

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593062

研究課題名(和文) 側坐核のノルアドレナリンおよびドパミン放出制御機構の研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms of noradrenaline and dopamine release in the nucleus accumbens

研究代表者

高田 耕司 (TAKADA, Koji)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：00216657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔ジスキネジアは顎顔面の不随意的な反復運動で、加齢以外にパーキンソン病治療薬または抗精神病薬の副作用として誘発される。口腔ジスキネジア発症メカニズムの詳細は不明だが、側坐核や線条体へ投射する中枢ドパミン神経の機能亢進が顎の常同運動を惹起することが、ラットを用いた行動学的研究から示されている。本研究で申請者らは、側坐核のドパミン神経活動制御におけるアドレナリン受容体の役割について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 is characterized by involuntary repetitive orofacial movement. It is associated with aging or use of drugs for Parkinson's disease and antipsychotics. The detailed biological basis of the syndrome is unclear, but the pharmacological-behavioural studies indicate that enhance of dopamine function in the nucleus accumbens and striatum plays major role for the induction of repetitive jaw movements of rats. In the present study, we investigated the roles of adrenaline receptor subtypes in the regulation of accumbal dopaminergic activity in freely moving rats, using the in vivo brain microdialysis technique.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：口腔ジスキネジア ノルアドレナリン ドパミン アドレナリン受容体 ラット

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ある。口腔ジスキネジアは加齢が原因となるほか、抗パーキンソン病薬の反復投与などの中枢ドパミン (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、口腔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。一方で、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口腔ジスキネジアが発症するので、大脳基底核以外の DA 神経の過活動の結果、口腔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口腔ジスキネジア様の反復性の開閉口運動を惹き起こすことを報告している (Cools et al., 1995 ほか)。

抗うつ薬は、うつ病のほか神経因性疼痛の治療で口腔外科領域でも用いる。「重篤副作用疾患別マニュアル ジスキネジア(平成 21 年 厚生労働省)」にあるように、「抗うつ薬は副作用として口腔ジスキネジアを誘発する(同)」ことは臨床で受け入れられているが、疫学調査が行われておらず「一例報告の集まり程度で、頻度が議論できない(同)」のが現状である。代謝産物が二次的な中枢 DA 神経亢進作用を起こすアモキサピンのように、口腔ジスキネジア発症につながりそうな薬理作用が判明している抗うつ薬もあるが、これ以外の抗うつ薬の口腔ジスキネジア発症機構は明らかでない。この点、中枢ノルアドレナリン (NA) 神経を賦活化するミルナシプランに口腔ジスキネジア誘発の危険性が指摘されているので、中枢 NA 神経活動の亢進が口腔ジスキネジアの発症につながる可能性も考えられる。

側坐核には青斑核などから NA 神経入力があり、この入力による側坐核の DA 神経機能の調節機構について申請者らは解明に取組んできた (Saigusa et al., 1999 ほか)。その結果、側坐核では α 受容体刺激と β 受容体刺激は、DA 神経活動をそれぞれ抑制と促進することを報告している。すなわち側坐核において、 α 受容体の活性化は DA 神経亢進を防ぐ反面、 β 受容体の活性化は DA 神経亢進を促すことが考えられた。これらのことは、 α 受容体と β 受容体では口腔ジスキネジア惹起の面では抑制と促進の正反対の役割を果たす可能性があることを示している点で興味深い。一方で、 α 受容体と β 受容体は後述のとおり複数のサブタイプが存在するが、各受容体またはそれらの相互作用が DA 神経活動制御に果たす役割については明らかでなかった。

本プロジェクトで申請者らは、側坐核に焦点を当て、同部位のアドレナリン受容体サブ

タイプの選択的刺激または遮断が、側坐核における DA 神経活動に及ぼす効果についてラットを用いた基礎的研究を行った。比較のため、アドレナリン受容体サブタイプの agonist または antagonist の NA 神経活動への効果も観察した。

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試料に含まれる DA 量を指標として、同部位の 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に取組んだ。比較のため、試料中の NA 量も測定して同部位の NA 神経活動の指標とした。

3. 研究の方法

本研究の実験は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認を受けて動物実験指針に従って行い、実験動物の苦痛軽減はもちろん、使用動物数の低減に努めた。

(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装着し、マニピュレーターを用いて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、回復期を 7~10 週間おき脳微小透析実験を行った。回復期では、手術を行なった全ての個体において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認められなかった。脳微小透析実験は、ラットが測定用ケージ内を自由に動きまわれる無麻酔非拘束の条件で行った。ラットは胴部を徒手で軽く保持し、ガイドカニューレに脳微小透析プローブを取りつけた後、テフロンチューブを接続した。つぎにラットはアクリル製測定ケージ (30×30×35 cm) へ収容し、脳微小透析プローブへ改良リンゲル液を流速 1 μ l/分でインフュージョンポンプを用いて灌流して、試料として透析膜を介して得た細胞外液を回収した。この試料はオートインジェクターを用いて 20 分毎に高速液体クロマトグラフに注入し、電気化学検出器で NA または DA を分離・定量した。

(3) 薬物処置

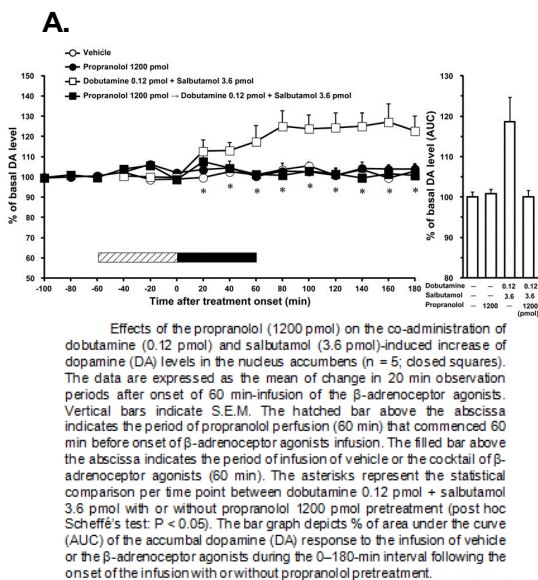
改良リンゲル液の脳微小透析プローブへの灌流開始後、4 時間以上が経過し試料中の NA または DA 量の変動が 10%以内になったのち、側坐核への薬物の逆透析による局所灌流投与をおこなった。試料中の NA および DA 量の変化は 4 時間にわたって測定した。各薬物の用量は、灌流液中 (60 μ l) の絶対量 (pmol) で示した。

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 β 受容体サブタイプの役割

我々はこれまで、側坐核への NA 取り込み阻害薬の reboxetine の灌流投与の結果、同部位の細胞外 NA 量のみならず DA 量も増加すること、さらにこの reboxetine 処置が誘発した DA 量の増加が非選択的 β 受容体 antagonist の propranolol により打ち消されることを報告してきた (Eur J Pharmacol, 601, 2008)。これらのことは、側坐核において DA 神経終末上に分布する β 受容体の活性化を介して NA 神経が 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 受容体サブタイプのうち β_1 と β_2 の少なくとも 2 種類の受容体が側坐核に分布しているが、propranolol はこれらの β 受容体サブタイプを非選択的に遮断する。したがって、 β 受容体を介した DA 神経活動亢進に対する β_1 と β_2 受容体サブタイプの関与について詳細は不明である。そこで側坐核の β_1 および β_2 受容体が同部位の DA 放出増加において果たす役割について、これらの受容体の選択的 agonist を用いて検討を行った。 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。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 A)。

以上の結果から、側坐核に分布する β_1 および β_2 受容体は同部位における NA 神経活動の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、各受容体サブタイプへの単独刺激ではなく同時刺激をした場合に DA 神経活動が亢進することが示された。

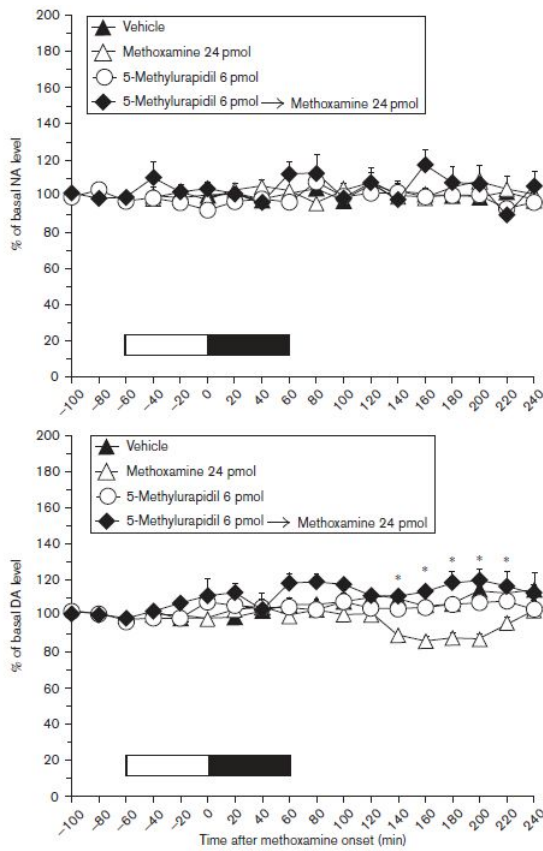
(2) 側坐核の DA 神経活動制御における α 受容体サブタイプの役割

我々はこれまで α_1 受容体 agonist の methoxamine の側坐核への灌流投与は、同部位から回収された細胞外液中の NA 量には影響を及ぼさないものの DA 量は減少させること、また基礎的な細胞外 NA および DA 量に影響を与えない低用量の α_1 受容体 antagonist の prazosin は、methoxamine の誘発した DA 量の減少を抑制することをそれぞれ報告している (Eur J Pharmacol, 688, 2012)。これらのことは側坐核では α_1 受容体が同部位の DA 放出を抑制的に調節することを示唆するものである。

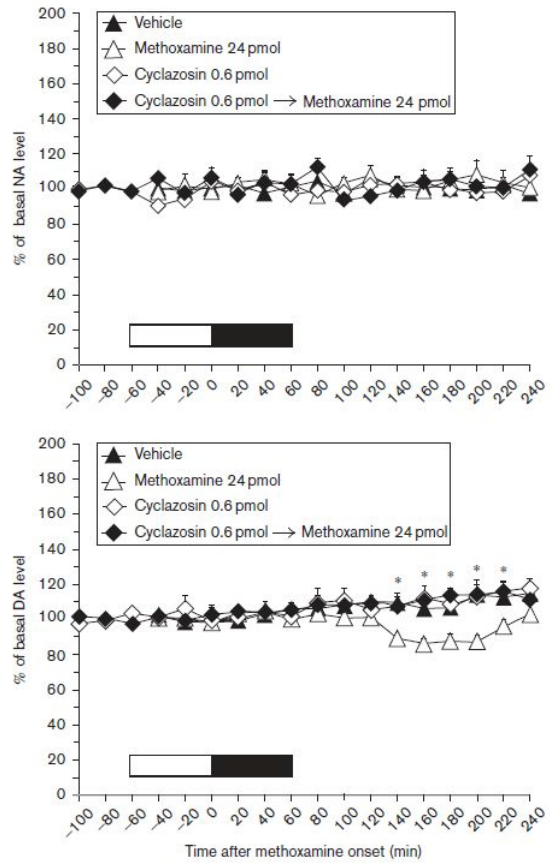
一方、 α_1 受容体には α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} の 3 種類のサブタイプが知られているが、methoxamine 処置が惹き起した DA 量の減少に対するこれら受容体の関与は明らかでない。そこで本研究では、 α_1 受容体の各サブタイプの選択的 antagonist が methoxamine の誘発した側坐核の DA 放出低下を抑制するか否かを指標として、 α_1 受容体サブタイプが methoxamine の効果発現において果たす役割について検討した。 α_1 受容体の各サブタイプの選択的 antagonist はいずれも灌流液に溶解して、単独または methoxamine と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、methoxamine (24 pmol) の灌流投与ではサンプル中の基礎 NA 量に目立った変化はなかったが DA 放出は約 20% 減少した。基礎 NA および DA 放出に影響を及ぼさない用量の α_{1A} 受容体 antagonist の 5-methylurapidil (6 pmol), α_{1B} 受容体 antagonist の cyclazosin (0.6, 6 pmol), α_{1D} 受容体 antagonist の BMY 7378 (0.6 pmol) をそれぞれ前投与したところ、methoxamine が誘発した DA 放出の低下はほぼ完全に消失した (図 B~D)。

我々は側坐核の DA 神経終末上に局在する α_1 受容体が、DA 放出を抑制的に制御する可能性を指摘してきたが、以上の結果から本研究で α_1 受容体 agonist の methoxamine が示した側坐核の DA 放出抑制作用の発現には、同部位の DA 神経終末上に分布する α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} の各 α_1 受容体サブタイプを同時に刺激する必要があることが示唆された。

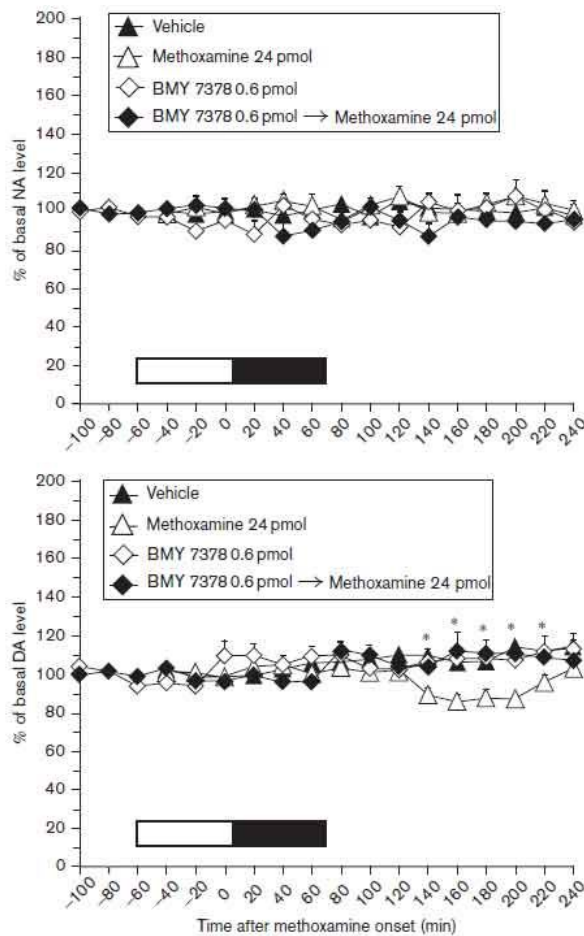
B.

A 60-min infusion of 5-methylurapidil [6 pmol ($n=5$; closed diamonds)] followed by a 60-min infusion of methoxamine (24 pmol) failed to affect the noradrenaline (NA; upper panel) level in the nucleus accumbens, but inhibited the methoxamine (24 pmol)-induced decrease in the dopamine (DA; lower panel) level in the nucleus accumbens. The data are expressed as the mean change in 20-min observation periods after onset of a 60-min infusion of methoxamine. Vertical bars indicate SEM. The open bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or 5-methylurapidil (60 min). The filled bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or methoxamine (60 min). *Comparisons per time point between 24 pmol methoxamine and 6 pmol 5-methylurapidil + 24 pmol methoxamine that achieved statistical significance (post-hoc Scheffé's test: $P < 0.05$).

C.

A 60-min infusion of cyclazosin [0.6 pmol ($n=5$; closed diamonds)] followed by a 60-min infusion of methoxamine (24 pmol) did not alter the noradrenaline (NA; upper panel) level in the nucleus accumbens, but counteracted the methoxamine (24 pmol)-induced decrease in the dopamine (DA; lower panel) level in the nucleus accumbens. The data are expressed as mean change in 20-min observation periods after onset of infusion of a 60-min infusion of methoxamine. Vertical bars indicate SEM. The open bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or cyclazosin (60 min). The filled bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or methoxamine (60 min). *Comparisons per time point between 24 pmol methoxamine versus 0.6 pmol cyclazosin + 24 pmol methoxamine that achieved statistical significance (post-hoc Scheffé's test: $P < 0.05$).

D.



A 60-min infusion of BMY 7378 [0.6 pmol ($n = 5$; closed diamonds)] followed by a 60-min infusion of methoxamine (24 pmol) did not affect the noradrenaline (NA; upper panel) level in the nucleus accumbens, but it suppressed the methoxamine (24 pmol)-induced decrease in dopamine (DA; lower panel) level in the nucleus accumbens. The data are expressed as mean change in 20-min observation periods after onset of a 60-min infusion of methoxamine. Vertical bars indicate SEM. The open bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or BMY 7378 (60 min). The filled bar above the horizontal axis indicates the period of infusion of vehicle or methoxamine (60 min). *Comparisons per time point between 24 pmol methoxamine versus 0.6 pmol BMY 7378 + 24 pmol methoxamine that achieved statistical significance (post-hoc Scheffé's test: $P < 0.05$).

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. Simultaneous activation of α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats

Yuri Aono, Hiroko Taguchi, Tadashi Saigusa, Takuya Uchida, Koji Takada, Hatakazu Takiguchi, Tetsuo Shirakawa, Noriyoshi Shimizu, Noriaki Koshikawa and Alexander R. Cools

Behavioural Pharmacology 26:73-80 (2015) doi: 10.1097/FBP.000000000000113. 査読有

2. Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal β_1 - and β_2 -adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats

Yuri Aono, Tadashi Saigusa, Hiroko Taguchi, Takuya Uchida, Koji Takada, Noriaki Koshikawa and Alexander R. Cools

European Journal of Pharmacology 715: 363-369 (2013) doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.035. 査読有

[学会発表](計2件)

1. Intra-accumbal administration of endomorphin-2 decreases acetylcholine efflux via mu receptors and increases dopamine efflux independent of mu receptors in the nucleus accumbens of freely moving rats

Yuri Aono,, Hiroko Taguchi, Yuri Kiguchi, Takuya Uchida, Koji Takada, Noriaki Koshikawa, and Tadashi Saigusa

29th The International College of Neuropsychopharmacology (CINP)

June 22nd-26th, 2014 (発表日 6月23日), Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada

2. ラットの側坐核へのエンドモルフィン-2の局所投与が示す同部位のアセチルコリン放出抑制作用

青野悠里, 田口寛子, 木口友里, 高田耕司, 前田隆秀, 越川憲明, 三枝 禎

第87回日本薬理学会年会

2014年3月19-21日(発表日3月19日), 東北大学百周年記念館川内萩ホール, 仙台国際センター, 宮城県仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 耕司 (TAKADA, Koji)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号: 00216657

(2) 研究分担者

三枝 禎 (SAIGUSA, Tadashi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 50277456