

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890281

研究課題名（和文）

ドパミン受容体を介した異常行動における統合的なエピジェネティクス解析

研究課題名（英文）

Epigenetics analysis in abnormal behavior through dopamin receptors

研究代表者

位田 雅俊（INDEN MASATOSHI）

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：70512424

研究成果の概要（和文）：

パーキンソン病は中脳黒質-線条体ドパミン神経の変性・脱落を特徴とし、線条体ドパミン量の低下の起因する錐体外路症状を示す神経変性疾患である。

本研究では、フルオキセチンを前投与した6-OHDA投与ラットにおけるL-dopa誘発旋回運動の著しい減少が認められた。また、線条体においてフルオキセチン前投与はL-dopa処置によるphospho-p44/42 MAPK、リン酸化ヒストンH3およびGAD67の増加を抑制した。さらに、セロトニン受容体1AのアンタゴニストであるWAY 100135処置では、前述のフルオキセチンの効果は消失した。これらの結果は、L-dopa誘発旋回行動には、ドパミンおよびセロトニン神経系両者は密接に関与したエピジェネティクス変化が生じていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrated that pre-treatment with fluoxetine, an SSRI, significantly suppressed L-DOPA-induced ERK1/2 and histone H3 phosphorylation, as well as L-DOPA-induced rotational behavior in 6-OHDA-lesioned rats. These data indicate that L-DOPA-derived DA, released as a “false transmitter” from 5-HT terminals, enhances levels of phosphorylated ERK and histone H3, and this results in abnormal behavior. Fluoxetine may attenuate these effects of a false transmitter via 5-HT receptor. In further support of this supposition, these effects of fluoxetine were abolished by pre-treatment with WAY 100135, a 5-HT_{1A} antagonist.

These results suggest that fluoxetine may influence motor function in PD via pharmacological modification of interactions between serotonergic and dopaminergic neuronal networks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) パーキンソン病 (2) ドパミン神経 (3) セロトニン神経 (4) 6-hydroxydopamine (5) フルオキセチン (6) L-dopa (7) リン酸化ヒストンH3 (8) 線条体

1. 研究開始当初の背景

Parkinson's disease (PD) は慢性進行性の神経変性疾患で、安静時振戦、無動、筋固縮、姿勢歩行障害の四大臨床症候を特徴とする。主に中年以降に発症し、神経変性疾患の中では AD に次いで高頻度で、人口の高齢化に伴い患者数は増加しつつある。罹患人口は、国内では少なくとも 15 万人、米国ではおおよそ 100 万人、さらに最近の国連による統計では、世界的にその患者数は 400 万人以上とされる。PD には、その治療薬の主流として、ゴールドスタンダードと位置づけられる L-2,3-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) があり、他の神経変性疾患と比較すると治療薬はあるものの、そのすべてが対症療法薬である。また、慢性的に L-DOPA を 4 年間以上服用すると約 40% もの患者に精神症状や日内変動といった重度な副作用が生じる。この副作用の発現機序は現在でも不明であり、著しく患者の Quality of life (QOL) を低下させる。

これまで、慢性的服用による L-DOPA による副作用の発現機序については、これまでの古典的な薬理学的研究だけでは不明な点が数多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、PD モデル動物を用いて、L-DOPA を含めたドパミン受容体アゴニスト投与で惹起される異常行動を指標にして、その個体としての解析を行い、その後、それら PD モデル動物の詳細な解析に、エピソードの観点からのアプローチを取り入れることで、異常行動の発現機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 薬物および試薬

使用した薬物および入手先は、次の通りである。

6-Hydroxydopamine (6-OHDA; Sigma, St Louis, MO, USA)、5,7-dihydroxytryptamine creatinine sulfate (5,7-DHT; Sigma)、ペントバルビタール (大日本住友製薬、大阪)、デシプラミン (Sigma)、メタンフェタミン (大日本住友製薬)、L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa; Sigma)、ベンジルアザイド (Sigma)、フルオキセチン (Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, USA)、8-hydroxy-DPAT (8-OH-DPAT) (Tocris Cookson Inc.)、マウス抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (clone TH-16; Sigma)、マウス抗 tryptophan hydroxylase (TPH) 抗体 (clone WH-3; Sigma)、

ウサギ抗 serotonin transporter (SERT) 抗体 (Millipore, Temecula, CA, USA)、ウサギ抗 phospho-p44/42 MAP kinase 抗体 (phospho-p44/42 MAPK; Cell Signaling Technology, USA)、ウサギ抗 p44/42 MAP kinase 抗体 (p44/42 MAPK; Cell Signaling Technology)、マウス抗 phospho-histone H3 (Ser10) 抗体 (clone RR002; Millipore)、ウサギ抗 histone H3 抗体 (Cell Signaling Technology)、マウス抗 67kDa-glutamic acid decarboxylase (GAD67) 抗体 (Millipore)、マウス抗 β -actin 抗体 (clone AC-15; Sigma)。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

(2) PD ラットモデルの作製

ラットをネンブタール (50 mg/kg i. p.) 深麻酔下で脳定位装置に固定した。6-OHDA (8 μ g/4 μ L) をラット脳地図に従い黒質 (冠矢交差から尾側へ 4.8 mm、外側へ 1.8 mm、硬膜下 7.8 mm) へ投与した。対照群としては phosphate buffered saline (PBS) を投与した。投与後 5 分間静置し、その後ゆっくりとシリンジを引き上げた。縫合は 4 号の医療用絹製縫合糸で行い、麻酔から覚醒するまで監視を行った。6-OHDA 投与してから 1 週間後に、メタンフェタミン誘発旋回運動を測定し、60 分あたり障害側に 300 回転以上するラットを 6-OHDA 投与 PD モデルラットとした。その後 L-dopa 誘発旋回運動を指標にして各群別けを行った。なお、ノルアドレナリン神経系の保護のために、6-OHDA 投与 30 分前にデシプラミン (50 mg/kg, i. p.) を投与した。

(3) セロトニン神経毒投与

ネンブタール (50 mg/kg i. p.) 深麻酔下で、5,7-DHT (150 μ g/20 μ L) をラット脳地図に従い両側の側脳室内 (尾側へ -0.8 mm、外側へ \pm 1.4 mm、硬膜下 -4.6 mm) へ投与した。対照群としては PBS を投与した。投与後 5 分間静置し、その後ゆっくりとシリンジを引き上げた。縫合は 4 号の医療用絹製縫合糸で行い、麻酔から覚醒するまで監視を行った。

(4) 薬物誘発旋回運動

旋回運動の測定は、ロトメーターを用いた。薬物は、メタンフェタミン (2.5 mg/kg i. p.)、L-dopa (10 mg/kg i. p.) をそれぞれ 75 分間計測した。L-dopa 誘発旋回運動を測定する場合は、末梢性の L-dopa 代謝を防ぐためにベンジルアザイド (6.25 mg/kg i. p.) を L-dopa 投与 15 分前に投与している。また、フルオキセチンを用いた L-dopa 誘発旋回運動を測定する場合には、ベンジルアザイド投与 5 分後にフルオキセチン (10 mg/kg

i. p.) を投与した。

(5) 免疫組織化学染色

1 次抗体として、脳切片をマウス抗 TH 抗体 (10,000 倍希釈)、マウス抗 TPH 抗体 (1,000 倍希釈)、ウサギ抗 SERT 抗体 (10,000 倍希釈)、と 4 日間、4°C で反応させた。2 次抗体にはそれぞれビオチン標識ウマ抗マウス IgG 抗体およびビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用い、2 時間反応させた。ビオチン標識抗体はアビジン-ビオチン標識酵素複合法 (ABC 法) において 1 時間反応させることにより検出した。酵素活性は 0.02 % 3,3-diaminobenzidine (DAB)、0.3 % nickel ammonium sulfate および 0.0045 % H₂O₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) により可視化した。その後、PBS-T により洗浄した切片をスライドガラスにはりつけ、エタノールで脱水後、エンテランで封入した。顕微鏡画像は、高解像度デジタルカメラ (Progress 3008; Carl Zeiss, Jena, Germany) を用い撮影した。

(6) 組織化学的定量解析

定量解析は、免疫組織化学染色を行った後、黒質緻密部 (substantia nigra pars compacta; SNpc) および背側縫線核 (dorsal raphe nucleus; RN) における TH および TPH 陽性細胞数を、ステレオロジーの理論に基づいて Stereo Investigator (MBF Bioscience, Willinton, VT, USA) を用いて行った。また、画像解析ソフト (WinRoof; 三谷商事、福井) を用いて、線条体における TH および SERT 陽性密度の解析を行った。

(7) 生化学的解析

薬物投与 30 分後に、ラットを断頭致死させ速やかに脳を摘出した。摘出した脳から線条体を分離し、その質重量を測定した。質重量の 7 倍量の 0.32 M sucrose、1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)、1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)、1 mM orthovanadic acid、1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)、1 μM okadaic acid および 1 μg/mL leupeptin を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 中でホモジナイズした。懸濁液を 800×g、4°C で 15 分間遠心し、核画分を得た。その後、15,000×g、4°C で 20 分間遠心し、上清の細胞質画分と沈降した膜画分とに分離した。膜画分は同量の新しいバッファーを加え、再度ホモジナイズおよび遠心を行い、この操作を計 3 回繰り返すことにより細胞質画分を除去した。タンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford, 1976) に

従い、Bradford protein assay キット (BioRad, Hercules, CA, USA) を用い、マイクロプレートリーダー (Model 550; BioRad, Hercules, CA, USA) およびマイクロプレートリーダーマネージャー (BioRad) で測定した。

Phospho-p44/42 MAP kinase、p44/42 MAP kinase、GAD67 の検出には細胞質画分 10 μg のタンパク質を、phospho-histone H3、histone H3 の検出には核画分 10 μg のタンパク質を、それぞれの分子量に合わせた 7~15% のポリアクリルアミドゲルを選択して SDS-PAGE した。電気泳動後、タンパク質を転写緩衝液 (25 mM Tris、192 mM glycine、20% methanol、0.02% SDS) 中、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, USA) に 100 V、4°C にて 90 分間転写した。PVDF 膜は 5% スキムミルクおよび 0.05 % Tween20 を含む Tris buffered saline (TBST) 中で 1 時間反応させ、非特異結合を防止した。その後、抗 p44/42 MAPK 抗体 (1000 倍希釈)、抗 phospho-p44/42 MAPK 抗体 (2000 倍希釈)、抗 GAD67 抗体 (5000 倍希釈)、抗 phospho-histone H3 抗体 (40,000 倍希釈)、抗 histone H3 抗体 (5000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。2 次抗体には 0.5% スキムミルク含む Horseradish peroxidase (HRP) で標識したヤギ抗マウス IgG 抗体および、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用い、30 分間反応させた。抗体と結合したタンパク質を ECL キット (Enhanced chemiluminescent detection Kit; Amersham, UK) を用いて検出した。定量解析には、バンドは X 線フィルム (Kodak, Rochester, NY, USA) をスキャナー (DuoScan, AGFA, Mortsel, Belgium) により取り込み、NIH image (Ver. 1.56) により発現量を半定量的に解析した。

(8) 統計学的解析

実験結果は平均値±標準誤差 (standard error of mean, SEM) で表示した。比較群と対照群の有意差検定には、分散分析法 (analysis of variance, ANOVA) を用い、後検定には Bonferroni/Dunn 検定法を行った。危険率は、統計学的に 5 % 未満を有意差があると判定した。

4. 研究成果

(1) 神経毒投与ラットにおける行動薬理学的解析および組織学的解析

5,7-DHT 投与 1 週間後においてメタンフェタミンによる旋回運動を測定した結果、6-OHDA/PBS 群および 6-OHDA/5,7-DHT 群にお

いて障害側への旋回運動が観察された。しかし、PBS/PBS 群においては、そのような旋回運動は観察されなかった。また、5,7-DHT 投与 2 週間後において L-dopa による旋回運動を測定した結果、6-OHDA/PBS 群では、メタンフェタミン誘発旋回運動とは逆（非障害側）への旋回運動が観察された。しかし、6-OHDA/5,7-DHT 群では L-dopa 誘発旋回運動の著しい減少が観察された。組織学的解析より、6-OHDA/5,7-DHT 群において、TPH 陽性セロトニン神経細胞数や線条体での SERT の免疫反応性が減少していた。このことから、6-OHDA/5,7-DHT 群では、セロトニン神経内で L-dopa から DA の合成量が減少し、その旋回運動数が減少したと考えられる。

(2) 6-OHDA 投与ラットを用いた L-dopa の効果に対するフルオキセチンの影響

パーキンソン病患者に抗うつ薬として使用される選択的セロトニン再取り込み阻害薬の 1 つであるフルオキセチンを用いて、フルオキセチンを前投与した 6-OHDA 投与ラットにおける L-dopa 誘発旋回運動の著しい減少が認められた。また、線条体においてフルオキセチン前投与は L-dopa 処置による phospho-p44/42 MAPK、リン酸化ヒストン H3 および GAD67 の増加を抑制した。さらに、セロトニン受容体 1A のアンタゴニストである WAY 100135 処置では、前述のフルオキセチンの効果は消失した。しかし、セロトニン受容体 1B のアンタゴニストである CP94253 処置では、フルオキセチンの効果は消失しなかった。これらの結果より、L-dopa 誘発旋回行動には、障害側の線条体において MAPK 経路を介したリン酸化ヒストン H3 の増加などのエピジェネティクス変化が生じていた。また、フルオキセチンは、セロトニン受容体 1A を介して L-dopa によるエピジェネティクス変化を抑制した。

これらの結果は、L-dopa 誘発旋回行動には、ドパミンおよびセロトニン神経系両者は密接に関与したエピジェネティクス変化が生じていることが示唆された。これらの結果は現在論文投稿中である。

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 4 件)

- ① Kitamura Y, Kamibayashi M, Inden M, Yanagida T, Shibaike T, Takata K, Yasui H, Yamashita M, Taniguchi T. Detoxification of 6-hydroxydopamine induced Parkinsonian neurodegeneration

by G-CYPMPPO, a novel radical trapper. Neurochem Int 2011, 58:721-727. 査読有り.

- ② Inden M, Kitamura Y, Abe M, Tamaki A, Takata K, Taniguchi T. Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. Biol Pharm Bull 2011, 34:92-96. 査読有り.
- ③ Kitamura Y, Inden M, Minamino H, Abe M, Takata K, Taniguchi T. The 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration produces microglia-like NG2 glial cells in the rat substantia nigra. Glia 2010, 58:1686-1700. 査読有り.
- ④ Inden M, Uozumi A, Tsujiko K, Iwata S, Matsui H, Fujioka H, Murata R, Fujita N. Adenosine A_{2A} receptor agonist attenuates HDAC inhibitor-induced cell death through the activation of ERK and Akt in PC12 cells. Current Topics in Pharmacology 2009, 13:13-23. 査読有り.

[学会発表] (計 2 件)

① 位田 雅俊, 高田 和幸, 谷口 隆之, 北村佳久. パーキンソン病モデルラットにおける運動機能へのセロトニン神経関連薬の影響. 第 34 回日本神経科学会 (2011 年 9 月 14-17 日), パシフィコ横浜 (神奈川県).

② 魚住 暁, 位田 雅俊, 村田 理沙, 藤岡 洋美, 藤田 典久. Adenosine A_{2A} receptor agonist protects PC12 cells from histone deacetylase inhibitor-induced cell death by activating ERK and Akt pathways. 第 83 回 日本薬理学会年会 (2010 年 3 月 16-18 日), 大阪国際会議場 (大阪府).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

位田 雅俊 (INDEN MASATOSHI)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号: 70512424

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし