

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792034

研究課題名（和文）GABA性薬物が側坐核カテコラミン神経活動に及ぼす効果

研究課題名（英文）Effects of GABAergic compounds on the accumbal catecholaminergic activity

研究代表者

内田 琢也 (UCHIDA TAKUYA)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：10409104

研究成果の概要（和文）：本研究は、GABA神経活動の低下による側坐核のドーパミン（DA）遊離の発現機構をGABA受容体サブタイプの関与の面から解明するため行った。また、側坐核を含む線条体領域のGABA神経とDA神経の相互作用の研究に広く用いられるベンザゼピン系D₁受容体アゴニストのSKF38393の線条体への局所微量投与による同部位のDA遊離機構について、Ca²⁺と細胞内DAプールの役割の面から検討した。

研究成果の概要（英文）：The ventral part of striatum called nucleus accumbens is one of the terminal areas of the mesolimbic dopaminergic neurons. It has been shown that the GABA receptor subtype agonists failed to decrease, but its antagonists increased the accumbal dopamine (DA) efflux. Since the GABA synthesis inhibitor enhanced the accumbal DA efflux, but the involvement of GABA receptor subtypes are unknown. Therefore, we investigated the roles of GABA receptor subtypes in the increase of accumbal DA efflux in freely moving rats by using the *in vivo* brain microdialysis technique. SKF38393, a benzazepine derivative D₁ receptor agonist is widely used in order to examine the GABA-DA interaction in the striatal structures. SKF38393 is known to increase the striatal DA efflux when applied locally into the dorsal striatum. We analysed the roles of the Ca²⁺ and the intracellular DA pools in the SKF38393-induced striatal DA efflux.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：GABA, カテコラミン, 大脳基底核, 抗不安薬, 口腔ジスキネジア

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ーパミン（DA）神経の主たる投射部位である。このDA神経の機能亢進は、代表的な麻薬性鎮痛薬のモルヒネの反復投与による有害現象の精神・身体依存の形成へ関与すると想定されている（Narita et al., Pharmacol. Ther., 2001）。側坐核にはDA神経

機能制御への密接な関与が報告されているGABA受容体、アドレナリン受容体、オピオイド受容体がそれぞれ分布している。これまで申請者らのグループは側坐核のDA神経が、口腔外科や歯科麻酔で用いるベンゾジアゼピン系薬物（Murai et al., Eur J. Pharmacol., 1994）、プロポホル（Yoshida et al., Neurosci. Res. Comm., 1999）、フェンタニル（Yoshida et

al., Neuroscience, 1999)の中核作用部位のひとつであることを指摘してきた。

GABA_A, GABA_B 受容体のアンタゴニストは側坐核の DA 遊離をそれぞれ増加する。このことは側坐核において GABA 神経が DA 神経を抑制的に制御することを示している。このアンタゴニストの効果と一見矛盾するが、GABA 受容体アゴニストは側坐核の DA 遊離へ影響を与えないか、むしろこれを増加する。このことと前述のアンタゴニストの効果は、側坐核の内因性 GABA (生理的に合成され GABA 受容体を介して作用を發揮する GABA) の示すトーン (緊張度) が高い可能性を示唆している。つまり、側坐核の内因性 GABA のトーンは高いため、アンタゴニストは脱抑制により DA 神経機能を促進するが、アゴニストは無効か、むしろ前シナプス自己受容体を刺激し GABA 放出抑制により DA 神経機能を促進する可能性を申請者らは指摘してきた (Aono et al., Eur J. Pharmacol., 2008; Saigusa et al., Eur J. Pharmacol., 2008)。一方、側坐核の μ 受容体刺激は同部位の DA 遊離を増加する (Yoshida et al., Neuroscience, 1999; Okutsu et al., Neuropsychopharmacol., 2006)。申請者らは、側坐核の GABA 介在神経に局在する μ 受容体が刺激されてこのニューロンから DA 神経への GABA 入力低下する結果、DA 神経への抑制性制御が解除される可能性を報告している (Aono et al., Eur J. Pharmacol., 2008; Saigusa et al., Eur J. Pharmacol., 2008)。しかしながら、側坐核において①実際に内因性 GABA の合成低下が DA 神経機能を亢進するか否か、また、②この内因性 GABA の合成低下が誘発する DA 神経機能亢進における GABA 受容体サブタイプの役割の詳細はいずれも明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究は、*in vivo* の条件下において側坐核の GABA 神経活動が低下した場合の DA 遊離の発現機構について、関与する GABA 受容体サブタイプの面から明らかにすることを目的として行った。また、側坐核を含む線条体領域における GABA 神経と DA 神経の相互作用を研究する際に広く用いられているベンザゼピン系 D₁ 受容体アゴニストの SKF38393 の線条体への局所微量投与が誘発する同部位の細胞外 DA 量の増加機構について、Ca²⁺ と細胞内 DA プールの関与の面からそれぞれ解明することを本研究は目指した。

即ち、本研究はラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法により、①GABA 合成酵素阻害薬の allylglycine (AG) を側坐核へ灌流投与し、同部位の GABA の合成を阻害した場合の細胞外 DA 量の変化について、GABA_A 受容体および GABA_B 受容体の役割の面からこれら受容

体の選択的アゴニストとアンタゴニストを用いて検討した。さらに、②SKF38393 による細胞外 DA 量の増加が、灌流液からの Ca²⁺ の除去、または、D₁ 受容体アンタゴニストの SCH23390 の併用投与によって抑制されるか否かを検討した。また、③灌流液の Ca²⁺ の減少は血管を拡張させ、細胞外 DA の血流への移行を高めることが推測されるので、 α アドレナリン受容体と V_{1a} 受容体のアゴニスト (oxymetazoline, felypressin) を用いて血管を収縮させた場合に、Ca²⁺ 非存在下で認められた SKF38393 誘発細胞外 DA が増加するか否かについても検討を加えた。次に、④この SKF38393 の線条体背側部へ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、シナプス小胞内 DA 枯渇薬の reserpine と細胞質での新たな DA 合成を抑制する DA 合成律速酵素阻害薬の α -methyl-*p*-tyrosine (α -MPT) を用いて検討した。

3. 研究の方法

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。

(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または線条体背側部に植立した。

(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 30×30×35 (cm) のアクリル製観察ケージ内に収容し、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 または 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 を定量した。

(3) 薬物処置

脳内局所投与：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 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 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連の実験では、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た。薬物は生理食塩液に溶解し、この微小ニードルを介して線条体へ局所投与して、DA 量の変化を3時間にわたり観察した。注入薬液量は、0.5 μ l とし、マイクロシリンジで30秒かけて投与した。

全身投与：Reserpine と α -MPT は、いずれも生理食塩液に溶解し、腹腔内投与により全身投与した。

(4) 組織学的検討

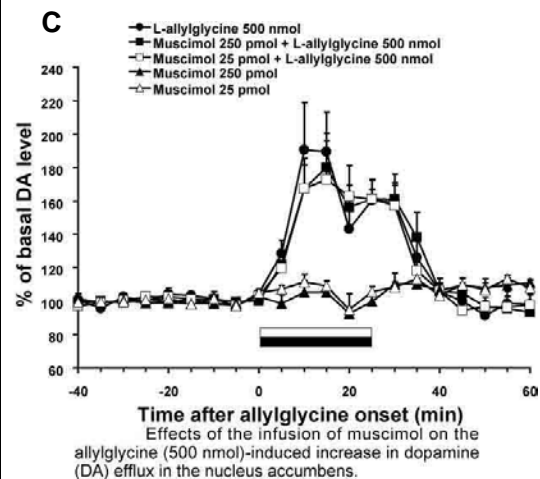
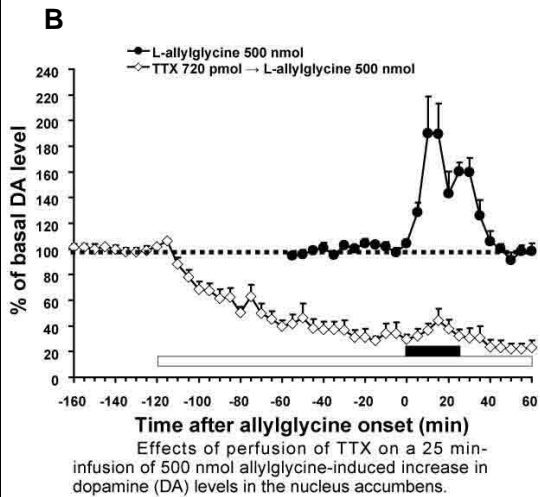
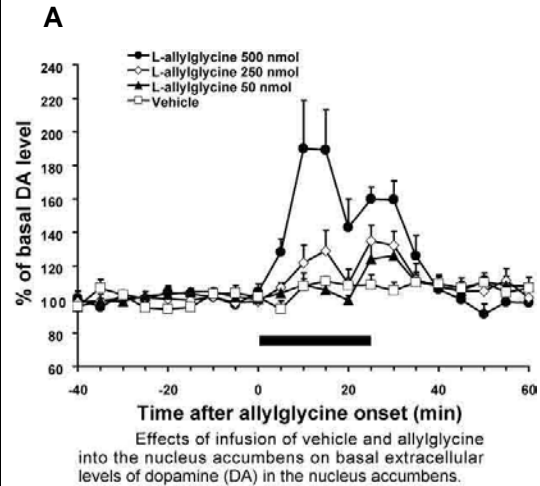
脳微小透析プローブの植立位置は、脳微小透析実験終了後に作成した厚さ 50 μ m の脳の連続切片で確認した。

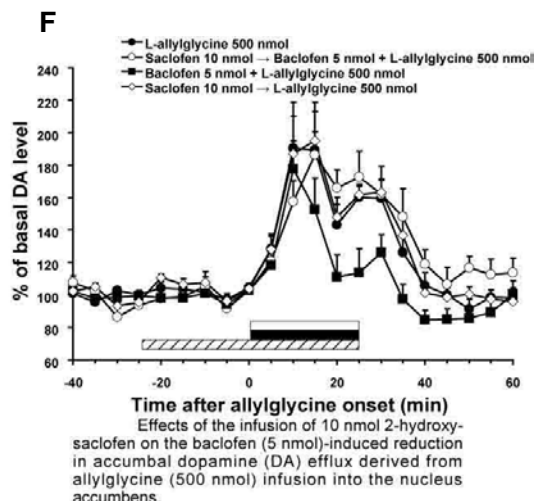
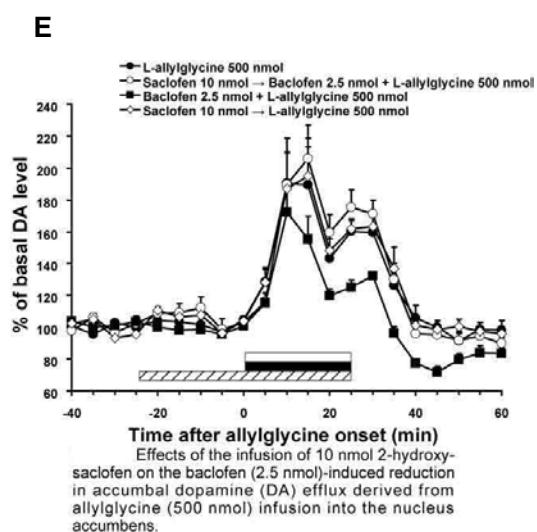
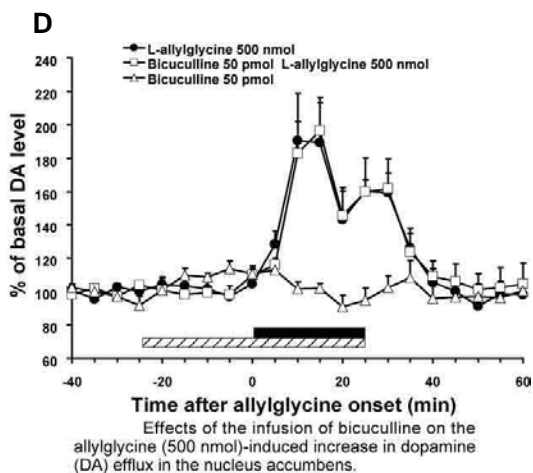
4. 研究成果

(1) ラットの allylglycine 誘発側坐核ドパミン遊離亢進における GABA_B 受容体の関与

我々はすでに、morphine の作用メカニズムに関する一連の研究において、側坐核の μ 受容体の活性化は、同部位の GABA 神経機能低下を介して DA 遊離を促進する可能性を報告した (Aono et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2008; Saigusa et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 2008)。しかし、GABA 神経活動が低下した場合の側坐核 DA 遊離の様式と、それに対する GABA 受容体サブタイプに関する関与については明らかでない。そこで本研究では、GABA 合成酵素阻害薬の allylglycine (AG) を側坐核へ灌流投与し、同部位の GABA の合成を阻害した場合の細胞外 DA 量の変化について、GABA_A 受容体および GABA_B 受容体の役割の面から検討した。

その結果、AG (50, 250, 500 nmol) の側坐核への灌流投与は、同部位の基礎 DA 量を用量依存的に約 200%にまで増加した(図 A)。この AG (500 nmol) の効果は、電位依存性 Na⁺チャネル阻害薬の TTX (720 pmol) の併用でほぼ完全に消失した(図 B)。基礎 DA 量に影響を与えない量の GABA_A 受容体のアゴニスト [muscimol (25, 250 pmol)] とアンタゴニスト [bicuculline (50 pmol)] は、いずれも AG (500 nmol) 誘発 DA 遊離に対してほとんど影響を与えなかった(図 C, D)。一方、AG (500 nmol) の効果は、基礎 DA 量に著変を与えない量の GABA_B 受容体アゴニスト [baclofen (BAC: 2.5, 5 nmol)] によって抑制され、この BAC の抑制効果は、基礎 DA 量と AG 誘発 DA 遊離に影響を与えない量の GABA_B 受容体アンタゴニスト [2-hydroxysaclofen (10 nmol)] によって消失した(図 E, F)。





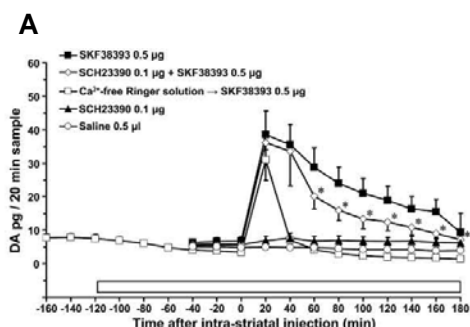
以上の結果から、AGは神経活動依存性に側坐核のDA遊離を亢進し、その効果は、同部位のGABA_A受容体ではなくGABA_B受容体を介したものであることが示唆された。

(2) 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 量の増加における Ca²⁺ の関与

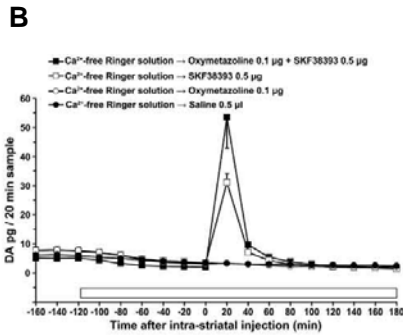
D₁ 受容体アゴニストの SKF38393 (0.5-1.5 μg) は、ラットの線条体背側部へ局所投与すると、同部位の細胞外 DA 量を amphetamine に類似した作用機構で Ca²⁺ 非依存性に増加させる (Tomiya et al., J. Neurochem., 1995)。しかし、amphetamine 類は Ca²⁺ 依存性の機構でも細胞外 DA 量を増加させるので (Gray et al., J. Neurochem., 1999), SKF38393 の効果も、その一部は Ca²⁺ 依存性である可能性が考えられる。そこで本研究では *in vivo* 脳微小透析法を用いて、まず、SKF38393 による細胞外 DA 量の増加が、灌流液からの Ca²⁺ の除去、または、D₁ 受容体アンタゴニストの SCH23390 によって抑制されるか否かを検討した。次に、Ca²⁺ の減少は血管を拡張させ、細胞外 DA の血流への移行を高めることが推測されるので、α アドレナリン受容体と V_{1a} 受容体のアゴニスト (oxymetazoline, felypressin) を用いて血管を収縮させた場合に、Ca²⁺ 非存在下で認められた SKF38393 誘発細胞外 DA が増加するか否かについても検討した。

その結果、

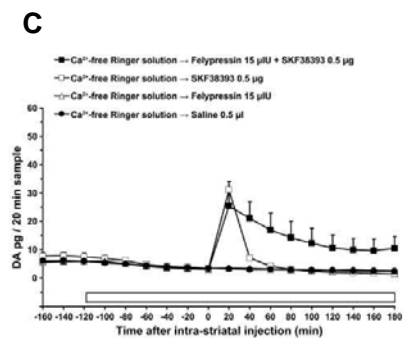
- ① SKF38393 (0.5 μg) の線条体背側部への投与により、同部位の細胞外 DA 量は投与後 20 分で最大となり、180 分に亘って増加を示した。投与後 40~180 分の DA 量の増加は、灌流液から Ca²⁺ を除去することにより消失し、基礎 DA 量に影響を与えない量の SCH23390 (0.1 μg) の併用で軽度の減少を示した (図 A)。
- ② 灌流液から Ca²⁺ を除去し、SKF38393 を線条体背側部へ投与したところ、投与後 20 分の DA 量は oxymetazoline (0.1 μg) の併用により増加し (図 B)、投与後 40~180 分の DA 量は felypressin (15 μIU) の併用により著しく増加した (図 C)。



Effects of co-administration of SCH23390 (0.1 μg, open diamond) on the striatal dopamine (DA) efflux induced by intra-striatal injection of SKF38393 (0.5 μg, closed square). The data expressed as the mean ± S.E.M. of dopamine levels (pg/20 min sample) (ordinate) and time (min) after the intra-striatal injection of SKF38393, SCH23390, and saline (closed square, closed triangle and open circle, respectively; abscissa). The data were corrected for the SKF38393-induced contamination, where appropriate. SKF38393 0.5 μg, n = 8 (closed square); SCH23390 0.1 μg + SKF38393 0.5 μg, n = 9 (open diamond); SKF38393 0.5 μg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (open square); SCH23390 0.1 μg, n = 9 (closed triangle); saline 0.5 μl, n = 6 (open circle). The asterisks represent the statistical comparison between SKF38393 0.5 μg versus SCH23390 0.1 μg + SKF38393 0.5 μg which turned out to be statistically significant (post hoc Scheffé's test; P<0.05).



B Effects of co-administration of oxymetazoline (0.1 µg, closed square) on the striatal dopamine (DA) efflux induced by intra-striatal injection of SKF38393 (0.5 µg) which was seen after the intra-striatal perfusion of Ca²⁺-free Ringer solution (open square). The data expressed as the mean ± S.E.M. of dopamine levels (pg)/20 min sample (ordinate) and time (min) after the intra-striatal injection of SKF38393 (abscissa). The opened bar above the abscissa indicates the period of the Ca²⁺-free Ringer solution perfusion that commenced 120 min before the intra-striatal injection of SKF38393. The data were corrected for the SKF38393-induced contamination, where appropriate. Oxymetazoline 0.1 µg + SKF38393 0.5 µg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 5 (closed square); SKF38393 0.5 µg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (open square); oxymetazoline 0.1 µg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 7 (open circle); saline 0.5 µl with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (closed circle).



C Effects of co-administration of felypressin (15 µIU, closed square) on the striatal dopamine (DA) efflux induced by intra-striatal injection of SKF38393 (0.5 µg) which was seen after the intra-striatal perfusion of Ca²⁺-free Ringer solution (open square). The data expressed as the mean ± S.E.M. of dopamine levels (pg)/20 min sample (ordinate) and time (min) after the intra-striatal injection of SKF38393 (abscissa). The opened bar above the abscissa indicates the period of the Ca²⁺-free Ringer solution perfusion that commenced 120 min before the intra-striatal injection of SKF38393. The data were corrected for the SKF38393-induced contamination, where appropriate. Felypressin 15 µIU + SKF38393 0.5 µg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (closed square); SKF38393 0.5 µg with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (open square); felypressin 15 µIU with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (open triangle); saline 0.5 µl with Ca²⁺-free Ringer solution, n = 8 (closed circle).

以上の結果から、線条体背側部のSKF38393 (0.5 µg) によるCa²⁺依存性の細胞外DA増加には、一部ではあるがD₁受容体の活性化が関与することが示された。また、Ca²⁺の非存在下では、SKF38393によって増加した細胞外DAの血流への移行が高まっていることが示唆された。

(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., Neuroscience, 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 (17.6%; 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 Sekino R, Saigusa T, Aono Y, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR. Dopamine D₁-like receptors play only a minor role in the increase of striatal dopamine induced by striatally applied SKF38393. Eur J Pharmacol, 2010, 648: 80-86. 査読有

② 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

[学会発表] (計1件)

1. 関野麗子, 三枝 禎, 青野悠里, 内田琢也, 大井良之, 越川憲明, ラット線条体背側部への SKF38393 局所投与で誘発される細胞外 DA 量の増加における Ca²⁺の関与. 2010年10月23日, 第123回日本薬理学会関東部会, 自治医科大学地域医療情報研修センター, 栃木県下野市

[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

内田 琢也 (UCHIDA TAKUYA)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 10409104