

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791316

研究課題名（和文）側坐核機能と意思決定の障害

—ドパミントーン操作動物を用いた実験的検討—

研究課題名（英文）The role of the nucleus accumbens in deficit of decision making: a rodent study with the manipulations on dopamine tone

研究代表者 井口 善生 (IGUCHI YOSHIO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20452097

研究成果の概要（和文）：側坐核のドパミントーンを遮断すると考えられる高用量のドパミン部分作動薬は、慢性ストレスや慢性的な抗うつ薬によって亢進した興奮性シナプス伝達を正常化する可能性が示唆された。また、側坐核のドパミントーン依存的な「意欲」やグルタミン酸トーン依存的な「意思決定の柔軟性」の個体差を反映する新たな行動指標の確立に成功した。これらは、意思決定及びその異常において側坐核が果たしている未知の役割とその分子機序を理解する上で重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Our results suggested that a high-dose administration of a dopamine-receptor partial agonist, aripiprazole, which is thought to block dopamine tone in the nucleus accumbens, would be able to normalize the upregulated excitatory synaptic transmission induced by chronic unpredictable stress or chronic administration of an antidepressant, fluoxetine. In addition, we established a new behavioral measure to reflect motivation, which would depend on dopamine tone in the nucleus accumbens, and flexible decision making, which would depend on glutamate tone. These results provided clues to understand unknown accumbal role and molecular mechanisms in decision making and its deficits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：意思決定、習慣形成、モチベーション、側坐核、ドパミントーン、興奮性シナプス伝達、個体差、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

中脳の腹側被蓋野(ventral tegmental area: VTA)から線条体腹側部(側坐核: NAc)に投射する中脳辺縁ドパミン系は、依存症や大うつ病に深く関与する。依存性薬物の作用点の多くがこの投射経路上に存在し、また NAc は大うつ病の深部脳刺激治療法の標的部位の1つである。依存症に陥ると、自分の薬物欲求行動を制御することが困難になる。大うつ病においては、将来的な展望を持たず、目先のこ

とに拘る短絡的思考が顕著になる。つまり、NAc が関与する精神疾患では共通して、適切な行動の選択と実行(=意思決定)に障害を来たしやすい。

一般に、ヒトを含む動物の意思決定においては、目標志向(goal-directed)モードと習慣(habit)モードが使い分けられている。ある意思決定は、はじめは線条体背内側部に依存する目標志向モードで開始され、同じ状況で何度も好ましい結果が得られると、線条体背外側部依存的な習慣モードへと漸進的に移行

する(=習慣形成, Yin & Knowlton, 2006, *Nat Rev Neurosci*)。依存症と大うつ病に共通する意思決定の障害の背後に、しばしば習慣形成における異常が存在することが報告されている(Dias-Ferreira et al., 2009, *Science*; Nelson & Killcross, 2006, *J Neurosci*)。しかし、病態的、治療的に線条体背側部よりも重要と考えられる NAc が、習慣形成(及びその異常)に関連しているのかどうかは不明である。また、NAc が習慣形成の異常に関与しているのであれば、どのような分子メカニズムが働いているのかを検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

NAc を含む線条体の機能は、ドパミン神経細胞の自発的発火に伴い神経終末から放出されるドパミンの濃度(=ドパミントーン)により、大きく影響される。精神刺激薬であるコカインや覚せい剤はドパミントーンを急激に上昇させることで精神機能に影響する(Kuhar et al., 1991, *Trends Neurosci*)。NAc のドパミントーンの上昇はまた、進行したパーキンソン病の治療の際にしばしば見られるように衝動性を高める(Dagher & Robbins, 2009, *Neuron*)。NAc と線条体背側部の間には、直接的な繊維連絡は確認されていないものの、VTA や黒質緻密部のドパミン起始核が仲介する螺旋状の投射経路が存在する(Haber et al., 2000, *J Neurosci*)。この経路を遮断すると、依存性薬物に対する欲求行動の習慣化が妨げられる(Belin & Everitt, 2008, *Neuron*)。

これらを踏まえて本研究は、NAc 内のドパミントーンが線条体背内側部(目標志向モードに関与)と同背外側部(習慣モードに関与)の機能的バランスを制御し、意思決定の2つのモードの切り替えスイッチとして働く、という仮説を提案する。この仮説を検証するためには、動物の NAc 特異的にドパミントーンを *in vivo* 操作し、意思決定のモード切り替えの様相をモニタする必要がある。そのような将来の研究を実現するために、2つの予備的な研究を行った。

(1) 大うつ病モデルラットに対するドパミン部分作動薬の慢性投与が NAc のシナプス機能に及ぼす効果：慢性予測不可能ストレス(Chronic unpredictable stress: CUS)を負荷したラット(=大うつ病のモデル動物)に対し、ドパミン部分作動薬である Aripiprazol を大用量で慢性投与し、ドパミントーンの操作を試みた。このような動物の NAc における興奮性シナプス関連タンパク質の発現を、vehicle や抗うつ薬(セロトニン選択性再取り込み阻害薬: SSRI)を投与した群と比較しながら解析した。

(2) ドパミントーン依存性の NAc 機能の個体差を反映する新たな行動指標の確立：最近、ドパミン依存性の NAc 機能に大きな個体差が存在することが報告された(Flagel et al., 2011, *Nature*)。これは、遺伝的多様性を保持する *outbred* の実験動物に対して一律のドパミントーン操作を加えることの妥当性に疑問を呈するものである。そこで、NAc のドパミントーンに依存すると考えられる「意欲」及び「柔軟な意思決定」を反映する新たな行動指標を確立し、これを用いることで、将来的にドパミントーンの上昇あるいは下降操作を施すべき個体群の特定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 大うつ病モデルラットに対するドパミン部分作動薬の慢性投与が NAc のシナプス機能に及ぼす効果：金沢大学 IACUC に実験計画を提出、その承認の下で8週齢の Sprague-Dawley 系ラットの雄を用いて2つの実験を行った。

第1実験(図1B)ではまず、全体の半数のラット( $n=9$ )に21日間に渡って CUS を与えた。CUS は、強制水泳、身体拘束、社会的敗北から1日1つランダムに選び、動物に負荷した(図1A)。残りの半数のラット( $n=8$ )には対照操作としてハンドリングを与えた。その後の14日間では、いずれの群にもストレス負荷を与えなかった。このストレスなし期間の翌日に、動物の NAc を取り出し、細胞下分画法を用いて後シナプス膜分画を精製した。その後、ウェスタン法を用いて同分画における PSD-95 のタンパク質発現を定量し、群間比較を行った。

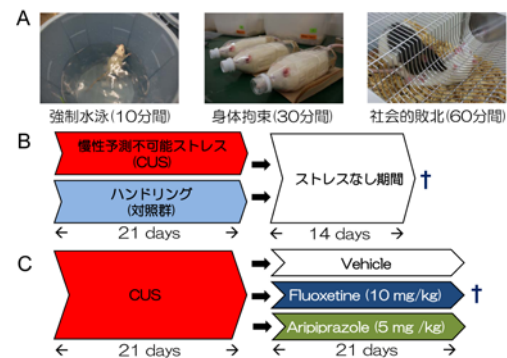


図1. A) 慢性予測不可能ストレスの3種類のストレスラー。 B) 第1実験のスケジュール。 C) 第2実験のスケジュール。 †は側坐核の取り出しとタンパク質の精製。

第2実験(図1C)では、まず全てのラットに CUS を21日間に渡って負荷した。その後の21日間ではラットを3群に分け( $ns=8$ )、それぞれに Aripiprazole (5 mg/kg)、Vehicle (20% demethylformamide [pH 5.2-5.5]), Fluoxetine (10 mg/kg)を腹腔注射した。21日の投薬期間の翌日、動物の側坐核を取り出し、第1実験と同様に後シナプス膜分画を精製、ウェスタ

ン法を用いて PSD-95 のタンパク質発現を群間比較した。

(2) ドパミントーン依存性の NAc 機能の個体差を反映する新たな行動指標の確立：金沢大学 IACUC に実験計画を提出，その承認の下で 8 週齢の雄の Sprague-Dawley 系ラット ( $n = 84$ ) を用いて実験を行った。ラットに摂水制限を施し，オペラント・チャンバーにおいて 0.2% saccharin 溶液 (50  $\mu$ L) を報酬としたレバー押しを訓練した。固定比率 (Fixed ratio) スケジュールでラットが安定的にレバーを押せるようになったことを確認した後，摂水制限を解除し，強化スケジュールを Progressive ratio (PR) に変更した。このスケジュールでは，1 つの報酬を得るために必要なレバー押しの回数 (= 労力) を指数関数的 ( $[5 \times e^{0.2n}] - 5$ ) に増加させた (図 2)。本実験では，毎日 1 セッション (35 分間)，連続 3 日間の PR 訓練を行い，各セッションでラットが示した労力の最大値を記録した。

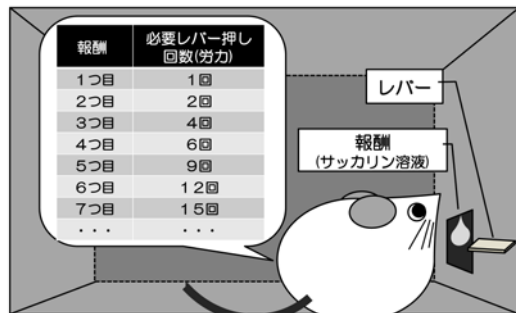


図 2. Progressive ratio スケジュールによる訓練の様式図。  
1 報酬を得るための労力 (レバー押し回数) が，同一セッション内で指数関数的に増加する。

この訓練終了後に，2 日間連続で尾静脈からの採血を行った。この 1 日目では安静時に，2 日目にはフットショック (1 秒間の 40V 電撃を 5 回) の 15 分後に採血した。採取した血液を遠心分離して得た血清のコルチコステロン濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 大うつ病モデルラットに対するドパミン部分作動薬の慢性投与が NAc のシナプス機能に及ぼす効果：ラットに対する 5 mg/kg の Aripiprazole は，ヒトでは統合失調症や双極性感情障害の急性期に用いられる高用量に相当し，ドパミントーンを遮断する方向に作用することが期待された。

実験の結果，CUS 負荷後の NAc では，PSD-95 が後シナプス膜分画で増加していた (図 3A)。PSD-95 は，興奮性シナプスのシグナル伝達に欠かせない NMDA 型グルタミン酸受容体の足場タンパク質である。また，PSD-95 の増加は CUS 負荷後に SSRI である Fluoxetine を慢性投与することで更に増強さ

れることが示された (図 3B)。ただし，この効果には個体差も大きく，顕著に増加する個体と，そうではない個体の混在も確認された。一方，高用量の Aripiprazole は，SSRI 投与のときのように PSD-95 を増加させることはなく，むしろ CUS 負荷による PSD-95 の増加を正常化する方向に作用した (図 3B)。

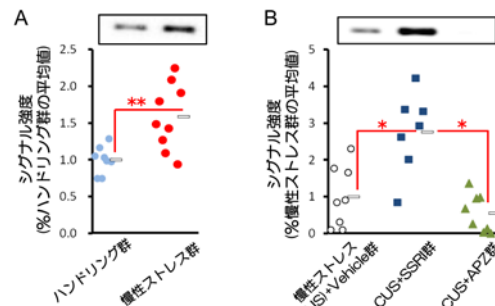


図 3. ウェスタン法による NAc の PSD-95 タンパク質の定量結果。A) 慢性予測不可能ストレス (CUS) は NAc の PSD-95 タンパク質を有意に増加させた (カラーは個体データ，口は群平均値)。B) CUS 後の SSRI 投与は CUS による PSD-95 の増加をさらに増強したが，Aripiprazole (APZ) 投与はそのような増強効果を示さなかった。\* $p < .05$ ，\*\* $p < .01$ 。

以上の結果は，高用量の Aripiprazole の慢性投与が，CUS 負荷や SSRI 慢性投与によって側坐核内で誘導される過剰な興奮性シナプス伝達を正常化する可能性を示唆した。したがって，大うつ病において習慣モードに偏った意思決定の異常の原因として NAc の過剰な興奮性シナプス伝達を想定することが可能であり，これに対して，NAc のドパミントーンを遮断することで意思決定の正常化が期待されることが推測された。

(2) ドパミントーン依存性の NAc 機能の個体差を反映する新たな行動指標の確立：VTA から NAc に投射するドパミンを遮断された動物は，選好する報酬を得るための労力 (Effort) を払うことが困難になる (Salamone et al., 2009, *Frontier Behav Neurosci*) ことから，一定時間の PR セッションでラットが示した労力の最大値は，ドパミントーン依存性の NAc 機能を直接反映すると考えられる。本実験でも，PR 第 1 セッションにおいて，最大労力が高い群 (= 高意欲，H，全体の 17%) と低い群 (L，全体の 83%) を分離することができた (図 4A)。したがって，本実験の H 群と L 群は，NAc 内のドパミントーンの高低を反映していると考えられた。

さらに H 群は，訓練を繰り返したときに一貫して高い最大労力を示し続ける個体 (H-H 群，全体の 26%) と，徐々に最大労力が低下する個体 (H-L 群，全体の 57%) に分けられた (図 4A)。PR 訓練で用いた報酬は，甘味はあるがカロリー価値のない saccharin であること，また，動物は PR 訓練の期間中に摂水制限を受けていなかったことを考慮すると，本実験の

PR 訓練では、労力(cost)に対する便益(benefit)としての報酬価はそれほど高くはない状態にあったと考えられる。したがって、H-L 群は費用便益(cost-benefit)比に応じて報酬価の低い結果を導く行動の遂行を低下させた(=柔軟な意思決定が可能)群である、と推測される。おそらく、H-L 群と H-H 群は、前頭前野から NAc へのグルタミン酸投射系の機能的差異を反映しているのであろう。

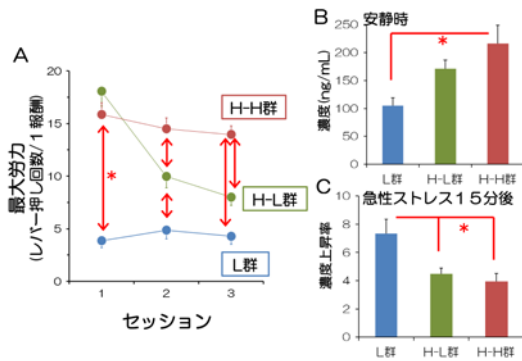


図 4. A) 3 セッションの Progressive ratio スケジュールによる訓練における最大重量に基づく 3 群分離。第 1 セッションにおける最大重量が 6 以下の個体を L 群として分離。残りの個体(H 群)のうち、第 3 セッションの最大重量が第 1 セッションの 75% 以下の個体を H-L 群、残りを H-H 群とした。B) 安静時血清コルチコステロン濃度。C) 急性ストレス(フットショック)の 15 分後の血清コルチコステロン濃度の上昇率(急性ストレス/安静時)。\* $p < .05$ 。

このような群分けの妥当性はバイオメトリカルな指標からも支持され、安静時の血清コルチコステロン濃度は、L 群よりも H-H 群のほうが有意に高かった(図 4B)が、急性ストレス(フットショック)負荷後のコルチコステロン濃度の上昇率は、L 群が H-L 群及び H-H 群よりも有意に高かった(図 4C)。

本研究の成果は、将来的に NAc 特異的にドパミントーン(あるいはさらに将来的にグルタミン酸トーン)を操作する実験系において、これら 3 群を分離した上で実験操作の影響を評価することの重要性、有効性を指摘したのみならず、ストレス関連性の精神疾患の前臨床研究においてもこの 3 群分離法の有用性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 13 件)

- ① Iguchi, Y., Kosugi, S., Minabe, Y., & Toda, S. (2012). Cocaine differently affects Redox status in the rats nucleus accumbens and dorsal striatum. 第 35 回日本神経科学大会, 9 月 18-21 日, 名古屋国際会議場, 愛知。
- ② Toda, S., Kosugi, S., Iguchi, Y., & Minabe, Y. (2012). The relevance of glutamate- and glutathione-homeostasis in decision-making and cocaine addiction. Neural mechanism for reward-based decision making. 第 35 回日本神

経科学大会, 9 月 18-21 日, 名古屋国際会議場, 愛知。

- ③ Iguchi, Y., Kosugi, S., Hirose, T., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Upregulation of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in the nucleus accumbens may be responsible for animal model of major depressive disorder. *Neuroscience 2011 (SfN's 41th annual meeting)*, November 12-16, Washington DC, USA.
- ④ Kosugi, S., Iguchi, Y., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Glutamate-independent effects of N-acetylcysteine in synaptic protein turnover in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration. *Neuroscience 2011 (SfN's 41th annual meeting)*, November 12-16, Washington DC, USA.
- ⑤ Toda, S., Kosugi, S., Iguchi, Y., & Minabe, Y. (2011). Dopamine antagonist induced reduction in PSD proteins in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration. *Neuroscience 2011 (SfN's 41th annual meeting)*, November 12-16, Washington DC, USA.
- ⑥ Iguchi, Y., Kosugi, S., Hirose, T., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Upregulation of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors in the rat nucleus accumbens after repeated unpredictable stress: a possible compensatory mechanism against depression. *The Anxiety and Depression: 21st Neuropsychopharmacology Conference*, November 10-11, Falls Church, VA, DC, USA.
- ⑦ Iguchi, Y., Kosugi, S., Hirose, T., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Upregulation of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors and PSD-95 in the nucleus accumbens may be responsible for animal model of major depressive disorder. 第 32 回内藤コンファランス「こころの機能と疾患の分子機構」, 10 月 18-21 日, 八ヶ岳ロイヤルホテル, 山梨。
- ⑧ Kosugi, S., Iguchi, Y., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Dopamine antagonist induced-PSD protein reductions in the rat nucleus accumbens of after repeated cocaine administration. 第 32 回内藤コンファランス「こころの機能と疾患の分子機構」, 10 月 18-21 日, 八ヶ岳ロイヤルホテル, 山梨。
- ⑨ 井口善生・小杉桜子・廣澤徹・三邊義雄・戸田重誠。側坐核シナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体: 大うつ病動物モデルにおける治療標的性の検討。第 20 回海馬と高次脳機能学会。10 月 8-9 日, 湯涌創作の森, 石川。
- ⑩ Iguchi, Y., Kosugi, S., Hirose, T., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Upregulation of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors and PSD-95 in the nucleus accumbens may be responsible for animal model of major depressive disorder. 第 34 回日本神経科学大会, 9 月 14-17 日, パシ

フィコ横浜, 神奈川.

- ⑪ Kosugi, S., Iguchi, Y., Minabe, Y., & Toda, S. (2011). Glutamate-independent effects of N-acetylcysteine in synaptic protein turnover in the rat nucleus accumbens after repeated cocaine administration. 第34回日本神経科学大会, 9月14-17日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- ⑫ Toda, S., Kosugi, S., Iguchi, Y., & Minabe, Y. (2011). Dopamine antagonist induced-PSD protein reductions in the rat nucleus accumbens of after repeated cocaine administration. 第34回日本神経科学大会, 9月14-17日, パシフィコ横浜, 神奈川.
- ⑬ Toda, S., Kosugi, S., Iguchi, Y., & Minabe, Y. (2011). How do drugs of addiction alter the neuronal functions in the rat nucleus accumbens?: implications of oxidative stress. Gordon Research Conference, "Catecholamine", August 10, Bates College, Maine, USA.

[図書] (計1件)

- ①  井口善生 (in press) インセンティブ, S-R 連合, S-S 連合他 17 語 上田恵介・菊水健史他(編) 行動生物学辞典 東京化学同人 (分担執筆).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井口 善生 (IGUCHI YOSHIO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 20452097

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし