

# 研究報告書

## 「運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 疋田 貴俊

### 1. 研究のねらい

大脳基底核は運動機能のみならず、欲動、認知、社会・精神活動などの高次機能を司る。大脳基底核が障害を受けると、ハンチントン病、パーキンソン病といった運動障害を引き起こす神経難病を発症する。また、薬物依存症、統合失調症などの精神疾患や認知障害に深く関与している。大脳基底核内の主要な神経回路は線条体から黒質網様部につながる直接路と、線条体から淡蒼球を介して黒質網様部に至る間接路に大きく二分される。しかしながら、これらの回路を構成する線条体投射ニューロンは形態が同一で、混在しているために、二つの回路の制御機構の解明は遅れていた。そこで、生体において直接路と間接路を選択的に神経伝達のスイッチングを行う可逆的神経伝達阻止法を開発し、大脳基底核神経回路の制御機構とその破綻としての精神神経疾患病態を明らかにすることをねらいとした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生体において大脳基底核神経回路の直接路と間接路を選択的に神経伝達遮断/再開を行う可逆的神経伝達阻止法(RNB)を開発し、運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構とその破綻としての精神神経疾患病態の研究を行った。直接路遮断マウスと間接路遮断マウスの行動観察により、直接路神経伝達は報酬行動と薬物依存を支配し、一方間接路神経伝達は忌避行動と行動柔軟性に関与していることを示した。さらに、大脳基底核神経回路制御と情報統合の分子機構を解析した。

#### (2) 詳細

#### 研究テーマ A 「大脳基底核神経回路の直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法の開発」

大脳基底核の直接路を構成する中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路を構成する中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk) がそれぞれ特異的に発現する。大脳基底核の2種類の神経回路に可逆的神経伝達阻止法を適応するために、それぞれのプロモーター下にテトラサイクリン反応性転写因子 tTA を挿入したリコンビナントアデノ随伴ウイルス AAV (V-S-tTA と V-E-tTA) を作製した(図 1 上)。このウイルスを、テトラサイクリン応答配列(TRE)の下流に破傷風菌毒素(TN)と GFP の融合遺伝子をつないだトランスジーンをもつ TN トランスジェニックマウスの線条体に注入した(図 1)。AAV 投与2週後より目的の神経細胞に特異的かつドキシサイクリン(DOX)依存的に破傷風菌毒素が発現するのを確認した。さらに、片側線条体にウイルスを感染させたトランスジェニックマウスの回転行動を観察した。DOX 非存在下では、直接路遮断ではウイルス投与と同側方向に、間接路遮断では反対側方向に異常回転

行動を示した。DOX を投与すると、DOX2週では異常回転行動は残るが、DOX4 週投与で消失した。これは破傷風菌毒素発現の時系列に一致した。これらの結果から RNB 法が直接路と間接路の神経伝達を特異的にかつ可逆的に遮断できていることを示した(論文 1)。

### 研究テーマ B 「直接路と間接路の薬物依存形成での役割の解析」

直接路あるいは間接路に特異的な可逆的神経伝達遮断を行ったマウスに対して、覚せい剤あるいはコカインを全身投与し移所行動量を測定することによって、乱用薬物の急性投与による行動賦活作用における大脳基底核神経回路制御機構を解析した。線条体の直接路遮断と間接路遮断は共にメタンフェタミン投与による急性移所行動量増加を完全に抑制した。DOX 投与し神経伝達を再開するとメタンフェタミンによる移所行動量増加は再発した。側坐核の直接路遮断と間接路遮断は共にコカインによる移所行動量を抑制した。これらから乱用薬物の急性投与による行動賦活作用において、直接路と間接路は共に必須であることを示した。次にコカインを連日投与したところ、間接路遮断マウスでは野生型マウスと同様に行動感受性増加と条件付け場所嗜好性を示したのに対して、直接路遮断マウスではコカイン連日投与による行動量増感と条件付け場所嗜好性は抑制された。この結果は直接路の神経伝達が乱用薬物の慢性投与による依存形成に重要であることを示した(論文 1)。

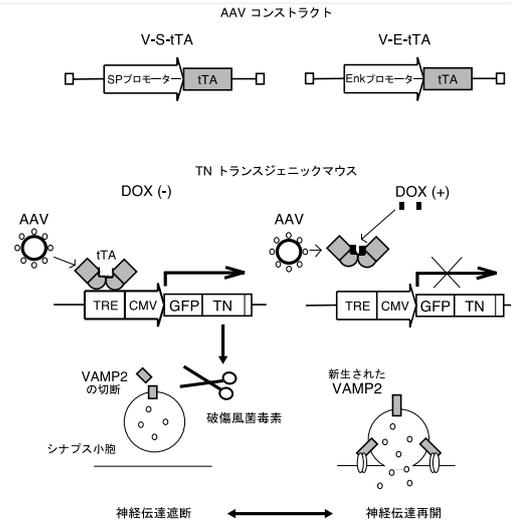


図 1. 可逆的神経伝達阻止法

### 研究テーマ C 「報酬・忌避学習における直接路と間接路の制御機構の解析」

報酬・忌避学習における直接路あるいは間接路の神経伝達遮断の影響を調べた。チョコレートによる条件付け場所嗜好性試験では直接路遮断でのみ報酬学習が阻害されたのに対して、一試行による抑制回避試験では間接路遮断でのみ忌避学習が阻害された(図 2)。これらの結果から報酬学習には直接路の神経伝達が、忌避学習には間接路の神経伝達がそれぞれ必須であることが分かった(論文 1)。さらに、十字迷路を用いた学習課題を行うと、直接路遮断が報酬関連学習に影響を与えるのに対して、間接路遮断は逆転課題においてのみ成績が悪く、前課題の正解への固執が見られた。このことは間接路の神経伝達が、報酬行動の柔軟

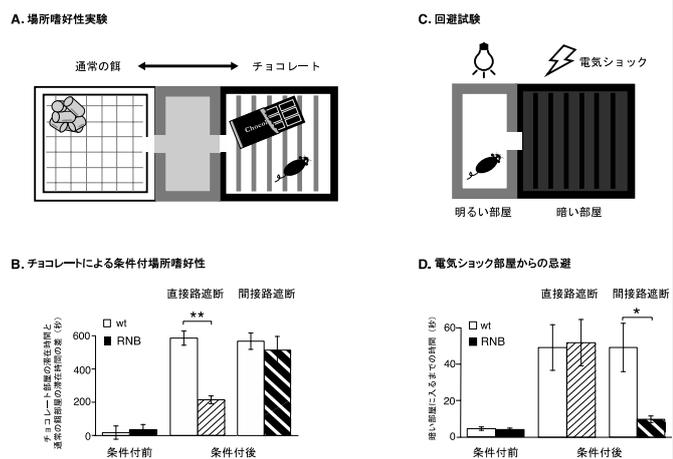


図 2. 報酬・忌避学習直接路/間接路遮断の影響

性に関与していることを示している(論文3)。これらの直接路と間接路の機能分離における制御機構を調べるために、可逆的神経伝達阻止法と薬理的処置を組み合わせ解析を進め、直接路の D1 受容体刺激が報酬学習と薬物依存形成に、間接路の D2 受容体不活化が忌避学習と学習柔軟性に関与していることを示した(論文3, 論文4)。

#### 研究テーマ D 「直接路と間接路の情報統合の分子機構の解析」

直接路と間接路の情報伝達は共に黒質網様部に入力するが、その統合された情報の処理に関わる分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、直接路と間接路のそれぞれに特異的な可逆的神経伝達阻止法を用いて、黒質網様部における神経回路特異的な情報処理機構を解析した。コカイン連日投与による行動量増加は直接路遮断でのみ抑制され、間接路遮断では野生型マウスと同様に観察される(論文1)。そこで、直接路遮断あるいは間接路遮断を行ったマウスにコカインを投与し、黒質網様部での遺伝子発現の変化をマイクロアレイ及び定量的 PCR で解析したところ、コカインを投与した直接路遮断マウスでのみ黒質網様部での ephrinA5, EphA4, EphA5 遺伝子の発現上昇がみられた(図3)。これらの分子は黒質網様部の GABA 作動性抑制性神経細胞に共存しており、イムノアドヘジンによるこれらの分子の活性化はコカイン連日投与による行動量増加を抑制した。さらに直接路遮断時にのみコカイン投与による ephrinA5 下流シグナルの増強(黒質網様部でのリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の増加)がみられた。以上の結果から黒質網様部の ephrinA5-EphA4/EphA5 シグナルが直接路依存的にコカインによる行動変化に関与していることを示し、薬物依存症における分子病態の一端を明らかにした(論文2)。

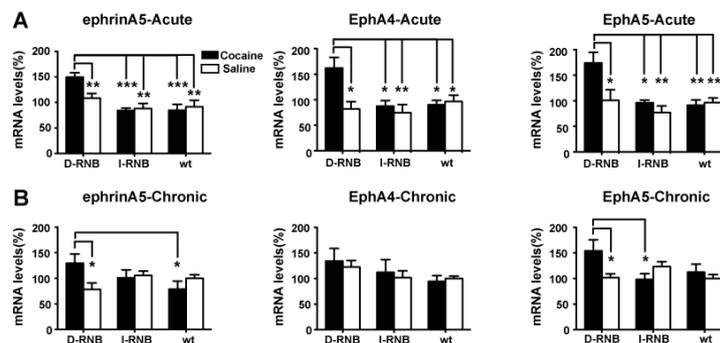


図3. (A) コカイン投与1時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。D-RNB と I-RNB はそれぞれ直接路遮断と間接路遮断マウス群(各6匹)、wt は野生型マウス群(12匹)の平均値と標準誤差を示す。(B) コカインを5日間連日投与し、5日目のコカイン投与1時間後の黒質網様部における ephrinA5, EphA4, EphA5 の mRNA 量。各6匹の平均と標準誤差を示す。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

### 3. 今後の展開

大脳基底核における直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発することによって、直接路神経伝達は報酬行動と薬物依存を支配し、一方間接路神経伝達は忌避行動と行動柔軟性に関与していることを示した。このことは、大脳基底核が関与する欲動、認知、社会・精神活動などの高次機能や、ハンチントン病、パーキンソン病、薬物依存症、統合失調

症、うつ病といった精神神経疾患の病態に直接路と間接路がそれぞれ異なる役割を担っている可能性を示唆している。さまざまな脳機能や病態における直接路と間接路の役割をさらに同定する。

薬物依存症モデルにおいて、直接路と間接路が統合される黒質網様部で神経回路特異的に ephrinA5, EphA4, EphA5 の分子変化を示したが、その分子変化がどのような神経回路特異的な機序によるものか、黒質網様部の神経細胞や局所神経回路にどのような変化を起こすことによって、コカイン誘発行動の抑制につながるのかは明らかではない。この分子機構を解析することによって薬物依存症の分子病態のさらなる解明を目指す。

#### 4. 自己評価

直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発することによって、特に報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路制御機構を解明することができた。さらに薬物依存症における神経回路の役割と、神経回路依存的な分子機構の一端を明らかにすることができた。当初ねらいとしていた以上に、多くの行動や病態において直接路と間接路の機能分離を明確にすることができ、領域目標の一つである脳神経回路の動作原理の解明に一例として貢献できたのではと考える。

精神神経疾患の病態解明において、神経回路からのアプローチが重要になってきている。精神疾患モデル動物の大脳基底核神経回路の制御異常を解析することによって、精神神経疾患の病態解明と治療法開発へとつなげたい。

#### 5. 研究総括の見解

大脳基底核は運動制御のみならず欲動・認知などの高次機能を司り、その神経回路は古くより薬理的に直接路と間接路からなることが知られていたが、各経路を区別して操作することはできなかった。本研究ではサブスタンス P プロモーターとエンケファリンプロモーターを巧みに用いてそれぞれ直接路あるいは間接路特異的に、かつドキシサイクリンにより可逆的に、シナプス伝達を阻止できるマウス系統を作出し、回転運動症状などによりそれぞれの経路の特異的遮断を確認した。さらにこれらのマウスを用いた実験解析により、覚せい剤の慢性投与による依存形成に直接路が重要であり、また報酬学習には直接路が、忌避学習には間接路の神経伝達が必須であり、間接路が報酬行動の柔軟性に関与することを明らかにした。一方、両経路が収斂する黒質網様部の分子の変化を解析して、コカイン投与では直接路依存的に ephrinA5 の下流シグナルが増強することをつきとめた。これらはハンチントン病、薬物依存症などの疾患の本態に重要な手掛かりを与える大きな成果であり、論文発表にもつながった。今後巧妙な工夫により、より広い意味での2つの回路の機能的役割の解明や、基底核が関与する他の神経疾患の病態との関係の解明につながることを期待できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 66:896-907, 2010.
2. Kimura K, Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Nakanishi S. Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108:9981-9986, 2011.
3. Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Hikida T, Nakanishi S. Pathway-specific control of reward learning and its flexibility via selective dopamine receptor in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109:12764-12769, 2012.
4. Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Sasaoka T, Wang Y, Nakanishi S. Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110:342-347, 2013.
5. Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. *Science*, 339:335-339, 2013.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

1.  
発明者: 疋田貴俊、中西重忠  
発明の名称: 大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法  
出願人: 公益財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
出願日: 2010/4/30  
出願番号: PCT/JP2010/003089

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表

1. Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of striatonigral and striatopallidal transmission in reward and aversive behavior. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40<sup>th</sup> Annual Meeting. 2010/11/15 San Diego, USA.
2. 疋田貴俊. 報酬・忌避行動の大脳基底核神経回路機構. 平成23年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ JST セッション. 2011.8.22 神戸(招待講演)
3. 疋田貴俊、木村健介、和田教男、船曳和雄、中西重忠. 報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 第34回日本神経科学大会 2011/9/16 横浜

4. 疋田貴俊. 薬物依存と意思決定における大脳基底核神経回路の制御機構. 平成 23 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2011/10/14 名古屋(招待講演)
5. 疋田貴俊. 運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路の制御機構. 第 27 回日本大脳基底核研究会 2012.6.30 東京(招待講演)
6. Hikida T. Basal ganglia circuit regulation in reward and aversive behavior and drug addiction. 平成 24 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ「シナプス病態」「脳内環境」「自己制御精神」脳疾患関連 3 領域合同シンポジウム 2012.7.25 仙台(招待講演)
7. 疋田貴俊. 直接路と間接路の機能分離. 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRES 2012.10.12 京都(招待講演)
8. 疋田貴俊. 報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構. 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ「動物の行動制御メカニズムの新展開」2012.12.11 福岡(ワークショップ座長)

#### 受賞

- 2010 年 包括脳ネットワーク若手優秀発表賞
- 2011 年 日本神経科学学会奨励賞
- 2012 年 日本生物学的精神医学会若手研究者育成プログラム奨励賞

#### 著作物等

1. 疋田貴俊、神谷篤. 精神疾患モデル動物の可能性 –遺伝子から神経回路へ. 実験医学 28:2205-2210, 2010.
2. 疋田貴俊. 精神疾患の分子遺伝学:最近の知見. 脳神経外科速報、21:1250-1254, 2011.
3. 疋田貴俊、友田利文. 精神疾患モデル動物の作製と治療法スクリーニング. 実験医学増刊、30:2074-2079, 2012.
4. Hikida T, Gamo NJ, Sawa A. DISC1 as a therapeutic target for mental illnesses. *Expert Opin. Ther. Targets*, 16:1151-1160, 2012.
5. 疋田貴俊. 大脳基底核の直接路と間接路の機能分離. Annual Review 神経 2013、pp10-16, 2013.