

令和元年6月13日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14938

研究課題名(和文) 行動の意欲をコントロールするドーパミン報酬系の神経回路ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of neuronal circuit mechanisms regulating motivated behavior in the dopamine reward system

研究代表者

松本 英之 (Matsumoto, Hideyuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50511383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：中脳ドーパミン細胞とその軸索投射脳領域からなる神経回路網は、意欲制御の情報処理において重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、動物の行動開始の意欲を動的に変化させる自由行動課題を確立し、大規模な単一細胞活動計測法と光遺伝学を組み合わせて中脳ドーパミン細胞の活動を同定しながら、動物が自ら意欲的に行動するときの腹側被蓋野ニューロンの情報処理を調べた。その結果、腹側被蓋野ニューロンの活動は多様であり、意欲の大きさに関連した応答を示す同定細胞があることがわかった。本研究成果は、中脳ドーパミンシステムがどのように意欲を適切に制御するのか、神経回路レベルの理解に貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

意欲の制御に関わる神経細胞種の活動を確実に同定することで、神経回路レベルの具体的な情報処理機構を解明できると期待される。

電気生理学と光遺伝学を組み合わせた本研究技術を用いることで、意欲やその他のさまざまな脳機能に関する情報処理のメカニズムを高い時間・空間解像度から明らかにできると期待される。

将来的に、意欲などに異常がみられる精神障害に対する治療ターゲット(神経回路)が明確になり、副作用の少ない医療応用につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that information processing in the midbrain dopamine system plays important roles in regulating motivated behavior. However, the relationships and causalities between neuronal activities of specific cell-types and specific aspects of motivated behavior remain elusive. Combining in vivo large-scale single-neuron recordings and optogenetics, we unambiguously discriminated dopamine from non-dopamine neurons while recording from ventral tegmental area when animals freely performed a self-paced decision-making task. We found the diversities of ventral tegmental area neurons depending on the vigor of motivation. Our results will reveal the circuit level mechanisms for the regulation of motivated behavior with super-high temporal resolutions and cell-type specificities.

研究分野：システム神経生理学

キーワード：電気生理学 光遺伝学 神経回路 ドーパミン系 ドーパミン細胞 意欲 学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

意欲・やる気を生み出すメカニズムを理解するには、複数の脳領域をまたがる神経回路網の情報処理を理解することが重要であると考えられる。しかし、神経回路網を構成するさまざまな種類の神経細胞が、意欲を適切に制御するためにどのような情報処理を行なっているのかはよくわかっていない。また、適切に意欲を発揮するためには、脳領域間の神経細胞同士が神経回路を介して相互作用し、協調して働くことが重要であると考えられるが、そのような脳領域をまたがる情報伝達に関してもよくわかっていない。

中脳の腹側被蓋野と黒質緻密部に散在するドーパミン細胞は、報酬系の各脳領域に軸索を投射し、意欲の形成において中心的な役割を担うと考えられている。これまで、古典的条件付け課題を用いた電気生理学的研究によって、報酬学習におけるドーパミン細胞の活動とその役割についてよく調べられてきた。一方で、意欲に関わるドーパミン細胞の活動に関しては不明な点が多く、先行研究の間で一貫した結果が得られてこなかった。この原因の一つに、従来の研究手法ではドーパミン細胞のスパイク発火活動を直接的かつ確実に調べることが難しい点が考えられた。また、近年の研究からドーパミン細胞は投射先別に異なる機能情報を伝達していることが明らかになりつつある。このことから、ドーパミン系は投射回路別に意欲に関わる異なる情報を伝達している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では意欲形成に重要な中脳ドーパミン細胞とその投射脳領域に着目し、動物が意欲的に行動しているときの神経活動を記録し、さらに記録している細胞タイプを同定することで、意欲を制御する神経回路機構を理解することを目的とした。具体的に、以下の二つの研究目的を立てた。

(1) 電気生理学と光遺伝学を組み合わせ、腹側被蓋野や黒質の単一ニューロン活動を大規模計測しながらドーパミン神経細胞特異的な活動を確実に同定する技術を開発する。

(2) 上記の細胞種同定技術を自由行動中の動物に適用し、動物が意欲的に行動するときの中脳ドーパミン細胞と非ドーパミン細胞の活動を大規模計測し、その情報処理機構を調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞種特異的な活動の同定

電気生理学的に記録された多くの細胞活動の中からドーパミン細胞の活動を確実に同定するため、ドーパミン細胞種特異的に光感受性陽イオンチャネルのチャネルロドプシン (ChR2) を発現させ、青色光照射に対する活動電位発生の有無を調べる (Matsumoto et al., 2016)。ドーパミン細胞種特異的に Cre 組換え酵素を発現させる BAC トランスジェニックラット (TH-cre ラット; Witten et al., 2011) を用意し、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を腹側被蓋野に微量注入 (1 μ l) し、Cre 組換え酵素依存的に ChR2 を発現させる。フッ化水素を用いて先端を尖らせた光ファイバー (コア径 75 μ m) を 64 チャンネルのシリコンプローブ多点電極に貼り合わせ (Stark et al., 2012) 腹側被蓋野に刺入し、大規模な神経活動計測を行う。行動実験の前後に光ファイバーから青色光を照射し、光照射に対して活動電位を発生させる細胞がいるかどうか確認する。またドーパミン細胞の投射先である線条体や前頭前皮質に光ファイバーを複数本刺入し、投射先特異的にドーパミン細胞の活動を操作する。

(2) 行動課題

動物が報酬獲得に向けて自由に試行開始する行動課題を利用し、各試行開始までの時間を行動開始の意欲を表す指標として用いる (Wang et al., 2013; Hamid et al., 2016)。動物は自分の好きなペースで試行を開始し、報酬確率あるいは報酬量の異なる選択ポートのうちのどちらか一方を選択し、報酬を得る。各ポートが与える報酬量は試行ブロック単位 (40-60 試行) で独立して変化する。動物行動を客観的に評価するため、ビデオや近赤外センサ、加速度計を用いて行動を記録する。

4. 研究成果

(1) 電気生理学と光遺伝学を組み合わせたドーパミン細胞同定技術の精度を調べるため、ChR2 がドーパミン細胞に特異的に発現しているかどうかまず検討した。TH-cre ラットの腹側被蓋野にウイルスを注入して二週間後と四週間後に動物を灌流固定し、脳切片を作製、観察した。すると、ウイルス注入して二週間後には腹側被蓋野にある神経細胞において ChR2 の発現が観察された。ドーパミン細胞のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の発現を調べると、ChR2 で標識された腹側被蓋野ニューロンのほぼ全てが TH 陽性であることがわかった。したがって、本研究で利用する細胞同定法によりドーパミン細胞と非ドーパミン細胞を非常に高い精度から区別できると考えられた。

(2) ドーパミン細胞の投射先脳領域の光照射によってドーパミン細胞の活動を投射先特異的に操作するためには、投射する軸索に光感受性のオプシンが発現していることが前提となる。この検討のため、ウイルス注入した上記の脳の全脳切片を作製し、ChR2 陽性の軸索を観察した。その結果、線条体や側坐核、内側前頭前野、扁桃体において ChR2 で標識された軸索が観察され

た。これらの軸索は TH 陽性であった。すなわち、腹側被蓋野ドーパミン細胞の投射先として知られるほぼ全ての脳領域において、Chr2 陽性かつ TH 陽性の軸索が観察された。また、AAV の複数のセロタイプを用いて同様の免疫組織学的な解析を行い、ドーパミン神経軸索におけるオプシンの発現が最も強いセロタイプを同定した。以上の検討により、光遺伝学を用いてドーパミン細胞種の活動を操作する実験の効率化を図ることができたと考えられる。

(3) ドーパミン細胞の活動を同定するため、シリコンプローブ多点電極に貼り付けた光ファイバーおよび投射先に刺入した光ファイバーより光照射を行なった。シリコンプローブに貼り付けた光ファイバーから光照射すると、5 ミリ秒以内に活動電位を発生させる細胞がいた。光照射に対する活動電位の発生確率が高いこと、光照射で発生した活動電位と自発的な活動電位の waveform 相関が高いこと、また光照射から活動電位発生までの潜時の揺らぎが極小であることを基準として、これらを満たす細胞をドーパミン細胞と同定した。このような特性は、テトロド電極を利用して細胞種の同定を行なった先行研究の結果 (例えば Matsumoto et al., 2016) と一致しており、シリコンプローブ等の多点電極でも効率よくドーパミン神経細胞種を同定できることがわかった。次に、投射先脳領域を光照射すると、計測された細胞のうちのいくつかが約 10-15 ミリ秒後に活動電位を発生させた。この投射先光照射によって生じる活動電位は、投射先毎にほぼ一定の潜時を示した。また、自発的な活動電位が発生した直後の光照射では活動電位が観察されなかった。このことは、光照射によって軸索で発生して細胞体へ向かう活動電位が、細胞体で発生して軸索へ向かう自発的な活動電位と衝突して消失する現象を検出したと考えられる (スパイク衝突試験; Guyenet and Aghajanian, 1978)。以上の実験技術を用いることで、多点電極を用いて大規模な神経活動同時記録を行いながら、特定の細胞種を同定したり、投射先別に活動を操作できると考えられる。このようなサブミリ秒の時間解像度で大規模単一細胞活動を計測しつつ、特定の神経回路の活動を同定したり操作できる技術は、神経回路網における情報処理機構の解明に大きく貢献すると考えられる。

(4) 動物が報酬獲得に向けて自由に試行開始する行動課題を確立した。ラットが試行を開始するまでの時間を計測すると、報酬獲得の確率が低い時間帯では試行開始までの時間が長くなり、報酬獲得の確率が高い時間帯では開始時間は短くなった。また、選択肢から予測される報酬確率を経時的にランダムに変化させると、動物は試行錯誤を通して報酬期待値の高い選択肢を選択する行動を示した。以上の結果から、動物は報酬環境の変化を試行錯誤によって学習し、行動開始意欲を適応的に変化させることが示唆された。

(5) この行動課題中の神経活動を調べるため、シリコンプローブ多点電極を用いて行動課題中に関連脳領域から大規模な単一細胞活動計測を行った。セミオートマチックなクラスタリング法を用いて、多チャンネルから記録された電位変化からスパイクをソーティング・クラスタリングする手法を確立した。動物の意欲状態や行動課題の各イベントに対する神経活動を解析した結果、例えば腹側被蓋野には報酬に関する情報をコードするニューロンが多く存在した。これらの細胞は期待される報酬の大きさによって応答を変化させ、その変化は試行開始時間と相関していた。この結果から、腹側被蓋野ニューロンは意欲的行動に関わる情報をコードし、その応答パターンは多様であることが示唆された。

(6) 次に、神経回路レベルの情報処理機構を理解するため、光遺伝学的手法を組み合わせ、活動計測された細胞の種類 (神経回路) の同定あるいは活動の操作を行った。ドーパミン細胞特異的な活動を調べると、報酬予測誤差以外の情報をコードする non-canonical なタイプが存在し、そのサブ細胞の一つは意欲的行動に相関して応答を変化させることが示唆された。本研究成果は、中脳ドーパミンシステムがどのように意欲を適切に制御するのか、神経回路レベルからの理解に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Ishikawa, T., Miura, K., Matsumoto, H. (2019) Identification of midbrain dopamine neurons using features from spontaneous spike activity patterns. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* (Accepted) (査読有)
- (2) Saito, H., Nishizumi, H., Suzuki, S., Matsumoto, H., Ieki, N., Abe, T., Kiyonari, H., Morita, M., Yokota, H., Hirayama, N., Yamazaki, T., Kikusui, T., Mori, K., Sakano, H. (2017) Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. *Nature communications* 8, 16011. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 三浦佳二、石川剛史、松本英之 第 42 回日本神経科学大会 / 第 62 回日本神経化学大会 (NEURO2019) 「自発電気活動に基づくドーパミンと非ドーパミンニューロンの判別」、新潟市、2019 年 7 月 26 日
- (2) 松本英之、水関健司 第 42 回日本神経科学大会 / 第 62 回日本神経化学大会 (NEURO2019)

「報酬に基づく意思決定における腹側被蓋野ニューロンの情報処理」、新潟市、2019年7月25日

- (3) Hideyuki Matsumoto, 新学術領域研究「意志動力学(ウィルダイナミクス)の創成と推進」第2回全体会議 “Context-dependent dopamine signaling in willpower regulation.” 秋葉原UDXカンファレンス、東京、2019年7月9日
- (4) Hideyuki Matsumoto, 新学術領域研究「人工知能と脳科学の対照と融合」第6回領域会議 “Pathway-specific roles of midbrain dopamine neurons in value-based decision-making.” 玉川大学、町田市、2019年5月15日
- (5) 松本英之、平成30年度生理学研究所研究会(情動の神経回路機構とその破綻)「中脳ドーパミンニューロンの報酬コンテキストに依存した信号モード変化」、生理学研究所、岡崎市、2018年9月18日
- (6) 松本英之、関西学院大学理工学部講演会「柔軟に学習する脳のしくみ：意思決定におけるドーパミン信号の役割」、三田市、2018年6月13日
- (7) 松本英之、第15回生物と行動セミナー「学習および動機づけに関するドーパミン神経系の情報処理機構」、大阪大学、2018年3月16日
- (8) 松本英之、第19回光科学若手研究会「オプトジェネティクスを用いた脳機能解析」、大阪市立大学、2017年11月11日
- (9) 松本英之、第2回脳と心の研究会「報酬系における環境適応的な価値表現」、京都大学、京都、2017年8月27日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

大阪市立大学大学院医学研究科 神経生理学

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/physiology2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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。