

「脳の機能発達と学習のメカニズムの解明」

平成 17 年度採択研究代表者

小林 和人

(福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所 教授)

「ドーパミンによる行動の発達と発現の制御機構」

1. 研究実施の概要

中脳ドーパミン神経系は、発育期の脳に影響し、行動の学習や発達制御に極めて重要な役割を担っている。また、この回路異常は統合失調症や注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの発達障害に結びつく。本研究プロジェクトでは、1) ドーパミン神経の形成と発達、2) ドーパミンに依存した神経回路の発達と可塑性、3) ドーパミンによる認知・情動行動の発達と制御に関する 3 つのテーマの解明に取り組んでいる。

小林グループは、独自に開発した先端的遺伝子改変技術を中心的に利用し、神経回路を構成する特定のニューロンタイプおよびドーパミン関連分子の行動発達と脳機能における役割を明らかにする。本年度は、前頭皮質ドーパミン系と関係し、視床下核を介して運動を制御する神経回路機構を明らかにした。また、イムノトキシン細胞標的法をサル脳機能研究に応用するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子発現系の開発に取り組んだ。高田グループは、イムノトキシン神経路標的法を実現するため、レンチウイルスベクター (HIV 及び SIV) のサル及びラットのニューロンへの導入効率と軸索輸送について詳細に解析した。初山グループは、線条体および前脳基底核を含むスライスから電気生理学的な解析を行い、ドーパミン D1 型受容体を介するシナプス前抑制に関与するカルシウムチャネルサブタイプを特定し、さらにソマトスタチンによるシナプス前抑制を見出した。曾良グループは、ドーパミントランスポーターが欠損したドーパミン神経伝達過剰マウスを注意欠陥多動性障害 (ADHD) の動物モデルとして用い、前頭前野皮質におけるモノアミン神経伝達の制御が ADHD の病態に関与している可能性について示した。

2. 研究実施内容

小林グループは、独自に開発した先端的遺伝子改変技術を中心的に利用し、神経回路を構成する特定のニューロンタイプおよびドーパミン関連分子の行動発達と脳機能における役割を明らかにする。本年度は、第一に、前頭皮質ドーパミン系と関係し、視床下核を介して運動を制御する神経回路機構を明らかにした。イムノトキシン細胞標的法を利用して

視床下核ニューロンを選択的に除去し、このニューロンは自発運動の抑制とドーパミン誘導性の運動促進に必須の役割を持つことを明らかにした。自発運動の抑制は主に視床下核から大脳基底核出力ニューロンへの神経路を介して調節され、ドーパミン誘導性の運動促進は視床下核から淡蒼球を介して出力ニューロンへ連絡する経路を介して制御されることを明らかにした。第二に、イムノトキシン細胞標的法をサル脳機能研究に応用するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子発現系の開発に取り組んだ。HIVに由来する非増殖型レンチウイルスベクターにイムノトキシンの標的分子であるヒトインターロイキン-2受容体 α サブユニット(IL-2R α)をコードする遺伝子を導入し、本遺伝子を効率よく発現する実験系を開発した。高田グループと共同し、この組換え体ウイルスをサル線条体へ注入し、導入遺伝子の発現パターンの解析を進める。

高田グループは、イムノトキシン細胞標的法の実現を目指して、レンチウイルスベクター(HIV及びSIV)のサル及びラットのニューロンへの導入効率と軸索輸送について詳細に解析した。具体的には、サル及びラットの線条体にGFPを発現するウイルスベクターを注入し、約3週間の生存期間の後、線条体及び線条体と神経連絡を有する淡蒼球や黒質におけるGFPのラベル様式を観察した。その結果、HIVを用いて作製したベクターの方が、SIVを用いて作製したベクターに比べて、線条体ニューロンに対する導入効率が高いことが明らかになった。また、淡蒼球や黒質における軸索終末の順行性ラベルはHIV、SIVを用いて作製したベクターのいずれでも確認されたが、特に、HIVを用いて作製したベクターをサルに注入した場合には、黒質において神経細胞体の逆行性ラベルが確認された。

初山グループは、線条体および前脳基底核を含むスライスからホールセルパッチクランプ法による電気生理学的な解析を行い、種々のカルシウムチャネルブロッカーを用いた薬理的解析を行なうことによって、興奮性および抑制性シナプス伝達機に関与するカルシウムチャネルサブタイプを特定し、さらにその生後発達変化を明らかにした。次いで、ドーパミンD1型受容体を介するシナプス前抑制とP/Qタイプカルシウムチャネルとの選択的な共役を見出した。また、興奮性および抑制性シナプス伝達に対するソマトスタチンによるシナプス前抑制機構を解析し、グルタミン酸性伝達とGABA性伝達が、異なる受容体サブタイプを介して修飾されていることを明らかにした。

曾良グループは、ドーパミントランスポーターを欠損したドーパミン神経伝達過剰マウスを注意欠陥多動性障害(ADHD)の動物モデルとして用い、前頭前野皮質におけるモノアミン神経伝達の制御がADHDの病態に関与している可能性について検討した。ドーパミントランスポーター欠損マウスにおいて移所運動量や認知機能を反映するプレパルスインヒビション(PPI)を測定し、ドーパミン神経による認知機能の制御機構を行動薬理的に解析した。ADHDの治療薬であるmethylphenidateの投与により、ドーパミントランスポーター欠損マウスの運動量は減弱し、認知機能障害の回復が認められた。これらの効果は前頭前野皮質のドーパミンの上昇を伴っており、非特異的モノアミントランスポーター阻害剤である

methylphenidate のノルエピネフリントランスポーター阻害作用によるものと推察された。これらの結果は前頭前野皮質におけるモノアミン神経伝達の制御が ADHD の病態に関与している可能性を示唆した。

3. 研究実施体制

「小林」グループ

- ①研究分担グループ長：小林 和人（福島県立医科大学、教授）
- ②研究項目：先端的な遺伝子改変技術を駆使したドーパミンによる行動の発達と制御機構の解析

「高田」グループ

- ①研究分担グループ長：高田 昌彦（東京都神経研、副参事研究員）
- ②研究項目：ドーパミンによる行動の発達と組織化のメカニズムのシステムの解析

「靱山」グループ

- ①研究分担グループ長：靱山 俊彦（生理学研究所、助教授）
- ②研究項目：ドーパミンによるシナプス伝達と可塑性の調節

「曽良」グループ

- ①研究分担グループ長：曽良 一郎（東北大学大学院、教授）
- ②研究項目：ドーパミン神経による認知機能制御の行動生理・薬理学的な評価

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

小林グループ

- Yasoshima Y, Kai N, Yoshida S, Shiosaka S, Koyama K, Kayama F, Kobayashi K. Subthalamic neurons coordinate basal ganglia function through differential neural pathways. J Neurosci 25 (34): 7743-7753 (2005).
- Pignatelli A, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O. Functional properties of dopaminergic neurones in the mouse olfactory bulb. J Physiol 564 (2): 501-514 (2005).
- Matsusaka T, Xin J, Niwa S, Kobayashi K, Akatsuka A, Hashizume H, Wang Q, Pastan I, Fogo BA, Ichikawa I. Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. J Am Soc Nephrol 16 (4): 1013-1023 (2005).
- Jomphe C, Bourque M-J, Fortin G, St-Gelais F, Okano H, Kobayashi K, Trudeau L-E. Use of TH-GFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological

studies in postnatal cell culture. J Neurosci Methods 146 (1): 1-12 (2005).

- Kobayashi K, Nagatsu T. Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited diseases. Biochem Biophys Res Commun 338 (1): 267-270 (2005).

高田グループ

- Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Takada M. Comparable GABAergic mechanisms of hippocampal seizure-like activity in post-tetanic and low-Mg²⁺ conditions. J Neurophysiol 95:2013–2019 (2006).
- Kaneda K, Tachibana Y, Imanishi M, Kita H, Shigemoto R, Nambu A, Takada M. Down-regulation of metabotropic glutamate receptor 1α in globus pallidus and substantia nigra of parkinsonian monkeys. Eur J Neurosci 22:3241–3254 (2005).
- Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Inoue T, Takada M. Input–output organization of jaw movement-related areas in monkey frontal cortex. J Comp Neurol 492:401–425 (2005).
- Kaneda K, Fujiwara-Tsukamoto Y, Isomura Y, Takada M. Region-specific modulation of electrically induced synchronous oscillations in the rat hippocampus and cerebral cortex. Neurosci Res 52:83–94 (2005).
- Miyachi S, Lu X, Inoue S, Iwasaki T, Koike S, Nambu A, Takada M. Organization of multisynaptic inputs from prefrontal cortex to primary motor cortex as revealed by retrograde transneuronal transport of rabies virus. J Neurosci 25:2547–2556 (2005).

舩山グループ

- Uchida K, Momiyama T, Okano H, Yuzaki M, Koizumi A, Mine Y, Kawase T. Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin. Neurosci Res. 52 (3): 276-286 (2005).
- Momiyama T, Zaborszky L. Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. J Neurophysiol *in press* (2006).

曾良グループ

- Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Imamura T, Sakai A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia. Neurosci Lett 376(3): 182-187 (2005).
- Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N. Haplotype association between GABA(A) receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and

- methamphetamine use disorder. *Pharmacogenomics J* 5(2): 89-95 (2005).
- Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Kishida M, Hagino Y, Hara Y, Shimada K, Yamamoto T, Sora I, Koga H, Ikeda K. Methamphetamine modulation of gene expression in the brain: analysis using customized cDNA microarray system with the mouse homologues of KIAA genes. *Brain Res Mol Brain Res* 137(1-2): 40-46 (2005).
 - Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N. The X-box binding protein 1 (XBP1) gene is not associated with methamphetamine dependence. *Neurosci Lett* 383(1-2): 194-198 (2005).
 - Ohgake S, Hashimoto K, Shimizu E, Koizumi H, Okamura N, Koike K, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Shirayama Y, Iyo M. Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis in Japanese. *Addiction Biology* 10: 145-148 (2005).
 - Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshiya Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N. Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 1-5 (2005).
 - Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujike H, Iyo M. Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132(1): 70-73 (2005).
 - Hashimoto T, Hashimoto K, Matsuzawa D, Shimizu E, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M. A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. *Am J Med Genet* 135(1): 5-9 (2005).
 - Ide S, Han W, Kasai S, Hata H, Sora I, Ikeda K. Characterization of the 3' untranslated region of the human mu-opioid receptor (MOR-1) mRNA. *Gene* 364: 139-45 (2005).
 - Wu HE, Sun HS, Terashivili M, Schwasinger E, Sora I, Scott Hall F, Uhl GR, Tseng LF. *dextro*- and *levo*-morphine attenuate opioid delta and kappa receptor agonist produced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 531(1-3): 103-107 (2006).
 - Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M. Association Between Polymorphisms in the Promoter Region of the Sialyltransferase 8B (SIAT8B) Gene and Schizophrenia. *Biol Psychiatry* *in press* (2006).
 - Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Ozaki N, Sekine Y, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Iwata N, Shen H, Iwahashi K, Itokawa M, Minami M, Satoh M, Ikeda

- K, Sora I. Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Pharmacogenomics J in press* (2006).
- Suzuki A, Nakamura K, Sekine Y, Minabe Y, Takei N, Suzuki K, Iwata Y, Kawai M, Takebayashi K, Iyo M, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Mori N. An association study between COMT gene polymorphism and methamphetamine psychotic disorder. *Psychiat Genet in press* (2006).
 - Yamashita M, Fukushima S, Shen H, Hall FS, Uhl GR, Numachi Y, Kobayashi H, Sora I. Norepinephrine transporter blockade can normalize the prepulse inhibition deficits found in dopamine transporter knockout mice. *Neuropsychopharmacology in press* (2006).
 - Kobayashi H, Hata H, Ujike H, Harano M, Inada T, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Naka M, Ide S, Ikeda K, Numachi Y, Sora I. Association analysis of delta-opioid receptor gene polymorphisms in methamphetamine dependence/psychosis. *Am J Med Genet in press* (2006).