

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650205

研究課題名(和文)ドーパミン非存在下での運動制御メカニズム

研究課題名(英文)Mechanisms of hyperactivity in dopamine deficient state

研究代表者

藤田 雅代(FUJITA, Masayo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：90415539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンは運動制御に重要で、ドーパミンの減少により運動障害が生じることはよく知られている。しかし、ドーパミンを欠乏するマウスを用いた解析により、ドーパミンがほぼ完全に欠乏した状態では従来知見とは逆に運動量が亢進することが認められた。亢進した運動量は、アセチルコリン系の促進により抑制された。また、ドーパミン欠乏マウスの線条体で、アセチルコリン低下も認められた。これらより、ドーパミン欠乏状態での運動量亢進は、アセチルコリン減少が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dopamine plays an essential role in brain functions including motor control, reward, and psychosis. Low levels of dopamine generally cause hypolocomotion as seen in Parkinson's disease patients. Unexpectedly, dopamine-deficient mice, which had received daily L-dopa injections, could move effectively and even be hyperactive 72 h after the last L-dopa injection when dopamine was almost completely depleted. Such hyperactivity was ameliorated by clozapine, one of the atypical antipsychotic drugs. Among multiple actions of clozapine, muscarinic acetylcholine activation markedly reduced locomotor activity in dopamine-deficient mice. The expression of choline acetyltransferase was reduced and extracellular acetylcholine levels were significantly reduced in dopamine-deficient mice. In conclusion, these results indicate that cholinergic system may be involved in hyperactivity in dopamine-deficient mice.

研究分野：神経科学

キーワード：ドーパミン マウス 運動 アセチルコリン 線条体

## 1. 研究開始当初の背景

ドーパミンは、線条体、大脳皮質、海馬、辺縁系などに作用し、運動制御、報酬予測、強化学習などに重要な役割を果たしている。なかでも、運動に対しては、パーキンソン病などのようにドーパミン減少によって運動障害がひき起こされることから、その重要性は明らかである。ドーパミンは、直接的に運動を制御するというより、調節的にはたらいっていると考えられるが、その制御メカニズムに関しては、詳細には分かっていない。

ドーパミンがどのような運動制御に関わるかを解析するための優れた方法の一つは、ドーパミンが枯渇した状態と、正常に存在する状態との運動の違いを比較検討することである。以前、他の別々の2つのグループが、遺伝子改変技術を用いて、ドーパミン欠乏マウスをそれぞれ独立に作製した。このマウスは、無処置であれば、生後3週齢程度で死亡するが、L-dopaを毎日投与することによって、成獣まで維持することが可能である。このマウスを用い、L-dopa投与中止後24時間後の、ドーパミンが欠乏した状態では、顕著な運動量低下を示し、運動制御におけるドーパミンの重要性を示した。

しかし、その後、我々のグループにおいて、さらに検討を行ったところ、L-dopa投与中止24時間後では確かに顕著な運動量低下を示したが、72時間後には逆に運動量が亢進するという予想外な結果を見出した。さらに、このマウスでは、L-dopa投与中止24時間後の線条体ドーパミン量は野生型マウスの2%程度ほど残存していること、およびL-dopa投与72時間後では検出限界以下であることを認め、72時間後にほぼドーパミンが枯渇状態になることも見出された。これらの結果は、運動自体はドーパミン非存在下でも行えることを明確に示すものであると考えられた。

## 2. 研究の目的

ドーパミン欠乏時における運動量の亢進がどのような機序で引き起こされるのか、どの神経伝達物質の関与が考えられるかを明らかにすることを目的として、研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ドーパミン欠乏マウスの維持

ドーパミン欠乏マウスは、福島県立医大の小林和人教授より供与いただいた。このマウスは、THノックアウトマウススペースに、ドーパミン水酸化酵素プロモーター下にTHを発現させることによって、ノルアドレナリンは保たれるが、ドーパミンのみを欠乏する。このマウスに対し、生後10日齢よりL-dopa 50 mg/kgを毎日投与し、成獣まで維持し、10週齢以降に達してからそれぞれの実験に用いた。

### (2) 新奇環境下における運動量の測定

新奇環境下における運動量は、スーパーメックス(室町機械)を用いて測定した。L-dopa

投与中止後72時間経過したマウスを用い、まず180分間新奇環境に馴化させたのち、各種薬剤を投与した。さらに180分間おき、薬剤投与前後の運動量をそれぞれ記録した。

### (3) 生化学的解析

L-dopa投与中止72時間後のドーパミン欠乏マウスおよび、コントロールの野生型マウスより脳を採取し、半球に切断し、液体窒素で急速凍結したのち、使用するまで-80にて保存した。凍結脳より線条体を切り分け、タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにてタンパク質発現量を解析した。

### (4) 組織学的解析

L-dopa投与中止72時間後のドーパミン欠乏マウスよりおよび、コントロールの野生型マウスより脳を採取し、半球に切断し、ブアン固定液にて一晚固定した。固定後の脳を70%エタノールで洗浄した後、パラフィン包埋を行った。厚さ4 $\mu$ mのcoronal切片を作製し、免疫染色を行った。

### (5) 網羅的遺伝子解析

L-dopa投与中止72時間後のドーパミン欠乏マウスよりおよび、コントロールの野生型マウスの脳を採取し、線条体及び淡蒼球を含む部位を切り分け、RNAを抽出した。イルミナのMouse-Ref 8 Expression Bead Chipを用いて網羅的遺伝子解析を行った。

### (6) 脳内ドーパミン量の測定

線条体における細胞外ドーパミン量の測定は、マイクロダイアリシスによって行った。

## 4. 研究成果

(1) 非定型抗精神病薬の一つであるクロザピンによって運動量亢進が抑制される

L-dopa投与中止72時間後に運動量が亢進したドーパミン欠乏マウスに対し、精神刺激薬や抗精神病薬を投与し、運動量に変化が表れるか、解析した。精神刺激薬であるメタンフェタミン(1 mg/kg)は、野生型マウスでは運動量の増加を引き起こしたが、ドーパミン欠乏マウスに対しては、変化は認められなかった。また、定型抗精神病薬の一つであるハロペリドール(3 mg/kg)は、野生型マウスの運動量を顕著に抑制したが、ドーパミン欠乏マウスの運動量亢進は抑制しなかった。これに対し、非定型抗精神病薬の一つであるクロザピン(5 mg/kg, 10 mg/kg)は、ドーパミン欠乏マウスの運動量亢進を顕著に抑制した。この結果より、クロザピンが作用する神経伝達物質が、ドーパミン欠乏マウスの運動量の亢進に関与していると考えられた。また、ハロペリドールが効果を示さなかったことから、運動量亢進はドーパミン非依存的であることが示された。

(2) アセチルコリンの促進作用が、ドーパミン欠乏マウスで亢進した運動量の抑制に関与している

クロザピンは、5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>,  $\mu$ スカリン、 $\alpha$ 1アドレナリン受容体など、多彩な神経伝達物質の受容体をターゲットとする。そこ

で、どの神経伝達物質を介した作用により強くはたらき、効果を発揮するのかを検討するため、様々な神経伝達物質のアンタゴニスト、アゴニストを投与し、亢進した運動量を抑制するものがないか、検討した。

すると、ムスカリン受容体アゴニストであるオキソトレモリン M (0.1 mg/kg) と、アセチルコリンエステラーゼインヒビターであるドネペジル (3 mg/kg) が顕著にドーパミン欠乏マウスにおける運動量亢進を抑制した。すなわち、アセチルコリン系の促進作用が運動量の抑制に関与していることが示唆された。

(3) ドーパミン欠乏マウスの線条体でアセチルコリン合成が低下している

アセチルコリン系を促進することが運動量の抑制に関わることから、ドーパミン欠乏マウスにおける運動量亢進は、アセチルコリンの減少が関わっていると考えられた。そこで、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の線条体における発現量を検討した。

ウエスタンブロットにて ChAT タンパク質の発現量を検討したところ、ドーパミン欠乏マウスにおいて、有意な発現量の低下が認められた (図 1)。網羅的遺伝子発現解析からも、ドーパミン欠乏マウスにおいて、ChAT の mRNA 発現量の減少が認められた。免疫染色の結果、線条体における ChAT 陽性細胞の減少も認められた (図 2)。これらの結果と一致して、ドーパミン欠乏マウスでは、線条体におけるアセチルコリン濃度の低下が認められた。

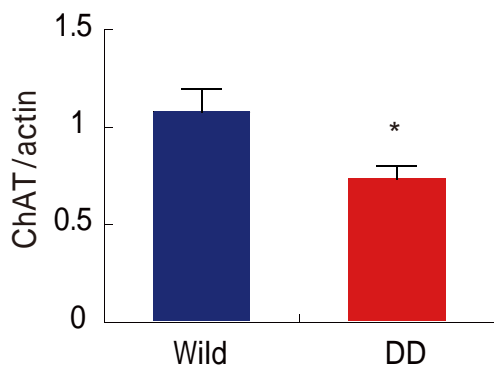


図 1 . ドーパミン欠乏マウス (DD) における線条体の ChAT タンパク質の減少。\*:  $p < 0.05$

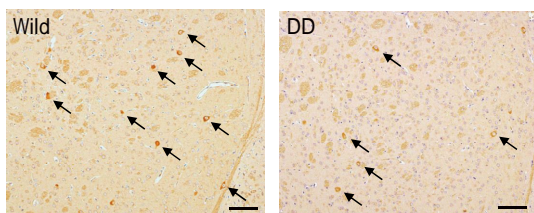


図 2 . 野生型マウスとドーパミン欠乏マウスの線条体における ChAT の染色像。矢印が ChAT 陽性細胞。

以上の結果から、ドーパミン欠乏時における運動量亢進は、線条体のアセチルコリンの低下と関連していると考えられた。

引き続き、ドーパミン欠乏時の運動量亢進の際に活性化される脳部位を検討しており、線条体の一部で強く活性化される所見が見出されている。この部位の活性化と、ChAT 発現の関連性など、さらに今後詳細に検討していく予定である。

## 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 8 件)

Hagino Y, Kasai S, Fujita M, Setogawa S, Yahaura H, Yanagihara D, Hashimoto M, Kobayashi K, Meltzer HY, Ikeda K.

Involvement of cholinergic system in hyperactivity in dopamine-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*. 40: 1141-1150. 2015, doi: 10.1038/npp.2014.295. 査読有

Sekiyama K, Waragai M, Akatsu H, Sugama S, Takenouchi T, Takamatsu Y, Fujita M, Sekigawa A, Rockenstein E, Inoue S, La Spada AR, Masliah E, Hashimoto M. Disease-Modifying Effect of Adiponectin in Model of  $\alpha$ -Synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol*. 1: 479-489. 2014, doi: 10.1002/acn.3.77 査読有

Sekigawa A, Sekiyama K, Fujita M, Takamatsu Y, La Spada AR, Masliah E, Hashimoto M. Dual effects of  $\beta$ -synuclein on the pathogenesis of Parkinson disease. *Ann Neurol*. 74: 306. 2013, doi: 10.1002/ana.23936. 査読有

Sekigawa A, Fujita M, Sekiyama K, Takamatsu Y, Hatano T, Rockenstein E, La Spada AR, Masliah E, Hashimoto M. Distinct mechanisms of axonal globule formation in mice expressing human wild type  $\alpha$ -synuclein or dementia with Lewy bodies-linked P123H  $\beta$ -synuclein. *Mol Brain*. 5: 34. 2012, doi: 10.1186/1756-6606-5-34. 査読有

Desplats P, Patel P, Kosberg K, Mante M, Patrick C, Rockenstein E, Fujita M, Hashimoto M, Masliah E. Combined exposure to Maneb and Paraquat alters transcriptional regulation of neurogenesis-related genes in mice models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 7: 49. 2012, doi: 10.1186/1750-1326-7-49. 査読有

Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Conti B, Hashimoto M. Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress. *Neuroscience*. 232C: 13-20. 2012, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.012. 査

読有

Sekiyama K, Sugama S, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Hashimoto M. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of  $\alpha$ -Synucleinopathies. Parkinsons Dis. 2012;271732. 2012, doi: 10.1155/2012/271732. 査読有

Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Takamatsu Y, Hashimoto M. Possible Alterations in  $\beta$ -Synuclein, the Non-Amyloidogenic Homologue of  $\alpha$ -Synuclein, during Progression of Sporadic  $\alpha$ -Synucleinopathies. Int J Mol Sci. 13:11584-92. 2012, doi: 10.3390/ijms130911584. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

藤田雅代、萩野洋子、笠井慎也、橋本款、小林和人、池田和隆、ドーパミン欠乏マウスモデルを用いたドーパミン非存在下の運動亢進メカニズムの解析 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2014 年 11 月 21 日(ポスター発表)

萩野洋子、笠井慎也、藤田雅代、瀬戸川将、山浦洋、柳原大、橋本款、小林和人、池田和隆、ドーパミン欠損マウスの多動におけるアセチルコリン神経の関与 第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市) 2014 年 11 月 21 日(ポスター発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/abuse/research/dopamine.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 雅代 (FUJITA, Masayo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：90415539