

氏名(本籍)	こ ばやし きよ あき 小林 清明 (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5114 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>K<sup>+</sup> Channel Openers Suppress Epileptiform Activities Induced by 4-Aminopyridine in Cultured Rat Hippocampal Neurons</b> (カリウムチャンネルオープナーは、ラット海馬培養細胞における 4-アミノピリジン誘発痙攣活動を抑制する)		
主 査	筑波大学教授	薬学博士	幸 田 幸 直
副 査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	本 間 真 人
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	堀 孝 文
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	山 本 純 偉

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

#### (目的)

てんかんは、神経細胞の過剰興奮に由来する反復性発作を主徴とする慢性の脳疾患である。有病率は全人口の約 1% で、患者の約 30% は薬物治療で発作のコントロールが困難な難治性てんかん患者といわれている。こうした患者のてんかん発作を抑制するために、既存抗てんかん薬と異なる作用メカニズムを有する新薬の開発が望まれている。

近年、カリウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、カルシウムチャンネルなどのイオンチャンネル遺伝子に機能的な変異があると、てんかんが発症することが確認され、てんかん発作の発症や抑制にはイオンチャンネルの機能が大きく関与していることが明らかとなった。本研究で注目するカリウムチャンネルは、活動電位の再分極や静止膜電位制御に関与して神経活動を抑制する調節因子である。このため、カリウムチャンネルオープナーによるカリウムチャンネル機能の亢進が、抗てんかん薬としての重要な資質である神経の過剰興奮抑制作用になることが考えられる。しかし、実際は現在までに、カリウムチャンネルオープナーで抗てんかん薬として臨床で使用されているものはなく、また既存抗てんかん薬に対する有用性や各カリウムチャンネルサブタイプのオープナーに対する興奮抑制作用の違いについては、十分な比較検討がなされていない。このため、どのカリウムチャンネルサブタイプが創薬ターゲットとして有望かは十分に解明されていない。

本研究では最初に、ラット海馬培養細胞を用いて、化合物の持つ神経興奮抑制作用を *in vitro* で簡便、かつ定量的に評価できる蛍光測定系を構築し、次に種々のカリウムチャンネルオープナーの *in vitro* における神経過剰興奮抑制作用を調べ、抗てんかん薬としての資質を明らかにした。

#### (対象と方法)

ラット胎仔 (E17-E19) より採取した海馬細胞を約 3 週間 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、初代培養細胞を作製した。評価系の確立と化合物評価は、以下のように行った。

(1) 神経過剰興奮評価系の構築：海馬培養細胞にナトリウムイオン感受性色素 sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) を取り込ませ、次に 4-aminopyridine (4-AP) を添加して、細胞内ナトリウムイオン濃度

上昇を誘発させ、ナトリウムイオン感受性蛍光色素 SBF1 で検出した。

(2) 化合物評価：4-AP 添加で過剰興奮を誘発させた海馬培養細胞に試験化合物を添加し、ナトリウムイオンの低下による蛍光強度の減少を定量的に測定した。阻害強度は、試験化合物なしのコントロールを100%、ナトリウムチャンネル阻害剤のテトロドトキシン (TTX) による作用を0%として、50% 阻害に必要な濃度 (IC<sub>50</sub> 値) で算出した。

(3) 蛍光測定系の検証：上記の蛍光系で見られた反応をパッチクランプ法による電気生理実験で再現できるか否かを検証した。

(4) カリウムチャンネルオープナーの評価：(2) と同様の試験方法で評価した。また、4-AP 刺激による過剰興奮に対して抑制効果を示した化合物については、4-AP 刺激前に化合物を前処置してから4-AP 刺激を行うことで、4-AP 誘発の神経過剰興奮に対する化合物の抑制効果を調べた。

(結果)

(1) ラット海馬培養細胞に、過剰興奮を誘発する4-APを添加すると、10-100 μM では濃度依存的に、100-1000 μM ではほぼ一定に、細胞内ナトリウムイオン濃度上昇が上昇することを、ナトリウム感受性色素 SBF1 の蛍光強度上昇で検出することができた。

(2) 4-AP 存在下において TTX を作用させると、濃度依存的な蛍光強度の減少が見られた。TTX の IC<sub>50</sub> 値は 2.4nM であった。次に、この4-AP 誘発神経過剰興奮評価系の性質を明らかにするため、興奮性のシナプス伝達に関与する因子の作用を調べた。その結果、AMPA/KA レセプター拮抗剤の CNQX と、P/Q タイプカルシウムチャンネル阻害剤の ω-AgatoxinIVA が、約 60% まで (40% 抑制) 統計学的に有意な部分的な阻害作用を示した。また既存抗てんかん薬では、ナトリウムチャンネル阻害薬や GABA 機能亢進作用を有する薬物で、50% 以上の明確な抑制効果を示した。

(3) パッチクランプ法を用いて、興奮性シナプス伝達に関与因子の作用を定量的に評価した。その結果、TTX では4-AP により誘発されるてんかん様活動電位の完全抑制が見られ、CNQX と ω-AgatoxinIVA では、てんかん様波形の部分的に抑制する作用を確認できた。一方、蛍光系で作用が認められなかった興奮性シナプス伝達の阻害因子はパッチクランプ法でも作用を示さなかった。

(4) カリウムチャンネルオープナーでは、K<sub>v</sub>7.2/K<sub>v</sub>7.3 チャンネルオープナーの Retigabine と Flupirtine、K<sub>Ca</sub>2 チャンネルオープナーの NS309、DCEBIO、1-EBIO が4-AP 誘発の過剰興奮に対して明確な抑制作用を示し、IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ Retigabine (38.1 μM)、Flupirtine (50.2 μM)、NS309 (36.1 μM)、DCEBIO (41.1 μM)、1-EBIO (1158.0 μM) であった。また、K<sub>Ca</sub>1.1 チャンネルオープナーは、低濃度側では統計学的に有意な部分的な阻害を示したが、高濃度側ではその作用が消失したため、IC<sub>50</sub> 値を算出できなかった。K<sub>v</sub>6 チャンネルオープナーはいずれの化合物も統計学的に有意な過剰興奮抑制作用を示さなかった。また興奮抑制作用を示したカリウムチャンネルオープナーは、4-AP で、刺激する前に処置しても、既存抗てんかん薬と同様に4-AP 誘発の神経過剰興奮に対して抑制作用を示した。

(考察)

本研究では、2つの研究課題を達成した。1) ラット海馬培養細胞を用いて、4-AP で誘発される細胞内ナトリウムイオン濃度上昇に基づく神経興奮作用を定量的に評価できる系を構築した。2) 本評価系を用いて各カリウムチャンネルオープナーの作用を検討し、K<sub>v</sub>7.2/K<sub>v</sub>7.3 チャンネルオープナーと K<sub>Ca</sub>2 チャンネルオープナーが既存の抗てんかん薬と同等の興奮抑制効果を示すこと、K<sub>Ca</sub>1.1 チャンネルオープナーが部分的な抑制効果を示すこと、K<sub>v</sub>6 チャンネルオープナーには抑制作用がないことを明らかにした。以上のことから、新規抗てんかん薬の創薬ターゲットとして有望なカリウムチャンネルサブタイプは、K<sub>v</sub>7.2/K<sub>v</sub>7.3 チャンネルと K<sub>Ca</sub>2 チャンネルであると結論付けることができた。

本評価系で得られたカリウムチャンネルオープナーの阻害活性には、すでに論文報告されている各カリウ

ムチャンネルサブタイプを過剰発現させた細胞を用いて、電気生理学的同機能解析した  $EC_{50}$  値の結果よりも、10 倍程度高濃度のカリウムチャンネルオープナーが必要であった。この違いは、神経細胞の過剰興奮を抑制させるために、チャンネルを最大レベルに活性させ過分極化させる必要があったためと考えられる。また、カリウムチャンネルオープナーを前添加した場合においても、既存抗てんかん薬と同様に 4-AP 誘発の過剰興奮抑制効果を示したため、カリウムチャンネルオープナーが興奮抑制作用のみならず、持続的に存在することで、新たな神経過剰興奮出現に対する抑制効果を示すことが示唆された。

以上のように本研究により、今後の創薬研究に繋がるカリウムチャンネルオープナーの神経過剰興奮抑制作用を明らかにし、新規抗てんかん薬の可能性を見出すことができた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ラット海馬培養細胞を用いて、化合物の持つ神経興奮抑制作用を *in vitro* で簡便、かつ定量的に評価できる蛍光測定系を構築し、次に種々のカリウムチャンネルオープナーの *in vitro* における神経過剰興奮抑制作用を調べ、抗てんかん薬としての資質を検討したものである。

その結果、ラット海馬培養細胞を用いて、4-AP で誘発される細胞内ナトリウムイオン濃度上昇に基づく神経興奮作用を定量的に評価できる系を構築することができた。また、その評価系を用いて各カリウムチャンネルオープナーの作用を検討し、 $K_v7.2/K_v7.3$  チャンネルオープナーと  $K_{Ca2}$  チャンネルオープナーが既存の抗てんかん薬と同等の興奮抑制効果を示すこと、 $K_{Ca1.1}$  チャンネルオープナーが部分的な抑制効果を示すこと、 $K_{ir6}$  チャンネルオープナーには抑制作用がないことを見出したものである。

このように新規抗てんかん薬の創薬ターゲットとして有望なカリウムチャンネルサブタイプを見出したことは、今後の新規抗てんかん薬の創薬研究において重要な知見を提供したものと評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。