

ドーパミン非依存的な運動制御メカニズムの研究

公益財団法人東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト

藤田 雅代

1. 目的

神経伝達物質の一種であるドーパミンは、脳の広範囲に作用し、多彩な生理機能の調節に関わっている。ドーパミンの作用経路には、黒質から線条体へ投射し、運動調節に関わる黒質線条体系、腹側被蓋野から側坐核へ投射し、情動行動や報酬系に関わる中脳辺縁系、腹側被蓋野から前頭前皮質へ投射し、ストレス刺激や不安行動に関与する中脳皮質系、視床下部から下垂体へ投射し、内分泌ホルモンの分泌調節に関わる漏斗下垂体系、の4つの経路が知られている。このように、作用する部位によってさまざまな機能を発揮することによって、生体活動に重要な役割を担っている。

ドーパミン系の異常は、いくつもの疾患に関わっていることが知られている。よく知られているものとして、黒質線条体系のドーパミン神経が変性・脱落することによって引き起こされるパーキンソン病が挙げられる。パーキンソン病では、ドーパミン神経脱落に伴い、線条体のドーパミン濃度が著しく減少することによって、無動・寡動などの運動障害が引き起こされるのが特徴である。運動障害は、ドーパミンの前駆体であるL-ドーパを投与することによって改善される。また、逆にドーパミンの過剰が原因となると考えられている疾患として、統合失調症における陽性症状が挙げられる。陽性症状では、幻覚や興奮など、活動が亢進した状態になることが知られている。この状態にたいして、ドーパミン受容体の遮断効果をもつ定型抗精神病薬が奏功することから、ドーパミン過剰がこの疾患の一因であると考えられており、統合失調症のドーパミン仮説としても有名である。陽性症状は、中脳辺縁系のドーパミン過剰が原因となると考えられている。

これらの疾患とドーパミン量との関係から、ドーパミン量が少ないと運動量が減少し、過剰になると運動量も増加するという、比例関係が成り立つことが想定される。しかし、ドーパミン量と運動量とは必ずしも比例関係にあるとはいえないと考えられる現象が存在する。まず、パーキンソン病患者でみられる、矛盾運動という現象である(Au et al., 2010)。これは、ドーパミンが減少し、著しい運動障害が生じているパーキンソン病患者であっても、階段や横断歩道など、目印となるものがあると、ほぼ正常な歩行が可能になることや、危機的状況に置かれたときに、動いて逃げるのが可能であるという現象である。このメカニズムについては、目印などの外的刺激によって小脳などの他の経路が活性化する可能性が示唆されているが、詳細は未だ不明である。また、陽性症状においても、ドーパミン受容体が奏功しない症例が存在することが知られている。このようなことから、ドーパミンと運動量とは必ずしも相関せず、ドーパミンに依存せずとも運動が発現される可能性が考えられる。

ドーパミン非依存的に運動が可能であるか、以前、我々の研究室で、ドーパミン欠乏(Dopamine deficient, DD)マウスモデル(Nishii et al., 1998)を用いた検討を行った。DDマウスは、ドーパミン神経で、ドーパミン生合成経路で働く酵素のひとつであるチロシン水酸化酵素(TH)を欠損するため、ドーパミンを生合成できないマウスである。DDマウスは、L-ドーパを毎日投与することにより、成獣まで維持できる。DDマウスの線条体内のドーパミン濃度は、L-ドーパ投与24時間後では、わずかに検出される程度に残存するが、72時間後では、検出限界以下となり、ほぼ完全に枯渇する。この状態で運動量がどのようになるか、オープンフィールドテストを行い検討した。L-ドーパ投与24時間後では、野生型マウスに比べ、運動量が減少しており、パーキンソン病などでみられるようにドーパミン量の減少に伴う運動量の減少が認められた。しかしながら、L-ドーパ投与後72時間後では、逆に運動量が亢進し、6時間の新奇環境曝露によっても、野生型マウスでみられるような環境馴化による運動量の減少は、認められなかった。また、L-ドーパ投与72時間後の亢進した運動量は、定型抗精神病薬では抑えられず、非定型抗精神病薬であるクロザピンにより、抑制された。これらのことから、L-ドーパ投与72時間後運動量亢進は、パーキンソン病における矛盾運動や、定型抗精神病薬が奏功しない陽性症状と類似点があり、ドーパミン非依存的な運動が可能であることを明確に示していると考えられた(Hagino et al., 2015)。

このような背景を踏まえ、本研究では、ドーパミン非依存的な運動がどのような機序で行われているか、解析することにした。具体的には、神経の活性化の変化に着目し、脳のどの領域の、どのようなサブタイプの神経細胞の活性化の変化がドーパミン非依存的運動に関与するか、明らかにすることを目的として、研究を行った。さらに、新奇環境曝露刺激がない状態での自発的な運動を解析し、ドーパミン非依存下でどのような自発行動が可能かについても明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 方法

DDマウスの準備

DDマウスは、THノックアウトマウスに、dopamine beta hydroxylase プロモータ制御下でTH発現が誘導されるトランスジーンを組み込み、ノルアドレナリン神経およびアドレナリン神経におけるTH発現をレスキューしたマウスである。10-14日齢より毎日L-ドーパを50mg/kg投与し、成獣まで維持し、10週齢以上のマウスを実験に用いた。

マウス脳切片の作成

野生型マウスと、L-ドーパ投与中止72時間後のDDマウスを準備し、それぞれ、4時間オープンフィールド内におき、新奇環境に曝露させた群、曝露させない群を作製した。マウスを深麻酔下で4%パラホルムアルデヒドでかん流し、脳を採取、一晚さらに固定を行ったあと、30%ショ糖溶液に脳が沈むまで浸漬させた。40umに薄切切片を作製し、免疫組織化学および、蛍光二重染色に用いるためのサンプルとした。

免疫組織化学

フリーフローティング法にて免疫組織化学を行った。切片を0.1% Triton-X 100で透過処理を行い、過酸化水素水で処理し、内在性ペルオキシダーゼを失活させたのち、5%ヤギ血清でブロッキングを行った。ウサギポリクローナル抗c-Fos抗体(Synaptic Systems)を1:20000で一晩反応させ、さらに二次抗体として、ビオチン化抗ウサギ抗体で反応後、HRP標識したアビジンを反応させた。形成されたHRP標識アビジンビオチン複合体を、DABにて発色させ、シグナルを得た。

蛍光二重染色

フリーフローティング法にて蛍光二重染色を行った。切片を0.1% Triton-X 100で透過処理を行い、10%ロバ血清でブロッキングを行い、ヤギポリクローナル抗c-Fos抗体(Santa Cruz)を1:500および、ウサギポリクローナル抗ドーパミンD1受容体(DRD1)抗体(Sigma Aldrich)を1:200で3日間反応させた。二次抗体として、AlexaFluor488標識抗ヤギ抗体および、AlexaFluor594標識抗ウサギ抗体で反応させ、それぞれのシグナルを蛍光ラベルした。さらに、カウンターステインとして、DAPI染色を行った。

ホームケージテスト

野生型マウス、L-ドーパ投与24時間後および72時間後のDDマウスの夜間の振る舞い行動を解析するために、ホームケージテストを行った。マウスを通常飼育のケージに一匹ずつ入れ、暗期に入ってから行動をビデオカメラで撮影した。撮影した映像をもとに、立ち上がり行動、毛繕い、摂餌行動などの行動をどのくらい行っているか、解析した。同時に、移所運動量も計測した。

3. 結果

新奇環境曝露刺激によるDDマウス脳における神経活動の過剰活性化

新奇刺激がいくつかの脳部位を活性化することが知られている(Rinaldi et al., 2010, Mendez et al., 2015)。本研究では、その中でも運動制御に重要である線条体(dorsomedial striatum, dorsolateral striatum)および、空間認知に重要である海馬(CA1, CA3)についての検討を行った。野生型マウスでは、CA1領域では、c-Fos陽性細胞数は新奇環境曝露によって増加が認められたが、その他の3領域では変化が認められなかった。これに対し、DDマウスでは、検討した4領域すべてでc-Fos陽性細胞数の増加が認められた。したがって、DDマウスでは、これらの領域において神経活動が過剰となっていることが示唆された。

新奇環境曝露刺激によってDDマウス脳で活性化される神経細胞のサブタイプ

検討した領域内で、特に線条体は複数の神経細胞サブタイプによって構成されており、それぞれのサブタイプが担う役割が異なっている(Goodchild et al., 2013)。そこで、DDマウスで活性化される神経細胞が、サブタイプに特異的なのか、あるいはランダムに活性化されるのか、検討した。本研究では、線条体における直接路を構成する神経サブタイプである、ドーパミンD1受容体(DRD1)陽性神経細胞について、検討を行った。新奇環境曝露なしの状態でも、c-Fos陽性を示す神経細胞のなかでDRD1陽性を示す神経細胞は存在したが、新奇環境曝露により、c-Fos陽性細胞数中のDRD1陽性細胞の割合が有意に増加していた。したがって、DRD1陽性細胞の活性化と、新奇環境下での運動量亢進が何らかのかかわりを持つ可能性は考えられる。しかし、DRD1陽性を示さない細胞の割合も多く、DRD1陽性細胞のみが選択的に活性化するわけではなく、他のサブタイプの神経細胞のはたらかきも関わっていることが示唆された。

DDマウスにおけるドーパミン欠乏時のホームケージ内での自発行動変化

ホームケージ内での自発行動について、まず運動量のみを調べたところ、L-ドーパ投与24時間後のDDマウスの運動量は、野生型マウスと同様であり、マウスの活動時間帯である暗期に入ったところに増加する傾向も同様であった。一方で、L-ドーパ投与24時間後では、暗期に入ったところにわずかに運動量の増加がみられたものの、野生型マウスやL-ドーパ投与24時間後に比べ、ずっと少なかった。しかし、少ないながらも運動が見られたため、どのような行動をしているのかの詳細をビデオ撮影画像を基に、解析を行った。すると、活動しているときは、立ち上がり行動をおこなったり、ケージの蓋に宙吊りになったりするなど、かなり活発に動き回っていることが認められた。また摂餌様の行動や、毛繕い行動も認められた。したがって、ドーパミン欠乏状態であっても、運動自体の発現は、従来考えられていた以上に可能であることが見出された。

4. 考察

DDマウスにおけるL-ドーパ投与72時間後の新奇環境刺激によって運動量が亢進した状態では、線条体および海馬の領域でc-Fos陽性を示す神経細胞数が増加することを見出し、これらの部位での神経活動が過剰に活性化されていることが認められた。これらの部位の神経活動の過剰な活性化が、運動量の亢進に関わっている可能性が考えられる。一方で、野生型マウスでは、CA1を除き、新奇環境曝露刺激後の過剰活性化は認められなかったが、過去の報告ではCA1, CA3および、線条体でも新奇環境によりc-Fos陽性細胞数が増加することが報告されている(Rinaldi et al., 2010, Mendez et al., 2015)。今回は、4時間新奇環境に滞在させており、この時間では、マウスは環境馴化により探索行動は認められなくなっていた。したがって、馴化によって、神経活動の活性化が低下した状態になったと考えられる。これに対して、DDマウスは、馴化が起きず、神経活動の過剰な活性化が継続する可能性が考えられる。これらを合わせて考えると、ドーパミンは、これらの部位の過剰活性化を抑制する方向にはたらき、馴化を促進する可能性が示唆される。このことを検証するためには、今後、新奇環境曝露後、

経時的にDDマウスと野生型マウスのc-Fos発現神経細胞を観察が必要である。

また、今回は、DDマウスで活性化される神経細胞のサブタイプについて、線条体において活性化するDRD1陽性細胞が若干増加する傾向を認めたが、DRD1陽性細胞が活性化する特異的なサブタイプとは言えなかった。引き続き、DRD2陽性細胞に関する検討も行い、完全にサブタイプには関係なく活性化が引き起こされるのか、それともある程度、サブタイプによる傾向が認められるのかを検討し、どの経路の過剰な活性化が運動量亢進につながるのか、今後さらに明らかにする予定である。

ホームケージでは、L-ドーパ投与72時間後に新奇環境下で運動量の亢進が認められたのとは異なり、運動量は著しく減少していたが、動いているときには活発な行動が認められた。このことは、新奇環境刺激の有無で、ドーパミン非依存的な運動量調節機構がまったく異なることを示しており、興味深い知見である。ただし、現時点では、ホームケージでの行動は、検出感度以下であってもごくわずかに残っているかもしれないドーパミンが作用したために起こる行動である可能性を否定できないため、今後ドーパミン遮断薬投与後のホームケージでの行動を解析する必要がある。

以上、本研究で、新奇環境刺激によって引き起こされるドーパミン非存在下での運動時に活性化される脳部位がいくつか同定された。また、ホームケージの自発行動も、ドーパミンが極端に少ない状態でも、動くときには活発な行動がみられることが見出された。研究をさらに深めることで、ドーパミン非存在時の運動制御機序を解明し、ドーパミン自体が運動に対して真にどのような役割を果たすのか、解明につなげていきたいと考えている。

5. 参考文献

- Au WL et al. (2010). L-dopa induces under-damped visually guided motor responses in Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 202 : 553-559.
- Goodchild RE et al. (2013) New genetic insights highlight 'old' ideas on motor dysfunction in dystonia. *Trends Neurosci* 36: 717-725
- Hagino Y et al. (2015) Involvement of cholinergic system in hyperactivity in dopamine-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 40: 1141-1150
- Mendez M et al. (2015) c-Fos expression correlates with performance on novel object and novel place recognition tests. *Brain Res Bull* 117: 16-23
- Nishii K et al. (1998) Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. *J Neurosci Res* 54: 450-464.
- Rinaldi A et al., (2010) Distinct patterns of Fos immunoreactivity in striatum and hippocampus induced by different kinds of novelty in mice. *Neurobiol Learn Mem* 94: 373-381