

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019年度
受付番号 201960668
氏名 石井宏志

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： オックスフォード（国名：イギリス）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
ドーパミンはギャンブルをどう促進するのか—FCVと光遺伝学でドーパミン動態に迫る
3. 派遣期間：令和 1 年 7 月 11 日 ~ 令和 2 年 12 月 1 日
4. 受入機関名及び部局名
オックスフォード大学実験心理学部
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

2020年12月28日

最終報告書『所期の目的の遂行状況及び成果』

受付番号：201960668 氏名：石井宏憲

研究課題：ドーパミンはギャンブルをどう促進するのか—FCV と光遺伝学でドーパミン動態に迫る

競争を勝ち抜くにはリスクを避けては通れないが、過度なリスク選択は身を亡ぼす。脳はどのようにしてリスク選択・回避のバランスをとっているのだろうか。本研究課題ではそのキープレイヤーとしてドーパミンに着目し、ドーパミンが各脳領域の機能をどのように調節するのか研究を進めた。本研究課題の目的は、私がこれまでの研究で確立したラットのギャンブル行動モデルに、新たに派遣先であるオックスフォード大学実験心理学部 Mark Walton 先生の研究室においてドーパミンの活動を計測するための FCV 法およびフォトメトリー法を学び取り入れることで、ギャンブル課題遂行中のラット島皮質前部と側坐核のドーパミンの局所動態を計測することであった。これまでの研究により、島皮質前部はリスク選択を促進する機能を有し、側坐核はリスク回避を促進する機能を有することが示唆されている。本研究によってドーパミンが意思決定のどのタイミングで放出され、またどのようにこれら相反する2つの脳領域の機能を調節している、その機序の解明を目指した。

行動実験装置とギャンブル課題のブラッシュアップ

行動実験モデルはすでに日本で開発・確立したものを派遣先研究室に導入した。その際、実験計画をオックスフォード大学実験心理学部内のセミナーで発表し意見・アドバイスを募ることで、より今回の実験目的に適した実験内容にブラッシュアップすることができた。これは齧歯類だけでなく霊長類やヒトを対象に研究を行う世界のトップ研究者たちが大勢、そして身近に存在する本学ならではの恩恵であった。さらに行動実験の内容だけでなく、それを制御する行動実験装置の改良についても多くのアドバイスを受けることができた。具体的には、ラズベリーパイと呼ばれる超小型コンピューターを導入し、制御プログラムを Python に移行することで非常に安価で拡張性の高い実験装置を確立することができた。ラズベリーパイは単価が5千円~1万円程度と非常に安価でありながら、行動実験の制御には十分なパフォーマンスを有している。また入出力チャンネルとして25ピンを使用可能である。本研究では視覚刺激を呈示するためのLED制御に8つ、8つのポートから報酬である水を供給するための電磁弁制御に8つ、試行を開始するためのゲートを開閉するためのサーボモーターの制御に2つ、ゲートへのエントリーやノーズポークなどを検出するための赤外線センサーのモニターに4つ、イベントのタイムスタンプを外部へ出力するために2つのチャンネルを使った。ラズベリーパイは電源の許容量がギリギリであるため、入出力は TTL

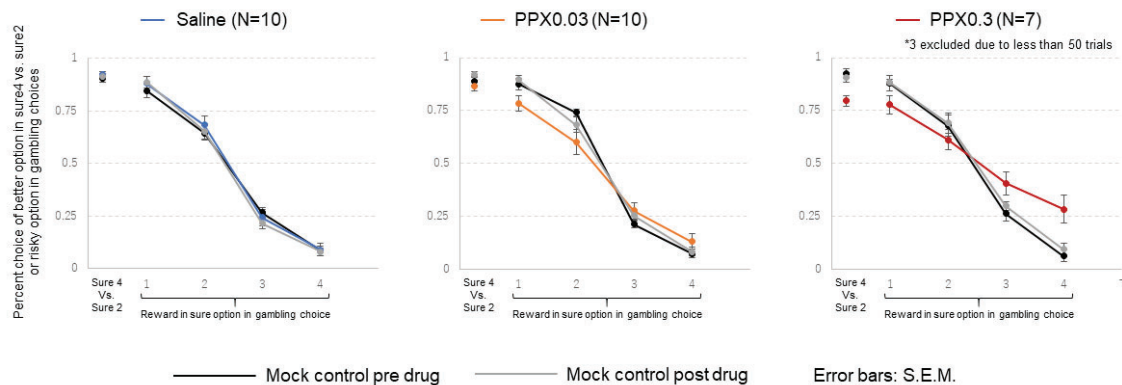
のやりとりのみで行い、各装置の制御には外部電源を用いた。ラズベリーパイ以外にも全体的に自作パーツを多く取り入れることで、1台あたりおよそ10~15万円ほどで完成させることができた。本研究で用いる行動実験装置はオリジナルであるため、市販品と単純に価格を比較することはできないが5分の1から10分の1程度で実現できたと考えられる。これにより限られた予算にもかかわらず4台の行動実験装置を組み上げることができ、複数のラットの行動課題の訓練が可能となった。本行動実験モデルを訓練する場合、1時間弱の訓練を午前と午後2回、1か月間にわたって行う必要があるが、4台の実験装置を用意できたことにより1日に20匹以上のラットを訓練することができた。

行動課題と系統および性差

私がこれまで日本で行ったきた研究ではWistar系統のラットのみを用いてきたが、今回はSD系統の野生型およびSD系統をバックグランドに持つTHCreラットを用いた。結果的に野生型に関してはWistarとSDで差は見られず、円滑に行動課題の訓練を進めることができた。本研究課題は報酬量がLEDによって視覚的に明示されるものの、試行毎に報酬量や左右の位置関係がランダムに変わるため、ラットにとってはステレオタイプな選択を行うことができない難易度の高い行動課題となっている。この実験デザインは同一セッションで複数のコントロール条件を試験するために欠かせない。今回、系統にかかわらずラットが普遍的に高いパフォーマンスを示すことが確認されたことは非常に有意義な結果だと考えている。一方遺伝子改変THCreラットはオスメス共に課題へのモチベーションが低く、特にメスは8匹を訓練したが、いずれも成績が向上せず途中で断念せざるを得なかった。通常の野生型ラットではあれば1時間に200~300試行遂行するが、本系統のメスラットは100試行以下であり、また単純な報酬の大小を弁別する能力ですら通常よりも劣っていた。原理的には問題はないはずであるが、実際にはドーパミンニューロンを中心に何らかの異常を持っている可能性が疑われる。

ドーパミンとギャンブル行動

ギャンブル行動中のドーパミン動態を計測する前に、訓練個体を用いてドーパミンシステムへの薬理学的操作が行動に及ぼす影響について今一度検証することにした。先行研究では齧歯類においてもD2/D3受容体の選択的作動薬であるpramipexole (PPX)がリスク選好性を増加させることが報告されている。しかし過去の研究で用いられてきたギャンブル課題モデルは報酬確率を変動させていたため、薬理操作の影響が意思決定に作用していたのか学習に作用していたのか不明瞭なところが大きかった。対して本モデルは報酬確率は一定であり、報酬の量とリスクの有無が試行毎に明示的に呈示されるため学習の要素による影響が極めて限定されている。その結果D2/D3作動薬はギャンブル行動に対して従来報告されてきた結果とは全く異なる作用を持つことが明らかとなった(次図)。



投与の濃度は過去の複数の研究で用いられたものと同じ 0.03mg/kg (低濃度)、0.3mg/kg (高濃度)、および saline の 3 条件を試験した。行動課題では、リスクがある選択肢 (4 滴もしくは 0 滴、50%。以下 4/0) と確実な選択肢 (1 滴の場合から 4 滴の場合まで) を与えるギャンブル選択と確実な 4 滴と確実な 2 滴を選択させる弁別選択がある。低濃度条件では弁別選択における成績やリスクがある選択肢を選ぶ価値がない 4/0vs.4 や 4/0vs.3 の選択条件での選択率にほとんど影響が見られない一方、通常時や saline 投与条件でリスクがある選択肢を好んで選んでいた 4/0vs.1 や 4/0vs.2 の選択条件において有意にリスク選択率が低下していることが分かる。すなわち過去の研究結果とは反対に PPX がリスク選好性を低下させている。一方高濃度条件では弁別選択における成績の大幅な減少、および 4/0vs.4 や 4/0vs.3 においてリスク選択率の上昇が見られ、これはリスク選好性に選択的に作用したというよりは課題を遂行するにあたって必要な能力全般が低下したと考えられる。実際高濃度条件では課題遂行へのモチベーションが著しく低下する個体が見られ、10 匹中 3 匹のラットが 2 時間の実験期間内で 50 試行以下しか課題を遂行できなかった。また試行を自ら開始しておきながら途中で選択すること自体を止めてしまう行動が増加 (通常は 0 回もしくは 1 回程度だが、平均 25 回程度に上昇) したり、課題遂行にかかる時間 (200 試行を遂行するのにかかる時間) が通常時 55 分から 119 分に増加したりしていた。これまでヒトや多くの実験動物を通じて、ドーパミンがギャンブル行動に非常に重要な役割を果たすことが報告されてきてはいたものの、その作用については一致していないものも多かった。その原因の一つとして臨床やこれまでの動物実験モデルでは行動課題に意思決定と学習の 2 つの要素が混在してしまっていたことが考えられる。学習の影響を最小限に抑えた本モデルによって、ドーパミンが本当にリスクを伴う意思決定に関与していること、そして従来とはことなり D2/D3 受容体の作動薬はリスク選好性を減少させることが明らかとなった。

光遺伝学およびファイバーフォトメトリーを用いた実験技術の習得

動物の訓練と並行して、訓練完了後に行う神経活動計測や光遺伝学的操作法についても技術習得および実証を行った。光遺伝学的操作においては THCre ラットおよび AAV ウィル

スを用いてドーパミンニューロン選択的にチャンネルロドプシンを導入した。遺伝子導入したタンパク質が発現した後、光ファイバーを通じて外部から細胞体が存在する VTA、もしくは軸索末端である側坐核を刺激してドーパミン放出を駆動、それを FCV 法を用いて測定する実験を行った。組織学的には VTA へベクターを注入した場合、AAV5 は SNc にも感染が広がってしまう一方、AAV2 は VTA に感染を限局させることができることが分かった。一方で、GFP 陽性（細胞にチャンネルロドプシンが導入されていることを示す）のニューロンが TH 陰性（ドーパミンニューロンであることを示す）であるケースや、組織全体から TH 陽性が失われるケースが見られた。これは想定していなかったアクシデントである。これらの個体では当然、光刺激を行ってもドーパミンの放出は測定されなかった。おそらく力価が高すぎて毒性を持ってしまったのではないかと推察している。今度の検討で力価を最適化する必要がある。覚醒下の動物では、レバー押しと VTA の光刺激を組み合わせることで脳内自己刺激行動が惹起されることを確認した。レバー押しの頻度は刺激強度（光強度、刺激頻度、刺激期間）依存的に変化した。また同時に FCV 法でドーパミンの計測を行い、光操作で駆動されるドーパミン放出量とスクロースペレットを食べることで放出される内因性のドーパミン放出量を比較、調節を行った。しかし脳内自己刺激が惹起されなかった個体もいた。それらの個体では前述の通り VTA が TH 陰性となっていたため、ドーパミンニューロンがなんらかの機能不全を起こしていたと考えられる。Dapi 染色では細胞核自体の異常は見られなかったため細胞死ではないと思われる。フォトメトリーでは野生型の個体の側坐核にシナプシンプロモーターを用いて dLight を導入し、やはり VTA を電気刺激した際のドーパミン放出を 2 個体で測定した。いずれも SN 比は非常に良かったものの、シグナル自体は小さかった。これは麻酔下であったことが原因であると考えられる。また蛍光変化が部屋の明かりに大きく影響される問題があることも分かった。部屋の光が、頭蓋骨に設けた窓と光ファイバーの隙間から脳内に入り込んだことが原因であると考えられる。これまでは半透明のデンタルセメントを用いていたが、行動課題で光刺激を用いていることを考慮すると、外部光の侵入を防ぐ対策が必要であることが分かった。2020年3月20日までに行動課題遂行中の個体からフォトメトリー計測をテストするために2匹のラットの訓練を完了し、ベクターウィルスの注入および光ファイバーのインプラントを完了した。また6匹のラットの訓練を80%ほど完成させていた。しかし新型コロナウイルスの世界的流行の影響によってオックスフォード大学での実験も中断されてしまった。その結果残念ながら初年度に行動訓練を行った動物での実験は中止し、かん流を行った。実験中断中はラズベリーパイによる実験装置制御システムの開発およびPythonを用いたプログラミングを進めていた。また研究室におけるセミナーやWalton先生および同僚・学生との会議はオンラインシステムを用いて中断せず継続されていた。実験は7月16日より再開が許可された。新たにラット20匹に行動課題を訓練し、訓練終了後AAV5を用いてdLight1.1およびムーブメントアーチファクトを除外するための差分を計測するためにtdtomatoを導入する手術を行った。残念ながら帰国までの時点ではタンパク質の発現量が十分ではなく計測を行うことは

できなかった。しかし当プロジェクトは研究室のメンバーによって引き継がれる予定である。

FCV 法の技術習得

本留学のもう一つの大きな目標である FCV 法の技術習得についても並行して進めることができた。FCV 法には電極づくりからボルタグラムの解析まで多くの熟練したスキルが必要であり大変な時間を要したが、最終的には覚醒下の動物の側坐核から非予期的な報酬に対するドーパミン応答を非常に精度の高く計測することができた。また麻酔下ラットを用いた実験では、種々のチャンネルロドプシンを用いてドーパミンニューロンを刺激、側坐核ドーパミン応答を記録することで最適な刺激強度・頻度などを探索した。これらの技術を組み合わせることで、より生理的な現象に近い刺激パターンで光操作を行うことができるようになった。

総括

本派遣により、①行動実験モデルの大幅な改良を行うことができた。これによりドーパミンのギャンブル行動に対する影響を正確に評価することが可能となり、結果として今回新たに D2/D3 作動薬がリスク選好性を減少させることが明らかとなった。また目的であった②光遺伝学・フォトメトリー技術の習得および③FCV 法の習得を達成することができた。