

68. ドーパ受容体欠損マウスにおける心血管応答解析

五嶋 良郎

Key words: ドーパ, 神経伝達物質, 孤束核, 心血管調節, GPR143

横浜市立大学 大学院医学研究科
分子薬理神経生物学

緒言

ドーパは神経伝達物質ドパミンの前駆体であり、パーキンソン病の治療における重要な薬物として位置づけられている。これに対し、我々はドーパを含有する神経の存在、神経刺激によるドーパ遊離、そしてドパミンへの変換を介さないドーパそれ自体の薬理作用を発見し、これらの知見に基づき、ドーパ神経伝達物質仮説を提起した。しかし、長らくドーパ固有の受容体の存在の有無は明らかではなかった。2008年、Lopezらは網膜色素上皮において眼白子症原因遺伝子産物 ocular albinism-1 (OA1) (GPR143) がドーパの受容体として機能することを報告した¹⁾。OA1欠損により、メラノソーム形成が異常となることが報告された。本研究は、OA1が、従来我々が報告してきた孤束核 (NTS) における心血管応答惹起作用を媒介する受容体候補であるか否かを明らかにするため、特異的 OA1 抗体の作製と、同抗体を用いた免疫組織化学的解析を行い、生体内分布を明らかにするとともに、OA1 発現抑制の効果の検討、および *oa1* 遺伝子欠損マウスにおける表現型解析を行い、OA1 がドーパ受容体として機能するか否かを明らかにすることを目的とする。

方法

OA1 に対するドーパの特異的結合を検出するため、OA1-enhanced green fluorescence protein (GFP) を発現する chinese hamster ovary (CHO) 細胞株を樹立した。10 cm プレートに培養した OA1 発現細胞を回収、洗浄し、 0.5×10^6 細胞/ml の濃度で懸濁し、氷上で2時間 ^3H -ドーパを含む溶液中にてインキュベートした。その後、細胞を洗浄した後、サンプル中の放射活性を計測した。ドーパ受容体拮抗薬 DOPA cyclohexyl ester (DOPA CHE) 10 mM 存在下の結合量を非特異的結合とし、総結合量から差し引いて特異的 ^3H -ドーパ結合を求めた。

オス Wistar ラット (240-350 g) をウレタン麻醉し、大腿動脈及び静脈にカニューレを挿入し、各々を介して血圧・心拍のモニターと静脈内投与を行った。ツボクラリンにより筋弛緩を行い、人工呼吸下に心血管機能のモニターを行った。ラットを脳固定装置に 45° の角度で固定し、開頭して背側脳幹部を露出した。Area postrema 最後野から 0.6 mm 吻側、0.6 mm 外側、脳表面から 0.6 mm 深部を目安に NTS の血圧下降部位にガラスピペット (50-100 μm 径) を挿入し、ドーパ (60 ng) ないしグルタミン酸 (100 ng) の 50 nl を 2 秒間に注入した。実験終了時にはエバンスブルーを 100 nl 注入し、実際の注入部位が NTS であったかどうかを判定した。*oa1* RNAi の特異的な小ヘアピン RNA (shRNA) 配列とスクランブル RNA 配列をアデノウイルスベクターに組み込み²⁾ (*oa1*-Ad, scramble-Ad) を一側の NTS 降圧部位に微量注入した後、切開部を縫合し、回復を待って注入後 48 時間後に、注入側にドーパないしグルタミン酸を微量注入し、心血管応答を比較・検討した。

一方、*oa1* (*gpr143*) 変異マウス作製に当たり、ターゲッティングベクターの構築、組み換え ES 細胞の単離、キメラマウスの作製を行った。*oa1* (*gpr143*) 遺伝子は X 染色体上にある。*oa1* の Exon1 を loxP で挟んだ変異を導入したキメラマウスを野生型マウスと交配し、*oa1* (loxP) のオス個体を得た。同個体を Cre を発現するトランスジェニックマウスと交配し、*oa1* がノックアウトされた変異マウス個体を得た。遺伝型の確認は PCR で行った。得られた *oa1* 変異マウスの C57B6/J への戻し交配を 5 世代行った。NTS におけるドーパおよびグルタミン酸応答能は上記のラットに準ずる手順で検討した。

生後3週から1ヶ月のラットないしマウスをイソフルラン吸入により麻酔し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) 灌流固定を行った。脳および末梢臓器を摘出し、4% PFA 中に24時間、4℃下に放置し、さらに30%ショ糖液中に放置後、OCT/30%ショ糖/PBS 溶液に浸け、液体窒素内で凍結した。各組織から作製した切片は、浮遊法により、スライドガラスに載せ、乾燥した。作製した抗 OA1 抗体、ビオチン化二次抗体染色をジアミノベンジジンにより可視化した。野生型と *oa1* 遺伝子欠損マウスにおける染色像との比較により抗体の特異性ととも OA1 発現部位を確認した。

結果および考察

我々は、ラット視床下部からのノルアドレナリン遊離³⁾、NTS への微量注入によるドーパ応答⁴⁾を指標として、ドーパの競合的拮抗薬 DOPA methyl ester (DOPA ME)、DOPA CHE などのドーパエステル化合物を見出した。我々が見出して来たドーパ拮抗薬に感受性のドーパ作用が OA1 を介するとすれば、ドーパ拮抗薬は OA1 への特異的³H-ドーパ結合を濃度依存性に阻害するはずである。実際、DOPA CHE は特異的ドーパ結合を抑制した²⁾。この結果は、DOPA CHE が OA1 へのドーパ結合を抑制する競合的ドーパ拮抗薬であることを示唆する。

一方、ドーパは麻酔下ラット NTS に微量注入した際、降圧・徐脈応答を惹起する⁵⁾。この作用は、中枢および末梢 AADC 阻害剤存在下においても残存し、DOPA ME および DOPA CHE によって拮抗される^{4,5)}。同作用が、OA1 によって媒介されるか否かを検討するため、NTS における OA1 の発現を免疫組織化学的に検討した。OA1 陽性細胞は、NTS 領域に存在し、その局在は TH 陽性細胞と近接していた (図1)。

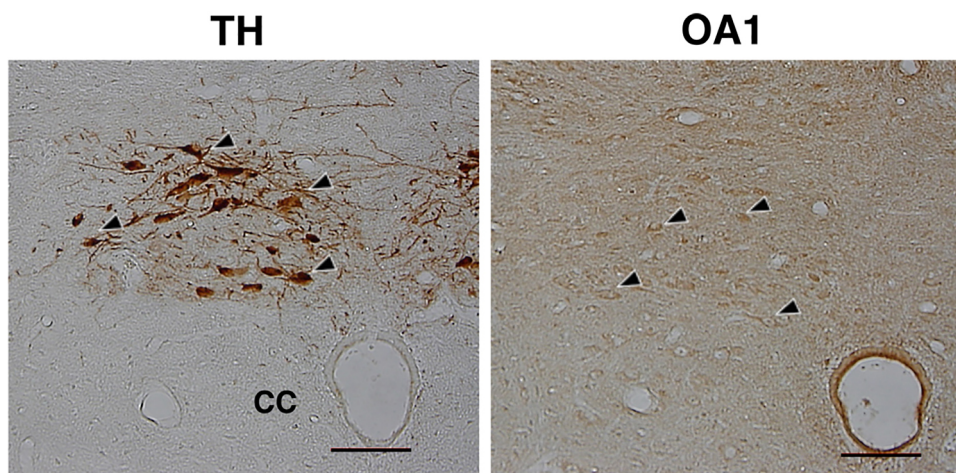


図1. ラット孤束核における OA1 (GPR143) およびチロシン水酸化酵素の発現。

ラット孤束核におけるチロシン水酸化酵素 (TH) および OA1 陽性細胞 (矢頭)。

CC: 中心管. Scale bar: 50 μ m.

NTS における OA1 の機能を評価するため、*oa1* の shRNA 配列を組み込んだアデノウイルスベクター、*oa1*-Ad を NTS の片側に注入し、対照群との間でドーパないしグルタミン酸を同部位に微量注入した際の応答を検討した。*oa1*-Ad 処置を行った NTS において、微量注入したドーパに対する降圧・徐脈応答はほぼ消失する一方、グルタミン酸応答は無変化であった²⁾。この結果は、OA1 が、NTS においてドーパの薬理作用を媒介する受容体である一方、グルタミン酸応答には関与しないドーパ応答を選択的に媒介する受容体であることを示す。

OA1 の役割をさらに詳細に検討することを目的として、*oa1* 遺伝子欠損マウスを作製した。同マウスは、見かけ上、大きな行動上および形態学的異常を示さなかったが、網膜色素上皮におけるメラニン色素の低下が観察された。この結果はヒトの網膜色素上皮の表現型と一致する⁶⁾。野生型および *oa1* 遺伝子欠損マウスにおいて抗 OA1 抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。その結果、NTS における発現等、ラットを用いた免疫組織化学の知見とほぼ一致した^{7,8)}。

oa1 欠損マウスではこれらの染色像は消失した (図2)。この結果は今回用いた抗 OA1 抗体が特異的に OA1 を認識することを示す。

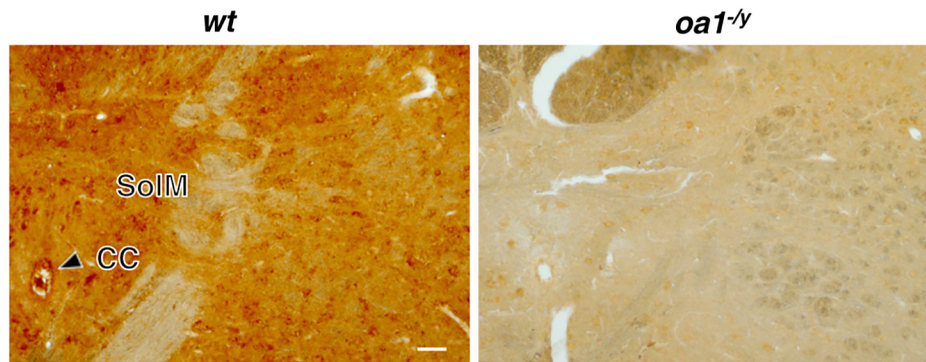


図2. マウス孤束核における OA1 (GPR143) の発現.

野生型 (*wt*) および *oa1* 遺伝子欠損マウス (*oa1^{-/-}*) における抗 OA1 抗体染色像.
CC: 中心管, SomM: nucleus of solitary tract medial. Scale bar: 50 μ m.

oa1 遺伝子欠損マウスにおいて、ラットと同様な方法により NTS におけるドーパ及びグルタミン酸応答を検討した. その結果, *oa1* 遺伝子欠損マウスにおいては, グルタミン酸応答は無変化であったが, ドーパ応答は消失した (図3, 未発表データ).

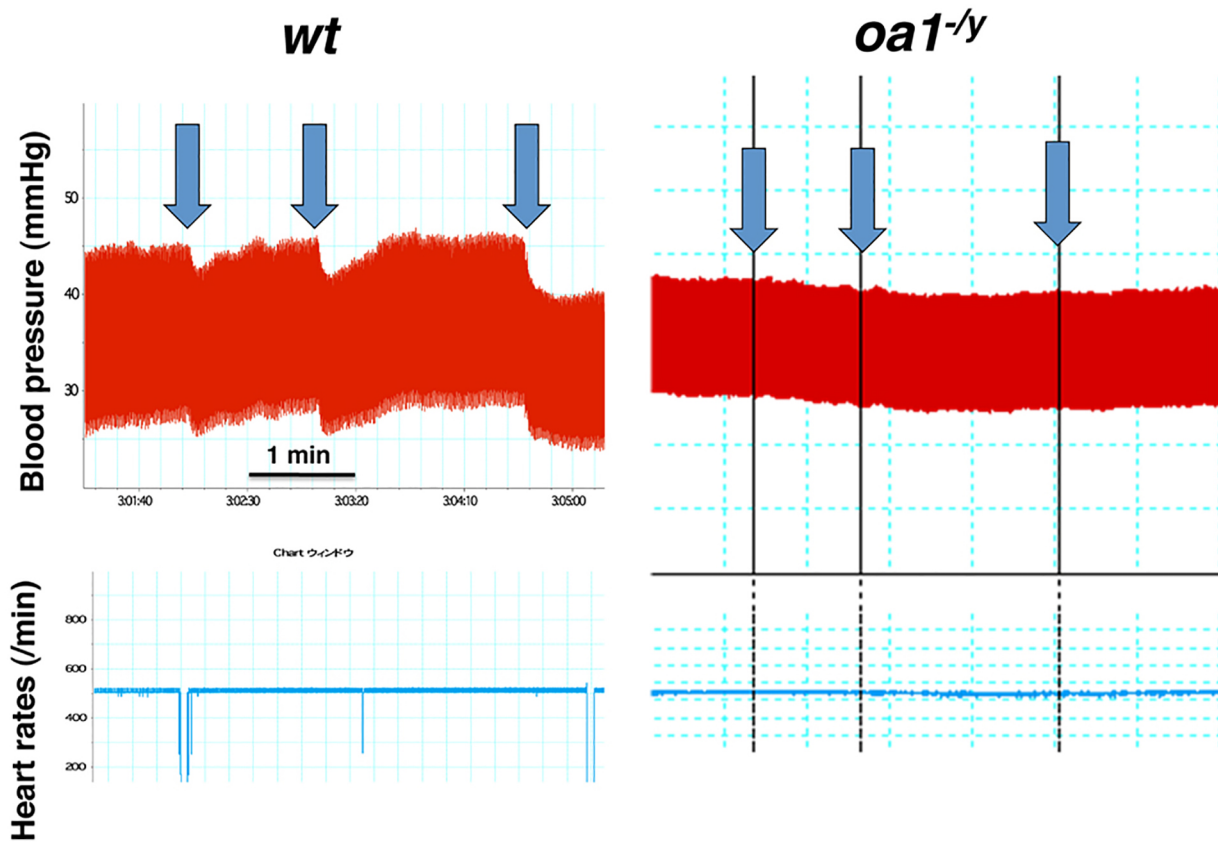


図3. *oa1* 遺伝子欠損マウスにおけるドーパ応答の消失.

麻酔・人口呼吸下の野生型 (*wt*) および *oa1* 遺伝子欠損マウス (*oa1^{-/-}*) におけるドーパ応答. ドーパ (60 ng) は孤束核領域に微量注入した (矢印).

この結果はラットと一致する。以上より、NTSに発現するOA1はドーパ応答を媒介して血圧、心拍数を制御する受容体である事が判明した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科の中村史雄、古賀資和、増川大輝、山下直也（現、ジョンホプキンス大学）である。終わりに、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に改めて深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lopez, V. M., Decatur, C. L., Stamer, W. D., Lynch, R. M. & McKay, B. S. : L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol.*, **6** : e236, 2008.
- 2) Hiroshima, Y., Miyamoto, H., Nakamura, F., Masukawa, D., Yamamoto, T., Muraoka, H., Kamiya, M., Yamashita, N., Suzuki, T., Matsuzaki, S., Endo, I. & Goshima, Y. : The protein Ocular albinism 1 is the orphan GPCR GPR143 and mediates depressor and bradycardic responses to DOPA in the nucleus tractus solitarii. *Br. J. Pharmacol.*, **171** : 403-414, 2014.
- 3) 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.*, **258** : 466-471, 1991.
- 4) Misu, Y., Goshima, Y., Miyamae, T., Furukawa, N., Sugiyama, Y., Okumura, Y., Shimizu, M., Ohshima, E. & Suzuki, F. : L-DOPA cyclohexyl ester is a novel stable and potent competitive antagonist against L-DOPA, as compared to L-DOPA methyl ester. *Jpn. J. Pharmacol.*, **75** : 307-309, 1997.
- 5) Kubo, T., Yue, J. L., Goshima, Y., Nakamura, S. & Misu, Y. : Evidence for L-dopa systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci. Lett.*, **140** : 153-156, 1992.
- 6) Schiaffino, M. V., d'Addio, M., Alloni, A., Baschiroto, C., Valetti, C., Cortese, K., Puri, C., Bassi, M. T., Colla, C., De Luca, M., Tacchetti, C. & Ballabio, A. : Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction system. *Nat. Genet.*, **23** : 108-112, 1999.
- 7) Masukawa, D., Nakamura, F., Koga, M., Kamiya, M., Chen, S., Yamashita, N., Arai, N. & Goshima, Y. : Localization of ocular albinism-1 gene product GPR143 in the rat central nervous system. *Neurosci. Res.*, **88** : 49-57, 2014.
- 8) Fukuda, N., Naito, S., Masukawa, D., Kaneda, M., Miyamoto, H., Abe, T., Yamashita, Y., Endo, I., Nakamura, F. & Goshima, Y. : Expression of ocular albinism 1 (OA1), 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) receptor, in both neuronal and non-neuronal organs. *Brain Res.*, **1602** : 62-74, 2015.