

内因性生理活性物質による神経細胞 K^+ チャネル修飾作用に関する研究

学位論文内容の要旨

イオンチャネルは、イオン透過による膜電位変化発生を電気信号として提供することにより、情報伝達に寄与する膜蛋白分子である。そのうち神経細胞電位依存性 K^+ チャネルは、細胞膜 K^+ コンダクタンスを変化させることにより、静止膜電位の維持、活動電位形成、活動電位反復発射の調節といった神経細胞の興奮にとって重要な役割を担っている。近年これら K^+ チャネル遺伝子のクローニングが進み、徐々にその構造が解明されつつあるが、チャネルが有する機能に関しては今なお不明な点が多い。薬理学観点からは従来から用いられている古典的なチャネル阻害薬やその派生物質による研究に終始しているため、臨床応用の際生じる様々な問題点を解決できぬまま現在に至っている。このような外因性のチャネル修飾薬という観点から離れ、元来生体内に存在する内因性の生理活性物質に注目し、これによるチャネル修飾作用を解き明かすことは、新たな創薬につながる可能性を秘めている。そこで本研究はいくつかの内因性生理活性物質を用いそれが有する神経細胞電位依存性 K^+ チャネルへの修飾作用を検討した。胎生ラット大脳皮質神経細胞を初代培養し、これに対してパッチクランプ法によるイオン膜電流を計測して各物質による修飾作用を機能的に評価した。さらに細胞毒性試験やチャネル蛋白定量なども加え、この修飾作用の持つ意味を細胞生物学的な角度からも検討した。

(1) 腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor - α : TNF)

TNF を培養液に添加し 12 時間以上処置することにより、一過性外向き K^+ 電流(I_A)の電流密度増大が生じた。この反応が生じるシグナル伝達機構を調べる目的で各種伝達機構修飾薬を用いて検討した結果、TNF 受容体(p55)、Phosphatidilcholine-specific phospholipase C、Protein kinase C の関与を認めたが、セラミドの関与は乏しいと考えられた。また、増大した I_A のカイネティクスは変化しなかったことから、TNF は個々のチャネル機能には影響せず、チャネル蛋白自体の発現量を増大させたものと推測された。事実、発現蛋白量の定量では、神経細胞 I_A 形成の責任チャネルの一つである Kv1.4 チャネルの発現増大が TNF

処置によりもたらされた。細胞毒性試験では、TNF 自体に神経毒性はなく、逆に TNF は I_A 増大を介して NMDA 神経毒性に対する神経保護作用を示すことが確認された。

(2) Thiamine

細胞膜透過性の低い thiamine を細胞外から投与しても遅延整流性 K^+ 電流(I_K)および活動電位に変化を及ぼさないが、膜透過性の高い thiamine 誘導体(thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide; TTFD)の細胞外投与により I_K の抑制ならびに活動電位幅延長が生じた。Thiamine をパッチ電極内液を介して細胞内へ直接投与すると I_K 抑制が出現するが、細胞質からパッチ膜を遊離する inside-out patch 法にて細胞膜内側面へ thiamine を直接投与しても I_K 抑制は再現できなかった。しかしながら、thiamine のリン酸化エステルである thiamine diphosphate(TDP)はこの inside-out patch 法での I_K 抑制を引き起こした。つまり、thiamine は細胞内に移行した後リン酸化を受けてはじめて I_K 抑制物質としての作用を発揮すると考えられた。また、この現象は神経細胞 I_K 形成の責任チャネルの一つである Kv1.2 クローンチャネルに対しても確認された。

(3) カイニン酸

イオンチャネル供役型グルタミン酸受容体(ionotropic glutamate receptor; iGluR)のうち AMPA/kainate 受容体を選択的に活性化する興奮性アミノ酸のカイニン酸が、培養ラット大脳皮質神経細胞の I_K を抑制することを見出した。この I_K 抑制は AMPA/kainate 受容体拮抗薬の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)で消失することから、AMPA/kainate 受容体活性化による陽イオン流入が原因と考えられた。そこで細胞外の Na^+ を Choline または N-methyl-D-glucamine に置換すると保持電流の内向き偏位と I_K 抑制は消失したことから、細胞内に増加した Na^+ が K^+ チャネルのイオン透過孔を塞ぐことにより I_K 抑制が生じると考えられた。この現象の持つ意味として、シナプス伝達の際グルタミン酸刺激が起こると iGluR を介したシナプス後細胞の脱分極は、同時に生じる I_K 抑制によりフィードフォワード的に加速される可能性を示唆している。

以上のように電位依存性 K^+ チャネルの機能ならびにその発現は、今回用いた内因性生理活性物質によって修飾を受けることが明らかとなった。このことは逆に生理的状态にあっては、常に電位依存性 K^+ チャネルが内因性物質によって調節を受けていることを意味している。しかし、その調節機構は決して単純なものではなく、複雑なシグナル伝達機構が介在することは本研究からも明白である。一方でこの伝達機構を解き明かすことは、内因性物質の新たな生理作用究明に寄与するものと考えられる。さらに、元来生体が持つ調節機能として様々な内因性生理活性物質が K^+ チャネルに作用しているのならば、将来 K^+ チャネルを標的としうる多くの内因性物質を見つけ、これを創薬に結びつける上で本研究はその一里塚になると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 福 島 菊 郎

学 位 論 文 題 名

内因性生理活性物質による神経細胞 K^+

チャネル修飾作用に関する研究

申請者が提出した学位論文は、申請者が主著者となって発表したラット胎仔大脳皮質神経細胞の外向き K^+ 電流を形成する K^+ チャネルに対する内因性生理活性物質の影響を検討した3編の研究成果を総括したものである。他の興奮性細胞と同様に神経細胞では、 K^+ チャネルは静止膜電位の維持、活動電位再分極相の形成、活動電位反復発射の調節もしくは不応期の設定と細胞の興奮性に重要な関わりを持っている。したがって、 K^+ チャネルの薬理学的修飾は神経細胞の興奮性を調節することとなり、興奮性の異常に基づく病態の改善に寄与することが期待される。本研究は、従来から知られている古典的な K^+ チャネル阻害薬や活性化薬の概念から離れ、 K^+ チャネル修飾作用を有する内因性生理活性物質を探索し、その物質の生成や分解を調節する事により間接的に K^+ チャネル機能を変容させる新しい治療法の開発を目的としたものである。以下に得られた新知見を要約する。

1. 中枢神経系変性疾患および虚血等で増加してくる腫瘍壊死因子($TNF\ \alpha$)は急性投与ではラット大脳皮質神経細胞の膜電流には何ら影響を与えないが、 TNF を培養液に添加し12時間以上処置すると、一過性外向き K^+ 電流(I_A)の電流密度増大が生じる事を見出した。増大した I_A のカイネティクスは変化しなかったことから、 TNF は個々のチャネル機能には影響せずチャネル蛋白自体の発現量を増大させたものと推測され、事実、神経細胞 I_A 形成の責任チャネルの一つである $Kv1.4$ チャネルの発現増大を確認した。このチャネル蛋白の増加には、 TNF 受容体($p55$)、phosphatidylcholine-specific phospholipase C、protein kinase Cが関与し、セラミドの関与は乏しいことを薬理学的に明らかにした。細胞毒性試験では、 TNF 自体に神経毒性はなく、逆に TNF は I_A 増大を介してNMDA神経毒性に対する神経保護作用を示すことを示した。2. Vitamin B_1 であるthiamineを細胞外から投与しても遅延整流性 K^+ 電流(I_K)および活動電位に変化を及ぼさないが、膜透過性の高いthiamine誘導体(thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide; TTFD)の細胞外投与により I_K の抑制ならびに活動電位幅延長を認めた。詳細

な電気生理学的検討により、膜を透過した TTFD が細胞内で thiamine となり、リン酸化を受けて生じる thiamine diphosphate (TDP) が I_K 抑制の本体であることを明らかにした。3. イオンチャネル供役型グルタミン酸受容体 (iGluR) の一つである AMPA/kainate 受容体を選択的に活性化する興奮性アミノ酸のカイニン酸が、培養ラット大脳皮質神経細胞の I_K を抑制することを見出し、その機序として、AMPA/kainate 受容体活性化によって流入した Na^+ が K^+ チャネルのイオン透過孔を塞ぐことにより I_K 抑制が生じると結論した。この現象は、シナプス伝達の際にグルタミン酸刺激が起こると、iGluR を介したシナプス後細胞の脱分極が同時に生じる I_K 抑制により加速される可能性を示唆している。学位論文発表に際して、主査および副査から、TNF による神経細胞の K^+ チャネル蛋白の上方修飾の時間依存性について、TNF による神経保護作用の機序、TTFD の臨床有用性、神経細胞に対する K^+ チャネル抑制薬研究の将来展望、他のサイトカインの神経膜電流に及ぼす作用等の質問が、また、参加者から、カイニン酸による I_K 抑制の意義、AMPA/kainate 受容体活性化によって流入した Na^+ が K^+ チャネルを抑制する機序等の質問があったが、申請者は自己の実験データおよび文献的知識に基づいて概ね的確に解答した。

本研究は、サイトカインである TNF、ビタミン B_1 およびその膜透過性誘導体および興奮性アミノ酸であるカイニン酸の培養ラット大脳皮質神経細胞 K^+ チャネルに及ぼす影響を電気生理学的に詳細に解析して、内因性生理活性物質が K^+ チャネル機能を修飾して神経細胞の興奮性に影響し得る可能性を示唆し、中枢神経系疾患治療法の開発に新たな視点を加えたものである。

審査員一同は、パッチクランプ法などの精緻な研究方法を駆使して内因性生理活性物質の神経細胞 K^+ チャネル機能に及ぼす作用を解析して、難治性中枢神経疾患治療法開発に新しい可能性を示唆した本研究を高く評価し、加えて、申請者の豊富な学識および研究に対する誠実な姿勢も勘案して、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。