

# 神経細胞選択的活動操作によるコカイン再燃機構の解明

金沢大学医薬保健研究域薬学系 薬理学研究室

金田 勝幸

## 1. 背景と目的

薬物依存症では、一旦薬物摂取を止めても、摂取した環境などが引き金となり、再び摂取する「再燃」が問題となる。しかし、その神経メカニズムには不明の点が多い。この神経メカニズムを解明することは、薬物依存の再燃を抑止する治療法・治療薬の開発において極めて重要である。我々は、これまでにコカイン条件付け場所嗜好性試験と電気生理学的手法をもちいることで、背外側被蓋核(LDT)から腹側被蓋野(VTA)へ投射するコリン作動性神経伝達の可塑性と活性化が、コカイン欲求行動の発現に重要な役割を果たすことを見出してきた(Kurosawa et al., 2013; Shinohara et al., 2014; Kamii et al., 2015)。コリン作動性伝達によって活性化されるVTAからはドパミン作動性神経が側坐核(NAc)に投射しており、ドパミン神経伝達によるNAcニューロンの活性化がコカイン欲求行動の発現に関与することが示唆されるが、その詳細は不明である。これまでの研究では、薬物局所適用や、遺伝子改変マウスを用いることで、すべてのNAcニューロン、あるいは、あるニューロン集団すべての活動を制御する方法がとられており、ヘテロな細胞種から構成されるNAcニューロンのそれぞれの機能、すなわち、コカイン欲求行動の発現に関係する各細胞の機能は不明であった。そこで本研究では、まず、遺伝子改変マウスに細胞種選択的にDREADDを発現させるAAVベクターを組み合わせることで、NAcのGABAニューロン特異的に神経活動を抑制することが、コカイン探索行動に与える影響を検証した。次に、コカインによって活性化される神経細胞のみ活動を抑制するTet-tag DREADDシステム(Zhang et al., 2015)をNAcに導入し、それら細胞のコカイン欲求に対する機能を解明することを目的として研究を行った。

## 2. 方法

### 使用動物

実験には、雄性vGAT-Creマウスおよび雄性C57BL/6Jマウス(6-12週齢)を使用した。

### vGAT-CreマウスNAcへのAAVベクター注入

抱水クロラル(400 mg/kg, i.p.)麻酔下、vGAT-CreマウスのNAcに、Cre依存的にhM4Diを発現するAAV-hSyn1-DIO-hM4Di-mCherryを注入し、NAc GABAニューロン特異的にhM4Diを発現するマウス(vGAT-Cre<sup>NAc</sup>/hM4Diマウス)を作製した。2週間以上の回復期間を経た後、以降の実験に使用した。発現したhM4Diの活性化には、hM4Diリガンドのclozapine-N-oxide(CNO; 1 mg/kg, i.p.)を用いた。

### Tet-tag DREADDシステム

ニューロンの活性化により誘導されるcFosをプロモーターとしてtTAを発現させるAAV-cfos-tTA-pAと、tTAが結合するTREをプロモーターとしてhM4Di-mCherryまたはEYFPを発現させるAAV-pTRE-tight-hM4Di-mCherry、AAV-pTRE-tight-EYFPを用いた。tTAはドキシサイクリン(Dox)存在下では、TREを活性化できないが、Dox非存在下ではTREを活性化できるため、コカイン摂取により活性化したニューロンにhM4Di-mCherryまたはEYFPが発現する(図1)(Zhang et al., 2015)。

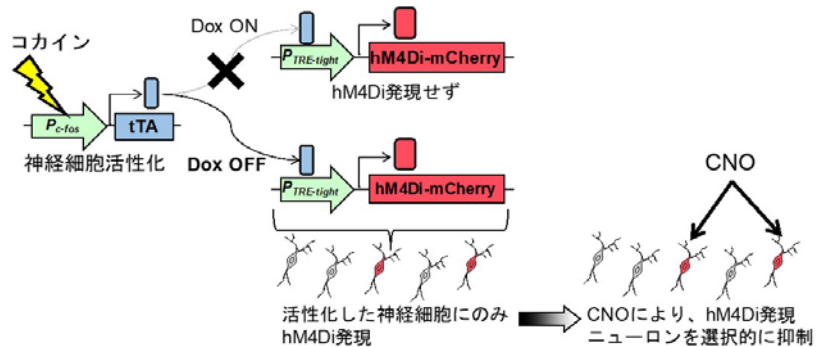


図1 Tet-tag DREADDシステム

C57BL/6JマウスのNAcに、AAV-cfos-tTA-pAとAAV-pTRE-tight-hM4Di-mCherry、AAV-cfos-tTA-pAとAAV-pTRE-tight-EYFP、あるいはAAV-pTRE-tight-EYFPのみを注入した。AAVベクター注入後、hM4Di-mCherryの発現を抑制する目的で、0.02% Dox・サッカリン含有飲用水(Dox ON)、またはサッカリンのみ含有する飲用水(Dox OFF)で2週間飼育した。その後、Doxを含まないサッカリン含有飲料水に切り替えて3日間マウスを飼育し(Dox ON→Dox OFF)、コカイン腹腔内投与(20または30 mg/kg)により、hM4Di-mCherryまたはEYFPの発現を誘導した。Dox OFFから再度Dox ONに戻す場合、Dox(10 mg/kg)を腹腔内投与した後、マウスを0.02% Dox加えたサッカリン含有飲料水で飼育した。

### ホールセル・カレントクランプ法

vGAT-Cre<sup>NAc</sup>/hM4DiマウスからNAcを含む冠状スライス(厚さ250 μm)を作製し、mCherry陽性NAc GABAニューロンからホールセル記録を行った。膜電位が-70 mVになるように電流注入を行い、GABA<sub>A</sub>受容体阻害薬ピクロトキシン(100 μM)およびグルタミン酸受容体阻害薬キヌレン酸(2 mM)存在下で、CNO(10 μM)を処置し、膜電位変化を記録した。

### 条件付け場所嗜好性試験(CPPテスト)

CPPテストには、床面が滑らかで壁面が黒色のコンパートメントと、床面が凸凹で壁面が白色のコンパートメントからなる装置を用いた。まず午前、マウスが両コンパートメント間を自由に移動できる状態で、各コンパートメントにおける滞在時間を15分間計測した(装置への馴化)。4時間以上経過した後、同様の操作を行い(プレテスト)、マウスの滞在時間が短かったコンパートメントをcocaine-paired compartmentとした。条件付けでは、まず午前生理食塩水(10 mL/kg)を腹腔内投与し、その直後から30分間、cocaine-paired compartmentとは反対側のコンパートメントにマウスを閉じ込めた。4時間以上経過した後、コカイン(20 mg/kg)を腹腔内投与し、その直後から30分間、cocaine-paired compartmentに閉じ込め、条件付けを行った。この条件付けを4日間繰り返した。一部の実験では、コカイン 30 mg/kgで条件付けを行ったが、この場合は、コカイン条件付けを午前、生理食塩水条件付けを午後に行った。最終の条件付けの翌日、再びプレテストと同様の試行を行い(ポストテスト)、各コンパートメントにおける滞在時間を15分間計測した。ポストテストのcocaine-paired compartment滞在時間から、プレテストのcocaine-paired compartment滞在時間を引いた値をCPP scoreとし、その値が正の場合、すなわち、コカイン条件付けによりcocaine-paired compartment滞在時間が増加した場合、CPPが惹起されたものとして評価した。

### 組織学的解析

4%パラホルムアルデヒドで固定した脳から、NAcを含む冠状切片(厚さ:30 μm)を作製した。蛍光顕微鏡にて画像を取得し、mCherryまたはEYFP蛍光を指標にAAVベクターの感染部位を同定した。

## 3. 結果

### コカイン欲求行動の発現におけるNAc GABAニューロンの役割

vGAT-Cre<sup>NAc</sup>/hM4Diマウスから作製した脳スライス標本において、hM4Di-mCherry陽性NAc GABAニューロンの膜電位は、CNO処置により過分極応答を示した(図2A)。また、コカイン欲求行動の発現におけるNAc GABAニューロンの役割を明らかにするために、ポストテストの30分前にCNOをvGAT-Cre<sup>NAc</sup>/hM4Diマウスに腹腔内投与したところ、コカイン欲求行動の発現は有意に抑制された(図2B)。これらの結果から、NAc GABAニューロンの活性化は、コカイン欲求行動の発現に重要であることが示唆された。

### Tet-tag DREADDシステムによるhM4Di-mCherryおよびEYFPの発現誘導に関する条件検討

#### ① コカイン 20 mg/kg 条件付けによるhM4Di-mCherry発現誘導

AAV-cfos-tTA-pA と AAV-pTRE-tight-hM4Di-mCherryをNAcに注入したマウスに、4回のコカイン20 mg/kg条件付けを行い、hM4Di-mCherryがNAcで発現するか否かを検討した。プレテスト後にDox OFFにし、プレテストの3日後から4日間条件付けを行った。最終のコカイン条件付け後に再度Dox ONにし、ポストテスト終了後、脱脳し、組織学的検討を行った。その結果、NAcにおいてhM4Di-mCherryの発現は認められなかった。この結果から、コカイン20 mg/kgは、hM4Di-mCherryの発現誘導には不十分であると考えられたため、以降の実験ではコカインを30 mg/kgに増量して検討を行った。

#### ② cfos-tTAによるTRE活性化を介したEYFP発現誘導

cfos-tTAにより、TRE活性化を介した遺伝子発現が誘導されるかを確認するために、AAV-cfos-tTA-pAとAAV-pTRE-tight-EYFP、あるいは、AAV-pTRE-tight-EYFPのみをNAcに注入し、その後実験終了までDox OFFの条件で飼育した。2種のAAVベクターを注入したマウスのNAcでは、AAV-pTRE-tight-EYFPのみを注入したマウスよりも強いEYFPの発現が認められた(図3)。この結果から、cfos-tTAによりTREが活性化され、遺伝子発現が誘導されることが示された。

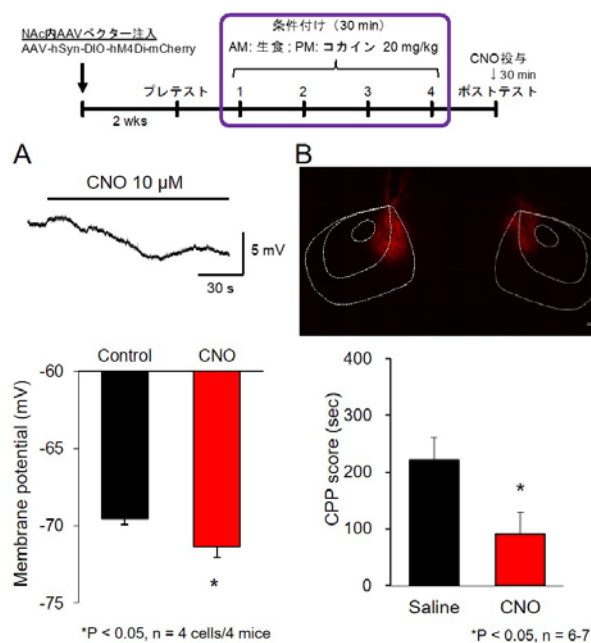


図2 A) CNO処置によりhM4Di-mCherry陽性NAc GABAニューロンの膜電位は過分極した。B) post-testの30分前に、NAcにhM4Diを発現したvGAT-CreマウスにCNOを投与することで、コカイン欲求行動の発現は抑制された。

### ③コカイン30 mg/kg条件付けによるhM4Di-mCherry発現誘導

AAV-cfos-tTA-pA と AAV-pTRE-tight-hM4Di-mCherryをNAcに注入したマウスにコカイン30 mg/kg条件付けを2日間行った。初回のコカイン条件付けの4時間後にDox 10 mg/kgを腹腔内投与することでDox ONにし、ポストテストを行った後、組織学的検討を行った。その結果、NAcにおいてhM4Di-mCherry陽性ニューロンが確認された。

また、naïveマウスを用いて、2日間のコカイン30 mg/kg条件付けによりCPPテストを行ったところ、ポストテストのcocaine-paired compartment滞在

時間が有意に増加し、CPPが惹起されることが確認された。以上の結果から、コカイン摂取の際に活性化したNAcニューロンが、コカイン欲求行動の発現に関与するか否かを検討することが可能な条件が明らかになった。

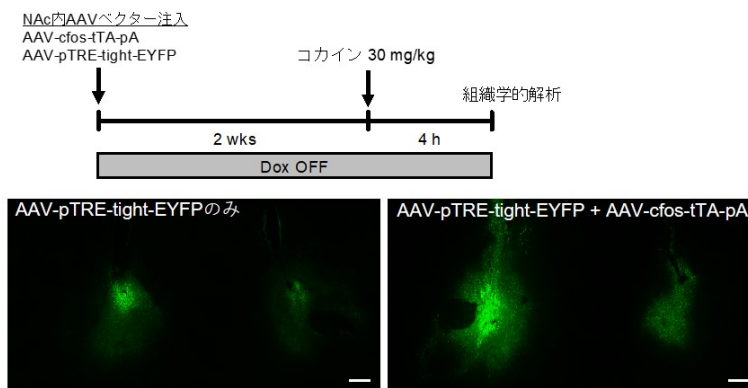


図3 cfos-tTAによるEYFPの発現誘導。Scale bar = 200  $\mu$ m

## 4. 考察

条件付け場所嗜好性試験の発現段階(ポストテスト)は、条件付け時の薬物の報酬効果の学習に基づき動物(マウス)が薬物を欲求、あるいは、探索する状況を反映すると考えられる。本研究により、コカイン条件付け後の薬物探索行動の発現にはNAcの神経活動上昇が重要であることが明らかになった。これまでに、ドパミンはD1受容体を介してNAcニューロンへの興奮性シナプス伝達を抑制することが報告されているため(Harvey and Lacey, 1997)、NAcの神経活動上昇に対するNAcでのドパミン神経伝達の直接的な関与の可能性は低いと考えられる。一方で我々は、NAcにグルタミン酸神経投射を送る内側前頭前野(mPFC)の活動上昇もコカイン探索行動の発現に関与することを見出していることから(Shinohara et al., 2017)、この経路を介したNAcニューロンの活性化が重要なかもしれない。この点については、今後のさらなる検討が必要である。

Tet-tag DREADDシステムによるhM4Diの発現には、低用量では不十分で、高用量のコカイン投与が必要であることが分かった。また、高用量のコカインによる条件付けには、4日間ではなく2日間で十分であることも明らかになった。ウイルスベクターを用いたDREADDの選択的発現誘導の条件検討が終了したことから、今後は、本実験システムを用いて、コカイン条件付け時に活性化したNAcニューロンの活動のみをポストテストの際に抑制することで、報酬効果の学習に関わる神経細胞が、報酬を探索する際にも関与することを証明していく予定である。

## 5. 参考文献

- Kurosawa R, Taoka N, Shinohara F, Minami M, Kaneda K. Cocaine exposure enhances excitatory synaptic drive to cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus. *Eur J Neurosci.* 2013 38(7):3027-35.
- 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.* 2014 79:573-9.
- 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. *Eur J Neurosci.* 2015 May;41(9):1126-38.
- Zhang Z, Ferretti V, Güntan İ, Moro A, Steinberg EA, Ye Z, Zecharia AY, Yu X, Vyssotski AL, Brickley SG, Yustos R, Pillidge ZE, Harding EC, Wisden W, Franks NP. Neuronal ensembles sufficient for recovery sleep and the sedative actions of  $\alpha 2$  adrenergic agonists. *Nat Neurosci.* 2015 18(4):553-561.
- Harvey JI, Lacey MG. A postsynaptic interaction between dopamine D1 and NMDA receptors promotes presynaptic inhibition in the rat nucleus accumbens via adenosine release. *J Neurosci.* 1997 17(14):5271-80.