

背側線条体ドーパミン D2 受容体陽性中型有棘神経細胞の活動は体動と関連する

Activity of D2-medium spiny neurons in the dorsal striatum correspond to body movements

広尾学園高校 2年7組 今田倫太郎

Abstract: The dorsal striatum (DS) is considered a critical component of the motor system. Majority of the dorsal striatal neurons consists of medium spiny neurons (MSNs). Some of MSNs express dopamine receptor type 2 (D2). Here, we examined whether the neuronal activities of D2-MSNs in the DS correspond to body movements or not. We used D2-YC mice, which selectively express a ratiometric Ca^{2+} indicator in D2-MSNs. We observed compound Ca^{2+} activity patterns using a fiber photometry system. Parallel to the measurement, we recorded a movie of the mouse for later analysis and tracking of the body movement. Our data indicate the correlation between the activity of D2-MSNs in the DS and the body movement of the mouse.

Keywords: Fiber photometry system, dorsal striatum, D2-MSNs, Intracellular Ca^{2+} recording, body movement

1. 研究背景

線条体は運動の制御に関わるとされる脳部位である (Graybiel ら, 1994)。脳活動の計測には様々な方法があるが、従来の脳波計測では、線条体などの脳深部の活動計測は難しかった。

近年、脳深部からの細胞種特異的な神経活動計測を可能にしたファイバーフォトメトリーシステムが注目されている (Cui ら, 2013)。本研究では、ファイバーフォトメトリーシステムを用いて、線条体に存在するドーパミン D2 受容体陽性中型有棘神経細胞 (D2-MSNs) と呼ばれる神経細胞の活動を計測した。

2. 研究目的・意義

本研究ではマウスの線条体神経活動が体動と関係するか調べることを目的とした。前述したファイバーフォトメトリーシステムを用いて線条体 D2-MSNs の集合神経活動を計測し、同時にマウスの体動をカメラで記録した。

従来は G-CaMP と呼ばれる単色蛍光を発する Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を用いたファイバーフォトメトリーシステムが主流であった (Chen ら, 2012, Akerboom ら, 2012, Nakai ら, 2001)。しかし、この手法は体動によって引き起こされるノイズに影響されてしまうという欠点があった。本研究では FRET と呼ばれる仕組みを利用し、二色の蛍光を用いて神経活動計測を行うファイバーフォトメトリーシステムを使用した。この方法は単色蛍光を用いた場合と比べ、運動によるノイズを減らすことができるとされている (Kanemaru ら, 2014)。これにより、本研究では体動に伴うノイズを減らした状態で、線条体神経活動と体動の関係を解析することができた。

3. 研究方法

(1) 光ファイバー刺入手術

手術は D2-YC マウスを用いて行った。マウスをケタミンとキシラジン (それぞれ 100 と 10mg/kg) で麻酔した。マウスの背側線条体 (ブレグマより前に 1 mm, 左に 1.8 mm, 頭骨表面より下に 3.5 mm) に光ファイバーカニューラ (CFMC14L05, ϕ 400 μ m, 0.39 NA; Thorlabs) を挿入した。ファイバー刺入時にも蛍光観察を行った。

(2) 細胞内神経活動計測

本研究ではファイバーフォトメトリーシステムを用いて、背側線条体 D2-MSNs の集合 Ca^{2+} 活動を計測した。

(3) 行動解析

計測中のマウスの運動をビデオで撮影した。ビデオを行動解析ソフトウェア Kinovea を使用して解析し、マウスの運動量を定量化した。

(4) 免疫組織化学

麻酔後、マウスを 0.1M リン酸緩衝液 (4%パラホルムアルデヒド) で灌流固定した。抽出した脳を、一晚、後固定した。脳を 20%スクロース/リン酸緩衝液で一晚低温保存した後に、凍結し、

クライオスタットを用いて厚さ 25 μm の切片を作成した。切片は蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence, Osaka, Japan) を使用して撮影した。

4. 結果・考察

(1) 光ファイバー刺入手術は成功した。ファイバー挿入に伴い、蛍光値が上昇するのを確認した。これは光ファイバーを、蛍光物質が発現する細胞が存在する領域に刺入できたことを示す。

(2) 自由行動下のマウスにおいて線条体 D2-MSNs の活動計測に成功した。本研究では二色の蛍光を発する蛍光物質を用いているため、図 1 で示すように黄色、シアン色の二色の蛍光をとらえることができた。先行研究に従い (natsubori ら, 2017)、この比を D2-MSNs の神経活動とみなした。

(3) 図 2 下段で示すように、記録された動画中で、マウスが一秒間に動いたピクセル数を定量化し、マウスの運動の指標とした。この解析により、マウスの運動が活発であった時点を割り出した。図 2 で示すように同時点での神経活動を調べ、背側線条体 D2-MSNs の活動波動とマウスの運動が一致していることが明らかになった。これらの結果は、マウスの運動と背側線条体 D2-MSNs の活動が関連していることを示唆している。

(4) 脳の凍結切片を作成して、ファイバー刺入位置を観察した。光ファイバーカニューラが背側線条体 [-0.1 1.8 -3.5] に挿入されていたことを確認できた。

5. 結論及び今後の展開

本研究はマウスの運動と背側線条体 D2-MSNs の活動が対応することを示した。この結論は先行研究の結果と一致している。さらに、D2-YC マウスを計測に用いることで運動アーチファクトを回避し、ノイズの少ないデータを取得できた。今回用いた、FRET を利用したファイバーフォトメトリーシステムを用いることで、脳の深部の長期計測、運動アーチファクトの少ない活動計測が可能となる。今後、この仕組みを用いて、脳の様々な部位の働きを解明していきたい。

参考文献・引用文献

- A. Graybiel, et al. (1994), 『The basal ganglia and adaptive motor control』, Science, 265(5180):1826-31
- G Cui, et al. (2013), 『Concurrent Activation of Striatal Direct and Indirect Pathways During Action Initiation』, 494(7436):238-242.
- Q. Chen, et al. (2012) 『Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice』, Neuron, 76(2):297-308
- J. Akerboom, et al. (2012) 『Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging』, The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 32(40):13819-13840
- J. Nakai, et al. (2001) 『A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein』, Nature biotechnology, 19(2):137-141
- K. Kanemaru, et al. (2014) 『In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca^{2+} indicator』, Cell reports, 8(1):311-318
- N. M. Hiebert, et al. (2014) 『Striatum in stimulus-response learning via feedback and in decision making』, NeuroImage, 101:448-457
- P. Bonnavion, et al. (2019) 『It takes two to tango: dorsal direct and indirect pathways orchestration of motor learning and behavioral flexibility』, Neurochemistry international, 124:200-214
- R. D. Palmiter, et al. (2008) 『Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice』, Annals of the New York Academy of Sciences, 1129:35-46
- A. Natsubori, et al. (2017) 『Ventrolateral striatal medium spiny neurons positively regulate food incentive, goal-directed behavior independently of D1 and D2 selectivity』, The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 37(10):2723-2733

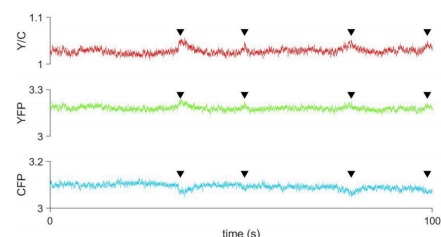


図 1 神経活動(上)は黄色蛍光値(中)とシアン色蛍光値(下)の比を算出して得た

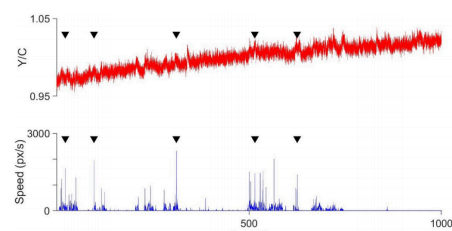


図 2 Ca^{2+} の濃度変化(上)はマウスの運動(下)に対応する