

学位論文（博士）

特異的神経活動の遺伝的操作による疼痛および全身性免疫制御における側坐核内 dopamine 受容体含有神経の機能解析

2022 年 3 月

星薬科大学大学院 薬学研究科  
薬学専攻  
薬理学

佐藤 大介

## 【論文目録】

本論文は、学術雑誌に掲載された以下の論文を基礎とするものである。

### 学術論文

1.: Daisuke Sato, Michiko Narita, Yusuke Hamada, Tomohisa Mori, Kenichi Tanaka, Hideki Tamura, Akihiro Yamanaka, Ryosuke Matsui, Dai Watanabe, Yukari Suda, Emiko Senba, Moe Watanabe, Edita Navratilova, Frank Porreca, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita. Relief of neuropathic pain by cell-specific manipulation of nucleus accumbens dopamine D1- and D2-receptor-expressing neurons. *Mol Brain* 15:10. doi: 10.1186/s13041-021-00896-2 (2022): 第 1 章

2.: Daisuke Sato, Yusuke Hamada, Michiko Narita, Tomohisa Mori, Hiroyuki Tezuka, Yukari Suda, Kenichi Tanaka, Sara Yoshida, Hideki Tamura, Akihiro Yamanaka, Emiko Senba, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita. Tumor suppression and improvement in immune systems by specific activation of dopamine D1-receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens. *Mol Brain* (2022) in press: 第 2 章

## 【略語リスト】

AAV: Adeno-associated virus

ANOVA: Analysis of variance

ArchT: Archaelhodopsin T

ChAT: Choline acetyltransferase

ChR2: Channelrhodopsin-2

CNO: Clozapine *N*-oxide

CUBIC: Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis

D1-MSNs: Dopamine D1 receptor-expressing medium spiny neurons

D2-MSNs: Dopamine D2 receptor-expressing medium spiny neurons

DREADD: Designer receptors exclusively activated by designer drugs

GABA: Gamma-amino butyric acid

GFP: Green fluorescent protein

hM3Dq: Human muscarinic receptor 3 DREADD subtype

hM4Di: Human muscarinic receptor 4 DREADD subtype

KC: keratinocyte-derived chemokines

LAG-3: Lymphocyte-activation gene 3

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1

MIG: monokine induced by gamma interferon

MIP-2: macrophage inflammatory protein-2

MSNs: Medium spiny neurons

NAc: Nucleus accumbens

PD-1: Programmed cell death protein 1

QOL: Quality of life

TIM-3: T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3

VTA: Ventral tegmental area

## 【序論】

### 痛みと情動

痛みとは、「実際の組織損傷もしくは組織損傷が起こりうる状態に付随する、あるいはそれに似た、感覚かつ情動の不快な体験」として国際疼痛学会により定義されている<sup>1</sup>。このように「痛み」は感覚的ならびに情動的成分からなる複雑な体験であるとされており、生物学的、心理的あるいは社会的要因の影響を受ける。疼痛状態下では、不安やストレスが生じることで情動機能の低下を引き起こす<sup>2-4</sup>。この情動機能の低下は痛みに対してだけではなく、腫瘍の増悪化ならびに免疫機構にも影響を及ぼし、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させることが臨床上問題となっている。

### 中脳辺縁 dopamine 神経系

中脳辺縁 dopamine 神経は、腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) から側坐核 (nucleus accumbens: NAc) に投射しており、この dopamine 神経は、社交性、意思決定、学習記憶および快情動の発現において重要な役割を果たすことが明らかになっている<sup>5-11</sup>。また、最近では、中脳辺縁 dopamine 神経の活性化により細菌感染に対する殺菌作用などの免疫機能が向上することが報告されている<sup>12</sup>。さらに、先行研究では、疼痛状態下において、中脳辺縁 dopamine 神経の神経活動は低下しており、中脳辺縁 dopamine 神経活動を人為的に活性化することにより低下した疼痛閾値が有意に回復することも明らかになっている<sup>12-14</sup>。

## 側坐核 (nucleus accumbens: NAc)

側坐核は、腹側被蓋野 dopamine 神経の投射先の一つであり、報酬、動機付け行動などの情動機能を司る脳領域である<sup>15-17</sup>。さらに、近年の報告によると、疼痛状態下では、側坐核へ入力する興奮性の神経の活性化により、dopamine D2 受容体含有神経の神経活動が上昇していることが明らかになっている<sup>18,19</sup>。また、側坐核は解剖学的に shell 領域と core 領域に分類され、shell 領域では、報酬や嫌悪などの情動機能の制御に深く関与する一方、core 領域は報酬を得るための行動制御に関与することが報告されている<sup>20-24</sup>。

## 側坐核を構成する神経細胞集団

側坐核領域に存在する神経細胞の多くは、GABA 含有の中型有棘神経細胞であり、dopamine D1 受容体を有する dopamine D1-receptor-expressing medium spiny neurons (D1-MSNs) または dopamine D2 受容体を有する dopamine D2-receptor-expressing medium spiny neurons (D2-MSNs) が 90% 以上を占めている<sup>25-28</sup>。D1-MSNs は一般的に動機付けや運動機能を正に制御する機能を有しており、直接的に中脳領域へと投射する直接路 (direct pathway) を形成している<sup>29-31</sup>。一方、D2-MSNs は、鎮静作用や嫌悪効果の発現に関与しており、主に淡蒼球へと投射し、淡蒼球でシナプスを介して中脳領域へと投射する間接路 (indirect pathway) を形成している<sup>32,33</sup>。その他の側坐核の構成神経細胞として、GABA 含有介在神経や choline acetyltransferase (ChAT) 陽性介在神経が存在する<sup>25</sup>。ChAT 陽性介在神経は、側坐核に存在する D1-MSNs や D2-MSNs へと接続し、両者の神経活動を調整する機能を有している<sup>34,35</sup>。

## 脳と末梢免疫連関

「病は気から」という諺があるように、喜びや幸福感といったポジティブな感情を感じている状態は健康にとって良い影響を及ぼすことが知られている。心の持ちよう  
が、末梢神経系に大きな影響を与えるように、中枢神経系の機能が末梢の免疫機構に  
影響を与えていると考えられる。最近では、がんの発症リスクやがんの増悪化と中枢  
の神経活動との関連性についての研究が行われるようになり、特に、視床下部-下垂体  
-副腎の経路 (HPA axis) が慢性的なストレスやうつ状態において活性化されることで、  
全身の免疫機構を損ない、がんの発生や進行に寄与していると考えられるようになって  
きている<sup>36-41</sup>。

## 【目的】

本研究では、光遺伝学的手法ならびに薬理遺伝学的手法に従い、側坐核の中型有棘神経細胞を人為的に活動制御した際の疼痛および末梢免疫機構に対する影響について解明することを目的とし、以下の行動学的検討を行った。

### 第1章

側坐核に存在する dopamine 受容体含有神経の疼痛制御に対する影響について検討する目的で、光遺伝学的手法に従い、側坐核 dopamine D1 および dopamine D2 受容体含有神経の神経活動を特異的に制御した際の神経障害性疼痛に対する影響について行動学的解析を行った。

### 第2章

側坐核 dopamine 受容体含有神経の人為的活性制御による腫瘍肥大および末梢免疫機構に対する影響について検討する目的で、薬理遺伝学的手法を用い、人為的に側坐核 dopamine D1 および dopamine D2 受容体含有神経の神経活動を制御した際の抗腫瘍効果および末梢免疫に対する影響について解析を行った。



## 【倫理】

本研究を遂行するにあたり、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的として規定された星薬科大学動物実験規程に従い、大学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮して動物の使用数を最小限にしてすべての実験を行った。また、組換え DNA 実験については、星薬科大学組換え DNA 実験安全委員会で承認を得て行った。

## 第 1 章

側坐核 dopamine D1 および dopamine D2 受容体含有神経の特異的  
活性制御による神経障害性疼痛に与える影響

## 【緒言】

痛み刺激は脊髄を介して上行性に伝達され、知覚領において痛みを認識する<sup>42</sup>。痛みの伝達経路の中継核には、情動機能を司る扁桃体や帯状回が存在し、その領域に痛みシグナルが伝達されることにより、痛みと感情を結びつけて認識すると考えられる。また、中脳辺縁 dopamine 神経の起始核である腹側被蓋野は、痛みや報酬行動、動機付け行動などの幅広い機能を有している<sup>7,10,43-46</sup>。当研究室の先行研究より、疼痛状態下においては側坐核へと投射する腹側被蓋野 dopamine 神経の活性が低下していることが明らかになっている<sup>14</sup>。また、腹側被蓋野 dopamine 神経を光遺伝学的手法に従って、特異的に活性化することで神経障害性疼痛ならびにがん疼痛による疼痛閾値の低下を有意に回復させることも実証されている<sup>14</sup>。

一方、側坐核を構成する神経細胞は、90% 以上が中型有棘神経細胞 (MSNs) と呼ばれる GABA 含有神経細胞によって占められており、残りの神経細胞は GABA 含有の介在神経や choline acetyltransferase (ChAT) 陽性の介在神経が存在している<sup>25-28</sup>。また、側坐核には 3 種の亜核 (medial shell、lateral shell および core) が存在しており、それぞれの亜核で多様性を担っているとされ<sup>20-24</sup>、特に、側坐核 shell 領域に存在する D2-MSNs は疼痛状態下で神経活動が上昇していることが明らかになっている<sup>18,19</sup>。つまり疼痛状態下では、側坐核において dopamine 神経ネットワークが機能低下しているため、その環境を改善することが重要となる。

一方、側坐核 D1-MSNs と疼痛との関連については十分には検討がなされていないものの、麻薬性鎮痛薬であるモルヒネの鎮痛効果は、dopamine D1 受容体遮断薬により抑制されることから<sup>47</sup>、側坐核に存在する dopamine D1 および D2 受容体含有神経と疼痛との関連を解明することが、新たな治療方法の提供につながると考えられる。

そこで本研究では、人為的に神経活動を操作する手法である光遺伝学的手法に従い、側坐核に存在する dopamine 受容体含有神経の人為的活性制御が神経障害性疼痛に対して及ぼす影響について検討した。

## 【実験方法および実験材料】

### 実験動物

実験には C57BL/6J (東京実験動物(株)、東京) マウス、D1-cre (C57BL/6-*Drd1a*<*tm1(cre)*>*Phsh*) マウス (Cyagen Bioscience Inc., Santa Clara, CA, USA)、D2-cre (C57BL/6-*Drd2*<*tm1(cre)*>*Phsh*) マウス (Cyagen Bioscience Inc.)、D1-tdTomato (B6.Cg-*Tg(Drd1a-tdTomato)*6*Calak/J*) マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)、ChAT-cre (B6N.129S6(B6)-*Chat*<*tm2(cre)*>*Lowl/J*) マウス (Jackson Laboratory) および D2-cre マウスと LSL-tdTomato (B6.Cg-*Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)*Hze/J) マウス (The Jackson Laboratory) を交配し樹立した D2-tdTomato マウスを使用した。マウスは恒温恒湿 ( $24 \pm 1$  °C,  $55 \pm 5\%$ ) にて飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。なお、摂餌 (固形飼料 MF、オリエンタル酵母工業 (株)、東京) および飲水 (水道水) は自由摂取とした。

### 使用薬物

実験には、chloro-APB hydrobromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および quinpirole hydrobromide (Sigma-Aldrich) を使用した。両薬物ともに saline に溶解し、濃度を  $6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  に調整し、 $0.5 \mu\text{L}$  を側坐核の両側に microinjection した。

## 全脳透明化法 (CUBIC 法)

Isoflurane (3% 吸入; 富士フィルム和光純薬 (株)、大阪) による全身麻酔下、21G の注射針を用いて D1-tdTomato および D2-tdTomato マウスの左心室に 0.6% heparin (持田製薬 (株)、東京) を含む 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) を注入し、右心房に切り込みを入れて脱血させた。その後、4% paraformaldehyde (PFA; 富士フィルム和光純薬 (株)) を含む 0.1 M phosphate buffer (PB, pH7.4) により全身灌流固定を行った。全脳を摘出し、4% PFA を含む 0.1 M PB により後固定を 18-24 時間行った。その後、PBS で洗浄後 (>2 hr x 3)、2 倍希釈した CUBIC-L (東京化成工業(株)、東京) に浸し、8 時間以上振盪 (60 rpm, RT) し、翌日 (Day 2) より原液の CUBIC-L に置換し、振盪 (60 rpm, RT) した。Day 3、Day 4 ならびに Day 6 において、新しい CUBIC-Lに置換し、振盪 (60 rpm, Day 3-5: RT、Day6: 37°C) を行い、Day 7 に PBS にて洗浄を行った後、翌日 (Day 8) に、2 倍希釈した CUBIC-R<sup>+</sup> (東京化成工業(株)) 5 ml に浸し、振盪 (60 rpm, RT) した。Day 9 に、原液の CUBIC-R<sup>+</sup> に置換し、振盪 (60 rpm, RT) を行い、サンプルを作製した。画像取得は、UltraMicroscope II (Zoom body configuration) (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DEU) を用いて行い、3 次元イメージング画像の解析は、Imaris (Oxford Instruments, Abingdon, UK) により行った。

## 免疫組織科学的染色法

Isoflurane (3% 吸入; 富士フィルム和光純薬 (株)) による全身麻酔下、21G の注射針を用いて D1-tdTomato および D2-tdTomato マウスを 4% PFA (富士フィルム和光純薬 (株)) を含む 0.1 M PB (pH7.4) により全身灌流固定を行った。全脳を摘出し、

4% PFA を含む 0.1 M PB により後固定を行った後、20-30% スクロース (富士フィルム和光純薬) を用いて凍結保護を行った。脳切片を O.C.T. compound (Tissue Tek; Sakura Fine Technical, 東京) を用いて凍結させた。凍結させた切片はクライオスタット (Leica CM1510; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) にて厚さ 10-20  $\mu\text{m}$  に薄切し、poly-L-lysine コート化スライドガラスに貼付後、室温乾燥させた。脳切片を 0.2% Triton<sup>TM</sup>-100 (Sigma-Aldrich) および 3% 正常ウマ血清 (normal horse serum, NHS; Vector Laboratories, Inc., CA, USA) を含む 0.01 M PBS を用いて 1 時間ブロッキングした後、100 倍希釈した抗 ChAT 抗体 (goat polyclonal; Millipore, MA, USA) を滴下し、4 $^{\circ}\text{C}$  で 48 時間インキュベートした。その後、0.01 M PBS で洗浄し、0.2% triton および 3% NHS で 400 倍希釈した Alexa<sup>®</sup> 488 標識抗ロバ IgG ヤギ抗体 (Thermo Fischer Scientific) を数滴加え、室温で遮光しながら 2 時間インキュベートした。作製したサンプルは、蛍光封入剤 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて封入した。また、画像の取得は、正立型蛍光顕微鏡 (BX-53; Olympus, 東京) を用いて、蛍光下、高感度デジタル CCD カメラ (MD-695; Molecular Devices, San Jose, CA, USA) により行った。画像解析は、Metamorph (Molecular Devices) を使用した。

### 光遺伝学的手法に従った人為的神経細胞活性制御

Cre 組み換え酵素依存的に光感受性受容体である channelrhodopsin-2 (ChR2) あるいは archaerhodopsin T (ArchT) の発現が誘導されるように設計されたコンストラクトを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV5-FLEX-ChR2-mCherry、AAV5-FLEX-ArchT-GFP) を isoflurane (3% 吸入; 富士フィルム和光純薬 (株)) 麻酔下、脳定位固定装置 (RWD Life Science, San Diego, CA, USA) に固定した D1-cre マウスおよ

び D2-cre マウスの側坐核 core 領域 (AP: +1.4 mm, ML:  $\pm$ 1.5 mm, DV: -3.6 mm, angle 10°) にマイクロシリンジポンプを用いて注入 (0.25  $\mu$ L/min, 1  $\mu$ L) した。また、側坐核 lateral shell (AP: +1.0 mm, ML:  $\pm$ 1.8 mm, DV: -4.9 mm, angle 0°)、medial shell 領域 (AP: +1.5 mm, ML:  $\pm$ 0.5 mm, DV: -4.7 mm, angle 0°) および core 領域 (AP: +1.4 mm, ML:  $\pm$ 0.9 mm, DV: -4.0 mm, angle 0°) に Nanoject III (Drummond Scientific) を用いて注入 (1 nL/sec, 300 nL) した。その後、ガイドカニューレ (ファイバーカニューレ II; Eicom (株)、京都) をマウスの側坐核 core 領域 (AP: +1.4 mm, ML:  $\pm$ 1.5 mm, DV: -3.1 mm, angle 10°)、lateral shell 領域 (AP: +1.0 mm, ML:  $\pm$ 1.8 mm, DV: -4.4 mm, angle 0°)、medial shell 領域 (AP: +1.5 mm, ML:  $\pm$ 1.4 mm, DV: -4.2 mm, angle 10°) および VTA 領域 (AP: -3.1 mm, ML:  $\pm$ 1.3 mm, DV: -4.2 mm, angle 10°) を挿入した後、光刺激用レーザー (Lucir (株)) に接続した。ChR2 に対する光刺激は、青色光 (473 nm, 30 Hz, 5 msec, 8 pulses every 5 sec) を 30 分間照射した。ArchT に対する光刺激は 589 nm の黄色光を 30 分間照射した。また、薬物投与のための peek カニューレ (EIM-54; Eicom) をマウスの側坐核 lateral shell 領域 (AP: +1.0 mm, ML:  $\pm$ 1.8 mm, DV: -4.9 mm, angle 0°)、medial shell 領域 (AP: +1.5 mm, ML:  $\pm$ 1.4 mm, DV: -4.7 mm, angle 10°) に留置した。

### 電気生理学的手法

側坐核を含む冠状脳切片 (250 $\mu$ m) をビブラトーム (VT-1200 S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) を用いて作製し、氷冷切断液には 222.1 mM sucrose, 2.5mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 7 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub> および 0.5 mM アスコルビン酸を含む溶液を使用した。脳切片は、128 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM グルコースを含む酸素添加人工脳



脊髄液中で室温にて少なくとも 1 時間回復させた。側坐核に存在する神経細胞の蛍光は、40x 水浸対物レンズと sCMOS カメラ (Zyla 5.5 sCMOS; Andor Technology, Belfast UK) を用いた正立蛍光顕微鏡 (ECLIPSE FN1; Nikon, Tokyo, Japan) により検出した。ChR2-mCherry および ArchT-GFP をそれぞれ発現する D1- および D2- 受容体含有神経細胞から、Multiclamp 700B Amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて whole-cell patch-clamp recording を行った。記録電極は、120 mM グルコン酸カリウム、10 mM KCl、10mM HEPES、10 mM ホスホクレアチン-Na<sub>2</sub>、4 mM Mg<sub>2</sub>ATP、0.3 mM Na<sub>3</sub>GTP、0.2 mM EGTA (pH7.3) および Biocytin (0.2%) の溶液を満たしたホウケイ酸ガラスピペット (4-6M $\Omega$ ) を用いた。データは pCLAMP 10 software (Molecular Devices) で保存した。ChR2 および ArchT は、顕微鏡の光学ポートから照射される 450-495 nm および 540-600 nm の光 (XLED1; Excelitas Technologies, Waltham, MA, USA) でそれぞれ励起した。記録後、冠状脳切片を 4% PFA で 4 °C 固定し、24 時間後にストレプトアビジン結合 Alexa Fluor-350 (1:2,000; S11249, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) でインキュベートして記録細胞の同定を行った。

### 神経障害性疼痛モデルの作製

Isoflurane (3%、吸入; 富士フィルム和光純薬) による麻酔下、Seltzer らの方法を応用し、8-0 の絹糸 ((株) 夏目製作所、東京) を用いてマウス右後肢の坐骨神経を半周だけ強固に結紮することにより作製した<sup>48</sup>。

## 熱刺激に対する痛覚過敏反応の測定

熱刺激に対する痛覚過敏反応は、正常動物において後肢を跳ね除けるまでの反応潜在時間が約 9-11 秒になるように熱刺激を調節した足底熱刺激装置 (UGO-BASILE Biological research apparatus, VA, Italy) を用いて測定した。なお、測定は坐骨神経結紮前および結紮 7 日目に行い、体重移動などによる後肢の動きは評価しなかった。薬物投与による鎮痛効果の測定は、神経障害性疼痛モデル作製後、10 日目 (Chloro-APB)、11 日目 (quinpirole) に行った。薬物投与前に疼痛閾値が pre 値に戻っていることを確認した後、測定を行った。

## 統計解析

統計学的有意差検定は、繰り返しのある 2 群間の比較においては、二元配置分散分析後に、Bonferroni post-hoc test に従い、解析を行った。すべての統計解析は、Prism version 8.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) を用いて解析を行った。

## 【結果】

### 側坐核における dopamine D1/D2 受容体陽性神経細胞の発現分布解析

側坐核における dopamine D1/D2 受容体陽性神経細胞の発現分布を確認する目的で、遺伝子改変動物を用いて画像解析を行った。はじめに、dopamine D1/D2 受容体陽性細胞特異的に蛍光タンパク質である tdTomato が発現する遺伝子改変動物である D1-tdTomato および D2-tdTomato マウスの側坐核領域における dopamine D1/D2 受容体陽性細胞の発現分布を確認した。その結果、側坐核の lateral shell、medial shell および core 領域において dopamine D1/D2 受容体陽性細胞の高密度な分布が認められた (Figure 1a)。

### Dopamine 受容体刺激薬を側坐核に局所投与した際の神経障害性疼痛に対する影響

続いて、dopamine D1 受容体選択的刺激薬および D2 受容体選択的刺激薬を側坐核に局所投与した際の神経障害性疼痛に対する影響について検討を行った。Dopamine D1 受容体選択的刺激薬である chloro-APB を側坐核 lateral shell および medial shell に微量注入したところ、両領域において神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値の有意な回復が認められた (Figure 1b-i, ii,  $^{SSS}p < 0.001$  vs. saline ligation ipsilateral paw)。また、dopamine D2 受容体選択的刺激薬である quinpirole についても同様の検討を行ったところ、lateral shell および medial shell 両領域において、有意な疼痛閾値の回復が認められた (Figure 1c-i, ii,  $^{SS}p < 0.01$ ,  $^{SSS}p < 0.001$  vs. saline ligation ipsilateral paw)。

## 光遺伝学的手法を用いた dopamine D1 受容体含有神経の特異的活性化による神経障害性疼痛に対する影響

次に、dopamine D1 受容体遺伝子プロモーターの下流に cre 酵素が発現するよう作製された D1-cre マウスの側坐核領域に AAV-FLEX-ChR2-mCherry のコンストラクトを有するアデノ随伴ウイルスベクターを medial shell, lateral shell および core 領域へと微量注入した (Figure 2a, b)。ChR2 が機能していることを確認する目的で、青色光を照射した際の活動電位の測定を電気生理学的手法に従って検討した結果、青色光の照射により神経活動の上昇が認められた (Figure 2c)。これらの領域に存在する dopamine D1 受容体含有神経の特異的な活性化が神経障害性疼痛に及ぼす影響について検討した。その結果、側坐核 medial shell, lateral shell および core 領域に存在する dopamine D1 受容体含有神経の特異的な活性化によって、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値を有意に回復することが明らかとなった (Figure 2d-f,  $^{***}p < 0.001$  vs. Wild-type/ChR2 ligation ipsilateral paw)。

## 光遺伝学的手法を用いた dopamine D2 受容体含有神経の特異的抑制による神経障害性疼痛に対する影響

Dopamine D2 受容体遺伝子プロモーターの下流に cre 酵素が発現するよう作製された D2-cre マウスの側坐核領域に AAV-FLEX-ArchT-GFP のコンストラクトを有するアデノ随伴ウイルスベクターを medial shell, lateral shell および core 領域に微量注入した (Figure 3a, b)。ArchT が機能していることを確認する目的で、黄色光を照射した際の活動電位の測定を電気生理学的手法に従って検討した結果、黄色光の照射により神経活動の抑制が認められた (Figure 3c)。側坐核のそれぞれの亜核に存在する

dopamine D2 受容体含有神経の特異的な抑制制御が神経障害性疼痛に及ぼす影響について検討した。その結果、側坐核 medial shell、lateral shell および core それぞれの領域に存在する dopamine D2 受容体含有神経の特異的な抑制によって、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値を有意に回復することが明らかとなった (Figure 3d-f,  $^{***}p < 0.001$  vs. Wild-type/ArchT ligation ipsilateral paw)。

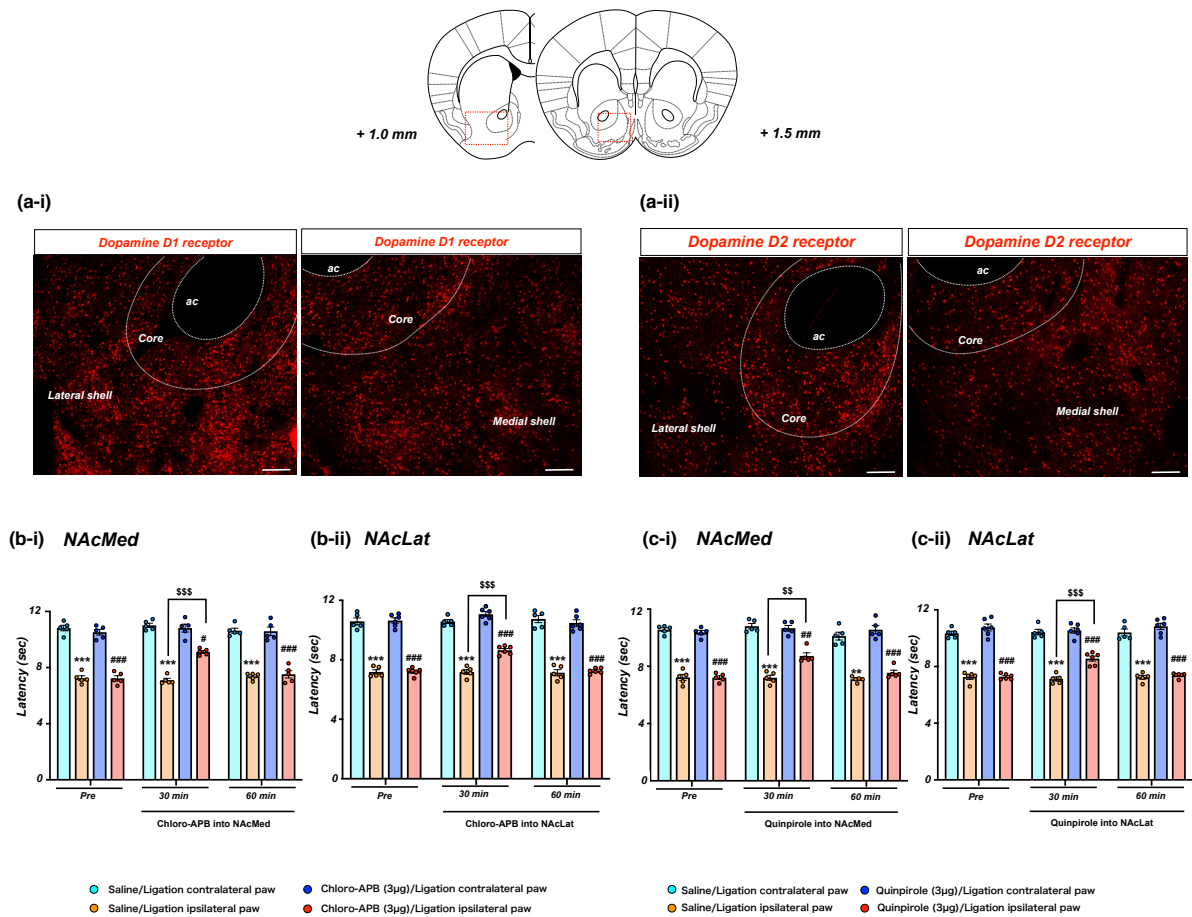
### 腹側被蓋野へと投射する側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の特異的活性化による神経障害性疼痛への影響

D1-tdTomato マウスおよび D2-tdTomato マウスを用いて、Clear, Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails and Computational analysis (CUBIC) 法に従い、dopamine D1/D2 受容体陽性細胞の脳内分布について解析したところ、側坐核ならびに線条体領域に高密度に存在していることが明らかになった (Figure 4a-i, iii)。さらに、側坐核に存在する dopamine D1 受容体陽性神経細胞は中脳領域へと投射する一方 (Figure 4a-ii)、dopamine D2 受容体陽性神経細胞は中脳領域への投射は認められなかった (Figure 4a-iv)。以上の結果より、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経は腹側被蓋野領域へと投射しており、この神経ネットワークが側坐核-腹側被蓋野-側坐核といった神経回路を正に制御し、疼痛制御に関与している可能性が考えられる。そこで、腹側被蓋野へと投射する側坐核 dopamine D1 受容体含有神経のみを特異的に活性化した際の神経障害性疼痛に及ぼす影響について検討を行った。まず、側坐核 core 領域に AAV-Flex-ChR2-mCherry を持つアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、D1-cre/ChR2 マウスを作製した (Figure 4b)。このマウスの腹側被蓋野領域を光刺激することで、側坐核から投射を受ける dopamine D1 受容体含有神経を特異的に活性化したところ、神経

障害性疼痛による疼痛閾値の低下は有意に回復した (Figure 4c,  $^{***}p < 0.001$  vs. Wild-type/ChR2 ligation ipsilateral paw)。

### 側坐核 ChAT 陽性介在神経の特異的活性制御が疼痛閾値に及ぼす影響

側坐核に存在する ChAT 陽性介在神経の分布について免疫組織化学的染色法に従い、検討を行ったところ、ChAT 陽性神経細胞は側坐核の medial shell 領域を中心に分布していることが明らかとなった (Figure 4d)。ChAT 陽性介在神経は D1-MSNs や D2-MSNs へと接続していることが報告されているため、D1-tdTomato マウスと D2-tdTomato マウスを用いて、ChAT 陽性介在神経と dopamine D1 受容体または dopamine D2 受容体陽性細胞の分布を免疫組織化学的染色法に従い、確認した。その結果、ChAT 陽性介在神経の周囲に dopamine D1 および D2 受容体含有神経が存在していることが確認された (Figure 4e, f)。続いて、側坐核に存在する ChAT 陽性介在神経の活性制御により、神経障害性疼痛に影響を及ぼすか否かについて検討する目的で、ChAT-cre マウスの側坐核 medial shell 領域に AAV-Flex-ArchT-GFP のコンストラクトを持つアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入することで、ChAT-cre/ArchT マウスを作製した (Figure 4g)。このマウスの medial shell 領域に光照射をすることで、側坐核に存在する ChAT 陽性介在神経を抑制した際の神経障害性疼痛に対する疼痛閾値の測定を行った。その結果、ChAT 陽性介在神経の特異的な活性制御により、神経障害性疼痛による疼痛閾値の低下を有意に回復させることが明らかとなった (Figure 4h,  $^{***}p < 0.001$  vs. Wild-type/ArchT ligation ipsilateral paw)。

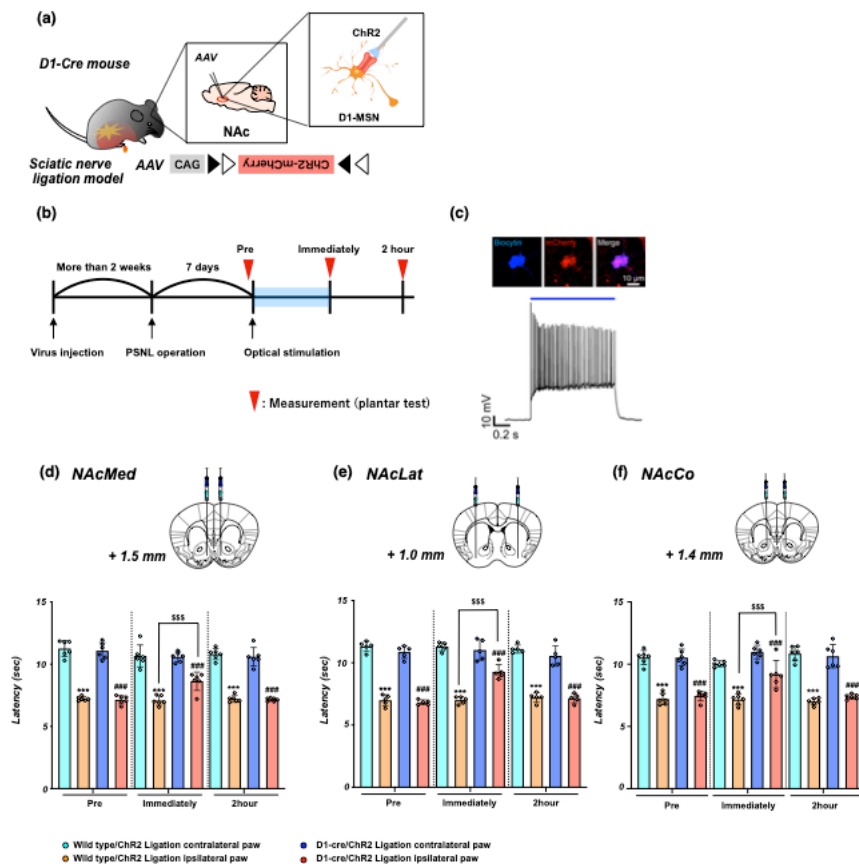


**Figure 1**

**Brain mapping of dopamine D1 and D2 receptor-positive neurons**

(a) The distribution of D1 receptor-expressing (a-i) and D2 receptor-expressing (a-ii) neurons in the NAcLat and NAcMed. Scale bars = 100  $\mu$ m. (b) Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by administration of the selective dopamine D1 receptor agonist Chloro-APB into the NAcMed (b-i) and NAcLat (b-ii). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 animals. \*\*\* $p$  < 0.001 vs. saline ligation contralateral paw; # $p$  < 0.05, ### $p$  < 0.001 vs. Chloro-APB ligation contralateral paw; \$\$\$ $p$  < 0.001 vs. saline ligation ipsilateral paw. (c) Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by the administration of the selective dopamine D2 receptor agonist quinpirole into the NAcMed (c-i) and NAcLat (c-ii). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 animals. \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 vs. saline ligation contralateral paw; # $p$  < 0.01, ### $p$  < 0.001 vs. quinpirole ligation contralateral paw; \$\$ $p$  < 0.01, \$\$\$ $p$  < 0.001 vs. saline ligation ipsilateral paw.

*Mol Brain* 15:10. (2022) より転載



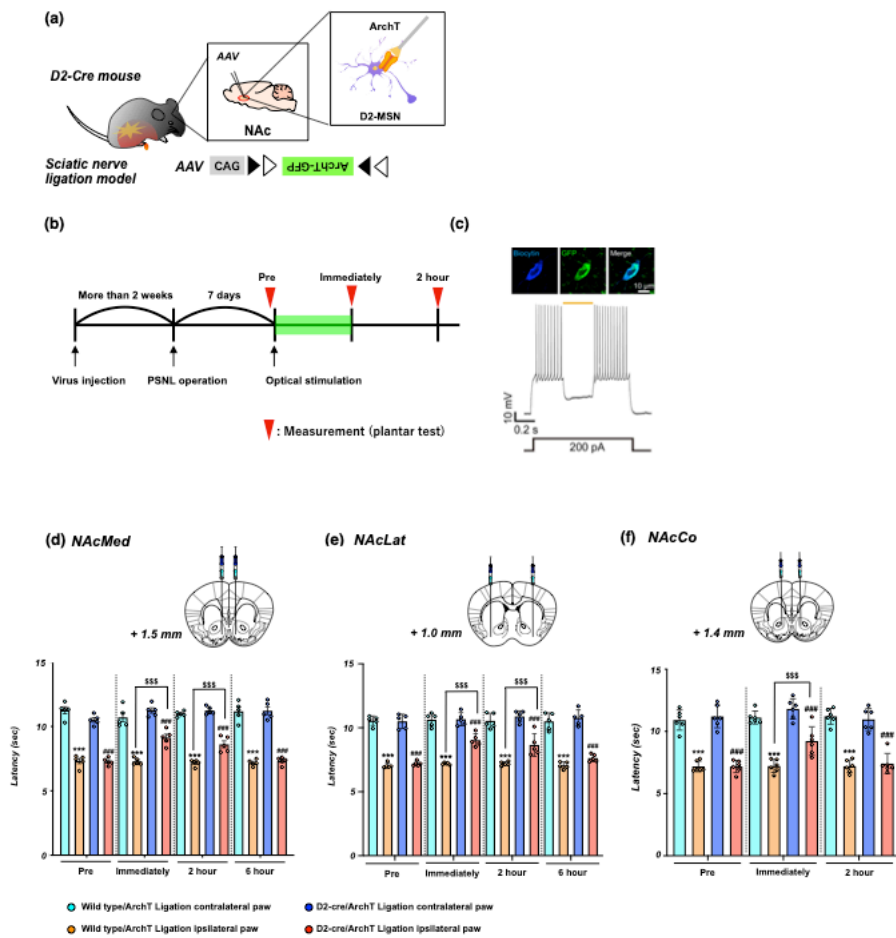
**Figure 2**

**Effect of optical stimulation of D1-receptor-expressing neurons in the NAc on neuropathic pain**

(a) Schematic showing that AAV-Flex-ChR2-mCherry was microinjected into the NAc of D1-cre mice. (b) Experimental timeline. (c) Biocytin-stained ChR2-mCherry-expressing neurons in a D1-cre mouse (upper) and representative current-clamp trace from a nucleus accumbens neuron expressing ChR2 showing action potentials in response to photoactivation (blue line) (lower). (d-f) Effects of optical stimulation of D1-receptor-expressing neurons in the NAcMed, NAcLat and NAcCo in mice. Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by optical stimulation of the NAcMed (d), NAcLat (e) and NAcCo (f) in Wild-type/ChR2 and D1-cre/ChR2 mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 animals. \*\*\*p < 0.001 vs. Wild-type/ChR2 ligation contralateral paw; ###p < 0.001 vs. D1-cre/ChR2 ligation contralateral paw; sssp < 0.001 vs. Wild-type/ChR2 ligation ipsilateral paw.

*Mol Brain* 15:10. (2022) より転載



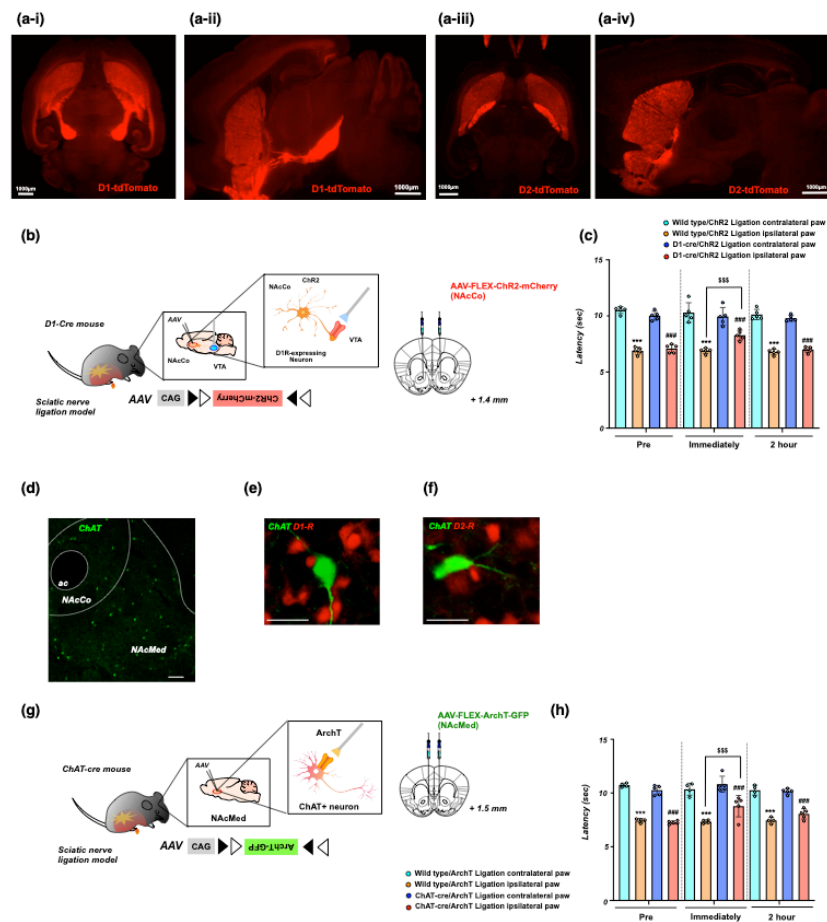


**Figure 3**

**Effect of optical suppression of D2-receptor-expressing neurons in the NAc on neuropathic pain**

(a) Schematic showing that AAV-Flex-ArchT-GFP was microinjected into the NAc of D2-cre mice. (b) Experimental timeline. (c) Examples of biocytin-stained ArchT-GFP-expressing neurons in a D2-cre mouse (upper) and representative current-clamp trace from a NAc neuron expressing ArchT showing reliable suppression of the firing of neurons during photostimulation (orange line) (lower). (d-f) Effects of optical suppression of D2-receptor-expressing neurons in the NAcMed, NAcLat and NAcCo in mice. Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by optical stimulation of the NAcMed (d), NAcLat (e) and NAcCo (f) in Wild-type/ArchT and D2-cre/ArchT mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5-6 animals. \*\*\* $p < 0.001$  vs. Wild-type/ArchT ligation contralateral paw; ### $p < 0.001$  vs. D2-cre/ArchT ligation contralateral paw; \$\$\$ $p < 0.001$  vs. Wild-type/ArchT ligation ipsilateral paw.

*Mol Brain* 15:10. (2022) より転載



**Figure 4**

**Effect of optical stimulation of D1-receptor-expressing neurons in the NAc projecting to the VTA and optical inhibition of cholinergic neurons in the NAc on neuropathic pain**

(a) Whole-brain imaging of D1 and D2 receptor-positive neurons in D1-tdTomato and D2-tdTomato mice, respectively. Fluorescent histochemical observation of D1 receptor-expressing neurons (a-i, ii) or D2 receptor-expressing neurons (a-iii, iv) using CUBIC. Images were acquired from horizontal (a-i, a-iii) and sagittal (a-ii, a-iv) sections. (b) Schematic showing that AAV-Flex-ChR2-mCherry was microinjected into the NAcCo of D1-cre mice. Scale bar = 1000  $\mu$ m. (c) Effects of optical stimulation of D1-receptor-expressing neurons projecting to the VTA. Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by optical stimulation of the VTA in Wild-type/ChR2 and D1-cre/ChR2 mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 animals. \*\*\*p < 0.001 vs. Wild-type/ChR2 ligation contralateral paw; ###p < 0.001 vs. D1-cre/ChR2 ligation contralateral paw; SSSp < 0.001 vs. Wild-type/ChR2 ligation ipsilateral paw. (d) Immunohistochemical staining images showing choline acetyltransferase (ChAT)-positive neuron in the NAc. Scale bar = 200  $\mu$ m. (e, f) The images showing ChAT (green) and dopamine D1 receptor (red) (e) or dopamine D2 receptor (red) (f). Scale bar = 25  $\mu$ m. (g) Schematic showing that AAV-Flex-ArchT-GFP was microinjected into the NAcMed of D1-cre mice. (h) Effects of the optical suppression of ChAT<sup>+</sup> neurons in the NAcMed. Latency in the response to thermal stimulation under a neuropathic pain-like state by optical suppression of ChAT<sup>+</sup> neurons in Wild-type/ArchT and ChAT-cre/ArchT mice. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-5 animals. \*\*\*p < 0.001 vs. Wild-type/ArchT ligation contralateral paw; ###p < 0.001 vs. ChAT-cre/ArchT ligation contralateral paw; SSSp < 0.001 vs. Wild-type/ArchT ligation ipsilateral paw.

## 【考察】

本研究では、光遺伝学的手法に従い、側坐核 dopamine 受容体含有神経の神経活性を人為的に制御した際の疼痛閾値に対する影響について検討を行った。まず、側坐核における dopamine D1 および D2 受容体陽性細胞の分布を dopamine D1 および D2 受容体陽性細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する D1-tdTomato マウスおよび D2-tdTomato マウスを用いて確認した。その結果、側坐核の亜核である medial shell、lateral shell ならびに core 領域において、dopamine D1 ならびに D2 受容体陽性細胞が高密度に分布していることを確認した。続いて、dopamine D1 および D2 受容体含有神経の人為的な活性制御が疼痛閾値に及ぼす影響について検討を行った。D1-cre または D2-cre マウスを用いて、cre-loxP system により、光感受性受容体である ChR2 または ArchT を cre 酵素依存的に発現するよう作製されたアデノ随伴ウイルスベクターを側坐核の 3 種の亜核へと微量注入することで、D1-cre/ChR2 および D2-cre/ArchT マウスを作製した。その後、dopamine D1 受容体含有神経を人為的に活性化したところ、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値は有意に回復した。また、dopamine D2 受容体含有神経の活性を抑制した際の神経障害性疼痛に及ぼす影響について検討したところ、有意な疼痛閾値の回復が認められた。これらの結果より、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の刺激作用と D2 受容体含有神経の抑制作用により、疼痛を制御することが明らかとなった。また、こうした制御機構が、病は気からといった情動による疼痛制御機構の一部に関与していることが推測される。

側坐核 dopamine D1 受容体含有神経は、直接路を形成する神経細胞であり、その活性化により間接的に腹側被蓋野 dopamine 神経を活性化し、側坐核における dopamine の遊離量を増加する。この神経ネットワークの継続的な活性化が、疼痛を制御する機構の 1 つであると考えられる。そこで、腹側被蓋野へと投射する側坐核

dopamine D1 受容体含有神経のみを特異的に活性化した際の、神経障害性疼痛に対する影響について検討した。その結果、腹側被蓋野へと投射する側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の特異的な活性化により、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値は有意に回復した。こうした結果から、dopamine D1 受容体の活性化により、腹側被蓋野 dopamine 神経が活性化し、側坐核で遊離した dopamine が dopamine D1 および D2 受容体へと結合することで、疼痛閾値が有意に回復すると考えられる。そのため、この円環的な feed forward ネットワークが疼痛コントロールに重要である可能性が示唆された。

最後に、側坐核の構成神経細胞である ChAT 陽性介在神経に着目し、疼痛との関連性について検討を行った。ChAT 陽性介在神経は、D1-MSNs や D2-MSNs へと接続し、その神経活動を調節していることが報告されている<sup>34,35</sup>。D1-MSNs にはムスカリン性アセチルコリン M4 受容体が発現しており、D2-MSNs にはムスカリン性アセチルコリン M1 受容体がそれぞれ発現している<sup>35,49</sup>。そのため、ChAT 陽性介在神経からアセチルコリンが遊離されると、dopamine D1 受容体含有神経は抑制され、dopamine D2 受容体含有神経は活性化するように調節される。また、側坐核 ChAT 陽性介在神経は腹側被蓋野 GABA 神経からの投射を受けており、GABA 神経の活性化により、ChAT 陽性介在神経が抑制されることで報酬行動を示すことが報告されている<sup>50</sup>。そこで本研究では、側坐核 ChAT 陽性介在神経の神経活動の人為的な抑制制御が神経障害性疼痛に及ぼす影響について検討した。その結果、ChAT 陽性介在神経を特異的に抑制することで、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値は有意に回復することが明らかとなった。上述したように、ChAT 陽性介在神経の神経活動を抑制することで、dopamine D1 および D2 受容体含有神経に対するアセチルコリンの遊離が抑制されるため、dopamine D1 受容体含有神経は活性化し、dopamine D2 受容体含有神

経は抑制される。これは内在性の dopamine が作用した時と同様の生理状態を作り出すことになるため、疼痛閾値の回復が認められたと考えられる。

以上の結果より、側坐核は疼痛を制御する役割を有しており、dopamine D1 受容体含有神経の活性化および dopamine D2 受容体含有神経の抑制作用が疼痛閾値の制御に重要であることが示唆された。本研究により dopamine 受容体の包括的な調節により難治性疾患である神経障害性疼痛の緩和が誘導されることが明らかとなり、中脳辺縁 dopamine 神経とそれに接続する神経ネットワークの機能回復が新たな治療ターゲットとなり得る可能性が強く示唆された。

## 第 2 章

側坐核 dopamine 受容体含有神経の人為的活性制御に伴う腫瘍肥  
大および末梢免疫機構に与える影響

## 【緒言】

がんは、様々なサイトカインや成長因子の遊離により免疫機構に大きな影響を与え、変容した免疫機構がさらなる腫瘍の肥大化を引き起こす悪循環を形成する。また、がんに罹患したという事実が患者の精神的側面に影響を及ぼし、不安やうつなどの情動障害を併発することがある。こうした情動障害により、脳機能は影響を受け、遠心性に全身免疫機能は影響を受ける可能性がある。このような背景から、中枢性または遠心的な免疫系の下行性調節作用をより深く解明することにより、がん治療のための新しいプラットフォームを提供することが可能であると考えられる。

一方、**dopamine** は脳内の主要な神経伝達物質の1つであり、辺縁領域への **dopamine** の放出は、運動機能や報酬の調節をはじめとした様々な生理機能を制御している<sup>7,10,43-46</sup>。こうした多様な生理機能から、**dopamine** 神経の機能障害は、不安やストレスなどの情動機能障害、あるいはパーキンソン病といった神経変性疾患の病態に関与している。また、近年の報告では、腹側被蓋野 **dopamine** 神経の活性化は、免疫細胞の機能を制御し、腫瘍の肥大化を抑制する可能性が提唱されている<sup>12</sup>。さらに、腹側被蓋野 **dopamine** 神経の活性化は、交感神経を介した細菌感染に対する殺菌作用などの免疫応答を賦活化することも明らかにされている<sup>13,51</sup>。

中脳辺縁 **dopamine** 神経の投射先である側坐核には、中型有棘神経細胞 (**Medium Spiny Neurons: MSNs**) が存在しており、それらは **dopamine D1** 受容体または **D2** 受容体を発現する **D1-MSNs** もしくは **D2-MSNs** の2種類に大別される<sup>25-28</sup>。上述したように、中脳辺縁 **dopamine** 神経の活性化が全身性の免疫機能を制御していることは明らかとなっているが、側坐核に存在する **dopamine D1** および **D2** 受容体含有神経による免疫機構に対する制御機構は殆ど明らかとされていない。そこで本研究では、薬理遺伝学的手法である **DREADD system** を従い、人為的に側坐核 **dopamine** 受容体

含有神経の神経活動を人為的に制御した際の抗腫瘍効果および末梢免疫機構の解析を試みた。



## 【実験方法および実験材料】

### 実験動物

実験には C57BL/6N マウス (日本クレア (株)、東京)、D1-cre (C57BL/6-*Drd1a*<*tm1*(*cre*)>*Phsh*) (Cyagen Bioscience Inc., Santa Clara, CA, USA) マウスおよび D2-cre (C57BL/6-*Drd2*<*tm1*(*cre*)>*Phsh*) (Cyagen Bioscience Inc.) マウスを使用した。マウスは恒温恒湿 ( $24 \pm 1$  °C,  $55 \pm 5\%$ ) にて飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。なお、摂餌 (固形飼料 MF、オリエンタル酵母工業 (株)、東京) および飲水 (水道水) は自由摂取とした。

### 薬理遺伝学的手法に従った人為的神経細胞活性制御

ヒト synapsin 遺伝子プロモーターの直下に human muscarinic receptor 3 (hM3Dq) および human muscarinic receptor 4 (hM4Di) と mCherry の複合遺伝子を挿入した AAV ベクター (AAV-hSyn-hM3Dq-mCherry、AAV-hSyn-hM4Di-mCherry) を使用した。また、各 AAV ベクターの力価をそれぞれ hM3Dq:  $5 \times 10^{12}$  or  $9 \times 10^{12}$  copies/mL、hM4Di:  $4 \times 10^{12}$  or  $3 \times 10^{12}$  copies/mL に調製した。Isoflurane (3%, 吸入) による全身麻酔下、脳定位固定装置 (RWD Life Science, San Diego, CA, USA) に固定した D1-cre および D2-cre マウスの側坐核 core 領域 (AP: +1.4 mm, ML:  $\pm 1.5$  mm, DV: -3.6 mm, angle  $10^\circ$ ) にマイクロシリンジポンプを用いて注入 ( $0.25 \mu\text{L}/\text{min}$ , 4 min) した。また、側坐核 lateral shell 領域 (AP +1.0 mm, ML  $\pm 1.8$  mm, DV -4.9 mm, angle  $0^\circ$ ) および medial shell 領域 (AP +1.5 mm, ML  $\pm 0.5$  mm, DV -4.7 mm, angle  $0^\circ$ ) には Nanoject III を用いて注入 ( $300 \text{ nL}/\text{side}$ ) し、側坐核 D1-MSN および D2-MSN 特異的に hM3Dq または

hM4Di を発現させた。hM3Dq および hM4Di の刺激には、clozapine *N*-oxide (CNO: Abcam plc., Cambridge, UK) の腹腔内投与 (3 mg/kg, *t.i.d.*) を行った。

### 電気生理学的手法

側坐核を含む冠状脳切片 (250  $\mu$ m) をビブラトーム (VT-1200S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) で作製した。氷冷切断液には 222.1 mM スクロース, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 7 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub> および 0.5 mM アスコルビン酸を含む溶液を使用した。作製した冠状脳切片は、128 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM グルコースを含む酸素添加人工脳脊髄液中に室温で少なくとも 1 時間回復させた。蛍光の検出には、40x 水浸対物レンズと sCMOS カメラ (Zyla 5.5 sCMOS; Andor Technology, Belfast UK) を用いた正立蛍光顕微鏡 (ECLIPSE FN1; Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。Whole-cell patch-clamp recording は、Multiclamp 700B Amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて、hM3Dq-mCherry および hM4Di-mCherry 陽性細胞からそれぞれ行った。記録電極はホウケイ酸ガラスピペット (4-6 M $\Omega$ ) を用いて、120 mM グルコン酸カリウム、10 mM KCl, 10 mM HEPES、4 mM ホスホクレアチン-Na<sub>2</sub>, 4 mM Mg<sub>2</sub>ATP、0.3 mM Na<sub>3</sub>GTP、0.2 mM EGTA、0.04 mM Alexa Fluor-488 hydrazide dye (pH7.3) を含む溶液を使用した。データは pCLAMP 10 ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて保存した。hM3Dq および hM4Di 受容体を活性化するために CNO (3 $\mu$ M) を灌流液中に添加した。記録後、脳切片を 4% PFA で固定し、Prolong Diamond Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA) を用いて封入した。画像の取得には、40 $\times$ /0.96 NA 対物レンズを装備した共焦点レーザー走査顕微鏡 (FV3000; Olympus,

Tokyo, Japan) を用いて、一連の z スタック画像 (0.6  $\mu\text{m}$  間隔で 3.6  $\mu\text{m}$  厚) から、Alexa Fluor 488 については 488 nm、mCherry については 561 nm で蛍光 2 次元画像を取得した。

### がん移植マウスの作製ならびに腫瘍増殖試験

マウス由来肺がん細胞株である Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を使用した。細胞はトリプシン処理により剥離し、細胞数をカウントした。その後、extracellular matrix (ECM) gel (Sigma-Aldrich Co., MO, USA) と Hanks' balanced salt solution (HBSS) の混合溶液 (ratio 3:1) により  $2 \times 10^6$  cells/0.5 mL/mouse に調整し、isoflurane (3%, 吸入) 麻酔下で、マウスの右腰背部に皮下移植した。移植後、隔日にノギスを用いて腫瘍サイズの測定を行った。腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を測定し、計算式  $(L \times W^2)/2$  より腫瘍体積を算出した。

### Flow cytometry を用いた脾臓免疫細胞の解析

Isoflurane (3%, 吸入) 麻酔下、マウスから脾臓組織を摘出した。摘出後、PBS を加え、homogenate し、メッシュ径 100  $\mu\text{m}$  のセルストレーナーおよびナイロンメッシュに透過させ、細胞凝集塊を除去し、single cell suspension を調整した。その後、塩化アンモニウム溶血剤により溶血除去し、約  $6 \times 10^6$  cells/tube になるように細胞懸濁液を分取した。細胞を抗 CD16/32 抗体 (BD Bioscience, Inc.) によりブロッキングを行なった後、各細胞膜表面抗原抗体を用いて目的免疫細胞の標識を行なった (Table 1)。

標識後、propidium iodide (PI) により、死細胞を染色後、BD FACS Aria™ II Cell sorter (BD Bioscience, Inc.) により各種免疫細胞の解析および分取を行った。

### 統計解析

統計学的有意差検定は、2 群間における比較では、Mann whitney test を用い、3 群間以上の比較においては、一元配置分散分析後に、Bonferroni post-hoc test に従い解析を行い、繰り返しのある 2 群間の比較においては、二元配置分散分析後に、Bonferroni post-hoc test に従い解析を行った。また、相関解析は、ピアソンの積率相関係数検定を用いて行った。すべての統計解析は、Prism version 8.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) を用いて解析を行った。

**Table 1. Antibodies for fluorescence-activated cell sorting (FACS)**

<b>Antibodies</b>	<b>SOURCE</b>	<b>IDENTIFER</b>
Anti-mouse CD4-FITC (clone GK1.5)	BioLegend	Cat# 100405, RRID: AB_312690
Anti-mouse CD8-PE (clone 53-6.7)	BioLegend	Cat# 100707, RRID: AB_312746
Anti-mouse CD11b-FITC (clone M1/70)	BioLegend	Cat# 101205, RRID: AB_312788
Anti-mouse Ly6G-PE/Cy7 (clone 1A8)	BioLegend	Cat# 127617, RRID: AB_1877262
Anti-mouse CD3ε-PE (clone 145-2C11)	BioLegend	Cat# 100307, RRID:AB_312672
Anti-mouse CD49b-APC (clone DX5)	BioLegend	Cat# 108910, RRID: AB_313417
Anti-mouse F4/80-PE (clone BM8)	BioLegend	Cat# 123109, RRID:AB_893498
Anti-mouse CD45.2-APC/Cy7 (clone 104)	BioLegend	Cat# 109824, RRID:AB_830789
Anti-mouse CD3-FITC (clone 17A2)	BioLegend	Cat# 100203, RRID:AB_312660
Anti-mouse CD279-APC (clone 29F. 1A12)	BioLegend	Cat# 135209, RRID:AB_2251944
Anti-mouse CD366-PE/Cy7 (RMT3-23)	BioLegend	Cat# 119715, RRID:AB_2571932
Anti-mouse CD223-PE/Cy7 (C9B7W)	BioLegend	Cat# 125225, RRID:AB_2715763

## 【結果】

### 側坐核 dopamine 受容体含有神経の活性化による腫瘍増殖に与える影響

側坐核に存在する dopamine D1 受容体含有神経の人為的な神経活動の制御により、腫瘍増殖の抑制が引き起こされるか否かについて検討する目的で、AAV-Flex-hM3Dq-mCherry および AAV-Flex-hM4Di-mCherry を D1-cre および D2-cre マウスの側坐核 medial shell 領域に局所微量注入し、D1-cre/hM3Dq および D2-cre/hM4Di マウスを作製した (Figure 1a, b)。これらの受容体が機能していることを確認する目的で、両受容体を選択的に活性化する様に誘導体化された CNO を処置した際の活動電位を電気生理学的手法に従い、検討を行った。その結果、hM3Dq が感染した dopamine D1 受容体含有神経では活動電位の上昇が認められ、hM4Di が感染した dopamine D2 受容体含有神経では神経活動の抑制が確認された (Figure 1c, d)。これらのマウスを用い、側坐核 medial shell に存在する dopamine D1 受容体含有神経の活性化および dopamine D2 受容体含有神経の持続的な抑制が腫瘍増殖に与える影響について検討を行う目的で、マウスの右腰背部に LLC 細胞を皮下移植し、経日的な腫瘍体積の変化について解析を行った。その結果、medial shell に存在する dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化により対照群と比較して、著明かつ有意な腫瘍体積の抑制 (Figure 1e-i, \*\*\* $p < 0.001$  vs. D1-WT/hM3Dq) ならびに腫瘍重量の減少が認められた (Figure 1e-ii, \*\* $p < 0.01$  vs. D1-WT/hM3Dq)。一方、側坐核 medial shell に存在する dopamine D2 受容体含有神経の神経活動を特異的かつ持続的に抑制した条件においては、腫瘍体積および腫瘍重量に対する影響は認められなかった (Figure 1f)。さらに、medial shell と同様に、lateral shell および core 領域に存在する dopamine D1 受容体含有神経の活性化による抗腫瘍効果の有無について検討を行った結果、側坐核 lateral

shell および core における dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化により有意な腫瘍体積の減少が認められた (Figure 2a, b, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. D1-WT/hM3Dq)。一方、lateral shell および core 領域の dopamine D2 受容体含有神経の特異的抑制により腫瘍体積に対する影響は認められなかった (Figure 2c, d)。

### **Dopamine D1 受容体含有神経の特異的活性化による脾臓免疫細胞に対する影響**

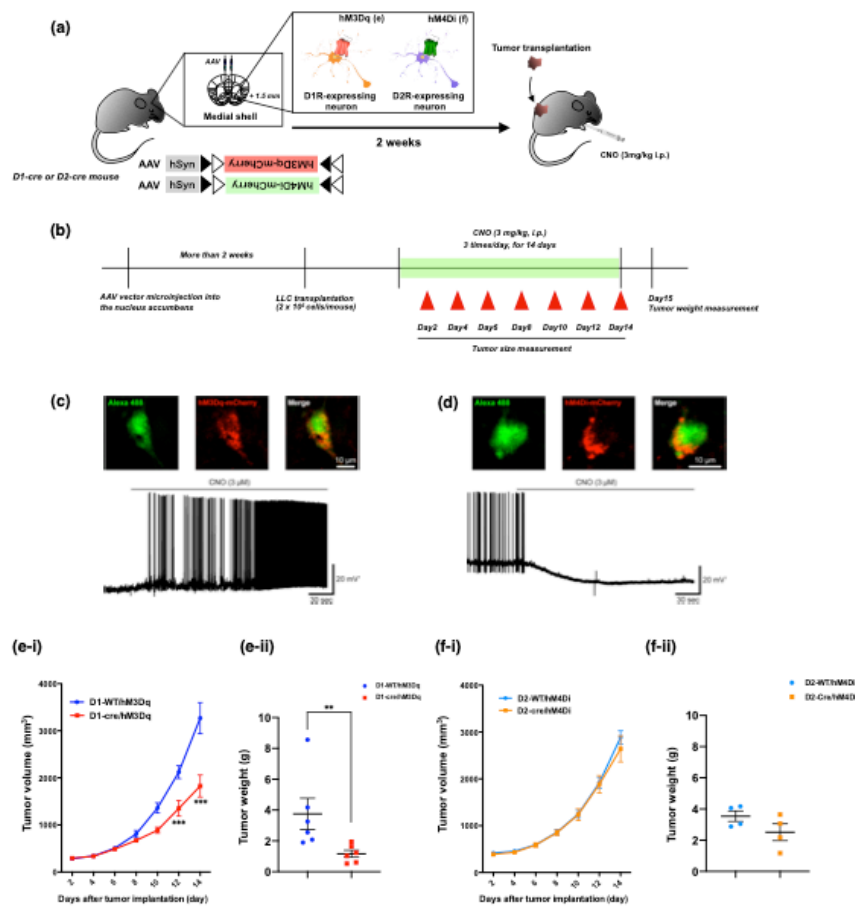
次に、側坐核 medial shell の dopamine D1 受容体含有神経を活性化した条件における脾臓免疫細胞の量的解析を fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いて行った。その結果、medial shell の dopamine D1 受容体含有神経を持続的に活性化したところ、対照群と比較して、脾臓リンパ球における  $CD4^+$  T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、好中球あるいはマクロファージの量的変化は認められなかったものの、 $CD8^+$  T 細胞数の有意な増加が認められた (Figure 3b, \* $p < 0.05$  vs. D1-WT/hM3Dq)。同様に、側坐核 medial shell に存在する dopamine D2 受容体含有神経を持続的に抑制した際の脾臓免疫細胞の量的変化についても検討を行った。その結果、対照群と比較して、側坐核 medial shell に局在する dopamine D2 受容体含有神経の持続的な抑制により、 $CD4^+$  T 細胞、 $CD8^+$  T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、好中球およびマクロファージに量的な変化は認められなかった (Figure 4b-e)。

### **Dopamine D1 受容体含有神経の特異的活性化による $CD8^+$ T cell の機能的解析**

側坐核 medial shell に存在する dopamine D1 受容体含有神経の特異的かつ持続的に活性化した際の  $CD8^+$  T 細胞の機能変容に着目し、免疫チェックポイント関連抑制性受容体として知られている programmed cell death protein 1 (PD-1)、T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3) および lymphocyte-

activation gene 3 (LAG-3) の発現について解析を試みた。その結果、側坐核 medial shell に存在する dopamine D1 受容体含有神経の持続的活性化により、対照群と比較して、脾臓組織での CD8<sup>+</sup> T 細胞における TIM-3 および LAG-3 の有意な発現低下が認められた (Figure 5a, d, \* $p < 0.05$  vs. D1-WT/hM3Dq)。また、それぞれの細胞群における PD-1 の発現についても加味して、さらなる検討を行ったところ、TIM-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞数および LAG-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞数の有意な減少が認められた (Figure 5b, e, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. D1-WT/hM3Dq)。また、免疫チェックポイント関連抑制性受容体の発現と腫瘍体積との間に相関関係が認められるか否かについて検討を行ったところ、腫瘍体積と TIM-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞数または LAG-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 細胞数との間に有意な相関関係が認められた (Figure 5c, f)。



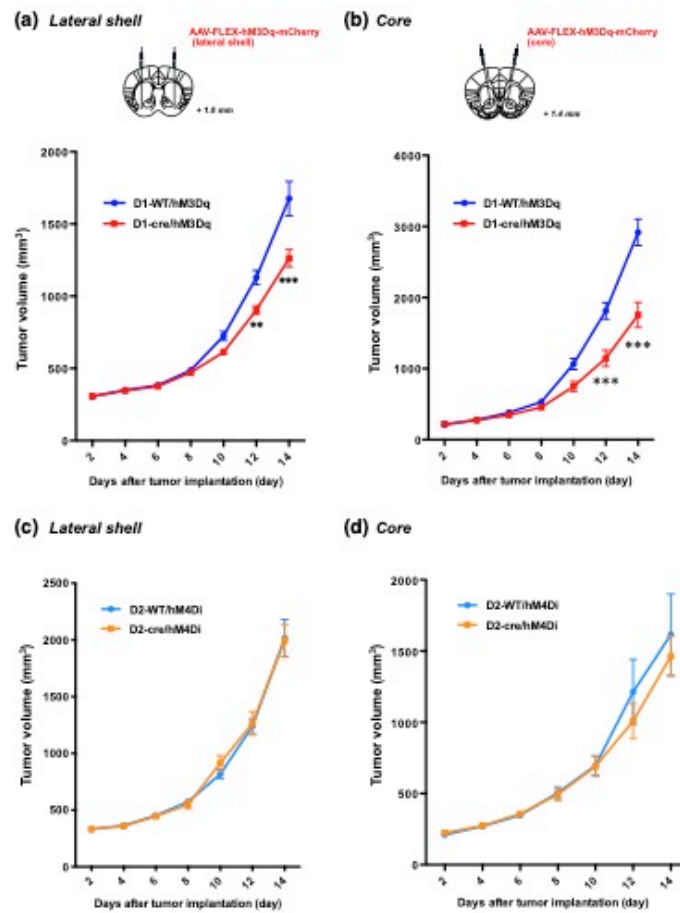


**Figure 1**

**Effect of pharmacogenetic activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens on tumor growth.**

(a) Schematic diagram showing experimental design. The D1-WT or D1-Cre mice was microinjected with hM3Dq into the medial shell of the nucleus accumbens. Two weeks after the microinjection, mice were transplanted by LLC cells and administered repeatedly by CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*). (b) Experimental timeline. (c, d) Confocal images of Alexa<sup>®</sup> 488 hydrazide-stained D1-hM3Dq-mCherry positive neurons (c) or D2-hM4Di-mCherry positive neurons (d). Scale Bar = 10µm. Current-clamp traces of D1-hM3Dq-positive (c) and D2-hM4Di-positive (d) neurons by CNO treatment in the nucleus accumbens. (e) Suppression of the increases in tumor volume (e-i, Two-way repeated measures ANOVA with post-hoc Bonferroni test, \*\*\**p* < 0.001 vs D1-WT/hM3Dq) and tumor weight (e-ii, Mann-Whitney test, \*\**p* < 0.01 vs D1-WT/hM3Dq) by concomitant stimulation of D1-receptor-expressing neurons through activation of hM3Dq in the medial shell of the nucleus accumbens of D1-Cre mice following repeated administration of CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*) in comparison to those of D1-WT mice. (f) Effects of concomitant inhibition of D2-MSNs through stimulation of hM4Di in the medial shell of the nucleus accumbens of D2-cre mice by repeated administration of CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*) on tumor volume (f-i) and tumor weight (f-ii) in comparison to those in D2-WT mice. Each point represents the mean ± S.E.M. of 4-6 animals.

Mol Brain. (2022) *in press* より転載

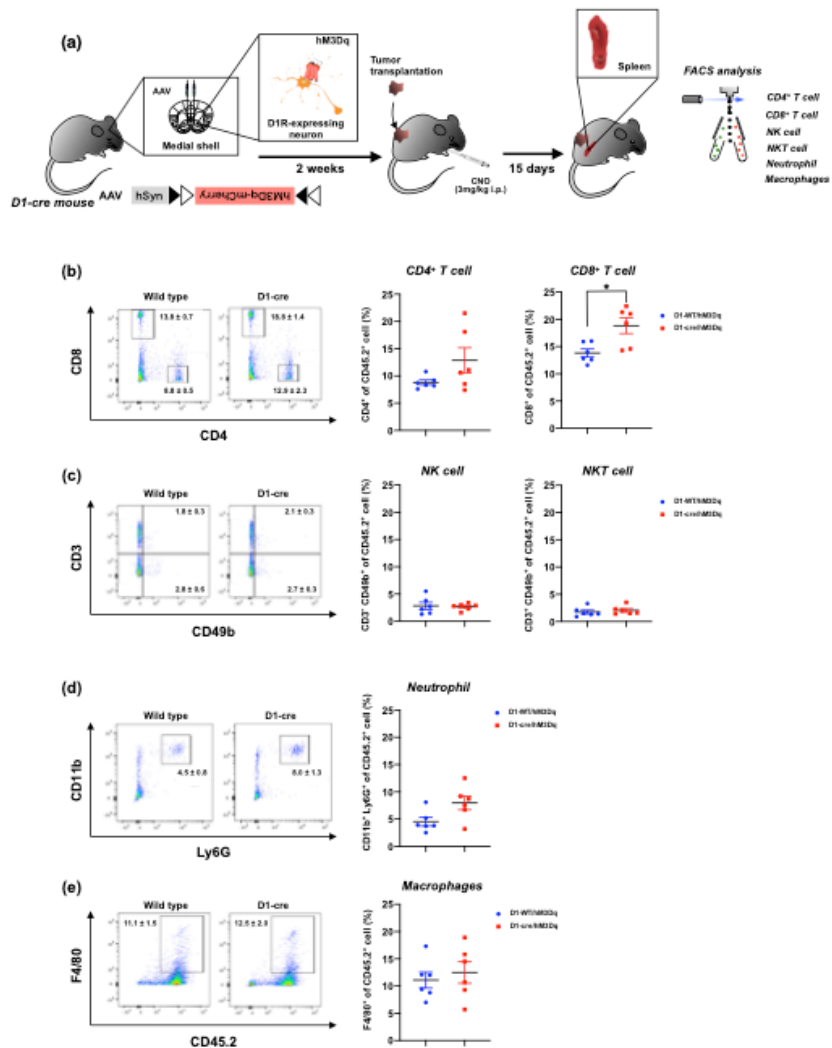


**Figure 2**

**Effect of pharmacogenetic activation of D1-receptor-expressing neurons in the lateral shell or core of the nucleus accumbens on tumor growth.**

(a, b) Suppression on the tumor volume by concomitant stimulation of D1-receptor-expressing neurons through activation of hM3Dq in the lateral shell (a) or core (b) of the nucleus accumbens of D1-Cre mice by repeated administration of CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*) in comparison of those of D1-WT mice (Two-way repeated measures ANOVA with post-hoc Bonferroni test, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. D1-WT/hM3Dq). (c, d) Effects of concomitant inhibition of D2-receptor-expressing neurons through stimulation of hM4Di in the lateral shell (c) or core (d) of the nucleus accumbens of D2-cre mice by repeated administration of CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*) on tumor volume in comparison to those in D2-WT mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-11 animals.

Mol Brain. (2022) *in press* より転載

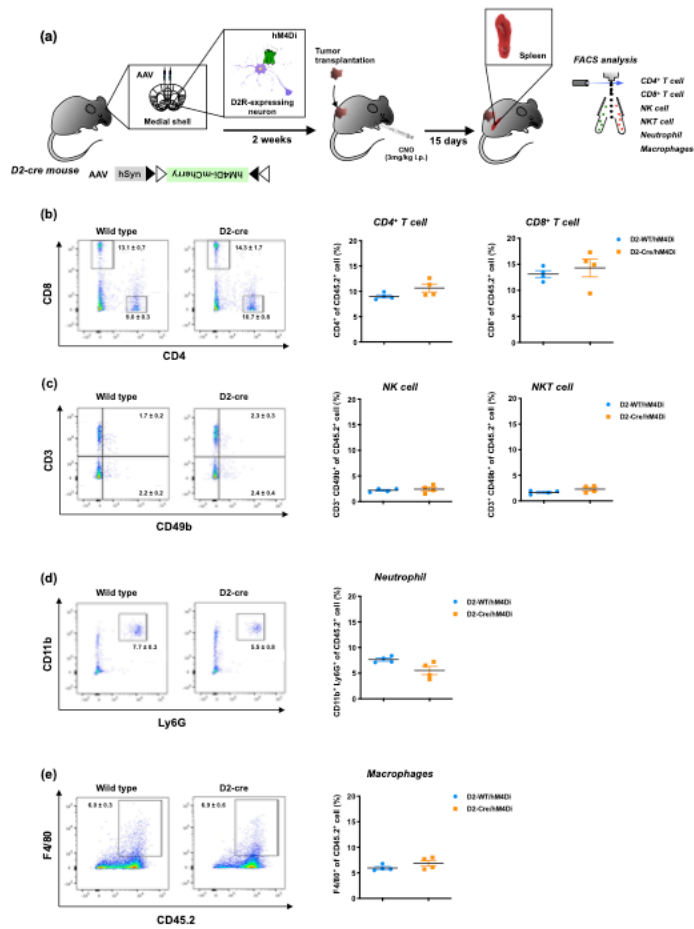


**Figure 3**

**Effect of pharmacogenetic activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens on the systemic immune response.**

(a) Schematic diagram of the experimental design. The D1-WT or D1-Cre mice was microinjected with hM3Dq into the medial shell of the nucleus accumbens. Two weeks after the microinjection, mice were transplanted by LLC cells and administered repeatedly by CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*). Fifteen days after LCC transplantation and CNO administration, the spleen was harvested from these mice and homogenized to make a single-cell suspension followed by flow cytometry to analyze the immune cells in the spleen. (b-e) Representative flow cytometric plots (left panel) and quantitative evaluation of the number (right panel) of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells (b), NK and NKT cells (c), neutrophil (d) and macrophages (e) derived from the spleen of D1-WT/hM3Dq and D1-Cre/hM3Dq mice bearing LLC after repeated administration of CNO. Each data point represents the mean ± S.E.M. of 6 samples (Mann-Whitney test, \*p < 0.05 vs D1-WT/hM3Dq).

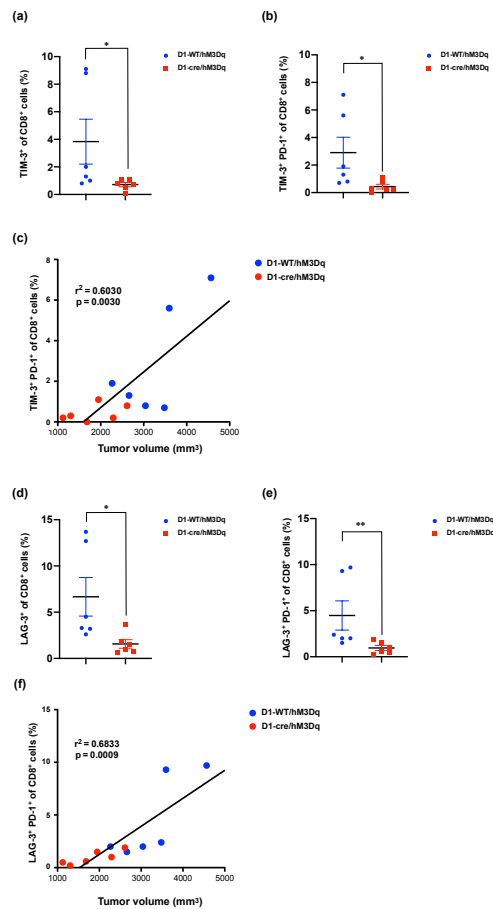
Mol Brain. (2022) *in press* より転載



**Figure 4**

**Effect of pharmacogenetic suppression of D2-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens on the systemic immune response.**

(a) Schematic diagram showing experimental design. The D2-WT or D2-Cre mice was microinjected with hM4Di into the medial shell of the nucleus accumbens. Two weeks after the microinjection, mice were transplanted by LLC cells and administered repeatedly by CNO (3 mg/kg, i.p., *t.i.d.*). Fifteen days after LCC transplantation and CNO administration, the spleen was harvested from these mice and homogenized to make a single-cell suspension followed by flow cytometry to analyze the immune cells in the spleen. (b-e) Representative flow cytometric plots (left panel) and quantitative evaluation of the number (right panel) of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells (b), NK and NKT cells (c), neutrophil (d) and macrophages (e) derived from the spleen of D2-WT/hM4Di and D2-Cre/hM4Di mice bearing LLC after repeated administration of CNO, which were microinjected with hM4Di. Each data point represents the mean ± S.E.M. of 4 samples.



**Figure 5**

**Effect of pharmacogenetic activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens on the state of exhaustion of CD8+ T cells**

(a, b) Effects of activation of D1-receptor-expressing neurons by hM3Dq in the medial shell of the nucleus accumbens of D1-cre mice with hM3Dq by repeated administration of CNO on TIM-3<sup>+</sup> (a) and TIM-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (b) levels of CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen 15 days after LLC transplantation (Mann-Whitney test, \*p < 0.05 vs. D1-WT/hM3Dq). (c) Relationship between the tumor volume and percentage of TIM-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> T cells from the spleen of D1-WT and D1-Cre mice with hM3Dq, which had been implanted with LLC, after activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens (Pearson's correlation coefficient test,  $r^2 = 0.6030$ ,  $p = 0.0030$ ). (d, e) Effects of activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens of D1-cre mice with hM3Dq by repeated administration of CNO on LAG-3<sup>+</sup> (d) and LAG-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (e) levels of CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen 15 days after LLC transplantation (Mann-Whitney test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. D1-WT/hM3Dq). (f) Relationship between tumor volume and the percentage of LAG-3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> in CD8<sup>+</sup> T cells from the spleen of D1-WT and D1-Cre mice with hM3Dq, which had been implanted with LLC, after activation of D1-receptor-expressing neurons in the medial shell of the nucleus accumbens by repeated administration of CNO (Pearson's correlation coefficient test,  $r^2 = 0.6833$ ,  $p = 0.0009$ ). Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 samples.

## 【考察】

本研究では、DREADD system を用いて、側坐核に存在する dopamine 受容体含有神経の神経活動を制御した際の腫瘍肥大に対する影響および末梢免疫機構の解析を試みた。まず、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の活性化による腫瘍肥大に対する影響について検討した結果、側坐核 medial shell、lateral shell および core 領域の dopamine D1 受容体含有神経の特異的かつ持続的な活性化により、有意な腫瘍体積の抑制が認められた。一方、側坐核 medial shell、lateral shell および core 領域の dopamine D2 受容体含有神経の持続的な抑制では、腫瘍体積に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

次に、顕著な腫瘍肥大の抑制作用が認められた medial shell の D1-MSNs を活性化した際の脾臓組織における免疫細胞数の解析を行った結果、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化によって、対照群と比較して CD8<sup>+</sup> T 細胞数の増加が認められた。これらの結果より、殺細胞因子を含有する CD8<sup>+</sup> T 細胞数の増加が、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化による抗腫瘍効果の発現に一部関与している可能性が考えられる。

一方、CD8<sup>+</sup> T 細胞は、慢性的な感染状態やがん病態下において、機能低下 (疲弊化) 状態となることが知られている<sup>52-54</sup>。そこで CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能変容を解析する目的で、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経を持続的に活性化した際の CD8<sup>+</sup> T 細胞における免疫チェックポイント関連抑制性受容体の発現状態を検討したところ、これらの抑制性受容体を発現している CD8<sup>+</sup> T 細胞の著しい減少が認められた。すなわち、担がん状態下において側坐核 dopamine D1 受容体含有神経を持続的に活性化させると、免疫チェックポイント関連抑制性受容体の発現が低く、抗腫瘍活性の高い

CD8<sup>+</sup> T 細胞が増加していることが明らかになった。このように、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化による CD8<sup>+</sup> T 細胞の疲弊化の抑制作用が抗腫瘍効果の発現に寄与していると考えられる。

側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化による抗腫瘍効果の発現および脾臓免疫細胞の疲弊化の抑制を引き起こす遠心性機構に関し、内分泌系や交感神経系の関与が考えられる。本研究の予備実験において、がん移植下における血中サイトカインおよびコルチゾール量の変化について検討を行ったところ、非がん移植マウスと比較し、がん移植マウスにおいて、血漿中の種々のケモカインや増殖因子およびコルチゾール量の増加が観察された。しかしながら、がん移植下の側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の活性化条件下では、増加した血漿中コルチゾール量に変化は認められなかった (データ未発表) ことから、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の活性化による抗腫瘍効果の発現には、HPA axis を介したグルココルチコイド分泌制御の影響はほとんどない可能性が示唆された。一方、ケモカインである keratinocyte-derived chemokines (KC)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) および monokine induced by gamma interferon (MIG) に関して、これらの分子のがん移植下における血中濃度の増加は、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の活性化により著明に低下した (データ未発表)。これらの分子は、がん細胞に直接作用し、細胞増殖能に影響を与えられるため<sup>55-61</sup>、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化により、がん病態下においてこれらのケモカインの血中濃度を低下させることで抗腫瘍効果を示したものと推察される。しかしながら、これらのケモカインは、がん細胞自身からオートクリン機構で放出される可能性も十分に考えられ、これらの分子の低下は、単純に腫瘍肥大の抑制効果に付随した結果として生じた可能性もある。そのため、今後は、非がん状態下における側坐核 dopamine

D1 受容体含有神経の活性化によるサイトカイン、ケモカインおよび増殖因子の量的変動を詳細に解析する必要がある。

以上、本研究より、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の持続的な活性化が、CD8<sup>+</sup> T 細胞の疲弊化の抑制および抗がん免疫の促進を誘導することが初めて明らかとなった。このような辺縁系-末梢免疫連関の存在は、感情や情動の安定化が全身免疫に影響を及ぼす仮説を科学的に立証し得る根拠となると考えられ、今後はその“遠心性・下行性免疫制御機構”を詳細に解析することが、がんをはじめとする様々な難治性疾患の悪性化の抑制や効果的治療法を開発する一助となることが期待される。



## 【総括】

以上の結果の結論を以下に示す

### 第1章

本研究では、光遺伝学的手法を応用し、側坐核 dopamine 受容体含有神経が疼痛閾値に及ぼす影響について検討した。その結果、dopamine D1 受容体含有神経の活性化および、dopamine D2 受容体含有神経の特異的な抑制制御により、神経障害性疼痛により低下した疼痛閾値を回復することが明らかとなった。また、腹側被蓋野へと投射する dopamine D1 受容体含有神経を特異的に活性化することで疼痛閾値が回復したことに加え、側坐核に存在する ChAT 陽性介在神経の特異的な抑制によっても疼痛閾値が回復したことから、feedforward な神経ネットワークの構築や側坐核内における細胞-細胞間相互作用が疼痛制御に重要である可能性が示唆された。

### 第2章

本研究では、薬理遺伝学的手法である DREADD system を用いて、側坐核 dopamine 受容体含有神経の活性を人為的に制御した際の、抗腫瘍効果ならびに末梢免疫機構に対する影響の解明を試みた。まず、側坐核 dopamine D1 受容体含有神経の特異的な活性化により有意な腫瘍肥大の抑制が認められた。特に、側坐核 medial shell に存在する dopamine D1 受容体含有神経の活性化が腫瘍肥大を顕著に抑制した。さらに、この条件下における末梢免疫機構の解析を行った結果、脾臓組織における CD8<sup>+</sup> T cell の細胞数が有意に増加していることが明らかとなり、かつ、疲弊化マーカーとして知られている PD-1、TIM-3 および LAG-3 の発現量が対照群と比較して、CD8<sup>+</sup> T cell において有意に減少していることが明らかになった。また、この疲弊化マーカーの発

現量と腫瘍体積の相関解析を行ったところ、強い正の相関が認められた。

以上、本研究により、側坐核 dopamine 受容体含有神経は疼痛閾値を回復することを明らかとし、特に dopamine D1 受容体の刺激と dopamine D2 受容体の抑制が疼痛制御に重要な役割を担っていること、さらに、dopamine D1 受容体含有神経は腫瘍肥大を抑制し、末梢の免疫機構にも影響を及ぼすことが示された。以上、これらの結果から、側坐核領域に存在する dopamine 受容体含有神経細胞間の包括的統合連関調節により、難治性疾患である神経障害性疼痛の緩和が誘導されることが改めて明らかとなり、疼痛下での情動変容と痛み感受性の変化は共に中脳辺縁 dopamine 神経系の機能低下が起因となっている可能性が示唆され、その機能回復が神経障害性疼痛の治療ターゲットとなり得ると考えられる。また、側坐核内 dopamine D1 受容体含有神経細胞の活性化により、CD8<sup>+</sup> T 細胞の疲弊化の抑制および抗がん免疫の促進が誘導されることをはじめて明らかにした。このような辺縁系-末梢免疫連関の存在は、感情・情動の安定化が全身免疫に影響を及ぼす仮説を科学的に立証しうる根拠となると考えられ、今後はその下行性免疫制御機構を詳細に解析することが様々な難治性疾患の悪性化の抑制や効果的治療法を開発する一助となることが期待される。

## 【謝辞】

終わりに臨み、本研究に際し、ご多忙の中多大なるお力添えと熱意あふれるご指導を賜りました成田 年教授に、深く感謝するとともに慎んで御礼申し上げます。

本稿作成を通じて、御心強い励ましと御助言さらにはご協力を賜りました森 友久教授に深く感謝いたしますとともに厚く御礼申し上げます。

本稿作成を通じて、終始厳しく温かいご指導、御助言さらにはご協力を賜りました葛巻 直子准教授に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本稿作成を通じて、終始厳しく温かいご指導、御助言そして恰好たるご観覧を賜りました成田 道子女史に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本稿作成を通じて、日夜厳しく温かいご指導、御助言そして恰好たるご観覧を賜りました濱田 祐輔助教に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、終始熱心な御指導、ご助言賜りました須田 雪明助教に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、多大なる御助言と御助力下さいました田中謙一大学院生、吉田小莉大学院生、真壁一志大学院生、松山尚樺大学院生、山下健介大学院生、矢部秀平大学院生、牟田武尊大学院生、渡邊諒大学院生をはじめ、薬理学研究室の研修生、専攻生に深く感謝致しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、一番近くで支えて下さいました片岡紗彩卒論生、小林直樹卒論生、小宮偉吹卒論生、斎藤光汰卒論生、畑慎介卒論生、岡本悠卒論生に深く感謝致しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究のため失われた多くの命に哀悼の意を表し、心よりご冥福をお祈り致します。

最後に、10年間の貴重な大学生活の場を与えて下さり、どんな時も支えとなり温かく見守って下さった家族に心から感謝致します。

## 【引用文献】

1. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe F, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan M, Tutelman P, Ushida T, Vader K. The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain.*, 161, 1976-82 (2020).
2. 南 雅文, 佐藤 公道. 「痛み」による「負の情動反応」における扁桃体の役割. *Folia Pharmacol Jpn.*, 125, 5-9 (2005).
3. Saisu, H., Igarashi, K., Narita, M., Ikegami, D., Kuzumaki, N., Wajima, K., Nakagawa, T., and Narita, M. Neuropathic pain-like stimuli change the expression of ribosomal proteins in the amygdala: genome-wide search for a “pain-associated anxiety-related factor”. *J Pharm Palliat Care Sci Jpn.*, 8, 47-57 (2015).
4. Butler, R.K., Ehling, S., Barbar, M., Thomas, J., Hughes, M.A., Smith, C.E., Pogorelov, V.M., Aryal, D.K., Wetsel, W.C., and Lascelles, B.D.X. Distinct neuronal populations in the basolateral and central amygdala are activated with acute pain, conditioned fear, and fear-conditioned analgesia. *Neurosci Lett.*, 661, 11-7 (2017).
5. Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.*, 68, 815-34 (2010).
6. Adcock, R.A., Thangavel, A., Whitfield-Gabrieli, S., Knutson, B., and Gabrieli, J. D. Reward-motivated learning: mesolimbic activation precedes memory formation. *Neuron.*, 50, 507-17 (2006).
7. Berridge, K.C. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology.*, 191, 391-431 (2007).
8. Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. Phasic excitation of

- dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 106, 4894-9 (2009).
9. Navratilova E, Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci.*, 17, 1304-12 (2014).
  10. Salamone, J.D., and Correa, M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron.*, 76, 470-85 (2012).
  11. Schultz, W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.*, 36, 241-63 (2002).
  12. Ben-Shaanan TL, Azulay-Debby H, Dubovik T, Starosvetsky E, Korin B, Schiller M, Green NL, Admon Y, Hakim F, Shen-Orr SS, Rolls A. Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. *Nat Med.*, 22, 940-4 (2016).
  13. Ben-Shaanan TL, Schiller M, Azulay-Debby H, Korin B, Boshnak N, Koren T, Krot M, Shakya J, Rahat MA, Hakim F, Rolls A. Modulation of anti-tumor immunity by the brain's reward system. *Nat Commun.*, 9, 2723 (2018).
  14. Watanabe M, Narita M, Hamada Y, Yamashita A, Tamura H, Ikegami D, Kondo T, Shinzato T, Shimizu T, Fukuchi Y, Muto A, Okano H, Yamanaka A, Tawfik VL, Kuzumaki N, Navratilova E, Porreca F, Narita M. Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Mol Pain.*, 14, 1744806918756406 (2018).
  15. Schultz W. Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 1, 199-207 (2000).
  16. Ambroggi F, Ghazizadeh A, Nicola SM, Fields HL. Roles of nucleus accumbens core and shell in incentive-cue responding and behavioral inhibition. *J Neurosci.*, 31, 6820-30 (2011).
  17. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci.*, 14, 609-25 (2013).

18. Ren W, Centeno MV, Berger S, Wu Y, Na X, Liu X, Kondapalli J, Apkarian AV, Martina M, Surmeier DJ. The indirect pathway of the nucleus accumbens shell amplifies neuropathic pain. *Nat Neurosci.*, 19, 220-2 (2016).
19. Ren W, Centeno MV, Wei X, Wickersham I, Martina M, Apkarian AV, Surmeier DJ. Adaptive alterations in the mesoaccumbal network after peripheral nerve injury. *Pain.*, 162, 895-906. (2021).
20. Nall RW, Heinsbroek JA, Nentwig TB, Kalivas PW, Bobadilla AC. Circuit selectivity in drug versus natural reward seeking behaviors. *J Neurochem.*, 157, 1450-72 (2021).
21. Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer SM, Smith ACW, Roberts-Wolfe DJ, Kalivas PW. The nucleus accumbens: Mechanisms of addiction across drug classes reflect the importance of glutamate homeostasis. *Pharmacol Rev.*, 68, 816–71 (2016).
22. Ito R, Hayen A. Opposing roles of nucleus accumbens core and shell dopamine in the modulation of limbic information processing. *J Neurosci.*, 31, 6001-7 (2011).
23. Haghparast A, Ghalandari-Shamami M, Hassanpour-Ezatti M. Blockade of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens attenuated the antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist in the basolateral amygdala. *Brain Res.*, 1471, 23-32 (2012).
24. Castro DC, Bruchas MR. A Motivational and neuropeptidergic hub: Anatomical and functional diversity within the nucleus accumbens shell. *Neuron.*, 102, 529-52 (2019).
25. Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci.*, 12, 623-37 (2011).
26. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr., Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal

- neurons. *Science.*, 250, 1429-32 (1990).
27. Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z. Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci.*, 16, 6579-91 (1996).
  28. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.*, 60, 543-54 (2008).
  29. Bocklisch C, Pascoli V, Wong JC, House DR, Yvon C, de Roo M, Tan KR, Lüscher C. Cocaine disinhibits dopamine neurons by potentiation of GABA transmission in the ventral tegmental area. *Science.*, 341, 1521-5 (2013).
  30. Lu XY, Churchill L, Kalivas PW. Expression of D1 receptor mRNA in projections from the forebrain to the ventral tegmental area. *Synapse.*, 25, 205-14 (1997).
  31. Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.*, 34, 441-66 (2011).
  32. Gerfen CR. The neostriatal mosaic; compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature.*, 311, 461-4 (1984).
  33. Kupchik YM, Brown RM, Heinsbroek JA, Lobo MK, Schwartz DJ, Kalivas PW. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbal projections. *Nat Neurosci.*, 18, 1230-2 (2015).
  34. Mamaligas AA, Ford CP. Spontaneous synaptic activation of muscarinic receptors by striatal cholinergic neuron firing. *Neuron.*, 91, 574-86 (2016).
  35. Francis TC, Yano H, Demarest TG, Shen H, Bonci A. High-frequency activation of nucleus accumbens D1-MSNs drives excitatory potentiation on D2-MSNs. *Neuron.*, 103, 432-44 (2019).
  36. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers



- B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol.*, 6, 603-21 (2016).
37. Tilan J, Kitlinska J. Sympathetic neurotransmitters and tumor angiogenesis-link between stress and cancer progression. *J Oncol.*, 539706 (2010).
38. Sloan EK, Priceman SJ, Cox BF, Yu S, Pimentel MA, Tangkanangnukul V, Arevalo JM, Morizono K, Karanikolas BD, Wu L, Sood AK, Cole SW. The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res.*, 70, 7042-52 (2010).
39. Batty GD, Russ TC, Stamatakis E, Kivimäki M. Psychological distress in relation to site specific cancer mortality: pooling of unpublished data from 16 prospective cohort studies. *B.M.J.*, 356, j108 (2017).
40. Russ TC, Stamatakis E, Hamer M, Starr JM, Kivimäki M, Batty GD. Association between psychological distress and mortality: individual participant pooled analysis of 10 prospective cohort studies. *B.M.J.*, 345, e4933 (2012).
41. Thaker PH, Han LY, Kamat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, Jennings NB, Armaiz-Pena G, Bankson JA, Ravoori M, Merritt WM, Lin YG, Mangala LS, Kim TJ, Coleman RL, Landen CN, Li Y, Felix E, Sanguino AM, Newman RA, Lloyd M, Gershenson DM, Kundra V, Lopez-Berestein G, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.*, 12, 939-44. (2006).
42. Kuroda R, Kawabata A. Pain information pathways from the periphery to the cerebral cortex. *Yakugaku Zasshi.*, 123, 533-46 (2003).

43. Adcock RA, Thangavel A, Whitfield-Gabrieli S, Knutson B, Gabrieli, JD. Reward-motivated learning: mesolimbic activation precedes memory formation. *Neuron.*, 50, 507-17 (2006).
44. Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 106, 4894-9 (2009).
45. Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.*, 68, 815-34 (2010).
46. Schultz, W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.*, 36, 241-63 (2002).
47. Reisi Z, Bani-Ardalan M, Zarepour L, Haghparast A. *Pharmacol Biochem Behav.* Involvement of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the development of sensitization to antinociceptive effect of morphine. *Pharmacol Biochem Behav.*, 118, 16-21 (2014).
48. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain.*, 43, 205-18 (1990).
49. Bernard V, Normand E, Bloch B. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci.*, 12, 3591-600 (1992).
50. Al-Hasani R, Gowrishankar R, Schmitz GP, Pedersen CE, Marcus DJ, Shirley SE, Hobbs TE, Elerding AJ, Renaud SJ, Jing M, Li Y, Alvarez VA, Lemos JC, Bruchas MR. Ventral tegmental area GABAergic inhibition of cholinergic interneurons in the ventral nucleus accumbens shell promotes reward reinforcement. *Nat Neurosci.*, 24, 1414-28 (2021).
51. Brod S, Rattazzi L, Piras G, D'Acquisto F. 'As above, so below' examining the interplay between emotion and the immune system. *Immunology.*, 143, 311-8 (2014).

52. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular signature of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.*, 27, 670-84 (2007).
53. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol.*, 37, 457-95 (2019).
54. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DAA, Wherry EJ. Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.*, 10, 29-37 (2008).
55. Hu J, Zhao Q, Kong LY, Wang J, Yan J, Xia X, Jia Z, Heimberger AB, Li S. Regulation of tumor immune suppression and cancer cell survival by CXCL1/2 elevation in glioblastoma multiforme. *Sci Adv.*, 7, eabc2511 (2021).
56. Hsu YL, Chen YJ, Chang WA, Jian SF, Fan HL, Wang JY, Kuo PL. Interaction between tumor-associated dendritic cells and colon cancer cells contributes to tumor progression via CXCL1. *Int J Mol Sci.*, 19, 2427 (2018).
57. Dutta P, Sarkissyan M, Paico K, Wu Y, Vadgama JV. MCP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancers and drives cancer invasiveness and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.*, 170, 477-86 (2018).
58. Shi L, Wang J, Ding N, Zhang Y, Zhu Y, Dong S, Wang X, Peng C, Zhou C, Zhou L, Li X, Shi H, Wu W, Long X, Wu C, Liao W. Inflammation induced by incomplete radiofrequency ablation accelerates tumor progression and hinders PD-1 immunotherapy. *Nat Commun.*, 10, 5421 (2019).

59. Li D, Ji H, Niu X, Yin L, Wang Y, Gu Y, Wang J, Zhou X, Zhang H, Zhang Q. Tumor-associated macrophages secrete CC-chemokine ligand 2 and induce tamoxifen resistance by activating PI3K/Akt/mTOR in breast cancer. *Cancer Sci.*, 111, 47-58 (2020).
60. Pein M, Insua-Rodríguez J, Hongu T, Riedel A, Meier J, Wiedmann L, Decker K, Essers MAG, Sinn HP, Spaich S, Sütterlin M, Schneeweiss A, Trumpp A, Oskarsson T. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. *Nat Commun.*, 11, 1494 (2020).
61. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK. Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol.*, 13, 263-75 (2006).