

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592141
 研究課題名 (和文)
 ヒスタミンH₃受容体を介したモノアミントランスポーター機能調節に関する研究
 研究課題名 (英文)
 A study of regulation for monoamine transporter function via histamine H₃ receptor
 研究代表者
 十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：30236153

研究成果の概要：

ヒスタミンH₃受容体(H₃R)を介するモノアミントランスポーター輸送活性制御機構が存在するか否かを確認するため、ラット脳シナプトソームおよび細胞発現系でのH₃Rおよびその関連物質によるノルアドレナリントランスポーター(NET)の輸送活性および細胞膜発現に対する影響を検討した結果、両実験系でH₃Rを介するNET機能の制御機構の存在が確認されるとともに、NETとH₃Rの蛋白質相互作用によるNET発現制御機構も存在することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯科薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：ヒスタミン、ヒスタミンH₃受容体、モノアミン、トランスポーター、

ノルアドレナリン、COS-7細胞、細胞膜発現、Constitutive activity

1. 研究開始当初の背景

中枢ヒスタミンは動物の摂食行動に関与しており、ヒスタミン神経系の活性化は摂食抑制を惹起する。ヒスタミンH₃受容体(H₃R)は、ヒスタミン神経終末において抑制性オートレセプターとして作用しており、薬物等による活性化は神経終末からのヒスタミン遊離を増加さ

せ、摂食抑制に導く。

一方、セロトニン、ドパミンおよびノルアドレナリンなどのモノアミン神経系も摂食行動に深く関与しており、例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害薬は摂食障害の治療薬としても利用される。

ところで、H₃Rはヒスタミンばかりでなくこ

れらモノアミンの神経終末からの遊離を制御するヘテロレセプターとしての機能も有しているため、摂食行動にはH₃Rを介したモノアミン神経系の制御機構も関与していることが想定される。シナプス間隙におけるモノアミン濃度の上昇は、神経終末からの遊離とトランスポーターによる回収により制御されることから、H₃Rによるモノアミン神経系の制御機構に関しては、ヘテロレセプターとしての遊離制御とトランスポーター機能の修飾という2つの機序が考えられる。モノアミントランスポーターは、Na⁺/K⁺ ATPaseの働きにより生じたNa⁺イオン濃度勾配を駆動力としてモノアミンの細胞内取り込みを行うが、他のイオンチャンネルも無関係ではない。H₃Rは、Na⁺、H⁺、K⁺、Ca²⁺など多くのイオンの出入りに関わっており、トランスポーター機能への関与が想定される。しかし、これまでH₃Rによるモノアミントランスポーター機能の修飾に関する報告はない。

2. 研究の目的

摂食行動においてH₃Rが関与する機構を明確にすることを最終目標とし、本課題では、H₃Rを介したモノアミントランスポーターの機能変化を受容体機能の異なるH₃Rアイソフォームも利用して検討することにより、モノアミン神経活動におけるH₃R関与の機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) H₃Rアイソフォーム過剰発現系の構築

① 遺伝子配列を確認したH₃R cDNA部分を適当な制限酵素で切り出し、蛋白質発現用ベクターに遺伝子移入した。次いで、H₃R配列中のEco47 III制限酵素切断部位を含む領域で設計したセンスプライマーと、H₃RC末端領域とc-Myc標識蛋白質配列からなるアンチセンスプライマーを用い、上記で作成した蛋白質発現プラスミドベクターを鋳型とするPCRを行い、

このPCR産物をH₃R蛋白質発現ベクターに導入した。

② 培養細胞株COS-7にリポフェクション法で遺伝子導入することにより、H₃Rアイソフォーム別過剰発現細胞を作製した。

③ 各H₃Rの細胞膜上への発現評価は抗c-Myc抗体を用い、培養細胞での免疫染色およびH₃R発現細胞の細胞膜画分のウェスタンブロッティングにより行った。

(2) H₃Rを介したモノアミントランスポーター機能修飾の検討

① ラットシナプトソームを用いた検討

定法によりラット脳各部位よりシナプトソームを調製し、ノルエピネフrintランスポーター (NET)、セロトニントランスポーター (SERT)、ドパミントランスポーター (DAT) 各々について、ヒスタミン添加時の基質取り込みへの影響を検討した。さらに、H₃Rアゴニストおよびアンタゴニスト添加時の影響も検討する。各基質には [³H] でラベルしたモノアミンを用い、シンチレーションカウンターにて測定した。

② 培養細胞を用いたNET機能修飾の検討

培養細胞にNETおよびH₃Rを共発現させ、 [³H] ノルアドレナリンの取り込みをヒスタミン、H₃Rアゴニストおよびアンタゴニスト存在下で検討し、トランスポーター機能を評価した。

(3) H₃Rの恒常的活性 (Constitutive activity) の検討

培養細胞株COS-7にリポフェクション法で遺伝子導入することにより、H₃RアイソフォームおよびNETあるいはDATの共発現細胞を作製し、各基質の取り込みを計測してH₃R発現によるConstitutive activityを検討した。

(4) NET発現に対するH₃R発現関与の検討

NET蛋白質の発現はヒトNET1抗体を用いたウェスタンブロットにより、蛋白質相互作用は免疫沈降法により検討した。

(5) NET発現に対するH₃Rシグナル関与の検討

H₃R発現を確認したラット副腎由来培養PC12

細胞にH₃Rアゴニストおよびアンタゴニストを作用させ、一定時間後のNET mRNA発現をReal-time PCR法で定量した。

4. 研究成果

《研究の主な成果》

(1) H₃R 4種アイソフォームと、それぞれのC末端にc-Myc標識蛋白を挿入した蛋白質発現ベクターを得た。

(2) ラットシナプトソームにおいて、ヒスタミンによりNET輸送活性は抑制 (IC₅₀: 443 ± 106 μM) された。DATはヒスタミンによりNETと同程度抑制されたが、SERTは抑制が小さかった。また、H₃R特異的アゴニスト、α-メチルヒスタミンによってもNET輸送活性はHAと同様抑制 (IC₅₀: 54.3 ± 9.1 μM) された。

(3) ヒスタミン受容体アンタゴニストの影響を検討したところ、H₁Rアンタゴニストであるジフェンヒドラミンでは、ほぼ完全に抑制され、これまでの報告と同様の結果が得られた。一方、H₂Rアンタゴニストであるシメチジンでは全く影響が認められず、さらに、H₃Rアンタゴニスト、チオペラミドではNET輸送活性は促進された。

(4) α-メチルヒスタミンによるNETの輸送活性抑制が、H₃Rを介したものであることを確認するためチオペラミドとの併用下におけるノルアドレナリン取り込みを検討した結果、α-メチルヒスタミンによるNETの輸送活性抑制は、チオペラミドにより回復に転じ、部分的に解除されることが認められた。

(5) H₃R遺伝子共発現COS-7細胞でH₃受容体リガンドおよびフォススコリンの影響について検討した結果、脳シナプトソームと同様、NET輸送活性はα-メチルヒスタミンにより有意な減少を、チオペラミドにより有意な増加を示すとともに、フォススコリンによる有意な増加が認められた。なお、先の結果(4)も同様に考察できるが、チオペラミドでNET輸送活性が促進さ

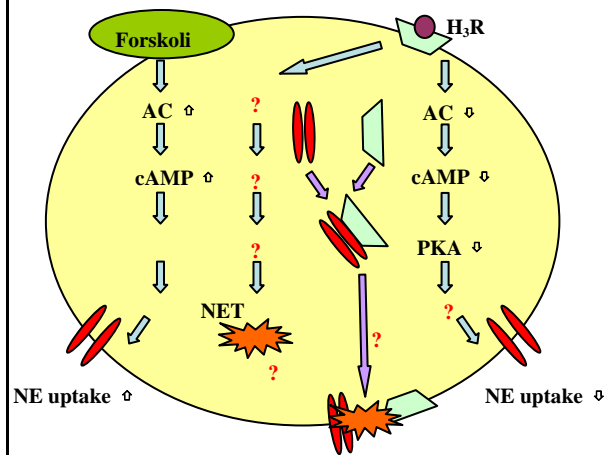
れた事実は、H₃受容体アゴニストでNET輸送活性が抑制されること、およびH₃受容体にはConstitutive activityがあり、この恒常的なH₃受容体活性は、H₃受容体の過剰発現系ばかりでなく生体においても発現していると考えられていることから、H₃受容体アンタゴニストにより恒常的に抑制されていたNET活性が解放された結果を示すものと思われる。

(6) H₃R遺伝子共発現COS-7細胞では、対照群と比べNETおよびDAT輸送活性が低下した。一方、受容体機能を欠失していると考えられる新規H₃Rスプライシングバリエント遺伝子共発現ではNET/DAT輸送活性の低下は抑制された。

(7) H₃Rとの共発現により成熟NET発現は細胞質および細胞膜画分で減少した。また、NETとH₃Rの細胞内での蛋白質相互作用が認められた。

(8) PC12細胞でH₃RアゴニストによるNET mRNAの発現変動を認めた。

以上、本検討の結果は、下図のごとく概略できる。



《得られた成果の国内外における位置づけとインパクト》

今回、われわれはH₃Rを介するNETの機能制御機構の存在を明らかにするとともに、NETとH₃Rの蛋白質相互作用、およびH₃Rシグナルを介するNET発現制御機構存在の可能性を示唆する結果を得た。これまでH₃Rを介したモノアミン

トランスポーター機能変化については報告がなく、H₃Rを介するNETの機能制御機構の存在を示し得たのは本検討結果が唯一のものである。

H₃R遮断薬は、摂食抑制や覚醒をもたらすことから、肥満やナルコレプシーなどの治療薬として期待され、製薬会社の次なる標的薬物の1つと考えられている。本検討結果は、NET機能を踏まえた新規H₃R遮断薬の開発にも関連するため、生活習慣病が蔓延している現代ではその解消の糸口の1つとなり、社会的意義も大きい研究結果であると考えられる。

また、H₃Rとモノアミン神経系の関連は、摂食行動ばかりでなく、モノアミン系の神経伝達物質の異常が関与していることが示唆されている注意欠陥/多動性障害などにおいても注目されており、その詳細な機序解明の一翼を担うことが期待される。

《今後の展望》

本検討により、H₃Rは神経終末からのモノアミン遊離を抑制するだけでなく、トランスポーターの機能や発現にも関与して、モノアミン神経系を制御していることが明らかとなったが、その詳細な機序は未だ明確ではない。

例えば、NET機能はH₃Rの細胞内シグナルにより抑制されると考えられるが、A蛋白キナーゼのリン酸化標的が何であるのかは判明しておらず、また、NET mRNA発現変動がH₃Rのいかなるシグナル伝達系を介しているのかも不明である。さらに、H₃RとNET蛋白質の細胞内相互作用がNET蛋白質の細胞膜輸送に関わる機序の解明も今後の課題である。

今後、上記の問題点についてさらに検討し、H₃Rによるモノアミン神経系の制御機構を明確にすることによって、H₃Rあるいはモノアミン神経系が関連する疾病や病態の原因究明および治療に貢献して行きたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3件)

①十川紀夫, 十川千春, 北山滋雄: キーワード解説「ヒスタミンH₃受容体」日本薬理学雑誌, 133, 168-169, 2009, 査読有.

② Norio Sogawa, Chiharu Sogawa, Kazumi Ohyama, Kenji Onodera, Sigeo Kitayama, Relation of Histamine H₃ receptor with noradrenaline transporter function, Journal of Pharmacological Sciences, 106, Supplement I, 2008, 90P, 査読無.

③北山滋雄, 十川千春, 十川紀夫: カテコールアミントランスポーターの薬理. Clinical Neuroscience, 26(10), 1104-1106, 2008, 査読無.

[学会発表] (計 6件)

①Norio Sogawa, Inhibitory regulation of noradrenaline transporter function by histamine H₃ receptor, Neuroscience 2008 Annual Meeting, 2008年11月19日, ワシントンD.C.

②十川紀夫, ヒスタミンH₃受容体を介するノルアドレナリントランスポーターの機能抑制について, 第36回薬物活性シンポジウム, 第12回日本ヒスタミン学会, 2008年10月24日, 徳島市

③Norio Sogawa, Relation of Histamine H₃ receptor with noradrenaline transporter function, 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月18日, 横浜市

④十川紀夫, ヒスタミンH₃受容体を介するノルアドレナリントランスポーターの機能抑制について, 第112回日本薬理学会近畿部会, 2007年11月16日, 豊中市

⑤十川紀夫, ノルアドレナリントランスポー

ター機能はヒスタミンH₃受容体によって制御されるか, 第49回歯科基礎医学会学術大会, 2007年8月31日, 札幌市

⑥十川紀夫, ヒスタミンH₃受容体を介したノルアドレナリントランスポーター輸送活性制御について, 第111回日本薬理学会近畿部会, 2007年6月15日, 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 30236153

(2) 研究分担者

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80177873

十川 千春 (SOGAWA CHIHARU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10253022

大山 和美 (OOYAMA KAZUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手
研究者番号: 00253021

(3) 連携研究者

小野寺 憲治 (ONODERA KENJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 40133988