

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04687

研究課題名(和文) 心血管系調節におけるドーパ神経伝達系の役割

研究課題名(英文) Functional analysis of DOPAergic transmission in cardiovascular system

研究代表者

五嶋 良郎 (GOSHIMA, Yoshio)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00153750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラット延髄孤束核においてドーパはGPR143を介して降圧・徐脈応答を惹起する(2014)。同部位におけるGPR143が圧受容器反射に関与するかどうかを確認するため、 α 1アドレナリン受容体(1AR)作動薬フェニレフリン(Phe)静注による昇圧・徐脈応答を野生型とGPR143-遺伝子欠損(KO)マウスとの間で比較した。GPR143-KOマウスではPheによる昇圧応答、摘出した動脈標本における収縮応答が野生型に比し減弱すること、活動期の昇圧の程度が、より少ないことが明らかになった。また免疫沈降法等によりGPR143は1ARと相互作用し、そのシグナル伝達を増強することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We proposed that L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) is a neurotransmitter. We recently identified OA1/GPR143, the gene product of ocular albinism 1, as a receptor candidate for DOPA. However, physiological relevance of DOPA action mediated through GPR143 remains unknown. To examine the role of GPR143, we established Gpr143-gene deficient (GPR143-KO) mice. We found that cardiovascular responses to intravenous α 1-adrenergic receptor (1AR) agonist phenylephrine were attenuated in GPR143-KO mice compared to wild-type (Wt) mice. DOPA at nanomolar concentrations alone produced no effect, but it enhanced phenylephrine-induced vasoconstriction in isolated descending aorta. In Wt mice, blood pressure increased during the transition from light-rest to dark-active phases. This elevation was not observed in GPR143-KO mice. Our findings provide evidence that DOPA/GPR143 signaling controls sympathetic neurotransmission through sensitizing vascular 1AR.

研究分野：薬理学

キーワード：生理活性物質 ドーパ 血圧 日内変動 血管平滑筋 1アドレナリン受容体 Gタンパク質連関型受容体 眼白子症原因遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ドーパは従来ドーパミンの前駆体として位置付けられ、それ自体は不活性であると考えられてきた。我々は 1986 年以來、神経興奮に基づく伝達物質様のドーパ遊離とドーパミン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。ドーパは下位脳幹部背側に存在する孤束核に終末する圧受容体からの第一次求心性線維(大動脈神経)の伝達物質である可能性が高い。すでにラット孤束核には 1)ドーパを最終産物として含有する神経が存在すること、2)大動脈神経を選択的に電気刺激した際に刺激依存性のドーパ遊離が孤束核(NTS)領域で検出できること、3)ドーパを孤束核領域に微量注入するとすばやい一過性の血圧下降・徐脈応答を惹起すること、4)同応答はグルタミン酸受容体拮抗薬により影響されずドーパ類縁化合物であるドーパエステル体(DOPA cyclohexyl ester, DOPA CHE)で拮抗されること、5)大動脈神経刺激による降圧徐脈応答は DOPA ME により拮抗されること等を証明してきた(1994, 2002)。しかし長らくドーパ受容体の同定には至らなかった。こうした過程において、2008 年、ヒト疾患遺伝子解析から同定された X-連鎖遺伝子産物、G 蛋白質連関型受容体 OA1 (ocular albinism-1)/GPR143 (GPR143)がドーパ結合活性を有することが報告された。

2. 研究の目的

本研究は、GPR143 がドーパの活性を媒介する受容体として機能するかどうか、生体内のどのような部位・組織に局在するのかを明らかとし、さらにドーパ受容体 *Gpr143* 遺伝子欠損(GPR143-KO)マウスを作成し、同マウスの解析から見だしつつある表現型の一つ、心血管応答異常の発見を契機として、実際に生体内でどのようなメカニズムに基づいて心血管調節機能を発揮するのかを検討することを主要な目的とするものである。

3. 研究の方法

本研究は、実際に内在性ドーパが GPR143 を介して、どのような分子メカニズムにより、どこでどのような生理学的機能を発現するのかを、GPR143-KO マウスの行動解析、薬物応答能の解析等を通じて明らかにする。GPR143-KO マウスの機能解析に先立ち、特異的抗 GPR143 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行う。また、新たに見だしつつあるカテコラミン性受容体との機能的関連の背景となる受容体相互作用等のメカニズムを、薬理的、細胞生物学、生化学手法を用いて解析する。具体的には、マウスをウレタン(1.2 g/kg, i.p.)により麻酔し、大腿動脈・静脈に血圧・心拍のモニターと薬液注入のためのカニューレを挿入した。摘出血管標本の作製の際には、マウスをイソフルランの吸入麻酔後、下行大動脈および腸間膜動脈を摘出

し、タンゲステンワイアを装着後、測定装置(Myograph System-410A, DMT)にセットした。無麻酔下の血圧・心拍数の日内変動は、予めマウス左頸動脈に血圧トランスデューサー(PA-C, Data Sciences Int.)を装着後、7日後に一個体ずつケージに移し、動物の行動が安定した時点からテレメトリーシステムを用いて計測を開始した。統計解析は、Bonferroni ないし Dunnett 多重比較検定に基づいて行った。

4. 研究成果

$\alpha 1$ -アドレナリン受容体($\alpha 1$ AR)作動薬、Phe の静注は、麻酔下の野生型マウスにおいて、用量依存的に昇圧・徐脈を惹き起こした。一方、GPR143-KO マウスにおいては、この Phe に対する昇圧・徐脈応答は野生型に比し、減弱していた(図 1)。

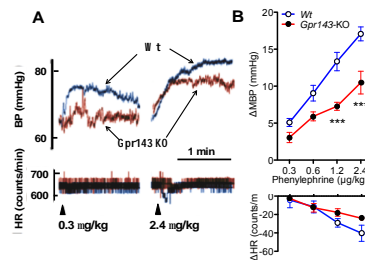


図 1 野生型 (Wt) (○) および GPR143-KO (*Gpr143* KO) (●) マウスにおけるフェニレフリン(Phe) に対する昇圧・徐脈応答。(A) Phe 0.3, 2.4 μ g/kg 静注時の昇圧・徐脈応答 (B) 各値は全て平均値 \pm 標準誤差、 $P < 0.001$ ($n=7-8$)。

この Phe 応答の低下が、抵抗血管における $\alpha 1$ AR を介する収縮応答の低下に基づくか否かを解析するため、野生型と GPR143-KO マウス摘出下行大動脈標本における Phe 応答を比較・検討した。Phe の濃度依存性の血管

Aortic Ring Contraction Assay

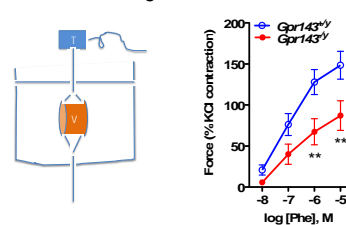


図 2 GPR143-KO (*Gpr143*^{-y}) マウス下行大動脈における Phe 収縮は野生型 (*Gpr143*^{+y}) に比して減弱する。 $P < 0.001$ ($n=9, 10$)。

収縮応答は、GPR143-KO マウスにおいて減弱していた(図2)。同様な Phe 応答の減弱は、腸間膜動脈標本においても認められた。ドーパ (0.1-10 nM)は、野生型において、濃度依存的に Phe 0.1 μ M による収縮応答を増強した。この効果はドーパミンによって模倣されず、GPR143-KO においては認められなかった(図3)。

L-DOPA augments phenylephrine-induced vasoconstriction

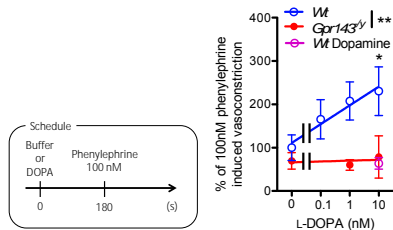


図3 無作用濃度のドーパ(0.1-10 nM)前処置は濃度依存性に Phe 収縮応答を増強する。この増強は GPR143-KO (Gpr143^{-/-})マウス血管標本では認められない。P<0.01 (n=6-11)。

また、培養平滑筋細胞においても、ドーパは、Phe による細胞内カルシウム (Ca²⁺) 応答を増強した(図4)。

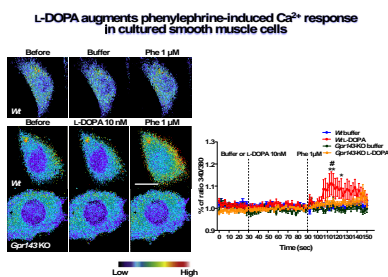


図4 培養平滑筋細胞において、ドーパの前処置は、Phe 単独による Ca²⁺ 応答を増強する。この増強効果は、GPR143-KO (Gpr143^{-/-})細胞では見られない。

以上の結果は、GPR143 と α 1AR との機能的関連を示す。この2つの GPCR が直接的に相互作用するかを免疫沈降法 (data not shown)、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法により解析した(図5)。その結果、GPR143 は、 α 1AR と選択的に相互作用することが明らかになった。これらの結果は、ドーパが GPR143 を介して、 α 1A のシグナル伝達を正に修飾し、Phe 応答を増強することを示す。この GPR143 と α 1AR との機

FRET between α_{1B} AR-CFP and OA1/GPR143-Venus

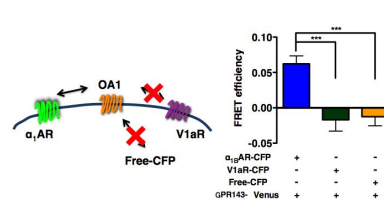


図5 FRETによるGPR143 と α 1AR との相互作用解析。***P<0.01 (n=36-59).GPR143 は α 1AR と相互作用する。一方、GPR143 はバソプレシン受容体 V1aR とは相互作用を示さない。

能関連が生体内で作動するかを検討するため、野生型および GPR143-KO マウスの血中のドーパとノルアドレナリン、アドレナリンのレベル(図6)と血圧の日内変動の経時的变化(図7)を観察した。GPR143-KO マウスにおいては、夜間の活動期の血中のドーパとノルアドレナリン、アドレナリンのレベルは休止期の約2倍に上昇した(図6)。

Plasma DOPA levels (5-10 nM) are high in the dark phase

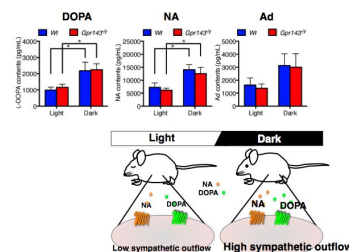


図6 野生型および GPR143-KO (Gpr143^{-/-})マウスにおいては、双方とも、夜間(活動期)の血中ドーパ、ノルアドレナリン、アドレナリンのレベルは昼間の約2倍に増加する。両者間にその程度に差は認められない。

一方、夜間の活動期の血圧の上昇が野生型に比して減弱していることが明らかとなった(図7)。この知見は、ドーパ・GPR143 伝達系が生理学的な血圧制御に関わるとの考えを支持する。

Blood pressure during the light phase and dark phase

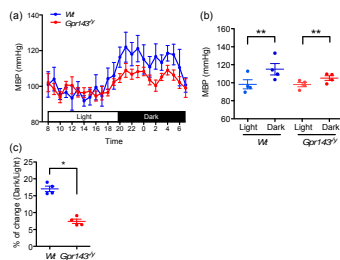


図7 野生型 (Wt) () および GPR143-KO (*Gpr143*^{-/-}) () マウスにおける明期 (Light, 休止期)・暗期 (Dark, 活動期) 血圧の経時変化 (A) および血圧の変動率 (B), (C)。*P<0.001 (n=3-4)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件) 全て査読あり

- Masukawa D, Koga M, Sezaki A, Nakao Y, Kamikubo Y, Hashimoto T, Okuyama-Oki Y, Aladeokin AC, Nakamura F, Yokoyama U, Wakui H, Ichinose H, Sakurai T, Umemura S, Tamura K, Ishikawa Y, Goshima Y. L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular $\alpha 1$ -adrenergic receptor. *JCI Insight*. 2017 Sep 21;2(18). pii: 90903. doi: 10.1172/jci.insight.90903, 2017.
- Ueda S, Masukawa D, Koga M, Goshima Y. 1-3,4-Dihydroxyphenyl- alanine induces ptosis through a GPR143-independent mechanism in mice. *J Pharmacol Sci* 132(1):109-112, doi: 10.1016/j.jphs.2016.08.005, 2016.
- 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, doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.020, 2015.
- Goshima Y, Nakamura F, Masukawa D, Chen S, Koga M. Cardiovascular actions of DOPA mediated by the gene product of ocular albinism 1. *J Pharmacol Sci* 126(1):14-20, <https://doi.org/10.1254/jphs.14R03CR>, 2014.
- 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, doi: 10.1016/j.neures.2014.07.

008, 2014.

- 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(2):403-14, doi: 10.1111/bph.12459, 2014.

〔学会発表〕(計 2 2 件)

- 金井香央里, GPR143 遺伝子欠損マウスにおけるメチルフェニデート, コカイン及びニコチンの行動に及ぼす効果, 第 137 回日本薬理学会関東部会, 2017.
- 瀧澤光太郎, L-DOPA 受容体候補分子 GPR143 のマウス腹側被蓋野及びその投射野における分布, 第 137 回日本薬理学会関東部会, 2017.
- Koga M, Immunoreactive signals of GPR 143 in ventral tegmental areas and its trajectory, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- Nakao Y, Screening for L-DOPA ligands by monitoring central cardiovascular regulation in the nucleus tractus solitarii, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- Masukawa D, L- DOPA sensitizes nervous system by modulating the vascular $\alpha 1$ -adrenergic receptor, 第 40 回日本神経科学大会, 2017.
- 古賀資和, L-DOPA の肺高血圧モデル肺血管におけるフェニレフリン応答の修飾作用, 第 136 回日本薬理学会関東部会, 2017.
- 増川太輝, ドーパ受容体 GPR143 とアドレナリン 1 受容体との機能的連関と複合体形成, 第 136 回日本薬理学会関東部会, 2017.
- Goshima Y, L-DOPA neurotransmitter hypothesis, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017.
- Kitamura S, GPR143 is involved in dopamine D2 receptor-mediated transmission in mice, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017.
- Masukawa D, DOPA-GPR143 signal augments $\alpha 1$ -adrenergic receptor response, 第 90 回日本薬理学会年会 (口頭発表), 長崎, 2017.
- Goshima Y, GPR143, the gene product of ocular albinism 1(OA1), mediates actions of L-DOPA in the cardiovascular system, 9th World Symposium on Ocular Albinism, 2017.
- ジョンソン実歌, 中枢神経系における抗ドーパ抗体を用いた免疫組織化学的検討, 第 135 回日本薬理学会関東部会,

- 2016.
13. 増川太輝, ドーパ受容体 GPR143 はアドレナリン 1 受容体応答を増強する, 第 135 回日本薬理学会関東部会, 2016.
 14. Masukawa D, DOPA-GPR143 signal augments pressor response mediated by α 1-adrenergic receptor, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 15. Okatsu H, General behavioral test in the GPR143-/y mice, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 16. Kitamura K, The effect of dopamine receptors agonists in gpr143-/y mice, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 17. Koga M, Distribution of GPR143-immunoreactive cells in the mouse ventral tegmental area, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 18. Sezaki A, Functional coupling between GPR143, a DOPA receptor, and α 1-adrenergic receptor regulates peripheral sympathetic nerve transmission, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 19. Watanabe S, The generation of antibody against human GPR143 and immunohistochemical analysis of GPR143 in human tissue, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.
 20. 北村 慧, GPR143 遺伝子欠損マウスにおけるドーパミン受容体作動薬の効果, 第 133 回日本薬理学会関東部会, 2015.
 21. Masukawa D, Distribution and function of L-DOPA receptor, ocular albinism 1 (OA-1), in the central nervous system, 第 38 回日本神経科学大会, 2015.
 22. 上田 傑, L-DOPA によって誘発される行動薬理学的変化の解析, 第 132 回日本薬理学会関東部会, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 血圧制御異常の新規治療法
発明者: 五嶋 良郎、中村史雄、増川太輝、
及川雅人
権利者: 五嶋 良郎
種類: 特許権
番号: 特開 2017-100958
出願年月日: 平成 27 年 11 月 30 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~pharmac/01kenkyu00.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五嶋 良郎 (GOSHIMA, Yoshio)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00153750

(2) 研究分担者

古賀 資和 (KOGA, Motokazu)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 00637233

増川 太輝 (MASUKAWA, Daiki)
横浜市立大学・医学部・助手
研究者番号: 10711898

及川 雅人 (OIKAWA, Masato)
横浜市立大学・生命ナノシステム研究科・
教授

中村 史雄 (NAKAMURA, Fumio)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10262023

(3) 連携研究者

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 60343745

一瀬 宏 (ICHINOSE, Hiroshi)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号: 90192492