

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—中国人研究者・技術者招聘—

2011 年 3 月 7 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 裏出 良博 
所属機関名： (財)大阪バイオサイエンス研究所
所属部署名： 分子行動生物学部門 職名：研究部長
所在地： 大阪府吹田市古江台 6-2-4
電 話： 06-6872-4851 内線：

1. 助成金額： 900,000円

2. 研究テーマ

アデノシン A2A 受容体の睡眠調節の役割

3. 成果の概要

アデノシン A2A 受容体などが高密度に局在している側坐核 (Nucleus
cuumbens; NAc) の核部及び殻部がいずれも睡眠—覚醒調節に不可欠
であり、核部は殻部よりも重要であることを発見した。

4. 被招聘者

被招聘者氏名： 邱 梅紅 職名：講師
所属機関名： 復旦大学上海医学院 部署名：神経生物学部門

5. 滞在日程概要(日付・主な活動・工程など)

第1回 2010年7月5日—9月30日

- ・ アデノ随伴ウイルスベクターを用いた RNA 干渉法の習得
- ・ 睡眠中枢の候補部位局所で A2A 受容体の knockdown 実験
- ・ 脳波による睡眠—覚醒の判断

第2回 2011年1月11日—2月10日

- ・ 追加実験、データ解析、論文作成

アデノシン A_{2A} 受容体の睡眠調節の役割

研究者氏名	邱 梅紅
中国所属機関	復旦大学上海医学院
日本研究機関	(財) 大阪バイオサイエンス研究所
指導責任者	裏出 良博
共同責任者名	黄 志力

要旨

側坐核 (Nucleus accumbens; NAc) は報酬、喜び、笑い、嗜癖、攻撃性、恐怖、プラセボ効果に重要な役割を担っているが、睡眠-覚醒調節に対する効果は未だに明らかになっていない。NAc の核部と殻部のいずれの部位にもドパミンD₁およびD₂受容体 (R)、アデノシンA₁RおよびA_{2A}Rが高密度に局在し、睡眠-覚醒調節に強く関与していると考えられる。本研究では、イボテン酸により、NAc核部または殻部を部位特異的に損傷させたNAc 損傷ラットを用いてドパミン受容体に作用するモダフィニルやA_{2A}Rに作用するカフェインの睡眠-覚醒に及ぼす効果を調べた。NAc核部を損傷させたラットは、対照のラットと比較して、24時間の累積覚醒量が25.8%増加した。また、このラットを6時間断眠させると、その後のリバウンド睡眠量は、対照のラットに比べて少なかった。睡眠反跳を示し、モダフィニルやカフェインの覚醒効果はより小さかった。さらに、NAc核部損傷ラットでは生理食塩水の腹腔内投与によって、睡眠潜時が165%延長された。同様に、NAc 殻部を損傷させたラットは、対照のラットと比較して、24時間の累積覚醒量が17.4%増加した。しかし、モダフィニルおよびカフェインの覚醒作用に対する効果は対照ラットと同程度であった。これらの結果はNAcの核部および殻部がいずれも睡眠-覚醒調節に不可欠であり、核部は殻部よりも重要であることを示している。

Key Words 側座核、A_{2A} 受容体、睡眠、覚醒、ドパミン

緒言 :

近代社会の発展とともに、睡眠障害は医学的、社会的にますます深刻な問題となってきた。しかし、睡眠-覚醒調節の生理学的機構は未だに明らかになっていない。神経薬理学的な研究結果は、断眠後に脳内のプロスタグランジン (PG) D₂やアデノシンレベルが上昇していることから、PGD₂ 受容体 (DPR) や A_{2A}R の活性化が強力な睡眠促進作用をもたらすことを示している。さらに、いくつかの実験によって、睡眠に対する PGD₂ の情報はアデノシンレベルの上昇に伝達されること、A_{2A}R がアデノシンの睡眠促進作用に関与していることが明らかにされている。これらのデータは、アデノシンが重要な内因性の睡眠物質であることを示している。

腹側外側視索前野 (VLPO) は睡眠の誘発や維持に関与するため(Ref)、睡眠中枢であることが知られ、一方で、結節乳頭体核 (TMN) は覚醒の調節に関与する覚醒中枢であることが広く知られている(Ref)。A_{2A}R 作動薬は VLPO ニューロンを活性化させ (VLPO 領域の c-fos

発現の増加により示される)、GABA/ガラニン抑制性神経を介して、TMNの神経活動を阻害することにより、睡眠を促進させる。しかし、VLPOにはA_{2A}Rは存在しないので、A_{2A}RがどのようにVLPOの活性化させるのかは未だに明らかになっていない。VLPOに加え、A_{2A}R作動薬の投与後にNAcでのc-fos発現も同様に上昇する。従って、我々は、A_{2A}R作動薬がNAcのA_{2A}Rを活性化させ、VLPOに睡眠を誘発するシグナルが伝達される可能性があると考えた。本研究の目的は睡眠-覚醒調節におけるNAcの役割を明らかにすることである。

目的と方法

目的:

1. 睡眠-覚醒調節におけるNAcの役割を明らかにすること。
2. NAc損傷ラットにおける睡眠-覚醒特性について、ドパミン受容体に作用するモダフィニルやアデノシンA_{2A}Rに作用するカフェインの覚醒効果を観察すること。

方法:

ラットの両側のNAcにイボテン酸 (Sigma) を投与して部位特異的な損傷を起こした。睡眠-覚醒の変化を評価するため脳波 (EEG) および筋電 (EMG) 記録用電極をラットに埋め込んだ。ラットは抱水クロラルで麻酔し、NAc (AP:+1.2 mm、ML:±1.8 mm、DV:-7.0 mm) にイボテン酸 (1%溶液) を定量的に微量注入した。続いて、睡眠-覚醒周期を評価するため、EEG および EMG 記録用電極を埋め込んだ。手術から10日間回復させた後、ラットを記録用チャンバーに入れ、記録用電極にケーブルを接続し、3日間馴化させた。次に、自発的な睡眠-覚醒周期を調べるため、それぞれのラットについて明期開始である午前8時より、24時間、EEGとEMGの記録を行った。その後、薬理学的研究を開始し、48時間のEEGとEMGを記録した。6時間断眠後のリバウンド睡眠に対する影響を調べるために、柔らかいティッシュの球でケージを軽く叩くことによりラットに6時間 (14:00 から 20:00 まで) の断眠を受けさせた。実験後、ラットを中性ホルマリンで灌流固定した後に脳を摘出し、40 μm厚の切片を作製した。これらの連続切片は、損傷部位の確認のため、ニッスル染色を行った。

結果

ラットのNAcをイボテン酸を用いて部位特異的に損傷させると覚醒が強く促進されることが明らかとなった。

NAc核部損傷ラットでは、対照ラットと比較して、自発的な覚醒が25.8%増加した。6時間断眠後のリバウンド睡眠は、対照ラットと比較して弱い反応を示した。また、モダフィニルやカフェインによる覚醒効果は、対照ラットに比べてより小さかった。さらに、NAc核部損傷ラットに生理食塩水を腹腔内投与すると、睡眠潜時が165%延長された。一方、NAc殻部を損傷させたラットでは覚醒が17.4%増加した、モダフィニル (90 mg/kg) およびカフェイン (15 mg/kg) の覚醒効果は対照ラットと同程度であった。

要約:

1. NAcの損傷は強力に覚醒を増加させる。
2. NAc核部損傷ラットは睡眠の恒常性調節の機能低下を示した。

3. NAc核部損傷ラットは対照ラットと比較して、モダフィニルおよびカフェインの覚醒効果が顕著に減少した。
4. NAc核部損傷ラットは刺激（生理食塩水腹腔内投与）に対し、高い反応を示し、興奮性行動を見せた。

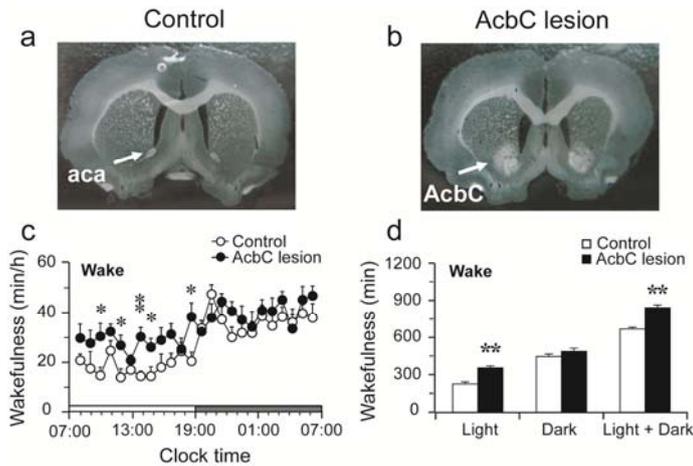


図 1. a および b: 対照 (a) および損傷例 (b) の冠状断面写真。b の矢印(淡い染色)部分 は NAc の核部損傷領域を示す。c: 対照と NAc 核部損傷ラットの 1 時間当たりの覚醒量の経時変化。d: 明期、暗期、24 時間中の累積覚醒時間。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ (aca: 前交連; AcbC: 側座核核部。対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

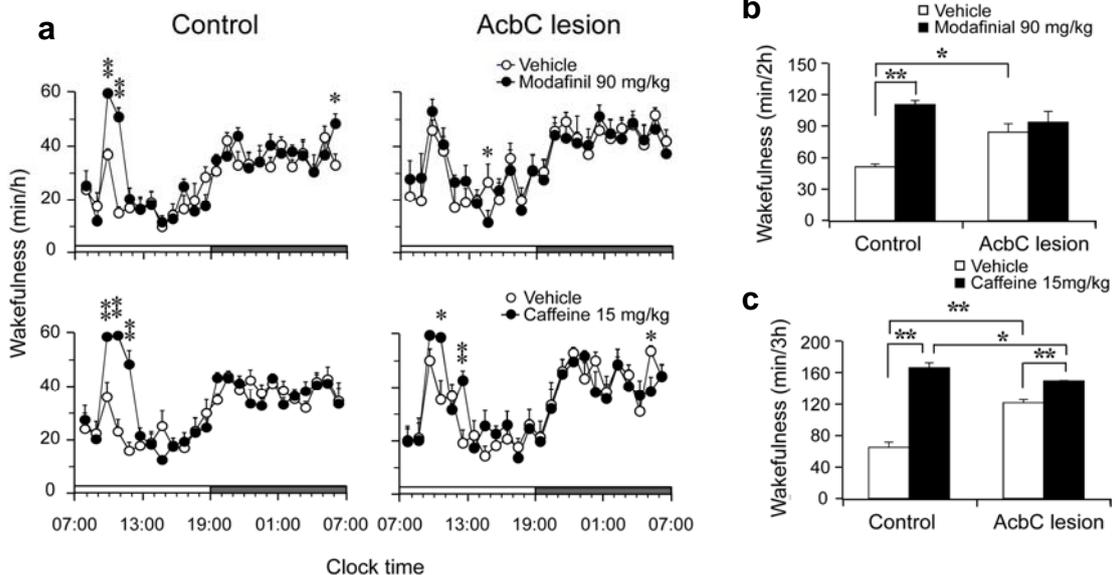


図 2. a および b: モダフィニルまたはカフェイン処理した対照群 (a) および NAc 核部損傷ラット (b) の覚醒量の経時変化。c: 溶媒またはモダフィニル投与後 2 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。d: 溶媒またはカフェイン投与後 4 時間の対照と NAc 核部損傷ラットの累積覚醒時間。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ (対照群: $n=6$; 損傷群: $n=8$)

考察

本研究の結果は、NAc 核部および殻部はいずれも睡眠-覚醒調節に不可欠であり、核部は殻部よりもより重要であることを示している。そして、核部は覚醒促進薬剤であるモダフィニルやカフェインの主要な標的部位でことが示唆される。

アデノシン A_{2A}R およびドパミン D₁R、D₂R は、NAc 領域に高密度に存在しているが、これらの受容体を介した機能は全く逆である。つまり、A_{2A}R の活性化は睡眠を誘発するのに対し、ドパミン D₁R、D₂R は覚醒促進を生じさせる。NAc 損傷が覚醒の強い増加を起こすことは、NAc は A_{2A}R が制御する睡眠の主要な領域であることを示唆している。

NAc は前頭前皮質(PFC)、扁桃体、腹側被蓋領域の3領域から主に入力を受けている。神経画像、神経病理学的、損傷解析等の結果から、通常感情処理に関与する神経回路は気分障害に強く関与していることが示されている。これらの回路の構造は PFC や扁桃体や海馬のような辺縁皮質下を含んでいる。そのため、NAc の核部損傷ラットの興奮性行動は通常感情神経処理回路の割り込みによって生じた可能性がある。

参考文献

- 1 Hayaishi, O., Urade, Y., Eguchi, N. and Huang, Z.L., Genes for prostaglandin d synthase and receptor as well as adenosine A_{2A} receptor are involved in the homeostatic regulation of nrem sleep, *Arch Ital Biol*, 142 (2004) 533-9.
- 2 Urade, Y., Eguchi, N., Qu, W.M., Sakata, M., Huang, Z.L., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fink, J.S. and Hayaishi, O., Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice, *Neurology*, 61 (2003) S94-6.
- 3 Huang, Z.L., Urade, Y. and Hayaishi, O., Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness, *Curr Opin Pharmacol*, 7 (2007) 33-8.
- 4 Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W. and McCarley, R.W., Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness, *Science*, 276 (1997) 1265-8.
- 5 Mizoguchi, A., Eguchi, N., Kimura, K., Kiyohara, Y., Qu, W.M., Huang, Z.L., Mochizuki, T., Lazarus, M., Kobayashi, T., Kaneko, T., Narumiya, S., Urade, Y. and Hayaishi, O., Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 11674-9.
- 6 Basheer, R., Strecker, R.E., Thakkar, M.M. and McCarley, R.W., Adenosine and sleep-wake regulation, *Prog Neurobiol*, 73 (2004) 379-96.
- 7 Hong, Z.Y., Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} receptor agonist induces sleep by increasing GABA release in the tuberomammillary nucleus to inhibit histaminergic systems in rats, *J Neurochem*, 92 (2005) 1542-9.
- 8 Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Fredholm, B.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., Adenosine A_{2A}, but not A₁, receptors mediate the arousal effect of caffeine, *Nat Neurosci*, 8 (2005) 858-9.
- 9 Saper, C.B., Scammell, T.E. and Lu, J., Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms, *Nature*, 437 (2005) 1257-63.
- 10 Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y. and Hayaishi, O., An adenosine A_{2A} agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons, *Neuroscience*, 107 (2001) 653-63.
- 11 Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G. and Linden, J., Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 401 (1998) 163-86.
- 12 Chou, T.C., Bjorkum, A.A., Gaus, S.E., Lu, J., Scammell, T.E. and Saper, C.B., Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus, *J Neurosci*, 22 (2002) 977-90.
- 13 Fredholm, B.B., AP, I.J., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. and Linden, J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev*, 53 (2001) 527-52.
- 14 Rye, D.B. and Jankovic, J., Emerging views of dopamine in modulating sleep/wake state from an unlikely source: PD, *Neurology*, 58 (2002) 341-6.

- 15 Isaac, S.O. and Berridge, C.W., Wake-promoting actions of dopamine D1 and D2 receptor stimulation, *J Pharmacol Exp Ther*, 307 (2003) 386-94.
- 16 Wisor, J.P., Nishino, S., Sora, I., Uhl, G.H., Mignot, E. and Edgar, D.M., Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness, *J Neurosci*, 21 (2001) 1787-94.
- 17 Lena, I., Parrot, S., Deschaux, O., Muffat-Joly, S., Sauvinet, V., Renaud, B., Suaud-Chagny, M.F. and Gottesmann, C., Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep--wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats, *J Neurosci Res*, 81 (2005) 891-9.
- 18 Salmi, P., Chergui, K. and Fredholm, B.B., Adenosine-dopamine interactions revealed in knockout mice, *J Mol Neurosci*, 26 (2005) 239-44.
- 19 Maletic, V, Robinson, M, Oakes, T, Iyengar, S, Ball, SG, and Russell, J, Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract*, 2007. 61(12):2030-40.