

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500307

研究課題名（和文） 中脳ドーパミン系の投射様式とパーキンソン病の発症に關与する神経基盤の解明

研究課題名（英文） Axonal arborization of dopaminergic neurons of the rat midbrain: mechanism of Parkinson's disease

研究代表者

松田 和郎（MATSUDA WAKOTO）

滋賀医科大学医学部・助教

研究者番号：80444446

研究成果の概要（和文）：

パルミトイル化膜移行シグナルを結合した緑色蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子組換えウイルスベクターをトレーサーとして用い、ドーパミン神経系の投射様式の定量的解析を単一細胞レベルで行った。再構成された8個の単一ドーパミン細胞は平均466,831 μm の軸索を線条体に投射し、一側の線条体容積の平均2.7%（細胞数にして約75,000個）にシグナルを伝達していることが判明した。反対に線条体細胞の側からみると1個の線条体細胞は95～194個の異なるドーパミン細胞のシグナルを受け取ることが見出された。また、 μ オピオイド受容体との二重染色により、単一ドーパミン細胞の軸索は線条体のstriosomeとmatrixの両方に分布することも明らかにされた。これらのことから、単一ドーパミン信号は従来考えられていたよりも広範囲かつ高密度に、またstriosome/matrix構造とは比較的無関係に線条体に分布することが結論された。これらはドーパミン系の持つ二面性、すなわち脆弱性（vulnerability）と予備力（redundancy）を反映し、またdopaminergic dysregulation syndromeにみられるような行動障害の一因を示唆すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The axonal arbors of nigrostriatal dopaminergic neurons were visualized with a viral vector expressing membrane-targeted green fluorescent protein in rat brain. As results, all eight reconstructed tyrosine hydroxylase-positive dopaminergic neurons possessed widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. The striatal axonal bush of each reconstructed dopaminergic neurons covered 0.45 – 5.7% (mean \pm S.D. = 2.7 \pm 1.5%) of the total volume of the neostriatum. Furthermore, all the dopaminergic neurons innervated both striosome and matrix compartments of the neostriatum, although each neuron's arborization tended to favor one of these compartments. Detail morphological images of DA neurons derived from this new approach are used to elucidate the role of DA neurons in PD. Firstly, we point out how the new images reveal how DA neurons have a massive axonal arborization in the striatum. This arborization is on a scale not previously known, and of a form that implies both a particular vulnerability and a redundancy in DA neurons. Secondly, we describe how the imaging results indicate that DA neurons innervate both the striosome and the matrix compartments of the striatum. This dual innervation has implications for

reinforcement learning in the basal ganglia, with further implications for how normal behavior is driven and how it may be disrupted by Levodopa PD therapies. In conclusion, these results would also contribute to understanding the clinicopathology of Parkinson's disease and related syndromes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学／神経病理学

キーワード：神経実験形態学、脳神経外科学

1. 研究開始当初の背景

中脳ドーパミン神経系は、周知の通りパーキンソン病・統合失調症・報酬行動・強化学習などに関与するとされる広域投射型モノアミンニューロンである。これまでに代表研究者（松田）は遅発性に発症する神経外傷疾患の臨床研究を行なう中で、従来回復が極めて困難であるとされていた外傷後植物症患者の中に中脳ドーパミン神経系の選択的損傷が原因でパーキンソン症候群を呈するサブタイプがあり、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劇的な回復を示す患者群が潜在していることを報告してきた (Matsuda et al., 2003, 2005, 2008)。この臨床経験から代表研究者はパーキンソン症候群に関与するドーパミン神経系の投射様式に強い関心を抱くに至った。

中脳ドーパミン神経系は黒質線条体路(A8,A9)と中脳皮質辺縁路(A10)に大別され、過去の古典的なトレーサー実験によってその大まかな投射経路は判明している (Prensa et al.; Gerfen, 2004)。しかし、個々の神経細胞 (=単一細胞; single cell) の解像度においては、その投射様式は現在に至るもほとんど未知である。そのような中、分担研究者（古田）の先行研究によって膜移行シグナル (GAP43) と蛍光タンパク質 (GFP) をコードする

遺伝子組換えウイルスベクターを用いて細胞体・樹状突起および軸索終末部を鮮明に標識する方法が開発された (Furuta et al., 2001)。

2. 研究の目的

このウイルスをトレーサーとして用いて従来のトレーサーの限界を克服し、1 個の神経細胞を軸索終末まで鮮明に可視化して再構成することによって従来の方法では知り得なかったドーパミン神経系の投射様式の解明を目指すことを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 単一神経細胞の可視化／脳連続切片の作成

ウイルスベクターは分担研究者（古田）より供与と助言を受けて使用した。ラット脳の標的部位に定位的手術によってウイルスベクターを注入し、一定時間後に還流固定し脳を取り出して全脳の凍結ブロックを作製して薄切した。注入部位の切片に tyrosine hydroxylase 免疫染色を行って蛍光顕微鏡で観察し、感染細胞の化学的特性（ドーパミン性）を確認した。

至適個数（1～3 個程度）の感染の確認されたサンプルの全切片を明視野二重染色 (GFP および MOR) にて可視化し、連続切片標本を作成した。これらによって特定領域の神経細胞と軸索の投射先

は、化学マーカーにより機能的にマッピング(例えば striosome/matrix 構造)されたバックグラウンド上に明瞭に可視化された。

(2) 単一細胞のトレースと再構成

解析用描画装置(camera lucida)およびグラフィックソフト(CANVAS)を用いて細胞体・樹状突起から軸索終末部に至る全投射経路をトレース記録し再構成した。最終サンプルではその細胞の軸索投射経路・樹状突起のネットワークが単一細胞レベルで明瞭に区別され、定量的な解析が可能となった。

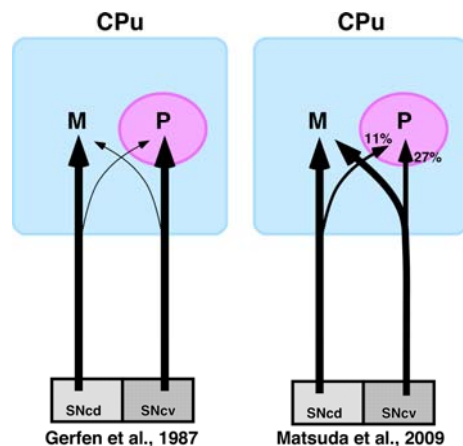
4. 研究成果

(1) 黒質ドーパミン細胞の投射様式

最終的に単一ドーパミン神経の全軸索が8個再構成された。それらの投射様式には共通点が認められた。ドーパミン細胞の軸索は線条体以外にほとんど投射せず、線条体に広範囲かつ非常に高密度に分布していた。定量的には、1個の中脳黒質ドーパミン細胞は約138,000~780,000 μm (平均466,831 $\mu\text{m} \approx 46.7\text{cm}$) の軸索を線条体に投射し、一側の線条体容積の0.45~5.7% (平均2.7%) を占めることが判明した。

1個のドーパミン細胞は平均して約75,000個 ($2,790,000 \div 0.027 = 75,330$) の線条体細胞にシグナルを伝達することになる。一方、1個の細胞が占める線条体への投射容積から約37個 ($1 \div 0.027 \approx 37$) のドーパミン細胞が存在すれば線条体を大まかに支配できることになる。したがって、1個の線条体細胞は95~194個 ($3500 \sim 7200 \div 37 \approx 95 \sim 194$) の異なるドーパミン細胞のシグナルを重複して受け取ることになる。また、軸索長をmatrixに投射している部分とstriosomeに投射している部分にそれぞれ区別して計測し、総軸索長に占めるstriosome 投射部分の軸索長の割合

をstriosome rate として算出した。その結果、dorsal tier とventral tier のドーパミン細胞のstriosome rate の平均は各々10.8±5.2% と27.0±11.5%であった(図1)。すなわち、 μ オピオイド受容体との二重染色により、多少のpreference はあるものの、単一ドーパミン細胞の軸索はstriosomeとmatrixの両方に分布していて、単一ドーパミンシグナルがこの2つの線条体コンパートメントに同時に送られることも明らかにされた。



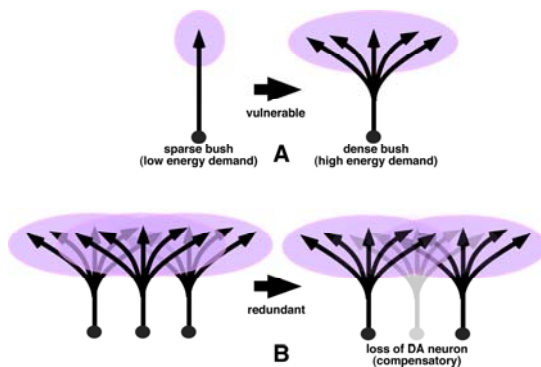
(図1: 黒質緻密部から線条体への投射様式。

M: matrix; P: patch=striosome; SNcd: substantia nigra, dorsal tier; SNcv: substantia nigra, ventral tier)

本研究の結果から、単一ドーパミン信号は、① 従来考えられていたよりも広範囲かつ高密度に、②striosome / matrix 構造とは比較的無関係に、線条体に分布していることが結論された。この2つの所見の意味を各々その二面性から考察する。

第一に、ドーパミン細胞は広範囲かつ高密度な軸索終末を形成することがパーキンソン病(症候群)の神経基盤にもつ意味を考える。まずエネルギー代謝の面から考えると、ドーパミン細胞は豊富な軸索終末を維持するために他の細胞と比較して高いエネルギー需要があると推定される(Wellstead et al., 2011)。

このことはドーパミン細胞の脆弱性 (vulnerability) を示唆する。一方、広範囲かつ高密度な軸索終末は線条体細胞からみて 95 から194 倍もの重複した支配を受けていることはドーパミン細胞の予備力 (redundancy) を示唆する (図2)。



(図2：高密度かつ広範囲な軸索投射をもつドーパミン細胞とエネルギー代謝および代償性の関係)

パーキンソン病では発症前期間 (prodromal phase) が存在し、中脳黒質細胞が正常の15～50%以下、線条体のドーパミンが10～30%以下になった時点で発症するとされている。そこまでドーパミン細胞が減少していてもなおL-dopa が効くことはドーパミン細胞の redundancy を示唆しているといえる。ドーパミン細胞の vulnerability について考えると、線条体におけるドーパミン細胞の軸索終末が広範囲かつ高密度であり、髄鞘化されていない長い軸索終末がとりわけ巨大なエネルギーを要求する故に、他の神経細胞と比較してドーパミン細胞がとりわけ脆弱であると推定される (Matsuda, 2012; Bolam et al., 2012)。vulnerability と redundancy という一見二律背反する性質は、言うなれば、「コインの裏表 (opposite sides of the same coin) 」のような1個のドーパミン細胞の形態の二面性であると推察される。

第二に、単一ドーパミン細胞が striosome と matrix の両方に投射する意義を考える。線条体の構造は均一ではなく、免疫組織化学反応によりアセチルコリンエステラーゼに濃染する matrix と striosome (あるいは patch) と呼ばれる μ オピオイド受容体陽性の部分に分かれる。前者は主に運動感覚皮質から、後者は連合皮質と辺縁皮質から入力を受け、それぞれ運動と報酬行動に関与するとされる。一方、線条体に投射する黒質緻密部のドーパミン細胞は calbindin 陽性の dorsal tier と陰性の ventral tier に区別される。従来 dorsal tier のドーパミン細胞からは線条体の matrix に、ventral tier からは striosome に各々区別して投射するとされていた (図1左)。本研究の結果によれば、そのような指向性はある程度認められており、dorsal tier からは平均して約11%の軸索が striosome に入力していたのに対し、ventral tier からは27%の軸索が striosome に入力していた (図1右)。しかしながら、最も重要な点は、dorsal / ventral tier の軸索終末はいずれも matrix と striosome の両方に入力するということである。このことがパーキンソン病における症候や強化学習にもつ意味を考察する。パーキンソン病患者において、ドーパミン補充療法を長期間継続中に、社会生活や家庭生活において様々な障害が生じる疾患を dopamine dysregulation syndrome (DDS) という (O' Sullivan et al., 2009)。DDS の症状の多くは依存的または強迫的である。これらは、行動が報酬や情動に病的に巻き込まれた (involve) 状態といえる。しかしながら、このような病的な状態ではなく正常な状態においても、一般に行動とは何らかの情動や報酬に involve されて生ずるものである。正常な状態では involve でなく統合 (integrate) されると表現されるが本質的には変わりはない。

い。Dorsal / ventral tierのドーパミン細胞のいずれもが、単一の細胞の解像度においてもmatrix (行動) とstriosome (情動ないし報酬) の両方に入力することは、これらを区別して入力するとしていた従来の仮説に対してむしろ現実の行動の説明に合致しており、情動・報酬と行動が線条体において、ドーパミンシグナルによって、分ち難くintegrate / involveされることを示唆する。

(2) 黒質非ドーパミン細胞の投射様式

黒質に注入し感染が確認されたウイルスベクターのうち、tyrosine hydroxylase 陰性の単一神経細胞を解析した。ドーパミン細胞と異なり、投射先は視床、外側視床下部、視索上核、中隔核、縫線核などであった。また、軸索の密度はドーパミン細胞と比較して非常に疎(sparse)であり、シナプス構造を示す軸索ボタン(button)が明瞭に観察された。

(3) 線条体細胞の投射様式

線条体から淡蒼球内節、黒質網様帯、淡蒼球外節に投射する経路の解析を行った。この結果、ストリオソームのみならずマトリックスにも直接路(淡蒼球内節/黒質網様帯への投射)と間接路(主として淡蒼球外節への投射)投射細胞が存在することが判明した。また、ストリオソームにおける線条体黒質路細胞だけが、黒質緻密帯に主として出力し、一定量の側副路を淡蒼球、黒質網様帯に出力することも明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① [Honma S](#), [Matsuda W](#), Kudo M. Right hepatic artery traveling anteriorly to the common bile duct. *Anat Sci Int*, 査読有、88(2): 93-96, 2013 doi: 10.1007/s12565-012-0134-1.

- ② [Sonomura T](#), [Furuta T](#), Nakatani I, Yamamoto Y, Unzai T, [Matsuda W](#), Iwai H, Yamanaka A, Uemura M, Kaneko T. Correlative analysis of immunoreactivity in confocal laser-scanning microscopy and scanning electron microscopy with focused ion beam milling. *Front Neural Circuits*, 査読有、7(26), 2013 (Epub 2013 Feb 25) doi: 10.3389/fncir.2013.00026.

- ③ [松田和郎](#), [古田貴寛](#), [菌村貴弘](#), 大原信司, 布施郁子, 武内重二, 山上達人, 金子武嗣, [宇田川潤](#). 中脳ドーパミン系の投射様式: パーキンソン病の発症に関与する神経基盤についての考察. *機能的脳神経外科*, 査読有、51(1): 60-66, 2012

- ④ [Fujiyama F](#), Sohn J, Nakano T, [Furuta T](#), Nakamura KC, [Matsuda W](#), Kaneko T. Exclusive and common targets of neostriatofugal projections of rat striosome neurons: A single neuron-tracing study using a viral vector. *Eur J Neurosci*, 査読有、33(4): 668-77, 2011 doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07564.x.

- ⑤ [松田和郎](#), 大原信司, 布施郁子, 眞屋キヨミ, 笠井祥子, 野崎和彦, 山上達人, 武内重二. パーキンソン病に対する深部脳刺激術後 ADL 改善度の中長期成績. *機能的脳神経外科*, 査読無、50(1): 78-79, 2011

- ⑥ [松田和郎](#). 意識とは何か: 意識障害治療と神経解剖学研究の現場から. *人体科学*, 査読有、18(1): 21-35, 2010

- ⑦ [松田和郎](#), 大原信司, 布施郁子, 武内重二, 野崎和彦, [安原治](#). 定位脳手術における周術期頭蓋内出血合併症例の局所

解剖学的検討. 機能的脳神経外科、査読無、49(1): 104-105, 2010

[学会発表] (計7件)

- ① 松田和郎、古田貴寛、菌村貴弘、金子武嗣、宇田川潤. 中脳非ドーパミン細胞の投射様式を解析する. 第118回日本解剖学会(2013年3月28日~30日 高松市かがわ国際会議場)
- ② 松田和郎、古田貴寛、菌村貴弘、金子武嗣、宇田川潤. 中脳非ドーパミン細胞の投射様式を解析する. 第35回日本神経科学学会(2012年9月18日~21日 名古屋市 名古屋国際会議場)
- ③ 松田和郎、大原信司、布施郁子、武内重二、山上達人、宇田川潤. 中脳ドーパミン系の投射様式: パーキンソン病の発症に関与する神経基盤についての考察. 第51回日本定位・機能神経外科学会(2012年1月20-21日 東京都 東京ステーションコンファレンス)
- ④ 松田和郎、古田貴寛、菌村貴弘、金子武嗣、安原治、工藤基. 中脳非ドーパミン細胞の投射様式を解析する. 第34回日本神経科学学会(2011年9月14日~17日 横浜市)
- ⑤ 松田和郎、大原信司、布施郁子、真屋キヨミ、笠井祥子、野崎和彦、武内重二. パーキンソン病に対する深部脳刺激術後ADL改善度の中長期成績. 第50回日本定位・機能神経外科学会(2011年1月21-22日 広島市)
- ⑥ 松田和郎、古田貴寛、金子武嗣、安原治. 中脳における非ドーパミン細胞の投射様式. 第33回日本神経科学学会(2010年9月2日~4日 神戸市)
- ⑦ 松田和郎、山上達人、大原信司、武内重二、野崎和彦、安原治. 外傷後最小意識

状態に対するL-dopa療法. 第19回日本意識障害学会(2010年7月23-24日 下関市)

[図書] (計1件)

Matsuda W. Chapter 1: Imaging of dopaminergic neurons and implications for Parkinson's disease. The systems biology of Parkinson's disease. Springer, New York, 2012, pp1-17

[その他] (計1件)

松田和郎、野崎和彦. 意識障害. 脳科学辞典(電子版) (<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田和郎 (MATSUDA WAKOTO)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80444446

(2) 研究分担者

宇田川潤 (UDAGAWA JUN)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10284027

藤山文乃 (FUJIYAMA FUMINO)
同志社大学・脳科学研究科・教授
研究者番号: 20244022

本間智 (HONMA SATORU)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40285581

菌村貴弘 (SONOMURA TAKAHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 40347092

古田貴寛 (FURUTA TAKAHIRO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60314184

安原治 (YASUHARA OSAMU)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号: 80239772

安田宗義 (YASUDA MUNEYOSHI)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10440752