

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19170

研究課題名(和文)放射線治療後の脳機能低下を惹起しうるKCC2分子病態の解析

研究課題名(英文)Analysis on the regulation of the KCC2 expression after radiation

研究代表者

五十嵐 健人(Igarashi, Kento)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00822876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療はがんに対する有効な治療の一つである一方で、脳機能の低下を伴う恐れがある。一回あたりの線量を減らして複数回に分けて照射するなどの工夫が取られているが、生き残った神経細胞にどのような機能的変化を生じるか未だ不明な点も多い。本研究では細胞内から細胞外へ塩化物イオン濃度を排出しているカリウム-塩化物イオン共輸送タンパク質であるKCC2に着目し、放射線照射後のマウス神経細胞ではKCC2の発現が低下していることを明らかにした。さらに照射後のオキシトシン投与がKCC2の発現を促進し、放射線治療時の認知機能防護に有用な治療薬候補の一つであることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は脳腫瘍の治療に有効な手段の一つである一方で正常な神経細胞にも影響を及ぼす恐れがあり、とくに若い患者ほど影響が顕著になるとされている。本課題では生後3-4週の幼若マウスに対して1.5Gyの線量を3日間繰り返して照射し、認知行動の低下とK-Cl共輸送タンパク質であるKCC2の発現低下を見出した。照射後にオキシトシンを投与したマウスにおいては認知行動の低下とKCC2の発現低下は見られなかった。オキシトシンは家族やペットとのスキンシップなど日常生活でも増加するとされており、本課題で得られた知見は、より安全な応用の治療開発に向けて役立てられるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：While radiation therapy is one of the effective treatments for brain tumor, it may be accompanied by deterioration of brain function. Although efforts have been made to reduce the dose per dose and irradiate in multiple doses, there are still many unclear points about what kind of functional changes will occur in the surviving neurons. In this study, we focused on KCC2, a potassium-chloride ion co-transport protein that exports chloride ion concentration from intracellular to extracellular, and found that the expression of KCC2 decreased in mouse neurons after irradiation. Furthermore, administration of oxytocin after irradiation promoted the expression of KCC2, indicating that it is one of the therapeutic drug candidates useful for protecting cognitive function during radiotherapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：KCC2 放射線 初代培養 ライブセルイメージング 動物行動解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線治療はがんに対する有効な治療の一つである一方で、脳機能の低下を伴う恐れがある (Padovani et al., Nat. Rev. Neurol. 2012)。一回あたりの線量を減らして複数回に分けて照射するなどの工夫が取られているが、生き残った神経細胞にどのような機能的変化を生じるか未だ不明な点も多い。

カリウム-塩化物イオン共輸送タンパク質である KCC2 は細胞内から細胞外へ塩化物イオン濃度を排出している。正常な神経細胞では A 型 γ -アミノ酪酸受容体 (GABAA 受容体) の開口に伴い細胞外から細胞内に Cl⁻ イオンが流入し、過分極をもたらすのに対して、KCC2 の機能低下した神経細胞では GABAA 受容体の開口に伴い細胞内から細胞外へ Cl⁻ イオンが流出し、正常に過分極を起こしづらくなる。KCC2 の機能低下はダウン症などの精神疾患やてんかんの関連が示唆されている (Moore et al., Front. Mol. Neurosci. 2019)。KCC2 は母子分離ストレスなどのストレスでも低下することを報告されている (Furukawa et al., BBRC 2017)。放射線照射と KCC2 の関係についてはこれまで明らかでなかった。

2. 研究の目的

マウス頭部に対して放射線照射を実施し、KCC2 の機能低下を惹起するのかが明らかにする。また新奇物体認識行動試験に基づき、認知機能への影響を調べる。さらに KCC2 の膜移行を促進することが知られるオキシトシンを放射線照射後に経鼻投与し、KCC2 の機能低下あるいは新奇物体認識試験成績の改善が見られるのかが調べる (Leonzino et al., Cell Rep. 2016)。さらに初代培養神経細胞に対して放射線照射し、細胞内 Cl⁻ イオン濃度、GABA 応答性への影響をライブセルイメージングの手法を用いて明らかにすることを目的とした。

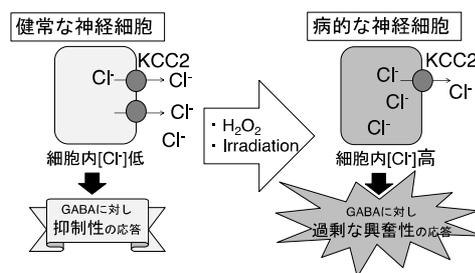


図1. X線/γ線照射によるKCC2機能低下がGABAに対する過剰な興奮を惹起する

3. 研究の方法

(1) KCC2 阻害剤投与マウスの行動解析

KCC2 の阻害剤である VU0240551 を生後 30 日の C57BL/6J マウスに脳室内投与し、1 週間後に新奇物体認識試験 (図 2) により評価した。

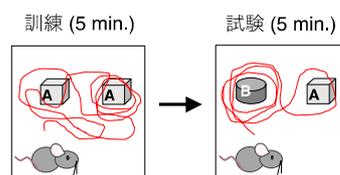


図2. 新奇物体認識試験

訓練によって物体Aを記憶させたのち物体Bを提示する。マウスは初めて見る物体Bに興味を示し、物体Bに対して鼻先を近づける等の行動を示す。物体Aと物体Bに近づいた時間をそれぞれ計測し、マウスの記憶機能を評価する。

(2) 頭部放射線照射マウスの解析

生後 25 日の C57BL/6J 系マウス頭部にガンマ線を照射し、照射後の海馬組織における KCC2 の発現について定量 PCR および免疫蛍光染色法により解析した (図 3)。またマロンジアルデヒド (MDA) アッセイにより酸化ストレスレベルを解析し、DNA 損傷部位に生じるリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) に対する抗体を用いた免疫蛍光染色の結果から DNA 損傷レベルを解析した。

(3) 初代培養細胞での解析

マウス新生仔より脳組織 (海馬と周辺の皮質) を回収し、初代培養した。初代培養開始から 11 日後から 1 日 1 回 1.5Gy の X 線を 3 日間照射した。エックス線照射後に 0.1 μ M オキシトシンを含む培地にて 30 分培養したものをオキシトシン投与群とした。各細胞群について抗 KCC2 抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した。Cl⁻ イオン濃度に反比例する蛍光色素である MQAE (N-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide) を用いて、細胞内 Cl⁻ イオン濃度を調べた。またカルシウムインジケータである Fluo-4 を用いて GABA 応答性を調べた。

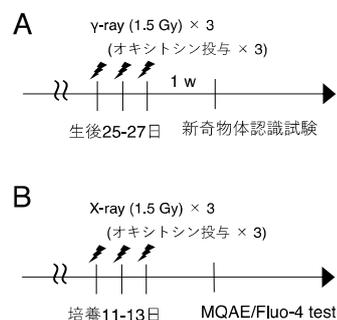


図3. 実験スケジュール
(A) マウス頭部への照射
(B) 初代培養細胞への照射

4. 研究成果

(1) KCC2 阻害剤投与マウスの認知行動解析

KCC2 阻害剤である VU0240551 投与マウスでは Vehicle 投与マウスと比べて新奇物体認識試験の成績が低下しており、KCC2 の機能低下が認知機能の低下をもたらすことが示唆された (図 4)。

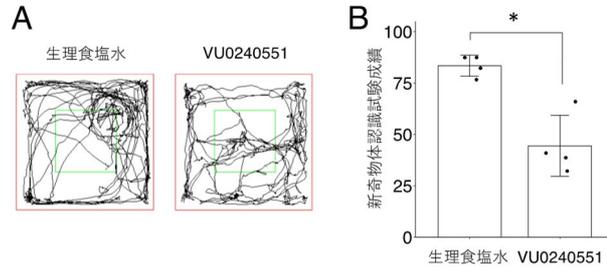


図4. KCC2阻害剤投与とマウスの認知行動の解析
(A) マウスの軌跡(新奇物体は右上に設置), (B) 新奇物体認識試験成績の比較

(2) 頭部放射線照射マウスの解析

頭部放射線照射マウスでは非照射マウスと比べて新奇物体認識試験の成績低下が見られた(図5A)。照射後にオキシトシンを経鼻投与したマウスでは新奇物体試験の成績低下が見られなかった。次に頭部放射線照射マウス海馬組織において KCC2 発現の低下がみられた(図 5C, D)。また、照射後にオキシトシンを投与したマウスでは KCC2 発現の上昇が見られた。これらのことからオキシトシン投与により照射後の KCC2 発現低下が回復することが示唆された。また照射マウス脳の海馬組織における MDA 量は非照射群と差はなかったが、照射後にオキシトシンを投与したマウスでは両群と比べて減少していた。DNA 損傷(DNA2 本鎖切断)部位に生じるリン酸化ヒストン H2AX (γ-H2AX) に対する抗体を用いた免疫蛍光染色の結果から、照射マウス海馬組織切片では非照射群と比べて染色部位数が増加していた。また、照射後にオキシトシンを投与したマウスでは減少した。

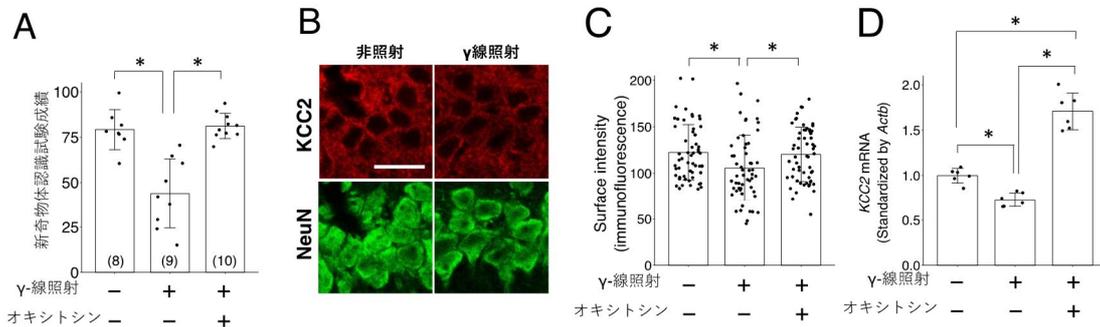


図5. 頭部ガンマ線照射マウスの解析. (A) 新奇物体認識試験成績の比較 (B) 抗KCC2抗体を用いた免疫蛍光染色 (C) 細胞表面に見られる染色シグナル輝度の比較 (D) 定量PCRに基づく海馬由来 KCC2 mRNA量の比較

(3) 初代培養細胞を用いた解析

抗 KCC2 抗体を用いた免疫蛍光染色の結果、X 線照射した細胞では非照射の細胞と比べて細胞表面部の蛍光強度が低下していた(図 6B)。一方照射後にオキシトシン添加培地で培養した細胞では低下は見られなかった。また MQAE 染色による蛍光強度は X 線照射細胞で低下しており、照射後にオキシトシン添加培地で培養した細胞ではやや回復が見られた(図 6C)。また GABA_A 受容体作動薬であるムシモールを投与し、Fluo-4 蛍光の経時変化を調べたところ、X 線照射細胞ではムシモール投与後に一時的な輝度の上昇が見られたが、統計的有意性は示されなかった(図 6D)。

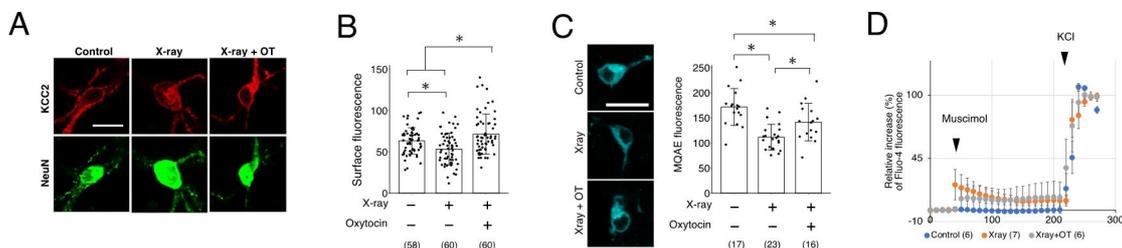


図6. 初代培養神経細胞の解析. (A) 抗KCC2抗体を用いた免疫蛍光染色 (B) 細胞表面に見られる染色シグナル輝度の比較 (C) MQAE蛍光に基づく細胞内Cl⁻イオン濃度の比較 (D) Fluo-4蛍光に基づくGABA応答性の比較

以上のことから、放射線照射後のマウスでは KCC2 の機能低下しており、物体認識行動の低下に関与している可能性が示唆された。また照射後のオキシトシン投与は mRNA レベルで KCC2 発現を促進し、認識行動の低下を防いでいる可能性が示唆された。さらに放射線照射後の神経細胞では KCC2 の機能低下を生じており細胞内から Cl⁻イオンを十分に排出できない状態にあること、照射後のオキシトシン投与は mRNA レベルでの発現促進を介して KCC2 の機能不全を解消するこ

とが明らかになり、オキシトシンは放射線治療時の認知機能防護に有用な治療薬候補の一つであることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Igarashi Kento, Kuchiiwa Toshiko, Kuchiiwa Satoshi, Iwai Haruki, Tomita Kazuo, Sato Tomoaki	4. 巻 1768
2. 論文標題 Kamishoyosan (a Japanese traditional herbal formula), which effectively reduces the aggressive biting behavior of male and female mice, and potential regulation through increase of Tph1, Tph2, and Esr2 mRNA levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147580 ~ 147580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi Kento, Iwai Haruki, Tanaka Koh-ichi, Kuwahara Yoshikazu, Kitanaka Junichi, Kitanaka Nobue, Kurimasa Akihiro, Tomita Kazuo, Sato Tomoaki	4. 巻 612
2. 論文標題 Neuroprotective effect of oxytocin on cognitive dysfunction, DNA damage, and intracellular chloride disturbance in young mice after cranial irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.04.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igarashi Kento, Kuchiiwa Satoshi, Kuchiiwa Toshiko, Tomita Kazuo, Sato Tomoaki	4. 巻 48
2. 論文標題 Comparative data on emotional (psychotic) aggressive biting behavior in mice of ddY strain measured by using two devices; Aggressive response meter and powerlab-compatible type aggressive response meter	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 109231 ~ 109231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2023.109231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 五十嵐健人、富田和男、佐藤友昭
2. 発表標題 加味逍遙散は隔離飼育マウスの嘔みつき行動を低減する
3. 学会等名 第71回日本東洋医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐健人、口岩俊子、口岩聡、岩井治樹、富田和男、佐藤友昭
2. 発表標題 加味逍遙散投与マウス背側縫線核におけるエストロゲン受容体 および 発現の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐健人、田中康一、北中純一、北中順恵、西山信好、富田和男、佐藤友昭
2. 発表標題 幼若マウスおよび初代培養神経細胞に対する放射線照射とオキシトシンの防護効果の解析
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐健人、口岩俊子、口岩聡、富田和男、田中康一、北中純一、北中順恵、西山信好、佐藤友昭
2. 発表標題 隔離飼育ストレス負荷マウスの攻撃性と関連する行動的特徴の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Igarashi Kento, Kuchiiwa Toshiko, Kuchiiwa Satoshi, Tomita Kazuo, Tanaka Koh-ichi, Kitanaka Junichi, Kitanaka Nobue, Nishiyama Nobuyoshi, Takemura Motohiko, and Sato Tomoaki
2. 発表標題 Kamishoyosan reduces aggressive behavior of isolated-reared mice toward inanimate objects and involvement of estrogen receptor
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Igarashi Kento, Tomita Kazuo, Tanaka Koh-ichi, Kuwahara Yoshikazu, Nishiyama Nobuyoshi, Kurimasa Akihiro and Sato Tomoaki
2. 発表標題 KCC2, a K ⁺ -Cl ⁻ co-transporter, is a possible target to attenuate the neuronal dysfunction that is associated with radiation therapy for brain tumor.
3. 学会等名 第6回アジア神経精神薬理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 五十嵐健人、富田和男、田中康一、桑原義和、西山信好、栗政明弘、佐藤友昭
2. 発表標題 放射線照射により惹起される脳機能障害に対する、K ⁺ -Cl ⁻ -トランスポーター-KCC2を標的とした薬物療法の有用性
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Igarashi Kento, Tomita Kazuo, Tanaka Koh-ichi, Kuwahara Yoshikazu, Kitanaka Junichi, Kitanaka Nobue, Nishiyama Nobuyoshi, Kurimasa Akihiro, Takemura Motohiko and Sato Tomoaki
2. 発表標題 An examination whether KCC2, a K ⁺ -Cl ⁻ co-transporter, is efficient as a target to attenuate the neuronal dysfunction that is associated with radiation therapy for brain tumor by using oxytocin.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Igarashi Kento, Kuchiiwa Satoshi, Kuchiiwa Satoshi, Tomita Kazuo, Tanaka Koh-ichi, Kitanaka Junichi, Kitanaka Nobue, Nishiyama Nobuyoshi, and Sato Tomoaki
2. 発表標題 Analysis of the effects of oxytocin and vasopressin on mice showing high aggression in isolation-rearing
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学学会大会・第32回日本神経回路学会大会)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五十嵐健人、田中康一、北中純一、北中順恵、西山信好、富田和男、佐藤友昭
2. 発表標題 桂枝茯苓丸は神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞のCamptothecin感受性を促進する
3. 学会等名 第75回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Igarashi Kento Igarashi, Tanaka Koh-ichi, Kitanaka Junichi, Kitanaka Nobue, Nishiyama Nobuyoshi, Tomita Kazuo, Sato Tomoaki
2. 発表標題 Oxytocin administration to head gamma-irradiated mice results in increased KCC2 mRNA expression through decreased phosphorylated CREB
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------