

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290004

研究課題名(和文) 中脳ドパミン神経の入出力発達を制御する内的・外的要因の解明

研究課題名(英文) External and Internal Factors Regulating Inputs/Output Development of Midbrain Dopaminergic Neurons

研究代表者

那波 宏之 (Nawa, Hiroyuki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：50183083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミン神経発達は、生後から思春期と長期に渡るが、その調節には不明な点が多い。本研究では、このドパミン神経発達調節の細胞内要因と外的要因を調べた。ドパミン神経は生後から性成熟直前まで、バースト性発火を特徴とする発火上昇が観察された。それにもないカチオン電流の変化とセロトニン感受性の低下が観察された。加えて、外的要因であるGDNF等の神経栄養因子によっても発火が大きく影響されていた。しかし、ドパミン神経の発火頻度と神経終末のドパミン放出量にはかなりの解離が生じていた。これらの結果は、ドパミン神経の内的要因や外的要因に加えて、成長後には神経終末部位での局所の調節も重要であることを示唆している

研究成果の概要(英文)：The development of mammalian dopamine neurons requires long periods of time and its regulation remains to be fully elucidated. In this research, we explored the postnatal mechanisms of the dopaminergic development, distinguishing external and internal regulatory factors. Cell autonomous firing of dopamine neurons tended to elevate until the pubertal stage, especially in its burst property. In parallel, there were alterations in gene expression of ion channels as well as in its sensitivity to serotonin. In addition, the firing rates were influenced by the external components of neurotrophic factors such as GDNF. However, there was a controversy between the firing/ bursting rates and terminal dopamine releases in the GDNF overexpression. These observations suggest that both internal and external factors play crucial roles in postnatal dopaminergic development, but local regulation of dopamine release should be considered additionally in its functioning.

研究分野：神経発達学

キーワード：ドパミン 神経栄養因子 自律発火 脳発達 RNA-SEQ GDNF

1. 研究開始当初の背景

脳内ドパミン神経回路は環境からの刺激に応じて注意、意欲、運動、情動レベルを脳で統合的に調節している。ドパミン神経は中脳：後脳境界領域からソニックヘッジホグや繊維芽細胞成長因子の作用と、転写因子制御により発生し、ノルアドレナリン神経などへも分離・分化してゆく。ネトリンやセマフォリンなどのガイダンス分子に従い中脳核や視床下部から大脳皮質や基底核、扁桃体などに広く神経線維を投射する。その後、軸索伸張/刈り込み、終末領域と数の変化、シナプス部位の変更などの発達変化を呈する。この多くは経験・環境依存的で、ヒトでは生後10歳(臨界期)まで緩慢に続き、また回路選択的である。この経験依存的な回路発達や機能成熟メカニズムには、その初期発生メカニズムに比して、不明な点が多い。我々は中脳ドパミン神経の回路発達と機能成熟が環境因子、特定の神経栄養因子に制御されていることを見出している。よって本課題では、正常脳発達過程におけるドパミン神経の成熟課程を、神経活動・入力シナプス可塑性・ドパミン出力の視点から分析し、その発達過程における可塑性と内的・外的調節因子の実態を明らかにすることにした。

2. 研究の目標

中脳ドパミン神経の細胞表現型のなかでも、とくにその発火頻度の生後変化を主たる研究対象として、発達制御メカニズムの内的要因(イオンチャンネル、神経伝達物質受容体)と外的要因(神経栄養因子)の強度について分析をする目標を立てた。その結果を踏まえて、ドパミン神経発火頻度が、ドパミンの放出やその機能にどのように影響しているかを考察する計画を立てた。具体的には下記の3つの研究目標を設定して、実験を進めた。

(1) 神経誕生後のドパミン神経の発達過程において、その自律的発火を変化させる内的な分子メカニズムを、電気生理学的手法と分子生物学的方法(RNA-SEQ)等により明らかにする。

(2) ドパミン神経の自発神経発火は、大脳皮質、手綱核、視床下部、視床下核からのシナプス入力の影響も受けても制御されている。なかでも、特に結合の強いセロトニン入力に着目して、その影響力を解析する。

(3) ドパミン神経回路の生後発達・成熟過程は、多種の栄養因子によって調節されているといわれている。最も有名なドパミン神経に対する栄養因子 GDNF の外的作用を、GDNF を過剰発現するマウスを用いて分析する。

3. 研究の方法

中脳ドパミン神経細胞の成長・成熟に関する疑問を明らかにする目的で実験計画を立てた。これらの実験計画は、主に麻醉下・自由行動下 in vivo 記録と、急性スライスを用いた生理学的観察法(ユニット記録、パッチクランプ法他)、遺伝子改変技術(トランスジェニックマウス)、ゲノム解析技術(次世代シーケンサー-RNA-SEQ)を駆使して、ドパミン神経細胞の発達変化を分析した。ドパミン神経終末発達はチロシン水酸化酵素の染色、ダイアリシス、モノアミン測定で評価した。ドパミン神経細胞自身の自律的発達能力と外部要因による発達変化を弁別し、ドパミン神経の自律的・従属的発達機序、およびドパミン機能との関連を明らかにするように勤めた。GDNF のトランスジェニックマウスは研究協力者、榎本秀樹(神戸大学)より入手した。細胞よりの RNA-SEQ は、クロンテック社の SMART 法キットを当初、利用する計画であった。記載した動物実験、組み換え DNA 実験は、新潟大学の当該倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 発達中のドパミン神経の自律発火の頻度、強度、パターン変化の解明

ラット中脳スライスを用いて黒質ドパミン神経の成長過程における自律発火頻度変化を分析した。スライス標本でユニット記録を実施したところ、発火はバーストせず、発火頻度も、ラットの発達時期によらず大きな差異は観察されなかった。

次に発達中のラットやマウスを麻醉して、黒質ドパミン神経から、その自律発火を in vivo ユニット記録として測定してみた。その結果、性成熟期(約8週)の直前まで、バースト比率の発火頻度は上昇傾向を示したが、性成熟期を越えると、少し下がって定常安定化していた。

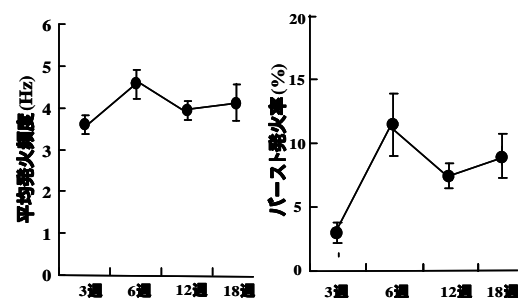


図1) ラット生後発達期における黒質ドパミン発火変化。麻醉下での In Vivo 細胞外記録

(2) 思春期前に見られる黒質ドパミン神経の発火頻度上昇の原因

6週くらいに見られる一過性のドパミン神経活動の上昇の内的要因を、マウスの中脳スライス標本を作製し、電位パルス刺激による電流成分を分析することで解析した。これまでの研究で示唆されているドパミン神経のバ

ーラスト発火調節因子である抑制性過分極活性化電流 [Ih] と小コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャンネル (SK) を中心に、思春期前後の変動を測定した。結果、Ih 電流に少し上昇が見られたものの、上記のバースト率変化を説明できるものではなかった。なお膜抵抗や膜容量は変化していなかった。

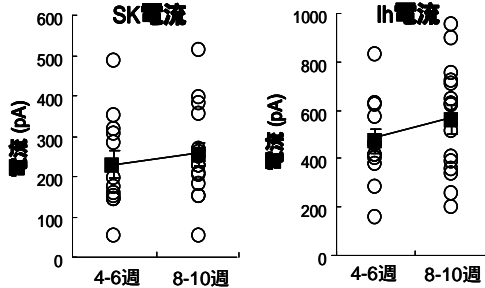


図 2) 思春期前後のマウスから調整した中脳スライス標本を用いた黒質ドパミン神経の SK 電流、Ih 電流成分

(3) 中脳ドパミン神経発火のセロトニン感受性の発達変化

上記の電気生理学的実験では、確たる内的な発達変化要因は探せなかったため、外的にドパミン神経発火に強い影響を与えているであろう、セロトニン入力について評価を加えた。中脳スライス標本のユニット記録を行い、腹側被蓋野の中脳ドパミン神経の自発発火頻度をセロトニン投与前後で比較してみた。結果、生後若い時期のドパミン神経細胞の多くは、セロトニンに大きな反応をして、その発火頻度を平均 3 倍以上上昇させる細胞が多く存在した。このセロトニンの影響は、その後、6 週齢、12 週齢とドパミン神経細胞が成長するにつれて、消失する方向で変化した。この事実は、セロトニン神経入力、ドパミン神経発火パターンの発達変化に関与していることを示していた。

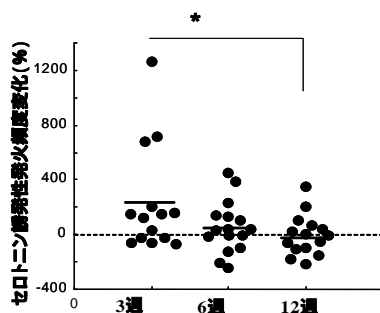


図 3) 中脳スライス標本を用いた腹側被蓋野ドパミン神経発火のセロトニン反応

(4) ドパミン神経栄養因子 GDNF の過剰発現トランスジェニックマウスの分析

ドパミン神経栄養因子 GDNF の過剰発現トランスジェニックマウスは恒常的ドパミン神経過活動とドパミン放出亢進を示すかどうかを分析した。予想通り当該マウスの中脳ドパミン神経発火は顕著な亢進を示したが、線条体でのドパミン合成、含量、放出量

はむしろ全て低下していた。このマウスでは繰り返し行動や立ち上がり行動が亢進するとともに、プレパルス抑制は異常に低下していた。ドパミン神経の栄養因子、EGF 過剰発現トランスジェニックマウスの場合と同様に、予想に反し、ドパミン合成酵素、チロシン水酸化酵素の発現量は低下していた。このことは、ドパミン神経発火頻度は確かに、栄養因子で調節されていたものの、ドパミン合成、放出とは必ずしも相関しないことが判明した。

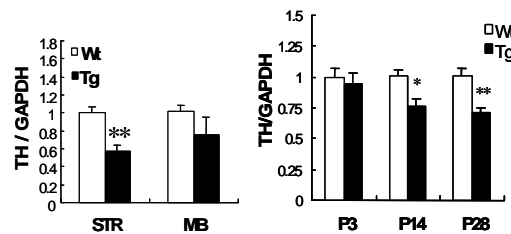


図 4) GDNF 過剰発現マウスのドパミン合成酵素 (TH) 発現量と発達変化 (STR; 線条体、MB; 中脳、P; 生後日齢)

(5) 次世代シーケンサーを使った RNA-SEQ によるドパミン神経発達にともなう内的要因 (遺伝子発現変化) の検討

生後発達過程でのドパミン神経発火パターン変化の分子機序を探るために、ドパミン神経細胞の RNA-SEQ を実施した。公表されている微量 RNA からシングルセルシーケン斯拉イブラリーの作製法 (SMART 法) に誤りがあることが判明した。仕方なく、本実験計画を 1 年延長して予備実験を重ね、その問題点を明らかにし、改善策を開発した。ラット黒質の組織を生後直後、2 週、4 週、12 週時点でマイクロダイセクションにより RNA を回収し、上記の改善されたシングルセル RNA-SEQ 法で遺伝子プロファイルリングを実施した。結果、遺伝子発現変化は生後から 2 週年齢までで 38 遺伝子、生後 2 週齢から 4 週齢までで 87 遺伝子、生後 4 週齢から 12 週齢までで 65 遺伝子に有意な変化が観察された。この間の特徴的な発達変化はミエリン関連遺伝子、コラーゲン遺伝子群とカリウムチャンネル群であった。ヒトでのドパミン神経細胞だけのシングルセル遺伝子プロファイルを考慮すると、チャンネル分子群の遺伝子発現変化がドパミン神経の機能発達に重要な役割を果たしていることが推定された。

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 2 件)

Sotoyama H, Iwakura Y, Oda K, Sasaoka T, Takei N, Kakita A, Nawa H. Striatal hypodopamine phenotypes found in transgenic mice that overexpress glial cell line-derived neurotrophic factor. Neurosci.

Lett. 2017 in press. 査読有り

Namba H, Okubo T, Nawa H. Perinatal Exposure to Neuregulin-1 Results in Disinhibition of Adult Midbrain Dopaminergic Neurons: Implication in Schizophrenia Modeling. Sci Rep. 6: 22606 (2016). 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

Sotoyama H, Nawa H. Abnormal firing activity of midbrain dopaminergic neurons of a schizophrenia animal model established by perinatal EGF treatment. DOPAMINE2016. Sept 5-8, 2016, Vienna Austria.

Namba H, Tomiyama K, Onishi S, Nawa H. 青年期前後での中脳ドパミン神経自発活動変化と新生仔期上皮成長因子投与の影響 第38回日本神経科学大会 平成27年7月28日~31日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Nawa H. Neuropathological impact of peripheral cytokines on dopaminergic development and neocortical aging; implication of schizophrenia. Asian Aging Symposium 平成27年3月14日~15日, 大阪大学中ノ島センター (大阪府・大阪市)

Namba H, Tomiyama K, Onishi S, Nawa H. Peri-adolescent spike elevation of dopaminergic neurons in a cytokine-induced schizophrenia model; implication of the temporal specificity of the onset. The 38th Annual meeting of the Japan Neuroscicncs Society 2015年7月28日~31日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

特記すべきもの無し

〔産業財産権〕

特記すべきもの無し

〔その他〕

特記すべきもの無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那波 宏之 (NAWA, Hiroyuki)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 50183083

(2) 分担研究者

なし

(3) 連携研究者

難波 寿明 (NAMBA, Hisaaki)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号: 90332650
武井 延之 (TAKEI, Nobuyuki)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号: 70221372
小林 和人 (KOBAYASHI, Kazuto)
福島県立医科大学・生体情報研究所・教授
研究者番号: 90211903
南部 篤 (NAMBU, Atushi)
自然科学研究機構・生理学研究所・教授
研究者番号: 80180553

(4) 研究協力者

なし