

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号： 19700317
 研究課題名(和文) 中脳ドーパミンニューロンへの入力完成時期を経シナプス性逆行性標識により解明する
 研究課題名(英文) Postnatal maturation of inputs to mesencephalic dopaminergic neurons by a trans-synaptic retrograde labeling method.
 研究代表者
 中村 公一 (NAKAMUA KOUICHI)
 京大・医学(系)研究科(研究院)・研究員
 研究者番号： 10444457

研究成果の概要：ラット新生仔線条体においてドーパミン入力線維が形成する「アイランド」領域は、成体でミューオピオイド受容体免疫活性を示す「パッチ」領域に対応すると考えられてきたが、生後4日前後では「アイランド」が「パッチ」よりも一回り大きいことを見出し、線条体の区画形成に新しい洞察を与えた。また、ウイルスベクターを用いて単一の線条体投射ニューロンの形態を調べ、大脳基底核神経回路の生後発達過程を明らかにしつつある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野： 神経解剖学・神経病理学

科研費の分科・細目：

キーワード： 大脳基底核、生後発達、神経回路、線条体、ドーパミン、ウイルストレーサー

1. 研究開始当初の背景

動物個体は快・不快の情報にもとづいて行動を選択する。快・不快の情報は新生仔にとっても生存上重要であろうと推測されるが、このような行動選択が個体発生の中でどのように発達して来るのかについては不明の点が多い。

中脳ドーパミンニューロンの phasic なバースト発火活動が、報酬予測誤差信号をコードしているという Schultz らの報告 (Schultz 1997) を始めとして、中脳ドーパミンニューロンおよび、その主な投射先のひとつである線条体を含む大脳基底核の神経

回路が、成体脳の報酬情報の処理および個体の行動選択に深く関与するとされ、数多くの研究がなされている。したがって、行動選択の生後発達の神経科学的な基盤を明らかにするためには、大脳基底核神経回路の生後発達変化について理解を進めることが必要である。

(1) ラット新生仔について、出生時には、中脳から線条体へのドーパミン繊維入力が既にあり、線条体にドーパミン受容体の発現が認められ、また線条体のそのほかの入力線維が部分的に完成しているなど、ドーパミンを介して報酬情報が処理されるため

の必要条件として、ドーパミンニューロンの下流の神経回路がある程度整っている。このような状況の中で、ドーパミンニューロンの発火活動を上流から支配・制御する神経回路の成熟過程を明らかにすることにより、報酬関連シグナルの脳内情報処理がどのように発達するのかについて示唆を得ることができる。

(2) 大脳基底核の入り口である線条体は、解剖学的にパッチとマトリックスに区画化されており、それぞれ入出力先が異なることが知られる。ミューオピオイド受容体 (MOR) 免疫活性は成体ラット線条体のパッチ領域に強いが、生後発達を通じて同様のパターンが観察される。一方、ラット新生仔の線条体では、チロシン水酸化酵素 (TH) 免疫活性が一過性によく似たパッチ状の構造を示し、「ドーパミンアイランド」と呼ばれる。パッチ領域とドーパミンアイランドは線条体内部の同一の区画であると考えられて来たが、その位置関係を直接比較した研究はなかった。さらに、研究代表者らは、新生仔線条体において、グルタミン酸作動性入力のマーカーである VGluT1 および VGluT2 免疫活性が、やはりパッチ状の構造（すなわちグルタミン酸アイランド）を一過性に示し、これらがドーパミンアイランドとほぼ一致することを報告しているが (Nakamura et al., 2005)、これらと MOR 陽性パッチとの位置関係についても不明のままであった。

(3) 線条体の 80%以上を占めるマトリックス領域は、大脳基底核の主たる入力部位であり、大脳皮質および視床から興奮性入力を受け、淡蒼球や黒質へ投射し、随意運動に重要な役割を果たしている。申請者らは、グルタミン酸作動性軸索終末のマーカーである VGluT1 および VGluT2 免疫活性のマウス生後発達における変化を調べ、線条体マトリックス領域への興奮性入力、生後 1 週間前後に、急激に増加することを報告した (Nakamura et al., 2005)。このうち特に顕著な増加を示す VGluT1 免疫活性の増加は、主に皮質錐体細胞の軸索の急激な発達を反映していると考えられる。そこで、大脳基底核機能の生後発達を理解する上で、これらの入力の受け手であるマトリックス領域の投射ニューロンが、どのような時間スケジュールで軸索を展開し、回路を形成して行くのが重要な問題である。

2. 研究の目的

本研究は、大脳基底核機能の発達の基盤である、大脳基底核神経回路の生後発達変化

を明らかにすることを目的とする。より具体的には、以下の 3 つの研究目的を掲げる。

(1) 中脳ドーパミンニューロンを上流から支配するニューロン群を同定する手法を確立し、さらにそれを新生仔ラットへ適用して、ドーパミンニューロンの活動を支配する上流の神経回路の発達スケジュールを明らかにする。

(2) ラット新生仔の線条体において、MOR 陽性パッチとドーパミンアイランド、グルタミン酸アイランドの相互位置関係を解明する。

(3) 大脳基底核の入り口である線条体マトリックスの投射ニューロンについて、その軸索側枝の生後発達変化を単一ニューロン単位で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 仮性狂犬病ウイルス (PRV) の Bartha 株は、経シナプス性かつ逆行性の神経トレーサーとして実績があり、その改変型 PRV Ba2001 株は、Cre-loxP システムを応用したもので、特定のニューロン群の上流の神経回路の同定に有用である (DeFalco et al., 2001)。本研究ではこのウイルスを TH-IRES-Cre ノックインマウスの線条体へ注入することで、中脳ドーパミンニューロンの上流の神経回路に、選択的にウイルス感染を引き起こし、GFP を発現させてそのニューロンを同定する。こうして同定されるニューロンの分布を成体と発達期とで比較し、神経回路の発達について明らかにする。

(2) MOR および TH、VGluT1、VGluT2 に対する特異的抗体を用いて蛍光多重染色を行い、MOR 陽性パッチ構造、ドーパミンアイランド、グルタミン酸アイランド（皮質由来の興奮性入力軸索終末および視床由来の興奮性入力軸索終末の局在）をそれぞれ可視化して、共焦点レーザー走査顕微鏡で撮影し、各領域の境界線を比較した。

(3) 生後発達期に単一の線条体マトリックス領域投射ニューロンの全形態を明らかにするため、所属研究室において成体脳ニューロンの可視化に優れた成果を上げているシンドビスウイルスベクター (雑誌論文 1, 5) を用いた。このウイルスベクターは、脳内注入によってニューロンに感染すると強力な GFP (緑色蛍光蛋白質) 発現を引き起こす。限界まで希釈したウイルス液を用いることによって、ほぼ単一ニューロンへのウイル

ス感染を引き起こすことができる (雑誌論文 1, 5)。ウイルスを新生仔ラットの線条体に注入後、24 時間ないし 36 時間以内に脳を固定して、連続凍結切片を作製し、研究代表者の作製した抗 GFP 抗体 (雑誌論文 8) で酵素抗体法染色 (DAB 法) を行った。カメラルシダを用いて、単一ニューロンの軸索側枝および樹状突起形態を再構成した。マトリックス領域の同定には、TH 抗体および MOR 抗体による蛍光多重染色、および TH 抗体または MOR 抗体とアルカリホスファターゼを用いた酵素抗体法 (NBT/BCIP 法または Vector Blue 法) による明視野の対比染色を用いた。

4. 研究成果

(1) TH-IRES-Cre ノックインマウスにおける Cre の特異的な発現を免疫組織化学法によって確認した。仮性狂犬病ウイルス PRV Ba2001 を TH-IRES-Cre マウス成体の線条体に注入したが、有効なウイルスの感染を認めることができなかった。そこで、同ウイルスを Emx1-Cre ノックインマウス大脳新皮質に注入したところ、少数の皮質および視床ニューロンへの感染が得られた (図 1)。実験に使用したウイルスの力価に問題があるものとみて、ウイルス調整法の再検討を行っている。

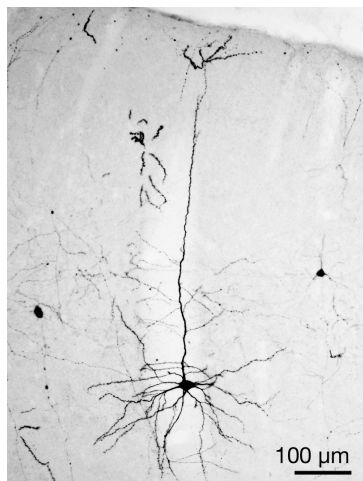


図 1 PRV Ba2001 によって GFP 標識された注入部位近傍の新皮質錐体ニューロン。ウイルスが機能することを確認する実験として、大脳皮質の錐体ニューロンが特異的に Cre を発現する Emx1-Cre マウスの大脳新皮質に PRV Ba2001 を注入し、3 日後に脳を固定して GFP に対する免疫組織化学染色を行った。

(2) 蛍光多重染色によって MOR 陽性パッチ領域と TH 陽性のドーパミンアイランドの領域を比較したところ、これまで同一の構造

であると考えられていた両者が、P4 (生後 4 日) 前後のラット新生仔において一過性に部分的な不一致を示した。すなわち、パッチ領域はほぼ例外無くドーパミンアイランドの中心部と一致するが、ドーパミンアイランドの周辺部は MOR 陰性であり、パッチ領域の外側にはみ出していた。この不一致は P12 以降ではほとんど目立たなくなった (図 2)。また、P4 ラット線条体において、グルタミン酸作動性軸索終末 (VGluT1 または VGluT2 免疫活性) が示すパッチ状の構造 (グルタミン酸アイランド) の境界線は、ドーパミンアイランドの境界線とよく一致し、結果として両者は全体として「入力アイランド afferent islands」と呼ぶべき区画を形成していることが明らかとなった。すなわち、ラット新生仔線条体においては、ドーパミン入力、グルタミン酸入力は、共に MOR 陽性のパッチよりも少し大きい「入力アイランド」を形成しており、これは MOR パッチを内包していた。この結果は、線条体の形態形成に関し、パッチとマトリックスの区画化がどのように成立するかという問題について新しい洞察を与えるものであり、NeuroReport 誌に発表した (雑誌論文 2, 学会発表 15)。

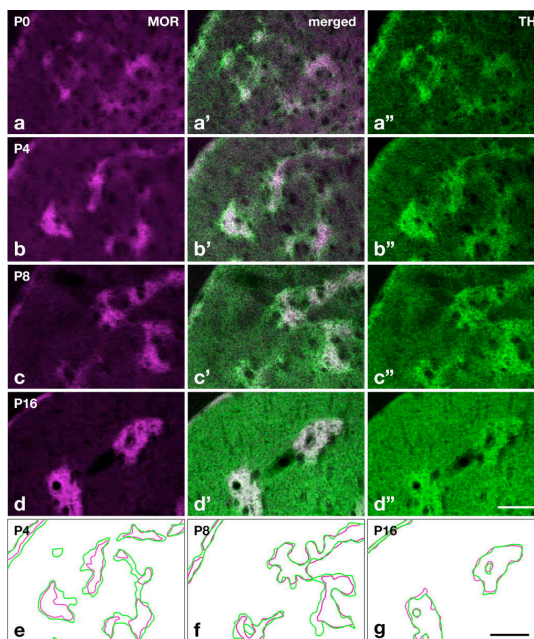
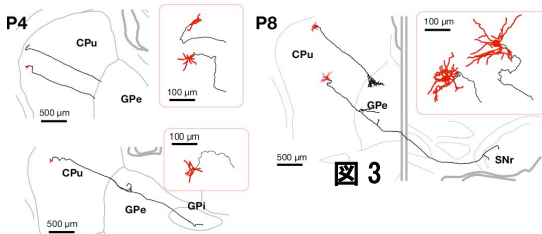


図 2

(3) ラット線条体マトリックス領域の投射ニューロンをウイルスベクターによって標識し、単一ニューロンの形態を再構成しながら、生後発達変化を調べた。P4 で観察される投射ニューロンは極めて未熟な形態を示し、多くは分枝のない 1 本の主軸索と、数本の非常に短い樹状突起をもった細胞体から成っていた (図 3)。同じ日齢のラットでもニューロンによって形態成熟の度合いにば

らつきがある。興奮性入力が増大する時期である P8 では、線条体からの投射先の軸索側枝がある程度見られ、また樹状突起もかなりの広がりを見せるようになった (図 3)。P12 では、すでに投射先の軸索側枝の分布は成体脳に近い似たものになっており、また細胞体周辺の軸索側枝が発達しているのが観察された。P16 では、全体の形態は成体脳のニューロンに似るが、樹状突起が依然としてスパインに乏しいのが特徴である。P24 では、樹状突起がスパインに覆われるようになるが、投射先の軸索の分枝を見ると、成体脳では見られないような、局所的に非常に濃密な分枝が見られた。これは大脳基底核において生後発達期に一時的な回路の過剰形成がなされることを示唆している。以上の成果は、大脳基底核回路の生後発達の時間スケジュールを明らかにするものであり、大脳基底核機能の発達を示唆するものである (学会発表 2, 11, 18)。



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 16 件)

1. Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. (2008) Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron tracing study using viral vectors. *Cerebral Cortex*, (in press), 2009, 査読有
2. Nakamura KC, Fujiyama F, Furuta T, Hioki H, Kaneko T. Afferent islands are larger than μ -opioid receptor patch in striatum of rat pups. *Neuroreport*, 20, p.584–88, 2009, 査読有
3. Yoshida M, Satoh T, Nakamura KC, Kaneko T, Hata Y. Cortical activity regulates corticothalamic synapses in dorsal lateral geniculate nucleus of rats. *Neuroscience Research*, 64(1):118–27, 2009, 査読有
4. Hioki H, Kuramoto E, Konno M, Kameda H, Takahashi Y, Nakano T, Nakamura KC, Kaneko T. High-level transgene expression in neurons by lentivirus with Tet-Off system. *Neuroscience Research*, 63, p.149–54, 2008, 査読有
5. Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *The Journal of Neuroscience*, 29, p.444–53, 2008, 査読有
6. Pang YW, Ge SN, Nakamura KC, Li JL, Kaneko T, Mizuno N. Axon terminals expressing vesicular glutamate transporter VGLUT1 or VGLUT2 within the trigeminal motor nucleus of the rat: origins and distribution patterns. *The Journal Comparative Neurology*, 512, p.595–612. 2008, 査読有
7. Koshimizu Y, Wu SX, Unzai T, Fujiyama F, Nakamura KC, Hioki H, Kaneko T. (2008) Paucity of enkephalin production in neostriatal striosomal neurons: Analysis with preproenkephalin-GFP transgenic mice. *The European Journal of Neuroscience*, 28, p.2053–64, 2008, 査読有
8. Nakamura KC, Kameda H, Koshimizu Y, Yanagawa Y, Kaneko T. Production and histological application of affinity-purified antibodies to heat-denatured green fluorescent protein. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 56, p.647–57, 2008, 査読有
9. May CA, Nakamura K, Fujiyama F, Yanagawa Y. Quantification and characterization of GABA-ergic amacrine cells in the retina of GAD67-GFP knock-in mice. *Acta Ophthalmologica*, 86, p.395–400, 2008, 査読有
10. Kameda H, Furuta T, Matsuda W, Ohira K, Nakamura K, Hioki H, Kaneko T. Targeting green fluorescent protein to dendritic membrane in central neurons. *Neuroscience Research*, 61, p.79–91, 2008, 査読有
11. Ito T, Hioki H, Nakamura K, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. Some gamma-motoneurons contain gamma-aminobutyric acid in the rat cervical spinal cord. *Brain Research*, 1021, p.78–87, 2008, 査読有
12. Furuta T, Timofeeva E, Nakamura K, Okamoto-Furuta K, Togo M, Kaneko T, Deschênes M. Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *The Journal of Neuroscience*, 28, p.1789–97, 2008, 査読有
13. Sonomura T, Nakamura K, Furuta T, Hioki H, Nishi A, Yamanaka A, Uemura M, Kaneko T. Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons

- producing neurokinin B in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 26, p.3093-103, 2007, 査読有
14. Nakamura K, Watakabe A, Hioki H, Fujiyama F, Tanaka Y, Yamamori T, Kaneko T. Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient. *The European Journal of Neuroscience*, 26, p.3054-67, 2007, 査読有
 15. Hioki H, Kameda H, Nakamura H, Okunomiya T, Ohira K, Nakamura K, Kuroda M, Furuta T, Kaneko T. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Therapy*, 14, p.872-82, 2007, 査読有
 16. Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. Gamma-aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *The Journal of Comparative Neurology*, 502, p.113-25, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 26 件)
1. 日置寛之, 倉本恵梨子, 今野美知輝, 高橋泰尋, 仲野孝史, 中村公一, 金子武嗣. Tet-Off システムを介した、神経細胞特異的かつ高発現型レンチウイルスの開発, 第 114 回 日本解剖学会・全国学術集会, 2009 年 3 月 29 日, 岡山理科大学
 2. 中村公一, 藤山文乃, 古田貴寛, 倉本恵梨子, 金子武嗣. ラット線条体マトリックス領域出力ニューロンの生後発達 - 単一ニューロンの軸索トレース, 第 114 回 日本解剖学会・全国学術集会, 2009 年 3 月 29 日, 岡山理科大学
 3. 亀田浩司, 日置寛之, 中村公一, 金子武嗣. BAC 遺伝子改変マウスを用いたパルブアルブミン発現皮質神経細胞への興奮性・抑制性入力の定量的解析, 第 114 回 日本解剖学会・全国学術集会, 2009 年 3 月 29 日, 岡山理科大学
 4. 亀田浩司, 日置寛之, 田中康代, 中村公一, 藤山文乃, 金子武嗣. BAC 遺伝子改変マウスを用いた、パルブアルブミン発現皮質神経細胞への興奮性・抑制性入力の定量的解析, CREST 研究領域「脳の発達と学習メカニズムの解明」第 6 回領域内研究報告会, 2009 年 3 月 11 日, 千里ライフサイエンスセンタービル
 5. 中村公一, 劉波, 藤山文乃, 金子武嗣, 櫻井芳雄. 侵襲型電極による慢性記録後のニューロンの傷害応答, CREST 研究領域「脳の発達と学習メカニズムの解明」第 6 回領域内研究報告会, 2009 年 3 月 11 日, 千里ライフサイエンスセンタービル
 6. 倉本恵梨子, 古田貴寛, 中村公一, 雲財知, 日置寛之, 金子武嗣. ラット視床から大脳皮質運動関連量やへの二種類の投射様式: ウイルスベクターを用いた単一ニューロンレベルでの解析, 第 82 回日本解剖学会・近畿支部学術集会, 2008 年 11 月 29 日, 大阪市立大学大学院医学研究科 4F 小講義室
 7. 今野美知輝, 日置寛之, 古田貴寛, 中村公一, 三橋賢大, 金子武嗣. Retrograde labeling with the pseudotyped Sindbis virus, 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 11 日, 東京国際フォーラム
 8. 松田和郎, 古田貴寛, 中村公一, 日置寛之, 藤山文乃, 新井良八, 金子武嗣. Axonal arborization of mesocorticolimbic (A10) dopaminergic pathway: a single-cell study, 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 11 日, 東京国際フォーラム
 9. 中村悠, 日置寛之, 中村公一, 古田貴寛, 金子武嗣. Axonal arborizations of single thalamocortical neurons in the rat visual cortex, 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 10 日, 東京国際フォーラム
 10. 倉本恵梨子, 古田貴寛, 中村公一, 日置寛之, 雲財知, 金子武嗣. Single-axon tracing of rat motor thalamocortical neurons. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 10 日, 東京国際フォーラム
 11. 中村公一, 藤山文乃, 古田貴寛, 倉本恵梨子, 金子武嗣. Postnatal development of striatofugal neurons in the matrix compartment of rat neostriatum: a single axon tracing study. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日, 東京国際フォーラム
 12. 大平耕司, 古田貴寛, 日置寛之, 中村公一, 金子武嗣. Regulation of dendritic morphogenesis by truncated TrkB-T1. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9 日, 東京国際フォーラム
 13. 日置寛之, 中村悠, 馬雲飛, 中村公一, 今野美知輝, 早川隆, 金子武嗣. ラット中脳縫線核におけるグルタミン酸作動性ニューロンの解析, 第 113 回日本解剖学会・全国学術集会, 2008 年 3 月 29 日, 大分大学
 14. 古田貴寛, Timofeeva E, 中村公一, 岡本古田敬子, 十河正弥, 金子武嗣. 三叉神経核群中間亜核から主感覚核への抑制

- 性入力, 第 113 回日本解剖学会・全国学術集会, 2008 年 3 月 29 日, 大分大学
15. 中村公一, 藤山文乃, 古田貴寛, 金子武嗣. ラット新生仔線条体のドーパミンアイランドにみられる二重構造, 第 113 回日本解剖学会・全国学術集会, 2008 年 3 月 28 日, 大分大学
 16. 亀田浩司, 古田貴寛, 松田和郎, 大平耕司, 中村公一, 日置寛之, 金子武嗣. レンチウイルスを用いた、樹状突起膜特異的移行シグナルの開発, 第 5 回 CREST 領域内研究報告会, 2008 年 3 月 5 日, 千里ライフサイエンスセンタービル
 17. 中村公一, 渡我部昭哉, 日置寛之, 藤山文乃, 田中康代, 山森哲雄, 金子武嗣. 発達期マウス大脳新皮質における小胞性グルタミン酸輸送体 1 (VGluT1) と VGluT2 免疫活性の共存の定量解析, 第 5 回 CREST 領域内研究報告会, 2008 年 3 月 5 日, 千里ライフサイエンスセンタービル
 18. 中村公一, 藤山文乃, 古田貴寛, 金子武嗣. ラット新生仔脳における線条体出力ニューロンの軸索投射を解析する, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜
 19. 伊藤哲史, 日置寛之, 中村公一, 金子武嗣, 野条良彰. GABA を含有する gamma-運動ニューロン, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜
 20. 松田和郎, 古田貴寛, 中村公一, 金子武嗣, 新井良八. 中脳黒質ドーパミンニューロンは線条体に広範囲かつ高密度な軸索終末を形成する, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜
 21. 亀田浩司, 日置寛之, 古田貴寛, 大平耕司, 松田和郎, 中村公一, 金子武嗣. レンチウイルスを用いた、樹状突起膜特異的標識法の開発, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜
 22. 古田貴寛, Timofeeva E, 岡本-古田敬子, Deschênes M, 中村公一, 金子武嗣. 三叉神経核群中間核から主感覚核への抑制性入力, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜
 23. 吉田三穂, 佐藤武正, 中村公一, 金子武嗣, 畠義郎. 外側膝状体における代謝型グルタミン酸受容体の活動依存的調節の年齢依存性, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜
 24. 日置寛之, 中村悠, 馬雲飛, 中村公一, 早川隆, 金子武嗣. ラット中脳縫線核におけるグルタミン酸作動性ニューロン

- の解析, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜
25. 中村悠, 日置寛之, 中村公一, 古田貴寛, 金子武嗣. 大脳皮質視覚野における単一視床ニューロンの軸索分枝, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜
 26. 倉本恵梨子, 古田貴寛, 中村公一, 日置寛之, 雲財知, 金子武嗣. ラット大脳皮質運動関連領野へ投射する単一視床ニューロン軸索分枝の形態学的解析, 第 30 回日本神経科学大会, 2007 年 9 月 10 日, パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)
 [産業財産権]
 ○出願状況 (計 0 件)
 ○取得状況 (計 0 件)

[その他]
 ホームページ等

業績リストホームページ
<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/publist-innseisann/nakamurakou/list-nakamurakou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 公一 (NAKAMURA KOUICHI)
 京都大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号: 10444457

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: