

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15758

研究課題名(和文)神経炎症に着目した薬物依存形成・再発分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of drug dependence formation / relapse molecular mechanism focusing on neuroinflammation

研究代表者

雑賀 史浩(Saika, Fumihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10644099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：依存性薬物投与後のPFCにおいて、数種のケモカイン発現増加を認めた。これらのケモカインの拮抗薬は、依存性薬物による場所嗜好性の増加を減弱させた。次にドパミンシグナルがPFCにおけるケモカイン発現に及ぼす影響を調べた。依存性薬物によるケモカイン発現増加は、ドパミンD1受容体拮抗薬により減弱するとともに場所嗜好性の増加も減弱させた。さらに、D1受容体作動薬はPFCにおいてケモカイン発現増加を示すと同時に、場所嗜好性を増加させた。これらの結果から、ドパミンD1受容体シグナルを介したケモカインの発現増加が場所嗜好性の増加すなわち精神依存形成において重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、薬物乱用の若年化および多発する依存性薬物による重大な事件・事故により依存症の病態生理に基づく新規薬物治療戦略の確立は社会的な緊急課題となっている。薬物依存は中枢神経系における炎症の一つと位置付けられることより、未だに有効な治療薬が開発されていない薬物依存形成期や治療後においても様々な要因により再び乱用時と同様の渴望を生じる再燃・再発期におけるサイトカインやケモカインなどの炎症性メディエーターの関与を明らかにすることで今後の臨床応用へとつなげたい。

研究成果の概要(英文)：Increased expression of several chemokines was observed in prefrontal cortex (PFC) after administration of addictive drugs. These chemokine receptor antagonists attenuated the increase in place preference due to addictive drugs. Next, the effect of dopamine signaling on chemokine expression in PFC was investigated. Increased chemokine expression as well as place preference by addictive drugs was attenuated by dopamine D1 receptor antagonist, but not dopamine D2 receptor antagonist. In addition, D1 receptor agonist showed increased chemokine expression in PFC and increased place preference. These results suggest that increased chemokine expression mediated by dopamine D1 receptor signals plays an important role in psychological dependence.

研究分野：薬理学

キーワード：薬物依存 炎症 ケモカイン メタンフェタミン コカイン 前頭前皮質 CPP ドパミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物依存は大きな社会問題であり、経済的損失など社会に及ぼす影響は計り知れない。これらの依存性薬物に見られる強い渴望は、薬物のみならず種々の外来刺激やストレスによっても再燃することが“薬物依存”治療を難治化させる要因である。覚せい剤事犯の検挙者のうち60%以上が再犯者であることも、これらの薬物に対する渴望の強さを裏付けている。従来、薬物依存に関する研究は、中脳腹側被蓋野から側坐核に投射する中脳辺縁系ドパミン作動性神経系(脳内報酬系)に焦点が当てられてきた。さらにげっ歯類から霊長類までの実験動物を用いた薬物依存の行動薬理学的評価モデルも確立されているが、有効な治療戦略の確立に繋がる研究成果はあまり得られていない。そのため、慢性疾患である薬物依存の分子基盤解明には脳内報酬系におけるグリア細胞・神経細胞とそれらが発現するメディエーターとのクロストークに基づく斬新なアプローチが必要である。

2. 研究の目的

サイトカインおよびケモカインは、脳内免疫系における重要な構成要素であり、これらを介する神経炎症は多くの慢性疾患に関与することが知られている。薬物依存は脳における神経炎症性疾患の一つと位置付けられることより、我々は依存性薬物であるメタンフェタミン(Meth)による依存形成における候補分子としてCC-ケモカインの1つであるCCL2を同定し、その阻害薬には強い依存形成抑制効果があることを見出した。本研究では、さらに依存形成に関与する新規候補因子の同定を行い、未だに有効な治療薬が開発されていない薬物依存形成の分子基盤を解明する。また、薬物依存症治療における最大の問題点は、長期の薬物乱用の結果として精神依存が形成されると、退薬後も容易に薬物への渴望が再燃・再発することである。そのため、マウスの退薬後の再燃・再発モデルを用い、本機構におけるサイトカイン-ケモカインシグナルの関与について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム PCR

依存性薬物【メタンフェタミン(Meth)・コカイン(Coca)】投与により誘発される神経炎症について検討した。マウス脳内報酬回路関連脳部位【腹側被蓋野、前頭前皮質(PFC)、側坐核】より総RNAを抽出し、cDNAを作製した。SYBR Greenの蛍光強度を指標とした定量的リアルタイムPCRを行い、各部位におけるmRNA発現を定量化した。

依存性薬物投与により誘発されるケモカイン発現増加の上流におけるドパミンシグナリングの関与をドパミンD1またはD2選択的作動薬・拮抗薬を用い検討した。ドパミン拮抗薬をMeth投与前に処置し、Methによるケモカイン発現増加に及ぼす影響を評価した。さらにドパミン作動薬自体がマウス脳におけるケモカイン発現に及ぼす影響についても評価した。

(2) 免疫蛍光染色

発現増加するケモカインの局在について検討した。深麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、摘出した脳の凍結組織切片を作製した。特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて目的タンパク質の発現を評価した。

(3) 条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned Place Preference; CPP 試験)

CPP試験には、白・黒の2-コンパートメントボックスを使用した。すなわち、一方のコンパートメントは暗室、床面は平ら、他方は明室、床面は凹凸のものを用いた。このような条件の異なる二つのコンパートメントのいずれか一方で依存性薬物による条件付けを行い、その場所嗜好性(CPPスコア)の変化に対する種々の受容体拮抗薬が及ぼす影響を評価した。

ケモカイン受容体阻害薬を用い薬物依存モデルにおける炎症性メディエーターの役割をCPP試験に従って行動学的な評価を行った。また、PFCにおけるケモカイン発現増加に関与するドパミンシグナルについて、ドパミン選択的作動薬や拮抗薬を用い行動学的評価を行った。

Cocaによる薬物依存形成モデル作成後、3週間退薬操作を行うことで、形成されたCocaによる場所嗜好性は消失した(n=11)。このマウスを2群に分け、一方にはCCR2拮抗薬RS504393(RS)他方にはVehを前処置し、その30分後に両群に対し、少量コカインprimingによるCoca誘発場所嗜好性の再発に及ぼすCCR2拮抗薬の影響を評価した。

4. 研究成果

Meth投与後の脳におけるケモカイン発現増加：以前の研究でMeth投与によるケモカインCCL2の発現と場所嗜好性の増加に関する報告を行っている。Meth単回投与後のPFCについて

DNA マイクロアレイ解析を行い、いくつかの候補分子を同定した。そのうちの1つである CCL7 について定量的リアルタイム PCR を行い、CCL7 の有意な発現増加を確認した。また、その産生細胞は、NeuN 陽性ニューロンであることを明らかにした(図 1)。同様に Coca 投与後の PFC においても、CCL2・CCL7 の有意な発現増加を確認するとともに、Meth と異なる因子として CXCL1 の発現増加を確認した(図 2)。

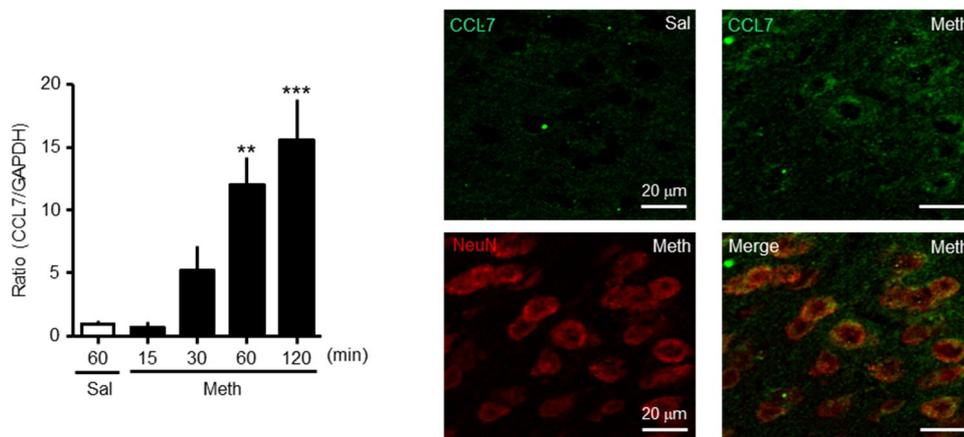


図 1 : Meth 投与後の前頭前皮質における CCL7 発現

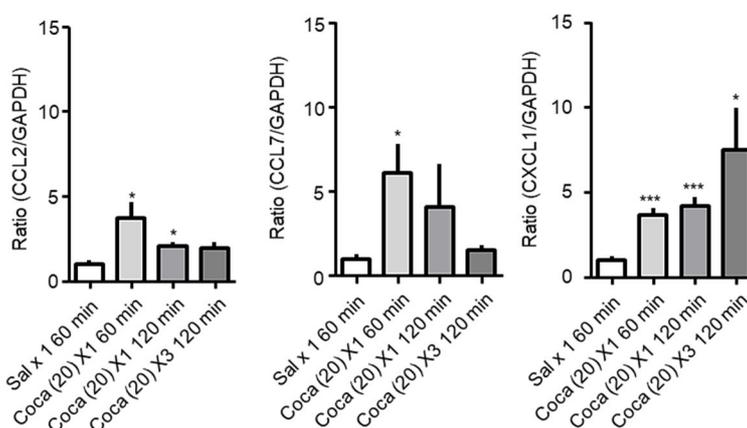


図 2 : Coca 投与後の前頭前皮質におけるケモカイン発現

次に、PFC において発現増加したケモカインが Meth や Coca 投与による場所嗜好性の増加に及ぼす影響について調べるため、Meth に対して CCL2 および CCL7 の共通受容体である CCR2 拮抗薬である INCB3284 を、Coca に対しては CXCL1 の受容体である CXCR2 に対する拮抗薬 SB 225002 をそれぞれ前処置すると、これら拮抗薬自体は CPP スコアに直接影響を与えずに Meth、Coca 誘発場所嗜好性の増加を有意に減弱させた(図 3)。

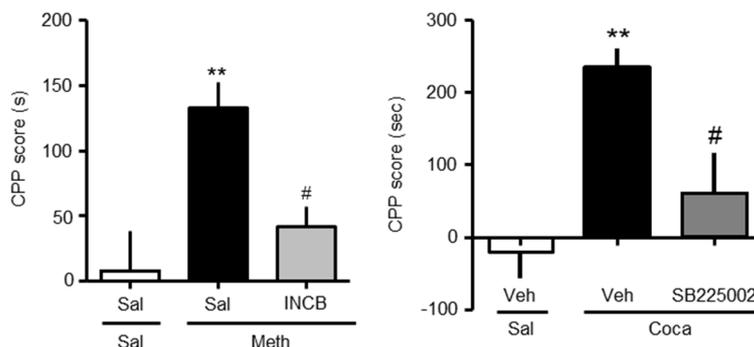


図 3 : Meth・Coca 誘発場所嗜好性増加に及ぼすケモカイン受容体の影響

ドパミン受容体シグナル伝達は依存性薬物による報酬効果に不可欠であるため、次にドパミン受容体作動薬または拮抗薬が PFC における Meth によるケモカイン mRNA 発現にどのような影響を及ぼすか調べた。Meth 単回投与後における CCL7 および CCL2 mRNA の発現増加は、ドパミン D1 受容体拮抗薬である SCH 23390 (SCH) 前処置により減弱した(図 4A、B)。この結果と一致して SCH はまた Meth による場所嗜好性の増加を有意に減弱させた(図 4C)。さらに、D1 受容体選択的作動薬である SKF 81297 (SKF) の単回投与後の PFC において CCL7 および

CCL2 の mRNA 発現レベルは用量依存的な発現増加を示すとともに (図 4D、F) SKF は CPP 試験において場所嗜好性を有意に増加させた (図 4F)。対照的に、D2 受容体選択的作動薬 Sumanriole (Suma) や拮抗薬 Raclopride (Rac) は、PFC における CCL7 または CCL2 mRNA の発現レベルに影響しなかった。加えて、D2 受容体拮抗薬 Rac や Haloperidol (Hal) は Meth による場所嗜好性の増加にもほとんど影響を及ぼさなかった。これらの結果から、PFC でのドパミン D1 受容体シグナルを介したケモカインの発現増加が Meth や Coca による場所嗜好性の増加すなわち精神依存形成において重要な役割を果たすことが示唆された。

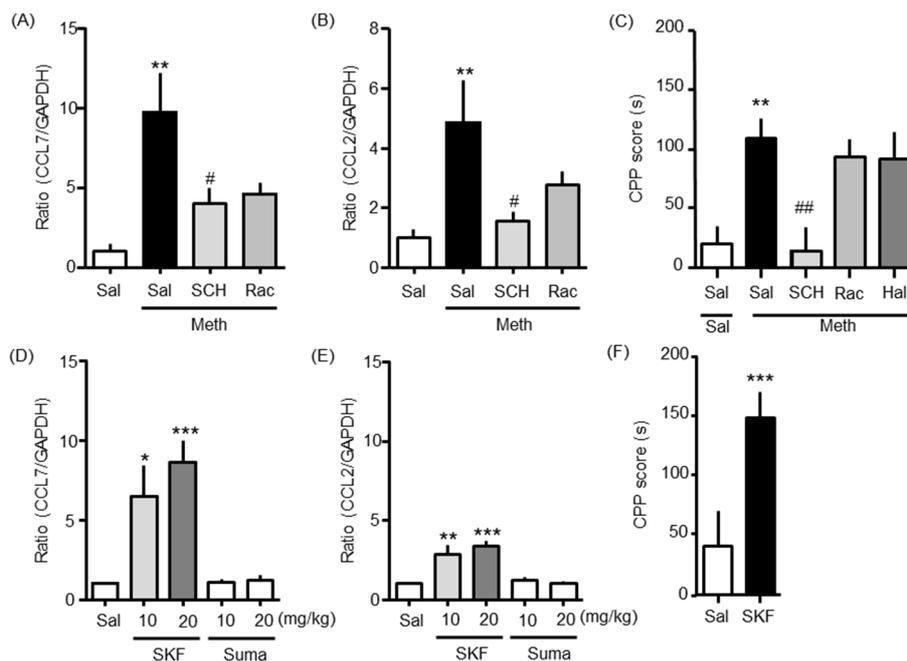


図 4：ドパミン D1 受容体シグナル伝達を介したケモカイン発現増加と精神的依存形成効果

最後に、依存性薬物への渴望 (薬物探索行動) の再燃・再発に関する実験を行なった。まずは Coca を用いた、再燃・再発モデルを確立した。3 週間にわたる連日の退薬操作により、Coca により誘発された場所嗜好性の増加は消失した。このタイムポイントで少量コカイン priming を行うと、マウスはいったん消失した場所嗜好性を再燃させた。しかし、あらかじめ priming 前に、CCR2 拮抗薬 RS を前処置しておく、priming による場所嗜好性の再燃・再発は抑制された。

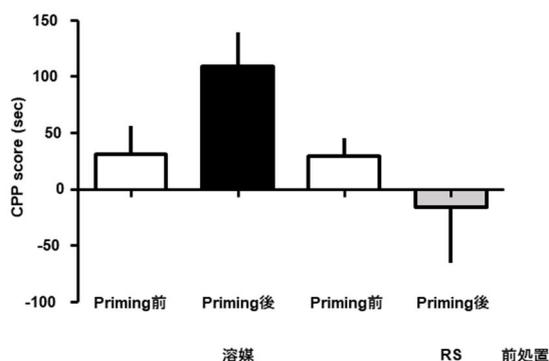


図 5：Coca 再燃・再発モデルに及ぼす CCR2 受容体拮抗薬の影響

まとめ：本研究では、マウス PFC におけるドパミンシグナルを介したケモカイン発現増加と依存性薬物投与による報酬効果との関連について明らかにすることを主眼としている。Meth または Coca 投与後の PFC において CCL2、CCL7 や CXCL1 などの発現増加を認め、これらの受容体拮抗薬が CPP 試験法における場所嗜好性の増加を有意に減弱させたことから、これらのケモカインシグナルを介する経路が Meth および Coca による精神依存形成において重要な役割を果たしていると考えられた。また、ドパミン D1、D2 受容体拮抗薬および作動薬を用いた実験より、Meth および Coca によるケモカイン発現増加にはドパミン D1 シグナルが関与することも確認した。依存形成期におけるケモカインシグナルの関与から、再燃・再発期におけるケモカイン受容体拮抗薬の効果を評価したところ、一定の効果は認められた。ケモカインシグナル抑制が薬物依存形成に一定の有効性を示したことから、引き続き神経炎症に焦点を当て、依存性薬物退薬後の再燃機構に及ぼす効果についての検討を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Daichi, Kiguchi Norikazu, Saika Fumihito, Kishioka Shiroh, Matsuzaki Shinsuke	4. 巻 525
2. 論文標題 Insufficient efferocytosis by M2-like macrophages as a possible mechanism of neuropathic pain induced by nerve injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 216 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi Norikazu, Uta Daisuke, Ding Huiping, Uchida Hitoshi, Saika Fumihito, Matsuzaki Shinsuke, Fukazawa Yohji, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Ko Mei-Chuan, Kishioka Shiroh	4. 巻 170
2. 論文標題 GRP receptor and AMPA receptor cooperatively regulate itch-responsive neurons in the spinal dorsal horn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108025 ~ 108025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2020.108025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saika F, Matsuzaki S, Kobayashi D, Kiguchi N, Kishioka S.	4. 巻 38(3)
2. 論文標題 CXCL1 is responsible for cocaine-induced reward in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 145-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saika F, Kiguchi N, Matsuzaki S, Kobayashi D, Kishioka S.	4. 巻 368(3)
2. 論文標題 Inflammatory Macrophages in the Sciatic Nerves Facilitate Neuropathic Pain Associated with Type 2 Diabetes Mellitus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther.	6. 最初と最後の頁 535-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.252668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S.	4. 巻 18(11)
2. 論文標題 Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18112296.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saika F, Kiguchi N, Wakida N, Kobayashi D, Fukazawa Y, Matsuzaki S, Kishioka S.	4. 巻 665
2. 論文標題 Upregulation of CCL7 and CCL2 in reward system mediated through dopamine D1 receptor signaling underlies methamphetamine-induced place preference in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 33-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S.	4. 巻 15(1)
2. 論文標題 Inhibition of peripheral macrophages by nicotinic acetylcholine receptor agonists suppresses spinal microglial activation and neuropathic pain in mice with peripheral nerve injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation.	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-018-1133-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 雑賀 史浩、木口 倫一、小林 大地、出口 雄也、松崎 伸介、岸岡 史郎
2. 発表標題 DREADDシステムを用いたマクロファージ/ミクログリア機能制御が神経障害性疼痛モデルに及ぼす疼痛抑制効果
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出口 雄也、雑賀 史浩、木口 倫一、小林 大地、松崎 伸介、岸岡 史郎
2. 発表標題 DREADDによるマクロファージ/ミクログリアの抑制は雄性マウスの神経障害性疼痛モデルにおいて抗アロディニア効果を示す
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木口倫一、雑賀 史浩、松崎 伸介、岸岡 史郎
2. 発表標題 乾癬モデルマウスの痒みを担う脊髄内調節機構
3. 学会等名 136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 雑賀史浩、木口倫一、小林大地、松崎伸介
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスにおけるDREADDシステムを用いたマクロファージ/ミクログリア活性操作
3. 学会等名 疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 F. Saika, N. Kiguchi, D. Kobayashi, S. Matsuzaki , S. Kishioka
2. 発表標題 Curcumin attenuates methamphetamine-induced conditioned place preference via inhibition of CC chemokine ligand 2 expression
3. 学会等名 31th ECNP Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Kishioka, F. Saika, N. Kiguchi, D. Kobayashi, S. Matsuzaki
2. 発表標題 Possible involvement of chemokine ligands in addictive drugs-induced conditioned place preference in mice
3. 学会等名 31th ECNP Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 F. Saika, N. Kiguchi, D. Kobayashi, S. Matsuzaki, S. Kishioka
2. 発表標題 4 ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストはマウスにおける2型糖尿病性神経障害性疼痛を減弱する
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木口倫一、雑賀史浩、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 炎症性マクロファージは神経傷害後のミクログリア活性化および機械的アロディニアを調節する
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Kiguchi, F. Saika, D. Kobayashi, S. Matsuzaki, S. Kishioka
2. 発表標題 Inflammatory macrophages mediate neuropathic pain caused by type 2 diabetes mellitus
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 N. Kiguchi, F. Saika, D. Kobayashi, S. Matsuzaki, S. Kishioka
2. 発表標題 Inflammatory macrophages in the injured peripheral nerves facilitate spinal microglial activation and neuropathic pain in mice
3. 学会等名 17th IASP World Congress of Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 雑賀史浩、木口倫一、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 神経障害性疼痛に関するマクロファージ/ミクログリアの機能解析
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Kishioka, F. Saika, N. Kiguchi, S. Matsuzaki
2. 発表標題 Peripheral pro-inflammation cytokines participate in chronic morphine-induced hyperalgesia in mice.
3. 学会等名 CPDD (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木口倫一、雑賀史浩、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 傷害神経に浸潤するマクロファージは脊髄ミクログリアの活性化を調節する
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岸岡史郎、山本千鶴子、小林大地、雑賀史浩、木口倫一、松崎伸介
2. 発表標題 モルヒネ禁断時の血清コルチコステロン上昇における 4-β-ニコチン性アセチルコリン受容体の関与
3. 学会等名 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木口倫一、雑賀史浩、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 食餌性肥満に及ぼす脱酸梅果汁の抑制効果
3. 学会等名 第15回果実酒・果実飲料と健康に関する研究
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 雑賀史浩、木口倫一、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 クルクミンによるメタンフェタミン誘発精神的依存形成の抑制
3. 学会等名 第15回果実酒・果実飲料と健康に関する研究
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木口倫一、小林大地、雑賀史浩、松崎伸介、岸岡史郎
2. 発表標題 神経傷害後の末梢マクロファージによる脊髄ミクログリア調節作用
3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S. Matsuzaki, G. Amano, Y.Mori, D. Kobayashi, H. Takamura, K. Miyoshi, T. Yoshimura, F. Saika, N. Kiguchi, T. Katayama, S. Kishioka
2. 発表標題 Regulation of COPI vesicle transport via Scyl1 methylation under ER-stress
3. 学会等名 ASCB2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------