

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860392

研究課題名(和文) 神経免疫分子による薬物依存の遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) The development of gene therapy with neuroimmune protein against drug addiction

研究代表者

村上 元 (Murakami, Gen)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70613727

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)：近年免疫特権とされていた脳に免疫分子が存在し重要な働きを担うことが明らかにされてきている。特に免疫系の重要な分子である主要組織適合性複合体抗原クラスI(MHCI)は健常状態においても脳で重要な役割を担っている。本研究はMHCIの薬物依存での役割を個体レベルから分子レベルまで明らかにした。また我々が新規に開発した薬物自己投与システムを用いて作製した薬物依存マウスに対し、アデノ随伴ウイルスを用いてMHCIを強制発現させることで薬物依存解消の新規遺伝子治療法を提唱した。

研究成果の概要(英文)：MHC class I (MHCI), an important immune protein, contributes to eliminate synaptic connections in various brain regions, and its deficiency results in brain dysfunctions. However, the contribution of MHCI to addictive behaviors has not been considered. Here we found that repeated cocaine intakes persistently reduce MHCI expression particularly in dopamine neurons that is important for brain reward functions. This reduction leads to enduring potentiation of synaptic inputs to these neurons, resulting in robust cocaine-seeking behavior that is an animal model of relapse to cocaine. By contrast, cocaine-seeking behavior was suppressed by restoring the cocaine-induced reduction of MHCI in dopamine neurons. These results suggest that MHCI regulates synaptic transmission in dopamine neurons and its reduction underlies animal model of relapse to cocaine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：主要組織適合遺伝子複合体 薬物依存 コカイン 自己投与 ドーパミン 腹側被蓋野

## 1. 研究開始当初の背景

近年の技術の発達により免疫特権であるとされていた脳に免疫分子が存在し重要な働きを担うことが明らかにされている。これらの脳に発現する免疫分子は本来の免疫としての機能に加え神経細胞特異的な機能を併せ持つ。特に免疫系の重要な分子である主要組織適合性複合体抗原クラス I (MHCI) は健常状態においても発達期には神経回路形成、成熟後では神経細胞結合の制御など神経回路の構成において重要な役割を担っている。これらの MHCI の神経細胞特異的な機能は神経回路構成の素因子であるシナプス可塑性の修飾に分子基盤をおく。すなわち健常状態では神経細胞間の信号伝達の長期増強 (long term potentiation : LTP) と長期抑制 (long term depression : LTD) がバランスを保つことで神経回路が組み替えられながらも恒常的に保たれる。一方 MHCI の欠損では LTP は増強し LTD が抑制されてバランスが崩れる結果、過剰な神経回路が形成される。MHCI は脳の中でも特に報酬系である中脳のドーパミン系に強く発現することを考えると、免疫分子である MHCI が報酬系においても重要な働きを担うことが示唆される。

一方、報酬系の疾患であるアルコールやニコチンを含む薬物依存症は日本でも大きな社会問題になってきている。特にコカインやメタンフェタミン等は摂取を止めてから長期間経た後でも薬物を探索する行動を繰り返す。薬物依存は難治性の精神疾患であり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。薬物依存には報酬系をつかさどる脳領域において LTP や LTD が障害を受けることがわかっている。具体的には長期の薬物摂取に伴い LTP が長期間にわたって維持される一方、シナプス除去に関係する LTD が抑制される。従って薬物依存脳では、新たに形成されたシナプス結合が薬物摂取を止めた後も長期にわたって除去されず記憶されることが薬物摂取の再発機構であると考えられている。この薬物依存で観測される LTP の増強ならびに LTD の抑制は MHCI 欠損によって観測されるものと同様であることから薬物依存の重要分子として MHCI が関わっている可能性が考えられる。実際当グループでは MHCI の機能が欠損したマウス (MHCI 欠損型マウス) では依存の指標であるコカイン誘発性行動感作が野生型マウスの3倍も増加することを発見した。さらに MHCI 欠損型マウスの報酬系神経回路において LTD が消失し LTP が有意に増強されることを確認している。これ等の結果は MHCI は通常薬物依存を抑制する方向に働いており、MHCI が欠損すると抑制が働かず依存が促進されることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は薬物依存における MHCI の役割を明らかにし、薬物依存に対する新規治療法を検討する。薬物依存の評価には我々が新規開発した自己投与システムを用いる。多くの薬物依存の動物モデルは1週間の実験者による薬物反復投与(強制投与)で作製されるが、動物自身が身体に接続されたカニューレを通して投与する自己投与系の方が人間の依存形式をより模倣している。また効果の面でも強制投与では1ヶ月でその依存は消失してしまうが、自己投与では3ヶ月以上持続するといった違いが報告されている。従って薬物依存の研究には自己投与型依存モデルを用いる必要が示唆されている。しかし自己投与型薬物依存モデルはラットでは確立しているものの、マウスでは静脈の太さがラットの1/3しかないためカニューレを長期間設置しておくことができない。そこで当グループでは今まで培ってきたマイクロダイアリシスの技術を応用した全く新しい方法で従来の10倍以上の期間薬物を脳に直接投与できる自己投与システムを確立し論文に発表している。具体的には、マウス自身が装置に装備されているホールをノーズポークすることで脳に埋め込まれたマイクロダイアリシスの半透膜を通り脳室に直接薬物が投与される。そこで本研究では MHCI による薬物依存への影響を調べるため、以下の4つに焦点を絞った。MHCI 欠損による薬物依存行動への影響、薬物による MHCI への影響、MHCI 欠損による報酬系神経回路への影響、薬物依存の新規治療法の開発。

## 3. 研究の方法

MHCI 欠損による薬物依存行動への影響 : MHCI の薬物依存行動への影響を調べるため、薬物自己投与システムを MHCI 欠損型マウスに対して用い、コカイン依存の程度を野生型と比較評価した。実験は野生型マウス、MHCI 欠損型マウスそれぞれに対し、自己投与システムを用いて作製したコカイン投与群とその対照として溶媒投与群を作製し、4群を比較した。自己投与実験は薬物依存の特徴である薬物投与停止に伴う禁断症状を評価した。すなわち10日間コカインを投与し、続いて10日間投与を停止した後、コカインを得るために必要なノーズポークの回数で依存度を評価した

薬物依存が報酬系脳部位に発現する MHCI に与える影響を自己投与システムで調べる : 薬物依存が脳に発現する MHCI に与える影響を調べるため、野生型マウスに対し自己投与システムを用いて作製したコカイン依存群とその対照群の2群から薬物依存に関与する脳部位である中脳腹側被蓋野を取り出し、MHCI の発現量の比較を定量的 PCR 法により調べた。定量的 PCR 法は少ない試料から解析できるため本研究に最も適していると考えられる。自己投与システムを

用いて薬物依存を形成した後、脳を取り出し解析をおこなった。

MHCI 欠損による報酬系神経回路への影響：MHCI による薬物依存亢進の分子機構を電気生理学的手法を用いて調べた。コカイン依存では LTP が増強され LTD が抑制される結果ドーパミン細胞に入力する神経信号伝達が強まる。その結果、信号伝達強度の指標とされる AMPA/NMDA 受容体電流比と自発性興奮性シナプス後電流(mEPSC)の振幅と頻度がコカイン依存で増加する。MHCI 欠損ではコカイン依存による LTP の増強と LTD の抑制が増進し、ドーパミン細胞への入力信号が更に増強される結果、薬物依存がより強くなることが考えられた。そこで本実験では上と同様に野生型マウス、MHCI 欠損型マウスそれぞれに対し自己投与システムを用いてコカイン群とその対照群を作製した。薬物摂取停止後の 10 日目にそれらのマウスから腹側被蓋野を含む急性スライスを作製し、パッチクランプ法によって AMPA/NMDA 受容体電流比と mEPSC をドーパミン細胞から計測した。本研究は本学の神経生理学講座(福田敦夫教授)でおこなった。

薬物依存の新規治療法の開発：本実験では MHCI 遺伝子を強制発現することで薬物依存を解消する全く新規の遺伝子治療法を自己投与システムを用い検討した。発現させる脳部位は報酬系の重要な部位であり、コカインによる MHCI の発現抑制が唯一観測された部位である中脳腹側被蓋野とした。強制発現には神経細胞での長期の安定発現と免疫応答を引き起こさないことから近年遺伝子治療で着目されているアデノ随伴ウィルスを用いた。具体的には MHCI 遺伝子とその上流に腹側被蓋野の主要細胞であるドーパミン細胞特異的に発現するチロシン水酸化酵素のプロモーターを組み込んだアデノ随伴ウィルスをマイクロインジェクション法により腹側被蓋野に投与し、腹側被蓋野のドーパミン細胞特異的に MHCI を発現させた。また対照群として MHCI の代わりに蛍光タンパク質である eGFP を発現させたマウスを作製し、依存の程度を比較評価した。また免疫組織染色法により腹側被蓋野の中で特にドーパミン神経細胞に MHCI が強く発現していることを確認した。依存は自己投与システムを用いて上と同様に薬物依存を評価した。

#### 4. 研究成果

MHCI 欠損型マウスは野生型マウスに比べノーズポーク回数が約 2 倍上昇することを明らかにした。以上の結果は MHCI 欠損により薬物依存の重要な要素である薬物探索行動がより強くなったことを示している。

自己投与システムを用いて作製したコカ

イン依存マウスを用いて MHCI の発現量を腹側被蓋野で調べた結果、MHCI の減少が確認された。この結果は野生型でおこるコカイン依存行動においても、コカインが MHCI の発現量を減少させた結果であることを示している。

ドーパミン細胞への入力信号を電気生理学的手法を用いて計測をおこなった結果、信号伝達強度の指標である AMPA/NMDA 受容体電流比が野生型でコカインによって増加し、MHCI 欠損型マウスではより大きくなっていることを明らかにした。以上の結果は MHCI は通常ドーパミン神経細胞の神経結合を抑制的に制御しており、コカインが引き起こす MHCI の減少により、ドーパミン神経細胞への神経結合が強化されコカイン依存になることがわかった。

コカインによる MHCI の発現抑制が唯一観測された部位である中脳腹側被蓋野のドーパミン神経細胞に MHCI を強制発現させ、コカイン自己投与の比較解析をおこなった結果、MHCI を発現したマウスはコカインの探索行動が約半分まで抑えることに成功した。この結果はコカインによる MHCI の減少がコカイン依存の原因であることを明らかにすると共に、MHCI をターゲットとした新規遺伝子治療法を提示することに成功した。

#### 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 1 件)

1, Edamura M, Murakami G, Meng H, Itakura M, Shigemoto R, Fukuda A, Nakahara D. "Functional deficiency of MHC class I enhances synaptic plasticity in the nucleus accumbens of mice" *PLoS One*. 30, e107099 2014

〔学会発表〕(計 5 件)

1, Murakami G, Meng H, Edamura M, Furukawa T, Fukuda A, Iwashita T, Ishida Y, Nakahara D. "Involvement of Immune Protein MHC class I in The Development of Cocaine Self-Administration", Society for neuroscience, Oral Presentation, Washington D.C., Nov. 2014

2, Murakami G, Meng H, Edamura M, Nakahara D. "Cellular Mechanisms of Enhanced Cocaine Self-Administration in MHC Class I Deficient Mice", Society for neuroscience, Poster Presentation, SanDiego, Nov. 2013

3, 村上元、孟紅蕊、枝村光浩、古川智範、

福田敦夫、岩下寿秀、中原大一郎 “免疫分子であるMHCクラス1がドーパミン神経細胞を修飾しマウスのコカイン探索行動を維持する” 第14回浜松医科学シンポジウム 招待講演 2014年11月

4, Murakami G, Meng H, Edamura M, Furukawa T, Fukuda A, Iwashita T and Nakahara D. “Involvement of Immune Protein MHC class I in Cocaine-seeking Behavior” 第19会静岡健康・長寿学術フォーラム ポスター発表 2014年11月

5, Murakami G, Meng H, Edamura M, Furukawa T, Fukuda A, Iwashita T, Ishida Y and Nakahara D “Involvement of Immune Protein MHC class I in The Development of Cocaine Self-Administration” 第37回日本神経科学会 ショートトーク、ポスター発表 横浜 2014年9月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0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 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

村上 元 (Murakami Gen)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号：70613727

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：