

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25702053

研究課題名(和文) 記憶・学習を介する神経回路の機能制御と優れた学習モデル動物作出の試み

研究課題名(英文) The functional control of thalamostriatal circuit and the understand the mechanism of animal learning behavior

研究代表者

加藤 成樹 (Kato, Shigeki)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90443879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：連合学習は様々な脳領域が互いに密に連絡することで制御されていることはわかっているが、その詳細なメカニズムは未だ不明のままである。我々は、独自に開発した特定の神経回路機能路操作する技術を用い、多くの出入力を統御する線条体が視床からの入力によって、学習や経験に基づく行動の実行および刺激やルールの変更に伴って行動を切り替える際の柔軟性を促進することを見出した。今回注目した視床の髄板内核はパーキンソン病等の脳神経疾患で変性することが知られており、今回の研究成果は、神経変性に関わる疾患の病態機序の解明や治療薬の開発に結び付くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although associative learning happens during learning processes associated with novel stimuli through trial and error, it still remains unclear. We addressed the roles of the pathways originating from central lateral nucleus (CL) in the intralaminar thalamic nuclei in mice. The CL-originated neuronal attenuation did not alter the acquisition of visual discrimination, whereas it disturbed transiently the selection accuracy and lengthened the response time. In addition, the mice impaired the reversal of response discrimination and the set shifting from visual discrimination to response discrimination. Our data suggest that the thalamostriatal systems are involved in cognitive function of basal ganglia circuitry, and that these two circuits possess distinct roles in the control of behavioral selection and flexibility. Furthermore, the subcircuits of basal ganglia including the thalamic nuclear groups that mediate discriminative learning appear to shift during the processes of learning.

研究分野：分子細胞神経科学、行動神経科学

キーワード：行動柔軟性 実行機能 視床線条体路 特定神経路機能操作

### 1. 研究開始当初の背景

これまで我々が独自に開発した特定の神経回路機能を操作する技術を使って、標的の神経回路の神経活動を制御することで動物の行動機能解析を行ってきた (Kato et al., 2011, Kinoshita et al., 2012)。本技術と様々な分子生物学的ツールを組み合わせることで、より詳細な視床-線条体神経回路の機能を特定することを計画した。

本研究では、視床髄板内核を構成する外側中心核 (central lateral thalamic nucleus; CL) ニューロンを選択的に除去及び機能抑制することで、大脳基底核ループを構成する主要な脳領域である線条体を介した神経路が担う様々な行動機能、特に学習機能や行動を切り替える柔軟性にどのような影響が見られるかを解析することを目指して研究を開始した。

### 2. 研究の目的

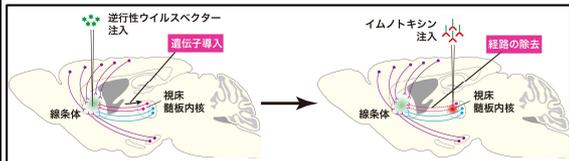
自然界において、動物は状況に応じた適切な行動を選択することで、より多くの報酬を獲得し、外敵から身を守ることができる。また、様々な環境変化に対して迅速に行動を切り替える必要がある。これらの行動は、様々な脳領域間の複雑な神経ネットワークが相互作用することにより発現すると考えられているが、その仕組みはほとんどわかっていない。視床の髄板内核は、これまで主に痛覚を媒介し、感覚機能の制御に関わると考えられていたが、その役割はよく理解されていなかった。一方で、この神経細胞は、運動の制御や認知機能に関わる線条体と密な神経連絡を形成することから、視床髄板内核は高次な脳機能に関わる可能性があるという仮説を立てた。この仮説検証のために、特定の神経回路の機能を操作する技術を利用して、視床から線条体へ連絡する神経回路の機能を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

特定神経路標的法を用いて、マウスの視床髄板内核から線条体への神経連絡の除去を誘導し (図 1 参照)、この動物を用いて、光刺激に基づいて行動を選択する学習の獲得と実行過程の解析を行った。行動試験では、3秒間の音刺激後、2つのレバーが提示され、どちらか一方のランプが点灯するレバーを押すことができれば正解で報酬が得られる視覚性弁別学習課題を行った (図 2 参照)。次に、行動選択を切り替える柔軟性の能力を解析するため、2つのレバーによる場所弁別学習を行った後、正解を反対のレバーに逆転させる逆転学習課題、また視覚性弁別学習の獲得後に、場所弁別学習課題に予期なくルールの変更を行うことで動物の行動柔軟性を調べるルール変更課題を行った (図 3 参照)。

さらに神経路破壊を行わず、視床髄板内核-線条体路の神経活動を選択的に抑制する技術を利用して、本経路の活動抑制を行い、行

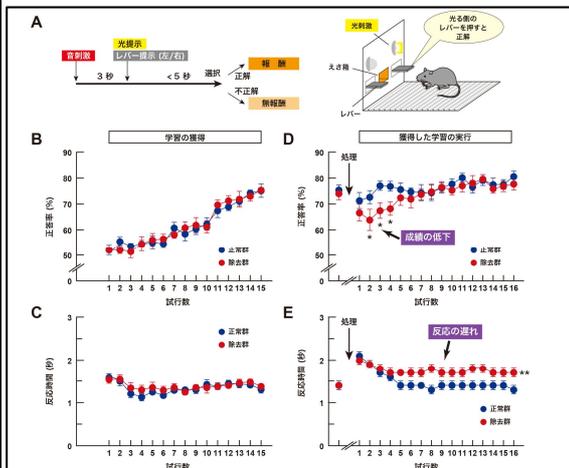
動選択の実行と逆転学習、ルール変更課題について検討した (図 4 参照)。



【図1】視床髄板内核-線条体路の除去  
イムノトキシン受容体分子を発現する逆行性ウイルスベクターを線条体に注入し、視床髄板内核などの領域に存在する細胞体でその遺伝子を発現させた後、イムノトキシンを視床髄板内核に注入することで、この視床髄板内核から線条体へ連絡する神経の経路を選択的に除去することができる。

### 4. 研究成果

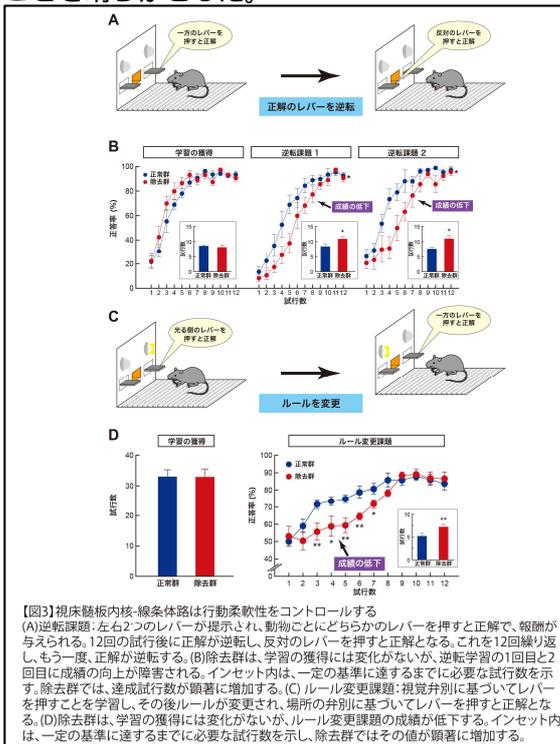
視床髄板内核-線条体路を特定神経路標的法によって選択的に除去し、視覚性弁別学習課題を行うと、視床髄板内核と線条体の連絡を除去した動物は、この学習獲得過程での正答率や反応時間に変化は見られなかった (図 2B, C)。しかし、学習獲得後に視床-線条体の神経連絡を除去し、学習行動の実行を調べたところ、正答率が顕著に低下すると共に、正反応時間が長くなり、行動の実行に障害が認められた (図 2D, E)。この結果は、視床髄板内核と線条体を連絡する経路は、刺激に基づく正しい行動選択を媒介していることを示唆した。



【図2】視床髄板内核-線条体路は行動選択の実行を制御する  
(A) 視覚弁別試験: 3秒間の試験開始を示す音が鳴った後に、2つのレバーが提示され、どちらか一方のランプが点灯する。点灯している方のレバーを5秒以内に押せば正解で、中央のえき箱から報酬(えき)が与えられる。(B, C) 弁別試験の獲得テスト: 神経路の処理を行った後、視覚弁別試験を開始し、この学習試験を徐々に獲得する。正答率 (B) とその時の反応時間 (C) を示す。(D, E) 弁別試験の実行テスト: 弁別学習の獲得後に製剤注入の処理を行い、学習の実行過程をテストする。正答率 (D) とその時の反応時間 (E) を示す。

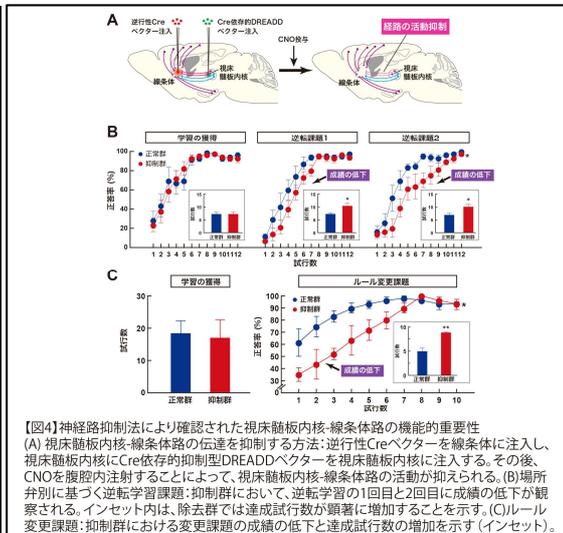
次に、神経路を除去したマウスを用いて、行動選択を切り替える柔軟性の能力について解析した。動物ごとに2つのレバーのうち、場所に応じてどちらか一方のレバーが正解である場所弁別学習を行った後 (学習の獲得)、正解を反対のレバーに逆転する逆転学習課題を行った (図 3A)。正常な動物は、学習の獲得後、逆転課題1において、正答率は一度低下するが、試行の繰り返しの反側側のレバーが正解であることを徐々に学習した。逆転課題2では、もう一度、正解のレバーを反対にすることで、同様に、学習の成績は試行とともに上昇した (図 3B)。一方、経路除去マウスでは、逆転課題の1回目も2回目も逆転学習の成績は正常群に比較して

低下することを見出した (図 3B)。別の行動柔軟性の課題として、ルール変更に対応する能力について調べるため、動物は、最初に、視覚弁別課題を獲得し、その後、予期なく場所弁別学習にルールを変更した (図 3C)。正常な動物は、このルール変更後、徐々に正答率が増加するが、神経路を除去したマウスでは、学習の成績が顕著に低下した (図 3D)。これらの結果から、視床髄板内核-線条体路は、刺激の逆転やルールの変更に対して行動を柔軟に切り替えるために重要な役割を持つことを明らかとした。



さらに、視床髄板内核-線条体路の機能を確認するために、逆行性 Cre ベクターと Cre 依存的抑制型 DREADD 発現ベクターを用いて、標的の経路の活動抑制を行う技術 (神経路抑制法) を開発した (図 4A)。この神経路抑制法を利用したマウスで行動解析を行った結果、経路の抑制によって、逆転学習とルール変更課題を含む行動柔軟性の成績は低下することが明らかとなり、神経路除去によって見出された本神経路の行動切り替えにおける重要性を確認した (図 4B, C)。一方、経路の抑制は行動選択の実行には影響が認められず、このことは、行動課題によって経路の機能操作に対する感受性が異なることが示唆された。選択行動の実行には、経路の抑制に対して脳内で何らかの補償機構が働いている可能性が考えられる。

一連の研究の成果として、これまで機能が十分明らかになっていなかった視床髄板内核は、線条体への神経連絡を形成することによって、学習や経験を介した行動の選択と状況に応じた適切な行動の切り替えに必須の役割を持つという事を明らかにした。このような認知機能には複雑な脳のネットワーク



が関わることが考えられていたが、その中で極めて重要な神経連絡が見出した。また、視床髄板内核はパーキンソン病において部分的な変性が生じることが報告されており、この神経機能が明らかになったことによって病態やその機序の理解が進むことが期待されると共に、新たな治療戦略や薬剤の開発に結び付くことが期待される。

## 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 21 件)

1. Action selection and flexible switching controlled by the intralaminar thalamic neurons. Kato, S., Fukabori, R., Nishizawa, K., Okada, K., Yoshioka, N., Sugawara, M., Maejima, Y., Shimomura, K., Okamoto, M., Eifuku, S. and Kobayashi, K.

*Cell Rep.* 22(9): 2370-2382 (2018). 査読有

2. Copy number elevation of 22q11.2 genes arrests the developmental maturation of working memory capacity and adult hippocampal neurogenesis.

Boku, S., Izumi, T., Abe, S., Takahashi, T., Nishi, A., Nomaru, H., Naka, Y., Kang, G., Nagashima, M., Hishimoto, A., Enomoto, S., Duran-Torres, G., Tanigaki, K., Zhang, J., Ye, K., Kato, S., Männistö, P., Kobayashi, K. and Hiroi, N.

*Mol. Psychiatry* 23(4): 985-992 (2018). 査読有

3. Gene therapy approaches in the non-human primate model of Parkinson's disease.

Pignataro, D., Sucunza, D., Rico, A., Dopeso-Reyes, I., Roda, E., Rodríguez-Perez, A., Labandeira-Garcia, J., Broccoli, V., Kato, S., Kobayashi, K. and Lanciego, J.

*J Neural Transm.* 125(3): 575-589 (2018). 査読有

- 4.** Anatomical evidence for a direct projection from Purkinje cells in the mouse cerebellar vermis to medial parabrachial nucleus. Hashimoto, M., Yamanaka, A., Kato, S., Tanifuji, M., Kobayashi, K. and Yaginuma, H. *Front. Neural Circuits* 12: 6 (2018). 査読有
- 5.** Genetic manipulation of specific neural circuits by use of a viral vector system. Kobayashi, K., Kato, S. and Kobayashi, K. *J Neural Transm.* 125(1): 67-75 (2018). 査読有
- 6.** Segregated excitatory-inhibitory recurrent subnetworks in layer 5 of the rat frontal cortex. Morishima, M., Kobayashi, K., Kato, S., Kobayashi, K. and Kawaguchi, Y. *Cerebral Cortex* 27(12): 5846-5857 (2017). 査読有
- 7.** Pseudotyped lentiviral vectors for retrograde gene delivery into target brain regions. Kobayashi, K., Inoue, K., Tanabe, S., Kato, S., Takada, M. and Kobayashi, K. *Front. Neuroanat.* 11: 65 (2017). 査読有
- 8.** Neuronal cytoskeletal gene dysregulation and mechanical hypersensitivity in a rat model of Rett Syndrome. Bhattacharjee, A., Mu, Y., Winter, M., Knapp, J., Eggiman, L., Gunewardena, S., Kobayashi, K., Kato, S., Krizsan-Agbas, D. and Smith, P. *PNAS* 114(33): E6952-E6961 (2017). 査読有
- 9.** The use of an optimized chimeric envelope glycoprotein enhances the efficiency of retrograde gene transfer of a pseudotyped lentiviral vector in the primate brain. Tanabe, S., Inoue, K., Tsuge, H., Uezono, S., Nagaya, K., Fujiwara, M., Kato, S., Kobayashi, K. and Takada, M. *Neurosci. Res.* 120: 45-52 (2017). 査読有
- 10.** Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. Wakaizumi, K., Kondo, T., Hamada, Y., Narita, M., Kawabe, R., Narita, H., Watanabe, M., Kato, S., Senba, E., Kobayashi, K., Kuzumaki, N., Yamanaka, A., Morisaki, H. and Narita, M. *Mol. Pain.* 12: 1-11 (2016). 査読有
- 11.** Survival of corticostriatal neurons by Rho/Rho-kinase signaling pathway. Kobayashi, K., Sano, H., Kato, S., Kuroda, K., Nakamuta, S., Isa, T., Nambu, A., Kaibuchi, K. and Kobayashi, K. *Neurosci. Lett.* 630: 45-52 (2016). 査読有
- 12.** Altering Entry Site Preference of Lentiviral Vectors into Neuronal Cells by Pseudotyping with Envelope Glycoproteins. Kobayashi, K., Kato, S., Inoue, K., Takada, M. and Kobayashi, K. *Methods Mol. Biol.* 1382: 175-186 (2016). 査読有
- 13.** Lgr4 controls specialization of female gonads. Koizumi, M., Oyama, K., Yamakami, Y., Kida, T., Satoh, R., Kato, S., Hidema, S., Oe, T., Goto, T., Clevers, H., Nawa, A. and Nishimori, K. *Biol. Reprod.* 93(4): 90 (2015). 査読有
- 14.** Double Virus Vector Infection to the Prefrontal Network of the Macaque Brain. Oguchi, M., Okajima, M., Tanaka, S., Koizumi, M., Kikusui, T., Ichihara, N., Kato, S., Kobayashi, K., and Sakagami, M. *PLoS ONE* 10(7): e0132825 (2015). 査読有
- 15.** An avian sarcoma leukosis virus receptor-envelope system for simultaneous dissection of multiple neural circuits in mammalian brain. Matsuyama, M., Ohashi, Y., Tsubota, T., Yaguchi, M., Kato, S., Kobayashi, K., and Miyashita, Y. *PNAS* 112(22): E2947-E2956 (2015). 査読有
- 16.** Simultaneous visualization of extrinsic and intrinsic axon collaterals in Golgi-like detail for mouse corticothalamic and corticocortical cells: a double viral infection method. Watakabe, A., Takaji, M., Kato, S., Kobayashi, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Ohsawa, S., Matsui, R., Watanabe, D., and Yamamori, T. *Front. Neural Circuits* 8: 110 (2014). 査読有
- 17.** Improved transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer by optimizing the junction of fusion envelope glycoprotein. Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K. *J Neurosci. Methods* 227: 151-158 (2014). 査読有
- 18.** Viral vector-mediated selective and reversible blockade of the pathway for visual orienting in mice. Sooksawate, T., Isa, K., Matsui, R., Kato, S., Kinoshita, M., Kobayashi, K., Watanabe, D., Kobayashi, K., and Isa, T. *Front. Neural Circuits* 7: 162 (2013). 査読有
- 19.** Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. Hirano, M., Kato, S., Kobayashi, K., Okada, T., Yaginuma, H., and Kobayashi, K.

*PLoS ONE* 8(9): e75896 (2013). 査読有

20. Elucidating information processing in primate basal ganglia circuitry: a novel technique for pathway-selective ablation mediated by immunotoxin.

Takada, M., Inoue, K., Koketsu, D., Kato, S., Kobayashi, K., and Nambu, A.

*Front. Neural Circuits* 7: 140 (2013). 査読有

21. Dissecting circuit mechanisms by genetic manipulation of specific neural pathways.

Kato, S., Kobayashi, K., and Kobayashi, K.

*Rev. Neurosci.* 24(1): 1-8 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

<招待講演>

1. 加藤成樹、小林和人: 経路選択的な回操作技術の応用: 行動制御機構解明に迫る 生理学研究所研究会@東北, 2017年11月24日, 東北大学片平キャンパス・さくらホール, 仙台, 日本

2. Shigeki Kato: Thalamostriatal circuit controls action selection and flexible switching in learning behavior., 平成 29 年度第 2 回大脳基底核機能研究会, Oct 13rd, 2017, 土湯温泉ホテル山水荘, 福島

3. Shigeki Kato: Behavioral selection and flexible switching through thalamostriatal circuit., International Workshop on Basal Ganglia Functions 2017, Jul 23rd, 2017, Tamagawa University, Machida, Japan

4. Shigeki Kato: Pathway-selective manipulation of neural function by using HiRet/NeuRet vector system., The International Workshop for Strategy for Neuroscience, Dec 8th, 2016, Convention Center, National Institute of Physiological Science, Okazaki, Japan

5. 加藤成樹、菅原正晃、小林和人: 特定神経回路を標的とした機能制御システムの開発と応用 第 7 回福島運動器疼痛セミナー, 2016 年 11 月 5 日, ホテルサンルートプラザ福島, 福島

6. Shigeki Kato and Kazuto Kobayashi: Comparative study of gene transduction efficiency for retrograde gene transfer lentiviral vector with novel fusion envelope glycoprotein., International Symposium on Adaptive Circuit Shift 2016, Mar 3rd, 2016, Kambaikan, Doshisha University, Kyoto, Japan

<国際学会>

7. Shigeki KATO and Kazuto KOBAYASHI: Comparative study of gene transduction efficiency for retrograde gene transfer lentiviral

vector with novel fusion envelope glycoproteins. Neuroscience 2016, Nov 16th, 2016, San Diego Convention Center, San Diego, USA

8. Shigeki KATO, Ryoji FUKABORI, Kenta Kobayashi, Hiromu Yawo, Yoshikazu Isomura and Kazuto KOBAYASHI: Functional control of specific neural pathways in basal ganglia circuit by HiRet. Neuroscience 2013, Nov 9th, 2013, San Diego Convention Center, San Diego, USA

9. Shigeki KATO, Ryoji FUKABORI and Kazuto KOBAYASHI: Distinct behavioral roles of thalamostriatal pathways arising from the central lateral and parafascicular nuclear groups in basal ganglia function. Molecular and Cellular Cognition Society-Asia 2013, Jun 19th, 2013, Kyoto International Conference Center, Annex Hall, Kyoto, Japan

<一般発表>

10. 加藤成樹、小林和人: Behavioral selection and switching flexibility via thalamostriatal circuit. 第 40 回日本分子生物学会, 2017 年 12 月 8, 9 日, 神戸ポートアイランド, 神戸

11. Shigeki KATO, Masateru Sugawara and Kazuto KOBAYASHI: Optimizing the junction of chimeric fusion glycoprotein of a lentiviral vector for highly neuron-specific retrograde gene transfer. 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年 7 月 21 日, 幕張メッセ, 千葉

12. Shigeki KATO, Kenta Kobayashi and Kazuto KOBAYASHI: Optimizing the junction of fusion glycoprotein for the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene transfer. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜, 横浜

13. 加藤成樹、深堀良二、小林和人: Behavioral and physiological roles of two major thalamostriatal pathways in sensory discrimination. 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸ポートアイランド, 神戸

14. Shigeki KATO, Ryoji FUKABORI and Kazuto KOBAYASHI: Comparative analysis for behavioral roles of the central lateral and parafascicular nuclear groups projecting to the dorsolateral striatum. 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 21 日, 京都国際会館, 京都

〔図書〕(計 1 件)

Vectors for highly efficient and neuron-specific retrograde gene transfer for gene therapy of neurological diseases. Kato, S., Kobayashi, K., Inoue, K., Takada, M.,

and Kobayashi, K.  
*Gene Therapy* (Francisco Martin Molina, ed),  
Chapter 15, InTech, Rijeka (Croatia), pp.387-398  
(2013). 査読有

〔産業財産権〕なし

○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〕

ホームページ等  
<http://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/>

## 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・講師  
研究者番号：90443879

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

佐野 裕美 (SANO HIROMI)  
生理学研究所・その他の部局等・助教  
研究者番号：00363755

深掘 良二 (FUKABORI RYOJI)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40457784

### (4) 研究協力者

菅原 正晃 (SUGAWARA MASATERU)  
福島県立医科大学・医学部・技術補佐

金松 真紀子 (KANEMATSU MAKIKO)  
福島県立医科大学・医学部・技術補佐

澤田 渚 (SAWADA NAGISA)

福島県立医科大学・医学部・技術補佐