

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792387

研究課題名（和文）アドレナリン受容体サブタイプによる側坐核ドパミン神経活動制御機構の研究

研究課題名（英文）Roles of adrenoceptor subtypes in the regulation of accumbal dopaminergic 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）：オーラルジスキネジアは顎顔面の無目的な反復性の運動を特徴とする症候である。その発症機構の詳細は不明だが、顎の常同運動の発現には中脳腹側被蓋野から側坐核へ入力するドパミン神経の関与が行動学的研究より示唆されている。側坐核ではノルアドレナリンとドパミンの両神経間に密接な機能的相互作用が存在するので、申請者らは、側坐核におけるこれら神経の活動制御におけるアドレナリン受容体の役割を無麻酔非拘束ラットを用い *in vivo* 脳微小透析法により検討した。

研究成果の概要（英文）：Oral dyskinesia is a neurological disorder characterized by repetitive stereotyped oral movements. The detailed biological basis of the symptom remains unclear, but behavioural studies suggest that accumbal dopaminergic neurons play a pivotal role in the induction of repetitive jaw movements of rats. It is known that there exists a close noradrenaline–dopamine interaction within this nucleus. In the present study, therefore, we analyzed the role of the adrenoceptor subtypes in the regulation of accumbal noradrenergic and dopaminergic activity in freely moving rats, using the *in vivo* brain microdialysis technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：アドレナリン受容体，カテコラミン，側坐核，オーラルジスキネジア

1. 研究開始当初の背景

青斑核などからのノルアドレナリン（NA）神経は、中脳腹側被蓋野に起始核をもつ中脳辺縁系ドパミン（DA）神経の主たる投射領域である側坐核へ入力している。

高齢者において、顎顔面の異常な不随意運動で舌の突出を伴うオーラルジスキネジア

がしばしば見られる。オーラルジスキネジアは抗パーキンソン病薬の反復投与などの中枢 DA 神経活性化を狙った薬物療法の副作用としても起こることから、オーラルジスキネジア発症に関する研究は、この薬物の主たる作用部位と推測される大脳基底核へ投射する黒質-線条体系 DA 神経を中心に推進され

てきた。しかしながら、臨床上、黒質-線条体 DA 神経の機能障害によるパーキンソン病の治療のため脳内の DA 神経を賦活化する薬物処置を行うと、パーキンソン病症状が改善する以前にオーラルジスキネジアが発症することも知られており、このことから大脳基底核以外の DA 神経の過活動の結果、オーラルジスキネジアが発症する可能性が考えられる。実際に申請者らのグループでは側坐核の DA 神経を活性化するとラットにオーラルジスキネジア様の常同的な顎運動を惹き起こすことを報告している (Cools et al., Eur J. Pharmacol., 1995)。

一方、青斑核などから側坐核への NA 神経入力は、側坐核の DA 神経機能の調節を行うことが示唆されており (Saigusa et al., Neuroscience, 1999), Tuinstra & Cools は、 α 受容体への入力低下と β 受容体の活性化は、いずれも側坐核における DA 放出を増加することを指摘している (Neuroscience, 2000)。現在、 α 受容体は α_1 と α_2 へ、 β 受容体は β_1 と β_2 へとそれぞれ少なくとも 2 種類ずつのサブタイプに分類することができ、これらはいずれも側坐核に分布しているが、各受容体サブタイプの側坐核の DA 放出調節における役割は明らかでない。これら受容体を選択的に活性化または遮断するには、先に挙げた報告 (Tuinstra & Cools, Neuroscience, 2000) で用いたアドレナリン受容体の作動薬と拮抗薬よりも各受容体サブタイプへ選択性の高い薬物を使用した研究が必要であった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ本研究は、ラットが自由に動き回れる状態で側坐核から回収した細胞外液に含まれる NA, DA 量を指標として、同部位の NA および DA 神経活動の制御メカニズムをアドレナリン受容体サブタイプの役割の面から解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究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

Sprague-Dawley (S-D) 系雄性ラット (体重約 200 g) を実験に用いた。ラットはペントバルビタール (50 mg/kg i.p.) により全身麻酔を施したのち脳定位固定装置に固定し、マニピュレーターで側坐核に微小透析プローブ固定用ガイドカニューレを植立した。

(2) 脳微小透析実験

上記の小手術後、約 1 週間の回復期をおき、体重が術前同様に増加しており、摂餌、摂水、歩行をはじめとする基本的行動に異常がな

いことを肉眼観察で十分確認したのち、ラットがストレスなく実験ケージ内を自由に動きまわれる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、ラットを 30×30×35 (cm) のアクリル製観察ケージ内に収容し、インフュージョンポンプにより脳微小透析プローブへ改良リンゲル液を 1 μ l/分で灌流して、透析膜を介して細胞外液を試料として持続的に回収した。この試料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 20 分毎に注入し、電気化学検出器でサンプル中の NA または DA を定量した。

(3) 薬物処置

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 NA または 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、NA または DA 量の変化を 4 時間にわたり観察した。

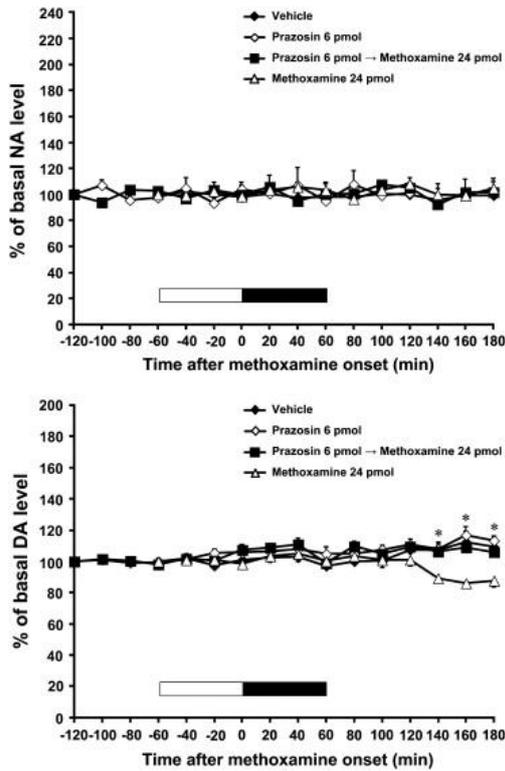
4. 研究成果

(1) 側坐核の NA および DA 神経活動制御における α 受容体サブタイプの役割

NA が作用する α 受容体の antagonist (phenolamine) および agonist (phenylephrine) を用いた研究から、側坐核の NA 神経終末に分布する α 受容体は NA 神経活動を、DA 神経終末に分布する α 受容体は DA 神経活動を、それぞれ抑制的に制御することを我々は指摘してきた (Aono et al., 2007; Tuinstra & Cools, 2000)。 α 受容体には α_1 と α_2 の少なくとも 2 種類の受容体サブタイプがありいずれも側坐核に分布しているが、phenolamine と phenylephrine は α 受容体サブタイプへ非選択的に作用するため、NA と DA 神経活動制御への各受容体サブタイプの関与の詳細については明らかでない。そこで当該年度は、側坐核の α_1 および α_2 受容体が同部位の NA と DA 放出制御において果たす役割について、これらの受容体へ選択的に作用する antagonist または agonist が無麻酔非拘束ラットの側坐核の細胞外 NA および DA 量に及ぼす効果を指標として、in vivo brain microdialysis 法により検討した。 α_1 受容体系薬物 (agonist の methoxamine, antagonist の prazosin), α_2 受容体系薬物 (agonist の clonidine または UK 14,304, antagonist の RX 821002) はいずれも灌流液に溶解して、単独または併用して側坐核へ微小透析プローブを介して逆透析により局所灌流投与した。

その結果、methoxamine (24 pmol) の灌流投与の結果、NA 量に変化は認められなかったが DA 量は減少した。また、prazosin (6 nmol)

A.

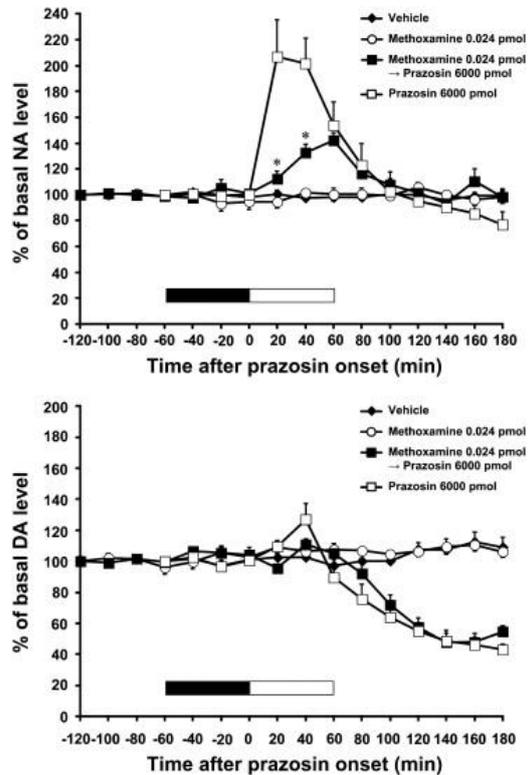


A 60 min-infusion of prazosin (6 pmol) followed by a 60 min-infusion of methoxamine (24 pmol) failed to alter noradrenaline (NA; upper panel) level in the nucleus accumbens (closed squares). Effects of a 60 min-infusion of prazosin (6 pmol) on a 60 min-infusion of methoxamine (24 pmol)-induced decrease in dopamine (DA; lower panel) level in the nucleus accumbens (closed squares). The data are expressed as the mean change in 20 min observation periods after onset of a 60 min-infusion of methoxamine (24 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of prazosin perfusion that commenced 60 min before onset of methoxamine infusion. The filled bar indicates the period of infusion of methoxamine (60 min). The asterisks represent the statistical comparison per time point between methoxamine 24 pmol versus prazosin 6 pmol + methoxamine 24 pmol which turned out to be statistically significant for dopamine (post hoc Scheffé's test; $P < 0.05$).

の灌流投与で NA 量は増加したのに対し、DA 量は減少した (図 A)。一方、methoxamine の DA 量に対する効果も NA と DA 量には影響を与えない用量の prazosin (6 pmol) の併用によりほぼ完全に消失し、prazosin (6 nmol) の NA 量に対する効果は、NA と DA 量には影響を与えない用量の methoxamine (0.024 pmol) の併用により強く抑制された (図 B)。

側坐核の NA 量は methoxamine の影響は受けなかったが、prazosin により用量依存的に増加した。基礎的な NA 量に影響を及ぼさない低用量の methoxamine の併用により prazosin が誘発した NA 量の増加が抑制されたことは、prazosin の効果は側坐核の α_1 受容体遮断によるものであることを示している。このことは、側坐核に投射する NA 神経終末に分布する α_1 受容体は、この神経からの NA 放出を抑制的に制御するというこれまでの我々の報告 (Aono et al., 2007) を基本的には支持するものであった。一方、methoxamine は基礎的な NA 量に影響を与えなかったが、

B.



Effects of a 60 min-infusion of methoxamine (0.024 pmol) on a 60 min-infusion of prazosin (6000 pmol)-induced increase in noradrenaline (NA; upper panel) and dopamine (DA; lower panel) level in the nucleus accumbens (closed squares). The data are expressed as the mean change in 20 min observation periods after onset of a 60 min-infusion of prazosin (6000 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of methoxamine perfusion that commenced 60 min before onset of prazosin infusion. The open bar indicates the period of infusion of prazosin (60 min). The asterisks represent the statistical comparison per time point between prazosin 6000 pmol versus methoxamine 0.024 pmol + prazosin 6000 pmol which turned out to be statistically significant for noradrenaline (post hoc Scheffé's test; $P < 0.05$).

DA 量は減少させた。基礎的な DA 量に影響を及ぼさない低用量の prazosin の併用により methoxamine が誘発した DA 量の減少がほぼ完全に抑制されたことは、methoxamine の効果発現に側坐核の α_1 受容体刺激が関与することを示している。つまり、本実験条件下において methoxamine は、DA 神経終末に分布する α_1 受容体を刺激してこの神経からの DA 放出を抑制することが示唆された。

本プロジェクトの海外研究協力者の Cools は非選択的 α_1 受容体 agonist の phenylephrine を用いた研究から、この薬物が側坐核の NA 神経終末に分布する α_1 受容体を刺激を介して同部位の DA 放出を促進する可能性を指摘している (Tuinstra & Cools, 2000)。このことは選択的 α_1 受容体 methoxamine が側坐核の NA 量に影響を与えずに DA 放出を抑制した本研究結果と一見矛盾する。しかし、アドレナリン受容体の薬物への感受性はこれら受容体へ作用するシナプス間隙の内因性 NA の濃度に依存することが示唆されている (Aono

et al., 2007)。すなわち、アドレナリン受容体は、作用する NA 濃度が高い場合は antagonist 感受性、作用する NA 濃度が低い場合は agonist 感受性を示す。Tuinstra & Cools (2000) の報告で用いた Wistar 系ラットとは異なり、本研究で用いた S-D 系ラットは側坐核の NA 量は非常に少ない (Scholl et. al., 2010)。したがって、側坐核の NA 神経伝達が行われる DA 神経終末上のシナプスのアドレナリン受容体は、Wistar 系の場合、後シナプス受容体が antagonist 感受性で前シナプス受容体が agonist 感受性であるのに対し、本実験で用いた S-D 系の場合、後シナプス受容体が agonist 感受性で前シナプス受容体が antagonist 感受性であることが考えられる。こうした受容体の感受性の特徴のため、Tuinstra & Cools (2000) の報告では NA 神経終末に分布する前シナプス α_1 受容体を非選択的 α_1 受容体 agonist の phenylephrine が刺激して同部位の DA 放出を促進したのに対し、本研究では NA 神経終末に分布する前シナプス α_1 受容体ではなく DA 神経終末に分布する後シナプス α_1 受容体を選択的 α_1 受容体 agonist の methoxamine が刺激したため NA 量に変化がない状態で DA 放出のみが低下したことが示唆された。こうしたアドレナリン受容体の antagonist への感受性の違いは、Tuinstra & Cools (2000) の報告した非選択的 α_1 受容体 antagonist の phentolamine の Wistar 系ラットの DA 放出促進作用と、本研究における選択的 α_1 受容体 antagonist の prazosin は S-D 系ラットの DA 放出抑制作用の発現にもそれぞれ関与した可能性が考えられた。

本研究結果から選択的 α_1 受容体 antagonist の prazosin は、側坐核において NA 神経終末に分布し NA 放出を抑制的に調節する α_1 受容体を遮断して脱抑制により NA 放出を亢進させ、同部位においてこの NA 神経が入力する DA 神経終末に分布する α_1 受容体への刺激を介して DA 放出を減少させることが示唆された。しかしこれらの prazosin の効果のうち、methoxamine は NA 放出促進は強く抑制できたのに対し、DA 放出抑制には目立った影響を及ぼさなかった。このことから、prazosin は NA 神経終末上の前シナプス α_1 受容体、また、methoxamine は DA 神経終末上の後シナプス α_1 受容体を、それぞれ各薬物が異なる受容体を作用点としていたことが推察された。

上記の α_1 受容体系薬物とは異なり、 α_2 受容体系薬物 (agonist の clonidine または UK 14,304, antagonist の RX 821002) の灌流投与は NA と DA 量には影響を及ぼさなかった。

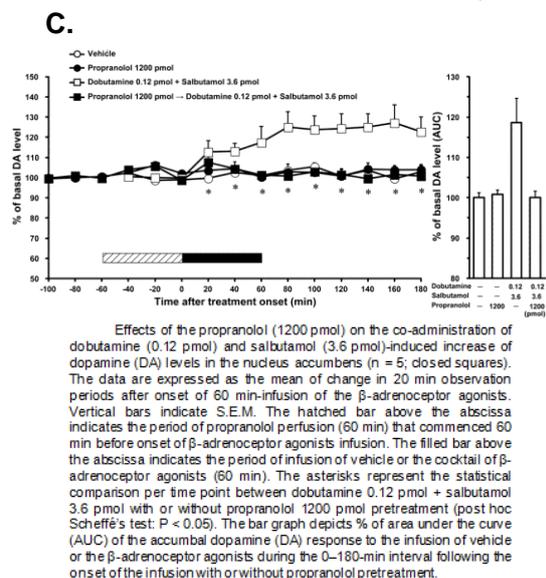
以上の結果から、側坐核では NA 神経終末に分布する α_1 受容体が同部位の NA 放出を、また、DA 神経終末に分布する α_1 受容体が同部位の DA 放出を、それぞれ抑制的に制御することが示された。また、側坐核に分布する

α_2 受容体は同部位の NA および DA 神経活動制御には目立った役割を果たさないことが示唆された。

(2) 側坐核の NA および DA 神経活動制御における β 受容体サブタイプへの役割

側坐核では、NA 取り込み阻害薬の reboxetine 処置の結果、細胞外 NA 量の増加に伴い DA 量も増加する。この reboxetine 処置が誘発した DA 量の増加は、非選択的 β 受容体 antagonist の propranolol により消失することを我々は報告してきた。このことは側坐核では、NA 神経が DA 神経終末上に分布する β 受容体の活性化を介して DA 放出を促進的に制御することを示唆するものである。一方、 β 受容体には β_1 と β_2 の少なくとも 2 種類の受容体サブタイプがありいずれも側坐核に分布しているが、propranolol は β 受容体サブタイプへ非選択的に作用する。したがって、 β 受容体による DA 神経活動促進への β_1 と β_2 の各受容体サブタイプの関与様式の詳細は明らかでない。そこで側坐核の β_1 および β_2 受容体が同部位の DA 放出促進においてそれぞれ果たす役割について、これらの受容体の選択的 agonist を用いて検討した。 β_1 受容体 agonist の dobutamine, β_2 受容体 agonist の salbutamol はいずれも灌流液に溶解して、単独または併用して側坐核へ微小透析プローブを介して局所灌流投与した。

その結果、dobutamine (0.06, 0.12 pmol), salbutamol (0.36, 3.6 pmol) をそれぞれ単独で灌流投与しても側坐核の NA および DA 量には目立った変化は認められなかった。これに対し、0.06 pmol の dobutamine と 3.6 pmol の salbutamol, 0.12 pmol の dobutamine と 0.36 または 3.6 pmol の salbutamol の併用投与はいずれも側坐核の NA 量には影響を与えずに DA 放出を促進した (図 C)。非選択的 β 受容



体 antagonist の propranolol の前処置の結果, dobutamine (0.12 pmol) と salbutamol (3.6 pmol) の併用投与が誘発した DA 量の増加はほぼ完全に消失した (図 C)。

以上の結果から, 側坐核に分布する β_1 および β_2 受容体は側坐核の NA 神経活動制御には目立った役割を果たさないことが示唆された。側坐核の DA 神経終末に分布する β_1 および β_2 受容体はそれぞれ単独ではなく同時に刺激することによって DA 神経活動を促進することが示された。

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 3 件)

① Saigusa T, Aono Y, Uchida T, Takada K, Koshikawa N, Cools A R. 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, in press. 査読有

② Saigusa T, Aono Y, Uchida T, Takada K, Verheij MMM, Koshikawa N, Cools A R. 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. 査読有

③ Saigusa T, Aono Y, Sekino R, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR. *In vivo* neurochemical evidence that newly synthesised GABA activates GABA_B, but not GABA_A, receptors on dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens of freely moving rats. Neuropharmacology, 2012, 62: 907-913. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Uchida T, Simultaneous, but not separate activation of beta-1- and beta-2-adrenoceptors in the nucleus accumbens increases accumbal dopamine efflux in freely moving rats. June 6th, 2012, 28th The International College of Neuropsychopharmacology (CINP), Stockholm, Sweden

② Uchida T, The alpha-1 adrenoceptor in the nucleus accumbens exerts an inhibitory control upon the accumbal noradrenaline and dopamine efflux in freely moving rats. September 24th, 2011, 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology Jointly with 2011 Annual Meeting of Korean College of Neuropsychopharmacology, Grand Hilton Seoul Hotel, Seoul, Korea

[その他]

ホームページ等 (研究内容の平易な紹介)
<http://www.bitway.ne.jp/ejournal/biglobe/2425100899.html>

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