

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861763

研究課題名(和文) ドパミンおよびアドレナリン受容体が側坐核のアセチルコリン神経活動制御に果たす役割

研究課題名(英文) Roles of dopamine and adrenaline receptors in regulation of acetylcholine efflux in the nucleus accumbens

研究代表者

青野 悠里 (AONO, Yuri)

日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)

研究者番号：50508497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔ジスキネジアは舌の突出を伴う顎顔面の異常な反復運動である。口腔ジスキネジアの発症機構は不明だが、げっ歯類の反復性顎運動誘発への側坐核のドパミン(DA)神経亢進の関与が行動実験から示されている。本研究では側坐核のDA放出制御におけるアドレナリン受容体サブタイプの役割について無麻酔非拘束ラットを用い、in vivo微小透析法により検討した。我々は内因性 $\mu$ 受容体agonist候補物質のendomorphin(EM)-1とEM-2は側坐核のDA放出を促進することを報告している。側坐核のアセチルコリン(Ach)神経には $\mu$ 受容体が発現しているため、EM類がAch放出に及ぼす効果についても解析した。

研究成果の概要(英文)：Oral dyskinesia is a neurological syndrome which is characterized by repetitive oral movement including tongue protrusion. The biological basis of the disorder remains unclear, but behavioural studies suggest that enhance of dopaminergic neural activity in the nucleus accumbens play major roles for induction of repetitive jaw movements in rodent. In the present study, we analyzed the roles of adrenergic receptor subtypes in the regulation of accumbal dopamine efflux in freely moving rats, using the in vivo brain microdialysis. We have shown that the putative endogenous mu receptor agonists endomorphin (EM)-1 and EM-2 could enhance accumbal dopamine efflux. We further analysed effects of EM-1 and EM-2 on the accumbal acetylcholine efflux since accumbal cholinergic neurons contain mu receptors.

研究分野：薬理学

キーワード：ドパミン ノルアドレナリン アセチルコリン 側坐核 微小透析法 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

口腔ジスキネジアは、反復性の顎顔面領域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、パーキンソン病治療薬の慢性投与などの中枢ドパミン (DA) 神経を活性化する薬物処置の副作用としても起こるため、口腔ジスキネジア発症に関する研究は、この薬物の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。しかし黒質-線条体系 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の改善の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 神経の過活動により口腔ジスキネジアが発症する可能性が考えられる。側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核がある中脳辺縁系 DA 神経の投射領域であるが、申請者らのグループではこの領域の DA 神経の賦活化によりラットに口腔ジスキネジア様の反復性の開閉口運動が起こることを報告している (Cools et al., 1995 ほか)。

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、 $\alpha$  受容体への入力低下と  $\beta$  受容体の活性化は、いずれも側坐核の DA 遊離を増加することを指摘している (Neuroscience, 2000)。現在、 $\alpha$  受容体は  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$  へ、 $\beta$  受容体は  $\beta_1$  と  $\beta_2$  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、 $\alpha_1$  受容体には  $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$  の 3 種類のサブタイプの存在が知られている。これら受容体は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 遊離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とされていた。

側坐核には Ach を分泌する介在神経が分布しており、DA 神経と機能的相互作用を示すことが示唆されている。これまで我々は、 $\mu$  受容体の内因性 agonist 候補物質の endomorphin (EM) -1 および EM-2 は、側坐核に局所投与するといずれも同部位の DA 放出を強く促進するが、EM-1 の効果には  $\mu$  受容体が分布する GABA 神経の脱抑制が関わるのに対し、EM-2 の効果には  $\mu$  受容体および GABA 神経を介さない神経機構が関与することを我々は指摘している。側坐核には  $\mu$  受容体が局在する Ach 介在神経があり、 $\mu$  受容体を含む opioid 受容体サブタイプを非選択的に刺激する morphine が側坐核の Ach 神経活動を抑制することが示されている。しかし、側坐核への EM 類の局所投与が同部位の Ach 放出に及ぼす影響は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

以上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り組んだ。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。また、側坐核の Ach 量を指標として、同部位の Ach 神経活動の  $\mu$  受容体を介した制御機構についても検討を加えた。

## 3. 研究の方法

(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 35×35×35 (cm) のアクリル製観察ケージ内に静かに収容し、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  $\mu$ 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 DA または NA は 20 分毎に、Ach は 15 分毎に注入し、電気化学検出器を用いて定量した。

(3) 薬物の局所投与：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、NA または Ach 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、NA または Ach 量の変化を 4 時間にわたり観察した。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  $\mu$ m の脳の連続切片で確認した。

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。

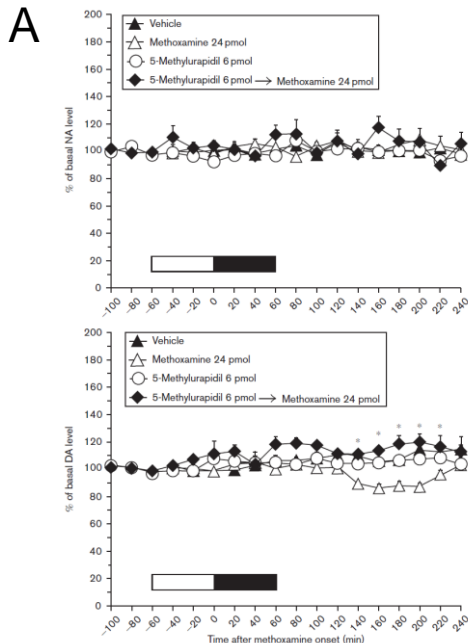
#### 4. 研究成果

(1) 側坐核の選択的  $\alpha_1$  受容体サブタイプが同部位の DA, NA 遊離に及ぼす効果

青斑核および延髄腹側部のノルアドレナリン (NA) 神経は、中脳-辺縁系ドパミン (DA) 神経の主たる投射領域の側坐核へ入力している。我々はこれまで  $\alpha_1$  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  $\alpha_1$  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 (Saigusa et al., Eur. J. Pharmacol. 688, 2012)。これらのことは側坐核では  $\alpha_1$  受容体が同部位の DA 遊離を抑制的に調節することを示すものである。

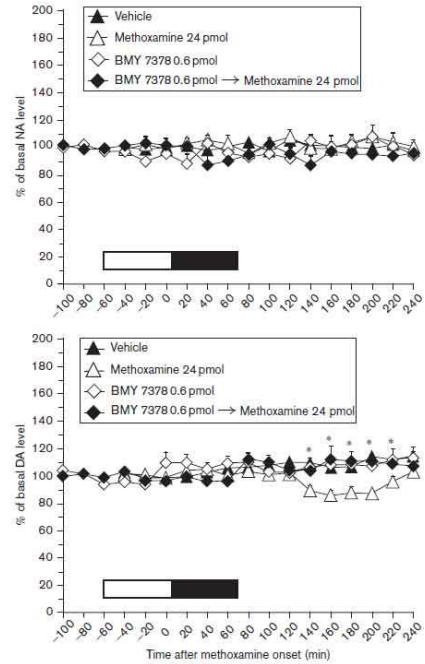
一方、 $\alpha_1$  受容体には  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  の 3 種類のサブタイプが知られているが、methoxamine 処置が惹き起した DA 量の減少に対するこれら受容体の関与は明らかでない。そこで  $\alpha_1$  受容体の各サブタイプの選択的 antagonist が methoxamine の誘発した側坐核の DA 遊離低下を抑制するか否かを指標として、 $\alpha_1$  受容体を介した側坐核の DA 遊離抑制において  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  受容体が果たす役割について検討した。その結果、

① 側坐核の基礎 NA および DA 遊離はいずれも、 $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  受容体 antagonist の灌流投与に影響を受けなかった。



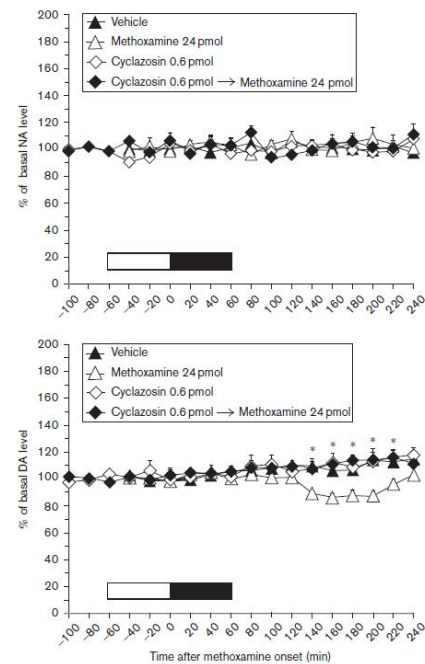
A 60-min infusion of 5-methylurapidil [6 pmol ( $n=5$ ; closed diamonds)] followed by a 60-min infusion of methoxamine (24 pmol) failed to affect the noradrenaline (NA; upper panel) level in the nucleus accumbens, but inhibited the methoxamine (24 pmol)-induced decrease in the dopamine (DA; lower panel) 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:  $P < 0.05$ ).

B



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:  $P < 0.05$ ).

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:  $P < 0.05$ ).

②  $\alpha_1$  受容体 agonist の methoxamine の側坐核への灌流投与が誘発した同部位の DA 遊離の減少は  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  受容体 antagonist により抑制された (図 A, B, C)。

以上の結果から  $\alpha_1$  受容体刺激を介した側坐核の DA 遊離減少の発現には、同部位の  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  の各  $\alpha_1$  受容体サブタイプの同時刺激が必要であることが示唆された。

(2)  $\beta$  受容体サブタイプ系薬物の側坐核への灌流投与が同部位の DA, NA 遊離に及ぼす効果

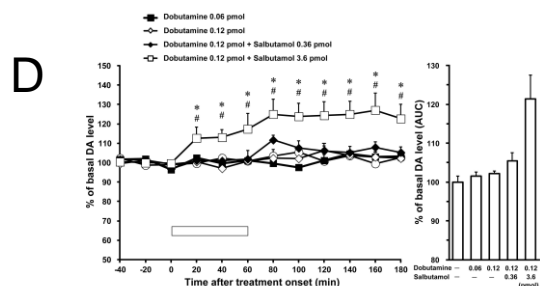
我々はこれまで、側坐核への NA 取り込み阻害薬の reboxetine の灌流投与の結果、同部位の細胞外 NA 量のみならず DA 量も増加すること、さらにこの reboxetine 処置が誘発した DA 量の増加が非選択的  $\beta$  受容体 antagonist の propranolol により打ち消されることを報告してきた (Eur J Pharmacol, 601, 2008)。これらのことは、側坐核において DA 神経終末上に分布する  $\beta$  受容体の活性化を介して NA 神経が DA 放出を促進的に制御することを示唆するものである。

側坐核には、 $\beta$  受容体サブタイプの  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  受容体が分布しているが、propranolol はこれらの  $\beta$  受容体サブタイプを非選択的に遮断する。したがって、 $\beta$  受容体を介した DA 神経活動亢進に対する  $\beta_1$  と  $\beta_2$  受容体サブタイプの関与は明らかでない。そこで側坐核の  $\beta_1$  および  $\beta_2$  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。 $\beta_1$  受容体 agonist の dobutamine,  $\beta_2$  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。

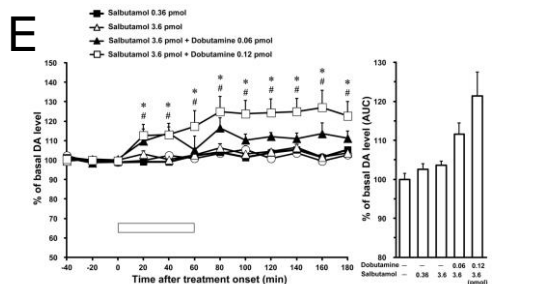
その結果、

①  $\beta_1$  受容体 agonist の dobutamine (0.06, 0.12 pmol),  $\beta_2$  受容体 agonist の salbutamol (0.36, 3.6 pmol) は単独投与では側坐核の細胞外 NA 遊離, DA 遊離には影響を与えなかった。

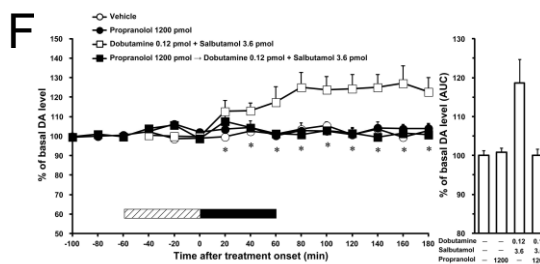
② Dobutamine の用量 (0.12 pmol) を固定し、salbutamol の用量 (0.36, 3.6 pmol) を増加させて併用投与をすると、側坐核の細胞外 DA 遊離を用量依存的に増加した。また salbutamol の



Effects of the infusion of dobutamine alone or co-administration with salbutamol into the nucleus accumbens on the basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens.



Effects of the infusion of salbutamol alone or co-administration with dobutamine into the nucleus accumbens on the basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens.



Effects of the propranolol on the co-administration of dobutamine and salbutamol-induced increase of dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens.

用量 (3.6 pmol) を固定し dobutamine の用量 (0.06, 0.12 pmol) を増加させ併用投与をすると、側坐核の細胞外 DA 量を用量依存的に増加した。この dobutamine (0.12 pmol) と salbutamol (3.6 pmol) の併用投与による側坐核細胞外 DA 量の増加は  $\beta$  受容体アンタゴニストの propranolol (1200 pmol) の前処置によって抑制された (図 D, E, F)。

以上の結果から、側坐核に分布する  $\beta_1$  および  $\beta_2$  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  $\beta_1$  および  $\beta_2$  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。

(3) Endomorphin 類誘発側坐核 Ach 遊離において  $\mu$  受容体サブタイプが果たす役割

Endomorphin (EM) -1 および EM-2 は、 $\mu$  受容体の内因性 agonist 候補物質である。これら EM 類は側坐核に局所投与するといずれも同部位の DA 放出を強く促進するが、EM-1 の効果には  $\mu$  受容体が分布する GABA 神経の脱抑制が関わるのに対し、EM-2 の効果には  $\mu$  受容体および GABA 神経を介さない神経機構が関与することを我々は指摘している。一方、側坐核には  $\mu$  受容体が局在する Ach 介在神経があり、 $\mu$  受容体を含む opioid 受容体サブタイプを非選択的に刺激する morphine が側坐核の Ach 神経活動を抑制することが示されている。

しかし、側坐核への EM 類の局所投与が同部位の Ach 放出に及ぼす影響は明らかでない。そこで本研究では、EM-1 または EM-2 の側坐核への投与が同部位の細胞外 Ach 量を減少させるか否かについて、無麻酔非拘束ラットを用い脳微小透析法により検討した。

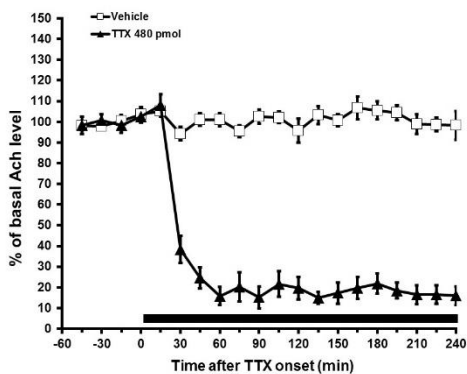
その結果、

① 側坐核へ電依存性  $\text{Na}^+$ チャネル阻害薬の TTX (480 pmol) を灌流投与したところ、同部位から回収された試料中の Ach はおよそ 80% 消失した (図 G)。

② 側坐核への EM-1, EM-2 (6, 30 nmol) の灌流投与の結果、同部位から回収された試料中の Ach 放出は用量依存的に約 30 から 50% 減少した (図 H および I)。側坐核への選択的  $\mu$  受容体 antagonist の CTOP (3 nmol) の投与は同部位の基礎的な Ach 放出にほとんど影響を与えなかったが、この CTOP の前処置は EM-1 のみならず EM-2 の誘発した Ach 放出の減少も強く抑制した (図 J および K)。

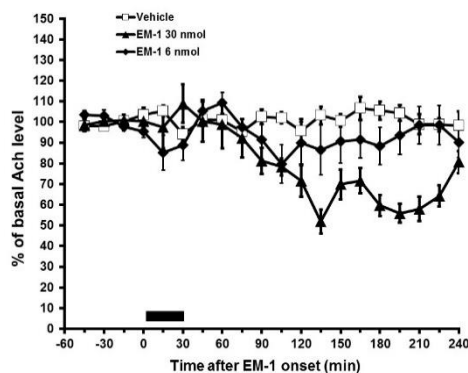
本研究では試料中の Ach の ChE による分解を防ぐ目的でごく低用量の physostigmine (50 nM) を灌流液へ添加したが、側坐核から得た Ach のほとんどが TTX の同部位への灌流投与により消失した。このことから、本実験条件下で側坐核から得た Ach はその大部分が神経活動に依存して細胞外へ放出されたことが示唆された。EM-1 の側坐核への灌流投与は同部位の  $\mu$  受容体刺激を介して DA 放出を促進させる。これに対し、EM-2 の場合、同部位の opioid 受容体刺激を介さずに DA の細胞外放出を促進させることが報告されている。本研究では EM-1 のみならず EM-2 の側坐核への灌流投与も同部位の  $\mu$  受容体刺激を介して Ach 放出を減少させることが示された。

G



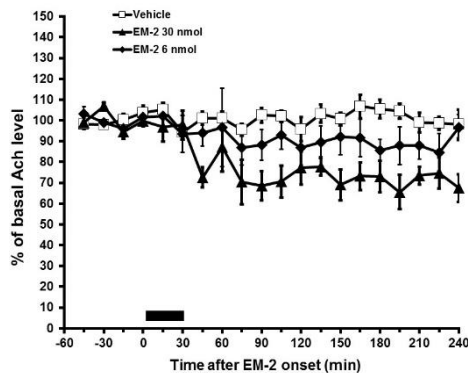
Effects of a 240-min infusion of TTX (480 pmol;  $n = 4$ ; closed triangles) on basal extracellular level of Ach in the nucleus accumbens. The data are expressed as the mean change in 15 min observation periods. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of TTX perfusion that commenced at 0 min.

H



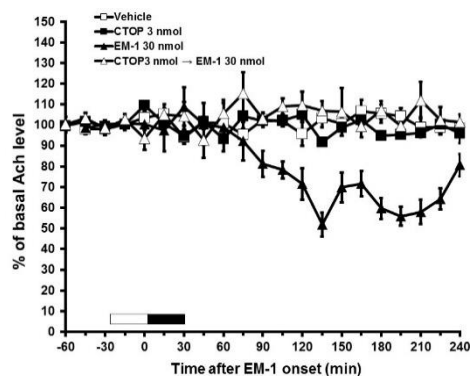
Effects of infusion of vehicle ( $n = 6$ ; open squares) and EM-1 (30 nmol;  $n = 6$ ; closed triangles, 6 nmol;  $n = 4$ ; closed diamonds) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of Ach in the nucleus accumbens. The data are expressed as the mean of change in 15 min observation periods after onset of EM-1 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or EM-1 (30 min).

I



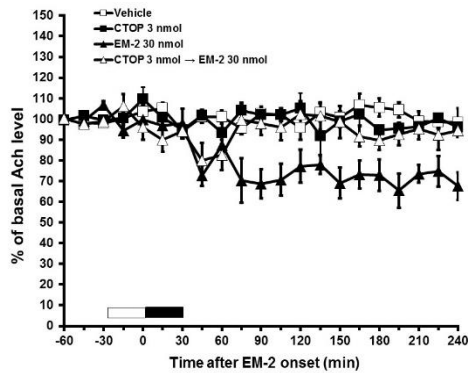
Effects of infusion of vehicle ( $n = 6$ ; open squares) and EM-2 (30 nmol;  $n = 7$ ; closed triangles, 6 nmol;  $n = 6$ ; closed diamonds) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of Ach in the nucleus accumbens. The data are expressed as the mean of change in 15 min observation periods after onset of EM-2 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or EM-2 (30 min).

J



Effects of the infusion of CTOP (3 nmol;  $n = 6$ ; closed squares) on the EM-1 (30 nmol)-induced decrease of Ach efflux in the nucleus accumbens ( $n = 5$ ; open triangles). The data are expressed as the mean of change in 15 min observation periods after onset of EM-1 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion (30 min) that commenced 30 min before onset of EM-1 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of EM-1 (30 min).

K



Effects of the infusion of CTOP (3 nmol; n = 6; closed squares) on the EM-2 (30 nmol)-induced decrease of Ach efflux in the nucleus accumbens (n = 6; open triangles). The data are expressed as the mean of change in 15 min observation periods after onset of EM-2 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion (30 min) that commenced 30 min before onset of EM-2 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of EM-2 (30 min).

## 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. Aono Y, Taguchi H, Saigusa T, Uchida T, Takada K, Takiguchi H, Shirakawa T, Shimizu N, Koshikawa N, Cools A R. Simultaneous activation of the  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behav Pharmacol*, 2015, 73-80, 査読有  
DOI: 10.1097/FBP.0000000000000113.

②. Aono Y, Saigusa T, Taguchi H, Uchida T, Takada K, Koshikawa N, Cools A R. Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ - adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715: 363-369. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.04.035. Epub 2013 May 9.

[学会発表] (計 8 件)

①. Aono Y, Taguchi H, Kiguchi Y, Uchida T, Takada K, Koshikawa N, Saigusa T, 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, 29th CINP World Congress, 2014 年 6 月 24 日, Vancouver (Canada)

②. 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, 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, 2014 年 3 月 21 日, 第 87 回日本薬理学会年会, 仙

台国際センター, 宮城県仙台市

③. 青野悠里, 田口寛子, 三枝 禎, ラットの側坐核のノルアドレナリンおよびドパミン放出制御における  $\beta_1$  および  $\beta_2$  受容体サブタイプの関与, 第 23 回神経行動薬理若手研究者の集い, 2014 年 3 月 18 日, 長陵会館記念ホール, 宮城県仙台市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青野 悠里 (AONO, Yuri)

日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)

研究者番号 : 50508497