

平成 30 年 9 月 18 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460114

研究課題名(和文) GIRKチャネル標的の独創的・画期的な難治性脳疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a revolutionary and inventive therapeutic drug for intractable brain diseases, targeting GIRK channel

研究代表者

高濱 和夫 (Kazuo, Takahama)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：80150548

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)：CRISPR/Casシステムを用いて、ドパミントランスポーター(DAT)発現ニューロンのGIRKチャネルのGIRK2サブユニットをノックアウトしたマウスを作製した。組織化学的検討の結果、このマウスの腹側被蓋野のDAT発現ニューロンのGIRK2サブユニットは削除され、GIRKチャネルの電気生理学的機能は損なわれていた。このマウスの行動を強制水泳試験で検討した結果、一般行動に有意な影響はなく、無動時間が有意に短縮された。これらの成績は、中枢性鎮咳薬の抗うつ様作用の発現に、腹側被蓋野のGIRKチャネルの抑制を介したドパミンニューロンの活性化が関与するという我々の考えをさらに支持する。

研究成果の概要(英文)：Using the CRISPR/Cas system, conditional knockout mice in which GIRK2 subunit was deleted in the neurons expressing dopamine transporter were generated. Histochemical and electrophysiological analysis of the ventral tegmental area (VTA) in this mouse revealed that GIRK2 subunit was deleted in the neurons expressing DAT and its electrophysiological function of the GIRK channels is deteriorated in this neurons. In the forced swimming test, this KO mice showed a significant decrease in the immobility time without little affecting general behaviors such as locomotion. The present results further support our hypothesis that activation of the dopamine neurons via inhibition of GIRK channels in the VTA may be involved in the expression of antidepressant-like effect of centrally acting antitussives such as tipepidine.

研究分野：薬理学

キーワード：GIRK channel GIRK2 subunit CRISPR/Cas system Knockout mouse ventral tegmental area dopamine neuron antidepressant effect tipepidine

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

1. 研究開始当初の背景

申請者は過去20数年以上にわたり鎮咳薬の薬理学的研究に従事し、その過程で、中枢性鎮咳薬デキストロメトルファンがGたんぱく質に共役した内向き整流性のKイオン(GIRK)チャネルの活性化電流を抑制するという興味深い知見を見出した(Neuropharmacol., 2000)。これに端を発して、本研究の契機となる以下の数々の興味深い知見を見出してきた。

1) 非麻薬性中枢性鎮咳薬はGIRKチャネル活性化電流を抑制し、その抑制作用の強さと鎮咳効果の強さの間には相関性が認められる。(Cough 2003; Handbook Pharmac. Exp. 2008)

2) GIRKチャネル阻害活性をもつ薬物は脳梗塞に伴う頻尿と排尿困難をともに著明に改善する。(Can.J.Physiol. Pharmacol.2009)

3) マウスの多動症モデルを改善し、その作用強度はGIRKチャネル抑制作用の強さ相関する。また、GIRKチャネル阻害薬は、注意欠陥多動性障害の治療薬、メチルフェニデートが効果を示さない多動モデルにも抑制作用を示す。(特許第5109132号)

4) GIRKチャネル阻害薬は、遊具などを配置したエンリッチ環境での飼育効果に類似した作用を示し、環境ホルモンの脳かく乱作用の発現をほぼ完全に抑制する。

5) GIRKチャネル阻害薬は、新奇の抗うつ様作用を示し、治療抵抗性のうつ病モデルにおいても効果を発揮する。(特許第5266520号; Behav. Brain Res.2009, Neurosci Lett. 2010)

6) GIRKチャネル阻害薬は、強迫性症候群(特許第5850299号)、パーキンソン病モデルなど、様々な難治性脳疾患モデルに対して強い改善作用を示し、脳障害の修復剤としての作用をもつ。(Behav. Brain Res., 2010)

7) 上記に加えて、統合失調症モデルに対する改善作用(特許5858477)、疼痛における中枢機能改善作用(特許6032561)など、多彩な薬理活性をもつ。

さらに、既存の統合失調症治療薬が奏功しにくい陰性症状にも効果を示すカルピブラミンや抗痴呆薬のドネペジルも比較的強いGIRKチャネル活性化電流抑制作用をもつ。上記の他にも、鎮咳薬(チペピジン)の服用により難治性の小児点頭けいれんが消失したという私信があり、これに基づいて実施した研究で、GIRKチャネル活性化電流抑制作用をもつ鎮咳薬チペピジンは、特異な抗けいれん活性をもつことも明らかにしている。GIRKチャネル阻害作用をもつチペピジンやクロペラスチンは、セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリンなどのモノアミンのトランスポーターに対してほとんど親和性を示さない。

2. 研究の目的

本研究は、鎮咳薬がGたんぱく質共役型内向き整流性Kイオン(GIRK)チャネルの活性化電流を抑制し、難治性うつ病モデルを始めとする様々な難治性脳疾患モデルに対して改善作用をもつ、という我々が独自に見いだした知見・特許を基にして実施する。具体的には、以下の3つの項目について、研究を実施する。(1) GIRKチャネル抑制作用をもつ薬物は、これまでの蓄積された知見から、アルツハイマー病に対する改善作用をもつ可能性が考えられるので、これらの作用をもつのか否か、動物モデルを用いて追及する。(2) 上記の多彩な薬理効果のメカニズムを調べるために、GIRKチャネルのコンディショナル(組織特異的)KOマウスの作成を試みてきたが、その作成の目途がついたので、これを進めて、そのKOマウスを完成させる。最後に、(3) このマウスを用いて、GIRKチャネル抑制作用をもつ薬物の多彩な薬理効果のメカニズムを追及する手掛かりを得ることを目的とした。これらを通して、GIRKチャネルを標的とした独創的・画期的

な難治性脳疾患治療薬の開発を目指した。

3．研究の方法

- (1) GIRK チャンネル活性化電流阻害作用をもつチペピジンのアルツハイマー病治療薬としての可能性を、A 25-35 の脳室内微量注入マウスを用いて、このマウスの新規物体認識試験において検討した。
- (2) CRISPR/Cas システムを用いて、予め作製した *Kcnj6 floxed/floxed* マウスと DAT-Cre マウスを交配させ、ドパミントランスポーターを発現しているニューロンの GIRK チャンネルの GIRK2 サブユニットをノックアウトした GIRK2 DAT KO マウス(*Kcnj6floxed/floxed ; DATcre/+*)の作成を試みた。
- (3)上記で作成した KO マウスが、ドパミントランスポーター発現している腹側被蓋野のドパミンニューロンにおいて GIRK2 サブユニットが削除され、そのニューロンの GIRK チャンネルの機能が損なわれているか、組織化学的、電気生理学的手法を用いて調べた。
- (4)上記のマウスの行動学的解析のために、強制水泳試験法などを用いた。

4．研究成果

- (1) チペピジンは、A 25-35の脳室内直接微量注入マウスの新奇物体認識試験において改善作用を示した。この作用は、ドパミンD2受容体ブロッカーにより遮断され、認知障害改善作用に脳内ドパミン系が関与していることが示唆された。
- (2)上記の CRISPR/Cas システムを用い、予め作製した *Kcnj6 floxed/floxed* マウスと DAT-Cre マウスを交配させ、ドパミントランスポーターを発現しているニューロンの GIRK チャンネルの GIRK2 サブユニットをノックアウトした GIRK2 DAT KO マウス(*Kcnj6floxed/floxed ; DATcre/+*)の作成に成功した。
- (3)このマウスの腹側被蓋野ニューロンの組織化学的解析により、ドパミンニューロンの指標であるTHおよびGIRK2サブユニットが共局在が、消失していることがわかった。また、この部位から急性に単利したドパミンニューロンの電気生理学的解析の結果、ノックアウトマウス由来のニューロンでは、ドパミンニューロンの指標であるIh電流やグルタミン酸応答電流は記録されたが、GIRKチャンネルと共役しているドパミン受容体を活性化するドパミンやGABAB受容体活性化剤のバクロフェンに対しては応答をしなかった。これらの成績から、腹側被蓋野のGIRKチャンネル発現ニューロンの機能が阻害されていることが強く示唆された。また、これらのノックアウトマウスの強制水泳試験法での行動学的解析は、無動時間の短縮を示し、GIRKチャンネル阻害作用を示すチペピジンなどの薬物を投与したときと同様の結果を示した。

これらの成績から、チペピジンのようなGIRKチャンネル阻害作用をもつ薬物の抗うつ様作用の発現には、腹側被蓋野のドパミンニューロンのGIRKチャンネルの阻害とそれに続くドパミンニューロンの活性化が少なくとも一部関与していることが示唆された。

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 1 件)

- 1) Deletion of GIRK2 subunit containing GIRK channels of neurons expressing dopamine transporter decrease immobility time on forced swimming in mice.
Honda I, Araki K, Honda S, Soeda F, Shin MC, Misumi S, Yamamura K,

Takahama K.
Neurosci Lett. (2018) 665:140-146.

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) チペピジンの新奇抗うつ様効果発現における脳内ドパミン系の関与：GIRK2 サブユニット欠損マウスでの検討
本多 幾多郎、荒木 喜美、申 敏哲、土井 篤、山村 研一、三隅 将吾、高濱 和夫
日本薬学会 第 138 年会 プログラム集 P.166 2016/3/25-28 金沢(石川)
- 2) チペピジンの抗うつ様作用は側坐核 core のドパミン神経系を介して発現する
濱口 大志、宿輪 ちあき、本多 幾多郎、三隅 将吾、高濱 和夫
第 47 回 日本神経精神薬理学会 2017/9/28-30 北海道・札幌市
- 3) ドパミントランスポーター発現ニューロンにおける GIRK2 サブユニット欠損の電気生理学的解析
本多 幾多郎、申 敏哲、土井 篤、荒木 喜美、山村 研一、三隅 将吾、高濱 和夫
第 47 回 日本神経精神薬理学会 2017/9/28-30 北海道・札幌市
- 4) GIRK チャネル抑制作用薬物の腹側被蓋野 側坐核ドパミン神経系における作用の解析：覚醒剤との差別化
濱口 大志、浜崎 亮太、宿輪 ちあき、三隅 将吾、高濱 和夫
第 28 回 霧島神経薬理フォーラム 2017/8/18-20 香川県・坂出市
- 5) チペピジンの新規抗統合失調症様作用メカニズムに関する行動薬理学的研究
本多 幾多郎、河原 遼、副田 二三夫、三隅 将吾、高濱 和夫
第 90 回 日本薬理学会年会 2017/3/15-17 長崎県・長崎市
- 6) Tipepidine および cloperastine の認知機能改善作用の発見とそのメカニズムの行動薬理学的解析
高橋 大貴、河原 遼、本多幾多郎、副田 二三夫、三隅 将吾、高濱 和夫
第 27 回霧島神経薬理フォーラム 2016/8/19-21 福岡県・福岡市
- 7) チペピジンとメタンフェタミンの側坐核亜核における TH と c-Fos 発現を指標にした作用の違い
本多 幾多郎、浜崎 亮太、副田 二三夫、三隅 将吾、高濱 和夫
第 46 回日本神経精神薬理学会 2016/7/2-3 韓国・ソウル
- 8) GIRK2 コンディショナル KO マウスの作製とそのうつ様行動の解析：うつ様行動としての無動における GIRK2 チャネルの役割
本多 幾多郎、荒木 喜美、野口 茂、笹岡 俊邦、本田 宗吉、高橋 大貴、副田 二三夫、三隅 将吾、山村 研一、高濱 和夫
第 89 回日本薬理学会年会 2016/3/9-11 神奈川
- 9) チペピジンは脳内ドパミン系の活性化を介して A 25-35 脳室内投与マウスの認知障害を改善する
河原 遼、副田 二三夫、三隅 将吾、高濱 和夫
第 89 回日本薬理学会年会 2016/3/9-11 神奈川
- 10) GIRK2 channel KO of neurons expressing dopamine transporters mimics the effect of antitussives on the forced swimming in mice
I. HONDA, K. ARAKI, S. HONDA, F. SOEDA, S. MISUMI, K. YAMAMURA, K. TAKAHAMA
2015 Annual meeting of Society for Neuroscience 2015/10/17-21 Chicago
- 11) Centrally acting non-narcotic antitussives improve A 25-35 induced cognitive deficits in mice
R. KAWAHARA, F. SOEDA, S. MISUMI, K. TAKAHAMA
2015 Annual meeting of Society for Neuroscience 2015/10/17-21 Chicago
- 12) Girk2 遺伝子コンディショナルノックアウトマウス作製と創薬への応用
本多 幾多郎、荒木 喜美、本田 宗吉、副田 二三夫、三隅 将吾、山村 研一、高濱 和夫

夫

第 26 回 霧島神経薬理フォーラム 2015/8/15-17 鹿児島

13) Tipepidine の多彩な薬理作用における中脳辺縁系ドパミンシステムの関与 - 強迫性障害
モデルでの検討 -

河原 遼、石橋 めぐみ、副田 二三夫、三隅 将吾、高濱 和夫

第 135 年会 日本薬学会 2015/3/26-28 神戸

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称： アルツハイマー治療薬
発明者： 高濱和夫(発明代表者)
権利者： 熊本大学(出願人)
種類： 特許出願
番号： 2015 - 158619
出願年月日： 2015 年 8 月 15 日
国内外の別： 日本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高濱和夫 (TAKAHAMA Kazuo)

研究者番号： 80150548

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

(2) 研究分担者

副田二三夫 (SOEDA Fumio)

研究者番号： 10336216

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

三隅将吾 (MISUMI Shogo)

研究者番号： 40264311

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

(3) 連携研究者

山村研一 (YAMAMURA Kenichi)

研究者番号： 90115197

熊本大学・発生医学研究所・教授