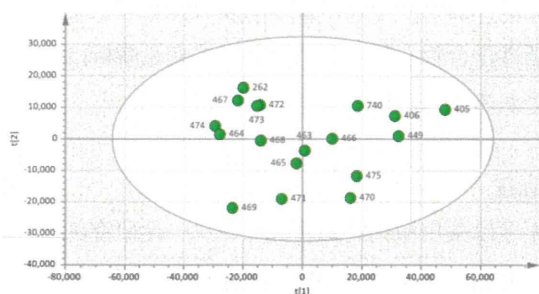
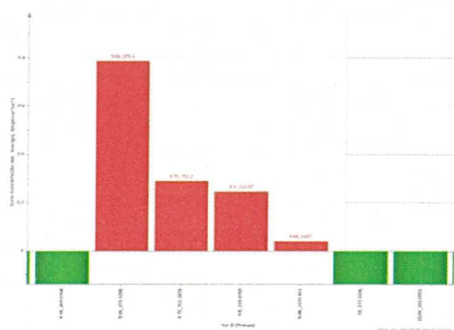
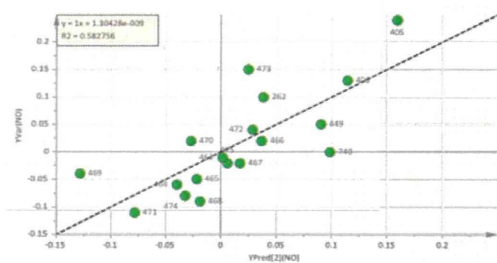


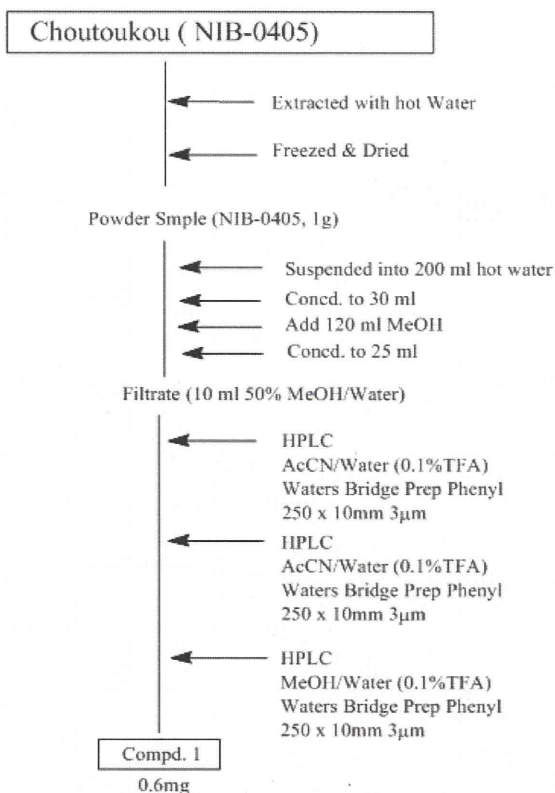
約 20 ml に減圧濃縮後、80 ml メタノールを加え沈殿物を除去、ろ液を約 10 ml に減圧濃縮した後、メンブランフィルターで再ろ過、このろ液をセミ分取 HPLC に付した。この溶出画分を分取 LC/MS にて分析しながら、MW376 を指標に分取、これを繰り返し目的物質約 0.6 mg を取得した。この 2 次元 NMR を含むスペクトル解析により、本第 1 候補化合物は loganic acid と決定した。この構造は ESI-Orbitrap MS による精密質量分析結果と一致した。



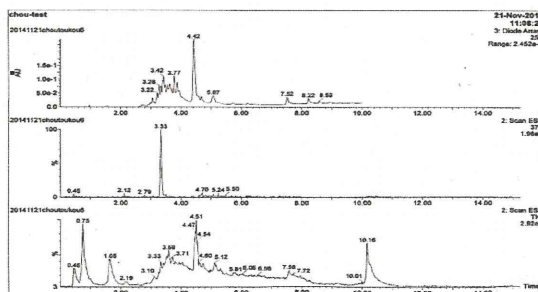
数値による PLS



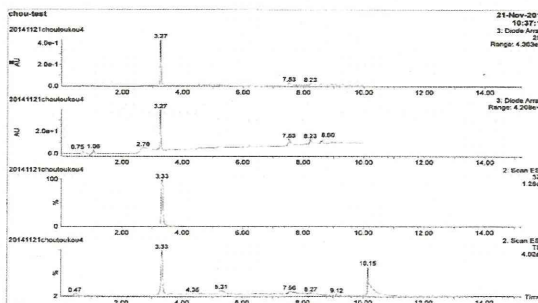
OPLS-DA の推定化合物と同じ



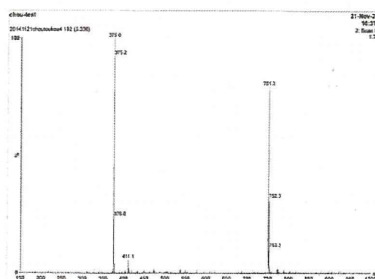
第 1 候補化合物 m/z375 の精製単離



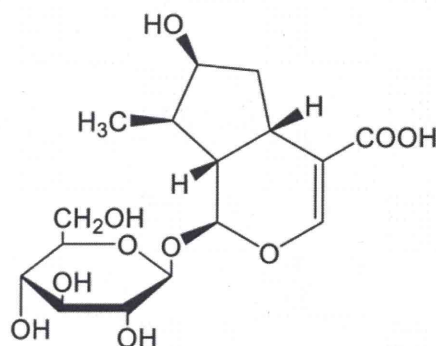
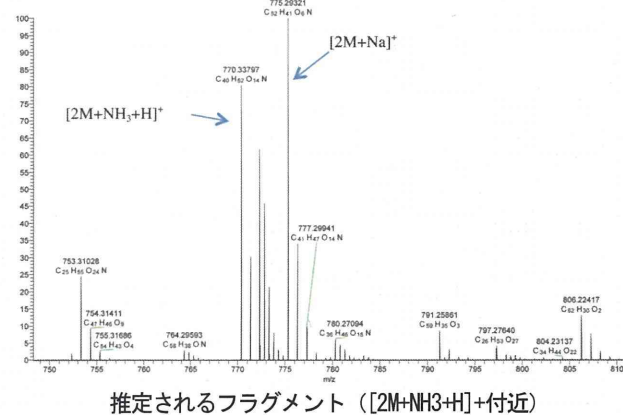
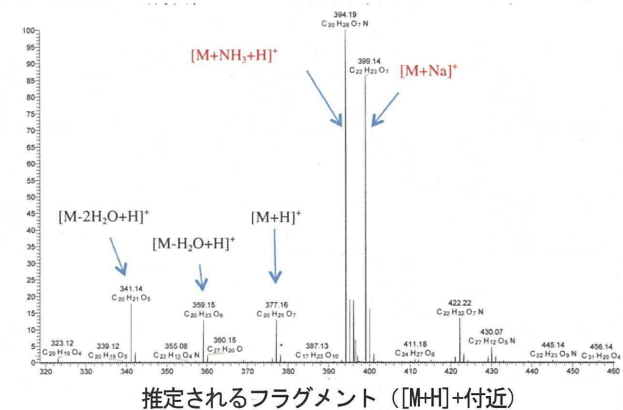
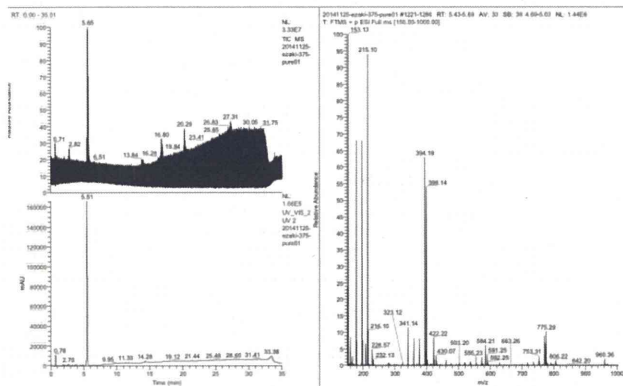
精製前熱水抽出エキスの LC/MS



精製後の化合物の LCMS (waters 分取 LCMS)



単離化合物の LC/MS (Waters) (negative mode)



Loganic acidの化学構造式

#### D. 考察

今年度は植物抽出エキス作成と分譲態勢の構築を念頭に行ったが、抽出溶媒の選択、効率的な抽出方法の確立に時間を要してしまった。また自動分注機におけるプログラム開発では不具合が生じるなどアッセイプレートへの分注が遅れるなどの問題があったが、現在は安定してきており安定な供給は可能と考えられる。

チョウトウコウから ATP 産生に影響を与える化合物として loganic acid と chlorogenic acid を得たが、植物エキスのような多成分系の状態から活性化合物を特定するために多変量解析は有効であることが分かった。

#### E. 結論

今年度は薬用植物資源研究センター全研究部の協力の元、多くの植物資源の積極的採取を行い、それらの本研究事業に対する効率的抽出法の確立と自動分注機によるアッセイプレートでの分譲態勢の構築を行った。また生薬チョウトウコウからは効率の良い活性化合物の特定手法として多変量解析を検討し、最終的に2つの活性化合物を特定するに至った。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

虚血及び血管性認知症モデルマウス評価

担当責任者 佐々木 勉

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学 講師

研究要旨

認知症はアルツハイマー型認知症、脳血管性認知症などに分類され、amyloid  $\beta$  仮説などが提唱されてきたが、糖尿病などの生活習慣病の関与、社会心理学的側面の寄与など、極めて多様な因子が関与している。認知症における神経細胞におけるamyloid  $\beta$  障害性については、多くの報告があるが神経細胞ーグリア細胞間のエネルギー代謝に関する報告は少ない。そこで本研究においては、これらのエネルギー代謝に寄与する因子を抽出し、大規模生薬ライブラリーをスクリーニングし、神経保護効果を検討する。又、高血圧に寄与するSIKs並びにSIKs-CREBシグナルの神経障害への関与を検討する。

A. 研究目的

神経細胞、神経ーアストロサイト共培養系において虚血性、或いはamyloid  $\beta$  毒性を検討する。また、SIKs 並びに SIKs-CREB シグナルの神経障害への関与を SIK 遺伝子改変マウスを用いて検討する。

B. 研究方法

In vitro ラット初代神経培養系、初代神経培養ーアストロサイト共培養系を作成。

SIK 遺伝子欠損マウスよりの初代神経細胞培養系を作成し、検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、大阪大学実験動物委員会規程の承認のもと行った。

C. 研究結果

SIK2 遺伝子欠損マウスにおいては、SIK2 ノックアウトにおいて、神経保護効果、梗塞サイズの縮小を認めたことは既に報告している（Sasaki et. al. *Neuron*. 2011 Jan 13;69(1):106-19）。他方、本研究により SIK1 遺伝子欠損マウスでは、神経障害的であった。本現象は、神経細胞の酸素消費量変化でも再現できた（図 1）。

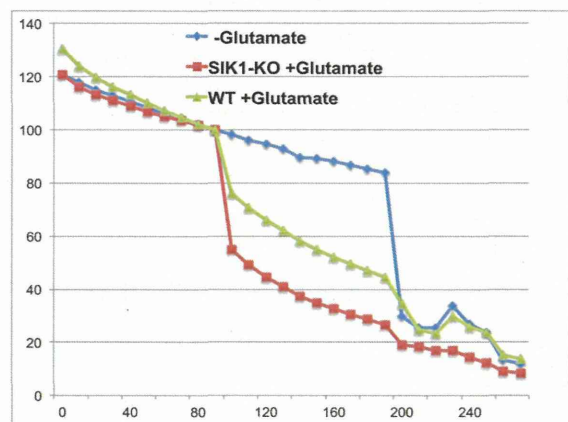


図 1 酸素消費量変化を活用した SIK1-KO マウスのグルタミン酸に対する感受性の亢進。縦軸は酸素消費量 (%)、横軸は時間 (分)

SIK1-KO マウス由来の神経細胞にグルタミン酸を作用させると、細胞が一気に死滅することで酸素消費量の低下に繋がった。ミトコンドリアストレステスト（200 分以降）でもミトコンドリアが機能していないことが判明した。今回は、アストロサイトの影響を除外するために、アストロサイトのグルタミン酸トランスポーターEAAT2 の阻害剤存在下で試験した。今後はアストロサイト側の反応も検討する必要がある。

以前の報告より SIK1 が Na/K ATPase 活性を調節していることが報告されていたため、SIK1KO マウ

ス、野生型マウスより初代神経細胞培養系を作成し、Na/K ATPase の機能の電気生理学的検討を whole-cell patch clamp 法を用いて行った。しかしながら、両群間で、Na/K ATPase を介した電流に差異はなく、その上流のシグナル伝達の差異であることが示唆された。一方、SIK1KO マウスと SIK2KO マウスでは炎症性因子の差異を認めた。

#### D. 考察

従来の報告、本年度の報告より、神経病態下での SIK1 と SIK2 の役割が大きく異なることが示唆された。また SIK1 の Na/K ATPase に与える影響は細胞種、組織により異なり、今後、初代内皮細胞などでの検討も必要である。また SIK1KO マウスと SIK2KO マウスでは炎症性因子の差異も認め、神経病態時におけるマクロファージの極性への寄与、並びに分泌されるサイトカインのプロファイルの違いが、各神経病態により異なることが示唆された。

#### E. 結論

神経病態時においては、SIK1 と SIK2 の役割が大きく異なることが示唆され、今後、さらに amyloid  $\beta$  毒性の違い、in vivo モデルでの検討が重要である。

#### F. 参考文献

Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Omura-Matsuoka E, **Sasaki T**, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett.** 564: 16-20 (2014)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, **Sasaki T**, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H,

Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. **Genes** (2014) 5: 1095-1114.

##### 2. 学会発表

熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、**佐々木 勉**、田端 俊英、竹森 洋  
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である  
第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

望月秀樹、**佐々木勉**、Choong Chi-Jing、上里新一、平田佳之（発明人）国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学（出願人）「アイソフォーム特異的新規 HDAC 阻害剤による神経疾患治療法の開発」特願 2014-183239

##### 2. 実用新案登録

該当無し

##### 3. その他

該当無し

電気生理学的解析

担当責任者 田端 俊英

富山大学大学院理工学研究部 神経情報工学研究室 准教授

研究要旨

認知症治療薬メマンチンに対して鋭敏に行動変調を示す突然変異マウス *Grid2*<sup>Htake/Htake</sup> から採取した小脳顆粒細胞にパッチクランプ法を適用して解析したところ、NMDAに対して大きなNMDA型グルタミン酸受容体 (NMDAR) 介在性内向き電流を発生するものと、発生しないものがあり、後者の割合が野生型マウスに比して優位に高かった。*Grid2*<sup>Htake/Htake</sup> マウスでは顆粒細胞のNMDAR機能低下により小脳が関与する運動協調等が障害され、またメマンチンの影響を受けやすくなっていると考えられた。このように認知症治療薬応答機序が明らかとなったマウスをツールとして用いることで、認知症治療薬の探索の促進が期待される。

A. 研究目的

メマンチン (NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) 遮断薬、アルツハイマー病治療薬) に鋭敏に反応して行動変調を示す突然変異マウス *Grid2*<sup>Htake/Htake</sup> において (図1)、小脳皮質で高発現する GRID2 をコードする *Grid2* の欠損が見つかった。*Grid2*<sup>Htake/Htake</sup> マウスのメマンチン高応答性の機序を明らかにすべく、NMDAR 発現ニューロンである小脳顆粒細胞の NMDAR シグナリングを解析した。

顆粒細胞の NMDAR は、上位中枢からの運動命令と身体各部位の感覚情報を小脳皮質に中継する役割を担っている。小脳皮質はとくに短期間に起こる運動学習に関与していることが分かっている。したがって *Grid2* の欠損が NMDAR シグナリングに何からの影響を与えているとすれば、小脳皮質依存的運動学習に影響が現れると考えられる。そこで小脳皮質依存的運動学習の一種である視機性動眼反射 (OKR) 順応 (動いている物体の画像が網膜上でぶれないように補正する反射性の眼球運動の精度がトレーニングにより向上する現象) を *Grid2*<sup>Htake/Htake</sup> と野生型マウスで比較するとともに、メマンチン等の影響を解析した。もし遺伝子変異とメマンチンの NMDAR シグナリングと OKR 順応に相関関係があれば、OKR 順応の成

績を指標として認知症治療薬候補物質を行動学的にスクリーニングする手法が確立できる可能性が期待される。

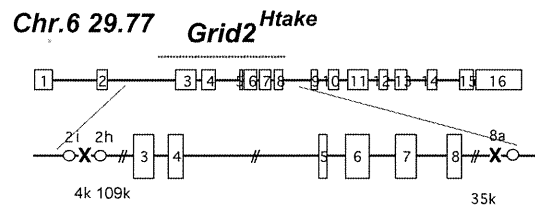


図1 : *Grid2* 変異マウスの遺伝子欠損部位と歩行失調

B. 研究方法

NMDAR シグナリングの解析 : 幼齢マウスから採取した小脳顆粒細胞を分散培養した。顆粒細胞にパッチクランプ電位固定法を適用し、NMDA を急速投与して、NMDAR 介在性内向き電流を記録した。

OKR 順応の測定 : 解析装置および原理の概念図を図2に示す。成熟マウスを予め頭蓋に



設置した金具を用いて定位台上に固定し、円筒形の市松模様刺激スクリーンの中に置いた。刺激スクリーンを 0.25Hz の周期で往復回転させた（点線プロット；横軸は時間、縦軸は方位角）。マウスの眼球は刺激スクリーンを追尾して OKR を起こすので、赤外線カメラにより瞳孔の位置を検出し、眼球の方位角（実線プロット）を推定した。長時間トレーニングにより最大回転振幅 (Ap) が刺激スクリーンのそれ ( $17^\circ$ ) に近づいていく。OKR 順応の学習成績は OKR ゲイン ( $A_p/17^\circ$ ) によって定量化した。コントロール群には生理食塩水を、テスト群にはメマンチン含有生理食塩水を腹腔投与してから OKR 順応測定を行った。

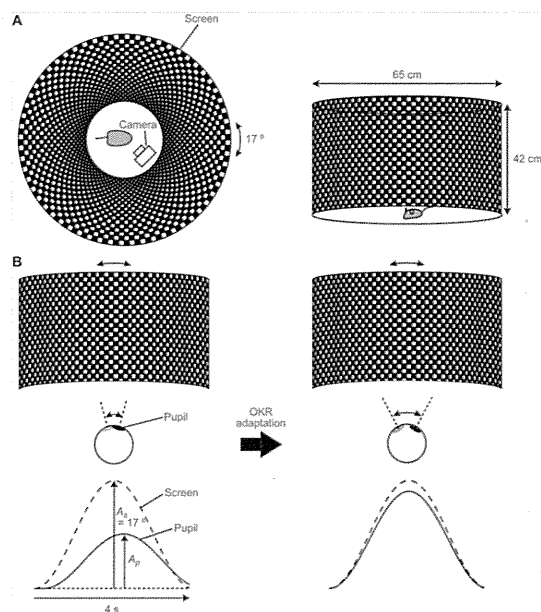


図 2 : OKR 測定の装置と原理。OKR は、マウスが刺激スクリーンの動きに眼球を追従させる能力と、トレーニングによる学習効果 (OKR 順応) を評価できる。

(倫理面への配慮)

富山大学実験動物委員会の承認を受けた手続きに沿って、幼齢マウスを低温麻酔してから断頭によって安楽死処分を行い、小脳を採取した。成熟マウスへの固定具の設置手術はイソフルラン吸入による深麻酔で実施した。

### C. 研究結果

WT、*Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスともに、数十 pA の内向き電流が発生する顆粒細胞と、発生しない顆粒細胞が存在した。しかし、大きな内向き電流を発生しない顆粒細胞の割合は *Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウス (Mut) の方が優位に高かった。メマンチン処理を行った後に再度 NMDA を投与して測定すると、内向き電流の振幅が減少した (図 3)。この減少は大きな内向き電流において顕著であった。このことから、*Grid2* 機能消失は、NMDAR 機能低下に繋がることが示唆された。メマンチンが NMDAR 阻害剤であることを考慮すると、*Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスの解析は、学習・記憶の生物学的素過程であるシナプス可塑性に重要とされる NMDAR 機能を細胞と生体レベルの両方で研究できる有用な戦略であると期待される。

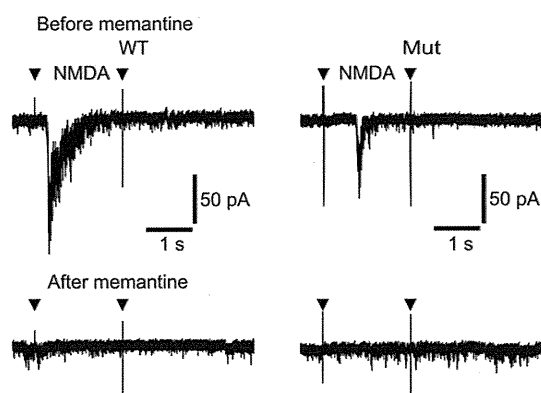


図 3 野生型及び *Gird2* 変異マウスの小脳顆粒細胞の NMDAR 活性とメマンチンの影響

そこで、*Grid2* 変異マウスの記憶のうち、小脳皮質依存的運動学習に着目し、*Grid2* 変異及びメマンチンの OKR 順応に対する作用を検討した (図 4)。WT マウスは高い OKR ゲインを示し、*Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスは著しく低い OKR ゲインを示した。

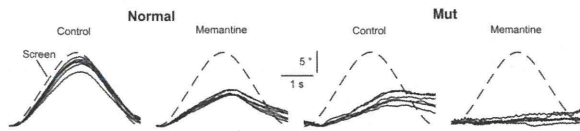


図 4: OKR 順応測定。刺激スクリーンの動き (方位角の時間変化) が破線で示され、眼球の動きが実線で示されている。OKR 順応の学習が進めば (6 本の実線は 1 時間のトレーニングのうち 10 分毎の平均)、実線の振幅と位相が破線に近づいていく。

OKR 順応を評価するため、1 時間にわたるトレーニング期間中 OKR ゲインを測定し、10 分間ごとに平均を算出した (図 5)。WT マウスはトレーニング期間が長くなるにつれ OKR ゲインが顕著に上昇し、顕著な OKR 順応を示した。Grid2 変異マウスでは OKR ゲインの上昇が観察されず、OKR 順応が起こらないことが分かった。

また、WT マウスではメマンチン処理は OKR およびその順応を著しく障害した (図 4, 5)。および Grid2<sup>Htake/Htake</sup> マウスでは、メマンチン処理は OKR およびその順応を完全に消失させた。

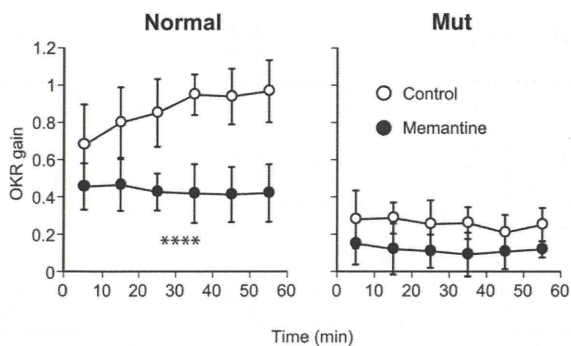


図 5: OKR 順応。WT (Normal) マウスではトレーニング時間ともに、OKR ゲイン (学習成績) が上昇した。一方、メマンチンや Grid2 変異は OKR および OKR 学習を障害した。

最後に、メマンチンのグルタミン酸依存的神経興奮に対する神経保護作用を竹森の項に記載の神経細胞呼吸量の変動で検討した。まずは、WT と Grid2 変異マウス由来の神経細胞で比較した (図 6)。

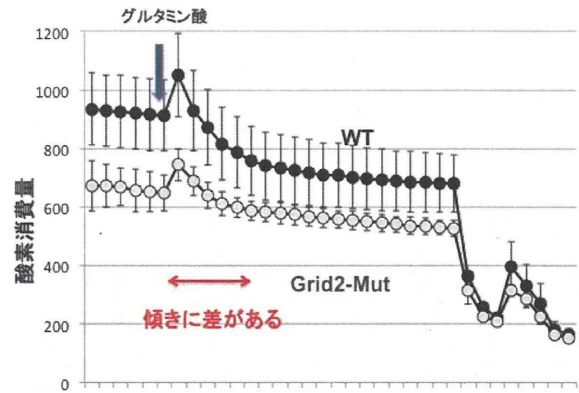


図 6: 培養神経細胞の呼吸流量変化。横軸は時間

Grid2 変異マウス由来の呼吸量は WT よりも低かった。一方で、グルタミン酸刺激後の呼吸量低下率 (グラフの傾き) は低く、グルタミン酸に反応していないことが示唆された。次に、メマンチンの影響を検討した (図 7)。

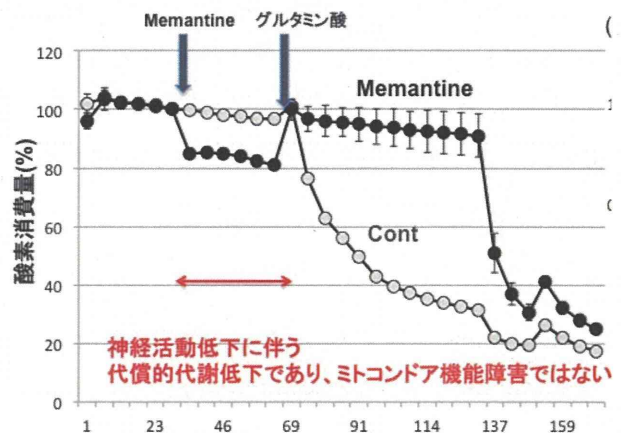


図 7: 培養神経細胞の呼吸流量変化。横軸は時間

通常の神経細胞にメマンチンを投与すると、一端、呼吸量が低下する。これは、神経活動の低下に伴う、過剰な ATP によるミトコンドリア機能の抑制である。次にグルタミン酸を投与すると、通常の神経は死滅するため、呼吸量が定値するが、メマンチンはその呼吸低下 (神経興奮毒性) を抑制した。

このことは、神経保護作用のうち、神経活動を低下させるものは、神経のエネルギー活動量指標で評価できることを示唆する。また、神経活動低下は、記憶構築においてはマイナスに作用するため、本研究における認知症根本薬の探索において、神経活動を低下させないことを検証する必要があることを再確認できた。

## D. 考察

*Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスでは小脳顆粒細胞における NMDAR 機能低下が示唆された。顆粒細胞の NMDAR は上位中枢からの運動命令および身体各部からの感覚情報を小脳皮質に中継するのに重要な役割を果たしており、その機能低下は小脳が関与する運動協調等の障害に繋がる。またメマンチンはもともと貧弱な *Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスの NMDAR シグナリングを阻害して行動障害を促進すると考えられた。

OKR 順応の成績には NMDAR シグナリングとの平行性が見られた。すなわち小脳皮質依存的学習である OKR 順応は顆粒細胞 NMDAR シグナリングを低下させる *Grid2* 変異で障害され、さらに *Grid2* 変異にメマンチンの作用が加わると OKR 順応が完全に消失した。

また以上の結果から、学習・記憶のパフォーマンスの指標として OKR 順応の成績が利用できることが示唆され、認知症薬探索の各ステップで電気生理学的測定による作用機序の確認が重要であることが再認識できた。

## E. 結論

*Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスでは小脳顆粒細胞の NMDAR 機能低下がメマンチン高応答性に繋がっていると考えられた。このように認知症治療薬応答機序が明らかとなった *Grid2*<sup>Itake/Itake</sup> マウスをツールとして用いることで、認知症治療薬の探索の促進が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, **Tabata T**, Takemori H. Altered actions of memantine and NMDA-induced currents in a new *Grid2*-deleted mouse line. *Genes* (2014) 5: 1095-1114.

## 2. 学会発表

熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、**田端 俊英**、竹森 洋  
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

白井義啓、**田端俊英**（発明者） 国立大学法人富山大学（所有）「保定装置」（2014）特許第 5577486 号

白井義啓、**田端俊英**（発明者） 国立大学法人富山大学（所有）「刺激装置、視機能性動眼反射測定装置および視機能性動眼反射測定方法」（2014）特許第 5582494 号

**田端俊英**、巽俊二（発明者） 国立大学法人富山大学、株式会社旭化成せんい（出願人）「振動減衰ケーブル」特願 2014-243088

### 2. 実用新案登録

該当無

### 3. その他

無



細胞保護効果のある低分子の抽出と修飾

担当責任者 上里 新一

関西大学化学生命工学部 生命・生物工学科 医薬品工学研究室 教授

研究要旨 ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害は、その作用スペクトラムから抗癌剤への応用が評価され、既に複数が治療薬として承認されている。一方、最近の遺伝子工学技術の進歩から、クラス 1 に属する HDAC のアイソフォームごとの阻害が神経保護作用を発揮することが示されている。既に、欧米の製薬企業を中心に 3 種あるクラス 1 HDAC の特異的阻害剤が合成されているが、未だ臨床試験には進んでいない。今回は、HDAC2 に特異性を発揮する阻害剤の部分構造のうち、ジケトピペラジン基の重要性に着目し、必要な修飾を加えた低分子化合物を合成した。

#### A. 研究目的

ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害が神経保護作用を示すことが古くから指摘されており、最近、遺伝子改変マウス等を利用して個別の s HDAC の寄与が報告される様になった。HDAC は大きく分けると 3 つのクラスに分類され、クラス 1 HDAC 阻害が神経保護に重要と考えられている。

しかし、クラス 1 HDAC はさらに 3 種の HDAC から構成されており、それらを特異的に制御する方法は RNAi 等の神経疾患には利用が困難な方法しか存在しない。そこで、クラス 1 を標的とする低分子化合物を複数作成し、評価チームに提供することを目的とする。

#### B. 研究方法

低分子化合物の合成に利用する試薬は和光純薬から購入した。合成確認は、Thermo Fisher 社の Orbitrap を活用した。最終化合物は再結晶にて精製した。

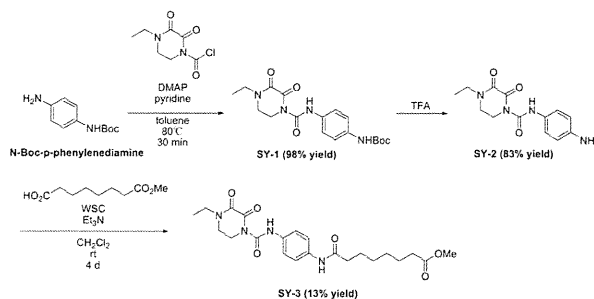
(倫理面への配慮)

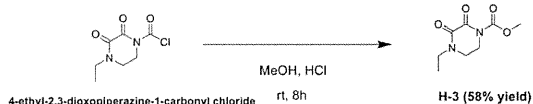
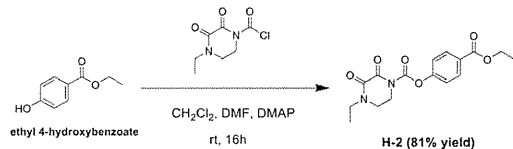
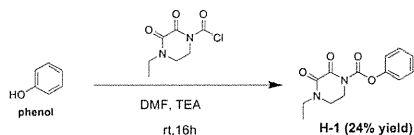
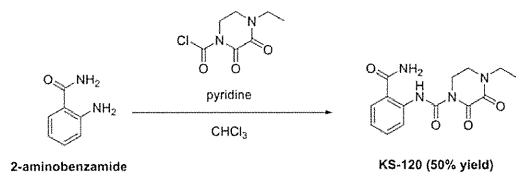
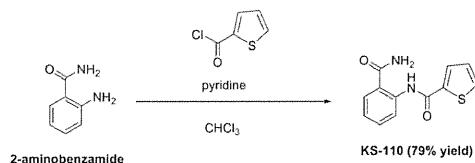
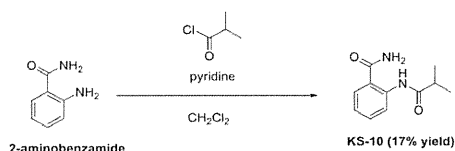
該当せず

#### C. 研究結果

ジケトピペラジン基を有する新規神経保護作用候補化合物の合成---

我々は、N-エチルジケトピペラジン基を有する HDAC1, 2 選択的阻害剤 K-560 が神経細胞保護作用を有することを見出した。一方、ジケトピペラジン基以外の官能基 (例えば N-エチルピペラジン基) を有する HDAC1, 2 選択的阻害剤には、特段の神経保護作用が見られなかったことから、N-エチルジケトピペラジンを主骨格とする誘導体に神経保護作用がある可能性はないかと推定し、N-エチルジケトピペラジンを基本骨格とする化合物 (SY-1、SY-2、SY-3、KS-120、H-1、H-2、H-3)、並びに関連化合物 (KS-10、KS-110) をそれぞれ合成した。以下にそれら化合物の合成スキームを示す。





## D. 考察

これまでに報告した HDAC 阻害剤のうち、ジケトピペラジン骨格を有する HDAC 阻害剤が神経保護に作用する傾向にあったため、ジケトピペラジン骨格を中心に化合物を合成した。今後は、特許出願が確認されていない類似構造化合物も調べる必要がある。

## E. 結論

神経保護に機能することが期待される HDAC 阻害剤をジケトピペラジン骨格を中心に合成できた。構造活性相関検討で、有用性構造が見出されることを期待する。

## F. 参考文献

- 1) Uesato S, Yamashita H, Maeda R, Hirata Y, Yamamoto M, Matsue S, Nagaoka Y, Shibano M, Taniguchi M, Baba K, Ju-ichi M. Synergistic antitumor effect of a combination of paclitaxel and carboplatin with nobiletin from Citrus depressa on non-small-cell lung cancer cell lines. *Planta Med.* 2014 80(6):452-7.
- 2) Kawaratani Y, Matsuoka T, Hirata Y, Fukata N, Nagaoka Y, Uesato S. Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 39(1):292-9.

## G. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し
2. 学会発表  
該当無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し

III. 学会等発表実績

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
塩誘導性キナーゼ(SIK)ファミリー欠損マウスの LPS 感受性に関する研究(ポスター)	佐野坂 真人、伊東 裕美、藤本 穰、大河原 知治、仲 哲治、竹森 洋	京都(第 87 回日本生化学会)	2014 年 10 月 18 日	国内
フラビ成分 Pterosin B の皮膚炎症疾患への応用 (ポスター)	黒井 梓、伊東祐美、瀧野裕之、山原 年、川原信夫、竹森 洋	京都(第 87 回日本生化学会)	2014 年 10 月 18 日	国内
メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的解析 (ポスター)	賀川 舞、杉村康司、飯田 修、瀧野裕之、黒井 梓、熊谷彩子、山原 年、川原信夫、竹森 洋	京都(第 87 回日本生化学会)	2014 年 10 月 18 日	国内
GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である(口頭)	熊谷 彩子、伊東祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、田端 俊英、竹森 洋	京都(第 87 回日本生化学会)	2014 年 10 月 18 日	国内
肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3 の重要性について(口答)	伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、瀧野裕之、川原信夫、竹森 洋	京都(第 87 回日本生化学会)	2014 年 10 月 18 日	国内
コロニトラッキングを応用した iPS 品質 状態のモニタリング (口頭)	吉田啓、長坂理沙子、岡田光加、佐々木寛人、清田泰次郎、本多裕之、古江-楠田美保、蟹江慧、加藤竜司	東京(細胞アッセイ研究会)	2015 年 1 月 13 日	国内
2 価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断 (口頭)	太刀川彩保子、藤木彩香、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、古江-楠田美保、浅島誠、大沼清	東京(細胞アッセイ研究会)	2015 年 1 月 13 日	国内
iPS 細胞培養手技標準化のための形態評価 モデル (口頭)	7) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、古江-楠田美保、加藤竜司	東京(細胞アッセイ研究会)	2015 年 1 月 13 日	国内
再生医療に果たす工学の役割 –ヒト多能性細胞の培養において求めてられるマテリアル– (招待講演)	古江-楠田美保	広島(第 64 回日本歯科理工学学会)	2014 年 10 月 4 日	国内
ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 (招待講演)	古江-楠田美保	神戸(第 41 回日本毒性学会学術年会)	2014 年 7 月 2 日	国内
Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm (Oral)	Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, Furue MK.	Vancouver, Canada (International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting)	2014. 6. 18	国外
Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. (Oral)	Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, Furue MK.	Vancouver, Canada (International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting)	2014. 6. 18	国外

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外 の別
Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line.	Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H	Genes	2014, Dec	国外
SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice.	Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H.	Immunology	2015, inpress	国外
薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用	熊谷彩子、竹森 洋	薬用植物・生薬の開発と今後の展望～資源確保、品質評価、製品開発（シーエムシー出版）	2014 Nov	国内
Development of a monitoring method for non-labeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis.	Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y and Furue MK	STEM CELLS Translational Medicine	2015, inpress	国外
Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications	Andrews P, Baker D, Benvinisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, Furue MK, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K, Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, and Zhou Q	Regen Med.	2015, inpress	国外
A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells.	Ozawa M, Ozawa Y, Iemura M, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK,	Protocol Exchange	2014 Dec	国外
Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations.	Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Onuma Y, Chan T, Michiue T, Furue MK	SCIENTIFIC REPORTS	2014 Sep	国外
HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin.	watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H.	PLoS One	2014 Sep	国外
ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション	古江-楠田美保	新たな創薬のための革新的技術開発（南山堂）	2014 Nov	国内
ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題	菅-三佳、古江-楠田 美保	生物工学会誌	2014 Sep	国内

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



Article

## Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New *Grid2*-Deleted Mouse Line

Ayako Kumagai <sup>1,†</sup>, Akira Fujita <sup>2,†</sup>, Tomoki Yokoyama <sup>2,†</sup>, Yuki Nonobe <sup>2,†</sup>, Yasuhiro Hasaba <sup>2,†</sup>, Tsutomu Sasaki <sup>3</sup>, Yumi Itoh <sup>1</sup>, Minako Koura <sup>4</sup>, Osamu Suzuki <sup>4</sup>, Shigeki Adachi <sup>5</sup>, Haruko Ryo <sup>5</sup>, Arihiro Kohara <sup>6</sup>, Lokesh P. Tripathi <sup>7</sup>, Masato Sanosaka <sup>1</sup>, Toshiki Fukushima <sup>2</sup>, Hiroyuki Takahashi <sup>2</sup>, Kazuo Kitagawa <sup>3</sup>, Yasuo Nagaoka <sup>8</sup>, Hidehisa Kawahara <sup>8</sup>, Kenji Mizuguchi <sup>7</sup>, Taisei Nomura <sup>5</sup>, Junichiro Matsuda <sup>4</sup>, Toshihide Tabata <sup>2,\*</sup> and Hiroshi Takemori <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Cell Signaling and Metabolic Disease, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: a-kumagai@nibio.go.jp (A.K.); y-itou@nibio.go.jp (Y.I.); m-sanosaka@nibio.go.jp (M.S.)
- <sup>2</sup> Laboratory for Neural Information Technology, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, Toyama 930-8555, Japan; E-Mails: fujita0153@gmail.com (A.F.); m1371119@ems.u-toyama.ac.jp (T.Y.); weather4519@gmail.com (Y.N.); takegoshiyoshihiro45@gmail.com (Y.H.); fookun3@gmail.com (T.F.); m1471114@ems.u-toyama.ac.jp (H.T.)
- <sup>3</sup> Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka 565-0871, Japan; E-Mails: sasaki@medone.med.osaka-u.ac.jp (T.S.); kitagawa@neurol.med.osaka-u.ac.jp (K.K.)
- <sup>4</sup> Laboratory of Animal Models for Human Diseases, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: koura@nibio.go.jp (M.K.); osuzuki@nibio.go.jp (O.S.); jmatsuda@nibio.go.jp (J.M.)
- <sup>5</sup> Nomura Project, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: sadachi@nibio.go.jp (S.A.); hryo@nibio.go.jp (H.R.); n5nomura@nibio.go.jp (T.N.)
- <sup>6</sup> Laboratory of Cell Cultures, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mail: kohara@nibio.go.jp
- <sup>7</sup> Laboratory of Bioinformatics, National Institute of Biomedical Innovation, Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; E-Mails: lokesh@nibio.go.jp (L.P.T.); kenji@nibio.go.jp (K.M.)
- <sup>8</sup> Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University, Suita, Osaka 564-8680, Japan; E-Mails: t010034@kansai-u.ac.jp (Y.N.); t912436@kansai-u.ac.jp (H.K.)

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

\* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: takemori@nibio.go.jp (H.T.); ttabata@eng.u-toyama.ac.jp (T.T.); Tel.: +81-72-641-9834 (H.T.); Fax: +81-72-641-9836 (H.T.); Tel.: +81-76-445-6742 (T.T.); Fax: +81-76-445-6703 (T.T.).

Received: 14 October 2014; in revised form: 12 November 2014 / Accepted: 2 December 2014 /

Published: 11 December 2014

---

**Abstract:** Memantine is a non-competitive antagonist of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, and is an approved drug for the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. We identified a mouse strain with a naturally occurring mutation and an ataxic phenotype that presents with severe leg cramps. To investigate the phenotypes of these mutant mice, we screened several phenotype-modulating drugs and found that memantine (10 mg/kg) disrupted the sense of balance in the mutants. Moreover, the mutant mice showed an attenuated optokinetic response (OKR) and impaired OKR learning, which was also observed in wild-type mice treated with memantine. Microsatellite analyses indicated that the *Grid2* gene-deletion is responsible for these phenotypes. Patch-clamp analysis showed a relatively small change in NMDA-dependent current in cultured granule cells from *Grid2* gene-deleted mice, suggesting that GRID2 is important for correct NMDA receptor function. In general, NMDA receptors are activated after the activation of non-NMDA receptors, such as AMPA receptors, and AMPA receptor dysregulation also occurs in *Grid2* mutant mice. Indeed, the AMPA treatment enhanced memantine susceptibility in wild-type mice, which was indicated by balance sense and OKR impairments. The present study explores a new role for GRID2 and highlights the adverse effects of memantine in different genetic backgrounds.

**Keywords:** GRID2; GluR $\delta$ 2; memantine; NMDA receptor; cerebellum

---

## 1. Introduction

Memantine (3,5-dimethyl-1-adamantanamine) is an approved drug in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease (AD). Ca<sup>2+</sup>-mediated excitotoxicity in neurons is one proposed mechanism of AD, and the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is one of the major receptor channels responsible for glutamate-induced Ca<sup>2+</sup> influx. Memantine binds and non-competitively inhibits NMDA receptors, which subsequently protects neurons from glutamate-induced excitotoxicity [1,2].

Glutamate is essential for excitatory synaptic transmission mediated by ionotropic glutamate receptors, which include NMDA receptors and non-NMDA receptors,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and kainate receptors [3]. NMDA receptor activation is dependent on the membrane potential that is evoked by non-NMDA receptor function [4]. Under pathological conditions, the voltage-dependent regulation of NMDA receptors is believed to be impaired, and memantine is thought to alleviate excitotoxicity by the unregulated NMDA receptor.

Unlike memantine, other NMDA receptor antagonists, such as MK-801 [5], are considered neurotoxins because they inhibit normal excitotoxic neurotransmission as well as pathological physiological neurotransmission. Although memantine is considered a relatively safe drug, some adverse effects, such as dizziness [6], have been reported. Such adverse effects are likely to result from individual differences among patients, especially in their genetic backgrounds. However, the causes of adverse effects to memantine have not yet been clarified.

The glutamate receptor ionotropic delta 2 (GRID2, also known as GluR $\delta$ 2) is abundantly expressed in cerebellar Purkinje cells, and shares sequence homology with other glutamate receptors. Despite its name and these homologies, GRID2 does not bind glutamate or other glutamate analogs [7–9]. Mice with an impaired *Grid2* gene exhibit a broad range of phenotypes, such as cerebellar ataxia, poor motor learning, and memory dysfunction. In addition to the known phenotypes in mice, new phenotypes presumably involving NMDA receptor dysfunction or memantine effects, such as nystagmus (in frogs) [10], oculomotor apraxia (in cats) [11,12], dementia (in humans) [13,14], have been observed in human patients with *GRID2* gene deletions [15–18]. However, there is not sufficient evidence to ascribe these complex symptoms in human patients to *GRID2* gene deletions.

Here, we report a new deletion in the mouse *Grid2* gene that is accompanied by ataxia. Administration of memantine led to impaired balance in ataxic mice, and the mutant mice showed deficits in the optokinetic response (OKR) and its learning. These optokinetic impairments were also sensitive to memantine. In addition, only a small population of cultured granule cells isolated from the mutant mice showed memantine-sensitive NMDA-induced currents. These phenomena were mimicked in wild-type (WT) mice following co-treatment with memantine and AMPA.

## 2. Results

### 2.1. The Hereditary Ataxic Mouse is Sensitive to Memantine

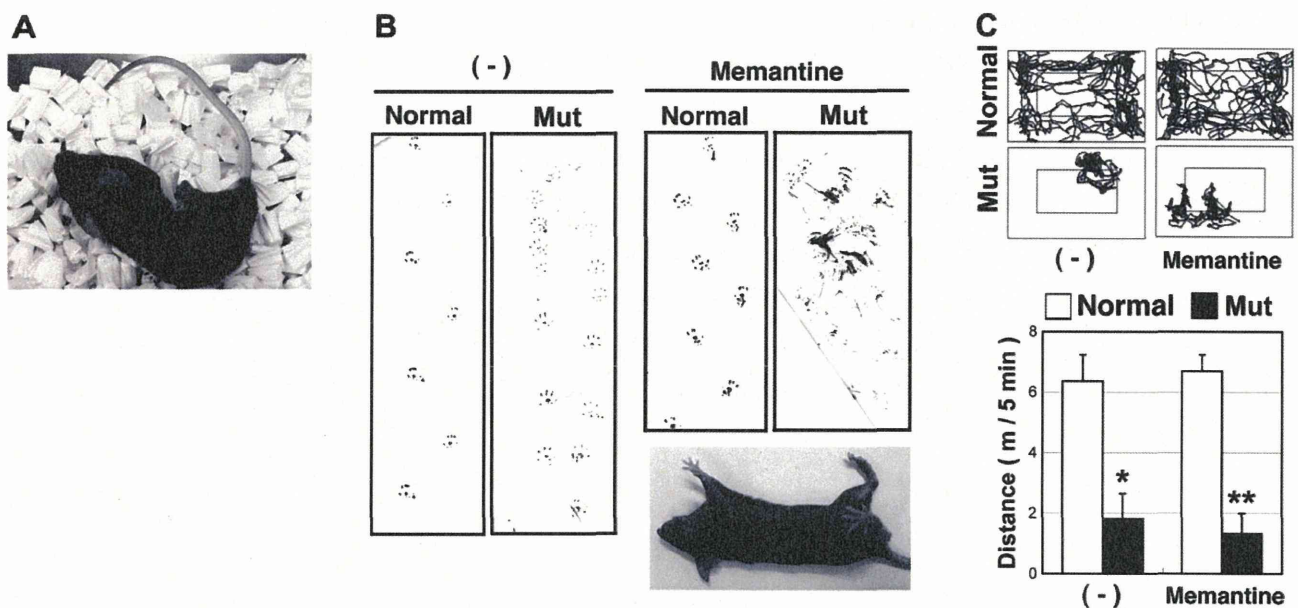
Two ataxic (male and female) mice appeared spontaneously in the same litter from a mating pair of hetero mice with the knockout (KO) allele for Salt-Inducible Kinase 3 (*Sik3*: *Sik3<sup>tm1Htake/+</sup>*) [19] on a C57BL/6J (B6) genetic background. The male was *Sik3<sup>+/-</sup>*, but the female was *Sik3<sup>+/+</sup>*. Because these ataxic mice failed to produce offspring by natural mating, we performed *in vitro* fertilization (IVF) using these ataxic mice and confirmed the heredity of the phenotype. To expound the mouse population, the original sperm of the ataxic male was also used for other IVF with the oocyte of normal B6 female, and offspring with the ataxic phenotype were obtained at the F2 generation (numbers of normal male, ataxic male, normal female, and ataxic female were 4, 1, 9, and 2, respectively), suggesting a recessively-inherited phenotype. Despite showing normal forelimb movements, the mutant offspring were characterized by a short-stepped gait and frequent falls due to suspected leg cramps (Figure 1A).

To examine whether the phenotype was caused by a neurogenic disorder, neuropharmacological compounds were tested in the normal and mutant mice. Because anesthesia (1% isoflurane) [20] alleviated leg cramps in the mutant mice, we first selected anticonvulsant drugs including gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor activators and NMDA receptor antagonists (Table 1). The GABA-A receptor activators felbamate and nitrazepam failed to modulate the phenotypes in the mutant mice. Whereas, memantine (10 mg/kg), an NMDA and 5HT<sub>3</sub> receptor antagonist which is also



reported to exert agonistic actions for the dopamine D2 receptor [21,22], impaired balance in the mutant mice, but not normal mice (Figure 1B and Supplementary Movie 1). Movement traces of the mice (Figure 1C) confirmed that 10 mg/kg memantine had no significant effect on walking in normal mice.

**Figure 1.** Isolation of ataxic mice with memantine susceptibility. (A) A mouse (6-month-old female) that exhibited an ataxic phenotype with rigid hind limbs. The phenotype became more severe with age; (B) Footprint analyses 10 min after memantine treatment (10 mg/kg, 12-week-old male). The soles of the hind limbs were labeled with India ink for a mouse that walked freely on paper. Rollover by the mutant mouse after memantine treatment is shown (lower right); (C) Monitoring mice walking after memantine treatment (10 mg/kg, 12-week-old male). The position of the mouse's head was tracked (left), and the walking distance was recorded for 5 min (right; expressed as the mean and SD;  $n = 6$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Next, we tested other NMDA receptor modulators. Similar to memantine, the NMDA receptor antagonist MK-801 (10 mg/kg) led to balance disturbances in the mutant mice. However, the normal mice also showed balance disturbances at this dose (Table 1). (R)-CPP also produced balance disturbances only in the mutant mice (Supplementary Movie 2), whereas ifenprodil, Ro25-6981, or the AMPA receptor antagonist DNQX did not produce balance disturbances in the mutant or normal mice. However, slower movements were observed in mutant mice following administration of DL-AP7.

Because serotonin reuptake inhibitors are used to treat vertigo [23], and the 5HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron causes headache and dizziness [24], we examined whether ondansetron affected the mutant mice. Both mutant and normal mice showed decreased activity with ondansetron (10 mg/kg; Supplementary Movie 3), but no effect that was specific to mutant mice was observed. Moreover, enhanced cholinergic signaling following donepezil treatment [21] and activation of dopamine signals by L-Dopa [21,22] had no significant effect on behavior in both normal and mutant mice (Table 1). These results suggest that, in addition to the ataxic phenotype, the mutant mice were characterized by enhanced memantine susceptibility, which was probably due to impaired NMDA receptor functions. The inconsistency in the efficacy of NMDA receptor antagonists on balance disturbance might result

from differences in NMDA receptor subunit subtype-specificity and/or effective dose among the antagonists; 10 mg/kg and 10–20 mg/kg might be the threshold doses to affect balance in the mutant mice for memantine and (*R*)-CPP, respectively.

**Table 1.** Pharmacological effectors on mutant mice phenotypes.

Chemical	Category	Dose (mg/kg)	Number of Mice	Movement of Normal Mice	Movement of Mutant Mice
Memantine	NMDA-R antagonist	2	2	NS	NS
		10	2	NS	Balance loss
MK-801	NMDA-R antagonist	2	2	NS	NS
		10	3	Balance loss	Balance loss
DL-AP7	NMDA-R antagonist	30	2	NS	Slow movement
(R)-CPP	NMDA-R antagonist (NR2A antagonist)	10	4	NS	Balance loss *
		20	2	NS	Balance loss
Ro25-6981	NMDA-R antagonist	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Ifenprodil	NMDA-R antagonist (NR2B antagonist)	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Felbamate	NR2B antagonist GABA-R activator	30	2	NS	NS
Nitrazepam	GABA-R activator	30	2	NS	NS
Isoflurane	GABA-R activator	1% in air	2	Slip	Slip
DNQX	AMPA/Kainate receptor antagonist	2	3	NS	NS
		10	3	NS	NS
Ondansetron	5-HT3 antagonist	5	2	NS	NS
		10	2	Not move	Not move
Donepezil	acetylcholinesterase inhibitor	10	3	NS	NS
L-Dopa	Dopamine precursor	20	3	NS	NS

NS: No significant effect was observed. \*: 2 mice.

## 2.2. Impaired OKR and Learning in the Ataxic Mice

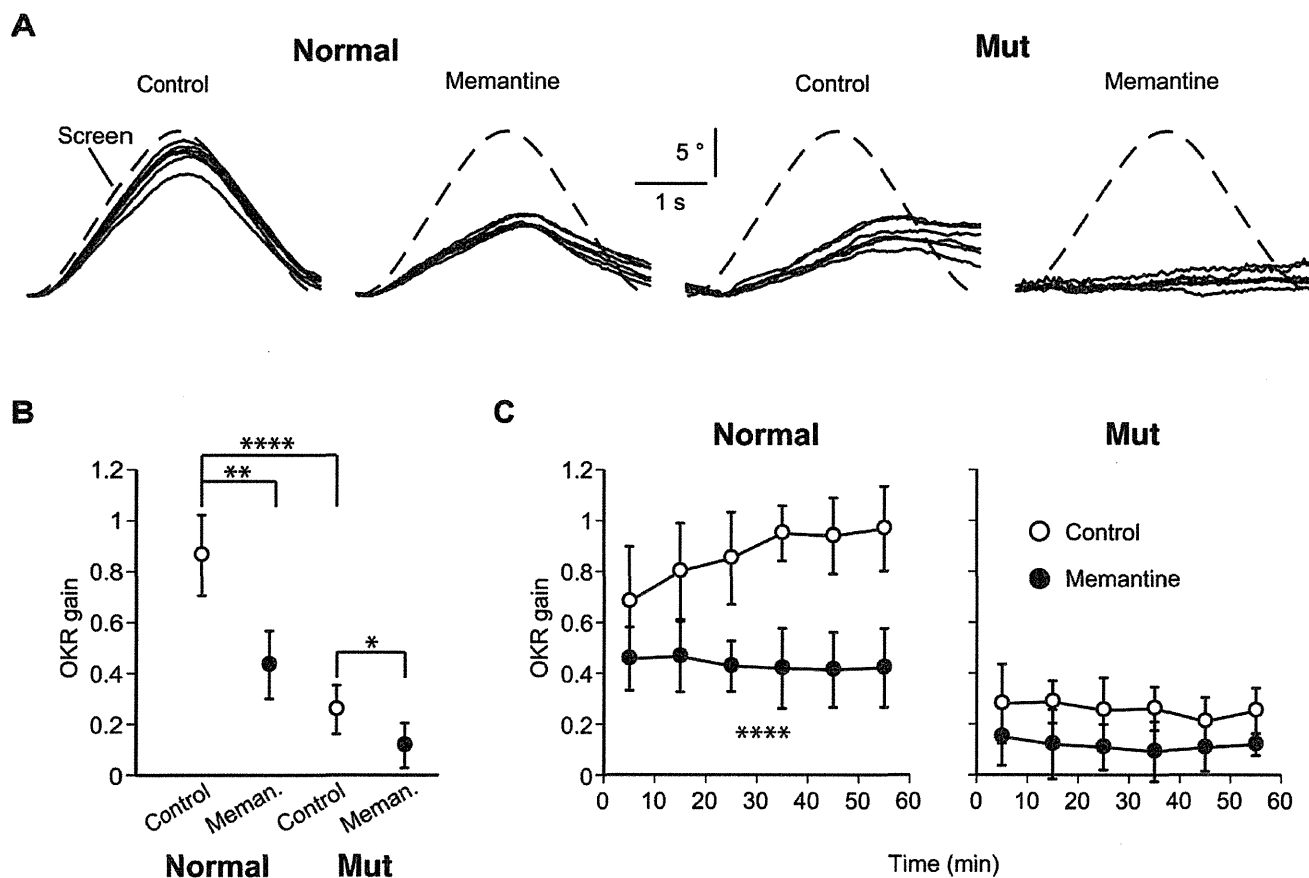
Gait disorders are a common pathology in patients with spinocerebellar degeneration, and are sometimes accompanied by vertigo resulting from oculomotor dysfunction [25,26]. Memantine also affects oculomotor functions in patients with cerebellar ataxia [27]. To examine whether our mutant mice also had oculomotor impairments, we measured the OKR and OKR adaptation, a form of cerebellum-dependent learning [28,29], and used the results from these assays to quantify memantine susceptibility (Supplementary Figure S1).

Normal and mutant mice were subjected to the OKR assay and horizontal visual pattern oscillations were given (Figure 2A). The normal mice could track the stimulus screen, whereas the mutant mice could not. Memantine (10 mg/kg) significantly lowered the overall OKR gain throughout a 1 h session in normal mice while the OKR in mutant mice was completely abolished (Figure 2B).



To evaluate OKR adaptation, the mean OKR gain was plotted for each 10-min interval (Figure 2C). Saline-injected normal mice (control) exhibited a time-dependent increase in the OKR gain, but no gain increase was observed in the mutant or the memantine-treated normal mice.

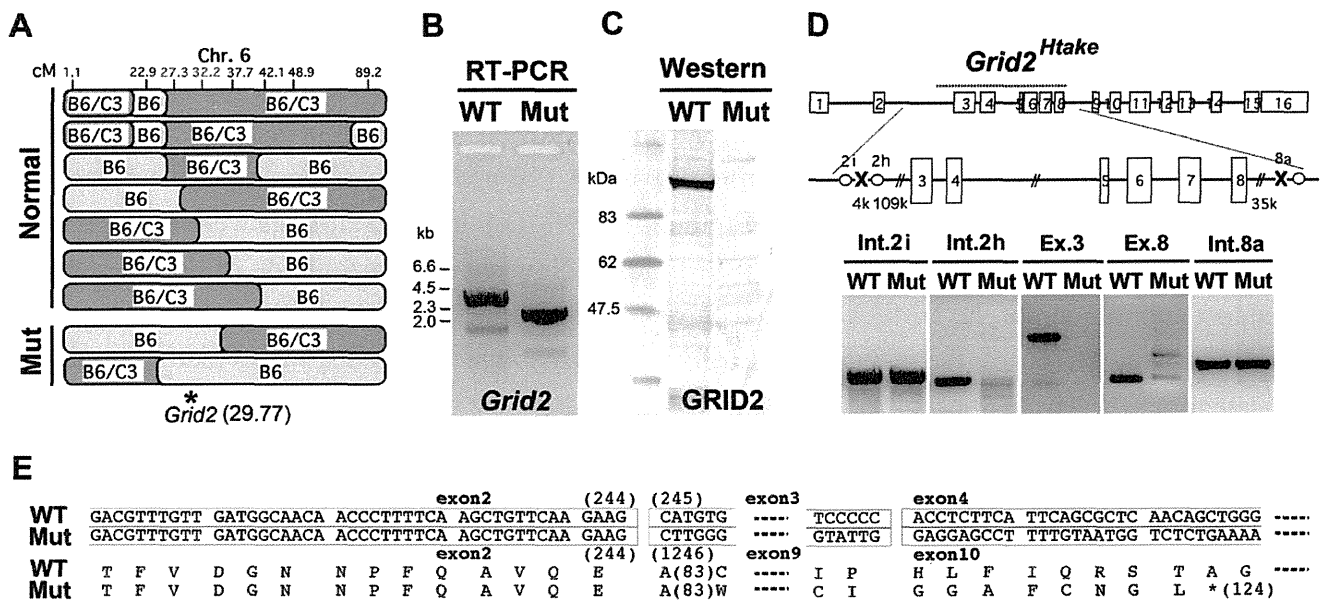
**Figure 2.** The optokinetic response (OKR) and its susceptibility to memantine. **(A)** The OKR of normal and mutant mice after intraperitoneal injection of saline (control) or memantine-containing saline (10 mg/kg). Measurements commenced 10 min after injection. Representative OKRs from normal and mutant mice are shown. The relative pupil azimuth is plotted against time. Each trace indicates the average over each 10-min period of a 1-h measurement session. Screen, movement of the stimulus screen; **(B)** Overall OKR gain throughout the 1-h session with or without memantine. Dots and error bars, mean  $\pm$  SD;  $n = 5$  for each data point. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , multivariate ANOVA. The overall OKR gain was calculated by averaging the OKR gains for all 10-min periods in a single 1-h session (see panel C); **(C)** Time course of the mean OKR gain for normal ( $n = 5$ ) and mutant ( $n = 5$ ) mice. Each dot indicates the average over a 10-min period of a 1-h measurement session. Error bars indicate  $\pm$ SD. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. the control for time  $\times$  drug interaction, repeated measures ANOVA.



2.3. Microsatellite Analysis in the Ataxic Mice

Because the pharmacological analyses were unable to predict the gene responsible for the ataxic phenotype, we performed a microsatellite analysis to identify the gene. Sperm were isolated from an ataxic mouse (N0: C57BL/6J[B6], B6/B6) and used to perform IVF with oocytes from C3H/HeN (C3) mice (normal: C3/C3). Oocytes were prepared from the N1 female (B6/C3 hetero-mice) and used for a second round of IVF using the original sperm from the N0 (B6/B6) ataxic mice, which produced 137 N2 mice (75 non-ataxic (the responsible genomic-region should be B6/C3) and 62 ataxic (the responsible genomic-region should be B6/B6)). Using 60 microsatellite markers and DNA from eight N2 non-ataxic mice, we screened heterogenic-regions composed of both B6 and C3 chromosomes. We observed that D6Mit149 (Chromosome 6, 48.93 cM) was amplified as the heterogenic-type in all eight mice. Next, we analyzed other markers near D6Mit149 using DNA from 70 mice (Figure 3A) and narrowed the responsible region to 27.3–32.2 cM (D6Mit384–D6Mit243), which was also associated with the phenotype of enhanced memantine susceptibility.

**Figure 3.** Identification of the responsible gene. (A) Microsatellite analyses of N2 mice. B6, parental allele of the ataxic mouse (C56BL/6J); C3, WT allele of C3H/HeN. N2 mice were produced following *in vitro* fertilization with oocytes from hetero N1 (B6/C3) and sperm from the original N0 ataxic B6 (B6/B6). Markers are described in the Experimental Section. Normal and Mut indicate mice with or without the ataxic phenotype, respectively. The *Grid2* gene is located 29.77 cM in chromosome 6; (B) The full-length open reading frame ORF of *Grid2* was amplified from cDNA prepared from the cerebellum of WT and Mut mice; (C) Western blotting for GRID2; (D) A diagram showing break points in the *Grid2* gene of ataxic mice; (E) Putative protein sequence of GRID2 in *Grid2<sup>Htake/Htake</sup>* mice is predicted from diagram D and the direct ORF sequence.



When we searched for genes that have known associations with ataxic phenotypes, we noticed the *Grid2* gene at 29.77 cM [30]. To determine whether this gene was responsible for the observed