

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16264

研究課題名（和文）環境に依存して行動を制御する線条体直接路・間接路の機能の解明

研究課題名（英文）Clarification of the functions of striatal direct and indirect pathways that regulate behavior in dependence on the environment.

研究代表者

西澤 佳代（Nishizawa, Kayo）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30644108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：背外側線条体（dorsolateral striatum: DLS）と背内側線条体（dorsomedial striatum: DMS）より構成される線条体は、弁別学習の調節に重要であることが知られている。しかしながら、弁別学習におけるDLSまたはDMSに由来する線条体直接路のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、このメカニズムを明らかにする為に必要な基盤技術について研究開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において我々は、直接路の選択的除去に必要な基盤技術開発に成功した。このような弁別学習を媒介する背側線条体のニューロンタイプを同定した上での機能の解明は現在までになく、本研究によって得られた知見は、パーキンソン病を代表する高次機能障害に対する新しい治療法の確立につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The dorsal striatum, which contains the dorsolateral striatum (DLS) and dorsomedial striatum (DMS), regulates the discrimination learning. However, the mechanism of striatal direct pathways derived from DLS or DMS in discrimination learning remains unclear. In this study, we investigated and developed the basic technology necessary to clarify this mechanism.

研究分野：神経科学

キーワード：背側線条体 直接路 間接路 弁別学習

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトの日常行動の多くは道具的行動の特徴を有する。道具的行動とは、目的を達成するための道具として機能する行動である。道具的行動では、様々な環境刺激に対する適切な“識別”が要求され、識別は“弁別”とも呼ばれる。2種類以上の刺激弁別が要求されるような課題を学ぶ事を“弁別学習”と言い、弁別学習は、正の刺激に対しては強化を与え、負の刺激には強化を与えない。つまり、正の刺激に対してのみ反応させる学習様式である。高次な注意障害やスピードを要求される認知情報の処理障害といった“弁別”に対する障害がパーキンソン病患者において報告されており (Brown et al., 1973; Canavan et al., 1989; Sahakian et al., 1998)、弁別学習の解析をする事で、迅速かつ正確な選択といった情報処理能力の有無を判断する事が可能となる。

近年、弁別学習の獲得や実行において“背側線条体”の関与が報告されており (Robbins et al., 1990)、背側線条体は、皮質からの入力の違いによって主に“背外側線条体” (dorsolateral striatum: DLS) と“背内側線条体” (dorsomedial striatum: DMS) の2領域にわけられる。単純弁別学習の獲得過程には DLS 領域が、実行過程には DLS と DMS の両領域の関与が報告されている (Featherstone et al., 2004; 2005)。さらに申請者の DLS または DMS の興奮性グルタミン酸作動性神経毒注入による破壊実験結果からも、それぞれの領域が条件つき弁別の学習過程において異なった役割を担っている事が示唆されている (未発表)。また背側線条体から投射する神経細胞の大部分は GABA 作動性神経細胞で、ドーパミン D₁ 受容体 (D₁R)、またはドーパミン D₂ 受容体 (D₂R) を発現するものに大別される。背側線条体の D₁R 陽性細胞は、黒質に投射し線条体直接路を形成する。一方、D₂R 陽性細胞は、淡蒼球に投射し線条体間接路を形成する。従来の研究では神経毒投与によって、D₁R 陽性細胞や D₂R 陽性細胞を区別する事なく神経細胞全体を破壊し、背側線条体の弁別学習における役割が検討されていた。しかし、この方法では背側線条体に局在するすべての神経細胞が破壊され、各々の神経細胞がどのような機能を分担し、それらが統合されて正常な機能が実現されるメカニズムを明らかにする事が極めて困難であった。その為、背側線条体から投射する2種類の経路における弁別学習に対する役割と機能分化については十分な知見が得られていない。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室では、イムノトキシン細胞標的法 (immunotoxin-mediated cell targeting, IMCT) として、遺伝子発現の特異性に基いて特定の神経細胞タイプを誘導的に損傷させる技術を開発した (Kobayashi et al., 2012)。イムノトキシン (IT) は、ヒトインターロイキン-2 受容体の α サブユニット (IL-2R α) に対するモノクローナル抗体の可変部位を含み、かつ緑膿菌の菌体外毒素との融合タンパク質であり、IL-2R α を発現させた動物に IT を注入すると、IT は IL-2R α を含有する標的細胞タイプに取り込まれ、この細胞タイプの選択的な損傷が誘導される。本研究では IMCT を用いる事により、DLS または DMS から由来する直接路だけを選択的に損傷する為に必要な基盤技術について研究開発を行った。

3. 研究の方法

(1) Tac1-Cre ラットの解析

線条体黒質路を構成する GABA 作動性神経細胞に、D₁R 陽性細胞と同じく、選択的に発現する P 物質前駆体 (tachykinin, Tac1) に注目し、Tac1 陽性細胞特異的に Cre 酵素を発現する (Tac1-Cre) ラットを作製した。ラットは 10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、固定液に一晩浸漬し、10、20、30% スクロース液含 PB にて洗浄、-80 にて凍結した。凍結脳は厚さ 30 μ m で薄切し、免疫組織化学染色法を用いて、D₁R、D₂R、及び Cre を標識し、超解像顕微鏡 (Nikon 社製 A1-SIM) を用いて観察した。

(2) IL-2R α の発現誘導

Tac1 陽性細胞特異的に IL-2R α を発現させる為、Cre 依存的に IL2R-GFP を発現誘導するアデノ随伴ウイルスベクターを開発した。Tac1-Cre ラットの頭部を脳定位固定装置に保定し、頭蓋骨の一部を剥離後、ベクターを充填したガラスキャピラリーを用いて、ラットの線条体にベクターを注入した。ベクター注入手術から 2 週間後、10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定した後、固定液に一晩浸漬し、10、20、30% スクロース液含 PB にて洗浄、-80 にて凍結した。凍結脳は厚さ 30 μ m で薄切し、免疫組織化学染色法を用いて、D₁R、D₂R、及び GFP を標識し、超解像顕微鏡 (Nikon 社製 A1-SIM) を用いて観察した。

(3) D₁R 陽性細胞の選択的損傷

Tac1 陽性細胞を選択的に損傷する為、ベクター注入手術から 2 週間後、線条体へ IT の注入手術を行った。IT 注入手術から 2 週間後、ラットの脳摘出を行い、脳は -80 にて凍結した。凍結脳は、厚さ 10 μ m で薄切し、in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、D₁R 及び D₂R の mRNA を可視化し、正立型蛍光顕微鏡 (Leica 社製 CTR6000) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) Tac1-Cre ラットの解析

Tac1-Cre ラットの線条体において、Tac1 陽性細胞特異的に Cre が発現している事を確認出来た (図 1)。スケールバー：20 μ m。

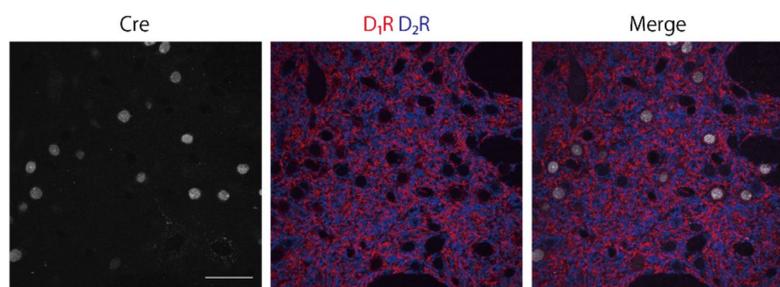


図 1 Tac1-Cre ラットの解析

(2) IL-2R α 発現の確認

Tac1-Cre ラット線条体に IL-2R α /GFP を発現誘導するアデノ随伴ウイルスベクターを注入した結果、Tac1 陽性細胞特異的に IL-2R α が発現する事を確認できた (図 2)。スケールバー：20 μ m。

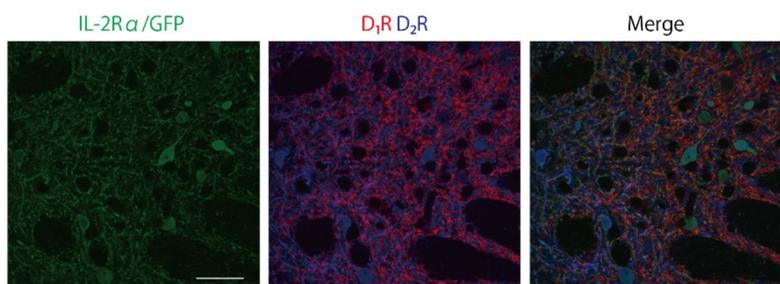


図 2 IL-2R α 発現の確認

(3) D₁R 陽性細胞の選択的損傷の確認

Tac1-Cre ラットの線条体に IL-2R α /GFP を発現させ、その2週間後 IT を注入し、D₁R 及び D₂R 陽性シグナルを解析した結果、D₁R 陽性細胞の選択的な除去が誘導された (図3左)。スケールバー：1 mm。

今後、DLS または DMS から由来する直接路の選択的損傷が、弁別学習に及ぼす影響について解析する予定である。

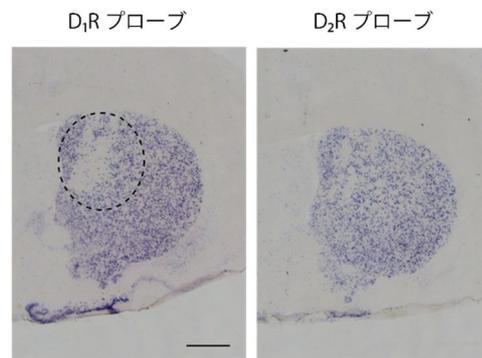


図3 IT注入後のD₁R及びD₂R陽性細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsushita Natsuki, Kato Shigeki, Nishizawa Kayo, Sugawara Masateru, Takeuchi Kosei, Miyasaka Yoshiki, Mashimo Tomoji, Kobayashi Kazuto	4. 巻 3
2. 論文標題 Highly selective transgene expression through the flip-excision switch system by using a unilateral spacer sequence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100393 ~ 100393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100393	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Matsushita Natsuki, Nishizawa Kayo, Kato Shigeki, Iguchi Yoshio, Fukabori Ryoji, Takeuchi Kosei, Miyasaka Yoshiki, Mashimo Tomoji, Kobayashi Kazuto	4. 巻 381
2. 論文標題 Catecholaminergic cell type-specific expression of Cre recombinase in knock-in transgenic rats generated by the Combi-CRISPR technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109707 ~ 109707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneumeth.2022.109707	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kato Shigeki, Nishizawa Kayo, Kobayashi Kazuto	4. 巻 15
2. 論文標題 Thalamostriatal System Controls the Acquisition, Performance, and Flexibility of Learning Behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Systems Neuroscience	6. 最初と最後の頁 729389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnsys.2021.729389	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Okada Kana, Nishizawa Kayo, Kobayashi Tomoko, Sakata Shogo, Hashimoto Kouichi, Kobayashi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Different cholinergic cell groups in the basal forebrain regulate social interaction and social recognition memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93045-7	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西澤佳代
2. 発表標題 条件付き弁別学習の獲得過程において活動変化を起こす線条体垂領域へ投射する視床領域の同定
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西澤佳代
2. 発表標題 Identification of the thalamic areas that innervate striatal subregions showing functional shifts during the acquisition of conditional discrimination learning
3. 学会等名 2021年度新学術領域研究学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西澤佳代
2. 発表標題 Behavioral roles of the striatal output pathway from the dorsal striatum in the discrimination task
3. 学会等名 2020年度新学術領域研究学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020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
---------	---------