

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430009

研究課題名(和文) 運動のバランスを司る神経回路の解明と新規運動サポート技術の開発

研究課題名(英文) Striatal plasticity during the earliest stage in motor coordination

研究代表者

木津川 尚史 (KITSUKAWA, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：10311193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれの日常には体の左右の連携・協調を必要とする運動が多く存在するが、その際に機能する脳機構は理解が進んでいない。左右の協調が必要である複雑ステップをマウスに行わせ、その際に活動する脳部位を最初期遺伝子c-Fosの発現を指標にして探索した。その結果、大脳皮質と大脳基底核線条体にかかる神経回路、神経細胞が活動していることが明らかになった。さらに、NMDA型グルタミン酸受容体の阻害薬AP5を用いて、新規な複雑ステップを学習する際に線条体のシナプス可塑性が寄与しているかを解析した。その結果、AP5投与群では新規パターンの学習初期に成績の低下が認められ、線条体における可塑性の寄与が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Balance between left and right body is important in executing our behavior in daily life. The commissure projection connecting left and right brain exists from the cortex to the striatum, which is one of the highest level commissure axons in the brain. To find brain areas involving complex motor activity requiring left-right coordination, we trained mice with the step-wheel, in which stepping patterns of mice can be controlled by arrangement of ladder-like pegs. We found that the motor cortex and the dorsolateral striatum were activated in the mice running in the step-wheel by c-Fos staining. Next, we applied NMDA receptor antagonist, AP5, into the striatum to clarify whether synaptic plasticity occurs in the striatum when experiencing a novel stepping. We found that the performance of AP5-treated mice was lower in early trials in early sessions, suggesting that the NMDA receptor dependent plasticity was required during the earliest phase of acquisition.

研究分野：神経科学

キーワード：step-wheel mouse running

### 1. 研究開始当初の背景

大脳基底核が運動に関与することは古くから知られている。特に、連続運動においての関与が示唆されてきたが、連続運動にどのように寄与しているのか、その役割はわかっていないことが多い。歩行や走行に代表される連続運動の多くは、左右交互に運動が交代するため、左右のバランス、協調が重要である。運動の左右協調には、脳の左右協調が必須である。脳の左右半球を交連させる交連線維に着目すると、その脳最上位に存在するものの一つが大脳皮質 線条体両側性投射繊維（両側性投射線維）がある。これは、大脳皮質からの投射線維の一部で、大脳皮質の第5層神経細胞から発して同側および反対側の大脳基底核線条体に投射する。しかし、連続運動における、これらの脳部位の機能、特に両側性投射神経細胞と線条体の機能の理解は不十分な状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、大脳皮質運動野とその両側性投射繊維の投射先である線条体の機能に着目して、連続運動時、運動学習時における機能を明らかにすることを目指した。左右の協調をコントロールするには、脳の左半球、右半球からの入力統合する部位での情報処理が必要である。そのためには、両側性投射神経細胞の線条体に対する機能、また線条体神経細胞における可塑的变化などが必要になると考えられる。左右の運動協調を必要とする複雑ステップ走行をステップホイール装置（後述）を用いてマウスに行わせて、その際の両側性投射回路の機能、線条体の神経可塑性の有無および機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

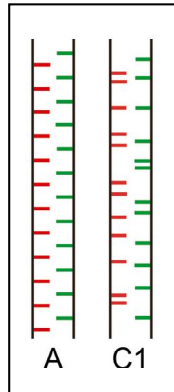
左右の協調を解析するために、ステップホイール装置を利用した。ステップホイールは、マウスを用いた運動解析装置であり、マウスは報酬である水を飲みながら梯子状に配置されたペグの上を走行する。ペグは不規則に配置することも可能であり、ペグの配置を変更することにより、マウスに様々なパターンの運足を行わせることが可能である。例えば、左右の脚が交互に動くパターン（Walk）や同時に動くパターン（Gallop）など複雑な運足パターンを構築することができるため、左右の協調が必要な連続運動を解析するために好都合な運動解析システムである。すべてのペグにはタッチセンサーが装着されており、ペグへのタッチのタイミングを計測できる。タッチタイミングの分散をもとに運動の精緻さを算出することが可能である。また、飲水しながら走行している時間を計測し、走行成績として利用できる。

ステップホイールで走行するマウスの両側性投射神経細胞を光遺伝学的に刺激することにより、両側性投射回路の機能を解析す

る。具体的には、大脳皮質にチャンネルロドプシン2を発現させたマウスの反対側線条体に光ファイバを挿入し、青色光刺激により両側性投射神経細胞を特異的に刺激する。

また、線条体の神経可塑性を薬理的に抑制して、ステップホイール走行における線条体の可塑性の役割を解析する。具体的には、線条体背外側部にカニューレを挿入し、走行30分前にNMDA型グルタミン酸受容体の阻害薬 AP5 を注入し、走行における運足の精度を解析する。

### 4. 研究成果

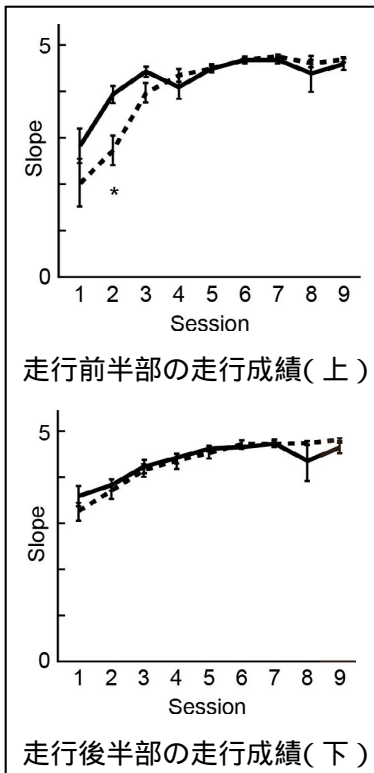


ステップホイールでの走行を単純なペグパターン A で十分訓練したのちに、ペグパターンを別の複雑なパターン C1 に変更すると、一時的にマウスの走行成績は低下するが、数日の訓練ののちに上昇してプラトーに至ることがわかった。成績の指標には、ペグタッチの精度と飲水時間を用いた。

ペグパターン C1 への変更時に活動する神経細胞を、神経細胞の活動に依存して発現する遺伝子産物である最初期遺伝子 c-Fos タンパク質の発現を指標にして解析したところ、大脳皮質運動野ならびに線条体背外側部の神経細胞に顕著な c-Fos の発現が認められた。特に、大脳皮質運動野第5層の両側性投射細胞に c-Fos が発現していることを確認した。また、神経細胞種マーカーとの2重染色により、線条体の神経細胞のうちどのタイプの神経細胞が活動したかを解析した。線条体の投射神経細胞では、Substance P を発現する直接路神経細胞と Enkephalin を発現する間接路神経細胞にほぼ均等に発現していることが明らかになった。さらに、線条体の介在神経細胞では、neuronal nitric oxide synthase 陽性神経細胞にペグパターン変更直後特異的に c-Fos が発現することを見出した。以上の発現パターンは、ペグパターン変更直後のマウス脳において、大脳皮質 線条体投射回路、特に両側性投射回路が働いている可能性、線条体で神経可塑性が起きている可能性を示唆している。

そこで、両側性投射神経細胞を青色光により賦活して、マウスの走行にどのような変化が現れるかについて、実験を試みた。大脳皮質にアデノ随伴ウイルスによりチャンネルロドプシン2を強制発現し、反対側の線条体に光ファイバを挿入して刺激を加えた。反対側の線条体に軸索を投射する大脳皮質神経細胞は両側性投射神経細胞のみであるので、この刺激により両側性投射神経細胞を特異的に刺激することができる。この結果については、現在まとめているところである。

ペグパターン変更に伴う線条体の神経可



塑性の可能性を明らかにするため、神経細胞の可塑性に關与する NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤を投与する薬理実験を行った。線条体背外側部にカニューレを挿入したマウスをペグパターン A で十分訓練したのちに、

ペグパターンを C1 に変更して 9 日間訓練した。その際、走行 30 分前に AP5 (0.05  $\mu$ g/site) またはコントロールとして生理的食塩水をカニューレから注入した。その結果、ペグパターン変更後の最初の数日において、AP5 群のほうが飲水時間の成績が悪い傾向が見られた。特に、一日の走行 (ペグパターン C1 を 50 回) の中でも、前半部での差が顕著であった (上図、上が前半部、下が後半部)。

この結果は、新規ペグパターン変更直後に線条体神経細胞で NMDA 型グルタミン酸受容体依存的な可塑性が起きていること、複雑なペグパターンに適応して走行、飲水するためにはこの可塑性が必要であることを示している。学習初期に線条体での可塑性が必要であることは、これまで知られておらず、本研究が最初の報告となった。線条体背外側部は「運動の自動化」に關係していると考えられている。今回の実験では、ペグパターン A を完全に学習したのちにペグパターン C1 に変更した。ペグパターン A で習得した自動化された運動を、ペグパターンが変更された際に可塑性によりキャンセルしているといった可能性が考えられる。この神経可塑性が左右バランスに寄与しているかどうかはまだ不確定ではあるが、両側性投射神経細胞の機能解析などを通じて明らかにしたい。

##### 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 8 件)

- Nakamura, T., Nagata, M., Yagi, T., Graybiel, AM., Yamamori, T., Kitsukawa, T., Learning new sequential stepping patterns requires striatal plasticity during the earliest phase of acquisition. *Eur J Neurosci.*, 45(7):901-911, 2017, (査読有), doi: 10.1111/ejn.13537.
- Tarusawa E., Kitsukawa T., et al., 員数 16 名 5 番目, Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the Dmmt3b DNA methyltransferase and clustered protocadherins. *BMC Biol.*, 2016, Dec 2;14(1):103., (査読有), doi:10.1186/s12915-016-0326-6.
- Mochizuki Y., Kitsukawa T., et al., 員数 54 名 19 番目, Similarity in neuronal firing regimes across mammalian species. *J Neurosci.* 2016, 36(21), 5736-5747., (査読有), doi: 10.1523/JNEUROSCI.0230-16.2016.
- Lux V, Atucha E, Kitsukawa T. Sauvage MM. Imaging a memory trace over half a life-time in the medial temporal lobe reveals a time-limited role of CA3 neurons in retrieval. *eLife*, 2016, 11862,(査読有), doi: 10.7554/eLife.11862.
- Kitsukawa T., Yagi T., The transfer and transformation of collective network information in gene-matched networks. *Scientific Reports*, 2015, 5, 14984, (査読有), doi: 10.1038/srep14984.
- Nakamura T., Sato A., Kitsukawa T., Sasaoka T., and Yamamori T., Expression pattern of immediate early genes in the cerebellum of D1R

KO, D2R KO, and wild type mice under vestibular-controlled activity. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2015, 3:38, ( 査読有 ), doi: 10.3389/fcell.2015.00038.

Meguro R., Hishida R., Tsukano H., Yoshitake K., Imamura R., Tohmi M., Kitsukawa T., Hirabayashi T., Yagi T., Takebayashi H., and Shibuki K., Impaired clustered proto-cadherin- $\alpha$  (cPcdh- $\alpha$ ) leads to aggregated retinogeniculate terminals and impaired visual acuity in mice. *J Neurochem.*, 2015, 133, 1, 66-72, ( 査読有 ), doi: 10.1111/jnc.13053.

Nakamura T., Sato A., Kitsukawa T., Momiyama T., Yamamori T., Sasaoka T., Distinct motor impairments of dopamine D1 and D2 receptor knockout mice revealed by three types of motor behavior. *Front Integr Neurosci.*, 2014, 8:56, ( 査読有 ), doi: 10.3389/fnint.2014.00056

[学会発表](計5件)

中村 徹 ステップホイール装置によるドーパミン受容体変異マウスの運動制御解析. 平成 28 年度 脳研究所共同利用共同研究 合同セミナー, 2016 年 12 月 27 日, 新潟大学脳研究所 (新潟県・新潟市).

木津川尚史 リズム運動の構造と神経基盤: ドーパミン受容体変異マウスでの運動解析. 平成 27 年度 脳研究所共同利用共同研究 合同セミナー, 2015 年 12 月 22 日, 新潟大学脳研究所 (新潟県・新潟市).

木津川尚史 局所回路モデル Gene-Matched Network: A micro-circuit model constructed by

combinatorial matching of neuronal diverse attributes. 第 38 回日本神経科学会, 2015 年 7 月 28-31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市).

中村 徹, 木津川尚史 複雑な連続ステップの学習初期に糸体の可塑性が必要である. 第 38 回日本神経科学会, 2015 年 7 月 28-31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市).

Kitsukawa T. and Yagi T. Gene-Matched Network: A micro-circuit model constructed by combinatorial matching of neuronal diverse attributes. Society for Neuroscience. 2014 年 11 月 15 日, Washington (USA).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木津川 尚史 (KITSUKAWA, Takashi)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号: 10311193

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中村 徹 (NAKAMURA, Toru )  
大阪大学・生命機能研究科・特任研究員  
研究者番号: 50771135