

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15349

研究課題名(和文) KATPチャネルを標的とした新規パーキンソン病治療法の確立

研究課題名(英文) The KATP channel as a therapeutic target for Parkinson's disease.

研究代表者

稲垣 良 (Inagaki, Ryo)

東北大学・薬学研究科・特任助教

研究者番号：40887072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では超高齢社会の進展に伴い、パーキンソン病(PD)患者数は急増している。申請者は、amantadineの新規作用機序として、KATPチャネルの閉口を介した細胞内Ca²⁺濃度上昇による神経興奮亢進作用を見出した。さらに、MPTP処置した野生型マウスでは運動機能障害が確認された一方で、MPTP処置したKir6.2欠損マウスでは異常が確認されなかった。併せて、MPTP処置した野生型マウスの運動機能障害はamantadineの投与によって改善された。本研究では、PDの病態発症・進行機序の要因としてKATPチャネルの機能低下の仮説のもと、KATPチャネルの病態生理学的役割について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、amantadineによるKATPチャネル抑制作用が線条体-黒質緻密部でのドパミン神経の変性・脱落を抑制すること、ならびにCaMKII自己リン酸化亢進を介して線条体におけるドパミンクリアランス調整機能を有している可能性を見出した。我が国のPD患者数は約20万人と推定されており、年齢別の有病率は60歳から急激に増加する傾向にある。既存のPD治療薬による初期治療が重篤な副作用等によって見直される中で、PD患者のQOL改善のためにも新規作用機序を持つ化合物の同定は喫緊の課題である。KATPチャネルの制御という従来とは異なる新規薬効機序がPD治療の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：ATP-sensitive potassium channel is a type of potassium channel which is ubiquitously expressed on the plasma membrane of cells in the brain. Here, we demonstrated that the existing Parkinson's disease (PD) drug amantadine increases [Ca²⁺]_i and phosphorylation of CaMKII in Kir6.2-expressed neuro-2A cells. In addition, repeated administration of amantadine ameliorated motor dysfunction in MPTP-induced PD model (MPTP) mice. Consistent with behavioral observations, expression of tyrosine hydroxylase in the striatum and substantia nigra were markedly ameliorated in amantadine-treated MPTP mice. Repeated administration of amantadine also increased extracellular dopamine levels in the striatum of MPTP mice. Finally, we confirmed the physical interaction between phospho-CaMKII and dopamine transporter in the striatum. Taken together, our results indicate that Kir6.2 channel blockage is a potential therapeutic target that modulates dopamine clearance and dopaminergic neuronal death in PD.

研究分野：神経科学

キーワード：KATPチャネル アマンタジン パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

我が国では、超高齢社会の進展に伴い、パーキンソン病(PD)患者数は急増している。一方で、PD に対する産学の関心の高まりにもかかわらず、その根本的な治療法は未だ存在しない。近年の PD に対して臨床適応された治療薬は、大脳基底核を構成する黒質緻密部-線条体におけるドパミン神経系もしくはアセチルコリン神経系に作用する機序に限定されている。一方、これら既存治療薬はパーキンソン病症状に対して寛解状態の持続を目指すものであり、根治は期待できない。現在、PD の主因とされる大脳基底核を構成する黒質-線条体ドパミン作動性神経系の変性・脱落に対して作用する多くの創薬シーズが開発される一方で、十分な薬効が認められない若しくは重篤な副作用により開発中止を余儀なくされるケースが相次いでいる (e.g. Sumanirole, GDNF, ...)。近年、PD と糖尿病との間の連関が疫学的調査や大規模ゲノム解析で報告され、「PD の脳糖尿病仮説」として国内外で注目されている (De Pablo-Fernandez et al., *Neurology* 91: e139-e142, 2018)。以前より、糖尿病がアルツハイマー病のリスクファクターであると考えられる向きがあったが、PD 患者においても耐糖能障害の確率が高いことが相次いでいることから、糖代謝異常に基づく糖尿病が PD の病態発症・進行に関与する可能性が示唆された (Marques et al., *Parkinsonism Relat Disord* 55: 122-127, 2018)。本申請者らは、既存の PD 治療薬 amantadine 同様にアダマンタン骨格を有する AD 治療薬 memantine の新規作用機序として、ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャネルの閉口を介した Ca^{2+} 流入による神経細胞の興奮性亢進作用を見出した (Moriguchi et al., 2018, 2021)。 K_{ATP} チャネルは、PD 患者の脳内における神経活動の過興奮に寄与することが報告されている一方で、その薬理的な抑制作用は、糖尿病治療薬である SU 剤の薬効機序として広範に用いられてきた。本課題では、PD の病態発症・進行機序の要因として K_{ATP} チャネルの機能低下の仮説のもと、 K_{ATP} チャネル抑制作用を持つ低分子化合物を用いて、 K_{ATP} チャネル制御機構に立脚した PD の脳糖尿病仮説の実証を目指し、各種解析を検討した。

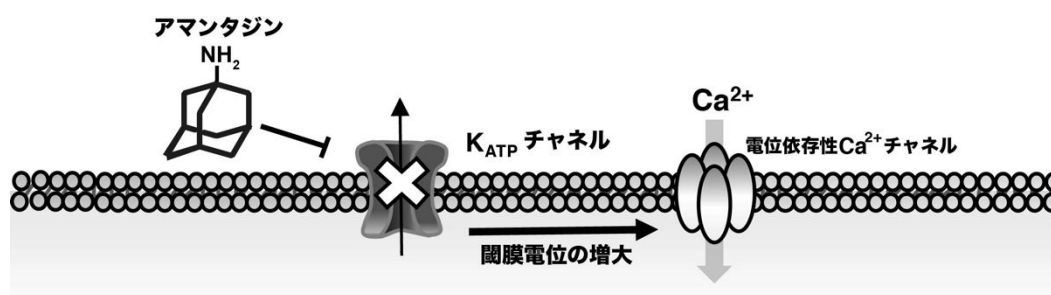


図 amantadine を含むアダマンタン誘導体による K_{ATP} チャネルの閉口を介した Ca^{2+} 流入作用の概要図

2. 研究の目的

本研究では、既存の PD 治療薬 amantadine による K_{ATP} チャネルの閉口を介した Ca^{2+} 流入を介した神経細胞の興奮性亢進作用の同定、ならびに amantadine によるパーキンソン病様症状改善作用について行動薬理学及び生化学的手法で検討した。さらに、神経毒 MPTP 処置でパーキンソン病様症状を惹起した Kir6.1、Kir6.2 遺伝子欠損 (Kir6.1^{+/-}、Kir6.2^{+/-}) マウスの病態進行についても同様に検証した。

3. 研究の方法

本研究に用いた研究の手法として、1) 行動薬理的解析(運動機能: ビームウォーク試験、ローターロッド試験)、2) 免疫組織化学的解析(ドパミン神経の細胞死: チロシンヒドロキシラーゼ発現の確認)、3) 免疫プロット解析(細胞内 Ca^{2+} シグナル・アポトーシスシグナル解析)、4) Ca^{2+} イメージング解析、5) *in vivo* microdialysis 試験(シナプス間隙におけるドパミン基礎遊離量の測定)を実施した。

4. 研究成果

1) amantadineの K_{ATP} チャンネルに関する機序解明

amantadineによる K_{ATP} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入及び Ca^{2+} 依存性リン酸化酵素CaMKIIの自己リン酸化亢進作用を検証した。

- (1) K_{ATP} チャンネルサブユニット Kir6.2 を過剰発現した Neuro2a 細胞を用いて、amantadine による K_{ATP} チャンネルの閉口を介した Ca^{2+} 流入作用の EC50 を Ca^{2+} イメージング法により検討した。この解析により、amantadine による K_{ATP} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入活性の EC50 は 100 μ M 前後であることを同定した。
- (2) K_{ATP} チャンネルサブユニット Kir6.2 を過剰発現した Neuro2a 細胞に amantadine を処置した際の Ca^{2+} 依存性リン酸化酵素 CaMKII の自己リン酸化上昇を免疫プロット法で検討した。この解析により、amantadine による K_{ATP} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入はその濃度依存的に CaMKII の自己リン酸化を亢進することを明らかとした。
- (3) Kir6.2 の C 末端を欠失させた Kir6.2 C36 プラスミドベクターを作成し、Kir6.2 C36 を過剰発現した Neuro2a 細胞を用いて、amantadine による K_{ATP} チャンネルの閉口を介した Ca^{2+} 流入作用を検討した。この解析により、amantadine は SUR を介さずに K_{ATP} チャンネルを閉口し、細胞内に Ca^{2+} を流入させている可能性が示唆された。

2) amantadine の K_{ATP} チャンネルを介した病態薬理解析

神経毒 MPTP 処置でパーキンソン病様症状を惹起した PD モデルマウスの病態進行が amantadine で改善されるかを行動薬理的解析で検証した。

- (1) 行動薬理的解析として、運動機能(ビームウォーク試験、ローターロッド試験)解析を行った。この解析により、ドパミン神経の細胞死を誘導する神経毒 MPTP を処置した野生型マウスで確認された PD 様症状は、amantadine の投与によって改善されることを明らかとした。
- (2) (1)の行動薬理解析の完了したマウス脳を摘出し、線条体-黒質緻密部領域でのドパミン神経神経の変性・脱落を免疫染色法で検討した。この解析により、MPTP 処置した野生型マウスの線条体・黒質緻密部で確認されたチロシンヒドロキシラーゼの発現低下は amantadine の投与によって改善されることを明らかとした。
- (3) 共免疫沈降法の結果、マウス線条体では、リン酸化 CaMKII とドパミントランスポーターが相互作用していることを明らかとした。
- (4) *in vivo* microdialysis 法では、線条体のシナプス間隙におけるドパミン基礎遊離量が MPTP を処置した野生型マウスでは有意に低下していたが、amantadine の投与によって改善することを明らかとした。
- (5) (2)を踏まえ、MPP+を処置した Kir6.2 過剰発現 N27 ラットドーパミン作動性神経細胞に amantadine を処置した際の細胞生存率を検証した結果、amantadine を処置した細胞ではその濃度依存的に生存率が増大した。

3) K_{ATP} チャンネルの PD 病態進行への寄与

神経毒 MPTP 処置でパーキンソン病様症状を惹起した Kir6.2 遺伝子欠損(Kir6.2^{-/-})マウスの病態進行を行動薬理的解析で検証した。

- (1) 行動薬理的解析として、野生型ならびに Kir6.2 欠損マウスに対して神経毒 MPTP を投与し、運動機能に関する解析(ビームウォーク試験、ローターロッド試験)を行った。この解

析により、野生型マウスでは MPTP によって惹起された運動機能障害が確認されたが、Kir6.2 欠損マウスでは異常は認められなかった。

- (2) (1)の行動薬理解析の完了したマウス脳を摘出し、線条体-黒質緻密部領域でのドパミン神経神経の変性・脱落を免疫染色法で検討した。この解析により、MPTP 処置した野生型マウスの線条体・黒質緻密部ではチロシンヒドロキシラーゼの発現低下が確認された一方で、MPTP 処置した Kir6.2 欠損マウスの線条体・黒質緻密部ではチロシンヒドロキシラーゼの発現低下が野生型マウスと比較して顕著に抑制された。

本研究では、PD モデルマウスにおいて Kir6.2 チャンネル欠損が病態発症を抑制することを同定し、加えて、amantadine による KATP チャンネル抑制作用が線条体-黒質緻密部領域でのドパミン神経神経の変性・脱落を抑制すること、ならびに CaMKII の自己リン酸化亢進を介して線条体におけるドパミンクリアランスの調整機能を有している可能性を見出した。我が国の PD 患者数は 15~20 万人と推定されており、年齢別の有病率は 60 歳から急激に増加する傾向にある。今後、後期高齢化社会への変化に伴い、PD 患者数のさらなる増大が見込まれる。本研究において明らかにした KATP チャンネルの制御という従来とは異なる新規薬効機序が PD 治療の一助となることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inagaki Ryo, Yamakuni Tohru, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Moriguchi Shigeki	4. 巻 139
2. 論文標題 Preventive effect of propolis on cognitive decline in Alzheimer's disease model mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 20~29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neurobiolaging.2024.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeki Moriguchi, Ryo Inagaki, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Kohji Fukunaga	4. 巻 59
2. 論文標題 Propolis Promotes Memantine-Dependent Rescue of Cognitive Deficits in APP-KI Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4630-4646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-022-02876-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeki Moriguchi, Ryo Inagaki, Kohji Fukunaga	4. 巻 117
2. 論文標題 Memantine improves cognitive deficits via KATP channel inhibition in olfactory bulbectomized mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2021.103680.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Atsumi Nitta, Naotaka Izuo, Kohei Hamatani, Ryo Inagaki, Yuka Kusui, Kequan Fu, Takashi Asano, Youta Torii, Chikako Habuchi, Hiroataka Sekiguchi, Shuji Iritani, Shin-ichi Muramatsu, Norio Ozaki, Yoshiaki Miyamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Schizophrenia-Like Behavioral Impairments in Mice with Suppressed Expression of Piccolo in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Personalized Medicine	6. 最初と最後の頁 607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jpm11070607.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣良、喜多紗斗美、丹羽望、岩本隆宏、森口茂樹
2. 発表標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体3 (NCX3) ヘテロ型欠損マウスにおける認知機能障害及び多動性行動に関する研究
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 / 第66回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲垣良、喜多紗斗美、丹羽望、岩本隆宏、森口茂樹
2. 発表標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体3 (NCX3) ヘテロ型欠損マウスにおける多動性および社会性障害に関する研究
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲垣良、森口茂樹
2. 発表標題 7型ニコチン性アセチルコリン受容体賦活化によるSAMP10マウスのうつ様症状改善効果
3. 学会等名 第74回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丹羽望、稲垣良、喜多紗斗美、岩本隆宏、福永浩司、森口茂樹
2. 発表標題 Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換輸送体3 (NCX3) 欠損マウスにおける多動性/認知機能障害に関する細胞内機序の解明
3. 学会等名 第74回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲垣良、森口茂樹
2. 発表標題 アルツハイマー病モデル動物の記憶障害に対するプロポリスとメマンチンの併用効果
3. 学会等名 ミツバチサミット
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲垣良、福永浩司、森口茂樹
2. 発表標題 恐怖記憶形成におけるKATPチャネルのメカニズム解明
3. 学会等名 第73回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣良、山國徹、森口茂樹
2. 発表標題 プロポリスによる細胞内カルシウムシグナル賦活化を介した認知機能改善効果
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会・第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣良、福永浩司、森口茂樹
2. 発表標題 ATP感受性カリウムチャネル Kir6.1の扁桃体依存性恐怖記憶の形成における役割
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特願2022-038836	発明者 稲垣良、森口茂樹、 有澤美枝子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、220236	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 認知機能改善剤	発明者 稲垣良、森口茂樹、 有澤美枝子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/ 8382	取得年 2022年	国内・外国の別 外国

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------