

令和元年6月5日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18878

研究課題名(和文)うつ病発症における脳アストログリア空間的カリウム緩衝機構の生理的役割の解明

研究課題名(英文)The role of potassium buffering mediated by brain astroglial cells in the onset of depression

研究代表者

中谷 善彦(NAKATANI, YOSHIHIKO)

国際医療福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：40582169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳アストログリアにおいて、内向き整流性カリウムチャンネル(Kirチャンネル)の発現が知られている。これらは脳内微小環境におけるカリウムイオン緩衝能に寄与していることから、うつ病の発症に関連する可能性が示唆されている。本研究では、分化誘導したC6グリオーマに発現したKirチャンネルに対してストレスホルモンであるコルチコステロンの影響を検討したところ、コルチコステロンの曝露によってKir4.1チャンネルの発現ならびにKirチャンネル電流の減少が認められた。このことから、うつ病の発症においてストレスホルモンによる脳アストログリアを介した脳内カリウムイオン緩衝能の変調が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ストレスホルモンによってアストログリアのKirチャンネル発現抑制およびカリウムイオン流入抑制が引き起こされることを明らかにした。これにより、ストレスホルモンがKirチャンネルを介した脳アストログリアの機能変調に関与している可能性が示唆された。現在、うつ病の発症機序として「モノアミン仮説」に基づくニューロンにおける神経伝達物質の遊離・取り込みバランスの破綻が提唱されている。既存の抗うつ薬の作用点もこの仮説に基づくものが大半であるが、それらの奏効率は50-60%である。今回の成果は、新規抗うつ薬開発の新たな標的を提示すると共に、うつ病発症メカニズムの解明を進める上でも意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that the inward rectifying potassium channels (Kir channels) express on astroglial cells in the brain. It has been suggested that Kir channels related to the onset of depression because these channels contribute to the potassium buffering in the brain microenvironment. In this study, we demonstrated that corticosterone (CORT), which is known as stress hormone, decrease the expression level of Kir4.1 channels on differentiated C6 glioma. In addition, it was observed that the amplitude of Kir channels current was decrease by CORT treatment. These results indicated that the modulation of potassium buffering in the brain microenvironment might induced by stress hormone might be related to the onset of depression.

研究分野：神経薬理学

キーワード：グルココルチコイド カリウムチャンネル Kir C6グリオーマ

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

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病などの精神疾患の発症機序として、「モノアミン仮説」に基づくニューロンにおける神経伝達物質の遊離・取り込みバランスの破綻が提唱されている。既存の抗うつ薬においても、この仮説に基づく治療標的に作用する物が数多く上市されているが、それらの奏効率が 50-60%であることを鑑みると、ニューロン以外のうつ病治療標的細胞もしくは標的分子が存在することが考えられる。近年、うつ病の発症をアストログリアの機能不全に伴う神経栄養因子・成長因子の分泌バランスの破綻とする「グリア仮説」が提唱されている。これに加え、アストログリアには K<sup>+</sup>チャンネルを介して脳内微小環境における K<sup>+</sup>濃度を調節する「空間的カリウム緩衝機構」機構の存在が知られている。

実際に、アストログリアの K<sup>+</sup>チャンネルと中枢性疾患との関連性について幾つかの報告がなされている。てんかんにおいては、てんかん発症モデルラットのアストログリア Kir4.1 の発現減少に伴い、大脳辺縁系の過興奮が生じることが認められている (Harada Y et al. Brain Res. 2013 1517:141-149)。また、うつ病との関連性においては、幾つかの K<sup>+</sup>チャンネル作用薬がうつ様症状の指標となる強制水泳試験での無動時間に影響を与えることや (Galeotti N. et al. Br J Pharmacol. 1999 126: 1653-1659.) 三環系抗うつ薬であるノルトリプチリンがアストロサイトの Kir4.1 機能に影響を及ぼすことが報告されている (Su S. et al. J Pharmacol Exp Ther. 2007 320: 573-580)。これらを踏まえ、脳内アストログリアが脳内微小環境における K<sup>+</sup>イオン濃度調節機構「空間的カリウム緩衝機構」を介し、ニューロンの情報伝達を二次的に調節する可能性が示唆されている (Kofuji P and Newman EA. Neuroscience. 2004 129:1045-1056.)。

以上より、脳アストログリア K<sup>+</sup>チャンネルが中枢神経系における脳内微小環境の恒常性及び神経ネットワーク維持に重要であり、うつ病の発症における標的分子となり得る可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たなうつ病治療標的としてアストログリアに着目し、グルココルチコイドによる K<sup>+</sup>チャンネルを介した「空間的カリウム緩衝機構」の破綻と、それに続くニューロンへの影響を明らかにすることで、うつ病発症に関わる新規標的分子を見出す。また、これを回復させる内因性成長因子や K<sup>+</sup>チャンネル活性化・阻害薬の探索を行い、抗うつ作用を持つ新規物質の発見を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスアストログリア由来 C6 グリオーマの培養と分化誘導

アストログリア細胞株としてマウス由来の C6 グリオーマを実験に用いた。C6 グリオーマは JCRB 生物資源バンクより購入した。細胞の培養は Ham's F10 medium を基礎培地とし、これに非働化したウシ胎児血清およびウマ血清をそれぞれ 15% および 2.5% ずつ加え、抗生物質として penicillin および streptomycin を添加したものをを用いた。細胞の継代は 3 日ないし 4 日毎に行い、隔日で培地を交換した。C6 グリオーマの分化誘導は、継代培養後に 1mM dibutyryl-cAMP を添加した 1% ウシ胎児血清含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に適切な数の細胞を懸濁・播種し、行った。

### (2) ウェスタンブロット法による Kir チャンネルサブタイプの検討

30 分から 48 時間の 1mM dibutyryl-cAMP を含む分化誘導培地曝露による C6 グリオーマにおける Kir チャンネル発現の変化をウェスタンブロット法により検討した。検討の対象としたチャンネルは、アストログリアに発現が認められることが報告されている Kir2.1, 4.1, 4.2 および 5.1 の 4 種類とした。また、C6 グリオーマの分化誘導の目安として、GFAP の発現量の変化についても併せて検討した。また、これに加え、グルココルチコイドの一つであるコルチコステロン (CORT) を分化誘導時に曝露した場合の Kir チャンネルおよび GFAP の発現量の変化についても検討した。

### (3) ホールセル・パッチクランプ法による Kir チャンネル電流の測定

ホールセル・パッチクランプ法を用い、分化誘導 C6 グリオーマにおける Kir チャンネル電流の測定を行った。電極内液として、140mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 4mM MgATP, 10mM HEPES (pH7.2) を、細胞外液として 150mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM d-glucose, 10mM HEPES (pH7.4) を用いた。測定条件として、静止膜電位を -50mV に設定し、-130mV から -20mV まで、10mV ずつステップパルスを与えた。

### (4) Asante Potassium Green-2 (APG-2) を用いたカリウムイオン流入の可視化

分化誘導 C6 グリオーマにおけるカリウムイオンの細胞内取り込み量の変化を、カリウムイオン蛍光プローブである Asante Potassium Green-2 を用いて検討した。CORT 存在下および非存在下において C6 グリオーマを分化誘導後、2.5 μM APG-2 を加えた分化誘導培地で 37 °C、1 時間インキュベーションした。細胞を DMEM で洗浄した後、10% FBS 含有 DMEM で 37 °C、20 分間インキュベーションした。その後、培地中に 40 mM KCl を加え、蛍光顕微鏡下で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) C6 グリオーマに発現する Kir チャンネルサブタイプの同定

アストログリアでの発現が認められている Kir2.1, 4.1, 4.2 および 5.1 について、C6 グリオーマにおける発現の有無をウェスタンブロット法で検討したところ、その発現が極めて低いことが明らかとなった。また、アストログリアのマーカーである GFAP の発現も低かったことから、アストログリアへの分化誘導を試みた。そこで、アストログリアへの分化誘導剤として報告されている dibutyryl-cAMP を培地に添加して 0.5, 1, 3, 6, 24 および 48 時間と時間経過を追って培養したところ、分化誘導 24 時間以降から、GFAP の強い発現誘導が認められたことから、C6 グリオーマがアストログリア様細胞に分化誘導されたことが確認できた (図 1A)。

この結果を踏まえ、同分化誘導条件下における各 Kir チャンネルおよび Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase の時間経過によるタンパク質発現変化を確認したところ、培養 24 時間以降から Kir4.1 の発現増加が認められた (図 1B)。このことから、C6 グリオーマの分化誘導と Kir4.1 の発現上昇とに相関性がある可能性が示唆された。続いて、本分化誘導条件下においてグルココルチコイドホルモンである CORT を添加して培養したところ、分化誘導による GFAP および Kir4.1 の発現上昇の抑制が認められた。以上のことから、グルココルチコイドホルモンにより C6 グリオーマの分化誘導が抑制される可能性が示唆された。

##### (2) C6 グリオーマにおける Kir チャンネル電流の測定

ホールセル・パッチクランプ法により、C6 グリオーマ分化誘導前および分化誘導後における内向き整流性カリウムチャンネル電流を試みた。分化誘導前の C6 グリオーマでは、4-aminopyridine (4-AP) の投与によって抑制される電位依存性カリウムチャンネル由来の外向き電流が観察されたものの、内向き整流性カリウムチャンネル由来の電流は観察されなかった。分化誘導 72 時間後の C6 グリオーマ細胞でも同様に観察されなかったものの、分化誘導 120 時間後の C6 グリオーマ細胞では、電位依存性の外向き電流の他、強い過分極刺激により内向き電流が認められた。この内向き電流は、4-AP の投与による影響を受けなかったことから、内向き整流性カリウムチャンネル由来の電流であることが示唆された。また、本分化誘導条件下において CORT を添加して培養したところ、内向き電流は観察されなかった。以上のことから、CORT (100 μM) により、分化誘導された C6 グリオーマにおけるカリウムチャンネルの電気生理学的性質が変化することが示唆された。

##### (3) APG-2 を用いた細胞内カリウムイオンの可視化

C6 グリオーマ分化誘導前および誘導後の培地中に 40 mM KCl を加え、細胞内における APG-2 シグナルを蛍光顕微鏡下で観察、比較した。その結果、分化誘導前の細胞と比べ、誘導後の細胞において細胞内での APG-2 由来蛍光シグナルの増大が観察された。しかし、予想に反し、分化誘導開始時に CORT (100 μM) を添加した細胞における細胞内 APG-2 由来蛍光シグナルの減少傾向は認められなかった。現在、APG-2 によるカリウムイオン流入可視化条件の確立を試みている。

以上の結果から、アストログリアにおける Kir チャンネル発現調節に CORT が関与していることが認められた。このことから、ストレス曝露によりストレスホルモンとして知られるグルココルチコイドの血中濃度が上昇することで、脳内における K<sup>+</sup>チャンネルを介した「空間的カリウム緩衝機構」に変調を来す可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Nakatani Y, Amano T. Functional Modulation of Nav1.2 Voltage-Gated Sodium Channels Induced by Escitalopram. *Biol Pharm Bull.* 2018 41:1471-1474.

Nakatani Y, Kobe A, Kuriya M, Hiroki Y, Yahagi T, Sakakibara I, Matsuzaki K, Amano T. Neuroprotective effect of liquiritin as an antioxidant via an increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression on B65 neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 2017 815:381-390.

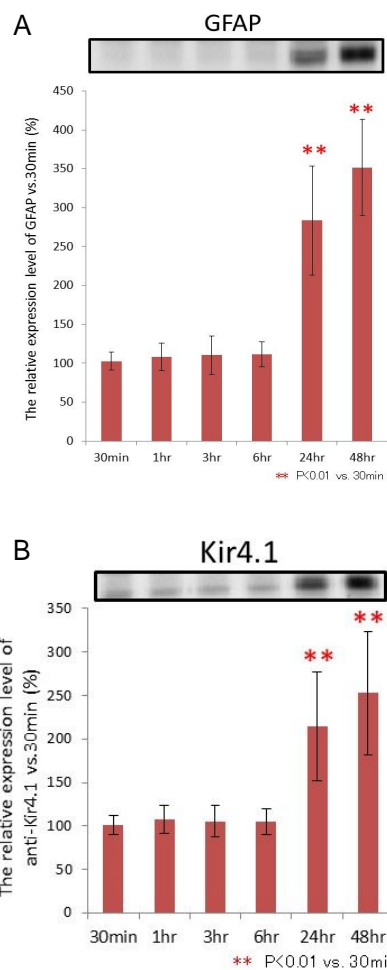


図 1 分化誘導 C6 グリオーマにおける GFAP (A) および Kir4.1 (B) 発現量の時間経過による変化

Nakatani Y, Amano T, Yamamoto H, Sakai N, Tsuji M, Takeda H. Yokukansan enhances the proliferation of B65 neuroblastoma. J Tradit Complement Med. 2016 7:34-44.

Nakatani Y, Amano T, Takeda H. Corticosterone Inhibits the Proliferation of C6 Glioma Cells via the Translocation of Unphosphorylated Glucocorticoid Receptor. Biol Pharm Bull. 2016 39:1121-1129.

Yamamoto K, Tsuboi M, Kambe T, Abe K, Nakatani Y, Kawakami K, Utsunomiya I, Taguchi K. Oxaliplatin administration increases expression of the voltage-dependent calcium channel  $\alpha_2$ -1 subunit in the rat spinal cord. J Pharmacol Sci. 2016 130:117-22.

Hotta S, Nakatani Y, Kambe T, Abe K, Masuda Y, Utsunomiya I, Taguchi K. Effects of IgG anti-GM1 monoclonal antibodies on neuromuscular transmission and calcium channel binding in rat neuromuscular junctions. Exp Ther Med. 2015 10:535-540.

[学会発表](計9件)

中谷 善彦、天野 託

The inhibitory effect of escitalopram on Nav1.2 voltage-gated sodium channels (第92回日本薬理学会年会、2019.3.15)

中谷 善彦、塚田 和代、山口 真里奈、山内 美輝、根来 加菜子、矢作 忠弘、松崎 桂一、榊原 巖、天野 託

牛車腎気丸構成生薬おける Nav1.7 チャネル電流抑制作用の検討 (第133回日本薬理学会近畿部会、2018.6.1)

藤野 恵理、八木澤 昂大、渡邊 有加里、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託

リン酸化 Akt および MAPK 発現変化を介した新規ベンズインドール誘導体の抗グリオーマ作用の解明 (第138回日本薬理学会関東部会、2017.3.11)

塚田 和代、片所 真紀、山内 美輝、根来 加菜子、山口 真里奈、塩川 真穂、遠藤 沙希子、中谷 善彦、矢作 忠弘、松崎 桂一、天野 託

牡丹皮を介した六味丸の Nav1.7 チャネル電流抑制作用 (第134回日本薬理学会関東部会、2016.7.9)

高橋 詩織、増子 瑞希、山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、高木 正史、中谷 善彦、天野 託

Dibutyryl-cAMP による Neuro2a 分化誘導時における SNAP25 と Tyrosine hydroxylase との相互作用についての検討 (第134回日本薬理学会関東部会、2016.7.9)

渡邊 有加里、藤野 恵理、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託  
抗悪性腫瘍薬開発を目指した新規ベンズインドール誘導体による抗グリオーマ作用とその作用機序の検討 (第134回日本薬理学会関東部会、2016.7.9)

中谷 善彦、天野 託、矢作 忠弘、辻 稔、武田 弘志

甘草含有成分である Iquiritin のセロトニン神経由来細胞株 B65 における menadione 誘導酸化ストレスに対する細胞保護効果とそのメカニズムに関する検討 (第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会合同年会、2015.9.24)

渡邊 有加里、高橋 詩織、Nyo Mi SWE、中谷 善彦、渡邊 敏子、天野 託

抗悪性腫瘍薬の開発を指向した新規ベンズインドール誘導体の抗グリオーマ作用の検討(生体機能と創薬シンポジウム2015、2015.8.27)

山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、高木 正史、高橋 詩織、中谷 善彦、天野 託  
Neuro2a細胞における SNAP25 の細胞生存に及ぼす影響(生体機能と創薬シンポジウム2015、2015.8.27)

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

該当なし

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者  
該当なし

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者  
該当なし

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。