

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300119

研究課題名(和文)新規神経回路操作技術による大脳皮質 基底核ネットワーク制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms underlying the cortico-basal ganglia network by using neural circuitry analysis

研究代表者

小林 和人(Kazuto, Kobayashi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90211903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々の研究グループで開発した独自の遺伝子改変技術を応用して、学習の獲得・実行・変換に關与する神経機構の仕組みの解明に取り組んだ。第一に、視床束傍核と中心外側核から線条体へ入力する神経路は学習の獲得と実行に異なる役割を担うことを明らかにした。また、視床線条体路は、Pavlovian-instrumental transfer (PIT) のプロセスに部分的に關与する可能性も示唆された。行動課題中の視床線条体ニューロンの活動を測定する動物系統を作成するとともに、大脳皮質領野から線条体へ投射する経路を選択的に除去した動物の作成に成功し、これらの経路の学習過程を解析する有益なモデルを開発した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate the neural mechanisms underlying the acquisition, performance, and switching of behaviors by using the technology for genetic manipulation of neural functions we originally developed. First, our results indicated that the thalamostriatal pathways arising from the parafascicular and central lateral nuclei have distinct functions in the acquisition and performance of sensory discrimination learning. The thalamostriatal pathways appear to be partly involved in the process of pavlovian-instrumental transfer. We also developed animal models useful for the analysis of firing activity of thalamostriatal neurons during behavioral paradigm and for the targeting of corticostriatal pathways from different cerebral cortical areas.

研究分野：分子神経生物学

 キーワード：視床線条体路 皮質線条体路 道具的学習 行動柔軟性 高頻度逆行性遺伝子導入ベクター 細胞標的
法 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

さまざまな脳機能は、複雑な神経回路における情報の処理とその修飾に依存し、時間空間的に統合された情報は一連の行動として出力される。神経回路の解剖学的な結合関係や電気生理学的な細胞応答については比較的良好に研究が行われているが、一連の行動を制御する神経回路の動作原理や病態の基礎となる回路の異常を説明するメカニズムについては十分な理解が進んでいない。脳機能の基盤となる複雑な神経回路の仕組みを明らかにし、回路の異常として病態の機構を明らかにすることは、現代の脳科学において解決すべき重要な課題である。また、この仕組みの理解は、病態の原因となる神経活動を適切に制御し、脳の障害からの機能回復を目指す新しいアプローチの開発に有益である。

大脳皮質と基底核を連関する神経回路は、学習と行動の発現制御に必須の役割を持ち、この回路の活動異常は多くの神経・精神疾患の病態と深く関係する。神経回路の中心である背側線条体には、多くの大脳皮質領野および視床からのグルタミン酸性入力および中脳腹側領域からのドーパミン性入力がある。これらの入力情報に依存して、さまざまな行動が時間空間的に適切に制御されていると考えられる。本研究では、大脳皮質 基底核ネットワークをモデルとし、我々の研究グループが開発した高頻度逆行性遺伝子導入ベクターに細胞標的法や光遺伝学的手法を組み合わせ、学習と行動の調節に重要な神経回路の仕組みの解明に取り組むこととした。特に、大脳皮質や視床からの入力経路の行動生理学的な役割とそれらを介したシステム制御の神経機構の解明を目的とした。

2. 研究の目的

我々のグループは、行動制御を媒介する神経回路の機構を明らかにするために、脳神経回路から特定のニューロンを誘導的に除去するイムノトキシン細胞標的法や一過性に神経伝達を抑制するイムノテタヌトキシン伝達抑制法を開発し、薬物応答に関わる神経ネットワークの作用機序について研究を行ってきた。さらに、最近、特定の神経路の行動生理学的な役割を解析するために、高頻

度逆行性輸送(HiRet)を示すウイルスベクターの開発に成功した。これらの技術を応用し、大脳皮質 基底核回路を構成するネットワークのうち、特に、大脳皮質および視床(髄版内核)から背側線条体に入力する経路の担う役割に焦点をあて研究を進めた。

視床線条体路については、束傍核(parafascicular nucleus/PF)と中心外側核(central lateral nucleus/CL)から入力する2種類の代表的な経路がある。これらの経路のそれぞれが刺激弁別学習において担う役割を明らかにするとともに、刺激と反応の関係を学ぶ pavlovian instrumental transfer (PIT)のプロセスへの関与について解析した。この経路の行動課題中の神経活動について解析するために、視床線条件体路において光遺伝学を適応するラット系統の開発を進めることを目的とした。また、皮質線条体路の役割を明らかにするために、特に、運動野および感覚野(視覚野)から背側線条体に入力する経路の役割を解析するための動物モデルの開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

視床線条体路の除去モデルの作成：HiRetベクターは、神経終末から取り込まれた後、遠方に存在する細胞体まで輸送され、そこで導入遺伝子の発現を誘導する。経路の除去のために、組換え体イムノトキシン(IT)の受容体であるヒトインターロイキン-2受容体サブユニット(IL-2R α)遺伝子をコードするHiRetベクターを作成した。ベクターをマウスあるいはラットの背側線条体に注入することによって、髄版内核に導入遺伝子の発現を誘導した。その後、ITをPFまたはCLに注入することによって、それぞれの神経核から線条体へ入力する経路を選択的に除去した。

視覚弁別学習：マウスを用いて視覚依存性の2弁別レバー押し課題の獲得と実行をテストした。本課題では、左右2つのレバーが提示され、どちらか一方に光刺激が点灯する(刺激はトライアルごとにランダム)。動物は、レバー提示後、5秒以内に、光刺激によって示された側のレバーを押すと報酬が与えられる。5秒以内のレバー押し数のうち、正反応の割合を正答率とし、制限時間内に反

応がない場合は無反応と評価された。また、正反応の反応時間を測定した。

PIT 課題 : ラットは、2種類の高さの異なる音(刺激)と2種類の香りの異なるジュース(報酬)の連合を学習した後、左右の2種類のレバーと上記の2種類のジュースの組み合わせを学習する。その後、異なる音のどちらか一方の提示に対して、正しい組み合わせのレバーを押すこと(PIT)の実行をテストする。刺激音に対して正しい組み合わせでレバーを押す頻度と異なるレバーを押す頻度、さらに、課題に関係しない刺激音に対するレバー押しの頻度を測定した。

経路選択的チャンネルロドプシン遺伝子の発現 : Cre遺伝子をコードするHiRetベクターをラット線条体に注入し、PFにCre-loxP組換えによりチャンネルロドプシン-Venusを発現するAAVベクターを注入した。また、Cre-loxP組換えにより同じ遺伝子を発現するレポーターを持つトランスジェニックラット系統を作成した。このラットの線条体にHiRet-Creベクターを注入した。

皮質線条体路除去モデルの作成 : HiRet-IL2R α ベクターをマウス線条体に注入した後、ITを大脳皮質領野(M1/M2, V1/V2)に注入することにより、それぞれの領野から投射する皮質線条体路の選択的除去を誘導した。

4. 研究成果

第一に、PFとCLから投射する2種類の視床線条体路について、視覚弁別学習課題においてこれらの経路の担う行動生理学的な役割の解析を行った。PF線条体路を欠損するマウスは、弁別課題の獲得フェーズにおいて正答率の増加の障害を示すとともに、反応時間の延長と無反応率の上昇を示し、明らかな学習の獲得障害のあることが明らかとなった。また、同じ学習を獲得後、経路を除去した場合、正答率の顕著な低下が認められたものの、反応時間には影響はなかった。また、この動物の自発運動、運動学習、シングルレバー押し行動、動機付け行動などには、顕著な変化は認められなかった。これらの結果か

ら、PF線条体路は、獲得フェーズでは反応の正確性と迅速性の両方の制御に必須であるが、実行フェーズでは正確性を維持するために重要な役割を持つが、迅速性には関与しないことが示唆された。CL線条体路を欠損するマウスは、対照群と比較して、課題獲得フェーズの正答率、反応時間、無反応率に顕著な変化を示さなかった。実行フェーズにおいては、正答率の緩和な低下を示し、この低下は試行の繰り返しにより徐々に回復した。一方、CL線条体路欠損マウスは、実行フェーズにおける反応時間の著明な延長を示した。この動物の自発運動、運動学習、シングルレバー押し行動、動機付け行動などは正常であった。以上から、CL線条体路は、獲得フェーズには必要ないが、実行フェーズにおいて反応の正確性と迅速性に重要な役割を持つことが示唆された。学習の獲得と実行のフェーズでは、2種類の視床線条体路の機能が異なるようである。次に、視床束傍核から線条体へ入力する神経路のPITプロセスにおける役割を解析するために、古典的学習(刺激報酬の連合)と道具的学習(反応報酬の連合)を学習させた後、刺激反応の連合のプロセスをテストした。2種類の音を提示し、それぞれの刺激に対応したレバーを押す行動を評価した結果、PF線条体路の選択的な除去を誘導したラットは、PITのパフォーマンスに部分的な低下のある可能性が示唆された。これらの結果はPF線条体路は刺激反応の形成に関わることを示唆する。

第二に、行動課題中の束傍核線条体路の神経活動を評価するために、Cre-loxP組換えを応用した二重遺伝子導入法を用いてチャンネルロドプシン-2-Venusを高レベルに発現するラット系統を作成した。このラットの脳を解析することにより、束傍核視床線条体路におけるチャンネルロドプシン-2-Venusの発現を確認した。また、高いレベルのチャンネルロドプシン-2-Venus発現の安定化するため

に、Cre-loxP 組換えを介して同じ遺伝子を発現するレポーターラット系統を作成し、このラットの線条体に Cre を発現する高頻度逆行性遺伝子導入 (HiRet) ベクターを導入した。このラットの脳内においても、束棒傍核視床線条体路においてチャネルロドプシン-2-Venus の発現が誘導された。これらの動物は、視床線条体路の活動を記録するために有益な実験動物となる。

第三に、皮質線条体路の行動生理学的役割に関して、特に、運動野 (M1/M2) や視覚野 (V1/V2) から背外側線条体へ投射する経路の行動生理学的役割を明らかにするために、ヒト IL-2R 受容体遺伝子をコードする HiRet ベクターをマウス線条体に注入し、M1/M2 運動皮質の局所領域にイムノトキシンを投与することによって、皮質線条体路を選択的に除去した。この欠損マウスを用いて、視覚弁別学習を用いて皮質線条体路の行動生理学的な役割を解析しており、学習の獲得と実行におけるそれぞれの経路の役割を明らかにする計画である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Kato, S., Kuramochi, M., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. (2011) Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. **J. Neurosci.** 31 (47) 17169-17179.
2. Kato, S., Kuramochi, M., Takasumi, K., Kobayashi, K., Inoue, K., Takahara, D., Hitoshi, S., Ikekana, K., Shimada, T., Takada, M., Kobayashi, K. (2011) Neuron-specific gene transfer through retrograde transport of lentiviral vector pseudotyped with a novel type of fusion envelope glycoprotein. **Hum. Gene Ther.** 22 (12) 1511-1523.
3. Fukabori, R., Nishizawa, K., Okada, K., Kai, N., Kobayashi, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. (2012) Striatal direct pathway modulates response time in execution of visual discrimination. **Eur. J. Neurosci.** 35 (5) 784-797.
4. Itoi, K., Sugimoto, N., Suzuki, S., Sawada, K., Das, G., Uchida, K., Fuse, T., Ohara, S., Kobayashi, K. (2011) Targeting of locus ceruleus noradrenergic neurons expressing human interleukin-2 receptor α -subunit in transgenic mice by a recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38: A study for exploring noradrenergic influence upon anxiety-like and depression-like behaviors. **J. Neurosci.** 31(16) 6132-6139.
5. Murata, K., Imai, M., Nakanishi, S., Watanabe, D., Pastan, I., Kobayashi, K., Nihira, T., Mochizuki, H., Yamada, S., Mori, K., Yamaguchi, M. (2011) Compensation of depleted neuronal subsets by new neurons in a local area of the adult olfactory bulb. **J. Neurosci.** 31 (29) 10540-10557.
6. Nishizawa, K., Fukabori, R., Okada, K., Kai, N., Uchigashima, M., Watanabe, M., Shiota, A., Ueda, S., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. (2012) Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. **J. Neurosci.** 32 (39) 13421-13432.
7. Dougalis, A.G., Matthews, GAC, Bishop, MW, Brischoux, F., Kobayashi, K., Ungless, M.A. (2012) Functional properties of dopamine neurons and co-expression of vasoactive-intestinal-polypeptide in the dorsal raphe nucleus and ventro-lateral periaqueductal grey. **Eur. J. Neurosci.** 36 (10) 3322-3332.
8. Kato, S., Kobayashi, K., Kobayashi, K. (2013) Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways. **Rev. Neurosci.** 24 (1) 1-8.
9. Sano, H., Chiken, S., Hikida, T., Kobayashi, K., Nambu, A. (2013) Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. **J. Neurosci.** 33 (17) 7583-7594.
10. Tanaka, T., Takano, Y., Tanaka, S., Hironaka, N., Kobayashi, K., Watanabe, K., Honda, M. (2013) Transcranial direct current stimulation increases extracellular dopamine levels in the rat striatum. **Front. Syst. Neurosci.** 7: 6.
11. Hoshina, N., Tanimura, A., Yamasaki, M., Inoue, T., Fukabori, R., Kuroda, T., Yokoyama, K., Tezuka, T., Sagara, H., Hirano, S., Kiyonari, H., Takada, M., Kobayashi, K., Watanabe, M., Kano, M., Nakazawa, T. Yamamoto, T. (2013) Protocadherin 17 regulates presynaptic

- assembly in topographic cortico-basal ganglia circuits. **Neuron** 78 (5) 839-854.
12. Tsujino, N., Tsunematsu, T., Uchigashima, M., Konno, K., Yamanaka, A., Kobayashi, K., Watanabe, M., Koyama, Y., Sakurai, T. (2013) Chronic alterations in monoaminergic cells in locus coeruleus in orexin neuron-ablated narcoleptic mice. **PLoS One** 8 (7) e70012.
 13. Depboylu, C., Klietz, M., Maurer, L., Oertel, W.H., Kobayashi, K., Weihe, E., Höglinger, G.U., Schäfer, M. K. (2014) Transcriptional and structural plasticity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in both striatum and nucleus accumbens following dopaminergic denervation. **J. Chem. Neuroanat.** 61/62: 169-175.
 14. Ikeda, S., Satoh, K., Kikuchi, N., Miyata, S., Suzuki, K., Omura, J., Shimizu, T., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Fukumoto, Y., Sakata, Y., Shimokawa, H. (2014) Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.** 34 (6) 1260-1271.
- [学会発表](計 25 件)
1. 小林和人, 分子・細胞標的による脳疾患モデル研究. 第 6 回日本統合失調症学会, 2011 年 7 月 18 日, 札幌.
 2. Kobayashi, K. Behavioral and physiological roles of striatal projection pathways in instrumental learning, 23rd Biennial meeting of International Society for Neurochemistry, 31st August 2011, Athen.
 3. 小林和人, 高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの霊長類脳科学への応用, 第 34 回日本神経科学学会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜.
 4. 加藤成樹, 倉持真人, 小林憲太, 深堀良二, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 筒井雄二, 小林和人. 弁別学習行動における視床-線条体路の機能の研究. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 16 日, 横浜.
 5. 深堀良二, 岡田佳奈, 西澤佳代, 甲斐信行, 小林憲太, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 筒井雄二, 小林和人. 線条体直接路は弁別課題遂行時の反応速度を調節する. 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 17 日, 横浜.
 6. Kobayashi, K. Neural circuit mechanism for learning dependent on dopamine transmission. 10th International Catecholamine Symposium (XICS), 11th September 2012, Pacific Grove.
 7. Itoi, K., Ohara, S., Kobayashi, K. Selective ablation of dopamine β -hydroxylase neurons in the brain by immunotoxin-mediated neuronal targeting: new insights into brain catecholaminergic circuitry and catecholamine-related diseases. 10th International Catecholamine Symposium (XICS), 11th September 2012, Pacific Grove.
 8. Kobayashi, K., Kato, S., Kobayashi, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Tsutsui, Y. Neural pathway-specific targeting reveals essential roles of thalamostriatal pathway in the acquisition and performance of sensory discrimination learning. 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, 16th October 2012, New Orleans.
 9. 加藤成樹, 小林和人. 学習行動に関わる視床線条体路の機能解析. 第 27 回日本大脳基底核研究会, 2012 年 7 月 1 日, 東京.
 10. 深堀良二, 岡田佳奈, 西澤佳代, 甲斐信行, 小林憲太, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 筒井雄二, 小林和人. 背内側線条体から投射する線条体黒質路は弁別課題遂行時の反応時間を調整する. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋.
 11. 西澤佳代, 深堀良二, 岡田佳奈, 甲斐信行, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 塩田明, 上田正次, 筒井雄二, 小林和人. 背外側線条体から投射する線条体淡蒼球路は聴覚弁別学習の正確な遂行を調節する. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 20 日, 名古屋.
 12. Kobayashi, K. Behavioral roles of thalamostriatal pathway in sensory discrimination learning. Dopamine 2013, 24 May 2013, Alghero.
 13. Kobayashi, K., Nishizawa, K., Fukabori, R. Key roles of striatal indirect pathway in response selection accuracy of auditory discrimination. 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, 13 November 2013, San Diego.
 14. Kato, S., Fukabori, R., Kobayashi, K. Distinct behavioral roles of thalamostriatal pathways arising from the central lateral and parafascicular nuclear groups in basal ganglia function. 第 6 回 MCCS-Asia シンポジウム, 9th June 2013, 京都.
 15. Nishizawa, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Shiota, A., Ueda, M., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. Behavioral roles of the striatal indirect pathway from the dorsomedial striatum in sensory discrimination

- task. 第6回MCCS-Asia シンポジウム, 9th June 2013, 京都.
16. 小林和人. 神経回路機能の遺伝子操作と制御へ向けたウイルスベクター技術, 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会, 2013年6月21日, 京都.
 17. 西澤佳代、深堀良二、岡田佳奈、内ヶ島基政、渡辺雅彦、塩田明、上田正次、筒井雄二、小林和人. 聴覚弁別学習の遂行における背内側線条体から投射する線条体投射路の機能解析. 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会, 2013年6月21日, 京都.
 18. 加藤成樹、深堀良二、小林和人. 視床外側中心核と束傍核から背側線条体へ入力する神経路の行動学的役割に関する比較解析. 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会, 2013年6月21日, 京都.
 19. Kobayashi, K., Kato, S. Improvement of gene transduction efficiency for neuron-specific retrograde gene transfer lentiviral vector with a novel function envelope glycoprotein. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 18th November 2014, Washington DC.
 20. Nishizawa, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Shiota, A., Ueda, M., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. Dorsal striatal indirect pathway regulates the response selection accuracy in auditory conditional discrimination. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 19th November 2014, Washington DC.
 21. Okada, K., Nishizawa, K., Fukabori, R., Kai, N., Shiota, A., Ueda, M., Tsutsui, Y., Sakata, S., Matsushita, N., Kobayashi, K. Inhibitory role of cholinergic interneurons in the dorsomedial striatum via muscarinic M4 receptors on reversal and extinction learning. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 19th November 2014, Washington, DC.
 22. 佐野裕美, 小林憲太, 加藤成樹, 小林和人, 南部 篤. 大脳皮質 - 線条体ニューロンの神経生理学的役割. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日、横浜.
 23. 加藤成樹, 小林憲太, 小林和人. 神経細胞特異的な逆行性遺伝子導入を示すレンチウイルスベクターにおける融合糖タンパク質ジャンクションの最適化. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月11日, 横浜.
 24. 西澤佳代, 深堀良二, 岡田佳奈, 内ヶ島基政, 渡辺雅彦, 塩田明, 上田正次, 筒井雄二, 小林和人. 背内側線条体から投射する間接路は固執反応の調節を介して条件付弁別学習の実行を制御する. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月12日、横浜.
 25. 岡田佳奈, 西澤佳代, 深堀良二, 甲斐信行, 塩田明, 上田正次, 筒井雄二, 坂田省吾, 松下夏樹, 小林和人. 背内側線条体コリン作動性介在ニューロンはムスカリン性 M4 受容体を介して行動柔軟性を抑制する. 第37回日本神経科学大会, 2014年9月12日, 横浜.
- 〔図書〕(計3件)
1. Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M., Kobayashi, K. (2013) Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. In Gene Therapy -Tools and Potential Applications (ed. Francisco Martin Molina), chapter 15, pp.387-398. InTech, Rijeka.
 2. Kobayashi, K., Okada, K., Kai, N. (2012) Functional circuitry analysis in rodents using neurotoxins/immunotoxins. In Neuromethods, Controlled Genetic Manipulations (ed. Alexei, M.), chapter 10, pp. 193-205. Humana Press Inc., New York.
 3. Kobayashi, K., Fukabori, R., Nishizawa, K. (2013) Neural circuit mechanism for learning dependent on dopamine transmission: roles of striatal direct and indirect pathways in sensory discrimination. In A New Era of Catecholamines in the Laboratory and Clinic (ed. Eiden, L.E.), chapter 7, pp. 143-153. Academic Press, Burlington.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
小林 和人 (福島県立医科大学・医学部・教授) 研究者番号: 90211903
 - (2)研究分担者
小林 憲太 (福島県立医科大学・医学部・助教) 研究者番号: 70315662
 - (3) 研究分担者
深堀 良二 (福島県立医科大学・医学部・助教) 研究者番号: 40457784