

神経回路発達へのドーパミンの機能の解明

ードーパミンシグナル操作による精神疾患治療の開発に向けてー

中井 彩加・上阪 直史
東京科学大学認知神経生物学分野

<要 旨>

自閉症スペクトラム症や統合失調症などの精神疾患では、シナプスの形成段階や不要なシナプスを取り除く剪定段階に異常があると考えられており、神経回路の発達における異常が疾患の病態や病因として指摘されている。また、ドーパミンは精神疾患の発症において重要な役割を果たしているとされているが、神経回路が形成される発達期の小脳におけるドーパミンの機能はいまだ解明されていない。本研究では小脳プルキンエ細胞にてドーパミン受容体 D2 (Drd2) を発達期以降に遺伝的に欠損させたマウスを作成し、シナプスの形態観察、細胞集団の活動の可視化、個体行動への影響の観察を行った。結果として、登上線維のシナプス数が増加し、幼弱期の細胞集団の同期性が上昇し、さらに不安様行動が低下していた。これらの結果から Drd2 は発達期における小脳プルキンエ細胞での登上線維のシナプス刈込みを促進し、細胞集団としての活動の同期性を低下させ、個体行動を正常に形成することに寄与していることが示唆された。

<キーワード> ドーパミン 小脳 神経細胞 発達 精神疾患

【はじめに】

自閉症スペクトラム症や統合失調症などの精神疾患では、シナプスの形成段階や不要なシナプスを取り除く剪定段階に異常があると考えられており、神経回路の発達における異常が疾患の病態や病因として指摘されている¹。また、ドーパミンは精神疾患の発症において重要な役割を果たしているとされ、特に自閉スペクトラム症の小児へのアリピプラゾール（ドーパミン関連因子の受容体部分アゴニスト）の投与が症状の緩和に効果を示すこと²や、実験動物におけるドーパミン関連遺伝子の変異が精神疾患症状を引き起こすことが報告されている³。さらに、臨床研究などから小脳のドーパミンと様々な精神疾患の関与が示唆されており⁴、ドーパミンが小脳の機能に重要で、かつ精神疾患に関与している可能性は長年示

唆されてきた。しかし、げっ歯類を用いた研究では小脳におけるドーパミンの存在自体に議論があり、これまで研究があまり進展していなかった。そのため、小脳のドーパミンと精神疾患の関係性は不明瞭であった。近年の染色技術やイメージング技術の向上により、小脳においてもドーパミンの存在が確認され、成体の実験動物の小脳機能においてドーパミンが重要であることが明らかとなった⁵⁻⁷。しかし、発達期の小脳におけるドーパミンの機能はいまだ解明されていない。

本研究でははじめに、ドーパミンシグナルと小脳の神経回路形成の関係を調べるため、プルキンエ細胞のドーパミン受容体に着目した。実験動物であるマウスの免疫組織化学染色法によるシナプスの形態観察、カルシウムイメージングによる

細胞集団の活動の可視化、行動実験による個体行動への影響の観察を行ったところ、小脳プルキンエ細胞にてドーパミン受容体 D2 (Drd2) を発達期以降に遺伝的に欠損させたマウスは登上線維のシナプス数が増加し、幼弱期の細胞集団の同期性が上昇し、さらに不安様行動が低下している結果がみられた。

【方法】

使用マウス系統

マウスは東京科学大学にて飼育し、12-h 明暗サイクルで餌と水をいつでも摂取できる状態を維持した。実験には *C57BL/6-Drd2<tm1.1 Mmsh>* マウス (Drd2 flox)⁸ を使用した。

ウイルスインジェクション

すべての手術はイソフルラン麻酔下で行い、導入時は濃度 3.0%、麻酔維持は呼吸速度を観察し 3.0~0.5% の間で調節した。ウイルスは先端 33G のハミルトンシリッジに充填し、小脳に傷がつかないようにドリルで頭蓋骨に穴をあけ、脳表を露出したのちに針先を小脳虫部に差し、インジェクターを用いて微量注入した。1 匹 1 時間以内で実施し、手術終了後はヒートパットにて体温を回復させたのちに元のケージ (母マウスのいるケージ) にもどした。

免疫組織化学染色、行動実験を行うマウスは生後 2 - 3 日齢のマウスに AAV-L76-P2A-mCherry-Cre もしくは AAV-L76-mCherry (どちらもセロタイプ PhP. eB) を 1.5 uL (流速 0.1 uL/分) ずつ小脳に注入した。

Ca イメージングを 9-11 日齢で行う場合は 2-3 日齢のマウスで AAV-L76-P2A-mCherry-Cre もしくは AAV-L76-mCherry と AAV-L76-jGCaMP7s

(すべてセロタイプ PhP. eB) を 2 : 1 の割合で混合し、1.5 uL (流速 0.1 uL/分) ずつ小脳に注入した。

Ca イメージングを 15-19 日齢で行う場合は生後 2-3 日齢で AAV-L76-P2A-mCherry-Cre もしくは AAV-L76-mCherry (どちらもセロタイプ 8) を 1.0 uL (流速 0.1 uL/分) ずつ小脳に注入し、その後、生後 8-13 日齢で AAV-L76-jGCaMP7s (セロタイプ PhP. eB) を 0.5 uL (流速 0.1 uL/分) 小脳に注入した。

免疫組織化学染色

3 種混合麻酔 (メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの混合薬) を腹腔内に投与し、四肢の応答が消失したのちに左心室から生理食塩水を還流し、その後 4% paraformaldehyde (w/v) in 0.1 M Phosphate-buffered saline (PFA/PBS) を還流した。脳を摘出し 4% PFA/PBS に 1 晩置換し、ビブラトームを用いて小脳虫部の 100 um の厚さの矢状断面切片を作成した。

作製した切片を一度 PBS で洗浄した後、1% Triton X-100 in PBS (PBST) に置換した。さらに bovine serum albumin (BSA) で 1 時間ブロッキングし、1 次染色液 (1/1000 Rabbit anti-RFP、1/300 Goat anti-Car8、1/300 Guinea pig anti-VGLUT 2) に 4°C で 2 晩振盪させた。PBS で 3 度洗浄し、2 次染色液 (1/300 Alexa 488-conjugated bovine anti-goat IgG、1/300 Cy3-conjugated bovine anti-goat IgG、1/300 Alexa 647-conjugated bovine anti-goat IgG、and 1/2000 DAPI) に室温で 4 時間振盪させた。PBS で 3 度洗浄し、スライドガラス上に並べて封入材で封入した。画像は オールインワン顕微鏡 (BZ-X700 もしくは BZ-X800; KEYENCE) で撮像した。撮影した画像

は画像解析ソフト ImageJ/Fiji (NIH) を用いて二値化し解析を行った。

Ca イメージングの手術

9-19 日齢の仔マウスを手術台にのせ 0.5-3% でイソフルラン麻酔をかけた。頭蓋骨上の皮膚と筋肉、結合組織を取り除き、メタルプレートの小脳の小葉(L)6-9 が穴の中央に入るようにデンタルセメントと接着剤で接着した。テルマパンチ (Maruho) を用いて直径 3 mm の穴を頭蓋骨上にあけ、脳表を露出し、出血が止まった状態で脳表が乾燥しないよう直径 3 mm のスライドガラス (松波硝子工業) を設置した。マウスの脳が揺れないようにメタルプレートをステージ上に固定し、手術終了 10 分後の麻酔が継続している時と、その 15 分後の覚醒した時に顕微鏡 (MVX-10; Olympus) がつながったカメラを専用のソフト (Andor Solis; Oxford Instrument) を用いて観察した。

Ca イメージングのデータ解析

画像の生データを 8bit 512×512 ピクセルに ImageJ/Fiji (NIH) を用いて変換し、画像中のシグナルが見える領域のみをトリミングした。画像解析ソフト Suite2p を用いて活動しているプルキンエ細胞を Regions of interest (ROI) として検出し、それぞれの ROI ごとの蛍光強度の変化を計算した。次にこのデータを MATLAB スクリプトによって解析を行った。蛍光強度 (F) は $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$ を計算し、各 ROI の F 値の平均値に 1 標準偏差 (SD) を加えたものを閾値とした。F₀ は閾値以下の F 値を平均した。最後の 50 フレーム (10 秒) でベースライン強度の平均値が初期値の 2 倍以上変化した ROI は除外した。相関係数はピアソンの相関係数を用いてすべての ROI ペア間を

計算した。得られた相関行列は、データセット内のすべての ROI ペア間の関係を計算した。

行動実験

行動実験は 8 週以降 15 週以内のオスマウスを用いて行った。行動実験を始める前にすべてのマウスを実験区域にて 30 分以上慣らした。オープンフィールドテスト、社会性テストの画像は ImageJ/Fiji (NIH) のツールボックス (MouBeAT) を用いて解析した。

オープンフィールドテスト

各辺が 50 cm の全面が白いオープンフィールドテスト用の箱の中央にマウスを置き、真上からビデオで 10 分間マウスの行動を記録した。新規環境下での自発活動性と不安様行動を評価できると考えられており、10 分間での移動距離と中央領域での滞在時間の割合を算出し評価した。

社会性テスト① (物体と新規マウス)

各辺が 50 cm の全面が白いオープンフィールドテスト用の箱の片側にアクリルケース (8 cm×8 cm で高さ 19 cm、格子状で中と接触が可能) の中にマウスの人形を入れたものと、反対側に会ったことがない同性で体格が近く同じ C57BL6/J バックグラウンドのマウスを設置し、それぞれのアクリルケースの付近に滞在している時間から滞在時間の割合を算出した。

社会性テスト② (接触済みマウスと新規マウス)

3 つのセッションから構成され、まず初めに各辺が 50 cm の全面が白いオープンフィールドテスト用の箱にアクリルケース (8 cm×8 cm で高さ 19 cm、格子状で中と接触が可能) を左右に 2 つ設置

した状態でテストマウスを5分間滞在させた。次に片方のアクリルケースにすでに接触済みマウスを入れ、テストマウスを10分間滞在させた。最後に空いている反対側のアクリルケースに会ったことがない新規マウスをいれ、10分間滞在させ行動をビデオで記録した。それぞれのアクリルケースの付近に滞在している時間から滞在時間の割合を算出した。

Rota-rod 試験

Rotarod 装置（小原医科産業）にマウスを乗せ、回転速度を5分間で4 rpm から40 rpm まで増加させて落下するまでの時間を記録した。1日3回を3日間実施し、各実施の間は10分間とした。

統計解析

すべての統計解析はPrism9（GraphPad）を用いて行い、統計的な有意差は $p < 0.05$ とした。すべての2群検定と多重比較は両側検定を行った。

【結果】

Drd2 cKO マウスでは小脳プルキンエ細胞上の登上線維のシナプス数が増加した

本研究でははじめに、ドーパミンシグナルと神経回路形成の関係を調べるため、小脳のプルキンエ細胞のドーパミン受容体に着目した。主要なドーパミン受容体であるD2受容体のFloxマウス（Drd2 flox）を使用し、小脳プルキンエ細胞特異的に発現するL76プロモーター⁹下流に遺伝子組み換え酵素Creを有するAAVウイルスベクターを生後2-3日齢のマウスの小脳に注入することで、D2受容体コンディショナルノックアウトマウス（Drd2 cKO マウス）を作成した。これらのマウスは発達期以降で小脳においてDrd2を介したドー

パミン受容が阻害されていることから、Drd2を介したドーパミンシグナルが発達期の小脳の神経回路形成にどのように影響しているかを解析できると考えられる。成体マウスを用いて免疫組織化学染色法により登上線維シナプスを染色するVGLUT2の発現分布の観察をおこなったところ、Drd2 cKO マウスにおいて小脳プルキンエ細胞上の登上線維のシナプス数が増加していた（図1）。このことから、小脳におけるDrd2は発達期における小脳プルキンエ細胞での登上線維のシナプス刈込みに寄与していることが示唆された。

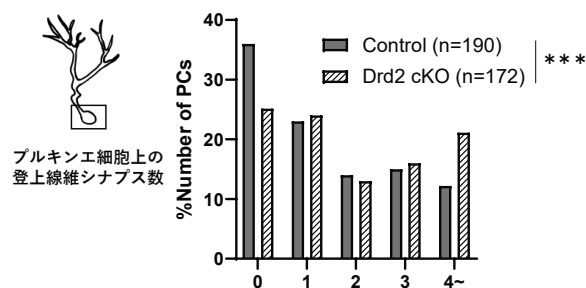


図1. Drd2 cKO マウスの小脳プルキンエ細胞における登上線維のシナプス数の割合
コントロール群 n=190, cKO 群 n=172
* は Mann-Whitney U test (***) $P < 0.001$

Drd2 cKO マウスでは発達期において小脳プルキンエ細胞同士の活動の同期性が高い状態が続いていた

続いて、ドーパミンシグナルがプルキンエ細胞の細胞集団としての活動性にどのように影響しているかを調べるためにDrd2 cKO マウスを用いてカルシウムイメージングを行った。小脳プルキンエ細胞は生後8日ごろまでに複数の登上線維がプルキンエ細胞に投射し、そこから生後18日ごろまでに刈込みがおきるとともに¹⁰、細胞集団としての活動の同期性も生後すぐが高く、その後低下していくことが知られている¹¹。はじめに、生後9-11日齢でイメージングを行ったところ、覚醒下においてDrd2 cKO マウスの細胞集団の活動

の相関係数が高く、同期性が高いことが分かった(図 2)。

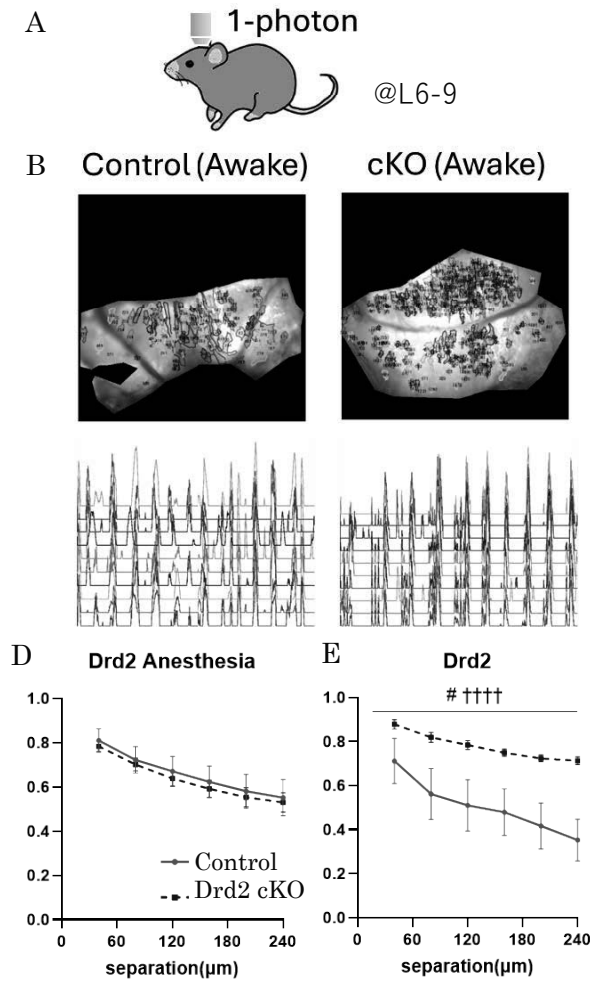


図 2. 生後 9-11 日齢の Drd2 cKO マウスのプルキンエ細胞におけるカルシウムシグナルの細胞集団中の相関係数と細胞間の距離の関係
(A) カルシウムイメージングの模式図
(B、C) 覚醒下におけるイメージング例。上の図がシグナル画像の例、下の図が 200 秒中のランダムな 10 ROI 中のシグナル強度変化の例
コントロール群 (B)、cKO 群(C)
(D) 麻酔下における相関係数の変化
コントロール群 N=4, cKO 群 N=6
(E) 覚醒下における相関係数の変化
コントロール群 N=3, cKO 群 N=3
#, † は 2-way ANOVA による主効果と相互作用の有意差(# $P < 0.05$, † † † † $P < 0.0001$)、グラフは平均 ± 標準誤差

続いて発達の後期過程である 15-19 日齢のマウスにおいても同様にイメージングを行ったところ、9-11 日齢でのイメージング結果と同様に、覚醒下において Drd2 cKO マウスにおいて相関係

数が高く細胞集団の同期性が高いことが分かった(図 3)。

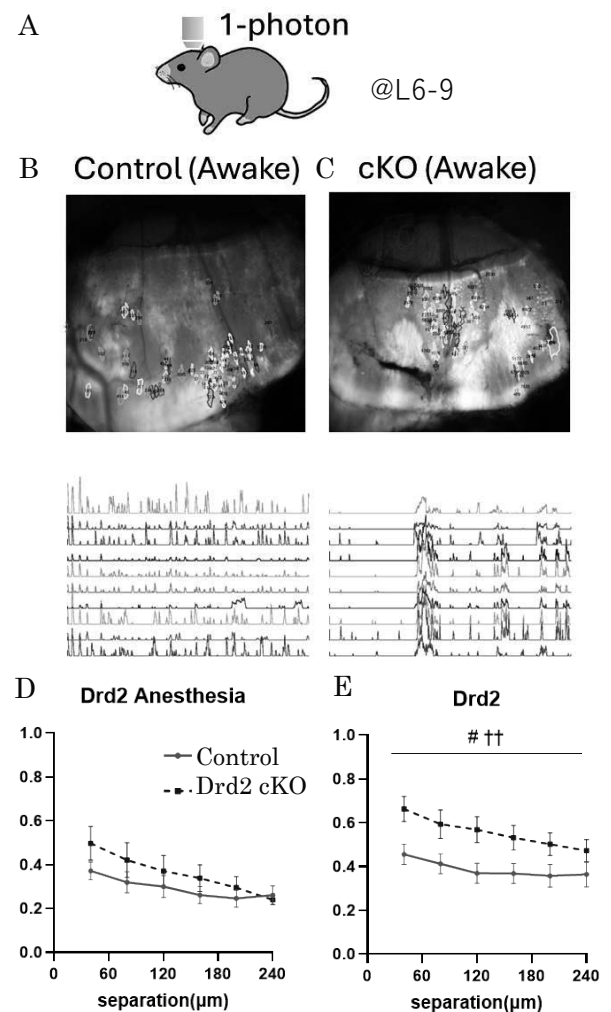


図 3. 生後 15-19 日齢の Drd2 cKO マウスのプルキンエ細胞におけるカルシウムシグナルの細胞集団中の相関係数と細胞間の距離の関係
(A) カルシウムイメージングの模式図
(B、C) 覚醒下におけるイメージング例。上の図がシグナル画像の例、下の図が 200 秒中のランダムな 10 ROI 中のシグナル強度変化の例
コントロール群 (B)、cKO 群 (C)
(D) 麻酔下における相関係数の変化
コントロール群 N=6, cKO 群 N=4
(E) 覚醒下における相関係数の変化
コントロール群 N=6, cKO 群 N=5
#, † は 2-way ANOVA による主効果と相互作用の有意差(# $P < 0.05$, † † $P < 0.01$)、グラフは平均 ± 標準誤差

これらの結果から、Drd2 cKO マウスでは発達過程の覚醒下においてプルキンエ細胞同士の同期性が高い状態が続いていることが示唆された。

Drd2 cKO マウスでは不安様行動が低下していた

最後に、発達過程から続くドーパミンシグナルの低下が成体のマウスの行動にどのような影響を与えているか調べるために、行動試験を実施した。マウスは新規空間に滞在するとき、壁側に滞在する時間が長くなることが知られており、中央領域に滞在している時間を算出することで不安様行動のレベルを測ることができる。同時に、マウスの移動量を測り活動性の測定も行った。コントロール群と比較して Drd2 cKO マウスでは中央滞在割合が増加しており、不安様行動が低下していることが分かった(図 4)。

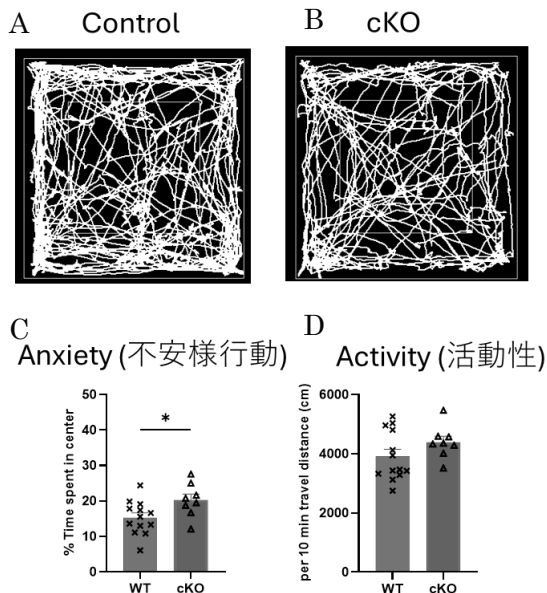


図 4. Drd2 cKO マウスのオープンフィールドテスト
(A、B) 10 分間の行動軌跡の例
コントロール群 (A)、cKO 群 (B)
(C) マウスが中央領域に滞在した時間の割合
(D) 10 分間当たりのマウスの移動距離
コントロール群 N=13, cKO 群 N=8
* は Mann-Whitney U test (*P<0.05)、グラフは平均
±標準誤差

さらに、マウスの社会性を測定するため、2 種類の社会性テストを行った。まず、物体（マウス型の人形）と会ったことがない新規マウスを領域内に設置し、近くに滞在した時間の割合を調べることで、マウスとそれ以外に対する興味の違いを調べた。次にすでに会ったことがあるマウスと

初めて会うマウスを領域内に設置し、滞在した時間の割合を調べ、マウス間での興味の違いを調べた。結果としては、どちらの条件においてもコントロール群と cKO 群の間に有意な差は見られなかった(図 5)。

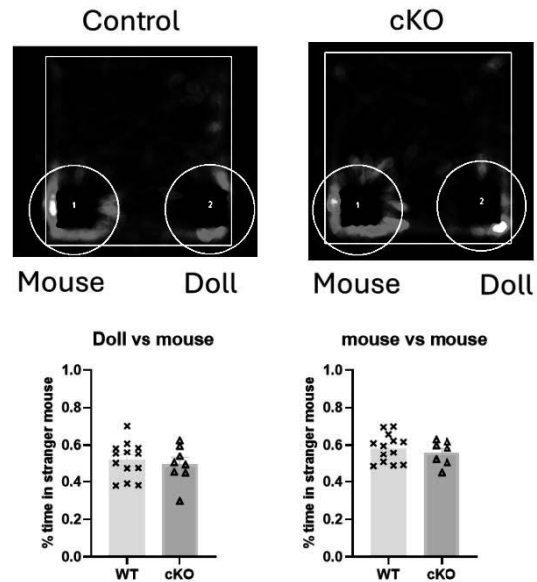


図 5. Drd2 cKO マウスの社会性テスト
(A、B) 物体とマウスを用いた社会性テストの 10 分間の行動分布ヒートマップの例
コントロール群 (A)、cKO 群 (B)
(C) 物体とマウスのうちマウス側に滞在した時間の割合
(D) すでに会っているマウスと新規マウスのうち新規マウス側に滞在した時間の割合
コントロール群 N=13, cKO 群 N=8、グラフは平均 ±標準誤差

運動機能を調べるため、Rota-rod 試験を行った。

こちらもコントロール群と cKO 群の間に有意な差は見られなかった(図 6)。

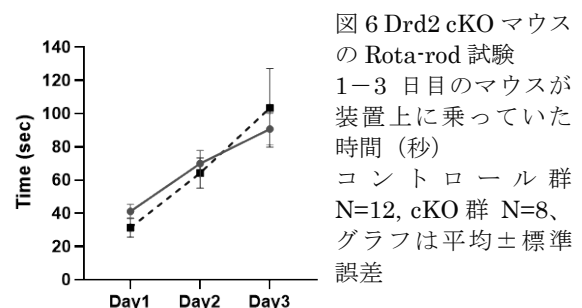


図 6 Drd2 cKO マウスの Rota-rod 試験
1-3 日目のマウスが装置上に乗っていた時間 (秒)
コントロール群 N=12, cKO 群 N=8、
グラフは平均 ±標準誤差

これらの結果から、Drd2 cKO マウスでは、不安様行動が低下していることが分かった。

【考察】

本研究の結果、小脳プルキンエ細胞にてドーパミン受容体 D2 を発達期以降に遺伝的に欠損させた Drd2 cK0 マウスは登上線維のシナプス数が増加し、幼弱期の細胞集団の同期性が上昇し、さらに不安様行動が低下している結果がみられた。

プルキンエ細胞の細胞集団の活動は登上線維入力の影響を受けると考えられており、Drd2 cK0 マウスでは登上線維シナプスの刈込みに異常をきたし、図 1 結果のようにシナプスが残ったままになってしまったことで図 2、3 のように細胞集団の活動の同期性が上がっているのではないかと推察される。

図 4 の結果より、オープンフィールドテストでは Drd2 cK0 マウスにおいて不安様行動が下がっている結果となった。ここから、小脳でのドーパミンシグナルの低下が不安様行動の低下につながることから、逆にドーパミンシグナルの増加が不安様行動の増加につながると推察される。今後、小脳においてドーパミンシグナルを増加させたマウスにおいて不安様行動が変化するかにしても調べていきたい。また、自閉スペクトラム症モデルマウスにおいては不安様行動が増加している場合があり¹²、小脳でのドーパミンシグナルが増加しているかや、Drd2 を介したドーパミンシグナルを減少させた場合に不安様行動が減少するかにしても実験したいと考えている。

図 5 の結果より、本研究では Drd2 cK0 マウスにおいて社会性への影響は見られなかった。これまでの論文から、成体マウスにおける小脳の Drd2 は小脳の Crus I/II を介して社会性へ影響を与えているとの示唆があり⁵、本研究では小脳虫部を対象として実験を行ったため、半球部が社会性形成に重要である可能性は残る。小脳半球部におけ

る発達過程中的 Drd2 シグナルが社会性形成に影響しているかに関しては今後の検討課題である。

ドーパミン受容体には D1-D5 まで 5 つの種類があることが知られており、主要なものとして本研究で対象とした Drd2 のほかに、D1 受容体(Drd1)も挙げられる。現在、Drd1 についてもコンディショナルノックアウトマウスを作成して表現型を調べており、小脳発達におけるドーパミン機能に関してより詳細を明らかにできるのではないかと考えている。

【引用文献】

1. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., Vanleeuwen, J. E. & Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience* 2011 14:3 14, 285–293 (2011).
2. Marcus, R. N. *et al.* A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48, 1110–1119 (2009).
3. Pogorelov, V. M., Rodriguiz, R. M., Insko, M. L., Caron, M. G. & Wetsel, W. C. Novelty seeking and stereotypic activation of behavior in mice with disruption of the *Dat1* gene. *Neuropsychopharmacology* 30, 1818–1831 (2005).
4. Flace, P. *et al.* The Cerebellar Dopaminergic System. *Front Syst Neurosci* 15, 650614 (2021).
5. Cutando, L. *et al.* Cerebellar dopamine D2 receptors regulate social behaviors. *Nature Neuroscience* 2022 25:7 25, 900–911 (2022).
6. Li, C. *et al.* Purkinje cell dopaminergic inputs to astrocytes regulate cerebellar-dependent behavior. *Nat Commun* 14, 1613 (2023).
7. Locke, T. M. *et al.* Dopamine D1 Receptor-Positive Neurons in the Lateral Nucleus of the Cerebellum Contribute to Cognitive Behavior. *Biol Psychiatry* 84, 401–412 (2018).

8. Ikegami, M., Uemura, T., Kishioka, A., Sakimura, K. & Mishina, M. Striatal dopamine D1 receptor is essential for contextual fear conditioning. *Sci Rep* **4**, (2014).
9. Nitta, K., Matsuzaki, Y., Konno, A. & Hirai, H. Minimal Purkinje Cell-Specific PCP2/L7 Promoter Virally Available for Rodents and Non-human Primates. *Mol Ther Methods Clin Dev* **6**, 159 (2017).
10. Watanabe, M. & Kano, M. Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells. *European Journal of Neuroscience* **34**, 1697–1710 (2011).
11. Good, J.-M. *et al.* Maturation of Cerebellar Purkinje Cell Population Activity during Postnatal Refinement of Climbing Fiber Network. *Cell Rep* **21**, 2066–2073 (2017).
12. Katayama, Y. *et al.* CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature* **537**, 675–679 (2016).