

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09777

研究課題名(和文) 側坐核のアセチルコリン神経活動の制御におけるアドレナリン受容体サブタイプの役割

研究課題名(英文) Roles of adrenaline receptor subtypes 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・専修研究員

研究者番号：50508497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：中脳辺縁系ドパミン(DA)神経系が投射する側坐核に分布するアセチルコリン(ACh)介在神経に認められるGABAAおよびGABAB受容体が同部位のACh神経活動の調節で果たす役割について、無麻酔非拘束ラットを用いたin vivo脳微小透析法により解析した。側坐核のACh神経活動は、受容体系薬物の影響を受けることが実験動物を用いた行動実験で示されており、同部位のACh神経にはノルアドレナリン(NA)神経の入力が想定されている。このため本研究では、特に α_2 受容体系薬物が側坐核のACh放出に及ぼす効果を指標としてNA神経による側坐核のACh神経活動の制御機構について α_2 受容体の役割の面から検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

側坐核では、DA神経とACh神経の間で密接な機能的相互作用が起こることが知られている。本研究は、側坐核において両神経を抑制的に制御するGABAAおよびGABAB受容体がDA神経活動には影響を与えずにACh神経活動を抑制できることを報告できた点が意義深い。また本計画では、NA神経が側坐核の α_2 受容体を介してACh神経活動を抑制的に制御することを示す神経薬理学的知見を得ることができた。このことはNA神経による側坐核のACh神経活動の調節機構のほか、抗うつ薬をはじめとする脳内のNA神経を作用点とする薬物のACh神経への作用メカニズムの解明のヒントとなるものであった。

研究成果の概要(英文)：The nucleus accumbens (NAc) is a major terminal area of mesolimbic dopaminergic system. Cholinergic neurons in the NAc contain GABAA and GABAB receptors (-Rs) that are thought to inhibit neural activity. We analyzed the roles of GABAA- and GABAB-Rs in regulating accumbal acetylcholine (ACh) efflux of freely moving rats using in vivo microdialysis. The effects of GABA-R ligands on the accumbal dopamine efflux were also analyzed since accumbal cholinergic and dopaminergic neurons could mutually interact. The NAc contains cholinergic interneurons that might receive inputs from noradrenergic projections and α -R ligands modulate accumbal cholinergic activity-dependent locomotion of rats. Therefore, in order to examine the involvement of α_2 -Rs in the regulation of accumbal cholinergic neural activity, we further investigated the effects of the α_2 -R agonist UK 14304 and the α_2 -R antagonist RX 821002 on the accumbal ACh efflux.

研究分野：薬理学

キーワード：脳微小透析法 ACh 側坐核

1. 研究開始当初の背景

口腔ジスキネジアは、舌の突出を伴う顎顔面の異常な不随意運動で高齢者に多く見られる。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、中枢 dopamine (DA) 神経の過活動を誘発する抗精神病薬や抗 Parkinson 病薬の反復投与の際にも起こる。このため口腔ジスキネジア発症機構の研究の多くは、これらの薬物の主な作用点の大脳基底核へ投射する黒質-線条体系 DA 神経を対象としている。しかし、臨床において黒質-線条体系 DA 神経の障害による Parkinson 病の薬物治療で脳内の DA 神経を賦活化すると、口腔ジスキネジアが Parkinson 病症状の改善の前に起こる。このため口腔ジスキネジアの発症には大脳基底核の DA 神経の過活動以外の要因の関与についても検討する必要がある。側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核をもつ中脳-辺縁系 DA 神経の主たる投射部位である。側坐核には介在ニューロン (介在神経) として GABA 神経、acetylcholine (ACh) 神経が分布しているほか、青斑核などから noradrenaline (NA) 神経が入力している。申請者らは、側坐核の DA のほか ACh 神経活動の亢進が口腔ジスキネジアをはじめとする常同性の (=無目的に繰り返される) 行動の発現の基盤の一部となる可能性を考え、側坐核の DA および ACh 神経活動の制御機構に着目した基礎研究に取り組んできた (Aono et al, 2013, 2017; Kiguchi et al, 2016)。

申請者らはこれまで NA が刺激する adrenaline 受容体サブタイプが側坐核の DA 神経活動の調節において果たす役割を解析してきた。その結果、側坐核の DA 神経活動は α_2 ではなく α_1 受容体刺激で抑制され (Aono et al, 2015), β_1 , β_2 受容体刺激で促進した (Aono et al, 2013)。しかし、側坐核の ACh 神経の活動性の調節において adrenaline 受容体サブタイプが果たす役割は不明であった。

2. 研究の目的

はじめに側坐核の ACh 神経に分布すると考えられている GABA_A および GABA_B 受容体が同部位の ACh 神経活動の制御において果たす役割について検討し、つぎに側坐核の ACh 神経活動の NA 神経による制御機構について α_2 受容体の関与の面から明らかにすることを目指して本計画を実施した。実験には無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法を採用し、側坐核の細胞外液中へ放出された ACh 量を指標として同部位の ACh 神経活動を評価した。本実験では酵素による細胞外 ACh の分解を低下させるため、微量 (50 nM) ではあるが灌流液にコリンエステラーゼ阻害薬の physostigmine を添加した。側坐核の ACh 神経と DA 神経は密接な機能的相互作用を示す可能性があるため、physostigmine を含む灌流液の使用が GABA_A および GABA_B 受容体系薬物と α_2 受容体薬物の側坐核の細胞外 DA 量に及ぼす効果についても検討を加えた。

本研究で採用した実験条件下では、細胞外液中の ACh (Kiguchi et al., 2016) および DA (Saigusa et al., 2012) が電位依存性 Na⁺チャネル阻害薬の TTX の灌流投与により約 80% が消失することが確認されている。したがって本研究では、細胞外液中の ACh および DA のほとんどが神経活動依存性に放出されたとみなされる条件下で実験を行った。

3. 研究の方法

(1) ガイドカニューレの植立手術: 全身麻酔下で Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重約 200 g) を脳定位固定装置に装着し、マニピレーターを用いて微小透析プローブ固定用ガイドカニューレを側坐核に植立した。

(2) 脳微小透析実験: 手術後に設けた 7~10 日の回復期のうち、ラットが実験用ケージ内を自由に動き回ることができる条件下 (無麻酔非拘束条件下) で脳微小透析実験を行った。はじめにラットを徒手で保持し、頭部のガイドカニューレに脳微小透析プローブを装着固定し、テフロンチューブを接続した。つぎにラットをアクリル製観察ケージ (35×35×35 cm) へ静かに収容するとともに、脳微小透析プローブに改良リング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、15 分 (ACh 分析の場合) または 20 分 (DA 分析の場合) ごとに微小半透膜を介して細胞外液を試料として回収した。試料はオートインジェクターを用いて直ちに高速液体クロマトグラフに注入し、電気化学検出器で ACh または DA を定量した。

(3) 薬物の脳内局所灌流投与: 脳微小透析実験開始から約 4 時間後、回収したサンプル中の ACh または DA 量が一定 (変動が 10% 以内) になったことを確認し、薬物を含む灌流液を側坐核へ微小半透膜を介した逆透析で側坐核に灌流投与した。この薬物投与がサンプル中の ACh または DA 量に及ぼす影響は 2~4 時間に亘り観察した。薬物の投与量は灌流液中 (30~40 μ l) の総量 (mol) で示した。脳微小透析実験終了後、脳微小透析プローブの植立位置を確認するため厚さ 50 μ m の脳の連続切片を作成した。本研究は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認のもと動物実験指針に従って実施し、実験動物の苦痛軽減と使用数の低減に努めた。

4. 研究成果

(1) 側坐核の基礎 ACh および DA 放出に対する GABA_A および GABA_B 受容体系薬物の効果

GABA_A 受容体 agonist の muscimol (3.0 または 30.0 pmol) の灌流投与により、側坐核の ACh 量は用量依存的に減少した (図 1)。また GABA_B 受容体 agonist の baclofen (30.0 または 300.0 pmol) の灌流投与も、側坐核から得た試料中の ACh を用量依存的に減少させた (図 2)。基礎的な ACh 量にほとんど影響がない用量の GABA_A 受容体 antagonist の bicuculline (60.0 pmol) の併用投与の結果、muscimol (30.0 pmol) の誘発した ACh の減少は消失した (図 3)。基礎的な ACh 量にほとんど影響を及ぼさない用量の GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol) の併用投与により、baclofen (300.0 pmol) が誘発した ACh の減少が打ち消された (図 4)。一方で ACh を減少させた muscimol (30.0 pmol) および baclofen (300.0 pmol) 処置は、試料中の DA 量には目立った影響を及ぼさなかった (図 5)。同様に、bicuculline (60.0 pmol)、2-hydroxysaclofen (12.0 nmol) 処置でも DA 量には著しい影響は認められなかった (図 6: 詳細は Aono et al., 2019 参照)。

(2) 側坐核の基礎 ACh および DA 放出に対する α_2 受容体系薬物の効果

α_2 受容体 agonist の UK 14304 (300 pmol) の灌流投与により、側坐核の ACh 量は約 30% 減少した (図 7)。 α_2 受容体 antagonist の RX 821002 (600, 6000 pmol) の灌流投与の結果、試料中の ACh 量は用量依存的に最大約 75% 増加した (図 8)。試料中の ACh に目立った影響を及ぼさない低用量 (0.6 pmol) の RX 821002 の併用投与により UK14304 (300 pmol) が誘発した ACh の減少は打ち消された (図 9)。UK 14304 (300 pmol) または RX 821002 (6000 pmol) の灌流投与は、DA 量には顕著な影響は及ぼさなかった (図 10)。

以上の無麻酔非拘束ラットを用いた基礎研究の結果、側坐核の GABA_A または GABA_B 受容体の選択的な刺激は、同部位の DA 放出には影響を与えずに ACh 放出を抑制することが示された。側坐核において GABA_A または GABA_B 受容体の選択的な刺激が ACh とは異なり DA の放出に影響が認められなかった理由として、ACh 神経活動を制御する GABA 受容体サブタイプに比べ、DA 神経活動を制御する GABA 受容体サブタイプに対する内因性の GABA の刺激 (トーンズ) が強かったことが推察された。一方、側坐核の α_2 受容体の選択的な刺激では DA 放出には目立った影響がないが、ACh 放出は低下することが示された。また NA 神経は、側坐核において α_2 受容体を介して同部位の DA 神経活動ではなく ACh 神経活動を抑制的に制御することが示唆された。

〈引用文献〉

- ① Aono et al., Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal β 1- and β 2-adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 2013, 715, 363-369.
- ② Aono et al., Simultaneous activation of the α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behav Pharmacol.* 2015, 26, 73-80.
- ③ Aono et al., Stimulation of accumbal GABA_A receptors inhibits delta2-, but not delta1-, opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 2017, 815, 18-25.
- ④ Aono et al., *In vivo* neurochemical evidence that stimulation of accumbal GABA_A and GABA_B receptors each reduce acetylcholine efflux without affecting dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Synapse.* 2019, 73, e22081.
- ⑤ Kiguchi et al, *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.* 2016, 789, 402-410.
- ⑥ Saigusa et al., The α_1 -, but not α_2 -, adrenoceptor in the nucleus accumbens plays an inhibitory role upon the accumbal noradrenaline and dopamine efflux of freely moving rats. *Eur J Pharmacol.* 2012, 688, 35-41.

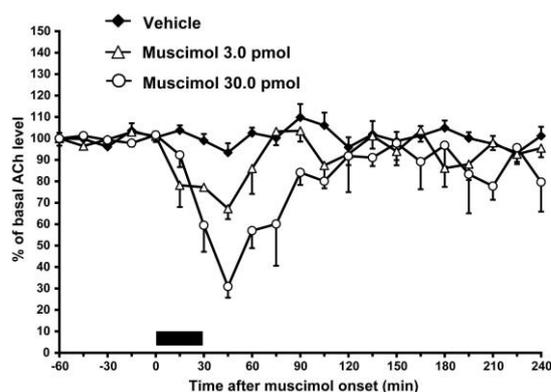


図 1

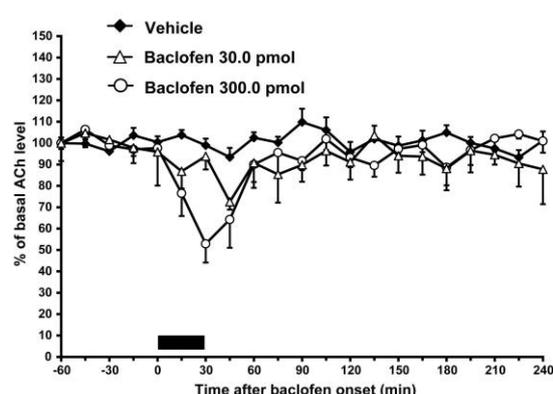
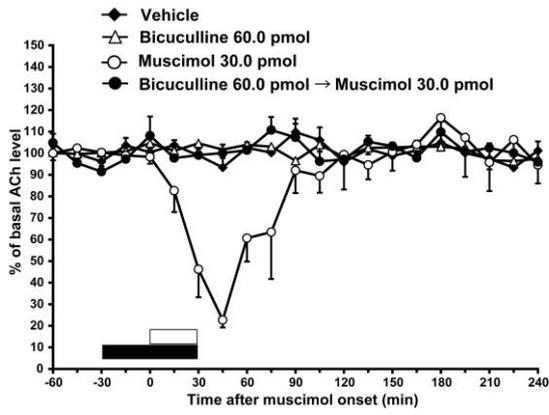
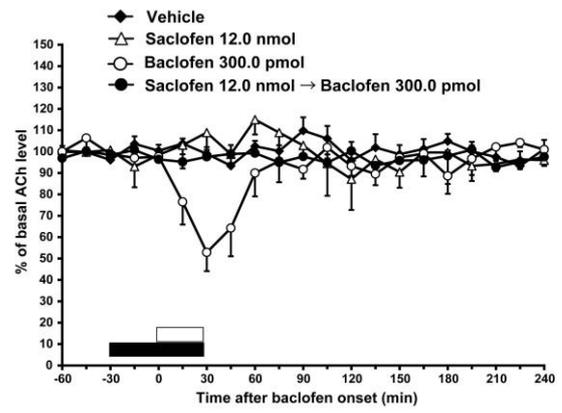


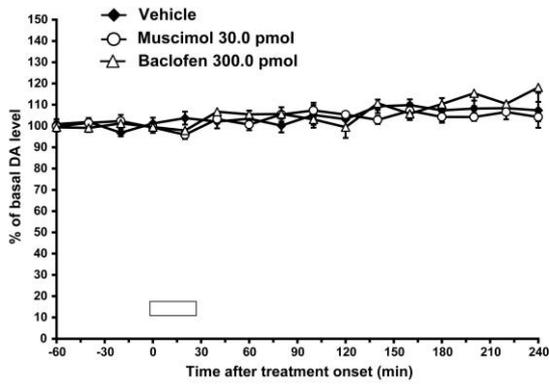
図 2



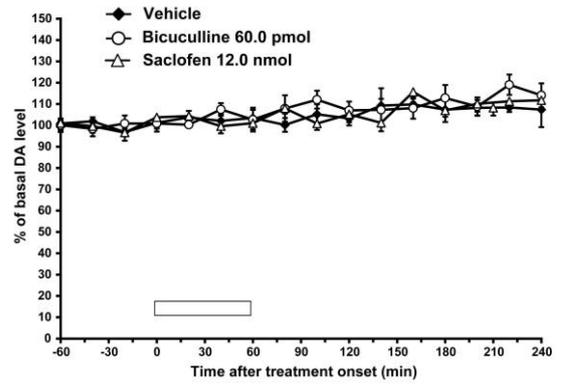
☒ 3



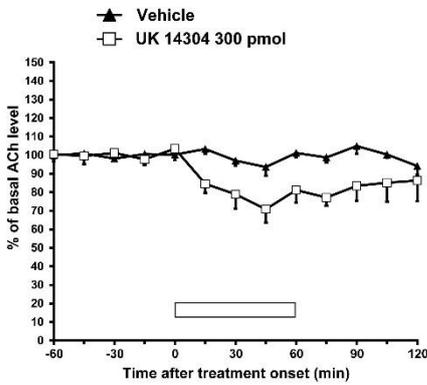
☒ 4



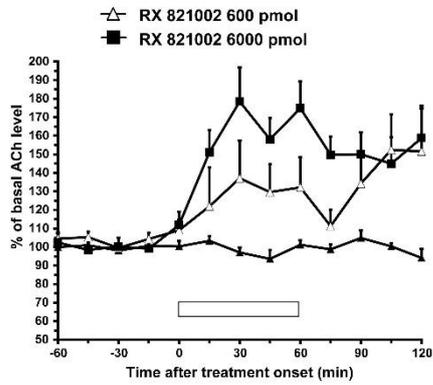
☒ 5



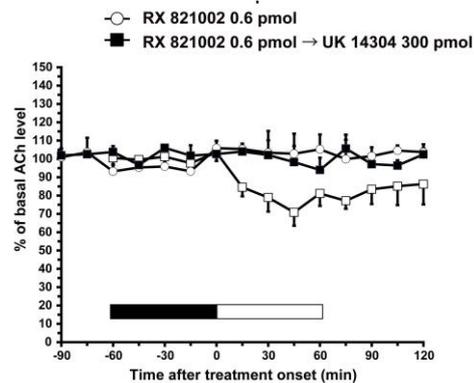
☒ 6



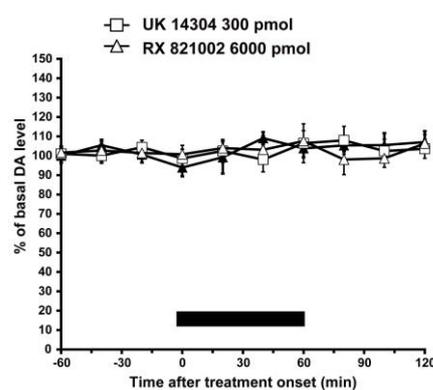
☒ 7



☒ 8



☒ 9



☒ 10

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aono Yuri, Watanabe Yuriko, Ishikawa Manabu, Kuboyama Noboru, Waddington John L., Saigusa Tadashi	4. 巻 73
2. 論文標題 In vivo neurochemical evidence that stimulation of accumbal GABAA and GABAB receptors each reduce acetylcholine efflux without affecting dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Synapse	6. 最初と最後の頁 e22081 ~ e22081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/syn.22081	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 Watanabe Yuriko, Aono Yuri, Komiya Masamichi, Waddington John L., Saigusa Tadashi	4. 巻 837
2. 論文標題 Stimulation of accumbal GABAB receptors inhibits delta1- and delta2-opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 88 ~ 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.08.003	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Aono Y, Kawashima H, Saigusa T
2. 発表標題 An α_2 receptor agonist and antagonist respectively decreases and increases acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kawashima H, Aono Y, Saigusa T
2. 発表標題 Local administration of the orexin receptor antagonist MK-4305, but not orexin-A, into the nucleus accumbens increases accumbal dopamine efflux in freely moving rats
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島央暉, 青野悠里, 三枝 禎
2. 発表標題 ラットの側坐核のdopamine放出の制御におけるorexin受容体の関与の特徴
3. 学会等名 第29回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aono Y, Watanabe Y, Ishikawa M, Kimura M, Saigusa T
2. 発表標題 Accumbal GABAA and GABAB receptors each inhibit acetylcholine efflux without affecting dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aono Y, Watanabe Y, Saigusa T
2. 発表標題 Analysis of the roles of μ receptor subtypes in the regulation of acetylcholine and dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saigusa T, Aono Y, Watanabe Y
2. 発表標題 Activation of accumbal GABAB receptors inhibits μ 1 and μ 2 receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------