

「脳の機能発達と学習メカニズムの解明」  
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生体機能研究部門・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、ドーパミンによる行動の発達と制御の神経機構およびドーパミン神経とそれに依存する神経回路の形成と発達の分子機構の解明に取り組んできた。特に、先端的な遺伝子改変技術を中心に利用し、げっ歯類から霊長類(サル)をモデルにした研究に発展させることを目的とし、プロジェクトを推進した。

小林グループは、イムノキシン細胞標的法を中心とした遺伝子改変技術により、ドーパミン神経伝達に依存し、行動を制御する神経回路の仕組みの解明を目指し、特に、中脳ドーパミン系が主要な役割を持ち、線条体、側坐核が関与する運動や学習の制御を媒介する神経回路の機構の解明に取り組んだ。また、イムノキシン細胞標的法を発展させ、特定ニューロンタイプの神経伝達を一過性に抑制するための新しい遺伝子改変技術(イムノテタヌストキシン伝達抑制法)を開発し、線条体投射路の機能解析に応用した。さらに、霊長類の脳神経回路の研究に発展させるために、逆行性輸送を示す新規レンチウイルスベクターとこれを応用した特定神経路の機能解析技術の開発を行った。高田グループは、宮地グループと共同して、サル脳への遺伝子導入に適した逆行性感染型レンチウイルスベクターの開発に大きな役割を果たすとともに、ラット・マウスを用いた実験系を導入して、注意欠如多動性障害(ADHD)の特徴である衝動的行動においてドーパミン神経伝達がどのような役割を果たすかを検討した。初山グループは、ドーパミン受容体サブタイプノックアウトマウス線条体のシナプス伝達解析を行い、刺激頻度依存的なシナプス伝達抑制機構におけるドーパミン受容体の機能を解析した。また、新たな試みとして、最近バイオセンサーとして注目されているカーボンナノチューブを用いたドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離検出法を導入した。那波グループは、ドーパミン神経栄養因子である上皮成長因子とニューレグリン1の *in vivo* 作用をマウスとカニクイザルで解析した。曾良グループは、ドーパミントランスポーターの欠損によりドーパミン神経伝達の亢進したマウスを ADHD の動物モデルとして解析し、脳由来神経栄養因子が DAT 欠損マウスの前頭前野皮質で特異的に減少していることを見出し、ADHD の病態メカニズムに神経回路の発達遅延の関与が示唆された。

## 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、ドーパミン依存性の行動であるオペラント条件づけにおける線条体投射路の行動生理学的な役割を明らかにするために、ドーパミン D1受容体 (D1R) を含有する線条体一黒質ニューロンの除去をイムノキシン細胞標的法により誘導し、視覚弁別レバー押し課題を用いて行動解析を行った。線条体一黒質路ニューロンの除去は、弁別課題の正答率に影響しないものの、反応時間を有意に遅延し、本ニューロンは、学習に依存した運動の応答に必須の役割を持つことが示唆された。また、ドーパミン D2 受容体 (D2R) を含有する線条体一淡蒼ニューロンの役割を明らかにするために、遺伝子改変ラットを作製し、イムノキシン細胞標的法による標的ニューロンの除去を誘導した。これらのラットを用いて視覚弁別レバー押し課題を用いた行動解析を行う。第二に、特定のニューロンの神経伝達を一過性に抑制する技術であるイムノテタヌトキシン伝達抑制法を開発した。ヒトインターロイキン-2 受容体  $\alpha$  サブユニット(IL-2R  $\alpha$ ) を認識する抗体領域に破傷風菌毒素の軽鎖ドメインを連結した融合タンパク質(イムノテタヌトキシン)を遺伝子改変マウスに投与することによって、一過性の行動変化と軽鎖ドメインによる基質タンパク質の分解に加え、特定の脳領域における神経伝達物質の遊離が抑制されることを証明した。これらの結果から、イムノテタヌトキシンは、標的ニューロンの神経伝達を一過性に抑制するために利用できることを明らかにした。第三に、脳内に逆行性輸送を介して効率的に遺伝子導入を行う自己不活型レンチウイルスベクター(RV-G/HIV-1 ベクター)を用いて、イムノキシン標的分子である IL-2R  $\alpha$  の遺伝子を導入するベクターを作製した。このベクターをマウス線条体に注入し、さまざまな入力神経路を、IL-2R  $\alpha$  遺伝子で標識することに成功し、視床束傍核にイムノキシンを注入することにより、視床一線条体路を効率よく除去できることを示した。この技術は、細胞標的法を応用し、サル脳機能の研究に実用化するための基盤となる。

高田グループは、宮地グループと共同して、サル脳への遺伝子導入に適した逆行性感染型レンチウイルスベクターの開発に大きな役割を果たすと同時に、ナビゲーションシステムを応用し、サル脳内への正確かつ再現性の高いベクター注入法を確立した。この技術開発は、今後のウイルスベクターを用いた遺伝子導入およびイムノキシンなどの薬剤の局所注入において不可欠で、かつ汎用性の高いものである。また、ラット・マウスを用いた実験系を導入して、ADHD の特徴である衝動的行動においてドーパミン神経伝達がどのような役割を果たすかを検討した。特に、ドーパミン D5 受容体のノックアウトマウスを用いた研究成果は、ADHD の病態生理を明らかにするとともに、これまで不明であった覚醒剤に対する感作機序や薬物濫用・薬物中毒の本態に迫るものであり、きわめて独創的かつ画期的である。

宮地グループは、高田グループと共同してサル脳内への正確かつ再現性の高いベクター注入法の確立に取り組み、この手法の一つの応用として、アデノおよびレンチウイルスベクターを用いて黒質ドーパミン細胞にカルビンディンの強制発現を誘導した。カルビンディンの強制発現は MPTP の全身投与によるドーパミン細胞の細胞死およびパーキンソン病様の症状を抑制することが可能なことを示した。

初山グループは、ドーパミン受容体サブタイプノックアウトマウス脳のスライス標本を用いたパッチクランプ解析により、線条体における刺激頻度依存的なGABA遊離抑制におけるドーパミンD2型受容体の関与、およびD2型受容体とN型カルシウムチャネルとの機能的共役を見出した。また、新たなバイオセンサー素材として近年注目されているカーボンナノチューブを電気化学的電極素材として導入し、ラット中脳スライス標本のドーパミン性ニューロンからのドーパミン遊離検出を開始し、ドーパミン性ニューロン細胞体からの自発性ドーパミン遊離を酸化・還元電流として記録することに成功した。

那波グループは、これまで新生仔ラットにEGFを皮下投与し、ドーパミン神経発達と行動学的変化を解析してきた。EGF投与は一過性に中脳ドーパミン神経発達を促進し、チロシン水酸化酵素量を上昇させるが、どのように成長後の認知機能異常に結びつくかは不明のままであった。今回、中脳ドーパミン神経の下流神経回路である基底核 GABA 神経系への影響を評価したところ、淡蒼球での発達亢進が観察され、認知行動変化の一部を合理的に説明できる結果となった。このEGFに加えて、もう一つの類縁体であるニューレグリン-1のドーパミン神経に対する栄養作用も *in vivo* で評価した。ニューレグリン-1の皮下投与は、中脳ドーパミン神経におけるチロシン水酸化酵素のリン酸化を促進し、酵素活性の上昇を誘導した。EGFと同様に、ドーパミン神経への作用が成長後の認知行動変化に結びついていることが判明した。今年度、新規に始めた shRNAを用いたドーパミン受容体のノックアウトレンチベクターについては、5種類の D2 受容体のウイルスの作製にこぎつけ、現在、ノックダウン活性を比較検討中である。

曾良グループは、ドーパミンの過剰な神経伝達をもたらす間接作動薬に関連し、ドーパミントランスポーター(DAT)欠損マウスにおいて変化する遺伝子の解析を行ってきた。DAT欠損マウスは運動量や衝動性が亢進していることから ADHD の動物モデルの一つである。ドーパミン間接作動薬によって発現が変化する脳由来神経栄養因子(BDNF)をDAT欠損マウスにおいて測定したところ、前頭前野皮質での BDNF 発現は野生型にくらべて半減していることを見いだした。さらに、ストレスなどで BDNF の減少が観察される海馬やドーパミン神経が多数投射する線条体では BDNF の変化はないことを確認した。これらの結果により ADHD の病態メカニズムに神経回路の発達遅延の関与が示唆された。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 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

#### (2) 高田グループ

①研究分担グループ長: 高田 昌彦((財)東京都医学研究機構 東京都神経科学総合研究所 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

(3)宮地グループ

①研究分担グループ長:宮地 重弘(京都大学霊長類研究所 准教授)

②研究項目

サルを用いた行動発達の神経機構の解析

(4)初山グループ

①研究分担グループ長:初山 俊彦(東京慈恵会医科大学 教授)

②研究項目

線条体および前脳基底核シナプス伝達におけるドーパミン受容体の機能に関する電気生理学的解析

(5)那波グループ

①研究分担グループ長:那波 宏之(新潟大学 教授)

②研究項目

神経栄養因子によるドーパミン神経の発達と活動性の制御

(6)曾良グループ

①研究分担グループ長:曾良 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・薬理的な評価

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

小林グループ

1. Kobayashi T, Kai N, Kobayashi K, Fujiwara T, Akagawa I, Onda M, Kobayashi K. Transient silencing of synaptic transmitter release from specific neuronal types by recombinant tetanus toxin light chain fused to antibody variable region. **J Neurosci Methods** 175 (1) 125-132 (2008).
2. Stewart AL, Anderson RB, Kobayashi K, Young HM. Effects on NGF, NT-3, and GDNF family members on cell migration and neurite outgrowth from pelvic ganglia in embryonic and newborn mice. **BMC - Dev Biol** 8:73 (2008).
3. Hao M, Anderson RB, Kobayashi K, Whittington PM, Young HM. The migratory behavior of immature enteric neurons. **Dev Neurobiol** 69 (1) 22-35 (2009).
4. Cooper MA, Kobayashi K, Zhou R. Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending

- midbrain dopaminergic pathways. **Dev Neurobiol** 69 (1) 36–46 (2009).
5. Masuda T, Kai N, Sakuma C, Kobayashi K, Koga H, Yaginuma H. Laser capture microdissection and cDNA array analysis for identification of mouse KIAA/FLJ genes differentially expressed in the embryonic dorsal spinal cord. **Brain Res** 1249 61–67 (2009).
  6. Sheela Rani CS, Elango N, Wang S-S, Kobayashi K, Strong R. Identification of an activator protein-1-like Sequence as the glucocorticoid response element in the rat tyrosine hydroxylase gene. **Mol Pharmacol** 75 (3) 589–598 (2009).

#### 高田グループ

7. Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Takada M. Transdural Doppler ultrasonography monitors cerebral blood flow changes in relation to motor tasks. **Cereb Cortex** (in press).
8. Tachibana Y, Kita H, Chiken S, Takada M, Nambu A. Motor cortical control of internal pallidal activity through glutamatergic and GABAergic inputs in awake monkeys. **Eur J Neurosci**, 27, 238–253 (2008).

#### 那波グループ

9. Ishizuka Y, Kakiya N, Nawa H, Takei N. Leucine induces phosphorylation and activation of p70S6K in cortical neurons via the system L amino acid transporter. **J Neurochem** 106(2): 934–942 (2008).
10. Iwakura Y, Nawa H, Sora I, Chao MV. Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. **J Biol Chem** 283(23): 15799–15806 (2008).
11. Tsuda N, Mizuno M, Yamanaka T, Komurasaki T, Yoshimoto M, Nawa H. Common behavioral influences of the ErbB1 ligands transforming growth factor alpha and epiregulin administered to mouse neonates. **Brain Dev** 30(8): 533–543 (2008).
12. Abe Y, Nawa H, Namba H. Activation of epidermal growth factor receptor ErbB1 attenuates inhibitory synaptic development in mouse dentate gyrus. **Neurosci Res** (in press).
13. Namba H, Zheng Y, Abe Y, Nawa H. Epidermal growth factor administered in the periphery influences excitatory synaptic inputs onto midbrain dopaminergic neurons in postnatal mice. **Neuroscience** (in press).
14. Ishiguro H, Koga M, Horiuchi Y, Noguchi E, Morikawa M, Suzuki Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Supportive evidence for reduced expression of GNB1L in schizophrenia. **Schizophr Bull** (in press).

#### 曾良グループ

15. Kishimoto M, Ujike H, Motohashi Y, Tanaka Y, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Hori T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S.

- The dysbindin gene (*DTNBPI*) is associated with methamphetamine psychosis. **Biol Psychiatry** 15;63(2):191–196 (2008)
16. Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. The glycine transporter 1 gene (GLYT1) is associated with methamphetamine–use disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 5;147(1):54–8 (2008)
  17. Uhl GR, Drgon T, Liu QR, Johnson C, Walther D, Ujike H, Komiyama T, Harano M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iyo M, Iwata N, Yamada M, Sora I, Chen CK, Liu HC, Lin SK. Genome–wide association for methamphetamine dependence: convergent results from two samples. **Arch Gen Psychiatry** 65(3):345–355 (2008)
  18. Otani K, Ujike H, Sakai A, Okahisa Y, Kotaka T, Inada T, Harano M, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Reduced CYP2D6 activity is a negative risk factor for methamphetamine dependence. **Neurosci Lett** 434(1):88–92 (2008)
  19. Ito M, Numachi Y, Ohara A, Sora I. Hyperthermic and lethal effects of methamphetamine: Roles of dopamine D1 and D2 receptors. **Neuroscience Lett** 27;438(3):327–9 (2008)
  20. Asada M, Ebihara S, Numachi Y, Okazaki T, Yamada S, Ikeda K, Yasuda H, Sora I, Arai H. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter. **Int J Cancer** 1;123(3):511–8 (2008)
  21. Kishimoto M, Ujike H, Okahisa Y, Kotaka T, Takaki M, Kodama M, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S. The Frizzled 3 Gene Is Associated with Methamphetamine Psychosis in Japanese Population. **Behavioral and Brain Functions** 15;4(1):37(2008)
  22. Perona MT, Waters S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, Murphy DL, Caron M, Uhl GR. Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. **Behav Pharmacol** 19(5–6):566–74(2008)
  23. Hashimoto T, Hashimoto K, Miyatake R, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M. Association study between polymorphisms in glutathione–related genes and methamphetamine use disorder in a Japanese population. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(7):1040–6(2008)

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）