

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860143

研究課題名(和文) 中脳黒質網様部アストロサイトに発現するD1ドーパミン受容体の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological function of D1 dopamine receptor-expressing astrocyte of substantia nigra

研究代表者

長友 克広 (Nagatomo, Katsuhiro)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30542568

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)：ドーパミンは報酬、運動、学習などに重要な伝達物質である。運動制御に重要な大脳基底核の出力部を担う中脳黒質網様部アストロサイトにD1ドーパミン受容体が発現していることを見出し、その生理学的な意義を電気生理学的アプローチとD1ドーパミン受容体を黒質網様部アストロサイト特異的に欠損した動物個体を用いた行動解析により解明を試みた。動物個体作製に際してトラブルがあり行動解析に至らなかった。また電気生理学的アプローチにおいても核心をつく結果を出すに至っていない。本研究のきっかけとなった事象については最終年度に論文として発表した。

研究成果の概要(英文)：Substantia nigra pars reticulata (SNr) receives dopamine (DA) from dendrites (dendritic release) extending into this nucleus from dopaminergic neurons in the adjacent nucleus pars compacta, which is known to be selectively degenerated in Parkinson's disease. Recently, we found acutely dissociated adult SNr astrocytes showed anti-D1 dopamine receptor (D1R) antibody immunoreactivity which might be as a recipient for dendritically released DA. Present study, the physiological function of D1R expressed in SNr astrocytes was examined by electrophysiological study in mouse brain slice and behavior analysis of SNr astrocyte-specific D1R-conditional knockout (D1R-CKO) mouse. The electrophysiological approach have yet given clues for the physiological function. A trouble on establishment of D1R-CKO mouse happened in the delivery process, then this approach could not be performed. The work for anti-D1R antibody immunoreactivity of acutely dissociated adult astrocyte was published on Feb., 2017.

研究分野：神経科学

キーワード：D1ドーパミン受容体 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

中脳黒質網様部(SNr)は大部分が高頻度自発発火する GABA ニューロンからなり、遠方の中脳(上丘)・間脳(視床)・脳幹を抑制している(Graybiel ら, Science, 1994; Hikosaka ら, Physiol Rev, 2000; Middleton & Strick, Brain Res Rev, 2000)。また Collateral に軸索を伸ばしており、黒質緻密部(SNc)ドーパミン(DA)ニューロンの SNr 領域の樹状突起に抑制性のシナプスを作っている(Hajos & Greenfield, Brain Res, 1994; Henny ら, Nat Neurosci, 2012)。一方 SNc は報酬系に重要な部位であり(Schultz ら, Science, 1997)、運動機能障害であるパーキンソン病にも重要な部位である(Lees ら, Lancet, 2009)。SNcDA ニューロンは近接する SNr に樹状突起を深く伸ばしており(Gonzalez- Hernandez & Rodriguez, J Comp Neurol, 2000)、DA を樹状突起放出することが知られているが(Bjorklund & Lindvall, Brain Res, 1975; Geffen ら, Nature, 1976; Nieoullon ら, Nature, 1977)、その標的となる要素については、特に SNr に投射している D1 受容体を有する線条体中型有棘性細胞(medium spiny neuron; MSN)の軸索および軸索終末や、SNr に散在している D2 受容体を発現している DA ニューロンが候補として挙げられる。

しかし、SNr を含む脳切片を D1 受容体抗体で免疫染色を行うと、D1 受容体は SNr に一様に発現しており(岩手大・山本 & 山田)、D2 受容体は SNcDA ニューロンの分布とほぼ一致する。SNr 組織レベルで DA 受容体遺伝子(D1 mRNA, D2 mRNA, D3 mRNA, D4 mRNA, D5 mRNA)の発現解析を行うと特に D1 mRNA と D2 mRNA が D3 ~ D5 mRNA よりも多く発現している。特に D1 受容体に関して、高密度な免疫染色像および D1 受容体遺伝子が検出されていることから、何らかの D1 受容体を発現している細胞種が存在すると推測された。

当初、SNr から単離した細胞のドーパミン受容体遺伝子発現解析(Single cell real time RT-PCR 法)を行っていたが、作業効率の低さから D1 受容体を発現している細胞要素の同定に至らず、作業効率を上げるために福島県立医科大学・小林和人先生が開発された D1 受容体プロモーターによって YFP を発現するマウス(D1-YFP マウス)の利用に至った。

実際に D1-YFP マウスの SNr を含む切片、また線条体を含む切片から、D1 受容体の免疫染色像と一致する形で強烈な YFP 蛍光を検出することができたため、D1-YFP マウスの SNr から細胞を単離して、D1 受容体を発現している細胞の同定を進めることにした。

コントロールとして、線条体、大脳皮質から細胞を単離して、SNr と比較した。ニューロンにおける D1-YFP 発現は主に線条体から検出された。SNr ニューロンの多くは神経終末と考えられる大きさを持つ点状の YFP シグナルを持っていた。驚いたのは SNr ではニュー

ロンとは形態の異なる細胞種から YFP シグナルを検出した。大脳皮質の細胞の多くはどれも自家蛍光レベルの蛍光強度、または非常に弱い YFP シグナルを有していた。

この SNr の非ニューロン細胞は形態から、グリア細胞であろうと考えられた。グリア細胞は、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、マイクログリアに大別されるが、あまり深く考えずにアストロサイトの可能性を確かめるために、抗 D1 受容体抗体と抗 GFAP(glial fibrillary acidic protein)抗体を用いて二重免疫染色を野生型マウスの単離細胞にて行った。

D1-YFP マウスの実験と同様に、線条体と大脳皮質をコントロールとして、SNr と比較した。SNr では、ニューロンの大部分はほとんど D1 受容体は発現しておらず、発現していたとしてもわずかであろうと考えられた。大脳皮質でも同様の結果であり、D1 受容体の発現している線条体では確かにポピュレーションとして半分程度のニューロンが D1 受容体陽性となった。線条体で D1 受容体が発現していないと考えられるポピュレーションの蛍光強度と SNr の蛍光強度を比較すると、わずかに SNr の方が蛍光強度が大きくなるのは、D1 受容体をわずかに発現している SNr ニューロンがいる可能性や D1 受容体陽性 MSN の神経終末を拾ってしまっている可能性が考えられた。一方、GFAP 陽性アストロサイトについて、D1 受容体発現を確認すると、SNr では大部分はニューロンよりも発現しており、強い蛍光強度を示すものから弱い蛍光強度を示すものまで一様に分布していることが分かった。大脳皮質ではニューロンと同様な分布パターンを示した。線条体にも D1 受容体を発現しているアストロサイトが確認されたが、SNr と分布パターンが異なっており、強い蛍光強度を示す群と発現していないと考えられる弱い蛍光強度を示す群に二分された。

これらの結果から、脳スライスの D1 受容体免疫染色で SNr に確認された高密度でベタな染色像には、線条体から SNr に投射する神経の軸索や軸索終末に加えて、グリア細胞としてアストロサイトの関与が示唆された。SNcDA ニューロンの樹状突起から放出される DA を SNr アストロサイトが受け取ることにより、何らかの機能を発揮しているであろう事が推測された。

2. 研究の目的

ドーパミン(DA)は運動や学習など生体で重要な役割を担っている物質である。運動制御に重要な大脳基底核の出力部を担う中脳黒質網様部(SNr)のアストロサイトに D1 ドーパミン受容体が発現していることを見出した。従って SNr アストロサイトは、近接する黒質緻密部(SNc)のドーパミン(DA)ニューロンから樹状突起放出される DA の標的細胞と

して機能する可能性がある。SNr は高頻度自発発火する GABA ニューロンで構成されており、その周辺にアストロサイトが存在していることを考えると「SNcDA ニューロン(樹状突起)-SNr アストロサイト-SNrGABA ニューロン」という回路が想定される。そこでマウス脳スライスを用いて、各種阻害剤存在下で視床下核(STN)を電氣的に刺激し、SNcDA ニューロンの樹状突起から DA が放出された状態を作り、SNrGABA ニューロンからユニットレコーディング(単一細胞外記録)を行うことで、自発発火頻度の解析を行う。また SNr は大脳基底核の出力部に相当するので運動制御に何らかの支障をきたすと考えられる。そこで Cre-loxP システムを用いて、SNr アストロサイトの D1 受容体コンベンショナルノックアウトマウスを作製し、種々の行動実験を行い、マウスの運動を解析する。以上、脳組織レベルでの検証と、動物の行動レベルでの検証を行い、黒質のニューロン-グリア相関を明らかにし、SNr アストロサイトに発現している D1 受容体の生理的意義を探る。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的アプローチ

STN は黒質領域に投射しており(Kita & Kitai, J Comp Neurol,1987)、STN 刺激により黒質領域の DA ニューロンの樹状突起から DA 放出がドーパミントランスポーター(DAT)の逆回転により引き起こされ、DA ニューロンは DA により自己抑制し、その抑制は D2 受容体阻害剤で消失することが知られている(Falkenburger ら, Science,2001)。しかし同様の実験系で SNrGABA ニューロンについて調べた報告はない。

そこで STN と SNr の回路が保存された脳スライス(parasagittal section)を作製し、刺激装置に接続した白金電極で STN を刺激し(10 μ A ~ 1mA 通電;Falkenburger ら, Science,2001)、SNr で DA 樹状突起放出が行われる条件を、カーボンナノチューブを充填したガラス電極を用い、大きな陽電位を加えた時の DA 酸化電流を検出することで確認する。

また SNcDA ニューロンの自発発火(3Hz 程度)が抑制されるかどうか確認する。さらに DAT 阻害剤(GBR12935)や D2 受容体阻害剤(Sulpiride)で自己抑制がなくなるかどうかテストする。

もし実際に樹状突起放出されたドーパミンをアストロサイトが受け取るのであれば、SNrGABA ニューロンは高頻度自発発火に何らかの影響を与えるのではないかと考えられる。次に Falkenburger らの方法に倣いイオンチャンネル共役型グルタミン酸受容体阻害剤(DNQX, AP-5)に加えて、GABA 受容体阻害剤(Bicuculline, SCH50911, GABAzine)存在下で STN を刺激し、黒質でユニットレコーディングを行い、SNrGABA ニューロンの高頻度自

発発火(40Hz 以上)を指標に検討する。また SNr アストロサイトのプロセスに発現している D1 受容体を D1 受容体阻害剤(SCH23390)により阻害した状態で樹状突起放出されたドーパミンの効果がキャンセルされるか実験を行う。

(2) D1 受容体コンディショナルノックアウトマウスによる行動解析によるアプローチ
D1 受容体コンベンショナルノックアウトマウスは本研究室で飼養しているが、全身性に D1 受容体がノックアウトされるので、Cre-loxP システムを用いて D1 受容体 conditional knockout (D1-CKO)マウスを作製する。海外機関 Knockout Mouse Project (KOMP)より D1-flox マウスの精子を購入し、D1-flox マウスを人工授精(受託業者に委託)により樹立しておく。Cre リコンビナーゼを組み込んだアストロサイト指向性アデノ随伴ウイルス(AAV-GFAP-Cre)により knockout する。

脳定位固定装置を用いて SNr に AAV-GFAP-Cre を微量注入し、D1 遺伝子破壊を行う。リアルタイム RT-PCR 法により D1 mRNA が遺伝子レベルで抑制されていることを、また免疫染色により D1 受容体がタンパクレベルで発現抑制されていることを確認し、確実に行動実験に使用できる AAV 注入後の経過日数を決定する。以上の条件を確定した後、AAV を注入して作製した D1-CKO マウスと、コントロールとして AAV の代わりに PBS を注入した同腹のマウスを行動実験に使用する。行動実験終了後、固定を行い、組織レベルで D1 受容体がノックダウンされていることを確認する。

運動制御に重要な大脳基底核の出力部である SNrGABA ニューロンの神経活動が制御されると考えられるので、以下のテストを行う。

オープンフィールドテスト：運動量に変化があるかどうか解析を行う。また探索性や不安性の判定にも使用されるテストであることを考慮し、ビデオ解析を行う。

ロータロッドテスト：協調運動に変化があるかどうか解析を行う。筋力などが関係する要素であることを考慮し、ビデオ解析を行う。

ポールテスト：錐体外路系運動障害があるか判定するために解析を行う。

その他：Beam walking test, Elevated plus maze test, Forced swim test, Light-Dark exploration など(Taylor ら, Behav Brain Res,2010; Buccafusco 編集, Methods of Behavior Analysis in Neuroscience 2ed., 2009)も追加して行う。パーキンソン病では運動障害の他に、非運動症状として睡眠障害、嗅覚異常、味覚消失などが知られているので、運動制御以外の評価についても検討を行う。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的アプローチ

H26年度 STN 刺激によってドーパミン放出を確実に起こしているかどうか検出するカーボンナノチューブを使用した微小ドーパミン電極を安定して作成することができなかった為、H27年度に既製品ケミカルランプによる検出方法に切り替えた。しかし製品の部品調達の影響でH27年度の後半で納入されることになってしまった。この為、期間内に研究を終えることができず、期間延長を行った。また予定していたユニットレコーディング用のチェンバー作製に時間がかかったこと、研究室レイアウトの関係で装置類の移設が行われたこと、ノイズ源の特定に時間を要したことなどが延長を行った理由に挙げられる。実際の実験結果については、薬理実験に到達していないため、公表を差し控える。

(2) D1 受容体コンディショナルノックアウトマウスによる行動解析によるアプローチ

以下2点の不測の事態により、D1 ドーパミン受容体のコンディショナルノックアウトマウスの作成ができなかった。所属機関付属動物実験施設が取り壊し、もしくは段階的増改築を行うという話があり、認可された場合はH27年度から工事が開始する旨、通達があったため、予定していた凍結精子の購入のタイミングが取れなかった。H26年度に購入した凍結精子の移送中に液体窒素がタンクより漏出し、サンプルが室温に晒されてしまい人工授精に使用できなくなった。H26年度に生じた想定外の凍結精子融解に関する事案については、業者と協議した結果、精子を再度購入した時にかかる費用は返金するとの回答を得た。しかし先立って、使用できる研究費がなく、多額を私費から支払う必要があったため、実施することができなかった。この点については、今後研究再開時に取り戻せるように確認を行った。

(3) 科研費応募当時の実験結果に関する疑義に関する対応

H27年度後半に、コンディショナルノックアウトマウスを作るよりも先に、本当に SNr アストロサイトに D1 受容体が発現しているのか、それとも神経終末に発現している D1 受容体をアストロサイトが貪食したために D1 受容体を発現しているように見えているだけなのか確認するように求められた。この為、免疫染色による追加実験や電顕レベルの実験が必要となった。電顕レベルに耐えうる固定方法の習得から対応しなければならなかった。しかし、さらに以下に示す事案に伴い、中断をせざるを得ない状況となった。本実績報告書の当初の背景に書いた内容の論文をある期日までに仕上げる必要が生じたが、これについてはアクセプトされ2017年2月に公開された。

(4) D1 受容体の対照として、D2 受容体の免疫染色も行った結果、論文化していないので詳

細は記述できないが、SNr/線条体/大脳皮質を比較すると、D1 受容体とはまた異なる分布パターンを呈した。

(5) SNrGABA ニューロンにおける分子Xを対象にした免疫染色結果、2割程度でサブポピュレーションが存在すると示唆される結果が得られた。SNrGABA ニューロンに関しては、本研究課題で自発発火頻度を指標にして研究を進めることになっているが、サブポピュレーションの存在に関しては、今後、解析過程で考慮する必要が生じた。

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 4件)

[査読有り] Nagatomo K, Suga S, Saitoh M, Kogawa M, Kobayashi K, Yamamoto Y, Yamada K.

Dopamine D1 Receptor Immunoreactivity on Fine Processes of GFAP-Positive Astrocytes in the Substantia Nigra Pars Reticulata of Adult Mouse.

Front Neuroanat, 2017 Feb 1.

DOI: 10.3389/fnana.2017.00003.

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2017.00003/full>

[査読有り] Sasaki A, Nagatomo K, Ono K, Yamamoto T, Otsuka Y, Teshima T, Yamada K.

Uptake of a fluorescent L-glucose derivative 2-NBDLG into three-dimensionally accumulating insulinoma cells in a phloretin-sensitive manner.

Hum Cell, 29:37-45, 2016.

DOI: 10.1007/s13577-015-0125-3.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13577-015-0125-3>

[査読有り] Kurogi M, Kawai Y, Nagatomo K, Tateyama M, Kubo Y, Saitoh O. Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons.

Chem Senses, 40: 27-46, 2015.

DOI: 10.1093/chemse/bju057.

<https://academic.oup.com/chemse/article/40/1/27/2908169/Auto-oxidation-Product-s-of-Epigallocatechin?cited-by=yes&legid=>

chemse;bj057v1

[査読有り] Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N.

Singular localization of sodium channel 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum.

Nat Commun, 5: 5525, 2014.

DOI: 10.1038/ncomms6525.

<https://www.nature.com/articles/ncomms6525>

[学会発表](計 6件)

長友 克広、小野 幸輝、萱場 広之、山田 勝也

細胞状態の悪化を鋭敏に検出する蛍光 L-グルコース誘導体 2-TRLG; ヨウ化プロピジウム(PI)との比較

第 48 回東北生理談話会

2016 年 10 月 15 日、岩手医科大学付属病院循環器医療センター 8 階研修室(岩手県・盛岡市)

第 47 回東北生理談話会

長友 克広、大塚 祐治、山本 敏弘、豊島 正、山田 勝也

蛍光標識グルコース誘導体を用いたヒト糞便由来腸内細菌のイメージング

Imaging of human fecal enteric bacteria by fluorescently labeled glucose derivatives.

第 93 回日本生理学会大会

2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

小野 幸輝、佐々木 綾子、横山 良仁、刀 稱 亀代志、渡邊 純、古川 正仁、今井 麻智子、長友 克広、山本 敏弘、大塚 祐治、豊島 正、黒瀬 顕、水沼 英樹、山田 勝也

蛍光 L-グルコース誘導体 fLG によるがん細胞可視化

2015 年 10 月 31 日、弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森県・弘前市)

長友 克広、大塚 祐治、望月 雅允、山本 哲也、津田 修吾、山本 敏弘、豊島 正、山田 勝也

蛍光標識 L-グルコース誘導体による腸内細菌の細胞状態評価

Evaluation of enteric bacterial cell condition by a fluorescent-labeling L-glucose derivative

第 19 回腸内細菌学会

2015 年 6 月 18 日、北里大学薬学部(東京都・港区)

山田 勝也、長友 克広

大脳基底核におけるアストロサイトの領域特異的ドーパミン受容体発現

第 92 回日本生理学会大会

2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

長友 克広、菅 世智子、山本 欣郎、山田 勝也

成熟マウス脳アストロサイトの領域特異的ドーパミン受容体発現 Area-specific dopamine receptor expression in adult mouse astrocytes

第 37 回日本神経科学大会

2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[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

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長友 克広 (NAGATOMO KATSUHIRO)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30542568

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし