

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04014

研究課題名(和文) 音声信号の認識と行動誘発の神経回路機構

研究課題名(英文) Neural circuit basis of behavioral change induced by social signals

研究代表者

渡邊 大 (Watanabe, Dai)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90303817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：社会性もふまえた意思決定プロセスを理解するためには、動物個体の自然な行動を阻害しない低侵襲な神経機能計測技術が必要である。タッチスクリーン・プラットフォームによる自由行動下の認知課題実施中の動物個体から単一細胞精度で神経機能を計測可能な技術を開発した。さらにDesigner Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)に基づく化学遺伝学的手法による実行機能解析手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは集団を形成し社会的に行動する。したがって、ヒトの行動原理の神経基盤を理解するためには、このような社会的認知の側面を踏まえた上で、「意思決定」のプロセスが「脳という生物学的な仕組み」にどのように実装されているか解明することが重要である。本研究により開発された技術を応用することにより、意思決定に関わる神経回路メカニズムを解析するとともに、社会的情報を媒介する音声コミュニケーションのような個体間の情報伝達の神経回路と、意思決定に関わる神経回路の相互作用に関する理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To study neural basis of behavioral change induced by social signals such as vocal communication, it is essential to establish technologies that enable measurements of neural functions without affecting natural behaviors. We developed novel endomicroscopy and conducted live cell imaging of neural activity and intracellular ERK activity in a freely behaving subject. We also applied Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD)-based chemogenetic manipulation of neural activity to behavioral analysis using a touchscreen operant platform, in order to address how the cortico-basal ganglia circuit is involved in cognitive processes for controlling behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：意思決定 社会性 音声コミュニケーション

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトは集団を形成し社会的に行動する。したがって、ヒトの行動原理の神経基盤を理解するためには、このような社会的認知の側面を踏まえた上で、「意思決定」のプロセスが「脳という生物学的な仕組み」にどのように実装されているか解明することが重要である。そのためには、意思決定に関わる神経回路メカニズムを解析するとともに、社会的情報を媒介する音声コミュニケーションのような個体間の情報伝達の神経回路と、意思決定に関わる神経回路の相互作用を理解することが必要である。しかしながら下記に述べるような研究技術に関する課題もあり、社会的な意思決定の神経基盤について不明な点が多い。

(1) 意思決定は経験（過去の情報）に基づき未来を予測し行動を選択することであり、その神経回路機構を理解するためには、意思決定の神経情報をスナップショット的に計測するのではなく、経験に伴いどのように変化するか長期的に計測する必要がある。さらに神経情報の変化には、複数の異なる可塑性メカニズムが異なるタイミングで作用している可能性があり、可塑的变化を長期間計測し解析する研究手法も必要である。

(2) 音声コミュニケーションや意思決定に重要な役割を果たす大脳皮質や基底核等の領域は、解剖学的な回路接続の観点からも、シナプス伝達効率や内因的興奮性等の機能の観点からも、極めて多様な神経細胞サブタイプから構成されている。さらに同一サブタイプの神経細胞であっても、個々の神経細胞の特性は可塑的に変化していく。したがって、単一細胞の精度での神経機能計測が望ましい。

(3) 神経情報の推移や可塑性の動態と社会性や意思決定に関する行動との関係を明らかにするためには、動物の認知行動を妨げないような侵襲性の低い神経機能計測を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高等動物の社会性もふまえた意思決定プロセスを理解するために、上記の課題に対応した神経機能計測技術を確立し、さらに意思決定に伴う神経情報の推移とその可塑性に関する生物学的な基盤を明らかにすることである。具体的には、以下の【課題1】～【課題4】を設定した。

【課題1】先行研究により、社会性をふまえた意思決定には、大脳皮質-基底核神経回路が中心的な役割を果たすと考えられている。大脳皮質から基底核へ投射する第V層錐体神経細胞は、両側線条体へ入力する Intratelencephalic (IT) ニューロンと同側線条体へ投射する Pyramidal tract (PT) ニューロンに大別される。IT ニューロン、PT ニューロンは、それぞれ異なる神経修飾物質 (neuromodulator) 受容体を発現し、セロトニンやドパミン等の神経修飾物質により、興奮性及び可塑性が異なる調節を受けることにより、回路動作が大きく変わると考えられている。本課題では、分子遺伝学的にマウス系統を開発し、IT ニューロン、PT ニューロンを正確に同定して神経機能計測を行う技術を確立する。

【課題2】鎮痛作用をもつオピオイドは臨床的には疼痛治療に用いられるが、報酬行動や社会性の制御など多岐にわたる脳機能と関わる。 $\mu$ -オピオイド受容体 (MOR) を発現する神経細胞は様々な脳領域に散在し、発生期と成体で発現パターンが変化する。従って MOR 陽性神経細胞を正確に同定し、その機能を解析することは従来困難であった。そこで MOR 陽性神経細胞を時期特異的に同定可能なマウス系統を開発することを目的に、MOR 陽性神経細胞特異的な誘導型 Cre を発現するマウス系統を開発する。

【課題3】意思決定に関わる認知行動課題実施中の動物個体からの細胞レベル、全脳レベルの神経活動および可塑性シグナル動態の計測・解析技術を確立する。

【課題4】大脳皮質から基底核への投射は、解剖学的には直接路、間接路、ハイパー直接路に大別される。視床下核 (subthalamic nucleus, STN) は、大脳-基底核回路を構成する神経核の一つであり、ハイパー直接路を介して、広範な大脳皮質領域からの入力と、間接路を介した淡蒼球からの入力を統合し、淡蒼球内節や黒質網様部へ出力する。パーキンソン病患者に対する STN の脳深部刺激 (deep brain stimulation, DBS) が運動機能を改善する一方で、社会的側面も含めた行動制御に関する認知機能 (実行機能, executive function) に影響することが報告されて以来、STN は非運動性認知プロセスにも重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、STN の認知プロセスにおける役割について不明な点が多い。その理由として、STN が、脳深部に位置し複雑な形態を有する神経核であるため、従来の電氣的刺激や薬剤による神経活動制御や破壊実験では、周囲の脳領域と正確に区別して STN の機能を調べるのが困難であることが挙

げられる。さらに STN の不可逆的な破壊・遺伝子操作により、黒質緻密部や線条体等の他の脳領域の興奮性・可塑性が間接的に変化することが近年報告されている。本課題では、このような STN による他の脳領域に対する間接的な作用と区別して、STN がどのような認知機能と直接的に関わっているか研究する手法を確立し、意思決定における STN の機能を解析する。

### 3. 研究の方法

【課題 1】IT ニューロンおよび PT ニューロンの軸索投射制御に関わる遺伝子を利用して、マウス受精卵に対して CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を行い、マウス系統を開発した。さらに蛍光タンパク質を発現するリポーターマウス系統と交配し、リポーター分子の発現を解析した。

【課題 2】マウス ES 細胞を用いて、T2A ペプチドと変異型エストロゲン受容体結合型のコドン最適化 Cre 組換え酵素 (iCreERT2) 配列を、MOR をコードする *Oprm1* 遺伝子エクソン上の停止コドン部位に相同組換えを用いてノックインした。ES 細胞からキメラマウスを経て、MOR-CreER マウスを作製した。Cre 組換え活性を可視化するため、MOR-CreER マウスと、Cre 依存的に HA タグ付き蛍光タンパク質 (bright teal fluorescent protein, mTFP1) を発現する R26-CAG-LoxP-mTFP1 マウスとを交配した。このマウス成体にタモキシフェン (Tm) を投与し、神経系において mTFP1 発現細胞の分布を解析した。

【課題 3】タッチスクリーン・プラットフォームを使った自由行動下での視覚弁別/逆転学習課題を実施中のマウス個体の前頭前皮質あるいは背内側線条体に内視顕微鏡を設置し、自由行動下で単一細胞レベルの神経活動計測 ( $\text{Ca}^{2+}$  イメージング)、細胞内シグナル活性計測 (FRET イメージング) を実施した。また全脳レベルの解析として、認知課題実施後の fMRI の撮像条件について検討した。

【課題 4】化学遺伝学的手法 (chemogenetics) により、薬剤投与依存的に STN の神経活動を選択的かつ可逆的に操作する技術開発を行った。内因性リガンドに反応しない改変型ムスカリン性アセチルコリン受容体 (hM4Di) を Cre リコンビナーゼ依存的に発現する AAV ウイルスベクターを、STN の発生に必須である転写因子 *pitx2* 遺伝子座に Cre リコンビナーゼをノックインしたマウス系統の STN に定位脳手術により導入した (hM4Di マウス)。hM4Di に対する合成リガンドである CNO の効果をスライス・パッチクランプ法により解析し、さらに化学遺伝学的な STN の神経活動抑制の行動制御に関わる認知機能への影響を解析するために、一定の潜時の後に反応刺激 (5 つのタッチスクリーンのうち 1 つが 0.8 秒~2 秒間点灯) が提示される 5-選択反応時間課題 (5-CSRTT) を実施した。

### 4. 研究成果

【課題 1】作成したマウス系統の F1 世代について PCR およびゲノムシーケンスを実施し、ゲノム編集により目的とする遺伝子ノックインについて確認した。さらに他系統との交配により、蛍光タンパク質の発現を指標として、大脳皮質第 V 層でのレポーター分子の発現を確認した (図 1)。本マウス系統を用いて、課題 3 の内視顕微鏡イメージングを実施することで、大脳皮質の回路動作の理解が進むと期待される。

【課題 2】mTFP1 発現細胞は、嗅球、大脳皮質、線条体ストリオソーム区画、海馬、扁桃核、視床、視床下部、脚間核、上丘、下丘、中脳水道灰白質、傍腕核、蝸牛神経核、縫線核、脳幹網様体、疑核、孤束核、脊髄、後根神経節を含む広範な領域に分布していた。これらの分布は既報の *Oprm1* mRNA の分布にほぼ合致していた。さらに、MOR 発現細胞への特異性を確認するため、*Oprm1* mRNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法と HA タグに対する免疫組織化学による蛍光二重染色を行ったところ、線条体、大脳皮質感覚野第 V 層、内側手綱核、外側視床下部、傍腕核、疑核、後根神経節において、HA 陽性細胞の 95% 以上で ISH シグナルを認めた。これは、Cre 組換えが *Oprm1* 発現細胞に特異的に生じることを示す。

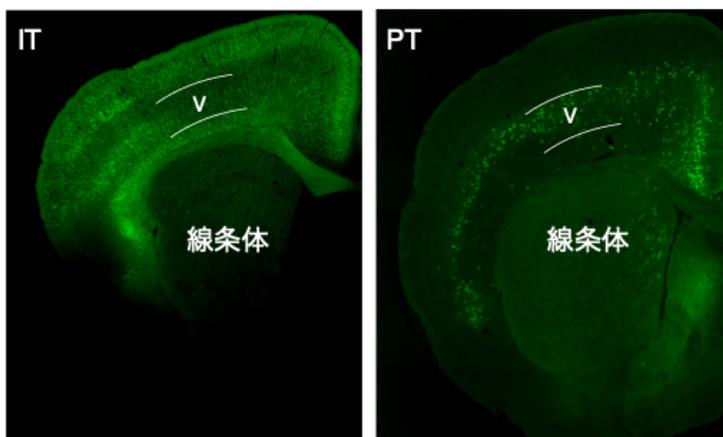


図 1: 新たに作成したマウス系統における遺伝子発現パターン。IT ニューロン特異的遺伝子を利用したノックインマウス系統 (左)、及び PT ニューロン特異的遺伝子を利用したノックインマウス系統 (右)

哺乳類の線条体は、MOR を強く発現するストリオソーム区画と、その周囲のマトリックス区画からなる。線条体神経回路の機能解明のためにストリオソーム選択的なCre組換え活性をもつマウスは有用と考えられる。そこで、MOR 免疫組織化学によってストリオソーム区画を定義し、Cre 組換え活性の分布を調べた。その結果、mTFP1 発現細胞のストリオソーム区画における細胞密度は、マトリックス区画に比べ7-15倍高かった。さらに、線条体に Cre 依存的な AAV ベクターを注入しても同様の結果を得た。これは、MOR-CreER マウスがストリオソーム選択的な Cre 活性をもつことを示す。

最後に、発生期における有用性を調べた。マウスの胎生期線条体において、Oprm1 mRNA は成体と異なりびまん性に分布することが知られている。MOR-CreER マウスと R26-CAG-LoxP-mTFP1 マウスを交配し、胎生17日目に Tm を投与すると、出生0日目の線条体において、mTFP1 発現細胞は広範に分布していた。これは、MOR-CreER マウスが発生期において、時期特異的に MOR 発現細胞を標識できることを示す。

以上から、本研究で作製した MOR-CreER マウスは、MOR 発現細胞特異的な Cre 組換えを可能にし、MOR のシグナル伝達および神経回路制御機構解析に応用できる新規遺伝子改変マウスであると考えられた (図2, Okunomiya et al., 2019)。

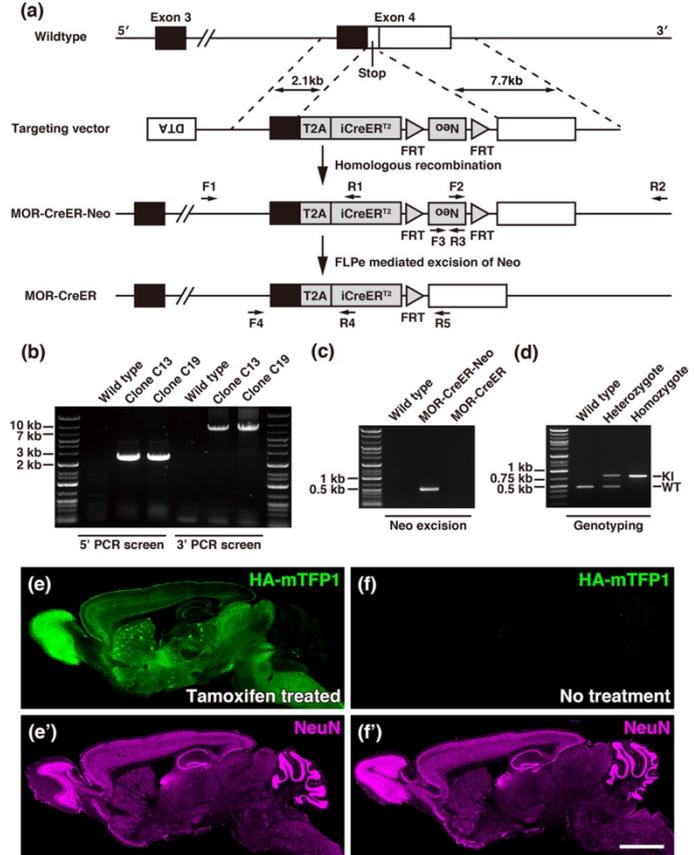


図2: MOR-Cre マウス (Okunomiya et al., 2019, 文献1を改変)

【課題3】ウイルスベクター、分子遺伝学的な遺伝子組換えにより蛍光指示タンパク質を発現するマウス個体の前頭前皮質或いは背内側線条体に内視顕微鏡を設置し、タッチスクリーン・プラットフォームを使った視覚弁別・逆転学習課題を実施した (図3)。内視顕微鏡を設置したマウス個体でも先行学習、逆転学習が可能であり、1ヶ月以上にわたる単一細胞の精度での神経活動計測が可能であることを確認した。

さらに線条体の中型有棘神経細胞 (medium spiny neuron, MSN) から ERK 活性を FRET イメージングにより計測したところ、MSN では ERK 活性が振動することを見出した。

【課題4】hM4Di に対する合成リガンドである CNO の効果をスライス・パッチクランプ法により解析したところ、hM4Di を発現する STN 神経細胞では、CNO 投与依存的な膜電位の低下、電流注入による活動電位応答の減少が観察された。以上の電気生理学的解析により、hM4Di マウスでは、CNO 投与依存的に STN 神経細胞の神

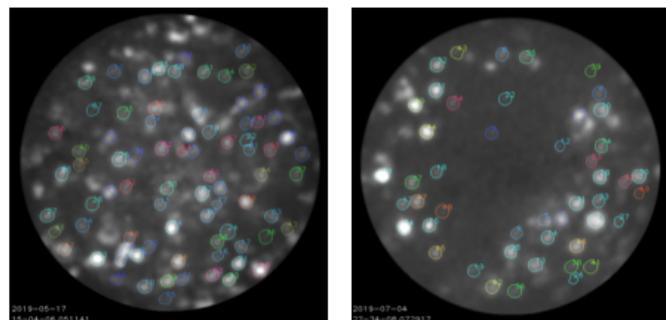


図3: 内視顕微鏡による ERK 活性 FRET イメージング

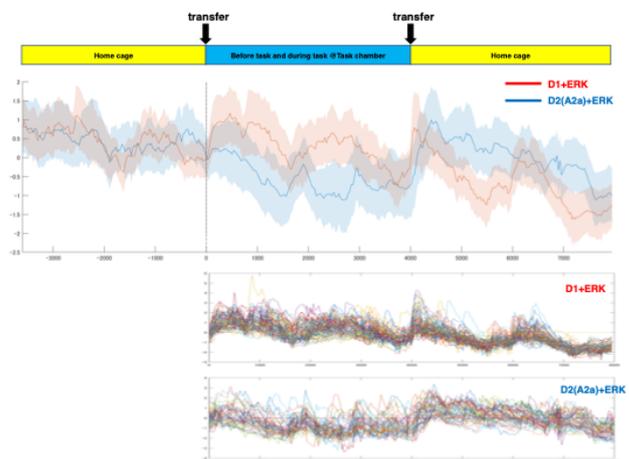


図4: 線条体 MSN における ERK 活性の振動現象

経活動が選択的に抑制されることを明らかにした。

次に化学遺伝学的なSTNの神経活動抑制の行動制御に関わる認知機能への影響を解析するために、一定の潜時の後に反応刺激（5つのタッチスクリーンのうち1つが0.8秒~2秒間点灯）が提示される5-選択反応時間課題（5-CSRTT）を実施した。その結果、注意に関する認知機能に関して、持続的注意の指標である正答率は、hM4Di マウス群でCNO投与依存的に有意に低下したが、全体的注意の指標である無反応試行には影響がなかった。一方、刺激提示に対する反応制御について、衝動性の指標である尚早反応は、hM4Di マウス群でCNO投与依存的に有意に増加したが、固執性の指標となる強迫反応には影響がなかった。またhM4Di マウス群の持続的注意や衝動性に対するCNOの効果は、投与24時間後には消失した。すなわち、STNの神経活動の選択的かつ可逆的な抑制により、特定の注意および反応制御が障害されることが明らかとなった（図5, 6. Nishioka et al., 2020）。

以上の結果は、STNが、シナプスを介した直接的な神経情報伝達により、実行機能と包括される認知機能の中で、注意や反応制御に関する特定の認知サブプロセスを制御している可能性を示唆する。

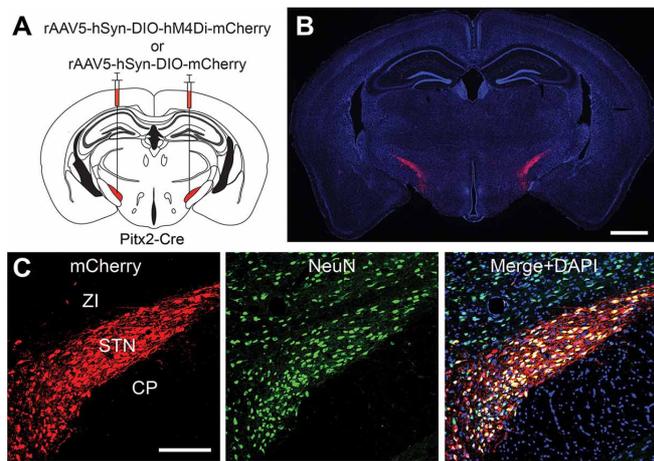
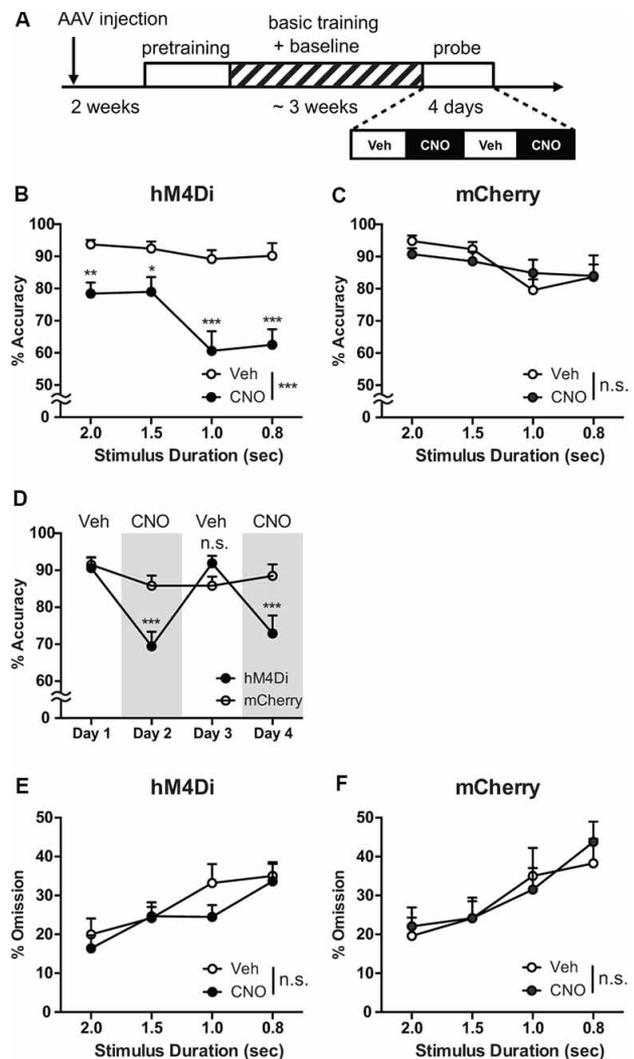


図5（上）、図6（下）：hM4Di マウスによる視床下核（STN）の認知機能解析（Nishioka et al., 2020, 文献2）



<引用文献>

Okunomiya, T., Hioki, H., Nishimura, C., Yawata, S., Imayoshi, I., Kageyama, R., Takahashi, R., and Watanabe, D. (2019). Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling. *Genesis* e23341.

Nishioka, T., Hamaguchi, K., Yawata, S., Hikida, T., and Watanabe, D. (2020). Chemogenetic Suppression of the Subthalamic Nucleus Induces Attentional Deficits and Impulsive Action in a Five-Choice Serial Reaction Time Task in Mice. *Frontiers Syst Neurosci* 14, 38.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Taro Okunomiya, Hiroyuki Hioki, Chika Nishimura, Satoshi Yawata, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama, Ryosuke Takahashi, Dai Watanabe	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of a MOR CreER knock in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling genesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 e23341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvg.23341	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 Seohyun Lee, Tomohiko Hayakawa, Chika Nishimura, Satoshi Yawata, Hiroki Yagi, Dai Watanabe, Masatoshi Ishikawa	4. 巻 19
2. 論文標題 Comparison of Deep Learning and Image Processing for Tracking the Cognitive Motion of a Laboratory Mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2019 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)	6. 最初と最後の頁 8919239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/biocas.2019.8919239	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 Nishioka Tadaaki, Hamaguchi Kosuke, Yawata Satoshi, Hikida Takatoshi, Watanabe Dai	4. 巻 14
2. 論文標題 Chemogenetic Suppression of the Subthalamic Nucleus Induces Attentional Deficits and Impulsive Action in a Five-Choice Serial Reaction Time Task in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnsys.2020.00038	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 Sugiyama Takefumi, Yamamoto Haruka, Kon Tetsuo, Chaya Taro, Omori Yoshihiro, Suzuki Yutaka, Abe Kentaro, Watanabe Dai, Furukawa Takahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 The potential role of Arhgef33 RhoGEF in foveal development in the zebra finch retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78452-6	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 Horie, Nakao, Miyasaka, Nishino, Matsumura, Nakazeki, Ide, Kimura, Tsuji, Rodriguez, Watanabe, Yamasaki, Xu, Otani, Miyagawa, Matsushita, Sowa, Omori, Tanaka, Nishimura, Nishiga, Kuwabara, Baba, Watanabe, Nishi, Nakashima, Picciotto, Inoue, Watanabe, Nakamura, Sasaki, Kimura, Ono	4. 巻 12
2. 論文標題 microRNA-33 maintains adaptive thermogenesis via enhanced sympathetic nerve activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21107-5	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 Sotoyama Hidekazu, Namba Hisaaki, Kobayashi Yutaro, Hasegawa Taku, Watanabe Dai, Nakatsukasa Ena, Sakimura Kenji, Furuyashiki Tomoyuki, Nawa Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Resting-state dopaminergic cell firing in the ventral tegmental area negatively regulates affiliative social interactions in a developmental animal model of schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01346-2	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 西岡忠昭、濱口航介、矢和多智、疋田貴俊、渡邊 大
2. 発表標題 実行機能における視床下核の因果的役割
3. 学会等名 日本神経科学大会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱口航介、渡邊 大
2. 発表標題 内部モデルに基づいた意思決定とマウス前頭皮質の神経表現
3. 学会等名 日本神経科学大会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥宮太郎、今吉格、日置寛之、西村知華、矢和多智、影山龍一郎、高橋良輔、渡邊 大
2. 発表標題 新規に作成したノックインマウスMOR-CreERによるmu-オピオイド受容体陽性神経回路の可視化
3. 学会等名 日本神経科学大会2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/publications.html">https://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/publications.html</a>
---

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