

令和元年9月5日現在

機関番号：21601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26112002

研究課題名(和文)経路選択的な神経回路の操作・制御技術

研究課題名(英文)Technology for pathway-selective manipulation and control of neural circuit

研究代表者

小林 和人(Kobayashi, Kazuto)

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) 108,400,000円

研究成果の概要(和文)：本領域では、神経回路を操作し、解析するための新しい技術を駆使して、学習過程での神経回路の発達や遷移、回路の損傷に対する機能代償と再編成のメカニズムの解明に迫る学術領域の創成を目指した。この目的を達成するために、われわれの計画班では、経路選択的な回路機能の操作・制御技術の開発として、特にウイルスベクターを用いた光遺伝学・化学遺伝学の活用に取り組んだ。また、この技術を応用して、大脳皮質・基底核・視床神経回路を構成する細胞種や神経路について行動の獲得、実行、切り替えにおける役割を明らかにするとともに、学習過程で活動の変化する新たな領域の探索に挑み、回路機能シフト機構の解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路機能の障害は、さまざまな精神・神経疾患の発病や病態に深く関与するため、本領域で取り組む神経回路の機能シフトの研究は、学術的な重要性ばかりでなく、臨床医学的にも重要な意義を持つ。これらの研究成果は、高次脳機能障害の病態を発現するメカニズムについて神経回路レベルでの理解に結び付く。詳細な回路動態の解明は、特に、発達や学習の脳内機序の理解は、効果的な教育・訓練法の開発につながる可能性がある。さらに、特定の神経回路を操作する技術は、脳機能障害において変化する細胞種や神経路の活動を制御することによって、疾患や病態の改善を目指す新たな戦略の開発に繋がる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Here we applied our new strategy to manipulate specific neural types and pathways and to characterize dynamic changes of the neural circuit and aimed to elucidate the mechanisms underlying the development and transition of neural circuit during learning processes and the functional compensation of the circuit against neural injury. To achieve this purpose, our planned group focused on the development of the technology for the neural circuit control, in particular, through the application of optogenetic and chemogenetic approaches with viral vector system. In addition, we investigated the roles of specific cell types or neural pathways constituting the cortico-basal ganglia-thalamic network in behavioral acquisition, performance, and switching, and challenged to identify the brain regions in which the activity changes during the learning processes to elucidate the mechanisms underlying the functional shift of neural circuit.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：高頻度逆行性遺伝子導入 光遺伝学 化学遺伝学 刺激弁別学習 皮質基底核回路 機能シフト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経回路は、動物の発達や学習の段階に応じて、ダイナミックな遷移を繰り返すことが知られている。試行錯誤によって行動を学ぶオペラント学習において、行動を獲得する過程とそれを獲得した後に習慣的に実行する過程では、行動を媒介する回路が異なる。脳や脊髄の一部の損傷に対して訓練やリハビリテーションによって機能回復が認められる際、脳内では大規模な回路の再編が誘導される。このような遷移と再編を含めた回路の機能シフトは、環境変化に応じて行動を柔軟に調節するために、また、失われた機能を代償し、回復するために、動物にとって極めて重要な適応戦略であり、回路機能シフトは個体の生存や種の存続に必須である。しかし、そのメカニズムについては、これまでほとんど研究が進んでいなかった。この課題の解明のためには、神経回路を構成する単位である神経細胞や神経路の機能を操作し(回路操作)、脳全体の活動や行動がどのように変化するかを観察することが重要であり、その結果として、回路と機能の因果関係を明らかにすることが必要となる。

2. 研究の目的

これまでに、われわれの研究グループは、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターを開発し、特定神経回路の機能操作に結び付ける新規ツールを開発してきた。本研究では、これらのベクターの機能向上と光遺伝学や化学遺伝学への発展に取り組み、この技術を応用して大脳皮質 基底核 視床神経回路が学習の過程で機能変化を示す動態を例に、そのメカニズムの解明に迫ることとした。私たちが開発した特定の神経路の機能を操作する技術を動物モデルに利用し、さらに脳機能の画像化や計算論を専門とする他の計画研究班と連携し、学習過程で起こる回路の動態の変化の解明に挑んだ。さらに、われわれの技術を他班に提供し、領域内の共同研究を推進することにより、行動適応を担う様々な神経回路について機能シフトの機構の解明に応用した。

3. 研究の方法

高頻度逆行性遺伝子導入ベクターの機能向上のために、狂犬病ウイルス糖タンパク質(RV-G)と水泡性口内炎ウイルス(VSV-G)の断片から構成される融合型エンベロープ糖タンパク質の改変を行い、脳内においてより効率的な遺伝子導入を誘導できるベクターを探索した。次に、このベクターを用いて、光遺伝学用にチャンネルロドプシン(ChR2)を発現させ、光により神経活動を誘導できる実験系の確立を試みた。このシステムを用いて、視床線条体路の活性化とこの経路除去により標的部位に存在する神経細胞の活動への影響を解析した。化学遺伝学については、第一に、DREADD システムの抑制性の受容体を視床線条体路に発現させ、リガンド投与によって標的の神経細胞の活動が抑制できるかどうか、また、それによる行動への影響を解析した。新規の科学遺伝学システムとして、昆虫のイオン透過型受容体を用いた神経活動活性化システムを構築し、ウイルスベクターを用いた発現系の構築を試みた。学習過程での大脳皮質 基底核 視床回路の機能変化の機構を調べるために、第一に、特定の神経細胞種や神経路の機能に焦点をあてて、種々の学習の獲得、実行、切り替えにおける役割を解析した。ここでは、線条体コリン作動性介在細胞、側坐核ドーパミン受容体(D1 と D2 受容体)発現細胞、視床線条体細胞、皮質線条体細胞(とくに運動野に由来する)について、弁別学習、習慣行動形成、逆転学習や注意シフトについて解析した。学習過程の機能シフトに関わる未知の脳内領域を同定するために、尾上班と共同して、小動物用 PET を用いて、音弁別学習の獲得期において活動の変化する領域の探索を行った。また、種々のウイルスベクターを作製し、他の計画班・公募班に供給し共同研究を行った。

4. 研究成果

われわれの以前の研究結果から、高頻度な逆行性遺伝子導入ベクターにおいて最も効率良く遺伝子導入できる RV-G と VSV-G 断片の融合点を特定し、この融合糖タンパク質を FuG-E 型と名付けた。この融合点にあたる 440 番目のアミノ酸の至適化を行ったところ、これまでのセリン残基をグルタミン酸残基に置換することによって、さらに遺伝子導入の効率を高められることを見出し、この変異体を FuG-E(P440E)と名付けた(Kato et al., J. Neurosci. Methods)。今後の研究において、FuG-E(P440E)によりシュードタイプ化した高頻度逆行性遺伝子導入ベクターを利用することとした。ChR2 とインターロイキン-2 受容体 サブユニット(IL-2Ra)を発現する逆行性ベクターを作成し、線条体に注入することにより、視床線条体路へ遺伝子導入を行った。視床核のひとつである正中中心核(central lateral nucleus, CL)を光刺激することにより、線条体において興奮性の応答が認められること、また、CL へのイムノトキシンの注入によりこの経路が除去され、興奮性の応答が欠失することを確認し(Kato et al. Cell Rep.)。また、化学遺伝学のため

に、Cre 遺伝子を発現する逆行性ベクターを線条体に注入し、CL に組み換え依存性に hMD4i を発現する AAV ベクターを注入した。この結果、視床線条体細胞において選択的に hMD4i が発現することを確認し、スライス電気生理によりリガンド応答により神経活動の抑制が誘導されること、生体内へのリガンド投与によって、逆転学習や注意シフトの成績の障害が見出されることが明らかとなった (Kato et al., Cell Rep.)。スイス・ローザンヌ大学との共同研究により、ショウジョウバエのイオン透過型受容体を用いた標的神経細胞の活性化技術の開発を進め、ウィルスベクターを用いてこれらの受容体サブユニットを線条体の特定細胞に発現させる実験系を構築した。末梢からのリガンド投与系も構築し、現在、行動学的な解析および PET を用いたリガンドの結合様式などについて解析を進めている (投稿準備中)。

大脳皮質 基底核 視床回路を構成する細胞種および神経路の機能解析については、線条体コリン作動性介在細胞を選択的に除去し、空間弁別学習を用いて行動切り替えをテストした結果、この細胞の除去は逆転学習の亢進に帰結し、コリン介在細胞は行動切り替えの抑制に重要な役割を持ち (Okada et al., Nat. Commun.)、この機能は試行間のインターバル時間と関係し、課題条件で変化することも見出した (Okada et al., Eur. J. Neurosci.)。2 種類の側坐核投射細胞を選択的に除去し、薬物の繰り返し投与によって運動量が増加する行動感作の課題において、D1 受容体を持つ経路は、感作の初期に促進性の役割を持ち、D2 受容体を持つ経路はその後期に抑制性の役割を持つことを見出し、2 種類の投射系が異なる時間帯において双方向性に行動感作の形成を調節していることが明らかとなった (Kai et al., J. Neurochem.)。視床線条体路 (CL 由来) は、選択的な経路除去と化学遺伝学により、視覚弁別学習の実行と逆転学習、注意シフトを含めた行動切り替えに必須の役割を持つことを明らかにした (Kato et al., Cell Rep.)。この結果は、われわれが以前、別の視床核 (束傍核) 由来の線条体路機能を調べた結果との比較から、2 種類の視床線条体路は弁別学習に必要な時期が異なり、この経路を含むサブ神経回路が学習過程で機能的に変化していることが示唆された。皮質線条体路の機能については、一次運動野に由来する経路は、行動の習慣化に関わり、二次運動野に由来する経路は動機づけと関係することが示唆された (投稿準備中)。音弁別学習の獲得における活動パターン変化の解析については、学習前期には、線条体の前部の背外側領域が活性化し、学習が進むにつれて、線条体後部が活性化することが見出された。これらの領域は、これまでの研究から学習で変化することの指摘されてこなかった脳領域であり、学習の進行に新たな線条体領域が関わるという興味深い結果であった。今後、これらの活性化がどのような神経活動の変化によるかを電気生理学的に明らかにし、さらに、線条体への入力源や出力先の解析を、これまで開発した選択的な神経回路操作技術を用いて進める予定である。

以上、これまでの研究において、行動の種々のプロセスにおいて重要な役割を担う神経細胞種や神経路の役割を同定するとともに、これまで知られていなかった、学習に関係する新たな脳領域を見出した。学習に伴う神経回路の機能シフトの機構は、脳内の広い領域で連携して起こり、かなり複雑なステップを介していることが示唆された。今後、さらに研究を進め、学習の基盤となる脳内回路シフトの機構について、その全容の解明を目指したい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 34 件) 代表的な 20 件を記載する。

1. Okada, K., Nishizawa, K., Fukabori, R., Kai, N., Shiota, A., Ueda, S., Tsutsui, Y., Sakata, S., Matsushita, N., and Kobayashi, K. (2014) Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting of striatal cholinergic interneurons. **Nat. Commun.** 5: 3778. doi: 10.1038/ncomms4778.
2. Kai, N., Nishizawa, K., Ueda, S., and Kobayashi, K. (2015) Differential roles of the nucleus accumbens shell neurons containing dopamine D1 and D2 receptors in behavioral sensitization. **J. Neurochem.** 135: 1232-1241. doi: 10.1111/jnc.13380.
3. Ishida, A., Isa, K., Umeda, T., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Hida, H., and Isa, T. (2016) Causal link between the cortico-rubral pathway and functional recovery through forced impaired limb use in rats with stroke. **J. Neurosci.** 36: 455-467. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2399-15.2016.
4. Kobayashi, K., Kato, S., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K. (2016) Altering entry site preference of lentiviral vectors into neuronal cells by pseudotyping with envelope glycoproteins. **Methods Mol. Biol.** 1382: 175-186. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9_12.
5. Matsumoto-Makidono, Y., Nakayama, H., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Kobayashi, K., Watanabe, M., Kano, M., Sakimura, K. and Hashimoto, K. (2016) Ionic basis for membrane potential resonance in neurons of the inferior olive. **Cell Rep.** 16: 994-1004. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.053.

6. Tohyama, T., Kinoshita, M., Kobayashi, K., Isa, K., Watanabe, D., Kobayashi, K., Liu, M., and Isa, T. (2017) Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 114: 604-609. doi: 10.1073/pnas.1610787114.
7. Matsuda, T., Hiyama, T.Y., Nimura, F., Matsusaka, T., Fukamizu, A., Kobayashi, K., Kobayashi, K., and Noda, M. (2017) Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nat. Neurosci.** 20: 230-241. doi: 10.1038/nm.4463.
8. Kobayashi, K., Kato, S., and Kobayashi, K. (2018) Genetic manipulation of specific neural circuits by use of a viral vector system. **J. Neural Transm.** 125: 67-75. doi: 10.1007/s00702-016-1674-7.
9. Pignataro, D., Sucunza, D., Rico, A.J., Dopeso-Reyes, I.G., Roda, E., Rodríguez-Perez, A.I., Labandeira-Garcia, J.L., Broccoli, V., Kato, S., Kobayashi, K., and Lanciego, J.L. (2018) Gene therapy approaches in the non-human primate model of Parkinson's disease. **J. Neural Transm.** 125: 575-589. doi: 10.1007/s00702-017-1681-3.
10. Oh, Y.-M., Karube, F., Takahashi, S., Kobayashi, K., Takada, M., Uchigashima, M., Watanabe, M., Nishizawa, K., Kobayashi, K., and Fujiyama, F. (2017) Using a novel PV-Cre rat model to characterize pallidonigral cells and their terminations. **Brain Str. Funct.** 222: 2359-2378. doi: 10.1007/s00429-016-1346-2.
11. Morishima, M., Kobayashi, K., Kato, S., Kobayashi, K., and Yasuo Kawaguchi. (2017) Segregated excitatory-inhibitory recurrent subnetworks in layer 5 of the rat frontal cortex. **Cereb. Cortex** 27: 5846-5857. doi: 10.1093/cercor/bhx276.
12. Saiki, A., Sakai, Y., Fukabori, R., Soma, S., Yoshida, J., Yawo, H., Kobayashi, K., Kimura, M., and Isomura, Y. (2018) *In vivo* spiking dynamics of intra- and extratelencephalic projection neurons in rat motor cortex. **Cereb. Cortex** 28:1024-1038. doi: 10.1093/cercor/bhx012.
13. Kato, S., Fukabori, R., Nishizawa, K., Okada, K., Yoshioka, N., Sugawara, M., Maejima, Y., Shimomura, K., Okamoto, M., Eifuku, S., and Kobayashi, K. (2018) Action selection and flexible switching controlled by the intralaminar thalamic neurons. **Cell Rep.** 22, 2370-2382. doi: org.10.1016/j.cellrep.2018.02.016.
14. Okada, K., Nishizawa, K., Setogawa, S., Hashimoto, K. and Kobayashi, K. (2018) Task-dependent function of striatal cholinergic interneurons in behavioural flexibility. **Eur. J. Neurosci.** 47: 1174-1183. doi: 10.1111/ejn.13768.
15. Nonomura S, Nishizawa K, Sakai Y, Kawaguchi Y, Kato S, Uchigashima M, Watanabe M, Yamanaka K, Enomoto K, Chiken S, Sano H, Soma S, Yoshida J, Samejima K, Ogawa M, Kobayashi K, Nambu A, Isomura Y, Kimura M. (2018) Monitoring and updating of action selection for goal-directed behavior through the striatal direct and indirect pathways. **Neuron** 99, 1302-1314.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.002.
16. Kato, S., Sugawara, M., Kobayashi, K., Kimura, K., Inoue, K., Takada, M., and Kobayashi, K. (2019) Enhancement of the transduction efficiency of a lentiviral vector for neuron-specific retrograde gene delivery through the point mutation of fusion glycoprotein type E. **J. Neurosci. Methods** 311: 147-155. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.10.023.
17. Soma, S., Yoshida, J., Kato, S., Takahashi, Y., Nonomura, S., Sugimura, Y., Ríos, A., Kawabata, M., Kobayashi, K., Kato, F., Sakai, Y., and Isomura, Y. (2019) Ipsilateral-dominant control of limb movements in rodent posterior parietal cortex. **J. Neurosci.** pii: 1584-18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1584-18.2018.
18. Nomura, K., Hiyama T.Y., Sakuta, H., Matsuda, T., Lin, C.H., Kobayashi, Ke., Kobayashi, Ka., Kuwaki, T., Takahashi K, Matsui S, and Noda M. (2019) [Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Na_x Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a. **Neuron.** pii: S0896-6273(18)31008-0. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.017.
19. Sakayori N., Kato, S., Sugawara, M., Setogawa, S., Fukushima, H., Ishikawa, R., Kida, S., and Kobayashi, K. (2019) Motor skills mediated by cerebellothalamic tracts projecting to the central lateral nucleus. **Mol. Brain** 12: 13. doi: 10.1186/s13041-019-0431-x.
20. Kinoshita, M., Kato, R., Isa, K., Kobayashi, Ke., Kobayashi, Ka, Onoe, H., and Isa, T. (2019) Dissecting the circuit for blindsight to reveal the critical role of pulvinar and superior colliculus. **Nat. Commun.** 10: 135. doi: 10.1038/s41467-018-08058-0.

[学会発表](計 58 件) 代表的な 15 件を示す。

1. 小林和人、加藤成樹、行動の選択と柔軟性を制御する視床線条体システム、第 37 回日本神経科学学会、2014 年 9 月 11 日、横浜
2. 小林和人、行動の選択と柔軟性を制御する神経ネットワーク：線条体入力系の役割、第 87 回日本生化学会、2014 年 10 月 17 日、京都
3. 小林和人、線条体コリン作動性介在ニューロンを介する行動柔軟性の制御、解剖学会・生理学会合同大会 2015、2015 年 3 月 23 日、神戸

4. Kazuto Kobayashi, Shigeki Kato, Selective elimination of basal ganglia pathways in animal models, 16th Biennial Meeting of the Spanish Society for Neuroscience, 2015/9/23-25, Granada.
5. 小林 和人, 環境刺激に適応する大脳基底核回路のメカニズム、第 45 回日本精神神経薬理学会、2015 年 9 月 24 日-25 日、船橋
6. 西澤佳代、小林和人, 行動感作を媒介する神経回路メカニズム, 第 89 回日本薬理学会, 2016 年 3 月 9 日 - 11 日, 横浜
7. Nishizawa, K., Fukabori, R., Okada, K., Uchigashima, M., Watanabe, M., Shiota, A., Ueda, M., Tsutsui, Y., Kobayashi, K. Dorsal striatal indirect pathway modulates the response selection accuracy in performance of an auditory conditional discrimination task. Dopamine 2016, 2016/9/5-8, Vienna.
8. Kato, S., and Kobayashi, K. Comparative study of gene transduction efficiency for retrograde gene transfer lentiviral vector with novel envelope glycoproteins, 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2016/11/12-16, San Diego.
9. Kobayashi, K. Roles of striatal cholinergic interneurons revealed by genetic cell targeting. OIST minisymposium “Cholinergic mechanisms in adaptive behavior”, 2016/4/14-15, Onna-son.
10. Kobayashi, K., Iguchi, Y., Nishizawa, K. Coordinated expression of learned behavior. 20th Annual Meeting for International Behavioral Neuroscience Society. 2017/6/26-30, Hiroshima.
11. Kobayashi, K. Controlling stimulus-response learning through striatal direct and indirect pathways. 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/7/20-23, Makuhari.
12. 小林和人、選択的経路標的法による回路機能の解析、平成 29 年度日本アルコール・薬物依存関連学会合同総会・第 52 回日本アルコール・アディクション医学会学術集会、2017 年 9 月 8 日 9 日、横浜。
13. Iguchi, Y., Nishizawa, K., Kato, S., Kobayashi, K. A chemogenetic approach to elucidate the role of the striatopallidal neurons in the performance of operant auditory discrimination. 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017/7/20-23, Makuhari.
14. Kato, S., Kobayashi, K. Behavioral selection and switching flexibility regulated by the thalamostriatal circuit. 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2018/7/26-29, Kobe.
15. Setogawa, S., Okauchi, T., Hu, D., Shigeta, M., Hayashinaka, E., Onoe, K., Wada, Y., Hikishima, K., Onoe, H., Cui, Y., Kobayashi, K. Dynamic shift of striatal activation pattern during acquisition of an auditory discrimination task. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2018, 2018/11/3-7, San Diego.

〔図書〕(計 1 件)

1. 佐野裕美、小林和人、南部篤、大脳基底核による運動制御と病態生理、分子脳科学、化学同人(三品昌美編), pp. 44-55 (2015).

〔その他〕ホームページ: <https://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：加藤 成樹

ローマ字氏名：Shigeki Kato

研究協力者氏名：深堀 良二

ローマ字氏名：Ryoji Fukabori

研究協力者氏名：西澤 佳代

ローマ字氏名：Kayo Nishizawa

研究協力者氏名：井口 善生

ローマ字氏名：Yoshio Iguchi

研究協力者氏名：瀬戸川 将

ローマ字氏名：Susumu Setogawa

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、研究者個人に帰属されます。