

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
Туре	theses (doctoral)
File Information	Fumiya_Shinohara.pdf



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 一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	医験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

II-2-	1. ml	PFC	にに	お	ける	5刹	睢	外	· D	Α	お	よ	び	N	A	量に	こう	付了	する	5拃	旬す	ミフ	<	· L	ノブ	、貨	(荷	fの	影	響					
II-2-2	2. ス	、ト	レフ	くに	よ	る	コ;	力~	イン	/記	秀草	事性	生場	易列	ī啫	鈵	앰	増	強	時	の	m	PF	Ċ	に	お	け	る	c-l	Fos	3 発	钙	ŧ		
II-2-2	3. ml	PFC	錐	体	細別	包の)圓	!奮	性	に	対	す	る	D	A :	お。	よび	バ	NA	0	Οľ	巨月]												
II-3.	考	察	••	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	4
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								
СРР	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
CaCl ₂	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	Invitrogen, Paisley, UK
Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa	
Fluor 488 (A21206)	
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
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Sigma, St Louis, MO, USA
MgSO ₄ · 7H ₂ O	和光純薬工業(株),大阪
Na ₂ -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
Na ₂ -GTP	Sigma, St Louis, MO, USA
NaHCO ₃	Sigma, St Louis, MO, USA
Na ₂ HPO ₄	ナカライテスク(株),京都
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	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渇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 への神経情報伝達が関与するのか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)。





第1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:170-250g)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±1℃)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 µL/min、VTA および mPFC; 0.5 µL、0.5 µL/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(×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30×30×30 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。



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 が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(F₁₂₂ = 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、t₁₂ = 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、 F1,11=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。



Figur	e 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。* <i>P</i> < 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

<u>1-2-2. 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</u> 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、 α 1受容体アンタゴニスト terazosin (Tera、1.0 µg/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)、 B受容体アンタゴニスト timolol (Tim、2.0 µg/side) および α 2受容体アンタゴニスト RX821002

(RX、3.0 µg/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 α 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 α 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 µg/side) ある いは α 2受容体アゴニスト guanfacine (Gua、0.01 µg/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 が大きいことが示された (Veh、77.58 ± 46.9 s、 n = 6、Iso、205.2 ± 29.4 s、 n = 5、P = 0.0415、Gua、222.6 ± 35.2 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 α 2 受容体刺激が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 α 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。



最後に、LDT のβあるいはα2 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か否かを検討した。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α2 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 47。 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 µg/side) あるいはニコチン性 ACh 受容体アンタゴニスト mecamylamine (Mec、50 µg/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 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。

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 µg/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。





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 ニューロンは渇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 µg/side)あるいは D2 受容体アンタ ゴニスト raclopride(Rac、3.0 µg/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

- 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。

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、α2 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 にも、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 の開始前にのみ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α2 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 α2 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α2 受容体刺激は 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関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関与しているの 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関 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関与す る可能性が考えられる。

LDT における α 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関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関与する^{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関与 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 α 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経路の関与を示したが、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、コカイン渇望感の生成への関与が知られる 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関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α1 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関与する 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。





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/LEDTA、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:+450mV)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(×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 10×3 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 (1×1 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 ± 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 ± 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 pH7.3 ± 0.1 に調製)を用いて記録を行った。Voltageclamp 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



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。静止 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±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シスについては 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が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シスにより検討した。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±4.21%) に比べ て、ストレス負荷中 (15-30 min: 183.1 ± 22.0%、P = 0.0331) ならびにストレス負荷解除後 (30-45 min: 202.8 ± 22.1%、P=0.0125、60-75 min: 179.8 ± 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±3.27%) に比べて、ストレス負荷中 (15-30 min: 145.6±8.54%、 P=0.0416) ならびにストレス負荷解除後 (30-45 min: 167.7±13.1%、P=0.0293、45-60 min: 158.6±9.44%、P=0.0143、60-75 min: 158.2±10.6%、P=0.0234、75-90 min: 138.3±6.86%、 P=0.0081、105-120 min: 125.3±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)。



Fig	ure 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。
	* <i>P</i> < 0.05 vs30~-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。
	*, ** <i>P</i> < 0.05, 0.01 vs30~-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なかった ($F_{13,247} = 11.16$ 、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 ± 14.1%、n= 9、コカイン群、237.9 ± 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。

<u>II-2-3.</u> 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 μ mol/L)を単独バス適用した後にNA(10 μ 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±21.6 MΩ、DA、154.9±22.5 MΩ、DA+NA、164.7±21.6 MΩ、 $F_{1,313,14,44}$ =0.4832、P=0.5485、sEPSC 振幅、Pre、24.9±3.3 pA、DA、22.3

±2.0 pA、DA+NA、23.6±2.3 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</td> 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</td> 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±31.8 MQ、NA、166.8±20.9 MQ、NA+DA、180.7±25.6 MQ、 $F_{1.151,11.51}$ = 2.01、P=0.1834、sEPSC 振幅、Pre、24.1±3.4 pA、NA、22.6±1.1 pA、NA+DA、22.5±1.2 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±9.0 pA、NA、-25.4±6.0 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±0.4 Hz、NA、3.7±0.7 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±7.5 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±1.0 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。
- 各適用時のsEPSC頻度。*P < 0.05 vs. Pre e.
- 各適用時のsEPSC振幅。 f.

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10pA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。

Neuron	Δ holding current (pA)		Neuron	euron Δ holding current (pA)					
#	DA	DA+NA	#	NA	NA+DA				
1	+	+	1	+	+				
1	(-19.63)	(-26.57)		(-92.66)	(-36.46)				
2	+	+	2	+	+/-				
2	(-12.12)	(-40.44)	2	(-10.99)	(-4.27)				
2	+/-	+/-	2	+	+/-				
5	(-7.75)	(-1.83)	3	(-14.19)	(-4.19)				
4	+/-	+	4	+/-	+/-				
4	(-8.51)	(-21.09)	4	(-7.55)	(-3.14)				
5	+	+	5	+	+/-				
5	(-31.30)	(-29.87)	5	(-12.45)	(1.65)				
(+/-	+	(+	-				
0	(-3.20)	(-16.51)	0	(-79.44)	(11.45)				
7	+/-	+/-	7	+	+/-				
1	(-0.18)	(-1.70)	/	(-13.72)	(-6.97)				
o	+	+/-	0	+	+/-				
o	(-12.26)	(-3.82)	0	(-18.80)	(-1.00)				
0	+	+	0	+	+/-				
9	(-12.78)	(-10.30)	9	(-40.32)	(8.21)				
10	+/-	+/-	10	+	+/-				
10	(-2.55)	(-8.02)	10	(-11.19)	(5.32)				
11	+	+	11	+	+				
11	(-15.78)	(-22.78)	11	(-26.66)	(-19.74)				
10	+	+							
14	(-25.77)	(-15.92)							

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

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、VTA DA 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、VTA DA 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 al 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 al 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、 α 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、 α 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、 α 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-HT1A 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。





終章

本研究では、第1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 負荷を組み合わせて、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シス法、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

- 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 Ecidence-based Synthesis Program Reports.
- 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
- 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
- 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
- Kauer, J. A., and Malenka, R. C. (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8, 844-858
- Kalivas, P. W. (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 10, 561-572
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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 cocaineinduced 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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*
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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 α1 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 fastspiking interneurons and pyramidal neurons by serotonin and fluoxetine. *PLoS One* **6**, e16970
- 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 dopamineinduced 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 fastspiking 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
- 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., Jego, 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-HT2A 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-HT1A 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
- 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活を支えてくれた家族にも心から感謝いたします。