

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590269

研究課題名（和文）薬物依存治療薬開発に有効な新規創薬ターゲット分子の検索とその遺伝性相違の解析

研究課題名（英文）Search of new therapeutic agents for drug dependence and analysis of the inherited difference in patients with drug dependence.

研究代表者

桂 昌司 (KATSURA MASASHI)

安田女子大学・薬学部薬学科・准教授

研究者番号：80204452

研究成果の概要（和文）：精神および身体依存のいずれの成立においても共通に認められる L 型高電位開口性カルシウムチャネル機能の亢進に影響を与える生体分子の検索、およびこれら経路とは異なる新規依存形成経路の同定を試みた。依存性薬物の長期曝露により生じる細胞内への持続的な Ca^{2+} 濃度の上昇に対して、heat shock factor のリン酸化とそれに続く熱ショック蛋白 70 の発現増加を介した防御機構が存在すること、また新たに細胞内 Fe^{2+} 含量の著明な増加が生じることを見出し、新たな依存形成メカニズムの経路となる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the detailed and new common mechanisms underlying the accentuation of L-type high voltage-gated calcium channels function in establishment of psychological and physical dependence. Phosphorylation of heat shock factor and following increase in heat shock proteins 70 (HSP70) were observed in sustained ethanol-treated neuronal cells. In addition, intracellular ferrous iron concentrations were also significant increased after long-term exposure of ethanol. These results suggest the possibility that increase in intracellular HSP70 expressions and ferrous iron concentrations are new target for mechanism of drug dependence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：6904

キーワード：薬物依存、アルコール、L 型高電位開口性カルシウムチャネル、熱ショック蛋白、神経細胞、鉄代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 依存性薬物ならびに非合法薬物の使用量は経年的増加の推移を示しており、神経薬理学領域のみならず精神医学および社会医学等の領域において重大な問題となっている。薬物依存症の治療・予防の困難さは、薬物依存の発現機序ならびに退薬後に認められる早期および遷延性退薬徴候の成立機序の本態について数多くの検討が行われてきたにも関わらず、未だ明確な見解が得られていないことに起因している。

(2) 薬物依存症にみられる症状の多くは、依存性薬物によりその症状の程度は異なるものの、依存性薬物の種類に関係なく共通している。そこで、依存形成および退薬症候発現の終末過程が共通している可能性について、これまでに L 型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCC) の機能亢進とそれに続く細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与していることを明らかにしてきた。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 動態変化や L 型 HVCC の各 subunit の発現調節に関与する神経化学的变化から、薬物依存症治療のための創薬ターゲット因子の検索を試みた研究は無く、また依存症患者の依存性薬物に対する感受性体質を、1 塩基多型や他の依存症発現と関連する細胞内情報伝達系の変化との相互解析により解明を試みた研究はない。

2. 研究の目的

(1) これまでの薬物依存に関する研究により見出した、精神および身体依存成立において明らかに異なる発現機序を介しているにも関わらず、最終的には共通機構として認められる L 型 HVCC 機能の亢進作用について、その発現機序の原因およびその後の細胞内情報伝達系に影響を与える生体分子の検索と、これら経路とは異なる新規依存形成経路の同定を試みることで、未だ明確ではない薬物依存症に対する治療および予防を開発するための有用な創薬ターゲット因子に関する情報を集積する。

(2) 本研究で得られた新規創薬ターゲット分子について、従来から報告されている薬物依

存に関連する細胞内情報伝達系変化との関連性について明らかにする。

(3) L 型 HVCC 機能を含む薬物依存発症に重要な創薬ターゲット分子について、依存性薬物間での感受性の相違性や相同性を、例えば遺伝性相違 (epigenetics 解析) 等の面から解析を試みることで、未だ明確な治療法が確立されていない薬物依存症患者の治療に対し、個人体質あるいは進行度の違いに応じた適正医療への応用に向けた基礎的基盤データの集積を行う。

3. 研究の方法

(1) 初代培養神経細胞に 50 mM ethanol、1 μ M morphine 等を連続曝露した場合に生じる L 型 HVCC の機能亢進作用の詳細を、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に続く細胞内情報伝達系の変化 (例えば store operated calcium channel 活性、membrane traffic、protein phosphatase 活性等) から解析を行う。また、変化の認められた生体分子について、依存薬物でも同様の変化が認められるかを Western blot 法等の生化学試験法により確認する。

(2) 未だ明確ではない薬物依存症に対する治療および予防法を開発するための有用な創薬ターゲット因子に関する情報集積を行うために、依存性薬物を連続曝露した神経細胞を用いて、タンパク質の変化を 2 次元電気泳動法、細胞内イオンの変化を誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP) 等を用いて測定し、L 型 HVCC 経路とは異なる新規依存形成経路の同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 依存性薬物の長期曝露に伴う L 型 HVCC の機能亢進の機序の詳細を明らかにする目的で、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う各種 HVCC サブユニットの動態変化と細胞内局在の可視化について検討した。先ず morphine の短期曝露が HVCC サブユニットの membrane traffic に影響を与える可能性について、plasma membrane より細胞内への移行に関与する vacuolar protein sorting (Vps) 34 に着目して検討した。その結果、Vps 34 の発現

量は初代培養大脳皮質神経細胞への morphine 曝露の極めて早期より上昇すること、しかもこの反応に細胞内 Ca^{2+} 応答性の protein kinase $\text{C}\gamma$ が関与していることが明らかとなった。したがって、依存性薬物の曝露早期には細胞内機能性蛋白質の局在が大きく変化している可能性が推察され、この成果は国内外において初めての知見であり、国際誌にて発表した。

(2) L型 HVCC サブユニットの局在を経時的に解析するために、HVCC サブユニットの可視化が重要である。Gateway system により human および mouse に特異的な HVCC サブユニットに蛍光色素を導入した plasmid を作製した。本 plasmid による株化細胞への導入効率は極めて良好であり、またこの plasmid 導入により発現した HVCC サブユニット蛋白質は、内在性 HVCC サブユニット蛋白質と極めて一致した局在を示した。以上の成績より、依存性薬物の連続曝露に伴う HVCC サブユニットの機能変化に影響を与える細胞内調節因子を解析する上で、有用な細胞内局在の可視化法を確立したことは、今後の研究の進展に期待されるものである。

(3) Ca^{2+} 濃度の上昇に続く情報伝達系の変化から依存性薬物の治療に有用な新規ターゲット分子の候補について検討した。その結果、stored operated Ca^{2+} channel の活性を細胞内 Ca^{2+} キレート剤により抑制したところ、L型 HVCC の機能亢進は生じなかった。一方、L型 HVCC の活性持続に影響すると想定される、①L型 HVCC C 末端部位のリン酸化遅延、②L型 HVCC 遺伝子発現に影響する protein phosphatase 活性の変化、および③ミトコンドリアの細胞内 Ca^{2+} 濃度調節への関与についてそれぞれ検討したが、そのいずれの可能性も無いことが判明した。これらの成績は L型 HVCC の機能亢進には L型 HVCC の活性経路とは異なる調節経路が存在する可能性を示唆するものである。また、依存性薬物による細胞内 Ca^{2+} 濃度亢進作用は、従来から報告されている細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節機構とは明らかに異なるものであることから、今後の研究の方向性を決定する上で重要な知見である。

(4) (3)での成績をふまえ、L型 HVCC の機能亢進の関わる新規ターゲット分子の検索を、ethanol 曝露に伴う細胞内ストレス性タンパク質を中心とした機能性蛋白質の動態変化を中心に2次元電気泳動法により行った。その結果、ethanol の連続曝露により L型 HVCC の発現亢進に先行して、新たに熱ショック蛋白質 (HSP) の1つとして知られている heme oxygenase-1 および HSP70 の発現誘導が認められることを見出した。またこの HSP 発現の誘導は、L型 HVCC 阻害薬の前処置により L型 HVCC の機能亢進を遮断した場合には認めなかった。したがって、依存性薬物の長期曝露により生じた細胞内への持続的な Ca^{2+} 濃度の上昇が、神経細胞へのストレス負荷になっている可能性が考えられる (国際誌に投稿準備中)。

(5) Ethanol 曝露に伴う HSP の発現の機序を明らかにする目的で、HSP の発現調節に重要な heat shock factor (HSF) の欠損した細胞株 ($\text{MEF}^{-/-}$ 細胞) を用いて検討した。対照となる $\text{MEF}^{+/+}$ 細胞では、ethanol の曝露より有意な HSP70 の発現増加が認められたが、 $\text{MEF}^{-/-}$ 細胞では HSP の発現増加は認められなかった。また ethanol の曝露急性期より、 $\text{MEF}^{+/+}$ 細胞においてのみ HSF のリン酸化の亢進が認められた。以上の成績より、ethanol の長期曝露により生じる細胞内への持続的な Ca^{2+} 濃度の上昇によるストレスに対して、HSF のリン酸化とそれに続く HSP の発現増加を介した防御機構が存在することが明らかとなり、新規ターゲット分子の候補となり得る可能性が考えられる (国際誌に投稿準備中)。

(6) Ethanol や morphine の連続曝露した神経細胞において変化する細胞内情報伝達経路のうち、機能性タンパク質以外の細胞内低分子を ICP により網羅的解析を行った。依存性薬物の連続曝露により、神経細胞において新たに細胞内 Fe^{2+} 含量の著明な増加が生じることを世界で初めて見出した。この細胞内 Fe^{2+} 含量の上昇は L型 HVCC 阻害薬により消失したことから、依存性薬物の連続投与により生じる細胞内 Fe^{2+} 含量の増加は、新たな依存形成メカニズムの経路となる可能性が考えられる (国際誌に投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Katsura M, Shimoda M, Tatsumi F, Tawaramoto K, Shigeto M, Kaku K. Alcohol-induced hypoglycemia: Evidence for direct activation of L-type voltage-gated calcium channels and ryanodine receptors in pancreatic β cells. *Diabetes* **59**, A210 (2010).
- ② Tatsumi F, Katsura M, Hashiramoto M, Tawaramoto K, Hamamoto S, Shimoda M, Kanda Y, Matsuda M, Kaku K. Molecular mechanism of antihypertensive azelnidipine-induced augmentation of insulin sensitivity: Evidence for antioxidative effect of insulin target 3T3-L1 cells. *Diabetes* **59**, A395 (2010).
- ③ 桂 昌司. パーキンソン病発症に関わる新たな因子: 4E-BP. *ファルマシア* **63**: 365-368 (2010).
- ④ Shibasaki M, Kurokawa K, Katsura M, Ohkuma S. Direct evidence for the up-regulation of Vps34 regulated by PKC γ during short-term treatment with morphine. *Synapse* **63**: 365-368, 2009.
- ⑤ Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Ohkuma S, Kaku K. Low, but physiological, concentration of GLP-1 stimulates insulin secretion independent of the cAMP-dependent protein kinase pathway. *J Pharmacol Sci.* **108**: 274-279, 2008.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 赤木玲子、太野路子、桂 昌司、中井 彰、井上幸江: 種々なストレス応答における熱ショック転写因子 (HSF) の関与. 第 5 回臨床ストレス応答学会, 徳島, 2010.11.20.
- ② Tatsumi, F., Katsura, M., Hashiramoto, M., Tawaramoto, K., Hamamoto, S., Shimoda, M., Kanda, Y., Matsuda, M., Kaku, K.: Molecular mechanism of antihypertensive azelnidipine-induced augmentation of insulin sensitivity: Evidence for antioxidative effect of insulin target 3T3-L1 cells. American Diabetes Association 70th Scientific Sessions. Orlando, FL, USA, 2010.6.26.
- ③ Katsura, M., Shimoda, M., Tatsumi, F., Tawaramoto, K., Shigeto, M., Kaku, K.: Alcohol-induced hypoglycemia:

Evidence for direct activation of L-type voltage-gated calcium channels and ryanodine receptors in pancreatic β cells. American Diabetes Association 70th Scientific Sessions. Orlando, FL, USA, 2010.6.28.

- ④ 辰巳文則、桂 昌司、柱本 満、俵本和仁、濱本純子、下田将司、菅田友紀子、松田昌文、加来浩平: 脂肪細胞におけるジヒドロピリジンによる酸化ストレス抑制作用—3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討—, 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 岡山, 2010.5.28.
- ⑤ 赤木玲子、太野路子、桂 昌司、中井 彰、井上幸江: グルタミンによる消化管保護効果発現のメカニズム. 第 51 回日本生化学会中国・四国支部例会, 山口, 2010.5.14.
- ⑥ 赤木玲子、太野路子、桂 昌司、中井 彰、井上幸江: ストレス負荷による消化管障害に対するグルタミンの保護効果. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.3.28.
- ⑦ 芝崎真裕、黒川和宏、桂 昌司、大熊誠太郎: Methamphetamine 誘発精神依存形成機構における高電位開口性カルシウムチャンネル(HVCCs) $\alpha 2/\delta$ subunit の役割. 第 43 回日本アルコール薬物医学会, 横浜, 2008.9.16.

[図書] (計 3 件)

- ① 大熊誠太郎、芝崎真裕、桂 昌司: 第 4 節 抗喘息薬 「安全性薬理試験マニュアル」, 安東賢太郎、橋本敬太郎、藤森観之助編, *エル・アイ・シー*, pp.222-240 (2009)
- ② 桂 昌司、大熊誠太郎: アルコール依存症病態発現時の神経薬理学的機序、アルコール・医学医療の最前線別冊、医学のあゆみ (竹井謙之編集), pp.101-108 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 昌司 (KATSURA MASASHI)
安田女子大学・薬学部薬学科・准教授