

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500297

研究課題名（和文）報酬行動に関わる神経回路メカニズムの解析

研究課題名（英文） Analysis of neural circuits in reward-related behaviors

研究代表者

甲斐 信行（KAI NOBUYUKI）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50301750

研究成果の概要（和文）：薬物依存は社会的に大きな問題である。本研究は、覚せい剤が脳内での神経回路に働いて行動を変化させるのかを調べるため、脳の特定の神経回路が除去されたマウスを作成し、薬物に対する行動の変化を調べた。その結果、側坐核シェルという領域である特定タイプの神経細胞が無くなると薬物依存の程度が強くなることを明らかにした。一方で、異なるタイプの神経細胞が無くなると、逆に薬物依存が起こりにくくなることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Drug addiction is a terrible social problem. To understand which neural circuits are involved in the addiction, mutant mice in which a specific kind of neurons was removed were tested for drug-associated behavior. It was revealed that the loss of a kind of neurons in the Nucleus accumbens shell strengthened drug addiction. Deletion of another kind of neurons in the shell weakened drug addiction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：側坐核、報酬行動、ドパミン受容体、イムノトキシン細胞標的薬、神経回路網

## 1. 研究開始当初の背景

薬物などの報酬を求める行動の表出には、大脳皮質より深部に位置する側坐核という領域が関与することが知られている。側坐核のニューロンのほとんどは、神経伝達物質のドパミンの受容体をもっており、D1 と D2 の 2 種類の受容体のうちどちらか片方を発現

している。D1 と D2 受容体の活性化はそれぞれ、異なる細胞内情報伝達系に作用して神経活動に異なる影響を及ぼすことから、各受容体を持つニューロンはそれぞれ、脳が報酬を求める行動を制御するうえで異なる役割を持つと考えられる。しかし、各ニューロンが報酬を求める行動をそれぞれどのように制御しているのかは、まだよく判っていない。

本研究代表者の所属チームで開発されたイムノトキシン細胞標的療法は、遺伝子発現の特異性に基づいて特定のニューロンを除去する分子遺伝学の技術である。この技術を用いると、特定のニューロンが除去された動物（マウスなど）を作成してその行動を調べること、除去されたニューロンの機能を推測できる。そこで本研究では、側坐核の中でもヒトの薬物依存に類似した症状を起こすことが知られているシェルとよばれる領域で、D1 もしくは D2 受容体を持つニューロンの選択的な破壊の影響を調べようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、側坐核シェルで D1 もしくは D2 受容体をもつニューロンが除去されたマウスを作成した。これらのマウスを使って、ヒトの薬物依存のモデルとなる、行動感作 (behavioral sensitization)、および条件性場所嗜好性 (conditioned place preference : CPP) の 2 種類の行動を調べ、各ニューロンがこれらの薬物依存行動に果たす役割を明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 側坐核シェルで D1 もしくは D2 受容体をもつニューロンが除去されたマウスの作成

すでに作成済みの、D1 もしくは D2 受容体をもつ細胞で選択的にヒトインターロイキン 2 受容体 (IL2R) を発現する遺伝子組換えマウスを用いた。これらのマウスの側坐核シェルに、イムノトキシン (IL2R を持つ細胞に選択的に取り込まれてその細胞を殺す毒物) を注入した (図 1)。

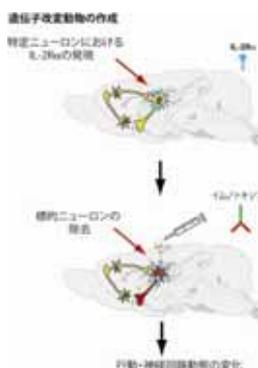


図 1. イムノトキシン細胞標的療法

### (2) 行動感作実験

イムノトキシン注入後のマウスに覚せい剤メタンフェタミン (METH) を皮下注射 (1mg/Kg) し、その後の運動量を調べた。注射は 8 日間続けて行い、毎日運動量を測定した。

これまでの知見から、このように覚せい剤を繰り返し投与すると、その後の運動量が日ごとに増加することが分かっている。これはヒトの薬物依存で認められる薬物渴望や薬物探索行動に深く関連した現象だと考えられている。そこで、D1 もしくは D2 受容体陽性ニューロンが除去されたマウスでは運動量の増加の度合いに、対照群とどのような違いがあるのかを調べた。

### (3) CPP 実験

この実験は薬物の与えられた環境を学習する能力をテストするもので、白/黒の箱と間の仕切りからなる実験装置を用いる (図 2)。実験初日と 2 日目は薬物を注射せずに、仕切りを上げて白と黒の部屋を 15 分間自由に行き来させて、両者の滞在時間を調べた。各部屋の平均滞在時間を求めて、それが短かった方の部屋で、翌日から薬物投与を行った。薬物投与は 6 日間行い、仕切りは閉めて部屋の行き来ができないようにした。1 日目は METH を注射後にマウスを 1 時間部屋に閉じこめた。翌日は生理食塩水を注射後、反対側の箱に閉じこめた。これを 1 サイクルとして合計 3 サイクル行った。その翌日に、仕切りを上げた装置にマウスを注射せずに入れ、滞在時間を測って薬物注射前と比較した。これまでの知見から、覚せい剤を注射されたマウスは、注射後の滞在時間が注射前より 200 秒近く増えることが分かっている。この方法で調べた薬物依存の効果は、動物を用いた薬物依存の最も厳格な測定法である脳内薬物自己投与実験の結果とほぼ等しいことが知られており、薬物依存の効果調べの方法として確立している。そこでこの方法を用いて、D1 もしくは D2 受容体陽性ニューロンが除去されたマウスでは、薬物依存の効果に対照群とどのような違いがあるのかを調べた。



図 2. CPP 実験装置

## 4. 研究成果

### (1) D1 もしくは D2 受容体をもつニューロンの、側坐核シェルからの除去

#### D2 ミュータントマウス

D2 受容体をもつ細胞で IL2R を発現する遺伝子組換え (ミュータント) マウスのシェルにイムノトキシンを注入して、D2 受容体陽

性細胞数を 70% 減少させることに成功した (図 3)。

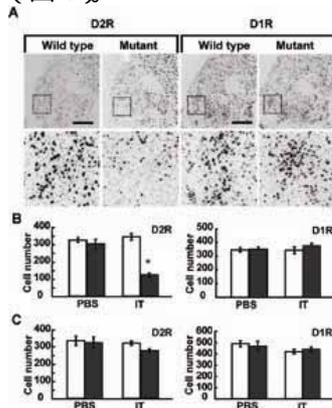


図 3. D2 受容体陽性細胞の除去

(A) In situ hybridization 法により、側坐核シェルで D2 および D1 陽性細胞数をミュータントマウスと対照群の野生型の間で比較した。下段は上段の拡大図。(B) シェルの陽性細胞数のカウント結果。D2 受容体陽性細胞が、イムノトキシンを注入されたミュータントマウス (黒棒) では野生型 (白抜き棒) や PBS 注入群に比べて 30% まで減少した。(C) 側坐核コアでは減少が認められなかった。

D1 ミュータントマウス  
シェル D1 受容体陽性細胞についても、ミュータントマウスを用いて、その数を 50% 以下に減少させることに成功した (図 4)。

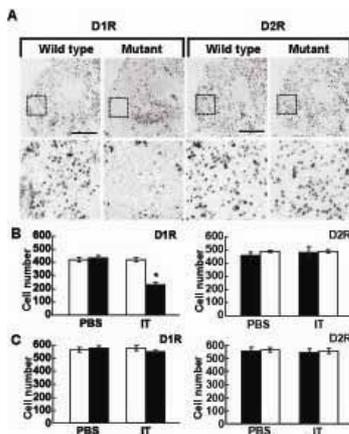


図 4. D1 受容体陽性細胞の除去

(A) In situ hybridization 法で、側坐核シェルの D1 および D2 陽性細胞数を調べた。下段は上段の拡大図。(B) シェルの陽性細胞数のカウント結果。D1 受容体陽性細胞が、イムノトキシンを注入したミュータントマウスでは野生型および PBS 注入群に比べて 50% まで減少しているが、側坐核コアでは減少は起きていなかった (C)。

## (2) 行動感作実験

### D2 ミュータントマウス

側坐核シェルの D2 受容体陽性細胞が除去されたミュータントマウスと、対照の野生型マウスの間で、METH の繰り返し投与による運動量の亢進に違いがあるかどうかを調べた。その結果、ミュータントマウスは 4 日目以降で有意に運動量が野生型よりも多くなることが分かり、行動感作の効果がより大きくなることが分かった (図 5)。

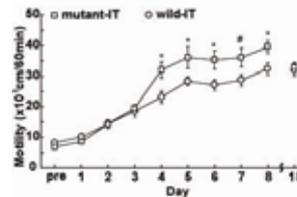


図 5. D2 ミュータントマウスの行動感作

縦軸は METH 注射後 1 時間の運動量、横軸は投与された日を表す。pre は初回投与前 1 時間の運動量で、1 日目から 8 日目まで毎日投与し、10 日間の断薬期間を置いて 18 日目に投与したときの運動量も調べた。\* $p < 0.05$ , # $p < 0.1$

### D1 ミュータントマウス

側坐核シェルの D1 受容体陽性細胞が除去されたミュータントマウスについても同様に、対照の野生型マウスとの間で、METH の繰り返し投与による運動量亢進の違いを調べた。その結果、ミュータントマウスでは行動感作の効果が野生型に比べて弱く、2 日目と 3 日目では野生型に比べて有意に運動量が少ないことが明らかになった。また、投与日数が増えるにつれて野生型の運動量に追いついて差が無くなることが分かった (図 6)。

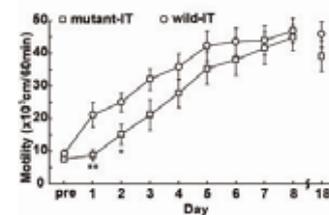


図 6. D1 ミュータントマウスの行動感作

縦軸は運動量、横軸は投与日を表す。投与や測定の条件は図 4 と同じ。\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

## (3) CPP 実験

### D2 ミュータントマウス

白/黒どちらかの部屋で METH の繰り返し投与を 3 日間受けた後に各部屋の自由な滞在時間を調べ、薬物投与された部屋の滞在時間が、投与前にあらかじめ測っておいた滞在時間と比べて何秒増加したかを CPP スコアとした。ミュータントマウスと野生型の側坐核シェ

ルにそれぞれイムノトキシンか PBS を注入した 4 群で CPP スコアを比較することで、D2 細胞の除去が薬物依存の効果に影響を及ぼすかどうかを検討した。その結果、どの群の間にも有意な差は認められず、薬物依存の効果に違いがあるとは言えなかった（図 7）。

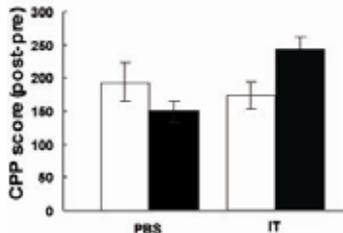


図 7 . D2 ミュータントマウスの CPP

縦軸は CPP スコア、横軸は処置群を表す。黒棒は D2 ミュータント、白抜き棒は野生型のデータを示す。

#### D1 ミュータントマウス

D1 受容体陽性細胞の除去の影響についても 4 群で比較を行った。その結果、どの群の間でも有意差は認められず、除去の影響は認められなかった（図 8）。

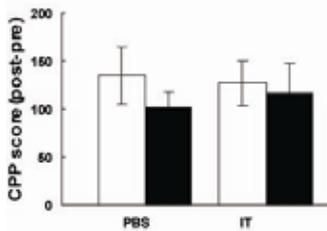


図 8 . D1 ミュータントマウスの CPP

縦軸は CPP スコア、横軸は処置群を表す。D1 ミュータントのデータを黒棒で、野生型を白抜き棒で表した。

#### (4) 考察

本研究では世界に先駆けて側坐核シエルの特定ニューロン(D1 または D2 受容体陽性)の除去に成功した。側坐核シエルはヒトの薬物依存に類似した行動に関わることがこれまでに知られており、これらの行動に関わる神経回路メカニズムの詳細な解析は、薬物依存のメカニズムを解明する上で重要な意味を持つと考えられてきた。しかし従来の方法では特定ニューロンを選択的に除去することが不可能だったため、そのメカニズムの解明は進んでいなかった。本研究の成果により、薬物依存行動の発達に、側坐核シエルの特定ニューロンがそれぞれどのように異なる役割を持つかが示され、依存に関わる神経回路網の全貌解明やその治療法の発達につながる重要な知見が得られた。

D1 ミュータントマウスと D2 ミュータントマウスでは、行動感作について正反対の結果

が得られた。D2 受容体陽性細胞が除去されたマウスでは、覚せい剤の繰り返し投与による行動感作の影響が途中から野生型に比べてより強く認められた。それとは逆に、D1 受容体陽性細胞が除去されたマウスは、繰り返し投与を行った最初の 2 日間は行動感作の度合いが弱く、その後で野生型と同等のレベルまで運動量増加が認められた。この異なる影響は、二つのタイプのニューロンが行動感作に果たす役割の違いを示唆する。この違いが生まれる仕組みは不明だが、二つのタイプのニューロンがそれぞれ異なる領域のニューロン活動を制御しているために起こる可能性が考えられる。実際に、シエルの D1 受容体陽性細胞は主に中脳の腹側被蓋野に投射してそのニューロンを興奮させ、D2 受容体陽性細胞は主に腹側淡蒼球に投射してそのニューロンを抑制する。腹側被蓋野のニューロンの興奮は行動感作の起点と考えられている。また腹側淡蒼球のニューロンは、行動感作を起こす程度の METH の繰り返し投与でその発火頻度が上昇して抑制がきかなくなることが分かっている。そこで本研究の D1 細胞の除去は腹側被蓋野のニューロンの興奮を弱めて行動感作の発達を遅らせ、一方 D2 細胞の除去は腹側淡蒼球の脱抑制を招いて行動感作を強めた可能性が考えられる。

行動感作と異なり、D2 細胞もしくは D1 細胞の除去はどちらも CPP に影響を及ぼさなかった。これまでに、側坐核シエルに投射するドパミン神経を薬物で破壊すると CPP が低下することが報告されている。このため、側坐核シエルのドパミン神経伝達は CPP に重要な役割を果たすと考えられたが、本研究の結果はどちらの受容体を持つニューロンも CPP には必須ではないことを示唆する。この食い違いを説明する可能性の一つに、D1 陽性細胞と D2 陽性細胞が CPP を起こす機能を互いに補って持つことが考えられる。この可能性は、D1 と D2 の両方の細胞を除去したマウスで CPP を調べることで確かめられる。他には、ドパミンの機能を他の神経伝達物質であるセロトニンが相補している可能性が考えられる。この可能性は、ドパミントランスポーターを欠損したマウスでも CPP が起こること、またそのマウスに対してだけセロトニン受容体の拮抗薬が CPP を押さえる働きを持つことから示唆される。この可能性は、セロトニン受容体の拮抗薬を前処理した D1 もしくは D2 細胞除去マウスの CPP を調べることで検討できる。CPP に関する側坐核シエルのニューロン機能は、将来の検討課題だと考えられる。

#### 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)

Masuda T, Kai N, Sakuma C, Kobayashi K, Koga H, Yaginuma H.

Laser capture microdissection and cDNA array analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the embryonic dorsal spinal cord.

Brain Res. 1249: 61-67 (2009) 査読有り

Kobayashi T, Kai N, Kobayashi K, Fujiwara T, Akagawa K, Onda M, Kobayashi K.

Transient silencing of synaptic transmitter release from specific neuronal types by recombinant tetanus toxin light chain fused to antibody variable region.

J Neurosci Methods. Vol. 175, No 1, pp. 125-132, 2008 査読有り

甲斐信行、小林和人

基底核と記憶、分子精神医学、8: 294-299 (2008) 査読無し

甲斐信行、小林和人

ドーパミン伝達による行動発現システムの制御、蛋白質・核酸・酵素、53: 565-572 (2008) 査読無し

[学会発表](計3件)

甲斐 信行

Conditional ablation of dopamine D2 receptor-containing neurons in the nucleus accumbens shell impairs reward-related behavior

Society for Neuroscience

2008年11月17日

Washington DC

甲斐 信行

Roles of two types of dopamine receptor-containing neurons of nucleus accumbens shell in reward-related behavior

第31回日本神経科学大会

2008年07月09日

東京国際フォーラム

甲斐 信行

Conditional ablation of dopamine D2 receptor-containing neurons in the nucleus accumbens shell impairs reward-related behavior

第30回日本分子生物学会年会

2007年12月13日

パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/cms/molgenet/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 信行 (KAI NOBUYUKI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50301750

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし