

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08332

研究課題名(和文) グレリン投与によるレット症候群の治療メカニズムの解明 - 脳内ドーパミン神経の役割 -

研究課題名(英文) Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of Rett syndrome -Role of central dopaminergic neurons-

研究代表者

河原 幸江 (Kawahara, Yukie)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：10279135

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)：グレリンはレット症候群モデルマウスの症状を治療できるのかを評価し、その治療作用の機序を調べた。

グレリンの全身投与は、モデルマウスの寿命や振戦などの症状に影響しなかったが、認知機能の改善作用をもつことが示唆された。そこで、モデルマウスにおいて、認知機能に重要な前頭前野のドーパミン神経活動を調べたところ、ドーパミン受容体シグナルを介してドーパミン神経活動が抑制され、外部刺激に対するドーパミン神経の応答性が減弱していることがわかった。グレリンはこのドーパミン受容体シグナルを介するドーパミン神経活動抑制を弱めることで、ドーパミン神経応答性を回復させる作用があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、成長ホルモンの一つであるグレリンがレット症候群モデルマウスに治療効果をもつのかを検討した。その結果、グレリンは、レット症候群モデルマウスにみられる短い寿命や運動障害には有効でなかったが、物体に対する認知機能障害を改善する作用がみられた。このグレリンの認知機能改善作用は、前頭前野のD1受容体シグナルを介するドーパミン神経活動の調節機構を改善する作用によるものであることが示唆された。したがって、グレリンはレット症候群の全身状態を改善する作用はないが、認知機能改善薬として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the therapeutic effects of ghrelin in a mouse model of Rett syndrome.

Systemic injection of ghrelin did not affect general phenotype, however, significantly improved cognitive function in the model mice. Therefore, we next studied the ability of dopamine release in the prefrontal cortex, that is critical for cognitive function. The results revealed that external stimuli-induced dopamine release is low in the model mice. The low responsiveness of dopamine release is mediated via the D1 receptor signaling strongly inhibiting dopamine release. Ghrelin blocked the dopamine inhibitory pathway via D1 receptor signaling and, in addition, stimulated the dopamine increasing pathway via D1 receptor signaling, resulting in the rescue of dopamine response to the external stimuli.

Thus, ghrelin has therapeutic effects on cognitive function, but not other phenotype in a mouse model of Rett syndrome.

研究分野：神経薬理学

キーワード：グレリン ドーパミン レット症候群 前頭皮質 D1受容体

1. 研究開始当初の背景

レット症候群は、運動機能障害、自閉症様の情動障害、重度の知的障害など多様な症状を呈する神経系発達障害である。これまで、本症候群患者の主要原因遺伝子である MECP2 遺伝子を中心に基礎的な研究がなされているが、病態解明には至っておらず、根本的な治療法がない。

グレリンは、主に胃から分泌される代謝調節ホルモンで、カヘキシアの改善作用や自律神経調節作用、抗炎症作用など多彩な生理作用を有しており、あらゆる疾患への有効性が検証されている。研究協力者の高橋・松石らの研究で、レット症候群患者では、臨床症状に相関した血中グレリンの低下がみられ、グレリン投与でジストニアや振戦の改善が認められた(Yuge et al., 2017)。これは、病態により低下したグレリンが補充されたためと予測されるが、その治療効果の機序は不明である。

そこで本研究は、このグレリンの治療効果の神経調節機序に着目した。振戦などの錐体外路症状は、黒質から線条体へ投射される黒質線条体系ドーパミン神経の機能が低下した場合にみられる。また、情動や認知機能の障害に関わる機能は腹側被蓋野から前頭皮質へ投射する中脳皮質系ドーパミン神経が重要な役割を担っている。申請者らは、グレリンが中脳辺縁系ドーパミン神経に対し、強力な活動調節作用をもつことを報告しており(Kawahara et al., 2009; Kawahara et al., 2013)、グレリンは黒質線条体系と中脳皮質系のドーパミン神経にも作用する可能性が高いと考えた。

本症候群は希少疾患であるため(女児約1万人~1万5千人に1人)、研究数が少なく、治療法の開発が推進されにくい現状がある。しかし、国内の推定患者数は平成21年度調査で1030人であり、現実にはさらに多いと考えられる。本研究の創造性として、有効で確実な薬物治療法の開発を目指すことに加え、本希少疾患の社会的認知度を広め、治療法開発を推進する可能性を高めることも考えた。

2. 研究の目的

レット症候群の脳内ドーパミン神経の病態への関与と、グレリンの治療効果がドーパミン神経作用によるものか否かを検討することを目的とした。具体的には、レット症候群モデルマウスのドーパミン放出調節障害とドーパミンの行動学的障害への関与を明らかにし、グレリンがドーパミン神経作用により治療効果を発揮する神経調節機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

➤ 使用したマウスについて

Mecp2^{-/+} female mice (B6.129P2(C)-*Mecp2*^{tm1.1Bird}/J strain)とC57BL/6 male miceの交配により得られた雄性 *Mecp2*^{-/-} KO mice と 雄性 control *Mecp2*^{+/+} mice (WT)(7週齢~)を用いた。

➤ 薬物について

ラットアシル化グレリン(PEPTIDE INC, Osaka, Japan)を生理食塩水に溶解し、8.6 mg/mouse を皮内投与(s.c.)した。

➤ ドーパミン検出について

全身麻酔下(セボフルラン・キシラジン併用)において、マイクロダイアリスプローブ植入手術を実施し、2日間の回復期間を置いてオンラインアプローチにてドーパミンを回収した。ドーパミンの検出は、HPLC-電気化学検出器を用いて実施した。

➤ 新規環境暴露刺激について

マウスが一度も入ったことのないアクリルボックスに20分間暴露した。

➤ 行動試験について

● 嗜好性新規物体認知試験

正方形のテストアリーナの4隅にそれぞれ、新規物体、既知の物体、嫌悪物体(ビー玉)、物体無しを設置し、これらの4隅の場所での滞在時間を評価した。

● 巣作り行動

アルファネスト(LBS Biotechnology, RH6 OUW, UK)に暴露後、24 h, 48 h, 96 h, 7日、10日経過時に巣作りの評価を実施した。0: nest material untouched; 1: nest material nearly untouched; 2: nest material scattered, no clear shape evident; 3: nest of intermediate quality; 4: nest round and well built (De Filippis et al., 2015)。

● フェノタイプの評価

8のパラメータによってスコア化した(wheezing, tremor, akinesia, hind limb clasp, posture, apnea and general condition (hair and eyes)).スコア0: 症状無し、スコア1: 症状あり、スコア2: 重篤な症状

➤ 実験群の設定について

行動試験は、本症候群の患者に特徴的な症状を反映する試験を中心に実施した。オープンフィールド試験、Novelty Suppressed Feeding Test, 社会的行動試験、Y迷路試験、新規物体再認識試験などの行動試験を実施した。

寿命、体重変化、振戦、毛並み、開眼状態、呼吸状態、後肢の屈曲、巣作り行動などの全身状態の経時的変化を観察した。

前頭皮質のドーパミン神経放出量を、マイクロダイアリシスを用いて測定した。これによって、外部からの刺激(新規環境暴露)によるドーパミン応答性を評価した。このドーパミン応答性の評価は、健常マウスにおいて、コカインやその関連キューでも充分確認した(Kawahara et al., 2021)。

線条体のドーパミン神経放出量もマイクロダイアリシスを用いて測定した。これらの実験で、グレリンを投与した群と投与しないコントロール群を作成し、グレリンのドーパミン神経作用を評価した。

4. 研究成果

複数の行動試験で、モデルマウスは特に新規物体再認識試験で認知機能の低下がみられた。他のY迷路試験や社会性行動試験などは意外にも野生型と差がみられなかった。

グレリン急性投与群は認知機能の有意な改善がみられた。

モデルマウスは、これまでの報告と一致して、特有の症状を示した。すなわち、短命、低体重であり、呼吸状態が7週齢以降から悪化する。ほぼ同時期に毛並みが悪くなり、振戦も示した。ほぼ観察期間を通して後肢の屈曲を示した。巣作り行動は全く見られなかった。

グレリン急性投与群および慢性投与群のどちらも、これらの全身的な症状は改善しなかった。

前頭皮質のドーパミン神経放出量について、基礎放出量やドーパミン代謝物はモデルマウスは野生型と差がなかった。外部からの刺激(新規環境暴露)で誘発されるドーパミン応答性を評価したところ、野生型でみられるドーパミン応答はモデルマウスではほぼみられなかった。認機能に深い関与をもつドーパミン D1 受容体の作動薬および遮断薬を還流し、ドーパミンの変細胞外量の変動の結果から、野生型では D1 受容体シグナルを介するドーパミン抑制経路とドーパミン刺激経路があることが示唆された。モデルマウスにおいて、この D1 受容体シグナルを介するドーパミン抑制経路が優位となっており、これがドーパミン応答を消失させている原因であることが示唆された。野生型のグレリン投与群では、ドーパミン基礎放出量が増加し、ドーパミン応答性には影響がなかった。モデルマウスのグレリン急性投与群では、ドーパミン基礎放出量には影響しなかったが、ドーパミン応答が野生型と同じレベルまで回復した。このドーパミン応答の回復には、グレリンの D1 受容体シグナルを介するドーパミン抑制経路の遮断とドーパミン刺激経路の増強作用があることが示唆された。

線条体のドーパミン神経放出量について基礎放出量やドーパミン代謝物はモデルマウスは野生型と差がなかった。グレリンの投与によるドーパミン放出量の変動は、前頭皮質に比較して小さかったことから、前頭皮質のドーパミン神経放出量に研究焦点を絞った。

これらの研究結果から、グレリンの投与は、レット症候群の全身状態の悪化には影響しないが、認知機能を改善する作用をもつことがわかった。このグレリンの認知機能改善作用は、D1 受容体シグナルを介するドーパミン神経放出量の調節作用を是正することで、外部からの刺激によるドーパミン応答性を回復させることによるものであることが示唆された。

本研究結果から、グレリンやグレリン様物質、合成グレリンはレット症候群の全身状態悪化に対する治療作用はないが、認知機能障害の治療薬となる可能性が示唆された。

References

- De Filippis B, Musto M, Altabella L, Romano E, Canese R, Laviola G (2015) Deficient Purposeful Use of Forepaws in Female Mice Modelling Rett Syndrome. *Neural Plast* 2015:326184.
- Kawahara Y, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Kawahara H, Nishi A (2021) Distinct Role of Dopamine in the PFC and NAc During Exposure to Cocaine-Associated Cues. *Int J Neuropsychopharmacol* 24:988-1001.
- Kawahara Y, Kaneko F, Yamada M, Kishikawa Y, Kawahara H, Nishi A (2013) Food reward-sensitive interaction of ghrelin and opioid receptor pathways in mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 67:395-402.
- Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Yamada M, Nishi Y, Tanaka E, Nishi A (2009) Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states. *Neuroscience* 161:855-864.
- Yuge K, Hara M, Okabe R, Nakamura Y, Okamura H, Nagamitsu S, Yamashita Y, Orimoto K, Kojima M, Matsuishi T (2017) Ghrelin improves dystonia and tremor in patients with Rett syndrome: A pilot study. *J Neurol Sci* 377:219-223.

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 Kawahara Yukie, Ohnishi Yoshinori N, Ohnishi Yoko H, Kawahara Hiroshi, Nishi Akinori	4. 巻 24
2. 論文標題 Distinct Role of Dopamine in the PFC and NAc During Exposure to Cocaine-Associated Cues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 988 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ijnp/pyab067	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 Sugiyama Keita, Kuroiwa Mahomi, Shuto Takahide, Ohnishi Yoshinori N., Kawahara Yukie, Miyamoto Yuta, Fukuda Takaichi, Nishi Akinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Subregion-Specific Regulation of Dopamine D1 Receptor Signaling in the Striatum: Implication for L-DOPA-Induced Dyskinesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6388 ~ 6414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0373-21.2021	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 Mifune Hiroharu, Tajiri Yuji, Sakai Yusuke, Kawahara Yukie, Hara Kento, Sato Takahiro, Nishi Yoshihiro, Nishi Akinori, Mitsuzono Ryouichi, Kakuma Tatsuyuki, Kojima Masayasu	4. 巻 244
2. 論文標題 Voluntary exercise is motivated by ghrelin, possibly related to the central reward circuit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0213	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yukie Kawahara, Yoshinori N. Ohnishi, Yoko H. Ohnishi, Hiroshi Kawahara, Akinori Nishi.
2. 発表標題 Distinct role of dopamine in the PFC and NAc during exposure to cocaine-associated cues
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 Yoshinori Ohnishi, Yukie Kawahara, Yuki Kishi, Yoko Ohnishi, Akinori Nishi.
2. 発表標題 What methods are physiologically or pharmacologically effective for attracting female mice?
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 Yukie Kawahara, Yoshinori N Ohnishi, Yoko H Ohnishi, Hiroshi Kawahara, Akinori Nishi.
2. 発表標題 Cocaine-induced conditioned place preference and locomotor response are distinctively regulated by glutamate and dopamine receptor signaling in the prefrontal cortex.
3. 学会等名 32nd CINP2021VIRTUAL WORLD CONGRESS
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原 幸江、大西 克典、大西 陽子、河原 博、西 昭徳.
2. 発表標題 コカインによる条件付け場所嗜好性に関わる前頭前野と側坐核ドーパミンの異なる役割
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会/第51回日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 枚山 慶太、黒岩真帆美、首藤 隆秀、大西克典、河原幸江、宮本雄太、福田孝一、西 昭徳.
2. 発表標題 線条体におけるドーパミンD1受容体シグナルの領域特異的な制御：L-ドーパ誘発性ジスキネジアとの関連性
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukie Kawahara, Yoshinori N Ohnishi, Yoko H Ohnishi, Hiroshi Kawahara, Akinori Nishi.
2. 発表標題 コカイン誘発性の場所嗜好性と行動量変化はそれぞれ前頭前野のグルタミン酸受容体およびドーパミン受容体シグナリングを介する個別の経路で制御される
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西 克典, 河原 幸江, 大西 陽子, 西 昭徳
2. 発表標題 お酒の力でモテないオスマウスはメスマウスの興味をひくことができるのか？
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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	河原 博 (Kawahara Hiroshi) (10186124)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	大西 克典 (Ohnishi Yoshinori) (10626865)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

	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
研究協力者	高橋 知之 (Takahashi Tomoyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	松石 豊次郎 (Matsuishi Toyojirou)		

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