

## 総 説

### ストレス関連病態における GABA 応答障害の関与

五十嵐健人,<sup>a</sup> 富田 和男,<sup>a</sup> 桑原 義和,<sup>b\*</sup> 山西沙祐里,<sup>a,c</sup>  
古川みなみ,<sup>c</sup> 宮脇 正一,<sup>c</sup> 栗政 明弘,<sup>b</sup> 佐藤 友昭<sup>a</sup>

#### Damage of GABA Response that Explains a Certain Stress-Related Pathology

Kento IGARASHI,<sup>a</sup> Kazuo TOMITA,<sup>a</sup> Yoshikazu KUWAHARA,<sup>b\*</sup> Sayuri YAMANISHI,<sup>a,c</sup>  
Minami FURUKAWA,<sup>c</sup> Shouichi MIYAWAKI,<sup>c</sup> Akihiro KURIMASA,<sup>b</sup> and Tomoaki SATO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Applied Pharmacology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University;

<sup>b</sup>Division of Radiation Biology and Medicine, Faculty of Medicine, Tohoku Medical and Pharmaceutical University;

<sup>c</sup>Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University.

(Received November 20, 2018)

Excessive stressful events in life is severe problem in modern society, since it is followed by onset of various mental diseases, such as depression, panic disorder or anxiety disorders. Although it remains unknown how social stress evoke a variety of symptom of mental diseases, combination of ethological and molecular biological analysis would provide us with cues to establish efficient therapy. We are working on the analysis of the symptoms of mental diseases, by using mouse model with social stress. Here, we introduce our published works and review the candidates of therapeutic targets.

**Key words** — GABA response, Cl<sup>-</sup> homeostasis, KCC2, NKCC1, Social stress, Mental disease

#### 1. 序 論

現代の科学技術の進歩は経済的繁栄をもたらした一方で、過度の競争や核家族化に伴う育児負担増など多様なストレス要因を生み出している。国内のうつ病やパニック障害、不安障害などを発症する患者数は年々増加傾向を示している。<sup>1)</sup> 心理的負担がどのように身体症状や行動変化を引き起こしているのか明らかになれば、将来的な薬理療法の標的分子を発見する上で有効である。

我々はマウスのストレス応答について、行動生物学的手法および分子生物学的手法を用いて解析を進めている。これまで不快な刺激の反復によるストレスや母子分離ストレスにより  $\gamma$ -アミノ酪酸 (Gamma-aminobutyric acid; GABA) 応答性に異常をきたすことを明らかにしてきた。本稿では実験的ストレス負荷がどのように神経障害をきたすのか、我々の成果を交えて概説する。さらに、現在効果が期待される薬理学的治療標的の候補につい

て概説する。

#### 2. ストレス負荷マウスに見られる行動的特性には GABA 応答障害が関与する

GABA は抑制性の神経伝達物質として重要な役割を果たしている。健常な脳において GABA は GABA<sub>A</sub> 受容体-Cl<sup>-</sup>チャネルを開口させ、電気化学勾配に従って Cl<sup>-</sup>の流入を引き起こし、過分極させることによって抑制の作用を発揮する。この作用には細胞内の Cl<sup>-</sup>イオン濃度を細胞外よりも低く維持する必要がある。細胞内の Cl<sup>-</sup>イオン濃度は Cl<sup>-</sup>を排出する K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>co-transporter (KCC) と、逆に Cl<sup>-</sup>イオンを流入させる Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>co-transporter (NKCC) により調節されている。<sup>2)</sup> 細胞内 Cl<sup>-</sup>イオン濃度調節機構が乱れると、GABA<sub>A</sub> 受容体-Cl<sup>-</sup>チャネルの開口により脱分極が引き起こされ、過剰な神経興奮による病的状態を惹起していると考えられている (Fig. 1)。

我々はこの GABA 応答障害が様々な行動特性変化をもたらすとする仮説に基づき、社会的ストレスを模した負荷を経験したマウスを用いた解析結果を報告してきた。塚原らは経口投与針を用いて強制飲水させるという不快な刺激の反復によるストレスが

<sup>a</sup> 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理学分野, <sup>b</sup> 東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学教室,  
<sup>c</sup> 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科矯正学分野  
\*e-mail: y-kuwahara@tohoku-mpu.ac.jp  
y-kuwahara@umin.ac.jp

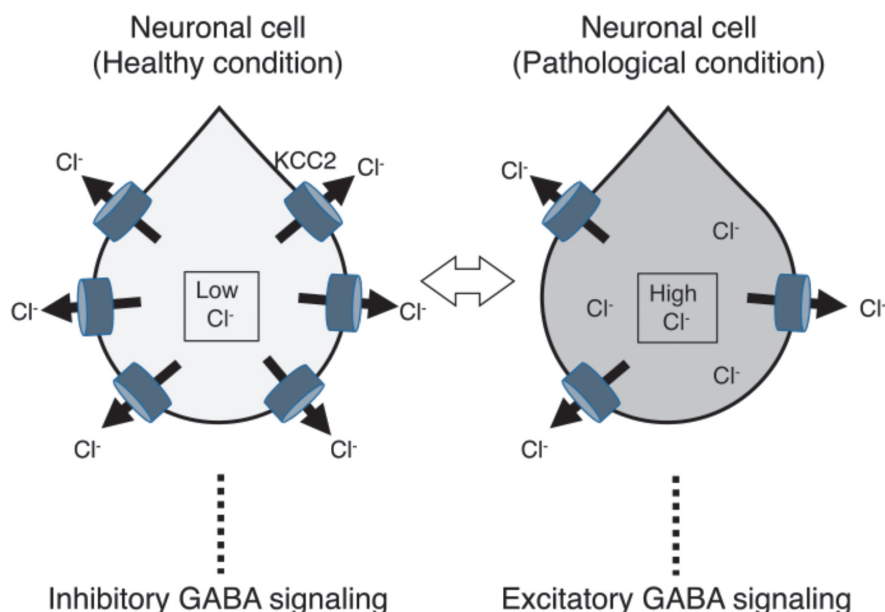


Fig. 1. Postulated pathological model drawing of GABA response. In this model, neuronal cells with healthy condition possess sufficient KCC2 expression and lower intracellular concentration of  $\text{Cl}^-$ , which is followed by inhibitory GABA signaling. In contrast, neuronal cell with pathological condition shows down regulation of KCC2 and higher intracellular concentration of  $\text{Cl}^-$ , which is followed by excitatory GABA signaling.

雌マウスの GABA 応答にもたらす影響に着目して解析した.<sup>3)</sup> 塚原らは不快な刺激を繰り返し経験したマウスを解析した結果, 新奇物体認識能力が低下していること, 社会性行動が減少することを見いだした. また, 成熟した神経細胞内からの  $\text{Cl}^-$  イオン排出を担い, 抑制的な GABA 応答を保つ役割をもつ  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$  co-transporter 2 (KCC2) について解析した結果, 海馬 CA1, CA3, GC 領域において KCC2 の減少が見られることを報告している.

また, 母子分離ストレス負荷が幼若マウスの行動的特性に及ぼす影響について報告している. この病態にも先述の GABA 応答障害が関わっていると示唆されている. 古川らは生後 1 日から 21 日までの間, 毎日 3 時間雌親マウスから隔離飼育したマウスでは, 隔離飼育しなかったマウスと比較して行動的特性の異常 (不安様行動の減少や攻撃性上昇) を示すことを見いだした.<sup>4)</sup>

### 3. GABA 応答障害は多様な神経機能障害に関与する

この GABA 応答障害は様々な神経疾患や精神疾患と関わりが指摘されている. 発達途上の未成熟な神経細胞では成熟した神経細胞と異なり GABA が興奮作用を示すため麻酔薬の副作用が懸念される. GABA 応答障害に関わる細胞内  $\text{Cl}^-$  イオン濃度調節

機構はてんかん発作治療の分子標的としても注目されている.<sup>5,6)</sup> 虚血再灌流のストレスによる認知機能の低下にも関わっている可能性もある.<sup>7)</sup> ダウン症のモデルとして用いられるマウスにおいて KCC2 の減少が報告されている.<sup>8)</sup> GABA 応答機構はダウン症の特徴の一つである知能低下にも関わっていると考えられる.

### 4. GABA 応答性を調節する KCC2 と NKCC1 は GABA 応答障害を改善する分子標的として重要である

KCC は  $\text{Cl}^-$  を排出することで GABA に対する神経細胞の応答を制御する重要な役割を果たす分子である. 中でも KCC2 は恒常的に機能しているが外部の環境ストレス要因により機能低下を起こし, 細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が細胞外と比べて低く維持できなくなる場合があり, このような場合には神経機能を障害して病的状態を惹起するものとして注目されている.

病的な神経細胞における KCC2 の発現動態は様々な因子により調節される. 脳由来神経栄養因子である BDNF がチロシンキナーゼ型受容体 TrkB を経て KCC2 の発現量低下を招いていると報告されている.<sup>9,10)</sup> TrkB の下流に位置する 2 つの経路 (Src homology 2 domain containing transforming

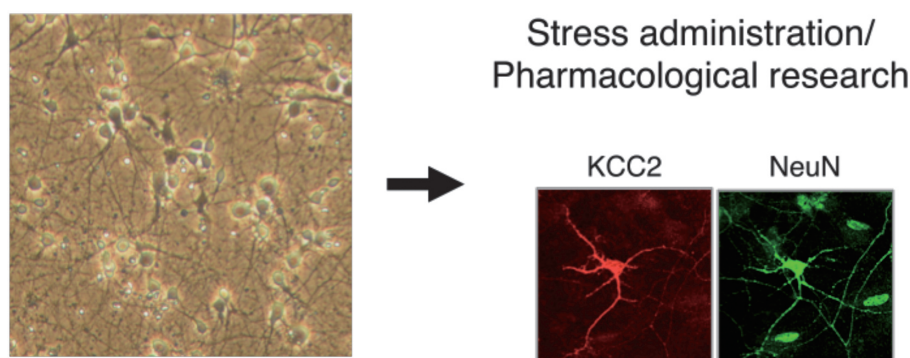


Fig. 2. Cultured neuronal cells of rat embryonic brain. Cultured neuronal cell shows expression of KCC2, which pumps  $\text{Cl}^-$  out of neuronal cells and reduces below the extracellular concentration of  $\text{Cl}^-$  and prevent depolarization.

protein/FGF receptor substrate (Shc/FRS-2) を介する経路と phospholipase  $\text{C}\gamma$ -cAMP response element-binding protein (PLC $\gamma$ -CREB) を介する経路) が協調的に作用することで KCC2 が減少すると考えられている。この BDNF-TrkB 経路は、GABA 応答障害を軽減する治療標的として期待される。近年では虚血処置を施したマウス新生仔に対して、TrkB の選択的アンタゴニストである低分子化合物 ANA12 の投与により、Phenobarbital 治療耐性のてんかん発作に回復傾向が報告されている。<sup>11)</sup>

KCC2 の細胞内動態を制御する翻訳後修飾もまた、KCC2 の機能低下を治療標的とする観点から重要視される。KCC2 は細胞表面と細胞内の間の移行を繰り返している。<sup>12)</sup> このような動的な機構においては、リン酸化を介して細胞表面から細胞内への移行を速やかに制御することができ、細胞内の  $\text{Cl}^-$  イオン濃度を調節する上で有益であると考えられている。例えば、Protein kinase C (PKC) による KCC2 Ser940 残基のリン酸化は表面から内部への移行を抑制する。<sup>13)</sup> これにより細胞表面にとどまる KCC2 が増え、抑制的な GABA 応答を保っている。このような KCC2 Ser940 残基のリン酸化は KCC2 の機能低下に伴う GABA 応答障害を軽減する可能性が期待される。PKC を介して Ser940 残基をリン酸化する経路として、オキシトシン受容体の活性化が報告されている。<sup>14)</sup> 一方で、Thr1007 残基は SPAK (STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase) と OSR1 (a.k.a. OXSR1, oxidative stress-responsive protein 1) によるリン酸化を受け、細胞表面の KCC2 を減少させる。このリン酸化経路の抑制もまた、KCC2 の減少を阻止して病的な GABA 応答を防ぐ標的として

着目されている。<sup>15)</sup>

$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -co-transporter である NKCC1 もまた GABA 応答障害の惹起に関わる。NKCC1 は細胞内に  $\text{Cl}^-$  を取り込むため、NKCC1 が機能亢進すると細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が上昇するため、GABA<sub>A</sub> 受容体- $\text{Cl}^-$  チャネル開放時の  $\text{Cl}^-$  イオン流出により脱分極を起こしやすくなり、過剰な神経興奮をもたらす原因となる。ループ利尿薬として知られるフロセミドやブメタニドは NKCC1 を阻害するため、GABA 応答障害を改善する薬物として着目されている。ブメタニドはラット新生仔を用いた動物実験では低酸素性の脳障害によるてんかん発作に有効であると報告されている一方で、臨床試験では聴覚障害の重篤な副作用がわかり、今後課題が残されている。<sup>16,17)</sup>

上述のように KCC2 や NKCC1 は GABA 応答障害を改善する分子標的として重要である。これらの分子病態の解析のため我々は新たに神経細胞の初代培養実験系を構築している (Fig. 2)。今後ストレス因子を神経細胞に投与することで病態モデルを構築し、有望な治療薬の効果を検証することを考えている。

## 5. 終わりに

これまで述べてきた GABA 応答障害の改善は様々な精神疾患症状の改善に効果を示すものと期待され、多くの疾患に共通するメカニズムを介して制御されていると考えられる。今後も病的モデルの作出とその分子病態の解析に基づくアプローチが新規治療法開発の足がかりとなるものと期待される。

**謝辞** 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神戸悠輝先生には神経細胞の初代培養についてご教示いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

## 利益相反

利益相反はありません。

## REFERENCES

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成 26 年患者調査  
〈[https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syoubu/](https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syoubu/10syoubu/)〉 アクセス 2018 年 11 月 16 日
- 2) Watanabe M., Fukuda A., *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 1–14 (2015).
- 3) Tsukahara T., Masuhara M., Iwai H., Sonomura T., Sato T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **465**, 145–151 (2015).
- 4) Furukawa M., Tsukahara T., Tomita K., Iwai H., Sonomura T., Miyawaki S., Sato T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 1243–1249 (2017).
- 5) Koyama R., Tao K., Sasaki T., Ichikawa J., Miyamoto D., Muramatsu R., Matsuki N., Ikegaya Y., *Nat. Med.*, **18**, 1271–1278 (2012).
- 6) Deidda G., Allegra M., Cerri C., Naskar S., Bony G., Zunino G., Bozzi Y., Caleo M., Cancedda L., *Nat. Neurosci.*, **18**, 87–96 (2015).
- 7) Wake H., Watanabe M., Moorhouse A.J., Kanematsu T., Horibe S., Matsukawa N., Asai K., Ojika K., Hirata M., Nabekura J., *J. Neurosci.*, **27**, 1642–1650 (2007).
- 8) Lysenko L.V., Kim J., Madamba F., Tyrtysnaia A.A., Ruparel A., Kleschevnikov A.M., *Neurobiol. Dis.*, **115**, 1–8 (2018).
- 9) Rivera C., Li H., Thomas-Crusells J., Lahtinen H., Viitanen T., Nanobashvili A., Kokaia Z., Airaksinen M.S., Voipio J., Kaila K., Saarma M., *J. Cell Biol.*, **159**, 747–752 (2002).
- 10) Rivera C., Voipio J., Tomas-Crusells J., Li H., Emri Z., Sipilä S., Payne J.A., Minichiello L., Saarma M., Kaila K., *J. Neurosci.*, **24**, 4683–4691 (2004).
- 11) Carter B.M., Sullivan B.J., Landers J.R., Kadam S.D., *Sci. Rep.*, **8**, 1–18 (2018).
- 12) Kahle K.T., Deeb T.Z., Puskarjov M., Sukateva L., Liang B., Kaila K., Moss S.J., *Trends in Neurosci.*, **36**, 726–737 (2013).
- 13) Lee H.H.C., Walker J.A., Williams J.R., Goodier R.J., Payne J.A., Moss S.J., *J. Biol. Chem.*, **282**, 29777–29784 (2007).
- 14) Leonzino M., Busnelli M., Antonucci F., Verderio C., Mazzanti M., Chini B., *Cell Rep.*, **15**, 96–103 (2016).
- 15) Gagnon K.B., Delpire E., *Physiol. Rev.*, **92**, 1577–1617 (2012).
- 16) Cleary R.T., Sun H., Huynh T., Manning S.M., Li Y., Rotenberg A., Talos D.M., Kahle K.T., Jackson M., Rakhade S.N., Berry G., Jensen F.E., *PLoS One*, **8**, 1–12 (2013).
- 17) Pressler R.M., Boylan G.B., Marlow N., Blennow M., Chiron C., Cross J.H., de Vries L.S., Hallberg B., Hellström-Westas L., Jullien V., Livingstone V., Mangum B., Murphy B., Murray D., Pons G., Rennie J., Swarte R., Toet M.C., Vanhatalo S., Zohar S., *Lancet Neurol.*, **14**, 469–477 (2015).