

## 日本における Aicardi-Goutières 症候群の遺伝子解析

研究分担者 平家俊男（京都大学大学院医学研究科発達小児科学）  
研究協力者 西小森隆太（京都大学大学院医学研究科発達小児科学）  
研究協力者 阿部純也（京都大学大学院医学研究科発達小児科学）

### 研究要旨

本邦における Aicardi-Goutières 症候群及び Familial Chilblain Lupus の原因遺伝子解析をおこなった。全国小児神経医および小児リウマチ医にアンケート調査して集積した 14 家系 33 症例について、既報告原因 5 遺伝子の遺伝子解析をおこなった。TREX1 変異（D18N ヘテロ、D200N ヘテロ、H195Y ヘテロ）、RNASEH2A コンパウンドヘテロ変異を同定した。

### A. 研究目的

Aicardi-Goutières 症候群（AGS）は、主に常染色体劣性遺伝形式に発症する家族性早発型脳症である。大脳基底核石灰化、髄液細胞増多や IFN- $\alpha$  上昇などを特徴とし、また約 40%の症例に凍瘡様皮疹を認める。現在までに 5 種類の病因遺伝子（TREX1、RNASEH2B、RNASEH2A、RNASEH2C、SAMHD1）が同定されている。Familial chilblain lupus（FCL）は、常染色体優性遺伝形式に凍瘡を発症する疾患であり、AGS の責任遺伝子の中の 2 種類（TREX1、SAMHD1）が病因遺伝子として同定されている本邦の AGS/FCL 症例を集積し、遺伝子変異の解析を通して、本邦における AGS/FCL の実態調査を行った。

### B. 研究方法

小児神経科医及び小児リウマチ医にアンケート調査し、AGS/FCL を疑った 14 家系 33 症例について上記 5 責任遺伝子をダイレクトシーケンス法により解析した。

（倫理面への配慮）

京都大学のヒト遺伝子解析研究に対する倫理審査委員会の承認の下に研究を実施した。インフォームドコンセント後、遺伝子検査に同意して頂いた患者、家族には全て文書で同意を得た。

### C. 研究結果

TREX1 遺伝子変異 heterozygous p.Asp18Asn、heterozygous p.Asp200Asn、heterozygous p.His195Tyr それぞれ 1 家系、RNASEH2A heterozygous p.Arg186Gln + heterozygous p.Arg235Trp を同定した。現在その疾患原性について検討中である。

遺伝子	同定した変異	症例数
TREX1	Hetero.D18N	1 家系 11 症例
	Hetero.D200N	1 症例
	Hetero.H195Y	1 症例
RNASEH2B	なし	
RNASEH2C	なし	
RNASEH2A	compound hetero.	1 症例
	hetero R186Q + hetero R235W	
SAMHD1	なし	

2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

#### D. 考察

現在までに認められた変異は、AGS に比較的稀とされる TREX1 常染色体優性遺伝形式変異が 3 家系 14 症例であり、RNASEH2A compound hetero が 1 家系 1 症例であった。また TREX1 変異の発端者 3 例すべてに凍瘡所見が見られ、TREX1 常染色体優性遺伝形式症例では特異的に凍瘡が多い可能性を示唆した。

#### E. 結論

本邦での AGS/FCL の原因遺伝子として TREX1 変異特にヘテロを 14 家系中 3 家系で認めた。その他 RNASEH2A コンパウンドヘテロ p.Arg186Gln + p.Arg235Trp、を認めた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会（千葉、2011 年 5 月 14-15 日）

The 2011 Annual European Congress of Rheumatology (EULAR; London, UK, 25-28 May 2011)

第 53 回日本小児神経学会総会（横浜、2011 年 5 月 26-28 日）

遺伝医学合同学術集会 2011（京都、2011 年 6 月 16-19 日）

The 18<sup>th</sup> European Pediatric Rheumatology Congress (PReS; Bruges, Belgium, 14-18 Sep 2011)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得  
該当なし

## エカルディ・グティエール症候群等のビオプテリン代謝異常を伴う疾患の診断方法確立および治療法開発のための横断的研究

研究分担者 南部 篤 自然科学研究機構生理学研究所 教授

**研究要旨** ビオプテリン代謝異常に伴う神経症状を解析することを目的として、モデルマウスの大脳基底核の神経活動記録を行った。その結果、淡蒼球外節・内節において、バースト発射やポーズなどを含む異常な発火パターンが観察された。また、大脳皮質刺激に対して、淡蒼球外節では抑制と遅い興奮の増強、淡蒼球内節では抑制の消失が見られた。

### A. 研究目的

ビオプテリン代謝異常には、ドーパ反応性ジストニア（瀬川病）とビオプテリン代謝酵素欠損症があり、両疾患ともにアミノ酸代謝異常から脳内ドーパミンやセロトニンの欠乏をきたす。これらは、大脳基底核での情報処理過程に変化をもたらし、ジストニアやパーキンソン病症状を引き起こすが、症状発現のメカニズムなど不明な点が多い。本研究では、遺伝子改変モデルマウスから神経活動を記録することにより、これらの疾患の病態について解析を行った。

### B. 研究方法

神経疾患、とくに大脳基底核を中心とした運動機能に障害を示す疾患の病態を明らかにするためには、疾患モデル動物から神経活動を記録し正常と比較・検討することが重要である。このような神経活動記録は、麻酔下にて行われる事が多いが、全身麻酔は神経活動を下げ、また発射パターンも変えてしまう。そこで、本研究では覚醒下で記録する方法を用

いた。

マウス頭蓋骨に記録と固定用のチェーンバーを、麻酔下において固定する。また、大脳皮質の一次運動野に刺激電極を埋め込んでおく。手術から回復後、覚醒下で無痛的に頭部をステレオ装置に固定する。次に記録用金属電極を大脳基底核に刺入し、神経活動の記録を行う。

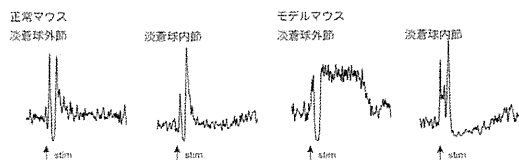
本動物実験は、自然科学研究機構岡崎3機関動物実験委員会で承認され、「自然科学研究機構岡崎3機関における動物実験に関する指針」に従って行われた。また、遺伝子改変動物に関しては、自然科学研究機構生理学研究所組換えDNA実験安全委員会で承認された。

### C. 研究結果

ビオプテリン代謝障害を有する遺伝子改変マウスは、ジストニア様肢位および四肢協調運動の障害を示す。大脳基底核のうち淡蒼球外節・内節から覚醒下で神経活動の記録を行い、正常マウスと比較検討した。

正常マウスにおいては、淡蒼球外節・

内節は50Hz前後の高頻度で、ランダムに発射している。また、大脳皮質を電気刺激すると、早い興奮・抑制・遅い興奮の3相性の応答が記録できる（図左参照）。一方、疾患モデルマウスにおいては、発射頻度は変わらないものの、バースト発射やポーズを示していた。また、大脳皮質刺激では、3相性の反応のうち、淡蒼球外節では抑制と遅い興奮が増強していたのに対し、淡蒼球内節では抑制の消失が見られた（下図参照）。



#### D. 考察

ビオプテリン代謝障害を有するマウスの淡蒼球外節・内節から神経活動を記録したところ、皮質刺激で惹起される3相性の応答のうち、淡蒼球外節では抑制と遅い興奮の増強、淡蒼球内節では抑制の消失が見られた。このような反応はドーパミン欠乏に由来する直接路（線条体-淡蒼球内節路）の活動性減少と間接路（線条体-淡蒼球外節路）の活動性増強を反映していると考えられる。今後は、他の大脳基底核からも神経活動の記録を行い、本疾患がジストニア症状を示すメカニズムを明らかにしたい。

#### E. 結論

ビオプテリン代謝異常に伴う神経症状を解析することを目的として、モデルマウスの神経活動記録を行った。その結果、大脳皮質刺激で惹起される3相性の応答のうち、淡蒼球外節では抑制と遅い興奮の増強、淡蒼球内節では抑制の消失

が見られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Nambu A, Kita K, Itakura T (2011) Cortically evoked responses of human pallidal neurons recorded during stereotactic neurosurgery. *Mov Disord* 26: 469-476

Nishibayashi H, Nambu A, Tachibana Y, Itakura T (2011) Re: Cortically evoked responses of human pallidal neurons. *Mov Disord* 26: 2583-2584

Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M, Nambu A (2011) Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *Eur J Neurosci* 34: 1470-1484

Takara S, Hatanaka N, Takada M, Nambu A (2011) Differential activity patterns of putaminal neurons with inputs from the primary motor cortex and supplementary motor area in behaving monkeys. *J Neurophysiol* 106: 1203-1217

Yumoto N, Lu X, Henry TR, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M (2011) A neural correlate of the processing of multi-second time intervals in primate prefrontal cortex. *PLoS ONE* 6(4): e19168

Nambu A (2011) Somatotopic organization of the primate basal ganglia. *Front Neuroanat* 5: 26

Nambu A, Chiken S, Shashidharan P, Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Kita H, Itakura T (2011) Reduced pallidal output causes dystonia. *Front Sys Neurosci* 5: 89

- Nambu A (2012) GABA-B receptor: possible target for Parkinson's disease therapy. *Exp Neurol* 233: 121-122
- 南部 篤 (2011) 気になる脳部位 視床下核. *分子精神医学* 11: 203-206
2. 学会発表
- Nambu A, Chiken S, Shashidharan P, Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Kita H, Itakura T (2011. 5) What electrophysiology teaches us about the pathophysiology of dystonia. The International Behavioural and Neural Genetics Society (IBANGS)(Rome, Italy)
- Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Katsuki M, Kurokawa M, Nambu A (2011. 6) Dopamine D1 receptor modulates neurotransmission through the basal ganglia. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (Nagoya)
- 知見聡美, 南部 篤 (2011. 7) 淡蒼球脳深部刺激療法の作用機序の検討. 第26回日本大脳基底核研究会 (箱根)
- 畑中伸彦, 高良沙幸, 金子将也, 南部 篤 (2011. 8) 運動課題遂行中のサルにおける淡蒼球ニューロン活動のグルタミン酸およびGABA作動性調節. 名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム (名古屋)
- 佐野裕美, 知見聡美, 加藤成樹, 小林憲太, 小林和人, 南部篤 (2011. 8) 大脳基底核の生理機能解明への光遺伝学の応用. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ (神戸)
- 南部 篤 (2011. 9) 大脳皮質-大脳基底核ループと大脳基底核疾患. 第11回秋田県神経変性疾患研究会 (秋田)
- 畑中伸彦, 金子将也, 高良沙幸, 高田昌彦, 南部篤 (2011. 9) 運動課題遂行中のサルにおける淡蒼球ニューロン活動のグルタミン酸およびGABA作動性調節. 第34回日本神経科学大会 (横浜)
- 知見聡美, 一瀬千穂, 一瀬宏, 近藤一直, 南部篤 (2011. 9) ドーパ反応性ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核ニューロンの活動. 第34回日本神経科学学会 (横浜)
- 佐野裕美, 知見聡美, 小林和人, 南部篤 (2011. 9) 線条体-淡蒼球投射ニューロンは淡蒼球外節および黒質網様部の応答パターンを介して運動を制御する. 第34回日本神経科学大会 (横浜)
- 額瀨大輔, 畑中伸彦, 伊佐 正, 南部 篤 (2011. 9) 覚醒下マーモセットにおける運動関連領域の神経生理学的解析. 第34回日本神経科学学会 (横浜)
- 知見聡美, 南部 篤 (2011. 11) 淡蒼球脳深部刺激療法の作用機序の検討. 第58回中部日本生理学会 (福井)
- 佐野裕美, 知見聡美, 小林和人, 南部 篤 (2011. 11) 線条体-淡蒼球投射ニューロンが制御する運動調節機構の解明. 第58回中部日本生理学会 (福井)
- 南部 篤 (2012. 2) 古典電気生理学+薬理学+分子生物学的手法を用いた脳研究. 第11回生理学若手ウインタースクール「高次脳機能研究の先端技術」(東京)
- Nambu A (2012. 2) Cortico-basal ganglia loop and movement disorders. 第11回生理研 チュービンゲン大学合同神経科学シンポジウム (岡崎)

#### G. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

## エカルディ・グティエール症候群等のビオプテリン代謝異常を伴う疾患の診断方法確立および治療法開発のための横断的研究

研究分担者 高田昌彦 京都大学霊長類研究所 教授

**研究要旨：**本研究では、パーキンソン病の発症過程におけるビオプテリンおよびその代謝産物の量的変化を解析することにより、黒質ドーパミン細胞死とビオプテリン代謝の相互関係を明らかにすることが目的である。具体的には、MPTP 投与によって作製したパーキンソン病モデルザルから、運動障害の発現をモニターしつつ、経時的に脳脊髄液を採取し、ビオプテリン等の含有量とドーパミン細胞の変性・脱落の程度を調べる。

### A. 研究目的

GTPから3段階の酵素反応によって生成されるテトラヒドロビオプテリン (BH4) は、ドーパミンやノルアドレナリン、セロトニンなどの神経伝達物質を合成する際の律速酵素であるフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH)、チロシン水酸化酵素 (TH)、トリプトファン水酸化酵素 (TPH) の補酵素として働く。また、BH4はグリセリルエーテルモノオキシゲナーゼによる酵素反応の補酵素として、脂質合成にも関与している。他方、BH4がこれらの補酵素として働くと、BH4はBH4-4 $\alpha$ -カルビノールアミンに酸化され、続いてプテリンカルビノールアミンデヒドラターゼ (PCD) による脱水反応を介してキノイド型のBH2 (q-BH2) が生成され、さらにジヒドロプテリジン還元酵素 (DPR) によるNADHの還元力を利用してBH4が再合成される。これらのことから、BH4はGTPからのde novo合成経路と、PCDとDPRの酵素反応によるrecycle経路を介して、合成が行われると考えられている。以上のように、BH4は脳内でカテコールアミンやセロトニンの合

成に寄与しており、また、肝臓などの末梢臓器においてはフェニルアラニン水酸化酵素の必須補酵素として、フェニルアラニンからチロシンへの水酸化反応を正常に行うことにより、神経毒性のあるフェニルアラニン代謝産物が体内に蓄積しないようにしている。

これまでの報告によれば、パーキンソン病 (PD) 患者において、脳脊髄液 (CSF) 中のビオプテリン含有量の顕著な低下 (control群の約50%) が観察されている。特に、還元型のビオプテリンであるBH4の含有量は検出限界以下であった。また、マウスにPD様運動障害を引き起こす化学物質として知られている MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) を全身投与した場合、投与後、短時間 (1時間程度) では、線条体におけるTHの蛋白質量が変化しないにもかかわらず、THの活性は低下し、繰り返し (8日間) 投与すると蛋白質量と活性が共に低下するという報告がある。脳内のBH4含有量は、de novoの合成経路と酸化型のBH2からの再合成経路によって維持

されているが、再合成経路におけるDPRの働きをMPTPが阻害するという報告があり、MPTP投与直後にTH活性が低下する原因として、THの補酵素であるビオプテリン、特にBH4の含有量がMPTPの影響により減少していることが関与している可能性がある。

これらのことを検証するため、本研究では、パーキンソン病の発症過程におけるビオプテリンおよびその代謝産物の量的変化を解析することにより、黒質ドーパミン細胞死とビオプテリン代謝の相互関係を明らかにすることが目的である。具体的には、MPTP投与によって作製したパーキンソン病モデルザルから、運動障害の発現をモニターしつつ、経時的に脳脊髄液を採取し、ビオプテリン等の含有量とドーパミン細胞の変性・脱落の程度を調べた。

## B. 研究方法

2頭のニホンザル (9-11 kg) に静脈を介してMPTPを定期的に全身投与し (1週あたり0.4 mg/kg)、パーキンソン病様の運動症状を発現させた。その際、CSFを経時的に採取し (500  $\mu$ l/回、2回/週)、生化学的解析により、CSF中のBH4およびその酸化体であるBH2、ドーパおよびドーパミンの最終代謝産物であるホモバニール酸 (HVA)、セロトニンの主要代謝物である5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) などの含有量を測定した。CSFは採取後速やかに還元剤であるジチオエリスリトール (DTE) を最終濃度が0.1 % (w/v) となるように添加し、-80  $^{\circ}$ Cで保管した。

測定の際には、CSFを氷上で融解した。CSF 200  $\mu$ lに除タンパク質を目的として4 Nの過塩素酸 10  $\mu$ lを混合して20分間氷上に静置し、遠心分離 (20400 x g, 10 min, 4  $^{\circ}$ C) を行った。この上清 (約200  $\mu$ l) をフィルター過逆相HPLC (移動相 : 0.1 M Na-P buffer, pH 3.0 ; Post-column method) に

より分離後に蛍光検出した (Ex 375 nm, Em 465 nm)。

サルのPD様運動症状が顕著になった段階で、ペントバルビタールナトリウムの静脈内投与による深麻酔下で生理食塩水を用いて経心的灌流を行い、それに続いて、4 %パラホルムアルデヒドで固定した。その後、脳を取り出し、同じ組成の固定液で後固定を行った。その後、固定した脳にシュークロース溶液を十分浸透させて、凍結マイクロームで60  $\mu$ m厚に薄切した線条体の切片を用いて、TH免疫組織化学染色を行った。まず切片をPBSで3回洗浄し、0.3 %過酸化水素で30分間反応させた。PBSで3回洗浄後、1 %スキムミルクを用いて常温で1時間ブロッキングした。続いて、2 % normal goat serumを含む一次抗体溶液で4  $^{\circ}$ C、2晩反応させた。反応後、PBSで3回洗浄した後、ビオチン標識の二次抗体溶液を加えて、常温で2時間反応させた。反応後、PBSで3回洗浄した後、ABC kit (Vector) を常温で90分間反応させた。反応後、PBSで3回洗浄し、0.2 mg/mlジアミノベンチジン、0.04 %ニッケルクロライドと0.04 %過酸化水素で発色させた。反応停止後、切片をスライドグラスにマウントし、キシレンで脱脂した後、封入し、顕微鏡で観察した。

### (倫理面への配慮)

本実験は、京都大学霊長類研究所の動物実験委員会により承認され、同大学の動物実験に関わる指針に則って行われた。

## C. 研究結果

まずニホンザルからCSFを安定して経時的に採取する腰椎穿刺法を習得し、ビオプテリンおよび関連物質の含有量を測定する実験系を確立した。

運動課題を訓練したニホンザルに静脈を介してMPTPを全身投与し、投与量に応じて経時的にPD様運動症状の増悪が観察された。

また、灌流固定した脳から得られた線条体標本を用いたTH免疫組織化学染色により、線条体におけるTH活性の顕著な低下が観察された。これらのことから、MPTP投与によりニホンザルのPDモデルが適切に作出されたと考えられた。

生化学的解析の結果は以下のとおりである。

(1) HVAおよび5-HIAAのモノアミン代謝産物の含有量は、MPTP投与開始直後から徐々に低下した。(図1参照)

(2) BH4含有量の低下はHVA含有量の低下より遅れてみとめられ、運動症状の発現・亢進とほぼパラレルに変化した。それに対して、BH2含有量の変化はほとんどみとめられなかった。(図2参照)

(3) (2)より、BH2/BH4比は運動症状の発現過程に合わせて上昇した。(図3参照)

(4) 以上の結果は、特に1頭のサルにおいて顕著であった。

#### D. 考察および結論

黒質ドーパミン細胞の変性・脱落はMPTP投与開始直後から起こると考えられるため、HVA含有量の低下はドーパミン細胞の変性・脱落によるドーパミン産生・放出の低下を意味している。したがって、本実験結果は、BH4含有量の低下がドーパミン細胞の変性・脱落の結果として引き起こされ、線条体におけるドーパミン含有量低下の原因ではないことを示唆している。このことは、黒質ドーパミン細胞の酸化ストレスの亢進により、還元型ピオプテリンであるBH4の酸化が進行した結果、BH4含有量が低下するのではないことを結論づけている。他方、BH4含有量の低下およびBH2/BH4比の上昇はパーキンソン病様の運動症状の発現過程に合わせてみとめられたが、その理由については不明である。

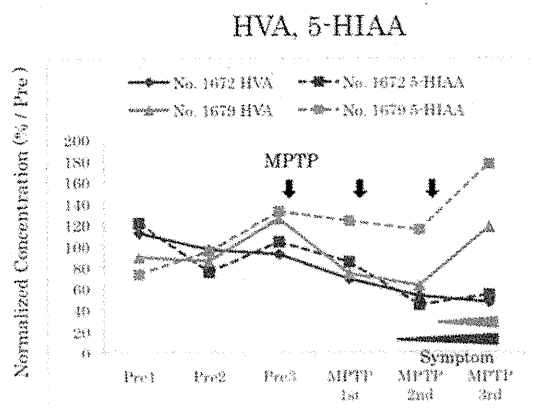


図1

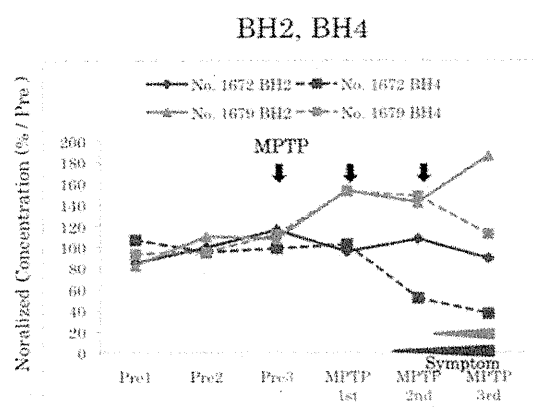


図2

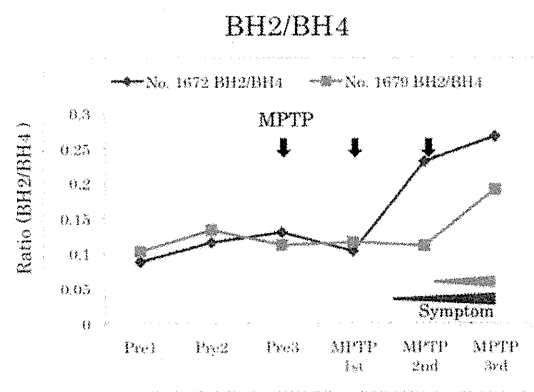


図3

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saga M, Hirata Y, Takahara D, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E (2011) Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal



premotor area in macaques. *Eur J Neurosci* 33:285-297.

Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren Y-R, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki, H (2011) Parkin-mediated dopaminergic neuroprotection in an MPTP-minipump mouse model of Parkinson's disease. *J Neuropath Exp Neurol* 70:686-697.

Takara S, Hatanaka N, Takada M, Nambu A (2011) Differential activity patterns of putaminal neurons with inputs from the primary motor cortex and supplementary motor area in behaving monkeys. *J Neurophysiol* 106: 1203-1217.

Masuda M, Miura M, Inoue R, Imanishi M, Saino-Saito S, Takada M, Kobayashi K, Aosaki T (2011) Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum. *Eur J Neurosci* 34: 1355-1367.

Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M, Nambu A (2011) Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia. *Eur J Neurosci* 34:1470-1484.

## 2. 学会発表

井上 謙一、瀬瀬 大輔、加藤 成樹、小林 和人、南部 篤、高田 昌彦：イムノトキシン

神経路標的法によるサル大脳基底核ハイパー直接路の選択的除去. 第34回日本神経科学大会、2011. 9. 15、横浜.

平田快洋、宮地重広、大迫俊二、今西美知子、黒田呈子、高田昌彦：ラット皮質線条体路の電気刺激によって直接路および間接路ニューロンに c-fos 発現が誘導される. 第34回日本神経科学大会、2011. 9. 15、横浜.

畑中伸彦、金子将也、高良沙幸、高田昌彦、南部 篤：運動課題遂行中のサルにおける淡蒼球ニューロン活動のグルタミン酸および GABA 作動性調節. 第34回日本神経科学大会、2011. 9. 15、横浜.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## Poly (I:C)投与による免疫刺激とテトラヒドロビオプテリン

研究分担者 一瀬 千穂 藤田保健衛生大学医学部 准教授

### 研究要旨

エカルディ・グティエール症候群（AGS）は先天的な核酸代謝酵素の変異により、自己の DNA および RNA に対して異常な免疫あるいは炎症反応が生じる病態であり、髄液中でテトラヒドロビオプテリン（BH4）の前駆体由来するネオプテリンが高値を示す。合成 2 本鎖 RNA である Poly(I:C) をマウスに投与して AGS に類似の反応を惹起できるかどうかを検討した。Poly(I:C) 5mg/kg を野生型マウスに腹腔内投与し、6,12,24 時間後の肝臓、副腎、血管、脳内各組織（視床下部、線条体、大脳皮質、中脳、橋・延髄）の BH4 量と、投与 24 時間後の組織中モノアミン含量を定量した。副腎では poly(I:C) 投与によって BH4 が増加したが、ノルアドレナリン・アドレナリンには有意な変化がなかった。投与後 24 時間後の線条体で BH4 の減少、大脳皮質で増加が見られ、線条体および中脳でドパミンの減少が見られた。今後 BH4 欠損マウスと野生型マウスで Poly(I:C) 投与による免疫反応について比較し、AGS との関連と、炎症および免疫反応における BH4 の役割を明らかにしたい。

### A 研究目的

エカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutières syndrome; AGS) は常染色体劣性遺伝性の疾患で、乳幼児期に重篤な神経症状（小頭症、ジストニア姿勢、精神発達遅滞）を示す。これまでに TREX1、RNASEH2B、SAMHD1 等複数の遺伝子の変異が同定されているが、いずれも核酸代謝関連の分子で、蓄積した核酸にたいし異常な免疫および炎症反応が生じる病態であると考えられる。脳萎縮、頭蓋内の基底核・血管の石灰化、脳脊髄液中の Interferon  $\alpha$  とネオプテリンの高値がみられるほか、SLE 様の症状や、軽症では凍傷を伴う例も多く、神経とともに血管の炎症が重要である。

我々の研究グループではこれまでに複数

の BH4 生合成酵素の遺伝子改変マウスを作成し、BH4 の不足によって生じるモノアミン神経系の機能異常とジストニア、およびパーキンソニズムや感情障害・統合失調症との関連を研究してきた。一方 BH4 は血管弛緩因子である一酸化窒素 (NO) 合成に必須の補酵素でもあり、BH4 およびその前駆体であるネオプテリンの産生はマクロファージを含む多くの細胞でサイトカインによって誘導を受けることから、炎症および血管病変との関連が深い。われわれは合成核酸である poly(I:C) (polyriboinosinic polyribocytidylic acid) の投与によって免疫系を刺激し、それが BH4 の代謝にどのような影響を与えるか、神経および血管に炎症反応を惹起して AGS のモデル系を作成し得るかどうかについて、基礎的な検討をおこなった。Poly (I:C) は合成 2 本鎖 RNA で、

Toll-Like Receptor-3 (TLR3) を介して Type I Interferon とサイトカインの誘導をおこし(Alexopoulou L et al. (2001) Nature 413; 732-738)、マウスにおいてウイルス感染症を mimic する系として使われている。また最近では Adult のラットに 3 mg/kg ip 投与して慢性疲労症候群のモデル (Katafuchi T et al. (2005) Eur J Neurosci 22; 2817-2826) とされているほか、妊娠中のマウス・ラットに投与すると産仔が成熟後統合失調症様の行動をおこす (Zuckerman L et al. (2003) Neuropsychopharmacology 28; 1778-1789.) として注目されている。

## B 研究方法

10~16 週齢の C57BL6J/Jcl(野生型) ♂ 各 3~4 匹に対し、生理食塩水に溶解した Poly (I:C) 5 mg/kg、およびコントロールとして 0.9% NaCl を腹腔内投与した。Poly (I:C)量はヌクレオチド含量に基づいた。6, 12, 24 時間後ネンブタール麻酔下で sacrifice し、脳(視床下部、線条体、大脳皮質、中脳、橋・延髄)、副腎、肝臓、血管を採取した。組織ホモジネートの BH4 量は Fukushima & Nixon の方法によって HPLC-蛍光検出器で測定した。24 時間後の組織ホモジネートについては、モノアミン量を HPLC-電気化学検出器で測定した。

(倫理面への配慮および関連法規の遵守) マウスの飼育および使用は本学の動物実験管理委員会の規定および審査にしたがっておこなった。(M2001)

## C 研究結果

末梢臓器においては、副腎で Poly (I:C) 投与後 24 時間で、BH4 の有意な増加が見られた ( $13.8 \pm 0.6$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $20.4 \pm 2.3$  pmol/mg protein (Poly (I:C) ( $p < 0.05$ ))). 6 時間および 12 時間後で

は有意ではないが、増加傾向にあった。肝臓の BH4 には有意な変化がなかった。血管では有意ではなかったが、12 時間後は増加傾向を示した ( $1.13 \pm 0.2$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $1.98 \pm 0.4$  pmol/mg protein (Poly (I:C))). 一方脳内においては、線条体で投与後 24 時間で有意な減少 ( $8.38 \pm 0.51$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $6.64 \pm 0.11$  pmol/mg protein (Poly (I:C))) ( $p < 0.05$ )、大脳皮質で投与後 24 時間で有意な増加 ( $2.48 \pm 0.3$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $3.4 \pm 0.22$  pmol/mg protein (Poly (I:C))) ( $p < 0.05$ ) があった。視床下部、中脳、橋・延髄では有意な変化がなかった。

Poly (I:C)投与後 24 時間後の組織中のモノアミン含量については、副腎ではノルアドレナリン、アドレナリンとも有意な差はなかった。脳内の各部位について、ノルアドレナリンには有意な差はなかった。線条体でドパミンの有意な低下 ( $609.7 \pm 57.3$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $437.6 \pm 24.7$  pmol/mg protein (Poly (I:C))) ( $p < 0.05$ )、中脳でのドパミン ( $34.1 \pm 1.3$  pmol/mg protein (0.9% NaCl)、 $27.0 \pm 2.6$  pmol/mg protein (Poly (I:C))) ( $p < 0.05$ ) の低下が見られた。

## D 考察

Poly (I:C)の投与量 5 mg/kg は Fujimoto C et al (2003) (Int Immunology 16; 55-63) において 6-12 week 齢の BALB/c マウスに対し 100  $\mu$ g 投与した例にもとづいた。この論文では血清 IL-12 は投与後 2 時間後には急上昇し 8 時間後には減少するが、INF- $\gamma$  は 2 時間後から 8 時間後に増加すると報告されている。一方 Antoniadou C et al (2011) らはヒトを対象とした臨床試験で Salmonella typhi のワクチン投与 8 時間後、12 時間後、24 時間後に血清中の IL-6 と BH4 を測定したところ、IL-6 は 8 時間後が

最高値で 24 時間後にはほぼ元にもどったこと、BH4 は 12 時間後に投与前の 2.5 倍程度に達し、24 時間後ではそれよりも減少したことを報告した。今回サイトカインの増加によって BH4 生合成の律速酵素である GTP cyclohydrolase 1(GCH)の発現が誘導されることを想定して、6, 12, 24 時間後に材料採取と分析をおこなったが、末梢臓器（副腎・血管）においては poly (I:C) 投与は BH4 含量を増加させる可能性が高い。中枢においても BH4 が変化する可能性があるが、予備実験で BH4 の変化が poly (I:C)の量に必ずしも比例しなかったことから、日内変動を含めサイトカインとの経時的な比較が必要である。また poly (I:C)は TLR3 のリガンドであるので、誘導される主要な Interferon は I 型 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) である。血管内皮細胞の培養系を用いた実験では GCH の誘導には  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ が有効とされているので、効果が十分でなかったのかもしれない。poly (I:C)の投与量・投与方法、核酸系の他の TLR リガンドとして CpG-DNA などを検討することが考えられる。BH4 とモノアミンの変化の差異があることについても、サイトカインが介するシグナルによって BH4 の産生誘導や抑制をうける細胞として、ニューロンよりもアストロサイトやミクログリアを考える必要がある。また Adult での急性投与と胎生期・幼若期での poly(I:C)投与には神経系および免疫系の発達や血液・脳関門の成熟度が関係するため、影響に違いがあることも考えられる。Smith SE et al. (2007) (J Neurosci 27; 10695-10702.)は妊娠 12.5 日の母親マウスに IL-6 を投与することで、成熟後の仔マウスに行動異常が生じること、Poly (I:C)

投与の影響を抗 IL-6 抗体で阻止できることをみいだしており、神経系の発達や病態には IL-6 の役割が大きいのかもしれない。

## E 結論

副腎・血管においては poly(I:C)投与は BH4 を増加させる可能性が高い。サイトカインを介する GCH の誘導が考えられるが、さらに検討する必要がある。副腎ではノルアドレナリン・アドレナリンに有意な変化が無かった。中枢神経系においては大脳皮質で BH4 の増加、線条体で BH4 の減少が見られた。BH4 の増加はかならずしも poly (I:C)の投与量と関連しなかった。線条体と中脳ではドパミンの減少が見られた。モノアミンの変化の機序および意義については検討が必要である。

今後 poly (I:C)等の Toll-Like Receptor リガンドの投与による反応を我々の開発した BH4 欠損マウスと野生型マウスで比較し、AGS との関連、炎症および免疫反応における BH4 の役割を明らかにしたい。

## F 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案  
なし
3. その他  
なし

### [Ⅲ] 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Nambu A	GABA-B receptor: possible target for Parkinson's disease therapy.	Exp Neurol	233	121-122	2012
Tokuoka H, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Sakane H, Kojima M, Aso Y, Nomura T, Metzger D, Ichinose H	Compensatory regulation of dopamine after ablation of the tyrosine hydroxylase gene in the nigrostriatal projection.	J Biol Chem	286	43549-43558	2011
Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Nambu A, Kita K, Itakura T	Cortically evoked responses of human pallidal neurons recorded during stereotactic neurosurgery.	Mov Disord	26	469-476	2011
Tachibana Y, Iwamuro H, Kita H, Takada M, Nambu A	Subthalamo-pallidal interactions underlying parkinsonian neuronal oscillations in the primate basal ganglia.	Eur J Neurosci	34	1470-1484	2011
Takara S, Hatanaka N, Takada M, Nambu A	Differential activity patterns of putaminal neurons with inputs from the primary motor cortex and supplementary motor area in behaving monkeys.	Journal of Neurophysiol	106	1203-1217	2011
Yumoto N, Lu X, Henry TR, Miyachi S, Nambu A, Fukai T, Takada M	A neural correlate of the processing of multi-second time intervals in primate prefrontal cortex.	PLoS ONE	6(4)	e19168	2011
Nambu A	Somatotopic organization of the primate basal ganglia.	Front Neuroanat	5	26	2011
Nambu A, Chiken S, Shashidharan P, Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Kita H, Itakura T	Reduced pallidal output causes dystonia.	Front Sys Neurosci	5	89	2011
Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren Y-R, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki, H	Parkin-mediated dopaminergic neuroprotection in an MPTP-minipump mouse model of Parkinson's disease.	J Neuropath Exp Neurol	70	686-697	2011

Masuda M, Miura M, Inoue R, Imanishi M, Saino-Saito S, Takada M, Kobayashi K, Aosaki T	Postnatal development of tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons in mouse neostriatum.	Eur J Neurosci	34	1355-1367	2011
南部 篤	気になる脳部位 視床下核.	分子精神医学	11	203-206	2011

## [IV] 研究成果の刊行物・別刷





## Commentary

## GABA-B receptor: Possible target for Parkinson's disease therapy

Atsushi Nambu\*

Division of System Neurophysiology, National Institute for Physiological Sciences and Department of Physiological Sciences, The Graduate University for Advanced Studies, Myodaiji, Okazaki 444-8585, Japan

In the recent issue of *Experimental Neurology*, Galvan et al. (2011) investigated the anatomical and physiological changes of  $\gamma$ -aminobutyric acid type B (GABA-B) receptors in the basal ganglia of parkinsonian monkeys. The basal ganglia play a key role in controlling voluntary movements, and their malfunctions cause movement disorders, such as Parkinson's disease and dystonia. The basal ganglia are composed of the striatum, subthalamic nucleus (STN), external (GPe) and internal (GPi) segments of the globus pallidus, and pars reticulata (SNr) and pars compacta (SNc) of the substantia nigra. Among these nuclei, the striatum is an input station of the basal ganglia, while the GPi and SNr are output nuclei. Two major pathways of the basal ganglia connect input and output structures: the striato-GPi/SNr direct and striato-GPe-STN-GPi/SNr indirect pathways (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). GPe, GPi and SNr neurons receive GABAergic inputs from the striatum and GPe (GPe neurons receive GPe inputs through local axon collaterals of GPe neurons) and glutamatergic inputs from the STN (Boyes and Bolam, 2007; Nambu, 2007).

In order to understand normal functions of the basal ganglia and pathophysiology of movement disorders, it is essential to investigate how GABA is synthesized and released from synaptic terminals, binds to GABA receptors and is finally taken up by GABA transporters. GABA receptors are classified into ionotropic GABA-A and metabotropic GABA-B receptors. GABA-A receptors are responsible for fast inhibitory synaptic transmission. On the other hand, GABA-B receptors are responsible for slow and prolonged inhibitory transmission that may modulate firing rates and firing patterns of neurons. GABA-B receptors are heterodimers made up of GABA-BR1 and GABA-BR2 subunits. GABA-B receptors are located at both presynaptic and postsynaptic sites, and associated not only with GABAergic terminals from the striatum and GPe, but also with glutamatergic terminals from the STN (Boyes and Bolam, 2007; Nambu, 2007). A higher proportion of GABA-B receptors are located at extrasynaptic sites. Activation of the presynaptic GABA-B receptors inhibits transmitter (GABA and glutamate) release through a decrease in membrane  $Ca^{2+}$  conductance, whereas activation of postsynaptic GABA-B receptors induces an increase in membrane conductance through G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels (GIRK or Kir3) (Emson, 2007).

Parkinson's disease is caused by loss of dopaminergic neurons in the SNc and is characterized by tremor at rest, akinesia (poverty and slowness of movements) and muscle rigidity. In addition to these classical motor symptoms, nondopaminergic and/or nonmotor symptoms, such as loss of postural reflexes, bradyphrenia (slowness in mental function), depression, sleep disturbances, sensory complaints and autonomic disturbances occur. So far, there are two major models explaining pathophysiology underlying the motor symptoms of Parkinson's disease: the firing rate model vs. firing pattern model (Nambu, 2008). Dopamine depletion decreases the activity of striatal direct pathway neurons and increases the activity of striatal indirect pathway neurons. The firing rate model proposes that activity imbalance between the direct and indirect pathways induces an increase in the mean firing rate of GPi/SNr neurons (DeLong, 1990). Increased GABAergic outputs from the GPi/SNr suppress thalamo-cortical activity, resulting in akinesia. However, recent electrophysiological studies using parkinsonian monkeys have not always detected such an increase in GPi activity (Nambu, 2008). On the other hand, unit activity and local field potentials recorded from the GPe, GPi, SNr and STN of parkinsonian patients and animals showed oscillatory, synchronized and/or bursting activity. The firing pattern model proposes that these abnormal firing patterns disturb information processing through the basal ganglia (Bergman et al., 1998).

In addition, GABAergic neurotransmission itself within the basal ganglia may be altered in Parkinson's disease. It was reported that mRNA levels of the GABA-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase (GAD67 and GAD65), were increased in striato-GPe, GPi and SNr neurons (Pedneault and Soghomonian, 1994; Soghomonian and Laprade, 1997; Soghomonian et al., 1994). In the GPe, mRNA levels of GAD67, not GAD65 (Pedneault and Soghomonian, 1994; Soghomonian and Chesselet, 1992; Soghomonian et al., 1994), and GABA levels examined by *in vivo* microdialysis (Bianchi et al., 2003) were increased. The expression levels of GABA-A and GABA-B receptors were changed as well. GABA-A receptor binding and mRNA levels were decreased in the GPe and increased in the GPi/SNr of parkinsonian patients and animals (Calon et al., 1995, 2003; Chadha et al., 2000; Gnanalingham and Robertson, 1993; Katz et al., 2005). Similarly, GABA-B receptor levels were decreased in the GPe and increased in the GPi/SNr (Calon et al., 2000, 2003; Johnston and Duty, 2003). GABA-B receptor changes may be attributable to changes in GABA-BR1 mRNA expression. The GABA-A and GABA-B receptor changes observed in the GPe and GPi/SNr seem to be compensatory responses for the hyperactive striato-GPe indirect pathway and hypoactive striato-GPi direct pathway. Levodopa or dopaminergic agonists partially reversed the changes of GABA-A

\* Commentary to Galvan, A., Hu, X., Smith, Y., Wichmann, T., 2011. Localization and pharmacological modulation of GABA-B receptors in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* 229: 429–439.

\* Fax: +81 564 52 7913.

E-mail address: [nambu@nips.ac.jp](mailto:nambu@nips.ac.jp).

receptors in the GPe (Calon et al., 1995) and SNr/GPi (Calon et al., 1999; Gnanalingham and Robertson, 1993; Katz et al., 2005) and the changes of GABA-B receptors in the GPi (Calon et al., 2000). Parkinsonian patients and animals with higher levels of GABA-A or GABA-B receptors in the GPi had a tendency to exhibit dyskinesia with chronic dopamine treatments (Calon et al., 1995, 2000, 2003). This may be because upregulation of GABA-A and/or GABA-B receptors in the GPi causes suppression of GABAergic outputs from the GPi to release enhanced thalamo-cortical activity, leading to involuntary movements such as dyskinesia (see Waszczak and Walters, 1984).

Although the above studies repeatedly reported the expression changes of GABA-B receptors in Parkinsonism, it has not been clarified yet whether such changes contribute to neuronal activity changes in the basal ganglia. Galvan et al. (2011) demonstrated that the effects of local microinjection of a GABA-B receptor agonist/antagonist on GPe/GPi activity significantly differed between normal and parkinsonian monkeys, despite the fact that cellular and ultrastructural localization of GABA- $\text{BR1}$  subunits in the GPe/GPi was not altered. The GABA-B receptor agonist decreased the firing rate of GPe/GPi neurons of both normal and parkinsonian monkeys, probably through postsynaptic effects, but the magnitude of reduction in GPe neurons was larger in parkinsonian monkeys. The GABA-B receptor antagonist did not significantly affect the activity of GPi neurons in normal monkeys, whereas it reduced the firing rate of GPi neurons in parkinsonian monkeys, probably through a blockade of presynaptic GABA-B receptors in the GABAergic terminals. In addition, the GABA-B receptor agonist into the GPe and GPi, and the GABA-B receptor antagonist into the GPi increased rebound bursts in parkinsonian animals, but not in normal monkeys. Thus, GABA-B receptor-mediated modulation of synaptic transmission is profoundly altered in parkinsonian monkeys, and may contribute to firing rate and firing pattern changes, especially bursting activity of GPe and GPi neurons in the parkinsonian state. The study by Galvan et al. (2011) suggests that the GABA-B receptor could become a possible new target for drug therapy in Parkinson's disease. Normalization of GABA-B receptor-mediated responses may provide beneficial effects on parkinsonian symptoms.

## References

- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Bergman, H., Feingold, A., Nini, A., Raz, A., Slovlin, H., Abeles, M., Vaadia, E., 1998. Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 21, 32–38.
- Bianchi, L., Galeffi, F., Bolam, J.P., Della Corte, L., 2003. The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *Eur. J. Neurosci.* 18, 856–868.
- Boyes, J., Bolam, J.P., 2007. Localization of GABA receptors in the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 160, 229–243.
- Calon, F., Goulet, M., Blanchet, P.J., Martel, J.C., Piercey, M.F., Bédard, P.J., Di Paolo, T., 1995. Levodopa or D2 agonist induced dyskinesia in MPTP monkeys: correlation with changes in dopamine and GABA $\text{A}$  receptors in the striatopallidal complex. *Brain Res.* 680, 43–52.
- Calon, F., Morissette, M., Goulet, M., Grondin, R., Blanchet, P.J., Bédard, P.J., Di Paolo, T., 1999. Chronic D1 and D2 dopaminomimetic treatment of MPTP-denervated monkeys: effects on basal ganglia GABA $\text{A}$ /benzodiazepine receptor complex and GABA content. *Neurochem. Int.* 35, 81–91.
- Calon, F., Morissette, M., Goulet, M., Grondin, R., Blanchet, P.J., Bédard, P.J., Di Paolo, T., 2000.  $^{125}\text{I}$ -CGP 64213 binding to GABA $\text{B}$  receptors in the brain of monkeys: effect of MPTP and dopaminomimetic treatments. *Exp. Neurol.* 163, 191–199.
- Calon, F., Morissette, M., Rajput, A.H., Hornykiewicz, O., Bédard, P.J., Di Paolo, T., 2003. Changes of GABA receptors and dopamine turnover in the postmortem brains of parkinsonians with levodopa-induced motor complications. *Mov. Disord.* 18, 241–253.
- Chadha, A., Dawson, L.G., Jenner, P.G., Duty, S., 2000. Effect of unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on GABA $\text{A}$  receptor subunit gene expression in the rodent basal ganglia and thalamus. *Neuroscience* 95, 119–126.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281–285.
- Emson, P.C., 2007. GABA $\text{B}$  receptors: structure and function. *Prog. Brain Res.* 160, 43–57.
- Galvan, A., Hu, X., Smith, Y., Wichmann, T., 2011. Localization and pharmacological modulation of GABA-B receptors in the globus pallidus of parkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* 229, 429–439.
- Gnanalingham, K.K., Robertson, R.G., 1993. Chronic continuous and intermittent L-3,4-dihydroxyphenylalanine treatments differentially affect basal ganglia function in 6-hydroxydopamine lesioned rats—an autoradiographic study using [ $^3\text{H}$ ]flunitrazepam. *Neuroscience* 57, 673–681.
- Johnston, T., Duty, S., 2003. Changes in GABA $\text{B}$  receptor mRNA expression in the rodent basal ganglia and thalamus following lesion of the nigrostriatal pathway. *Neuroscience* 120, 1027–1035.
- Katz, J., Nielsen, K.M., Soghomonian, J.J., 2005. Comparative effects of acute or chronic administration of levodopa to 6-hydroxydopamine-lesioned rats on the expression of glutamic acid decarboxylase in the neostriatum and GABA $\text{A}$  receptors subunits in the substantia nigra, pars reticulata. *Neuroscience* 132, 833–842.
- Nambu, A., 2007. Globus pallidus internal segment. *Prog. Brain Res.* 160, 135–150.
- Nambu, A., 2008. Seven problems on the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 595–604.
- Pedneault, S., Soghomonian, J.J., 1994. Glutamate decarboxylase (GAD65) mRNA levels in the striatum and pallidum of MPTP-treated monkeys. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 25, 351–354.
- Soghomonian, J.J., Chesselet, M.F., 1992. Effects of nigrostriatal lesions on the levels of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamate decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus of the rat. *Synapse* 11, 124–133.
- Soghomonian, J.J., Laprade, N., 1997. Glutamate decarboxylase (GAD67 and GAD65) gene expression is increased in a subpopulation of neurons in the putamen of parkinsonian monkeys. *Synapse* 27, 122–132.
- Soghomonian, J.J., Pedneault, S., Audet, G., Parent, A., 1994. Increased glutamate decarboxylase mRNA levels in the striatum and pallidum of MPTP-treated primates. *J. Neurosci.* 14, 6256–6265.
- Waszczak, B.L., Walters, J.R., 1984. A physiological role for dopamine as modulator of GABA effects in substantia nigra: supersensitivity in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 105, 369–373.

# Compensatory Regulation of Dopamine after Ablation of the Tyrosine Hydroxylase Gene in the Nigrostriatal Projection<sup>\*§</sup>

Received for publication, July 20, 2011, and in revised form, October 6, 2011. Published, JBC Papers in Press, October 25, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.284729

Hirofumi Tokuoka<sup>†1</sup>, Shin-ichi Muramatsu<sup>§</sup>, Chiho Sumi-Ichinose<sup>¶</sup>, Hiroaki Sakane<sup>‡</sup>, Masayo Kojima<sup>‡</sup>, Yoshinori Aso<sup>‡</sup>, Takahide Nomura<sup>¶</sup>, Daniel Metzger<sup>||\*\*\*††</sup>, and Hiroshi Ichinose<sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>Department of Life Science, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259 B-7, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, 226-8501 Japan, the <sup>§</sup>Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical University, Tochigi 329-0498, Japan, the <sup>¶</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Fujita Health University, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan, the <sup>||</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch F-67400, France, <sup>\*\*</sup>CNRS, Illkirch, France, and the <sup>††</sup>Université Louis Pasteur, Strasbourg F-67000, France

**Background:** The tyrosine hydroxylase (TH) gene, essential for dopamine synthesis, is partially ablated in adult nigrostriatal projection.

**Results:** TH reduction in axon terminals is slower than in soma, and dopamine is better maintained than TH.

**Conclusion:** Striatal dopamine is compensatorily regulated by axonal TH level and L-DOPA synthesis activity per TH level.

**Significance:** This regulation has potential relevance to pathogenesis of Parkinson disease and other dopamine-related psychiatric disorders.

The tyrosine hydroxylase (TH; EC 1.14.16.2) is a rate-limiting enzyme in the dopamine synthesis and important for the central dopaminergic system, which controls voluntary movements and reward-dependent behaviors. Here, to further explore the regulatory mechanism of dopamine levels by TH in adult mouse brains, we employed a genetic method to inactivate the *Th* gene in the nigrostriatal projection using the *Cre-loxP* system. Stereotaxic injection of adeno-associated virus expressing Cre recombinase (AAV-Cre) into the substantia nigra pars compacta (SNc), where dopaminergic cell bodies locate, specifically inactivated the *Th* gene. Whereas the number of TH-expressing cells decreased to less than 40% in the SNc 2 weeks after the AAV-Cre injection, the striatal TH protein level decreased to 75%, 50%, and 39% at 2, 4, and 8 weeks, respectively, after the injection. Thus, unexpectedly, the reduction of TH protein in the striatum, where SNc dopaminergic axons innervate densely, was slower than in the SNc. Moreover, despite the essential requirement of TH for dopamine synthesis, the striatal dopamine contents were only moderately decreased, to 70% even 8 weeks after AAV-Cre injection. Concurrently, *in vivo* synthesis activity of L-dihydroxyphenylalanine, the dopamine precursor, per TH protein level was augmented, suggesting up-regulation of dopamine synthesis activity in the intact nigrostriatal axons. Collectively, our conditional *Th* gene targeting method demonstrates two regulatory mechanisms of TH in axon terminals for dopamine homeostasis *in vivo*: local regulation of TH protein

amount independent of soma and trans-axonal regulation of apparent L-dihydroxyphenylalanine synthesis activity per TH protein.

The dopaminergic system is important for many brain functions, including voluntary movements (1) and reward-related behaviors (2). The dysfunction of dopaminergic transmission is involved in many neurological and psychiatric disorders, such as Parkinson disease (3), addiction (4), attention deficit hyperactive disorders (5), and schizophrenia (6). Although chronic alterations in the dopaminergic system may be relevant to these disorders, it is still unclear how the dopaminergic system is regulated over days to months. In Parkinson disease, motor symptoms exhibit only after a large loss of striatal dopamine (7), suggesting compensation for the loss of dopamine. Although studies on Parkinson disease have suggested multiple forms of compensatory mechanisms, including enhanced dopamine release and turnover (8, 9, 10, 11), it is not fully understood what cellular and molecular mechanisms underlie the long term regulation of striatal dopamine levels under non-degenerative conditions.

Chronic intervention in the dopamine system has been performed for many years by pharmacological methods although they exhibit limitations related to dose dependence, drug metabolism, and circuit specificity. Gene-targeting methods, including germ line knock-out mice (12–14) and dopamine-deficient mice (15–17), have been generated, but because dopaminergic transmissions are blocked from the early stage of brain development, these methods may induce developmental effects. To explore the regulatory mechanisms of the nigrostriatal dopaminergic system in the adult brain, we generated mice in which dopamine synthesis can be selectively abrogated in a spatio-temporally controlled manner. The nigrostriatal projection is the largest dopaminergic projection in the brain, and the dense dopaminergic axon terminals in the striatum are readily

\* This work was supported by Grants-in-aid for Human Frontier Science Program; by Research Grant 18A-2 for Nervous and Mental Disorders from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; by KAKENHI from MEXT; by the Nakajima Foundation; and by Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency (CREST, JST).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–5.

<sup>1</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 81-45-924-5822; Fax: 81-45-924-5807; E-mail: htokuoka@bio.titech.ac.jp.

<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed. Tel.: 81-45-924-5822; Fax: 81-45-924-5807; E-mail: hichinos@bio.titech.ac.jp.

## Regulation of Dopamine Level in the Nigrostriatal Projection

investigated in isolation from their cell bodies and dendrites. Because tyrosine hydroxylase (TH)<sup>3</sup> is the rate-limiting enzyme in dopamine biosynthesis (18), we generated transgenic mice that contain two *loxP* sites flanking the major coding exons of the *TH* gene (floxed *Th* mice).

A microinjection of adeno-associated viral (AAV) vector expressing Cre recombinase (AAV-Cre) (19, 20) into the substantia nigra pars compacta (SNc) of the floxed *Th* mice disrupted the expression of the *Th* gene in a subset of neurons in the SNc of the adult mice. Our biochemical and histochemical analyses suggest two regulatory mechanisms of axonal TH for dopamine homeostasis in the nigrostriatal projection. First, the TH protein level in axon terminals is regulated differently from that in soma. Second, *in vivo* apparent L-DOPA synthesis activity per TH protein level in a given axon is influenced by dopamine synthesis in the neighboring axons, which we propose as trans-axonal regulation of dopamine levels.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Production of *Th* Floxed Mice, Genotyping**—To construct the targeting vector for generating a floxed *Th* allele, a 9.5-kb XhoI-EcoRI genomic DNA segment containing genomic *Th* DNA was isolated from a  $\lambda$  phage 129SV mouse genomic library. The EcoRI site located at the 3'-end was replaced by MluI, a HindIII restriction site was engineered by site-directed mutagenesis between exons 5 and 6, and the SpeI site located between exons 9 and 10 was converted into a NotI site. A *loxP* site and an EcoRV restriction site were inserted into a HindIII site, and a neomycin-resistant cassette, flanked by *loxP* sites, was inserted into a NotI site. The three *loxP* sites in the final targeting vector were in the same orientation (3' to 5') (Fig. 1A).

Mouse embryonic stem cells were electroporated with the targeting vector, and the homologously recombined clones were screened by PCR and Southern blot analysis. Embryonic stem clones with three *loxP* sites were selected, and a plasmid expressing Cre DNA recombinase was transiently transfected into the cells. Embryonic stem cells with two *loxP* sites without a neomycin cassette were selected by PCR and used for production of chimeric mice.

The genotypes of mice were identified on mouse ear biopsies by PCR (30 cycles at 94 °C for 30 s, 65 °C for 3 min, and a final extension at 72 °C for 5 min) with primers TH9F (5'-CATTTCGCCAGTTCTCCCAG-3') and TH10R (5'-AGAGATGCAAGTCCAATGTC-3'). The sizes of the PCR products amplified from the wild-type *Th* allele and from the floxed *Th* allele are 431 and 513 bp, respectively.

For the detection of recombined *Th* alleles, genomic DNA was extracted from the substantia nigra regions of brain slices fixed by paraformaldehyde. The recombined *Th* alleles were detected by PCR (30 cycles at 94 °C for 30 s, 66 °C for 30 s, 72 °C

for 1 min 15 s, and a final extension at 72 °C for 5 min) with primers TH5F (5'-AGGCGTATCGCCAGCGCC-3') and TH10Rb (5'-CCCCAGAGATGCAAGTCCAATGTC-3'). The sizes of the PCR products amplified from the wild-type *Th* allele, floxed *Th* allele, and deleted *Th* allele are 1722, 1886, and 430 bp, respectively.

**AAV Vector Construction**—We generated two types of AAV-Cre vectors basically as described previously (19). One was the AAV-Cre vector, which contained an expression cassette with a human cytomegalovirus immediate early promoter (CMV promoter), followed by the first intron of human growth hormone, Cre recombinase cDNA, and simian virus 40 polyadenylation signal sequence (SV40 poly(A)), between the inverted terminal repeats of the AAV-2 genome. The other was the AAV-GFP/Cre vector, which contained an expression cassette with a synapsin I promoter (21), followed by AcGFP1 (Clontech), the internal ribosomal entry site, Cre recombinase cDNA, and simian virus 40 polyadenylation signal sequence (SV40 poly(A)), between the inverted terminal repeats of the AAV-1 genome. The two helper plasmids, pHLP19 and pladeno1 (Avigen, Alameda, CA), harbored the AAV *rep* and *cap* genes as well as the E2A, E4, and VA RNA genes of the adenovirus genome, respectively. HEK293 cells were co-transfected with the vector plasmid, pHLP19, and pladeno1 by the calcium phosphate precipitation method. The AAV vectors were then harvested and purified by two rounds of continuous iodoxale ultracentrifugations. Vector titers were determined by quantitative DNA dot-blot hybridization or by quantitative PCR of DNase I-treated vector stocks. We routinely obtained 10<sup>12</sup> to 10<sup>13</sup> vector genome copies/ml.

**Animals and Stereotaxic Microinjections**—Mice were acclimated to and maintained at 25 °C under a 12-h light/dark cycle (light on 08:00–20:00). All animal experiments were performed in accordance with the general guidelines of the Tokyo Institute of Technology. Unilateral injections into the SNc were performed on 12–16-week-old mice that were anesthetized with Nembutal (intraperitoneally) and mounted into a stereotaxic apparatus. The coordinates were 3.0 mm posterior from bregma, 1.0 mm lateral to midline, and 4.0 mm ventral from the dural surface. 1  $\mu$ l of AAV-Cre or AAV-GFP/Cre (about 10<sup>9</sup> particles) was injected through an injection cannula (28-gauge) with a Hamilton microsyringe driven by a microdialysis pump at a rate of 0.2  $\mu$ l/min. After microinjection, the injection cannula was left for 2 min before its withdrawal to reduce the efflux of injected liquid along the injection tract. When a cannula was blocked or leaked, the mouse was excluded from the following experiments. The mice were sacrificed at 1, 2, 4, 8, or 16 weeks after microinjection for analyses. We used the uninjected side of a brain as a control side to compare with. *Th*<sup>+/+</sup> mice were used as control animals.

**Immunohistochemistry**—Striatal slices were prepared by transcardial perfusion with saline, followed by 4% paraformaldehyde, 60 mM phosphate buffer, and postfixation overnight. All solutions were used at 4 °C. In some experiments, striatal tissues were dissected and homogenized for Western blot and monoamine assay (see below), and the rest of the brain, including the midbrain with the SNc region, was fixed by immersing in 4% paraformaldehyde, PBS overnight. The fixed brain pieces

<sup>3</sup> The abbreviations used are: TH, tyrosine hydroxylase; AADC, aromatic L-amino acid decarboxylase; AAV, adeno-associated virus; AAV-Cre, adeno-associated virus expressing Cre recombinase; DA, dopamine; DAT, dopamine transporter; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; L-DOPA, L-dihydroxyphenylalanine; vMAT2, vesicular monoamine transporter 2; SNc, substantia nigra pars compacta; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; GBR12909, 1-[2-[bis-(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl)piperazine dihydrochloride.