

令和4-6年度厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

指定薬物の指定に係る試験法の評価検証に資する研究「3年間のまとめ」

分担研究報告書

危険ドラッグ誘発幻覚作用の測定法開発に関する研究

分担研究者：増川太輝 横浜市立大学 医学部

【研究要旨】

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬である。ドーパの薬理作用は、従来、アミノ酸脱炭酸酵素によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。我々は、ドーパの遊離が、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって増加するのに対して、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制させること、ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化が、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステルによって抑制されることを見出してきた。これらのことは、ドーパが精神症状の一部に関与することを示す。本研究においては、ドーパの遊離、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

セロトニン 2A 受容体とドーパ/GPR143 シグナルとの関連性を明らかにするため、GPR143 欠損マウスを用いて、セロトニン 2A 受容体作動薬である 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) の薬理作用を野生型と比較・検討した。結果、GPR143 欠損マウスにおいて野生型と比較し、DOI による運動量増加作用および側坐核における c-Fos 発現増加作用が増強した。次に、マイクロダイアリシスを用いて、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定を試みたところ、側坐核におけるこれらの神経伝達物質検出が可能となった。さらに、セロトニン 2A 受容体発現 CHO 細胞に DOI を処置すると、ERK リン酸化レベルが上昇し、DOI の効果は GPR143 の共発現により増強した。これらの結果は、GPR143 がセロトニン 2A 受容体応答を負に修飾することを示す。

A. 研究目的

L-3,4-dihydroxyphenylalanine (ドーパ) は、現在でも、最も有効なパーキンソン病治療薬であ

る。ドーパの薬理作用は、アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) によるドパミンへの変換を介して作動し、ドーパ自体に活性はないと考えられてきた。一方において、我々は、ドーパが神経伝

達物質として機能する知見を集積してきた¹⁾。

ドーパは、メタンフェタミンおよびニコチンの投与によって遊離され、コカインはむしろ、ドーパ遊離を抑制する。ニコチンおよびメタンフェタミンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬であるドーパシクロヘキシルエステル (DOPA CHE) によって抑制される^{2,3)}。長い間、ドーパに対する受容体は不明であったが、我々は、眼白子症の原因遺伝子産物である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の GPR143 がドーパ受容体の一つであることを見出した⁴⁾。GPR143 欠損 (GPR143 KO) マウスを用いて表現型解析を行った結果、ニコチンによる運動量変化および報酬効果が、GPR143 KO マウスにおいて野生型 (WT) と比較し、減弱した⁵⁾。また、抗精神病薬の薬理作用についても GPR143 KO マウスにおいて抑制される⁶⁾。これらのことは、精神賦活薬によって遊離されたドーパが、GPR143 を介して精神症状を発現することを示す。

本研究においては、ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離および、ドーパ受容体 GPR143 とセロトニン受容体との機能連関を解析することを通じて、指定薬物の幻覚作用におけるドーパ性神経伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、6-12 週齢の GPR143 KO マウスおよび WT マウス (体重 20-28 g) を用いた。

動物実験は、横浜市立大学動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号 F-A-23-010)。

2. 運動量測定

自発運動量を評価するため、マウスは運動量測定試験の少なくとも 1 時間前に防音室の環境に順化させた。その後、使用するマウスをそれぞれ 70 ルクスの照明条件に設定されたチャンバー (50×50×40cm³) に入れた。移動距離 (cm) は 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) および saline 投与前 60 分、後 120 分間記録した。Open field での活動は、画像ソフト (TimeOFER4 : O'Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて定量化した。

3. 免疫染色

DOI (1 mg/kg) または saline を腹腔内投与し、1 時間後に、イソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。側坐核を含む 50 μm の切片をビブラトームを用いて作成した。抗 c-Fos 抗体 (1:1000, Cell Signaling) を用いて、一次抗体反応後、Alexa fluoro 488 goat anti-rabbit IgG plus 抗体により可視化した。また DAPI を用いて核を可視化した。蛍光シグナルは、AX 顕微鏡 (Leica) により観察した。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を計測し、定量化した。

4. 神経伝達物質遊離量測定

ドーパ、ドパミンおよびセロトニンを同時に測定するために、マイクロダイアリシスを行った。マウスをイソフルラン (3%) の吸入麻酔下で、脳定位装置を用いて頭部を固定し、ガイド (AG-6) およびダミー (AD-6) カニューレ (Eicom, Kyoto, Japan) を側坐核 (Bregma より前方 1.5 mm、左右 0.9 mm、深さ 4.9 mm) に挿入した。手術から 2 日後、マイクロダイア

リシスプローブ (FX-I-6-02, Eicom, Kyoto) を留置していたガイドカニューレに挿入し、2 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速で、リングル液を注入した。2 時間の馴化後、20 分おきにサンプルを回収した。サンプルは、等量の 0.1% ギ酸を含む超純水を展開溶媒として混合し、測定まで -80°C で保存した。回収したサンプルにおけるドーパ、ドパミン、セロトニンの濃度は、MicroLC-MS/MS (Xevo TQS, MA, U.S.A) により測定した。分析カラムには UPLC column ACQUITY HSS T3 C18 (WT186003539, Waters, MA, U.S.A)、とガードカラムには guard column (WT186003976, Waters, MA, U.S.A) を、移動相には 3% アセトニトリルと 0.1% ギ酸を含む超純水を用いた。

5. ウェスタンブロット解析

セロトニン 2A (5-HT2A) 受容体-mCherry を安定に発現している Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に、FuGENE6 を用いて Gpr143-flag および pSN-flag プラスミドでそれぞれ導入した。2 日間の培養後、DOI (1 および 10 μM) を処理し、免疫沈降バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 0.1% Nonidet P-40, 0.1% プロテアーゼ阻害剤) で溶解した。サンプルを SDS-PAGE (9%) で分離、PVDF メンブレンに転写し、抗 extracellular signal-regulated kinase (ERK)、pERK 抗体 (#9102, #9101, Cell Signaling) を用いて各タンパク質量を定量した。

6. 統計解析

全てのデータは、平均値±標準誤差により示し、Prism 10 により解析した。データは三元または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行い、ポストホックテストとして、Tukey's または Bonferroni's multiple comparison test により比較した。

C. 研究結果

1. GPR143 は DOI による薬理作用を負に制御する

GPR143 が 5-HT2A 受容体応答を修飾するか否かを明らかにするため、まず、DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与による自発運動促進作用を WT および GPR143 KO マウスを用いて比較・検討した。DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させた。その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,26)=39.76$, $P<0.001$; genotype, $F(1,26)=5.430$, $P=0.028$; interaction, $F(1,26)=4.757$, $P=0.038$, 図 1)。次に、DOI (1 mg/kg) 投与による側坐核における c-Fos 発現変化について検討した。運動量と同様、DOI は WT および GPR143 KO マウスの自発運動量を促進させ、その効果は GPR143 KO において、WT マウスと比較し増強された (drug, $F(1,16)=94.77$, $P<0.001$; genotype, $F(1,16)=2.951$, $P=0.105$; interaction, $F(1,16)=5.543$, $P=0.032$, 図 2)。

2. ドーパ、ドパミン、セロトニンは側坐核より遊離する

我々は昨年度の報告においてドーパとドパ

ミンの同時測定系を確立している⁶⁾。検出時間を延長させたところ、ドーパ、ドパミンに加えてセロトニンのスタンダードシグナルが検出され、このシグナルは側坐核におけるマイクロダイアリシスサンプルでも確認できた(図3)。よって脳内における3種類の神経伝達物質の同時測定系が確立できた。来年度には幻覚薬によるドーパ遊離の変化を解析する予定である。

3. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化を抑制する

次に、5-HT_{2A} 受容体と GPR143 の直接的な機能連関を明らかにするため、5-HT_{2A} 受容体を安定的に発現する CHO 細胞に GPR143 を発現させ、DOI 刺激による ERK のリン酸化反応を検討した。DOI は ERK のリン酸化タンパク質量を増加させたが、その効果は GPR143 を発現させることにより増強した(dose, $F(2,28)=35.50$, $P<0.001$; plasmid, $F(1,14)=4.726$, $P=0.047$; interaction, $F(2,28)=4.619$, $P=0.019$, 図4)。これらの結果は、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を負に制御することを示唆する。

D. 考察

本研究では、GPR143 KO マウスにおいて DOI による運動量促進作用および c-Fos 発現増加作用が増強された。また、ドーパ、ドパミン、セロトニンの同時測定系を確立した。これらの結果は、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を負に修飾することを示す。

ドーパは、GPR143 のリガンドなので、内在性に遊離するドーパが、5-HT_{2A} 受容体の機能

を制御する可能性が高い。ドーパの遊離は、メタンフェタミンやニコチンなどのドパミン神経賦活薬によって、増加する。メタンフェタミンおよびニコチンによる行動変化は、ドーパ拮抗薬である DOPACHE により抑制される^{2,3)}。今後は、ドーパが GPR143 を媒介し、精神症状を示すのか？ドーパは、指定薬物による幻覚作用を媒介するのか？ドーパはどのような指定薬物によって遊離されるのか？を明らかにする必要である。

GPR143 は、他の GPCR と複合体を形成することによって、その機能を修飾することが報告されている。実際に GPR143 は、アドレナリン $\alpha 1$ 受容体との機能連関を介して生理的な血圧調節を担う⁴⁾。線条体において、ドパミン D₂ 受容体と相互作用し、ドパミン D₂ 受容体を介する薬理作用を調節する^{6,7)}。本年度の CHO 細胞を用いた実験結果より、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を負に修飾することが明らかとなった。このことは、GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を複合体形成を介して抑制している可能性を示唆する。GPR143 とセロトニン 2A 受容体との機能連関メカニズムについて、更なる検討が必要である。

E. 結論

本研究では、① GPR143 が 5-HT_{2A} 受容体応答を抑制することを明らかにし、②ドーパ、ドパミン、セロトニンの遊離測定系を確立した。ドーパ測定系が指定薬物の評価に有効であるかを検討する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Misu Y, Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? *Trends Pharmacol Sci* 1993;14(4):119-23.
- 2) Goshima Y, Miyamae T, Nakamura S *et al.* Ventral tegmental injection of nicotine induces locomotor activity and L-DOPA release from nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1996; 309(3):229-33.
- 3) Matsushita N, Misu Y, Goshima Y. *In vivo* antagonism of the behavioral responses to L-3,4-dihydroxyphenylalanine by L-3,4-dihydroxyphenylalanine cyclohexyl ester in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2009;605(1-3):109-13.
- 4) Masukawa D, Koga M, Sezaki A *et al.* L-DOPA sensitizes vasomotor tone by modulating the vascular alpha1-adrenergic receptor. *JCI Insight* 2017; 2(18). pii: 90903. doi: 10.1172/jci.insight.90903.
- 5) Masukawa D, Nishizawa D, Goshima Y, *et al.* 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. *J Pharmacol Sci.* 2020;144(2): 89-93.
- 6) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, *et al.* Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* in press.
- 7) Masukawa D, Kitamura S, Goshima Y, *et al.* Coupling between GPR143 and dopamine D2 receptor is required for selective potentiation of dopamine D2 receptor function by L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the dorsal striatum, *J Neurochem*, 2023; doi: 10.1111/jnc.15789.
- 8) Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004; 101:131–181. [PubMed: 14761703]

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masukawa D (corresponding author), Takahagi R, Nakao Y, Goshima Y. L-DOPA Receptor GPR143 Functionally Couples with Adrenergic α 1B Receptor at the Second Transmembrane Interface. *Biol Pharm Bull.* 46: 869-873, 2023
- 2) Uchimura H, Kanai K, Arai M, Inoue M, Hishimoto A, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Involvement of the L-DOPA receptor GPR143 in acute and chronic actions of methylphenidate. *J Pharmacol Sci.* 152: 178-181, 2023
- 3) Arai M, Suzuki E, Kitamura S, Otaki M, Kanai K, Yamasaki M, Watanabe M, Kambe Y, Murata K, Takada Y, Arisawa T, Kobayashi K, Tajika R, Miyazaki T, Yamaguchi M, Lazarus M, Hayashi Y, Itoharu S, de Kerchove d'Exaerde A, Nawa H, Kim R, Bito H, Momiyama T, Masukawa D (corresponding author), Goshima Y. Enhancement of haloperidol-induced catalepsy by GPR143, an

L-DOPA receptor, in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* in press.

2. 学会発表

1) 荒井柗美、増川太輝、北村慧、大瀧百々代、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介してハロペリドールによる錐体外路様症状を修飾する第 95 回日本薬理学会年会 (2022 年 11 月 30 日-12 月 3 日)

2) 荒井柗美、増川太輝、鈴木江津子、北村慧、大瀧百々代、靱山俊彦、五嶋良郎. コリン介在性神経 L-DOPA 受容体 GPR143 は、ドパミン D2 受容体との機能連関を介して haloperidol 誘発性錐体外路様症状を修飾する. 第 147 回日本薬理学会関東部会 (2023 年 3 月 21 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得、実用新案登録、その他

特になし

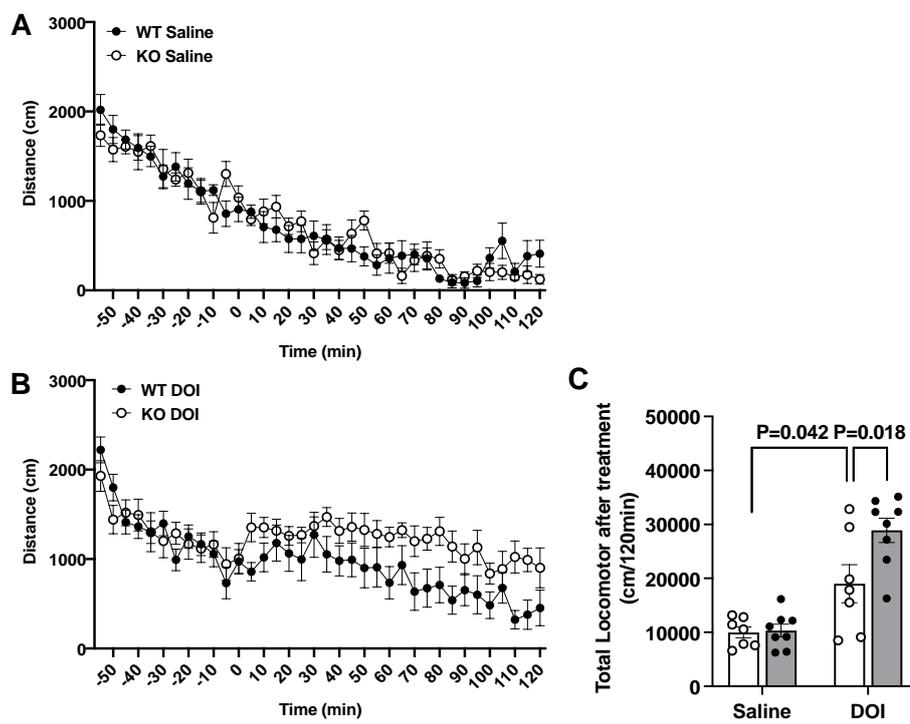


Fig. 1. DOI 投与による運動量の変化

(A) 生理食塩液 (Saline) または (B) DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与前後の WT マウスおよび GPR143 KO マウスにおける運動量変化。(C) は薬物投与後の総運動量を示す。

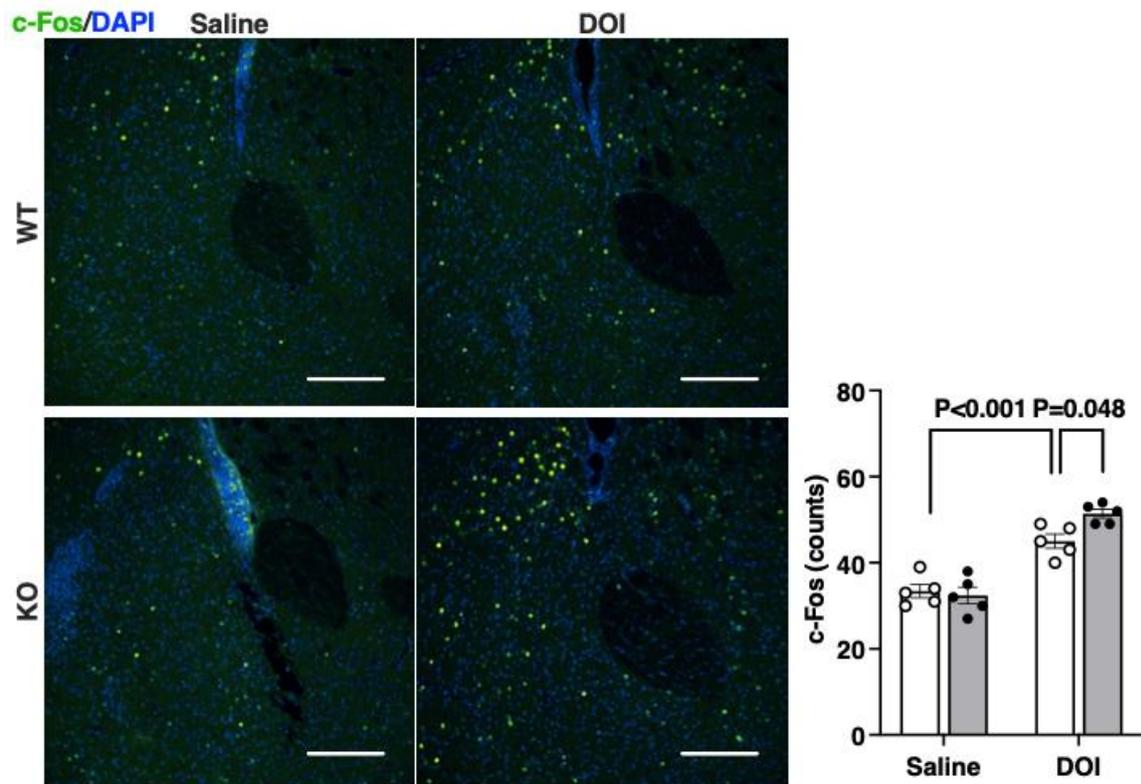


Fig. 2. DOI 投与による側坐核における c-Fos 発現変化

生理食塩液 (Saline) または DOI (1 mg/kg) 腹腔内投与後の WT マウスおよび GPR143 KO マウス側坐核における c-Fos 発現変化 (左図)。緑で c-Fos、青で DAPI を示す。スケールバーは 200 μ m。側坐核における c-Fos 陽性細胞数を定量化したもの (右図)。

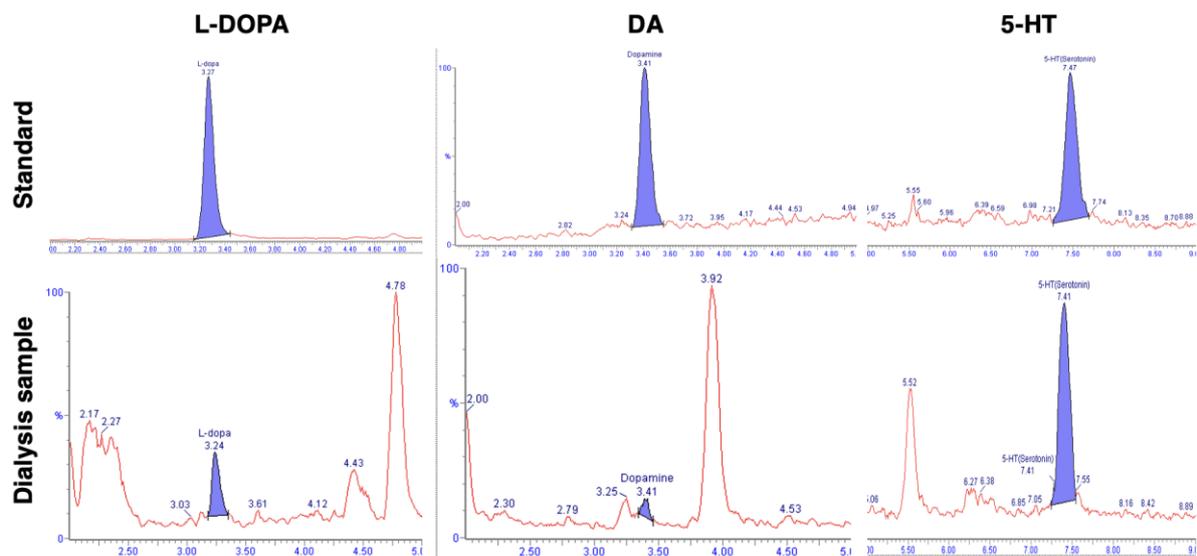


Fig. 3. 側坐核における L-DOPA、ドパミン (DA)、セロトニン (5-HT) の遊離
 LC-MS/MS を用いて L-DOPA、DA、5-HT のスタンダード (上図) および側坐核における遊離を
 検出したもの (下図)。スタンダードとダイアリスサンプルでほぼ同じリテンションタイムを示
 すピークが得られた。

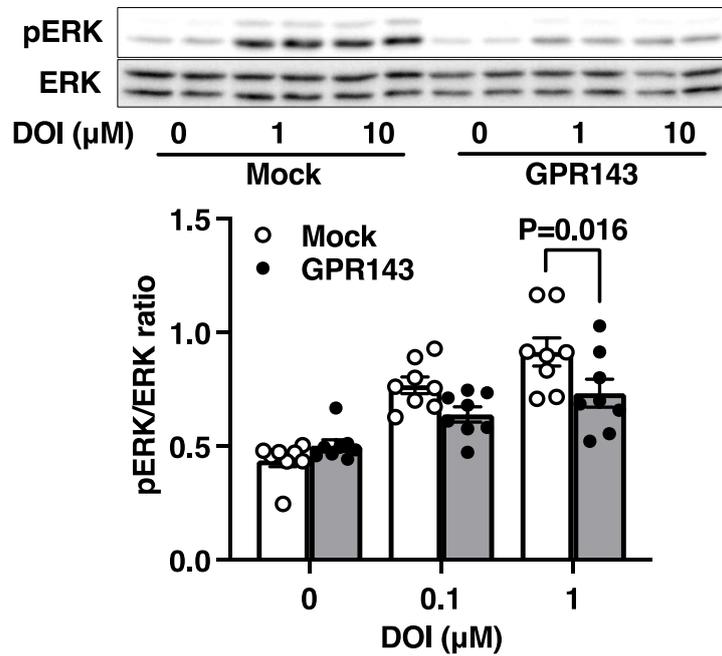


Fig. 4. GPR143 は DOI による ERK のリン酸化応答を抑制する

GPR143 もしくは Mock ベクターを発現させた 5-HT_{2A} 受容体発現 CHO 細胞に、DOI (1, 10 μM) を処置した際のリン酸化 ERK (pERK) タンパク質の発現変動。定量データは pERK/ERK のシグナル比を計算することにより算出した。