

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500362

研究課題名（和文）強迫行為をひき起こす線条体ストリオソームの生理特性

研究課題名（英文）Obsessive compulsive disorder-related striosome circuits in the striatum

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）：強迫障害神経回路を構成する線条体ストリオソームの投射ニューロンは線条体ではこれだけが μ オピオイド受容体を持つ。この μ オピオイド受容体はムスカリン受容体を抑えておくとストリオソームへの抑制を解除するように働くことを見いだした。これは行動パターン形成時に起こるアセチルコリンの放出低下が行動の動機づけをコードするストリオソームの活動を脱抑制して活動的にさせ、行動学習を進めることを示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：The striatal striosome compartment is considered one of the critical stations related to obsessive compulsive disorder. Medium spiny projection neurons in the striosomes but not in the matrix have mu-opioid receptors whose physiological roles have not fully examined. We found that prior blockade of muscarinic receptors augmented the suppressive effect of the mu-opioid receptor agonist DAMGO on the inhibitory postsynaptic currents. This phenomenon suggests the notion that the cessation of tonic action potential discharges of cholinergic interneurons in the striatum (the pause response of the tonically active cholinergic neurons of the striatum) during behavioral learning induces disinhibition of neuronal activities of the striosomal medium spiny neurons which are believed to encode motivational information.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

強迫性障害 (obsessive-compulsive disorder, 以下 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。線条体およびその投射

先である淡蒼球の局所破壊で OCD 様症状が出現すること、fMRI などの機能画像所見から OCD 患者では眼窩前頭葉皮質、前帯状皮質、尾側前頭前野皮質および尾状核の活動が亢進（血流、代謝）していて、治療が奏効す

るとこれらの活動が低下することが知られており、この神経回路は「OCD 回路」とも呼ばれている。この OCD 回路は実は解剖学的には皮質－線条体－視床－皮質ループ回路のひとつで、皮質の眼窩前頭葉皮質、前帯状皮質、尾側前頭前野皮質から線条体のストリオソームという線条体コンパートメントのひとつに入る神経回路に他ならない。線条体の機能は生理学的には一塊の行動要素ないし思考要素を順序良くつなぎ合わせてある行動パターンを形成することであると言える。正常ではひとつの行動要素から次の行動要素へとスムーズに移行していくのが普通であるが、OCD では線条体ストリオソームを含む局所神経回路が異常なため、ひとつの行動要素から次の行動要素に移行できず、行動が完了しないのではないかと考えられる。OCD 回路の皮質部位は外界における刺激に対して情動的な評価を行い、行動を選択する働きを持っている。この皮質の投射先は線条体ストリオソームである。ストリオソームはその周囲のマトリックスよりも発生学的により古く、辺縁系、前頭前野、前帯状回、眼窩前頭皮質、基底外側扁桃核から入力を受け、中脳ドーパミンニューロンに投射する。これに対し、マトリックスは新皮質の感覚運動野から入力を受け、黒質網様部および淡蒼球内節の GABA ニューロンに投射する。ストリオソームは線条体の 15%以下を占めるに過ぎず、しかも線条体の中に島状に散在する構造のため、その機能を生理学的に調べることはこれまで事実上不可能であった。最近、我々はドーパミンの律速酵素である tyrosine hydroxylase の promoter 領域に GFP を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて皮質線条体スライスを作成すれば、蛍光顕微鏡下に光る「dopamine islands」として同定し、記録可能なことを見出した (J Neurosci, 1997)。神経化学的には μ オピオイド受容体やセロトニン受容体の 5-HT 1A、2A 受容体はストリオソームにのみ限局している。また、ストリオソームとマトリックスの境界部に多くストリオソームの活動をマトリックスに伝えるコリン作動性ニューロンはセロトニンによって興奮する。また、ストリオソームはドーパミンに対する感受性が非常に高く、アンフェタミンやコカインの慢性投与で特異的に fos などが発現し、強迫行為が生じる。申請者はこれまで線条体のコリン作動性ニューロンが運動学習にどのように寄与するかについて調べてきた (Science, 1994a; Science, 1994b; J Neurosci, 1998, 2001, 2003)。コリン作動性ニューロンはストリオ

ソームの辺縁に多く (J Neurophysiol, 1995, J Neurosci, 1996)、ニコチンの慢性投与を行うとコリン作動性ニューロンの発火に起因する GABA ニューロンからの GABA 放出の増加が投射ニューロンに対して起こる (NeuroReport, 2006)。我々は最近ストリオソームからのスライス記録に世界で初めて成功し、 μ オピオイド受容体の活性化が抑制性シナプス電流を特異的に抑制することを見出し、それが cAMP と PKC の経路の相互作用で増強することを見出した (J Neurosci, 2007; Mol Neurobiol, 2007)。生理学的記録が可能になった現在、このストリオソームの神経回路がどのように OCD 発症に関わるか、どのような治療的戦略が可能なのか、早急に研究を開始しなければならない。

2. 研究の目的

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 線条体に内在することが知られている tyrosine hydroxylase 陽性ニューロンの生理解剖学的状況について調べる。
- (4) 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) 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

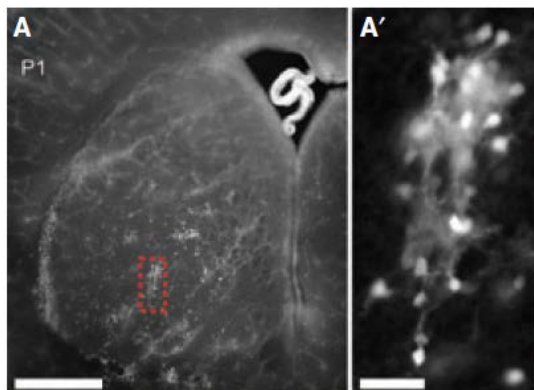
- (1) 線条体内に由来する抑制性入力のみ μ オピオイド受容体の活性化による抑制の機序について調べたところ、4-aminopyridine 感受性の K チャネルが cAMP 依存性に関与していることが明らかとなった。面白いことに予め protein kinase C (PKC) を抑制しておくと、この DAMGO による抑制性シナプス後電流 (IPSC) の抑制はさらに増強することがわかった。
- (2) 記憶形成において線条体ではドーパミンの大量の放出とアセチルコリンの放出低下が起こる。線条体ストリオソームは μ オピオイド受容体を持ち、動機付けの情報を受けるので、線条体の投射ニューロンへの抑制性入力のみ 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。

- (3) 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。実験は、線条体の固有のドーパミンニューロンの研究については、チロシン水酸化酵素 (TH) の mRNA を持つ細胞を GFP で標識したマウスの線条体で調べることによって行った。TH はチロシンからドーパミンを経てドーパミンを合成するのに必須の酵素である。調べた結果、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。しかし、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% に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。この細胞は一樣ではなく、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局限しているものの、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。

(下図は生後1日に見られるドーパミン産生能を持つ細胞。拡大したものがA'。ストリオソームとマトリックスのどちらも無視して分布することがわかった。)



- (4) 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。
- (5) 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。

- (6) 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がわかった。テタヌス刺激による通常のシナプス可塑性の評価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」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」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