

## ニコチンと脳内ドーパ機能相関

五嶋 良郎\*

### はじめに

ドーパは専らドパミンの前駆体としてのみ位置づけられ、それ自体は不活性であると考えられてきた。中枢カテコールアミンの遊離制御機構を検討する過程において、電場ないしニコチン刺激が脳内ドーパを遊離することを見出した。従来までに *in vitro* および *in vivo* の実験系において神経刺激による遊離、ドーパ自体による作用、拮抗薬による遮断等を証明し、ドーパが神経伝達物質であるとの仮説を提起してきた<sup>1)</sup>。しかし、ドーパ受容体は未同定である。ここ 10 年にわたるニコチンと脳内ドーパ相関を中心に研究成果をまとめ今後の課題をさぐりたい。

### 生体内ドーパ遊離の性質

ドーパは *in vitro* のラット脳スライス標本において神経興奮により細胞外  $Ca^{2+}$  に依存して遊離される。一方、*in vivo* 脳微量透析法を用いると内因性ドーパの基礎遊離は細胞外  $Ca^{2+}$  に依存し、電位依存性  $Na^+$  チャネル部ブロッカーであるテトロドトキシンにより阻害されることから、生理学的な刺激により起ると考えられる<sup>1)</sup>。このような条件下に、線条体における微量透析法による遊離の定量を行うと、おどろくべきことに、ニコチン性受容体拮抗薬のメカミラミンの単独投与

はドパミン遊離には無作用、一方ドーパ遊離を抑制した。この事実は、ドーパ遊離がドパミン遊離に比べ優位のニコチン性制御を受けていることを示唆する<sup>2)</sup>。

側坐核におけるドパミン遊離は、ニコチンをはじめ、様々な嗜癖を惹起する薬物により増加することが知られている。ニコチンは側坐核においてもドーパ遊離を引き起こすのであろうか？ そしてもしそうなら、ドーパ遊離の意義は何か？ 私たちは、ストレス応答と嗜癖を引き起こす薬物の効果比較からこの課題を検討することとした。

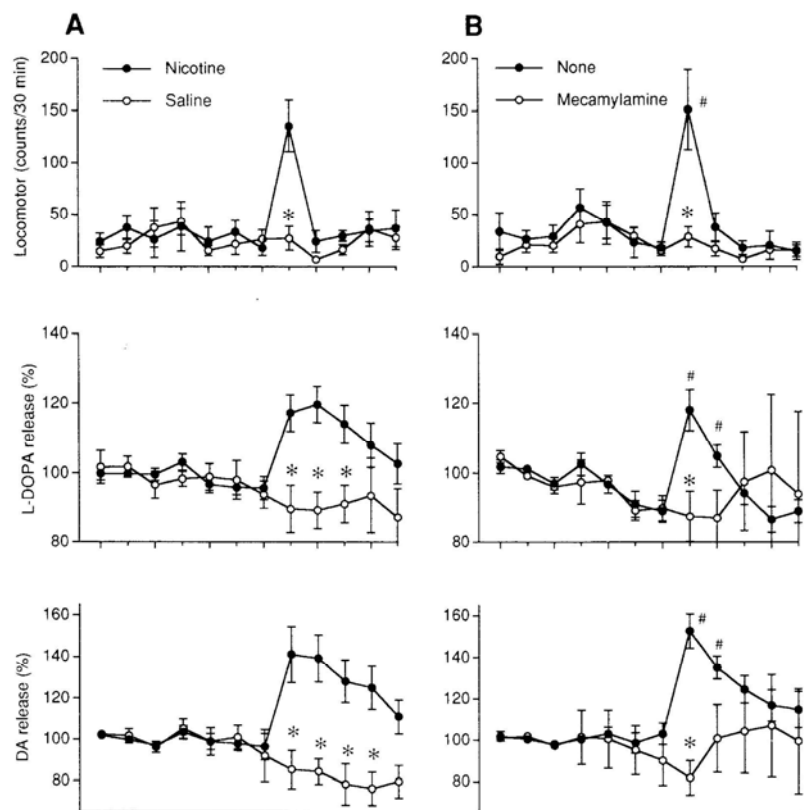


図-1 ニコチン皮下注射 (A) と腹側被蓋 (VTA) へのニコチン微量注入 (B) の無麻酔・無拘束ラット側坐核におけるドーパ・ドパミン遊離作用<sup>3)</sup>

\* 横浜市立大学医学部

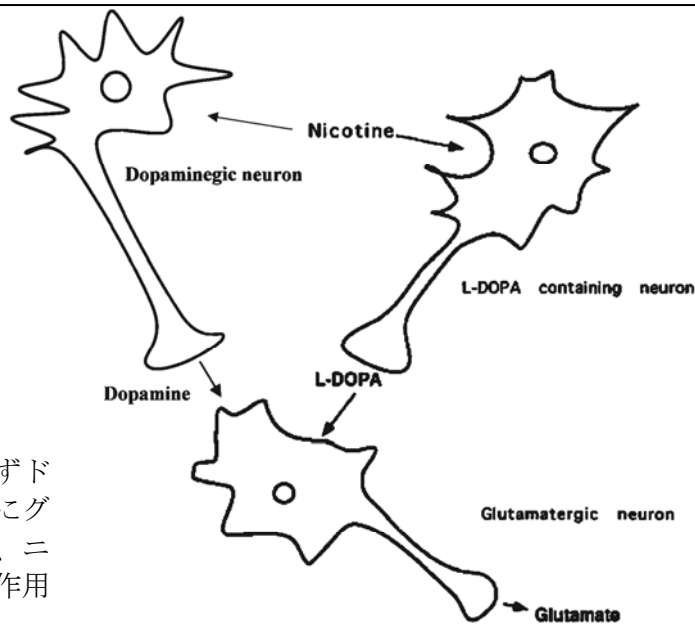


図-2 ニコチンドーパ相関

ニコチンはドーパミンのみならずドーパを遊離する。ドーパがさらにグルタミン酸遊離を惹起するなど、ニコチン作用の理解にはドーパの作用解明が必須であると考えられる。

### 腹側被蓋野ニコチン性受容体が側坐核ドーパ遊離を制御する

ニコチンの作用部位を検討するため、ニコチンの皮下投与と腹側被蓋野への微量注入の側坐核ドーパおよびドーパミン遊離に及ぼす効果を比較・検討した(図-1)。ニコチンの皮下注射(1 mg/kg)は、自発運動能の増加とともに、側坐核ドーパおよびドーパミン遊離を増加した。腹側被蓋野に微量注入したニコチン(30 μg)は皮下注射(1 mg/kg)にほぼ匹敵する効果を示した。またこの効果は同部位にメカミラミン(100 μg)微量注入することにより拮抗された。この結果は、腹側被蓋野に局在するニコチン性受容体刺激が側坐核ドーパの遊離を促進することを示す<sup>3)</sup>。

### ストレス誘発性ドーパ遊離とニコチン性受容体

次にラットにストレス刺激を加え、側坐核ドーパおよびドーパミン遊離に及ぼす効果を比較・検討した。金属のグリッドを床に敷いたケージにラッ

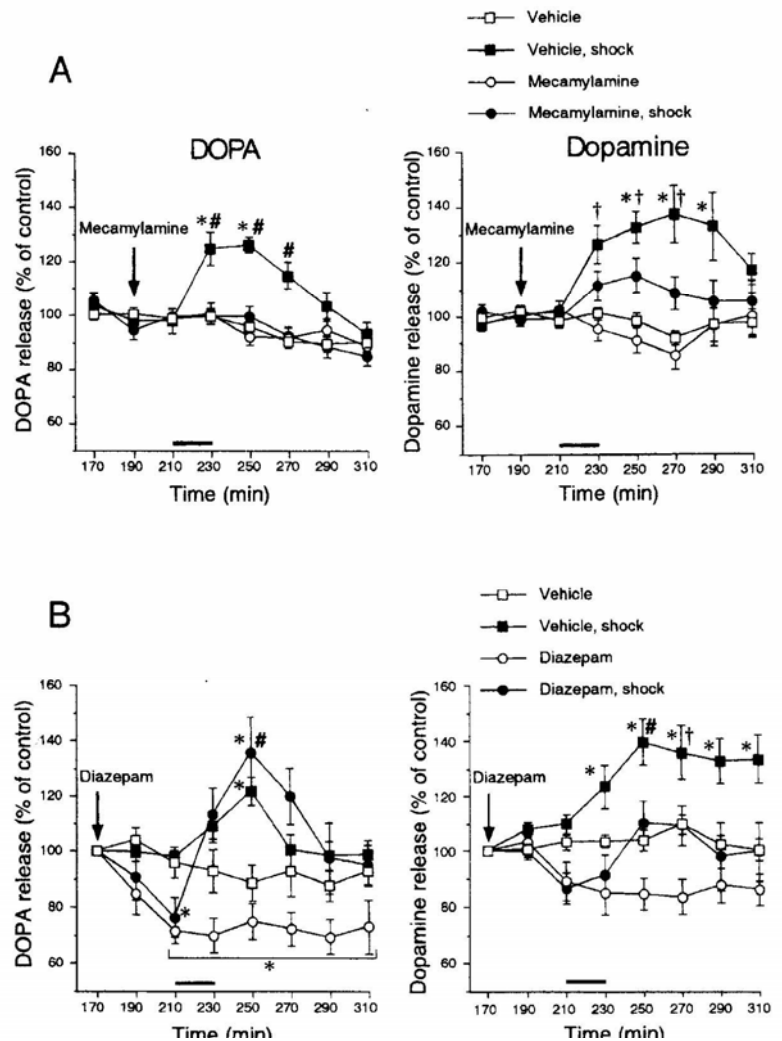


図-3 ストレスによる側坐核からのドーパおよびドーパミン遊離とそれらに対するメカミラミン (A) およびジアゼパム (B) の抑制作用<sup>4)</sup>

トを入れ、そこに通電してストレスを加える電撃ストレス刺激は、通電量をコントロールすることによりその程度を調節することが可能である。電撃刺激 (0.4 mA) を加えると、ラットは jumping (跳ぶ)、running (走る)、vocalization (鳴く)、crouching (うずくまる)、flinching (しりごみする)、rearing (立ち上がる) など様々な行動変化を惹起する。Rearing は電撃刺激後の方がむしろ刺激中より頻繁に観察された。同一強度の電撃刺激は側坐核からのドーパおよびドパミン遊離を増加した (図-3)<sup>4)</sup>。メカミラミンはドーパ遊離をほぼ完全に、ドパミン遊離を部分的に抑制する。一方メカミラミンは電撃刺激による行動変化に対して無作用であった。抗不安薬であるジアゼパムは電撃刺激によるドパミン遊離を抑制する一方、ドーパ遊離に対して抑制効果はほとんど認められなかった。ストレスによるドーパ遊離の生理学的意義は现阶段では不明であるが、ストレス応答としての側坐核ドーパおよびドパミン遊離の性格は異なっており、この結果は、この2つの生体内活性物質の異なる役割を示唆する。メカミラミンの電撃刺激による行動変化に対する作用は、少なくとも観察しえた限りにおいて確認できなかった。ジアゼパムは電撃刺激による行動変化のうち、sniffing (鼻をくくんさせる)、grooming (けづくろいをする) などの程度を減弱した。これらは従来ドパミン作動薬によって惹起される行動であり、ジアゼパムのこの効果は側坐核ドパミン遊離抑制効果にもとづく可能性が考えられる。

#### ドーパ拮抗薬 DOPA cyclohexyl ester

ドーパの生理学的な役割を検討するためには安定かつ強力なドーパ拮抗薬が必須である。我々は視床下部からの電場刺激によるノルアドレナリン遊離に対するドーパの促進効果を指標として、ドーパ競合的拮抗薬、ドーパメチルエステル (DOPA ME) を見出した<sup>5)</sup>。しかし、DOPA ME は生体内においてすみやかにドーパへ変換するドーパプロドラッグとして開発された経緯があり、我々もこの化合物が拮抗薬として *in*

*vivo* の実験には使用できないことを確認した。我々は、構造活性相関からドーパエステル体に候補を絞り、数種類のドーパエステル化合物の拮抗活性を比較・検討したところ、作用の持続時間およびドーパへの変換の程度において、DOPA cyclohexyl ester (DOPA CHE) が現在入手しうる最も安定かつ強力なドーパ拮抗薬であることを見出した<sup>6)</sup>。また DOPA CHE はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体リガンド [<sup>3</sup>H]AMPA、 [<sup>3</sup>H]kainate、 [<sup>3</sup>H]MK-801、 [<sup>3</sup>H]DCKA、 [<sup>3</sup>H]CGP 39653、あるいはドパミン D<sub>1</sub> および D<sub>2</sub> 受容体リガンド [<sup>3</sup>H]SCH2390、 [<sup>3</sup>H]spiperone などの特異的結合を阻害しない。この DOPA CHE を用いて以下に述べるように幾つかの重要な知見を得ることができた<sup>6)7)</sup>。

#### ドーパは脳虚血時グルタミン酸遊離の上流因子である

1993 年、ドーパ作用を検討する中、線条体切片灌流実験系において、ドーパが DOPA ME 感受性にグルタミン酸遊離を惹起することを見出した<sup>8)</sup>。脳虚血時に放出されるグルタミン酸は遅発性神経細胞死の重要因子である。このことから、我々は、ドーパが虚血時におけるグルタミン酸遊離→神経細胞死という経路のさらに上流に位置する因子であるか否かを、線条体 *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて検討した。この系で DOPA ME は全く効果を示さなかった。一方、DOPA CHE (30 nM、100 nM) は 10 分間の 4 血管閉塞による虚血によって誘発されるグルタミン酸遊離を用量依存性に約 80% 抑制した。さらに DOPA CHE は遅発性神経細胞死をも抑制することが判明した。この結果は、ドーパが脳虚血誘発性グルタミン酸遊離ならびに遅発性神経細胞死の上流因子として作用することを示す。またこの事実は、DOPA CHE が *in vivo* において有効なドーパ拮抗薬であることを示す<sup>1)9)</sup>。

#### ドーパ遊離とニコチン、コカイン、メタンフェタミン作用の相違

ニコチンとならび、コカイン、メタンフェタ

ミンは嗜癖をもたらす薬物として位置づけられている。その共通の性質として側坐核におけるドーパミン遊離作用が指摘され、嗜癖との因果関係が推測されている。これら 3 つの薬物は、ドーパミンと同様、側坐核ドーパミン遊離をも引き起こすのであろうか？ ニコチン (1 mg/kg, s. c.)、コカイン (10 mg/kg, s. c.)、メタンフェタミン (1 mg/kg, i. p.) はドーパミン遊離をほぼ同程度の基礎遊離の 4~5 倍に増大する。その一方で、これら 3 者のうち、メタンフェタミンおよびニコチンがドーパミン遊離を増大するが、コカインはむしろドーパミン遊離を抑制することを見出した<sup>10)</sup>。この 3 者の相違の理由は明らかではない。ニコチンによるドーパミン遊離がメカミラミン感受性であることは、ニコチンが神経興奮を介してドーパミン遊離を惹起する考え方に一致する。コカインはドーパミン遊離をその取り込み抑制によって増大し、細胞外に増大したドーパミンがシナプス前 D<sub>2</sub> ドーパミン受容体を介してカテコールアミン合成経路の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) を抑制するため、生成されるドーパミンが減少することによる遊離の減少である可能性がある。メタンフェタミンのドーパミン遊離機構は不明である。

もし、この内在性のドーパミン遊離が一定の生理学的意義を持つとしたら、この 3 つの薬物の薬理作用になんらかの差異が存在するのではないか？ 側坐核ドーパミン遊離を同程度に増大する上記濃度のニコチン、コカイン、メタンフェタミンの行動に及ぼす効果を比較すると幾つかの相違があることが判明した。ニコチンおよびメタンフェタミンは chewing (噛む)、walking (歩く)、sniffing を惹起するが、コカインはこれらの行動指標に対して有意な効果を示さない。これらの結果から、コカインの行動に及ぼす作用が、側坐核ドーパミン遊離を同程度に亢進するニコチンおよびメタンフェタミンに比し弱いのは、ドーパミン遊離の有無に左右されている可能性が浮上してくる。

ついで、ニコチン、メタンフェタミンの効果に内因性ドーパミン遊離が関与するか否かを検討す

るため、ニコチン、メタンフェタミンに対する DOPA CHE (30 mg/kg, i. p.) 前処置の効果を検討した。DOPA CHE はメタンフェタミンおよびニコチンによって惹起される chewing、walking、sniffing 行動の誘起を抑制した。この結果は、ニコチン、メタンフェタミンとコカインの薬理作用の差は側坐核ドーパミン遊離作用の有無にあり、ニコチン、メタンフェタミンの薬効の少なくとも一部に内因性ドーパミンが関与することを示唆する。ドーパミンは、ドーパミン D<sub>2</sub> 受容体作動薬クインピロールの自発運動亢進作用を増強することから<sup>1)</sup>、ドーパミン D<sub>2</sub> 受容体機能増強作用を有すると考えられる。ニコチン、メタンフェタミンがコカインに比べて行動に及ぼす効果が相対的に強力な理由は、ドーパミンと同時に遊離されるドーパミンがドーパミン作用を増強するためと考えられる。

#### ドーパミン作用における一酸化窒素の関与と ドーパミンによる c-Fos 発現誘導作用

大動脈弓・頸動脈洞から、孤束核 (NTS) に終末する第一次求心性感覚性線維は、そこからさらに尾側腹外側延髄 (CVLM) および吻側腹外側延髄 (RVLM) に興奮性線維を投射する。これらの線維の有力な興奮性伝達物質候補はグルタミン酸である。下位脳幹部の圧受容反射系において、CVLM が中心的役割を担い、血管緊張を減弱する。その抑制線維は RVLM に投射し、その伝達物質候補は GABA である。RVLM は後視床下核 (PHN) 等の入力を受け、その興奮性線維は胸・腰髄中間質外側柱に投射し、静止時・反射性血圧制御に関わる中枢からの交感神経発射系の役割を果たしている。詳細は割愛するが、これらの諸経路において、ドーパミンが興奮性の伝達物質として作動することを支持する知見が得られている。NTS、CVLM の降圧部位に微量注入したドーパミンは降圧・徐脈応答、RVLM の昇圧部位に微量注入したドーパミンは昇圧・頻脈応答を示し、これらの応答はすべてドーパミン拮抗薬で遮断される。またドーパミンは緊張性に機能している証拠がある。ドーパミン拮抗薬単独の両側微量注入は NTS、CVLM

において昇圧・頻脈応答を、RVLM において降圧・徐脈応答を示し、上記応答はドーパミン合成酵素である TH の阻害により消失する<sup>11)</sup>。

ドーパが第一次求心性神経の伝達物質である証拠が示される一方、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体に対して広範囲のスペクトルを持つ拮抗薬キヌレン酸は大動脈降圧神経 (ADN) 刺激に対する降圧・徐脈応答に拮抗する。しかし、一方で外来微量注入グルタミン酸に対する同応答に拮抗しない。この一見矛盾した結果はなぜ起こるのか。キヌレン酸注入は、ドーパに対する降圧・徐脈応答を遮断する<sup>11)12)</sup>。しかし、受容体結合実験の結果からドーパはキヌレン酸感受性グルタミン酸受容体には作用しないことが分かっている<sup>7)</sup>。ドーパがグルタミン酸を遊離する事実<sup>8)</sup>を考え合わせると、ドーパは第一次求心性 ADN の神経伝達物質であり、グルタミン酸を第二次性介在神経からドーパ拮抗薬感受性に遊離し、そのグルタミン酸が降圧・徐脈応答に関与していることが推測される。遊離したグルタミン酸の次の情報経路は NTS 内の神経修飾物質 NO である。ドーパ応答は可逆的に nNOS 阻害剤 NMMA および nNOS アンチセンスオリゴにより抑制される。また、キヌレン酸は NO 前駆体である L-アルギニンの降圧・徐脈応答を修飾しない。すなわち、NO はグルタミン酸受容体刺激の下流因子であると考えられる (図-4)<sup>12)</sup>。

#### 圧受容器反射におけるドーパ - グルタミン酸神経の関与

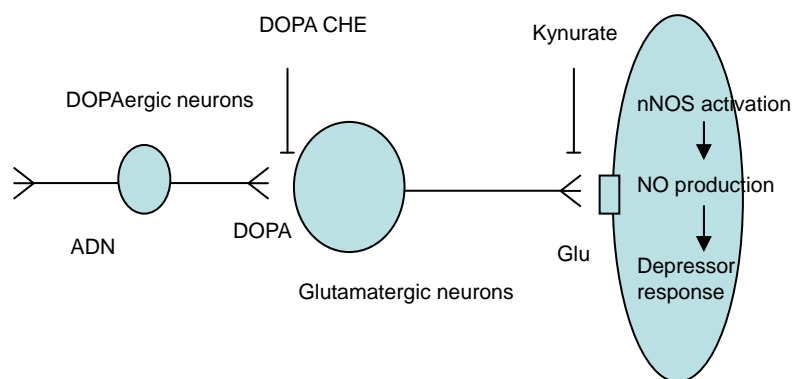


図-4 ドーパは圧受容器反射の一次求心性ニューロンの伝達物質でありグルタミン酸は二次介在ニューロンの伝達物質である。

DOPA CHE: DOPA cyclohexyl ester, ADN: aortic depressor nerve, Glu: glutamate, NO: nitric oxide.

我々は最近、中枢芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 阻害下に、ドーパが c-Fos 発現を誘導しうるかどうか、脳内多部位のマッピングを行い、発現部位として NTS、視交叉上核 (SON)、室傍核 (PVN) を見出した<sup>13)</sup>。中枢 AADC 阻害は、中枢移行性の AADC 阻害剤である NSD-1015 を用いて行った。この場合のドーパミン変換阻害はもちろん完全なものではない。しかし、この条件下で、6-OHDA で一側の黒質・線条体投射路を破壊したラットにおける線条体のドーパ誘発性 c-Fos 誘導はほぼ 10% にまで低下するのに対し、無傷ラットの NTS、SON、PVN 部位における c-Fos 発現は中枢 AADC 阻害により全く変化を受けないか、むしろ増加する傾向があった。この結果は、ドーパ作用に対する中枢 AADC 阻害効果は脳内部位により著しく異なることを示している。また、c-Fos 発現は脳の可塑性変化と関連することから、今後は臨床におけるドーパの薬理作用、副作用を解釈する上で重要なヒントを与える可能性がある。

#### ドーパ受容体

上記の結果から、ニコチン作用の発現にはニコチンによって遊離された様々な生理活性物質が関与することが知られてきたが、ドーパもそのような活性物質の候補リストに加えられる (図-2)。しかし、ドーパの存在・遊離・作用等の神経伝達物質としての基準を満たすべき知見が集積する中で、依然としてドーパ受容体は未同定である。ドーパ受容体の組織発現量が微量なためか？あるいはそのリガンドの不安定性のためか？ここ十年来ドーパ自身あるいはドーパ関連分子の標識体を用いて脳膜画分における結合活性の検出を試みてきたが、すべて低親和性・高結合能の結合特性を示し、ピコないしナノモラーオーダーのドーパの作用濃度と一致しなかった。その後、我々は全ゲノム配列が解読されつつあった線虫

*Caenorhabditis elegans*に注目し、この材料をモデルとした変異体スクリーニング実験、ならびにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた発現クローニングを試行した。その結果、ピコモラーオーダーのドーパ溶液に応答する受容体候補分子を単離した<sup>14)</sup>。本受容体が実際にドーパ受容体として機能するか否か、哺乳類ドーパ受容体とどのような関連を有するかは今後の重要課題である。

## 文 献

- 1) Misu Y, Goshima Y (Eds). *Neurobiology of DOPA as a Neurotransmitter*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp1-384, 2006.
- 2) Nakamura S, Goshima Y, Yue JL, Miyamae T, Misu Y. Transmitter-like 3,4-dihydroxyphenylalanine is tonically released by nicotine in striata of conscious rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 222: 75-80.
- 3) Goshima Y, Miyamae T, Nakamura S, Miki K, Kosaka K, Misu Y. Ventral tegmental injection of nicotine induces locomotor activity and L-DOPA release from nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1996; 309: 229-33.
- 4) Yamanashi K, Miyamae T, Misu Y, Goshima Y. Tonic function of nicotinic receptors in stress-induced release of L-DOPA from the nucleus accumbens in freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 27: 424: 199-202.
- 5) Goshima Y, Nakamura S, Misu Y. L-Dihydroxyphenylalanine methyl ester is a potent competitive antagonist of the L-dihydroxyphenylalanine-induced facilitation of the evoked release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamic slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 466-71.
- 6) Furukawa N, Goshima Y, Miyamae T, Sugiyama Y, Shimizu M, Ohshima E, Suzuki F, Arai N, Fujita K, Misu Y. L-DOPA cyclohexyl ester is a novel potent and relatively stable competitive antagonist against L-DOPA among several L-DOPA ester compounds. *Jpn J Pharmacol* 2000; 82: 40-7.
- 7) Miyamae T, Goshima Y, Shimizu M, Shibata T, Kawashima K, Ohshima E, Suzuki F, Misu Y. Some interactions of L-DOPA and its related compounds with glutamate receptors. *Life Sci* 1999; 64: 1045-54.
- 8) Goshima Y, Ohno K, Nakamura S, Miyamae T, Misu Y, Akaike A. L-DOPA induces Ca<sup>2+</sup>-dependent and tetrodotoxin-sensitive release of endogenous glutamate from rat striatal slices. *Brain Res* 1993; 617: 167-70.
- 9) Furukawa N, Arai N, Goshima Y, Miyamae T, Ohshima E, Suzuki F, Fujita K, Misu Y. Endogenously released DOPA is a causal factor for glutamate release and resultant delayed neuronal cell death by transient ischemia in rat striata. *J Neurochem* 2001; 76: 815-24.
- 10) Izawa J, Yamanashi K, Asakura T, Misu Y, Goshima Y. Differential effects of methamphetamine and cocaine on behavior and extracellular levels of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in the nucleus accumbens of conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 84-90.
- 11) Misu Y, Goshima Y, Ueda H, Okamura H. Neurobiology of L-DOPAergic systems. *Prog Neurobiol* 1996; 49: 415-54.
- 12) Yamanashi K, Miyamae T, Sasaki Y, Maeda M, Hirano H, Misu Y, Goshima Y. Involvement of nitric oxide production *via* kynurenic acid-sensitive glutamate receptors in DOPA-induced depressor responses in the nucleus tractus solitarii of anesthetized rats. *Neurosci Res* 2002; 43: 231-8.
- 13) Shimamura M, Shimizu M, Yagami T, Funabashi T, Kimura F, Kuroiwa Y, Misu Y, Goshima Y. L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-induced c-Fos expression in the CNS under inhibition of central aromatic L-amino acid decarboxylase. *Neuropharmacology* 2006; 50: 909-16.
- 14) 五嶋良郎、竹居光太郎、中村史雄、小倉顕一、矢上達郎. 線虫におけるニコチン・ドーパ関連の分子機構. 平成 17 年度喫煙科学研究財団研究年報 2006; 207-12.