

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14923

研究課題名（和文）下位脳幹孤束核領域におけるドーパ神経伝達の機能解明

研究課題名（英文）The functional analysis of L-DOPA neurotransmission in the nucleus tractus solitarii

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） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ドーパによる降圧・徐脈反応が、ラットの大動脈神経（ADN）を光遺伝学的に刺激することによって模倣されるか否かを検討した。チャンネルロドプシン2（ChR2）をアデノ随伴ウイルスを用いて ADN に感染させたところ、NTS において ChR2 の一部はチロシン水酸化酵素と共同在した。この条件下において、NTS を光刺激（473 nm、40 mW、20 Hz、20秒）すると、降圧・徐脈反応が惹起され、この応答はドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルの前処置により減弱した。これらのことは、ドーパが ADN から NTS に終末する神経における神経伝達物質であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果より、ドーパが大動脈神経から NTS に終末する神経において、生理的に血圧を調節する可能性が示唆された。この結果はドーパが NTS における神経伝達物質であることを示唆する。従来、ドーパミンの前駆体に過ぎず、それ自体に活性がないと考えられてきたドーパが神経伝達物質として機能することを証明することは、薬理学の教科書を塗り替える可能性を秘めている。この点が本成果の学術的意義である。

研究成果の概要（英文）：We have proposed that L-DOPA is a neurotransmitter in the primary baroreceptor afferents terminating in the nucleus tractus solitarii (NTS). We investigated whether depressor and bradycardic responses to L-DOPA was mimicked by stimulating aortic depressor nerve (ADN) using optogenetic procedure in rats. We injected adeno-associated virus encoding ChR2-EYFP or EYFP into the ganglion of ADN. Four to five weeks after injection, ChR2-EYFP and EYFP signals were partially localized with tyrosine hydroxylase-positive neurons in the NTS of the brain tissues. Photostimulation (473 nm, 40 mW, 20 Hz, 20s) from the surface of the NTS induces depressor, bradycardic response in the animals expressing ChR2-EYFP, but not EYFP in the ADN. The effects of photostimulation were attenuated by treatment with L-DOPA cyclohexylester, an antagonist for L-DOPA, in the NTS, as were those of exogenously applied L-DOPA. These results suggested that L-DOPA is a neurotransmitter in the NTS.

研究分野：薬理学

キーワード：L-DOPA GPR143 Neurotransmitter NTS Aortic depressor nerve

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はドーパミンの前駆体であるドーパが神経伝達物質として振る舞うとの知見を見出し、ドーパ神経伝達物質仮説を提唱してきた (Misu and Goshima, *TIPS*, 1993)。最も重要な課題の一つは、特定の神経刺激がドーパを遊離し、それがシナプス後応答を発揮することを示すことである。申請者は、大動脈神経刺激依存的に延髄孤束核 (NTS) よりドーパが遊離され、ドーパ遊離に伴う降圧・徐脈応答を示すことを示してきた (Yue et al, *Neurosci*, 1994)。しかし、大動脈神経刺激から降圧・徐脈応答に至る神経回路は不明のままであり、また、ドーパ-GPR143 シグナルの圧受容器反射制御における役割も不明なままである。今回、ドーパ合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH) 陽性神経が存在すると考えられる大動脈神経を標識することに成功した。当技術の習得により、大動脈神経の標識、光遺伝学的手法が可能となり、特定の神経を刺激することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究においては、ドーパが、NTS において生理学的に血圧調節分子として機能するか、GPR143 を媒介し、生理作用を示すかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラットの TH 陽性神経が存在すると考えられる大動脈神経に対して、eSynI プロモーターの下流に EYFP により標識されたチャンネルロドプシン 2 (ChR2-EYFP) を発現するアデノ随伴ウイルスを感染させた。目的の神経に ChR2-YFP が発現しているかどうかを確認するために、TH や vGlut2 と ChR2-EYFP が共発現しているかを免疫組織学的染色法により検討した。

(2) 大動脈神経に ChR2-EYFP および EYFP を発現させたラットに対し、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後、NTS 領域に 473 nm のレーザーを照射 (40 mW, 20-100 Hz, 20 s) を行い、神経を活性化させた時の心血管応答を測定した。光刺激による心血管応答を確認した後、その応答がドーパシクロヘキサシルエステル (1 µg) の前処置により拮抗されるかどうかを検討した。また、ドーパの遊離はマイクロダイアリシス法により検出した。

(3) 上記の応答が GPR143 を媒介するか否かを検討するために、GPR143 遺伝子欠損 (GPR143 KO) ラットを作成した。同ラットの 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。

4. 研究成果

(1) 大動脈神経の TH および vGlut2 陽性細胞に ChR2-EYFP が発現しているかどうかを免疫組織学的染色法を用いて検討したところ、ChR2-EYFP が TH および vGlut2 と一部、共局在していた。したがって、大動脈神経の一部は TH 陽性細胞であることが明らかとなった。

(2) 次に、光刺激による大動脈神経刺激がドーパを遊離させるかどうかを検討した。その結果、ChR2-EYFP を発現させたラットにおいて、光刺激依存的なドーパの遊離が認められたが、EYFP 発現群においては、変化は認められなかった (図 1)。

このような条件下において、心血管応答を測定したところ、ChR2-EYFP を発現させたラットにおいて、降圧・徐脈応答が認められた。また、ドーパシクロヘキサシルエステル (1 µg) の前処置により、ドーパおよび光刺激による応答は消失した (図 2)。これらのことは、ドーパが大動脈神経を遊離されることにより、心血管応答を惹起することを示唆する。

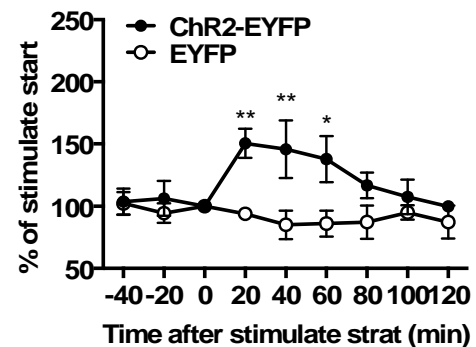


図 1 NTS におけるドーパの遊離。グラフは刺激直前の遊離量を 100% とした時の相対値で示した。青帯は刺激している時間を示す。

(3) このような応答が GPR143 を媒介するかどうかを検討するために、GPR143 KO を作成し、ドーパによる心血管応答を測定した。その結果、ドーパによる降圧・徐脈応答は GPR143 KO ラットにおいても野生型と比較し、同程度だった (未発表データ)。このことより、GPR143 以外の新規ドーパ受容体の存在が示唆された。

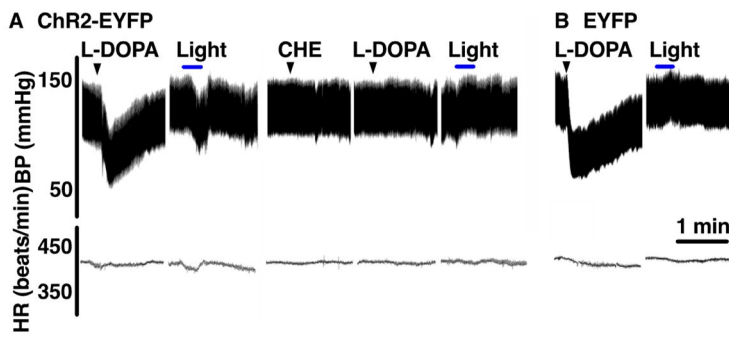


図2 A 大動脈神経に ChR2-EYFP を発現させたラットにおける心血管応答。ドーパおよび光刺激は降圧・徐脈応答を惹起した。また、ドーパシクロヘキシルエステルの前処置はその応答を抑制した。B EYFP を発現させたラットにおいては、ドーパ応答は認められたものの、光刺激応答は起こらなかった。

<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3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masukawa D, Nishizawa D, Kanai K, Kitamura S, Kasahara Y, Hashimoto T, Takahagi R, Hasegawa J, Nakayama K, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Ikeda K, Goshima Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic associations of single nucleotide polymorphisms in the L-DOPA receptor (GPR143) gene with severity of nicotine dependence in Japanese individuals, and attenuation of nicotine reinforcement in Gpr143 gene-deficient mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goshima Y, Masukawa D, Kasahara Y, Hashimoto T, Aladeokin AC	4. 巻 -
2. 論文標題 L-DOPA and Its Receptor GPR143: Implications for Pathogenesis and Therapy in Parkinson's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masukawa D, Yamada K, Goshima Y	4. 巻 141
2. 論文標題 Overexpression of the gene product of ocular albinism 1 (GPR143/OA1) but not its mutant forms inhibits neurite outgrowth in PC12 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 41-48
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daiki Masukawa, Yuka Nakao, Yoshio Goshima
2. 発表標題 Tyrosine hydroxylase (TH) and/or rBAT positive neuron in primary afferent innervates in the nucleus tractus solitarii
3. 学会等名 18th world congress of basic and clinical pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Daiki Masukawa, Yuka Nakao, Yoshio Goshima
2. 発表標題 The localization and innervation of rBAT and tyrosine hydroxylase positive neuron
3. 学会等名 第41回神経科学大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Daiki Masukawa, Yuka Nakao, Hiroki Muneto, Ryang Kim, Haruhiko Bito, Yoshio Goshima
2. 発表標題 An optogenetic approach to identify L-DOPA as a neurotransmitter in the nucleus tractus solitarii
3. 学会等名 第92回薬理学会年会
4. 発表年 2018年～2019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