

学位論文要旨

Addictions to drugs and behaviors have become major social problems, but their neural mechanisms remain unclear. Although the medial prefrontal cortex (mPFC) has been reported to be involved in cocaine addiction, it remains unknown whether excitatory and inhibitory mPFC neurons are causally related to the formation and retrieval of cocaine-associated memories. We, firstly, investigated this issue using chemogenetic technology combined with a cocaine-induced conditioned place preference (CPP) paradigm. Chemogenetic suppression of mPFC pyramidal, but not GABAergic, neurons significantly attenuated both the acquisition and expression of cocaine CPP, suggesting that activation of mPFC glutamatergic neurons mediates the formation and retrieval of cocaine-associated memories.

Rodents have strong motivation to rotate running wheels (RWs), which might reflect addictive behaviors. We, secondly, used RW rotation as a model of behavioral addiction, and investigated changes of neuronal activity in the brain reward circuitry associated with motivation for wheel running in mice. Exposure to RWs increased the number of c-Fos (a neuronal activity marker)-positive cells in the mPFC, nucleus accumbens (NAc), striatum (Str), and lateral septum (LS) in an experience-dependent manner. Overnight access to RWs exhibited high and low rotation numbers at the start and end of the session, respectively. Consistent with these changes, c-Fos-positive cell numbers in the mPFC, NAc, Str, and LS at the start of the session was higher than those at the end of the session, suggesting the involvement of these brain regions in the motivation for RW rotations.

These findings suggest that the mPFC plays a critical role in cocaine addiction and that the brain reward circuitry may be crucial for the development of behavioral addiction.

【背景・目的】

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、その対象によって物質依存症と行動嗜癖に分類される。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、ネットやゲームなどに対する重度の嗜癖により、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。

薬物依存症には、依存性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、細胞外のドー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、その使用者は世界中で1400万人と推計されている。コカイン報酬記憶の形成と想起には、ドー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变化が重要であると考えられている。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していることが示唆されているが、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獲得および発現における 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。したがって、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。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が知られている。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強いモチベーションを示すことから、本研究の後半では、このマウスの 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。

【方法】

条件付け場所嗜好性 (CPP) テスト：CPP テストは薬物報酬効果を検出する有用な方法の一つで、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。本実験では、識別できる 2 つの部屋 (それぞれ 15 × 24 × 30 cm) から成る装置を用いた。条件づけ前に、マウスが上記の二つの文脈に対する興味を計測するために、プレテストを行い、各部屋における滞在時間を計測した。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を測定した (ポストテスト)。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。この値が大きいほど、コカイン CPP が強いことを示している。

化学遺伝学的手法である Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) システムによる mPFC の細胞種特異的な活動抑制：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 を WT マウスの mPFC に、抑制性ニューロン (GAD67 陽性ニューロン) に導入できるように設計された

AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry または AAV-DJ-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry を *GAD67-Cre* マウスの mPFC に注入した。注入から少なくとも 2 週間以上の待機期間をおいた後、CPP テストを行った。CNO (10 mg/kg, i.p.) または vehicle (生理食塩水 10 mL/kg, i.p.) はコカイン条件づけ、あるいは、ポストテストの 30 分前に投与した。

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 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、乗るまでの潜時は手動で計測した。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。

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 : 上記と同様に 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。

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。

【結果】

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 の興奮性ニューロンに hM4Di を発現させた WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスでは、vehicle 投与群と比較して、CNO 投与群の CPP score が有意に減少したが、mPFC の抑制性ニューロンに hM4Di を発現させた *GAD67-Cre*^{mPFC}/hM4Di マウスでは、CPP score に両群間で有意な差は認められなかった。

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 : コ

コカイン探索行動の発現段階に、mPFC の興奮性ニューロンに hM4Di を発現させた WT^{mPFC}/CaMKII-hM4Di マウスでは、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が、mPFC の抑制性ニューロンに hM4Di を発現させた GAD67-Cre^{mPFC}/hM4Di マウスでは、両群間で有意な差は認められなかった。

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。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。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。

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：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、mPFC、NAc、Str、および、LS の c-Fos 発現を評価した結果、run 群では、control 群、あるいは、non-run 群に比べ、上記のいずれの脳部位においても c-Fos 陽性細胞数の増加が認められ、そのタイミングは脳部位毎に異なっていた。

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：回転数の安定後に、ロックした RW に 7 日間以上接触させても、mPFC、NAc、Str、および、LS の大部分において、c-Fos 陽性細胞数は増加したままであった。

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：マウスを 6 日間にわたり暗期に 12 時間 RW に接触させると、接触開始初期の数時間では高い回転数を示したのに対し、最後の数時間では低い回転数を示した。したがって、長時間の接触は、RW 回転行動に対するモチベーションを低下させることが示唆された。そこで、RW に 2.5 時間あるいは 13.5 時間接触させた後、各脳部位の c-Fos 陽性細胞数を計測したところ、多くの脳領域において、control 群、または、non-run 群と比較して、2.5 時間 run 群では c-Fos 陽性細胞数は増加していたが、13.5 時間 run 群では有意な変化は見られなかった。

【考察】

本研究の前半では、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

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。

後半では、マウスの RW 回転行動を行動嗜癖のモデルとして利用することで、RW 回転行動に対するモチベーションに関与する脳部位を探索し、以下のことを明らかにした。(1) 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。(2) Day 1、9、20-24 において、mPFC、NAc、Str、および、LS の c-Fos 陽性細胞数は異なるタイミングで増加した。(3) 回転数の安定後に、ロックした RW に 7 日間以上接触させても、mPFC、NAc、Str、および、LS の大部分において、c-Fos 陽性細胞数は増加したままであった。(4) RW に 2.5 時間あるいは 13.5 時間接触させた後、各脳部位の c-Fos 陽性細胞数は多くの脳領域において、2.5 時間 run 群では増加していたが、13.5 時間 run 群では有意な変化は見られなかった。以上より、マウスは RW 回転行動に対して持続的で強いモチベーションを形成し、その過程では、各脳部位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ことが示唆された。

審査結果の要旨

本研究の前半では、コカイン関連記憶の形成・想起における内側前頭前野（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。その結果、関連記憶の形成・想起における mPFC 興奮性ニューロンの活動抑制は、コカイン場所嗜好性（CPP）を低下させたが、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。以上より、mPFC の抑制性ニューロンではなく、興奮性ニューロンがコカイン関連記憶の形成・想起に重要であることが示唆された。

本研究の後半では、マウスの執拗なランニングホイール（RW）回転行動を、特定の行動に対して異常なモチベーションを示す行動嗜癖のモデルとして利用し、RW 回転行動に対するモチベーション制御に関与する脳部位を探索した。RW への接触開始 1 日目、安定期の約 80% の回転数を示す 9 日目、および安定期である 20-24 日目の 3 つのタイミングで、薬物依存に関連する mPFC、側坐核、線条体、および、外側中隔核における神経活動を評価したところ、RW 非接触群とロックした RW に接触させた群（ロック群）に比較して、各脳部位の神経活動は RW 回転行動の経験日数依存的に上昇した。次に、マウスを 6 日間にわたり暗期の 12 時間 RW に接触させたところ、接触開始初期の数時間では高い回転数を示したのに対し、後期の数時間では低い回転数を示したことから、長時間の接触は、RW 回転行動に対するモチベーションを低下させることが示唆された。そこで、RW に 2.5 時間あるいは 13.5 時間接触させた後、各脳部位の c-Fos 陽性細胞数を計測したところ、多くの脳領域において、ロック群と比較して、2.5 時間群では c-Fos 陽性細胞数は増加していたが、13.5 時間群では有意な変化は見られなかった。以上より、各脳部位が異なるタイミングで RW 回転行動に関与すること、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ことが示唆された。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ため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。