

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07720

研究課題名(和文) 意思決定のための情報蓄積を担う神経回路の形態と神経活動へのNMDA受容体の関与

研究課題名(英文) Anatomical analysis of neuronal network for accumulation of evidence in decision making and NMDA receptor involvement

研究代表者

石田 真帆 (Ishida, Maho)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80362086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて頭蓋骨への頭部固定用フレーム設置手術を施し、頭部固定下で知覚意思決定課題を訓練した。課題では、左右のスピーカーから、総数約40回/1秒間のクリック音を提示し、クリック音数の多い方を判断させ、ペダルを離すことで答えさせた。クリック音の左右の比率に21:19～39:1まで難易度を設けて課題を行った結果、正解率は難しい課題では約50%、優しい課題では約80%となり、ラットがクリック音を知覚して意思決定していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットは脳が比較的大きく、昔から行動実験や精神疾患のモデル多用されてきた歴史がある。さらに近年遺伝子改変モデル動物の増加も著しい。本研究ではラットを用いて、知覚意思決定課題を行わせる訓練方法を確立できた。これにより、電気生理学的な解析、またカルシウムセンサー蛋白を用いた神経細胞活動の画像解析に発展させることで、知覚意思決定時の脳内システムについて解剖学的知見を含む新たな知見を得ることにつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Head-fixed Long-Evans rats were trained to perform a perceptive decision making task. In the task, rats select which pedal to release as a result of decision making according to an auditory stimulus presented for 1 second. The auditory stimulus in each trial is a total of 40 clicks composed of left and right clicks, the ratio of which is preselected randomly. For example, a click rate of 39:1 is used for an easy trial and 21:19 is used for a difficult trial. The accuracy was about 80% in an easy task and was gradually decreased to about 40-50% in a difficult task.

研究分野：神経科学

キーワード：ラット 知覚意思決定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

意思決定とは、複数の選択肢から一つを選ぶことである。知覚意思決定では、数百ミリ秒という短時間で、意思決定に必要な感覚情報が収集・蓄積され、ある選択肢を肯定する情報が十分蓄積すると出力に向けた次のステップが発動する。このような情報蓄積のメカニズムを探る研究は、霊長類を用いて電気生理学的手法により行われてきた。その結果、後部頭頂葉皮質(Posterior parietal cortex, PPC)の一部である外側頭頂間野(Lateral intraparietal subregion, LIP subregion)の神経細胞の発火頻度が、意思決定に必要な情報蓄積の過程で上昇すること、平易な意思決定の場合には、難しい意思決定の場合よりもシャープに上昇することが明らかにされており、情報蓄積を担う脳内システムの存在が明らかになりつつある(Kumano, Suda, Uka, J Neurosci, 2016)。一方で、意思決定における情報蓄積の実体として、NMDA 受容体を介した再帰的神経回路モデルが提唱されている(Wang, Neuron, 2002)。すなわち、数百ミリ秒を要する情報蓄積に必要な神経活動を時間的に貯める機構に、イオンチャネルの開口時定数が長いNMDA 受容体と、出力した神経活動を自身に戻す再帰的回路が関わるというものである。実際、NMDA 受容体拮抗薬であるケタミンの低用量全身投与により、意思決定の柔軟性が損なわれることが知られている(Suda, Uka, Commun Biol, 2022)。

2. 研究の目的

霊長類で認められている、意思決定に必要な情報蓄積に関わる神経活動の存在が、ラットにおいても報告されている(Hanks et al., Nature, 2015)。本研究の目的は、情報蓄積を伴う知覚意思決定課題をラットに行わせ、脳内神経活動を可視化する実験系を構築することである。ラットを用いることで、十分なサンプル数を元にした詳細な解剖学的解析を行うことが可能になる。これを用いて、再帰的な神経回路とNMDA 受容体機能の関わりを解析し、情報蓄積を担う脳内システムの実態を明らかにしていくことを視野に入れている。

3. 研究の方法

ラットに意思決定課題を訓練するため、アルミフレームを頭蓋骨に設置する手術を行う。ラットに給水制限を行ったうえで、水を報酬として頭部固定状態で訓練を行う。訓練装置では、ラットは頭部固定下、前肢で左右ペダルを上下させられると共に、ノズルにより水報酬を得られるものとする。ラットの胸部から尾部はトンネル内で比較的自由に動ける状態とする。左右スピーカーからの音出力、および水報酬のためのバルブ開閉の出力、ペダルの動き情報の入力をパソコンにより制御できる訓練プログラムを、MATLAB あるいは Arduino を用いて作成する。最終的には、左右のスピーカーからクリック音を呈示し、クリック音の総数が多かった側の前肢を上げることで答えるように訓練する。左右のクリック音の総数は平均 40 回/秒とする。すなわち、1 秒間当たりの左右クリック数を $rate_l$ 、 $rate_r$ とした場合に $rate_l + rate_r = 40$ とする。 $rate_l$ を 1 から 39 の区間で複数設定することにより設けた難易度別試行をランダムに行い、正解率と反応時間を検出する。

4. 研究成果

(1)トランスジェニックラット LE-Tg(GCaMP6f-7)脳神経細胞における GCaMP6f 発現の確認

本研究では、将来的に神経活動を可視化できるよう、 Ca^{2+} センサー蛋白(GCaMP6f)を神経細胞で発現するトランスジェニックラット LE-Tg(GCaMP6f-7)を用いた。ラットを灌流固定後、脳の凍結切片を作成し、一次抗体(Anti-green fluorescent protein, #A11122, Invitrogen, 1:1,000)

と二次抗体 (Goat anti-rabbit IgG H&L(Alexa Fluor 488), #ab150077, abcam, 1:500) で免疫染色し、GCaMP6f の発現を確認した。

(2)頭部固定用フレーム設置手術後の訓練期間

頭部固定用フレームは、露出した頭蓋骨にステンレスねじを差し込んで支柱とし、歯科用セメントを介して接着した。訓練中にフレームの外れた事例では、設置手術後経過日数は平均 124 ± 13 日 ($n = 7$) であった。

(3)訓練プログラムの作成

以下の内容のプログラムを MATLAB および Arduino を用いて作成した。

- (a) 手でノズルから水報酬を出力する。
- (b) 開始音出力後、両ペダルが下がれば水報酬を出力する。
- (c) (b) を改変し、両ペダルが下がればクリック音 ($rate_l = 20$) を一定時間 ($0.1s \sim 1.0s$) 出力し、その間ペダルを下に維持できれば水報酬を出力する。
- (d) (c) を改変し、クリック音 ($rate_l = 20$) 出力後、合図音を出力し、ペダルを上げたら左右に関わらず水報酬を出力する。
- (e) (d) でクリック音 ($rate_l = 0$ or 40) と同側のペダルを上げたら水報酬を出力する。
- (f) (e) で一定回数 (10 回 ~ 1 回) 正解すれば左右を切り替える。
- (g) (e) で正解の場合はランダムに左右を切り替えた試行を行い、不正解の場合は同側の試行を 90% の確率で繰り返す。
- (h) (e) (f) (g) で左右からクリック音 ($rate_l = 5$ or 35) を出力する。
- (i) (e) で $rate_l$ を 1 ~ 39 の間で複数設けて作成した左右クリック音をランダムに出力し、左右でクリック数の多い方のペダルを上げたら水報酬を出力する。

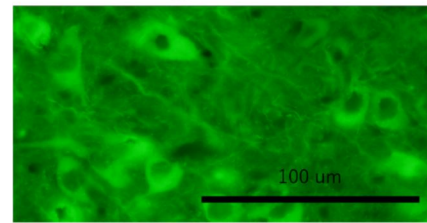
(c) ~ (i) では、クリック音出力の最中にペダルを上げた場合にフライングと判定し、エラー音出力後、数秒間次の試行を行わないペナルティを科し、合図音まで反応を待機するよう訓練した。

(4)知覚意思決定課題訓練方法の確立

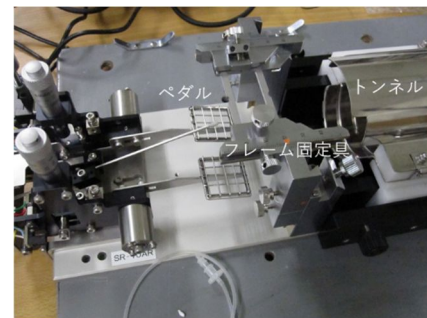
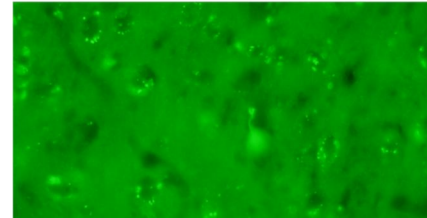
まず、十分な給水制限による訓練への動機づけを行った。訓練では、ラットがトンネル通過後に、頭部に設置したフレームを掴んで装置に固定する。トンネルは前もって飼育ケージ内にも設置して馴化させた。訓練開始前にも頭部を把持してシリンジで給水を行い、頭部固定と摂水を関連付けた。また、体重から (訓練前体重の 83-85% まで) ラットが十分に給水制限されていることを確認した。訓練中の体重は雌で約 250g、雄では約 300g であった。訓練装置へ固定する初回には、ラットのフレームを把持し、ラットが静止すれば解放することを数回繰り返すことで、フレームを掴まれることと静止することを関連付け、固定せずにトンネルを数回通過させた上で、素早く静かに固定した。初回はすぐに給水し (プログラム a) 訓練装置への固定と摂水を関連付けた。給水量は少なめに加減し、翌日以降の訓練への動機づけとした。

プログラム b により、開始音を合図にラットが左右両ペダルを下げて水報酬を得られるように訓練した。左右ペダルの間には仕切りを設けて左右を認識しやすくした。片方の前肢でノズルを掴むなど、どうしても片方のペダルしか下げられないラットでは、ラットがノズルを離れた瞬間や、両前肢をペダルに載せたタイミングで手動供水して前肢をペダルに載せるように仕向け

LE-Tg(GCaMP6f-7)



wild type



た(プログラム a)。

プログラム c により、両ペダルを下げた状態で、クリック音が出力されている間ペダルを下げた状態を維持できるよう訓練した。クリック音は 0.1s ずつ延長した。

プログラム d により、クリック後の合図音で反応させる訓練をした。クリック後、ラットはしばらく両ペダルを下げ続けるが、やがてどちらかのペダルを上げる。このタイミングで供水することにより、合図音とペダルを上げることを関連付けた。この時、個々のラットが上げるペダルの左右の偏りを観察しておき、次の訓練に反映させた。

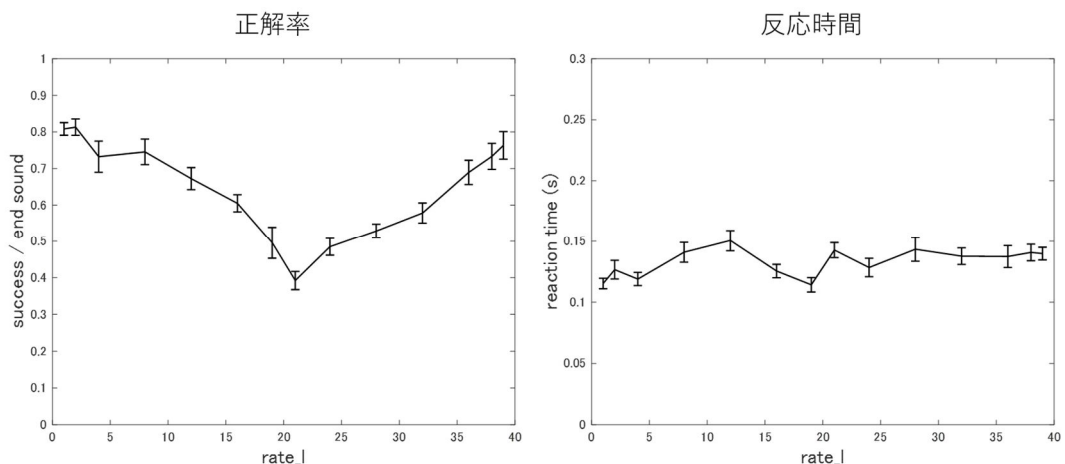
プログラム e により、クリック音と同側のペダルを上げられるよう訓練した。最初はラットが上げやすい方から始め、確実に片方を上げられるまで繰り返した。続いてクリック音の左右を切り替えるが、そのタイミングが早すぎるとラットは混乱して両ペダルを同時に上げるようになってしまう。またどうしても切り替えられないラットもいるが、習得の可否は、最低 1 週間は繰り返し訓練した上で決定した。

多くのラットには左右に得手不得手があり、左右を特定回数繰り返す方法では、苦手な側が全て不正解でも、切り替わりを待てば正解できる試行となるため、なかなか苦手な側を習得できないという問題も生じる。プログラム f を用いて、正解ペダルを上げられるまで繰り返す訓練により、左右別のペダル操作および切り替え操作を習得させた。

左右ペダルを一定回数、短い間隔で切り替えることができるようになっても、クリック音の左右をランダムにすると混乱するラットは多い。プログラム g を用いてクリック音とペダルの左右を関連付けるよう訓練し、さらにプログラム h により左右のクリック音を混在させてクリック音の多い方を答えられるように訓練した。約 7 割以上の正解率を示したラットを、訓練習得ラットとした。訓練は 1 日当たり最長 3 時間とし、毎日行うことが有効であると思われた。課題の習得には約 2 か月を要した。

(5) 知覚意思決定課題の正解率と反応時間

プログラム i を用いて、知覚意思決定課題を行った。rate_l を 1~39 まで 14 段階設定して課題を行った結果、難しい試行 (rate_l が 20 に近い試行) での正解率は、偶然による正解率と同等の 40-50% であるが、易しい試行 (rate_l が 0 や 40 に近い試行) になるにつれて ~80% まで正解率は上昇し、ラットがクリック音を知覚して意思決定していると考えられた。クリック出力後、合図音からペダル反応までの時間を計測した反応時間には、難易度による差は認められなかったことから、合図音のタイミングですでに意思決定されていた可能性が考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	宇賀 貴紀 (Uka Takanori) (50372933)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

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