

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290029

研究課題名(和文) D1/D2ドーパミン受容体コンディショナル発現マウスによる運動制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of motor control mechanism by D1 / D2 dopamine receptor conditionally expressing mice

研究代表者

笹岡 俊邦 (SASAKA, Toshikuni)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：50222005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンD1受容体(D1R)の発現を薬物投与で可逆的に欠損する遺伝子改変マウスを用いて、D1R欠損の状態にしたところ運動量が減少した。大脳皮質運動野を電気刺激すると、大脳基底核の出力部(脚内核)で、正常では3相性の「興奮-抑制-興奮」の神経活動として出力されるが、D1R欠損の状態では第2相の「抑制」が消失した。この「抑制」は大脳基底核回路の「直接路」を通り、運動誘発に働くと考えられている。本研究では、D1Rを介する情報は「直接路」の信号伝達と、運動の発現に不可欠であり、「直接路」を通る信号の動的な伝達の減少がパーキンソン病の運動症状を説明する本質的な変化であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using genetically modified mice that reversibly suppress expression of dopamine D1 receptor (D1R) by drug (doxycycline) administration, D1R deficiency leads to decrease of motor activity. Normally, the electrical stimulation at motor cortex travels through three pathways (hyper-direct, direct and indirect pathways) and is recorded as neural activity of triphasic "excitation - suppression - excitement" in the entopeduncular nucleus, the output part of the basal ganglia. In the state of D1R deficiency, 'suppression' disappeared. It is believed that this "suppression" passes through the direct pathway of the basal ganglia circuit and works for induction of movement. In this study, information via D1R is thought to be indispensable for signaling of the direct pathway and induction of movement, and a decrease in the dynamic transmission of signals through the direct pathway is thought to lead to motor symptoms of Parkinson's disease.

研究分野：実験動物学 神経科学 分子生物学

 キーワード：D1ドーパミン受容体 D2ドーパミン受容体 運動制御 大脳基底核回路 パーキンソン病 遺伝子操作
 マウス テトラサイクリン制御システム 神経活動

1. 研究開始当初の背景

大脳基底核のD1ドーパミン受容体(D1R)を介する「直接路」およびD2ドーパミン受容体(D2R)を介する「間接路」は、共に運動制御の主要な経路と考えられている。国内・国外で、「直接路」・「間接路」を選択的に操作する試みが行なわれているが、それぞれの運動制御の役割については不明な点も多い。最近、D1RおよびD2RがNMDA受容体と相互作用し、細胞内と細胞膜上の局在の制御が報告されている。本研究は、D1R欠損の背景にD1Rのみをコンディショナルに発現させるマウスを作成し、「直接路」の運動制御に関する機能を、同様にD2R欠損の背景にD2Rのみをコンディショナルに発現させるマウスを作成し、「間接路」の運動制御に関する機能の解明を目指す。

2. 研究の目的

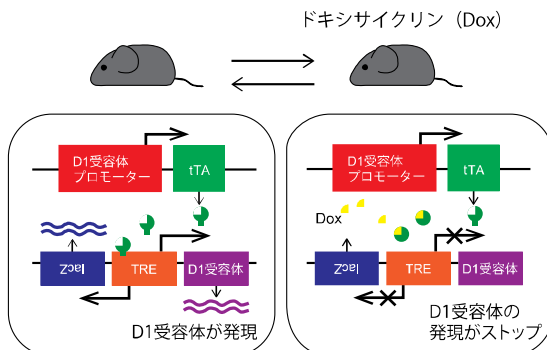
運動の制御には大脳基底核の神経回路であるD1ドーパミン受容体(D1R)を介する直接路およびD2ドーパミン受容体(D2R)を介する間接路が重要な役割を持つ。本研究は直接路・間接路の機能を個別に理解するため、ドキシサイクリン(Dox)による発現制御法を用いてD1RまたはD2Rを欠損させる遺伝子操作マウスを作製し、運動制御や学習記憶における直接路・間接路の役割を解明し、パーキンソン病の運動障害の理解を深め、治療法の開発への発展を目的とする。

3. 研究の方法

本研究で実施した実験方法は、「5. 主な発表論文等」のうち、以下の論文を中心に参照。
 (6)Chiken *et al.* *Cerebral Cortex* 25(12) 4885-97, 2015.
 (9)Nakamura *et al.* *Frontiers in Integrative Neuroscience* Vol.8, Article 56, 2014.

4. 研究成果

(1) Dox を投与することによって一定の期間、ドーパミンD1Rをなくすことが出来る遺伝子改変マウスを新たに開発した(図1)。



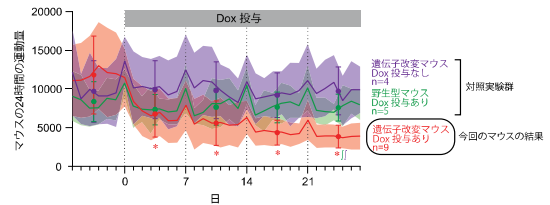
tTA, テトラサイクリン制御性トランス活性化因子
 TRE, テトラサイクリン応答因子
 lacZ, lacZ遺伝子

(図1)新たに開発したマウス

ドキシサイクリン(Dox)によりドーパミンD1Rの発現を調節できる。Doxを投与しない状態(図左)ではD1Rが作られるが、Doxを投与すると(図右)D1受容体が作られなくなる。

(2) マウスの行動をD1Rがある時とない時に調べたところ、D1Rがない時にマウスの運動量が減少することが判った(図2)。

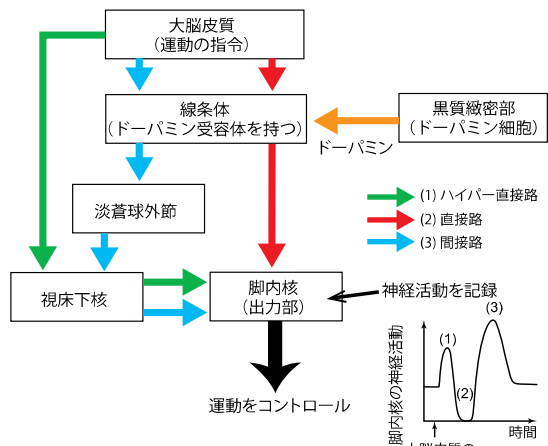
(図2) D1Rの発現をなくすと、マウスの運動量が減少した。



マウスのホームケージでの動きを24時間継続的に、Dox投与前から投与開始後27日目まで測定した。遺伝子改変マウスにDoxを投与すると(図中の赤色グラフ)、1週間目(1-6日目)からマウスの運動量は減少し始め、投与期間を通し減少が続いた。一方、他のマウスには、そのような変化はなかった。

(3) 大脳皮質を電気的に刺激し、運動の指令をシミュレートすると、指令は大脳基底核の3つの経路を通して伝達され(図3)、正常な状態では3相性(興奮-抑制-興奮)の神経活動として大脳基底核出力部(脚内核)で観察されるが、D1Rがない状態では抑制が消失した(図4)。

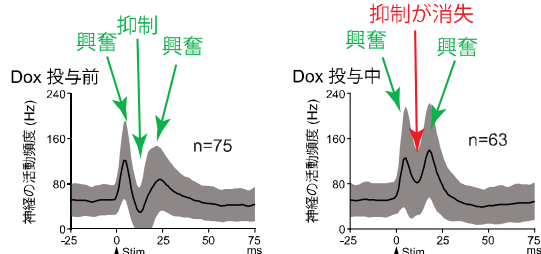
(図3)大脳皮質からの指令は、ハイパー直接路、直接路、間接路の3つの経路を通り、運動をコントロールする



(図4)大脳基底核出力部(脚内核)の3相性応答のうち抑制が消失した

脚内核の神経活動を記録し、大脳皮質の電気刺激に対する応答を調べた。Dox投与前は、興奮-抑制-興奮の3相性の活動が見られるが(図左)、Dox投与中、すなわちD1受容体の発現がない状態では、

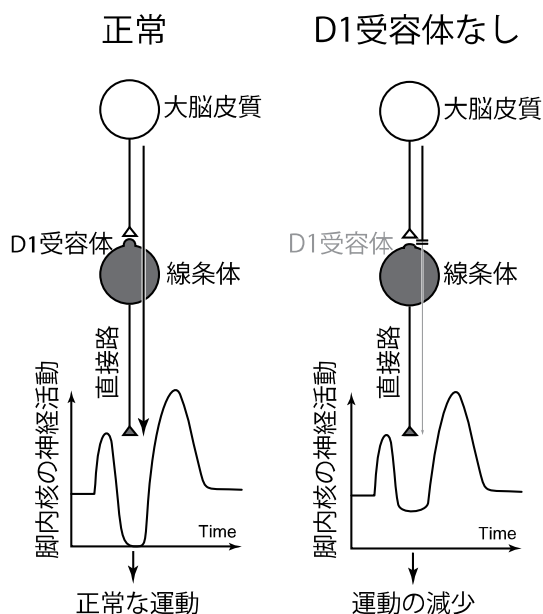
抑制が消失した（図右）



- (4) これまでの定説とは異なり、D1R を介する情報伝達をなくしても、大脳基底核出力部の自発的神経活動は変化しなかった。
- (5) 抑制は大脳基底核の「直接路」と呼ばれる経路を通して伝えられ、運動を誘発するように働くことが知られている。このことから、D1R を介する情報伝達は、大脳基底核の「直接路」を通る信号の伝達と、運動の発現に不可欠であることが明らかになった(図5)。

(図5)D1R を介する情報伝達は、直接路を通る信号の伝達と運動の発現に不可欠

正常な状態では、直接路（大脳皮質 - 線条体 - 脚内核路）が脚内核の神経活動を抑制することによって運動を引き起こす（図左）。一方、D1R がない状態では、直接路を通る信号が伝わりにくくなり、脚内核の神経活動を抑制できなくなるため、運動が起こりにくくなる（図右）。



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 12 件)

- (1) Maekawa T, Sasaoka T, Azuma S, Ichikawa T, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F; Leucine-rich repeat kinase 2

(LRRK2) regulates α -synuclein clearance in microglia.

BMC Neuroscience 査読有 17(1):77 2016 doi: 10.1186/s12868-016-0315-2

- (2) Shioda N, Yabuki Y, Wang Y, Uchigashima M, Hikida T, Sasaoka T, Mori H, Watanabe M, Sasahara M, Fukunaga K; Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular Psychiatry* 査読有 2016 Dec 6, doi: 10.1038/mp.2016.200.
- (3) Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Okada K, Niwa M, Sawa A, Hikida T: Dopamine D2L receptor is required for visual discrimination learning. *Molecular Neuropsychiatry* 査読有 2(3):124-132 2016, doi: 10.1159/000447970
- (4) Macpherson T, Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Sawa A, Hikida T: Nucleus accumbens dopamine D2-receptor expressing neurons control behavioral flexibility in a place discrimination task in the IntelliCage. *Learning and Memory* 査読有 2016, 23(7):359-64. doi: 10.1101/lm.042507.116.
- (5) Kubo M, Nagashima R, Ohta E, Maekawa T, Isobe Y, Kurihara M, Eshima K, Iwabuchi K, Sasaoka T, Azuma S, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F; Leucine-rich repeat kinase 2 is a regulator of B cell function, affecting homeostasis, BCR signaling, IgA production, and TI antigen responses. *Journal of Neuroimmunology* 査読有 2016 Mar 15;292:1-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.01.005.
- (6) Chiken S, Sato A, Ohta C, Kurokawa M, Arai S, Maeshima J, Sunayama-Morita T, Sasaoka T, Nambu A: Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the cortico-striato-entopeduncular direct pathway to release movements. *Cerebral Cortex* 査読有 25(12):4885-97, 2015. doi: 10.1093/cercor/bhv209.
- (7) Nakamura T, Sato A, Kitsukawa T,

- Sasaoka T, Yamamori T: Expression pattern of immediate early genes in the cerebellum of D1R KO, D2R KO, and wild type mice under various conditions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 査読有 Vol.3, Article 38, June 2015 doi: 10.3389/fcell.2015.00038
- (8) Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, Kusumoto D, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, Endo J, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K: G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nature Communications* 査読有 2015 Apr 13; Vol.6: Article number 6745. doi: 10.1038/ncomms7745.
- (9) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 中村徹, 大久保直, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 前田宜俊, 小田佳奈子, 酒井清子, 神保幸弘, 馬川恵梨子, 木津川尚史, 初山俊彦, 山森哲雄: 統合失調症モデルマウスの行動解析方法の試み **日本生物学的精神医学会誌** 査読無 Vol.26, No.2, 2015
- (10) Nakamura T, Sato A, Kitsukawa T, Momiyama T, Yamamori T, Sasaoka T: Distinct motor impairments of dopamine D1 and D2 receptor knockout mice revealed by three types of motor behavior. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 査読有 2014 Vol. 8, Article 56. doi: 10.3389/fnint.2014.00056.
- (11) Hayashi Y, Nabeshima Y, Kobayashi K, Miyakawa T, Tanda K, Takao K, Suzuki H, Esumi E, Noguchi S, Matsuda Y, Sasaoka T, Noda T, Miyazaki JI, Mishina M, Funabiki K, Nabeshima YI. Enhanced stability of hippocampal place representation caused by reduced magnesium block of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Molecular Brain* 査読有 2014 Jun 4;7(1):44. doi:10.1186/1756-6606-7-44
- (12) Miyoshi K, Kasahara K, Murakami S, Takeshima M, Kumamoto N, Sato A, Miyazaki I, Matsuzaki S, Sasaoka T, Katayama T, Asanuma M: Lack of dopaminergic inputs elongates the primary cilia of striatal neurons. *PLoS One*, 査読有 2014 May 15;9(5): e97918. doi: 10.1371/journal.pone.0097918.
- (13) Sato A, Sasaoka T, Nishijo T, Momiyama T: GABAergic synaptic transmission onto striatal cholinergic interneurons in dopamine D2 receptor knock-out mice. *Neuroscience*. 査読有 2014 Mar 28;263:138-47. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.010.
- 〔学会発表〕(計 22 件)
- (1) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 前島純, 新井慧, 砂山智子, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 中尾聡宏, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 南部篤: D1 ドーパミン受容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である 第94回日本生理学会大会 シンポジウム 2017年3月28-30日 静岡県浜松市 アクトシティ浜松
- (2) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 阿部学, 川村名子, 中尾聡宏, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 崎村建司, 南部篤: D1/D2 ドーパミン受容体コンディショナル発現マウスによる運動制御機構の解明 平成28年度先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会 2017年2月6-7日 滋賀県大津市 琵琶湖ホテル
- (3) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 前島純, 新井慧, 砂山智子, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 中尾聡宏, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 横山峯介, 南部篤: D1 ドーパミン受容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜
- (4) 笹岡俊邦 「ドーパミン受容体及びNMDA受容体変異マウスを用いた大脳基底核回路の機能解析」「非線形発振現象を基盤としたヒューマンネイチャーの理解」第2回領域会議(主催:オシロロジー総括班・国際活動支援班)2016年6月27-28日 北海道札幌市 ガトーキングダム
- (5) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 前島純, 新井慧, 砂山智子, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 馬川恵梨子, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 横山峯介, 南部篤: D1 ドーパミン受

容体を介する神経伝達は運動情報の伝達と運動の発現に不可欠である 第57回新潟生化学懇話会 2016年6月25日 新潟県新潟市 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター

- (6) 中村徹, 佐藤朝子, 木津川尚史, 初山俊彦, 山森哲雄, 笹岡俊邦: ドーパミン受容体サブタイプ D1R、D2R 遺伝子欠損マウスは3種類の行動解析課題でそれぞれ異なる表現型を示す 第57回新潟生化学懇話会 2016年6月25日 新潟県新潟市 新潟大学脳研究所統合脳機能研究センター
- (7) 笹岡俊邦: ドーパミン受容体遺伝子操作マウスを用いた運動制御の仕組みの解明 第5回新潟脳研-生理研合同シンポジウム 2016年3月2日 愛知県岡崎市 岡崎コンファレンスセンター
- (8) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 前島純, 新井慧, 砂山智子, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 馬川恵梨子, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 横山峯介, 南部篤: ドーパミンD1受容体を介する神経伝達は大脳基底核の直接路の情報伝達と運動の発現に不可欠である 第32回 生殖工学研究会 2015年12月5日 神奈川県川崎市 実験動物中央研究所
- (9) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 知見聡美, 大久保直, 前島純, 新井慧, 砂山-森田智子, 小田佳奈子, 酒井清子, 前田宜俊, 神保幸弘, 馬川恵梨子, 佐藤俊哉, 藤澤信義, 横山峯介, 南部篤: D1ドーパミン受容体を介するシグナルによる運動量の維持 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月3日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド
- (10) 森田真規子, 笹岡俊邦, Yanyan Wang, 澤明, 疋田貴俊: ドーパミンD2L受容体は視覚弁別学習に参与する 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド
- (11) 笹岡俊邦: ドーパミン受容体遺伝子操作マウスを用いた運動制御の仕組みの解明」東海医学会例会 講演 2015年9月9日 神奈川県伊勢原市 東海大学医学部
- (12) Sasaoka T, Sato A, Chiken S, Maeshima J, Arai S, Sunayama-Morita T, Oda K, Maeda Y, Sakai S, Jinbo Y, Umakawa E, Sato T, Okubo T, Fujisawa N, Yokoyama M, Nambu A: D1 dopamine receptor-mediated signal is required to maintain normal motor activity. 第38回日本神経科学大会 2015年7月30日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド
- (13) Miyoshi K, Kasahara K, Miyazaki I, Matsuzaki S, Sato A, Sasaoka T, Asanuma M, Katayama T; Primary cilia of striatal neurons are elongated by absence of dopaminergic inputs. 第38回日本神経科学大会 2015年7月30日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド
- (14) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 大久保直, 藤澤信義, 佐藤俊哉, 小田佳奈子, 前田宜俊, 田中稔, 山本美丘, 酒井清子, 神保幸弘, 千葉さおり, 馬川恵梨子, 横山峯介: D1ドーパミン受容体の発現の減少はマウスの運動量の低下を誘導する 平成27年度 日本生化学会 関東支部例会 第56回 新潟生化学懇話会 2015年6月20日 新潟県新潟市 新潟日報メディアシップ
- (15) 中尾聡宏, 竹本賢司, 竹尾透, 笹岡俊邦, 中瀬直己: 精子生体膜脂質の漏出による精子受精能への影響 平成27年度 日本生化学会 関東支部例会 第56回 新潟生化学懇話 2015年6月20日 2015年6月20日 新潟県新潟市 新潟日報メディアシップ
- (16) 笹岡俊邦, 佐藤朝子, 大久保直, 藤澤信義, 佐藤俊哉, 小田佳奈子, 前田宜俊, 田中稔, 山本美丘, 酒井清子, 神保幸弘, 千葉さおり, 馬川恵梨子, 横山峯介: D1ドーパミン受容体の発現の減少はマウスの運動量の低下を誘導する 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月29日 京都府京都市 京都テルサ
- (17) 小田佳奈子, 佐藤俊哉, 前田宜俊, 酒井清子, 神保幸弘, 藤澤信義, 横山峯介, 笹岡俊邦: 初期胚の体外培養がマウスの産仔数および個体の臓器重量に及ぼす影響 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月29日 京都府京都市 京都テルサ
- (18) Iida Y, Kojima T, Nagayama H, Yamamori S, Itakura M, Sasaoka T, Miyaoka H, Takahashi M: The dopamine D2 receptor is involved the anxiety-like behavior in light and dark choice test. Society for Neuroscience 2014 Nov.18, 2014 Washington DC.USA
- (19) Morita M, Sasaoka T, Wang Y, Sawa A, Hikida T: Involvement of dopamine D2L receptor and its signaling in

cognitive learning. Society for Neuroscience 2014, Nov.17, 2014, Washington DC. USA

- (20) Tanaka K, Aritake K, Tayama M, Shigeno K, Hayashi Y, Sasaki E, Utsugi T, Sasaoka T, Urade Y: Inhibition of hematopoietic prostaglandin D synthase improves symptoms of muscular dystrophy in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Society for Neuroscience 2014 Nov.15, 2014, Washington DC. USA
- (21) 笹岡俊邦 統合失調症モデルマウスの可能性と課題 第 36 回日本生物学的精神医学会 第 57 回日本神経化学会 合同年会 シンポジウム 6 「精神疾患動物モデルの可能性と課題」2014 年 9 月 29 日 奈良県奈良市 奈良県文化会館
- (22) 笹岡俊邦、佐藤朝子、新井慧、前島純、大久保直、藤澤信義、佐藤俊哉、小田佳奈子、前田宜俊、田中稔、山本美丘、酒井清子、神保幸弘、千葉さおり、横山峯介 D 1 ドーパミン受容体の発現抑制によりマウスの自発運動量が低下する 第 61 回日本実験動物学会総会 2014 年 5 月 14 日 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター

〔その他〕

新潟大学脳研究所ホームページ
(http://www.bri.niigata-u.ac.jp/field/lab_animal/index.html)

〔プレスリリース〕

- (1) NHK新潟放送局 ニュース 2015年10月6日、10月7日
- (2) BSN新潟放送局 ニュース 2015年10月6日、10月7日
- (3) 科学新聞記事 2015年11月2日
- (4) 新潟日報記事 2015年11月1日
- (5) 新潟大学脳研究所 プレスリリース 2015年10月8日
(http://www.bri.niigata-u.ac.jp/result/lab_animal/000126.html)
- (6) 生理学研究所 プレスリリース 2015年10月8日
(http://www.nips.ac.jp/release/2015/10/_d1.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹岡 俊邦 (SASAOKA, Toshikuni)

新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号 50222005

(2) 研究分担者

藤澤 信義 (FUJISAWA, Nobuyoshi)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号 50199311

前田 宜俊 (MAEDA, Yoshitaka)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号 00754524

小田 佳奈子 (ODA, Kanako)
新潟大学・脳研究所・特任助教
研究者番号 60708212

佐藤 俊哉 (SATO, Toshiya)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 90359703

大久保 直 (OKUBO, Tadashi)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号 10450719

佐藤 朝子 (SATO, Asako)
北里大学・医学部・臨時職員(研究職)
研究者番号 10465932

(3) 研究協力者

中尾 聡宏 (NAKAO, Satohiro)

南部 篤 (NAMBU, Atsushi)

知見 聡美 (CHIKEN, Satomi)