

機関番号：36102
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2009～2010
課題番号：21890265
研究課題名（和文） 側坐核ニューロンに対するドパミン受容体活性化による修飾作用
研究課題名（英文） The modulatory effects on the nucleus accumbens neurons by the activation of dopamine receptors
研究代表者
鴻海 俊太郎（SHUNTARO KOHNOMI）
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号：40548947

研究成果の概要（和文）：ラットの側坐核スライス標本を用いて、電気生理学的手法により、シナプス結合を有する 2 つのニューロン（2 つの中型有棘細胞、もしくは中型有棘細胞と高閾値発火型細胞）から同時記録を行い、それぞれにおいて観察される抑制性シナプス後電流に対するドパミン受容体を介した修飾作用を検討した。その結果、上記の 2 種類のシナプスは、ドパミン $D_{2,3}$ 受容体を介して相反する修飾を受けていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the modulatory effects via dopamine receptor on the unitary inhibitory postsynaptic current between two medium spiny neurons, or a medium spiny neuron and a fast-spiking interneuron, using simultaneous electrophysiological recording. We have revealed that these two types of synapse were differentially modulated via dopamine $D_{2,3}$ receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：薬理学（中枢神経）

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：オーラルジスキネジア、側坐核、ドパミン、電気生理学

1. 研究開始当初の背景

オーラルジスキネジアは口腔領域の常同的な不随意運動である。口腔内に食物がない状態で無意識に下顎や口唇、舌に生ずる異常運動である。この症状は長期の薬物治療を受けているパーキンソン病患者や統合失調症患者において、治療薬の副作用としてよく見られる。これは四肢のジスキネジアと同様に患者の QOL を低下させるものであるだけで

なく、歯科治療にも支障をきたす。また、治療薬の副作用として、このような症状が生じることが、現在のパーキンソン病治療薬・抗精神病薬が満足度の低いものであることを意味している。

オーラルジスキネジア発症の主要因は、黒質－線条体ドパミン神経の変性であると考えられている。しかし、申請者の所属する研究室ではこれまでに、麻酔下ラットを用いた

検討により、不随意顎運動発現に線条体腹外側部だけでなく、側坐核 shell も関与していることを報告している。さらに、そのいずれの部位においても、ドパミン D_1 および D_2 受容体両方の活性化が必要であることを明らかにしている (Adachi et al., 2002, Uchida et al., 2005)。したがって、線条体のみならず側坐核におけるドパミンの役割についても詳細に検討する必要がある。

線条体の神経回路は、いわゆる直接路と間接路の 2 つに大別されて考えられている (Alexander et al., 1990, Bevan et al., 2002)。直接路に関してはドパミン D_1 受容体、間接路に関しては D_2 受容体が主要な役割を果たしていることが知られている (Gerfen and Wilson, 1996) が、 D_1 , D_2 受容体の相互作用などに関する詳細は分かっていない。一方、側坐核に関しては、細胞の分類や結合様式などについて線条体と類似する点が多いと考えられている。側坐核に存在する主要な細胞は、線条体同様、GABA 作動性の中型有棘ニューロンであり、直接路・間接路の存在も提唱されている (Nicola, 2007)。しかし、その詳細は不明である。また、側坐核における電気生理学的研究は core に集中しており、shell については、ほとんど研究がなされていない。

申請者は、博士課程在籍時に新規統合失調症治療薬の創製を目標とした研究に携わった。側坐核は統合失調症と関わりの深い部位である。既存の抗精神病薬のほとんどは、 D_1 受容体には親和性を有しておらず、錐体外路症状発現は、主に D_2 受容体拮抗作用によるものと考えられている。抗精神病薬は、線条体あるいは側坐核における D_1 , D_2 受容体の機能バランスを失調させていると推測される。つまり、精神疾患のメカニズムを明らかにする上でも、側坐核における D_1 , D_2 受容体の相互作用について明らかにすることは極めて

重要であり、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、側坐核 shell ニューロンを電気生理学的性質に基づいて分類し、特に、中型有棘ニューロン間のシナプスの存在、およびそれに対するドパミンの各種アゴニストの関与について詳細を明らかにすることを目的とする。

研究を遂行する上での具体的目標は以下の通りである。

(1) ホールセル・パッチクランプ法によって、側坐核 shell のニューロンから記録を行い、細胞内通電に対する膜電位応答と発火パターンから、ニューロンを中型有棘細胞 (medium spiny neuron), 高頻度発火型細胞 (fast-spiking neuron), 低閾値発火型細胞 (persistent and low threshold spike neuron), 持続性後過分極型細胞 (long-lasting afterhyperpolarization neuron) に分類する。

(2) 各タイプのニューロンで観察される興奮性シナプス後電位 (EPSP) および抑制性シナプス後電位 (IPSP) に対する各種ドパミンアゴニストの効果について検討する。

(3) シナプス結合を有する 2 つの中型有棘ニューロン (抑制性細胞) からの同時記録を行い、側坐核 shell 内の神経伝達、およびそれに対するドパミンの修飾機構について、GABA の放出確率といったシナプスレベルでの詳細を明らかにする。

(4) 記録細胞を biocytin によって可視化することにより、細胞の軸索と樹状突起のパターンを解析し、電気生理学的解析と合わせて細胞分類に用いる。

3. 研究の方法

幼若ラット側坐核スライス標本を用いた in vitro ホールセル・パッチクランプ法を用いて、記録ニューロンを電気生理学的に同定し (Kawaguchi, 1993), 各タイプのニューロンから記録される興奮性シナプス後電流に対するドパミンアゴニストの修飾効果を

検討する。

実験には、Venus 発現ラット (2-4 週齢) を用いる。Pentobarbital (50 mg/kg) 麻酔下にて断頭し、脳を摘出する。酸素を飽和させ、かつ、氷冷した人工脳脊髄液中にて、マイクロスライサーを用いて、側坐核を含む冠状切片 (厚さ 350 μ m) を作製する。切片は人工脳脊髄液中で 1 時間培養した後、記録用チャンバーに移し、側坐核 shell に刺激用のタングステン電極を刺入する。続いて、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いて、側坐核 shell に存在するニューロンからホールセル記録を行う。細胞の大きさや静止膜電位、発火閾値、発火パターンを参考に、記録ニューロンの分類を行う。なお、GABA 作動性ニューロンは Venus により蛍光を発しているため、容易に同定できる。

記録ニューロンのタイプを同定した後、電流固定から電圧固定に切り替えて、電気刺激によって誘発される興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録する。記録中は GABA による IPSC の混入を防ぐために、GABA_A 受容体アンタゴニスト bicuculline (10 μ M) を灌流する。また、過興奮を防ぐために、NMDA 受容体アンタゴニストである APV (100 μ M) も灌流しておく。記録ニューロンに対して、ドパミン D_{1/2} 受容体アゴニストである apomorphine の作用およびその濃度依存性を検討する。さらに、ドパミン D₁ 受容体選択的アゴニストや D₂ 受容体選択的アゴニストの作用を検討し、それぞれの受容体サブタイプの修飾効果およびその相加・相乗作用の有無を明らかにする。

記録終了後、脳スライスは 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、記録ニューロンの樹状突起・軸索の分枝パターン、および細胞体の位置・大きさを形態学的に解析する。そのため予め、細胞内液に biocytin を加えて、

ABC 法により記録ニューロンを可視化できるようにしておく。

次に、側坐核 shell に存在する中型有棘ニューロン (GABA 作動性ニューロン) 2 つから同時にホールセル記録を行い、細胞間に存在する抑制性シナプスの伝達効率に対するドパミン各種アゴニストの作用を検討する。

Venus 発現ラットを使用することにより、中型有棘ニューロンはスライス上で容易に同定できる。まず、蛍光を当てて Venus 発現細胞の位置を確認した後、2 つの中型有棘ニューロンから電流固定下で記録を行う。一方を細胞内通電して活動電位を発生させた際に、他方で IPSP が記録できるか否かを確認する。シナプス結合があった場合、シナプス前ニューロンを電流固定下で活動電位を発生させ、シナプス後ニューロンを電圧固定して unitary IPSC を記録する。電極内液は、KCl を主体にしたものを用い ($E_{Cl} = -15$ mV), unitary IPSC を記録する際は、シナプス後ニューロンを -70 mV に電圧固定する。申請者は、既に右図に示すように、シナプス結合を有する 2 つの中型有棘ニューロンからの同時記録に成功している。記録ニューロンに対して、ドパミン D_{1/2} 受容体アゴニストである apomorphine の作用、さらに、ドパミン D₁ 受容体選択的アゴニストや D₂ 受容体選択的アゴニストの作用を検討し、各々の受容体サブタイプの修飾効果およびその相加・相乗作用の有無を明らかにする。その際、variance-mean analysis を行うことにより、GABA の放出確率を推定し、ドパミンの修飾作用をより詳細に明らかにする。

4. 研究成果

Venus 発現幼若ラット (20-30 日齢) 側坐核スライス標本において、in vitro ホールセル・パッチクランプ法により、側坐核 shell ニ

ニューロンから記録を行った。蛍光の有無と電気生理学的特質に基づいて、記録した各ニューロンの分類を行った。続いて、2つの中型有棘細胞からの同時記録に成功した。また、近傍に存在する任意の2つの中型有棘細胞を選択した場合、その間にシナプス結合を有する割合は、20%程度であった。一方、高閾値発火型細胞と中型有棘細胞から同時記録をした場合では、50%程度の割合でシナプス結合が存在した。

シナプス結合を有する2つの中型有棘細胞、および高閾値発火型細胞とシナプス結合を有する中型有棘細胞の2種類のシナプス結合において、それぞれ、シナプス前後の両細胞からの同時記録を行った。シナプス後ニューロンを電圧固定にて記録した。なお、グルタミン酸による興奮性シナプス後電流の混入を防ぐために、AMPA 受容体アンタゴニストである DNQX (20 μ M) の灌流下で記録した。観察されたシナプス後電流は、いずれのタイプのシナプスにおいても、GABA_A 受容体アンタゴニスト bicuculline (10 μ M) の灌流により消失したことから、GABA_A 受容体を介したものであることが明らかとなった。2つの中型有棘細胞間の抑制性シナプス後電流 (uIPSC) は、ドパミンD_{2,3} 受容体アゴニスト quinpirole (1 μ M) およびドパミンD₃ 受容体アゴニスト PD128907 (1 μ M) の両方により抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、中型有棘細胞間の抑制性シナプス伝達に、ドパミン D₂ および D₃ 受容体が関与していることが示された。一方、高閾値発火型細胞と中型有棘細胞間の uIPSC は、ドパミンD_{2,3} 受容体アゴニスト quinpirole (1 μ M) により抑制されるもの、ほとんど変化が見られないもの、増強されるもの、の3通りの結果が見られた。これらの結果から、中型有棘細胞間と高閾値発火型細胞 - 中型有棘細胞間におけるシナプス伝達に対する、ドパミン神経系の制御様式が異なっていることが明らかとなった。このことは、投射ニューロンである中型有棘細胞から投射先の神経核への神経伝達が、近傍の中型有棘細胞と高閾値発

火型細胞から、相反する制御を受けていることを示唆している。

これらの結果をまとめ、現在、Journal of Neurophysiology 誌に投稿中である（現在、改訂中である）。

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0件）

〔学会発表〕（計1件）

- ① 鴻海俊太郎、越川憲明、小林真之
側坐核中型有棘細胞間の側方抑制はドパミン D2 受容体の活性化により抑制される、第 83 回薬理学会年会、2010 年 3 月、パシフィコ横浜

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鴻海 俊太郎 (SHUNTARO KOHNOMI)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号：40548947

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：