

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500331

研究課題名（和文）依存性薬物による脳内神経幹細胞からグリア細胞ならびに神経細胞への分化誘導

研究課題名（英文）Drugs of abuse induced neural or glial differentiation from neural stem cells

研究代表者

成田 年（NARITA MINORU）

研究者番号：40318613

研究成果の概要：

本研究では、細胞-細胞間相互作用に関連した、神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導に対する依存性薬物の影響について検討を行った。まず、神経-アストロサイト共培養細胞にモルヒネを処置したところ、アストロサイトの形態変化を伴った **glial fibrillary acidic protein (GFAP)** 免疫活性の増強が認められた。次に、モルヒネを胎生 14 日齢のマウス全脳由来神経幹細胞に処置し、モルヒネの神経幹細胞に対する影響について検討を行った。その結果、神経幹細胞から神経あるいはアストロサイトへの分化誘導に変化は認められなかった。さらに、モルヒネを神経-アストロサイト共培養細胞に処置し、活性化した神経-アストロサイト共培養細胞の培養上清を神経幹細胞に処置したところ、アストロサイトへの著明な分化誘導促進作用が認められた。以上、本研究の結果より、モルヒネによるアストロサイトの活性化は神経細胞を介して誘発されることが明らかとなった。また、モルヒネは神経細胞-アストロサイト-神経幹細胞の細胞-細胞間相互作用により、神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導を惹起する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
H20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：薬物依存、依存性薬物、神経幹細胞、アストロサイト、細胞-細胞間相互作用、分化誘導、グリア細胞、 μ オピオイド受容体

1. 研究開始当初の背景

これまでの薬物依存の研究の多くは、依存性薬物による神経機能変化のみに注目したものが殆どである。ここ数年の研究成果より、薬物依存形成におけるアストロサイトの役割に関してはおおむね認知されてきたが、薬物依存形成のメカニズムがまだ完全に解明されていない現状を鑑みると、薬物依存形成過程におけるグリア細胞以外の細胞と神経間との相互作用に着目する必要がある。神経およびオリゴデンドロサイトならびにアストロサイトは共通の神経幹細胞から分化誘導され、さらには、成熟した動物の脳内においても神経新生が絶えず引き起こされている事実から、神経-グリア細胞間の相互作用のみならず、神経幹細胞を含めたこれら三者間の相互作用を考え、薬物依存の新しい分子機構を探索する必要があると考え、このような着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、薬物依存形成・維持におけるアストロサイトの活性化に対する神経幹細胞の役割を数種依存性薬物（メタンフェタミン、コカイン、モルヒネ、ベンゾジアゼピン系薬物）を用いて、行動薬理的、分子生物学および解剖学的レベルで比較検討することを目的とする。また、数種依存性薬物の神経幹細胞への直接的あるいは間接的な影響について、多角的な検討を行なう。薬物依存形成過程における神経幹細胞の役割を明確にすることは、薬物依存の本質を理解する上で非常に意義深いものと考えられる。また、神経科学的な側面から今回のアプローチについて考えた場合に、こうした細胞間相互作用を明らかにすることにより、新たな脳神経機能解明の一助となり得ることが期待できる。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に則り、動物に対する倫理面を十分に考慮して、さらに使用動物を最小限にして動物実験計画を立案し、星薬科大学動物実験委員会の許可を得てからすべての実験を行った。神経幹細胞は胎生 14 日齢のマウス全脳より単離することにより作製した。また、初代培養神経/グリア共培養細胞はマウス新生仔より大脳皮質あるいは海馬領域を単離し、培養することにより作製した。数種依存性薬物処置による神経幹細胞の増殖ならびに分化誘導への影響は MTT 法あるいは免疫染色法に従い検討を行った。また、モルヒネ処置による神経-グリア共培養細胞培養上清

の作製は大脳皮質由来神経/グリア共培養細胞に依存性薬物を 3 日間処置し、その後 DMEM に 1 日間おきかえることにより作製した。一方、脳内におけるグリア細胞活性化の変化は、数種依存性薬物をマウスに間欠投与し逆耐性モデルを作製して、側脳室下帯ならびに海馬歯状回顆粒細胞層における GFAP 陽性免疫活性の変化を免疫染色法に従い検討することにより評価を行った。また、依存性薬物の投与による細胞新生の変化は、BrdU 投与 4 週後のサンプルを作製して検討を行った。神経幹細胞の移植は、GFP で標識した神経幹細胞を側脳室下帯に、マイクロインジェクション法に従い行った。移植神経幹細胞の正着を確認後、神経幹細胞の移動ならびに分化誘導の変化について検討を行った。

4. 研究成果

まず、モルヒネをマウス新生仔由来初代培養アストロサイトに処置したところ、アストロサイトの構成タンパクである GFAP の免疫活性に変化は認められなかった。一方、メタンフェタミンについても同様に検討を行った結果、GFAP の免疫活性の著明な増強が認められた。次に、神経-アストロサイト共培養細胞にモルヒネを処置したところ、アストロサイトの形態変化を伴った GFAP 免疫活性の増強が認められた。以上、本研究の結果より、メタンフェタミンは直接的にアストロサイトを活性化させるのに対して、モルヒネによるアストロサイトの活性化は神経細胞を介して誘発されることが明らかとなった。次に、モルヒネをマウス全脳由来神経幹細胞に処置し、モルヒネの神経幹細胞に対する影響について検討を行った。その結果、神経幹細胞から神経ならびにアストロサイトへの分化誘導に変化は認められなかった。同様に、メタンフェタミン、コカイン、ベンゾジアゼピン系受容体作動薬であるミダゾラムについても検討を行ったところ、神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導に変化は認められなかった。近年、組織幹細胞の周囲には微小環境である”ニッチ”が存在し、増殖や分化を制御していることが知られている。近年になり、神経幹細胞の分化も他の組織幹細胞と同様に”ニッチ”により制御されていることが明らかとなりつつあり、中枢神経系では”ニッチ”としてアストロサイトの役割に注目が集まっている。そこで次に、モルヒネを神経-アストロサイト共培養細胞に処置し、活性化した神経-アストロサイト共培養細胞の培養上清を神経幹細胞に処置したところ、アストロサイトへの著明な分化誘導促進作用が認められた。以上の結果より、 μ -オピオイド受容体の刺激により認められる神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導には、神経-ア

ストロサイト細胞間相互作用が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、依存性薬物の成体神経幹細胞からの分化誘導について検討を行なう目的で、モルヒネ長期投与による脳内細胞新生の変化について検討を行なった。その結果、帯状回、側坐核あるいは海馬領域において、モルヒネ投与により GFAP 陽性アストロサイトの著明な免疫活性の増強が認められたが、細胞増殖の指標となる BrdU 陽性細胞数に変化は認められず、こうした脳内における変化は細胞新生に依存しない可能性が示唆された。一方、神経幹細胞は多能性幹細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) より産生される。そこで、ES 細胞からの神経分化に対するモルヒネの影響について検討した。ES 細胞から胚様体を介して神経へ分化させる実験系を確立し、ES 細胞にモルヒネを処置することによる変化について解析を行なったところ、神経に分化し得る外胚葉系のマーカーの減少傾向が認められた。以上の結果より、 μ -オピオイド受容体の刺激は、発生初期段階より幹細胞の分化制御に関与している可能性が考えられる。本研究により、モルヒネを中心とした依存性薬物のグリア細胞あるいは神経幹細胞への影響が明らかになった。神経の可塑性に影響を及ぼす薬物依存の本質を理解する上で非常に意義深いものと考えられる。また、こうしたモルヒネによる細胞間相互作用を明らかにすることにより、新たな脳神経機能解明の一助となるものと考えられる。

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 11 件)

- 1) Terada M, Kuzumaki N, Hareyama N, Imai S, Niikura K, Narita M, Yamazaki M, Suzuki T, Narita M, Suppression of enriched environment-induced neurogenesis in a rodent model of neuropathic pain, *Neurosci Lett*, 440, 314-318, 2008 査読有り
- 2) Matsuzawa-Yanagida K, Narita M, Nakajima M, Kuzumaki N, Niikura K, Nozaki H, Takagi T, Tamai E, Hareyama N, Terada M, Yamazaki M, Suzuki T, Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites, *Neuropsychopharmacology*, 33, 1952-1965, 2008 査読有り
- 3) Narita M, Nakamura A, Ozaki M, Imai S, Miyoshi K, Suzuki M, Suzuki T, Comparative Pharmacological Profiles of Morphine and Oxycodone under a Neuropathic Pain-Like State in Mice: Evidence for Less Sensitivity to Morphine, *Neuropsychopharmacology*, 33, 1097-1112, 2008 査読有り
- 4) Niikura K, Narita M, Narita M, Nakamura A, Okutsu D, Ozeki A, Kurahashi K, Kobayashi Y, Suzuki M, Suzuki T, Direct evidence for the involvement of endogenous beta-endorphin in the suppression of the morphine-induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state, *Neurosci Lett*, 435, 257-262, 2008 査読有り
- 5) Niikura K, Narita M, Okutsu D, Tsurukawa Y, Nanjo K, Kurahashi K, Kobayashi Y, Suzuki T, Implication of endogenous beta-endorphin in the inhibition of the morphine-induced rewarding effect by the direct activation of spinal protein kinase C in mice, *Neurosci Lett*, 433, 54-58, 2008 査読有り
- 6) Niikura K, Kobayashi Y, Okutsu D, Furuya M, Kawano K, Maitani Y, Suzuki T, Narita M, Implication of spinal protein kinase Cgamma isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis, *Neurosci Lett*, 433, 6-10, 2008 査読有り
- 7) Narita M, Hashimoto K, Amano T, Narita M, Niikura K, Nakamura A, Suzuki T, Post-synaptic action of morphine on glutamatergic neuronal transmission related to the descending antinociceptive pathway in the rat thalamus, *J Neurochem*, 104, 469-478, 2008 査読有り
- 8) Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, Suzuki T, Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period, *Addict Biol*, 12, 167-172, 2007 査読有り
- 9) Miyagawa K, Narita M, Narita M, Niikura K, Akama H, Tsurukawa Y, Suzuki T, Changes in central dopaminergic systems with the expression of Shh or GDNF in mice perinatally exposed to bisphenol-A, *Jpn J Neuropsychopharmacol*, 27, 69-75, 2007 査読有り
- 10) Narita M, Nagumo Y, Miyatake M, Ikegami D, Kurahashi K, Suzuki T, Implication of protein kinase C in the orexin-induced elevation of extracellular dopamine levels and its rewarding effect, *Eur J Neurosci*, 25, 1537-1545, 2007 査読有り
- 11) Kuzumaki N, Narita M, Narita M, Hareyama N, Niikura K, Nagumo Y, Nozaki H, Amano

T, Suzuki T, Chronic pain-induced astrocyte activation in the cingulate cortex with no change in neural or glial differentiation from neural stem cells in mice, *Neurosci Lett*, 415, 22-27, 2007 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 成田 年、葛巻直子、鈴木 勉、オピオイド鎮痛薬はがん治療の直接的な手助けとなり得るか?: オピオイドと血管新生阻害 成田 年、緩和医療における薬物療法に対する正しい知識と科学的根拠に基づいた包括的な副作用対策、第 2 回日本緩和医療薬学会年会、2008 年 10 月 18-19 日、横浜
- 2) 成田 年、葛巻直子、朝戸めぐみ、鈴木 勉、メチルフェニデートとメタンフェタミンの細胞毒性の分子機構-その相違とメチルフェニデートの安全性-、第 18 回日本臨床神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会、2008 年 10 月 1 日 - 10 月 3 日、品川
- 3) Minoru Narita, Naoko Kuzumaki, Megumi Asato, Tsutomu Suzuki, Glial function on the development of drug dependence、第 43 回日本アルコール・薬物医学会、第 2 回アルコール関連問題に関する日米合同ワークショップ、2008 年 9 月 18 日 - 9 月 19 日、横浜
- 4) 成田 年、鈴木 勉、疼痛の病態を考えた新しい鎮痛薬の探索、薬理学サマーセミナー2008、2008 年 9 月 8 日 - 9 月 10 日、那須
- 5) Narita, M¹., Hirayama, S¹., Suzuki, M¹., Imai, S¹., Niikura, K¹., Narita, M¹., Ishiwata, S¹., Kuzumaki, N¹., Matsuda, N². and Suzuki, T⁽¹⁾、⁽¹⁾Dept. Toxicol., Hoshi Univ. Sch. Pharm. Pharmaceut. Sci., Tokyo, Japan、²Dept. Prim. Care & Emerg. Med., Grad. Sch. Med. Kyoto Univ., Kyoto, Japan)、CHANGES IN THE SPINAL MU OPIOID RECEPTOR AND COX-2 EXPRESSION UNDER THE CAERULEIN-INDUCED ACUTE PANCREATITIS PAIN、International Narcotics Research Conference (INRC) 2008、2008 年 7 月 13 -18 日、Charleston
- 6) 成田 年、新倉慶一、葛巻直子、鈴木 勉、痛みストレスによる脳高次機能の歪み、第 31 回日本神経科学大会、シンポジウム: からだの痛みからこころの痛みへ、2008 年 7 月 9-11 日、千代田
- 7) 成田 年、痛みによる“生体機能の歪み”の分子機構-脳内および脊髄内サイトカイン・ケモカインならびにグリア細胞の変化、第 85 回 日本生理学会大会、2008 年 3 月 25-27 日
- 8) 成田 年、鈴木 勉、緩和医療の現場で求められる緩和医療研究のあり方: 機能解剖学的アプローチの有用性、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17-19 日、横浜
- 9) 成田 年、難治性疼痛の“緩和”を目指す新たな薬物療法の探索-神経科学的なアプローチからの視点、第 37 回 日本慢性疼痛学会、2008 年 2 月 22 -23 日、栃木
- 10) 成田 年、葛巻直子、南條加奈、新倉慶一、鈴木 勉、痛みシグナルによる情動障害と帯状回領域の変化、ストレス学会、2007 年 11 月
- 11) Narita, M., Niikura, K., Kuzumaki, N., Nanjo, K., Suzuki, M. and Suzuki, T., Chronic pain causes the change in cortical GABAergic transmission associated with increased astrocyte activation, Society for Neuroscience 2007、2007 年 11 月 3-7 日、San Diego
- 12) 成田 年、鈴木 勉、医療用麻薬の有用性と各種オピオイドの特徴: 基礎研究の意義と科学的根拠の必要性 成田 年、緩和医療における薬物治療の基礎、第 1 回日本緩和医療薬学会年会、2007 年 10 月 20 -21 日、東京
- 13) 成田 年、痛みによる情動反応の神経科学的解析、ヒューマンサイエンス、2007 年 10 月 9 日、東京
- 14) 成田 年、葛巻直子、新倉慶一、鈴木 勉、痛みシグナルによる脳内細胞-細胞間相互作用、生体機能・創薬シンポジウム、2007 年 9 月 13-14 日、金沢
- 15) 成田 年、葛巻直子、新倉慶一、鈴木 勉、慢性疼痛下における脳内アストロサイトの機能変化に伴う情動変化、第 30 回日本神経科学大会、2007 年 9 月 10 -12 日、横浜
- 16) 成田 年、葛巻直子、新倉慶一、鈴木雅美、鈴木 勉、疼痛刺激による脳内神経幹細胞への影響とグリア細胞活性化の分子機構、第 37 回 日本神経精神薬理学会 合同年会、2007 年 7 月 11 -13 日、札幌
- 17) Narita, M., Nanjo, K., Niikura, K., Kuzumaki, N., Narita, M., Suzuki, M. and Suzuki, T., Implication of increased gliotransmission in the suppression of opioid reward under a chronic pain-like state、International Narcotics Research Conference (INRC) 2007、2007 年 7 月 8-13 日、Berlin
- 18) 成田 年、鈴木 勉、オピオイド研究の最前線とペインクリニックへの応用、第 12 回日本緩和医療学会総会、2007 年 6 月 22 -23 日、岡山
- 19) 成田 年、緩和医療におけるオピオイド鎮痛薬 ~基礎と臨床~、2007 年 5 月 22 日、大宮

〔図書〕（計 9 件）

- 1) Narita M, Suzuki M, Kuzumaki N, Miyata k M, Suzuki T, Implication of activated ast rocytes in the development of drug depen dence: differences between methamphetamine and morphine, Ann N Y Acad Sci, 114 1, 96-104, 2008
- 2) 成田 年、新倉慶一、橋本敬輔、鈴木雅美、葛巻直子、鈴木 勉、オピオイド研究の最前線 '08 - 麻薬性鎮痛薬の統合的理解 -, 臨床麻酔、32、1157-1165、2008
- 3) 成田 年、矢島真理絵、葛巻直子、鈴木 勉、オピオイド研究の新展開 - 幹細胞分化決定機構におけるオピオイドの役割-, ペインクリニック、別冊秋号、S485-S490、2008
- 4) 成田 年、上園保仁、葛巻直子、鈴木 勉、トランスレーショナル・オピオイドリサーチ 2008: μ オピオイド受容体の多機能性、ペインクリニック、別冊秋号、S301-S313、2008
- 5) 成田 年、葛巻直子、鈴木 勉、薬物依存形成の分子機構に及ぼす神経 - グリア相互作用の関与、日本アルコール・薬物医学会雑誌、43、13-18、2008
- 6) 成田 年、葛巻直子、鈴木 勉、薬物依存形成の分子機構に及ぼす神経 —グリア相互作用の関与、日本アルコール・薬物医学会雑誌、43(1)、13-18、2008
- 7) 成田 年、葛巻直子、新倉慶一、鈴木 勉、慢性疼痛と情動 -慢性疼痛と脳高次機能の歪み-ペインクリニック、29(2)、189-195、2008
- 8) 葛巻直子、成田 年、鈴木 勉、痛みシグナルによる情動障害と帯状回領域の変化、医学のあゆみ、223(9)、713-716、2007
- 9) 成田 年、三好 敏、鈴木雅美、鈴木 勉、オピオイドについての新しい話題 2007、ペインクリニック、28(3)、367-378、2007

〔その他〕

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/dokusei/home/研究内容.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 年 (NARITA MINORU)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40318613