

博士学位論文審査要旨

2021年2月10日

論文題目: Characterization of unique subregions of the caudal lateral striatum: In their conserved expression patterns of dopamine receptors D1 and D2 in rodents and primates
(げっ歯類および霊長類の尾側線条体におけるドーパミン受容体 D1 および D2 の特殊な発現領域の解明)

学位申請者: 緒方 久実子

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査: 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査: 脳科学研究科 教授 高橋 晋

要 旨:

この学位論文では、尾側線条体の一部に存在するドーパミン受容体 D2(D2R)を発現する細胞がほとんど存在せず、ドーパミン受容体 D1(D1R)を発現する細胞が主として存在する D2R-poor zone と、その隣に存在する D1R を発現する細胞がほとんど存在せず、D2R を発現する細胞が主として存在する D1R-poor zone に着目し、1) 野生型マウスにおけるこれらの領域について内在性のドーパミン受容体発現について調べ、2) ラットと霊長類においてこれらの領域の存在を確認し、3) これらの領域のニューロンがどのような神経回路を形成するのか検討した。その結果、1)内在性ドーパミン受容体免疫染色において D1R-/D2R-poor zone の存在が確認され、in situ hybridization においても確認された。それらの領域で TH の免疫染色が弱いこと、また、D2R-poor zone にはセロトニンの軸索が多く観察された。2)さらにラットとマーモセットにおいても D1R-/D2R-poor zone が存在し、げっ歯類だけでなく霊長類にも保存されていることが示された。3)D1R-/D2R-poor zone に存在する線条体ニューロンがどのような神経回路を形成するのかを明らかにするため、順行性神経トレーサーを打ち検討した。D1R-/D2R-poor zone の直接路ニューロンの軸索は、黒質外側部の背側に約 79%が集中しており、D1R-/D2R-poor zone の直接路ニューロンは、黒質外側部の PV 陽性ニューロンの細胞体を取り囲むように軸索を伸ばしており、これらのニューロンに投射していることが示唆された。

口頭試問では、英語による適切な研究発表を行い、質疑応答にも満足のできる回答・討論を行い、学位論文の defense を行うことができたと判断できる。

よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2021年2月10日

論文題目: Characterization of unique subregions of the caudal lateral striatum:
In their conserved expression patterns of dopamine receptors D1 and D2
in rodents and primates

(げっ歯類および霊長類の尾側線条体におけるドーパミン受容体 D1 および D2 の特殊な発現領域の解明)

学位申請者: 緒方 久実子

審査委員:

主査: 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査: 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

副査: 脳科学研究科 教授 高橋 晋

要 旨:

博士学位候補者の緒方氏に対して、2021年1月28日午前9時00分より約1時間にわたり総合試験を行なった。緒方氏の学位研究は、尾側線条体の一部に存在する D1R-poor zone, D2R-poor zone の解剖学的解析である。そこで総合試験では解剖学の基礎および専門的な知識についての試問を行った。またその研究の脳科学一般、疾患研究などにおける意義についても質疑を行った。

緒方氏は、審査委員の質問について適切に答え、不明な点に関しては十分に論理的な考察を行った。また関連分野の基礎知識は十分に備わっていると判断した。専門的な知識について、概して満足のできるレベルにあると判断した。

なお語学試験については、総合試験の前に行った公開口頭試問を英語で行なったため、研究で通じていることが認められた。

以上を踏まえて、審査委員一同の協議の結果、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目: Characterization of unique subregions of the caudal lateral striatum: In their conserved expression patterns of dopamine receptors D1 and D2 in rodents and primates
(げっ歯類および霊長類の尾側線条体におけるドーパミン受容体 D1 および D2 の特殊な発現領域の解明)

氏 名: 緒方 久実子

要 旨:

大脳基底核は大脳の深部に位置し、運動や報酬、情動に関与している。大脳基底核の入力核である線条体は、大脳皮質と視床から入力を受け、二種の異なる投射ニューロンを介して出力核である黒質網様部と淡蒼球内節に情報を伝達する。一つは線条体から出力核に直接投射する直接路ニューロンで、もう一つは淡蒼球外節や視床下核を経由して出力核に伝達する間接路ニューロンである。この二つの投射経路は、黒質緻密部から線条体へのドーパミン入力によって調節されている。ドーパミンは、直接路に対してはドーパミン受容体 D1 (D1R) を介して興奮性に、間接路に対してはドーパミン受容体 D2 (D2R) を介して抑制性に作用する。従来の研究では、D1R と D2R それぞれを持つ細胞群は線条体内に偏ることなく無秩序に散在しているとされてきた。しかし近年、これらの細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いた研究により、淡蒼球外節に面した尾側線条体の一部では D2R を発現する細胞がほとんど存在せず、D1R を発現する細胞が主に存在する領域 D2R expressing MSNs-poor zone (D2R-poor zone) があること、またその隣には、D1R を発現する細胞がほとんど存在せず D2R を発現する細胞が多く存在する領域 (D1R-poor zone) があることが報告された。また、D1R-poor zone 及び D2R-poor zone (以下、D1R-/D2R-poor zones) 内は、ドーパミンニューロンの軸索が疎であることも示され、これらの領域は他の線条体領域とは異なる神経回路を形成していることが示唆された。以上の背景から、本研究では、1) 野生型マウスにおけるこれらの領域について内在性のドーパミン受容体発現を指標にして調べ、2) ラットと霊長類においてこれらの領域の存在を確認し、3) これらの領域のニューロンがどのような神経回路を形成するのかを明らかにすることで、D1R-/D2R-poor zone の機能解明の基盤となる情報を得ることを目的とした。

まず、C57BL/6J マウスにおいて内在性ドーパミン受容体及び tyrosine hydroxylase (TH) の染色を行い、D1R-/D2R-poor zone の存在を検証した。その結果、内在性ドーパミン受容体染色においても D1R-/D2R-poor zone の存在が確認され、それらの領域で TH の免疫染色が弱いことも確認できた。しかし、D1R 及び D2R は線条体ニューロンの細胞体だけでなく、皮質線条体投射ニューロンやドーパミンニューロンのシナプス前終末にも存在する。そのため、in situ hybridization 法を用いて、線条体ニューロンの細胞体における D1R と D2R の発現と、各領域における発現の差異を調べた。その結果、従来の線条体領域は D1R の mRNA である *Drd1* 発現細胞と D2R の mRNA である *Drd2* 発現細胞が各々約 46-50% と同じくらいの割合で存在した。しかし、D1R-poor zone では *Drd1* 発現細胞が約 12%、*Drd2* 発現細胞が約 79% である一方、D2R-poor zone では *Drd1* 発現細胞が約 82%、*Drd2* 発現細胞が約 4% とお互いを補完し合うような分布であることも明らかになった。この結果は、遺伝子改変動物を用いた先行研究の結果とほぼ一致していた。さらに、D1R 発現細胞が直接路ニューロンであるという従来の関係がこの特殊な領域でも成立するのかを検証するため、逆行性神経トレーサーを直接路ニューロンの投射先

である黒質に注入し、尾側線条体内で標識された直接路ニューロンの密度を定量解析した。その結果、従来の線条体領域に比べて、D1R-poor zone では標識された直接路ニューロンは有意に少なく、D2R-poor zone では有意に多いことがわかった。さらに、これらの特殊な領域においても、直接路ニューロンはD1Rを発現し、D2Rを発現しないという従来の関係が成り立つことも明らかになった。

次に、D1R-/D2R-poor zone が C57BL/6J マウスだけでなく、ラットや霊長類にも保存されているのかを検証するため、ICR マウス、Wistar ラット、Long-Evans ラット、小型霊長類であるコモンマーモセットに対し D1R 及び D2R の免疫染色を行った。その結果、全ての種において D1R-/D2R-poor zone 様の構造が存在することを見出した。理化学研究所の Marmoset Gene Atlas では、D1R-poor zone が位置する場所には確かに Drd1 発現細胞が少なく、D2R-poor zone が位置する場所には Drd2 発現細胞が少ないことも確認できた。これらの結果から、D1R-/D2R-poor zone は、げっ歯類だけでなく霊長類にも保存されていることが示された。

最後に、D1R-/D2R-poor zone に存在する線条体ニューロンがどのような神経回路を形成するのかを明らかにするため、D1R-poor zone、D2R-poor zone、及びそれら領域の背側に位置する線条体領域の三つそれぞれに対し、順行性神経トレーサの打ち分けを行った。今回注入した三つの領域の全てのサンプルにおいて、軸索が淡蒼球外節及び黒質で観察された。また、淡蒼球外節では三つの領域間に差は見られなかった。さらに、黒質においても D1R-/D2R-poor zone の間で投射先の領域に差異はなかったが、これらの領域と背側に位置する線条体領域との間では黒質内での軸索分布が異なっていた。D1R-/D2R-poor zone の直接路ニューロンの軸索は、黒質外側部の背側に約 79% が集中していたが、背側に位置する線条体領域の直接路ニューロンは黒質外側部及び黒質網様部の腹側に散在していることもわかった。黒質外側部は、ドーパミンニューロン及びパルブアルブミン含有 GABA 作動性ニューロン (PV 陽性ニューロン) の二種類で構成されているが、D1R-/D2R-poor zone の直接路ニューロンは、黒質外側部の PV 陽性ニューロンの細胞体を取り囲むように軸索を伸ばしており、これらのニューロンに投射していることを示唆する結果も得た。一方、これらの領域にドーパミンニューロンの軸索が少ないことは前述したが、D1R-/D2R-poor zone では、セロトニン陽性の軸索が他の線条体領域と比べて多いことを本研究において初めて観察した。これらの結果は、D1R-/D2R-poor zone の入出力や活動制御機構が線条体の他領域とは異なっていることを示唆している。

以上の結果から、①D1R-poor zone には間接路ニューロンが多く、D2R-poor zone には直接路ニューロンが多いこと、②D1R-/D2R-poor zone はげっ歯類だけでなく霊長類であるコモンマーモセットにも存在すること、そして③D1R-/D2R-poor zone の直接路ニューロンは黒質外側部の PV 陽性ニューロンに投射する可能性が高いことが示された。本研究では、ドーパミンニューロンの支配が弱いと考えられる D1R-/D2R-poor zone において、D1R 及び D2R のどちらか一方が十分に発現していた。D2R は内在性物質ではドーパミンしかリガンドになり得ないが、D1R はセロトニンがパーシャルアゴニストとしてドーパミンと同程度の親和性を持つ。また、D2R-poor zone にはセロトニンの軸索が多く観察された。つまり、D1R がドーパミンの代わりにセロトニンを受け取り、パーシャルアゴニストとして抑制性に働いている可能性も考えられる。

近年、D1R-/D2R-poor zone 付近の領域は主に聴覚皮質から入力を受けるという報告があり、黒質外側部の PV 陽性ニューロンは聴覚神経核である下丘に投射することも示されている。本研究の結果と合わせて考えると、聴覚皮質から D1R-/D2R-poor zone へ、そして黒質外側部の PV 陽性ニューロンを介し、さらに下丘へという情報伝達経路が推察され、D1R-/D2R-poor zone が聴覚に関与する領域であることが示唆される。またげっ歯類において、尾側線条体の一部 the tail of the striatum (TS) が特別な領域として近年注目されている。ドーパミンニューロンは、得られると予測していた報酬と実際に得られる報酬との誤差 (報酬予測誤差) に反応することが知られている。しかし、TS に投射する黒質緻密部のドーパミンニューロンは報酬予測誤差に反応せず、

新規性や嫌悪刺激に対して反応するという機能的な差が報告された。さらに、TS に投射するドーパミンニューロンは淡蒼球外節から主に入力を受ける一方、その他の線条体領域に投射するドーパミンニューロンは腹側線条体から主に入力を受けるという神経回路の差異も示唆された。TS は霊長類における the tail of the caudate nucleus (CDt) に相当すると考えられており、サルを用いた研究から、the head of the caudate nucleus (CDh) との機能の違いや、投射するドーパミンニューロン集団が異なることも示唆されている。そして D1R/D2R-poor zone の位置を考えると、これらの領域は TS に含まれている可能性がある。しかし、TS の領域の定義は未だ存在せず、先行研究において TS とされる場所は、研究ごとに異なり一定していない。本研究のげっ歯類及び霊長類における D1R/D2R-poor zone の解剖学的解明は、げっ歯類の TS 及び霊長類の CDt の定義づけに大きな役割を果たし、今後の機能解明に大いに貢献すると考えられる。