

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25351002

研究課題名(和文)運動、報酬に基づく学習の制御における大脳基底核の神経生理学的役割の解明

研究課題名(英文)Physiological roles of the basal ganglia on motor control and learning.

研究代表者

佐野 裕美(SANO, Hiromi)

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教

研究者番号：00363755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大脳基底核は運動、運動学習、報酬予測、情動などの制御に重要であることがよく知られている。本研究では、大脳基底核を構成する線条体投射ニューロン、線条体-淡蒼球投射ニューロン、線条体-黒質投射ニューロン、大脳皮質-線条体路の4種類の経路に注目し、これらの経路に興奮性の光駆動性イオンチャネルであるchannelrhodopsin-2を発現させ、光照射により経路特異的な興奮を誘導した。そして、出力核である黒質網様部での神経活動の記録と行動変化の観察を行った。その結果、各経路の興奮誘導に応じて黒質網様部では二相性、あるいは三相性の一過性の応答が認められた。さらに、興奮誘導に応じて運動の変化も認められた。

研究成果の概要(英文)：The basal ganglia is considered to play important roles on motor control, motor learning, reward prediction and emotion. In this study, I investigated the physiological and behavioral roles of striatal projection neurons, striato-pallidal neurons, striato-nigral neurons and cortico-striatal neurons in the basal ganglia.

I used transgenic mouse lines, which express channelrhodopsin-2 (ChR2) in striatal projection neurons, striato-pallidal neurons and striato-nigral neurons, respectively. In addition, I used retrograde lentiviral vector to express ChR2 in cortico-striatal neurons. The pathway specific excitation induced by ChR2 gave effect on the neuronal activity in the output nuclei of the basal ganglia (the substantia nigra pars reticulata, SNr). The biphasic or triphasic responses in the SNr through ChR2 also induced changes in motor behaviors.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：大脳基底核 随意運動 光遺伝学 線条体

1. 研究開始当初の背景

(1) 大脳基底核は、神経回路全体として自発運動の制御に重要であることがよく知られてきた。これまでに大脳基底核に関する様々な基礎研究や臨床研究が行われてきており、直接路、間接路、ハイパー直接路を中心とした神経回路モデルも提唱されてきた (Alexander and Crutcher, TINS, 1990; Nambu et al., Neurosci Res, 2002)。また一方で、大脳基底核にあるドーパミンニューロンが報酬予測に重要な役割を果たしていることがよく知られており (Schultz et al., Science, 1997)、ドーパミンニューロンの活動と報酬に基づく学習との関係が解明されてきた (Schultz, Neuron, 2002)。そのため、教科書的には大脳基底核が制御する運動や報酬予測の作動原理が明らかにされているように思われがちである。しかし、回路モデルに沿った個々の神経経路の役割の解析は、マーカー分子を上手く利用した分子生物学的手法を用いた極少数の研究に限られていた。そのため、神経回路を構成する個々の神経経路が自発運動や報酬予測をどのように制御しているのかについての詳細は、十分に解明されていないのが現状であった。

(2) 研究代表者はこれまでの研究で、線条体投射ニューロンに特異的に発現する phosphodiesterase10A2 (PDE10A2) の遺伝子座への tTA (tetracycline transactivator) ノックインマウス (PDE10A2-tTA マウス) を作製しており (Sano and Yokoi, JNS, 2007)、PDE10A2-tTA マウスと tet0 (tetracycline operator)-ChR2 (channelrhodopsin-2) マウス (Tanaka et al., Cell Report, 2012) との交配により得た PDE10A2-tTA::tet0-ChR2 マウスにおいて光遺伝学を利用した線条体投射ニューロンの興奮誘導 (Sano and Asim, et al., PLOS ONE, 2012) に取り組んでいた。また、線条体-淡蒼球投射ニューロンのマーカー遺伝子であるドーパミン D2 受容体 (D2R) を利用した D2R-tTA マウスの作製にも取り組んでおり、tet0-ChR2 マウスとの交配により得た D2R-tTA::tet0-ChR2 マウスにおいて、線条体-淡蒼球投射ニューロンの興奮誘導が確認できた。さらに、線条体-黒質投射ニューロンのマーカーであるアセチルコリン M4 受容体 (Achrn4) を利用した Achrn4-tTA マウスの作製にも着手しており、Achrn4-tTA::tet0-ChR2 マウスにおける線条体-黒質投射ニューロンの興奮誘導を目指していた。一方で、ウイルスベクターを用いた

逆行性の遺伝子導入法 (Kato et al., Hum Gene Ther, 2011) を利用して、大脳皮質-線条体路に ChR2 を発現させ、大脳皮質-線条体路の特異的な興奮誘導に成功していた。これらの遺伝子組換えマウスやウイルスベクターによる遺伝子導入法を利用すれば、線条体の投射ニューロンや大脳皮質-線条体路が自発運動や報酬予測をどのように制御しているのか、その詳細なメカニズムを解明出来るのではないかと着想していた。

2. 研究の目的

大脳基底核は運動、運動学習、報酬予測、情動などの制御に重要であることがよく知られている。しかし、大脳基底核を構成する個々の神経経路の活動が、どのように情報を出力核へと伝え、行動を制御しているのかについては十分に理解されていない。そこで、覚醒下のマウス個体を用いて、光遺伝学を利用して、特定の神経経路の活動を特異的に操作し、投射先の神経核や出力核の神経活動と自発運動や報酬予測などの行動に与える影響を解析する。本研究では、大脳基底核を構成する神経経路のうち、線条体投射ニューロン、線条体-淡蒼球投射ニューロン (間接路)、線条体-黒質投射ニューロン (直接路)、大脳皮質-線条体路の 4 種類の経路を標的とする。電気生理学的変化と行動学的変化から標的とする神経経路の神経生理学的役割を明らかにし、大脳基底核が制御する神経生理機能の作動原理を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

これまでに作製してきた遺伝子組換えマウス、現在作製中の遺伝子組換えマウス、逆行性レンチウイルスベクターを利用した遺伝子導入を用いて、線条体投射ニューロン、線条体-淡蒼球投射ニューロン (間接路)、線条体-黒質投射ニューロン (直接路)、大脳皮質-線条体路の 4 種類の経路に興奮性の光駆動性イオンチャネルである ChR2 を発現させ、光照射により経路特異的な興奮を誘導する。

単一細胞からの細胞外記録による電気生理学的解析により、標的とする神経経路の選択的な興奮誘導が大脳基底核の活動に及ぼす影響を記録し、神経回路の作動原理を明らかにする。大脳基底核の神経活動は麻酔薬の影響を受けやすいことが知られている。そこで、覚醒下で無痛的に脳定位固定装置にマウスを保定するため、最初に、頭部にアダプターを取り付ける外科的手術を行う。次に、アダ

プターを介して脳定位装置に覚醒下で無痛的に保定したマウスから、淡蒼球外節、黒質網様部など大脳基底核を構成する神経核の活動を記録する。光照射したときの自発発火頻度、自発発火パターンの解析、さらには光照射に対する応答パターンを解析し、標的とした神経路の活動の変化が、個々の神経核に対してどのような影響を与え、さらにこれらの影響が出力核である黒質網様部においてどのように統合されて出力されるのかを解析する。

一方で、標的とした神経路の活動を操作したときの、行動変化を解析する。

これらの電気生理学的解析と行動学的解析から、標的とした神経路がどのように大脳基底核神経回路の活動を調節し、その結果、行動がどのように制御されるのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 線条体投射ニューロンに ChR2 を発現するマウス (PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウス) を用いて、覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定し、線条体に光ファイバーを刺入して青色光を照射し、線条体投射ニューロンの興奮を誘導し、そのときの淡蒼球外節、黒質網様部における神経活動を記録した。淡蒼球外節では、光照射に応じた一過性の「抑制-遅い興奮」という二相性の応答が認められた。一方の黒質網様部でも、一過性の「抑制-遅い興奮」という二相性の応答が認められた。(図1)

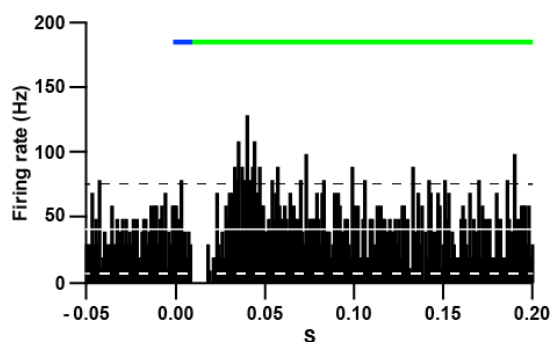


図1 PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウスの線条体を光照射したときの黒質網様部における応答

この神経活動の記録の際、光照射を始めるとマウスが舌を動かす、あるいは、体幹をよじる行動が観察できたため、右側の線条体に光ファイバーを刺入して自由行動下で光照射したときの行動変化を観察した。その結果、光刺激とは反対側へ回転する回転運動が認められた。

(2) 線条体-淡蒼球投射ニューロンに ChR2 を発現するマウス (D2R-tTA::tetO-ChR2 マウス) を用いて、同様に覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定し、線条体に青色光を照射し、線条体-淡蒼球投射ニューロンの興奮を誘導し、そのときの淡蒼球外節、黒質網様部における神経活動を記録した。淡蒼球外節では、光照射に応じた一過性の「抑制-遅い興奮」という二相性の応答が認められたのに対して、黒質網様部では、一過性の「遅い興奮」が認められた(図2)。

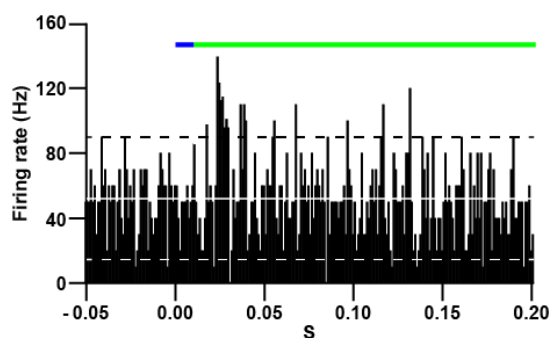


図2 D2R-tTA::tetO-ChR2 マウスの線条体を光照射したときの黒質網様部における応答

右側の線条体に光ファイバーを刺入して自由行動下で光照射したときの行動変化を観察したところ、光刺激と同側に 2~3 回、回転運動を示した後、動かなくなった。

(3) 線条体-黒質投射ニューロンに ChR2 を発現するマウス (Achrm4-tTA::tetO-ChR2 マウス) を用いて、線条体に青色光を照射し、線条体-黒質投射ニューロンの興奮を誘導し、そのときの黒質網様部における神経活動を記録したところ、黒質網様部では、一過性の「抑制-遅い興奮」という二相性の応答パターンが認められた(図3)。

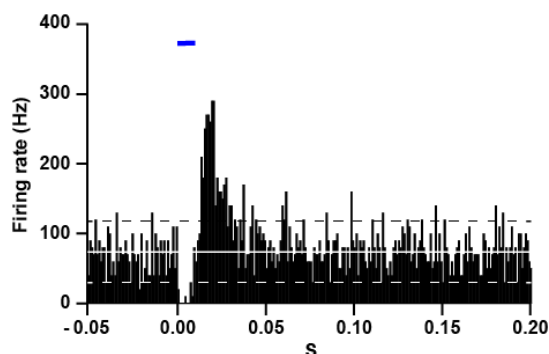


図3 Achrm4-tTA::tetO-ChR2 マウスの線条体を光照射したときの黒質網様部における応答

右側の線条体に光ファイバーを刺入して自由行動下で光照射したときの行動変化を観察したところ、PDE10A2-tTA::tetO-ChR2 マウスほど顕著ではなかったものの、光刺激とは反対側へ回転する傾向が認められた。

これら3種類のトランスジェニックマウス

の解析から、線条体の投射ニューロンの興奮は出力核である黒質網様部において、線条体-黒質投射ニューロンは主に「抑制」、線条体-淡蒼球投射ニューロンは主に「遅い興奮」をもたらし、運動の開始や促進、停止や抑制に関わっていることが示唆された。

しかし、線条体-黒質投射ニューロンの興奮を誘導したとき、黒質網様部において「遅い興奮」も認められた。これは、線条体-黒質投射ニューロンの側枝が淡蒼球外節に投射していることが知られているため、側枝を介した応答であることが可能性の1つとして考えられる。また、線条体-黒質投射ニューロンの興奮により黒質網様部が抑制されるため、そのリバウンド興奮として「遅い興奮」が認められる可能性もある。

(4) 逆行性レンチウイルスベクターを線条体に注入し、大脳皮質-線条体路にChR2を発現させたマウスを用いて、覚醒下で無痛的に脳定位固定装置に保定し、大脳皮質運動野に光ファイバーを刺入して青色光を照射し、大脳皮質-線条体路の興奮を誘導し、そのときの淡蒼球外節、黒質網様部における神経活動を記録した。淡蒼球外節、黒質網様部では主に、光照射に応じた一過性の「抑制-遅い興奮」という二相性の応答が認められた(図4)。

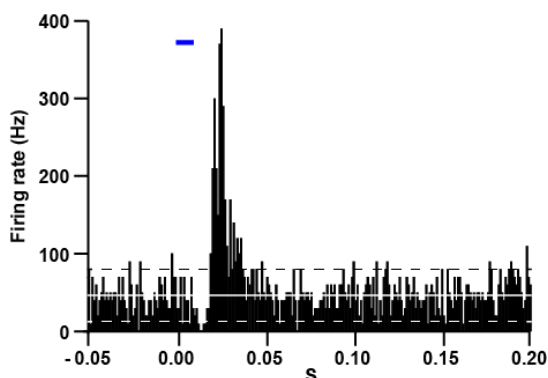


図4 大脳皮質-線条体路の興奮を特異的に誘導したときの黒質網様部における応答

また、大脳皮質運動野へ光照射する際、上肢や口顔面を支配する領域へ光照射すると、ICMS(intracerebral microstimulation)のように、光照射によって上肢や口顔面の動きが誘発された。

これまでの研究から、大脳皮質運動野へ電気刺激したときに淡蒼球外節、黒質網様部では主に、一過性の「早い興奮-抑制-遅い興奮」という三相性の応答が認められることが知られている。今回の大脳皮質-線条体路の特異的な興奮誘導により二相性の応答が得られた結果と比較すると、「早い興奮」は大脳皮質-視床下核-淡蒼球外節、および大脳皮質-視床下核-黒質網様部(ハイパー直接路)に由来し、「抑制」は大脳皮質-線条体-淡蒼球外節、および大脳皮質-線条体-黒質網様部

(直接路)に由来し、「遅い興奮」は大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球外節及び大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-黒質網様部(間接路)に由来すると考えられる。

一方で、線条体への電気刺激で運動が引き起こされるのは、線条体投射ニューロンの興奮によるものであるのか、大脳皮質-線条体路の神経終末への刺激によって大脳皮質-線条体路が興奮することによるものであるのか、これまでに議論があった。光遺伝学を利用した今回の研究結果から、大脳皮質-線条体路の興奮誘導だけでなく、線条体投射ニューロンの興奮誘導によっても運動が引き起こされることが明らかとなった。

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4件)

Sano H, Murata M, Nambu A.
Zonisamide reduces nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse genetic model of Parkinson's disease.
Journal of Neurochemistry、査読有、
134(2)、2015、371-381
DOI: 10.1111/jnc.13116

Horie M, Watanabe K, Bepari AK, Nashimoto J, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita A, Yamamura K, Takebayashi H.
Disruption of actin-binding domain-containing Dystonin protein causes dystonia musculorum in mice.
European Journal of Neuroscience、査読有、
40(10)、2014、3458-3471
DOI: 10.1111/ejn.12711

佐野裕美、南部篤
無動、寡動、舞踏運動の病態生理
Clinical Neuroscience、査読無、
32、2014、80-82

Sano H, Chiken S, Hikida T, Kobayashi K, Nambu A.
Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra.
Journal of Neuroscience、査読有、
33、2013、7583-7594
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4932-12.2013

〔学会発表〕(計13件)

Sano H, Tanaka FK, Nambu A.
Physiological roles of striatal projection neurons in voluntary movements.
ACS2016、2016年3月3~4日、同志社大学(京

都府京都市)

佐野裕美

ドーパミンニューロンに対するゾニサミドの神経保護作用～遺伝子組換えマウスを用いた基礎研究～ HAPPY FACE SEMINAR、2016年2月25日、名古屋マリオットアソシアホテル(愛知県名古屋市)

Sano H, Kobayashi K, Chiken S, Kato S, Kobayashi K, Nambu A.

Cortically induced responses in the basal ganglia through cortico-striatal neurons. Neuroscience2015、2015年10月17～21日、シカゴ(米国)

Sano H, Chiken S, Tanaka FK, Kobayashi K, Nambu A. NBN2014、2014年12月18～20日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Sano H, Murata M, Nambu A. Zonisamide reduces nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse genetic model of Parkinson's disease through brain-derived neurotrophic factor signaling pathway. Neuroscience2014、2014年11月15～19日、ワシントンDC(米国)

佐野裕美、小林憲太、加藤成樹、小林和人、南部篤
大脳皮質-線条体ニューロンの神経生理学的役割 第37回日本神経科学大会、2014年9月11～13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

佐野裕美

大脳皮質-大脳基底核神経回路が制御する運動機能の解明を目指した光遺伝学の利用
光操作研究会 in 東北大学 2014 技術検討会、2014年8月21～25日、東北大学(宮城県仙台市)

Sano H, Kobayashi K, Kato S, Kobayashi K, Nambu A.

Physiological roles of cortico-striatal neurons in voluntary movements. 9th FENS Forum of Neuroscience、2014年7月5～9日、ミラノ(イタリア)

佐野裕美

大脳基底核が制御する運動機能の解明を目指して～分子生物学的手法を利用した挑戦～ グローバルネットワークによる情報処理、2014年1月10～11日、生理学研究所(愛知県岡崎市)

) Sano H.
Physiological roles of cortico-striatal

and striatal projections in voluntary movements. Optogenetics2013、2013年9月26～27日、慶応義塾大学(東京都港区)

佐野裕美、田中謙二、南部篤

線条体投射ニューロンの運動制御における役割 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ、2013年8月29日～9月1日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Sano H, Tanaka FK, Nambu A.

Concurrent activation of striatal direct and indirect projection neurons by using optogenetics. Neural Oscillation Conference、2013年7月18～19日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

佐野裕美、知見聡美、小林和人、田中謙二、南部篤

運動制御における線条体投射ニューロンの生理学的役割 Neuro2013、2013年6月20～22日、京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計1件)

佐野裕美、小林和人、南部篤、化学同人、分子脳科学 分子から脳機能と心に迫る 三品昌美編、第4章大脳基底核による運動制御と病態生理、44-55、2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐野 裕美(SANO, Hiromi)

生理学研究所・統合生理研究系・特任助教
研究者番号: 00363755

(2)研究協力者

小林 憲太(KOBAYASHI, Kenta)

小林 和人(KOBAYASHI, Kazuto)

加藤 成樹(KATO, Shigeki)

田中 謙二(TANAKA, Kenji)