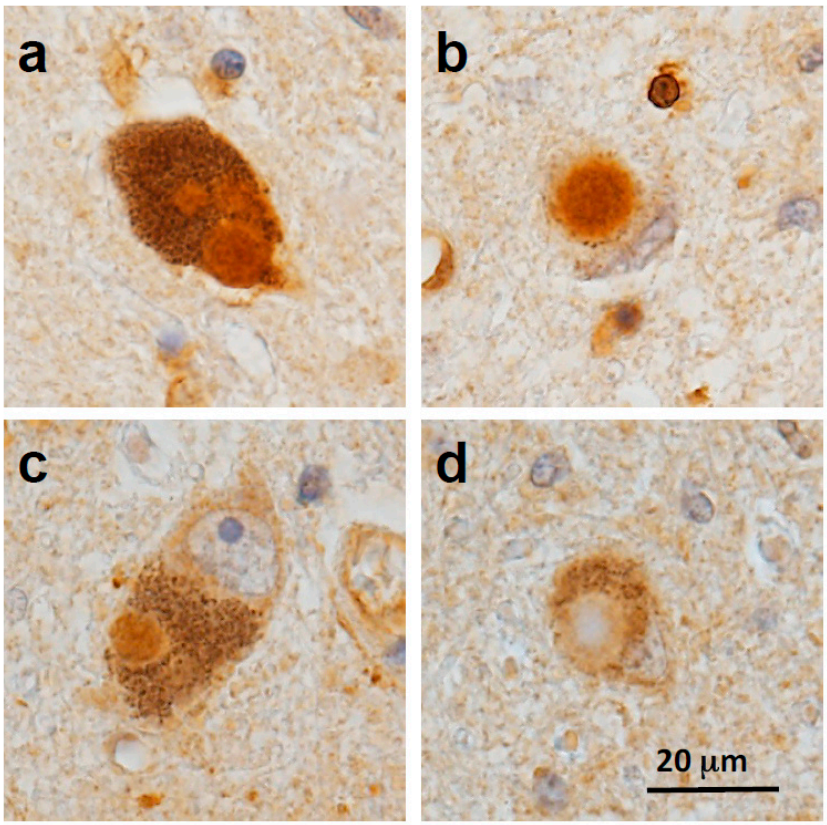
40　パーキンソン病におけるドーパ受容体GPR143の役割	五嶋　良郎

【目的】我々は、1986 年以来、L-ドーパ（ドーパ）神経伝達物質仮説を提起してきた。2014 年、その受容体候補分子として G タンパク質連関型受容体（GPCR）の一つ GPR143（OA1）を同定した。ドーパは、パーキンソン病　（PD）におけるもっとも有効な治療薬である。本研究計画は、GPR143 の PD における病態への関与の有無について解析することを目的とする。

【方法】抗ヒト GPR143 ポリクローナル抗体を作製し、その特異性をウェスタンブロッティング、および免疫細胞化学染色、抗原ペプチドによる吸収実験により確認する。倫理委員会における承認を得た上で、PD 剖検脳組織において、抗ヒト GPR143 抗体ならびに抗リン酸化 Ser129　α-シヌクレイン抗体を用いて免疫組織化学的解析を行う。陽性シグナルの可視化はジアミノベンチジン、ないし蛍光 2 次抗体により行った。

【結果】今回新たに作製した抗ヒト GPR143 ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、GPR143 陽性シグナルがヒト剖検脳における中脳領域において存在することを確認した。PD 剖検脳組織においては、GPR143 陽性シグナルが、PD に特徴的な病理組織像であるレビー小体に局在することを見出した。

GPR143 はレビー小体に局在する



40. パーキンソン病におけるドーパ受容体 GPR143 の役割

五嶋 良郎

横浜市立大学 大学院医学研究科 分子薬理神経生物学

Key words : L-ドーパ，パーキンソン病，レビー小体，α-シヌクレイン，G タンパク質連関型受容体

緒 言

我々は、1986 年以来、神経興奮に基づく伝達物質様の L-3,4-dihydroxyphenylalanine（ドーパ）の遊離とドパミン（DA）への変換を介さない薬理作用を明らかにし、ドーパ伝達物質仮説を提起してきた［1］。ながらくドーパ受容体の存在は未知であった。こうした中、ヒト疾患（*ocular albinism 1*、眼白子症）遺伝子解析から同定された 7 回膜貫通領域をもつ G 蛋白質連関型受容体（GPCR）の 1 つ OA1/GPR143 が、ドーパ結合活性を持つことが報告された［2］。我々は、下位脳幹部背側に存在する孤束核（NTS）において、ドーパ自体の降圧・徐脈作用を発見し、ドーパが、NTS において、NTS に終末する圧受容体からの第一次求心性線維の有力な神経伝達物質候補の一つであることを証明してきた［1］。この知見を踏まえ、つい最近、我々は、GPR143 が、この NTS において確かに発現し、同部位の GPR143 の発現を、shRNA 法により抑制すると、NTS でのドーパ応答が消失することを発見した。この結果は、GPR143 が、ドーパ応答を担う受容体候補分子である事を示す［3］。一方、免疫組織化学的解析から、GPR143 は、黒質・線条体等 DA 作動性神経伝達に関わる部位の他、末梢臓器にも分布することが明らかになった［4］。本研究の目的は、ドーパ療法を根本から再検討するため、ヒト PD 病剖検脳標本において、GPR143 陽性シグナルが、神経変性部位やレビー小体と、どのような局在関係を示すか等、を検討することを目的とする。

方 法

GPR143 の C 末端アミノ酸 305～404 をペプチド抗原、ウサギを免疫動物として、抗ヒト GPR143 ポリクローナル抗体を作製した。また、リン酸化α-シヌクレイン抗体（pSyn#64）を用いた重染色を行なった。発色は、ジアミノベンチジンにより行なった。蛍光標識 2 次抗体は、Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 594 ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。また、Hoechst 33342 による核染色を行った。作製した抗ヒト GPR143 抗体の特異性を確認した後、同抗体を用いて健常および PD 剖検脳の中脳黒質領域における免疫組織化学的解析を行った。

結果および考察

1. 結果

抗ヒト GPR143 抗体の反応性、特異性をウェスタンブロット、免疫細胞化学的解析により確認した。健常脳において、GPR143 陽性シグナルが、比較的大型の核をもつ神経細胞体の細胞質内においてドット状に認められた。この陽性シグナルは GPR143 抗原ペプチドの過剰により消失した。一方、PD 脳においては、特徴的な病理形態像の 1 つ、レビー小体が散在することを確認した。一部のレビー小体には、小体内全体に均一に広がる GPR143 陽性シグナルが検出された（図 1）。さらに、この GPR143 陽性像の一部は、リン酸化 Ser129α-シヌクレイン陽性像と共局在することが明らかとなった（図 2）。リン酸化α-シヌクレイン陽性シグナルは、GPR143 陽性シグナルを外周から取り囲むような局在パターンを示した。

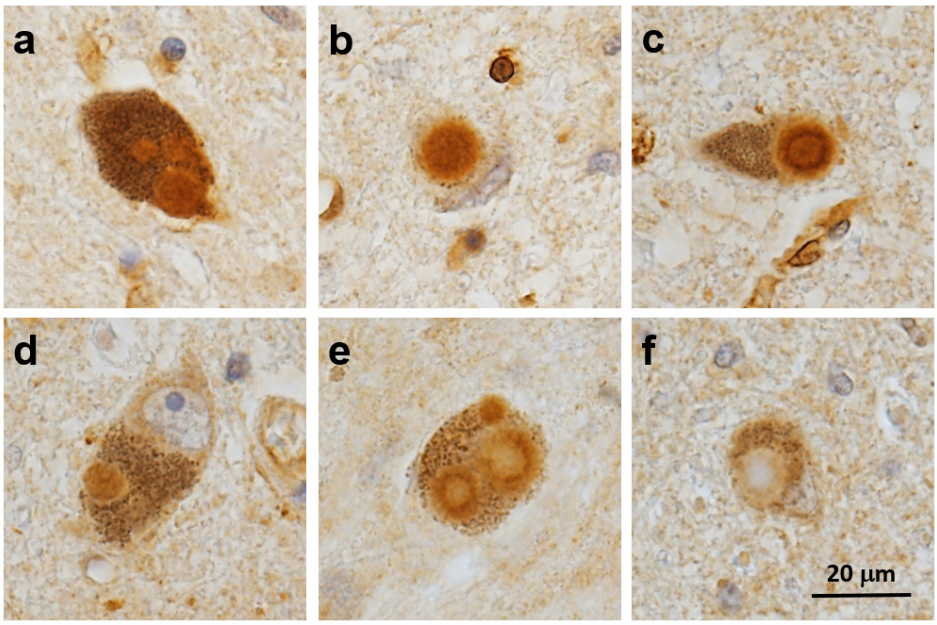


図 1. 抗ヒト GPR143 抗体による免疫組織化学像（Goshima et al.,2018）

a～e、PD 剖検脳、中脳黒質領域における染色像。f、抗原ペプチドによる陽性シグナルの消失。

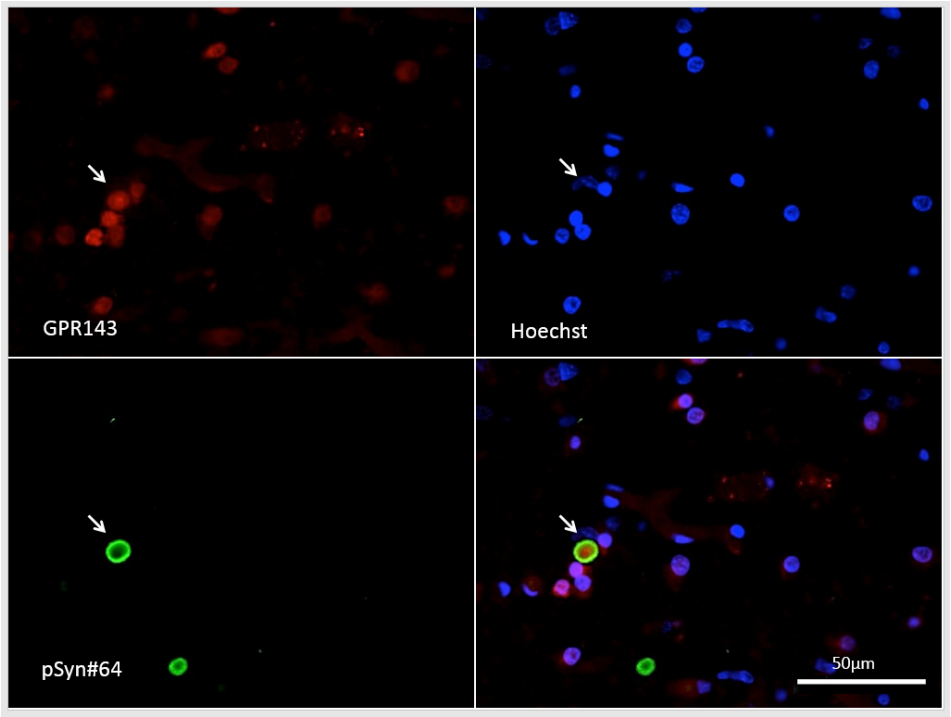


図 2. 抗 GPR143 およびリン酸化・α-シヌクレイン抗体（pSyn#64）による重染色像（Goshima et al., 2018）

2. 考察

今回作製した抗ヒトGPR143抗体は、ウェスタンブロット、免疫細胞化学的解析等により、ヒトGPR143を認識する抗体であることが確認された。同抗体による免疫組織化学的解析において、GPR143陽性シグナルが健常脳組織における神経細胞体において、ドット状に認められることが確認された。細胞体におけるドット状の染色像は、COS-7細胞に発現させたヒトGPR143の局在パターンと一致する［5］。GPR143の局在が、メラノソームや細胞内の特定のコンパートメント、例えばlate endosome、リソソームに局在する事は、そのほか多くの報告の間で一致する知見である［5, 6］。この性質は、GPCRに属する他のアミン受容体やペプチド受容体とは異なる際立つ性質である。この特異な局在性が機能と密接に連関するのであろうか？GPR143／OA1 には眼白子症という表現型と連関する多くの変異が存在するが、その一部には、GPR143 が endoplasmic reticulum （ER）に滞留することが報告されており［7］、この事実は、GPR143の局在性が、この分子の機能発現に重要である事を示唆する。PD脳組織においては、GPR143陽性シグナルが、PD脳における特徴的な病理組織像であるレビー小体に局在することを見出した［8］。さらに、GPR143がレビー小体に局在する事は、リン酸化α-シヌクレインと共局在することによっても支持される。リン酸化修飾を受けたα-シヌクレインでは、不溶化して凝集体を形成する傾向が高まるため［9］、GPR143が共存する事は、GPR143がレビー小体の形成やPDの病態に関わる可能性を示唆する。

GPR143と同様、PDとの関連が示唆されるGPCRsとしては、mGluR5、ドパミンD2/3、アデノシン受容体、GPR37／Pael-R 等が報告されている［9］。GPR37／Pael-R は、レビー小体に局在すると点で注目される。興味深い点は、GPR37／Pael-Rが、若年性PDの原因遺伝子の1つParkinと相互作用する事、また細胞内に局在する割合が多いことや、中脳に高い発現レベルを示すなど、GPR143と類似するいくつかの性質を持つ事である。また、GPR143が、リン酸化α-シヌクレイン陽性シグナルにより、外周からハローのように取り囲まれるような局在パターンは、GPR37／Pael-Rと類似する（図2）。報告によれば、GPR37／Pael-Rは、ユビキチンに局在が類似しており、Parkinやリン酸化α-シヌクレインは、ハローのようにそれらを取り囲むパターンを示す［8］。これらの知見から、GPR143とParkinとの相互作用の有無、そのドパミン作動性神経の生存やPDの病態への関与の有無は今後の重要な検討課題と考えられる［10］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京都医学総合研究所の新井信隆博士、東京都立神経病院の小森隆司博士である。

文　献

1） Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? Trends Pharmacol Sci. 1993 Apr;14(4):119-23. Review. PMID: 8100096

2） Lopez VM1, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. PLoS Biol. 2008 Sep 30;6(9):e236. PMID: 18828673 DOI: 10.1371/journal.pbio.0060236

3） 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. 2014 Jan;171(2):403-14. PMID: 24117106 DOI: 10.1111/bph.12459

4） 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. 2015 Mar 30;1602:62-74. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25601010 DOI: 10.1016/j.brainres.2015.01.020

5) Schiaffino MV, d'Addio M, Alloni A, Baschirotto C, Valetti C, Cortese K, Puri C, Bassi MT, Colla C, De Luca M, Tacchetti C, Ballabio A. Ocular albinism: evidence for a defect in an intracellular signal transduction system. Nat Genet. 1999 Sep;23(1):108-12. PMID: 10471510 DOI: 10.1038/12715

6) Giordano F, Bonetti C, Surace EM, Marigo V, Raposo G. The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. Hum Mol Genet. 2009 Dec 1;18(23):4530-45. PMID: 19717412 DOI: 10.1093/hmg/ddp415.

7) d'Addio M, Pizzigoni A, Bassi MT, Baschirotto C, Valetti C, Incerti B, Clementi M, De Luca M, Ballabio A, Schiaffino MV. Defective intracellular transport and processing of OA1 is a major cause of ocular albinism type 1. Hum Mol Genet. 2000 Dec 12;9(20):3011-8. PMID 11115845

8) Goshima Y, Watanabe S, Seki E, Koga M, Masukawa D, Nakamura F, Komori T, Arai N. Immunoreactivity of a G protein-coupled l-DOPA receptor GPR143, in Lewy bodies. Neurosci Res. 2018 Dec 24. pii: S0168-0102(18)30598-4. PMID: 30590075 DOI: 10.1016/j.neures.2018.12.004

9) Murakami T, Shoji M, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Sasaki A, Takahashi R, Abe K.Ann Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. Neurol. 2004 Mar;55(3):439-42. PMID: 14991825 DOI: 10.1002/ana.20064

10) Goshima Y, Masukawa D, Kasahara Y, Hashimoto T, Aladeokin AC. L-DOPA and Its Receptor GPR143: Implications for Pathogenesis and Therapy in Parkinson's Disease. Front Pharmacol. 2019 Oct 3;10:1119. DOI: 10.3389/fphar.2019.01119. eCollection 2019. Review.