

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01837

研究課題名(和文)酸化ストレス反応は鬱状態における依存症を悪化させるのか？その分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Does oxidative stress reaction in nucleus accumbens exacerbate cocaine addiction after social defeat stress?

研究代表者

大西 克典(OHNISHI, YOSHINORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10626865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス後に依存症や依存性が悪化するの我々も日常的に経験しているが、その分子メカニズムはほとんどわかっていませんでした。我々は、ストレスの有無で側坐核におけるドーパミン放出の反応性が異なることを見出し、さらにその下流の分子シグナルについても一部明らかにすることが出来ました。さらにその依存性悪化を防ぐ手段もいくつか確立しました。また、研究の成果として、ストレス状態を作る実験系で結果的にうつ状態とストレス耐性状態のどちらかにわかれるが、それを事前に予測できない問題がありましたが、実験系を変えることで、そのどちらになるかを9割の成功率で分けられる系を開発しました。

研究成果の概要(英文)：Generally, mental stress enhances irresistible impulse to addictive craving. However, the molecular mechanism is not fully understood. We reproduced this behavior in a mouse model, in which pre-exposure of mice to social defeat stress (SDS) increased cocaine preference. Motivation for preference is well known to be controlled by dopamine neurotransmission in reward system network from the ventral tegmental area to nucleus accumbens (NAc). We therefore performed microdialysis to detect dopamine levels in the NAc. Dopamine levels in the NAc increased when mice were placed in cocaine-conditioned box, and the increase in dopamine levels was significantly enhanced after SDS. As dopamine is known to be an inducer of oxidative stress, we revealed the effect of antioxidant-rich-foods or anti-oxidative reagent against cocaine preference, and the downstream molecular pathway.

研究分野：精神神経科学

キーワード：依存症 コカイン うつ病 転写因子 行動実験 マウス 酸化ストレス 側坐核

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ストレスを感じているとき、チョコレート、たばこ、大食い、アルコールなど快楽情動の欲動に抵抗しにくくことを我々は日常的に経験しています。この状態が病的になると、ストレスはうつ病に、依存性は薬物(アルコール、ニコチンを含む)依存に発展します。うつ病の発症を契機とした自殺も年々上昇しており、その数は交通事故死より多い状態です。また、日本は全世界の自殺率で第6位、先進国の中では最悪の状況であり、その解決は早急な課題といえます。特に依存症を併発したうつ病は難治性であり、時に図1の死に至る負のスパイラルにおちいり、より深刻な問題になると言えます。

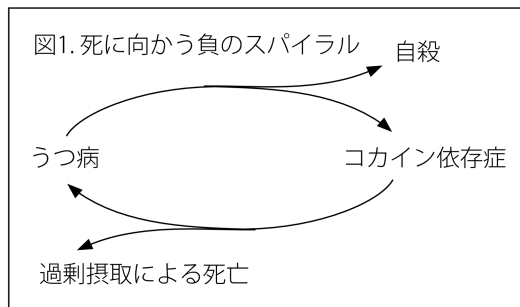


図1のようにストレスと薬物依存は、非常に密接した関係性を持っており(Saal, Neuron 2003, Covington, Neuron 2011)、互いに状態を悪化させる関係にあります。つまり、前者は自殺、後者は過剰摂取による死亡と死に向かう負のスパイラルの関係にあるわけです。しかしながら、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていません。

我々は、依存症としてモデルが確立しているコカインを使用して、うつ状態の有無でコカイン依存症のメカニズムが異なることを同定しています。さらに、その治療法も見出しており、うつ状態での依存形成の分子メカニズムを明らかにしたいというのが我々の問いになります。

その分子メカニズムのキーとなる蛋白質として $\Delta$ FosBが報告されています。 $\Delta$ FosBはストレス負荷で脳内に蓄積することが知られており、また、コカインなど依存性薬物の繰り返し投与で徐々に脳内に蓄積することがわかっています。特に腹側被蓋野のドーパミン神経からの投射を受ける側坐核での蓄積が依存性上昇に関与していることが予想されていました。

我々はアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、正常マウスの側坐核に $\Delta$ FosBを過剰発現させることで依存性を上げるのかどうかについて検討したところ、それだけでは変化しないことを見出しました。これに関しては側坐核にあるD1神経でだけ発現させると2週間後では下がるが、8週間後では上がるというデータがあるのでそれほど単純な話でない

ことが予想されます。一方で、ストレス負荷後に同様の実験をすると依存性が上昇することを見出しました。

## 2. 研究の目的

側坐核に蓄積した $\Delta$ FosBがストレス後の依存性悪化に重要な働きをすることを見出したので、それに関係する分子メカニズムを明らかにすることを目的としていくつかのアプローチを取りました。

## 3. 研究の方法

### (1) AAV (アデノ随伴ウイルス)

脳神経の特定の領域の遺伝子機能を調べるため、アデノ随伴ウイルスをマウス脳内に注入し、特定領域の神経細胞に感染させて、ウイルスの中に仕込んだ遺伝子を発現させる方法を使います。ウイルスは、本来、感染後自己増殖して、自己複製したものが増えていくようになっていますが、実験で使うウイルスは、自己増殖に必要な遺伝子を別のベクターに分けており、ウイルスを増やしたいときだけそれらの遺伝子が発現する仕組みを使っています。パッケージングされてウイルス粒子となったものは、その骨組みとなる遺伝子を含まず、代わりに任意に設定した遺伝子、つまり、機能をみたい遺伝子が発現するようになっています。

### (2) Social defeat model

うつ病のモデルとして、Social defeat ストレスを用いました。Social defeat ストレスは、自分より大きくて凶暴なCD1マウスと小さいC57/BL6マウスを柵で居住空間が分離された同一のケージ内にいれて、毎日、異なるCD1マウスと5分間同一空間に入れていじめられたあと、そのまま同じケージ内で透明の柵に分けられた状態で24時間飼育するのを10日間繰り返し、11日目に別の箱にいれて、CD1マウスをどれだけ避けるようになるかをカメラを用いて2分半評価する方法です。この実験のメリットは、抗うつ薬が最低2週間投与しないとその効果が出ない実験系であることです。これまでのその他のうつ病モデルは抗うつ薬の一日投与でその効果が現れるものでした。しかし、ヒトにおいても、抗うつ薬がその効用を発揮するには最低2週間は必要で、その意味でもこのモデルがもっとも人間のうつに近いものと評価されています。また、同系統のマウスを用いた場合、うつになるマウスとそうでないマウスが現れるという意味においてもヒトに近いと考えられています。つまり、同じストレスに対してマウスによってその感受性が違い、それが実験の結果に現れるということです。この違いに関しても、我々のグループはいくつかの分子生理学的な反応性の違いをすでに明らかにしています。

Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility

to depression.

Bagot RC, Parise EM, Peña CJ, Zhang HX, Maze I, Chaudhury D, Persaud B, Cachope R, Bolaños-Guzmán CA, Cheer J, Deisseroth K, Han MH, Nestler EJ. Nat Commun. 2015

Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of  $\Delta$ FosB.

Vialou V, Bagot RC, Cahill ME, Ferguson D, Robison AJ, Dietz DM, Fallon B, Mazei-Robison M, Ku SM, Harrigan E, Winstanley CA, Joshi T, Feng J, Berton O, Nestler EJ.

J Neurosci. 2014 Mar 12;34(11):3878-87

Enhancing depression mechanisms in midbrain dopamine neurons achieves homeostatic resilience.

Friedman AK, Walsh JJ, Juarez B, Ku SM, Chaudhury D, Wang J, Li X, Dietz DM, Pan N, Vialou VF, Neve RL, Yue Z, Han MH.

Science. 2014 Apr 18;344(6181):313-9.

Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons.

Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, Ferguson D, Tsai HC, Pomeranz L, Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han MH.

Nature. 2013 Jan 24;493(7433):532-6

我々はさらにこれに改良を加えました。従来は実験するまでうつ状態か、ストレス耐性状態かわからなかったのですが、事前にどちらになるかほぼ9割の確率でわかるようにするプロトコルを開発し、今回の実験はうつ状態になる状態でマウスを用意しました。

### (3) cocaine CPP

依存症のモデルとして、マウスを使った条件付け場所嗜好性試験を利用しました。壁の色として灰色と縞々模様を用意して、床の編み目の太さを変えて、嗜好性に差が付かない二つの行き来できる箱を用意して、二日間、午前中は生理食塩水を注射して片側に30分間、午後はもう片方にコカインを7.5mg/kg注射して30分間入れて、三日目にコカイン側をどれだけ好むか、二つの箱の滞在時間の時間差を測定することで判断します。尚、間に白色の領域を設けて、悩んでいる時間はカットしています。

### (4) sucrose preference

コカインは刺激が強すぎて、脳の神経細胞の機能そのものを変化させてしまうため、刺激の弱い自然な報酬を求める行動を測定する

ために、砂糖水をどれだけ好むか調べる実験です。ストレス時は通常甘いものをほしがるとの傾向があるが、social defeatのように強いストレスの場合は快情動を感じなくなり、砂糖水への嗜好性が減少します。ただ欠点としてデータが非常にぶれやすいため、我々は無欲状態かどうか判断するために二つの実験を新たに開発しました。

### (5) Preferable novel object test

通常の Novel object test は嗜好性のあまりない物体に対する嗜好性テストですが、我々はジャングルジムのようにマウスが楽しいと感じるような物体を既知の object としてストレスを加えている間ケージに入れておき、新しい物体として形がそっくりで居心地がよく、色が異なるものを用意し、さらにマウスが嫌いなビー玉と何もないスペースの四つで嗜好性を測定し、マウスが本来もっている新しいものに対する興味や行動がどう変化するか調べました。結果的には sucrose preference よりも感度が高いものとなっています。同様の実験スキームでメスに対する興味も測定し、同様の結果を得ました。

### (6) Yeast two hybrid method

$\Delta$ FosB が、抗ストレス、および依存症において重要な働きをしていることが分かったため、結合する蛋白質を同定して、その蛋白質機能をより詳細に明らかにするために行った。

### (7) Microdialysis

$\Delta$ FosB は側坐核でドーパミンに反応して発現するため、側坐核でのドーパミン量をマイクロダイアリシスを用いて測定しました。側坐核にプローブを挿入し、20分間で放出されたドーパミンを集めて定量化しています。

## 4. 研究成果

まず、最初にストレスがある状態とない状態で側坐核でのドーパミン反応性が変わるかどうか調べました。コカインを投与して特定の箱に入れることを繰り返して、3日目に箱に入れるだけでドーパミンが増えるかどうかを調べたところ、ストレスがない状態では反応がなく、ストレスがある状態でのみドーパミンが増えることを見出しました。

CPP という同じ実験をしていたとしても事前にストレスがあるかないかでドーパミンの反応性が全く異なることを見出したわけです。さらにこの反応はコカイン投与という注射をしないことでも上がることがわかりました。つまり、ストレスを加えるだけで側坐核でのドーパミン反応性が飛躍的に上がっていることがわかったわけです。さらにコカインを投与することで有意にその量が増えることもわかりました。

ドーパミンは酸化ストレスの原因であることが知られています。つまり、ストレスがあ

ると側坐核ではドーパミンが増えやすい状態になっており、それだけ酸化ストレスも受けていることが予想されました。そこで我々は酸化ストレスに反応する蛋白質が側坐核で増えていないか調べたところ、Nrf-1 という蛋白質が増えていることを見出しました。Nrf-1 は酸化ストレスに反応する転写因子であり、刺激を受けて核内に移行することが知られています。そこで、Nrf-1 と $\Delta$ FosB が結合するかどうか *in vitro* と *in vivo* で調べたところ、どちらでも結合することが確認できました。

次に一般的に Nrf-1 の下流の遺伝子として知られる遺伝子群の発現を調べたところ、有意ではないが増加している傾向がありました。そのため、Nrf-1 のシステム全てが活性化しているわけではない可能性が示唆されました。

さらに活性を持たずに本来の機能を抑制する dominant negative タイプの Nrf-1 を側坐核で過剰発現させて、social defeat 後の cocaine CPP をしたところ、コカイン依存性は減少していることを見出しました。これは転写活性を持たない $\Delta$ 2 $\Delta$ FosB を過剰発現させたときと同様の結果であり、Nrf-1 が $\Delta$ FosB と同様にストレス後の依存性を悪化させるメカニズムに参与している可能性を示唆されました。

我々はさらに別のアプローチから検証するために薬物と食物による酸化ストレス軽減が可能かどうか検討しました。薬物としてはメタアンフェタミンの CPP を抑えると報告されていた試薬を同様の投与量で検討しましたが、効果が認められませんでした。

次に酸化ストレスを減らすことが知られているビタミン3種を混合したものをストレスを加える前からえさに混ぜる形で投与して、同様の実験を行いました。その結果、ストレス後のコカイン依存性を減少させることはありませんでしたが、ストレス後3週間あけて依存性テストをしたところ減弱させる効果を認めました。このことから抗酸化ビタミンにはストレスから解放された後の回復を促進する効果があることが予想されました。また、Nrf-1 の発現に関しても、減弱していることを見出したため、やはり、Nrf-1 の発現量がストレス後の依存性悪化に重要であることが示唆されました。

その他にも $\Delta$ FosB と結合する蛋白質と $\Delta$ FosB の結合を側坐核で阻害することで、ストレス後のコカイン依存性を抑制することや、現在流通している別の薬物でも劇的に抑制することを見出しており、そのメカニズムを探索中です。

また、メスへの嗜好性テストをする過程で逆にオスに対するメスの嗜好性で新たな知見を経て、現在それについてもとりまとめているところです。

## 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14件)

PSMC5, a 19S Proteasomal ATPase, Regulates Cocaine Action in the Nucleus Accumbens. Ohnishi YH, Ohnishi YN, Nakamura T, Ohno M, Kennedy PJ, Yasuyuki O, Nishi A, Neve R, Tsuzuki T, Nestler EJ. PLoS One. 2015 May 11;10(5):e0126710 doi: 10.1371 (査読あり)

Ohnishi YN, Ohnishi YH, Vialou V, Mouzon E, LaPlant Q, Nishi A, Nestler EJ. Functional role of the N-terminal domain of  $\Delta$ FosB in response to stress and drugs of abuse. Neuroscience. 2015 Jan 22;284:165-70 (査読あり)

Ohnishi YN, Eagle AL, Ohnishi YH, Cahill ME, Wirtz AJ, Robison AJ, Nestler EJ. Generation and validation of a floxed FosB mouse line. BioRxiv 179309 2017 Aug (査読なし)

[学会発表](計36件)

大西克典、河原幸江、黒岩真帆美、西昭徳：恋するメカニズムの解明に向けて。第17回ブレインサイエンス研究会 2015年6月6日(福岡)

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Kuroiwa M, Vialou VF, Neve RL, Nestler EJ, Nishi A: Oxidative stress response exacerbates cocaine addiction after social defeat stress. Neuroscience 2015 10.17-21 (Chicago, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、Neve RL、Vialou VF、Nestler EJ、西昭徳：NRF蛋白質はストレス後のコカイン依存性を促進する 第89回日本薬理学会年会 2016年3月9-11日(神奈川)

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH,  
Neve RL, Nestler EJ, Nishi A: Nrf  
exacerbates cocaine addiction after  
social defeat stress. Neuroscience 2016  
11.12-16 (San Diego, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、Neve RL、  
Nestler EJ、西 昭徳：社会的敗北ストレ  
ス後のコカイン依存症悪化は側坐核にお  
ける酸化ストレス反応による 第 39 回  
日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30  
日～12 月 2 日（神奈川）

大西克典、河原幸江、大西陽子、Neve RL、  
Vialou VF、Nestler EJ、西 昭徳：長期  
間の抗酸化食物摂取は社会的ストレス後  
のコカイン依存症を抑制する 第 90 回  
日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15-17  
日（長崎）

Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH,  
Nishi A: Is it possible that  
non-attractive male mouse could get  
female mind? Neuroscience 2017  
11.11-15 (Washington DC, USA)

大西克典、河原幸江、大西陽子、西 昭徳：  
モテモテ大作戦！女の子にモテる方法、  
モテなくなる方法 第 28 回マイクロダ  
イアリシス研究会 2017 年 12 月 16 日  
（東京）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大西 克典 ( OHNISHI, Yoshinori )

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10626865

(2)研究分担者

西 昭徳 ( NISHI, Akinori )

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：50228144

河原 幸江 ( KAWAHARA, Yukie )

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：10279135

大西 陽子 ( OHNISHI, Yoko )

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70727586