

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06898

研究課題名(和文) アストロサイトの微細プロセス別に異なるドーパミン受容体サブタイプが発現する可能性

研究課題名(英文) Possible expression of D1 and D2 dopamine receptors in the fine processes of astrocytes in striatum of adult mouse

研究代表者

長友 克広 (Nagatomo, Katsuhiro)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30542568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：成体マウスから急性単離した細胞のドーパミン受容体発現解析を行ったところ、線条体アストロサイトのプロセスにDrd1およびDrd2の発現が認められ、プロセス毎に異なるドーパミン受容体を発現している可能性が示唆された。そこで、プロセス毎のドーパミン受容体機能解析を目的とした。標的とするアストロサイトを効率よく見出すことができず、異なるベンダーのGFAP抗体で脳スライスを免疫染色したところ、GFAPを発現するアストロサイトが線条体には非常に少ないことがわかり、急性単離法によるアプローチを取り止めた。改めて、急性単離した状態から初代培養に持ち込むことで機能解析することとして実験を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動調節機能などを司る大脳基底核のうち、線条体を構成するほとんどの細胞は神経伝達物質であるドーパミン(DA)によって調節を受ける。線条体を構成する細胞のうち、アストロサイトの極細細胞突起に、細胞内シグナルが正反対のDA受容体が存在する可能性が示唆された。この特殊なアストロサイトのドーパミン受容体機能を解析する研究である。両受容体が機能しているとすれば、単体の細胞で1つの神経伝達物質を受容して、異なる情報出力をすることから、線条体では情報伝達のハブとして機能していることが予想される。また、将来的に、脳機能を模して開発された既存のコンピュータを、さらに進化させる基盤研究となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the functions of dopamine D1 and D2 receptors in the fine processes of GFAP-expressing astrocytes in the striatum of adult mice under acute dissociation. Empirically, our serial immunochemical studies of acutely dissociated cells showed that GFAP-expressing astrocytes in the striatum have lower intensities of GFAP immunoreactivity than the substantia nigra (SNr), and the numbers of astrocytes are lesser in the striatum than in the SNr. Although I had a bias that astrocytes are essential and ubiquitously localized in the brain, anti-GFAP antibody immunostainings showed a sparse distribution of striatal astrocytes in the sagittal brain sections of adult mice. Another astroglial marker, 3-PGDH, showed a similar trend. Using acutely dissociated cells for function assays was inefficient for relatively few GFAP-expressing astrocytes in the striatum. Instead, primary culture cells originating from the striatum of adult mice can be used for functional assays.

研究分野：神経科学

キーワード：ドーパミン受容体

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、もともと大脳基底核の最終出力核のひとつである黒質網様部に隣接する緻密部ドーパミンニューロンの樹状突起から放出されるドーパミンの標的細胞の探索に始まる。黒質網様部はドーパミン D1 受容体が密に発現しており、その細胞実体として急性単離アストロサイトに D1 受容体が発現していることを報告した。また、対照として線条体から急性単離したアストロサイトはドーパミン D1 受容体を発現する群としない群に分かれていた (Nagatomo et al, Front Neuroanat, 2017)。中型有棘神経細胞が D1 受容体と D2 受容体に分かれている知見から線条体アストロサイトの D1 受容体を発現しない群には D2 受容体が発現している可能性が示唆されたため、D2 受容体発現解析に至り、D1 受容体・D2 受容体・GFAP の 3 重免疫染色により、GFAP 標識された線条体アストロサイトには D1 受容体と D2 受容体を共に発現しており、どちらか片方だけ発現しているということではなく、共発現しており、その強度が強いアストロサイトから弱いアストロサイトになっているようであると示唆された。さらに、プロセス毎にいずれかの受容体を発現している、もしくは、プロセス 1 本あたりについてまだらに各受容体が発現しているような染色像が得られていた。

2. 研究の目的

D1 受容体と D2 受容体の細胞内シグナル経路はそれぞれ D1/Gs と D2/Gi となっており、アデニル酸シクラーゼに対して真逆のシグナル経路となっているため、実際にプロセス上の受容体が機能しているのか、また、それぞれのプロセスでどのような応答がなされるのか、さらに細胞体で情報統合されるのか、成体マウスの線条体アストロサイトについて詳細に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

【当初予定】成体マウスの線条体（前交連より吻側）を含む脳スライスを氷冷下薄切し、酵素処理に加えて、ガラスピペットで機械的に吸引吐出を繰り返し、段階的にピペット径を小さくしながら、細胞をカバーガラスまたはガラスボトムディッシュに単離する。アストロサイトの識別は形態、もしくは、事前に腹腔投与した SR-101 により赤色標識する。膜電位色素 di-3-ANEPPDHQ、または、カルシウムインジケーター Fluo-4 を用いて、D1 受容体もしくは D2 受容体の選択的作動薬および阻害剤により受容体選択的に機能解析を行う。

【研究方法変更後】当初予定と同様に線条体アストロサイトを急性単離する。Neurobasal A を基本とする培地を用いて、数日間培養し、細胞増殖後、当初予定と同様の生理薬理学実験に供する。

4. 研究成果

研究当初より想定外に、成体マウス線条体から急性単離したアストロサイトを数多く観察することができず、また、アストロサイトを発見できたとしても免疫染色を行っていた時と異なりプロセスをうまく認識することができず、申請時点での実験方法に障害を来していた (図 1)。

そもそも、アストロサイトは脳全体に偏りなく散在しているだろうという認識が間違っていたことを、学生と実施した免疫染色実験により目の当たりにされることになった。用いたアストロサイト標識用 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体の精度にも依存する可能性があり、以前から使用していた DAKO 社抗体 (ただし、旧製品は製造中止となり抗体が希釈された新製品) およびニットボーメディカル社抗体で検討したところ、両抗体による染色は、いずれもマウス線条体において GFAP 標識アストロサイトが疎になった (図 2)。

さらに、アストロサイトを標識する 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH) 抗体でも確認したところ、GFAP 染色像と同様に、線条体におけるアストロサイトが疎となる結果となった。

調べたところ、線条体におけるニューロン-アストロサイト比 (ニューロンは中型有棘神経細胞に限定される) は、80:1 となっており、他のニューロンを加味すると、線条体におけるアストロサイトの存在比率は相当少ないことが分かった (Oorschot, J Comp Neurol, 1996; 第 5 章, Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, 2nd)。参考までに、黒質網様部ではニューロン-アストロサイト比は 1.3:1 となっており、この情報は経験的に感じていた感覚とも合致している。

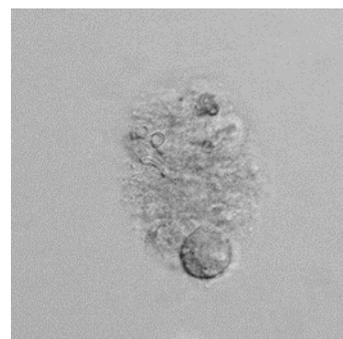


図 1 未固定アストロサイト

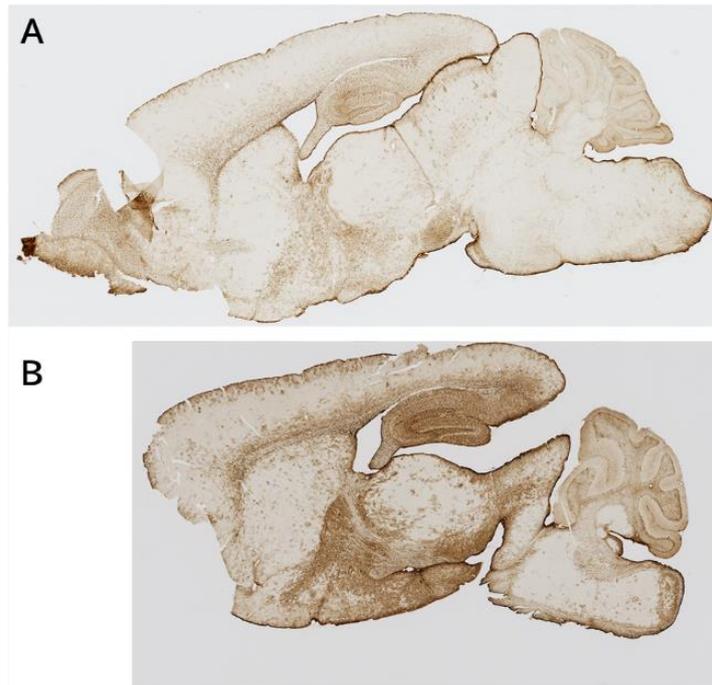


図2 GFAP 標識アストロサイトは神経核により細胞蜜が異なる
A. DAKO 社抗体, B. ニッソーボーメディカル社抗体

そこで、申請時点の実験方法から初代培養を利用する実験方法に変更することにした。図1に示した急性単離後のアストロサイト（図3A）から培養し、雲状プロセスの中から新たなプロセスが伸長すれば、そのプロセスに対して機能解析可能と予想した（図3B）。Neurobasal Aを基本培地として、種々追加する成分を変更し培養条件を検討したが、結果として雲状プロセスからプロセスが伸長することはなく、培養皿底面に接着したアストロサイトが増加した（図3C）。培養日数をおって観察したところ、2次元細胞となっているが、徐々に細胞突起を伸ばし、種々形態変化することが判明した（図3D）。増殖した細胞については免疫染色によりGFAP陽性であることを確認したが、線条体アストロサイトのGFAP発現量は黒質網様部と比較すると少ないことがわかった。

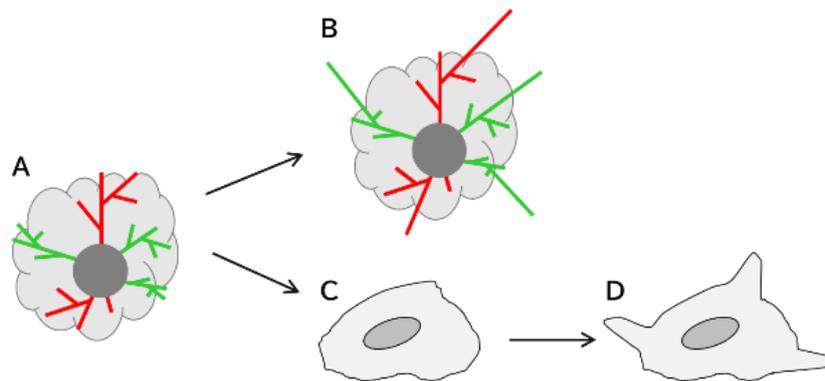


図3 初代培養アストロサイトの模式図

また、線条体に存在するアストロサイトはそもそも少ないことから、成体マウス線条体から急性単離する際に用いるチェンバーをシリコンで作製し、単離した細胞が定着する面積（容積）が最低限度小さくなるようにした。黒質網様部から単離・初代培養したアストロサイトと比較するとやはり獲得できる細胞数自体が少ないため、細胞を単離してくる脳片の大きさを検討する必要がある。

現状、サンプル数が少なくGFAP抗体染色に留まっているため、今後、初代培養細胞として立ち上がってきたアストロサイトにおけるD1およびD2受容体発現解析を実施する必要があるが、いくつかの試行を経て、成体マウス線条体アストロサイトの初代培養系を用いて、薬理的に機能解析に用いることができる状態に至った（図4）。

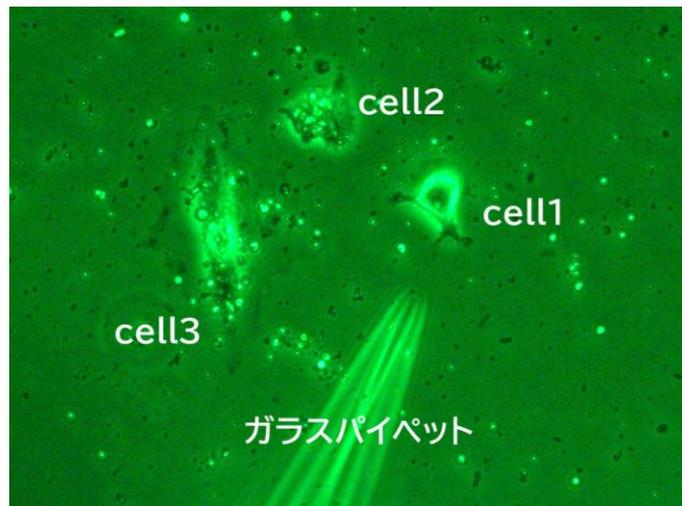


図 4 初代培養アストロサイトをを用いた薬理実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Agnieszka M., Yonekura Manabu, Nagatomo Katsuhiko, Niwa Yasutaka, Itagaki Shirou, Murakami Manabu	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid method for plasmid DNA recombination (Murakami-system)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 102167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2023.102167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Agnieszka M., Nagatomo Katsuhiko, Miyoshi Ichiro, Itagaki Shirou, Niwa Yasutaka, Murakami Manabu	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel binding site between the voltage-dependent calcium channel CaV1.2 subunit and CaV 2 subunit discovered using a new analysis method for protein-protein interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-41168-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuhiko Nagatomo
2. 発表標題 A method for acutely dissociation of melanocytes of mouse leptomeninges
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katsuhiko Nagatomo
2. 発表標題 Isolation of the leptomeningeal melanocytes in mice
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------