
パッチクランプによる黒質線条体ドパミン系におけるニコチン受容体の機能的役割の解明

(課題番号 11670090)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 松林 弘明

(広島大学医学部講師)

はしがき

錐体外路系の主役である黒質-線条体ドパミン系の変性によってパーキンソン病が起こる。従来より黒質-線条体ドパミン系のコリン作動系はムスカリン受容体とされてきた。しかし、喫煙がパーキンソン病を予防するという臨床的事実から、黒質-線条体ドパミン系にニコチン性アセチルコリン受容体の重要な関与が示唆される。そこで、本ドパミン系におけるニコチン受容体の意義を明らかにし、パーキンソン病の治療に資する新たな機序をもつ治療薬の開発を可能にすることをめざした。

私は、これまで黒質-線条体及び腹側被蓋野-側坐核ドパミン系について、主として電気生理学的研究を行ってきた。この中で、線条体ニューロンには黒質刺激によって興奮するニューロンが存在すること、そしてこのニューロンにドパミン D1 と D2 受容体が共存しており、D1 受容体はシナプス領域外にあって、ドパミンにより抑制を受け、D2 受容体はシナプス領域にあってドパミンにより脱分極を起し興奮することを、生体位動物を用いたイオントホレーシス法による研究およびスライス標本を用いた細胞内記録法による研究によって報告した。一方、中枢性ニコチン受容体に関して、海馬培養細胞を用いた研究によりニコチン受容体 $\alpha 7$ サブタイプが重要な役割をもつことを報告した。

以上の経験を基礎として、本研究では、パッチクランプ法を用いて黒質-線条体系のニコチン受容体サブタイプとドパミン伝達との関係を電気生理学的に明らかにすることを目的とした。現在、機能している中枢性ニコチン受容体は、

$\alpha 7$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 3\beta 4$ の3種とされている。しかしながら、黒質-線条体ドパミン系において、どの部位にどのようなニコチン受容体サブタイプが存在し、いかなる機能を果たしているのか、未だに解明されてない。本研究において、電気生理学的手法を用いてニコチン受容体の存在を明らかにし、ドパミン伝達におけるその生理的機能的役割を明らかにすることができる。このことによりL-DOPA療法のみでは克服できない難治性パーキンソン病の治療に新たな展開が期待される。

研究組織

研究代表者 松林 弘明 (広島大学医学部講師)

研究経費

| | |
|--------|----------|
| 平成11年度 | 2,500 千円 |
| 平成12年度 | 1,100 千円 |
| 計 | 3,600 千円 |

研究発表

(1) 学会誌等

1. Matsubayashi H., Amano T., and Sasa M.:
Activation of dopaminergic neurons in the substantia nigra by nicotine in a slice patch-clamp study.:
Japan.J. Pharmacol.,79, suppl.I, 49P, 1999.
2. Akimitsu T., Iida K., Hanaya R., Ishihara K., Matsubayashi H., Serikawa T., Noda A., Sasa M., Arita K., and Kurisu K.:
The role of hippocampus in acoustic priming-induced seizure in Noda epileptic rats (NER).:
Japan.J. Pharmacol.,79, suppl.I, 244P, 1999.
3. Amano T., Matsubayashi H., Muhammad A., and Sasa M.:
Dopamine D2 receptor-mediated hypersensitivity in VTA dopamine neurons following repeated methamphetamine treatment with the patch clamp method.:
Japan.J. Pharmacol.,79, suppl.I, 223P, 1999.
4. Takeshita, S., Sasa, M., Ishihara, K., Matsubayashi H., Yajin, K., Okada, M., Izumi, R., Arita, K., and Kurisu, K.:
Cholinergic and glutamatergic transmissions in medial vestibular nucleus neurons responding to lateral roll tilt in rats. :
Brain Research, 840, 99-105, 1999.
5. Matsubayashi H., Amano T. and Sasa M.:
Inhibition by aripiprazole of dopaminergic inputs to striatal neurons from substantia nigra. :
Psychopharmacology, 146, 139-143, 1999.

6. Matsubayashi H., Amano T. and Sasa M.:
Postsynaptic excitation of dopaminergic neuron in substantia nigra by nicotine. :
Neuroscience Research, Suppl.23, S51, 1999.
7. 松林 弘明、笹 征史：
急性単離線条体細胞を用いたニコチンの作用点に関する電気生理学的検討：
日本薬理学雑誌：113（3）、43P, 1999.
8. 笹 征史、松林 弘明、天野 託：
黒質線条体ドーパミン系におけるニコチン受容体の役割
平成10年度喫煙科学研究財団研究年報、289-294、1999.
9. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
腹側被蓋野ドーパミンニューロンに対する新規抗精神病薬 MS-377
の脱分極作用：
日本薬理学雑誌：114（4）、65P, 1999.
10. 天野 託、松林 弘明、笹 征史：
前庭神経内側核ニューロンに対する 5-HT_{1A} アゴニスト、タンドスピ
ロンの作用：スライスパッチクランプによる研究
Equilibrium Research：58（5）、548P, 1999.
11. 松林 弘明：
サブスタンス P 拮抗薬は抗うつ薬の新機軸になりうるか？：
日本神経精神薬理学雑誌：19（1）、41-42、1999.
12. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
黒質ドーパミンニューロンに対するニコチンの後シナプス性興奮作
用：
日本神経精神薬理学雑誌：19（6）、318P, 1999.

13. Amano T., Matsubayashi H., Tamura Y., and Takahashi T.:
Orphanin FQ-induced outward current in rat hippocampus.:
Brain Res., 853, 269-274, 2000.
14. Matsubayashi H., Amano T., Cai Ji-qun and Sasa M.:
Postsynaptic currents mediated with nicotinic acetylcholine
receptors bearing alpha4 and 7 subunits in rat nigral neurons.:
Japan. J. Pharmacol., 82, suppl.I, 109P, 2000.
15. Amano H., Matsubayashi H., Amano T., Ishihara K., Sasa M.:
Enhancement of intracellular calcium increase in hippocampal
CA3 area of spontaneously epileptic rats (SER):.
Japan. J. Pharmacol., 82, suppl.I, 168P, 2000.
16. Amano T., Matsubayashi H., Muhammad A., Cai Ji-qun and Sasa
M.:
Hypersensitivity to dopamine D1 receptor of dopaminergic
ventral tegmental area neurons following repeated
methamphetamine treatment.:
Japan. J. Pharmacol., 82, suppl.I, 128P, 2000.
17. Akimitsu T., Kurisu K., Hanaya R., Iida K., Kiura Y., Arita K.,
Matsubayashi H., Ishihara K., Kitada K., Serikawa T., and Sasa
M.:
Epileptic seizure induced by N-acetyl-L-aspartate in rats: in
vivo and in vitro studies.:
Brain Research, 861, 143-150, 2000.
18. Teranishi Y., Tsuru H., Shimomura H., Amano T. and
Matsubayashi H.:
Compensatory vasoconstrictor effects of sodium pentobarbital

on the hindquarters of conscious normotensive control and lumbar-sympathectomized Wistar rats.:

Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical, 82, 130-136, 2000.

19. Yu H., Matsubayashi H., Amano T., Cai J.-Q., and Sasa M.:
Activation by nicotine of striatal neurons receiving excitatory input from the substantia nigra via dopamine release.:
Brain Research, 872, 223-226, 2000.
20. Matsubayashi H., Amano T., Cai J.Q., and Sasa M.:
Excitation of dopaminergic neurons in the substantia nigra by activation of the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor.:
The International Journal of Neuropsychopharmacology, vol3 suppl.1, S258, 2000.
21. Amano T., Matsubayashi H. and Sasa M.:
Analysis with patch clamp method of 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of medial vestibular nucleus neurons.:
Neuroscience Research 24 (1) suppl. 24, S80, 2000.
22. Matsubayashi H., Amano T., Kashio M., Inoue A., Nakata Y. and Sasa M.:
Excitation of rat nigral neurons by postsynaptic alpha4 and alpha7 type nicotinic receptors. :
Neuroscience Research 24 (1) suppl. 24, S35, 2000.
23. 花谷 亮典、飯田 幸治、秋光 知英、栗栖 薫、松林 弘明、石原 熊寿、芹川 忠夫、笹 征史：
GABA transaminase 阻害薬ピガバトリンの抗てんかん作用：SERを用いた検討：
臨床薬理：31 (1)、179-180、2000。

24. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
新規抗精神病薬 MS-377 による腹側被蓋野ドーパミンニューロンに
対する脱分極作用と Na チャネル抑制作用：
日本薬理学雑誌：115 (3)、46P, 2000.
25. 天野 託、松林 弘明、笹 征史：
メタアンフェタミン反復投与による腹側被蓋野ドーパミンニューロ
ンのドーパミンレセプターサブタイプ感受性亢進：スライスパッチ
クランプ法による研究：
日本アルコール・薬物医学会雑誌：35 (3)、182-183、2
000.
26. 笹 征史、松林 弘明、天野 託：
黒質線条体ドーパミン系におけるニコチン受容体の役割：
平成 11 年度喫煙科学研究財団研究年報、289-294、2000.
27. 蔡 際群、松林 弘明、秋光 知英、北田 一博、芹川 忠夫、笹 征
史：
Tremor ラット(tm/tm)における tm 因子による欠神様発作の解析：
日本薬理学雑誌：116 (4)、82P, 2000.
29. 松林 弘明：
最近の話題 抗ヒスタミン薬の K⁺チャネルブロック作用：
日本薬理学雑誌：116 (4)、247-249、2000.

(2) 学会発表

1. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
黒質ドーパミン神経細胞のニコチン性興奮に関するパッチクランプ
法を用いた研究：
第72回日本薬理学会年会：札幌：3/22-25, 1999.

2. 秋光 知英、飯田 幸治、花谷 亮典、石原 熊寿、松林 弘明、
芹川 忠夫、野田 篤、笹 征史、有田 和徳、栗栖 薫：
ノダてんかんラット(NER)の音刺激 priming によるけいれん発作への海馬の関与：
第72回日本薬理学会年会：札幌：3/22-25, 1999.
3. 天野 託、松林 弘明、ムハマドアクバル、笹 征史：
メタアンフェタミン反復投与における腹側被蓋野ドーパミンニューロンD2レセプターを介する過感受性パッチクランプ法を用いた研究一：
第72回日本薬理学会年会：札幌：3/22-25, 1999.
4. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
腹側被蓋野ドーパミンニューロンに対する新規抗精神病薬 MS-377の脱分極作用：
第95回日本薬理学会近畿部会：広島：6/18, 1999.
5. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
黒質ドーパミン神経細胞に対するニコチンの興奮作用：
第22回日本神経科学大会：大阪：7/6-7/8, 1999.
6. 笹 征史、松林 弘明：
黒質線条体ドーパミン系におけるニコチン受容体の役割：
第14回平成10年度助成研究発表会（喫煙科学財団）：東京：7/15, 1999.
7. 松林 弘明、笹 征史：
線条体におけるニコチンによるドーパミン遊離：in vivo およびパッチクランプ法による研究：
第3回活性アミンに関するワークショップ：福岡：8/27, 1999.

8. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
黒質ドーパミンニューロンに対するニコチンの後シナプス性興奮作用：
第29回日本神経精神薬理学会年会：広島：9/14-9/15, 1999.
9. 天野 託、松林 弘明、笹 征史：
前庭神経内側核ニューロンに対する 5-HT_{1A} アゴニスト、タンドスピロンの作用：スライスパッチクランプによる研究：
第58回日本平衡神経科学会総会：横浜：11/25-26, 1999.
10. 松林 弘明、天野 託、笹 征史：
新規抗精神病薬 MS-377 による腹側被蓋野ドーパミンニューロンの脱分極作用と Na チャネル抑制作用：
第96回日本薬理学会近畿部会：京都：11/5, 1999.
11. 花谷 亮典、飯田 幸治、秋光 知英、栗栖 薫、松林 弘明、石原 熊寿、芹川 忠夫、笹 征史：
GABA transaminase 阻害薬ピガバトリンの抗てんかん作用：SERを用いた検討：
第20回日本臨床薬理学会：パシフィコ横浜：12/3-4, 1999.
12. 笹 征史、松林 弘明、ムハマドアクバル、花谷 亮典、秋光 知英、栗栖 薫：
新しい抗てんかん薬の薬物動態-vigabatrin による体内 GABA レベルの変動と抗てんかん作用メカニズム：
平成 11 年度厚生省精神・神経疾患研究委託費 新技術を用いたてんかん等の診断法と治療法の開発 研究報告会：東京： 12/13-14, 1999.
13. 松林 弘明、笹 征史：
黒質ドーパミン細胞に対するニコチンの興奮作用；パッチクランプによる研究：

第27回広島ホルモン・トランスミッター研究会：広島：1/18, 2000.

14. 天野 宏子、松林 弘明、天野 託、石原 熊寿、笹 征史：
自然発症てんかんラット海馬 CA3 における細胞内カルシウム濃度の
増強：
第73回日本薬理学会年会：横浜：3/22-25, 2000.
15. 松林 弘明、天野 託、蔡 際群、笹 征史：
黒質神経細胞におけるシナプス後性ニコチン性 alpha4 および alpha7
受容体を介する興奮作用：
第73回日本薬理学会年会：横浜：3/22-25, 2000.
16. 天野 託、松林 弘明、ムハマドアクバル、蔡 際群、笹 征史：
メタアンフェタミン反復投与における腹側被蓋野ドーパミンニュー
ロンの D1 レセプターの過感受性：
第73回日本薬理学会年会：横浜：3/22-25, 2000.
17. 蔡 際群、松林 弘明、秋光 知英、北田 一博、芹川 忠夫、笹 征
史：
Tremor ラット(tm/tm)における tm 因子による欠神様発作の解析：
第97回日本薬理学会近畿部会：大阪：6/16, 2000.
18. Sasa M., Matsubayashi H., Amano T. and Ishihara K.:
Dopamine release by nicotine in striate nucleus: Patch clamp
study with slice preparation.:
CINP regional meeting: Oporto, Portugal: March 30-April 1,
2000.
19. Matsubayashi H., Amano T., Cai J.Q., Sasa M.:
Excitation of dopaminergic neurons in the substantia nigra by
activation of the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor.:
XXIInd C.I.N.P. Congress: Brussels, Belgium: July 9-13, 2000.

20. 笹 征史、松林 弘明、天野 託：
黒質線条体ドーパミン系におけるニコチン受容体の役割：
第15回平成11年度助成研究発表会（喫煙科学研究財団）：東京：
7/13, 2000.
21. 天野 託、松林 弘明、笹 征史：
メタアンフェタミン連続投与による腹側被蓋野ドーパミンニューロンのドーパミンレセプターサブタイプ感受性亢進：スライスパッチクランプ法による研究：
第35回日本アルコール・薬物医学会総会：横浜：7/4-6, 2000.
22. 天野 託、松林 弘明、笹 征史：
5-HT_{1A} レセプターを介する前庭神経内側核ニューロンの抑制作用：
パッチクランプ法による解析：
第23回日本神経科学大会：パシフィコ横浜：9/4-6, 2000.
23. 松林 弘明、天野 託、加塩 麻紀子、井上 敦子、仲田 義啓、
笹 征史：
 $\alpha 4$ および $\alpha 7$ 型シナプス後性ニコチン受容体を介するラット黒質ドーパミン細胞の興奮作用：
第23回日本神経科学大会：パシフィコ横浜：9/4-6, 2000.
24. 岐浦 禎展、笹 征史、花谷 亮典、蔡 際群、松林 弘明、秋光 知英、
山本 恵子、芹川 忠夫、栗栖 薫：
Tremor rat ヘテロ型における欠神様発作の発現：
第34回日本てんかん学会：東京：9/21-22, 2000.
25. 天野 宏子、松林 弘明、天野 託、石原 熊寿、笹 征史：
自然発症てんかんラット(SER)海馬 CA3 野ニューロンへの Ca^{2+} 流入の増大：
第34回日本てんかん学会：東京：9/21-22, 2000.

研究成果

まず、黒質-線条体ドパミン系におけるニコチン受容体の役割を明らかにするため、抱水クロラル麻酔ラットを用い、電気生理学的研究を行った。7 極微小ガラス管に張り合わせたガラス管微小電極を用い、線条体のニューロン活動を記録し、黒質緻密部の単一刺激に反応するニューロンについて検討した。7 極微小ガラス管にはニコチン、キンピロール (D2 アゴニスト)、ドンペリドン (D2 アンタゴニスト)、グルタミン酸等を充填し、これらを記録ニューロン近傍に微小電気泳動法により投与した。黒質刺激によるスパイクがドンペリドンによって抑制されるニューロンにおいて、ニコチンはこのスパイクには影響せず、自発発火を亢進した。ヘキサメトニウムはニコチンによる発火亢進を抑5 制した。同一ニューロンにおいてキンピロールによっても自発発火の亢進が認められた。ニコチンあるいはキンピロールによる発火亢進はドンペリドンの同時投与によって遮断された。これらの成績からニコチンは黒質由来のドパミン神経終末に作用してドパミンの遊離を亢進させ、D2 レセプターを介するニューロンの発火亢進を起こすと考えられる。(Brain Res., 872, 223-226, 2000)

次に、生体位におけるニコチンの興奮作用のメカニズムをさらに明らかにするための研究を行った。すなわち、線条体においては大型ニューロンが伝達物質としてアセチルコリンを含有し、線条体からの出力系ニューロンを興奮させるため、パーキンソン病において重要な役割を担うと考えられている。この大型ニューロンに対するニコチンの作用を明らかにするため、ラット線条体スライス標本を用いたパッチクランプ法による研究を行った。顕微鏡下でスライス標本における線条体ニューロンに対してホールセルパッチクランプを行い、電流固定下においてニコチン投与時の膜電位変化を測定した。さらに急性単離線条体ニューロンをホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位を固定し、U-tube 法によりニコチンにより惹起される電流を記録した。その結果、ニコチンは大型線条体ニューロンの静止膜電位を変化させることなくミニアチュアシナプス後電位とそれに伴うスパイクの増加を示した。ニコチンのこの作用は、DH β E (ニコチン受容体ブロッカー) で抑制され、さらにドンペリドン (ドパミン D2 受容体ブロッカー) と GDEE (グルタミン酸受容体ブロッカー) で抑制された。これらのことはニコチンがニコチン受容体を介してドパミンおよびグ

ルタミン酸の遊離を亢進することを示唆している。急性単離線条体ニューロンを用いた電圧固定式パッチクランプ法において、1個の大型ニューロンにニコチン性電流を確認したが、検討した27個の中型および大型ニューロンにはニコチン性電流を観察できなかった。このことは、線条体ニューロンにおいてシナプス後性ニコチン受容体が存在しないか、存在するとしてもごく少数であることを示唆している。以上より、ニコチンは線条体大型ニューロンに対するグルタミン酸性およびドパミン性の興奮性神経伝達を亢進し、この結果このニューロンを興奮させると考えられる。これらの成果を第72回日本薬理学会年会、第3回活性アミンに関するワークショップで報告した。

さらに、線条体へのドパミンニューロンの起始核である黒質緻密部の変性脱落がパーキンソン病を惹起するとされており、この部位のドパミン神経は錐体外路系において重要な役割を担うと考えられる。そこで、黒質ドパミンニューロンに対するニコチンの作用を明らかにするため、ラット黒質スライス標本を用いたパッチクランプ法による研究を行った。ニコチンは、このニューロンに対して用量依存性に膜電位を脱分極させ、それに伴い発火頻度を増加した。このニコチンによる脱分極性興奮作用は、通常の灌流液より Ca^{2+} を Mg^{2+} で置き換えた低 Ca^{2+} 灌流液下においても観察された。スライス標本では膜電位固定法により $\alpha 4$ 型ニコチン受容体を確認したが、黒質急性単離標本を用いた研究により $\alpha 4$ に加えて $\alpha 7$ 型ニコチン受容体も観察された。以上より、ニコチンは後シナプス性に黒質ドパミンニューロンを興奮させて、この結果線条体でのドパミン遊離を亢進すると考えられる。これらの成果を第73回日本薬理学会年会、第23回日本神経科学会および第29回日本神経精神薬理学会総会で報告した。

以上の結果より、ニコチンは黒質ドパミン細胞を興奮させ、かつその神経終末に作用してドパミンの遊離を促進すると結論できる。ニコチンのパーキンソン病治療効果は、おそらく線条体における神経終末からのドパミン遊離亢進作用と、黒質ドパミンニューロンに対する興奮作用がその機序の一部に関与すると考えられる。