

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部・教授・岸岡史郎

共同研究者

近畿大学生物理工学部・教授・三谷隆彦

和歌山県立医科大学医学部・講師・木口倫一

和歌山県立医科大学医学部・助教・小林悠佳

**研究課題名：「依存症のメカニズム解明」**

**クロス・アディクションの病態生理を担う脳内ミクログリア活性化機構の解明**

**要旨**

薬物乱用による健康被害ならびに社会的損失は極めて大きいものの、薬物依存に対する根本的治療法はなく、対症療法や社会的介入に頼らざるを得ないのが現状である。薬物依存は中脳辺縁系の可塑的变化を伴った慢性疾患であり、薬物が体内から消失してもなお、薬物への渴望や探索行動が持続する。近年、多くの中枢神経疾患の分子基盤において、グリア細胞—神経細胞間クロストークに基づく神経炎症の役割が注目されている。本研究では、薬物依存の新たな分子標的の候補として、特にミクログリアの役割を重点的に検討した。

実験にはいずれもマウスを用いた。精神的依存形成を条件付け場所嗜好性（CPP）試験により評価したところ、メタンフェタミンの用量依存的に精神的依存形成が認められた。精神的依存形成に重要な脳内報酬系に及ぼすメタンフェタミンの影響を評価したところ、メタンフェタミン投与 3 時間後の側坐核においてケモカインである MCP-1 およびサイトカインである IL-1 $\beta$  の遺伝子発現増加が認められた。一方、腹側被蓋野においてはこれらの発現に変化は観察されなかった。ミクログリアを活性化する薬物であるリポ多糖（LPS）を脳室内に投与すると、ミクログリアの形態学的活性化ならびに MCP-1、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現増加が観察された。メタンフェタミンによる精神的依存形成は、ミクログリアの活性化阻害薬であるミノサイクリンの前処置により抑制された。さらに、コカインによってもメタンフェタミンと同様の精神的依存形成ならびに側坐核における炎症性メディエーターの発現増加が観察された。

本研究の結論として、依存性薬物による精神的依存形成の分子基盤には、グリア細胞と神経細胞のクロストークが核となる神経炎症が存在することが明らかとなり、サイトカイン、ケモカインを含む様々な炎症性メディエーターが関与することが示唆された。ミクログリアを主軸とした神経炎症を分子標的とすることで、精神的依存の新たな薬物治療戦略確立に繋がることが期待される。

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部・教授・岸岡史郎

共同研究者

近畿大学生物理工学部・教授・三谷隆彦

和歌山県立医科大学医学部・講師・木口倫一

和歌山県立医科大学医学部・助教・小林悠佳

研究課題名：「依存症のメカニズム解明」

クロス・アディクションの病態生理を担う

脳内ミクログリア活性化機構の解明

## 1 目的

我が国において薬物事犯による検挙者数は年間1万人を超えており、覚せい剤事犯がそのうち約8割を占める。覚せい剤の乱用は戦後より急速に増加し、その後は減少したものの現在でも依然として高い水準にある。政府も社会的介入による対策を講じているものの、依存症の病態生理に基づいた薬物治療戦略を早急に確立することが求められている。

覚せい剤にはアンフェタミンおよびメタンフェタミンの二種類があり、これらは急性効果として強力な中枢神経興奮・覚醒作用を示す。その機序として、ドパミン輸送担体の阻害、ドパミン分解酵素であるモノアミンオキシダーゼの阻害、ならびにドパミンの遊離促進などによりシナプス間隙におけるドパミン濃度を上昇させることが知られている。覚せい剤は特に中脳辺縁系に属する腹側被蓋野から側坐核へと投射するドパミン神経系（脳内報酬系）を賦活化させ、快感や陶酔感をもたらすため、結果として長期的な薬物への激しい渴望（アディクション）が惹起される<sup>1)</sup>。その渴望の強さは、乱用者の多くが薬物を入手するためには反社会的行為を犯すことを厭わないという事実からも伺える。さらに覚せい剤事犯の検挙者のうち半数以上が再犯者であることも、薬物に対する渴望の強さを裏付けている。このように精神的に薬物に依存している状態を精神的依存というが、一方で覚せい剤は連用により耐性を生じることも知られている。そのため乱用者は初回使用時と同様の快楽を得るために反復して大量使用するケースがあり、このような状況下では妄想や幻覚を主体とした精神病症状に加え、心血管系への影響から致命的な循環不全を引き起こすことも少なくない<sup>2)</sup>。

薬物依存は中脳辺縁系の可塑的变化を伴った慢性疾患であり、薬物動態学的には薬物が体内から消失しているにも関わらず、薬物への渴望や探索行動が持続するのが特徴である。また治療後においても強いストレス暴露、アルコールやその他の依存性薬物によって再び乱用時と同様の渴望（再燃）を生じることがある。これらの薬物はいずれも覚せい剤と同様に脳内報酬系を賦活化させるため、異なる薬物・刺激に対して同時に依存する多重嗜癖（クロス・アディクション）が形成される原因であると考えられている<sup>3)</sup>。覚せい剤を筆頭とする依存性薬物の蔓延による乱用者の増加は健康被害および社会的損失が極めて大きいものであるが、アディクションに対する根本的治療法はなく、対症療法や社会的介入に頼らざるを得ないのが現状である。

近年、多くの中枢神経疾患の分子基盤における神経炎症の役割が注目されている。従来は神経細胞の器質的变化が疾患の本体であると考えられてきたが、現在では神経

細胞を数で圧倒するグリア細胞の重要性が広く認識されるようになった。特にミクログリアやアストロサイトが様々な疾患の病態と密接に関連することが示されており、疾患の病態生理を理解する上で必要不可欠の要素として位置づけられている。

ミクログリアは中枢神経系における免疫担当細胞であり、通常は細微な突起伸張を介して中枢神経系の環境を監視している。生体外からの微生物や異物の侵入時には、貪食などの自然免疫反応によってそれらを排除すると共に抗原提示能も有している。ミクログリアはストレスや各種薬物などの様々な刺激に応じて活性化され、炎症性メディエーターを介して神経変性に関与することが報告されている<sup>4)</sup>。多発性硬化症などの神経免疫疾患や脳虚血による神経障害、またパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患で認められる神経変性においても、活性化ミクログリアの影響が多数報告されている。薬物依存に関しても、覚せい剤乱用者の脳内ではミクログリアが長期的に活性化していることが示されており<sup>5)</sup>、またメタンフェタミンが培養ミクログリアを活性化することもこれまでに明らかにされている。さらにエタノールや医療用麻薬であるモルヒネもミクログリア活性化作用を有することを示した報告も増えつつあり、依存性薬物とミクログリアの関連が強く示唆される<sup>6)</sup>。しかしながら、薬物依存の分子基盤におけるミクログリアの役割についてはほとんど明らかにされておらず、更なる研究が必要とされている。

アストロサイトはシナプスの構築や機能調節に重要な役割を果たしており、細胞外におけるグルタミン酸の濃度調節にも関与する。ミクログリアと同様、各種の刺激や薬物により活性化され、細胞外メディエーターの放出を介して様々な神経疾患の病態を調節している。これらグリア細胞と神経細胞とのクロストークにおいては物理的な接触も起こりうるが、多くは液性因子の放出を介して情報が伝達されている。栄養因子やサイトカイン類、神経ペプチドの中でも、神経炎症においては特にサイトカインおよびケモカインの役割に焦点が当てられている。炎症性サイトカインとしては **Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ )**、腫瘍壊死因子 (**Tumor necrosis factor-alpha; TNF $\alpha$** ) などが代表的であり、またケモカインの中でミクログリアとアストロサイトのクロストークにおいては **monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)** が最もよく知られている分子の一つである。これらはグリア細胞を双方向性に活性化し、様々な炎症性メディエーターの産生亢進を介して持続的な神経炎症を誘導する。このようにして中枢神経ネットワークの可塑的变化が引き起こされ、器質的変化・機能障害に繋がると考えられている。

このような炎症性メディエーターを介した細胞間クロストークは様々な神経疾患

における共通の分子基盤とされているが、薬物依存を含む殆どのケースにおいて、機能制御の鍵となる因子は全く明らかにされていない。そこで複雑な神経—グリア間クロストークに基づく薬物依存の病態制御因子を明らかにするため、様々な角度から解析を行うことが求められる。本研究では、薬物依存の新たな分子標的の候補として、特にミクログリアの役割を重点的に検討した。具体的には行動薬理学的および生化学的視点から、覚せい剤依存および他の依存性薬物とのクロス・アディクション形成の病態生理においてミクログリアが果たす役割を解明し、脳内報酬系における神経炎症を担う神経—グリア間ネットワークの制御因子を同定した。新たに同定した因子の病態生理学的役割を精査し、依存症の薬物療法戦略の確立へと繋がるトランスレーショナル・リサーチを目指した研究を展開した。

## 2 実施方法

### 実験動物

8-10 週齢 (20–26 g) の雄性 C57BL/6 マウス (SLC、大阪) を用いた。温度 23–24°C、湿度 60–70%、照明時間を 8 時–20 時とする環境にて飼育し、MF 固形飼料 (オリエンタルイースト、東京) および飲料水を自由に摂取させた。1 ケージあたり 5 匹以下で飼育した。

### 薬物投与

塩酸メタンフェタミン (Methamphetamine hydrochloride; Meth、0.3-3 mg/kg、大日本住友製薬、大阪)、塩酸コカイン (Cocaine hydrochloride; Coca、20 mg/kg、武田薬品、大阪)、塩酸ミノサイクリン (Minocycline hydrochloride; Mino、40 mg/kg、Sigma Aldrich、東京) はいずれも生理食塩水に溶解し、26G 注射針を用いて覚醒状態にて背側皮下 (subcutaneous injection; s.c.) もしくは腹腔内 (intraperitoneal injection; i.p.) に投与した。投与液量は 0.1 ml/10 g とした。リポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS、3 µg、Sigma Aldrich) はリン酸生理食塩水 (Phosphate-buffered saline; PBS) に溶解し、ペントバルビタール (70 mg/kg、i.p.) 麻酔下マウスを伏臥位にし、二段針を接続したマイクロシリンジを用いて 3 µl を側脳室内 (intracerebroventricular; i.c.v.) に投与した。投与技術の確認のため、エバンスブルー溶液を同様にマウス側脳室内に投与すると、脳室を経由して色素の浸潤が認められた。

### 条件付け場所嗜好性試験

薬物による精神的依存形成能を評価するため、アクリル樹脂製の 2-コンパートメントボックス (図 1) を用いて条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned Place Preference; CPP) を行った。一方のコンパートメント (16 cm×16 cm×16 cm) は四方の壁の色を全て黒色とした暗室であり、床面を平滑とした。他方は四方の壁の色を全て白色とした明室であり、床面を凹凸とした。実験スケジュールは Pre-conditioning (1、2 日)、Conditioning (3–8 日)、および Post-conditioning (9 日) の三過程より構成され、計 9 日間に渡って実験を行った。

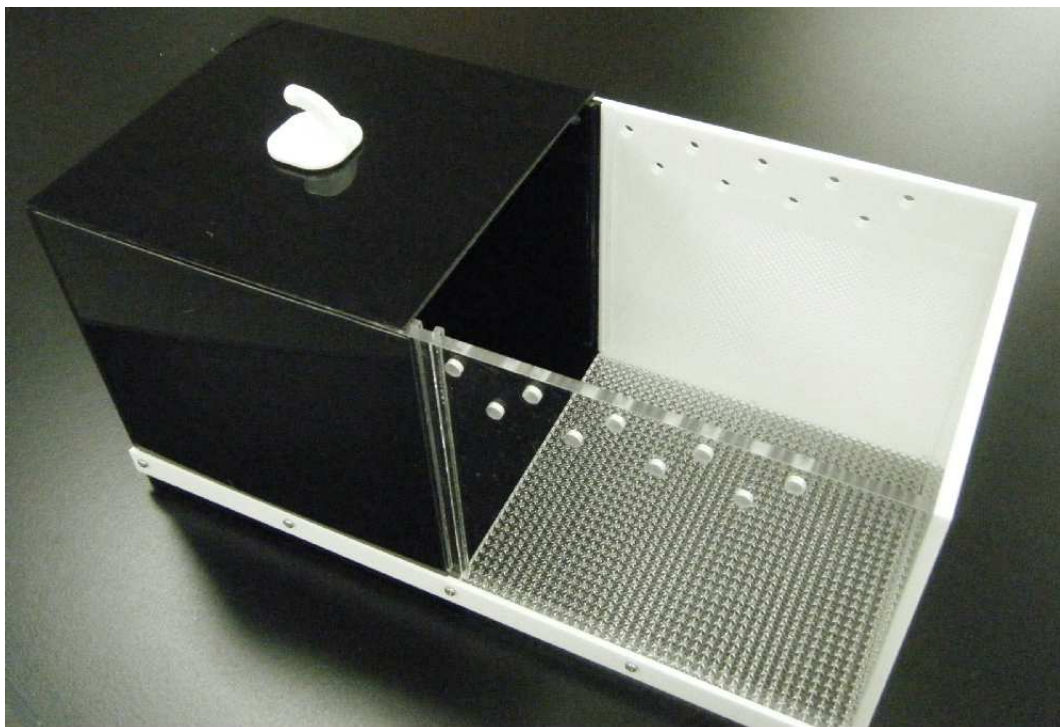
**Pre-conditioning** : マウスが両コンパートメント間を自由に移動可能となるよう、2-コンパートメントボックス中央の仕切りに穴が空いたものをセットした。1 日目はマウスをコンパートメント内に入れ、15 分間自由に行動させた。2 日目も同様の操作を行いつつ、15 分間における各コンパートメントでの滞在時間を測定した。

**Conditioning** : Pre-conditioning (2 日目) において滞在時間の短いコンパートメントを

非嗜好側、他方を嗜好側とした。条件付け初日（3日目）は Methamphetamine（0.3-3 mg/kg）、Cocaine（20 mg/kg）または対照として生理食塩水（Saline）を投与し、中央に仕切り板を入れて非嗜好側コンパートメントに 60 分間閉じ込めた。翌日（4日目）にはいずれも Saline を皮下投与し、嗜好側コンパートメントに 60 分間閉じ込めた。この 2 日間のセッションを計 3 回繰り返した（3-8 日）。

**Post-conditioning:** 中央の仕切りに穴が空いた 2-コンパートメントボックスに条件付けしたマウスを入れて 15 分間自由に行動させ、15 分間における各コンパートメントへの滞在時間を測定した。

非嗜好性コンパートメントにおける Post-conditioning と Pre-conditioning の滞在時間の差（CPP スコア；秒）を算出し、場所嗜好性すなわち精神的依存形成の指標とした。CPP スコアが大きいほど、強い精神的依存が形成されたことを示す。



**図1：CPP実験装置**

一方のコンパートメントのサイズは 16 cm×16 cm×16 cm とした。照明を付け、床面が平滑の暗室（黒色）と床面が凹凸の明室（白色）に設定した。

RT-PCR (polymerase chain reaction; ポリメラーゼ連鎖反応)

断頭により安楽死させたマウスより脳を摘出し、氷冷したブレインマトリックス(ブレインサイエンス・イデア、大阪)を用いて厚さ 1 mm の Coronal 切片を作製した。脳内報酬系を構成する側坐核 (Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) を切片より切り出し、1.5 ml チューブに入れて -80°C にて保存した。RNA を抽出するため、Trizol 溶液 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 300  $\mu$ l を加え、組織をホモジナイズした。Chloroform 60  $\mu$ l を加え、4°C、15000 rpm にて 10 分間遠心した後、上清を新しいチューブに移した。同量の 2-propanol を加え、十分に混和して 4°C、15 krpm にて 15 分間遠心した。上清を取り除き、75% ethanol を加えて RNA ペレットを洗浄した。乾燥させた後、DEPC 処理した蒸留水に溶解して 260 nm における吸光度をもとに総 RNA 濃度を測定した。単離した総 RNA 1  $\mu$ g に Random primer (Invitrogen) 150 ng を加え、70°C にて 10 分間インキュベートした後、即座に冷却した。Buffer、deoxy-NTPs および PrimeScript (Takara Bio、大津) を加えて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。得られた cDNA を鋳型とし、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 または  $\beta$ -Actin 遺伝子特異的プライマーを用いて GoTaq ポリメラーゼ (Promega, Madison, WI) による PCR 反応を行った。PCR 条件は最初に 94°C にて 2 分インキュベートした後、94°C:40 秒、58°C:40 秒、72°C:50 秒のステップをプライマーに応じて 23-41 サイクル繰り返し、最後に 72°C にて 5 分インキュベートした。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し、臭化エチジウム染色後、紫外線照射下にてバンドを検出した。ImageJ ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD) を用い、バンドの濃度を計測して各々の発現量を定量化した。データは MCP-1 または IL-1 $\beta$  の発現量と内部標準である  $\beta$ -Actin の発現量との比で表した。

#### 免疫染色

Pentobarbital (100 mg/kg) にて深麻酔したマウスを開腹し、翼状針を接続したシリンジを左心室に挿入した。リン酸生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) 20 ml を灌流して脱血した後、4% Paraformaldehyde (PFA; Sigma Aldrich) を含むリン酸緩衝液 20 ml を用いて灌流固定を行った。摘出した全脳を 4% PFA 溶液に浸して 2 時間以上室温に置いた後、25% Sucrose を含むリン酸緩衝液に移し、4°C にて約 2 日間放置した。脱水後、嗅球および延髄部位をカミソリで切除し、Optical Cutting Tissue コンパウンド (SAKURA、東京) に包埋して急速冷凍した。作製した凍結ブロックは -80°C にて保管した。凍結ブロックを -20°C に維持したクリオスタットにて厚さ 16  $\mu$ m の凍結 Coronal 切片を作製し、MAS コーティングしたスライドガラスに貼付した。作製した切片を 37°C にて一晩乾燥させ、側坐核および腹側被蓋野を含む脳切片を免疫染色に用いた。切片を PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS (PBST) に浸して 40 分間インキュベートした。リキッドブロッカーを用いて切片を囲み、4% ウシ血清アルブ



ミン (Bovine Serum Albumin; BSA) を含む PBST にて切片を室温で 2 時間、ブロッキング反応を行った。ミクログリアのマーカーである Iba-1 に対する特異的抗体 (ウサギポリクローナル IgG、WAKO、大阪) を 0.025% Triton X-100 および 1% BSA を含む PBS にて 200 倍希釈し、切片をそれに浸して 4°C で一晩反応させた。翌日に PBST を用いて切片を 5 分×3 回洗浄し、緑色蛍光物質である Alexa-488 標識した抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen、200 倍希釈) に室温で 2 時間反応させた。PBST にて切片を洗浄し、PBS により 1000 倍希釈した Hoechst 33342 溶液 (Invitrogen) に 5 分間反応させ、核染色を行った。切片を PBS にて洗浄後、褪色防止剤を含むパーマフロー溶液に浸し、カバーガラスを被せて封入した。遮光にて 1 日風乾させ、蛍光顕微鏡にて緑色 (ミクログリア) および青色 (核) 蛍光を観察した。

#### 統計処理

データはいずれも平均値±標準誤差で示した。統計学的解析において二群間の比較では Student の t 検定を行った。3 群以上の比較においては、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。いずれも危険率 5% ( $P < 0.05$ ) 以下の場合を有意差ありとした。

### 3 結果

メタンフェタミンによる精神的依存形成を CPP 法により評価したところ、メタンフェタミン (Meth; 0.3-3 mg/kg) の用量依存的に CPP スコアの増加が認められ、精神的依存の形成が認められた (図 2)。対照群として用いた生理食塩水では場所嗜好性は認められなかった。

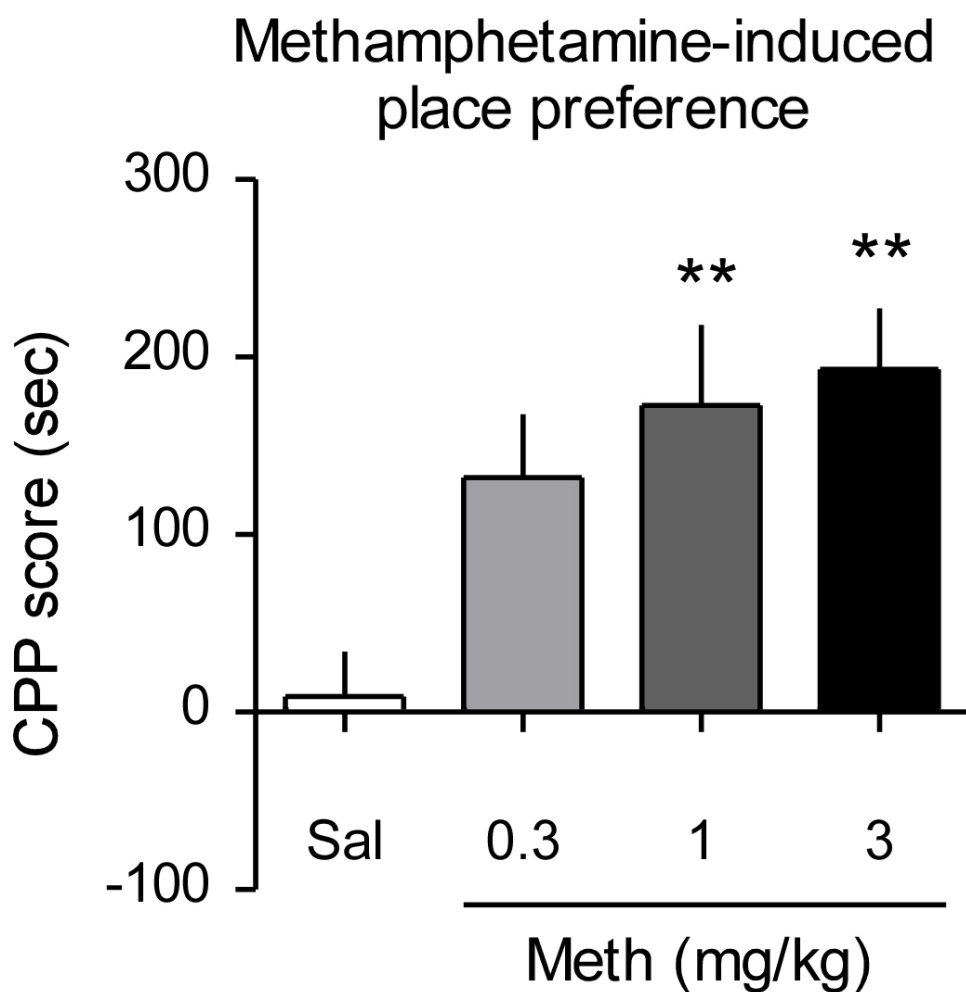


図 2 : メタンフェタミンによる精神的依存形成

Conditioned place preference (CPP) 法を用い、Methamphetamine

(Meth, 0.3-3 mg/kg, s.c.) による精神的依存形成を評価した。

データは 8-12 例の平均値±標準誤差で示した。\*\*P<0.01 vs. Saline (Sal)。

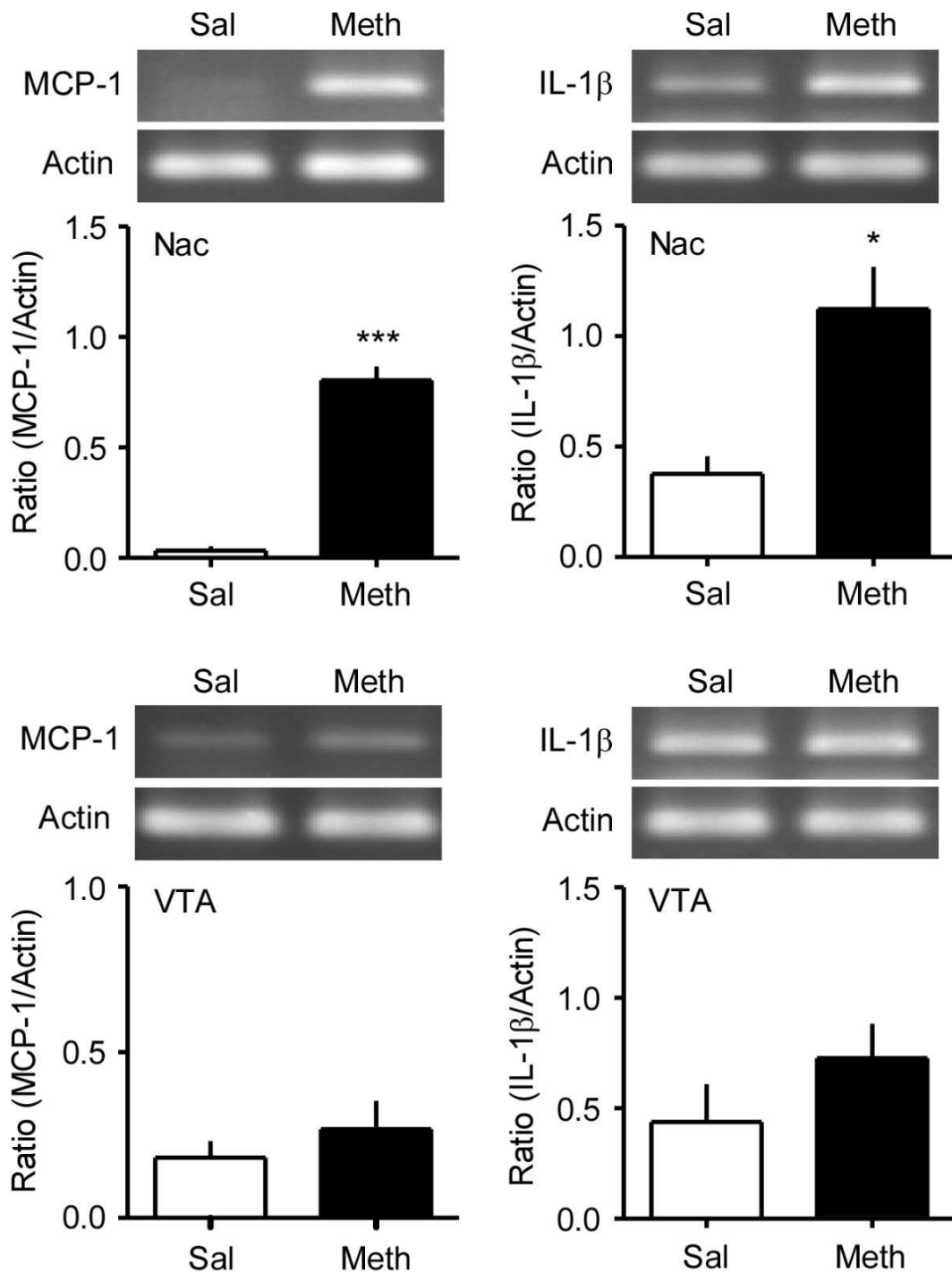


図3 : Methによる炎症メディエーター発現増加

Methamphetamine (Meth; 3 mg/kg, s.c.) を単回投与し、3時間後における側坐核 (Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) の RT-PCR を行った。データは 5-6 例の平均値±標準誤差で示した。

\*\*\*P<0.01、\*P<0.05 vs. Saline (Sal)。

精神的依存の病態と密接に関与する脳内報酬系に着目し、メタンフェタミンによる炎症性メディエーター発現誘導効果を RT-PCR 法により評価した。メタンフェタミン (1 または 3 mg/kg) 単回投与 3 時間後の側坐核において、炎症性サイトカインである Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) およびケモカインである Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現増加が認められた (図 3)。CPP 法で検討したメタンフェタミン処置スケジュール後のこれらの分子の発現変化を観察するため、メタンフェタミン 3 mg/kg を 1 日間隔で 3 回投与した。最終投与 3 時間後において MCP-1 の発現が増加していた (図 4)。一方、腹側被蓋野においてはこれらの発現に有意な変化は観察されなかった。この結果はメタンフェタミンが脳内報酬系において神経炎症を誘導したことを示唆している。

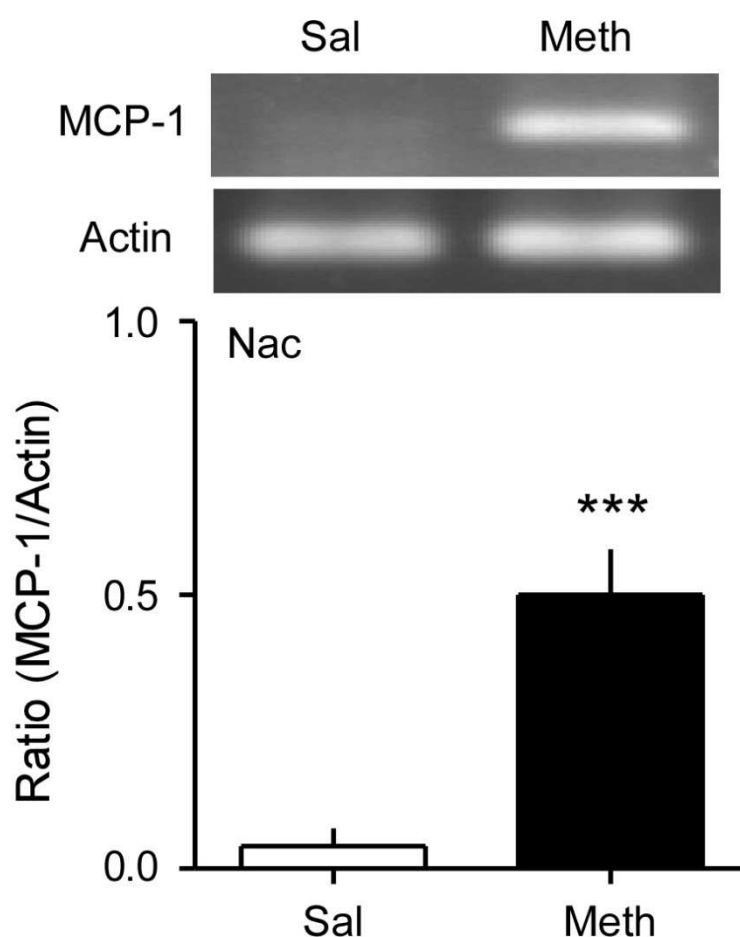
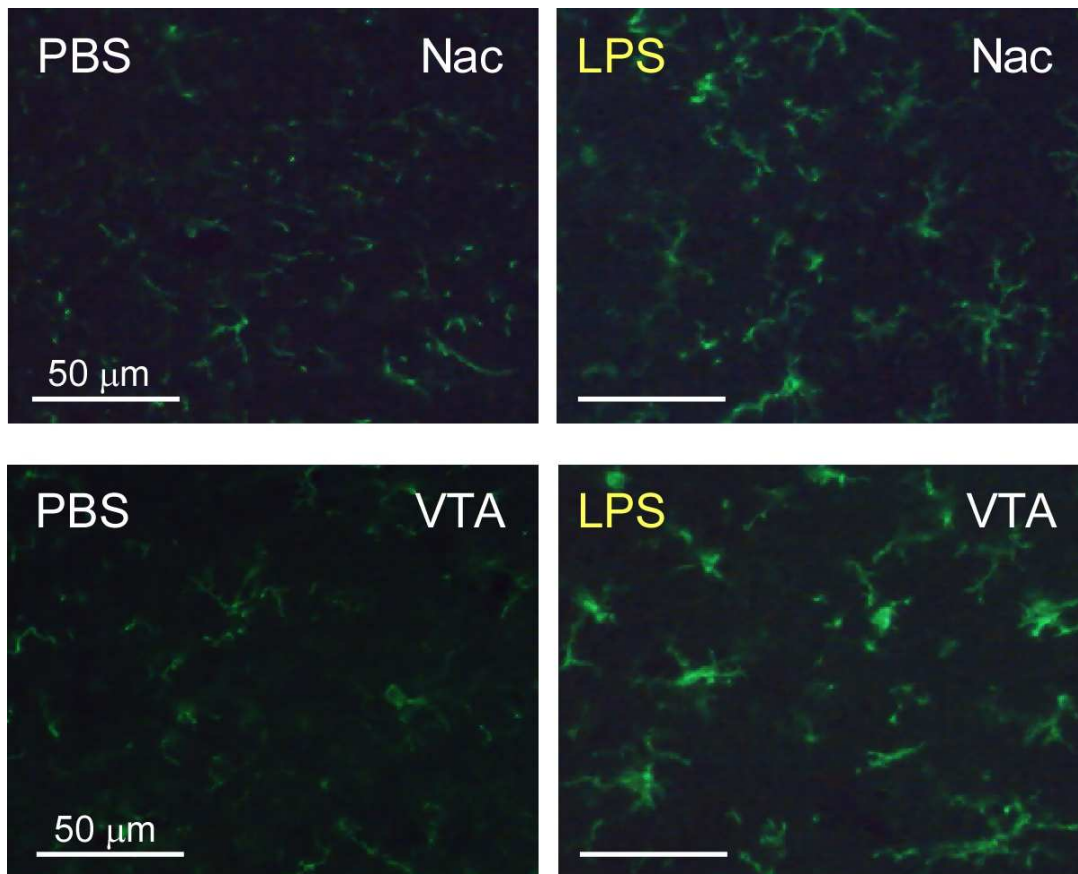


図 4 : Meth反復投与によるMCP-1発現増加

Methamphetamine (Meth; 3 mg/kg, s.c.) を 1 日おきに 3 回投与し、3 時間後における側坐核 (Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) の RT-PCR を行った。データは 5-6 例の

平均値±標準誤差で示した。\*\*\*P<0.01 vs. Saline (Sal)。

脳内における炎症性サイトカイン発現増加とミクログリアとの関連を検討するため、ミクログリアを特異的に活性化する薬物であるリポ多糖 (LPS) をマウス脳室内に局所投与した。ミクログリア特異的マーカーである Iba-1 の免疫染色により、LPS 投与1日後の側坐核ならびに腹側被蓋野においてミクログリアの細胞体肥大化および突起の短縮を特徴とする形態学的活性化が認められた (図5)。



**図5 : LPSによる脳内ミクログリア活性化**

Lipopolysaccharide (LPS, 3 μg, i.c.v.) を投与し、1日後における側坐核 (Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) の免疫染色を行った。緑はミクログリア特異的マーカーの Iba-1 を示す。

そこで MCP-1 および IL-1 $\beta$  の遺伝子発現について検討した。RT-PCR により LPS (3  $\mu$ g) 脳室内投与 1 日後の側坐核および腹側被蓋野において、IL-1 $\beta$  ならびに MCP-1 が有意に発現増加していた (図 6)。

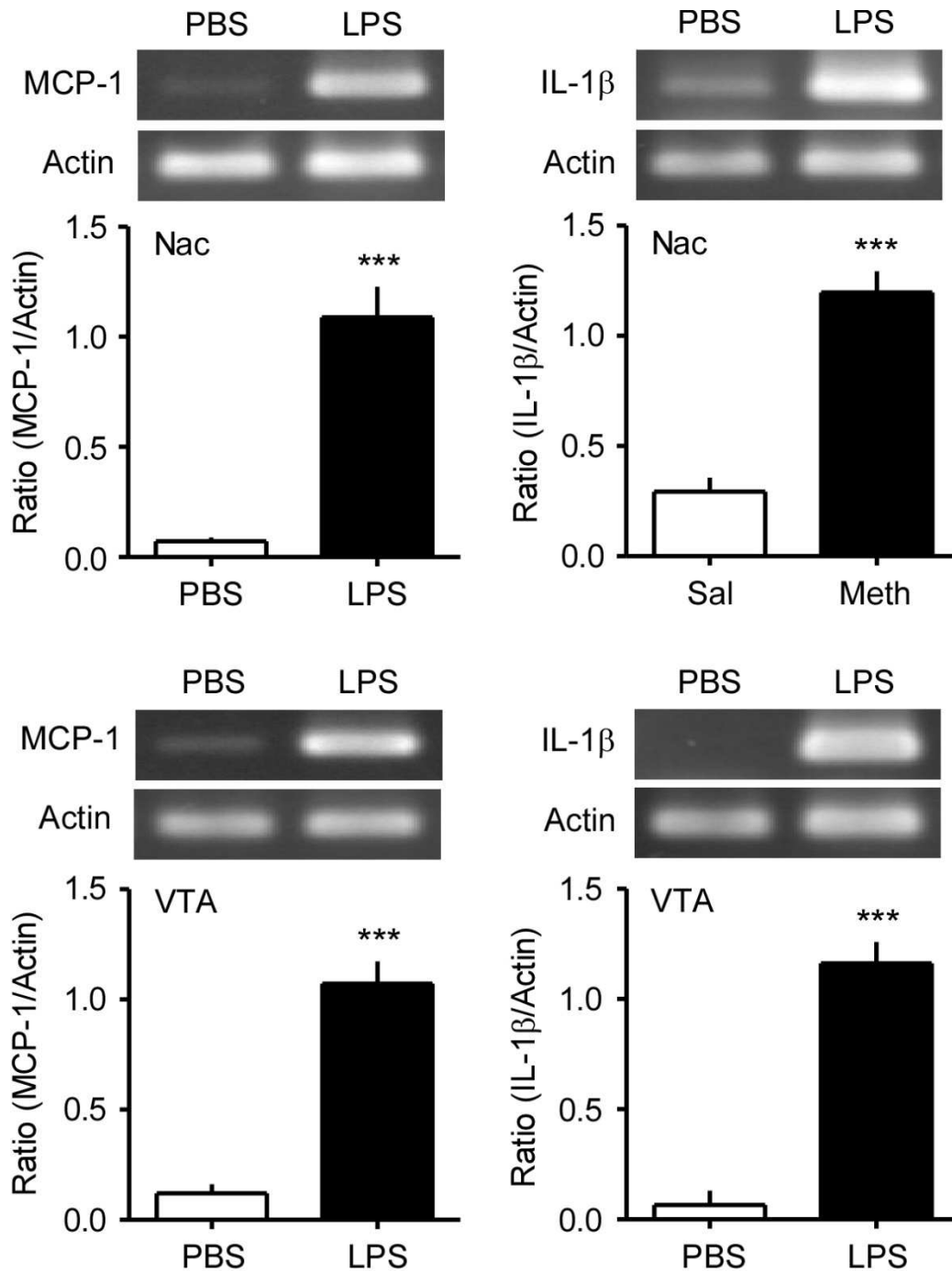


図 6 : LPSによる炎症メディエーター発現増加

Lipopolysaccharide (LPS, 3  $\mu$ g, i.c.v.) を投与し、1 日後における側坐核

(Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) の RT-PCR を行った。データは 5-6 例の平均値±標準誤差で示した。

\*\*\*P<0.01 vs. PBS。

メタンフェタミンの精神的依存形成に及ぼすミクログリアの影響を検討するため、ミクログリア活性化阻害薬として知られるミノサイクリン (Mino; 40 mg/kg, i.p.) をメタンフェタミン処置の 15 分前に投与した。CPP 法による精神的依存形成能に及ぼすミノサイクリンの影響を検討したところ、メタンフェタミン 1 mg/kg により惹起される場所嗜好性はミノサイクリンの前処置により有意に抑制された。しかしながら、Saline 処置に対してミノサイクリンは有意な影響を及ぼさなかった (図 7)。この結果はメタンフェタミンの精神的依存形成にミクログリアの活性化が密接に関与することを示唆している。

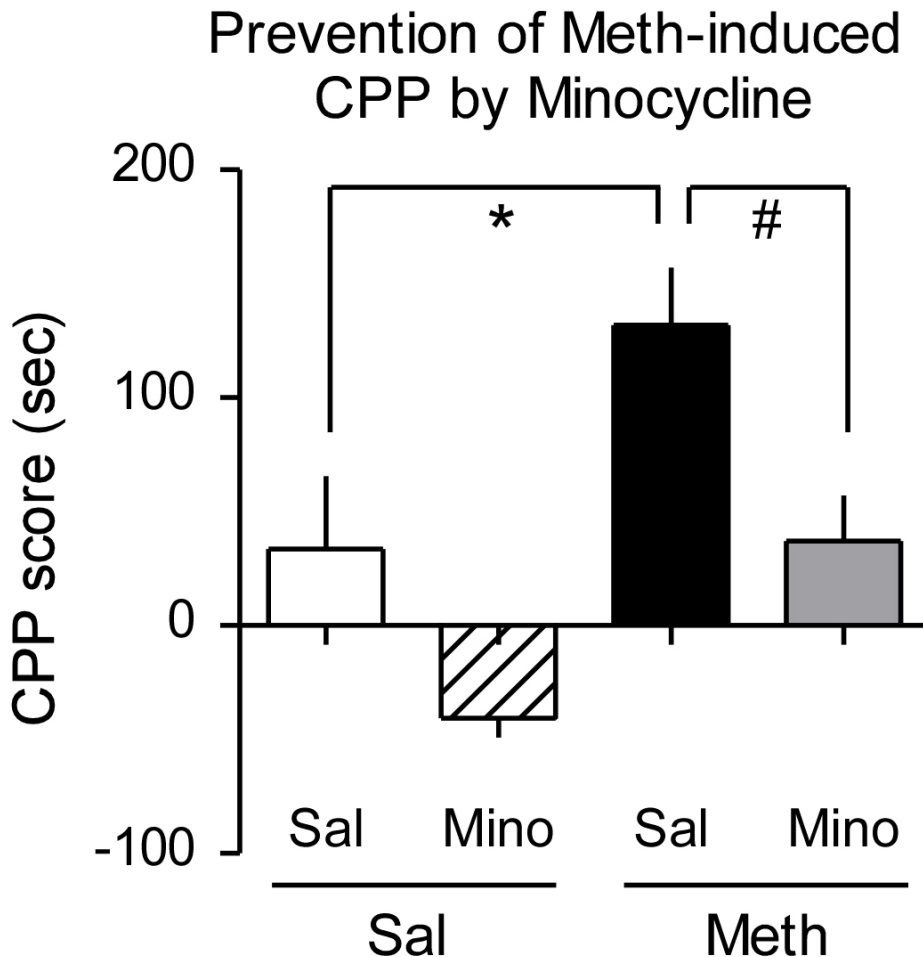


図 7 : ミノサイクリンによるMeth依存抑制効果

Minocycline (Mino, 40 mg/kg, i.p.) を Methamphetamine (Meth, 1 mg/kg, s.c.) 投与 15 分前に処置し、CPP 法により精神的依存に及ぼす影響形成を評価した。

データは 5-10 例の平均値±標準誤差で示した。

\*P<0.05 vs. Saline (Sal) + Sal、#P<0.05 vs. Sal+Meth。

メタンフェタミン以外の依存性薬物によっても同様の神経炎症が誘導されることを明らかにするため、コカインを用いて精神的依存形成能および炎症性サイトカインの発現効果について観察した。CPP 法において、コカイン 20 mg/kg による CPP スコアの増加が認められ、精神的依存が形成されることを確認した (図 8)。

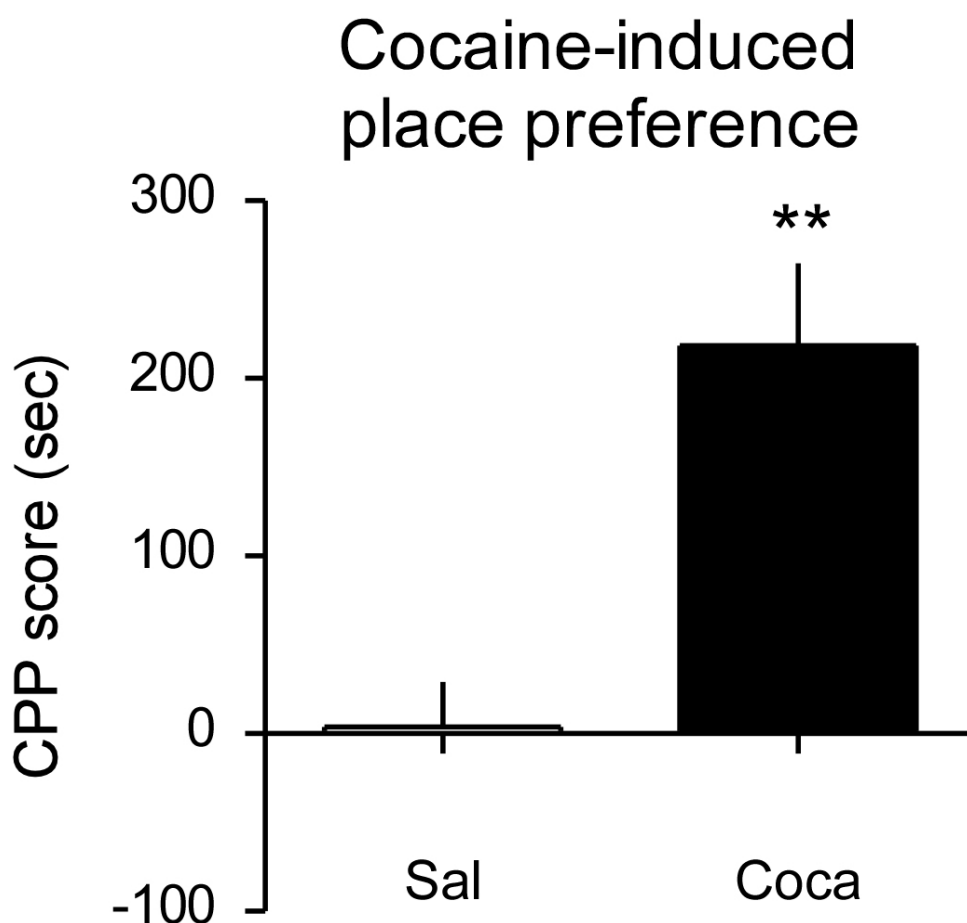


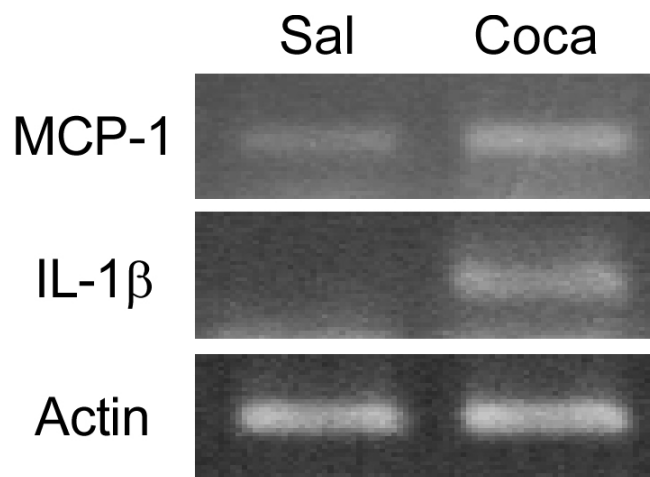
図 8 : コカインによる精神的依存形成

CPP 法を用い、Cocaine (Coca, 20 mg/kg, i.p.) による精神的依存形成を評価した。

データは 4 例の平均値±標準誤差で示した。\*\*P<0.01 vs. Saline (Sal)。



さらに CPP 法におけるコカイン処置スケジュールに従い、コカイン 20 mg/kg を 1 日間隔で 3 回投与し、最終投与 2 日後の側坐核における MCP-1 および IL-1 $\beta$  の発現を RT-PCR によって評価した。その結果、メタンフェタミンと同様にコカイン反復投与により側坐核における MCP-1 および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現増加が認められた (図 9)。



**図 9 : Cocaによる炎症メディエーター発現増加**

Cocaine (Coca; 20 mg/kg, i.p.) を 1 日おきに 3 回投与し、その 2 日後における側坐核 (Nucleus accumbens; Nac) および腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) の RT-PCR を行った。

## 4 その他

### 考察

本研究では、ミクログリアが核となる神経炎症がメタンフェタミンおよびその他の依存性薬物により形成されるクロス・アディクションの病態生理学的分子基盤を担うという仮説について検証した。ミクログリアは様々な条件下で活性化されることが知られ、多くの難治性中枢神経疾患の調節に重要な役割を果たすと考えられている<sup>7)</sup>。例えば神経障害性疼痛においては、疼痛伝達の中継点である脊髄において顕著なミクログリアの活性化が認められる。ミクログリアの活性化に関与する分子の阻害薬が神経障害性疼痛に有効であることが報告されて以降、ミクログリアは慢性疼痛の病態生理を理解する上で不可欠の要素として位置づけられている<sup>8)</sup>。慢性疼痛に関する多くの研究がミクログリアを標的としたアプローチにシフトしていったことから、その重要性ならびに注目度は極めて高いものであるといえる。また脊髄損傷や多発性硬化症などの中枢神経炎症性疾患に加え、脳梗塞時の虚血障害などにおいても、ミクログリアの関与が多数報告されており、多くの中枢神経疾患の病態生理においてミクログリアが重要な役割を果たすと考えられる。

通常ミクログリアは静止型として存在しており、細く長い突起を伸長させることで中枢神経系内の環境を監視し、感染や異物の侵入に備えている。微生物感染、薬物やストレスなどにより一度活性化されると、細胞体の肥大化ならびに太く短い突起を特徴とする形態学的変化が認められる。この活性化状態のミクログリアはプロスタノイドや一酸化窒素などの古典的な炎症性物質に加え、様々なサイトカイン、ケモカインおよび神経栄養因子を放出して周囲のグリア細胞または神経細胞に働きかける。これらの因子の代表的なものとしてはインターロイキン類や脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor) などが知られている。ミクログリアは病態時においては神経・グリア細胞に対して傷害効果を示すものの、前述の通り通常は免疫担当細胞としてホメオスタシスの維持に必要不可欠の役割を担っている<sup>4)</sup>。すなわち、その性質は諸刃の剣であり、状況に応じてミクログリアの機能を効果的に調節できる方法が確立できれば治療上有用であると考えられる。現状ではいずれの疾患においてもそのような報告はなく、今後更なる検討が必要とされる。

本研究の結果、メタンフェタミン反復投与により CPP 法における場所嗜好性が惹起

され、用量依存的な精神的依存形成効果が観察された。我々が今回用いた用量は、他の研究グループでも最もよく用いられている用量であり、最も妥当なアプローチにより精神的依存形成を評価できる実験系を確立できたといえる。同様にコカインを用いた場合においても、メタンフェタミンと同等もしくはそれ以上の顕著な精神的依存が形成されることを確認した。同様に、げっ歯類を用いた CPP 法により、モルヒネに代表される多くの依存性薬物による精神的依存形成能が報告されている。CPP 法は薬物が引き起こす報酬効果と装置の環境刺激を関連させる方法として開発されたものである。CPP 法の結果は薬物自己投与法による結果とよく対応しており、操作が簡便であることが利点として挙げられる。そのため、遺伝子改変マウスなどを用いた解析にも対応可能であり、遺伝子工学に基づいた手法を行動薬理的解析へと応用することで依存形成のメカニズム解明を飛躍的に伸展させる可能性を秘めている。本研究の結果では、CPP 法により観察されたメタンフェタミン精神的依存形成は、ミノサイクリンの前処置によって抑制された。ミノサイクリンは本来、抗菌スペクトルの広い抗生物質として感染症によく用いられているが、文献的にはミクログリアの活性化を抑制する薬物として広く支持され<sup>9)</sup>、我々も確認している。メタンフェタミンの場所嗜好性をミノサイクリンが抑制したことは、その精神的依存形成においてミクログリアが極めて重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、これは我々の作業仮説を強く支持するものである。ミノサイクリンのみならず、他の阻害薬物によっても同様の効果が認められることを確認し、本研究成果の裏付けを進めていくことも必要であると考えられる。

ミクログリアの活性化に伴い放出される因子として、サイトカインやケモカインが挙げられる。RT-PCR 解析により、メタンフェタミン投与後の側坐核における IL-1 $\beta$  および MCP-1 の発現増加が認められた。これは覚せい剤が脳内報酬系における神経炎症を惹起することを示唆している。これらの産生源としてはミクログリアが候補として挙げられるが、アストロサイトもまた同様にこれらの因子を放出することが知られている。文献的考察に基づくと、IL-1 $\beta$ の大部分はミクログリアから産生されることが予想されるが、MCP-1 についてはアストロサイトの関与が大きい可能性もある。実際に、神経傷害後の中枢神経系において増加する MCP-1 は主にアストロサイトより放出されると考えられており<sup>10)</sup>、メタンフェタミンによる MCP-1 発現増加についてはその産生源を十分に精査する必要がある。そこでミクログリアを直接的に活性化する薬物である LPS をマウス脳室内に投与し、これらの発現変化を RT-PCR により解析した。LPS 投与 1 日後の側坐核ならびに腹側被蓋野において、前述の特徴を示すミクログリアの顕著な活性化が認められた。この条件下では、側坐核および腹側被蓋野において IL-1 $\beta$  および MCP-1 いずれの mRNA 発現も増加していた。この事実はミクロ

グリアがメタンフェタミン投与後に増加する MCP-1 の産生源である可能性を示唆するものであるが、LPS 投与モデルはメタンフェタミン投与時とは様々な現象において異なっているため、より詳細な検討が必要である。例えば、腹側被蓋野においてはメタンフェタミン投与による顕著な変化は認められなかったものの、LPS の投与では側坐核と同様のミクログリア活性化ならびにサイトカインやケモカインの発現増加が観察されており、このような点も視野に入れて検討する必要がある。

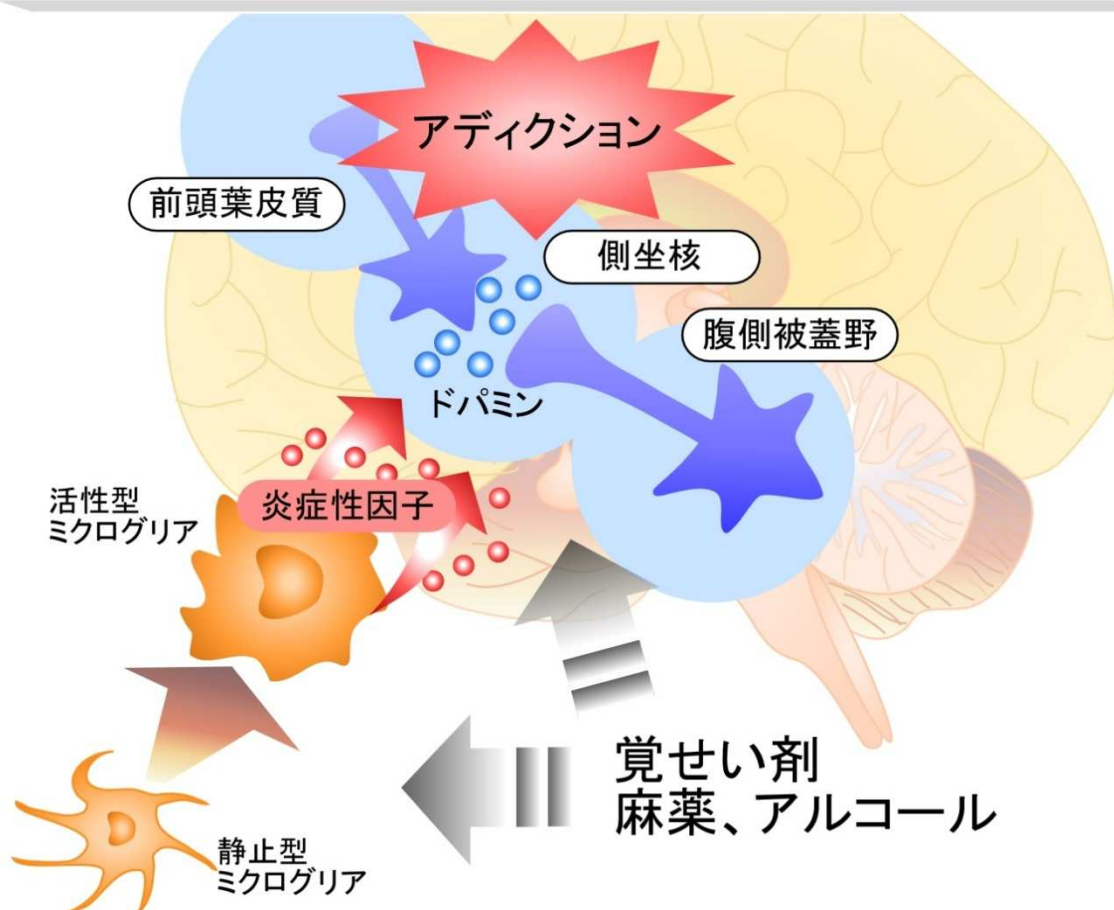
LPS は自然免疫機構の制御において重要なパターン認識受容体的一种であるトール様受容体 4 (Toll-like receptor 4; TLR4) を介して、ミクログリアや末梢におけるマクロファージを活性化させる。そのため、投与された LPS の直接的な作用点はミクログリアであると考えられるが、活性化されたミクログリアが放出する様々な因子はアストロサイトにも働きかける。すなわち、グリア間クロストークにより、ミクログリアとアストロサイトが相互に活性調節を行う点について考慮しなければならない。MCP-1 はケモカイン受容体である CC-chemokine receptor 2 (CCR2) に特異的に作用することが知られており、末梢ではマクロファージに分化する単球の遊走や、マクロファージの活性調節に重要な役割を果たす。中枢神経系において CCR2 は主にミクログリアに発現しており、その分化や活性化を調節する重要な因子である<sup>11)</sup>。アストロサイトが MCP-1 を放出すると、CCR2 を介してミクログリアを活性化させ、IL-1 $\beta$ などの代表的な炎症性メディエーターの産生を亢進するといったカスケードが存在する。このように神経炎症を担うサイトカイン・ケモカインネットワークは極めて複雑であり、神経細胞への影響も含めた病態生理学的機序をより詳細に検討することが求められる。

メタンフェタミンと同様、コカインによっても側坐核における炎症性メディエーターの発現が増加したことは、作用機序の異なる依存性薬物が共通して神経炎症を誘導することを示唆している。コカインは比較的メタンフェタミンと類似しているものの、中枢神経抑制薬であるモルヒネなどのオピオイドは、コカインやメタンフェタミンなどの興奮系の依存性薬物とは作用機序が全く異なる。それでもなお、モルヒネを投与したマウスの様々な脳部位においてミクログリア、アストロサイトの活性化ならびに炎症性メディエーターの産生亢進が報告されている。イブジラストやミノサイクリンなどの薬物を用いて側坐核におけるミクログリアの活性化を阻害すると、CPP 法により評価されるモルヒネの精神的依存形成が抑制される<sup>12)</sup>。また脊髄においてミクログリアおよびアストロサイト由来のサイトカインを阻害すると、モルヒネ反復投与による鎮痛耐性形成が減弱することも報告されている<sup>13)</sup>。加えて、エタノールをマウスに投与しても、脳内のミクログリアが活性化されることが示されている。これらの薬物

はいずれも培養グリア細胞を直接的に活性化する効果を有しており、作用機序が全く異なる薬物が同様にグリア細胞を活性化することは非常に興味深い点である。言い換えれば、これは様々な依存性薬物による精神的依存形成において共通の分子基盤が存在することを裏付けるものでもあり、クロス・アディクションが形成される原因の説明付けを可能にする証拠でもある。しかしながら、全ての現象が同等であるとは考えにくく、薬物毎の相違点についても重視しつつ、各々の薬物の特徴に応じたアプローチを展開していくことも重要である。

本研究の結論として、覚せい剤による精神的依存形成の分子基盤には、グリア細胞と神経細胞のクロストークが核となる神経炎症が存在することが明らかとなり、サイトカイン、ケモカインを含む様々な炎症性メディエーターが関与することが示唆される。また急性効果においては作用機序の全く異なる依存性薬物が、同様のグリア細胞活性化に基づく炎症性メディエーターの産生亢進を惹起し、共通の機構によってクロス・アディクションが形成される可能性もまた示された。神経炎症がどのような機序によって脳内報酬系における可塑的变化をもたらすかなど、検討すべき課題は多く残されているものの、ミクログリアを主軸とした神経炎症を分子標的とすることで、これまでに全く前例のない精神的依存の新たな薬物治療戦略確立の足がかりを得られたといえる。

### 作業仮説: クロス・アディクションにおける中脳ミクログリアの役割



## 参考文献

- 1) Sulzer D: How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69: 628-649, 2011.
- 2) 前田武彦: 覚せい剤精神病および覚せい剤依存の基礎研究における現況. 和歌山医学 61(2): 36-41, 2010.
- 3) Nestler EJ: Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8(11): 1445-1449, 2005.
- 4) Graeber MB: Changing face of microglia: *Science* 330: 783-788, 2010.
- 5) Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G et al.: Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J Neurosci* 28(22), 5756-5761, 2008.
- 6) Crews FT, Zou J, Qin L: Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun* 25(Suppl 1): S4-S12, 2011.
- 7) Miller G: Neuroscience. the dark side of glia. *Science* 308(5723), 778-781, 2005.
- 8) Tsuda M, Inoue K, Salter MW: Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia. *Trends Neurosci* 28(2): 101-107, 2005.
- 9) Ledebner A, Sloane EM, Milligan ED et al.: Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain* 115(1-2): 71-83, 2005.
- 10) Gao Y, Zhang L, Samad OA et al.: JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* 29(13): 4049-4108, 2009.
- 11) Zhang J, Shi XQ, Echeverry S et al.: Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* 27(45): 12396-12406, 2007.
- 12) Schwarz JM, Hutchinson MR, Bilbo SD: Early-life experience decreases drug-induced reinstatement of morphine CPP in adulthood via microglial-specific epigenetic programming of anti-inflammatory IL-10 expression. *J Neurosci* 31(49): 17835-17847, 2011.
- 13) Wang Z, Ma W, Chabot J et al.: Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia. *FASEB J* 2009.

注) 用紙はA4版縦長横書きとし、20頁から25頁程度(約35,000字程度)とすること。(写真、図表の挿入可)