

## 学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室  
職・氏名 助教・清水 佐紀

### 研究テーマ：

過分極作動性 HCN1 チャネルを介した本態性振戦の発現調節機構

### 研究期間：

2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日

### 研究担当者：

#### <本学>

研究代表者 清水 佐紀 (大阪薬科大学・薬学部・助教)

研究分担者 大野 行弘 (大阪薬科大学・薬学部・教授)

#### <共同研究機関>

研究分担者 庫本 高志 (東京農業大学・農学部・教授)

### 研究目的：

過分極活性化環状ヌクレオチド依存性の陽イオンチャネルである Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1 (HCN1 チャネル) は、主に心臓や脳に分布し、自発性リズム形成の調節や神経のオシレーション発火を担っている。一方で我々は、本態性振戦の原因遺伝子の一つとして HCN1 チャネルを同定しており (PLoS One., 10, e123529, 2015)、HCN1 チャネルと本態性振戦が密接に関連することを明らかにしてきた。本研究では、本態性振戦の発症における HCN1 チャネルの役割とその調節メカニズムを明らかにすることにより、本態性振戦に対する新規治療法の提案を目指す。

### 研究内容および研究成果：

本態性振戦は不随意運動障害の一つであり、姿勢時および動作時振戦を呈する。これまでに当研究室では、自然発症性の振戦を発症する Tremor ラットを本態性振戦モデルとして同定してきた (PLoS One., 10, e123529, 2015)。Tremor ラットはアセチルアスパラギン酸分解酵素 (aspartoacylase) の欠損および過分極作動性カリウムチャネル 1 (HCN1 チャネル) の変異ラットであり、個々の遺伝的要因のみでは振戦は発症せず、これら 2 つの遺伝的要因が合わさることで振戦が発症することを明らかにしてきた (PLoS One., 10, e123529, 2015)。

振戦発現の原因遺伝子として同定された HCN1 チャネルは、主に心臓や脳に分布し、自発性リズム形成の調節や神経のオシレーション発火を担っている。中枢神経系においては、HCN1 の *de novo* 変異が早期乳児てんかん性脳症を引き起こすこと (Nature genetics, 46, 6, 2014) などの知見が報告されており、様々な神経疾患との関連が世界的にも注目されている。本研究では、本態性振戦の発症

における HCN1 チャンネルの役割とその調節メカニズムを明らかにする目的で、HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットを用いて、本態性振戦の発現調節機構を解析した。

## 1. HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットにおける振戦感受性評価

*Hcn1*-KO ラットおよび起源動物である F344 ラット (対照動物) を用いて、各種振戦誘発剤に対する感受性評価を行った。まず始めに、セロトニン (5-HT) 前駆体である 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) を各動物に腹腔内投与した結果、5-HTP (100 mg/kg, i.p.) の投与では、*Hcn1*-KO ラットにおいてのみ 5-HTP 投与後 30~60 分において緩徐な振戦発現が見られた (図 1)。さらに高用量の 5-HTP (200 mg/kg, i.p.) を投与したところ、F344 ラットと比較して、*Hcn1*-KO ラットでは振戦持続時間の有意な増強が認められた (図 1)。次に、本態性振戦誘発剤である MAO<sub>A</sub> 阻害薬の harmaline (10 mg/kg, i.p.) を投与した。F344 ラットでは振戦は発現したが、*Hcn1*-KO ラットでは全く振戦発現が認められず、完全に抑制された (図 2)。

以上の結果から、*Hcn1*-KO ラットは 5-HTP による 5-HT 神経系を介する振戦発現に対しては増強作用を示すが、harmaline 誘発振戦に対しては抑制作用を示すことが明らかとなった。

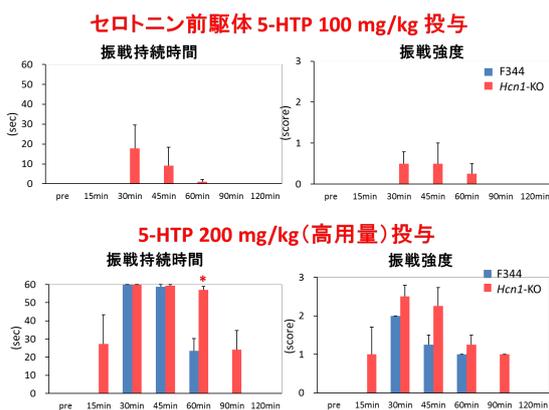


図 1 . HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットにおける 5-HT 前駆体 (5-HTP) による振戦発現の感受性評価

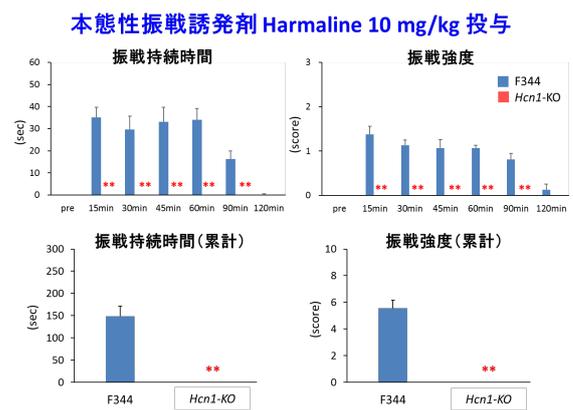


図 2 . HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットにおける本態性振戦誘発剤 Harmaline による振戦発現の感受性評価

## 2. HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットの脳内セロトニン (5-HT) 神経機能の評価

HCN1 チャンネルの脳内 5-HT 代謝回転へ及ぼす影響を調べるために、*Hcn1*-KO ラットと F344 ラットの脳を摘出し、本態性振戦の発現部位とされる下オリーブ核 (Inferior olive : IO) を含む、全脳 9 部位における脳内 5-HT およびその代謝体 (5-HIAA) 含量を測定した。その結果、*Hcn1*-KO ラットは F344 ラットと比較して、5-HT 含量が多く、脳部位で増加していた。特に本態性振戦の原因部位とされる下オリーブ核においては、5-HT 代謝体および 5-HT 代謝回転の有意な上昇が見られた (図 3)。

本結果より、本態性振戦の発現には下オリーブ核における 5-HT 神経活動の亢進が関与している可能性が示唆された。

### 脳内セロトニン含量および代謝回転

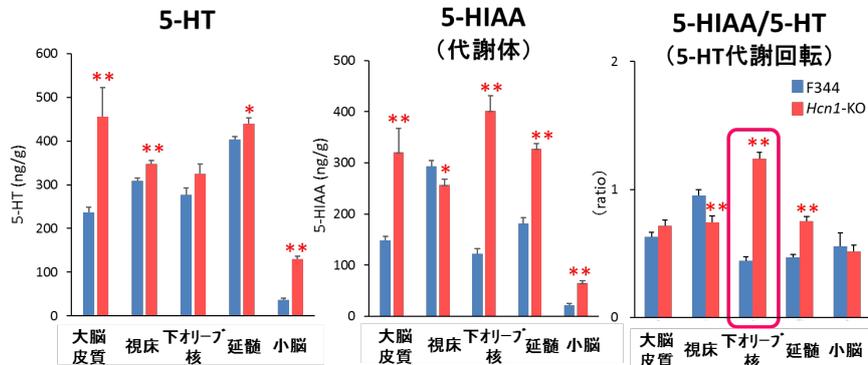


図 3. HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットにおける脳内 5-HT 代謝回転の評価

### 3. HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットの脳内アミノ酸機能の評価

$\beta$ -カルボリン系化合物である harmaline は MAO<sub>A</sub> 阻害作用の他に、GABA<sub>A</sub> 受容体逆アゴニスト作用を有する。*Hcn1*-KO ラットでは harmaline による振戦発現が認められなかったことから、*Hcn1*-KO ラットの脳内 GABA およびグルタミン酸含量について評価した。

脳内 GABA 含量を定量した結果、*Hcn1*-KO ラットでは下オリーブ核の GABA が部位特異的に減少していたが、グルタミン酸含量はほぼ変化が見られなかった (図 4)。

さらに、下オリーブ核における GABA 神経のマーカーである GAD67 の免疫組織染色を実施したところ、*Hcn1*-KO ラットでは F344 ラットと比較して、下オリーブ核における GABA 神経の発現が抑制されていることが確認された (図 4)。

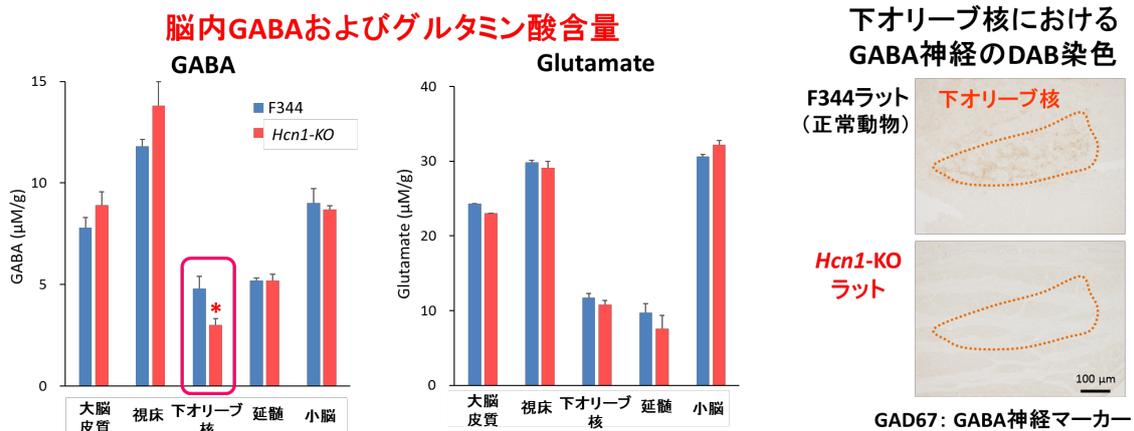


図 4. HCN1 チャンネル遺伝子欠損 (*Hcn1*-KO) ラットにおける脳内 GABA およびグルタミン酸含量の評価

#### 4. Tremor ラットの振戦発現に対する 5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬および GABA<sub>A</sub> 作動薬の作用評価

自然発症性の本態性振戦モデルである Tremor ラットを用いて、5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬の(s)-WAY-100135 および GABA<sub>A</sub> 作動薬 Muscimol の作用を評価した。

Tremor ラットの振戦発現に対する 5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬(s)-WAY-100135 (10 mg/kg, i.p.) の作用を評価した結果、振戦持続時間および強度ともに有意な抑制作用が認められた (図 5)。また、GABA<sub>A</sub> 作動薬 Muscimol (1 mg/kg, i.p.) を投与した場合も、Tremor ラットの振戦発現は顕著に抑制された (図 5)。これら結果より、5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬および GABA<sub>A</sub> 作動薬は、本態性振戦の発現を抑制することが明らかとなった。

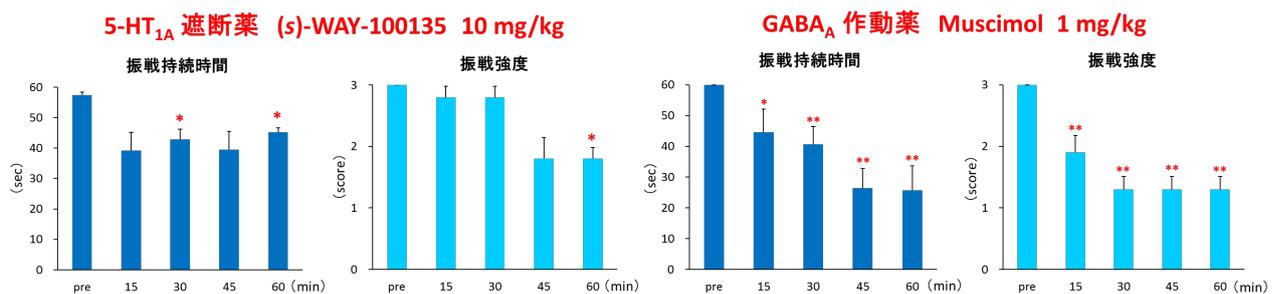


図 5. 自然発症性本態性振戦モデル Tremor ラットにおける 5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬および GABA<sub>A</sub> 作動薬による振戦発現の抑制作用

#### 5. *Aspa/Hcn1*-double KO ラットの振戦発現に対するグルタミン酸受容体遮断薬の作用評価

Tremor ラットの振戦原因遺伝子である *Aspa* と *Hcn1* を共に欠損させた *Aspa/Hcn1*-double KO ラット (振戦性) を用い、グルタミン酸受容体遮断薬の作用を評価した。

*Aspa/Hcn1*-double KO ラットの振戦発現に対する NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) 遮断薬の作用を評価した結果、NMDA 受容体遮断薬の CPPene (1 mg/kg, i.p.)、Ro 25-6981 (10 mg/kg, i.p.) および cis-PPDA (10 mg/kg, i.p.) はいずれも振戦発現を抑制した。一方、non-NMDA 受容体遮断薬 NBQX (15 mg/kg, i.p.) の振戦抑制作用は弱く、代謝型グルタミン酸受容体遮断薬 LY-341485 (5 mg/kg, i.p.) は何ら作用を示さなかった。これら結果より、Tremor ラットの振戦発現には一部 NMDA 受容体が関与することが明らかとなった (Exp. Anim., DOI:10.1538/expanim.20-0025 in press)。

本研究により、*Hcn1*-KO ラットでは下オリブ核における部位特異的な 5-HT 代謝回転の亢進や GABA 含量の低下が認められた。これら結果は、HCN1 チャンネルの抑制が下オリブ核の GABA 神経活動を抑制し、神経の異常な同期発火を誘発することによって、本態性振戦の発現を促進的に調節することを示唆する。さらに、本態性振戦の新規治療薬として、5-HT<sub>1A</sub> 遮断薬および GABA<sub>A</sub> 作動薬が有用であることが考えられた。また、Tremor ラットにおける振戦発現には、NMDA 受容体も一部関与することが示唆された。

成果発表：

<原著論文>

- Ai Nishitani, Haruna Nagayoshi, Shigeo Takenaka, Masahide Asano, Saki Shimizu, Yukihiro Ohno, Takashi Kuramoto: Involvement of NMDA receptors in tremor expression in *Aspa/Hcn1* double-knockout rats., *Exp. Anim.*, DOI:10.1538/expanim.20-0025 (2020) in press

<学会発表>

- 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, 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2018年10月(姫路)
- 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, 第139回日本薬学会年会, 2019/3/20-23(千葉)
- K. Maekawa, S. Shimizu, S. Masuda, Y. Oguru, N. Katsumi, K. Abe, A. Nishitani, T. Kuramoto, Y. Ohno, Enhancement of 5-HT synthesis and metabolism in aspartoacylase-knockout rats., 第92回日本薬理学会年会, 2019/3/14-16(大阪)
- 前川華澄, 塚本弥恵, 山中美生, 井上裕太, 清水佐紀, 大野行弘, Harmaline 誘発振戦に対するセロトニン神経系の制御機構, 生体機能と創薬シンポジウム2019, 2019/8/29-30(東京)
- 山中美生, 塚本弥恵, 前川華澄, 井上裕太, 清水佐紀, 大野行弘, セロトニン神経系を介した harmaline 誘発振戦の発現調節機構, 第69回日本薬学会関西支部総会・大会, 2019/10/12(神戸)