

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 5月14日現在

機関番号：74415

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659069

研究課題名（和文） 可逆的神経伝達阻止法を用いた薬物依存症における大脳基底核神経回路の制御異常の解析

研究課題名（英文） Neural mechanism of basal ganglia circuit in drug addiction

研究代表者

疋田 貴俊 (HIKIDA TAKATOSHI)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号：70421378

研究成果の概要(和文):薬物依存症における大脳基底核神経回路の制御異常を解析するために、大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法を開発した。本手法を用いて、依存性薬物による急性反応には直接路と間接路が共に必須であることを示した。さらに、依存性薬物の反復投与による薬物依存形成および報酬学習においては直接路が、忌避学習には間接路が重要であることを示した。さらに、直接路と間接路が統合される黒質網様部の依存性薬物投与時の分子病態を調べ、直接路依存的な分子変化を見いだした。

研究成果の概要(英文): To analyze neural mechanism of basal ganglia circuit in drug addiction, we developed a reversible neurotransmission blocking technique, in which transmission of the direct and indirect pathways was selectively and reversibly blocked. The results indicated that the coordinated modulation of these two pathways was necessary for acute psychostimulant actions. This modulation, however, shifted to the predominant roles of the direct pathway in the development of drug addiction by repeated exposure of psychostimulants and rewarding learning and the indirect pathway in aversive learning. Furthermore, we have revealed pathway-specific molecular changes in the substantia nigra pars reticulata after cocaine treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物依存症の病態生理

コカインやモルヒネなどの依存性薬物は、側坐核のドーパミン濃度を上昇させ、薬物依存症を誘発させる。薬物依存症患者は世界で三千万人を超え社会問題も引き起こす重篤

な疾患であるが、有効な治療法は見つからない。依存性薬物の反復投与により、薬理作用の増大、質的な変化をもたらす増感現象の形成が見られることから、生体脳の障害、神経細胞可塑性の持続性の変化として捉えられ、薬物依存の病理研究が進められている。

(2) 大脳基底核神経回路

大脳基底核は運動制御や報酬系に関与しており、線条体、側坐核の出力を担当する中型有棘細胞には、黒質、腹側被蓋野の神経細胞からのドーパミン、大脳皮質からのグルタミン酸、インターニューロンからのアセチルコリン、GABA などが入力し、大脳基底核内の神経回路を調節している。中型有棘細胞の出力は黒質網様部あるいは腹側被蓋野に行く直接路と、淡蒼球を介する間接路に分かれる。この両経路のバランスで運動制御を行っている。黒質網様部において直接路と間接路が統合されるが、その情報処理や薬物依存時の分子病理については明らかでなかった。

(3) これまでの研究成果と課題

研究代表者はこれまでにイムノトキシン細胞標的破壊法 (IMCT 法) を用いて、脳局所神経回路の制御機構を明らかにしてきた。IMCT 法により線条体のアセチルコリン産生細胞のみを特異的に破壊すると、急性期にはドーパミンの過剰な反応をもたらす異常な運動症状を呈した。さらに慢性期にはドーパミン受容体の代償反応により異常運動が消失した。この結果は基底核のドーパミンとアセチルコリンが協調的かつ拮抗的に作用し基底核の神経活動を制御していることを示す (Kaneko, Hikida et al., *Science*, 289, 633, 2000)。さらに、側坐核のアセチルコリン産生細胞を除去したマウスにコカインおよびモルヒネを連続投与すると、薬物依存の感受性が顕著に高まることを明らかにした (Hikida et al., *PNAS*, 98, 13351, 2001; Hikida et al., *PNAS*, 100, 6169, 2003)。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤がコカイン依存、モルヒネ依存の改善に効果があり、その効果点が側坐核のアセチルコリン産生細胞であることを示した (Hikida et al., *PNAS*, 100, 6169, 2003)。さらに、報酬関連学習においてもアセチルコリン産生細胞の関与を示した (Kitabatake, Hikida et al., *PNAS*, 100, 7965, 2003)。このように、アセチルコリン産生細胞の機能を解明することによって、一貫して大脳基底核神経回路の制御機構を探求してきた。一方、大脳基底核においてドーパミンやアセチルコリンの入力を受ける中型有棘細胞については、黒質網様部あるいは腹側被蓋野に行く直接路と淡蒼球を介する間接路に投射先の違いによって大きく二分されているにもかかわらず、形態に違いがないことから、直接路と間接路での中型有棘細胞の情報処理やそれに関与する分子の違いについて未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、大脳基底核の特定神経細胞の可逆的神経伝達阻止法を開発し、薬物依存時

の大脳基底核神経回路の制御異常を個体レベルで、行動科学的、電気生理学的、生化学的に解析を行った。大脳基底核神経回路における薬物依存症の分子病態を明らかにすることで、新たな治療標的分子を探索することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 薬物依存症における大脳基底核神経回路の制御異常を研究するために、大脳基底核の神経経路特異的に神経機能調節するシステム (Reversible neurotransmission blocking; RNB 法) を開発した。直接路の中型有棘細胞にはサブスタンス P (SP) が、間接路の中型有棘細胞にはエンケファリン (Enk) がそれぞれ特異的に発現する。そこで、SP 遺伝子 β -preprotachykinin A (PPTA) あるいは Enk 遺伝子 preproenkephalin A (PPE) の上流域のプロモーター約 2 kbp と、テトラサイクリン依存性転写因子 tetracycline-repressive transcription factor (tTA) をアデノ随伴ウイルスベクター pAAV (Stratagene) に組み込んだ。AAV は AAV Helper-Free System (Stratagene) を用いてマニュアルに従い作製した。作製した遺伝子組み換え AAV を tetracycline-responsive element (TRE) の下流に CMV をプロモーターとして GFP と破傷風菌毒素 tetanus toxin (TN) の融合タンパクを発現させる遺伝子を持つ TN トランスジェニックマウスの線条体に打ち込み、線条体神経細胞に感染させた。破傷風菌毒素はシナプス小胞関連蛋白質である VAMP2 を切断し、シナプス小胞を介した神経伝達を遮断する。このマウスにドキシサイクリンを与えると、tTA は不活性型となり、GFP-TN の発現は消失し、PEST 配列を介して、GFP-TN は分解され、やがて新生した VAMP2 によって神経伝達は再開する。これが、DOX 依存的な可逆的神経伝達阻止のストラテジーである。直接路と間接路への本方法の特異的な適応は AAV ベクター内の SP と Enk のプロモーター活性に依存する。

(2) AAV を感染後、2 週以降に行動実験、組織学的実験、生化学的実験、電気生理学的実験を行った。ドキシサイクリン (DOX) 投与は DOX を 6 mg/g 混入させた餌と 2 mg/ml の DOX と 10% の sucrose を含有する水をマウスに与えることによって行った。TN トランスジェニックマウスの作製、ウエスタンブロット法は Yamamoto et al., *J. Neurosci.*, 23, 6759, 2003 に従った。回転行動は Kaneko et al., *Science*, 289, 633, 2000 に従った。メタンフェタミンは 2 mg/kg を腹腔内投与し、60 分間の移所行動量を調べた。コカインは 10 mg/kg 腹腔内投与し、依存行動試験は Hikida et al., *PNAS*, 98, 13351, 2001 に従った。

抑制性回避試験は、狭い明室と広い暗室を連結した装置を用いた。条件付け前には、マウスを明るい小部屋に入れると、マウスの好む環境である暗室に速やかに移動する。マウスが暗室に4つの脚全てを入れた時点で、2部屋を区切る扉を閉じ、床に0.5mA, 60 Hz, 1 secの電流を流すことで電気ショックを与えた。24時間後に忌避学習の保持を測定するために、電気ショック無しで同様の手順を行い、暗室に入るまでの時間を測定した。恐怖行動試験はMasugi et al., J. Neurosci., 19, 955-963, 1999に従った。黒質網様部の分離はエッペンドルフ社のMicro Dissector PPMDを用いて、凍結冠状切片より行い、RNA抽出し、Affymetrix マイクロアレイ解析および定量RT-PCRを行った。免疫組織化学染色はSchneider Gasser et al., Nat. Protoc., 1, 1887, 2006に従った。

(3) ephrinA5, EphA4, EphA5の結合部位をヒトIgGのFc領域に融合させたイムノアドヘジン(R&D Systems)を蛍光ミクロスフェア(Lumafuour)にRiddle et al., Biotechniques, 23, 928, 1997に従って付着させた。イムノアドヘジンは野生型マウスの両側黒質網様部に定位的に投与し、4日後よりコカイン誘発行動量を測定した。行動解析後、イムノアドヘジンの投与位置をミクロスフェアの蛍光観察によって観察した。

4. 研究成果

(1) 大脳基底核の直接路と間接路に特異的な可逆的神経伝達阻止法の開発

直接路と間接路の中型有棘細胞特異的にGFP-TNが発現しているかは、感染させた線条体をGFPとSP, Enkの前駆体であるPPTA, PPEの抗体で二重免疫組織染色を行い、GFP-TNは目的の神経細胞に特異的に発現していることを確認した。可逆的なTNの発現はGFP抗体に対するウェスタンブロット法で行った。AAV投与2週以降に継続的なGFP-TNの発現を確認した。このGFP-TNはDOX投与4週間で消失した。TNが神経伝達を遮断していることはVAMP2が切断していることをVAMP2のN末に対する抗体で確認した。片側線条体にAAVを感染させたTNマウスは、直接路遮断では感染線条体同側方向への回転行動が、間接路遮断では反対方向に回転行動が見られた。これらの異常回転行動はDOX4週投与で消失した。すなわち、DOX ON/OFFによって、可逆的に神経伝達を阻止する方法を大脳基底核の直接路あるいは間接路において特異的に確立した。また、線条体を電気刺激した後の黒質網様部における細胞外電気記録においても、特異的な神経伝達遮断を確認した。

(2) 直接路遮断あるいは間接路遮断の依存性薬物による急性反応への影響

線条体の直接路遮断と間接路遮断は共にメタンフェタミン投与による急性移所行動量増加を完全に抑制した。DOX投与による神経伝達再開によるメタンフェタミンによる移所行動量増加は再発した。側坐核の直接路遮断と間接路遮断は共にコカインによる移所行動量を抑制した。これらから依存性薬物による急性賦活反応において、直接路と間接路は共に必須であることを示した。

(3) コカインの慢性投与による薬物依存形成への直接路と間接路の神経伝達の役割

野生型マウスはコカインの連日投与により行動量を増大させる増感現象を引き起こす。間接路遮断したマウスはコカイン反復投与による行動量増感に遅れを生じたが、第3日以降に野生型マウスと同等の高い移所行動量に達した。それに対して、直接路遮断マウスは行動量増感を大幅に抑制した。また、コカインによる精神依存形成を調べるために条件付け場所嗜好性試験を行うと、直接路遮断マウスでは条件付け場所嗜好性は有意に減少したが、間接路遮断マウスは野生型マウスと同等の条件付け場所嗜好性を示した。これらの結果から、直接路の神経伝達がコカイン依存形成に重要であることを示した。さらに、生来の欲求に基づく報酬学習も、チョコレートによる条件付け場所嗜好性試験で調べたところ、直接路が重要であることを示した。

(4) 忌避学習における神経伝達遮断の影響

次に、忌避学習における神経伝達遮断の影響を、一試行による抑制性回避試験を用いて調べた。野生型マウスは、前日に電気ショックを受けた暗室への入室時間が延長した。この忌避学習は直接路遮断マウスにおいても保たれていた。それに対して、間接路遮断マウスは忌避学習の保持が見られず、電気ショック前後で有意差なく暗室に入室した。したがって、忌避学習には間接路の神経伝達が必須であることがわかった。忌避学習の障害が恐怖行動の障害による可能性を除外するために、電気ショック直後のすくみ反応を測定した。1分間のインターバルで3回の電気ショックを与えると、野生型、直接路遮断、間接路遮断マウスはどれも程度やパターンに有意差なく、電気ショックの反復提示によって、電気ショック直後のすくみ反応のパーセンテージを増加させた。したがって、抑制性回避試験における間接路遮断による障害は、恐怖行動の違いではなく、忌避学習の障害によるものであることが分かった。

(5) 直接路と間接路が統合する黒質網様部

の薬物依存時の分子変化を検索した。直接路遮断、間接路遮断を行ったマウスにコカインを投与1時間後に黒質網様部を分離し、RNAを抽出しマイクロアレイ解析および定量RT-PCRを行った。ephrinA5, EphA4, EphA5の3遺伝子のmRNA発現がコカインを投与した直接路遮断マウスでのみ上昇していた。これらの遺伝子発現上昇は生理食塩水を投与したマウスでは見られなかったため、直接路遮断かつコカイン投与に特異的な現象であった。この現象はコカインの慢性投与に対しても同様であった。

(6) 直接路遮断マウスで ephrinA5, EphA4, EphA5 の発現上昇が見られることから、これらの分子シグナル活性化によって、直接路遮断マウスと同様にコカイン誘発行動が抑制できるのではないかと調べた。EphA4 と EphA5 のイムノアドヘジンは、ヒト IgG を投与した対照群と比較して有意にコカイン連日投与による行動感受性亢進を抑制した。

(7) EphA4 と EphA5 は共に ephrinA5 に結合し、ephrinA5 の下流シグナルとして MAP キナーゼ (Erk1 と Erk2) のリン酸化を引き起こす。そこで直接路遮断マウスの黒質網様部の ephrinA5 陽性細胞において Erk1/2 のリン酸化がコカイン投与によって増強されているかを調べるために、黒質網様部スライス標本に対して ephrinA5 抗体とリン酸化 Erk1/2 抗体の二重免疫染色を行った。ephrinA5 陽性細胞におけるリン酸化 Erk1/2 陽性細胞の割合を計測したところ、コカインを単回あるいは連日投与した直接路遮断マウスでのみ黒質網様部におけるリン酸化 1/2 陽性細胞の割合が増加していた。これは直接路遮断マウスでのみコカイン投与による ephrinA5-EphA4/A5 の発現上昇が見られており、またコカイン誘発行動が抑制されることとよく相関しており、黒質網様部での ephrinA5 の下流シグナルである Erk1/2 のリン酸化がコカイン誘発行動に重要であることを示した。

(8) 結論

以上の実験結果から、直接路の神経伝達は薬物依存形成と報酬学習に、間接路の神経伝達は忌避学習にそれぞれ異なる役割を担っていることを示した。また、コカイン誘発行動における直接路依存的な ephrinA5-EphA4/A5 システムと下流シグナルの分子変化を見いだした。

(9) 国内外における位置づけとインパクト

本研究は、大脳基底核の直接路と間接路の役割について、いままで両経路のバランスによって運動が規定されているとされていた

が、はじめて異なる役割を見いだしたものでインパクトが高く、本研究をまとめた論文は Neuron 誌に受理された。また、薬物依存症における黒質網様部の分子変化をはじめて見だし、PNAS 誌に受理された。

(10) 今後の展望

本研究で開発された可逆的神経伝達阻止法を用いることで、大脳基底核神経回路を踏まえた、薬物依存症の分子病態がさらに明らかになり、治療法開発につながることを期待できる。

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5件)

(1) Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S, Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior, Neuron, 査読有, Vol. 118, 2010, 896-907,

DOI:10.1016/j.neuron.2010.05.011

(2) Schretlen DJ, Vannorsdill TD, Winicki JM, Mushtaq Y, Hikida T, Sawa A, Yolken RH, Dickerson FB, Cascella NG, Neuroanatomic and cognitive abnormalities related to herpes simplex virus type 1 in schizophrenia, Schizophrenia Research, 査読有, Vol. 118, 2010, pp. 224-231,

DOI:10.1016/j.schres.2010.01.008

(3) 正田貴俊, 神谷篤、精神疾患モデル動物の可能性-遺伝子から神経回路へ-, 実験医学, 査読無, 28 巻, 2010, 2205-2210.

(4) Kimura K, Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Nakanishi S, Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses, Proc Natl Acad Sci USA, 査読有, Vol. 108, 2011, 9981-9986, DOI:10.1073/pnas.1107592108

(5) 正田貴俊, 精神疾患の分子遺伝学: 最近の知見、脳神経外科速報, 査読無, 21 巻, 2011, 1250-1254.

[学会発表] (計14件)

(1) Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S, Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior, 平成22年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ, 2010年7月29日, ホテルさっぽろ芸文館 (札幌市)

(2) Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S, Distinct roles of

striatonigral and striatopallidal transmission in reward and aversive behavior, Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, 2010年11月15日、San Diego, CA, USA

(3) Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Huang B, Pou S, Ozaki N, Hikida T, Kamiya A, Nabeshima T, Sawa A, Dopaminergic disturbance and behavioral deficits in a novel genetic model of DISC1, which are highly influenced by social isolation stress, Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience's 40th Annual Meeting, 2010年11月15日、San Diego, CA, USA

(4) 疋田貴俊、報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路の制御機構、平成 23 年度生理学研究所研究会「シナプス可塑性の分子細胞基盤」、2011 年 6 月 16 日、生理学研究所(愛知県)

(5) 疋田貴俊、報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路機構、平成 23 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ JST セッション、2011 年 8 月 22 日、神戸国際会館(兵庫県)

(6) 疋田貴俊、黒質網様部における大脳基底核神経回路特異的な情報処理機構の解析、平成 23 年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ、2011 年 8 月 22 日、神戸国際会館(兵庫県)

(7) 疋田貴俊、Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward-based and aversive learning, 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

(8) 疋田貴俊、薬物依存と意思決定における大脳基底核神経回路の制御機構、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 10 月 14 日、愛知県産業労働センター(愛知県)

(9) 疋田貴俊、Distinct roles of synaptic transmission in the direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior, 第 32 回内藤コンファレンス、2011 年 10 月 19 日、八ヶ岳ロイヤルホテル(山梨県)

(10) 疋田貴俊、Distinct roles of the direct and indirect pathways in the basal ganglia to reward and aversive behavior, IIAS Research Conference 2011 on "Frontiers in Neuroscience: From Brain to Mind", 2011 年 12 月 8 日、国際高等研究所(京都府)

(11) 木村健介、疋田貴俊、矢和多智、山口隆司、中西重忠、Ephrin-Eph signaling in cocaine-induced responses, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

(12) 疋田貴俊、可逆的神経伝達阻止法を用いた大脳基底核神経回路機構の解析、基礎生物学研究所セミナー、2012 年 1 月 12 日、基礎生理学研究所(愛知県)

(13) 疋田貴俊、運動・精神機能を司る大脳基底核神経回路機構の解明に向けて、合同シンポジウム「高次生命制御研究のニューフロンティア」、2012 年 1 月 21 日、京都大学(京都府)

(14) 疋田貴俊、報酬・忌避行動における大脳基底核神経回路機構、第 40 回ホミニゼーション研究会、2012 年 3 月 15 日、京都大学霊長類研究所(愛知県)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 大脳基底核神経回路の神経伝達を解析する方法

発明者: 疋田貴俊、中西重忠

権利者: 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/003089

出願年月日: 2010 年 4 月 30 日

国内外の別: 国際

[その他]

大阪バイオサイエンス研究所広報誌

OBI SCOPE No.1 2011, p.9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 貴俊 (HIKIDA TAKATOSHI)

(財)大阪バイオサイエンス研究所・システムズ生物学部門・研究員

研究者番号: 70421378

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: