

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19500300
研究課題名 (和文) 作業記憶神経回路におけるドーパミン作動性入力の分布とシナプス形態
研究課題名 (英文) Synaptic distribution of dopaminergic inputs to the prefrontal cortex related to working memory
研究代表者 黒田 優 (KURODA MASARU) 東邦大学・医学部・教授 研究者番号：10170135

研究成果の概要 (和文)：

ラットの前頭前野におけるドーパミン受容体D5の分布を蛍光多重染色法を用いて明らかにした。その結果、興奮性、抑制性神経細胞ともほとんどの細胞がD5を有していたものの、細胞内の局在分布パターンが大きく異なっていることが明らかとなった。また、ほとんどすべての神経終末はD5を含有していなかった。これらのD5の詳細な局在分布の解析は、前頭前野で行われる高次認知機能のドーパミン作動性修飾システムの解明に貢献するものである。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, to identify the precise localization of dopamine receptor D5 (D5R) in the rat prefrontal cortex, we observed the D5R-immunolabeled structures by confocal laser microscopy. As a result, we found that nearly all neurons, both excitatory and inhibitory neurons, contained D5R, and that the intracellular distribution pattern of D5R is markedly different between them. These findings strongly suggested that the differential distribution pattern of D5R may underlie dopaminergic modulation of cognitive functions subserved by the prefrontal cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：前頭前野、視床背内側核、ドーパミン受容体、共焦点顕微鏡、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、シナプス

1. 研究開始当初の背景

前頭前野は、げっ歯類やヒトを含む霊長類

など、多くの種で学習や作動記憶などの様々な高次認知機能を担っていることが知られ

ている。前頭前野はドーパミン作動性の中脳皮質路を密に受けており、このドーパミン作動性入力の前頭前野における正常な認知機能の形成や維持に重要であることが示されている。

ドーパミンには5つの受容体があり、D1型 (D1とD5)とD2型 (D2-4)の2つのタイプに分類されている。これらのうちD1型受容体は、皮質の錐体細胞で長期増強の形成に関与していることが示され、また皮質内にD1型受容体がD2型受容体よりも10から20倍も多く含まれていることから、D1型受容体が前頭前野におけるドーパミン作動性修飾にとってより重要な受容体であろうと考えられてきた。

近年になってD1型受容体のサブタイプであるD1受容体とD5受容体を識別できる抗体が作られ、ラットの前頭前野ではD1受容体よりもD5受容体が有意に多いことが示された。また、ドーパミンに対する親和性はD5受容体の方が10倍以上高いことから、D5受容体が、前頭前野におけるドーパミン作動性修飾の最も重要な要素であることが示唆されている。

しかし、海外の研究者によるD5受容体の単染色の免疫染色による報告では、錐体細胞の細胞体と頂上樹状突起が標識されることが記載されたのみで、どのくらいの割合の錐体細胞がD5受容体を有しているのか、あるいは抑制性細胞は有しているのか、さらに、神経終末に存在しているのか、など不明な点が多い。これらの問題を明らかにしなければ、前頭前野におけるD5受容体を介したドーパミン作動性修飾システムを理解することはできない。

2. 研究の目的

錐体細胞(興奮性細胞)と抑制性細胞(パルブアルブミン含有細胞)、それぞれにおいてD5受容体を有する細胞の割合を明らかにする。さらに、錐体細胞とパルブアルブミン含有(PV)細胞においてD5受容体の細胞内分布を明らかにする。PV細胞は、抑制性細胞の中で最も大きなサブポピュレーションを形成し、電気生理学的にはfast-spiking細胞に分類され、錐体細胞を強力に抑制する最も重要な皮質内抑制性要素である。PVは細胞体・樹状突起・軸索に広く分布するため、PVに対する抗体で細胞要素全体を観察することが可能である。

3. 研究の方法

(1) 動物と試薬

動物は雄の成獣SDラット12匹を用いた。免疫染色には以下の4種の抗体を使用した。

抗D5受容体 (Santa Cruz Biotechnology, Sc-1441:300倍)、

抗GAD65/67 (Chemicon, AB1511:2000倍)、
抗PV (Sigma, P-3088:4000倍)、
抗シナプトフィジン (Chemicon,
MAB5258:2000倍)

GAD65/67は抑制性細胞のマーカーであり、シナプトフィジンは神経終末のマーカーである。

さらに核染色のため、Hoechst33342 (Molecular Probe, H21493, 2 μ g/ml)を用いた。

(2) 灌流固定と切片の作成

動物にネンブタールで深麻酔をかけ、リン酸緩衝液を100ml、続けて3%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液を1000ml経心的に灌流した。速やかに脳を取り出し、同固定液で3時間後固定した。その後、20%シュクロース・リン酸緩衝液に一晩浸漬した。切片は、凍結マイクロトームを用いて、厚さ60 μ mの切片を作成した。

(3) 蛍光多重染色

切片はリン酸緩衝液で洗浄し、2種の抗体を混合した液(抗D5受容体と抗GAD65/67, 抗D5受容体と抗PV, あるいは抗D5受容体と抗シナプトフィジン)で4日間浸漬した。リン酸緩衝液で切片を洗浄した後、核染色のためHoechst33342を加えた2種の2次抗体混合液に3時間浸漬した。Alexa555抗ヤギIgGはD5受容体、Alexa488抗ウサギはGAD65/67, Alexa488抗マウスIgGはPVとシナプトフィジンの検出に用いた。蛍光多重染色された切片はリン酸緩衝液、次いで蒸留水で洗浄した後、Gel Mountを用いて封入した。

(4) 共焦点顕微鏡

蛍光多重染色を施された切片は、共焦点顕微鏡LSM-510(Carl Zeiss)を用いて観察した。対物レンズは、40倍、63倍、100倍を用い、ピンホールサイズを調節して光学的な切片の厚さを0.6-1.0 μ mとした。連続切片を採取する場合は、Z-stackを用いて1 μ mの間隔で採取した。

採取された画像は、Zeiss LSM Image Browserで明るさやコントラストを調節し、TIFFフォーマットに変換した。その後、Jasc Paint Shop Pro 9 (Jasc Software)を用いてレタリングを挿入した。

Lingらによってグリア細胞の核の形態が分類されているため、核染色によりこれらの非神経細胞要素の細胞(内皮細胞も含む)はカウントから除外した。

4. 研究成果

(1) 錐体細胞におけるD5受容体の共存

D5受容体、抑制性細胞のマーカーであるGAD65/67と核染色の蛍光3重染色を行って観察した(図1)。GAD65/67陰性細胞(すなわち興奮性細胞)中のおよそ99%の細胞がD5受容体陽性を示した(図1のP)。これらの細

胞は主としてII層からVI層まで広く分布していた。I層にはわずかに認められた。

細胞体だけでなく、多数の太い頂上突起もD5受容体が密に分布していた。従って、これらのD5受容体陽性細胞の多くは錐体細胞である。GAD65/67陰性細胞でD5受容体陰性を示す細胞はごく少数であった(図1のN)。層別に、またD5受容体の免疫染色性の強さ別にカウントした結果は表1に示す。

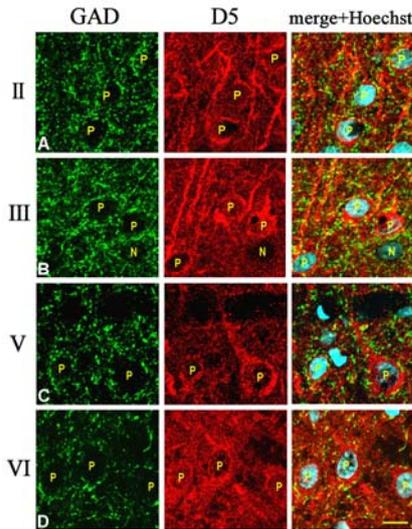


図1. 興奮性細胞におけるD5受容体の共存

表1. GAD陰性、GAD陽性、PV陽性細胞におけるD5受容体の共存率

Layer of PrL	GAD-immunonegative neurons (N=761; 3 rats)			GAD-immunopositive neurons (N=158; 3 rats)			PV-immunopositive neuron (N=165; 3 rats)		
	DSR immunopositivity			DSR immunopositivity			DSR immunopositivity		
	Strong~Moderate	Weak	Negative	Strong~Moderate	Weak	Negative	Strong~Moderate	Weak	Negative
I	16	2	0	8	12	2	0	1	0
II	142	3	0	14	6	0	8	6	0
III	196	4	1	27	10	1	43	12	0
V	209	5	3	32	16	1	45	16	0
VI	173	5	2	23	6	0	30	4	0
Total number	736	19	6	104	50	4	126	39	0
(%)	(96.7)	(2.5)	(0.8)	(65.8)	(31.6)	(2.5)	(76.4)	(23.6)	(0)

(2) 抑制性細胞におけるD5受容体の共存

D5受容体、GAD65/67と核染色の蛍光3重染色を行って観察した(図2)。GAD65/67陽性細胞(すなわち抑制性細胞)のおよそ97%の細胞でD5受容体を有していた。これらの細胞は全層で観察された(図2の矢印、表1)。

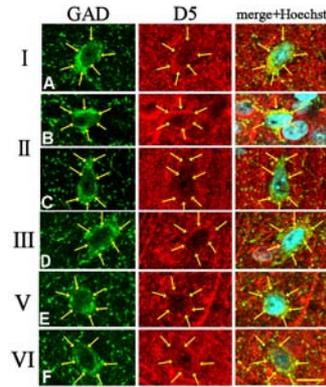


図2. 抑制性細胞におけるD5受容体の共存

(3) ニューロピルにおけるD5受容体の分布

ニューロピルにはD5受容体強陽性の頂上樹状突起以外にも多数のドット状の陽性構造物が全層に渡って観察される(図3)。これらの構造物はGAD65/67陰性であり、しばしば頂上樹状突起幹に起始しているのが観察される(図2Bの矢印)。さらに神経終末のマーカーであるシナプトフィジン陽性構造物としばしば接触を有するものの共存関係はない(図3C and D)。すなわち、D5受容体は神経終末には存在せず、これらニューロピルに多数存在するD5受容体陽性のドット状構造物は頂上樹状突起の棘である。

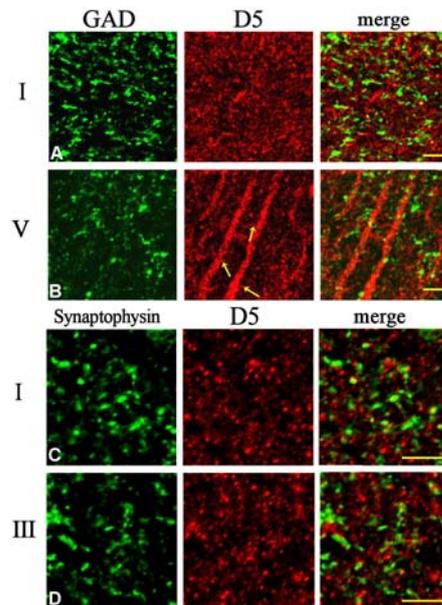


図3. ニューロピルにおけるD5受容体陽性構造物

(4) PV含有細胞におけるD5受容体の共存

PV含有細胞は主にII層からVI層まで広く分布しており、すべての細胞がD5受容体を有していた(図4、表1)。

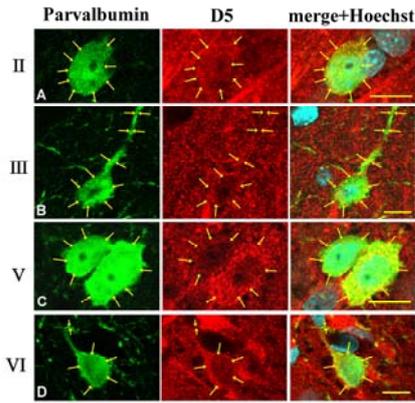


図 4. PV 含有細胞における D5 受容体の共存

(5) PV 含有細胞における D5 受容体の樹状突起内分布

PV 含有細胞内の D5 受容体の樹状突起内分布パターンを明らかにするため、19 本の樹状突起を光学的切片厚さ 0.7 あるいは 0.8 μm 、切片間隔 1.0 μm にして連続画像を得た。2 例を図 5 と 6 に示す。これらの細胞から起始する樹状突起は、D5 受容体は細胞体や近位樹状突起に分布するものの二次樹状突起から遠位側に向かって著しく減少し始め、樹状突起全体に一樣に強陽性を示す錐体細胞の場合と異なる局在パターンを示す。(図 4B と D)。

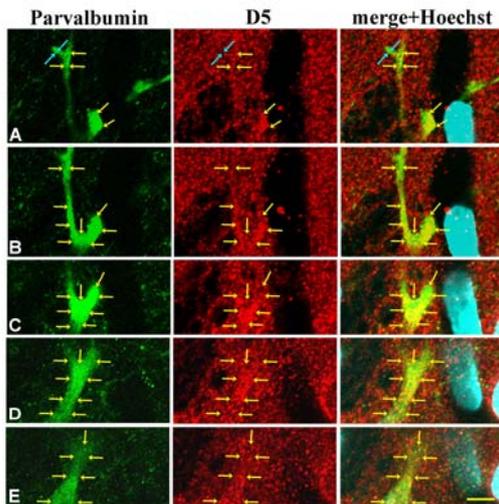


図 5. PV 陽性樹状突起における D5 受容体の分布 1

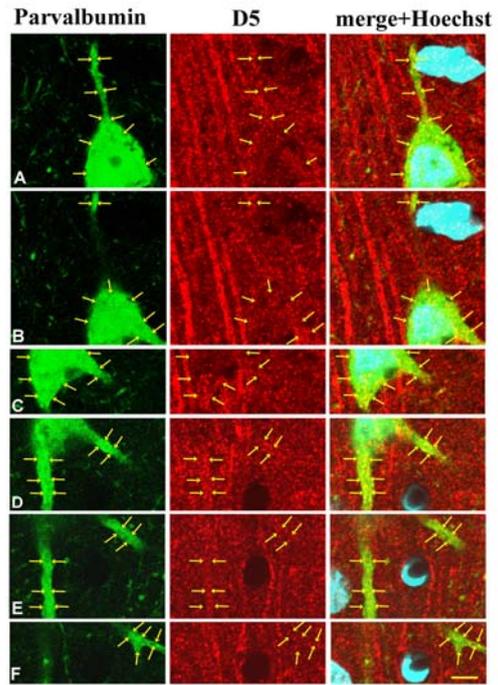


図 6. PV 陽性樹状突起における D5 受容体の分布 2

さらに、ニューロピルにおける PV 含有構造物の D5 受容体の共存の有無をより高倍像で観察した (図 7)。直径 1.0 μm 未満の軸索様構造物 (図 7A) は D5 受容体を全く含んでいなかった。直径 1.0 μm 以上の遠位樹状突起様構造物も D5 受容体はごくわずかであった (図 7B-D)。

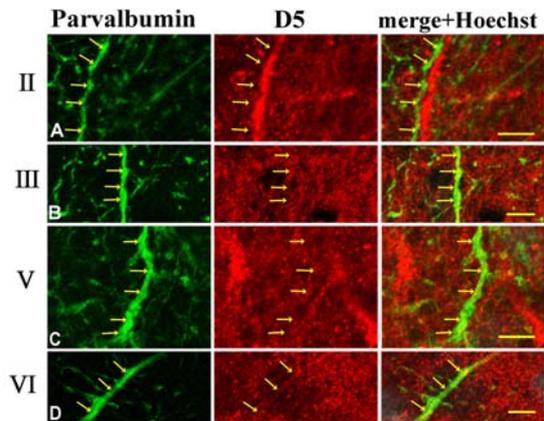


図 7. ニューロピル内の PV 含有構造物における D5 受容体の分布

(6) 結果のまとめ

まとめの模式図を図 8 に示す。ラットの前頭前野において、D5 受容体はほとんどの錐体細胞に存在する。そして、細胞内の分布は、細胞体に加えスパインを含む樹状突起全体に広く密に分布していた。

GAD65/67 免疫陽性の抑制細胞もほとんど

の細胞が D5 受容体を有している。抑制細胞の中で最大のポピュレーションを形成し、電気生理学的には fast-spiking 細胞に分類され、II 層から VI 層まで広く分布する PV 含有細胞は、錐体細胞を強力に抑制する最も重要な皮質内抑制性要素である。この細胞はすべてが D5 受容体を有するものの細胞内の分布は主に細胞体と近位樹状突起で、より遠位の樹状突起ではわずかにしか分布していなかった。従って、本研究は錐体細胞と PV 含有細胞では、D5 受容体の細胞内分布パターンが全く異なることを明らかにした。また、シナプトフィジン免疫陽性によって示される神経終末には D5 受容体は含まれていなかった。これらの神経終末は D5 受容体陽性のスパインとしばしば接触していた。

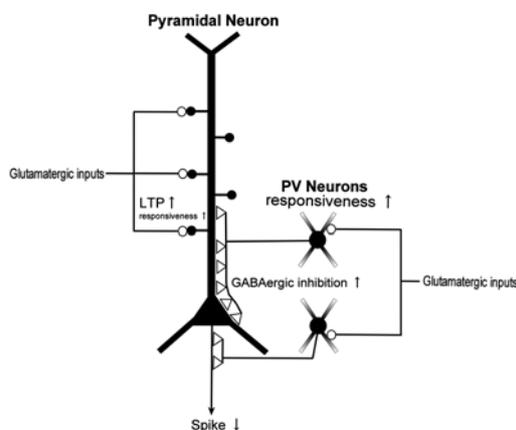


図8. ラット前頭前野の錐体細胞と PV 含有細胞における D5 受容体の分布

電気生理的研究によれば、ドーパミンはグルタミン酸作動性入力とともに作用することによって、錐体細胞の反応性を活性化し、さらに DARPP-32 を介した経路で長期増強を引き起こすことが知られている。また、PV 含有細胞でもドーパミンはグルタミン酸作動性入力とともに作用することによって、細胞の反応性を活性化し、強力に錐体細胞のスパイク発生を抑制することも報告されている。そしてこれらの錐体細胞および PV 含有細胞の反応にはともに D1 型受容体が関与していることが報告されていた。

本研究の結果は、これらの電気生理学のデータときわめて興味深い関連を有する。すなわち、錐体細胞ではグルタミン酸作動性入力の場でもあるスパインを含む樹状突起に D5 受容体が密に分布し、同様な分布パターンが報告されている DARPP-32 を介して長期増強が生じる。また、PV 細胞では、D5 受容体は細胞体近傍に限局している。PV 細胞は DARPP-32 を欠くことが報告されており、錐体細胞のような長期増強は生じないと考えられ、主として細胞の反応性の亢進に働くと考

えられる。従って、D5 受容体が活動電位の発生する部位の近くに存在していることは興味深い。さらに、D5 受容体を介するドーパミン作動性調節はシナプスの受け手側で働き、シナプス前終末側では行われぬことも明確に示した。

本研究で示した D5 受容体の局在分布パターンは、内側前頭前野で遂行される高次脳機能に対するドーパミン作動性修飾の基礎をなすことが強く推察される。

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 3 件)

- ① Oda S, Funato H, Adachi-Akahane S, Ito M, Okada A, Igarashi H, Yokofujita J, Kuroda M : Dopamine D5 receptor immunoreactivity is differentially distributed in GABAergic interneurons and pyramidal cells in the rat prefrontal cortex. *Brain Res.* (査読有) 1329, 2010, 89-102
- ② Yokofujita J, Oda S, Igarashi H, Sato F, Kuroda M : Synaptic characteristics between cortical cells in the rat prefrontal cortex and axon terminals from the ventral tegmental area that utilize different neurotransmitters. *Int. J. Neurosci.* (査読有) 118, 2008, 1443-1459
- ③ Oda S, Sato F, Okada A, Akahane S, Igarashi H, Yokofujita J, Yang J, Kuroda M : Immunolocalization of muscarinic receptor subtypes in the reticular thalamic nucleus of rats. *Brain Res. Bull.* (査読有) 74, 2007, 376-384

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 小田哲子、船戸弘正、五十嵐広明、横藤田純子、黒田 優 : 前頭前野における抑制性および興奮性神経細胞の細胞内ドーパミンD5 受容体分布の比較. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会、2010. 3. 29、盛岡
- ② 横藤田純子、五十嵐広明、小田哲子、船戸弘正、黒田 優 : 前頭前野における腹側被蓋野投射線維のシナプス形態について. 第 97 回日本解剖学会関東支部学術集会、2009. 10. 24、入間
- ③ Funato H, Sato M, Sinton C, Williams S-C, Gautron L, Elmquist J-K, Skoultchi A-I, Kuroda M, Yanagisawa M : Abnormal REM sleep structures of

goosecoid-like-deficient mouse.
Society for Neuroscience,
Neuroscience Annual Meeting 2009,
2009. 10. 19, Chicago, USA

- ④ 横藤田純子、小田哲子、五十嵐広明、黒田 優：異なる神経伝達物質を利用するラット腹側被蓋野投射線維と前頭前野細胞間のシナプス形態について．第 114 回日本解剖学会全国学術集会、2009. 3. 30、岡山

〔図書〕（計 1 件）

- ① 黒田 優，他、医学書院、嗅神経（他 19 用語）、医学書院医学大辞典第 2 版、2009、3560

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 優 (KURODA MASARU)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：10170135

(2) 研究分担者

小田 哲子 (ODA SATOKO)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90224237

横藤田 純子 (YOKOFUJITA JUNKO)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80114792