

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06346

研究課題名(和文)報酬待機行動を促進させるセロトニンを制御する脳内回路：光操作とCa画像化での検証

研究課題名(英文)The brain circuit mechanism for controlling the serotonin to promote the waiting behavior for future rewards : The verification by combination of calcium imaging and optogenetics.

研究代表者

宮崎 佳代子 (Miyazaki, Kayoko)

沖縄科学技術大学院大学・神経計算ユニット・グループリーダー

研究者番号：80426577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Inscopix nVistaによるカルシウムイメージングで背側縫線核セロトニン神経活動を記録することに成功し、現在マウスが行動課題遂行中に神経活動記録を行っている段階である。またこの実験と並行して新たにファイバーフォトメトリーシステムを用いた背側縫線核セロトニン神経活動記録を行い、報酬待機中及び報酬提示時に発火頻度が上昇することを確認した。今後も引き続き両実験を続ける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は常に変化する環境に適応しながら報酬を獲得し罰を回避することでその生存を維持していますが、将来的な報酬を待つ場合、その報酬の内的な価値や確率によって獲得行動に至る意思決定は様々に変化します。このプロセスにセロトニンが重要であることを私達はこれまでに突き止めており、本研究ではこの詳細な脳内メカニズムを明らかにします。この研究は意思決定を担う脳基盤におけるセロトニンの動的な役割を照らし出すもので、将来的にうつなどセロトニンが関わる精神疾患を生じさせる神経基盤の解明に寄与できると考えています。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in recording the serotonin neural activity in the dorsal raphe nucleus (DRN) by calcium imaging with Inscopix nVista. Now we are in the stage of recording the neural activity during the several behavioral tasks. In parallel with this experiment, we have started the recording of the population of serotonin neural activity in DRN using a fiber photometry system. In that experiment, it was confirmed that the firing frequency increased while waiting for rewards and when acquiring the rewards. We plan to continue both experiments in the future.

研究分野：神経科学

キーワード：セロトニン 辛抱強さ 報酬 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

神経修飾物質の一つであるセロトニンはこれまでうつ病や注意欠陥多動性障害などの衝動性を伴う精神疾患との関連が報告されている。ヒトや動物を用いた行動実験等の先行研究から嫌悪や罰が予測される行動を抑制することに関わるという見解がこれまで多く示されてきた。しかし一方で矛盾する報告も多く、認知や行動制御におけるセロトニンの機能的役割について新たな枠組みでの考察が求められている。

申請者らはこれまで *in vivo* のラット及びマウスを用いた複数の実験で背側縫線核セロトニン神経活動の働きについて詳細に調べてきた。その結果背側縫線核セロトニン神経が活動を高めることで遅延報酬のための待機行動を維持する辛抱強さが促進されるという独自の知見を得た。さらに背側縫線核セロトニンニューロンの活動は、報酬が出るまで「待ち続けるか」、或いはもう「諦めるか」の意思決定のタイミングで強く影響を与えることも突き止めた。このユニークなセロトニンの役割はこれまで不明瞭であった意欲低下や衝動性を含む精神疾患のメカニズムの中でセロトニンがどのように機能しているかを理解する上で重要な知見となった。「この神経活動はどのような神経回路メカニズムで生じるのか？」これは今後精神医療や工学分野への応用のために有益な結果が期待される問いである。本研究では背側縫線核へ強く投射する複数の脳領域に着目し、このメカニズムを探索する。

2. 研究の目的

本研究は光操作技術を各脳部位に用いて不活性化のタイミングを光照射により制御しながら、同時に内視鏡型蛍光顕微鏡 (Inscopix nVista) によるカルシウムイメージングで報酬待機行動中の背側縫線核のセロトニン細胞群の活動を記録することで、注目する脳部位からの入力ならびにセロトニン細胞群の活動パターンがどのように動物の待機時間に影響を及ぼしているかを明らかにすることを目的とする。

将来の報酬のための待機行動における時間的な辛抱強さを調節するという背側縫線核セロトニンの新たな機能的役割を申請者らはこれまでの研究で見出したが、背側縫線核へは内側前頭前野、前頭眼窩野、手綱核からの強い投射入力があり、それらが背側縫線核で統合され、いつ得られるか分からない報酬のためにどれくらい待つかの意思決定に繋がっていることが予測される。各脳部位の神経活動がどのように待機行動に影響を与えるのかを捉える上で、従来の薬理的方法では部位特異的ではあるが継続的に不活性化するためこの観察が不可能であった。本研究では上記の技術を用いることでこの問題を克服し、精度よく各脳領域からの入力信号を制御しつつセロトニン神経活動を観察する。

3. 研究の方法

行動課題

オペラントボックスの一面に音サイト、反対面に一定時間ノーズポークを続けることで餌が得られる餌サイトを設置した(図 1A)。室内灯点灯後、マウスが音サイトにノーズポークし音提示されることで各試行が開始される。音提示後、反対面の餌サイトにノーズポークし、遅延時間中その状態を維持できれば報酬待機成功で 1 粒の餌が提示される(図 1B)。実験では 3 秒、6 秒、9 秒そして無報酬(遅延無制限)の 4 つの遅延時間条件を提示する。1 回のテストで 40 試行、各条件を同数回ランダムに繰り返す。

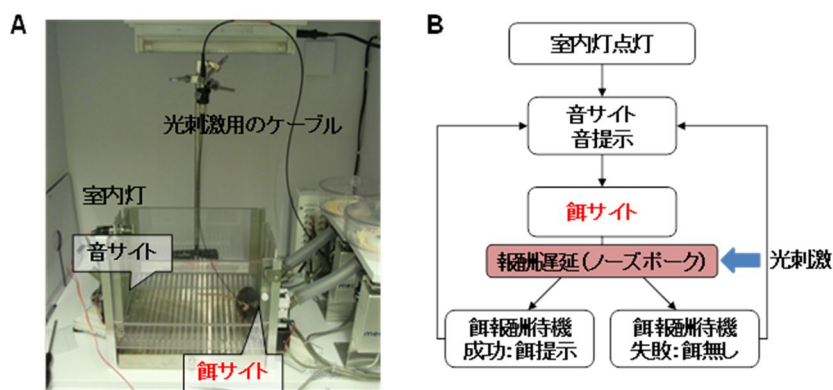


図 1. オペラントチャンバーと行動課題

Insopix nVista による神経活動観察

遅延報酬待機課題中、注目する脳領域から重要なタイミングでの投射入力を断たれたとき背側縫線核セロトニン神経活動がどのような活動パターンを示すかを調べる。遅延報酬待機課題を学習させたマウスの背側縫線核に逆行性ウイルスベクターを注入する。その後注目脳領域上に光刺激用プローブを、背側縫線核上部に Insopix nVista を装着するためのベースプレートを設置する手術を行う(図 2)。約 1 週間マウスの回復を待ってから行動実験を開始する。1 テスト 40 試行で遅延報酬待機課題を行う。実験 2 で調べた報酬待機時間が最も短くなったタイミングで緑色光を照射し注目脳領域から背側縫線核に投射する神経活動を選択的に抑制する。このときセロトニン神経細胞群の活動パターンがどのように変化するかを Insopix nVista を用いたカルシウムイメージングで詳細に観察する。コントロールとして 40 試行のうち半数では緑色光照射を行わない。

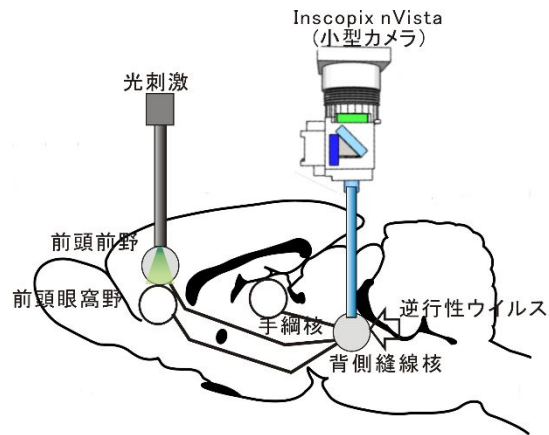


図 2. 光刺激用プローブ、Inscopix nVista 設置図

4. 研究成果

Inscopix nVista によるカルシウムイメージング

研究開始当初は、トリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (Tph2) プロモーターの制御下でテトラサイクリン制御転写活性化因子 (tTA) を発現する遺伝子改変マウス (Tph2-tTA マウス) と Tet オペレーター配列とカルシウムセンサーたんぱく質 GCaMP6s を発現する遺伝子改変マウス (tetO-GCaMP6s マウス) を交配して 2 つの遺伝子を発現した遺伝子改変マウス (Tph2-tTA:: tetO-GCaMP6s) を用いて Inscopix nVista を用いたカルシウムイメージングを行った。Tph2-tTA:: tetO-GCaMP6s マウスはセロトニン神経に安定的に GCaMP6s を発現していることが利点であったが、GCaMP6s の発現量が十分でなくセロトニン神経のカルシウムイメージングが困難であった。そこで GCaMP6 の発現量を増やすために、Tph2-tTA マウスの背側縫線核に AAV9-tetO-GCaMP6 ウイルス注射することを試みた。その結果、GCaMP6 の発現量が増加し、自由行動下マウスの背側縫線核セロトニン神経のカルシウムイメージングに成功した (図 3)

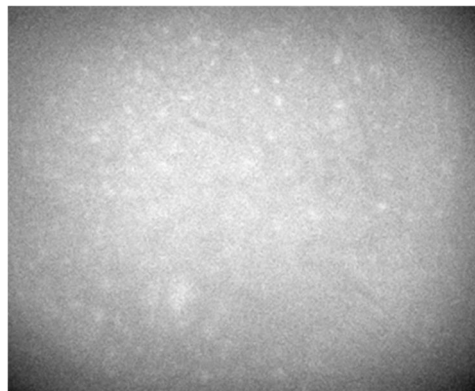


図 3. Inscopix nVista によるセロトニン神経カルシウムイメージング

新たに行った実験：ファイバーフォトメトリーによる背側縫線核神経活動記録

脳深部に位置する背側縫線核からの Inscopix によるカルシウムイメージングはこれまでに報告例が少なく、技術的課題から記録可能になるまでに予想以上に時間を要した。背側縫線核全体でのセロトニン神経の挙動について観察するため、本実験と並行してファイバーフォトメトリー（※）による神経活動記録も開始した。

実験では背側縫線核からセロトニン神経を選択的に記録するために、トリプトファンヒドロキシラーゼ2 (Tph2) プロモーターの制御下でテトラサイクリン制御転写活性化因子 (tTA) を発現する遺伝子改変マウス (Tph2-tTA マウス) を使用した。Ca 指示薬 GCaMP6 は、AAV9-tetO-GCaMP6 ウイルスを背側縫線核に注射することによってセロトニン神経細胞選択的に発現される (Tph2-GCaMP マウス)。Tph2-GCaMP マウスの背側縫線核に光プローブを埋め込み、遅延報酬課題遂行中にセロトニン神経活動を観察したところ (図4)、報酬待機期間と報酬提示時にセロトニン神経活動の増加が見られた (図5)。

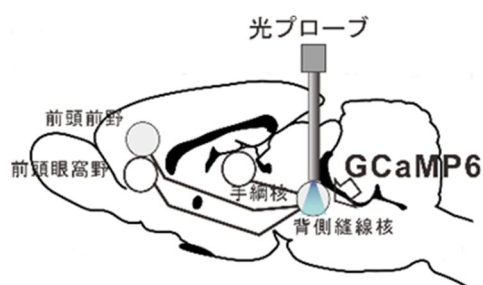


図4. 背側縫線核への神経活動記録用光プローブ設置図

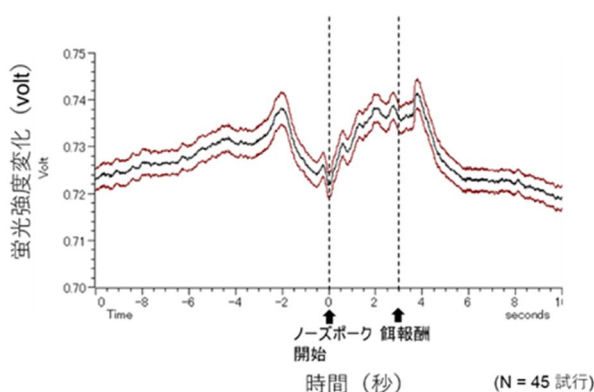


図5. 遅延報酬課題中の背側縫線核セロトニン神経活動

ファイバーフォトメトリー：動物脳内に埋め込まれた光ファイバークニューラを通して蛍光カルシウムマーカーでタグ付けされたニューロンに励起光を送り、その蛍光を収集し解析する方法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki K*, Miyazaki KW*, Yamanaka A, Tokuda T, Tanaka KF, Doya K *These authors contributed equally to this work.	4. 巻 9
2. 論文標題 Reward probability and timing uncertainty alter the effect of dorsal raphe serotonin neurons on patience	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-04496-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Katsuhiko, Miyazaki Kayoko W., Sivori Gaston, Yamanaka Akihiro, Tanaka Kenji F., Doya Kenji	4. 巻 6
2. 論文標題 Serotonergic projections to the orbitofrontal and medial prefrontal cortices differentially modulate waiting for future rewards	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc7246 ~ 7246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc7246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Doya Kenji, Miyazaki Kayoko W, Miyazaki Katsuhiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Serotonergic modulation of cognitive computations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Behavioral Sciences	6. 最初と最後の頁 116 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cobeha.2021.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Miyazaki KW, Miyazaki K, Yamanaka A, Tanaka KF, Doya K
2. 発表標題 Stimulation of serotonergic terminals in the orbitofrontal and medial prefrontal cortices differentially affects waiting for the future rewards.
3. 学会等名 Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎勝彦 宮崎佳代子 銅谷賢治
2. 発表標題 セロトニンによる報酬待機行動の制御機構
3. 学会等名 254th Tsukuba Brain Science Seminar (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taira M, Miyazaki KW, Miyazaki K, Doya K
2. 発表標題 Serotonergic effect on motor actions for future rewards in mice.
3. 学会等名 11th Forum of European Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki K, Miyazaki KW, Doya, K
2. 発表標題 The orbitofrontal and medial prefrontal cortices differentially calculate the posterior probability of reward delivery to modulate waiting for future rewards.
3. 学会等名 12th Forum of European Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------