

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790607

研究課題名（和文） 神経伝達物質測定によるレボドパ誘発ジスキネジアの解明

研究課題名（英文） GABAergic neurotransmission in the basal ganglia of a rat model of levodopa-induced dyskinesia

研究代表者

新井 陽 (ARAI AKIRA)

弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80422062

研究成果の概要（和文）：L-dopa誘発ジスキネジア（LID）の発症機序の解明と対策の確立のため、パーキンソン病モデルラット（PDラット）とLIDモデルラット（LIDラット）の淡蒼球内節で*in vivo*マイクロダイアリシス法によりGABAを測定した。LIDラットではPDラットに比較して淡蒼球内節でのGABA放出が増加していることを確認した。またPDモデルの淡蒼球内節にGABA_A受容体アゴニスト（muscimol）を注入することによってジスキネジアを誘発されることを確認した。さらにL-dopaを投与したLIDモデルラットの淡蒼球内節にGABA_A受容体アンタゴニスト（bicuculline）を直接注入することによってジスキネジアが抑制されることを確認した。以上の結果より淡蒼球内節へのGABA放出異常がLID発現の原因であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that abnormal GABA transmission in the MGP is involved in the occurrence of L-DOPA induced dyskinesia (LID). The results of this study, using *in vivo* microdialysis, confirmed this hypothesis. L-DOPA challenge increased GABA release in the MGP on the lesioned side in both LID-model and PD-model rats but significantly more so in LID-model rats. To confirm that stimulation of GABA receptors in the MGP induces dyskinesia-like abnormal involuntary movements (AIMs) and inhibition of GABA transmission in the MGP improves L-DOPA-induced AIMs, we performed microinjection of GABA_A receptor agonist (muscimol) and antagonist (bicuculline) into the MGP on the lesioned side of 6-OHDA-lesioned PD-model rats. We could show that injection of muscimol induced AIMs same as those induced by L-DOPA. In addition, microinjection of bicuculline significantly alleviated L-DOPA-induced AIMs and L-DOPA-induced AIMs revived after discontinuation of bicuculline microinjection. Thus, we could evidence that activation of GABA_A receptors in the MGP of PD-model rats induced dyskinesia-like AIMs and inhibition of GABA signaling in the MGP of PD-model rats improved L-DOPA-induced AIMs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：パーキンソン病、L-DOPA 誘発ジスキネジア、淡蒼球内節、GABA、GABA_A 受容体

1. 研究開始当初の背景

L-dopa はパーキンソン病に対し最も有効な治療法である。しかし、パーキンソン病患者に L-dopa を反復投与することによって L-dopa 誘発ジスキネジア (LID) が生じることが知られている。LID は一旦発症するとコントロールに難渋し (N Engl J Med 2000;342:1484)、仕事を断念せざるを得ない患者、あるいは L-DOPA 減量を余儀なくされ ADL が著明に悪化する患者も少なくない。特に LID は若年発症 PD に多く発症するため社会的損失は甚大であり、早急な発症機序の解明と対策の確立が求められている。

LID の直接的な原因は淡蒼球内節神経細胞の発火異常であることが知られているが (Brain 124, 546-557:2001)、この発火異常が生じる機序は不明である。淡蒼球内節は線条体より 2 つの入力を受けている。第 1 は線条体から抑制性の GABA 入力、第 2 に視床下核から興奮性のグルタミン酸 (Glu) 入力であり (Trends Neurosci 1990;13:671) いずれかの入力の異常が淡蒼球内節の発火異常を引き起こしていると考えられる。申請者らの研究グループは、パーキンソン病モデルラットに L-dopa を反復投与することによりジスキネジアが生じる LID モデルを作成し、その淡蒼球内節が肥大することを発見した (Neuropathology. 2004;24:290)。さらに GABA 作動性である線条体-淡蒼球内節路の神経終末が GABA を大量に含み拡張することが淡蒼球内節の肥大の原因であることを示した。この結果は、この神経終末から淡蒼球内節への GABA 放出の異常が、淡蒼球内節神経細胞の発火異常に、そして LID を引き起こしていることを示唆している。したがって LID モデルで L-dopa により淡蒼球内節での GABA 遊離が異常に増加することを証明できれば、LID の発現機序が明らかとなる。

淡蒼球内節は非常に小さな核であり、またラットでは錐体路の通る内包に埋伏して存在しているため、手技的困難さからいままで生体の淡蒼球内節での神経伝達物質の測定が行われてこなかった。申請者らはパーキンソン病モデルラットの線条体でドパミン濃度を in vivo マイクロダイアリス法によって測定する薬理学的研究を行ってきた (Tohoku J Exp Med 2003;199:149, Brain Res 2003;972:229, Neurosci Lett 2006;402:62)。近年申請者は淡蒼球内節挿入用の特殊プローブとプローブ刺入法を工夫することによ

り、ラットの淡蒼球内節で in vivo マイクロダイアリス法により GABA を測定する実験系を世界に先駆けて確立することが出来た。さらに同様の技術を応用し片麻痺などの合併症を生ずることなく淡蒼球内節に薬物を直接注入する実験系も確立している。これらの手技を用いて、淡蒼球内節への GABA 放出異常が LID 発現の原因であることを立証することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) 淡蒼球内節への GABA 遊離が LID 発現を規定していることを明らかにする

パーキンソン病モデルラット

(6-hydroxydopamine (6-OHDA) により黒質神経細胞を破壊したラット：以後 PD ラットと略す) と L-dopa 誘発ジスキネジアモデルラット (PD ラットに L-dopa を反復投与したラット：以後 LID ラットと略す) (Eur J Neurosci. 1998 ;10:2694) の淡蒼球内節において、GABA 放出を L-dopa 投与前後と比較し、淡蒼球内節への GABA 放出の異常増加が LID モデルで起こっていることを明らかにする。

(2) 淡蒼球内節の GABA_A 受容体への刺激がジスキネジア発現を規定していることを確認する

L-dopa 投与で淡蒼球内節での GABA 遊離は増加すると推定されるが、その増加した GABA がジスキネジアを起こしていることを証明するためには、GABA 受容体アゴニストとアンタゴニストの淡蒼球内節への注入が、それぞれジスキネジアを誘発あるいは抑制することを確認する必要がある。GABA 受容体には GABA_A 受容体と GABA_B 受容体があるが基底核ではほとんどの GABA 伝達は GABA_A 受容体を介して行われている。したがって、GABA_A 受容体アゴニストである muscimol の淡蒼球内節への注入がジスキネジアを発現させることが出来るか、また GABA_A 受容体のアンタゴニスト bicuculline の淡蒼球内節への注入が発現しているジスキネジアを抑制することが出来るかを PD モデルラットと LID モデルラットを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

要旨：パーキンソン病 (PD) モデルと L-dopa 誘発ジスキネジア (LID) モデルラットを作成し、In vivo マイクロダイアリス法で L-dopa 投与後の淡蒼球内節における

GABA放出がLIDモデルで増加することを明らかにする。 淡蒼球内節へのGABA_A受容体アゴニスト (muscimol) の注入でジスキネジアが誘発され、 GABA_A受容体アンタゴニスト (bicuculline) の注入でジスキネジアが抑制されることを明らかにする。

研究計画・方法 (平成20年度)

PDモデルラット作成:

PDモデルラットは、Wistar系雄ラットにドパミン神経毒である6-OHDAを用いて作成する。PDモデルラット作成の実際は定位脳手術装置に固定したWistar系雄ラットの片側内側前脳束に6-OHDAを8 µg注入する。2週間後にドパミン受容体刺激薬であるアポモルフィン0.05 mg/kgを皮下注射し、病変側と反対方向に向かって5分間に20回以上の回転運動を生じたラットをPDモデル動物として以下の実験に用いる。わたしたちは、このラットは線条体内ドパミンの99%以上が消失していることを確認している (Neuroreport 1999;10:631)。

LIDモデルラット作成:

PDモデルラットにL-dopa (50 mg/kg) とベンセラジド (12.5 mg/kg) を1日2回朝夕に連続14日間腹腔内投与を行う。わたしたちはこのラットがジスキネジアと淡蒼球内節の肥大を生じることを確認している (Neuropathology. 2004;24:290、Neurosci Res. 2005;52:185)。

In vivoマイクロダイアリス法:

無麻酔無拘束のPDモデルとLIDモデルラットの淡蒼球内節にエイコム社特製半透膜プローブを留置し人工髄液を灌流する。灌流した人工髄液を一定時間ごとに回収してL-dopaを投与前後のGABAとGlu濃度を高速液体クロマトグラフィー (エイコム社) にて経時的に測定する。L-dopaにより誘発されるGABAとGluの放出量をPDモデルラットとLIDモデルラットで比較する。

研究計画・方法 (平成21年度)

平成20年度に継続しPDモデルラット、LIDモデルラットを作成し、In vivoマイクロダイアリス法にて淡蒼球内節のGABA濃度とGlu濃度の測定を行う。

淡蒼球内節へのGABA_A受容体アゴニスト局注:

PDモデルとLIDモデルラットの淡蒼球内節にstereotaxicに特製注入プローブ (エイコム) を刺入し、GABA_A受容体アゴニスト (muscimol 0.16 µmol) あるいは生食を直接微量注入し誘発される回転運動数とジスキネジア (Eur J Neurosci. 1998 ;10:2694) を記録する。

以上の実験よりパーキンソン病モデルラットで、淡蒼球内節へのGABA_A受容体アゴニストの注入でジスキネジアを誘発されることを確認する。

淡蒼球内節へのGABA_A受容体アンタゴニスト局注:

PDモデルとLIDモデルラットに淡蒼球内節にstereotaxicに特製注入プローブ (エイコム) を刺入する。L-dopa 50mg/kgを投与した後、GABA_A受容体アンタゴニスト (bicuculline 0.2 µmol) あるいは生食を淡蒼球内節に直接微量注入する。注入の前後でL-dopa投与後に生じる回転運動およびジスキネジアを記録する。

以上の実験よりPDモデルラットとLIDモデルラットにGABA_A受容体アンタゴニストの淡蒼球内節への直接微量注入がジスキネジアを抑制することを示す。

上記実験には個別にモデルラットを準備し使用する予定である (1匹のラットに1回の注入のみを行う)。

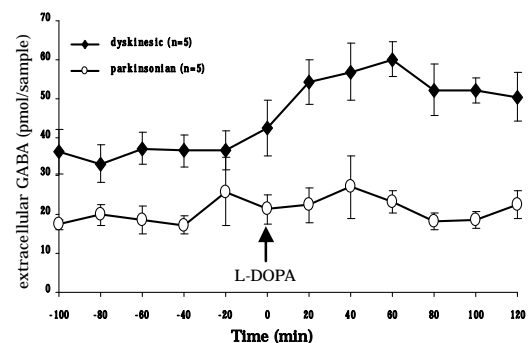
4. 研究成果

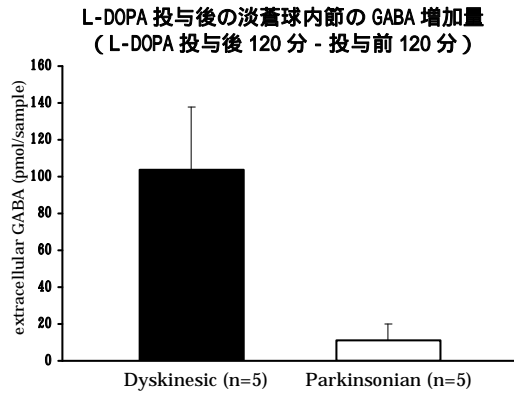
(1) PDラットとLIDラットの淡蒼球内節において、GABA放出をL-dopa投与前後で比較し、淡蒼球内節へのGABA放出の異常増加がLIDモデルで起こっていることを明らかにした。

LIDモデルではPDモデルに比較して

1. 定常時の淡蒼球内節細胞外GABA濃度が高い。
2. L-DOPA投与後の細胞外GABA濃度が高い。
3. L-DOPA投与後のGABA遊離の増加量が大きい。

淡蒼球内節の細胞外GABA濃度の経時変化
(parkinsonian vs dyskinetic)



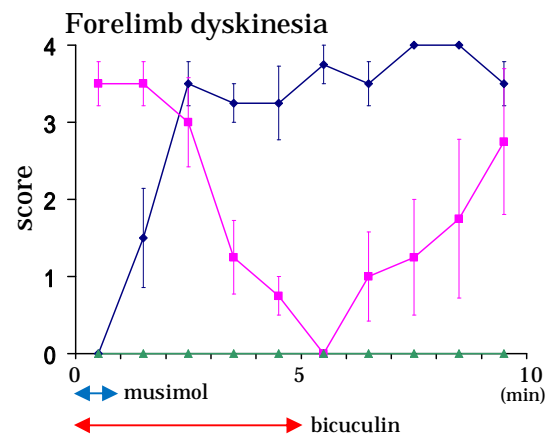
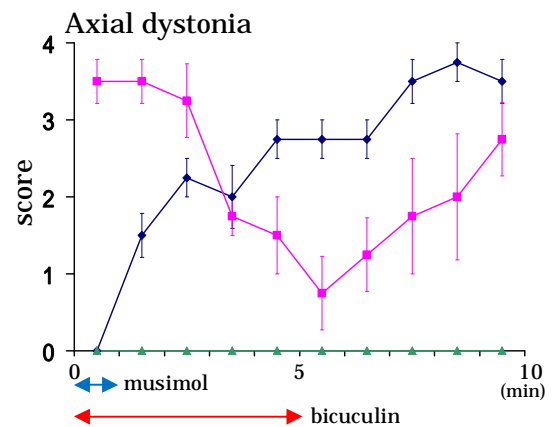
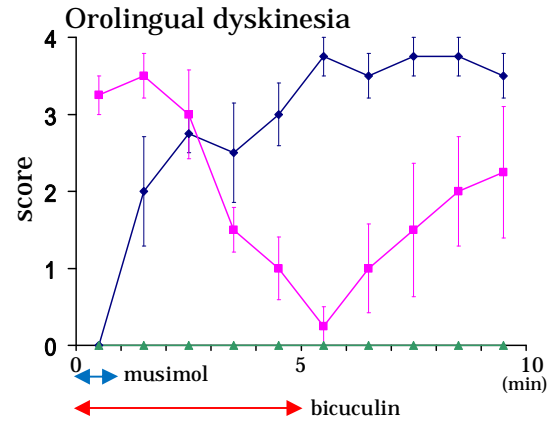
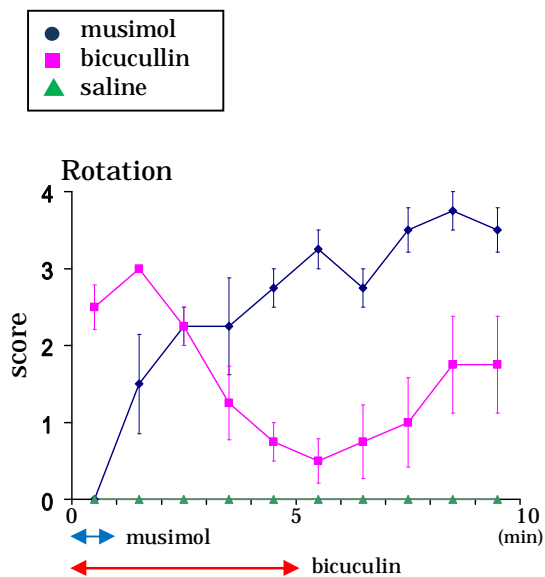


(2) PDモデルとLIDモデルラットの淡蒼球内節にstereotaxicに特製注入プローブを刺入し、GABA_A受容体アゴニスト (muscimol 0.16 μmol) あるいは生食を直接微量注入し誘発される回転運動数とジスキネジアスコアを記録した。

PDモデルとLIDモデルラットに淡蒼球内節にstereotaxicに特製注入プローブを刺入する。L-dopa 50mg/kgを投与した後、GABA_A受容体アンタゴニスト (bicuculline 0.2 μmol) あるいは生食を淡蒼球内節に直接微量注入する。注入の前でL-dopa投与後に生じる回転運動およびジスキネジアスコアを記録した。

1. PDモデルラットの淡蒼球内節に GABA_A 受容体アゴニスト (muscimol) を投与するとジスキネジアが誘発される
2. LIDモデルラットの淡蒼球内節に GABA_A 受容体アンタゴニスト (bicuculline) を投与すると L-DOPA 誘発ジスキネジアが消失する

ジスキネジアスコア



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 1件)

Arai A, Tomiyama M, Kannari K, Kimura T, Suzuki C, Watanabe M, Kawarabayashi T, Shen H, Shoji M. Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. Synapse. 2008 Aug;62(8):632-5. 査読有

[学会発表](計 4件)

富山誠彦、新井 陽、等 レボドパ誘発ジスキネジアモデルラット線条体におけるスパインの可塑的形態変化 第3回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 平成21年10月22日 東京

Tomiyama M, Arai A, et al Morphologic changes of spines in the striatum of a rat model of levodopa-induced dyskinesia 50th Annual Meeting of Society for Neuroscience 平成21年10月20日 Chicago, USA

富山誠彦、新井 陽、等 レボドパ誘発ジスキネジアモデルラット線条体におけるスパインの可塑的形態変化 第50回日本神経学会総会 平成21年5月22日 仙台市

新井 陽 L-DOPA誘発ジスキネジアは淡蒼球内節 GABA_A 受容体刺激により生じる 第49回日本神経学会総会 平成20年5月15日 横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 陽 (ARAI AKIRA)

弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：80422062

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：