

薬物依存症と行動嗜癖の神経メカニズムに関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2022-11-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: 金沢大学
URL	http://hdl.handle.net/2297/00068066

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文

薬物依存症と行動嗜癖の神経メカニズム に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬理学研究室

学 籍 番 号 1929012008

氏 名 張 彤

主任指導教員名 金田 勝幸

目次

第1章 はじめに

- 1-1. 緒言 3
- 1-2. 略語 5
- 1-3. 使用試薬 6

第2章 コカイン探索行動の獲得と発現における内側前頭前野 (mPFC) の興奮性および抑制性ニューロンの役割

- 2-1. 序文 7
- 2-2. 方法 8
 - 2-2-1. 使用動物
 - 2-2-2. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製および精製
 - 2-2-3. mPFC 内へのウイルス注入手術
 - 2-2-4. ウイルス注入部位の確認
 - 2-2-5. in situ ハイブリダイゼーションおよび蛍光免疫組織化学
 - 2-2-6. mPFC スライス標本の作製
 - 2-2-7. ホールセルカレントクランプ法
 - 2-2-8. 条件付け場所嗜好性 (CPP) テスト
 - 2-2-9. 統計処理
- 2-3. 結果 12
 - 2-3-1. hM4Di 活性化による mPFC の神経細胞種特異的な活動抑制
 - 2-3-2. mPFC の興奮性あるいは抑制性ニューロンの活動抑制がコカイン探索行動の獲得に与える影響
 - 2-3-3. mPFC の興奮性あるいは抑制性ニューロンの活動抑制がコカイン探索行動の発現に与える影響
- 2-4. 考察 18

第3章 マウスのランニングホイール (RW) 回転行動に対するモチベーション変化に伴う神経活動の時空間的变化

- 3-1. 序文 21
- 3-2. 方法 22
 - 3-2-1. 使用動物
 - 3-2-2. RW 回転行動

3-2-3. RW 回転行動経験後にロックした RW に接触させた場合の RW 回転行動	
3-2-4. 短時間あるいは長時間の RW への接触による RW 回転行動	
3-2-5. c-Fos の免疫組織化学的染色	
3-2-6. c-Fos 陽性細胞数の定量	
3-2-7. 統計処理	
3-3. 結果	24
3-3-1. RW 回転行動のパフォーマンス	
3-3-2. RW 回転行動の経験日数に依存した mPFC、側坐核 (NAc)、線条体 (Str)、 および、外側中核 (LS) の c-Fos 発現変化	
3-3-3. 20-24 日間の RW 回転行動経験後に、ロックした RW に 7-10 日間接触させた場合の モチベーションおよび各脳部位の c-Fos 発現変化	
3-3-4. 短時間、あるいは長時間の RW への接触がモチベーション、および c-Fos 発現に 及ぼす影響	
3-4. 考察	36
第 4 章 おわりに	40
参考文献	41
謝辞	48

第1章はじめに

1-1. 緒言

嗜癖とは、有害な結果をもたらすにもかかわらず、報酬に対して自制できないほどにのめり込んだ状態であると定義され（日本学術会議、2020）、その対象によって物質依存症と行動嗜癖に分類される。麻薬や覚せい剤、近年では危険ドラッグなどの依存性薬物の摂取によって発症する物質依存症、すなわち薬物依存症や、ギャンブル、ゲームなどの行動に対する行動嗜癖は、単なる意志の弱さのために誘導される病態ではなく、統合失調症、うつ病、および、自閉症などと同様に精神疾患である。薬物依存症患者は、薬物に対する過剰な欲求、あるいは、薬物摂取後の錯乱状態などから人命に関わる事件・事故を引き起こすことがある。また、重度の行動嗜癖により、仕事や学業への無関心や家庭内暴力などの問題を引き起こすことがある。したがって、薬物依存症や行動嗜癖に対する治療薬・治療法の開発は、患者自身を回復させるのみでなく、社会的な問題を解決するうえでも極めて重要である。

薬物依存症の原因となる薬物には、コカインや大麻などの麻薬、オピオイド、および、覚せい剤のメタンフェタミンなどがある。薬物依存症には、これらの薬物による強烈な多幸感・報酬効果が、摂取した環境・文脈とともに強固な記憶として蓄えられる形成段階と、その後、薬物を経験した環境などが引き金となり、その記憶が引き出されることで再び薬物を摂取したいという強い渴望感が生じる想起段階がある。コカインは、モノアミン再取り込み阻害剤として、細胞外のドパミン遊離量を増加させることで、強烈な多幸感をもたらすとされており、その乱用者は世界中でおよそ 1400 万人と推計されている（World drug report, 2005）。コカイン報酬記憶の形成と想起には、ドパミン作動性神経細胞が豊富に存在する腹側被蓋野（ventral tegmental area, VTA）とその投射先である内側前頭前野（medial prefrontal cortex, mPFC）、側坐核（nucleus accumbens, NAc）を含む脳内報酬系の活性化と可塑的変化が重要であると考えられている（Kaddis et al., 1995; Ranaldi, 2014）。コカイン摂取により、VTA ドパミン作動性神経細胞では、学習・記憶時に誘導されるのと同様に長期増強が誘導され（Ungless et al., 2001）、それに伴い、VTA の投射先である mPFC や NAc におけるドパミン遊離量が増加し、神経活動上昇や可塑的な変化が引き起こされる（Francis et al., 2019）。これまでの研究から、コカイン関連記憶の形成・想起に mPFC の興奮性および抑制性神経細胞の両方が関与することが示唆されているが（Otis, Dashew and Mueller, 2013; Shinohara et al., 2017）、直接的な因果関係は証明されていない。そこで、本研究の前半では、コカイン報酬記憶の形成および想起における mPFC の興奮性および抑制性神経細胞の役割について検討した。

また、近年、薬物依存症だけでなく、日常生活に悪影響を及ぼすにもかかわらず、ネットやゲームなどの特定の行動にのめり込む行動嗜癖が大きな社会問題となっている。世界保健機関（WHO）2014年の報告では、ゲーム使用障害者数はアメリカでは人口の約0.3-26%、ヨーロッパでは約1-18%と推計されている（WHO meeting report, 2014）。また、厚生労働省による2013年と2017年の調査では、「ネット使用障害」が疑われる患者は成人で推定約421万人、中高生では約93万人（樋口進、2021）にのぼるとされている。さらに、WHOは2018年に「ゲーム障害」を最新版の国際疾病分類に加えた。このような背景から、行動嗜癖に対する治療法・治療薬の開発が求められているが、そのためには分子病態メカニズムの解明が必要である。しかし、行動嗜癖の適切な動物モデルが存在しないため、基礎研究は遅れており、行動嗜癖の脳内メカニズムに関する知見は、ヒトのfMRI研究報告が大部分である（Han et al., 2011; Ko et al., 2009; Sun et al., 2012）。一方、マウスなどの齧歯類は、エサなどの報酬がなくてもランニングホイール（running wheel, RW）を執拗に回転させること、すなわち、RW回転行動に強いモチベーションを示すことが知られている。行動嗜癖では特定の行動に異常に強いモチベーションを示すことから、本研究の後半では、マウスのRW回転行動に着目し、これを行動嗜癖のモデルとして利用することで、その神経メカニズムの解明を試みた。

1-2. 略語

ANOVA	analysis of variance
AAV	adeno associated virus
CNO	clozapine-N-oxide
CPP	conditioned place preference
cRNA	complementary ribonucleic acid
DIG	digoxigenin
DIO	double floxed inverted open-reading-frame
DL-Str	dorsolateral Str
DM-Str	dorsomedial Str
DREADD	Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAD	glutamic acid decarboxylase
HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
i.p.	intraperitoneal injection
IL-mPFC	infralimbic mPFC
LS	lateral septum
mPFC	medial prefrontal cortex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSN	medium spiny neurons
NAc	nucleus accumbens
NAc-C	NAc core
NAc-LS	NAc lateral shell
NAc-MS	NAc medial shell
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PL-mPFC	prelimbic mPFC
RW	running wheel
Str	striatum
vGAT	vesicular GABA transporter
vGLUT	vesicular glutamate transport
VTA	ventral tegmental area
WHO	world Health Organization
WT	wild type

1-3. 使用試薬

3,3'-diaminobenzidine-4 HCl	ナカライテスク (株)、京都
Benzonase	Sigma, St. Louis, MO, USA
CaCl ₂	関東化学工業 (株)、東京
CC/Mount	Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA
Chloral hydrate	ナカライテスク (株)、京都
Clozapine-N-oxide	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Cocaine HCl	武田薬品 (株)、大阪
EGTA	Sigma, St Louis, MO, USA
Entellan New	Merck, Darmstadt, Germany
Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets	Sigma, St Louis, MO, USA
Gluconic acid	和光純薬工業 (株)、大阪
Glucose	Sigma, St Louis, MO, USA
HEPES	同人化学研究所 (株)、熊本
Isoflurane	和光純薬工業 (株)、大阪
KCl	Sigma, St Louis, MO, USA
KOH	和光純薬工業 (株)、大阪
MgCl ₂ · 6H ₂ O	和光純薬工業 (株)、大阪
Na ₂ ATP	Sigma, St Louis, MO, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma, St Louis, MO, USA
Na ₃ GTP	Sigma, St Louis, MO, USA
NaCl	和光純薬工業 (株)、大阪
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Sigma, St Louis, MO, USA
PFA	Sigma, St Louis, MO, USA
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, Alabama
Polyethylenimine	Polysciences, Warrington, USA
R.T.U. ABC Reagent	Vector laboratories, California, USA
Sodium pentobarbital	共立製薬 (株)、東京
Spermine	Sigma, St Louis, MO, USA
Sucrose	ナカライテスク (株)、京都
Triton-X-100	ナカライテスク (株)、京都

第2章 コカイン探索行動の獲得と発現における内側前頭前野（mPFC）の興奮性および抑制性ニューロンの役割

2-1. 序文

コカイン報酬記憶の形成や想起には、VTA から NAc や mPFC へのドパミン作動性神経投射から構成される脳内報酬系の活性化と可塑的变化が関与すると考えられている (Kaddis et al., 1995; Ranaldi, 2014)。これまでの研究から、mPFC の破壊により、コカイン探索行動が阻害されることが明らかになっている (Isaac et al., 1989; Tzschentke and Schmidt, 1999)。しかし、これらの研究ではコカイン関連記憶の形成前に mPFC を破壊しているため、mPFC がコカイン関連記憶の形成・想起のどの段階に関与しているかは不明である。これを解明するためには、コカイン関連記憶の形成および想起の各過程でのみ神経活動を抑制する必要がある。また、mPFC には興奮性ニューロンであるグルタミン酸作動性の錐体ニューロンと抑制性ニューロンである GABA 作動性ニューロンが存在する。したがって、これらの神経細胞種特異的な活動抑制により、コカイン関連記憶の形成・想起における神経細胞種ごとの役割を解明することが必要となる。コカインの反復投与により、mPFC の錐体ニューロンにおいてシナプスと膜の可塑的变化が誘導されることから (Dong et al., 2005; Huang et al., 2007; Muñoz-Cuevas et al., 2013; Nasif et al., 2005; Nasif et al., 2004; Otis and Mueller, 2017; Pena-Bravo et al., 2017)、mPFC の錐体ニューロンはコカイン関連記憶の形成に関与していることが示唆されている。また、コカイン投与により、GABA 作動性ニューロンの抑制性シナプス伝達や興奮性が変化することから (Campanac and Hoffman, 2013; Slaker et al., 2015)、mPFC の GABA 作動性ニューロンもコカイン関連記憶の形成に関与していると考えられる。さらに、コカイン報酬関連記憶の想起時に mPFC 錐体ニューロンが活動上昇を示すことや、mPFC の GABA 作動性ニューロンの興奮性が増大することが報告されているため (Chefer et al., 2011; Miller and Marshall, 2004)、コカイン関連記憶の想起には mPFC の興奮性および抑制性ニューロンの両方が関与することが示唆される。これらの知見は、mPFC 興奮性および抑制性ニューロンの両方がコカイン関連記憶の形成および想起に関与することを示唆しているが、mPFC の神経細胞活動とコカイン関連記憶の形成および想起の直接的な因果関係は証明されていない。

上記を検討するための有用な方法の一つに、薬物報酬効果を検出する条件付け場所嗜好性 (conditioned place preference, CPP) テストが挙げられる (Tzschentke, 1998)。CPP テストでは、条件付けによりコカインなどの依存性薬物の報酬効果とそれを摂取した場所との関連性を学習するコカイン探索行動の獲得段階と、報酬関連記憶が形成された後に、動物 (ラット、マウス) が薬物を

摂取した場所に再び遭遇することで、薬物に関連した記憶を想起し、その場所に長時間滞在するコカイン探索行動の発現段階がある。

本研究では、特定の脳部位の活動を人為的に操作することが可能な化学遺伝学的手法である Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) システム (Armbruster et al., 2007) を細胞種特異的に導入し、CPP テストを用いて、コカイン関連記憶の形成・想起、すなわち、コカイン探索行動の獲得・発現の各段階における mPFC 興奮性および抑制性ニューロンの役割について検討した。

2-2. 方法

2-2-1. 使用動物

実験には雄性の野生型 C57BL/6J (WT) マウスおよび *glutamic acid decarboxylase 67* (*GAD67*) - *Cre* マウス (6~10 週齢) を使用した。動物は室温が一定 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) かつ明暗周期 12 時間の室内で摂食・飲水が自由に行える環境下で飼育した。本研究は金沢大学動物実験委員会の審査・承認を受け、金沢大学動物実験指針を遵守して行い、使用する動物数は最小限に留め、動物に苦痛を与えないよう最大限努力した。

2-2-2. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作製および精製

Lenti-X 293T 細胞 (Clontech, Mountain View, USA) を 60-70% の培養密度まで増殖させ、pHelper, pAAV-DJ および pAAV-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を polyethylenimine で感染させた。60-72 時間の培養後、細胞を回収した。回収した細胞は液体窒素にて 10 分間凍結し、 55°C の水浴で融解した。凍結融解を 3 回繰り返したのち、benzonase を加え、 37°C で 45 分間反応させ、R20A2 ローター (Koki Holdings, 東京) にて 3,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収した。上清は 15%, 25%, 40%, 58% の iodixanol 濃度勾配溶液上に滴下し、50.2Ti ローター (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) にて 48,000 rpm で 1 時間 45 分間超遠心した。40% と 58% iodixanol 溶液の境界線下部 1-2 mm に 18G 針を挿入し、約 3 mL の AAV 溶液を回収した。回収した AAV 溶液は -80°C にて保存した。

2-2-3. mPFC 内へのウイルス注入手術

ペントバルビタールナトリウム (65 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスを脳定位固定装置 (SR-6N, Narishige, 東京) に固定して頭蓋を露出させた後、インジェクションポンプ (Micro4, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA) に接続したマイクロシリンジ (Model 95RN, 26G, Hamilton, Reno, NV, USA) を用いて、両側 mPFC (bregma より吻側に 1.8 mm、外側に 0.35 mm、腹側に 2.5 mm) 内

へのウイルス注入手術を行った。内因性のアセチルコリンには反応せず、clozapine-*N*-oxide (CNO) によってのみ過分極応答を示す変異型アセチルコリン受容体 (hM4Di) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を興奮性ニューロン (CaMKII 陽性ニューロン) に導入できるように設計されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである AAV5-CaMKII-hM4Di-mCherry (UNC Vector Core, Chapel Hill, NC, USA) を WT マウスに、AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (UNC Vector Core) 、または作製した AAV-DJ-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を *GAD67-Cre* マウスに注入した。行動試験に使用した動物に 0.075 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で、電気生理実験に使用した動物に 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で 0.5 μL ずつのウイルスを注入した。注入から少なくとも 2 週間以上の待機期間をおいた後、各試験を行った。

2-2-4. ウイルス注入部位の確認

ペントバルビタールナトリウム (65 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスを開胸し、0.1 M PBS および 4 % PFA を経心灌流することにより全身を固定した。その後、ただちに脳を取り出し、4 % PFA 溶液中で一晩静置することで後固定を行った。次に、30%スクロース溶液に移すことでスクロース置換を行った。その後、脳を粉末状ドライアイスにより凍結し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 30 μm の mPFC を含む冠状切片を作製した。切片をスライドガラスに貼り付け Fluoromount-G により封入した。画像は蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence, 大阪) を用いて取得した。

2-2-5. in situ ハイブリダイゼーションおよび蛍光免疫組織化学

Vesicular glutamate transporter 1 (*vGLUT*) および *GAD67* mRNA を検出するために、ジゴキシゲニン (DIG) 標識 cRNA プローブを作製した。mPFC を含む脳切片を順に、PBS で 5 分間、4% PFA で 15 分間、PBS で 10 分間 2 回、0.3% Triton-X100/PBS で 15 分間、PBS で 5 分間室温にて振盪した。その後、Proteinase K (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.1M Tris-HCl [pH 7.5]/50 mM EDTA) で 30 分間インキュベートした (37°C) 。また、順に 0.75% glycine/PBS 15 分間 2 回、4% PFA 5 分間、PBS 10 分間 2 回、acetylation buffer 15 分間、PBS 5 分間 2 回室温で振盪した。続いて、ハイブリダイゼーションバッファー (50% deionized formamide, 2% blocking reagent, 5 \times SSC (1 \times SSC consists of 0.88% NaCl and 0.44% sodium citrate \cdot 2H₂O) , 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.1% sodium sulfate) 中で 1 時間インキュベートし、プレハイブリダイゼーションを行った。その後、ハイブリダイゼーションバッファー中に cRNA プローブを加え、切片を反応溶液中でインキュベートし (60°C、オーバーナイト)、ハイブリダイゼーションを行った。

翌日、切片を SSC/50% Formamide/0.1% N-lauroylsarcosine にて 20 分間 (50°C) 、2 回洗浄した。続いて、RNase バッファー (0.5 M NaCl, 10 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5) 、10 mM EDTA) で 5 分間インキュベート (室温) した後に、RNase バッファー中に RNase (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、遊離 cRNA

を分解した (37°C)。次に 2×SSC/0.1% N-lauroylsarcosine で 20 分間 2 回、0.2×SSC/0.1% N-lauroylsarcosine で 20 分間 2 回インキュベート (それぞれ 37°C) した。続けて、0.1 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5) で 5 分間室温において振盪した。その後、blocking solution (0.1 M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.5)、0.15 M NaCl、1% blocking reagent) 室温で 1 時間インキュベートし、切片にブロッキングを施した。その後、ヤギ由来抗 mCherry 抗体を 1:500、アルカリフォスファターゼ標識抗ヒツジ DIG 抗体を 1:1000 の希釈濃度で blocking solution に加え、インキュベート (4°C、オーバーナイト) した。

三日目に、切片を順に TS7.5 (0.1M Tris-HCl [pH 7.5]/0.15M NaCl) /0.1% Tween20 にて 20 分間 2 回、14) TS7.5/1% blocking にて 20 分間室温で振盪した。蛍光検出の際には、Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat IgG (1:400; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) で 1 時間インキュベートした。アルカリフォスファターゼによる検出の際には Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets を使用し、45 分間反応させた後に、PBS 中でスライドガラスに貼り付け、CC/Mount で封入した。

2-2-6. mPFC スライス標本の作製

イソフルラン麻酔下、マウスを開胸し、95% O₂/5% CO₂ で通気した氷冷 cutting 液 (92 mM NMDG, 20 mM HEPES, 0.5 mM CaCl₂, 10mM MgSO₄, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM Thiourea, 5 mM ascorbate, 3 mM pyruvate, 12 mM N-acetyl-L-cysteine, 30 mM NaHCO₃, 25 mM glucose, HCl により pH 7.3-7.4 に調製) により、経心灌流を行った。4 mL/min の速度で 6.5 分間灌流した後に素早く脳を取り出し、95% O₂/5% CO₂ で通気した氷冷 cutting 液に浸した。マイクロスライサー (VT1200S; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて mPFC スライスを作製し、95% O₂/5% CO₂ で通気した 32-34°C の cutting 液内で 15 分間、室温の normal Ringer (in mM, 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, and 25 glucose bubbled with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4) 液でさらに 45 分以上インキュベートした後に実験に使用した。

2-2-7. ホールセルカレントクランプ法

ステージ固定式顕微鏡 (BX-51, Olympus, 東京) 上に記録チャンバーを置き、95% O₂/5% CO₂ で通気した normal Ringer 液 (33-34°C) を流速 2-2.5 mL/min で灌流させた。この記録チャンバーに脳スライスを置き、赤外線 CCD カメラ (model IR-1000, Dage-MTI, Michigan City, IN, USA) を使用して mCherry 陽性ニューロンからホールセル記録を行った。記録電極はガラスキャピラリー (1B150F-4, World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA) からプラー (Model p-1000, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) を使用して作製し、内液 (150 mM KOH, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 2 mM Na₂ATP, 0.3 mM Na₃GTP, 10 mM HEPES, 0.1 mM spermine, gluconic acid により pH を 7.3-7.4 に調製、

抵抗値 5-8 M Ω) で満たしたものを使用した。データの記録と解析には Multiclamp 700B amplifier および pClamp10 software (Molecular Devices, Foster City, CA, USA) を使用した。

2-2-8. 条件付け場所嗜好性 (CPP) テスト

CPP テストには、換気可能な防音箱内に設置された、着脱可能な仕切りによって分けられる 2 つの部屋 (それぞれ 15 × 24 × 30 cm) から成る装置を用いた (Fig. 1)。この装置では動物が触覚的、視覚的に 2 つの部屋を識別できる。一方の部屋は床面が滑らかで壁面と床が黒色の部屋と、もう一方は床面が凹凸で壁面と床が白色の部屋から構成される。1 日目の午前に馴化、それから 4 時間以上経過した後にプレテストを行った。プレテストでは、2 つの部屋を 900 秒間マウスに自由探索させ、その間の各部屋における滞在時間と運動量を ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)、または Smart 3.0 software (Panlab Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A) を用いて解析した。この時、一方の部屋における滞在時間が測定時間の 80%以上、つまり 720 秒以上の場合、あるいは馴化時とプレテストで一方の部屋における滞在時間が 200 秒以上変化した場合はそのデータを除外した (WT, $n = 4$; *GAD67-Cre*, $n = 2$)。プレテストにおいて、マウスの滞在時間が短かった部屋を cocaine-paired compartment とした。2-5 日目の間は、午前中マウスに生理食塩水 (10 mL/kg, i.p.) を投与し、cocaine-paired compartment とは別の部屋に 30 分間閉じ込めた。それから 4 時間以上経過した後にコカイン (20 mg/kg, i.p.) を投与し、cocaine-paired compartment に 30 分間閉じ込め、条件付けを行った。6 日目は、プレテストと同様に、マウスに 900 秒間 2 つの部屋を自由探索させ、各部屋における滞在時間と運動量を測定した (ポストテスト)。CNO (10 mg/kg, i.p.)、または vehicle (生理食塩水 10 mL/kg, i.p.) をコカイン条件づけ、あるいは、ポストテストの 30 分前に投与した。CPP score は、ポストテストとプレテストの cocaine-paired compartment における滞在時間の差として算出した。

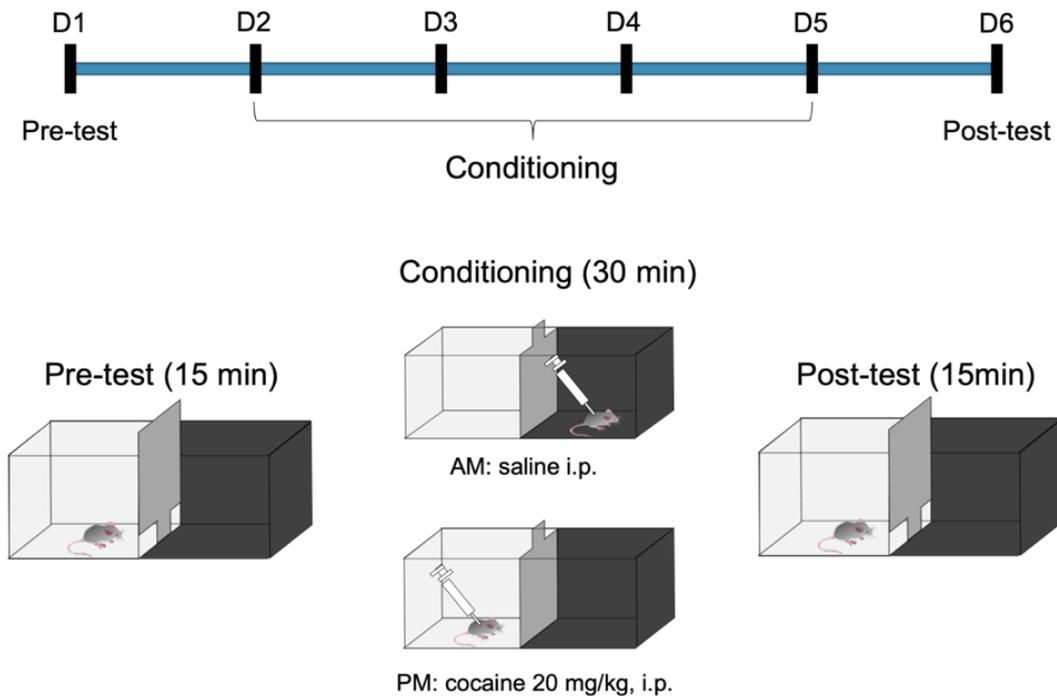


Fig.1 CPP テスト

2-2-9. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で表記した。統計解析は GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, California)で、Student's *t*-test、または two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) を用いて、Sidak's *post hoc* test を行った。結果は $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。

2-3. 結果

2-3-1. hM4Di 活性化による mPFC の神経細胞種特異的な活動抑制

AAV-DJ-CaMKII-hM4Di-mCherry を WT マウスの mPFC に注入することで、mPFC 興奮性ニューロン特異的な hM4Di-mCherry の発現が可能であるかを *in situ* ハイブリダイゼーション法および蛍光免疫組織化学を用いて検討した (Fig. 2A, B)。その結果、mCherry 陽性細胞 (緑) は、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである *vGLUT1* mRNA 陽性 (赤) であった。したがって、mPFC 興奮性ニューロン特異的に hM4Di-mCherry が発現していることが確認された。

mPFC スライス標本を用いて、hM4Di-mCherry 陽性ニューロンからホールセルカレントクランプ記録を行い、hM4Di のリガンドである CNO (10 μ M) バス適用による膜電位変化について検討した (Fig. 2C, D)。その結果、CNO 適用により、CNO 適用前 (control) と比べて、膜電位の有意な過

分極が認められた。これに対して、hM4Di-mCherry 陰性ニューロンから記録を行ったところ、CNO 適用前後において、膜電位に有意な変化は認められなかった (Fig. 2D, interaction, $F_{1,8} = 80.1$, $p < 0.0001$; hM4Di, $F_{1,8} = 7.39$, $p = 0.0263$; CNO, $F_{1,8} = 74.0$, $p < 0.0001$)。これらの結果から、CNO 適用により hM4Di-mCherry 陽性 mPFC 興奮性ニューロンにおいて過分極応答が誘導されることが確認された。

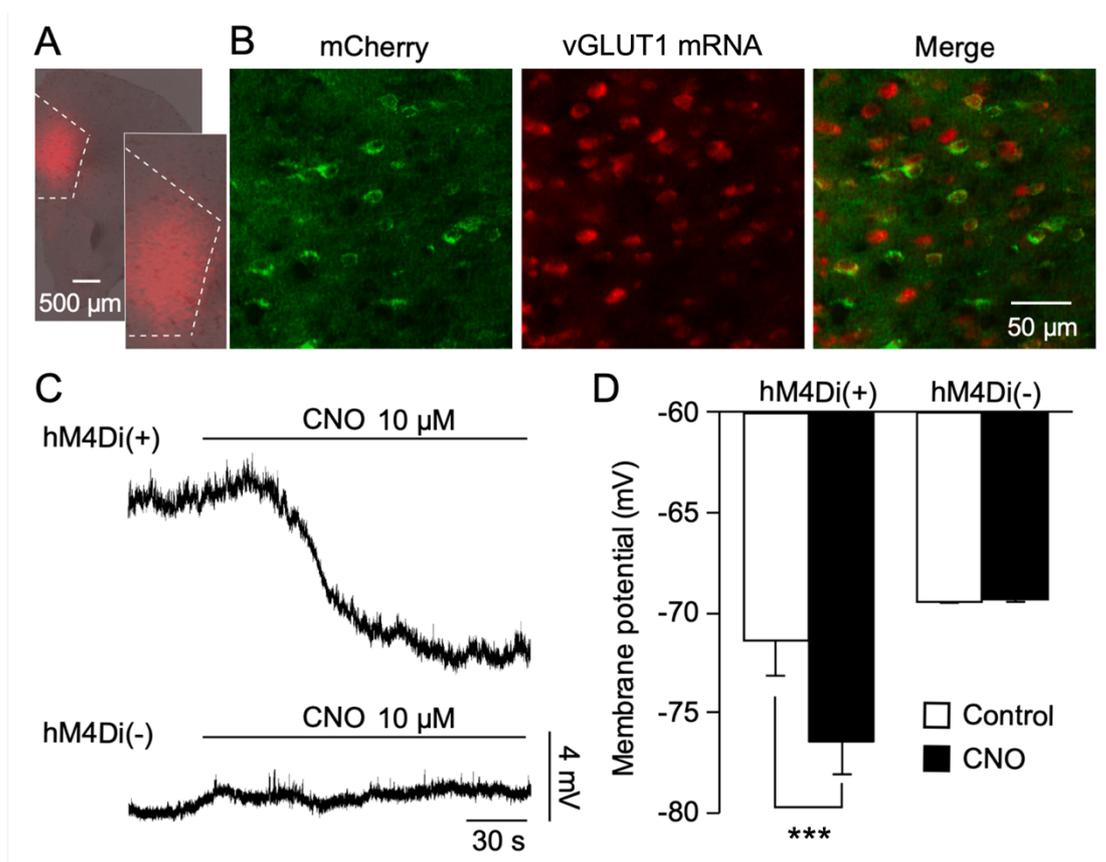


Fig. 2 CNO 適用による hM4Di-mCherry 陽性 mPFC 興奮性ニューロンの過分極応答

A) mPFC における AAV-DJ-CaMKII-hM4Di-mCherry 感染部位の典型例。B) In situ ハイブリダイゼーションの代表画像。mCherry (緑)、vGLUT1 mRNA (赤)、および、これらを重ね合わせた像 (Merge)。C) CNO 適用前後の膜電位トレースの典型例。D) CNO 適用前後の膜電位変化。n = 5, *** $p < 0.001$.

次に、AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry あるいは AAV-DJ-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を *GAD67-Cre* マウスの mPFC に注入することで、mPFC 抑制性ニューロン特異的に hM4Di-mCherry が発現するかを in situ ハイブリダイゼーション法および蛍光免疫組織化学を用いて検討した (Fig.3A, B)。その結果、mCherry 陽性細胞 (緑) は、GABA ニューロンのマーカーである *GAD67* mRNA 陽性 (赤) で

あった。したがって、mPFC 抑制性ニューロン特異的に hM4Di-mCherry が発現していることが確認された。

mPFC スライス標本を用いて、hM4Di-mCherry 陽性ニューロンからホールセルカレントクランプ記録を行い、CNO (10 μ M) バス適用による膜電位変化について検討した (Fig.3C, D)。その結果、CNO 適用により、CNO 適用前 (control) と比較して、膜電位の有意な過分極が認められた。これに対して、hM4Di-mCherry 陰性ニューロンでは、膜電位の有意な変化は認められなかった (Fig. 3D, interaction, $F_{1,8} = 118, p < 0.0001$; hM4Di, $F_{1,8} = 0.0144, p = 0.908$; CNO, $F_{1,8} = 74.4, p < 0.0001$)。これらの結果から、CNO 適用により hM4Di-mCherry 陽性 mPFC 抑制性ニューロンにおいて過分極応答が誘導されることが確認された。

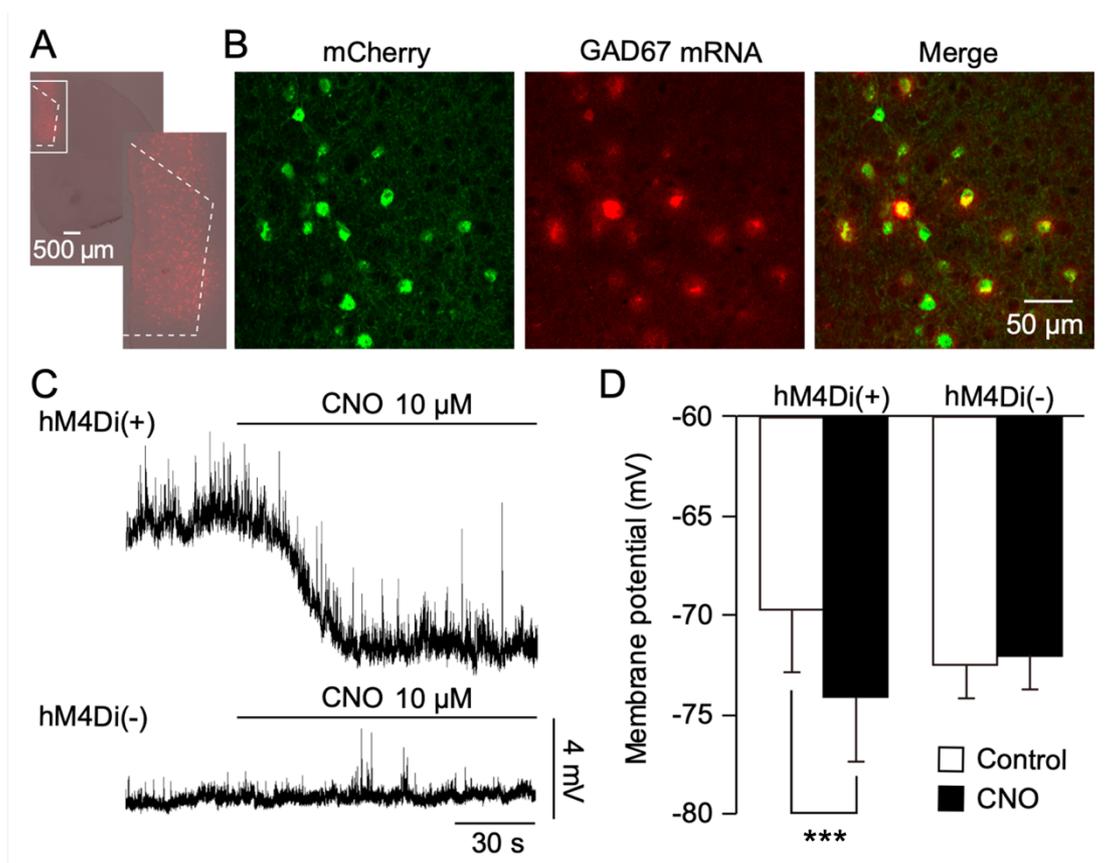


Fig. 3 CNO 適用による hM4Di-mCherry 陽性 mPFC 抑制性ニューロンの過分極応答

A) mPFC における AAV-DJ-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry 感染部位の典型例。B) In situ ハイブリダイゼーションの代表画像。mCherry (緑)、GAD67 mRNA (赤)、および、これらを重ね合わせた像 (Merge)。C) CNO 適用前後の膜電位トレースの典型例。D) CNO 適用前後の膜電位変化。n = 5, *** $p < 0.001$.

2-3-2. mPFC の興奮性あるいは抑制性ニューロンの活動抑制がコカイン探索行動の獲得に

与える影響

コカイン探索行動の獲得段階に mPFC 興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの活性化が関与しているか否かを明らかにするために、mPFC の興奮性ニューロンにのみ hM4Di-mCherry を発現させたマウス (WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウス) および mPFC の抑制性ニューロンにのみ hM4Di-mCherry を発現させたマウス (*GAD67-Cre*^{mPFC}/hM4Di マウス) に対して、コンディショニング 30 分前に CNO (10 mg/kg) の腹腔内投与を行い、コカイン CPP の獲得に及ぼす影響を検討した (Fig. 4A)。

WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスにおいて、vehicle 投与群では、ポストテストでの cocaine-paired compartment 滞在時間がプレテストでの滞在時間と比較して有意に増加したが、CNO 投与群では有意な変化は認められなかった (Fig. 4B, interaction, $F_{1,8} = 14.6, p = 0.0051$; cocaine conditioning, $F_{1,8} = 32.9, p = 0.0004$; CNO, $F_{1,8} = 0.735, p = 0.416$)。また、vehicle 投与群と比較して、CNO 投与群の CPP score は有意に減少した (Fig. 4C, $t_8 = 3.82, p = 0.0051$)。一方で、コンディショニングおよびポストテスト中の運動量は、vehicle 投与群と CNO 投与群の間で有意な差を認めなかった (Fig. 4D, interaction, $F_{1,8} = 0.703, p = 0.426$; cocaine conditioning, $F_{1,8} = 35.5, p = 0.0003$; CNO, $F_{1,8} = 0.0385, p = 0.849$; Fig. 4E, $t_8 = 0.220, p = 0.832$)。

次に、*GAD67-Cre*^{mPFC}/hM4Di マウスにおいて同様の検討を行ったところ、vehicle 投与群と CNO 投与群のポストテストでの cocaine-paired compartment 滞在時間は、プレテストでの滞在時間と比較して両群とも有意に増加した (Fig. 4F, interaction, $F_{1,8} = 2.20, p = 0.176$; cocaine conditioning, $F_{1,8} = 108, p < 0.0001$; CNO, $F_{1,8} = 0.132, p = 0.726$)。また、CPP score に両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 4G, $t_8 = 1.48, p = 0.176$)。さらに、運動量についても両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 4H, interaction, $F_{1,8} = 1.92, p = 0.203$; cocaine conditioning, $F_{1,8} = 121, p < 0.0001$; CNO, $F_{1,8} = 1.76, p = 0.221$; Fig. 4I, $t_8 = 0.00842, p = 0.994$)。

これらの結果から、コカイン探索行動の獲得に mPFC 興奮性ニューロンの活性化が関与していることが示唆された。

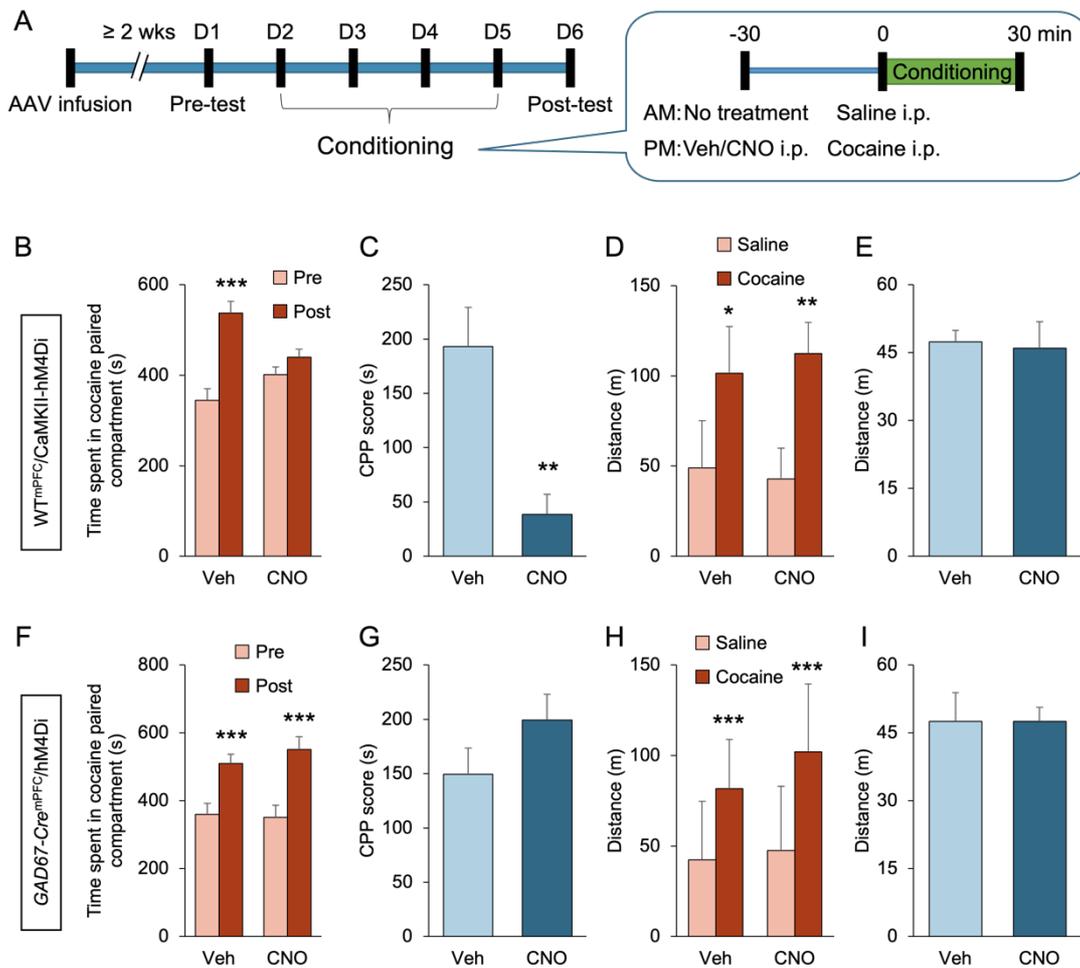


Fig. 4 コカイン CPP の獲得における mPFC 興奮性および抑制性ニューロンの関与

A) 実験スケジュール。B, F) 各群のプレテスト (Pre) およびポストテスト (Post) における cocaine-paired compartment 滞在時間。C, G) 各群の CPP score。D, H) 各群コンディショニング 4 日目における saline 投与および cocaine 投与後の運動量。E, I) 各群のポストテスト中の運動量。n = 5 in each group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Veh, vehicle.

2-3-3. mPFC の興奮性あるいは抑制性ニューロンの活動抑制がコカイン探索行動の発現に与える影響

続いて、コカイン探索行動の発現に mPFC 興奮性および抑制性ニューロンの活性化が関与しているか否かを検討するために、WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスおよび GAD67-Cre^{mPFC}/hM4Di マウスに対するポストテスト 30 分前の CNO (10 mg/kg) 腹腔内投与がコカイン CPP の発現に与える影響について検討した (Fig. 5A)。

WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスにおいて、vehicle 投与群と CNO 投与群の両群で、ポストテストでの cocaine-paired compartment 滞在時間はプレテストでの滞在時間と比較して有意に増加した (Fig. 5B, interaction, $F_{1,13} = 5.37$, $p = 0.0375$; cocaine conditioning, $F_{1,13} = 70.7$, $p < 0.0001$; CNO, $F_{1,13} = 10.7$, $p = 0.0061$)。また、*GAD67-Cre*^{mPFC}/hM4Di マウスにおいても同様の変化が観察された (Fig. 5E, interaction, $F_{1,11} = 0.0366$, $p = 0.852$; cocaine conditioning, $F_{1,11} = 69.1$, $p < 0.0001$; CNO, $F_{1,11} = 4.13$, $p = 0.0669$)。一方で、CPP score を比較したところ、WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスでのみ、vehicle 群と比較して、CNO 投与群で CPP score の有意な低下が観察された (Fig. 5C, $t_{13} = 2.32$, $p = 0.0373$; Fig. 5F, $t_{11} = 0.192$, $p = 0.852$)。なお、ポストテスト中の運動量は、WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスおよび *GAD67-Cre*^{mPFC}/hM4Di マウスにおいて、vehicle 投与群と CNO 投与群の両群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 5D, $t_{13} = 0.0698$, $p = 0.945$; Fig. 5G, $t_{11} = 1.18$, $p = 0.264$)。

これらの結果から、コカイン探索行動の発現に mPFC 興奮性ニューロンの活性化が関与していることが示唆された。

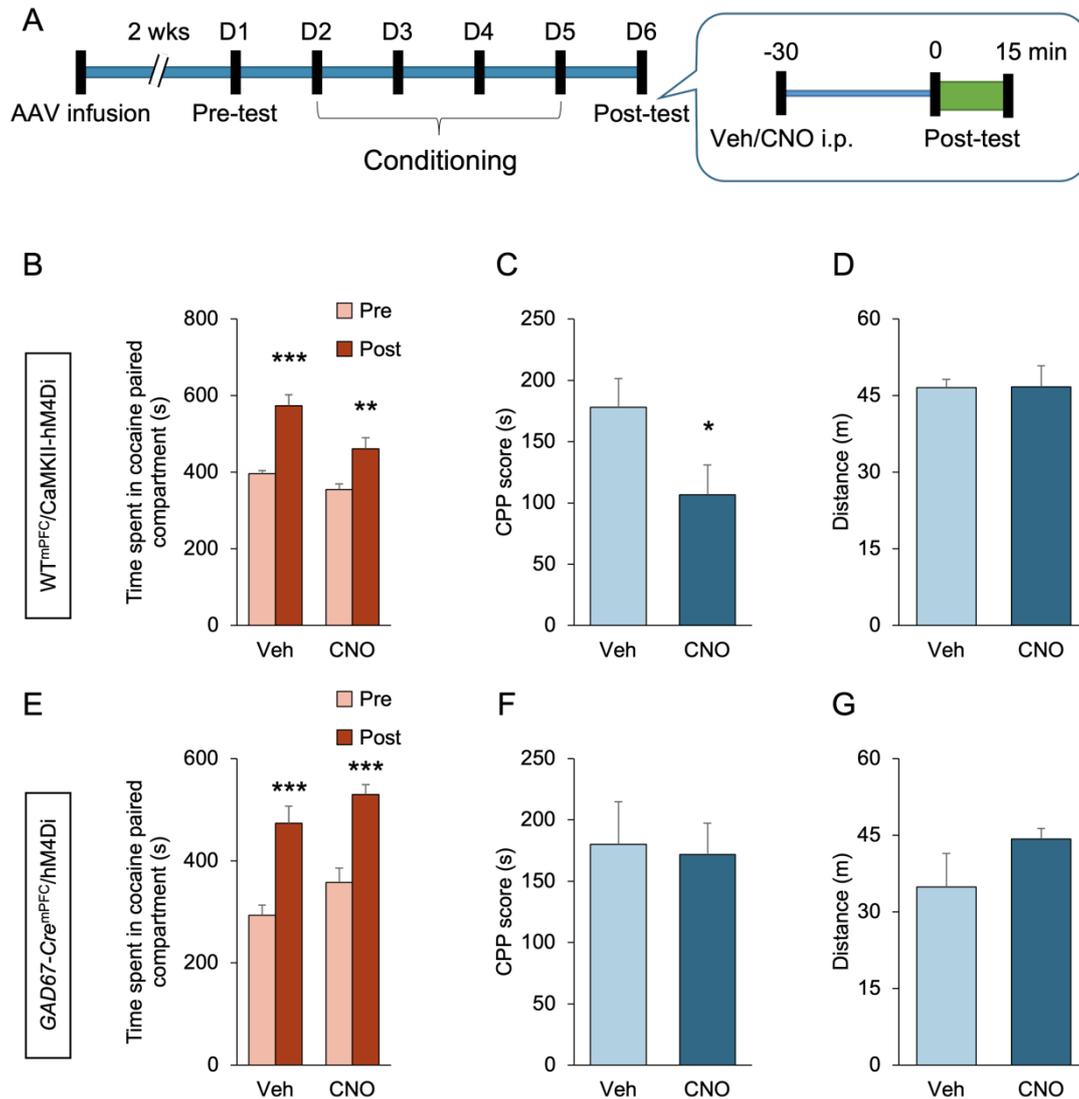


Fig. 5 コカイン CPP の発現における mPFC 興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの関与

A) 実験スケジュール。B, E) 各群のプレテスト (Pre) およびポストテスト (Post) における cocaine-paired compartment 滞在時間。C, F) 各群の CPP score。D, G) 各群のポストテスト中の運動量。n = 6-8, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Veh, vehicle.

2-4. 考察

本章では、コカイン探索行動の獲得と発現における mPFC 興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの役割を以下の通り明らかにした。(1) hM4Di の選択的発現と CNO の投与により、条件づけ中の mPFC 興奮性ニューロンの活動を抑制することで、コカイン CPP が減少した。(2) 化学遺伝学的にポストテスト中の mPFC 興奮性ニューロンを抑制することで、コカイン CPP が減少した。(3) 条

件づけ中、または、ポストテスト中の化学遺伝学的な mPFC 抑制性ニューロンの活動抑制は、コカイン CPP に影響を与えなかった。これらの結果から、mPFC 興奮性ニューロンの活性化がコカイン関連記憶の形成と想起の両方に関与することが示唆された。

先行研究により、D1 受容体刺激により mPFC 興奮性ニューロンが脱分極/興奮すること (Dong et al., 2003; Witkowski et al., 2008)、並びに、オプトジェネティクスを用いた mPFC におけるドパミン神経終末の刺激により mPFC 興奮性ニューロンの活動が上昇することが報告されている (Buchta et al., 2017)。当研究室でもこれまでに、コカイン探索行動の発現に mPFC での D1 受容体を介した神経伝達に関与すること、並びに、mPFC での D1 受容体刺激は mPFC 神経細胞を活性化させることを見出してきた (Shinohara et al., 2017)。また、CPP テスト後のラットの mPFC 興奮性ニューロンにおいて神経活動マーカーである c-Fos の発現が上昇することが報告されている (Otis et al., 2013)。これらの知見から、D1 受容体を介したドパミン神経伝達が、コカイン探索行動の発現過程における mPFC 興奮性ニューロンの活性化に関与している可能性が考えられる。

mPFC の錐体ニューロンは多くの皮質下の脳領域に投射しているが、コカイン CPP の獲得および発現時に活性化される mPFC 錐体ニューロンがどの脳部位に投射するものであるかは未だ不明である。考えられる投射先としては、NAc や VTA が挙げられる。先行研究により、mPFC から興奮性入力を受ける NAc コアのダイノルフィンや D1 受容体を発現する中型有棘神経細胞 (medium spiny neurons, D1-MSN) の活動はコカイン CPP の獲得時および発現時の両方で上昇することが示されている (Calipari et al., 2016)。さらに、我々はポストテスト中に NAc の GABA 作動性ニューロンを阻害することで、コカイン CPP の発現が減弱することを報告しており (Zhang et al., 2018)、ポストテスト中における NAc の GABA 作動性ニューロンの活動上昇が mPFC からの入力を介したものである可能性が示唆されている (Stefanik et al., 2013)。加えて、VTA から mPFC に投射するドパミン作動性ニューロンを光遺伝学的手法、あるいは DREADD を用いて活性化することにより、NAc に投射する mPFC 錐体ニューロンが活性化されることが報告されている (Buchta et al., 2017)。上述のように、コカイン CPP の獲得時および発現時の両方でドパミン神経伝達が亢進していることを考えると、これらの知見は、NAc に投射する mPFC 錐体ニューロンの活性化がコカイン関連記憶の形成と想起の両方に関与することを強く示唆している。また、コカイン CPP の発現段階における NAc に投射する mPFC 錐体ニューロンの活性化は、キューによるコカイン探索行動の再燃時においてドパミン依存的にこれらのニューロンに c-Fos が発現することからも支持される (McGlinchey et al., 2016)。一方、条件づけ中に mPFC でのノルアドレナリン放出が増加し、それにより VTA のドパミン神経が活性化されるという報告から (Ventura et al., 2007)、コカイン関連記憶の形成には mPFC から VTA への神経投射が重要な役割を果たすことが示唆される。さらなる研究が必要であるが、

今回の結果は、NAc と VTA に投射する mPFC 錐体ニューロンの活動が、コカイン CPP テストにおけるコカイン関連記憶の形成と想起の両方に関与している可能性を示している。

本研究では、DREADD を用いて mPFC における GABA 作動性ニューロンを抑制しても、コカイン CPP の獲得と発現のいずれにも影響を与えないことが示された。これは、mPFC の GABA 作動性介在ニューロンの活性化がコカイン CPP の発現に関与しているとする過去の知見と矛盾する (Miller et al, 2004; Miller and Marshall, 2005)。また、mPFC の GABA 作動性ニューロンを DREADD で抑制することで、mPFC 錐体ニューロンの活動が上昇し、コカイン CPP が増強されるのではないかと予測されたが、そのような変化は観察されなかった。コカイン CPP の獲得および発現時に、mPFC 神経細胞の活動がすでに亢進していることを考慮すると、GABA 作動性ニューロンの抑制によるコカイン CPP の変化が観察されなかった一因として、mPFC 錐体ニューロンの活動亢進による天井効果が考えられる。また、過去の研究から、コカイン CPP の発現時における mPFC の GABA 作動性介在ニューロンの活動上昇は、mPFC 錐体ニューロンの活動上昇に対する代償反応であることが示唆されている (Slaker et al., 2015)。したがって、mPFC の GABA 作動性ニューロンの抑制ではなく、その活性化がコカイン CPP の発現を抑制する可能性が考えられる。さらに、*GAD67-Cre^{mPFC}/hM4Di* マウスを用いて mPFC の GABA 作動性ニューロンのサブタイプ非特異的に抑制を行ったことも、本研究で変化が見られなかった一因と考えられる。mPFC には、機能的に異なる数種類の GABA 作動性ニューロンが存在する。ソマトスタチン陽性、およびパルバルブミン陽性の介在ニューロンは、mPFC における抑制性ニューロンの 2 つの主要なサブタイプであり、主に錐体ニューロンの入力と出力をそれぞれ制御している (Hangya et al., 2014; Tremblay et al., 2016)。このため、本研究で行った GAD67 陽性ニューロンの抑制は、mPFC 錐体ニューロンの興奮性に複雑な影響を与えている可能性が考えられる。今後は、コカイン CPP の獲得、および発現に対する mPFC の GABA 作動性ニューロンの各サブタイプの役割について検討する必要がある。

結論として、本研究では、mPFC の抑制性ニューロンではなく、興奮性ニューロンを DREADD により抑制することで、コカイン CPP の獲得と発現の両方が抑制されることを明らかにした。以上の結果は、mPFC の錐体ニューロンの活性化がコカイン関連記憶の形成および想起の両方に重要であることを示唆するものである。

第3章 マウスのランニングホイール (RW) 回転行動に対するモチベーション変化に伴う神経活動の時空間的变化

3-1. 序文

近年、ネットやゲームなどの特定の行動にのめり込む行動嗜癖が大きな社会問題となっているが、適切な動物モデルが存在しないため、基礎研究が遅れている。この問題を解決するために、マウスがランニングホイール (RW) を執拗に回転させる行動に着目した。マウスなどのげっ歯類では、RW 回転行動が報酬効果をもたらすことが報告されており、エサなどの報酬が無くても執拗に RW を回転させる (Richter et al., 2014; Knab et al., 2012; Rhodes and Garland, 2003)。また、マウスは RW 回転行動を報酬とした CPP を獲得することや (Greenwood et al., 2011; Belke and Wagner, 2005)、RW 回転行動を強化子としたオペラント条件づけ試験において、レバー押しを学習することが報告されている (Muguruza et al., 2019; Belke, 1997)。このように、げっ歯類は、RW 回転行動に対して高いモチベーションを示すと考えられる。さらに、長期間にわたる RW への接触により、依存性薬物の摂取時と類似した VTA ドパミン神経細胞の可塑的变化が誘導されることや、攻撃性の上昇といった行動嗜癖の臨床と類似した離脱症状が観察されることも報告されている (Medrano et al., 2020, Hoffmann et al., 1987)。以上より、マウスによる RW 回転行動と、ヒトのネットやゲーム使用障害は、いずれも、特定の行動に対して強いモチベーションを持つという点で類似しており、マウスにおける RW 回転行動は、ヒトにおけるネットやゲームのように嗜癖としての一面も有するものであると考えられる。そこで本研究では、行動嗜癖の病態メカニズムを解明する手がかりとして、マウスにおける RW 回転行動をモデルとし、特定の行動に対するモチベーションの形成・維持における神経メカニズムの解明を試みた。

過去の報告では、マウスを1ヶ月間 RW に毎日接触させることで、NAc において、持続性の神経活性化マーカーである Δ FosB の発現が増加することが明らかとなっている (Werme et al., 2002)。また、NAc あるいは線条体 (striatum, Str) において Δ FosB を過剰発現させると、RW 回転数が増加することが示されている (Werme et al., 2002)。さらに、RW 回転行動を報酬とした CPP テストにおいて、mPFC や NAc の活動抑制により RW 回転行動から離脱後の急激な RW 回転行動の増加が抑制されることも報告されている (Basso and Morrell, 2015)。このように、mPFC や NAc、Str は RW 回転行動に対するモチベーションに関与することが示唆されているが、これらの脳部位が RW 回転行動に対するモチベーションの形成・維持のどの段階で関与するかは未だ不明である。また、上記の脳部位に加えて、外側中核 (lateral septum, LS) の活動上昇は、摂取環境により誘導されるコカイン探索行動を促進することが報告されており (McGlinchey and Aston-Jones, 2018)、LS も依存性薬

物の報酬効果に重要であるとされるが (Pantazis and Aston-Jones, 2020) 、RW 回転行動に対するモチベーションにも関与するか否かは不明である。

そこで本研究では、神経細胞活性化マーカーである c-Fos 発現細胞数を指標として、RW 回転行動に対するモチベーションが形成される過程である RW への接触開始から 1 日目と 9 日目、および、モチベーションの維持期である 20-24 日目における各脳部位の神経活動変化を検討した。さらに、各脳部位で観察された c-Fos 発現細胞数の変化が、RW 回転行動へのモチベーションの変化を反映しているか否かを検討するために、RW 回転行動ができないようにロックした RW への複数回の接触や、短時間あるいは長時間の RW への接触により、RW 回転行動へのモチベーションを変化させた場合の各脳部位の神経活動変化について検討した。

3-2. 方法

3-2-1. 使用動物

動物は 2-2-1 に準じて飼育した。

3-2-2. RW 回転行動

マウスを running (run) 群、non-running (non-run) 群、および control 群に分けて実験を行った。Run 群では、RW を設置したプラスチック製のケージ内にマウスを入れることで RW への馴化を行い、30 分以内に自発的に RW に乗らなかったマウスは除外した。RW への馴化後に、1 日間 (day 1) 、9 日間 (day 9) 、および 20-24 日間 (day 20-24) の期間で、1 日 1 時間マウスを RW に接触させた。解析ソフト Wheel Manager v2.0 (Med Associates, Fairfax, VT, USA) を用いて、1 分間ごとの RW 回転数を記録した。マウスが RW に乗った回数、乗っていた時間、回していた時間、乗るまでの潜時はストップウォッチで計測した。Non-run 群のマウスは、run 群と同様のスケジュールで、回転できないようロックした RW を設置したケージに入れた。Control 群はホームケージ内で飼育し、RW には一度も接触させなかった。c-Fos の発現量は約 90 分後にピークに達することが知られているため、day 1, day 9 および day 20-24 において、run 群と non-run 群のマウスをそれぞれ RW あるいはロックした RW に 1 時間自由に接触させ、その 90 分後に灌流を行った (Fig. 7A) 。

3-2-3. RW 回転行動経験後にロックした RW に接触させた場合の RW 回転行動

3-2-2 と同様に 20-24 日間 RW に接触させた後、マウスを running + running (run + run) と running + non-running (run + non-run) 群に分け、それぞれ RW、あるいは、ロックした RW に 7-10 日間接触

させた。最終日に、各群のマウスを、それぞれ RW、あるいはロックした RW に 5 分間自由に接触させ、その 90 分後に灌流を行った (Fig. 12A)。

3-2-4. 短時間あるいは長時間の RW への接触による RW 回転行動

マウスを running (run) 群、non-running (non-run) 群、control 群に分けて実験を行った。Run 群では、マウスを 6 日間にわたり、12 時間 (暗期の 20:30-8:30)、ホームケージ内で自由に RW に接触させた。7 日目に、2.5 時間 (1 時間+90 分)、または 13.5 時間 (12 時間+90 分) RW に接触させた後、灌流を行った。Non-run 群のマウスは、run 群と同じスケジュールで、ロックした RW に接触させた。Control 群はホームケージ内で飼育し、RW には一度も接触させず、run 群と同じタイミングで灌流した (Fig. 13A)。

3-2-5. c-Fos 免疫組織化学的染色

マウスは抱水クロラール (400 mg/kg, i.p.) 麻酔下、0.01 M PBS および 4% PFA を経心灌流することにより全身を固定した。その後、ただちに脳を取り出し、4% PFA 溶液で一晩静置することで後固定を行った。続いて、15%スクロース溶液に一晩静置してスクロース置換を行った。その後、脳を粉末状ドライアイスにより凍結し、クライオスタットを用いて厚さ 30 μm の冠状切片を作製した。切片を PBS で 3 回洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するため、0.3% H_2O_2 、および 0.3% Triton X-100 を含む PBS (PBST) で 30 分間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、切片を PBST 中 3% ウシ血清アルブミンで 1 時間ブロッキングし、一次抗体 (rabbit anti c-Fos antibody, 1:5000, ABE457, Merck, Darmstadt, Germany、または 1:3000, 2250S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を加えたブロッキング液中で一晩インキュベートした。2 日目、PBST で 3 回洗浄した後、切片をビオチン化二次抗体 (goat anti rabbit IgG antibody, 1:500, BA-1000, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) を加えたブロッキング液中で 1 時間インキュベートした。その後、切片を PBST で 3 回洗浄し、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (R.T.U. ABC Reagent) で 1 時間インキュベートした。PBS、および 0.05M Tris-HCl (pH 7.5) でそれぞれ 2 回洗浄した後、0.05% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl、1% nickel ammonium sulfate, 0.03% H_2O_2 を含む Tris-HCl で発色反応をさせた後に、切片をスライドにマウントし、エタノール、およびキシレンで脱水・透徹し、Entellan New で封入した。

3-2-6. c-Fos 陽性細胞数の定量

各脳領域における c-Fos 陽性細胞は、明視野顕微鏡 (倍率 40 倍、BZ-9000、または BZ-X810、Keyence、大阪) と ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて計数した。

mPFCは、1匹のマウスにつき3切片の前辺縁皮質（prelimbic, PL）-mPFC 2/3層（0.1 mm × 0.4 mm）、PL-mPFC 5/6層（0.2 mm × 0.4 mm）、下辺縁皮質（infralimbic, IL）-mPFC 2/3層（0.1 mm × 0.2 mm）、IL-mPFC 5/6層（0.2 mm × 0.2 mm）について、c-Fos 陽性細胞数を計数した。NAcは、1匹のマウスにつき3切片の側坐核コア（NAc core, NAc-C, 0.4 mm × 0.2 mm）、側坐核内側シェル（NAc medial shell, NAc-MS, 0.2 mm × 0.4 mm）、側坐核外側シェル（NAc lateral shell, NAc-LS, 0.2 mm × 0.4 mm）について、c-Fos 陽性細胞数を計数した。Str と LS は、1匹のマウスにつき6切片の背内側線条体（dorsomedial Str, DM-Str, 0.2 mm × 0.4 mm）、背外側線条体（dorsolateral Str, DL-Str, 0.4 mm × 0.4 mm）、LS（0.2 mm × 0.4 mm）についてc-Fos 陽性細胞数を計数した（Fig. 6）。

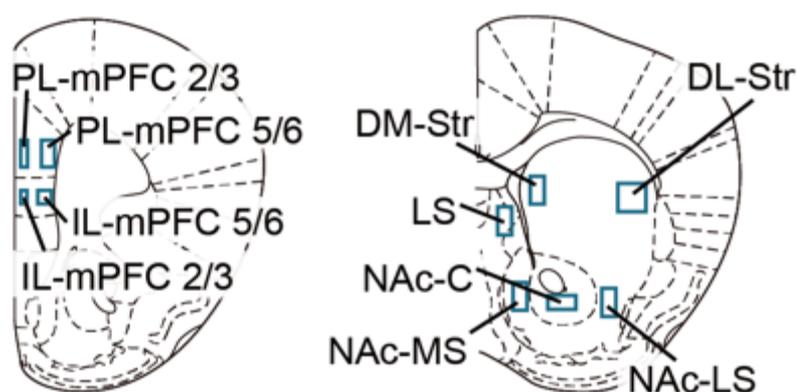


Fig. 6 各脳部位における c-Fos 陽性細胞数の計数領域

3-2-7. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差（SEM）で表記した、GraphPad Prism 6（GraphPad software, La Jolla, CA, USA）を用いて、Student's *t*-test、one-way ANOVA、または two-way repeated measures ANOVA、および Holm-Sidak's *post hoc* test により比較した。 $p < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。

3-3. 結果

3-3-1. RW 回転行動のパフォーマンス

マウスを毎日1時間RWに自由に接触させることで、RWの回転数は徐々に増加し、約3週間後に安定した（Fig. 7B）。RW回転行動に対するモチベーションと関連する神経活動の時間的依存的な変化を調べるために、day 1（最大回転数の10%）、day 9（最大回転数の80%）、および、最大回転数で安定したday 20-24のタイミングに着目した。まず、これらのタイミングにおいて、RW回転行動に対するモチベーションを反映すると推測される、RWに乗った回数、乗っていた時間、回

していた時間、および、乗るまでの潜時の 4 つのパラメータを測定した。Day 1 と比較して、day 9 と day 20-24 における RW に乗った回数、乗っていた時間、回していた時間は有意に増加した (Fig. 7C, number of rides, $F_{2,33} = 14.63, p < 0.0001$; day 9, $p = 0.0004$, day 20-24, $p = 0.0002$, vs. day 1, day 20-24 vs. day 9, $p = 0.2603$; Fig. 7D, total time on wheel, $F_{2,33} = 12.11, p = 0.0001$; day 9, $p = 0.0004$, day 20-24, $p = 0.0024$, vs. day 1, day 20-24 vs. day 9, $p = 0.9241$; Fig. 7E, running duration, $F_{2,33} = 20.54, p < 0.0001$; day 9, $p < 0.0001$, day 20-24, $p = 0.0002$, vs. day 1, day 20-24 vs. day 9, $p = 0.9830$)。RW に乗るまでの潜時は、day 1 と比べ、day 9 で有意に減少し、day 20-24 では減少傾向が見られた (Fig. 7F, $F_{2,33} = 4.095, p = 0.0258$; day 9, $p = 0.0468$, day 20-24, $p = 0.0946$, vs. day 1, day 20-24 vs. day 9, $p = 0.9713$)。以上の結果より、マウスを毎日 1 時間 RW に自由に接触させることで、3 週間をかけて徐々に RW 回転行動に対するモチベーションが形成され、その後は維持されることが示唆された。

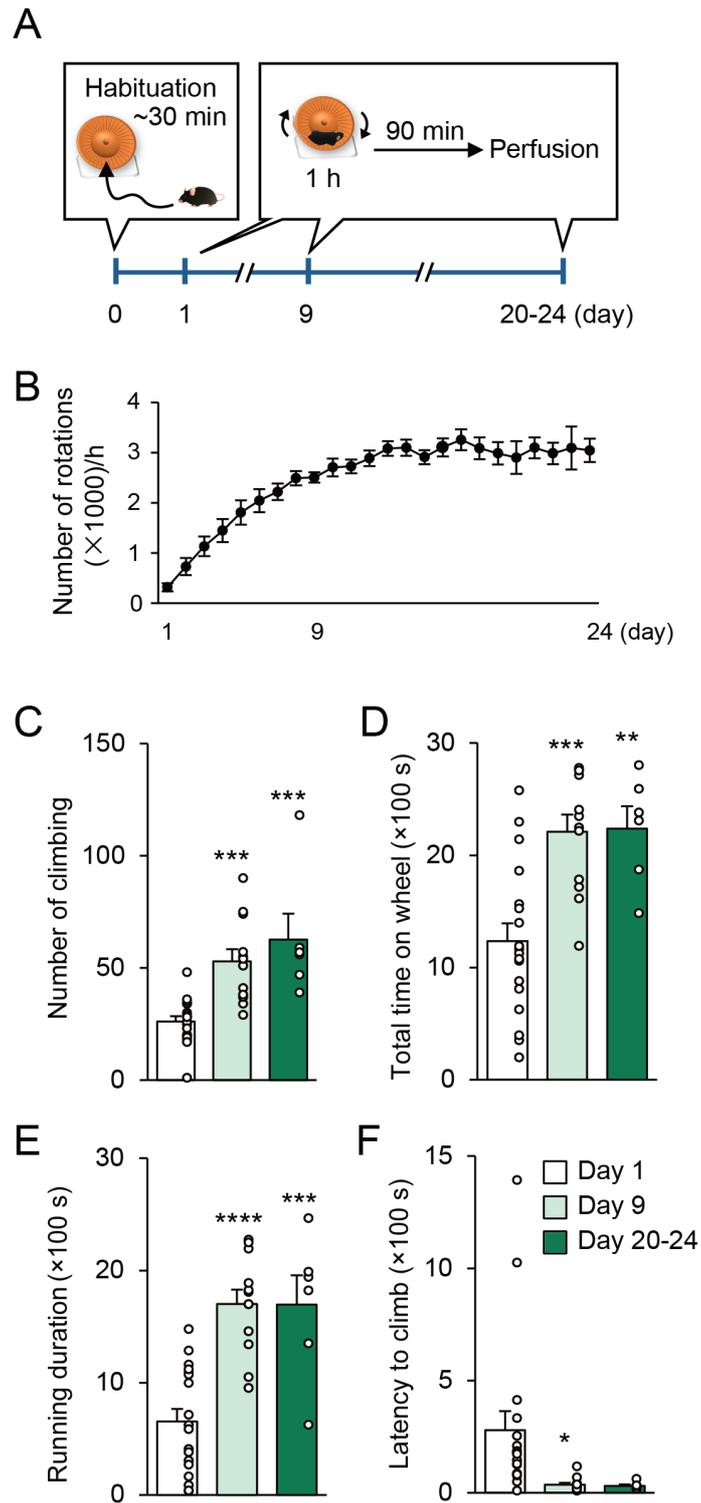


Fig. 7 RW 回転行動のパフォーマンス

A) 実験スケジュール。B) RW 回転数の経日変化。C-F) Day 1, 9, 20-24 における RW に乗った回数、乗っていた時間、回していた時間、および、乗るまでの潜時。Day 1, $n = 18$; Day 9, $n = 12$; Day 20-24, $n = 6$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. Day 1.

3-3-2. RW 回転行動の経験日数に依存した mPFC、NAc、Str、および、LS の c-Fos 発現変化

各脳部位において、RW 回転行動に対するモチベーションの形成・維持に関連する神経活動変化を明らかにするために、RW への接触開始後 day 1, 9, 20-24 の 3 つのタイミングにおける mPFC、NAc、Str、および、LS の c-Fos 発現を評価した。この実験では、RW に毎日 1 時間自由に接触させた run 群の他に、ロックした RW に毎日 1 時間自由に接触させた non-run 群、および、RW に接触した経験のない control 群を設けた。これにより、RW への曝露と RW 回転の経験が神経活動に与える影響をそれぞれ区別することが可能になる。mPFC の各亜領域はモチベーションの制御において、それぞれ異なる役割を担うことが報告されているため (Ewald and LaLumiere, 2018; MacFarland and Kalivas, 2001; Caballero et al., 2019)、PL-mPFC、および IL-mPFC の 2/3 層、および 5/6 層について c-Fos 陽性細胞数を計測した。PL-mPFC 2/3 層の c-Fos 陽性細胞数は、control 群と比較して、non-run 群と run 群の day 1 で増加し、run 群では day 20-24 でも増加した (Fig. 8A, B, $F_{6,35} = 8.155$, $p < 0.0001$; day 1 non-running, $p = 0.0022$, day 1 running, $p < 0.0001$, day 20-24 running, $p = 0.0116$, vs. control)。一方で、run 群と non-run 群間には有意な差は認められなかった (Fig. 8A, B, $p > 0.5817$ for all comparisons, non-running vs. running)。PL-mPFC 5/6 層において、run 群の c-Fos 陽性細胞数は control 群と比較して、day 1 と day 20-24 で増加し、non-run 群と比較して、day 1 で増加した (Fig. 8C, D, $F_{6,35} = 8.972$, $p < 0.0001$; day 1, $p < 0.0001$, day 20-24, $p = 0.0274$, running vs. control; day 1, $p = 0.0235$, non-running vs. running)。IL-mPFC 2/3 層では、control 群と比較し、non-run と run 群の c-Fos 陽性細胞数は day 1 で増加したが (Fig. 8E, F, $F_{6,35} = 4.386$, $p = 0.0021$; day 1 non-running, $p = 0.0470$, day 1 running, $p = 0.0028$, vs. control)、run 群と non-run 群の間には有意な差は認められなかった (Fig. 8E, F, $p > 0.7226$ for all comparisons, non-running vs. running)。IL-mPFC 5/6 層において、control 群と比較して、non-run 群の c-Fos 陽性細胞数は day 1 で増加したが、run 群では、control 群、および non-run 群と比較して、すべてのタイミングで増加した (Fig. 8G, H, $F_{6,35} = 19.00$, $p < 0.0001$; day 1 non-running, $p = 0.0050$, day 1 running, $p < 0.0001$, day 9 running, $p = 0.0023$, day 20-24 running, $p = 0.0022$, vs. control; day 1, $p = 0.0006$, day 9, $p = 0.0103$, day 20-24, $p = 0.0048$, non-running vs. running)。

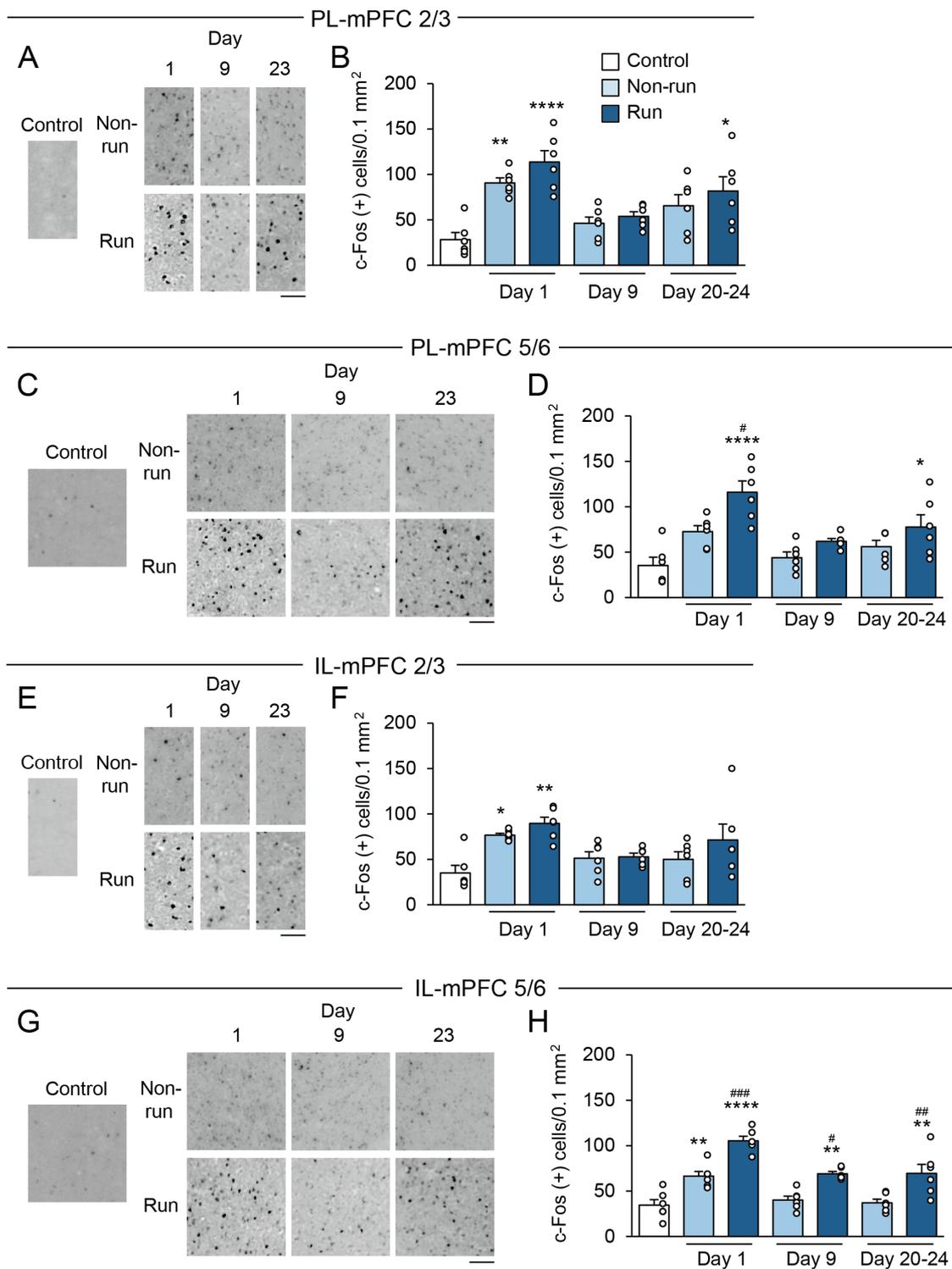


Fig. 8 RW 回転行動による mPFC の神経活動変化

A, C, E, G) PL-mPFC および IL-mPFC の 2/3 層および 5/6 層における c-Fos 免疫染色の代表写真。B, D, F, H) PL-mPFC および IL-mPFC の 2/3 層および 5/6 層の control、non-run、および、run 群の c-Fos 陽性細胞数。n = 6 in each group, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001 vs. control, #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, run vs. non-run.

NAcは、その神経接続と機能の違いから NAc-C、NAc-MS、および、NAc-LS の3つの亜領域に分類されるため (Zahm, 2000; Floresco, 2015; Yang et al., 2018)、これらの亜領域について、それぞれ c-Fos 陽性細胞数を計数した。NAc-C における run 群の c-Fos 陽性細胞数は、control 群に対して day 20-24 で増加し、non-run 群に対して day 9、および day 20-24 で増加した (Fig. 9A, B, $F_{6,35} = 5.511, p = 0.0004$; day 20-24, $p = 0.0341$, running vs. control; day 9, $p = 0.0264$, day 20-24, $p = 0.0160$, non-running vs. running)。NAc-MS において、run 群の c-Fos 陽性細胞数は、control 群、および non-run 群と比較して、すべてのタイミングで増加した (Fig. 9C, D, $F_{6,35} = 21.96, p < 0.0001$; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0016$, day 20-24, $p = 0.0024$, running vs. control; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0004$, day 20-24, $p < 0.0001$, non-running vs. running)。NAc-LS における run 群の c-Fos 陽性細胞数は、non-run 群と比較して、day 20-24 でのみ増加した (Fig. 9E, F, $F_{6,35} = 4.894, p = 0.0010$; day 20-24, $p = 0.0485$, non-running vs. running)。

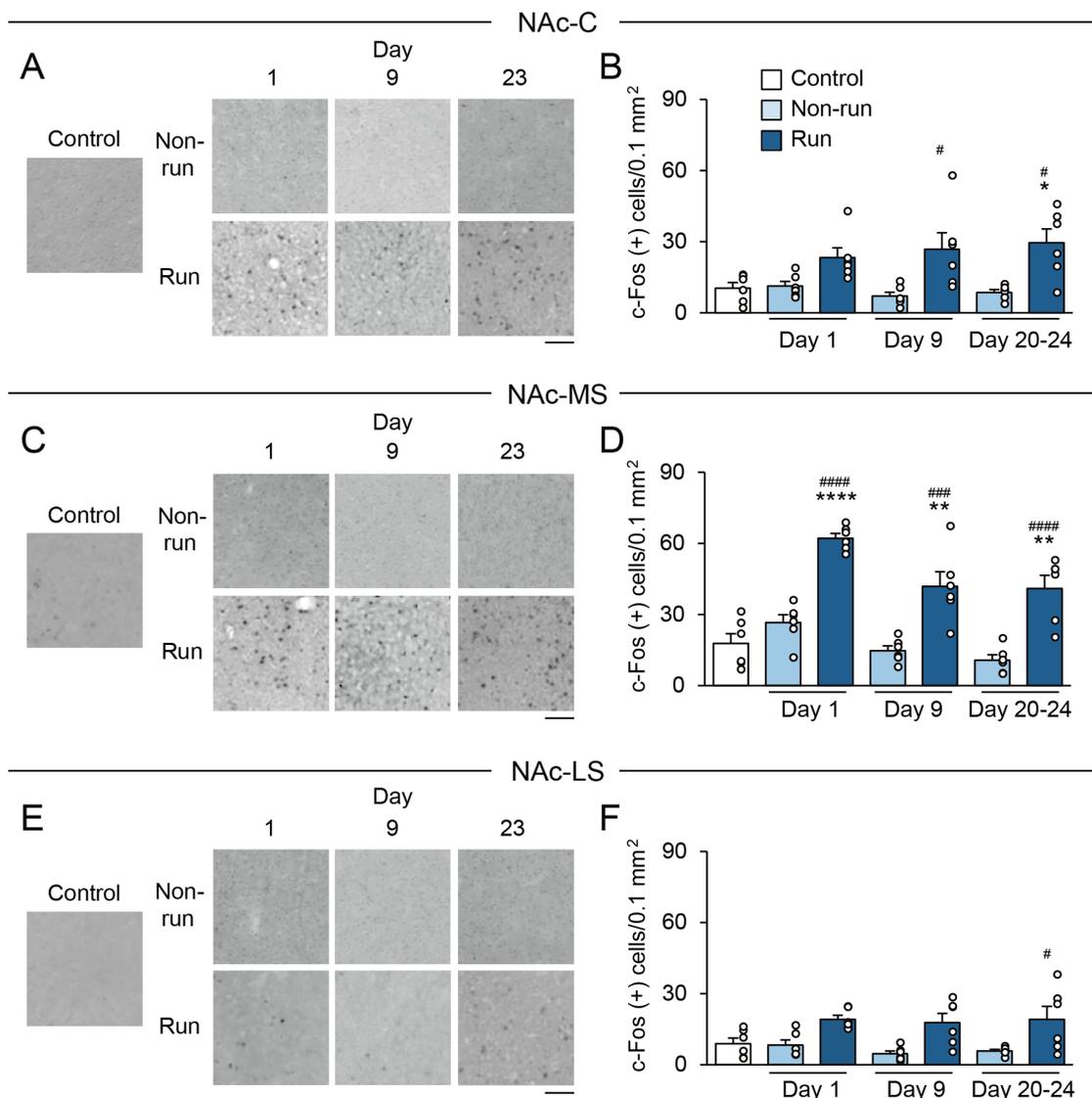


Fig. 9 RW 回転行動による NAc の神経活動変化

A, C, E) NAc-C、NAc-MS、および、NAc-LSにおける c-Fos 免疫染色の代表写真。B, D, F) NAc-C、NAc-MS、および、NAc-LS の control、non-running、および、running 群の c-Fos 陽性細胞数。n = 6 in each group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. control, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$, running vs. non-running.

Str は、その神経入出力や機能的な相違から (Devan et al., 2011; Hunnicutt et al., 2016; Farassat et al., 2019)、DM-Str と DL-Str の 2 亜領域に分類し、それぞれの c-Fos 陽性細胞数を計測した。Run 群の c-Fos 陽性細胞数は、control 群、および non-run 群と比較して、DM-Str では全てのタイミングで増加したが (Fig. 10A, B, $F_{6,35} = 18.14$, $p < 0.0001$; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0007$, day 20–24, $p = 0.0004$, running vs. control; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0045$, day 20–24, $p = 0.0019$, non-running vs. running)、DL-Str では day 1 でのみ増加した (Fig. 10C, D, $F_{6,35} = 4.623$, $p = 0.0015$; day 1, $p = 0.0079$, running vs. control; day 1, $p = 0.0069$, non-running vs. running)。

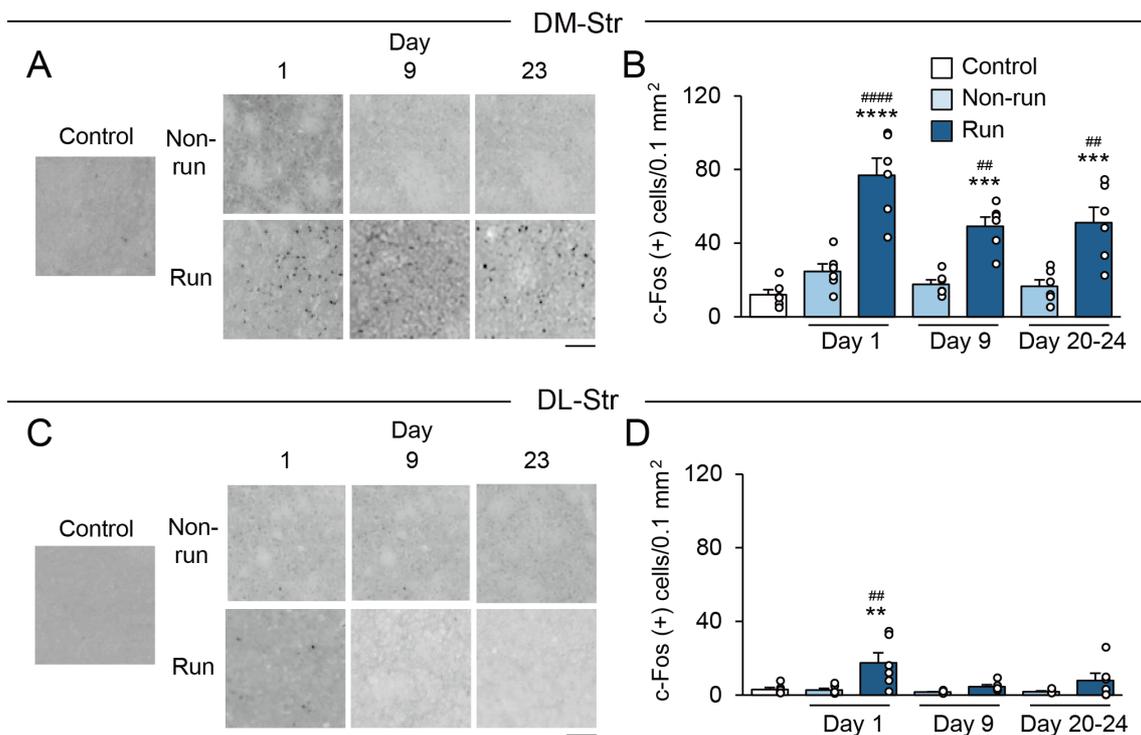


Fig. 10 RW 回転行動による Str の神経活動変化

A, C) DM-Str および DL-Str における c-Fos 免疫染色の代表写真。B, D) DM-Str と DL-Str の control、non-running、および、running 群の c-Fos 陽性細胞数。n = 6 in each group, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control, ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$, running vs. non-running.

最後に、LS の c-Fos 陽性細胞数を計数したところ、run 群では、control 群および non-run 群と比較して、すべてのタイミングで増加した (Fig. 11A, B, $F_{6,35} = 16.83, p < 0.0001$; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0029$, day 20–24, $p = 0.0079$, running vs. control; day 1, $p < 0.0001$, day 9, $p = 0.0014$, day 20–24, $p = 0.0284$, non-running vs. running)。

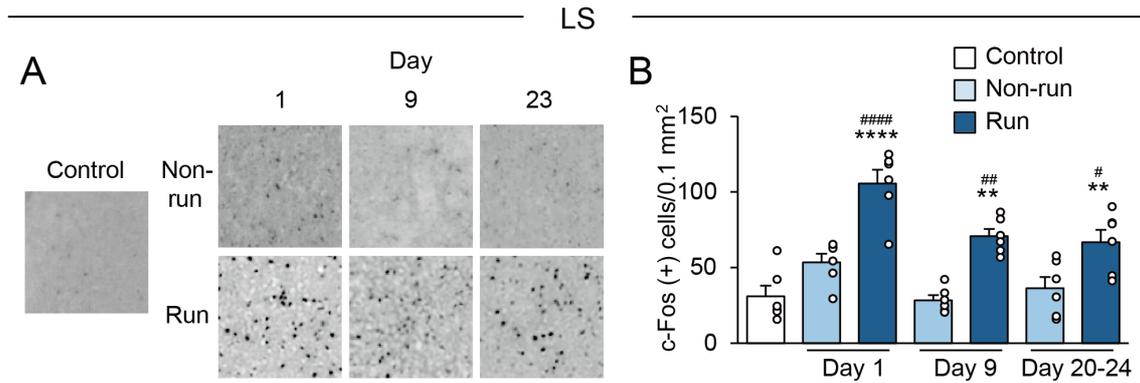


Fig. 11 RW 回転行動による LS の神経活動変化

A) LS における c-Fos 免疫染色の代表写真。B) LS の control、non-running、および、running 群の c-Fos 陽性細胞数。 $n = 6$ in each group, $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$ vs. control, $#p < 0.05$, $##p < 0.01$, $####p < 0.0001$, running vs. non-running.

以上の結果より、mPFC, NAc, Str, LS の神経活動は、RW 回転行動に対するモチベーション形成・維持を反映すると推測される異なるタイミングで上昇することが明らかとなった。

3-3-3. 20-24 日間の RW 回転行動経験後に、ロックした RW に 7-10 日間接触させた場合のモチベーションおよび各脳部位の c-Fos 発現変化

3-3-2 の結果から、day 20-24 では、PL-mPFC、IL-mPFC 5/6、NAc、DM-Str、および、LS の c-Fos 陽性細胞数が増加したため、これらの脳部位での神経活動亢進が RW 回転行動に対するモチベーション維持に関与することが示唆される。この仮説を検証するために、3-3-2 の実験と同様に、マウスを RW に 20-24 日間接触させた後、ロックした RW に 7-10 日間接触させることで、RW 回転行動に対するモチベーションを低下させることを試みた (Fig. 12A)。しかしながら、我々の予想に反して、ロックした RW に接触させた run + non-run 群と RW に接触させた run + run 群の間で、RW に乗った回数、乗っていた時間、乗るまでの潜時に有意な差は認められなかった (Fig. 12B, $p > 0.1187$ for all comparisons)。したがって、20-24 日間にわたる RW 回転行動により、強いモチベーションが形成され、その後にマウスを 7-10 日間ロックされた RW に接触させても、そのモチベーションは低

下しない可能性が示唆された。この仮説と一致して、control 群と比較して、run + run 群の c-Fos 陽性細胞数は今回測定した全脳部位で増加し、run + non-run 群においても、PL-mPFC 以外の脳部位では、有意な減少は認められず、run + run 群と同程度のままであった (Fig. 12C, D, PL-mPFC 2/3, $F_{2,14} = 18.30, p = 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.014$, vs. running + running; PL-mPFC 5/6, $F_{2,14} = 45.18, p < 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.076$, vs. running + running; IL-mPFC 5/6, $F_{2,14} = 44.53, p < 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.3634$, vs. running + running; NAc-C, $F_{2,14} = 18.64, p = 0.0001$; control, $p = 0.0002$, running + non-running, $p = 0.4107$, vs. running + running; NAc-MS, $F_{2,14} = 44.37, p < 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.3815$, vs. running + running; NAc-LS, $F_{2,14} = 31.84, p < 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.8171$, vs. running + running; DM-Str, $F_{2,14} = 16.24, p = 0.0002$; control, $p = 0.0004$, running + non-running, $p = 0.3653$, vs. running + running; LS, $F_{2,14} = 54.74, p < 0.0001$; control, $p < 0.0001$, running + non-running, $p = 0.9910$, vs. running + running)。以上の結果より、これらの脳部位の神経活動の亢進が、RW 回転行動に対する強いモチベーションに関与することが示唆された。また、ロックされた RW に 5 分間接触させた場合でも、1 時間の接触とほぼ同程度まで c-Fos 陽性細胞数が増加していたことから (Fig.12 C, D) 5 分間の RW への接触は、RW 回転行動に対するモチベーションを反映する神経活動上昇の誘発に十分であることが示唆された。

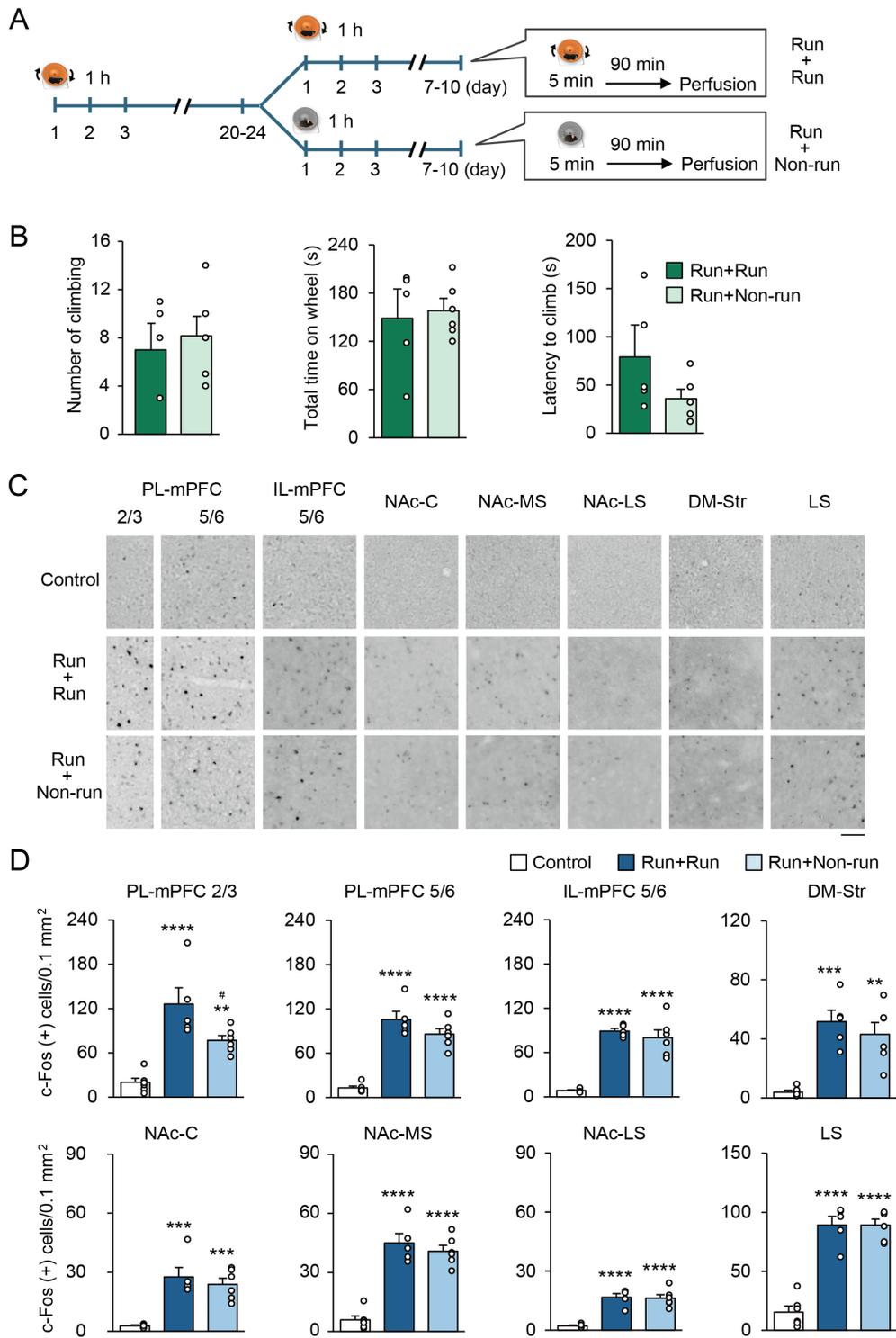


Fig. 12 20-24 日間の RW 回転行動経験後にロックした RW に 7-10 日間接触させた際の RW 回転行動
および c-Fos 発現の変化

A) 実験スケジュール。B) run + non-run 群および run + run 群の RW に乗った回数、乗った時間、および、乗るまでの潜時。C, D) 各脳部位における c-Fos 免疫染色の代表写真と c-Fos 陽性細胞数。

Control, $n = 6$; run + run, $n = 5$; run + non-run, $n = 6$; $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$ vs. control, $^{#}p < 0.05$
run + run vs. run + non-run.

3-3-4. 短時間、あるいは長時間の RW への接触がモチベーション、および c-Fos 発現に及ぼす影響

RW 回転行動に対するモチベーションと c-Fos 発現の関係性をより明確にするために、マウスを RW に長時間接触させ、RW 回転行動に飽きさせた状態、すなわち、RW 回転行動に対するモチベーションを低下させた状態における c-Fos 発現について検討を行った。マウスを暗期に 12 時間 RW に自由に接触させたところ、回転数は徐々に増加し、6 日目には安定した (Fig. 13A, B)。さらに、Fig. 13C で示すように、マウスは RW への接触を開始した初期の数時間では高い RW 回転数を示し、後期の数時間では、RW 回転数が低下することが明らかとなった。c-Fos 発現は神経活動上昇の 90 分後にピークに達し、約 6 時間後には消失することが報告されている (Sonnenberg et al., 1989)。そこで、7 日目において、高い RW 回転数を示す RW への接触開始から 2.5 時間 (1 時間の RW への接触 + 90 分; 2.5 時間 run 群)、および、低い RW 回転数を示す RW への接触開始から 13.5 時間 (12 時間の RW への接触 + 90 分; 13.5 時間 run 群) の 2 つのタイミングでの c-Fos 発現を評価した。また、上記 2 群の対照群として、RW に接触したことのない control 群およびロックした RW に接触させる non-run 群を設けた。13.5 時間 run 群における、灌流前 2.5 時間の回転数は、2.5 時間 run 群と比較して、有意に低下していることを確認した (Fig. 13D, $t_8 = 6.0148$, $p = 0.0003$)。2.5 時間 run 群の各脳部位における c-Fos 陽性細胞数は、2.5 時間 non-run 群と比較して有意に増加した。この増加は、PL-mPFC、IL-mPFC 5/6、NAc-MS、DM-Str、および LS では、13.5 時間 run 群で有意に減少した (Fig. 13E-H, PL-mPFC 2/3, $F_{5,24} = 38.99$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.9997$, 13.5 h $p = 0.1963$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.2358$ run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.9984$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run; PL-mPFC 5/6, $F_{5,24} = 52.00$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.948$, 13.5 h $p = 0.1829$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.0035$ run vs. control 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.3375$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run; IL-mPFC 5/6, $F_{5,24} = 31.69$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.9871$, 13.5 h $p = 0.3625$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.0071$ run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.3625$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run; NAc-MS, $F_{5,24} = 47.99$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.7251$, 13.5 h $p = 0.094$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p < 0.0001$ run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.01$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run; DM-Str, $F_{5,24} = 133.7$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.1747$, 13.5 h $p = 0.0715$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.1633$ run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.9478$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run; LS, $F_{5,24} = 17.33$, $p < 0.0001$, 2.5 h $p = 0.9998$, 13.5 h $p = 0.9998$ non-run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.9998$ run vs. control, 2.5 h $p < 0.0001$, 13.5 h $p = 0.9998$ run vs. non-run, $p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run)。

以上の結果より、長時間にわたる RW への接触は RW 回転行動に対するモチベーションを低下させ、それに伴い、RW への接触初期に観察された c-Fos 発現増加も低下することが示唆された。したがって、本実験で検討した脳部位における c-Fos 発現上昇は、RW 回転行動に対するモチベーション増加を反映するものであることが示唆された。

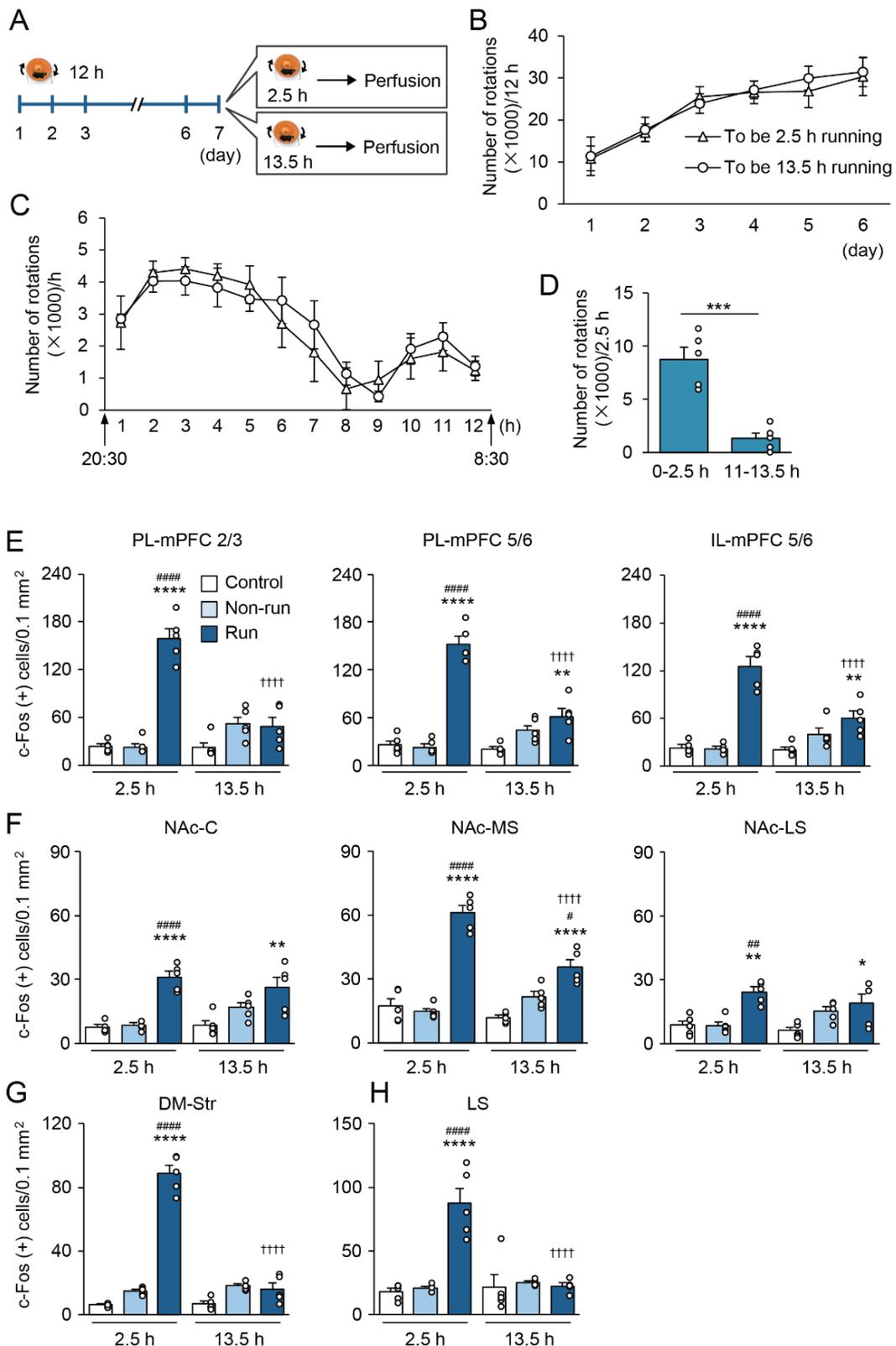


Fig. 13 短時間あるいは長時間の RW への接触による RW 回転数および c-Fos 発現の変化

A) 実験スケジュール。B) 2.5 と 13.5 時間 run 群の 6 日間の暗期 12 時間の回転数の推移。C) 2.5 と 13.5 時間 run 群の 6 日目の暗期 1 時間ごとの回転数の推移。D) 2.5 と 13.5 時間 run 群の灌流する直前 2.5 時間の回転数。E) 各脳部位の c-Fos 陽性細胞数。 $n = 5$ in each group, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.0001$ vs. control, $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.0001$ vs. non-run, $^{+++}p < 0.0001$ 2.5 h run vs. 13.5 h run.

3-4. 考察

本研究ではまず、毎日 1 時間の RW への接触により、RW 回転数が徐々に増加し、約 3 週間後には安定することを示した。これは、齧歯類で以前に報告されている結果と矛盾しないものであった (Greenwood et al., 2011; Brené et al., 2007; Grigsby et al., 2020)。また、RW 回転数に加え、乗る回数、乗っていた時間、回していた時間、および、乗るまでの潜時を計測した。最初の 3 つのパラメータは、day 1 と比較して、day 9 と day 20-24 で時間依存的に増加したことから、マウスの RW 回転行動に対するモチベーションは RW に繰り返し接触することによって増加したと考えられる。しかしながら、この RW 回転数の増加は、RW に繰り返し接触することで、マウスの RW を回転させる技術が向上した可能性も否定できない。RW に乗るまでの潜時は、day 1 と比較して、day 9 と day 20-24 で減少傾向が認められた。一般的に、ある行動を開始するまでの潜時は、その行動に対するモチベーションを反映していると考えられているため (Lukaszewska and Młodkowska, 1980)、この潜時の減少傾向は、RW への繰り返しの接触により RW 回転行動に対するモチベーションが増加することを示唆している。

また、本研究では、報酬情報処理やモチベーションに関与する脳領域において、RW への接触日数依存的に c-Fos 陽性細胞数が変化することが明らかとなった。RW への接触経験のないマウスや、ロックした RW に接触させたマウスと比較して、RW に接触したマウスでは、mPFC、NAc、Str、および、LS の c-Fos 陽性細胞数が異なるタイミングで有意に増加した。Day 1 において、ロックしていない RW に接触させたマウスでは、NAc-C と NAc-LS 以外の全ての脳部位における c-Fos 陽性細胞数が有意に増加しており、day 9 および day 20-24 と比較しても増加していた。RW 回転数は day 1 で低い値を示し、day 20-24 ではほぼ最大値となったことから、day 1 における高い c-Fos 発現量は RW 回転数とは直接的に関係するものではなく、RW の新奇性、モチベーション、報酬効果などによる神経細胞の活性化を反映したものである可能性がある。

RW に接触させたマウスの mPFC では、RW を経験したことの無いマウスと比較して、day 1 で c-Fos 陽性細胞数が増加したが、それに加え、ロックした RW に接触させたマウスでも、RW を経験したことの無いマウスと比較して、day 1 の mPFC における c-Fos 陽性細胞数は増加した。この結果か

ら、mPFCにおけるc-Fosの発現は、RW回転行動に対するモチベーションや報酬効果だけでなく、RWの新奇性による影響も反映していることが示唆される。実際に、PL-mPFCとIL-mPFCのニューロンは新奇物体や新奇環境に対する探索に参与することが報告されている（Rinaldi et al., 2010; Hervig et al., 2017; Matsumoto et al., 2007）。加えて、mPFCではday 20-24でもc-Fos陽性細胞数の増加が見られた。Day 20-24において、RW回転行動はすでにマウスにとって新奇性を示さないと考えられるため、このタイミングでのc-Fos発現細胞数の増加はRW回転行動に対するモチベーションを反映していると考えられる。この仮説を裏付けるように、ラットのmPFCを抑制することで、長期間にわたるRW回転行動から強制的に離脱させた後にRWに再曝露することで誘発されるRW回転数の急激な増大が抑制されること、すなわち、RW回転行動に対するモチベーションが抑制されることが報告されている（Basso and Morrell, 2015）。

齧歯類において、自発的なRW回転行動は、RWが設置された環境に対するCPPを引き起こすことが報告されている（Greenwood et al., 2011; Brené et al., 2007; Belke and Heyman, 1994）。本研究では、マウスを毎日RWが設置されたケージ内に入れ、実験を行ったことから、マウスがその環境とRWの報酬効果との関連性を学習した可能性がある。過去の報告から、依存性薬物に対する場所嗜好性の発現には、VTA-NAc経路を介したNAcの神経活性化が重要であることが知られている（Liang et al., 2012; Liu et al., 2014）。したがって、day 9とday 20-24に観察されたNAc、特にNAc-MSにおけるc-Fos発現の有意な増加は、RWが設置されたケージへの再曝露によって誘発された可能性が考えられる。また、NAcの抑制によりRW回転行動が抑制されたという過去の報告から（Basso and Morrell, 2015）、NAcニューロンの活性化は、RWへのモチベーションと関連する可能性もある。さらに、day 1ではNAc-MSにおいて、c-Fos陽性細胞数の劇的な増加が確認された。本実験のスケジュールでは、マウスは1日1時間のRWへの接触を開始する1日前に、RWへの馴化を行っている。そのため、Day 1の時点で、RWが設置された環境とRW回転行動による報酬効果との関連記憶が形成されている可能性も考えられるが、この点については、今後のさらなる検討が必要である。また、day 1でのc-Fos発現の増加は、RW回転行動に対するモチベーションや報酬効果以外に、RWの新奇性を反映している可能性もある（Rinaldi et al., 2010; Hooks and Kalivas, 1994; Legault and Wise, 2001）。

DM-StrおよびDL-Strにおけるc-Fosの発現は、day 1で有意に増加した。この増加は、上述のmPFCやNAc-MSと同様のメカニズムによるものと考えられる。それに加え、DM-Strでのc-Fos発現の増加は、day 9およびday 20-24でも観察されたが、DL-Strではこれらのタイミングでの増加は認められなかった。DM-StrとDL-Strがそれぞれ目的指向型行動と習慣行動に関連していることを考慮すると（Balleine BW and O'Doherty JP, 2010）、この結果は矛盾するように思われる。一方で、day 20-24ではマウスは習慣的にRWを回転させているように見えるが、本実験は上述の既報で使用

されているオペラント課題とは異なり、マウスは RW を回転させるために労力を必要としないため、習慣化には至っていない可能性も考えられる。また、過去の研究では、ラットにおいて、自発的なアルコール摂取後に、皮質-線条体間の神経生理学的適応により、DL-Str ではなく、DM-Str の活動が増加することが報告されている (Lagström et al., 2019)。以上の知見から、実験手法によっては、報酬効果をもたらす自発行動が DM-Str を選択的に活性化する可能性がある。

本研究では、NAc-MS および DM-Str で RW 回転行動によって c-Fos 発現上昇が認められた神経細胞の種類を特定できていないため、今後のさらなる検討が必要である。Str の主要な出力ニューロンには D1-MSN、およびエンケファリンや D2 受容体を発現する D2-MSN が存在する。これまでに、Str のダイノルフィン陽性神経細胞に Δ FosB を過剰発現させると RW 回転行動が増加するのに対し、Str のエンケファリン陽性神経細胞に Δ FosB を過剰発現させると RW 回転行動が減少することが報告されていることから (Werme et al., 2002)、Str の D1-MSN が、RW 回転行動に対するモチベーションの増強に重要である可能性が示唆される。同様に、DREADD を用いて NAc の D1-MSN を活性化することで、RW 回転距離が増加し、NAc の D2-MSN を活性化すると、RW 回転距離が減少することも報告されている (Zhu et al., 2016)。しかし、同じ研究で、NAc の D1-MSN を抑制しても、RW 回転距離に影響を及ぼさない一方で、D2-MSN の抑制により、RW 回転距離が増加することも示されている (Zhu et al., 2016)。ドパミンが D1 受容体を刺激することで、NAc と DM-Str の両方で D1-MSN の活動が上昇することから (Luo et al., 2011; Swapna et al., 2016)、本研究において NAc-MS と Dm-Str 内で c-Fos 発現が増加した神経細胞の種類は D1-MSN である可能性がある。

LS において、c-Fos 陽性細胞数は day 1 で最も増加し、day 9 と day 20-24 では減少した。Day 1 の RW 回転数は非常に少なかったことから、このタイミングでの c-Fos 発現は運動によって引き起こされたものではないと考えられる。むしろ、day 1 の c-Fos 陽性細胞数の増加は、mPFC、NAc、Str などの脳部位で見られたように、RW 回転行動の新奇性を反映している可能性が考えられる。一方で、day 9 および day 20-24 では、上記以外の要因により LS の活動が増加した可能性がある。最近の研究では、LS の抑制がコカインに対するモチベーションを低下させることが明らかにされた (Pantazis and Aston-Jones, 2020)。LS の GABA 作動性ニューロンは、VTA のドパミン作動性ニューロンの活動を抑制する GABA 作動性ニューロンに投射している。したがって、LS の GABA 作動性ニューロンの活性化は VTA の GABA 作動性ニューロンを抑制し、結果的に VTA のドパミン作動性ニューロンを脱抑制する可能性が考えられる (Vega-Quiroga et al., 2018)。さらに、LS は空間情報をコードする海馬からの入力を受け、その情報を処理して、環境依存的に行動を決定する可能性がある (Wirtshafter and Wilson, 2021)。したがって、LS における c-Fos の発現は、RW 回転行動自体とそれに対するモチベーションの両方による神経活動の増加を反映していると考えられる。

3-3-3の実験では、ロックしたRWに7-10日間接触させたrun + non-run群のマウスはRWを回転できなくなったことを学習することで、RW回転行動に対するモチベーションの低下、およびc-Fos発現の減少が引き起こされると予想した。しかし、run + run群とrun + non-run群間で、RWに乗った回数、乗っていた時間、乗るまでの潜時に有意な差は認められなかった。これと一致して、c-Fos発現にも両群間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、マウスのRW回転行動に対するモチベーションは容易に消失しないことが示唆され、これはマウスにおけるRW回転行動の嗜好性を支持するものである(Basso and Morrell, 2015)。

3-3-4の実験では、実験3-3-2のday 20-24でc-Fos発現が増加した脳部位において、c-Fos陽性細胞数は2.5時間run群では増加したが、13.5時間run群では増加しなかった。6日目の暗期における1時間ごとの回転数推移を見ると、2.5時間でほぼ最大値に達していたため、このタイミングでマウスのRW回転行動に対するモチベーションも最大となっていると考えられる。RW回転開始から約12時間後には、おそらくマウスはRW回転行動に飽きたことで、RW回転数は低下したと考えられた。このようなc-Fos発現量とRW回転数の相関から、c-Fos発現量の程度はRW回転行動に対するモチベーションの程度を反映することが示唆される。

以上をまとめると、本研究では、mPFC、NAc、Str、および、LSにおいてc-Fos発現により評価した神経活動変化は、マウスのRW回転行動に対するモチベーションに関与するものであることを明らかにした。今後、さらなる研究により、RW回転行動に対するモチベーションの形成・維持に関与する神経細胞種と神経伝達物質を明らかにすることで、行動嗜癖の病態神経メカニズムの解明に繋がると考えられる。

第4章 おわりに

本研究の第2章では、特定の脳部位の特定の神経細胞集団の活動を制御する DREADD システム、電気生理学および行動薬理学の研究手法を用いて、mPFC の抑制性ニューロンではなく、興奮性ニューロンの活性化がコカイン探索行動の獲得と発現に重要であることを明らかにした。

第3章では、マウスの執拗な RW 回転行動を、特定の行動に対する異常なモチベーションを示す行動嗜癖のモデルととらえ、RW 回転行動に対するモチベーション制御に mPFC、NAc、Str、および、LS が異なるタイミングで関与すること、また、各脳部位の神経活動上昇はモチベーションの変化を反映する可能性を示した。

コカイン関連記憶の形成と想起における mPFC 神経細胞の役割、および、特定の行動に対するモチベーションの形成・維持に関与する脳部位の時空間的な活動変化を明らかにした本研究の成果は、薬物依存症と行動嗜癖の病態メカニズムに関する基盤的知見を提供するものである。これらの知見に基づき、さらなる研究を遂行することにより、薬物依存症と行動嗜癖に対する治療薬・治療法の開発に繋がることが期待される。

参考文献

1. Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S. and Roth, B. L. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5163–5168 (2007).
2. Balleine, B. W. and O’Doherty, J. P. Human and rodent homologues in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* **35** 48–69 (2010).
3. Basso, J. C. and Morrell, J. I. The medial prefrontal cortex and nucleus accumbens mediate the motivation for voluntary wheel running in the rat. *Behav. Neurosci.* **129**, 457–472 (2015).
4. Belke, T. W. Running and responding reinforced by the opportunity to run: effect of reinforcer duration. *J. Exp. Anal. Behav.* **67**, 337–351 (1997).
5. Belke, T. W. and Heyman, G. M. A matching law analysis of the reinforcing efficacy of wheel running in rats. *Anim. Learn. Behav.* **22**, 267–274 (1994).
6. Belke, T. W. and Wagner, J. P. The reinforcing property and the rewarding aftereffect of wheel running in rats: A combination of two paradigms. *Behav. Processes* **68**, 165–172 (2005).
7. Brené, S. *et al.* Running is rewarding and antidepressive. *Physiol. Behav.* **92**, 136–140 (2007).
8. Buchta, W. C., Mahler, S. V., Harlan, B., Aston-Jones, G. S. and Riegel, A. C. Dopamine terminals from the ventral tegmental area gate intrinsic inhibition in the prefrontal cortex. *Physiol. Rep.* **5**, e13198 (2017).
9. Caballero, J. P., Scarpa, G. B., Remage-Healey, L. and Moorman, D. E. Differential Effects of Dorsal and Ventral Medial Prefrontal Cortex Inactivation during Natural Reward Seeking, Extinction, and Cue-Induced Reinstatement. *eneuro* **6**, ENEURO.0296-19.2019 (2019).
10. Calipari, E. S. *et al.* In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2726–2731 (2016).
11. Campanac, E. and Hoffman, D. A. Repeated cocaine exposure increases fast-spiking interneuron excitability in the rat medial prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.* **109**, 2781–2792 (2013).
12. Chefer, V. I., Wang, R. and Shippenberg, T. S. Basolateral amygdala-driven augmentation of medial prefrontal cortex gabaergic neurotransmission in response to environmental stimuli associated with cocaine administration. *Neuropsychopharmacology* **36**, 2018–2029 (2011).

13. Devan, B. D., Hong, N. S. and McDonald, R. J. Parallel associative processing in the dorsal striatum: Segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiology of Learning and Memory* **96** 95–120 (2011).
14. Dong, Y. *et al.* Cocaine-induced plasticity of intrinsic membrane properties in prefrontal cortex pyramidal neurons: Adaptations in potassium currents. *J. Neurosci.* **25**, 936–940 (2005).
15. Dong, Y. and White, F. J. Dopamine D1-class receptors selectively modulate a slowly inactivating potassium current in rat medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **23**, 2686–2695 (2003).
16. Farassat, N. *et al.* In vivo functional diversity of midbrain dopamine neurons within identified axonal projections. *Elife* **8**, (2019).
17. Floresco, S. B. The nucleus accumbens: An interface between cognition, emotion, and action. *Annu. Rev. Psychol.* **66**, 25–32 (2015).
18. Francis, T. C., Gantz, S. C., Moussawi, K. and Bonci, A. Synaptic and intrinsic plasticity in the ventral tegmental area after chronic cocaine. *Current Opinion in Neurobiology* **54** 66–72 (2019).
19. Greenwood, B. N. *et al.* Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behav. Brain Res.* **217**, 354–362 (2011).
20. Grigsby, K. B., Childs, T. E. and Booth, F. W. The role of nucleus accumbens CREB attenuation in rescuing low voluntary running behavior in female rats. *J. Neurosci. Res.* **98**, 2302–2316 (2020).
21. Han, D. H. *et al.* Brain activity and desire for Internet video game play. *Compr. Psychiatry* **52**, 88–95 (2011).
22. Hangya, B., Pi, H. J., Kvitsiani, D., Ranade, S. P. and Kepecs, A. From circuit motifs to computations: Mapping the behavioral repertoire of cortical interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* **26** 117–124 (2014).
23. Hervig, M. E. S. *et al.* Involvement of serotonin 2A receptor activation in modulating medial prefrontal cortex and amygdala neuronal activation during novelty-exposure. *Behav. Brain Res.* **326**, 1–12 (2017).
24. Hoffmann, P., Thoren, P. and Ely, D. Effect of Voluntary Exercise on Open-Field Behavior and on Aggression in the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). *Behavioral and Neural Biology* **47** (1987).
25. Hooks, M. S. and Kalivas, P. W. Involvement of dopamine and excitatory amino acid transmission in novelty- induced motor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 976–988 (1994).

26. Huang, C. C., Lin, H. J. and Hsu, K. Sen. Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* **17**, 1877–1888 (2007).
27. Hunnicutt, B. J. et al. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *Elife* **5**, e19103 (2016).
28. Isaac, W. L., Nonneman, A. J., Neisewander, J., Landers, T. and Bardo, M. T. Prefrontal Cortex Lesions Differentially Disrupt Cocaine-Reinforced Conditioned Place Preference but Not Conditioned Taste Aversion. *Behav. Neurosci.* **103**, 345–355 (1989).
29. Kaddis, F. G., Uretsky, N. J. and Wallace, L. J. Research report DNQX in the nucleus accumbens inhibits cocaine-induced conditioned place preference. *Brain Research* **697** (1995).
30. Knab, A. M., Bowen, R. S., Hamilton, A. T. and Lightfoot, J. T. Pharmacological manipulation of the dopaminergic system affects wheel-running activity in differentially active mice. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **26**, 119–129 (2012).
31. Ko, C. H. et al. Brain correlates of craving for online gaming under cue exposure in subjects with Internet gaming addiction and in remitted subjects. *Addict. Biol.* **18**, 559–569 (2013).
32. Lagström, O., Danielsson, K., Söderpalm, B., Ericson, M. and Adermark, L. Voluntary Ethanol Intake Produces Subregion-Specific Neuroadaptations in Striatal and Cortical Areas of Wistar Rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **43**, 803–811 (2019).
33. Legault, M. and Wise, R. A. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: Dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 819–828 (2001).
34. Liang, J. et al. Dynamic changes of tyrosine hydroxylase and dopamine concentrations in the ventral tegmental area-nucleus accumbens projection during the expression of morphine-induced conditioned place preference in rats. *Neurochem. Res.* **37**, 1482–1489 (2012).
35. Liu, X. et al. CaMKII activity in the ventral tegmental area gates cocaine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* **39**, 989–999 (2014).
36. Lukaszewska, I. and Mlodkowska, Z. Exploratory motivation in response-to-change test in rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **40**, 161–171 (1980).
37. Luo, Z., Volkow, N. D., Heintz, N., Pan, Y. and Du, C. Acute cocaine induces fast activation of D1 receptor and progressive deactivation of D2 receptor striatal neurons: In vivo optical microprobe [Ca²⁺] i imaging. *J. Neurosci.* **31**, 13180–13190 (2011).

38. Matsumoto, M., Matsumoto, K. and Tanaka, K. Effects of novelty on activity of lateral and medial prefrontal neurons. *Neurosci. Res.* **57**, 268–276 (2007).
39. McFarland, K. and Kalivas, P. W. The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J. Neurosci.* **21**, 8655–8663 (2001).
40. McGlinchey, E. M. and Aston-Jones, G. Dorsal hippocampus drives context-induced cocaine seeking via inputs to Lateral Septum. *Neuropsychopharmacology* **43**, 987–1000 (2018).
41. McGlinchey, E. M., James, M. H., Mahler, S. V., Pantazis, C. and Aston-Jones, G. Prelimbic to accumbens core pathway is recruited in a dopamine-dependent manner to drive cued reinstatement of Cocaine Seeking. *J. Neurosci.* **36**, 8612–8623 (2016).
42. Medrano, M. C. *et al.* Exercise craving potentiates excitatory inputs to ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Addict. Biol.* **26**, (2021).
43. Miller, C. A. and Marshall, J. F. Altered Fos expression in neural pathways underlying cue-elicited drug seeking in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1385–1393 (2005).
44. Miller, C. A. and Marshall, J. F. Altered prelimbic cortex output during cue-elicited drug seeking. *J. Neurosci.* **24**, 6889–6897 (2004).
45. Muguruza, C. *et al.* The motivation for exercise over palatable food is dictated by cannabinoid type-1 receptors. *JCI Insight* **4**, (2019).
46. Muller Ewald, V. A. and LaLumiere, R. T. Neural systems mediating the inhibition of cocaine-seeking behaviors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **174** 53–63 (2018).
47. Muñoz-Cuevas, F. J., Athilingam, J., Piscopo, D. and Wilbrecht, L. Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.* **16**, 1367–1369 (2013).
48. Nasif, F. J., Hu, X. T. and White, F. J. Repeated cocaine administration increases voltage-sensitive calcium currents in response to membrane depolarization in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **25**, 3674–3679 (2005).
49. Nasif, F. J., Sidiropoulou, K., Hu, X. T. and White, F. J. Repeated cocaine administration increases membrane excitability of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1305–1313 (2005).

50. Otis, J. M., Dashew, K. B. and Mueller, D. Neurobiological dissociation of retrieval and reconsolidation of cocaine-associated memory. *J. Neurosci.* **33**, 1271–1281 (2013).
51. Otis, J. M. and Mueller, D. Reversal of Cocaine-Associated Synaptic Plasticity in Medial Prefrontal Cortex Parallels Elimination of Memory Retrieval. *Neuropsychopharmacology* **42**, 2000–2010 (2017).
52. Pantazis, C. B. and Aston-Jones, G. Lateral septum inhibition reduces motivation for cocaine: Reversal by diazepam. *Addict. Biol.* **25**, (2020).
53. Pena-Bravo, J. I., Reichel, C. M. and Lavin, A. Abstinence from cocaine-induced conditioned place preference produces discrete changes in glutamatergic synapses onto deep layer 5/6 neurons from prelimbic and infralimbic cortices. *eNeuro* **4**, (2017).
54. Rhodes, J. S. and Garland, T. Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology (Berl)*. **167**, 242–250 (2003).
55. Richter, S. H., Gass, P. and Fuss, J. Resting is rusting: A critical view on rodent wheel-running behavior. *Neuroscientist* **20** 313–325 (2014).
56. Rinaldi, A., Romeo, S., Agustín-Pavón, C., Oliverio, A. and Mele, A. Distinct patterns of Fos immunoreactivity in striatum and hippocampus induced by different kinds of novelty in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **94**, 373–381 (2010).
57. Shinohara, F., Kamii, H., Minami, M. and Kaneda, K. The Role of Dopaminergic Signaling in the Medial Prefrontal Cortex for the Expression of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference in Rats. *Biol. Pharm. Bull* **40** (1983).
58. Slaker, M. *et al.* Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J. Neurosci.* **35**, 4190–4202 (2015).
59. Sonnenberg, J. L., Macgregor-Leon, P. F., Carrant, T. and Morgant, J. I. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* **3**, 359–365 (1989).
60. Stefanik, M. T. *et al.* Optogenetic inhibition of cocaine seeking in rats. *Addict. Biol.* **18**, 50–53 (2013).
61. Sun, Y. *et al.* Brain fMRI study of crave induced by cue pictures in online game addicts (male adolescents). *Behav. Brain Res.* **233**, 563–576 (2012).

62. Swapna, I., Bondy, B. and Morikawa, H. Differential Dopamine Regulation of Ca²⁺ Signaling and Its Timing Dependence in the Nucleus Accumbens. *Cell Rep.* **15**, 563–573 (2016).
63. Tremblay, R., Lee, S. and Rudy, B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* **91** 260–292 (2016).
64. Tzschentke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* **56**, 613–672 (1998).
65. Tzschentke, T. M. and Schmidt, W. J. Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: Effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 4099–4109 (1999).
66. Ungless, M. A., Whistler, J. L., Malenka, R. C. and Bonci, A. Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**, 583–587 (2001).
67. Vega-Quiroga, I., Yarur, H. E. and Gysling, K. Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors. *Neuropharmacology* **128**, 76–85 (2018).
68. Ventura, R., Morrone, C. and Puglisi-Allegra, S. Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward-and aversion-related stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5181–5186 (2007).
69. Werme, M. *et al.* ΔFosB regulates wheel running. *J. Neurosci.* **22**, 8133–8138 (2002).
70. Wirtshafter, H. S. and Wilson, M. A. Title: Differences in reward biased spatial representations in the lateral septum and hippocampus. *Elife* **9**, (2020).
71. Witkowski, G., Szulczyk, B., Rola, R. and Szulczyk, P. D1 dopaminergic control of G protein-dependent inward rectifier K⁺ (GIRK)-like channel current in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **155**, 53–63 (2008).
72. World drug report (2005), <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR-2005.html>
73. World health organization meeting report: Public health implications of excessive use of the internet, computers, smartphones and similar electronic devices. Main meeting hall, Foundation for promotion of cancer research national cancer research centre, Tokyo, Japan, 27-29 August 2014

74. Yang, H. *et al.* Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* **97**, 434-449.e4 (2018).
75. Zahm, D. S. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. in *Annals of the New York Academy of Sciences* **877** 113–128 (1999).
76. Zhang, T. *et al.* Activation of GABAergic neurons in the nucleus accumbens mediates the expression of cocaine-associated memory. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 1084–1088 (2018).
77. Zhu, X., Ottenheimer, D. and DiLeone, R. J. Activity of D1/2 receptor expressing neurons in the nucleus accumbens regulates running, locomotion, and food intake. *Front. Behav. Neurosci.* **10**, (2016).
78. 日本学術会議、アディクション問題克服に向けた学術活動のあり方に関する提言 (2020)
<https://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/kohyo-24-t286-6-abstract.html>
79. 樋口進、やめられない怖い依存症！ゲーム障害はひきこもりの原因にも治療法について
(2021/6/20 更新) https://www.nhk.or.jp/kenko/atc_883.html

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域薬学系薬理学研究室 教授・金田勝幸 先生、同研究室 准教授・出山諭司 先生、同研究室 助教・西谷直也 先生に謹んで感謝の意を表します。特に主指導教官として研究指導をしていただきました金田勝幸 先生には重ねて感謝いたします。

また、AAV ベクターを提供していただきました、京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 教授・金子周司 先生、同研究室 助教・永安一樹 先生並びに、*in situ* ハイブリダイゼーション法に関するご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系統合神経生理学分野 教授・三枝理博 先生および同研究室 准教授・前島隆司 先生に謹んで感謝の意を表します。

最後に折に触れ有益な御助言、御討論いただきました薬理学研究室の諸先輩方、同級生、後輩、そして研究生活を支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。