

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16920

研究課題名（和文）神経細胞のイオンホメオスタシスに着目した新生児慢性肺疾患に伴う神経障害の病態解明

研究課題名（英文）Pathophysiology of neurological disorder associated with neonatal chronic lung disease focusing on ion homeostasis in neurons

研究代表者

村松 友佳子（Muramatsu, Yukako）

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：10581522

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）：極低出生体重児の合併症の一つとして、高濃度酸素や陽圧換気が原因とされる慢性肺疾患があるが、その神経発達への影響は解明されていない。慢性肺疾患（CLD）の補助治療として、ループ利尿薬が使用されることがしばしばある。ループ利尿薬は、神経細胞膜に存在するCl<sup>-</sup>トランスポーターであるKCC2およびNKCC1の双方を阻害する。幼若期の神経細胞はNKCC1優位であるが、成熟するにしたがって、KCC2優位に変わる。

本研究では、CLDの影響およびループ利尿薬の投与によるKCC2/NKCC1の発現の変化を調べ、またそれによる神経発達への影響を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、CLDの影響およびループ利尿薬の投与によるKCC2/NKCC1の発現の変化、またそれによる神経発達への影響が解明された。

本成果は、超低出生体重児、特にCLDを合併する児の神経学的予後を改善する管理に繋がると思われる。

研究成果の概要（英文）：Chronic lung disease is one of major complications in extremely low birth weight infants, which is caused by high concentrations of oxygen and/or positive pressure ventilation, but its neurodevelopmental effects are not understood.

Loop diuretics are often used as adjunctive therapy for chronic lung disease (CLD). Loop diuretics inhibit both KCC2 and NKCC1, Cl<sup>-</sup> transporters present in neuronal membranes. Immature neurons are NKCC1-dominant, but as they mature, they change to KCC2-dominant.

In this study, we investigated the effects of CLD and loop diuretics on KCC2/NKCC1 expression and elucidated the resulting neurodevelopmental consequences.

研究分野：新生児学

キーワード：超低出生体重児 イオンホメオスタシス

## 1. 研究開始当初の背景

極低出生体重児の合併症の一つとして、高濃度酸素や陽圧換気が原因とされる慢性肺疾患がある。慢性肺疾患による神経発達への影響は解明されていないことが多い。

一方で、慢性肺疾患 (CLD) の治療として、ループ利尿薬が使用されることがしばしばある。神経細胞膜に存在する Cl<sup>-</sup> トランスポーターである KCC2 (K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter) および NKCC1 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter) の双方を阻害することが知られている。KCC2 は細胞内から細胞外へ Cl<sup>-</sup> イオンを輸送するのに対し、NKCC1 は細胞外から細胞内へ Cl<sup>-</sup> イオンを輸送することで Cl<sup>-</sup> イオンのホメオスタシス維持を制御している。幼若期の神経細胞は NKCC1 優位であり、細胞内の Cl<sup>-</sup> イオン濃度が高く、GABA が膜電位を脱分極させることで興奮性に働く。成熟するにしたがって、神経細胞は KCC2 優位に変わり、細胞内 Cl<sup>-</sup> イオン濃度が低くなるため、GABA が膜電位を過分極させるため抑制性に働くことが知られている。KCC2 および NKCC1 は WNK-SPAK/OSR1 というリン酸化カスケードによって相反的に制御されているが、その他にも酸化ストレスや虚血によって変化することが知られている。

イオンホメオスタシスの変化が、CLD やその治療によってもたらされる神経発達への影響の一因になっている可能性がある。

## 2. 研究の目的

CLD の影響およびループ利尿薬の投与によって KCC2/NKCC1 の発現の変化を調べ、またそれによる神経発達への影響を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) モデルの作成

先行研究で生後早期の高濃度酸素暴露によって人 CLD と同様に肺胞の発達障害をきたすことが証明されている。生後のラットを 室内気飼育、室内気飼育+フロセミド 20 mg/kg 連日腹腔内投与、CLD (高酸素飼育)、CLD+フロセミド 20 mg/kg 連日腹腔内投与の 4 群に分けて、日齢 14 まで負荷を継続した。日齢 15 に断頭器で脳を取り出し、評価を行った。

### 2) ウエスタンブロットによる評価

日齢 15 時点での 4 群の KCC2、NKCC1 の部位別 (海馬、皮質、基底核、小脳) 発現量をウエスタンブロット法で比較した。また、タンパク質は、全てのタンパク質ではなく、膜タンパクのみを使用した。

### 3) 組織学的評価

凍結切片を作製し、海馬、および皮質の、KCC2 および NKCC1 の発現部位および発現量を評価した。また、ニューロンやアストロサイトのマーカーと多重染色することにより、神経系のどの細胞に発現するかを確認した。

#### 4 . 研究成果

特許出願に係る可能性があるため、公開ができません。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Narita Kotaro, Muramatsu Hideki, Narumi Satoshi, Nakamura Yuji, Okuno Yusuke, Suzuki Kyogo, Hamada Motoharu, Yamaguchi Naoya, Suzuki Atsushi, Nishio Yosuke, Shiraki Anna, Yamamori Ayako, Tsumura Yusuke, Sawamura Fumi, Kawaguchi Masahiro, Wakamatsu Manabu, Muramatsu Yukako, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Whole-exome analysis of 177 pediatric patients with undiagnosed diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14161-6	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 -

1. 著者名 Kotani Tomomi, Tsuda Hiroyuki, Ito Yumiko, Nakamura Noriyuki, Ushida Takafumi, Imai Kenji, Iitani Yukako, Fuma Kazuya, Muramatsu Yukako, Hayakawa Masahiro, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Prenatal diagnosis of distal 13q deletion syndrome in a fetus with esophageal atresia: a case report and review of the literature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-022-03713-z	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 Mariya Tasuku, Kato Takema, Sugimoto Takeshi, Miyai Syunsuke, Inagaki Hidehito, Ohye Tamae, Sugihara Eiji, Muramatsu Yukako, Mizuno Seiji, Kurahashi Hiroki	4. 巻 67
2. 論文標題 Target enrichment long-read sequencing with adaptive sampling can determine the structure of the small supernumerary marker chromosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 363 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-01004-x	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 Nishida Yoshihiro, Ikuta Kunihiro, Natsume Atsushi, Ishihara Naoko, Morikawa Maki, Kidokoro Hiroyuki, Muramatsu Yukako, Nonobe Norie, Ishizuka Kanako, Takeichi Takuya, Kanbe Miki, Mizuno Seiji, Imagama Shiro, Ozaki Norio	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of in-hospital clinical network for patients with neurofibromatosis type 1 in Nagoya University Hospital	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91345-6	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 Kato Takema, Inagaki Hidehito, Miyai Syunsuke, Suzuki Fumihiko, Naru Yuki, Shinkai Yasuko, Kato Asuka, Kanyama Kazuo, Mizuno Seiji, Muramatsu Yukako, Yamamoto Toshiyuki, Shinya Mitsuhsa, Tazaki Yukiko, Hiwatashi Sayuri, Ikeda Toshiro, Ozaki Mamoru, Kurahashi Hiroki	4. 巻 139
2. 論文標題 The involvement of U-type dicentric chromosomes in the formation of terminal deletions with or without adjacent inverted duplications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02186-8	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------