

機関番号：63905

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700353

研究課題名 (和文) 大脳皮質が制御する大脳基底核の神経生理作用と運動制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of physiological and behavioral roles of the basal ganglia which is regulated by the cortex.

研究代表者

佐野 裕美 (SANO HIROMI)

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教

研究者番号：00363755

研究成果の概要 (和文)：大脳皮質は大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路の二つの経路により大脳基底核に情報を送っている。これまでの技術では、大脳皮質-線条体経路あるいは大脳皮質-視床下核経路のどちらか一方の経路の役割を選択的に解析することができなかった。本研究では、ウイルスベクターを用いて大脳皮質-線条体経路に選択的な光受容体の遺伝子導入に成功し、さらに光照射により大脳皮質-線条体経路の選択的な興奮誘導に成功した。

研究成果の概要 (英文)：The cortex sends the information to the basal ganglia through the corticostriatal pathway and the cortico-subthalamic nucleus pathway. In the previous study, it was difficult to reveal the specific role of the corticostriatal pathway or the cortico-subthalamic nucleus pathway. In current study, photoreceptors have been able to express in the corticostriatal pathway selectively by using the virus vector. In addition, the specific excitation in the cortico-striatal pathway has been able to be induced by giving the blue light.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経、筋肉生理学

キーワード：神経回路、運動制御、大脳基底核、大脳皮質

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核はこれまでの研究から、運動や運動学習の制御に重要であることがよく知られている。神経回路モデルも提唱されており、大脳基底核の入力部である線条体と視床下核は大脳皮質運動野から入力を受け、出力核である黒質網様部へと情報を送る。黒質網様部は情報を統合して、視床を介して再び大

脳皮質へと情報を送る。このように大脳皮質と大脳基底核はループを形成していると考えられている。しかし、実際の神経連絡は回路モデルよりも複雑であり、神経回路に沿って個々の神経経路の役割が解明されているわけではない。大脳基底核が制御する神経生理機能を解析するためには、神経回路に沿った生理機能の解析が必要である。従来からよ

く用いられてきた電気刺激や局所的な薬物注入では、同時に複数の神経経路の活動が変化するという欠点がある。例えば、大脳皮質運動野を電気刺激すると、大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路の両者の経路が刺激を受ける。近年では遺伝子組換えマウスが作製され、標的とする経路に特異的に発現するマーカー分子の遺伝子を利用して、標的とする神経経路の解析が行われてきた。しかし、標的とする神経経路に特異的なマーカー分子の発現が知られていない場合は、標的とする神経経路を特異的に遺伝子操作することができないため、大脳基底核の神経回路に沿った解析は限られてきた。

Channelrhodopsin-2 (ChR2)は緑藻類の光受容体であり、特定の波長の光を受容するとチャンネルが開口し、陽イオンを選択的に透過させ、細胞を一過性に興奮させることができる (Nagel G. et al., PNAS, 2003)。マウスのニューロンに ChR2 を発現させ光を照射すると、光の照射を受けた領域の ChR2 を発現するニューロンが選択的に興奮することが示され (Arenkiel B. R. et al., Neuron, 2007; Wang H. et al., PNAS, 2007; Petreanu L. et al., Nat Neurosci, 2007)、非常に注目を集めていた。

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は遺伝子治療への利用のため、盛んに改良が加えられ発展してきた。しかし、個体にウイルスベクターを注入し、特定の細胞群にのみ遺伝子導入する技術は確立されていなかった。ところが、狂犬病の G タンパクを利用したレンチウイルスベクターが新たに開発され (福島県立医科大学・小林和人教授らのグループ)、このレンチウイルスベクターを利用すると、脳内においてウイルスベクターの注入部位から逆行性に、効率良くニューロンに遺伝子導入ができるようになった。

以上の実験背景から、狂犬病の G タンパクを利用したレンチウイルスベクターを利用して ChR2 を発現させれば、大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路を各々選択的に興奮誘導することが可能であり、大脳皮質が制御する大脳基底核の神経生理作用と運動制御機構を解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

大脳基底核は、その障害がパーキンソン病やハンチントン病などの重篤な運動障害を引き起こすことから、運動や運動学習の制御に重要であることがよく知られている。神経回路モデルが提唱されていることから、教科書的には大脳基底核の作動原理が明らかにされているように思われがちである。しかし、実際の神経連絡は複雑であるため、個々の神経経路の役割は明らかになっていない。大脳

基底核の神経生理作用を解明するためには、神経回路に沿った個々の神経経路の神経活動の解析や行動制御における役割を明らかにする必要がある。大脳皮質運動野は大脳基底核へ入力する領域の一つであり、大脳基底核が制御する運動や運動学習の制御に深く関わっていると考えられている。大脳皮質運動野の情報は、大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路によって大脳基底核に送られるが、これらの神経経路には特異的なマーカー分子が知られていないため、各々の経路の特異的な役割はほとんど解明されていない。

本研究では、大脳皮質運動野が制御する大脳基底核の神経生理機能と運動制御機構を解明するため、大脳皮質から大脳基底核への入力経路である大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路に注目し、これらの個々の神経経路の神経生理機能と運動制御における役割を解析することを目的としている。大脳皮質-線条体経路あるいは大脳皮質-視床下核経路を特異的かつ時間分解能良く操作するため、逆行性に遺伝子導入できるレンチウイルスベクターと ChR2 を組み合わせた光遺伝学を利用して、覚醒下のマウス個体において大脳皮質-線条体経路あるいは大脳皮質-視床下核経路を特異的に時間分解能良く興奮させ、そのときの大脳基底核における神経活動の記録や自発運動や運動学習などの行動に与える影響を解析する。これらの実験から、大脳皮質-線条体経路と大脳皮質-視床下核経路が大脳基底核を制御する神経生理学的機構と運動制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) ウイルスベクターの作製とマウスへの遺伝子導入

ChR2 と蛍光タンパク venus の融合タンパクである ChR2-venus の遺伝子をコードする cDNA を発現用プラスミドベクターに挿入した。狂犬病の G タンパクの cDNA 等をもつパッケージングベクターと発現用プラスミドベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、レンチウイルスベクターを作製した。レンチウイルスベクターを遠心により培地から回収し、超遠心を用いた濃縮や HPLC を用いた精製、濃縮を行った。

野生型マウスの頭部にアダプターを取り付け、アダプターを介して覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定した。頭蓋骨の一部を剥離し、ガラスキャピラリーを用いて線条体にウイルスベクターを注入した。

注入から6週間後にマウスの灌流固定を行い、脳を摘出した。脳を薄切し、蛍光タンパクに対する抗体を用いた免疫染色により ChR2-venus の発現を可視化した。線条体へ入力することがよく知られている、大脳皮質運

動野や視床束傍核、黒質緻密部を中心に ChR2-venus の発現を観察した。

(2) 光照射による興奮誘導

頭部にアダプターを取り付けた後、頭蓋骨の一部を剥離して線条体にウイルスベクターを注入したマウスを、アダプターを介して覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定した (図 1 参照)。

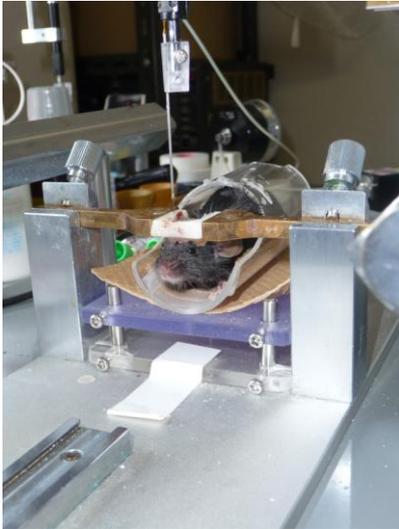


図 1. 覚醒下での脳定位固定装置への保定

大脳皮質運動野や視床束傍核に光ファイバーを接着した記録電極を刺入し (図 2 参照)、光照射と神経活動の記録を行った。

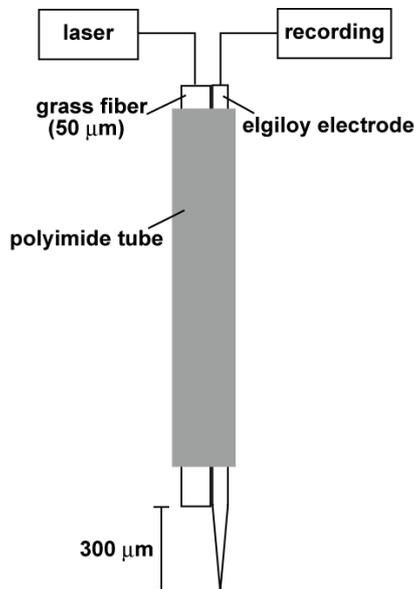


図 2. 光ファイバー付き記録電極の模式図

さらに、光ファイバーを大脳皮質運動野、記録電極を淡蒼球外節に刺入し、大脳皮質運動野を光刺激で興奮誘導したときの応答を淡蒼球外節で記録した。

4. 研究成果

(1) ウイルスベクターの作製とマウスへの遺伝子導入

ウイルスベクターによる遺伝子導入において、高い力価のウイルスベクターを得ることが重要である。高速遠心による濃縮と HPLC を用いた精製方法により、高い力価のレンチウイルスベクターを得ることができた。このレンチウイルスベクターを野生型マウスの線条体に 1 回注入し、ChR2-venus の発現を組織化学的に解析した結果、図 3 のように、大脳皮質や視床束傍核をはじめ、黒質緻密部や視床正中中心核にも ChR2-venus の発現が認められた。

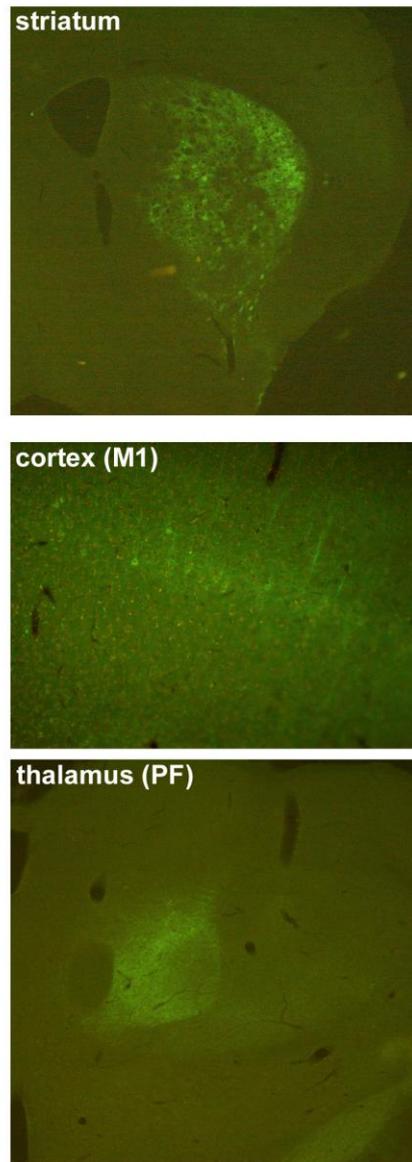


図 3. 注入部位 (線条体) と逆行性に発現した大脳皮質運動野、視床束傍核における ChR2-venus の発現

さらに、発現量を上げるための工夫として、

ウイルスベクターの注入回数を増やし、2-3日間隔で合計5回、線条体にウイルスベクターを注入した。その結果、1回注入より明らかに高い ChR2-venus の発現が、大脳皮質運動野や視床束傍核で認められた。さらに、1回注入では ChR2-venus の発現が認められなかった、腹側被蓋野や縫線核においても ChR2-venus の発現が認められた(図4参照)。

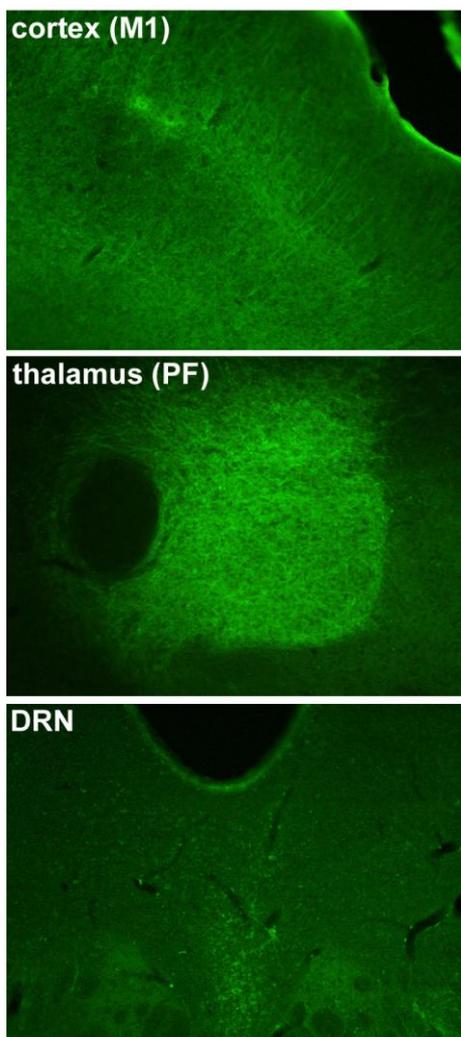


図4. 大脳皮質運動野、視床束傍核、縫線核における逆行性の ChR2-venus の発現

これらの結果は、大脳皮質-線条体経路、視床束傍核-線条体経路、縫線核-線条体経路に特異的な ChR2-venus の遺伝子導入を示している。大脳皮質-線条体経路のように、これまでに特異的なマーカー分子が知られていなかった神経経路に対しても、特異的な遺伝子導入が可能であることを示した結果であり、国内外を問わず、非常に注目を集める遺伝子導入法を確立することができた。

(2) 光照射による興奮誘導

線条体にウイルスベクターを1回注入したマウスを覚醒下で無痛的に脳定位固定装置

に保定し、大脳皮質運動野に光ファイバーを接着した記録電極を刺入した。光照射を行いながら大脳皮質運動野の神経活動を記録したところ、非常に弱い光照射に応じた興奮が認められた(図5参照)。

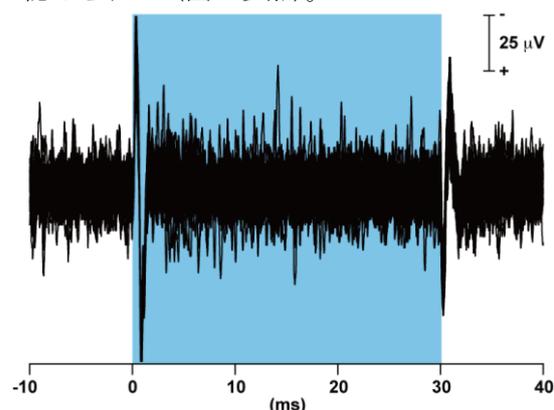


図5. 光照射(青色部分)に応じた大脳皮質運動野の弱い興奮誘導

線条体にウイルスベクターを5回注入したマウスを、同様に脳定位固定装置に覚醒下で保定し、光照射を行いながら大脳皮質運動野の神経活動を記録したところ、光照射に応じた明らかな興奮誘導が認められた(図6参照)。

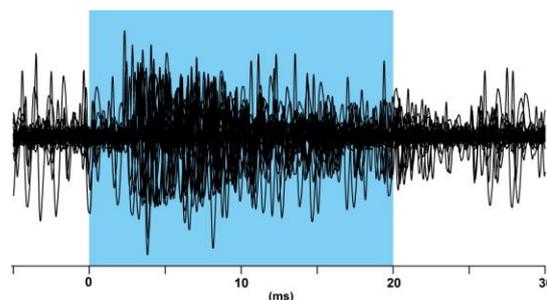


図6. 光照射(青色部分)に応じた大脳皮質運動野の興奮誘導

この結果は、大脳皮質-線条体経路の特異的な興奮誘導を示しており、大脳皮質が大脳基底核を制御する機構を明らかにする上で、強力なツールを得ることができた。さらに、この方法では、大脳皮質のニューロンの中から光照射により大脳皮質-線条体経路を選別することが可能であり、大脳皮質-線条体経路の神経生理学的な特性を明らかにすることもできる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

佐野裕美

気になる脳部位「視床下部外側野」、分子神経医学、査読無、10(2)、132-136、2010

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kazuto Kobayashi, Atsushi Nambu
The physiological role of striatopallidal neurons on motor function.
NIPS SOKENDAI International Symposium
2010. 12. 16, Aichi, Japan
- ② 佐野裕美、村田美穂、南部篤
ゾニサミドは BDNF シグナルを介して中脳ドーパミンニューロンを細胞死から保護する
第 33 回日本神経科学大会
2010. 9. 3、兵庫県
- ③ 佐野裕美、村田美穂、南部篤
中脳ドーパミンニューロンに対するゾニサミドの神経保護作用
第 25 回日本大脳基底核研究会
2010. 8. 1、福島県
- ④ 佐野裕美、知見聡美、加藤成樹、小林憲太、小林和人、南部篤
光遺伝学を利用した大脳基底核神経回路の調節機構の解明
包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ
2010. 7. 27、北海道
- ⑤ 佐野裕美、知見聡美、小林和人、南部篤
線条体におけるドーパミン D2 受容体発現ニューロンの運動機能
第 32 回日本神経科学大会
2009. 9. 18、愛知県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 裕美 (SANO HIROMI)

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教
研究者番号：00363755