

令和 元年 9 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26507004

研究課題名(和文)腎不全患者のむずむず脚症候群(RLS)発症機構の分子生物学的解明と腎毒性物質同定

研究課題名(英文)Analysis of pathophysiology of restless legs syndrome with renal failure and toxic substances

研究代表者

村松 一洋 (Muramatsu, Kazuhiro)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70510907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全患者のRLS発症促進機構を解明するため、Btd9変異マウスに患者血清を投与し、かつ治療薬であるRotigotine投与により改善するかどうか、脳波及び筋電図による解析を実施した。Rotigotine投与による覚醒反応の増強とNREMの減少はプラセボ、健常者血清投与で生じ、RLS患者血清(特発性、透析)では変化がなかった。筋活動は変異型にRLS患者血清(特発性、透析)を投与した際に増強し、Rotigotineで改善した。筋活動に関してはPLMSに相当し、これはBtd9変異とPLMSが強く相関するというヒトでの過去の報告を支持するものであった。この成果は論文にも掲載が決まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Restless legs syndromeは加齢に伴い罹患率が上昇し、睡眠障害をきたすことで生活の質の低下を招くともに生活習慣病の発症リスクとなり、生命予後に影響する疾患である。腎不全による透析患者には高率に発症するこの疾患の病態を明らかにするために実施したこの研究により、発症機構を一部明らかにするとともに、治療の知見も見出した。これらの成果は、腎不全患者のRLS病態解明の基礎データとして十分な意義のあるものであり、患者の疾患管理や発症抑制に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Some uremic substances could not be filtered dialysis membrane, would relate with pathogenic mechanism of RLS symptoms in patient with renal failure. In addition, we investigated whether genetic mutation such as Btd9 would contribute to the exacerbation of RLS symptoms in this condition. Furthermore we investigated whether an exacerbation of RLS symptoms would be improved by Rotigotine. The EEG/EMG signals were captured. The amount of wakefulness and NREM sleep of KO mice were similar to those of WT mice, while amount of REM sleep was decreased compared with that of WT mice. Leg EMG data shows that KO mice showed an increased leg muscle activity during NREM sleep compared with WT mice. The reason why this wake-promoting effect of rotigotine is unclear. However this will be associated with the pathophysiology of RLS. It is also hoped that the future study will be develop.

研究分野：神経科学、臨床神経学、小児科学

キーワード：睡眠障害 renal failure Rotigotine Btd9 動物モデル RLS

## 1. 研究開始当初の背景

Restless Legs Syndrome (RLS) は非常に罹患率の高い疾患であり、欧米では約 10% にアジアでも 3-5% の比率で認められる common disease である。同時に、睡眠障害をもたらすことで生活への多大な影響を及ぼし、不眠により心血管イベント発生率の上昇をまねく (Winkelman JW, et al. *Neurology*. 70(1):35-42. (2008) 等) など生命を脅かす疾患である。近年、大規模なゲノムワイド関連解析が行われ BTBD9 や MEIS1 といったいくつかの遺伝学的多型が RLS や periodic limb movement in sleep (PLMS) の発症に強く関与していることが近年報告されてきた (Winkelmann J, et al. *Nat Genet*. 39(8):1000-6. (2007)、Stefansson H, et al. *N Engl J Med*. 357(7):639-47. (2007) 等)。

病態生理からは特発性 RLS および 2 次性 RLS に分けられ、特発性ではドーパミン神経機能異常や神経組織での鉄代謝異常が病態にあるものと考えられているが未解決である。2 次性では Parkinson 病などの神経疾患、末期腎不全や妊娠などに合併するものが多い。

末期腎不全患者では一般対照群に比して、RLS および PLMS の合併率が有意に高いことがわかっている (Aritake-Okada S, et al. *Sleep Med*. 12(10):1031-3. (2011))。その反面、腎移植後にはこれらの合併率は低下することが知られている (Azar SA, et al. *Transplant Proc*. 39(4):1132-3. (2007))。これは末期腎不全に伴う何らかの腎毒性物質が RLS や PLMS の発症に関与している可能性を強く示唆するもののその関与は証明されておらず、腎毒性物質自体も明らかとなっていない。さらには腎不全患者の背景にある遺伝学的多型の存在、特に BTBD9 や MEIS1 の多型が RLS や PLMS の発症に関与し、BTBD9 のそのオッズ比は 1.47 であることが報告されている (Schormair B, et al. *J Med Genet*. 48(7):462-6. (2011)) が、この点に関して動物モデルを用いて *in vivo* で実験的に証明した報告は現在のところない。

## 2. 研究の目的

末期腎不全患者が有する腎毒性物質が RLS 発症を促進すること、そして遺伝的多型がその発症率を増強させるという影響をもつこと、さらには RLS 治療薬であるドーパミン作動薬 Rotigotine が症状を改善させること、これらを RLS 動物モデルである Btbd9 変異マウスを使用して電気生理学的に検証する。

遺伝学的多型として特に BTBD9 に着目し、BTBD9 の機能低下が及ぼす RLS および PLMS 発症に及ぼす分子生物学的機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) BTBD9 変異マウスおよび野生型マウスに対して、腎不全患者血清を腹腔内投与する。投与後に睡眠中の脳波および下肢運動を計測する。

(2) これらの運動量測定後に、Rotigotine 投与を行い睡眠中の下肢運動量の改善を認めるかどうか計測する。

(3) 測定後に脳神経組織、特に黒質、A11 や脊髄のドーパミン神経細胞数計測、ドーパミン受容体の発現やチロシンハイドロキシラーゼ活性を計測する。

## 4. 研究成果

(1) Btbd9 変異マウスを作製し、電気生理学的に睡眠解析を行い野生型と比較したところ、REM の短縮や断片化を認め、睡眠覚醒リズムに影響を生じていた。

(2) 同様に下肢筋電図を測定し、変異型で亢進を認めた。

(3) Rotigotine による覚醒反応の増強はプラセボ、健常者血清投与で生じ、RLS 患者血清 (特発性、透析) では変化がなかった。

(4) Rotigotine による NREM の減少もプラセボ、健常者血清投与でのみ生じた。

(5) Rotigotine による REM の変化は生じなかった。

(6) 筋活動は変異型に RLS 患者血清 (特発性、透析) を投与した際に増強し、Rotigotine で改善した。

(7) 黒質及び A11 領域におけるドーパミン細胞数は幼若時には変異型、野生型で有意差を認めめず、加齢によって有意差を生じた。

本研究によってこれまでに報告のない新しい知見が得られた。

## 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 39 件)

(1) Muramatsu K, Chikahisa S, Shimizu N, Sei H, Inoue Y. Rotigotine suppresses sleep-related muscle activity augmented by injection of dialysis patients' sera in a mouse model of restless legs syndrome. *Sci Rep*. (accepted) 査読有

(2) Okajima I, Nakajima S, Ochi M, Inoue Y. Association among changes in sleep-related beliefs, sleep reactivity, and improvement of insomnia following cognitive behavioral therapy. *Sleep Med*. 2017

- 29:96-7. 査読有
- (3) Picchietti DL, Van Den Eeden SK, Inoue Y, Berger K. Achievements, challenges, and future perspectives of epidemiologic research in restless legs syndrome (RLS). *Sleep Med.* 2017 31:3-9. 査読有
- (4) Sasai-Sakuma T, Nishio Y, Yokoi K, Mori E, Inoue Y. Pareidolias in REM sleep behavior disorder: A possible predictive marker of lewy body diseases? *Sleep.* 2017 40(2). 査読有
- (5) Takahashi M, Nishida S, Nakamura M, Kobayashi M, Matsui K, Ito E, Usui A, Inoue Y. Restless legs syndrome augmentation among Japanese patients receiving pramipexole therapy: Rate and risk factors in a retrospective study. *PLoS one.* 2017 12(3):e0173535. 査読有
- (6) RM. Lardelli, AE. Schaffer, VR.C. Eggens, MS. Zaki, S Grainger, S Sathe, EL. V Nostrand, Z Schlachetzki, B Rosti, N Akizu, E Scott, LD Heckman, RO Rosti, E Dikoglu, A Gregor, A G-Gamboa, D Musaev, R Mande, A Widjaja, TL. Shaw, S Markmiller, I M-Valencia, JH. Davies, L de Meirleir, H Kayserili, U Altunoglu, ML Freckmann, L Warwick, D Chitayat, AO Çağlayan, K Bilguvar, H Per, C Fagerberg, M Kibaek, KA. Aldinger, D Manchester, N Matsumoto, K Muramatsu, H Saitsu, M Shiina, K Ogata, N Foulds, WB. Dobyns, N Chi, D Traver, L Spaccini, SM Bova, SB. Gabriel, M Gunel, EM Valente, EJ. Bennett, GW. Yeo, F Baas, J L-Andersen, JG. Gleeson. Biallelic Mutations in the 3' Exonuclease TOE1 Cause Pontocerebellar Hypoplasia and Uncover a Role in snRNA Processing. *Nature Genetics.* 2017 49(3):457-464 査読有
- (7) Muramatsu K, Sawaura N, Ogata T, Makioka N, Tomita K, Motojima T, Ida K, Hazama K, Arakawa H. Efficacy and tolerability of levetiracetam for pediatric refractory epilepsy. *Brain Dev.* 2017 39(3):231-235 査読有
- (8) Ferri R, Fulda S, Allen RP, Zucconi M, Bruni O, Chokroverty S,.,, Inoue Y et al. World Association of Sleep Medicine (WASM) 2016 standards for recording and scoring leg movements in polysomnograms developed by a joint task force from the International and the European Restless Legs Syndrome Study Groups (IRLSSG and EURLSSG). *Sleep Med.* 2016 26:86-95. 査読有
- (9) Inoue Y. Asian specific feature of sleep habits and sleep disorders. *Sleep Biol Rhythms* 2016 14(2):123-4. 査読有
- (10) Inoue Y, Miki M, Tabata T. Findings of the maintenance of wakefulness test and its relationship with response to modafinil therapy for residual excessive daytime sleepiness in obstructive sleep apnea patients adequately treated with nasal continuous positive airway pressure. *Sleep Med.* 2016 27-28:45-8. 査読有
- (11) Maeda K, Itoh E, Okawara Y, Takei Y, Kobayashi M, Inoue Y, et al. A pitfall of an orthodontic approach to pubescent obstructive sleep apnea: A case report *Journal of Dental Sleep Medicine.* 2016 3(2):73-4. 査読有
- (12) Sasai-Sakuma T, Kikuchi K, Inoue Y. Cross-Sectional study of obstructive sleep apnea syndrome in Japanese public transportation drivers: Its prevalence and association With pathological objective daytime sleepiness. *J Occup Environ Med.* 2016 58(5):455-8. 査読有
- (13) Shimura A, Takaesu Y, Aritake S, Futenma K, Komada Y, Inoue Y. Later sleep schedule and depressive symptoms are associated with usage of multiple kinds of hypnotics. *Sleep Med.* 2016 25:56-62. 査読有
- (14) Suzuki K, Miyamoto M, Miyamoto T, Suzuki S, Inoue Y, Murata M, et al. The effect of comorbidity of restless legs syndrome and migraine on sleep and mood: an integration of multi-center data. *Sleep Biol Rhythms.* 2016 14(2):187-91. 査読有
- (15) Takaesu Y, Inoue Y, Murakoshi A, Komada Y, Otsuka A, Futenma K, et al. Prevalence of circadian rhythm sleep-wake disorders and associated factors in euthymic patients with bipolar disorder. *PLoS one.* 2016 11(7):e0159578. 査読有
- (16) Suzuki T, Miyake N, Tsurusaki Y, Okamoto N, Alkindy A, Inaba A, Sato M, Ito S, Muramatsu K, Kimura S, Ieda D, Saitoh S, Hiyane M, Suzumura H, Yagyu K, Shiraishi H, Nakajima M, Fueki N, Habata Y, Ueda Y, Komatsu Y, Yan K, Shimoda K, Shitara Y, Mizuno S, Ichinomiya K, Sameshima K, Tsuyusaki Y, Kurosawa K, Sakai Y, Haginoya K, Kobayashi Y, Yoshizawa C, Hisano M, Nakashima M, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. Molecular genetic analysis of 30 families with Joubert syndrome. *Clin Genet.* 2016

- 90(6):526-535 査読有
- (17) Takaesu Y, Kishimoto T, Murakoshi A, Takahashi N, Inoue Y. Factors associated with discontinuation of aripiprazole treatment after switching from other antipsychotics in patients with chronic schizophrenia: A prospective observational study. *Psychiatry research*. 2016 236:71-4. 査読有
- (18) Takaesu Y, Tsuiki S, Kobayashi M, Komada Y, Nakayama H, Inoue Y. Mandibular advancement device as a comparable treatment to nasal continuous positive airway pressure for positional obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2016 12(8):1113-9. 査読有
- (19) Tamura N, Sasai-Sakuma T, Morita Y, Okawa M, Inoue S, Inoue Y. A nationwide cross-sectional survey of sleep-related problems in Japanese visually impaired patients: prevalence and association with health-related quality of life. *J Clin Sleep Med*. 2016 12(12):1659-67. 査読有
- (20) Yanagihara M, Tsuiki S, Setoguchi Y, Inoue Y. Treatment of obstructive sleep apnea with a tongue-stabilizing device at a single multidisciplinary sleep center. *Journal of Dental Sleep Medicine*. 2016 3(2):43-7. 査読有
- (21) Inoue Y. Sleep-related eating disorder and its associated conditions. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2015 69(6):309-20. 査読有
- (22) Inoue Y, Kamiyo A, Nagai R. Patient background factors affecting the therapeutic outcomes in response to eszopiclone in adult patients with chronic insomnia: A post hoc analysis of a double-blind phase III study in Japan. *J Clin Sleep Med*. 2015 11(10):1171-8. 査読有
- (23) Inoue Y, Sasai T, Hirata K. Electroencephalographic finding in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neuropsychobiology*. 2015 71(1):25-33. 査読有
- (24) Matsui K, Sasai-Sakuma T, Takahashi M, Ishigooka J, Inoue Y. Restless legs syndrome in hemodialysis patients; prevalence and association to daytime functioning. *Sleep Biol Rhythms*. 2015 13(2):127-35. 査読有
- (25) Morita Y, Sasai-Sakuma T, Asaoka S, Inoue Y. The impact of a delayed sleep-wake schedule on depression is greater in women - A web-based cross-sectional study in Japanese young adults. *Chronobiol Int*. 2015 32(7):952-8. 査読有
- (26) Morita Y, Sasai-Sakuma T, Asaoka S, Inoue Y. Prevalence and correlates of insufficient sleep syndrome in Japanese young adults: A Web-Based Cross-Sectional Study. *J Clin Sleep Med*. 2015 11(10):1163-9. 査読有
- (27) Nomura T, Inoue Y, Kagimura T, Kusumi M, Nakashima K. Validity of the Japanese version of the REM Sleep Behavior Disorder (RBD) Screening Questionnaire for detecting probable RBD in the general population. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2015 69(8):477-82. 査読有
- (28) Sasai-Sakuma T, Inoue Y. Differences in electroencephalographic findings among categories of narcolepsy-spectrum disorders. *Sleep Med*. 2015 16(8):999-1005. 査読有
- (29) Sasai-Sakuma T, Kinoshita A, Inoue Y. Polysomnographic assessment of sleep comorbidities in Drug-Naive narcolepsy-spectrum disorders-a Japanese cross-sectional study. *PLoS one*. 2015 10(8):e0136988. 査読有
- (30) Suzuki K, Miyamoto M, Miyamoto T, Inoue Y, Matsui K, Nishida S, et al. The prevalence and characteristics of primary headache and dream-enacting behaviour in Japanese patients with narcolepsy or idiopathic hypersomnia: A multi-centre cross-sectional study. *PLoS one*. 2015 10(9):e0139229. 査読有
- (31) Takahashi M, Ikeda J, Tomida T, Hirata K, Hattori N, Inoue Y. Daytime symptoms of restless legs syndrome - clinical characteristics and rotigotine effectiveness. *Sleep Med*. 2015 16(7):871-6. 査読有
- (32) Trenkwalder C, Winkelmann J, Inoue Y, Paulus W. Restless legs syndrome-current therapies and management of augmentation. *Nature reviews Neurology*. 2015 11(8):434-45. 査読有
- (33) Asaoka S, Komada Y, Aritake S, Morita Y, Fukuda K, Inoue Y. Effect of delayed sleep phase during university life on the daytime functioning in work life after graduation. *Sleep Med*. 2014 15(9):1155-8. 査読有
- (34) Maeda K, Tsuiki S, Fukuda T, Takise Y, Inoue Y. Is maxillary dental arch constriction common in Japanese male adult patients with obstructive sleep apnoea? *Eur J Orthod*. 2014 36(4):403-8.

査読有

- (35) Maeda K, Tsuiki S, Nakata S, Suzuki K, Itoh E, Inoue Y. Craniofacial contribution to residual obstructive sleep apnea after adenotonsillectomy in children: a preliminary study. *J Clin Sleep Med.* 2014 10(9):973-7. 査読有
- (36) Narisawa H, Komada Y, Usui A, Inoue Y. Characteristics of insomniacs having sleep state misperception. *Neuroscience and Biomedical Engineering.* 2014 2(3):138-41. 査読有
- (37) Okajima I, Nakajima S, Ochi M, Inoue Y. Reducing dysfunctional beliefs about sleep does not significantly improve insomnia in cognitive behavioral therapy. *PloS one.* 2014;9(7):e102565. 査読有
- (38) Shiota S, Inoue Y, Takekawa H, Kotajima M, Nakajyo M, Usui C, et al. Effect of continuous positive airway pressure on regional cerebral blood flow during wakefulness in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 2014 18(2):289-95. 査読有
- (39) Takaesu Y, Komada Y, Asaoka S, Kagimura T, Inoue Y. Factors associated with long-term use of hypnotics among patients with chronic insomnia. *PloS one.* 2014 9(11):e113753. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Tsukida K, Muramatsu K. The characterization of BTBD9, genetic association with Restless legs syndrome, in vivo and vitro study. 14<sup>th</sup> International Child Neurology Congress, Amsterdam, 2.May.2016
- (2) Muramatsu K. Molecular mechanism of BTBD9 in dopaminergic neuron and animal model. 15<sup>th</sup> Annual Meeting of European Restless Legs Syndrome Study Group, Munich, 11.Dec. 2015
- (3) Muramatsu K. The characterization of BTBD9 mutant mice, genetic association with Restless legs syndrome. 11<sup>th</sup> Congress of the Asian Society for Pediatric Research, Osaka, 17.Apr.2015
- (4) 井上雄一. レストレスレッグス症候群の薬物療法のあり方 第 25 回日本臨床精神神経薬理学会 東京, 29. Oct. 2015
- (5) Inoue Y. Symptomatic profile of RLS in Japanese population 6th world congress on sleep medicine. Seoul, Korea, 21. Mar. 2015

- (6) Muramatsu K. 14<sup>th</sup> Annual Meeting of European Restless Legs Syndrome Study Group, Munich, 12. Dec. 2014
- (7) Inoue Y. Dopaminergic treatment for RLS Asian Sleep Research Society 2014 Kovalam, Thiruvananthapuram, India, 22. Sep. 2014

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

村松 一洋 (MURAMATSU Kazuhiro)  
群馬大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70510907

### (2) 研究分担者

井上 雄一 (INOUE Yuichi)  
公益財団法人神経研究所・研究部・研究員  
研究者番号：50213179