

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06723

研究課題名（和文）経口投与可能な神経細胞特異的カリウム排出促進薬による神経変性予防効果の実証

研究課題名（英文）Demonstration of the neurodegeneration prevention effect of an orally administered neuron-specific potassium excretion promoter.

研究代表者

倉本 展行 (Kuramoto, Nobuyuki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：60324092

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）：我々は神経細胞質ゾルのカリウムイオン（K<sup>+</sup>）レベルを下げることで神経保護的に働く可能性を探索してきた。本研究ではカリウムクロライド共輸送体（KCC）2促進剤が、細胞質ゾルのK<sup>+</sup>レベルを下げることで神経保護効果を示すことを想定したが、実際はKCC2阻害剤にその効果を認めた。同阻害剤は細胞質ゾルのK<sup>+</sup>レベルを上げる可能性があったが、実際はミトコンドリアがK<sup>+</sup>を取り込み、細胞質ゾルK<sup>+</sup>濃度増加を緩衝することで、神経細胞を保護する可能性が示唆された。高齢マウス脳内K<sup>+</sup>チャネル発現量が変化していたが、脳組織内K<sup>+</sup>濃度は過齢間に変化は無く、遺伝子発現レベルでもK<sup>+</sup>レベルを保っている事実が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化に伴う認知機能の低下、各種神経精神疾患、運動機能障害は中枢神経系の神経細胞死によるものが大きい。神経細胞は幹細胞による補充が期待されず、脱落後は必然的に担当機能が不全となる。本研究により、神経細胞の老化や神経細胞死の進行の一因が神経細胞内K<sup>+</sup>濃度の変化に起因する可能性が示唆された。摂取した過剰なK<sup>+</sup>は尿として排出されるが、それまでの間、血中濃度を上げないように多くの細胞内に取り込まれ、一時的に保管される。すなわち腎機能が低下すると細胞内での蓄積が多くなる。したがって、本研究の遂行により、食事等由来K<sup>+</sup>摂取量の限度を定めることで高齢化社会における神経変性疾患抑制への関与が期待される。

研究成果の概要（英文）： We have investigated a possibility that lowering intracellular potassium ion (K<sup>+</sup>) level would perform protective effect on neuronal cell death. The potassium-chloride co-transporter (KCC) 2 stimulators were hypothesized to protect neurons by lowering K<sup>+</sup>, while a KCC2 inhibitors had such an effect. Although the inhibitor had the potential to increase cytosolic K<sup>+</sup> levels, it was suggested that mitochondria may actually take up K<sup>+</sup> and buffer the increase in cytosolic K<sup>+</sup> levels, thereby protecting neurons. Although the expression level of K<sup>+</sup> channels in the brains of aged mice changed, the K<sup>+</sup> concentration in brain tissue did not change with age, suggesting that the K<sup>+</sup> level was maintained even at the gene expression level.

研究分野：神経科学

キーワード：カリウム ホメオスタシス 神経細胞 脆弱性 保護効果 ミトコンドリア 高齢化

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者において神経変性の発症や進行を予防することは、人生 100 年時代において急務である。アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症のような急速に進行する神経変性疾患だけでなく、歳を重ねるにつれ緩徐に進行する神経変性もまた、予防する時代が来ている。

我々は、カリウム ( $K^+$ ) チャネル開口薬の全身投与が、細胞膜電位の過分極とは異なる様式で、培養神経細胞の細胞死及び脳虚血モデル動物での脳虚血負荷後の神経障害を抑制する研究成果を得てきた。したがって本研究では次の段階として、神経細胞特異的に細胞内  $K^+$ 濃度を低下させる薬物が、神経細胞を保護することを解明することを目指せないか検討することで始めた。

血中  $K^+$ 濃度の基準値は  $3.5 \sim 5.3$  (mEq/L)であるが、この濃度は細胞内への一次的な  $K^+$ の取り込みで緩衝されており、生体全体の実含量を現さない。したがって腎機能が低下するような条件や、細胞内への  $K^+$ 輸送を促進させる精神的ストレス条件下では、実は神経細胞内  $K^+$ レベルが慢性的に増加しており、故に神経細胞が脆弱になり、神経変性の原因となっている可能性が示唆される。本研究ではこの仮説を実証し、細胞内  $K^+$ 濃度増加という身近で、しかしながら未知の神経変性メカニズムの解明と、神経変性及び神経変性疾患の予防及び治療標的提案を目指した。

高カリウム血症では、早くに筋力低下や不整脈が顕在化するため、神経障害との関連性はほとんど着目されて来なかった。しかしながら、少なくとも高カリウム血症は神経障害も起こす。細胞内  $K^+$ レベルが増減しても mEq/L (または mM) オーダーの変化であり、検出や追跡は困難であったと推察される。灯台下暗し、ここに神経変性疾患の一因が潜む可能性があったのを見逃してきたのではないか。本研究は血液検査で  $K^+$ の異常値が出る前の段階で既に高レベル  $K^+$ が神経細胞を蝕んでいる可能性を追求することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の大目的は、神経細胞内  $K^+$ レベルには「適正值」があり、増加することで神経細胞を脆弱にしていること、及び、食生活の改善や薬物投与により神経細胞内  $K^+$ レベルを「是正」することで、神経細胞の機能を保全、生存期間を延長し、中枢神経系の機能を長期的に保つことに繋がる可能性を明らかにすることであった。我々は既に、 $K^+$ チャネル開口薬ミノキシジルが脳虚血に伴う神経組織障害を抑制することを報告していた(1,2)。しかしながら、全身的に作用する薬物では臨床的でない。一方、本研究では研究対象を神経特異的に発現する  $K^+,Cl^-$ 共輸送体 ( $KCC$ ) 2 とした。通常この輸送担体は  $Cl^-$ 輸送の重要性の観点で研究対象となるが、この輸送担体の活性化は細胞外へ  $K^+$ を放出する。

$KCC2$  の促進薬  $CLP290$  は経口投与可能である。したがって、 $KCC2$  促進薬が細胞内  $K^+$ 濃度を低下させることで、神経保護効果が得られるならば、 $CLP290$  はそのものが神経変性抑制薬になり得る可能性があり、また少なくとも重要なリード化合物となる可能性があった。

なお、研究遂行中において、 $KCC2$  活性化剤  $CLP257$  ( $CLP290$  の活性化体)よりも  $KCC2$  阻害剤  $VU0463271$  の方が神経保護効果を示すことが示唆されたため、計画を変更し、 $KCC2$  阻害剤による神経保護効果の探索を中心に、細胞内  $K^+$ 濃度の恒常性を保つ仕組みや、神経細胞死への影響を探索するとともに、既存のシグナル伝達経路や食品によるこの仕組みへの影響の探索を行った。

## 3. 研究の方法

蛍光指示薬を用いた検討：培養細胞のミトコンドリアの脱分極、細胞内  $K^+$ 濃度、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度増加、細胞膜の  $K^+$ チャネル開口、細胞膜の脱分極は、各種蛍光指示薬により測定した。

細胞または組織内  $K^+$ 濃度の測定：簡易  $K^+$ イオンメータを用いて、細胞内および組織内  $K^+$ 濃度を測定する系を樹立し、測定を試みた。

免疫化学法を用いた検討：培養細胞内または脳組織内の  $K^+$ チャネル構成タンパク質の発現を免疫細胞化学法、組織化学法またはイムノブロット法を用いて解析した。

細胞の生存能の検討：細胞の増殖または生存能の検討は  $MTT$  アッセイにて測定した。

#### 4. 研究成果

培養神経細胞には **KCC2** の mRNA 及びタンパク質発現が確認された。また、**KCC2** 促進剤 (**CLP257** 以下 **CLP**) 曝露に伴い、**GABAA** 受容体作動がもたらす電位依存性 **Ca<sup>2+</sup>** チャンネル開口に伴う細胞内 **Ca<sup>2+</sup>** 濃度増加を促進した。すなわち **GABAA** 受容体作動により細胞膜の脱分極が起こった。したがって、培養神経細胞に発現した **KCC2** は機能していることが示唆された。

培養神経細胞に **CLP** または **KCC2** 阻害剤 (**VU0463271** 以下 **VU**) の単独曝露は、神経細胞の生存能を変化させなかった。次に神経細胞に **NMDA** を曝露することで神経細胞の **MTT** 還元能が低下したが、この低下は **CLP** を事前曝露しても変化せず、**VU** の事前曝露で抑制された。したがって、当初の **KCC2** 促進剤による神経保護効果を検討する予定を変更し、**KCC2** 阻害剤による神経保護効果の探索を開始した。

バリノマイシンや **NMDA** 曝露は培養神経細胞のミトコンドリアを脱分極させた。この脱分極は **VU** を事前曝露することで抑制された。**VU** 単独曝露もミトコンドリアを脱分極させミトコンドリアが細胞質で増加した **K<sup>+</sup>** を取り込む可能性が示唆された。**CLP** はミトコンドリアを脱分極させなかった。事実、**VU** 単独曝露に伴うミトコンドリアの脱分極はミトコンドリアの **KATP** チャンネル阻害剤 5-ヒドロキシデカン酸 (**HD**) により阻害された。したがって、ミトコンドリアは細胞質ゾルの **K<sup>+</sup>** 濃度増加に伴いこれを取り込み、緩衝し、細胞質ゾルとミトコンドリア間の **K<sup>+</sup>** 濃度差を小さくする作用がある可能性が示唆された。

細胞破碎液中の **K<sup>+</sup>** 濃度を簡易 **K<sup>+</sup>** イオンメータで測定した。細胞膜に穴をあけるジギトニン処理は細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度を下げたが、バリノマイシン処理は細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度を下げなかった。従って、バリノマイシンはミトコンドリアの **K<sup>+</sup>** 透過性を亢進するが、細胞膜に対してその作用が無い可能性及び細胞膜の **K<sup>+</sup>** 透過性を増加させても他の輸送担体が **K<sup>+</sup>** 濃度を回復させる細胞膜の緩衝能の存在が示唆された。細胞内の **K<sup>+</sup>** 濃度は細胞外の緩衝液の **K<sup>+</sup>** 濃度が変化にあわせて変化した。この変化は、細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度の蛍光指示薬による測定よりも感度良く測定できた。

組織破壊液中の **K<sup>+</sup>** 濃度を簡易 **K<sup>+</sup>** イオンメータで測定した。脳 8 部位に分けて組織を破碎し、**K<sup>+</sup>** 濃度を測定したところ、まず、雌雄でその差はなかった。次に、高齢 (25 または 50 週齢程度) と若齢 (6 週齢) のマウス間で差は無かった。一方、高齢マウスと若齢マウス海馬の **KATP** チャンネル構成タンパク質 **SUR1** の発現を検討したところ、週齢の違いで発現量が異なる可能性が示唆された。免疫染色法でも海馬 **CA3** のシグナルが週齢によって異なった。しかしながら、海馬組織内の **K<sup>+</sup>** 濃度は週齢に伴う変化が認められなかった。したがって、神経組織の細胞は周囲の環境変化に合わせ、あるいは各細胞のチャンネル等の発現量の変化に合わせて、細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度が変化しないよう、細胞のダイナミックであるいは別の遺伝子発現量の変化で調節している可能性が示唆された。

我々はこれまで **GABAB** 受容体作動が共役する **K<sup>+</sup>** チャンネル開口に伴い、**NMDA** 誘発性で、ミトコンドリア脱分極を介した神経細胞死を抑制する可能性を探究してきた(1)。現在、別の **G** タンパク質活性型 **K<sup>+</sup>** チャンネル開口のモデル系として、ドパミン **D2** 受容体、アペリン **APJ** 受容体の *in vitro* 発現系を樹立した。現在はこれら受容体の作動がミトコンドリア脱分極を抑制することで **NMDA** 誘発性の神経細胞死を抑制するのかが検討している。

グルタミン酸や **GABA** に類似でヒトには通常存在しないアミノ酸、テアニンは、チャノキで合成され、緑茶に含まれるアミノ酸である。我々はこのアミノ酸の測定系を樹立し(3)、この作用が細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度変化に関与するのかが検討した。現在のところ、テアニンを培養神経細胞に曝露すると、**K<sup>+</sup>** 蛍光指示薬は細胞内 **K<sup>+</sup>** 濃度増加を示したが、簡易 **K<sup>+</sup>** イオンメータは変化を否定した。また、テアニンはミトコンドリアの脱分極を起こさなかったため、次に **NMDA** 誘発性の脱分極を抑制するデータを収集している。

#### 参考文献

1. Kinjo T, Ashida Y, Higashi H, Sugimura S, Washida M, Niihara H, Ogita K, Yoneda Y, Kuramoto N. (2018) *Neurochem Res.* 43(1):79-88. doi: 10.1007/s11064-017-2311-z.
2. Higashi H, Kinjo T, Uno K, Kuramoto N. (2020) *Neurochem Int.* 133:104627. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104627.
3. Yamaura S, Sadamori K, Konishi R, Majima T, Mukai A, Uno K, Kinjo T, Komori K, Kuramoto N, Kawada K. (2024) *Amino Acids.* 56(1):29. doi: 10.1007/s00726-024-03389-3.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Onishi Yuki, Yamamura Yusuke, Hosogi Misa, Higashi Hiroshi, Ogita Kiyokazu, Kinjo Toshihiko, Uno Kyosuke, Yoneda Yukio, Kuramoto Nobuyuki	4. 巻 47
2. 論文標題 Delayed Expression of Both GABAB1 and GABAB2 Subunits in Murine Hippocampal Dentate Gyrus After a Single Systemic Injection of Trimethyltin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2780 ~ 2792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03652-7	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 Kinjo Toshihiko, Ebisawa Shun, Nokubo Tatsuya, Hashimoto Mifu, Yamada Takonori, Oshio Michiko, Nakamura Ruka, Uno Kyosuke, Kuramoto Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Post-translational modifications of the apelin receptor regulate its functional expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 AIMS Neuroscience	6. 最初と最後の頁 282 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/Neuroscience.2023022	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 Yamaura Shinnosuke, Sadamori Koki, Konishi Reiko, Majima Takashi, Mukai Akira, Uno Kyosuke, Kinjo Toshihiko, Komori Koji, Kuramoto Nobuyuki, Kawada Kou	4. 巻 56
2. 論文標題 Pharmacokinetics of L-theanine and the effect on amino acid composition in mice administered with L-theanine	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-024-03389-3	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 Onishi Yuki, Yamamura Yusuke, Hosogi Misa, Higashi Hiroshi, Ogita Kiyokazu, Kinjo Toshihiko, Uno Kyosuke, Yoneda Yukio, Kuramoto Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-lasting increases in GABAB receptor subunit levels in hippocampal dentate gyrus of mice with a single systemic injection of trimethyltin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e29713 ~ e29713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2024.e29713	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21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東浦悠太郎、宇野恭介、森新之介、山際真由、高崎一郎、金城俊彦、倉本展行
2. 発表標題 Proenkephalin線条体過剰発現はうつ抵抗性を示す
3. 学会等名 日本薬理学会第143回近畿部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇野恭介、河原井康介、上田舞那水、金城俊彦、倉本展行
2. 発表標題 マウス脳海馬CA3領域への特異的なPP5過剰発現は不安様行動を示す
3. 学会等名 第66回日本神経化学学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉本展行、岡田暉己、二股有貴子、岩本昂也、金城俊彦、宇野恭介
2. 発表標題 簡易測定器を用いた神経細胞内K <sup>+</sup> イオン濃度変化の測定
3. 学会等名 第66回日本神経化学学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山浦慎之介、貞盛耕生、金城俊彦、宇野恭介、小西麗子、眞島崇、向井啓、小森浩二、倉本展行、河田興
2. 発表標題 L-Theanineの摂取がマウス膵臓に対するインスリン分泌および膵島組織に及ぼす影響
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松島悠理、山浦慎之介、小森浩二、河田興、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 テアニンの神経系細胞株に対する細胞増殖抑制作用とグルタミン輸送担体発現との関連性
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇野恭介、東浦悠太郎、森新之介、山際真由、金城俊彦、倉本展行
2. 発表標題 線条体におけるオピオイドペプチドはうつ脆弱性に関与する
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩本昂也、岡田暉己、森永龍太、西亜依梨、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 簡易装置を用いた細胞内K <sup>+</sup> イオン濃度変化測定に関する研究
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田暉己、保坂裕美、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 K <sup>+</sup> イオン濃度測定における電極法とK <sup>+</sup> 蛍光指示薬を用いた測定との比較
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾松果奈、原友凜亜、渡辺夏楓、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 ミトコンドリアKATPチャンネルを介したK <sup>+</sup> 緩衝作用と脱分極の抑制作用の可能性
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松島悠理、山浦慎之介、小森浩二、河田興、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 運動神経様細胞株NSC-34へのテアニンの取り込みと細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 尾松果奈、原友凜亜、渡辺夏楓、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 ミトコンドリア内外K <sup>+</sup> イオン濃度勾配変動に起因した神経細胞保護効果の可能性
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤謙伸、中西菜乃、山浦慎之介、小西麗子、向井啓、宇野恭介、金城俊彦、倉本展行、小森浩二、河田興
2. 発表標題 L-Theanineの組織移行に関するトランスポーターの検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中西菜乃、伊藤謙伸、山浦慎之介、小西麗子、向井啓、宇野恭介、金城俊彦、倉本展行、小森浩二、河田興
2. 発表標題 L-Theanineの腸管吸収および近位尿細管からの再吸収過程に關するグリシンの影響
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山浦慎之介、貞盛耕生、小西麗子、向井啓、宇野恭介、金城俊彦、倉本展行、小森浩二、河田興
2. 発表標題 L-Theanine投与が健常マウスの尿糖排泄に与える影響についての検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 二股有貴子、岡田暉己、岩本昂也、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 神経細胞内K <sup>+</sup> イオン濃度変化測定に関する研究
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 平嶋未佳、原友凜亜、尾松果奈、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 培養神経細胞におけるKCC2阻害剤VU0463271によるミトコンドリア脱分極抑制作用
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 原友凜亜、平嶋未佳、尾松果奈、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 KCC2阻害剤VU0463271による神経細胞ミトコンドリア脱分極抑制作用
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 岡田暉己、二股有貴子、岩本昂也、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 神経細胞内K <sup>+</sup> イオン濃度変化測定法に関する研究
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 尾松果奈、平嶋未佳、原友凜亜、金城俊彦、宇野恭介、倉本展行
2. 発表標題 KCC2阻害剤VU0463271による神経細胞興奮に伴うミトコンドリア脱分極の抑制作用
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 金城俊彦、宇野恭介、米田幸雄、前田定秋、倉本展行
2. 発表標題 L-theanineによるsolute carrier family 7 member 5発現細胞特異的細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 宇野恭介、吉永卓郎、河原井康介、金城俊彦、倉本展行
2. 発表標題 プロテインホスファターゼ5強制発現に伴うGABAB受容体サブユニットの脱リン酸化
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
研究分担者	宇野 恭介  (Uno Kyosuke)  (30608774)	摂南大学・薬学部・講師   (34428)	
研究分担者	金城 俊彦  (Kinjo Toshihiko)  (70758599)	摂南大学・薬学部・助教   (34428)	

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