

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03532

研究課題名(和文) リスク志向な意思決定の神経基盤：行動・神経回路操作・計算論的手法によるアプローチ

研究課題名(英文) Neural basis of risky decision-making: Behavior, neural manipulation, computational approaches

研究代表者

溝口 博之 (Mizoguchi, Hiroyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70402568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多種多様な遺伝子発現制御法と遺伝子改変ラットを用いて、島皮質を基軸とした意思決定・行動選択の変容に関わる領域間ネットワーク、神経-神経ネットワークについて検討した。その結果、DRD2-Creラットを用いて間接路の神経脱落がリスク回避行動に関与すること、逆行性AAV-Flp (FLP/FRTシステム)を用いることで、島皮質 線条体経路特異的に遺伝子を発現させることが可能であること、CRISPR/Cas9システムを用いることで、大脳基底核間接路特異的にドーパミンD2受容体を脱落させることを証明した。以上から、島皮質を基軸とした神経回路を操作する手法をin vivo実験で立証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

依存症は世界銀行・WHOが報告するDALY(障害調整生命年)によると、世界トップ10に入る健康を脅かす疾患であり、ギャンブル障害、ゲーム障害などが新たに精神疾患として認定されるなど、今まで以上に身近な社会問題として懸念されている。リスク志向な行動異常を解明するためには、より細胞特異性の高い操作方法が求められている。その点から考えると、本研究結果は島皮質がリスク志向な意思決定のハブ領域であることを見つけるための手法を確立することができ、行動実験などの応用性が期待できる成果となった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we found that DRD2 deficits in striatum induce risk-averse behavior: Flp/FRT system is powerful tool for manipulation of insular-striatum pathway: DRD2 is disrupted in DRD2-positive cells by CRISPR/Cas9 system. Thus, we established the in vivo method for manipulating neural circuits based on the insular cortex.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：リスク志向 意思決定 島皮質 大脳基底核

1. 研究開始当初の背景

依存症は世界銀行・WHO が報告する DALY (障害調整生命年) によると、世界トップ 10 に入る健康を脅かす疾患である (Lancet 2016,387,2383-401)。また統合型リゾート推進法の成立により日本でもカジノが解禁されることから、ギャンブル依存者の急増という社会的且つ医学的問題も懸念されている。さらに WHO がゲーム障害を精神疾患と認定したことから、新たな依存症の包括的理解に向けた機序解明と医学的に適切な予防対策や治療戦略の発信が期待されている。

依存症の完治困難な原因に意思決定異常がある。依存者は不合理な判断により近視眼的な意思決定を示し、行動を自己制御できないからだ。ヒトのイメージング研究から、意思決定プロセスは報酬の予測を担う大脳基底核を中心に、価値を創出する大脳皮質との皮質-線条体-視床ループを中心に論じられている (Gleicher et al., Nat Rev Neurol, 2010)。その他に、海馬、扁桃体、視床下部といった脳領域がネットワークの情報を修飾する。リスク志向な意思決定を示す依存患者も大脳基底核や島皮質、眼窩前頭皮質領域の機能低下が報告されている (Tanabe et al., Am J Psychiatry 2013)。fMRI による画像解析は脳領域の重要性を示せるが、領域内のどの細胞が、どの神経回路が意思決定に関与するのかまでは分からない。そのため、動物モデルを用いた実証研究が必要である。しかし、精神疾患モデル動物における意思決定異常についての研究は他の領域研究と比較して未解明な点が多い。申請者は精神疾患への新たな治療戦略の発見を目的に、意思決定障害に注目したニューロ・エコノミクス (神経経済学) の創薬科学への応用を目指してきた。その結果、ヒトの Iowa ギャンブル試験を参考にラット用のギャンブル試験を開発した。この試験はラットの自己制御能力を明確に判断できる行動試験法であり、トランスレーショナルリサーチとして国内外で高く評価されている。さらに、この意思決定異常には、島皮質内 GABA 神経の機能低下が関与すること、大脳基底核直接路の活性化は探索的でリスクを顧みない意思決定に関与すること、島皮質-線条体経路の活性化がリスク志向な意思決定に関与する可能性を見つけた。すなわち、島皮質を基軸とした異常な興奮の伝播はリスク志向な選択を導くことが分かってきた。

2. 研究の目的

リスク志向な意思決定の神経基盤の解明を目指す。特に、大脳基底核 (側坐核・線条体) へ入力する島皮質-線条体神経が導く情報シグナル (リスク志向を促す) はどのような修飾を受け、どの細胞へ受け渡されていくかに焦点を絞り、島皮質を基軸とした行動選択の変容に関わる領域間ネットワーク、神経-神経ネットワークを実証する。

3. 研究の方法

(1) ラットギャンブル試験

ラットの意思決定の解析は、ラット用ギャンブル試験を使用した。餌報酬と罰刺激 (ラットが食べられないキニンでコートされた餌) がランダムに置かれるハイリスク・ハイリターン (H-H) アーム とローリスク・ローリターン (L-L) アームを設定し、H-H アームの選択率から意思決定を評価した。また、餌のないアームへの侵入回数からラットの学習・記憶を評価する。正常動物は、リスク依存的に H-H アームの選択率が減少する (リスク回避行動)。

(2) 大脳基底核直接路・間接路の機能解析

大脳基底核からの出力系のうち、ドーパミン D2 受容体(DRD2)を発現する間接経路を特異的に機能操作するため、DRD2-Cre ラットを使用した。線条体・側坐核へ AAV-FLEX-DTA を注入し、ガンブル試験を行った。

(3) 逆行性 AAV を用いた島皮質機能解析

DRD2-Cre ラットと ROSA26 Cre レポーターラットとを交配させた。逆行性 AAV-Flp(FLP/FRT システム)により、仔ラット(DRD2 陽性細胞上に tdTomato 発現)の島皮質-線条体神経のみに DREADD や ChR2 を発現させた。スライスパッチ法を用いて光刺激した際の tdTomato 陽性細胞、非陽性細胞の活動電位を測定した。

(4) 強化学習モデルに基づく脳内計算機構の検討

強化学習モデルでは、報酬予測誤差を反映した価値の更新により行動選択されると考える。計算理論を土台にすることで、リスク志向に関わる脳活動の意味が理解できるようになる。特定の投射神経や脳領域の活動と主観的価値や学習係数との関係について検討した。統計解析ソフト R と確率的プログラミング言語 Stan を用いて、パラメータ推定を行った。

4. 研究成果

(1) ガンブル試験を用いた間接路の神経脱落の影響

AAV-FLEX-DTAをDRD2-Creラットの線条体、側坐核に感染させた。間接路の神経脱落がリスク回避行動を促す可能性について例数を追加し、結論を得た。

(2) DRD2陽性細胞上にtdTomatoが発現するラットの作出

DRD2-CreラットとRosa-tdTomatoラットとを交配させた。線条体、側坐核において、間接路特異的にtdTomato陽性細胞を確認した。

(3) 逆行性AAV-Flp(FLP/FRTシステム)の確認

島皮質にAAV-FLEX-FRT-hM3Dq-EGFP、線条体に逆行性AAV-Flpをインジェクションし、島皮質内にEGFP陽性細胞を確認した。また線条体にEGFP陽性の神経軸索を観察した。

(4) 電気生理学的手法による島皮質 - 線条体経路の活性化による直接路、間接路の活動変化

ホールセルパッチクランプ法を用いて電気生理学的に島皮質からの線条体への入力役割を検討した。島皮質 - 線条体回路にチャンネルロドプシンを発現させ、線条体・側坐核の直接路、間接路への入力について検討した。線条体スライスを作製し、光照射した際のtdTomato陽性細胞と非陽性細胞のEPSC、EPSPを測定した。しかし、島皮質から線条体へと入力する神経細胞の数、発現細胞の数の少なさから目的としていた結果は得られなかった。用いた手技には相当な発現細胞の数が必要であることが分かった。

(5) c-Fosマッピング法による島皮質 - 線条体経路の役割解明

DRD2陽性細胞上にtdTomatoが発現する仔ラットを作出した。このラットの島皮質にAAV-FRT-hM3Dq-EGFPを、線条体・側坐核に逆行性AAV-Flpを感染させた。免疫組織学的に検討したところ、島皮質領域EGFP陽性細胞を確認でき、線条体・側坐核にEGFPの神経軸索を観察できた。c-Fos発現も線条体・側坐核において観察でき、c-Fos発現の増加している細胞種の特定向け定量実験を継続している。

(6) CRISPR/Cas9システムによる間接路特異的な遺伝子発現制御法の開発

間接路特異的に遺伝子発現をコントロールするため、CRISPR/Cas9システムを導入し、in vitroレベルでの構築を始めた。作製したウイルスの効果を培養細胞系で検討したが、明確な反応は見られなかった。そこで、in vivo実験で検討することにした。AAV-CMV-SaCas9-rDrd2をDRD2-Creラットの線条体片側のみに感染させ、DRD2を脱落させたラットを作製し、アポモ

ルヒネ投与による回転行動、あるいはquinpiroleの投与による細胞活動（AAV-FLEX-GCaMPを感染）をin vivoで検討した。いずれも定量的解析中であるが、quinpirole投与による神経活動の増加は、DRD2を脱落させることで低下することが観察できた。このことから、ラットにおいて神経特異的にDRD2のみを脱落させる手法を確立できた。

（ 7 ）強化学習によるギャンブル行動のパラメータ推定

ラット用ギャンブル行動データを用いて新たに開発したStanによるパラメータ解析を行った。島皮質 - 線条体経路を活性化させたラットはリスク志向な行動を示す（既存データ）。この時、大報酬に対する期待値(KappaPL値)が大きくなることが分かった。

（ 8 ）今後の展望

本研究を通して、操作可能な島皮質から投射先への神経回路の数が少ないなど予想していなかった実験結果から実験手法を変更することになったが、島皮質 線条体回路を特異的に操作する手法、そしてその回路操作により線条体における情報伝達の解明に向けた手法の開発、パラメータ解析の改良を行うことができた。今後は線条体・側坐核での細胞種の特定、さらには他の投射先を含め、新たなアイデアを取り入れ、島皮質を基軸とした行動選択の変容に関わる領域間ネットワークを検討していく予定である。

<引用論文>

1. Mokdad AH et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016, 11;387(10036):2383-401.
2. Gleichgerricht E, Ibáñez A, Roca M, Torralva T, Manes F. Decision-making cognition in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2010, 6(11):611-23.
3. Tanabe J, Reynolds J, Krmpotich T, Claus E, Thompson L, Du YP, Banich MT. Reduced neural tracking of prediction error in substance-dependent individuals *Am J Psychiatry*. 2013, 170(11):1356-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tsuneura Yumi, Nakai Tsuyoshi, Mizoguchi Hiroyuki, Yamada Kiyofumi	4. 巻 23
2. 論文標題 New Strategies for the Treatment of Neuropsychiatric Disorders Based on Reelin Dysfunction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1829 ~ 1829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031829	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 Liao Jingzhu, Dong Geyao, Wulaer Bolati, Sawahata Masahito, Mizoguchi Hiroyuki, Mori Daisuke, Ozaki Norio, Nabeshima Toshitaka, Nagai Taku, Yamada Kiyofumi	4. 巻 416
2. 論文標題 Mice with exonic RELN deletion identified from a patient with schizophrenia have impaired visual discrimination learning and reversal learning in touchscreen operant tasks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113569 ~ 113569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakai Tsuyoshi, Yamada Kiyofumi, Mizoguchi Hiroyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Alzheimer's Disease Animal Models: Elucidation of Biomarkers and Therapeutic Approaches for Cognitive Impairment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5549 ~ 5549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115549	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 Hada K, Wulaer B, Nagai T, Itoh N, Sawahata M, Sobue A, Mizoguchi H, Mori D, Kushima I, Nabeshima T, Ozaki N, Yamada K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Mice carrying a schizophrenia-associated mutation of the Arhgap10 gene are vulnerable to the effects of methamphetamine treatment on cognitive function: association with morphological abnormalities in striatal neurons.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00735-4.	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 Tsuneura Y, Sawahata M, Itoh N, Miyajima R, Mori D, Kohno T, Hattori M, Sobue A, Nagai T, Mizoguchi H, Nabeshima T, Ozaki N, Yamada K	4. 巻 144
2. 論文標題 Analysis of Reelin signaling and neurodevelopmental trajectory in primary cultured cortical neurons with RELN deletion identified in schizophrenia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104954. Epub 2021 Jan 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sobue A, Komine O, Hara Y, Endo F, Mizoguchi H, Watanabe S, Murayama S, Saito T, Saido TC, Sahara N, Higuchi M, Ogi T, Yamanaka K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Microglial gene signature reveals loss of homeostatic microglia associated with neurodegeneration of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01099-x.	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 Saifullah AB, Komine O, Dong Y, Fukumoto K, Sobue A, Endo F, Saito T, Saido TC, Yamanaka K, *Mizoguchi H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Touchscreen-based location discrimination and paired associate learning tasks detect cognitive impairment at an early stage in an App knock-in mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00690-6.	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 Macpherson T, Mizoguchi H, Yamanaka A, Hikida T.	4. 巻 126
2. 論文標題 Preproenkephalin-expressing ventral pallidal neurons control inhibitory avoidance learning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.02.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izawa S, Chowdhury S, Miyazaki T, Mukai Y, Ono D, Inoue R, Ohmura Y, Mizoguchi H, Kimura K, Yoshioka M, Terao A, Kilduff TS, Yamanaka A.	4. 巻 365(6459)
2. 論文標題 REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1308-1313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aax9238.	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 該当する

1. 著者名 溝口 博之, 山田 清文.	4. 巻 153(5)
2. 論文標題 はまる脳, リスク志向な脳: ウイルスベクターによる島皮質機能操作.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 224-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yutao Dong, 溝口博之, 山中章弘, 山田清文
2. 発表標題 Dynamic changes in orexin activities in reward-based motivative behavior.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口博之
2. 発表標題 報酬獲得行動に関わる脳内ネットワークの追究
3. 学会等名 2021年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口博之
2. 発表標題 依存症がもたらす意思決定異常と脳内報酬系
3. 学会等名 2021年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yutao Dong、溝口博之、山中章弘、山田清文
2. 発表標題 Activities of orexin neurons in motivative behavior.
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口博之、山中宏二.
2. 発表標題 認知症早期発見と創薬への行動薬理学研究者の挑戦.
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝口博之、山田清文、山中章弘.
2. 発表標題 依存症の理解に向けた意思決定の神経回路の解明.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝口博之、山田清文
2. 発表標題 意思決定異常に対する創薬標的：バレニクリンの有効性.
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mizoguchi H.
2. 発表標題 Roots of decision-making in addiction: the insular cortex, nucleus accumbens, striatum.
3. 学会等名 7th Meeting of the International Drug Abuse Research Society (IDARS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizoguchi H, Inutsuka A, Katahira K, Yamada K, Yamanaka A.
2. 発表標題 Roles of orexin neurons in motivated behaviors in rats.
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saifullah Md. Ali Bin , Komine O, Sobue A, Yamanaka K, Mizoguchi H.
2. 発表標題 Touchscreen-based tests detect cognitive impairment at an early stage in APP knock-in mice model.
3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口博之、山田清文
2. 発表標題 依存症における意思決定の神経回路：島皮質と線条体.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会第62回日本神経化学会大会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口博之
2. 発表標題 食欲、報酬に対する動機づけにおけるオレキシン神経の役割
3. 学会等名 第4 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口博之、山田清文
2. 発表標題 依存症における意思決定異常と島皮質GABA神経
3. 学会等名 第49回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口博之.
2. 発表標題 報酬に対する動機づけにおけるオレキシン神経の役割.
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝口 博之、犬束 歩、片平 健太郎、山田 清文、山中 章弘.
2. 発表標題 動機づけ行動におけるオレキシン神経の役割
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝口博之、小峯 起、Md. Ali Bin Saifullah1、祖父江 顕、遠藤史人、山中宏二.
2. 発表標題 タッチスクリーン式学習試験法はアルツハイマー病モデル動物の早期の認知機能障害を検出できる.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
研究 分担者	犬束 歩 (Inutsuka Ayumu) (30584776)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究 分担者	片平 健太郎 (Katahira Kentaro) (60569218)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員 (82626)	

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
---------	---------