

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293053

研究課題名(和文)意思決定の神経回路・分子機構の解明と創薬研究への応用

研究課題名(英文) Study on the neuronal circuit and molecular mechanism underlying decision-making and its application for drug development

研究代表者

山田 清文 (Yamada, Kiyofumi)

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30303639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬物依存などの精神疾患患者では意思決定に異常が認められるが、そのメカニズムは不明である。本研究ではラット用ギャンブル課題を用いて、覚せい剤依存モデルラットの意思決定障害を明らかにするとともに、神経薬理学的実験およびDREADDシステムによる特定神経の活性操作により、そのメカニズムを解明した。すなわち、覚醒剤依存モデルラットにおいては、島皮質のGABA神経機能が低下しており、これが同モデルラットの意思決定障害に関与していることを明らかにした。さらに、DREADDシステムを応用して島皮質の神経活動を操作すると、ギャンブル課題におけるアーム選択行動が変化した。

研究成果の概要(英文)：Patients suffering from neuropsychiatric disorders such as substance-related and addictive disorders have impairments in decision-making, which may be associated with their behavioral abnormalities. However, the neuronal mechanisms underlying such impairments are largely unknown. Using a gambling test, we demonstrated that methamphetamine (METH)-dependent rats choose a high-risk/high-reward option more frequently, and assign higher subjective value to high returns, than control rats, suggesting that decision-making is impaired in the drug-dependent animals. Immunohistochemical analysis following the gambling test revealed aberrant activation of the insular cortex (INS) and nucleus accumbens in METH-dependent animals. Pharmacological studies together with in vivo microdialysis showed that GABAergic neurotransmission in INS played a crucial role in decision-making. Moreover, manipulation of INS activation using DREADD technology resulted in alterations to decision-making.

研究分野：薬理学

キーワード：神経科学 脳神経疾患 意思決定

1. 研究開始当初の背景

意思決定は時間的、機能的に異なる4つのプロセス(選択肢の評価とその順位付け、行動の選択と実行、結果の評価、選択肢の再評価)から成り、それぞれに認知、注意、作業記憶、動機付け、予測、衝動性などの心理的プロセスが関与している(Biol Psychiatry 2005)。また、fMRIを用いた脳機能画像解析により、意思決定に関連する脳領域(前頭前野腹内側核、島皮質、大脳基底核など)も明らかになっている(Neuron 2013)。

一方、前頭前野腹内側核(ventromedial prefrontal cortex; VMPFC)に損傷がある患者の行動異常に意思決定障害が関与していることがIowa Gambling Test(IGテスト)により証明された(Brain 2000)。その後、IGテストを用いて、薬物依存やギャンブル依存の他、統合失調症、双極性障害、うつ病、自閉症、L-Dopaで治療中のパーキンソン病など、多くの精神疾患において意思決定に異常があることが明らかになっている(Neuron 2013)。例えば、薬物依存者ではリスク(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目先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。これは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関係する思慮的な前頭葉皮質回路のアンバランスに基づくと考えられているが、詳細は不明である(Nat Neurosci. 2005)。

2. 研究の目的

薬物依存やギャンブル依存の他、統合失調症などの多くの精神疾患において、明らかな意思決定の異常が認められるが、そのメカニズムは不明であり、有効な治療法も開発されていない。動物実験において意思決定を評価するための適切なテスト課題や安定した意思決定異常を示す動物モデルが確立されていないことが、その原因の一つと思われる。我々は、意思決定を定量的に解析可能なラット用ギャンブルテストを独自に考案するとともに、覚せい剤依存誘発性意思決定障害モデルの作製に成功した。

本研究では、特定の神経細胞の活性を特異的に制御することが可能な designer receptor exclusively activated by designer drug (DREADD) システムを駆使して、意思決定に関わる神経回路の機能と分子機構の解明を目的とした基礎的研究を行った。さらに、意思決定障害の治療を可能とする創薬標的の同定を目的とするトランスレショナルリサーチを進めた。

3. 研究の方法

ラットの意思決定の解析は、ヒトの意思決定の検査に広く使用されているIGテストを参考に我々が独自に開発した8方向放射状迷路を用いたラット用ギャンブル試験を使

用した。具体的には、餌報酬と罰刺激(ラットが食べられないようにキニンを塗した餌ペレット)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、餌の置いてないアームへの侵入回数からラットの学習・記憶を評価した。

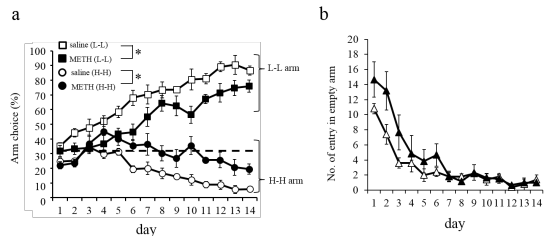


Fig. 1 Rats were given METH at a dose of 4 mg/kg once a day for 30 days. The gambling test was initiated after 2 weeks of withdrawal from METH. a, Performance of METH-dependent rats in the gambling test. Values are means \pm SE (n = 5-6). *, P < 0.05. b, Number of entries into empty arms. Values are means \pm SE (n = 5-6). n.s.: not significant.

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)一方、覚せい剤依存モデルでは、正常動物に比較してH-Hアームを選択する割合が有意に増加した(リスク志向性, Fig.1)。この意思決定障害モデルの心理学的特徴について、強化学習モデルに基づく理論的解析を行うため、名古屋大学環境学研究科の大平英樹教授/片平健太郎准教授グループと共同研究を実施し、我々が動物実験の基礎データを提供し、同グループが理論的解析を担当した。

DREADDシステム(hM3DqおよびhM4Di)はアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて目的の脳部位へ発現させた。具体的には、島皮質神経にDREADDを強制発現させ、特異的リガンドであるCNOを投与して島皮質の神経活動を操作した時のアーム選択パターンの変化を解析した。

大脳基底核からの出力系のうち、ドーパミンD1受容体(D1R)を発現するGABA神経(直接経路:サブスタンスP(SP)を共発現)とD2受容体を発現するGABA神経回路(間接経路:Enkを共発現)の役割を解析するため、SPプロモーター制御下にhM3Dq/hM4Diを発現するDREADD(直接経路)とEnkプロモーター制御下に発現するDREADDシステム(間接経路)を用いて、ギャンブル試験を行った。

4. 研究成果

DREADDシステムを用いて、hM3DqあるいはhM4Diを発現した神経細胞の活動を特異的リガンド(CNO)で制御(活性化あるいは抑制)し、ラットの意思決定を薬物で操作することを試みた。初めに正常ラットの島皮質にAAVを感染させ、蛍光タンパクmCherryの発現パターンから島皮質領域にhM3Dqが発現していることを確認した(Fig.2)。さらに、CNO投与が島皮質を活性化させるかどうかc-Fosマッピング法を用いて免疫組織学的検討を行ったところ、コントロール群

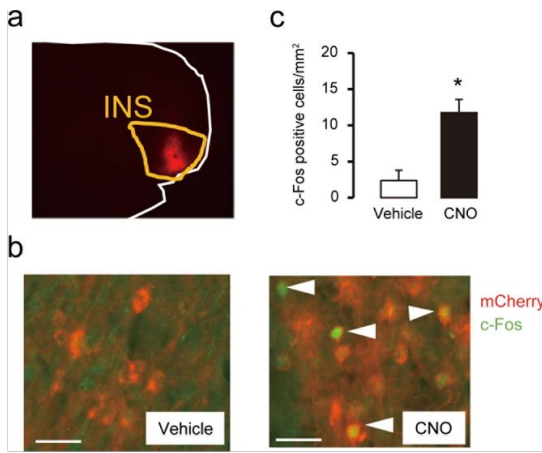


Fig. 2. *a*, Representative photograph of the expression of hM3Dq-mCherry in the insular cortex (INS). *b*, Representative photograph of c-Fos expression induced by CNO treatment in the INS of hM3Dq-overexpressed rats. Scale bar: 50 μ m. *c*, Quantitation of c-Fos expression induced by CNO treatment in the INS of hM3Dq-overexpressing rats. Rats were sacrificed 1.5 h after CNO treatment. Values are means \pm SE (n = 4-5). *, $P < 0.05$ vs. vehicle-treated group

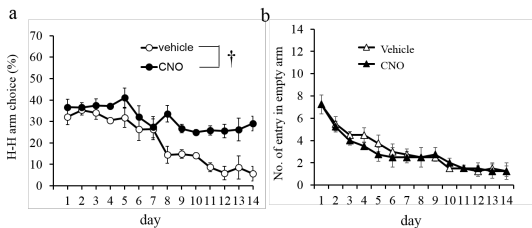


Fig. 3 Manipulation of neural activity in the INS using the DREADD technology resulted in alterations of arm-choice behavior in the gambling test in normal rats. *a*, hM3Dq was overexpressed in the insular cortex (INS) of native rats. The rats were given i.p. injections of CNO (0.5 mg/kg) or vehicle 30 min before each gambling test. Values are means \pm SE (n = 4). *, $P < 0.05$. *b*, Effect on number of entries into empty arms. Values are means \pm SE (n = 4).

と比較して c-Fos 発現の増加が確認できた (Fig. 2)。そこで、島皮質に hM3Dq を過剰発現させたラットに CNO を投与して、島皮質が活性化された状態でギャンブル試験を行った。

Vehicle 処置コントロール群では、無処置正常ラットと同様、次第に H-H アーム選択率が減少し、リスク回避型の意思決定が認められた。一方、CNO 処置群では H-H の選択率は変化しなかった (Fig. 3)。

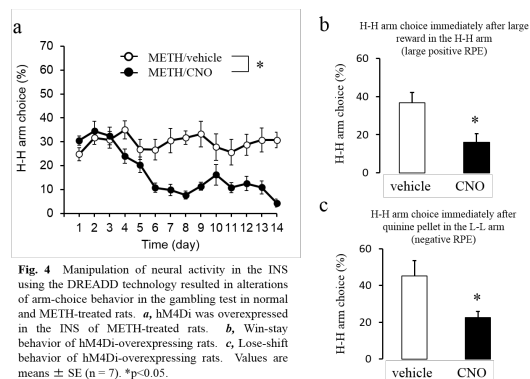


Fig. 4 Manipulation of neural activity in the INS using the DREADD technology resulted in alterations of arm-choice behavior in the gambling test in normal and METH-treated rats. *a*, hM4Di was overexpressed in the INS of METH-treated rats. *b*, Win-stay behavior of hM4Di-overexpressing rats. *c*, Lose-shift behavior of hM4Di-overexpressing rats. Values are means \pm SE (n = 7). * $p < 0.05$.

覚せい剤依存ラットの島皮質に hM4Di を発現させ、CNO を投与して島皮質の活動を抑制したところ、H-H アームの選択率が減少し意

思決定異常が緩解した (Fig. 4)。

以上より、DREADD システムは神経活動ならびに行動を制御する手法として有用であることが確認できた。また、島皮質の活動操作は意思決定に影響すること、覚せい剤依存ラットの意思決定障害には島皮質の異常興奮が関与していることが示唆された。

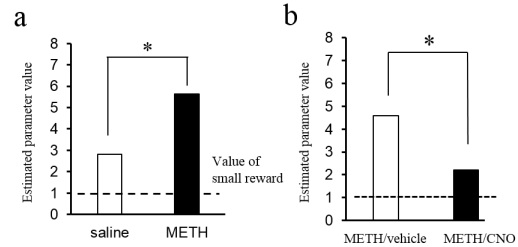


Fig. 5 Reinforcement learning model-based analysis of rats' performance. *a*, motivational value of large reward. *b*, motivational value on CNO-treated hM4Di expressing METH rats. *, $P < 0.05$.

次に、数理モデル (Q-学習) を用いてギャンブル試験の行動データを解析し、覚せい剤依存ラットの意思決定障害の心理学的メカニズムについて検討した。その結果、覚せい剤依存ラットのハイリターンに対する期待値 (motivational value) は、正常ラットと比較して有意に高く、DREADD により島皮質の活動を抑制することで低下した (Fig. 5)。以上より、島皮質は motivational value の決定に重要な脳領域であることが示された。

これまでの我々の神経化学的解析により、島皮質の GABA 神経の機能不全がリスク嗜好性の意思決定に関与することが考えられた。そこで、GABA 作動性神経機能の特異的制御を目指し、GAD プロモーターによる DREADD の発現制御を可能とするウイルスベクターの作製を目指した。In vivo 実験で感染効率を確認したが、細胞選択性に若干の問題がある可能性があり、別の方法を検討することにした。

次に、大脳基底核直接経路の制御を目指し、サブスタンス P プロモーター制御 (直接路) とエンケファリンプロモーター制御 (間接路) による DREADD ウイルスベクターを用いてギャンブル試験を行った。

側坐核直接路に hM3Dq を発現するラットに CNO を投与したところ、vehicle 処置コントロール群と比較して、c-Fos 発現細胞の増加が観察され、mCherry 陽性細胞において有

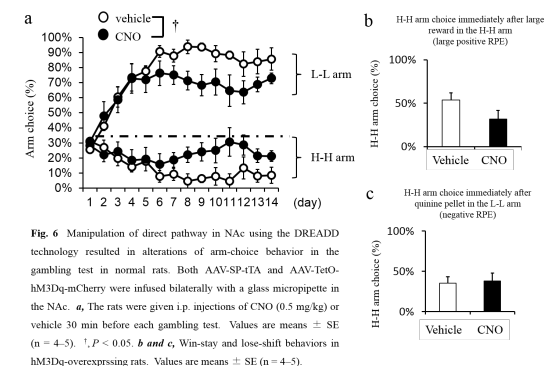


Fig. 6 Manipulation of direct pathway in NAc using the DREADD technology resulted in alterations of arm-choice behavior in the gambling test in normal rats. Both AAV-SP-tTA and AAV-TetO-hM3Dq-mCherry were infused bilaterally with a glass micropipette in the NAc. *a*, The rats were given i.p. injections of CNO (0.5 mg/kg) or vehicle 30 min before each gambling test. Values are means \pm SE (n = 4-5). *, $P < 0.05$. *b* and *c*, Win-stay and lose-shift behaviors in hM3Dq-overexpressing rats. Values are means \pm SE (n = 4-5).

意に増加した。次に、この hM3Dq 発現ラットを用いてギャンブル試験を行った。CNO を投与して側坐核直接路を活性化させると、H-H アームの選択率が高くなり、リスク志向な行動選択を示した (Fig.6)。一方、ラットの側坐核の間接路に hM3Dq を強制発現させたラットの場合、CNO を投与して側坐核間接路を活性化しても、vehicle 処置コントロール群と比較してアーム選択行動に大きな変化は認められなかった。

創薬標的分子として、我々は覚せい剤依存ラットの意思決定障害に対するニコチンの有効性を見出している。最近、大脳皮質における 5 サブユニットから構成されるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) が精神疾患や喫煙 (タバコ依存) に関わる可能性が報告された (Nature Med. 2017)。このことから、nAChR は覚せい剤依存ラットの意思決定異常の創薬標的となり得る可能性があり、nAChR 選択的作用薬が意思決定異常に効果を示す可能性があると考えている。

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 11 件)

Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K: Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: The role of Girdin in the CNS. Rev Neurosci., 27:481-90, 2016. (査読有)

Nagai T, Nakamuta S, Kuroda K, Nakauchi S, Nishioka T, Takano T, Zhang X, Tsuboi D, Funahashi Y, Nakano T, Yoshimoto J, Kobayashi K, Uchigashima M, Watanabe M, Miura M, Nishi A, Kobayashi K, Yamada K, Amano M, Kaibuchi K.: Phospho-proteomics of the dopamine pathway enables discovery of Rap1 activation as a reward signal in vivo. Neuron 89: 550-565, 2016. (査読有)

Aoyama Y, Toriumi K, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, Sakakibara N, Soh Y, Mamiya T, Nagai T, Kim HC, Hiramatsu M, Nabeshima T, Yamada K: Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology 41: 578-589, 2016. (査読有)

Nakajima A, Aoyama Y, Shin, EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi, T, Ohizumi Y, Yamada K: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and

reduces soluble A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). Behav. Brain Res. 289: 69-77, 2015. (査読有)

Mizoguchi H, Katahira K, Inutsuka A, Fukumoto K, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, Yamada K: Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 112:E3930-3939, 2015. (査読有)

Furukawa-Hibi Y, Yun J, Nagai T and Yamada K: Stress increases DNA methylation of the neuronal PAS domain 4 (Npas4) gene. Neuroreport 26:827-832, 2015. (査読有)

Ibi D, Yamada K: Therapeutic targets for neurodevelopmental disorders emerging from animal models with perinatal immune activation. Int. J. Mol. Sci. 16, 1-12, 2015. (doi:10.3390/ijms161226092) (査読有)

Yamada S, Nagai T, Nakai T, Ibi D, Nakajima A, and Yamada K: Matrix metalloproteinase-3 is a possible mediator of neurodevelopmental impairment due to polyI:C-induced innate immune activation of astrocytes. Brain Behav Immun., 38:272-282, 2014. (査読有)

Nakai T, Nagai T, Wang R, Yamada S, Kuroda K, Kaibuchi K, Yamada K: Alterations of GABAergic and dopaminergic system in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the Disc1 gene. Neurochem. Int., 74:74-83, 2014. (査読有)

Nakai T, Nagai T, Tanaka M, Itoh N, Asai N, Enomoto A, Asai M, Yamada S, Saifullah MAB, Sokabe M, Takahashi M, and Yamada K: Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. J. Neurosci., 34:14995-15008, 2014. (査読有)

Nakajima A, Ibi D, Nagai T, Yamada S, Nabeshima T, Yamada K: Induction of interferon-induced transmembrane protein 3 gene expression by lipopolysaccharide in astrocytes. Eur. J. Pharmacol., 745:166-175, 2014. (査読有)

[学会発表](計 12 件)

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、2016年10月7日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

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年8月6日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

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回日本神経科学会、2016年7月21日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

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年7月2日、ソウル（韓国）

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年5月14日、名古屋大学（愛知県名古屋市）

Mizoguchi H, Yamanaka A, Yamada K. Usefulness of DREADD technology combined with adeno-associated virus vector in behavioral pharmacology. 第89回日本薬理学会年会、ワークショップ、2016年3月10日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Mizoguchi H, Yamada K. Nicotine receptor as a potential target for treatment of pathological decision-making in addiction.、WPAIC 2015, 4th Asian Congress of Schizophrenia Research, 4th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Symposium、2015年11月20日、Taipei (Taiwan)

溝口博之、山田清文．基礎研究から探る薬物依存者の意思決定：リスク回避より目先の利益を優先する近視眼的意思決定、平成27年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、シンポジウム、2015年10月13日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Mizoguchi H, Yamada K. The insular GABAergic system controls decision-making in healthy and drug-dependent animals.、IBNS 24th Annual Meeting.、Symposium、2015年6月3日、Victoria (Canada)

溝口博之、山田清文．島皮質は薬物依存症モデルラットの意思決定に関与する、第88回日本薬理学会年会、シンポジウム、2015年3月20日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

溝口博之、片平健太郎、犬束 歩、大平英樹、山中章弘、山田清文．薬物依存症の意思決定異常と島皮質、第36回日本生物学的精神医学会、第57回日本神経

化学会大会合同年会、シンポジウム、2014年9月29日、奈良県文化会館（奈良県奈良市）

溝口博之．日本心理学会第78回大会、シンポジウム、意思決定異常と島皮質意思決定研究からみた薬物依存症、2014年9月10日、同志社大学（京都市上京区）

〔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

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/pharmacy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 清文 (YAMADA, Kiyofumi)
名古屋大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30303639

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

永井 拓 (NAGAI, Taku)
名古屋大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10377426