

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591684

研究課題名(和文) 脳内ドパミン神経系における転写調節因子の機能解析を目的とした行動薬理学的研究

研究課題名(英文) Behavioral and pharmacological studies for the purpose of function analysis of transcription factors in brain dopamine system

研究代表者

石田 康 (Ishida, Yasushi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：20212897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘミ・パーキンソン病モデルラット(6-OHDAラット)の破壊側線条体に胎仔中脳腹側部細胞を移植し、L-DOPA反復投与による行動変化、FosBその他の転写調節因子の脳内分布を免疫組織学的手法を用いて観察した。移植部線条体その他のFosBとc-Fosでは発現様式に違いがみられた。6-OHDAラットの破壊側線条体に胎仔中脳腹側部細胞を移植し、その後の疼痛関連行動の変化を、対照群(非移植群)と比較した。移植群では、破壊側後肢の痛覚過敏が改善していた。

研究成果の概要(英文)：A study was carried out to examine the effects of repeated L-DOPA treatment on the distribution of the immediate-early gene (IEG) proteins (FosB, c-Fos, and Zif268) in forebrain regions in a unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of Parkinson's disease with or without intrastriatal grafts of fetal ventral mesencephalon. During a course of repeated L-DOPA treatment, rats with a 6-OHDA lesion developed abnormal involuntary movements. In summary, differential expression of three IEG proteins was observed in the forebrain regions during a course of repeated L-DOPA treatment of 6-OHDA-treated hemiparkinsonian rats. The other goal of this study was to investigate the effect of intrastriatal grafts of fetal ventral mesencephalon (VM) on the withdrawal response in 6-OHDA rats. The present results suggest that the intrastriatal grafts of fetal VM may relieve pain sensation induced by mechanical stimulation in 6-OHDA rats.

研究分野：精神医学

キーワード：パーキンソン病 神経移植 転写調節因子 ドパミン 行動薬理学

1. 研究開始当初の背景

L-DOPA 慢性投与に伴う運動障害に対する研究報告 (Obeso et al, 1989; Kaiser et al, 2003) に比べ、パーキンソン病治療経過中に認められる L-DOPA 起因性精神病の研究は極端に少ない。基礎研究に関しても、疾患あるいは症状モデル作製の困難さも手伝い、かなり限定される (Ishida et al, 2000; Ebihara et al, 2011)。L-DOPA による精神症状の発現機序に関しては、大脳皮質や辺縁系におけるドパミン (DA) 受容体及びセロトニン受容体の過刺激、あるいはアセチルコリン受容体の刺激不足等の関与が、あくまで仮説として示唆されているものの、詳細な説明はなされていない。他の精神疾患と同様、L-DOPA 起因性精神病についても精緻な動物モデルを作製することは困難である。しかし、本疾患の病態生理を神経解剖・神経薬理学的手法を用いて説明することは臨床研究では困難であり、動物を用いた基礎研究が必要である。

過去の報告のなかで、L-DOPA 慢性投与後の DA 受容体感受性の変化 (sensitization) や FosB をはじめとする転写調節因子発現について検討した研究は、ほとんど線条体のみを対象としたもの (Gross et al, 2003; Van Kampen and Stoessl, 2000; Carey, 1991; Juncos et al, 1989; Fredduzzi et al, 2002) であり、大脳皮質や辺縁系領域を対象としたものはみあたらない。線条体における最近の知見としては、DA やセロトニン受容体に加え、アデノシン受容体 (Tomiyama et al, 2004) あるいは prodynorphin (Cenci et al, 1998) と L-DOPA 慢性投与に伴う運動障害への機能関与が示唆されている程度である。

パーキンソン病モデル動物に対する DA 受容体作働薬投与による大脳基底核内の c-Fos 発現観察 (Ishida et al, 1998)、アンチセンス・オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を用いた基底核内の転写調節因子観察 (Hebb et al, 1997, 1999 (研究代表者の元共同研究者); Ishida et al, 2002) はいくつか報告されている。我々は最近、パーキンソン病モデルラットへの L-DOPA 反復投与に伴い、関心領域 (線条体・前部帯状回・扁桃体) 全般について c-Fos, Zif268 の発現は徐々に低下するのに対し、FosB 発現は破壊側 (DA 入力遮断側) の線条体背側のみならず前部帯状回においても増加することを初めて報告した (Ebihara et al, 2011)。

パーキンソン病モデル動物に対する神経移植が、その後の L-DOPA 慢性投与による運動症状の改善や副作用にどのような影響を与えるかに関しては、単に行動や受容体活性を観察したものに留まり (Steece-Collier et al, 2003)、本研究で計画している複数の転写調節因子を対象とした研究は例を見ない。

2. 研究の目的

本研究は、中枢 DA 神経系の可塑性に対す

る転写調節因子 (c-Fos, FosB, Zif268) の役割を観察する目的で、一側の黒質線条体 DA 路を破壊したヘミ・パーキンソン病モデルラットに対し、神経移植や L-DOPA 投与等の治療的処置を施す。これらの神経破壊及び治療的処置により生じる行動変化と転写調節因子との機能的関連を明らかにするため、methamphetamine や L-DOPA 投与による転写調節因子遺伝子発現様式及び、種々の行動観察、形態学的観察 (免疫組織化学法) を施行する。本研究により、パーキンソン病をはじめとする中枢 DA 神経関連疾患の進行及び治療過程における転写調節因子の役割の一端が明らかとなる。

3. 研究の方法

実験には体重約 130 g のウイスター系雄性ラットを用いる。

1) 6-hydroxydopamine によるヘミ・パーキンソン病モデルラットの作製

ペントバルビタール麻酔下、脳定位的に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を一側の内側前脳束へ微量注入することにより、中脳 DA 神経を化学破壊した 6-OHDA ラット (ヘミ・パーキンソン病モデルラット) を作製する。6-OHDA 溶液の脳実質内への投与においては、マイクロインフュージョンポンプ (今回購入申請) を用いる。6-OHDA 破壊 2 週間後に、methamphetamine 誘起回転運動を観察し行動の偏位を定量化し、一定の基準に満たなかった動物は本実験より除外する (Ishida et al, 2008)。

2) ラット胎仔中脳 DA 細胞移植による行動及び転写調節因子 (c-Fos, FosB, Zif268) 発現の観察

前記 1) で作製した 6-OHDA ラットの中から移植群を選び、破壊側線条体に胎仔中脳 DA 細胞の移植を行う。移植は、6-OHDA 破壊後 3 週目に Björklund らの方法の変法を用いて行う。移植組織には、胎生 14-15 日目のラット胎仔の中脳腹側部を、細胞浮遊液の状態にしたものを用いる。ペントバルビタール麻酔下、脳定位的に破壊側線条体 2 カ所に神経組織を注入移植する。その後、破壊群・移植群について前記した回転運動の観察を行い、移植による代償および機能的亢進を調べる。Methamphetamine 誘起回転運動観察後、ペントバルビタールによる深麻酔下、ラット脳を灌流固定する。取り出された脳は、後固定後、マイクロトームにより凍結切片とし、その後は浮遊法で免疫組織化学法 (ABC 法) を施行する (Ishida et al, 2008)。

以上の手法により、ラット大脳基底核 (線条体、黒質、腹側被蓋野) を中心に c-Fos, FosB 及び Zif268 陽性細胞の分布を調べ、それぞれの蛋白発現の部位特異性を観察する。

3) L-DOPA 単回及び反復投与に伴う転写調節因子発現の観察

前記2)の破壊群・移植群のなかからL-DOPA 単回投与群と反復投与群を抽出する。

薬物投与に際しては、まず芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬(末梢におけるL-DOPAの代謝を阻害し、L-DOPAがより効率的に脳血管関門を通過できる)のbenserazide(15 mg/kg, i.p.),引き続きL-DOPA methyl ester(15 mg/kg, i.p.)を投与する。単回投与群の動物には1回のみL-DOPA投与、反復投与群の動物には3週間連日のL-DOPA投与を行い、いずれの群もL-DOPA最終投与2時間後に、ペントバルビタールによる深麻酔下、ラット脳を灌流固定し免疫染色に供する。なお、この実験では、L-DOPA反復投与に伴う回転運動・不随意運動を観察する目的で、L-DOPA投与初日、1週後、2週後、最終日に、各ラットのL-DOPA投与後1時間の行動観察を施行する。不随意運動の観察には、Cenciらの提唱した評価尺度を用いる。

以上の手法により、ラット大脳基底核(線条体、淡蒼球、視床下核)、DA神経終末部位(前頭前野、側坐核、扁桃核)、更に主なアミン性神経核(黒質・腹側被蓋野—DA神経核、青斑核—ノルアドレナリン神経核、背側縫線核—セロトニン神経核、マイネルト核・脚橋被蓋核・橋背外側被蓋核—アセチルコリン神経核)に関してc-Fos, FosB及びZif268陽性細胞の分布を調べ、それぞれについて発現の部位特異性、L-DOPA反復投与に伴う免疫陽性細胞数の変化を観察する。

4) ラット胎仔中脳 DA 細胞移植による疼痛関連行動変化の観察

前記2)の破壊群・移植群に関して、下肢に対する機械的圧刺激による疼痛の回避反応閾値を測定する。疼痛の回避反応閾値の測定には、フォンフレイ式刺激針による機械的侵害刺激を用いる。

4. 研究成果

L-DOPA反復投与に伴い、6-OHDAラットにおける種々の不随意運動はその程度が亢進していった。

L-DOPA反復投与に伴い、関心領域全般についてc-Fos, Zif268の発現は低下するのに対し、FosB発現は破壊側(ドパミン入力遮断側)の帯状回前部、線条体背側において増加する傾向を確認した。

結果より、L-DOPA製剤の長期服用による副作用発現にFosBを介した神経機構が関与する可能性が示唆された。

また、6-OHDAラットの破壊側線条体に胎仔由来の中脳腹側部細胞を移植し、前記同様の行動観察・形態学的実験に供した。結果については現在解析中である。

胎仔中脳 DA 細胞の破壊側線条体への移植

により、6-OHDAラットに生じた痛覚過敏が改善することが明らかとなった(下記、図2参照)(Takeda et al, 2014)。

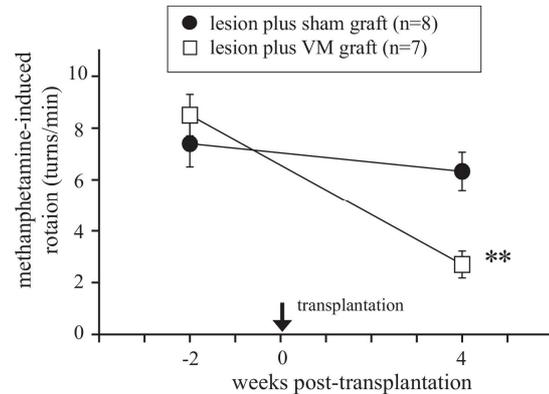


図1 破壊群(●)と比較し、移植群(□)では、破壊側線条体への胎仔中脳DA細胞移植4週後にはmethamphetamine誘起回転運動が有意に軽減した。

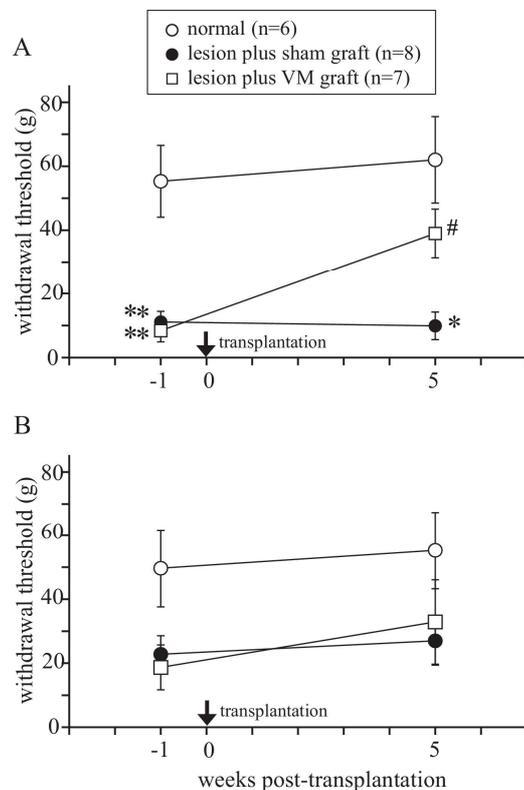


図2 A: 破壊側後肢への機械的刺激に対する閾値(フォンフレイ式刺激針), B: 破壊反対側後肢の閾値。正常群(○), 破壊群(●), 移植群(□)。6-OHDAによる黒質線条体路の破壊により、破壊側後肢で機械的刺激に対する痛覚過敏が生じたが、その後の移植により軽減した。

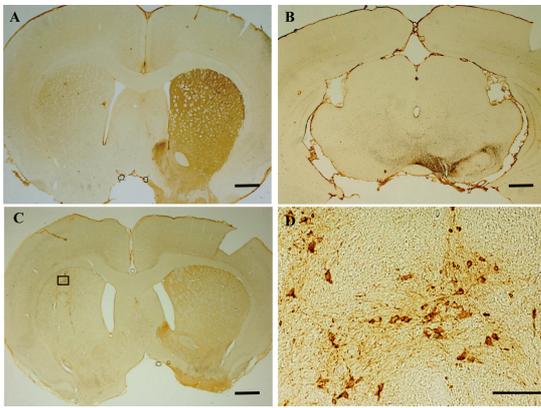


図 3

Tyrosine Hydroxylase に対する抗体を用いた免疫組織化学法による破壊群ラットの線条体(A)・中脳(B),移植群ラットの線条体(C)・線条体移植部(D)の顕微鏡写真。Scale bars = 1 mm (A-C), 100 μm (D).

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 9 件)

1. Funahashi H, Naono-Nakayama R, Koganemaru G, Miyahara Y, Nishimori T, Takamiya K, Ishida Y: Hemokinin-1-derived peptides have the antipruritic effect in rats. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases 2*: e704 (2015) (査読あり)
2. Yasuda K, Abe H, Koganemaru G, Ikeda T, Arimori K, Ishida Y: Pramipexole reduces parkinsonian tremor induced by pilocarpine infusion in the rat striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 131:1-5 (2015) (査読あり)
3. Koganemaru G, Abe H, Kuramashi A, Nishimori T, Ebihara K, Matsuo H, Funahashi H, Yasuda K, Ikeda T, Ishida Y: Effects of cabergoline and rotigotine on tacrine-induced tremulous jaw movements in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 126: 103-108 (2014) (査読あり)
4. Funahashi H, Naono-Nakayama R, Ebihara K, Koganemaru G, Kuramashi A, Ikeda T, Nishimori T, Ishida Y: Hemokinin-1 mediates pruriceptive processing in the rat spinal cord. *Neuroscience* 277: 206-216 (2014) (査読あり)
5. Nakamura T, Ikeda T, Takeda R,

Igawa K, Naono-Nakayama R, Sakoda S, Nishimori T, Ishida Y: The role of spinal serotonin receptor and alpha adrenoceptor on the antiallodynic effects induced by intrathecal milnacipran in chronic constriction injury rats. *Eur J Pharmacol* 738: 57-65 (2014) (査読あり)

6. Takeda R, Ishida Y, Ebihara K, Abe H, Matsuo H, Ikeda T, Koganemaru G, Kuramashi A, Funahashi H, Magata Y, Kawai K, Nishimori T: Intra-striatal grafts of fetal ventral mesencephalon improve allodynia-like withdrawal response to mechanical stimulation in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 573: 19-23 (2014) (査読あり)
7. Kuramashi A, Abe H, Koganemaru G, Matsuo H, Ikeda T, Ebihara K, Funahashi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y: Effect of blonanserin on methamphetamine-induced disruption of latent inhibition and c-Fos expression in rats. *Neurosci Lett* 549: 97-102 (2013) (査読あり)
8. Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, Ohba T, Yanagita T, Watanabe H, Shirasaka T, Tsuneyoshi I, Ishida Y, Hirota K, Sawaguchi A, Murakami M: Involvement of the Orexin System in Adrenal Sympathetic Regulation. *Pharmacology* 91(5-6): 250-258 (2013) (査読あり)
9. 安部博史, 石田康: Functional dissociation between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discrimination tasks (私の論文から) *九州神経精神医学* 58 (1):62-68 (2012) (査読あり)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Murakami G, Meng H, Edamura M, Furukawa T, Fukuda A, Iwashita T, Ishida Y, Nakahara D: Involvement of immune protein mhc class I in the development of cocaine self-administration. 44th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, DC, Nov. 15-19 (2014)
2. Funahashi H, Naono-Nakayama R, Abe H, Ebihara K, Nishimori T,

- Ishida Y: Hemokinin-1 mediates pruriceptive processing in the rat spinal cord. 44th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, DC, Nov. 15-19 (2014)
3. Matsuo H, Nishimori T, Abe H, Kuramashi A, Koganemaru G, Funahashi H, Ebihara K, Ikeda T, Ishida Y: Effect of an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in animal models of schizophrenia: An immunohistochemical study in the rat. 44th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, DC, Nov. 15-19 (2014)
 4. 今村幸子, 田淵雅宏, 山口琢児, 五十嵐康, 加瀬義夫, 蛭原功介, 石田康: セロトニン産生細胞 RIN-14B における L-DOPA 誘発ドパミン合成に対する抑肝散の増強作用. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会, 奈良市, 9 月 29-10 月 1 日 (2014)
 5. 倉増亜紀, 安部博史, 小金丸剛, 松尾寿栄, 池田哲也, 蛭原功介, 船橋英樹, 武田龍一郎, 西森利数, 石田康: 統合失調症の潜在抑制障害モデルを用いた、プロナンセリンの改善効果に関する行動学的、形態学的検討. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会, 奈良市, 9 月 29-10 月 1 日 (2014)
 6. 保田和哉, 安部博史, 小金丸剛, 蛭原功介, 池田哲也, 松尾寿栄, 倉増亜紀, 船橋英樹, 武田龍一郎, 有森和彦, 石田康: プラミペキソールはラット線条体へのピロカルピン投与によって誘導されるパーキンソン病様振戦を減弱させる. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会, 奈良市, 9 月 29-10 月 1 日 (2014)
 7. 石田康, 林要人, 岡原一徳: 抑肝散の認知症に対する臨床効果. シンポジウム 10 抑肝散の基礎と臨床最前線. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学学会大会, 奈良市, 9 月 29-10 月 1 日 (2014)
 8. 村上元, Hongrui Meng, 枝村光浩, 古川智範, 福田敦夫, 岩下寿秀, 石田康, 中原大一郎: MHC クラス 1 のコカインの自己投与への関与. 第 37 回日本神経科学学会, 2014 年 9 月 11-13 日 (横浜)
 9. 倉増亜紀, 安部博史, 小金丸剛, 松尾寿栄, 船橋英樹, 保田和哉, 武田龍一郎, 蛭原功介, 池田哲也, 西森利数, 石田康: Methamphetamine 誘発性潜在抑制障害に対する blonanserin の改善効果. DS フォーラム 2014, 神戸市, 3 月 8 日 (2014)
 10. Suenaga T, Ogawa Y, Meng H, Ishida Y, Nakahara D: Long-lasting effects of adolescent nicotine exposure on cognitive function and neuronal development in mice. 43th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, Nov. 9-13 (2013)
 11. Koganemaru G, Abe H, Kuramashi A, Ebihara K, Matsuo H, Funahashi H, Yasuda K, Ikeda T, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y: Effects of dopamine receptor agonist, cabergoline or rotigotine on tremulous jaw movements induced by acetylcholinesterase inhibitor, tacrine. 43th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, Nov. 9-13 (2013)
 12. 池田哲也, 井川加織, 中村武宏, 武田龍一郎, 石田康, 西森利数: 巻き貝の神経ペプチドがヒトの苦痛を救うかもしれない? 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市, 10 月 24-26 日 (2013)
 13. Koganemaru G, Abe H, Kuramashi A, Ebihara K, Matsuo H, Funahashi H, Yasuda K, Ikeda T, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y: Effects of dopamine agonist, cabergoline on the tremulous jaw movements produced by the acetylcholinesterase inhibitor, tacrine, and their related patterns of c-Fos expression in the striatum. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, Japan, June 23-27 (2013)
 14. 小金丸剛, 安部博史, 倉増亜紀, 蛭原功介, 松尾寿栄, 石田康: アセチルコリンエステラーゼ阻害薬が誘発する不随意運動に対するドパミン受容体作動薬の効果. 第 20 回カテコールアミンと神経疾患研究会, 東京, 4 月 27 日 (2013)
 15. Funahashi H, Naono-Nakayama R, Morishita M, Abe H, Matsuo H, Kuramashi A, Koganemaru G, Ikeda T, Ishida Y, Nishimori T: Effect of pretreatment with [Leu11]-hemokinin-1 on scratching induced by histamine or serotonin. 42th Annual Meeting Society for

Neuroscience, New Orleans, Oct.
13-17 (2012)

16. Matsuo H, Abe H, Okada N, Kuramashi A, Koganemaru G, Funahashi H, Ikeda T, Takeda R, Ebihara K, Nishimori T, Ishida Y: Effect of perospirone on methamphetamine-induced disruption of latent inhibition in rats. 42th Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, Oct. 13-17 (2012)

〔図書〕(計2件)

1. 石田康, 武田龍一郎: 精神医学からみたうつ病に伴う疼痛へのアプローチ. 村崎光邦監修. 小山司, 樋口輝彦編: デュロキセチンのすべて. 先端医学社(東京), 227-231 (2014)
2. 石田康, 武田龍一郎: 身体表現性障害. 北川泰久, 寺本明, 三村將監修: 神経・精神疾患診療マニュアル. 日本医師会雑誌 第142巻・特別号(2) 日本医師会(東京), S293-S294 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/psychiatry/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 康 (ISHIDA YASUSHI)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号: 20212897

(2) 研究分担者

武田 龍一郎 (TAKEDA RYUICHIRO)
宮崎大学・安全衛生保健センター・教授
研究者番号: 90336298

安部 博史 (ABE HIROSHI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 20344848

西森 利数 (NISHIMORI TOSHIKAZU)
宮崎大学・医学部・研究員
研究者番号: 20112211

(3) 連携研究者

なし