

(参考) 様式 4-2

## Expression of D1 but not D2 Dopamine Receptors in Striatal Neurons Producing Neurokinin B in Rats

(ラット線条体ニューロキニンB産生神経細胞は、ドーパミン受容体2ではなく、ドーパミン受容体1を発現する。)

所属・職 医歯学総合研究科 助教  
(指導教員 植村 正憲 教授)

申請者氏名 菰村 貴弘

大脳皮質の直下にある、線条体、淡蒼球、黒質、視床下核の4つの神経核をまとめて大脳基底核と呼んでいる。これらの神経核は互いに協調し、随意運動の遂行、企画、運動のイメージ、習慣形成などに重要な役割を果たす領域である。その中でも最も広大な領域を占める線条体は、大脳皮質や視床から大脳基底核に入る情報を受け取る窓口として働き、それに続く淡蒼球外節、淡蒼球内節、および黒質網様部に抑制性の出力線維を送っている。

線条体には、数億個の出力ニューロンが存在し、その出力ニューロンは、古くから大きく二つのグループに分けられてきた。一つは、サブスタンスPやタキキニンA、ダイノルフィンを産生して、黒質網様部および淡蒼球内節に投射線維を送る「直接路」を形成するグループ、もう一つは、エンケファリンを産生し、淡蒼球外節に投射線維を送る「間接路」を形成するグループである。そのうち直接路ニューロンがドーパミン受容体1 (D1) を、間接路ニューロンはドーパミン受容体2 (D2) をそれぞれ発現し、黒質緻密部からのドーパミンを受け取って運動の調節などに深く携わっていることが知られている。

近年、線条体出力ニューロン群の中に、この二つのグループとは明確に異なるニューロキニンBを産生するグループがあることが見いだされた。この第三のグループはトレーサー実験等から、他の二つのグループと大きく異なる回路を形成する新しいニューロン群であることが判明した。この新規に発見された第三の線条体出力ニューロン群が、ドーパミン受容体サブタイプのいずれを発現しているか、またはいずれのドーパミン受容体も発現していないかは、これまで全く明らかにされていない。

そこで本研究では、この新しい第三の線条体出力ニューロン群が、果たしてドーパミン受容体を発現しているのか、発現しているとしたらどのサブタイプのドーパミン受容体を発現しているのかを検証し、この新しい出力ニューロン群の真の役割を明らかにすることを試みた。

本研究では、ドーパミン受容体を可視化するために、蛍光*in situ* hybridization法を用いた。これは、比較的簡便な免疫組織化学染色法を用いた場合、線条体ニューロンの細胞体だけでなく、線条体全体が染まるため、ドーパミン受容体の細胞内局在の判別ができず、各細胞が持つ

ドーパミン受容体の同定が困難であること、そして、明視野*in situ* hybridization法を用いた場合、直接路ニューロン、間接路ニューロン、第三の出力ニューロンをそれぞれ識別するために用いる免疫組織化学染色におけるマーカーであるペプチドの細胞内局在と、*in situ* hybridization法におけるドーパミン受容体の細胞内局在がほとんど一致してしまうことから両者の識別が困難であるためである。

ドーパミン受容体に対する蛍光*in situ* hybridization法と、各ニューロン群を識別するためのペプチドに対する蛍光免疫組織化学染色法の二重染色法を詳細に行った結果、線条体第三の出力ニューロン群がドーパミン受容体 1 (D1) を発現 (85~89%) し、ドーパミン受容体 2 (D2) は発現しないことが明らかになった。

しかし、ここで新たな問題が生じた。神経細胞に限らず、細胞は一般に伝達物質を受け取った後、それぞれの細胞内でシグナル伝達を行っており、線条体のようなドーパミンを受容する部位の多くの神経細胞では、効率的に情報伝達するための必須タンパクであるDARPP32

(dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) を発現していることが知られている。しかし、これまでに、第三の出力ニューロン群にはDARPP32が発現しないことが示されていた。よって、第三の出力ニューロン群がドーパミン受容体 1 を発現し、ドーパミンを受け取っても、他の二つのグループと同じ様式を用いてドーパミンを効率的に細胞内シグナル伝達することができない。そこで、第三の出力ニューロン群には、DARPP32に代わる別のタンパク質が発現しているのではないかと考え、その候補となるタンパク質と、第三の出力ニューロン群の蛍光二重免疫組織化学染色法を行った結果、STEP (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) というタンパクとの共存が認められた (60~64%)。

本研究は、近年発見された線条体第三の出力ニューロン群において、ドーパミン受容体 1 (D1) の発現を新たに見出し、またこれらがドーパミンを受容したのちの細胞内シグナル伝達に、STEPを用いる様式を明らかにしたことで、未だ不明な点の多く残る線条体神経回路の解明に寄与することができた。

(*European Journal of Neuroscience* 26巻11号 平成19年12月7日掲載予定)

平成 20 年 2 月 8 日

鹿児島大学大学院  
歯 学 研 究 科 長 殿

## 学位審査委員会

主査 植 村 正 憲

副査 佐 藤 友 昭

副査 梶 山 加 綱

副査 三 浦 裕 仁

## 学位論文審査経過報告書

平成 19 年 12 月 19 日(水)開催の第 269 回大学院歯学研究科委員会で付託された下記申請者の論文審査と試験(学力確認)を終了しましたので、経過を報告します。

学位申請者 齒 村 貴 弘

第 1 回審査委員会：平成 19 年 12 月 19 日(水) 18:30~18:45 (歯学部大会議室)

1. 歯学研究科委員会で、審査委員 4 名(植村教授、佐藤教授、梶山教授、三浦准教授)が選出され、同会終了後に第 1 回の審査委員会を開催し、委員の互選により植村を主査に選出した。
2. 第 2 回審査委員会の開催日等は主査に一任することとした。

第 2 回審査委員会：平成 20 年 1 月 8 日(火) 16:00~16:20 (歯学部長室)

1. 次回の委員会で論文審査を行う。論文の審査は、申請者による口頭説明および審査委員との質疑応答で行う。
2. 大学院博士課程修了者と同程度の学力、識見を有することの確認は、論文内容とそれに関連した事項の質疑応答によって行う。
3. 第 2 外国語(独語)の学力確認は独文和訳 2 題によって行い、出題は佐藤委員と三浦委員が行う。
4. 次回(第 3 回)は、平成 20 年 2 月 5 日(火) 17:00 から、第 7 カンファレンス室で開催する。

(参考) 平成 19 年 12 月 27 日 学長より学位論文審査委託

第 3 回審査委員会：平成 20 年 2 月 5 日(火) 17:00~<sup>19</sup>~~18~~:00 (第 7 カンファレンス室)

1. 第 2 回審査委員会で協議した手順に従って審査を行った。
2. 第 2 外国語は独文和訳 2 問を課し、十分な学力を有することを確認した。
3. 申請者による口頭説明を約 <sup>50分</sup>~~20分~~ 行なった後、審査委員と申請者の間で論文の内容と関連した事項について、大略次のような質疑応答(Q and A)があった。

(次ページへ続く)

2字訂正

3字訂正

- Q1. 線条体とは、尾状核と被殻という理解で正しいか？新線条体、古線条体、背側線条体、腹側線条体などの分類との違いは何か？
- A1. 線条体は尾状核と被殻をあわせたもので間違いありません。ヒトでは尾状核と被殻を内包が分けますが、ラットなどでは尾状核と被殻に分かれておらず、線条体と呼ぶしかありません。また「新線条体」とはこの尾状核と被殻をいい、「古線条体」は淡蒼球のことを指しますが、単に「線条体」と言う場合は「新線条体」を指すことがほとんどです。背側線条体は、新線条体すなわち尾状核と被殻をあわせたものと同義で、腹側線条体は、側坐核など別の核を指しますが、ラットなどでは背側と腹側の、すなわち線条体と側坐核の境界が不明瞭です。脳の単純な肉眼解剖学的な観点からの分類と、発生学的な知見をふまえた上での分類の差によって、このように名称が複雑になったという経緯があります。
- Q2. 直接路のニューロンは最終的に大脳皮質を抑制するのか？
- A2. いえ、抑制の抑制になり、脱抑制ということで結果的に直接路ニューロンが興奮することで視床ならびに大脳皮質を興奮させます。
- Q3. 大脳皮質から、または視床からの線条体への入力量は、直接路と間接路それぞれに対して偏りがあるかなどといった、バランス、アンバランスの関係は何かあるか？
- A3. 現在まさに進行しております別の実験で解析している最中ですが、これまでの結果では両者に差があまりないことがわかってきております。
- Q4. パーキンソン病では「運動抑制」がかかっているにもかかわらず、逆に、手が勝手に震え出すという症状が出るのはなぜか？
- A4. 運動調節のバランスが障害されるからだろうと考えられています。運動の調節は大脳基底核による調節と、小脳からの調節の、2種類の調節が平行して行われています。小脳から入力を受け大脳皮質の運動野に投射する視床中間腹側核という核がありますが、パーキンソン病患者で、この視床中間腹側核を破壊すると振戦が停止するという報告があります。すなわちパーキンソン病患者においては、この小脳-視床-大脳皮質という運動調節回路（障害なし）と、大脳基底核-視床-大脳皮質という運動調節回路（障害あり）というアンバランスが振戦を生じさせる原因であろうと考えられています。しかし、根本的にはまだ解明されていないのが現状です。
- Q5. L-ドーパなどを投与すると一次的にパーキンソン症状が緩解するが、長期的にはL-ドーパの効果が薄れてしまうのはなぜか？
- A5. 現段階では、はっきりとしたことはわかっていません。かつてはL-ドーパが代謝される際に神経毒性を持つのではないかといわれていましたが、それは誤りのようです。現在は黒質のドーパミン細胞がさらに減少してドーパミンの保持能力が落ちることが最も有力な説ですが、個人的な見解としては線条体内のインターニューロンが関与してL-ドーパなどに対する反応閾値を上昇させる効果をもたらしているのではないかと考えています。
- Q6. 第三の投射ニューロンの線条体内での分布に特徴はあるか？
- A6. それについての報告は現在までにありませんが、自分が日頃観察していますとパッチとマトリックスの境界に並んで存在しているように見え、両者の仲介的な機能を果たしているのではないかと考えております。それについてより深く追求していくことで今後の新たな研究テーマとなってくるかもしれないと注目しているところです。
- Q7. 第三の投射系の経路を見つけた実験手法はどのようなものか？
- A7. トレーサー実験と破壊実験とを組み合わせた手法を用いています。ニューロキニンBの陽性部位の中で線条体の破壊実験によって陰性になった部位（結果的に無名質）を特定し、別の個体でその部位（無名質）に逆行性のトレーサーを注入して線条体にニューロキニンBを免疫染色し、トレーサーの細胞体部位とニューロキニンBが共存することを確認しています。
- Q8. 上記の破壊実験とはどの程度の範囲の破壊実験か？
- A8. 片側の線条体全体をカイニン酸などによって破壊し、破壊しない側と比較しています。
- Q9. 無名質という神経核はヒトでいうとどのあたりに存在するか？
- A9. 無名質などは、ヒトでは視交叉背側側の前有孔質の周辺とその奥側から淡蒼球の腹側にかけての領域に相当します。

- Q 10. 直接路、間接路、第三の投射経路それぞれを構成する神経細胞の数の割合はどれくらいか？
- A 10. 線条体の構成ニューロンの約45%が直接路ニューロン、同じく約45%が間接路ニューロン、約5%が第三の投射経路を形成するニューロンです。残りの5%は線条体の外に軸索を投射しないインターニューロンで、インターニューロンには4、5種類の型があるとされています。
- Q 11. 第三の投射経路を発見したのがFurutaという人物か？ ニューロキニンB陽性細胞と第三の投射経路の発見は同時か？
- A 11. 京都大学の古田先生が発見された新しい回路です。線条体のような脳解剖学的に研究されつくされたと思われる領域で、近年になって新しい神経回路が見つかることは極めて異例なことだと認識しております。ニューロキニンBを産生するニューロンが線条体内に存在していることについては、それよりも何年か前に認知されておりましたが、このニューロキニンBを産生するニューロンが別の神経回路を形成するとはあまり考えられていませんでした。
- Q 12. 直接路、間接路、第三の投射系の3種類のニューロンには腹側と背側で偏りなどがあるか？
- A 12. 直接路、間接路を構成するニューロン群には背側、腹側による分布の偏りはほとんど見られません。第三の投射経路を構成するニューロン群に関しては、背側ではまばら、腹側では所々に細胞塊を形成しております。背側のニューロキニンBを産生するニューロンと腹側のニューロキニンBを産生するニューロンは、機能的にかなり異なる可能性が高いと考えています。
- Q 13. ドーパミンレセプターは1と2以外にサブタイプがあるのではないか？
- A 13. ドーパミン受容体のサブタイプは5つあります。D1とD5が同じグループ、D2、D3、D4がまた別のグループを形成しています。このD1とD5、そしてD2、D3、D4はそれぞれ塩基配列もほとんど変わりませんが、発現量がD1とD2に比べてD3、D4、D5は極めて少なく、線条体内で機能する役割も低いと考えております。実際にはD3、D4、D5のプローブも作製して実験を行いましたが、今回は線条体内で発現の強いD1とD2に関してのみの結果で顕著な差が出ましたので、この時点での報告をいたしました。
- Q 14. 放射性同位元素を用いた*in situ* hybridization法の方が感度は良くないのか？
- A 14. 「感度」に関しては、放射性同位元素を用いた*in situ* hybridization法が蛍光*in situ* hybridization法よりも優れているかと思いますが、蛍光*in situ* hybridization法も近年非常に感度が向上しており、放射性同位元素を用いた場合と遜色なくなってきました。また蛍光*in situ* hybridization法の方が操作の面で圧倒的に簡便であること、そして細胞レベルでのmRNAの局在を観察しようとする、放射性同位元素を用いた場合、にじんで本来の境界を越えてシグナルが見えてしまいがちですが、蛍光*in situ* hybridization法を用いれば、境界が明瞭なシグナルを観察することが可能です。これらの点から、本研究では、蛍光*in situ* hybridization法を採用しました。
- Q 15. 用いた切片の厚みはどれくらいか？
- A 15. 30  $\mu$ mです。通常の実験で用いる厚みよりも薄めですが、*in situ* hybridization法としてはかなり厚い切片といえます。これは、今回の実験において浮遊*in situ* hybridization法を用いたため比較的厚くても浸透が容易であるためです。
- Q 16. 線条体では細胞と細胞の間には何があるのか？
- A 16. 細胞体と細胞体の間にはその細胞の樹状突起と棘突起、これらにシナプスする大脳皮質と視床からの軸索、黒質からの大量の軸索、さらにはインターニューロンおよび、星状膠細胞などが存在しております。またラットの線条体内には内包が小さく分かれて走行していますので有髄神経線維などの束なども存在しています。
- Q 17. Striatal-enriched tyrosine phosphatase(STEP)以外に何か細胞内シグナル伝達を担うタンパクがある可能性はないのか？
- A 17. その可能性は否定できません。現在判明している線条体内のDARPP-32に近い働きをするタンパクは全て検討しましたが、これまでに見つかっていない細胞内シグナル伝達物質が、この第三の投射系のニューロン内で機能していることも考えられます。

Q 18. 線条体内における直接路、間接路、第三の投射経路の各マーカーのシグナルに強弱は見られたか？

A 18. 若干見られました。直接路ニューロンのマーカーはパッチにやや強くマトリックスにやや弱い、逆に間接路ニューロンのマーカーはパッチに弱く、マトリックスには強く観察される傾向があると思っていますが、少し弱くなるだけで全くなくなるわけではないため、これによって何か機能的なことまで示唆できる可能性は低いと考えています。

Q 19. *in situ* hybridization法のプローブはどのような部分をターゲットにして作製しているのか？ 良好なプローブの条件とはどのようなものか？

A 19. パソコンを用いて、各ドーパミンレセプターサブタイプの塩基配列の中で互いに配列が重複しない部位を探し出し、長さが1000~1500塩基になるようなものを設計します。互いに配列が重複しないとなると、かなり条件が厳しくなりますので、実際にはほんの1、2カ所程度しか設計できないことがほとんどです。良いプローブの条件は、様々なことが言われていますが、必ずしもその通りに作製すればいいものでもなく、例えば、2種類作製したとき、一般的に言われている良い条件で作製したプローブのシグナルの方が弱い場合もあります。実際に作製してみないと良いか悪いかはいえないと思います。

Q 20. 二重TSA法とは実際にどのように行っているのか？

A 20. ジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたプローブとフルオロセイン (FITC) ラベルしたプローブとを用いて行います。例えば、D1のDIGラベルプローブとD2のFITCラベルプローブを同時にハイブリダイゼーションした後、anti DIGペルオキシダーゼ抗体を用いてTSA-Biotin増感を行い、ペルオキシダーゼの不活化をアジ化ナトリウムで行った後、anti FITCペルオキシダーゼ抗体を用いてTSA-DNP (ジニトロフェニル) 増感を行い、最後に両者を蛍光発色させます。

1. 申請者を退席させた後、論文の内容について審査し、本論文は、中枢神経系における形態学的な新知見と将来的な臨床応用に貢献し得る基礎的知見を豊富に提示しており、博士（歯学）の学位論文として価値あるものであるとの結論に達した。
2. 申請者との質疑応答の内容から、申請者は大学院博士課程修了者と同等かそれ以上の学力、識見を十分に有していると判定された。
3. 以上により、申請者は博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格を有すると、本審査委員会は判定した。

第4回審査委員会： 平成20年2月8日（金）持ち回り  
歯学研究科長へ提出する書類を作成した。

様式 15

報 告 番 号	歯 論 第 69 号		氏 名	菌村 貴弘	
論文審査担当者	主 査	植村 正憲			
	副 査	佐藤 友昭	梶山 加綱		三浦 裕仁

## ラット線条体におけるニューロキニン B 産生細胞は ドーパミン受容体 1(D1)を発現する

### Expression of D1 but not D2 Dopamine Receptors in Striatal Neurons Producing Neurokinin B in Rats.

(European Journal of Neuroscience 26 巻 11 号 平成 19 年 12 月 7 日掲載)

大脳皮質の直下にある、線条体、淡蒼球、黒質、視床下核の 4 つの神経核をまとめて大脳基底核と呼んでいる。これらの神経核は互いに協調し、随意運動の遂行、企図、運動のイメージ、習慣形成などに重要な役割を果たす領域である。その中でも最も広大な領域を占める線条体は、大脳皮質や視床から大脳基底核に入る情報を受け取る窓口として働き、それに続く淡蒼球外節、淡蒼球内節、および黒質網様部に抑制性の出力線維を送っている。

線条体には、数億個の出力ニューロンが存在し、その出力ニューロンは、古くから大きく二つのグループに分けられてきた。一つは、サブスタンス P、ダイノルフィンを産生して、黒質網様部および淡蒼球内節に投射線維を送る「直接路」を形成するグループ、もう一つは、エンケファリンを産生し、淡蒼球外節に投射線維を送る「間接路」を形成するグループである。そのうち直接路ニューロンがドーパミン受容体 1(D1)を、間接路ニューロンはドーパミン受容体 2(D2)をそれぞれ発現し、黒質緻密部からのドーパミンを受け取って運動の調節などに深く携わっていることが知られている。

近年、線条体出力ニューロン群の中に、この二つのグループとは明確に異なるニューロキニン B を産生するグループがあることが見いだされた。この第三のグループはトレーサー実験等から、他の二つのグループと大きく異なる回路を形成する新しいニューロン群であることが判明した。この新規に発見された第三の線条体出力ニューロン群が、ドーパミン受容体サブタイプのいずれを発現しているか、またはいずれのドーパミン受容体も発現していないかは、これまで全く明らかにされていない。

そこで本研究では、この新しい第三の線条体出力ニューロン群が、果たしてドーパミン受容体を発現しているのか、発現しているとしたらどのサブタイプのドーパミン受容体を発現しているのかを検証し、この新しい出力ニューロン群の真の役割を明らかにすることを試みた。

本研究では、ドーパミン受容体を可視化するために、蛍光 *in situ* hybridization 法を用いた。これは、比較的簡便な免疫組織化学染色法を用いた場合、線条体ニューロンの細胞体だけでなく、線条体全体が染まるため、ドーパミン受容体の細胞内局在の判別ができず、各細胞が持つドーパミン受容体の同定が困難であること、そして、明視野 *in situ* hybridization 法を用いた場合、直接路ニューロン、間接路ニューロン、第三の出力ニューロンをそれぞれ識別するために用いる免疫組織化学染色におけるマーカーであるペプチドの細胞内局在と、*in situ* hybridization 法におけるドーパミン受容体の細胞内局在がほとんど一致してしまうことから両者の識別が困難であるためである。

ドーパミン受容体に対する蛍光 *in situ* hybridization 法と、各ニューロン群を識別するためのペプチドに対する蛍光免疫組織化学染色法の二重染色法を詳細に行った結果、線条体第三の出

力ニューロン群がドーパミン受容体 1(D1)を発現(85-89%)し、ドーパミン受容体 2(D2)は発現しないことが明らかになった。

しかし、ここで新たな問題が生じた。神経細胞に限らず、細胞は一般に伝達物質を受け取った後、それぞれの細胞内でシグナル伝達を行っており、線条体のようなドーパミンを受容する部位の多くの神経細胞では、効率的に情報伝達するための必須タンパクである DARPP-32(Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa)を発現していることが知られている。しかし、これまでに、第三の出力ニューロン群には DARPP-32 が発現しないことが報告されていた。よって、第三の出力ニューロン群がドーパミン受容体 1 を発現して、ドーパミンを受け取っても、他の二つのグループと同じ様式を用いてドーパミンを効率的に細胞内シグナル伝達することができない。そこで、第三の出力ニューロン群には、DARPP-32 に代わる別のタンパク質が発現しているのではないかと考え、その候補となるタンパク質と、第三の出力ニューロン群の蛍光二重免疫組織化学染色法を行った結果、STEP(striatal-enriched tyrosine phosphatase)というタンパクとの共存が認められた(60-64%)。

以上、本研究は、近年発見された線条体第三の出力ニューロン群において、これまで明らかにされていなかったドーパミン受容体サブタイプの発現が、ドーパミン受容体 1(D1)であることを新たに見出し、またこれらがドーパミンを受容したのちの細胞内シグナル伝達に、STEP(striatal-enriched tyrosine phosphatase)を用いる様式を明らかにしたことで、脳神経科学の中で未だ不明な点の多く残る線条体神経回路の解明に寄与し、さらにはパーキンソン病などの神経疾患に対する将来的な臨床応用に貢献し得る基礎的知見を供給した。

これらのことより、本研究は博士(歯学)の学位論文として価値あるものと判断した。



試験(学力確認)の結果の要旨および担当者

様式 16

報 告 番 号	歯 論 第 69 号	氏 名	菌 村 貴 弘	
論文審査担当者	主 査	植 村 正 憲		
	副 査	佐 藤 友 昭	梶 山 加 綱	三 浦 裕 仁
<p>学位審査委員会は、平成20年2月5日(火)に、上記学位申請者に面接して学位論文の内容について説明を求めるとともに、これと関連する研究方法の妥当性と信頼性、得られた知見の基礎科学としての意義、臨床応用への可能性、参考論文の内容などについても諮問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>なお、第1外国語試験(英語)については、平成18年12月13日(水)に実施された学位取得のための第1外国語試験に合格していることが確認され(登録番号 第240号)、また第2外国語試験(独語)についても独文和訳の結果から、大学院歯学研究科博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力があると判断された。</p> <p>以上のから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力と識見を有するものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと判断した。</p>				