

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07069

研究課題名(和文)ドーパ性神経伝達の神経回路およびその作用機構の解明

研究課題名(英文)Neural circuits of L-DOPAergic neurotransmission and their mechanisms of action

研究代表者

増川 太輝(MASUKAWA, Daiki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10711898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ドパミン(DA)の前駆体であるドーパが神経伝達物質として機能するとの仮説を提唱し、その検証を行ってきた。本研究においては、ドーパが神経伝達物質として作動する神経回路を同定し、その生理学的意義を解明することを目的とした。マイクロダイアリシスを用いた検討により、ドーパおよびドパミンが背側線条体から遊離することを見出した。また、ドーパの遊離のみを抑制する条件を見出し、この条件下において、ドパミン D2 受容体作動薬の効果が減弱した。このことは、内在性のドーパが、背側線条体におけるドパミン D2 受容体の機能を修飾することを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドーパは現在でも、最も使用されるパーキンソン病治療薬であるが、その作用は、ドパミンへの変換を介していると考えられてきた。本研究において、ドーパが、GPR143 を介してドパミン D2 受容体の機能を制御することを明らかにした。このことは、ドーパ自体が薬理作用を持つことを示す。本研究の成果は、パーキンソン病治療法の見直しや、統合失調症などのドパミン D2 受容体を治療標的とする疾患に対する治療法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have proposed the hypothesis that L-DOPA, the precursor of dopamine (DA), is a neurotransmitter. In this study, we aimed to identify the neural circuits in which L-DOPA acts as a neurotransmitter and elucidate its physiological roles. Using microdialysis experiment, we found that L-DOPA and dopamine released from the dorsal striatum. The effects of dopamine D2 receptor agonists were attenuated by inhibiting the release of L-DOPA. Our findings suggests that endogenous L-DOPA modulates dopamine D2 receptor function in the dorsal striatum.

研究分野：神経薬理学

キーワード：L-DOPA 延髄弧束核 線条体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、ドーパミン(DA)の前駆体であるドーパが神経伝達物質として機能するとの仮説を提唱し、その検証を行ってきた (Misu & Goshima, TiPS, 1993)。神経刺激によるドーパの遊離はドーパ合成酵素のチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 阻害薬である *-methyl-para-tyrosine* により抑制される。したがって、ドーパは TH 陽性神経細胞から遊離されると考えられる (Yue et al, Neurosci, 1994)。この度、我々は、ドーパによる神経伝達を担う神経回路を明らかにするため、TH 陽性神経系を選択的に標識し、その特異的な刺激と応答との因果関係を明らかにする実験系の確立を試みた。まず、大動脈神経に選択的にチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を導入後、NTS 領域への光刺激が、降圧・徐脈応答を惹起すること、そして、この応答がドーパ拮抗薬である L-DOPA cyclohexyl ester (DOPA CHE) 感受性である事実を見出す事に成功した。この知見は、ドーパが圧受容器から NTS へ投射する大動脈神経における神経伝達物質の一つであることを示唆する。一方、NTS における降圧・徐脈応答において、ドーパとグルタミン酸との機能的相関を示唆する知見が得られている。例えば、ドーパは Ca^{2+} 依存性にグルタミン酸を遊離すること、ドーパ応答が NMDA 受容体拮抗薬であるキヌレン酸に感受性を示すこと、NTS に NMDA を微量注入した際の降圧・徐脈応答が、単独では無作用量のドーパを共処置することにより増強されること等を見出してきた (未発表データ)。

2. 研究の目的

本研究では、ドーパ含有神経回路の選択的刺激と応答を捉える実験系を確立し、ドーパが伝達物質として作動する神経回路を同定・解析し、ドーパがどのようにグルタミン酸や DA 作動性神経系と関わるのかを明らかとする事を目的とする。すなわち、ドーパ含有神経の選択的刺激とその応答性、DA 作動性神経系におけるドーパの役割を明らかにすることである。本研究では、様々な機能を担う脳内神経回路系において、ドーパ作動性神経伝達がどのような役割を果たし、どのような位置付けを占めるかを明らかにする。本研究の目的は、まず、これを可能とするための遺伝学的操作を用いた実験系を確立し、それを基盤にその分子的機構の解明を行うことを通じて、ドーパによる神経伝達の分子機構と生理学的役割を神経回路レベルで解明することである。

3. 研究の方法

(1) ドーパおよび DA の遊離測定

ドーパおよび DA を同時に測定するために、マウス背外側線条体 (0.5 mm anterior, 2.2 mm right lateral, 2.8 mm depth from the Bregma) からマイクロダイアリシスを用いて伝達物質を回収し、LC-MS を用いて定量した。ドーパ合成酵素阻害薬である *-メチル-p-チロシン* (MPT, 3 mg/kg) の腹腔内投与前 60 分、投与後 120 分のサンプルを用いた。DA 神経を特異的に刺激するために、DAT-cre マウスの黒質 (-3.0 mm anterior, 1.3 mm lateral, 4.3 mm depth from the bregma) に、cre 依存的に hM3Dq-mCherry または mCherry のみを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) をマイクロインジェクションし、その 2 週間後、clozapine-N-oxide (CNO, 3 mg/kg) の腹腔内投与前後のドーパおよび DA 遊離量を測定した。

(2) 運動量測定

野生型およびドーパ受容体 GPR143 遺伝子欠損マウス (*Gpr143^{-/-}*) マウスに十分なハンドリングを行った。その後、オープンフィールド実験装置 (O'HARA & CO., LTD., Tokyo, Japan) を 70 Lux に設定してマウスを入れ、60 分間馴化した。GPR143 の有無におけるドーパミン受容体作動薬の効果を検討するため、D2 受容体作動薬である quinpirole (0.03 mg/kg) を腹腔内投与後、60 分間の運動距離を 5 分おきに計測し、*Gpr143^{-/-}* と野生型マウスを比較した。内在性のドーパによる影響を確認するため、quinpirole の投与 60 分前に、MPT (3 mg/kg) を投与した。

(3) NTS におけるドーパ応答の薬理学的プロファイル解析

GPR143 遺伝子欠損 (GPR143 KO) ラットおよび野生型ラットの NTS に、ドーパ (60 ng/100 nL) を NTS 領域に微量注入した際の降圧・徐脈応答を確認した。ドーパ応答に対するプロプラノロールおよびヨヒンビン (300 ng/100 nL) の事前処置による拮抗作用を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス背外側線条体より、定常的なドーパおよび DA の遊離が確認できた。MPT (200 mg/kg) の腹腔内投与は、ドーパおよびドーパミンの遊離量を抑制した (未発表データ)。低用量の MPT (3 mg/kg) は、DA の遊離量には影響を与えずに、ドーパの遊離量のみを抑制した ($F(1, 8)=12.54$, $P=0.008$ for ドーパ, $F(1, 8)=0.353$, $P=0.569$ for DA, 図 1A)。次に、黒質線条体ドーパミン神経系を刺激した際の、ドーパおよび DA の遊離量を測定した。DAT-cre マウスに、AAV-D10-hM3Dq-mCherry を感染させると、黒質および線条体に、mCherry シグナルが確認できた。そのシグナルは、TH 陽性細胞と共同在していた (図 1B)。このような条件下、CNO (3 mg/kg) を腹腔内投与すると、ドーパおよび DA の遊離量が増加し、mCherry のみを発現する動物にお

いては、変化が認められなかった (図 1C)。この結果は、ドーパが、黒質-線条体 DA 神経系から遊離することを示す。

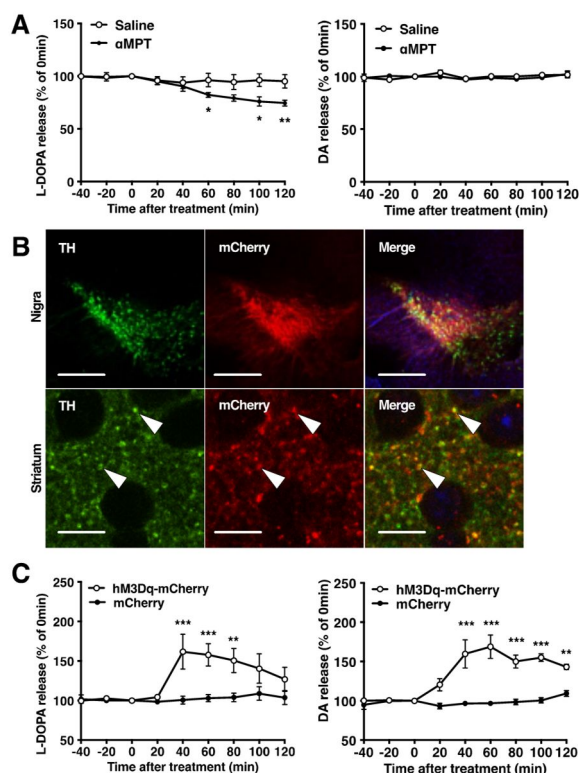


図 1、ドーパおよびドパミンの遊離量測定 (A) -メチル-p-チロシン (MPT, 3 mg/kg) または、生理食塩液 (Saline) 投与前後の野生型マウス背側線条体におけるドーパ(左)およびドパミン(右)の遊離量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(B) AAV-DIO-hM3Dq-mCherry 感染後の DAT-cre マウスの黒質および線条体における TH (緑)、mCherry (赤) の免疫染色像。矢頭は TH と mCherry の共局在を示す。スケールバーは黒質と線条体でそれぞれ 200 と 10 μm である。(C) DAT-cre マウスの黒質に AAV-DIO-hM3Dq-mCherry または AAV-DIO-mCherry を感染後、clozapine-N-oxide (3 mg/kg) の腹腔内投与前後におけるドーパ(左)およびドパミン(右)の遊離量。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(2) D2 受容体作動薬 quinpirole は野生型マウスにおいて運動量を抑制した。この作用は *Gpr143*^{-/-} マウスにおいて有意に減弱した (three-way ANOVA, drug: $F(1, 30) = 59.97$, $p < 0.001$; genotype: $F(1, 30) = 0.595$, $p = 0.446$; drug \times genotype: $F(1, 30) = 5.235$, $p = 0.029$ 、図2A)。MPT (3mg/kg)の事前投与は、quinpirole による運動量抑制作用を減弱した (three-way ANOVA, saline/quinpirole: $F(1, 31) = 25.01$, $p < 0.001$; saline/ MPT: $F(1, 31) = 1.63$, $p = 0.211$; saline/quinpirole \times saline/ MPT: $F(1, 31) = 4.51$, $p = 0.042$ 、図2B)。これらの結果は、ドーパが GPR143 を介して D2 受容体機能を修飾することを示す。

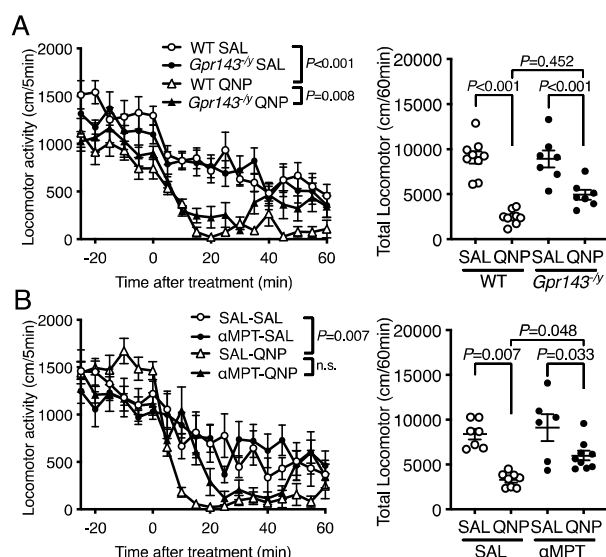


図 2、内在性ドーパは GPR143 を介して quinpirole の作用を増強する (A) 野生型および *Gpr143*^{-/-} マウスにおける quinpirole 投与前後の自発運動量。(B) Quinpirole による運動量抑制作用に対する MPT (3 mg/kg)の効果。

(3) ドーパによる心血管応答が GPR143 KO ラットにおいても野生型と比較し、同程度であることを見出した(図3)。NTSにおけるドーパの薬理的性質を明らかにするため、ドーパを投与した際の降圧・徐脈応答に対する各種化合物による拮抗作用を検討した。その結果、プロプラノロールおよびヨヒンピンがドーパ応答を抑制することを見出した(図3)。

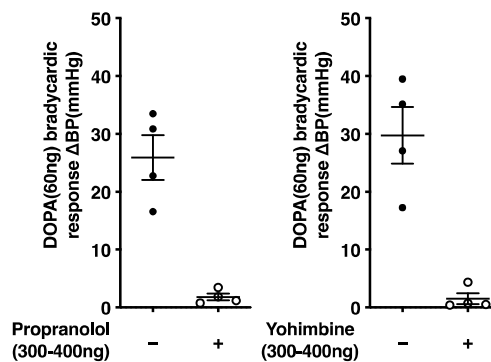


図3、ドーパ (60 ng)による降圧応答に対するプロプラノロールおよびヨヒンピンの作用 (n=4)。

<引用文献>

Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? Trends Pharmacol Sci 1993;14(4):119-123.

Yue JL, Okamura H, Goshima Y, Nakamura S, Geffard M, Misu Y. Baroreceptor-aortic nerve-mediated release of endogenous L-3,4-dihydroxyphenylalanine and its tonic depressor function in the nucleus tractus solitarii of rats. Neuroscience 1994 Sep;62(1):145-161.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masukawa Daiki, Kitamura Satoshi, Tajika Rei, Uchimura Hiraku, Arai Masami, Takada Yuuki, Arisawa Tetsu, Otaki Momoyo, Kanai Kaori, Kobayashi Kenta, Miyazaki Tomoyuki, Goshima Yoshio	4. 巻 165
2. 論文標題 Coupling between <sc>GPR143</sc> and dopamine <sc>D2</sc> receptor is required for selective potentiation of dopamine <sc>D2</sc> receptor function by L 3,4 dihydroxyphenylalanine in the dorsal striatum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 177 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiraku Uchimura, Kaori Kanai, Masami Arai, Miyu Inoue, Akitoyo Hishimoto, Daiki Masukawa, Yoshio Goshima	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Masukawa, Ryo Takahagi, Yuka Nakao, Yoshio Goshima	4. 巻 -
2. 論文標題 L-DOPA receptor GPR143 functionally couples with adrenergic 1B receptor at the second transmembrane interface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masukawa Daiki, Kitamura Satoshi, Tajika Rei, Uchimura Hiraku, Arai Masami, Takada Yuuki, Arisawa Tetsu, Otaki Momoyo, Kanai Kaori, Kobayashi Kenta, Miyazaki Tomoyuki, Goshima Yoshio	4. 巻 165
2. 論文標題 Coupling between <sc>GPR143</sc> and dopamine <sc>D2</sc> receptor is required for selective potentiation of dopamine <sc>D2</sc> receptor function by L 3,4 dihydroxyphenylalanine in the dorsal striatum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 177 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraku Uchimura, Kaori Kanai, Masami Arai, Miyu Inoue, Akitoyo Hishimoto, Daiki Masukawa, Yoshio Goshima	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daiki Masukawa, Ryo Takahagi, Yuka Nakao, Yoshio Goshima	4. 巻 -
2. 論文標題 L-DOPA receptor GPR143 functionally couples with adrenergic 1B receptor at the second transmembrane interface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Masayuki, Koga Motokazu, Hashimoto Tatsuo, Matsushita Natsuki, Masukawa Daiki, Mizuno Yusuke, Uchimura Hiraku, Niikura Ryo, Miyazaki Tomoyuki, Nakamura Fumio, Zou Suo, Shimizu Takahiro, Saito Motoaki, Tamura Kouichi, Goto Takahisa, Goshima Yoshio	4. 巻 148
2. 論文標題 Right ventricular overloading is attenuated in monocrotaline-induced pulmonary hypertension model rats with a disrupted Gpr143 gene, the gene that encodes the 3,4-l-dihydroxyphenylalanine (l-DOPA) receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 214 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増川太輝、五嶋良郎
2. 発表標題 線条体間接路における L-DOPA の生理学的役割解明
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増川太輝、五嶋良郎
2. 発表標題 Functional analysis of GPR143, an L-DOPA receptor, in GPCRs hetero-oligomers
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daiki Masukawa, Nishiawa Daisuke, Yuka Kasahara, Satoshi Kitamura, Kaori Kanai, Kazutaka Ikeda, Yoshio Goshima
2. 発表標題 Impairment of nicotine-induced behavioral changes in L-DOPA receptor gene (Gpr143)-deficient mice, and genetic associations of single nucleotide polymorphisms in the GPR143 gene with severity of nicotine dependence in Japanese individuals
3. 学会等名 第43回神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daiki Masukawa, Yoshio Goshima
2. 発表標題 L-DOPA は線条体間接路における GPR143 と ドパミン D2 受容体間相互作用を介して不安様行動を制御する
3. 学会等名 第45回神経科学学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	賈木 亨	三重大学・医学系研究科・准教授	
	(Jitsuki Susumu)		
	(10546675)	(14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------