

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07401

研究課題名(和文) 依存症はうつ状態の有無で病態メカニズムが異なる！その治療法の開発と分子機構の解明

研究課題名(英文) Novel approaches for treatment of addiction after social defeat stress

研究代表者

大西 克典 (Yoshinori, Ohnishi)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：コカインは腹側被蓋野から側坐核に投射するドーパミン神経が放出したドーパミン濃度を上昇させます。一方、うつ状態ではそのドーパミン神経の発火頻度が上がります。また、ストレスを感じると依存性の高いものに手を出しやすくなり、依存性薬物はうつ状態を悪化させる負のスパイラルを形成します。我々はストレスとコカインで依存性が悪化する分子メカニズムを同定し、それを防ぐための食品と薬物を見出しました。さらにコカインによるドーパミン放出上昇には側坐核のアセチルコリン介在神経細胞のp11の存在が必須であり、また、ストレスに対して抗ストレス状態になるには腹側海馬におけるDFosBの蓄積が重要であることを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はコカイン投与のみ、ストレス刺激のみでは誘導されないが、うつ状態でのコカイン投与でのみ上昇する分子を同定しており、それがコカインの繰り返し投与やストレス時に誘導されるDFosBと結合することを見出しました。その標的蛋白質、および遺伝子を同定するためにHA-fosBマウスを製作しました。さらにコカイン刺激、メスと出会ったときの刺激、甘いものを食べたときの刺激で側坐核でドーパミンが上昇するのですが、それが側坐核側の介在神経機能でON/OFFされるメカニズムを明らかにしました。さらにストレスに対して拮抗する状態には側坐核だけでなく、腹側海馬のDFosBが重要であることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Cocaine increases the concentration of dopamine released by dopaminergic nerves projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens. On the other hand, the frequency of firing of that dopaminergic nerve is increased in depression. Also, when we are stressed, we are more likely to turn to addictive substances, and addictive drugs form a negative spiral that worsens depression. We have identified a molecular mechanism by which stress and cocaine work in concert to exacerbate dependence on addictive drugs, and have found foods and drugs to prevent this. We also found that the presence of p11 in acetylcholinergic interneurons in the nucleus accumbens is essential for cocaine-induced elevation of dopamine release, and that accumulation of DFosB in the ventral hippocampus is important for an anti-stress state in response to stress.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：神経科学

キーワード：転写因子 FosB AP-1 コカイン 依存症 うつ病 ストレス 行動実験

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。

コロナ禍の中、これから失業者の数も増えて、自殺が激増することが予見されています。経済活動が停滞しているあおりを受けて、みかじめ料などが減った反社会的組織が覚せい剤やコカインで収入を増やしていく可能性もあり、うつ病と依存性薬物の関係は無視できない社会情勢となっています。特に依存症を併発したうつ病は難治性であり、時に図1のように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りえるからです。

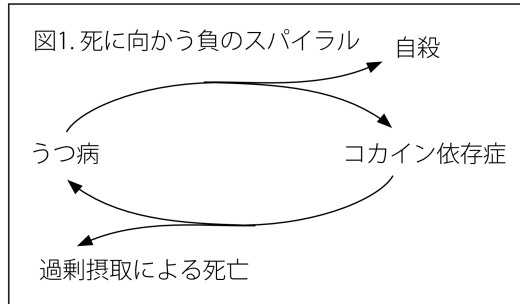


図1のようにストレスと薬物依存は、非常に密接した関係性を持っており (Saal, *Neuron* 2003, Covington, *Neuron* 2011)、互いに状態を悪化させる関係にあります。つまり、前者は自殺、後者は過剰摂取による死亡と死に向かう負のスパイラルの関係にあるわけです。しかしながら、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていません。

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おり、食品、薬物、遺伝子発現と多様なアプローチでそれらを予防する方法を見出していました。本研究はそれらをさらに発展させる方法を確立するとともに、元々の依存症、およびうつ状態と抗うつ状態の違いについて新たな知見を見いだしています。

依存症や抗うつ効果の分子メカニズムのキーとなる蛋白質として我々は Δ FosB を報告しています (Vialou, et al. *Nature neuroscience* 2010, Ohnishi, et al. *Biological psychiatry* 2011, Ohnishi, et al. *Neuroscience* 2015)。我々はすでに yeast two hybrid を用いて、 Δ FosB の結合蛋白質を複数見出していますが、*in vivo* での探索はまだしたことがない状態でした。また、 Δ FosB は転写因子ですが、その標的となる遺伝子は ChIP seq に使えるだけの良質の抗体が存在しないため、今まで成功していませんでした。そこで、我々はモデルマウス作成支援の協力を得て、HA-fosB マウスを作製し、現在、繁殖させて増やしている段階です。このマウスを使うことで、*in vivo* での結合蛋白質や転写因子として働いているときの標的遺伝子を明らかにできると期待できます。

さらに発展研究として、うつ病にならないようにするための治療法の探索、ストレス抵抗性を獲得したときの分子メカニズム、コカイン依存性に関連する行動制御の新たなメカニズム、うつ状態やコカイン投与で上昇する側坐核でのドーパミン上昇の ON/OFF メカニズムの解明、メスマウスのオスマウスに対する嗜好性の特性解明に取り組みました。

2. 研究の目的

- (1) ストレス下での依存症悪化の分子メカニズムの解明
- (2) ストレス抵抗性を獲得したときの分子メカニズムの解明
- (3) うつ病にならないための新しい治療法の開発
- (4) コカイン依存性の指標となる行動異常の制御メカニズムの解明
- (5) 側坐核におけるドーパミン上昇を決める新たなメカニズムの解明
- (6) メスマウスのオスマウスに対する嗜好性の特性解明

3. 研究の方法

(1) 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、**C57/BL6** マウスを自分より大きくて凶暴な **CD1** マウスと柵で居住空間が分離された同一の大きなケージ内にいれます。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。

我々はさらにこれに改良を加え、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。

(2) 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、三日間、午前中は生理食塩水を注射して片側に 30 分間、午後はコカインを 7.5mg/kg 注射してもう片方に 30 分間入れて、四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。

(3) 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きますが、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。

(4) 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、我々はジャンク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。

(5) Microdialysis

側坐核、前頭前野にプローブをセットして透析により20分かけて回収したサンプル内のドーパミン濃度を HPLC をかけて ECD にて測定した。

4. 研究成果

(1) ストレス下での依存症悪化の分子メカニズムの解明

ストレスでうつ状態になったときのコカイン依存性増悪は、側坐核における Δ FosB の発現上昇で悪化し、転写活性を持たない $\Delta 2\Delta$ FosB の過剰発現で抑制される (Ohnishi, et al. Neuroscience 2015) ことから、 Δ FosB の下流の遺伝子が原因遺伝子として推測されます。それを ChIP-seq を用いて同定するために HA-fosB マウスを作製しました。通常の Δ FosB 抗体では免疫沈降が上手くいかないため、HA-tag をつけた Δ FosB を用いることで標的遺伝子を今後、明らかにしていきます。

(2) ストレス抵抗性を獲得したときの分子メカニズムの解明

Δ FosB はストレス時に側坐核で発現上昇し、抗うつ的に働くことを示してきました (Vialou, et al. Nature neuroscience 2010, Ohnishi, et al. Biological psychiatry 2011) が、それ以外に腹側海馬においても発現上昇することを見出し、HSV と CRISPR-Cas9 を使った fosB ノックダウンと、floxed fosB マウスを使ったコンディショナルノックアウトにより、それが抗うつ的なために必要な発現上昇であることを示しました (Eagle, et al. Nature communications 2020)。

(3) うつ病にならないための新しい治療法の開発

コロナ不況によるうつ病患者の増加に対応するため、新たな治療法の開発に取り組み、薬を使わない全く新しい治療法をマウスの行動実験で見出しました。

その分子メカニズムを探索するため、まずはどの神経領域に影響を与えているかを調べるために c-fos EGFP マウスを購入しました。さらにその活性化した神経細胞の機能を調べるために c-fos 活性化神経細胞特異的に遺伝子発現制御ができる TRAP2 マウスも同時に購入し、現在繁

殖中です。

(4) コカイン依存性の指標となる行動異常の制御メカニズムの解明

Cocaine CPP では、コカインの連日投与における行動量の増加と、コカインと関連付けされた箱への嗜好性増加の二つの行動異常が依存性と関連付けられて測定できます。この二つの行動が前頭前野のドーパミン受容体発現細胞、グルタミン酸受容体発現細胞でそれぞれ別々に制御されていることを見出しました（投稿中）。

(5) 側坐核におけるドーパミン上昇を決める新たなメカニズムの解明

側坐核の神経細胞の **90%** はドーパミン受容体を発現する中型有棘神経細胞ですが、**1%** の割合で大型のアセチルコリン性介在神経が存在します。中型有棘神経細胞の **GABA** 放出能力を調整することが知られており、パーキンソン病などの病態と深い関係があります。我々はこの細胞において **p11** というたんぱく質を欠損させると、コカイン注入、甘いお菓子、メスとの遭遇で上昇する側坐核のドーパミンが上昇しないことを見出しました。また、それらが、アセチルコリン性介在神経から分泌されるアセチルコリンが減少することが原因であることも見出しました（**Hanada, et al. eNeuro 2018**）。

(6) メスマウスのオスマウスに対する嗜好性

(5)の結果から、雌雄の遭遇において側坐核のドーパミンが上昇することがわかったので、今度は逆にメスマウスにおいてオスマウスと遭遇した時に側坐核のドーパミンがどう上がるのかを検討しました。さらにその上がる条件と行動との関係性を明らかにしました（投稿準備中）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Manning Claire E., Eagle Andrew L., Kwiatkowski Christine C., Achargui Ridouane, Woodworth Hillary, Potter Emily, Ohnishi Yoshinori, Leininger Gina M., Robison A.J.	4. 巻 406
2. 論文標題 Hippocampal Subgranular Zone FosB Expression Is Critical for Neurogenesis and Learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 225 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.03.022	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 該当する
1. 著者名 Shuto Takahide, Kuroiwa Mahomi, Sotogaku Naoki, Kawahara Yukie, Oh Yong-Seok, Jang Jin-Hyeok, Shin Chang-Hoon, Ohnishi Yoshinori N., Hanada Yuuki, Miyakawa Tsuyoshi, Kim Yong, Greengard Paul, Nishi Akinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Obligatory roles of dopamine D1 receptors in the dentate gyrus in antidepressant actions of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-018-0316-x	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 Hanada Y., Kawahara Y., Ohnishi Y. N., Shuto T., Kuroiwa M., Sotogaku N., Greengard P., Sagi Y., Nishi A.	4. 巻 5
2. 論文標題 p11 in Cholinergic Interneurons of the Nucleus Accumbens Is Essential for Dopamine Responses to Rewarding Stimuli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0332 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0332-18.2018	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 Eagle AL, Manning CE, Williams ES, Bastle RM, Gajewski PA, Garrison A, Wirtz AJ, Akguen S, Brandel-Ankrapp K, Endege W, Boyce FM, Ohnishi YN, Mazei-Robison M, Maze I, Neve RL, Robison AJ	4. 巻 11
2. 論文標題 Circuit-specific hippocampal FosB underlies resilience to stress-induced social avoidance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17825-x	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西 昭徳
2. 発表標題 モテるオスはハゲるとモテなくなるのか？
3. 学会等名 NEURO 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Nishi A
2. 発表標題 Does baldness of attractive male decrease his external and internal power to fascinate female in mice?
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西昭徳
2. 発表標題 アルコールを飲むことでメスのオスへの嗜好性やドーパミン反応性はどうか変化するか
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西昭徳
2. 発表標題 モテるオスの分子神経基盤を探る
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西昭徳
2. 発表標題 お酒の力でモテないオスマウスはメスマウスの興味をひくことができるのか？
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 Ohnishi YN, Kawahara Y, Ohnishi YH, Nishi A
2. 発表標題 Is it possible that non-attractive male mouse can get attractive mind set?
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西 昭徳
2. 発表標題 モテるオスにはどうしたらなれるのか？
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西克典、河原幸江、大西陽子、西 昭徳
2. 発表標題 魅力的なオスマウスの剃毛はメスマウスを惹きつける力を失わせるか？
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/
eNeuro Research Highlight
http://www.eneuro.org/content/6/2/ENEURO.0105-19.2019
久留米大学医学部薬理学講座HP
http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/pharm/

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
研究分担者	河原 幸江 (Yukie Kawahara) (10279135)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	西 昭徳 (Nishi Akinori) (50228144)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	大西 陽子 (Ohnishi Yoko) (70727586)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

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
---------	---------