

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19164

研究課題名(和文) ウイルス脳内感染による薬物依存脆弱性の亢進

研究課題名(英文) the effect of virus infection in the brain on cocaine addiction

研究代表者

村上 元 (Murakami, Gen)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70613727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEGFP遺伝子を組み込んだウイルスを用いて母胎に感染したウイルスが胎児の脳に侵入しドーパミン神経細胞に直接感染することで、薬物依存への脆弱性を引き起こす可能性を調べた。その結果、海馬や大脳皮質等に強いウイルス感染が確認できたが、ドーパミン神経細胞が存在する中脳では感染が確認できなかった。

そこでウイルスの直接感染ではなく、間接的に胎児のドーパミン神経細胞へ影響を与える可能性を母胎免疫活性化法を用いて検討した。その結果、先行研究の結果と同様に母胎免疫活性化されたマウスでは、運動量の増加や後統合失調症のエンドフェノタイプであるPrepulse Inhibitionで疾患が見られた。

研究成果の概要(英文)：Using EGFP-expressed virus, we assessed whether a virus injection into the third ventricle of fetuses leads to the direct infection of dopaminergic neurons, resulting in increased vulnerability to drug addiction. We observed strong virus infection in the hippocampus and cerebral cortex, but not in the ventral tegmental area where dopaminergic neurons are located in the fetus.

Therefore, we next assessed the other possibility of an indirect effect of virus infection on the dopaminergic neurons by maternal immune activation method. Consistent with the previous reports, we observed increased locomotor activity and deficits of Prepulse Inhibition, an endophenotype of schizophrenia patient.

研究分野：神経科学

キーワード：主要組織適合遺伝子複合体クラスI ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

アルコール、ニコチンをはじめ危険ドラッグ等、ドーパミン系の疾患である薬物依存は摂取を止めてから長期間経た後でも薬物の探索行動を繰り返し、日本でも大きな社会問題となっている。しかし効果的な薬物療法が存在しないために再発率が極めて高い。薬物摂取者の内、約 80% は深刻な依存に陥らないことから、脆弱性の防止が有効な手段である。薬物依存への脆弱性は遺伝的要因や発達期の環境要因によって決定すると考えられるが、具体的な要因はまだ解っていない。

私は 2011-2012 年度に採択されたスタートアップと 2012-2014 年度に採択された若手研究 B において、今まで困難であったマウスの薬物自己投与システムを新規開発し、様々な遺伝子改変マウスを評価し、薬物依存に関わる遺伝子を探索した。その結果、主要組織適合性複合体抗原クラス 1 (MHCI) の欠損型マウスが約 2 倍もの薬物探索行動を示すことを見出した。野生型マウスにおいも、薬物がドーパミン神経細胞の MHCI 発現を恒常的に減少させ、薬物探索行動を持続させることを明らかにした。またその機構として、MHCI の欠損や減少によりドーパミン神経細胞への入力神経結合が増強することをホールセルパッチクランプ法を用いた AMPAR/NMDAR 電流比の解析や自発性興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の解析、シナプス結合の場であるスパインの形態解析により明らかにした。更にアデノ随伴ウイルスによりドーパミン神経細胞特異的に MHCI を強制発現させ、薬物によるドーパミン神経細胞の MHCI 減少を補うと、薬物探索行動が抑制されることを確認した。これらの研究は MHCI が薬物依存の持続性を決定する重要な因子であることを示している。

MHCI は免疫特権であると考えられていた脳にも発現し、従来の免疫の機能に加え神経細胞特異的な機能を併せ持つことが近年明らかにされた。免疫系において MHCI は抗原ペプチドに結合し、細胞膜表面に提示する。これを T 細胞が認識することで免疫応答が開始される。一方、脳では MHCI は健常状態でも発現し、神経細胞活動依存的に神経細胞結合の削除をおこなう。特に発達期に MHCI は神経回路形成に強く関与する。神経回路形成では一旦過剰な神経結合が形成された後、必要な神経結合以外が削除され、正常な神経回路が形成される。しかし MHCI 欠損型マウスでは神経結合の削除がおこなわれず過剰な神経結合が維持される (Huh et al., 2000 Science)。MHCI の発現は脳の発達期に最大になり、その後減少するも一定量発現し続けるため、健康な大人の脳でも機能している。

MHCI は免疫応答で中心的な役割を担い、日常生活においても容易に影響を受けるリスクの高い遺伝子である。特にヘルペスウイルスや HIV ウイルスは末梢組織では MHCI の機能を阻害したり、発現そのものを抑制す

ることで、宿主の免疫から逃れ、長い間感染し続ける。大人ではウイルスの脳内への感染は血液脳関門により防がれているが、血液脳関門が未発達な発達期では脳内感染が容易におこる。実際、共同研究者である浜松医科大学、再生・感染病理学講座の小杉伊三夫准教授等は母マウスの胎盤にウイルスを注入し、それが血管を通り胎児の脳室から脳神経細胞へ感染することを証明している (Sakao-suzuki et.al., 2014 Ann. clin. transl. neurol.)。従って母胎感染など、発達期のウイルス感染は脳内の MHCI 発現を抑制する可能性が考えられる。実際、予備実験で初代神経培養細胞にウイルスを感染させたところ、MHCI の発現量が著しく減少することを確認している。

2. 研究の目的

以上の知見から、“ウイルス脳内感染による薬物依存脆弱性の亢進”をドーパミン神経細胞の MHCI に着目し検討する。すなわち、発達期のマウス胎児脳へのウイルスの直接感染が、ドーパミン神経細胞の MHCI を減少させ、薬物依存への脆弱性を引き起こすか調べる。発達期のウイルス脳内感染には母胎感染をモデルとした、脳室内ウイルス注入を発達期の仔マウスに対しおこない、仔マウスの脳への感染をドーパミン神経細胞に着目して調べる。また、ウイルス感染マウスが成熟後、ドーパミン神経細胞の MHCI 発現量の減少を定量的 PCR 法を用いて調べる。またウイルス脳内感染マウスの薬物自己投与行動を解析し、薬物依存度を調べる。また薬物依存ではドーパミン系神経回路の異常が、その主原因の一つである。従って、薬物依存を分子レベルで評価するため、ドーパミン神経細胞に発現するドーパミン系制御遺伝子の発現を調べる。またマウス胎児脳への直接感染が観測されなかった場合には、ウイルス感染がドーパミン神経細胞に間接的に影響を与える可能性を検討する。すなわち、MHCI は様々なサイトカインによってその発現が制御されることが知られており、ウイルスが直接目的細胞に到達し作用しなくても、他の神経細胞に感染することでサイトカインが分泌され、ドーパミン神経細胞の MHCI 発現を変化させる可能性が考えられる。ウイルス感染による間接的な影響の解析では世界的によく用いられている母胎免疫活性化法を用い、直接感染の場合と同様にウイルス感染マウスが成熟した後にその脳を調べる。また母体免疫活性化が従来の報告と同様に発達障害様行動を示すかを調べる。

3. 研究の方法

脳室内ウイルス注入法を用いて新生児の脳室にウイルスを注入し、脳室から脳内に移行し神経細胞へ感染した後、胎児の脳におけるウイルスの分布を観測した。ウイルスには EGFP 遺伝子を組み込むことで、擬陽性の可能

性が無くウイルスの存在を評価することができた。

母胎免疫活性化法では炎症誘発剤を妊娠マウスに投与し、胎児が生まれ成獣(9W-12W)になった後に発達障害様行動を調べた。発達障害様行動では統合失調症の指標とされている Prepulse Inhibition (PPI)の阻害、注意欠陥多動性障害の指標である自発的行動量の増加、自閉症の指標である社会的相互作用、社会的認知機能の障害を調べた。PPIは先行する小さな刺激による直後の強大な刺激からの不随意的な保護システムを評価した。統合失調症の患者では上記の抑制システムが働かないことが知られ、動物に対しても統合失調症の指標として良く用いられる。自発的行動量試験では運動量自動解析装置を用い、マウスの運動量を約1週間連続解析をおこなった。社会的相互作用、社会的認知機能の評価には世界的によく用いられている3-chamber testをおこなった。すなわち左・中・右の3つに領域に区切る敷居の穴を通ることでマウスは3つの領域に自由に行き来できる。まず左と右の領域にメッシュ状のシリンダーをそれぞれ置き、そのうちの一つに相互作用マウスをいれ、実験マウスがそのシリンダーにアクセスする頻度を社会的相互作用として評価する。社会的相互作用能力が高いほどそのシリンダーへのアクセス頻度が増加することが知られている。その後、もう一つのシリンダーに2匹目の相互作用マウスをいれ、そのシリンダーにアクセスする頻度を社会的認知能力として評価する。マウスは新規のマウスにより多くアクセスする性質をもつことから、社会的認知能力が高いマウス程2匹目の相互作用マウスがいるシリンダーへのアクセスが増加することが知られている。

4. 研究成果

新生児の脳室にEGFPを発現するウイルスを注入し、脳室から脳内に移行し神経細胞へ感染した後、胎児の脳におけるウイルスの分布を観測した。その結果、海馬や大脳皮質等に強いウイルス感染が確認できた。しかし、ドーパミン神経細胞が存在する中脳では感染が確認できなかった。以上の結果から、新生児の脳室へウイルス注入を行った場合はドーパミン神経細胞へ直接感染しないことがわかった。そこで次にウイルスが間接的に影響を及ぼす可能性を考えた。その可能性を検討するために母体免疫活性化法を用い、母胎期に免疫活性化したマウスが成熟した後、従来の報告と同様に発達障害様行動を示すかを調べた。その結果統合失調症の評価に用いられるPPI試験では母胎免疫活性化法により生まれた胎児でPPIが阻害されていることが確認できた。また、注意欠陥多動性障害の指標である自発的行動量試験で自発的行動量を1週間計測した結果、行動量が母胎免疫活性化法により生まれた

胎児で上昇していることが確認できた。

一方、自閉症の指標である社会的相互作用、社会的認知機能試験では、母胎免疫活性化法により生まれた胎児に変化は見られなかった。ただし本結果は実験個体数が少なく、今後繰り返し行うことで統計的に優位な結果であることを証明する必要がある。本研究は現在採択されている基盤Cにおいて引き続き検証している。

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7件)

1, Murakami G *(corresponding author), Edamura M, Furukawa T, Kawasaki H, Kosugi I, Fukuda A, Iwashita T, Nakahara D. "MHC class I in dopaminergic neurons suppresses relapse to reward seeking" *Science Advances*: Volume 4, eaap7388, 2018, DOI: 10.1126/sciadv.aap7388, 査読あり

2, Murakami G, Hojo Y, Kato A, Komatsuzaki Y, Horie S, Soma M, Kim J, Kawato S. "Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: Androgen, oestrogen and corticosteroid" *J Neuroendocrinol*: Volume 30, jne. 12561, 2018, DOI: 10.1111/jne.12561, 査読あり

3, Murakami G *(corresponding author). "Distinct effects of estrogen on mouse maternal behavior, the contribution of estrogen synthesis in the brain" *PLoS One*: Volume 11, e0150728, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0150728, 査読あり

4, Murakami G, Nakamura M, Takita M, Ishida Y, Ueki Y, Nakahara D. "Brain rewarding stimulation reduces extracellular glutamate through glial modulation in medial prefrontal cortex of rats" *Neuropsychopharmacology*: Volume 40, P2686-95, 2015, DOI: 10.1038/npp.2015.115, 査読あり

5, Hojo Y, Munetomo A, Mukai H, Ikeda M, Sato R, Hatanaka Y, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kimoto T, Kawato S. "Estradiol rapidly modulates spinogenesis in hippocampal dentate gyrus: involvement of kinase networks" *Hormone and Behavior*: Volume 74, P149-56, 2015, DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.008, 査読あり

6, Murakami G, Ogiue-Ikeda M, Hojo Y, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T Kawato S. “Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus” Brain Res: Volume 1621, P133-46, 2015, DOI: 10.1016/j.brainres.2014.12.002, 査読あり

7, Hatanaka Y, Hojo Y, Mukai H, Murakami G, Komatsuzaki Y, Kim J, Ikeda M, Hiragushi A, Kimoto T, Kawato S. “Rapid increase of spines by dihydrotestosterone and testosterone in hippocampal neurons: Dependence on synaptic androgen receptor and kinase networks” Brain Res: Volume 1621, P121-32, 2015, DOI: 10.1016/j.brainres.2014.12.011, 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1, Murakami G, Edamura M, Furukawa T, Fukuda A, Iwashita T, Nakahara D. “Persistent reduction of MHC-I in dopamine neurons underlies enduring potentiation of its synaptic inputs in cocaine-seeking behavior” Society for neuroscience, Oral Presentation, Chicago, Oct. 2015

2, 村上元、中原大一郎 “薬物依存の新たなメカニズム-ドーパミン神経細胞に発現する免疫分子MHCクラスIの関与” アルコール薬物依存関連学会合同学術総会 招待講演 神戸 2015年10月

3, Murakami G, Fukuda A, Iwashita T and Nakahara D “Persistent reduction of MHC-I in dopamine neurons underlies enduring potentiation of its synaptic inputs in cocaine-seeking behavior” 第38回日本神経科学学会 ポスター発表 神戸 2015年7月

〔図書〕(計1件)

Murakami G *(corresponding author), Kawato S. “Co-Immunoprecipitation methods to identify associated proteins with estrogen receptor at postsynaptic density in brain tissue” in Neuro Methods, Springer Nature: 2018 in press

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

This Week in Science で紹介。“MHC1 suppresses relapse” Science: Volume 359, P1227, 2018,

“MHC1 減り薬物依存 メカニズムの一部解” 静岡新聞 2018年3月16日 朝刊

“コカイン依存 仕組み発見” 中日新聞 2018年3月16日 朝刊

“メカニズム解明 うつ病治療に道” 静岡新聞 2015年6月11日 朝刊

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上元 (Murakami Gen)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：70613727

研究者番号：

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()