



Title	ストレスによるコカイン欲求行動の増強機構の解明：内側前頭前皮質におけるノルアドレナリンおよびドパミン作動性神経伝達の役割
Author(s)	篠原, 史弥
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第14666号
Issue Date	2021-09-24
DOI	10.14943/doctoral.k14666
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/83331
Type	theses (doctoral)
File Information	Fumiya_Shinohara.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

ストレスによるコカイン欲求行動の増強機構の解明
—内側前頭前皮質におけるノルアドレナリンおよび
ドパミン作動性神経伝達の役割—

篠原 史弥

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬理学研究室

2021年9月

略語表	1
使用試薬	3
序章	5

第 I 章

ストレスによるコカイン欲求行動の増強における背外側被蓋核-腹側被蓋野-内側前頭前皮質の関与

I-1. 実験方法	7
I-1-1. 使用動物	
I-1-2. 脳内薬物微量投与	
I-1-3. 条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験	
I-1-4. ロタロッド試験	
I-1-5. 統計解析	
I-2. 実験結果	9
I-2-1. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強	
I-2-2. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における LDT への NA 作動性神経情報伝達の関与	
I-2-3. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における VTA へのコリンおよびグルタミン酸作動性神経情報伝達の関与	
I-2-4. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における mPFC への DA 作動性神経情報伝達の関与	
I-3. 考察	18

第 II 章

内側前頭前皮質におけるドパミンおよびノルアドレナリンの相互作用

II-1. 実験方法	22
II-1-1. 使用動物	
II-1-2. インビボマイクロダイアリシス	
II-1-3. 条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験	
II-1-4. 免疫染色	
II-1-5. 電気生理学的解析	
II-1-6. 統計解析	
II-2. 実験結果	25

II-2-1. mPFC における細胞外 DA および NA 量に対する拘束ストレス負荷の影響	
II-2-2. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強時の mPFC における c-Fos 発現	
II-2-3. mPFC 錐体細胞の興奮性に対する DA および NA の作用	
II-3. 考察	34
終章	38
参考文献	39
謝辞	44

略語表

ACh	acetylcholine
AMPA	α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
ANOVA	analysis of variance
AP5	2-amino-5-phosphonopentanoic acid
AP5/CNQX	cocktail of AP5 and CNQX
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPP	conditioned place preference
DA	dopamine
DA+NA	cocktail of DA and NA
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
GABA	gamma-aminobutyric acid
GIRK	G protein-activated inwardly rectifying potassium channel
GTP	guanosine triphosphate
Gua	guanfacine
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
i.p.	intraperitoneal
Iso	isoproterenol
LC	locus coeruleus
LDT	laterodorsal tegmental nucleus
Mec	mecamylamine
mPFC	medial prefrontal cortex
NA	noradrenaline
NA+DA	cocktail of NA and DA
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDG	N-methyl-D-glucamine diatrizoate
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	3% Triton X-100 in phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
Rac	raclopride

RX	RX821002
SCH	SCH23390
Sco	scopolamine
sEPSC	spontaneous excitatory postsynaptic current
Tera	terazosin
Tim	timolol
TREK2	tandem pore domain weak inward rectifier K ⁺ channel-related K ⁺ channel-2
Veh	vehicle
VTA	ventral tegmental area
5-HT	5-hydroxytryptamine

使用試薬

ammonium acetate	和光純薬工業（株），大阪
anti-c-Fos antibody (sc-52)	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
BSA	和光純薬工業（株），大阪
CaCl₂	和光純薬工業（株），大阪
CNQX disodium salt hydrate	Sigma, St Louis, MO, USA
cocaine HCl	武田薬品（株），大阪
cresyl violet	東京化成（株），東京
dl-AP5	Sigma, St Louis, MO, USA
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A21206)	Invitrogen, Paisley, UK
dopamine hydrochloride	Sigma, St Louis, MO, USA
EDTA	関東化学（株），東京
EGTA	Sigma, St Louis, MO, USA
guanfacine HCl	和光純薬工業（株），大阪
gluconic acid	和光純薬工業（株），大阪
glucose	Sigma, St Louis, MO, USA
HCl	和光純薬工業（株），大阪
HEPES	同人化学研究所（株），熊本
isoflurane	Pfizer, USA
(-)-isoproterenol (+)-bitartrate	Sigma, St Louis, MO, USA
KCl	Sigma, St Louis, MO, USA
mecamylamine HCl	Sigma, St Louis, MO, USA
methanol	和光純薬工業（株），大阪
MgCl₂ · 6H₂O	Sigma, St Louis, MO, USA
MgSO₄ · 7H₂O	和光純薬工業（株），大阪
Na₂-ATP	Sigma, St Louis, MO, USA
N-acetyl-L-cysteine	Sigma, St Louis, MO, USA
NaCl	和光純薬工業（株），大阪
Na₂-GTP	Sigma, St Louis, MO, USA
NaHCO₃	Sigma, St Louis, MO, USA
Na₂HPO₄	ナカライテスク（株），京都
NaH₂PO₄ · 2H₂O	Sigma, St Louis, MO, USA

NMDG	Sigma, St Louis, MO, USA
noradrenaline hydrochloride	Sigma, St Louis, MO, USA
PFA	Sigma, St Louis, MO, USA
raclopride	Tocris Bioscience
R (+)-SCH23390 HCl	Sigma, St Louis, MO, USA
RX821002 HCl	Sigma, St Louis, MO, USA
(-)-scopolamine HCl	Sigma, St Louis, MO, USA
sodium ascorbate	和光純薬工業（株），大阪
sodium pentobarbital	Sigma, St Louis, MO, USA
sodium pyruvate	ナカライテスク（株），京都
sodium sulfate	ナカライテスク（株），京都
spermine	Sigma, St Louis, MO, USA
sucrose	ナカライテスク（株），京都
terazosin HCl	Sigma, St Louis, MO, USA
thionin acetate	東京化成（株），東京
thiourea	Sigma, St Louis, MO, USA
timolol maleate	Sigma, St Louis, MO, USA
Triton X-100	ナカライテスク（株），京都
Vectashield mounting medium	Vector Laboratories, Peterborough, UK

序章

薬物依存症は、コカインを含む乱用薬物への異常な欲求行動の繰り返しにより日常生活に支障を生じさせる精神疾患である。世界的な社会問題となっている薬物依存症ではあるが、有効性の高い治療法は確立されていない。特にコカイン依存症においては、本邦を含む全世界において当局による承認治療薬はなく、いくつかの薬剤が適応外で治療に使用されているものの、その効果は限定的である¹⁾。以上のことから、有効性の高い新規コカイン依存症治療薬が強く望まれている。コカイン依存症治療においては、異常なコカイン欲求行動の制御が重要である。ヒトやげっ歯類において、ストレスがコカイン欲求行動を惹起あるいは増強することが知られているが^{2,3)}、そのメカニズムには不明な点が多く、コカイン依存症新規治療薬創製に向けて、ストレスによるコカイン欲求行動の惹起・増強のメカニズムを理解することは重要である。

これまでの研究により、薬物欲求行動の発現には腹側被蓋野 (VTA) のドパミン (DA) 作動性ニューロンを中心とする脳内報酬系が関与すると考えられている⁴⁻⁷⁾。背外側被蓋核 (LDT) は脳幹に存在するコリン作動性神経の起始核として知られ⁸⁾、VTADA 作動性ニューロンの活動制御に関与することが示唆されている⁹⁾。さらに、我々はこれまでに、コカイン欲求行動の発現において LDT の関与を示唆するデータを示してきた¹⁰⁻¹²⁾。また、ストレス負荷により活性化することが知られている青斑核 (LC) のノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロンは¹³⁾、LDT に密に投射している (Figure 1)¹⁴⁾。以上のことから、LDT への NA 作動性神経情報伝達の亢進と、それに続く LDT コリン作動性ニューロンの活動変化、さらには、VTADA 作動性ニューロンの活動変化が、ストレスによるコカイン欲求行動に関与する可能性が考えられるが、この点は明らかにはなっていない。

内側前頭前皮質 (mPFC) は、ヒトやげっ歯類において渴望感の生成に中心的な役割を担っている脳領域である¹⁵⁻¹⁸⁾。さらに、mPFC は VTA から DA 作動性投射を、LC から NA 作動性投射を受けている (Figure 1)¹⁹⁻²¹⁾。以上より、ストレスによるコカイン欲求行動に mPFC への DA および NA 作動性神経情報伝達も関与する可能性が考えられるが、これについても明らかではない。

そこで、これらの点について検討するため本研究では、条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験を用いて、ストレスによるコカイン欲求行動の惹起あるいは増強に LDT、VTA、および、mPFC への神経情報伝達に関与するの否かについて検討した (第 I 章)。さらに、mPFC において DA および NA 作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン欲求行動の制御に関与しているのであれば、mPFC ニューロンの活動調節におけるこれら神経情報伝達がどのような影響を与えているかについても神経化学的、組織化学的、および、電気生理学的実験により検討した (第 II 章)。

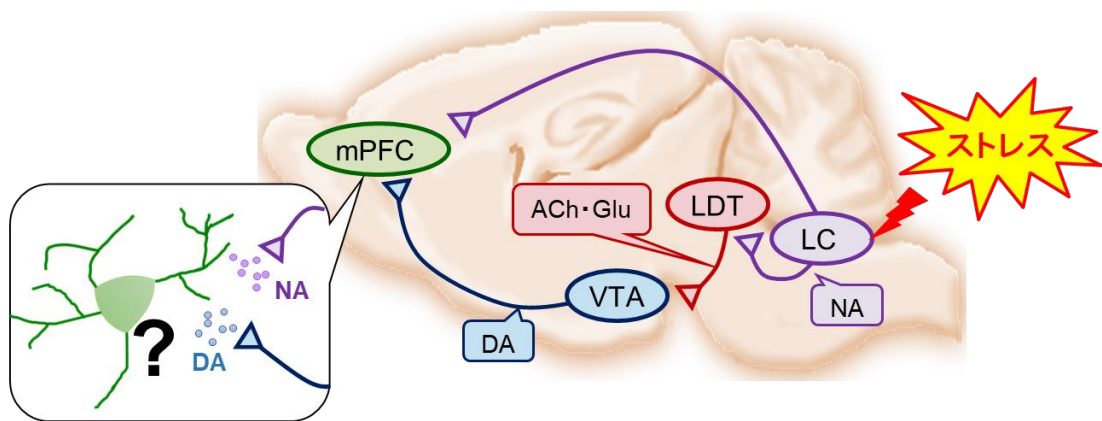


Figure 1. 背外側被蓋核 (LDT) -腹側被蓋野 (VTA) -内側前頭前皮質 (mPFC) 経路と
 ストレス応答神経核である青斑核 (LC)
 DA : ドパミン、NA : ノルアドレナリン、ACh : アセチルコリン、Glu : グルタミン酸

第 I 章 ストレスによるコカイン欲求行動の増強における背外側被蓋核-腹側被蓋野-内側前頭前皮質の関与

I-1 実験方法

I-1-1. 使用動物

雄性 Sprague-Dawley 系ラット（実験開始時：170–250 g）を使用した。動物は 12 時間の明暗サイクルおよび温度保持（ $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ）環境下で、自由摂水摂食が可能な条件で飼育した。全ての動物実験は、3R の原則（使用動物数の削減、代替法の利用、苦痛軽減を中心とする動物実験の洗練）に配慮して動物実験を計画し、北海道大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

I-1-2. 脳内薬物微量投与

ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i.p.）麻酔下にて、両側の LDT（Bregma より尾側 9.0 mm、外側 0.83 mm、腹側 7.0 mm の位置）、VTA（Bregma より尾側 5.8 mm、外側 1.0 mm、腹側 8.5 mm の位置）、および、mPFC（Bregma より吻側 3.0 mm、外側 0.67 mm、腹側 4.0 mm の位置）に薬物微量投与用のステンレス製ガイドカニューレ（25 ゲージ、外径 0.5 mm、内径 0.22 mm）の先端が位置するように埋め込んだ²²⁾。LDT へのガイドカニューレ埋め込み手術の際は、カニューレを垂直から 22° 尾側方向に傾けて挿入した。埋め込み手術後、ラットは個別に飼育して、6-9 日間の回復期間を設けた。また、行動試験開始の 3 日前から毎日ハンドリング操作を行った。脳内への薬物微量投与は、33 ゲージのステンレス製インジェクションカニューレ（外径 0.2 mm、内径 0.08 mm）を用いて実施した。ガイドカニューレを通してインジェクションカニューレを挿入し、覚醒下で投与した（LDT; 0.2 μL 、0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、VTA および mPFC; 0.5 μL 、0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。投与終了後、薬液の逆流を防ぐために 1 分間インジェクションカニューレを静置した。

行動試験終了後に、各動物の脳内への薬物投与部を確認し、標的脳領域外への投与が確認された個体のデータは除外した。薬物投与部の確認は、以下のように実施した。チオニン（1.0%）およびクレシルバイオレット（1.0%）の混合液を薬液と同条件で各脳領域に投与した。断頭により安楽死し、ラットの脳を素早く取出し、粉末状のドライアイスで凍結した。クリオスタット（Leica CM3050; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany）を用いて LDT、VTA あるいは mPFC を含む冠状切片（50 μm ）を作成し、対比染色後、顕微鏡（ $\times 40$ ）により薬物注入部位を確認した。

I-1-3. 条件付け場所嗜好性（CPP）試験

本試験では視覚的、触覚的に識別可能な 2 つのコンパートメント（それぞれ $30 \times 30 \times 30$ cm）から成る装置（Muromachi Kikai, Tokyo, Japan）を用いた（Figure 2a）。一方のコンパー

トメントは黒色かつ床にステンレス格子が設置され、もう一方は白色かつ床にステンレス金網が設置されている。1日目（馴化）と2日目（プレテスト）は、2つのコンパートメントを900秒間ラットに自由探索させ、各コンパートメントに設置した赤外線センサー（Supermex, Muromachi Kikai）により、動物の各コンパートメント滞在時間と運動量を測定した。2日目に、一方のコンパートメントにおける滞在時間が測定時間の80%以上（720秒以上）の個体、あるいは、1日目と2日目で一方のコンパートメントにおける滞在時間が200秒以上違う個体は試験から除外した。2日目において滞在時間が短かったコンパートメントをコカインによる条件付けを行うコンパートメント（cocaine-paired side）とした。4-9日目の間は、ラットにコカイン（5あるいは20 mg/kg, i.p.）あるいは生理食塩水（1 mL/kg, i.p.）を毎日交互に投与し、投与直後に一方のコンパートメントに30分間閉じ込めた。11日目（ポストテスト）は、1、2日目と同じく、2つのコンパートメントを900秒間ラットに自由探索させ、各コンパートメントにおける滞在時間と運動量を測定した。ただし、ストレス負荷動物においては、ポストテスト開始直前に、プラスチック製拘束バッグ（DecapiCones, Briantree Scientific）を用いて、15あるいは30分間の拘束ストレスを負荷し（Figure 2b）、非ストレス負荷動物においては、15あるいは30分間ストレスを負荷せずホームケージにて静置した。脳内への薬物微量投与を行う場合は、ストレス負荷の直前に実施した（Figure 2b）。CPP score はポストテストとプレテストの cocaine-paired side における滞在時間の差として算出した。

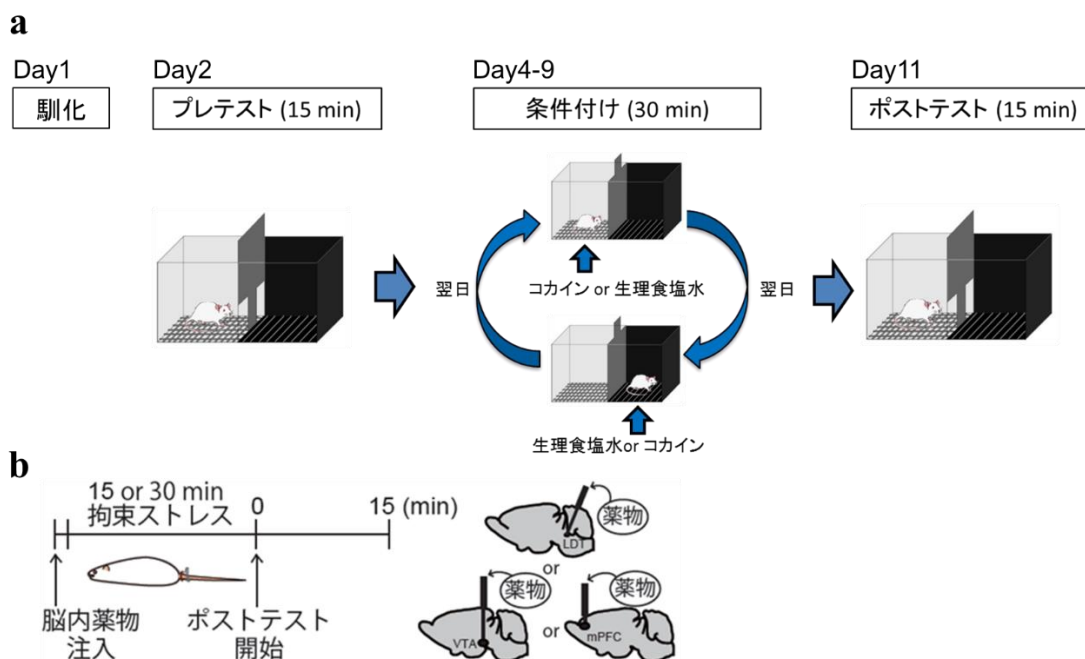


Figure 2. 条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験の概略

- a. CPP試験全体の流れ
b. ポストテストにおける試験操作の流れ

I-1-4. ロタロッド試験

1 日目にプレテスト、2 日目にテストを行った。両日ともに、等加速度的に回転速度が上昇するロタロッド装置（ENV-575、Med Associates、初速度：4 rounds/min、加速度：7.2 rounds/min²）にラットをのせ、ラットが落下するまでの時間を最大 5 分まで測定し、協調性運動機能を評価した。2 日目において、ストレス負荷群の動物には I-1-3 に準じた方法で 30 分間拘束ストレスを負荷し、非ストレス負荷群の動物にはストレスを負荷せず 30 分間ホームケージにて静置した後に、テストを実施した。

I-1-5. 統計解析

データは全て平均値±標準誤差で表記した。統計学的有意差は、2 群の比較については Student's *t*-test を用いて評価し、3 群以上の比較については one-way ANOVA、two-way ANOVA、あるいは、two-way repeated measures ANOVA および Holm-Sidak *post hoc* test を用いて評価した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

I-2 実験結果

I-2-1. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強

ストレスによるコカイン欲求行動の制御にどのような脳領域のどのような神経情報伝達に関与するのかについては不明な点が多い。この点の検討をするためにまずは、ストレスによるコカイン欲求行動の増強を評価する試験系の構築を試みた。CPP 試験では、薬物の報酬刺激と場所条件刺激を組み合わせて提示することで成立する連合学習（条件付け）の後に、場所条件刺激のみを提示することで薬物と関連付けられた場所への滞在時間の増加を計測し（ポストテスト）、増加した滞在時間を薬物への欲求行動の指標とする。本研究では、CPP 試験のポストテストの直前に拘束ストレス負荷を行い、コカイン（5 mg/kg）誘導性場所嗜好性がどのような影響を受けるかについて検討した。15 あるいは 30 分間の拘束ストレスを負荷した結果、two-way ANOVA を用いた解析により、拘束ストレス負荷による効果とその負荷時間による効果はそれぞれ単独では CPP score に対して有意な影響は与えなかったが（拘束ストレス負荷による効果、 $F_{1,22} = 4.132$ 、 $P = 0.0543$ ；ストレス負荷時間による効果、 $F_{1,22} = 1.613$ 、 $P = 0.2173$ ）、これらの効果の間には有意な交互作用が認められた（ $F_{1,22} = 4.414$ 、 $P = 0.0473$ ）。また、Holm-Sidak *post hoc* test により、15 分間のストレス負荷群と非ストレス負荷群の CPP score の間には有意な差がなかったものの（非ストレス負荷群、 106.2 ± 53.2 s、 $n = 6$ 、15 分ストレス負荷群、 102.7 ± 64.6 s、 $n = 6$ 、 $P = 0.9633$ 、two-way ANOVA followed by a *post hoc* Holm-Sidak test）、30 分間のストレス負荷群の CPP score は非ストレス負荷群に比べて有意に大きいことがわかった（非ストレス負荷群、 63.64 ± 48.7 s、 $n = 7$ 、30 分ストレス負荷群、 275.21 ± 25.7 s、 $n = 7$ 、 $P = 0.0119$ 、two-way ANOVA followed by a *post hoc* Holm-Sidak test; Figure 3a）。生理食塩水のみで条件付けを行った動物において、30 分間のストレス負荷群と非ストレス負荷群の CPP score の間に有意な差は認められなかったことから（非ストレ

ス負荷群、 -30.5 ± 59.3 s、 $n=8$ 、ストレス負荷群、 2.63 ± 27.2 s、 $n=6$ 、 $t_{12}=0.524$ 、 $P=0.6096$ 、Student's *t*-test; Figure 3b)、Figure 3a にて示した 30 分間の拘束ストレス負荷による CPP score の増大は、コカイン誘導性場所嗜好性の増強によるものであることが考えられた。本試験系により、ストレスによるコカイン欲求行動増強の評価が可能であることが示された。

拘束ストレス負荷後の自発運動量への影響を調べるために、ポストテスト時の運動量を解析した。Two-way ANOVA を用いた解析により、ポストテスト時の運動量に対して、拘束ストレス負荷時間による効果は有意な影響を与えなかったが ($F_{1,22} = 0.4348$ 、 $P = 0.5165$)、拘束ストレス負荷による効果は有意な影響を与えた ($F_{1,22} = 11.77$ 、 $P = 0.0024$)。これらの効果の間には有意な交互作用は認められなかった ($F_{1,22} = 1.839$ 、 $P = 0.1888$)。Holm-Sidak *post hoc test* により、15 分間のストレス負荷群と非ストレス負荷群の間には有意な差は認められなかったが (15 分非ストレス負荷群、 3563 ± 256 、 $n=6$ 、15 分ストレス負荷群、 3109 ± 190 、 $n=6$ 、 $P=0.1714$ 、two-way ANOVA followed by a *post hoc* Holm-Sidak test)、30 分間の拘束ストレス負荷群の自発運動量は非ストレス負荷群に比べて有意に少なかった (30 分非ストレス負荷群、 3715 ± 151 、 $n=7$ 、30 分ストレス負荷群、 2668 ± 258 、 $n=7$ 、 $P=0.0038$ 、two-way ANOVA followed by a *post hoc* Holm-Sidak test; Figure 3c)。また、生理食塩水のみで条件付けを行った動物においても、30 分間の拘束ストレス負荷により、有意な自発運動量の減少が認められた (非ストレス負荷群、 3841 ± 127 、 $n=8$ 、ストレス負荷群、 2732 ± 158 、 $n=6$ 、 $t_{12} = 5.544$ 、 $P = 0.0001$ 、Student's *t*-test; Figure 3d)。以上より、コカインによる条件付けの有無に関わらず、30 分間の拘束ストレス負荷は自発運動量を抑制することが示された。この運動量の低下が協調性運動機能障害に起因するものであるか否かは不明であったため、この点についてロタロッド試験を用いて検討した。Two-way repeated measures ANOVA による解析により、協調性運動機能の指標であるロッド滞在時間は、30 分間の拘束ストレス負荷群および非拘束ストレス負荷群のいずれにおいても、プレテストに比べてテスト時に有意な増加が認められ馴化効果が確認され (ストレス負荷群、 $n = 7$ 、非ストレス負荷群、 $n = 6$ 、 $F_{1,11} = 29.73$ 、 $P = 0.0002$)、テスト時のロッド滞在時間は群間で有意な差は認められなかった ($F_{1,11} = 0.6661$ 、 $P = 0.4317$; Figure 3e)。したがって、30 分間の拘束ストレス負荷による自発運動量の低下は協調性運動機能障害に起因するものではないことが示唆された。

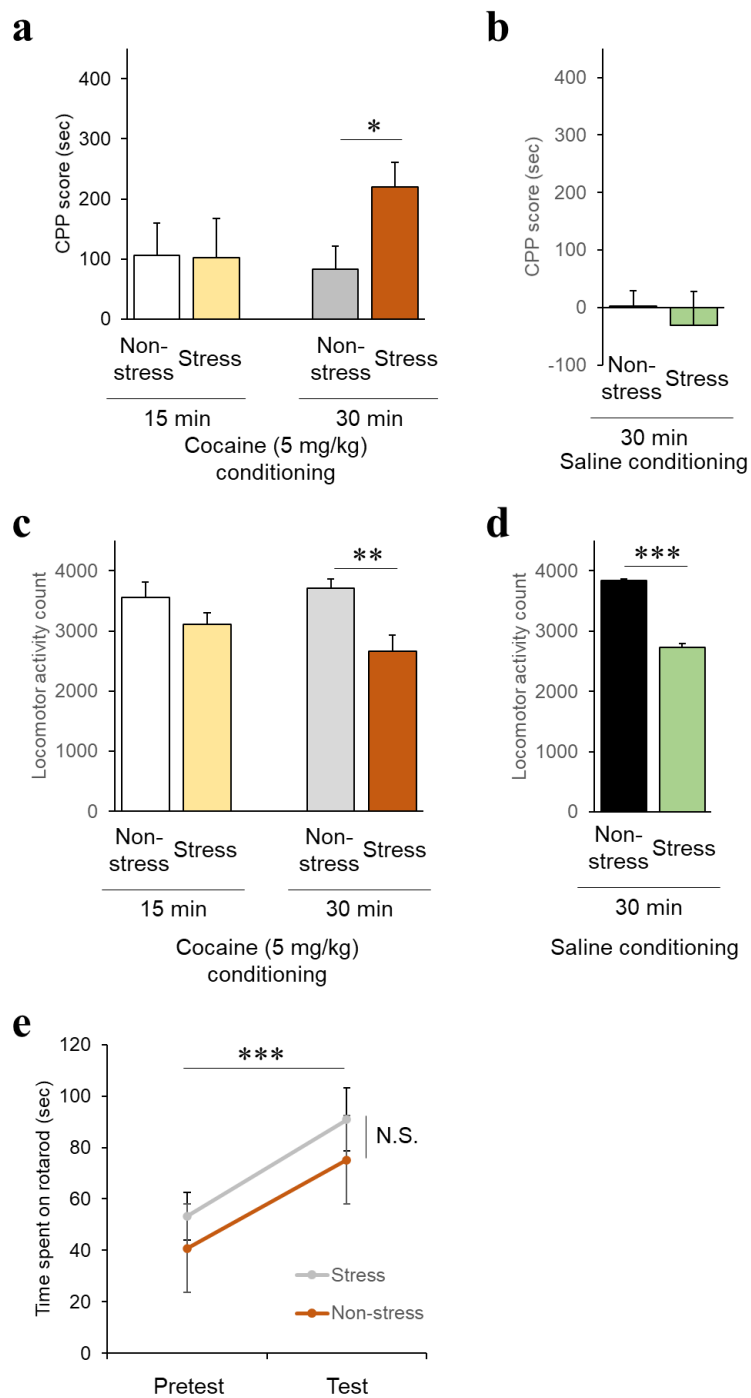


Figure 3. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強

a, b. 各群のCPP score. * $P < 0.05$

c, d. 各群のポストテストにおける自発運動量. **, *** $P < 0.01, 0.001$

e. 各群の協調性運動機能. *** $P < 0.001$

I-2-2. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における LDT への NA 作動性神経情報伝達の関与

ストレスによるコカイン欲求行動増強の評価系を用いて、関与する脳領域および神経情報伝達を調べた。LDT はコカイン誘導性場所嗜好性の発現に関与することがわかっており¹¹⁾、ストレス負荷によって神経活動が亢進する LC NA 作動性ニューロンの密な投射を受けている¹⁴⁾。したがって、まずは、LDT への NA 作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与するか否かについて検討を行った。ストレス負荷直前に LDT 内に NA 受容体アンタゴニストを投与して (Figure 4a)、NA 作動性神経情報伝達を遮断した。One-way ANOVA による解析の結果、群間で CPP score の有意な差が認められた ($F_{3,17}=5.99$, $P=0.0056$)。また、Holm-Sidak *post hoc* test により、 $\alpha 1$ 受容体アンタゴニスト terazosin (Tera, 1.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) 投与群と vehicle (Veh) 投与群の CPP score の間には有意な差が認められなかったものの (Veh, 327.4 ± 39.0 s, $n=5$, Tera, 363.4 ± 34.4 s, $n=5$, $P=0.6921$)、 β 受容体アンタゴニスト timolol (Tim, 2.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) および $\alpha 2$ 受容体アンタゴニスト RX821002 (RX, 3.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) 投与群の CPP score は Veh 群に比べて有意に小さかった (Tim, 73.0 ± 97.2 s, $n=5$, $P=0.0335$, RX, 84.3 ± 57.3 s, $n=6$, $P=0.0355$; Figure 4b)。また、ポストテストにおける自発運動量については群間での有意な差は認められなかった ($F_{3,17} = 1.20$, $P = 0.3383$; Figure 4c)。以上の結果より LDT の β および $\alpha 2$ 受容体を介した神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが示された。

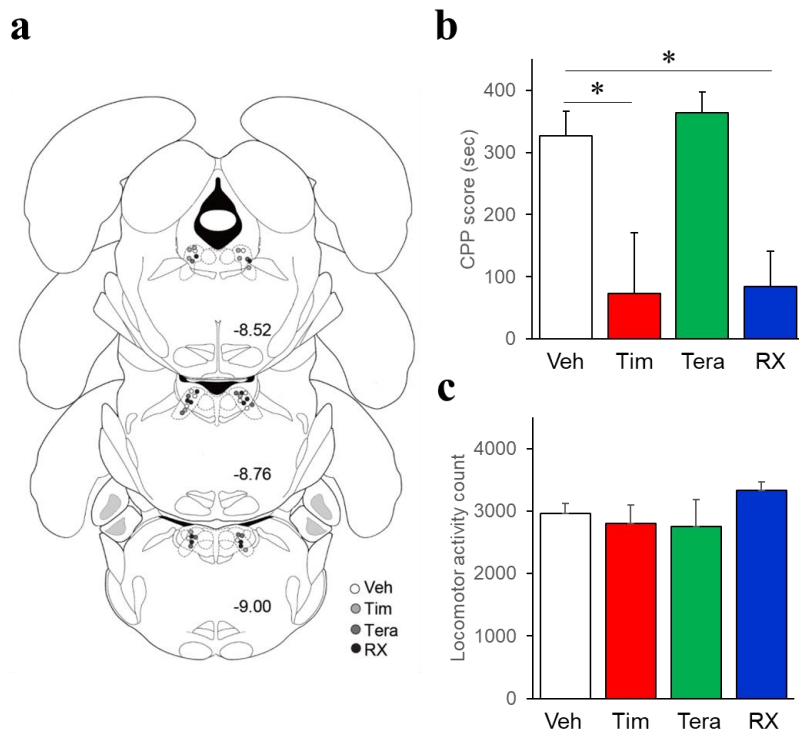


Figure 4. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強におけるLDTへのNA作動性神経情報伝達の役割

- a. Vehicleあるいは薬物の投与部位。
イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
- b. 各群のCPP score。* $P < 0.05$
- c. 各群のポストテストにおける自発運動量。

次に、30分間の拘束ストレス負荷の代わりにLDTに β あるいは $\alpha 2$ 受容体アゴニストを投与することで、ストレス負荷と同様にコカインによる場所嗜好性の増強を惹起できるか否かについて調べた。Figure 5aは薬物およびvehicleの投与部位を示す。One-way ANOVAによる解析の結果、群間でCPP scoreに有意な差が認められた ($F_{2,13} = 4.24$, $P = 0.0384$)。また、Holm-Sidak *post hoc* testにより、 β 受容体アゴニスト isoproterenol (Iso, $3.0 \mu\text{g}/\text{side}$) あるいは $\alpha 2$ 受容体アゴニスト guanfacine (Gua, $0.01 \mu\text{g}/\text{side}$) をLDTに投与した群では、Vehを投与した群に比べて、有意にCPP scoreが大きいたことが示された (Veh, $77.58 \pm 46.9 \text{ s}$, $n = 6$, Iso, $205.2 \pm 29.4 \text{ s}$, $n = 5$, $P = 0.0415$, Gua, $222.6 \pm 35.2 \text{ s}$, $n = 5$, $P = 0.0415$; Figure 5b)。自発運動量については群間での有意な差は認められなかった ($F_{2,13} = 0.64$, $P = 0.5454$; Figure 5c)。本結果は、LDT内の β および $\alpha 2$ 受容体刺激がコカイン誘導性場所嗜好性の増強に十分であることを示しており、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強におけるLDT内の β および $\alpha 2$ 受容体を介した神経情報伝達の関与を強く支持するものである。

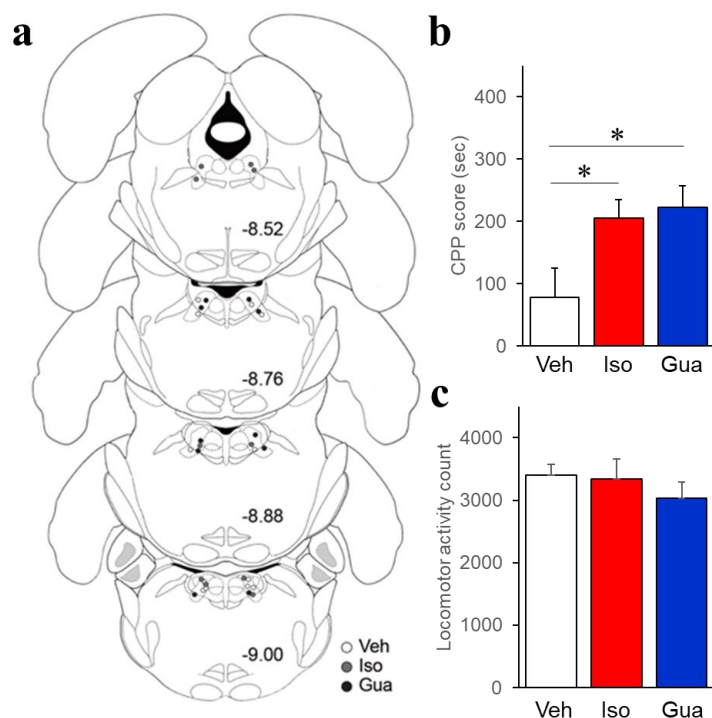


Figure 5. LDTのNA受容体刺激によるコカイン誘導性場所嗜好性の増強

- a. Vehicleあるいは薬物の投与部位。
イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
- b. 各群のCPP score。* $P < 0.05$
- c. 各群のポストテストにおける自発運動量。

最後に、LDT の β あるいは $\alpha 2$ 受容体を介した神経情報伝達が、ストレス負荷を行わないコカイン誘導性場所嗜好性の発現にも関与するの否かを検討した。ストレス負荷を行わない条件下において有意なコカイン誘導性場所嗜好性を惹起するために、より高用量のコカイン (20 mg/kg) により条件付けを行い、ポストテストの直前に Tim、RX、あるいは、Veh を LDT に投与した (Figure 6a)。One-way ANOVA による解析の結果、群間で CPP score およびポストテストにおける自発運動量に有意な差は認められなかった (CPP score、 $F_{2,19} = 0.0755$ 、 $P = 0.928$ 、自発運動量、 $F_{2,19} = 0.522$ 、 $P = 0.6016$; Figure 6b, c)。

以上をまとめると、LDT の β および $\alpha 2$ 受容体を介した神経情報伝達は、非ストレス負荷条件下でのコカイン誘導性場所嗜好性の発現には関与せず、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に選択的に関与することが示された。

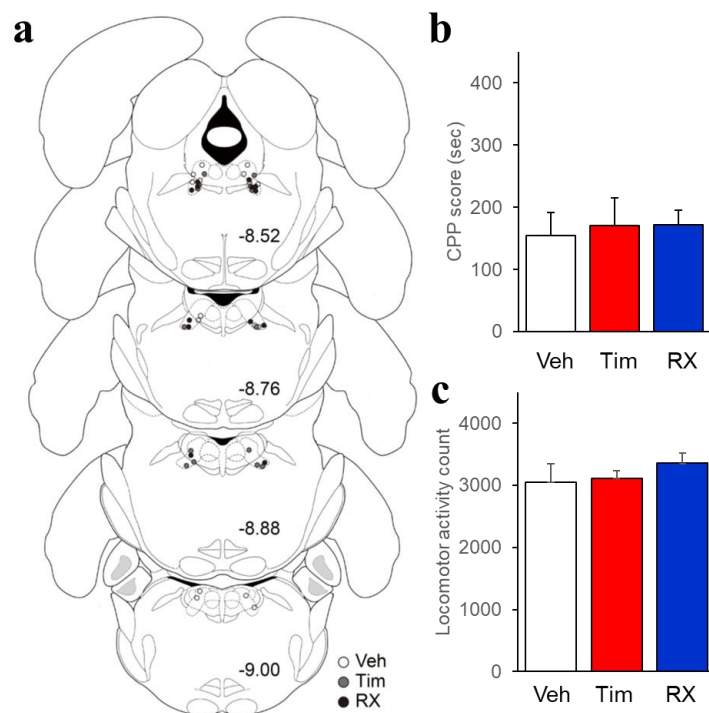


Figure 6. コカイン誘導性場所嗜好性の発現におけるLDTへのNA作動性神経情報伝達の役割
 a. Vehicleあるいは薬物の投与部位。イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
 b. 各群のCPP score。
 c. 各群のポストテストにおける自発運動量。

I-2-3. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における VTA へのコリンおよびグルタミン酸作動性神経情報伝達の関与

序章で述べたように、VTA は薬物欲求行動の発現に重要であることがわかっている⁴⁻⁷⁾。また、I-2-2 においてストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強への関与を示した LDT は VTA に投射しているコリン作動性ニューロンの主要な起始核である²³⁾。以上より、VTA のコリン作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与する可能性が考えられた。そこでこの点を調べるために、ストレス負荷直前に VTA 内にアセチルコリン (ACh) 受容体アンタゴニストを投与し (Figure 7a)、コリン作動性神経情報伝達を遮断した。One-way ANOVA による解析の結果、群間で CPP score に有意な差が認められた ($F_{2,12} = 6.46$, $P = 0.0125$)。また、Holm-Sidak *post hoc* test により、VTA への Veh 投与群と比較して、ムスカリン性 ACh 受容体アンタゴニスト scopolamine (Sco, 50 $\mu\text{g}/\text{side}$) あるいはニコチン性 ACh 受容体アンタゴニスト mecamlamine (Mec, 50 $\mu\text{g}/\text{side}$) の VTA への投与群はいずれも有意に低い CPP score を示した (Veh, 292.4 ± 50.0 s, $n = 5$, Sco, 111.1

± 15.9 s, $n = 5$, $P = 0.0142$, Mec, 94.9 ± 53.2 s, $n = 5$, $P = 0.0142$; Figure 7b)。また、自発運動量については群間での有意な差は認められなかった ($F_{2,12} = 3.51$, $P = 0.0633$; Figure 7c)。以上より、VTA のムスカリン性およびニコチン性 ACh 受容体を介したコリン作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが示された。

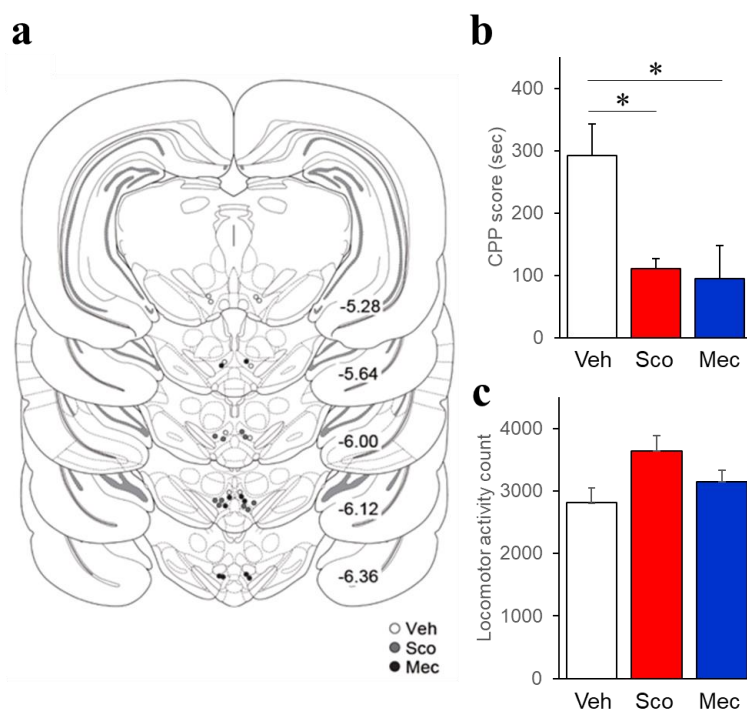


Figure 7. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強におけるVTAへのコリン作動性神経情報伝達の役割

- Vehicleあるいは薬物の投与部位。イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
- 各群のCPP score。* $P < 0.05$
- 各群のポストテストにおける自発運動量。

VTA は LDT よりグルタミン酸作動性ニューロンの入力も受けており²⁴⁾、LDT のグルタミン酸作動性ニューロンの活動が NA 処置によって増強することも示唆されている²⁵⁾。そこで次に、VTA のグルタミン酸作動性神経情報伝達もストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与するか否かを検討した。ストレス負荷前に VTA に NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト AP5 と AMPA 型グルタミン酸受容体アンタゴニスト CNQX の混合液 (AP5/CNQX, 0.04 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{side}$) を投与した結果 (Figure 8a)、有意な CPP score の減弱が認められた (Veh, 292.4 ± 50.0 s, $n = 5$, AP5/CNQX, 10.8 ± 56.6 s, $n = 5$, $t_8 = 3.729$, $P = 0.0058$, Student's t -test; Figure 8b)。自発運動量については群間での有意な差は認められ

なかった ($t_8 = 0.1225$, $P = 0.9055$, Student's t -test; Figure 8c)。

以上をまとめると、VTA へのコリン作動性神経情報伝達およびグルタミン酸作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが示された。

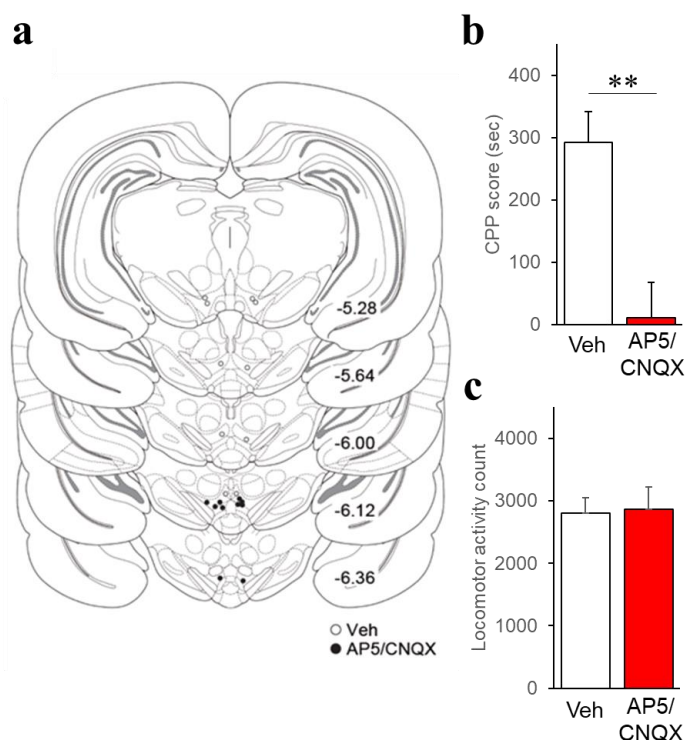


Figure 8. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強におけるVTAへのグルタミン酸作動性神経情報伝達の役割

- a. Vehicleあるいは薬物の投与部位。
イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
- b. 各群のCPP score。 ** $P < 0.01$
- c. 各群のポストテストにおける自発運動量。

I-2-4. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強における mPFC への DA 作動性神経情報伝達の関与

mPFC ニューロンは渴望感の生成に重要であること、VTA DA ニューロンからの入力があることから¹⁵⁻²⁰、mPFC への DA 作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与する可能性が考えられた。そこで、この点を検討するため、ストレス負荷前に D1 受容体アンタゴニスト SCH23390 (SCH, 1.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) あるいは D2 受容体アンタゴニスト raclopride (Rac, 3.0 $\mu\text{g}/\text{side}$) を mPFC に投与し (Figure 9a)、DA 作動性神経情報伝達を遮断した。One-way ANOVA による解析の結果、群間で CPP score に有意な差が認められた ($F_{2,16} = 3.89$, $P = 0.0419$)。また、Holm-Sidak *post hoc* test により、mPFC への Veh 投

与群と比較して、SCH を投与した群の CPP score は有意に小さかった (Veh、 355.8 ± 28.1 s、 $n = 6$ 、SCH、 193.0 ± 50.4 s、 $n = 7$ 、 $P = 0.0277$)。一方で Rac を投与した群と Veh 投与群の CPP score の間には有意な差は認められなかった (Rac、 289.6 ± 40.6 s、 $n = 6$ 、 $P = 0.2952$; Figure 9b)。自発運動量については群間での有意な差は認められなかった ($F_{2,16} = 0.26$ 、 $P = 0.7717$; Figure 9c)。したがって、mPFC の D1 受容体を介した DA 作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが示された。

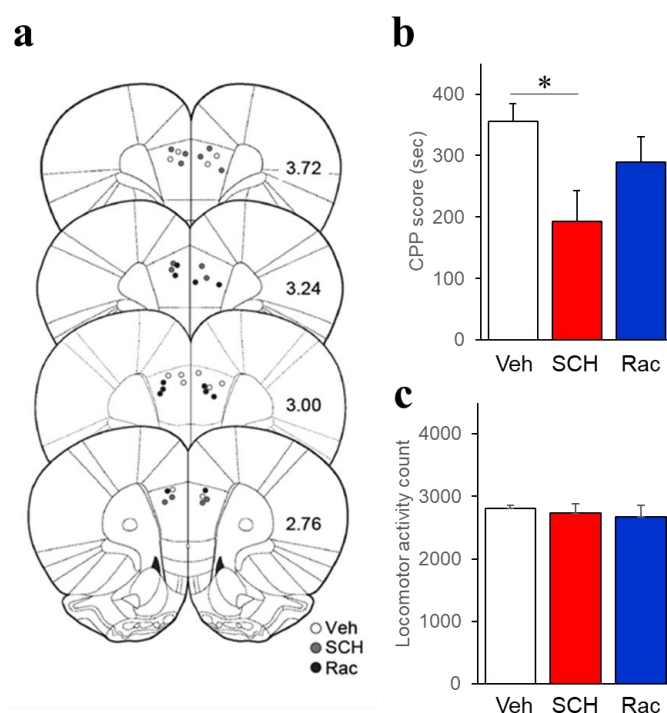


Figure 9. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強におけるmPFCへのDA作動性神経情報伝達の役割

- Vehicleあるいは薬物の投与部位。
イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
- 各群のCPP score。* $P < 0.05$
- 各群のポストテストにおける自発運動量。

I-3 考察

第I章では、まず、CPP試験のポストテスト前に30分間の拘束ストレスを負荷することでコカイン誘導性場所嗜好性が増強することを明らかにし、ストレスによるコカイン欲求行動の惹起あるいは増強を評価する試験系を確立した。この評価系を用いて、 $\alpha 2$ および β 受容体を介したLDTへのNA作動性神経情報伝達、VTAへのコリン作動性およびグルタミン酸作動性神経情報伝達、mPFCへのD1受容体を介したDA作動性神経情報伝達が、スト

レスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することを明らかにした。

CPP 試験のポストテストにおける自発運動量の低下は CPP score に影響する可能性がある。そこで本研究では、30 分間の拘束ストレス負荷が運動量に影響するか否かを検討したところ、協調性運動機能は障害されなかったものの、自発運動量は減少した (Figure 3c, e)。一方で、生理食塩水条件付け動物においてもストレス負荷によって自発運動量が減少したが、CPP score は非ストレス負荷群との間で有意な差は認められなかった (Figure 3b, d)。さらに、各種アンタゴニスト投与により、ストレスによる CPP score の増大が抑制された際にも、ストレス負荷による自発運動量の減少は認められた (Figure 4c, 7c, 8c, 9c)。以上のことから、ストレス負荷による CPP score の増大は自発運動量の減少に起因するものではないと考えられる。

本研究ではストレスによるコカイン欲求行動増強の評価系を新たに構築した。これまでも、CPP 試験とストレス負荷を組み合わせた試験系が報告されている。コカイン、モルヒネ、アンフェタミン、および、ニコチンを用いた CPP 試験において、条件付け前に急性あるいは慢性ストレス負荷を行うことで、場所嗜好性の増強を引き起こすことが報告されている²⁶⁻³³⁾。しかしながら、これらの研究では、ストレス負荷は条件付けの前に行われているため、薬物により生成される快情動がストレスにより増強されるか否かを検討する実験デザインとなっており、条件付け後のストレス負荷により薬物欲求行動が増強するか否かを評価しているものではない。一方で、条件付け後およびポストテスト前に強制水泳ストレスをそれぞれ負荷することで、コカインやニコチン誘導性場所嗜好性が増強することも報告されているが^{34, 35)}、条件付け後のストレス負荷が記憶の固定化に影響を与えている可能性を排除できない。以上から、本研究により確立した、薬物欲求行動が発現するポストテストの開始前にも拘束ストレスを負荷する評価系は、ストレスによるコカイン欲求行動の評価系としてより有用であると考えられる。

I-2-3 において、VTA へのコリン作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することを示した (Figure 7)。LDT が VTA へのコリン作動性神経情報伝達の主要な投射元であることから²³⁾、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強には VTA に投射する LDT コリン作動性ニューロンが関与していると考えられる。本研究では LDT の $\alpha 2$ NA 受容体を介した神経情報伝達もストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することを示した。我々はこれまでに、コカインの慢性投与により、ラット LDT コリン作動性ニューロンにおける抑制性シナプス後電流が NA によるプレシナプス $\alpha 2$ 受容体刺激により減弱することを見出している³⁶⁾。これは、コカイン慢性投与により、NA が LDT コリン作動性ニューロンにおける抑制性入力の減少とそれに続く活性化を引き起こすことを示唆する。つまり、コカインによる条件付けにより、LDT の $\alpha 2$ 受容体刺激はコリン作動性ニューロンを間接的に活性化するようになり、ストレス負荷によるこの間接的なコリン作動性ニューロンの活性化とそれに続く VTA へのコリン作動性神経情報伝達亢進がコカイン誘導性場所嗜好性の増強に寄与する可能性が考えられる。

VTA へのグルタミン酸作動性神経情報伝達についても、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に關与することを示した (Figure 8)。VTA では様々な脳領域由来のグルタミン酸作動性神経投射が認められており^{37, 38)}、どの脳領域からの入力が關与しているのかは明らかでない。しかしながら、LDT グルタミン酸作動性ニューロンは VTA DA 作動性ニューロンに投射していること²⁴⁾、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に關与することが明らかになった LDT β 受容体の刺激は LDT のグルタミン酸作動性ニューロン活動を上昇させる可能性があることから²⁵⁾、LDT から VTA へのグルタミン酸作動性神経情報伝達がストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に少なくとも部分的には關与する可能性が考えられる。

LDT における $\alpha 2$ あるいは β 受容体を介した NA 作動性神経情報伝達がストレス負荷を伴わないコカイン誘導性場所嗜好性の発現には關与しないことを示した (Figure 6)。一方で、LDT から VTA へのコリン作動性およびグルタミン酸作動性神経情報伝達とそれに続く mPFC への DA 作動性神経情報伝達については、ストレス負荷を伴わないコカイン誘導性場所嗜好性の発現にも關与する^{11, 12, 39, 40)}。以上より、ストレスにより LDT における NA 作動性神経情報伝達が亢進し、これがトリガーとなり、コカイン誘導性場所嗜好性の発現に關与する LDT-VTA-mPFC 経路が活性化しコカイン誘導性場所嗜好性が増強される可能性が考えられる。LDT への $\alpha 2$ あるいは β 受容体アゴニスト投与がコカイン誘導性場所嗜好性を増強するという結果 (Figure 5) もこの考えを支持している。

本章では、拘束ストレス負荷によるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に、LDT への NA 作動性神経情報伝達亢進、VTA へのコリン作動性・グルタミン酸作動性神経情報伝達亢進、さらには、mPFC への DA 作動性神経情報伝達亢進が重要な役割を担っていることを示した。ストレスによる LDT への NA 作動性神経情報伝達亢進が、場所嗜好性発現に重要な LDT-VTA-mPFC 経路を活性化させることが考えられる (Figure 10)。

薬物依存症に対する有効性の高い治療法の確立には、ストレスによる薬物欲求行動発現の脳内メカニズムの広く深い理解が必要である。本研究では LDT-VTA-mPFC 経路の關与を示したが、ストレスによる薬物欲求行動発現メカニズムのさらなる理解のためには、コカイン渴望感の生成への關与が知られる mPFC-側坐核 core 経路をはじめ、他の神経経路および神経情報伝達の關与についても研究が必要である^{6, 41)}。最近の研究より、mPFC への $\alpha 1$ 受容体を介した NA 作動性神経情報伝達もストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に重要であることが示されている⁴²⁾。そこで、次章では、mPFC に着目し、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に關与する DA 作動性および NA 作動性神経情報伝達の相互作用について検討する。

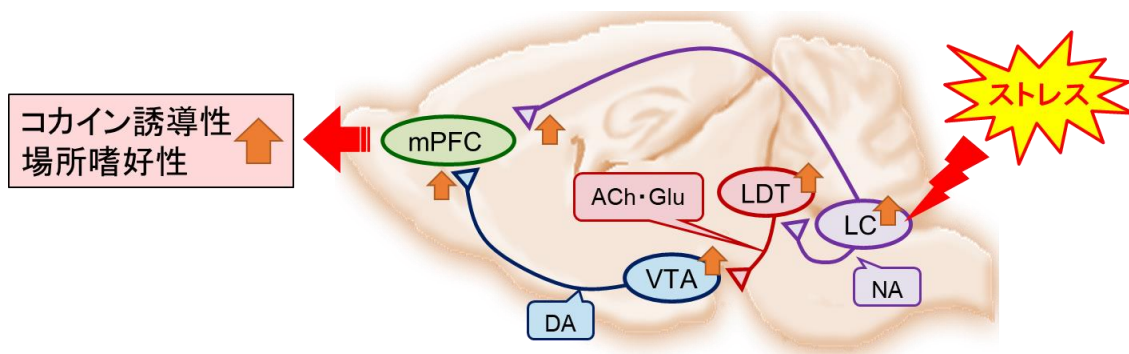


Figure 10. 第 I 章より示唆されるストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強のメカニズム

mPFC : 内側前頭前皮質、VTA : 腹側被蓋野、LDT : 背外側被蓋核、LC : 青斑核
 DA : ドパミン、NA : ノルアドレナリン、ACh : アセチルコリン、Glu : グルタミン酸

第 II 章 内側前頭前皮質におけるドパミンおよびノルアドレナリンの相互作用

II-1. 実験方法

II-1-1. 使用動物

全て I-1-1 に準じた。

II-1-2. インビボマイクロダイアリシス

イソフルラン（導入：5%、維持：2.5%）麻酔下で、mPFC（Bregma より吻側 2.7 mm、外側 0.7 mm、腹側 3.0 mm の位置²²⁾）にマイクロダイアリシスガイドカニューレ（外径 0.5 mm、AG-4、Eicom）の先端が位置するように埋め込んだ。埋め込み手術後、ラットは個別に飼育し、6~9 日後にインビボマイクロダイアリシスを実施した。コカイン処置動物を用いる実験では、埋め込み手術後に CPP 試験と同様のプロトコルでコカインあるいは生理食塩水の投与を行った（I-1-3、Figure 2a）。すなわち、手術後 2~7 日において、コカイン群の動物にはコカイン（5 mg/kg, i.p.）あるいは生理食塩水（1 mL/kg, i.p.）を 1 日 1 回、毎日交互に投与し、生理食塩水群の動物には毎日生理食塩水を投与した。インビボマイクロダイアリシス実験では、まず、イソフルラン麻酔下（導入：5%、維持：2.5%）で、ガイドカニューレを通して透析プローブ（膜長 1.0 mm、外径 0.22 mm、A-I-4-01、Eicom）を mPFC 内に挿入した。その後、動物をアクリル製チャンバー（width × depth × height: 30 × 30 × 35 cm）内に入れ、覚醒させた。以降は、挿入した透析プローブ内に常時リンゲル液（147 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, and 2.3 mmol/L CaCl₂）を灌流させ（1 μL/min）、15 分ごとに透析サンプルを回収した。回収したサンプルは HPLC により分離し（固定相：Eicompak CAX、内径 2.0 mm、長さ 200 mm、Eicom、移動相：0.1 mol/L 酢酸アンモニウム、0.05 mol/L 硫酸ナトリウム、0.17 mmol/L EDTA、30%メタノール、pH 6.0、流速 0.25 mL/min）、電気化学検出器（HTEC-500、Eicom、Ag/AgCl 参照電極に対する作用電極電圧：+450 mV）を用いて酸化還元電流を測定し、クロマトグラムを検出した。DA および NA のクロマトグラムピークは PowerChrom data recording system（Eicom）を用いて解析し、DA および NA の濃度を算出した。DA および NA 量が安定した後に、3 つの連続したサンプルをベースラインサンプルとして回収した。その後、プラスチック製シートとタオルを用いて、頭部以外を拘束することで拘束ストレスを負荷した。30 分後に拘束ストレスを解除し、その 120 分後までサンプルを回収した。サンプル中の DA および NA 濃度は、3 つのベースラインサンプルの平均濃度を 100%として標準化した。ベースラインサンプルの平均濃度が 0.025 (DA) あるいは 0.1 (NA) pg/sample 以下の場合、3 つのベースラインサンプルにおいて 30%以上の変動が認められた場合、あるいは、微小出血に起因すると思われるセロトニン (5-HT) レベルのバースト増加が認められた場合はその個体由来のデータを統計解析から除外した。測定が終了した動物は速やかに断頭により安楽死を行い、ラットの脳を素早く取り出し、粉末状ドライアイスで凍結した。

その後クリオスタットを用いて mPFC を含む冠状切片 (50 μm) を作成した。チオニン (0.25%) による染色後、顕微鏡 ($\times 40$) により透析プローブ挿入部位を確認し、挿入部位が mPFC 外の個体、あるいは、顕著な組織損傷が認められた個体は統計解析から除外した。

II-1-3. 条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験

I-1-3 に準じた。用いたコカインの用量は 5 mg/kg であり、拘束ストレスは 30 分間負荷した。

II-1-4. 免疫染色

CPP 試験ポストテスト終了 90 分後に、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて、0.1 M PBS を経心灌流し安楽死した。その後 4% PFA を経心灌流した後に、直ちに脳を取り出した。取り出した脳は 4% PFA 溶液中で一晩静置することで後固定を行い、その後 10% スクロース溶液に 3 時間、30% スクロース溶液に一晩静置することで凍結保護を行った。粉末状のドライアイスにより脳を凍結し、mPFC (bregma より約 3.0 mm 吻側)²²⁾を含む、厚さ 50 μm の冠状切片をクリオスタットにより作製した。作製した切片を 10 分間 PBS-T によりリンスし、3% BSA を 1 時間処置しブロッキング操作を行った。その後、4°C の条件下で 1 次抗体溶液 (ウサギ抗 c-Fos 抗体、sc-52、1:1000、Santa Cruz Biotechnology) を一晩処置した。翌日、PBS-T により 10 \times 3 分間洗浄し、室温で 2 次抗体溶液 (AlexaFluor-488 標識ロバ抗ウサギ抗体、A21206、1:200、Invitrogen) を 1 時間処置した。PBS により 10 分間の洗浄を 3 回行った後に、切片をスライドガラスに張り付け Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) により封入した。乾燥後、蛍光顕微鏡 (Bio-zero BZ-9000 microscope、Keyence) を用いて観察した。c-Fos 陽性細胞数の計測は、左右どちらかの mPFC 上に格子 (1 \times 1 mm²) を設け、格子内の c-Fos 陽性細胞数を ImageJ software (National Institutes of Health) を用いて計測した。計測はブラインド条件下で実施した。

II-1-5. 電気生理学的解析

イソフルラン麻酔下 (導入: 3%、維持: 2%) にて、氷冷下 cutting solution (in mM: 92 NMDG, 2.5 KCl, 30 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 25 glucose, 5 sodium ascorbate, 0.5 CaCl₂, 20 HEPES, 10 MgSO₄, 2 thiourea, 3 sodium pyruvate, and 12 N-acetyl-L-cysteine, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4 \pm 0.1 adjusted with HCl) を経心灌流し安楽死した。その後速やかに脳を取り出し、スライサー (VT1200S; Leica Microsystems GmbH) を用いて、mPFC を含む冠状スライス (250 μm) を氷冷下 cutting solution 中で作製した。スライスを 15 分間 32-34°C の cutting solution 中でインキュベーションした後に、室温の recording solution (in mM: 119 NaCl, 2.5 KCl, 24 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 12.5 glucose, 2 CaCl₂, and 2 MgSO₄, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂) 中で 1 時間以上インキュベーションした。その後、recording solution (35 \pm 1°C, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂) を 2 mL/min の流速で灌流した記録チャンバーにスライスを移した。

顕微鏡 (BX50WI; Olympus) を用いて、皮質表面より 700-900 μm に位置し、かつ、錐体型の細胞を mPFC V 層錐体細胞として記録した (Figure 11a)。尚、mPFC V 層錐体細胞はスパイク頻度順応を示すことが知られており⁴³⁾、本試験での全ての記録細胞がスパイク頻度順応を示すことも確認した (Figure 11b)。マイクロピペットプラー (Model P - 1000IVF; Sutter Instrument) により作製したホウケイ酸ガラス製の記録電極 (先端抵抗: 4.0-9.0 M Ω 、内液組成、in mM: 150 KOH, 2 MgCl₂, 10 KCl, 0.2 EGTA, 2 Na₂-ATP, 0.3 Na₂-GTP, 10 HEPES, and 0.1 spermine、グルコン酸により pH 7.3 \pm 0.1 に調製) を用いて記録を行った。Voltage-clamp モードにて、膜電位を -70 mV に固定して、保持電流ならびに自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSCs) を記録した。保持電流が安

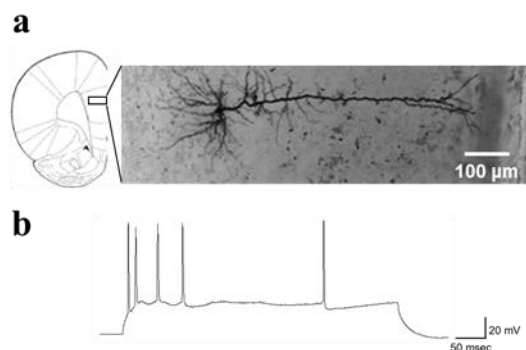


Figure 11. mPFC V層錐体細胞
a. 記録したmPFC V層錐体細胞の代表例
b. 200 pA注入時の発火活動とスパイク頻度順応の代表例

定した後に、DA あるいは NA を単独で 5 分間バス適用し、続いて DA および NA の混合液を 5 分間適用した。DA あるいは NA 単独適用直前の 1 分間 (Pre)、単独適用開始 4~5 分後の 1 分間、および、DA および NA 混合液適用開始 4~5 分後の 1 分間において、保持電流と sEPSC を解析した。保持電流は、30 秒毎に算出した。30 秒毎に 10 秒間の window を設置し、その window 内の保持電流平均値を 30 秒間の保持電流値とした。sEPSCs の頻度および振幅は Mini Analysis Program (Synaptosoft, Fort Lee, NJ, USA) を用いて解析した。全データは Multiclamp 700B と pClamp10 ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて取得した。静息膜電位が -50 mV 以上の細胞、活動電位のオーバーシュートが観察されない細胞、あるいは、記録中にアクセス抵抗が 20% 以上変化した細胞は統計解析から除外した。アクセス抵抗は 30 秒ごとに電位パルス (-5 mV, 50 ms) を入力することで計測した。

II-1-6. 統計解析

データは全て平均値 \pm 標準誤差で表記した。統計学的解析は、インビボマイクロダイアリスについては one-way repeated measures ANOVA および Dunnett's *post hoc* test、あるいは、two-way repeated measures ANOVA および Sidak's *post hoc* test を用いて、c-Fos 陽性細胞数の比較については Student's *t*-test を用いて、電気生理学的解析については one-way repeated measures ANOVA および Tukey's *post hoc* test を用いて行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

II-2. 実験結果

II-2-1. mPFCにおける細胞外 DA および NA 量に対する拘束ストレス負荷の影響

I章ではストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に mPFC への DA 作動性神経情報伝達に関与することを示した。最近、mPFC への NA 作動性神経情報伝達もストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが報告されている⁴²⁾。一方で、mPFC での DA および NA 作動性神経情報伝達がどのように相互作用し mPFC ニューロンの活動に影響を与えているのかは必ずしも明らかになっていない。そこで、II章ではこの点について検討した。

最初に mPFC における細胞外 DA および NA 量に対する拘束ストレス負荷の影響について、インビボマイクロダイアリスにより検討した。Figure 12a は透析プローブ挿入位置を示す。DA 量について、one-way repeated measures ANOVA を用いた解析の結果、拘束ストレス負荷による有意な作用が認められた ($F_{2,282,13.69} = 8.476$, $P = 0.0032$, $n = 7$)。また、Dunnett's *post hoc test* により、ベースラインサンプルのうちの最後のサンプル ($100.5 \pm 4.21\%$) に比べて、ストレス負荷中 (15-30 min: $183.1 \pm 22.0\%$, $P = 0.0331$) ならびにストレス負荷解除後 (30-45 min: $202.8 \pm 22.1\%$, $P = 0.0125$, 60-75 min: $179.8 \pm 22.4\%$, $P = 0.0440$) における DA 量の有意な増加が示された (Figure 12b)。NA 量についても one-way repeated measures ANOVA を用いて解析したところ、拘束ストレス負荷による有意な作用が認められた ($F_{2,363,14.18} = 14.83$, $P = 0.0002$, $n = 7$)。また、Dunnett's *post hoc test* の結果、ベースラインサンプルのうちの最後のサンプル ($100.8 \pm 3.27\%$) に比べて、ストレス負荷中 (15-30 min: $145.6 \pm 8.54\%$, $P = 0.0416$) ならびにストレス負荷解除後 (30-45 min: $167.7 \pm 13.1\%$, $P = 0.0293$, 45-60 min: $158.6 \pm 9.44\%$, $P = 0.0143$, 60-75 min: $158.2 \pm 10.6\%$, $P = 0.0234$, 75-90 min: $138.3 \pm 6.86\%$, $P = 0.0081$, 105-120 min: $125.3 \pm 7.00\%$, $P = 0.0334$) における NA 量の有意な増加が認められた (Figure 12c)。

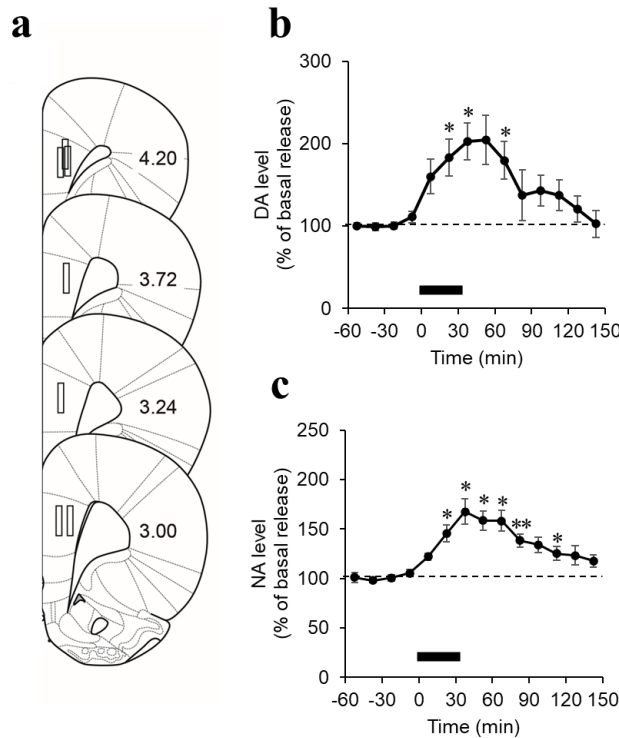


Figure 12. 拘束ストレス負荷によるmPFCにおけるDAおよびNA遊離量の変化
 a. 透析プローブの挿入部位。イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
 b. mPFCにおけるDA遊離量変化率。黒色バーは拘束ストレス負荷タイミングを示す。
 * $P < 0.05$ vs. -30~-15 min時点
 c. mPFCにおけるNA遊離量変化率。黒色バーは拘束ストレス負荷タイミングを示す。
 *, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. -30~-15 min時点

次にコカインの事前処置が、ストレスによる mPFC での DA および NA 量の増加に影響を与えるのか否かを検討した。Figure 13a は透析プローブ挿入位置を示す。コカイン群と生理食塩水群の DA 量について、two-way repeated measures ANOVA を用いた解析の結果、コカインによる効果は単独では有意な影響を与えなかった ($F_{1,19} = 2.075, P = 0.166$)。一方で、ストレス負荷による効果は単独で有意な影響を与え ($F_{13,247} = 11.16, P < 0.0001$)、コカインによる効果との間には有意な交互作用が確認された ($F_{13,247} = 1.819, P = 0.0408$)。また、Sidak's *post hoc* test により、拘束ストレス負荷解除後において、コカイン群の DA 量が生理食塩水群に比べて有意に多いことが示された (30-45 min: 生理食塩水群、 $149.3 \pm 14.1\%$, $n = 9$ 、コカイン群、 $237.9 \pm 36.5\%$, $n = 12$, $P = 0.0211$; Figure 13b)。NA 量についても同様の解析を行ったところ、ストレス負荷による効果は単独で有意な影響を与えたが ($F_{13,247} = 19.89, P < 0.0001$)、コカインによる有意な効果 ($F_{1,19} = 0.3778, P = 0.5461$) およびこれらの効果の間の有意な交互作用は認められなかった ($F_{13,247} = 0.3997, P = 0.9691$; Figure 13c)。以

上をまとめると、mPFCにおいて、拘束ストレス負荷中ならびに負荷解除後では細胞外 DA および NA 量は増加し、コカインの事前処置によりストレス負荷による mPFC での DA 量は更に増加することが示された。

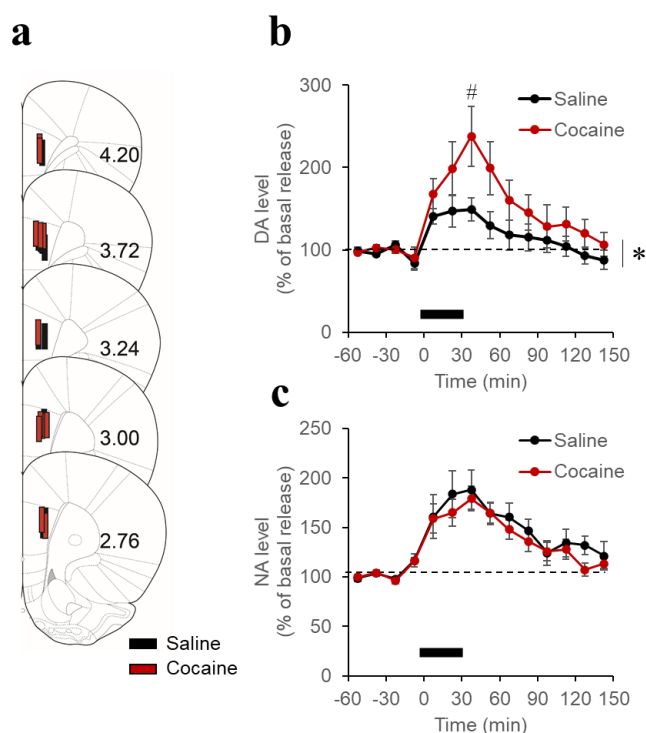


Figure 13. コカイン処置動物のmPFCにおける拘束ストレス負荷による DAおよびNA遊離量の変化

- a. 透析プローブの挿入部位。イラスト内の数字はBregmaからの距離 (mm) を示す。
b. mPFCにおけるDA遊離量変化率。黒色バーは拘束ストレス負荷タイミングを示す。
 $\#P < 0.05$ vs. saline. $*P < 0.05$, 全時間における群間比較。
c. mPFCにおけるNA遊離量変化率。黒色バーは拘束ストレス負荷タイミングを示す。

II-2-2. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強時の mPFC における c-Fos 発現

II-2-1 において、拘束ストレス負荷による mPFC での DA および NA 量の増加が示されたが、mPFC ニューロンの神経活動が拘束ストレス負荷によりどのような影響を受けるのかは不明であった。そこで、神経活性マーカーである c-Fos の発現を指標としてこの点を調べた。コカインによる場所嗜好性の増強を示したストレス負荷群 (非ストレス負荷群の CPP score、 123.1 ± 66.9 , $n=5$ 、ストレス負荷群の CPP score、 294.2 ± 31.1 , $n=5$, $t_8=2.321$, $P=0.0489$ 、Student's *t*-test; Figure 14a) の mPFC における c-Fos 陽性細胞数は、非ストレス負荷群のそれと比べて有意に多かった (非ストレス負荷群、 254.1 ± 31.6 , $n=5$ 、ストレス負荷群、 390.7 ± 44.9 , $n=5$, $t_8=2.485$, $P=0.0378$ 、Student's *t*-test; Figure 14b, c)。ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強時には mPFC ニューロンの活動上昇が起こる可能性が示された。

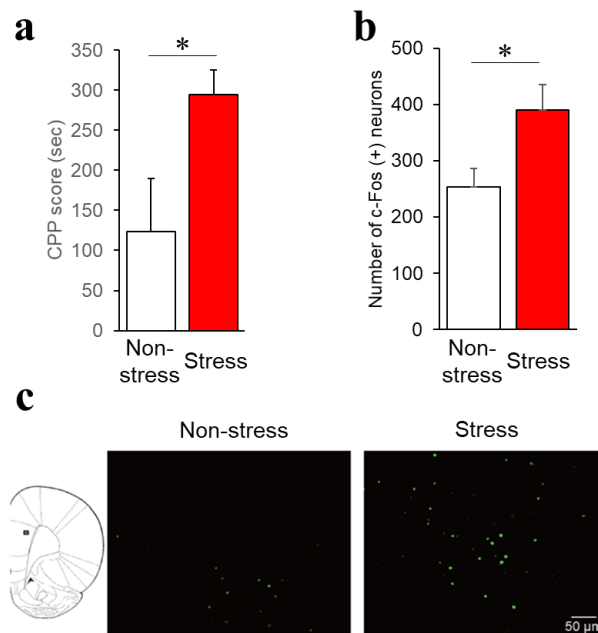


Figure 14. ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強が発現した際の mPFC における c-Fos の発現
 a. 各群の CPP score. * $P < 0.05$
 b. 各群の mPFC における c-Fos 陽性細胞数. * $P < 0.05$
 c. c-Fos の免疫染色画像の代表例。画像は左図の囲い部を拡大したもの。

II-2-3. mPFC 錐体細胞の興奮性に対する DA および NA の作用

II-2-1 および II-2-2 における結果から、ストレス負荷による DA および NA 作動性神経情報伝達の亢進が mPFC ニューロンの活動を増強する可能性が示唆された。この点を検討するため、ホールセルパッチクランプ法を用いて、mPFC の V 層錐体細胞に対する DA および NA の単独適用時、ならびに、同時適用時の保持電流、入力抵抗、sEPSC の頻度および振幅に対する作用を調べた。

最初に、DA (20 $\mu\text{mol/L}$) を単独バス適用した後に NA (10 $\mu\text{mol/L}$) を付加適用 (DA および NA 混合液 : DA+NA をバス適用、Figure 15a) した。One-way repeated measures ANOVA を用いた解析の結果、入力抵抗ならびに sEPSC の振幅については薬液適用による有意な変化は確認されなかったが (入力抵抗、Pre, $163.7 \pm 21.6 \text{ M}\Omega$ 、DA, $154.9 \pm 22.5 \text{ M}\Omega$ 、DA+NA, $164.7 \pm 21.6 \text{ M}\Omega$, $F_{1,313,14.44} = 0.4832$, $P = 0.5485$ 、sEPSC 振幅、Pre, $24.9 \pm 3.3 \text{ pA}$ 、DA, $22.3 \pm 2.0 \text{ pA}$ 、DA+NA, $23.6 \pm 2.3 \text{ pA}$, $F_{1,318,14.50} = 0.59$, $P = 0.4986$, $n = 12$ neurons from 11 rats)、保持電流ならびに sEPSC 頻度については薬液適用による有意な変化が確認された (保持電流、 $F_{1,197,13.17} = 26.14$, $P = 0.0001$ 、sEPSC 頻度、 $F_{1,168,12.85} = 10.17$, $P = 0.0057$; Figure 15)。DA

単独適用による影響について解析したところ、保持電流の有意な変化が認められた (Pre、 29.9 ± 16.8 pA、DA、 17.2 ± 17.8 pA、 $P = 0.0019$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 15c)。一方で、sEPSC 頻度については、DA 単独適用による有意な変化は認められなかった (Pre、 2.6 ± 0.5 Hz、DA、 3.5 ± 0.8 Hz、 $P = 0.2956$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 15e)。さらに、DA+NA 適用による影響について解析したところ、Pre に比べて保持電流の有意な増加が認められ (DA+NA、 0.7 ± 18.7 pA、 $P = 0.0006$ 、Tukey's *post hoc* test)、DA 単独適用時と比べても有意な増加が確認された ($P = 0.0016$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 15c)。sEPSC の頻度についても、Pre ならびに DA 単独適用時のいずれと比べても有意に増加した (DA+NA、 7.1 ± 1.7 Hz、Pre vs. DA+NA、 $P = 0.0203$ 、DA vs. DA+NA、 $P = 0.0138$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 15e)。以上をまとめると、DA は mPFC V 層錐体細胞を脱分極させ、NA の付加適用は更なる脱分極を起こすとともに興奮性シナプス伝達を増大させることが示唆された。

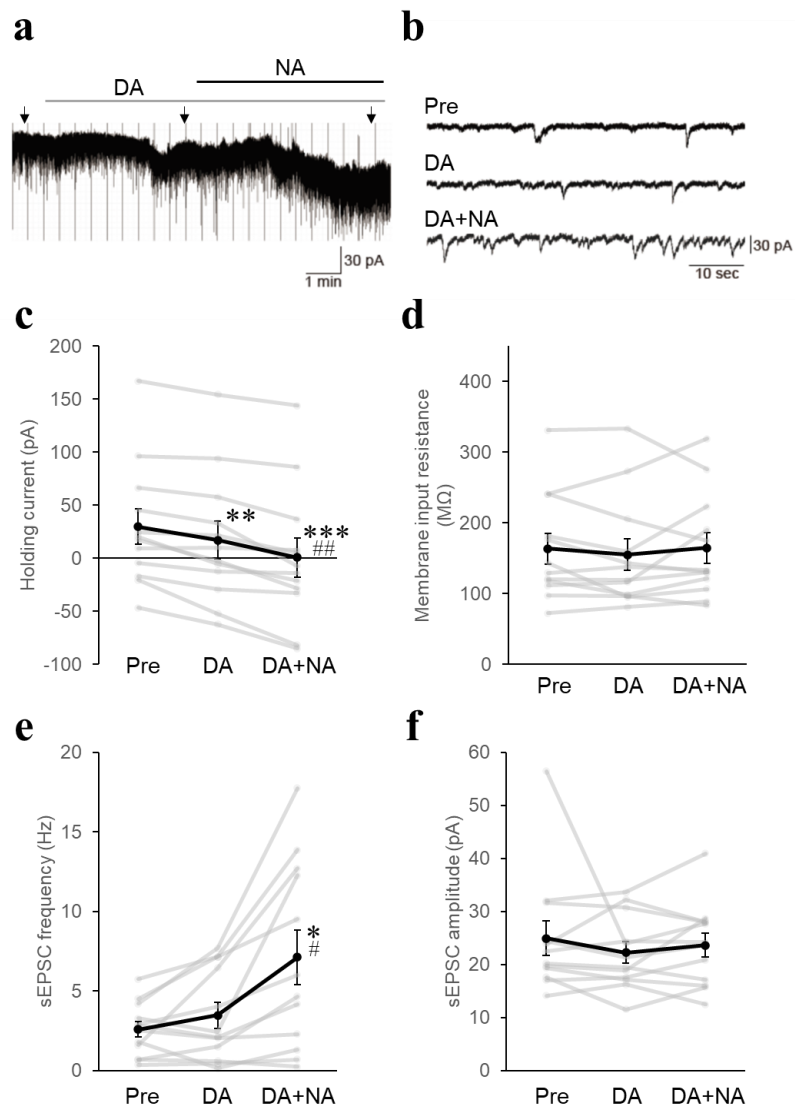


Figure 15. mPFC V層錐体細胞におけるDAの作用とNA付加適用による作用

a, b. 代表的なトレース。bはaに示す矢印部を拡大したもの。

c. 各適用時の保持電流。**, *** $P < 0.01, 0.001$ vs. Pre, ## $P < 0.01$ vs. DA

d. 各適用時の入力抵抗。

e. 各適用時のsEPSC頻度。* $P < 0.05$ vs. Pre, # $P < 0.05$ vs. DA

f. 各適用時のsEPSC振幅。

次に、NA を単独バス適用した後に、DA を付加適用（NA および DA の混合液：NA+DA をバス適用、Figure 16a）した。One-way repeated measures ANOVA を用いた解析の結果、入力抵抗ならびに sEPSC 振幅については、薬液適用による有意な変化は確認されなかったが（入力抵抗、Pre、 $194.1 \pm 31.8 \text{ M}\Omega$ 、NA、 $166.8 \pm 20.9 \text{ M}\Omega$ 、NA+DA、 $180.7 \pm 25.6 \text{ M}\Omega$ 、 $F_{1,151,11.51} = 2.01$ 、 $P = 0.1834$ 、sEPSC 振幅、Pre、 $24.1 \pm 3.4 \text{ pA}$ 、NA、 $22.6 \pm 1.1 \text{ pA}$ 、NA+DA、 $22.5 \pm 1.2 \text{ pA}$ 、 $F_{1,045,10.45} = 0.25$ 、 $P = 0.6372$ 、 $n = 11$ neurons from 9 rats）、保持電流ならびに sEPSC 頻度については有意な変化が確認された（保持電流、 $F_{1,175,11.75} = 9.68$ 、 $P = 0.0074$ 、sEPSC 頻度、 $F_{1,744,17.44} = 5.94$ 、 $P = 0.0132$; Figure 16）。NA 単独適用による影響について解析したところ、保持電流の有意な変化が認められた（Pre、 $4.4 \pm 9.0 \text{ pA}$ 、NA、 $-25.4 \pm 6.0 \text{ pA}$ 、 $P = 0.0181$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 16c）。また、sEPSC の頻度も NA 単独適用により有意に増加した（Pre、 $1.8 \pm 0.4 \text{ Hz}$ 、NA、 $3.7 \pm 0.7 \text{ Hz}$ 、 $P = 0.0395$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 16e）。さらに、NA+DA 適用による影響について解析した。Pre と比べて、保持電流は有意な変化が認められたが（ $-29.9 \pm 7.5 \text{ pA}$ 、 $P = 0.0265$ 、Tukey's *post hoc* test）、NA 単独適用時に比べると有意な変化は認められなかった（ $P = 0.5371$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 16c）。また、sEPSC の頻度も Pre に比べて有意に増加したものの（ $4.6 \pm 1.0 \text{ Hz}$ 、 $P = 0.0230$ 、Tukey's *post hoc* test）、NA 単独適用時に比べると有意な変化は認められなかった（ $P = 0.6129$ 、Tukey's *post hoc* test; Figure 16e）。以上をまとめると、NA は mPFC V 層錐体細胞を脱分極させるとともに興奮性シナプス伝達を増大させるが、DA の付加適用はこれらの作用に更なる変化を起こさないことが示唆された。

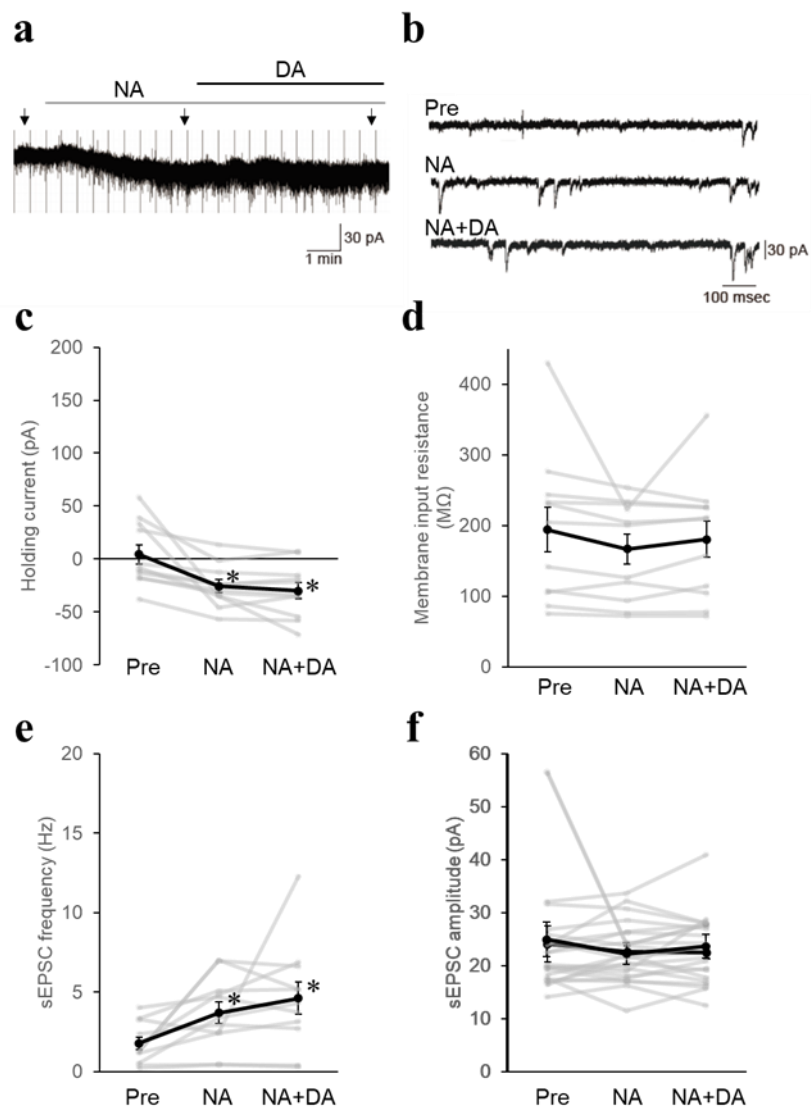


Figure 16. mPFC V層錐体細胞におけるNAの作用とDA付加適用による作用

a, b. 代表的なトレース。bはaに示す矢印部を拡大したもの。

c. 各適用時の保持電流。* $P < 0.05$ vs. Pre

d. 各適用時の入力抵抗。

e. 各適用時のsEPSC頻度。* $P < 0.05$ vs. Pre

f. 各適用時のsEPSC振幅。

また、本研究で記録したニューロンについて、保持電流が正あるいは負の方向に 10 pA 以上変化した細胞を抑制性あるいは興奮性応答細胞として分類した (Table)。DA 単独適用の後に DA+NA を適用した試験において、12 個の記録ニューロンのうち 7 個のニューロンが DA 単独適用に対する興奮性応答細胞であり、5 個のニューロンは非応答性細胞であった。7 個の興奮性応答細胞のうち 6 個は、NA の付加適用により更なる興奮性応答を示し、残りの 1 個は応答を示さなかった。DA 単独適用に対する非応答性細胞 5 個のうち、2 個は NA 付加適用に対して興奮性応答を示し、残りの 3 個は応答を示さなかった。

NA 単独適用の後に NA+DA を適用した試験において、11 個の記録ニューロンのうち 10 個が NA 単独適用に対して興奮性応答を示した。そのうち 2 個は DA の付加適用により更なる興奮性応答を示し、1 個は抑制性応答を示し、残りの 7 個は DA の付加適用に対して応答を示さなかった。

最後に NA および DA 単独適用時の興奮性応答細胞の割合と保持電流変化の比較からこれらの作用強度を比較した。NA および DA 単独適用時の興奮性応答細胞の割合はそれぞれ 10/11 および 7/12 であった (Table)。また、NA 単独適用時の保持電流変化は DA 単独適用時のそれに比べて大きい傾向が認められた (NA: -29.8 ± 8.9 pA, $n=11$ 、DA: -12.7 ± 2.7 pA, $n=12$ 、 $t_{21}=1.921$ 、 $P=0.0684$ 、Student's *t*-test、Table)。以上より、本研究で用いた濃度では、NA は DA に比べてより強力な興奮性作用を示すことが示唆された。

Table. 各記録細胞の DA、NA、および、その混合液処置に対する応答性

Neuron			Neuron		
#	Δ holding current (pA)		#	Δ holding current (pA)	
	DA	DA+NA		NA	NA+DA
1	+	+	1	+	+
	(-19.63)	(-26.57)		(-92.66)	(-36.46)
2	+	+	2	+	+/-
	(-12.12)	(-40.44)		(-10.99)	(-4.27)
3	+/-	+/-	3	+	+/-
	(-7.75)	(-1.83)		(-14.19)	(-4.19)
4	+/-	+	4	+/-	+/-
	(-8.51)	(-21.09)		(-7.55)	(-3.14)
5	+	+	5	+	+/-
	(-31.30)	(-29.87)		(-12.45)	(1.65)
6	+/-	+	6	+	-
	(-3.20)	(-16.51)		(-79.44)	(11.45)
7	+/-	+/-	7	+	+/-
	(-0.18)	(-1.70)		(-13.72)	(-6.97)
8	+	+/-	8	+	+/-
	(-12.26)	(-3.82)		(-18.80)	(-1.00)
9	+	+	9	+	+/-
	(-12.78)	(-10.30)		(-40.32)	(8.21)
10	+/-	+/-	10	+	+/-
	(-2.55)	(-8.02)		(-11.19)	(5.32)
11	+	+	11	+	+
	(-15.78)	(-22.78)		(-26.66)	(-19.74)
12	+	+			
	(-25.77)	(-15.92)			

II-3 考察

第II章では、拘束ストレスを負荷することで、mPFCにおけるDAおよびNAの遊離量が増加することが明らかとなり、DA量の増加はコカインの複数回事前処置によりさらに増加することが示された。また、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強時にmPFCニューロンの活動が増加することをc-Fosの発現を指標に確認した。さらに、電気生理学的な検討により、DAおよびNAがmPFC V層錐体細胞の興奮性を増強すること、DAによって増強した興奮性はNAの付加適用により更に増強されることも明らかにした。

これまでの報告と同様に⁴⁴⁾、本研究においても、拘束ストレス負荷により mPFC における DA および NA 遊離量が増加することを確認した (Figure 12, 13)。ストレス負荷中 (15-30 min) に加えて、ストレス負荷解除後 (DA: 30-45 min および 60-75 min、NA: 30-45 min、45-60 min、60-75 min、75-90 min および 105-120 min) においても DA および NA 量が増加した (Figure 12)。ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強は、ストレス負荷解除後 15 分間のポストテストセッションにおいて認められたことから (Figure 2, 3)、ストレスによって増強されたコカイン誘導性場所嗜好性の発現時には mPFC において DA および NA の神経情報伝達亢進が引き起こされていることが示唆された。

コカインの投与は VTA DA ニューロンにおいて神経可塑性を誘導することが知られている⁴⁵⁾。例えば、コカインの慢性投与により、DA ニューロンにおいてグルタミン酸作動性神経情報伝達の長期増強が誘導されることや、DA ニューロンの発火頻度が増加することなどが報告されている^{46,47)}。本研究では、コカインを事前に複数回処置することで、ストレス負荷後の mPFC での DA 遊離量が更に増加することを明らかにした (Figure 13)。このコカインによる作用は、少なくとも一部は、VTADA ニューロンにおける可塑的な変化に起因するものである可能性が考えられる。この点を調べるためには、本研究で用いた投与プロトコルにてコカインを投与した動物を用いて、VTADA ニューロンの可塑的な変化を調べることが必要である。

本研究では、mPFC V 層錐体細胞における電気生理学的解析により、保持電流や sEPSC の頻度および振幅に対する DA および NA の作用も検討した (Figure 15, 16)。過去の報告と同様に、DA および NA の保持電流に対する有意な作用を確認した^{42,48-50)}。DA は G タンパク質活性化型内向き整流性カリウムチャネル (GIRK チャネル) を抑制、内向き整流性 K⁺電流および電位依存性 K⁺電流を減少、および、L-type カルシウムチャネル電流を増加させることが報告されており⁵¹⁻⁵⁴⁾、NA はタンデムポアドメイン内向き整流性カリウムチャネル関連カリウムチャネル 2 (TREK2 チャネル) 電流を減少させることが報告されている⁵⁵⁾。本研究で認められた DA および NA 処置による保持電流の変化もこれらのチャネルを介した電流が関与している可能性が考えられる。NA は過去の報告と同様に sEPSC の頻度も有意に増加させた^{42, 56, 57)}。最近、マウスにおいて、NA による sEPSC 頻度増加が NA のポストシナプス性の作用によるものであることが報告されており⁴²⁾、本研究で認められた NA による sEPSC 頻度の増加もポストシナプス性の作用である可能性がある。つまり、NA のポストシナプス性作用により mPFC 局所神経回路が活性化することにより、NA 作用細胞への興奮性シナプス伝達が増加するポジティブフィードバック機構の存在が考えられる。

本研究では NA および DA がどのような受容体サブタイプに作用して、保持電流や sEPSC に影響を与えているのかは検討していないが、最近、マウスの mPFC V 層錐体細胞において NA の作用が $\alpha 1$ NA 受容体を介していることが報告されており⁴²⁾、本研究で認められた NA による興奮性作用についても $\alpha 1$ 受容体の関与が考えられる。一方で、DA については、mPFC 錐体細胞において、D1 受容体アゴニストが発火数を増加させること、および、NMDA 処置

による発火をさらに増加させることが報告されている^{53,58}。さらに我々は、VTA から mPFC への神経情報伝達を選択的に活性化することにより mPFC において c-Fos 発現が増加すること、この c-Fos 発現増加が D1 受容体遮断により抑制されることを見出している³⁹。以上のことから、mPFC 錐体細胞の DA に対する興奮性応答は D1 受容体を介している可能性が考えられるが、これについては、D1 受容体アンタゴニストを用いた電気生理学的解析によるさらなる検討が必要である。

DA の単独適用により興奮性応答を示した細胞は 12 個のうち 7 個であり、残りの 5 個は応答を示さなかった。DA 応答性細胞 7 個のうち 6 個は NA の付加適用 (DA+NA 適用) により興奮性応答を示したが、DA 非応答性細胞は 5 個のうち 2 個のみが NA に対して興奮性応答を示した (Table)。これらの結果は、DA+NA 適用による強力な mPFC V 層錐体細胞の活性化には、主に DA 応答性細胞に対する NA の相加的あるいは相乗的な興奮性作用が寄与していることを示唆している。一方、NA の単独適用により興奮性応答を示した細胞は 11 個のうち 10 個であり、NA+DA 適用によって更なる興奮性応答を示した細胞は 10 個のうち 2 個であった (Table)。DA 単独適用時に比べて、NA 存在下での DA 応答性細胞の割合は小さかったが (DA 単独適用 : 7/12、NA 存在下 DA 適用 : 2/11)、この原因として NA の興奮性作用が強力であるために頭打ちとなっている可能性が考えられる。実際に、NA および DA 単独適用時の興奮性応答細胞の割合 (NA: 10/11、DA: 7/12) や保持電流変化 (NA: -29.8 ± 8.9 pA, $n=11$ 、DA: -12.6 ± 2.7 pA, $n=12$ 、 $P=0.068$ 、Student's *t*-test、Table) を比較した場合、本研究で用いた濃度では、NA は DA に比べてより強力な興奮性作用を示すことが考えられる。

ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強は mPFC への D1 受容体アンタゴニスト投与 (Figure 9)、あるいは、 $\alpha 1$ 受容体アンタゴニスト投与により有意に抑制される⁴²。ただし、D1 受容体アンタゴニストは CPP score を有意に抑制するものの、コカイン誘導性場所嗜好性は依然として認められており (プレテストにおける cocaine-paired side 滞在時間 : 330.1 ± 10.2 s、ポストテストにおける滞在時間 : 523.1 ± 52.3 s, $n=7$ 、 $t_6=3.827$ 、 $P=0.0087$ 、paired *t*-test)、その抑制効果は部分的であった。一方で、 $\alpha 1$ 受容体アンタゴニスト投与はストレス負荷時のコカイン誘導性場所嗜好性を完全に抑制する。コカイン欲求行動において mPFC V 層錐体細胞の活性化は重要であり^{6,41}、先述したように NA は DA に比べてより多くの mPFC V 層錐体細胞においてより強い興奮性応答を引き起こす。以上のことから、D1 受容体を介した DA 作動性神経情報伝達に比べて、 $\alpha 1$ 受容体を介した NA 作動性神経情報伝達はより多くの mPFC V 層錐体細胞に対して強い興奮性作用を示すことで、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強により深く関与していると考えられる。

本章では拘束ストレス負荷により、mPFC において DA および NA の遊離量が増加し、これらの神経情報伝達は mPFC V 層錐体細胞を脱分極させるとともに興奮性シナプス伝達を増大させることを示した (Figure 17)。mPFC ニューロンの活動を増強させることが報告されている 5-HT は急性ストレスにより mPFC において増加する^{59,60}。最近、5-HT_{1A} 受容体

を介した5-HT作動性神経情報伝達もストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性の増強に関与することが報告された⁶¹⁾。ストレスによるコカイン欲求行動増強メカニズムの更なる理解のためには、mPFC V層錐体細胞に対するDA、NA、および、5-HTの単独作用やこれらの相互作用が、ストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強において果たす役割の更なる検討が必要である。

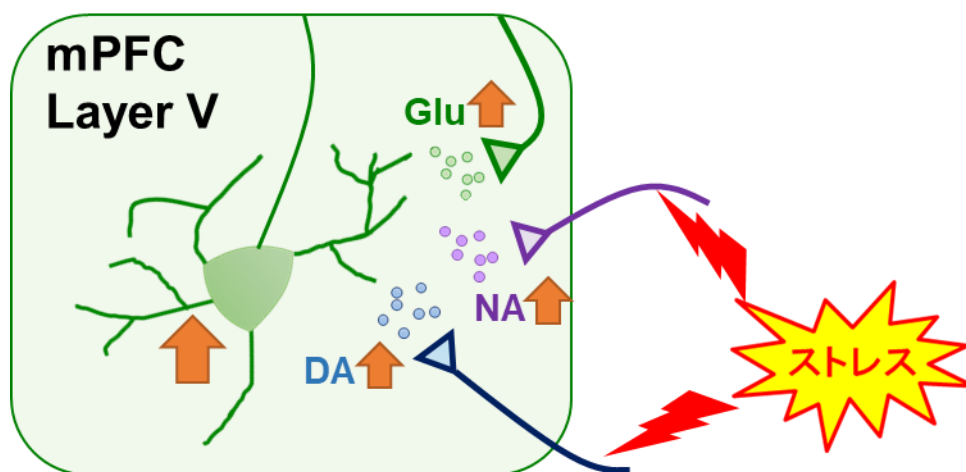


Figure 17. 第 II 章より示唆されるストレスによるコカイン誘導性場所嗜好性増強のメカニズム
mPFC : 内側前頭前皮質、DA : ドパミン、NA : ノルアドレナリン、Glu : グルタミン酸

終章

本研究では、第I章において、コカインを用いた条件付け場所嗜好性試験と拘束ストレス負荷を組み合わせ、ストレスによるコカイン欲求行動の増強機構を検討するための実験系を構築し、脳内薬物微量投与により関与する神経情報伝達を検討した。その結果、LDTへのNA作動性神経情報伝達によるLDTの神経活動亢進とそれに伴うVTAへのコリン作動性・グルタミン酸作動性神経情報伝達亢進、さらには、VTAからmPFCへのDA作動性神経情報伝達亢進がストレスによるコカイン欲求行動の増強に関与することを明らかにした。

第II章では、mPFCにおけるDAおよびNA作動性神経情報伝達がコカイン欲求行動に関与していることが報告されている。mPFCニューロンにどのように作用するかについて調べた。インビボマイクロダイアリス法、c-Fos免疫染色、および、電気生理学的解析により、拘束ストレスを負荷することで、mPFCにおけるDAおよびNA遊離量がともに増加し、これらの神経情報伝達の亢進が、mPFC V層錐体細胞の脱分極と興奮性シナプス伝達を増大させることがストレスによるコカイン欲求行動増強に関与している可能性を示した。

本研究により、ストレスによる薬物欲求行動増強の神経機構の一端が明らかとなった (Figure 18)。これらの知見は、薬物依存症治療に関する研究の進展に貢献することが期待できる。

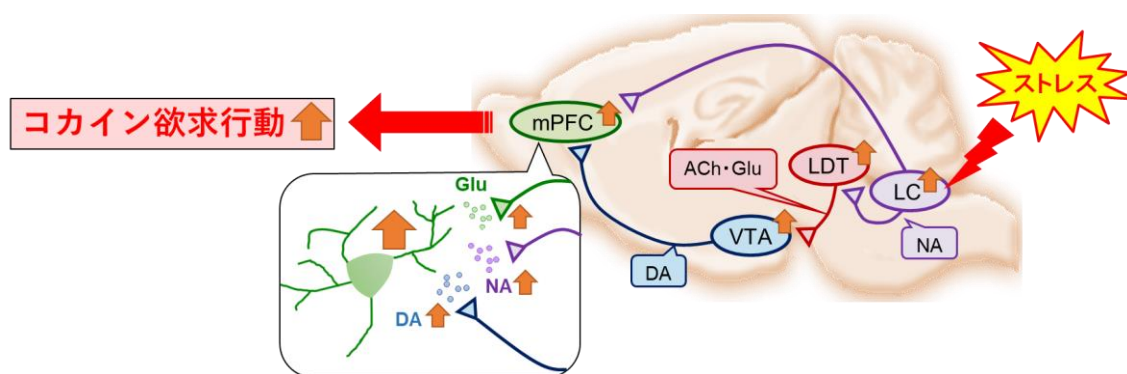


Figure 18. 本研究より示唆されるストレスによるコカイン欲求行動の増強メカニズム
mPFC : 内側前頭前皮質、VTA : 腹側被蓋野、LDT : 背外側被蓋核、LC : 青斑核
DA : ドパミン、NA : ノルアドレナリン、ACh : アセチルコリン、Glu : グルタミン酸

参考文献

1. Chan, B., Kondo, K., Ayers, C., Freeman, M., Montgomery, J., Paynter, R., and Kansagara, D. (2018) Pharmacotherapy for stimulant use disorders: A systematic review, *VA Evidence-based Synthesis Program Reports*.
2. Kosten, T. R., Rounsaville, B. J., and Kleber, H. D. (1986) A 2.5-year follow-up of depression, life crises, and treatment effects on abstinence among opioid addicts. *Arch Gen Psychiatry* **43**, 733-738
3. Mellinger, G. D., Balter, M. B., Manheimer, D. I., Cisin, I. H., and Parry, H. J. (1978) Psychic distress, life crisis, and use of psychotherapeutic medications: national household survey data. *Arch Gen Psychiatry* **35**, 1045-1052
4. Schmidt, H. D., Anderson, S. M., Famous, K. R., Kumaresan, V., and Pierce, R. C. (2005) Anatomy and pharmacology of cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking. *Eur J Pharmacol* **526**, 65-76
5. Kauer, J. A., and Malenka, R. C. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* **8**, 844-858
6. Kalivas, P. W. (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* **10**, 561-572
7. Schmidt, H. D., and Pierce, R. C. (2010) Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Ann N Y Acad Sci* **1187**, 35-75
8. Wang, H. L., and Morales, M. (2009) Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* **29**, 340-358
9. Lodge, D. J., and Grace, A. A. (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5167-5172
10. Kurosawa, R., Taoka, N., Shinohara, F., Minami, M., and Kaneda, K. (2013) Cocaine exposure enhances excitatory synaptic drive to cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus. *Eur J Neurosci* **38**, 3027-3035
11. Kamii, H., Kurosawa, R., Taoka, N., Shinohara, F., Minami, M., and Kaneda, K. (2015) Intrinsic membrane plasticity via increased persistent sodium conductance of cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus contributes to cocaine-induced addictive behavior. *Eur J Neurosci* **41**, 1126-1138
12. Shinohara, F., Kihara, Y., Ide, S., Minami, M., and Kaneda, K. (2014) Critical role of cholinergic transmission from the laterodorsal tegmental nucleus to the ventral tegmental area in cocaine-induced place preference. *Neuropharmacology* **79**, 573-579

13. Chowdhury, G. M., Fujioka, T., and Nakamura, S. (2000) Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull* **52**, 171-182
14. Semba, K., and Fibiger, H. C. (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* **323**, 387-410
15. Grant, S., London, E. D., Newlin, D. B., Villemagne, V. L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R. L., Kimes, A. S., and Margolin, A. (1996) Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12040-12045
16. Milella, M. S., Fotros, A., Gravel, P., Casey, K. F., Larcher, K., Verhaeghe, J. A., Cox, S. M., Reader, A. J., Dagher, A., Benkelfat, C., and Leyton, M. (2016) Cocaine cue-induced dopamine release in the human prefrontal cortex. *J Psychiatry Neurosci* **41**, 322-330
17. Martín-García, E., Courtin, J., Renault, P., Fiancette, J. F., Wurtz, H., Simonnet, A., Levet, F., Herry, C., and Deroche-Gamonet, V. (2014) Frequency of cocaine self-administration influences drug seeking in the rat: optogenetic evidence for a role of the prelimbic cortex. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2317-2330
18. Zavala, A. R., Weber, S. M., Rice, H. J., Alleweireldt, A. T., and Neisewander, J. L. (2003) Role of the prelimbic subregion of the medial prefrontal cortex in acquisition, extinction, and reinstatement of cocaine-conditioned place preference. *Brain Res* **990**, 157-164
19. Popescu, A. T., Zhou, M. R., and Poo, M. M. (2016) Phasic dopamine release in the medial prefrontal cortex enhances stimulus discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E3169-3176
20. Han, X., Jing, M. Y., Zhao, T. Y., Wu, N., Song, R., and Li, J. (2017) Role of dopamine projections from ventral tegmental area to nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in reinforcement behaviors assessed using optogenetic manipulation. *Metab Brain Dis* **32**, 1491-1502
21. Chandler, D. J., Gao, W. J., and Waterhouse, B. D. (2014) Heterogeneous organization of the locus coeruleus projections to prefrontal and motor cortices. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 6816-6821
22. Paxinos, G., and Watson, C. (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. fifth ed. *Academic Press, San Diego*
23. Oakman, S. A., Faris, P. L., Kerr, P. E., Cozzari, C., and Hartman, B. K. (1995) Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* **15**, 5859-5869
24. Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., and Malenka, R. C. (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* **491**, 212-217
25. Kohlmeier, K. A., and Reiner, P. B. (1999) Noradrenaline excites non-cholinergic laterodorsal tegmental neurons via two distinct mechanisms. *Neuroscience* **93**, 619-630

26. McLaughlin, J. P., Marton-Popovici, M., and Chavkin, C. (2003) Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J Neurosci* **23**, 5674-5683
27. Rozeske, R. R., Der-Avakian, A., Bland, S. T., Beckley, J. T., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2009) The medial prefrontal cortex regulates the differential expression of morphine-conditioned place preference following a single exposure to controllable or uncontrollable stress. *Neuropsychopharmacology* **34**, 834-843
28. Brielmaier, J., McDonald, C. G., and Smith, R. F. (2012) Effects of acute stress on acquisition of nicotine conditioned place preference in adolescent rats: a role for corticotropin-releasing factor 1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **219**, 73-82
29. Dai, Z., Kang, L., Wang, L., and Ma, L. (2006) Different roles of dopamine receptor subtypes in footshock stress-induced enhancement of morphine conditioned place preference. *Neurosci Lett* **409**, 52-56
30. Capriles, N., and Cancela, L. M. (1999) Effect of acute and chronic stress restraint on amphetamine-associated place preference: involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. *Eur J Pharmacol* **386**, 127-134
31. Li, Y., Li, G. Y., Li, L. J., Wang, C. H., Li, Z. X., Zhang, J. L., Zhang, J., and Li, W. H. (2007) Subsequently enhanced CPP to morphine following chronic but not acute footshock stress associated with corticosterone mechanism in rats. *Int J Neurosci* **117**, 1237-1255
32. Burke, A. R., Watt, M. J., and Forster, G. L. (2011) Adolescent social defeat increases adult amphetamine conditioned place preference and alters D2 dopamine receptor expression. *Neuroscience* **197**, 269-279
33. Haile, C. N., GrandPre, T., and Kosten, T. A. (2001) Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **154**, 213-220
34. Schindler, A. G., Li, S., and Chavkin, C. (2010) Behavioral stress may increase the rewarding valence of cocaine-associated cues through a dynorphin/kappa-opioid receptor-mediated mechanism without affecting associative learning or memory retrieval mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1932-1942
35. Smith, J. S., Schindler, A. G., Martinelli, E., Gustin, R. M., Bruchas, M. R., and Chavkin, C. (2012) Stress-induced activation of the dynorphin/ κ -opioid receptor system in the amygdala potentiates nicotine conditioned place preference. *J Neurosci* **32**, 1488-1495
36. Taoka, N., Kamiizawa, R., Wada, S., Minami, M., and Kaneda, K. (2016) Chronic cocaine exposure induces noradrenergic modulation of inhibitory synaptic transmission to cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus. *Eur J Neurosci* **44**, 3035-3045

37. Qi, J., Zhang, S., Wang, H. L., Wang, H., de Jesus Aceves Buendia, J., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., Seal, R. P., and Morales, M. (2014) A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat Commun* **5**, 5390
38. Brown, P. L., and Shepard, P. D. (2016) Functional evidence for a direct excitatory projection from the lateral habenula to the ventral tegmental area in the rat. *J Neurophysiol* **116**, 1161-1174
39. Shinohara, F., Kamii, H., Minami, M., and Kaneda, K. (2017) 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**, 1983-1989
40. Sartor, G. C., and Aston-Jones, G. (2012) Regulation of the ventral tegmental area by the bed nucleus of the stria terminalis is required for expression of cocaine preference. *Eur J Neurosci* **36**, 3549-3558
41. Kalivas, P. W., and McFarland, K. (2003) Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **168**, 44-56
42. Wada, S., Yanagida, J., Sasase, H., Zhang, T., Lia, X., Kamii, H., Domoto, M., Deyama, S., Hinoi, E., Yamanaka, A., Nishitani, N., Nagayasu, K., Kaneko, S., Minami, M., and Kaneda, K. (2020) Acute restraint stress augments the rewarding memory of cocaine through activation of $\alpha 1$ adrenoceptors in the medial prefrontal cortex of mice. *Neuropharmacology* **166**, 107968
43. Zhong, P., and Yan, Z. (2011) Differential regulation of the excitability of prefrontal cortical fast-spiking interneurons and pyramidal neurons by serotonin and fluoxetine. *PLoS One* **6**, e16970
44. Swanson, C. J., Perry, K. W., and Schoepp, D. D. (2004) The mGlu2/3 receptor agonist, LY354740, blocks immobilization-induced increases in noradrenaline and dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *J Neurochem* **88**, 194-202
45. Francis, T. C., Gantz, S. C., Moussawi, K., and Bonci, A. (2019) Synaptic and intrinsic plasticity in the ventral tegmental area after chronic cocaine. *Curr Opin Neurobiol* **54**, 66-72
46. Chen, B. T., Bowers, M. S., Martin, M., Hopf, F. W., Guillory, A. M., Carelli, R. M., Chou, J. K., and Bonci, A. (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**, 288-297
47. Marinelli, M., Rudick, C. N., Hu, X. T., and White, F. J. (2006) Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**, 79-97
48. Shi, W. X., Zheng, P., Liang, X. F., and Bunney, B. S. (1997) Characterization of dopamine-induced depolarization of prefrontal cortical neurons. *Synapse* **26**, 415-422
49. Gorelova, N., Seamans, J. K., and Yang, C. R. (2002) Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* **88**, 3150-3166
50. Grzelka, K., Kurowski, P., Gawlak, M., and Szulczyk, P. (2017) Noradrenaline Modulates the Membrane Potential and Holding Current of Medial Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons via beta1-Adrenergic Receptors and HCN Channels. *Front Cell Neurosci* **11**, 341

51. Witkowski, G., Szulczyk, B., Rola, R., and Szulczyk, P. (2008) D(1) 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
52. Dong, Y., Cooper, D., Nasif, F., Hu, X. T., and White, F. J. (2004) Dopamine modulates inwardly rectifying potassium currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci* **24**, 3077-3085
53. Wang, J., and O'Donnell, P. (2001) D(1) dopamine receptors potentiate nmda-mediated excitability increase in layer V prefrontal cortical pyramidal neurons. *Cereb Cortex* **11**, 452-462
54. Tseng, K. Y., and O'Donnell, P. (2005) Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1-NMDA co-activation. *Cereb Cortex* **15**, 49-57
55. Ładno, W., Gawlak, M., Szulczyk, P., and Nurowska, E. (2017) Kinetic properties and adrenergic control of TREK-2-like channels in rat medial prefrontal cortex (mPFC) pyramidal neurons. *Brain Res* **1665**, 95-104
56. Zhang, Z., Cordeiro Matos, S., Jegu, S., Adamantidis, A., and Seguela, P. (2013) Norepinephrine drives persistent activity in prefrontal cortex via synergistic alpha1 and alpha2 adrenoceptors. *PLoS One* **8**, e66122
57. Marek, G. J., and Aghajanian, G. K. (1999) 5-HT_{2A} receptor or alpha₁-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* **19**, 197-206
58. Chen, G., Greengard, P., and Yan, Z. (2004) Potentiation of NMDA receptor currents by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2596-2600
59. Lladó-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F., and Celada, P. (2012) 5-HT_{1A} receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. *Cereb Cortex* **22**, 1487-1497
60. Yoshioka, M., Matsumoto, M., Togashi, H., and Saito, H. (1995) Effects of conditioned fear stress on 5-HT release in the rat prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* **51**, 515-519
61. Chu, J., Deyama, S., Li, X., Motono, M., Otoda, A., Saito, A., Esaki, H., Nishitani, N., and Kaneda, K. (2021) Role of 5-HT_{1A} receptor-mediated serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex in acute restraint stress-induced augmentation of rewarding memory of cocaine in mice. *Neurosci Lett* **743**, 135555

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室 教授・南雅文 先生、同研究室 講師・天野大樹 先生、同研究室 講師・野村洋 先生、同研究室 助教・人羅菜津子 先生、同研究室 前准教授で、現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、ならびに、同研究室 前助教で、現公益財団法人東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野 主席研究員・井手聡一郎 先生に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本論文を審査していただき、貴重な御助言を賜りました同大学大学院薬学研究院薬理学研究室 教授・南雅文 先生、同研究室 講師・天野大樹 先生、同研究室 前准教授で、現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、ならびに、北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室 教授・中川真一 先生に深く感謝申し上げます。

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山内直紀 博士、朝岡勇太 修士、原隆人 修士、実験にご協力いただきました新垣紗也 氏に心から感謝いたします。そして大学院での研究生生活を支えてくれた家族にも心から感謝いたします。