

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590512

研究課題名（和文）

内向き整流性カリウムチャンネルに作用する薬物の探索と創薬への基盤研究

研究課題名（英文）

Discovery of drugs active at inwardly rectifying K⁺ channels

研究代表者

小林 徹 (KOBAYASHI TORU)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：70450583

研究成果の概要（和文）：細胞興奮性の調節に重要な内向き整流性カリウム (Kir) チャンネルの主要なサブファミリーである Kir2 および G 蛋白質活性型内向き整流性カリウム (GIRK; Kir3) チャンネルに対する様々な薬物の作用をアフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用いた電気生理学的研究によって網羅的に検索した。注意欠陥多動障害やうつ病の治療薬として用いられている選択的ノルエピネフリン再取込み阻害剤のアトモキセチン・レボキサチン、薬物依存が問題となるフェンサイクリジンが GIRK チャンネルを抑制することを見出した。また、うつ病のほかにも不安障害、強迫性障害、疼痛障害などに用いられている様々なクラスの抗うつ薬が GIRK チャンネルを異なる効力で抑制することも見出した。これらの研究成果により、臨床における薬物の効果や副作用の理解がより深められたとともに、Kir チャンネルを標的とする創薬研究の分子的基盤や臨床適用拡大への提言につながるものが考えられた。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of a variety of drugs on classical inwardly rectifying K⁺ (Kir2) channels and G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK; Kir3) channels using the *Xenopus* oocyte expression system. We found that the selective norepinephrine reuptake inhibitors: atomoxetine and reboxetine, and phencyclidine inhibited GIRK channels. Furthermore, several classes of antidepressants inhibited GIRK channels with various degrees of potency and effectiveness. These findings may help advance our understanding of their clinical effects and side effects and suggest molecular basis of drug discovery and new indications of known drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬理学、創薬、カリウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の静止膜電位の維持や興奮性の調節に重要な内向き整流性カリウム(Kir)チャネルは、1993年にKir1.1、Kir2.1、G蛋白質活性型内向き整流性カリウム(GIRK1; Kir3.1)チャネルのcDNAがクローニングされて以来、チャネルの分子構造、局在、種々の受容体や細胞内分子による調節機構、生理的機能等について精力的に研究は進められてきていた。こうした中、Kir2.1のアミノ酸変異が周期性四肢麻痺、不整脈、dysmorphologyを主徴とするAndersen症候群の病因であることやGIRKチャネルは痙攣、鎮痛、アルコール作用、コカイン・モルヒネ依存、不安、活動性、不整脈(心房細動、発作性上室性頻拍)、血小板凝集能などに関係することも示されてきていた。したがって、Kir2やGIRKチャネル活性に影響する薬物は、精神神経障害や心臓血管系疾患の治療に役立つことが考えられ、臨床への応用が期待されていた。

(2) 私たちはアフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用いた電気生理学的研究から、GIRKチャネルはエタノールによって活性化される一方、抗精神病薬、三環系抗うつ薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるフルオクセチン・パロクセチン、脳循環改善薬のイフェンプロジル、抗てんかん薬のエトスクシミド、コカインでは抑制されることを見出し、これらの作用を機能面から解明し、臨床との関わりを示してきた。また、他の研究グループからは麻酔薬、性ホルモンなどがGIRKモジュレーターとして作用することが見い出されてきた状況であった。Kir2チャネルに対して、私たちは内在性ステロイドである硫酸プレグネノロンが前脳に多く存在するKir2.3チャネルを活性化させることを見出したが、Kir2チャネルに作用する薬物は依然少数のみであった。

(3) Kirチャネルサブファミリーの一つであるKir6がチャネルポア部分を構成しているATP感受性カリウムチャネルの阻害薬は、2型糖尿病治療薬として非常に有効で忍容性も十分あることから広く用いられてきた。さらに、いろいろなカリウムチャネルを治療的標的とする研究動向があった。さらに、既存薬の再評価から新たな適用や開発に結び付けることが押し進められ、その有益性が示されてきてもいた。また、Kir2及びGIRKチャネルに作用する薬物も様々な病態に対して治療的に関与する可能性が注目されているにもかかわらず、それらのチャネルを直接標的とする薬による治療適用拡大への応用研究や創薬開発については進んでいない状

況であった。このため、これらKirチャネルを標的とした薬理学的研究は臨床応用につながることから重要性を持ち、期待されるものと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究は、脳や心臓に多く存在し、細胞の静止膜電位の維持や興奮性の調節に重要なKirチャネルの主要なサブファミリーであるKir2及びGIRKチャネルに作用する薬物をアフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用いた電気生理学的研究によって数多く見出し、その作用を機能面から詳細に解析することを目的とした。この研究結果から薬物の効果や副作用の理解をより深めるとともに、Kirチャネルを標的とする創薬研究における分子的基盤や臨床適用拡大への提言になることを目指した。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用いた電気生理学的解析のために、Kir2およびGIRKチャネルサブユニットのcDNAクローンを揃え、これらを用いて生体外でmRNAを合成し保存した。

(2) 個々にしたアフリカツメガエル卵母細胞へKirチャネルのmRNAを微量注入することにより目的としたKirチャネルを細胞膜に人工的に発現させた。

(3) この蛋白質発現系に2電極膜電位固定法を用い、目的としたKirチャネルに対する様々な薬物の作用を網羅的に検討することにより新たに作用する薬物を見出し、その機能解析を詳細に行った。

(4) 薬物のチャネルへの作用が細胞外部からか細胞内部分かを明らかにするために、Kirチャネルに作用した薬物をアフリカツメガエル卵母細胞内へ微量注入し、チャネル活性の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 注意欠陥多動障害やうつ病の治療薬として用いられている選択的ノルエピネフリン再取り込み阻害剤であるアトモキセチン、レボキサチンがGIRKチャネルを抑制することを見出した。これらの治療濃度域ではアトモキセチンの効力はレボキサチンより高いことが示唆された。また、エタノールにより生じた

GIRK 電流もアトモキセチンによって抑制された。薬物の細胞内への微量注入によってはチャネル活性に影響しなかったことから細胞外からチャネルへ作用すると考えられた。一方、Kir1.1 および Kir2.1 チャネルには高濃度においても影響しなかった。アトモキセチン、レボキサチンの GIRK チャネルに対する抑制効果は新たな特徴と考えられた。

(2) 薬物依存性が問題となるフェンサイクリジン(PCP)が、GIRK チャネルを抑制することを見出した。その効果は、PCP の中毒濃度レベルにおいてのみ生じることが示唆された。しかし Kir1.1 および Kir2.1 チャネルには高濃度においても影響しなかった。PCP の大量服薬時における痙攣や他の精神神経系の副作用のいくつかに関与することが示唆された。

(3) うつ病のほかに不安障害、摂食障害、強迫性障害、疼痛障害などの治療薬として用いられている様々なクラスの抗うつ薬が GIRK チャネルを異なる効力で抑制することを見出した。セルトラリン、アモキサピンは治療における脳内濃度レベルで GIRK チャネルを抑制し、デュロキセチン、ミアンセリン、ヴェンラファキシンは過量服薬した場合に GIRK チャネルを抑制するものと示唆された。ミルタザピン、ネファゾドンは高濃度で GIRK チャネルを抑制したが、過量服薬例でみられた濃度においても GIRK チャネルにほとんど影響しないことが示唆された。一方、検討したこれらすべての抗うつ薬は Kir1.1 および Kir2.1 チャネルには高濃度においても影響しなかった。様々なクラスの抗うつ薬による GIRK チャネルの抑制効果の違いから薬物の新たな効果や副作用の違いについての理解がより深められたと考えられた。

(4) これまでに Kir チャネルに作用することが判明した薬物の構造を参考にするとともに、さらに様々な化学構造の薬物をこのアフリカツメガエル卵母細胞の実験系を用いて解析したことにより、Kir2 および GIRK チャネルに作用するいくつかの臨床薬をさらに見出すことができ、機能的な解析を進めた。

GIRK チャネルは細胞の静止膜電位の維持や興奮性の調節に重要な分子であり、GIRK チャネル遺伝子欠損マウスを用いた研究からアルコール、コカイン、モル

ヒネ依存や不安に対して有望な治療標的としても考えられてきている。したがって、GIRK チャネルに対して抑制効果を持つ薬物の発見と機能を明らかにすることは基礎と臨床の両面から注目されるインパクトを持つものと考えられる。研究成果により、臨床における薬物の効果や副作用の理解をより深めることができるとともに、Kir チャネルを標的とする創薬研究における分子的な基盤や臨床適用拡大への提言になることが考えられた。

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 6 件)

- ① Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K Inhibition of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by different classes of antidepressants. **PLoS ONE** 6(12): e28208, 2011. 査読有
- ② Kobayashi T, Nishizawa D, Ikeda K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by phencyclidine. **Current Neuropharmacology** 9(1): 244-246, 2011. 査読有
- ③ Ogai Y, Hori T, Haraguchi A, Asukai N, Senoo E, Ikeda K Influence of GIRK channel inhibition on alcohol abstinence and relapse risk in Japanese alcohol-dependent outpatients. **Japanese Journal of Neuropsychopharmacology** 31: 95-96, 2011. 査読有
- ④ Takamatsu Y, Yamamoto H, Hagino Y, Markou A, Ikeda K The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine conditioned place preference in mice. **Current Neuropharmacology** 9(1): 68-72, 2011. 査読有
- ⑤ Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K Inhibition of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the selective norepinephrine reuptake inhibitors atomoxetine and reboxetine. **Neuropsychopharmacology** 35(7): 1560-1569, 2010. 査読有
- ⑥ 小林 徹, 池田和隆 GIRK チャネル **生体の科学** 61(5): 416-417, 2010. 査読無

〔その他〕

ホームページ等

http://www.igakuken.or.jp/research/project/res_prj13.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 徹 (KOBAYASHI TORU)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：70450583

(2) 研究分担者

池田 和隆 (IKEDA KAZUTAKA)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・参事研究員

研究者番号：60281656