

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10899

研究課題名(和文) 線条体コンパートメント構造に基づくL-ドーパ誘発性ジスキネジアの治療法開発

研究課題名(英文) Development of new surgical therapies for l-dopa induced dyskinesia targeting striatal striosome compartment

研究代表者

森垣 龍馬 (MORIGAKI, Ryoma)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：70710565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットのL-ドーパ誘発性ジスキネジアモデルを疾患モデルとして確立した後、脳線条体のストリオソーム分画の機能を修正する目的で、infralimbic cortexの神経破壊を行った。ジスキネジアが改善するかどうかを観察したが抑制効果は得られなかった。そこで正常脳でアデノ随伴ウィルスベクターを用い、候補皮質神経トレーシング研究を行い、線条体背外側領域(運動関連領域)のストリオソームに注入する皮質領域を同定する研究を行っている。運動異常モデルを脳萎縮が少ないq175ハンチントン舞踏病モデルマウスやジストニアマウスモデルに変更し、ストリオソームの異常の検索を継続して研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

L-ドーパ誘発性ジスキネジアモデルラットに関しては本プロトコルでは3週間でモデルが確立することが明らかになり、今後の研究に生かされる可能性があった。Infralimbic cortex破壊によるジスキネジア抑制実験はうまくいかなかったが、その検討から線条体ストリオソームに投射する新たな領域を見つけた。また、q175ハンチントン舞踏病マウスモデルにおいてストリオソーム分画に異常が起きていることを発見し、不随意運動症に関して線条体ストリオソーム分画の異常が関与していることを示唆した。今後の研究、治療に役立つ可能性を提示できた。

研究成果の概要(英文)：After establishing l-dopa induced dyskinesia Parkinson's disease rat model, I tried to modulate the function of the striosome compartment in the striatum by destroying the infralimbic cortex. But it had no therapeutic effects on dyskinesia. Then, I underwent tracing studies using AAV-DJ virus in order to find the cortex area which innervates striosome compartment in the dorsolateral striatum. I am also checking if there is an abnormality in the striosome compartment of other movement disorder mice models, i.e. q175 mice model of Huntington's disease and dystonia model mice generated by ouabain in the cerebellum. These studies are still on-going.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：不随意運動 ジスキネジア 動物モデル 線条体 ジストニア パーキンソン病 ハンチントン舞踏病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線条体を含む大脳基底核回路の異常が、パーキンソン病やジストニアなどに伴う運動異常と密接に関連していると考えられている。パーキンソン病において、病進行期ではドパミン前駆体であるL-ドーパ投与による内科的治療が中心となる。しかしL-ドーパの長期繰り返し投与によって出現する合併症であるL-ドーパ誘発性ジスキネジア (LIDs)はジストニアなどの運動異常症と同様、一度発症すると非常に難治であり、その詳細な発症機序解明と新たな治療方法の開発が強く望まれている。

これらの運動異常症は難治の場合脳内の運動フィードバックループ(皮質 線条体 淡蒼球・黒質 視床 皮質)を電氣的に修正することで劇的な改善が得られることが知られている。特にLIDsやジストニアに関しては淡蒼球内節刺激が有効であることが知られている。しかしながら、この刺激部位にも痙縮など刺激の副作用も報告されており、より良い刺激部位同定が必要とされている。

我々の研究チームは線条体のストリオソーム分画と運動異常症との関係に着目して研究を行ってきた。線条体ストリオソーム分画の異常がLIDsをはじめとした運動異常症発症の原因ではないかと推定してきた。そこで、線条体ストリオソーム分画に投射すると報告された前頭前野の前辺縁皮質(Prefrontal cortex region / Infralimbic cortex: IL cortex)に着目し、この部位を破壊、もしくは刺激することで運動異常を改善できるのではないかと考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

脳線条体ストリオソーム分画の異常が運動異常症と関連することを示し、機能を修正することでLIDsを代表とする運動異常症を改善することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LIDsモデル作成

雄の9-10週齢Sprague-Dawleyラットを用いて6-OHDA片側パーキンソン病モデルによるLIDsモデル作成を行った。6-OHDA(10 µg in saline containing 0.1% ascorbic acid)またはvehicleを定位的(Bregma よりAP= -4.0 mm, ML = -1.3 mm, DV = -8.4 mm)に右内側前頭束に投与することで作成した。L-dopa + benserazide は以下のレジメ通りに投与することでLIDs モデルを作成した。

Days 1-7: 2 mg/kg of L-dopa or vehicle with 2 mg/kg of benserazide

Days 8-14: 6 mg/kg of L-dopa or vehicle with 6 mg/kg of benserazide

Days 15-21: 12 mg/kg of L-dopa or vehicle with 12 mg/kg of benserazide

Days 22-28: 25 mg/kg of L-dopa or vehicle with 12 mg/kg of bensearazide

(2) イボテン酸を用いた破壊によるLIDs抑制実験

LIDsモデル作成後、定位的にハミルトンシリンジを用いて、生理食塩水またはibotenic acidをIL cortexに投与した(Bregma よりAP=+3.1 mm, ML = +0.6 mm, DV = -5.3 mm)。術翌日から再びL-dopa投与を続け、10日目までAIMS scoreを観察の後、サクリファイスした。

(3) 前行性アデノ随伴ウィルスベクター-AAV-DJ-CMV-hfGFPを用いた神経トレーシング研究

同ウィルスベクターをC57/BLマウス脳皮質に35ゲージシリンジを用いて定位脳手術装置で片側脳皮質に局所的に投与し、神経トレーシング研究を行った。候補皮質はAllen brain atlasのvirus injection studyを詳細に検討し、数か所に決定した。ウィルスベクター投与2週間後に

マウスを還流固定し、免疫組織学的に線条体のストリオソーム分画に強い発現があるかどうかを確認した。ストリオソーム分画のマーカースとして抗mu-opioid受容体抗体を使用した。

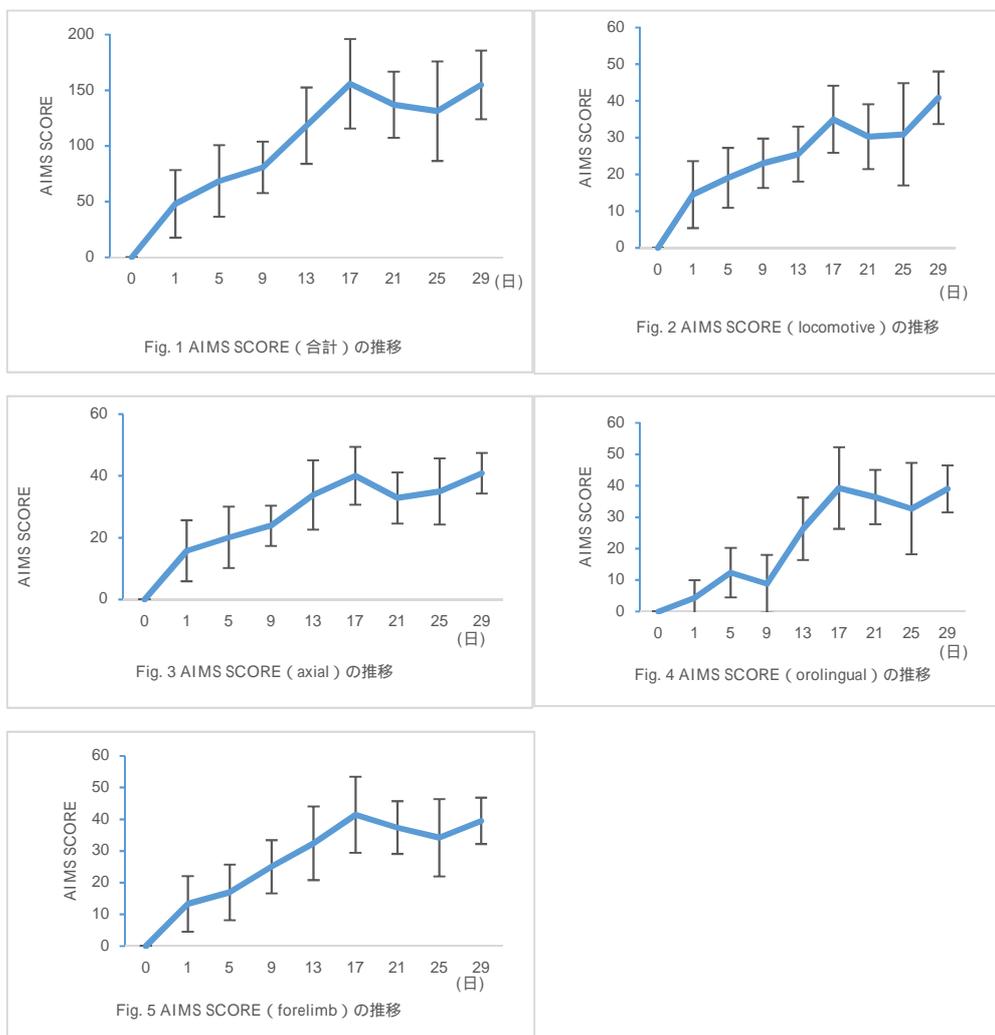
(4) q175ハンチントン舞踏病モデルマウスにおけるストリオソーム分画の検索

他にジストニア・ジスキネジアを示す疾患としてハンチントン舞踏病があるが、Q175 knock-in ハンチントン舞踏病モデルマウス(C57/BL)を用いてストリオソーム分画に異常があるのか、抗mu-opioid受容体抗体を用いて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 6-OHDA による片側パーキンソン病モデルラットの作成

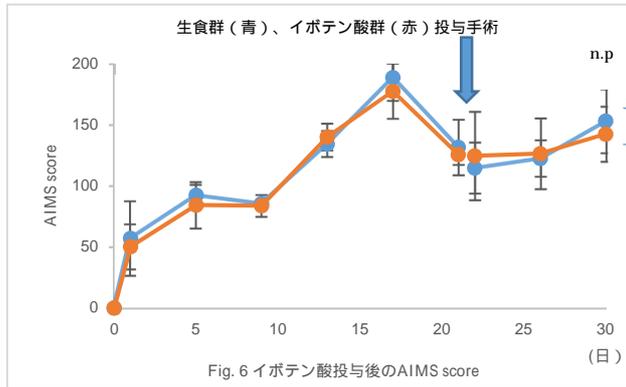
下図に示すように、片側パーキンソン病モデルラットの AIMS SCORE (Fig.1)はその後 L-dopa 投与量が増加するにも拘わらず、17日目でプラトーに達した(n = 23)。サブスコアについても同様の傾向であった(Fig.2-5)。これらの所見から、本プロトコルに基づけば21日目までの投与で LIDs モデルとして十分と判断し、以後の研究は21日間投与モデルで行った。



(2) IL cortex 破壊術による LIDs 抑制効果

6-OHDA 片側パーキンソン病モデルラットに21日間 L-dopa を投与し、ジスキネジアモデルを作成した。22日目に患側 IL cortex に ibotenic acid または生理食塩水(各 n = 6)を投与し、術翌日(23日目)を術後1日目として、L-dopa を続けて投与を行い、術後8日間(30日目まで) AIMS score を用いてジスキネジアを観察した。患側 IL cortex に生食塩水、イボテン酸投与両

群に術前から術後に至るまで AIMS score に差はなかった (n = 6, Two-way ANOVA)。



(3) 前行性ウイルスベクターを用いた線条体ストリオソームをターゲットとしたトレーシングスタディ

(2)の結果を受け、組織学的な検索などから以下の問題点が抽出された。

片側パーキンソン病モデルでは患側脳の萎縮が認められること、また最初の 6-OHDA 投与手術からイボテン酸投与手術まで 3 週間の期間があり、rat の体重は 2 倍近くまで増加する個体もあることで、IL cortex の定位的な座標が少なからず変化するためこの時系列では IL cortex を正確に破壊することは難しい可能性があること。

IL cortex は線条体内側のストリオソームに投射することは確認されているが、運動に関与する線条体背外側には投射が少ないため IL cortex は運動症状には関与していない可能性があること。

IL cortex は非常に正中に近い構造物のため、薬剤注入のための穿刺が上矢状静脈洞を通過し、出血が多いことが手術を困難にすること。これを避ける目的で穿刺角度をつけると、さらに座標のずれを生じやすくすること。

以上の理由から、運動領域の背外側線条体のストリオソームにより多く投射する IL cortex 以外の皮質領域を同定し、これをターゲットと変更することを目指すことにした。この目的のため、新たに研究計画を立案し、徳島大学の遺伝子組み換え実験の認可、および動物実験の認可を得て、前行性アデノ随伴ウイルスベクター-AAV-DJ-CMV-hfGFP を用いた神経トレーシング研究を開始した。現在、この研究を続行中であり、より線条体背外側領域のストリオソームにより多く投射する部位を同定しつつある (Fig.7)。本研究は続行中である。

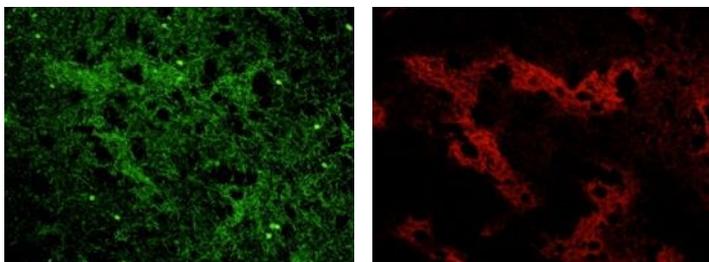


Fig.7 線条体に対する皮質領域からの投射 (GFP) と同じ部位の mu-opioid 受容体 (ストリオソーム分画のマーカ) の 2 重染色

(4) 6-OHDA 片側パーキンソン病モデル以外のジスキネジア・ジストニアモデルの探索

脳萎縮が少なく破壊術、刺激術などが定位的な座標通りに可能な不随意運動モデルとして、CAG リピートを knocked-in した q175 ハンチントン舞踏病モデルマウスが候補に挙がった。しかしそもそも本モデルにてストリオソームに異常が起こっているのかは知られておらず、免疫組織学的に探索することとした。その結果、ストリオソームに豊富な mu-opioid 受容体は年齢

を重ねるごとにストリオソームでの発現が増加することを発見し国際学会で報告した(Fig.8)。同結果については報告準備中である。

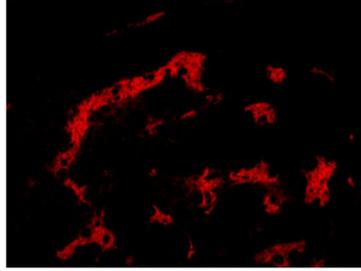
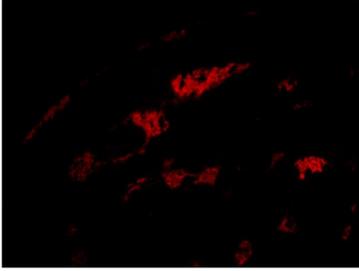


Fig.8 コントロール(左)と q175 ハンチントン舞踏病モデルマウス(右)の線条体における mu-opioid 受容体の発現の変化

また、本研究中に発見した様々な関連所見、ジスキネジア・ジストニアに関する知見を雑誌、図書、学会にて報告したので以下に記載する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinoshita M, Nakataki M, Morigaki R, Sumitani S, Goto S, Kaji R, Ohmori T	4. 巻 16
2. 論文標題 Turning on the Left Side Electrode Changed Depressive State to Manic State in a Parkinson's Disease Patient Who Received Bilateral Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation: A Case Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Psychopharmacology and Neuroscience	6. 最初と最後の頁 494 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9758/cpn.2018.16.4.494	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 Kawarai T, Miyamoto R, Nakagawa E, Koichihara R, Sakamoto T, Mure H, Morigaki R, Koizumi H, Oki R, Montecchiani C, Caltagirone C, Orlacchio A, Hattori A, Mashimo H, Izumi Y, Mezaki T, Kumada S, Taniguchi M, Yokochi F, Saitoh S, Goto S, Kaji R	4. 巻 52
2. 論文標題 Phenotype variability and allelic heterogeneity in KMT2B -Associated disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2018.03.022	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 該当する
1. 著者名 Morigaki R, Goto S	4. 巻 7
2. 論文標題 Striatal vulnerability in Huntington's disease neuroprotection versus neurotoxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/brainsci7060063	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 Kawarai T, Morigaki R, Kaji R, Goto S	4. 巻 7
2. 論文標題 Clinicopathological phenotype and genetics of X-linked dystonia-parkinsonism (XDP; DYT3; Lubag)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/brainsci7070072	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 小山広士、大北真哉、牟礼英生、森垣龍馬、梶龍兒、後藤惠、永廣信二	4. 巻 83
2. 論文標題 遅発性ジストニア(tardive dystonia)に対して脳深部刺激術を施行した5例	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 四国医学雑誌	6. 最初と最後の頁 193 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Morigaki R, Lee JH, Yoshida T, Wuthrich C, Graybiel AM
2. 発表標題 Mu opioid receptors are strongly upregulated in the q175 mouse model of Huntington's disease
3. 学会等名 Society for Neuroscience (Chicago) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morigaki R, Okita S, Mure H, Takagi Y, Goto S
2. 発表標題 Olfactory type G-protein alpha subunit related changes in the striatum underlie the genesis of Ldopa- induced dyskinesia
3. 学会等名 Brain & Brain PET (Yokohama) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mure H, Morigaki R, Okita S, Miyamoto R, Nagahiro S, Goto S
2. 発表標題 Deep Brain Stimulation for Dystonia - Pallidal stimulation and thalamic stimulation
3. 学会等名 World Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牟礼英生、藤田浩司、森垣龍馬、宮本亮介、松田拓、後藤恵、高木康志
2. 発表標題 FDG PET を用いたジストニア患者の脳代謝ネットワークパターンの描出
3. 学会等名 第59 回日本定位・機能神経外科学会(浜松)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森垣龍馬、牟礼英生、松田拓、宮本亮介、山本陽子、豊田直人、高木康志、後藤恵
2. 発表標題 GPI-DBS を施行したDYT-GNAL(DYT25)の一例
3. 学会等名 第59 回日本定位・機能神経外科学会(浜松)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田拓、森垣龍馬、牟礼英生、中瀧理仁、山本陽子、豊田直人、後藤恵、高木康志
2. 発表標題 ジストニアと強迫性障害の関係について の検討
3. 学会等名 第59 回日本定位・機能神経外科学会(浜松)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牟礼英生、藤田浩司、森垣龍馬、宮本亮介、松田拓、後藤恵、高木康志
2. 発表標題 FDG PET を用いたジストニア患者の脳代謝ネットワークパターンの描出
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78 回学術総会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森垣龍馬、牟礼英生、宮本亮介、松田拓、高木康、後藤恵
2. 発表標題 機能的ジストニアは器質 性ジストニアスペクトラム障害か？
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第78 回学術総会(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牟礼英生、森垣龍馬、宮本亮介、中瀧理仁、里見淳一郎、梶龍兒、後藤恵、永廣信治
2. 発表標題 ジストニアDBS 治療におけるチーム医療 の重要性
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第76 回学 術総会(名古屋)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森垣龍馬、小川允利、牟礼英生、宮本亮介、後藤恵
2. 発表標題 Nuclear factor kappa b セリン 276 残基のリン酸化はL-ドーパ誘発性ジ スキネジア発症に関与する
3. 学会等名 第18 回日本 分子脳神経外科学会(甲府)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 巨雄也、牟礼英生、森垣龍馬、大北真哉、西山徹、永廣信治
2. 発表標題 Lance-Adams 症候群に 対する両側淡蒼球内節刺激術の一施行例
3. 学会等名 第83 回日本脳神経外科学会中国四国支部 学術集会(岡山)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森垣龍馬、牟礼英生、大北真哉、小山広士、宮本亮介、梶龍兒、後藤恵
2. 発表標題 心因性ジストニアは器質性ジストニアと同じスペクトラムの障害か？
3. 学会等名 第2回中四国機能神経外科談話会(松山)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牟礼英生、安積麻衣、大北真哉、森垣龍馬
2. 発表標題 オフジストニアに対するITB 過量投与の経験
3. 学会等名 第2回中四国機能神経外科談話会(松山)
4. 発表年 2017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
連携研究者	後藤 恵 (GOTO Satoshi) (50240916)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部医学域・特任教授 (16101)	