



Therapeutic effects of KCC2 chloride transporter activation on detrusor overactivity in mice with spinal cord injury

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-04-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡邊, 恭平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004364

博士（医学）渡邊 恭平

論文題目

Therapeutic effects of KCC2 chloride transporter activation on detrusor overactivity in mice with spinal cord injury

（脊髄損傷に伴う排尿筋過活動に対する KCC2 クロライドイオン・トランスポーター活性化の治療的作用）

論文の内容の要旨

[はじめに]

下部尿路機能は、脳、脊髄、および末梢神経系の神経回路の調整に依存しており、いくつかの神経伝達物質が機能の制御において重要な役割を果たしている。Gamma-aminobutyric acid (GABA) は、脊髄を含む中枢神経系の最も主要な抑制性神経伝達物質である。しかし、脊髄損傷などの病的状態では興奮性に変化することがある。この逆説的な GABA のシグナル伝達は、ニューロンの細胞内 Cl^- 濃度に依存している。 K^+ - Cl^- 共輸送体 2 (KCC2) は、GABA_A またはグリシン受容体の活性化を介した Cl^- の流入に反応して Cl^- を細胞外へ排出することで細胞内 Cl^- 濃度を維持する。脊髄損傷 (spinal cord injury: SCI) は、ラットの腰髄における KCC2 の発現を低下させ、脱抑制を引き起こし、痙縮を引き起こす。ただし、SCI によって生じた排尿筋過活動 (detrusor overactivity: DO) における KCC2 発現量の変化およびその役割については分かっていない。本研究は、膀胱を神経支配する腰仙脊髄の仙骨副交感神経核 (SPN) における KCC2 の発現低下が、細胞の過興奮性を引き起こし、神経因性排尿筋過活動に關与するかを検討した。

[材料ならびに方法]

本研究計画は、浜松医科大学動物実験委員会の審査承認を得た (承認番号: H31-046)。SCI は、DO を含む下部尿路機能障害を誘発する主要な障害の 1 つとして挙げられる。実験には 8~9 週齢 C57BL6 雌マウス (N=77) を使用し、sham 手術 (spinal intact: SI) 群または SCI 群をランダムに分け、vehicle (ジメチルスルホキシドおよび 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンで作成) あるいは KCC2 の選択的活性剤である CLP290 を経口投与した 4 群 (SI-vehicle、SI-CLP290、SCI-vehicle、SCI-CLP290) で膀胱内圧測定による比較を行った。その後、3 群 (SI-vehicle、SCI-vehicle、SCI-CLP290) に対して免疫組織化学染色、細胞外記録による神経活動計測を行った。SCI モデルは、イソフルラン麻酔下で Th8-9 脊髄を完全離断したのち 4 週間飼育した。免疫組織化学染色は L6-S1 の脊髄標本を用い c-fos、choline acetyltransferase (ChAT) および KCC2 の 3 重染色で評価した。また、細胞外記録は SPN 領域を含む急性脊髄標本を作製し、ニューロンの発火頻度により神経興奮性を評価した。

[結果]

畜尿時の無排尿収縮の頻度および振幅は、SI-vehicle 群と比較し、SCI-vehicle 群では有意に増加したが、SCI-CLP290 群では有意差を認めなかった。c-fos 陽性細胞数は、SI-vehicle 群と比較し、SCI-vehicle 群では全領域で有意に増加したが、SCI-CLP290 群では、lateral dorsal horn (LDH) または SPN 領域での増加を認めなかった。また、SPN 領域の ChAT、c-fos 陽性細胞の共発現は、SCI-vehicle 群と比較し、SCI-CLP290 群で有意な減少を認めた。KCC2 の免疫染色では、KCC2 が SPN ニューロンの細胞膜に発現している事が確認され、SPN ニューロンにおける KCC2 の normalized fluorescence intensity は、SI-vehicle 群と比較し、SCI-vehicle 群で有意に低下したが、SCI-CLP290 群では SI-vehicle 群と同程度まで回復した。SPN ニューロンにおける発火活動では、SCI マウスにおいて、求心性神経線維への電気刺激により SI マウスでは見られない発火頻度の漸増現象が確認され、CLP290 の投与により抑制された。

[考察]

本研究結果は、C 線維求心性神経によって引き起こされる非排尿収縮の増強に KCC2 のダウンレギュレーションが関与していることを示した。SCI は、排尿期に排尿筋括約筋協調不全と呼ばれる尿道機能障害を誘発し、残尿が増加することが知られている。SCI-CLP290 群の残尿量は、SCI-vehicle 群と比較し、減少傾向にあったが、有意差はみられなかった。この研究では、外尿道括約筋筋電図で評価できる SCI による排尿機能障害は検討しなかった為、この点については今後さらに実験を行う必要がある。さらに、免疫組織化学染色、細胞外記録の結果から、膀胱への遠心路の起始細胞である L6-S1 脊髄 SPN 領域内の副交感神経節前細胞における KCC2 の発現が、SCI 後に減少し、CLP290 の投与によって回復することを示した。KCC2 の発現低下は細胞内の Cl⁻濃度の上昇により Cl⁻平衡電位を脱分極させ、GABA_A/グリシン抑制性受容体活性化による抑制応答の減少または興奮性応答への逆転をもたらすと考えられる。過去の研究では、SCI 後の L6-S1 脊髄で GABA 合成酵素 (glutamic acid decarboxylase: GAD) と血清グリシンのレベルが低下すること、そして GABA 受容体の活性化、GAD 遺伝子導入、およびグリシン投与が、SCI ラットの DO を軽減することが報告されている。本研究では、GABA/グリシン神経伝達物質レベルの低下だけでなく、SPN において生じる KCC2 の発現低下もまた DO において重要な役割を果たしていることを示した。

CLP290 は、KCC2 の膜局在化を増加させることが示されているため、KCC2 活性化剤として有望な薬剤であると考えられている。本研究では、CLP290 の単回投与により、ChAT 陽性の副交感節前ニューロンにおける KCC2 タンパク質の発現が増加した。CLP290 の神経因性排尿筋過活動に対する効果は、この遠心路における KCC2 の活性化によると考えられた。副交感節前ニューロンでの発火

活動増加のメカニズムの解明には今後さらなる研究が必要である。

[結論]

SCI マウスで生じる DO は、SPN ニューロンでの KCC2 の発現低下が関与し、KCC2 の活性化により DO が改善する可能性が示唆された。