

学位論文（博士）

知覚神経刺激による
不快情動発現の分子機構

2020年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科
総合薬科学専攻
薬理学

近藤 貴茂

【目次】

論文目録	----- 1
略語リスト	----- 2
本研究で使用した薬物の構造	----- 5
序論	----- 6
目的	----- 10
倫理	----- 11

第 1 章

人為的に知覚神経刺激を誘発した際の中脳辺縁ドーパミン神経機能変化の解析

緒言	----- 13
実験方法および実験材料	----- 15
結果	----- 18
考察	----- 23

第 2 章

人為的に知覚神経刺激を誘発した際の嫌悪行動誘発メカニズムの解析

緒言	----- 26
実験方法および実験材料	----- 28

結果	----- 32
考察	----- 38
総括	----- 40
謝辞	----- 42
引用文献	----- 44

【論文目録】

本論文は、学術雑誌に掲載された以下の論文を基礎とするものである。

学術論文

1. Eiji Sugiyama, Takashige Kondo, Naoko Kuzumaki, Kurara Honda, Akihiro Yamanaka, Minoru Narita, Makoto Suematsu, Yuki Sugiura. Mechanical allodynia induced by optogenetic sensory nerve excitation activates dopamine signaling and metabolism in medial nucleus accumbens. *Neurochem Int.* **129**, 104494 (2019): 第 1 章
2. Takashige Kondo, Yusuke Hamada, Daisuke Sato, Kenichi Tanaka, Yoshiyuki Yamabe, Michiko Narita, Sara Yoshida, Reiko Kagawa, Takaaki Mizuno, Masumi Iizuka, Haruna Shimizu, Kensuke Yamashita, Tomohisa Mori, Akihiro Yamanaka, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita. Conditional activation of peripheral sensory nerves induces an aversive state with the down-regulation of neural functions of the nucleus accumbens. *Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci.* (*Accepted*): 第 2 章

【略語リスト】

3-MT: 3-Methoxytyramine

AAV: Adeno-associated virus

AAV6: Adeno-associated virus serotype 6

Adra2a: Adrenoceptor alpha 2A

AMPA: DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor

ANOVA: Analysis of variance

cAMP: 3'5'-Cyclic adenosine monophosphate

ChR2: Channelrhodopsin-2

CNO: Clozapine *N*-oxide

COMT: Catechol-*O*-methyltransferase

CP: Caudate putamen

CPP: Conditioned place preference

CREB: cAMP response element binding protein

CRHR: Corticotropin-releasing hormone receptor

DA: Dopamine

DAT: Dopamine transporter

DNA: Deoxyribonucleic acid

DNMT3a: DNA methyltransferase 3a

DPP: 2,4-Diphenyl-pyranylum

DREADD: Designer receptors exclusively activated by designer drugs

DRG: Dorsal root ganglion

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

EYFP: Enhanced yellow fluorescent protein

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GR: Glucocorticoid receptor

hM3Dq: Human muscarinic receptor 3 DREADD subtype

hM4Di: Human muscarinic receptor 4 DREADD subtype

IMS: Imaging mass spectrometry

KOR: Kappa opioid receptor

INAc: Lateral part of the nucleus accumbens

MALDI: Matrix assisted laser desorption ionization

mGluR: Metabotropic glutamate receptor

mNAc.: Medial part of the nucleus accumbens

MS: Mass spectrometry

N.Acc.: Nucleus accumbens

NMDA: *N*-methyl-D-aspartate

NR: NMDA receptor

OXR: Orexin receptor

OXTR: Oxytocin receptor

PBS: Phosphate buffered saline

PDYN: Prodynorphin

PFA: Paraformaldehyde

QOL: Quality of life

RNA: Ribonucleic acid

RT-qPCR: Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

SN: Substantia nigra

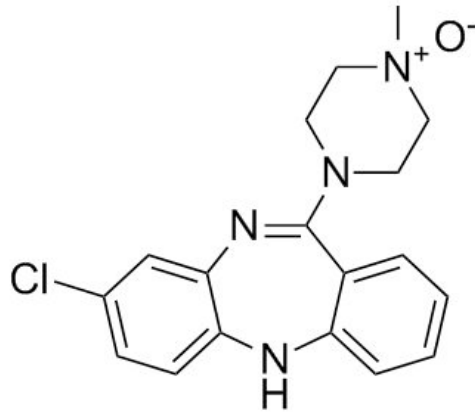
Tac: Tachykinin

TH: Tyrosine hydroxylase

VTA: Ventral tegmental area

【本研究で使用した薬物の構造】

CNO (clozapine *N*-oxide)



【序論】

痛みと不快情動

痛みは、「組織の実質的ないし潜在的な傷害と関連したあるいはこのような傷害と関連して述べられる不快な感覚的情動体験」と国際疼痛学会により定義されている¹。このように「痛み」は感覚的ならびに情動的成分からなる複雑な体験であるとされており、「痛い」という感覚により、不安、不快ならびに恐怖等の「負の情動」が形成されることが知られている^{2,3,4}。このような「痛み」による「負の情動」が、長期間持続することで睡眠障害やうつ病の発症原因となり、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させることが臨床上問題となっている。

中脳辺縁ドーパミン神経系

中脳辺縁ドーパミン神経は、腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) から側坐核 (nucleus accumbens: N.Acc.) に投射しており、このドーパミン神経は、社交性、意思決定、学習記憶および喜びや幸福などの快情動の発現において重要な役割を果たすことが明らかになっている⁵⁻¹⁰。また、中脳辺縁ドーパミン神経は、痛み、ストレスなどの様々な生理応答により神経活動が変化することが明らかになっており¹¹⁻¹³、痛みにより自然報酬に対する感受性が低下することや、心地よい音楽や食物、香りといった快刺激により痛みが軽減されること、加えて痛みを取り除く「鎮痛」を施すことにより中脳辺縁ドーパミン神経の活性化を介して報酬効果が誘発されることも明らかになっている¹⁴⁻¹⁶。

光遺伝学的手法

光遺伝学的手法とは、光感受性イオンチャネルを、遺伝学的手法に従い特定の細胞に発現させ、その細胞機能を特定波長の光で操作することが可能な技術である。光遺伝学的手法の開発により、特定神経細胞の活動を高い時間分解能で正確に操作することが初めて可能となった。従来の神経活動の操作手法としては、電気刺激による神経活動操作が主流であったが、電気刺激は細胞特異性が低く、電極の近傍に存在する軸索や細胞体をも同時に活性化してしまうといった欠点を有していた。さらに、薬物の局所投与などによる神経操作は、神経活動の活性化または抑制することが可能である一方で、時間分解能ならびに細胞特異性が低いという欠点があった。光遺伝学的手法はこれらの欠点を全て補っており、特定神経細胞の活動をマイクロ-ミリ秒単位と高い時間分解能で興奮あるいは抑制することが可能である¹⁷⁻¹⁹。

薬理遺伝学的手法

薬理遺伝学的手法は、遺伝子改変受容体を特定神経に発現させ、その受容体に特異的なリガンドを投与することにより、特定の神経活動を興奮または抑制することが可能な技術である。この技術を応用することで、薬理学的手法や電氣的な手法では制御が困難であった特定神経細胞の活動制御が可能となり、神経ネットワーク解析において未解明とされている神経機能をより詳細に解明することが可能となった²⁰。

DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug) システムは、遺伝子改変型ヒトムスカリン受容体を特定神経細胞に発現させ、遺伝子改変型受容体に特異的なリガンドである clozapine *N*-oxidase (CNO) を処置することで特定神経細胞の ON/OFF 調節を可能とした技術である²¹。

イメージング質量分析法

イメージング質量分析法 (imaging mass spectrometry; IMS) は、細胞および組織切片において分子情報を優れた空間分解能で可視化するために有効な手法の 1 つである^{22, 23}。この手法を用いることにより、低分子物質、外因性薬物や脂質の中間代謝産物、アミノ酸、有機酸などの組織中分布を可視化することが可能となった²⁴⁻²⁶。質量分析由来の検出原理により、IMS には i) 分子を検出するためにラベルまたは特定のプローブを用いる必要がないこと、ii) 非選択的であるため、予期しない分子に関する情報を取得することが可能であること、iii) 様々な種類の分子の組織分布を同時に可視化することが可能であること、以上の利点を有している。

条件付け場所嗜好性試験

条件付け場所嗜好性試験は、ヒトや動物に依存性薬物を投与した時、薬物が引き起こす感覚効果 (中枢神経作用) と環境刺激 (視覚刺激、触覚刺激など) を結び付ける方法として開発され、薬物による報酬効果を検討する方法として広く用いられている^{27, 28}。一方、条件付け場所嗜好性試験は薬物の報酬効果のみならず、嫌悪効果の評価も行うことが可能である。一般的に嫌悪効果は薬物の有害作用につながる可能性があるため、条件付け場所嗜好性試験を利用することにより医薬品の開発において嫌悪効果を誘発しない化合物のスクリーニングに応用できると考えられる。

CREB (cAMP response element binding protein)

CREB は転写制御因子の 1 つであり、ゲノム上の遺伝子転写制御領域に存在する cAMP 応答配列を介した転写活性化に関わる重要な核タンパク質として知られている。CREB は生体内において多くの細胞で恒常的に発現しており、細胞の増殖や分化

などの多様な細胞応答において重要な役割を担っている²⁹。CREB の転写活性は様々なセカンドメッセンジャー経路を介して調節されており、神経細胞においては cAMP 依存的な活性調節に加えて、シナプス活性化に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇や受容体の活性化などが CREB 活性化に関与している。CREB は、神経系において長期記憶の形成、薬物依存、さらには鬱などの精神疾患の発症に関与することが明らかとなっている³⁰⁻³²。

【目的】

本研究では、光遺伝学的手法ならびに薬理遺伝学的手法に従い、人為的に知覚神経刺激を与えた際の、不快情動誘発メカニズムを解明することを目的とし、以下の行動および分子生物学的な検討を行った。

第 1 章

人為的に知覚神経刺激を誘発した際の中脳辺縁ドーパミン神経機能に及ぼす影響を検討する目的で、光遺伝学的手法ならびに imaging mass spectrometry 法に従い、N.Acc. ならびに VTA におけるドーパミン産生、代謝変動の解析を試みた。

第 2 章

薬理遺伝学的手法である DREADD システムを用い、人為的に知覚神経刺激を与えた際の、嫌悪行動誘発メカニズムの解析を試みた。

【倫理】

本研究を遂行するにあたり、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的として規定された星薬科大学動物実験規定に従い、本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮して動物の使用数を最小限にしてすべての実験を行った。また、組み換え DNA 実験については、星薬科大学組み換え DNA 実験安全委員会で承認を得て行なった。

第 1 章

人為的に知覚神経刺激を誘発した際の
中脳辺縁ドーパミン神経機能変化の解析

【緒言】

腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) から側坐核 (nucleus accumbens: N.Acc.) に投射するドパミン作動性神経経路は、急性および慢性疼痛^{33,34} および疼痛逃避行動³⁵ の発現に重要であることが知られている。中でも、側坐核内側部 (medial part of the nucleus accumbens: mNAc) は、中脳ドパミン作動性神経ならびに他の脳領域からの感情情報の処理ならびに統合において重要な役割を担っている^{36, 37}。近年、N.Acc. からの投射経路は、ドパミン (dopamine: DA) と DA 受容体の相互作用を介し、感情および行動の決定に関与していることが明らかになっている³⁸。さらに、この経路は、疼痛制御に密接に関与しており、上行性侵害受容経路の活動制御において重要な役割を果たしている³⁹。近年、当研究室より、VTA を起始核とするドパミン作動性神経の活性化が N.Acc. 内の細胞外 DA 遊離量を増加させ、それが神経損傷または骨がんによって誘発されるがん疼痛を緩和させることを報告している¹³。さらに、DA 作動薬の投与により mNAc における興奮性を制御することで、神経障害性疼痛モデルの機械的触アロディニア反応が軽減されることが明らかになっている⁴⁰。一方で、嫌悪刺激は VTA を起始核とするドパミン作動性神経活動の亢進を阻害することが明らかになっている⁴¹⁻⁴³。

近年、光遺伝学的手法であるオプトジェネティクスを応用し、マウスの知覚神経に光感受性イオンチャネル (channelrhodopsin-2: ChR2) を発現させ、無拘束下、マウスの足底部へ青色光 (473 nm) 照射を行うことで、足底部における侵害受容器を非侵襲的に活性化させることが可能となった⁴⁴。当研究室の先行研究より、この手法とイメージング質量分析法 (imaging mass spectrometry: IMS) を応用し、青色光照射により知覚神経刺激を与えることにより、mNAc における総 DA 含有量の減少が引き起こさ

れることを明らかにしている⁴⁵。IMS は、組織切片の各分画からの総 DA 含有量などの局在を可視化することが可能な技術である^{46, 47}。すなわち、知覚神経刺激による mNAc に貯蔵された総 DA 含有量の急速かつ大きな変動は、疼痛閾値の低下に関与していることを示唆している。しかしながら、持続的な知覚神経刺激が他の脳領域における DA 含有量にも同様の影響を与えるか否かについては明らかになっていない。そこで本研究では、知覚神経刺激を与えた際の各脳領域における DA 含有量の変化を検討する目的で、IMS を用いて、安定同位体標識 tyrosine ($^{13}\text{C}^{15}\text{N-Tyr}$) から $^{13}\text{C}^{15}\text{N-DA}$ (新規合成にされた DA) への代謝変動のみならず、非標識 DA および $^{13}\text{C}^{15}\text{N-Tyr}$ 投与により新規合成された DA 含有量の変化を N.Acc、線条体 (caudate putamen: CP) および VTA において検討した。

【実験方法および実験材料】

実験動物

実験には 8-12 週齢の雄性 C57BL/6J 系雄性マウス (東京実験動物 (株)、東京) を使用した。マウスは恒温恒湿 (24 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$) にて飼育し、明暗条件は 8:00 点灯、20:00 消灯の 12 時間サイクルとした。なお、摂餌 (固形飼料 MF、オリエンタル酵母工業 (株)、東京) および飲水 (水道水) は自由摂取とした。

新規合成ドパミンの経時的分析

実験は絶食 12-15 時間後に $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr (Taiyo Nippon Sanso, 東京, 30 mg/mL in H_2O , 10 $\mu\text{L/g}$ body weight) を経口投与した。Isoflurane (3%, 吸入) による全身麻酔下、投与 0.5、1、1.5 時間後に脳組織を採取し、採取直後速やかにドライアイスで凍結し、 -80 °C で凍結保存した。

光遺伝学的手法に従った人為的知覚神経活性制御

ヒト synapsin プロモーターの直下に enhanced green fluorescent protein (EGFP) または ChR2 (ET/TC) ならびに enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) 複合遺伝子を挿入した AAV ベクター (AAV6-hSyn-EGFP, AAV6-hSyn-ChR2 (ET/TC)-EYFP) は、血清型 6 の外被タンパク質を用いて作製した。また、各 AAV ベクターの力価を 1×10^{11} - 3×10^{12} copies/mL に調製した。Isoflurane (3%, 吸入) による全身麻酔下、メスを用いて坐骨神経の走行に沿って皮膚を約 2 cm 切開し、大臀筋ならびに大腿二頭筋を

切断して坐骨神経を露出させた。この際、インジェクション針を神経上膜下に留置し、AAV ベクターを 1 μ L/min の速度で 8 μ L 注入した (8 min + 1 min 静置)。

IMS 法

脳切片 (厚さ、8 μ m) をクライオマイクロトーム (CM3050, Leica Microsystems) で切断し、indium-tin-oxide でコーティングされたスライドガラス (Bruker Daltonics, MA, USA) に貼り付け、-16 $^{\circ}$ C で解凍した。その後、内部標準物質として重水素標識ドパミン (D_4 -DA, 5 μ M in 50% MeOH, IsoSciences PA, USA) を、ロボットスプレー装置 (SunCollect system, SunChrom, Friedrichsdorf, Germany) を用いて、自動でスプレーコーティングした。さらに、切片に 2,4-diphenyl-pyranylium (DPP) tetrafluoroborate salts (Sigma-Aldrich, MO, USA; 1.3 mg/mL in methanol) 溶液をエアブラシ (Procon Boy FWA Platinum 0.2 mm caliber airbrush, Mr. Hobby, 東京) を用いて、手動でスプレーコーティングした。その後、切片に 2,5-dihydroxybenzoic acid (40 mg/mL, dissolved in 50% methanol) 溶液をロボットスプレー装置を用いて、自動でスプレーコーティングした。データ測定は、MALDI 用レーザーユニット (AP-SMALDI10, TransMIT GmbH, Giessen, Germany) とオービトラップ型質量分析装置 (QExactive Focus, Thermo Fisher Scientific) の組み合わせもしくは MALDI イオン源搭載リニアイオントラップ型質量分析計 (MALDI LTQ XL, Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。オービトラップ型質量分析装置は、350-400 の質量範囲内にて、m/z 200 で質量分解能 70,000 で検出を行った。イオントラップ型質量分析装置は、DPP-DA (m/z 368> 232)、DPP-D4-DA (m/z 372>232) および DPP- $^{13}C^{15}N$ -DA (m/z 377>233) シグナルについては、m/z 1.0 の前駆イオン分離幅で検出を行った。

データ解析は、得られたスペクトルデータを画像データに変換した後、ImageQuest 1.0.1 (Thermo Fisher Scientific)、SCiLS 2019a (Bruker Daltonics) および ImageJ 1.51 (National Institutes of Health, USA) ソフトウェアを用いて行った。

統計解析

すべての実験の測定値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表記した。統計学的有意差検定は、2 群間における比較について、unpaired *t*-test を用いて行った。すべての統計解析は、Prism version 5.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) を用いて解析を行った。

【結果】

IMS を用いた VTA/黒質 (substantia nigra: SN) 神経回路における DA 局在の可視化

IMS を用いて脳内 DA の局在を可視化することにより、CP および N.Acc. 領域において高濃度に局在しており、起始核である SN および VTA 領域よりも高い濃度の DA が局在していることが明らかになった (Fig. 1A, B)。

各脳領域における高濃度 DA 局在メカニズムの解析

CP および N.Acc. において、高濃度に局在する DA の一部が新規合成された DA に関連しているか否かを検討した。 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr をマウスに経口投与し、投与の 0.5、1.0 ならびに 1.5 時間後の CP ならびに N.Acc. を含む脳切片において新規合成された DA の可視化を試みた (Fig. 2A, B)。その結果、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr 投与の 1.5 時間以内に CP ならびに N.Acc. における総 DA 含有量の内、10% 以上が新規合成された DA に置換されていることが明らかになった (Fig. 2C-E)。

光遺伝学的手法を応用し、知覚神経活動特異的に活性化した際の CP、N.Acc. ならびに VTA における DA 産生ならびに代謝機能に与える影響

次に、マウスの足蹠に青色光を照射して知覚神経刺激を与えた際の CP、N.Acc. ならびに VTA における DA 産生ならびに代謝機能の変化を検討した。知覚神経に ChR2 を発現させたマウスへの $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr の投与 1.5 時間後、30 分間青色光を照射し、知覚神経刺激を与えたマウスより、脳を採取し IMS を用いて DA、新規合成さ

れた DA ならびに DA の代謝産物である 3-methoxytyramine (3-MT) 含有量の可視化を試みた (Fig. 3A)。その結果、CP および N.Acc. 領域において、DA 含有量の有意な減少が確認された (Fig. 3B, C * $p < 0.05$ vs. EYFP)。一方で、VTA において変化は認められなかった (Fig. 3C)。また、CP および N.Acc. において新規合成された DA ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA) 含有量の変化は認められなかった一方で、VTA においては新規合成された DA ならびに 3-MT 含有量の有意な減少が確認された (Fig. 3C * $p < 0.05$ vs. EYFP)。以上の結果から、持続的な知覚神経刺激は、CP および N.Acc. 領域において DA 含有量の減少を伴い、VTA においては DA の産生ならびに代謝機能を抑制することが明らかとなった。

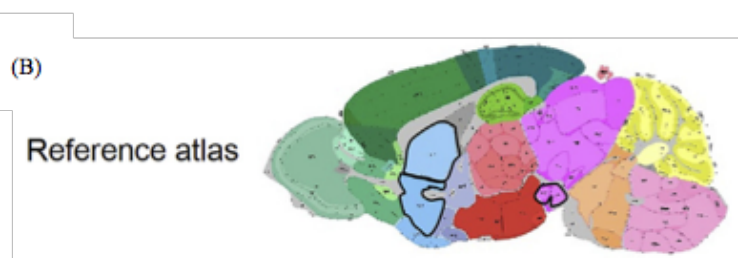
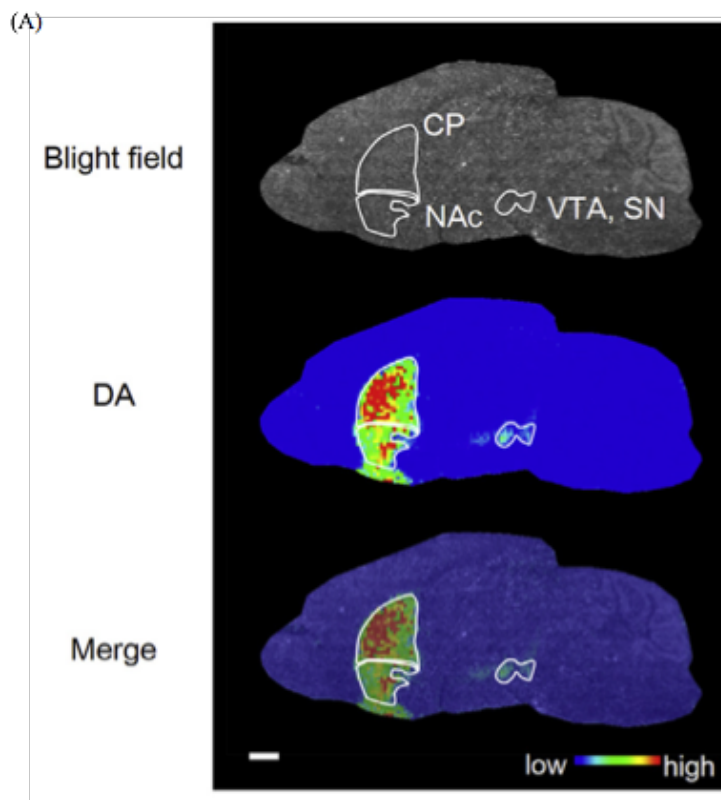


Fig. 1. Representative dopamine distribution in a sagittal slice of mouse brain.

(A). Representative image of a sagittal section of mouse brain imaged under bright field (top), IMS for DA (middle), and merged (bottom). Scale bar, 1 mm. (B) Reference atlas (<http://atlas.brain-map.org/>) corresponding to the co-ordinates of the section shown in a. IMS, imaging mass spectrometry; CP, caudate-putamen; NAc, nucleus accumbens; VTA, ventral tegmental area; SN, substantia nigra.

Neurochem Int, **129**, 104494 (2019) より引用

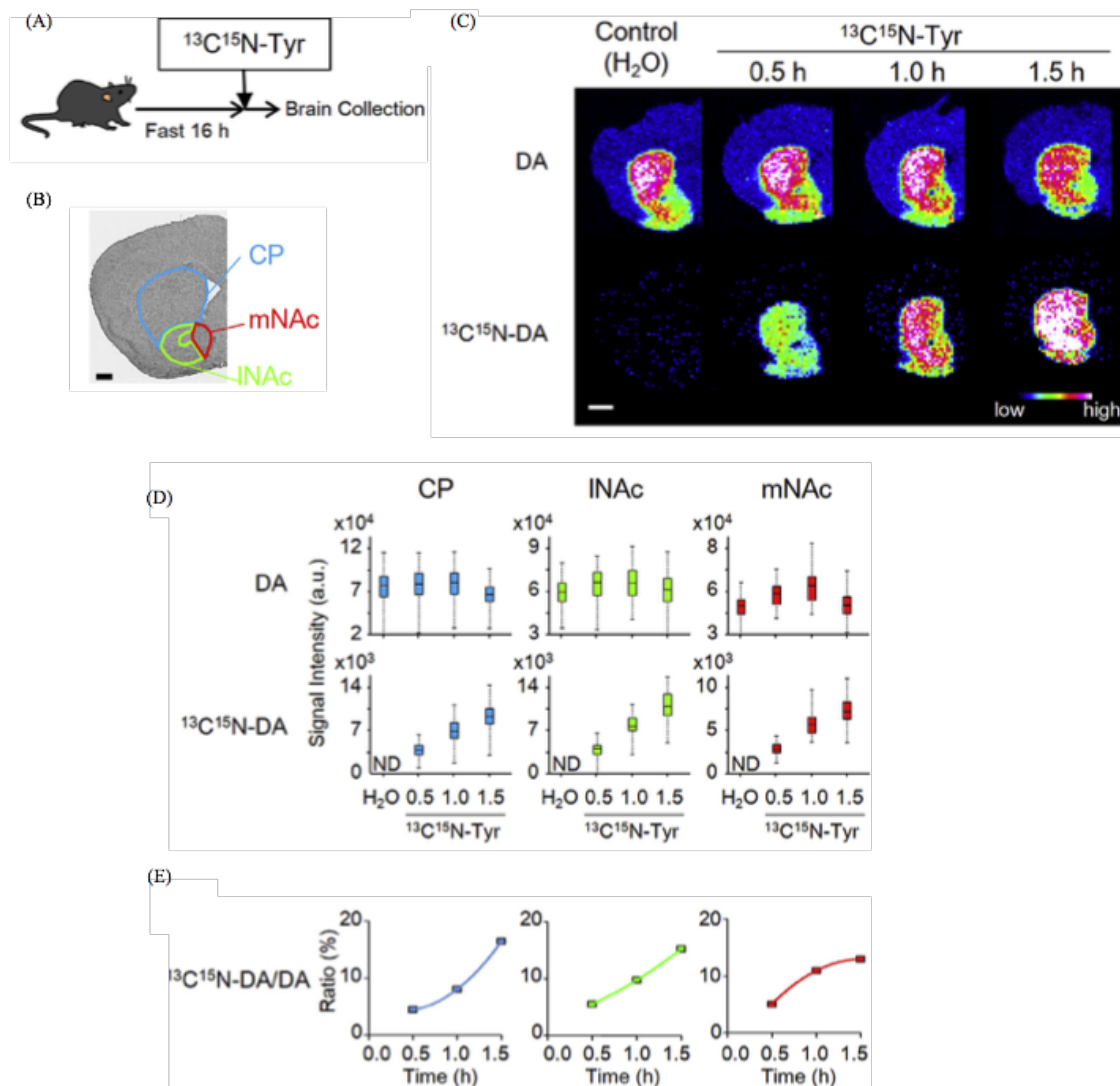


Fig. 2. Time course analysis of dopamine metabolic turnover with in the striatum.

(A) Experimental design. (B) Representative image showing the striatal sub-regions. Scale bar, 0.5 mm. (C) Ion images showing the levels of DA (upper) or $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA (lower). Scale bar, 1 mm. (D) Box showing the signal intensities of DA (upper) or $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA (lower) at all pixels within striatal sub-regions. The three horizontal lines of the boxed section represents first, second, and third quartile from the bottom to top, respectively. Lines extending vertically from the boxes represent minimum and maximum. (E) Mean $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA/DA ratio at each time point. DA, dopamine; CP, caudate-putamen; NAc, nucleus accumbens; lNAc, lateral part of the nucleus accumbens; mNAc, medial part of the nucleus accumbens.

Neurochem Int, 129, 104494 (2019) より引用

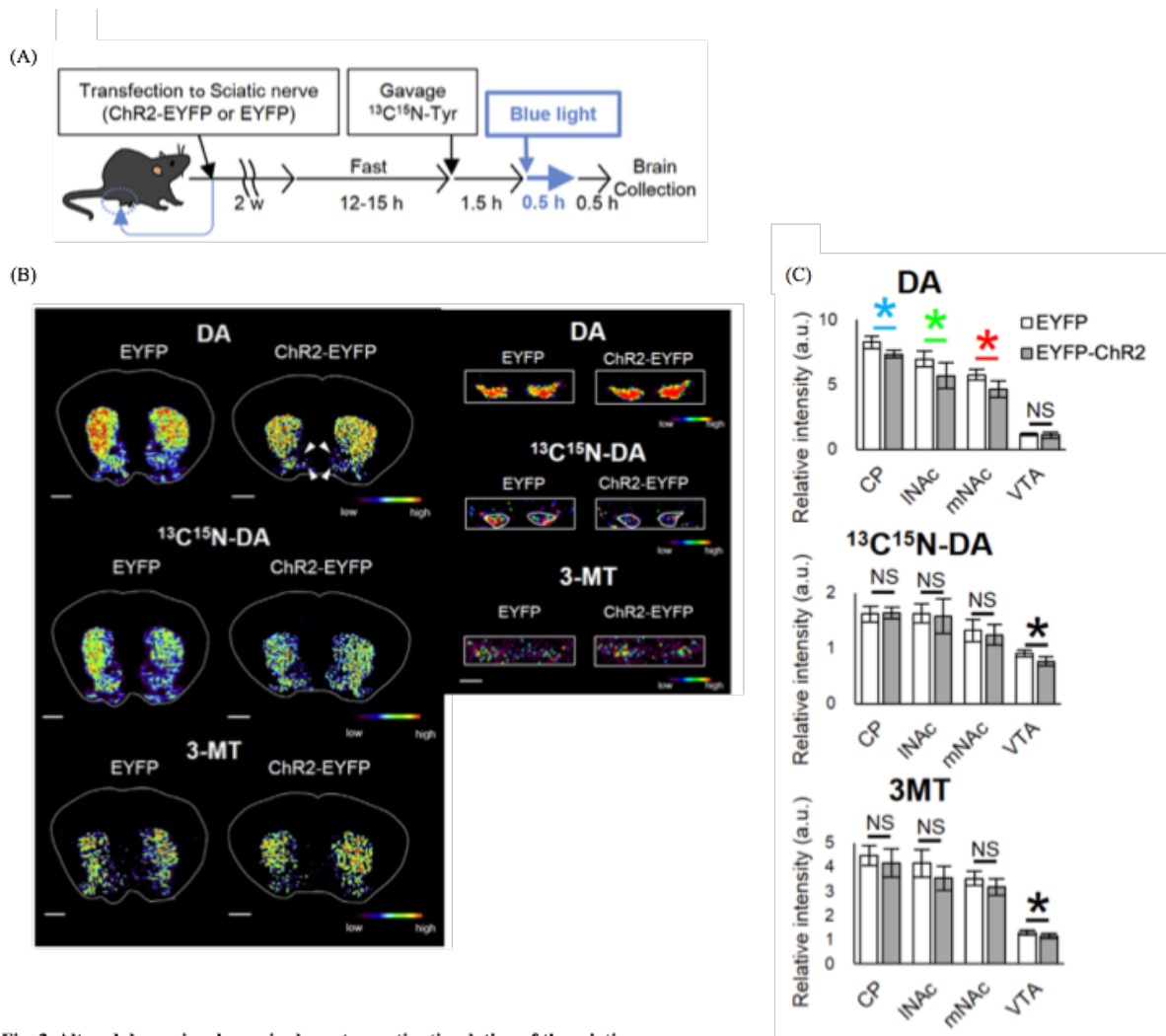


Fig. 3. Altered dopamine dynamics by optogenetic stimulation of the sciatic nerve.

(A) Experimental design. (B) Representative ion images showing DA, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA, and 3-MT. The upper section includes the striatum and the lower includes the VTA. White lines enclose the measured regions. White arrow heads indicate altered DA levels at mNAc. (C) Mean levels of DA, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA, and 3-MT in the striatum. Scale bar: 0.5 mm. Each column represents the mean with SEM ($n=3$, $*p<0.05$ vs. EYFP).

Neurochem Int. 129, 104494 (2019) より引用

【考察】

本研究では、光遺伝学的手法を応用し、人為的な知覚神経の活性化による疼痛刺激を与えた際の、CP、N.Acc. ならびに VTA における DA 含有量の変化を IMS を用いて、検討した。まず始めに、新規合成された DA ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -DA) が、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr 投与の 1.5 時間以内に、各脳領域において急速に増加することを明らかにした。この結果は、DA の高い供給機能を明らかにした先行研究と同様の結果であるが^{48,49}、IMS を応用することで、初めて高解像度画像として可視化することに成功した。

IMS を用いた各脳領域における DA 含有量は、任意の区画における細胞内および細胞外 DA 含有量を合計して可視化される。通常、細胞内 DA 含有量は細胞外 DA 含有量よりも高いことが知られているため⁵⁰、先行研究で確認された DA 含有量の変動は、主に神経終末におけるシナプス小胞に存在する神経細胞内 DA 含有量の変化を反映している⁵¹。そこで、この技術的な課題を克服する目的で、神経シナプス小胞より放出される DA、 $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Tyr の投与により標識された新規合成 DA ならびに DA 代謝産物である 3-MT の評価を行い、持続的な知覚神経の活性化がドパミン神経機能に与える影響についてより詳細な検討を行った。IMS を用いることで、人為的に知覚神経を活性化した際の各脳領域における DA、新規合成された DA ならびに 3-MT 含有量の可視化を試みた。その結果、持続的な知覚神経の活性化により CP ならびに N.Acc. 領域における DA 含有量が減少することが明らかとなった。一方で、新規合成された DA ならびに 3-MT 含有量に変化は認められなかった。また、VTA においても同様に検討したところ、持続的な知覚神経刺激を与えることで DA 含有量に変化は認められなかったものの、新規合成された DA ならびに 3-MT 含有量が減少することが明らかとなった。以上の結果から、持続的な知覚神経の活性化に

よる疼痛刺激を与えることで VTA における DA 産生ならびに DA 代謝機能の減弱が引き起こされ、中脳辺縁ドパミン神経の投射先である N.Acc. において DA 含有量の減少が引き起こされている可能性が考えられる。この結果は、当研究室の先行研究である、慢性疼痛ならびにがん疼痛下、中脳辺縁ドパミン神経活動が低下することを明らかにした報告と同様の結果を示した¹³。さらに、光遺伝学的手法を応用した知覚神経刺激により、嫌悪行動が誘発されること⁴⁴、ならびに慢性疼痛下において、不安が誘発されることが明らかになっている⁵²。一方、疼痛刺激に対し、鎮痛を施すことで N.Acc. における細胞外 DA 濃度が増加することが明らかになっており^{53, 54}、N.Acc. における DA 含有量の増加は過剰な疼痛刺激を減衰させる役割を果たしている可能性が考えられる。以上のことから、痛みによる不快情動の発現メカニズムとして、知覚神経刺激を介した、中脳辺縁ドパミン神経活動の機能低下がその一因であると考えられる。

以上、本研究より、光遺伝学的手法に従った持続的な知覚神経刺激は、中脳辺縁ドパミン神経機能の低下を引き起こすことが明らかとなった。

第 2 章

人為的に知覚神経刺激を誘発した際の
嫌悪行動誘発メカニズムの解析

【緒言】

長期的な「痛み」は、不安、抑うつ状態、認知機能傷害、さらには睡眠障害などの発症に寄与し、患者の QOL を著しく低下させることが臨床上問題となっている。このような「痛み」による情動変化は、主に脳内神経機能異常により引き起こされることが明らかになっている⁵⁵。中でも、VTA から N.Acc. へ投射しているドパミン神経は快および不快情動の制御に重要な役割を果たすことが知られている⁵⁶。実際に、モルヒネ、コカインまたはメタンフェタミンの投与によるドパミン神経の活性化は、報酬効果を誘発する⁵⁷⁻⁵⁹。一方、慢性疼痛は中脳辺縁ドパミン神経系の活動を抑制する一方、中脳辺縁系ドパミン神経系の一過性の活性化は慢性疼痛による痛覚過敏を軽減することが明らかになっている¹³。以上の報告は、疼痛刺激による中脳辺縁ドパミン神経系の活動減弱が疼痛誘発性の不快情動の発現に関与している可能性を示唆している。

近年、遺伝子工学の発展により、特定遺伝子の発現を制御することが可能となった。中でも、薬理遺伝学的手法である Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) システムは、遺伝子改変受容体を特定の細胞に発現させ、その受容体に特異的なリガンドを投与することにより、その細胞の活動を興奮または抑制することが可能な技術である^{60, 61}。また、血清型 6 の外被タンパク質を有するアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターは小型の末梢感覚神経細胞に高い感染効率を有しており、DREADD システムと組み合わせることで、知覚神経活動を特異的かつ人為的に、長時間制御することが可能となった。

そこで本研究では、薬理遺伝学的手法である DREADD system を用い、人為的に知

覚神経刺激を与えた際の嫌悪行動誘発メカニズムの解析を試みた。

【実験方法および実験材料】

実験動物

実験には 7 週齢の C57BL/6J 系雄性マウス (東京実験動物 (株)、東京) を使用した。マウスは恒温恒湿 (24 ± 1 °C, $55 \pm 5\%$) にて飼育し、明暗条件は 8:00 点燈、20:00 消燈の 12 時間サイクルとした。なお、摂餌 (固形飼料 MF、オリエンタル酵母工業 (株)、東京) および飲水 (水道水) は自由摂取とした。

薬理遺伝学的手法に従った人為的知覚神経活性制御

ヒト synapsinプロモーターの直下に enhanced green fluorescent protein (EGFP) または human muscarinic receptor 3 (hM3Dq) と mCherry の複合遺伝子を挿入した AAV ベクター (AAV6-hSyn-EGFP, AAV6-hSyn-hM3Dq-mCherry) は、血清型 6 の外被タンパク質を用いて作製した。また、各 AAV ベクターの力価をそれぞれ EGFP: 2×10^{11} copies/mL、hM3Dq: 1×10^{11} copies/mL に調製した。Isoflurane (3%, 吸入) による全身麻酔下、メスを用いて坐骨神経の走行に沿って皮膚を約 2 cm 切開し、大臀筋ならびに大腿二頭筋を切断して坐骨神経を露出させた。この際、インジェクション針を神経上膜下に留置し、AAV ベクターを 1 μ L/min の速度で 4 μ L 注入した (4 min + 1 min 静置)。

免疫組織学的染色法

AAV6-hM3Dq マウスは、3% isoflurane 吸入麻酔下、4% paraformaldehyde を含む 0.1 M PBS (pH 7.4) を用いて灌流固定を行った。灌流固定後、脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) ならびに坐骨神経を採取し、4% paraformaldehyde で後固定を行った (DRG: 20 分間、坐骨神経、120 分間)。次に、20% sucrose を含む 0.1 M PBS および 30% sucrose を含む 0.1 M PBS を攪拌しながらそれぞれ浸透させ (DRG; 200 分間、坐骨神経; 1 日)、OCT-Compound (Sakura Fine Technical, 東京) を用いて凍結させた。凍結させたサンプルはクライオスタット (Leica CM1510; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) にて厚さ 8 μ m に薄切し、poly-L-lysine コート化スライドガラス上に貼付後、室温乾燥させてから免疫染色を行った。スライドガラスに貼付した凍結スライス切片は、0.01 M PBS で 3% に希釈した正常ヤギ血清 (normal goat serum, NGS; Vector Laboratories, Inc., San Diego, CA, USA) あるいは 0.1% の最終濃度になるよう triton X-100 (sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を加えた 3% NGS (0.1% triton/ 3% NGS) で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体 (anti-peripherin (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)、anti-myeline (1:300, Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA) ならびに anti-mCherry (1:1000, Abcam plc., Cambridge, UK)) とともにインキュベートした。洗浄後、各一次抗体に対してする二次抗体として、Alexa 488 または 546 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) と結合した二次抗体を数滴加え、インキュベートした。サンプルは蛍光封入剤 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて封入した。また、画像の取得は、正立型蛍光顕微鏡 (BX-61; Olympus, 東京) を用いて、蛍光下、高感度デジタル CCD カメラ (MD-695; Molecular Devices) により行った^{13,62}。

熱痛覚過敏反応の評価

痛覚過敏反応の測定は、足底熱刺激装置 (IITC Ins./Life Science Instruments, CA, USA) を用いて行い、熱刺激は正常動物において後肢を跳ねのけるまでの反応潜時が、約 8-10 秒になるように調節した。マウスの両側後肢の足蹠表層にそれぞれ熱刺激を加え、後肢を跳ねのけるまでの反応潜時を疼痛閾値の指標とし、3 回測定した平均値を結果とした。なお、体重移動などによる後肢の動きは評価しなかった。また、マウスを実験環境に慣れさせるためにアクリル製シリンダー (高さ 15 cm、直径 8 cm) 内で最低 1 時間馴化させてから無拘束下にて測定を行った。

条件付け場所嗜好性試験

場所条件付けは、鈴木ら⁶³の方法を応用して行った。実験装置は、アクリル樹脂ボードで作製され、2 つの同じサイズのコンパートメントに分割されたボックス (幅 15 cm×長さ 30 cm×高さ 25 cm, 小原医科産業 (株), 東京) を用いた。1 つの区画は白色のボックスで、凹凸を有している床面を用い、もう 1 つの区画は黒色のボックスで、滑らかな床面を用いた。場所条件付けのスケジュールは、3 つのフェーズ (条件付け前試験、条件付け、条件付け後試験) で行った。900 秒の試験中に各区画に滞在した時間は、赤外線ビームセンサー (TimeLD4; 小原医科産業 (株)) で記録を行った。場所条件付けは、生理食塩水投与直後、条件付け前試験で滞在時間が短かった区画に、マウスを 1 時間滞在させ、翌日に clozapine *N*-oxide (CNO) 投与直後、条件付け前試験で滞在時間が長かった区画に、マウスを 1 時間滞在させることで行なった。この場所条件付けを 6 回、計 12 日間行い、場所条件付け最終日の翌日に、条件付け前試験と同様の方法での条件付け後試験を行った。

RT-qPCR 法に従った N.Acc. ならびに VTA における遺伝子発現解析

mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、サンプルから total RNA を抽出し、SuperScript[®] VILOTM cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、逆転写反応を行うことにより、cDNA を作製した。RT-qPCR は、Fast SYBR[®] Green Master mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) と各種遺伝子に対する primer (Table.1 参照) を使用し、StepOnePlusTM System (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて解析を行った。遺伝子発現の定量は、内標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法に従うことにより、相対定量を行った。

統計解析

すべての実験の測定値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) として表記した。統計学的有意差検定は、2 群間における比較では、unpaired t-test を用い、相関解析は、ピアソンの積率相関係数検定を用いて行った。すべての統計解析は、Prism version 5.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) を用いて解析を行った。

【結果】

知覚神経活性化による痛覚閾値の変化

Gq-DREADD を介した、知覚神経活性化により痛覚過敏反応が引き起こされるか否かを検討する目的で AAV6-hM3Dq-mCherry (Fig. 1A-i) または AAV-hSyn-EGFP (対照群、Fig. 1A-ii) を、マウス右後肢坐骨神経に微量注入することで感染させ、活性化型遺伝子改変ヒトムスカリン受容体である hM3Dq を知覚神経特異的に発現させた (Fig. 1B)。その後、hM3Dq 特異的なリガンドである CNO をマウスに腹腔内投与し、痛覚閾値の変化を検討した (Fig. 1C)。AAV 微量注入 2 週間後、DRG において peripherin 陽性神経細胞と hM3Dq-mCherry の共局在が認められた。一方、坐骨神経において、hM3Dq-mCherry は軸索近傍に局在していることが明らかとなった (Fig. 1D, E)。この条件下、知覚神経活動を活性化した際の痛覚閾値変化について検討した結果、坐骨神経に AAV6-hM3Dq を感染させたマウスにおいて、CNO 投与により痛覚閾値の有意な低下が確認された (Fig. 1F、*** $p < 0.001$ vs. EGFP)。

Gq-DREADD を介した知覚神経刺激による嫌悪行動に与える影響

次に、知覚神経の活性化によって引き起こされる疼痛刺激により嫌悪行動が誘発されるか否かについて検討した。坐骨神経への AAV6-hM3Dq 微量注入 2 週間後、CPP ボックスを用いて場所嗜好性試験を行った (Fig. 2A, B)。その結果、対照群である EGFP 群においては条件付け前試験と比較して、CNO 条件付け区画における滞在時間に有意な変化は認められなかった一方で (Fig. 2C-i)、hM3Dq 群においては、条件付け前試験と比較して、知覚神経刺激を誘発した CNO 条件付け区画における滞在時間の有意な減少が認められた (Fig. 2C-ii, * $p < 0.05$ vs. Pre-test)。

Gq-DREADD を介した知覚神経刺激により誘発される嫌悪行動と脳内遺伝子発現変化の解析

知覚神経刺激によって誘発される嫌悪行動の誘発メカニズムを解明する目的で、RT-qPCR 法に従い、N.Acc. における神経マーカーの発現変化を検討した。知覚神経特異的な活性化により嫌悪行動が誘発されたマウスの N.Acc. 領域を採取し、25 遺伝子の神経マーカーの発現変動を解析した。その結果、知覚神経刺激による嫌悪行動誘発条件下において、神経特異的転写調節因子である CREB mRNA のみが有意に減少し、metabotropic glutamate receptors (mGluR; mGlu1, mGlu2, mGlu3, mGlu4, mGlu5, mGlu6, mGlu7, mGlu8)、N-methyl-d-aspartate receptors (NMDAR; NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D)、DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors (AMPA; GluR1, GluR2, GluR3, GluR4)、dopamine receptors (D1-R, D2-R)、adrenoceptor alpha 2A (Adra2a)、tachykinin 1 (Tac1)、prodynorphin (PDYN)、kappa opioid receptor (KOR) ならびに DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) に変化は認められなかった (Fig. 3A ** $p < 0.01$ vs. EGFP)。さらに、N.Acc. における CREB mRNA 発現量と嫌悪行動の相関解析を検討したところ、強い正の相関が認められた (Fig. 3B, $r = 0.987$, $p = 0.013$)。一方、VTA においては、同様の条件下、oxytocin receptor (OXTR)、glucocorticoid receptor (GR)、corticotropin-releasing hormone receptors (CRHR1, CRHR2)、dopamine receptor (D2-R)、catechol-*O*-methyltransferase (COMT)、tyrosine hydroxylase (TH)、dopamine transporter (DAT)、orexin receptors (OXR1, OXR2) ならびに CREB mRNA 発現量に変化は認められなかった (Fig. 3C)。

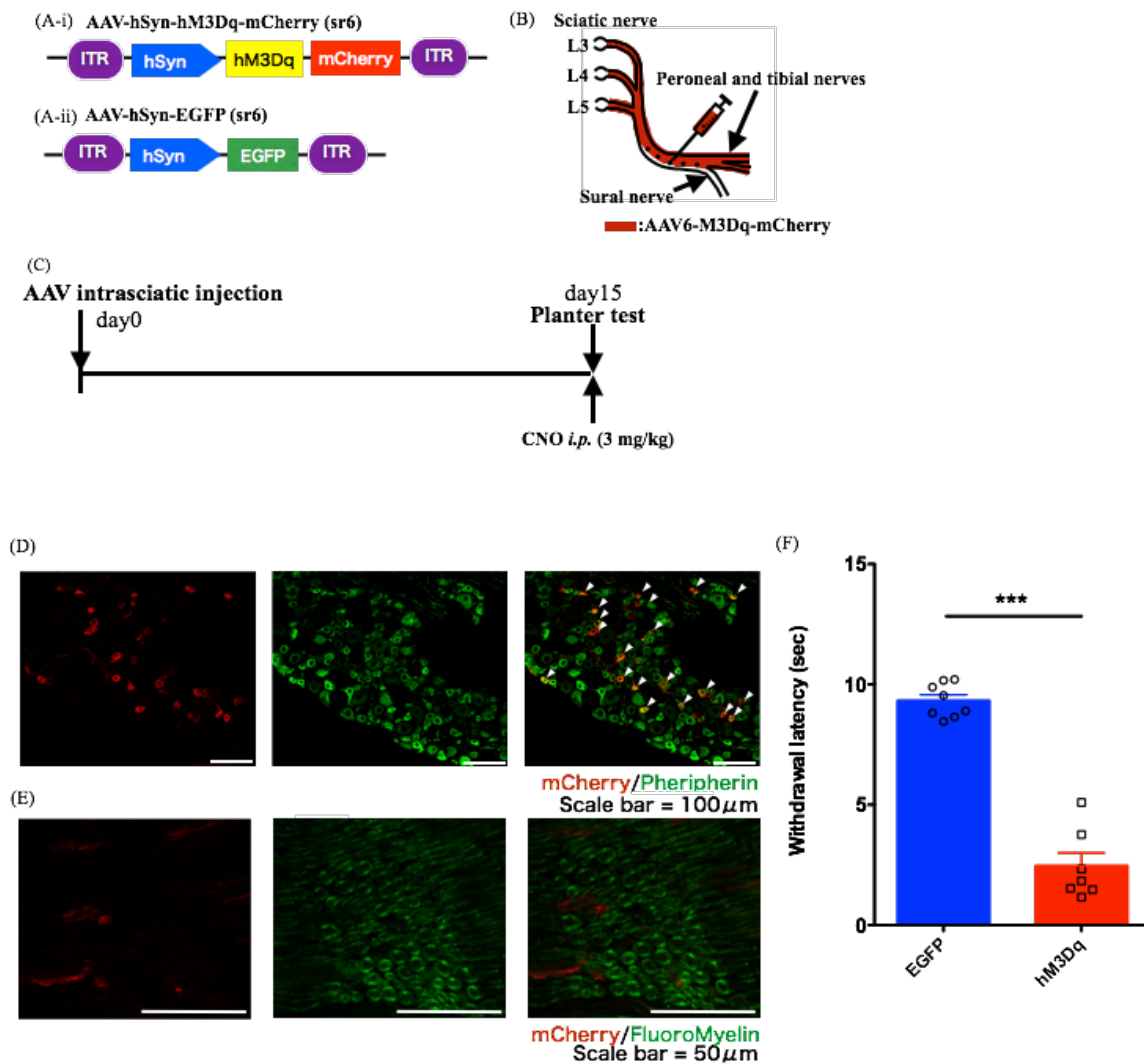


Fig. 1 Effect of specific activation of sensory neurons by Gq-DREADD on the pain threshold

(A) Schematic illustration of AAV-hSyn-hM3Dq-mCherry (sr6) (A-i) and AAV-hSyn-EGFP (sr6) (A-ii). (B) Operative schematic. (C) Experimental timeline. (D) AAV-hSyn-hM3Dq-mCherry was injected into the sciatic nerve. Qualitative observation of mCherry fluorescence in histological sections suggested that hM3Dq-mCherry (red) was expressed in the lumbar DRG. Scale bars: 100 μ m. Lumbar DRG section was stained with antibodies specific for a nociceptive marker (peripherin). Peripherin: green, hM3Dq: red. (E) Qualitative observation of mCherry fluorescence in histological sections suggested that hM3Dq-mCherry (red) was expressed in the sciatic nerve. Scale bars: 50 μ m. Sciatic nerve section was stained with antibodies specific for a myelin marker (FluoroMyelin). FluoroMyelin: green, hM3Dq: red. (F) Changes in the pain threshold induced by the temporary activation of sensory neurons by the Gq-DREADD system, measured by a planter test. Each column represents the mean with SEM ($n=7-8$, *** $p<0.001$ vs. EGFP)

Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci. Accepted. より引用

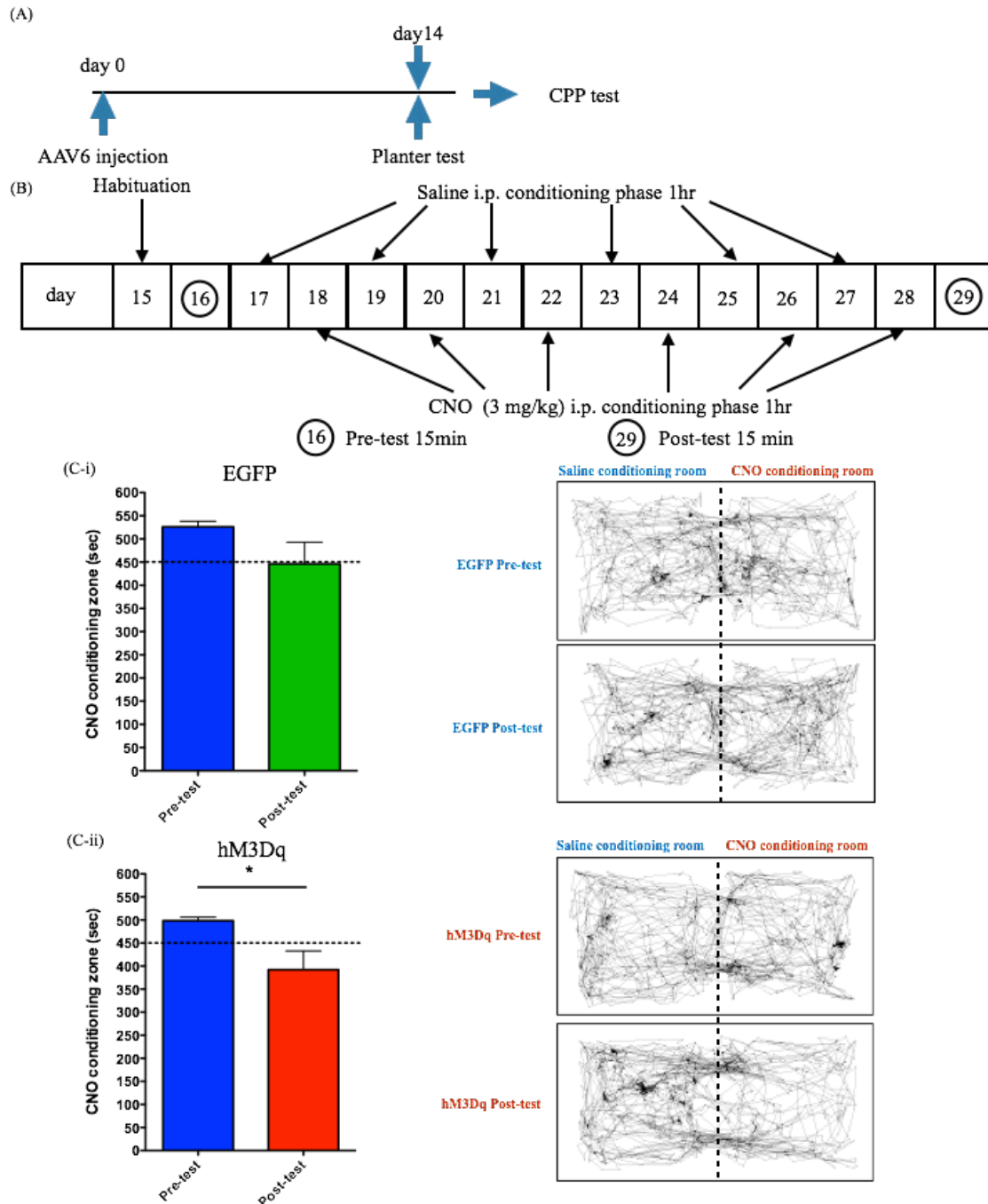


Fig. 2 Induction of conditioned place aversion by the artificial activation of sensory neurons by Gq-DREADD

(A) Experimental timeline. (B) CPP conditioning and test schedule (C) Changes in the place preference induced by the temporary activation of sensory neurons by the Gq-DREADD system using a CPP test in EGFP (C-i, left: CPP test results, right: Traces) and hM3Dq (C-ii, left: CPP test results, right: Traces). Each column represents the mean with SEM (n = 5-6, * $p < 0.05$ vs. Pre-test).

Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci. Accepted. より引用

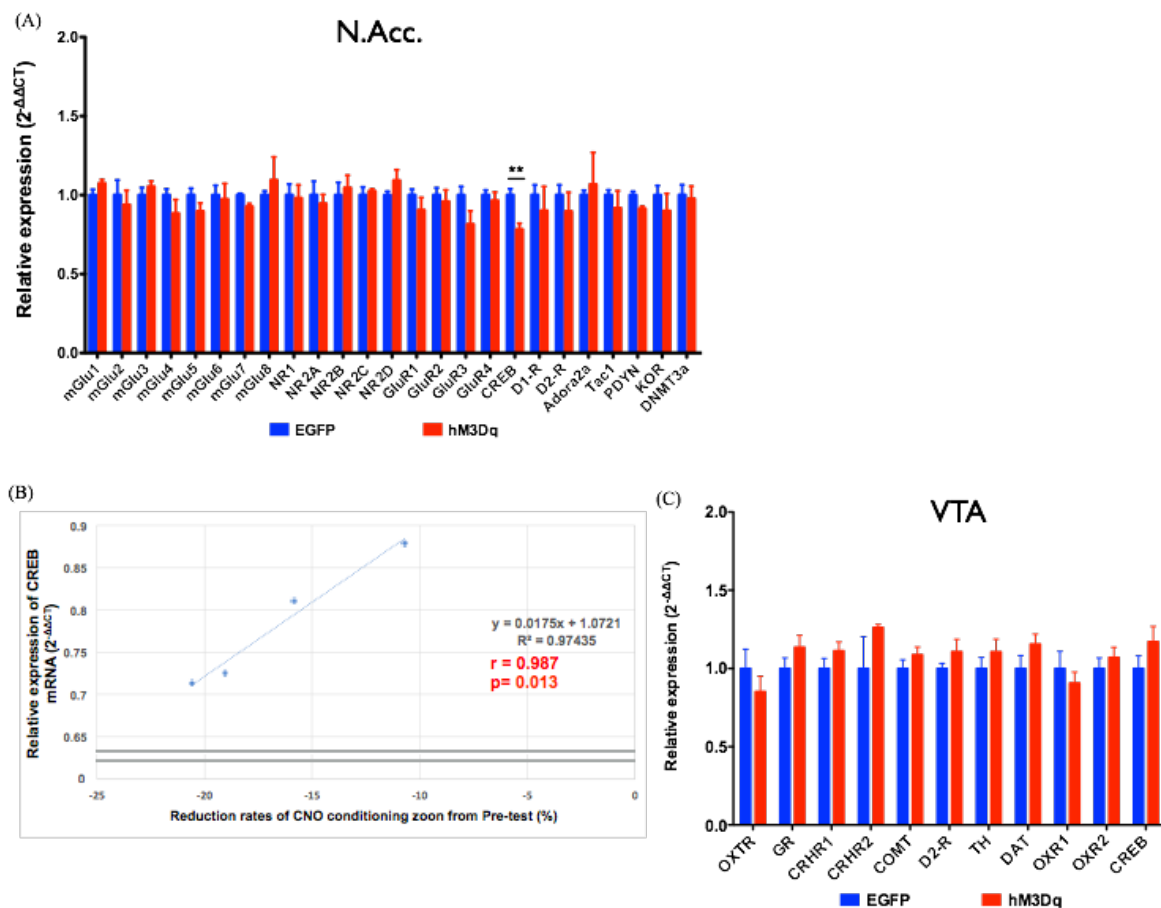


Fig. 3 Changes in mRNAs of neural markers in the N.Acc. under the aversive condition induced by activating sensory neurons via Gq-DREADD

(A) Changes in mRNA levels of metabotropic glutamate receptors (mGluR; mGlu1, mGlu2, mGlu3, mGlu4, mGlu5, mGlu6, mGlu7, mGlu8), *N*-methyl-d-aspartate receptors (NMDAR; NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D), DL- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors (AMPA; GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), cAMP response element binding protein (CREB), dopamine receptors (D1-R, D2-R), adrenoceptor alpha 2A (Adra2a), tachykinin 1 (Tac1), prodynorphin (PDYN), kappa opioid receptor (KOR) and *de novo* DNA methyltransferase 3a (DNMT3a) in the N.Acc. of the EGFP and hM3Dq groups. Each column represents the mean with SEM ($n = 4-5$, $**p < 0.01$ vs. EGFP). (B) Relationship between the aversive state and CREB mRNA expressions levels. The data were subjected to a comparative analysis by testing the null hypothesis for the Pearson product moment correlation. (C) Changes in mRNA levels of oxytocin receptor (OXTR), glucocorticoid receptor (GR), corticotropin-releasing hormone receptors (CRHR1, CRHR2), catechol-*O*-methyltransferase (COMT), D2-R, tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), orexin receptors (OXR1, OXR2) and CREB in the VTA of the EGFP and hM3Dq groups.

Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci. Accepted. より引用

Table1 RT-PCR primer sequences

Primer	F/R	Sequence(5'-3')	bp
mGlu1	Forward	JCG GCT ACG TAT GCC CTT TC	135
	Reverse	TGC GTG CAA TAC GAT TGG TT	
mGlu2	Forward	GGC CAA GTT CAT CGG CTT TA	119
	Reverse	CGG ACA CGC ACA TCG TAG TG	
mGlu3	Forward	GGG AGC AAG GCT ACG CAA CA	120
	Reverse	ACA ACT CGC GCG TTA GGT TT	
mGlu4	Forward	ACG GCT CGG CTG AGT ACA AG	75
	Reverse	GCC ACT GCA TCC GCT CTA TT	
mGlu5	Forward	GGG CAG TCC GTG AGC AGT AT	90
	Reverse	TGG GCA AGA GTG TGG GAT CT	
mGlu6	Forward	TCA TGG TAG CCG AGC CTT GT	125
	Reverse	TTG CTC GAAAAT GCG GTA GA	
mGlu7	Forward	AAC CTG CTG CCC AAC GTA AC	100
	Reverse	TAA GCG CCT GGA CGA AAG TG	
mGlu8	Forward	AGC CAG GAG TAT GCG CAT TC	130
	Reverse	GTG TGT GGA TGC CCT TTT CC	
NR1	Forward	GCA CAC AGG AGC GGG TAA AC	120
	Reverse	GCG CAC GCT CAT TGT TAA TG	
NR2A	Forward	GGG TAC TCC AGC GCT GAA CA	130
	Reverse	TAA CGC CAC CAC GTT CAC AT	
NR2B	Forward	TGG AAA GTG GGA CCC TCT CA	122
	Reverse	CCC CTT GCA GCA TTT TTT GA	
NR2C	Forward	TGT AAG GCC TTC TGC ATC GA	120
	Reverse	ACC ATT CCA CAC ACC ACG AA	
NR2D	Forward	GGG TCT GCC ACA ACG ACA AA	145
	Reverse	CGC AGT CGC CAG TAC ACA AG	
GluR1	Forward	GTG GAC TGG AAG AGG CCA AA	112
	Reverse	CTC GCC GGG ATA TGT CAA TC	
GluR2	Forward	CAA GAG GCG TCT ATG CGA TTT	126
	Reverse	ATG GAT GCG TGC CAT CTG TT	
GluR3	Forward	GGG CCC TGG ACT CTG GTT CA	137
	Reverse	AAC TCG GGC TAC CCC ATC AG	
GluR4	Forward	TGT TGG GAA GCA CGT CAA AG	140
	Reverse	TGC TCA CCA TGG GCG TAT TA	
CREB	Forward	AGT GCC AAC CCC CAT TTA CC	101
	Reverse	ACC CCA TCC GTA CCA	
D1R	Forward	GGA TGA CAA CTG TGA CAC GA	83
	Reverse	TAA TGG CTA CGG GGA TGT AA	
D2R	Forward	CTG ACA GTC CTG CCA AAC CA	129
	Reverse	TGC GGC TCA TCG TCT TAA GG	
Adora2a	Forward	CCC ACA GCA AAT CCG TTG TC	90
	Reverse	CGT GGG TTC GGA TGA TCT TC	
Tac1	Forward	AAI CGA TGC CAA CGA TGA TCT	107
	Reverse	GGG CGA TTC TCT GCA GAA GA	
PDYN	Forward	TTT GGC AAC GGA AAA GAA TC	118
	Reverse	CAT AGC GTT TGG CCT GTT TT	
KOR	Forward	CCT TTT GGA GAT GTG CTA TGC A	100
	Reverse	TGT AGC GGT CCA CAC TCA TCA	
DNMT3a	Forward	GCC AAT AAC CAT GAC CAG GAA	117
	Reverse	CAG GAG CCC TGT AGC AAT CC	
GR	Forward	CAA GTG ATT GCC GCA GTG AA	114
	Reverse	GGC AAA TGC CAT GAG AAA CA	
COMT	Forward	GAC GCA AAA GGC CAA ATC AT	100
	Reverse	CCA TTC GCA CGG CTG AGT A	
OXTR	Forward	ACG CTC GCC GTC TAC AIT GT	95
	Reverse	GCC GTC TTG AGT CGC AGA TT	
CRHR1	Forward	GAT CAG CAG TGT GAG AGC CT	157
	Reverse	TGT TGT AGC GGA CAC CGT AG	
CRHR2	Forward	CAA GTA CAA CAC GAC CCG GA	106
	Reverse	CTG CTT GTC ATC CAA AAT GGG T	
TH	Forward	TTC GAG GAG AGG GAT GGA AA	118
	Reverse	GGT GGA TTT TGG CTT CAA ATG	
DAT	Forward	GCT GCT GGT GTC TGG AAG ATC	117
	Reverse	GTA GTG CAG TGC CCA TGC AA	
OXR1	Forward	CCC CAC TGG GCC TCA TG	55
	Reverse	CCC CAG AGC TTG CGG AAT A	
OXR2	Forward	TGC AAA GAC CAG AAG TAC AAC CA	60
	Reverse	CAG ATC CGA GCA CGA AGG AA	
GAPDH	Forward	CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA	108
	Reverse	GAT GCC TGC TTC ACC ACC TT	

【考察】

痛みは感覚的要素と感情的要素で構成される複雑な体験であり、不快情動は侵害受容性の刺激に対する感受性を高めることが知られている。持続的な知覚神経刺激は、嫌悪ならびに報酬の制御に重要な中脳辺縁ドーパミン神経系の投射先の 1 つである N.Acc. において、ドーパミンの産生ならびに代謝機能を低下させる一方で、N.Acc. へ投射するドーパミン神経の持続的な活性化は、痛覚過敏を抑制することが明らかになっている¹³。また、functional-MRI を用いた研究においては、痛みが長期的に続いている患者において N.Acc. における神経活動が低下し、鎮痛を行うことで低下した脳機能が改善することが明らかになっている⁶⁴。さらに、不快情動または嫌悪行動は、中脳辺縁神経経路におけるドーパミン伝達機能の低下を伴うことで誘発されることが広く知られている^{13, 65-71}。以上のことから、感情ならびに疼痛閾値の制御において重要な中脳辺縁ドーパミン神経系は、持続的な知覚神経刺激により機能低下を引き起こすことが明らかになっているものの、知覚神経刺激によるドーパミン神経機能低下に関するメカニズムについては未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、Gq-DREADD を介し、人為的な知覚神経刺激による、痛覚過敏反応ならびに条件付き場所嫌悪行動を誘発した条件下、N.Acc. ならびに VTA における遺伝子発現変動の解析を試みた。その結果、人為的な知覚神経刺激による嫌悪行動誘発条件下の N.Acc. において、転写調節因子である CREB mRNA 発現量の著しい減少が確認された。一方で、他の神経活動マーカーである mGluRs、NMDARs、AMPARs、dopamine receptors、Adra2a、Tac1、PDYN、KOR ならびに DNMT3a の mRNA 発現量に変化は認められなかった。さらに、VTA においても、OXTR、GR、CRHRs、D2-R、COMT、TH、DAT、OXRs ならびに CREB の mRNA 発現量に変化は認められなかった。一方で、N.Acc. における CREB mRNA 発現量と嫌悪行動の相

関解析を検討したところ、強い正の相関が認められた。過去の報告から、CREB が N.Acc. において主に dopamine D₁ receptor を発現する中型有棘神経細胞の下流分子として存在し、細胞興奮、シナプス可塑性および生存などの多様な細胞応答を調節していることが知られている⁷²⁻⁷⁶。以上のことから、知覚神経刺激により誘発される不快情動は、N.Acc. における神経活動の持続的な低下によって引き起こされている可能性が考えられる。

以上、本研究より、Gq-DREADD を介した持続的な知覚神経刺激は、場所嫌悪行動を誘発し、N.Acc. において神経特異的転写調節因子である CREB mRNA 発現量を減少させることが明らかになった。

【総括】

以上の結果の結論を以下に示す

第 1 章

本研究では、光遺伝学的手法を応用し、持続的な知覚神経刺激を与えた際の各脳領域における DA 含有量の変化を IMS を用いて検討した。その結果、持続的に人為的な知覚神経刺激を与えることで、N.Acc. における DA 含有量が減少することが明らかになった。一方で、中脳辺縁ドパミン神経系の起始核である VTA においては、新規合成された DA 産生量の減少ならびに、DA の代謝産物である 3-MT の減少が確認された。

第 2 章

本研究では、薬理遺伝学的手法である Gq-DREADD system を用いて、人為的に知覚神経刺激を与えた際の、嫌悪行動の発現ならびにメカニズムの解明を試みた。まず知覚神経刺激を与えた際の、嫌悪行動の発現を CPP 試験により検討した結果、知覚神経刺激を与えることで、嫌悪行動が誘発されることが明らかとなった。この条件下、嫌悪行動誘発メカニズムを解明する目的で、嫌悪行動が引き起こされたマウスの側坐核領域において、神経特異的転写調節因子である CREB mRNA 量の有意な減少が確認された。さらに、N.Acc. における CREB mRNA 発現量と嫌悪行動の相関解析を行ったところ、強い正の相関が認められた。一方で、腹側被蓋野においては、各種 mRNA 発現量に変化は認められなかった。

以上、本研究により、人為的な知覚神経刺激により中脳辺縁ドパミン神経機能が低下すること、さらには側坐核領域において CREB の発現低下を介して嫌悪行動が誘

発されることを明らかとした。こうした結果は、疼痛下において、二次的な情動障害の発症を抑え、また、高い QOL の維持のためにも、積極的な疼痛コントロールを行う必要性を示すエビデンスの 1 つになると考えられる。

【謝辞】

終わりに臨み、本研究に際し、ご多忙の中多大なるお力添えと熱意あふれるご指導を賜りました成田年主任教授に、深く感謝するとともに慎んで御礼申し上げます。

本稿作成を通じて、御心強い励ましと御助言さらにはご協力を賜りました森友久教授に深く感謝いたしますとともに厚く御礼申し上げます。

本稿作成を通じて、終始厳しく温かいご指導、御助言さらにはご協力を賜りました葛巻直子准教授に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本稿作成を通じて、終始熱心なご指導、御助言励ましを賜りました、芝崎真裕講師に深く感謝いたしますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本稿作成を通じて、終始厳しく温かいご指導、御助言そして恰好たるご観覧を賜りました成田道子女史に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本稿作成を通じて、日夜厳しく温かいご指導、御助言そして恰好たるご観覧を賜りました濱田祐輔助教に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、終始熱心な御指導、ご助言賜りました須田雪明特任助教に深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力くださり、御助言と御協力、さらには暖かい励ましを賜りました慶應義塾大学の杉浦悠毅専任講師、静岡県立大学の杉山栄二助教に心より御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、多大なる御助言と御助力下さいました佐藤大介大学院生、田中謙一大学院生、吉田小大学院生、浅野克典大学院生、及川大亮大学院生、香川玲

子大学院生、三賢春香大学院生、松本紘聡大学院生、山邊慶幸大学院生、をはじめ、薬理学研究室の研修生、専攻生に深く感謝致しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究に御協力下さり、一番近くで支えて下さいました櫻井究卒論生、田邊一貴卒論生、樋口京香卒論生、眞壁一志卒論生、水野貴章卒論生、上之郷悠人卒論生、飯塚麻純卒論生、清水遥奈卒論生、山下健介卒論生、田辺真凜卒論生に深く感謝致しますとともに心より御礼申し上げます。

本研究のため失われた多くの命に哀悼の意を表し、心よりご冥福をお祈り致します。

最後に、9年間の貴重な大学生活の場を与えて下さり、どんな時も支えとなり温かく見守って下さった家族に心から感謝致します。

【引用文献】

1. IASP. (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage: recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. **6**, 249
2. 南 雅文, 佐藤 公道. (2005) 「痛み」による「負の情動反応」における扁桃体の役割. *Folia Pharmacol. Jpn.* **125**, 5-9
3. Saisu, H., Igarashi, K., Narita, M., Ikegami, D., Kuzumaki, N., Wajima, K., Nakagawa, T., and Narita, M. (2015) Neuropathic Pain-Like Stimuli Change the Expression of Ribosomal Proteins in the Amygdala: Genome-Wide Search for a “Pain-Associated Anxiety-Related Factor”. *Jpn J Pharm Palliat Care Sci.* **8**, 47-57
4. Butler, R.K., Ehling, S., Barbar, M., Thomas, J., Hughes, M.A., Smith, C.E., Pogorelov, V.M., Aryal, D.K., Wetsel, W.C., and Lascelles, B.D.X. (2017) Distinct neuronal populations in the basolateral and central amygdala are activated with acute pain, conditioned fear, and fear-conditioned analgesia. *Neurosci Lett.* **661**, 11-17
5. Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.* **68**, 815-834
6. Adcock, R.A., Thangavel, A., Whitfield-Gabrieli, S., Knutson, B., and Gabrieli, J. D. (2006) Reward-motivated learning: mesolimbic activation precedes memory formation. *Neuron.* **50**, 507-517
7. Berridge, K.C. (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl).* **191**, 391-431
8. Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009) Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 4894-4899

9. Salamone, J.D., and Correa, M. (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. **76**, 470-485
10. Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*. **36**, 241-263
11. Lammel, S., Lim, B.K., and Malenka, R.C. (2014) Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*. **76**, 351-359
12. Holly, E.N., Miczek, K.A. (2016) Ventral tegmental area dopamine revisited: effects of acute and repeated stress. *Psychopharmacology*. **233**, 163-186
13. Watanabe, M., Narita, M., Hamada, Y., Yamashita, A., Tamura, H., Ikegami, D., Kondo, T., Shinzato, T., Shimizu, T., Fukuchi, Y., Muto, A., Okano, H., Yamanaka, A., Tawfik, V.L., Kuzumaki, N., Navratilova, E., Porreca, F., and Narita, M. (2018) Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Mol Pain*. **14**, 1744806918756406
14. Borsook, D., Linnman, C., Faria, V., Strassman, A.M., Becerra, L., and Elman, I. (2016) Reward deficiency and anti-reward in pain chronification. *Neurosci Biobehav Rev*. **68**, 282-297
15. Ferreri, L., Mas-Herrero, E., Zatorre, R.J., Ripollés, P., Gomez-Andres, A., Alicart, H., Olivé, G., Marco-Pallarés, J., Antonijoan, R.M., Valle, M., Riba, J., and Rodriguez-Fornells, A. (2019) Dopamine modulates the reward experiences elicited by music. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **116** (9), 3793-3798
16. Steidl, S., Wasserman, D.I., Blaha, C.D., and Yeomans J.S. (2017) Opioid-induced rewards, locomotion, and dopamine activation: A proposed model for control by mesopontine and rostromedial tegmental neurons. *Neurosci Biobehav Rev*. **83**, 72-82
17. Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenböck, G., Ting, A., and Schnitzer, M.J.

- (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci.* **26**, 10380-10386
18. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics. *Nat Methods.* **8**, 26-29
 19. Deisseroth, K. (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci.* **18**, 1213-1225
 20. Carlson, S.M., and White, F.M. (2012) Expanding applications of chemical genetics in signal transduction. *Cell Cycle.* **11**, 1903-9
 21. Armbruster, B.N., li, X., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 5163-8
 22. Berry, K.A., Hankin, J.A., Barkley, R.M., Spraggins, J.M., Caprioli, R.M., and Murphy, R.C. (2011) MALDI imaging of lipid biochemistry in tissues by mass spectrometry. *Chem Rev.* **111**, 6491-6512
 23. Benabdellah, F., Touboul, D., Brunelle, A., and Laprévotte, O. (2009) In situ primary metabolites localization on a rat brain section by chemical mass spectrometry imaging. *Anal Chem.* **81**, 5557-5560
 24. Hsieh, Y., Chen, J., and Korfmacher, W.A. (2007) Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **55**, 193-200
 25. Cornett, D.S., Frappier, S.L., and Caprioli, R.M. (2008) MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue. *Anal Chem.* **80**, 5648-5653
 26. Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J.L., Gillespie, T.A., and Caprioli, R.M. (2006) Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal Chem.* **78**, 6448-6456

27. Hoffman, D.C. (1989) The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. *Brain Res Bull.* **23**, 373-387
28. Schechter, M.D., and Calcagnetti, D.J. (1993) Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neurosci Biobehav Rev.* **17**, 2141
29. Shneor, D., Folberg, R., Pe'er, J., Honigman, A., and Frenkel, S. (2017) Stable knockdown of CREB, HIF-1 and HIF-2 by replication-competent retroviruses abrogates the responses to hypoxia in hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* **24**, 64-74
30. Lakhina, V., Arey, R.N., Kaletsky, R., Kauffman, A., Stein, G., Keyes, W., Xu, D., and Murphy, C.T. (2015) Genome-wide functional analysis of CREB/long-term memory-dependent transcription reveals distinct basal and memory gene expression programs. *Neuron.* **85** (2), 330-345
31. Nestler, E.J. (2013) Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* **15** (4), 431-443
32. Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002) Neurobiology of depression. *Neuron.* **34** (1), 13-25
33. Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev.* **56**, 27–78
34. Taylor, A.M.W., Becker, S., Schweinhardt, P., and Cahill, C. (2016) Mesolimbic dopamine signaling in acute and chronic pain: implications for motivation, analgesia, and addiction. *Pain.* **157**, 1194–1198

35. Danjo, T., Yoshimi, K., Funabiki, K., Yawata, S., and Nakanishi, S. (2014) Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 6455–6460
36. Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., and Bonci, A. (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron.* **76**, 790–803
37. Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron.* **68**, 815–834
38. Tritschler, L., Kheirbek, M.A., Dantec, Y.L., Mendez-David, I., Guilloux, J.P., Faye, C., Doan, J., Pham, T.H., Hen, R., David, D.J., and Gardier, A.M. (2018) Optogenetic activation of granule cells in the dorsal dentate gyrus enhances dopaminergic neurotransmission in the Nucleus Accumbens. *Neurosci Res.* **134**, 56-60
39. Ren, W., Centeno, M.V., Berger, S., Wu, Y., Na, X., Liu, X., Kondapalli, J., Apkarian, A.V., Martina, M., and Surmeier, D.J. (2016) The indirect pathway of the nucleus accumbens shell amplifies neuropathic pain. *Nat Neurosci.* **19**, 220–222
40. Sarkis, R., Saadé, N., Atweh, S., Jabbur, S., and Al-Amin, H. (2011) Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two rat models I: behavioral effects and role of nucleus accumbens. *Exp Neurol.* **228**, 19–29
41. Danjo, T., Yoshimi, K., Funabiki, K., Yawata, S., and Nakanishi, S. (2014) Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine

- neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **111**, 6455–6460
42. Moriya, S., Yamashita, A., Kawashima, S., Nishi, R., Yamanaka, A., and Kuwaki, T. (2018) Acute aversive stimuli rapidly increase the activity of ventral tegmental area dopamine neurons in awake mice. *Neuroscience.* **386**, 16–23
 43. Ungless, M.A., Magill, P.J., and Bolam, J.P. (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science.* **303**, 2040–2042
 44. Iyer, S.M., Montgomery, K.L., Towne, C., Lee, S.Y., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., and Delp, S.L. (2014) Virally mediated optogenetic excitation and inhibition of pain in freely moving nontransgenic mice. *Nat Biotechnol.* **32**, 274–278.
 45. Watanabe, M., Sugiura, Y., Sugiyama, E., Narita, Michiko, Navratilova, E., Kondo, T., Uchiyama, N., Yamanaka, A., Kuzumaki, N., Porreca, F., and Narita, M. (2018) Extracellular N-acetylaspartylglutamate released in the nucleus accumbens modulates the pain sensation: analysis using a microdialysis/mass spectrometry integrated system. *Mol Pain.* **14**, 174480691875493
 46. Shariatgorji, M., Nilsson, A., Goodwin, R.J.A., Källback, P., Schintu, N., Zhang, X., Crossman, A.R., Bezard, E., Svenningsson, P., and Andren, P.E. (2014) Direct targeted quantitative molecular imaging of neurotransmitters in brain tissue sections. *Neuron.* **84**, 697–707
 47. Morikawa, T., Kajimura, M., Nakamura, T., Hishiki, T., Nakanishi, T., Yukutake, Y., Nagahata, Y., Ishikawa, M., Hattori, K., Takenouchi, T., Takahashi, T., Ishii, I.,

- Matsubara, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., Nagata, E., Gadalla, M.M., Snyder, S.H., and Suematsu, M. (2012) Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 1293–1298
48. Karoum, F., Korpi, E.R., Linnoila, M., Chuang, L.W., and Wyatt, R.J. (1984) Reduced metabolism and turnover rates of rat brain dopamine, norepinephrine and serotonin by chronic desipramine and zimelidine treatments. *Eur J Pharmacol.* **100**, 137–144
49. Kilts, C.D., and Anderson, C.M. (1987) Mesoamygdaloid dopamine neurons: differential rates of dopamine turnover in discrete amygdaloid nuclei of the rat brain. *Brain Res.* **416**, 402–408
50. Ortiz, A.N., Kurth, B.J., Osterhaus, G.L., and Johnson, M.A. (2010) Dysregulation of intracellular dopamine stores revealed in the R6/2 mouse striatum. *J Neurochem.* **112**, 755–761
51. Kai-Kai, M.A. (1984) Ultrastructural localization of [3H] dopamine in neurons of leech (*Haemopsis sanguisuga*) abdominal ganglia. *Comp Biochem Physiol C.* **78**, 363–367
52. Matsuzawa-Yanagida, K., Narita, M., Nakajima, M., Kuzumaki, N., Niikura, K., Nozaki, H., Takagi, T., Tamai, E., Hareyama, N., Terada, M., Yamazaki, M., and Suzuki, T. (2008) Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology.* **33** (8), 1952-1965

53. Kato, T., Ide, S., and Minami, M. (2016) Pain relief induces dopamine release in the rat nucleus accumbens during the early but not late phase of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* **629**, 73–78
54. Navratilova, E., Atcherley, C.W., and Porreca, F. (2015) Brain circuits encoding reward from pain relief. *Trends Neurosci.* **38**, 741–750
55. Hashmi, J.A., Baliki, M.N., Huang, L., Baria, A.T., Torbey, S., Hermann, K.M., Schnitzer, T.J., and Apkarian, A.V. (2013) Shape shifting pain: chronification of back pain shifts brain representation from nociceptive to emotional circuits. *Brain.* **136** (Pt 9), 2751-2768
56. Coimbra, B., Soares-Cunha, C., Vascibcelos, N.A.P., Domingues, A.V., Borges, S., Sousa, N., and Rodrigues, A.J. (2019) Role of laterodorsal tegmentum projections to nucleus accumbens in reward-related behaviors. *Nat Commun.* **10**, 4138
57. Narita, M., Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, M., Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., and Suzuki, T. (2006) Direct Involvement of Orexinergic Systems in the Activation of the Mesolimbic Dopamine Pathway and Related Behaviors Induced by Morphine. *J Neurosci.* **26**, 398-405
58. Camarini, R., Hoffmann, L.B., Suarez, A., Rae, M., Marcourakis, T., and Pautassi, R.M. (2019) Cocaine-induced behavioral sensitization is greater in adolescent than in adult mice and heightens cocaine-induced conditioned place preference in adolescents. *Pharmacol Biochem Behav.* **181**, 60-68
59. Li, H., Li, C., Zhou, Y., Luo, C., Ou, J., Li, J., and Mo, Z. (2018) Expression of microRNAs in the serum exosomes of methamphetamine-dependent rats vs.

- ketamine-dependent rats. *Exp Ther Med.* **15**, 3369-3375
60. Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 5163-5168
 61. Carlson, S.M., and White, F.M. (2012) Expanding applications of chemical genetics in signal transduction. *Cell Cycle.* **11**, 1903-1909
 62. Yamashita, A., Hamada, A., Suhara, Y., Kawabe, R., Yanase, M., Kuzumaki, N., Narita, M., Matsui, R., Okano, H., and Narita, M. (2014) Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. *Synapse.* **68**, 235-47
 63. Suzuki T, Masukawa Y, Misawa M. (1990) Drug interactions in the reinforcing effects of over-the-counter cough syrups. *Psychopharmacology.* **102**, 438-442
 64. Zhang, S., Li, T., Kobinata, H., Ikeda, E., Ota, T., and Kurata, J. (2018) Attenuation of offset analgesia is associated with suppression of descending pain modulatory and reward systems in patients with chronic pain. *Mol Pain.* **14**, 1744806918767512
 65. Porreca, F., and Navratilova, E. (2017) Reward, motivation and emotion of pain and its relief. *Pain.* **158** (Suppl 1), S43-S49
 66. Baliki, M.N., and Apkarian, A.V. (2015) Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron.* **87** (3), 474-91
 67. Takahashi, D., Asaoka, Y., Kimura, K., Hara, R., Arakaki, S., Sakasai, K., Suzuki, H., Yamauchi, N., Nomura, H., Amano, T., and Minami, M. (2019) Tonic Suppression of the Mesolimbic Dopaminergic System by Enhanced Corticotropin-Releasing Factor Signaling Within the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in Chronic Pain Model Rats. *J*

Neurosci. **39** (42), 8376-8385

68. Zhou, H., Martinez, E., Lin, H.H., Yang, R., Dale, J.A., Liu, K., Huang, D., and Wang, J. (2018) Inhibition of the Prefrontal Projection to the Nucleus Accumbens Enhances Pain Sensitivity and Affect. *Front Cell Neurosci.* **12**, 240
69. Descalzi, G., Mitsi, V., Purushothaman, I., Gaspari, S., Avrampou, K., Loh, Y.E., Shen, L., and Zachariou, V. (2017) Neuropathic pain promotes adaptive changes in gene expression in brain networks involved in stress and depression. *Sci Signal.* **10** (471), eaaj1549
70. Zhang, Q., Manders, T., Tong, A.P., Yang, R., Garg, A., Martinez, E., Zhou, H., Dale, J., Goyal, A., Urien, L., Yang, G., Chen, Z., and Wang, J. (2017) Chronic pain induces generalized enhancement of aversion. *eLife.* **6**, e25302
71. Wu, X.B., He, L.N., Jiang, B.C., Wang, X., Lu, Y., and Gao, Y.J. (2019) Increased CXCL13 and CXCR5 in Anterior Cingulate Cortex Contributes to Neuropathic Pain-Related Conditioned Place Aversion. *Neurosci Bull.* **35** (4), 613-623
72. Chandra, R., Francis, T.C., Konkalmatt, P., Amgalan, A., Gancarz, A.M., Dietz, D.M., and Lobo, M.K. (2015) Opposing role for Egr3 in nucleus accumbens cell subtypes in cocaine action. *J Neurosci.* **35** (20), 7927-7937
73. Walters, C.L., Kuo, Y.C., and Blendy, J.A. (2003) Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem.* **87** (5), 1237-1244
74. Cohen, S.M., Ma, H., Kuchibhotla, K.V., Watson, B.O., Buzsáki, G., Froemke, R.C., and Tsien, R.W. (2016) Excitation-Transcription Coupling in Parvalbumin-Positive

Interneurons Employs a Novel CaM Kinase-Dependent Pathway Distinct from Excitatory Neurons. *Neuron*. **90** (2), 292-307

75. Muschamp, J.W., and Carleson, W.A. Jr. (2013) Roles of nucleus accumbens CREB and dynorphin in dysregulation of motivation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **3** (2), a012005
76. Mak, S.O.K., Zhang, L., and Chow, B.K.C. (2019) In vivo actions of SCTR/AT1aR heteromer in controlling Vp expression and release via cFos/cAMP/CREB pathway in magnocellular neurons of PVN. *FASEB J*. **33** (4), 5389-5398