

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700344

研究課題名（和文） 大脳基底核の行動制御機構における分子基盤に関する研究

研究課題名（英文） The study of molecular basis underlying the motor control in the basal ganglia.

研究代表者

有村 奈利子（ARIMURA NARIKO）

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：20420375

研究成果の概要（和文）：

脳を構成する神経細胞群の特性と神経回路の構成を知ることは、多様な脳機能や脳神経系疾患を理解する上で極めて重要である。しかし気分や行動等の高度な脳高次機能において、どのような遺伝子発現パターンを持った細胞集団が、複数の細胞集団とどのような分子基盤で相互作用をし、それぞれの神経回路にどのような生理的機能をもたらすかについての、網羅的な解析は未だ報告がない。本研究課題では、気分や行動を制御する大脳基底核の出力部である淡蒼球の神経核の遺伝子発現解析を行う。

研究成果の概要（英文）：

It is essential to understand the property of neural population consisting of the brain and the constitution of neural network in familiarization with the variety of brain function and the nerve disease. However, in the higher brain function including the mood and motor control, it still lacks the global analysis to reveal what kinds of neuronal populations showing the unique gene expression patterns interplay with several neuronal populations using what molecular mechanisms, and which neural function was generated. In this study, I analyzed the gene expression pattern in the globus pallidus, as an output device of the basal ganglia mediated mood and motor control.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：行動神経科学

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究において、神経細胞の成熟過程における分子的な基盤について研究は数多くある。成熟過程において機能する分子群の多くは、成熟後の神経細胞においても発現しており、何らかの機能を有すると考えられる。しかし、これらの分子の機能や、ヒトの脳機能における役割についての研究は少ない。そこで、ヒトの脳機能を解析できる霊長類脳を利用し、遺伝子の発現している回路や行動を解析することで、こういった問題にアプローチできると考えられた。また、脳由来神経栄養因子(BDNF)は、当初神経軸索の形成過程に重要な遺伝子として同定されたが、近年、成熟脳における難治性うつ症や気分障害に関与しているという報告がある。また、パーキンソン病やハンチントン舞踏病のような神経変性疾患における随意運動障害は、大脳基底核における α ・シンクレインやハンチンチンといった遺伝子が関与しているという報告もある。これらの報告は、特定の遺伝子が特定の回路で機能することが、行動の制御に非常に重要であることを示唆している。しかしながら、ヒトをはじめとする霊長類の高度な行動、運動機能は、複雑な大脳皮質-基底核ループによって制御され、様々な情報伝達物質と回路が階層的に関与している為、その解析は容易ではない。本研究課題では、これらの問題に対し、回路と遺伝子の関係を明らかにし、将来的に霊長類に分子遺伝学的手法を導入して特定回路の遮断を行い、その回路を介して表現される行動に異常がみられるかどうかを検証できるような枠組みを立ち上げることを可能とすることを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、大脳皮質-基底核回路とそれにより制御される行動が、どのような分子基盤により制御されているかを明らかにしようとする。霊長類脳の大脳皮質基底核間投射は、線条体や淡蒼球、視床下部、黒質、視床等、様々な脳領域を介して大脳皮質に再投射するループを形成している。線条体から視床までの回路は、機能別に二つに分けられる。一つは直接路と呼ばれ、線条体から淡蒼球内節・黒質に投射する。もう一つは間接路と呼ばれ、淡蒼球外節へ投射する。淡蒼球外節細

胞は淡蒼球内節、視床下核に投射する一方で、視床下核は淡蒼球内節と外節に投射するため、間接路は2つの中継点を介して淡蒼球内節を制御する。淡蒼球内節及び黒質の出力は抑制性であるため、線条体から淡蒼球内節に直接投射する直接路は脱抑制作用を、淡蒼球外節を介する間接路は抑制作用を及ぼすとされる。大脳基底核は、これらの直接路と間接路のバランスにより出力を制御されている。この回路モデルはパーキンソン病やヘミバリスムスなどの運動異常を説明する際に用いられてきており、ある程度の成功を収めている。

これらの経路は共に GABA を神経伝達物質として使用する他、直接路特異的神経伝達物質としてサブスタンス P が、間接路ではエンケファリンが機能しているといわれてきた。しかし、近年の単一神経細胞の軸索追跡実験の結果、直接路の神経細胞が間接路の投射先へ軸索側枝を出すことが明らかとなった。淡蒼球外節から視床下部に投射する軸索も淡蒼球内節に側枝を出す。また、視床下核から淡蒼球内節に向かう軸索も淡蒼球外節に側枝を出す。従って、従来の直接・間接路の機能仮説は再考の余地があることが明らかとなった。また線条体において、直接・間接路の細胞はそれぞれ D1 と D2 という別のドーパミン受容体を発現していると考えられてきたが、近年、線条体の同じ細胞上に両方の受容体が発現していることも示唆されている。従って、大脳基底核における神経伝達物質及び受容体の発現分布は詳細に再検討されるべきであると考えられた。

本研究課題では、淡蒼球内部に存在する神経細胞群を投射先別にラベルし、それらを単離、解析することで、各神経回路に優先的に発現する分子群を同定し、それら回路の分子的特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本実験系ではラットの大脳基底核の淡蒼球を使用した。淡蒼球は通常線条体に近接して囲まれており、染色なしの状態ではその境界線を確認することができない。しかし、通常の固定方法及び染色方法ではRNAの分解が懸念された。そこで、RNAに損傷のないように脳を染色し、淡蒼球の切り出し可能な実験手法の確立を行った。ラット脳サンプルは未固定のまま、ヘキサン・ドライアイスにより急

速冷凍した。冷凍脳は前後軸に沿って40マイクロメートルずつスライスした。スライスを付けるマイクロフォイル、染色液、トルジンブルー0の濃度、染色時間について様々な条件を変え最適条件の検討を行った。その後、この脳サンプルをレーザーマイクロディセクションシステム(Leica, LMD6500)によりカットし、淡蒼球の切片を回収した。回収チューブに、RNAの分解を防ぐRNase later (Ambion)を入れた。回収した淡蒼球はRNeasy Micro (Qiagen)で処理し、約0.1 ngのRNAを回収した。回収したRNAは、MessageAmpII (Ambion)により増幅した。増幅RNA (amplified RNA; aRNA)はcDNAに変換した後、EvaGreen (BioRad)とCFX96 (BioRad)を使用してリアルタイムPCRを行った。

次に細胞レベルでの遺伝子解析を行った。淡蒼球の内節と外節において、視床、線条体、視床下核と相互作用する淡蒼球細胞を、逆行性トレーサーを用いてラベルし、出力パターンを調べた。さらに、トレーサーを抗体を用いて染色し、クライスタットを用いてスライスした後、レーザーマイクロディセクションを利用して、単一細胞の単離を行なった。切り出した細胞から微量mRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを得、このcDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、神経活動に関与する遺伝子群の発現比較を行った。

4. 研究成果

本研究課題では、行動制御に関わる大脳基底核の淡蒼球に焦点をあて、淡蒼球内に存在している投射先の異なる様々な細胞群が、どのような分子的な特徴を有するかを解析した。まずは、淡蒼球の前後軸で投射先に勾配があることが知られている。このため、まずは前後軸でスライスを準備し、最適条件の検討と、発現遺伝子の変化を検討した。その結果、淡蒼球の前後軸に沿って発現が変動した遺伝子は8個あった。これまで均一と考えられていた淡蒼球内部で、神経伝達物質、及びその受容体を含む幾つかの発現量が異なることが示唆された。さらに、淡蒼球の内節と外節において、視床、線条体、視床下核と相互作用する淡蒼球細胞を逆行性トレーサーを用いてラベルし、出力パターンを調べた。この結果、複数の遺伝子の発現が投射先の違いにより増減していることが

わかった。通常の免疫染色法では、RNAが破壊されてしまうが、本研究課題により確立した新たな免疫染色法では、短時間の染色により数百個の細胞を単離した後でもRNAの分解を押さえることが可能となった。本研究課題で目的とした特定回路における機能遺伝子の同定を達成できたと考えている。さらに同定した遺伝子の機能阻害を目的として、アデノ随伴ウイルスベクターやレンチウイルスベクターを使用したウイルス作製法を立ち上げた。また淡蒼球におけるウイルス感染の効率化を目指して条件設定を行った。本研究課題で同定した遺伝子の機能阻害を行うことにより、淡蒼球内で投射先の異なる特定の回路を減弱、もしくは遮断することが可能となる為、これらの研究手法は、基底核淡蒼球の情報処理をどのような細胞種が担っているかという動作原理の解明につながると考えられる。

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3件)

① Nakamuta, S., Funahashi, Y., Namba, T., Arimura, N., Picciotto, MR., Tokumitsu, H., Soderling, TR., Sakakibara, A., Miyata, T., Kamiguchi, H., and *Kaibuchi, K. Local application of Neurotrophins specifies axon through inositol 1, 4, 5-trisphosphate/Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Science Signalling*, 査読有, 4, 2011, ra76

② 星 英司、中山義久、山形朋子、佐賀洋介、橋本雅史、有村奈利子、丹治 順、認知と運動の統合過程を支える神経基盤、*Brain and Nerve*、査読有、63、2011、59-68

③ 丹治 順、中山義久、山形朋子、佐賀洋介、橋本雅史、有村奈利子、星 英司、補足運動野と前補足運動野、*Clinical Neuroscience* 査読有、28、2011、1121-24

[学会発表] (計5件)

① Arimura N, Nakayama Y, Yamagata T, Tanji J, & Hoshi E. A comparison of neuronal

activity of globus pallidus and premotor cortex in retrieving a virtual action plan instructed by a visual object and in developing a physical motor plan. Neuro2011, 2011.9.14-17, 横浜

②Arimura N, Nakayama Y, Yamagata T, Saga Y, Tanji J, Hoshi E. Role of the globus pallidus in action planning as mediated by the abstract representation of action. 第一回東北大学脳科学国際シンポジウム, 2011.1.21-23, 宮城

③Arimura N, Nakayama Y, Yamagata T, Saga Y, Tanji J, Hoshi E. Role of the globus pallidus in action planning as mediated by the abstract representation of action. 41th NIPS International Symposium, 2010.12.16-18, 岡崎

④Arimura N, Nakayama Y, Yamagata T, Saga Y, Tanji J, Hoshi E. Role of the globus pallidus in action planning as mediated by the abstract representation of action. Neuroscience2010, 2010.11.13-17, San Diego

⑤有村奈利子、中山義久、山形朋子、佐賀洋介、丹治順、星英司. 運動の表象表現を介した運動計画における大脳基底核と前頭前野の関与, Neuro2010, 2010.9.2-4, 神戸

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/frontal-lobe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有村 奈利子 (ARIMURA NARIKO)

財団法人東京都医学総合研究所・認知症・

高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：20420375