介した HDAC7 の発現調節が関与している可能性が示唆された。

Reference

- Gilje P, Gidlöf O, Rundgren M, Cronberg T, Al-Mashat M, Olde B, Friberg H, Erlinge D (2014) The brain-enriched microRNA miR-124 in plasma predicts neurological outcome after cardiac arrest. *Crit Care* 18:R40
- Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844-858.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 285:17442-17452
- Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, Trimbuch T, Eom G, Hinz M, Kaul D, Habel P, Kälin R, Franzoni E, Rybak A, Nguyen D, Veh R, Ninnemann O, Peters O, Nitsch R, Heppner FL, Golenbock D, Schott E, Ploegh HL, Wulczyn FG, Lehnardt S. (2012) An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 15:827-835
- Liu Y, Zhang J, Han R, Liu H, Sun D, Liu X (2014) Downregulation of serum brain specific microRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci.* 2014
- Mulholland PJ, Chandler LJ (2007) The thorny side of addiction: adaptive plasticity and dendritic spines. *ScientificWorldJournal* 7:9-21.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.
- Shakespeare MR, Hohenhaus DM, Kelly GM, Kamal NA, Gupta P, Labzin LI, Schroder K, Garceau V, Barbero S, Iyer A, Hume DA, Reid RC, Irvine KM, Fairlie DP, Sweet MJ (2013) Histone deacetylase 7 promotes Toll-like receptor 4-dependent proinflammatory gene expression in macrophages. *J Biol Chem.* 288:25362-25374

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Keisuke Mizuo Implications of toll-like receptor signaling in the development of ethanol dependence in mice brain *Neuroscience* 2018, 2018
2. Keisuke Mizuo Implications of innate immune systems in the development of ethanol dependence by changes in the expression of microRNAs in the brain 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine 2018
3. Keisuke Mizuo, Comparison of microRNAs expression between ethanol and methamphetamine dependence *Neuroscience* 2017, 2017
4. 水尾圭祐 アルコール依存時の脳における免疫関連 microRNA 発現変動 第 18 回日本法医学会学術北日本地方集会, 2017

5. 水尾圭祐 アルコール依存時および離脱時における腹側被蓋野での microRNA 発現変動 第 101 次日本法医学会学術全国集会, 2017
6. Keisuke Mizuo, Chronic ethanol consumption and withdrawal affect the expression of microRNAs in mouse brain Neuroscience 2016, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。