

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500289

研究課題名 (和文) 豊かな環境飼育による中脳皮質辺縁ドパミン神経系の活性化と栄養因子の関連性の解析

研究課題名 (英文) Activation of mesocorticolimbic dopaminergic system by environmental enrichment and trophic factor expression

研究代表者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00305525

研究成果の概要 (和文)：発育期のラットを、外部刺激の多い環境（豊かな環境）で飼育した場合の中脳皮質辺縁ドパミン (DA) 神経系の機能変化について、DA レセプターおよびその関連分子（コカイン-アンフェタミン関連転写物: CART）の遺伝子発現や情動行動の解析から研究を展開した。その結果、発育期を豊かな環境で飼育することにより、脳内 DA 神経系の行動制御関連部位の内側前頭皮質や側坐核において DA 受容器 4 型および CART の遺伝子発現が変化し、また不安様行動が軽減するなどの情動行動の変化が認められた。

研究成果の概要 (英文)： To investigate the function of mesocorticolimbic dopaminergic (DAergic) system in developing rats grown in environmental enrichment (EE), gene expressions of DA receptors and cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) and analysis of emotional behavior were carried out. It revealed that expression of DA receptor type IV and CART in prefrontal cortex and amygdala was altered by EE, and also found out that emotional behavior such as anxiety-behavior was reduced in rats grown in EE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：豊かな環境飼育、脳内ドパミン神経系、ラット、情動行動、ドパミン受容体、側坐核、内側前頭野、real-time PCR

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 豊かな環境の定義

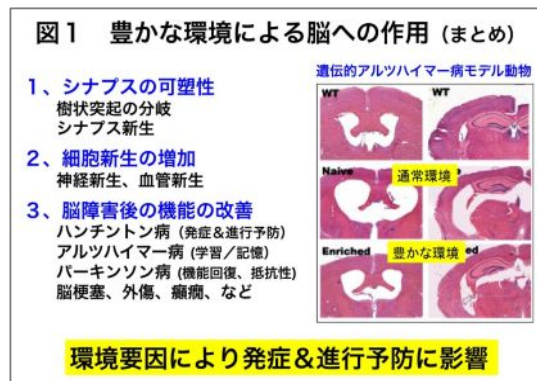
豊かな環境とは、階段、トンネル、輪車等の運動遊具を含む広いケージの中で、運動遊具の配置および餌や水の配置の変換を週に 2 回行い、6-8 匹の動物個体数にて飼育する環境をいう。従来の通常の飼育に比べ、①豊富な運動遊具と広いケージの中による生理

的な運動量の増加、②多数の動物飼育による社会性の亢進、③運動遊具および食餌の定期的な配置変換による探索様行動の亢進、の要素を含む環境であると考えられている。

## (2) 豊かな環境による脳への作用

豊かな環境による“個体レベルの外部環境変化”による脳への作用として、①シナプス可塑性と空間認知機能の亢進、②神経新生の

亢進、③脳障害後の運動機能改善、が報告されている（下図）。



(3) 脳障害後の運動機能と神経新生の解析  
豊かな環境で飼育した動物では、栄養因子 (BDNF, GDNF など) の増加により海馬や脳室下帯 (SVZ) における神経新生が亢進することが報告された。豊かな環境飼育が、“脳障害後の運動機能改善に如何に関与しているのか？” また、“神経新生が如何に機能に結びついているのか？” が注目されている。

我々は、線条体障害モデルラットを豊かな環境で飼育し、①SVZから線条体障害部へ遊走する未成熟神経細胞が増加すること、②棒上歩行動障害が有意に軽減すること、③線条体障害部において pleiotrophin (PTN) や stromal cell-derived factor 1 (SDF-1a) の発現が増加していることを報告し、個体の置かれた外部環境の変化により、脳内での栄養因子発現が増加し、脳障害後の運動機能の改善や神経新生が亢進することを示した。

(4) 環境要因による遺伝的要因への影響

遺伝的アルツハイマー病モデル動物や遺伝的ハンチントン病モデル動物に於いて、豊かな環境飼育によりその発症や病状の進行が抑制されることが報告された。(Eur J Neurosci 26, 101-12, 2007)。

このことは遺伝的要因に規定される生物現象が、豊かな環境で飼育すること（環境要因）により大きく影響を受けていることを示唆している。

(5) 豊かな環境による行動と中脳皮質辺縁 DA 系の発達に対する影響

豊かな環境で飼育した動物が、①新奇環境における適応能力の向上、②側坐核 (NAc) における DA 代謝の変化、③内側前頭皮質 (mPFC) における DA 関連因子 (PTN, SDF-1a, CART) などの発現変化を確認している。

すなわち、豊かな環境において mPFC で PTN の発現が増加し、中脳皮質辺縁 DA 神経系の活性化により、新奇環境適応という行動制御に関連している可能性が示された。

## 2. 研究の目的

### (1) 研究の全体構想

個体の置かれた外部環境の変化や脳の病態時に最大限に活性化されている生体応答メカニズムの解析を通して、脳内 DA 神経系の機能を明らかにする。

(2) 豊かな環境による DA 神経系への影響  
豊かな環境飼育によって、mPFC で PTN 等の栄養因子の発現増加が誘導され、その発現変化により脳内 DA 神経系の遺伝子発現変化がもたらされた結果、新奇環境に対する行動制御に影響するのではないかと仮説を考えた。

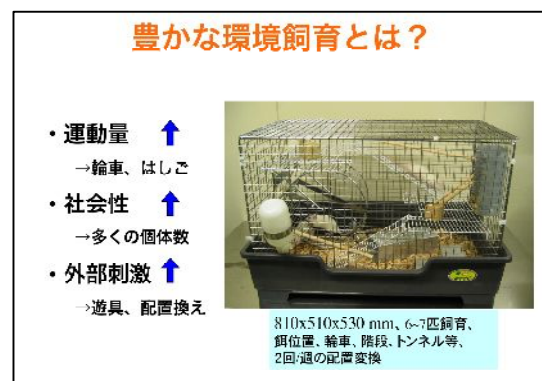
(3) DA 選択的 real-time 測定法の開発  
in vivo リアルタイム DA 測定法の開発

## 3. 研究の方法

### (1) 豊かな環境飼育

雄 Wistar ラット または雄 SHR (自然発症型高血圧ラット：注意欠陥多動性障害モデル動物) を用い、通常飼育 (SE: 400 × 230 × 180 mm の通常ケージ、餌・水の位置は固定で 2 匹飼育)、豊かな環境飼育 (EE: 810 × 510 × 530 mm の大きなケージ、輪車、階段、トンネル等の遊具を入れ 6-7 匹飼育、遊具および水・餌の配置は 2 回/週の割合で配置変換する)、孤独環境 (Iso: 通常ケージ、餌・水の位置は固定で 1 匹飼育) を行った。

離乳直後の生後 25 日齢から成熟期までの生後 60 日齢までの発育期の 5 週間を上記の各条件で飼育した。



### (2) real-time PCR 法

情動行動の発現に関係する内側前頭皮質 (mPFC), 側坐核 (NAc), 扁桃核 (Amy), 海馬 (Hipo) の組織から Trizol にて RNA を抽出した。cDNA を作成したのち、ABI Prism 7000 sequence detection system を用い SYBER Green 試薬により定量 PCR を行った。

### (3) 行動評価

#### ① オープンフィールドテスト

ラットを直径 60cm 高さ 30cm の円形の新規環境空間の中央部にいれ、動物の行動を 10 分間ビデオに撮影した。全移動距離 (cm)、歩行移動時の速さ (cm/sec)、直径 30cm の中央

部分への新入回数を行動解析ソフト smart を用いて解析した。

②シリンダーテスト

ラットを直径 20cm 高さ 30cm の透明な円形の筒にいれ、5 分間の行動をビデオ撮影した。新規環境下での立ち上がり行動(rearing)、活動時間、安静時間を測定した。

③社会性テスト

ラットを縦 60cm 横 20cm 高さ 30cm の長方形空間の両端に、観測対象となるラットとその反対側に新規動物を同時にいれ、5 分間の行動をビデオ撮影した。新規動物との距離(一定距離の範囲以内に滞在している時間を contact 時間と定義)、sniffing 回数とその時間を測定した。

**社会性テスト**

**社会性の観察**

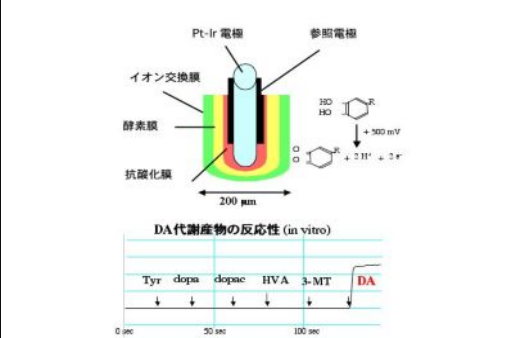
- 1 初対面のラットに対する Sniffing の回数、時間
- 2 初対面のラットとの Contact 時間を 5 分間測定



200 mm x 600 mm x 300 mm (height)

(4) DA 選択的 real-time 測定法

InterMedical 社と共同研究中の 3 層膜構造よりなる DA 選択的生体膜プローブを用いた(下図)。



DA 代謝産物の反応性 (in vitro)

ネンブター麻酔下(50mg/kg)に、ラット線条体および mPFA ヘビスおよび歯科用セメントを用い DA 選択的生体膜プローブを装着した。2 日後以降にインターメディカル社の DA モニター装置 (IMDA-301) を用い、無麻酔自由行動下 (in vivo) の脳内 DA 量を real-time に電気化学的に測定した。実験は外部ノイズの少ない条件にて実施した。

(5) 免疫染色

基本的な固定は、麻酔後、経心的に生理食塩水で脱血、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を実施した。用いた抗体により

ピクリン酸を用いた固定法を実施した。

4. 研究成果

(1) DA レセプター遺伝子の発現変化

Wistar ラットにおいて、豊かな環境飼育により側坐核(NAc)の DA 受容体 1 型(D1R)および D2R の軽度減少、内側前頭野(PFC)において D1R および D4R の減少、扁桃体(Amy)において D1R, D2R の顕著な減少、海馬(Hipo)において D4R の著しい増加が認められた。現在、情動行動に関連する PFC および Amy での変化が注目している。(下図)

**豊かな環境飼育による発現変化**

	D1R	D2R	D3R	D4R
側坐核	↓	↓	→	(-)
内側前頭野	↓	→	(-)	↓
扁桃体	↓	↓	↓	→
海馬	→	→	→	↑

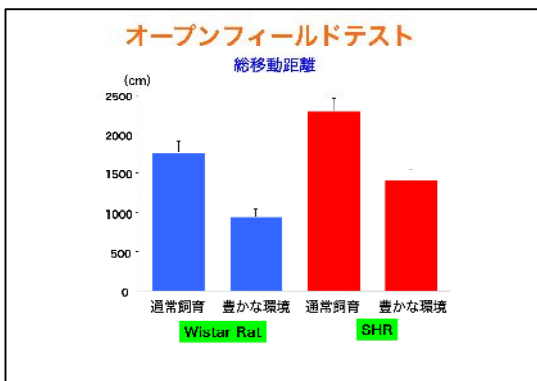
(real-time PCR法) (-) : 発現なし

(2) 行動評価

①オープンフィールドテスト

Wistar ラットにおいて、通常飼育(SE)に比べ豊かな環境(EE)飼育した場合に、全移動距離は減少していた。また ADHD モデル動物の SHR においても同様な結果が得られた。

Wistar ラットに比べ、SHR では SE および EE とともに全移動距離が高値を示し、多動性が示された(下図)



さらに、Wistar ラットにおいて、歩行時の歩行スピードは最初の 1 分目に違いはなかったが、2 分目以降 EE において遅いことが示された。

②シリンダーテスト

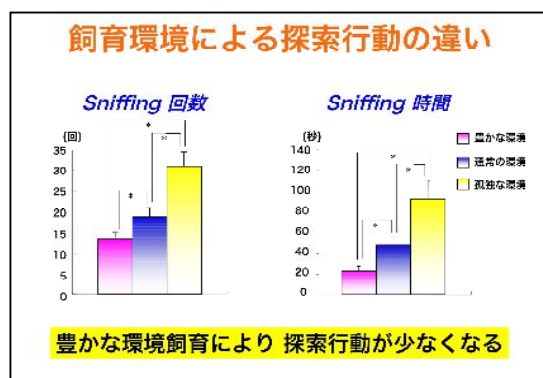
Wistar ラットにおいて、通常飼育(SE)に比べ豊かな環境(EE)飼育した場合に、活動時間の減少、安静時間の増加が認められた。また、rearing 回数はやや減少している傾向があった。いずれの解析に於いても、テスト開始直

後の1分目には大きな違いは認められなかったが、2分目以降に有意な変化が認められ、EE 飼育した動物では新規環境に対する適応能力が良いことが示唆された。

また ADHD モデル動物の SHR を用いた予備的実験においても同様な結果が得られつつある。

### ③社会性テスト

Wistar ラットにおいて、通常飼育(SE)に比べ豊かな環境(EE)飼育した場合に、sniffing 回数および sniffing 時間ともに減少した(下図)。また ADHD モデル動物の SHR を用いた予備的な実験でほぼ同様な結果が得られつつある。



### (3) DA 選択的 real-time 測定法

DA 選択的プローブを脳内に装着し、装着どれくらい後まで DA 変化の検出が可能なのかを調べた。まず、物理的な強度が必要であることが明らかになったため、プローブの先端に改良を加えた。脳内装着2週間においても線条体内の DA 変化の検出が可能であることが分かった。

プローブ2本を用い、片方には0mV または100mV の電圧を与え、DA の電気分解に依存しないノイズ電流を検出し、500mV 電圧での電流値との差分をコンピューター的に処理した。これにより、1本の場合に比べより正確な DA 電流の測定が可能であることが明らかになってきた。

mPFA に於ける DA 量の変化を検出するまでの感度はないことが明らかになってきた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Ishida A, Ueda Y, Ishida K, Misumi S, Masuda T, Fujita M, Hida H. Minor neuronal damage and recovered cellular proliferation in the hippocampus after continuous unilateral forelimb restraint in normal rats. *J Neurosci Res* 89(3): 457-65, 2011 査読有り

- ② 飛田秀樹 夢の治療に向けた挑戦—細胞移植による運動機能の再建. *現代医学* 462(2): 243-249, 2009 査読無し

- ③ Mizuno K, Hida H, Masuda T, Nishino H, Togari H. Pretreatment with low doses of erythropoietin ameliorate brain damage in periventricular leukomalacia model rats by targeting late oligodendrocyte progenitors: A rat model. *Neonatology* 94: 255-266, 2008. 査読有り

- ④ Misumi S, Kim TS, Jung CG, Masuda T, Urakawa S, Iosbe Y, Furuyama F, Nishino H, Hida H. Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor  $\beta$ 1. *Eur J Neurosci*, 28(6): 1049-1059, 2008. 査読有り

- ⑤ Kim T.S., Misumi S., Jung C.G., Masuda T. Iosbe Y, Furuyama F, Nishino H., Hida H. Increase in dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cell-derived neural progenitor/stem cells is mediated by hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . *J Neurosci Res* 86(11): 2353-2362, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 21 件)

- ① 清水 由布子、西垣瑠里子、飛田秀樹ら(6人、6番目)、発育期の豊かな環境による注意欠陥多動性障害モデルの多動性および衝動性の低下、第88回日本生理学会平成23年3月30日、横浜(震災のため紙上開催)
- ② 飛田秀樹、上田佳朋ら(5人、1番目)、ラットにおいて成長期の豊かな環境は不安様行動の発現を減少する、第31回日本神経科学大会、平成20年7月10日、東京国際フォーラム

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 00305525

### (2) 研究分担者

水野 恵介 (MIZUNO KEISUKE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 00405177

(H20度のみ)



藤田 政隆 (FUJITA MASATAKA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号： 10360637

(3) 連携研究者

水野 恵介 (MIZUNO KEISUKE)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号： 00405177  
(H21年度～H22年度)

(4) 研究協力者

増田 匡 (MASUDA TADASHI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 10423641

三角 吉代 (MISUMI SACHIYO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 70529148