

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20563

研究課題名(和文) 側坐核のアセチルコリン神経活動制御における μ および δ 受容体の関与

研究課題名(英文) Roles of mu- and delta-opioid receptor in regulation of cholinergic activity in nucleus accumbens

研究代表者

青野 悠里 (AONO, Yuri)

日本大学・松戸歯学部・助手(専)

研究者番号：50508497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：中脳辺縁系ドパミン(DA)神経の投射先である側坐核に分布するアセチルコリン(ACh)神経の選択的な障害は、記憶を含む認知機能を低下させることが動物実験で示されている。持続性疼痛に用いる麻薬性鎮痛薬の副作用に健忘があるが、その発現機構の詳細は不明の点が残されている。本研究は麻薬性鎮痛薬の作用点のオピオイド受容体サブタイプのうち、側坐核のACh神経に発現する μ および δ 受容体が同部位のACh神経活動制御で果たす役割を無麻酔非拘束ラットを用い *in vivo* 微小透析法により解析した。また比較の目的で側坐核のDA神経活動制御における μ 受容体の役割についても検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Nucleus accumbens (NAc) in a terminal areas of mesolimbic dopaminergic neurons that project from the ventral tegmental area. NAc contains cholinergic neurons and animal experiments have shown that selective depletion of these neurons induces cognitive impairment, including memory deficits. Opioids are used to control persistent pain and amnesia is a recognized adverse effect. There are three subtypes of opioid receptors: mu, delta and kappa. Accumbal cholinergic neurons express delta and mu receptors that are thought to inhibit cholinergic activity. In present study, we investigated the roles of delta and mu receptors in the regulation of accumbal acetylcholine efflux of freely moving rats by *in vivo* microdialysis.

研究分野：薬理学

キーワード：ドパミン アセチルコリン 側坐核 微小透析法 ラット

1. 研究開始当初の背景

麻薬性鎮痛薬は、がん性疼痛や手術後痛の緩和の目的で口腔外科を含めた医療の場で広く用いられている。

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系ドパミン (DA) 神経の投射領域のひとつである。側坐核には opioid 受容体の δ , μ 受容体が発現したコリン性介在神経が分布している。これらの受容体は、そのアセチルコリン (ACh) 神経における発現様式の特徴から側坐核の ACh の放出を前シナプス性に調節すると考えられてきた。 δ 受容体は δ_1 , δ_2 受容体、 μ 受容体は μ_1 , μ_2 受容体の各サブタイプの存在が知られている。しかしながら、側坐核に分布するこれらの δ および μ 受容体のサブタイプが同部位の ACh 放出の制御において果たす役割は明らかでない。

そこで本研究では、側坐核の ACh および DA 放出制御における同部位の δ および μ 受容体サブタイプの関与の特徴について明らかにするためラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法による検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、麻薬性鎮痛薬の作用点である opioid 受容体サブタイプのうち、側坐核の ACh 神経に発現する δ および μ 受容体が同部位の ACh 神経活動制御で果たす役割について無麻酔非拘束ラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法により解析した。また灌流液に physostigmine が入っている状態での μ 受容体が側坐核での DA 神経活動制御についても同様の方法を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) ガイドカニューレの植立手術：実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重約 200 g) を用いた。イソフルランによる全身麻酔を施したラットを脳定位固定装置に固定し、微小透析プローブ固定用ガイドカニューレをマニピュレーターで側坐核に植立した。

(2) 脳微小透析実験：前述の小手術より 7~10 日後、ラットが実験ケージ内を自由に動きまわられる条件下で脳微小透析実験を行った。まず、ラットを徒手で軽く保持して脳微小透析プローブをガイドカニューレに装着固定し、テフロンチューブを接続した。つぎに、ラットは 35×35×35 (cm) のアクリル製観察ケージ内に静かに収容し、脳微小透析プローブへ改良リンゲル液をインフュージョンポンプにより 1 μ l/分で灌流して、透析膜を介して細胞外液をサンプルとして持続的に回収した。このサンプルはオートインジェクターを用いて、高速液体クロマトグラフに DA は 20 分毎に、ACh は 15 分毎に注入し、電気化学検出器を用いて定量した。

(3) 薬物の局所投与：脳微小透析プローブ装着 4 時間以上が経過し、サンプル中の ACh または DA 量が一定になったことを確認後、薬物を灌流液に溶解し逆透析による側坐核への局所灌流投与を行い、ACh, DA 量の変化を 4 時間にわたり観察した。全身投与した naloxonazine を除く各薬物の投与量は、灌流期間中に投与された薬物の総量 (nmol) で示した。

脳微小透析プローブの植立位置は、脳微小透析実験終了後に作成した厚さ 50 μ m の脳の連続切片で確認した。

本研究プロジェクトにおけるすべての実験は、日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認の下、動物実験指針に従って行い、実験動物の苦痛軽減および使用動物の低減に努めた。

4. 研究成果

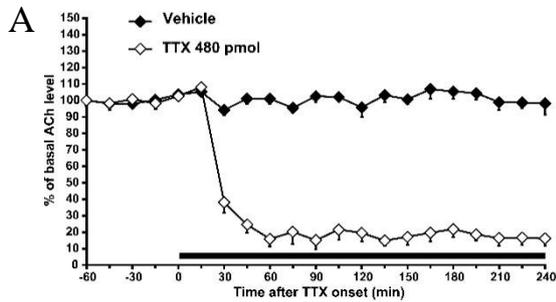
側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系 DA 性ニューロンの投射領域のひとつである。免疫組織化学的研究から、側坐核にはコリン性介在神経が広く分布していることが示されている (Meredith et al., 1989)。

側坐核には opioid 受容体サブタイプの δ , μ , κ 受容体が分布している。*In vivo* 脳微小透析実験から δ および μ 受容体を含む opioid 受容体サブタイプを非特異的に刺激する morphine の全身投与は、無麻酔非拘束ラットの側坐核の ACh 放出を減少させることが示されている (Rada et al., 1991)。また側坐核のコリン性介在神経には δ および μ 受容体が発現することを示唆する電気生理学的研究もある (Britt and McGehee, 2008)。一方、 δ 受容体は薬理的に δ_1 , δ_2 受容体に (Dietis et al., 2011)、 μ 受容体も選択的 μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine への感受性にに基づき μ_1 , μ_2 受容体にそれぞれ分類されている (Dietis et al., 2011; Pasternak and Wood, 1986)。しかしながら、側坐核に分布する δ および μ 受容体サブタイプが同部位の ACh 放出の制御において果たす役割は明らかでない。そこで本研究では、 δ および μ 受容体サブタイプのアゴニストが無麻酔非拘束ラットの側坐核の細胞外 ACh 量に及ぼす効果について *in vivo* 脳微小透析法を用いて解析した。この側坐核 ACh に対するアゴニストの効果の受容体特異性は、 δ および μ 受容体のアンタゴニストを用いて検討した。側坐核から回収した透析液中の ACh 量の変化を詳細に評価するため、本研究は低用量 (50 nM) の cholinesterase 阻害薬の physostigmine を含んだ灌流液を使用して行なった。

① 側坐核の ACh 放出における tetrodotoxin

の効果

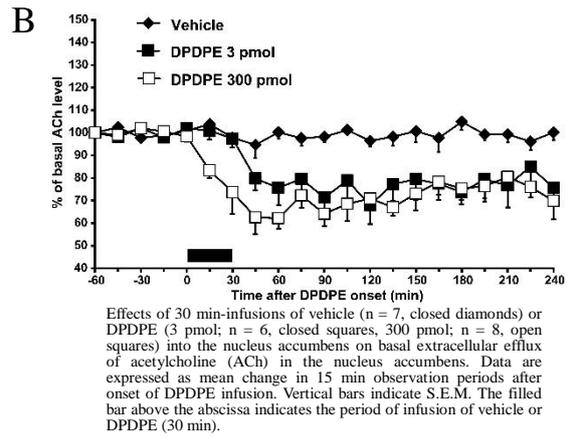
*In vivo*脳微小透析法実験による ACh 放出の測定では、細胞外 ACh の酵素的不活性化を低下させる目的で cholinesterase 阻害薬を灌流液に添加する (Noori et al., 2012)。本研究では、灌流液に physostigmine を添加した。これは physostigmine は neostigmine に比べ低濃度でも細胞外 ACh 濃度への効果が強いことが示唆されているからである (Noori et al., 2012)。本実験条件下では、側坐核の基礎的な ACh のうち、80%以上が電位依存性 Na⁺チャンネル阻害薬の tetrodotoxin (480 pmol) の灌流投与で消失した。したがって本研究で検出した側坐核の ACh は、神経活動依存性に放出されたものであることが示された (図 A)。



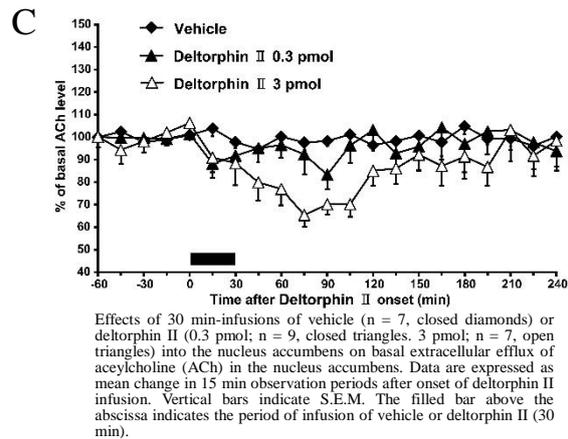
Effects of 240 min-infusions of vehicle (n = 7, closed diamonds) or tetrodotoxin (TTX, 480 pmol; n = 6, open diamonds) into the nucleus accumbens on basal extracellular levels of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of Tetrodotoxin perfusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the 240 min period of Tetrodotoxin infusion that commenced at 0 min.

② 側坐核における δ_1 および δ_2 受容体アゴニストが ACh 放出に及ぼす効果

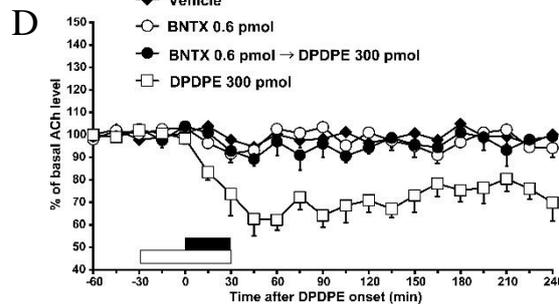
δ_1 受容体アゴニストの DPDPE (3 pmol, 300 pmol) または δ_2 受容体アゴニストの deltorphin II (0.3 pmol, 3 pmol) の無麻醉非拘束ラットの側坐核への灌流投与は、同部位の ACh 放出を減少させた。この DPDPE (300 pmol) および deltorphin II (3 pmol) が誘発した ACh 放出の減少は、それぞれ δ_1 受容体アンタゴニストの BNTX (0.6 pmol) または δ_2 受容体アンタゴニストの naltriben (15 pmol) の併用投与により抑制された。このことからこれらのアゴニストの効果は、それぞれ δ_1 , δ_2 受容体の活性化を介して発現したものと考えられた (図 B, C, D, E)。



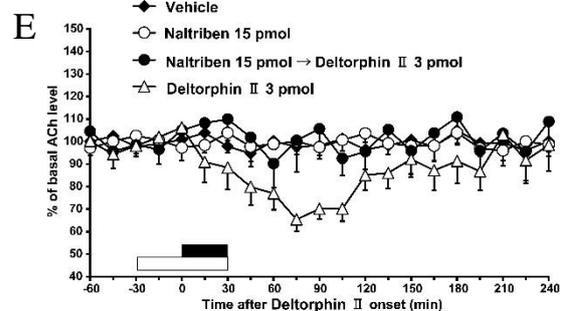
Effects of 30 min-infusions of vehicle (n = 7, closed diamonds) or DPDPE (3 pmol; n = 6, closed squares, 300 pmol; n = 8, open squares) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of DPDPE infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or DPDPE (30 min).



Effects of 30 min-infusions of vehicle (n = 7, closed diamonds) or deltorphin II (0.3 pmol; n = 9, closed triangles, 3 pmol; n = 7, open triangles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of deltorphin II infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or deltorphin II (30 min).



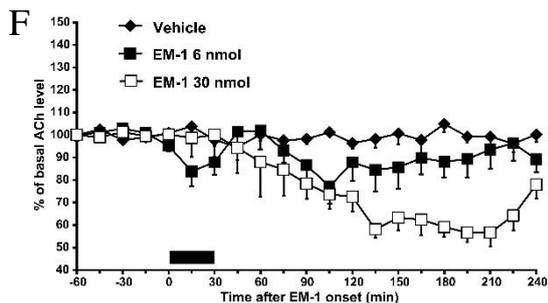
Effects of a 60 min-infusion of BNTX (0.6 pmol) on a 30 min-infusion of DPDPE (300 pmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 8, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of DPDPE (300 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of BNTX perfusion that commenced 30 min before onset of DPDPE infusion. The filled bar indicates the period of infusion of DPDPE (30 min).



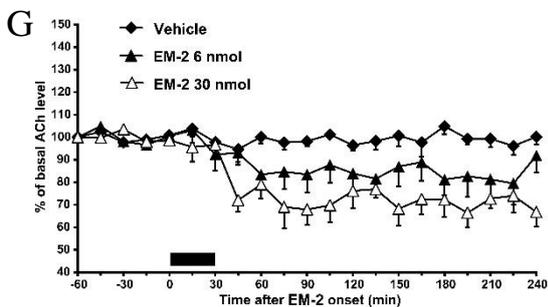
Effects of a 60 min-infusion of naltriben (15 pmol) on a 30 min-infusion of deltorphin II (3 pmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 7, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of deltorphin II (3 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of naltriben perfusion that commenced 30 min before onset of deltorphin II infusion. The filled bar indicates the period of infusion of deltorphin II (30 min).

③ 側坐核における endomorphin (EM) -1 および EM -2 の灌流投与が同部位の ACh 放出に及ぼす効果

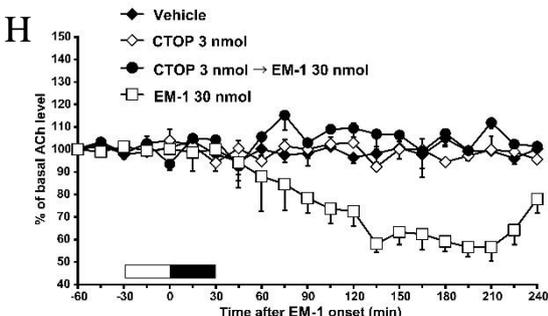
μ 受容体の内因性アゴニスト候補物質 (Zadina et al., 1997) である endomorphin (EM) -1 (6, 30 nmol) および EM -2 (6, 30 nmol) の側坐核への投与はそれぞれ無麻酔非拘束ラットの側坐核の ACh 放出を減少させた。これらの EM 類の効果は選択的 μ 受容体アンタゴニストの CTOP (3 nmol) の併用で打ち消された。これらの結果から側坐核へ局所灌流された EM 類が μ 受容体刺激を介して同部位のコリン性神経活動を抑制することが明らかに示された (図 F, G, H, I)。



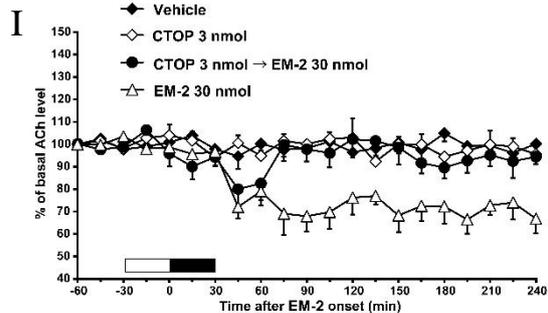
Effects of 30 min-infusion of vehicle (n = 7, closed diamonds) or endomorphin-1 (EM-1; 6 nmol; n = 5; closed squares, 30 nmol; n = 7, open squares) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of endomorphin-1 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or endomorphin-1 (30 min).



Effects of 30 min-infusions of vehicle (n = 7, closed diamonds) or endomorphin-2 (EM-2; 6 nmol; n = 7, closed triangles, 30 nmol; n = 7, open triangles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of endomorphin-2 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or endomorphin-2 (30 min).



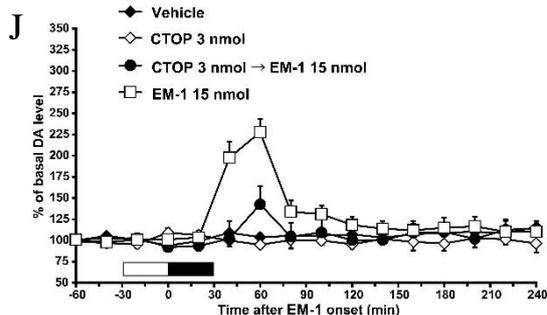
Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 5, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-1 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).



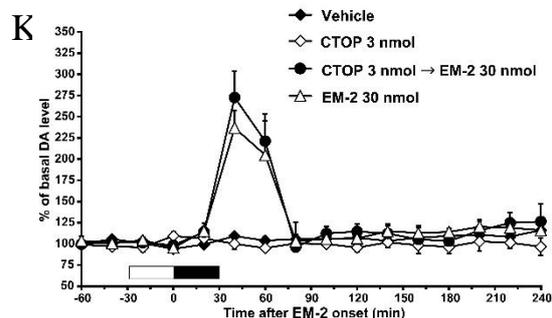
Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 6, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-2 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

④ EM-1 および EM-2 の側坐核への灌流投与による DA 放出の増加に及ぼす CTOP の効果

前述の通り本研究では低濃度 (50 nM) の physostigmine を添加している灌流液を使用した。 μ 受容体アンタゴニストの CTOP (3 nmol) の側坐核への灌流投与は、同部位の EM-1 (15 nmol) 誘発 DA 放出を抑制したものの、EM-2 (30 nmol) 誘発 DA 放出は抑制できなかった (図 J, K)。



Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 15 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (n = 5, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (15 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-1 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).



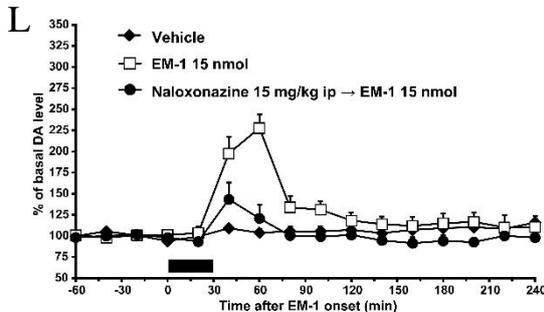
The 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (n = 5, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-2 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

これらの結果は、EM-1 とは異なり EM-2 の側坐核への投与は μ 受容体を含む opioid 受容体を介さない機構で同部位の

DA を増加させるとする, physostigmine を添加していない灌流液を使用して行なった以前の研究の成果 (Okutsu et al., 2006) と一致するものであった。

⑤ Naloxonazine の前処置が側坐核における EM-1 誘発 DA 放出の増加に及ぼす効果

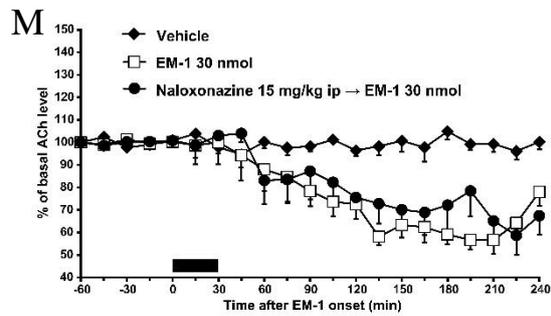
μ 受容体は μ_1 受容体選択的アンタゴニストの naloxonazine への感受性に基づき μ_1 , μ_2 受容体に分類されている。以前の実験結果 (Okutsu et al., 2006) と同様に, naloxonazine (15 mg/kg ip) は本実験条件下で側坐核への EM-1 (15 nmol) の灌流投与が誘発した DA 放出を抑制できることが明らかとなった。これらの結果は, EM-1 誘発側坐核 DA 放出には側坐核の μ_1 受容体刺激が関与するとするこれまでの報告 (Okutsu et al., 2006) を支持するものであった (図 L)。



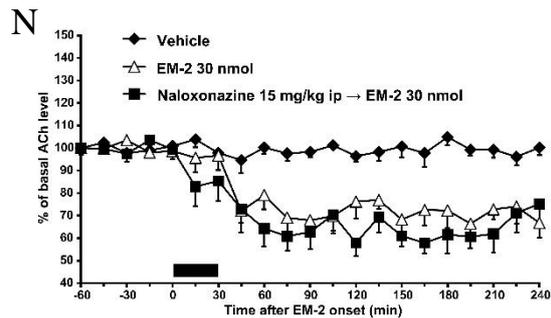
Effects of intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before onset of EM-1 infusion) on a 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 15 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (n = 6; closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (15 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).

⑥ Naloxonazine の前処置が側坐核における EM-1 および EM-2 誘発 ACh 放出の減少に及ぼす効果

本実験とこれまでの研究の結果 (Okutsu et al., 2006) は, 側坐核では μ_2 ではなく μ_1 受容体が同部位の DA 神経活動を促進的に制御することを示している。これに対して本研究では, EM-1 (30 nmol) と EM-2 (30 nmol) が誘発した ACh 放出の減少はいずれも μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine (15 mg/kg ip) の影響を受けなかった。これらの結果は EM-1 と EM-2 の側坐核への投与は μ_2 受容体刺激を介して同部位の ACh を減少させたことを示している。またこの結果は, 側坐核では μ_1 ではなく μ_2 受容体が同部位の ACh 神経活動を抑制的に制御することも示唆するものである (図 M, N)。



Intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before onset of EM-1 infusion) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 6, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).



Intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before onset of EM-2 infusion) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens (n = 7, closed squares). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

以上の結果から, 側坐核では δ_1 , δ_2 受容体のほか, μ_1 ではなく μ_2 受容体が ACh 神経を抑制的に制御することを示す神経化学的証拠が *in vivo* の条件で得られた。さらに本研究から μ_1 受容体は側坐核の DA 神経活動制御において促進的な役割を果たすのに対して, μ_2 受容体は側坐核の ACh 神経活動制御において抑制的な役割を果たすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Saigusa T, Aono Y, Waddington JL, Mechanisms of delta- and mu-opioid receptor agonist induced increases in extracellular dopamine level in the nucleus accumbens of freely moving rats. Journal of Oral Science, 査読有, in press
- ② Kiguchi Y, Aono Y, Watanabe Y, Yamamoto-Nemoto S, Shimizu K, Shimizu T, Kosuge Y, Waddington JL, Ishige K, Ito Y, Saigusa T, In vivo neurochemical evidence that delta1-, delta2- and mu2-opioid receptors, but not mu1-opioid receptors, inhibit acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. European

[学会発表] (計 12 件)

- ① Aono Y, Watanabe Y, Kiguchi Y, Ishikawa M, Shibutani K, Saigusa T, Activation of GABA_B receptors inhibits δ_2 receptor-mediated accumbal dopamine efflux in rats. 第90回日本薬理学会年会 2017年3月16日, 長崎ブリックホール, 長崎県, 長崎市
- ② 青野悠里, 木口友里, 渡邊由梨子, 三枝 禎, δ 受容体サブタイプ刺激が誘発したラットの側坐核ドパミン放出に対する muscimol の効果の特徴, 第134回日本薬理学会関東部会, 2016年7月9日, 国際医療福祉大学, 栃木県, 大田原市
- ③ Saigusa T, Aono Y, δ_1 , δ_2 and μ_2 , but not μ_1 receptors, exert an inhibitory role in regulation of acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, CINP 2016, 2016年7月4日, Seoul, Korea
- ④ 青野悠里, 三枝 禎, Muscimol inhibits the deltrophin II-, but not DPDPE-, induced increase of dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, 第46日本神経精神薬理学会, 2016年7月2日, Seoul, Korea
- ⑤ 木口友里, 青野悠里, 渡邊由梨子, 山本晴子, 清水邦彦, 小菅康弘, 石毛久美子, 伊藤芳久, 三枝 禎, δ_1 and δ_2 receptors subtypes exert an inhibitory role in regulation of acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, 第89日本薬理学会年会, 2016年3月11日, パシフィコ横浜, 神奈川県, 横浜市
- ⑥ Saigusa T, Aono Y, Intra-accumbal infusion of endomorphin-1 and endomorphin-2 decreases accumbal acetylcholine efflux via μ_2 receptors in the nucleus accumbens of freely moving rats, Neuroscience 2015, 2015年10月18日, Chicago, USA
- ⑦ 青野悠里, 三枝 禎, Intra-accumbal infusion of endomorphin-2 reduces acetylcholine efflux via μ_2 receptors in the nucleus accumbens of freely moving rats, 第45回日本神経精神薬理学会 第37回日本生物学的精神医学会 合同年会, 2015年9月25日, タワーホール船堀, 東京都, 江戸川区

6. 研究組織

(1) 研究代表者