

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03303

研究課題名(和文) 投射経路選択的細胞活性制御法と計算論的手法を用いた意思決定の神経回路機構の解明

研究課題名(英文) Research on neural circuit in decision-making by using cell- and projection-specific manner of chemogenetics and computational approach

研究代表者

溝口 博之 (Mizoguchi, Hiroyuki)

名古屋大学・環境医学研究所・講師

研究者番号：70402568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では投射経路選択的遺伝子発現制御法と計算論的手法を用いて、薬理遺伝学的に責任脳領域を操作し、島皮質を中心とした意思決定の神経回路の役割について検討した。その結果、島皮質のGABA神経の機能不全はリスク志向な意思決定を促すこと、大脳基底核の間接路の機能不全はリスク回避型の意思決定を促すこと、島皮質線条体経路の過活動はリスク志向な意思決定を促すことを見つけた。さらに島皮質のGABA神経や島皮質線条体経路は大報酬の期待値を調節する神経であることが分かった。以上のことから、島皮質GABA神経を中心とした神経回路は意思決定・行動選択に重要なネットワークを形成していることが証明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により意思決定に関わる神経回路および分子機構を解明することができ、高次脳機能の根本的理解が進み、神経精神薬理学の分野に留まらず、脳科学の発展に大きく貢献できた。また、社会的問題として取り上げられているゲーム依存やギャンブル依存といった意思決定の異常を伴う多くの神経精神疾患の病態の解明と治療薬の開発につながる成果である。臨床研究と基礎研究をつなぐトランスレーショナルテスト・動物モデルとして、今後の創薬研究において極めて有用な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Decision-making is a key activity process that influences many aspects of daily living and both mental and physical health. In general, healthy participants reveal rational choice, but patients with neuropsychiatric disorders reveal irrational and risky choice in decision-making. A better understanding of the mechanisms underlying altered decision-making would provide insights into potential therapeutic approaches for these diseases. However, the neural pathway and substrates underlying these deficits are particularly unknown. In this research, we demonstrated that insular cortex, nucleus accumbens, and striatum are key regions for risky decision-making. Our findings suggest that disinhibition of glutamatergic neurons as well as dysfunction of GABAergic interneurons in the insular cortex, plays a role in altered decision-making. Further research on the insular-striatal pathway would be necessary to understand the mechanisms underlying impaired decision-making.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：意思決定 DREADD 島皮質 神経回路 精神疾患

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

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤やコカイン依存症患者の意思決定プロセスは健常者と異なることが示唆されており、ハイリスク(刑罰)を恐れずハイリターン(薬物)を好むといったリスク志向性が高いことや、安定した小さい利益よりも近い将来の大きな利益を選択する(近視眼的意思決定)などの特徴がある。薬物依存患者における意思決定の障害は生体恒常性の制御機構の変化 (Science, 2007)、近い将来の快感に関連する扁桃体を含む衝動的神経回路と遠い将来に係る思慮的な前頭葉皮質回路のアンバランス (Nat Neurosci., 2005) に基づくと提唱されている。しかし、薬物依存者の意思決定の障害が薬物乱用の原因であるか、あるいは薬物依存の結果として意思決定に障害が生じたのかは不明である。

そのような背景の中、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。今までに受けた研究助成により、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。この試験法はハイリスク・ハイリターンとローリスク・ローリターンの確率で報酬が貰えるゲーム的選択行動試験で、ラットの自己制御能力を明確に判断できる試験法であり、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(中日新聞掲載、朝日新聞掲載、PNAS, E3930-3939, 2015)。ヒトと同様に正常ラットはローリスク・ローリターンな選択を好む(リスク回避)のに対して、薬物依存症などの精神疾患モデル動物はハイリターンに対する報酬予測誤差に異常があることや大報酬の主観的価値が大きいことにより、ハイリスク・ハイリターンな選択を好む(リスク志向)ことを証明した。また、この意思決定異常には、島皮質、線条体、側坐核の異常な活性化が関与する可能性を見つけた。さらには、島皮質内 GABA 神経の機能低下が意思決定異常に関与する可能性を証明した。しかし、島皮質内 GABA 神経の機能不全を引き金としたグルタミン酸神経系の過興奮が意思決定異常に関与するのか? 島皮質の異常なシグナルがどの脳領域へ情報を伝達しているのか? 報酬予測に関与する側坐核、線条体でのドーパミンシグナルはどうなっているのか? 島皮質からの信号はドーパミンシグナルの直接経路、間接経路、はたまたそれ以外の伝達経路(アセチルコリン神経、介在性 GABA 神経)へどのように影響するのか?、疑問が残ったままである。

2. 研究の目的

本研究では確立した研究成果をもとに、投射経路選択的遺伝子発現制御法と計算論的手法を用いて、薬理遺伝学的に責任脳領域(島皮質を中心)を操作し、意思決定における島皮質 GABA 神経、グルタミン酸神経系の役割、意思決定における大脳基底核直接路、間接路の役割、意思決定における島皮質線条体経路の役割、脳内計算機構における各種神経細胞の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. 実験動物

実験には摂食制限した 8 週齢の雄性 Wistar ラットと Long-Evans ラット、ドーパミン D2 受容体が発現する細胞に Cre recombinase (Cre) が特異的に発現する DRD2-Cre ラット、VGAT 陽性細胞に Venus が特異的に発現する VGAT-Venus ラットを使用した。

3-2. ギャンブル試験

8 方向放射状迷路を用いてギャンブル試験を行った。8 つのアームのうち 1 つを L-L アーム、1 つを H-H アーム、2 つを empty アーム(餌なし)、2 つをスタートアームとして使用し、残り 2 つは使用しなかった。アーム位置は常に固定し、スタートアームのいずれかにラットを置き、L-L もしくは H-H アーム先端の餌ペレットを摂取するまでを 1 試行とし、1 日 16 試行を連続して行った。L-L アームには、餌ペレットを 1 つ(小報酬)置いたが、16 試行中 2 回の一定の割合でランダムにキニン入りペレット 1 つ(罰)を置いた。一方、H-H アームには、キニン入りペレットを 1 つ置いたが、16 試行中 2 回の一定の割合でランダムに複数の餌ペレット(大報酬)を置いた (standard condition)。この時、16 試行通して L-L と H-H 両アーム間の総報酬量に差はないようにした。1 日 16 試行を 14 日間行った。16 試行中の H-H アーム選択回数(選択率)と empty アームへの侵入回数を測定した。

3-3. 島皮質 GABA 神経への遺伝子発現

島皮質の GABA 神経活動を操作するため、Cre-DOG(GFP 陽性細胞特異的遺伝子発現制御法、Tang

et al., Nat Neurosci., 2015)を導入した。VGAT-Venus ラットの島皮質に AAV-EFla-N-Creint G (DJ)、AAV-EFla-C-Creint G (DJ)、AAV-hSyn-FLEX-hM4Di-mCherry (DJ)の3種混合ウイルス液を両側に 3 μ l 注入した。注入後 2 週間以上経ってからギャンブル試験を行った。CNO もしくは vehicle を投与し、30 分後にギャンブル試験を行った。

3-4. 大脳基底核直接路と間接路への遺伝子発現

側坐核の神経活動を抑制させるために、直接路 (substance P プロモーター制御) の場合、AAV-SP-tTA(DJ)と AAV-Tet0-hM4Di-mCherry(DJ)の混合ウイルス液を両側側坐核に 1 μ l 微量注入した。間接路 (enkephalin プロモーター制御) の場合、AAV-Enk-tTA (DJ)と AAV-Tet0-hM4Di-mCherry(DJ) の混合ウイルス液を両側側坐核に 1 μ l 微量注入した。注入後 2 週間以上経ってからギャンブル試験を行った。CNO もしくは vehicle を投与し、30 分後にギャンブル試験を行った。

DRD2-Cre ラットの側坐核に AAV-CMV-FLEX-diphtheria toxin A (DTA) を両側 (片側 2カ所) に 1.5 μ l 注入した。コントロール群には AAV-hSyn-FLEX-mCherry-WPRE(DJ)を 1.5 μ l 注入した。注入後 4 週間以上経ってからギャンブル試験を行った。

3-5. 皮質 線条体回路への遺伝子発現

以下の異なる 3 つの逆行性ウイルスベクターを用いた: AAV-CMV-mCherry-2A-Cre-TTC(DJ)を線条体へ 0.5 μ l 微量注入し、AAV-CMV-FLEX-hrGFP(Ser9)を島皮質に 1 μ l 微量注入した。注入後 3 週間以上経ってから剖検した。イヌ科アデノウイルス(CAV2-Cre)を線条体へ 0.5 μ l 微量注入し、AAV-CMV-FLEX-hrGFP(Ser9)を島皮質に 1 μ l 微量注入した。注入後 3 週間以上経ってから剖検した。rAAV-CMV-Cre(Ser2Ret)を線条体へ 0.5 μ l 微量注入し、AAV-hSyn-FLEX-hM3Dq-mCherry(DJ)を島皮質に 1 μ l 微量注入した。注入後 3 週間以上経ってからギャンブル試験を行った。CNO もしくは vehicle を投与し、30 分後にギャンブル試験を行った。

3-6. 計算論モデリング

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、脳活動の意味が理解できるようになる。そこで、Q-learning により学習係数、報酬に対する主観的価値、逆温度を推定した。

4. 研究成果

4-1. ウイルス作製

共同研究者との連携により kappa-opioid receptor (kOR)-DREADD、Cre-DOG テクノロジーといった新しいウイルスベクターの作製、供給も順調に進んだ。特に Cre-DOG テクノロジーの機能について免疫組織学的検討により、特異性が確認できた。

4-2. 島皮質 GABA 神経と意思決定

Cre-DOGテクノロジーを用いて、Venus陽性細胞にhM4Di-mCherryを発現させたVGAT-Venusラットを用いてギャンブル試験を行った。島皮質のGABA神経の特異的な活動抑制はリスク志向な行動選択を引き起こすことが分かった。この時、win-stay行動、lose-shift行動といずれも有意に増加していた。また、この時の行動を計算論的手法によりパラメーター推定を行ったところ、リスク志向を示したラットは大報酬に対する期待値が大きいことが分かった。さらに、電気生理学的手法と組織化学的手法を用いて、これら神経活動操作方法の手技的確認と感染効率の確認を行った。その結果、我々が使用しているDREADDシステム(特にhM4Di)はしっかりと目的の神経活動を操作できていることが分かり、やはり、島皮質のGABA神経の抑制はリスク志向な行動選択を示すようになることが証明できた。

4-3. 大脳基底核直接路、間接路と意思決定

以前に、substance P プロモーター制御下で直接路を活性化させたところリスク志向な行動選択を示すことを見つけた。そこで、substance P あるいは enkephalin プロモーター制御下で側坐核に hM4Di-mCherry を発現させ、直接路あるいは間接路を抑制した時の行動選択について検討した。直接路を抑制しても行動選択に変化はなかった。間接路を抑制すると若干のリス

ク回避型の行動選択を示したが、有意な差はなかった。

そこでDRD2-Creラット（間接路特異的に Cre 遺伝子が発現しているラット）を用いて側坐核の間接路を特異的に遮断したところ、リスク回避型の行動選択を示した。この行動選択の変化にはlose-shift行動の減弱が大きく影響する可能性が示された。間接路は報酬獲得の柔軟性に関与すると考えられており、私たちの結果と合わせて考えると、間接路は負の報酬予測誤差に関与しており、間接路の機能不全はconservative behavior（保守的な選択）を促す可能性が考えられる。間接路実験については現在例数の追加を行っている。

4-4. 逆行性ウイルスベクターによる島皮質 線条体回路操作と意思決定

テタヌトキシンC末端は逆行性に輸送される。よって、線条体および側坐核の神経細胞にCre-TTC（経シナプス逆行性クレリコンビナーゼ）をAAVにより発現させると、神経細胞にCre-TTCが取り込まれて逆行性に輸送される。島皮質にAAV-FLEXベクターを感染させると、島皮質から線条体・側坐核へ投射する島皮質神経細胞だけに遺伝子発現させることが可能となる。Cre-TTCシステムを用いて検討したところ、島皮質にhrGFP陽性細胞が、線条体にその軸索が確認できた。しかし、陽性細胞数は少なく、生体機能を確認できるまで至っていないと判断した。加えてCAV2-Creも検討したところ、hrGFP陽性細胞が多く確認できたが、毒性があり、脳組織に障害があった。そこで、感染効率および毒性が低いと報告されている逆行性rAAV(Ser2Ret)を使用することにした。島皮質にAAV-Flex-hM3Dq-mCherryを、線条体にrAAV-Cre(Ser2Ret)を感染させ、ギャンブル試験を行ったところ、島皮質 線条体回路の活性化はリスク志向な行動選択を引き起こした。この時のwin-stay行動とlose-shift行動は有意に増加していた。このことから、おそらく島皮質から線条体へと投射するグルタミン酸神経の異常な過活動は行動選択に影響することが分かった。また、この時の行動を計算論的手法によりパラメーター推定を行ったところ、リスク志向を示したラットは大報酬に対する期待値が大きいことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. 溝口博之、山田清文. 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. *日本薬理学雑誌*, 査読有, 2019;153:224-230.
2. Macpherson T, Mizoguchi H, Yamanaka A, Hikida T. Preproenkephalin-expressing ventral pallidal neurons control inhibitory avoidance learning. *Neurochemistry International*, 査読有, 2019; 126: 11-18. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.011.
3. Mizoguchi H, Wang T, Kusaba M, Fukumoto K, *Yamada K. Nicotine and varenicline ameliorate changes in reward-based choice strategy and altered decision-making in methamphetamine-treated rats. *Behavioral Brain Research*, 査読有, 2019; 359: 935-941. doi: 10.1016/j.bbr.2018.06.016.
4. Mizoguchi H, Fukumoto K, Sakamoto G, Jin S, Toyama A, Wang T, Suzumura A, Sato J. Maternal separation as a risk factor for aggravation of neuropathic pain in later life in mice. *Behavioral Brain Research*, 査読有, 2019; 359: 942-949. doi: 10.1016/j.bbr.2018.06.015.
5. Mizoguchi H, Yamada K. Methamphetamine use causes cognitive impairment and altered decision-making. *Neurochemistry International*, 査読有, 2019; 124: 106-113. (Review) doi:10.1016/j.neuint.2018.12.019
6. 溝口博之, 山田清文. 精神科領域における薬物療法の現状と薬剤師の役割] 物質使用障害(薬物依存)・ギャンブル障害の現状と薬剤師の役割. *医薬ジャーナル*, 査読有, 2018;54(4): 1037-1040.
7. Takagishi Y, Katanosaka K, Mizoguchi H, Murata Y. Disrupted axon-glia interactions at the paranode in myelinated nerves cause axonal degeneration and neuronal cell death in the aged *Caspr* mutant mouse shambling. *Neurobiology of Aging*, 査読有, 2016; 43: 34-46. doi: 10.1016/j.neurobiolaging. 2016.03.020.
8. Fujisawa H, Sugimura Y, Takagi H, Mizoguchi H, Takeuchi H, Izumida H, Nakashima K, Ochiai H, Takeuchi S, Kiyota A, Fukumoto K, Iwama S, Takagishi Y, Hayashi Y, Arima H, Komatsu Y, Murata Y, Oiso Y. Chronic hyponatremia causes neurologic and

psychologic impairments. *Journal of the American Society of Nephrology*, 査読有, 2016; 27(3): 766-780. doi: 10.1681/ASN.2014121196.

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Saifullah AB, Komine O, Sobue A, Yamanaka K, Mizoguchi H. Behavioral characterization of APP knock-in mice model in touchscreen-based tests aiming early detection of Alzheimer's disease. 第 92 回日本薬理学会年会. 2019.3, 大阪. (ポスター)
2. 溝口博之, 王 天, Saifullah AB, 福本和哉, 山田清文. マウスのリスク意思決定を評価する試験法の開発. 第 92 回日本薬理学会年会. 2019.3, 大阪. (ポスター)
3. Mizoguchi H, Inutsuka A, Katahira K, Yamada K, Yamanaka A. Roles of orexin neurons in motivated behaviors in rats. The 7th Annual IIS Symposium ~Solving the mystery of sleep~ 2018.12, Tokyo. (Poster)
4. Mizoguchi H. Roots of risky decisions in addiction. The 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolism, 2018. 11, 前橋. (口頭)
5. 溝口博之. 依存性薬物がもたらす認知・行動選択異常の解明に向けた基礎研究 . NP 学術奨励賞講演. 第 28 回日本臨床精神神経薬理学会・第 48 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2018. 11, 東京. (口頭)
6. Macpherson T, Mizoguchi H, Yamanaka A, Hikida T. Ventral pallidum neurons control aversive learning. Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting, 2018.11, San-Diego. (Poster)
7. Inutsuka A, Mizoguchi H, Kaneko R, Nomura R, Takanami K, Sakamoto H, Onaka T. Monomeric and dimeric RFP-dependent Cre and its application to detect glucocorticoid receptor activation. Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting 2018.11, San-Diego. (Poster)
8. 溝口博之. 基礎研究から探る覚せい剤依存の脳内機序. 柳田知司賞講演. 第 53 回アルコール・アディクション医学会学術総会. 2018. 9, 京都. (口頭)
9. Wang T, Fukumoto K, Mizoguchi H, Yamada K. An Operant task for testing risky decision-making in mice. 19th World Congress of International-Society-for-Biomedical-Research-on-Alcoholism (ISBRA) 2018. 9, Kyoto. (Poster)
10. Mizoguchi H, Yamada K. Roots of risky decisions in drug dependence. 10th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, 2018. 6, Kyoto. (Oral)
11. Md.Ali Bin Saifullah, 山中宏二, 溝口博之. タッチスクリーン式弁別課題を用いた認知機能解析システムの確立. 日本薬学会第 138 年会, 2018. 3, 金沢 (ポスター)
12. 溝口博之, 犬束 歩, 片平健太郎, 山田清文. 島皮質 GABA 神経の機能操作は意思決定に影響する. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 2017. 8, 京都. (口頭)
13. Md.Ali-Bin-Saifullah, 溝口博之. タッチスクリーン式弁別課題を用いた認知機能解析システムの確立. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム, 2017. 8, 京都. (ポスター)
14. 溝口博之, 犬束 歩, 片平健太郎, 山田清文. リスク下の意思決定における島皮質 GABA 神経の役割. 日本アルコール・アディクション医学会学術総会, 2017. 9, 横浜. (口頭)
15. 溝口博之, 山田清文. 依存性薬物がもたらす認知・意思決定異常. 第 40 回日本神経科学大会 (日本神経精神薬理学会合同企画シンポジウム) 2017. 7, 千葉市. (口頭)
16. 犬束 歩, 溝口博之, 金子涼輔, 尾仲達史. ナノボディおよび DARPIn を利用した RFP-dependent Cre の開発. 第 40 回日本神経科学大会, 2017. 7, 千葉市 (ポスター)
17. Mizoguchi H, Yamada K. Nicotinic acetylcholine receptor as a target of harm reduction and treatment in addiction. 第 51 回日本アルコール・アディクション医学会学術総会, シンポジウム, 2016. 10. 東京. (口頭)
18. 溝口博之, 山田清文. 意思決定障害と創薬標的としてのニコチン受容体. 第 18 回応用薬理シンポジウム, シンポジウム, 2016. 8. 名古屋. (口頭)
19. 溝口博之, 山田清文. 島皮質 GABA 神経は薬物依存ラットの意思決定に関与する. 第 39 回日本神経科学大会, シンポジウム, 2016. 7, 横浜 (口頭)
20. 溝口博之, 山田清文. 薬物依存症における意思決定異常. 第 46 回日本神経精神薬理学会, シンポジウム, 2016. 7. ソウル. (口頭)

21. 溝口博之. 薬物依存における意思決定と島皮質機能障害. 第34回日本生理心理学会大会、シンポジウム, 2016. 5. 名古屋(口頭)

〔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://www.riem.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山中 章弘

ローマ字氏名：(YAMANAKA, akihiro)

研究協力者氏名：大平 英樹

ローマ字氏名：(OHIRA, hideki)

研究協力者氏名：片平 健太郎

ローマ字氏名：(KATAHIRA, kentaro)

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。