

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19590069  
 研究課題名（和文）脳発達に伴う GIRK チャンネル機能の変化、ストレスの影響と GIRK 抑制薬の作用  
 研究課題名（英文）Developmental change, effects of stress and GIRK channel inhibitor on GIRK channel function.  
 研究代表者  
 白崎 哲哉（SHIRASAKI TETSUYA）  
 熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
 研究者番号：30264047

研究成果の概要（和文）：生後早期の心理的ストレスが脳発達に伴う GIRK チャンネル機能の変化に与える影響を知る目的で、生後 2 日目から 14 日まで 1 時間または 2 日目から 9 日目まで 3～4 時間の母仔隔離ストレスを与えた。その結果、情動や記憶学習に關与する海馬神経細胞のセロトニン誘発 GIRK 電流が増強し、縫線核では変化しなかった。GIRK2 遺伝子の発現レベルは、海馬で減少し、縫線核と前頭皮質では変化しなかった。行動実験で不安レベル指標が減少した。よって、母仔隔離が海馬 GIRK チャンネルの機能に影響することが示唆される。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of early life stress on the functional change of GIRK channel in developing brain, rat pups were given maternal deprivation (MD) stress for 1h a day from postnatal day (PND) 2 to 14 or for 3 to 4h a day from PND2 to 9. As a result, the 5-HT-induced GIRK current ( $I_{5-HT}$ ) was increased in hippocampal neurons. GIRK2 expression level was decreased in the hippocampus but not in prefrontal cortex and raphe nucleus. Anxiety level index in behavioral experiment was decreased. These suggest that MD stress affects the function of GIRK channel in the hippocampus.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学、K<sup>+</sup>チャンネル、神経疾患、電気生理

## 1. 研究開始当初の背景

近年我々は、クロペラスチンなどの非麻薬性中枢性鎮咳薬が比較的低濃度でGタンパク

質共役型内向き整流性K<sup>+</sup>（GIRK）チャンネルの機能を阻害することを見出した。GIRKチャンネルは中枢神経系に広く分布し、様々なGi共役

型受容体と共役できることが示されている。その中には、ヒトの気分、感情、ストレス反応などに係わるモノアミン神経系の受容体（ドパミン $D_2$ 、 $D_4$ 、セロトニン $5-HT_{1A}$ 、 $2$  アドレナリンなど）、中枢神経の基本的な興奮性および抑制性神経伝達物質であるグルタミン酸とGABAの受容体（mGluR1a、mGluR2、GABA $_B$ ）、記憶・学習に係わるコリンおよびプリン作動性神経の受容体（ $M_2$ ムスカリン、 $A_1$  アデノシン、 $P_{2Y}$ プリン）、痛覚などに関わるオピオイド系受容体（ $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ およびNOP）、またこれらと相互作用する大麻成分カンナビノイドの受容体（ $CB_1$ 、 $CB_2$ ）などが含まれる。

過去約10年間の研究から、GIRKチャネルの分布や機能的に共役できる受容体の種類、GIRKチャネルの活性化・不活性化機構については知見が集まりつつある。近年、ある種の抗うつ薬や麻酔薬などがGIRKチャネルを抑制することも報告されている。しかし、これらの抑制作用は弱く、またすべての抗うつ薬や麻酔薬などがGIRKチャネルを抑制するわけでもない。このようなことから、中枢神経機能におけるGIRKチャネルの生理・薬理的役割については、ほとんどわかっていない。

興味深いことに、クロペラスチンは、現在知られている中で最も強くGIRKチャネルを抑制する低分子化合物であり、NMDA受容体、グリシン受容体、 $Na^+$ チャネル、遅延整流性 $K^+$ チャネル、 $A$ 型 $K^+$ チャネルなどへの作用も弱い。また、クロペラスチンがテルチアピン（一般にGIRKチャネルブロッカーとされている）や $Ba^{2+}$ （低濃度でGIRKチャネルを抑制）とは異なる様式でシングルGIRKチャネル電流を抑制すること、細胞内の $PIP_2$ 結合関連部位と細胞外の少なくとも2箇所クロペラスチンの作用点があるらしいことなどを明らかにした。このようなことから我々は、クロペラスチンが、GIRKチャネルの生理・薬理的役割、ひいては脳機能の解明において重要なツールになるのではないかと考えている。

GIRKチャネルは、少なくともセロトニン神経の起始核において、 $5-HT_{1A}$ 受容体と共役し、セロトニンニューロンの興奮を負にフィードバック制御する。うつ病や統合失調症の他、双極性障害、強迫神経症、注意欠陥多動性障害（ADHD）、パーキンソン病などの難治性中枢疾患の発症に、モノアミン神経系の異常が少なくとも一部関与すると考えられている。よって、GIRKチャネルが、これらの疾患と何らかの関連を持つ可能性が考えられる。このような考えに基づき、我々は*in vivo*において、クロペラスチンが1)脳梗塞後の排尿障害、2)ADHDのモデル動物における多動、3)環境ホル

モン（ジエチルスチルベストロール）の胎仔期低用量暴露による学習障害をいずれも鎮咳薬用量で改善することなどを見出した。最近では、4)難治性うつ病モデルにおいても、うつ様症状の改善がみられている。また、治療が難しいとされる陰性症状にも有効な統合失調症治療薬であるカルピプラミンもGIRK電流を強く抑制する可能性が得られている。これらの結果は、難治性中枢疾患とGIRKチャネル機能の変化との関連を示唆するように思える。

## 2. 研究の目的

生活の質が急速に変化した現代において、我々は子供から大人まで様々なストレスにさらされて生活している。特に子供の脳において、ストレスなどによる脳の発達障害が様々な疾患や事件の引き金になっている可能性が考えられる。モノアミン神経系はヒトの気分、感情や意欲などに関わりが深いと考えられているが、そのいずれの起始核ニューロンにおいてもGIRKチャネルが発現していることは興味深い。ダウン症モデル動物の海馬、前頭葉および黒質においてGIRK2の発現異常があることが報告されている。このことは、精神・神経機能の発達にGIRKチャネルが関わる可能性を示唆する。本研究ではGIRKチャネルおよびその抑制が高次脳機能といかなる関わりを持ち、脳の発達やストレスによりその機能がどのように変化するか、GIRKチャネル抑制剤が高次脳機能障害や発達期脳機能障害の治療薬に成り得るかを知る手がかりを得るために、以下の項目について検討する。

これまでGIRK電流抑制作用に関する知見はほとんど縫線核ニューロンで得られている。しかし、GIRKチャネルは脳幹部よりも海馬や大脳皮質など上位中枢に多い。ダウン症モデル動物での発現異常もこのような部位で見られている。また、GIRKチャネルサブタイプの発現は部位により異なる。そこで、電気生理学と急性単離標本の利点を生かし、脳高次機能に関わる領域（海馬、大脳皮質、黒質、腹側被蓋、青斑核など）において、神経細胞の種類ごとにGIRKチャネルの機能とクロペラスチンおよびカルピプラミンの作用を明らかにする。

また、幼少期のストレスがモノアミン系の異常を介してその後の脳高次機能に障害を与える可能性が考えられるため、脳の発達障害を念頭に、発達期のストレスがGIRKチャネルの機能に影響するか否かについて、クロペラスチンやカルピプラミンの作用と共に検討する。さらに、成熟動物におけるGIRKチャネルの機能に与えるストレスの影響も検討する。

さらに、卵母細胞発現系を用いてGIRK2や

GIRK4 の発現チャンネルに対するクロペラスチンとカルピプラミンの作用を検討し、適用症の異なる2薬物にサブタイプ特異性や作用様式の点で違いがあるか明らかにする。

### 3. 研究の方法

**母仔隔離:** Wistar系ラットを用い、1) 生後2日目~14日目まで1日1時間(9時~12時までの間)、または2) 生後2日目~9日目まで1日3~4時間(8時~14時までの間、または16時~20時までの間) 隔離した。

**ニューロンの急性単離:** エーテル麻酔下に断頭し、厚さ375~500 $\mu$ mの脳スライスを作製した後、31 にてプロナーゼ(1mg/8cc)とサーモリジン(1mg/8cc)により酵素処理した。酵素処理後、顕微鏡下に目的の脳部位を眼科用メスで切りだし、微小ピペットを用いて機械的に単離した。細胞外液にはクレブス液を用い、常時95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>を通気した。

**パッチクランプ法:** 急性単離したニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、保持電位-80mVにて全細胞電流を記録した。まず、クレブス液中にてシールを形成後、5mVの脱分極パルスに対するピペット容量を補正し、さらに、膜容量とシリーズ抵抗が一定になったところで、膜電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル電流を測定し、空間固定も良好であることを確認した。GIRKチャンネル電流は、クレブス液のNaClをKClで置換し、20mMとした細胞外液中で記録した。薬液は、Y-チューブ用により投与した。電極内液の組成は、80mM KCl, グルコン酸カリウム70mM, HEPES 10mMでpHは、7.2とした。

#### GIRKチャンネルサブユニットcRNAの調整:

GIRK1 (gene number NM\_031610)、GIRK2 (同NM\_001025584) およびGIRK4 (同NM\_017297) のcDNAをNot1またはKpn1を用いてpcDNA3.1 (+/-) プラスミドから切り出し、mMESSAGE mMACHINE T7 RNA Transcription Kit (Ambion, Austin, Texas, USA)を用いてcRNAを調製した。得られたcRNAは、MEGAclear (Ambion, Austin, Texas, USA)を用いて精製した。

#### アフリカツメガエル卵母細胞の調整:

体重120~130gの雌性アフリカツメガエルから卵母細胞を抽出し、MBS (in mM; NaCl 88, KCl 1, NaHCO<sub>3</sub> 2.4, HEPES 10, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.33, CaCl<sub>2</sub> 0.41, MgSO<sub>4</sub> 0.82, pyruvic acid 2.5, pH7.4) 中で分離後、濾胞細胞を除去した。MicroSyringe Pump(UMC4, WPI社)を用いて、卵母細胞にcRNAをインジェクションし、恒

温装置(18 )で2~3日間培養した後、実験に供した。

**2電極膜電位固定法:** マイクロマニピュレーターを用い、実体顕微鏡で観察しながら、MBS中の卵母細胞に膜電位測定用微小電極(電極内液; 3M KCl)と電流注入用微小電極(電極内液; 3M CH<sub>3</sub>COOK)を刺入した。2電極膜電位固定増幅器(CEZ-1250, 日本光電)で静止膜電位が-30mVより深いことを確認した後、膜電位を-80mVに固定して全細胞電流を測定した。GIRKチャンネル電流の測定には、96K細胞外液(in mM)KCl 96, NaCl 2, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.5, HEPES 5. pH7.5)を用いた。得られた膜電流は、1kHz以上の高周波ノイズを増幅器のフィルターでカットした後、フラットベクトレコーダーで記録した。同時に、4チャンネルカセットレコーダー(MR-10, TEAC)を用いて、カセットテープに磁気記録した。

#### マイクロダイアリシス:

ペンタバルビタール(50.0mg/kg, i.p.)麻酔下に、ラットを脳定位固定装置に固定し、Paxinos and Watson (1986)のラット脳地図に従ってブレグマから尾側に3.8 mm、外側に1.6 mm、大脳表面から3.6 mmの海馬CA1にガイドカニューレを留置した。マイクロシリンジポンプ(ESP-32, エイコム)を用い、プローブから人工細胞外液(145 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, and 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)を2 $\mu$ l/分の速度で灌流し、回収したサンプルを6分ごとに電気化学検出器付きHPLC (HTEC-500, エイコ)に注入して、セロトニンおよびドパミンの濃度を測定した。測定開始から1時間後、レベルが安定したところで10回測定し、その平均値を求めた。クロペラスチン投与群では、クロペラスチン投与後直ちに測定を開始し、1時間後から同様に10回測定して平均値を求めた。終了後、プローブの位置を組織学的に確認し、正しくCA1に挿入されていたラットの結果のみデータとして採用した。

#### GIRK2 mRNA量の定量:

ジエチルエーテル麻酔下にラットを断頭後、速やかに脳を摘出し、氷冷したショ糖リンガー液に1分間浸漬した後、ブレインスライサーを用いて脳切片を作成した。実体顕微鏡下に縫線核、海馬、前頭前皮質をすばやく切り出し、液体窒素にて凍結後、RNA抽出まで-80 で保存した。

Total RNAは、TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)を用い、定法に従って抽出した。iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)を用い、Total RNA 0.2 $\mu$ gからsingle strand cDNAを合成した。合成したcDNA 1 $\mu$ lにラットGIRK2に特異的なプライマーとSYBR Green Supermix (Bio-Rad)を加え、Chromo4TM (Bio-Rad)を用いてリアルタイムPCRを行っ

た。内部標準にはラット GAPDH を用いた。

発現レベルの解析は、まず Opticon Monitor Version3.1 (Bio-Rad)を用いて threshold cycle (Ct)を求め、GIRK2 のスタンダードカーブより DNA 量を算出した。その値を GAPDH の DNA 量で補正したものを各サンプルの mRNA レベルとした。

**オープンフィールド試験:** 高さ 50 cm の壁で覆われた  $100 \times 100 \text{ cm}^2$  のオープンフィールドの中央にラットを入れ、フィールドの中央で高さ 1.7m の位置に設置した CCD カメラを用いてその行動を 5 分間観察した。自発行動量の解析には、LimeLite2 自動追尾システム (ACTIMETRICS 社、ウィルメット、イリノイ州、米国)を用い、総行動量、 $10 \times 10 \text{ cm}$  のエリアを横切った回数、壁から 20cm 以上離れたエリアに滞在した時間を測定した。測定開始前には、嗅覚情報によるエラーを防ぐため、必ず 70%エタノールでフィールドを拭いて匂いを消去した。クロペラスチン投与群では、クロペラスチン投与の 45 分後に測定を開始した。

**高架式十字迷路試験:** 高さ 40cm、走路長 30cm、走路幅 7 cm の高架式十字迷路 (MSM-509S、ニューロサイエンス社)をオープンフィールドに設置し、LimeLite2 自動追尾システム (ACTIMETRICS 社、ウィルメット、米国)を用いて、オープンアーム滞在時間、オープンアーム侵入回数、クローズドアーム滞在時間、クローズドアーム侵入回数、センタープラットフォーム滞在時間を測定した。

#### 4. 研究成果

現在、特異的な GIRK チャンネル阻害剤は存在しない。一般に GIRK チャンネル阻害剤と認識されているテルチアピンも GIRK チャンネルより RONK1 チャンネルに対して 10 倍低濃度で作用する。しかもペプチドであるため、高価であり、中枢への移行性の点でも問題がある。よって、*in vivo*において中枢の GIRK チャンネルを阻害する目的では使用しにくい。

クロペラスチンは、GIRK チャンネル抑制作用のある低分子化合物の中で最も低濃度で作用し、かつ最大抑制が 100%を示す中枢性鎮咳薬である。また、膜電位依存性  $\text{Na}^+$ 電流、遅延整流性  $\text{K}^+$ 電流、A 型  $\text{K}^+$ 電流、NMDA 型グルタミン酸受容体応答、グリシン受容体応答等に対して比較的高濃度でしか作用せず、各種トランスポーターに対する親和性も低い。このため GIRK チャンネルに対する作用特異性が示唆されている。

中枢の GIRK チャンネルは、主に GIRK1/GIRK2 ヘテロ 4 量体 (GIRK1/2) として機能すると考えられるが、黒質ドパミンニューロンでは、GIRK2 ホモ 4 量体 (GIRK2/2) として機能する

ことが報告されている。このため、GIRK チャンネルサブタイプに対するクロペラスチンの特性を知ることは、今後の研究の展開のために重要である。

また、ピコペリダミンも縫線核の GIRK 電流を抑制する中枢性鎮咳薬であるが、心毒性のため発売が中止されている。このため、心毒性との関連から、心筋に特異的に発現する GIRK1/GIRK4 ヘテロ四量体 (GIRK1/4) への作用についても検討する必要がある。

そこで、やはり催不整脈作用があるテルフェナジンも含め、これらの各 GIRK チャンネルサブタイプに対する作用を検討した。

いずれのサブタイプを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞においても、 $-80 \text{ mV}$  に膜電位固定下し  $96 \text{ mM K}^+$ を局所灌流すると内向き電流 ( $I_{\text{base}}$ ) が惹起され、 $100 \text{ mM}$  エタノールを投与するとさらに内向き電流 ( $I_{\text{EtOH}}$ ) が惹起された。これらは共に内向き整流性を示し、低濃度の  $\text{Ba}^{2+}$ およびテルチアピンにより抑制された。

クロペラスチンは、GIRK1/2、GIRK2/2 および GIRK1/4 チャンネルの  $I_{\text{base}}$  および  $I_{\text{EtOH}}$  をいずれも濃度依存的かつ可逆的に抑制した。この時、50%抑制濃度は、GIRK1/2 で  $1.85 \times 10^{-5} \text{ M}$  と  $4.43 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、GIRK2/2 で  $2.05 \times 10^{-4} \text{ M}$  と  $2.22 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、GIRK1/4 で  $2.12 \times 10^{-5} \text{ M}$  と  $3.75 \times 10^{-6} \text{ M}$  であった。また、Hill 係数は、0.80 と 1.10、0.65 と 0.71、1.22 と 0.93 であった。いずれのサブタイプにおいても抑制作用の強さは、クロペラスチン投与前の  $I_{\text{base}}$  および  $I_{\text{EtOH}}$  の振幅には依存しなかった。これらの結果は、クロペラスチンが GIRK2/2 に対して作用が弱いことを示す。

ピコペリダミンとテルフェナジンは、クロペラスチンと同様の作用特性を示したが、ピコペリダミンでは  $I_{\text{EtOH}}$  の GIRK2/2 チャンネルに対しても GIRK1/2 および GIRK1/4 と同程度の抑制を示し、サブタイプ選択性は見られなかった (図 1B)。また、テルフェナジンの場合、GIRK1/4 の  $I_{\text{base}}$  に対しては、GIRK1/2 および GIRK2/2 に比べて有意に強い抑制を示した (図 1C)。このことから GIRK1/4 抑制作用がテルフェナジンの心毒性と関与する可能性も考えられなくはないが、クロペラスチンに重大な心毒性が報告されていないことと、テルフェナジンの心毒性に HERG チャンネルの抑制が関与すると考えられていることを考え合わせると、本結果はむしろ GIRK1/4 チャンネルの抑制と心毒性との関連はあまりないと考えられる。

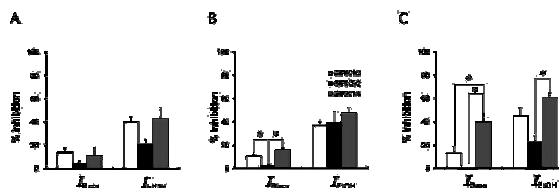


図1 クロペラスチン  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  (A)、ピコペリダミン  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  (B) およびテルフェナジン  $10^{-6} \text{M}$  (C) による GIRK 電流抑制作用のサブタイプ選択性

続いて、生後の早い段階で加えられるストレスが、成熟後のラットの脳機能と GIRK チャンネルの発現量および機能に与える影響を調べるため、Wistar 系の仔ラットに生後 2 日～14 日目まで 1 日 1 時間の母仔隔離ストレスを与え、成熟後の自発運動、脳内セロトニン (5-HT) およびドパミン (DA) 量、クロペラスチンによるモノアミン増加量、GIRK2 チャンネル発現量を検討した。

その結果、自発運動と 5-HT および DA 量 (図 2B) に有意な差は見られなかったが、不安レベル指標の低減 (図 2A) とクロペラスチンによる 5-HT および DA 量増加の増強 (図 2B) が見られた。クロペラスチンの作用の増強は DA の方でより顕著であった。コントロールの 5-HT および DA 量はそれぞれ  $0.660 \pm 0.065 \text{ fmol}/12 \mu\text{l}$  と  $2.176 \pm 0.114 \text{ fmol}/12 \mu\text{l}$  であった。また、全脳の GIRK2 mRNA 発現量に 15% の有意な減少が見られた。クロペラスチンの投与も全脳の GIRK2 mRNA 発現量を 10% 減少させたが、興味深いことに母仔隔離ストレス負荷群では、クロペラスチンの作用が消失していた。

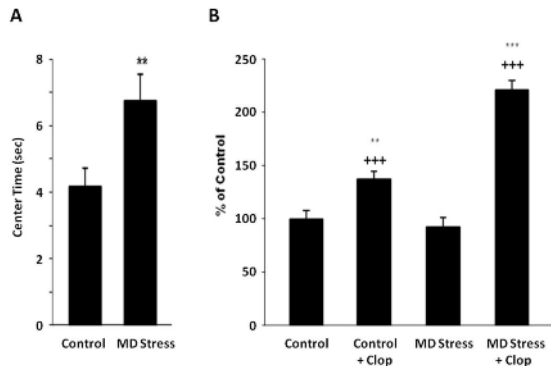


図2 不安レベル指標 (A) および海馬ドパミンレベル (B) に対する母仔隔離ストレスとクロペラスチン (Clop) 投与の影響

1 日 1 時間の母仔隔離でも不安レベル指標に影響がみられたが、その効果は弱かったので、1 日 3～4 時間の母子隔離を生後 2～9 日目まで行った。すると、生後 10 日目の体重がコントロール群に比べ有意に減少し、開眼も 1 日遅れるなどストレスの影響がみられた。

しかし、生後 10 日～15 日目の背側縫線核 (5-HT 神経起始核) で記録した 5-HT 誘発 GIRK 電流 ( $I_{5-HT}$ ) の濃度 - 電流密度関係に有意な差は見られなかった。すな

わち、 $EC_{50}$  と Hill 係数は、コントロール群で  $2.6 \mu\text{M}$  と 0.72、母仔隔離群で  $2.0 \mu\text{M}$  と 0.86 であった。また、電流電圧関係にも大きな影響は見られなかった。ただし、膜容量が  $17 \text{ pF}$  以下の小型の細胞で、 $I_{5-HT}$  が見られない確率が高くなっている傾向が示された。この期間、成長に伴う  $I_{5-HT}$  電流密度の変化は見られなかった。

一方、5-HT ニューロンの投射先である海馬 CA1 においても、記録した 80% の錐体細胞と 73% の非錐体細胞において、 $I_{5-HT}$  が観察された。この期間、錐体細胞では、成長に伴う電流密度の変化は見られなかったが、非錐体細胞では、成長に伴い電流密度が大きくなる傾向が見られた。

縫線核の場合と同様に一日 4 時間の母仔隔離を生後 2 日～9 日目まで行ったところ、 $I_{5-HT}$  が記録されるニューロンの割合が、錐体細胞で 70% にわずかに減少し、非錐体細胞で 43% まで減少した。ところが、錐体細胞における電流密度は、コントロールの  $1.17 \pm 0.15 \text{ pA/pF}$  から  $4.18 \pm 0.76 \text{ pA/pF}$  に 3.3 倍増強し ( $p=0.001$ )、非錐体細胞においても  $0.90 \pm 0.22 \text{ pA/pF}$  から  $2.38 \pm 0.87 \text{ pA/pF}$  に増強する傾向が見られた。膜電位依存性には、内向き電流が増強される以外顕著な影響は見られなかった。電流密度の成長に伴う変化は、コントロールと似ていた。

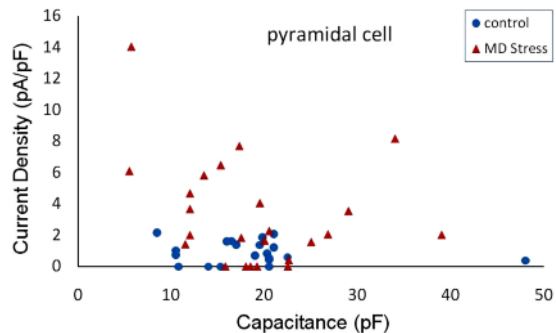


図3 海馬 CA1 錐体細胞における 5-HT 誘発 GIRK 電流の電流密度分布に対する母仔隔離ストレスの影響

ノルアドレナリンも 45% の錐体細胞と 50% の非錐体細胞で GIRK 電流を惹起した。しかし、5-HT とは異なり、面白いことに母仔隔離によりその割合が錐体細胞で 74% に増加し、電流密度は有意には変化しなかった。ただし、コントロールでは成長にともない電流密度が減少する傾向もみられたが、母仔隔離では、その傾向が見られなかった。もう少し例数を増やして、成長に伴う変化に影響が

あるか検討する必要がある。

一方、バクロフェン誘発 GIRK 電流は、錐体細胞の 42% と非錐体細胞の 36% で観察され、母仔隔離により非錐体細胞で応答ニューロンの確率が若干上昇したが、錐体細胞で電流密度が減少するもののほとんど影響を受けなかった。成長に伴う変化も見られなかった。アデノシン誘発 GIRK 電流についてもほとんど影響されない傾向がみられた。

1 日 4 時間の母仔隔離終了翌日(生後 10 日目)に GIRK2 mRNA 発現量を縫線核、海馬、前頭前皮質において測定したところ、縫線核と前頭前皮質では有意な差は見られなかったが、海馬では 1 日 1 時間生後 2 日から 14 日まで母仔隔離した場合の全脳で見られたのと同様に有意な減少が見られた。

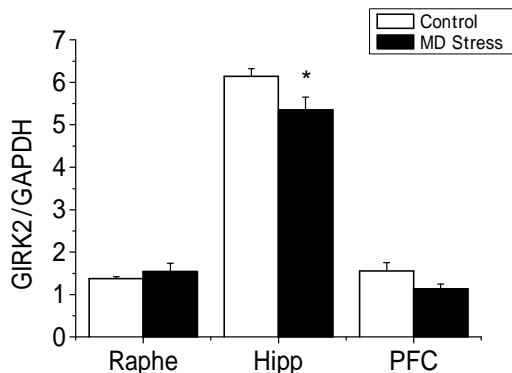


図4 縫線核(Raphe)、海馬(Hipp)、前頭皮質(PFC)、における GIRK2 mRNA 発現量に対する母仔隔離(MD Stress)の影響 \*: p < 0.05

生後 4 週目に不安様行動を評価したところ、母仔隔離群で不安が減弱しているように見えたが、統計学的には有意な差は見られなかった。

生後早期のストレスがその後のストレスに関連した病理的变化に対するリスクを上昇させることが知られている。本研究は、母仔隔離ストレスが情動や精神疾患と係わりの深いセロトニン系およびノルアドレナリン系の GIRK チャネル機能に影響を与えることを示した初めての知見である、今後、特に変化が顕著であった 5-HT 誘発 GIRK 電流の増強についてさらにそのメカニズムや意義を解明する必要がある。

さらに、陰性症状に一定の効果を持つ統合失調症治療薬のカルピプラミンは、クロペラスチンに次いで背側縫線核の 5-HT 誘発 GIRK 電流を強く抑制するが、GIRK1/2 に対して、クロペラスチンとほぼ同じ作用を示し、GIRK2/2 チャネル対

してはクロペラスチンより強い抑制作用がみられた。また、定常 GIRK 電流に対しても強い作用を示した。よって、今後 in vivo において GIRK2 チャネルの機能の変化を検討する上でカルピプラミンが有用なツールになると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Tetsuya Shirasaki, Ahmed M. Shehata, Fumio Soeda, Kazuo Takahama. Maternal isolation affects function of GIRK channels in neurons of the hippocampus but not the raphe nucleus. Neuroscience 2010 2010.10.13 17 San Diego USA San Diego Convention Center (演題登録)

木下瑞恵、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫。クロペラスチンの GIRK チャネル活性抑制作用のサブタイプ特異性 第 81 回 日本薬理学会年会 2008. 3. 18 横浜 パシフィコ横浜

木下瑞恵、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫。クロペラスチンの GIRK チャネルに対する作用 ~GIRK1/2 サブユニット発現卵母細胞における解析~ 第 1 回トランスポーター研究会九州支部会 2007. 11. 24 熊本 熊本大学薬学部

木下瑞恵、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫。クロペラスチンは直接 GIRK チャネルを抑制するか? 第 60 回 日本薬理学会西南部会 2007. 11. 22 宮崎フェニックス・シーガイア・リゾート ワールドコンベンションセンターサミット

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

白崎 哲哉 (SHIRASAKI TETSUYA)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号: 30264047

### (2)研究分担者

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 80150548  
副田 二三夫 (SOEDA FUMIO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 10336216