

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16373

研究課題名(和文)強迫的行動促進の神経基盤

研究課題名(英文)Neural substrate for compulsive behavioral augmentation

研究代表者

西川 宏美(NISHIKAWA, HIROMI)

金沢大学・医学系・研究員

研究者番号：70534155

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):習慣化が困難として知られる固定インターバル条件において、「個体がインターバルをモニターし続けるために必要な持続性注意が習慣化を阻害する」と仮説を立て、レバー押しのタイミングを教示するシグナルを付加してオペラント訓練を施行したところ、動物の行動は予想通り習慣化した。また、「目標指向性行動から習慣化への移行を妨げるのは訓練の連日反復であり、逆に移行を促進するのは一定期間の訓練休止である」と仮説を立て、通常習慣化しない7日間のオペラント訓練の後に行動が目標指向性であることを確認の後、2週間の訓練休止期間を挟んで習慣化の有無を再検討したところ、行動が習慣化していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

習慣とは何か、と言う議論は古くから心理学あるいは神経科学で存在し、複数の有力なモデルが提唱されてきた。それにも関わらず、モデル間には無視できない齟齬が存在し、また神経回路や電気生理学的な新たな知見もモデル間の矛盾に十分な説明を与えることができていなかった。本研究の成果はこれらの問題の解決に新たに道筋を示すことが期待される。また、目標指向性行動と習慣のアンバランスは、依存症、強迫性障害、発達障害、認知症など様々な精神神経疾患の病態生理に関わることから、本研究の成果はこれらの疾患の病態機序の解明と治療法の開発に多大な貢献をすると期待される。

研究成果の概要(英文):To verify the hypothesis that sustained attention may interfere with habit expression during an operant learning under fixed internal schedule, we first provided buzzer sounds that instruct the timing of lever press to rats. As a result, when buzzer sounds were contingent to the timing of lever press, rats' behavior became habitual. We next tried to verify another hypothesis that while repeated daily training prevent the transfer from goal-directed to habitual, a certain period of training abstinence promotes habit expression. To this aim, we trained rats for 7 days and confirmed that their behaviors were still goal-directed at this point, Then, followed by 2 weeks of abstinence and 3 days of re-training, the second outcome devaluation test revealed that their behaviors became habitual, as we expected.

研究分野：神経薬理学

キーワード：習慣 目標指向性行動 強迫性 線条体 扁桃体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

強迫的行動とは、繰り返し現れる観念や心の中の決まりに駆り立てられたり、あるいはそれから逃れる目的で反復あるいは常同的に繰り返される行動、もしくは本人が不適切と理解していても繰り返ししてしまう行動を意味する。一度強迫化した行動は長期記憶のように安定で変更や修正が困難であるだけでなく、常にそこにばかり注意が集中してしまう（=過度の没頭）。そのため強迫的行動が一旦始まると、その間は他のことが手につかず、そればかりに長時間を費やす。代表例が強迫性障害（Obsessive Compulsive Disorder、以下、OCD）で、強迫観念や不安を解消あるいは回避するために何回も確認したり、洗浄したりを繰り返す。重症化すると、自分の行動の理不尽さを理解しつつも行動反復はさらにエスカレートし、周囲の人間に確認を強要したりする。OCD 以外では、物質使用障害（依存症）や過食を伴う摂食障害が挙げられる。依存性薬物の摂取の場合、最初はレクリエーションとして始まり、摂取者は自分の意志で摂取を開始することも止めることもできる。ところが乱用が進むと依存性薬物の摂取を自分の意志でコントロールできなくなり、社会的、あるいは身体的に不適切と理解していても乱用が繰り返されるようになる（戸田、2016）。強迫的行動の重要な特徴は、それが嗜好性の追及であれ、嫌悪条件や不安回避の目的であれ、癖のように単純に繰り返されるのではなく、制御困難なほど非常に強く動機づけされ、次第にエスカレートする点である。強迫的行動を促進する因子として、上記の疾患に共通するのは増悪因子としてのストレスの存在と、前頭葉機能の低下（hypofrontality）あるいは機能異常がある（Kalivas and Volkow, 2005; Figeo *et al*, 2016）。OCD は基本的に不安回避のための負の強化学習の結果であり、ストレスは明らかな促進因子である。依存症も、快楽追求の時点では強迫性を伴わない正の強化学習だが、そこに不安やストレスなどのネガティブな感情（とその回避目的）が加わることで強迫性が獲得されることは広く知られる（Koob, 2013; Koob *et al*, 2014）。しかし、hypofrontality とストレスがどのように関係して行動の過剰なエスカレーションを誘導するのか、詳細な病態生理は解明されていない。

2. 研究の目的

不安に関係する脳部位の1つに扁桃体がある。扁桃体は、不安・ストレスなどの嫌悪性情報だけでなく嗜好性情報の処理にも関わる他、パブロフ条件付けの責任核としても知られ（Balleine and Killcross, 2006; Femando *et al*, 2016）、中心核（CeA）と基底外側核（BLA）の2つの神経核からなる。CeA が行動のエスカレーションに関与するとの報告は、以前から特に依存症の基礎研究モデルで多かった（Zorrilla and Koob, 2013）。また、依存性薬物とは関係なく、パブロフ条件下でのCeA の光刺激でも行動促進が起こると報告された（Robinson *et al*, 2014）。BLA は前頭眼窩野（OFC）と協調して、コストや行動と結果の随伴性に関する情報の処理に関与している

（Balleine *et al*, 2003; Izuquierdo *et al*, 2013）。さらに、BLA は扁桃体内の介在神経群

（intercalated neurons; ITC）を介してCeA を抑制する（Duvarci and Pare, 2014）。従って、CeA はBLA が十分活性化されない場合、すなわち、OFC からの情報が乏しいhypofrontality の状態で特に活性化されやすい、と予想される。研究代表者らは、ラットにレバーを押すことで餌を獲得する行動を学習させる道具訓練を行った。この時、レバー押しのやり方に関わらずランダムなタイミングで一定の割合の報酬が得られる条件（例、平均1分間に1つ餌が与えられる；random interval スケジュール法；以下、RI）で訓練を行うと、動物はレバー押し回数をエスカレートさせてもそれ以上餌はもらえず、また、餌をもらえるタイミングを予測できない。この条件で訓練を行ったところ、RI 条件下では獲得可能な餌数に上限があるにも関わらず、レバー押しが非合理的なエスカレートが続けた。また、同じ訓練期間中の各段階で、それまで訓練に使用していない未知のレバーを同時に提示したところ、動物は新規の対象に対して強い好奇心を示し、新規レバーもそれなりに押すはずだが、訓練が進めば進むほど動物は新規レバーに見向きもせず、馴致したレバー押しに没頭するようになった。本来動物は、同じ道具訓練を反復するに従い、行動はより無駄のない形に合理化かつ自動化され、他の対象（行動）に注意を割く余裕が出るはずだが、反対に依存症や強迫性障害に類似した極度に没頭した強迫的行動を示した。その原因は予測が困難な（=フィードバック情報の乏しい）RI に起因すると考えられる。そこでCeA の関与を疑い、訓練6日目付近でCeA（対照実験としてBLA）のc-Fos 発現細胞を選択的に破壊したところ、CeA 破壊群では過剰な行動促進を示す餌あたりのレバー押し回数比が有意に抑制された。そこで本研究提案では、「多くの精神疾患で見られるhypofrontality のような状況下で扁桃体への入力低下した場合や、予測困難性が高まると不安やストレスが増大し、その結果CeA の活性化が引き起こされ、情報不足を代償するために過剰な行動促進や過度の集中が誘導される」と仮説を立て、動物実験でその仮説の立証し、過剰な行動促進や過度の集中に関与する神経基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

平成29年度；報酬タイミングに関する確実性が異なる複数の条件下での道具訓練比較による意欲制御回路の同定；上記のように報酬のタイミングが不明なRI条件下では報酬を得るために、

いつ行動が必要なのか予測できない。このような条件下では情報収集のために過剰な行動促進が起きやすいと予想される。逆に言えば、予測の容易な条件下ではこのような行動促進は観察されないはずである。そこで、報酬タイミングの予測が容易な **fixed interval** スケジュール法（例；1分間隔でレバーを押すと、餌がもらえる；以下、**FI**）条件下で訓練を反復し、各種指標を **RI** と比較してその違いを分子・行動レベルで比較検証する。具体的には、報酬の遅延に関する情報の処理や行動と結果のタイミング予測に関与し扁桃体に強い投射を送る前頭眼窩野（**OFC**）と扁桃体に着目し、**RI** 条件下での訓練と同じ訓練時期における *c-Fos* や *Arc* などの神経活動マーカー（学習記憶にも必須である）の発現パターンの推移及び発現する神経細胞のタイプについて詳細に比較検討する（**RI** 条件での同検討は、**OFC** を除いて、既にはほぼ終了している）。行動については、①レバー押し回数、②獲得餌数、③連続性（=連続する2回のレバー押しの間隔の長さを指標とする）、④過剰な行動促進を示す餌あたりのレバー押し回数比、⑤習慣化を評価する脱価値テスト（*Iguchi et al, 2016*）、⑥新規レバー同時提示時の既知レバーへの没頭性、について同様の検討を行う。

平成30年度；過剰な行動促進に関与する扁桃体内神経基盤の解明；上述の予備検討のように、情報の不確実性が高い条件下では **CeA** の活性化が起こる可能性が高い。一方、情報の確実性が高い時には **BLA** の活性化が予想される。そこで、**a.** ①予測が困難な **RI** 条件下で活性化の予想される両側の **CeA** に道具訓練施行中の幾つかの時点で *c-Fos* 発現が誘導される細胞を破壊することで過度の集中を伴った習慣化が抑制されるか検討する。②反対に、予測が容易な **FI** 条件下で活性化の予想される両側の **BLA** の *c-Fos* 発現が誘導される細胞を破壊することで、過剰な行動促進と過度の集中を伴った習慣化が促進されるか検討する。実験には予備検討と同様に *cfos-lacZ* トランスジェニックラットにカルシウムチャネル阻害剤 *daunorubicin* のプロドラッグ **Daun02** の局所注入を組み合わせたシステムを用いる。同トランスジェニックラットに **Daun02** を局所注入すると、*c-fos* プロモーター下で転写された *lacZ* の活性で **Daun02** が *daunorubicin* に変換され、*c-Fos* 発現細胞を選択的に破壊することができる（*Koya et al, 2009*）。**b.** 予測の困難な条件下では、不安やストレスを伴いやすく、それが行動促進に関わっている可能性がある。そこで、①**RI** 条件下で道具訓練を行い、いくつかの訓練時期を選んで不安行動を誘導する **corticotrophin-releasing factor (CRF)** の扁桃体内における濃度を **ELISA** 法を用いて測定する。②訓練期間中に扁桃体に投射を送る **OFC** にて *c-Fos* 発現が高い時期に、**Daun02** の局所注入で両側 **OFC** 内の *c-Fos* 発現神経細胞を破壊し、その後扁桃体内の **CRF** 量が増加するか検討し、同時に行動への影響も検討する。③**CRF** の阻害剤 **D-Phe-CRF (12-41)** を訓練中に浸透圧ポンプを用いて **CeA** に持続注入し、過剰な行動増強が阻害されるか検証する。

c. **BLA** は **OFC** と協調して、コストやタイミング予測に関する情報の処理に関与している（*Balleine et al, 2003; Izuquierdo et al, 2013*）。さらに、**BLA** は扁桃体内の介在神経群（**intercalated neurons; ITC**）を介して **CeA** を抑制する（*Duvarci and Pare, 2014*）。そこで、「**OFC** から **BLA** への入力（情報）が十分な状況下では、**BLA** は **ITC** を介して **CeA** を抑制することで、過剰な行動促進を抑えている。**OFC** から **BLA** への情報が不十分な状況下（=**hypofrontality**）では、**CeA** は **BLA** による抑制的支配から解放されて活性化し、過剰な行動促進と過度な集中を表出する」と仮説を立て、これを実験的に検証する。具体的には、①片側の **OFC** と反対側の **BLA** に **Daun02** を局所注入し、*c-Fos* 発現細胞を破壊することで、両側の **OFC-BLA** 連絡路を破壊し（*Belin and Everitt, 2008; 図7*）、**hypofrontality** を模倣した上で **FI** 条件でも行動促進と過度の集中が起こるか検証する。②**FI** 条件下で道具訓練を行ないながら **BLA** から **CeA** への抑制性回路を選択的に阻害し、過剰な行動促進と過度の集中を伴った習慣化が促進されるか検討する。具体的には、**ITC** に **Cre** を発現する逆行性レンチウイルスを感染させ、ターゲットある **BLA** に2つの **loxP** 配列で挟んだ *c-fos-LacZ* 配列を組み込んだアデノ随伴ウイルス（**AAV**）を二重感染させることで、**BLA** への **Daun02** 局所注入で **BLA-ITC** 経路を選択的にノックアウトするシステムを開発し、**BLA** が **ITC** を介して **CeA** による過剰な行動促進を抑制しているか各行動指標を用いて検証する。**BLA** から **CeA** への抑制解除の成否は、**BLA** の不活化操作時における **CeA** での *c-Fos* 発現の増強で判断する。

4. 研究成果

①予備検討にて強迫化の前段階である習慣化の起きやすい**RI**スケジュールでのオペランド学習訓練反復の結果、最初に**Arc**、続いて**c-Fos**、その後再び**Arc**が線条体の中型有棘細胞に発現誘導されることを確認していたが、さらに、これらの神経マーカー遺伝子の発現交代が、同一のドパミンD1受容体陽性細胞で起きることを確認した（図1）。

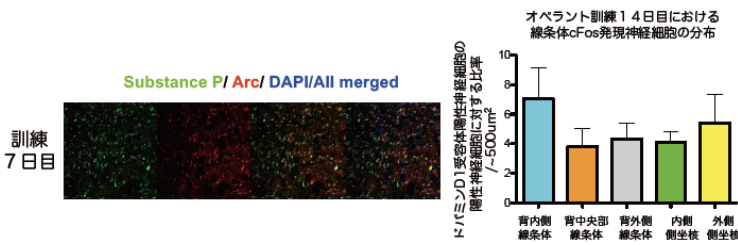


図1 Arc及びc-Fos発現の線条体ドパミンD1陽性神経細胞に対する選択的誘導性

一方、ArcはRIスケジュールでは発現が抑制される時期にも誘導が続き、しかも目標指向性行動の獲得に重要とされる背内側線条体では、Arcと同じ細胞に共発現が確認された(図2まとめ)。

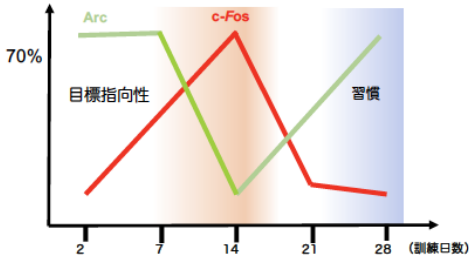


図2 オペラント訓練期間中における同一ドパミンD1神経細胞でのArcとFosの交代性発現誘導

この結果は、Arcとc-Fosの発現が独立して制御されていることを示唆すると同時に、Arcはc-Fosと共発現すると、習慣化への移行を阻害する因子として機能する可能性が示唆された。

FIスケジュールでは、動物は自分で1分間という時間間隔を測定するために注意を持続する必要があります。そこで、この時間的注意要求性が習慣化を阻害していると仮説を立て、2週間のFI条件下での訓練後に動物を①FI条件、②FI条件に、ランダムにブザー音提示を追加したもの、さらに③FI条件下にレバー押しタイミングの

指示を追加することで持続性注意を必要としないものの、計3つの群にランダムに振り分けてさらに2週間オペラント訓練を追加し、習慣化の有無を脱価値化テストで比較したところ、③の群では動物の行動は習慣化が認められたのに対し、①②群では行動は目標指向性のままであった(図3)。以上の結果より、目標指向性行動から習慣への移行に重要なのは、行動と結果の時間的随伴性ではなく、時間間隔をモニターするための注意持続が習慣化を妨げる

図3 計時のための持続的注意から解放されるとFI条件でも習慣化する

る因子として重要であること強く示唆された。本行動実験の結果は、日本神経科学会のシンポジウム及びISBRA2018にて発表し、現在投稿中である。

さらに上記①～③の条件で、線条体および線条体に注射を送り、目標指向性行動や習慣化の制御に関わると予想されるいくつかの他の脳部位(OFCを含む)に関してArc、c-Fosの発現パターンの比較を行った。免疫組織化学の結果は現在解析中である。OFCの神経活動性を制御してのウイルス実験を含めた行動実験は、実験を担当していた博士課程大学院生の早期卒業もあり、行えなかった。

一方、cfos-LacZラットにオペラント訓練を4週間施行し、行動が習慣化したのを確認後、BLAのc-Fos発現細胞をDaun02の局所注入にて選択的に破壊したところ、一旦習慣化したはずの行動がその2週後に再度目標指向性行動に戻ることを確認した(図4)。

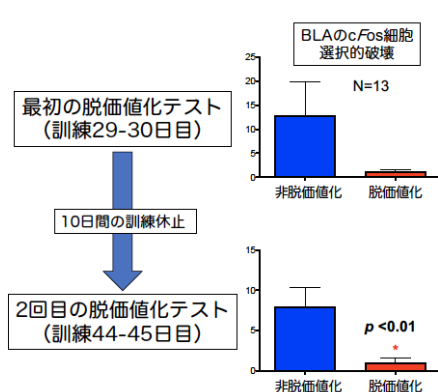


図4 BLAでのcFos陽性神経細胞の選択的破壊が習慣記憶に与える影響

呼び出せるかを検討した。同時に、同じ薬理的処置がBLAにおいて、どのような種類の神経細

現象が後部線条体の破壊で起きることが確認されている。サルの後部線条体に相当するラット尾側背内側線条体は、直接BLAに注射する。そこで、「行動は一旦習慣化しても、訓練終了の時点ではまだ可逆的であり、長期記憶化

(consolidation) されるためには、訓練終了後にしばらくの期間が必要である。この際、尾側背内側線条体からBLAへの注射が習慣化記憶の貯蔵あるいは呼び出しに重要である」と仮説を立て、4週間のオペラント訓練終了後にラットの行動が習慣化していることを確認の後、BLAにタンパク質合成阻害剤を局所注入することで記憶の貯蔵阻害し、その2週後に習慣化した記憶が

胞におけるc-Fosの発現誘導を阻害するかについて免疫組織学的な検討を行った。上記実験の結果は現在解析中である。

また、「目標指向性行動から習慣化への移行を妨げるのは訓練の連日反復であり、逆に移行を促進するのは一定期間の訓練休止である」と仮説を立て、通常習慣化しない7日間のオペラント訓練の後に行動が目標指向性であることを確認の後、2週間の訓練休止期間を挟んで習慣化の有無を再検討したところ、行動が習慣化していることを確認した(図5; 投稿準備中)。さらに3週間の訓練反復を行ったところ、習慣化は維持されたがその間にレバー押し回数はさらに増加していた(図6; 投稿準備中)。以上の結果より、習慣化とは、反復訓練による運動技能の維持(固定化)を保証するものではなく、一時的あるいは恒久的な行動の自動化を目的としたものであることが示された。

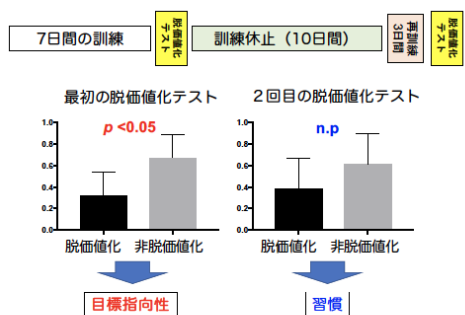


図5 短期訓練後の訓練休止期間は習慣化を促進する

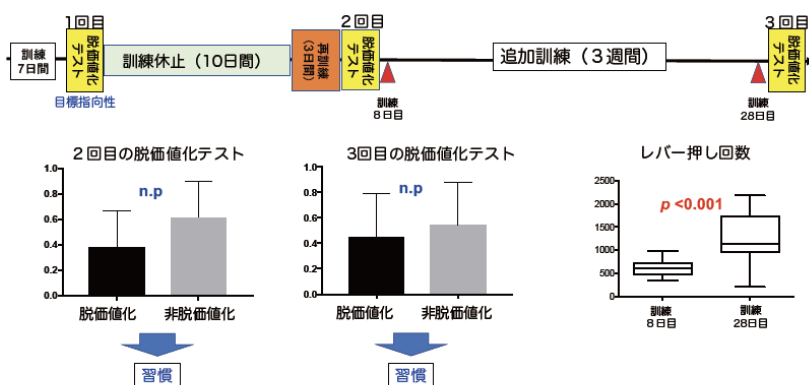


図6 習慣形成後も技能は向上する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. S Toda, Z Lin, H Nishikawa, Y Iguchi, A Iwanami, Y Minabe
HOW IS A HABIT DEVELOPED OR UNDEVELOPED?: IMPLICATIONS FOR A CRITICAL ROLE OF ATTENTION DURING A GOAL-DIRECTED PROCESS OF OPERANT LEARNING IN RATS.
ISBRA2018 京都 (招待講演), 2018
2. Lin Z, Nishikawa H, Iguchi Y, Iwanami, A, Minabe Y, Toda S
Continuous attentional demand may prevent habit formation in rats.
第 41 回日本神経科学学会大会, 2018

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：戸田 重誠

ローマ字氏名：TODA, Shigenobu

研究協力者氏名：林 子喬

ローマ字氏名：Lin, Ziqiao

※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。