

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500343

研究課題名（和文）D1/D2 ドーパミン受容体遺伝子操作マウスを用いた運動制御機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of regulatory mechanism of motor activity using D1 and D2 dopamine receptor gene-modified mice

研究代表者

笹岡 俊邦（SASAKA TOSHIKUNI）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：50222005

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病では黒質線条体ドーパミン神経の変性によってドーパミンが枯渇し、運動障害が起こる。線条体の中型有棘神経に発現する D1、D2 ドーパミン受容体（D1R、D2R）の運動制御への関与がわかっているが、その分子機構は明らかでない。本研究では Tet-off システムによるコンディショナル D1R 発現マウスを用いて、成熟後に D1R を発現抑制すると運動量の低下が確認された。しかし D1R ノックアウト（KO）マウスが示す過剰な運動量と反対の結果であった。このことはマウスの発育時における D1R 発現の有無がその運動量の低下又は過剰への制御と関係することを示している。

研究成果の概要（英文）：In Parkinson disease the degeneration of nigro-striatal dopamine neuron leads to depletion of dopamine and motor deficit. It is known that D1 and D2 dopamine receptors (D1R, D2R) expressed in the medium spiny neurons of striatum are involved to motor control. However, the regulatory mechanism of motor control via D1R and D2R remains to be clarified. In this study we found the conditional D1R-expressing mice controlled by Tet-off system showed decrease of motor activity in the homecage when D1R expression was suppressed in adult stage. This finding was opposite to the marked increase of motor activity of D1R KO mice. These suggest the presence or absence of D1R expression during mouse development is closely related to up-regulation or down-regulation of motor activity in adult stage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ドーパミン受容体、遺伝子操作マウス、パーキンソン病、運動調節、協調運動、学習記憶、遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

ドーパミン神経系は、運動の制御、情動、精神・神経疾患の病態及び治療に深く関わる。ドーパミン神経系が関与する運動制御のしくみについて、ドーパミン受容体からの情報を受ける細胞及びそれ以降の情報伝達機構には不明な点も多い。パーキンソン病の主な症状である運動異常は、黒質-線条体ドーパミン神経の変性によるドーパミンの減少が原因と考えられ、病態を説明するモデルが示されている。大脳基底核の神経回路には、線条体と淡蒼球内節を直接繋ぐ「直接路」と、介在部である淡蒼球外節と視床下核を経由して間接的に繋ぐ「間接路」が考えられている。パーキンソン病ではドーパミンが枯渇するため、「直接路」細胞への D1R を介する情報が消失し、淡蒼球内節は脱抑制され、抑制性出力が亢進する。一方「間接路」細胞への D2R を介する情報が消失し、線条体から淡蒼球外節への抑制が亢進し、視床下核が脱抑制され淡蒼球内節の抑制性出力が亢進する。これらにより大脳皮質・視床の活動が抑制されると考えられている。

2. 研究目的

本研究の目的は、ドーパミン受容体の主要分子である D1 受容体 (D1R) および D2 受容体 (D2R) を介する経路に着目し、D1R/D2R 二重欠損の遺伝背景に D1R のみ、または D2R のみ発現するマウスを開発し、運動の制御機構を解明すること、ならびに当該マウスをドーパミン神経系が重要な働きをするパーキンソン病、統合失調症、注意欠陥/多動性障害のモデル動物に用いて病態の理解を深め、治療研究に発展させることである。本研究では、D1 ドーパミン受容体 (D1R) および D2 ドーパミン受容体 (D2R) の欠損マウス

およびテトラサイクリン制御 D1R 発現マウスを用いて、遺伝子発現様式の解析と運動量の行動学的解析により、D1R および D2R の個体レベルでの運動調節の役割を明らかにする。

3. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

1) マウス生殖工学実験を用いたマウスの作成及び配偶子の保存

D1R、D2R の単独欠損マウス、D1R/D2R 多重変異マウスおよびテトラサイクリン調節 D1R 発現マウスは運動異常及び成長遅延の表現型があることから、自然交配による方法では効率的な作成が困難であり、マウス発生工学・生殖工学実験による方法が必須である。発生工学・生殖工学実験により、D1R 欠損 (D1R KO) マウス、D2R 欠損 (D2R KO) マウス、Tet-off システムを用いて、ドキシサイクリン (Dox) 投与により発現抑制ができるようにしたコンディショナル D1R 発現マウス [D1R(-/-);Tg(+)] を作成し、配偶子の凍結保存を行なった。

2) 生化学的解析および行動学的解析

作成した D1R KO マウス、D2R KO マウス、コンディショナル D1R 発現マウス [D1R(-/-);Tg(+)] の D1R および D2R の発現様式の解析を行なった。発現量の解析は、マウス線条体を用いて常法によりウェスタンブロットを行った。また、専用行動解析装置 (小原医科産業株式会社製) を用いて運動量の定量的測定と、運動異常について解析した。また、ローターロッド加速機能付き装置 (同社製) を用いて運動協調性と運動学習の解析を行った。動物個体を用いるすべての実験は、「北里大学における動物実験等に関する規程」に基づき、動物実験委員会の審査を受け、承認された実験計画に従って実施し

た。

4. 研究成果

1) ドーパミン受容体発現量の解析

マウス線条体における D1R の発現量について ImageJ を用いて解析したところ、D1R(-/-);Tg(+)マウスの D1R 発現量は、Dox 投与前は、野生型の 2-3 倍程度であったが、Dox を 4 週間投与すると D1R(-/-);Tg(+)マウスの D1R の発現量は D1R KO マウスと同程度に、発現が検出できないレベルまで低下していた。

2) ホームケージにおける運動量の解析

D1R 及び D2R の役割を明らかにするため、独自の行動解析装置を用いて、D1R KO マウス、D2R KO マウスおよび D1R(-/-);Tg(+)マウスをホームケージで 5 日間以上連続して運動量を測定した。その運動量を詳しく分析し、下記の知見を得た。

D1R KO マウスは 24 時間当たりの運動量が野生型の 2-3 倍に上昇していたが、その運動量上昇は暗期にのみに見られた。暗期の活動パターンを解析すると、活動休止している時間の長さは野生型マウスと変わらないが、活動時の単位時間当たりの運動量が極めて多い。

D2R KO マウスは 24 時間当たりの運動量が野生型マウスの 50%程度まで減少しており、明期も暗期も減少していた。明暗リズムは保たれていた。暗期の活動パターンは、活動休止している時間の長さは野生型マウスと変わらないが、活動時の単位時間当たりの運動量が少ない。

D1R(-/-);Tg(+)マウスは、Dox 投与前は野生型マウスの運動量と有意な差は無かったが、Dox 投与を 4 週間継続し、D1R の発現を抑制すると、野生型マウスの 1/2-1/3 程度

に低下した。このことは、D1R KO マウスが野生型の 2-3 倍の運動量を示すことと対照的である。

3) ローターロッド試験

D1R KO マウス、D1R(-/-);Tg(+)マウス(4 週間の Dox 投与後)の成績を対照(CTL)マウス及び D1R(-/-);Tg(+)マウス(Dox 投与前)と比較したところ、D1R KO マウスは、CTL マウスと比べ成績に有意な低下が見られた。同様に CTL マウスと D1R(-/-);Tg(+) (4 週間の Dox 投与後)との比較においても、D1R KO と D1R(-/-);Tg(+) (Dox 投与)との比較においても成績の低下が見られた。このことから、D1R が運動に関与している事が確認された。また、D1R KO マウスと D1R(-/-);Tg(+)マウス(Dox 投与)の成績で有意な低下が確認されたことから、成長発達期での D1R の発現の有無も運動協調性・運動学習に関与することが示唆された。

4) 考察

上記の行動解析は神経活動の異常による行動異常の内容を知るために有用であり、D1R KO マウス及び D2R KO マウスの行動解析により、D1R および D2R のそれぞれの運動量調節に関する役割に重要な知見を得ることができた。また、D1R に関する運動協調性・運動学習への関与の知見も得ることができた。

D1R(-/-);Tg(+)マウスの運動量低下とは対照的な D1R KO マウスの運動量の過剰が観察された事の説明として以下の可能性が考えられる。

第一に、D1R KO マウスは D1R の発現が無い為に、D2R の発現量又は D2R を発現している神経細胞数が増加し、ドーパミンによる D2R を介した信号が過剰となり、運動量が増加した可能性がある。導入した遺伝子によって D2R

の発現が上昇し、運動や生理学的作用が変化したという報告もある。

第二に、D1R KO マウスは個体発達初期に D1R が発現しない為、その D1R を発現している神経細胞へ投射する神経回路、もしくは D1R を発現する神経細胞が形成する神経回路が変化したことにより、運動の変化として現れた可能性がある。これが、個体発達時に D1R が存在し、成体になってから D1R の発現を抑制する事が出来る D1R(-/-);Tg(+) マウスとの違いの原因となっている事が考えられるため、D1R KO マウスと、D1R(-/-);Tg(+) マウスとの比較、検討が必要であると考え。

発達段階の遺伝子欠損の影響を検討するため、Dox 投与により D1R 発現抑制が可能な遺伝子操作マウスを用いて、Dox の投与時期を適切に変えることにより、遺伝子発現様式と運動制御についての解析を行なう。

また、テトラサイクリン制御 D1R 発現マウスと同様に、D1R/D2R 二重欠損による致死の表現型を D2R 発現の導入によりレスキューするマウスの開発も進めている。

5. 研究発表

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Hikida T, Yawata S, Yamaguchi T, Danjo T, Sasaoka T, Wang Y, Nakanishi S. Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 110(1):342-7. 2013. doi: 10.1073/pnas.1220358110. 査読 有
- ② Sasaoka, T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: friend and foe. *Clinical Experimental Pharmacology*

and Physiology. Jul;39(7):597-8. 2012. doi:

10.1111/j.1440-1681.2012.05723.x

査読 無

- ③ Shibasaki, T., Tokunaga, A., Sakamoto, R., Sagara, H., Noguchi, S., Sasaoka, T., and Yoshida, N.

PTB deficiency causes the loss of adherens junctions in the dorsal telencephalon and leads to lethal hydrocephalus.

Cerebral Cortex, doi:

10.1093/cercor/bhs161, First

published online: June 15, 2012

査読 有

- ④ Itoh, M., Tahimic, C.G.T., Ide, S., Otsuki, A., Sasaoka, T., Noguchi, S., Oshimura, M., Goto, Y., and Kurimasa, A. (2012)

Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for Rett syndrome phenotypes but essential for embryo viability and placenta development.

Journal of Biological Chemistry,

Apr. 20;287(17):13859-13867.

doi: 10.1074/jbc.M111.309864

査読 有

- ⑤ Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Shima, Y., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Sasaoka, T., Kitamura, K., Aizawa, S., and Morohashi, K.-I. (2010)

Abnormal epithelial cell polarity and ectopic epidermal growth factor receptor (EGFR) expression induced in Emx2 KO embryonic gonads.

Endocrinology, 151, 5893-5904. doi:
10.1210/en.2010-0915 査読 有

[学会発表] (計7件)

- ① 知見聡美、太田力、佐藤朝子、笹岡俊邦、勝木元也、黒川信、南部篤
Dopamine D1 and D2 receptors differently modulate information processing through the basal ganglia
米国神経科学学会、米国、2012年10月13-17日
- ② 佐藤朝子、初山俊彦、笹岡俊邦
「ドーパミンD1受容体欠損およびドーパミンD2受容体欠損マウスの運動量の詳細解析」
第35回日本神経科学大会、名古屋、2012年9月21日
- ③ 初山俊彦、佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦
ドーパミン受容体ノックアウトマウスにおける行動および線条体抑制性シナプス伝達の解析
第34回日本生理学会大会、松本、2012年3月29日
- ④ 初山俊彦、佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦
ドーパミンD1およびD2受容体ノックアウトマウスにおける行動および線条体GABA性シナプス伝達の解析
第34回日本神経科学学会、横浜、2011年9月17日
- ⑤ 佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦
「ドーパミンD1受容体の発現変化が引き起こす運動量異常」
第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学学会大会 合同大会、神戸、2010年12月7日
- ⑥ 知見聡美、太田力、佐藤朝子、笹岡俊邦、勝木元也、黒川信、南部篤

「大脳基底核内情報伝達におけるドーパミンD1受容体の機能」
第33回日本神経科学大会、神戸、2010年9月4日

- ⑦ 佐藤朝子、勝木元也、笹岡俊邦
「調節可能なドーパミンD1受容体発現系を有するトランスジェニックマウスの運動量解析」
第33回日本神経科学大会、神戸、2010年9月2日

[図書] (計1件)

- ① Wang, Y., Sasaoka, T., and Dang M. T.
A Molecular Genetic Approach to Uncovering the Differential Functions of Dopamine D2 Receptor Isoforms
Methods in Molecular Biology, 964:181-200. 2013. doi:
10.1007/978-1-62703-251-3_11.

[その他]
ホームページ等
<http://web.med.kitasato-u.ac.jp/edures/animal.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹岡 俊邦 (SASAOKA TOSHIKUNI)
北里大学・医学部・教授
研究者番号：50222005

(2) 研究分担者

大久保 直 (OKUBO TADASHI)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：10450719

佐藤 朝子 (SATO ASAKO)
北里大学・医学部・臨時職員 (研究員)
研究者番号：10465932

(3) 連携研究者 なし