

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15340

研究課題名(和文) 大脳皮質 - 基底核ループにおける神経活動代替システムの確立

研究課題名(英文) Extrinsic substitution for neuronal activity in the cortico-basal ganglia-thalamic loop.

研究代表者

長谷川 拓 (Hasegawa, Taku)

生理学研究所・システム脳科学研究領域・特任研究員

研究者番号：90713256

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)：大脳基底核は運動の制御に関わると信じられているが、実際にどのように運動を制御しているのかは明らかではない。本研究では、神経細胞の活動を薬剤投与によって可逆的に制御する化学遺伝的手法を大脳基底核の視床下核と呼ばれる小領域に適用した。視床下核の活動を抑制すると、反対側の前肢に不随意運動が現れ、滑らかな運動がぎこちなくなった。その時の大脳基底核の出力の神経発火を計測すると、発火頻度はほぼ変わらないものの、神経活動パターンが不規則になった。この結果は大脳基底核の視床下核はその出力を規則的にすることで滑らかな運動を実現していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳基底核の障害は運動が寡少になるパーキンソン病や、逆に過剰な運動が起きるハンチントン病やヘミバリスムがある。しかし、どのような神経活動の変化が運動障害を引き起こすかは明かではなかった。本研究は、ウイルスベクターと人工遺伝子を用いて、ヘミバリスム様の不随意運動を可逆的にかつ繰り返し誘導することに成功した。その不随意運動の最中に神経活動を計測することによって、大脳基底核が運動制御を行うメカニズムの新たな仮説を提唱するに至った。今後、障害によって異常になった神経活動を正常化することによる病気の治療へと発展させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The basal ganglia is believed to play a role in motor control; however, it is not clear how the neural activity in the basal ganglia affects movements. In the present study, a chemogenetic tool, a method to control neural activity reversibly and repeatedly, was applied to the subthalamic nucleus, a small region of the basal ganglia. The suppression of the subthalamic nucleus induced involuntary movements on the contralateral forelimb and smooth movements became difficult. Electrophysiological recordings during the abnormal movements revealed only a little change in the firing rate of the output of the basal ganglia, but firing pattern became irregular. This results suggest that the subthalamic nucleus of the basal ganglia regularizes the output of the basal ganglia to achieve smooth movements.

研究分野：脳神経科学

キーワード：運動障害 大脳基底核 視床下核 分子遺伝学的手法

1. 研究開始当初の背景

古典的な大脳基底核のモデルでは運動を促進する直接路と抑制する間接路のアンバランスが大脳基底核の異常による運動障害を引き起こすと説明されてきた (Fig. 1)。このモデルによると、パーキンソン病では、ドーパミン作動性神経細胞の脱落が線条体のドーパミン D1/D2 受容体を介して直接路の出力を減弱させ、間接路を亢進させることで、大脳基底核の出力核である淡蒼球内節の発火頻度を上昇させることで運動が寡少になると考えられる。逆に、過剰な運動を示すハンチントン病やヘミバリスムはそれぞれ線条体の D2 受容体を発現する神経細胞の脱落や視床下核の損傷によって間接路の活動が減弱され、淡蒼球内節の活動が上昇することで起きると考えられる。しかしながら、病態モデル動物から電気生理学的に記録した報告によると、淡蒼球内節の発火頻度は必ずしもモデルの予想と一致しない。さらに、パーキンソン病では大脳基底核の神経細胞が同期した振動現象を示すことが知られており、病態への関与が示唆されている。

視床下核は間接路と大脳皮質からの直接投射であるハイパー直接路を担い、運動制御に重要な役割があると考えられている。視床下核の損傷は反対側の手足に不随意運動を誘導するが、パーキンソン病の患者において視床下核を損傷または高頻度の電気刺激をすることで運動寡少の症状が改善する。古典的なモデルでは視床下核が淡蒼球内節の発火頻度を上昇させることで運動を抑制すると考えられるが、運動実行の際に視床下核の活動が上昇することや、薬理学的手法による視床下核の活動上昇は反対側の運動を上昇させることが報告されている。従って、単純に視床下核が淡蒼球内節の発火頻度を上昇させることで運動を抑制するとは考えにくく、視床下核がどのように運動制御を行っているかは明らかではない。

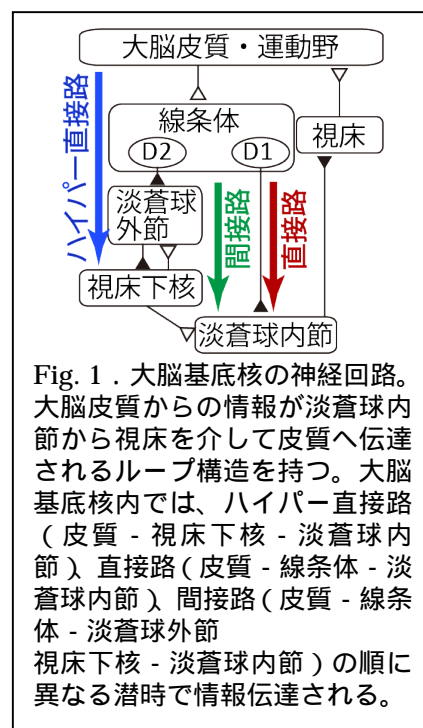


Fig. 1. 大脳基底核の神経回路。大脳皮質からの情報が淡蒼球内節から視床を介して皮質へ伝達されるループ構造を持つ。大脳基底核内では、ハイパー直接路 (皮質 - 視床下核 - 淡蒼球内節) 直接路 (皮質 - 線条体 - 淡蒼球内節) 間接路 (皮質 - 線条体 - 淡蒼球外節 - 視床下核 - 淡蒼球内節) の順に異なる潜時で情報伝達される。

2. 研究の目的

大脳基底核の運動制御の神経メカニズムとして以下のものが提唱されている。

神経発火頻度の変化によって運動の促進と抑制を行う (発火頻度仮説)。

神経発火が特定の周波数で振動することにより、伝達される情報を制御する (同期活動仮説)。

神経細胞が運動の際に、興奮 - 抑制 - 興奮のような活動パターンを生成し、特定のタイミングにのみ運動実行を行う (タイミング仮説)。

このように大脳皮質 - 基底核ループにおいてどのように神経発火列が情報を符号化し、運動制御を行っているのかは明らかではない。既存の計測技術や神経活動操作技術では仮説を証明することは困難であり、新たな実験アプローチが期待されている。

本研究では、Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD) と光遺伝学的手法を組み合わせ、一部の神経核の活動を光刺激によって代替する神経活動代替システムを開発する。このシステムを大脳基底核の淡蒼球内節と視床下核に適用し、運動制御を担う神経発火列の符号化様式を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の目的は、分子遺伝学的手法を駆使して上記の仮説を検証する。まず、化学遺伝学的手法によって特定の神経核の活動を抑制し運動異常を引き起こす。次に、オプトジェネティクスによって抑制された神経活動を任意の発火パターンで刺激を行う。運動異常が正常化する刺激パターンを探索することで、その神経核が運動制御に必要な活動を調べる。

間接路に位置する視床下核は部分的な損傷でも運動障害を示すことが知られており、運動制御に深い関わりがあると考えられる。視床下核の損傷は不可逆的であり、それに伴う神経活動の変化を調べることは難しい。従って、視床下核に対し化学遺伝学的手法による神経活動の抑制と、オプトジェネティクスによる神経活動の代替を試みた。

3頭のマカクザルに到達行動課題をトレーニングし、視床下核の特に運動関連領域を大脳皮質運動野への電気刺激によって同定した。アデノ随伴ウイルスベクターによって抑制型の DREADD 受容体 hM4Di を視床下核の運動関連領域に発現させ、リガンドの全身投与による行動変化を調べた。また、多点マルチ電極によって視床下核及びその投射先である淡蒼球内節と外節において複数の神経細胞の単一神経活動を同時記録した。

さらに hM4Di とチャンネルロドプシンと同様に光に応じて神経発火を引き起こす Chronos¹

を共発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。ラットの視床下核へ注入し、リガンドの全身投与による活動抑制と光刺激による任意の活動パターンの導入を行った。

4. 研究成果

(1) DREADD による視床下核の活動抑制と大脳皮質 - 基底核路の神経伝達の減弱

単一神経活動を記録しながら、DREADD 受容体のリガンドの Clozapine-N oxide (CNO) または新規リガンドである Deschloroclozapine (DCZ)² を投与した。CNO の投与後 15 分、DCZ の投与後 5 分から視床下核の神経活動が減少し、平均発火頻度が 70% ほどになった (Fig. 2A)。また、大脳皮質運動野への電気刺激を行い、大脳皮質 - 基底核路の神経伝達の効率をリガンド投与前後で調べた (Fig. 2B)。淡蒼球内節と外節において視床下核を介するハイパー直接路の応答強度が減少し、直接路の応答強度が上昇した。神経発火頻度及び神経伝達共に減少する傾向が見られたが、視床下核の活動は完全に抑制されず、減弱するに留まった。

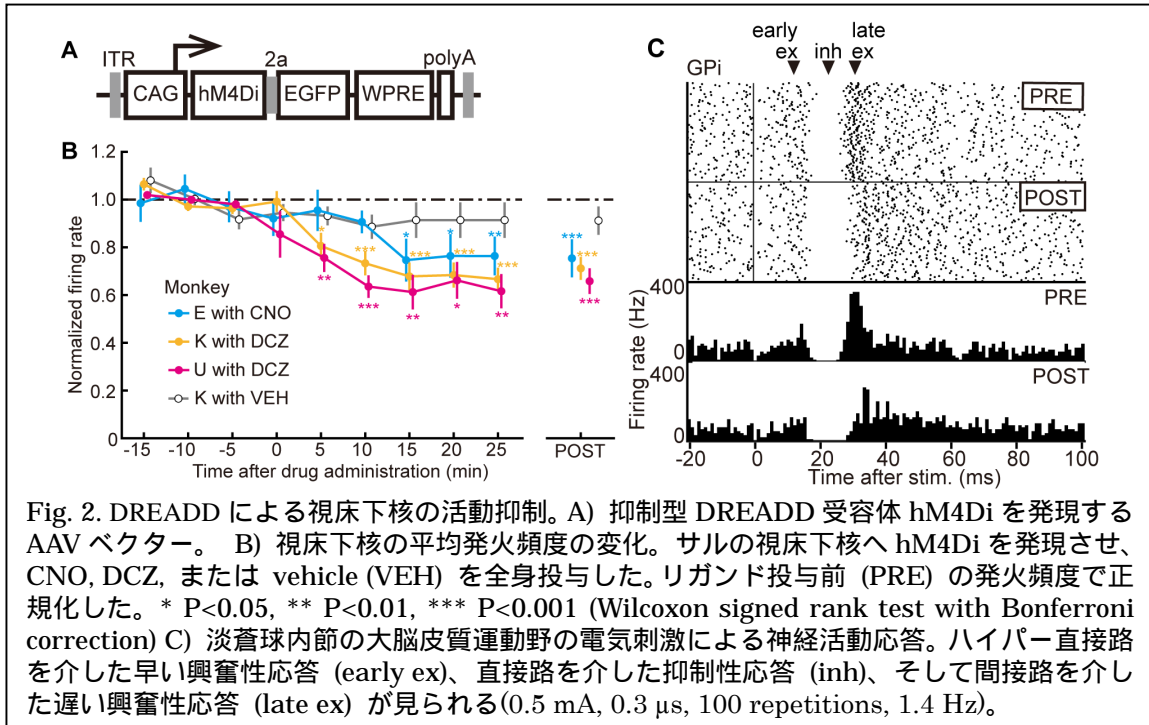


Fig. 2. DREADD による視床下核の活動抑制。A) 抑制型 DREADD 受容体 hM4Di を発現する AAV ベクター。 B) 視床下核の平均発火頻度の変化。サルの視床下核へ hM4Di を発現させ、CNO, DCZ, または vehicle (VEH) を全身投与した。リガンド投与前 (PRE) の発火頻度で正規化した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Wilcoxon signed rank test with Bonferroni correction) C) 淡蒼球内節の大脳皮質運動野の電気刺激による神経活動応答。ハイパー直接路を介した早い興奮性応答 (early ex)、直接路を介した抑制性応答 (inh)、そして間接路を介した遅い興奮性応答 (late ex) が見られる (0.5 mA, 0.3 μ s, 100 repetitions, 1.4 Hz)。

(2) 異なる化学遺伝学的手法の検討

(1) の結果より hM4Di では神経活動を完全に抑制させることが困難であることが確認された。これは、リガンド投与後も本来の神経活動が残っており、運動異常の解釈を困難になることが考えられる。従って、異なるメカニズムの化学遺伝学的手法を試みた。hM4Di は G 蛋白を介した細胞内メカニズムで神経活動を抑制するが、イオンチャネル型の化学遺伝学的手法 Pharmacologically selective actuator module (PSAM4)³ が報告された。抑制型の PSAM4 を発現するウイルスベクターを作製し (Fig. 3A)、マカクザルの視床下核に投与し、運動異常と神経活動の抑制を計測した (Fig. 3B)。しかしながら、リガンドの varenicline の全身投与による神経活動の減少は見られず、DREADD がより効率的に神経活動を抑制するとの結果が得られた。

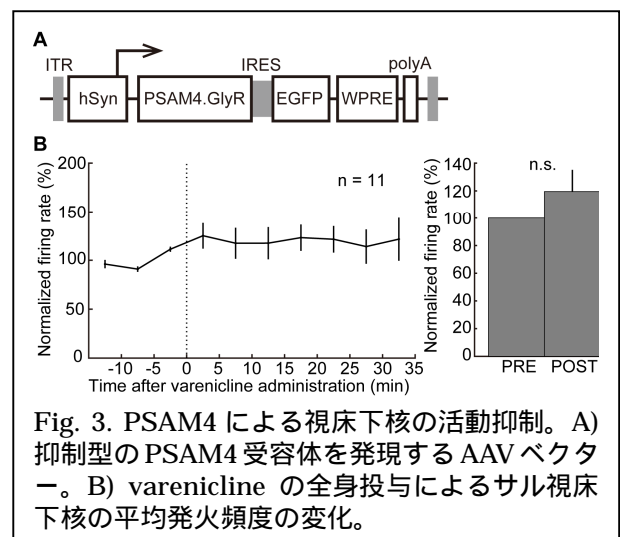


Fig. 3. PSAM4 による視床下核の活動抑制。A) 抑制型の PSAM4 受容体を発現する AAV ベクター。 B) varenicline の全身投与によるサル視床下核の平均発火頻度の変化。

(3) 視床下核の活動抑制による運動異常。

DREADD による視床下核の神経活動抑制によって反対側の手に不随意運動が見られ、到達運動課題における運動の実行が不安定になった。これまでの損傷実験や薬理学的的手法による抑制による視床下核の活動抑制と同様の報告であり、DREADD によって再現できたとと言える。

(4) 行動中の大脳基底核の神経活動

マカクザルの行動タスク中に淡蒼球内節、淡蒼球外節、そして視床下核の運動関連領域から単一神経活動記録を行った。運動実行の際には全ての神経細胞から活動変化が見られたが、行動タスクによる神経活動の差はみられなかった。このことから、大脳基底核の運動関連領域は運動遂行には関わるが、運動準備には関与しないことが示唆された。また、運動遂行の際に淡蒼球内節・外節では興奮性と抑制性の活動変化を示す神経細胞が約半数ずつ見られたものの、視床下核においては興奮性の応答を示す神経細胞が多い傾向にあった (73%; n = 32/44)。

DREADD による視床下核の活動抑制によって大脳基底核の出力核である淡蒼球内節にどのような活動変化が起きたかを調べた (Fig. 4)。運動に関連した活動変化にはほぼ変化がなく (Fig. 4A, B)、平均発火頻度や周波数特性にもリガンド投与前後で差が見られなかった (Fig. 4C, D)。しかし、神経発火の試行間変動の指標である Fano factor は有意に上昇した (Fig. 4E)。この結果から、異常な運動は淡蒼球内節の平均発火頻度や周波数特性の変化ではなく、活動パターンの変化によって引き起こされたと考えられる。視床下核が大脳基底核の出力である淡蒼球内節の活動パターンを安定化することで、滑らかな運動実行を可能になるといった神経メカニズムの提唱に至った。

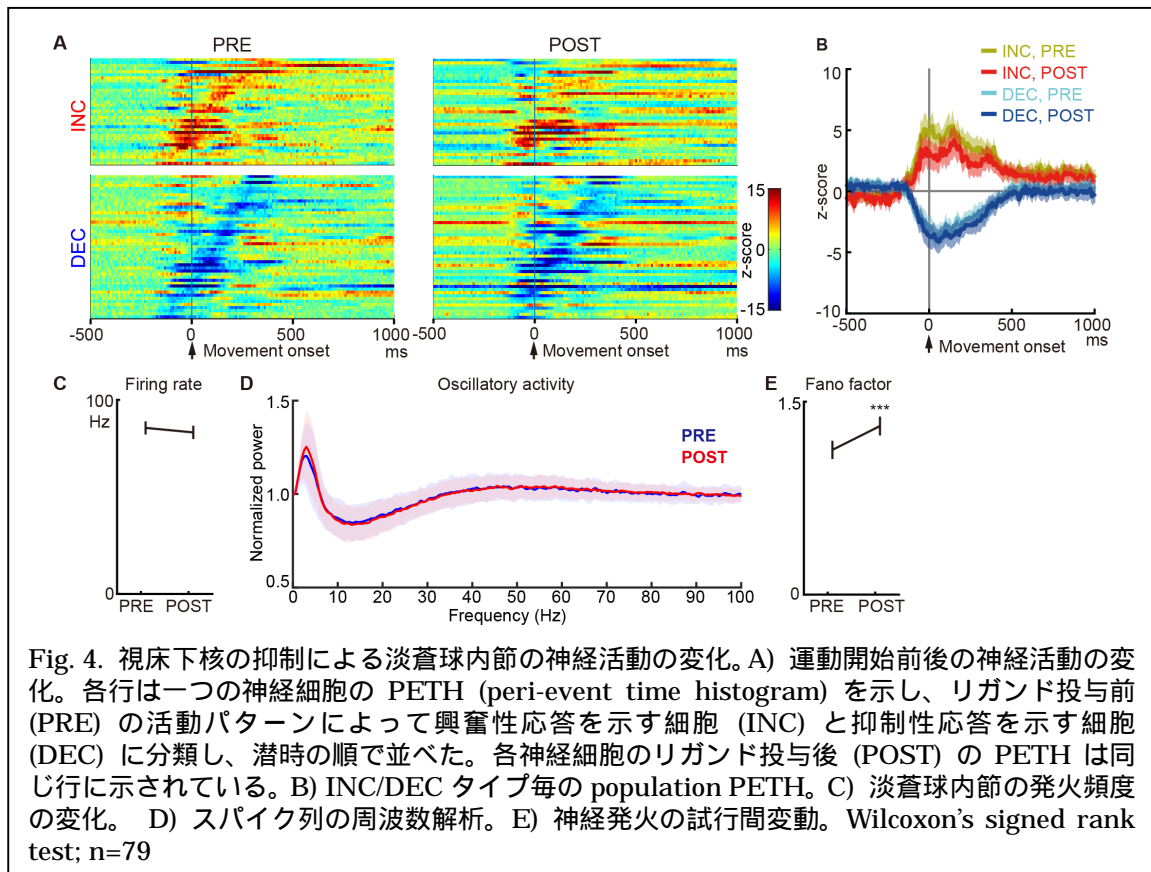


Fig. 4. 視床下核の抑制による淡蒼球内節の神経活動の変化。A) 運動開始前後の神経活動の変化。各行は一つの神経細胞の PETH (peri-event time histogram) を示し、リガンド投与前 (PRE) の活動パターンによって興奮性応答を示す細胞 (INC) と抑制性応答を示す細胞 (DEC) に分類し、潜時の順で並べた。各神経細胞のリガンド投与後 (POST) の PETH は同じ行に示されている。B) INC/DEC タイプ毎の population PETH。C) 淡蒼球内節の発火頻度の変化。D) スパイク列の周波数解析。E) 神経発火の試行間変動。Wilcoxon's signed rank test; n=79

(5) 光駆動型陽イオンチャンネルとの共発現

現状最も効果的に神経活動を抑制させると考えられる hM4Di と高頻度の光刺激に対して応答する Chronos を共発現させるウイルスベクターを作製した (Fig. 5)。ラットの視床下核にウイルスベクターを注入し、リガンドの全身投与によって反対方向の運動が誘導することが確認できた。現在、光刺激と組み合わせ、運動異常を改善する光刺激条件の探索を行っている。

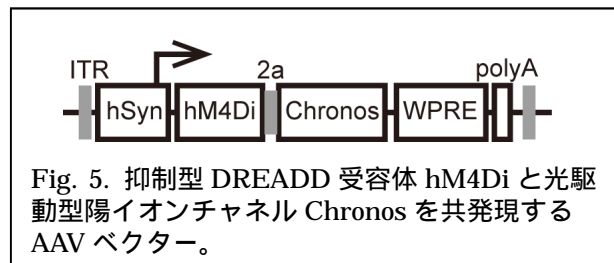


Fig. 5. 抑制型 DREADD 受容体 hM4Di と光駆動型陽イオンチャンネル Chronos を共発現する AAV ベクター。

REFERENCE

1. Ronzitti, E. *et al.* Submillisecond Optogenetic Control of Neuronal Firing with Two-Photon Holographic Photoactivation of Chronos. *J Neurosci* **37**, 10679–10689 (2017).
2. Nagai, Y. *et al.* Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat. Neurosci.* **23**, 1157–1167 (2020).
3. Magnus, C. J. *et al.* Ultrapotent chemogenetics for research and potential clinical applications. *Science* **364**, eaav5282 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa, T., Chiken, S., Kobayashi, K., Nambu, A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Subthalamic nucleus stabilizes movements by reducing neural spike variability in monkey basal ganglia: chemogenetic study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.04.13.439559v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taku Hasegawa
2. 発表標題 Chemogenetics to decipher the functional role of the subthalamic nucleus in Macaque monkeys
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会サテライトシンポジウム 「大脳基底核の機能と疾患の新たな理解：基礎と臨床」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taku Hasegawa
2. 発表標題 The chemogenetic suppression of the primate subthalamic nucleus impairs voluntary movements by disturbing the firing pattern in the internal segment of the globus pallidus.
3. 学会等名 Neuroscience 2018 - Society for Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------