

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	高橋 桂哉
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>The mitochondrial calcium uniporter contributes to morphine tolerance through pCREB and CPEB1 in rat spinal cord dorsal horn (ラット脊髄後角でミトコンドリアカルシウムユニポータはpCREB, CPEB1を介してモルヒネ耐性に関与する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>Hyun Yi, Jun Gu, Daigo Ikegami, Shue Liu, Takafumi Iida, Yuta Kashiwagi, Chuanhui Dong, Takayuki Kunisawa, Shuanglin Hao British Journal of Anaesthesia, 123 (2): e226-e238 2019 掲載</p> <p>研 究 目 的</p> <p>オピオイドの長期使用は耐性、痛覚過敏、依存、乱用などの副作用を伴うが、その詳細な機序はいまだに解明されていない。 ミトコンドリアカルシウムユニポータ (MCU) はミトコンドリアにおいてCa²⁺の流入を調節する重要な蛋白であり、痛覚過敏や脊髄の長期増強 (LTP) に関与している。慢性モルヒネ投与によってLTPが引き起こされるがMCUとモルヒネ耐性の関係については明らかでない。 転写因子CREBは神経の可塑性を調節している。慢性モルヒネ投与ではリン酸化CREB (pCREB) が様々な神経領域で増加しており神経適応に関与していると考えられている。 CPEBはmRNA結合蛋白であり蛋白変換を調節し健康と病気に関して重大な役割を担っている。CPEB1は特に不安や慢性痛に関与しているがCPEB1のモルヒネ耐性における役割は明らかでない。 本研究ではモルヒネ耐性におけるこれらの作用、関係性を明らかにする。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>生後7-8週、210-230gのオスラットを対象とした。薬物投与のために環椎後頭膜より第2-4腰髄付近のくも膜下にカテーテル先端を留置した。モルヒネ耐性モデルではモルヒネ10μlを12時間おきに13回行なった。 モルヒネ耐性治療モデルではRu360 50μMかAS-CREB 50μgかAS-CPEB 40μgを24時間毎にモルヒネ投与30分前に行った。 行動学的検討はVon Frey testとHot plate testを行った。</p>			

リアルタイム定量PCRはラットL4/L5脊髄後角 (SCDH) 組織を採取しRNAを分離後、RNA 1 μ gをcDNAに変換してリアルタイム定量PCRを行った。

ウェスタンブロット法はラットSCDH組織かB35細胞を蛋白溶解バッファーを用いて溶解後、得られた蛋白をPVDF膜に転写、一次抗体 (抗MCU、抗pCREB、抗CPEB1、抗VDEC1、抗 β -actin)を含んだ溶液で振盪させた。その後PVDF膜は2次抗体に浸され、化学発光を用いて検出した。クロマチン免疫沈降-定量PCR法はSCDH組織を1%ホルムアルデヒドでクロスリンクし、溶解バッファーで洗浄後、音波破砕を行い10 μ lの上澄み液をインプットとして保存した。断片化した15 μ gクロマチンを0.5mlのChIP溶解バッファーに希釈し、ChIP抗体、pCREBをサンプルに加え、G磁気ビーズを加え4 $^{\circ}$ Cで2時間振盪した。洗浄後、免疫沈降物、インプットにプロテイナーゼKを加えDNAを抽出した。DNAを精製し、qPCRを行った。

RNA免疫沈降-リアルタイム定量PCR法はB35細胞に10ng/ml rTNF α かvehicleを加え、1%ホルムアルデヒドでクロスリンクし、溶解バッファーにて細胞を溶解、抗CPEB1抗体を加え4 $^{\circ}$ Cで1晩、免疫沈降を行った。免疫沈降物は洗浄後、1%SDSとプロテイナーゼKを含む溶解バッファーでRNAを抽出した。RNAをcDNAに逆転写しリアルタイムPCRを行った。

免疫染色法は脊髄の冷凍切片を1次抗体 (抗GFAP、抗Iba1、抗NeuN、抗CPEB、抗pCREB、抗MCU)を加え振盪、その後、蛍光色素で標識された2次抗体を加え室温で2時間振盪した。蛍光顕微鏡によって観察し画像を保存した。

脊髄後角におけるミトコンドリアCa²⁺の画像化ではRhod2/AM 33 μ Mをくも膜下カテーテルより注入、70分後にL4-L5領域の脊髄を採取し35 μ mの冷凍切片を蛍光顕微鏡で観察、画像を保存した。

成 績

行動学的行動の検討ではRu360 (MCU阻害薬)、AS-CREB、AS-CPEB1ともにvon Frey test、Hot plate testにてモルヒネ耐性を有意に抑制した。

ウェスタンブロット法ではモルヒネ耐性ラットはshamに比べて有意に脊髄後角においてMCU、pCREB、CPEB1の発現が増加していた。

免疫染色法ではMCU、pCREB、CPEB1ともにニューロンでの発現が認められた。またpCREBとCPEB1はMCUと共局在していた。

脊髄後角におけるミトコンドリアCa²⁺の画像化では脊髄後角でモルヒネ耐性ラットはshamに比べて有意にRhod2陽性細胞の数が多く、Ru360による治療でその増加が抑制された。

クロマチン免疫沈降-定量PCR法ではMCU遺伝子プロモーター領域であるCRE結合領域Site1(TGACGTAA)とSite2(TGAGGTCA)においてモルヒネ耐性ラットはshamに比べて有意にpCREBの濃縮が認められ、AS-CREBによって抑制された。

リアルタイムPCRではモルヒネ耐性ラットはshamに比べて有意にMCU mRNAの増加を認め、AS-CREBによって増加は抑制された。

RNA免疫沈降-リアルタイム定量PCR法ではMCU mRNAの3'非翻訳領域M2(UUUUUUAU)配列においてrTNF α 投与を行った細胞で有意にCPEB1免疫沈降物中のMCU mRNAの増加を認めた。

考 案

慢性モルヒネ投与では遺伝子活動を変化させ、蛋白発現やイオンチャンネル機能を変化させることからエピジェネティックな機序が重要な役割をはたしていると推察される。

ミトコンドリアCa²⁺は様々な代謝や細胞死を調節し、ミトコンドリアCa²⁺はMCUによって調節されている。我々はMCU阻害剤であるRu360を用いてモルヒネ耐性の抑制を観察し、ミトコンドリアCa²⁺指示薬であるRhod2を用いてモルヒネ耐性ラットでミトコンドリア内でのミトコンドリアCa²⁺の蓄積を証明した。

CREBは学習、記憶、薬物乱用などに関与し、モルヒネ耐性にとっても重要な因子と推察された。モルヒネ耐性ラットでpCREBの増加が確認でき、その阻害によって耐性を抑制した。

CPEBはシナプスの可塑性、学習、記憶に関して重要な役割を持っており、慢性疼痛において痛覚過敏の出現にCPEBの関与が指摘されている。特にCPEB1は神経でのミトコンドリアエネルギー産生に関与している。研究の結果、モルヒネ耐性ラットで脊髄後角にCPEB1の発現は増加しておりCPEB1の阻害はモルヒネ耐性を抑制した。

最近の研究により薬物の濫用やストレスによる脳内報酬系のエピジェネティックな調節が明らかになっているが、我々の研究によってモルヒネ耐性におけるラットmcuプロモーターで少なくとも2つの推定されるCREB結合領域が明らかとなり、pCREBはmcu遺伝子の転写を調節していることが分かった。

CPEB1はmRNAの翻訳を調節するためのmRNA結合蛋白であり、mRNAの3'非翻訳領域にあるCPEに結合する。我々の研究でMCU mRNAが3'非翻訳領域にCPEを含み、培養ニューロン中のMCU mRNA 3'非翻訳領域でCPEB1の増加を認めた。このことによりCPEB1はMCU mRNAの翻訳を調節しMCU蛋白の発現を増加させることが明らかとなった。

結 論

モルヒネ耐性モデルにおいてMCU、pCREB、CPEB1の増加が認められ、pCREBはmcu遺伝子プロモーターに結合し転写を調節し、CPEB1はMCU mRNAに結合しMCU蛋白の翻訳を調節していることがわかった。これらの結果は臨床的にMCU阻害剤、pCREBやCPEB1の抑制剤がオピオイド耐性を防ぐ可能性を示唆した。

引 用 文 献

1. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, et al.
Ca²⁺ signals regulate mitochondrial metabolism by stimulating CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter gene MCU.
Sci Signal 2015; 8: ra23
2. Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA et al.
CREB(cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence.
J Neurosci 1997; 17: 7890-901
3. Bogen O, Alessandri-Haber N, Chu C, Gear RW, Levine JD.
Generation of a pain memory in the primary afferent nociceptor triggered by PKC ϵ activation of CPEB.
J Neurosci 2012; 32: 2018-26

参 考 论 文

1. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, et al.
Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter.
Nature 2011; 467:341-5
2. Kim HY, Lee KY, Lu Y, et al.
Mitochondrial Ca²⁺ uptake is essential for synaptic plasticity in pain.
Neurosci 2011; 31: 12982-91
3. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD.
Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions.
Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 7731-6