

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640001

研究課題名(和文) 光制御によるサル大脳皮質基底核投射における多重神経回路の機能同定

研究課題名(英文) Identification of functional role of neural networks between basal ganglia and cerebral cortex by optogenetics

研究代表者

蔵田 潔 (Kurata, Kiyoshi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30170070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンザルに到達運動課題を訓練し、大脳基底核の出力部位である淡蒼球内節と、基底核と小脳からの出力を大脳皮質に中継する視床腹側核群からニューロン活動を記録することにより、これら神経回路の役割を明らかにしようとした。その結果、視床腹側核群の方が著明な活動をしていること、運動開始に先行するものが視床腹側核群のみならず、淡蒼球内節にも存在するとの新知見を得た。さらに、チャンネルロドプシンを視床腹側核群に注入し光刺激を行ったところ、運動終点の誤差が有意に増加した。この結果は、小脳および基底核の出力が、運動の準備・実行と運動が正しく遂行されているかの評価にそれぞれ重要な役割を果たしていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We recorded neuronal activities of the internal segment of globus pallidus (GPi) and ventral motor thalamus (VMT) while monkeys were performing a reaching task, in order to clarify what roles outputs from basal ganglia and cerebellum play in motor control. We obtained two major findings. First, the both structures contained neurons whose activity exhibit changes during motor preparation and execution periods. Second, the activities in VMT were more distinctly modulated in various phases of motor control than those in GPi. When VMT was stimulated optogenetically following channelrhodopsin (ChR2) expression, the terminal points of executed movements were more variable than control conditions. Those results suggest that VMT plays a more important role in motor preparation and execution, whereas GPi is more specialized for monitoring of intended movements, than for motor execution per se.

研究分野：神経生理学

キーワード：basal ganglia cerebellum motor control reaching neuronal activity optogenetics

1. 研究開始当初の背景

基底核疾患の代表例であるパーキンソン病では強直や振戦といった不随意運動以外に運動開始困難や内的誘導に基づく運動症状が著明であることがよく知られている。一方、小脳症状として指鼻試験に代表されるように、視覚誘導に基づく運動遂行に著しい障害が生じる。これらの知見は小脳が視覚誘導に基づく随意運動に、また大脳基底核が内的誘導に基づく随意運動にそれぞれ選択的役割を果たしていることを示唆している。さらに、サルにおいて基底核と小脳はそれぞれ分離した経路によって、基底核は補足運動野を中心とする大脳内側面の運動皮質に、また小脳は運動前野を中心とする大脳外側面の運動皮質に投射することが解剖学的に明らかにされている (Kemp & Powell 1972, Strick 1986 など)。サルと同様にヒトにおいて、小脳と大脳基底核は直接には下位運動中枢に出力しておらず、基底核と小脳とがそれぞれの標的となる大脳運動皮質との連関によって運動の制御と調節が行われていると考えられている。小脳系が視覚誘導性運動に、基底核系が内的誘導性運動にそれぞれ機能分担を有していることが、それらの運動課題を遂行するサルの基底核(特に基底核出力領域の淡蒼球内節)と小脳核(特に歯状核)それぞれの出力先である補足運動野および運動前野で、内的および視覚誘導性運動遂行時に選択的活動を示すニューロンが優位に存在すること (Kurata & Wise 1988 など) や、運動前野へのムシモル注入の効果 (Kurata & Hoshi 1999) などから、これらの機能連関の果す役割分担の考え方が支持されている。しかし、皮質下運動中枢と皮質運動領域の形成する機能連関が直接的に証明されてい

ない。

2. 研究の目的

本研究は、視覚誘導性および内的誘導性運動が大脳基底核と小脳に代表される皮質下運動中枢から大脳皮質への神経回路によってどのように制御・調節されているかを明らかにしようとした。そのため、視覚誘導性および内的誘導性運動課題をサルに課し、まず課題遂行中のサルの視床腹側核群および淡蒼球内節から著明なニューロン活動を記録・解析した上で、その領域にアデノ随伴ウィルスをベクターとしたチャンネルロドプシン (ChR2) をした。ChR2 光刺激によるオプトジェネティクスを行動課題のさまざまな局面においてミリ秒単位で与えた際の行動変化を解析することで、従来、ヒトを含む霊長類の小脳あるいは基底核疾患から推論されてきたこれらの随意運動機能に関する機能が、皮質運動野とどのように連関することによって発現・制御されているかを直接的に明らかにしようとした。

3. 研究の方法

2 頭のサルに二種類の手による到達運動課題を訓練した。サルの手運動は、デジタルタイザー上でサルの操作するマウスによってモニターした。サル眼前には 19' モニターを設置し、課題遂行用の視覚刺激等やマウスの位置を示すカーソルを呈示した。第一の課題は空間的視覚目標(右あるいは左)への視覚誘導性到達運動であり、第二は運動方向を示す視覚刺激は与えず、前回の試行で報酬が得られたかどうかで次の試行の運動方向を自分で決める内的誘導性課題とし、これら課題をブロック単位でサルに訓練した。

(1) 視覚誘導性課題ブロック

視覚誘導性課題はさらにふたつのタイ

プを用いる (Kurata & Wise 1988)。それぞれ小脳と基底核から優位な入力を有する運動前野腹側部と背側部の機能差を発見するのに有効であった (Kurata et al. 1994, 1999)。モニターには3つの白枠の正方形を呈示する。中央の正方形は保持領域、左右の正方形は目標領域である。サルがホールド領域にマウスを動かし、その位置を保持していると、一定の時間後に左あるいは右の目標領域が白で塗りつぶされる。これが視覚目標を空間的に示す指示信号である。または中央の保持領域が緑か黄に塗りつぶされると、それぞれ左あるいは右の正方形が目標領域を示す条件付き指示信号である。さらにそのまま2-4秒、保持領域を保っていると保持領域が青に変化した。これが運動開始のキューを示す。運動開始のキューが出てから500ミリ秒以内に運動を開始し、指示された目標領域に到達すると報酬を得る。4種類の指示信号は試行ごとにランダムに選択された。

(2) 内的誘導性課題ブロック

この課題は基底核から優位な入力を有する補足運動野の選択的機能を発見するのに有効であった (Kurata & Wise 1988)。初期条件は視覚誘導課題と同じであるが、中央の四角形等には運動開始を示す青が点灯するまで変化がなく運動方向は示されない。運動方向は前回の試行で、前回報酬が出た方を内的に記憶し、同じ側を選択すると報酬を出すようにした。報酬の出る側は5試行ごとに切り替え、サルが同一の到達目標を選択して報酬が得られない場合、他方の到達目標を選択するように訓練した。

(3) 視床腹側核および淡蒼球内節ウイルスベクター注入領域の決定

サルの訓練完了後、視床腹側核群およ

び淡蒼球内節からニューロン活動記録とマッピングを行い、ウイルス注入を正確に行った。大脳半球の正中部から一次運動野および運動前野が肉眼的に観察される領域の頭蓋骨領域を切除し、水平に記録用チェンバーを無菌手術により装着し。手術からの回復後、チェンバーから垂直に刺入するエルジロイ電極を用いて行動課題遂行中のニューロン活動記録を行った。まず、体性感覚応答とその体部位特異性から外側腹側核尾側部 (VPLc) を確認した。VPLcの手領域同定後、吻側へ記録部位を移動し、手運動に先行して活動するニューロン活動と微小電気刺激により、外側腹側核吻側部 (VPLo) を確認した。VPLoとその近傍は小脳と基底核からの両方が入っていることが解剖学的に知られており、VPLo手領域をウイルスベクター注入部位として決定した。決定後、ウイルスベクター注入用カニューレを留置し固定した。一方、淡蒼球内節の運動関連領域は視床VPLoと同レベルの深さで前方約5mmに存在することを確認しており、この領域から課題関連活動を記録した。

(4) 課題遂行下のオプトジェネティクス実験

アデノ随伴ウイルスをベクターとしてチャンネルロドプシン (ChR2) を淡蒼球内節に注入し、4週間の発現時間を置いた。その後、LED光源によりオプトジェネティクス実験を行った。行動課題遂行中の手運動のさまざまなパラメーター (反応時間、運動軌跡など) は訓練時から記録できるようにしておき、行動課題のあらゆる時点でミリ秒単位の刺激による運動遂行への効果を記録し解析した。

4. 研究成果

2頭のニホンザルの視床腹側核群およ

び淡蒼球内節から課題に関連するニューロン活動をそれぞれ 411 個および 236 個記録し、それらをオフライン解析した。運動課題に関連するニューロンには、運動の方向を示す指示信号の提示後、運動の開始まで持続的な活動のみられる準備関連活動、運動の開始から遂行にかけて活動の変化する運動関連活動、運動の終了後に活動の変化がみられるが報酬を得るための口の運動とは同期していないものなどが記録され、行動イベントに関連して多彩な活動がみられた。視床腹側核および淡蒼球内節を比較すると、準備関連活動および運動関連活動については視床腹側核群ニューロンの方がニューロン変化の程度および方向選択性のいずれも統計学的に有意に著明な活動をしていることが明らかとなった。新知見として、従来の淡蒼球内節からの記録では必ずしも明らかではなかった運動開始に先行するものが視床腹側核群にだけでなく淡蒼球内節にも存在する成果を得た。運動終了後に活動するものが、到達運動の方向の誤りや終点誤差を直接符号化しているかは必ずしも明らかではなかった。しかし、チャンネルロドプシンを視床腹側核群に注入して光刺激を行ったところ、到達目標まで手を動いた時点で刺激を行った時に運動終点の誤差が有意に増加するという明瞭な効果を得た。この結果は、基底核よりも小脳の出力が、運動の準備・実行に関わるとともに、両者の活動が視床において統合されることにより、運動が正しく遂行されているかのオンライン評価系として重要な役割を果たしていることを示唆している。

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2件)

Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, et al. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. *Neurosci. Res.*, 査読有, 93, 2015, 144-157. doi:10.1016/j.neures.2014.09.002.

Mochizuki Y, Kurata K, et al. *J. Neurosci.*, 査読有, 36, 2016, 5736-5747. doi:10.1523/JNEUROSCI.0230-16.2016.

〔学会発表〕(計1件)

Kurata K Comparison of Neuronal Activity in Globus Pallidus and Motor Thalamus of Monkeys during Motor Tasks The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. July 20-22. 2016, Pacifico Yokohama, (Yokohama)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~physio2/>

6. 研究組織
(1)研究代表者

蔵田 潔 (KURATA, Kiyoshi)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30170070

(2)研究分担者

木下 正治 (KINOSHITA, Masaharu)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60599083