

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890218

研究課題名(和文) 新生児糖尿病の中枢神経症状およびKATPチャネルの中枢機能の解明と新規治療基盤

研究課題名(英文) Neuronal feature of neonatal diabetes and investigation of neuronal feature of KATP channel in brain

研究代表者

下村 健寿(Shimomura, Kenju)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90636226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：トランスジェニックマウスの作成は新生児糖尿病(DEND症候群)を引き起こすR50Pを組み込んだベクターが大腸菌増殖に毒性を有し困難であったが、改良型ベクターによりES細胞のスクリーニングが終了し受精卵にインジェクションする段階にいたった。

薬理的にDEND症候群の状態を再現すべくラット脳にKATPチャネル開口剤であるジアゾキサイドを注入した結果、患者の飲水障害を再現することに成功した。

既存の脳中枢作用薬の中にDEND症候群患者に有効なKATPチャネル閉鎖作用を有するものがないかの解析を行った結果、抗鬱剤のブプロピオンと抗てんかん薬のバルプロ酸がKATPチャネル閉鎖作用を有することを発見した。

研究成果の概要(英文)：The mutation which was used to generate transgenic mice showed toxicity on E coli. However, by using modified vector, ES screening was completed and now at the stage of injecting to the ex bryo. The pharmacological regeneration of DEND status was committed by injecting KATP channel opener diazoxide to the rat brain. The injection successfully reproduced water intake disorder which is observed in DEND patient. In order to investigate possible new and effective treatment of DEND syndrome, the effect of pre-existing neurological drug on KATP channel activity was investigated. This study showed that antidepressant bupropion and antiepileptic drug valproic acid have inhibitory effect on KATP channel.

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：KATPチャネル 新生児糖尿病 DEND症候群

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓の細胞では  $K_{ATP}$  チャンネルが血糖コントロールにおいて重要な役割を果たすことが知られている。細胞の  $K_{ATP}$  チャンネルは血糖の上昇に伴うグルコース代謝の亢進によって増加した細胞内 ATP に反応する。上昇した細胞内 ATP は細胞膜に存在する  $K_{ATP}$  チャンネルを閉鎖し細胞膜の脱分極を促す。細胞膜の脱分極は同じく細胞膜上にある電位依存性 Ca チャンネル (VDCC) の開口を引き起こし、細胞内へ  $Ca^{2+}$  イオンが流入する。そして細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が契機となってインスリン分泌が惹起される。

2004 年にオックスフォード大学の Ashcroft らは、 $K_{ATP}$  チャンネルの遺伝子変異が新生児に糖尿病を引き起こすことを発見した。しかし新生児糖尿病患者の多くは糖尿病症状だけでなく低筋力、重度精神発育遅滞、てんかんといった中枢神経症状を伴う (DEND 症候群)。これは  $K_{ATP}$  チャンネルが脳神経にも発現しており、遺伝子変異によって正常な機能を果たせなくなった脳神経  $K_{ATP}$  チャンネルがこれらの神経症状を引き起こしているものと考えられる。しかし  $K_{ATP}$  チャンネルが脳神経において果たしている役割については不明な点も多く、DEND 症候群の神経症状の病態メカニズムや根本的な治療法についてはまだ明らかにはなっていない。

### 2. 研究の目的

(1) DEND 症候群患者の遺伝子変異を持つトランスジェニックマウスを作成し、その中枢症状のメカニズムを解析する。

(2) 作成したトランスジェニックマウスを用いて DEND 症候群の患者の治療方法についての検討も行う。

(3) トランスジェニックマウスの変異型  $K_{ATP}$  チャンネルが起こす中枢神経症状を研究することにより、脳神経に存在する  $K_{ATP}$  チャンネルが果たす生理的な役割についても検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 脳神経特異的 R50P 変異トランスジェニックマウスの作成：マウスが患者の状態を反映しているかを検証する。

(2) 変異型  $K_{ATP}$  チャンネルが脳の発生に与える影響：R50P を発現したマウスの脳組織を胎生期から経時的に病理学的に検証し、 $K_{ATP}$  チャンネルが脳神経の発生に果たす役割を検証する。

(3) 正常脳において  $K_{ATP}$  チャンネルが果たしている役割の検討：CreER-LoxP システムを用いて成長したマウスに変異型  $K_{ATP}$  チャンネルを誘導し、脳神経症状を観察し正常脳神経での

$K_{ATP}$  チャンネルの果たす役割を検討する。

(4)  $K_{ATP}$  チャンネルのてんかん症状へ果たすメカニズムについて：てんかんの発生メカニズムへの  $K_{ATP}$  チャンネルの寄与を検討する。

(5) DEND 症候群の脳神経症状に対する治療の検討：トランスジェニックマウスの皮下に徐放型 SU 剤 (グリベンクラミド) を埋め込み、その際の治療効果、脳神経組織の変化を検討する。

### 4. 研究成果

(1) トランスジェニックマウスの作成について：Bac サブクローニング&Red/ET システムを用いた組み換えを行った結果、DEND を引き起こす変異型遺伝子である R50P が大腸菌に対する毒性を有することが明らかとなり、さらに Pgkgb2Neo カセットとの相性も悪く、大腸菌の増殖が停止する事態に陥った。そこで PgkNeo カセットを用いてターゲティングベクターを構築した。この場合 loxP-STOP-loxP の下流に R50P-i-res-tdTomato をつないでおり ES 細胞を用いたスクリーニングも終了しマウス受精胚へのインジェクションの段階にこぎつけた。

(2) 上記のトランスジェニックマウスの作成が予想外の困難によって遅延したため、通常のマウスを用いて薬理的に脳  $K_{ATP}$  チャンネルの開口を試み DEND 症候群患者の状態の再現を試みた。具体的には  $K_{ATP}$  チャンネル開口剤である diazoxide をラットの脳第三脳室に注入した。その結果、diazoxide が注入されたラットにおいて飲水量の有意な上昇が確認された。これは実際に R50P を有する DEND 症候群患者が SU 剤の内服によって脳  $K_{ATP}$  チャンネル閉鎖が促された場合に飲水量が極端に減少することに対応していると考えられ、DEND 症候群ならびに  $K_{ATP}$  チャンネルが脳において果たす生理的な役割を解明する上で重要な知見であると考えられた (現在、論文投稿中)。

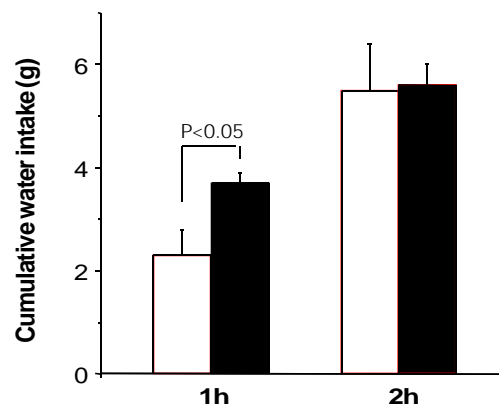


図1・Diazoxide の第三脳室投与による飲水量の増加 (open box: Control, closed box: diazoxide group).

(3) DEND症候群においてはSU剤が治療に有効であることが判明しているが、脳への移行がよいことが神経症状の治療に有効な効果を挙げられない一因であると考えられる。そこで脳神経系疾患に有効な薬剤にSU剤と同様に  $K_{ATP}$  チャンネル閉鎖させる作用を有する薬剤がないかの検討を行った。その結果、抗鬱剤であり禁煙補助薬として欧米で使用されているブプロピオンに  $K_{ATP}$  チャンネル閉鎖作用があることが確認された。さらに抗てんかん作用を有するバルプロ酸にも  $K_{ATP}$  チャンネルに作用する可能性を発見した。ブプロピオンやバルプロ酸がDEND症候群の治療に有効か否かについては安全面等の問題から今後の検討課題となるが、治療のひとつの方向性として重要な知見であると考えられる。

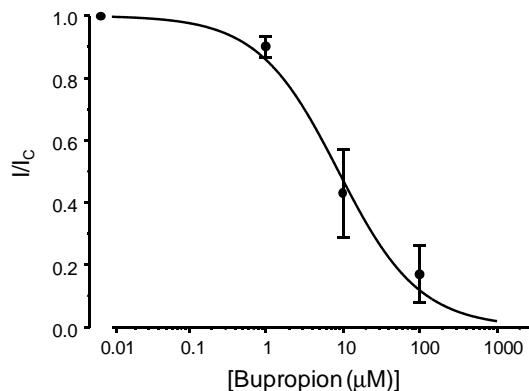


図2・ブプロピオンにおける  $K_{ATP}$  チャンネル閉鎖作用の濃度依存曲線。

#### 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 2 件)

1. Manaka K, Nakata M, Shimomura K, Rita RS, Maejima Y, Yoshida M, Dezaki K, Kakei M, Yada T (2014) Chronic exposure to valproic acid promotes insulin release while reducing  $K_{ATP}$  channel current and unfaltering  $Ca^{2+}$  signaling in mouse islets. *Journal of Physiological Sciences* 64. 77-83
2. Yang Y, Shimomura K, Sakuma K, Maejima Y, Iwasaki Y, Galvanovskis J, Dezaki K, Nakata M, Yada T (2013) Bupropion can close  $K_{ATP}$  channel and induce insulin secretion. *J*

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 下村健寿、ヨウ・イヒ、佐久間和哉、オトゴンウール・ゼセムドルジェ、プトラ・サントソ、前島裕子、矢田俊彦「脳における  $K_{ATP}$  チャンネルの活性化は摂食量の変化を伴わず飲水量を増加させる」(第34回日本肥満学会)
2. ヨウ・イヒ、前島裕子、佐久間和哉、オトゴンウール・ゼセムドルジェ、プトラ・サントソ、岩崎有作、下村健寿、矢田俊彦「抗肥満作用のある抗鬱剤ブプロピオンがインスリン分泌に与える影響」(第34回日本肥満学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
下村健寿 (SHIMOMURA Kenju)

研究者番号：90636226

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：