

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500432

研究課題名(和文) 依存性薬物による脳幹コリン作動性ニューロンでの新規シナプス可塑性とその意義の解明

研究課題名(英文) Mechanisms and functional roles of drug-induced neuroplasticity in the brainstem cholinergic neurons

研究代表者

金田 勝幸 (Kaneda, Katsuyuki)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30421366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：コカインを含む薬物による依存形成に腹側被蓋野(VTA)から側坐核および内側前頭前野に至る中脳辺縁皮質ドパミン神経系の活動と可塑的变化が重要な役割を果たすことが知られている。しかし、報酬系に投射し、その活動制御に関わるとされる報酬系外の神経核の関与やそこでのコカインによる可塑的变化の誘導については不明であった。そこで我々は背外側被蓋核(LDT)に着目し、コカインによる依存形成における役割を解析したところ、LDTの神経活動およびLDTからVTAへのコリン作動性神経伝達がコカイン依存形成に関与すること、また、この過程にLDTコリン作動性ニューロンでのシナプス可塑性が関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The involvement and plasticity of the mesocorticolimbic dopamine (DA) system in cocaine-induced addiction have been studied extensively. However, it remains largely unexplored that the role of the brainstem cholinergic system in cocaine addiction. The laterodorsal tegmental nucleus (LDT) contains cholinergic neurons that innervate the ventral tegmental area (VTA) and is crucial for regulating the activity of VTA DA neurons, implying that LDT may also be associated with cocaine addiction. In this study, we found that cholinergic transmission from the LDT to the VTA is involved in acquisition and expression of cocaine-induced conditioned place preference and that, after repeated cocaine exposures, these neurons exhibit synaptic plasticity, which is dependent on NMDA receptor activation, nitric oxide production, and the activity of medial prefrontal cortex. The findings strongly suggest that LDT cholinergic neurons may be critically involved in developing cocaine-induced addiction.

研究分野：神経薬理学

キーワード：薬物依存 神経可塑性 背外側被蓋核 腹側被蓋野 報酬系

1. 研究開始当初の背景

コカインを含む様々な薬物による依存形成に中脳腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) から側坐核 (nucleus accumbens, NAc) および内側前頭前野 (medial prefrontal cortex, mPFC) に至る中脳辺縁皮質ドパミン (DA) 神経系、いわゆる脳内報酬系の活動と可塑的变化が重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、コカインの急性・慢性投与後、あるいは慢性投与に続く退薬後にシナプス伝達あるいは膜特性に可塑的变化が誘導され、これらの変化と薬物探索行動とが密接に関係することが報告されている。しかし、報酬系の中心である VTA DA ニューロンに投射し、その活動制御に関わるとされる報酬系外の神経核の依存形成への関与やそこでのコカインによる可塑的变化の誘導についてはよく分かっていない。

アセチルコリン (ACh)、グルタミン酸および GABA 作動性ニューロンから成る背外側被蓋核 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT) は、近年、報酬系の機能制御に関わることが示唆されている脳幹の神経核である。LDT は VTA DA ニューロンへ投射するコリン作動性神経伝達の主要な起始核であり、DA ニューロンの活動上昇およびバースト発火の生成に必要である。したがって、LDT コリン作動性ニューロンが VTA DA ニューロンの活動を制御することにより、コカインによる依存の形成に関与する可能性が考えられる。さらに、LDT コリン作動性ニューロンにおいてコカイン暴露により可塑的变化が誘導され、その興奮性が変化すれば、報酬系の活動にも影響を及ぼし、コカイン依存の形成に関わることが推察される。しかし、これらの点に関してはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

上述のような背景から我々は、薬物の依存形成能を報酬効果から予測する方法である条件付け場所嗜好性試験 (CPP テスト) を用いた行動薬理学的手法と、薬物投与後の動物からのスライス標本においてシナプス伝達の可塑的变化を検出する *ex vivo* 電気生理学的手法を駆使することで、LDT がコカイン依存形成に関与するのではないかという仮説の検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 行動薬理学実験

動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット (行動実験開始時: 170-250 g) を使用した。ラットは一定温度 (22 ± 1 °C)、12 時間毎の明暗サイクルおよび自由な摂水・摂食環境下で飼育した。

薬物

コカイン塩酸塩 (武田) は生理食塩水 (saline) に溶解した。塩化カルバモイルコ

リン (カルバコール、CCh)、スコポラミン臭化水素酸塩三水和物、メカミラミン塩酸塩、dl-AP5 および CNQX ニナトリウム塩水和水物 (Sigma) は 0.1 M PBS (pH 7.4) に溶解した。薬物の用量は過去の研究報告を基に決定した: CCh (3.0 µg/0.2 µL/side)、dl-AP5/CNQX 混合液 (0.2 および 0.05 µg/0.2 µL/side)、スコポラミン (50 µg/0.5 µL/side)、メカミラミン (50 µg/0.5 µL/side)。

脳内薬物微量投与

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) ラットの両側 LDT (Bregma より尾側に 9.0 mm、外側に 0.83 mm、腹側に 7.0 mm) あるいは VTA (Bregma より尾側に 5.8 mm、外側に 1.0 mm、腹側に 8.5 mm) に、25 ゲージのステンレスガイドカニューレ (外径 0.5 mm、内径 0.22 mm) を埋め込み、その後、6-9 日間を回復期間とした。脳内薬物微量投与は、33 ゲージのステンレスインジェクションカニューレ (外径 0.2 mm、内径 0.08 mm) を両側の LDT あるいは VTA に挿入し、0.2 (LDT) あるいは 0.5 µL (VTA) をそれぞれ 0.2 あるいは 0.5 µL/min で行った。

条件付け場所嗜好性試験 (CPP テスト)

ラットが識別できる二つの同じ大きさ (30 × 30 × 30 cm) のボックス (一方は壁と床が黒色で床にステンレス格子があり、もう一方は壁と床が白色で床にステンレス金網がある) からなる CPP 装置を用いた (室町機械)。1 日目 (馴化) と 2 日目 (プレテスト) は、ラットに 2 つのボックスを 900 秒間自由探索させ、各ボックスでの滞在時間を天井に設置した赤外線センサー (Supermex, 室町機械) を用いて測定した。2 日目に滞在時間の短かったボックスをコカイン条件付けサイドとした。4-9 日目は、ラットにコカイン (20 mg/kg, i.p.) あるいは saline (1 mL/kg, i.p.) を 1 日に 1 回、交互に投与し、投与直後に一方のボックスに 30 分間閉じ込めた。CPP の獲得についての実験の場合は、コカイン条件付けの 5 分前に両側 LDT あるいは VTA に薬物を微量注入した。11 日目 (ポストテスト) は、1、2 日目と同様に、ラットに 900 秒間 2 つのボックスを自由探索させ、各ボックスにおける滞在時間を測定した。CPP の発現に関する実験の場合は、ポストテスト開始の 15 分前にラットの両側 VTA に薬物を微量注入した。CPP スコアはポストテストとプレテストのコカイン条件付けサイドにおける滞在時間の差として算出した。

組織学

CPP テスト終了後、脳内薬物注入部位の確認のため、断頭直前にチオニン (1.0%) / クレシルバイオレット (1.0%) を LDT あるいは VTA にそれぞれ、0.2 あるいは 0.5 µL 投与した。その後、脳を取出し、粉末状ドライアイスで凍結し、クリオスタットにより冠状切片 (50 µm) を作成後、ニュートラルレッドにより対比染色し、顕微鏡下で薬物注入部位を確認した。

データ解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。3 群以上の比較は one-way あるいは two-way ANOVA と Holm-Sidak *post hoc* test によって行った。P < 0.05 の場合に統計学的に有意であるとみなした。

(2)電気生理学実験

動物

雌雄 SD 系ラット (2-5 週齢) を saline (1.0 mL/kg, i.p.) あるいはコカイン (15.0 mg/kg, i.p.) を 1 日あるいは 5 日間投与する群に分け、最終薬物投与の翌日あるいは 5 日後に電気生理学実験を行った。コカインによる可塑性誘導メカニズムを検討するために、saline、NMDA 受容体アンタゴニストの MK-801 (0.5-1 mg/kg, i.p.) あるいは一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) 阻害剤の *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 50 mg/kg, i.p.) あるいは MK-801 と L-NAME の混合液を 5 日間、コカイン投与の 15 分前に全身投与した。電気生理学実験は最終薬物投与の翌日に行った。

mPFC への薬物微量投与

コカインによる LDT でのシナプス可塑性誘導における mPFC の活動の関与を検討するため、GABA_A 受容体アゴニストのムシモール (0.03 nmol/side, Sigma) と GABA_B 受容体アゴニストのバクロフェン (0.3 nmol/side, Sigma) の混合液 (B-M 混合液) を mPFC へ局所投与した。ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) で、25 ゲージのステンレスガイドカニューレ (外径 0.5 mm、内径 0.22 mm) を両側の mPFC (Bregma より吻側 2.8 mm、外側 0.65 mm、腹側 3.0 mm) に埋め込み、2-11 日間の回復期間を設けた。33 ゲージのステンレスインジェクションカニューレ (外径 0.2 mm、内径 0.08 mm) を両側の mPFC へ挿入し、0.5 μL の薬液あるいは PBS を 0.5 μL/min で投与した。薬物投与はコカイン投与の 4-5 分前に 5 日間行った。投与部位の確認は行動薬理学実験と同様に行った。

スライス作製とホールセルパッチクランプ記録

薬物投与したラットをイソフルラン麻酔下で断頭し、取り出した脳を以下の組成の氷冷 modified Ringer 's 液に浸した: NaCl 130、KCl 3.5、KH₂PO₄ 1.1、MgCl₂ 6.0、CaCl₂ 1.0、NaHCO₃ 30、glucose 10、kynurenic acid 2 (mM) (95% O₂-5% CO₂ で通気、pH 7.4)。LDT を含む矢状断スライス (厚さ 250 μm) を作製し、以下の組成の標準 Ringer 's 液中で 1 時間以上インキュベーションした: NaCl 125、KCl 2.5、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、NaHCO₃ 26、NaH₂PO₄ 1.25、glucose 25 (mM) (95% O₂-5% CO₂ で通気、pH 7.4)。その後、スライスを正立顕微鏡上の記録チャンパーに移し、標準 Ringer 's 液で灌流した。ホールセルボルテジクランプ記録には以下のピペット内液を用いた: Cs-gluconate 150、CsCl 5、

MgCl₂ 2、Na₂ATP 4、Na₂GTP 0.3、EGTA 10、HEPES 10、QX-314 2-3 (mM)、biocytin 2-3 mg/mL (pH 7.3、電極抵抗 3-9 M Ω)。記録ニューロン近傍に配置したガラス電極を用いて 200 μs、~200 μA の陰性パルスにより電気刺激を行った。刺激誘発性 EPSC の paired pulse ratio (PPR) を算出するため、それぞれ GABA_A 受容体およびグリシン受容体アンタゴニストのギャバジン (10 μM、Sigma) およびストリキニーネ (10 μM、Wako) 存在下で膜電位を -70 mV に固定し、刺激間隔 50 ms で 2 回刺激を行った。AMPA/NMDA 比を算出するため、膜電位を +40 mV に固定し IPSC をブロック下、AMPA 受容体アンタゴニストの CNQX (10 μM、Sigma) の存在下および非存在下での刺激誘発性 EPSC を記録した。その後、AMPA を介する EPSC は CNQX 非存在下で記録した EPSC から CNQX 存在下の EPSC を引くことにより求めた。Miniature EPSC (mEPSC) は膜電位を -70 mV に固定し、ギャバジン (10 μM)、ストリキニーネ (10 μM) およびテトロドトキシン (TTX、0.5 μM、Wako) 存在下で記録した。

記録細胞の同定

記録後のスライスを 4% PFA で一晩固定した。コリン作動性ニューロンは NADPH-diaphorase 反応を用いて同定した。すなわち、スライスを -NADPH (1 mg/mL) と nitroblue tetrazolium (0.1 mg/mL) を含む PBS (pH 7.4) 中で、37 °C で 1 時間インキュベート後、streptavidin-conjugated Alexa Fluor 594 (5 μg/mL、Molecular Probes) を含む PBS 中で、室温で 2 時間インキュベートすることにより、記録細胞内の biocytin を可視化した。脱水、封入後、蛍光および明視野観察下で Alexa Fluor 陽性かつ NADPH-diaphorase 反応陽性ニューロンをコリン作動性ニューロンとして同定した。

データ解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較は Student 's *t*-test あるいは paired *t*-test で、また、複数群間の比較は two-way ANOVA と Bonferroni *post hoc* test を用いて行った。P < 0.05 の場合に統計学的に有意であるとみなした。

4. 研究成果

(1) コカイン CPP の獲得におけるグルタミン酸神経伝達を介した LDT 神経活動の役割
はじめに、LDT がコカイン CPP の獲得に関与しているか否かを調べた。カルバコール (CCh) は M2 および M4 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) に作用し、G 蛋白共役内向き整流性 K⁺チャネルを開口することにより LDT コリン作動性ニューロンを過分極させる。そこで、CCh (3.0 μg/0.2 μL/side) をコカイン (20 mg/kg, i.p.) による条件付けの前にラットの LDT 内に局所投与することにより、LDT の神経活動を抑制した (図 1A)。その結果、両側 LDT 内へ CCh を投与した群の

CPP スコアは vehicle を LDT 内に投与したコントロール群に比べて有意に低いことが分かった(図 1B)。一方、両側とも LDT 近傍に CCh を投与した群 (CCh-miss 群) とコントロール群との間で CPP スコアの有意な差は認められなかったことから、CCh 局所投与による CPP スコア減弱作用は LDT 近傍のニューロンに対する作用によるのではなく、LDT の神経活動を抑制した結果であることが分かった。したがって、コカイン条件付けの際に LDT の神経活動を抑制すると、コカイン CPP の獲得が阻害されることが明らかとなった。

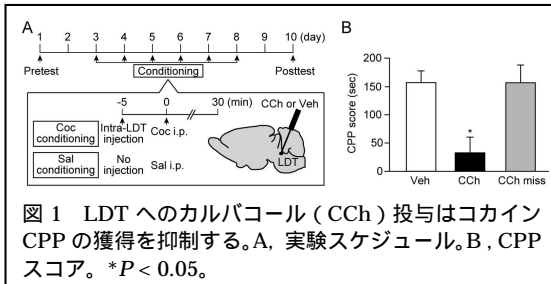


図 1 LDT へのカルパコール (CCh) 投与はコカイン CPP の獲得を抑制する。A, 実験スケジュール。B, CPP スコア。* $P < 0.05$ 。

次に、LDT へのどのような情報伝達が活動上昇に関与しているのかを調べた。LDT は mPFC、視床下部外側野、外側手綱核、脚橋被蓋核および LDT 自身からグルタミン酸投射を受けている。そこで、LDT 神経活動の上昇にグルタミン酸神経伝達に関与しているか否かを調べるために、条件付けの前に LDT 内にそれぞれ NMDA および AMPA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストである AP5 および CNQX の混合液 (AP5/CNQX, 0.2 および 0.05 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{L}/\text{side}$) を局所投与した(図 2A)。その結果、コントロール群と比較して、両側 LDT 内へ AP5/CNQX を投与した群 (AP5/CNQX 群) では CPP スコアが有意に減弱していることが分かった(図 2B)。一方、両側とも LDT 近傍に AP5/CNQX を投与した群 (AP5/CNQX-miss 群) とコントロール群の CPP スコアには有意な差は認められなかったことから(図 2B)、AP5/CNQX による CPP スコアの減弱は LDT 近傍への薬液漏出によるものではないと考えられた。以上の結果から、LDT へのグルタミン酸神経伝達が、少なくとも部分的には LDT 神経活動の上昇に寄与しており、この上昇がコカイン CPP の獲得に必要なことが示唆された。

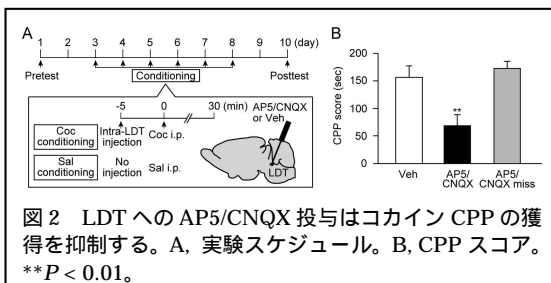


図 2 LDT への AP5/CNQX 投与はコカイン CPP の獲得を抑制する。A, 実験スケジュール。B, CPP スコア。* $P < 0.01$ 。

(2) コカイン CPP の獲得における VTA でのコリン作動性神経伝達の役割
 これまでに、VTA へのグルタミン酸神経伝達がコカイン CPP の獲得に関わることが報告されており、これには、NMDA 受容体を介した

VTA DA ニューロンのバースト発火の生成が重要であると考えられている。一方で、VTA へのコリン作動性神経伝達がコカイン CPP の獲得に関与しているかどうかは不明である。しかし、コリン作動性神経伝達も DA ニューロンのバースト発火に寄与することが示唆されていること、また、LDT は VTA へ投射するコリン作動性神経の主要な起始核であることを考慮すると、上述の結果は LDT から VTA へのコリン作動性神経伝達がコカイン CPP の獲得に関与している可能性を強く示唆している。この仮説を検証するため、コカインによる条件付けの際にスコポラミン (50 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$) あるいはメカミラミン (50 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$) を VTA 内に局所投与することにより、それぞれ mAChR あるいはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を遮断した(図 3A)。その結果、vehicle 投与群と比較してスコポラミンあるいはメカミラミン投与群では CPP スコアが有意に減弱していることが分かった(図 3B)。以上の結果から、VTA への mAChR および nAChR を介したコリン作動性神経伝達がコカイン CPP の獲得に重要であることが示唆された。

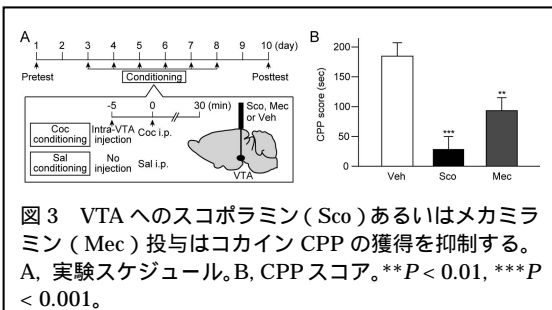


図 3 VTA へのスコポラミン (Sco) あるいはメカミラミン (Mec) 投与はコカイン CPP の獲得を抑制する。A, 実験スケジュール。B, CPP スコア。* $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(3) コカイン CPP の発現における VTA でのコリン作動性神経伝達の役割
 ポストテストでのコカイン CPP の発現過程では、条件付けされた環境に暴露されることが引き金となり、ラットはコカインに関連した記憶を想起し、報酬効果を経験した環境への接近行動をとると推測される。この過程、すなわち、コカイン CPP の発現にも VTA へのコリン作動性神経伝達に関与しているか否かを検討した。ポストテスト開始の直前に VTA 内にスコポラミン (50 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$)、メカミラミン (50 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$) あるいはこれらの混合液を局所投与した(図 4A)。その結果、vehicle 投与と比較して、スコポラミンあるいはメカミラミンの VTA 内単独投与は CPP スコアを減少させた(図 4B)。さらに、スコポラミンとメカミラミンの混合液投

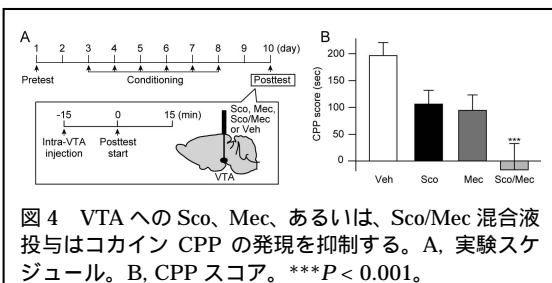


図 4 VTA への Sco, Mec, あるいは、Sco/Mec 混合液投与はコカイン CPP の発現を抑制する。A, 実験スケジュール。B, CPP スコア。*** $P < 0.001$ 。

与群では vehicle 投与群と比べて有意に CPP スコアが減弱することが分かった (図 4B)。VTA へのコリン作動性入力 LDT あるいは脚橋被蓋核に由来するが、脚橋被蓋核は主に黒質緻密部へ投射しており、コリンエステラーゼ阻害薬であるネオスチグミンの VTA 内投与により誘導される DA の遊離は脚橋被蓋核ではなく LDT の破壊により減少することから、DA ニューロンの活動制御には脚橋被蓋核よりも LDT のコリン作動性ニューロンがより重要であると考えられる。したがって、上記の知見は、おそらくは LDT に由来する VTA へのコリン作動性神経伝達がコカイン CPP の発現にも関与することを示唆している。

(4) コカイン慢性投与による LDT コリン作動性ニューロンでのプレシナプス可塑性

LDT コリン作動性ニューロンがコカイン CPP の獲得および発現に関与するという我々の結果は、このニューロンにおいてもコカイン投与により可塑的变化が誘導される可能性を示唆している。そこで次に、この仮説を *ex vivo* スライス標本を用いて電気生理学的に検証した。

まず、3 つの異なるコカイン投与条件下で刺激誘発性 EPSC を記録し、プレシナプス可塑性の指標となる paired pulse ratio (PPR : この値が小さいほどプレシナプスからの伝達物質放出確率が高いことを示す) を調べた。

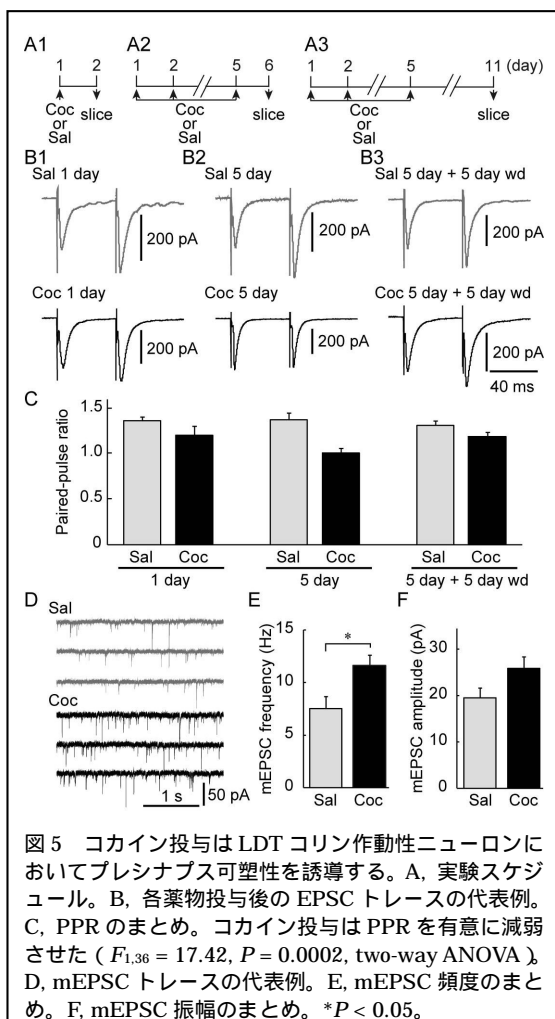


図5 コカイン投与はLDTコリン作動性ニューロンにおいてプレシナプス可塑性を誘導する。A, 実験スケジュール。B, 各薬物投与後のEPSCトレースの代表例。C, PPRのまとめ。コカイン投与はPPRを有意に減弱させた ($F_{1,36} = 17.42, P = 0.0002$, two-way ANOVA)。D, mEPSCトレースの代表例。E, mEPSC頻度のまとめ。F, mEPSC振幅のまとめ。* $P < 0.05$ 。

すなわち、1日あるいは5日間コカイン (15 mg/kg, i.p.) あるいはsalineを投与した翌日、あるいは、5日間コカインあるいはsalineを投与した5日後に記録を行った (図5A)。その結果、コカイン投与群ではsaline投与群と比較して有意にPPRが減弱しており (図5B,C) 特に、5日間のコカイン投与の翌日に最も顕著なPPRの変化が観察された。さらに、PPRとともに伝達物質放出確率の指標となる miniature EPSC (mEPSC : 活動電位を抑制する TTX 存在下で自発的に遊離されるグルタミン酸によって誘発される EPSC) の頻度を saline およびコカイン 5 日間投与群において比較したところ、コカイン投与群の mEPSC 頻度は saline 投与群よりも有意に高く、グルタミン酸の放出確率が上昇していることが分かった (図 5D,E)。mEPSC の振幅もコカイン 5 日間投与群において saline 投与群よりも大きい傾向を示したが (図 5F) 予備的検討の結果、これは LDT コリン作動性ニューロンの膜抵抗の増大に起因するものであることが分かった。以上の結果から、コカイン慢性投与により LDT コリン作動性ニューロンのグルタミン酸作動性神経伝達においてプレシナプス性の可塑的变化が誘導されることが明らかとなった。

(5) プレシナプス可塑性における NMDA 受容体と一酸化窒素の関与

次に、LDT コリン作動性ニューロンでのプレシナプス可塑性の誘導メカニズムを検討した。可塑性誘導に対する NMDA 受容体の関与を調べるために、5 日間のコカイン投与の直前に NMDA 受容体アンタゴニストの MK-801 (0.5-1 mg/kg, i.p.) あるいは saline を投与した (図 6A)。MK-801 前処置を行ったニューロンの PPR は saline 前処置の PPR よりも有意に大きく (図 6B,C)。さらに、mEPSC の頻度は MK-801 前処置群では saline 前処置群よりも有意に低かった (図 6D,E)。したがって、NMDA 受容体の遮断はコカインによる LDT コリン作動性ニューロンでのシナプス可塑性を抑制することが分かった。

LDT コリン作動性ニューロンは NMDA 受容体刺激による細胞内への Ca^{2+} 流入により活性化される NOS を有していることから、次に、可塑性誘導に対する NO の関与について検討した。NOS 阻害剤である L-NAME (50 mg/kg, i.p.) あるいは saline をコカイン投与の直前に 5 日間全身投与したところ (図 6A)、L-NAME 前処置群の PPR は saline 前処置群より有意に大きく、mEPSC の頻度は有意に低かった (図 6B-E)。したがって、NOS 阻害剤投与はプレシナプス可塑性を抑制することが分かった。また、コカインによる PPR の減弱と mEPSC の頻度増加において、MK-801 と L-NAME の同時投与群と MK-801 あるいは L-NAME のそれぞれの単独投与群とで作用に違いが認められなかったことから (図 6C,E) MK-801 が L-NAME の効果を排除したこと、すなわち、NO の産生が NMDA 受容体刺激の下流であることが示唆

された。以上の結果から、NMDA 受容体の活性化とそれに続く NO 産生が LDT コリン作動性ニューロンでのコカインによる可塑性誘導に關与することが示唆された。

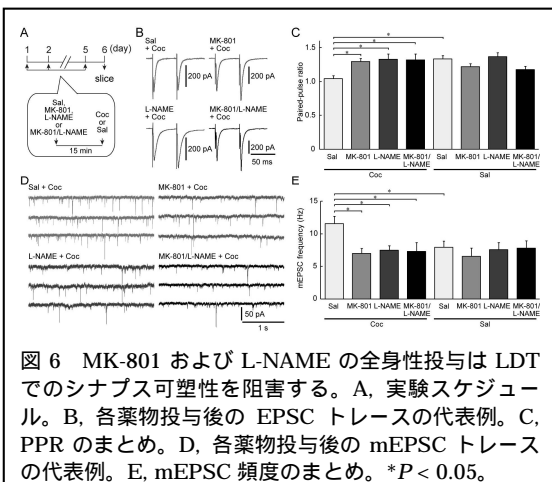


図 6 MK-801 および L-NAME の全身性投与は LDT でのシナプス可塑性を阻害する。A, 実験スケジュール。B, 各薬物投与後の EPSC トレースの代表例。C, PPR のまとめ。D, 各薬物投与後の mEPSC トレースの代表例。E, mEPSC 頻度のまとめ。* $P < 0.05$ 。

(6)LDT シナプス可塑性への mPFC 活動の寄与
解剖学的研究から、mPFC は LDT コリン作動性およびグルタミン酸作動性ニューロンへと投射しており、それらは次に NAc および mPFC 投射型 VTA DA ニューロンに直接シナプス結合している。この LDT - VTA 投射は DA ニューロンのバースト発火とそれに続く NAc での DA 遊離に重要であることから、LDT コリン作動性ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンと同様に、mPFC から NAc 投射型 DA ニューロンへ興奮性情報伝達を中継するという重要な役割を担うと考えられる。また、mPFC は LDT へのグルタミン酸投射の主要な起始核の一つであり、さらに、mPFC ニューロンもコカイン慢性投与後に膜特性の可塑的变化を示し、結果的に興奮性が增大するとの報告がある。これらの知見は、LDT でのシナプス可塑性誘導に mPFC 神経活動が關与している可能性を示唆している。この仮説を検証するために、それぞれ GABA_B 受容体および GABA_A 受容体アゴニストのバクロフェン (0.3 nmol/side) とムシモール (0.03 nmol/side) の混合液 (B-M mix) あるいは vehicle を 5 日間、コカインあるいは saline 投与の直前に mPFC 内へ局所投与した (図 7A, B)。その結果、mPFC への B-M mix の投与がコカイン誘導

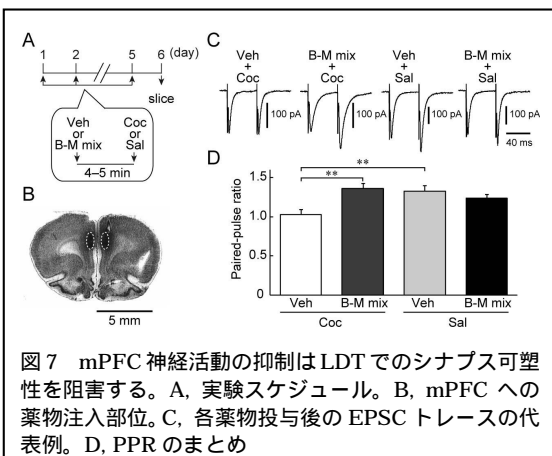


図 7 mPFC 神経活動の抑制は LDT でのシナプス可塑性を阻害する。A, 実験スケジュール。B, mPFC への薬物注入部位。C, 各薬物投与後の EPSC トレースの代表例。D, PPR のまとめ

性の PPR 減弱を回復させることが分かった (図 7C, D)。mPFC への vehicle 投与がコカイン誘導性の PPR 減弱に影響を与えないこと、また、B-M mix 自体が PPR に影響を与えないことも確認した (図 7C, D)。これらの結果から、mPFC の活動が LDT コリン作動性ニューロンにおけるプレシナプス可塑性の誘導に必要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kamii H, Kurosawa R, Taoka N, Shinohara F, Minami M, Kaneda K, Intrinsic membrane plasticity via increased persistent sodium conductance of cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus contributes to cocaine-induced addictive behavior. *European Journal of Neuroscience*, in press.

Shinohara F, Kihara Y, Ide S, Minami M, Kaneda K, Critical role of cholinergic transmission from the laterodorsal tegmental nucleus to the ventral tegmental area in cocaine-induced place preference. *Neuropharmacology*, 79: 573-579, 2014.

Kurosawa R, Taoka N, Shinohara F, Minami M, Kaneda K, Cocaine exposure enhances excitatory synaptic drive to cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 38(7): 3027-3035, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

金田勝幸. 薬物依存形成に関わる神経回路とその変化. シンポジウム「脳疾患治療戦略の確立を目指した中枢神経回路網の理解への挑戦」第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18-20 日、名古屋国際会議場 (愛知・名古屋)

金田勝幸. コカイン依存形成における脳幹コリン作動性ニューロンの関与とその可塑的变化. シンポジウム「依存性薬物により誘発される脳機能障害のメカニズム」平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、岡山コンベンションセンター (岡山・岡山)

金田勝幸, 黒澤諒, 篠原史弥. 薬物依存形成にかかわる脳幹神経回路とその可塑的变化. シンポジウム「基底核とパーキンソン病」生理研研究会: 神経オシレーション: 共振とディスリズム, 2012 年 7 月 12-13 日、生理学研究所 (愛知・岡崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 勝幸 (KANEDA, Katsuyuki)

北海道大学 大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 30421366