

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890236
 研究課題名(和文) 側坐核のノルアドレナリンおよびドパミン遊離制御機構
 研究課題名(英文) Mechanisms of regulation of noradrenaline and dopamine efflux
 in the nucleus accumbens
 研究代表者
 青野 悠里 (AONO YURI)
 日本大学・歯学部・ポストドクター
 研究者番号：50508497

研究成果の概要(和文)：口腔ジスキネジアは顎顔面の無目的な反復性の運動を特徴とする症候である。その発症機構の詳細は不明だが、ラットを用いた行動学的研究から側坐核のドパミン神経が顎の常同運動の発現へ関与していることが示唆されている。側坐核ではノルアドレナリンとドパミンの両神経間に密接な機能的相互作用が存在するので、申請者らは、側坐核におけるこれら両神経の活動制御機構について、無麻酔非拘束ラットを用い *in vivo* 脳微小透析法により検討した。

研究成果の概要(英文)：Oral dyskinesia is a neurological syndrome which is characterized by the repetitive stereotyped oral movement. The detailed biological basis of the disorder remains unclear, but the behavioural studies suggest that the accumbal dopaminergic neurons play a pivotal role for the induction of repetitive jaw movements of rats. It is known that there exists a close noradrenaline-dopamine interaction within this nucleus. Therefore, in the present study, we investigated the mechanisms of the regulation of accumbal dopaminergic and noradrenergic activity in freely moving rats, using the *in vivo* brain microdialysis technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,380,000	414,000	1,794,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,580,000	774,000	3,354,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：カテコラミン, 大脳基底核, 口腔ジスキネジア, 麻薬性鎮痛薬, 鎮痛補助薬

1. 研究開始当初の背景

側坐核は、中脳腹側被蓋野に起始核をもつ中脳辺縁系ドパミン(DA)神経の主たる投射部位である。

高齢者では舌の突出を伴う顎顔面の異常な不随意運動の口腔ジスキネジアがしばしば見られる。口腔ジスキネジアは抗パーキン

ソン病薬の反復投与などの中枢DA神経活性化を狙った薬物療法の副作用としても起こることから、口腔ジスキネジア発症に関する研究は、この薬物の主たる作用部位と推測される大脳基底核へ投射する黒質-線条体系DA神経に焦点を当てて進められてきた。しかし、臨床上、黒質-線条体DA神経の機能障害によ

るパーキンソン病の治療のため脳内の DA 神経活性を高める薬物を投与すると、パーキンソン病症状が改善する以前に口腔ジスキネジアが発症することも知られている。このことから大脳基底核以外の DA 神経の過活動の結果、口腔ジスキネジアが発症する可能性が考えられる。実際に申請者らのグループでは側坐核の DA 神経機能亢進がラットに口腔ジスキネジア様の顎運動を惹き起こすことを報告している (Cools et al., Eur J. Pharmacol., 1995)。

一方、側坐核には DA 神経のみならず青斑核などから NA 神経入力があり DA 神経機能の調節を行うことが指摘されている (Saigusa et al., Neuroscience, 1999)。側坐核の NA 神経の制御機構は同部位の DA 神経活動を指標とした研究 (Tuinstra & Cools, Neuroscience, 2000) からその一端こそ明らかにされているものの、側坐核の NA 神経からの NA 遊離そのものの制御機構については、この神経の終末に分布するアドレナリン受容体サブタイプの関与の面からさえ不明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究は *in vivo* の条件下において、側坐核の NA 遊離の制御機構を解明することを目指して計画した。即ち、本研究はラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法により、①側坐核の細胞外 NA 量の制御へ同部位に分布する NA 再取り込み機構が関与するか否かについて、さらに②同部位に分布するアドレナリン受容体サブタイプが細胞外 NA 量の制御に果たす役割についてそれぞれ明らかにすることを計画した。

実験動物を用いた基礎的な研究から、側坐核の DA 神経の亢進が口腔ジスキネジア様の顎顔面領域の異常な不随意運動を惹起することが示されている。したがって、この DA 神経の促進機構の解明が口腔ジスキネジア発症機構の生物学的背景の解明につながることを期待できる。しかしながら、*in vivo* の条件下における側坐核の DA 神経の活性化メカニズムの詳細は明らかでない。そこで、本研究では (1) NA 神経と DA 神経、(2) μ 受容体と GABA 神経のそれぞれの相互作用の面から側坐核の DA 神経亢進機構について検討を加えた。即ち、

(1) 側坐核では NA 神経と DA 神経の間に密接な機能的相互関係があることが知られている。そこで、側坐核の NA 神経の活性化が同部位の DA 神経に及ぼす効果について、アドレナリン受容体サブタイプのひとつの β 受容体の役割に注目して側坐核の DA 神経亢進機構について検討した。

(2) 側坐核の DA 神経への入力が想定されている GABA 神経による抑制性制御の抑制 (脱

抑制) による DA 神経の活動亢進機構について GABA 受容体サブタイプの面から検討を加えた。 μ 受容体刺激が惹起する DA 神経の亢進には GABA 神経の抑制が関わることが知られているので、つぎに、内因性 μ 受容体アゴニスト候補物質の EM 類の示す側坐核 DA 遊離促進のメカニズムを同部位に分布する GABA 受容体サブタイプの役割の面から解明を試みた。

一方、DA 受容体サブタイプの機能の検索に広く用いられているベンザゼピン系 D_1 受容体アゴニストの SKF38393 は、ラットの線条体背側部へ局所投与すると、dexamphetamine と似たメカニズムで D_1 受容体を介さずに同部位の細胞外 DA 量を増加する (Tomiyama et al., 1995)。Dexamphetamine は、神経終末のシナプス小胞のみならず細胞質からの DA 遊離も惹起するが、この SKF38393 処置により誘発された DA の細胞内由来は明らかでない。そこで、この SKF38393 の線条体背側部への投与が誘発した同部位の DA 遊離が、シナプス小胞と細胞質のいずれを由来としているかについて検討を行った。

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。ペントバルビタール (50 mg/kg i.p.) 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 1~2 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 5 または 20 分毎に注入し、電気化学検出器でサンプル中の DA または NA を定量した。

(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 DA または NA 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、DA または NA 量の変化を 4 時間にわたり観察した。側坐核ではなく線条体背側部を対象とした一部の実験では、薬物投与用の微小ニードルを透析膜表面に備えた脳微小透析プローブを用い、こ

の微小ニードルを介した薬物の線条体への局所投与を行ってDA量の変化を3時間にわたり観察した。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 μm 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

(1) Reboxetine 誘発側坐核 DA 遊離において β 受容体が果たす役割

青斑核などからの NA 神経は、中脳辺縁系 DA 神経の投射する側坐核へ入力する。側坐核の NA 神経と DA 神経の間には密接な機能的相互関係があり、この領域に分布する β 受容体の作動薬による活性化は同部位の DA 遊離を増加する。一方、NA 取り込み阻害薬は細胞外間隙において NA のみならず DA も増加するが、その発現機構として NA 取り込み機構を介した DA の細胞内移行の阻害の関与が示唆されている。しかし、NA 取り込み阻害薬の示す DA 遊離促進作用へ細胞外 NA 量の増加による β 受容体の刺激が関わるか否かについては明らかでない。そこで本研究では、選択的 β 受容体遮断薬の propranolol を用いて、この薬物が選択的 NA 取り込み阻害薬の reboxetine の示す側坐核の DA 遊離促進効果を抑制するか否かについて検討した。

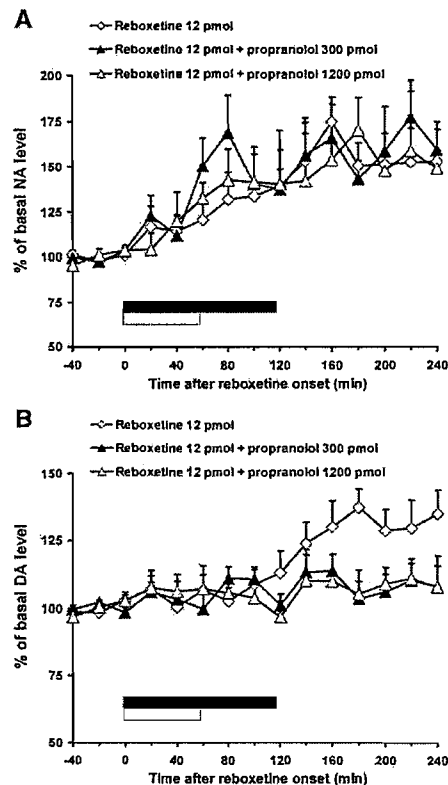
実験には無麻酔非拘束ラットを用い、側坐核から脳微小透析プローブを介して回収した細胞外液中の NA および DA は HPLC-ECD 法で分離・定量した。薬物はいずれも灌流液中に溶解し、脳微小透析プローブを介した逆透析で側坐核に局所灌流投与した。

Propranolol は、側坐核の β 受容体の作動薬による活性化が誘発する同部位の DA 遊離の亢進を抑制する用量を用いた。

その結果、

- ① 側坐核の基礎 NA および DA 遊離はいずれも、reboxetine (1.2, 12 pmol) の灌流投与により増大した。
- ② Propranolol (300, 1200 pmol) の灌流投与は、基礎 NA 遊離、基礎 DA 遊離、reboxetine 誘発 NA 遊離にはいずれも著明な影響を与えなかったが、reboxetine が誘発した DA 遊離の増大を強く抑制した (図 A, B)。

以上の結果から reboxetine が誘発した側坐核の DA 遊離亢進には、同部位において増加した細胞外 NA による β 受容体の活性化が関わる可能性が示された。



(A) Effects of a 60 min-infusion of l-propranolol [propranolol; 300 pmol (n=9; closed triangles) and 1200 pmol (n=7; opened triangles)] on a 120 min-infusion of reboxetine (12 pmol)-induced increase in noradrenaline (NA) level in the nucleus accumbens (n=6; opened diamonds). The data are expressed as the mean change in 20 min observation periods after onset of a 120 min-infusion of reboxetine (12 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of reboxetine perfusion. The opened bar indicates the period of infusion of l-propranolol. (B) Effects of a 60 min-infusion of l-propranolol [propranolol; 300 pmol (n=9; closed triangles) and 1200 pmol (n=7; opened triangles)] on a 120 min-infusion of reboxetine (12 pmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (n=6; opened diamonds). The data are expressed as the mean change in 20 min observation periods after onset of a 120 min-infusion of reboxetine (12 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of reboxetine perfusion. The opened bar indicates the period of infusion of l-propranolol.

(2) Endomorphin 類誘発側坐核 DA 遊離において GABA 受容体サブタイプが果たす役割

内因性 μ 受容体アゴニスト候補物質の endomorphin (EM) -1 と EM-2 は、ラットの側坐核に灌流投与すると、いずれも同部位の DA 遊離を促進する。 μ 受容体アゴニストによる中枢 DA 神経活性化は、 μ 受容体刺激を介した GABA 神経機能の脱抑制によることが示唆されているが、EM 類が惹起した側坐核 DA 遊離における同部位の GABA 受容体サブタイプの関与の詳細は明らかでない。本研究では EM-1 と EM-2 それぞれの灌流投与で誘発される側坐核 DA 遊離における同部位の GABA 受容体サブタイプの役割を明らかにする目的で、無麻酔非拘束ラットを用い、*in vivo* 脳微小透析法にて検討を行った。

すなわち、側坐核の基礎 DA 遊離と、EM-1 および EM-2 誘発 DA 遊離に対する GABA_A 受容体系薬物(アゴニストの muscimol とアンタゴニストの bicuculline) の局所灌流投与の

効果を検討した。

DA 遊離の測定には、側坐核に挿入した脳微小透析プローブを介して回収した細胞外液中の DA を、電気化学検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフにて分離定量した。薬物はいずれも灌流液中に溶解し、脳微小透析プローブを介した逆透析で側坐核に局所灌流投与した。

その結果、GABA_A 受容体系薬物を用いた研究より、

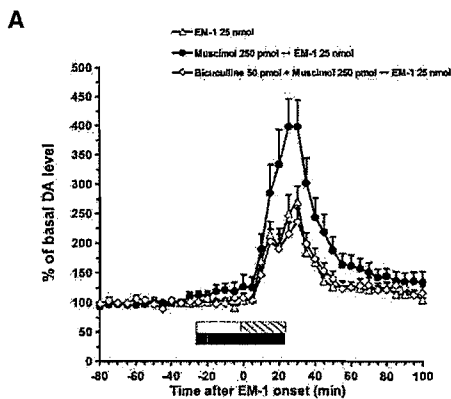
① GABA_A 受容体のアゴニスト (muscimol; 2,500 pmol) とアンタゴニスト (bicuculline; 5 および 10 nmol) は、共に基礎 DA 遊離を増大させた。

② Muscimol (2,500 pmol) 誘発 DA 遊離の増大は bicuculline (50 pmol) により拮抗されることが明らかとなった。

③ EM-1 誘発 DA 遊離は muscimol (250 pmol) により促進されたが、bicuculline (50 または 500 pmol) による影響は受けなかった。

④ Muscimol (250 pmol) による EM-1 誘発 DA 遊離の促進は、bicuculline (50 pmol) の併用によって拮抗された (図 A)。

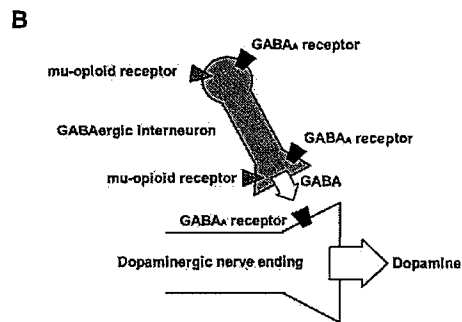
⑤ Muscimol および bicuculline は、いずれも EM-2 (25 nmol) が誘発した DA 遊離に影響を与えなかった。



Effects of the infusion of bicuculline (50 pmol) on the increase in accumbal dopamine (DA) efflux induced by the co-administration of 250 pmol muscimol and 25 nmol endomorphin-1 (EM-1; $n=6$, open diamonds). The data are expressed as the mean of change in 5 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 bicuculline perfusion (50 min) that commenced 25 min before onset of endomorphin-1 infusion. The open bar indicates the period of infusion of muscimol (25 min) that commenced 25 min before onset of endomorphin-1 infusion. The hatched bar above the abscissa indicates the period of endomorphin-1 perfusion (25 min).

Muscimol と bicuculline とが、いずれも基礎 DA 遊離を増大させたことから、これらの薬物はそれぞれ異なる部位に作用した可能性が考えられた。すなわち、muscimol は、DA 神経を抑制する GABA 性介在神経上の GABA_A 受容体に作用して DA 神経活動を脱抑制するのに対し、bicuculline は、DA 神経上

の GABA_A 受容体に直接作用して DA 神経に対する抑制を解除することが示唆された。また、GABA_A 受容体のアゴニストは EM-1 の効果を促進させたが、アンタゴニストではそのような効果は認められなかったことから、DA 神経終末に局在する GABA_A 受容体に対する EM-1 の効果は限度近くに達しており、いわゆる床効果を誘発していた可能性が示された (図 B)。さらに、EM-2 (25 nmol) が誘発した DA 遊離に対して muscimol と bicuculline は、いずれも著明な影響を与えなかったことから、EM-2 は EM-1 とは異なるメカニズムで側坐核の DA 遊離を促進することが示された。



A model indicating how GABA-ergic interneuron and dopaminergic neuron (dopaminergic nerve ending) interact by mediating GABA_A as well as mu-opioid receptors in the nucleus accumbens. The glial cells which may contribute to the regulation of extracellular neurotransmitter levels are not included. The arrows are indicating the GABA and dopamine release from the nerve endings.

(3) ベンザゼピン系 D₁ 受容体アゴニストの SKF38393 の線条体背側部への局所投与が誘発する細胞外 DA 遊離の由来

我々はシナプス小胞内 DA 枯渇薬の reserpine と DA 合成律速酵素阻害薬の α -methyl-*p*-tyrosine (α -MPT) を用いた研究から、覚醒アミンの dexamphetamine は、線条体の DA 神経終末のシナプス小胞のみならず細胞質からも DA を細胞外へ放出することを報告している (Watanabe et al., 2005)。ベンザゼピン系 D₁ 受容体アゴニストの SKF38393 はラットの線条体背側部へ局所投与すると、dexamphetamine と類似した神経活動非依存性の機構により同部位の DA の放出を促進するが、この DA はシナプス小胞と細胞質のいずれを由来とするかは明らかでない。そこで、無麻酔非拘束ラットの線条体背側部への SKF38393 の局所投与が誘発した DA 放出におけるシナプス小胞と細胞質の DA プールの役割について、reserpine と α -MPT を用いて *in vivo* 脳微小透析法により検討した。その結果、① Reserpine (5 mg/kg, 24 時間前) または α -MPT (250 mg/kg, 2 時間前) の全身投与の

結果，線条体背側部への SKF38393 の局所注入 (1.5 µg/0.5 µl) が誘発した同部位の DA 放出は，reserpine により約 82%が，α-MPT により約 62 %がそれぞれ抑制され，これら reserpine と α-MPT の抑制効果の合計は 100%を超える約 144%に達した (下表)。

② 細胞内 DA を枯渇させるため reserpine と α-MPT を併用投与しても，SKF38393 誘発 DA 放出は約 86%までしか抑制できなかった (下表)。

Summary of the dopamine efflux of baseline in the striatum (control) and SKF38393 (1.5 µg/0.5 µl) injected rats without or with pretreatment by reserpine (5 mg/kg i.p., 24 h before intrastriatal injection of the drug), alpha-methyl-para-tyrosine (250 mg/kg i.p., 2 h before intrastriatal injection of the drug) or both.

	Without pretreatment	With pretreatment		
		Reserpine	Alpha-methyl-para-tyrosine	Reserpine and Alpha-methyl-para-tyrosine
Control rats	5.0 ± 0.36 (100%; n = 25)	0.8 ± 0.20 (17.7%; n = 7)	2.1 ± 0.47 (44.7%; n = 6)	0.4 ± 0.10 (7.5%; n = 5)
SKF38393-treated rats	84.0 ± 12.03 (100%; n = 7)	14.8 ± 7.48 (17.8%; n = 7)	32.3 ± 8.64 (38.5%; n = 6)	11.8 ± 7.32 (14.0%; n = 5)

The data were expressed as means ± S.E.M. of dopamine level (pg)/20 min sample and corrected for the SKF38393-induced contamination, where appropriate.

以上の結果から，ラットの線条体背側部への SKF38393 の局所投与は，同部位のシナプス小胞と細胞質の両方から DA を放出することが示された。また，この SKF38393 処置は細胞内の DA のシナプス小胞と細胞質の間の移動を誘発すること，さらに細胞外 DA の細胞内への取込み機構を阻害することがそれぞれ示唆された。

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, Sekino R, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools A R. Contribution of vesicular and cytosolic dopamine to the increased striatal dopamine efflux elicited by intrastriatal injection of SKF38393. *Eur J Pharmacol*, 2009, 624: 169-174. 査読有

2. 三枝 禎, 青野悠里, 越川憲明, 側坐核のドーパミン放出と GABA_A 受容体アゴニスト, アンタゴニスト. *生体の科学*, 2009, 60: 420-421. 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 関野麗子, 青野悠里, 三枝 禎, 大井良之, 越川憲明, Allylglycine のラット側坐核ドーパミン遊離促進効果における GABA_B 受容体の役割. 2009 年 7 月 11 日, 第 120 回日本薬理学会関東部会, 東京医科歯科大学 / 5 号館講堂, 東京都文京区

2. 三枝 禎, 青野悠里, 関野麗子, ノルアド

レナリン再取り込み阻害薬の示すラットの側坐核ドーパミン遊離促進作用へ β 受容体拮抗薬が及ぼす効果. 2009 年 6 月 6-7 日, 第 1 回日本心身医学 5 学会合同集会第 24 回日本歯科心身医学会総会・学術大会, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区

3. 関野麗子, 青野悠里, 三枝 禎, 大井良之, 越川憲明, ラットの allylglycine 誘発側坐核ドーパミン遊離亢進における GABA_B 受容体の役割. 2009 年 5 月 16 日, 第 61 回日本大学歯学会総会・学術大会, 日本大学歯学部, 東京都千代田区

4. 青野悠里, 三枝 禎, 関野麗子, Cools A. R., 越川憲明, ラットの側坐核における reboxetine 誘発ノルアドレナリンおよびドーパミン遊離亢進へ l-propranolol が及ぼす効果. 2009 年 3 月 16-18 日, 第 82 回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市

〔その他〕

ホームページ等

研究内容の平易な紹介

http://www.nihon-u.ac.jp/community_and_service/publication/newsletter/nu_excellence/9-04.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青野 悠里 (AONO YURI)

日本大学・歯学部・ポストドクター

研究者番号：50508497