

博士学位論文 2023 年度

目的指向型行動における
背内側および腹外側線条体・中型有棘細胞の機能解明

慶應義塾大学大学院薬学研究科
河野晏奈

目次

略語.....	1
序章.....	3
1 章.....	8
1 背景と目的	8
2 方法	9
2.1 動物.....	9
2.2 手術.....	12
2.3 レバー押し課題	12
2.4 ファイバーフォトメトリーシステム	14
2.5 免疫組織化学染色.....	15
2.6 データ解析.....	16
2.7 統計.....	16
3 結果	17
3.1 目的指向型行動中の DMS D1-MSN の神経活動	17
3.2 目的指向型行動中の DMS D2-MSN の神経活動	20
4 考察	22
5 小括	23
2 章.....	25
背景と目的	25
2 方法	26
2.1 動物.....	26
2.2 手術.....	26
2.3 レバー押し課題	26
2.4 ファイバーフォトメトリーシステム	30

2.5 光遺伝学的操作	30
2.6 免疫組織化学染色.....	32
2.7 データ解析.....	32
2.8 統計.....	33
3 結果	34
3.1 熟練マウスでは目的指向型行動実施中の DMS の神経活動がわずかに変化した....	34
3.2 未熟マウスでは、目的指向型行動の継続、中断に関連した神経活動が見られた ..	36
3.3 D1-MSN を光操作で活性化すると目的指向型行動の中断が助長される	40
4 考察	48
5 小括	50
3 章	52
1 背景と目的	52
2 方法	52
2.1 動物.....	52
2.2 手術.....	53
2.3 DSS 誘発性大腸炎モデルの作成.....	53
2.4 レバー押し課題	54
2.5 ファ이버フォトメトリーシステム	54
2.6 光遺伝学的操作	55
2.7 免疫組織化学染色.....	56
2.8 データ解析.....	56
2.9 統計.....	56
3 結果	57
3.1 DSS 誘発性大腸炎モデルは意欲減退傾向にあった	57
3.2 DSS 誘発性大腸炎モデルの神経活動は報酬獲得後に増加傾向を示す.....	61
3.3 VLS D2-MSN 活性化は意欲を減退させる	63

4 考察	66
5 小括	67
総括.....	68
参考文献	69
謝辞.....	73

略語

DMS, dorsomedial striatum

DLS, dorsolateral striatum

VMS, ventromedial striatum

VLS, ventrolateral striatum

D1-MSN, dopamine type1 receptor-expressing medium spiny neuron

SNr, substantia nigra pars reticulata

VTa, ventral tegmental area

D2-MSN, dopamine type2 receptor-expressing medium spiny neuron

GPI, globus pallidus internus

GPe, globus pallidus externa

MC, motor cortex

ACC, anterior cingulate cortex

IC, insular cortex

dlPFC, dorsolateral prefrontal cortex

OFC, orbitofrontal cortex

CFP, cyan fluorescence protein

YFP, yellow fluorescence protein

ITI, inter-trial interval

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

DSS, dextran sulfate sodium

PBST, phosphate-buffered saline with TritonX100

PBS, phosphate-buffered saline

TS, trial start

LP, lever press

RA, reward acquirement

ChR2, channelrhodopsin2

ArchT, archaerhodopsinT

PV, parvalbumin

序章

目的指向型行動とはある目的（報酬の獲得など）を達成するための行動のことである。ある特定の行動が結果に結びつくことを学習し、その結果を出すという目的を達成するためにこの特定の行動を誘引する。目的指向型行動とよく比較されるのが習慣化行動だ。例えば靴を履いたら靴ひもを締める、帰宅したら手を洗うなどの無意識な行動を習慣と見なす。結果を出すために行動を意識的に起こす目的指向型行動と無意識的な習慣化行動には多くの共通点があるが、本論文では前者の目的指向型行動に焦点を当てる。

我々の生活は目的指向型行動で溢れている。試験に合格するために勉強する、健康を維持するために毎日一駅歩くなどの行動は目的指向型行動に当たる。動物もヒトと同様に目的指向型行動を行い、これまでマウスを使った目的指向型行動の研究はヒトの疾病理解に貢献してきた。例えばヒトでは、衝動優位型 ADHD の患者はストップシグナル反応時間が延長することが知られている。d-アンフェタミンやメチルフェニデートがストップシグナル反応時間を短縮することから、ドパミンの不足が衝動優位型 ADHD の症状に関与している可能性が示唆されていた¹⁻³。そこで、Eagleらはマウスを利用したストップシグナル課題でドパミン受容体が衝動性をコントロールしていることを明らかにした。つまり、マウスの目的指向型行動を利用して、ヒトの ADHD 理解につながった⁴。また、Huntington 病の早期では意欲の低下がみられ、これは線条体のドパミン受容体に関与していると言われていた。そこでマウスの鼻入れ、レバー押しを用いた目的指向型行動から意欲の低下と線条体のドパミン受容体の関係を Tsutsui-Kimura らが明らかにし、Huntington 病の病態理解を促した⁵。このように、ヒトの疾患理解を深め、治療法を見出すために、マウスの目的指向型行動に着目した研究は大いに役立っている。

目的指向型行動は大脳皮質-線条体-視床経路で制御されている⁶。その中でも線条体は大脳皮質から最初に入力信号を受け取る領域のため、目的指向型行動の制御を考え

る上で欠かせない存在である^{5,7-14}。しかしひとえに線条体と言っても、領域によって機能が異なることが知られている。では、どのように線条体を分割するのが適切なのだろうか。ここでは 2 種類の方法で線条体を分割する。まず、大脳皮質からの神経細胞の投射^{5,7,9,11,12,14-18}によって解剖学的に線条体を分割する方法だ。これに従うと線条体は、背内側線条体 (DMS, dorsomedial striatum) /背外側線条 (DLS, dorsolateral striatum) /腹内側線条 (VMS, ventromedial striatum) /腹外側線条体 (VLS, ventrolateral striatum) の 4 領域に分けられる (図 1 左側)。この線条体の分割法を解剖学的線条体分割モデルと名付ける。また、大脳を機能的に大きく 3 つ (連合野、辺縁系、感覚運動野) に分けた時、それらからの入力によっても線条体は小領域に分けられる^{15,19-23} (図 1 右側)。これを、機能的線条体分割モデルと名付ける。解剖学的線条体分割モデルでは DMS (図 1 左ピンク) と VLS (図 1 左オレンジ) は相違な領域とみなされる。一方、機能的線条体分割モデルではこれらは図 1 右紫色で示した associative region に属する同一の領域とされる。私は、分類法によって同一、相違、とみなされるこの領域に興味を持った。

線条体は大脳皮質からの入力に加えて、線条体からの出力によっても 2 つの細胞集団に分けることができる。一つはドパミン 1 型受容体を発現した中型有棘細胞 (D1-MSN, dopamine type1 receptor-expressing medium spiny neuron) で、神経信号を黒質網様部 (SNr, substantia nigra pars reticulata) と淡蒼球内節 (GPi, globus pallidus internus) に直接送る (直接路)。もう一方のドパミン 2 型受容体を発現した中型有棘細胞 (D2-MSN, dopamine type2 receptor-expressing medium spiny neuron) は淡蒼球外節 (GPe, globus pallidus externa) を介して SNr に神経信号を伝達する (間接路) (図 2)²⁰⁻²⁷。

これまで動物を用いた多様な行動実験が DMS の直接路、間接路の役割を明らかにしてきた。例えば、報酬確率が無作為に遷移するレバー押す/引く課題では、直接路の活性化は一つ前に選んだ選択肢を再び選択し、間接路の活性化は 1 つ前の選択と逆の選択をすることが知られている²⁴。また頭蓋固定下、自由に四肢が動かせる状態で報酬

を提示する課題では、直接路の活性化で四肢の動きが加速し、間接路の活性化で減速することが分かっている²⁵。

先述のとおり、機能的線条体分割モデルでは DMS と VLS は同一領域とみなされている一方で、解剖学的線条体モデルでは異なる領域としてみなされる矛盾が生じている。しかしながらこれまで両領域に着目して、同じ課題下、これらの機能を比較検討した報告はこれまでない。

解剖学的線条体分割モデル

機能的線条体分割モデル

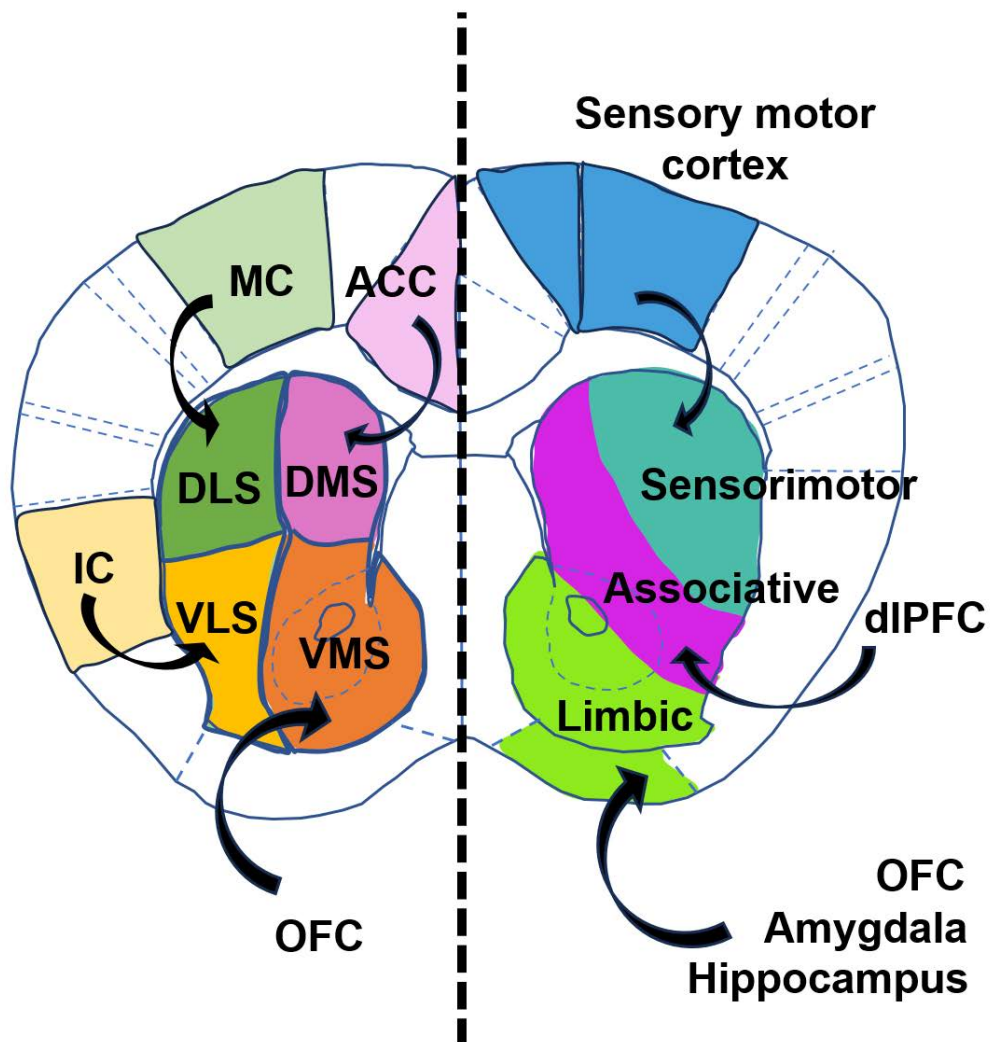


図1 線条体の2通りの分割

解剖学的線条体分割モデル（図1左側）と機能的線条体分割モデル（図1右側）によって、線条体は2通りに分割される。(MC, 運動野; ACC, 前帯状皮質; IC, 島皮質; DMS, 背内側線条体; DLS, 背外側線条体; VMS, 腹内側線条体; VLS, 腹外側線条体; dIPFC, 背外側前頭前野; OFC, 眼窩前頭皮質)

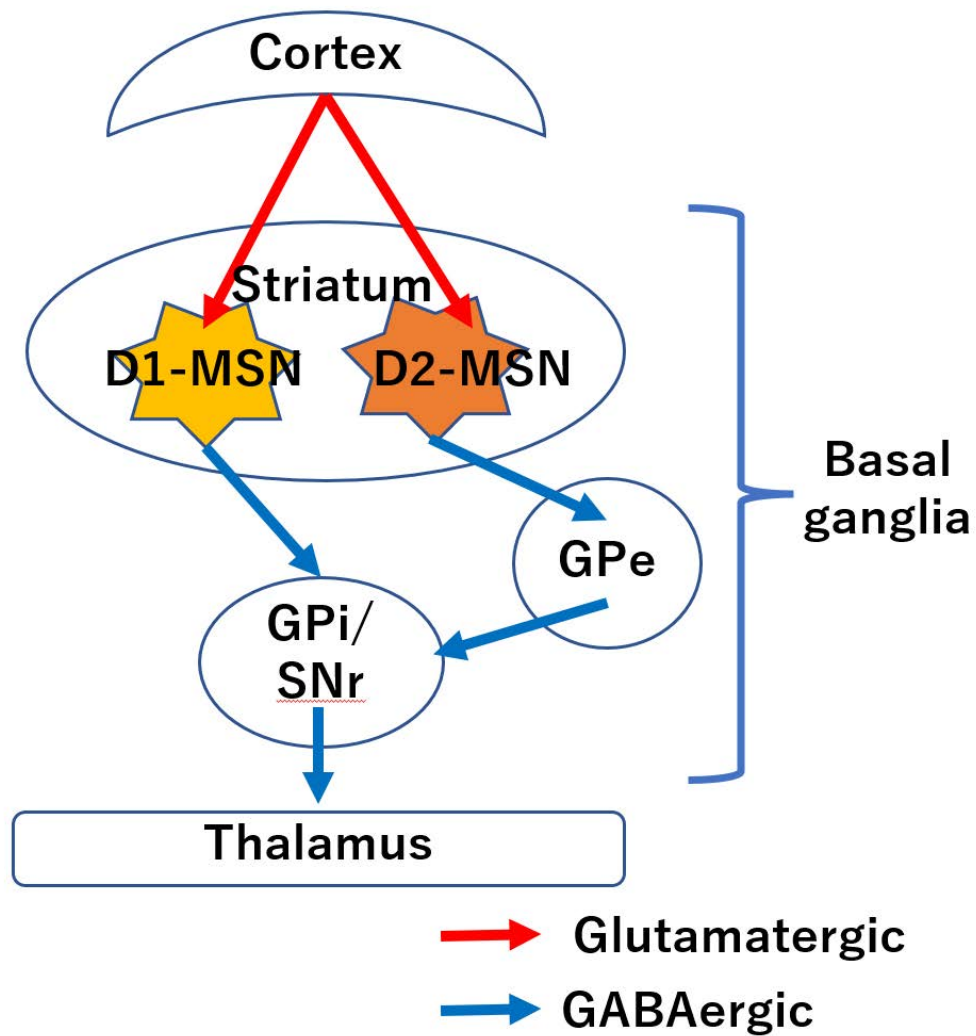


図 2 直接路と間接路

線条体には D1-MSN と D2-MSN の 2 種類の細胞集団がある。D1-MSN を介し興奮シグナルを出力する経路を直接路、D2-MSN を介し抑制シグナルを出力する経路を間接路と呼ぶ。(SNr, 黒質網様部; GPi, 淡蒼球内節; GPe, 淡蒼球外節)

1 章

1 背景と目的

線条体には序章図 2 のように活性化シグナルを出力する直接路と、抑制シグナルを出力する間接路がある。相反する信号を下流に伝達することから、同じ領域内の直接路、間接路の活動、その機能は頻繁に比較されてきた^{26,27}。しかし DMS の神経活動と VLS の神経活動を同じ行動課題を用いて、比較検討したことはない。

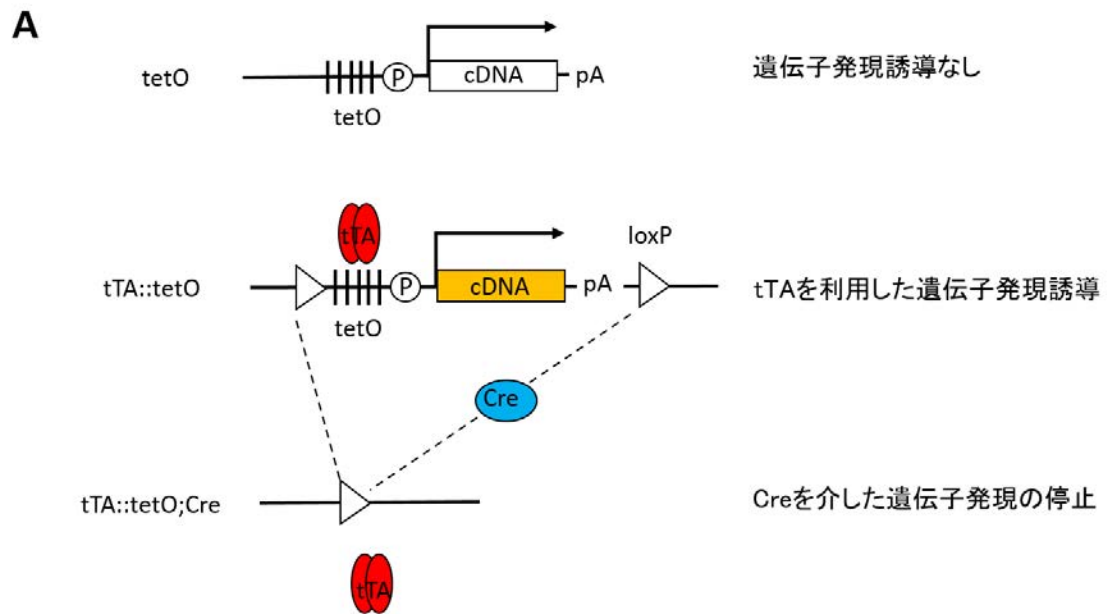
当研究室ではこれまでマウスによるレバー押し課題を用いて VLS の機能解明に取り組んできた^{7,9}。レバー押し課題とは、2 本のレバーのうち片方を 5 回押すと餌報酬が得られる課題である。マウスには事前に課題を学習させておく。マウスはレバーを 5 回押して報酬をもらう手続きを 1 時間繰り返す。レバー押し課題には、トライアルの開始、レバーの押し始め、報酬の獲得といったイベントがある。なお、神経活動は、フォトメトリーシステムを用いて継続的に観測を行う。先行研究では、VLS 直接路、間接路共に、課題開始のタイミングで神経活動が上昇し始め、レバーの押し始めに向かってさらに神経活動が上昇した。上昇した神経活動は、いずれもレバーを押している間は抑制され、報酬獲得後に一気に活動が上昇したことから、VLS の直接路、間接路はレバー押し課題中に似た活動パターンを示すことが分かっている。しかし、レバー押し課題中の DMS の神経活動パターンは明らかにされていない。

そこで本章では、レバー押し課題の手法を用いて、DMS の直接路、間接路の神経活動を明らかにし、DMS、VLS が機能的線条体分割モデルもしくは、解剖学的線条体分割モデルのどちらに従うのか解明することを目的とする。これが明らかになると大脳皮質、線条体の神経解剖学的コネクションが神経信号の出力先である行動に与える影響の重要性を再認識することに繋がる。

2 方法

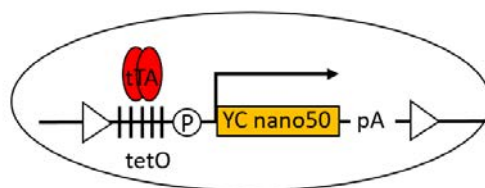
2.1 動物

全ての動物実験は National Institutes of Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に則り取り扱い科学的、技術的、倫理的に適切な方法で動物実験を実施した。また本実験は慶應義塾大学動物実験委員会の承認を得ている（承認番号: 14027-(5)、申請タイトル：脳深部細胞種特異的細胞内カルシウム測定法を用いた情動応答の解明）。実験は 3 か月齢から 12 か月齢の D1-YC マウスと D2-YC マウスを使用した。D1-YC マウス (*Pde10a2*-tTA::tetO-YCnano50; *Adora2a*-Cre triple-transgenic mice) は *Pde10a2*-tTA mice²⁸ と tetO-YCnano50 mice²⁹, *Adora2a*-Cre mice³⁰ を交配させて得た（図 1A）。D2-YC マウス (*Drd2*-tTA::tetO-YCnano50 double-transgenic mice) は *Drd2*-tTA マウス⁷ と tetO-YCnano50 マウスを交配させて得た（図 1B）。遺伝子改変マウスの遺伝的背景は C57BL6/J と 129SvEvTac の混合背景である。実験者自身で新たな組み換えラインの樹立は行っていないが、Cre-loxP システムを利用した遺伝子組み換えの操作は行った。また、すべてのマウスは 12:12 時間の明暗サイクル（午前 8 時～午後 8 時に点灯）のもと飼育され、行動実験は明期に行われた。YCnano50（以下 YC と記す）は CFP と YFP を含むカルシウムインジケータで、青色の蛍光を発する YC はカルシウム濃度が上昇すると FRET による蛍光エネルギーの遷移によって黄色の蛍光を発するようになる（図 2）。D1-YC マウスはこの YC が D1-MSN 特異的に、D2-YC マウスは D2-MSN 特異的に発現する。そして後述するフォトメトリーシステムを用いて YC から発せられる青色と黄色の蛍光強度を観測し、神経活動を観察する。



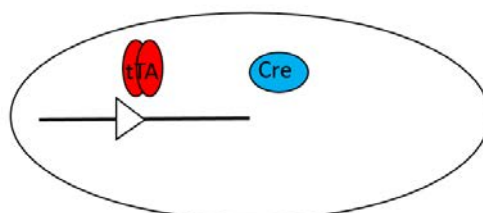
B

D2-YCマウス (Drd2-tTA::tetO-YCnano50 double-transgenic mice)

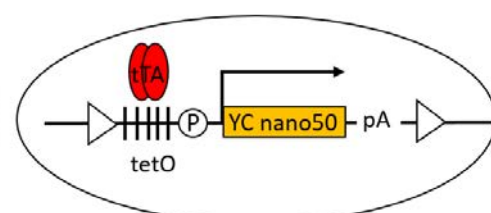


D2-MSN

D1-YCマウス (Pde10a2-tTA::tetO-YCnano50;Adora2a-Cre triple-transgenic mice)



D2-MSN



D1-MSN

図1 遺伝子改変マウスの作成

(A) tet システムを利用した遺伝子制御機構。tTA (tetracycline transactivator)がない状態では遺伝子誘導は生じないが（上段）、tTA 存在下では下流の遺伝子が誘導される

(中段)。また、tetO カセットは Cre (Cre recombinase) で遺伝子の発現を抑制できる (下段)。

(B) tet システムを利用した D1-, D2-YC マウスの作成方法。

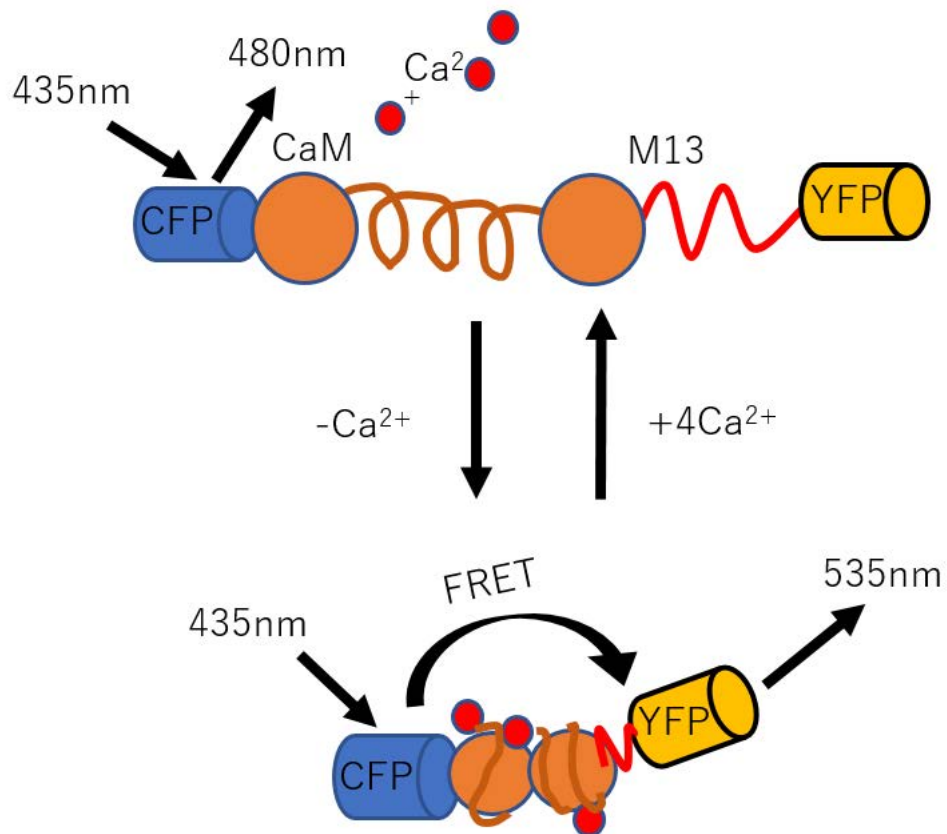


図 2 カルシウムインジケータ

カルシウムインジケータの YCnano50 は CFP、YFP、カルモジュリン、M13 で構成される。カルシウム濃度が低いと CFP と YFP は離れたコンフォメーションを取り、435nm の光で照射するとシアン色光を発する。一方、カルシウム濃度が高いとカルシウムはカルモジュリンに結合し、CFP と YFP の距離を縮める。そして蛍光エネルギーが CFP から YFP に遷移する Förster resonance energy transfer (FRET) 現象が生じ、黄色

光を発する。YCnano50 は $K_D \approx 50$ nM という非常に低濃度のカルシウムでも反応する高感度のカルシウムセンサーで、カルシウム濃度に応じて発する光の波長を変化させる。

2.2 手術

手術はマウス用脳底固定装置 (SM-6M-HT, Narishige) 上で行った。ケタミンとキシラジン [それぞれ 100 mg/kg (第一三共プロファーマ) と 10 mg/kg (エランコジャパン)、腹腔内投与] をマウスに投与し、麻酔した。

DMS の神経活動を記録するために、D1-YC、D2-YC マウスは Paxinos and Franklin の脳地図に従い、光ファイバー (CFMC14L05, 直径 400 μ m, 0.39 NA; Thorlabs) を片側 (右もしくは左) に埋め込んだ。光ファイバー先端の位置は、+1.10 mm anteroposterior (AP), 1.25 mm mediolateral (ML) from bregma, 1.85 mm dorsoventral (DV) from the brain surface である。

2.3 レバー押し課題

レバーを押すと餌が供給されるという行動とエサの連合学習を終えたマウスを実験に用いる。空腹のマウスが、食欲を満たすという目的を達成するために、レバーを押すという行動が目的指向型行動である。そこで摂餌制限下 (体重は摂餌制限前の体重の 85% を維持)、個別飼育したマウスに目的指向型行動を実施した。行動課題は明かりの無いアルミニウム製のオペラントボックス (21.6 $\times$ 17.6 $\times$ 14.0 cm; Med Associates) で実施した。このオペラント装置は Med Associates が提供するコンピュータープログラムで制御されている。マウスは報酬を得るために 5 回のレバー押し (lever press, LP) をする。報酬を受け取る餌箱は 2 つのレバーの間に設置した (図 3 A)。これらのレバーは押すと壁内に引き戻される。左側のレバーはアクティブレバーと呼ばれ、決まった回数を押すと餌がもらえる。右側のレバーはインアクティブレバーと呼ばれ、何度押しても餌はもらえない。また、インアクティブレバーを押しても、アクティブレバーの回数

はリセットされない。各トライアルは2本のレバーが提示されることで開始する。左側のレバーを押すとその回数がカウントされ、指定した回数に達すると報酬のチーズペレット（1粒 20 mg, Dustless Precision Pellets, Bio-serv）が餌箱に運ばれてくる。報酬が運ばれてくると同時に、レバーはオペラント装置の壁の中に引き戻される。餌が運ばれた後、30秒間のインターバル（inter trial interval: ITI）を挟んで、新たなトライアルが開始される。本課題において、セッションとは1時間の課題のことを示し、トライアルとは1セッション内でレバーが提示され、再び壁内に引き戻されるまでの一連のことを指す。課題は1日1セッション行った。

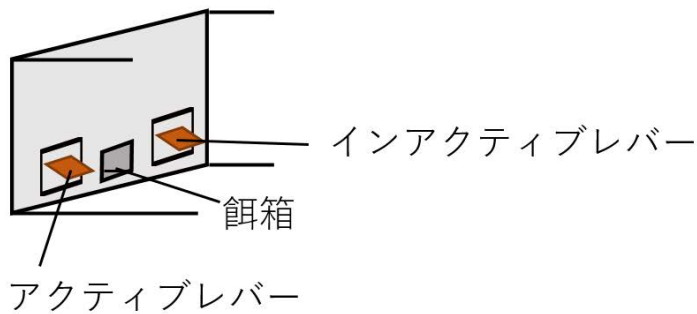
トレーニングは、1回アクティブレバーを押せば報酬がもらえる fixed ratio (FR) 1 課題を実施した。マウスは10-14セッション連続でFR1課題を練習し、1セッションあたり50トライアル完了できたマウス（約8割）はテスト課題に移行した。各トレーニングでは、レバーは60秒間提示され、1セッションは60分が経過するまで、もしくは、マウスが100個の報酬を獲得するまで続いた。

テスト課題は、5回レバーを押すと報酬が貰える FR5 課題を実施した。（図 3B）この課題ではトライアル開始と同時に二本のレバーが提示される。レバーが提示されている間にマウスが総計5回アクティブレバーを押したら、餌報酬が貰える。報酬が貰えたトライアルを成功トライアルと呼ぶ。餌が運ばれた後レバーは引き戻され、30秒間の ITI ののち、自動的に次のトライアルが開始する。私はマウスに FR5 課題を7セッション行わせ、7セッション目のデータを比較した。

本課題において、セッションとは1時間の課題のことを示し、トライアルとは1セッション内でマウスが何回課題に取り組んだのかを指す。課題は1日1セッション行った。

TTL 信号はレバーが提示されたとき、押されたとき、餌報酬が提示されたときに MED-PC (Med Associates)を使って生成した。TTL 信号は同時に LabVIEW (National Instruments)を使って 1000Hz のサンプリングレートで記録した。

A



B

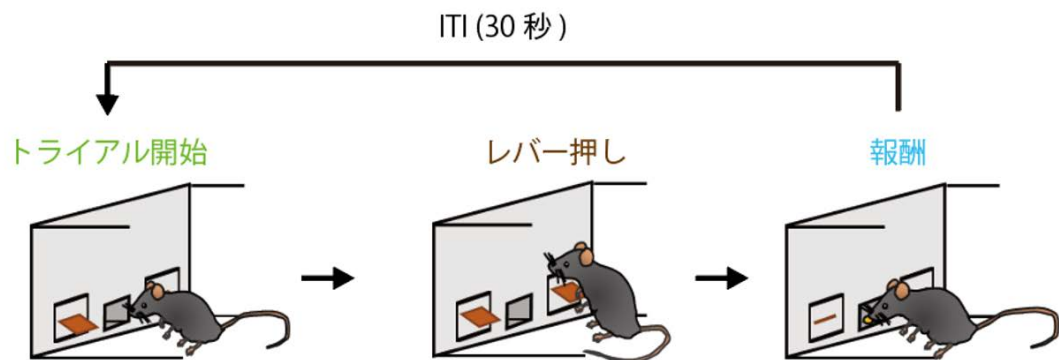


図 3 レバー押し課題

(A) オペラントボックス。餌箱の左右に二本のレバーが設置されている。

(B) レバー押し課題。トライアルの開始とともに 2 本のレバーが提示される。マウスがアクティブレバーを 5 回押すと、餌箱に報酬が提示される。レバーは壁内に引き戻され、30 秒間の ITI ののちに、再び提示され、次のトライアルが開始する。

2.4 ファイバーフォトメトリーシステム

神経活動を記録するために、カルシウム濃度の変動をファイバーフォトメトリーシステムで検出した (図 4)。ダイクロイックミラー (DM455CFP, Olympus) で反射された励起光 (435 nm; silver-LED, Prizmatix) は、20 倍の対物レンズに集められたのち、ピンホール (Φ 400 μ m) を通じて光ファイバー (M79L01, Φ 400 μ m, 0.39 NA, Thorlabs) まで送られた。LED パワーは先端光で 100 μ W 以下である。カルシウムインジケータの YC から発

せられた蛍光は光ファイバーを介して集めて、ダイクロイックミラー (DM515YFP, Olympus)によってシアン (483/32 nm band-path filters, Semrock)と黄色 (542/27 nm)に分け、各々光増幅管 (H10722-210, Hamamatsu Photonics)を使って検出した。蛍光シグナルはデータ獲得モジュール (cDAQ-9178, National Instruments)を用いてデジタル信号化し、LabVIEW (National Instruments)を用いて記録した。信号は 1000 Hz のサンプリングレートで記録した。

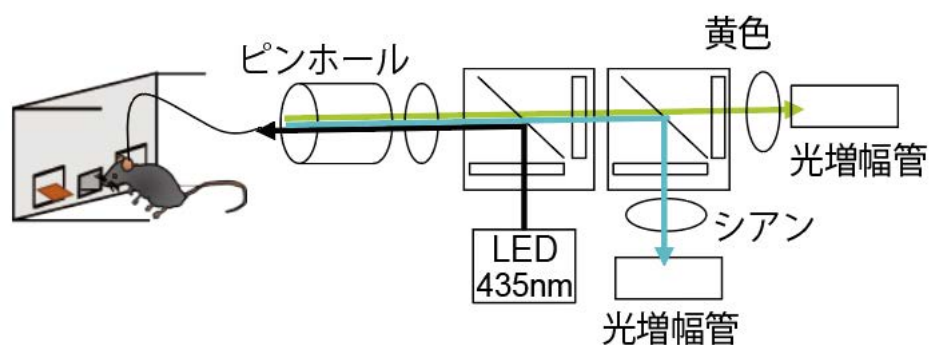


図 4 ファイバーフォトメトリーシステムの概略図

LED (励起光) が光ファイバーを通じてマウス脳内の YC に送られた。YCncno50 から発せられた黄色とシアンの光を光増幅管で検出した。

2.5 免疫組織化学染色

行動実験終了後、マウスをケタミン (100 mg/kg)とキシラジン(10 mg/kg)で深く麻酔し、4 % パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を心臓から灌流した。脳を頭蓋骨から外し、同じ固定液で終夜固定した。続いて、脳を 20 % スクロース溶液に一晩浸して氷晶防止したのちに 2 メチルブタン (Sigma) で凍結した。凍結脳をクライオスタット (Leica CM3050 S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)で 25 μm の厚さにスライスした。切片はシラン加工されたスライドガラス (S9226, Matsunami Glass, Osaka, Japan)の上に貼り付

けた。5 分間、3 回 PBST (phosphate-buffered saline with Tween 20) で洗ったのち、切片を一晩室温で 1 次抗体 [anti-green fluorescent protein (GFP) (1:200, goat polyclonal, Rockland Immunochemicals Inc.)] に反応させた。YC が持つ YFP, CFP のいずれも GFP ポリクローナル抗体に親和性を持つ。翌日、5 分間、3 回 PBST で洗ったのち、PBST に希釈した 2 次抗体 (1:1,000, anti-goat IgG-Alexa Fluor 488, Invitrogen) と細胞の核を染める DAPI (1 mg/mL, Sigma) を室温で 2 時間反応させた。その後 PBS (phosphate-buffered saline) で 5 分間、3 回洗い、ポリビニルアルコールで封入し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) を用いて蛍光写真を撮影した。

2.6 データ解析

全動物、サンプルはランダムに実験群に割り当てたが、実験の条件について盲検化していない。光ファイバーが DMS に留置できていなかったマウスは、解析から除外した。ファイバーフォトメトリーデータは MATLAB コードを用いて解析した。1 セッションの YC 比(黄色とシアンの蛍光強度の比: R)の蛍光退色は 3 次元スプライン補正し、z-score を $(R - R_{\text{mean}}) / \text{RSD}$ (Rmean と RSD は各トライアル開始直前 5 秒間の YC 比の平均と標準偏差) より計算することで、フォトメトリー信号をトライアル毎に標準化した。z-score が正に大きくなると神経活動が活性化していることを示し、負に大きくなると抑制されていることを示す。

2.7 統計

全てのデータを MATLAB コードで解析し、特記していない限りデータは平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。サンプル数は結果と図のレジェンドに記載した。統計学的有意差を確かめるために、2 つのサンプルデータセットに対して paired t -test を行った (図 5C, 6C)。また、危険率 5%未満を有意水準とした。

3 結果

3.1 目的指向型行動中の DMS D1-MSN の神経活動

14 匹中 9 匹の D1-YC マウスの DMS にファイバーが留置できていた。記録したマウスはどれも図 5A のように線条体に YC が発現していた。緑色が YC の発現している場所を指す (図 5A)。D1-YC マウスの神経細胞活動を、3 つのトリガーイベント (トライアル開始、1 回目のレバー押し、報酬提示) に時間軸を合わせて表示した (図 5B, C)。図 5B は代表的な個体の神経活動記録である。図 5C は 9 匹の平均した神経活動記録である。D1-YC マウスはトライアル開始から 1 回目のレバー押しまで 11.40 ± 5.23 秒要し、1 回目から 5 回目までのレバーを押し切るのに 5.26 ± 1.23 秒かかった (図 5C 箱ひげ図)。

トライアル開始直前 1 秒間の神経活動 (ベースライン) と各イベント (トライアル開始 (TS)、1 回目のレバー押し (LP)、報酬提示 (RA)) 開始後 1 秒間の神経活動を比較した (図 5C 棒グラフ)。ベースラインの z-score は -0.03 ± 0.04 で、TS から 1 秒間の平均 z-score は 0.04 ± 0.06 、LP から 1 秒間の平均 z-score は 0.08 ± 0.09 、RA から 1 秒間の平均 z-score は -0.09 ± 0.10 であった。TS、LP および RA いずれの z-score もベースラインと比較して有意な差は見られなかった (baseline vs. TS: $t(8) = -0.96$, $p = 0.37$, baseline vs. LP: $t(8) = -1.34$, $p = 0.23$, baseline vs. RA: $t(8) = 0.89$, $p = 0.47$, paired t-test)。

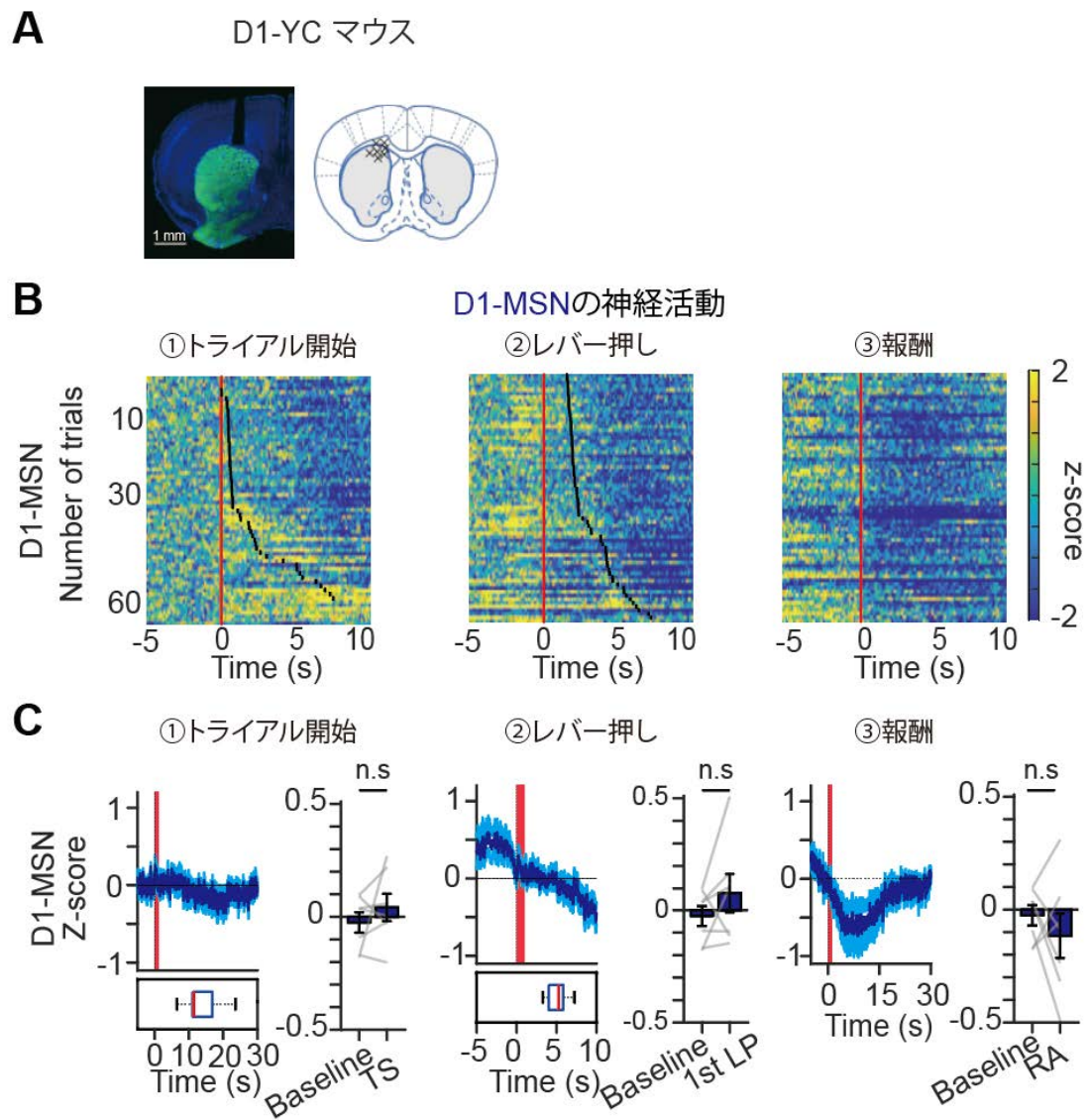


図 5 DMS における D1-MSN の神経活動

(A) 光ファイバーを DMS D1-YC マウスに挿入した。組織学的データと挿入個所を模式図で示した。

(B) ヒートマップは 1 セッション全 65 トライアルの D1-MSN の活動記録を、①トライアルの開始、② 1 回目のレバー押し、③報酬の提示のタイミングをそれぞれ Time 0 として、上から 65 トライアル並べたものである。なお、7 セッション目の 1 個体のデータを示している。ヒートマップ①はトライアル開始からレバーを押し始めるまでの時

間が短いトライアルから順に上から並べ、ヒートマップ②は1回目から5回目のレバー押しの所要時間の短いものから順に上から並べた。(ヒートマップ①の黒線は1回目のレバー押しのタイミングを、ヒートマップ②の黒線は5回目のレバー押しのタイミングを示す。)

(C) D1-YC マウス ($n=9$) の平均した神経活動を示す。①トライアルの開始 (TS)、②1回目のレバー押し (LP)、③報酬のタイミング (RA)をそれぞれ Time 0 とし、青い線は平均した神経活動、水色の線は SEM を示す。箱ひげ図はそれぞれ、トライアル開始から1回目のレバー押しにかかった時間と、1回目から5回目のレバー押しの所要時間を表している。箱ひげ図中の赤い線は中央値を示している。棒グラフ①はトライアル開始直前1秒間の神経活動 (Baseline)とトライアル開始後1秒間の神経活動 (赤色網掛け) を示している。棒グラフ②はトライアル開始直前1秒間の神経活動 (Baseline)と1回目のレバー押し後1秒間の神経活動 (灰色網掛け) を示している。棒グラフ③はトライアル開始直前1秒間の神経活動 (Baseline)と報酬提示後1秒間の神経活動 (赤色網掛け) を示している。

3.2 目的指向型行動中の DMS D2-MSN の神経活動

次に D2-YC マウスのレバー押し課題中の神経活動を記録した。8 匹中 5 匹のマウスが正しく DMS にファイバーが挿入されていた。記録したマウスはどれも図 6A のように線条体に YC が発現していた。緑色が YC の発現している場所を指す (図 6A)。図 6B, C は D1-YC マウスの結果と同様に、代表的な個体の神経活動の結果と 5 匹の平均した神経活動の結果をそれぞれ示した。D2-YC マウスはトライアル開始から 1 回目のレバー押しまで 7.47 ± 4.28 秒要し、1 回目から 5 回目までのレバーを押し切るのに 5.82 ± 1.06 秒かかった (図 6C 箱ひげ図)。

ベースラインの z-score は 0.20 ± 0.12 で、TS から 1 秒間の平均 z-score は 0.41 ± 0.21 、LP から 1 秒間の平均 z-score は 0.59 ± 0.31 、RA から 1 秒間の平均 z-score は -0.27 ± 0.30 であった。TS、LP および RA いずれの z-score もベースラインと比較して有意な差は見られなかったが (baseline vs. TS: $t(4) = -1.90$, $p = 0.13$, baseline vs. LP: $t(4) = -1.2$, $p = 0.13$, baseline vs. RA: $t(4) = 2.24$, $p = 0.09$, paired t-test)、トライアル開始後と 1 回目のレバー押し後の神経活動は活性化傾向に、報酬提示後の神経活動は抑制傾向にあった。以上の結果より、DMS の D1, D2-MSN はどのタイミングでも神経活動に有意差は見られなかったが、D2-MSN は全てのタイミングで神経活動の活性化傾向、もしくは、抑制傾向がみられることが分かった。先行研究では、VLS D1-MSN と D2-MSN はトライアル開始後、1 回目のレバー押し後、報酬獲得後に神経活動がベースラインよりも上昇することが明らかになっている。このことから DMS の神経活動パターンは、VLS D1-, D2-MSN の活動パターンとは異なる。

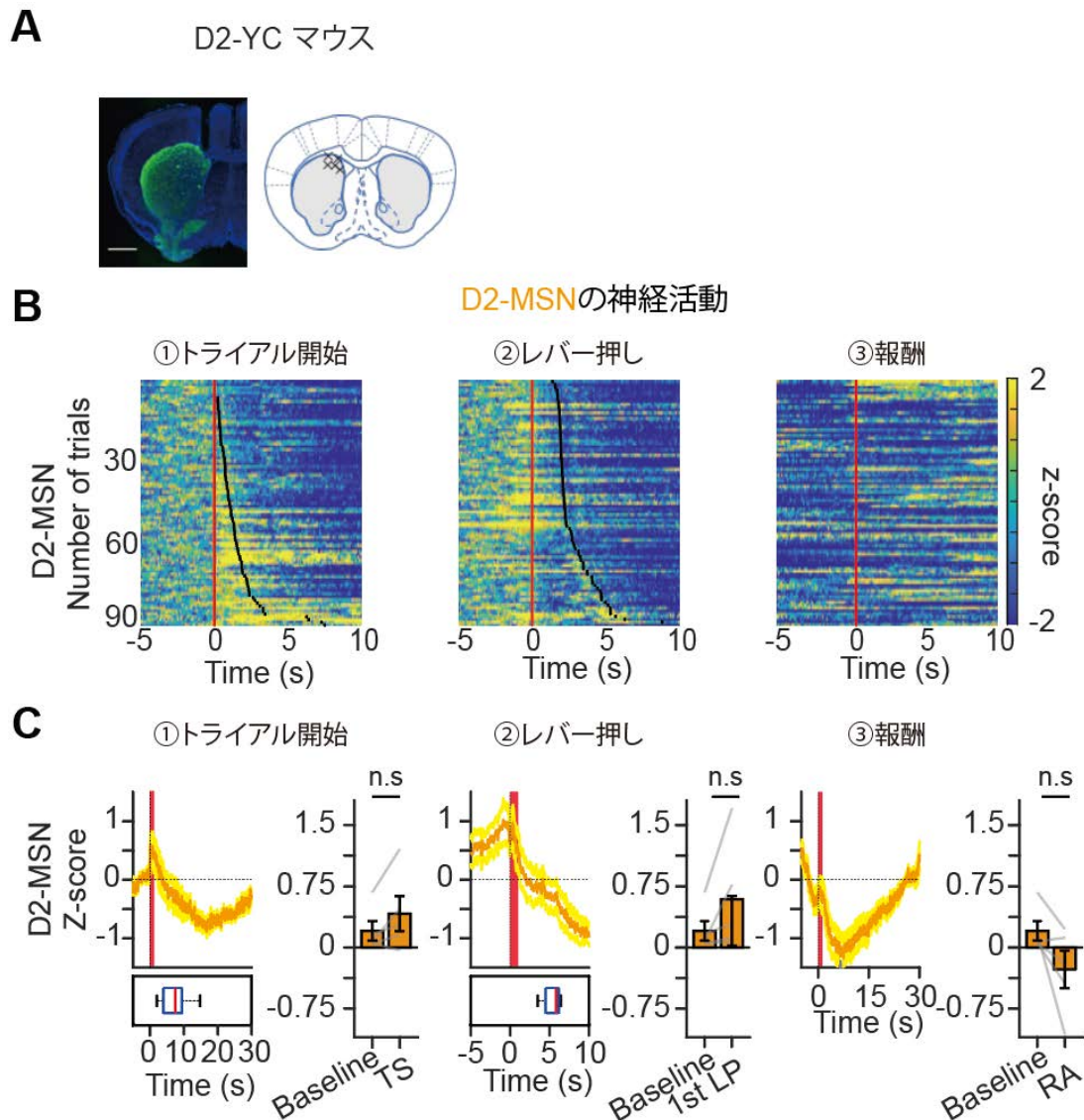


図 6 DMS における D2-MSN の神経活動

(A) 光ファイバーを DMS D2-YC マウスに挿入した。組織学的データと挿入個所を模式図で示した。

(B) ヒートマップは代表的な 1 セッション (90 トライアル) の D2-MSN の活動記録を図 5B 同様、①トライアルの開始、② 1 回目のレバー押し、③報酬のタイミング (赤い線) ごとに並べたものである。

(C) D2-YC マウス ($n=5$) の平均した神経活動。オレンジ色の線は平均値、黄色の線は $\pm$ SEM を示す。図 5C と同様に、①トライアルの開始、② 1 回目のレバー押し、③

報酬のタイミングを時間 0 秒とし、箱ひげ図はトライアル開始から 1 回目のレバー押しにかかった時間と 1 回目から 5 回目のレバー押しの所要時間を示し、棒グラフはトライアル開始の 1 秒前の神経活動とトライアル開始後、1 回目のレバー押し後、報酬後 1 秒間の神経活動を示した。

4 考察

当研究室の結果から⁹⁾、VLS は D1-, D2-MSN とともにレバー押し課題のトライアルの開始時に活性化、さらに 1 回目のレバー押しにかけて徐々に活動が高まり、報酬提示時にかけてゆっくりと活動が低下、そして報酬提示後に急激な神経活動の大きな活性化を示した。一方本実験から、DMS D1-MSN はトライアル開始後、1 回目のレバー押し後、報酬提示後すべてのタイミングでベースラインと比較して、神経活動の大きな変化は見られなかった。DMS D2-MSN はトライアル開始後、1 回目のレバー押し後に活性化傾向を、報酬提示後に抑制傾向を示した。以上より、DMS D2-MSN は VLS D1, D2-MSN とトライアル開始後、1 回目のレバー押し後に似た神経活動の傾向を示すが、それ以外は異なることが分かった。また、本実験で使用したレバー押し課題が目的指向型行動を担保できているかについては、当研究室の先行研究で示している³¹⁾。先行研究では、レバー押し課題を習得済みのマウスを満腹にさせ課題を行わせた。習慣化している場合課題を行うが、先行研究では課題に従事しなかったことから、これは目的指向型行動であると証明した。本研究でも同じ課題を用いているため、習慣化行動ではなく目的指向型行動であることが考えられる。

よって、DMS と VLS は目的指向型行動下、同期してないと考えられる。すなわち DMS, VLS は異なる領域として識別される解剖学的線条体モデルに従う。

DMS, VLS の上流に当たる ACC, IC は共に salience network に属し覚醒下活動休止状態の時に同期すると考えられている³²⁾。上流が同期している可能性が高いことから、下流の DMS, VLS も同期する可能性が示唆された。しかし、本実験から目的指向型行動

下、DMS, VLS の神経活動は同期していないことが示された。これは、目的指向型行動を行っているときは ACC, IC は同期していない、もしくは、同期しているが下流の領域は同期していない、の2つの可能性が考えられる。前者の可能性は、目的指向型行動下、ACC, IC の神経活動を計測することで確認可能である。後者の可能性に関して、フィードフォワード機構を介した抑制機構が働いていることが考えられる。先行研究³³から、IC-VLS 間には PV (parvalbumin) を発現する抑制ニューロンを介したフィードフォワード抑制が働いていることが知られている。しかし DMS にもこのフィードフォワード抑制が働いているかどうか、つまり、PV ニューロンの発現があるかどうかは今後検討する必要がある。

5 小括

私は、機能的分類モデルでは同一、解剖学的分類モデルでは相違、とみなされる DMS と VLS に興味を持った。これまで同じ行動課題中の DMS と VLS の神経活動を比較した研究はなく、これら2領域が目的指向型行動中どちらの分類モデルに従うのかわ明らかではなかった。当研究室ではすでにレバー押し行動中、VLS の細胞種別神経活動を明らかにしている。そこで、私は同じレバー押し課題を採用し、DMS の神経活動を記録、比較した。

DMS D1-, D2-MSN の活動記録の結果と先行研究を比較して、DMS と VLS の神経活動は完全に同じまたは反対の挙動を示さなかったため、機能的に同期していないことがわかった。よって、目的指向型行動中、線条体は、機能的線条体分割モデルよりも大脳皮質からの神経投射に則った解剖学的線条体分割モデルによって分類されることを明らかにした。そして、DMS と VLS は目的指向型行動中の活動パターンに基づけば、異なる領域とみなされることを明らかにした。よって、DMS と VLS の目的指向型行動中の役割は異なる可能性が考えられる。

細胞集団の役割を検証するには、1章で行ってきた活動記録だけでは不十分であり、活動を人為的に操作する介入を行う必要がある。当研究室では、VLS MSN の活動操作をレバー押し行動中に行い、すでに VLS D1-, D2-MSN の役割を明らかにしている^{7,9}。一方で、DMS MSN の役割は、介入操作によって検討していない。そこで、2章ではレバー押し課題中の DMS D1、D2-MSN の機能を明らかにする。

2 章

背景と目的

本章は、目的指向型行動中の DMS の機能を明らかにすることを目的とする。ACC は大脳皮質の一部であり、DMS に強く入力している（序章図 1）。また、ACC は手続きと目的を予測して目的指向型行動の形成に寄与することが知られている³⁴。ACC の機能と類似して、DMS もこれまで目的と手続きの関連性を学習し、新しい目的指向型行動を形成するために重要だと考えられてきた。一方で、DLS は学習済みの目的指向型行動の行使に関与していると広く言われてきた^{14,35}。さらに、DLS の神経細胞を傷害させると、目的指向型行動の習慣化が阻害されることがわかっている¹⁶。つまり、DLS は、既得の目的指向型行動を効率よく実行し、果てには行動を習慣化させる機能を持つと考えられている。DLS が目的指向型行動の行使に関与していることが謳われる一方で、DMS は動物が目的達成に必要な手続きを探り、学習をしている期間に神経活動が亢進することがわかっている^{16,36}。この学習している最中の DMS の神経活動を、大脳皮質から MSN への入力を遮断することで阻害すると、目的指向型行動の学習が妨げられることが知られている³⁷。さらに目的指向型行動を形成・学習した後は神経活動が減少することが報告されている^{14,35}。

しかし近年の研究では、DMS が目的指向型行動の行使にも重要な役割を持っていることが示唆されている。とりわけ、Vandaele ら¹² は動物が既得の目的指向型行動を実行する最中、DMS の神経細胞が活発に活動をしている様子を捉えた。さらに、これらの神経細胞は、目的指向型行動の行使の間、神経活動が抑制される群と、亢進される群に分けられることが示された。しかし Vandaele らはそれら 2 つの異なる神経活動パターンを示した細胞集団を分子的に分けることはできなかった。また、それらの生理学的機能についても追及できなかった。そこで本章では、まず目的指向型行動を実行している間の DMS D1-、D2-MSN の活動を明らかにする。しかし神経細胞の機能を明らかにするためには神経活動の観察だけでは不十分である。得られた神経活動と真逆

の神経活動を人為的な介入で作り出し、どのように行動が変化するかを観察することとで神経細胞の機能を明らかにできる。そこで、本章ではさらに DMS D1-、D2-MSN の活動を人為的に操作し、それらの機能を究明する。

2 方法

2.1 動物

2 章で使用した D1-YC マウスと D2-YC マウスは 1 章で使用した個体と同一である。2 章ではさらに 2 種類のマウスを用いて実験を行った。D1-ChR2 マウス (*Pde10a2-tTA::tetO-ChR2(C128S)-EYFP; Adora2a-Cre* triple-transgenic mice)は *Pde10a2-tTA* マウスと *tetO-ChR2* マウス³⁸, *Adora2a-Cr* マウスを交配させて得た。D2-ArchT マウス (*Drd2-tTA::tetO-ArchT-EGFP* double-transgenic mice)は *Drd2-tTA* マウスと *tetO-ArchT-EGFP* マウス³⁹を交配させて得た。

2.2 手術

手術は手術台 (SM-6M-HT, Narishige)で行い、ケタミンとキシラジン (それぞれ 100 mg/kg と 10 mg/kg, 腹腔内投与)をマウスに投与し、麻酔した。

D1-YC, D2-YC マウスには 1 章と同様に DMS に光ファイバーを留置した。光遺伝学的操作のために D1-ChR2 と D2-ArchT マウスは両側に中心径 200 μm の光ファイバー (0.39 NA, Thorlabs)を脳の中心線から 27°の角度で挿入した (+0.98 mm AP, ± 2 mm ML, 2.2 mm DV)。

2.3 レバー押し課題

マウスは餌制限下、個別に飼育した。体重は餌制限前の体重の 85%を維持した。レバー押し課題の装置は 1 章と同じものを使用した。レバー押し課題のトレーニングは、1 回アクティブレバーを押せば報酬がもらえる FR1 課題から開始した。マウスは 10-14

セッション連続で FR1 課題を練習した。1 セッション中に 50 回報酬を獲得できたマウスは、トレーニングからテスト段階に進んだ。トレーニングでは、レバーは 60 秒間提示され、1 セッションが 60 分経過するまで、もしくは、マウスが 100 個の報酬を獲得する時点まで続いた。テストは、5 回レバーを押すと報酬が貰える FR5 課題である。レバーが提示されている間にマウスが 5 回アクティブレバーを押した場合、餌報酬が与えられる。これを成功トライアルと呼ぶ。餌が運ばれた後レバーは壁内に引き戻され、30 秒間の ITI ののち、自動的に次のトライアルが開始される。また、レバーが提示されている間にマウスが 1 回もレバーを押さなかったトライアルを無視トライアルと呼ぶ。その後レバーは壁内へ引き戻される。そしてまた ITI に続いて、新しいトライアルが開始する。

テストは 7 セッションの FR5 課題で構成した (図 1A)。初めて FR5 課題を経験したマウスを未熟マウス、7 回目のマウスを熟練マウスとした。1 回のレバー押しで報酬をもらえたトレーニング (FR1 課題) から、5 回のレバー押しが要求されるテスト (FR5 課題) に移行すると、マウスは時々、5 回レバーを押し切る前に餌の無い餌箱に鼻入れをして餌を確認した⁴⁰。アクティブレバーと餌箱は 6 cm 離れている。マウスが餌箱に入ったタイミングは、マウスの頭が餌箱から 2.5 cm 以内に入ったタイミングと定義した。マウスは餌箱を確認したあと、アクティブレバーのある場所に戻り、再びレバー押しに従事した。このように報酬獲得前にレバー押し行動を一時中断することを中断された目的指向型行動と定義した (図 1B)。反対に、餌箱を確認せず 5 回押し切ることを継続した目的指向型行動と定義した。さらに、私はレバー押しに関係のないエリアを設定した。これは直径 2 cm の円で、アクティブレバーから 10 cm、レバーと反対の壁の方向に離れた場所である。私はマウスがこの場所に入る頻度を解析し、レバーを押して報酬を得るのに関係のない運動量を測定するために用いた (図 1C)。

また、マウスの軌跡を追うために、光ファイバーの保護剤 (1.2 × 1.4 cm) に反射テープを貼り、マウスの頭の上に付け、オペラントボックスの天井に設置した赤外線カメラ (ELP

2 Megapixel WEB Camera, OV2710, Ailipu Technology Co., Ltd)で撮影した。動画は 20 Hz のサンプリングレートで録画した。各動画フレームのマウスの位置はオリジナルの MATLAB コードで算出した。

TTL 信号はレバーが提示された時、押されたときにデータ獲得装置(cDAQ-9178, National Instruments)を使って生成した。TTL 信号は同時にオリジナルの LabVIEW プログラム (National Instruments)を使って 1000 Hz のサンプリングレートで記録した。

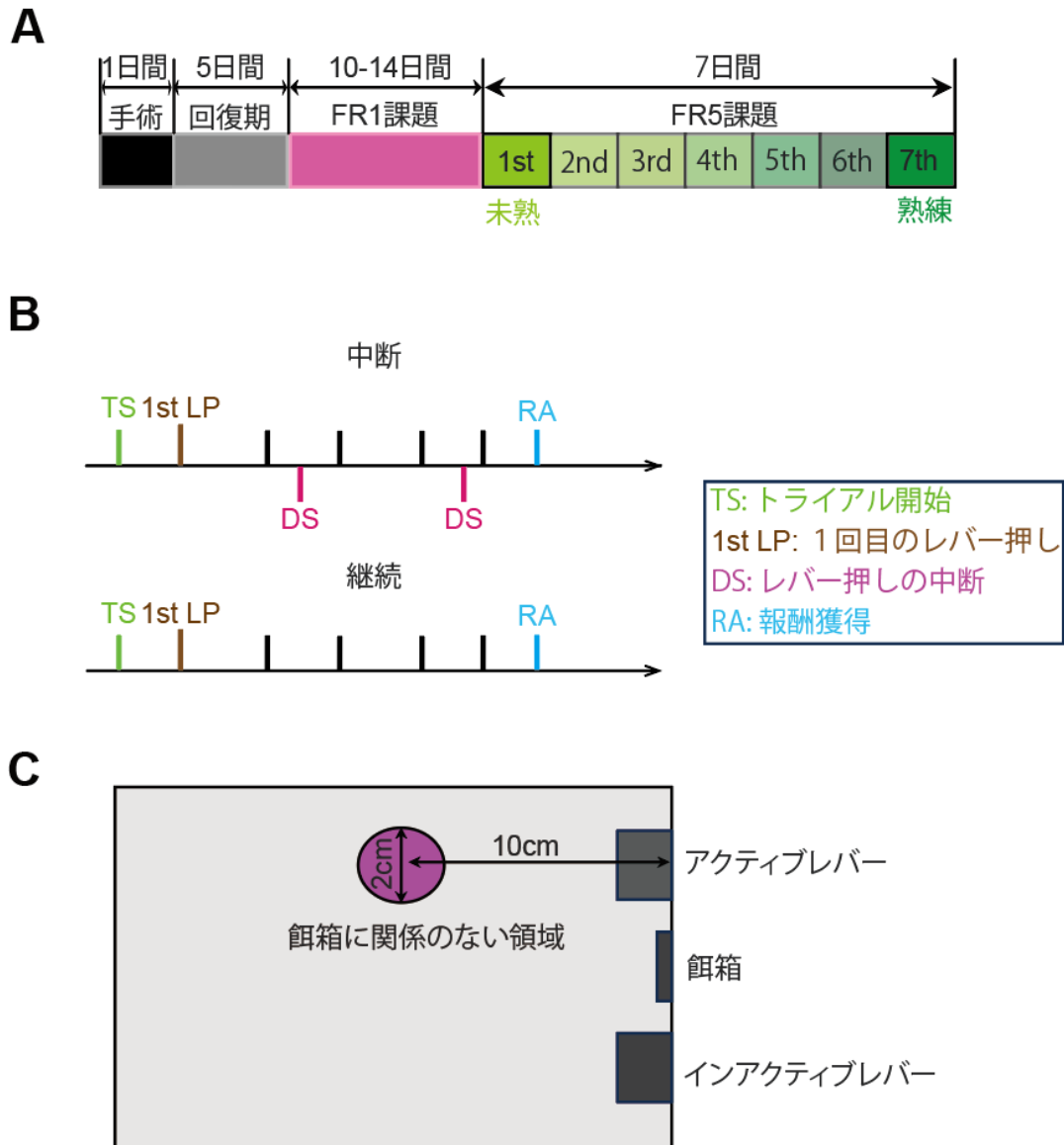


図1 実験デザイン

(A) レバー押し課題のトレーニングとテスト課題。はじめに、マウスはFR1 課題を経験し、1 回のレバー押しと報酬の関連性を学習するトレーニングを行った。続いて要求されるレバー押しの回数が5 回に増加した。そして、FR5 課題では5 回のレバー押しという手続きと報酬という目的の関連性を学習させた。手続きと報酬の関連性の学習経験によって、FR5 課題を1 回経験したマウスを未熟マウス、7 回経験したマウスを熟練マウスとした。

- (B) レバー押しの実行中に餌箱を確認する目的指向型行動の中断は時々発生した
(上)。餌箱を確認しない目的指向型行動は継続と呼んだ (下)。(TS: トライアル開始,
1st LP: 1 回目のレバー押し, DS: レバー押しの中断, RA: 報酬獲得)。
(C) アクティブレバーから 10 cm のところを餌箱に関係のない領域とした。

2.4 ファ이버フォトメトリーシステム

神経活動を記録するために、カルシウム濃度の変動をファイバーフォトメトリーシステムで検出した。詳細は 1 章 2.4 参照。

2.5 光遺伝学的操作

タスク中に MSN 活動を活性化するために、チャンネルロドプシン (ChR2 (C128S))⁴¹ が D1-MSN に発現するマウスを用いた。このチャンネルロドプシンは一度青色光で活性化されると、黄色光を照射するまでチャンネルが開くステップファンクション式オプシンである (図 2 左)。そしてチャンネルが開いている間は、Na⁺が細胞内に流入して、神経活動が活性化する。この活性化は、黄色光を照射するまで続く。MSN 活動を抑制させるために、アーキロドプシン (ArchT)³⁹ が D2-MSN に発現するマウスを用いた。ArchT はプロトンポンプで、黄色光を照射している間、H⁺を細胞外に汲み出して、神経活動を抑制する (図 2 右)。6 匹の D1-ChR2 マウスに FR1 課題を学習後、更に FR5 課題を 7 セッション経験させた。この熟練マウスを用い、光操作を行った。活性化のセッション (青色光 0.1 秒・黄色光 0.1 秒の照射の組み合わせ) は 2 回、コントロールセッション (黄色光照射 0.2 秒) も 2 回施行した (図 3 A)。また、5 匹の D2-ArchT マウスも同様に FR1 課題を学習後、更に FR5 課題を 7 セッション経験させた。そして、抑制化のセッション (黄色光 0.2 秒照射) を 2 回、コントロールセッション (青色光 0.2 秒照射) を 2 回施行した (図 3 B)。

光ファイバー (NA 0.39, Thorlabs)は線条体の両側にガイドカニューレから挿入した。黄色 (575 nm)と青色 (475 nm)の光は SPECTRA 2-LCR-XA light engine (Lumencor)によって生成した。黄色、青色光の光ファイバー先端でのパワーはそれぞれ 3-4 mW, 2-3 mW だった。光は MED-PC (Med Associates)によって生成される TTL 信号でコントロールした。

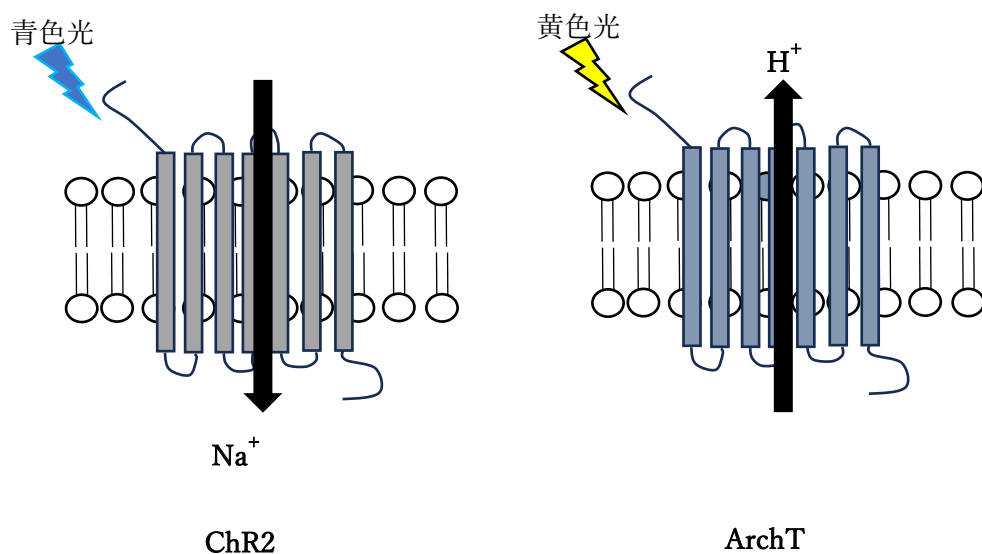


図2 光タンパク質の動作原理

ChR2 (左) は青色光を照射すると細胞内に Na^+ を流入させ、神経細胞を活性化する。
ArchT (右) は黄色光の照射で H^+ を細胞外に流出し、神経細胞を抑制する。

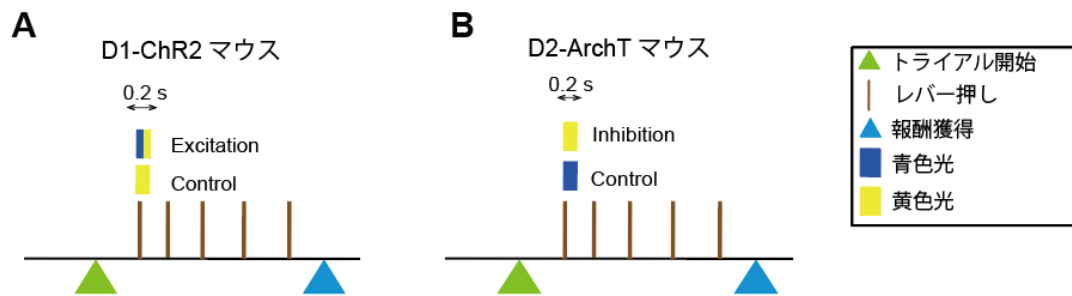


図 3 光遺伝学的操作の方法

(A) ChR2 を使った D1-MSN の光活性化のタイミング。

(B) ArchT を使った D2-MSN の光抑制のタイミング。

2.6 免疫組織化学染色

1 章同様、行動実験終了後、脳切片を作成し免疫染色を行った。そして、ファイバーの挿入痕から、神経活動の記録、操作部位を特定した。詳細は、1 章 2.5 参照。

2.7 データ解析

全動物、サンプルはランダムに実験群に割り当て、実験の条件は盲検化していない。光ファイバーが DMS に留置できていなかったマウスは、解析から除外した。ファイバーフォトメトリーデータは MATLAB コードを用いて解析した。1 セッションの YC 比 (黄色とシアンの蛍光強度の比: R) の蛍光退色は 3 次元スプライン補正し、z-score を $(R - R_{\text{mean}}) / RSD$ (R_{mean} と RSD は各トライアル開始直前 5 秒間の YC 比の平均と標準偏差) より計算することで、フォトメトリー信号をトライアル毎に標準化した。z-score が大きくなると神経活動が活性化していることを示し、小さくなると抑制されていることを示す。

2.8 統計

全てのデータをオリジナルの MATLAB コードを使って解析し、特記していない限りデータは平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM)で示した。サンプル数は結果と図のレジェンドに記載した。統計学的有意差を確かめるために、2つのサンプルデータセットに対して paired t -test を行った (図 4, 5, 6, 7C-F, 8, 9C-F, 10)。そして2つのサンプルデータセットに対してカイ二乗検定を実施した (図 7B, 9B)。また、危険率 5%未満を有意水準とした。

3 結果

3.1 熟練マウスでは目的指向型行動実施中の DMS の神経活動がわずかに変化した

熟練期 (FR5 課題 7 回経験したマウス) の D1-, D2-YC マウスを目的指向型行動が継続、中断された場合に分けて、神経活動を解析した (図 4A, B)。時間 0 秒はレバー押しの瞬間を指す。中断群における 0 秒から目的指向型行動が中断された時間 (マウスが餌箱に鼻を入れたタイミング) までの継続群と中断群の神経活動を比較した。

レバーを押してから目的指向型行動が中断されるまでに D1-YC マウスでは 1.07 ± 0.17 秒要した (図 4A グレー部分)。その間の継続時の神経活動の z-score の平均値は 0.11 ± 0.06 で、中断した場合は 0.02 ± 0.08 だった (図 4A 右棒グラフ)。paired *t*-test で $t(6) = 1.62$, $p = 0.16$ で両者に有意差はなかった。

熟練期 D2-Y マウスでは、レバーを押してから目的指向型行動が中断されるまでに 1.33 ± 0.21 秒要した (図 4B グレー部分)。その間の継続した場合の神経活動の z-score の平均値は 0.16 ± 0.22 で、中断した場合は 0.15 ± 0.30 だった (図 4B 右棒グラフ)。paired *t*-test で $t(4) = -0.05$, $p = 0.96$ で両者に統計学的有意差はなかった。

熟練した D1-YC, D2-YC マウスともに、継続、中断した目的指向型行動間で神経活動に有意な差は認められなかったが、D1-YC マウスは目的指向型行動が継続されている方が中断された時よりも神経活動が活性化する傾向を示した。

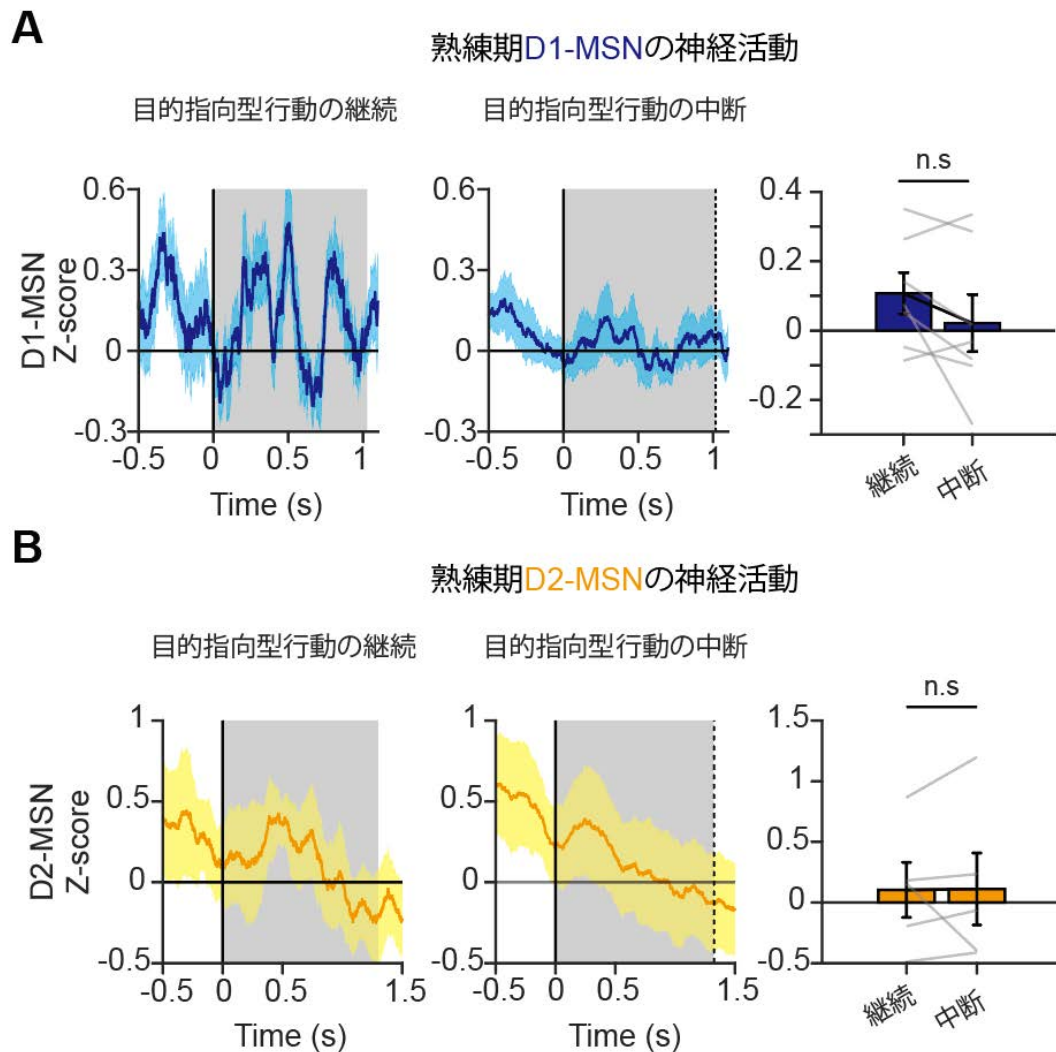


図 4 熟練期 D1-, D2-YC マウスで目的指向型行動が継続または中断したときの神経活動の比較

目的指向型行動が継続、中断した場合に分けて、その時の神経活動を比較した。平均神経活動（青、オレンジ色）はレバー押しのタイミングを時間 0 秒として、継続（左、マウスが連続してレバーを押す）、中断（右、マウスがレバー押し間に餌箱を確認しに行きレバー押しが一時中断される）場合に分けた。D1-YC マウスの活動が A、D2-YC マウスの活動が B である。灰色の網掛けはレバーを押してから鼻入れまでを示す。棒グラフは、目的指向型行動が継続、中断した時の平均した神経活動である。

3.2 未熟マウスでは、目的指向型行動の継続、中断に関連した神経活動が見られた

先行研究で論じられていたように^{14,36}、私は繰り返しレバー押し課題を経験したマウスから、わずかな神経活動の変化しか観察することができなかった。そこでまだ手続きと目的の関連性を学習し始めたばかりの未熟マウス（初めて FR5 課題を経験したマウス）に着目した。D1-YC 未熟群では、目的指向型行動の継続が 1 セッションあたり 4.43 ± 1.67 回生じ、熟練群では 27.3 ± 4.43 回生じた（図 5A）。両者を比較すると、paired t -test で $t(6) = 5.04$, $p = 0.006$ で有意差が認められた。D2-YC 未熟群では、目的指向型行動の継続が 1 セッションあたり 10.2 ± 4.22 回生じ、熟練群では 40.2 ± 9.30 回生じた（図 5B）。両者を比較すると、paired t -test で $t(4) = 4.43$, $p = 0.03$ で D2-YC マウスでも有意差が認められた。

次に未熟期 D1-, D2-YC マウスの神経活動を記録し、目的指向型行動が継続、中断した場合に分けた（図 6A, B）。D1-YC マウスはレバーを押してから鼻入れまでに平均 0.58 ± 0.10 秒要した。その間の継続した場合の神経活動の z -score は -0.14 ± 0.10 で、中断した場合は -0.01 ± 0.06 だった（図 6A）。paired t -test で $t(8) = -3.41$, $p = 0.01$ で統計学的有意差が認められた。D2-YC マウスはレバーを押してから鼻入れまでに平均 0.98 ± 0.17 秒要した。その間の継続した場合の神経活動の z -score は 0.99 ± 0.70 で、中断した場合は 1.01 ± 0.67 だった（図 6B）。paired t -test を実施し、 $t(4) = -0.08$, $p = 0.94$ で統計学的有意差が認められなかった。

以上より、D1-MSN は目的指向型行動の継続中、活動が抑制され、目的指向型行動が中断された試行ではその活動の抑制は弱まった。一方で、D2-MSN は目的指向型行動を実行している間、活性化される傾向にあったが、その活動変化は目的指向型行動の継続・中断と関係しなかった。

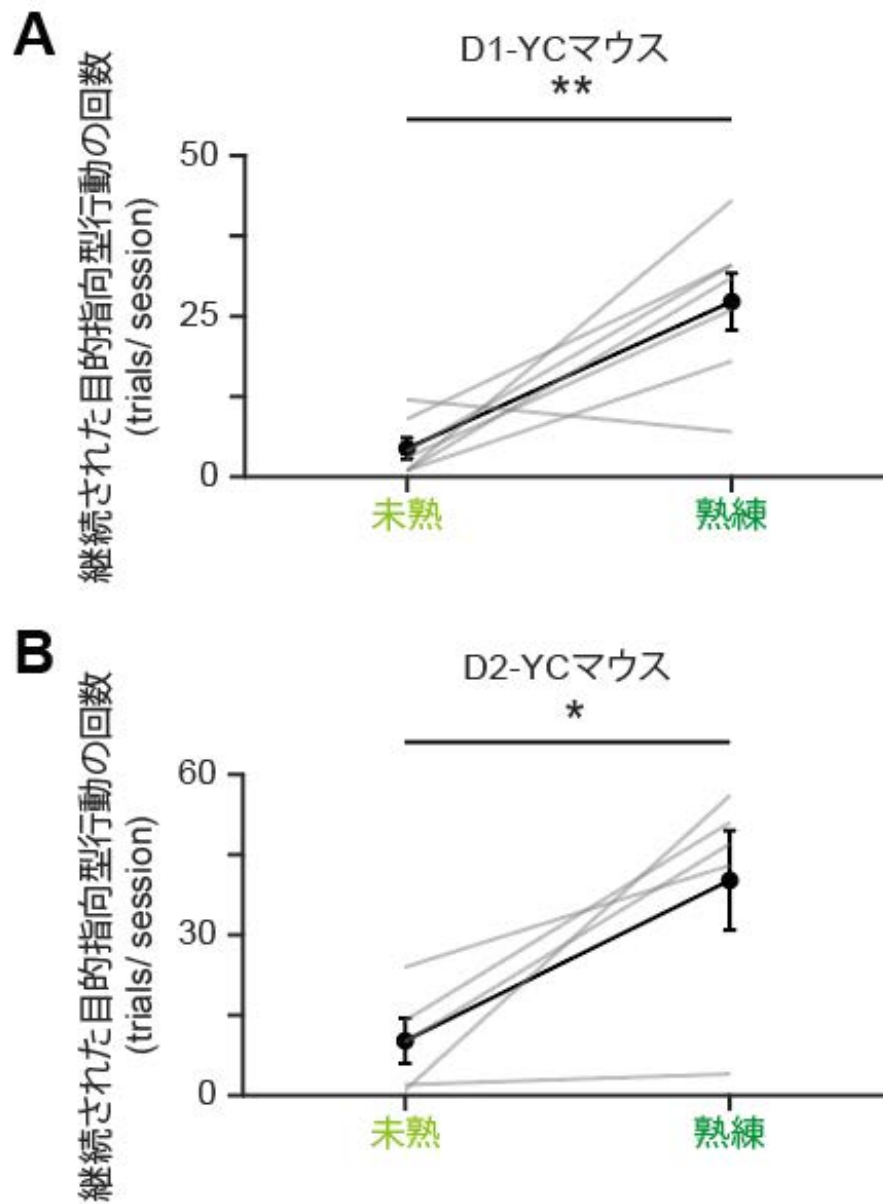
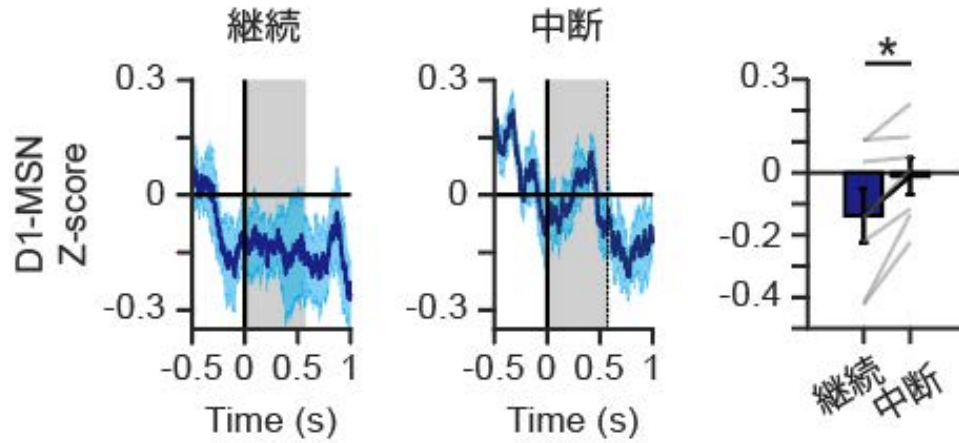
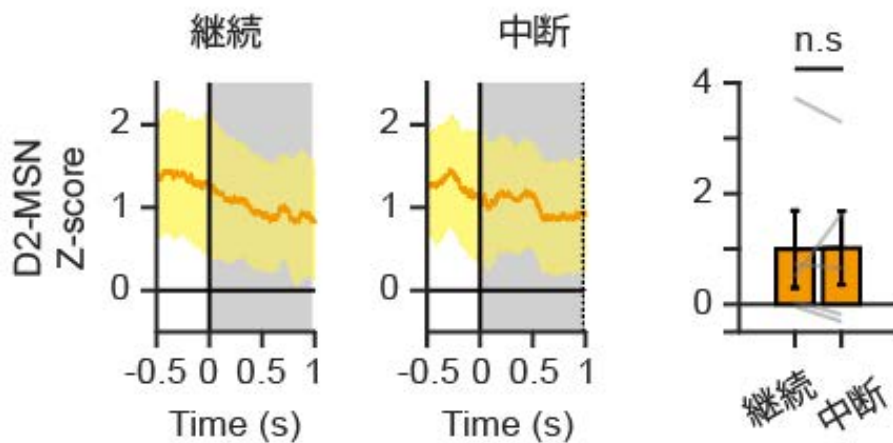


図5 未熟群は熟練群より継続された目的指向型行動が少ない

D1- (A), D2-YC (B)マウスでそれぞれ、未熟群と熟練群の1セッション中の継続された目的指向型行動の回数を比較した。 $**p < 0.01$, $*p < 0.05$

A**未熟群D1-MSNの神経活動****B****未熟群D2-MSNの神経活動****図 6 目的指向型行動が継続または中断された時の未熟期マウスの神経活動**

(A, B) 未熟な D1- (A)と D2-YC マウス (B) の目的指向型行動が継続、中断された時の神経活動を示す。青い線 (A)とオレンジ色の線 (B)は平均した神経活動、水色 (A)と黄色 (B)の線はSEMを示す。灰色網掛けはレバーを押してから餌箱に鼻入れをするまでの時間の平均値である。継続の場合は鼻入れがないため、中断された時と同じ時間幅を適

用した。棒グラフはレバー押しが継続、中断された時のレバーを押してから餌箱に鼻を入れるまでの神経活動の平均を示す。 $*p < 0.05$

3.3 D1-MSN を光操作で活性化すると目的指向型行動の中断が助長される

目的指向型行動の継続、中断と DMS の因果関係を明らかにするために、私は D1-, 2-MSN の神経活動を人為的に光操作した。光操作のタイミングは 2 章方法 2.5 に示した。D1-MSN は目的指向型行動が中断された時に神経活動の抑制が減弱したため (図 6A)、D1-MSN を人為的に活性化できる D1-ChR2 マウス (Pde10a2-tTA::tetO-ChR2-YFP; Adora2a-Cre triple-transgenic mice) を使って、神経活動の操作をした。記録したマウスはいずれも図 7A のように線条体に YC が発現していた。12 匹にファイバーを挿入し、うち 6 匹で正しく両側 DMS にファイバーが留置された。

D1-Chr2 マウスのコントロール群では、全トライアル 65.9 ± 7.55 回中 46 % で目的指向型行動が中断され、54 % で目的指向型行動が継続された。一方で光活性化群は、全トライアル 73.7 ± 7.68 回中目的指向型行動が中断されたのは 68 % で、32 % は目的指向型行動が継続された (図 7B)。カイ二乗検定より、 $\chi^2 (5) = 4.14$, $p = 0.04$ であり、D1-MSN の光刺激は目的指向型行動に影響を及ぼすことが示された。1 セッション当たりの目的指向型行動が継続した回数はコントロール群で 46.0 ± 3.58 回で、活性化群で 32.0 ± 7.10 回であった (図 7C 左)。paired t -test から、 $t (5) = -3.72$, $p = 0.01$ で、D1-MSN を活性化することで有意に目的指向型行動の継続が抑制されることが分かった。加えて、1 トライアル中に目的指向型行動の中断が生じる頻度は、コントロール群で 1.60 ± 0.12 回で、活性化群で 1.81 ± 0.16 回であった (図 7C 右)。paired t -test から、 $t (5) = 3.32$, $p = 0.02$ で、光活性化によって目的指向型行動が中断された頻度も有意に増加した。

これらの結果は、D1-MSN の活動が活性化させられると目的指向型行動の実行が中断することを示唆した。さらに、マウスが餌箱に滞在する時間は、コントロール群で 1.50 ± 0.25 秒で、活性化群で 1.53 ± 0.23 秒であった (図 7D)。paired t -test から、 $t (5) = -0.12$, $p = 0.91$ で、餌箱に滞在する時間に有意差はなかった。餌箱を確認する行動は増加するが、餌箱に滞在する時間に差がないことから、D1-MSN の活動亢進は目的指向型行動の一時的な中断を惹起することが示唆された。

線条体は意欲の調節に重要な役割を果たすことが知られている⁹。私は次に、成功トライアルの割合が光刺激によって変化したかを解析した。1セッション中に成功トライアルの割合はコントロール群で $82.0 \pm 2.64\%$ 、活性化群で $83.8 \pm 4.10\%$ であり（図 7E 左）、paired t -test で $t(5) = 0.35$, $p = 0.74$ だったことから成功トライアルの割合に有意差はなかった。成功トライアルに加えて、マウスがレバー押しに従事しなかった無視トライアルに着目した。1セッション中に無視トライアルの割合はコントロール群で $14.40 \pm 2.88\%$ 、活性化群で $9.36 \pm 2.86\%$ であった（図 7E 右）。paired t -test で $t(5) = -1.07$, $p = 0.33$ であり、無視トライアルは光活性化によって有意に変化しなかった。図 7E の成功、無視トライアルの結果から、D1-MSN の活性化は意欲に明らかな影響は示さなかった。

D1-MSN は一般的に運動を促進すると考えられているため^{26,27}、私は課題中、マウスがオペラントボックスを移動する速度を計算した。コントロール群は 2.93 ± 0.57 cm/秒、活性化群は 2.37 ± 0.27 cm/秒であった（図 7F）。paired t -test から、 $t(5) = -1.70$, $p = 0.17$ で有意な差は見られなかった。さらにマウスがレバーから餌箱まで移動するのに要した時間はコントロール群で 1.59 ± 0.19 秒、活性化群で 1.39 ± 0.18 秒であった（図 8A）。paired t -test から $t(5) = -0.74$, $p = 0.49$ で有意な差は見られなかった。餌箱以外の場所に侵入した頻度は、コントロール群で $1.05 \pm 0.75\%$ 、活性化群で $2.15 \pm 0.75\%$ であった（図 8B）。paired t -test から $t(5) = -1.26$, $p = 0.26$ で有意な差は見られなかった。餌報酬に繋がらないインアクティブレバーを押した回数は、コントロール群で 4.10 ± 1.05 回、活性化群で 1.17 ± 0.80 回であった（図 8C）。paired t -test から $t(5) = 1.71$, $p = 0.15$ で有意な差は見られなかった。これらの結果は、D1-MSN の活性化を高めると目的指向型行動の実行を邪魔するが運動機能と課題に対する意欲は保存されたままであることを示した。

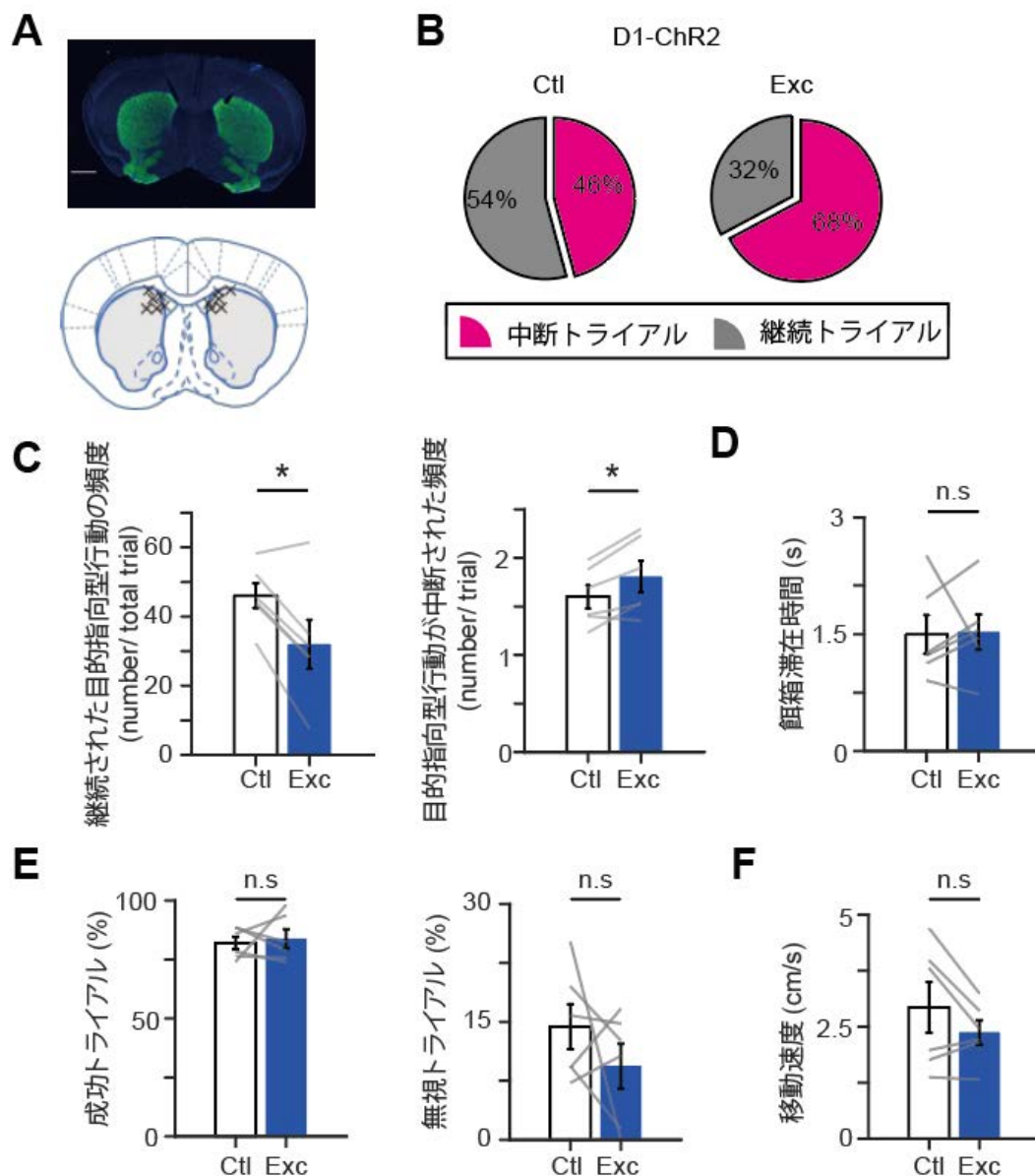


図 7 D1-MSN の光活性化は目的指向型行動の中断を引き起こした

(A) 6 匹のマウスに光ファイバーを正中線から 27°の角度で埋め込んだ。

(B) コントロール群と活性化群の目的指向型行動が中断（マゼンタ）あるいは継続（灰色）されたトライアルの頻度を示した。目的指向型行動の継続したトライアルは、マウスが連続して 5 回レバー押しをしたことを意味する。中断したトライアルは、1 トライアルあたりマウスが餌箱を最低でも 1 度は確認したトライアルを意味する。p < 0.05 (Ctl: コントロール群、Exc: 活性化群)

(C) 成功した全トライアルの中でコントロール群、光活性化群の目的指向型行動が継続された頻度（左）と 1 トライアル当たり目的指向型行動が中断された頻度（右）を示した。* $p < 0.05$

(D) コントロール群と光活性化群のレバー押し後の餌箱での滞在時間を示している。

(E) コントロール群と光活性化群の成功トライアルと無視トライアルの頻度を示した。

(F) コントロール群と光活性化群の、課題に従事している間の平均移動速度を示した。

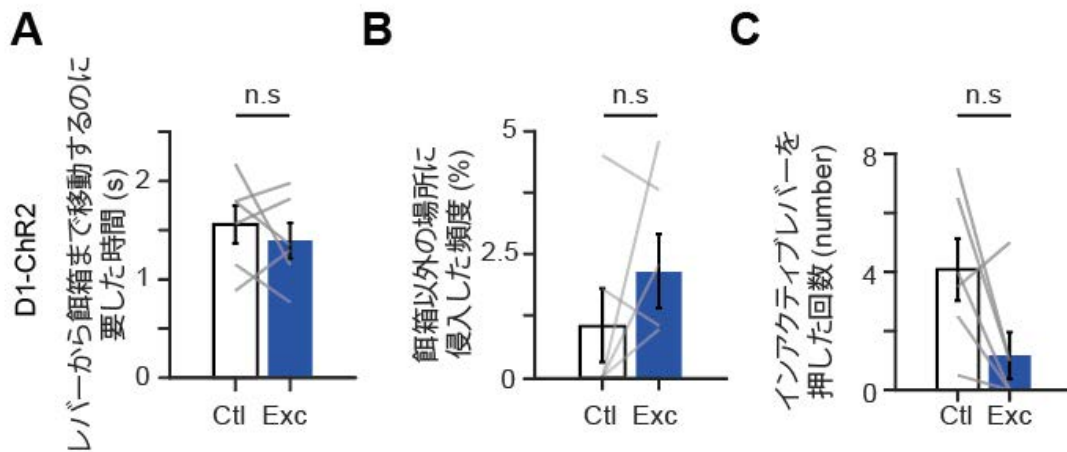


図 8 D1-MSN の活性化は運動機能に影響を及ぼさない

(A) コントロール群と光活性化群のレバーから餌箱までマウスが移動するのに要した時間を示した。

(B) レバーから反対の壁に 10 cm 離れた場所で、直径 2 cm の円を餌箱以外の場所、と定義した。課題を実行するのに関係のない運動機能の変化を捉えるために、コントロール群と光活性化群のこの場所に侵入した頻度を算出した。

(C) コントロール群と光活性化群の 1 セッション中に目的達成に関係のないインアクティブレバーを押した回数を示した。

D2-MSN のカルシウムシグナルは目的指向型行動中、ベースラインよりも高い傾向にあったため(図 4B)、D2-ArchT マウス (Drd2-tTA::tetO-ArchT-EGFP double-transgenic mice)を使って神経活動を抑制させた。神経活動の操作をした D2-ArchT マウスに光ファイバーを挿入した様子を図 9A に示した。9 匹にファイバーを挿入し、うち 5 匹で正しく両側 DMS に光ファイバーが留置された。

D2-ArchT マウスのコントロール群は全トライアル 66.0 ± 7.55 回中 22%で目的指向型行動が中断され、78%は目的指向型行動が継続された。一方で抑制群は、全トライアル 73.7 ± 7.68 回中 14%で目的指向型行動が中断され、86 %は目的指向型行動が継続された (図 9B)。カイ二乗検定より、 $\chi^2(4) = 1.84, p = 0.17$ であり、D2-MSN の光抑制は目的指向型行動に有意に影響を及ぼさないことが示された。1セッション当たりの目的指向型行動が継続した頻度はコントロール群で 78.4 ± 3.36 回で、光抑制群で 85.7 ± 4.10 回であった (図 9C 左)。paired t -test から、 $t(4) = 1.21, p = 0.29$ で、D2-MSN を抑制しても目的指向型行動の継続に影響はなかった。加えて、1 トライアル中に目的指向型行動の中断が生じる頻度は、1 セッションあたりコントロール群で 2.81 ± 0.52 回で、抑制群で 2.18 ± 0.54 回であった (図 9C 右)。paired t -test から、 $t(4) = -0.86, p = 0.44$ で、光抑制によって目的指向型行動が中断された頻度は変化なかった。さらに D1-ChR2 マウス同様、マウスが餌箱に滞在する時間を調べた。コントロール群で 1.67 ± 0.48 秒で、抑制群で 1.16 ± 0.48 秒であった (図 9D)。paired t -test から、 $t(4) = 0.46, p = 0.82$ で、餌箱に滞在する時間に有意な変化はなかった。1セッション中に成功トライアルの割合はコントロール群で $91.5 \pm 4.34\%$ 、抑制群で $85.9 \pm 4.35\%$ であった (図 9E 左)。paired t -test で $t(4) = -1.82, p = 0.14$ であり、成功トライアルの割合は光抑制によって変化しないことが示された。成功トライアルに加えて、マウスがレバー押しに従事しなかった無視トライアルに着目した。1 セッション中に無視トライアルの割合はコントロール群で $7.80 \pm 4.34\%$ 、抑制群で $12.17 \pm 4.27\%$ であった (図 9E 右)。paired t -test で $t(4) = 2.24, p = 0.09$ であり、無視トライアルは光抑制によって変化しなかった。図 9E の成功、無視ト

ライアルの結果から、D2-MSN の光抑制は D1-ChR2 マウス同様に意欲に影響しないことが示唆された。オペラントボックスを移動する速度は、コントロール群で 2.10 ± 0.33 cm/秒、抑制群で 1.61 ± 0.51 cm/秒であった (図 9F)。paired t -test から、 $t(4) = 0.63$, $p = 0.56$ で有意な差は見られなかった。さらにマウスがレバーから餌箱まで移動するのに要した時間はコントロール群で 1.00 ± 0.08 秒、抑制群で 1.90 ± 0.32 秒であった (図 10A)。paired t -test から $t(4) = 3.62$, $p = 0.02$ で有意な差が見られた。餌箱以外の場所に侵入した頻度は、コントロール群で $0.61 \pm 0.29\%$ 、活性化群で $0.69 \pm 0.43\%$ であった (図 10B)。paired t -test から $t(4) = -0.37$, $p = 0.73$ で有意な差は見られなかった。餌報酬に繋がらないインアクティブレバーを押した回数は、コントロール群で 3.6 ± 3.6 回、抑制群で 0.5 ± 0.39 回であった (図 10C)。paired t -test から $t(4) = 1.71$, $p = 0.63$ で有意な差は見られなかった。

これらの結果を踏まえて、D2-MSN は目的指向型行動の実行へ有意に関与しないことがわかった。以上の結果より、D1-MSN の抑制が目的指向型行動の維持に不可欠であることを明らかにした。

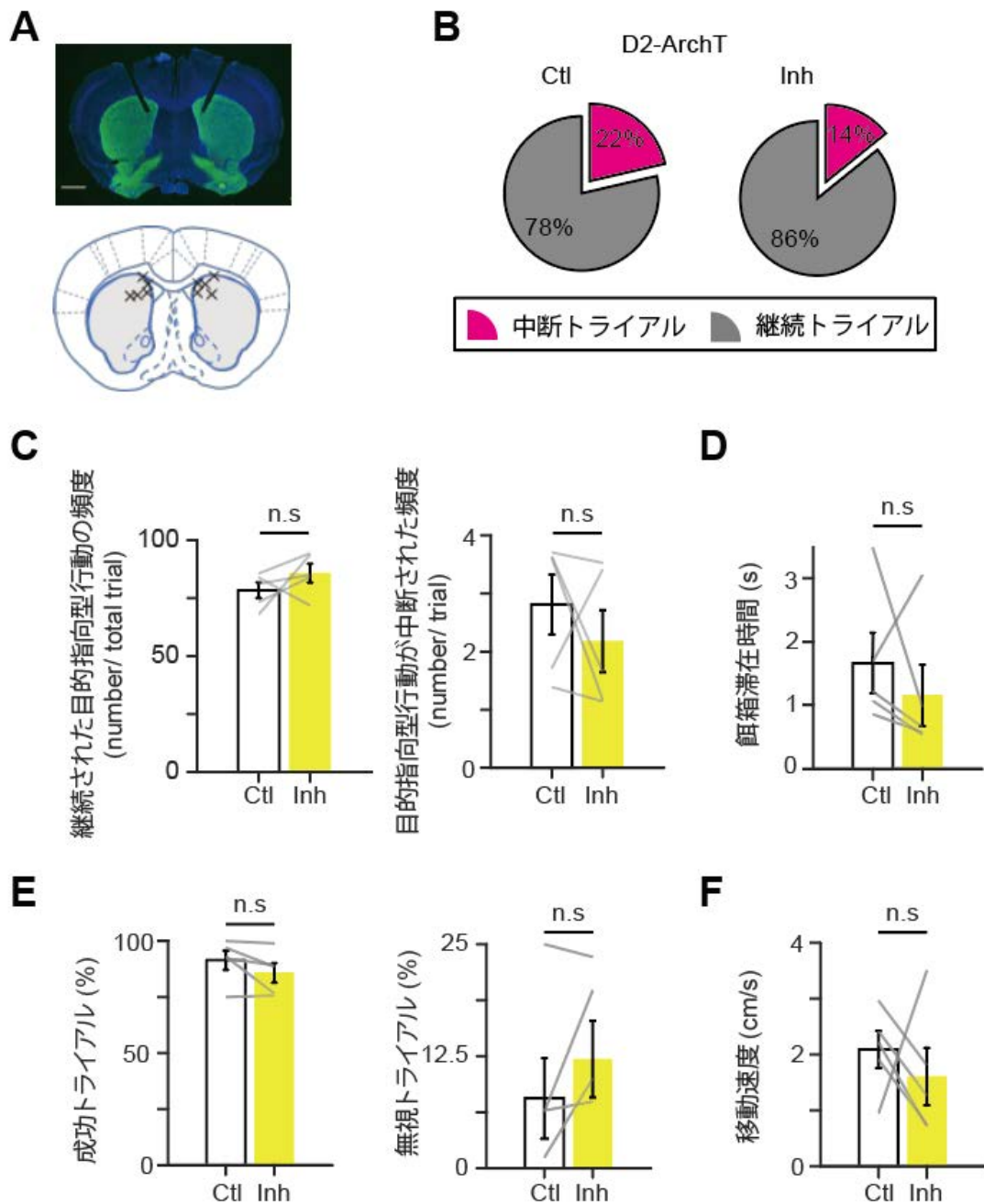


図 9 D2-MSN の抑制は目的指向型行動の実行に影響しない

(A) 5 匹のマウスに光ファイバーを正中線から 27°の角度で埋め込んだ

(B) 光抑制が目的指向型行動の中断、継続に与える影響を示した。

(C) 成功した全トライアルの中でコントロール群、光抑制群の目的指向型行動が継続された頻度（左）と 1 トライアル当たり目的指向型行動が中断された頻度（右）を示した。

(D) コントロール群と光抑制群のレバー押し後の餌箱での滞在時間を示している。

(E) コントロール群と光抑制群の成功トライアルと無視トライアルの頻度を示した。

(F) コントロール群と光抑制群の、課題に従事している間の平均移動速度を示した。

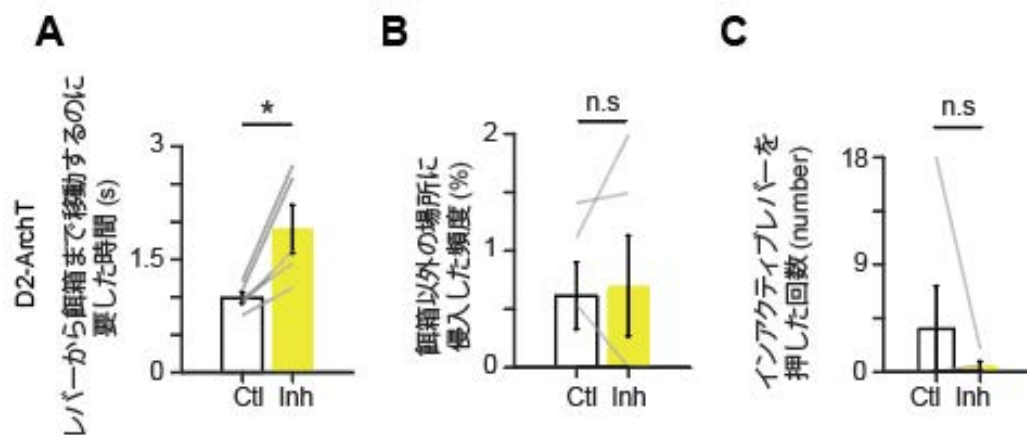


図 10 D2-MSN の抑制はレバーから餌箱まで移動する時間を延長する

(A) コントロール群と光抑制群のレバーから餌箱までマウスが移動するのに要した時間を示した。* $p < 0.05$

(B) コントロール群と光抑制群が課題と関係のない餌箱以外の場所に侵入した頻度を示した。

(C) コントロール群と光抑制群の 1 セッション中に目的達成に関係のないインアクティブレバーを押した回数を示した。

4 考察

本研究では、どのように DMS が目的指向型行動を制御しているかについて検証した。細胞種特異的なカルシウムレコーディング技術と神経活動の操作技術を用い、D1-

MSN はマウスが目的指向型行動を実行するときに抑制されていることを発見した。そして、この D1-MSN の抑制シグナルは目的指向型行動が中断されたときに減弱した。この抑制シグナルをキャンセルするため、目的指向型行動の開始時に D1-MSN を光活性化すると、目的指向型行動の中断が生じた。D2-MSN は行動の開始時にわずかに活性化していたが、D2-MSN のカルシウムシグナルは目的指向型行動の継続、中断には関与しなかった。また、この活性化シグナルをキャンセルするために、D2-MSN を光抑制しても、目的指向型行動は変化しなかった。従ってこれらのデータは、DMS の D2-MSN は本研究で用いたレバー押し課題ではあまり役割を示さなかったが、DMS の D1-MSN の活動を抑制する信号は目的指向型行動を継続するために重要であることが示唆された。

DMS は手段と目的の関連性の構築^{16,36}や行動の柔軟性⁴²⁻⁴⁵に重要な役割を担っている。その活動は手段と目的関連性が構築されたのちには低下することが知られており^{14,35,46}、DMS の活動がすでに学習した目的指向型行動の実行を妨げる可能性が示唆されている。この考えを支持するように、本研究を含む複数の研究^{12,47}において、すでに学習された目的指向型行動の実行時に DMS の活動が平坦化することが観察されている。また、D1-MSN の活性化は目的を達成するためには必要のない行動を誘発し、目的指向型行動の中断を引き起す⁴⁸。このことから、私は DMS D1-MSN の活性化は新たな手段と目的の関連性の学習を促し、この活動を抑えることで、新たな手段と目的の関連学習を抑制し、学習済みの目的指向型行動の実行をスムーズにすると予想する。

D1-MSN とは異なり、私は D2-MSN の観察実験および操作実験のいずれにおいても、目的指向型行動と D2-MSN の間に明白な関係を示す結果を得ることができなかった。先行研究¹²は、DMS に目的指向型行動と関連する複数の細胞集団を見出し、その一つは目的指向型行動の開始時に活性化されることを報告している。本研究では、目的指向型行動の実行時にわずかな D2-MSN の活性化が観察されたが、そのカルシウムシグナルは行動の中断・継続とは関連しなかった。Vandaele らの先行研究¹²で採用されて

いた課題はラットに5回連続でレバーを押させる、という点では本研究で用いた課題と類似しているが、レバー押しが中断された場合は餌報酬を与えないという点で、本課題と異なる。このことから、DMSのD2-MSNは動物がより集中力を必要とするような目的指向型行動を実行するときに寄与が大きくなるのかもしれないと推察する。その他の可能性は、Geddesら⁴⁸によって示されている。彼らは、餌報酬獲得のために、2種類の行動を順序通り実行することをマウスに課した。この課題で、彼らはDLSのD2-MSNが最初の行動から次の行動へ切り替える間に活性化されることを明らかにした。さらに、Wangら⁴²はD2-MSNの活性化が行動の切り替えを促し、逆転学習に役立つことを発見した。従って、DMSのD2-MSNは目的達成のために複数の行動を紡ぐ必要がある場合に、機能を発揮するとも考えられる。

私は本研究で、DMSが目的指向型行動の実行を制御していること、中でもD1-MSNの抑制が重要であることを示した。大脳皮質-線条体のコネクティビティの障害によって発症するParkinson病やHuntington病は、それまで出来ていた目的指向型行動がスムーズに実行できなくなり、日常生活に支障をきたす⁴⁹⁻⁵¹。本研究の発見は、これらの患者のQOLを上げる糸口になるかもしれない。

5 小括

DLSは学習済みの目的指向型行動の行使に関与することが報告されてきた^{14,35}。そしてDMSは相反するように、目的指向型行動の形成・学習中に活動し、以降はその神経活動は減少するとされていた^{14,35}。しかしVandaeleら¹²は動物が学習済みの目的指向型行動を実行する最中、DMSの神経細胞が活発に活動をしている様子を捉えた。そしてこれらの神経細胞は、目的指向型行動の行使の間、神経活動が抑制される群と、亢進される群に分けられることが示された。しかしVandaeleらはそれら2つの異なる神

経活動パターンを示した細胞集団が、分子的に分けられるのか、また、それらの生理学的機能については追及できていなかった。

本実験から私は DMS D1-MSN の活性化は報酬と無関係な行動を誘発して、学習済みの目的指向型行動を中断することを明らかにした。そしてこれより、D1-MSN の活動抑制がスムーズな目的指向型行動の行使に必要であることを初めて示した。

ここまで、1 章では DMS と VLS は目的指向型行動中、機能的に異なる領域として扱われるべきということを示した。そして 2 章ではスムーズな目的指向型を実行するために D1-MSN の活動が平坦化される必要性を見出した。次の 3 章では VLS について扱う。

VLS における目的指向型行動中の役割はすでに、当研究室の成果から明らかになっている。しかし、VLS に入力する IC は内受容感覚、特に嫌悪刺激に対する内受容感覚を処理するが、これまで嫌悪的状況下での目的指向型行動中の VLS の応答は報告がない。そこで 3 章では、内受容感覚の変動に伴う VLS の変化を明らかにする。

3 章

1 背景と目的

2007 年、Seeley らによって salience network という言葉が生まれた⁵²。Salience とは脳科学において目立つ、注意を引くような、といった意味合いを持つ。島皮質 (IC)、前帯状皮質 (ACC)、そのほか扁桃体や視床下部等をつなぐ salience network は内臓痛を含め身体全体の感覚の入力を受ける。Salience network の中でも、とりわけ IC は痛覚⁵³や空腹、口渴、不安といった嫌悪刺激⁵⁴⁻⁵⁶の感覚にセンシティブなことが分かっている。IC は VLS に密な投射を送る^{33,57}ことから、VLS が嫌悪刺激に反応して行動を変化させることが考えられる。

人間は自身の体調の変化を脳で感じ取り、具合が悪い時は身体を休ませようとする。体調が悪いと意欲がなくなって何事もやる気が起きないのは、脳が体の異常を感じ取っているからだ。これまでの研究で、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を使って腸に炎症を引き起こし、体調を悪化させ、内受容感覚を変化させると、IC の神経活動が活性化することが分かっている。またその活性化した神経活動を抑制すると、炎症まで緩和されることを Koren らは報告しているが、意欲の増減についてはいまだ不明である⁵⁸。そこで私はこれまでの研究をもとに、消化管の炎症は IC の活性化を通して VLS の神経活動を活性化し、意欲を減少させるという仮説を立てた。そこで本研究は Koren らと同様に、DSS を用いて炎症を惹起したマウスを作成した。そして VLS D2-MSN の神経活動が消化管の炎症で活性化し、その神経活動の変化が意欲の低下をもたらすかいないかを検討した。

2 方法

2.1 動物

3 章で使用した D2-YC マウスは 1 章で使用したマウスと同じ遺伝子型である。D2-ChR2 マウス (*Drd2-tTA::tetO-ChR2(C128S)-EYFP double-transgenic mice*) は *Drd2-tTA* マウスと

tetO-ChR2 マウス³⁸を交配させて得た。遺伝子改変マウスの遺伝的背景は C57BL6/J と 129SvEvTac の混合背景である。

2.2 手術

手術は手術台 (SM-6M-HT, Narishige)で行った。ケタミンとキシラジン(それぞれ 100 mg/kg と 10 mg/kg, 腹腔内投与)でマウスを麻酔した。

VLS で記録を取るために、D2-YC マウスは Paxinos and Franklin の脳地図に従い、光ファイバー (CFMC14L05, 400 μ m, 0.39 NA; Thorlabs) を片側 (右もしくは左)に埋め込んだ (+1.10 mm anteroposterior (AP), 2.0 mm mediolateral (ML) from bregma, 3.5 mm dorsoventral (DV) from the brain surface)。光遺伝学的操作のために D2-Chr2 マウスは両側 VLS に中心径 200 μ m の光ファイバー (0.39 NA, Thorlabs)を埋め込んだ(+1.10 mm AP, $\pm$ 1.9 mm ML, 3.5 mm DV)。

2.3 DSS 誘発性大腸炎モデルの作成

D2-YC マウスは滅菌蒸留水にデキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS, 分子量 36,000-50,000 Da, lots M7191, Q3526; MP Biomedicals, Santa Ana, CA)を溶解して 1.5 % (w/vol)にし、レバー押し課題を学習したマウスに 9 日間飲水投与した。DSS の入っていない蒸留水を飲ませた日を day 0 とした。

先行研究⁵⁹に基づき、DAI (disease activity index, 疾患活動性評価指標)には体重、便の硬さ、直腸からの出血を用いた。体重は基準値から 0 %の減少を 0, 1-5 %の減少を 1, 6-10 %の減少を 2, 11-20 %の減少を 3, 20 %以上の減少を 4 とした。便の硬さは、正常で 0,

肛門への付着はないが形状が崩れてきた場合を 2, 肛門に付着する液状の便を 4 とした。
出血は、出血がない場合が 0, ある場合は 2, かなりの出血が確認できる場合は 4 とした。

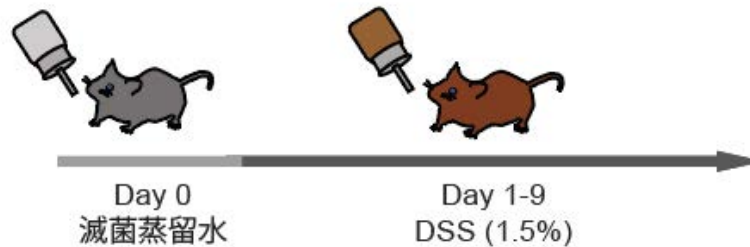


図 1 実験デザイン

滅菌蒸留水を飲ませていたマウスに 9 日間 DSS を投与し、大腸炎モデルを作成した。

2.4 レバー押し課題

3 章で使用したレバー押し課題のセットアップは 1,2 章と同様のものを使用した。レバー押し課題のトレーニングは、1 回アクティブレバーを押せば報酬がもらえる FR1 課題から開始した。マウスが 1 セッション当たり 50 回トライアルを成功した場合、FR2 課題（2 回アクティブレバーを押すと餌報酬が貰える）に移行した。FR2 課題も 1 セッション当たり 50 トライアル成功できれば、FR3 課題へ、その後 FR5 課題へと移行した。5 回レバーを押し、報酬が貰えたトライアルを成功トライアル、1 回もレバーを押さず報酬も貰えないトライアルを無視トライアルとした。FR5 課題を 1 セッション当たり 50 トライアル以上成功させ、FR5 課題を 10 セッション以経験し、十分にレバー押し課題を学習したマウスに DSS 投与を行った

2.5 ファイバーフォトメトリーシステム

神経活動を記録するために、カルシウム濃度の変動をファイバーフォトメトリーシステムで検出した。詳細は 1 章 2.4 参照。

2.6 光遺伝学的操作

2 章で使用した光タンパク質 ChR2 (C128S)を使って、光遺伝学的に神経活動を活性化した。4 匹の D2-ChR2 マウスの両側 VLS に光ファイバー(NA 0.39, Thorlabs)を埋め込み、FR5 課題下、光照射を実施した。光活性化群は5回目のレバーを押したタイミングで 0.5 秒間青色光を照射して神経活動を活性化し、次のトライアルが開始する 0.5 秒前から 0.5 秒間黄色光を照射してチャンネルを閉じ、活性化を終了した。つまり、5 回目のレバーを押してから次のトライアルが開始するまで、光照射した。コントロール群は5回目のレバーを押したタイミングで 0.5 秒間黄色光を照射し、次のトライアルが開始する 0.5 秒前から 0.5 秒間も黄色光を照射した。5 回目のレバー押しから次のトライアル開始までは 30 秒間である (図 2)。

光ファイバー(NA 0.39, Thorlabs)は線条体の両側にガイドカニューレから挿入した。黄色 (575 nm)と青色 (475 nm)の光は SPECTRA 2-LCR-XA light engine (Lumencor)によって生成した。黄色、青色光の光ファイバー先端でのパワーはそれぞれ 3–4 mW, 2–3 mW だった。光は MED-PC (Med Associates)によって生成される TTL 信号でコントロールした。

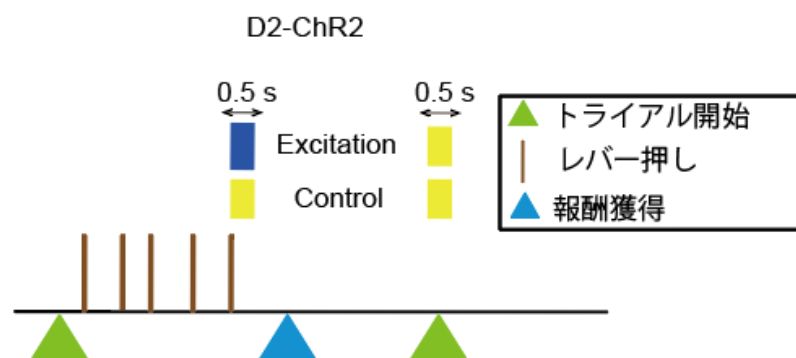


図 2 光操作の方法

2.7 免疫組織化学染色

1 章同様、行動実験終了後、脳切片を作成し免疫染色を行った。そして、ファイバーの挿入痕から、神経活動の記録、操作部位を特定した。詳細は、1 章 2.5 参照。

2.8 データ解析

1 章と同様の解析を行った。

2.9 統計

全てのデータをオリジナルの MATLAB コードを使って解析し、特記していない限りデータは平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM)で示した。サンプル数は結果と図のレジェンドに記載した。統計学的有意差を確かめるために、2つのサンプルデータセットに対して *paired t*-test (図 4A, 4B, 6B-E, 7)、*non-paired t*-test (図 4C, 4D, 5) を行った。そして4つのサンプルセットに対して一元配置分散分析を実施し、さらに3つのサンプルセットに対しチューキー・クレマーで事後分析をした(図 3B)。また、危険率 5%未満を有意水準とした。

3 結果

3.1 DSS 誘発性大腸炎モデルは意欲減退傾向にあった

作成した DSS 誘発性大腸炎モデルの意欲と VLS D2-MSN の神経活動を観察するために、D2-YC マウスに FR5 課題を実施した。9 匹中 7 匹から神経活動の記録に成功した。FR5 課題はマウスに報酬獲得のためにレバー押し（目的指向型行動）を行わせる課題で、レバー押しの出現頻度やレバー押しの開始にかかる時間を指標に、意欲を定量化することができる^{9,60}。

マウスには day 0 に DSS の入っていない蒸留水を飲ませた。day 1 から day 9 の 9 日間には DSS を溶解した水を飲水させた。day 0 と day 9 の FR5 課題中の行動を記録し、神経活動は VLS から取得した（図 3A）。大腸炎の DAI スコアは day 0 から 0, 1.70 ± 0.69 , 7.02 ± 0.82 , 10.5 ± 0.56 であった（図 3B）。DAI スコアは経日的に有意に上昇し、(day 0 vs day 6, $p < 0.001$ および day 0 vs day 9, $p < 0.001$)、DSS 摂取が身体に炎症を引き起こしていることが確認できた（図 3B）。DAI スコアの構成要素である体重、便の状態、出血の day 0 から day 9 までの変化を示したが、体重減少と軟便化に続いて、出血がおこることがわかる（図 3C）。

次にレバー押し課題の結果を比較する。Day 0 を water, day 9 を DSS と表記する。成功トライアルは water で 46.7 ± 10.3 、DSS で 33.0 ± 15.3 で、Paired t-test では $t(6) = 0.63$, $p = 0.55$ だった（図 4A）。無視トライアルは water で 9.29 ± 2.46 、DSS で 16.4 ± 7.07 で、Paired t-test では $t(6) = -0.92$, $p = 0.39$ だった（図 4B）。DSS 投与によって成功トライアルは約 71%に減少したが有意差は見られなかった。無視トライアルは約 3 倍に増加したがこちらも有意差はなかった。成功トライアルのうち、1 回目のレバーを押すまでにかかる時間は、water で 8.69 ± 9.29 秒、DSS で 26.0 ± 16.4 秒で、約 3 倍に増加した（図 4C, $t(10) = -1.73$, $p = 0.11$, non-paired t -test）。1 回目のレバーから 5 回目のレバーを押す切るまでにかかる時間は、water で 11.89 ± 6.95 、DSS で 31.77 ± 21.6 で 2.7 倍に増加した（図 4D, $t(10) = -0.87$, $p = 0.40$, non-paired t -test）。どちらも増加したが、有意差は見ら

れなかった。どの行動パラメータにも有意差は検出できなかったが、目的指向型行動の出現頻度の低下、行動開始の遅滞、行動完遂に要した時間の延長が示された。そして先行研究^{9,60}でレバー押し課題を意欲の評価系として用いていることから、この行動パラメータの変化は DSS による消化管の炎症で意欲が減退していることを意味する。ただし意欲減退以外にも、消化管の炎症による運動機能低下の可能性も考えられる。しかし、意欲を評価するためには運動機能の変化を観察する方法しかない。そのため、この行動パラメータの変化が運動機能低下に起因する可能性は完全に棄却できない。

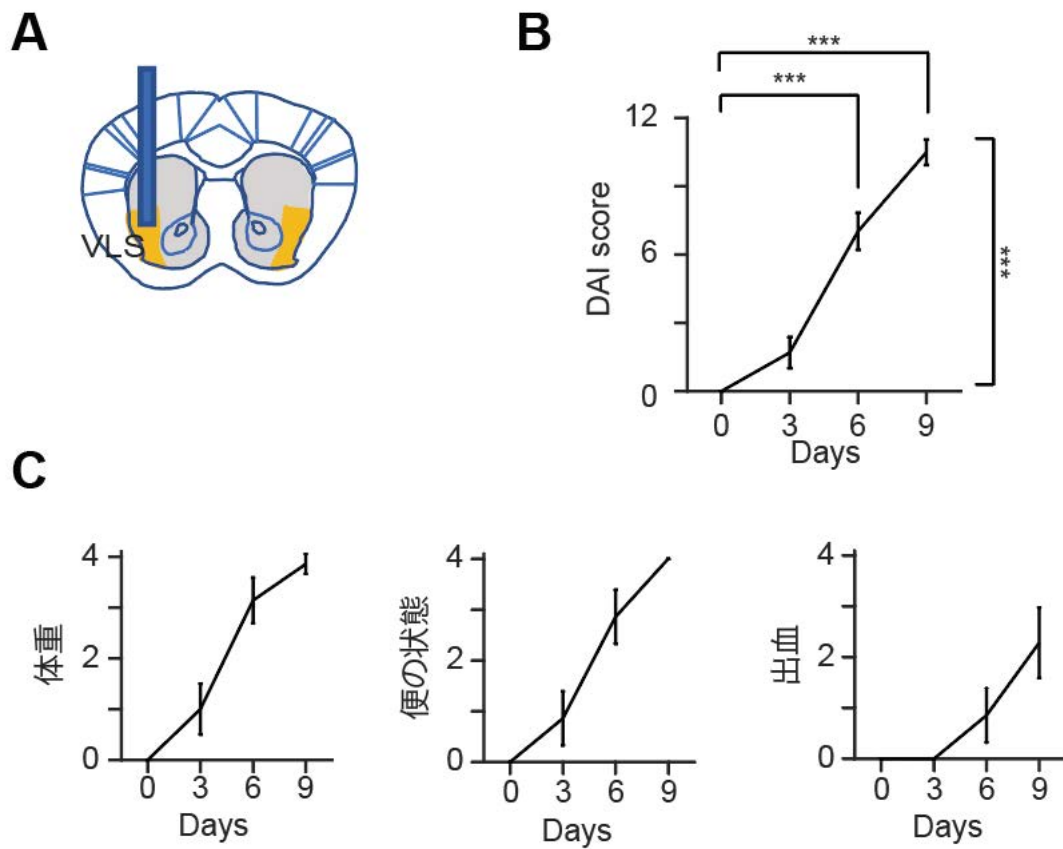


図 3 DSS 誘発性炎症モデルマウスの作成

(A) 左右 VLS の片側どちらかに光ファイバーを挿入して、D2-MSN の活動をファイバーフォトメトリーで記録した

(B) 大腸炎の活動性を示す DAI スコアを記した。*** $p < 0.001$

(C) DAI スコアの構成因子である体重、便、出血の状態、各スコアを示す。

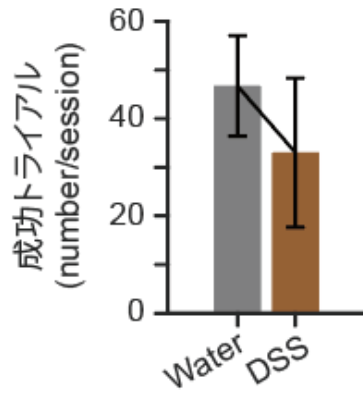
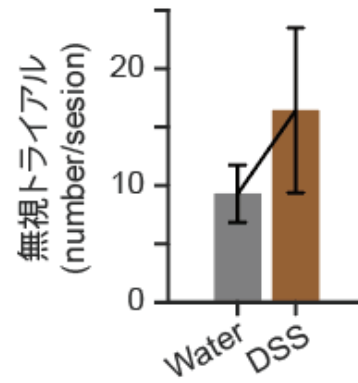
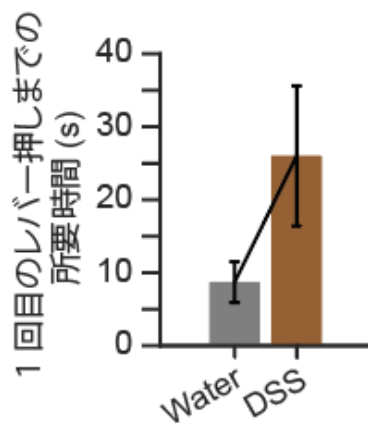
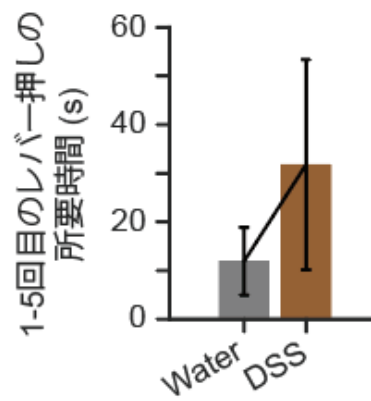
A**B****C****D**

図 4 DSS 誘発性大腸炎モデルは目的指向型行動の意欲を減少させる傾向を示す

(A, B) 炎症化前 (day 0, water) と炎症化後 (day 9, DSS) の目的指向型行動の成功トライアルと無視トライアルの 1 セッションあたりの回数を示した。

(C, D) 成功トライアルのうち、1 回目のレバーを押すまでにかかる時間と 1 回目のレバーから 5 回目のレバーを押し切るまでにかかる時間を炎症化前後で示した。

3.2 DSS 誘発性大腸炎モデルの神経活動は報酬獲得後に増加傾向を示す

炎症化前 (day 0) と炎症化後 (day 9) のレバー押し課題中の神経活動を記録して、トライアルの開始 (図 5A)、1 回目のレバー押し (図 5B)、報酬提示 (図 5C) の 3 つのイベントを起点にしてデータをプロットした。大腸炎前の神経活動 (図 5A-C 左) はレバー押し課題下で VLS D2-MSN の活動記録を行った先行研究⁹と同一のパターンを示し、報酬提示後が最も神経活動が活性化し、トライアルの開始時、レバーの押し始めも活動の上昇が見られた。1 回目のレバーを押すまでにかかった時間の中央値は炎症化前で 5.80 ± 6.84 秒, 炎症化後は 8.56 ± 23.2 秒だった (図 5A 箱ひげ図)。1 回目から 5 回目までのレバーを押すのににかかった時間は、炎症化前で、 5.84 ± 17.0 秒, 炎症化後では 4.74 ± 56.0 秒だった (図 5B 箱ひげ図)。各イベント (トライアルの開始、1 回目のレバー押し、報酬提示) から 1 秒間の平均神経活動を、炎症化前後で比較した。

炎症化前のトライアル開始の z-score は 0.23 ± 0.41 で、炎症化後は 0.94 ± 0.61 だった。Non-paired t-test で検定して、 $t(9) = -2.31$, $p = 0.05$ で有意差はなかったが増加傾向が見られ、z-score は 4.1 倍に増加していた。炎症化前の 1 回目のレバー押しの z-score は 0.21 ± 1.69 、炎症化後は 1.11 ± 1.93 だった。Non-paired t-test で検定して、 $t(9) = -0.81$, $p = 0.44$ で有意差はなかったが、z-score は 5.3 倍に増加した。炎症化前の報酬提示時の z-score は 0.28 ± 0.83 、炎症化後は 5.14 ± 7.31 だった。Non-paired t-test で検定して、 $t(9) = -1.89$, $p = 0.10$ で有意差はなかったが増加傾向が見られ、z-score は 18 倍に増加した。

これらの行動データ、神経活動記録から、DSS で身体に炎症が生じると目的指向型行動の意欲は損なわれ、VLS D2-MSN の活動は全体的に活性化、とりわけ報酬獲得後の D2-MSN は活性化傾向が強くなることが分かった。

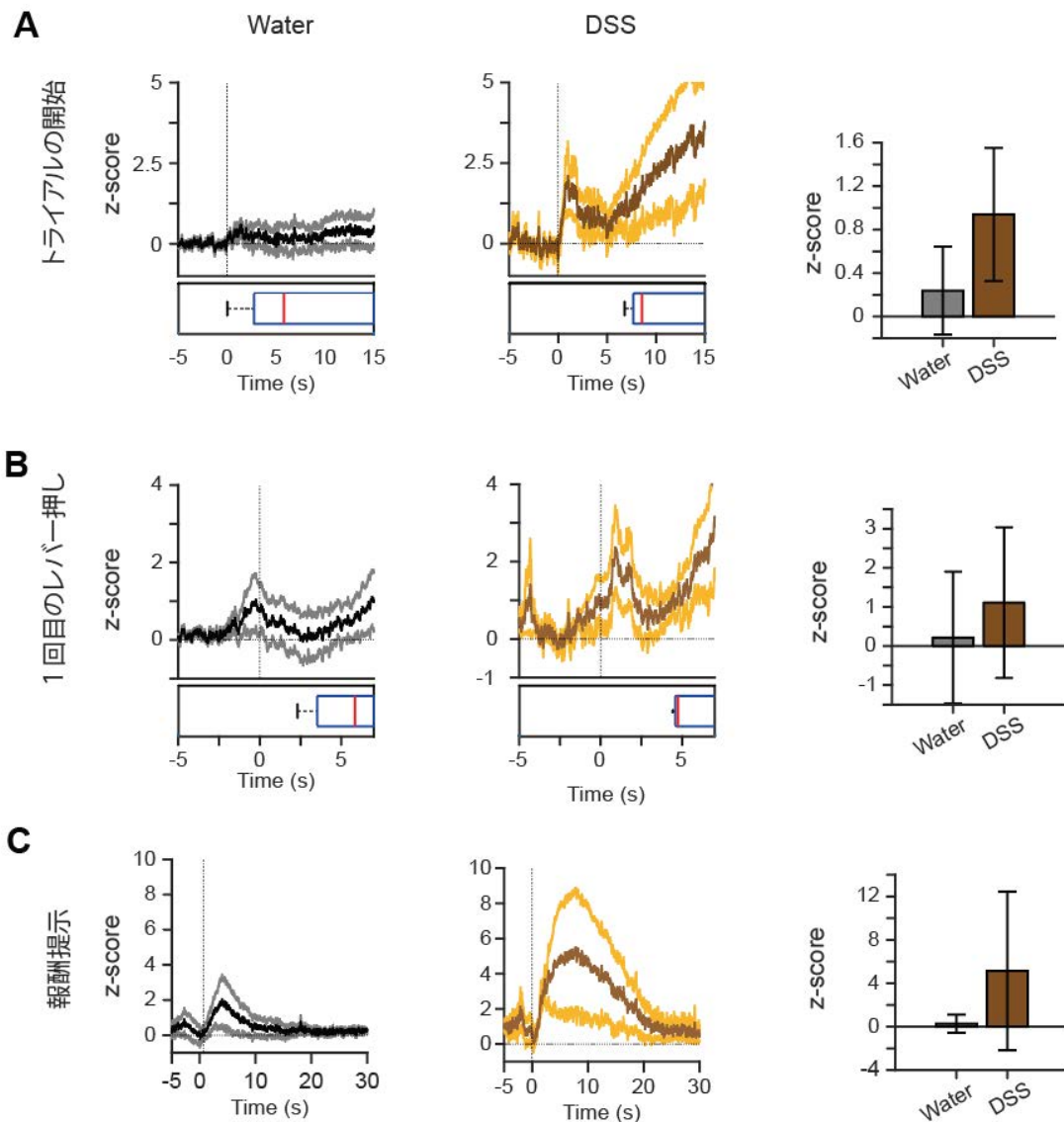


図 5 DSS 誘発性大腸炎モデルの D2-MSN の活動は報酬獲得後に増加傾向を示す

炎症化前後の神経活動を各イベント（トライアルの開始 (A)、1 回目のレバー押し (B)、報酬獲得 (C) のタイミングを時間 0 秒として、プロットした。黒と茶色の線は神経活動の平均値を、灰色とオレンジ色は $\pm$ SEM を示す。それぞれのイベントから 1 秒間の神経活動を平均し、炎症化前後で活動の変化を比較した。

3.3 VLS D2-MSN 活性化は意欲を減退させる

報酬提示後の VLS D2-MSN の活性化と意欲減退の因果関係を明らかにするために、光遺伝学的に VLS D2-MSN の活動を D2-ChR2 マウス (D2-ChR2::tetO-ChR2-YFP double-transgenic mice) を使って活性化した。図 4C より報酬獲得後の神経活動が炎症化で活性化傾向にあることから、報酬が運ばれたタイミングから次のトライアル開始までの神経活動をチャンネルロドプシンで活性化した (図 2)。

VLS D2-MSN の光活性化によって、成功トライアルはコントロール群で $91.5 \pm 5.21\%$ 、活性化群で $99.5 \pm 0.45\%$ だった。paired *t* test で $t(3) = 1.81, p = 0.17$ で、統計学的有意差はなかった。無視トライアルはコントロール群で $5.0 \pm 3.41\%$ 、活性化群で 0% だった。paired *t* test で $t(3) = -1.0, p = 0.5$ で、統計学的有意差はなかった。トライアル開始から 1 回目のレバーを押すまでにかかった時間はコントロール群で 3.92 ± 0.44 秒、活性化群で 18.10 ± 3.89 秒だった。paired *t* test で $t(3) = -3.95, p = 0.03$ で、有意に延長した。5 回のレバーを押すのに要した時間は、コントロール群で 3.74 ± 0.18 秒、活性化群で 5.47 ± 0.50 秒だった。paired *t* test で $t(3) = 2.82, p = 0.07$ で、統計学的有意差はなかったが 1.5 倍に延長していた。この目的指向型行動を開始するまでの時間の延長や目的指向型行動の完遂にかかる時間の延長傾向は、DSS 誘発性大腸炎モデルのフェノタイプ (図 4C, D) と類似している。

1 回目のレバーを押すまでにかかった時間が有意に延長したことから、トライアル開始時にマウスがレバーから離れたところにいる、もしくは、トライアル開始時にいる場所からレバーまで移動するスピードが遅い可能性が考えられた。トライアル開始時のマウスの位置を調べると、マウスからレバーまでの距離はコントロール群で 4.34 ± 0.20 cm、活性化群で 5.67 ± 0.28 cm だった。paired *t* test で $t(3) = -5.24, p = 0.014$ で、活性化するとレバーまでの距離が有意に延長した。マウスから餌箱までの距離はコントロール群で 6.23 ± 0.15 cm、活性化群で 4.50 ± 0.28 cm だった。paired *t* test で $t(3) = 3.99, p = 0.03$ で、活性化するとマウスは餌箱に近い位置にいることが分かった。さら

に、トライアルが始まった時点のマウスのポジションからレバーまで移動する速度はコントロール群で 2.65 ± 0.13 cm/秒、活性化群で 0.67 ± 0.31 cm/秒だった。paired t test で $t(3) = -5.22, p = 0.01$ で、活性化するとレバーまでの移動速度が有意に遅くなったことが分かった。これらの結果から、コントロール群は ITI の間に次のトライアルに向けてレバーの前で準備している、もしくは、トライアルが開始するとすぐにレバーへ向かうことが分かる。一方、光活性化群は、次のトライアルの準備が遅い、もしくは、トライアルが開始してもゆっくりレバーへ向かうことが分かる。これは次のトライアルへの意欲が減退していると考えられる。

これらの結果から、DSS による消化管の炎症が目的指向型行動の意欲を減退させ、特に VLS D2-MSN は目的指向型行動を始めるときの意欲を制御していることが分かった。

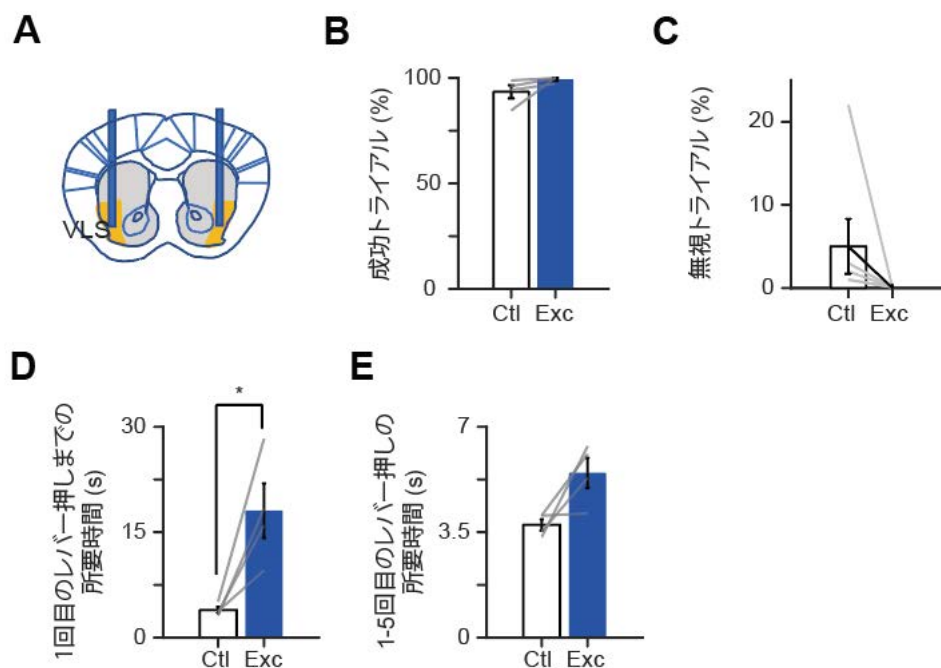


図 6 VLS D2-MSN の活性化は目的指向型行動を開始する意欲を減退させた

(A) 光ファイバー（中心径 200 μ m）は両側の VLS に埋め込んだ。

(B, C) VLS D2-MSN の光活性化群とコントロール群の光操作による成功トライアル、無視トライアルの変化を示した。

(D, E) VLS D2-MSN の光活性化群とコントロール群の光操作による 1 回目のレバーを押すまでの所要時間、5 回レバーを押すのに要した時間の変化を示した。

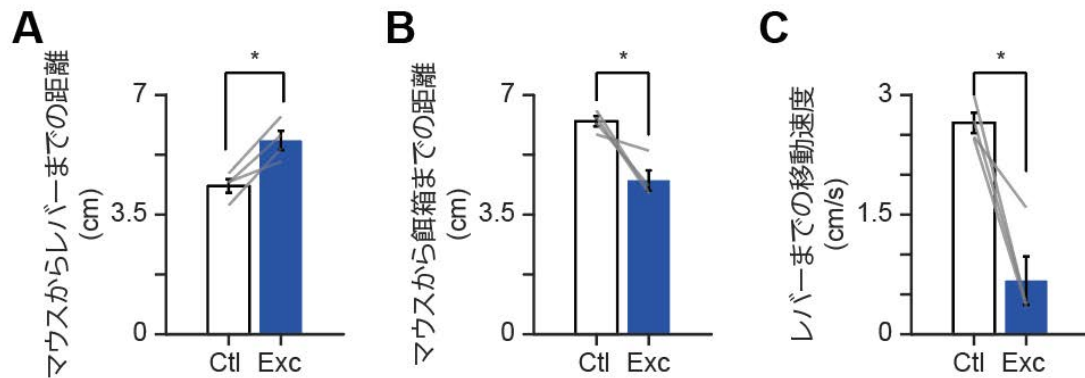


図 7 VLS D2-MSN の活性化はトライアル開始時の意欲を減退させる

(A, B) トライアル開始時のマウスの位置からレバーまで (A)と餌箱まで (B)の距離を示した。

(C) トライアル開始時のマウスの位置からレバーまで移動したときの平均移動速度を示した。

4 考察

私は本実験から DSS を使って身体に炎症を引き起こすと、意欲が低下することを明らかにした。また細胞種特異的なカルシウム記録法を用いて、炎症モデルの VLS D2-MSN は報酬獲得後に神経活動が活性化する傾向が強いことを発見した。加えて、報酬提示後の神経活動の活性化が意欲の低下を引き起こすかを検証するために、健康なマウスの VLS D2-MSN を光活性化したところ、目的指向型行動の開始が有意に遅延し、意欲の低下が引き起こされたことを見出した。以上の結果から、消化管の炎症は意欲を低下させ、それが VLS D2-MSN の活性化によることを明らかにした。

Koren ら⁵⁸は DSS 誘発性大腸炎モデルを作成し、消化管の炎症が IC の活性化を引き起こすことを見出した。さらにこの活性化を抑制すると炎症反応が緩和することを明らかにし、IC と炎症の関係性を解いた。そして本実験から、IC から強く神経投射を受ける VLS も DSS による炎症で活性化することが分かった。そしてこの VLS の活性化が実際に意欲を低下させることを本研究で明らかにした。

VLS D2-MSN は目的指向型行動の実行、ひいては意欲をコントロールしている^{7,9}。これらの行動制御は線条体の D1-, D2-MSN が担っている。D1-MSN を活性化すると下流は活性化し、D2-MSN の活性化は下流を抑制する^{2,61,62}。そして、活性化した D1-MSN は運動を促進し、逆に活性化した D2-MSN は運動を抑制すると考えられてきた^{26,27}。これらの先行研究と合致して、今回 VLS D2-MSN の活性化は行動を抑制したと考えられる。

光操作実験で、健康なマウスの神経活動を人為的に活性化させたときは行動の開始を遅延させた。しかし DSS 誘発性大腸炎モデルでは、FR5 課題で明らかな行動の開始の遅延を検出できなかった。これは、FR5 課題はレバーを 5 回押すという簡単な課題であることに加え、繰り返し FR5 課題を行ったことで、レバー押しがわずかに習慣化し、意欲が減退しても行動の開始を遅らせなかった可能性が考えられる。また、DSS 誘発性大腸炎モデルは行動パラメータのばらつきが大きいことも、有意差を導けな

った原因の一つと考えられる。よって、習慣化しにくい意欲の評価系を使って、個体数を増やして再検討する余地がある。

また本実験は課題を実行する意欲を評価する実験系であるが、食餌制限をしているため結果から食欲の要素を払拭することが困難である。そして炎症性腸疾患の患者は食欲が減退することが知られている⁶³。そのため今回の DSS 誘発性モデルマウスの VLS 活性化は課題を遂行する意欲の低下を反映しているのではなく、食欲の低下を反映している可能性も考えられる。しかし、光操作で VLS D2-MSN を活性化して DSS による神経活動を模倣しても成功トライアルが減少しなかったことから（図 6B）、光操作をしても餌報酬獲得の意欲は維持されることが示唆された。このことから、VLS D2-MSN の活性化は食欲を反映している可能性は低いと考えられる。

本実験では、D1-MSN を扱っていない。先に述べたように、意欲評価をする上で運動を制御する線条体の D1-, D2-MSN 両方を検討することが必要である。よって今後 VLS D1-MSN についても、内受容感覚との関連を調べる必要があると考える。今までは、具合が悪いとやる気がなくなるという状態を心理的に解釈していたが、意欲の評価系を用いた本研究の結果から、DSS による消化管の炎症が VLS D2-MSN の活動上昇を引き起こし、意欲を低下させるという科学的根拠を得ることに成功した。臨床では、慢性炎症性疾患を持ちうつ病を伴う患者に抗うつ薬が漫然と処方されている。現在臨床領域では光操作のように時間依存的に神経活動を操作できる技術は存在しないが、本研究が炎症で変化する神経活動基盤を明らかにしたことで、炎症性疾患のうつ症状治療法の開発に繋がると考える。

5 小括

私たちは感覚的に体調が悪くなると、意欲が低下することを知っている。しかしこれは科学的に説明されてこなかった。そこで私は意欲行動を司る線条体に着目した。

その線条体の中でも体の状態を感知する IC から強く神経入力を受けている VLS に注目して、炎症と意欲低の関係性の解明に着手した。

私は DSS を使って大腸炎モデルマウスを作成して、意欲が低下傾向にあることを確認し、そのマウスの VLS D2-MSN が報酬提示後に活性化傾向を示すことを見出した。そして人為的にその活性化を模倣すると、目的指向型行動の開始が有意に延長し、物事に取り組み始める意欲が減退することを明らかにした。この結果から、全身の炎症が VLS を活性化し、これが意欲行動を抑制することを証明した。

総括

本研究から、

- 1) DMS, VLS は単一領域と考えるのではなく、それぞれ異なる機能を有した独立の領域であること
- 2) DMS は D1-MSN の抑制を介して、目的指向型行動の継続に重要な役割をもつこと
- 3) 体の不調が引き起こす VLS の活性化が意欲低下を引き起こすことが分かった。

2 章の研究成果は、運動障害を持つパーキンソン病やハンチントン病患者の QOL 向上の、3 章の研究成果は、うつ病を併発する炎症性疾患のうつ病治療薬の開発の手がかりとなる知見である。しかし現在の技術で、神経活動を任意のタイミングで操作することはできない。今後技術が進歩した際に、今回の研究の成果は還元されるだろう。

主論文に関する原著論文 : **Kono A**, Shikano Y, Tanaka KF, Yamaura K, Tsutsui-Kimura I, Inhibition of the dorsomedial striatal direct pathway is essential for the execution of action sequences. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2023 Sep;414-424.

参考文献

1. Tannock R, Schachar RJ, Carr RP, Chajczyk D, Logan GD. Effects of methylphenidate on inhibitory control in hyperactive children. *J Abnorm Child Psychol*. 1989;17(5):473-491. doi:10.1007/BF00916508
2. Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*. 2000;23:185-215. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.185
3. Feola TW, de Wit H, Richards JB. Effects of d-amphetamine and alcohol on a measure of behavioral inhibition in rats. *Behav Neurosci*. 2000;114(4):838-848. doi:10.1037/0735-7044.114.4.838
4. Eagle DM, Wong JCK, Allan ME, Mar AC, Theobald DE, Robbins TW. Contrasting Roles for Dopamine D1 and D2 Receptor Subtypes in the Dorsomedial Striatum but Not the Nucleus Accumbens Core during Behavioral Inhibition in the Stop-Signal Task in Rats. *J Neurosci*. 2011;31(20):7349-7356. doi:10.1523/JNEUROSCI.6182-10.2011
5. Tsutsui-Kimura I, Takiue H, Yoshida K, et al. Dysfunction of ventrolateral striatal dopamine receptor type 2-expressing medium spiny neurons impairs instrumental motivation. *Nat Commun*. 2017;8:14304. doi:10.1038/ncomms14304
6. Jin X, Tecuapetla F, Costa RM. Basal ganglia subcircuits distinctively encode the parsing and concatenation of action sequences. *Nat Neurosci*. 2014;17(3):423-430. doi:10.1038/nn.3632
7. Tsutsui-Kimura I, Natsubori A, Mori M, et al. Distinct Roles of Ventromedial versus Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons in Reward-Oriented Behavior. *Current Biology*. 2017;27(19):3042-3048.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.08.061
8. Dezfouli A, Balleine BW. Actions, Action Sequences and Habits: Evidence That Goal-Directed and Habitual Action Control Are Hierarchically Organized. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(12):e1003364. doi:10.1371/journal.pcbi.1003364
9. Natsubori A, Tsutsui-Kimura I, Nishida H, et al. Ventrolateral Striatal Medium Spiny Neurons Positively Regulate Food-Incentive, Goal-Directed Behavior Independently of D1 and D2 Selectivity. *J Neurosci*. 2017;37(10):2723-2733. doi:10.1523/JNEUROSCI.3377-16.2017
10. Miyashita K, Hikosaka O. Learning of sequential movements in the monkey: process of learning and retention of memory. doi:10.1152/jn.1995.74.4.1652
11. Klaus A. The Spatiotemporal Organization of the Striatum Encodes Action Space: Neuron. Published 2017. Accessed May 19, 2023. [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(17\)30730-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627317307304%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(17)30730-4?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627317307304%3Fshowall%3Dtrue)
12. Vandaele Y, Ottenheimer DJ, Janak PH. Dorsomedial Striatal Activity Tracks Completion of Behavioral Sequences in Rats. *eNeuro*. 2021;8(6):ENEURO.0279-21.2021. doi:10.1523/ENEURO.0279-21.2021

13. Lee J, Wang W, Sabatini BL. Anatomically segregated basal ganglia pathways allow parallel behavioral modulation. *Nat Neurosci.* 2020;23(11):1388-1398. doi:10.1038/s41593-020-00712-5
14. Graybiel AM, Grafton ST. The Striatum: Where Skills and Habits Meet. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(8):a021691. doi:10.1101/cshperspect.a021691
15. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annual Review of Neuroscience.* 1986;9(1):357-381. doi:10.1146/annurev.ne.09.030186.002041
16. Yin HH, Mulcare SP, Hilário MRF, et al. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience.* 2009;12(3):333-341. doi:10.1038/nn.2261
17. van Elzelingen W, Goedhoop J, Warnaar P, Denys D, Arbab T, Willuhn I. A unidirectional but not uniform striatal landscape of dopamine signaling for motivational stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2022;119(21):e2117270119. doi:10.1073/pnas.2117270119
18. Hintiryan H, Foster NN, Bowman I, et al. The mouse cortico-striatal projectome. *Nat Neurosci.* 2016;19(8):1100-1114. doi:10.1038/nn.4332
19. Parent A, Bouchard C, Smith Y. The striatopallidal and striatonigral projections: two distinct fiber systems in primate. *Brain Research.* 1984;303(2):385-390. doi:10.1016/0006-8993(84)91224-1
20. Haber SN. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat.* 2003;26(4):317-330. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.10.003
21. Mandelbaum G, Taranda J, Haynes TM, et al. Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron.* 2019;102(3):636-652.e7. doi:10.1016/j.neuron.2019.02.035
22. Cazorla M, de Carvalho FD, Chohan MO, et al. Dopamine D2 Receptors Regulate the Anatomical and Functional Balance of Basal Ganglia Circuitry. *Neuron.* 2014;81(1):153-164. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.041
23. Chuhma N, Mingote S, Kalmbach A, Yetnikoff L, Rayport S. Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia. *Biological Psychiatry.* 2017;81(1):43-51. doi:10.1016/j.biopsych.2016.07.002
24. Nonomura S, Nishizawa K, Sakai Y, et al. Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways. *Neuron.* 2018;99(6):1302-1314.e5. doi:10.1016/j.neuron.2018.08.002
25. Yttri EA, Dudman JT. Opponent and bidirectional control of movement velocity in the basal ganglia. *Nature.* 2016;533(7603):402-406. doi:10.1038/nature17639
26. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences.* 1990;13(7):266-271. doi:10.1016/0166-2236(90)90107-L

27. DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*. 1990;13(7):281-285. doi:10.1016/0166-2236(90)90110-V
28. Sano H, Nagai Y, Miyakawa T, Shigemoto R, Yokoi M. Increased social interaction in mice deficient of the striatal medium spiny neuron-specific phosphodiesterase 10A2. *Journal of Neurochemistry*. 2008;105(2):546-556. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05152.x
29. Kanemaru K, Sekiya H, Xu M, et al. In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator. *Cell Reports*. 2014;8(1):311-318. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.056
30. d'Exaerde A de K. D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. Accessed January 6, 2022. https://core.ac.uk/reader/189498344?utm_source=linkout
31. Yoshida K, Drew MR, Mimura M, Tanaka KF. Serotonin-mediated inhibition of ventral hippocampus is required for sustained goal-directed behavior. *Nature Neuroscience*. 2019;22(5):770-777. doi:10.1038/s41593-019-0376-5
32. Snyder W, Uddin LQ, Nomi JS. Dynamic functional connectivity profile of the salience network across the life span. *Hum Brain Mapp*. 2021;42(14):4740-4749. doi:10.1002/hbm.25581
33. Yoshida K, Tsutsui-Kimura I, Kono A, et al. Opposing Ventral Striatal Medium Spiny Neuron Activities Shaped by Striatal Parvalbumin-Expressing Interneurons during Goal-Directed Behaviors. *Cell Reports*. 2020;31(13). doi:10.1016/j.celrep.2020.107829
34. Cowen SL, Davis GA, Nitz DA. Anterior cingulate neurons in the rat map anticipated effort and reward to their associated action sequences. *Journal of Neurophysiology*. 2012;107(9):2393-2407. doi:10.1152/jn.01012.2011
35. Thorn CA, Atallah H, Howe M, Graybiel AM. Differential Dynamics of Activity Changes in Dorsolateral and Dorsomedial Striatal Loops during Learning. *Neuron*. 2010;66(5):781-795. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.036
36. Balleine BW, O'Doherty JP. Human and Rodent Homologies in Action Control: Corticostriatal Determinants of Goal-Directed and Habitual Action. *Neuropsychopharmacol*. 2010;35(1):48-69. doi:10.1038/npp.2009.131
37. Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW. Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action–outcome learning in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22(2):505-512. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04219.x
38. Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, et al. Expanding the Repertoire of Optogenetically Targeted Cells with an Enhanced Gene Expression System. *Cell Reports*. 2012;2(2):397-406. doi:10.1016/j.celrep.2012.06.011
39. Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, Boyden ES, Tominaga M, Yamanaka A. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res*. 2013;255:64-74. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.021

40. Shikano Y, Yagishita S, Tanaka KF, Takata N. Slow-rising and fast-falling dopaminergic dynamics jointly adjust negative prediction error in the ventral striatum. *European Journal of Neuroscience*. n/a(n/a). doi:10.1111/ejn.15945
41. Berndt A, Yizhar O, Gunaydin LA, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*. 2009;12(2):229-234. doi:10.1038/nn.2247
42. Wang X, Qiao Y, Dai Z, et al. Medium spiny neurons of the anterior dorsomedial striatum mediate reversal learning in a cell-type-dependent manner. *Brain Struct Funct*. 2019;224(1):419-434. doi:10.1007/s00429-018-1780-4
43. Lhost J, More S, Watabe I, et al. Interplay Between Inhibitory Control and Behavioural Flexibility: Impact of Dorsomedial Striatal Dopamine Denervation in Mice. *Neuroscience*. 2021;477:25-39. doi:10.1016/j.neuroscience.2021.09.026
44. Brockett AT, Tennyson SS, deBettencourt CA, Gaye F, Roesch MR. Anterior cingulate cortex is necessary for adaptation of action plans. *PNAS*. 2020;117(11):6196-6204. doi:10.1073/pnas.1919303117
45. Corbit LH, Janak PH. Posterior dorsomedial striatum is critical for both selective instrumental and Pavlovian reward learning. *European Journal of Neuroscience*. 2010;31(7):1312-1321. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07153.x
46. Hunnicutt BJ, Jongbloets BC, Birdsong WT, Gertz KJ, Zhong H, Mao T. A comprehensive excitatory input map of the striatum reveals novel functional organization. *eLife*. 5:e19103. doi:10.7554/eLife.19103
47. Martinez MC, Zold CL, Coletti MA, Murer MG, Belluscio MA. Dorsal striatum coding for the timely execution of action sequences. Calakos N, Wassum KM, Uchida N, eds. *eLife*. 2022;11:e74929. doi:10.7554/eLife.74929
48. Geddes CE, Li H, Jin X. Optogenetic Editing Reveals the Hierarchical Organization of Learned Action Sequences. *Cell*. 2018;174(1):32-43.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.06.012
49. Galvan A, Devergnas A, Wichmann T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Front Neuroanat*. 2015;9:5. doi:10.3389/fnana.2015.00005
50. Paulo DL, Qian H, Subramanian D, et al. Corticostriatal beta oscillation changes associated with cognitive function in Parkinson's disease. *Brain*. 2023;146(9):3662-3675. doi:10.1093/brain/awad206
51. Dogan I, Eickhoff CR, Fox PT, et al. Functional connectivity modeling of consistent cortico-striatal degeneration in Huntington's disease. *NeuroImage: Clinical*. 2015;7:640-652. doi:10.1016/j.nicl.2015.02.018
52. Seeley WW, Menon V, Schatzberg AF, et al. Dissociable Intrinsic Connectivity Networks for Salience Processing and Executive Control. *J Neurosci*. 2007;27(9):2349-2356. doi:10.1523/JNEUROSCI.5587-06.2007
53. Tan LL, Pelzer P, Heintz C, et al. A pathway from midcingulate cortex to posterior insula gates nociceptive hypersensitivity. *Nat Neurosci*. 2017;20(11):1591-1601. doi:10.1038/nn.4645

54. Gehrlach DA, Dolensek N, Klein AS, et al. Aversive state processing in the posterior insular cortex. *Nat Neurosci.* 2019;22(9):1424-1437. doi:10.1038/s41593-019-0469-1
55. Livneh Y, Sugden AU, Madara JC, et al. Estimation of Current and Future Physiological States in Insular Cortex. *Neuron.* 2020;105(6):1094-1111.e10. doi:10.1016/j.neuron.2019.12.027
56. Livneh Y, Ramesh RN, Burgess CR, et al. Homeostatic circuits selectively gate food cue responses in insular cortex. *Nature.* 2017;546(7660):611-616. doi:10.1038/nature22375
57. Gehrlach DA, Weiand C, Gaitanos TN, et al. A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. Wassum KM, Livneh Y, eds. *eLife.* 2020;9:e55585. doi:10.7554/eLife.55585
58. Koren T, Yifa R, Amer M, et al. Insular cortex neurons encode and retrieve specific immune responses. *Cell.* 2021;184(24):5902-5915.e17. doi:10.1016/j.cell.2021.10.013
59. Kiyohara H, Sujino T, Teratani T, et al. Toll-Like Receptor 7 Agonist-Induced Dermatitis Causes Severe Dextran Sulfate Sodium Colitis by Altering the Gut Microbiome and Immune Cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2019;7(1):135-156. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.09.010
60. Salamone JD. Dopaminergic involvement in motivational aspects of motivation: Effects of haloperidol on schedule-induced activity, feeding, and foraging in rats. *Psychobiology.* 1988;16(3):196-206. doi:10.3758/BF03327307
61. Tritsch NX, Sabatini BL. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron.* 2012;76(1):33-50. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.023
62. Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science.* 2008;321(5890):848-851. doi:10.1126/science.1160575
63. Moran GW, Thapaliya G. The Gut-Brain Axis and Its Role in Controlling Eating Behavior in Intestinal Inflammation. *Nutrients.* 2021;13(3):981. doi:10.3390/nu13030981

謝辞

本研究を遂行するにあたり、快く慶應義塾大学医学部での研究を認めてくださり、熱心なご指導、ご配慮を承りました慶應義塾大学薬学部 医療薬学・社会連携センター 社会薬学部門 山浦克典教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究課題の立案から終始ご指導ご鞭撻を承り、最適な研究環境を提供して下さった 慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 脳科学研究部門 田中謙二教授に厚く御礼申し上げます。

博士論文執筆のご指導を手取り足取りご指導受け賜りました、慶應義塾大学薬学部 医療薬学・社会連携センター 社会薬学部門 近藤慎吾助教に深く感謝いたします。

研究の整理、論文執筆など懇切丁寧にご指導を賜りました、慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 脳科学研究部門 木村(筒井)生先生に心より感謝申し上げます。

副査として本論文をご精読、審査して頂き、有益なご助言を頂きました、慶應義塾大学薬学部 薬理学講座 三澤日出巳教授、慶應義塾大学薬学部 薬剤学講座 登美斉俊教授、慶應義塾大学薬学部 薬学教育センター 鈴木岳之 元教授に深く感謝申し上げます。

DSS を調製して下さった慶應義塾大学医学部 消化器内科グループの皆様に感謝いたします。

本研究を行うにあたり、日常の議論を通じて多くの有益な知識や示唆、並びにたくさんのご協力を頂きました、慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 脳科学研究部門ならびに、慶應義塾大学薬学部 医療薬学・社会連携センター 社会薬学部門の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活において、励まし、応援し、支え続けて下さいました家族に最大の感謝を捧げます。