

機関番号：18001

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500310

研究課題名 (和文) 神経系の発生、発達、再生過程における GABA シグナルの変化

研究課題名 (英文) Changes in GABA signaling during development and regeneration

研究代表者

高山 千利 (TAKAYAMA CHITOSHI)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60197217

研究成果の概要 (和文)：GABA 伝達に関与する様々な分子の発現・局在を解析し、GABA の神経系の発生・再生・可塑性への関与を解析した。その結果、次の3つのことが明らかになった。多くの領域では、GABA の興奮作用を介した形態形成への関与があるが、最も原始的な領域である脊髄の前角ではほとんど無い。末梢運動神経線維の損傷においては、再生過程で GABA が興奮性に作用し、再伸長を促す。三叉神経系の領域 (脳幹、大脳皮質) では GABA シナプスの形成と抑制作用の開始が臨界期の終了と関連していた。

研究成果の概要 (英文)：To reveal the GABAergic roles in development, regeneration and maintenance of plasticity in the nervous system, we examined the changes in expression and localization of various molecules involved in GABAergic transmission. Excitatory action of GABA might play important roles in development of nervous system except for anterior horn of spinal cord, regeneration of the hypoglossal nerve, and maintenance of plasticity in the somatosensory cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：GABA, GABA transporters, KCC2, spinal cord, development, brain stem, regeneration, immunohistochemistry

1. 研究開始当初の背景

GABA は、中枢神経系における主要な神経伝達物質の1つである。成熟動物においては、シナプス放出され、シナプス後膜の膜電位を過分極して、抑制性に作用する。一方、神経発生の早い段階、すなわちシナプスが形成される前は興奮性に作用し、脳・

脊髄の発生、発達に関与すると考えられている。しかしながら、合成酵素遺伝子を欠損させ GABA の合成を完全に阻害しても、口蓋裂、膈ヘルニアなど抑制作用の欠如が原因と考えられる体表奇形はあるものの、脳・脊髄などでの明らかな形態的異常は発見されていない。このことから、シナプス

形成を含め、中枢神経系の形態形成に GABA 自身が本当に機能しているかは依然として不明である。

2. 研究の目的

申請者は、これまで、発達期小脳における GABA シグナルの変化を解析し、GABA がシナプス形成以前も機能しうる分子である事を示してきた。本研究では、これまでの研究を進め、GABA の機能発現機序をより詳細に明らかにするために、(1)構造が最も原始的である胎児脊髄、(2)軸索再生/変性過程の脳幹舌下神経核、(3)脊髄損傷後の脊髄・大脳皮質、(4)可塑性のモデルである三叉神経系（脳幹三叉神経核、大脳皮質体性感覚野）を材料として用いた。これらの領域での形態形成、変性/再生過程と GABA シグナル変化との時間的・空間的關係を解析し、GABA の神経形成、再生、可塑性への関与を目に見える形で明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 脊髄、脳幹における GABA シグナルの発達変化

妊娠 10 日以降各日齢のマウス胎児を用いて脊髄（頸髄）、脳幹（延髄三叉神経核）における GABA 伝達に関与する分子の発現・局在を免疫組織化学的に解析した。特に、脳幹三叉神経核では、臨界期の終了と GABA シグナルの關係に注目した。

(2) 大脳皮質における GABA シグナルの発達変化

生後各日齢のマウス大脳皮質における GABA 伝達に関与する分子の発現・局在を免疫組織化学的に解析した。特に、臨界期と GABA シグナルの關係に注目した。

(3) 舌下神経切断・縫合モデルを用いた神経変性・再生過程における GABA シグナルの経時的变化

舌下神経を顎二腹筋の位置で切断したのち、縫合群と非縫合群に分けて、GABA 伝達に関与する分子の発現・局在の経時的变化を免疫組織化学的に解析した。

(4) 脊髄損傷後の GABA シグナルの変化

下部胸椎のレベルで脊髄を完全横断したのち、GABA 伝達に関与する分子の発現・局

在の経時的变化を免疫組織化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) (脊髄) 発生・発達過程での GABA シグナルの変化

① 全体の傾向

前角→後角の方向に発生が進行した。

② GABA ニューロンの発生と分化

発生の初期、辺縁層（白質）に軸索を出し、一部は交連線維となって脊髄の別の分節、脳幹に投射していた。発生の進行にしたがって交連線維は消失し、連合線維は辺縁層の部分が消失し本来の介在ニューロンとして灰白質内で働くようになった。

③ シナプス形成

はじめは辺縁層（白質）で形成され、やがて灰白質に広がり、最終的には辺縁層のシナプスは消失した。

④ GABA の作用

前角では終始抑制性に作用した。一方、後角では、妊娠の 15 日目まで興奮性に作用し以後抑制性に变化した。

考 察

脊髄は中枢神経系の中で最も原始的な領域である。その脊髄の前角における GABA シグナルの発達変化は非常に特異的であった。大脳皮質・小脳皮質、海馬に共通する発生初期の GABA の興奮性の作用がみられず、脊髄前角に対しては常に抑制性に作用していた。このことは、原始的な脊髄が上位中枢に進化（機能分化）する過程で、GABA の興奮性作用が獲得された事を示唆している。

(2) 再生過程での変化

① 末梢神経（舌下神経）損傷後の変化

舌下神経切断後、舌下神経核におけるシナプス構成要素分子の発現・局在変化を解析したが、シナプス構築に大きな変化は認められなかった。しかしながら、過去の文献通り、電子顕微鏡レベルでわずかなシナプスの解離が認められた。

切断後、速やかに舌下神経核ニューロンの伝達物質であるアセチルコリンの合成が停止した。そして、GABA の興奮性/抑制性を決定する KCC2 の発現が 1 週間以降著明に減少した。非縫合群は、そのまま減少を続け、やがて細胞死が誘導され、1 ヶ月以降ニューロンが消失した。一方、縫合群では、徐々に回復し、軸索の舌への再到達の時期に合わせて両者の正常レベルに回復した。

考 察

軸索が切断されると、すみやかに伝達物質の合成が停止され、GABA の働きが興奮性に变化した。このことは、舌下神経ニューロンの時計が幼弱期に逆戻りしたことを意味する。そして、軸索の伸長が促進され、軸索が標的

機関（舌）に到達すると、通常の状態に復帰する事が明らかになった。一方、再到達が不成立に終わると、細胞死が誘導された。

② 中枢神経系（脊髄）損傷後の変化

脊髄横断後、投射先である腰髄と投射ニューロンの存在する大脳皮質運動野（皮質脊髄路）、脊髄後索（脊髄視床路）における GABA シグナルの変化を解析した。その結果、舌下神経切断モデルで見られたような、投射ニューロンでの KCC2 の発現低下は観察されなかった。かわりに、腰髄灰白質内での GABA 合成の低下が観察され、興奮性入力遮断による局所の神経回路の改変が起こったことが明らかになった。

考察

再生が成立しない中枢神経系内での軸索損傷においては、末梢神経損傷と異なるメカニズムが働く可能性が示唆された。

(3) 発達過程の変化—可塑性との関連

齧歯類では、発達した髭からの感覚入力を受容（中継）する領域に、1本1本の髭に対応する特徴的なシリンダ状構造（バレル様構築）が形成されている。この構造は、感覚入力を発生の一定期間（臨界期）に変動させることにより形態が変化することが知られている。このバレル様構築が認められる領域を材料とし、臨界期の終了時期と GABA シグナルの発達変化との関係を解析した。

① 脳幹（三叉神経核）における変化

GABA シナプスの形成は、神経核内を縦断する GABA 作動性線維との間で妊娠 13 日以前から開始されていた。KCC2 は、妊娠 13～15 日目にかけて発現を開始していた。このことは 15 日以降、GABA は抑制的に作用することを示している。GABA ニューロンの出現は遅れて 15 日目頃で、実質内でのシナプス形成は 17 日以降に本格的に始まっていた。

臨界期の終了は、これまでの解析から妊娠 17～18 日目と考えられている。このことから、実質内での GABA のシナプス形成と臨界期の終了との関連が示唆された。

② 大脳皮質における変化

大脳皮質における GABA シグナルの発達は、生後、深層→浅層に向かって進行した。GABA シナプス形成と興奮性作用から抑制性作用への移行は同時に進行していた。そして、第 4 層におけるシナプス形成と GABA 作用の抑制性への変化はいずれも生後 4～5 日であった。

一方、第 4 層におけるバレル構築の臨界期は、生後 4 日までと考えられている。このことから、大脳皮質第 4 層における臨界期の終了は GABA シナプスの形成、抑制性への移行と一致することが明らかになった。

以上の事から、GABA のシナプス形成と臨界期の終了が重要な働きをしていることが明

らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- ① Takayama C. Developmental localization of potassium chloride co-transporter 2 (KCC2), GABA and vesicular GABA transporter (VGAT) in the postnatal mouse somatosensory cortex. *Neurosci Res.* 査読有, vol. 67, 2010, 137-148
- ② 高山千利, 【シナプスをめぐるシグナリング】—トランスポーター 小胞型 GABA トランスポーター-VGAT(解説/特集) 生体の科学, 査読なし, vol. 61, 2010, 406-407
- ③ Okabe Akihito, Takayama Chitoshi Ontogeny of Cl Homeostasis in Mouse Hypoglossal Nucleus, *Advances in experimental medicine and biology.* 査読有, Vol. 669, 2010, 29-31
- ④ Akiyama M, Sakai K, Takayama C, Yamanaka Y, McMillan J R, Shimizu H. CGI-58 is an alpha/beta hydrolase in lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes. *Am J Pathol* 査読有, vol. 173, 2008, 1349-1360

〔学会発表〕（計 14 件）

- ① 小坂祥範, 高山千利. “マウス頸髄における GABA transporter の発達変化. 日本解剖学会第 66 回九州支部学術集会 2010 年 10 月 8 日福岡歯科大学
- ② 金正泰, 高山千利. 脊髄損傷後 GABA シグナルの変化. 日本解剖学会第 66 回九州支部学術集会 2010 年 10 月 8 日福岡歯科大学
- ③ 荒田晶子, 高山千利. 発達小脳における下オリブ核由来の KCC2 の局在. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日～4 日 神戸コンベンションセンター
- ④ 金武秀道, 高山千利. マウス脳幹三叉神経核における GABA シグナルの発達変化. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日～4 日 神戸コンベンションセンター
- ⑤ 栗本侑依, 高山千利. 発生に伴って変化する培養小脳組織およびグリア細胞中の VGAT-Venus タンパク質の発現. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日～4 日 神戸コンベンションセンター
- ⑥ 福田敦夫, 高山千利. アストロサイトの生理機能研究の新展開 バグマングリアが放出する GABA による小脳顆粒細胞前駆細胞の増殖. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 9 月 2 日～4 日 神戸コンベ

- ンションセンター
- ⑦ 小坂祥範, 高山千利. マウス胎児頸髄における GABA シグナルの発達変化. 日本解剖学会第 65 回九州支部学術集会. 2009 年 11 月 7 日 沖縄県 琉球大学医学部
 - ⑧ 金武秀道, 高山千利. 三叉神経核における GABA シグナルの発達変化 . 日本解剖学会第 65 回九州支部学術集会 2009 年 11 月 7 日 沖縄県 琉球大学医学部
 - ⑨ 立津政晴, 高山千利. 神経軸索の変性、再生と舌下神経核における GABA シグナルの関係. 日本解剖学会第 65 回九州支部学術集会 2009 年 11 月 7 日 沖縄県 琉球大学医学部
 - ⑩ 丸谷圭, 高山千利. 発達期小脳の GABA 放出制御因子 . 第 32 回日本神経科学大会 . 2009 年 9 月 16 日～18 日 愛知県 名古屋国際会議場
 - ⑪ 森島寿貴, 高山千利. GABA が小脳皮質形成期の外顆粒細胞層で一時的にバグマンゲリアから放出され顆粒細胞前駆体の増殖に関与している. 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日～18 日 愛知県 名古屋国際会議場
 - ⑫ 立津政晴, 高山千利. 舌下神経の変性・再生時における GABA シグナルの変化. 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日～18 日 愛知県 名古屋国際会議場
 - ⑬ 小坂祥範, 高山千利. マウス頸髄における GABA シグナルの発達変化. 第 32 回日本神経科学大会. 2009 年 9 月 16 日～18 日. 愛知県 名古屋国際会議場
 - ⑭ Akihito Okabe, Chitoshi Takayama. Ontogeny of CI homeostasis in mouse hypoglossal nucleus. 11thOxford Conference. 2009 年 7 月 23 日～26 日. 奈良県 奈良新公会堂

[その他]

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/anatomy2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山千利 (TAKAYAMA CHITOSHI)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 60197217

(2) 研究分担者 なし

研究者番号 : なし

(3) 連携研究者 なし

研究者番号 : なし

(4) その他

本研究は、琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座所属の博士課程・修士課程の学生

とともに研究を行った。

立津政晴

金武秀道

金 正泰

小坂祥範