

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 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：25861035

研究課題名(和文) アルコールが及ぼす細胞内Cl⁻調節機構への影響研究課題名(英文) Effect of alcohol on GABAA receptors and Cl⁻ transporters

研究代表者

水野 晃治 (Mizuno, Koji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：10551046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール依存症モデルにおいてGABAA受容体alpha6 subunit、NKCC1の発現増加が認められ、このモデルにおいて利尿薬であるブメタニドの脳室内投与によりアルコール摂取量の有意な抑制が認められた。また、神経細胞においてアルコールによるGABAA受容体alpha6 subunitの発現増加にはcRelが関与することも見出した。これらの知見より、アルコール依存症の新たな治療薬として細胞内Cl⁻調節機構が標的となりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：GABAA receptor alpha6 subunit and NKCC1 were up-regulated in alcohol dependent model mice. In addition, bumetanide suppressed chronic intermittent alcohol-induced alcohol consumption. In vitro study showed that alcohol induced GABAA receptor alpha6 subunit up-regulation via cRel activation. These findings indicated that the reagent for modulation of intracellular Cl⁻ concentration may be useful to treat the alcohol dependence.

研究分野：精神神経薬理学

キーワード：alcohol GABA Cl⁻ NKCC1

1. 研究開始当初の背景

近年の精神疾患の罹患率増加を背景として、2011年、厚生労働省により、がん、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病の4大疾患に新たに精神疾患が加わり5大疾患となり、現在、精神疾患治療の重要性が問われている。精神疾患のひとつであるアルコール依存症の罹患者は、現在6000万人程度と言われている日本の飲酒人口のうち、230万人程度と推定されている。長期にわたるアルコールの多量摂取はアルコール依存症を引き起こし、また、アルコール依存症の治療1年後の完全断酒率は30%程度であり、その再発率は極めて高いことが知られている。しかしながら、アルコールは多様な作用を有することから、“アルコール依存症の発症メカニズムおよび離脱メカニズムの明確な見解が得られていない”のが現状である。

一般に薬物依存形成には、腹側被蓋野から扁桃核、側坐核、前頭前野へのドパミン神経投射および、側坐核を中心とした淡蒼球、視床、前頭前野の強化ループが重要な役割を担っている。アルコール依存症について Ca^{2+} チャネルの機能および発現変化に関する報告はなされているが、治療薬開発に結びついていないことから新たなアルコール依存症発症および離脱メカニズムの解明が求められている。

本研究代表者は、これまでにコカインおよびメタンフェタミンによる側坐核および前頭前野におけるドパミン受容体を介した細胞内 Ca^{2+} チャネル(IP_3 受容体)発現増加が薬物依存形成に関与することやドパミン受容体を介した Ca^{2+} シグナル伝達による IP_3 受容体発現増加機構を明らかとしている。また、行動薬理学的手法を用いてエタノールにより IP_3 受容体発現増加を伴った依存形成が行われることや、神経細胞においてエタノールによる IP_3 受容体発現増加は、GABA(A)受容体アゴニストであるムシモールを前処置しておくことで抑制されることも報告している。このようにエタノール誘発性アルコール依存症発症に関わる細胞内 Ca^{2+} チャネル制御機構が GABA(A)受容体により制御されることから、“エタノール誘発性薬物依存形成には Ca^{2+} チャネルのみならず細胞内 Cl^- 調節機構が重要な役割を有する可能性”が示唆される。

また、アルコール曝露により GABA(A)受容体 α サブユニットのうち主に発現している $\alpha 1$ サブユニットが $\alpha 4$ サブユニットへ発現変化することやそれに伴い GABA(A)受容体の機能変化が起こることも報告されている。一方で、未熟な脳において細胞内 Cl^- 濃度が高いために GABA(A)受容体は興奮性シグナル伝達を行なうこと、成長に伴い Cl^- トランスポーター(NKCC1 および KCC2)発現のバランスが変化することにより抑制性に働くことが報告されており、また、出生後から成長に伴い GABA(A)受容体 α サブユニットの発現変化を

きたすことも報告されている。GABA(A)受容体が α サブユニット依存的に機能制御されることから“GABA(A)受容体 α サブユニット、NKCC1 および KCC2 の発現バランスによって GABA(A)受容体の作用が精密に制御されている”ことが示唆され、“アルコール依存症発症時にはこれらのバランスが崩壊しており、神経抑制機構が制御されていない可能性”が考えられる。

2. 研究の目的

エタノールによるアルコール依存症発症と報酬系神経回路における Cl^- 濃度調節機構変化の相関性について検討した例はほとんどないため、本研究ではエタノール誘発性アルコール依存症モデルを用いてエタノールによる細胞内 Cl^- 調節機構の変化とアルコール誘発精神依存の関与および Cl^- トランスポーター発現変化に伴う GABA(A)受容体の機能的変化について行動薬理学的、神経科学的観点から検討し、基礎的知見を得ることを目的とし、将来的にはこれらの知見をもとに Cl^- トランスポーターに作用する薬剤を用いてアルコール依存症モデル動物に対する影響を検討するところまで発展させる。

3. 研究の方法

アルコール依存症モデルを作成し Cl^- 調節機構の時間的、空間的発現変化について検討した。アルコール依存症モデルは、C57BL/6J系マウスを用い Goldstein の方法(J. Pharmacol. Exp. Ther. 1972) を応用し、作成した。アルコール依存症モデルマウスの脳より大脳皮質、側坐核、腹側被蓋野、および扁桃核を分画し、タンパク質を抽出した。Western blot 法により、GABA(A)受容体 $\alpha 1$ サブユニット、GABA(A)受容体 $\alpha 6$ サブユニット、NKCC1、および KCC2 の発現を検討した。アルコール依存症モデルのエタノール消費量に対する NKCC1 阻害剤および KCC2 阻害剤の影響を検討した。

マウス胎児より大脳皮質神経細胞初代培養細胞を行った。これにエタノールを曝露し、mRNA を抽出した。GABA(A)受容体 α サブユニットならびに NKCC1 および KCC2 の発現変化について real time PCR 法を用いて検討を行った。エタノールによる NF κ B ファミリーの発現変化を western blot 法ならびに免疫染色法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) アルコール依存性モデルの作成

アルコール慢性曝露の後、2ボトル法を用いてアルコール消費量の変化を測定したところ、アルコール消費量は対照群に比して3-10日間において有意に増加した。

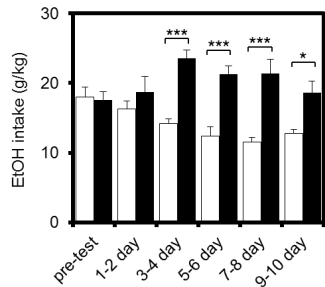


Fig.1 Effect of chronic intermittent EtOH exposure on EtOH consumption.

(2) アルコール依存症モデルの脳内各部位における Cl⁻調節因子発現変化

Goldstein の方法に従い、アルコールを空気曝露することによりアルコール依存症モデルを作成し、このモデルの大脳皮質、側坐核、腹側被蓋野、および扁桃体に含まれる GABA(A)受容体 α 1 および 6 サブユニット、NKCC1 および KCC2 の発現を検討した。その結果、大脳皮質において GABA(A)受容体 α 6 サブユニットおよび NKCC1 の有意な発現増加が認められた。

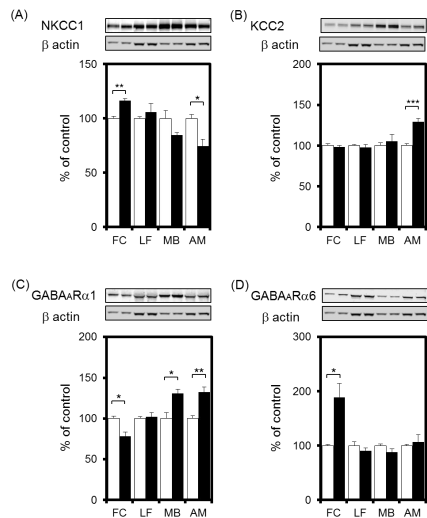


Fig. 2. Effect of chronic intermittent ethanol exposure on protein expression of Cl⁻ transporters and GABA_A receptor α 1 and 6 subunits in the mouse frontal cortex, limbic forebrain including nucleus accumbens, midbrain including ventral tegmental area, and amygdala. FC, frontal cortex; LF, limbic forebrain; MB, midbrain; AM, amygdala.

(3) アルコール依存症モデルにおけるアルコール消費量に対する KCC2 および NKCC1 阻害剤の影響

アルコール依存症モデルにおいて GABA(A)受容体 α 6 サブユニットおよび NKCC1 の発現変動が認められたことから、細胞内 Cl⁻濃度の調節がアルコール摂取量に関与する可能性がある。そこで、本モデルにおけるアルコール消費量に対する KCC2 および NKCC1 阻害剤脳室内投与の影響を検討した。KCC2 阻害剤である VU024551 はアルコ

ール摂取量に有意な影響を及ぼさなかったが、NKCC1 阻害剤である bumetanide は慢性アルコール曝露により増加するアルコール消費量を有意に抑制した。

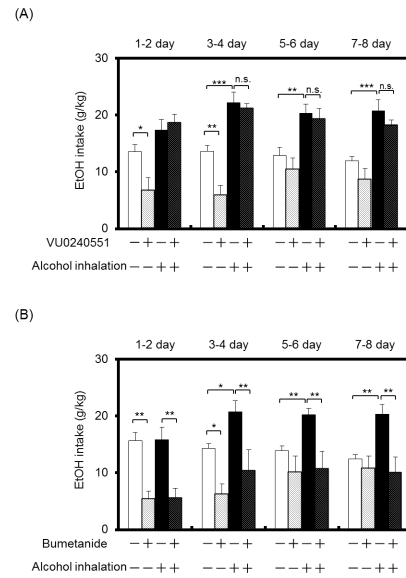


Fig. 3 Effect of KCC2 and NKCC1 inhibitors on CIE-induced increase of alcohol consumption.

(4) 大脳皮質初代培養神経細胞における GABA_A 受容体 α 6 サブユニット、KCC2、および NKCC1 に対するエタノールの作用

大脳皮質初代培養神経細胞にエタノールを 24 時間処置したところ、GABA_A 受容体 α 6 サブユニットの mRNA 発現は有意に増加した。しかしながら、KCC2 および NKCC1 には変化は認められなかった。

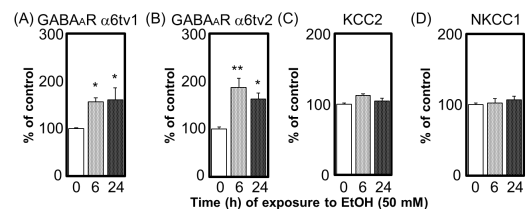


Fig. 4. Effect of continuous ethanol exposure on mRNA expression of GABA_A receptor α 6 subunit, KCC2, and NKCC1 in the cerebral cortical neurons.

(5) 大脳皮質初代培養神経細胞における cRel の核内発現に対するエタノールの作用

エタノールによる GABA_A 受容体 α 6 サブユニットの発現増加を引き起こす転写因子を特定するため、NF κ B ファミリーの核内発現を検討した。NF κ B ファミリーの一つである cRel の核内発現はエタノールにより有意に増加したが、その他の NF κ B ファミリーには有意な発現変化は認められなかった (data not shown)。また、エタノールによる cRel の核内発現の増加は、I κ B kinase (IKK) inhibitor である IKK inhibitor VII および BAY110782 により有意に抑制された。

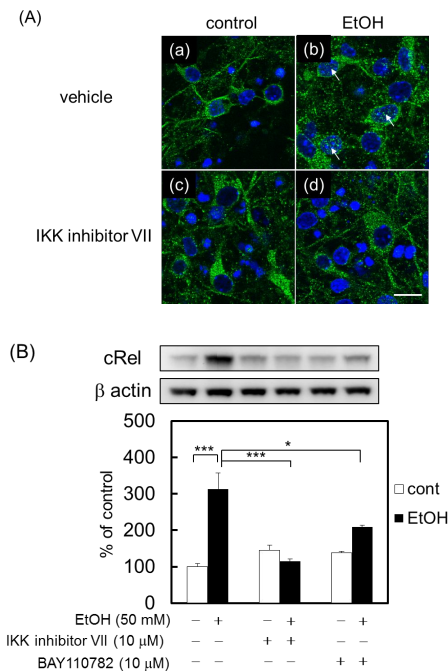


Fig. 5. Expression of cRel in nucleus after continuous treatment with ethanol in the presence or absence of IKK inhibitors.

以上(1) (5)の結果から、既存の利尿薬を脳室内投与することによりアルコール摂取量の抑制が認められたことから、利尿薬を基礎とした脳内移行性の高い薬剤の開発がアルコール依存症の治療薬となりうる事が考えられる。神経細胞に対するエタノールの作用として tonic inhibition を制御する extrasynaptic GABA_A 受容体の発現変化が認められたことから、アルコール依存症の発症には細胞内 Cl⁻濃度の上昇が関与するのかもしれない。また、この GABA_A 受容体発現増加は NFκB ファミリーの一つである cRel の活性化を介することから、NFκB 活性化を抑制することでアルコール依存症発症が抑制される可能性も示唆された。

しかしながら、アルコール依存症モデルによる脳内変化が臨床のアルコール依存症の病態に類似するかどうかを判断することは非常に難しい課題である。今後は、血液等の解析により、アルコール依存症モデルにおける脳内機能変化を評価する方法を確立すること、また、臨床患者サンプルを用いた解析および functional MRI 等を用いてアルコール依存症患者の脳内機能変化に対する評価方法を確立することが必要である。これらによりアルコール依存症患者とアルコール依存症モデルとの類似性、相違性を把握することで、より安全かつ迅速な治療薬の開発が行われるものと考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

1. Koji Mizuno, Kazuhiro Kurokawa, Seitaro Ohkuma : cRel modulates alcohol-induced GABA_A receptor α6 subunit expression via IκB kinases. 第 88 回日本薬理学会年会「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」2015 年 3 月 18 日

2. 水野晃治, 黒川和宏, 大熊誠太郎 : アルコールによる GABA_A 受容体 α6 サブユニット発現調節機構. 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(愛知県・名古屋市)」2014 年 11 月 22 日

3. Koji Mizuno, Kazuhiro Kurokawa, Seitaro Ohkuma : Basic research of alcohol dependence. 16th International Society of Addiction Medicine Annual Meeting. 「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」, 2014 年 10 月 4 日

4. 水野晃治, 黒川和宏, 大熊誠太郎 : アルコール依存症モデルの病態生理学的解析. 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(神奈川県・横浜市)」, 2014 年 10 月 3 日

5. Koji Mizuno, Kazuhiro Kurokawa, Tsutomu Suzuki, Seitaro Ohkuma : The role of GABA_A receptors on ethanol-induced type I IP₃ receptors up-regulation. CPDD 76th Annual Meeting. 「San Juan (Puerto Rico)」, 2014 年 6 月 17 日

6. 水野晃治, 黒川和宏, 大熊誠太郎 : アルコール依存症モデルにおけるうつ様行動とシナプス可塑的变化 「岡山大学(岡山県・岡山市)」, 2013 年 12 月 21 日

7. 水野晃治, 黒川和宏, 芝崎真裕, 大熊誠太郎 : アルコール依存症と気分障害の病態生理学的機序の関連性. 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(沖縄県・宜野湾市)」, 2013 年 10 月 25 日

8. 水野晃治, 黒川和宏, 大熊誠太郎 : アルコール依存における細胞内カルシウム、クロライドイオン調節因子の発現と病態生理学的役割. 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(岡山県・岡山市)」, 2013 年 10 月 5 日

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 晃治 (Mizuno Koji)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：10551046

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：