

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10124

研究課題名（和文）口腔ジスキネジア発症への脳内adrenaline受容体サブタイプの関与

研究課題名（英文）Studies on the involvement of brain adrenergic receptors in oral dyskinesia

研究代表者

青野 悠里（AONO, Yuri）

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：50508497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は口腔ジスキネジアを含む反復性の異常な行動への脳内のアセチルコリン（ACh）神経活動の関与を想定し、その制御機構を研究してきた。本計画では中脳辺縁系ドパミン（DA）神経系の終末領域の側坐核のACh神経活動に焦点を当てた。側坐核にはノルアドレナリン神経が投射するため、同部位の α_2 受容体のAChの放出の調節への関与をラットで分析した。側坐核ではAChとGABA神経が相互作用するため、同部位の細胞外GABA量を調節するGABAトランスポーターサブタイプを検索した。さらに歯周疾患の進行に関わる *P. gingivalis*由来のリポ多糖が新規環境誘発性の移所行動に及ぼす影響もマウスを用いて分析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中脳辺縁系DA神経の投射領域の側坐核では、 α_1 ではなく、 α_2 受容体刺激により同部位のACh神経活動が低下することが報告できた。つまりノルアドレナリン神経との相互作用の面から脳内のACh神経活動の制御機構について検討ができた。側坐核の基礎的な細胞外GABA量の制御へのGAT-1の関与を示す解析結果が得られた。また新環境でのマウスの活動亢進は *E. coli*とは異なり、*P. gingivalis*由来のリポ多糖の全身投与による顕著な影響は受けなかったことが示された。

研究成果の概要（英文）：We have been studying the mechanisms that control acetylcholine (ACh) neural activity in the brain, as they may constitute part of the basis for repetitive abnormal behaviors, including oral dyskinesia-like jaw movements. In the present study, we focused on ACh neural activity in the nucleus accumbens (NAc), a terminal area of the mesolimbic dopaminergic (DAergic) system. We analyzed the involvements of α_2 adrenergic receptors in regulating the neuronal release of accumbal ACh in rats, as the NAc receives noradrenergic projections. We also studied the roles of GABA transporter subtypes in regulating accumbal extracellular GABA levels, as GABA and ACh neurons may interact in the NAc. Additionally, we analyzed the effects of lipopolysaccharides from *P. gingivalis*, known to be involved in the progression of periodontal disease, on novel-environment-induced locomotion in mice, which is known to be induced by increased mesolimbic DAergic activity.

研究分野：薬理学

キーワード：脳微小透析法 側坐核 ラット GABA

1. 研究開始当初の背景

口腔ジスキネジアは、顎顔面を無目的に繰り返し動かす異常な不随意運動で高齢者にしばしば見られる。口腔ジスキネジアは舌の突出も伴うことも多く、歯科治療の妨げになるほか生活の質も低下させる。しかし口腔ジスキネジアの発症機構の詳細は不明であり、根治的治療法がない。口腔ジスキネジアは、抗精神病薬や抗 Parkinson 病薬の反復投与のように中枢 dopamine (DA) 神経の過活動を起こす薬物療法に伴い発症する。このため口腔ジスキネジア発症機構の研究は、これらの薬物が作用する大脳基底核の黒質-線条体系 DA 神経を対象とするものが多い。

側坐核は中脳腹側被蓋野を起始核とする中脳-辺縁系 DA 神経の主な投射部位である。側坐核には DA 神経と機能的相互作用を示す ACh 神経が介在神経として局在している。我々は側坐核の ACh 神経活動の制御機構について opioid 受容体および GABA 受容体サブタイプの役割の面から基礎研究に取り組んできたが (Aono et al., Synapse 73, 2019; Kiguchi et al., 2016 他), 脳内の ACh 神経活動も口腔ジスキネジア様の顎運動でも認められる反復性の行動の基盤の一部となる可能性を想定している。側坐核には青斑核から noradrenaline (NA) 神経が入力しており, adrenaline 受容体サブタイプ (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 受容体) のいずれかを介して DA および ACh 神経を含む側坐核の神経活動に影響を及ぼす可能性がある。口腔ジスキネジアは抗うつ薬の副作用としても起こることがあること, 選択的 NA 取込み阻害作用のある抗うつ薬が口腔ジスキネジアを起こすことにそれぞれ注目し, 脳内で増大した内因性 NA が刺激する adrenaline 受容体サブタイプが側坐核の DA 神経活動に及ぼす影響を解析した。その結果, 側坐核の DA 神経活動は α_1 受容体刺激で抑制され (Aono et al., 2015; Saigusa et al., 2012), β_1 , β_2 受容体の同時刺激で促進した (Aono et al., 2013)。本研究では, (1) 側坐核の細胞外 ACh 量を指標として, 同部位の ACh 神経活動の調節において, adrenaline 受容体サブタイプが果たす役割について特に α 受容体サブタイプの役割に焦点を当てて検討した。また, (2) 側坐核において DA および ACh 神経と密接な機能的相互作用を示す GABA 神経に着目し, 細胞外 GABA 量の調節に関わる GABA トランスポーター (GAT) のサブタイプの検索に取り組んだ。最後に (3) 側坐核の DA 神経活動の亢進が関わると考えられている新環境誘発性の自発運動の亢進に対してリポ多糖 (LPS) の投与が及ぼす影響の面からそれぞれ動物実験により検討した。

2. 研究の目的

実験動物を用い, 側坐核の ACh 神経活動の制御において同部位の NA 神経が果たす役割を α 受容体サブタイプの関与の面から解明に取り組んだ。また, 側坐核の ACh 神経と機能的相互作用を示すことを報告してきた GABA 神経 (Aono et al., Synapse, 2019) から放出された GABA の細胞外液中の量の調節に関わる GAT サブタイプの検索に取り組んだ。これらの検討は, いずれも無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法により行った。さらに, 歯周疾患の発症・進行において重要と考えられているグラム陰性桿菌の *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) の細胞壁を構成している LPS の *Pg*-LPS の全身投与の作用について, 中脳辺縁系 DA 神経活動が関わることが知られている実験動物の移所行動量の増加のほか, 血液に含まれるサイトカインのうち炎症促進性に作用すると想定されている IL-6 と TNF-alpha, 炎症抑制性に作用すると想定されている IL-10 の量への影響について観察した。比較のため代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli* (*Ec*) 由来の LPS の *Ec*-LPS の投与を行った個体も用い, 行動量と血中サイトカイン量への影響について検討を加えた。

3. 研究の方法

S-D 系ラット (雄性, 体重約 250 g) を用い, (1) α_2 受容体リガンドの側坐核への局所投与が同部位の細胞外 ACh 量に及ぼす影響を指標とし, 側坐核の基礎的な ACh 放出の制御において α_2 受容体が果たす役割について *in vivo* 脳微小透析法により検討した。比較の目的で, α_1 受容体リガンドの投与実験も行った。さらにこれらのリガンドの投与が当該実験条件下で側坐核から回収された NA および DA 量に及ぼす影響も観察した。(2) GAT サブタイプの選択的な阻害薬の側坐核への局所投与が同部位の細胞外 GABA 量に及ぼす影響を指標とし, 側坐核の基礎的な細胞外 GABA 量の調節に関わる GAT サブタイプの検索に取り組んだ。また, (3) ddY 系マウス (雄性, 体重約 20 g) を用い, *Pg*-LPS の作用の特徴を *Ec*-LPS と比較して, アクリル製の透明ケージ (底面 縦 30 cm×横 30 cm, 高さ 20 cm) での移所行動をデジタルビデオカメラにより 30 分間記録しビデオ画像行動解析装置で移動距離の測定を行う open field test と, 採血用ランセットにより採取した微量の血液に含まれている炎症性サイトカイン量をビーズ法により定量する生化学的解析を行った。これらの LPS はいずれも全身投与 (腹腔投与) した。

4. 研究成果

(1) 側坐核の基礎的な細胞外 ACh 量の制御において α_2 受容体が果たす役割

側坐核の細胞外 ACh 量は, α_2 受容体の選択的なアゴニストの UK 14,304 またはアンタゴニストの RX 821002 の灌流投与によりそれぞれ減少または増加した。この UK 14,304 による ACh の

減少は、それ自体では基礎的な ACh 量に目立った影響を及ぼさない低用量の RX 821002 の併用投与により打ち消された。側坐核の細胞外 ACh 量は、 α_1 受容体の選択的なアゴニストの methoxamine またはアンタゴニストの prazosin の灌流投与による目立った影響は受けなかった。このことから側坐核では、 α_1 受容体ではなく α_2 受容体が基礎的な ACh 神経活動を抑制的に制御することが考えられた。

(2) 側坐核の基礎的な細胞外 GABA 量の制御で GAT サブタイプが果たす役割

側坐核の細胞外 GABA 量は、GAT-1 阻害薬の NNC-711 の灌流投与により顕著に増加した。これに対してこの GABA 量に GAT-2 と GAT-3 の阻害薬の(S)-SNAP 5114 の灌流投与による影響は認められなかった。このことから側坐核では、基礎的な細胞外 GABA 量の制御には GAT-1 が関与することが考えられた。

(3) 全身投与した *Pg*-LPS の作用の行動学的および生化学的な特徴

新環境の提示が被験個体に誘発した移所運動の発現に対する *Pg*-LPS の全身投与の影響を *Ec*-LPS と比較するため open field test を行った。その結果、飼育ケージから新たなアクリルケージに被験個体を移したところ、この新環境で起きた移所行動の指標である移動距離は、*Pg*-LPS 処置の影響はほとんど受けなかったのに対し、*Ec*-LPS の投与で顕著に減少した。この *Ec*-LPS による移動距離の減少は TLR4 のアンタゴニストの TAK-242 の併用投与により打ち消されたほか、*Pg*-LPS の併用投与でも抑制される傾向が認められた。*Pg*-または *Ec*-LPS の全身投与が血液中のサイトカイン量に及ぼす影響について検討したところ、IL-6、TNF-alpha、IL-10 の量は *Ec*-LPS の投与でいずれも著しく増大したものの、*Pg*-LPS の投与では殆ど変化が見られなかった。TAK-242 の併用投与では、*Ec*-LPS 処置が誘発した IL-6 と IL-10 の増加は強く抑制されたが、TNF-alpha の増加は目立った影響を受けなかった。*Pg*-LPS の併用投与を行ったところ、IL-6 と TNF-alpha とは異なり IL-10 の *Ec*-LPS 処置による増加が顕著に抑制された。以上の LPS の全身投与と実験の結果から、*Ec*-LPS は TLR4 を介して新環境が誘発した行動量の増加を抑制すると共に、血中の IL-6 と IL-10 を増加させるのに対して、*Pg*-LPS は血中の基礎的な IL-6、TNF-alpha、IL-10 の量には殆ど影響を及ぼさないことが示された。また、併用投与と実験で認められた TAK-242 により抑制される一方で *Pg*-LPS の影響を受けないという行動学および生化学的解析の結果から、*Ec*-LPS が誘発した移所行動量の抑制には血中の IL-6 の増加が関わったことが考えられた。さらに全身投与された *Pg*-LPS の作用のひとつとして TLR4 刺激を介した血中の IL-10 の増加の抑制が示唆された (Aono et al., PLOS ONE, in press)。

< 引用文献 >

- Aono et al., Synapse 73, 2019, e22081
- Kiguchi et al., European Journal of Pharmacology 789, 2016, 402-410
- Aono et al., Behavioural Pharmacology 26, 2015, 73-80
- Saigusa et al., European Journal of Pharmacology 688, 2012, 35-41
- Aono et al., European Journal of Pharmacology 715, 2013, 363-369
- Aono et al., PLOS ONE, in press

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aono Yuri, Saito Koji, Kawashima Hiroki, Watanabe Arata, Kono Tetsuro, Hashizume-Takizawa Tomomi, Okada Hiroyuki, Kosuge Yasuhiro, Senpuku Hidenobu, Waddington John L, Saigusa Tadashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli: Differential and interactive effects on novelty-induced hyperlocomotion, blood cytokine levels and TLR4-related processes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0292830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0292830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawashima Hiroki, Aono Yuri, Watanabe Yuriko, Waddington John L., Saigusa Tadashi	4. 巻 55
2. 論文標題 In vivo microdialysis reveals that blockade of accumbal orexin OX2 but not OX1 receptors enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 733 ~ 745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Saigusa Tadashi, Aono Yuri, Waddington John L.	4. 巻 73
2. 論文標題 Integrative opioid-GABAergic neuronal mechanisms regulating dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacological Reports	6. 最初と最後の頁 971 ~ 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43440-021-00249-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青野悠里、斉藤幸治、三枝 禎
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis由来のリポ多糖のラットの歯肉内への投与が血漿中のTNF- α 量に及ぼす影響
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤幸治、青野悠里、泉福英信、三枝 禎
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisとは異なりEscherichia coli由来のリポ多糖の全身投与は新環境が誘発したマウスの移所行動の増大を抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島央暉、青野悠里、榛葉繁紀、三枝 禎
2. 発表標題 Morphineが誘発したラットの側坐核のdopamine放出の促進作用はnandroloneの単回ではなく反復投与により抑制される
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三枝 禎、川島央暉、青野悠里
2. 発表標題 両後肢足底へcarrageenanを投与したラットの疼痛関連行動へmeloxicamおよびmorphineが及ぼす効果
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗栖 諒子、三枝 禎、青野 悠里、林 良憲、人見 涼露、前田 茂、嶋田 昌彦、岩田 幸一、篠田 雅路
2. 発表標題 眼窩下神経の障害が誘発したラットの口腔顔面領域の機械的アロディニアにおける三叉神経節のpannexin 1の役割
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島央暉、青野悠里、三枝 禎
2. 発表標題 Morphineのラットの側坐核のdopamine放出促進作用へnandroloneの全身投与が及ぼす影響
3. 学会等名 第22回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤幸治、青野悠里、泉福英信、三枝 禎
2. 発表標題 マウスの移所行動を指標としたPorphyromonas gingivalis由来のリポ多糖の作用の特徴の研究
3. 学会等名 第22回日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青野悠里、川島 央暉、三枝 禎
2. 発表標題 GABAトランスポーターサブタイプの選択的阻害薬がラットの側坐核の細胞外液中のGABAおよびグルタミン酸量へ及ぼす効果
3. 学会等名 第144回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	三枝 禎 (SAIGUSA Tadashi) (50277456)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------