

令和元年6月13日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15458

研究課題名(和文) Na⁺, K⁺-ATPase活性制御による不安障害発症の脳-腎関連メカニズム研究課題名(英文) Na⁺, K⁺-ATPase dysfunction in the pathophysiology of anxiety: Involvement of brain-kidney crosstalk

研究代表者

倉内 祐樹 (Kurauchi, Yuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：70631638

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)：本研究では、5/6腎臓摘出により慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)モデルマウスを作製し、精神症状に重点を置いた諸種行動解析を行った。腎機能低下が認められるモデル作製から8週後以降のマウスを用いた行動解析の結果、CKDモデルマウスは不安レベルが高く(高架式十字迷路試験および明暗箱試験)、社会性が低下することを見出した(社会性試験)。さらに、CKDモデルマウスの脳内ではグリア細胞の活性化および酸化ストレスレベルの亢進が認められ、腎機能低下に伴う精神症状の誘発メカニズムの一端を解明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKD患者はうつ病などの精神症状を合併することが多いが、その発症メカニズムは解明されていない。本研究では、CKDの代表的な病態モデルである5/6腎臓摘出モデルマウスの詳細な行動解析および生化学的解析により、CKDモデルマウスの不安レベルが高く、社会性が低下していることを明らかにした。本研究は、CKD患者が合併する精神症状の発症機序解明のみならず、高齢化に伴い増加し続けると予想されるCKD患者の身体および精神状態の包括的マネジメントにつながると思う。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) patients shows psychiatric symptoms such as depression. In this study, 5/6-nephrectomized model mice (CKD model mice) were produced and were performed behavioral test focusing psychiatric symptoms. At eight weeks after the surgery, anxiety level of CKD model mice was higher than sham mice (Elevated plus maze test and light/dark box test). In addition, CKD model mice showed lower sociability than sham mice (sociability test). Furthermore, we observed glial activation and the increase in oxidative stress level in the brain of CKD model mice. These results suggest that renal dysfunction, followed by glial activation in the brain, contributes to the pathophysiology of psychiatric symptoms of CKD patients.

研究分野：薬理学

キーワード：脳-腎関連 不安 社会性 Na⁺,K⁺-ATPase 酸化ストレス レドックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease: CKD) は脳血管障害発症の危険因子であり、不安やうつ症状はCKD患者が訴える重篤な精神症状として知られている。研究代表者はこれまでに、脳内 Na^+ 、 K^+ -ATPaseの機能阻害が脳血管障害および不安障害を誘導する事を見出した。 Na^+ 、 K^+ -ATPaseは強心配糖体であるウアバインにより活性が制御されるが、生体内で Na^+ 、 K^+ -ATPase活性を制御する“内因性ウアバイン様物質”の存在も報告され、 Na^+ 、 K^+ -ATPase機能低下が高血圧の発症原因としても注目されている。近年、CKD患者の脳脊髄液および血漿中で内因性ウアバイン様物質が増加する事も報告されたが、腎機能低下による脳血管障害や不安症状の誘導、すなわち「脳-腎連関」メカニズムに関して脳内 Na^+ 、 K^+ -ATPaseの活性制御に着目した研究は行われていない。

2. 研究の目的

腎機能低下による脳血管障害や不安症状の誘導、すなわち「脳-腎連関」メカニズムにおける脳内 Na^+ 、 K^+ -ATPaseの役割を明らかにする。また、 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性を調節する薬物が腎機能や不安症状を改善するか解析する。

3. 研究の方法

本研究では、慢性腎臓病 (CKD) の代表的な病態モデルである5/6腎臓摘出モデルマウスを作成し、詳細な行動解析および生化学的解析を行った。また、CKDマウスが呈する不安症状に対する Na^+ 、 K^+ -ATPase活性調節薬の効果についても行動解析を行った。

4. 研究成果

1) CKDモデルマウスの行動解析

実験にはC57BL/6Jマウス(8週齢、オス)を用い、5/6腎臓摘出により慢性腎臓病(CKD)モデルを作製した。モデル作製の8週間後より、①オープンフィールド試験(自発運動量)、②高架式十字迷路試験(不安レベル)、③明暗箱試験(不安レベル)、④社会性試験(社会性)を実施した。さらに、全ての行動試験終了後にマウスの全脳および血漿を回収し、生化学的評価も行った。オープンフィールド試験において、CKDモデルマウスの自発運動量はShamマウスと同レベルであったが、フィールドの中心エリア滞在時間が優位に低下していた。また、CKDモデルマウスは、高架式十字迷路試験においてOpen arm滞在時間が短く、明暗箱試験においても明箱滞在時間が短かったことから、不安レベルが高いことが示唆された。さらに社会性試験の結果、CKDモデルマウスはShamマウスに比べて新規マウスへの接触時間が短く、社会性が低下していることが示唆された。なお、全ての行動試験終了後に回収した血漿中の尿素窒素(Blood urea nitrogen: BUN)値およびクレアチニン値の測定結果から、CKDモデルマウスの腎機能が著しく低下していることを確認した。以上のCKDモデルマウスの解析結果から、腎機能低下が不安レベルの上昇や、社会性低下の引き金となることが示唆された。

2) CKDモデルマウスの脳内で観察される変化

全ての行動試験終了後にマウスの全脳を摘出して解析した結果、CKDモデルマウスの脳内 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性が低下していることを見出した。さらに、CKDモデルマウスではミクログリアマーカーであるIba1、アストロサイトマーカーであるGFAP発現量が増加しており、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)および内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)発現量も増加していた。一方、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)発現量はCKDモデルマウスとShamマウス間で違いが認められなかった。さらに興味深いことに、CKDモデルマウスの脳内ではeNOSアンカッピングの亢進やタンパク質グルタチオン化レベルの増大が認められ、活性酸素種の賛成増大が示唆された。

3) CKDモデルマウスの不安様行動および社会性の低下に対するRostafuroxinの効果

CKDモデルマウスの脳内で Na^+ 、 K^+ -ATPase活性が低下していたことから、 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性調節薬であるRostafuroxinの効果について検討した。5/6腎臓摘出の4週間後からRostafuroxin(100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)を連日経口投与し、その4週間後(5/6腎臓摘出の8週間後)より、①オープンフィールド試験(自発運動量)、②高架式十字迷路試験(不安レベル)、③明暗箱試験(不安レベル)、④社会性試験(社会性)を実施した。行動試験の結果、Rostafuroxinを連日経口投与されたマウスではVehicle投与群に比べて、高架式十字迷路試験におけるOpen arm滞在時間が延長し、明暗箱試験における明箱滞在時間が延長したことから、不安様症状が改善したことが示唆された。さらに社会性試験において、Rostafuroxinを連日経口投与されたマウスではVehicle投与群に比べて、新規マウスへの接触時間が延長しており、社会性が向上したことが示唆された。また、Rostafuroxinを連日経口投与されたマウスではVehicle投与群に比べて脳内 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性が高かったが、RostafuroxinはCKDモデルマウスで認められた血漿BUN値およびクレアチニン値の上昇を抑制しなかった。以上の結果から、 Na^+ 、 K^+ -ATPase活性の低下を抑制することで、腎機能低下に伴う不安レベルの上昇や社会性の低下を改善できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 17 件) 全て査読あり

1. Anti-neuroinflammatory activities of extract and polymethoxyflavonoids from immature fruit peels of Citrus 'Hebesu'. Adhikari-Devkota A, Kurauchi Y, Yamada T, Katsuki H, Devkota HP. Journal of Food Biochemistry 43 (6) e12813-e12822, 2019
2. Chronic brain blood-flow imaging device for a behavioral experiment using mice. Haruta M, Kurauchi Y, Ohsawa M, Inami C, Tanaka R, Sugie K, Kimura A, Oha Y, Noda T, Sasagawa K, Tokuda T, Katsuki H, Ohta J. Biomedical Optics express 10(4) 1557-1566, 2019
3. Lysosomal dysfunction and early glial activation are involved in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 21 caused by mutant transmembrane protein 240. Seki T, Sato M, Kibe Y, Ohta T, Oshima M, Konno A, Hirai H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Katsuki H. Neurobiology of disease 120 34-50, 2018
4. Involvement of exosomes in dopaminergic neurodegeneration by microglial activation in midbrain slice cultures. Tsutsumi R, Hori Y, Seki T, Kurauchi Y, Sato M, Oshima M, Hisatsune A, Katsuki H. Biochemical and biophysical research communications 511(2) 427-433, 2019
5. d-Cysteine promotes dendritic development in primary cultured cerebellar Purkinje cells via hydrogen sulfide production. Seki T, Sato M, Konno A, Hirai H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Katsuki H. Molecular and cellular neurosciences 93 36-47, 2018
6. A Nurrl agonist amodiaquine attenuates inflammatory events and neurological deficits in a mouse model of intracerebral hemorrhage. Kinoshita K, Matsumoto K, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Journal of neuroimmunology 330 48-54, 2019
7. Propranolol prevents cerebral blood flow changes and pain-related behaviors in migraine model mice. Kurauchi Y, Haruta M, Tanaka R, Sasagawa K, Ohta J, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Biochemical and biophysical research communications 508(2) 445-450, 2018
8. Intra-axonal Ca²⁺ mobilization contributes to triphenyltin-induced facilitation in glycinergic transmission of rat spinal neurons. Noma K, Kurauchi Y, Katsuki H, Oyama Y, Akaike N. Toxicology in vitro 55 11-14, 2018
9. Na⁺, K⁺-ATPase inhibition causes hyperactivity and impulsivity in mice via dopamine D2 receptor-mediated mechanism. Kurauchi Y, Yoshimaru Y, Kajiwara Y, Yamada T, Matsuda K, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Neuroscience research, in press
10. Na⁺, K⁺-ATPase inhibition induces neuronal cell death in rat hippocampal slice cultures: Association with GLAST and glial cell abnormalities. Kurauchi Y, Noma K, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Journal of pharmacological sciences 138(3) 167-175, 2018
11. Polysulfide protects midbrain dopaminergic neurons from MPP⁺-induced degeneration via enhancement of glutathione biosynthesis. Takahashi S, Hisatsune A, Kurauchi Y, Seki T, Katsuki H. Journal of pharmacological sciences 137(1) 47-54, 2018
12. Endogenous Nitric Oxide Inhibits, Whereas Awakening Stimuli Increase, the Activity of a Subset of Orexin Neurons. Yamakawa T, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Biological & pharmaceutical bulletin 41(12) 1859-1865, 2018
13. Effects of triphenyltin on glycinergic transmission on rat spinal neurons. Noma K, Akaike H, Kurauchi Y, Katsuki H, Oyama Y, Akaike N. Environmental research 163 186-193, 2018
14. l-Citrulline improves cerebral blood flow in migraine model rats. Kurauchi Y, Mokudai K, Morita M, Kamimura A, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Journal of Functional Foods 38(A) 540-544, 2017
15. Cystamine-mediated inhibition of protein disulfide isomerase triggers aggregation of misfolded orexin-A in the Golgi apparatus and prevents extracellular secretion of orexin-A. Fujita I, Nobunaga M, Seki T, Kurauchi Y, Hisatsune A, Katsuki H. Biochemical and biophysical research communications 489(2) 164-170, 2017
16. MEK/ERK- and calcineurin/NFAT-mediated mechanism of cerebral hyperemia and brain injury following NMDA receptor activation. Kurauchi Y, Kinoshita R, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Biochemical and biophysical research communications 488(2) 329-334, 2017
17. Cortical hemorrhage-associated neurological deficits and tissue damage in mice are ameliorated by therapeutic treatment with nicotine. Anan J, Hijioka M, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. Journal of neuroscience research 95(9) 1838-1849, 2017

〔学会発表〕(計 34 件)

1. 抹茶の抗不安作用: ドパミンD1 受容体およびセロトニン5-HT1A受容体の関与. 倉内祐樹, Hari Prasad DEVKOTA、堀 健吾、西原佑衣子、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 日本薬学会第139年会、2019年3月22日
2. プロプラノロールは片頭痛モデルマウスの脳血流変化および痛み関連行動を抑制する. 倉内祐樹、春田牧人、田中理紗子、笹川清隆、太田 淳、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 第92回日本薬理学会年会、2019年3月15日
3. Visualization of weather-related headache pathology by implantable CMOS imaging device. Kurauchi Y, Haruta M, Tanaka R, Kawamoto H, Seki T, Sasagawa K, Ohta J, Katsuki H. Neuroscience 2018、2018年11月3日
4. BV-2 ミクログリア細胞におけるビタミンD受容体およびレチノイドX受容体を介した炎症性サイトカイン産生抑制機構. 倉内祐樹、Yevgeny Aster T. Dulla、久恒昭哲、関 貴弘、首藤紘一、香月博志. 日本レチノイド研究会第29回学術集会、2018年10月27日
5. Visualization of headache pathology by implantable CMOS imaging device in awake and freely moving mice. Kurauchi Y, Haruta M, Tanaka R, Sasagawa K, Ohta J, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. The 16th K-J meeting、2018年9月14日(招待講演)
6. 新規 CMOS イメージングデバイスを用いた気圧変動による脳血流動態の可視化. 田中理紗子、倉内祐樹、川本 雛、春田牧人、笹川清隆、太田 淳、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018、2018年8月25日
7. 活性イオン分子による Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制と慢性腎臓病モデルマウスでの解析. 川本 雛、倉内祐樹、西原佑衣子、澤 智裕、張 田力、渡邊博志、丸山 徹、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018、2018年8月25日
8. 新規 CMOS イメージングデバイスを用いた気圧変動による脳血流動態の可視化. 田中理紗子、倉内祐樹、川本 雛、春田牧人、笹川清隆、太田 淳、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 生体機能と創薬シンポジウム2018、2018年8月23日
9. 活性イオン分子による Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制と慢性腎臓病モデルマウスでの解析. 川本 雛、倉内祐樹、西原佑衣子、澤 智裕、張 田力、渡邊博志、丸山 徹、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 生体機能と創薬シンポジウム2018、2018年8月23日
10. Na^+ , K^+ -ATPase 活性制御による社会性の形成・維持. 倉内祐樹、田中理紗子、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 第41回日本神経科学大会 2018年7月28日
11. マウスの社会性維持におけるアドレナリン β 受容体の役割. 西原佑衣子、倉内祐樹、川本 雛、田中理紗子、久恒昭哲、関 貴弘、香月博志. 第41回日本神経科学大会、2018年7月26日
12. Noradrenergic system contributes to the maintenance of social hierarchy in mice. Nishihara T, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018、2018年7月4日
13. Memantine treatment improves hyperactivity induced by Na^+ , K^+ -ATPase dysfunction in mice. Yamada T, Kurauchi Y, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018、2018年7月2日
14. Na^+ , K^+ -ATPase dysfunction induces hyperactivity and impulsivity via dopamine D2 receptor activation in mice. Kurauchi Y, Yoshimaru Y, Yamada T, Hisatsune A, Seki T, Katsuki H. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018、2018年7月2日
15. 慢性腎臓病モデルマウスにおける脳内レドックスシグナル破綻と不安症状の誘発. 倉内祐樹、川本雛、渡邊博志、丸山徹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第71回 日本酸化ストレス学会・第18回 日本NO学会 合同学術集会、2018年5月18日
16. Na^+ , K^+ -ATPase 機能異常による精神症状の誘発. 倉内祐樹. 熊本県病院薬剤師会 2017年度第3回精神科領域研究会研修会、2018年3月31日(招待講演)
17. 中脳切片培養系を用いたドパミン神経変性モデルにおけるポリスルフィドドナーの効果. 高橋周平、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 日本薬学会第138年会、2018年3月28日
18. CMOS イメージングデバイスを用いた疼痛刺激時の血流変化と生理的意義の解明. 大澤匡弘、春田牧人、稲波千尋、倉内祐樹、木村文香、野田俊彦、笹川清隆、徳田崇、太田淳. 日本薬学会第138年会、2018年3月27日
19. 小型動物用超小型イメージングデバイスによる脳疾患モデルマウスの脳血流・脳機能同時計測. 春田牧人、倉内祐樹、木村文香、大澤匡弘、野田俊彦、笹川清隆、徳田崇、太田淳. 日本薬学会第138年会、2018年3月27日
20. 新規 CMOS イメージングデバイスによる頭痛病態の可視化と脳機能解明への応用. 倉内祐樹、春田牧人、田中理紗子、久恒昭哲、関貴弘、笹川清隆、太田淳、香月博志. 日本薬学会第138年会、2018年3月27日
21. 脳内出血モデルマウスにおける血管新生に対するニコチンの効果. 松本倅政、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 日本薬学会第138年会、2018年3月26日
22. 培養脳組織との相互作用による好中球のフェノタイプ変換: in vitro での検討. 野田大介、

- 倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 日本薬学会第138年会 2018年3月26日
23. 社会集団のヒエラルキー維持におけるノルアドレナリン神経系の関与. 西原佑衣子、倉内祐樹、川本雛、田中理紗子、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 日本薬学会第138年会、2018年3月26日
 24. 脊髄小脳失調症 21 型モデル細胞を用いた神経細胞死非依存的グリア細胞活性化のメカニズムの解明. 太田智子、関貴弘、倉内祐樹、久恒昭哲、香月博志. 日本薬学会第138年会、2018年3月26日
 25. Anti-neuroinflammatory activities of extract and polymethoxyflavonoids from unripe fruit peels of Citrus 'Hebesu'. Anjana Adhikari-Devkota, Yuki Kurauchi, Taishi Yamada, Hiroshi Katsuki, Takashi Watanabe, Hari Prasad Devkota. 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences、2018年3月11日
 26. Anxiolytic action of matcha: Involvement of dopaminergic and serotonergic signaling pathway. Yuki Kurauchi, Hari Prasad Devkota, Kengo Hori, Yuiko Nishihara, Akinori Hisatsune, Takahiro Seki, Hiroshi Katsuki. 4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences、2018年3月11日
 27. 新規 CMOS イメージングデバイスによる脳血流動態のリアルタイムモニタリング. 倉内祐樹、春田牧人、田中理紗子、川本雛、久恒昭哲、関貴弘、笹川清隆、太田淳、香月博志. 第4回日本血管生物医学会若手研究会、2018年3月2日
 28. 活性イオウによる Na^+ , K^+ -ATPase の活性制御. 倉内祐樹、西原佑衣子、久恒昭哲、関貴弘、津々木博康、澤智裕、香月博志. 第17回日本NO学会学術集会、2017年
 29. Memantine improves hyperactivity induced by Na^+ , K^+ -ATPase dysfunction in mic. 山田太志、倉内祐樹、吉丸侑子、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第40回日本神経科学大会、2017年
 30. Na^+ , K^+ -ATPase inhibition induces hyperactivity and impulsivity via dopamine D2 receptor activation in mice. 倉内祐樹、吉丸侑子、山田太志、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第40回日本神経科学大会、2017年
 31. 脳内 Na^+ , K^+ -ATPase による多動性および衝動性の制御メカニズム. 倉内祐樹、吉丸侑子、山田太志、野間和希、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第40回日本神経科学大会、2017年
 32. 活性イオウ分子による Na^+ , K^+ -ATPase の活性制御. 西原佑衣子、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、澤智裕、香月博志. 第10回トランスポーター研究会九州部会、2017年
 33. マウス不安様行動の誘導における前頭前野 Na^+ , K^+ -ATPase の関与. 倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第47回日本神経精神薬理学会、2017年
 34. 環境汚染物質トリフェニルスズは脊髄神経伝達を阻害する. 野間和希、倉内祐樹、久恒昭哲、関貴弘、香月博志. 第34回日本薬学会九州支部大会、2017年

〔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〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/kmyakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。