

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24132

研究課題名（和文） および  $\mu$  受容体 subtype が側坐核の GABA 神経活動制御において果たす役割

研究課題名（英文） Roles of delta- and mu-opioid receptors in the nucleus accumbens in the control of accumbal GABAergic neural activity

研究代表者

渡邊 由梨子 (WATANABE, Yuriko)

日本大学・松戸歯学部・専修医

研究者番号：90849340

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：中脳辺縁系 dopamine (DA) 神経が投射する側坐核には DA 神経を抑制する GABA 神経が分布する。本研究は、側坐核の基礎的な細胞外 GABA 量の調節で GABA transporter (GAT) が果たす役割を無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法で解析した。GAT1 阻害薬の NNC711 と GAT3 阻害薬の (S)-SNAP-5114 を微小透析膜を介して側坐核に灌流投与したところ、同部位の細胞外 GABA 量を (S)-SNAP-5114 とは異なり NNC711 は増加させた。以上のことから側坐核の細胞外 GABA 量の制御には GAT3 ではなく GAT1 が関わることを *in vivo* の条件下で示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻薬性鎮痛薬が起こす多幸感や精神依存には、オピオイド受容体の選択的刺激を介した中脳辺縁系 DA 神経活動の亢進へ関与すると想定されている。この DA 神経活動の促進は、GABA 神経と DA 神経との相互作用で起こることが考えられる。本研究は、中脳辺縁系 DA 神経が投射する側坐核の GABA 神経活動の制御機構について GABA を細胞内へ取り込む GAT の役割の面から実験動物を用いて検討した。その結果、側坐核では細胞外へ放出された GABA が、GAT3 よりも GAT1 を介して細胞内に取り込まれること示唆する結果が *in vivo* の条件下で得られたことが意義深い。

研究成果の概要（英文）：The nucleus accumbens (NAc) is a major terminal area of mesolimbic dopaminergic neurons that originate in the ventral tegmental area. The NAc contains GABAergic neurons that interact with dopaminergic neurons. We analyzed the role of the GABA transporter (GAT) in regulation of basal extracellular GABA levels in the NAc of freely moving rats using *in vivo* microdialysis. The GAT1 inhibitor NNC711 and the GAT3 inhibitor (S)-SNAP-5114 were each administered directly into the NAc through the microdialysis probe. The intra-accumbal infusion of NNC711, but not of (S)-SNAP-5114, induced a dose-related increase in accumbal GABA efflux. These results provide *in vivo* evidence that GAT1, but not GAT3, plays an important role in regulation of accumbal extracellular GABA levels.

研究分野：口腔外科

キーワード：GABA オピオイド受容体 麻薬性鎮痛薬 ラット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

麻薬性鎮痛薬の示す多幸感や精神依存性には、中脳辺縁系 dopamine (DA) 神経活動の亢進の関与が想定されている。中脳辺縁系 DA 神経が投射する側坐核には、麻薬性鎮痛薬が作用する opioid 受容体サブタイプの  $\delta$ 、 $\mu$  受容体が発現しており、これらの刺激は同部位の細胞外 DA 放出を促進する。また、この  $\delta$  または  $\mu$  受容体の選択的な刺激による DA 放出の発現には側坐核に分布する GABA 神経活動の抑制が関わることを申請者らのグループは指摘している (Saigusa et al., Pharmacol. Rep., 2022)。即ち、一般に神経活動を抑制するはずの  $\delta$ 、 $\mu$  受容体の刺激により側坐核の DA 放出が促進するメカニズムとして、これらの opioid 受容体サブタイプの活性化に伴う DA 神経を抑制する GABA 神経の脱抑制が考えられる。

$\delta$  受容体は薬理的性質の異なる  $\delta_1$ 、 $\delta_2$  の 2 種類のサブタイプが知られており、これらは側坐核で DA 神経終末に入力する GABA 神経上に分布すると想定されるが、我々の無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法による基礎研究の結果に基づくと、 $\delta_1$  受容体の活性化では GABA の  $GABA_B$  受容体への刺激の低下、 $\delta_2$  受容体の活性化では GABA の  $GABA_A$  および  $GABA_B$  受容体への刺激の低下をそれぞれ介して DA 放出が促進したことが考えられる (Aono et al., Eur J Pharmacol. 2017; Saigusa et al., Pharmacol. Rep., 2022; Watanabe et al., Eur J Pharmacol. 2018)。また、 $\mu$  受容体にも  $\mu_1$ 、 $\mu_2$  の 2 種類のサブタイプがありいずれも側坐核に分布していると考えられるが、 $\mu_2$  ではなく  $\mu_1$  受容体刺激により同部位の DA 放出が促進することを我々のグループは報告してきた (Okutsu et al., Neuropsychopharmacology, 2006; Kiuchi et al., Eur J Pharmacol. 2016)。つまり、側坐核で DA 神経終末に入力する GABA 神経上には  $\mu_1$  受容体が発現していることが推察される。我々の基礎研究の結果からは、 $\mu_1$  受容体の活性化で GABA の  $GABA_A$  および  $GABA_B$  受容体への刺激の強い低下を介して DA 放出が促進したことが示唆されている (Aono et al., Eur J Pharmacol. 2008; Saigusa et al., Eur J Pharmacol. 2008; Saigusa et al., Pharmacol. Rep., 2022)。これらのことから側坐核の  $\delta$  または  $\mu$  受容体サブタイプを介した DA 神経活動の亢進は、この領域の GABA 神経の基礎的な活動の抑制の影響を受けたものであることが考えられる。このため本研究で申請者らは、側坐核の GABA 神経の基礎的な活動の制御機構について、同部位の細胞外 GABA 量を指標として GABA トランスポーター (GAT) の関与の面から検討することにした。

### 2. 研究の目的

細胞外に放出された GABA の細胞内への取り込みには、細胞膜上に発現している GAT が関与する。脳内の GAT には、神経細胞に主に見られる GAT1 と、グリア細胞に主に見られる GAT3 が知られており、側坐核にはこれらの GAT1 と GAT3 がいずれも分布している。しかしながら、これらの GAT が側坐核の基礎的な細胞外 GABA 量の制御で果たす役割は明らかでなかった。そこで本研究では、無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法により検出した側坐核の GABA 量に選択的 GAT1 または GAT3 阻害薬が及ぼす効果を指標とし、GAT1 と GAT3 の側坐核の細胞外 GABA 量の調節への関与について検討した。GABA の前駆物質で側坐核の細胞外液に含まれるグルタミン酸 (Glu) 量へ各薬物処置が及ぼす影響も比較のため観察した。

### 3. 研究の方法

実験には S-D 系雄性ラット (体重約 200 g) を用いた。全身麻酔下で微小透析プローブ装着用のガイドカニューレの植立手術を行ったのち約 1 週間の回復期をおき、無麻酔非拘束の条件下で *in vivo* 脳微小透析実験を行った。

先端にセルロース製微小透析膜 (直径 220  $\mu\text{m}$ 、長さ 2 mm) を備えた微小透析プローブをガイドカニューレにキャップナットを用いて固定し、テフロンチューブを接続しインフュージョンポンプで改良リンゲル液を 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流し、側坐核から細胞外液を試料として 20 分毎にオートサンプラーに回収した。オートインジェクターを用いて試料を HPLC システム (日本分光社製) に注入して GABA と Glu 量を分離し、それぞれ蛍光検出器で定量した。使用薬物はいずれも灌流液に用いた改良リンゲル液へ溶解し、微小透析プローブから逆透析で側坐核に 60 分間にわたり灌流投与した。GAT 阻害薬の投与量は灌流液中の総量 (mol) で示した。

### 4. 研究成果

HPLC システムと蛍光検出器を組合せた測定装置を用い、食品等に含まれる GABA をはじめとするアミノ酸の定量分析が広く行われている。本研究では、無麻酔非拘束ラットの脳内 (側坐核) から 20 分毎に微小透析膜を介して採取した微量 (20  $\mu\text{l}$ ) の細胞外液に含まれる GABA と Glu の高感度測定のための測定条件設定に初めに取組んだ。これらの神経アミノ酸の測定のために確立した測定条件は、本研究以外に慢性痛モデルラットの三叉神経節内の細胞外液に含まれる Glu の定量実験にも応用することができた (Kurusu et al., Oral Dis., 2022)。

本研究の試料中の GABA 量は、選択的 GAT1 阻害薬の NNC711 (600, 6000 pmol) により最大約 220% まで用量依存的に増大したが、選択的 GAT3 阻害薬の (S)-SNAP-5114 (12, 120 nmol) では目立った変化がなかった。一方、NNC711、(S)-SNAP-5114 は試料中の Glu 量に著しい影響は及ぼさなかった。以上の結果から側坐核の細胞外 GABA 量は、GAT3 ではなく GAT1 の阻害で増大することが示された。また、側坐核で細胞外に放出された GABA の細胞内への取り込みには

GAT1 が関与するが、GAT3 は目立った役割を果たさない可能性が示唆された。さらに GAT1 または GAT3 の阻害は、側坐核の細胞外 Glu 量には殆ど影響がないことが考えられた。

「研究開始当初の背景」に述べた通り、側坐核の  $\delta$  または  $\mu$  受容体サブタイプを介した DA 神経活動の促進には、基礎的な GABA 神経活動の抑制が関わるものと申請者らは考えている (Saigusa et al., Pharmacol. Rep., 2022)。申請者らのグループでは本研究を基盤のひとつとして、慢性痛モデルラットの三叉神経の Glu 神経活動の特徴 (Kurusu et al., Oral Dis., 2022) のほか、側坐核の DA 神経活動の調節において orexin 受容体サブタイプが果たす役割についても海外の専門学術誌へ報告できた (Kawashima et al., Eur J Neurosci., 2022)。Opioid 受容体サブタイプの選択的刺激が側坐核の細胞外 GABA 量に及ぼす効果の解明につなげるため、同部位の GABA の放出と GAT を介した再取り込みへ GABA 神経活動の変化が及ぼす影響について検討を続けている。

#### < 引用文献 >

Aono Y, Kiguchi Y, Watanabe Y, Waddington JL, Saigusa T. Stimulation of accumbal GABA<sub>A</sub> receptors inhibits delta2-, but not delta1-, opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.*, 815, 2017, 18–25.

Aono Y, Watanabe Y, Ishikawa M, Kuboyama N, Waddington JL, Saigusa T. In vivo neurochemical evidence that stimulation of accumbal GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors each reduce acetylcholine efflux without affecting dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Synapse*, 73, 2019, e22081.

③ Kawashima H, Aono Y, Watanabe Y, Waddington JL, Saigusa T. In vivo microdialysis reveals that blockade of accumbal orexin OX<sub>2</sub> but not OX<sub>1</sub> receptors enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Neurosci.*, 55, 2022, 733–745.

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. *Eur J Pharmacol.*, 789, 2016, 402–410.

Kurusu R, Saigusa T, Aono Y, Hayashi Y, Hitomi S, Shimada M, Iwata K, Shinoda M. Pannexin 1 role in the trigeminal ganglion in infraorbital nerve injury-induced mechanical allodynia. *Oral Dis.*, 2022, doi: 10.1111/odi.14129.

Okutsu H, Watanabe S, Takahashi I, Aono Y, Saigusa T, Koshikawa N, Cools AR. Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2006, 375–383.

Saigusa T, Aono Y, Waddington JL. Integrative opioid-GABAergic neuronal mechanisms regulating dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving animals. *Pharmacol Rep.*, 73, 2021, 971–983.

Watanabe Y, Aono Y, Komiya M, Waddington JL, Saigusa T. Stimulation of accumbal GABA<sub>B</sub> receptors inhibits delta1- and delta2-opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.*, 837, 2018, 88–95.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Kawashima, Yuri Aono, Yuriko Watanabe, John L. Waddington and Tadashi Saigusa	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 由梨子, 青野 悠里, 川島 央暉, 三枝 禎
2. 発表標題 Imidazoline系 1受容体作動薬のcirazolineが誘発したラットの側坐核のdopamine放出促進作用の特徴
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊由梨子, 小宮正道
2. 発表標題 受容体を介したラットの側坐核のドパミン放出におけるGABAB受容体の役割
3. 学会等名 第64回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野悠里、川島央暉、渡邊由梨子、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
研究協力者	三枝 禎 (SAIGUSA Tadashi) (50277456)	日本大学・松戸歯学部・教授  (32665)	
研究協力者	青野 悠里 (AONO Yuri) (50508497)	日本大学・松戸歯学部・助教  (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			
アイルランド	アイルランド王立医科大学			