

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08403

研究課題名(和文) ラット脳内自己刺激行動を用いた意欲の神経回路の探索

研究課題名(英文) Exploration of motivational neural circuit using intracranial self-stimulation behavior in rats

研究代表者

千堂 年昭 (SENDO, Toshiaki)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：30437561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、動物の意欲のメカニズムを解明するためにラットを用いた「報酬をほしがる意欲」の強さを測定できるモデル実験を開発し、そのモデル実験を行ったラットでどのような脳領域が活性化されているのか調べました。実験の結果、側坐核という報酬に関わる領域や海馬という記憶に関わる脳領域で神経細胞の大きさや数が変化していました。つまり、これらの脳領域は報酬を欲しがる意欲的活動に関わっている領域であることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年問題となっている「引きこもりの増加」や「難治性のうつ」には、意欲の低下が関わっていると言われていますが、意欲を改善する薬は今のところ商品化されていません。また、脳内のどのようなメカニズムが意欲低下や意欲の改善につながるのかわかっていませんでした。本研究成果は意欲に関わる脳領域の一端を明らかにする結果であり、意欲のメカニズムを解明し意欲を改善する新たな治療法・治療薬開発に応用できると考えられます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a model experiment that can measure the strength of "motivation for reward" using rats in order to elucidate the mechanism of the motivation of animals, and what kind of brain does the rat do for that model experiment I checked if the area was activated.

As a result of the experiment, the size or number of neurons or glial cells changed in the area related to reward called nucleus accumbens and the brain area related to memory called hippocampus. In other words, it has become clear that these brain areas are related to motivational activities that want rewards.

研究分野：医療薬学

キーワード：脳内自己刺激行動 神経マーカー 際簿内伝達経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、労働者の精神疾患による意欲や動機づけの減退は、社会的経済損失をもたらす、厚生労働省は精神疾患を5大疾患の1つとして重点的な対策を行うことを表明している。意欲や動機づけの減退は、うつ病や統合失調症等の精神疾患あるいはパーキンソン病に見られる代表的な症状である。最近では、がん患者の闘病意欲の減退が発症後の治療効果や予後に大きく影響をもたらす事が明らかになりつつある。しかしながら、精神疾患の治療において意欲や動機づけの減退の改善を主目的とした治療薬は存在しない。その理由は、労働者の精神的ケアの早急な対応が求められている中、意欲や動機づけ改善を目的とした薬物の標的作用部位や、その解明に必要な薬効評価系動物モデルが確立されていないことによる。

そのような中、申請者はこれまで、情動領域の研究で使用されている報酬系オペラント行動である脳内自己刺激行動を応用し、先行(Priming)刺激効果を用いた脳内自己刺激行動のRun-Way法を動機づけの行動実験モデルとして確立した。本モデルを応用し、申請者はこれまでに科学研究費補助金(平成22~24年度基盤研究(C):課題番号22590135、平成25~27年度基盤研究(C):課題番号25460212)を受けて研究を行った結果、以下の3点を明らかにし誌上に発表を行っている。臨床的に動機づけを改善するとされている薬物が本実験モデルにおいても動機づけの促進作用を有する「実験モデルの妥当性」、本Run-Way法におけるドーパミン神経の関与とドーパミン神経に作用する薬剤の作用特性、本Run-Way法における動機づけと、他の情動を評価する行動薬理学手法(強制水泳試験法および条件付け場所嗜好行動)との間の薬物の作用特性の違い、すなわち「動機づけ評価モデルとしての薬理学的特性」である。これらの研究結果から、動機づけには報酬や依存行動と関連深い脳内ドーパミン神経が関与するが、その神経メカニズムは類似した精神機能とは異なっているとの知見を得た。しかしながら、動機づけの行動薬理学的な特徴を裏付けるような神経活動はこれまで全く明らかにされていない。意欲や動機づけに作用する薬物がどのような神経メカニズムを介して動機づけの改善作用を発現するのか明らかにすることは、意欲低下を改善する薬物の標的作用点を見出し、創薬に応用するための重要な課題である。

2. 研究の目的

以上のことから申請者は、動機づけの評価モデルである本Run-Way法を用いて動機づけ行動を行かせた動物の脳組織を採取し免疫組織化学の手法を用いることで、動機づけ行動により神経活動が活性化される脳部位および神経の種類を特定することが可能であり、意欲・動機づけに関わる神経メカニズムの解明および意欲低下に有効な薬物の発見につながるものとの発想を得た。

本研究では、動機づけの評価モデルである脳内自己刺激行動のRun-Way法により活性化される脳神経ネットワークを明らかにすることで、意欲や動機づけに特異的に関与する神経メカニズムを解明し、意欲や動機づけ改善薬の臨床開発に貢献する基盤データを構築することを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動機づけ実験モデルの作製

本研究における意欲や動機づけ行動の供与は、脳内自己刺激行動のRun-Way法を用いて行った。脳内自己刺激行動のRun-Way法における動機づけは、刺入した電極を通じて視床下部外側野のドーパミン神経を電気的に刺激することで生じる快情動を報酬とし、報酬を求めてRun-Way実験装置内を走行する行動を動機づけ行動として用いた。

動機づけ行動による脳内の活性化を評価するため、実験には動機づけ行動獲得ラットを以下のように3群に分け、実験を行った。

Run-Way群: Run-Way実験装置を用いた動機づけ行動を1日当たり30試行、5日間連続して実施させた。

Stimulation群: 動機づけ行動における報酬刺激と同等の電気刺激を与えるが、レバー押しなどのオペラント行動に基づかない、実験者によってランダムに刺激を供与する。与える電気刺激そのものの数はRun-Way群と同数である。

Control群: 全く電気刺激を与えない群

以上の3群間について、Run-Way群およびStimulation群は最終の電気刺激を与えた直後に脳組織を固定し、以下の実験に供した。

(2) 動機づけ行動により活性化される脳部位の特定

報酬刺激を求めて装置を走行するという動機づけ行動によって特徴的に活性化される脳領域を探索的に評価した。上記手法にて得られた脳切片を用いて、脳内で産生されるメッセンジャー蛋白質であるc-Fos、神経細胞の標識タンパク質であるNeuN、神経細胞の支持細胞であるグリア細胞の標識タンパク質GFAPおよびIba-1の発現変化を免疫組織染色法にて評価した。

本研究で評価した脳部位は記憶に関連する海馬および報酬や動機づけに関連する側坐核とし、神経細胞の判定マーカーとしてNeuN、グリア細胞のうちアストロサイトのマーカーとしてGFAP、ミクログリアのマーカーとしてIba-1を用いた。

(3) 動機づけ行動が神経細胞突起の伸長に与える影響の検討

上記研究によって明らかとなった動機づけ行動による部位特異的な神経細胞の構造変化に着目し、神経モデル細胞における細胞内伝達経路の解明を行った。

動機づけ行動の影響を評価する先駆けとして、より単純な実験条件を設定し脳内自己刺激行動（レバー押し行動）による報酬供与を15分間行わせたラットを実験に供した。なお、脳内電気刺激の条件は脳内自己刺激行動のRun-way法の報酬刺激と同様の刺激である。また、対照群として拘束ストレスを与え不快情動を惹起させたラットおよび無処置ラットを用いた。これらの動物より得られた血液成分をPC12変異細胞の培地に注入して反応を確認した。

4. 研究成果

(1) 動機づけ行動により活性化される脳部位の特定

c-Fosタンパク質の免疫学的染色法を用いた動機づけ行動による脳内活性化部位の検討

脳内の機能的活性を評価するマーカー（神経活動マーカー）であるc-Fosタンパク質の発現について、動機づけ行動による発現変化の有無をドーパミン神経の代表的起始核である腹側被蓋野および終末部である側坐核、海馬の3領域で評価した。その結果、側坐核領域でRun-Way群のc-Fos陽性細胞数が増加していたが十分に再現性の良いデータが得られなかった。

動機づけ行動による神経細胞および神経膠細胞の発現変化の検討

まず、神経細胞のマーカーであるNeuNについて評価したところ、Run-Way群およびstimulation群ではcontrol群と比較して側坐核領域におけるNeuN陽性細胞数の増加が認められた。したがって、側坐核領域におけるc-Fos発現量の増加は神経細胞マーカーの発現強度の増加と関連する可能性があり、報酬獲得だけでなく動機づけが存在することが側坐核の活性化に關与する可能性がある。

次に、脳内海馬領域におけるGFAPおよびIba-1の陽性細胞数について評価した海馬および側坐核におけるGFAP陽性細胞の細胞面積は、Run-Way群およびstimulation群でcontrol群と比較して増大し、特にRunway群の増大の程度が大きかった。Iba-1陽性細胞については、側坐核領域においてのみ同様にstimulation群およびRunway群で陽性細胞の細胞面積の増大が認められた。

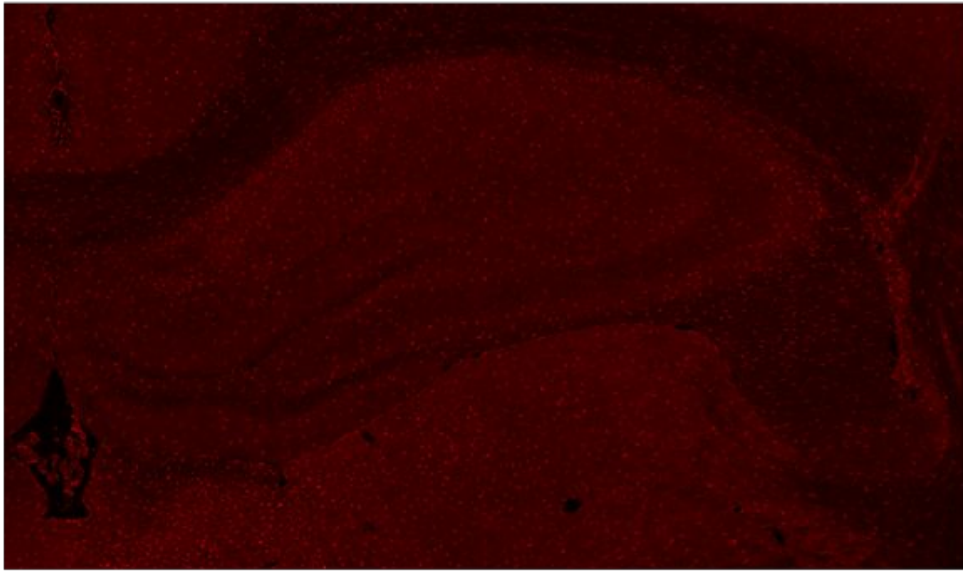
つまり、同様の電気刺激であっても報酬あるいは動機づけに関連するか否かによって細胞に与える影響が異なり、報酬あるいは動機づけに作用する電気刺激はグリア細胞の発現強度あるいは細胞機能を変化させるが、報酬として機能しない電気刺激ではこれらの活性化は生じないことが明らかとなった（図1および図2）。

近年、グリア細胞は神経細胞と相互作用を示し神経機能に影響を与えることが報告されている。グリア細胞の発現変化による神経伝達への影響を受容体機能および神経伝達物質の定量に評価する。これらの方法により動機づけ行動による神経メカニズムへの影響を明らかにする予定である。

(2) 動機づけ行動により活性化される細胞内伝達経路の検討

その結果、快情動を供与したラット血液はPC12変異細胞の細胞突起を無処置ラットと比較して大きく伸長させた。一方、不快情動を供与したラット血液によっても細胞突起の伸長は確認されたが、その程度は快情動供与ラットよりも小さかった。また、細胞突起の伸長に関わる細胞内伝達経路について評価したところ、快情動供与ラットの血液を加えた細胞ではp38 mitogen-activated protein kinase経路の活性化およびExtracellular Signal-regulated Kinase経路の關与が認められた。しかしながら、不快情動供与ラットの血液ではこのような変化は認められなかった。以上のことから、快情動および不快情動はともに神経突起を伸長させるが、細胞内伝達経路は異なることが明らかとなった。

Control群



Run-Way群

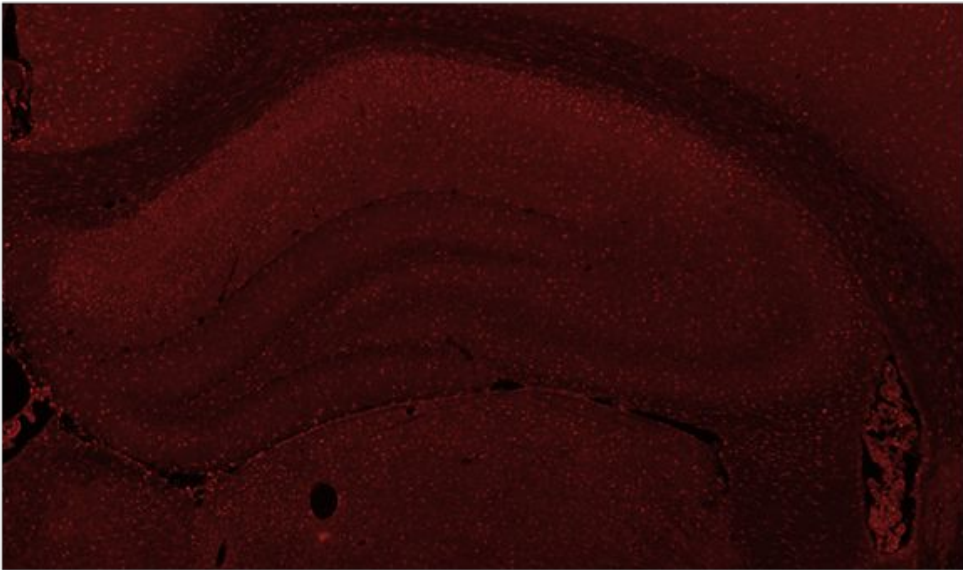
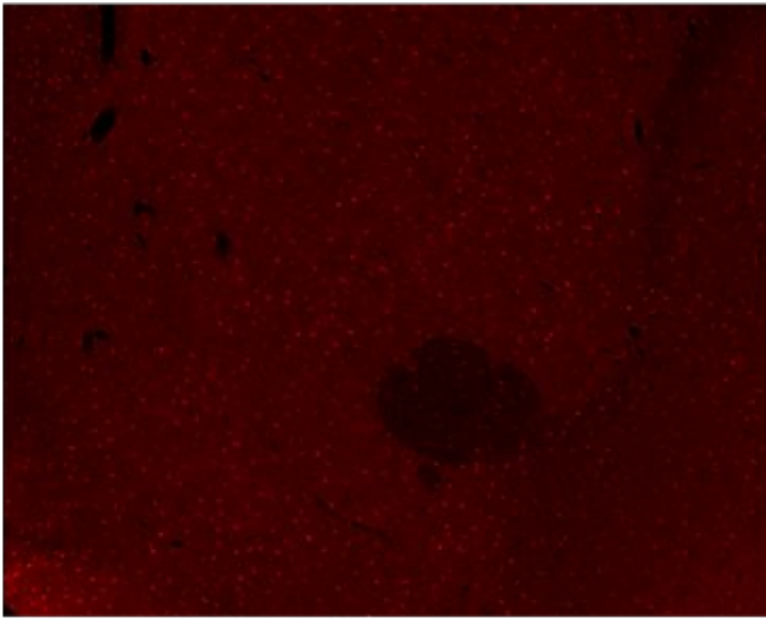


図1 海馬におけるIba-1染色画像

Control群



Run-Way群

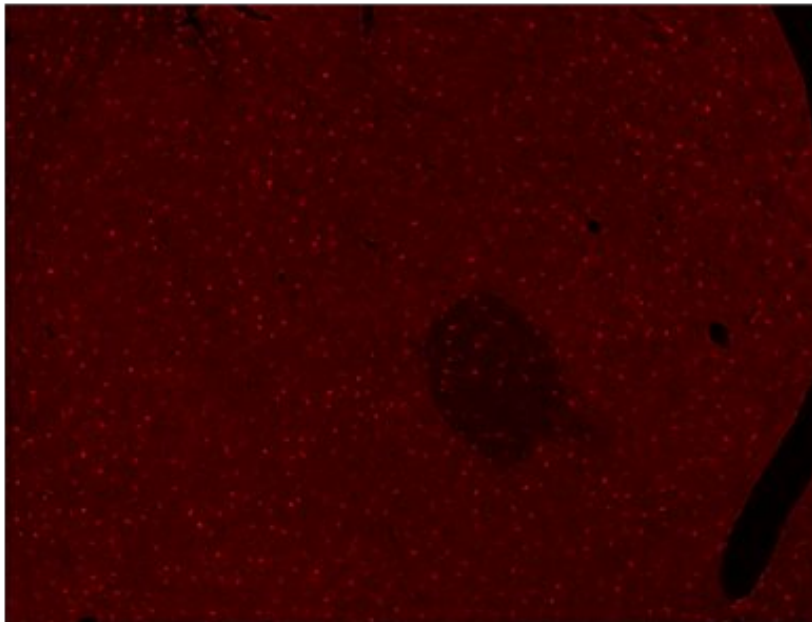


図2 側坐核におけるIba-1染色画像の1例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Gomita Y, Esumi S, Kitamura Y, Sendo T et al., Intracranial self-stimulation and immobilization had different effects on neurite extension and the p38 MAPK pathway in PC12m3 cells., Life Sci. 190 巻 (2017), 査読あり.

Gomita Y, Esumi S, Sugiyama N, Kitamura Y, Sendo T et al., Intracranial self-stimulation-reward induces neurite extension in PC12m3 cells and activation of the p38 MAPK pathway., Neurosci Lett. 649 巻 (2017), 査読あり.

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：五味田 裕

ローマ字氏名：(GOMITA, yutaka)

研究協力者氏名：北村 佳久

ローマ字氏名：(KITAMURA, yoshihisa)

研究協力者氏名：江角 悟

ローマ字氏名：(ESUMI, satoru)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。