

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430037

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたGABAの神経再生・可塑性誘導に関する研究

研究課題名(英文) GABAergic signaling.

研究代表者

高山 千利 (TAKAYAMA, CHITOSHI)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60197217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性神経伝達物質であるGABAとグリシンは発生期及び神経損傷後、興奮性に作用する。その興奮性は、神経系の発生及び損傷の修復に寄与すると予想されているが、証拠は示されていない。本研究は、GABA・グリシン伝達を担う小胞型GABA輸送体(VGAT)とK, Cl共輸送体(KCC2)の発現量が半減したヘテロマウスを用いて、神経再生への関与を解析した。その結果、GABA・グリシンの作用を抑制性に導くKCC2の発現量が半減した場合、顔面神経の機能回復が早まるが、小胞への充填を担うVGATの発現量が半減した場合、遅延していた。この結果、GABA・グリシンの興奮性作用が、神経の再生に寄与することが示された。

研究成果の概要(英文)：GABA and glycine, inhibitory neurotransmitters, act as an excitatory neurotransmitter during development and after nerve injury, and are thought to be involved in morphogenesis and regeneration. However their direct evidences were not clearly demonstrated. In this study, we examined the time course of facial motor function recovery in the heterozygote mice reducing the expression of vesicular GABA transporter (VGAT), which is involved in transporting GABA and glycine into synaptic vesicles, and K, Cl co-transporter 2 (KCC2), which shifts GABA action from excitation to inhibition after facial nerve dissection and suturing. The facial motor function recovered earlier in the KCC2-heterozygote mice than that in the wild type mice. In contrast, facial motor function recovered later in the VGAT-heterozygote mice than that in the wild type mice. These results suggested that excitatory action of GABA and glycine may be involved in regeneration of peripheral nerves, after nerve injury.

研究分野：総合領域

キーワード：アミノ酪酸(GABA) コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT) 小胞型GABAトランスポーター(VGAT) K+, Cl 共輸送体(KCC2) 行動検査 ヘテロ接合体 顔面神経 舌下神経

1. 研究開始当初の背景

GABA は、成熟動物では抑制性神経伝達物質としてグルタミン酸による興奮性伝達を制御する。一方、幼弱期に存在する GABA は興奮性に作用し、形態形成の様々なステップに機能すると考えられている。しかしながら、GABA の合成を完全に欠損させたマウスにおいても、その仮説を裏付ける異常が発見されず、未解決の問題として残っている。

2. 研究の目的

本研究において、GABA 合成酵素欠損マウスと、GABA の抑制性作用に關与するその他の分子を欠如させたマウス中枢神経系の形態を詳細に比較・解析し、GABA による興奮性伝達のはたす役割について明らかにし、幼弱期の GABA の機能を確定したいと考えている。

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウス解析のための基準として、正常の発達変化も併せて解析し、正常マウスにおける脊髄での GABA シグナルの変化を免疫組織学的手法を用いて解析した。

(2) 神経系の発生、再生(軸索の再伸長)への関与を明らかにするために、末梢神経損傷モデルのマウスを用いて、GABA シグナルに關与する分子の発現・局在の変化を指標に解析した。

(3) 各ノックアウトマウスのヘテロマウスを作製し、それを掛け合わせたホモマウスを用いて、脊髄を経時的に形態変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 脊髄における、GABA ニューロンの形成と消褪、GABA シナプスの形成と消褪、GABA 排出機構の変化(=時間的空間的発達変化)を明らかにし、ノックアウト解析のための指標を作成した。(発表論文 2, 6)

併せて、脳幹三叉神経核における発達変化も明らかにした。(発表論文 1)

(2) 舌下神経、顔面神経を切断・縫合し、GABA シグナルの変化を解析した。その結果、舌下神経核、顔面神経核における GABA シグナルは幼弱期に逆戻りし、GABA が興奮性作用に転じ、再伸長に GABA が關与する可能性が強く示唆された。(発表論文 3, 7)

(3) GABA 合成酵素(グルタミン酸脱炭酸酵素 GAD)、GABA 放出に關与するトランスポーター(小胞型 GABA トランスポーター-VGAT)、Cl⁻を細胞外に排出し GABA の作用を興奮性に变化させるトランスポーター(K⁺, Cl⁻-共輸送体 KCC2)の遺伝子改変マウスを用いて形態的異常を解析した。その結果、脊髄の後角において、カルピンジン、カルレチニン各陽性の介在ニューロンの分布、数に異常が認められた。しかしながら、運動ニューロンの分布、数に大きな差は認められず、GABA の幼弱期には介在ニューロンの移動、生存に關与する可能性が示唆された。(学会発表)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Sunagawa M, Shimizu-Okabe C, Kim J, Kobayashi S, Kosaka Y, Yanagawa Y, Matsushita M, Okabe A, Takayama C. Distinct development of the lycinergeric terminals in the ventral and dorsal horns of the mouse cervical spinal cord. *Neuroscience* 343 : 459-471, (2017) doi:10.1016/j.neuroscience.2016.12.032. 査読有

Takamatsu G, Katagiri C, Tomoyuki T, Shimizu-Okabe C, Nakamura W, Nakamura-Higa M, Hayakawa T, Wakabayashi S, Kondo T, Takayama C, Matsushita M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 22 : 482(4):1327-1333. 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.036.

Kim J, Sunagawa M, Kobayashi S, Shin T, Takayama C. Developmental localization of calcitonin gene-related peptide in dorsal sensory axons and ventral motor neurons of mouse cervical spinal cord. *Neuroscience Research* 105 : 42-48, 2016 doi: 10.1016/j.neures.2015.09.003. 査読有

Kim J, Son Y, Kim J, Lee S, Kang S, Park K, Kim SH, Kim JC, Kim J, Takayama C, Im HI, Yang M, Shin T, Moon C. Developmental and degenerative modulation of GABAergic transmission in the mouse hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 47 : 320-332, 2015 doi: 10.1016/j.ijdevneu.(2015)08.009. 査読有

Kim J, Takayama C, Park C, Ahn M, Moon C, Shin T. Immunohistochemical localization of GABAergic key molecules in the main olfactory bulb of the Korean roe deer, *Capreolus pygargus*. *Acta Histochem.* 査読有 117(7) : 642-648(2015) doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.08.009.

Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Ohshiro Y, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Ishiuchi S, Nakata M, Yada T, Miyazaki J, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H. A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived γ -oryzanol via the suppression of local dopamine D4 receptor signaling in mouse islet. *Br J Pharmacol* 172 : 4519-4534, (2015) 査読有 doi:10.1111/bph.13236.

Okabe A, Shimizu-Okabe C, Arata A, Konishi S, Fukuda A, Takayama C. KCC2 - mediated regulation of respiration-related rhythmic activity during postnatal development in mouse medulla oblongata. *Brain Res.* 1601 : 31-39, (2015) 査読有

Fukuda T, Kakinohana M, Takayama C,

Matsushita M, Sugahara K, Dietary supplementation with sodium nitrite can exert neuroprotective effects on global cerebral ischemia/reperfusion in mice. *J ANESTH* 29 : 609-617, (2015) doi:10.1007/s00540-014-1968-6. 査読有

Higa M, Katagiri C, Shimizu-Okabe C, Tsumuraya T, Sunagawa M, Nakamura M, Ishiuchi S, Takayama C, Kondo E, Matsushita M. Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457 : 206-212, 2015. 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.089.

Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Ishiuchi S, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Miyazaki J, Oyadomari S, Shimabukuro M, and Masuzaki H. -oryzanol protects pancreatic β -cells against endoplasmic reticulum stress in male mice. *Endocrinology* 156(4) : 1242-1250, 2015 doi:10.1210/en.2014-1748. 査読有

高山千利 神経の基本-神経の変性と再生. *JOHNS (Journal of Otolaryngology Head and Neck Surgery)* 30:1413-1416, 2014.

Suzuki H, Kanagawa D, Nakazawa H, Tawara-Hirata Y, Kogure Y, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Ishikawa Y, Shiosaka S. Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. *FRONT CELL NEUROSCI* (8) : 420, 2014 doi: 10.3389/fncel. 2014. 00420. 査読有

Kin H, Kim J, Shimizu-Okabe C, Okabe A, Takayama C. Embryonic development of GABAergic signaling in the mouse spinal trigeminal nucleus interpolaris. *Neurosci Lett.* 査読有 566:221-225, (2014)doi:10.1016/j.neulet.2014.02.057.

Kim J, Kosaka Y, Shimizu-Okabe C, Niizaki A, Takayama C. Characteristic development of the GABA-removal system in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 262:129-142, 2014, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.066. 査読有

[学会発表](計8件)

高山千利、清水千草、視床下部における GABA 神経回路の発達、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、浜松(アクトシティ浜松)

岡部明仁、清水千草、金正泰、小林しおり、高山千利、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、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、浜松(アクトシティ浜松)

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、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日～30 日、第 94 回日本生理学会大会、浜松(アクトシティ浜松)

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」、2017 年 2 月 19 日、第 18 回沖縄県理学療法学会、沖縄県総合福祉センター

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、2016 年 10 月 29 日、日本解剖学会第 72 回九州支部学術集会、長崎(ホードインホール/良順会館(長崎大学医学部内))

Jeongtae Kim, Shiori Kobayashi, Yuchio Yanagawa, Chitoshi Takayama, Deficiency of Vesicular GABA transporter alters the expression of calcitonin gene-related peptide in the embryonic spinal cord and dorsal root ganglion. 2016 年 7 月 20 日～22 日、第 39 回日本神経科学大会、神奈川(パシフィコ横浜)

小坂祥範、屋富祖司、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 伝達関連分子の発現変化、2016 年 3 月 28 日～30 日、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、福島(ビックパレット福島)

Fukuda T, Kakinohana M, Takayama C, Matsushita M, Sugahara K, Dietary supplementation with sodium nitrite can exert neuroprotective effects on global cerebral ischemia/reperfusion in mice. *J ANESTH* 29 : 609-617, (2015) 査読有 doi:10.1007/s00540-014-1968-6.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://molanatomy.blogspot.jp/>

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

(3)連携研究者

柳川 右千夫 (YANAGAWA Yuchio)
群馬大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90202366

清水 千草 (SHIMIZU Chigusa)
琉球大学・大学院医学研究科・特別研究員
研究者番号：70435072