

氏名（本籍）	宮竹 真由美	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第109号	
学位授与年月日	平成18年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Role of astrocytes in the development of synaptic plasticity induced by chronic treatment with drugs of abuse	
論文審査委員	主査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 鎌田 勝雄
	副査	教授 亀井 淳三

論文内容の要旨

緒言

薬物依存は人類が抱える重大な社会問題であり、その解決が切望されている。依存性薬物に対する精神依存の形成および維持には中枢神経系の極めて複雑な情報伝達機構および分子機構が関与すると想定されている。精神依存の形成機序は未だ完全に解明されていないが、依存性薬物に対する精神依存形成時には中枢神経系の可塑的変化が起きていると想定されている。

一方、ほ乳類の中枢神経系は神経細胞と、その数倍もの数のグリア細胞で構成されている。近年、中枢神経系における神経情報伝達効率に対するグリア細胞の重要な役割が認識されるようになってきた。グリア細胞の中でも大部分を占めるアストロサイトは、ほとんど全ての神経伝達物質に対する受容体を発現しており、周辺に存在する神経細胞間でのシナプス伝達により放出された神経伝達物質を受容し、即時的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させることで応答する。さらに、アストロサイトは刺激依存的に神経伝達物質を放出することで、近傍のシナプス伝達効率を制御することができる。また、アストロサイトは細胞外からの様々な刺激を受けて細胞体の肥大化および樹状突起の増加といった形態変化を伴う活性化型になり、その細胞形態を変化させ病巣の修復などに重要な役割を果たすことが知られている。近年、中枢神経系の新生や可塑的変化においてもアストロサイトが重要な役割を有していることが多数報告されている。

これらの背景から、中枢神経系の薬物の詳細な作用機序を理解する上で、アストロサイトへの薬物の作用を考慮する必要があるものと思われる。しかしながら、アストロサイトと神経細胞間での情報伝達機構は未だ不明な点が多く、特にアストロサイトに対する依存性薬

物の作用の詳細は全く分かっていない。そこで本研究では、依存性薬物によって誘発される中枢神経系の神経可塑的变化におけるアストロサイトの役割を詳細に検討した。

依存性薬物によって誘発されるアストロサイトの活性化機構

マウス新生仔大脳皮質由来初代培養アストロサイトに覚せい剤であるメタンフェタミンを処置したところ、アストロサイトのマーカーであるグリア線維由来酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) 様免疫活性の増強、GFAP 陽性細胞の樹状突起の増加といった、アストロサイトの活性化した形態変化が認められた。また、メタンフェタミンによって惹起されるアストロサイトの活性化は細胞内のプロテインキナーゼ C (PKC) の著しいリン酸化を伴っており、選択的 PKC 阻害薬である chelerythrine の処置によって著明に抑制された。さらに、メタンフェタミンを処置したアストロサイトにおいて、ドパミンやグルタミン酸によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 応答が増強した。これらの結果より、メタンフェタミンはドパミンやグルタミン酸に対する感受性の増強を伴ったアストロサイトの活性化を惹起することが明らかとなった。一方、モルヒネを初代培養アストロサイトに処置したところ、アストロサイトの形態変化は認められなかった。しかしながら、大脳皮質由来神経・グリア共培養にモルヒネを処置したところ、PKC 依存的なアストロサイトの活性化が認められた。これらの結果より、モルヒネは神経細胞に由来する PKC を介してアストロサイトの活性化を誘発することが明らかになった。また、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞におけるメタンフェタミンによって誘発されるアストロサイトの活性化は持続的であるのに対し、モルヒネ誘発アストロサイト活性化は一過性であった。さらに、これらの依存性薬物の間欠投与により形成される自発運動促進作用に対する逆耐性の持続性を検討したところ、メタンフェタミンに対する逆耐性はメタンフェタミン休薬 2 ヶ月においても維持されたままであった。一方、モルヒネを間欠投与することにより形成されたモルヒネ誘発自発運動促進作用に対する逆耐性は、モルヒネ休薬 2 ヶ月後にはすでに消失していた。以上の結果から、メタンフェタミンとモルヒネの慢性処置によって発現する逆耐性の持続の相違は、アストロサイトに対する両薬物の作用の相違に起因する可能性が考えられる。興味深いことに、メタンフェタミンを間欠投与したマウスの側坐核および帯状回領域において PKC 依存的なアストロサイトの活性化が認められた。この結果より、メタンフェタミン誘発逆耐性形成下には PKC に依存したアストロサイトの活性化が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

メタンフェタミン精神依存形成機構におけるグルタミン酸神経系と PKC による神経-アストロサイト情報伝達機構

大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞にグルタミン酸を処置したところ、PKC に依存的

なアストロサイトの活性化が認められた。さらに、グルタミン酸によって惹起される神経細胞およびアストロサイト細胞内 Ca^{2+} 応答は PKC 阻害薬である chelerythrine により抑制され、PKC 活性化薬である phorbol 12, 13-dibutyrate の処置により増強した。これらのことより、神経およびアストロサイトにおけるグルタミン酸を介した情報伝達機構に PKC が極めて重要な制御を行っている可能性が示唆された。

一方、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞にメタンフェタミンを処置したところ、神経細胞およびグリア細胞内において著明な PKC の活性化が認められた。さらに、メタンフェタミンを処置した神経細胞において、グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 上昇は有意に増強した。また、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞におけるメタンフェタミン誘発アストロサイト活性化は *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体 NR2B サブユニット拮抗薬である ifenprodil、 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体拮抗薬である 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) もしくはグループ I 代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬である 2-methyl-6(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) を処置することにより抑制された。さらには、メタンフェタミンを慢性投与することによって誘発される報酬効果の形成も、ifenprodil、DNQX もしくは MPEP の処置により抑制された。これらの結果から、メタンフェタミンによって神経細胞内およびアストロサイト細胞内の PKC の活性化が引き起こされ、神経-アストロサイト間でのグルタミン酸を介した情報伝達が活性化することが、メタンフェタミンに対する報酬効果の形成に少なくとも一部関与している可能性が示唆された。

依存性薬物に対する精神依存形成機構におけるアストロサイトの役割

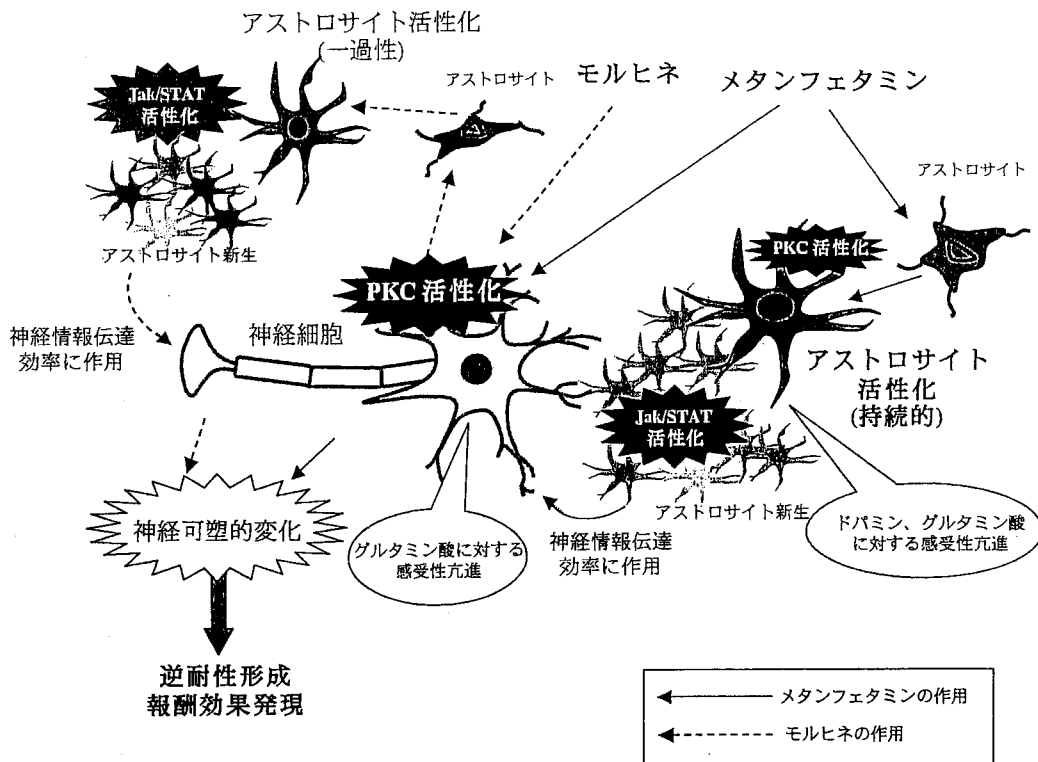
依存性薬物に対する精神依存形成時におけるグリアの役割を検討する目的で、グリア細胞の機能を制御する 3-methyl-1-(5-oxohexyl)-7-propylxanthine (propentofylline) をマウスに処置したところ、メタンフェタミンおよびモルヒネ誘発報酬効果の形成は有意に抑制された。さらに、アストロサイトに由来する液性因子を大量に含んだアストロサイトの培養上清 (astrocyte-conditioned medium: ACM) をマウスの側坐核領域に投与したところ、メタンフェタミンやモルヒネに対する報酬効果の形成が増強した。また、ACM によるメタンフェタミン誘発報酬効果の増強およびモルヒネ誘発報酬効果の発現と増強は、選択的 Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Jak/STAT) 阻害薬である α -cyano-(3,4-dihydroxy)-*N*-benzylcinnamide (AG490) の処置により抑制された。さらに、ACM を上皮増殖因子 (EGF) 除去後の神経幹細胞に処置したところ、GFAP 陽性アストロサイトへの分化誘導が起これ、この作用は AG490 により抑制された。また、マウスの帯状回領域に ACM を投与したところ、メタンフェタミンやモルヒネ誘発報酬効果の形

成が増強した。しかしながら、線条体に ACM を投与してもこれら薬物に対する報酬効果の形成に何ら影響を及ぼさなかった。一方、ミクログリアの培養上清をマウスの側坐核領域に投与したが、メタンフェタミンやモルヒネ誘発報酬効果の形成に変化は認められなかった。以上の結果より、側坐核領域および帯状回領域において、アストロサイトから放出される液性因子は Jak/STAT を介して依存性薬物の報酬効果形成を促進的に制御している可能性が示唆された。

結語

本研究の結果から、依存性薬物の慢性処置によって中枢神経系では神経細胞-アストロサイト間のコミュニケーションの変化が起きている可能性が示唆された。また、依存性薬物の慢性投与によって誘発される逆耐性や報酬効果の形成時における中枢神経系の可塑的变化時には、アストロサイトが極めて促進的な役割を果たしていることが明らかになった。

薬物依存形成時における神経細胞-アストロサイト間の情報伝達機構の模式図



論文審査の結果の要旨

薬物依存の形成機序は未だ完全に解明されていないが、依存性薬物に対する精神依存形成時には中枢神経系の可塑的変化が惹起される。一方、中枢神経系における神経情報伝達効率に対するグリア細胞の重要な役割が認識されるようになってきている。グリア細胞の中でも大部分を占めるアストロサイトは、ほとんど全ての神経伝達物質に対する受容体を発現しており、シナプス伝達により放出された神経伝達物質を受容し、即時的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させることで応答する。さらに、アストロサイトは神経伝達物質を放出することで、近傍のシナプス伝達効率を制御することができる。また、アストロサイトは細胞外の様々な刺激により細胞体の肥大化や樹状突起の増加といった形態変化を伴う活性化型になり、病巣の修復などに重要な役割を果たしている。近年、中枢神経系の新生や可塑的変化にアストロサイトが重要な役割を担っていることが知られている。このような背景から、本論文では依存性薬物によって誘発される中枢神経系の神経可塑的変化におけるアストロサイトの役割を詳細に検討している。

マウス新生仔大脳皮質由来初代培養アストロサイトに覚せい剤であるメタンフェタミン (METH) を処置したところ、アストロサイトのマーカーであるグリア線維由来酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) 様免疫活性の増強、GFAP 陽性細胞の樹状突起の増加といった活性化した形態が認められた。また、METH によって惹起されるアストロサイトの活性化は細胞内プロテインキナーゼ C (PKC) の著しいリン酸化を伴っており、選択的 PKC 阻害薬 chelerythrine の処置によって著明に抑制された。さらに、METH を処置したアストロサイトでは、ドパミンやグルタミン酸によって誘発される細胞内 Ca^{2+} 応答が増強した。これらの結果より、METH はドパミンやグルタミン酸に対する感受性の増強を伴ったアストロサイトの活性化を惹起することが明らかとなった。一方、モルヒネを初代培養アストロサイトに処置したところ、アストロサイトの形態変化は認められなかった。しかしながら、大脳皮質由来神経・グリア共培養にモルヒネを処置したところ、PKC 依存的なアストロサイトの活性化が認められた。これらの結果より、モルヒネは神経細胞に由来する PKC を介してアストロサイトの活性化を誘発することが明らかになった。また、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞における METH 誘発アストロサイトの活性化は持続的であるのに対し、モルヒネ誘発アストロサイト活性化は一過性であった。さらに、これらの

依存性薬物の間欠投与により形成される自発運動促進作用に対する逆耐性の持続性を検討したところ、METH に対する逆耐性はMETH 休薬2ヶ月においても維持されたままであった。一方、モルヒネの間欠投与により形成されたモルヒネ誘発自発運動促進作用に対する逆耐性は、モルヒネ休薬2ヶ月後にはすでに消失していた。以上の結果から、METH とモルヒネの慢性処置によって発現する逆耐性の持続の相違は、アストロサイトに対する両薬物の作用の相違に起因する可能性が考えられる。興味深いことに、METH を間欠投与したマウスの側坐核および帯状回領域においてPKC 依存的なアストロサイトの活性化が認められている。この結果より、METH 誘発逆耐性形成下にはPKC に依存したアストロサイトの活性化が重要な役割を担っている可能性を示唆している。

大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞にグルタミン酸を処置すると、PKC 依存的なアストロサイトの活性化が認められた。さらに、グルタミン酸によって惹起される神経細胞およびアストロサイト細胞内 Ca^{2+} 応答はPKC 阻害薬により抑制され、PKC 活性化薬で増強された。これらのことより、神経およびアストロサイトにおけるグルタミン酸を介した情報伝達機構にPKC が極めて重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

一方、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞にMETH を処置したところ、細胞内PKC の著明な活性化が認められた。さらに、METH を処置した神経細胞において、グルタミン酸誘発細胞内 Ca^{2+} 上昇は有意に増強した。また、METH 誘発アストロサイト活性化は *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体 NR2B サブユニット拮抗薬 ifenprodil、 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体拮抗薬 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) もしくはグループ I 代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬 2-methyl-6(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) の処置により抑制された。さらに、METH 慢性投与によって誘発される報酬効果も、ifenprodil、DNQX および MPEP により抑制された。これらの結果から、METH によって神経およびアストロサイト細胞内の PKC が活性化され、神経-アストロサイト間でのグルタミン酸を介した情報伝達の活性化が、METH に対する報酬効果の形成に少なくとも一部関与している可能性が示唆された。

グリア細胞の機能を制御する 3-methyl-1-(5-oxohexyl)-7-propylxanthine (propentofylline) の処置により、METH およびモルヒネ誘発報酬効果は有意に抑制された。さらに、アストロサイトの培養上清 (astrocyte-conditioned medium: ACM) をマウスの側坐核領域に投与したところ、METH およびモルヒネ誘発報酬効果は増強された。また、ACM による METH およびモルヒネ誘発報酬効果の増強

は、選択的 Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (Jak/STAT) 阻害薬 α -cyano-(3,4-dihydroxy)-N-benzylcinnamide (AG490) により抑制された。さらに、ACM を上皮増殖因子 (EGF) 除去後の神経幹細胞に処置したところ、GFAP 陽性アストロサイトへの分化誘導が起こり、この作用は AG490 により抑制された。また、マウスの帯状回領域に ACM を投与したところ、METH やモルヒネ誘発報酬効果の形成が増強した。以上の結果より、側坐核および帯状回領域において、アストロサイトから放出される液性因子は Jak/STAT を介して依存性薬物の報酬効果を促進的に制御している可能性が示唆された。

本研究結果から、依存性薬物の慢性処置によって神経細胞-アストロサイト間のコミュニケーションの変化が起きている可能性が示唆された。また、依存性薬物の慢性投与によって誘発される逆耐性や報酬効果の形成時における中枢神経系の可塑的变化時には、アストロサイトが極めて促進的な役割を果たしていることを明らかにしている。

本論文で覚せい剤やオピオイドの依存形成にアストロサイトが重要な役割を果たしていることを明らかにしたことは、薬物依存の研究に大きく貢献し、依存症の治療にも今後応用できるものと考えられる。本論文は英文で正確に記載されており、博士（薬学）の学位に値する内容と判断する。