

研究成果報告書

令和 5年 4月 20日

公益財団法人本庄国際奨学財団

理事長 本庄八郎殿

貴財団より助成のありました研究の成果について下記のとおり報告します。

報告者 中山 高宏



記

1. 助成対象テーマ

アルコール・ニコチン依存症治療における緑茶成分の効果と作用機序に関する研究

2. 助成対象者

(所属) 杏林大学医学部病態生理学

(氏名) 中山 高宏

3. 共同研究者

(所属)

(氏名)

(所属)

(氏名)

(所属)

(氏名)

(所属)

(氏名)

(所属)

(氏名)

4. 研究の目的

我が国において 1500 万人の罹患者を抱えるアルコール・ニコチン等による依存症は、中脳辺縁ドーパミン神経の報酬系亢進によって引き起こされ、ドーパミン機能の阻害により症状が緩和されることが知られている。これら依存症の薬物療法として現在までに認可されている治療薬は病原部位である報酬系を標的としておらず、報酬系への直接的な作用機序を有する根本的な治療法の開発が望まれている現状にある。我々はこれまでに、神経モノアミン伝達に関わるシタキシシン 1A 遺伝子の発現量低下が、中脳ドーパミン分泌抑制を引き起こすと共に、シタキシシン 1A 発現はヒストンアセチル化酵素 KAT3 により神経細胞・組織特異的に促進性に発現制御されていることを発見してきた。

本計画では、シタキシシン1Aの中脳高発現を決定しているKAT3の阻害剤であり天然の緑茶成分に着目し、中脳シタキシシン1A発現抑制によって起こるドーパミン分泌低下がアルコール・ニコチン依存症状を治癒することを明らかにする。そして既存療法とは作用機序が全く異なる、緑茶成分による報酬系を直接の標的とした新しい治療戦略の有効性を検証することを目的とする。

5. 研究の成果

上記目的を達成するため、KAT3 阻害剤とその類縁体として知られている緑茶成分からエピガロカテキンガレート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、ケルセチンに着目し、アルコール・ニコチン依存症に対する治療効果の検証を行った。

先ずアルコール依存症に対する効果を検証するため、具体的にこれらを水と自由選択飲水可能な 10%アルコールの提示により、予めアルコール依存症に陥らせたモデルマウス (40 匹/薬種) を作製し、これらのマウスに対し上記緑茶成分 3 種を 1

週間連続投与した時のアルコール選好率および消費量の変化から依存性の変化を算出することを行った。その結果、KAT3 ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤である EGCG を投与することによりアルコール選好率が低下していることが示唆された。またアルコール消費量に対する効果も同様に確認された。一方で同じ KAT3 阻害剤であるケルセチンを投与した場合にも同様にアルコール選好率が低下するとともにアルコール消費量も減少することが明らかとなった (図 1)。興味深いことに EGCG の類縁体である EGC は KAT3 阻害剤としては知られていないが、この EGC を投与し

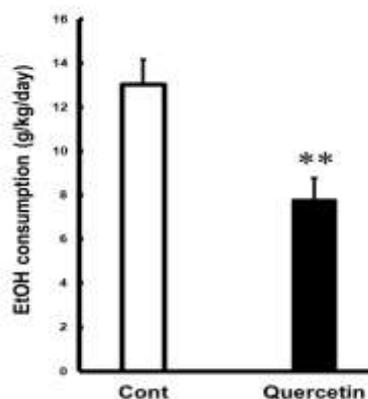


図1 ケルセチンを用いたアルコール依存性試験
KAT3 阻害剤であるケルセチンを投与することによりアルコール依存性が低下していることが示唆された。

5. 研究の成果 (つづき)

た場合にも、効果は弱いながらもアルコール依存性を抑制する効果を有していることが示唆された。これらの結果から、緑茶成分の中でも75%を占める大部分の成分にアルコール依存性を抑制する効果があることを示すことが明らかとなってきた。

そこで我々は、アルコール依存症と並び1000万人におよぶ多くの罹患者が存在するニコチン依存症に対する効果に関しても同様に検証することを次に行った。ニコチン依存症に対する効果の試験に際しては、場所嗜好性(CPP)行動解析を行うこと

で検証を行った。具体的には、1 mg/kg ニコチン投与による明暗箱を用いた CPP 行動解析試験を行い、試験期間中1日1回のKAT3阻害剤を投与した群のニコチン投与場所への滞在時間減少から依存性の低下を検証した。その結果、KAT3阻害剤であるEGCG並びにケルセチンを投与することによりニコチン場所嗜好性が優位に低下することを見出した(図2)。

これらのアルコール・ニコチン依存症試験に引き続き、神経細胞内のシタキシン1A発現量と脳内ドーパミン分泌機能が低下するか否かの検証を行った。アルコール・ニコチン依存症試験の終了後に安楽死させたマウスより中脳を摘出し、イムノブロット解析をおこなったところ、アルコール・ニコチン依存性の低下が認められたKAT3阻害剤の投与によって、中脳におけるシタキシン1Aタンパク質の発現量が有意に低下していることを見出した。更にシタキシン1Aの神経機能である中脳

ドーパミン分泌機能の変化を調べるために電気化学的液体クロマトグラフィ解析を行ったところ、ドーパミンターンオーバーが顕著に低下していることも明らかになった(図3)。

これらの結果から現在までのところ、EGCGやケルセチンに代表される緑茶成分の投与により、中脳におけるシタキシン1A発現量が抑制され、その神経機能であるドーパミン小胞の開口放出機能が低下することで、アルコール依存性ならびにニコチン依存性の低下がもたらされている可能性が示唆された。

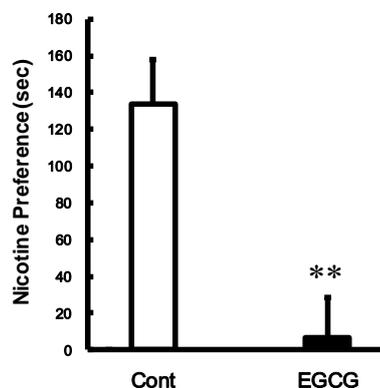


図2 EGCGを用いたニコチン依存性試験
KAT3阻害剤であるEGCGを投与することによりニコチン依存性が低下していることが示唆された。

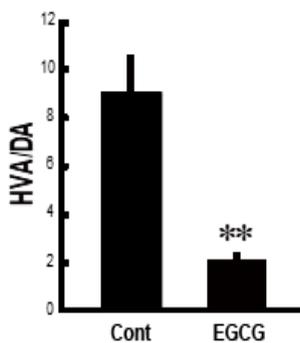


図3 ECD-HPLCによるドーパミンターンオーバー解析

EGCG投与は中脳におけるホモバニリン酸/ドーパミン比率を低下させドーパミンターンオーバーを抑制することが示唆された。

6. 今後の課題

本研究の実施により明らかになってきた研究成果である「KAT3 阻害効果を有するケルセチンを代表とした緑茶成分が、中脳におけるシンタキシン 1A 発現量とドーパミン放出量を抑制することを介して、アルコール依存症およびニコチン依存症を優位に抑制する」という実験事実を確固たるものとするために、今後の研究課題としては、シンタキシン 1A 遺伝子発現に関与していない例えば NFκB シグナル伝達経路阻害剤などを用いた際の、アルコール依存症およびニコチン依存症に対する効果の検証を行う必要があるものと考えている。また KAT3 阻害作用を有する化合物の効果が *stx1A*-ヒストンアセチル基転移酵素の経路以外を介したサイドエフェクトではないことを証明するためにも、*stx1A* ノックアウトマウスを用いて直接的な作用機序が働いていることを検証することも必要であると考えている。これらの課題解明が必要な理由として、EGCG やケルセチンなどの緑茶成分をはじめとした天然化合物には複数の非特異的な作用機序を介した生体効果を有することが知られていることから、今回我々が得てきたアルコール依存症ならびにニコチン依存症に有効であったという一連の生体効果が、既存の経路を介した効果なのか否かを検証することは神経科学分野における学術的貢献が大きいものと考えられる。またそれら作用経路情報の解明と同様に、脳局所領域特異的な遺伝子破壊実験を通して中脳報酬系の抑制を介した効果であることを直接的に証明することも今後の重要な課題であると考えている。

また本研究の学術的な位置づけとして、上記課題を解明した先には世界初のエピゲノム精神薬の実現を目指しているという点が特筆すべき点として挙げられる。2011 年に初めて抗癌薬の認可を受けたヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の阻害剤として知られる Vorinostat (SAHA) を皮切りに、DNA メチル化阻害薬 Azacitidine や RNAi 阻害薬 Patisiran 等、現在までに 8 種類のエピゲノム作用薬に属する新薬が登場してきたが、未だ精神疾患に対する認可薬は存在しておらず、本研究で対象とする同じくエピゲノム制御因子であるヒストンアセチル化酵素 (KAT1~14) に対する認可薬もこれまでに前例がない。従って上記課題を解明した暁には報酬系の過剰なドーパミン分泌によって引き起こされる依存症状に対する治癒を可能にする世界初のエピゲノム精神薬を実現可能になるものと考えている。

従って上記課題の解明を含めた本研究の更なる推進により将来的に、日々の食事やサプリメント、エピゲノム精神薬等を通してアルコール依存症ならびにニコチン依存症の離脱期における禁断症状をコントロールすることが可能となり、患者への負担と副作用の少ない治療・再発予防法を提供できる道が拓かれるものと期待される。

7. 本研究に関する主な発表論文、投稿等

(論文を別送またはメールに添付して送付)

- [1] **Takahiro Nakayama**, Yasuo Terao and Kimio Akagawa “The role of Sp3 transcription factor in syntaxin 1A gene silencing” *Gene Reports*, (2022) 11 (2), 146. 1-8 doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101628
- [2] Hiroki Hamada, **Takahiro Nakayama**, Kei Shimoda and Kohji Ishihara “Effects of Curcumin on Anxiety-like Behaviors of Mice Subjected to the Open Field Test” (2023) *Natural Product Communication*, in press.
- [3] **Takahiro Nakayama**, Akash K Singh, Toshiyuki Fukutomi, Noriyuki Uchida, Yasuo Terao, Hiroki Hamada, Takahiro Muraoka, Eswaramoorthy E Muthusamy, Tapas K Kundu and Kimio Akagawa “Activator of KAT3 histone acetyltransferase ameliorates a neurodevelopmental disorder phenotype in the syntaxin 1A abraded model” *Science Translational Medicine*, (2023) in submitted

以上