

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12771

研究課題名(和文) 複数の入力源による動的神経活動生成機構解明にむけた技術開発

研究課題名(英文) Development of technologies for elucidating mechanisms how dynamic neural activities are generated by multiple inputs from other regions

研究代表者

小川 正晃 (OGAWA, MASAAKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00716186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来の認知神経科学研究は認知機能に 관련된 神経活動を見出してきたが、その活動が他の複数領域からの入力により生成されるメカニズムはよく理解されていない。そこで本研究は、ラットで、過去に学習した条件刺激と報酬間の関係を用いた認知機能を発揮するための前頭連合野・眼窩前頭皮質の神経細胞活動をモデルシステムとして、その活動がどのような神経回路レベルのメカニズムによって生成されるのかを明らかにするための基盤技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Many cognitive neuroscience studies have been examined neural correlates of cognitive functions. However, little is known about how those neural activities are dynamically generated by multiple inputs originating from other regions. To examine this, we have proposed to use one of prefrontal regions called orbitofrontal cortex (OFC) in rats that has been shown to be critical for cognitive function based on stimulus-outcome relationships as a model system. We have developed basic technologies to elucidate how activities of other regions that have direct inputs to OFC contribute to the generation of dynamic activity of OFC neurons.

研究分野：脳科学

キーワード：光遺伝学 遺伝子改変ラット 連合学習

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の認知神経科学研究は、認知機能に関連した神経活動を見出してきた。例えば、前頭前野・眼窩前頭皮質 (OFC) の神経細胞は、条件刺激-報酬間関係の柔軟な学習の結果、条件刺激や報酬獲得・損失に対して発火する。しかしながら、OFC へ直接神経入力を送る主要な領域として、価値情報のアップデートに関わる扁桃核、刺激-報酬間関係の連合記憶に関わる嗅周皮質などがあるが、これら複数の領域からの神経経路、および状況・タイミング特異的な活動がどのように協調することで OFC 神経活動が生成、維持されるのかは未解明である。

(2) OFC に限らず、一般に認知機能を担う高次脳領域では入力情報が多様であり、他領域からの複数入力の協調によって適切な活動が生成、維持される可能性が高いが、技術的な限界からその機構を精緻なレベルで問う研究は過去に例がない。

(3) ラットは、条件刺激-報酬間関係の柔軟な学習行動の研究で長年の蓄積がある。また、OFC 領域の因果的役割の理解、電気生理学的研究も進んでおり、OFC の基本機能はラットと霊長類間で類似する。

また、最近、光遺伝学法の分子ツールの性能は大幅に改善され、申請代表者は MIT の Boyden 研究室でこれらのツール開発、応用に関わり、現在、これを用いて、秒単位のタイミング特異的な OFC 神経細胞活動が刺激-報酬間学習行動に重要であることを見出している。

さらに、細菌がもつ獲得免疫系 CRISPR/Cas を利用したゲノム編集技術の進歩によって、ラットでの遺伝子操作が容易になりつつある。研究分担者の真下博士はすでにラットで遺伝子ノックイン技術を樹立している (Yoshimi, et al, 2014)。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、条件刺激-報酬間関係の変化を学習中の OFC 神経細胞活動をモデルシステムとして、その機構を明らかにするための技術を、ラットで開発する。最先端の光遺伝学法、遺伝子改変ラット、逆行性ウイルスを組み合わせ、同一個体で、OFC に強い入力を持つ複数の領域に光駆動性の興奮もしくは抑制性神経活動調節分子を効率よく発現する技術を開発する。

(2) それら複数の領域から OFC への経路特異的活動を光照射によってタイミング特異的に促進・抑制し、これら直接入力の協調による OFC 単一神経細胞活動の動的生成機構について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 改良型チャンネルロドプシンを Cre 依存的に発現する遺伝子改変ラットを開発する。分子のより良い発現を得るために異なる方法を検討する。

(2) 上記で開発する遺伝子改変ラットの OFC に、逆行性に輸送され Cre を発現するウイルスを注入し、OFC に強い神経入力を持つ複数領域の細胞体に改良型チャンネルロドプシンを発現させる。

(3) 条件刺激-報酬の有無の関係が変化する学習中のラットで、OFC に強い神経入力を持つ複数領域から OFC への直接入力経路の活動を、行動制御に重要である、期待される報酬が提示されなくなるタイミング特異的に刺激または抑制し、OFC 神経発火活動におよぼす影響について検討することで、OFC 神経活動を生成、維持するためのこれらの脳領域の協調様式を検討する。

## 4. 研究成果

(1) Cre 組替え酵素依存的に、青色光反応の光遺伝学法用オプシン (改良型チャンネルロドプシン-GFP) を発現するコンストラクトを持つラットを、Rosa26 遺伝子座を利用したノックインとランダム挿入によるトランスジェニックの 2 方法で新規作成した。Rosa26 遺伝子座へのノックインについては、研究分担者の真下博士らが樹立した CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術によって実際に目的の位置へのノックインに成功した。

サザンブロット法、PCR 法によって、目的とする遺伝子改良型チャンネルロドプシン-GFP の全長が確かにラットゲノムに挿入されていることを確認した。トランスジェニック法では、異なる部位に挿入されたと考えられる 2 ラインの F0 世代の個体を取得したが、1 ラインのみ次世代に遺伝子が伝達したので、この 1 ラインを以降、解析することにした。

(2) 次に、Cre を発現するウイルスを OFC 神経回路領域に注入、また、特定の神経細胞に Cre を発現する遺伝子改変ラットを新たに導入して、上記の 2 種のラットと交配した。すると、目的の場所に GFP を発現する細胞を認めた。しかし血管やグリア細胞と思われる組織に強い GFP の発現を認めたが、神経細胞への発現は強くはなかった。

また、脳のいくつかの他の場所に Cre の発現に依存しない異所性の発現を認めた。現在、さらに飼育を継続して、ホモで発現するラットを作成しており、発現が増強するか検討する。また、一部のラットは、ラットナショナルバイオリソースに寄託した。

(考察と今後の展望) 従来の研究で、Rosa26 遺伝子座に Cre 依存的にチャネルロドプシンなどを発現する技術はマウスでは成功を収めており、すでに発表されている。本研究では、Cre 依存的に発現する遺伝子の挿入の方向を通常とは反対にしたという違いはあるものの、ラットにおける Rosa26 遺伝子座ノックインは、神経細胞をターゲットとした遺伝子発現にはあまり適さないことを示唆するのかもしれない。

一方、Rosa26 遺伝子座を利用したトランスジェニックの方法では、ある程度偶然には左右されるものの、挿入される遺伝子座やコピー数が異なるラットが数ライン取れば、その後の選択によってよいラインが取れる可能性は依然として存在する。実際に同様の方法を利用して、緑色光反応性に神経活動を抑制するラット開発は成功を収めた(下記、学会発表 1, 3)。本研究が目指す改良型チャネルロドプシン-GFP についても、多数のラインを始めに得ることができればその可能性も出てくるだろう。今後この可能性についても検討したい。

(3) 逆行性に輸送され GFP を発現するレンチウイルス、または、アデノアソシエイトウイルスを、複数作成した。OFC を含む神経回路領域に注入して発現をチェックし、OFC 神経回路の標識に有用となる候補を見出した。

(4) 頭部固定下で匂い刺激と報酬確率の関係を学習する道具条件づけ行動課題を頭部固定下のラットで開発し、OFC 関連領域から単一神経細胞電気活動記録を行うシステムを立ち上げた。また、行動中ラットからの多数の単一神経細胞電気活動記録の経験を持つポストドクを採用し、その研究に従事させた。またラットが、過去に学習した記憶に基づいて複数ステップ行動のプランニングを行う際の、前頭前野と海馬間のシータ帯域の協調に関する論文作成に責任著者として関わり、そのポストドクと共に発表した(下記、雑誌論文 1)。

ラットがモチベーションを適度に保ちながら課題を行えるためには、適切な行動パラメータの検討が必要である。これには、匂い刺激の時間、レバー位置を一定に保つ時間、報酬を得る直前の時間、トライアル間の時間などが含まれる。我々はそのようなパラメータ設定に成功し、ラットが多数のトライアルをこなすような課題環境を見出した。

実際にラットの行動様式を観察すると、不確実な報酬に条件づけされた匂い提示後に、確実な報酬に条件づけされた匂い提示後よりも素早く反応することを見出した。申請者は以前、異なる行動課題において同様の傾向を見出しているが、より行動の厳密な統制が可能で頭部固定下条件でこの行動が樹立できたのは、意義深い。

(考察と今後の展望) 今後、OFC に投射す

る扁桃核や嗅周皮質の活動を刺激することにより、OFC 神経細胞活動の表象様式への影響を検討する。

また、上記で見出した、確実な報酬よりも不確実な報酬により早く反応する行動課題において OFC 以外の、報酬に関する情報処理に関わる脳領域の活動様式についても検討したい。さらに、本研究で立ち上げた電気生理システムと統合して、その領域に投射する領域の活動を刺激することで、その領域の活動が成り立つ神経回路レベルの役割を明らかにしたい。

(5) チャネルロドプシンは、神経細胞の活動を促進する興奮性光遺伝学分子(オプシン)であるが、神経細胞活動を阻害する抑制性オプシンの開発と OFC 神経回路への応用も次の重要な課題である。

本研究で我々は、赤色光に反応する新規抑制性オプシンである Jaws をウイルスベクターを用いてマウス OFC に発現し、OFC の赤色光照射によってその活動を期待される報酬が提示されなくなるタイミング特異的に抑制することで、刺激-報酬関係の逆転学習行動への影響を明らかにした(下記学会発表 2, 4, 5, 6)。

(考察と今後の展望) 赤色反応性のオプシンは従来の他の波長を使用する方法と比べて、より多くの体積の脳を効率良く抑制できる意味でポテンシャルが高い。今後は、このマウスでの成果を基にしたラットでの逆転学習課題、さらには上記で開発した確実な報酬よりも不確実な報酬により早く反応するラット行動課題と、逆行性ウイルスを組み合わせることによって、OFC に投射する領域の活動を抑制し、同時に OFC 神経細胞活動の表象様式への影響を検討し、上記の刺激実験と統合して OFC 神経回路の作動機構を明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Ishino S, Takahashi S, Ogawa M, Sakurai Y. Hippocampal-prefrontal theta phase synchrony in planning of multi-step actions based on memory retrieval. (2017) (印刷中)  
doi: 10.1111/ejn.13547 (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Onimaru H, Ikeda K, Ogawa M, Ihara KI, Kobayashi K, Kawakami K. Optogenetic analysis of neuronal network of medullary respiratory

center in brainstem-spinal cord preparations from transgenic newborn rats expressing Archaelrhodopsin in Phox2b positive cells. November 13, 2016 (San Diego, USA)

- (2) 小川正晃、伊佐正：逆転学習における時間特異的な眼窩前頭皮質の因果的役割 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日 パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）
- (3) 鬼丸洋、池田啓子、小川正晃、伊原寛一郎、小林和人、川上潔：Phox2b 遺伝子の発現制御領域下にアーキロドプシンを発現させたトランスジェニック ラットにおける延髄呼吸中枢の神経回路の解析 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 7 月 20 日 札幌コンベンションセンター（北海道、札幌市）
- (4) 小川正晃：報酬学習における眼窩前頭皮質の因果的役割 第 5 回大脳基底核機能研究会 2016 年 3 月 18 日 生理学研究所（愛知県、岡崎市）
- (5) 小川正晃：意思決定における眼窩前頭皮質の役割 第 22 回日本行動医学会学術総会 2015 年 10 月 16 日 東北大学（宮城県、仙台市）
- (6) 小川正晃：報酬に基づく連合学習における眼窩前頭皮質の役割 大阪市立大学 医学部生理学講座セミナー 2015 年 4 月 17 日 大阪市立大学（大阪府、大阪市）

[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]

ホームページ等

[http://researchmap.jp/masaakiogawa\\_read/](http://researchmap.jp/masaakiogawa_read/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 正晃 (OGAWA, Masaaki)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：00716186

### (2) 研究分担者

真下 知士 (MASHIMO, Tomoji)  
大阪大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80397554

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

石野 誠也 (ISHINO, Seiya)  
京都大学・医学研究科・研究員