

氏名	くにさわ なおふみ 國澤 直史
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第33号
学位授与の日付	平成30年3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Nicotine 誘発振戦の発現メカニズム解析
論文審査委員	(主査) 教授 松村 靖夫 (副査) 教授 大野 行弘 (副査) 准教授 大喜多 守

論文内容の要旨

Nicotine は nicotine 性アセチルコリン (nACh) 受容体を介して、抗パーキンソン病作用、認知機能促進作用、抗うつ作用、運動興奮作用、依存形成作用など様々な薬理作用を示す。このうち、nicotine による運動興奮症状としては、運動亢進、振戦、けいれん発作などが誘発されるが、その発現メカニズムは未だ不明である。一方、nACh 受容体は 9 つの α サブユニット ($\alpha 2 \sim \alpha 10$) と 3 つの β サブユニット ($\beta 2 \sim \beta 4$) から構成されるホモまたはヘテロ 5 量体の陽イオンチャンネル内蔵型受容体であり、特に脳内では、 $\alpha 7$ サブユニットのホモ 5 量体である $\alpha 7$ nACh 受容体と、 $\alpha 4$ および $\beta 2$ サブユニットのヘテロ 5 量体からなる $\alpha 4\beta 2$ nACh 受容体が豊富に存在し、重要な役割を担っている。本研究では、nicotine による運動興奮症状のうち、振戦に着目し、その発現メカニズムを行動薬理的、免疫組織学的に解析した。

動物に nicotine (0.5~2 mg/kg) を腹腔内投与した結果、用量依存的に振戦行動が誘発された。また、ラットに nicotine (1 mg/kg, i.p.) を 14 日間連日投与した結果、nicotine 誘発振戦は次第に増強し、nicotine に対する感受性の亢進が認められた。次いで、nicotine 誘発振戦に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価した。その結果、非選択的 nACh 受容体拮抗薬 mecamylamine (MEC) および $\alpha 7$ nACh 受容体拮抗薬 methyllycaconitine (MLA) は nicotine 誘発振戦を有意に抑制した。一方、 $\alpha 4\beta 2$ nACh 受容体拮抗薬 dihydro- β -erythroidine

(DH β E)、末梢性 α 3 β 4 nACh 受容体拮抗薬 hexamethonium およびムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬 scopolamine は、nicotine 誘発振戦に影響を及ぼさなかった。

さらに、nicotine 誘発振戦の発現に関わる脳内部位を同定する目的で、神経興奮マーカーである Fos タンパク質の免疫組織染色を行った。Nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 2 時間後に摘出した脳を用いて Fos 陽性細胞数を計測した結果、梨状葉皮質、内側手綱核、孤束核、下オリーブ核において、nicotine による Fos 発現の上昇が認められた。これら 4 部位のうち、梨状葉皮質と下オリーブ核の nicotine による Fos 発現上昇は、振戦行動と同様に、MEC および MLA により有意に抑制されたが、DH β E による影響を受けなかった。さらに、ラットを用いた脳部位の電気破壊実験を行った。その結果、下オリーブ核を電気破壊した動物では、nicotine 誘発振戦が有意に抑制されたが、梨状葉皮質の電気破壊による nicotine 誘発振戦への影響は認められなかった。以上より、nicotine 誘発振戦の発現には、 α 7 nACh 受容体を介した下オリーブ核の過剰興奮が関与していることが明らかとなった。下オリーブ核は本態性振戦の発現に関与していることが報告されている脳部位であり、nicotine 誘発振戦の発現メカニズムが本態性振戦と一部共通していることが示唆された。

一方、nACh 受容体は前シナプス性の作用として、セロトニン (5-HT) やドパミンなど神経伝達物質の遊離を促進することが知られている。また、MAO 阻害薬である harmaline が脳内 5-HT 量を増加させ、ヒトの本態性振戦に類似する振戦行動を誘発することが報告されている。そこで次に、5-HT 神経系の nicotine 振戦調節機構を明らかにする目的で、nicotine 振戦に対する 5-HT 受容体関連薬の影響について検討を加えた。Nicotine (1 mg/kg, i.p.) 投与 15 分前に 5-HT_{1A} 受容体作動薬 8-hydroxydipropylaminotetraline (8-OH-DPAT) を処置した結果、nicotine 誘発振戦の振戦強度が有意に増強した。この 8-OH-DPAT による nicotine 誘発振戦増強作用は、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬 WAY-100135 により拮抗された。さらに、nicotine 誘発振戦に関与する 5-HT_{1A} 受容体が 5-HT 神経シナプス前終末あるいはシナプス後膜のどちらに存在するのかを明らかにする目的で、トリプトファン水酸化酵素阻害薬 *p*-chlorophenylalanine (PCPA) と 8-OH-DPAT の併用実験を行った。その結果、8-OH-DPAT による nicotine 誘発振戦増強作用は、PCPA によって 5-HT 神経を不活化させた動物においても顕著であった。一方、5-HT₂ 受容体作動薬 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine は nicotine 誘発振戦を有意に抑制し、この振戦抑制作用は 5-HT₂ 受容体拮抗薬 ritanserin により拮抗された。しかし、5-HT₃ 受容体作動薬 SR-57227 は nicotine 誘発振戦に対し、作用を示さなかった。また、nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬単独投与の影響を評価した結果、nicotine 誘発振戦は WAY-100135 によって有意に抑制されたが、ritanserin、5-HT₃ 受容体拮抗薬 ondansetron、5-HT₆ 受容体拮抗薬 SB-258585 は nicotine 誘発振戦に影響を及ぼさな

った。以上より、nicotine 誘発振戦の発現には、シナプス後膜に存在する 5-HT_{1A} 受容体の一部関与しており、また、5-HT₂ 受容体が振戦発現を抑制的に調節していることが示唆された。

以上、本研究により nACh 受容体を介する振戦発現のメカニズムが明らかとなり、 $\alpha 7$ nACh 受容体の活性化による下オリーブ核ニューロンの過剰興奮が振戦を引き起こすことが示された。また、nicotine 誘発振戦の発現には 5-HT 神経系が重要な役割を果たしており、 $\alpha 7$ nACh 受容体の活性化による 5-HT 遊離と 5-HT_{1A} 受容体の活性化が一部振戦発現に関与していることが示唆された。さらに、nicotine 誘発振戦と本態性振戦の発現メカニズムが類似していることから、今後、nACh 受容体や 5-HT 受容体を標的とした新たな振戦治療薬の開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

Nicotine は nicotine 性アセチルコリン (nACh) 受容体を介して、抗パーキンソン病作用、認知機能促進作用、抗うつ作用、運動興奮作用、依存形成作用など様々な薬理作用を示す。このうち、nicotine による運動興奮症状としては運動亢進、振戦、けいれん発作などの異常行動が誘発されるが、その発現メカニズムは未だ不明である。一方、神経系に分布する nACh 受容体は、9つの α サブユニット ($\alpha 2 \sim \alpha 10$) と 3つの β サブユニット ($\beta 2 \sim \beta 4$) から構成されるホモまたはヘテロ 5 量体の陽イオンチャネル内蔵型受容体であり、特に脳内では、 $\alpha 7$ サブユニットのホモ 5 量体である $\alpha 7$ nACh 受容体と、 $\alpha 4$ および $\beta 2$ サブユニットのヘテロ 5 量体からなる $\alpha 4\beta 2$ nACh 受容体が豊富に存在し、重要な役割を担っている。今回、学位審査申請者の國澤直史君は、nicotine による運動興奮症状の振戦発現に着目し、その発現メカニズムを解明するため行動薬理的、免疫組織化学的研究を行った。

実験にはマウスおよびラットを用い、nicotine を腹腔内投与した際の振戦発現を評価した。その結果、0.5~2 mg/kg の nicotine は用量依存的に動作時振戦を誘発した。また、ラットに nicotine (1 mg/kg, i.p.) を 14 日間連日投与した結果、nicotine 誘発振戦は次第に増強し、nicotine に対する感受性の亢進が認められた。次いで、nicotine 誘発振戦に対する各種 nACh 受容体拮抗薬の影響を評価した結果、nicotine 誘発振戦は非選択的 nACh 受容体拮抗薬 mecamylamine (MEC) および $\alpha 7$ nACh 受容体拮抗薬 methyllycaconitine (MLA) により有意に抑制された。一方、選択的な $\alpha 4\beta 2$ nACh 受容体拮抗薬である dihydro- β -erythroidine (DH β E) あるいは末梢性 $\alpha 3\beta 4$ nACh 受容体拮抗薬 hexamethonium やムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬 scopolamine は、nicotine 誘発振戦に影響を及ぼさなかった。

また、nicotine 誘発振戦の発現に関わる脳内部位を同定する目的で、免疫組織化学的手法を用い、神経興奮のバイオマーカーである Fos タンパク質の発現解析を行った。その結果、振戦誘発用量の nicotine (1 mg/kg, i.p.) は、梨状葉皮質、内側手綱核、孤束核、下オリーブ核において Fos 発現を部位特異的に上昇した。これら 4 部位のうち、梨状葉皮質と下オリーブ核の Fos 発現上昇は、nicotine 誘発振戦の反応性と同様に、MEC および MLA により抑制され、DH β E によって影響を受けなかった。さらに、ラットを用いて脳局所の電気破壊実験を行った結果、下オリーブ核を電気破壊した動物では nicotine 誘発振戦が抑制されたが、梨状葉皮質の電気破壊は nicotine 誘発振戦に影響を及ぼさないことが明らか

となった。以上の結果は、 $\alpha 7$ nACh 受容体を介した下オリブ核の過剰興奮が nicotine 誘発振戦の発現に関与していることを示すものであり、nicotine 誘発振戦の発症メカニズムが本態性振戦の発症メカニズムに類似することが示唆された。

さらに、 $\alpha 7$ nACh 受容体を介する nicotine 誘発振戦の発現メカニズムに、セロトニン (5-HT) 神経系が関与するか否かを明らかにする目的で、nicotine 誘発振戦に対する各種 5-HT 受容体作用薬の影響についても検討した。その結果、選択的な 5-HT_{1A} 受容体作動薬の 8-hydroxydipropylaminotetraline (8-OH-DPAT) が nicotine 誘発振戦を有意に増強すること、5-HT₂ 受容体作動薬の 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) が nicotine 振戦を有意に抑制すること、8-OH-DPAT および DOI の作用がそれぞれ選択的な 5-HT_{1A} および 5-HT₂ 受容体遮断薬で拮抗されること、一方、5-HT₃ 受容体作動薬の SR-57227 は nicotine 誘発振戦に何ら影響を及ぼさないことを明らかにした。さらに、nicotine 誘発振戦に対する 5-HT_{1A} 受容体の増強作用が前シナプス性の 5-HT_{1A} 自己受容体を介するものか、あるいは後シナプス性 5-HT_{1A} 受容体を介するかを検討するため、トリプトファン水酸化酵素阻害薬 *p*-chlorophenylalanine (PCPA) 処置による 5-HT 神経の不活化実験を行った。その結果、8-OH-DPAT による nicotine 振戦増強作用は、PCPA による 5-HT 神経の不活化により減弱されず、8-OH-DPAT の作用がシナプス後膜に分布する 5-HT_{1A} 受容体を介する反応であることが示された。最後に、nicotine 誘発振戦に対する 5-HT 受容体拮抗薬の単独作用を評価し、nicotine 振戦が 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬の WAY-100135 によって特異的に抑制されることを明らかにした。この結果は、nicotine 振戦の発現に、内因性 5-HT による 5-HT_{1A} 受容体の活性化が関与することを示唆する。

以上、学位審査申請者である國澤直史君による研究は、nicotine 摂取時の異常行動である振戦発現の薬理学的特性とその発現メカニズムを詳細に検討したものであり、nicotine による $\alpha 7$ nACh 受容体の活性化を介した下オリブ神経核ニューロンの興奮が振戦を引き起こすことを明らかにした。また、その振戦発現メカニズムには 5-HT 神経系が一部関与しており、 $\alpha 7$ nACh 受容体による 5-HT 遊離と 5-HT_{1A} 受容体の活性化が振戦発現に寄与していることを明らかにした。さらに、nicotine 振戦の発現メカニズムが本態性振戦の発症メカニズムに類似することを示した。本研究成績は、nicotine 摂取時の振戦発現のメカニズムを理解するうえで極めて重要であるとともに、今後、nACh 受容体や 5-HT 受容体に作用する薬物が新たな振戦治療薬になりうることを示唆しており、将来的な創薬研究にも繋がる成果として高く評価される。

以上より、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。