

原著論文

## 4- Aminopyridine 誘発けいれんに対する cloperastine の抗けいれん作用－GABA<sub>B</sub> 受容体の関与

木下 陽介, 吉川 弥里, 阿藤 寛明, 渡辺 雅彦, 末丸 克矢\*  
就実大学薬学部公衆衛生学

### Anticonvulsant activity of cloperastine on 4-aminopyridine-induced seizures in mice - involvement of GABA<sub>B</sub> receptors

Yosuke Kinoshita, Misato Yoshikawa, Hiroaki Aso, Masahiko Watanabe, Katsuya Suemaru\*

*Department of Public Health, School of Pharmacy, Shujitsu University*

(Received 30 October 2020; accepted 26 December 2020)

**Abstract** : G protein-activated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels have been proposed as a target for developing new therapeutic drugs for brain diseases. Cloperastine is a central-acting antitussive that has an inhibitory effect on GIRK channels. In this study, we investigated whether cloperastine has anticonvulsant activities using an acute seizure test induced by continuous infusion of 4-aminopyridine, a potassium channel blocker, in mice. Cloperastine (10-40 mg/kg, i.p.) dose-dependently increased the seizure thresholds of tonic forelimb extension. GABA<sub>B</sub> receptors are G-protein-coupled receptors that mediate inhibition throughout the central nervous systems. The 4-aminopyridine-induced seizure was reduced by baclofen (3-15 mg/kg, i.p.), a GABA<sub>B</sub> agonist, in a dose-dependent manner. These anticonvulsant activities of cloperastine and baclofen were blocked by intracerebroventricular administration of CGP 35348, a GABA<sub>B</sub> receptor antagonist. These results indicate that cloperastine produces anticonvulsant activities through GABA<sub>B</sub> receptors.

**Keywords**: Cloperastine, Anticonvulsant activity, GABA<sub>B</sub> receptor, GIRK channel

#### 緒言

てんかんの薬物治療は、てんかん症候群または発作型に対して適切とされている薬剤を用いて行われ、患者の約 70%は発作抑制に至るとされている。しかし、残りの約 30%は単剤あるいは2～3 種類以上の多剤併用の十分量の治療でも発作が抑制されない薬剤抵抗性てんかんの患者である。従って、新しい作用機序を有する抗てんかん薬の開発が期待されている。

抗てんかん薬の ethosuximide は、T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの抑制を介して薬理作用を発現することが知られている。さらに、ethosuximide の新たな作用機序として G 蛋白質活性化型内向き整流性カリウム (G protein-activated inwardly rectifying potassium; GIRK) チャネルの抑制が報告された<sup>1)</sup>。GIRK チャネルは中枢神経系において GABA<sub>B</sub> 受容体と機能的に共役し、抑制性シナプスにおいて観察される遅延性の抑制性シナプス後電流 (slow inhibitory postsynaptic current, sIPSC) の制御

を担っている。中枢性疾患動物モデルを用いた基礎的研究において、GIRK チャンネルは抗うつ薬や依存症治療の創薬標的としての可能性が報告されている<sup>2-4)</sup>。一方、非麻薬性中枢性鎮咳薬は、中枢ニューロンにおいて GIRK チャンネル活性化電流を抑制することが示唆されている<sup>5)</sup>。近年ではヒト胎児腎細胞 (HEK) 細胞において、中枢性鎮咳薬の cloperastine が GIRK チャンネル活性化電流を抑制することが確認された<sup>6)</sup>。しかし、cloperastine の抗てんかん薬としての有用性については明らかになっていない。

新規抗てんかん薬の開発には、評価モデルを用いた評価が重要である。4-Aminopyridine (4-AP) は電位依存性の K<sup>+</sup>チャンネルを阻害するけいれん誘発剤で、海馬スライス標本を用いた *in vitro* や *in vivo* の抗けいれん薬の評価方法として繁用されている。4-AP を用いた *in vivo* 法としては、4-AP を皮下投与してけいれんの発現を検討する方法が汎用されているが、近年 4-AP を尾静脈に持続注入して動物個々にけいれん閾値を算出する方法が報告された<sup>7)</sup>。既に、代表的なけいれん誘発剤の pentylenetetrazole けいれんモデルにおいて、静脈内持続投与方法によるけいれん閾値の評価方法は皮下投与法に比べて精度が高いことが明らかにされている<sup>8)</sup>。

本研究では、4-AP 尾静脈注入誘発けいれんに対する cloperastine の抗けいれん作用について調べた。また、GIRK チャンネルは GABA<sub>B</sub> 受容体と機能的に共役し関連していることから、その機序を明らかにする目的で、GABA<sub>B</sub> 受容体刺激薬である baclofen による抗けいれん作用との比較のもと、GABA<sub>B</sub> 受容体阻害薬である CGP35348 による拮抗作用を検討した。

## 方法

**実験動物:** 実験には、ICR 系雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を用いた。動物は、室温 23±2°C の動物飼育室にて、紙製敷料を敷いたプラスチックケージ内で 5~6 匹ずつ飼育した。餌

および水は自由に摂取させた。本実験は、就実大学動物実験委員会 (承認番号 23-003) の承認を得て行った。

**実験試薬:** 4-AP, cloperastine, ethosuximide および baclofen は東京化学工業株式会社から購入した。CGP35348 は Cayman Chemical Company から購入した。全ての薬品は生理食塩水に溶解した。Cloperastine, baclofen および ethosuximide は、4-AP の静脈内 (i.v.) 投与の 30 分前に腹腔内 (i.p.) に投与した。CGP35348 は、Malcangio<sup>9)</sup> の報告に準じて cloperastine および baclofen 投与の 5 分前に脳室内 (i.c.v.) に投与した。4-AP (2 mg/mL) は、マイクロシリンジポンプを用いて流速 0.5 mL/min で尾静脈内に持続注入した。

**けいれん閾値実験:** 4-AP の持続注入により、まず前肢のクローヌス (forelimb clonus) が現れ、その後に強直性屈曲けいれん (tonic flexor, TF) が起こり、続いて強直性伸展けいれん (tonic extensor, TE) が現れる。本実験では、TF が発現するまでの潜時を指標として、けいれんの閾値を算出した。けいれん閾値は、以下の式を用いて計算した。

$$\text{Seizure threshold (mg/kg)} = \frac{\text{IR} \times \text{T} \times \text{C} \times 1000}{(60 \times \text{BW})}$$

IR: infusion rate (mL/min)  
T: time for onset of seizure (s)  
C: concentration of 4-AP (mg/mL)  
BW: body weight of animal (g)

**統計学的検討:** 値は、平均値 ± SE (標準誤差) で示した。けいれん閾値のデータは一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った後、多重比較検定には Dunnett's test を用いて統計解析を行った。2 群間の比較には、Student's *t*-test を用い解析した。有意水準 (p 値) は、p < 0.05 とした。

## 結果

図 1 に 4-AP の尾静脈内持続注入によって誘発される TF けいれんに対する ethosuximide の作用について示した。抗てんかん薬の ethosuximide (300 mg/kg, i.p.) は、4-AP 誘発けいれんの閾値を

有意 ( $p < 0.01$ ) に上昇させた。

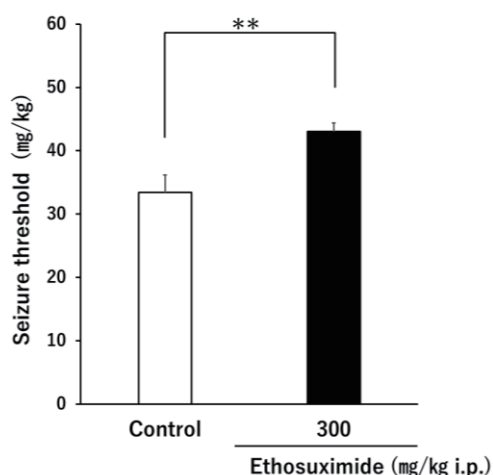


図1. 4-AP 誘発けいれんに対する ethosuximide の影響

Mean  $\pm$  SE (control:  $n=9$ , ethosuximide:  $n=6$ )  
\*\* $p < 0.01$  vs control (Student's  $t$ -test).

Cloperastine (10-40 mg/kg, i.p.) の投与は4-AP誘発けいれんの閾値を用量依存的に上昇し、cloperastine の抗けいれん作用が認められた (図2)。

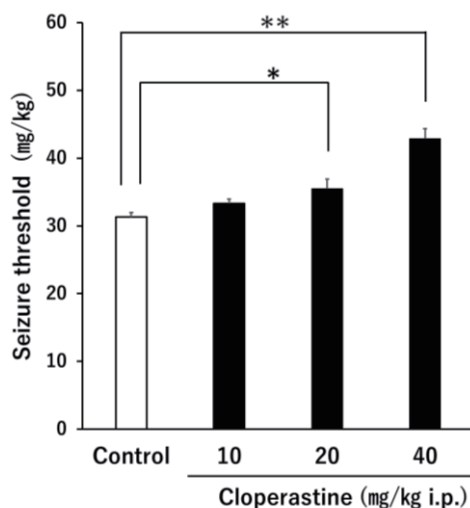


図2. 4-AP 誘発けいれんに対する cloperastine の影響

Mean  $\pm$  SE (control:  $n=16$ , 10 mg/kg:  $n=8$ , 20 mg/kg:  $n=8$ , 40 mg/kg:  $n=10$ ) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control (ANOVA followed by Dunnett's test).

GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬の baclofen (3-15 mg/kg,

i.p.) の投与により、4-AP のけいれん閾値は用量依存的に増加した (図3)。

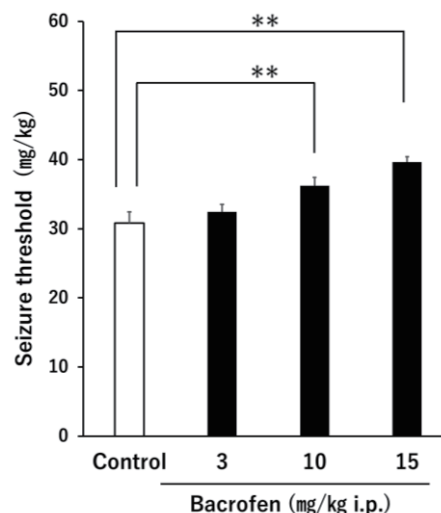


図3. 4-AP 誘発けいれんに対する baclofen の影響

Mean  $\pm$  SE (control:  $n=8$ , 3 mg/kg:  $n=8$ , 10 mg/kg:  $n=8$ , 15 mg/kg:  $n=10$ ) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control (ANOVA followed by Dunnett's test).

GABA<sub>B</sub> 受容体遮断薬の CGP35348 (2.5 および 5  $\mu$ g/mice, i.c.v.) の投与は、4-AP 誘発けいれんの閾値に有意な影響を示さなかった (図4)。従って、cloperastine および baclofen の抗けいれん作用に対する GABA<sub>B</sub> 受容体遮断薬による拮抗実験には、CGP35348 (5  $\mu$ g/mice)を脳室内に投与した。

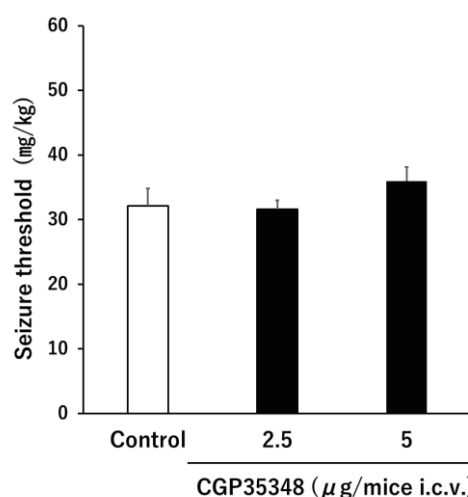


図4. 4-AP 誘発けいれんに対する CGP35348 の影響

Mean  $\pm$  SE (control:  $n=5$ , 2.5  $\mu$ g/mice:  $n=4$ , 5  $\mu$ g/mice:  $n=5$ ).

図5に CGP35348 (5  $\mu$ g/mice) の脳室内投与が baclofen (15 mg/kg, i.p.) の抗けいれんに対する影響を示した。Baclofen の 4-AP 誘発けいれんに対するけいれん閾値の上昇は、CGP35348 によって有意 ( $p < 0.05$ ) に抑制された。

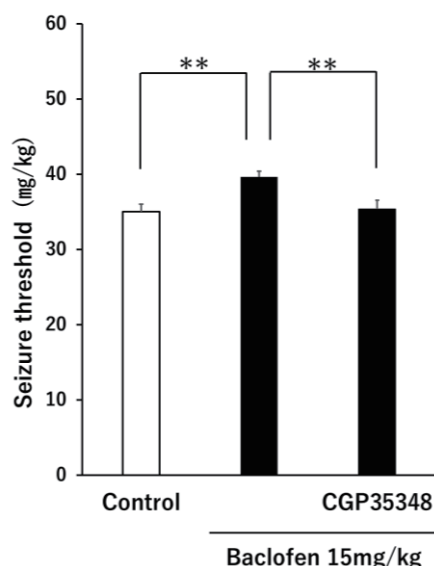


図5. 4-AP 誘発けいれんに対する baclofen の抗けいれん作用に及ぼす CGP35348 の影響

CGP35348 (5  $\mu$ g/mice, i.c.v.) は baclofen (15 mg/kg, i.p.) 投与の 5 分前に投与した。Mean  $\pm$  SE (control: n=10, baclofen: n=10, CGP35348 + baclofen: n=10) \*\* $p < 0.01$  vs baclofen (15 mg/kg, i.p.) (ANOVA followed by Dunnett's test).

Cloperastine (40 mg/kg, i.p.) の 4-AP 誘発けいれんに対するけいれん閾値の上昇は、GABA<sub>B</sub> 受容体遮断薬の CGP35348 (5  $\mu$ g/mice, i.c.v.) の前処置によって有意 ( $p < 0.01$ ) に抑制された (図6)。従って、4-AP 誘発けいれんに対する cloperastine の抗けいれん作用には、GABA<sub>B</sub> 受容体が関与することが示唆された。

## 考察

現在、臨床で汎用されている抗てんかん薬の効果は、作用点との関連で、①Na<sup>+</sup>および Ca<sup>2+</sup>などの電位依存性イオン、②グルタミン酸受容体や GABA<sub>A</sub> 受容体などのリガンド依存性イオンチャネル、③GABA 代謝阻害、④シナプス小胞蛋白 2A、

の4つに大別される。4-AP をマウスに皮下投与したモデルにおいては、T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害作用を有する valproic acid が強い抑制作用を示し、Na<sup>+</sup>チャネル阻害作用を有する carbamazepine や zonisamide など抗けいれん作用を発揮する<sup>10,11</sup>。電位依存性の K<sup>+</sup>チャネルを阻害する 4-AP がけいれんを誘発する機序の詳細は明らかになっていないが、Na<sup>+</sup>や Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性化が関与していることが報告されている<sup>10,12</sup>。本研究では 4-AP 静脈内持続投与方法において、T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害作用を有する ethosuximide が抗けいれん作用を示すことを確認した。

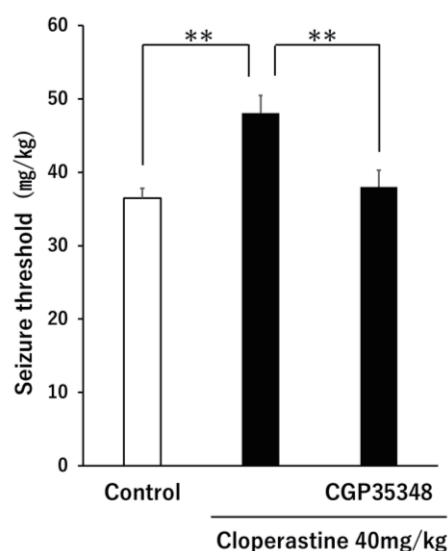


図6. 4-AP 誘発けいれんに対する cloperastine の抗けいれん作用に及ぼす CGP35348 の影響

CGP35348 (5  $\mu$ g/mice, i.c.v.) は cloperastine (40 mg/kg, i.p.) 投与の 5 分前に投与した。Mean  $\pm$  SE (control: n=11, cloperastine: n=11, CGP35348 + cloperastine: n=10) \*\* $p < 0.01$  vs cloperastine (40 mg/kg, i.p.) (ANOVA followed by Dunnett's test).

中枢性疾患動物モデルを用いた基礎的研究において、GIRK チャネル抑制作用を有する cloperastine の改善作用が示されている。Soeda らは、出生前に diethylstilbestrol を曝露したマウスの受動的回避反応障害を cloperastine (10-30 mg/kg, i.p.) が改善したことを報告している<sup>13</sup>。また、Johnson らは、cloperastine (30 mg/kg, i.p.) が

レット症候群マウスモデルの呼吸異常を改善したことを報告している<sup>6)</sup>。本研究では、これらの先行研究の投与量を参考にして 4-AP 誘発けいれんに対する cloperastine の影響を検討した結果、cloperastine の 10-40 mg/kg (i.p.) の投与によりけいれん閾値の用量依存的な上昇が認められ、cloperastine の抗けいれん作用が示唆された。

GABA は中枢神経系の抑制性シナプス伝達を担うアミノ酸で、イオンチャンネル型の GABA<sub>A</sub> 受容体ならびに G タンパク質共役型受容体である GABA<sub>B</sub> 受容体に作用することで神経細胞の活動を低下させる。GIRK チャンネルは中枢神経系において GABA<sub>B</sub> 受容体と機能的に共役し、抑制性シナプスを制御している。しかし、4-AP 誘発けいれんにおける GABA<sub>B</sub> 受容体の関与は不明である。そこで、本研究では GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬の baclofen の影響を検討した結果、baclofen の 3-15 mg/kg (i.p.) の投与により 4-AP のけいれん閾値は用量依存的に増加した。さらに、GABA<sub>B</sub> 受容体の遮断薬の CGP35348<sup>9)</sup> が baclofen の抗けいれん作用に及ぼす影響を検討した結果、CGP35348 は baclofen の抗けいれん作用を抑制した。従って、4-AP 誘発けいれんに GABA<sub>B</sub> 受容体が関与することが明らかになった。この拮抗実験の評価系を用いて、cloperastine の GABA<sub>B</sub> 受容体への関与を検討した。その結果、4-AP 誘発けいれんに対する cloperastine の抗けいれん作用は CGP35348 の前処置により拮抗された。従って cloperastine の抗けいれん作用に GABA<sub>B</sub> 受容体が関与することが示唆された。

Cloperastine はシナプス前膜の GIRK チャンネルを阻害することで、GABA の放出を促進し、GABA 受容体刺激による抑制作用を示すことが報告されている<sup>6)</sup>。GABA<sub>B</sub> 受容体はシナプス前膜と後膜で機能が異なっている。シナプス前膜の GABA<sub>B</sub> 受容体は、その刺激作用により GIRK チャンネルや T 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを介して GABA 放出を抑制するオートレセプターとして機能している。また、シナプス前膜のこれらの受容体

やチャンネルは抑制されることで GABA の放出を促すことが知られている<sup>6)</sup>。シナプス後膜の GABA<sub>B</sub> 受容体は、その刺激作用により GIRK チャンネルを開口し、抑制性シナプス後電流を引き起こすとされている。加えて、シナプス後膜のこれらの受容体やチャンネルは抑制されることで、けいれんを誘発するとされている。しかし、cloperastine による GABA<sub>B</sub> 受容体の刺激作用は確認されていない。従って、cloperastine による作用が GABA<sub>B</sub> 受容体の直接刺激による作用か、シナプス前膜から放出した GABA による作用なのかは不明である。また、互いに拮抗するシナプス前膜と後膜の GABA<sub>B</sub> 受容体遮断のバランスの結果として、最終的にシナプス前膜での遮断作用がより強く現れて、抗けいれん作用を示す可能性も考えられる。今後は、さらに GABA<sub>A</sub> 受容体の関与についても明らかにする必要がある。

これまでに、電気生理学的、薬理学的ならびに遺伝学的な手法を用いて、てんかん症状を有する様々な動物モデルが開発されてきた。急性の薬理学的刺激薬によって惹起されるけいれんモデルには、4-AP によるけいれんモデルに加えて、GABA 神経抑制薬の pentylenetetrazole、ムスカリン性コリン受容体作動薬の pilocarpine およびグルタミン酸受容体作動薬の kainic acid によるけいれんモデル等が抗てんかん薬のスクリーニングに活用されている。今後は、他の抗てんかん薬の評価モデルを用いた検討を行い、cloperastine の抗けいれん作用の特性を明らかにすることが必要と考えられる。

以上、本研究により 4-AP 静脈内持続投与方法を用いたけいれんモデルにおいて cloperastine は抗けいれん作用を示すことが明らかになった。さらに、その作用機序には GABA<sub>B</sub> 受容体の関与が示唆された。これらの知見は、GIRK チャンネル活性化抑制作用を有する薬剤が、新たな抗てんかん薬開発のターゲットとして期待できることを示唆している。



## 利益相反

本研究は学内の研究費のみで実施しており、開示すべき利益相反はない。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験手技のサポート頂きました実験動物管理者の小倉邦彰氏に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Kobayashi T., Hirai H., Iino M., Fuse I., Mitsumura K., Washiyama K., Kasai S., Kazutaka I.: Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels., *Neuropharmacology*, 56, 499-506 (2009).
- 2) Takahara A., Fujiwara K., Ohtsuki A., Oka T., Namekata I., Tanaka H.: Effects of the Antitussive Drug Cloperastine on Ventricular Repolarization in Halothane-Anesthetized Guinea Pigs., *J. Pharmacol. Sci.*, 120, 165-175 (2012).
- 3) Mayfield J., Blednov YA., Harris RA.: Behavioral and Genetic Evidence for GIRK Channels in the CNS: Role in Physiology, Pathophysiology, and Drug Addiction., *Int. Rev. Neurobiol.*, 123, 279-313 (2015).
- 4) Kawaura K., Ogata Y., Honda S., Soeda F., Shirasaki T., Takahama K.: Tipepidine, a non-narcotic antitussive, exerts an antidepressant-like effect in the forced swimming test in adrenocorticotrophic hormone-treated rats., *Behav. Brain Res.*, 302, 269-278 (2016).
- 5) Takahama K.: Multiple pharmacological actions of centrally acting antitussives--Do they target G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels?, *J. Pharmacol. Sci.*, 120, 146-151 (2012).
- 6) Johnson CM., Cui N., Xing H., Wu Y., Jiang C.: The antitussive cloperastine improves breathing abnormalities in a Rett Syndrome mouse model by blocking presynaptic GIRK channels and enhancing GABA release., *Neuropharmacology*, 176, 108214 (2020).
- 7) Wang YJ., Hsieh CP., Chan MH., Chan TY., Chen L., Chen HH.: Distinct effects of resveratrol on seizures and hyperexcitability induced by NMDA and 4-aminopyridine., *Nutr. Neurosci.*, 22, 867-876 (2019).
- 8) Mandhane SN., Aavula K., Rajamannar T.: Timed pentylene-tetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice., *Seizure*, 16, 636-644 (2007).
- 9) Malcangio M., Ghelardini C., Giotti A., Malmberg-Aiello P., Bartolini A.: CGP 35348, a new GABA<sub>B</sub> antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen., *Br. J. Pharmacol.*, 103, 1303-1308 (1991).
- 10) Yamaguchi S., Rogawski MA.: Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice., *Epilepsy Res.*, 11, 9-16 (1992).
- 11) Klitgaard HV., Matagne A., Gobert J., Wülfert E.: Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy., *Eur. J. Pharmacol.*, 353, 191-206 (1998).
- 12) Cramer CL., Stagnitto ML., Knowles MA., Palmer GC.: Kainic acid and 4-aminopyridine seizure models in mice: evaluation of efficacy of anti-epileptic agents and calcium antagonists., *Life Sci.*, 54, 271-275 (1994).
- 13) Soeda F., Hirakawa E., Inoue M., Shirasaki T., Takahama K.: Cloperastine rescues impairment of passive avoidance response in mice prenatally exposed to diethylstilbestrol., *Environ. Toxicol.*, 29, 216-225 (2014).