

博士学位論文

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン誘導体  
ロバチレリンの脊髄小脳変性症治療薬開発を  
目的とした薬効薬理作用の研究

飯代 智之

2023年3月

東京薬科大学

# 目次

緒言 .....	1
第 1 章 ロバチレリンの青斑核を介した中枢ノルアドレナリン系への作用 .....	5
1.1 序論 .....	5
1.2 実験材料と試験方法 .....	5
1.2.1 実験動物 .....	5
1.2.2 試薬 .....	6
1.2.3 ヒト甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体への受容体結合性試験 .....	6
1.2.4 青斑核ノルアドレナリン作動性神経における電気生理学的解析 .....	7
1.2.5 青斑核の c-Fos 陽性細胞の免疫染色 .....	8
1.2.6 <i>In vivo</i> マイクロダイアリシスおよびノルアドレナリン濃度測定 .....	8
1.2.7 運動量測定 .....	10
1.2.8 統計学的解析 .....	10
1.3 結果 .....	11
1.3.1 ロバチレリンのヒト甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体への結合性 .....	11
1.3.2 ロバチレリンおよびタルチレリンによる青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用 .....	11
1.3.3 ロバチレリンの経口投与によるラット青斑核における c-Fos 免疫応答 .....	15
1.3.4 ロバチレリンの経口投与によるラット前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量への作用 .....	16
1.3.5 ロバチレリンの経口投与によるラット運動量への作用 .....	18
1.4 考察 .....	20
1.5 小括 .....	22
第 2 章 ロバチレリンの遺伝性脊髄小脳変性症モデルローリングマウスナゴヤの運動失調改善作用 .....	23
2.1 序論 .....	23
2.2 実験材料と試験方法 .....	24
2.2.1 実験動物 .....	24
2.2.2 試薬 .....	25
2.2.3 ロバチレリンのマウス血中濃度測定 .....	25
2.2.4 行動観察試験 .....	25
2.2.5 オートラジオグラフィ試験（局所脳中グルコース取り込み量測定） .....	27
2.2.6 リアルタイム PCR .....	28
2.2.7 統計学的解析 .....	28

2.3 結果 .....	30
2.3.1 マウスへのロバチレリン経口投与によるロバチレリンの血中濃度推移 .....	30
2.3.2 ローリングマウスナゴヤへのロバチレリン投与による運動機能改善評価のための行動観察 .....	31
2.3.3 ローリングマウスナゴヤへのロバチレリン投与による脳中局所グルコースへの作用 .....	35
2.3.4 ローリングマウスナゴヤの小脳の脳由来栄養因子遺伝子へのロバチレリンおよびタルチレリンの作用 .....	36
2.4 考察 .....	37
2.5 小括 .....	41
第3章 ロバチレリンの孤発性脊髄小脳変性症モデル cytosine arabinoside 誘発運動失調モデルラットにおける運動失調改善作用 .....	42
3.1 序論 .....	42
3.2 実験材料と方法 .....	42
3.2.1 実験動物 .....	42
3.2.2 試薬 .....	42
3.2.3 運動失調モデルラット作製と行動観察試験 .....	43
3.2.4 <i>In vivo</i> マイクロダイアリシス, アセチルコリンおよびドパミン濃度測定 .....	44
3.2.5 統計学的解析 .....	45
3.3 結果 .....	46
3.3.1 Ara-C 誘発運動失調モデルラットへのロバチレリンの経口投与による運動機能改善評価のための行動観察 .....	46
3.3.2 ロバチレリンの経口投与によるラット前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量への作用 .....	48
3.3.3 ロバチレリンの経口投与によるラット側坐核の細胞外ドパミン量への作用 .....	52
3.4 考察 .....	53
3.5 小括 .....	56
総括 .....	57
謝辞 .....	60
主論文目録 .....	61
参考文献 .....	62

## 略号一覧

ALS	amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症
Ara-C	cytosine arabinoside シトシンアラビノシド
BA	bioavailability バイオアベイラビリティ
BDNF	brain-derived neurotrophic factor 脳由来栄養因子
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素
HPT axis	hypothalamic-pituitary-thyroid axis 視床下部-下垂体-甲状腺軸
PCR	polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応
RMN	rolling mouse Nagoya ローリングマウスナゴヤ
SCA	spinocerebellar ataxia 脊髄小脳失調症
SCD	spinocerebellar degeneration 脊髄小脳変性症
TRH	thyrotropin-releasing hormone 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン
TSH	thyroid-stimulating hormone 甲状腺刺激ホルモン



## 緒言

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone; TRH) は, L-ピログルタミン酸, L-ヒスチジンおよび L-プロリンアミドからなるトリペプチド (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) である <sup>1),2)</sup> (Fig.1).

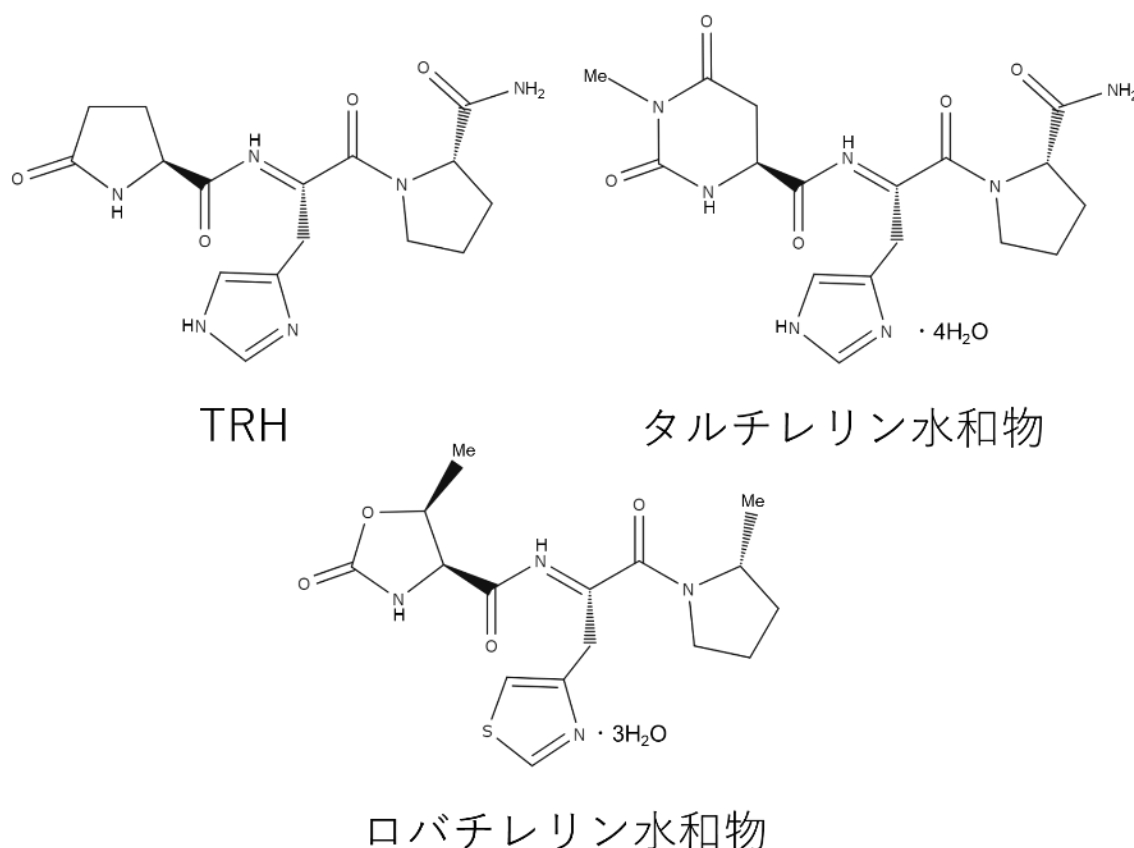


Fig.1 TRH, タルチレリンおよびロバチレリンの化学構造

TRH は L-ピログルタミン酸, L-ヒスチジンおよび L-プロリンアミドからなるトリペプチド. タルチレリンは TRH のグルタミン酸部分を修飾した TRH 誘導体. ロバチレリンは TRH のすべてのアミノ酸部分に修飾を加えた TRH 誘導体.

TRH は視床下部の室傍核で産生され, 視床下部近傍の下垂体前葉で G タンパク質共役型の TRH 受容体を介して甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone; TSH) の合成およびその放出を促進させる <sup>3),4)</sup>. TSH は, 甲状腺での甲状腺ホルモンの合成と放出を促進する. その結果, 甲状腺ホルモン分泌量の増加により, TRH および TSH の分泌が抑制される. これらの内分泌制御機構は, 視床下部-下垂体-甲状腺軸 (HPT axis) と呼ばれ, TRH はその中心的な役割を担っている <sup>3),4)</sup>. HPT axis は細胞代謝, 熱産生, 血圧, 体温, 呼吸および食物・水分摂取などの維持調節

に重要な役割を果たしている<sup>5)</sup>。一方、TRHは、視床下部、下垂体以外の海馬視床、皮質、小脳および脊髄の中樞神経系組織から、消化管、膵臓、生殖器、網膜、毛嚢や血液成分などの末梢にまで幅広く分布し、HPT axis 以外の組織でもそれらの機能の発揮に関与すると考えられている<sup>6),7),8),9)</sup>。TRHの中樞神経系での機能は、気分制御による抗うつ、抗不安作用、睡眠覚醒における覚醒促進、認知・記憶機能向上、鎮痛作用、抗痙攣作用、神経保護および運動機能制御への関与が報告されている<sup>10),11)</sup>。末梢では膵臓におけるインスリン量の調節、消化管運動の制御、胃酸分泌調節、心機能の維持および発毛制御への関与が報告されている<sup>10),11)</sup>。これら TRH の多様な生理学的機能のうち、特に、中枢作用は神経疾患の治療ターゲットとして注目を集めてきた。現在までに外傷性脳障害、脊髄傷害、てんかん、うつ病、不安障害、脊髄小脳変性症、アルツハイマー病、ナルコレプシーおよび筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における TRH を医薬品として利用するための開発が進められてきた<sup>12),13),14),15),16),17)</sup>。

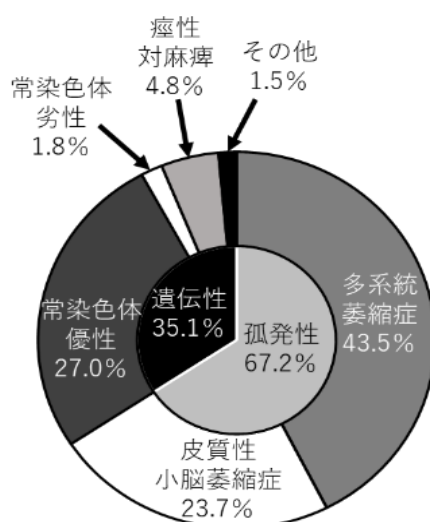


Fig.2 日本国内の脊髄小脳変性症の疫学 (文献<sup>19)</sup>改変)

日本国内の疫学調査に基づく、脊髄小脳変性症のうち孤発性は 67.2%、遺伝性は 35.1% (重複を含む)。孤発性における多系統萎縮症と皮質性小脳萎縮症の比率を示す。遺伝性における常染色体優性、常染色体劣性、痙性対麻痺及びその他の比率を示す。

脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration; SCD) は、小脳に加え、脊髄、脳幹および大脳などの広い範囲に神経変性・萎縮を生じる進行性の疾患の総称である。SCD の小脳失調症状は運動失調症状、つまり歩行異常、上肢・下肢の協調運動障害、測定障害 (運動が目的の場所で止められない障害)、構音障害、眼振および筋緊張低下を特徴とし、小脳以外での付随した障害が生じるとパーキンソン症候群、不随意運動症状、認知機能障害、錐体路障害、感覚障害が併せて観察されることがある<sup>18)</sup>。本邦における 2002 年度の厚生労働省の疫学調査では SCD の有病

率は 10 万にあたり 18.6 人と推定され、全国では約 3 万人の患者が存在するとされている。SCD は臨床学的知見および SCD 原因遺伝子のサブタイプ解析から、その分類は多岐にわたる。それらは家族歴（遺伝性）の有無から孤発性 SCD と遺伝性 SCD に分類さる。さらに孤発性 SCD は皮質性小脳萎縮症と多系統萎縮症に、遺伝性 SCD はさらに常染色体優性遺伝性 SCD、常染色体劣性遺伝性 SCD、痙性対麻痺およびその他（X 染色体連鎖性等）に分類されている<sup>18),19)</sup>。本邦では孤発性 SCD は 67.2%、常染色体優性 SCD が 27.0%、常染色体劣性 SCD が 1.8%、痙性対麻痺が 4.7%、その他 1.5% であることが報告されている<sup>19),20)</sup> (Fig.2)。

SCD の中の常染色体優性遺伝性のものは、脊髄小脳失調症（spinocerebellar ataxia; SCA）と呼ばれ、特定された原因遺伝子から 40 種類を超えるサブタイプが存在している<sup>18),21)</sup>。SCA の原因として、特定遺伝子内あるいは非翻訳領域でグルタミンをコードする CAG リピート配列の異常な伸長に由来するポリグルタミン鎖が神経毒性を発揮することで発症すると考えられている。CAG 配列以外の異常なリピート配列の伸長あるいは古典的な点変異・欠失変異および DNA 損傷修復機構の破綻も SCA の発症への関与が示唆されている<sup>21)</sup>。

現在、SCD による運動失調を治癒あるいは進行を停止させる治療法は確立されていない。SCA での運動失調症状の進行への対処療法は、理学療法および作業療法が中心で、SCD の病因の複雑さから有効な治療薬の開発は未だ進展していない。その様な中で、SCD における運動失調症状に改善効果を示す薬物として、合成 TRH であるプロチレリンが本邦で初めて医薬品販売承認の認可を得た。プロチレリンは SCD 患者の中で、小脳に起因する症状が顕著な患者（純粋小脳型）にて運動失調改善作用を示す<sup>22)</sup>。しかしながら、プロチレリンは TRH の化学的な性質から血漿中内での代謝安定性が低く、その血中半減期は約 4~5 分で急速に分解され消失する。さらに脂溶性が低いことから、中枢への移行性およびバイオアベイラビリティ（bioavailability; BA）も低い、そのため、臨床では筋肉内あるいは静脈内に投与されており、本薬の投与のため、毎日の通院あるいは入院が必要となり、患者の利便性に問題がある<sup>23),24),25)</sup>。これら TRH の薬物治療の問題点を解消するために、TRH のアミノ酸残基の一部に修飾を加えた様々な TRH 誘導体の開発が進められてきた<sup>25),26)</sup>。モンチレリン（CG-3703）、アザチレリン（YM-14678）、JTP-2942、DN-1417 およびポサチレリン（RGH-2202）などの TRH 誘導体は、SCD だけでなく、ALS、遷延性意識障害、うつ、認知機能障害およびてんかんなどの治療適用を目指して開発が進められてきた<sup>26)</sup>。しかしながら、それらの TRH 誘導体も、十分な代謝安定性、脂溶性および経口吸収性を確保できず、未だ医薬品の承認には至っていない。一方、タルチレリンはそれらの問題点を改善して、経口摂取可能な SCD の治療薬として、本邦で医薬品承認された唯一の TRH 誘導体となっている<sup>27)</sup>。

ロバチレリン（1-{N-[(4S,5S)-(5-メチル-2-オキソオキサリジン-4-イル)-カルボ

ニル]-3-(チアゾール-4-イル)-L-アラニル}-(2R)-2-メチルピロリジン三水和物) は、構造活性相関解析技術を用い、経口摂取可能かつ中枢移行性の高い TRH 誘導体として創製された<sup>25)</sup>。ロバチレリンは、TRH の中枢作用に由来する TRH 受容体へのアゴニスト活性をマウスのレセルピン誘発低体温症の改善作用で評価された。その結果、TRH よりも低体温症の回復を促進させ、かつ作用時間の長いことが示された<sup>25)</sup>。経口投与による薬物動態試験において、ラット、イヌおよびヒトでの TRH の BA がそれぞれ 1.5、6.0 および 2.0% であった。ラットおよびイヌでのタルチレリンの BA はそれぞれ 3.9 および 18.5% であった。一方、ロバチレリンの BA は、ラットおよびイヌで、それぞれ 7.3 および 41.3% であった<sup>28),29)</sup>。ロバチレリンのラット脳各所の組織への移行性は、タルチレリンのそれよりも 3.5~9.0 倍高いことが示されている (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料)。加えて、ロバチレリンは、ラットの血漿中および脳組織ホモジネート中での安定性が高く、特に、脳組織ホモジネート中ではタルチレリンが約 0.5 時間で代謝されるのに対し、ロバチレリンは 3 時間後でもほとんど代謝されなかった<sup>29)</sup>。ロバチレリンは、現在、SCD の治療薬として開発が進められており、健常人での臨床第 I 相試験では経口投与による良好な薬物動態と安全性が担保された。SCD 患者における臨床第 II 相および第 III 相試験で、SCD 治療におけるロバチレリンの有効性と安全性が確認されている<sup>30)</sup>。そこで、本研究は、ロバチレリンの SCD 治療薬としての薬理作用を解明するために企画された。

# 第1章 ロバチレリンの青斑核を介した中枢ノルアドレナリン系への作用

## 1.1 序論

ロバチレリンは、TRH よりも高い脂溶性を示す。TRH の中枢性の作用である体温調節機能を指標に、ラットを用いた実験から TRH のそれよりも優れた活性を示すことが見出された<sup>25)</sup>。同時にラット TRH 受容体への受容体結合試験でロバチレリンの本受容体への結合性が確認されている<sup>25)</sup>。げっ歯類において、TRH 受容体は2つのサブタイプが存在し、TRH 受容体タイプ1 (TRH<sub>1</sub> receptor) は内分泌作用を、TRH 受容体タイプ2 (TRH<sub>2</sub> receptor) は中枢作用を制御していると考えられている<sup>31),32),33),34)</sup>。なお、ロバチレリンのラット TRH 受容体結合性試験では、TRH<sub>1</sub> receptor と TRH<sub>2</sub> receptor 両方を含むラット脳組織ホモジネートを試料として用いたので、これら受容体の選択性は確かめられていない<sup>25)</sup>。一方、ヒト TRH 受容体は、げっ歯類の TRH<sub>1</sub> receptor に相同性を示すサブタイプのみとされている<sup>34),35)</sup>。

TRH の中枢作用は、中枢ノルアドレナリン神経系によって、その一部が制御されている。青斑核はノルアドレナリン作動性神経の起始核とされ、ノルアドレナリン産生に関与し、大脳、小脳、視床、海馬、および脊髄など中枢の広範囲に神経投射する<sup>36)</sup>。TRH はその青斑核でノルアドレナリン作動性神経を直接的に賦活化する<sup>37)</sup>。加えて、TRH は中枢での細胞外ノルアドレナリン濃度を上昇させ、ノルアドレナリンの代謝回転を促進させることが報告されている<sup>38),39),40)</sup>。さらに、TRH は中枢作用としてマウスにおける自発運動量を増加させ、その作用はアドレナリン  $\alpha_1$  受容体アンタゴニストによって阻害されたことから、TRH の自発運動亢進作用は中枢ノルアドレナリン神経系に関連することが示唆されている<sup>41)</sup>。

本章では、新規の TRH 誘導体ロバチレリンのヒト TRH 受容体を介した直接的な中枢作用の有無を明らかにするため、中枢ノルアドレナリン神経系へのロバチレリンの効果について検討した。加えて、SCD への経口投与可能な治療薬タルチレリンとの中枢作用を比較することで、ロバチレリンの SCD 治療の可能性について検討した。

## 1.2 実験材料と試験方法

### 1.2.1 実験動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (7~9 週齢、体重 200~300g) を日本 SLC (静岡、日本) から購入し、マイクロダイアリシスによる細胞外ノルアドレナリン測定、免疫染色による c-Fos 陽性細胞の観察およびラットの自発運動量測定に用いた。Ishibashi らの文献を参考に<sup>37)</sup>、雌性妊娠 Wistar ラットを日本 SLC から購入し、生

後 10 日から 17 日の新生仔を電気生理学的評価に用いた。

ラットは温度（20～26°C）および相対湿度（45～65%）で保たれた飼育室内で、12 時間の明暗サイクル（8 時点灯，20 時消灯）にて飼養された。試験操作に使用するまで，市販の固形飼料 CE-2（日本クレア，東京，日本）および滅菌処理された水道水を与え，自由摂食と自由飲水とした。マイクロダイアリシス，免疫染色および自発運動量測定試験では，媒体および薬物投与の約 12 時間前から試験操作終了まで，絶食下で試験実施された。

本章の全ての動物実験は，キッセイ薬品工業および自然科学研究機構の実験動物委員会の審査・承認を経て，我が国の動物実験のガイドライン動物の愛護及び管理に関する法律に従って実施された。

### 1.2.2 試薬

ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は塩野義製薬（大阪，日本）から提供された。ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は蒸留水に溶解して，5 mL/kg の容量で，それぞれ 10～30 mg/kg および 30～100 mg/kg の投与用量を動物に経口投与した。アンホテリシン B，ノルアドレナリン酒石酸水素塩および TRH は Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）から， $[^3\text{H}]\text{-}[3\text{-methyl-His}^2]\text{TRH}$  は PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA)から，抗 c-Fos 抗体 anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) Rabbit pAb (Cat No. PC38) は EMD Millipore (Billerica, MA, USA) から，クロルジアゼポキシドは和光純薬工業（東京，日本）から購入した。その他の化学物質は原則 GR（特級）グレードの市販試薬を使用し，一部 EP（一級）グレードのものも使用した。

### 1.2.3 ヒト甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体への受容体結合性試験

ヒト甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）受容体結合性試験には，ヒト TRH 受容体過剰発現 CHO-K1 細胞からの抽出膜画分（PerkinElmer）を用いた。ロバチレリン水和物，タルチレリン水和物および TRH を DMSO に溶解し，それぞれ  $1 \times 10^{-4}$  mol/L， $3 \times 10^{-4}$  mol/L および  $1 \times 10^{-5}$  mol/L に調製し，さらに 11 段階の濃度に公比 3 で段階希釈し，被験物質溶液を調製した。被験物質溶液に  $[^3\text{H}]\text{-}[3\text{-methyl-His}^2]\text{TRH}$  および抽出膜画分を混合し，25°C，60 分間インキュベートした。混合液を GF/C ガラスマイクロフィルターに濾過し，洗浄および乾燥後に，液体シンチレーションカクテルに浸して Tri-Carb 1500 液体シンチレーションカウンター（PerkinElmer）にて被験物質存在下での結合放射エネルギー（B）を測定した。同様の操作で， $1 \times 10^{-5}$  mol/L の TRH 溶液および DMSO 溶液を用い，それぞれ非特異的結合放射エネルギー（N）および被験物質非存在下での総結合放射エネルギー（B<sub>0</sub>）の測定を行った。最終的に被験物質溶液の各濃度における受容体結合阻害率を次式にて算出した。

$$\text{受容体結合阻害率 (\%)} = 100 - [(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$$

さらに、用量反応曲線を(B-N)/(B<sub>0</sub>-N)比を logit-log モデルに当てはめて作成し、用量反応曲線から阻害率が 50% となる値：IC<sub>50</sub> 値を求めた。各被験物質の阻害定数 (K<sub>i</sub> 値) を次式にて算出した。

$$\text{阻害定数 (K}_i \text{ 値)} = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{L}] / \text{K}_d)$$

[L] : [<sup>3</sup>H]-[3-methyl-His<sup>2</sup>]TRH の濃度, K<sub>d</sub> : [<sup>3</sup>H]-[3-methyl-His<sup>2</sup>]TRH の解離定数 K<sub>d</sub> 値は [<sup>3</sup>H]-[3-methyl-His<sup>2</sup>]TRH とヒト TRH 受容体の Scatchard 解析から求められた。その結果, K<sub>d</sub> 値は, 17.71±0.50 nmol/L であった。

なお、被験物質溶液の各濃度における受容体結合阻害率は 1 回の試験で取得された 2 例の測定値を平均し、さらに独立した 3 回の試験を繰り返して、3 回の試験の平均値および標準誤差が採用された。

#### 1.2.4 青斑核ノルアドレナリン作動性神経における電気生理学的解析

ラット新生仔から、青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞を機械的振動単離方法で調製した<sup>37)</sup>。ラット新生仔の脳をペントバルビタール導入麻酔下 (100 mg/kg, 腹腔内投与) で断頭により、素早く混合ガス (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) でバブリングした氷冷下のインキュベーション液 (124 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L glucose) に移行させ、振動刃ミクロトーム (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 380μm の脳スライスを作製した。この脳スライスを細胞単離前の 1 時間、室温 (21-24°C) にてインキュベーション液内でインキュベートした。その後、脳スライスを培養皿中の標準細胞外液 (150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 10 mmol/L glucose, pH7.4) に移行した。実体顕微鏡下で、青斑核を形態学的に同定し、ファイヤーガラスポリッシュで先端を尖らせたガラスピペットを装着した振動デバイスを用い、機械的に細胞剥離を行った。脳スライスを取り除き、剥離した神経細胞を少なくとも 15 分静置した後に、形態学的にノルアドレナリン作動性神経細胞を判別し、電気生理学的測定に用いた。なお、ノルアドレナリン作動性神経細胞は 25μm 以上の大きさで樹状突起を兼ね備えた卵型の細胞体の形態を有することを基準として判定した。

電気生理学測定では cell-attached パッチクランプ法またはアンホテリシン B を用いた穿孔パッチクランプ法で測定を行った。細胞膜電位の制御および電流記録には、パッチクランプ増幅器 EPC-7plus (List Medical, Darmstadt-Eberstadt, Germany) を用いた。電極内液 (140 mmol/L potassium methanesulfonate, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L HEPES, pH7.3) で満たしパッチピペットと、細胞外液に

設置した参照電極との抵抗値 4~6 M $\Omega$  でパッチクランプを実施した。穿孔パッチクランプ法で記録を行う場合、電極内液に 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンホテリシン B を加えた。電流および電圧はオシロスコープとペンレコーダーで継続的にモニターした。膜電流には 3kHz でフィルターをかけ、10kHz でデジタルサンプリングした。pCLAMP8.2 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)を用い、これらデータ記録および保存を行った。なお、薬物は Y-tube を用い、細胞外液の灌流を行うことで作用させた。電流波形データ解析にも pCLAMP8.2 software が用いられた。

### 1.2.5 青斑核の c-Fos 陽性細胞の免疫染色

ラットに媒体（蒸留水）または 30 mg/kg ロバチレリンを投与後の 2 時間目に、イソフルラン麻酔下（3%）で、脱血による安楽死を行った。生理食塩水に続いて、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液を心臓から全身灌流することで組織固定し、脳を摘出した。この摘出された脳をさらに 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液に一晩浸漬した後、30% スクロース溶液に 4°C、24 時間浸漬した。全脳から青斑核を含む部位を冠状面で切り出し、凍結組織切片作製用包埋剤 O.C.T. Compound（サクラファインテックジャパン、東京、日本）に包埋し、凍結させた。凍結ブロックをクライオスタットクライオ 3D（サクラファインテックジャパン）にて厚さ 40 $\mu\text{m}$  ずつで薄切し、標本切片を作製した。青斑核を含む脳切片は、組織染色後、日本毒性病理学会認定毒性病理学専門家の助言の下、Paxinos & Watson の脳図譜に従って選択した<sup>42)</sup>。青斑核の c-Fos 陽性細胞の免疫染色は、過去の文献報告<sup>43),44)</sup>を参考に実施した。一次抗体には抗 c-Fos 抗体 anti-c-Fos (Ab-5) (4-17) Rabbit pAb（希釈倍率 1:6000; EMD Millipore, MA, USA）を、二次抗体には biotinylated-secondary goat anti-rabbit IgG（希釈倍率 1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いて、染色試薬には VECTASTAIN Elite ABC Kit（Vector Laboratories）を使用し、ニッケル DAB で染色した。c-Fos 陽性細胞は、濃い紫青色の円形または楕円形の核を有する細胞として判別した。脳図譜<sup>42)</sup>をもとに、青斑核の領域を光学顕微鏡（BX50WI; オリンパス、東京、日本）で特定し、CCD カメラ（DP72; オリンパス）で画像撮影をした。撮影された画像から画像解析ソフト WinRoof version 5.7.1（三谷商事、福井、日本）を用い、青斑核の関心領域 ROI の面積を統一して、c-Fos 陽性細胞数を計測した。動物 1 個体から、2 枚の切片で左右 2 箇所（合計 4 か所）の青斑核の c-Fos 陽性細胞を計数後、平均値し、さらに各群 7 例からの平均値および標準誤差が採用された。

### 1.2.6 *In vivo* マイクロダイアリシスおよびノルアドレナリン濃度測定

覚醒下、無拘束でのラット前頭前皮質からの脳透析サンプル回収にはマイクロダイアリシス法を用いた<sup>45)</sup>。ラットに 7 週齢で外科処置手術を行って、8 週齢で *in vivo* マイクロダイアリシス試験に用いた。マイクロダイアリシスの事前操作として、脳固定装置による透析プローブを固定するガイドカニューレ（AG-8; エイコム、



京都，日本）の埋め込み手術を行った．ラットへペントバルビタール導入麻酔（100 mg/kg），イソフルラン麻酔（3%）を行い，Paxinos & Watson の脳図譜<sup>42)</sup>に基づき，bregma（冠状縫合とや矢状縫合の交点）から前方 3.0 mm，側方 0.6 mm の頭蓋骨の位置に小孔を作製し，硬膜から 2.0 mm の位置にガイドカニューレを留置した．このガイドカニューレはビスと重合レジンで固定された．カニューレの設置術後，1 週間程度（5～9 日間）の回復期間を設けた．マイクロダイアリシス試験の日に，ガイドカニューレにマイクロダイアリシス透析プローブ（A-I-08-2; エイコム）を挿入した．プローブにはリンガー液（147 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 2.3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>）を 1  $\mu$ L/min の流速で灌流した．送液された脳透析サンプルはオートインジェクターのサンプルループへ一時貯留され，20 分毎に高速クロマトグラフ（HPLC, 700 シリーズあるいは 500 シリーズ; エイコム）へ自動的に注入された．HPLC のノルアドレナリン分析条件を Table 1 示す．

Table 1 ノルアドレナリン分析条件

分離カラム	EICOMPAK CAX (2.0 mm, I.D.×200 mm)
プレカラム	PREPAKSET-CA (3.0 mm, I.D.×4 mm)
カラム温度	35°C
移動相	50 mg/L EDTA·2Naおよび0.05 mol/L硫酸ナトリウムを含む0.1 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液（pH 6.0）とメタノール混合液（7:3, v/v）
流速	250 $\mu$ L/min
検出条件	+450 mV vs Ag/AgCl, 作用電極 WE-3G（グラファイト），ガスケット GS-25, 検出器 Time Constant 3.0 sec
データ処理装置	EPC-500（サンプリングレート4 points/sec）
サンプル注入量	19.5 $\mu$ L
分析時間	18 min
データ解析ソフト	PowerChrom (ADInstruments, New South Wales, Australia)

ノルアドレナリンのピークの同定および定量は，ノルアドレナリン標準試料で検量線を作成し，外部標準法で行った．薬物投与前の脳透析サンプル中のノルアドレナリン濃度が安定したことを確認し，ラットへ薬物を経口投与した．データ分析は薬物投与 1 時間前（投与前 3 時点）から投与後 12 時間目（投与後 36 時点）まで実施された．薬物投与前の 3 時点のノルアドレナリン濃度の平均値をベースライン値として算出し，その値を 100% とすることで，各時点のノルアドレナリン濃度を変化率として示した．投与後 0 時間目から 6 時間目までおよび投与後 6 時間目から 12 時間目までのノルアドレナリン濃度の変化量を積算して，AUC（area under the curve）値として示した．実験操作終了後，ラットをイソフルラン麻酔下（3%）

で放血による安楽死させ、脳を摘出した。プローブ挿入位置を確認し、挿入位置が Paxinos & Watson の脳図譜<sup>42)</sup>に従って正しいことを確認した。

### 1.2.7 運動量測定

ラットの運動量は、飼育ケージ（奥行 35cm×幅 40cm×高さ 18cm）の上部に熱放射感知式センサー（NS-AS01；ニューロサイエンス，東京，日本）を設置して測定した。熱放射感知式センサーからのデータは、短期データ集録解析システム（NS-DAS-8；ニューロサイエンス）を介してカウント数へ変換され、解析ソフト（マルチデジタル 32 ポートカウントシステム；ニューロサイエンス）で 20 分間毎の運動量の集積値が自動で記録された。運動量の測定は、薬物投与後 12 時間目まで行った。

### 1.2.8 統計学的解析

統計解析には、SAS System Version 8.2（SAS Institute, NC, USA）およびその連動プログラムの前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan, 東京，日本）を使用した。2 群間の比較検定では、F 検定の結果から群間の等分散性が確認し、等分散であったため Student の  $t$  検定を用いた。3 群以上の群間で多重比較検定を行う際には、Bartlett 検定を用いて群間の等分散性を確認した。等分散が確認され、全ての 2 群間で多重比較検定を行う場合には、Tukey 検定が用いられ、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Dunnett 検定が用いられた。不等分散が確認され、全ての 2 群間で多重比較検定を行う場合には、Kruskal-Wallis 検定が用いられ、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Steel 検定が用いられた。危険率は 5% 未満で統計学的に有意差ありとした。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 ロバチレリンのヒト甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体への結合性

ヒトの TRH 受容体は、げっ歯類の TRH 受容体タイプ 1 に相同性を示すサブタイプのみ報告され、ヒト TRH 受容体は 1 種類のみとされる<sup>34)</sup>。ロバチレリン、タルチレリンおよび TRH のヒト TRH 受容体への結合性を、ヒト TRH 受容体の放射標識リガンド $[^3\text{H}][3\text{-Me-His}^2]\text{TRH}$  の競合阻害率として示す (Fig.3)。ロバチレリン、タルチレリンおよび TRH は、いずれも用量に相関したヒト TRH 受容体への結合性を示した。用量反応曲線から算出されたロバチレリン、タルチレリンおよび TRH のヒト TRH 受容体への放射性リガンドの結合阻害定数  $K_i$  値は、それぞれ  $702\pm 24$ ,  $3880\pm 523$  および  $128\pm 11$  nmol/L であった。したがって、ロバチレリンはタルチレリンよりも高いヒト TRH 受容体への結合親和性を有することが認められた。

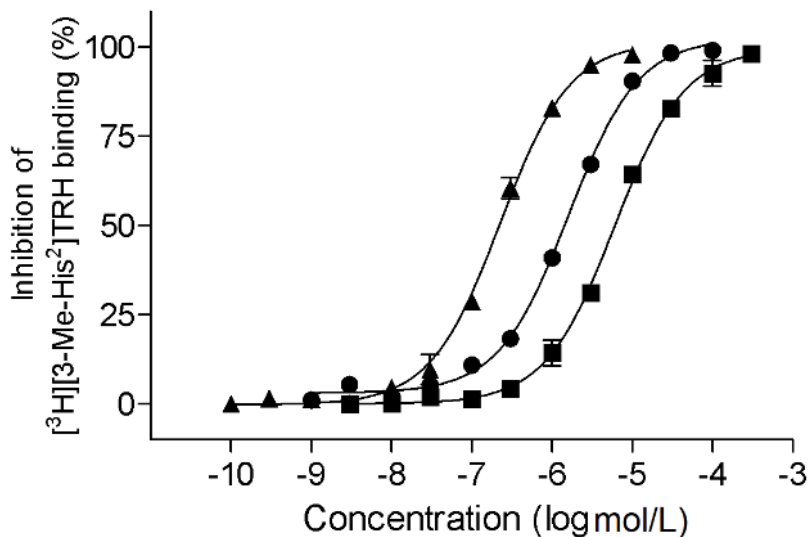


Fig.3 ロバチレリン、タルチレリンおよび TRH のヒト TRH 受容体への結合性の用量反応曲線

各群のデータは独立した 3 回の試験からの mean±S.E.M として示す。

▲ : TRH, ● : ロバチレリン, ■ : タルチレリン。

#### 1.3.2 ロバチレリンおよびタルチレリンによる青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用

ラットの青斑核から単離されたノルアドレナリン作動性神経へのロバチレリンおよびタルチレリンの活性化作用を確かめるため、神経の自発発火への作用を Cell-attached パッチクランプ法で検証した (Fig.4A-C)。10 nmol/L のタルチレリンおよび 10 nmol/L のロバチレリンは青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火を薬物処置前のそれらよりもそれぞれ 1.32 倍および 1.92 倍に亢進させた。ロバチレリンの青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火亢進作用は、等用量での

タルチレリンよりも強力であることが示された (Fig.4C).

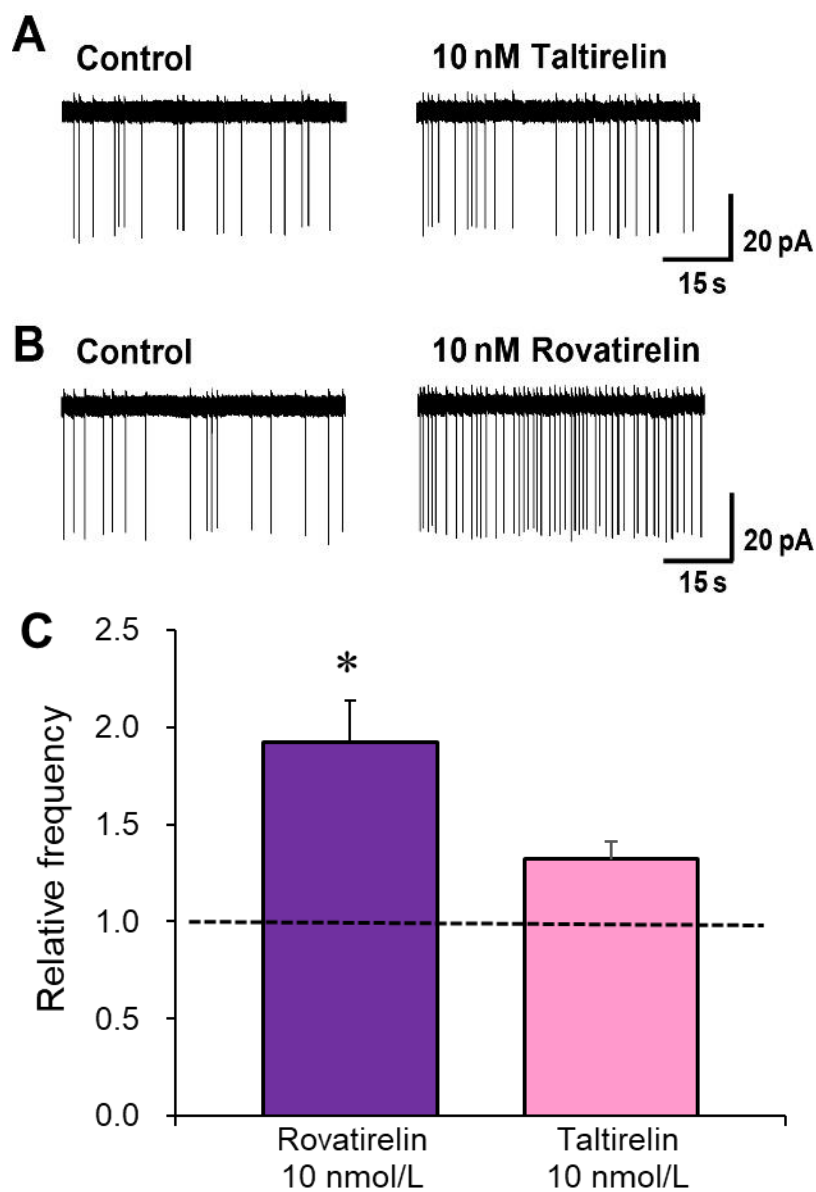


Fig.4 ロバチレリンおよびタルチレリン添加による青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用 (Cell-attached patch 記録法)

A: 左側; 薬物処置前 (control) の神経自発発火, 右側; 10 nmol/L タルチレリン処置後の神経自発発火, B: 左側; 薬物処置前 (control) の神経自発発火, 右側; 10 nmol/L ロバチレリン処置後の神経自発発火, C: 薬物処置前 (control) からの変化を表す相対的な自発発火頻度を 10 nmol/L ロバチレリン添加群と 10 nmol/L タルチレリン添加群の間で比較. 点線は薬物処置前 (Control) のレベル. データは 5 例の mean±S.E.M として示す. \* $p < 0.05$ , タルチレリン添加群との間での Student の  $t$  検定.

穿孔パッチクランプ法を用いて **current clamp** (電流固定) 下で, ロバチレリンおよびタルチレリンの青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への用量反応性を評価した (Fig.5A,B). ロバチレリンおよびタルチレリンにて, 用量に相関した青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火亢進作用が観察された. 用量反応曲線から得られたロバチレリンおよびタルチレリンの 50% 効果濃度  $EC_{50}$  は, それぞれ 30.3 および 92.9 nmol/L となった.

現在まで TRH 受容体特異的なアンタゴニストは見つけられていない. クロルジアゼポキシドは,  $\gamma$ -アミノ酪酸 A ( $GABA_A$ )受容体のモジュレーターであるベンゾジアゼピン系の薬物であると同時に, TRH 受容体への直接的なアンタゴニスト作用を有することも知られている<sup>46),47)</sup>. 50  $\mu$ mol/L クロルジアゼポキシドは単独では青斑核ノルアドレナリン作動性神経の静止膜電位や自発発火頻度へ影響を与えなかった. その一方で, 30 nmol/L ロバチレリンによる自発発火亢進作用を抑制した (Fig.5C,D). 青斑核ノルアドレナリン作動性神経は pH7.2 から pH6.5 への酸性化で自発発火頻度増加を示した. 2 ポアドメイン酸感受性  $K^+$ チャネルの tandem pore domain weak inward rectifier  $K^+$  channel-related  $K^+$  チャネル (TASK チャネル) は青斑核ノルアドレナリン作動性神経をはじめ様々な神経細胞の静止コンダクタンスを制御する<sup>37)</sup>. TASK チャネルは細胞外の塩基性条件下で活性化され, 酸性化で抑制される<sup>37)</sup>. TRH は pH7.2 の中性化では自発発火頻度を増加させるものの, pH6.5 の酸性化では TRH による自発発火頻度の増加作用は認められなかったことなどが示されている<sup>37)</sup>. これらのことから, TASK チャネルを TRH が抑制することで, 自発発火をもたらすと考えられている<sup>37)</sup>. そこで, 同様にロバチレリンの酸性条件 (pH6.5) 下における青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用を検討した. pH7.2 から pH6.5 への酸性化は青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火を亢進したが, さらに 1  $\mu$ mol/L のロバチレリンを添加しても自発発火頻度を亢進させることはなかった. これらの結果から, ロバチレリンは TRH 受容体を介して, 青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火を亢進することが示された. その作用の制御には, TASK チャネルの関与が示唆された.

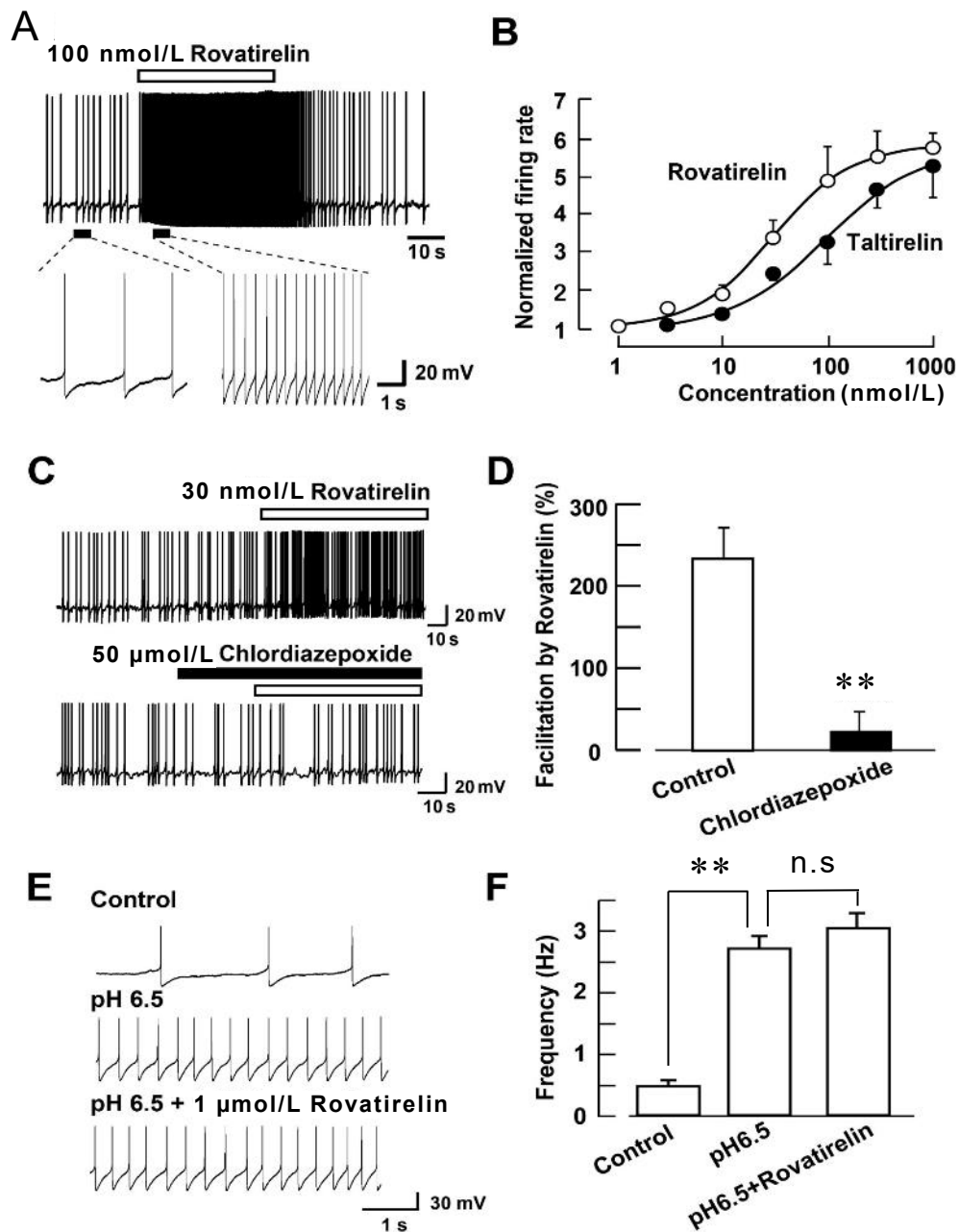


Fig.5 ロバチレリンおよびタルチレリン添加による青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用（穿孔 whole cell patch 記録法）

A : 100 nmol/L ロバチレリンによる青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用. B : ロバチレリンおよびタルチレリンの青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火への作用における用量反応曲線. データは各ポイント 5-10 例の mean±S.E.M. として示す. C および D : TRH 受容体アンタゴニストクロルジアゼポキシドによるロバチレリンの自発発火亢進作用への影響. 値は薬物処置前からの変化量. Control 群 (30 nmol/L ロバチレリン) は 8 例, クロルジアゼポキシド群 (50 μmol/L クロルジアゼポキシド+30 nmol/L ロバチレリン) は 6 例の mean±S.E.M. として示す. \*\*p<0.01, 対照群との間の Student の *t* 検定. E および F : 酸性条件 (pH6.5) 下におけるロバチレリンの自発発火への応答性. Control 群は pH7.2. データは各群 5 例の mean±S.E.M. として示す. \*\*p<0.01, 群間の Tukey 検定. n.s は統計学的有意差なしを示す.

### 1.3.3 ロバチレリンの経口投与によるラット青斑核における c-Fos 免疫応答

神経組織における c-Fos タンパク発現は、薬物投与などを含む様々な刺激で、急速かつ一過性に観察され、神経の活性化の指標とされる<sup>48),49)</sup>。ロバチレリンのラットへの経口投与による青斑核神経の活性化を評価するため、青斑核における c-Fos 発現陽性細胞を免疫組織化学染色によって検出した (Fig.6)。

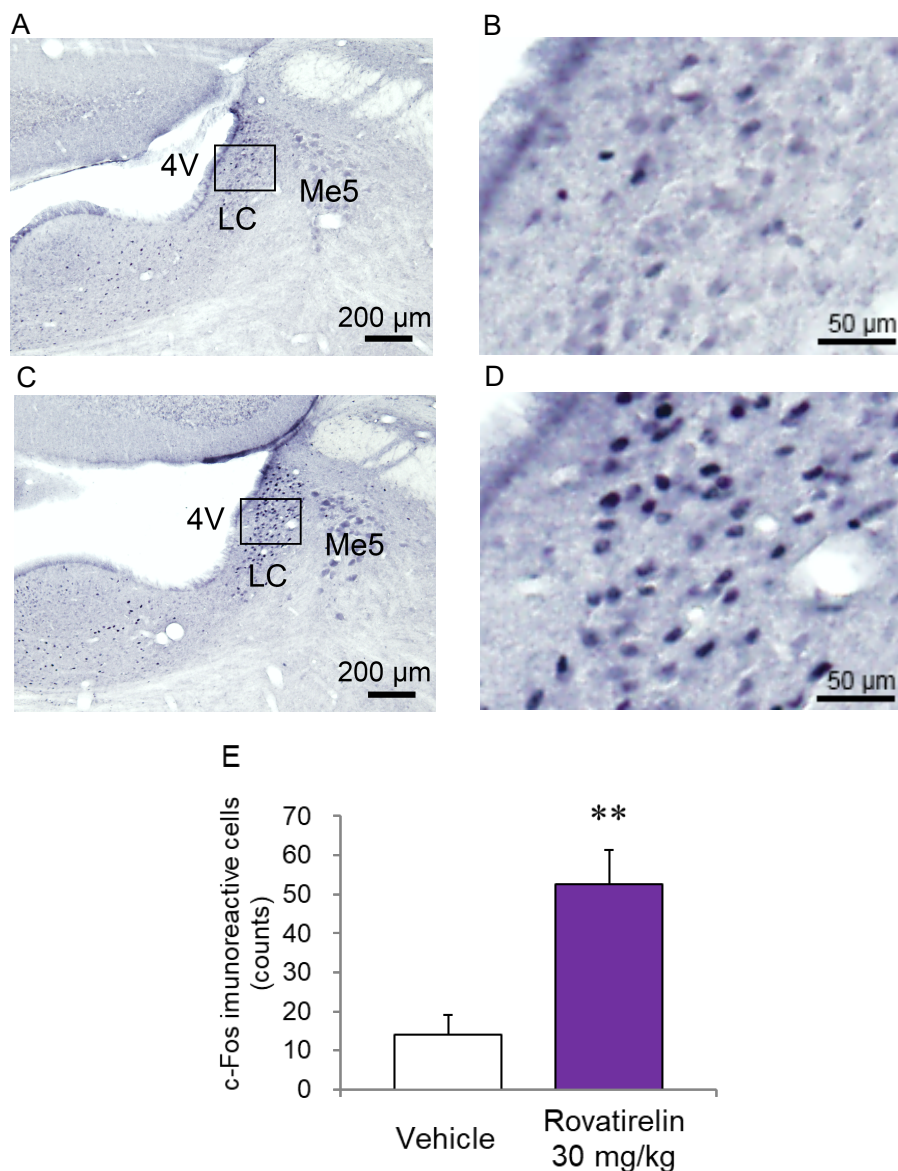


Fig.6 ロバチレリンの単回経口投与によるラット青斑核における c-Fos 発現への作用

A: 媒体 (蒸留水) 投与における青斑核領域周辺の c-Fos 陽性細胞免疫染色像の代表例, B: A の四角で囲まれた領域の拡大図, C: 30 mg/kg ロバチレリン投与における青斑核領域周辺の c-Fos 陽性細胞免疫染色像の代表例, D: C の四角で囲まれた領域の拡大図. 濃紫色のドットが c-Fos 陽性細胞を示している. LC は青斑核, 4V は第 4 脳室, Me5 は三叉神経中脳路核を表す. E: 媒体および 30 mg/kg ロバチレリン投与 2 時間後における青斑核の c-Fos 陽性細胞数. データは 7 例の mean  $\pm$  S.E.M.として示す. \*\*p<0.01, 媒体群との間の Student の *t* 検定.

ラットへ媒体およびロバチレリンを単回経口投与後 2 時間目の c-Fos 発現細胞数を計測した結果、媒体投与では青斑核での c-Fos 陽性細胞は  $16.0 \pm 3.1$  counts であり、30 mg/kg ロバチレリン投与では  $56.8 \pm 6.3$  counts に増加した。

#### 1.3.4 ロバチレリンの経口投与によるラット前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量への作用

ロバチレリンおよびタルチレリンの覚醒下無拘束ラットへの単回経口投与による細胞外ノルアドレナリン量に及ぼす効果について評価した。媒体、ロバチレリン (10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (30 および 100 mg/kg) の投与前に細胞外ノルアドレナリン濃度のベースライン値を測定した。各投与群のベースライン値は  $1.02 \pm 0.05$  から  $1.32 \pm 0.10$  nmol/L の範囲にあった。これらの値に差異はなかった。

ロバチレリンおよびタルチレリン投与後の前頭前皮質での細胞外ノルアドレナリン量への経時的な作用を Fig.7A に示す。10 および 30 mg/kg のロバチレリン投与群では用量依存的に細胞外ノルアドレナリン量を増加させ、10 および 30 mg/kg 群の最大反応はそれぞれ  $160.0 \pm 5.2\%$  および  $193.0 \pm 8.9\%$  であった。30 および 100 mg/kg のタルチレリン投与群も用量依存的に細胞外ノルアドレナリン量を増加させ、それぞれの最大反応は  $167.1 \pm 4.1\%$  および  $186.0 \pm 14.4\%$  であった。10 mg/kg のロバチレリン投与群と 30 mg/kg のタルチレリン投与群のノルアドレナリン上昇の度合いが同程度であり、30 mg/kg のロバチレリン投与群と 100 mg/kg のタルチレリン投与群でのノルアドレナリン上昇の度合いも同程度となった。

一方、ロバチレリン投与群のノルアドレナリン量増加作用は、タルチレリン投与群のそれよりも持続的であった。100 mg/kg のタルチレリン投与によるノルアドレナリン量の増加作用は投与後 6 時間目には媒体投与と同様のレベルに戻ったのに対し、30 mg/kg のロバチレリン投与によるノルアドレナリン増加の作用は投与後 12 時間目でも高いレベル ( $175.6 \pm 21.9\%$ ) で維持されていた。投与後 6 時間目および投与後 6 時間目から 12 時間目までのノルアドレナリン量増加作用の総変化量を示した  $AUC_{0-6hr}$  および  $AUC_{6-12hr}$  をそれぞれ Fig.7B および C に示す。10 および 30 mg/kg ロバチレリン投与群ならびに 30 および 100 mg/kg タルチレリン投与群のそれぞれの  $AUC_{0-6hr}$  は、媒体投与群のそれよりも増大した。30 mg/kg ロバチレリン投与群および 100 mg/kg タルチレリン投与群における  $AUC_{0-6hr}$  値はほぼ同等であった。一方、30 mg/kg ロバチレリン投与群での  $AUC_{6-12hr}$  のみが、媒体投与群のそれよりも増大した。ロバチレリンはタルチレリンよりも強力かつ持続的な前頭前皮質のノルアドレナリン量増加作用を発揮することが示された。



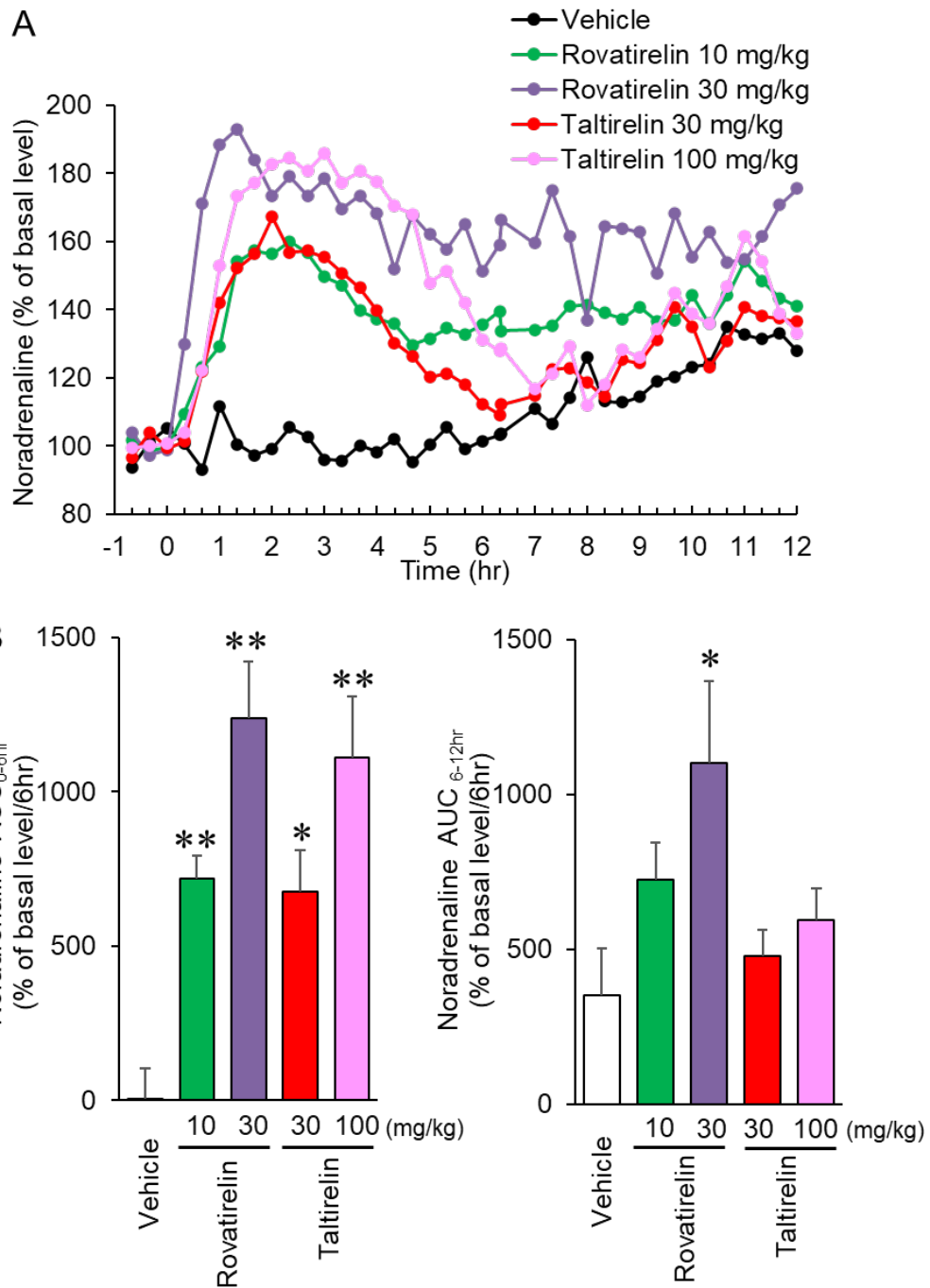


Fig.7 ロバチレリンおよびタルチレリンの覚醒下無拘束のラットへの単回経口投与による前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量への作用

A: ロバチレリン (10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (30 および 100 mg/kg) の前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量への経時的作用. 投与前の3時点 (-40, -20 および 0 分) の平均値を 100% として, 各時点の変化率を示した. 矢印で示した時点で投与を行った. データは各ポイント 5 例の mean で示す. B: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目までノルアドレナリン量増加作用の総変化量 (AUC<sub>0-6hr</sub>). C: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目から投与後 12 時間目までノルアドレナリン量増加作用の総変化量 (AUC<sub>6-12hr</sub>). データは各群 5 例の mean ± S.E.M として示す. \*p<0.05, \*\*p<0.01, 媒体群との間の Dunnett 検定.

### 1.3.5 ロバチレリンの経口投与によるラット運動量への作用

ロバチレリン (10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (30 mg/kg および 100 mg/kg) のラットへの単回経口投与による運動量に及ぼす効果について評価した。ロバチレリンおよびタルチレリン投与後の運動量の経時的な作用を Fig.8A に示す。媒体投与は投与直後に一過性の運動量増大が確認された。これは経口投与自体の刺激によるものと考えられた。この一過性の運動量増大は過去に報告されている知見<sup>50)</sup>と一致した。対照的に、10 および 30 mg/kg のロバチレリン投与群では、投与後 3 時間目まで高いレベルの運動量が持続した。10 および 30 mg/kg のロバチレリン投与群の運動量増加作用は、それぞれ投与後 120 分および 60 分でピーク値  $401.3 \pm 43.7$  および  $536.4 \pm 25.4$  counts/20min を示した。10 mg/kg のロバチレリン投与群の運動量は、投与後 6 時間目には媒体投与群のそれと同様のレベルに戻った。その一方で、30 mg/kg のロバチレリン投与群の運動量は、投与後 12 時間目においても媒体投与群のそれよりも高値を示した (30 mg/kg ロバチレリン投与群 vs 媒体投与群;  $199.9 \pm 30.4$  vs  $126.3 \pm 20.2$  counts/20 min)。30 および 100 mg/kg のタルチレリン投与群でも、運動量の増加が観察された。100 mg/kg タルチレリン投与群での運動量増加作用は投与後 100 分目で  $429.4 \pm 28.3$  counts/20 min のピーク値を示した。その一方、30 mg/kg タルチレリン投与群では投与直後に  $391.0 \pm 42.3$  counts/20 min の最大値となった。30 および 100 mg/kg タルチレリン投与群での運動量増加作用は、それぞれ投与後 4 時間目および 8 時間目に媒体投与群のそれと同レベルに戻った。

ロバチレリン、タルチレリンおよび媒体投与後 6 時間目までの運動量の積算値 (総運動量) と、投与後 6 時間目から 12 時間目までの運動量の積算値 (総運動量) を Fig.8B および C に示す。ロバチレリンおよびタルチレリン投与群とも、薬物投与後 6 時間目までの総運動量に用量依存的な増加作用が観察された。一方、投与後 6 時間目から 12 時間目までの総運動量では、10 および 30 mg/kg のロバチレリン投与群で増加作用が認められたのに対して、タルチレリン投与群では 100 mg/kg でのみ増加作用が観察された。10 mg/kg ロバチレリン投与群では投与後 6 時間目までの運動量の総運動量と投与後 6 時間目から 12 時間目までの総運動量が、100 mg/kg タルチレリン投与群のそれと同レベルになった。

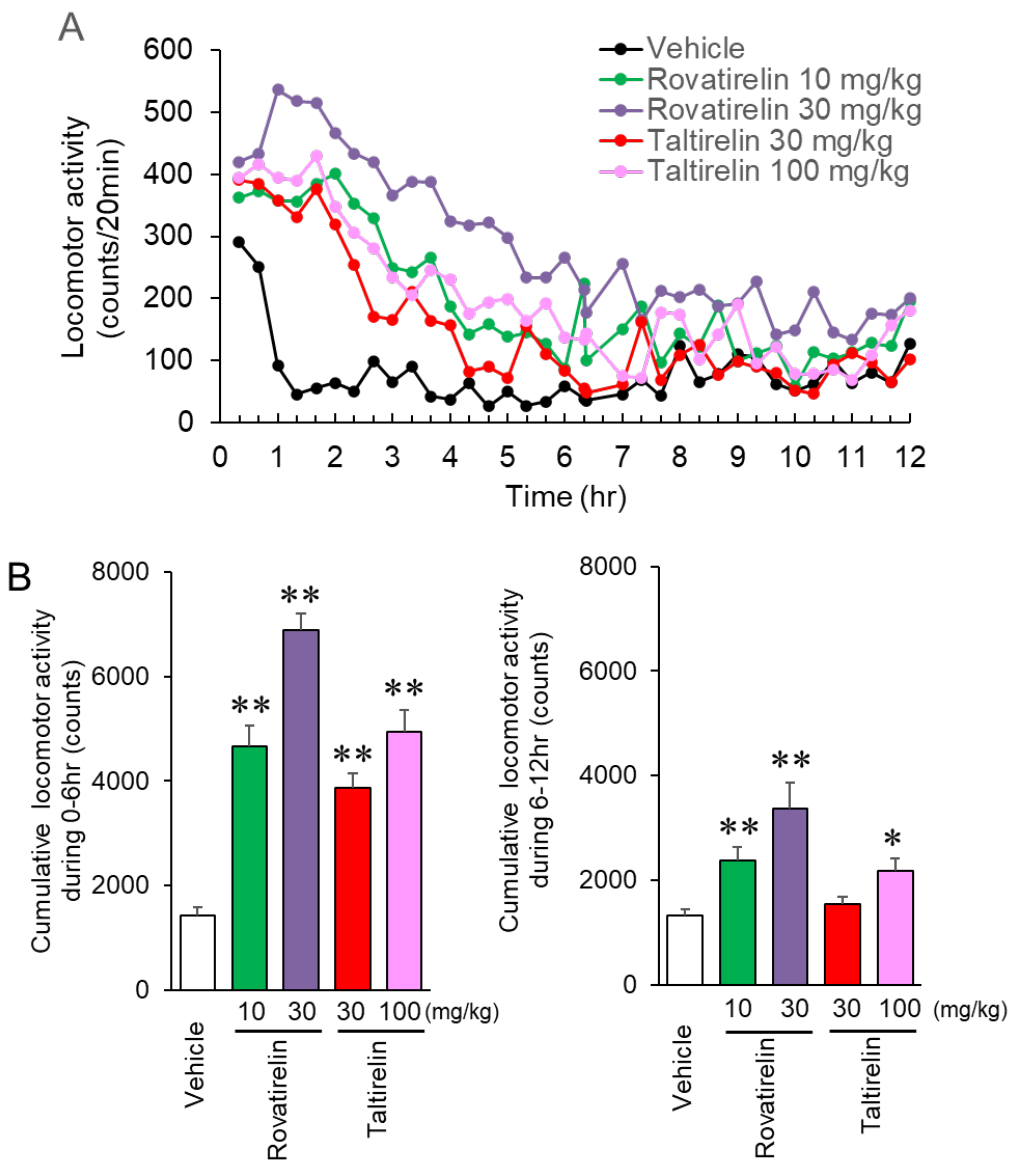


Fig.8 ロバチレリンおよびタルチレリンのラットへの単回経口投与による運動量への作用

A: ロバチレリン (10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (30 および 100 mg/kg) の運動量への経時的作用. データは各群 10 例の mean で示す. B: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目までの運動量の積算値 (総運動量). C: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目から投与後 12 時間目まで運動量の積算値 (総運動量). データは各群 10 例の mean ± S.E.M. で示す. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 媒体群との間の Dunnett 検定.

## 1.4 考察

新規の TRH 誘導體であるロバチレリンの中枢ノルアドレナリン神経系への電気生理学的および薬理学的作用を検証した。ロバチレリンはヒト TRH 受容体結合した。ロバチレリンは、ラットの前頭前皮質を含む大脳および小脳など中枢の広範囲に投射する青斑核のノルアドレナリン作動性神経を活性化した。さらに、ロバチレリンは前頭前皮質のノルアドレナリン量を増加させ、かつ運動を亢進させた。ロバチレリンのそれら作用は、TRH よりも強力な中枢作用が報告されているタルチレリン<sup>51),52)</sup>よりも、さらに強力かつ作用持続性を有することが示された。

受容体結合試験で、ロバチレリンはタルチレリンよりもヒト TRH 受容体への高い親和性が確認された (Fig.3)。一方、ロバチレリンは TRH よりもヒト受容体への親和性が低かった (Fig.3)。これに一致して、タルチレリンも TRH よりもヒト受容体への親和性が低かった (Fig.3)。タルチレリンの TSH 内分泌作用は、TRH のそれよりも低いことが報告されている<sup>53),54)</sup>。タルチレリンは TRH よりも TRH 受容体への親和性が低い、タルチレリンと TRH では、TRH 受容体への結合様式の違いが存在し、その結合様式は TRH 受容体下流に存在する複数のシグナル伝達方式に違いをもたらすことで、高い中枢作用を発揮する可能性が報告されている<sup>53),54)</sup>。したがって、ロバチレリンは TRH 受容体よりも親和性が低いものの、TRH よりも高い中枢作用を発揮すること可能性がある。予備的な試験では、ロバチレリンの TSH 内分泌作用は、タルチレリンのそれと同等であることも確認されている (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料)。

青斑核ノルアドレナリン作動性神経における電気生理学的試験では、ロバチレリンはタルチレリンよりも神経の自発発火の頻度をより増加させた (Fig.4)。ロバチレリンによる青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火亢進作用は、TRH 受容体アンタゴニストのクロルジアゼポキシドによって阻害された (Fig.5)。これまでに、げっ歯類では 2 つのサブタイプの TRH 受容体、TRH<sub>1</sub> receptor および TRH<sub>2</sub> receptor の存在が確認されている<sup>34),55)</sup>。加えて、ラットの青斑核で、TRH 受容体の分布が確認され、TRH 含有神経の青斑核への投射がラットとヒトで確認されている<sup>56),57),58)</sup>。その一方で、ヒトでの TRH 受容体は 1 種類のみである<sup>34),35)</sup>。ヒト TRH 受容体の塩基配列は、ラットの TRH<sub>1</sub> receptor のそれと 89.2% の相同性を示すが、ラットの TRH<sub>2</sub> receptor のそれと相同性を示さない<sup>34)</sup>。加えて、TRH およびタルチレリンは、ヒト TRH 受容体のアゴニストである<sup>53),48)</sup>。したがって、本試験から、ロバチレリンはヒト青斑核の TRH 受容体刺激を介してノルアドレナリン作動性神経を活性化させることが示唆された。

TRH はラット青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火頻度を増加させる。しかしながら、酸性条件下で TRH を併用しても、神経の自発発火がさらに亢進されなかったと報告されている<sup>37)</sup>。これらの知見から、TRH の自発発火作用は酸性化による TASK チャネルの機能調節の機構を介していることが示唆された<sup>37)</sup>。ロバ

チレリンも同様の酸性条件下で、さらなる自発発火の亢進は認められなかった。一方、TRH のラット TRH 受容体への結合性は酸性条件下で低下することおよび pH 低下が青斑核ノルアドレナリン作動性神経に対して電気生理学および生理学的に様々な反応を引き起こすことが知られていることから<sup>37)</sup>、ロバチレリンの青斑核ノルアドレナリン作動性神経活性化作用のメカニズム解明には更なる研究が必要である。

本章では、*in vitro* 電気生理学的試験はロバチレリンがラットの青斑核ノルアドレナリン作動性神経を直接的に活性化させる作用を持つことを示した。さらに *in vivo* 試験におけるロバチレリンの中枢ノルアドレナリン神経系への作用について検討した。ロバチレリンの単回経口投与は、ラット青斑核での c-Fos 陽性細胞数を増加させた (Fig.6)。神経組織における c-Fos タンパク発現は神経の活性化の指標とされ、薬物投与などを含む様々な刺激で、急速かつ一過性に観察される<sup>48),49)</sup>。したがって、ロバチレリンの投与による c-Fos 発現陽性細胞数の増加は、ロバチレリンが *in vivo* 条件下でも青斑核ノルアドレナリン作動性神経を活性化することが示された。

各種の薬物（例えば、カルバコール、*N*-methyl-*D*-aspartic acid、カイニン酸、クロザピンおよびオランザピンなど）や電気刺激で活性化した青斑核ノルアドレナリン作動性神経は、前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量を増加させる<sup>60),61),62),63)</sup>。本研究で、ロバチレリンは覚醒下無拘束ラットの前頭前皮質での細胞外ノルアドレナリン量を増加させた (Fig.7)。細胞外ノルアドレナリン量の増加作用では、10 mg/kg のロバチレリンは 30 mg/kg のタルチレリンとほぼ同レベルのノルアドレナリン量の最大値および AUC<sub>0-6hr</sub> 値を示し、投与用量ベースで、ロバチレリンのノルアドレナリン増加作用はタルチレリンの約 3 倍となることが示された。ロバチレリンとタルチレリンの青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火増強作用の EC<sub>50</sub> 値でも 3 倍の差が認められたことから、ノルアドレナリン増加作用のロバチレリンとタルチレリンの差は、青斑核ノルアドレナリン作動性神経の自発発火増強作用を反映していると考えられた。一方、ノルアドレナリン増加作用の持続性では、ロバチレリンがタルチレリンよりも長い持続性を発揮した。これらの結果に相関して、ラットへのロバチレリンの経口投与は、タルチレリンのそれよりも、強力かつ持続的に運動量を増加させた (Fig.8)。TRH 投与によるげっ歯類の運動量亢進には中枢ノルアドレナリン神経系の関与が報告されている<sup>41)</sup>。加えて、タルチレリンは TRH よりも優れた代謝安定性とバイオアベイラビリティで、TRH よりも強力かつ持続的な運動亢進作用を発揮することが報告されている<sup>51)</sup>。脳組織ホモジネート中に、ロバチレリンは、タルチレリンよりも優れた代謝安定性を示している<sup>29)</sup>。したがって、ロバチレリンの運動亢進作用の一部には、タルチレリンとの代謝安定性の差異が関与すると推察された。

タルチレリンの SCD 患者を対象とした臨床開発試験では、タルチレリンは SCD

の進行を鈍化させることあるいは運動機能を改善することが示されている<sup>52),64)</sup>。本研究で、ロバチレリンの経口投与は、タルチレリンよりも強力かつ持続的な中枢ノルアドレナリン神経系の亢進作用および運動量増加作用を示した。以前のSCD患者およびSCD動物モデルにおいて、小脳、脊髄、大脳や脳脊髄液でのノルアドレナリン神経系およびノルアドレナリン代謝物の異常が報告されている<sup>65),66),67),68)</sup>。これらのことから、ロバチレリンは、青斑核を介した中枢ノルアドレナリン神経系に対する作用を示し、SCDの治療薬として、高い治療効果を有する可能性が示された。

## 1.5 小括

本研究において、新規TRH誘導体ロバチレリンは、ヒトTRH受容体への結合親和性を示し、青斑核ノルアドレナリン神経系を賦活化した。ロバチレリンは、前頭前皮質の細胞外ノルアドレナリン量を増加させ、自発運動を亢進した。ロバチレリンのこれらの中枢性の作用は、タルチレリンのそれらよりも強力かつ持続的であることが示された。したがって、ロバチレリンがSCDへの有用な治療薬となる可能性が示された。

## 第2章 ロバチレリンの遺伝性脊髄小脳変性症モデルローリングマウスナゴヤの運動失調改善作用

### 2.1 序論

第1章では、ロバチレリンの中枢ノルアドレナリン神経系への作用およびノルアドレナリン神経系を介した運動亢進作用を示した。ロバチレリンは脊髄小脳変性症（SCD）治療を目的としていることから、SCDでの運動機能障害の改善作用についても検討する必要がある。

SCDは、その多様な症状および病因のタイプにもとづいて、細分化されている。特に常染色体優性遺伝性のSCDである脊髄小脳失調症（SCA）は、病因遺伝子が特定され、現在では40種類以上のサブタイプがある。それらの病因理解および治療法開発のため、実験動物を用いた様々な病態モデルが創出されている。

近年、トランスジェニックマウス作製技術の向上により、SCAの原因遺伝子上に、CAG繰り返し配列を挿入したマウスモデルが多く作製され、CAG繰り返し配列から翻訳されたポリグルタミンによる疾患の発症機序解析が進められている<sup>69)</sup>。最終的に、SCAは神経細胞の変性に至る。SCAの神経細胞変性に至る過程は、タンパク質の凝集（タンパク質毒性）、RNAのgain of functionによる神経毒性発現、転写調節異常、オートファジー障害、ミトコンドリア機能不全・酸化ストレスおよびチャネル障害と多岐にわたる（Fig. 9）。

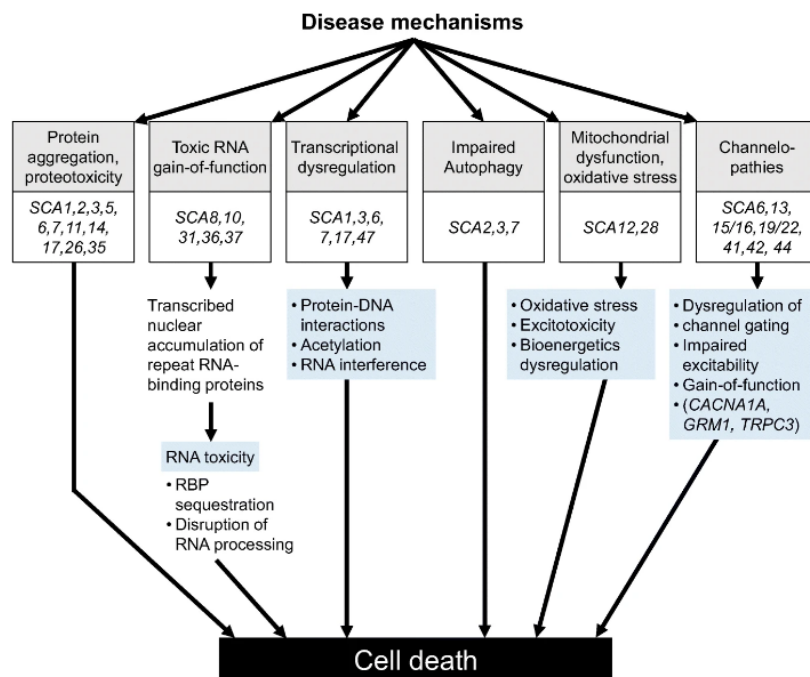


Fig.9 SCAの病因と種類（文献<sup>69)</sup>より抜粋）

SCAは40種類以上の分類がされている。SCAの疾患発症機序は、タンパク質の凝集、RNAのgain-of-functionによる神経毒性、転写異常、オートファジー障害、ミトコンドリア障害、酸化ストレスおよびチャネルopathyなど多岐にわたる。

ポリグルタミンに関連した凝集タンパク質あるいは蓄積タンパク質が神経細胞への直接的な有害作用を發揮するのか、あるいは神経細胞への保護作用として働いているのかは未だ解明されていない。SCA の病理像として認められるタンパク質の特徴と細胞死の関連についても、明らかにされておらず、SCA での治療標的の特定は困難な状態が続いている<sup>21), 69)</sup>。

自然発症の遺伝性運動失調モデルは、SCD の病態・病状をよく再現し、SCD 治療法や治療薬開発に用いられている。ローリングマウスナゴヤ (Rolling mouse Nagoya; RMN) は、電位依存性 P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャネルの  $\alpha_1$  サブユニット遺伝子 *Cacn1a1* に点突然変異を持ち、重度の運動失調症状を認め、歩行時に転倒を繰り返すことを特徴とする遺伝性運動失調マウスである。*Cacn1a1* 遺伝子は、ヒトの脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) の病因遺伝子であり、RMN は遺伝性 SCD モデルのひとつと考えられている。RMN は小脳の萎縮とともに、小脳の顆粒細胞、バスケット細胞および星状細胞の減少、プルキンエ細胞の樹状突起スパインの減少が病理所見となっている。電気生理学的な解析から、RMN では、頭部の位置や加速度の変化に対応して、頸部および体幹の筋緊張を制御することで安定した姿勢を維持させる前庭脊髄反射の時間間隔 (潜時) が延長し、小脳プルキンエ細胞の異常な神経発火だけでなく、シナプス機能障害も確認されている。その他にも、小脳、脊髄、間脳および大脳において、種々の神経伝達物質や神経アミノ酸の機能異常が示されている。これら全ての素因の運動失調症状発現への因果関係については未だに明らかにはされていない<sup>70), 71), 72), 73)</sup>。しかしながら、明確な運動失調症状を示すことから、RMN はこれまでに運動失調改善治療薬の開発研究に用いられてきた<sup>74), 75), 76)</sup>。

そこで、本章では、遺伝性運動失調モデルマウス RMN を用いて、ロバチレリンの SCD における運動失調症状の改善効果について検討した。

## 2.2 実験材料と試験方法

### 2.2.1 実験動物

名古屋大学で作出されたローリングマウスナゴヤ (RMN; CH3/He-Tg(*rol*)) を日本チャールスリバーで繁殖させ、本実験に供した。行動観察実験およびオトラジオグラフィ試験で、雌雄の RMN および野生型の CH3/He マウスを用いた。ロバチレリンのマウスにおける血漿中濃度測定には、日本 SLC から購入した雄性 ICR マウスを使用した。マウスは温度 (20~26°C) および相対湿度 (30~70%) で保たれた室内で 12 時間の明暗サイクル (8 時点灯, 20 時消灯) にて飼養され、試験操作に使用するまでは市販の固形飼料 CE-2 (日本クレア) と滅菌処理された水道水で、自由摂食と自由飲水とした。

本章の全ての動物実験は、キッセイ薬品工業の実験動物委員会の審査・承認を



経て、我が国の動物実験のガイドライン動物の愛護および管理に関する法律に従って実施された。

### 2.2.2 試薬

ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は塩野義製薬から提供された。ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は蒸留水を媒体として、10 mL/kgの容量で、それぞれ1~30 mg/kg および3~100 mg/kgの投与用量を動物に経口投与した。[1-<sup>14</sup>C] 2-deoxy-D-glucose (100 μCi/mL)はPerkinElmerから購入した。生化学検査用キットラボアッセイ<sup>™</sup>グルコースは富士フイルム和光純薬(大阪, 日本)から購入した。その他の化学物質はGR(特級)あるいはEP(一級)グレードの市販品を使用した。

### 2.2.3 ロバチレリンのマウス血中濃度測定

Kobayashiらの報告<sup>29)</sup>から、動物の血漿中濃度は投与用量の増加に伴って、線形性の増加を示す。ICRマウス(8週齢)に、推定されたマウス薬効用量域の3 mg/kgのロバチレリンを経口投与してマウスの血漿中濃度測定をおこなった。投与後0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 および8時間目に、ヘパリン添加したシリンジを用いて採血を行った(n=3, 投与後6時間のみn=2)。遠心分離(2000×g, 3分間, 4°C)を行って血漿を分離した。ロバチレリンの血漿中濃度測定はKobayashiらの以前の文献<sup>29)</sup>を参考にした。血漿試料中(50μL)のロバチレリンをOASIS HLB μElutionプレート(日本ウォーターズ, 東京, 日本)を用いて抽出し、最終媒体を蒸留水/アセトニトリル(70:30, v/v)として測定資料とした。血漿中のロバチレリン濃度は、液体クロマトグラフィ(LC-vp series; 島津製作所, 京都, 日本)および質量分析装置(API 3000 Triple-Quad; エービー・サイエックス, 東京, 日本)を用いて、ポジティブイオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行う液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法により測定した。HPLCによる分離は、30°Cに保温したDevelosil C30-UG-5カラム(長さ150×内径2 mmol/L, 粒子径5-μm; 野村化学, 瀬戸, 日本)を用いて行った。移動相として、0.1% (v/v) 酢酸/アセトニトリル(65:35, v/v)を用いて、0.2 mL/minの流速で溶出した。多重反応モニタリング(MRM)により、ロバチレリンの質量電荷比(m/z 367→254)および内標準(ロバチレリン-d<sub>10</sub>)の質量電荷比(m/z 377→254)の遷移をモニターし、ロバチレリン濃度として算出した。

### 2.2.4 行動観察試験

雌雄のRMN(10~11週齢)に、媒体, ロバチレリン(1, 3, 10 および30 mg/kg) およびタルチレリン(3, 10, 30 および100 mg/kg)を2週間反復経口投与した。行動観察試験を、投与前(pre), 投与初日(投与1日目)および最終投与日(投与

14 日目) に実施した. なお, 薬物投与後の行動観察は, マウス血中濃度推移を考慮して, 投与 2 時間後に実施された. 加えて, 休薬期間となる最終投与日から 1 週間後および 2 週間後にも, 同様に行動観察を実施した.

過去の報告<sup>77),78)</sup>を参考にし, 傾斜型式アンブロメータ (ACTY-303; バイオメディカ, 大阪, 日本) にプラスチックケージ (直径 20 cm, 高さ 20 cm) をセットして自発運動量を測定した. 転倒数は, 目視で手持ちの数取器を用いて計測した. 転倒状態を示す代表例を Fig.10 に示す. RMN は静止時の姿勢は前肢および後肢を広げて, 体全体を支える姿勢を示し (Fig.10A,B), 姿勢を維持できないため移動時には体幹をねじりながら, 体側面を床へ打ち付けるように転倒を頻繁に繰り返した (Fig.10C,D). 自発運動量と転倒数は, 飼育ケージからプラスチックケージに動物を移した直後から 10 分間の計測を行った. 運動機能改善の主要評価項目である転倒指数は, 転倒数を自発運動量で除することで算出した.

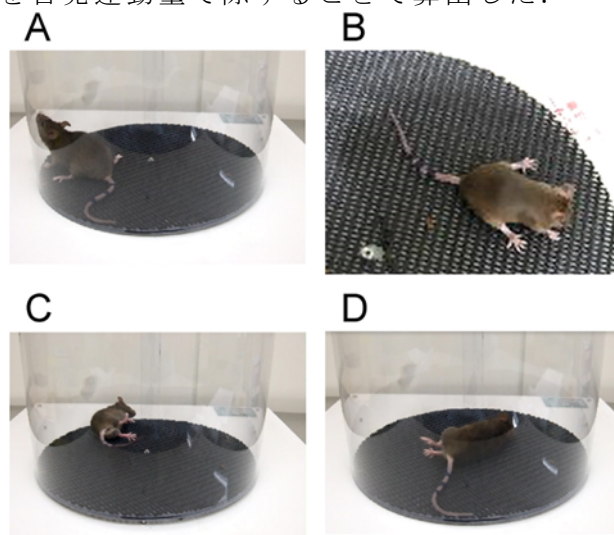


Fig.10 RMN の静止時および転倒時の姿勢

A, B: RMN の静止時の姿勢. C, D: 転倒時の姿勢.

薬物投与前の行動観察において, 運動失調症状の明確な RMN 個体を選択するため, 転倒指数が 0.5 以上かつ自発運動量が 10 以上となる個体を選抜した. 条件を満たした個体を対象として, SAS System Version 8.2 (SAS Institute) およびその運動プログラムの前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan) を用い, 転倒指数および自発運動量を変数とする「多変数によるブロック化割付け」を行い, 転倒指数および自発運動量の平均値が近似するように 9 つの試験群 (媒体投与群, ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) 投与群およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) 投与群) に割り付けた. なお, 一度に得られる個体の数が限られるため, 群分け操作は複数回に分けて行われ, 本試験で設定した例数 (n=12/group) に達するまで試験は繰り返された. 一度の試験で得られた個体数が少数であり「多変数によるブロック化割付け」が行えない場合は, その時点における各群の転

倒指数の平均値を指標として、各試験群に割付けを行った。最終的に、設定した例数に達した段階で、Tukey 検定を行って、自発運動量、転倒数および転倒指数に各群間の測定値に統計学的な差異がないことを確認した。この群分け操作に続いて、薬物投与および運動機能の改善評価が行動観察で実施された。

### 2.2.5 オートラジオグラフィ試験（局所脳中グルコース取り込み量測定）

雌雄の RMN（11 週齢）および野生型の CH3/He マウス（11 週齢）を 5 つ試験群（正常動物群（n=6）、RMN 媒体投与群（n=7）、RMN ロバチレリン投与群（10 および 30 mg/kg, n=7/group）および RMN タルチレリン投与群（100 mg/kg, n=6/group））に割り付けた。約 18 時間絶食させた後、媒体、ロバチレリンおよびタルチレリンを単回経口投与した。投与 1 時間 30 分後に、20  $\mu\text{Ci/mL}$  の  $[1-^{14}\text{C}]2\text{-deoxy-D-glucose}$  (PerkinElmer) を 5 mL/kg の容量で尾静脈投与した。 $[1-^{14}\text{C}]2\text{-deoxy-D-glucose}$  投与 30 分後にイソフルラン麻酔下で、開腹して腹部大静脈よりを採血した。採血により安楽死後、速やかに頭骨から脳を摘出した。摘出した脳を凍結切片作成用包埋剤 M1エンベディング（サーモフィッシュサイエンス、東京、日本）に包埋し、ドライアイス上で凍結した。凍結包埋した組織を、クリオスタット（CM-1800；Leica Biosystems, Wetzlar, Germany）を用いて、冠状面で切片厚 20  $\mu\text{m}$  ごとに薄切した。薄切切片をスライドガラスに貼り付け、マウスの脳図<sup>79)</sup>で位置を特定した後、60°C のホットプレート上で乾燥させた。切片を貼り付けたスライドガラスと<sup>14</sup>C スタンダードガラススライド（Carbon-14 Standards for autoradiography；American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA）をオートラジオグラフィ用カセット（Hypercasett；GE ヘルスケア・ジャパン、東京、日本）内で、Kodak BioMax MR フィルム（Eastman Kodak Company, New York, USA）を 4°C にて、1 週間露光させた。暗室にてフィルムを現像液（Kodak GBX Developer and Replenisher；Eastman Kodak Company）および定着液（Kodak GBX Fixer and Replenisher；Eastman Kodak Company）を用いて現像した。

続いて、GS-800 Calibrated Densitometer（Bio-Rad Laboratories, CA, USA）でフィルムの感光面をスキャニングした。数値定量化には 1 次元画像分析ソフトウェア Quantity One（Bio-Rad Laboratories）を用いた。<sup>14</sup>C スタンダードガラススライドの放射エネルギーとフィルムのフィルム黒化度から検量線を作成した。脳の各部位ごとに関心領域（ROI）を指定して、検量線から脳の各部位の放射線量を算出した。ROI の同定には、マウスの脳図<sup>79)</sup>を用いた。

脳の各部位の放射エネルギーから、脳の各部位のグルコース取り込み量を次の計算式から算出した。

グルコース取込み量 = 脳組織中放射エネルギー  $\times$  血漿中グルコース濃度  $\div$  血漿中放射エネルギー

血漿中グルコース濃度測定には、安楽死時に採取した血液サンプルを用いた。血液サンプルをフッ化ナトリウム/EDTA-2Na コートチューブ（日本ベクトン・デックスン、東京、日本）に回収して、遠心分離（2000×g, 3 分間）し、血漿サンプルを得た。血漿中グルコース濃度の測定には生化学検査用キットラボアッセイ™ グルコース（富士フイルム和光純薬、大阪、日本）を用いた。血漿中放射性濃度は液体シンチレーションカウンター（Tri-Carb 3100TR ; PerkinElmer）を用い、測定した。

## 2.2.6 リアルタイム PCR

行動観察試験とは別に用意された雌雄の RMN（10～11 週齢）および野生型の CH3/He マウス（10～11 週齢）を 4 つ試験群（正常動物群（n=6）、RMN 媒体投与群（n=8）、RMN ロバチレリン投与群（30 mg/kg, n=8/group）および RMN タルチレリン投与群（100 mg/kg, n=6/group））に割り付けた。動物へ 2 週間反復投与後、安楽死させ、小脳を採取した。各個体の小脳を RNeasy Lipid Tissue Mini Kit（キアゲン、東京、日本）を用いて RNA を抽出して、RNase-free DNase set（キアゲン）を用いてゲノム DNA を分解処理した。PrimeScript™ RT reagent Kit（タカラバイオ、滋賀、日本）を用いて、オリゴ dT プライマーおよびランダムヘキサマーをプライマーとして RNA を鋳型に逆転写反応を行い、cDNA を合成した。リアルタイム PCR（Real-time Polymerase Chain Reaction）には、7500 Fast リアルタイム PCR システム（アプライドバイオシステムズジャパン、東京、日本）と SYBR Premix Ex Taq（タカラバイオ）を用いた。脳由来栄養因子（BDNF ; brain-derived neurotrophic factor）の mRNA 定量には、グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素（GAPDH ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）をリファレンス遺伝子として、比較定量  $\Delta\Delta Ct$  法を用いた。BDNF のプライマーの設計および合成は、タカラバイオの Perfect Real Time サポートシステムで行った。

マウス BDNF Forward プライマー : 5'-TCAAGTTGGAAGCCTGAATGAATG-3'

マウス BDNF Reverse プライマー : 5'-CTGATGCTCAGGAACCCAGGA-3'

マウス GAPDH Forward プライマー : 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

マウス GAPDH Reverse プライマー : 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

## 2.2.7 統計学的解析

統計解析には、SAS System Version 8.2（SAS Institute）およびその連動プログラムの前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan）、あるいは EXSUS（CAC クロア、東京、日本）を使用した。2 群間の比較検定においては、F 検定の結果を行い、等分散性であった場合は Student の *t* 検定を、不等分散であった場合は Aspin-Welch の *t* 検定あるいは Mann-Whitney U 検定を用いた。3 群以上の群間で多重比較検定を行う際には、Bartlett 検定を用いて群間の等分散性を確認した。等分散が確認され、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Dunnnett 検定が、

全ての 2 群間で多重比較検定を行う場合には、Tukey 検定が用いられた。なお、EXSUS では、例数がアンバランスな場合、それを考慮して、Tukey-Kramer 検定の近似計算が可能である。不等分散が確認され、全ての 2 群間で多重比較検定を行う場合には、Wilcoxon の順位和検定が用いられ、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Steel 検定が用いられた。危険率は 5% 未満で統計学的に有意差ありとした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 マウスへのロバチレリン経口投与によるロバチレリンの血中濃度推移

マウスへのロバチレリン単回経口投与後のロバチレリンの血漿中の濃度推移を Fig.11 に示し，薬物動態パラメータを Table2 に示した．非絶食下での  $C_{max}$  および  $AUC_{0-\infty}$  は，非絶食下の  $C_{max}$  の 92.1% および  $AUC_{inf}$  の 72.3% であった．3 mg/kg ロバチレリン投与 2 時間目のロバチレリン血漿中濃度は絶食下で 35.60ng/mL，非絶食下で 11.67ng/mL であった．

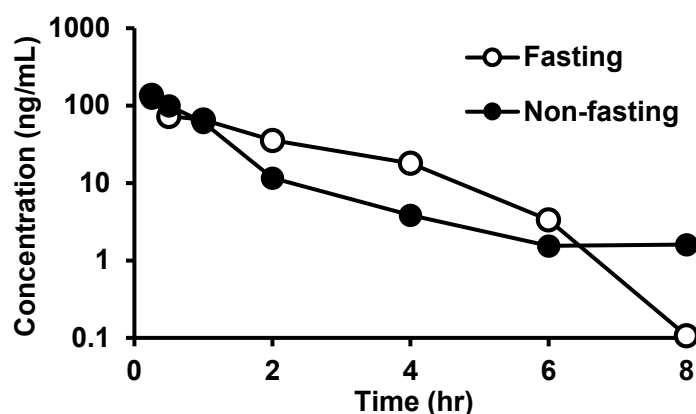


Fig.11 絶食下および非絶食下でのマウスへのロバチレリン単回経口投与後のロバチレリンの血漿中濃度推移

各時点 2-3 例の mean で示す．投与後 0.25 時間から 8 時間目の血中濃度推移を示す．

Table2 絶食下および非絶食下でのマウスへのロバチレリン単回経口投与時の薬物動態パラメータ

Feeding	$C_{max}$ (ng/mL)	$T_{max}$ (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)
Fasting	136.7	0.25	0.5	197.2
Non-fasting	125.9	0.25	3.2	142.5

2-3 例の mean として示す． $C_{max}$ ：最高血漿中濃度， $T_{max}$ ：最高血漿中濃度到達時間， $AUC_{0-\infty}$ ：血漿中濃度－時間曲線下面積

### 2.3.2 ローリングマウスナゴヤへのロバチレリン投与による運動機能改善評価のための行動観察

ローリングマウスナゴヤ (RMN) (n=12/group) に、媒体、ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) を 2 週間反復経口投与して、運動機能改善に及ぼす効果を評価した。

薬物投与前の行動観察において、108 例の RMN の自発運動量の平均値は  $32.4 \pm 1.4$  counts/10min であり、17 例の正常マウスにおける自発運動量の平均値  $57.0 \pm 6.5/10$  min よりも低値となった。薬物投与前の RMN の転倒数の平均値は  $33.6 \pm 1.5/10$  min であったのに対し、正常マウスでは一切転倒が認められなかった。

次に、投与初日 (投与 1 日目)、最終投与日 (投与 14 日目)、最終投与日から 1 週間後および最終投与日から 2 週間後における各薬物の RMN の自発運動量に及ぼす効果を Fig.12 に、転倒数に及ぼす効果を Fig.13 に、転倒指数への改善作用を Fig.14 に示す。1, 3 および 10 mg/kg のロバチレリン投与群の自発運動量は、投与初日で、媒体投与群のそれよりも増加した。3 mg/kg ロバチレリン投与群は最終投与日でも自発運動量の増加が観察された。一方、タルチレリン投与群は、自発運動量の増加傾向を認めたものの有意な差はなかった。30 mg/kg ロバチレリン投与群の転倒数は投与初日 (投与 1 日目) および最終投与日 (投与 14 日目) に、媒体投与群のそれよりも減少した。100 mg/kg タルチレリン投与群では転倒数が低下する傾向にあった ( $p=0.0638$ )。運動機能改善評価の主要評価項目である転倒指数は、投与初日 (投与 1 日目) に 3, 10 および 30 mg/kg ロバチレリン投与群ならびに 30 および 100 mg/kg タルチレリン投与群で、媒体投与群のそれよりも低下した。最終投与日 (投与 14 日目) でも、ロバチレリンおよびタルチレリンの両薬物の転倒指数に及ぼす効果は、投与初日のそれと同様の値となり、これら薬物の運動機能改善作用の減弱は認められなかった。さらに、休薬後 1 週間目および 2 週間目におけるロバチレリンおよびタルチレリンの運動機能改善効果の持続性を評価した。その結果、ロバチレリンは休薬後 1 週間目では 3 mg/kg 以上の投与群で、休薬後 2 週間後目では 10 mg/kg 以上で転倒指数が減少しており、運動機能改善効果の持続が認められた。その一方、タルチレリンは休薬後 1 週間目では 100 mg/kg でのみ転倒指数が減少したが、休薬後 2 週間目にはいずれの投与群でも転倒指数の減少は観察されなかった。

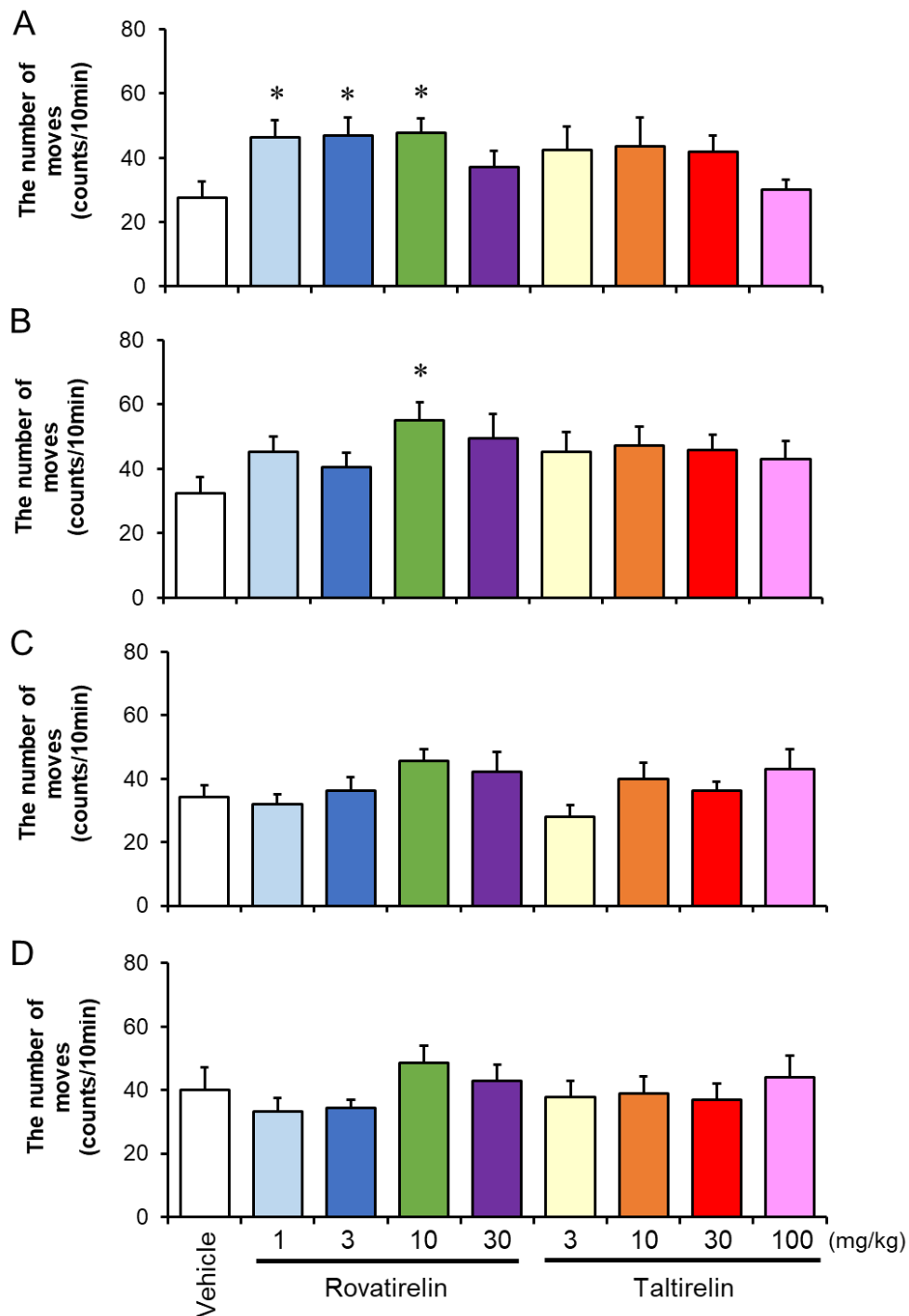


Fig.12 ロバチレリンおよびタルチレリンの経口投与によるRMNの運動機能（自発運動量）への作用

RMNに媒体（蒸留水），ロバチレリン（1，3，10および30 mg/kg）およびタルチレリン（3，10，30および100 mg/kg）を2週間反復経口投与して，2週間の休薬期間を設けた．A：初日投与後2時間目，B：最終投与後2時間目，C：最終投与後の1週目およびD：最終投与後の2週目の各時点の行動観察による自発運動量の測定結果を示した．データは各群12例のmean±S.E.M.として示す．\*p<0.05，媒体群との間のDunnett検定．



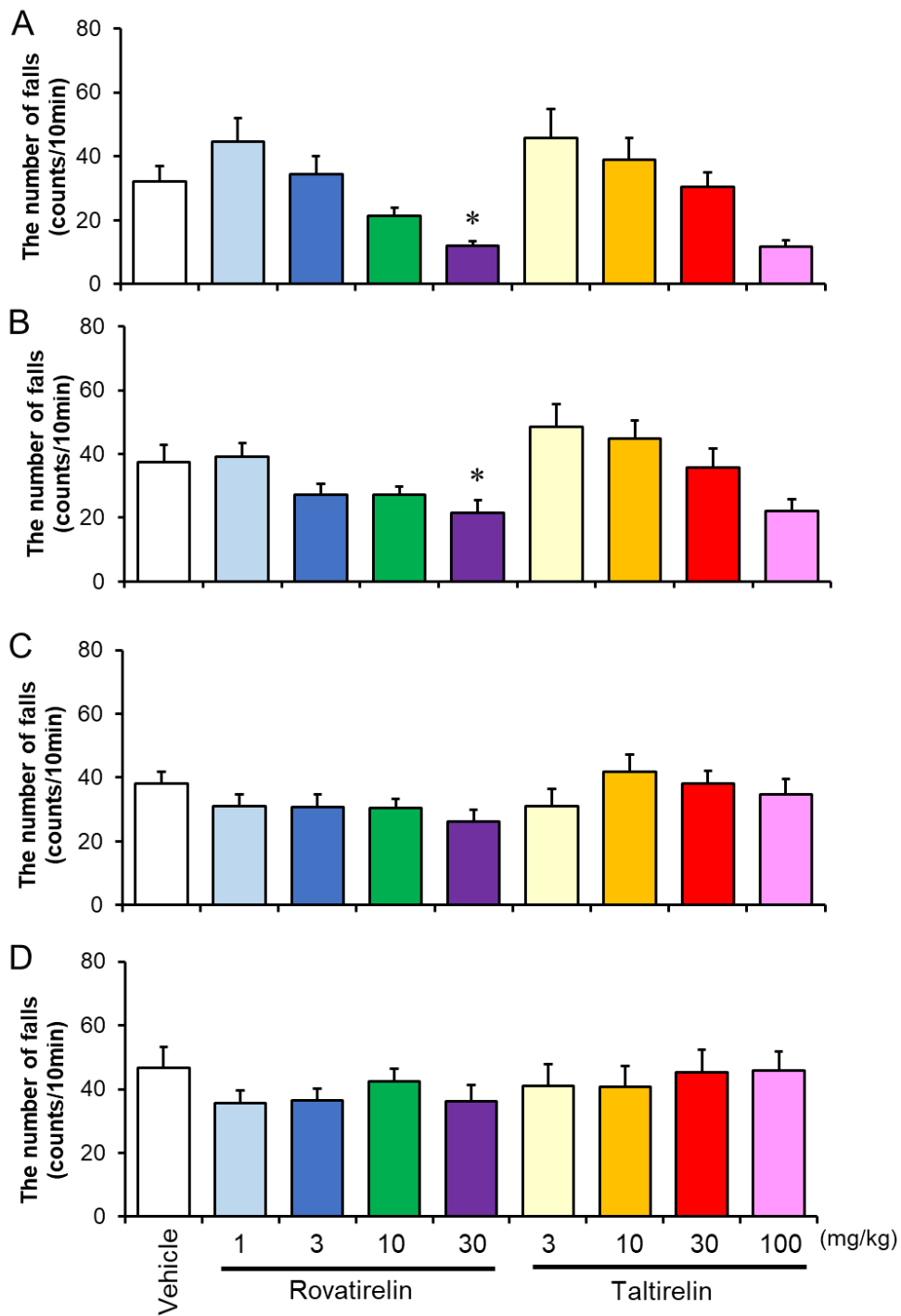


Fig.13 ロバチレリンおよびタルチレリンの経口投与によるRMNの運動機能（転倒数）への作用

RMNに媒体（蒸留水），ロバチレリン（1，3，10および30 mg/kg）およびタルチレリン（3，10，30および100 mg/kg）を2週間反復経口投与して，2週間の休薬期間を設けた．A：初日投与後2時間目，B：最終投与後2時間目，C：最終投与後の1週目およびD：最終投与後の2週目の各時点の行動観察による転倒数の測定結果を示した．データは各群12例のmean±S.E.M.として示す．\*p<0.05，媒体群との間のDunnett検定．

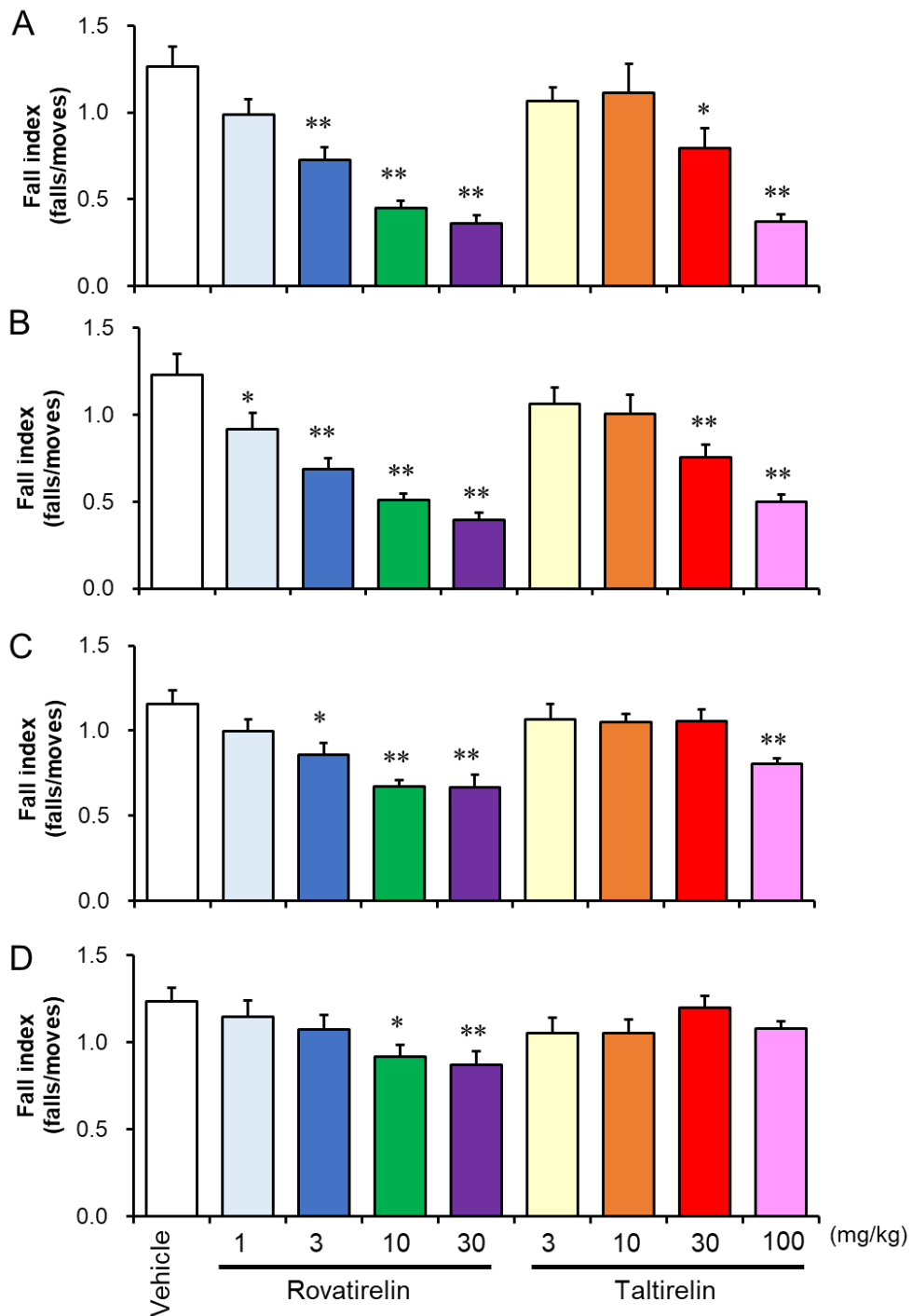


Fig.14 ロバチレリンおよびタルチレリンの経口投与によるRMNの運動機能（転倒指数）への作用

RMNに媒体（蒸留水），ロバチレリン（1，3，10および30 mg/kg）およびタルチレリン（3，10，30および100 mg/kg）を2週間反復経口投与して，2週間の休薬期間を設けた．A：初日投与後2時間目，B：最終投与後2時間目，C：最終投与後の1週目およびD：最終投与後の2週目の各時点の行動観察による転倒指数の評価結果を示した．データは各群12例のmean±S.E.M.として示す．\* $p < 0.05$ ，\*\* $p < 0.01$ ，媒体群との間のDunnett検定．

### 2.3.3 ローリングマウスナゴヤへのロバチレリン投与による脳中局所グルコースへの作用

正常マウスおよびローリングマウスナゴヤ (RMN) (n=6~7/group) に、媒体、ロバチレリン (10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (100 mg/kg) を単回経口投与の脳中局所グルコース取り込みに及ぼす効果を評価するため、オートラジオグラフィを行った (Table3).

正常群と媒体 (蒸留水) 投与群の間で、脳内局所グルコース取り込み量を比較した結果、脳内の各領域において、グルコース取り込み量に差はなかった。一方、RMN では、視蓋前域前核、腹側被蓋野、黒質緻密部、小脳中位核、前庭神経内側核、小脳第 4/5 小葉、小脳第 3 小葉において、グルコースの取り込み量が低下傾向にあった。

一方、RMN の媒体 (蒸留水) 投与群と、ロバチレリンの 30 mg/kg 投与群の脳内局所グルコース取込み量を比較した結果、前頭前皮質、側坐核シェル、側坐核コア、線条体、前帯状皮質、二次運動野、視蓋前域前核、腹側被蓋野、黒質緻密部、青斑核、小脳中位核、前庭神経内側核、第 4/5 小葉および第 3 小葉で、ロバチレリン投与によるグルコース取込み量の増加が認められた。媒体 (蒸留水) 投与群のグルコース取り込み量とロバチレリンの 10 mg/kg 投与群のそれとの比較では、脳全体において、ロバチレリン投与群でグルコース取込み量の増加傾向が認められた。

RMN の媒体 (蒸留水) 投与群のグルコース取り込み量と、タルチレリンの 100 mg/kg 投与群のそれを比較した。その結果、タルチレリン投与群での前頭前皮質、側坐核シェル、側坐核コア、線条体、前帯状皮質、二次運動野、視蓋前域前核、腹側被蓋野、一次視覚野、黒質緻密部、黒質網様部および青斑核でグルコース取込み量が促進された。30 mg/kg ロバチレリン投与群と 100 mg/kg タルチレリン投与群の比較では、30 mg/kg ロバチレリン投与群において、より多くのグルコース取込み量が認められた。RMN の小脳におけるグルコース取込み量の増加は 30 mg/kg ロバチレリン投与群でのみ観察された。

Table3 正常マウスおよび RMN における局所脳中グルコース取り込み量

Structure	Wt		RMN		
	Vehicle	Vehicle	Rovatiirelin	Rovatiirelin	Taltirelin
	n = 6	n = 7	10 mg/kg n = 7	30 mg/kg n = 7	100 mg/kg n = 6
Prefrontal cortex	8.17 ± 1.02	7.76 ± 0.72	8.62 ± 0.87	19.12 ± 3.59 <sup>b</sup>	16.25 ± 2.74 <sup>e</sup>
Nucleus accumbens, Shell	9.41 ± 0.86	9.45 ± 0.96	11.30 ± 1.46	24.61 ± 4.64 <sup>b</sup>	18.55 ± 2.05 <sup>d</sup>
Nucleus accumbens, Core	8.16 ± 0.75	8.98 ± 0.88	9.05 ± 0.82	19.73 ± 4.26 <sup>a</sup>	18.09 ± 2.98 <sup>e</sup>
Striatum	12.10 ± 1.15	14.83 ± 1.92	14.94 ± 1.83	27.52 ± 5.40 <sup>a</sup>	29.41 ± 2.80 <sup>d</sup>
Corpus callosum	2.90 ± 0.19	3.09 ± 0.29	3.43 ± 0.30	4.64 ± 0.93	3.99 ± 0.33
Anterior cingulate cortex	9.12 ± 0.86	8.85 ± 0.87	9.95 ± 1.77	19.14 ± 4.79 <sup>a</sup>	17.92 ± 2.35 <sup>e</sup>
Supplementary motor area	9.52 ± 0.85	10.45 ± 0.80	11.18 ± 1.43	22.22 ± 5.58 <sup>a</sup>	21.31 ± 2.11 <sup>d</sup>
Pretectal region	14.48 ± 1.32	12.12 ± 21.04	13.64 ± 1.90	28.79 ± 5.92 <sup>b</sup>	28.01 ± 2.99 <sup>e</sup>
Ventral tegmental area	10.51 ± 0.97	9.22 ± 0.93	9.29 ± 0.91	18.45 ± 3.85 <sup>a</sup>	16.76 ± 2.28 <sup>d</sup>
Primary visual area	13.20 ± 1.66	12.65 ± 1.36	12.17 ± 1.33	25.11 ± 5.32	23.10 ± 1.86 <sup>d</sup>
Substantia nigra compacta	8.89 ± 0.89	7.50 ± 0.48	7.17 ± 1.00	14.99 ± 3.60 <sup>a</sup>	12.76 ± 0.96 <sup>d</sup>
Substantia nigra reticulata	6.39 ± 0.59	6.03 ± 0.35	5.91 ± 0.65	11.16 ± 2.51	9.53 ± 1.01 <sup>e</sup>
Locus ceruleus	8.36 ± 0.71	8.33 ± 0.93	10.20 ± 1.84	17.81 ± 4.27 <sup>a</sup>	14.54 ± 2.36 <sup>c</sup>
Inferior colliculus	20.54 ± 2.19	24.19 ± 1.76	19.33 ± 2.19	36.69 ± 5.77	31.31 ± 4.19
Nucleus interpositus	12.17 ± 1.67	10.31 ± 0.49	10.67 ± 0.82	16.59 ± 2.58 <sup>a</sup>	14.07 ± 2.32
Medial vestibular nucleus	17.54 ± 1.89	14.90 ± 1.07	15.41 ± 1.12	26.67 ± 5.09 <sup>a</sup>	21.27 ± 3.31
4th and 5th cerebellar lobules	10.11 ± 1.38	7.70 ± 0.66	9.48 ± 0.84	15.69 ± 2.88 <sup>a</sup>	11.42 ± 2.06
3rd cerebellar lobules	10.13 ± 1.31	8.01 ± 0.81	9.20 ± 0.78	14.86 ± 2.84 <sup>a</sup>	11.05 ± 2.27

データは各群 6~7 例の mean±S.E.M.として示す。Wt: 正常マウス, RMN: ローリングマウスナゴヤ。18 時間の絶食後に, 媒体 (蒸留水), ロバチレリン (10 または 30 mg/kg) およびタルチレリン (100 mg/kg) を経口投与して, 1 時間半後に [1-<sup>14</sup>C]2-deoxy-D-glucose (100 μCi/kg) を尾静脈投与した。さらに, 30 分後に下大静脈から採血を行って, 脳を取り出して, オートラジオグラフィに供した。<sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, 媒体群とロバチレリンの間の Steel 検定。<sup>c</sup>p<0.05, <sup>d</sup>p<0.01, 媒体群とタルチレリンの間の Student の *t* 検定。<sup>e</sup>p<0.01, 媒体群とタルチレリンの間の Wilcoxon の順位和検定。

#### 2.3.4 ローリングマウスナゴヤの小脳の脳由来栄養因子遺伝子へのロバチレリンおよびタルチレリンの作用

正常マウスおよびローリングマウスナゴヤ (RMN) (n=6~8/group) に, 媒体, ロバチレリン 30 mg/kg およびタルチレリン 100 mg/kg を 2 週間反復経口投与した後, リアルタイム PCR を用いて小脳の BDNF 遺伝子発現に及ぼす効果を評価した (Fig.15)。

RMN の BDNF mRNA 発現レベルは, 正常マウスのそれよりも低下した。ロバチレリン 30 mg/kg およびタルチレリン 100 mg/kg の 2 週間反復経口投与は, 媒体投与群の BDNF mRNA 発現レベルよりも, その発現レベルを上昇させた。

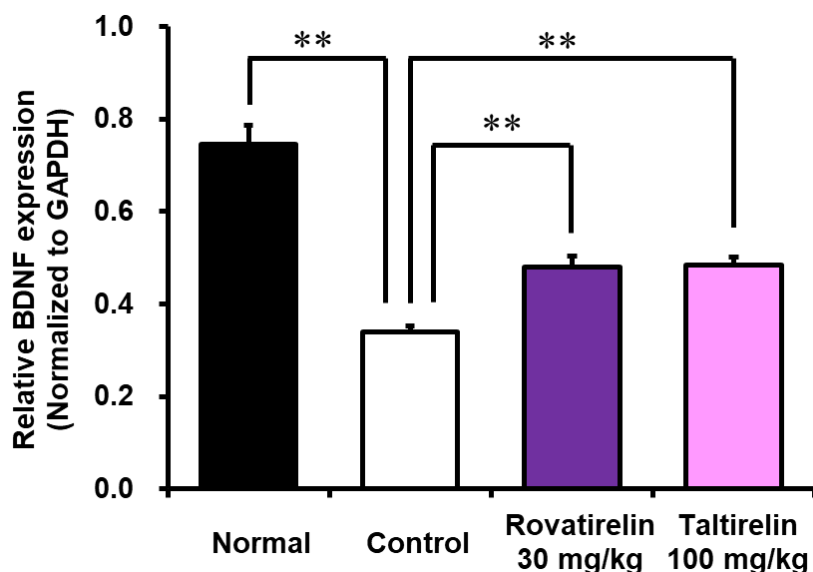


Fig.15 RMN へロバチレリンおよびタルチレリン反復投与による小脳の BDNF 遺伝子の発現への作用.

正常マウスおよび RMN に媒体 (蒸留水), ロバチレリン 30 mg/kg およびタルチレリン 100 mg/kg を 2 週間反復投与後, 小脳を採取して, BDNF の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した. データは各群 6~8 例の mean±S.E.M.として示す. \*\*p<0.01, 各群の間の Tukey 検定.

## 2.4 考察

遺伝性 SCD モデルマウス RMN の運動失調症状へのロバチレリンの運動機能改善作用について検討した. ロバチレリンの反復経口投与は, RMN の転倒指数を減少させ, その運動機能を改善した. 加えて, RMN におけるオートラジオグラフィの結果から, 小脳を含めた脳内の様々な部位のグルコース取り込み量を増加させ, 中枢神経を賦活化することが示された. 反復投与により, 小脳の BDNF 遺伝子の発現を亢進させることも示された.

RMN はモデル動物であり, P/Q 型カルシウムチャネル ( $\alpha 1A$  Cav2.1)をコードする *Cacnala* 遺伝子の突然変異により運動失調を発症する<sup>70),72),80)</sup>. P/Q 型カルシウムチャネルの変異は, ヒトの神経変性疾患の SCA6, 片麻痺型片頭痛および反復発作性運動失調症 2 型の発症に関与する<sup>81),82)</sup>. 一方, Oda らは RMN (*tg<sup>rol</sup>* マウス) が痙攣発作は示さないことを報告した<sup>72)</sup>. 本試験においても RMN で痙攣は観察されなかった. 本実験で RMN マウスは, 後肢の異常による転倒が全ての個体で観察されていることから, 本試験に用いた RMN は, ヒトの SCA6 への適切なモデル動物になると考えられた.

げっ歯類の運動機能の協調性および平衡感覚の評価には, 通常, ロータロッド試験が用いられる<sup>83)</sup>. しかしながら, 本試験では, RMN が転倒を主症状とすることから, ロータロッド装置の回転運動での評価に RMN は適性を欠くこととなる.

そのため、本試験では行動観察の転倒指数を指標にして薬物の効果を評価した。本研究での行動観察評価は、脊髄小脳変性症治療薬タルチレリンの腹腔内投与による RMN の運動機能改善作用が示された報告<sup>75)</sup>と同様の方法がとられていることから、運動機能の評価としては信頼性があると判断された。本試験では、臨床利用における薬物投与経路を想定して、RMN へのロバチレリンおよびタルチレリンで反復経口投与の運動機能改善作用を評価した。その結果、マウスへの 3 mg/kg ロバチレリンの経口投与における  $C_{max}$  付近での血漿中濃度は 373 nmol/L (136.7 ng/mL)、投与 2 時間後では 97 nmol/L (35.5 ng/mL) であった。ヒト TRH 受容体への TRH 放射性同位体に対するロバチレリンの阻害定数  $K_i$  値は 702 nmol/L である<sup>84)</sup>。ヒト臨床における有効投与用量 2.4 mg における  $C_{max}$  は 8.4~10.5 ng/mL である (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料)。Kobayashi らの報告ではロバチレリンは投与用量に応じて血漿中濃度が線形性を示し<sup>29)</sup>、行動観察において設定されたロバチレリンの投与用量 1~30 mg/kg は、投与 2 時間目において、ヒトにおける薬効を発揮する血漿中濃度に達し、運動機能への有効な血中濃度が確保されると推察された。ロバチレリンおよびタルチレリンは 2 週間の反復投与の投与初日から、用量依存的に RMN の転倒指数を減少させた。その作用は、中枢の TRH 受容体の活性化を介したノルアドレナリンなどの神経伝達物質の放出による中枢神経系の賦活化によって生じると考えられた。実際、第 1 章では、ロバチレリン投与群での青斑核ノルアドレナリン神経の活性化および前頭前皮質でのノルアドレナリン放出亢進を確認した<sup>84)</sup>。投与初日において、ロバチレリンは 3 mg/kg 以上、タルチレリンは 30 mg/kg 以上の投与で転倒指数を減少させた。その一方、3 mg/kg のロバチレリンおよび 30 mg/kg のタルチレリン投与群の転倒指数を減少させる作用は同等であった。同じ薬物投与用量で比較した結果、30 mg/kg ロバチレリン投与群の転倒指数は、30 mg/kg タルチレリン投与群のそれよりも低かったことから、ロバチレリンはタルチレリンよりも強力な運動機能改善作用を発揮することが示された。このロバチレリンの強力な運動機能改善作用は、タルチレリンよりも高い TRH 受容体への親和性<sup>84)</sup>および薬物動態指標の脳内での代謝安定性とバイオアベイラビリティの関与が考えられた<sup>29)</sup>。さらに、ロバチレリンの 2 週間反復投与後でも、運動機能改善効果が減弱しなかったことから、ロバチレリンは長期間投与でも薬物耐性を示さず、かつ長期間にわたって有効性が維持される薬物となる可能性が示された。

本試験で、注目すべきことは、ロバチレリンの運動機能改善作用が、2 週間反復経口投与終了後の休薬期間の 2 週間を通じて維持されていたことである。同様に、タルチレリンもまた休薬後の運動機能改善効果が一部確認された。このタルチレリンの効果は Kinoshita らによっても腹腔内投与による休薬後に同様の効果の維持が報告されている<sup>75),76)</sup>。Kobayashi らのロバチレリンの薬物動態解析 (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料) では、げっ歯類への 0.3 mg/kg から 10 mg/kg のロバチレリン経口投与時の血中半減期は 0.5 時間から 7.7 時間であり、10 mg/kg ロバチレ

リン投与でも投与 48 時間目にはロバチレリンが血中からほぼ消失した。したがって、休薬期間に観察された運動機能改善効果は、ロバチレリンの脳組織に移行した薬物の組織内濃度が維持されることで発揮されるのではないと考えられた。TRH 誘導体は、動物への虚血や外傷による中枢神経系損傷に対して神経保護作用を発揮することに加え<sup>85),86),87)</sup>、SCA6 患者由来の iPS 細胞では TRH が神経保護作用を示すことが報告されている<sup>88)</sup>。これらの知見から、ロバチレリンの持続的な運動機能改善作用は、ロバチレリンの神経保護作用が関与すると推察された。

グルコースの放射性標識同位体を用いたオートラジオグラフィは中枢神経系活動の度合いを評価する方法である<sup>89)</sup>。本試験では、RMN の脳中グルコース取り込み量を測定することで中枢神経活動レベルを評価した。正常マウスと RMN の脳中グルコース取り込み量を比較した結果、視蓋前域前核、腹側被蓋野、黒質緻密部、小脳中位核、前庭神経内側核、小脳第 4/5 小葉、小脳第 3 小葉において、グルコースの取り込み量が低下傾向にあった。これら領域はノルアドレナリン、ドパミンおよびアセチルコリン等の神経伝達物質の産生を担う部位、あるいは RMN で特徴的な神経変性が文献的に観察される部位<sup>70),71),72),73)</sup>であり、グルコース取り込み量の減少傾向は RMN の病態の反映によると考えられた。しかしながら、正常マウスと RMN の脳中グルコース取り込み量で、統計学的に有意な差はなかった。Nakayama & Nagai は、正常マウスと RMN の脳中グルコース取り込み量を比較し、RMN の間脳、脳幹、小脳の領域でグルコース取り込み能の低下を報告した<sup>90)</sup>。Nakayama & Nagai と本試験での試験系の検出感度の違いが想定され、本試験でも小脳領域では RMN は正常マウスよりもグルコース取り込み量の低値傾向を認めることから、グルコース取り込み量の変化と病態の関連の一端をとらえていることが推察された。30 mg/kg のロバチレリン投与群は、青斑核、前頭皮質、前帯状皮質、二次運動野および小脳の中核など様々な中枢組織の領域を活性化することが示された。これら結果から、ロバチレリンは、神経伝達物質産生を担う部位および RMN で特徴的な神経変性が知られる小脳部位を中心に、脳組織全体のグルコースの取り込み量増加を介して、中枢神経を活性化し、RMN の運動失調症状を改善させると推察された。一方、10 mg/kg のロバチレリン投与群では、RMN の行動観察評価において、運動機能の改善作用が観察されるにもかかわらず、グルコース取り込み量で、増加傾向にとどまったことは、正常マウスと RMN の比較と同様に、本試験系の検出感度に起因することが想定された。あるいは、30 mg/kg のロバチレリン投与群でのグルコース取り込み能の亢進は、薬物による過剰な薬理作用の一面を反映していることも推察された。しかしながら、本評価では、ロバチレリンが中枢神経系に作用する領域の詳細を明らかとする点で有用と考えられた。第 1 章において、ロバチレリンによってノルアドレナリン作動性神経が活性化される部位として青斑核を、ノルアドレナリン量の増加する部位として前頭皮質を示した。それらの脳領域のオートラジオグラフィの評価において、これらはロバチレリン

によるグルコース取り込み能の亢進，つまり神経の活動亢進が観察された部位であった．ロバチレリンは，タルチレリンよりも中枢移行性が高く，投与後に大脳皮質，線条体，小脳，脳幹およびその他脳領域へ速やかに移行する<sup>29)</sup>．したがって，ロバチレリンが移行した中枢組織の領域で，神経系の活性化をもたらしたと考えられた．ロバチレリンは，小脳中核，小脳第4/5小葉，小脳第3小葉および前庭神経内側核のグルコース取り込み能も亢進させた．SCDは小脳を中心とした神経障害であり，SCDのタイプによっては付随して脊髄，脳幹および大脳などにも神経障害をもたらす．ロバチレリンは小脳，ならびに運動機能制御やノルアドレナリン，アセチルコリンおよびドパミンなどの神経伝達物質亢進に関わる大脳・脳幹領域に至る広範囲の中枢組織の領域で神経活性化をもたらし，SCDでの主要な神経変性部位である小脳領域の機能を直接的に亢進するとともに，中枢で運動制御に関わる様々な領域の機能を亢進することで小脳の機能を代償的にも制御して，SCDの運動機能を改善することが推察され，臨床利用において有益な効果をもたらすと考えられた．

中枢神経系に広く分布する分泌タンパクのBDNFは，神経細胞の発生，生育および修復などの中枢組織で重要な役割を担っている．本試験において，RMNの小脳でのBDNF mRNA発現レベルは，正常マウスのそれより低下した．そのRMNへの2週間のロバチレリン反復投与は，小脳のBDNF mRNAレベルを上昇させた．SCA6患者の小脳において，BDNF mRNA発現レベルの低下が報告されている<sup>91)</sup>．ロバチレリンが小脳のBDNFを増加させるメカニズムは未だに不明であるが，オートラジオグラフィの結果と併せて，ロバチレリンのBDNF mRNA発現レベルの上昇作用は小脳の神経活動活性化に関与する可能性が示された．SCA6は遺伝的な病因からポリグルタミン病に分類される．ポリグルタミン病のひとつであるハンチントン病のモデルマウスにおいて，BDNFの過剰発現は神経変性症状を抑制することが報告されている<sup>92)</sup>．したがって，ロバチレリンがRMNの小脳で神経変性を抑制していることが示唆された．一方，RMNへのタルチレリンの投与でも，ロバチレリンと同様にBDNF mRNAの上昇が認められたが，オートラジオグラフィにおいてタルチレリンの投与により小脳でのグルコース取り込み能の亢進の程度が異なっており，本研究では，この原因について明らかにできなかった．その可能性の一つとして，小脳へ神経投射するノルアドレナリン作動性神経の起始核である青斑核の活性化への作用の違いが，グルコース取り込み能の亢進の差異に関与すると推察された．持続的な運動がマウスの中枢組織でBDNFの増加をもたらすことから，ロバチレリンおよびタルチレリンのBDNF mRNA増加作用には，それらの反復投与による持続的な中枢神経機能の活性化を介した運動機能改善が関与した可能性もある<sup>93)</sup>．本章で見いだされたRMNでのロバチレリンのBDNF mRNA増加作用は，ロバチレリンの運動機能改善作用の新規メカニズムであり，薬物投与後の運動機能改善作用を持続させる一因と考えられた．



SCD 治療において、SCA の病因メカニズムの解析研究は SCD 治療戦略の発展に大きく寄与すると期待される<sup>94),95)</sup>。本試験において、SCA モデル動物で既存の治療薬タルチレリンよりもロバチレリンがより高い治療効果を示したことは、ロバチレリンが SCA 治療における臨床利用に有用であることを提示した。

## 2.5 小括

TRH 誘導体ロバチレリンの投与は、SCA6 患者の運動失調モデル動物 RMN で運動機能を改善した。ロバチレリンの運動機能の改善作用は、既存の SCD 治療薬タルチレリンのそれよりも強力かつ持続性があり、ロバチレリンの臨床利用での有用性が示めされた。ロバチレリンの作用機序として、RMN において、ロバチレリンの投与が、小脳、大脳および脳幹のさまざまな領域でグルコース取り込み能を亢進することで中枢神経系を賦活化し、小脳では BDNF mRNA の発現量を増加させることで神経保護作用を発揮することを示唆した。したがって、ロバチレリンは、SCD の患者で、主要な神経変性部位の小脳への神経活性化と神経保護作用を直接的に発揮するとともに、大脳および脳幹での運動制御に関わる領域の神経活性化を介して、小脳機能を代償的にも制御することが考えられた。

## 第3章 ロバチレリンの孤発性脊髄小脳変性症モデル cytosine arabinoside 誘発運動失調モデルラットにおける運動失調改善作用

### 3.1 序論

脊髄小脳変性症（SCD）は病因から孤発性と遺伝性のタイプに大別され、本邦における疫学調査では、SCD 全体で 67.2% が孤発性 SCD であることが知られている<sup>19),20)</sup>。Cytosine arabinoside（Ara-C）は、急性白血病や膀胱腫瘍治療薬として臨床利用されている一方で、その副作用として高用量で小脳毒性が知られる<sup>96)</sup>。げっ歯類の胎児で、小脳形成期に高曝露されると、小脳の萎縮、顆粒細胞脱落および小脳プルキンエ細胞の配列異常などヒト SCD 患者と共通する小脳の病理学的組織像を示し、小脳失調症状も認められる<sup>96)</sup>。この Ara-C 誘発運動失調モデル動物は、しばしば SCD 治療薬の開発に汎用され、遺伝性ではない孤発性 SCD モデルとして<sup>97),98)</sup>用いられている。本章では、この病態モデルを用い、ロバチレリンの運動機能改善作用を検証し、さらに既存薬タルチレリンとの治療効果の比較検証も行った。本章では、ロバチレリンの運動機能改善作用のメカニズムをさらに検証した。第 2 章では RMN の運動機能の制御に関わる中枢領域の前頭前皮質、線条体および側坐核で脳内グルコース取り込み量の亢進が認められた。そこで、これら領域での細胞外の神経伝達物質アセチルコリンおよびドパミン量に及ぼす薬物投与の効果について検討した。

### 3.2 実験材料と方法

#### 3.2.1 実験動物

雄性 SD ラット（6 週齢）と妊娠雌性 SD ラット（10 週齢、交配後 14 日）を日本 SLC から購入した。雄性ラットは 7 週齢で外科処置手術を行って、8 週齢で *in vivo* マイクロダイアリシス試験に用いた。妊娠雌性ラットから、新生仔を得て、cytosine arabinoside（Ara-C）誘発運動失調モデルラットの作製に用いた。Ara-C を投与された動物は 6 週齢以降で、行動観察試験に用いた。動物は温度（20～26℃）および相対湿度（30～70%）で保たれた飼育室内で 12 時間の明暗サイクル（8 時点灯、20 時消灯）にて飼養され、試験操作に使用するまでは市販の固形飼料 CE-2（日本クレア）と滅菌処理された水道水を与え、自由摂食と自由飲水とした。

本章の全ての動物実験は、キッセイ薬品工業の実験動物委員会の審査・承認を経て、我が国の動物実験のガイドライン動物の愛護および管理に関する法律に従って実施された。

#### 3.2.2 試薬

ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は塩野義製薬から提供された。

ロバチレリン水和物およびタルチレリン水和物は蒸留水を媒体として、5 mL/kg の容量で、それぞれ 1~30 mg/kg および 3~100 mg/kg の投与用量を動物に経口投与した。Cytosine arabinoside (Ara-C, キロサイド注®) は日本新薬 (京都, 日本) から購入した。その他の化学物質は GR (特級) あるいは EP (一級) グレードの市販品を使用した。

### 3.2.3 運動失調モデルラット作製と行動観察試験

新生仔ラットに 65 mg/kg の Ara-C を生後 2 日および 3 日目に 1 日 1 回皮下投与した。Ara-C 投与ラットは 6 週齢まで飼養後、行動観察試験を薬物投与前後に実施した。

移動数 (自発運動量) および転倒数の測定には、円形オープンフィールド試験装置 (直径: 75 cm, 高さ: 40 cm, 区画: 25 区画; 室町機械, 東京, 日本) を用い、3 分間目視で計測した。運動機能改善の主要評価項目である転倒指数は、転倒数を自発運動量にて除することで算出した。自発運動量はオープンフィールド装置の区画を跨いだ回数を、転倒数の転倒状態の判定は第 2 章の RMN の行動観察と同様に 3 分間計測した<sup>99)</sup>。

薬物投与前の行動観察において、運動失調症状の明確な個体を選択するため、転倒指数が 0.5 以上かつ自発運動量が 10 以上となる Ara-C 誘発運動失調モデル個体を選抜した。条件を満たした個体を対象として、SAS System Version 8.2 (SAS Institute) およびその連動プログラムの前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan) を用い、転倒指数および自発運動量を変数とする「多変数によるブロック化割付け」を行い、転倒指数および自発運動量の平均値が近似するように 9 つの試験群 (媒体投与群, ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) 投与群およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) 投与群) に割り付けた。なお、一度に得られる個体の数が限られるため、群分け操作は複数回に分けて行われ、本試験で設定した例数に達するまで試験は繰り返された。一度の試験で得られた個体数が少数であり「多変数によるブロック化割付け」が行えない場合は、その時点における各群の転倒指数の平均値を指標として各試験群に割付けを行った。最終的に、設定した例数に達した段階で、Tukey 検定を行って、自発運動量、転倒数および転倒指数に各群間で有意な差がないことを確認した。

群分け操作に続いて、薬物投与を単回あるいは 2 週間反復投与した後、運動機能改善評価を行動観察にて実施した。行動観察は単回投与後 2 時間目、あるいは 2 週間反復投与後 2 時間目の時点で行った。

単回投与試験では、各群雄 20 例あるいは雌 20 例を評価した。反復投与試験では、反復投与期間中の病態悪化に伴う途中死亡例の発生に伴い、各群雌雄合算で 8~9 例を評価した。

### 3.2.4 *In vivo* マイクロダイアリシス, アセチルコリンおよびドパミン濃度測定

覚醒下, 無拘束での正常ラットにおける前頭前皮質, 背側線条体および側坐核の脳透析サンプルの細胞外アセチルコリンおよびドパミンの回収には, 第1章と同様にマイクロダイアリシス法を用いた. 事前準備として, 脳定位固定手術を7週齢でラットに施し, 8週齢にマイクロダイアリシスを行った.

ラットの透析プローブ固定のためのガイドカニューレ (AG-8; エイコム, 京都, 日本) の埋め込みを麻酔下で第1章同様に行った. Paxinos & Watson の脳図譜<sup>42)</sup>に基づき, 前頭前皮質へは bregma から前方 3.0 mmol/L, 側方 0.6 mmol/L, 硬膜から 2.0 mmol/L の位置に, 背側線条体へは bregma から前方 0.2 mmol/L, 側方 3.0 mmol/L, 硬膜から 3.5 mmol/L の位置に, 側坐核へは bregma から前方 2.2 mmol/L, 側方 1.5 mmol/L, 硬膜から 4.9 mmol/L の位置に, ガイドカニューレを埋め込んだ. カニューレ手術後, 1週間程度 (5~9日間) の回復期間を設けた.

マイクロダイアリシス試験の日に, ガイドカニューレにマイクロダイアリシス透析プローブ (A-I-08-2 または A-I-08-3; エイコム) を挿入した. プローブ内にリンガー液 (147 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 2.3 mmol/L CaCl<sub>2</sub>) を 1 μL/min の流速で灌流した. 前頭前皮質のアセチルコリン測定では, 内標準物質としてイソプロピルホモコリン (IPHC) をリンガー液と混合して送液した. 送液された脳透析サンプルはオートインジェクターのサンプルループへ一時貯留され, 20分毎に高速クロマトグラフ (HPLC, 700 シリーズ; エイコム) へ自動的に注入された. HPLC でのアセチルコリンおよびドパミンの分析条件を Table 4 および Table 5 に示す.

アセチルコリンピークの同定と定量は IPHC を添加したアセチルコリンの標準試料で検量線を作成して, 内部標準法により実施した. ドパミンのピークの同定と定量はドパミンの標準試料で検量線を作成して, 外部標準法により行った.

Table 4 アセチルコリン分析条件

分離カラム	AC-Gel (2.0 mm, I.D. × 150 mm)
酵素カラム	AC-Enzympak II (3.0 mm)
プレカラム	PC-03 CH-GEL (3.0 mm, I.D. × 40 mm)
カラム温度	33°C
移動相	300 mg/L 1-デカンスルホン酸ナトリウムおよび50 mg/L EDTA・2Naを含む50 mmol/Lol/L炭酸水素カリウム溶液
流速	150 μL/min
検出条件	+450 mV vs Ag/AgCl, 作用電極WE-PT (白金電極), ガスケット GS-25P, 検出器 Time Constant 3.0 sec
データ処理装置	EPC-500 (サンプリングレート4 points/sec)
サンプル注入量	24.375 μL
分析時間	16 min
データ解析ソフト	PowerChrom (ADInstruments, New South Wales, Australia)

Table 5 ドパミン分析条件

分離カラム	EICOMPAK CAX(2.0 mm, I.D. × 200 mm)
プレカラム	PREPAKSET-CA (3.0 mm, I.D. × 4 mm)
カラム温度	35°C
移動相	50 mg/L EDTA・2Naおよび0.05 mol/L硫酸ナトリウムを含む0.1 mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) -メタノール (7:3, v/v)
流速	250 µL/min
検出条件	+450 mV vs Ag/AgCl, 作用電極 WE-3G (グラファイト), ガスケット GS-25, 検出器 Time Constant 3.0 sec
データ処理装置	EPC-500 (サンプリングレート4 points/sec)
サンプル注入量	19.5 µL
分析時間	15 min
データ解析ソフト	PowerChrom (ADI Instruments, New South Wales, Australia)

薬物投与前の脳透析サンプル中のアセチルコリンおよびドパミン濃度が安定したことを確認し、ラットへ薬物を経口投与した。データ分析は、薬物投与1時間前（投与前3時点）から投与後6時間目（投与後18時点）まで実施した。薬物投与前の3時点のアセチルコリンあるいはドパミン濃度の平均値をベースライン値として算出し、その値を100%として、各時点でのアセチルコリンおよびドパミン濃度の変化率を示した。投与後0時間目から6時間目までのアセチルコリンおよびドパミン濃度の変化量を積算し、AUC (area under the curve) 値として示した。実験操作終了後、ラットをイソフラン麻酔下 (3%) で放血による安楽死させ、脳を摘出した。プローブ挿入位置を確認し、挿入位置が Paxinos & Watson の脳図譜<sup>42)</sup>に従って正しいことを確認した。

### 3.2.5 統計学的解析

統計解析には、SAS System Version 8.2 (SAS Institute) およびその連動プログラムの前臨床パッケージ Version 5.0 (SAS Institute Japan), あるいは EXSUS (CAC クロア) を使用した。多重比較検定を行う際には、Bartlett 検定を用いて群間の等分散性を確認した。等分散が確認されて、全ての2群間で多重比較検定を行う場合には、Tukey 検定が用いられ、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Dunnett 検定が用いられた。不等分散が確認され、媒体対照群と複数群間での多重比較検定を行う場合には、Steel 検定が用いられた。行動観察評価における雌雄間での比較では、「性別」と「用量」を要因とした二元配置分散分析を用いた。危険率は5%未満で統計学的に有意差ありとした。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 Ara-C 誘発運動失調モデルラットへのロバチレリンの経口投与による運動機能改善評価のための行動観察

媒体, ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) を単回経口投与時の雌雄の Ara-C 誘発運動失調モデルラットで, 性差が運動機能改善作用に及ぼす差異について検討した (Fig. 16).

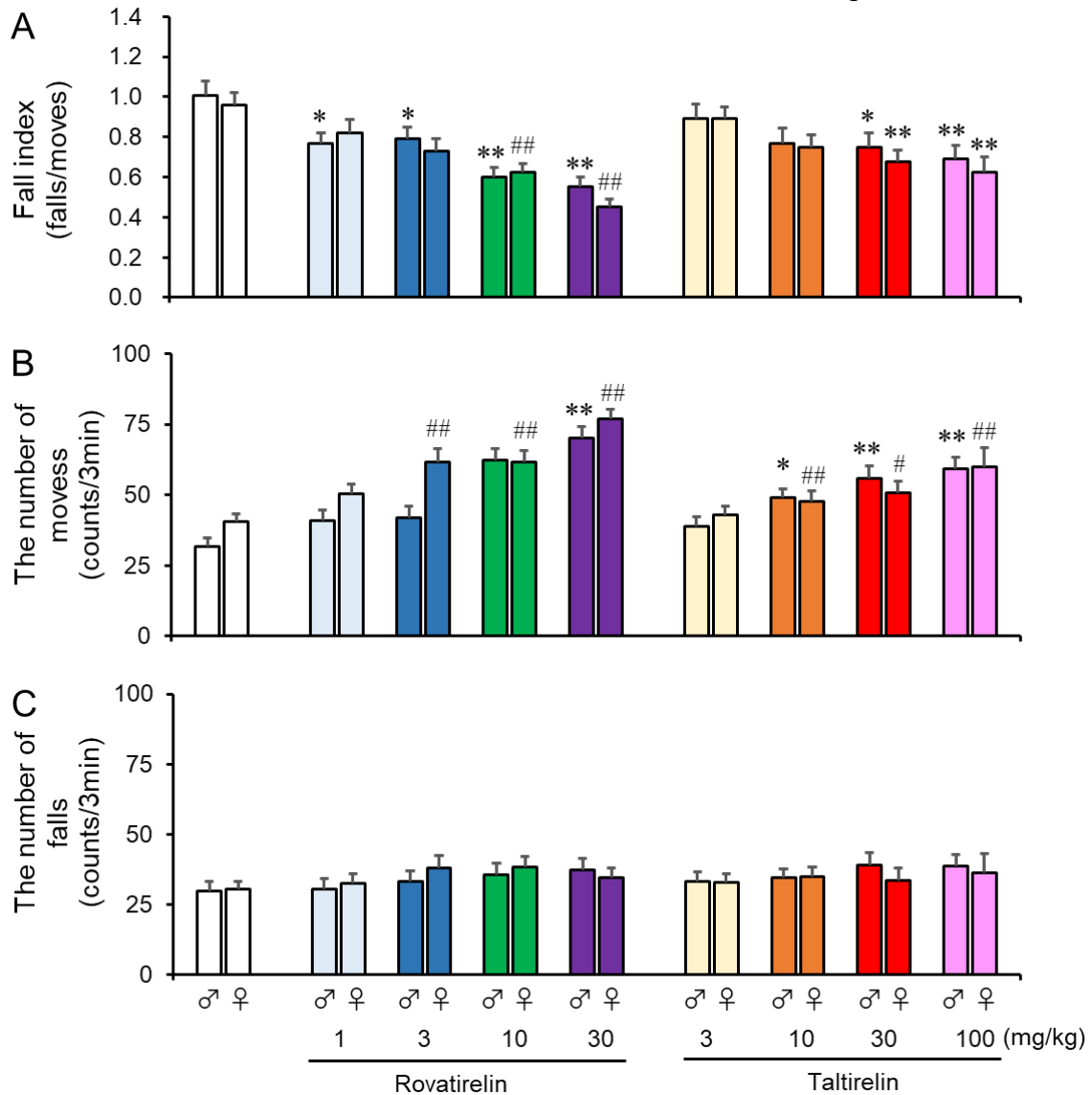


Fig. 16 ロバチレリンおよびタルチレリンの単回経口投与による雌雄の cytosine arabinoside (Ara-C) 誘発運動失調モデルラットへの運動機能改善作用

Ara-C 誘発運動失調モデルラットに媒体 (蒸留水), ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) を単回経口投与し, 投与 2 時間後に行動観察評価した. A: 転倒指数, B: 自発運動量, C: 転倒数の評価結果を示した. データは各群雌雄それぞれ 20 例の mean ± S.E.M.として示す. \*p<0.05, \*\*p<0.01, 媒体群との間の Dunnett 検定. #p<0.05, ##p<0.01, 媒体群との間の Steel 検定.

ロバチレリンは Ara-C 誘発運動失調モデルの雄性ラットで 1 mg/kg 以上，雌性ラットで 3 mg/kg 以上で，運動機能改善作用の主要評価項目転倒指数を用量依存的に減少させた (Fig. 16A)．ロバチレリンは雄性ラットで 10 mg/kg 以上，雌性ラットで 3 mg/kg 以上で自発運動量を亢進したが，転倒数に影響を及ぼさなかった (Fig. 16B, C)．ロバチレリンの転倒指数低下作用と自発運動量増加作用では，効果を示したロバチレリンの最小用量に違いを認めたが，「性別」と「用量」を要因とした二元配置分散分析の結果には，「性別」および「性別」と「用量」の交互作用に統計学的な差はなく，雌雄差は認められなかった．同様に，SCD の既存薬であるタルチレリンも，雌雄の Ara-C 誘発運動失調モデルでそれぞれ 10 mg/kg 以上で用量依存的に転倒指数を減少させ，雌雄差は認められなかった (Fig. 16A)．したがって，ロバチレリンおよびタルチレリンの Ara-C 誘発運動失調モデルラットへの運動機能改善作用に，性差による影響は無いことが示唆された．

ロバチレリンとタルチレリンの間で，運動機能改善作用を比較検討した．ロバチレリンは 1 あるいは 10 mg/kg 以上で，タルチレリンは 30 mg/kg 以上で転倒指数の低下を示した．一方，ロバチレリンの 10 mg/kg 投与群の転倒指数は，雄  $0.60 \pm 0.05$ ，雌  $0.62 \pm 0.05$  に対して，タルチレリンの 100 mg/kg 投与群の転倒指数は，雄  $0.69 \pm 0.07$  雌： $0.62 \pm 0.08$ ) であった．

次に，ロバチレリンの Ara-C 誘発運動失調モデルラットへの運動機能改善作用に及ぼす反復経口投与の効果について検討した (Fig. 17)．2 週間のロバチレリン反復経口投与の結果，10 mg/kg/日のロバチレリン投与群は転倒指数を減少させた．(Fig. 17A) 10 mg/kg/日のロバチレリン投与群は，自発運動量を亢進したが，転倒数に影響を及ぼさなかった (Fig. 17B,C)．1 mg/kg/日および 10 mg/kg/日のロバチレリン 2 週間反復投与後の転倒指数はそれぞれ  $0.89 \pm 0.13$  および  $0.59 \pm 0.11$  であった (Fig. 17A)．また，1 mg/kg および 10 mg/kg のロバチレリン単回経口投与時の転倒指数は，それぞれ  $0.79 \pm 0.04$  および  $0.61 \pm 0.03$  であり，2 週間反復投与時の転倒指数と同等であった．したがって，Ara-C 誘発運動失調モデルラットの病態進行やロバチレリン反復投与による TRH 受容体の脱感作は想定されず，2 週間反復投与によってもロバチレリンの運動機能改善作用が減弱されることはないことが示された．

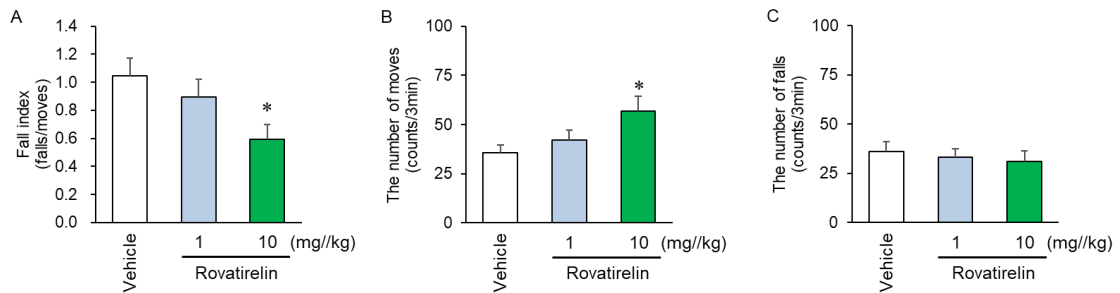


Fig. 17 ロバチレリンの反復経口投与による Ara-C 誘発運動失調モデルラットへの運動機能改善作用

Ara-C 誘発運動失調モデルラットに媒体（蒸留水）、ロバチレリン（1, 3, 10 および 30 mg/kg）およびタルチレリン（3, 10, 30 および 100 mg/kg）を 2 週間反復経口投与し、最終投与 2 時間後に行動観察評価を行った。A：転倒指数，B：自発運動量および C：転倒数の評価結果を示した。データは雌雄合算で各群 9～10 例の mean±S.E.M.として示す。\* $p<0.05$ ，媒体群との間の Dunnett 検定。

### 3.3.2 ロバチレリンの経口投与によるラット前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量への作用

覚醒下無拘束ラットへのロバチレリンおよびタルチレリンの単回経口投与による前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量に及ぼす効果を評価した。媒体、ロバチレリン（1, 3, 10 および 30 mg/kg）およびタルチレリン（3, 10, 30 および 100 mg/kg）の投与前に細胞外アセチルコリン濃度のベースライン値を測定した。ロバチレリンおよびタルチレリン投与による前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量への経時的な変化を Fig.18A に示す。なお、各投与群のベースライン値は  $25.6 \pm 9.9$  から  $38.9 \pm 4.4$  fmol/20 min の範囲にあった。これらの値に差異は検出されなかった。



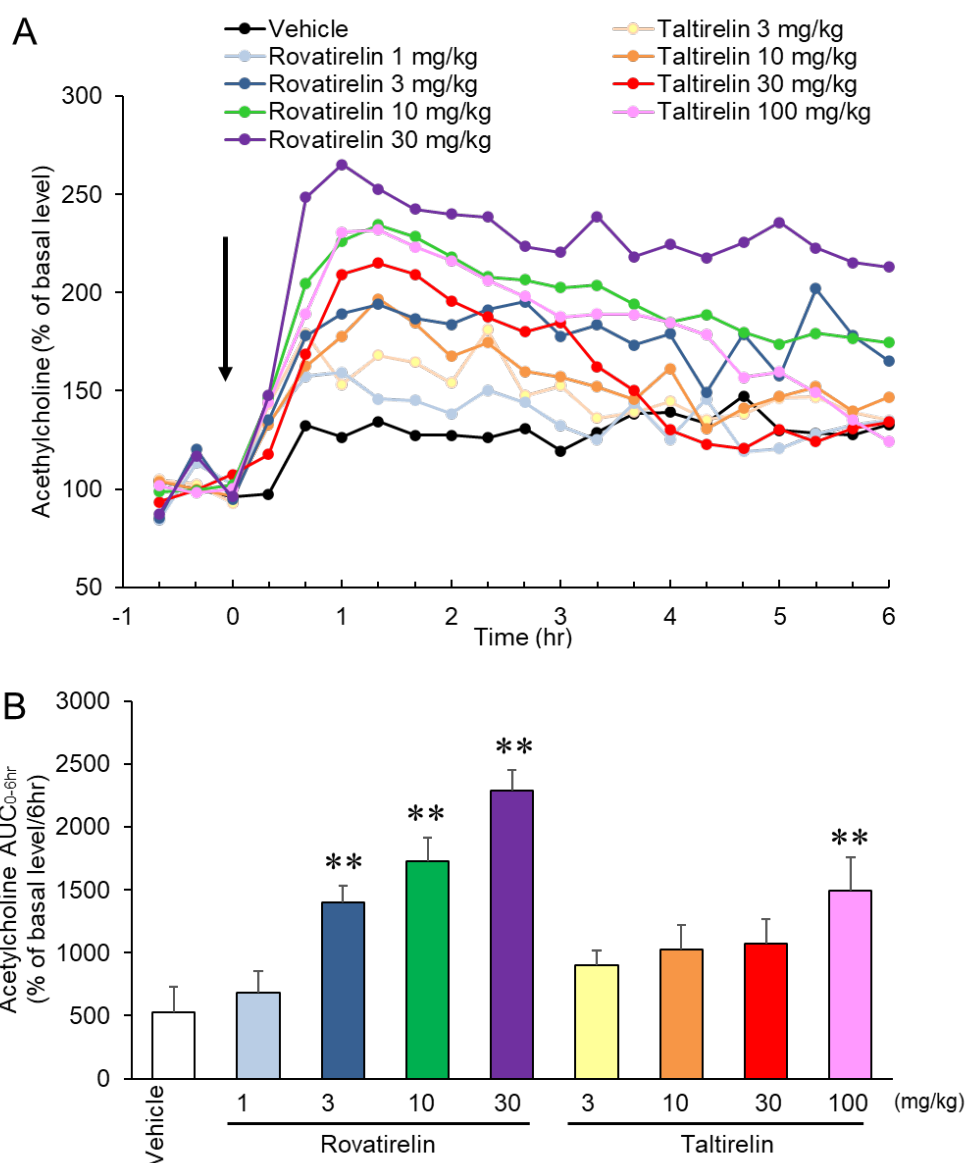


Fig. 18 ロバチレリンおよびタルチレリンの覚醒下無拘束ラットへの単回経口投与による前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量への作用

A: ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 10 mg/kg) の前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量への経時的作用. 投与前の 3 時点 (-40, -20 および 0 分) の平均値を 100% とし、各時点の変化率を示した. 矢印で示した時点で投与を行った. データは各ポイント 8 例の mean で示す. B: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目までアセチルコリン量増加作用の総変化量 (AUC<sub>0-6hr</sub>). データは各群 8 例の mean ± S.E.M.として示す. \*\*p<0.01, 媒体群との間の Dunnett 検定.

媒体投与は投与前のベースライン値を 100% とすると、最大 147.35 ± 16.04% まで細胞外アセチルコリン量が増加した. 本試験は、1 日 1 回測定系のバリデーション後、各個体でのアセチルコリン量が安定したところで、19 時過ぎに投与が実施された. 媒体投与によるアセチルコリンの増加は、投与が 19 時過ぎに行われて測定室の 20 時に消灯され、消灯直後で増加が認められたことから、照度の変化ある

いはサーカディアンリズムによる影響が考えられた。ロバチレリンは 3, 10 および 30 mg/kg の投与後、用量依存的にアセチルコリンを増加させて、それぞれのアセチルコリンレベルの最大値は  $202.06 \pm 24.35\%$ ,  $234.63 \pm 9.77\%$  および  $265.24 \pm 12.94\%$  であった。さらに、3, 10 および 30 mg/kg のロバチレリンは、投与後 6 時間目の時点で、細胞外アセチルコリンレベルが媒体群のそれよりも高い状態にあった (Fig.18A)。一方、1 mg/kg ロバチレリン投与群のアセチルコリンレベルは、媒体投与群のそれと同様の値となった。タルチレリン 3, 10, 30 および 100 mg/kg 投与群でも、タルチレリン投与量の用量依存的にアセチルコリンを増加させた。それぞれのアセチルコリンレベルの最大値は  $181.15 \pm 12.24\%$ ,  $196.88 \pm 14.01\%$ ,  $215.12 \pm 11.81\%$  および  $231.95 \pm 15.53\%$  であった。しかしながら、投与後 6 時間目の時点では、いずれのタルチレリン投与群でも、アセチルコリンレベルは、媒体群のそれと同等であった (Fig.18A)。

媒体、ロバチレリンおよびタルチレリンを投与後 6 時間目までのアセチルコリン量増加作用の総変化量を  $AUC_{0-6hr}$  を Fig.18B に示す。3, 10 および 30 mg/kg ロバチレリン投与群の  $AUC_{0-6hr}$  は、媒体投与群のそれよりも増大した。一方、タルチレリン投与群では、100 mg/kg 投与群でのみ  $AUC_{0-6hr}$  が増大した。3 mg/kg ロバチレリン投与群の  $AUC_{0-6hr}$  と 100 mg/kg タルチレリン投与群のそれとはほぼ同等であった (Fig.18B)。これらの結果から、ロバチレリンはタルチレリンよりもラットで強力かつ持続的な前頭前皮質のアセチルコリン量増加作用を発揮することが示唆された。

ロバチレリンの経口投与によるラット背側線条体の細胞外ドパミン量への作用  
覚醒下無拘束ラットへのロバチレリンおよびタルチレリンの単回経口投与による背側線条体の細胞外ドパミン量に及ぼす効果について評価した。媒体、ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) の投与前に背側線条体の細胞外ドパミン濃度のベースライン値を測定した。ロバチレリンおよびタルチレリン投与後の背側線条体での細胞外ドパミン量の経時的な変化を Fig.19A に示す。なお、各投与群のベースライン値は  $89.5 \pm 10.2$  から  $130.2 \pm 21.0$  fmol/20 min の範囲にあり、これらの値に差異は認められなかった。

媒体投与群では、背側線条体の細胞外ドパミン量に変化は観察されなかった。10 mg/kg および 30 mg/kg ロバチレリン投与群では、それぞれ最大  $131.48 \pm 8.29\%$  および  $125.55 \pm 3.32\%$  に背側線条体の細胞外ドパミンレベルが増加した。加えて、10 mg/kg および 30 mg/kg ロバチレリン投与群のドパミン増加作用は、投与後 6 時間目でも媒体投与群のそれより高いレベルにあった。一方、1 mg/kg および 3 mg/kg ロバチレリン投与群のドパミンレベルは媒体投与群のそれと同等となった。(Fig.19A)。10, 30 および 100 mg/kg タルチレリン投与群では、一過性のドパミンレベル上昇となり、それぞれの最大値は  $111.75 \pm 3.78\%$ ,  $109.85 \pm 4.88\%$  および  $121.27 \pm 5.64\%$  であった (Fig.19A)。

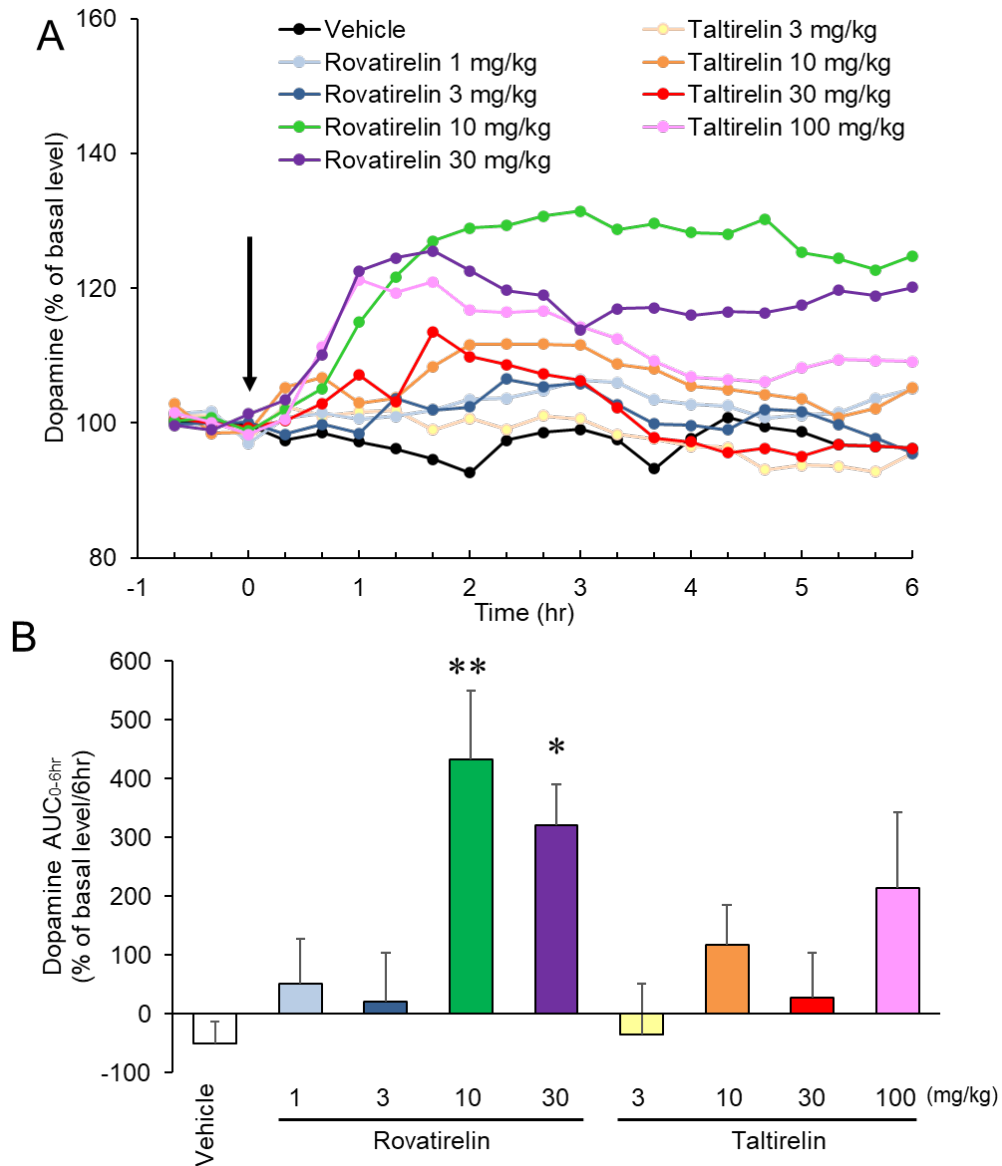


Fig. 19 ロバチレリンおよびタルチレリンの覚醒下無拘束ラットへの単回経口投与による線条体の細胞外ドパミン量への作用

A: ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 10 mg/kg) の線条体の細胞外ドパミン量への経時的作用. 投与前の 3 時点 (-40, -20 および 0 分) の平均値を 100% として, 各時点の変化率を示した. 矢印で示した時点で投与を行った. データは各ポイント 6 例の mean で示す. B: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目までドパミン量増加作用の総変化量 (AUC<sub>0-6hr</sub>). データは各群 6 例の mean ± S.E.M. として示す. \*\*p<0.01, \*p<0.05, 媒体群との間の Dunnett 検定.

媒体, ロバチレリンおよびタルチレリン投与後 6 時間目までの背側線条体のドパミン量増加作用の総変化量 AUC<sub>0-6hr</sub> を Fig.19B に示す. 10 および 30 mg/kg ロバチレリン投与群の AUC<sub>0-6hr</sub> は, 媒体投与群のそれよりも増大した. 一方, タルチレリン投与群の AUC<sub>0-6hr</sub> は, いずれの投与量でも媒体投与群のそれと同等となった. 10

mg/kg ロバチレリン投与群の  $AUC_{0-6hr}$  と 100 mg/kg タルチレリン投与群のそれはほぼ同等であった (Fig.19B). これらの結果から, ロバチレリンはタルチレリンよりもラットで強力かつ持続的な背側線条体のドーパミン量増加作用を発揮することが示唆された.

### 3.3.3 ロバチレリンの経口投与によるラット側坐核の細胞外ドーパミン量への作用

覚醒下無拘束ラットへのロバチレリンおよびタルチレリンの単回経口投与による側坐核の細胞外ドーパミン量に及ぼす効果について評価した. 媒体, ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 100 mg/kg) の投与前に側坐核の細胞外ドーパミン濃度のベースライン値を測定した. ロバチレリンおよびタルチレリン投与後の側坐核での細胞外ドーパミン量への経時的な変化を Fig.20A に示す. なお, 各投与群のベースライン値は  $41.1 \pm 4.9$  から  $70.0 \pm 15.1$  fmol/20 min の範囲にあり, これらの値に差異は認められなかった.

媒体投与群では, 側坐核の細胞外ドーパミン量の変化は観察されなかった. 1, 3, 10 mg/kg および 30 mg/kg ロバチレリン投与群では, それぞれ最大  $118.99 \pm 3.75\%$ ,  $118.95 \pm 5.83\%$ ,  $125.93 \pm 3.57\%$  および  $126.18 \pm 2.50\%$  まで側坐核の細胞外ドーパミンレベルが用量依存的に上昇した. 加えて, 3, 10 mg/kg および 30 mg/kg ロバチレリン投与群でのドーパミン増加作用は, 投与後 6 時間目でも媒体投与群のそれよりも高いレベルが維持されていた (Fig.20A). 30 および 100 mg/kg タルチレリン投与群では, 用量依存的にドーパミンレベルが一過性に上昇し, それぞれの最大値は  $124.31 \pm 4.18\%$  および  $132.04 \pm 7.38\%$  であった (Fig.20A).

媒体, ロバチレリンおよびタルチレリン投与後 6 時間目までの側坐核のドーパミン総変化量  $AUC_{0-6hr}$  を Fig.20B に示す. 3, 10 および 30 mg/kg ロバチレリン投与群では, 媒体投与群のそれよりも  $AUC_{0-6hr}$  が増大した. 一方, タルチレリン投与群の  $AUC_{0-6hr}$  では, いずれの投与量でも媒体群のそれと同等となった. 3 mg/kg ロバチレリン投与群と 30 mg/kg タルチレリン投与群の  $AUC_{0-6hr}$  値は, ほぼ同等になった (Fig.20B). これらの結果から, ロバチレリンはラットでタルチレリンよりも強力かつ持続的な側坐核のドーパミン量増加作用を発揮することが示唆された.

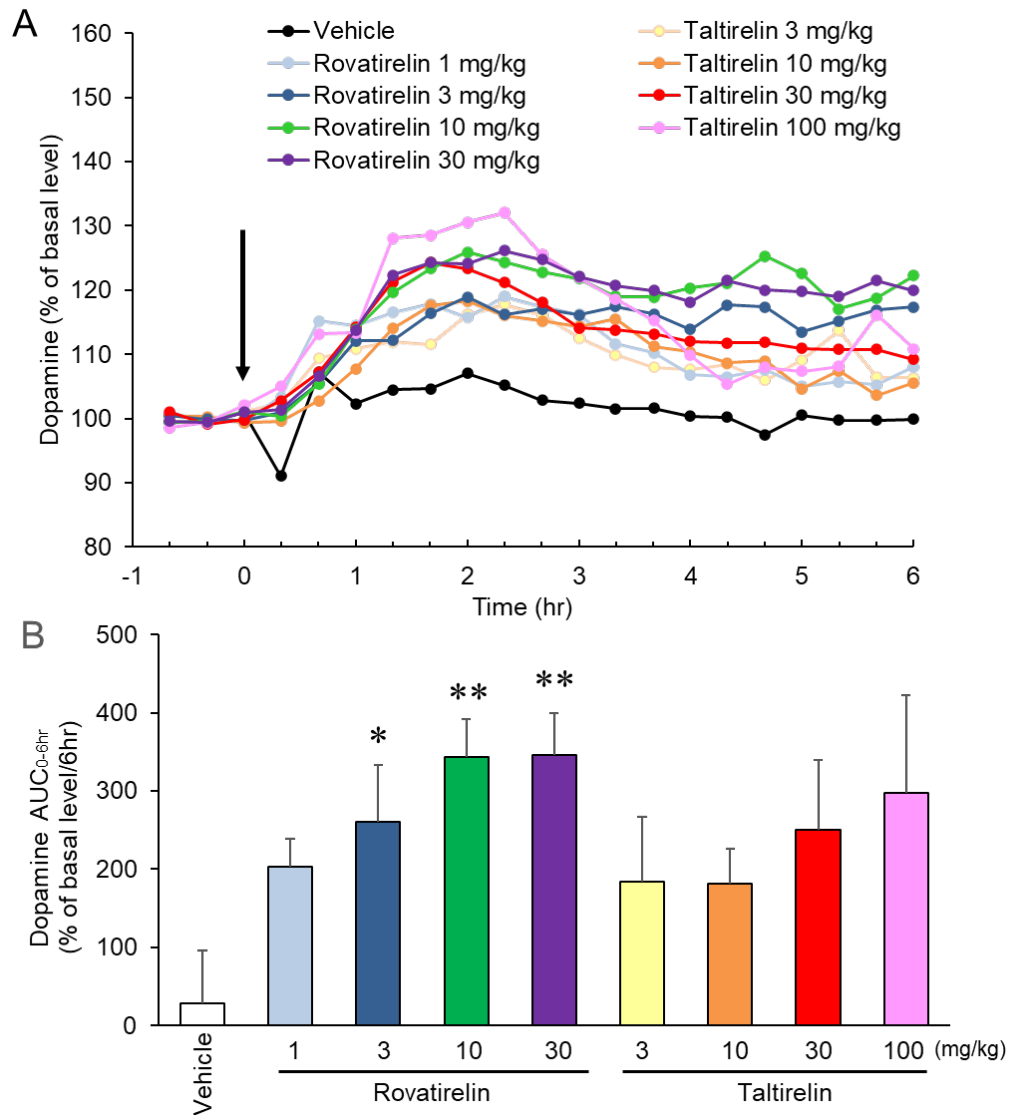


Fig. 20 ロバチレリンおよびタルチレリンの覚醒下無拘束ラットへの単回経口投与による側坐核の細胞外ドパミン量への作用

A: ロバチレリン (1, 3, 10 および 30 mg/kg) およびタルチレリン (3, 10, 30 および 10 mg/kg) の側坐核の細胞外ドパミン量への経時的作用. 投与前の3時点 (-40, -20 および 0 分) の平均値を 100% として, 各時点の変化率を示した. 矢印で示した時点で投与を行った. データは各ポイント 6 例の mean で示す. B: ロバチレリン, タルチレリンおよび媒体 (蒸留水) の投与後 6 時間目までドパミン量増加作用の総変化量 (AUC<sub>0-6hr</sub>). データは各群 6 例の mean ± S.E.M.として示す. \*\*p<0.01, \*p<0.05, 媒体群との間の Dunnett 検定.

### 3.4 考察

孤発性 SCD モデルとしての Ara-C 誘発運動失調ラットの運動失調症状に及ぼすロバチレリンの運動機能改善効果について検証した. ロバチレリンの経口投与は, Ara-C 誘発運動失調ラットの自発運動量を促進することで, 転倒指数を減少させ, その運動機能を改善した. このロバチレリンの運動機能改善作用は, SCD の既存

薬タルチレリンよりも有効であることが示唆された。さらに、ロバチレリンは前頭前皮質のアセチルコリン、背側線条体および側坐核のドパミンを増加させることで、運動機能を改善する可能性も示された。

SCD は進行性の小脳運動失調症状を特徴とする神経変性疾患の総称である<sup>100)</sup>。本邦における 2002 年度の疫学調査では、SCD 患者のうち 68.2% が孤発性 SCD であると報告されていることから<sup>19),20)</sup>、本試験では、孤発性 SCD モデルの Ara-C 誘発運動失調ラットにおけるロバチレリンの運動機能改善効果について検証した。Ara-C を投与された運動失調症状のラットでは、小脳の萎縮、小脳顆粒細胞の脱落およびプルキンエ細胞層の不整列などの所見が関与している。これら所見はヒトでの孤発性 SCD の病状を反映している<sup>102),103),104)</sup>。ロバチレリンの単回経口投与は転倒指数を減少させた。これは、自発運動を促進して、転倒数には影響せず、ロバチレリンの経口投与が孤発性 SCD の治療に有益であることを示唆した。ロバチレリンの運動機能改善作用は、用量ベースでタルチレリンのそれよりも強力であることも示した。さらに、ロバチレリンの運動機能改善作用は 2 週間にわたる反復投与でも、減弱は認められなかったことから、ロバチレリンの反復投与が TRH 受容体の脱感作あるいは薬物耐性を生じることなく、運動機能に及ぼす効果が維持されることを示した。同様に、第 2 章において、遺伝性 SCD モデル RMN にもロバチレリンは運動機能改善作用を単回および 2 週間の反復経口投与で、タルチレリン投与よりも低用量で効果が発揮されることを示した。したがって、ロバチレリンは、様々な SCD の病態に治療効果をもたらす可能性が提示された。

ロバチレリンが青斑核のノルアドレナリン作動性神経を活性化し、前頭前皮質のノルアドレナリン量を増加させることを第 1 章で示した。一方、前頭前皮質のコリン作動性（アセチルコリン）神経、線条体および側坐核でのドパミン作動性神経は、運動制御に直接的あるいは間接的に関与する。第 2 章では、ロバチレリンが RMN の運動機能改善する際に、前頭前皮質、線条体および側坐核の脳内グルコース取り込み能を亢進することを示した。そこで、SCD でのロバチレリンの運動機能改善のメカニズムを明らかにするため、本章では、ロバチレリンの Ara-C 誘発運動失調ラット前頭前皮質でのアセチルコリン量ならびに背側線条体および側坐核でのドパミン量に及ぼす効果について検証した。タルチレリンの腹腔内投与は、海馬のアセチルコリン量を増加させ、かつアセチルコリン代謝を亢進させると報告されている<sup>105)</sup>。しかしながら、海馬は記憶・学習に関わる中枢領域であり、運動機能制御への直接的な役割は不明確である<sup>106)</sup>。注目すべきことに、本研究では、ロバチレリンおよびタルチレリン投与が、前頭前皮質のアセチルコリン量を増加させた。前頭前皮質は、神経線維の求心性・遠心性の投射を介して、大脳皮質および皮質下の脳領域と接続して、運動、不安、認知、情動および社会性などの行動機能を制御する<sup>107)</sup>。前頭前皮質は、運動機能障害を特徴とするパーキンソン病での治療ターゲットと考えられている視床下核と密接に相互作用の関係を構築し

ている。視床下核の高周波脳深部刺激療法は、パーキンソン病患者において運動や認知機能改善効果をもたらす。その際、視床下核の神経活動が前頭前皮質の神経活動と同調して働いていることが示されている<sup>107),108)</sup>。加えて、ラットの前頭前皮質におけるアセチルコリン量の経時的プロファイルを24時間にわたって測定した結果、自発運動量とアセチルコリン量の間には正の相関があることも示されている<sup>109)</sup>。したがって、ロバチレリンの前頭前皮質アセチルコリン増加作用は、運動機能改善作用に一部関与していると推察された。

背側線条体は不随意運動の制御を行っており、線条体のドパミン濃度の低下に伴う機能障害はパーキンソン病の誘因となる<sup>110),111)</sup>。遺伝性SCD患者SCA1, SCA2, SCA3, SCA6およびSCA17の遺伝性SCD患者の一部では、パーキンソン病様症状を有することが知られている。これら患者では、ドパミン作動性神経やドパミントランスポーターの機能が低下していることも報告されている<sup>112),113)</sup>。SCA6の患者で、パーキンソン病様症状を発症する患者だけではなく、発症していない患者でもドパミン作動性神経の機能低下が起きているとの報告もある<sup>114)</sup>。加えて、タルチレリンはパーキンソンモデルラットで、持続的にドパミン作動性神経を活性化することで運動機能を改善することが示唆されている<sup>115)</sup>。これらの知見から、ロバチレリン投与後の背側線条体でのドパミン量増加作用は、運動失調モデル動物における不随意運動の改善に寄与することが示唆された。

側坐核は腹側被蓋野からドパミン作動性神経投射を受け、ドパミン濃度に依存して情動行動および自発運動量を制御する中枢領域である<sup>116),117)</sup>。脊髄損傷後のサル運動機能回復の早期に側坐核のドパミン作動性神経を刺激すると、運動機能をつかさどる大脳皮質運動野の活動が活性化され、運動機能の回復を促進させる効果（リハビリによる回復効果を高める作用）について報告されている<sup>118)</sup>。したがって、これらの知見は、ロバチレリンの側坐核におけるドパミン増加作用が、運動失調モデル動物の運動機能改善作用に関連する可能性を示すと考えられた。

ロバチレリンの背側線条体および側坐核へのドパミン増加作用が直接的あるいは間接的作用かは本研究では明らかとされていない。しかしながら、TRH類縁体の側坐核への直接的投与は運動機能を亢進させることが示されており、TRH類縁体は側坐核および線条体のスライス組織においてもドパミン放出および代謝亢進を促進することが知られる<sup>119)</sup>。さらに、ラットの側坐核へのTRHの注入投与は、側坐核のドパミン放出を促進する<sup>119)</sup>。したがって、ロバチレリンは、直接的に背側線条体および側坐核でのドパミン増加作用をもたらすことが推察される。一方、第2章の脳中グルコース取り込み能の亢進作用では、線条体および側坐核へ投射するドパミン作動性神経の起始核である黒質や腹側被蓋野への作用も認められたことから、直接的だけではなく、間接的にも背側線条体および側坐核でのドパミン増加作用を制御することが推察された。

本章では、ロバチレリンとタルチレリンのSCDモデル動物への運動機能改善効

果の差異を示した。両薬物の差異は前頭前皮質のアセチルコリンならびに背側線条体および側坐核のドーパミンの増加作用の違いによる可能性も提示することができた。Kobayashi らは、ロバチレリンの経口吸収性や脳透過性、脳代謝安定性がタルチレリンよりも優れていることを示した<sup>29)</sup>。さらに、1章においてロバチレリンのヒト TRH 受容体への親和性がタルチレリンの約 5 倍であることを示している<sup>84)</sup>。したがって、これらロバチレリンとタルチレリンの運動機能改善作用の差異は、上記の薬物の化学的・構造的な特徴および TRH 受容体への親和性の差異の複合的な要因により生じたと推察された。

以上、ロバチレリンは孤発性 SCD モデル Ara-C 誘発運動失調ラットの運動機能を改善し、それらの有益な作用はロバチレリンの前頭前皮質のアセチルコリン増加作用ならびに背側線条体および側坐核のドーパミン増加作用によってもたらされる可能性が示された。

### 3.5 小括

TRH 誘導体ロバチレリンの投与は、ヒトの孤発性 SCD を模した運動失調モデル動物 Ara-C 誘発運動失調ラットの運動機能を改善した。ロバチレリンは前頭前皮質の細胞外アセチルコリン量ならびに背側線条体および側坐核の細胞外ドーパミン量を増加させ、これらの増加作用はタルチレリンよりも強力かつ持続性があることが示された。この運動機能への作用は、既存の SCD 治療薬タルチレリンよりも強力であることも示された。



## 総括

本研究では、ロバチレリンの SCD 治療薬への可能性について検討するため、ロバチレリンの中枢作用メカニズムの解析および SCD モデル動物への運動機能改善作用を評価した。

第 1 章では、*in vitro* 実験系にてロバチレリンのヒト TRH 受容体への結合親和性を評価するとともに、正常ラットを用いて中枢ノルアドレナリン神経系を介した運動機能亢進作用について検討した。ロバチレリンはヒト TRH 受容体への高い親和性を示し、その親和性はタルチレリンのそれの約 5 倍高かった。ロバチレリンはラット脳から単離された青斑核のノルアドレナリン作動性神経を電気生理学的に活性化した。このノルアドレナリン作動性神経の賦活化作用もタルチレリンのよりも強力であった。加えて、ラットへのロバチレリンの経口投与は青斑核での c-Fos 陽性発現細胞を増加させたことから、青斑核を活性化することも示された。ラットへのロバチレリンの経口投与は、青斑核からのノルアドレナリン作動性神経投射先である前頭前皮質において細胞外ノルアドレナリン量を増加させた。これは、ノルアドレナリン作動性神経細胞からのノルアドレナリン遊離を促進させたことによると考えられた。ロバチレリンによるノルアドレナリン増加作用は、タルチレリンのそれよりも強力かつ持続性も見出した。さらに、ラットへのロバチレリンの経口投与は、タルチレリンの経口投与よりも強力かつ持続的に自発運動量を増加させた。これらの結果からロバチレリンは TRH 受容体を介した強力かつ持続的な中枢ノルアドレナリン作動性神経の賦活作用を介して、SCD での運動機能を改善させることが示唆された。

第 2 章では、遺伝性 SCD のモデル動物である RMN にロバチレリンを単回および反復経口投与し、運動機能改善作用に及ぼす効果を評価した。さらに、ロバチレリンの運動機能改善作用のメカニズムを探索する局所脳内グルコース代謝および脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現に及ぼすロバチレリンの効果について検討した。RMN へのロバチレリンの単回経口投与は、転倒指数を低下させたことから、運動失調を改善することが示された。加えて、2 週間の反復経口投与後でも運動機能の改善作用が減弱しなかったことから、薬物への耐性は生じないことが示された。さらに、その後の休薬期間においても持続的な運動機能の改善作用も認められた。ロバチレリンの経口投与後には、RMN の青斑核、前頭皮質、前帯状皮質、二次運動野および小脳中核をはじめとした様々な脳領域が賦活化された。RMN への反復経口投与により、小脳の BDNF 遺伝子の発現レベルが上昇することも確認した。これらの結果から、遺伝性 SCD モデル動物において、ロバチレリンはタルチレリンよりも強力な運動機能改善作用を示し、その作用発現メカニズムとして、SCD の病因の中心である小脳を含めた様々な脳領域を活性化するとともに、神経変性の保護作用をもつ BDNF を増加させることが考えられた。したがって、ロバチレリンは、タルチレリンよりも経口投与可能な遺伝性 SCD の治療薬となる可能性

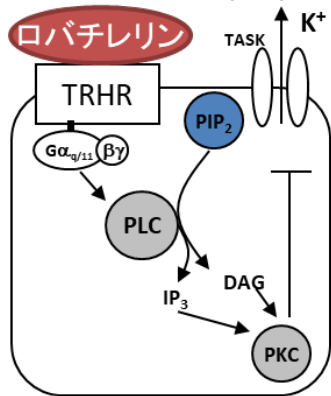
が示された。

第3章では、ロバチレリンを孤発性 SCD のモデル動物の Ara-C 誘発運動失調ラットに単回および反復経口投与し、行動観察による運動機能改善作用を評価した。さらに、第2章でロバチレリンにより活性化される前頭前皮質、背側線条体および側坐核における細胞外アセチルコリンおよびドパミン量に及ぼす効果について検討した。Ara-C 誘発運動失調ラットへのロバチレリンの経口投与により、転倒指数を減少させたことから、運動機能の改善されることが示された。ロバチレリンの Ara-C 誘発運動失調ラットへの運動機能改善作用は、RMN を用いた第2章の結果と同様に、反復投与による運動機能改善効果の減弱は認められなかった。ラットへのロバチレリンの経口投与は、前頭前皮質における細胞外アセチルコリン量ならびに背側線条体および側坐核の細胞外ドパミンを持続的に増加させた。これらの結果から、ロバチレリンは、経口投与可能な孤発性 SCD 治療薬となる可能性が示された。

本研究では、新規 TRH 誘導体ロバチレリンの SCD 治療薬としての可能性について検討した。ロバチレリンの運動機能改善作用に関する作用メカニズムとして、TRH 受容体刺激を介して、中枢の様々な領域のノルアドレナリン、アセチルコリンおよびドパミン作動性神経の活動を活性化することを示した (Fig.21)。ロバチレリンは SCD での主要な神経変性部位である小脳領域およびそれ以外の中枢領域で運動制御に関わる様々な領域の機能を亢進することで、小脳の機能を直接的あるいは代償的に制御して、SCD の運動機能を改善すると考えられた (Fig.21)。ロバチレリン反復投与は、神経保護作用因子 BDNF を増加させることも示し、ロバチレリンのこれら指標に対する効果は、既存の SCD 治療薬タルチレリンのそれらよりも強力であることを示した。本研究では、新規 TRH 誘導体ロバチレリンが孤発性および遺伝性の SCD 治療薬として有用性を提示することができた。

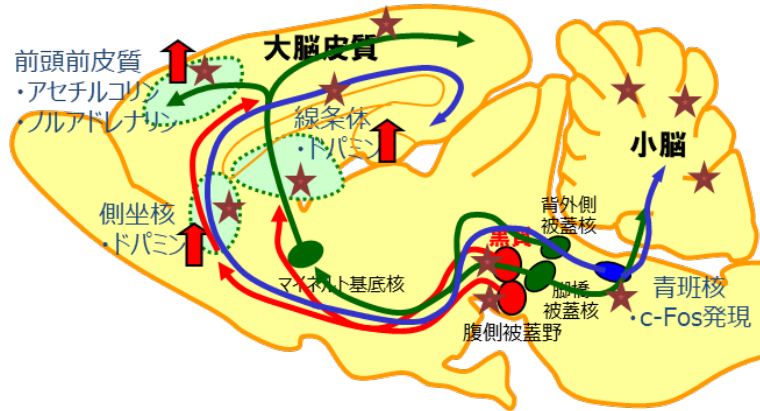
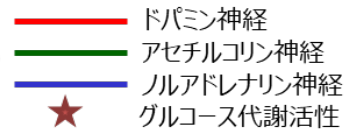
### 細胞レベル

- ・ヒトTRH受容体結合試験 (1章)
- ・電気生理学的試験 (1章)



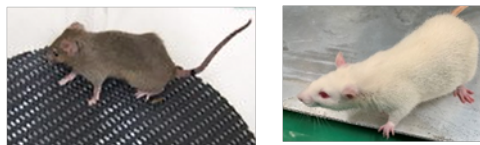
### 脳組織レベル

- ・ノルアドレナリン測定試験 (1章)
- ・アセチルコリン測定試験 (3章)
- ・脳内局所グルコース代謝活性 (2章)
- ・青斑核 c-FOS発現 (1章)
- ・BDNF遺伝子発現 (2章)



### 動物個体レベル

- ・正常ラット運動量測定試験 (1章)
- ・RMN行動観察試験 (2章)
- ・Ara-C誘発運動失調ラット行動観察試験 (3章)



運動機能改善作用

Fig. 21 ロバチレリンの薬効薬理作用メカニズム

ロバチレリンは、TRH 受容体に親和性を示し、TRH 受容体を介して、ノルアドレナリン作動性神経を賦活化する。ロバチレリンは、小脳および運動機能の制御に関与する中枢領域の脳内グルコース取り込み能を亢進する。ノルアドレナリン作動性神経、コリン作動性（アセチルコリン）神経およびドパミン作動性神経の賦活化により、前頭前皮質のノルアドレナリンおよびアセチルコリン量、ならびに線条体および側坐核のドパミン量を増加させる。小脳では、神経保護作用をもつ BDNF 遺伝子の発現を上昇させる。ロバチレリンはこれらの薬理作用メカニズムによって、正常ラットでの運動量増加作用および SCD モデル動物（RMN および Ara-C 誘発運動失調ラット）の運動機能の改善作用を発揮する。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本学位論文の発表の機会と多大なるご指導ご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部病態生理学教室教授 市田 公美 先生に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際して、共同研究の機会と資料の提供をいただくとともに有益なご助言いただきました自然科学研究機構生理学研究所所長 鍋倉 淳一 先生，北里大学医療衛生学部生理学教室教授 石橋 仁 先生，同教室准教授 緒形 雅則 先生，豊橋創造大学保健医療学部理学療法学科講師 中村 佳代 先生，大塚製薬株式会社中枢神経疾患研究所 稲田 浩之 先生に深く感謝申し上げます。

本研究に際して、多大なるご支援と発表の機会を与えてくださいましたキッセイ薬品工業株式会社 代表取締役 神澤 陸雄 会長並びに代表取締役 竹花 泰雄 社長に心よりお礼申し上げます。

本研究に際して、実験実施ならびに論文作成のご指導とご助言をいただきましたキッセイ薬品工業株式会社研究統括部 木口 純好 博士に深く感謝いたします。本研究に際して、ご支援とご援助いただきました神澤医学研究振興財団常務理事 小林 護 博士，信頼性保証本部 丸山 和容 博士，薬物動態研究所所長 安倍 美和 博士，経営企画部 矢口 篤 氏，安全性研究部 横山 綾香 氏並びに共同開発提携先の塩野義製薬株式会社の関係者の皆様に感謝いたします。

## 主論文目録

本学位論文は以下の学術論文を主論文とした。

- 1) Ijiro T, Nakamura K, Ogata M, Inada H, Kiguchi S, Maruyama K, Nabekura J, Kobayashi M, Ishibashi H. Effect of rovatirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on the central noradrenergic system. *Eur J Pharmacol.* **761**, 413-422 (2015). doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.047.
- 2) Ijiro T, Yaguchi A, Yokoyama A, Abe Y, Kiguchi S. Ameliorating effect of rovatirelin on the ataxia in rolling mouse Nagoya. *Eur J Pharmacol.* **882**, 173271 (2020). doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173271.
- 3) Ijiro T, Yaguchi A, Yokoyama A, Kiguchi S. Rovatirelin ameliorates motor dysfunction in the cytosine arabinoside-induced rat model of spinocerebellar degeneration via acetylcholine and dopamine neurotransmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **49**, 950-958 (2022). doi: 10.1111/1440-1681.13675.

## 参考文献

- 1) Bøler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Shally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun.* **37**, 705-710 (1969).
- 2) Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, Guillemin R. Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature* **226**, 321-325 (1970).
- 3) Griffiths EC. Thyrotrophin releasing hormone: endocrine and central effects. *Psychoneuroendocrinology.* **10**, 225-235 (1985).
- 4) Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr Physiol.* **6**, 1387-1428 (2016).
- 5) Jackson IM. Thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med.* **306**, 145-155 (1982).
- 6) Morley JE. Extrahypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) -- its distribution and its functions. *Life Sci.* **25**, 1539-1550 (1979).
- 7) Koch Y, Okon E. Localization of releasing hormones in human brain. *Int Rev Exp Pathol.* **19**, 45-62 (1979).
- 8) Low WC, Roepke J, Farber SD, Hill TG, Sattin A, Kubek MJ. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neurosci Lett.* **103**, 314-319 (1989).
- 9) Gáspár E, Hardenbicker C, Bodó E, Wenzel B, Ramot Y, Funk W, Kromminga A, Paus R. Thyrotropin releasing hormone (TRH): a new player in human hair-growth control. *FASEB J.* **24**, 393-403 (2010).
- 10) Nilni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev.* **20**, 599-648 (1999).
- 11) Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of Thyrotropin Releasing Hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimers Dis (Columbia).* **1**, 10.7726/ajad.2013.1003 (2013).
- 12) Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci.* **13**, 29-35 (1992).
- 13) Pitts LH, Ross A, Chase GA, Faden AI. Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries. *J Neurotrauma.* **12**, 235-243 (1995).
- 14) Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci.* **62**, 1443-1448 (1998).
- 15) Vetulani J, Nalepa I. Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol.* **405**, 351-363 (2000).
- 16) Kubek MJ, Garg BP. Thyrotropin-releasing hormone in the treatment of intractable epilepsy. *Pediatr Neurol.* **26**, 9-17 (2002).
- 17) Luo L, Stopa EG. Thyrotropin releasing hormone inhibits tau phosphorylation by dual signaling pathways in hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis.* **6**, 527-536 (2004).
- 18) 水澤 英洋. 脊髄小脳変性症とその分類. *Clin Neurosci.* **35**, 1050-1052 (2017).
- 19) Tsuji S, Onodera O, Goto J, Nishizawa M; Study Group on Ataxic Diseases. Sporadic ataxias in Japan--a population-based epidemiological study. *Cerebellum.* **7**, 189-197 (2008).
- 20) Takeichi N. Spinocerebellar degeneration (SCD). *Equilibrium Res.* **74**, 159-165 (2015).

- 21) Klockgether T, Mariotti C, Paulson HL. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*. **5**, 24 (2019).
- 22) Sobue I, Takayanagi T, Nakanishi T, Tsubaki T, Uono M, Kinoshita M, Igata A, Miyazaki M, Yoshida M, Ando K, et al. Controlled trial of thyrotropin releasing hormone tartrate in ataxia of spinocerebellar degenerations. *J Neurol Sci*. **61**, 235-248 (1983).
- 23) Horita A, Carino MA, Lai H. Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **26**, 311-332 (1986).
- 24) Meena CL, Thakur A, Nandekar PP, Sharma SS, Sangamwar AT, Jain R. Synthesis and biology of ring-modified l-Histidine containing thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogues. *Eur J Med Chem*. **111**, 72-83 (2016).
- 25) Kobayashi N, Sato N, Fujimura Y, Kihara T, Sugita K, Takahashi K, Koike K, Sugawara T, Tada Y, Nakai H, Yoshikawa T. Discovery of the Orally Effective Thyrotropin-Releasing Hormone Mimetic: 1-{N-[(4S,5S)-(5-Methyl-2-oxooxazolidine-4-yl)carbonyl]-3-(thiazol-4-yl)-l-alanyl}-(2R)-2-methylpyrrolidine Trihydrate (Rovatiirelin Hydrate). *ACS Omega*. **3**, 13647-13666 (2018).
- 26) Khomane KS, Meena CL, Jain R, Bansal AK. Novel thyrotropin-releasing hormone analogs: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. **21**, 1673-1691 (2011).
- 27) 金澤一郎, 里吉栄二郎, 平山恵造, 高柳哲也, 高橋和郎, 古和久幸, 田代邦雄, 納光弘, 清水夏繪, 加知輝彦, 中島光好. Taltirelin hydrate(TA-0910)の脊髄小脳変性症への臨床評価 - プラセボを対照とした臨床第 III 相二重盲検比較試験 - *臨床医薬*. **13**, 4169-4224 (1997).
- 28) Yokohama S, Yamashita K, Toguchi H, Takeuchi J, Kitamori N. Absorption of thyrotropin-releasing hormone after oral administration of TRH tartrate monohydrate in the rat, dog and human. *J Pharmacobiodyn*. **7**, 101-111 (1984).
- 29) Kobayashi K, Abe Y, Harada H, Oota E, Endo T, Takeda H. Non-clinical pharmacokinetic profiles of rovatirelin, an orally available thyrotropin-releasing hormone analogue. *Xenobiotica*. **49**, 106-119 (2019).
- 30) Nishizawa M, Onodera O, Hirakawa A, Shimizu Y, Yamada M; Rovatiirelin Study Group. Effect of rovatirelin in patients with cerebellar ataxia: two randomised double-blind placebo-controlled phase 3 trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **91**, 254-262 (2020).
- 31) Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**, 9514-9518 (1990).
- 32) Cao J, O'Donnell D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*. **273**, 32281-32287 (1998).
- 33) Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwaasa H, Kanatani A, Borkowski J, Ihara M, Ohta M. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. **250**, 68-71 (1998).
- 34) Sun Y, Lu X, Gershengorn MC. Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences. *J Mol Endocrinol*. **30**, 87-97 (2003).
- 35) Matre V, Karlsen HE, Wright MS, Lundell I, Fjeldheim AK, Gabrielsen OS, Larhammar D, Gautvik KM. Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. **195**, 179-185 (1993).
- 36) Benarroch EE. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res*. **373**, 221-232 (2018).

- 37) Ishibashi H, Nakahata Y, Eto K, Nabekura J. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone. *J Physiol.* **587**, 5709-2572 (2009).
- 38) Keller HH, Bartholini G, Pletscher A. Enhancement of cerebral noradrenaline turnover by thyrotropin-releasing hormone. *Nature.* **248**, 528-529 (1974).
- 39) Itoh Y, Ogasawara T, Yamazaki A, Ukai Y, Miura A, Kimura K. Enhancement of noradrenaline release from rat frontal cortex by thyrotropin releasing hormone and its analog, (3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinylcarbonyl-L-histidyl-L-prolinamide, as studied by intracerebral microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther.* **268**, 255-261 (1994).
- 40) Itoh Y, Yamazaki A, Ukai Y, Yoshikuni Y, Kimura K. Enhancement of brain noradrenaline and dopamine turnover by thyrotropin-releasing hormone and its analogue NS-3 in mice and rats. *Pharmacol Toxicol.* **78**, 421-428.
- 41) Heal DJ, Stoodley N, Elliott JM, Marsden CA, Bennett GW, Youdim MB. Behavioural and biochemical evidence for the release of noradrenaline in mouse brain by TRH and some of its biologically stable analogues. *Neuropharmacology.* **26**, 313-322 (1987).
- 42) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.), 0-12-547612-4, Academic Press, New York. (2007).
- 43) Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE. cFos immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem.* **42**, 1635-1642 (1994).
- 44) Le WW, Berghorn KA, Rassnick S, Hoffman GE. Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. *Endocrinology.* **140**, 510-519 (1999).
- 45) Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kato A, Kusumi I, Koyama T. Effect of triiodothyronine (T(3)) augmentation of acute milnacipran administration on monoamine levels: an in vivo microdialysis study in rats. *Neuropsychiatr Dis Treat.* **8**, 501-507 (2012).
- 46) Deng PY, Porter JE, Shin HS, Lei S. Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. *J Physiol.* **577**, 497-511 (2006).
- 47) Parmentier R, Kolbaev S, Klyuch BP, Vandael D, Lin JS, Selbach O, Haas HL, Sergeeva OA. Excitation of histaminergic tuberomamillary neurons by thyrotropin-releasing hormone. *J Neurosci.* **29**, 4471-4483 (2009).
- 48) Duthie SM, Taylor PL, Anderson L, Cook J, Eidne KA. Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor. *Mol Cell Endocrinol.* **95**, R11-5 (1993).
- 49) Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods.* **29**, 261-265 (1989).
- 50) Miyamoto M, Nagawa Y. Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *Eur J Pharmacol.* **44**, 143-152 (1977).
- 51) Yamamura M, Kinoshita K, Nakagawa H, Tanaka T, Maeda K, Ishida R. Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog, (I): Effects on the central nervous system by oral administration. *Jpn J Pharmacol.* **53**, 451-461 (1990).
- 52) Kinoshita K, Yamamura M, Suzuki MMOL/Latsuoka Y. Taltirelin hydrate (TA-0910): an orally active thyrotropin-releasing hormone mimetic agent with multiple actions. *CNS Drug Rev.* **4**, 25-41 (1998).
- 53) Thirunarayanan N, Raaka BM, Gershengorn MC. Taltirelin is a superagonist at the



- human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **3**, 120 (2012).
- 54) 山村道夫, 鈴木護, 松本和男. TRH 系ペプチド (タルチレリン) の合成とその薬理活性. *日薬理誌*. **110**, 33-38 (1997).
- 55) de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F. Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *J Biol Chem*. **267**, 25703-25708 (1992).
- 56) Manaker S, Winokur A, Rostene WH, Rainbow TC. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *J Neurosci*. **5**, 167-174 (1985).
- 57) Eskay RL, Long RT, Palkovits M. Localization of immunoreactive thyrotropin releasing hormone in the lower brainstem of the rat. *Brain Res*. **277**, 159-162 (1983).
- 58) Pammer C, Görcs T, Palkovits M. Peptidergic innervation of the locus coeruleus cells in the human brain. *Brain Res*. **515**, 247-255 (1990).
- 59) Chung L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. *Dev Reprod*. **19**, 61-67 (2015).
- 60) Ohashi K, Hamamura T, Lee Y, Fujiwara Y, Suzuki H, Kuroda S. Clozapine- and olanzapine-induced Fos expression in the rat medial prefrontal cortex is mediated by beta-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology*. **23**, 162-169 (2000).
- 61) Dawe GS, Huff KD, Vandergriff JL, Sharp T, O'Neill MJ, Rasmussen K. Olanzapine activates the rat locus coeruleus: in vivo electrophysiology and c-Fos immunoreactivity. *Biol Psychiatry*. **50**, 510-520 (2001).
- 62) Kawahara H, Kawahara Y, Westerink BH. The noradrenaline-dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied by multi-probe microdialysis. *Eur J Pharmacol*. **418**, 177-186 (2001).
- 63) Devoto P, Flore G, Saba P, Fà M, Gessa GL. Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *J Neurochem*. **92**, 368-74 (2005).
- 64) Kanazawa I, Satoyoshi E, Hirayama K, Takayanagi T, Takahashi K, Kowa H, Tashiro K, Osama M, Shimizu N, Kachi T, Nakashima M. Clinical evaluation of taltirelin hydrate (TA-0910) in patients with spinocerebellar degeneration: a multi-center double-blind comparative study with placebo. *J Clin Ther Med*. **13**, 4169-4224 (1997).
- 65) Spokes EG, Bannister R, Oppenheimer DR. Multiple system atrophy with autonomic failure: clinical, histological and neurochemical observations on four cases. *J Neurol Sci*. **43**, 59-82 (1979).
- 66) Ichikawa N. Study on monoamine metabolite contents of cerebrospinal fluid in patients with neurodegenerative diseases. *Tohoku J Exp Med*. **150**, 435-446 (1986).
- 67) Tsuji M, Satoh K, Iwase N, Tanaka S and Takahashi S. Transmitter biochemistry and histochemistry of the hypoplastic cerebellum in mice after neonatal administration of cytosine arabinoside. *Brain Res Bull*. **12**, 33-41 (1984).
- 68) 小野 秀樹, 岡田 啓希, 本多 基子. 運動失調マウスの脊髄反射電位: TRH アナログの作用と下行性ノルアドレナリン神経系の機能変化. *日薬理誌*. **116**, 68-72 (2000).
- 69) Cendelin J, Cvetanovic M, Gandelman M, Hirai H, Orr HT, Pulst SM, Strupp M, Tichanek F, Tuma J, Manto M. Consensus Paper: Strengths and Weaknesses of Animal Models of Spinocerebellar Ataxias and Their Clinical Implications. *Cerebellum*. **21**, 452-481 (2022).

- 70) 織田鉄一. 歩行異常マウスの発見と維持. *実験動物*. **22**, 281-288 (1973).
- 71) 室賀辰夫, 足立皓岑 他. Rolling mouse Nagoya. a. 電気生理学のおよび組織化学的研究. *最新医学*. **31**, 219-225 (1976).
- 72) Oda SI, Lee KJ, Arii T, Imoto K, Hyun BH, Park IS, Kim H, Rhyu IJ. Differential regulation of Purkinje cell dendritic spines in rolling mouse Nagoya (tg/tg), P/Q type calcium channel ( $\alpha 1(A)/Ca(v)2.1$ ) mutant. *Anat Cell Biol*. **43**, 211-7 (2010).
- 73) Plomp JJ, van den Maagdenberg AM, Kaja S. The ataxic Cacnala-mutant mouse rolling nagoya: an overview of neuromorphological and electrophysiological findings. *Cerebellum*. **8**, 222-230 (2009).
- 74) Matsui K, Mano Y, Ando K. Effect of DN-1417 on ataxia in Rolling mouse Nagoya and Staggerer mouse in comparison with the effect of TRH. *Yakubutsu Seishin Kodo*. **6**, 281-283 (1986).
- 75) Kinoshita K, Fujitsuka T, Yamamura MMOL/Latsuoka Y. Effects of TA-0910, a novel orally active thyrotropin-releasing hormone analog, on the gait of ataxic animals. *Eur J Pharmacol*. **274**, 65-72 (1995).
- 76) Kinoshita K, Fukushima T, Kodama Y, Sugihara J, Yamamura M, Matsuoka Y. Chronic anti-ataxic actions of the novel thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog, TA-0910, during and after repeated administration in Rolling mouse Nagoya: behavioral and pharmacokinetic studies. *Biol Pharm Bull*. **20**, 36-39 (1997).
- 77) Hirotsu I, Horikawa Y, Kihara T, Ishihara T, Kanai T. Reversal of alpha-methyltyrosine-induced hypoactivity by 6- $\beta$ -5,6,7,8-tetrahydro-L-erythrobiopterin (R-THBP) in mice. *Jpn J Pharmacol*. **58**, 67-73 (1992).
- 78) Kuribara H. Induction of sensitization to hyperactivity caused by morphine in mice: effects of post-drug environments. *Pharmacol Biochem Behav*. **57**, 341-346 (1997).
- 79) Paxinos G, Franklin K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition: Academic Press. (2007).
- 80) Mori Y, Wakamori M, Oda S, Fletcher CF, Sekiguchi N, Mori E, Copeland NG, Jenkins NA, Matsushita K, Matsuyama Z, Imoto K. Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channels is associated with the ataxic mouse mutation rolling Nagoya (tg(rol)). *J Neurosci*. **20**, 5654-5662 (2000).
- 81) Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohnenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommol/Len GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the  $Ca^{2+}$  channel gene CACNL1A4. *Cell*. **87**, 543-552 (1996).
- 82) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the  $\alpha 1A$ -voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*. **15**, 62-69 (1997).
- 83) Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, Takahashi R, Kitazawa S, Hattori N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. **189**, 180-185 (2010).
- 84) Ijiri T, Nakamura K, Ogata M, Inada H, Kiguchi S, Maruyama K, Nabekura J, Kobayashi M, Ishibashi H. Effect of rovatirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on the central noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*. **761**, 413-422 (2015).
- 85) Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and

- YM-14673. *Exp Neurol.* **126**, 61-75 (1994).
- 86) Faden AI, Fox GB, Fan L, Araldi GL, Qiao L, Wang S, Kozikowski AP. Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents. *Am J Physiol.* **277**, R1196-1204 (1999).
  - 87) Urayama A, Yamada S, Kimura R, Zhang J, Watanabe Y. Neuroprotective effect and brain receptor binding of taltirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogue, in transient forebrain ischemia of C57BL/6J mice. *Life Sci.* **72**, 601-607 (2002).
  - 88) Ishida Y, Kawakami H, Kitajima H, Nishiyama A, Sasai Y, Inoue H, Muguruma K. Patient-Derived iPSCs. *Cell Rep.* **18**, 1075-1076 (2017).
  - 89) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [<sup>14</sup>C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem.* **28**, 897-916 (1977).
  - 90) Nakayama T, Nagai Y. Alterations in local cerebral glucose metabolism and endogenous thyrotropin-releasing hormone levels in rolling mouse Nagoya and effect of thyrotropin-releasing hormone tartrate. *Jpn J Pharmacol.* **72**, 241-246 (1996).
  - 91) Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao MMOL/Lurayama S, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immol/Lunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology.* **32**, 595-603 (2012).
  - 92) Xie Y, Hayden MR, Xu B. BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *J Neurosci.* **30**, 14708-14718 (2010).
  - 93) Adlard PA, Perreau VM, Engesser-Cesar C, Cotman CW. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci Lett.* **363**, 43-48 (2004).
  - 94) Ashizawa T, Öz G, Paulson HL. Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development. *Nat Rev Neurol.* **14**, 590-605 (2018).
  - 95) Ilg W, Bastian AJ, Boesch S, Burciu RG, Celnik P, Claaßen J, Feil K, Kalla R, Miyai I, Nachbauer W, Schöls L, Strupp M, Synofzik M, Teufel J, Timmol/Lann D. Consensus paper: management of degenerative cerebellar disorders. *Cerebellum.* **13**, 248-268 (2014).
  - 96) Patel RS, Rachamalla M, Chary NR, Shera FY, Tikoo K, Jena G. Cytarabine induced cerebellar neuronal damage in juvenile rat: correlating neurobehavioral performance with cellular and genetic alterations. *Toxicology.* **293**, 41-52 (2012).
  - 97) Yamamoto M, Shimizu M. Effect of YM-14673, a new thyrotropin releasing hormone analogue, on ataxic gait in cytosine arabinoside-treated mice. *Eur J Pharmacol.* **166**, 545-547 (1989).
  - 98) Tatsuoka Y, Kato Y, Imura H. Effect of DN-1417, a synthetic thyrotropin-releasing hormone analogue, on [<sup>3</sup>H] GABA binding in the cerebellum of ataxic rats. *Neurosci Lett.* **53**, 63-68 (1985).
  - 99) Ijiri T, Yaguchi A, Yokoyama A, Abe Y, Kiguchi S. Ameliorating effect of rovatirelin on the ataxia in rolling mouse Nagoya. *Eur J Pharmacol.* **882**, 173271 (2020).
  - 100) Koga S. The Nomenclature and Classification of Sporadic Spinocerebellar Degeneration. *Brain Nerve.* **68**, 1453-1457 (2016).
  - 101) Tsuji M, Yamada N, Ohi K. Cytosine arabinoside-induced cerebellar ataxia model. (2).

- Roles of the 5-hydroxyindole compounds in the developmental cerebellum. *Rinsho Shinkeigaku*. **23**, 998-1003 (1983).
- 102) 松井京子, 真野行生, 向山昌邦, 村本治, 豊島英徳, 安藤一也.  
Cytosinearabioside による薬物性運動失調マウスに対する TRH-T 投与後の行動薬理学的研究: 遺伝性運動失調マウスとの比較検討. *実験動物*. **32**, 13-19 (1983).
- 103) 小倉博雄, 見上孝, 高村直子, 鈴木芳和, 千葉胤孝. Cytosine arabioside(ara-C)により誘発された小脳低形成ラットの行動発達について. *日薬理誌*. **76**, 33-44 (1980).
- 104) Yamano T., Shimada M., Nakao K., Nakamura T., Wakaizumi S., Kusunoki T. Maturation of purkinje cells in mouse cerebellum after neonatal administrations of cytosine arabioside. *Acta Neuropathol*. **44**, 41-45 (1978).
- 105) Kinoshita K, Kawashima K, Kawashima Y, Fukuchi I, Yamamura MMOL/Latsuoka Y. Effect of TA-0910, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine release and turnover in rat brain. *Jpn J Pharmacol*. **71**, 139-145 (1996).
- 106) Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. **25**, 1116-1121 (2015).
- 107) Xu P, Chen A, Li Y, Xing X, Lu H. Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiol Genomics*. **51**, 432-442 (2019).
- 108) Kelley R, Flouty O, Emmons EB, Kim Y, Kingyon J, Wessel JR, Oya H, Greenlee JD, Narayanan NS. A human prefrontal-subthalamic circuit for cognitive control. *Brain*. **141**, 205-216 (2018).
- 109) Takase K, Kimura F, Yagami T, Mitsushima D. Sex-specific 24-h acetylcholine release profile in the medial prefrontal cortex: simultaneous measurement of spontaneous locomotor activity in behaving rats. *Neuroscience*. **159**, 7-15 (2009).
- 110) Burton AC, Nakamura K, Roesch MR. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol Learn Mem*. **117**, 51-59 (2015).
- 111) Kalynda K. Gonzales, Yolanda Smith. Striatal Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Ann N Y Acad Sci*. **1349**, 1-45 (2015).
- 112) Xie T, Appelbaum D, Bernard J, Padmanaban M, Pu Y, Gomez C. Evaluation of parkinsonism and striatal dopamine transporter loss in patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol*. **263**, 2302-2307 (2016).
- 113) Yun JY, Lee WW, Kim HJ, Kim JS, Kim JM, Kim HJ, Kim SY, Kim JY, Park SS, Kim YK, Kim SE, Jeon BS. Relative contribution of SCA2, SCA3 and SCA17 in Korean patients with parkinsonism and ataxia. *Parkinsonism Relat Disord*. **17**, 338-342 (2011).
- 114) Horimoto Y, Hayashi E, Ito Y, Iida A, Goto Y, Kato S, Okita K, Kako T, Sato C, Tajima T, Inagaki A, Nokura K, Hibino H, Matsukawa N, Yamada K, Kabasawa H. Dopaminergic function in spinocerebellar ataxia type 6 patients with and without parkinsonism. *J Neurol*. **267**, 2692-2696 (2020).
- 115) Zheng C, Chen G, Tan Y, Zeng W, Peng Q, Wang J, Cheng C, Yang X, Nie S, Xu Y, Zhang Z, Papa SM, Ye K, Cao X. TRH analog, taltirelin improves motor function of hemi-PD rats without inducing dyskinesia via sustained dopamine stimulating effect. *Front Cell Neurosci*. **12**, 417 (2018).
- 116) Tzschentke TM, Schmidt WJ. Crit Rev Neurobiol. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol*. **14**, 131-142 (2000).

- 117) Floresco SB. The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annu Rev Psychol.* **66**, 25-52 (2015).
- 118) Sawada M, Kato K, Kunieda T, Mikuni N, Miyamoto S, Onoe H, Isa T, Nishimura Y. Function of the nucleus accumbens in motor control during recovery after spinal cord injury. *Science.* **350**, 98-101 (2015).
- 119) Puga L, Alcántara-Alonso V, Coffeen U, Jaimes O, de Gortari P. TRH injected into the nucleus accumbens shell releases dopamine and reduces feeding motivation in rats. *Behav Brain Res.* **306**, 128-136 (2016).