

「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的に利用し、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、側坐核が関与する道具的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。第一に、線条体—黒質路と線条体—淡蒼球路は、刺激弁別課題の実行において異なる役割を担うことを明らかにした。第二に、トランスジェニックラットを用いて、線条体コリン作動性介在ニューロンの逆転学習における役割を明らかにした。第三に、融合糖タンパク質を用いてシュードタイプ化した高頻度逆行性輸送ベクターを開発し、これを応用して皮質—線条体路と視床—線条体路を選択的に遮断した動物モデルを作製し、これらの神経路の行動生理学的な役割の研究を行った。高田グループは、小林グループと連携して、優れた逆行性輸送能を有するレンチウイルスベクターを開発し、それを用いてサル脳への遺伝子導入を行うことにより、イムノキシン神経路標的法を確立した。また、小林グループと共同して、黒質緻密部や腹側被蓋野から大脳基底核や前頭前野へのドーパミン神経伝達が果たす機能的役割を、マウスやラットを用いて行動学的に解析した。靱山グループは、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、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開発した。さらに、中脳シナプスにおけるプロスタグランジンとドーパミンとの相互作用の解析を行なった。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受容体の脳内分布を解析し、ドーパミン放出との関連を実証した。曾良グループは、ドーパミントランスポーター (DAT) の欠損によりドーパミン神経伝達の亢進したマウスを AD/HD および統合失調症の動物モデルとして解析した。DAT 欠損マウスモデルにおいて前頭前野領域で脳由来神経栄養因子が特異的に減少していることを見出し、前頭前野領域での神経細胞の発達を解析した。

§ 2. 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 (京都大学、教授)

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 (H18 年度～H20 年度)

① 研究分担グループ長: 宮地 重弘 (京都大学、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) 靱山グループ

① 研究分担グループ長: 靱山 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、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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、道具的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、イムノキシン細胞標的により線条体—黒質ニューロンあるいは線条体—淡蒼球ニューロンの除去を誘導し、刺激弁別課題を用いて学習の実行におけるそれぞれのニューロンの役割を解析した。ドーパミン D_1 受容体 (D_1R) 遺伝子にヒトインターロイキン-2 受容体 α サブユニット ($IL-2R\alpha$) をノックインした変異マウスを用いて、脳内へのイムノキシン注入により線条体—黒質路ニューロンの選択的除去を誘導した。この変異マウスでは、課題の正答率に影響はないものの、正答反応に要する時間が有意に増加した。線条体—黒質ニューロンは、学習に依存した反応の促進に必須の役割を持つことが示唆された。また、ドーパミン D_2 受容体 (D_2R) 遺伝子プロモーターの制御下に $IL-2R\alpha$ を発現するBACトランスジェニックラットを作製し、イムノキシン注入によって線条体—淡蒼ニューロンの選択的除去を誘導した。このトランスジェニックラットでは聴覚依存性の弁別課題において、正答率の低下を示したが、反応時間に変化は認められなかった。を用いた行動解析を行う。線条体—淡蒼球ニューロンは、学習に依存した行動選択に重要な役割を持つことが示唆された。第二に、逆転学習における線条体コリン作動性介在ニューロンの行動生理学的な役割について検討した。コリンアセチル転移酵素 (ChAT) 遺伝子プロモーターの制御下に $IL-2R\alpha$ を発現するBACトランスジェニックラットを作製し、イムノキシン注入によって線条体コリン作動性介在ニューロンの選択的除去を誘導した。このトランスジェニックラットでは、空間認識に依存したT字迷路課題において、オリジナルの学習は正常に獲得したが、逆転学習の獲得が増強を示すことが明らかとなった。線条体コリン作動性ニューロンは、行動のスイッチを抑制するように機能していることが示唆された。第三に、融合糖タンパク質を用いてシェードタイプ化することにより、脳内で高頻度の逆行性輸送を示すレンチウイルスベクター (FuG-B ベクター) を開発した(特許出願)。 $IL-2R\alpha$ 遺伝子を持つ FuG-B 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に $IL-2R\alpha$ の発現を誘導した。大脳皮質領野あるいは視床東傍核にイムノキシンを注入することにより、皮質—線条体路あるいは視床—線条体路を選択的に効率よく除去することに成功した。これらの動物は、線条体への入力経路の行動生理学的な役割の解明を進めるための有益なモデルを提供する。

高田グループは、小林グループと連携して、優れた逆行性輸送能を有するレンチウイルスベクターを開発し、それを用いてサル脳への遺伝子導入を行うことにより、イムノキシン神経路標的法を確立した。具体的には、サルの線条体に $IL-2R\alpha$ を発現する改変レンチウイルスベクターを注

入し、逆行性輸送を介して黒質ドーパミンニューロンに IL-2R α が発現することを確認したのち、このようなサル黒質にイムノキシンを注入し、線条体に投射するドーパミンニューロンのみを選択的に除去することに成功した。この技術を利用して、現在、黒質緻密部あるいは腹側被蓋野から前頭前野に投射するドーパミン神経路を選択的に除去したサルを作製し、この神経路が報酬に基づく強化学習にどのように関与しているかを解析するための実験システムを構築している。また、小林グループと共同して、黒質緻密部や腹側被蓋野から大脳基底核や前頭前野へのドーパミン神経伝達が果たす機能的役割を、マウスやラットを用いて行動学的に解析した。特に、D2 タイプドーパミン受容体の関連薬物により側坐核の core 領域と shell 領域へのドーパミン神経伝達を個別に制御したラットを用いた研究では、遅延付き報酬選択課題の遂行過程において、core 領域と shell 領域がそれぞれ異なる情報を取り扱っていることを明らかにした。この成果は、側坐核へのドーパミン入力が報酬に基づく行動選択に深く関与していることを示しており、注意欠陥多動性障害の病態生理の本質に迫る、きわめて独創的かつ画期的なものである。

梶山グループは、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 型カルシウムチャン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。さらに、中脳ドーパミン性ニューロンへの GABA 性シナプス伝達が、プロスタグランジン E 受容体 EP1 サブタイプ活性化によって増強することを見出した。

那波グループは、中脳ドーパミン神経に対する神経栄養因子、上皮成長因子とニューレグリン-1 が誘導する認知行動変化の原因を主に探求した。上皮成長因子とニューレグリン-1 の受容体 4 種類 (ErbB1-4) の発現を *in situ hybridization* 法を用いてマウスの各発達段階で調べた^{1,2}。ErbB1 は黒質—線条体路の一部の神経に発現し、出生前後に高値を示すのに対し、ErbB4 はほぼすべてのドーパミン神経にその発現が見られ、一生持続していた。上皮成長因子の新生児投与は、結果、淡蒼球への過剰ドーパミン神経支配を引き起こし、他方、ニューレグリン-1 の新生児投与は、前頭葉での過剰神経支配を誘発することが判明した。この解剖学的知見は、*in vivo* ダイアリススによっても裏付けられた。このように末梢循環中のドーパミン神経栄養因子は、ドーパミン神経支配状況を改変することができ、認知行動発達に重大な影響を及ぼしていることを明らかにした。

曾良グループは、ドーパミン神経伝達が過剰なドーパミントランスポーター (DAT) 欠損マウスが移所運動量や衝動性が亢進していることから AD/HD の動物モデルの一つとして解析してきた。DAT 欠損マウスの前頭前野領域では脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現量が半減していることを見出され、神経細胞の発達遅延や形態形成の変化が示唆された。そこで DAT 欠損マウスの前頭前野領域において神経細胞を形態学的に解析したところ、樹状突起上の後シナプスであるスパインが野生型マウスより減少している結果が得られた。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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). DOI; 10.1124/mol.108.051219
2. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. **Neuron** 62 (2) 218-229 (2009). DOI; 10.1016/j.neuron.2009.01.033
3. Biagioli M, Pinto M, Cesselli D, Zaninello M, Lazarevic D, Simone R, Vlachouli C, Plessy C, Bertin N, Beltrami A, Kobayashi K, Gallo V, Ferrer I, Santoro C, Rivella S, Beltrami CA, Carninci P, Raviola E, Gustincich S. Unexpected expression of α - and β -globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106 (36) 15454-15459 (2009). DOI; 10.1073/pnas.0813216106
4. Hotta R, Anderson RB, Kobayashi K, Newgreen DF, Young HM. Effects of age, presence of neurons and endothelin-3 on the ability of enteric neuron precursors to colonize recipient gut. **Neurogastroenterol. Motil.** 22(3)331-e 86(2009). DOI; 10.1111/j.1365-2982.2009.01411.x
5. Kiyokage E, Pan Y, Shao Z, Kobayashi K, Szabo Y, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. **J. Neurosci.** 30 (3) 1185-1196 (2010). DOI; 10.1523/JNEUROSCI.3497-09.2010

高田グループ

1. Hatanaka N, Tokuno H, Nambu A, Takada M (2009) Transdural Doppler ultrasonography monitors cerebral blood flow changes in relation to motor tasks. *Cereb Cortex* 19:820-831. DOI; 10.1093/cercor/bhn129
2. Zheng Y, Watakabe A, Takada M, Kakita A, Namba H, Takahashi H, Yamamori T, Nawa H (2009) Expression of ErbB4 in substantia nigra dopamine neurons of monkeys and humans. *ProgNeuro-PsychopharmacolBiol Psychiat* 33:701-706. DOI; 10.1016/j.pnpbp.2009.03.021
3. Hashimoto M, Takahara D, Hirata Y, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E (2010) Motor and nonmotor projections from the cerebellum to rostrocaudally

distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques. *Eur J Neurosci* in press.

梶山グループ

1. Tanaka Y, Furuyashiki T, Momiyama T, Namba H, Mizoguchi A, Mitsumori T, Kayahara T, Shichi H, Kimura K, Matsuoka T, Nawa H, Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. **Eur. J. Neurosci.** 30 (12) 2338–2346 (2009). DOI; 10.1111/j.1460–9568.2009.07021.
2. Yoshikawa G, Momiyama T, Oya S, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. Induction of striatal neurogenesis and generation of region-specific functional mature neurons after ischemia by growth factors. **J. Neurosurg.** 2010 Mar 26. [Epub ahead of print] DOI; 10.3171/2010.2.JNS09989
3. Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davis M, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A & Sasaki T. The Pdlns(3,4)P2-phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. **Nature** in press.

那波グループ

1. Takei N, Kawamura M, Ishizuka Y, Kakiya N, Inamura N, Namba H, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor enhances the basal rate of protein synthesis by increasing active eukaryotic elongation factor 2 levels and promoting translation elongation in cortical neurons. **J Biol Chem** 284(39): 26340–26348 (2009). DOI; 10.1074/jbc.M109.023010
2. Tanaka Y, Furuyashiki T, Momiyama T, Namba H, Mizoguchi A, Mitsumori T, Kayahara T, Shichi H, Kimura K, Matsuoka T, Nawa H, Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 enhances GABA-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and regulates dopamine level in the dorsal striatum. **Eur J Neurosci** 30(12):2338–2346 (2009) DOI; 10.1111/j.1460–9568.2009.07021
3. Kato T, Abe Y, Sotoyama H, Kakita A, Kominami R, Hirokawa S, Ozaki M, Takahashi H, Nawa H. Transient exposure of neonatal mice to neuregulin-1 results in hyperdopaminergic states in adulthood: implication in neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia. **Mol Psychiatry** 2010 Feb 9 Epub DOI; 10.1038/mp.2010.10

曾良グループ

1. Kanahara N, Miyatake R, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M, Hashimoto K. Association study between the PIK4CA

- gene and methamphetamine use disorder in a Japanese population. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;150B(2):233–8 (2009) DOI; 10.1002/ajmg.b.30797
2. Ujike H, Katsu T, Okahisa Y, Takaki M, Kodama M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S. Genetic variants of D2 but not D3 or D4 dopamine receptor gene are associated with rapid onset and poor prognosis of methamphetamine psychosis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 15;33(4):625–9 (2009) DOI; 10.1016/j.pnpbp.2009.02.019
 3. Nakamura K, Sekine Y, Takei N, Iwata Y, Suzuki K, Anitha A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Ujike H, Mori N. An association study of monoamine oxidase A (MAOA) gene polymorphism in methamphetamine psychosis. **Neurosci Lett.** 15;455(2):120–3 (2009) DOI; 10.1016/j.neulet.2009.02.048
 4. Asada M, Ebihara S, Yamada S, Niu K, Okazaki T, Sora I, Arai H. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. **Neoplasia.** 11(4):408–17 (2009) DOI; 10.1593/neo.81630
 5. Okochi T, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Kinoshita Y, Kawashima K, Okumura T, Tsunoka T, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Genetic association analysis of NRG1 with methamphetamine-induced psychosis in a Japanese population. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 1;33(5):903–5 (2009) DOI; 10.1016/j.pnpbp.2009.04.016
 6. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Okochi T, Tsunoka T, Okumura T, Inada T, Ujike H, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Iwata N. A functional polymorphism in estrogen receptor alpha gene is associated with Japanese methamphetamine induced psychosis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 1;33(5):895–8 (2009) DOI; 10.1016/j.pnpbp.2009.04.008
 7. Okahisa Y, Ujike H, Kotaka T, Morita Y, Kodama M, Inada T, Yamada M, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S. Association between neuropeptide Y gene and its receptor Y1 gene and methamphetamine dependence. **Psychiatry Clin Neurosci.** 63(3):417–22 (2009) DOI; 10.1111/j.1440-1819.2009.01961.x
 8. Kotaka T, Ujike H, Okahisa Y, Takaki M, Nakata K, Kodama M, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S. G72 gene is associated with susceptibility to methamphetamine psychosis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 33(6):1046–9 (2009) DOI; 10.1016/j.pnpbp.2009.05.017
 9. Hall FS, Li XF, Randall-Thompson J, Sora I, Murphy DL, Lesch KP, Caron MG, Uhl GR. Cocaine conditioned locomotion in dopamine transporter, norepinephrine transporter and 5-HT transporter knockout mice. **Neuroscience.** 162(4):870–80(2009) DOI ;

10.1016/j.neuroscience.2009.05.058

10. Nishizawa D, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Kasai S, Ogai Y, Han W, Hasegawa J, Shimoyama N, Sora I, Hayashida M, Ikeda K (2009) Association between *KCNJ6* (*GIRK2*) Gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery. **Plos one**.16; 4(9):e7060 (2009) DOI; 10.1371/journal.pone.0007060.
11. Li B, Arime Y, Hall FS, Uhl GR, Sora I. Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knock out mice. **Eur J Pharmacol**. 25;628(1-3):104-107 (2010) DOI; 10.1016/j.ejphar.2009.11.036
12. Kishi T, Tsunoka T, Ikeda M, Kitajima T, Kawashima K, Okochi T, Okumura T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ujike H, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Iwata N. Serotonin 1A receptor gene is associated with Japanese methamphetamine-induced psychosis patients. **Neuropharmacology**. 58(2):452-456 (2010) DOI; 10.1016/j.neuropharm.2009.09.006
13. Frye CA, Sora I. Progesterone reduces hyperactivity of female and male dopamine transporter knockout mice. **Behav Brain Res**. 209(1):59-65 (2010) DOI ; 10.1016/j.bbr.2010.01.015
14. Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M, Ichikawa T, Nishida A, Tanaka Y, Furukawa A, Aikawa Y, Kuroda O, Niizato K, Izawa R, Nakamura K, Mori N, Matsuzawa D, Hashimoto K, Iyo M, Sora I, Matsushita M, Okazaki Y, Yoshikawa T, Miyata T, Itokawa M. Enhanced carbonyl stress in a supopulation of schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**. *in press*
15. Kobayashi H, Ujike H, Iwata N, Inada T, Yamada M, Sekine Y, Uchimura N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Sora I. Association analysis of the Adenosine A1 receptor gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. **Current Neuropharmacology** *in press*
16. Kobayashi H, Ujike H, Iwata N, Inada T, Yamada M, Sekine Y, Uchimura N, Iyo M, Ozaki N, Itokawa M, Sora I. Association analysis of the Tryptophan Hydroxylase 2 gene polymorphisms in patients with methamphetamine dependence/psychosis. **Current Neuropharmacology** *in press*

(4-2) 知財出願

①平成21年度特許出願件数(国内 1件)

②CREST 研究期間累積件数(国内 3件)