

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：82674

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200015

研究課題名（和文） 常同行動を誘発する皮質線条体ストリオソーム回路の生理特性

研究課題名（英文） Physiological characteristics of the striatal striosome circuits

研究代表者

青崎 敏彦 (AOSAKI TOSHIHIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：70221033

研究成果の概要（和文）：常同行動に関連する神経回路の一部である線条体ストリオソームの投射ニューロンは μ オピオイド受容体を持つが、この μ オピオイド受容体はムスカリン受容体と拮抗していた。行動パターン形成時のアセチルコリンの放出低下は protein kinase C の低下を来し、 μ オピオイド受容体活性化による線条体ニューロンに対する抑制性シナプス後電流の抑制を更に増強することによってストリオソームの活動を脱抑制する。

研究成果の概要（英文）：Output neurons of the striosome compartment of the striatum are one of the important components the neural pathway responsible for development and execution of stereotyped behaviors. They are exclusively equipped with μ -opioid receptors in the striatum. We found that prior blockade of protein kinase C (PKC) augments the suppressive effect of μ -opioid receptors (MORs) on the GABAergic inhibitory postsynaptic current (IPSC) in the MOR-rich striosomes of the striatum. Interestingly, Striatal medium spiny neurons have muscarinic acetylcholine receptor subtypes M_1 and M_4 , among which M_1 activates the phosphoinositide signaling pathway yielding PKC. We examined whether acetylcholine regulates MOR's effects on presynaptic IPSC by binding to the M_1 receptor, and found that IPSC suppression by the MOR agonist DAMGO was significantly augmented and prolonged by the PKC inhibitor chelerythrine and attenuated by the PKC activator PDBu. These results suggest that PKC activity modulates MOR's effect via muscarinic receptors in the striosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経筋肉生理学

キーワード：神経系病態生理

1. 研究開始当初の背景
一見均一の構造を持つように見える線条体
- にはストリオソームという、周囲の線条体（マトリックス）とはその神経連絡も神経伝

達物質受容体もさらに発生学的にも異なるユニークな構造物が埋め込まれている。解剖学的には線条体ストリオソームは線条体の中で唯一 μ オピオイド受容体を持ち、眼窩前頭葉皮質、前帯状皮質、尾側前頭前野皮質、および扁桃体からの入力を受けて黒質ドーパミンニューロンに直接投射する。従って、ストリオソームは行動の動機付けやプログラミング、行動の情動的側面に深い関わりがあるのではないかと想像されてきた。臨床的には、患者さんの脳の病理学的検索から、鬱を伴うハンチントン病、伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム (XDP, DYT3, lubag 病)、ドーパ反応性ジストニアが線条体ストリオソームの「神経変性による細胞死」によって起こると考えられている。他方、細胞死には至らないがストリオソームの「機能異常」と考えられるものに強迫性障害 (obsessive-compulsive disorder, OCD) およびチック、Tourette 症候群 (TS)、コカインやアンフェタミンによる薬物依存がある。特に OCD 患者の脳の機能画像所見はストリオソームを中心とした入出力回路ときわめてよく一致しているので、ストリオソームをめぐる回路は別名「OCD 回路」とも呼ばれている。OCD は強迫思考 (obsessions) と強迫行為 (compulsions)、強迫性恐怖を特徴とする神経症性障害である。従って、常同行動の発現の機序の解明には線条体ストリオソームの生理特性を調べる必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 線条体ストリオソームの投射ニューロンとマトリックスの投射ニューロンとの間にどのような生理学的な違いがあるかを調べる。
- (2) 大脳皮質由来の興奮性入力に対する応答と線条体内に由来する抑制性入力に対する応答が、 μ オピオイド受容体の活性化によってどのように変化するか、線条体ストリオソームの投射ニューロンとマトリックスの投射ニューロンで比較する。
- (3) 線条体内に由来する抑制性入力の μ オピオイド受容体の活性化による抑制の機序について調べる。
- (4) 行動パターンの形成時には線条体にドーパミンの放出の増加と同時にアセチルコリンの放出の低下が起こる。このときストリオソームの投射ニューロンにおける μ オピオイド受容体の活性化は線条体のシナプス可塑性にどのような影響を与えるのかについて調べる。
- (5) 線条体に内在することが知られている tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ニューロンの生理解剖学的状況について調べる。

- (6) アンフェタミン慢性投与によって作成した常同行動マウス脳を用いて線条体ストリオソームの投射ニューロンとマトリックスの投射ニューロンの間にシナプス可塑性の形成に違いがあるか調べる。

3. 研究の方法

- (1) 実験動物。我々は tyrosine hydroxylase 遺伝子のプロモーター領域に GFP を組み込んだトランスジェニックマウス (TH-GFP マウスと略す) から皮質-線条体スライスを作成して蛍光顕微鏡下に観察すれば、線条体ストリオソームを線条体の中に光る領域 (dopamine islands とも言う) として同定することができることを見出し、ストリオソームには特異的に μ オピオイド受容体を持つ GABA 細胞群が密集していて抑制性シナプス後電位 (IPSP) を抑制することを見だし、本研究でもこのマウスを用いた。
- (2) TH-GFP マウスから脳を取り出し、皮質-線条体スライスを作成して蛍光顕微鏡下にパッチクランプ記録を行い、さらに免疫組織学的に記録したニューロンを染色する。
- (3) 常同行動マウスモデルの作成。TH-GFP マウスにメタンフェタミンを慢性投与する。アンフェタミンやコカインをマウスに慢性投与すると繰り返し head bobbing, rearing, sniffing などの特徴的な常同運動 (motor stereotypy) を生じるが、このとき線条体ストリオソームでは immediate early gene の Fos, Fra, Jun B の発現が選択的に増加し、マトリックスでは逆に発現の抑制が見られることが知られているので組織学的に確認する。また、行動学的にも評価する。
- (4) 常同行動マウスモデルから皮質-線条体スライスを作成し、大脳皮質に刺激電極を置き、テタヌス刺激によりシナプス可塑性を調べる。

4. 研究成果

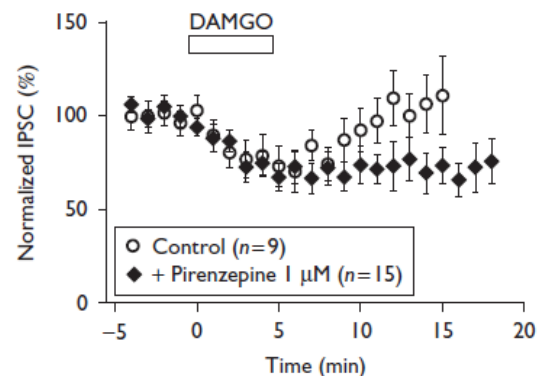
- (1) 線条体ストリオソームの投射ニューロンとマトリックスの投射ニューロンの間には明瞭な生理学的な違いが見られた。ストリオソームの投射ニューロンはより浅い静止膜電位と大きな入力抵抗が特徴的であった。静止膜電位のほうは成熟につれて差はなくなっていくが、入力抵抗は大きいままであった。
- (2) μ オピオイド受容体の活性化は DAMGO の投与によって行った。大脳皮質由来の興奮性入力に対する応答はストリオソームの投射ニューロンもマトリックスの

投射ニューロンも全く同程度に弱い抑制を受けた。これは皮質線条体投射の神経終末に μ オピオイド受容体が存在するからで、シナプス前性の現象であった。これに対し、線条体内に由来する抑制性入力に対する応答は DAMGO による μ オピオイド受容体の活性化によってマトリックスでは何の変化も起こらなかったが、ストリオソームの投射ニューロンでは著名な抑制が見られた。この抑制もシナプス前性であった。その根拠は、①シナプス後の投射ニューロンの G タンパクを不活化してやっても、抑制性応答が DAMGO によって小さくなること、②抑制性応答の paired pulse ratio (1 回目の抑制性応答の大きさを 2 回目のものを割った比) が DAMGO 投与で有意に大きくなること、③抑制性の微小電流を調べると DAMGO 投与で大きさは変わらないのに、頻度だけが減ること、である。

- (3) 線条体内に由来する抑制性入力の μ オピオイド受容体の活性化による抑制の機序について調べたところ、4-aminopyridine 感受性の K チャネルが cAMP 依存性に開くからであることが明らかとなった。面白いことに予め protein kinase C (PKC) を抑制しておくこと、この DAMGO による抑制性シナプス後電流 (IPSC) の抑制はさらに増強することがわかった。
- (4) 記憶形成において線条体ではドーパミンの大量の放出とアセチルコリンの放出低下が起こる。線条体ストリオソームは μ オピオイド受容体を持ち、動機付けの情報を受けるので、線条体の投射ニューロンへの抑制性入力に μ オピオイド受容体とムスカリン受容体の活性化でどのような影響を受けるかを TH-GFP マウスの脳スライスを用いて電気生理学的に調べた。実験はストリオソームを可視化した遺伝子改変マウス (TH-GFP マウス) から皮質線条体スライスを作成し、線条体の投射ニューロンからの whole cell patch clamp 記録を行った。記録する細胞の近傍に刺激電極を置いてマトリックスにある細胞はマトリックス由来の GABA を、ストリオソームにある細胞はストリオソーム由来の GABA を受けるようにした。発生させた GABA 作動性 IPSC はストリオソームにおいてのみ μ オピオイド受容体の作動薬である DAMGO によって濃度依存的に抑制され、1 μ M DAMGO では 21% の抑制をみた。あらかじめ PKC inhibitor である chelerythrine を投与しておくこと、DAMGO による IPSC の抑制効果は 30% となり抑制が増強した。同様に PKC activator である phorbol

ester を投与しておくこと IPSC は逆に 15% 増えた。更に muscarine 受容体の作動薬・阻害薬をそれぞれ投与したところ、M1 受容体の阻害薬である pirenzepine で 31% 抑制され、DAMGO による IPSC 抑制効果の増強が引き起こされた。これらの結果から、線条体の局所回路においては μ オピオイド受容体と muscarine 受容体とは拮抗していることが示唆された。つまり、ムスカリン受容体の阻害は protein kinase C の低下を来し、 μ オピオイド受容体活性化による線条体ニューロンに対する抑制性シナプス後電流 (IPSC) の抑制を更に増強する。すなわち、記憶形成時のアセチルコリンの放出低下はドーパミンの大量の放出を促すと同時に動機付けの情報を持つストリオソームの活動を脱抑制すると考えられる。

(下図はムスカリン受容体をブロックすると抑制性のシナプス後電流が大きくなるばかりでなく、効果も延長することを示している。)



- (5) 線条体にドーパミン産生能を持つ細胞があることは知られているが、この細胞の生理学的性質についてはよくわかっていない。線条体投射ニューロンがドーパミン枯渇と L-DOPA 投与によりドーパミン産生能を持つようになるという仮説をマウス線条体に存在するチロシンヒドロキシラーゼ mRNA 陽性細胞と投射ニューロンの生後発達を比較して検証した。その結果、線条体 GFP 陽性細胞は生後発達につれてやや減少はするものの成体でもかなり残っていた。しかし、GFP 陽性ではあっても TH 免疫染色で陽性のものは殆どなかった。ドーパミン受容体欠損マウスとの交配によって得られたマウスでは有意に GFP 陽性細胞が増えており、この細胞の多くは TH 陽性であった。また、ドーパミンニューロンの神経毒である MPTP と 3-NP の投与でパーキンソン病マウスを作成すると TH 陽性の GFP 陽性細胞が 15% が増えることがわかった。したがって、この GFP 細胞

は近年パーキンソン病患者脳や霊長類の脳でドーパミン枯渇後に線条体に誘導されて出てくるドーパミン細胞の前駆体ではないかと考えられる。この細胞は一様ではなく、電気生理学的に少なくとも2種類あることがわかった。この細胞は常時線条体原基から産生され、線条体に遊走してきてそこで分裂し、病的状態に備えて形質を発現する細胞であると思われる。ストリオソームとマトリックスとの関連について調べた結果、発達初期においてはストリオソームに限局しているものの、発達にともなってマトリックスに散在し、両者双方に見られるようになることがわかったため、このニューロンは常同行動の発現には関係していないことが明らかとなった。

- (6) アンフェタミン慢性投与による行動の評価は齧歯類で知られる常同行動をリストアップし、得点化して常同行動を記録した。行動の記録を行った後、組織学的にc-fosの発現の程度を線条体のストリオソームおよびマトリックスに分けて定量化した。その結果、部位による違いはあるものの線条体ストリオソームにc-fosの発現が多いことが明らかになった。次にこの線条体ストリオソーム局所神経回路が皮質線条体路のテタヌス刺激によってどのようなシナプス可塑性の性質を持つか明らかにしようと試みた。方法は皮質-線条体-視床スライスを作成し、蛍光顕微鏡下に光るストリオソームを同定した。ストリオソームは μ オピオイド受容体に富む領域なので、実験のあと免疫抗体染色を行って確認した。しかし、長時間の記録は難しく、結果もさまざまに整合性のあるデータの取得は困難であることがわかった。
- (7) 位置づけとインパクト。これまで不明であったストリオソームの生理的意義がより一層明らかになったことは今後さらにストリオソームが関係すると考えられる様々な疾患（ハンチントン病、伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム、ドーパ反応性ジストニア、強迫性障害、チック、Tourette症候群、コカインやアンフェタミンによる薬物依存など）の理解と治療に役立つものと思われる。
- (8) 今後の展望。線条体ストリオソーム局所神経回路におけるシナプス可塑性のデータは、長時間の記録が難しく、結果もさまざまに整合性のあるデータの取得は困難であることから、戦略を変更し、今後は微小興奮性シナプス後電流（miniature EPSC）がアンフェタミン慢

性投与によりどのように変化するか、アンフェタミン慢性投与 TH-GFP マウスで調べることにしている。

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11件）

- ① Ose, Y., Miura, M., Inoue, R., Andou, N., Aosaki, T., Nishimura, K. Imbalanced suppression of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto mouse striatal projection neurons during start of anesthesia induction with sevoflurane in vitro. **European Journal of Neuroscience**, 査読有り 35: 1396-1405, 2012. doi:10.1111/j.1460-9568.2012.08065.x
- ② Inoue, R., Aosaki, T., Miura, M. The suppressive effect of μ -opioid receptors on GABAergic IPSC is modulated by alteration of PKC activity via muscarinic receptors in striosomes of the mouse striatum. **NeuroReport**, 査読有り 23(3):184-188, 2012. DOI:10.1097/WNR.0b013e32834faab0
- ③ Masuda, M., Miura, M., Imanishi, M., Saino-Saito, S., Inoue, R., Takada, M., Kobayashi, K., Aosaki, T. Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. **European Journal of Neuroscience**, 査読有り 34:1355-1367, 2011. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07873.x
- ④ 三浦正巳、井上律子、青崎敏彦 和文総説：「パーキンソン病におけるコリン作動性ニューロン」 **Clinical Neuroscience**, 査読なし Vol. 30 No.6, 697-699 中外医学社、2012年 https://www.chugaiigaku.jp/modules/shop/index.php?main_page=product_info&cPath=3_73&products_id=1260
- ⑤ Ebihara, S., Tomida, S., Mamiya, T., Sakamaki, H., Miura, M., Aosaki, T., Masuda, M., Niwa, M., Kameyama, T., Kobayashi, J., Iwaki, Y., Imai, S., Ishikawa, A., Abe, K., Yoshimura, T., Nabeshima, T. *Usp46*, encoding a ubiquitin specific peptidase, is a quantitative trait gene underlying “behavioral despair” in mice. **Sleep**

- and Biological Rhythms, 査読有り 8 (2) : 114-119 , 2010. DOI: 10.1111/j.1479-8425.2010.00435.x
- ⑥ Ageta, H., Ikegami, S., Miura, M., Masuda, M., Migishima, R., Hino, T., Takashima, N., Murayama, A., Sugino, H., Setou, M., Kida, S., Yokoyama, M., Yoshihisa Hasegawa, Y., Tsuchida, K., Aosaki, T., Inokuchi, K. Activin Bi-directionally Controls the Fate of Fear Memory. **Learning and Memory**, 査読有り 17:176-185, 2010. doi: 10.1101/lm.16659010
- ⑦ Aosaki, T., Miura, M., Suzuki, T., Nishimura, K. and Masuda, M. Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. **Geriatrics and Gerontology International**, 査読なし 10(Suppl.1): s148-s157, 2010. doi: 10.1111/j.1447-0594.2010.00588.x
- ⑧ 三浦正巳、増田正雄、青崎敏彦 「中枢神経系におけるドーパミン受容体のはたらき」 **生体の科学** 査読なし 60(5):4123-413, 2009 総説 <http://ej.islib.jp/ejournal/2425100895.html>?
- ⑨ Tomida, S., Mamiya, T., Sakamaki, H., Miura, M., Aosaki, T., Masuda, M., Niwa, M., Kameyama, T., Kobayashi, J., Iwaki, Y., Imai, S., Ishikawa, A., Abe, K., Yoshimura, T., Nabeshima, T., Ebihara, S. Identification of *Usp46*, encoding a ubiquitin specific peptidase, as a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension test and the forced swimming test. **Nature Genetics**, 査読有り 41(6): 688-695, 2009. doi:10.1038/ng.344
- ⑩ Sato, T., Miura, M., Yamada, M., Yoshida, T., Wood, J.D., Yazawa, I., Masuda, M., Suzuki, T., Shin, R-M., Yau, H-J., Liu, F-C., Shimohata, T., Onodera, O., Ross, C.A., Katsuki, M., Takahashi, H., Kano, M., Aosaki, T., Tsuji, S. Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by en masse expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. **Human Molecular Genetics**, 査読有り 18(4):723-736, 2009. doi:10.1093/hmg/ddn403
- ⑪ 青崎敏彦、三浦正巳、増田正雄 「線条体におけるアセチルコリンとドーパミンの生理的相互作用」 **Brain and Nerve** 査読なし 特集「大脳基底核—分子基盤から臨床まで」 61(4):373-380, 2009. 総説、 <http://ej.islib.jp/ejournal/1416100461.html>?
- [学会発表] (計19件)
- ① 三浦正巳、井上律子、青崎敏彦 「ニコチン受容体の脱感作は線条体コリン作動性ニューロンへのGABA入力を調節する Desensitization of nicotinic receptor modulates GABAergic inputs to cholinergic interneurons in the matrix of mouse striatum.」第89回日本生理学会大会 2012年3月29日(木)~31日(土) 長野県松本文化会館
- ② Toshihiko Aosaki, Masao Masuda, Masami Miura, Ritusko Inoue. Postnatal development of intrinsic tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in the striatum. 第85回日本薬理学会年会 シンポジウム 28、2012年3月、京都
- ③ Ritsuko Inoue, Masami Miura, Toshihiko Aosaki, “Suppressive effect on GABAergic IPSC via μ -opioid receptor is modulated by endogenous acetylcholine in the mouse striatum”, The Society for Neuroscience 41st Annual Meeting, Washington, D.C., USA, November 12-16, 2011, Poster presentation.
- ④ 井上律子、三浦正巳、青崎敏彦 「 μ オピオイド受容体作動薬と内在性アセチルコリンがマウス線条体のGABA作動性抑制電流に与える影響 Opposite effects of the μ -opioid receptor agonist DAMGO and endogenous acetylcholine on GABAergic IPSC in mouse striatum」 Neuro2011、第34回日本神経科学大会 横浜 2011年9月14日~17日 ポスター発表
- ⑤ 増田正雄、三浦正巳、今西美知子、齋野・斉藤幸子、井上律子、高田昌彦、小林和人、青崎敏彦 「線条体チロシン水酸化酵素 mRNA 陽性細胞の分類と生後発達」 JBAGS 第26回日本大脳基底核研究会 2011年7月2日、3日 神奈川県・箱根町・パレスホテル箱根

- ⑥ 井上律子、三浦正巳、青崎敏彦「マウス線条体における μ オピオイド受容体の効果に内在性アセチルコリンが及ぼす影響」第34回日本基礎老化学会大会 東京 2011年6月15日~17日 ポスター発表
- ⑦ 井上律子、三浦正巳、青崎敏彦「アセチルコリンはマウス線条体の抑制性電流に対する μ オピオイド受容体の抑制効果を減弱する」第88回日本生理学会大会 ポスター発表 2011年3月28日~30日、横浜
- ⑧ 大瀬善之、三浦正巳、井上律子、青崎敏彦、西村欣也、「吸入麻酔薬セボフルレンのマウス線条体ニューロンに対する作用」Neuro2010、第33回日本神経科学大会 P3-p12 2010年9月2~4日、神戸
- ⑨ 青崎敏彦、東京農工大学大学院修士課程講義 「環境老年学特論II：パーキンソン病の発症メカニズム」2010年7月13日、東京
- ⑩ 青崎敏彦、増田正雄、三浦正巳、今西美智子、井上律子、齋野・齋藤幸子、高田昌彦、小林和人、「マウス線条体チロシンヒドロキシラーゼmRNA陽性細胞の生理学的性質」日本基礎老化学会第33回大会 2010年6月17~18日、名古屋
- ⑪ 青崎敏彦「線条体におけるアセチルコリンとドーパミンの生理的相互作用とシナプス可塑性」平成22年度生理学研究所研究会 「シナプス可塑性の動作原理」2010年6月10-11日 講演、岡崎
- ⑫ 青崎敏彦「自治医大時代」木村實先生定年退職記念講演会「視覚、大脳基底核研究から異分野統合的脳研究へ」2010年5月22日 講演、京都
- ⑬ Aosaki, T., Miura, M., Roles of cholinergic interneurons in inter-compartmental communication and synaptic plasticity in the striatum. **The Journal of Physiological Sciences**, 60(Suppl. 1):S45, 2010. シンポジウム、盛岡
- ⑭ Aosaki, T. Roles of cholinergic interneurons in inter-compartmental communication and synaptic plasticity in the striatum. Satellite Symposium of the 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society “The Basal Ganglia in Health and Disease”,

Okazaki, Sept. 14-15, 2009 シンポジウム

- ⑮ 青崎敏彦 「動物のメンタリティーを測定する」第105・106回老年学公開講座 2009年10月8日、11月12日 講演
- ⑯ 三浦正巳、増田正雄、青崎敏彦、「線条体コリン作動性インターニューロンのGABA性入力調節機構」第32回日本神経科学大会 P3-a30 2009年9月16~18日、名古屋
- ⑰ 青崎敏彦、東京農工大学大学院修士課程講義 「環境老年学特論II：パーキンソン病の発症メカニズム」2009年7月7日、東京
- ⑱ 三浦正巳、富田滋、間宮隆吉、酒巻大岳、増田正雄、丹羽美苗、亀山勉、小林淳哉、井脇有香、今井早希、石川明、安部訓也、吉村崇、鍋島俊隆、海老原史樹文、青崎敏彦 「GABA性の抑制低下とうつ病様行動異常」日本基礎老化学会第32回大会 OS-11、6学会合同ポスター 合P-15 2009年6月18~20日、横浜
- ⑲ 青崎敏彦、「パーキンソン病のしくみと治療の最前線」当事者と介護者のための特別講演会、主催わかかな会（パーキンソン病友の会あさお）、川崎市麻生区、2009年4月18日

[その他]

ホームページ

<http://www.tmig.or.jp/>

新聞報道

- ① 平成22年3月25日 日経産業新聞 「恐怖の想起 脳ホルモン関与 PTSD治療に道」
- ② 平成21年5月25日 時事通信 「うつ病関連遺伝子の発見」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青崎 敏彦 (AOSAKI TOSHIHIKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：70221033

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし