

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460331

研究課題名(和文)脳アストロサイトにおけるカリウム緩衝機構と薬理作用のin silico研究

研究課題名(英文)Simulation analysis on astrocytic K<sup>+</sup> buffering

研究代表者

村上 慎吾 (Murakami, Shingo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40437314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：疾患などによる過剰な細胞外カリウム濃度の上昇によって神経細胞の機能や生存に問題が生じる。細胞外カリウム濃度を安定化させる機構として、アストロサイトが過剰な細胞外カリウムを吸収し血管に運ぶ、カリウム緩衝が挙げられるが、その機序は詳細に理解されていない。そこで、アストロサイトモデルを作製し、カリウムバッファリングの機構を解析した。このモデルには主要なイオンチャネルやトランスポーター、そしてその局在が組み込まれており、解析を行うことで細胞外高カリウム濃度時のカリウムバッファリングの解析ができた。また、細胞外高カリウム濃度でのアストロサイトの膨張をNKCCの阻害剤で抑制できると予測できた。

研究成果の概要(英文)：In response to elevation of extracellular K<sup>+</sup> concentration ([K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>), astrocytes clear excessive extracellular K<sup>+</sup> to maintain proper environment for neural activity. Here we conducted simulation analysis on the mechanisms of the astrocytic K<sup>+</sup> clearance and swelling. Astrocyte models were constructed by incorporating into a compartment model various mechanisms. Simulated response of astrocyte models to high [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub> revealed significant contributions of NKCC and Na,K-ATPase to the increases of the intracellular K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations, and swelling. Moreover, we show that the KIR channel localized at synaptic cleft absorbs the excessive K<sup>+</sup>, while the K<sup>+</sup> release through KIR channel localized at perivascular is enhanced. Further analysis of simulated drug effects shows that K<sup>+</sup> uptake, K<sup>+</sup> release and swelling can be modulated differently by blocking each of the ion channels and transporters.

研究分野：生理学

キーワード：アストロサイト カリウム緩衝 シミュレーション システムバイオロジー 内向き整流性カリウム電流

1. 研究開始当初の背景

カリウム緩衝機構とは、脳における細胞外カリウム濃度上昇を抑えるための機構である。細胞外領域の生理的なカリウム濃度は通常 3-5mM 程度であるが、癲癇などによる神経細胞の過度の興奮や脳卒中に伴う虚血などにより、数十 mM へと上昇する。この細胞外のカリウム濃度上昇により、神経細胞の膜電位は脱分極することで神経細胞の過度の興奮が誘発され、細胞死なども誘発することが知られている。そのため、このカリウム濃度上昇を抑えるべき現象である。この問題に対して、アストロサイトにはカリウム緩衝と呼ばれる機構が存在する。このカリウム緩衝がうまく働けば、虚血時の細胞外カリウム濃度上昇を防ぎ、神経細胞のダメージを抑えることができる。

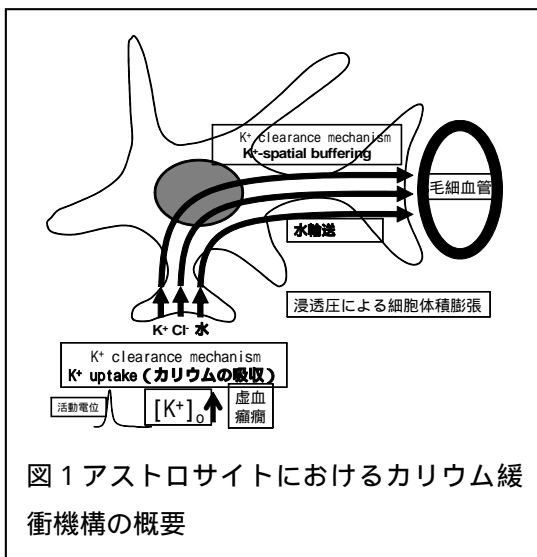


図1 アストロサイトにおけるカリウム緩衝機構の概要

アストロサイトでのカリウム緩衝は、カリウムの吸収により始まると考えられている(図1, )。そして、このカリウムの吸収とともに、塩素イオンと水も吸収され、アストロサイトは膨張すると推定されている。そして、この吸収された細胞内のイオンと水は、アストロサイトの血管と面した部分から放出され、血液へと流れていくと推測されている(図1, )。しかし、この機序の詳細はよく分かっておらず、どのような分子の実態がどのように貢献しているかは未だ完全に解明されていない。

脳卒中、特に脳梗塞急性期において脳を保護する薬物治療の選択肢は限定されていた。当時の脳卒中治療ガイドラインによると、明確なエビデンスがあるとされる薬物療法は2つのみであった。ひとつは、頭蓋内圧亢進を伴う脳浮腫を改善して血管の圧迫を減らし脳の血流量を増加させる高張グリセロールである。もうひとつは、日本においてのみエビデンスが報告されており主に日本で使用されるエダラボンのような抗酸化薬である。そのため、脳卒中治療において使用することができる脳保護薬の選択肢は極端に限られていた。脳卒中が我が国のような高齢化

社会において重点的な対策を要する疾患であることも考慮すると、新たな脳梗塞の薬理的治療方法は非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳を保護するためにアストロサイトが果たす重要な役割の一つである、細胞外カリウム濃度の過度の上昇を防ぐ「カリウム緩衝機構」の機序の解明と、脳卒中での細胞外カリウム濃度上昇を防止する脳梗塞急性期に用いる新規治療薬の機序の探索を目的とした。カリウム緩衝に関係しているイオンチャネルやトランスポーターのモデルを個別に構築の後に統合し、イオン輸送、イオン濃度、細胞体積の変化に対応するアストロサイトモデルをコンピュータ上で開発した。そして、カリウム緩衝機構の機序を明らかにした後に、アストロサイトのイオンチャネルやトランスポーターの阻害薬を持つ薬理機序としての可能性をモデルにて検討したことで、脳卒中急性期で使用する治療薬の新規機序を探索し、新たな脳卒中治療薬の開発へとつなげる。

3. 研究の方法

本研究では、アストロサイトモデルの各構成要素の構築と、構成要素の統合によるアストロサイトモデルの構築を行った。アストロサイトモデルの各構成要素の構築では、アストロサイトに存在し、現在カリウム緩衝機構に関係すると考えられているイオンチャネルやトランスポーターなどのモデル化を行った。各構成要素の統合によるアストロサイトモデルの構築では、構築したモデルを統合することにより、アストロサイトモデルを構築した。

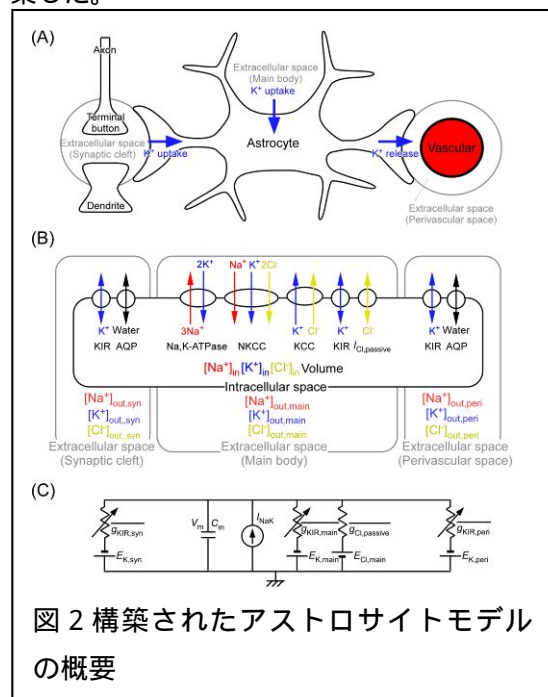


図2 構築されたアストロサイトモデルの概要

本研究では、アストロサイト細胞一つをモデル化した(図2, A)。このモデルでは、ア

ストロサイトの一部分が神経細胞のシナプスを囲み、別の部分が血管を囲んでいるという、実験的に知られている知見を取り入れた。また、アストロサイトの細胞膜に存在し、カリウム緩衝に関係していると考えられているイオンチャネルやトランスポーターのモデルを構築した(図2、B)。そして、このモデルをアストロサイトの形態を取り入れた細胞膜モデルに導入することにより、アストロサイトのモデルを完成させた。このモデルを用いて計算をすることで、細胞膜を介したイオンの流れを計算でき、細胞内のイオン濃度の変化も計算することができる。電荷を持ったイオンが流れることで膜電位も変化をするので、等価電気回路のモデルも構築し、膜電位の計算もできるようにした(図2、C)。

#### 4. 研究成果

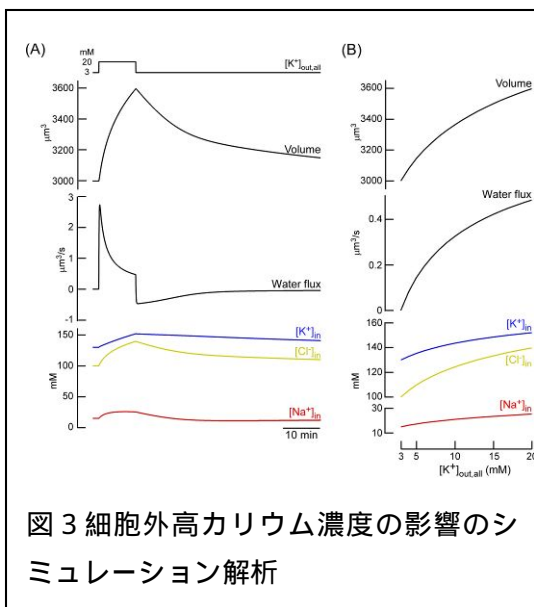


図3 細胞外高カリウム濃度の影響のシミュレーション解析

図3の研究結果では、細胞外カリウム濃度を3mMから10mMの上げた時の、アストロサイトの体積変化と細胞内イオン濃度の変化が計算されている。実験で計測されているように、シミュレーションでも高カリウム濃度の適用により細胞が膨張し、カリウムと塩素イオンの細胞内濃度が増加し細胞体積が増えた。しかし、実験結果と同様に、ナトリウムの濃度変化は限定的であった。

モデルによる解析の利点として、実験では見ることが難しい機序を詳細に確認できることがある。図4で示されている解析結果では、細胞外溶液のカリウム濃度が一時的に増加した時(10mM)に、アストロサイトの細胞膜に存在するイオンチャネルやトランスポーターをイオンがどのように流れるかが示されている。この結果によると、高カリウム適用により、主にNKCCを介して、イオンが細胞内に流入している。しかし、ナトリウムに関しては、NaKATPaseによる細胞外への汲み出しも活性化する。図3で再現されているカリウム、塩素のみ大きく細胞内濃度が増加

するという実験・モデル検討の結果をイオンチャネルやトランスポーターの働きで説明することができた。

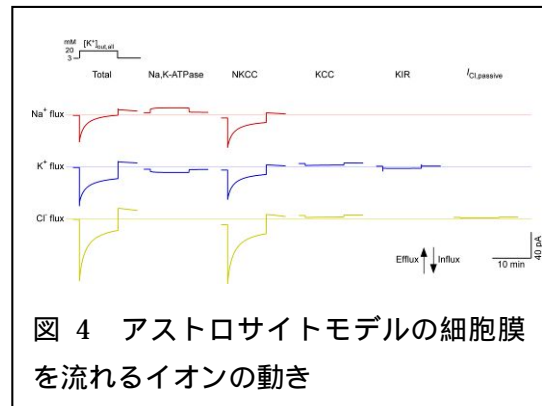


図4 アストロサイトモデルの細胞膜を流れるイオンの動き

脳卒中への新たな薬理的治療方法の可能性を探索するために、構築されたモデルを用いて、カリウム緩衝機能を増強する薬理作用及び細胞膨張を防ぐ薬理作用の検討を行った。この検討においては、どのような薬理作用が最終的に神経細胞の細胞死を防ぐ脳保護薬としての潜在能力を持っているかを、コンピュータ上でバーチャルに検討した。

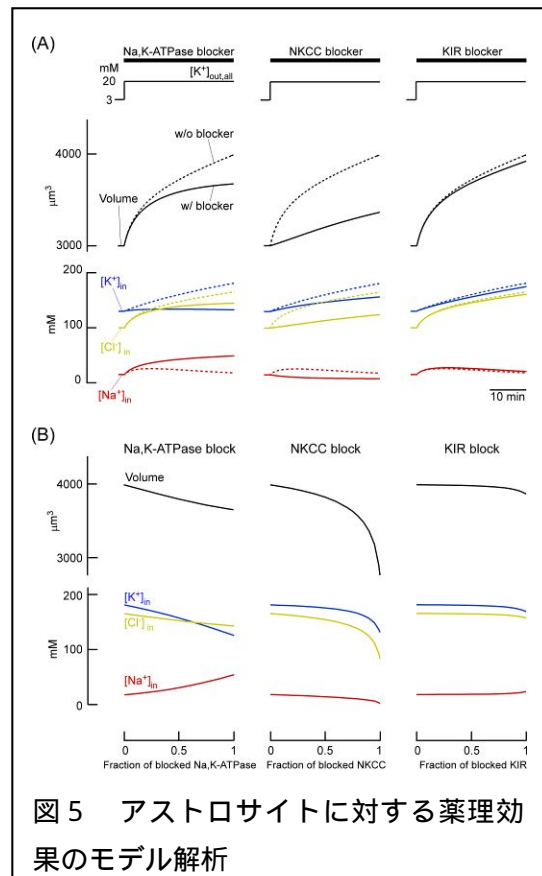
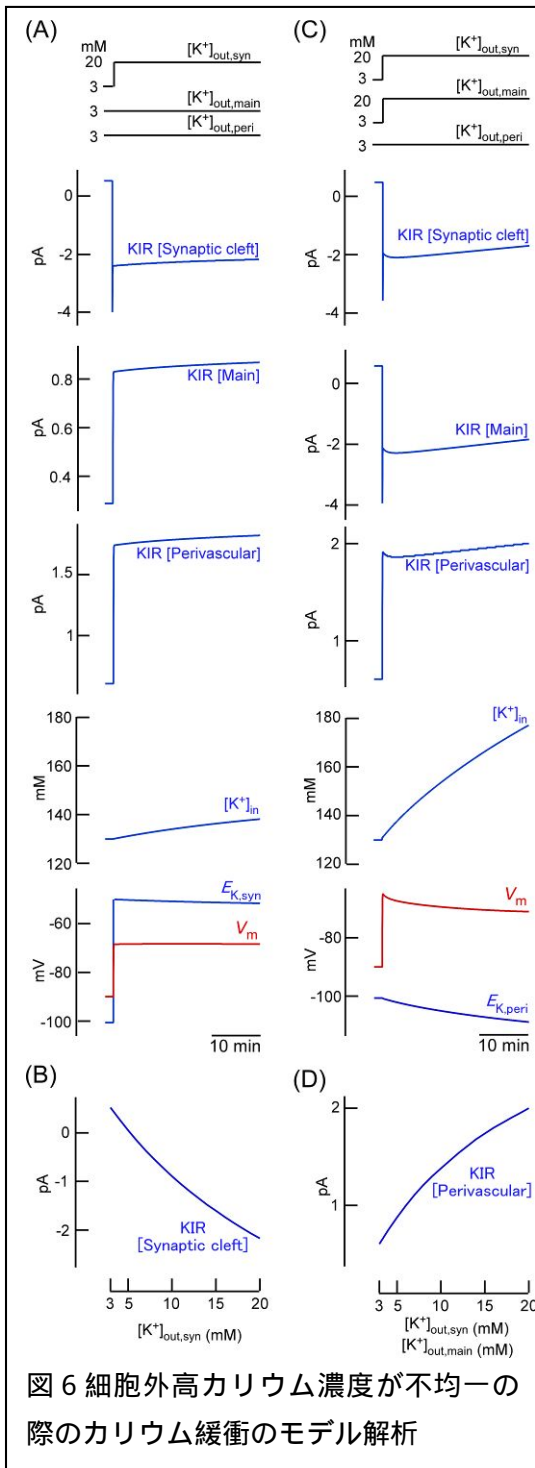


図5 アストロサイトに対する薬理効果のモデル解析

図5の研究の計算では、高細胞外カリウム適応時に、NKCCの阻害により細胞膨張(A)や細胞内の過度のカリウム濃度上昇(B)を防げる可能性が示唆されている。



さらに、細胞外高カリウム濃度が不均一の際に、どのようにカリウムが輸送させるかのモデル解析も行った(図6)。まず、シナプス周辺のみでカリウムの濃度が高い時、普段は外向きの流れているカリウム電流がシナプス周辺のみでアストロサイト内部への内向きに流れ、余分なカリウムを吸収する作用があることが分かった(図6、A)。このカリウム電流の反転は、細胞膜電位とカリウムの等価電位の大小関係が逆転することにより起こることが分かった。

次に、より広い領域で細胞外高カリウム濃度が高くなった時は、細胞内により多くの

カリウムが貯まるが、そのカリウムが血管へと排出されることが計算された(図6、B)。これは、脳卒中などの時に、アストロサイトが過度のカリウムを血管へと輸送することに相当する。そのため、内向き整流性カリウムチャンネルがシナプスや血管の周辺部に多く存在するのであることが理解できた。

## 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 4 件)

日比野浩, 任書晃, 村上慎吾, 土井勝美, 鈴木敏弘, 久育男, 倉智嘉久: 内耳内リンパ液の特殊電位環境の成立機構の理解. 日耳鼻 査読無, 116:60-68, 2013

Murakami S, Okada Y: Invariance in current dipole moment density across brain structures and species: Physiological constraint for neuroimaging. Neuroimage 査読有, 111:49-58: 2015

Murakami S, Kurachi Y: Mechanisms of astrocytic K<sup>+</sup> clearance and swelling under high extracellular K<sup>+</sup> concentrations. J Physiol Sci 査読有, 66, 127-142, 2016

村上慎吾, 稲野辺厚, 倉智嘉久: アセチルコリン感受性カリウム電流における短期脱感作のシミュレーション解析. 査読有, 心電図 35, 245-257, 2016

### 〔学会発表〕(計 15 件)

村上慎吾, 倉智嘉久: アセチルコリン感受性カリウム電流における short term desensitization のシミュレーション解析. 第 30 回日本心電学会学術集会, 青森, 2013. 10

村上慎吾, 倉智嘉久: アストロサイトにおけるカリウム緩衝機能のシミュレーション解析. 第 106 回近畿生理学談話会, 奈良, 2013. 11

村上慎吾, 倉智嘉久: アストロサイトによるカリウム緩衝機能のシミュレーション解析. 第 124 回日本薬理学会近畿部会, 京都, 2013. 11

村上慎吾, 倉智嘉久: アストロサイトのカリウム緩衝機能のモデル解析. 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014. 3

村上慎吾, 倉智嘉久: アストロサイトにおけるカリウム緩衝機能のモデル解析. 第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014. 3

村上慎吾, 倉智嘉久: アストロサイトによるカリウム輸送のシミュレーション解析. 第 53 回日本生体医工学会大会, 仙

台, 2014. 6

村上慎吾、倉智嘉久: アストロサイトにおけるカリウムバッファリングのモデル解析. 新学術領域研究「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」第九回(平成26年度第一回)領域全体会議・研究報告会, 秋田, 2014. 8

Murakami S, Kurachi Y: Simulation analysis of water and ion dynamics in astrocyte. 新学術領域研究「多階層生体機能学」最終成果報告会, 大阪, 2015. 3

Murakami S, Kurachi Y: アストロサイトにおける水・イオン動態のシミュレーション解析. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015. 3

Murakami S, Kurachi Y: Simulation analysis of water and ion dynamics in astrocyte. 第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015. 3

任書晃、吉田崇正、村上慎吾、緒方元気、上塚学、倉智嘉久、日比野浩: 局所性Na<sup>+</sup>電流は内リンパ液高電位に不可欠な内耳上皮組織の電位環境を形成する. 第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015. 3

任書晃、吉田崇正、村上慎吾、緒方元気、上塚学、倉智嘉久、日比野浩: 聴覚に必須の内リンパ液電位に不可欠な蝸牛線維細胞の持続的脱分極性膜電位のメカニズム. 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015. 7

村上慎吾、倉智嘉久: アストロサイトによる細胞外環境の恒常性維持機構のシミュレーション解析. 第128回日本薬理学会近畿部会, 大阪, 2015, 11

Murakami S, Kurachi Y: Simulated roles of astrocytes of ionic and volume homeostasis. 第89回日本薬理学会年会, 横浜, 2016, 3

Murakami S, Kurachi Y: Simulated roles of astrocytes of ionic and volume homeostasis. 第93回日本生理学大会, 札幌, 2016, 3

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 慎吾 (MURAKAMI, Shingo)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40437314