

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790764  
 研究課題名 (和文) 乳幼児突然死症候群の原因究明に向けて  
 : KCC2 の発達期発現異常と呼吸リズム失調  
 研究課題名 (英文) Abnormality of KCC2 expression during the development may disrupt respiratory-related rhythm which may be responsible for sudden infant death syndrome.  
 研究代表者  
 岡部 明仁 (OKABE AKIHITO)  
 兵庫医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：1031394

## 研究成果の概要：

新生仔（生後0日齢～生後7日齢）正常動物を用いて自発的な呼吸リズムを確実に記録できる延髄スライス標本作製方法を確立した。得られた呼吸様リズム性神経活動がKCC2の阻害剤であるフロセミド (furosemide)により、変化することを明らかにした。ここで、フロセミドの投与はHübnerらが報告したKCC2遺伝子欠損マウスより得られた結果とは異なっていた。呼吸様リズム性神経活動においては、KCC2の機能を正常動物で阻害することと、KCC2ノックアウトマウスにおいて得られた結果は同一ではなく、様々な要因によりノックアウト動物で呼吸不全が引き起こされていることを示唆している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：新生児医学

## 1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死症候群 (SIDS; Sudden Infant Death Syndrome) は、その原因については不明な点が多いが、一因として脳における呼吸循環調節機能不全が考えられてい

る。呼吸リズムはグリシン及び GABA 作動性の抑制性ニューロンにより制御されているため、シナプス後神経細胞の応答性はその細胞内塩素イオン ( $Cl^-$ ) 濃度 ( $[Cl^-]_i$ ) に依存して変化すると考えられる。また、 $[Cl^-]_i$  は

Cl<sup>-</sup>共輸送体により制御されており、特に細胞外に Cl<sup>-</sup>を排出する KCC2 と細胞内に Cl<sup>-</sup>を取り込む NKCC1 が神経細胞の発達過程において重要な役割を果たしていると考えられる。Hübner ら (2001 年) により KCC2 遺伝子欠損マウスは呼吸不全による低酸素血症により生直後に死亡することが報告された。彼らはこの原因が中枢性であって、呼吸リズム形成機構の異常であることを、胎生 18.5 日齢の遺伝子欠損動物と正常動物とを比較して明らかにしている。このことから呼吸ニューロンにおける KCC2 の発現による [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の減少、それに伴い生じる GABA に対する応答性の変化が呼吸リズムの形成には必須であると考え、立案に至った。

## 2. 研究の目的

呼吸リズムの形成と維持には、機能的な KCC2 の発現に伴う [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の減少によってグリシン及び GABA に対する応答性が興奮性から抑制性に変化することが不可欠であり、SIDS の原因が KCC2 の発現異常にあるのではないかという仮説を立てた。本研究では、周産期の KCC2 ノックアウトマウスを用いて、発達過程における呼吸リズムの形成・獲得過程について、何時どこでどのように獲得されるのかを Cl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化を指標に分子レベルから神経回路網レベルまで明らかにし、発達過程における呼吸リズムの形成メカニズムとその分子基盤を示すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 生後 0 日齢～生後 7 日齢の正常マウスを用いて、pre-Böt と舌下神経核、そこから伸びる神経根を含む延髄のスライス標本作製する。スライスパッチクランプ法を応用して、細胞内容をガラスピペット電極内に採取する。ここで細胞での GABA<sub>A</sub>/glycine 作動性応答、Cl<sup>-</sup>ホメオスタシスの状態、それに関連する Cl<sup>-</sup>トランスポーターの種類・機能について検討する。次に、Cl<sup>-</sup>トランスポーター遺伝子について単一細胞での発現パターンの経時変化を解析する目的で、

single-cell multiplex RT-PCR 法の確立を行う。これにより、細胞個々の [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の発達的变化の解析を試みた。

(2) 新生マウス脳幹摘出標本を用いて、舌下神経根から自発的な呼吸リズムを記録し、その呼吸神経活動をトリガーとして呼吸リズムに同期したニューロンの膜電位活動の多点同時記録を MiCAM Ultima を用いて行う。そこで、発達過程の pre-BötC、pFRG、BötC 各領域における興奮の伝播パターンを蛍光観察する。

(3) 本研究を遂行するにあたり、最も適当な KCC2 ノックアウトマウスは 2001 年に Hübner ら (ハンブルグ大学、ドイツ) により報告された株であると考えられる。そこで彼らから KCC2 ノックアウトマウス株の供与を受け系統を維持し、コンスタントに実験動物を得られるよう環境を整える。

## 4. 研究成果

(1) 呼吸リズム形成過程について新生仔 (生後 0 日齢～生後 7 日齢) の正常動物を用いて検討した。まず始めに、新生仔 (生後 0 日齢～生後 7 日齢) 正常動物を用いて、pre-Böt と舌下神経核、そこから伸びる神経根を含む延髄のスライス標本作製し、その神経根から自発的な呼吸リズムを確実に記録できるスライス標本作製方法を確立した。

(2) その呼吸神経活動をトリガーとして呼吸リズムに同期したニューロンの膜電位活動の多点同時記録を MiCAM Ultima を用いて行うことに成功した。

(3) スライスパッチクランプ法を用いて発達過程の pre-BötC、pFRG、BötC の各領域の呼吸ニューロンの応答を記録した後、細胞内容をガラスピペット電極内に採取するという手技を確立した。この採取した細胞内容を利用した Cl<sup>-</sup>トランスポーター遺伝子の単一細胞での発現パターンの経時変化を解析す

るための、single-cell multiplex RT-PCR 法を確立した。

(4) ドイツハンブルグ大学の Dr. Hübner より KCC2 ノックアウトマウス株を譲渡していただき、その系統維持と繁殖に成功した。

(5) 新生仔 KCC2 ノックアウトマウス（ヘテロ接合体）を用いて、pre-Böt と舌下神経核を含む延髄の急性スライス標本作製方法を確立した。

(6) 舌下神経核から得られた呼吸様リズム性神経活動が KCC2 の阻害剤であるフロセמיד (furosemide) により、変化することを明らかにした。ここに具体例を示す。

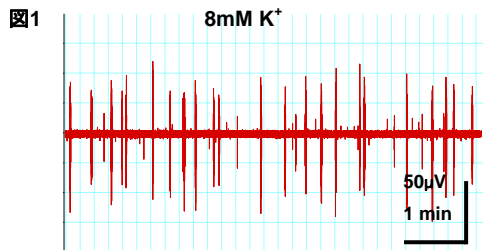


図1のように高カリウムイオン濃度の人工脳脊髄液でこの急性延髄スライス標本を還流するとこのような、自発性呼吸様リズム発火を生じさせる。

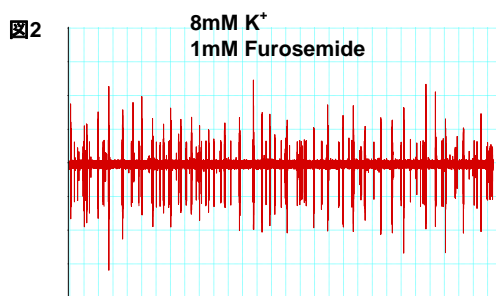


図1の状態に1mMのフロセמיד(KCC2阻害剤)を投与すると(図2)、自発性呼吸用リズム発火の頻度が高くなった。このことは、Hübnerらが報告した KCC2 ノックアウトマウスより得られた結果とは異なっていた。つまり、KCC2 ノックアウトマウスは呼吸不全によって生直後に死亡するのだが、正常動物におい

て KCC2 の機能を阻害すると自発性呼吸リズムが早くなるという、逆の結果が得られた。呼吸様リズム性神経活動においては、KCC2 の機能を正常動物で阻害することと、KCC2 ノックアウトマウスにおいて得られる表現型は同一ではなく、このことは様々な要因によりノックアウト動物で呼吸不全が引き起こされていることを示唆している。これらの相違が何に起因するのか、新たに明らかにすべき検討課題が生じ残されているものの、本申請課題の研究目的をほぼ達成できたと考える。

#### 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4件)

- ① Oku, Y., Okabe, A., Hayakawa, T., Okada, Y. A respiratory neuron group in the high cervical spinal cord discovered by optical imaging. *Neuroreport* 19(17):1739-43, 2008 査読有り
- ② Kilb, W., Hanganu, I.L., Okabe, A., Sava, B.A., Shimizu-Okabe, C., Fukuda, A., Luhmann, H.J. Glycine Receptors Mediate Excitation of Subplate Neurons in Neonatal Rat Cerebral Cortex. *J. Neurophysiol.* 100(2): 698-707, 2008 査読有り
- ③ Shimizu-Okabe, C., Okabe, A., Kilb, W., Sato, K., Luhmann, H.J., Fukuda, A. Changes in the expression of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci. Res.* 59(3): 288-295, 2007 査読有り
- ④ Achilles, K., Okabe, A., Ikeda, M., Shimizu-Okabe, C., Yamada, J., Fukuda, A., Luhmann, H.J., Kilb, W. Kinetic

Properties of  $\text{Cl}^-$  Uptake Mediated by  $\text{Na}^+$ -Dependent  $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  Cotransport in Immature Rat Neocortical Neurons. *J. Neurosci.* 27(32): 8616-8627, 2007 査読有り

〔学会発表〕（計3件）

- ① 王天英, 熊田竜郎, 岡部明仁, 森島寿貴, 福田敦夫 マウス多小脳回モデルである凍結損傷で誘発した微小脳回における異常な皮質形成 第31回日本神経科学大会 2008年7月9-11日 東京
- ② 王天英, 熊田竜郎, 岡部明仁, 福田敦夫 マウス大脳皮質における凍結損傷法により誘発された microgyrus の皮質形成 第85回日本生理学会大会 2008年3月25-27日 東京
- ③ 魏兵, 古川知範, 熊田竜郎, 岡部明仁, 大野浩二, 佐藤康二, 福田敦夫 入力損傷のある三叉神経核におけるクロライド恒常性変化関連遺伝子 第30回日本神経科学大会 (Neuro2007) 2007年9月10-11日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡部 明仁 (OKABE AKIHITO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：1031394