

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2015～2019
 課題番号：15K07155
 研究課題名(和文) 行動選択に関与する視床 線条体インフォメーションフロー

研究課題名(英文) Thalamostriatal information flow in choice behavior

研究代表者

深掘 良二 (Ryoji, Fukabori)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40457784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で刺激に合わせて行動を選択する神経回路基盤を明らかにしてきた。背側線条体には視床Pf核、CL核より入力を受ける。視床線条体路が担う機能を明らかにするために、逆行輸送ベクターとイムノトキシン細胞標的法を利用して背側線条体に投射する視床CL核からの経路を特異的に破壊した。これらの動物では行動選択は正常に獲得できたが、獲得後に経路を破壊した動物では反応速度の遅延が引き起こされ、選択行動の柔軟性も失われた。このことから、視床線条体路は選択行動の獲得には影響を与えないが、成立した選択行動の実行速度や環境の変化への対応に重要な役割を示していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

行動選択は幅広い種で観察される重要な行動様式である。応募者らは刺激に合わせて行動を選択する仕組みに関して研究を行ってきた。この行動選択の仕組みには線条体が重要な働きをしている。本研究では視床から線条体に入力される情報に焦点を当てて研究を進めた。視床は感覚情報や運動情報が集約される重要な脳部位であるが、大脳基底核回路の入力核である線条体に送っている情報には不明な点が多い。本研究では視床からの入力行動選択時の注意に関連することが明らかとなった。また視床や線条体は脳内出血時に損傷を受けやすい部位でもあり、将来、脳内出血後の様々な機能障害の改善の礎となるだろう。

研究成果の概要(英文)：Thalamostriatal projection modulates the dorsal striatum function which mediates learning and performance of appropriate selection. The central lateral nucleus (CL) is the major source of projection originating from the intralaminar thalamic nuclei to the dorsal striatum. Here, we showed the contribution of these nuclei to the selection of behavior by retrograde transgene technique and cell specific ablation. Acquisition process of stimulus-response learning is not distinguishable between the thalamostriatal pathway ablation animal and non-ablation control. Loss of thalamostriatal pathway after acquisition of this behavior induces temporally reduction of performance and long-lasting response delay. Further, it revealed that the thalamostriatal pathway maintain the flexibility and attentional state. The information from the intralaminar thalamic nuclei may contribute to the processing of attention which is mediated by the front-striatal loop of basal ganglia circuit.

研究分野：神経行動科学

キーワード：線条体 行動選択 弁別学習

1. 研究開始当初の背景

行動選択は幅広い種で観察される重要な行動様式である。Robbins ら (1990) はラットを用いて、背側線条体のドーパミン神経伝達を遮断することにより弁別学習課題の獲得・遂行が著しく障害されることを発見した。線条体神経細胞の約 95% を占める中型有棘神経細胞はドーパミン受容体を強く発現している。ドーパミン神経伝達を遮断による弁別学習課題の障害は線条体の中型有棘神経細胞の異常によって生じていると考えられるが、課題に関連する情報の処理メカニズムは解明されなかった。

その後続く研究では線条体の各領域と行動選択について様々な結果が報告された。Featherstone ら (2004) は背外側線条体を破壊すると、弁別学習において刺激と行動の関係を学習できないことが示された。背内側線条体の破壊では行動選択の障害は現れなかった。しかし、刺激に対する行動の生起頻度は著しく亢進した。これらのことから、背外側線条体と背内側線条体は行動選択に別々の機能で貢献していることがわかった。

これらを受けて我々は各領域での細胞タイプ別の機能について研究を進めた。行動選択課題において細胞選択的な除去を行った動物では、課題遂行時の「反応速度」や「正確さ」は直接路 (線条体黒質路) を構成するドーパミン D1 受容体細胞と間接路 (線条体淡蒼球路) を構成するドーパミン D2 受容体細胞によってそれぞれ担われていることを解明した (Fukabori, 2012; Nishizawa, 2012)。

線条体は様々な視床垂核や大脳皮質からグルタミン酸作動性の投射を受けており、その投射経路における情報伝達の流れが行動選択に大きな影響を与えている。視床や線条体が障害を受けると現在の行動を他の行動にスイッチする機能が損なわれることが報告された (Bradfield, 2013) これらの結果は視床からの投射が線条体の機能を強く修飾していることを示唆している。

2. 研究の目的

線条体は皮質や視床から入力を受け、大脳基底核回路を構成する直接路と間接路に出力することにより、運動の調節を行っている。近年の研究により、直接路や間接路は運動の情報だけではなく、高次の脳機能も担っていることが明らかとなった (Fukabori, 2012; Nishizawa, 2012) 。これらの脳機能は大脳皮質や視床からの入力情報をもとにして構成されていると考えられる。大脳皮質からの入力情報はそれらの部位が担う機能に依存していると考えられている。例えば、前頭葉から投射する神経線維は背内側線条体でシナプスを形成し、注意などの前頭葉が担う機能の情報を伝達していると考えられている (Robbins, 2007) 。一方で視床からの入力情報には明らかになっていない点が多い。線条体は視床の幾つかの核から投射を受けているがこれらの核の機能は未解明な部分が多い。

本研究では視床から線条体への投射される入力される情報を解明するために、経路選択的に操作を加え、聴覚弁別課題や逆転学習課題などを行った。これらの学習課題の獲得や実行機能は、線条体が障害されると影響を受けることが知られている (Okada, 2014) 。視床からの入力情報がこれらの機能に与える影響を明らかにして、視床線条体路が担う機能の解明を行った。

3. 研究の方法

遺伝子導入のために逆行輸送能をもつ HiRet ベクターを用いた (Kato, 2011) 。線条体の 2 か所にこれらのベクターを注入した。この HiRet ベクターにはイムノトキシン細胞標的的法で用いるヒトインターロイキン 2 受容体遺伝子 (hIL2R) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合遺伝子、GFP 遺伝子を組み込んだ。線条体への HiRet ベクターは両側 4 か所注入した。イムノトキシン細胞標的的法で hIL2R/GFP 陽性細胞を破壊するために視床にイムノトキシンである anti-Tac(Fv)-PE38 を両側 2 か所注入した。

組織解析は 4%パラフォルムアルデヒドで灌流した後、30%スクロースにて置換した。30 マイクロメートルの切片を作製し、抗 GFP 抗体 (Invitrogen) にて反応させた。その後、2 次抗体としてビオチン化した抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) で反応させ、さらにアビジン-HRP (Vector Laboratories) で反応させた。その後、3,3'-diaminobenzide tetrahydrochloride と過酸化水素で発色させた。また蛍光での検出では 2 次抗体に FITC でラベルした抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用いた。

行動選択課題は Med Associates 社製のオペラント実験装置を用いた。実験装置内は正面と背面のパネルがアルミ製で側面がアクリル製である。アルミ製のパネルは 3 つに区切られており、正面の中心のパネルには報酬の受け皿となっており、正答するとエサが出てくる。報酬受け皿の上部には音刺激を提示するためのスピーカーがある。左右のパネルにはレバーと上部に LED ライトが設置されている。背面の中心のパネルにはハウスライトが取り付けられている。試行開始の 3 秒前に音が提示され、試行開始時にレバーが装置内に挿入される。弁別刺激として左右どちらか一方の LED ランプが点灯し、その下のレバーを押すと正反応とし、報酬を得ることができる (視覚刺激による弁別) 。5 秒以内に反応しない場合、その試行は無反応としてカウントさ

れる。試行間隔は 20 秒で、40 報酬を獲得した場合、もしくは 30 分経過した場合、セッションを終了する。1 日 1 セッションを行い、1 セッションブロックは 5 セッションとした。

逆転学習課題は行動選択課題と同じ実験装置を用いた。試行の開始とともに実験装置内に左右のレバーが挿入され、どちらか一方が正答レバーで報酬を得ることができる。試行間隔は 20 秒で、10 試行で 1 セッションが終了する。12 セッション終了した後、正答レバーが反対のレバーとなる。12 セッションが終了したら、再び反対側のレバーになる。

セットシフト課題は行動選択課題と同じ実験装置を用いた。この課題では行動選択課題と同様の視覚を用いた弁別課題を学習する。課題学習後、どちらか一方のレバーが常に正答となる課題に移行する(場所による弁別)。試行間隔は 20 秒で 10 試行を 1 セッションとする。

遅延マッチング課題は行動選択課題と同じ実験装置を用いた。この課題では行動選択課題と同様の視覚を用いた弁別課題を学習する。課題学習後に遅延マッチング課題を開始する。この課題では 1 セッション 60 試行、試行間隔は 20 秒で構成される。試行開始 3 秒前に音刺激が鳴り、試行開始後正答レバーの位置を示す LED ライトが 3 秒間点灯する。消灯して 0.1 秒、0.5 秒、1.0 秒、2.0 秒、4.0 秒のどれかの遅延があり、その後レバーが実験装置内に挿入される。LED ライトによって示された位置のレバーを押せば正答となり報酬を獲得できる。5 秒以内に反応しない場合は無反応と判定される。遅延間隔はランダムで提示される。

統計解析は SPSS を用いて行った。サンプル数は過去の研究をもとに決定した。有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

視床線条体路を経路選択的に破壊するために HiRet ベクターを用いて hIL2R 遺伝子を導入した。線条体に注入して 4 週間後には運動皮質、感覚皮質、黒質とともに視床束傍核や中心外側核 (CL 核) で遺伝子の発現を確認した(図 1A)。これらの動物にイムノトキシンを注入したところ、注入部位において顕著な細胞数の減少が確認された(図 1B)。また背側線条体においても染色される繊維の減少が確認できた。このことから、視床 CL 核からの投射が除去されたことが分かった(図 1C)。

視床線条体路の役割を明らかにするために、これらの動物を用いて線条体に関与する脳機能の変化を調べた。これまでの研究で、線条体の直接路・間接路が障害を受けると行動選択課題に影響が出ることが知られている

(Fukabori, 2012; Nishizawa, 2012)。本研究では、同様に鼓動選択課題を用いて視床線条体路を除去した動物について正答率や反応速度などを調べた。学習過程においては統制群と実験群の間に差はないことが分かった。しかし、学習した動物の視床線条体路を破壊したあとに再び行動選択課題を行うと、正答率の一時的な低下(two-way ANOVA with repeated measures, group effect: $F(1,20) = 1.922$, $p = 0.181$; session effect: $F(16,320) = 4.873$, $p < 0.001$; group \times session interaction, $F(16,320) = 1.300$, $p = 0.195$) 長期的な反応時間の遅延が生じることが分かった(two-way ANOVA with repeated measures, group effect: $F(1,20) = 8.644$, $p < 0.01$; session effect: $F(16,320) = 11.482$, $p < 0.001$; group \times session interaction: $F(16,320) = 2.483$, $p < 0.05$, 図 2)。これらのことは線条体が担う高次脳機能に視床からの入力が必要な働きをしていることを示している。

線条体は行動の柔軟さにも関与しており、線条体アセチルコリン作動性介在神経細胞の除去は逆転学習を促進することがわかっている(Okada, 2014)。視床 CL 核からの入力が逆転学習に与える影響を調べるために行動選択課題と同様の実験装置を用いて検討した。行動選択課題と同様に、視床 CL 核から線条体に投射する経路の除去は初期の学習には影響を与えなかった。しかし、正答レバーの位置を逆転させたあと、経路除去を受けた動物は新たな学習を成立させるまで多くの試行を必要とした(two-way ANOVA with repeated measures, group effect: $F(1,21) = 4.385$, $p < 0.05$; session effect: $F(11,231) = 89.249$, $p < 0.001$; group \times session interaction: $F(11,231) = 2.240$, $p < 0.05$, 図 3A)。この傾向は 2 回目の逆転学習時にも見られ、正答レバーの変更に柔軟に対応できないことが明らかになった(two-way ANOVA with repeated measures,

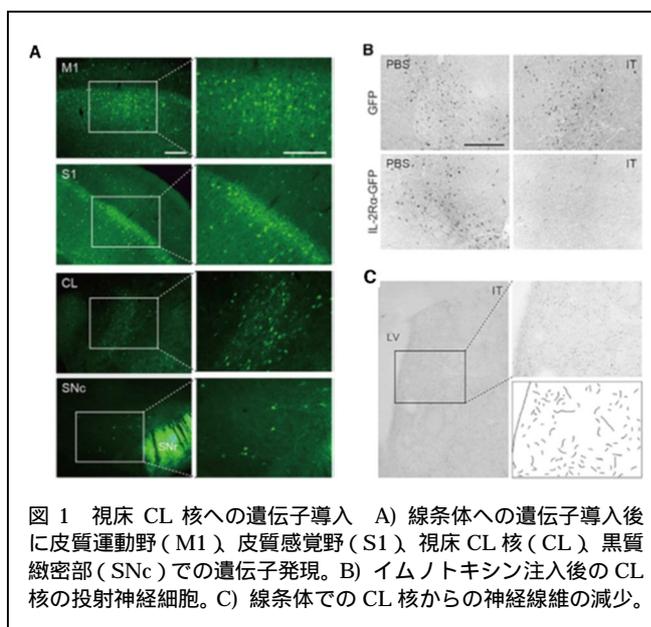


図 1 視床 CL 核への遺伝子導入 A) 線条体への遺伝子導入後に皮質運動野 (M1)、皮質感覚野 (S1)、視床 CL 核 (CL)、黒質緻密部 (SNc) での遺伝子発現。B) イムノトキシン注入後の CL 核の投射神経細胞。C) 線条体での CL 核からの神経線維の減少。

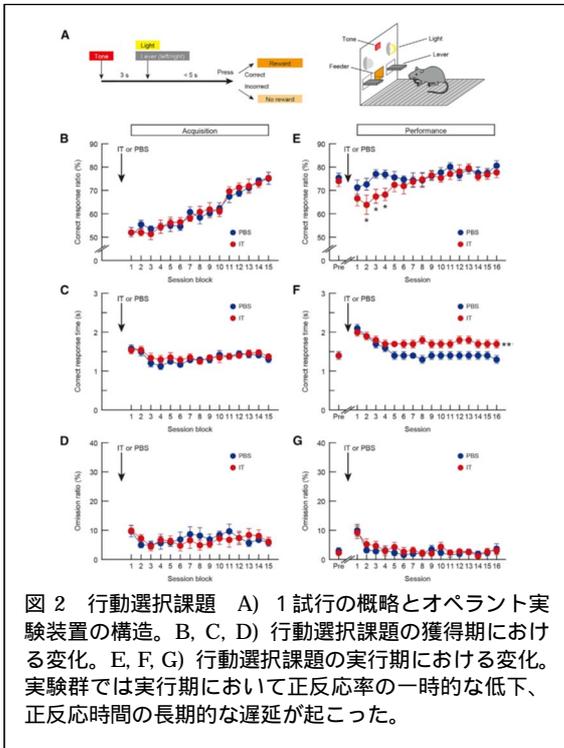


図2 行動選択課題 A) 1試行の概略とオペラント実験装置の構造。B, C, D) 行動選択課題の獲得期における変化。E, F, G) 行動選択課題の実行期における変化。実験群では実行期において正反応率の一時的な低下、正反応時間の長期的な遅延が起こった。

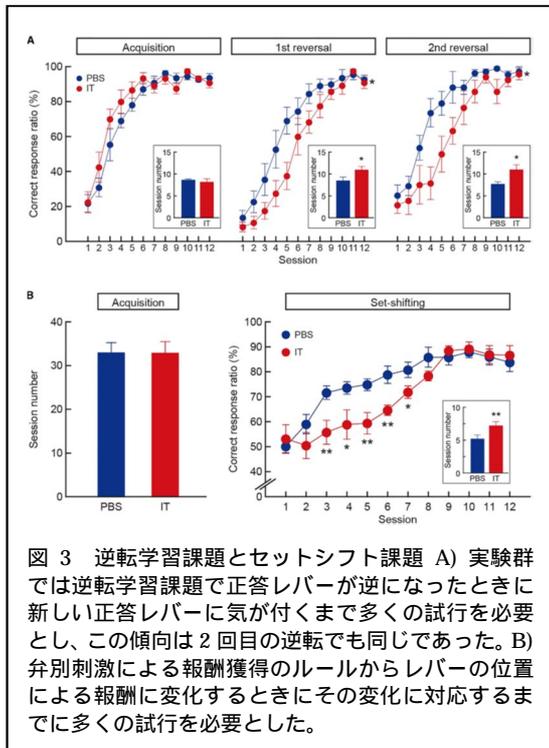


図3 逆転学習課題とセットシフト課題 A) 実験群では逆転学習課題で正答レバーが逆になったときに新しい正答レバーに気が付くまで多くの試行を必要とし、この傾向は2回目の逆転でも同じであった。B) 弁別刺激による報酬獲得のルールからレバーの位置による報酬に変化するときその変化に対応するまでに多くの試行を必要とした。

group effect: $F(1,21) = 6.283, p < 0.05$; session effect: $F(11,231) = 48.946, p < 0.001$; group \times session interaction: $F(11,231) = 2.439, p < 0.01$ 、図3A)。

行動選択の柔軟性について、より詳細な分析を行うために、ルール変更への柔軟性を検討するセットシフト課題を行った。視覚刺激による行動選択課題を学習した動物に対して場所を弁別する課題に変更し、その学習過程を調べた。正常な動物では報酬を獲得するためのルール変更に対応できたが、視床 CL 核から線条体への投射経路を除去した動物ではこれらのルール変更に対応するためにより多くの試行を必要とした (two-way ANOVA with repeated measures, group effect: $F(1,19) = 3.741, p = 0.068$; session effect: $F(8,152) = 38.200, p < 0.001$; and group \times session interaction: $F(8,152) = 3.837, p < 0.001$ 、図3B)。これらのことは視床 CL 核からの投射は行動の柔軟性に重要な働きをしていることを示している。

注意やセットシフト課題は前頭葉が関与していると考えられている。背内側線条体は前頭葉から入力を受けていることから、視床 CL 核から線条体への投射経路がそれらの領域の機能に影響を与えている可能性が考えられる。そこで前頭葉が担っていると考えられている作業記憶を調べるために遅延マッチング課題を行い、経路除去による影響を検討した。遅延マッチング課題では弁別刺激とレバー提示の間に遅延があり、動物はレバーが提示されるまでの間、弁別刺激の記憶を保持する必要がある。この課題では遅延が長くなるにつれて正答率はさがるが、視床 CL 核から線条体への投射経路を除去した動物と正常動物との間には差が見られなかった (図4)。

これらの結果から、視床 CL 核から線条体に投射する経路は行動選択課題の実行に重要な役割

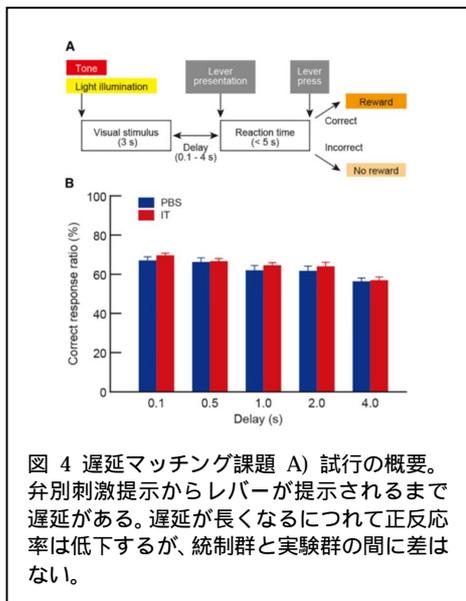


図4 遅延マッチング課題 A) 試行の概要。弁別刺激提示からレバーが提示されるまで遅延がある。遅延が長くなるにつれて正反応率は低下するが、統制群と実験群の間には差はない。

を果たしていることが明らかとなった。また、線条体が関与する行動の柔軟性を維持する機能にも視床 CL からの投射が重要な働きをしていることが分かった。一方で前頭葉が関与していると考えられていた作業記憶に関しては影響を受けていないことから、視床 CL からの投射は特定の機能のみを制御している可能性が示唆された。

線条体と皮質の間には5つの回路が存在し、それぞれの回路は独立していると考えられている (Alexander & Crutcher, 1990)。前頭葉は線条体に投射をしている主要な皮質であり、注意や作業記憶に関与している。前頭葉の間には回路が二つあり、一つは前頭葉の腹側より線条体に投射する経路で、もう一つは背側より線条体に投射する経路である。前頭葉の腹側から入力は刺激情報の維持に関与し、背側からの入力は情報処理に関するものだと考えられている (Robbins, 2007)。本研究では遅延マッチング課題で弁別刺激情報の保持に障害が見られず、一方で行動の柔軟性に関しては障害が見られた。このことから、視床 CL 核から線条体への入力は前頭葉の背側から線条

体に入力する情報に影響を与えている可能性がある。しかしながら視床からの入力の前頭葉からの情報に影響を与える神経基盤は分かっておらず、より詳細な研究が必要とされる。行動の柔軟性に関する線条体の役割は未解明な部分が多く、今後の研究の進展が望まれている。

参考文献

- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**:266–71. doi:10.1016/0166-2236(90)90107-1
- Bradfield LA, Bertran-Gonzalez J, Chieng B, Balleine BW. 2013. The Thalamostriatal Pathway and Cholinergic Control of Goal-Directed Action: Interlacing New with Existing Learning in the Striatum. *Neuron* **79**:153–66. doi:10.1016/j.neuron.2013.04.039
- Featherstone RE, McDonald RJ. 2004. Dorsal striatum and stimulus-response learning: lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a simple discrimination task. *Behav Brain Res* **150**:15–23. doi:10.1016/S0166-4328(03)00218-3
- Fukabori R, Okada K, Nishizawa K, Kai N, Kobayashi Kenta, Uchigashima M, Watanabe M, Tsutsui Y, Kobayashi Kazuto. 2012. Striatal direct pathway modulates response time in execution of visual discrimination. *Eur J Neurosci* **35**:784–97. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08005.x
- Kato S, Fukabori R, Nishizawa K, Okada K, Yoshioka N, Sugawara M, Maejima Y, Shimomura K, Okamoto M, Eifuku S, Kobayashi K. 2018. Action Selection and Flexible Switching Controlled by the Intralaminar Thalamic Neurons. *Cell Rep* **22**:2455–2468. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.016
- Kato S, Kobayashi Kenta, Inoue K, Kuramochi M, Okada T, Yaginuma H, Morimoto K, Shimada T, Takada M, Kobayashi Kazuto. 2011. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther* **22**:197–206. doi:10.1089/hum.2009.179
- Nishizawa K, Fukabori R, Okada K, Kai N, Uchigashima M, Watanabe M, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Kobayashi K. 2012. Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. *J Neurosci* **32**:13421–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.1969-12.2012
- Okada K, Nishizawa K, Fukabori R, Kai N, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Sakata S, Matsushita N, Kobayashi K. 2014. Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons. *Nat Commun* **5**:3778. doi:10.1038/ncomms4778
- Robbins T. 2007. Shifting and stopping: fronto-striatal substrates, neurochemical modulation and clinical implications. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **362**:917–932. doi:10.1098/rstb.2007.2097
- Robbins TW, Giardini V, Jones GH, Reading P, Sahakian BJ. 1990. Effects of dopamine depletion from the caudate-putamen and nucleus accumbens septi on the acquisition and performance of a conditional discrimination task. *Behav Brain Res* **38**:243–261. doi:10.1016/0166-4328(90)90179-I

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Shigeki, Fukabori Ryoji, Nishizawa Kayo, Okada Kana, Yoshioka Nozomu, Sugawara Masateru, Maejima Yuko, Shimomura Kenju, Okamoto Masahiro, Eifuku Satoshi, Kobayashi Kazuto	4. 巻 22
2. 論文標題 Action Selection and Flexible Switching Controlled by the Intralaminar Thalamic Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2370-2382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.02.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saiki A, Sakai Y, Fukabori R, Soma S, Yoshida J, Yawo H, Kobayashi K, Kimura M, Isomura Y	4. 巻 28
2. 論文標題 In vivo spiking dynamics of intraand extra-telencephalic projection neurons in rat motor cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 1024-1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhx012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
連携研究者	加藤 成樹 (Kato Shigeki) (90443879)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
連携研究者	小林 和人 (Koboyashi Kazuto) (90211903)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	永福 智志 (Eifuku Satoshi) (70262508)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
連携研究者	岡本 正博 (Okamoto Masahiro) (90548976)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
連携研究者	磯村 宜和 (Isomura Yoshikazu) (00415077)	東京医科歯科大学・医学部・教授 (12602)	