

鳴禽の線条体疾患モデルにおける神経機能障害

Duke University School of Medicine, Neurobiology

田中 雅史

【研究の背景と目的】

線条体は、大脳基底核における入力部として、皮質や皮質下からの入力を統合し、運動制御や学習において重要な機能を担っている (Mink, 1996)。事実、線条体が関与する疾患では種々の深刻な症状が発現し、たとえば、ハンチントン病では、線条体で神経変性が生じた結果、運動制御や発話学習などに障害が生じることが知られている (Walker, 2007)。しかし、広範な機能を有する大脳基底核の神経回路とその動作メカニズムは十分に解明されておらず、これらの疾患における諸症状の神経基盤の多くが不明なままである。その原因の一つとして、ある機能のみに特異的に障害が生じるような疾患モデルが少なく、発見された神経病理を、特定の機能に結びつけることが困難であったことが挙げられる。

そこで、本研究では、鳴禽（歌鳥）の大脳基底核において、歌制御に関与する神経回路の理解が近年目覚しく進展していることに注目し (Doupe et al., 2005; Murugan et al., 2013)、歌鳥の線条体疾患モデルを作成することで、大脳基底核の機能と疾患における病理を明らかにすることを目的とした。歌鳥は、模倣学習によって獲得した複雑な発話パターンを精緻に制御することが知られており (Mooney, 2009)、発話や複雑な運動パターン制御の障害機構を調べる際に、優れた疾患モデルとなる可能性を秘めている。また、本研究で用いたキンカチョウという鳥は、安定した歌パターンを高い再現性で制御することが知られ、大脳基底核の機能不全によって生じたわずかな運動障害も検出できることが期待された。

【研究経過】

本研究では、ハンチントン病の疾患モデルを作成するため、レンチウイルスを用いて、ヒトのハンチントン病の原因遺伝子である、長い CAG 反復配列 (94 CAG) を含んだ変異 HTT 遺伝子のエクソン 1 (**mHTT-Q94**) を、synapsin プロモーターの制御下で、キンカチョウの大脳基底核のうち歌制御に関与する領野 (**Area X**) の神経特異的に発現させた。ウイルス注入の 20 日後には、Area X の神経群にリポーター蛍光タンパク質の発現が確認され、この方法で mHTT を導入できることが示された。本研究では、このハンチントン病モデルを調べた結果、特徴的な運動障害と、それに対応する神経障害を見つけることができた。

1) 発声パターン制御の選択的な障害

通常、キンカチョウは、学習した歌を安定したパターンで歌うことができる (図 1A)。しかし、mHTT-Q94 を発現させた鳥は、新しい発声を歌に取り込んだり、特定の発声を異常に反復したりと、不安定な歌パターンで歌うようになった (図 1B-C)。また、ヒトのハンチント

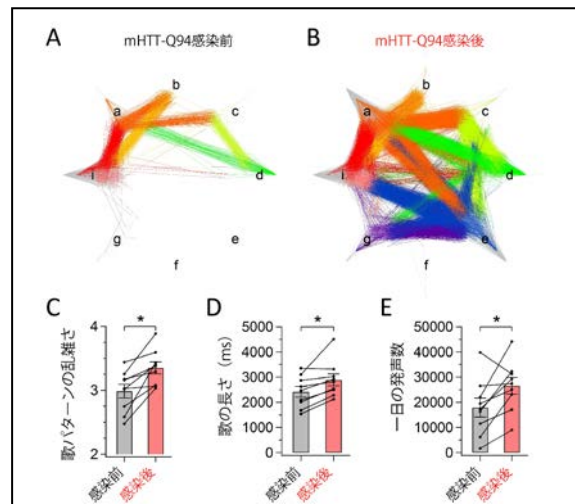


図 1. ハンチントン病モデルにおける異常な歌

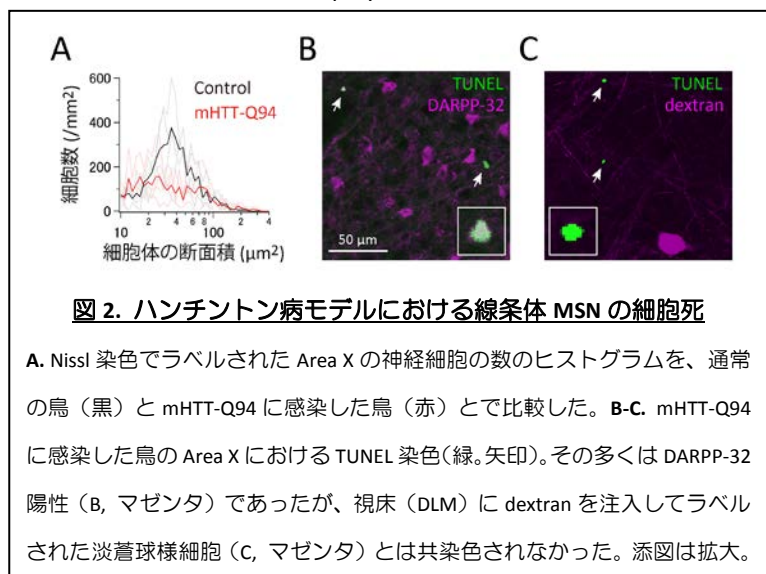
A-B. mHTT-Q94 感染前後の歌パターンを、歌を構成する発声（シラブル。a~g のアルファベットで示した）の遷移の軌跡として描いた。線の色は、先行する発声と対応しており、グレーの線で歌の開始を表した。C-E. mHTT-Q94 感染前後の歌の変化。歌パターンの乱雑さは、2 発声遷移の確率分布のエントロピーで示した。歌の長さは歌で 400 ms 以内に生じた一連の発声の全長とした。一日の発声数には歌以外の発声（地鳴き）も含まれた。

ン病で見られる不随意運動の亢進と対応するように、歌う頻度や持続時間の増大も認められた(図 1D-E)。さらに興味深いことに、これらの異常な歌制御にも関わらず、歌を構成する個々の単純な発声の質は正常に保たれていた。これらの結果から、mHTT-Q94 を発現した鳥では、発声そのものではなく、むしろ発声パターンを制御する機能が選択的に障害を受けている可能性が示唆された。一方、コントロール実験として、より短い 20 の CAG 反復配列を含んだ変異 HTT 遺伝子のエクソン 1 (mHTT-Q20) を導入した鳥では、歌パターンの異常は見られなかったため、長大な CAG 配列を持つ mHTT が運動パターン障害を引き起こすのだと考えられる。

2) 線条体 MSN の細胞死

次に、本研究では、こうした運動パターン障害と相関する神経障害を探索した。一般に、ハンチントン病や mHTT は、線条体の神経変性を引き起こすことが知られている (Gil and Rego, 2008; de Almeida et al., 1998)。そこで、mHTT-Q94 を発現した鳥の Area X の神経細胞を Nissl 染色で染めてみたところ、細胞数が減少していることが明らかになった(図 2A)。特に減少が著しかったのは、細胞体が小さい神経細胞で、線条体を構成する主な神経細胞である中型有棘神経 (medium spiny neuron: MSN) が選択的に減少

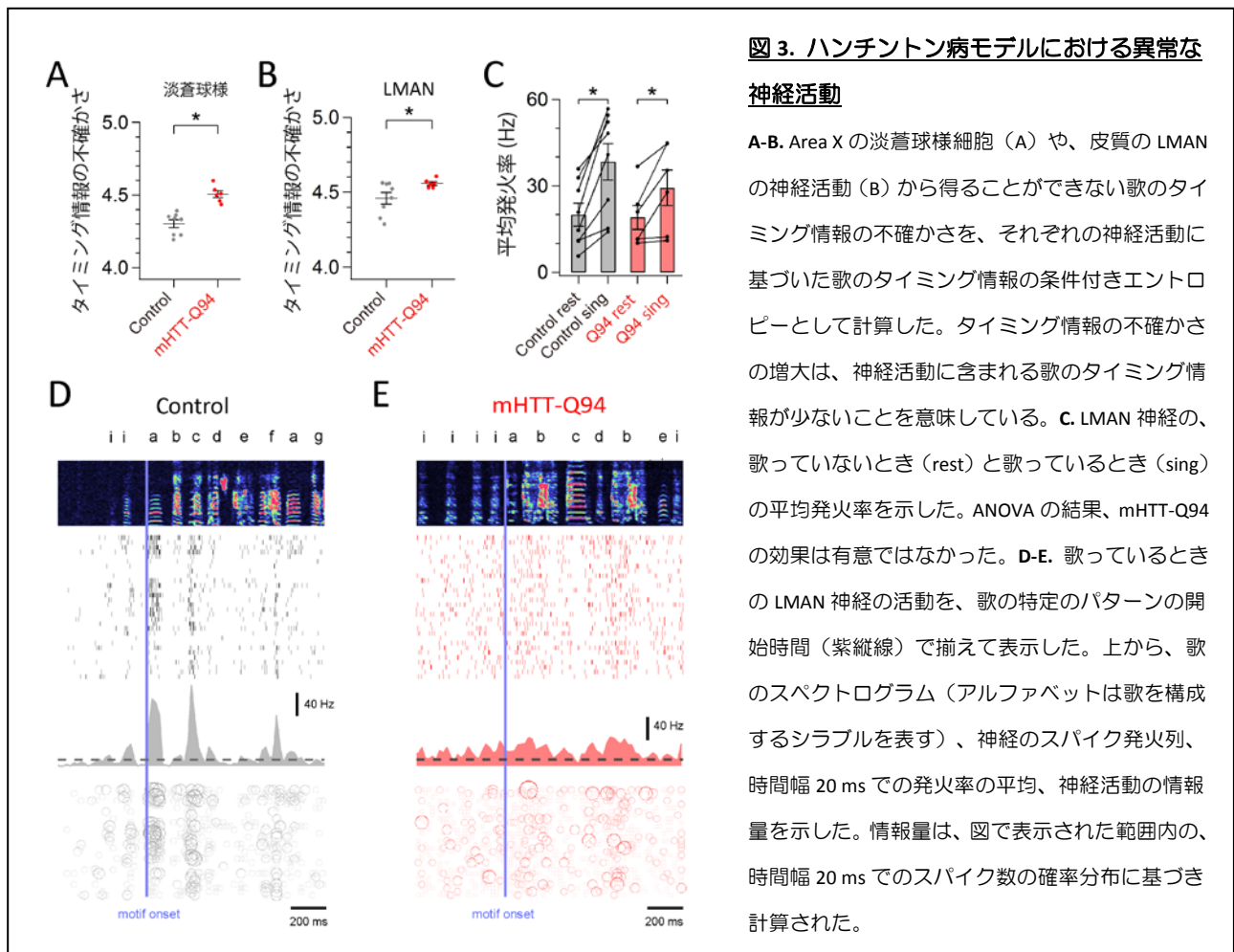
している可能性が示唆された。そこで、TUNEL という手法を用い、アポトーシスが生じている細胞をラベルした結果、これらの細胞の多くが、MSN のマーカーである DARPP-32 と共染色された(図 2B)。一方、逆行性トレーサーを用いて、大脳基底核の出力細胞である淡蒼球様細胞をラベルしたところ、これらの細胞はアポトーシスを起こしていなかった(図 2C)。このことから、mHTT-Q94 を発現した鳥の Area X では、MSN 選択的に細胞死が生じることが示唆された。



3) 大脳基底核とその下流の神経における神経活動の異常

MSN は、複雑な運動パターンの制御を行っている際に、特定のタイミングで発火することが知られている (Jin and Costa, 2010; Woolley et al., 2014)。したがって、MSN が失われると、こうした運動のタイミング情報が、下流の情報処理経路へ十分に伝達されない可能性が考えられる。こうした仮説を検討するため、シリコンプローブを Area X へ慢性的に埋め込み、鳥が歌っているときの神経活動を記録した。その結果、mHTT-Q94 に感染した鳥では、MSN から抑制入力を受けることが知られている Area X の淡蒼球様細胞において、歌っている際の発火率の変動が減少し、神経活動がコードする歌のタイミング情報が減少していることが明らかになった(図 3A)。

淡蒼球様細胞は、Area X で処理された情報を、主に、視床を経由して、皮質の LMAN という神経核に送ることによって、歌を調節していると考えられている (Mooney, 2009)。そこで、シリコンプローブを用い、歌っているときの LMAN の神経活動を記録したところ(図 3B-E)、mHTT-Q94 に感染した鳥では、LMAN においても、歌のタイミング情報が減少していることが明らかになった(図 3B)。さらに、LMAN では、バースト発火が減少するなど、神経活動の時間的特性に異常が認められた一方で、発火率には顕著な変化は見られなかった(図 3C)。LMAN の活動を亢進させると、歌パターンの分散が増大することが知られており (Hamaguchi and Mooney, 2012)、このように、LMAN が、十分なタイミング情報を含まないシグナルを送り続けていることは、歌の制御に悪影響を与える可能性がある。



4) LMAN 不活性化による発声パターン障害の回復

そこで、LMAN の異常な活動が歌に及ぼす影響を検討するため、mHTT-Q94 に感染した鳥において、LMAN の神経活動を、GABA_A 受容体の作動薬である muscimol を注入することで不活性化させた (図 4)。すると驚いたことに、これらの鳥における発声制御の障害が回復し、不安定になっていた歌パターンは安定化し、歌の長さも短くなること明らかになった (図 4)。この結果は、歌のタイミング情報を十分に含まない LMAN の異常な活動が、ハンチントン病モデルにおける発声パターン障害の主要な原因であることを強く示唆する。現在、これらの結果をまとめ、学術論文へ投稿する準備を進めている。

【研究成果のまとめ】

本研究では、歌鳥の脳基底核 (Area X) の神経細胞に mHTT-Q94 を発現させることで、歌の発声パターンの制御に選択的に障害が生じるという興味深い疾患モデルを生み出すことができた。この疾患モデルでは、線条体 MSN の細胞死が生じることで、MSN がコードしていたと思われる運動のタイミング情報が下流の神経活動から失われ、その結果生じた異常な神経活動が、発声パターン制御の障害を引き起こしたと考えられる。

本研究で作成したハンチントン病モデルは、脳基底核の神経細胞の一部に、mHTT のエクソン 1 を強制発現させるものであり、病気の進行

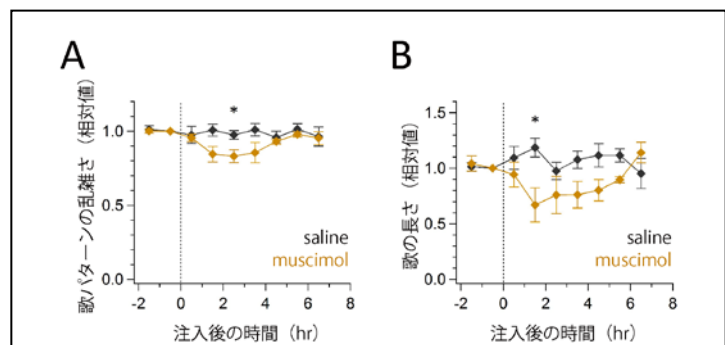


図 4. LMAN 活動の不活性化による運動障害の回復

A-B. カニユレを慢性的に脳に挿入し、LMAN へ muscimol (オレンジ) または生理食塩水 (saline, 黒) を注入した前後の、歌パターンの乱雑さ (A) と歌の長さ (B) の推移。注入前の 1 時間の値を 1.0 とした。

に伴って皮質の神経変性も見られる現実のハンチントン病とは、多くの点で異なる。また、歌鳥と哺乳類の大脳基底核が形成する神経回路にどこまで同質性を認められるかについても、直接路と間接路の存在を含め、いまだ不明な点が多い (Doupe et al., 2005)。しかし、ヒトのハンチントン病でも、MSN が神経変性を生じやすいことは知られており (Gil and Rego, 2008)、この MSN が運動のタイミング情報を担っている可能性は、哺乳類でも指摘されている (Jin and Costa, 2010)。したがって、本研究で見つかった病理メカニズムが、現実のハンチントン病の障害の一部を構成している可能性は十分に考えられるであろう。事実、ハンチントン病の患者でも、運動のパターン制御が障害を受けるという報告があり、動作緩慢との関連が指摘されている (Thompson et al., 1988)。大脳基底核の疾患は非常に広範な病態を呈するため、本研究のように、個々の症状に標的を絞った病理の探求は、今後も有用であると思われる。

一方、歌鳥の歌の制御と、ヒトの言語に關与する神経回路の共通点を指摘する研究は年々増えており (Doupe et al., 2005; Pfenning et al., 2014)、本研究で作成した疾患モデルは、大脳基底核の障害における発話障害の病理を探求する際にも、優れた疾患モデルとなる可能性がある。発話障害は、ハンチントン病や他の大脳基底核疾患においても深刻な病態の一つであり、また、その治療として、特定の部位破壊や深部脳刺激 (DBS) などを適用した際にも発話障害が生じる例が知られている (Murdoch, 2010)。本疾患モデルでは、MSN の減少によって、下流の神経回路、特に皮質 LMAN で異常活動が生じることで、正確な発声パターンの制御に障害が生じていた。LMAN は、哺乳類のプロード野と類似しているとも言われるが、残念ながら、いまだ相同な脳部位は同定されていない (Pfenning et al., 2014)。今後、本研究で作成したハンチントン病モデルを用いて、LMAN や、そのさらに下流で運動パターン制御に關与する神経核や受容体などを探求し、臨床的に有用な標的を探索する必要があるであろう。

【研究成果】

学会発表 (ポスター)

Tanaka, M., Murugan, M., and Mooney, R. Expressing mutant Huntingtin in the songbird basal ganglia increases song variability. 44th SfN annual meeting. Washington D.C., USA. Nov 2014.

【文献】

de Almeida, L. P. et al. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22: 3473-83.

Doupe, A. J. et al. (2005). Birdbrains could teach basal ganglia research a new song. *Trends in Neurosci.* 7: 353-63.

Gil, J. M. and Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci.* 27: 2803-20.

Hamaguchi, K. and Mooney, R. (2012). Recurrent interactions between the input and output of a songbird cortico-basal ganglia pathway are implicated in vocal sequence variability. *J Neurosci* 32: 11671-87.

Jin, X. and Costa, R. M. (2010). Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning. *Nature.* 466: 457-62.

Mink, J. W. (1996). The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog in Neurobiol* 50: 381-425.

Mooney, R. (2009). Neural mechanisms for learned birdsong. *Learn Mem.* 16: 655-669.

Murdoch, B. E. (2010). Surgical approaches to treatment of Parkinson's disease: Implications for speech function. *Int J Speech Lang Pathol* 12: 375-84.

- Murugan, M., Harward, S., Scharff, C., and Mooney, R. (2013). Diminished FoxP2 levels affect dopaminergic modulation of corticostriatal signaling important to song variability. *Neuron*. 80: 1-13.
- Pfenning, A. R. et al., (2014). Convergent transcriptional specializations in the brains of humans and song-learning birds. *Science* 346: 1256846.
- Thompson, P. D. et al. (1988). The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. *Brain* 111: 223-44.
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet* 369: 218-28.
- Woolley, S. C. et al. (2014). Emergence of context-dependent variability across a basal ganglia network. *Neuron* 82: 208-23.