

令和元年6月14日現在

機関番号：37119

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10096

研究課題名(和文) 胎児期に完成する呼吸リズムにおけるGABAシナプスと細胞内Cl⁻濃度の発達変化研究課題名(英文) Developmental changing in GABAergic synapse formation and intracellular Cl⁻ concentration related with respiratory rhythm during prenatal mouse medulla.

研究代表者

岡部 明仁 (Okabe, Akihito)

西南女学院大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10313941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：GABAとCl⁻共輸送体が舌下神経核で発生する呼吸様リズム(RRA)がどのように形成されるのか検討した。免疫組織化学的手法により、野生型マウスにおけるKCC2とVGATの発現変化を検討したところ、E16で既に発現しており、発達に伴い発現量が増加した。またグラミシジン穿孔パッチクランプ法により舌下神経核運動神経細胞の細胞内Cl⁻濃度([Cl⁻]_i)を測定した。胎生期群(E16-E18)と生直後群(P0-P2)で比較したところ、胎生期群が[Cl⁻]_iが高い傾向を示した。このことから、胎生期間にKCC2の発現が増加することにより、[Cl⁻]_iが低下しRRAが出生までに整えられることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られる結果は、GABA入力と舌下神経核運動神経細胞との間に生じる、正常呼吸リズム獲得過程のメカニズムを明らかにすることである。このことは、乳幼児突然死候群や、出産時における呼吸不全のリスクを予測し、治療法開発の一助となる。

また、本研究に代表される生体のリズム形成過程の解明は、脊髄におけるロコモーションなどの運動リズムの発生機序に適用でき、脊髄損傷などの治療に応用できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Role of GABAergic transmission in regulation of medullary respiration-related rhythmic activity (RRA) perinatally is yet to be determined. We previously reported that mean numbers of RRA recorded from mouse hypoglossal nucleus (12N) were significantly increased from embryonic day (E) 16 to postnatal day (P) 0. Here, we examined how GABA and chloride co-transporters contribute to RRA during development in 12N. We performed immunohistochemistry for KCC2 and VGAT in 12N of wild type mouse. Both of them were already expressed on E16 and gradually increased by P0. We also recorded intracellular Cl⁻ concentration ([Cl⁻]_i) in motoneurons of mouse hypoglossal nucleus using gramicidin perforate patch clamp method. The mean value [Cl⁻]_i of prenatal 12N motoneurons was higher than that of postnatal 12N motoneurons. These results suggest that decreasing [Cl⁻]_i levels caused by increasing KCC2 levels in 12N could play important roles in regulating the frequency of RRA during development.

研究分野：呼吸生理学

キーワード：GABA VGAT KCC2 舌下神経核 呼吸リズム 胎生期

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GAD (GABA を合成するグルタミン酸脱炭酸酵素) 欠損マウス及び VGAT 欠損マウス (VGAT^{-/-}) は呼吸不全により生直後に死亡することから、呼吸リズム獲得には、抑制性神経伝達物質である GABA が重要な役割を果たしていると考えられる。GABA は抑制性のみならず、発達期や神経損傷時には興奮性に働き、その原因が KCC2 の低発現量に依存した高 $[Cl^-]_i$ 値にあることを申請者は明らかにした。加えて、KCC2 欠損マウス (KCC2^{-/-}) も呼吸不全により生直後に死亡することが報告されている。そこで、正常な呼吸リズムを獲得するためには、①GABA シナプスが形成されること、②KCC2 の発現増加により低 $[Cl^-]_i$ 値となり、GABA が抑制性として働くことが重要であると考えられる。

本申請者は、舌下神経核から細胞外記録で得られる呼吸リズムを野生型 (WT)、VGAT^{-/-}、KCC2^{-/-} で比較したところ、現在までに以下の 3 点を明らかにした。

- (1) WT において、呼吸リズムは出生直前までに完成し、生後は変化しない。
- (2) 胎生 18 日齢 (E18) の VGAT^{-/-} 及び KCC2^{-/-} の呼吸リズムのパターンは全く異なる。これは①GABA シナプスの入力呼吸の発生に、②低 $[Cl^-]_i$ 値が規則正しいリズムの獲得に必要なこと、を示している。
- (3) 胎生 16 日齢 (E16) の舌下神経核において、VGAT 及び KCC2 は既に発現が認められ、次第に増加し生後 1 週以内で成熟動物と同等の発現を示した。

そこで、本研究では、胎児期の呼吸リズム発生に必須である GABA シナプスの形成過程と正しいリズム形成に重要な $[Cl^-]_i$ の減少過程における時間的、空間的变化を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

胎児期に完成する規則正しい呼吸リズムに必須である GABA 入力と $[Cl^-]_i$ の変化について時間的、空間的関連を解明することを目的とした。

(1) 呼吸発生に必須である舌下神経核への GABA 入力の形成過程の形態学的検討

舌下神経核内には GABA を放出するインターニューロンが存在せず、外部の複数の神経核から GABA 入力を受けることが報告されている。そこで、胎児期の舌下神経核への GABA 入力がいづ完成するのかを、GFP 陽性細胞が GABA を放出する細胞である GAD67-GFP ノックインマウス (GAD67-GFP KI) を用いて形態学的に明らかにする。

(2) 規則正しいリズムの形成に重要な $[Cl^-]_i$ の減少過程の決定

WT の発達期舌下神経核内の運動神経細胞において、胎児期から生直後まで $[Cl^-]_i$ が、いつ、どの程度減少するのかを、グラミシジン穿孔パッチクランプ法により明らかにする。

(3) 胎児期発達過程の舌下神経核における VGAT、GAD 及び KCC2 の免疫組織学的発現変化の検討

野生型マウスを用いて、胎児期の舌下神経核において、VGAT、GAD および KCC2 がどのように発現変化しているのかを明らかにし、上述の $[Cl^-]_i$ の研究成果と比較することを目的とした。

具体的には、舌下神経核に入力する GABA を放出する神経細胞の発達変化を、GAD 及び VGAT の抗体を用いて免疫染色法により同定する。これは、GAD67-GFP KI を用いた形態学的同定の代替として計画した。

3. 研究の方法

GAD67-GFP ノックインマウス (GAD67-GFP KI) をはじめ、遺伝子改変動物が十分に得られなかったため、主に E16 から生後 0 日齢までの WT を用いた研究内容に変更した。

- (1) 胎児期の舌下神経核内の運動神経細胞における $[Cl^-]_i$ の減少過程を経時的に明らかにし、出生直後から正常呼吸をするために必要な $[Cl^-]_i$ を同定する。
- (2) 舌下神経核に入力する GABA を放出する神経細胞の発達変化を、GAD 及び VGAT の抗体を用いて免疫染色法により同定する。具体的には、4%パラホルムアルデヒドにより固定した WT の延髄を摘出し、クリオスタットにて 20 μ m 厚の凍結切片を作製する。これに、GAD 及び VGAT に対する抗体を用いて免疫染色を行う。抗体は琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座で作成した抗体を使用する。

4. 研究成果

- (1) GABA 入力がいづ完成するのかを知る目的で、胎生 16 日齢 (E16) から生後 0 日齢 (P0) までの GAD67-GFP ノックインマウスを用いて、舌下神経核における GABA 作動性神経細胞の組織学的検討を試みた。その結果、P0 における舌下神経核には GABA 作動性神経細胞は認められなかった。加えて C57BL/6J の正常動物を用いて E16 から生後 7 日齢 (P7) の舌下神経核における VGAT の発現変化を免疫組織化学法により検

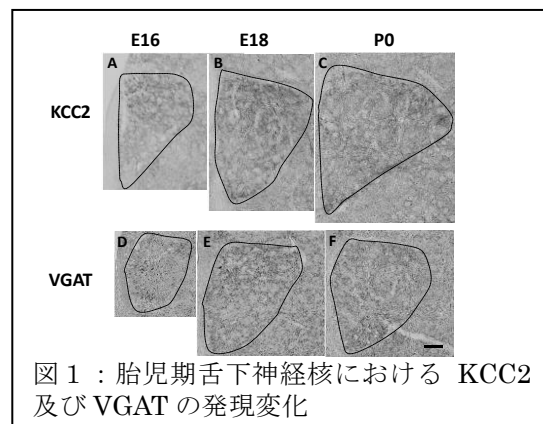


図 1 : 胎児期舌下神経核における KCC2 及び VGAT の発現変化

討した。その結果、E16 では既に VGAT の発現が認められ、P0 まで次第に増加する傾向を認めた (図 1)。詳細な検討の結果、KCC2 の発現は胎生 16 日齢 (E16) では舌下神経核内では腹側部と比較すると背側部に発現が多く、発達に伴い発現量を増しながら腹側部へと広がっていき、生後 7 日齢 (P7) において成熟動物と同レベルの発現量に達していることが分かった。VGAT については、E16 から P7 までの舌下神経核において、詳細な検討を行ったところ、生後 0 日齢 (P0) までに発達に伴い発現量の増加傾向が認められ、P7 には成熟動物と同じような発現パターンを示していた。

- (2). C57BL/6J の正常動物を用いて、胎児期から生直後にかけどのように $[Cl^-]_i$ が低下していくのかを知る目的で、 $[Cl^-]_i$ を損なわないグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いた電気生理学的手法により検討した。胎生 16 - 18 日齢の群と生直後 - 生後 2 日齢の群を比較すると出生前後で $[Cl^-]_i$ が減少する傾向が得られた (図 2)。
- (3). 発達過程における C57BL/6J 正常マウスを用いた、胎齢 16 日齢 (E16) から生後 7 日齢 (P7) の舌下神経核に入力してくる GAD 陽性細胞の発現を免疫組織化学法により検出を試みた。GAD67-GFP ノックインマウスを用いた予備実験同様、正常マウスの舌下神経核内において、いずれの日齢においても GAD 陽性細胞は検出できなかったが、他の延髄の領域においてその発現を確認できた。

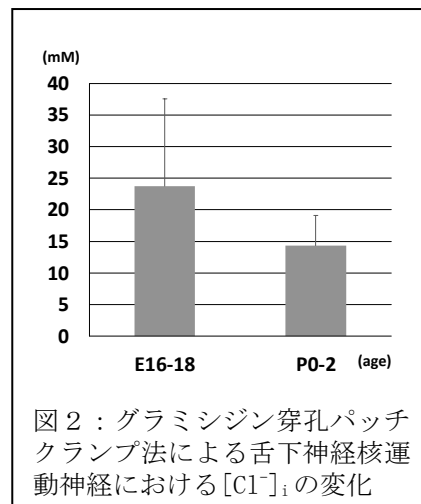


図 2 : グラミシジン穿孔パッチクランプ法による舌下神経核運動神経における $[Cl^-]_i$ の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Sunagawa M, Shimizu-Okabe C, Kim J, Kobayashi S, Kosaka Y, Yanagawa Y, Matsushita M, Okabe A, Takayama C.
Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord.
Neuroscience. 2017 Feb 20;343:459-471
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.12.032. Epub 2016 Dec 28.
- ② Jeongtae Kim, Shiori Kobayashi, Chigusa Shimizu-Okabe, Akihito Okabe, Changjong Moon, Taekyun Shin, Chitoshi Takayama
Changes in the expression and localization of signaling molecules in mouse facial motor neurons during regeneration of facial nerves.
Journal of Chemical Neuroanatomy 88 (2018) 13-21.
doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.11.00

[学会発表] (計 8 件)

- ① 屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、金 正泰、清水千草、岡部明仁、高山千利
マウス坐骨神経損傷モデルにおける GABA 伝達関連分子の発現変化
日本解剖学会 第 72 回 九州支部学術集会 2016 年 10 月 29 日 ボードインホール/良順会館 (長崎県長崎市)
- ② 屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、金 正泰、清水千草、高山千利
マウス坐骨神経損傷モデルにおける GABA シグナル関連分子の発現変化
第 18 回沖縄県理学療法学術大会 2017 年 2 月 19 日 沖縄県総合福祉センター (沖縄県沖縄市)
- ③ Akihito Okabe, Chigusa Shimizu, Jongtae Kim, Shiori Kobayashi, Chitoshi Takayama
周産期舌下神経核運動ニューロンにおける胞内 Cl^- 濃度変化の検討
Developmental changes in the intracellular Cl^- concentration in the perinatal hypoglossal motoneurons related with respiration-related activities.
第 94 回日本生理学会大会
2017 年 3 月 28 日 - 2017 年 3 月 30 日 浜松アクトシティコンgresセンター (静岡県浜松市)
- ④ 清水千草、小林しおり、金正泰、小塚智沙代、宮崎悠、新垣正悟、岡部明仁、益崎裕章、高山千利
wx/ae 玄米は肝脂質代謝遺伝子群の発現を変化させ、脂質異常症を改善する
wx/ae brown rice changed the expression of hepatic gene related to lipid metabolism to improve dyslipidemia. 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28 日 - 2017 年 3 月 30 日 浜松アクトシティコンgresセンター (静岡県浜松市)

- ⑤ Yoshinori Kosaka, Tsukasa Yafuso, Jeongtae Kim, Chigusa Shimizu, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
Relationship between neuropathic pain and changes in GABAergic signaling in the model of tibial nerve injury
(マウス脛骨神経損傷モデルを用いた神経障害性疼痛と GABA 伝達機構の変化)
第 40 回日本神経科学大会、千葉 (幕張メッセ)、2017 年 7 月 20 日～23 日
- ⑥ Chigusa Shimizu, Shiori Kobayashi, Hidetoshi Saze, Chisayo Kozuka, Yu Miyazaki, Shogo Arakaki, Yuta Ogura, Hiroaki Masuzaki, Jeongtae Kim, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
難消化米による脂質排泄の促進と腸内環境の改善
第 95 回日本生理学会大会、2018 年 3 月 28 日～30 日香川(サンポートホール高松)、
- ⑦ Akihito Okabe, Chigusa Shimizu, Jeongtae Kim, Siori Kobayashi, Chitoshi Takayama
Modulation of respiration-related activities activated by GABA and Cl⁻ co-transporters in the perinatal mouse hypoglossal nucleus.
第 11 回 FENS Forum of Neuroscience、ベルリン (ドイツ)、2018 年 7 月 7 日～11 日
- ⑧ Chigusa Shimizu, Masanobu Sunagawa, Jongtae Kim, Shiori Kobayashi, Yoshinori Kosaka, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
Distinct development of the glycinergic terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord.
第 11 回 FENS Forum of Neuroscience、ベルリン (ドイツ)、2018 年 7 月 7 日～11 日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：清水千草

ローマ字氏名：Shimizu Chigusa

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学 (系) 研究科 (研究院)

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70435072

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高山千利

ローマ字氏名：Takayama Chitoshi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。