

令和元年6月4日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21501

研究課題名（和文）本態性振戦の病態メカニズム解析と新たな治療薬ターゲットの解明

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of essential tremor and identification of the novel therapeutic targets.

研究代表者

清水 佐紀 (Shimizu, Saki)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00630815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本態性振戦の新規治療法を探索する目的で、自然発症性の本態性振戦モデルTremorラットを用いて、対症療法の遮断薬propranololの作用機序を解析した。Propranololは振戦発現の原因部位である下オリーブ核の神経興奮を抑制し、その作用は脳内 α_2 受容体を介した反応であった。また、Tremorラットおよびaspartoacylase遺伝子欠損ラットは、いずれも下オリーブ核における5-HT代謝回転が上昇していた。さらに、aspartoacylase遺伝子の欠損は本態性振戦の発現感受性を亢進させた。本研究結果より、これらターゲットを介した本態性振戦の新規治療法が有用であることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本態性振戦は高齢者に多く発症する不随意運動障害であり、認知症やパーキンソン病などの合併症が多く認められる疾患である。手先の不自由を伴う微細運動障害は、患者のQOLに大きな障害となっている。しかし未だ根本的治療薬は存在せず、より有効性の高い新たな治療法の開発が求められてきた。本研究成果は、本態性振戦の発現機序や対症療法である遮断薬の作用機序、脳内5-HT代謝回転と振戦発現との関連性の解明に繋がるものであり、本態性振戦の新規治療法開発における重要な知見が得られたものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To explore the novel therapeutics of essential tremor, we analyzed the pharmacological mechanism of non-selective α_2 blocker, propranolol, the control therapy against essential tremor, using the spontaneous essential tremor model, Tremor rat. Propranolol inhibited the neural excitation of the inferior olive, the generation site of tremor, which it was the effect via the intracerebral α_2 receptors. Also, both Tremor rat and aspartoacylase-KO rat showed enhancement of 5-HT turnover in the inferior olive. In addition, the deletion of aspartoacylase increased the sensitivity of tremor induction. The present study suggests that these targets may be useful for the novel therapeutics for essential tremor.

研究分野：薬理学

キーワード：本態性振戦 遮断薬 aspartoacylase 脳内モノアミン セロトニン（5-HT）

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本態性振戦は、動作時振戦および姿勢時振戦を主症状とし、人口のおよそ 2.5 ~ 10%、65 歳以上では 5 ~ 14% 以上の高い頻度で認められる神経疾患である。日常生活に大きな支障をきたすことから、その病態機序の解明、有効な治療薬の開発が求められている。しかしながら、本態性振戦には根本的な治療法はなく、薬物治療においても、経験的に有効性が確認された β 遮断薬や抗てんかん薬などが使用されているのみで、これら治療薬の振戦抑制メカニズムに関しても未だ不明な点が多い。

近年では本態性振戦に関する研究を進め、Kyo:Wistar ラットの近交化途上に発見された Tremor ラットが新たな本態性振戦モデルとして有用であることを見出し、報告してきた (*PLoS. One*, 10,e0123529, 2015)。Tremor ラットは 4 ~ 7 週齢において顕著な動作時振戦を呈し、その抗振戦薬に対する反応性がヒト本態性振戦に類似することを見出した。また、非振戦性の垂系統を用いたポジショナルクローニング研究から、Tremor ラットは aspartoacylase 遺伝子 (*Aspa*) の欠損と hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel1 (HCN1 チャンネル) のミスセンス変異 (機能欠失) を有しており、これら 2 つの遺伝的要因が共存することによって振戦発現が誘発されること、さらに、振戦発現には延髄の下オリーブ核の部位特定の神経興奮が関与していることを報告してきた (*PLoS. One*, 10,e0123529, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、我々が新たに樹立した自然発症性の本態性振戦モデル Tremor ラットを用い、本態性振戦の神経制御機構を明らかにするとともに、現在の対症療法治療薬である非選択的 β 遮断薬 propranolol の振戦抑制メカニズムを解明する。さらに、本態性振戦の原因候補遺伝子として見出した aspartoacylase の本態性振戦制御における役割について、新たに遺伝子欠損ラットを作出して探索する。これら実験により得られた知見をもとに、本態性振戦の新たな作用機序に基づく新規治療法 (薬) を考案・提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Tremor ラットの振戦発現に対する各種薬物の作用評価

Tremor ラットの振戦発現に対して、各種受容体作用薬やイオンチャンネル作用薬の及ぼす影響を振戦持続時間 (1 分間の累積振戦持続時間) および強度 (4 段階のスコア付け) を指標に評価した。

(2) Tremor ラットの Fos 発現に対する Propranolol の抑制効果

Tremor ラットの振戦発現に伴う脳内 Fos 発現の上昇に対して、非選択的 β 遮断薬 propranolol の作用を評価した。

(3) Nicotine 誘発振戦との類似性評価

本態性振戦と同様に動作時振戦を示す nicotine 誘発振戦に対して、各種受容体作用薬やイオンチャンネル作用薬の作用を評価し、Tremor ラットの振戦発現に対する作用と比較した。

(4) Tremor ラットの脳内モノアミン含量および代謝回転の評価

Tremor ラットと非振戦性 WTC ラット (HCN1 チャンネル変異; 対照動物) の全脳について、下オリーブ核を含む 9 部位に分離し、各脳部位における脳内モノアミンおよび代謝体含量を HPLC により定量し、セロトニン (5-HT) およびドパミン (DA) 代謝回転を算出した。

(5) Aspartoacylase (*Aspa*) 欠損ラットの脳内モノアミン含量および代謝回転の評価

Aspa 欠損ラットと F344 ラット (対照動物) の全脳について、下オリーブ核を含む 9 部位に分離し、各脳部位における脳内モノアミンおよび代謝体含量を HPLC により定量し、5-HT および DA 代謝回転を算出した。

(6) Aspartoacylase (*Aspa*) 欠損ラットの振戦感受性評価

Aspa 欠損ラットと F344 ラットに対して、各種振戦誘発剤として harmaline (本態性振戦誘発剤)あるいは oxotremorine (パーキンソン病振戦誘発剤)を処置し、振戦発現の感受性評価を行った。

4. 研究成果

(1) Tremor ラットの振戦発現に対する各種薬物の作用評価

評価薬物として、各種受容体作用薬 (5-HT、DA、ノルアドレナリン等のモノアミン系や、GABA、glutamate 等のアミノ酸系)、各種イオンチャネル作用薬 (Na⁺チャネル、Ca²⁺チャネル阻害薬など)を使用した。その結果、GABA_A 作動薬 phenobarbital, muscimol および 5-HT_{1A} 遮断薬 WAY-100135 により、Tremor ラットの振戦発現は抑制された。また、非選択的 β 遮断薬の propranolol および pindolol によっても同様に、振戦は有意に抑制された。さらに脳室内投与試験において、選択的 β₂ 遮断薬の ICI-118551 は振戦を有意に抑制したが、選択的 β₁ 遮断薬 metoprolol ではほぼ影響は認められなかった。

(2) Tremor ラットの Fos 発現に対する Propranolol の抑制効果

Tremor ラットの振戦発現により誘発される脳内 Fos タンパクの発現上昇に対して、propranolol の影響を評価した結果、Tremor ラットの下オリーブ核における Fos 発現の上昇に対して、propranolol は部位特異的な抑制作用を示した。

(3) Nicotine 誘発振戦との類似性評価

動作時振戦の一つである nicotine 誘発振戦に対して、各種受容体作用薬の影響を評価した結果、propranolol および WAT-100135 により nicotine 誘発振戦の発現は抑制され、Tremor ラットにおける薬物反応との類似性が確認された。

(4) Tremor ラットの脳内モノアミン含量および代謝回転の評価

Tremor ラットと非振戦性 WTC ラットの脳内モノアミン含量の定量を行った結果、Tremor ラットでは、複数の脳部位で 5-HT、DA、ノルアドレナリンの含量が低下傾向にあること、5-HT および DA の代謝回転が上昇していることが明らかとなった。

(5) *Aspartoacylase* (*Aspa*) 欠損ラットの脳内モノアミン含量および代謝回転の評価

Aspa 欠損ラットおよび F344 ラットの全脳 9 部位における脳内モノアミン含量を定量した結果、下オリーブ核および視床下部における 5-HT 含量の上昇が認められた。さらに、下オリーブ核を含む多くの脳部位において、5-HT 代謝体である 5-HIAA 含量および 5-HT 代謝回転の上昇が確認された。一方、DA はほとんどの脳部位で大きな変動は認められなかった。

(6) *Aspartoacylase* (*Aspa*) 欠損ラットの振戦感受性評価

無処置の *Aspa* 欠損ラットは自発的な振戦発現を示さなかった。薬剤性振戦による評価では、harmaline 誘発振戦に対して、*Aspa* 欠損ラットは F344 ラットと比較して振戦発現の増強傾向を示した。一方、oxotremorine 誘発振戦に対しては、*Aspa* 欠損による影響はほぼ認められず、*Aspa* 欠損は本態性振戦の発現に対して、特異的に影響を及ぼすことが考えられた。

以上の本研究結果より、本態性振戦の対症療法として使用される propranolol は、振戦発現の原因部位である下オリーブ核神経の異常興奮を抑制すること、その作用は脳内 β₂ 受容体を介した反応であることが明らかとなった。また、本態性振戦の発現には下オリーブ核における 5-HT 代謝回転の亢進が関与すること、5-HT_{1A} 遮断薬 WAY-100135 の処置により振戦発現は抑制されること、さらに、振戦原因遺伝子である *aspartoacylase* 遺伝子の欠損下では本態性振戦の発現感受性が高いことが明らかとなった。本研究成果は、本態性振戦の発現メカニズムの解明に繋がるものであり、本態性振戦の新規治療ターゲットとして、β₂ 受容体、5-HT_{1A} 受容体および *aspartoacylase* が有用であることが考えられる。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 12 件)

1. Kinboshi M, Shimizu S, Mashimo T, Serikawa T, Ito H, Ikeda A, Takahashi R, Ohno Y., Down-Regulation of Astrocytic Kir4.1 Channels during the Audiogenic Epileptogenesis in Leucine-Rich Glioma-Inactivated 1 (Lgi1) Mutant Rats., *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1013, 2019, 10.3390/ijms20051013.
2. Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Onishi M, Nomura Y, Matsubara N, Iwai C, Ogawa M, Hashimura M, Sato K, Kato M, Ohno Y., Mechanism Underlying Organophosphate Paraoxon-Induced Kinetic Tremor., *Neurotox. Res.*, 35, 575-583, 2019, 10.1007/s12640-019-0007-7.
3. Ohno Y, Kinboshi M, Shimizu S, Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir4.1 as a Novel Modulator of BDNF Expression in Astrocytes., *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 3313, 2018, 10.3390/ijms19113313.
4. Kunisawa N, Shimizu S, Kato M, Iha HA, Iwai C, Hashimura M, Ogawa M, Kawaji S, Kawakita K, Abe K, Ohno Y., Pharmacological characterization of nicotine-induced tremor: Responses to anti-tremor and anti-epileptic agents., *J. Pharmacol. Sci.*, 137, 162-169, 2018, 10.1016/j.jphs.2018.05.007.
5. Shimizu S, Sogabe S, Yanagisako R, Inada A, Yamanaka M, Iha HA, Ohno Y., Glycine-Binding Site Stimulants of NMDA Receptors Alleviate Extrapyramidal Motor Disorders by Activating the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway., *Int. J. Mol. Sci.*, 18, 1416, 2017, 10.3390/ijms18071416.
6. Kinboshi M, Mukai T, Nagao Y, Matsuba Y, Tsuji Y, Tanaka S, Tokudome K, Shimizu S, Ito H, Ikeda A, Inanobe A, Kurachi Y, Inoue S, Ohno Y., Inhibition of Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in Astrocytes., *Front. Mol. Neurosci.*, 10, 408, 2017, 10.3389/fnmol.2017.00408.
7. Kunisawa N, Iha HA, Nomura Y, Onishi M, Matsubara N, Shimizu S, Ohno Y., Serotonergic modulation of nicotine-induced kinetic tremor in mice., *J. Pharmacol. Sci.*, 134, 131-138, 2017, 10.1016/j.jphs.2017.06.001.
8. Kuramoto T, Yokoe M, Kunisawa N, Ohashi K, Miyake T, Higuchi Y, Yoshimi K, Mashimo T, Tanaka M, Kuwamura M, Kaneko S, Shimizu S, Serikawa T, Ohno Y., Tremor dominant Kyoto (Trdk) rats carry a missense mutation in the gene encoding the SK2 subunit of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel., *Brain Res.*, 1676, 38-45, 2017, 10.1016/j.brainres.2017.09.012.
9. Iha HA, Kunisawa N, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Ikeda A, Ito H, Serikawa T, Ohno Y., Nicotine Elicits Convulsive Seizures by Activating Amygdalar Neurons., *Front. Pharmacol.*, 8, 57, 2017, 10.3389/fphar.2017.00057.
10. Kunisawa N, Iha HA, Shimizu S, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Serikawa T, Ohno Y., Nicotine evokes kinetic tremor by activating the inferior olive via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors., *Behav. Brain Res.*, 314, 173-180, 2016, 10.1016/j.bbr.2016.08.013.
11. Iha HA, Kunisawa N, Tokudome K, Mukai T, Kinboshi M, Shimizu S, Ohno Y., Immunohistochemical analysis of Fos protein expression for exploring brain regions related to central nervous system disorders and drug actions., *Neuromethods*, 121, 389-408, 2016, 10.1007/978-1-4939-6490-1_17.
12. Nishitani A, Tanaka M, Shimizu S, Kunisawa N, Yokoe M, Yoshida Y, Suzuki T, Sakuma T, Yamamoto T, Kuwamura M, Takenaka S, Ohno Y, Kuramoto T., Involvement of aspartoacylase in tremor expression in rats., *Exp. Anim.*, 65, 293-301, 2016, 10.1538/expanim.16-0007.

[学会発表] (計 23 件)

1. 清水佐紀、升田晋一郎、尾来雪絵、勝見菜奈、阿部圭佑、西谷あい、庫本高志、大野行弘、アスパルトアシラーゼ遺伝子欠損ラットにおける下オリーブ核のセロトニン合成および代謝回転の亢進作用、日本薬学会第 139 年会、2019 年
2. Kasumi Maekawa, Saki Shimizu, Shinichiro Masuda, Yukie Oguru, Nana Katsumi, Keisuke Abe, Ai Nishitani, Takashi Kuramoto, Yukihiro Ohno, Enhancement of 5-HT synthesis and metabolism in aspartoacylase-knockout rats., 第 92 回日本薬理学会年会, 2019 年
3. Yukihiro Ohno, Chihiro Iwai, Iha Higor. A, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Masaki Kato, Mizuki Ogawa, Mai Hashimura, Mechanism of organophosphate paraoxon-induced kinetic tremor in mice., 第 92 回日本薬理学会年会, 2019 年
4. 升田晋一郎、阿部圭佑、尾来雪絵、勝見菜奈、清水佐紀、大野行弘、Aspartoacylase 遺伝子欠損ラットにおける脳内モノアミン含量の解析、第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2018 年
5. 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、Higor Alves Iha, 岩井千紘、橋村 舞、小川瑞葵、川路翔平、河北和馬、阿部圭佑、大野行弘、ニコチン誘発振戦の薬理解析: 抗振戦薬および抗てんかん薬に対する反応性評価、第 133 回日本薬理学会近畿部会、2018 年
6. 清水佐紀、多田羅絢加、水口裕登、安達咲希、木津朋也、祖父江顕、藤原麻衣、森本朋樹、大野行弘、抗精神病薬による錐体外路障害の発現予測とセロトニン神経に着目した回避法検討、生体機能と創薬シンポジウム 2018、2018 年
7. 加藤将貴、國澤直史、清水佐紀、岩井千紘、小川瑞葵、橋村舞、河合悦子、大野行弘、ニコチン誘発振戦の薬理解析: 抗振戦薬および抗てんかん薬に対する反応性評価、日本薬学会第 138 年会、2018 年
8. 國澤直史、Higor A. Iha、清水佐紀、尾西美咲、野村有治、松原菜美、岩井千紘、小川瑞葵、橋村舞、河合悦子、大野行弘、パラオキソンによる振戦発現のメカニズム解析、パラオキソンによる振戦発現のメカニズム解析、第 44 回日本毒性学会学術集会、2017 年
9. Saki Shimizu, Shunsaku Sogabe, Ryoto Yanagisako, Akiyoshi Inada, Megumi Yamanaka, Yukihiro Ohno, Glycine-binding site agonists of NMDA receptors alleviate extrapyramidal side effects by activating nigrostriatal dopamine pathway., 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年
10. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Misaki Onishi, Yuji Nomura, Nami Matsubara, Saki Shimizu, Yukihiro Ohno, Serotonergic modulation of nicotine-induced tremor., 第 40 回日本神経科学大会, 2017 年
11. 清水佐紀、曾我部俊策、柳迫領仁、稲田顕慶、山中萌、大野行弘、NMDA 受容体グリシン結合部位活性化薬は黒質 - 線条体ドパミン神経路の活性化を介して錐体外路障害を改善する、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会、2017 年
12. 國澤直史、Higor A. Iha、清水佐紀、大野行弘、ニコチン誘発振戦に対するセロトニン神経系の調節メカニズム、第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 年
13. 庫本高志、横江繭子、国澤直史、大橋佳奈、三宅崇仁、樋口裕城、吉見一人、真下知二、田中美有、桑村 充、金子周二、清水佐紀、芹川忠夫、大野行弘、SK2 チャネル遺伝子にミスセンス変異を持つ振戦ラット、第 136 回関西実験動物研究会、2017 年
14. Saki Shimizu, Tomohiro Sekiguchi, Nanami Ikeda, Saya Okamura, Saki Itaya, Yukihiro Ohno, Effects of D-cycloserine, a glycine-binding site agonist of NMDA receptors, on antipsychotic-induced extrapyramidal side effects., 第 90 回日本薬理学会総会, 2017 年
15. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Yuto Mizuguchi, Takanori Nohara, Yudai Atsuta,

- Keito Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno, Analysis of causative brain regions for nicotine-induced seizures., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016 年
16. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Kento Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Yukihiro Ohno, Pharmacological responses of nicotine-induced tremor to various anti-tremor agents., 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016 年
17. Yukihiro Ohno, Yuka Sato, Syodai Fujii, Ryo Wakamatsu, Haruna Takasaki, Megumi Yamanaka, Akiyoshi Inada, Syunsaku Sogabe, Ryoto Yanagisako, Saki Shimizu, Evaluation of the extrapyramidal side effects (EPS) liability of NMDA receptor glycine-binding site agonists., 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology (国際学会), 2016 年
18. Higor A. Iha, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Yuto Mizuguchi, Takanori Nohara, Yudai Atsuta, Keito Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Masato Kinboshi, Tadao Serikawa, Yukihiro Ohno, Nicotine evokes convulsive seizures by activating amygdala neurons partly through $\alpha 7$ nACh receptors., 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology (国際学会), 2016 年
19. Naofumi Kunisawa, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Yudai Atsuta, Takanori Nohara, Kento Yoshikawa, Kentaro Tokudome, Yukihiro Ohno, Pharmacological analysis of nicotine-induced tremor., 30th CINP World congress of Neuropsychopharmacology (国際学会), 2016年
20. 國澤直史, Higor A. Iha, 清水佐紀, 尾西美咲, 野村有治, 松原菜美, 徳留健太郎, 河合悦子, 大野行弘, ニコチンによる運動興奮症状の発現メカニズム解析, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会, 2016 年
21. 関口知弘, 池田菜々美, 板谷紗希, 岡村沙耶, 秋葉健太, 藤井 恵, 山本真奈, 清水佐紀, 大野行弘, NMDA 受容体グリシン結合部位活性化薬の線条体内ドパミン遊離に対する影響, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会, 2016 年
22. 野村有治, 尾西美咲, 松原菜美, 國澤直史, Higor A. Iha, 清水佐紀, 河合悦子, 大野行弘, ニコチン誘発振戦におけるセロトニン受容体の関与, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会, 2016 年
23. Higor A. Iha, 國澤直史, 清水佐紀, 熱田侑大, 野原孝紀, 吉川健斗, 徳留健太郎, 大野行弘, Acute nicotine causes convulsive seizures by activating amygdala neurons, primarily through $\alpha 7$ nACh receptors., 第 130 回日本薬理学会近畿部会, 2016 年

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)
〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :