

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03342

研究課題名(和文)げっ歯類の左右前肢運動を制御する大脳皮質-基底核回路メカニズム

研究課題名(英文)Cortico-basal ganglia mechanism of controlling forelimb movements in rodents

研究代表者

磯村 宜和 (Isomura, Yoshikazu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00415077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では前肢運動を発現制御する大脳皮質や大脳基底核の神経回路の仕組みを解明することを目指した。頭部を固定したラットに前肢の運動発現課題を遂行させて各脳領域のスパイク活動を記録解析した。神経毒6-OHDAによるパーキンソン病変に伴い一次・二次運動野の神経細胞が示す対側支配性の変化を見出した。前肢の運動発現に関連する黒質緻密部と線条体の投射細胞の運動・報酬関連活動や、海馬と嗅内野の神経細胞の活動タイミングを解析した。また、記録細胞の投射先を同定するスパイクコリジョン試験の自動化や光活性オプシンの最適化、神経活動タイミングの定量的な解析手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちが手や足を意のままに動かす随意運動を実現する神経回路の仕組みはまだ十分には解明されていない。パーキンソン病などの神経疾患では大脳皮質-基底核回路に異常が生じて運動発現や制御に障害が出現する。本研究は独自に開発したラットの運動発現課題を活かし、さまざまな外界状況における大脳皮質や大脳基底核の神経細胞活動の特性を解明した。また、神経活動の定量的解析手法や領域間信号の計測法などの実験解析技術も開発した。これらの研究成果は神経科学の基礎的基盤を一層強固にするとともに、神経疾患の病態生理の理解にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the mechanisms of neural circuits in the cerebral cortex and basal ganglia that control the expression of forelimb movements. We analyzed spike activity in these brain areas of head-fixed rats performing forelimb movement tasks. We found lateral dominance changes exhibited by primary and secondary motor cortex neurons with parkinsonian lesions caused by 6-OHDA. We also analyzed the motor- and reward-related activity of projection neurons in the substantia nigra pars compacta and striatum, as well as the timing of activity of hippocampal and entorhinal neurons. Moreover, we have developed automatized spike collision tests to identify the projection of recorded neurons, optimized photoactive opsins for the spike collision test, and established a new method for analyzing the timing of neural spike activity.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳皮質 大脳基底核 運動制御 ラット スパイク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間や動物は脳の働きによって手や足を意のままに動かすことができる。このような随意運動の発現や制御を実現する神経回路の仕組みはまだ十分には解明されていない。そのためには遺伝子改変技術を導入でき、実験環境や条件を統制しやすい、げっ歯類動物を研究対象とすることが有効である。

私たちはラットの随意運動を司る大脳皮質の一次・二次運動野や大脳基底核の背内外側線条体の神経細胞のスパイク活動に注目した神経生理学的研究を一貫して推進してきた。これまでに脳活動の計測のために頭部を固定したラットが前肢でレバーを適切に操作すると報酬の水滴を得られる行動課題を確立した (Isomura 2009; Kimura 2012; 2014 など)。ラットの運動発現中に運動・報酬関連活動を計測し、可視化同定した運動野各層の興奮性の錐体細胞や抑制性の介在細胞および背外側線条体の直接路・間接路投射細胞の活動特性を解明した (Isomura 2009; 2013)。さらに運動野の投射細胞である IT 型および PT 型錐体細胞のスパイク活動をスパイクコリジョン試験で同定する手法も確立した (Saiki 2018; Soma 2017)。このような研究手法を組み合わせて、一次・二次運動野や後頭頂連合野の神経細胞の対側支配性 (Soma 2017; 2019) や背内側線条体の直接路・間接路投射細胞の行動選択に関連する活動 (Nonomura 2018) の詳細な特性を解明してきた。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの左右半球の一次・二次運動野とその投射先の背外側線条体の領域間経路に注目し、左右前肢を使う行動課題とマルチニューロン記録と光遺伝学的同定などを組み合わせて、1) 一次・二次運動野の投射細胞や介在細胞と背外側線条体の直接路・間接路投射細胞はどのように前肢運動の発現や制御に関与しているのか、2) その前肢運動の制御機構は大脳皮質-基底核ループの活動バランスが崩れるパーキンソン病状態でどのように変容するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前肢を使う行動課題の学習遂行実験

本研究には目的に応じて野生型 Long-Evans 系ラット、Thy1 プロモータ-チャンネルロドプシン ChR2 発現トランスジェニックラット、および各種プロモータ特異的 Cre 発現トランスジェニックラット (Tac1-Cre 発現ラット、Drd2-Cre 発現ラット、TH-Cre 発現ラット) を使用し、ChR2 などを発現するために AAV ベクターの脳内注入を適宜組み合わせた。トランスジェニックラットや AAV ベクターは福島県立医科大学の小林和人教授の協力を得た。本研究の遺伝子組換え実験計画および動物実験計画はすべて東京医科歯科大学の遺伝子組換え実験委員会および動物実験委員会により承認を受けている。

ラットはイソフルラン麻酔下にて頭部に軽量の金属アタッチメントを取り付ける手術を施した。脳活動の計測実験の前には再びイソフルラン麻酔下にて電極や光ファイバーなどを脳表・脳内に挿入するための骨孔も設けた。一部のラットの線条体には 6-OHDA を注入してパーキンソン病モデルとした。

手術からの回復後、適切に飲水制限を課したうえで、頭部を脳定位固定装置に固定した状態で両方または片側の前肢によりレバーやペダルを適切に操作すると報酬の水滴を得ることができるオペラント学習課題を学習させた。レバー操作の開始は自発的または音や光の手がかり刺激に応答させた。これらの行動課題の学習には数週間程度かかり、一定の成功基準に達すると脳活動の計測実験に移行した。学習を終えたラットは 1 回の記録セッションにつき通例 500 ~ 1,000 試行程度の遂行が可能であった。

(2) スパイク活動の計測実験

スパイク活動の急性記録には、本研究室がデザインした 32ch または 64ch シリコンプローブを使用するマルチニューロン記録法を適用した (Isomura 2009; Kimura 2014; Saiki 2018 など)。多チャンネルの記録データは自動クラスタリング・ソフトウェア EToS および手動クラスタリング・ソフトウェア Klusters を使用してオフライン解析し、単一神経細胞由来と推定されるスパイク活動 (スパイククラスタ) に分離した。このスパイク解析には玉川大学脳科学研究所の酒井裕教授の協力を得て実施した。

スパイククラスタは MATLAB プログラムによりスパイク特性や行動課題との関連性などを詳細に解析した。大脳皮質細胞はスパイク波形により Regular-spiking (RS) 型と Fast-spiking (FS) 型の神経細胞に分類した。また、RS 型はスパイクコリジョン試験により Intratelencephalic (IT) 型と Piramidal tract (PT) 型投射細胞に分類した。線条体細胞は下記の光遺伝学的手法 (オプトタギング) により直接路と間接路の投射細胞に分類した。

(3)光遺伝学的刺激実験

解析の対象とする神経細胞のサブタイプに特異的に ChR2 を発現させて光遺伝学的に記録細胞のサブタイプを同定した。特に大脳皮質の IT 型と PT 型投射細胞の同定には Thy1-ChR2 発現ラットにおけるコリジョン試験を実施した (Saiki 2018)。線条体の直接路と間接路投射細胞の同定には、それぞれ Tac1-Cre 発現ラットと Drd2-Cre 発現ラットに Cre 特異的に ChR2 を発現する AAV ベクターを脳内注入することによりオプトタギングを実施した。ChR2 の光刺激には青色光 470nm のハイパワーLED 光源 (一部はレーザー光源) と光ファイバーを使用した。

4. 研究成果

(1)片側パーキンソン病ラットの一次・二次運動野 IT 型・PT 型投射細胞の活動変化

ラットの右前肢と左前肢の運動発現を観測できる行動実験系にマルチニューロン記録と光遺伝学的刺激を組み合わせ、一次運動野と二次運動野の前肢領域にシリコンプローブを挿入して、左右前肢運動の発現中に多領域マルチニューロン記録を実施した。事前に線条体の一側に神経毒 6-OHDA を注入してパーキンソン病変を生じさせたうえで、左右前肢の運動課題を訓練した。一次運動野と二次運動野の興奮性 RS 細胞、特に IT 型と PT 型の投射細胞が伝えるスパイク信号の機能的情報に焦点を当て、領域内回路を形成する抑制性 FS 介在細胞の活動とも比較し、左右前肢運動に関わる大脳皮質回路の機能的情報の伝達内容や病態生理の動的変化などを評価して報告した (Rios 2019)。

(2)黒質緻密部と線条体投射細胞の運動・報酬関連活動の報酬経験依存性

過去の報酬獲得に基づくレバー押し引きの行動選択課題 (Nonomura 2018) を遂行中のラットの黒質緻密部および背内外側線条体の投射細胞および介在細胞のスパイク活動の報酬経験依存性を調べた。黒質緻密部のドーパミン細胞と介在細胞、背内外側線条体の直接路・間接路投射細胞とアセチルコリン作動性介在細胞と介在細胞において、行動関連活動は報酬経験により一様に促進される傾向がみられる一方、結果 (報酬・無報酬) 関連活動は報酬経験により促進または抑制と多様な作用がみられることを見出した。黒質ドーパミン細胞は強化学習理論の報酬予測誤差や TD 誤差に矛盾しない修飾作用を示した。また、報酬経験によりドーパミン細胞の活動が増加しドーパミン放出も増加するにもかかわらず、ドーパミン D2 受容体を発現する間接路投射細胞も予想に反して増加することが明らかとなった (Rios 投稿準備中)。

(3)海馬と嗅内野の神経細胞の運動・報酬関連活動タイミング

海馬や嗅内野では、いつどこでなにがというエピソード情報の記憶が形成される。前肢レバー操作行動課題を学習させたラットの海馬 CA1 や外側嗅内野の浅層・深層では、学習に伴って行動や報酬に関連するスパイク活動が増加した。興味深いことに、行動や報酬に関連する活動のピークは外側嗅内野よりも海馬 CA1 の細胞の方が短潜時で出現することが判明した。つまり、海馬 CA1 領域では場所細胞と時間細胞に加えて事象 (行動や報酬) に瞬時に応答する細胞が存在し、特定の時間と場所と事象発生のスナップショットを取り出してエピソード情報を形成する可能性があることを見出した (Soma, Ohara 投稿中)。

(4)光遺伝学的スパイクコリジョン試験の自動化と光活性オプシンの最適化

多チャンネルのマルチニューロン記録に光遺伝学的な逆行性スパイク誘発を組み合わせたスパイクコリジョン試験 (マルチリンク法; Saiki 2018) の実施を自動化かつ並列化することに成功した (Mitani, Kawabata 投稿中; bioRxiv 公開)。またマルチリンク法の空間精度を向上させるために、ChR2 遺伝子に mGluR2 タグなどを付加して遠位軸索への集積を増強した ChR2-mGluR2-PA 分子を開発し、実際にマルチリンク法に活用できることを実証した (Hamada 2021)。

(5)スパイク活動の事象関連性の定量的評価法の開発

感覚刺激や行動発現や報酬獲得などの複数の事象発生に関連してスパイク活動の時間経過や増減変化を客観的に定量化する解析手法 Phase-Scaling analysis を開発した。この解析法を活用してラットの大脳皮質の各領域における機能的スパイク活動をクラスタ分類して評価したところ、一次視覚野には早い視覚応答を示す感覚関連細胞が多くみられ、後頭頂連合皮質には一次・二次運動野と同様に運動関連細胞や中間型の活動を示す細胞が多くみられることを示した (Kawabata2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mitani Keita, Kawabata Masanori, Isomura Yoshikazu, Sakai Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Automated and parallelized spike collision tests to identify spike signal projections	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.10.21.465238	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamada Shun, Nagase Masashi, Yoshizawa Tomohiko, Hagiwara Akari, Isomura Yoshikazu, Watabe Ayako M., Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 4
2. 論文標題 An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01977-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kajiwara Motoki, Nomura Ritsuki, Goetze Felix, Kawabata Masanori, Isomura Yoshikazu, Akutsu Tatsuya, Shimono Masanori	4. 巻 17
2. 論文標題 Inhibitory neurons exhibit high controlling ability in the cortical microconnectome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1008846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1008846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawabata Masanori, Soma Shogo, Saiki-Ishikawa Akiko, Nonomura Satoshi, Yoshida Junichi, R?os Alain, Sakai Yutaka, Isomura Yoshikazu	4. 巻 124
2. 論文標題 A spike analysis method for characterizing neurons based on phase locking and scaling to the interval between two behavioral events	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 1923 ~ 1941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00200.2020	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 Tanaka Tomoko, Isomura Yoshikazu, Kobayashi Kazuto, Hanakawa Takashi, Tanaka Satoshi, Honda Manabu	4. 巻 14
2. 論文標題 Electrophysiological Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Neural Activity in the Rat Motor Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rios Alain, Soma Shogo, Yoshida Junichi, Nonomura Satoshi, Kawabata Masanori, Sakai Yutaka, Isomura Yoshikazu	4. 巻 6
2. 論文標題 Differential Changes in the Lateralized Activity of Identified Projection Neurons of Motor Cortex in Hemiparkinsonian Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 0110~19.2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0110-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 磯村 宜和
2. 発表標題 行動発現を担う大脳皮質-基底核回路メカニズムを探る
3. 学会等名 金沢医科大学 医学研究セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitani K, Kawabata M, Isomura Y, Sakai Y
2. 発表標題 Automatic and parallel spike collision test for efficient identification of interareal spike signals
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Virtual: Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hamada S, Nagase M, Yoshizawa T, Hagiwara A, Isomura Y, Watabe AM, Ohtsuka T
2. 発表標題 An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Virtual: Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Alain Rios, Kawabata Masanori, Tomomi Sakairi, Satoshi Kaneko, Riichiro Hira, Yutaka Sakai, Yoshikazu Isomura
2. 発表標題 Differential phasic activity of the DMS and DLS projecting SNc dopaminergic neurons in rats performing a probabilistic reward based task.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Virtual: Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawabata M, Rios A, Sakairi T, Sakai Y, Isomura Y
2. 発表標題 Mapping of sensory/motor related neuronal activities in the rodent cerebral cortices by using Phase-Scaling analysis
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Virtual: Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯村 宜和
2. 発表標題 行動発現を担う大脳皮質-基底核回路
3. 学会等名 第35回日本大脳基底核研究会JBAGS (オンライン開催) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawabata M, Nonomura S, Yoshizawa T, Rios A, Sakairi T, Sakai Y, Isomura Y.
2. 発表標題 Establishment and demonstration of a novel spike analysis for neuronal activity during sensorimotor transformation.
3. 学会等名 FENS Forum 2020 (Virtual: SEC Centre, Glasgow, UK) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawabata M, Nonomura S, Yoshizawa T, Rios A, Sakairi T, Sakai Y, Isomura Y
2. 発表標題 Establishment and demonstration of an analytical method to evaluate neuronal activity during sensorimotor transformation.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2020) (Virtual: Kobe International Conference Center, Kobe, Hyogo)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礒村 宜和
2. 発表標題 げっ歯類の行動発現を担う大脳皮質・基底核回路メカニズム
3. 学会等名 第257回つくばブレインサイエンス・セミナー（筑波大学，茨城県つくば市）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 礒村 宜和
2. 発表標題 げっ歯類の行動発現を担う大脳皮質・基底核回路メカニズム
3. 学会等名 浜松医科大学 大学院特別講演（浜松医科大学，静岡県浜松市）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rios A, Soma S, Nonomura S, Yoshida J, Kawabata M, Sakai Y, Isomura Y
2. 発表標題 Differential changes in the forelimb selectivity of IT and PT projection neurons of motor cortex in hemiparkinsonian rats.
3. 学会等名 The Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2019) (McCormick Place, Chicago, IL, USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rios AA, Satoshi N, Yoshizawa T, Kawabata M, Sakairi T, Sakai Y, Isomura Y
2. 発表標題 Modification of motor cortex forelimb lateralization preference in a hemiparkinsonian rat model.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2019) (Toki Messe, Niigata, Niigata)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯村 宜和
2. 発表標題 教育講演：げっ歯類の脳皮質・皮質下回路の機能的スパイク信号を調べる。
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2019) (Toki Messe, Niigata, Niigata) (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap
<https://researchmap.jp/yoshikazuismura/>
 Researchmap
https://researchmap.jp/yoshikazuismura/published_papers

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
研究協力者	川端 政則 (Kawabata Masanori)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究協力者	リオス アライン (Rios Alain)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究協力者	酒井 裕 (Sakai Yutaka)	玉川大学・脳科学研究所・教授 (32639)	
研究協力者	小林 和人 (Kobayashi Kazuto)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関