

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830022

研究課題名(和文) 大脳基底核内の各経路が運動制御に関わる機能の解明

研究課題名(英文) Motor Function of Neuronal Pathways in the Basal Ganglia

研究代表者

額 大輔 (Koketsu, Daisuke)

生理学研究所・統合生理研究系・特別協力研究員

研究者番号：20437289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳基底核内の「ハイパー直接路」の運動情報の伝達を選択的に阻害した。大脳基底核の出力部位である淡蒼球内節(GPi)は皮質刺激に対して、興奮-抑制-興奮反応という三相性の反応を示すが、選択的破壊後には早い興奮だけが有意に減弱した。したがって、GPiでの早い興奮反応は「ハイパー直接路」を経由して引き起こされ、またGPiの抑制性の出力は大脳皮質の活動を抑えることから、「ハイパー直接路」は運動に不必要な皮質の活動を抑える働きがあることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：The motor information flow of “hyperdirect pathway” in the Basal ganglia was selectively eliminated. The internal segment of global pallidus, the output station in the basal ganglia shows the tri-phasic response, excitation-inhibition-excitation that responds to the cortical stimulation. After the selective elimination, only the early excitation was significantly decreased. Therefore, it is conceivable that the early excitation of GPi neurons would be generated through “hyperdirect pathway”. The inhibitory output of GPi consequently inhibits cortical activities. It is estimated that “hyperdirect pathway” could inhibit the unnecessary motor cortical activities.

研究分野：神経生理学

キーワード：大脳基底核 運動制御

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核は運動関連皮質と強い神経連絡を持ち、また大脳基底核の機能異常によりパーキンソン病などの運動障害疾患を引き起こされることから、運動制御において大きな役割を担っていることが知られている。大脳基底核内には皮質からの運動情報を伝達する3つの経路があることが解剖学的に知られており(文献)それぞれの経路が運動制御において異なる役割を持つことが推測されるが、その詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

運動皮質から視床下核(STN)へ投射する神経経路を選択的に破壊し、大脳基底核内の細胞活動の変化を調べることで、「ハイパー直接路」の運動制御に関わる機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

インターロイキン受容体(IL2R)遺伝子を持つ逆行性のウイルスベクターをSTNに注入し、細胞体へ十分に逆行性輸送された後に、運動皮質にイムノトキシンを注入した。イムノトキシンはIL2Rに特異的に結合する神経毒で、IL2Rを細胞体に発現しているニューロンの細胞死を誘導する(文献)。この手法を用いて、運動皮質からSTNへ投射するニューロンのみを選択的に破壊して、大脳基底核内の「ハイパー直接路」の運動情報伝達を選択的に阻害する。さらに、選択的破壊により大脳基底核内の細胞活動がどのように変化するかを調べ、「ハイパー直接路」の運動制御における役割を明らかにする。

4. 研究成果

IL2R遺伝子を持つ逆行性ウイルスベクターをSTNに注入し、さらに運動皮質にイムノトキシンを注入することで、運動皮質からSTNへ投射するニューロンの選択的破壊を行った。この選択的破壊は組織学的に確認を行った。逆行性及び順行性の神経トレーサーであるFluoroRuby(FR)をSTNに注入し、さらにBDAを運動皮質に注入した。FRをSTNに注入した場合には、ITを注入した運動皮質の前肢領域で逆行性にラベルされたニューロンの数が他の領域(後肢領域及び顔面領域)に比べて減少していた(図1)。そして、ニューロンマーカーであるNeuNを使い、抗体染色をして、ITを注入した運動皮質を観察したところ、ITによるニューロンの損傷を見られなかった。また、BDAを運動皮質に注入し、STNへの順行性ラベルを観察したところ、STNでの順行性にラベルされた軸策末端の数が選択的破壊を行っていないコントロールに比べて著しく減少していた。運動皮質からのラベルされた軸策末端は線条体、被殻ではコントロールと同様に観察された。以上の結果は、運動皮質からSTNへ投射しているニューロン

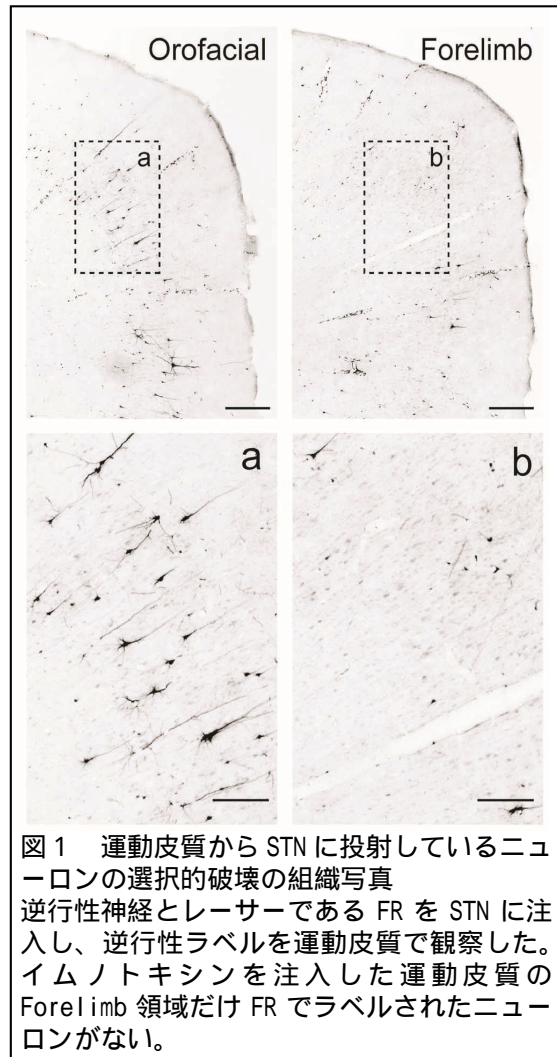


図1 運動皮質からSTNに投射しているニューロンの選択的破壊の組織写真
逆行性神経とレーザーであるFRをSTNに注入し、逆行性ラベルを運動皮質で観察した。イムノトキシンを注入した運動皮質のForelimb領域だけFRでラベルされたニューロンがない。

を選択的に除去したことを示すものである。そして選択的破壊の前後に、大脳基底核の出力部位である淡蒼球内節(GPi)から細胞活動を記録した。STNへのウイルスベクター注入後に35個のGpiニューロンの細胞活動を記録した。このうち13個のニューロンが運動皮質への電気刺激に対して、反応を示した。過去の報告にあるように、12個のGpiニューロンが興奮-抑制-興奮反応という三相性の細胞応答を示した。これはウイルスベクターのSTNへの注入が運動皮質刺激によるGpiニューロンの反応に影響を与えていないことを示している。NeuNに対する免疫染色による組織観察でも、STNの損傷は観察されていない。そして、運動皮質へのIT注入後に72個のGpiニューロンの細胞活動を記録した。このうち31個のニューロンが運動皮質の電気刺激に対して反応を示した。さらに31個のニューロンのうち、16個のニューロンが早い興奮反応がない、抑制-興奮の三相性の反応を示した。その他の応答パターンとしては、9個のニューロンが興奮-抑制-興奮の三相性反応を示し、4個のニューロンが抑制のみの単相性反応を示した。それぞれ

の反応の大きさを測定し、IT注入前のコントロールと比較したところ、IT注入後の早い興奮反応の大きさがコントロールの12%まで減少していた。それに対して、抑制反応と遅い興奮反応の大きさに変化は見られなかった。更に、抑制反応の反応潜時と反応時間及び遅い興奮反応の反応潜時と反応時間にも変化は見られなかった。そして、早い興奮反応の減少をポピュレーション・ヒストグラムで見ると、早い興奮反応だけが著しく減弱し、抑制反応と遅い興奮反応に変化は見られなかった(図2)。また、コントロール実験として、STNにはウィルスを注入しないで、運動皮質にはITを注入するという実験を行った。IT注入前に17個、IT注入後に19個のGPIニューロンの細胞活動を記録した。このうち、IT注入前では9個、IT注入後では10個のニューロンが運動皮質の電気刺激に対して応答を示した。IT注入の前後ともに、最も数の多い応答パターンは興奮-抑制-興奮反応であった(IT注入前、7個; IT注入後9個)。そして、各反応の大きさを測定したところ、IT注入前後で変化は見られなかった。したがって、STNへのウィルス注入及び運動皮質へのIT注入により、GPIでの早い興奮反応だけが選択的に減弱し、その他の抑制反応及び遅い興奮反応に影響は与えないことが示された。

さらに、選択的破壊の前後でのGPIニューロンの自然発火頻度と発火パターンの比較を行った(図3)。選択的破壊前の発火頻度は45.8Hz、破壊後は46.6Hzであり、変化見られなかった。またInter spike interval (ISI)、ISIのCV、kurtosis、skewness、そしてburst index、バースト中のスパイク%には有意差は見られなかった。GPIニューロンは選択的破壊前の状態で高頻度でランダムに発火しており、選択的破壊後に明らかな変化は見られなかった。これらの結果は、運動皮質からSTNへ投射しているニューロンを選択的に破壊しても、GPIニューロンの発火頻度及び発火パターンに影響を与えないことを示している。

今回の研究により、霊長類の脳におけるITを用いて特定の神経経路をターゲットにした操作技術を確立した。そして、この技術を大脳基底核内の「ハイパー直接路」に適用した。「直接路」、「間接路」と併せて、「ハイパー直接路」は大脳基底核内の主要な経路として知られている。この経路は運動皮質と大脳基底核の出力部位であるGPIを繋げていて、線条体を介さない短い反応潜時を示し、大脳基底核内の運動情報の処理を担っている。運動皮質を電気刺激して、GPIニューロンの細胞応答を記録すると、早い興奮-抑制-遅い興奮という三相性の反応が得られる。薬理生理学実験から、早い興奮反応は運動皮質-STN-GPIを通る「ハイパー直接路」によって引き起こされると考えられていた。GABA受容体のアゴニストであるムシモールを注入す

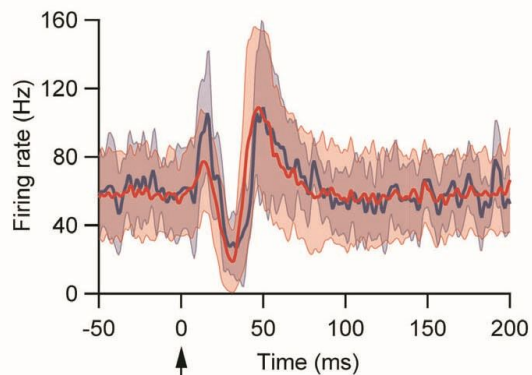


図2 GPIの三相性細胞応答
運動皮質からSTNへ投射しているニューロンを選択的に破壊した場合(赤線)では、破壊前(青線)に比べて早い興奮反応だけが減弱した。

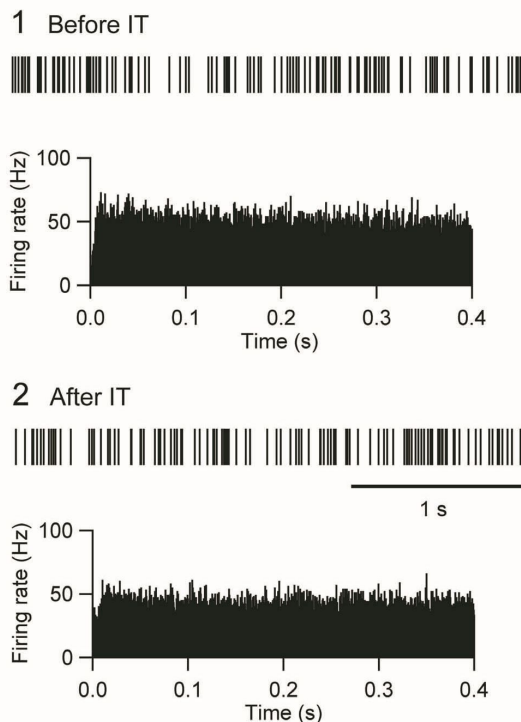


図3 GPIニューロンのスパイク列と自己相関ヒストグラム

ることでSTNの活動をブロックすると、GPIニューロンの早い興奮反応と遅い興奮反応が消失する。またグルタミン酸受容体のアンタゴニストを局所注入することで、STNからGPIへの興奮性入力をブロックしても、GPIニューロンの早い興奮反応と遅い興奮反応がブロックされる。しかし、これらの実験では付随的にGPIニューロンの発火頻度が減少し、また発火パターンも変化してしまう。

本研究では、運動皮質からSTNに投射しているニューロンだけを選択的に破壊した。そして、GPIニューロンの三相性反応のうち、早い興奮反応のみが著しく減弱して、他の抑

制反応と遅い興奮反応に変化は見られなかった。この結果は、運動皮質の電気刺激により引き起こされる早い興奮反応は「ハイパー直接路」を介して生じることを示している。さらに運動皮質からSTNへの投射ニューロンを除去しても、GPiニューロンの発火頻度と発火パターンに変化は見られなかった。これらの結果は、「ハイパー直接路」は運動皮質からGPiへフェーズックな活動変化の情報を伝達しており、GPiニューロンのトニックな活動の維持には寄与していないことを示している。早い興奮反応とは異なり、運動皮質からSTNへの投射ニューロンの除去により抑制反応に影響は見られなかった。これは抑制反応が運動皮質-線条体-GPiの「直接路」を介しているからと考えられる。また、遅い興奮反応は運動皮質-GPe-STN-GPiの「間接路」を介していると考えられる。そして、「ハイパー直接路」は運動皮質からGPiへの運動情報を他の経路と比べて、早い速度で伝達していることを示している。また、GPiは抑制性の出力を視床に送ることで、結果的に運動皮質の活動を抑えることから、三相性反応のうち抑制反応は視床の活動を脱抑制することで、運動皮質の活動を亢進し、結果として必要な運動皮質の活動を高めると考えられる。そして、「ハイパー直接路」経由して引き起こされるGPiでの早い興奮反応は逆に運動開始前の不必要な運動皮質の活動を抑える働きがあると考えられる。

今回の研究により、特定の神経経路をターゲットとして、操作する技術を霊長類で実現した。この技術は特別な神経ネットワークからなる特定の機能だけが対象ではなく、一般的な神経ネットワークにも応用可能である。

<引用文献>

Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res* 43: 111-117.

Kato S, Inoue K, Kobayashi K, Yasoshima Y, Miyachi S, et al. (2007) Efficient gene transfer via retrograde transport in rodent and primate brains by an HIV-1-based vector pseudotyped with rabies virus glycoprotein. *Hum Gene Ther* 18: 1141-1151

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 0件)

[学会発表](計 2件)

Koketsu D "Neuronal Activities of Subthalamic Nigra Pars Reticulata During the Saccade Adaptation" Lions Eye Summit: Gained In Translation, 2014年9月13日, シアトル(米国)

Koketsu D et al., "Neurophysiological and Anatomical Study of Marmoset Area 3a" *Neuroscience* 2013, 2013年11月09-13日, サンディエゴ(米国)

[図書](計 0件)

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧本 大輔 (Koketsu Daisuke)

生理学研究所・総合生理研究系・特別協力
研究員

研究者番号: 20437289

(2)研究分担者

なし

研究者番号:

(3)連携研究者

なし

研究者番号: