

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10945

研究課題名(和文) 幼若動物の鎮静耐性におけるカリウム - 塩素イオン共輸送担体の機能解析と治療法開発

研究課題名(英文) Functional analysis of KCC2 in the animal model showing resistance to sedative drug

研究代表者

安藤 富男 (Andoh, Tomio)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：00193110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CLP290を投与することで細胞内の塩素イオンが細胞外にくみ出され、相対的に細胞外の塩素イオン濃度が高くなる。今回の研究では、細胞内塩素イオン濃度を規定するKCC2のリン酸化をCLP290が上昇させることが分かった。この状態でGABA受容体作動薬を投与すると、GABA受容体の活性化に引き続き、濃度が高い細胞外から塩素イオンが細胞内に流入し、神経細胞の活性化が抑制される。本研究ではこの現象をpCREBを用いた免疫組織学的検討により明らかにした。こうした細胞生物学的変化は、個体レベルにおいては鎮静を引き起こすことが明らかになった。本研究では、この現象を正向反射を用いて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カリウム - 塩素イオン共輸送担体を介したchloride homeostasisが幼若動物の鎮静に与える役割を明らかにし、さらにはそのメカニズムに着目した鎮静耐性改善薬としての臨床応用可能性を探るものである。

研究成果の概要(英文)：By administering CLP290, intracellular chloride ion is pumped out of the cell and the extracellular chloride ion concentration becomes relatively high. In the present study, it was found that CLP290 increases phosphorylation of KCC2, which regulates intracellular chloride ion concentration. When a GABA receptor agonist is administered in this state, chloride ions are introduced into the cells from outside the cell, which has a high concentration, following activation of the GABA receptor, and nerve cell activation is suppressed. In this study, this phenomenon was clarified by immunohistological examination using pCREB. It was revealed that these cell biological changes cause sedation at the individual level. In this study, we investigated this phenomenon using the direct reflection.

研究分野：麻酔科学

キーワード：KCC2 CLP290 ミダゾラム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GABA-A 受容体作動薬による神経細胞の興奮抑制効果は、細胞内の塩素イオン濃度によって規定されている。通常、細胞内塩素イオン濃度は細胞外に比して低く、GABA-A 受容体刺激に伴い塩素イオンが細胞内へ流入し、細胞は過分極する。神経細胞における細胞内塩素イオン濃度は、主に2種類のカリウム - 塩素イオン共輸送担体 (NKCC1 および KCC2) によって調節されている。両者は生後時期によって発現パターンが異なり、塩素イオンを細胞内に汲み入れる NKCC1 は生後8日目に向かって発現が低下する一方で、塩素イオンを細胞外に汲み出す KCC2 は生後8日目以降から発現量が増加する(図1)。申請者らは、幼若期における麻酔薬作用のメカニズムについて、NKCC1 に着目して研究してきた(安藤 富男、文部科学省科学研究費基盤研究(C)平成25~27年度)。生後8日目以前に、GABA-A 受容体刺激薬であるミダゾラムを非鎮静量で生体投与すると、神経細胞は興奮する。一方で、NKCC1 拮抗薬であるブメタニド投与により細胞内塩素イオン濃度を低下させると、ミダゾラムは神経細胞興奮を抑制し、鎮静が得られることを明らかにした(Koyama, Andoh., *Anesthesiology*. 2013)。また、同様の効果をプロポフォールでも明らかにしている(Koyama, Andoh., *submitted*)。その一方で、幼若動物における KCC2 と麻酔薬との関係については、これまでほとんど明らかになっていない。

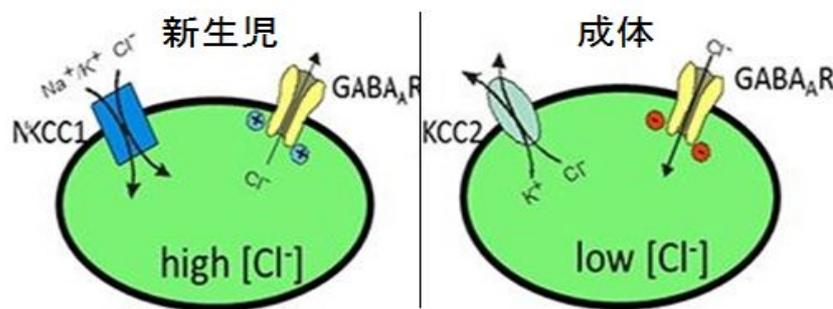


図1. 新生児期は NKCC1 の発現が優位であり、細胞内塩素イオン濃度は高い。成体では KCC2 の発現が優位であり、細胞内塩素イオン濃度は低い。

成体では KCC2 の発現が優位であるが、神経損傷に伴い発現低下が生じる。KCC2 発現低下に伴い、疼痛閾値の低下(Miletic et al., *Pain*. 2008) や痙縮が引き起こされる(Boulenguez et al., *Nat. Medicine*. 2010)。幼若動物では、酸化ストレスにより KCC2 の発現低下が誘導され、そのメカニズムとして KCC2 細胞内領域のリン酸化の低下が報告されている(Wake et al., *JNS*. 2007)。これら結果は、KCC2 の発現や機能低下により細胞内塩素イオン濃度が上昇すると、神経細胞が興奮しやすくなることを示唆している。そうした疾患モデルを対象とし、KCC2 を標的とした創薬研究も始まっている。KCC2 の細胞膜表面提示量を増加させる薬剤 (CLP290) がすでに開発されており、神経障害性疼痛モデル動物への投与により疼痛行動の改善効果が認められている(Gagnon et al., *Nat. Medicine*. 2013)。また CLP290 の発明により、これまで困難であった幼若動物における KCC2 の機能解析が行えるようになった。

2. 研究の目的

事前検討として、申請者らは、非鎮静量のミダゾラム投与に際し、KCC2 の細胞膜表面提示量を増加させる薬剤 (CLP290) を併用することにより鎮静が得られることを確認している(図2)。本研究では、幼若動物の鎮静メカニズムにおける KCC2 の機能を包括的に明らかにし、NKCC1 との比較検討を行う。そこで構築された情報を基に、ミダゾラム連用に伴う鎮静耐性に対して、鎮静耐性改善効果を検討し、治療応用への可能性を探る。

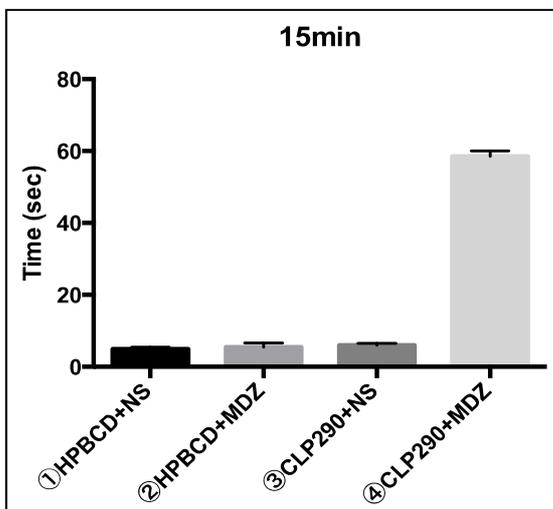


図2. 生後7日目のラットにおけるミダゾラムの鎮静効果を行動学的に評価した。正向反射という鎮静レベルを評価する行動実験であり、上限を60秒として寝ている時間を評価した(縦軸:秒数)。非鎮静量のミダゾラムを投与した群では() 生食を投与した群()と寝ている時間が同じであった。それに対し、CLP290をミダゾラム投与2時間前に経口投与した群では、寝ている時間が優位に延長した()。またCLP290で細胞内塩素イオン濃度が低下するだけでは鎮静は得られなかった()。

具体的には以下のことを明らかにする。

-) 幼若動物の鎮静における KCC2 の役割について、組織染色、生化学、蛍光イメージング技術を用いて、包括的に明らかにする。
-) ミダゾラム連用に伴う鎮静耐性モデル動物を確立する。
-) NKCC1、KCC2 への作動薬を用いて、鎮静耐性モデル動物に対する抵抗改善薬としての応用可能性を検討する。

実験において、CLP290を用いた包括的な KCC2 の機能評価を行う。次に、実験において、ブメタニド、CLP290の投与量をふって、鎮静への影響を評価する。投与条件の最適化を行った上で、いずれの薬剤が幼若動物の鎮静に強い影響を有するかを決定する。その後、実験において、いずれかの薬剤を用いて、鎮静耐性のモデルラットに対する効果を検討する。以上の実験より、カリウム - 塩素イオン共輸送担体を介した chloride homeostasis が幼若動物の鎮静に与える役割を明らかにし、さらにはそのメカニズムに着目した鎮静耐性改善薬としての臨床応用可能性を探るものである。

3. 研究の方法

1. 幼若動物の鎮静における KCC2 の役割について、組織染色、生化学、蛍光イメージング技術を用いて、包括的に明らかにする
2. 幼若動物におけるミダゾラム連用に伴う鎮静耐性モデルを確立する
3. NKCC1、KCC2 への作動薬を用いて、上記2で作成した鎮静耐性モデルに対する耐性改善薬としての応用可能性を検討する

4. 研究成果

CLP290 投与に伴う鎮静増強作用の組織学的検討

CLP290 は in vitro の実験系において KCC2 の細胞膜表面への移行を促進させることが分かっている。しかしながら幼若動物での報告は今までにない。前述のとおり、申請者らは、CLP290 (100mg/kg) を経口投与し、その2時間後にミダゾラムを投与して行動実験を行い、鎮静の獲得を確認している。組織染色のプロトコールであるが、CLP290 ないし溶媒である HP CD を経口投与し、その2時間後にミダゾラムを投与。さらにその75分後に経心臓的に脳還流固定を行い、脳切片を作製し、pCREB での組織染色を行った。その結果、MDZ 単独投与では pCREB 陽性細胞数に変化はなかった

が、KCC2 の活性化薬を併用すると pCREB 陽性細胞数は有意に減少した (図 3)。この結果は、MDZ 単独では発現しなかった神経細胞活性の抑制効果が、CLP290 を併用することで誘導されたことを示しており、図 2 に示す鎮静効果のメカニズムを支持する結果となった。

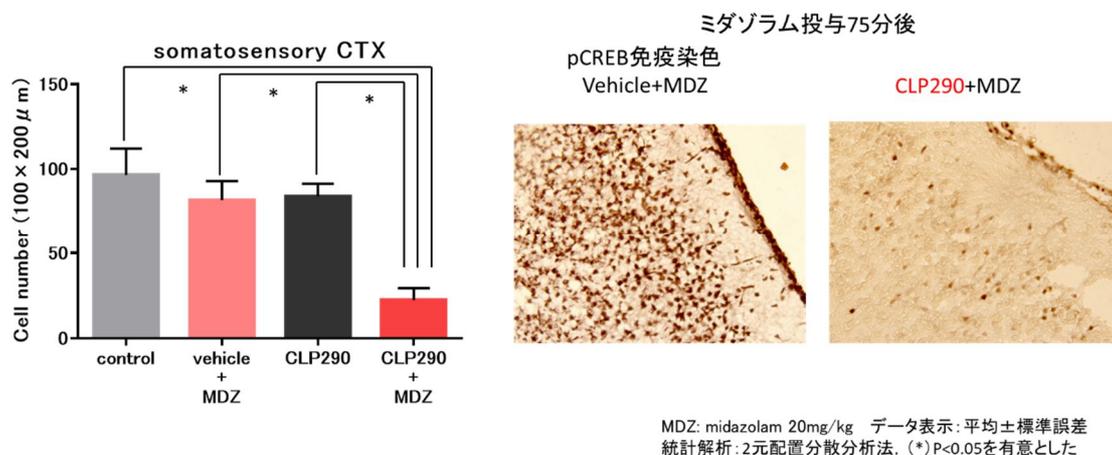


図 3 . 生後 7 日目のラットにおいて MDZ および CLP290 の併用効果を pCREB 組織染色により検討した。左：各群における pCREB 陽性細胞数。右：MDZ 単独および MDZ/CLP290 併用動物での pCREB 組織染色の画像。

CLP290 投与に伴う鎮静増強作用の生化学的検討

CLP290 ないし溶媒である HP CD 投与 2 時間後に、組織学的に活性化が低下した脳領域を含んだ急性脳切片を作製する。脳切片を Sulfo-NHS-ビオチンと 4 で 40 分反応させて、アビジンビーズを用いて細胞膜表面に提示されたタンパク質を回収する (Oh et al., JBC. 2006)。ウェスタンブロット法を用いて、KCC2 およびリン酸化 KCC2 の生化学的定量を行った。その結果、CLP290 を成体ラットに投与した際の KCC2 の膜表面提示量の増加は認められなかった (図 4 左)。一方で KCC2 機能を向上させることが知られるリン酸化のレベルは、CLP290 投与によって増加した (図 4 右)。この結果、CLP290 は KCC2 の膜表面提示量は変化させず、リン酸化レベルを上昇させることが分かった。この結果は、CLP290 による MDZ 鎮静の誘導メカニズムの一つと考えられる。

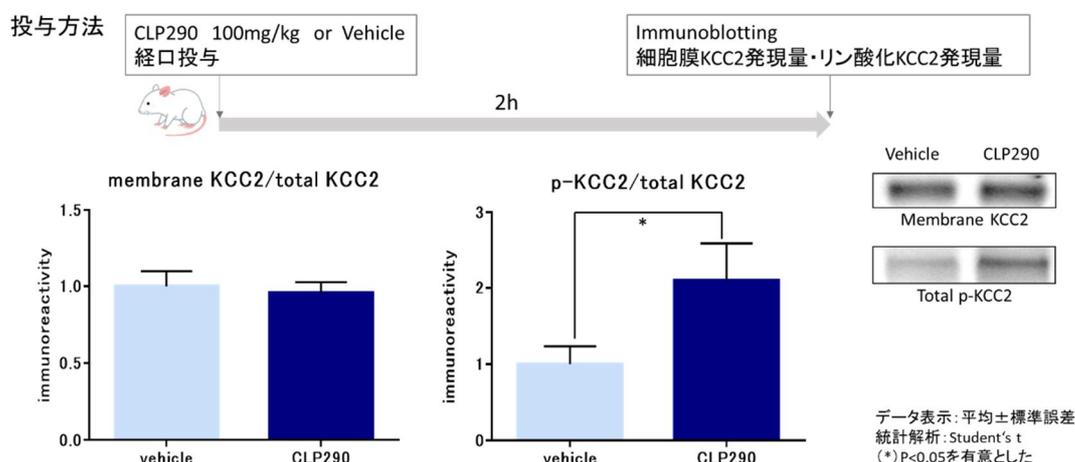


図 4 . 生後 7 日目のラットにおいて CLP290 を経口投与した際の、KCC2 の膜表面提示量 (左) ならびに KCC2 のリン酸化レベルの変化を示す。

鎮静耐性モデルに対する CLP290 の治療効果検討

ミダゾラム連用に伴う鎮静耐性動物に CLP290 を投与する。前年度の実験結果より、鎮静耐性が行動学的にどのように推移するのかを検討し、入眠時間が有意に短縮するタイミングを確定させた。そこから CLP290 を投与するが、chloride homeostasis の是正が重要であるため、ミダゾラム投与直前に CLP290 の投与が必要であるとは考えにくい。したがって、入眠時間が有意に短縮した翌日から、ミダゾラム投与とは独立して CLP290 を 1 日 2~3 回投与する。もしくはミダゾラム投与直前に、つまり CLP290 を 1 日 3 回投与する実験を行った。投与後は、正向反射回復までの時間をカウントして、両薬剤の治療的効果を検討する。その結果、ミダゾラム連用に伴い生じた正向反射回復までの時間の短縮は、CLP290 投与に伴い改善する傾向にあった。

【総括】

CLP290 を投与することで細胞内の塩素イオンが細胞外にくみ出され、相対的に細胞外の塩素イオン濃度が高くなると考えられる。今回の研究により、細胞内塩素イオン濃度を規定する KCC2 のリン酸化を CLP290 が上昇させることがそのメカニズムの一つであることが分かった。この状態で GABA 受容体作動薬を投与すると、GABA 受容体の活性化に引き続き、濃度が高い細胞外から塩素イオンが細胞内に流入し、神経細胞の活性化が抑制される。本研究ではこの現象を pCREB を用いた免疫組織学的検討により明らかにした。こうした細胞生物学的変化は、個体レベルにおいては鎮静を引き起こすことが明らかになった。本研究では、この現象を正向反射を用いて検討した。

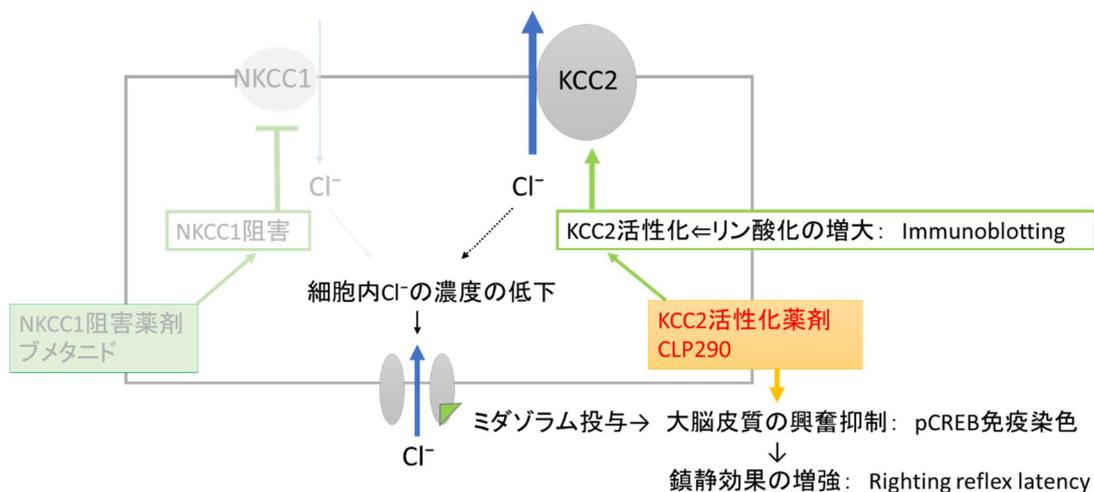


図5. 生後7日目のラットにおける KCC2 および CLP290 の作用メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田舞子, 宮崎智之, 米崎久美子, 小山行秀, 安藤富男, 後藤隆久
2. 発表標題 新生児動物の鎮静におけるKCC2の機能解析
3. 学会等名 第63回日本麻酔科学会
4. 発表年 2016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	宮崎 智之 (miyazaki tomoyuki) (30580724)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	