

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06394

研究課題名(和文) GABA/グリシンの興奮性応答を介した神経再生カスケードの解析と治療法への応用

研究課題名(英文) Analysis of nerve regeneration cascade mediated by GABA/glycine excitatory response and application to therapy

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：GABA/グリシンは抑制性神経伝達物質である。一方、幼若期には興奮性応答を示すため、形態形成への関与が示唆されているが、以前不明である。まず、新たに坐骨神経結紮モデルを作製し、下肢運動機能、坐骨神経組織、マーカー分子発現変化の時間的關係を解析した。その結果、ミクログリア活性化、KCC2発現低下、神経再生というカスケードが明らかになった。続いて、KCC2が半減したノックアウトヘテロ接合体を用いて、脛骨神経の切断・縫合モデルを作製し、再生過程を野生型と比較した。その結果、KCC2の低下(GABA/グリシンの興奮性応答)は、神経の再生を加速し、運動機能障害を軽度抑える作用があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は2つの大きな学術的意義を持つ。1つめは、GABAとグリシンの興奮性応答の機能について、その一端を明らかにしたことである。これまで、GABA/グリシンの興奮性機能について様々な可能性が示唆されてきたが、エビデンスのある結果は得られていない。今回世界で初めて、「神経軸索の再生を加速する」という機能を明らかにすることが出来た。2つ目は、神経再生を加速する因子を特定できたことである。血管障害、外傷などで神経変性に陥った場合、軸索の再生を促す方法は、「運動療法」程度であった。今回は、分子の動き(KCC2の抑制)として捉えることに成功し、今後、上記の疾患における治療法に道を開くことになる。

研究成果の概要(英文)：GABA and Glycine are inhibitory neurotransmitters in the mature CNS. On the other hand, since they show an excitatory response during the immature stage, their involvement in morphogenesis has been suggested. However, it is still unclear. First, we prepared a new sciatic nerve ligation model mice and analyzed the temporal relationship between changes in lower limb motor function, sciatic nerve histology and marker molecule expressions. The results revealed a cascade of microglial activation, decreasing of KCC2 expression, and axonal regeneration. Next, a tibial nerve cut and suture model was prepared using a KCC2 knockout heterozygote mice in which KCC2 was halved, and the regeneration processes were compared with that of the wild type mice. The results revealed that a decrease in KCC2 (GABA/glycine excitatory response) may accelerate the nerve regeneration and prevent severe motor dysfunction.

研究分野：神経科学

キーワード：GABA Glycine KCC2 神経損傷 軸索再生 ミクログリア 下肢運動機能検査 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

γ -アミノ酪酸(GABA)とグリシンは、成熟動物の主要な抑制性神経伝達物質である。一方、幼若期には興奮性応答を示す。この違いは、神経細胞の細胞内 Cl^- 濃度依存する。細胞内 Cl^- 濃度は、中枢神経系においては、2種類の輸送体によって制御されているが、成熟に伴って顕著に変化し、興奮性/抑制性の決定に関与するのは、 K^+ , Cl^- 共輸送体(KCC2)であると考えられている。成熟動物ではKCC2の発現量が多く、細胞内 Cl^- 濃度が低く抑えられるため、GABA/グリシンは抑制的に作用するが、幼若期には、KCC2の発現量が極めて少なく、細胞内 Cl^- 濃度が高いために、興奮性に作用する。GABA/グリシンによる興奮性応答はグルタミン酸による興奮性応答に先立って出現し、かつ、この興奮性応答が電位依存性カルシウムチャネルと活性化し、細胞内カルシウム濃度の上昇を招くことから、何らかの形態形成に関与すると考えられている。しかしながら、GABA合成酵素 (glutamic acid decarboxylase; GAD)、GABA放出に関与する分子 (vesicular GABA transporter; VGAT) の完全ノックアウトマウスにおいて、GABAの合成、GABA/グリシンの放出がないにもかかわらず、形態異常が全く見つからないことから、興奮性作用の形態形成への関与について、懐疑的な意見が多数を占めるようになった。

とは言うものの、生命活動において無駄な生理現象は無いとの観点に立てば、何らかの機能は有していると考えることが自然である。我々は、神経損傷後の再生期にもGABA/グリシンが興奮性応答を示し、再生が完了すると元通り抑制性になることから、軸索の伸長、神経の再生に関与するのではないかと仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は3つある。各種神経損傷モデル(切断・縫合以外の損傷)においても同じようはGABA/グリシン応答に変化が生じるか、KCC2の発現量を減少させ、GABA/グリシンの興奮性応答を長くすると神経損傷後の回復が促進されるか、そして神経損傷後の再生を起こす分子のカスケードを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 神経結紮モデルにおける運動機能、神経組織、GABA/グリシン伝達機構、マーカー分子発現の経時的変化に関する研究

以下の方法で実験を行った。

C57Bl/6マウスの坐骨神経を、径が半分程度になるように結紮し、坐骨神経結紮モデルマウスを作製

SFI (Sciatic functional index) を用いた下肢運動検査

走査型電子顕微鏡を用いた坐骨神経組織の経時的変化の解析

GABA/グリシン伝達に関与する3つの分子、GAD, VGAT, KCC2の発現変化の解析

そのほかのマーカー分子の発現変化の解析

ミクログリア、アセチルコリン合成酵素、神経ペプチドガラニン

(2) KCC2の発現量が半減しているKCC2ノックアウトマウスのヘテロ接合体を用いた脛骨神経損傷後の回復に関する研究

以下の項目を野生型とヘテロマウスで比較した。

下肢運動機能検査 (SFI)

再生神経軸索の染色 (ニューロフィラメントの免疫染色)

走査型電子顕微鏡を用いて、坐骨神経組織の経時的変化の解析

マーカー分子の発現変化の解析

ミクログリア、アセチルコリン合成酵素、神経ペプチドガラニン

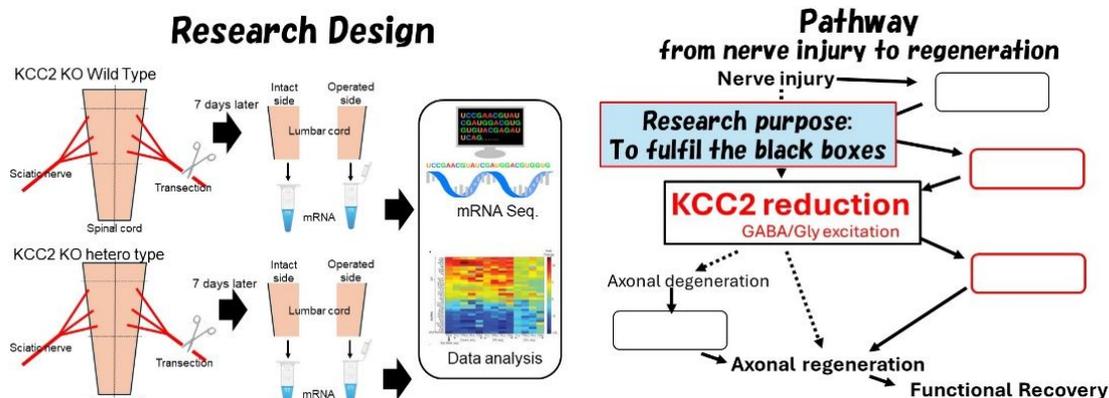
(3) 神経損傷後、神経再生過程で発現を大きく変化させる分子の探索

KCC2ノックアウトマウスのヘテロ接合体並びに野生型マウスの坐骨神経を一側切断

KCC2の発現が最も低下し、再生が開始する7日後に脊髄を抽出

野生型とヘテロ、非手術側、手術側のサンプルから mRNA を抽出し、塩基配列を解析

KCC2の発現低下と連動する分子を探索 (下左図、下右図の空欄分子を探索)



4. 研究成果

(1) 神経結紮モデルにおける運動機能、神経組織、GABA/グリシン伝達機構、マーカー分子発現の経時的変化に関する研究（右図がまとめ）

結紮モデルでは切断モデルと比較して神経の変性・再生が緩やかに進行していた。

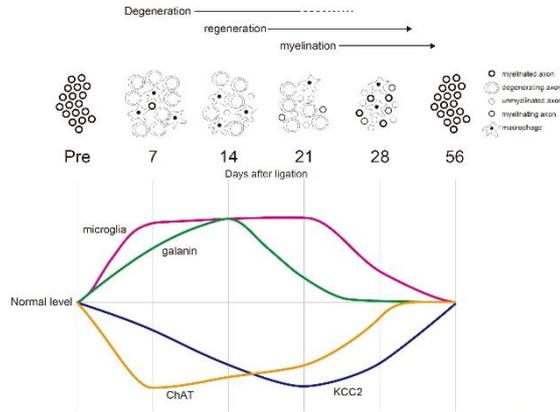
最終的には脛骨神経全体が変性することから、運動障害は大きく、術後7日目から90日目の間で有意な機能回復が認められたものの、90日後においても大きな障害が残った。

神経組織の形態変化、マーカー分子の発現に関する時間的空間的解析を行った結果、「ミクログリアの活性化 KCC2 発現の減少 軸索再生のシグナル経路」が本結紮モデルにおいても認められた。

従って、この経路は神経損傷後に共通する現象であることが明らかになった。

ガラニン、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 2つの分子の動きが、それぞれ、神経軸索の変性と再生を示す客観的指標となることが明らかになった。

以上の研究結果は、Neuroscience Research 誌に掲載された (Yafuso et al. 2022)。



(2) KCC2の発現量が半減している KCC2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体を用いた脛骨神経損傷後の回復に関する研究

KCC2の発現量が半減しているヘテロマウス (HT) では、野生型 (WT) に比べて、以下の点がすぐれていた。

術後のすべての経過において、運動機能障害程度が有意に軽度であった。

軸索の変性は早く進行した。

術後7日目、遠位部に軸索が長く再生していた。(右図：蛍光写真HT>WT)

術後21日目以降、有意に再生有髄軸索が高密度であった。

変性ニューロンのマーカーであるガラニン陽性神経細胞 (運動ニューロン) が有意に少なかった。

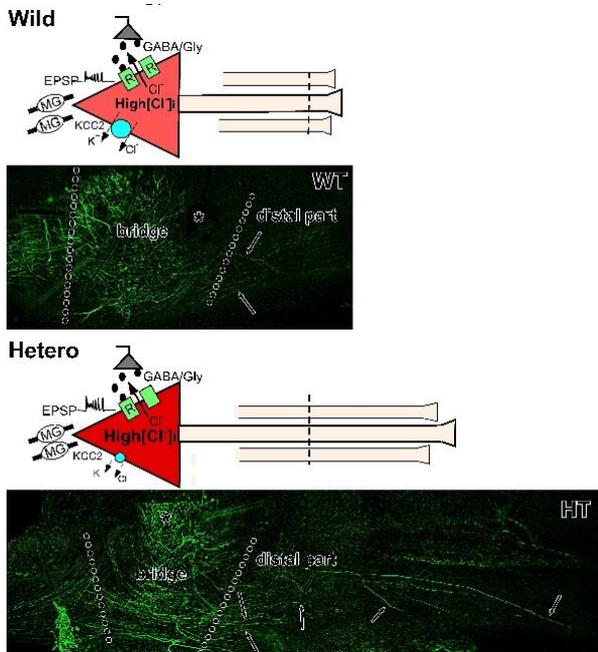
運動ニューロンの機能マーカーであるアセチルコリン合成酵素 (ChAT) の発現量が有意に高く、早期に通常レベルに回復していた。

加えて、ミクログリアは両方で同程度に活性化されていた。

これらのことから、以下の結論が導かれた。

- ヘテロマウスと野生型マウスにおいて、同等にミクログリアが活性化されることからヘテロマウスの方が、常にKCC2の発現量が少ないと予想される。したがって、KCC2の発現低下が軸索の変性・再生・有髄化を促進させ、その結果として運動機能の回復に有効であることが証明された。(上図、イラスト)
- ヘテロマウスでは、もともとKCC2の発現量が半減していることから、GABA/グリシンの応答性が興奮性に変化することも早く、かつ長く興奮性作用が持続していると考えられる。したがって、GABA/グリシンの興奮性作用は、軸索の再生を加速し、運動機能の回復を早めることが明らかになった。

この結果は、Neuroscience誌に受理され、7月号に掲載予定である。(Ando et al. 2024)



(3) 神経損傷後、神経再生過程で発現を大きく変化させる分子の探索

脊髄の摘出、mRNAのSequenceは行ったが、解析は行う事が出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ando Hironobu, Shimizu-Okabe Chigusa, Okura Nobuhiko, Yafuso Tsukasa, Kosaka Yoshinori, Kobayashi Shiiori, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 551
2. 論文標題 Reduced Gene Expression of KCC2 Accelerates Axonal Regeneration and Reduces Motor Dysfunctions after Tibial Nerve Severance and Suturing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 55 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2024.05.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno-Shosaku Takako, Yoneda Mitsugu, Maejima Takashi, Wang Mohan, Kikuchi Yui, Onodera Kaito, Kanazawa Yuji, Takayama Chitoshi, Mieda Michihiro	4. 巻 532
2. 論文標題 Action Sequence Learning Is Impaired in Genetically Modified Mice with the Suppressed GABAergic Transmission from the Thalamic Reticular Nucleus to the Thalamus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 87 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2023.09.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cheung Dennis Lawrence, Toda Takuya, Narushima Madoka, Eto Kei, Takayama Chitoshi, Ooba Tatsuko, Wake Hiroaki, Moorhouse Andrew John, Nabekura Junichi	4. 巻 13
2. 論文標題 KCC2 downregulation after sciatic nerve injury enhances motor function recovery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-34701-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu-Okabe Chigusa, Kobayashi Shiiori, Kim Jeongtae, Kosaka Yoshinori, Sunagawa Masanobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 834 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu-Okabe Chigusa, Okada Shigeki, Okamoto Shiki, Masuzaki Hiroaki, Takayama Chitoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Specific Expression of KCC2 in the Cells of Normal and Type 1 Diabetes Model Mouse Pancreatic Islets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 47 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yafuso Tsukasa, Kosaka Yoshinori, Shimizu-Okabe Chigusa, Okura Nobuhiko, Kobayashi Shiori, Kim Jeongtae, Matsuda Koyata, Kinjo Daichi, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 177
2. 論文標題 Slow progression of sciatic nerve degeneration and regeneration after loose ligation through microglial activation and decreased KCC2 levels in the mouse spinal cord ventral horn	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 52 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Shiori, Shimizu-Okabe Chigusa, Kim Jeongtae, Kosaka Yoshinori, Sunagawa Masanobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of the GABAergic network in the mouse spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Factors Affecting Neurodevelopment - Genetics, Neurology, Behavior, and Diet	6. 最初と最後の頁 273 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-817986-4.00024-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Isabel Sebastin, Nobuhiko Okura, Bruno M Humbel, Jun Xu, Idam Hermawan, Chiaki Matsuura, Malgorzata Hall, Chitoshi Takayama, Tetsu Yamashiro, Shuichi Nakamura, Claudia Toma	4. 巻 23(9)
2. 論文標題 Disassembly of the apical junctional complex during the transmigration of Leptospira interrogans across polarized renal proximal tubule epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安藤博之、清水千草、屋富祖司、小坂祥範、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl-共輸送体2(KCC2)の発現低下によるGABA/グリシンの興奮性と、脛骨神経損傷後の再生との関係
3. 学会等名 第129回日本総会解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高山千利
2. 発表標題 学生によりそった組織学実習を目指して
3. 学会等名 第129回日本総会解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高山千利
2. 発表標題 New GABA/glycine functions revealed in the gene targeted mice
3. 学会等名 ICGSK2023：韓国遺伝学会国際学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤博之、清水千草、屋富祖司、小坂祥範、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl-共輸送体2(KCC2)の発現低下は、損傷脛骨神経の再生を促進し、運動障害を軽減する
3. 学会等名 日本解剖学会 第79回九州支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山千利
2. 発表標題 組織学教育の現状と問題点 - 琉球大学の取り組み -
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水千草、岡田滋喜、岡本土毅、益崎裕章、高山千利
2. 発表標題 Specific expression of K+-Cl- cotransporter(KCC2) in in the cells of normal and type 1 diabetes model mouse pancreatic islets
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl- 共輸送体2(KCC2)の発現減少は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 第70回日本理学療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水千草、岡田滋喜、岡本土毅、益崎裕章、高山千利
2. 発表標題 膵臓ランゲルハンス島におけるGABA生合成酵素及びK+-Cl-共輸送体の局在と糖尿病モデルでの発現変化
3. 学会等名 日本解剖学会第78回九州支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水千草、岡田滋喜、岡本土毅、益崎裕章、高山千利
2. 発表標題 臍島におけるGABA生合成酵素及びK ⁺ -Cl ⁻ -共輸送体(KCC2)の局在と糖尿病モデルマウスでの発現変化
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 K ⁺ -Cl ⁻ -共輸送体2(KCC2)の発現減少は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 第70回日本理学療法学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Chitoshi Takayama.
2. 発表標題 Contribution of reduced KCC2 to nerve regeneration.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水千草、岡田滋喜、岡本土毅、益崎裕章、高山千利
2. 発表標題 臍島におけるGABA合成酵素及びKCC2の局在と糖尿病モデルマウスでの発現変化
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清水 千草 (SHIMIZU Chigusa) (70435072)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------