

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300153

研究課題名（和文）ラットモデルを用いた本態性振戦の遺伝的要因の解明

研究課題名（英文）Identification of genetic components in a rat model of essential tremor

研究代表者

庫本 高志（KURAMOTO TAKASHI）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20311409

研究成果の概要（和文）：

先天的に振戦を示す突然変異ラット（TRM ラット）を本態性振戦のモデルとして確立した。TRM ラットを用いた遺伝解析ならびにノックアウトマウスを用いた解析によって、Hcn1 と Aspa が本態性振戦の原因遺伝子であることを明らかにした。おもしろいことに、Hcn1 のみ、あるいは Aspa のみの遺伝子機能不全では本態性振戦は引き起こされない。Hcn1 の機能不全と Aspa の機能不全が同時におこることで本態性振戦が引き起こされる。ヒトにおいても、複数の遺伝子の組み合わせで本態性振戦が生じると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We established TRM rat as a good model of essential tremor (ET). Using the rat and mouse model systems, we identified Hcn1 and Aspa as genetic components essential to express ET. Interestingly, either Hcn1 or Aspa alone could not induce any ET in rat or mouse model system. Simultaneous inactivation of both Hcn1 and Aspa gene functions could induce ET. These findings suggest that HCN1 and ASPA are also essential to express the human ET.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル、亜系統、本態性振戦、順遺伝学、ラット、アスパルトアシラーゼ、HCN1 チャネル、下オリーブ核

1. 研究開始当初の背景

本態性振戦は、成人で最も頻繁に見られる進行性の神経系疾患のひとつで、腕の運動性振戦を主な症状とする。手がふるえて字を書きづらい、道具をうまく扱えないなどといった不便が生じ、患者の Quality of Life は損なわれる。これまで振戦が唯一の症状であると考えられてきたが、近年、運動失調、静止時振

戦さらには認知障害や人格障害などの神経症状を伴うことが判明し、本態性振戦は complex disease のひとつとして考えられるようになった。

本態性振戦では、約半数の症例で家族歴があり、遺伝的要因の関与は無視できない。これまで3つの感受性遺伝子座が同定されているが、原因遺伝子変異の同定には至っていない。

また、未同定の感受性座位が複数あると考えられている。

ヒト本態性振戦を示す家系が非常に限られていること、さまざまな環境要因で振戦の表現型が修飾されることなどから、ヒトにおける本態性振戦の遺伝解析は容易ではない。

そこで、本態性振戦の発症に係わる遺伝的要因を突き止めるには、厳密な遺伝統御が可能で、中枢神経系疾患モデルとして有用なラットの利用が効果的である。

我々は振戦を示す突然変異系統である Tremor rat (TRM ラット) とその垂系統で振戦を示さない Tremor Resistant rat (TRMR ラット) を用いた遺伝学的解析により、本態性振戦の発症にかかわる遺伝子を同定することを企画した。

TRM と TRMR は、tm 欠失をとにもつ。tm 欠失領域には少なくとも 12 の遺伝子が存在する。TRM と TRMR が示す中枢の空胞変性の原因遺伝子は Aspa (アスパルトアシラーゼ) である。また、TRM と TRMR が示す被毛異常の原因遺伝子は Trpv3 (パニロイド受容体 3) である。

振戦の原因遺伝子 (以下 tremor1 (trm1) と記す。) は、これら 2 個の遺伝子と残り 10 個の遺伝子のいずれかと考えられ、後者には Trpv1 (パニロイド受容体 1) や 7 種類の臭覚受容体が含まれる。また、tm 欠失内の遺伝子のうち、遺伝子変異マウスが知られているものは Aspa, Trpv1, Trpv3 であるが、いずれの変異マウスも振戦を示さない。

繰り返すが、TRM の振戦の発現には、trm1 ひとつでは不十分で、さらなる変異 trm2 が必要であることが示唆された。TRM ラットは trm1 と trm2 を有し、振戦を示す。一方、TRMR は trm1 のみを有し、振戦を示さない。

2. 研究の目的

本研究では、最初に、TRM の振戦とヒト本態性振戦の類似性を示す。次いで、TRM と TRMR を用いた遺伝解析から、trm2 を同定する。さらに、マウスの系において、ダブルミュータントを作出し、trm1 を同定する。複数の遺伝子変異の組み合わせによって、本態性振戦が発現することを示し、ヒト本態性振戦の発症に関する遺伝モデルを提示する。

3. 研究の方法

(1) TRM ラットの振戦の行動薬理学的評価
4-5 週齢の TRM ラットに、被検薬を投与し、薬物の投与前および投与後 15 分、30 分、45 分、60 分の時点で目視による 1 分間の行動観察を行った。

被験薬には、パーキンソン病性振戦の治療薬 trihexyphenidyl、ヒト本態性振戦の治療に有

効とされる β 受容体遮断薬 propranolol、ベンゾジアゼピン作動薬 diazepam、抗てんかん薬 phenobarbital を用いた。

(2) 振戦時の神経活動部位の同定

4-5 週齢の TRM ラットと対照系統である WTC ラットから麻酔下にて脳を摘出し、免疫組織学的手法により、前脳から脳幹部位にいたる脳部位における Fos 免疫陽性細胞数を計測した。

(3) TRM ラットの本態性振戦の原因遺伝子同定

(TRM x TRMR)F1 x TRM 戻し交雑子 154 頭を作出した。離乳時の振戦の有無により trm2 座位のタイピングを行った。TRM と TRMR で差異のあるゲノム領域 (第 2, 4, 5, 9, X 染色体) について連鎖解析を行った。

Trm2 座位の候補遺伝子について、RT-PCR により遺伝子の発現レベルを比較し、さらにダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定・比較した。

(4) マウスモデルでの再構成

Aspa, Trpv1, Hcn1 遺伝子ノックアウトマウス入手し、掛け合わせによって、Aspa/Hcn1, Trpv1/Hcn1 ダブルノックアウトマウスを作製した。離乳時における振戦の有無を観察した。

(5) Hcn1 チャンネルの電気生理学的解析

野生型 Hcn1 遺伝子と変異型 (A354V) Hcn1 遺伝子の mRNA をそれぞれアフリカツメガエルの卵に注入し、HCN1 チャンネルを発現させた。卵の膜電位を -20mV から 10mV ずつ脱分極させ流入する陽イオンを測定した。

(6) Hcn1 拮抗剤を用いた振戦の再構成

TRMR ラット (trm1 はホモ型、trm2 は野生型で振戦を示さない) に選択的 HCN1 チャンネル拮抗薬 ZD7288 を脳室内投与した。

4. 研究成果

(1) TRM ラットの振戦の行動薬理学的評価
TRM の振戦は、trihexyphenidyl では抑制されなかったが、propranolol、diazepam、phenobarbital に抑制された。TRM の振戦の薬剤反応性は、ヒト本態性振戦のそれと類似していた。ゆえに、TRM ラットは、ヒト本態性振戦のモデル動物としての有用であると確認できた。

(2) 振戦時の神経活動部位の同定

対照系統の WTC ではいずれの脳部位でも顕著な Fos 蛋白発現は認められなかったが、TRM ラットでは、大脳皮質、視床下部、下

オリブ核で有意な Fos 発現が認められた。ゆえに、TRM ラットの振戦の発現には、大脳皮質、視床下部、下オリブ核の神経活動が関与していることが示唆された。

(3) Trm2 の同定

連鎖解析の結果、trm2は第2染色体47-51Mbの領域にマップされた。この領域には5個の遺伝子が既にマップされていた。これらの遺伝子のうち、Hcn1 遺伝子を候補遺伝子とした。Hcn1 遺伝子は、過分極で活性化される陽イオンチャネルHCN1をコードしている。TRM ラットと TRMR ラットの脳におけるHcn1 発現量を解析したところ、両系統間で差異はなかった。次いで、Hcn1 遺伝子のcDNA 配列を決定したところ、TRM ラットにおいて354番目のアミノ酸をアラニンからバリンに置換するミスセンス変異(A354V)を見いだした。このアミノ酸置換は、TRM ラット特異的であり、また、チャネルのポアを構成するP-loop 領域に近接していた。従って、trm2は、Hcn1 遺伝子のミスセンス変異であり、この変異はHCN1チャネルの機能を変化させる可能性があると考えられた。

(4) Trm1 の同定

tm 欠失領域の遺伝子のうち、Aspa、Trpv1についてノックアウトマウスを入手できた。Aspa/Hcn1, Trpv1/Hcn1 ダブルノックアウトマウスの行動を観察したところ、Aspa/Hcn1 のみにTRM 同様の振戦が観察された。したがって、Aspa が trm1 であると考えた。

(5) HCN1 阻害剤による振戦の誘発

TRMR ラットに ZD7288 を脳室内投与したところ、投与量に応じて TRMR に振戦を誘発しできた。これら TRMR より脳を採取し、網羅的に脳内 Fos 発現を解析した結果、TRMR ラットの下オリブ核において部位特的な Fos 発現の上昇が認められた。さらに、TRM において下オリブ核を電気焼却したところ、TRM の振戦は顕著に抑制された。したがって、TRM ラットの振戦発現には、下オリブ核が重要な役割を果たしていることが判明した。

HCN1 チャネルは、細胞膜が過分極することに対応して開くイオンチャネルである。神経細胞や心筋のペースメーカー機能にかかわるとされている。神経細胞では樹状突起での HCN チャネルの発現が知られておりシナプス入力の調節に働く。Hcn1 ノックアウトマウスを用いた解析から、HCN1 は小脳プルキンエ細胞による運動学習と神経統合に関与していることがわかっている。

アスパルトアシラーゼ酵素 (ASPA) は、N

アセチルアスパラギン酸 (NAA) を酢酸とアスパラギン酸に分解する。この酵素の欠損によって脳内に NAA が蓄積し、脳の空胞変性症や脱髄が生じる。

本研究によって、Hcn1 と Aspa がラットならびにマウスモデル系における本態性振戦の原因遺伝子あることが判明した。おもしろいことに、これら遺伝子の機能不全は、単一では本態性振戦を引き起こさない。Hcn1 の機能不全と Aspa の機能不全が同時におこることで本態性振戦が引き起こされる。

少なくともマウスやラットのモデル系では、本態性振戦は、複数の遺伝子機能不全の組み合わせによって引き起こされることが判明した。ヒトの本態性振戦においても、複数の遺伝子の組み合わせで本態性振戦が生じると考えられる。

これまで、Hcn1、Aspa ともヒトの本態性振戦の原因遺伝子として同定されていない。しかし、今後のヒト集団における遺伝解析によってこれらの遺伝子がヒト本態性振戦の原因遺伝子として同定される可能性がある。

Hcn1 と Aspa の機能不全によって本態性振戦が引き起こされる機序は現在のところ不明である。本研究で確立されたモデルラットを用いることで、本態性振戦の発症機序が解明されることを期待する。

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5件)

- ① Kuramoto T, Yokoe M, Hashimoto R, Hiai H, Serikawa T. A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in the Edaradd gene. **BMC Genet.** 査読あり、12 巻、2011 年、91 ページ、10.1186/1471-2156-12-91
- ② Kuwamura M, Inumaki K, Tanaka M, Shirai M, Izawa T, Yamate J, Franklin RJ, Kuramoto T, Serikawa T. Oligodendroglial pathology in the development of myelin breakdown in the dmy mutant rat. **Brain Res.** 査読あり、1389 巻、2011 年、161-168 ページ、10.1016/j.brainres.2011.03.009
- ③ Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T. A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg²⁺ channel MRS2 results in demyelination in the rat. **PLoS Genet.** 査読あり、7 巻、2011 年、e1001262、

10.1371/journal.pgen.1001262

- ④ Kuramoto T, Kuwamura M, Tagami F, Mashimo T, Nose M, Serikawa T. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis. **Exp Anim.** 査読あり、60 巻、2011 年、57-63 ページ、10.1538/expanim.60.57
- ⑤ Xie B, Nakanishi S, Guo Q, Xia F, Yan G, An J, Li L, Serikawa T, Kuramoto T, Zhang Z. A novel middle-wavelength opsin (M-opsin) null-mutation in the retinal cone dysfunction rat. **Exp Eye Res.** 査読あり、91 巻、2010 年、26-33 ページ、10.1016/j.exer.2010.03.017

〔学会発表〕(計 1 2 件)

- ① 庫本ら、A rat model of hypohidrotic ectodermal dysplasia carries a missense mutation in Edradd gene、Rat Genomics & Models、2011 年 12 月 8 日 Cold Spring Harbor Laboratory (米国)
- ② 多田羅ら、Tremor ラットにおける β 受容体遮断薬の振戦抑制メカニズムの解析、第 21 回臨床精神薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会合同年回、2011 年 10 月 28 日、京王プラザホテル(東京)
- ③ 庫本ら、ラットモデルを用いた本態性振戦の遺伝要因の解明、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ④ 庫本ら、ラットモデルを用いた本態性振戦の遺伝要因の解明、第 58 回日本実験動物学会総会、2011 年 5 月 26 日、タワーホール船堀 (東京)
- ⑤ 多田羅ら、Neural mechanisms underlying tremor induction in Tremor rats, a novel model of human essential tremor、第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 23 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑥ 庫本ら、Genetic components in a rat model of essential tremor、第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップ、平成 22 年 12 月 2 日、京都大学(京都市)
- ⑦ 今奥ら、Behavioral and pharmacological studies in Tremor

rats, a novel rat model of human essential tremor、第 18 回国際ラット遺伝システムワークショップ、平成 22 年 12 月 2 日、京都大学(京都市)

- ⑧ 今奥ら、本態性振戦モデル Tremor ラットにおける中枢神経系薬物の作用評価、第 20 回日本臨床精神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、平成 22 年 9 月 15-17 日、仙台国際センター (仙台市)
- ⑨ 大野ら、Tremor ラットにおける振戦行動の薬理的解析、第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日、京都テルサ (京都市)
- ⑩ 今奥ら、Tremor ラットにおける脳内 Fos 発現解析、第 57 回日本実験動物学会、平成 22 年 5 月 12 日、京都テルサ (京都市)
- ⑪ 清水ら、新たなヒト本態性振戦モデル Tremor ラットの行動薬理的解析、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会、平成 21 年 11 月 14 日、国立京都国際会館 (京都市)
- ⑫ 今奥ら、新たなヒト本態性振戦モデル Tremor ラットにおける前脳 Fos 発現分布の解析、第 19 回日本臨床精神神経薬理学会、平成 21 年 11 月 14 日、国立京都国際会館 (京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/Kuramoto/home.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庫本 高志 (Kuramoto Takashi)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：20311409

(2) 研究分担者

大野 行弘 (Ohno Yukihiro)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00432534

(3) 連携研究者

桑村 充 (Kuwamura Mitsuru)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：20244668