

時間・空間選択的な神経活動の同定と操作による 報酬系神経回路の機能解明

所属： 大阪市立大学 大学院医学研究科 神経生理学分野

助成対象者： 松本 英之

概要

ドーパミンは、学習、モチベーション、運動、意思決定といった生存に重要なさまざまな生体機能に関与している。これまでの研究から、ドーパミン系は空間（投射神経回路）と時間（応答のタイミングやパターン）の情報を組み合わせて多様なドーパミン信号パターンを生成することで、個々の機能の適切な処理に関与していると考えられている。そこで本研究は、電気生理学と光遺伝学を組み合わせ、ドーパミンニューロン種の投射神経回路別の活動を高い時間分解能で計測して同定、操作する技術を開発することを目的とする。さらに、この技術を自由行動中の動物に適用し、多様な機能を司るドーパミン神経回路の情報処理機構を解明することを目指した。

abstract

Dopamine plays important roles in various brain functions such as motivation, learning, movement and decision-making. Recent studies suggest that the diversities of dopamine signals in space (projection pathways) and time (timing and temporal patterns) are responsible for processing individual brain functions properly. Combining in vivo electrophysiology and optogenetics, we developed a novel technique identifying projection specific dopamine electrical activities with sub-millisecond time resolution. This technique will reveal new insights into the mechanisms of information processing underlying various brain functions in the dopamine reward system.

研究内容

【背景】

中脳に分布するドーパミンニューロンは、学習、モチベーション、運動、行動選択など、我々の生存に必須の多様な機能に關与している。このような多様な機能に關する情報は、ドーパミンニューロンの異なる時間タイミングにおける応答や、時間スケールの異なる応答パターンとして投射先の脳領域に適切に伝達されていると考えられている（ドーパミン信号の時間的な多様性）。一方で、近年の研究から、ドーパミンニューロンは性質の異なるヘテロな集団から成り、投射する脳領域別に異なる機能に關する情報を伝達していることが明らかになってきている（空間・投射回路別の多様性）。したがって、ドーパミン系は時間と空間（神経回路）における信号の多様性を巧妙に組み合わせることで、状況に応じた適切な情報処理に貢献していると考えられる。これまで生体脳からの活動計測法として用いられてきた、電気生理学的手法やイメージング法は、時間あるいは空間（神経回路）の一側面における多様性を調べる上で優れた研究技術である。一方で、時間と空間の両方の多様性を同時計測する技術の実現は難しかった。そのため、ドーパミン系が多様な機能を処理する神経回路機構を包括的に理解する上で大きな障壁となっていた。

【目的】

このような技術的な困難を克服するため、本研究は「ドーパミンニューロン単一細胞活動を同定して投射先別に分類する研究技術を開発する」ことを第一の目的とした。時間的な多様性を高い分解能で計測できる電気生理学的手法を用いて、単一ニューロン活動の大規模な同時計測を行う（[Matsumoto et al., eLife, 2016](#)）。そして、ドーパミンニューロン種特異的な活動を投射先別に同定するために、ニューロン種特異的にオプシンを発現させ、神経活動を光によって操作可能な光遺伝学的手法（[Matsumoto et al., eLife, 2016](#)）を組み合わせる。この新規の技術を自由行動中の動物に適用することで、学習やモチベーション、運動、行動選択といった機能を司るドーパミン系の情報処理機構を神経回路レベルから明らかにすることを目指した。

【結果】

本研究ではまず、中脳に分布するドーパミンニューロンの活動を投射先別に同定する

ため、ドーパミンニューロンの軸索に光感受性陽イオンチャネル ChR2 を発現させ、軸索への光照射によって発生させた活動電位を検出することで細胞同定する技術の確立を行なった。このために、ドーパミンニューロン種特異的に Cre 組換え酵素を発現させる BAC トランスジェニックラット (Witten et al., *Neuron*, 2011) を用意し、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて Cre 組換え酵素依存的に ChR2 を発現させる系を利用した。腹側被蓋野には、ドーパミンニューロン以外にも複数のニューロンタイプが存在し、ドーパミンニューロンと類似の脳領域へと軸索を投射させることが知られている。そこでまず、ChR2 がドーパミンニューロン特異的に発現しているのかどうか検討した。AAV を腹側被蓋野に注入して二週間後と四週間後に動物を灌流固定し、脳切片を作製、観察した。その結果、ウイルス注入して二週間後には ChR2 の発現が細胞体で観察され、ChR2 で標識された腹側被蓋野ニューロンのほぼ全てがドーパミンニューロンのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 陽性であることがわかった。

次に、ChR2 で標識された腹側被蓋野ドーパミンニューロンの軸索の分布を検討するため、全脳切片を作製し、ChR2 陽性の軸索を観察した。その結果、線条体や側坐核、内側前頭前野、扁桃体において ChR2 で標識された軸索が観察された。これらの軸索は TH 陽性であった。すなわち、腹側被蓋野ドーパミンニューロンの投射先として知られるほぼ全ての脳領域において、ChR2 陽性かつ TH 陽性の軸索が観察された。また、AAV の特定のセロタイプがドーパミン神経軸索における ChR2 発現に有効であることも明らかになった。以上の結果から、ドーパミンニューロン種の活動を投射先別に同定する実験の効率化を図ることができたと考えられる。

ドーパミンニューロンの軸索の電気刺激によって生じた活動電位は、軸索から細胞体へと逆行性に伝わることが知られる (Guyenet and Aghajanian, *Brain Research*, 1978)。そこで、この原理を利用して、腹側被蓋野から多数のニューロン活動を記録しながら投射先脳領域に刺入した光ファイバーより光を照射し、ChR2 陽性ドーパミンニューロンの軸索において活動電位を発生させる。この逆行性のスパイクを細胞体で検出することで、ドーパミンニューロン種の活動を投射先別に同定できると考えられる。上の免疫組織学実験から明らかにされた、ChR2 陽性かつ TH 陽性の軸索が観察された投射脳領域に光ファイバー (直径 200 μ m) を刺入し、腹側被蓋野から多数のニューロン活動を記録中に光照射を行なった。側坐核に刺入した光ファイバーから光照射を行なったところ、光照射から約 13 ミリ秒後に細胞体において活動電位を発生させるニューロンを同定することができた。この逆

行性の活動電位は、光照射に対して一貫して同じ潜時で発生し、順行性の活動電位が発生した直後には観察されなかった（つまり逆行性スパイクと順行性スパイクの衝突によるスパイクの消失が起きたと考えられる[Spike collision test]）。以上の実験により、ドーパミンニューロンの細胞体がある腹側被蓋野で大規模な神経活動同時記録を行いながら、ChR2 陽性ドーパミン神経の投射先において光照射を行うことで、ドーパミンニューロンの活動を投射先別に同定し、体系的に分類できることが明らかになった。

【今後】

本研究技術を、学習、モチベーション、運動、行動選択といったさまざまな機能が必要とされる認知行動課題を行う動物に適用することで、ドーパミン系の投射回路別の情報処理機構を包括的に検証できると考えられる。現在、環境における選択肢の報酬価値を操作することにより、行動開始のモチベーションや選択行動を変化させる行動課題を確立した状況にある。この行動課題を遂行中の自由行動ラットに本研究技術を適用することにより、モチベーション状態や学習の過程における、投射先別のドーパミンニューロン活動の変化やその役割を詳細に調べることが可能である。さらに、同じ実験系を用いて、同定された活動を光遺伝学的手法によって人為的に再現あるいは阻害する操作実験を確立させる。本研究技術を用いて、特定の神経回路の活動と機能の間の因果関係を調べることにより、多様な機能を生み出すドーパミン系の動作原理の解明につながると考えられる。また、本研究技術は、複数の脳領域へと神経投射するシステムに応用できるため、薬物治療のターゲットとなるセロトニン神経系や、記憶に重要な海馬など、脳機能の解明に広く貢献すると考えられる。

引用文献

- [Matsumoto H et al.](#) (2016) Midbrain dopamine neurons signal aversion in a reward-context-dependent manner. *eLife* e17328.
- [Witten IB et al.](#) (2011) Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron* 72, 721-33.
- [Guyenet P. G. and Aghajanian G. K.](#) (1978) Antidromic identification of dopaminergic and other output neurons of the rat substantia nigra. *Brain Research* 150, 69-84.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. #Ishikawa T, #Matsumoto H, Miura K. (#equally contributed) Discriminating dopamine from non-dopamine neurons based on the spontaneous electrical activities. (2018) *Proc of IEEE Brain Initiative Workshop on Advanced NeuroTechnologies 2018*.
2. Saito H, Nishizumi H, Suzuki S, Matsumoto H, Ieki N, Abe T, Kiyonari H, Morita M, Yokota H, Hirayama N, Yamazaki T, Kikusui T, Mori K, Sakano H. (2017) Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. *Nature communications* 8, 16011.

[口頭発表]

1. 松本英之、「中脳ドーパミンニューロンの報酬コンテキストに依存した信号モード変化」、平成 30 年度生理研研究会 情動研究会「情動の神経回路機構とその破綻」(岡崎)、2018 年 9 月 18 日
2. 松本英之、「柔軟に学習する脳のしくみ：意思決定におけるドーパミン信号の役割」、関西学院大学理工学部講演会 (三田)、2018 年 6 月 13 日
3. 松本英之、「学習および動機づけに関与するドーパミン神経系の情報処理機構」、第 15 回生物と行動セミナー、大阪大学人間科学研究科 (大阪)、2018 年 3 月 16 日
4. 松本英之、「オプトジェネティクスを用いた脳機能解析」、第 19 回光科学若手研究会、大阪市立大学医学部 (大阪)、2017 年 11 月 11 日
5. 松本英之、「報酬系における環境適応的な価値表現」、第二回脳と心の研究会、京都大学医学部 (京都)、2017 年 8 月 27 日

[ポスター発表]

1. 齊藤治美、西住裕文、鈴木悟司、松本英之、家城直、阿部高也、清成寛、森田正彦、横田秀夫、平山望美、山崎 崇裕、菊水 健史、森 憲作、坂野 仁 (2017) “Immobility responses are induced by photoactivation of a single glomerular species responsive to fox odor TMT.” 第 40 回日本神経科学学会 (幕張)、30-10e2-1