

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21700354  
 研究課題名（和文） 特定神経路標識する逆行性レンチウイルスベクターを用いた視床-線条体神経路の機能解明  
 研究課題名（英文） Functional analysis of thalamostriatal pathway by lentiviral vector with retrograde axonal transport.  
 研究代表者  
 加藤 成樹 (KATO SHIGEKI)  
 福島県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90443879

研究成果の概要（和文）：イムノトキシン (IT)受容体を発現する逆行性レンチウイルスベクターをマウス線条体に注入し、視床 (PF)に IT を注入することで、視床-線条体神経路の選択的な除去を誘導した。この動物を用いて視覚性 2 弁別学習を行ったところ、正答率・正反応時間の遅延が見られた。次に、マウスに先に学習を獲得させた後、視床-線条体神経路を除去すると正反応時間に影響はないものの獲得した学習の保持が損なわれることを見出した。この結果は、視床-線条体神経路が弁別学習の獲得と実行に重要な役割を持つことを示唆した。

研究成果の概要（英文）：A highly efficient retrograde gene transfer lentiviral vector encoding the recombinant immunotoxin (IT) receptor was injected into the dorsolateral striatum in mice to express the receptor in neurons innervating the striatum. IT treatment into the thalamus (PF) of the vector-injected animals caused a selective elimination of neurons of the PF-derived thalamostriatal pathway. The elimination of this pathway impaired the response selection accuracy and delayed the motor response in the acquisition of a visual cue-dependent discrimination task. When the pathway elimination was induced after learning acquisition, it disturbed the response accuracy in the task performance with no apparent change in the response time. These results demonstrate that thalamostriatal projection derived from the PF plays essential roles in the acquisition and execution of discrimination learning in response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

大脳基底核を構成する主要な領域である線条体は、運動学習、運動制御、強化学習など重要な脳機能を媒介する随意運動遂行系の調節中枢である。線条体への入力については、様々な運動系・感覚系・連合的認知系機能に関わるとされる皮質-線条体経路、ドーパミン神経系により報酬を介した学習の獲得に関わるとされる黒質-線条体経路についての知見は数多い。しかし、視床-線条体経路についての報告は少なく、視床が複数の亜核の集合により複雑に構成されていることから、視床の特定の神経核から線条体へ入力する経路が持つ脳機能についての深い解析はされていない。本研究課題では、**視床-線条体経路を構成する特定のニューロンや神経路の行動における役割の解明に取り組む**と考

### 2. 研究の目的

我々のグループは、複雑な神経回路網における情報の処理とその行動の機能を明らかにするため、神経回路から特定のニューロンを誘導的に除去する遺伝子改変技術（イムノトキシン細胞標的法）の開発を行った。また、脳特定部位に注入することにより、注入部位への高い感染性、神経終末から取り込まれ軸索を逆行性に輸送して、細胞体において導入遺伝子を発現する逆行輸送活性を持つ神経回路研究への応用性が高い組換え体レンチウイルスベクターを開発した。導入遺伝子をヒトインターロイキン2受容体 $\alpha$ サブユニット（IL2R $\alpha$ ）としてマウス線条体にウイルスベクターを注入すると、視床束傍核（PF）において逆行性にIL2R $\alpha$ が発現し、この領域に組換え体イムノトキシン（anti-Tac(Fv)-PE38）を注入することで視床-線条体神経路ニューロンのみを局所的に除去できる。これらの技術の組み合わせにより、**視床-線条体経路のみを遮断したモデル動物を用いて、この神経路の行動機能への生理的意義を解析**することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) <平成21年度>

●**視床-線条体神経路破壊モデル動物の樹立を行う。**

我々の開発した逆行性レンチウイルスベクターは、線条体に注入することによって、導入遺伝子を皮質運動野（cortex M1）、皮質体性感覚野（cortex S1）、視床束傍核（PF）、中脳黒質緻密部（SNc）に逆行性に輸送する

ことを報告した。特に視床束傍核への輸送頻度が高いため、**視床-線条体神経路を標的とし行動制御に関わる機能メカニズムの解明に取り組む**と共に、視床へのダメージが学習獲得の遅延や記憶保持の低下の誘発、記憶障害や健忘症との関わりが深いことから、神経変性疾患などへの新たな治療法として視床への導入遺伝子輸送を可能とするウイルスベクターを提供する。

21年度においては、導入遺伝子をGFPからIL2R $\alpha$ に置換したウイルスベクターを作製し、文献2と同じ実験条件でウイルスベクターを線条体に注入、視床におけるIL2R $\alpha$ の発現を確認した後、組換え体イムノトキシンを注入して視床-線条体神経路の除去を誘導する。また、組織化学的手法（免疫染色およびニッスル染色）によってモデル動物が標的神経路ニューロンのみを除去したことを証明する。

検討実験においては、既に導入遺伝子をIL2R $\alpha$ に置換したウイルスベクターを線条体に注入し、視床束傍核に組み換え体イムノトキシンを注入した場合にのみ、IL2R $\alpha$ 遺伝子によって逆行標識された神経細胞が除去される結果を示した。現在、より高いタイトルのウイルスベクター取得のための改変とウイルスベクター精製法の改良、視床束傍核での強いIL2R $\alpha$ 遺伝子発現の条件検討がほぼ完了しており、21年度には円滑に研究計画を開始することが可能である。

#### (2) <平成22年度>

●**能動的回避反応実験を用いた強化学習解析を行う。**

視床への組換え体イムノトキシン注入群（視床-線条体神経路除去群）およびPBS注入群（対照群）に対して、シャトルアボイダンステストを用いた能動的回避反応実験によるオペラント条件付け課題などの行動学的試験を利用し、回避行動の正確性と反応時間に与える影響を分析する。また、一定時間（24時間、1週間）の後に同様の行動課題を行い、獲得した学習の保持についての検討を行う。これらの強化学習で、**視床-線条体神経路における学習の獲得と発現および記憶とその保持に関わるメカニズムを考察**する。

また、臨床医学的には視床-線条体神経回路網を介した健忘症モデル動物を提供することが見込めるので、神経内科学的見地から専門家の意見を取り入れ実用・応用を目指した多角的なアプローチを行う。

(3) <平成 23 年度>

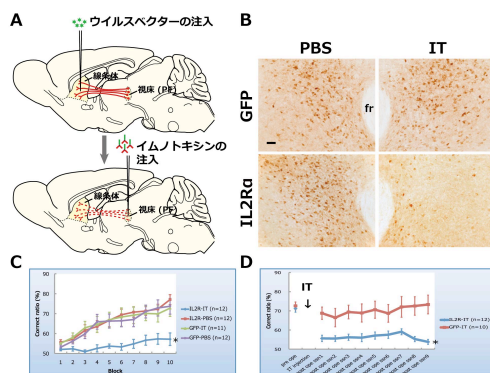
●自発運動や薬物誘導運動および運動学習の獲得による行動解析を行う。

自発運動量の測定は赤外線ビームセンサーを用いた運動量測定装置を利用し、一定区画内で動物の行動をモニタリングして、赤外線横切った回数や場所ごとの停留時間を計測する。実験は前年度と同様に視床-線条体神経路を除去誘導したモデル動物および対照群について行う。また薬物投与実験は、グルタミン酸受容体作働薬/拮抗薬、 $\gamma$ -アミノ酪酸受容体作働薬/拮抗薬、ドーパミン受容体作働薬/拮抗薬を皮下注射してそれに伴う行動変化を対照群と比較する。さらに、ロータールード(回転運動測定テスト)を用いた運動学習獲得への影響を解析する。

両群の動物から得られるこれらの結果における変化を比較・検討し、視床-線条体神経路が担う運動学習への役割を分析する。

4. 研究成果

我々の開発した逆行性レンチウイルスベクターを用いて、ある特定の神経路のみを遺伝子標識し、その遺伝子に合わせた誘導因子によって、標識された神経路機能のみを制御する新しい method (特定神経路標的法)を開発した。この方法により大脳基底核の局所回路を構成する視床-線条体神経路を除去したモデル動物を作製し、様々な行動試験を行ったところ、視床-線条体路を構成するネットワークは、基本運動能には変化は示さないものの、視覚性 2 弁別学習における学習の獲得過程に障害が見られることを見出した。また、獲得した学習の保持に視床-線条体神経路が関わることを明らかとするため、2 弁別学習の獲得をさせた後に、視床-線条体神経路を除去したところ、獲得した学習成績が著しく低下したことから、この神経路は学習の保持にも重要な役割を持つことを明らかにした(下図)。



視床-線条体路除去と行動生理学的解析  
(A) 逆行性ウイルスベクターをマウス線条体に注入、逆行輸送された IL2R $\alpha$ 遺伝子を発現する標的ニューロンに対し、イムノトキシン (IT) を注入して、視床-線条体神経路の除去を誘導。(B) 視床における免疫染色により IL2R $\alpha$ -IT の組み合わせで、視床-線条体路を構成するニューロンを除去した。(C, D) 2 レバー弁別学習による視床-線条体路の学習機能への役割の解明。対照群に対し、視床-線条体路除去群では、学習獲得、学習の保持が障害された。

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 7 件)

① Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways. *Rev. Neurosci.* in press (2012). 査読有

② Kinoshita, M., Matsui, R., Kato, S., Hasegawa, T., Kasahara, H., Isa, K., Watakabe, A., Yamamori, T., Nishimura, Y., Alstermark, B., Watanabe, D., Kobayashi, K., and Isa, T. Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates. *Nature* in press (2012). 査読有

③ Inoue, K., Koketsu, D., Kato, S., Kobayashi, K., Nambu, A., and Takada, M. Immunotoxin-mediated tract targeting in the primate brain: Selective elimination of the cortico-subthalamic "Hyperdirect" pathway. *PLoS ONE* 7: e39149 (2012). 査読有

④ Kato, S., Kuramochi, M., Takasumi, K., Kobayashi, K., Inoue, K., Takahara, D., Hitoshi, S., Ikenaka, K., Shimada, T., Takada, M., and Kobayashi, K. Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22: 1511-1523 (2011). 査読有

⑤ Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., and Kobayashi, K. Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J Neurosci.* 31: 17169-17179 (2011). 査読有

⑥ Matsunaga, E., Suzuki, K., Kato, S., Kurotani, T., Kobayashi, K., and Okanoya, K. Dynamic expression of cadherins regulates vocal development in a songbird. *PLoS ONE* 6: e25272 (2011). 査読有

⑦ Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Kuramochi, M., Okada, T., Yaginuma, H., Morimoto, K., Shimada, T., Takada, M., and Kobayashi, K. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* 22: 197-206 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計8件)

- ① ○加藤成樹、倉持真人、高住賢司、小林憲太、井上謙一、高原大輔、等誠司、池田一裕、島田隆、高田昌彦、小林和人  
新規融合糖タンパク質組換え体レンチウイルスベクター系による神経細胞特異的逆行性遺伝子導入  
第34回日本分子生物学会/2011年12月13日/横浜・パシフィコ横浜
- ② ○Shigeki KATO, Masahito KURAMOCHI, Kenta KOBAYASHI, Ryoji FUKABORI, Motokazu UCHIGASHIMA, Masahiko WATANABE, Yuji TSUTSUI and Kazuto KOBAYASHI  
Behavioral role of thalamostriatal neural pathway in conditional discrimination paradigm.  
第34回日本神経科学大会/2011年9月16日/横浜・パシフィコ横浜
- ③ ○加藤成樹、小林憲太、井上謙一、倉持真人、岡田知明、八木沼洋行、森本金次郎、島田隆、高田昌彦、小林和人  
脳神経回路研究のための融合糖タンパク質組換え体レンチウイルスベクター系による高頻度逆行性遺伝子導入  
第33回日本分子生物学会/2010年12月7日/神戸・神戸ポートアイランド
- ④ ○Shigeki KATO, Kenta KOBAYASHI, Ryoji FUKABORI and Kazuto KOBAYASHI  
Analysis of behavioral role of the thalamostriatal neural pathway by using the highly efficient retrograde transport vector.  
第33回日本神経科学大会/2010年9月2日/神戸・神戸ポートアイランド
- ⑤ Kazuto Kobayashi, ○Shigeki Kato, Kenta Kobayashi, Ken-ichi Inoue, Masahiko Takada  
HIGHLY EFFICIENT GENE DELIVERY SYSTEM INTO THE BRAIN THROUGH RETROGRADE AXONAL TRANSPORT BY USING LENTIVIRAL VECTORS PSEUDOTYPED WITH RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN AND ITS DERIVATIVES.  
第16回日本遺伝子治療学会大会/2010年7月2日/宇都宮・宇都宮文化会館
- ⑥ ○加藤成樹、小林憲太、深堀良二、小林和人  
高頻度逆行性輸送ベクターを利用した視床-線条体路の学習行動における機能の研究  
第7回領域内研究報告会(CREST)/2010年3月1日/大阪・千里ライフサイエンスセンタービル
- ⑦ ○Shigeki KATO, Kenta KOBAYASHI,

Tomoaki OKADA and Kazuto KOBAYASHI  
Development of the efficient gene transfer system through a lentiviral vector with retrograde axonal transport for specific neural circuit labeling.

第32回日本分子生物学会/2009年12月10日/横浜・パシフィコ横浜

⑧ ○Shigeki KATO, Kenta KOBAYASHI, Tomoaki OKADA and Kazuto KOBAYASHI  
Immunotoxin targeting of the thalamostriatal neural pathway labeled by the retrograde gene transfer.

第33回日本神経科学大会/2009年9月17日/名古屋・名古屋国際会議場

〔図書〕(計1件)

① Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K.

Croatia: In Tech

*Viral Gene Therapy* (Ke Xu, ed) (2011)

pp371-380

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 成樹 (KATO SHIGEKI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90443879

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: