

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500397

研究課題名(和文) 光刺激操作を用いた内発性動作における基底核-運動前野ネットワークの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of basal ganglia-premotor cortex circuit in voluntary movement using photo stimulation

研究代表者

有村 奈利子 (Arimura, Nariko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・流動研究員

研究者番号：20420375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大脳基底核と運動前野は、認知に基づく動作決定から、運動の準備実行まで、幅広い運動機能の制御に関与している。しかし、両領域をつなぐネットワークの機能的な連関や役割の差異については不明な点が多い。本研究課題では、これらの領域ネットワークと「予測に基づく運動の準備実行の神経機構」に注目し、研究を行う。大脳基底核-運動前野ネットワークの機能的な役割を明らかにすることを目的とする。

研究成果の概要(英文)：The BG and premotor cortex (PM) are shown to play a crucial role in associating multiple computational processes essential to behavior, including visual signals with actions in a goal-oriented and adaptive manner. However, it is still unknown that the functional relationship and distinct roles between these two regions. In this project, we focus on the basal ganglia-premotor cortex circuit and the neuronal activity during the voluntary movement based on the prediction in two regions.

研究分野：大脳生理学

キーワード：大脳基底核

### 1. 研究開始当初の背景

基底核は大脳皮質前頭葉から入力を受け、情報処理の結果を前頭葉へ出力する。従って、基底核と前頭葉はループ回路を形成しており、密接な情報交換を行っている。当研究室ではこれまで、運動前野と基底核に注目し研究を行ってきた。運動前野は、運動の準備実行のみならず、認知情報に基づく動作決定を行う一連の過程に関与していることを明らかにしてきた(Nakayama et al., *J Neurosci*, 2008; Yamagata et al., *J Neurophys*, 2009)。さらに経シナプス性の逆行性トレーサーを用いた研究により、大脳基底核の淡蒼球から運動前野への豊富な出力が存在することを報告した(Saga et al., *Eur J Neurosci*, 2010)。従って、淡蒼球-運動前野のネットワークが、動作決定から運動の準備実行の過程で機能していると考えられた。

### 2. 研究の目的

これに関して行動課題を遂行しているサルの淡蒼球と運動前野からニューロン活動を記録し、これらの間の機能連関を検討してきた。先行研究は、大脳基底核は習熟した連続作業や自ら始めた行動の実施に関与していると提唱している(Hikosaka et al., *Curr Opin Neurobiol.*, 2002)。また、パーキンソン病などの大脳基底核関連疾患では、不随意運動や外部手がかりに依らない内発性動作の減少などが症例として報告されている。これらの報告は、大脳基底核が内発的行動の実施や制御において、主要な役割を有する可能性を示唆している。研究代表者のこれまで研究結果と合わせると、動作実行が「視覚誘導性」と「内発性」によってなされる2つのモードを設定した課題をサルに遂行させ、大脳基底核の淡蒼球と運動前野の機能連関のメカニズムを解明することが必要であると考え、これを目的とした。

さらに基底核の淡蒼球と運動前野の機能連関に関して解析を進める為、パーキンソン病などでみられる姿勢異常や振戦などの不随意運動異常のみみられるマウスに着目した。パーキンソン病の前屈姿勢異常や振戦は大変多く見られる症状であり、歩行や食事動作など日常生活動作に与える影響が大きい。パーキンソン病の病理として黒質、青斑核の神経細胞脱落が報告されており、これらによる大脳基底核ひいては大脳皮質への入力異常が原因と考えられている。従って、大脳基底核と大脳皮質の異常な入出力が前屈姿勢異常や振戦に大きく関与していると考えられるが、基底核と大脳皮質の機能連関と分子メカニズムについては不明な点が多い。本研究では姿勢保持異常や振戦を呈するマウスを使用し、この病態における基底核と大脳皮質の役割及び分子メカニズムを明らかにする。野生型と比較し、変異型マウスの異常な神経活動について検討する。さらに、オプトジェネティクスの技術を用いて、神経活動を変化させ、マウスの行

動の変化を確認する。この実験において、行動課題依存的に神経活動が変化した神経細胞のある箇所、光刺激により膜電位を変化させる光駆動性チャンネル及びポンプ(チャンネルロドプシン、ハロロドプシン)を発現させ、神経活動の抑制や増強を行う。これらの実験を行うことで、姿勢保持や振戦における基底核と大脳皮質の機能連関を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本実験では、行動のゴールとアクションの選択を、二ホンザルにやらせることにより、この神経基盤を調べている。本実験課題では、右から左に順番に視覚刺激をモニターに映し出し、最終的にサルにモニターにタッチさせ、この時の神経活動を記録するというを行う。固視点を呈示した後に、右を選ぶ、もしくは左を選ぶということの意味する、instruction cue を呈示する。個視点提示後に今度は、2枚のグレーのパネルを呈示する。これがchoice cueである。これは、7箇所の場所のうち隣り合う2つのパネルがランダムに呈示される。パネルが白色に変化したらサルは、先ほどのInstruction cueで、呈示されたゴールに従って、右か左のパネルにタッチする。正解したら報酬(ジュース)が与えられる。この実験では、最初のinstruction cueでは、ゴールは設定できるが、モニターのどこにタッチするか、というアクションは決定できない。アクションはchoice cueがでて、初めて決定できることが、本研究の特長である。神経活動を記録して比較した脳の領域は、大脳皮質の背側運動前野と、大脳基底核の淡蒼球である。すでに背側運動領域には、ゴールをアクションに変換する過程を反映する神経活動が多く見受けられることが明らかになっている。この領域は、大脳基底核と相互に軸索を投射しており、機能的連関があることが知られていた。2004年のNixonらの報告では、運動前野の障害のみでは、視覚運動宇連合課題の再学習に障害が生まれないが、淡蒼球との組み合わせで傷害したときは、再学習のエラー率が3倍になったという報告もある。そこでこの2領域がゴールとアクションの決定に重要であると考え、比較を試みた。

また運動異常を起こすマウスについては、原因遺伝子の分子間相互作用を知るために、マウス脳抽出液中から免疫沈降法を用いて結合分子を単離し、液体クロマトグラフィーと質量分析によるショットガン解析を試みる。また、invitro結合実験や変異型遺伝子を用いた結合実験を行う。さらに、遺伝子発現部位を免疫組織学的に検討する。特にGAD67-GFPやVglut-2-GFPなどのノックインマウスと交配し、興奮性、及び抑制性神経細胞における原因遺伝子の発現とその機能を検討する。相互作用分子についても、同交配マウスを用いて、原因遺伝子との相関関係を免疫組織学的に検討する。

### 4. 研究成果

淡蒼球における細胞活動の例について述べる。一つの細胞の活動をそれぞれの instruction cue にソートして神経活動を比較している。横軸が時間軸で、灰色の部分が、cue を呈示している時間で、縦軸が神経活動の頻度である。まず、視覚刺激選択的神経細胞の例ですが、この細胞は、赤のダイヤモンドの instruction cue が出たときにだけ、神経活動が下がる、という特長を示した。また、ゴール選択的神経細胞では、Left (左を選択する) という指示の 2 つの instruction cue の時だけ、神経活動が下がる、という結果になり、ゴール選択的と判断された。さらにアクション選択的細胞も見つかった。この細胞は T4 や T5 を選択するとき chice cue 呈示直後に神経活動を増加させることが示され、アクション選択的神経細胞とかがえられる。先ほどのように神経活動の変化を統計解析し、5 つのクライテリアに分類した。視覚刺激選択的、ゴール選択的、choice cue 場所選択的、ゴールと choice cue の場所の mix したような選択性、アクション選択的な神経細胞に分けている。横軸が時間で、縦軸が細胞の割合で、左が淡蒼球の結果、右が背側運動前野の結果である。Instruction cue 提示後に、グリーンで示された、視覚刺激選択的細胞の割合が、淡蒼球で多いことが明らかとなった。また、Choice cue 提示後は黄色で示された、ゴールと choice cue の場所の混合選択性を示す細胞が増えていることも明らかになった。

さらに、視覚刺激、ゴール、アクション選択的細胞の細胞活動の立ち上がりである潜時を比較した。横軸が時間で、縦軸が細胞の割合で、時間を応ごとに細胞が増えてゆくというグラフである。その結果、Instruction cue 提示後は、淡蒼球の視覚刺激選択的細胞活動の立ち上がり、最も早いこと、実線が淡蒼球で、点線が運動前野だが、ゴール選択的細胞は、淡蒼球、背側運動前野でほぼ同じであったことなどが明らかとなった。また、choice cue 提示後は、アクション選択的細胞の活動は、背側運動前野で早く、淡蒼球で遅いことがわかった。

このように、コードしている情報によって、2 領域における情報表現の早さが異なることが明らかになった。さらに、ゴール選択的細胞の活動がどれくらい持続しているかを検討した。各線の色の違いは cue が出てから 200 ms ごとに分けて、その時に選択性があった細胞群が、それ以外の時間に選択性をどれくらい維持しているかを示した。この結果、左の淡蒼球では、ある特定の時間で選択性があった物はそれ以外の時間では選択性は低いが、背側運動前野では、選択性が維持されていることが示された。

以上の結果は、ゴールの決定は基底核-運動前野ループで為されるのに対して、ゴールからアクションへの変換は運動前野が主要な役割をはたすことを示唆する。背側運動前野

では持続的に情報が保持されるのに対し、淡蒼球ではより一過的であった。つまりこれらの領野間で情報処理のメカニズムが異なることを示唆する。高次脳機能を達成するにあたって、「決定や選択」と「結果の保持」という二つの要素が重要となる。る今回発見された役割分担は、大脳基底核と前頭連合野が連携することによって初めて「決定や選択」と「結果の保持」の両者が達成されることを明らかとした。この結果を Journal of Neuroscience に発表した。

これらの結果から、運動前野が基底核に先行して動作概念を実際の運動に反映させる過程に重要な役割を担うことが示された。一方、基底核の損傷により内発的な行動の遂行に障害が出ることが報告されており、内発性行動における基底核の機能を明らかにすることが必要と考えられた。基底核については、機能的にもまた分子、細胞的にも霊長類と相似の構成をラットも持つ事が知られている。従って、ラット基底核の機能をオプトジェネティクスによって操作する事を目標とし、まずは技術の立ち上げを行った。光刺激にตอบสนองして膜電位を変化させるチャンネルロドプシンやハロロドプシンを、アデノ随伴ウイルスとレンチウイルスに組み込んだものを使用した。hSynapsin1 や CaMKII プロモーターが挿入されたウイルスを精製する事で、興奮性、抑制性の神経細胞の機能を別々に制御するベクターを作成、使用した。AAV 精製については、HEK293T cell を 100mm tissue culture plate 15 枚に passage して遺伝子導入を行った。この遺伝子導入は従来のリン酸化カルシウムトランスフェクション法を改良し高効率で遺伝子導入できるシステムを確立した。トランスフェクション後 66-72 時間で培養上清を回収し、凍結融解を 5 回繰り返した。その後 PEG8000 を用いた沈殿法によりウイルスを沈殿させ、可溶化した後、セシウムクロライド密度勾配遠心法にてウイルスの単離を行った。Lenti ウイルスについては、同様の方法で HEK293T 細胞に遺伝子導入を行った後、24 時間後に培養上清を回収した。この溶液をフィルトレーションした後、ショ糖密度勾配遠心法にてウイルス単離を行った。AAV ウイルスと Lenti ウイルスの両方共に、高タイトターのウイルス精製法が確立できた。この、ラット一次運動野にウイルス液を注入し、72 時間後に光刺激により筋電図を計測した。473nm の波長のレーザー 43mW で duration 5 ms, 1 Hz, 1 trial の条件で光刺激した結果、刺激後 30 ms 時点で上腕部の筋電図に波形を確認した。この結果は、大脳皮質への光刺激により神経細胞が興奮し、筋肉を制御する神経細胞の興奮を誘導できた事を示している。

これまでの研究において、サル運動野と基底核の機能的連関と差異について報告を行い、さらに、オプトジェネティクスの実験系を立ち上げる事ができた。今後はこの実験系

を利用して、実際に基底核-運動前野ネットワークが「内発的行動の準備・実行過程」においてどのような機能的連関を持つかについて検討したいと考えている。

基底核の淡蒼球と運動前野の機能連関に関して解析を進める為、パーキンソン病などでみられる姿勢異常や振戦などの不随意運動異常のみみられるマウスに着目した。Dscamの遺伝子発現が損なわれている自然発症マウス Dscam<sup>del17/del17</sup>において、中脳が肥大し細胞移動に異常が見られる事を見いだした。さらに、Dscamが低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap1の活性化因子 RapGEF2 及び Rap1 を介して細胞形態と接着に関与する分子群と相互作用することを見出している。具体的には以下の通りである。Dscam<sup>del17/del17</sup> マウスの中脳上丘・下丘では、抑制性神経細胞がクラスターを形成していた。Edu で増殖中の細胞をラベルすると、神経細胞移動の異常が確認できた。エレクトロポレーション法を用いた実験により、Dscam をノックダウンすると細胞移動が損なわれ、Dscam 過剰発現では、細胞移動が促進された。これらの結果から、パーキンソン病様の表現型を示すマウスでは、神経細胞移動異常がみられる事が明らかとなった。Dscam は中枢神経系のすべてに発現している事から、おそらく大脳基底核や運動野においても神経細胞移動に関与していると考えられる。この細胞移動異常は、適切な神経突起の伸長を困難にし、従って、シナプス形成や回路網形成に重要な異常をもたらすと考えられた。今後は上述のオプトジェネティクス的手法を用いて、異常な回路網形成によりどのような異常な入力が行われているか、またそれをどのように止める事ができるかを検討し、大脳基底核-運動野の連関の研究につなげたい。

#### 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)

Arimura N, Nakayama Y, Yamagata T, Tanji J, Hoshi E., Involvement of the globus pallidus in behavioral goal determination and action specification. *Journal of Neuroscience* (査読有), 33, 13639-53, 2013

Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, Sugiyama I, Arimura N, Matsuzawa K, Shirahige A, Ishidate F, Nishioka T, Taya S, Hoshino M, Kaibuchi K. TTBK with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation *Journal of Cell Biology* (査読有), 210(5), 737-751, 2015.

[学会発表](計5件)

Yoshihisa Nakayama, Tomoko Yamagata, Nariko Arimura, Jun Tanji, and Eiji Hoshi, Differential involvement of the frontal motor areas of macaques in planning and execution of action based on an abstract behavioral goal. The 42nd annual meeting of the Society for Neuroscience 2012 年 10 月 13 日~2012 年 10 月 17 日 Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana

Yoshihisa Nakayama, Tomoko Yamagata, Nariko Arimura, Jun Tanji, Eiji Hoshi Involvement of frontal cortical areas and basal ganglia in behavior mediated by conditional 'visuo-goal' Association 2014 International symposium, 2014.12.6-7, Tokyo

川端政則, 林崇, 宮下聡, 田谷真一郎, 有村奈利子, 瀬戸裕介, 早瀬ヨネ子, 福田光則, 星野幹雄 細胞接着因子の細胞膜での発現・局在制御機構の観察系の開発第 37 回 日本分子生物学会年会 2014,11,25-27, 横浜

Nariko Arimura, Yuki Nishihara, Yoneko Hayase, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino : The functional involvement of a down syndrome-associated gene in the neuronal migration. Neuro2014 2014.9.11-13, Yokohama

Nariko Arimura, Kenichi Dewa, Yoneko Hayase, Yuchio Yanagawa, Shin-ichiro Taya, Mikio Hoshino. A down syndrome-associated gene controls neuronal migration in mouse mesencephalon. Neuro2015 2015.7.28-31, Kobe

[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.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_diag/CV%20hoshino.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/CV%20hoshino.html)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

有村 奈利子 (ARIMURA Nariko)

東京都医学総合研究所、主席研究員

国立精神・神経医療研究センター～ 流動研究員

研究者番号：20420375