

摂取行動を制御する大脳基底核オピオイド性神経伝達メカニズムの解明

乾 賢

大阪大学大学院人間科学研究科行動生態学講座行動生理学研究分野 助教

緒 言

大脳基底核は主に線条体と淡蒼球によって構成される神経系である。大脳基底核の腹側部に位置する側坐核と腹側淡蒼球が、嗜好性の高い食物や味溶液の摂取に重要な役割を果たしている¹⁾。腹側淡蒼球には-アミノ酪酸(GABA)が豊富に存在し、高嗜好性溶液の摂取²⁾や経験による摂取行動の変化³⁾に関与する。

腹側淡蒼球に多くみられるもう一つの神経伝達物質として、オピオイドがある。オピオイドが摂取行動に関与していることを示唆する知見が、少数ながらも最近になって報告されている⁴⁾。しかし、そのメカニズムの詳細はいまだ不明である。また、腹側淡蒼球で β -エンドルフィンを出発するニューロンはどの脳部位から投射しているのか、という解剖学的知見が報告されていない。そこで本研究では、動物が摂取行動を表出する際に、腹側淡蒼球において β -エンドルフィンが機能するかどうかを検証し、その β -エンドルフィンが腹側淡蒼球においてどのように分布しているかを調べることを目的とした。研究開始当初はマイクロダイアリシス法(脳内微小透析法)とELISA法(酵素免疫測定法)を用いて腹側淡蒼球の β -エンドルフィン量を測定することを試みた。しかし、マイクロダイアリシス法で回収されるエンドルフィン量が非常に少なく、ELISA法による検出が困難であることが判明した。そこで代替実験として、先行研究⁵⁾で摂取行動に関与することを明らかにしたGABAの動態にオピオイドがどのように関与しているかを調べることを目的とした。これは腹側淡蒼球に投射するGABA作動性ニューロンの神経終末に μ -オピオイド受容体(β -エンドルフィンの受容体)が存在し、神経終末からのGABA放出を β -エンドルフィンが調節していることを示唆する報告⁶⁾があったためである。

方 法

実験1：腹側淡蒼球におけるGABAとオピオイドの相互作用が摂取行動に及ぼす影響

Wistar系雄性ラットを用いた。腹側淡蒼球へのガイドカニューレ(AG-12、エイコム)留置手術の後、蒸留水の摂取トレーニング(14時~16時)を5日間行った。その後、実験箱にて同様のトレーニングを2日間行ってから、サッカリン溶液(5mM)を摂取させるトレーニングを2日間行った。2日目の夕方に、透析プローブ(AI-12-015、エイコム)を挿入し、リンゲル液を $2\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で灌流した。翌日の10時からサンプル回収を開始した。20分間で1つのサンプルとし、18時までの8時間で24サンプルを集めた。実験群では12時から14時の間はDAMGO(μ -オピオイド受容体作動薬、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$)を灌流させた。対照群では12時から14時の間もリンゲル液を灌流させた。14時から16時の間はどちらの群にもサッカリン溶液を呈示し、トレーニングと同様に摂取量を20分毎に測定した。回収したサンプルは高速液体クロマトグラフィー(HTEC-500、エイコム)を用いてGABAを電気化学的に検出し、含有量を測定した。

実験2：腹側淡蒼球における β -エンドルフィンの分布

腹側淡蒼球を含む厚さ $50\mu\text{m}$ の脳切片を作製し、免疫組織化学的実験を行った。 β -エンドルフィンの分布を調べると同時に、 β -エンドルフィンが細胞のどこに局在しているかを調べるために、神経細胞核のマーカーであるNeuNあるいは神経終末のマーカーであるシナプトフィジンを検出し、蛍光2重染色法によって、 β -エンドルフィンがNeuNとシナプトフィジンのどちらと共発現するかを調べた。抗 β -エンドルフィン抗体(AB5028、Chemicon)、抗NeuN抗体(MAB377、Chemicon)、抗シナプトフィジン抗体(MAB5258、Chemicon)を用いた。共焦点レーザー顕微鏡(FV1000-D IX81、オリンパス)で観察・撮影を行った。

結 果

実験1

サンプル回収を行った日（テスト日）のサッカリン溶液の累積摂取量を図1に示す。溶液呈示開始から40分後まではDAMGOを灌流した群（DAMGO群）とリンゲル液を灌流した群（Ringer群）の間に差はみられなかった。しかし、40分後以降はDAMGO群のみ増加し続けた。群（DAMGO、Ringer）と時間を要因とした二元配置の分散分析を行ったところ、交互作用が有意であり（ $F[5,55] = 27.22, p < 0.001$ ）、多重比較によって40分後以降において群間で有意差があることがわかった。

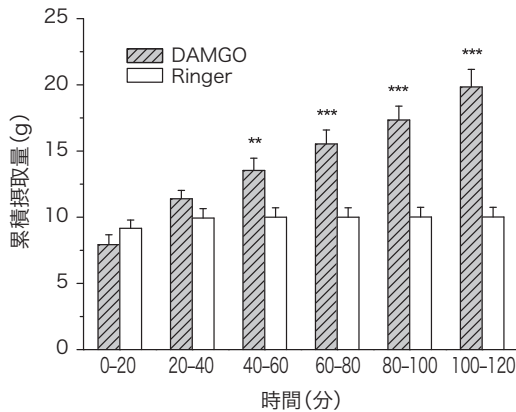


図1

サッカリン溶液の摂取量を示す。図中のエラーバーは標準誤差を表す。*はRinger群と比較して有意差があることを示す（** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ ）。

細胞外GABA遊離レベルを図2に示す。最初の6のサンプルの平均値をbaselineとし、その相対値としてデータを示した。DAMGOの灌流中にGABAレベルが低下した。群（DAMGO、Ringer）、セッション（baseline、DAMGO or Ringer、サッカリン溶液呈示、溶液呈示後）、サンプル（各セッションの1～6）を要因とした三元配置の分散分析を行ったところ、群×セッション×サンプルの交互作用が有意であった（ $F[15,165] = 2.21, p < 0.01$ ）ため、多重比較を行った。その結果、DAMGOあるいはRingerを灌流したセッションの2番目と6番目（サンプル8と12）において、群間に有意差がみられた。

実験2

β -エンドルフィンとNeuNの分布と二重蛍光画像を図3に示す。二重蛍光画像より、 β -エンドルフィンとNeuNの発現部位が重なっている様子が観察された。

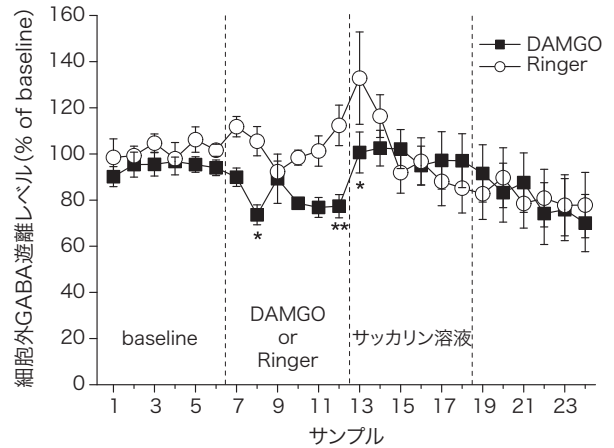


図2

細胞外GABA遊離レベルの変動を示す。最初の6つのサンプルをbaseline(100%)として、相対値としてデータを表した。エラーバーは標準誤差を表す。*はRinger群と比較して有意差があることを示す（* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ ）。

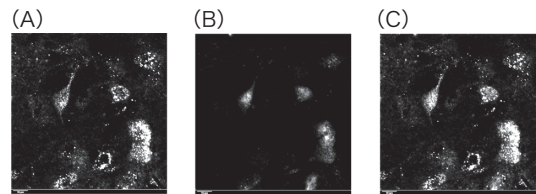


図3

腹側淡蒼球における β -エンドルフィン (A) とNeuN (B) の発現。(C)は(A)と(B)の二重蛍光画像である。黄色の線は10 μ mのスケールバーである。

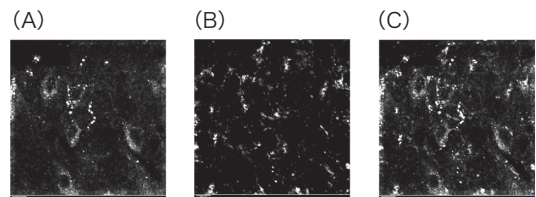


図4

腹側淡蒼球における β -エンドルフィン (A) とシナプトフィジン (B) の発現。(C)は(A)と(B)の二重蛍光画像である。黄色の線は10 μ mのスケールバーである。

図3 (C) において β -エンドルフィンが神経核の周囲の細胞体に発現している様子が観察できた。

β -エンドルフィンとシナプトフィジンの分布と二重蛍光画像を図4に示す。二重蛍光画像より、 β -エンドルフィンとシナプトフィジンの発現部位は重ならないことが分かった。

図4 (C) において、シナプトフィジンが β -エンドル

フィンを取り囲むように発現している様子が観察された。

考 察

図2のグラフにおいて、GABA レベルが低下していたのは、DAMGO を灌流させていた期間だけであった。また、GABA レベルは DAMGO 灌流期間の最後（サンプル 12）で最も低くなっていた。DAMGO が腹側淡蒼球内で作用するためには、半透膜を通過しなければならない。したがって、DAMGO が拡散するには時間を要すると考えられる。したがって、図2で示した GABA レベルの変動に DAMGO の灌流が何からの影響を及ぼしたと示唆される。

サッカリン溶液の摂取量は DAMGO 群の方が有意に多いという結果になった。DAMGO によってサッカリン溶液の摂取量が増加するという傾向は、局所微量注入法を用いた先行研究²⁾と一致する。また、GABA_A 受容体の阻害剤であるピククリンを腹側淡蒼球に局所微量注入することで、サッカリン溶液の摂取量が増加することも報告されている²⁾。本研究の結果はそれと一致するものである。しかし、摂取量が増加していったのは DAMGO の灌流が終了してから 40 分以上が経過してからであり、GABA レベルの低下がみられなくなった時間帯である。したがって、サッカリン溶液の摂取量増加と DAMGO の灌流の関連性については慎重に検討する必要がある。本研究の結果の原因として考えられるのは、灌流した DAMGO が腹側淡蒼球内に残留し、それがマイクロダイアリシス法では検知できない程度に GABA の放出量を低下させることで摂取行動が促進されたという仕組みである。また、先行研究²⁾では DMAGO 注入から 1 時間以上が経過してからサッカリン溶液の摂取量が増加した。したがって、DAMGO による摂取量の増加は GABA レベルの低下という現象を経てから生じるのかもしれない。

蛍光二重染色では、NeuN の分布と β -エンドルフィン の分布が重なった。NeuN は神経細胞核のマーカーであるが、免疫組織化学的手法では核の周囲の細胞体の領域も染色されるといわれている。図3(C)をみると、細胞の中心部分、すなわち核が存在すると予想される部分では二重染色はみられなかった。したがって、核の周囲の細胞体の部分に β -エンドルフィンが存在することが示唆された。一方、シナプトフィジンと β -エンドルフィンが共存している部分は図4(C)ではほとんどみ

られなかった。このことから、 β -エンドルフィン は神経終末には局在しないことが分かった。以上のことから、腹側淡蒼球で機能する β -エンドルフィン は、他の脳部位から投射するニューロンによって運ばれるのではなく、腹側淡蒼球のニューロンによって産生されることが示唆された。したがって、細胞体に接続する神経終末との間に形成するシナプス間隙に、細胞体から β -エンドルフィンが放出され、それが神経終末の μ -オピオイド受容体に作用して GABA 放出量を低下させるという仕組みを予想することができる。今後は、細胞体からの β -エンドルフィン放出が実際に起こっているのかどうかを検討していく必要がある。

要 約

摂取行動への関与が示唆されている腹側淡蒼球のオピオイド系と GABA 系の関連について調べた。また、腹側淡蒼球におけるオピオイド (β -エンドルフィン) の分布を調べた。 β -エンドルフィンの受容体である μ -オピオイド受容体の作動薬 (DAMGO) を腹側淡蒼球に投与すると、神経終末からの GABA 放出量が減少することがわかった。このような GABA 放出量の現象を引き起こす β -エンドルフィン は腹側淡蒼球のニューロンで産生されることが明らかとなった。腹側淡蒼球ニューロンで産生された β -エンドルフィンが何らかの刺激によって細胞外へ放出され、神経終末の末端にある μ -オピオイド受容体に結合することで神経終末からの GABA 放出量が減少し、それによって摂取行動が調節されることが示唆される。

謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団平成 23 年度学術研究奨励金の援助によって行われました。関係者の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) T. Inui, et al, : *Neuroscience*, 177, 66-73, 2011
- 2) T. Shimura, et al, : *Eur. J. Neurosci.*, 23, 1596-1604, 2006
- 3) T. Inui, et al, : *Brain Res.*, 1164, 117-124, 2007
- 4) K. S. Smith, & K. C. Berridge, : *J. Neurosci.*, 25, 8637-8649, 2005
- 5) T. Inui, et al, : *Eur. J. Neurosci.*, 30, 110-115, 2009
- 6) M. F. Olive, et al, : *J. Neurosci.*, 17, 7471-7479, 1997