

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20687

研究課題名（和文）線条体直接路・間接路による弁別学習の制御機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of discrimination learning mediated by the direct and indirect striatal pathways

研究代表者

西澤 佳代（Nishizawa, Kayo）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30644108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：大脳基底核の中心的な神経核である線条体は、学習に重要な脳領域である。大脳基底核神経回路には、線条体からの出力経路として、黒質へ投射する線条体直接路と、淡蒼球へ投射する線条体間接路が存在する。これらは拮抗的に作用し、その適切なバランスによって学習が可能となる。そのバランスの破綻は、大脳基底核回路の機能障害に直結する為、認知障害を伴う疾患発症に繋がる。しかしながら、技術的な問題により、それぞれの経路が果たす学習への役割については十分な知見が得られていない。本申請研究では、それぞれの経路を区別し、狙った経路特異的な除去する遺伝子操作技術開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られた知見は、高次機能障害に対する新しい治療法の確立につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The striatum, the central neuronal nucleus of the basal ganglia, is a brain region important for learning. The basal ganglia neural circuit has two output pathways from the striatum: a direct striatal pathway that projects to the substantia nigra and an indirect striatal pathway that projects to the globus pallidus. They act antagonistically, and the proper balance between them makes learning possible. Disruption of the balance directly leads to dysfunction of the basal ganglia circuit, which in turn leads to the development of diseases with cognitive impairment. However, due to technical difficulties, the role of each pathway in learning has not been fully understood. In this study, we attempted to develop a genetic manipulation technique to distinguish each pathway and remove the targeted pathway specifically.

研究分野：神経科学

キーワード：背側線条体 弁別学習 直接路 間接路 大脳基底核回路

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトの日常行動の多くは道具的行動の特徴を有する。道具的行動とは、目的を達成するための道具として機能する行動である。道具的行動では、様々な環境刺激に対する適切な“識別”が要求され、識別は“弁別”とも呼ばれる。2種類以上の刺激弁別が要求されるような課題を学ぶ事を“弁別学習”と言い、弁別学習は、正の刺激に対しては強化を与え、負の刺激には強化を与えない。つまり、正の刺激に対してのみ反応させる学習様式である。高次な注意障害やスピードを要求される認知情報の処理障害といった“弁別”に対する障害がパーキンソン病患者において報告されており (Brown et al., 1973; Canavan et al., 1989; Sahakian et al., 1998)、弁別学習の解析をする事で、迅速かつ正確な選択といった情報処理能力の有無を判断する事が可能となる。

近年、“背側線条体”が、弁別学習に関与している事が報告されており (Robbins et al., 1990)、大脳皮質からの入力の違いによって、“背外側線条体” (dorsolateral striatum: **DLS**) と“背内側線条体” (dorsomedial striatum: **DMS**) の2領域に背側線条体は分けられている。両領域は、弁別学習の獲得や遂行といった学習段階において、異なった寄与を示す事が報告されている (Featherstone et al., 2004; 2005)。更に、背側線条体からは、2種類の GABA 作動性の投射ニューロンが出力核へシグナル伝達をしている。それは、ドパミン D₁ 受容体 (D₁R) を介して淡蒼球内節及び黒質網様部に投射するニューロン (線条体直接路)と、ドパミン D₂ 受容体 (D₂R) を介して淡蒼球外節に投射するニューロン (線条体間接路)に区分される。パーキンソン病患者では、黒質緻密部のドパミン作動性ニューロンが変性・脱落し、線条体へのドパミン神経入力が増減する事で、線条体直接路や間接路の活動性のバランスが崩れる事が報告されている (DeLong, 1990)。従来、背側線条体の弁別学習における役割を解明する事を目的とした研究において用いられてきた神経毒や電気破壊による損傷では、D₁R 陽性細胞や D₂R 陽性細胞を区別する事なく背側線条体に局在する全てのニューロンを破壊する為、現在まで各々のニューロン群がどのような機能を担うのかを明らかにする事が極めて困難であった。事実、背側線条体から投射する2種類の経路における弁別学習に対する役割については十分な知見が得られていない。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室では、イムノトキシン細胞標的法 (immunotoxin-mediated cell targeting, IMCT) として、遺伝子発現の特異性に基いて特定の神経細胞タイプを誘導的に損傷させる技術を開発した (Kobayashi et al., 2012)。イムノトキシン (IT) は、ヒトインターロイキン-2 受容体の α サブユニット (IL-2R α) に対するモノクローナル抗体の可変部位を含み、かつ緑膿菌の菌体外毒素との融合タンパク質であり、IL-2R α を発現させた動物に IT を注入すると、IT は IL-2R α を含有する標的細胞タイプに取り込まれ、この細胞タイプの選択的な損傷が誘導される。本研究課題では IMCT を用いる事により、DLS または DMS から由来する直接路だけを選択的に損傷する為に必要な基盤技術について研究開発を行った。

3. 研究の方法

研究1: Tac1-Cre ラットを用いた、直接路の選択的除去実験

(1) Tac1-Cre ラットの解析

線条体黒質路を構成する GABA 作動性神経細胞に、D₁R 陽性細胞と同じく、選択的に発現する P 物質前駆体 (*tachykinin*, *Tac1*) に注目し、*Tac1* 陽性細胞特異的に Cre 酵素を発現する (*Tac1-Cre*) ラットを作製した。ラットは 10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、固定液に一晩浸漬し、10、20、30% スクロース液含 PB にて洗浄、-80°C にて凍結した。凍結脳は厚さ 30 μ m で薄切し、免疫組織化学染色法を用いて、D₁R、D₂R、及び Cre を標識し、超解像顕微鏡 (Nikon 社製 A1-SIM) を用いて観察を行った。

(2) IL-2R α の発現誘導

Tac1 陽性細胞特異的に IL-2R α を発現させる為、Cre 依存的に IL2R-GFP を発現誘導するアデノ随伴ウイルスベクターを開発した。*Tac1-Cre* ラットの頭部を脳定位固定装置に保定し、頭蓋骨の一部を剥離後、ベクターを充填したガラスキャピラリーを用いて、ラットの線条体にベクターを注入した。ベクター注入手術から 2 週間後、10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、固定液に一晩浸漬し、10、20、30% スクロース液含 PB にて洗浄、-80°C にて凍結した。凍結脳は厚さ 30 μ m で薄切し、免疫組織化学染色法を用いて、D₁R、D₂R、及び GFP を標識し、超解像顕微鏡 (Nikon 社製 A1-SIM) を用いて観察を行った。

(3) Tac1-Cre ラットにおける D₁R 陽性細胞の選択的除去

背側線条体の *Tac1* 陽性細胞を選択的に除去する為、ベクター注入手術から 2 週間後、背側線条体へ IT の注入手術を行った。IT 注入手術から 2 週間後、ラットの脳摘出を行い、脳は -80°C にて凍結した。凍結脳は、厚さ 10 μ m で薄切し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、D₁R 及び D₂R の mRNA を可視化し、正立型蛍光顕微鏡 (Leica 社製 CTR6000) を用いて観察を行った。

研究2: Tac1-IL2R ラットを用いた、直接路の選択的除去実験

(1) Tac1-IL2R ラットの解析

Tac1 陽性細胞に特異的に IL-2R α を発現させた *Tac1-IL2R* ラットを作製した。ラットは 10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、固定液に一晩浸漬し、10、20、30% スクロース液含 PB にて洗浄、-80°C にて凍結した。凍結脳は厚さ 30 μ m で薄切し、免疫組織化学染色法を用いて、D₁R、D₂R、及び Cre を標識し、超解像顕微鏡 (Nikon 社製 A1-SIM) を用いて観察を行った。

(2) Tac1-IL2R ラットにおける D₁R 陽性細胞の選択的除去

Tac1 陽性細胞の選択的除去を誘導する為、背側線条体へ IT の注入手術を行った。IT 注入手術から 2 週間後、ラットの脳摘出を行い、脳は -80°C にて凍結した。凍結脳は、厚さ 10 μ m で薄切し、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、D₁R 及び D₂R の mRNA を可視化し、正立型蛍光顕微鏡 (Leica 社製 CTR6000) を用いて観察を行った。

4. 研究成果

研究1: Tac1-Cre ラットを用いた、直接路の選択的破壊実験

(1) Tac1-Cre ラットの解析

Tac1-Cre ラットの線条体において、Tac1 陽性細胞特異的に Cre が発現している事を確認出来た (図 1)。スケールバー: 20 μm 。

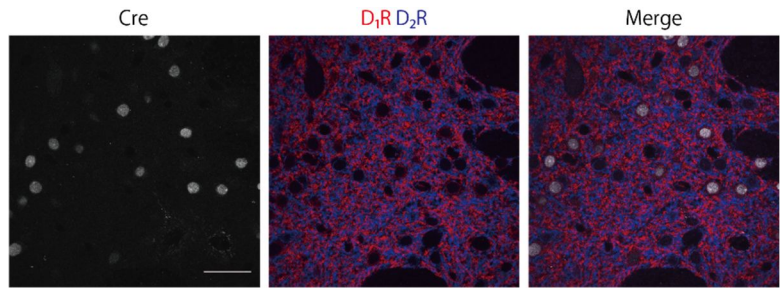


図1 Tac1-Cre ラットの解析

(2) IL-2R α 発現の確認

Tac1-Cre ラット線条体に IL-2R α /GFP を発現誘導するアデノ随伴ウイルスベクターを注入した結果、Tac1 陽性細胞特異的に IL-2R α が発現する事を確認できた (図 2)。スケールバー: 20 μm 。

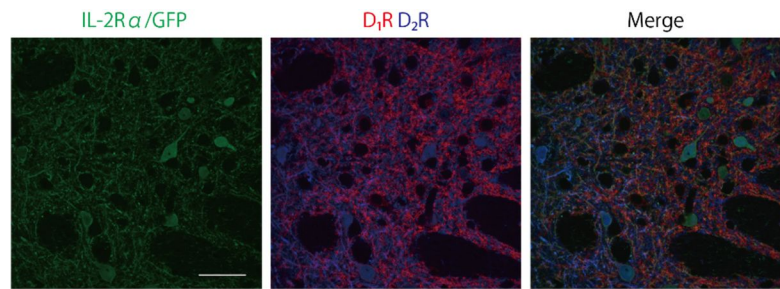


図2 IL-2R α 発現の確認

(3) D₁R 陽性細胞の選択的損傷の確認

Tac1-Cre ラットの線条体に IL-2R α /GFP を発現させ、その2週間後 IT を注入し、D₁R 及び D₂R 陽性シグナルを解析した結果、D₁R 陽性細胞の選択的な除去が誘導された (図 3 左)。スケールバー: 1 mm。

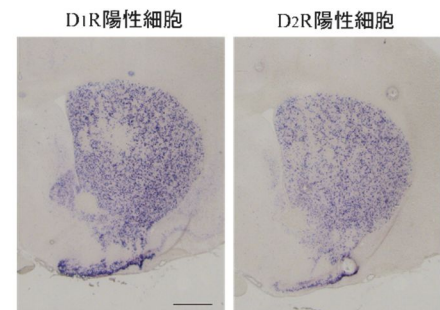


図3. イムノトキシン注入によるD₁R陽性細胞の除去

研究2: Tac1-IL2R ラットを用いた、直接路の選択的除去実験

(1) Tac1-IL2R ラットの解析

Tac1-IL2R ラットの線条体において、IL-2R α が低発現ながら、Tac1 陽性細胞特異的に発現している事を確認出来た (図 4)。スケールバー: 20 μm 。

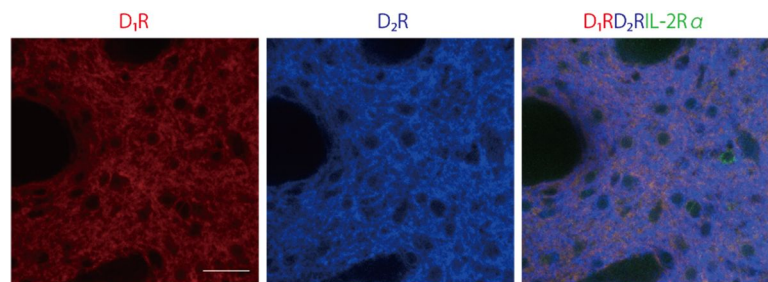


図4 Tac1-IL2R ラットの解析

(2) Tac1-IL2R ラットにおける D₁R 陽性細胞の選択的除去

Tac1-IL2R ラットの線条体に IT を注入し、D₁R 及び D₂R 陽性シグナルを解析した結果、僅かながら、D₁R 陽性細胞の除去が観察された (図 5)。スケールバー: 20 μm 。D₁R 陽性細胞の選択的除去の効率を向上させる為、現在、Tac1-IL2R のホモラットを作製し、IT 注入による影響を検討している。

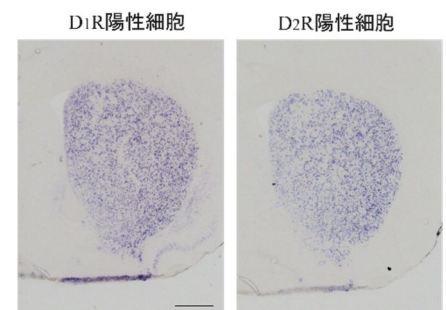


図5. イムノトキシン注入によるD₁R陽性細胞の除去

今後、上記技術を用いた、選択的除去に適切なアプローチを確立し、DLS または DMS から由来する直接路の選択的除去が、弁別学習に及ぼす影響について解析する計画である。

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 2件）

1. 著者名 Matsushita Natsuki, Kato Shigeki, Nishizawa Kayo, Sugawara Masateru, Takeuchi Kosei, Miyasaka Yoshiki, Mashimo Tomoji, Kobayashi Kazuto	4. 巻 3
2. 論文標題 Highly selective transgene expression through the flip-excision switch system by using a unilateral spacer sequence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100393 ~ 100393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2022.100393	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 Matsushita Natsuki, Nishizawa Kayo, Kato Shigeki, Iguchi Yoshio, Fukabori Ryoji, Takeuchi Kosei, Miyasaka Yoshiki, Mashimo Tomoji, Kobayashi Kazuto	4. 巻 381
2. 論文標題 Catecholaminergic cell type-specific expression of Cre recombinase in knock-in transgenic rats generated by the Combi-CRISPR technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109707 ~ 109707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneumeth.2022.109707	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kayo Nishizawa
2. 発表標題 Development of knock-in transgenic rats with catecholaminergic cell type-specific expression of Cre recombinase by the Combi-CRISPR technology
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西澤佳代
2. 発表標題 中枢カテコールアミン研究に有益な新規ノックインラットの開発
3. 学会等名 福島医学会学術研究集会
4. 発表年 2022年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------