

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790096

研究課題名(和文) ストレス性精神障害による線条体ドパミン神経の脆弱性形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the vulnerability of striatal dopaminergic neurons caused by stress-related mental disorders.

研究代表者

室山 明子 (Muroyama, Akiko)

北陸大学・薬学部・講師

研究者番号：00434473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：線条体ドパミン神経終末の機能評価系を確立するため、モノアミントランスポーターの機能評価に用いられている蛍光物質 ASP+に注目した。線条体および前頭皮質由来シナプトソームにおけるASP+の取り込みについて、種々のモノアミントランスポーター阻害剤の影響を検討したところ、ドパミン神経に対して選択性が高いことが認められた。したがって、ASP+は、ドパミン神経終末の機能評価に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to establish the functional assay system for dopaminergic terminals in striatal synaptosomes, we use the fluorescent compound 4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP+). ASP+ has been used to measure the biophysical properties of norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT) or dopamine transporter (DAT). In this study, we have investigated whether ASP+ can be used as a fluorescent substrate to monitor DAT function in mouse striatal synaptosomes. We confirmed the specificity of ASP+ uptake for the NET, SERT and DAT using several inhibitors of monoamine transporters in synaptosomes prepared from the striatum and frontal cortex. These results suggest that the ASP+ method might be used to evaluate for the function of dopaminergic terminals in striatal synaptosomes.

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：パーキンソン病 ストレス性精神障害 ドパミン神経 MPTP シナプトソーム

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は黒質線条体ドパミン神経の変性・脱落により運動機能障害を呈する進行性の神経変性疾患である。PDのような神経変性疾患では原因となる神経細胞が慢性的に徐々に変性・脱落することからさまざまな内的・外的要因がその病勢の進行に影響を及ぼす可能性がある。多くの疫学的解析により、ストレス性精神障害であるうつ病が PD 発症の危険因子の1つとして報告されている。また、医療現場において、PD 患者に対する過度なストレス暴露がその治療の妨げになると考えられている。つまり、精神的ストレスやストレス性精神障害が PD の発症や病勢の進行に関与している可能性を示唆している。しかしながら、PDにおけるドパミン神経細胞の変性・脱落に対して、精神的ストレスやストレス性精神障害およびその背景にある神経伝達異常が及ぼす影響については不明である。そこで、ストレス性精神障害が PD の発症や進行に関与するとの仮説のもと、ストレス性精神障害モデルマウスにおける PD 誘発神経毒 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の及ぼす影響を検討した。そして、ストレス性精神障害が線条体ドパミン神経の MPTP に対する脆弱性を惹起することを明らかにした。しかしながら、この脆弱性形成機構は不明である。

孤発性 PD および MPTP 誘発ドパミン神経変性は線条体における神経終末から中脳黒質の細胞体に向け逆行的に進行すると考えられている。そのため、変性の開始点である神経終末に着目する必要があると考えた。しかしながら、線条体組織にはドパミン神経以外に様々な神経が存在するため、ドパミン神経終末分子を特異的に解析することは困難である。そこで、線条体組織より調製したシナプトソーム画分において、免疫分離法によりドパミン神経終末(シナプトソーム)の単離法を確立した。これを応用することで、ドパミン神経終末の選択的な機能評価系が確立できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ストレス性精神障害モデルマウスにおける線条体ドパミン神経終末の脆弱性形成機構を明らかにすることを目的とする。特に、単離した線条体ドパミン神経シナプトソームを応用し、変性のメカニズムとして考えられているミトコンドリア機能および酸化ストレスを評価する。そして、黒質線条体ドパミン神経の変性・脱落に至る分子機構を解明する。さらに、この疾患の進行抑制、発症予防法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 水浸拘束ストレス (water immersion restraint stress: WIRS) 負荷は、雄性 C57BL/6N マウスを拘束チューブに入れ、マウ

スの鎖骨付近まで 25°C の水に 5 時間浸すことで行った。ストレス負荷の 24 時間後に MPTP 20 mg/kg を腹腔内投与し、その 3 日後に線条体を摘出し、線条体ホモジネートを調製した。ウェスタンブロット法により、ドパミン神経の指標タンパク質であるドパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) およびチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH)、アストロサイトの指標タンパク質であるグリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) および神経終末の指標タンパク質であるシナプトフィジンタンパク質レベルを評価した。うつ様症状の発現は、強制水泳試験により評価した。

(2) 我々が独自に作製した DAT 細胞外ループに対する抗体をマグネットビーズと結合させた。これと、マウス線条体組織より調製したシナプトソーム画分を反応させ、ビーズ結合画分を得た。シナプトソーム画分およびビーズ結合画分において、シナプトソームの形態を透過型電子顕微鏡により観察した。

(3) マウス線条体、前頭皮質または小脳よりシナプトソーム画分を調製した。モノアミントランスポーターの機能評価に用いられている 4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP*) または小胞型モノアミントランスポーターの基質である fluorescent false neurotransmitter (FFN)102 を添加し、蛍光強度を測定した。また、蛍光強度の増加に対する種々のモノアミントランスポーター阻害剤の影響を検討した。

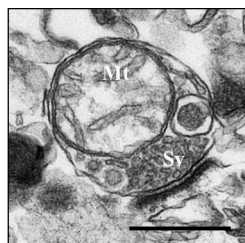
4. 研究成果

(1) マウス線条体ドパミン神経のストレス脆弱性について、様々なストレス負荷条件のもと検討を進めている。今回、ストレス性精神障害であるうつ様症状の発現が認められる WIRS 負荷マウスにおいて、MPTP の線条体ドパミン神経に及ぼす影響を検討した。WIRS 負荷マウスにおいて、線条体 DAT および TH タンパク質レベルに変化は認められなかった。低用量の MPTP を投与した WIRS 負荷マウスでは、線条体 DAT および TH タンパク質レベルの減少および GFAP レベルの増加が認められた。一方、シナプトフィジンタンパク質レベルにはほとんど影響がなかった。また、WIRS 負荷マウスは、強制水泳試験において無動時間の延長傾向を示した。したがって、うつ様傾向を呈した WIRS 負荷マウスの線条体ドパミン神経において、MPTP 神経毒に対する感受性が増大する可能性が示唆された。

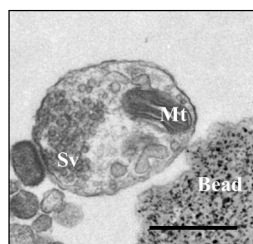
(2) 線条体ドパミン神経終末においてミトコンドリア機能、酸化ストレスの増加およびそれらの影響を受ける分子動態を検討することを目的とし、線条体ドパミン神経シナプトソームの単離法の確立を目指している。これ

までに確立した単離法から得られるビーズ結合画分において、確かにマグネットビーズにシナプトソームが結合していることを確認するため、シナプトソーム画分(図1)およびビーズ結合画分(図2)を透過型電子顕微鏡により観察した。

(図1)
シナプトソーム画分



(図2)
ビーズ結合画分



Scale bar: 500 nm

Mt: mitochondria
Sv: synaptic vesicles

両画分において、ミトコンドリアやシナプス小胞などのオルガネラを含んだシナプトソームの形態が認められ、ビーズ結合画分では、マグネットビーズに結合したシナプトソームが確認された。

(3)線条体ドパミン神経終末の機能評価系を確立するため、モノアミントランスポーターの機能評価に用いられるASP⁺または小胞型モノアミントランスポーターの基質であり、DATを介して取り込まれることが報告されているFFN102に着目し、これらの蛍光物質が線条体シナプトソームにおいてドパミン神経に選択的に取り込まれるか検討した。

ASP⁺は線条体シナプトソームにおいて、濃度および温度依存的に取り込まれ、飽和が認められた。線条体および前頭皮質よりシナプトソームを調製し、ASP⁺がモノアミントランスポーターに特異的に取り込まれるか、阻害剤であるイミプラミン、フルオキセチン、MPP⁺およびGBR-12909を用い検討した。線条体シナプトソームではイミプラミン、フルオキセチン、MPP⁺およびGBR-12909処置によりASP⁺の輸送は抑制された。前頭皮質シナプトソームではイミプラミン、フルオキセチンおよびMPP⁺処置によりASP⁺の輸送は抑制されたが、GBR-12909では抑制は認められなかった。

線条体シナプトソームにFFN102を添加すると、FFN102の蛍光強度の増加が認められた。線条体、前頭皮質および小脳由来シナプトソームを調製し、FFN102の蛍光強度を比較したところ、ドパミン神経を多く含む線条体にお

いて、最も蛍光強度の増加が認められた。したがって、ドパミン神経に選択性が高い可能性が示唆された。さらに、線条体シナプトソームにおけるFFN102の蛍光強度の増加は、DAT阻害剤であるGBR-12909により抑制されたことから、DATを介した取り込みであると考えられた。

これらの結果より、線条体シナプトソームにおけるASP⁺およびFFN102の輸送活性は、ドパミン神経終末の機能評価に有用である可能性が示唆された。線条体ドパミン神経シナプトソームの機能評価系は、ドパミン神経終末の脆弱性形成評価に有用であり、さらに、神経変性・脱落における神経保護効果の効力評価にも応用可能であると考えている。

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 3件)

室山 明子・パーキンソン病の進行抑制を目指した神経保護代替医療アプローチ・薬学雑誌, 133: 849-856, 2013. 査読有
DOI: 10.1248/yakushi.13-00158

Kobayashi S., Yokoyama S., Maruta T., Muroyama A., Yoshikawa H., Mitsumoto Y. Attenuation of nicotine-evoked Ca²⁺ influx by antibody to the nicotinic acetylcholine receptor 3 subunits in human embryonic kidney cells. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 32959, 2013. 査読有
DOI: 10.4236/abb.2013.46A002

Kobayashia S., Yokoyama S., Maruta T., Negami M., Muroyama A., Mitsumoto Y., Iwasa K., Yamada M., Yoshikawa H. Autoantibody-induced internalization of nicotinic acetylcholine receptor 3 subunit exogenously expressed in human embryonic kidney cells. *J. Neuroimmunol.* 257: 102-106, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.12.010

[学会発表](計 3件)

室山 明子、保井 伴之、藤井 千聖、光本 泰秀、水侵拘束ストレス負荷マウスにおける線条体ドパミン神経のMPTP感受性増大について、日本薬学会北陸支部第125回例会、2013年11月17日、金沢

室山 明子、パーキンソン病の進行抑制を目指した補完代替医療アプローチ、日本薬学会北陸支部第124回例会(奨励賞受賞講演)、2012年11月18日、富山

室山 明子、光本 泰秀、ASP⁺を用いたマウス脳シナプトソームにおけるモノアミント

ランスポーターの機能解析、第 35 回日本神
経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室山 明子 (MUROYAMA, Akiko)
北陸大学・薬学部・講師
研究者番号：00434473

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：