

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06587

研究課題名(和文) アストロサイト空間的カリウム緩衝機構に着目した精神疾患の発症メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying development of neuropsychiatric diseases with focus on astrocytic potassium buffering function

研究代表者

大野 行弘 (Ohno, Yukihiro)

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00432534

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)：アストロサイトの空間的カリウム緩衝能を仲介する内向き整流性Kir4.1チャネルの治療ターゲット分子としての有用性を評価した。その結果、各種の疾患モデルを用いた検討から、Kir4.1チャネル阻害薬が抗うつ作用、抗不安作用および認知障害改善作用を有すると共に、炎症性の神経細胞障害に対して改善効果を有することを見出した。また、アストロサイト初代培養系を用いた研究から、Kir4.1チャネル阻害薬がBDNFなどの神経栄養因子発現を促進することなどを明らかにした。以上の結果から、アストロサイトのKir4.1チャネル阻害が精神神経疾患の抑うつ・不安障害や認知機能障害の治療に有用であることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の神経疾患治療薬は全て神経細胞を作用標的として開発されてきており、脳のグリア細胞をターゲットとした治療薬は存在しない。また、既存の治療薬では治療できない疾患、症状は非常に多く、治療抵抗性を示す患者群も膨大な数にのぼる。こういった背景から、アストロサイトをターゲットとする“グリア創薬”という新たな概念の創薬研究が期待されている。本研究の成果は、脳アストロサイトに局在するKir4.1チャネルの阻害が精神神経疾患の抑うつ・不安障害や認知機能障害を改善できる可能性を示すものであり、難治性神経疾患への新たな治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the therapeutic potential of the inwardly rectifying Kir4.1 channels, which are specifically located in brain astrocytes and mediate the astrocytic spatial K<sup>+</sup> buffering function. From studies using various CNS disease models, we found that Kir4.1 channel blockers show antidepressant and anxiolytic actions, and ameliorate cognitive impairment. They also alleviated the neuronal cell damage induced by brain inflammation. In addition, studies using primary astrocyte culture systems showed that Kir4.1 channel blockers facilitate the expression of neurotrophic factors such as BDNF in astrocytes. Our results suggest that inhibition of the Kir4.1 channel in astrocytes is useful for treating depression, anxiety, and cognitive dysfunction in psychiatric disorders.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：アストロサイト 内向き整流性Kir4.1チャネル 空間的カリウム緩衝機構 抑うつ・不安障害 認知機能障害 てんかん 精神疾患 神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは単なる神経細胞の支持細胞でなく、神経細胞と3者間シナプスを形成して神経細胞 - グリア細胞がクロストークすることにより、正常な脳の活動性制御がなされている。特に、アストロサイトに局在する内向き整流性Kir4.1チャネルはアストロサイトの空間的カリウム ( $K^+$ ) 緩衝機能を仲介しており、シナプス周囲の細胞外 $K^+$ 濃度のホメオスタシスを維持している。近年、アストロサイトKir4.1チャネルの機能異常がてんかん性疾患 (SeSAME/EAST 症候群など)、うつ病、ハンチントン病をはじめとする多くの中枢神経疾患の病態に深く関与することが示唆されている。しかし、精神神経疾患の発症および治療におけるアストロサイトの役割とその制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。特に、これまでの神経疾患治療薬は全て神経細胞を作用ターゲットとして開発されてきており、これら治療薬に抵抗性を示す疾患、患者群も多い。こういった背景から、アストロサイトを作用ターゲットとした創薬研究の展開が期待されており、“グリア創薬”という新たな概念に基づく研究から難治性神経疾患の治療法が開発できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、精神神経疾患の発症制御におけるグリア空間的 $K^+$ 緩衝機構の役割を明らかにすることを目的とし、各種疾患モデルにおけるKir4.1チャネル阻害薬の治療効果を薬理的に解析した。また、Kir4.1チャネルはアストロサイトのBDNF発現調節因子としても知られていることから、Kir4.1チャネル-BDNF系機能を制御する生体内因子を明らかにし、精神疾患 (うつ病、ストレス疾患、てんかん) の発症制御におけるアストロサイトの機能を探索した。さらに、抗うつ効果、認知機能促進、けいれん惹起など多彩な作用を示すニコチンの薬理作用発現におけるアストロサイトの関与についても検討を加えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種疾患モデルにおける Kir4.1 チャネル阻害薬の作用評価

炎症性抑うつ・不安モデル：BALB/c 系雄性マウスに lipopolysaccharide (LPS, 0.8 mg/kg, i.p.) を投与し、翌日にうつ症状評価系の強制水泳試験および尾懸垂試験、ならびに不安症状評価系の高架式十字迷路試験を実施した。Kir4.1 チャネル阻害薬としては quinacrine (10-100 mg/kg, s.c.) および VU0134992 (10, 30 mg/kg, s.c.) を用いた。

炎症性認知機能障害モデル：実験には BALB/c 系雄性マウスを用い、LPS (0.4 mg/kg, i.p.) を 7 日間反復投与し、最終投与の翌日に新奇物体認識試験を実施した。Kir4.1 チャネル阻害薬としては quinacrine (10, 30 mg/kg, s.c.) を用い、LPS の投与 30 分前に連日前処置した。また、行動試験の終了後にこれら動物の脳を摘出し、海馬の GFAP 陽性アストロサイト数および NeuN 陽性神経細胞数を免疫組織化学的に計測した。

### (2) 培養アストロサイトにおける神経栄養因子発現の作用評価

アストロサイトの初代培養系を用いて、BDNF、GDNF、NGF など神経栄養因子の mRNA 発現に対する Kir4.1 チャネル阻害薬の影響を RT-qPCR 法により解析した。Kir4.1 チャネル阻害薬としては quinacrine および VU0134992 を用いた。また、Kir4.1 mRNA および BDNF mRNA 発現に対するアセチルコリン神経系やセロトニン神経系薬物の影響についても検討した。

### (3) ニコチンの薬理作用発現におけるアストロサイト関与の評価

ニコチン (1~3 mg/kg) を ddY 系雄性マウスに腹腔内投与し、その 1~24 時間後に脳を摘出して

脳内 GFAP 発現を ABC-DAB 法にて免疫染色した。また、特異的なアストロサイト不活性化剤である fluorocitrate (FC、1 nmol/匹) を脳室内投与した SD 系雄性ラットを用い、ニコチンの運動興奮作用に対するアストロサイト不活性化の影響を行動薬理的に評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種疾患モデルにおける Kir4.1 チャンネル阻害薬の作用評価

炎症性抑うつ・不安モデル：LPS 単回投与により、急性の炎症性うつ症状及び不安症状の誘発が確認された。すなわち、強制水泳試験および尾懸垂試験において LPS は有意に無動時間を延長したが、quinacrine はいずれの試験においても改善作用を示した。特に強制水泳試験において、100 mg/kg の quinacrine は、LPS による無動時間の延長を有意に短縮した。さらに不安症状の評価において、quinacrine は用量依存的な改善作用を示し、100 mg/kg において不安症状の有意な改善を示した。

LPS と併用投与した Kir4.1 チャンネル阻害薬		抑うつ症状（無動時間延長）		不安症状
		強制水泳試験	尾懸垂試験	高架式十字迷路
Quinacrine	10 mg/kg			影響なし
	30 mg/kg	改善傾向	影響なし	影響なし
	100 mg/kg	有意に改善	改善傾向	有意に改善

炎症性認知機能障害モデル：LPS (0.4 mg/kg, i.p.) を 7 日間反復投与したマウスを用いて新奇物体認識試験を実施すると、LPS 投与による明らかな認知機能障害が確認された。しかし、Kir4.1 チャンネル阻害薬である quinacrine あるいは VU0134992 を前処置した動物においては LPS による認知障害は有意に改善された。一方、これら動物の脳病変を免疫組織化学的に解析したところ、LPS が海馬 CA1 および CA3 領域の GFAP 陽性アストロサイト数を増加し、NeuN 陽性神経細胞数を減少させること、さらに quinacrine および VU0134992 がこれら病変を改善することが明らかとなった。

以上の結果は、Kir4.1 チャンネル阻害薬が炎症性脳神経障害に対して改善効果を有し、脳炎症反応に伴う抑うつ、不安障害、および認知機能障害を改善することを示唆する。

##### (2) 培養アストロサイトにおける神経栄養因子発現作用の評価

アストロサイト初代培養系を用いて、Kir4.1 チャンネル阻害薬の神経栄養因子発現に対する作用を評価した。その結果、quinacrine などの Kir4.1 チャンネル阻害薬が BDNF および GDNF の mRNA 発現を促進することが示された。さらに、うつ病を誘発する corticosterone による BDNF、GDNF および NGF の発現抑制作用に対し、Kir4.1 チャンネル阻害薬が有意な改善作用を示すことが確認された。

以上の結果は、Kir4.1 チャンネルの阻害がアストロサイトに直接作用して BDNF などの神経栄養因子発現を促進することを示し、Kir4.1 チャンネル阻害薬の認知機能障害改善効果や抗うつ作用のメカニズムに寄与する可能性を示唆する。

##### (3) ニコチンの薬理作用発現におけるアストロサイトの関与評価

ニコチンの腹腔内投与は、脳内の海馬において GFAP 陽性アストロサイト数を用量依存的かつ部位特異的に上昇した。このアストロサイト活性化は 7 ニコチン受容体拮抗薬の併用により消

失した。また、FC の脳室内投与によりアストロサイトを不活性化した動物モデルにおいて、ニコチンのけいれん誘発作用と海馬神経の興奮反応が有意に抑制された。

以上の結果は、ニコチンが海馬におけるアストロサイトの活性化を惹起し、これはニコチン誘発けいれんの慢性的な促進反応（キンドリングなど）に關与することを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaki Kato, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu, Higor A. Iha, Yukihiro Ohno	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanisms Underlying Dopaminergic Regulation of Nicotine-Induced Kinetic Tremor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 938175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2022.938175	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 Yukihiro Ohno, Naofumi Kunisawa, Saki Shimizu	4. 巻 22
2. 論文標題 Emerging Roles of Astrocyte Kir4.1 Channels in the Pathogenesis and Treatment of Brain Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10236 ~ 10236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910236	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 0件）

1. 発表者名 毎田愛莉、清水佐紀、石崎悠斗、森山芽衣、宮越樹里、佐納 匠、大野行弘
2. 発表標題 Lipopolysaccharideによる神経炎症性アルツハイマー病モデルの確立
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬由佳、中野諒子、堀名宏紀、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 Lipopolysaccharide誘発急性うつ症状に対するKir4.1チャネル阻害薬の作用評価
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國澤直史、加藤将貴、小田明奈、白川美波、坂口茉鈴、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 ニコチンによる運動興奮症状に対するアストロサイト選択的抑制剤フルオロクエン酸の影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水佐紀、堀名宏紀、中野諒子、廣瀬由佳、大野行弘
2. 発表標題 コルチコステロン慢性投与マウスのうつ様症状に対するKir4.1チャンネル阻害薬の作用評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saki Shimizu, Ryoko Nakano, Yuka Hirose, Kouki Horina, Yukihiko Ohno
2. 発表標題 Evaluation of the effects of Kir4.1 channel inhibitors on lipopolysaccharide-induced depressive behavior
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國澤直史、加藤将貴、小田明奈、白川美波、坂口茉鈴、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 ニコチンによる運動興奮症状におけるアストロサイトの関与
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日垣愛生、中村義弘、東野いずみ、石崎悠斗、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 マウス強制水泳試験を用いたKir4.1チャンネル阻害薬による抗うつ効果の評価
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水佐紀、日垣愛生、中村義弘、東野いずみ、石崎悠斗、大野行弘
2. 発表標題 強制水泳試験を用いた内向き整流性カリウムチャンネルKir4.1阻害薬の抗うつ作用評価
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國澤直史、加藤将貴、高田和志、豊樹美沙、藤原安哉子、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 Pentylentetrazole誘発けいれんに対するアストロサイト選択的阻害剤フルオロクエン酸の影響
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 清水佐紀、中村義弘、日垣愛生、東野いずみ、石崎悠斗、大野行弘
2. 発表標題 Kir4.1チャンネル遮断薬quinacrineによる急性うつ病モデルマウスを用いた抗うつ効果の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國澤直史、加藤将貴、高田和志、豊榎美沙、藤原安哉子、清水佐紀、大野行弘
2. 発表標題 アストロサイト選択的抑制剤フルオロクエン酸の内向き整流性Kir4.1チャンネル発現およびベンチレントラゾールけいれん感受性に対する作用評価
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪医科薬科大学薬学部 薬品作用解析学研究室  <a href="https://www.ompu.ac.jp/class/pharm/daa.html">https://www.ompu.ac.jp/class/pharm/daa.html</a>  researchmap 大野行弘  <a href="https://researchmap.jp/read0156131/">https://researchmap.jp/read0156131/</a></p>
---

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
研究分担者	清水 佐紀  (Shimizu Saki)  (00630815)	大阪医科薬科大学・薬学部・准教授   (34401)	
研究分担者	國澤 直史  (Kunisawa Naofumi)  (10858096)	大阪医科薬科大学・薬学部・助教   (34401)	

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
---------	---------