

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06765

研究課題名(和文)薬物報酬に基づく行動発現における腹側被蓋野-内側前頭前野ドーパミン神経伝達の機能

研究課題名(英文)The role of dopaminergic signaling from the ventral tegmental area to the medial prefrontal cortex in the expression of cocaine-associated addictive behaviors

研究代表者

金田 勝幸 (Kaneda, Katsuyuki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30421366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬物依存症での重要な問題は、薬物を摂取した環境・文脈により薬物の報酬経験が想起され、渴望感が生じ、再び薬物を摂取することである。この過程に腹側被蓋野(VTA)ドーパミン(DA)ニューロンの活動が関与することを過去の研究から見出していた。本研究では、コカイン条件付け場所嗜好性試験を用いた行動薬理学的手法に電気生理学的、解剖学的、光遺伝学的、および、薬理遺伝学的手法を融合して、VTAの主要投射先の一つである内側前頭前野でのDA神経伝達が、薬物の報酬記憶の想起と渴望感を反映する場所嗜好性の発現に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Reinstatement of drug use is a critical problem of drug addiction. In this study, using the conditioned place preference paradigm combined with electrophysiological recordings, optogenetics and chemogenetic techniques, we found that dopaminergic transmission in the medial prefrontal cortex (mPFC), one of the target brain regions of dopamine neurons in the ventral tegmental area, plays a critical role for inducing the reinstatement of cocaine use. Our data show that excitation of mPFC neurons, which is mediated by D1 dopamine receptor signaling, induces cocaine craving behaviors, including reinstatement.

研究分野：神経薬理学

キーワード：addiction ventral tegmental area medial prefrontal cortex cocaine dopamine craving

### 1. 研究開始当初の背景

薬物依存ではコカインなどの薬物による強烈な報酬効果が、摂取した環境・文脈とともに強固な記憶として蓄えられ、薬物を経験した環境が引き金となりその記憶が引き出されることで再び薬物を摂取したいという渴望感を生じさせる。報酬効果の獲得に側坐核 (NAc) でのドパミン (DA) 遊離と D1 受容体を介したシグナル伝達が関わるとの多くの知見に比べ、報酬記憶を想起し、渴望感を生じさせる神経機構については不明な点が多い。この過程に、腹側被蓋野 (VTA) の DA ニューロンから投射を受け、NAc とともに報酬系を構成し、記憶、学習、意思決定に関与する脳部位である内側前頭前野 (mPFC) が関与するとの報告はあるが、実験前に動物の mPFC を破壊しているため、報酬効果の獲得が障害された結果なのか、あるいは、報酬記憶想起と渴望感の生成過程が障害された結果なのかの区別はできていない。したがって、mPFC の薬物依存における役割については不明な点が多い。

一方、筆者のこれまでの研究から、VTA DA ニューロン活動が報酬記憶の想起とそれに基づく渴望感の生成に関与する可能性が分かってきた。すなわち、VTA にコリン作動性投射を送りその活動と報酬系の活動を制御する位置にある脳幹の背外側被蓋核 (LDT) に着目し、コカインによる LDT での可塑的变化とコカイン探索行動への関与を検討してきたところ、コカイン慢性投与により LDT コリン作動性ニューロンへのグルタミン酸神経伝達がプレシナプス性に増強すること、また、この可塑性発現には mPFC の神経活動が必要であることを世界に先駆けて見出した (Kurosawa & Kaneda et al., Eur J Neurosci, 2013)。さらに、コカイン条件付け場所嗜好性試験において、コカインの報酬記憶の想起と、それに伴う渴望感を反映すると考えられる場所嗜好性の発現に LDT から VTA へのコリン作動性神経伝達が重要であることを明らかにした (Shinohara & Kaneda et al., Neuropharmacology, 2014)。これらの結果は、コカイン摂取により興奮性の上昇した LDT から VTA へのコリン作動性神経伝達が、コカインに対する渴望感の生成に重要な役割を果たすことを示唆している。そして、このコリン作動性投射は VTA DA ニューロンの活動を上昇させるため、この上昇を抑えることが場所嗜好性の発現に影響を与えるのではないかとこの仮説から、GABA<sub>A</sub> および GABA<sub>B</sub> 受容体アンタゴニストのムシモールとバクロフェンを VTA に局所投与し活動を抑制したところ、コカイン場所嗜好性が抑制されるというデータを得た。これらの結果は、コカインによる場所嗜好性の発現には VTA DA ニューロンの活動上昇が重要であることを示している。しかし、VTA からの DA 神経伝達がどの脳部位で、どの受容体を介し、どのような影響を与えることで場所嗜好性

の発現に至るのかは分かっていない。解剖学的結合、報酬予測誤差に加えて DA ニューロンがサリエント (顕著) な物体・状況に反応するという機能、さらに、後者の機能は mPFC も担っていることを示唆する知見を考慮すると、mPFC での DA 神経伝達が場所嗜好性の発現に関わっている可能性が考えられる。この仮説を検証し、mPFC における DA の機能を明らかにすることは、未だ有効な治療法・治療薬のない薬物依存という個人にとってのみでなく社会的にも重要な問題を解決する上できわめて重要である。

### 2. 研究の目的

上述の背景から本研究では、LDT からのコリン作動性入力によって活性化された VTA DA ニューロンの投射が、その後、どの脳部位において、どのように処理されることで場所嗜好性の発現に至るのかを、特に mPFC に着目して、行動薬理的、電気生理学的、解剖学的、光遺伝学的、および、薬理遺伝学的手法を駆使して明らかにすることを目指した。具体的には、以下の3点を明らかにした。

(1) コカインによる場所嗜好性の発現に mPFC での D1 あるいは D2 受容体を介した神経伝達が関与するのか。

(2) 場所嗜好性の発現に関与するとすれば DA 受容体を介したシグナル伝達が mPFC 神経細胞の活動をどのように制御するのか。

(3) mPFC からどの脳部位への神経投射が場所嗜好性の発現に関わるのか。

### 3. 研究の方法

(1) ラットを用いたコカイン条件付け場所嗜好性試験のポストテストの直前に各 DA 受容体アンタゴニストを mPFC に局所投与し、場所嗜好性への影響を調べた。

(2) 神経活動マーカーの cFos の発現を指標として、場所嗜好性発現に伴う mPFC ニューロンの活動変化を検出し、変化が認められた場合には、DA 受容体を介した変化なのか否かを DA ニューロンにチャンネルロドプシン (ChR2) を発現させ、その軸索を mPFC で光刺激することで DA を遊離させ、cFos の発現が誘導されるのか否かを検討することで調べた。

(3) mPFC の投射部位の一つである NAc の神経活動を DREADD を用いて抑制し、mPFC からの興奮性作用を遮断することでコカインによる場所嗜好性が抑制されるか否かを調べた。

### 4. 研究成果

(1) 条件付け場所嗜好性試験のポストテストの直前に D1 受容体アンタゴニストの SCH23390、あるいは、D2 受容体アンタゴニストのラクロプリドを mPFC に局所微量投与したところ、SCH23390 の投与により、用量依存的に場所嗜好性スコアの減少が認められた (図 1)。一方、ラクロプリドの投与

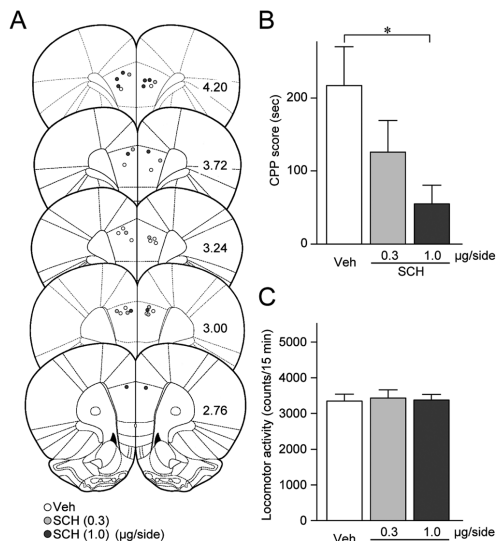


図 1 コカイン条件付け場所嗜好性試験のポストテストにおいて、mPFCでのD1受容体刺激が場所嗜好性の発現を誘導した。

は場所嗜好性スコアに影響を与えなかった。すなわち、VTA DAニューロンの活動に伴うmPFCでのDA神経伝達はD1受容体を刺激することでコカイン場所嗜好性を誘導することが明らかとなった。

(2) コカイン条件付け場所嗜好性試験のポストテストの直後に脳を取り出し、mPFCにおけるcFosの発現を免疫組織化学により検討したところ、生理食塩水条件付け動物と比較して、cFos陽性細胞数が有意に増加していることが分かった(図2)。すなわち、コカ

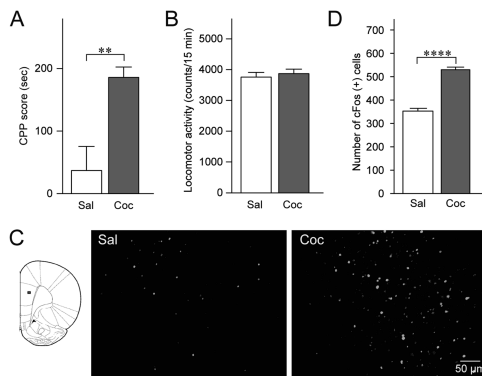


図 2 コカイン条件付け場所嗜好性試験のポストテスト後のmPFCにおいてcFos陽性細胞数が顕著に増加した。

イン条件付け場所嗜好性試験のポストテストにおいて、薬物報酬効果への期待あるいは薬物探索過程に、mPFCニューロン活動の上昇が関与していることが分かった。さらに、VTAにバクロフェン・ムシモールの混合液を微量注入し、VTA DAニューロン活動を抑制すると、コカイン場所嗜好性が減弱するとともに、mPFCでのcFos陽性細胞数も減少することが明らかとなった。これらの結果は、コカイン場所嗜好性のポストテストにおい

てVTA DAニューロン活動増大に伴い、mPFCの神経活動が上昇することが、場所嗜好性の発現に重要であることを示唆している。この可能性をさらに追求するために、オプトジェネティクスを用いて検討を行った。すなわち、VTAにChR2を発現させるAAVベクターを注入し、2週間以上の待機期間後、mPFCに光ファイバーを埋込み、VTA DAニューロン由来の軸索を光刺激したところ、多数のmPFCニューロンにcFosの発現が誘導された。一方、光刺激の前に予めD1受容体アンタゴニストのSCH23390を全身投与しておくこと、mPFCにおけるcFosの誘導は有意に抑制された(図3)。この結果は、VTA DA

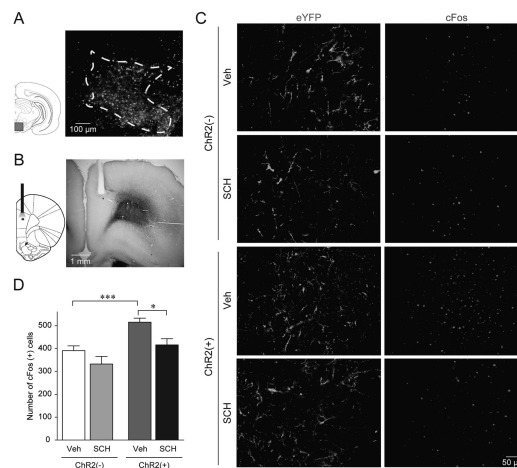


図 3 ChR2を発現させたVTA DAニューロン由来の軸索を光刺激で活性化すると、mPFCにおいてcFosの発現が誘導された。この誘導はD1受容体アンタゴニストSCH23390の前処置で抑制された。

ニューロンの活動上昇に伴うmPFCでのD1受容体を介した神経伝達が、mPFCニューロンの活動を上昇させることを示している。

以上の結果より、コカイン欲求行動の発現過程においてmPFCでのD1受容体を介した神経伝達、および、それに伴うmPFCニューロン活動の上昇が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) mPFCの神経活動の上昇はその投射先神経細胞の活動を上昇させると考えられる。そこで、その一つの候補であるNAcの神経活動をDREADDシステムを用いて抑制した際のコカイン場所嗜好性への影響を検討した。vGAT-CreマウスのNAcにCre依存性に抑制性のDREADDであるhM4Diを発現させるAAVベクターを注入し、2週間以上の待機期間後にコカイン条件付け場所嗜好性試験を行った。ポストテストの直前に生理食塩水あるいはhM4Diの選択的人工リガンドであるCNOを全身投与し、hM4Di陽性細胞の活動を選択的に制御した。なお、hM4Di陽性細胞ではCNO適用によってわずかな過分極の誘導と電流注入による発火活動の抑制が起こることをスライス電気生理学的手法に

より確認している。その結果、hM4Diを発現させたマウスでは、コカイン場所嗜好性が顕著に抑制されることが認められた(図4)。こ

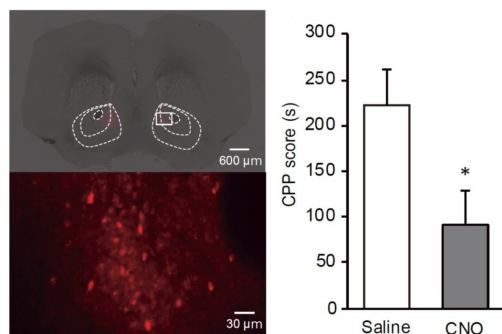


図4 NAc GABAニューロンにhM4Diを選択的に発現させたマウスでは、コカイン条件付け場所嗜好性試験のポストテスト直前にCNOを投与することにより、場所嗜好性が顕著に抑制された。

の結果から、コカイン場所嗜好性の発現にはNAcのGABAニューロンの活動上昇が重要であることが示唆された。本研究では、NAcの神経活動の上昇がmPFC由来の興奮性投射に起因するの否かは直接的に証明できていないが、過去の報告を考慮すると、少なくとも部分的にはmPFCからの興奮性投射がNAcの活動上昇に寄与している可能性が考えられる。今後、この点をさらに追求する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kamii H, Taoka N, Minami M, Kaneda K (2017) Nitric oxide in the medial prefrontal cortex contributes to the acquisition of cocaine place preference and synaptic plasticity in the laterodorsal tegmental nucleus. *Neurosci Lett*, 660:39-44. 査読あり

DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.015.

Shinohara F, Kamii H, Minami M, 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(11):1983-1989. 査読あり

DOI: 10.1248/bpb.b17-00614.

Taoka N, Kamiizawa R, Wada S, Minami M, Kaneda K. (2016) Chronic cocaine exposure induces noradrenergic modulation of inhibitory synaptic transmission to cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 44(12):3035-3045. 査読あり

DOI: 10.1111/ejn.13405.

Kaneda K, Kamii H, Taoka N, Minami M. (2016) The role of neuroplasticity in cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus for cocaine addiction. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 51(5):259-267. 査読あり  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/jmsas/magazine>

[学会発表](計13件)

Zhang Tong, 堂本 将輝, 柳田 淳子, 出山 諭司, 檜井 栄一, 金田 勝幸, 側座核 GABA ニューロンの活動が cocaine 探索行動の発現に及ぼす影響、日本薬学会第 138 年会、2018

柳田 淳子, 和田 進太郎, 堂本 将輝, 笹瀬 人暉, 張 彤, 松下 夏子, 出山 諭司, 檜井 栄一, 金田 勝幸, 急性ストレス負荷によるコカイン欲求行動における内側前頭前野ノルアドレナリン神経伝達の役割、第 132 回 日本薬理学会近畿部会、2017

和田 進太郎, 柳田 淳子, 堂本 将輝, 笹瀬 人暉, 張 彤, 松下 夏子, 出山 諭司, 檜井 栄一, 金田 勝幸, ストレス負荷によるコカイン欲求行動における内側前頭前野ノルアドレナリン神経伝達の関与、日本薬学会北陸支部第 129 回例会、2017

金田 勝幸, 薬物探索行動発現における脳幹-中脳-皮質神経回路の役割、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2017

伊藤 志穂, 出山 諭司, 堂本 将輝, 矢口 立真, 金子 周司, 金田 勝幸, 危険ドラッグ 5F-AMB の脳内投与により誘発されるマウスの行動異常、第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2017

金田 勝幸, 和田 進太郎, 柳田 淳子, 上居 寛典, 堂本 将輝, 出山 諭司, The role of noradrenergic transmission in the medial prefrontal cortex for acute restraint stress-induced augmentation of cocaine reward、第 40 回日本神経科学大会、2017

堂本 将輝, 和田 進太郎, 出山 諭司, 金子 周司, 金田 勝幸, 内側前頭前野における危険ドラッグ 5F-AMB の作用、第 130 回日本薬理学会近畿部会、2016

金田 勝幸, 上居 寛典, 田岡 直史, 和田 進太郎, 南 雅文, コカイン依存形成における背外側被蓋核コリン作動性ニューロンの可塑性と内側前頭前野の NO の役割、平成 28 年度日本アルコール・アディクション医学会学術総会、2016

金田 勝幸, Involvement of brainstem noradrenaline system in acute stress-induced enhancement of cocaine craving behavior、第 39 回日本神経科学大会、2016

上居 寛典, 篠原 史弥, 田岡 直史, 南 雅

文、金田 勝幸、Neural mechanisms of acute stress-induced enhancement of cocaine craving behaviors、第 89 回日本薬理学会年会、2016

Katsuyuki Kaneda、Neural mechanisms of acute stress-induced enhancement of cocaine craving behavior、International Symposium on Prediction and Decision Making 2015、2015

金田 勝幸、脳幹コリン作動性ニューロンを含む神経回路のコカイン依存形成における役割、平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、2015

上居 寛典、篠原 史弥、田岡 直史、南 雅文、金田 勝幸、急性ストレス負荷によるコカイン誘導性場所嗜好性増強の神経メカニズム、第 38 回日本神経科学大会、2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakuri/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

金田 勝幸 (KANEDA, Katsuyuki)  
金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授  
研究者番号：30421366