

機関番号：34519

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791046

研究課題名 (和文) 周産期呼吸リズム調節とCl⁻ホメオスタシス
：乳幼児突然死症候群の中枢性要因の探索研究課題名 (英文) Regulation of perinatal respiration-related activity and Cl⁻-homeostasis: searching for the factors of sudden infant death syndrome in the brain
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：10313941

研究成果の概要 (和文)：

Cl⁻ホメオスタシス調節分子、特にKCC2について呼吸中枢を含む発達期延髄毛様体領域における発現分布及びその変化を、免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、マウスの舌下神経核において、発達に伴い隣接する迷走神経核と比べてKCC2の発現は減少していることが確認された。また、生後発達期の正常マウスにおいてGABA投与により呼吸様リズム発火が増加した。一方、KCC2阻害剤を投与すると、呼吸様リズム発火が増加することが認められた。これらのことから、生後1週齢までは、舌下神経核の神経細胞における[Cl⁻]_iは運動系出力を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Cation-chloride cotransporters are considered to play critical roles in the regulation of intracellular chloride ion concentration ([Cl⁻]_i), and hence in the control of neuronal function. First, I tested the immunoreactivity of KCC2 using KCC2 antibody in developmental mouse medulla. Immunoreactivity of KCC2 in hypoglossal nucleus at P0 was higher than that at P7, while that of vagus nerve nucleus did not change during same period. Since developmental changes in expression pattern of KCC2 associated with respiration-related rhythmic activity (RRA) in medulla are not yet well understood, I recorded RRA extracellularly from respiration-related neurons in medullary slice preparation obtained from mice of P0-7. Under these conditions, perfusion of 100μM GABA-containing ACSF transiently increased the frequency of RRA. The KCC2 inhibitor furosemide also increased the frequency of RRA. Thus Cl⁻ homeostasis likely regulates the activity of motor output in early postnatal stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：乳幼児突然死症候群、KCC2、細胞内Cl⁻濃度、GABA_A受容体、舌下神経核

1. 研究開始当初の背景

呼吸リズム生成の中枢機構に関しては、延髄の疑核腹側に位置する pre-Bötzinger complex (pre-BötC) (Smith et al., *Science*, 1991、Feldman and DelNegro, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006)、顔面神経核腹側に位置する para-facial respiratory group (pFRG) (Onimaru and Homma, *J. Neurosci.*, 2003) が呼吸リズムを形成するニューロン群であると一般的に考えられている。近年、マウス pre-BötC の神経細胞では、生後一週目に 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示された (Ritter and Zhang, *Eur. J. Neurosci.*, 2000)。加えて同様の変化が胎生 19 日齢の pre-BötC 吸息性神経細胞において起こることが Ren と Greer (*J. Neurosci.*, 2006) により示された。この GABA に対する応答性の変化は、海馬や大脳皮質において $[Cl^-]_i$ 変化に依存しており、 $[Cl^-]_i$ 変化は Cl^- トランスポーター (KCC2 及び NKCC1) により調節されていることが示された (Payne et al., *Trends Neurosci.*, 2003)。これらの報告から $[Cl^-]_i$ を調節している Cl^- トランスポーター (KCC2 及び NKCC1) が、呼吸リズムを形成するニューロン群における GABA に対する応答性の変化に関与していることを示唆している。一方、KCC2 のノックアウト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ている (Hübner et al., *Neuron*, 2001)。以上のことから、周産期の呼吸リズム形成過程においては、KCC2 の発現により $[Cl^-]_i$ が低下し、生後一週齢までに GABA 作動性応答が興奮性から抑制性に変化していることが重要と考えられる。しかしながら、呼吸リズム調節と Cl^- トランスポーター (KCC2 及び NKCC1) の相関を、呼吸循環中枢を含む延髄毛様体領域で発達段階を追って機能的及び組織学的に詳細に検討した報告はない。

2. 研究の目的

呼吸の基本リズムは、延髄のリズム形成機構によって生み出され、神経回路網の中で様々な修飾を受けて、最終的な呼吸神経出力のパターンが形成されていると考えられている。Bötzinger Complex (BötC) の呼吸ニューロンは GABA 及びグリシン作動性の抑制性ニュー

ロンであることが知られている。Hübner ら (2001) は KCC2 ノックアウトマウスの死亡原因が中枢性の呼吸リズム失調による呼吸不全であることを、胎生 18.5 日齢 (E18.5) のノックアウトマウスと正常動物とを比較して示している。このことから呼吸リズム調節の破綻が SIDS の一因であり、そのリズム調節には Cl^- ホメオスタシスが重要な役割を果たしていると考え、立案に至った。周産期の正常動物において、舌下神経核、pre-BötC、pFRG、BötC などの呼吸様リズム発火に重要な延髄領域について、 Cl^- トランスポーター (KCC2 及び NKCC1) の発達に伴う発現変化を組織学的に検討する。また呼吸様リズム発火を *in vitro* で再現することのできる延髄スライス標本を用いて、発達過程における Cl^- トランスポーター阻害剤に対する呼吸リズムの変化を電気生理学的に検討する。具体的には、pre-BötC と舌下神経核を含む 700 μ m 厚の延髄の急性スライス標本作製し、舌下神経核から呼吸様リズム発火を記録する。そこで KCC2 の阻害剤である Furosemide 或いは NKCC1 の阻害剤である Bumetanide を投与し呼吸様リズム発火の変化を検討する。また各種阻害剤存在下で GABA に対する応答性の変化を検討する。このように組織学的結果と電気生理学的結果とを合わせて、 Cl^- ホメオスタシス関連分子が呼吸リズム調節に、いつ、どこで、どのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各種 Cl^- トランスポーター分子 (KCC2 及び NKCC1) について、呼吸中枢を含む延髄毛様体領域における発現分布を、免疫組織化学法を用いて詳細に検討した。具体的には、KCC2 及び NKCC1 に特異的な抗体を用いて、生後発達期 (生後 0 日齢～生後 7 日齢) マウスの舌下神経核、迷走神経核、pre-BötC、pFRG、などの呼吸リズムに重要な延髄毛様体領域における発現分布の詳細な検討を行った。

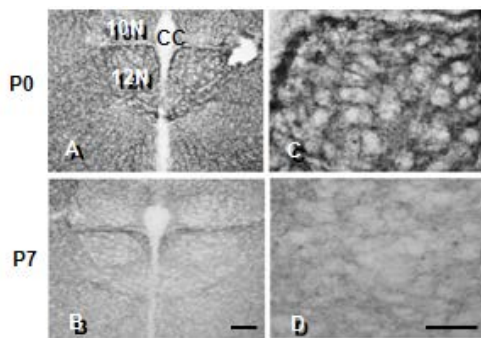
(2) 生後発達期 (生後 0 日齢～生後 7 日齢) 正常マウスを用いて、pre-BötC と舌下神経核を含む 700 μ m 厚の延髄急性スライス標本作製し (Oku et al., *Pflugers Arch.*, 438(5):656-664, 1999; Hülsman et al., *Eur J*

Neurosci., 12(3):856-862, 2000)、舌下神経核にタングステン電極を刺入し、呼吸リズム発火を記録する。この延髄急性スライス標本は人工脳脊髄液 (ACSF) の K^+ 濃度を 3mM から 8mM に増加させることで呼吸リズム発火を発生させることができる。この時期において①Furosemide (KCC2 阻害剤) 及び Bumetanide (NKCC1 阻害剤) 投与による呼吸リズム発火の変化に加えて、GABA 受容体に対する②アゴニスト (GABA) 投与に対する呼吸リズム発火の変化を経時的に検討した。

4. 研究成果

はじめに、 Cl^- ホメオスタシス調節分子、特に KCC2 (K^+-2Cl^- 共輸送体) について、呼吸中枢を含む発達期延髄毛様体領域における発現分布及びその変化を、免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、マウスの舌下神経核において、生後 0 日齢から 7 日齢まで発達に従い、隣接する迷走神経核と比べて KCC2 の発現は減少していることが確認された (図 1 参照)。しかしながら、その他の呼吸リズムに

図 1



生後発達期 (P0 及び P7) の舌下神経核における KCC2 の発現変化 (雑誌論文①より抜粋、改変)

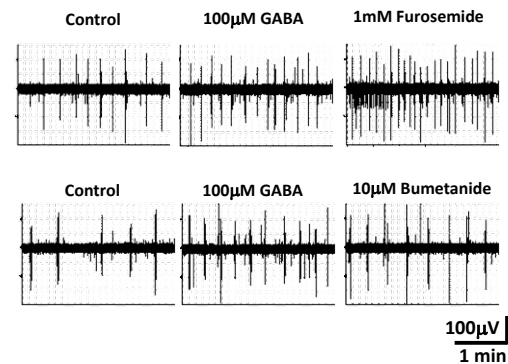
A-B: 舌下神経核 (12N) を含む周囲の KCC2 免疫染色像。C-D: A 及び B の舌下神経核部分の強拡大像。発達するに従って KCC2 の発現量が減少しているように見える。CC: 中心管、10N: 迷走神経核、12N: 舌下神経核、scale bar = 100µm (A, B), 50µm (C, D)

重要であると考えられている、pre-BötC、BötC などの領域では、明らかな発現量変化は認められなかった。KCC2 は神経細胞内の Cl^- 濃度を低値に保つ役割を持つので、発現量が減少しているということは呼吸リズムを調節する GABA 作動性抑制性ニューロンの作用が、

発達期の舌下神経核において変化している可能性を示唆した。

次に、生後 (生後 0 日齢~7 日齢) 正常マウスを用いて、舌下神経核を含む 700µm 厚の延髄急性スライス標本を作製し、舌下神経核にタングステン電極を刺入し、呼吸リズムを記録した。この延髄急性スライス標本は人工脳脊髄液 (ACSF) の K^+ 濃度を 3mM から 8mM に増加させることで呼吸リズム発火を発生させることができる。このスライス標本に 100µM の GABA を投与すると、呼吸リズム発火は平均約 1.5 倍に増加した。その後約 40 分間のリカバリーを経て①1mM の Furosemide (KCC2 阻害剤) 及び②10µM の Bumetanide (NKCC1 阻害剤) を投与して呼吸リズム発火の変化を検討した。その結果、いずれの阻害剤を投与しても、呼吸リズム発火が 1.5~2 倍程度増加することが認められた (図 2 参照)。Furosemide の代わりに、より選択的な阻害剤

図 2



GABA 及び Furosemide (KCC2 阻害剤) 又は Bumetanide (NKCC1 阻害剤) 投与による呼吸リズム発火の変化の例 (生後 1 日齢のマウス) 上段及び下段左: control

上段及び下段中: 100µM GABA 投与

上段右: 1mM Furosemide (KCC2 阻害剤) 投与
下段右: 10µM Bumetanide (NKCC1 阻害剤) 投与

100µM の GABA を投与すると、control と比べて呼吸リズム発火が増加した。40 分のリカバリー後、1mM の Furosemide または 10µM の Bumetanide を投与すると、どちらの阻害剤を投与しても control と比べて呼吸リズム発火が増加した。

である DIOA を投与しても、同様に呼吸リズム発火が増加した。

以上の結果から、生後 1 週齢までは、舌下神経核の神経細胞における $[Cl^-]_i$ は高値である可能性が示唆された

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2件)

- ① Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Mihara T, Okabe A, Sato K, Inoue Y, Fujiwara T, Yagi K, Fukuda A. KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res.* 99:177-184, 2011, 査読有り
- ② Okabe A, Arata A, Oku Y, Takayama C, Fukuda A. Ontogeny of Cl⁻ homeostasis in mouse hypoglossal nucleus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 669:29-31, 2010, 査読有り

[学会発表] (計5件)

- ① Okabe A, Arata A, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Konishi S, Fukuda A. Developmental changes in Cl⁻ homeostasis in postnatal mouse hypoglossal nucleus. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 2011年3月28-30日 横浜
- ② Arata A, Okabe A, Takayama C, Fukuda A, Ito M. Correlated expression of the neuron-specific potassium chloride cotransporter 2 (KCC2) in the neonatal cerebellum and inferior olive. 第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会 (Neuro2010) 2010年9月2-4日 神戸
- ③ Okabe A. Cl⁻ co-transporters play important roles in developmental brain of rodent. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第32回日本神経科学大会), 2009年9月16-18日 名古屋
- ④ Luhmann HJ, Kilb W, Hanganu-Opatz IL, Okabe A, Sava BA, Shimizu-Okabe C, Fukuda A. Function of ligand-gated chloride channels in the newborn rodent

cerebral cortex. 40th NIPS International Joint Symposium 2009, "Physiology of Anion Transport" and "Cell Volume Regulation" (PAT-CVR 2009), 2009年8月3-6日 岡崎

- ⑤ Wang T, Kumada T, Morishima T, Okabe A, Yanagawa Y, Fukuda A. PECULIAR ACCUMULATION OF GABAergic AND GLUTAMATERGIC NEURONS AT THE EARLY STAGE OF FREEZE LESION-INDUCED MICROGYRUS IN MICE. The XXXVIth International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), 2009年7月27日-8月1日 京都

[その他]

- ① 清水一岡部千草、岡部明仁 「日本神経科学大会託児室を利用して (Using the Nursery Room for Children at the Japan Neuroscience Society Conference)」 神経科学ニュース 2009年No.6、pp16-17

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: 10313941

