

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17868

研究課題名（和文）歩行制御における脳内ドーパミン機能の解明

研究課題名（英文）The function of dopamine receptors in the striatum during running of mice

研究代表者

中村 徹 (NAKAMURA, Toru)

大阪大学・生命機能研究科・招聘研究員

研究者番号：50771135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマウス運動課題「ステップホイール」を用いて、脳内ドーパミン（DA）神経回路の機能阻害時の運動機能を評価した。より短期間に効率的に結果を得るため、ホイールの回転速度を徐々に上げてどこまで走行可能かを調べる漸増負荷課題を確立した。そして、時間的・空間的に限定して機能を阻害するために、DA受容体D1RのコンディショナルノックダウンマウスおよびDA受容体D1RまたはD2R阻害剤の線条体局所投与マウスを評価に用いた。結果、D1Rの機能阻害時にステップホイール漸増負荷課題の成績低下が認められ、運動遂行時の線条体ドーパミン神経回路、特にDA-D1Rシグナルが運動制御に関与している事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病にみられる中脳ドーパミン神経細胞の変性脱落と運動失調症状の知見から、中脳-基底核のドーパミン神経回路が身体の運動制御に関与することは知られているが、その詳細な脳内機構については不明点も多い。今回の研究結果から、運動実行中の基底核線条体におけるドーパミン神経回路、特にドーパミン受容体D1Rを介したシグナル回路が歩行運動の制御に関与していることが明らかとなった。今後更に研究が進む事でこの神経回路が運動制御のどこに機能しているのか、より詳細な機構を明らかにすることで運動失調を伴う神経変性疾患の治療に繋がる知見を得ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the function of dopamine receptors in motor control using a mouse running control system, Step-Wheel. In order to efficiently measure the motor ability in one session, we developed the accelerating step-wheel task, in which the rotational speed of the wheel was increased gradually during a session. We measured the fastest speed mice could run in the task using D1R conditional knockdown (D1R cKD) mice and the mice injected with D1R or D2R blocker. As a result, we found that the speed of the D1R cKD mice and the mice injected with D1R blocker was lower than that of control mice. These results indicate that dopamine-D1R signaling in the striatum is required for locomotive motor ability.

研究分野：神経科学

キーワード：運動制御 ドーパミン ドーパミン受容体 線条体 マウス コンディショナルノックダウンマウス 脳内薬物投与

1. 研究開始当初の背景

(1) 意志と運動指令、行動の関係

意志の力は人が行動を起こし目標を達成するために不可欠であり、人生をより活動的に過ごすための重要因子である。意志の一部はモチベーション（動機づけ）や報酬系機能が担っていると考えられ、大脳基底核の神経回路やそこで作用するドーパミン（DA）の関与が報告されているが、未知な部分も多い。

運動指令は大脳皮質から脊髄・延髄を通して筋肉などの運動器へ伝わるのと同時に皮質-基底核-視床ループからの調整を受ける。一方、報酬系信号は中脳にある DA 神経細胞群から線条体へと伝わる。基底核にはアクセルとブレーキのように互いに協調する直接路-間節路回路があり、それぞれドーパミン受容体サブタイプ 1 型、2 型（D1R、D2R）が選択的に発現している（図 1）。以上のことから、意志・モチベーション信号は中脳の DA 神経細胞から基底核へ入力し、線条体での DA-DR を介して直接路-間節路回路を駆動させ、皮質からの運動指令に対する調整・フィルタリング機能を果たして最終的な行動・運動に繋がる事が想定される。

(2) 報酬系運動課題におけるドーパミン機能

研究代表者らはドーパミン受容体（DR）遺伝子欠損マウス（KO マウス）の運動課題でのパフォーマンスを調べ、D1R KO マウスの報酬系課題特異的な運動機能低下を示した（図 2、Nakamura et al., 2014）。DR は線条体に高く発現していることから、DA は線条体 D1R を介して報酬系信号を伝え、報酬を動機づけとする運動を引き起こす事が考えられる。本研究の目的はこの仮説を検証することであり、線条体での DA 神経回路を実験者側で操作した時の運動パフォーマンスへの影響を調べることで、運動に関与する DA 機能の解明を目指した。

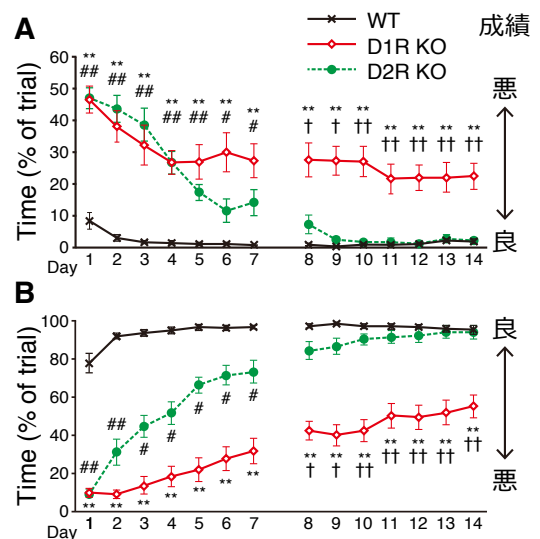
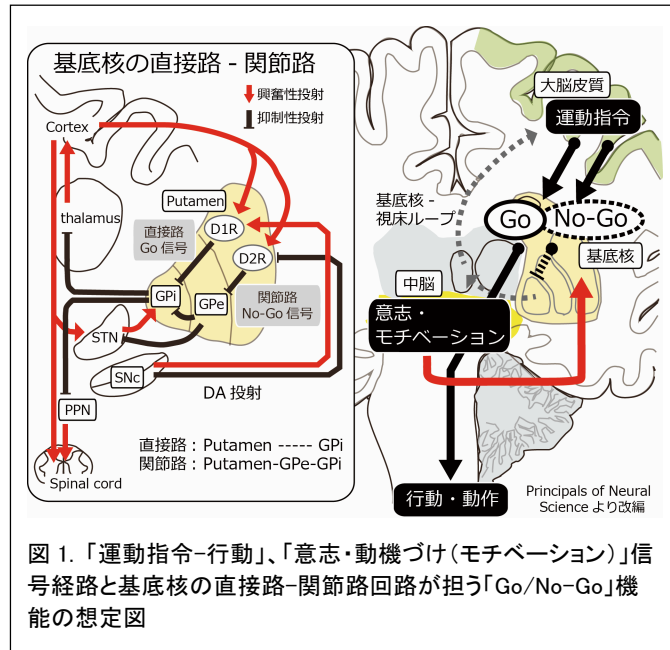


図 2. ドーパミン受容体欠損マウスのステップホイール課題の成績 (Nakamura et al. 2014 より)
A ベグの踏み外し時間と B 飲水時間。D2R KO マウスは後半成績が向上し WT マウスと同程度に達するのに対して、D1R KO マウスが最後まで成績が低い。

2. 研究の目的

行動を引き起こす意志のメカニズムの一部は動機づけや報酬系機能が担っていると考えられるが、その脳内機構の詳細は未知である。本研究では、中脳ドーパミン神経-線条体ドーパミン受容体の信号回路が報酬系運動遂行に機能しているという仮説を検証し、意志・モチベーションによる運動制御の神経メカニズム解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ステップホイール装置による運動機能評価

本研究では「ステップホイール（SW）装置」を用いてマウスの運動機能の評価を行った。この装置は研究代表者らが開発・運用してきたもの (Kitsukawa et al., 2011; Nakamura et al., 2017) で、給水制限したマウスに水を与えて走らせる報酬系運動課題である。モーターで回転するホイールの内部は梯子状の足場になっており、マウスは飲水するために足場の動きに合わせて

て走ることが要求される。今回、新たに給水制御装置を組み込み、給水の量やタイミングを制御した時の報酬と運動パフォーマンスの関係性を定量化する実験系確立を目指した。また、SW装置を用いた運動機能評価試験として、先行研究では一試行内のホイール回転速度を一定にしていたために数週間を要した。より簡便に短期間で評価出来るよう、一試行内で回転速度を徐々に増加させる漸増負荷試験のプロトコル確立を試みた。

(2) ドーパミン受容体サブタイプの違いによる運動機能

先行研究の KO マウスの結果から、D1R の機能阻害により報酬系運動機能の低下、報酬価値の低下が予想された。しかし、KO マウスはその標的遺伝子の発現を全身で欠損しているため、原因となる脳領域を限定出来ない。また時間的な点でも、遺伝子を生得的に欠損しているため、発達期における神経回路形成への影響や代償作用の可能性も考えられる。これらの問題を克服するため、以下①～③の方法を試みた。

① 遺伝子操作マウスによる行動実験

Tet-Off システムを利用してドキシサイクリン (Dox) 投与の有無により D1R を可逆的に発現制御できるコンディショナルノックダウンマウス (D1R cKD マウス) を用いた (Chicken et al., 2015)。このマウスでの D1R の発現は、Dox 投与下で抑制され、Dox 非投与下では発現しており、同一個体で遺伝子を ON/OFF した時の影響を比較可能である。また、Dox 非投与時の発達期には D1R 遺伝子が発現していることから、代償作用の可能性を排除できる。

② ドーパミン受容体阻害薬の線条体局所投与

線条体に空間的に制限して DR 機能を阻害するため、D1R、D2R それぞれの選択的阻害薬 (D1R 阻害には SCH23390、D2R 阻害にはハロペリドールを使用) を線条体に局所投与し、運動への影響を比較した。SW装置で走行訓練を行った WT マウスの両側線条体へカテーテル留置手術を行い、回復期 (約 1 週間)、再訓練 (約 2 週間) を課した。漸増負荷試験の開始 30 分前に阻害薬を投与し、成績を比較した。

③ 光遺伝学的手法によるドーパミン神経細胞の活性操作

より時間的・空間的な解像度を上げて制御するために、光遺伝学的手法を用いた。D1R (または D2R) を発現している細胞選択的に Cre を発現させた D1R-Cre (または D2R-Cre) マウスの線条体に AAV ウィルスを投与することで、Cre-LoxP システムにより標的細胞選択的にチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させた。光刺激用ファイバーを同部位に留置し、光刺激を与えることで標的細胞を活性化させ、運動パフォーマンスへの影響を調べた。

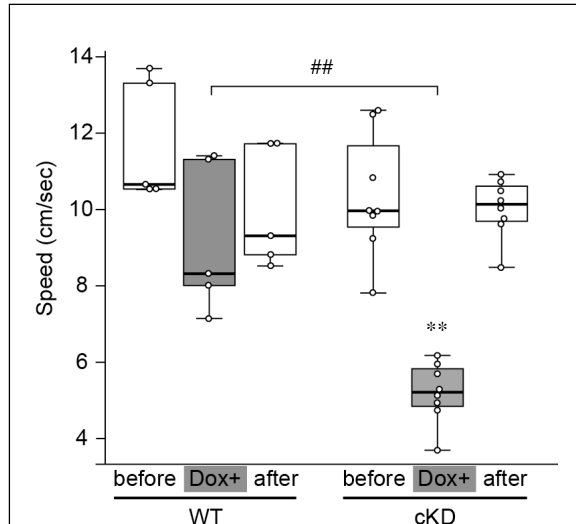


図 3. D1R cKD マウスの運動機能評価

Dox 投与前、投与中、投与中止後の 3 点で漸増負荷試験を課し、走行を維持出来た最高速度を調べた。左側は対照群の WT マウスで、cKD マウスと同様の Dox 処置を施した。

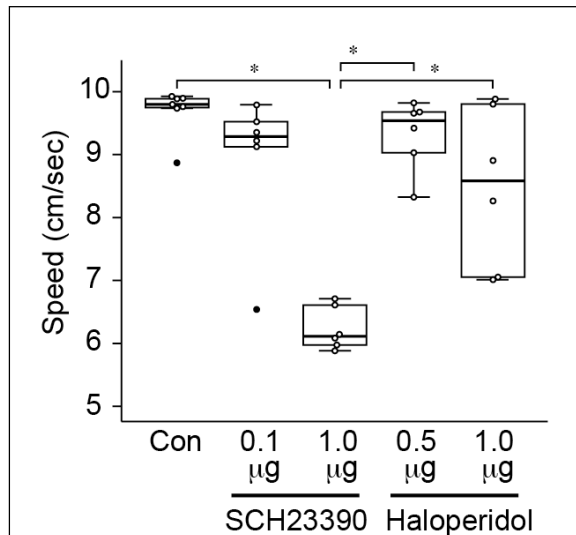


図 4. DR 阻害薬投与マウスの運動機能評価

両側線条体へカテーテル留置を行い、薬剤を局所投与して漸増負荷試験を課し、走行を維持出来た最高速度を調べた。

4. 研究成果

(1) ステップホイール装置による運動機能評価

① 給水制御装置による報酬の制御

給水量と運動パフォーマンスとの関係性が比例関係にあれば、実験者側で給水制御する事でマウスのモチベーション (動機づけ) を制御出来る事を期待した。給水の多寡によりマウスの動きに変化は観察できたが、給水量がある水準以下になると急にマウスの動きが止まってしまう、定量化は難しいと判断して本研究期間中の実験系確立は断念した。

② 漸増負荷試験

一試行内でホイールの回転速度を徐々に上げる漸増負荷試験のため、開始時の回転速度や試行回数、成績の基準等の条件検討を行った。一試行最長 70 秒間で徐々に加速させ、マウスが走る速度を維持出来なくなる（給水口から 3 秒間離れる）時点の速度を記録した。連続 10 試行を行い、その中で最も良い 3 試行の平均値を成績として採用することで、運動評価を可能とする実験系を確立した。以下、(2)-①、②はこの漸増負荷試験にて評価を行った。

(2) ドーパミン受容体サブタイプの違いによる運動機能への関与

① D1R cKD マウス

同一の cKD マウスで D1R 発現の有無による運動成績を比較するため、Dox 投与前 (before)、投与中 (Dox+, 約 6 週間)、投与後 (after、投与中止から約 1 週間) の 3 点で SW 課題を行い、比較した。先行研究 (Chicken et al., 2015) において、各期間での D1R 発現を確認している。Dox は飲料水に混ぜて摂取させ、SW 課題中は飲水量制限が必要なため腹腔内投与とした。結果、Dox 投与中でのみ成績低下が認められ (図 3)、D1R 発現と SW 課題の運動パフォーマンスの関係が示唆された。

② ドーパミン受容体阻害薬の線条体局所投与

D1R、D2R の阻害薬それぞれに 2 つの濃度を設定し、投与による SW 課題の運動パフォーマンスへの影響を調べた。結果、高濃度 SCH23390 投与群でのみ成績低下が認められ、他の群は対照群 (同量の生理食塩水を投与) と差が認められなかった (図 4)。DR のサブタイプによる違いが認められ、KO マウスの先行研究 (Nakamura et al., 2014) の結果と同じく D2R よりも D1R の機能阻害をした方がより顕著な影響で見られた。

③ 光遺伝学的手法によるドーパミン神経の活性操作

標的細胞に ChR2 を発現させた D1R-cre (あるいは D2R-cre) マウスに SW 課題を課し、任意のタイミングで光刺激を与えて神経活性化させた時の様子を観察した。D1R-cre マウスには特に影響なく走っている様子だったのに対し、D2R-cre マウスは光刺激のタイミングで僅かに脚の動きが泊まる、あるいは給水口から顔を背けるような動きが見られた。いずれも予備実験段階であるので、今後の検証を要する。

線条体における D1R、D2R を介した DA 信号回路やそれらが発現している直接路・間接路の神経回路の機能に関して、ここ数年で研究が進み少しずつ明らかにされつつあるが、依然として議論の最中にある。本研究で得られた知見は、この神経回路の機能解明へ貢献するものと考えている。今後更に研究が進む事で、パーキンソン病のような運動失調を引き起こす神経変性疾患の治療に繋がる知見を得ることが期待される

<引用文献>

Chicken, S., Sato, A., Ohta, C., Kurokawa, M., Arai, S., Maeshima, J., Sunayama-Morita, T., Sasaoka, T., Nambu, A., 2015. Dopamine D1 receptor-mediated transmission maintains information flow through the cortico-striato-entopeduncular direct pathway to release movements. *Cereb. Cortex* 25, 4885-4897, <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhv209>.

Kitsukawa, T., Nagata, M., Yanagihara, D., Tomioka, R., Utsumi, H., Kubota, Y., Yagi, T., Graybiel, A.M., Yamamori, T., 2011. A novel instrumented multipeg running wheel system, Step-Wheel, for monitoring and controlling complex sequential stepping in mice. *J. Neurophysiol.* 106, 479-487, <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00139.2011>.

Nakamura, T., Sato, A., Kitsukawa, T., Momiyama, T., Yamamori, T., Sasaoka, T., 2014. Distinct motor impairments of dopamine D1 and D2 receptor knockout mice revealed by three types of motor behavior. *Front. Integr. Neurosci.* 8, 56, <http://dx.doi.org/10.3389/fnint.2014.00056>.

Nakamura, T., Nagata, M., Yagi, T., Graybiel, A.M., Yamamori, T., Kitsukawa, T., 2017. Learning new sequential stepping patterns requires striatal plasticity during the earliest phase of acquisition. *Eur. J. Neurosci.* 45, 901-911, <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.13537>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nakamura Toru, Rios Luis Carl, Yagi Takeshi, Sasaoka Toshikuni, Kitsukawa Takashi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Dopamine D1 and muscarinic acetylcholine receptors in dorsal striatum are required for high speed running | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.12.001 | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toru Nakamura, Toshikuni Sasaoka, Takeshi Yagi, Takashi Kitsukawa |
| 2. 発表標題 Dopamine receptor D1R and muscarinic acetylcholine receptor in the dorsal striatum are required for wheel running. |
| 3. 学会等名 日本神経科学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Terashita, Toru Nakamura, Yasuo Kubota, Dan Hu, Takeshi Yagi, Ann M. Graybiel, Takashi Kitsukawa |
| 2. 発表標題 Striatal neurons encode the interval and phase of stepping in the step-wheel task. |
| 3. 学会等名 日本神経科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kohjiro Hirokane, Toru Nakamura, Yasuo Kubota, Dan Hu, Takeshi Yagi, Ann M. Graybiel, Takashi Kitsukawa |
| 2. 発表標題 Rhythmic timing control of mice running in complex stepping patterns. |
| 3. 学会等名 日本神経科学会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|-------|-----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 木津川 尚史 (Kitsukawa Takashi) | | |
| 研究協力者 | 笹岡 俊邦 (Sasaoka Toshikuni) | | |