

ドーパミン非依存性行動制御メカニズムの解明

東京都医学総合研究所 依存性薬物プロジェクト

池田 和隆

1. 目的 背景

ドーパミンは、快情動、人格、注意など主要な精神活動や運動を制御する極めて重要な脳内物質である。ドーパミン欠乏マウスの解析は、ドーパミンシステムの機能解明において画期的な手法であるが、申請者らは、従来の条件ではドーパミンが脳に残存していることおよび真に欠乏させるとマウスが多動になるという驚くべき実験結果を得ている。そこで、真のドーパミン欠乏マウスを用いることで、ドーパミンシステムの行動制御における真の役割を解明できると考え、本研究を着想した。

本研究は、ドーパミン欠乏時の行動を制御する脳内システムを同定し、ドーパミン非依存性行動制御システムを同定することを目的とする。本研究は、パーキンソン病の病因やアカシジアの病態メカニズムの解明にも繋がると期待できる。

具体的には、以下の3つの目標を設定した。

- 1) ドーパミン欠乏による多動時の行動の特徴を明らかにする。
- 2) ドーパミン欠乏時の多動に対する定型、非定型抗精神病薬の効果を明らかにする。
- 3) ドーパミン欠乏時の行動を制御する神経伝達物質システムを同定する。

小林和人らと Palmiter らは、遺伝子組換え技術を駆使してそれぞれ独立にドーパミン欠乏マウスを作出し、このマウスが顕著な運動量低下を示すことを報告した(J Neurosci Res, 1998; Cell, 1995)。また、Palmiter らはL-ドーパを投与することでこのマウスを成獣まで生かし、L-ドーパの投与中止 24 時間後のマウスを用いることで、モルヒネの報酬効果がドーパミンシステムに依存しないこと (Nature, 2005) など、ドーパミンシステムの生理的役割に関する研究報告を一流誌に数多く発表した。しかし、申請者らは、Palmiter らの実験条件 (L-ドーパの投与中止 24 時間後) では細胞外ドーパミン量が野生型マウスの 2%ほどは残存していること、L-ドーパ投与中止 72 時間後では検出限界以下であること、また、72 時間以降ではむしろ多動を示し、この多動はドーパミン受容体拮抗薬であるハロペリドールを投与しても抑制されないという驚くべき実験結果を得た。つまり、ドーパミン欠乏マウスの行動解析結果として報告されてきたことは、少なくとも一部は不正確であり、正しい条件 (L-ドーパ投与中止 72 時間後) で解析をし直す必要があることが明らかになった。また、ドーパミンシステム全般に関しては、50 年以上前から現在に至るまで多数の研究者によって膨大な研究がなされており、詳細な機能が明らかになってきている。しかし、ドーパミンシステムの根本的な役割については、数十年前の研究結果や知見から一定の解釈がなされて近年ではそれが常識として疑われなくなっており、改めて研究されることは無い状況であった。

2. 方法

<ドーパミン欠乏マウスの準備>

チロシン水酸化酵素 (TH) 遺伝子欠損でありドーパミンβ水酸化酵素 (DBH) のプロモーター制御下で TH を発現させたマウスを準備した。具体的には、TH ヘテロ欠損マウスと、TH ヘテロ欠損でありかつ DBH プロモーター制御の TH 遺伝子が導入されているマウスとの交配により仔を得、生後 10 日目より 50 mg/kg L-ドーパ (ドーパミンの前駆体であり、このマウスの生存には継続的な投与が必要) を毎日投与した。生後 2 週目に耳より生体組織を採取し、PCR を用いた遺伝子多型判定を行った。最後に L-ドーパを投与してから 72 時間以降にドーパミン欠乏マウスとして実験に用いた。

<ドーパミン非存在下で維持される行動と障害される行動の同定>

申請者らが有する各種行動解析装置を用いて、ドーパミン欠乏マウスにおける各種行動を解析し、ドーパミンが必須の行動とドーパミン非依存性の行動を選別した。

<異常行動に対する抗精神病薬の効果検討>

移所運動量試験（室町機械スーパーメックス）を行った。オープンフィールドに3時間マウスを入れて行動量を測定したのち、定型抗精神病薬（ハロペリドール）または非定型抗精神病薬（クロザピン）を投与し、オープンフィールドへ戻して、3時間マウスの行動量を測定した。

<ドーパミン欠乏時の行動を制御する神経伝達物質システムの同定>

クロザピンの標的分子は複数知られているので、それぞれに選択的な薬剤（8-OH-DPAT、リタンセリン、プラゾシン、クロニジン、ピリラミン、オキソトレモリン）およびコリンエステラーゼ阻害剤のドネペジルを投与して実験を行うことで、クロザピンがドーパミン欠乏マウスの多動を抑制するメカニズムを検討し、ドーパミン非依存性の行動を制御する神経伝達物質システムの同定を目指した。また、そのシステムについて、マイクロダイアリシス分析、ウェスタンブロット解析、免疫組織化学的解析を行い、ドーパミン欠乏時にこのシステムが機能するメカニズムを物質レベルで調べた。

3. 結果 研究成果

<細胞外ドーパミン量の測定>

ドーパミン欠乏マウスにL-ドーパを毎日投与したところ、成獣でも生存し続けた。このマウスのL-ドーパ投与を中止して24時間後に脳内の細胞外ドーパミン量をマイクロダイアリシスで調べたところ、ドーパミンが検出され、しかも、メタンフェタミンを投与するとさらに細胞外ドーパミン量が上昇した。24時間のL-ドーパの断薬では、ドーパミンが残存しており、ドーパミン欠乏マウスとは言えないことが明らかになった。

次に72時間のL-ドーパの断薬後にドーパミン欠乏マウスの脳内の細胞外ドーパミン量を調べたところ、ドーパミンは検出されなかった。72時間の断薬後はドーパミンが枯渇していると考えられた。

<移所運動量試験>

そこで、72時間のL-ドーパ断薬後に移所運動量試験を行った。野生型マウスでは初期に移所運動量が高くその後徐々に運動量が減少したが、ドーパミン欠乏マウスでは初期は移所運動量が低くその後徐々に上昇し、2時間後以降は顕著な多動を示した。

<抗精神病薬の効果>

72時間L-ドーパ断薬後のドーパミン欠乏マウスの多動を、定型抗精神病薬のハロペリドールと非定型抗精神病薬のクロザピンが抑制するか調べた。野生型マウスの移所運動量を顕著に低下させる用量のハロペリドールをドーパミン欠乏マウスに投与しても、このマウスの多動は全く影響を受けなかった。これに対し、ハロペリドールはドーパミン欠乏マウスの多動を顕著に抑制した。

<クロザピン作用のメカニズム>

クロザピンの多様な作用点の中でどの作用点がドーパミン欠乏マウスの多動に影響したのかを、選択的な薬剤を用いることで調べた。セロトニン1A受容体作動薬の8-OH-DPATや $\alpha 1$ 拮抗薬のプラゾシンは、野生型マウスの運動量は顕著に抑えたが、ドーパミン欠乏マウスの運動量には有意な影響は与えなかった。セロトニン2A/2C受容体拮抗薬のリタンセリン、 $\alpha 2$ 作動薬のクロニジン、ヒスタミンH1受容体拮抗薬のピリラミンは、ドーパミン欠乏マウスの多動を抑制したが、部分的であった。これらに対し、ムスカリニックアセチルコリン受容体作動薬のオキソトレモリンは、顕著にドーパミン欠乏マウスの多動を抑制した。また、エステラーゼ阻害薬のドネペジルも多動を抑制した。

<ドーパミン欠乏マウスにおけるアセチルコリンの低下>

ドーパミン欠乏マウスにおいて、アセチルコリンシステムの働きが低下している可能性が考えられたので、脳内の細胞外アセチルコリン量をマイクロダイアリシスで調べたところ、低下していることが明らかになった。さらに、アセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼの遺伝子発現と蛋白質量を調べたところ、低下していることが明らかになった。

4. 考察 まとめ

ドーパミン欠乏マウスでは、24時間のL-ドーパ断薬ではドーパミンが残存しており、72時間の断薬後ではドーパミンが枯渇していると考えられた。ドーパミンが枯渇した状態のマウスは、顕著な多動を示すことが明らかになった。ドーパミンは運動制御において重要な役割を果たし、ドーパミン量が低下すると運動量が低下すると考えられてきたが、極端にドーパミン量が減少すると、逆に

多動になることが初めて示された。ドーパミンが無くても動き回ることができることは、既成概念を覆す発見であると考えられる。ドーパミン神経伝達が低下して運動障害を引き起こすと考えられているパーキンソン病の治療では、ドーパミン神経伝達を回復させる治療が行われているが、むしろドーパミンを枯渇させることで運動障害を治療できる可能性も考えられる。

ドーパミン欠乏によりドーパミン受容体の過感受性が生じて多動が引き起こされた可能性も考えられたが、この多動がハロペリドールで抑えられないことから、ドーパミン非依存性の多動であると考えられる。

ドーパミン欠乏マウスの多動が、定型抗精神病薬では抑えられず、非定型抗精神病薬で抑制されることから、この異常行動は定型抗精神病薬非感受性非定型抗精神病薬感受性の精神症状と類似する可能性が考えられる。

今回の結果から、ドーパミンが生体内から無くなると、アセチルコリンの低下が引き起こされ、多動が生じる可能性が考えられる。これは、薬物依存と最も密接に関わると考えられるドーパミンシステムの新たな役割の発見であり、パーキンソン病の新たな治療法の開発や統合失調症の一部の患者群のメカニズムの解明にも繋がる可能性がある。

5. 参考文献

Q. Y. Zhou, R. D. Palmiter, Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83, 1197 (1995).

K. Nishii *et al.*, Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. *J. Neurosci. Res.* 54, 450 (1998).

T. S. Hnasko, B. N. Sotak, R. D. Palmiter, Morphine reward in dopamine-deficient mice. *Nature* 438(7069), 854, (2005).