

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861389

研究課題名(和文) 幼若脳に対するブメタニドと麻酔薬の作用に関する検討

研究課題名(英文) The study to evaluate the effect of bumetanide on the effectiveness of anesthetic agents in the neonate

研究代表者

刈谷 隆之 (KARIYA, TAKAYUKI)

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：90614404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：幼若動物における鎮静に対して、Cl⁻-共輸送担体によるCl⁻-排泄機構の変化およびそれに伴うGABA受容体の脱抑制が関与している。われわれは、Cl⁻-共輸送担体の一つであるKCC2の選択的活性化薬剤であるCLP290を投与することにより、ミダゾラムによって引き起こされる鎮静が増強することを行動学的に明らかにした。また組織学手法を用いて、CLP290によって大脳皮質感覚野の興奮が抑制されることを明らかにした。また生化学手法を用いて、CLP290がKCC2のリン酸化を介して機能を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cl⁻ transporters control intracellular Cl⁻ concentration, which affects the behaviour of anesthetic agents. We examined if the activation of KCC2 enhances the sedative actions of midazolam. We revealed that CLP290, KCC2 enhancer via phosphorylation of KCC2, enhanced MDZ-dependent sedation.

研究分野：麻酔薬

キーワード：鎮静作用 NKCC1 KCC2

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬は新生児早期のラットにおいて、麻酔・鎮静作用の減弱と神経毒性を起こすことが知られている。これらの現象に対して、1) GABAA 受容体作用性全身麻酔薬は幼若脳の海馬、大脳皮質において興奮作用を示すことで、麻酔・鎮静作用が減弱する。2) ループ利尿薬の bumetanide は NKCC1 阻害作用を介して全身麻酔薬の幼若脳における興奮作用を抑制し、麻酔・鎮静作用を増強する。という仮説を立てた。

2. 研究の目的

私たちは上記過程に、Cl⁻共輸送担体による Cl⁻排泄機構の変化およびそれに伴う GABA 受容体の脱抑制が関与しているのではないかと考えた。幼若動物を用いたてんかん原生獲得のメカニズムに Cl⁻共輸送担体が関与していることは報告されているが、しかしながら臨床分野で広く使用されている GABA 受容体アゴニストであるミダゾラムについて、鎮静に対する Cl⁻共輸送担体の影響を検討した研究はあまりない。

本研究では以下の目的を設定する。

Cl⁻共輸送担体の一つである KCC2 の選択的活性化薬剤である CLP290 を投与することにより、ミダゾラムによって引き起こされる鎮静が増強するかを行動学的に検討するこれらの現象が抑制されるかを検証する

組織学手法を用いて、CLP290 によって影響が出現する脳領域を網羅的に解析する。

生化学手法を用いて、CLP290 がどのようなメカニズムで Cl⁻共輸送担体の一つである KCC2 の機能を就職するかを検討する

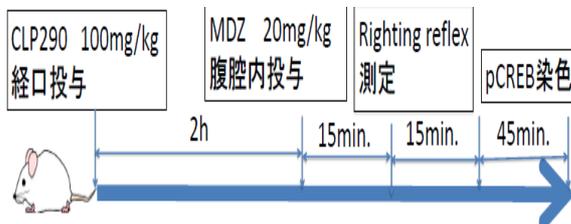
上記目的のため、in vivo、in vitro の実験系により、全身麻酔薬とループ利尿薬の幼若ラットの脳と行動に対する作用の検討を行う。

3. 研究の方法

動物

すべての実験は生後 7 日齢の雄性 SD ラットを使用して行った。またミダゾラムは生理的食塩水に溶解し、20mg/kg で腹腔内投与した。

対向反射試験 (Righting reflex test)



SD ラットにミダゾラム投与を行い、15 および 30 分後に鎮静程度を評価するため対向反射試験を行った。試験は、各評価の時間帯にラットを仰向けにし、腹這いに戻り 1 歩後ろ足を使って歩き出すまでの時間を計測した。測定時間は各回 60 分として打ち切った。また CLP290 はミダゾラム投与 2 時間前に経口で実施した。

組織学的実験

麻酔薬曝露終了 75 分後に経左心室的に 4% パラホルムアルデヒド (体重 g × 3ml) を 10 分間かけて還流した。その後断頭し、脳は 4% パラホルムアルデヒドで一晩後固定した後、15 および 30% スクロースに浸透させた。その後パラフィン包埋し、厚さ 15um の切片を作成した。神経細胞の興奮性を評価するため pCREB 染色を行い、陽性細胞数のカウントを行った。カウント作業は染色者と異なる実験者を採用し、blind 下で実施した。

生化学的実験 (ウェスタンブロット法)

生後 7 日齢のラットに CLP290 を経口投与し、2 時間後に厚さ 400um の急性脳切片を作成した。切片はビオチンと 45 分間反応させ、その後 Neutravidin agarose resin でビ



オチン化タンパクのみを回収した。この方法により膜表面に存在するたんぱく質のみビオチン化されるため、resin により膜発現している KCC2 のみを回収できる。その後 homogenize し、SDS-PAGE 法を用いて電気泳動を行い、PVDF 膜に転写後、KCC2 およびリン酸化 KCC2 の抗体と反応させた。現象は RAS-3000 を用いて行った。

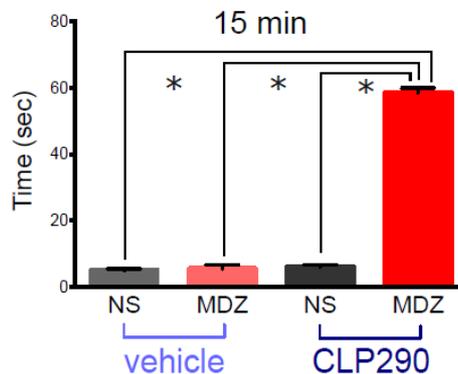
CLP290 の調整および投与

CLP290 は 40%HPBCD に氷冷下で溶解し、完全に溶解したところで生食を等量加え、最終的に 20%HPBCD に溶解して使用した。CLP290 は prodrug であるため、静脈ではなく経口投与を行った。マウス用経口ゾンデを用いて 100mg/kg で投与を行った。

4. 研究成果

CLP290 はミダゾラムの鎮静作用を有意に増強させる

ミダゾラム 20mg/kg の腹腔内投与では生後 7 日目のラットは入眠せず、生理的食塩水を投与されたラットと同程度である。しかしながら CLP290 を先行投与された動物では、ミダゾラム投与 15 分後には有意に深い鎮静を示した (図 1)。一方 CLP290 単剤には鎮静



作用は認められなかった。図 1. ミダゾラム投与 15 分後、CLP290 併用により有意に鎮静作用を発現した

またこの効果はミダゾラム投与 30 分後でも顕著であった(図2)。

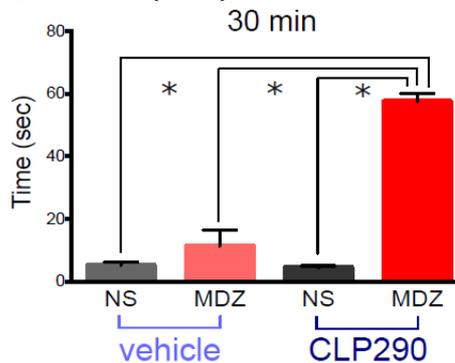


図2.ミダゾラム投与 30 分後、CLP290 併用により有意に鎮静作用を発現した

CLP290 は大脳皮質感覚野において神経細胞の興奮性を低下させる

ミダゾラム 20mg/kg の腹腔内投与を行った 75 分後に脳組織を摘出し、組織染色用に切片を作成した。神経の興奮性を評価するため pCREB 抗体を用いて染色を行い、陽性細胞数をカウントした。その結果、大脳皮質感覚野において pCREB 陽性細胞数の有意な低下を認めた。視床、海馬やほかの大脳皮質においては各群において陽性細胞数に有意な変化は認めなかった(図3)。

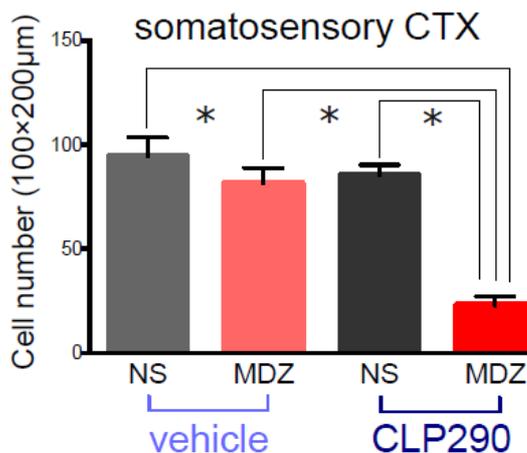


図3.ミダゾラム投与 75 分後、CLP290 併用により大脳皮質感覚野において有意に興奮性の低下を認めた

CLP290 は KCC2 のリン酸化を介して KCC2 活性化を誘導する

CLP290 がどのようなメカニズムで KCC2 の機能を活性化させるかを検討するためウェスタンブロット実験を行った。まず KCC2 は膜上に存在することで Cl⁻ のトランスポーターとして機能するため、CLP290 が KCC2 の膜表面提示量を増加させるかを検討した。膜表面提示量を定量するため、大脳皮質に存在する総 KCC2 量を測定し、それに対するリン酸化の比率を算出した。その結果、CLP290 は vehicle と比較して膜表面の KCC2 提示量を増加させないことが分かった(図4)。

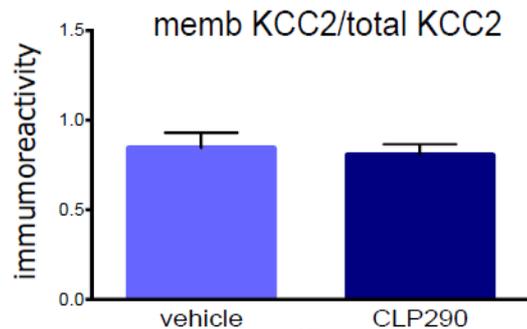


図4.CLP290 は膜表面に提示される KCC2 を増加させなかった

KCC2 の活性化メカニズムを検討すると、過去には KCC2 ser940 のリン酸化が機能を活性化させることが報告されている (Lee HH et al. Nat Neurosci. 2011)。われわれも KCC2 のリン酸化を定量すべく、実験を行った。その結果、CLP290 を投与したラットにおいて KCC2 のリン酸化が上昇することが分かった(図5)。

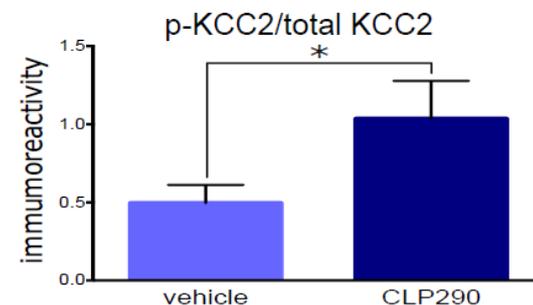


図5.CLP290 は KCC2 のリン酸化を増加させることがわかった

上記の実験結果より、CLP290 は KCC2 のリン酸化を上昇させ、Cl⁻ を細胞外にくみ出す効率を増加させる結果、細胞内 Cl⁻ 濃度を低下させたのではないかと推察される。その結果、GABAA 受容体刺激により、幼若動物では Cl⁻ が細胞外に流出し脱分極するのに対し、CLP290 投与ラットでは Cl⁻ が細胞内に流入し、過分極状態となり、その結果 GABAA 受容体刺激薬の鎮静作用を増強させたのではないかと考えられる。またこうした反応に関与しているのは大脳皮質の感覚野であり、外界からの刺激情報の入力を抑制することで、鎮静作用の増強を誘導していることが示唆された。こうした研究により、幼若期の鎮静耐性や鎮静補助薬の開発に対し新たな知見を与えることができたと考えている。

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 1 件)
 Koyama, Andoh, Kamiya, Miyazaki, Maruyama, Kariya, Goto.
 Bumetanide, an inhibitor of NKCC1 (Na-K-2Cl Cotransporter Isoform1), Enhances Propofol-Induced Loss of

Righting Reflex but not Its Immobilizing
Actions in Neonatal Rats.
PLoS One 2016 e0164125)

〔学会発表〕(計 1件)

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: 新生児動物
の鎮静における KCC2 の機能解析、第 63
回日本麻酔科学会、福岡、2016 年 5 月 27
日、ポスター

〔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

刈谷 隆之 (KARIYA, takayuki)

横浜市立大学・附属市民総合医療センタ

ー・助教

研究者番号: 90614404

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()