

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860357

研究課題名(和文) サイトカイン・ケモカインネットワークを軸とした新規薬物依存制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel drug dependent control mechanism focused on cytokine-chemokine network

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳内報酬系の神経炎症に基づく、薬物依存形成の分子メカニズム解明を目的とした。メタンフェタミン全身投与後に前頭前皮質で炎症性ケモカインCCL7、CCL2発現増加を認めた。薬理的行動実験により、これらのケモカインの共通の受容体を阻害するとメタンフェタミンによる依存形成が緩和された。また、組織化学的解析により、ケモカイン受容体阻害薬は、メタンフェタミンによる腹側被蓋野(報酬回路の基盤)のドパミン神経の賦活化を抑制した。結論として、脳内報酬系におけるケモカインシグナルは薬物依存形成において重要な役割を果たし、新規の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of drug dependence based on neuroinflammation in the brain reward system. We found that inflammatory chemokines (CCL7 and CCL2) were markedly upregulated in the prefrontal cortex after methamphetamine administration. Using pharmacological behavioral experiments, methamphetamine-induced addiction was attenuated by the antagonists of CCR2, a receptor that binds both CCL7 and CCL2. Furthermore, by histochemical analysis, chemokine receptor antagonist suppressed the activation of dopamine neurons by methamphetamine in the ventral tegmental area (the basis of the reward circuit). In conclusion, we demonstrate that the enhancement of brain reward system via chemokine signaling plays a crucial role in drug dependence on methamphetamine, and novel treatments targeting this machinery may be effective for drug addiction.

研究分野：薬理学、薬物依存、疼痛学

キーワード：methamphetamine chemokine place preference dopamine receptor prefrontal cortex ventral tegmental area

1. 研究開始当初の背景

麻薬、覚せい剤は中脳辺縁系ドパミン神経を介して強い報酬効果をもたらす。薬物依存を形成することが知られている。薬物依存に見られる薬物への強い渴望は、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」を難治化させる要因である。我が国における薬物事犯の多くはメタンフェタミンによるものであり、それに基づく経済的・社会的損失は計り知れない。

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)の役割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的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新たな視点に基づく斬新なアプローチが必要である。

2. 研究の目的

炎症性細胞由来のサイトカイン、ケモカインネットワークを介する神経炎症は多くの慢性疾患に関与している。近年、薬物依存は神経炎症の一つと位置付けられるようになったことより、乱用薬物による依存形成メカニズムの分子基盤としてサイトカイン、ケモカインを含む炎症性メディエーターに着目し、(1)依存性薬物による中枢神経炎症の誘導とその中枢神経炎症の誘導における分子基盤、(2) 依存形成に及ぼす炎症関連因子の影響について検討を行った。

本研究では、未だに有効な治療薬が開発されていないアルコール等の多くの乱用薬物に対する依存形成の分子基盤解明および新規創薬シーズの発掘に繋がるものであり、極めて高い学術的・社会的波及効果をもたらすことが考えられた。

3. 研究の方法

(1) 依存性薬物投与により誘発される神経炎症について、生化学的解析により評価を行う。

リアルタイム PCR: マウス脳内報酬回路関連脳部位(腹側被蓋野、前頭前皮質、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。

マイクロアレイ: メタンフェタミンまたは生理食塩水(コントロール)処置後の前頭前皮質より総 RNA を抽出した。cDNA を作製し、蛍光標識を行った cDNA を GeneSpring GX software (Agilent Technologies)を用いて解析し、生理食塩水群に対するメタンフェタミンでの発現変化率が上昇しているケモカイン遺伝子を示した。

(2) ケモカインなどの産生細胞やそれが作用する受容体の局在および腹側被蓋野のドパミン神経に及ぼすリコンビナントケモカインの影響などを組織化学的解析にて検討した。

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。各々の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。ドパミン神経賦活化は、リン酸化チロシンヒドロキシラーゼの発現量で評価した。

(3) ケモカインの機能阻害薬を用い、メタンフェタミン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条件付け場所嗜好性試験(Conditioned Place Preference; CPP 試験)に従って行動学的な評価を行った。

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メタンフェタミンによる条件付けを行い、その場所嗜好性(CPP スコア)の変化に対する拮抗薬の影響について評価した。

4. 研究成果

(1) メタンフェタミン投与後の脳におけるケモカイン発現増加: メタンフェタミン反復投与後の前頭前皮質をマイクロアレイにより網羅的に評価した。特に、CC-chemokine ligand 7 (CCL7)と CCL2 が顕著に発現増加しており(図1)、リアルタイム PCR によってもこれらの mRNA 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。

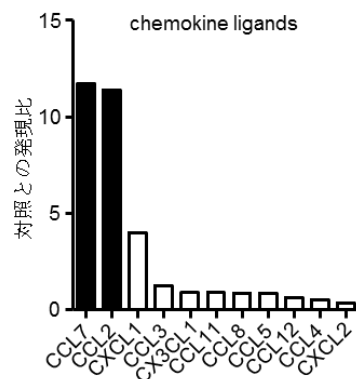


図1: メタンフェタミンによるケモカイン発現増加

(2) ドパミン神経賦活化におけるケモカインの関与: リコンビナント CCL7 を脳室内投与後の腹側被蓋野におけるリン酸化チロシンヒドロキシラーゼ(TH)発現を免疫蛍光染色法に従って評価した。結果として、ケモカインにより腹側被蓋野におけるリン酸化 TH

発現増加、すなわちドパミン神経の賦活化が認められた(図2)。また、リコンビナントCCL2を投与した際にも、同様の結果が得られた。

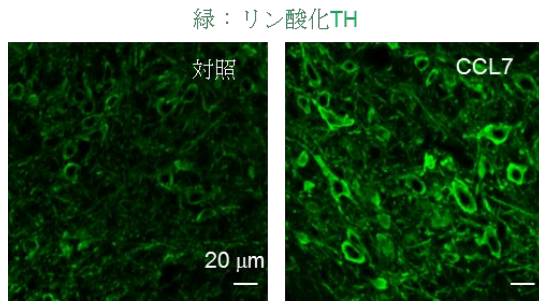


図2: ケモカインによるドパミン神経賦活化

(3)メタンフェタミンによるドパミン神経賦活化に及ぼすケモカイン受容体拮抗薬の影響:メタンフェタミンを反復全身投与すると、生理食塩水投与群に比べ、リン酸化THの発現増加が認められた(データ示さず)。この発現増加は、ケモカイン受容体拮抗薬を前処置することにより抑制された(図3)。

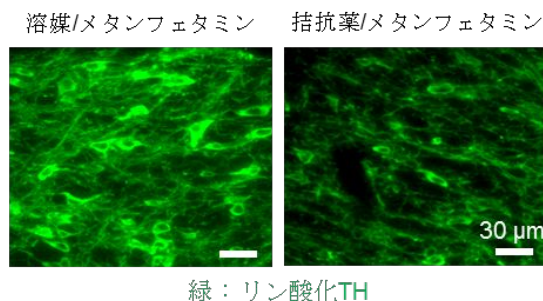


図3: ケモカイン拮抗薬によるドパミン神経賦活化の抑制

(4)メタンフェタミン精神的依存形成に及ぼすケモカイン受容体拮抗薬の影響:2種類のケモカイン受容体拮抗薬の前処置はどちらも、メタンフェタミンにより誘発されるCPPスコアの増加を有意に抑制した。すなわち、ケモカイン受容体を介したシグナルがメタンフェタミン依存形成に重要であることが示唆された(図4)。

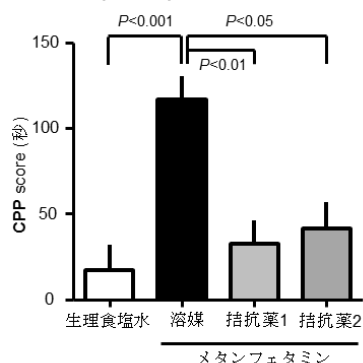


図4: ケモカイン拮抗薬によるメタンフェタミン依存形成抑制

(5)メタンフェタミン精神的依存形成に及ぼすクルクミンの影響:生薬成分ウコンの主成分であるクルクミンの併用投与は、メタンフェタミン反復投与による前頭前皮質のケモカイン mRNA 発現増加を抑制した(データ示さず)。また、クルクミンは、メタンフェタミンによる CPP スコアの増加を有意に抑制した(図5)。

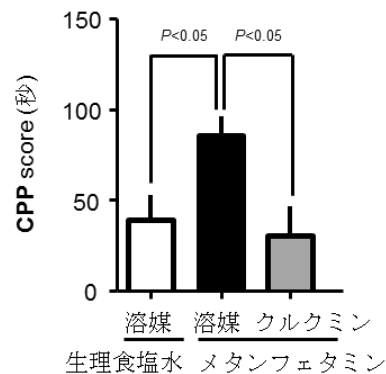


図5: クルクミンによるメタンフェタミン依存形成抑制

(6)まとめ:メタンフェタミン投与により前頭前皮質の神経細胞においてケモカインの発現が増加し、また腹側被蓋野においてはドパミン生合成の亢進を示すリン酸化チロシンヒドロキシラーゼ(TH)の発現増加を認めた。リコンビナントケモカインの脳室内投与によっても腹側被蓋野においてリン酸化THが増加した。またメタンフェタミンによるリン酸化TH発現増加はCCケモカイン拮抗薬の前処置により抑制されたことから、メタンフェタミンにより発現増加したケモカインはその受容体を介して脳内報酬系を活性化すると考えられた。CPP試験において、メタンフェタミンによる場所嗜好性の増加が、ケモカイン受容体拮抗薬の併用により抑制されることから、このケモカインを介する経路がメタンフェタミン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。以上の結果より、CCL7およびCCL2を介するケモカインシグナルが依存形成の分子基盤であることを明らかにした。

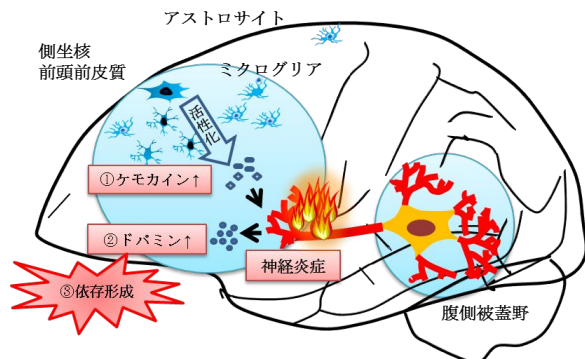


図6: ケモカインシグナルに基づく薬物基盤の分子基盤

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5件)

Saika F, Kiguchi N, Kishioka S: The role of CC-chemokine ligand 2 in the development of psychic dependence on methamphetamine. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi. 2015 Oct;50(5):189-95. 査読有.

Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Ko MC, Kishioka S. TC-2559, an $\alpha\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor agonist, suppresses the expression of CCL3 and IL-1 β through STAT3 inhibition in cultured murine macrophages. J Pharmacol Sci. 2015 Jun;128(2):83-6. 査読有. doi: 10.1016/j.jphs.2015.04.009.

Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Peripheral $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor signalling attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia after nerve injury in mice. Acta Physiol. 2015 Feb;213(2):462-71. 査読有. doi: 10.1111/apha.12437.

Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Kishioka S. Epigenetic regulation of CC-chemokine ligand 2 in nonresolving inflammation. Biomol Concepts. 2014 Aug;5(4):265-73. 査読有. doi: 10.1515/bmc-2014-0022.

Wakida N, Kiguchi N, Saika F, Nishiue H, Kobayashi Y, Kishioka S. CC-chemokine ligand 2 facilitates conditioned place preference to methamphetamine through the activation of dopamine systems. J Pharmacol Sci. 2014;125(1):68-73. 査読有. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/125/1/125_14032FP/_pdf

[学会発表](計8件)

木口倫一、他: CC-chemokines facilitate methamphetamine dependence through the activation of dopamine system in mice. 17th Pacific Rim College of Psychiatrists scientific Meeting (招待講演). 2016年11月3~5日. Kaohsiung (Taiwan).

雑賀史浩、他: クルクミンはCCL2発現抑制を介してメタンフェタミン精神依存を減弱させる. 第51回日本アルコール・アディクション医学会総会. 2016年10月7~8日. タワーホール船堀(東京).

雑賀史浩、他: メタンフェタミン精神依存形成における中脳辺縁系炎症性ケモカインの関与. 第46回日本神経精神薬理学会年会. 2016年7月2~3日. ソウル(韓国).

岸岡史郎、他: Participation of CC-Chemokine Ligands (CCL2 and CCL7) in reward system on methamphetamine-induced psychological dependence in mice. 78th Annual Meeting-College on Problems of drug Dependence. 2016年6月11~16日. California (United States).

雑賀史浩、他: ドパミンD1受容体を介したCC-ケモカイン発現増加はメタンフェタミン精神的依存形成に関与する. 第127回日本薬理学会近畿部会. 2015年6月26日. 長良川国際会議場(岐阜).

雑賀史浩、他: CC-ケモカインはメタンフェタミン精神的依存形成に関与する. 第126回日本薬理学会近畿部会. 2014年10月24日. 和歌山県JAビル(和歌山).

木口倫一、他: 炎症性ケモカインによるメタンフェタミン依存調節機構. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 2014年10月3~4日. パシフィコ横浜会議センター(神奈川).

雑賀史浩、他: メタンフェタミン精神的依存におけるCC-ケモカインの役割. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 2014年10月3~4日. パシフィコ横浜会議センター(神奈川).

[その他]

和歌山県立医科大学医学部薬理学ホームページ
<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160416/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

雑賀史浩 (Saika Fumihiko)

和歌山県立医科大学医学部・助教

研究者番号: 10644099

(4)研究協力者

和木田直希 (Wakida Naoki)

今居一輝 (Imai Kazuki)