

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890130

研究課題名（和文） 海馬長軸方向における構造的・機能的差異

研究課題名（英文） Patterns of expression of Kv1.3 and Kv1.5 in the mouse brain

研究代表者

山田 純 (YAMADA JUN)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70582708

研究成果の概要（和文）：

電位依存性カリウムチャンネルサブユニットであるKv1.3とKv1.5は、マウスの腹側海馬・背側海馬で発現が見られない。一方で、Kv1.3とKv1.5は神経傷害後の活性化ミクログリアに発現していた。ミクログリアにおけるKv1.3とKv1.5の発現時期は、障害性ミクログリアのマーカーであるリン酸化p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（p-p38 MAPK）の発現時期と一致していた。抗生物質であるミノサイクリンの投与は、ミクログリアにおけるKv1.3とKv1.5、p-p38 MAPKの発現レベルを低下させるとともに、傷害に伴って生じる神経細胞死を抑制した。本研究の結果は、ミクログリアにおけるカリウムチャンネルの重要性を提示し、Kv1.3およびKv1.5の阻害薬が神経保護薬として作用する可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Immunoreactivity for voltage dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 was not observed in the mouse hippocampus. On the other hand, Kv1.3 and Kv1.5 were most highly expressed in microglia after neuronal injuries. Proliferating microglia were not labeled by Kv1.3/Kv1.5, but microglia expressing phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK), markers for neurotoxicity, were Kv1.3/Kv1.5-positive. Minocycline-treatment suppressed expression of Kv1.3/1.5 and p-p38 MAPK in microglia. These findings suggest that microglia expressing Kv1.3/1.5 and p-p38 MAPK can be a potential therapeutic target against neuronal death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般

キーワード：Kv1.3 Kv1.5 カリウムチャンネル ミクログリア ミノサイクリン

1. 研究開始当初の背景

(1)海馬の神経結合は長軸方向で異なり、背側海馬は記憶、腹側海馬は情動と結びついている。近年の研究によって、長期増強や脳波などの神経ネットワーク活動あるいは個々の神経細胞の分子発現にも長軸方向の差異が存在することが報告されている。

(2)カリウムチャンネルは、細胞の膜特性、発火特性、神経伝達物質の放出などの生理的現象や長期増強などのネットワーク活動に関与する重要なチャンネルである。

(3)これまでのところ電位依存性カリウム(Kv)チャンネルサブユニット発現の詳細な解析は行われていなかった。特に、Kv1.3、Kv1.5のサブユニットについては詳細な報告がなく、本研究ではこの二つのサブユニットを中心として、種々のカリウムチャンネルサブユニット(Kv1.3、Kv1.5、Kv2.1、Kv3.1、Kv3.2、Kv4.2、Kv4.3、Kir2.1)の発現を解析する計画であった。

2. 研究の目的

(1)本研究の目的は、海馬の長軸方向に見られる機能的・構造的不均一性の解明を通して、海馬が高次脳機能を支えるメカニズムの一端を明らかにすることである。

(2)本研究では海馬におけるカリウムチャンネルの分布について解剖学的、あるいは電気生理学的情報を得ることができるため、イオンチャンネルをターゲットとした創薬や高次脳機能の制御といった観点からも重要な意義を持つと考えている。

3. 研究の方法

(1)動物

成熟雄 C57BL/6J マウス(8-11 週齢)を使用した。

(2)免疫組織化学

4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、40 μ mの切片を作成し、以下に示す一次抗体で免疫組織化学染色を行った。

Anti-Kv1.3 (mouse, monoclonal; 1:5000)、
Anti-Kv1.5 (mouse, monoclonal; 1:5000)、
Anti-Kv2.1 (mouse monoclonal; 1:5000)、
Anti-Kv3.1 (rabbit polyclonal; 1:2000)、
Anti-Kv3.2 (rabbit polyclonal; 1:2000)、
Anti-Kv4.2 (mouse monoclonal; 1:5000)、
Anti-Kv4.3 (mouse monoclonal; 1:5000)、
Anti-Kir2.1 (mouse monoclonal; 1:5000)、
Anti-Ibal (rabbit polyclonal; 1:10000)、
Anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (mouse monoclonal; 1:2000)、
Anti-phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK) (rabbit monoclonal; 1:5000)。

(3)カイニン酸痙攣

マウスにカイニン酸(30mg/kg)を投与し、痙攣を起こした。明らかな痙攣症状が見られたマウスを解析に使用した。

(4)舌下神経軸索切断

マウスの片側舌下神経末梢側枝を切断した。

4. 研究成果

(1)はじめに、種々のカリウムチャンネルサブユニット(Kv1.3、Kv1.5、Kv2.1、Kv3.1、Kv3.2、Kv4.2、Kv4.3、Kir2.1)の海馬における発現を網羅的に探索した。特にこれまでの報告がほとんどない、Kv1.3、Kv1.5の解析を行った。すると、ほかのチャンネルサブユニットは正常な海馬における発現が見られたが、Kv1.3、Kv1.5は正常な海馬での発現がなかった。

(2)種々の脳障害によって、チャンネルの動態は大きく変化することが知られている。そこで、

カイニン酸投与によって実験的痙攣モデルを作成し、チャンネル発現の変化を解析した。痙攣後 3~7 日目において、海馬 CA3・CA1 領域を中心に Kv1.3、Kv1.5 の発現が見られた。Kv1.3、Kv1.5 は海馬錐体細胞・介在細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトには発現していなかった。一方で、ミクログリアマーカーである Iba1 と一致していたことから、ミクログリア特異的に発現することが分かった。Kv2.1、Kv3.1、Kv3.2、Kv4.2、Kv4.3、Kir2.1 の活性化ミクログリアにおける発現は確認されなかった。

(3) カリウムチャンネル発現の詳細と機能的意義を解明するために、舌下神経切断モデルでの解析を行った。舌下神経切断では、ミクログリアは増殖・神経細胞の包囲といった典型的な挙動を示すので、古典的なミクログリア活性化モデルとして広く用いられている。また、傷害後 14 日目以降にゆっくりとした神経細胞死が起こることが知られている。舌下神経切断後 3 日目のミクログリアは、増殖マーカーである PCNA を発現していたが、7 日目以降には、増殖性ミクログリアはほとんど見られなかった。傷害後 3 日目のミクログリアはいわゆる活性化型の形態を示した。一方で、7 日目以降のミクログリアは障害性ミクログリアのマーカーであるリン酸化 p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (p-p38 MAPK) を発現していた。7 日目のミクログリアは細胞体が肥大化した形態を示しており、14 日目のミクログリアも静止型とは異なる活性化形態を示していた。

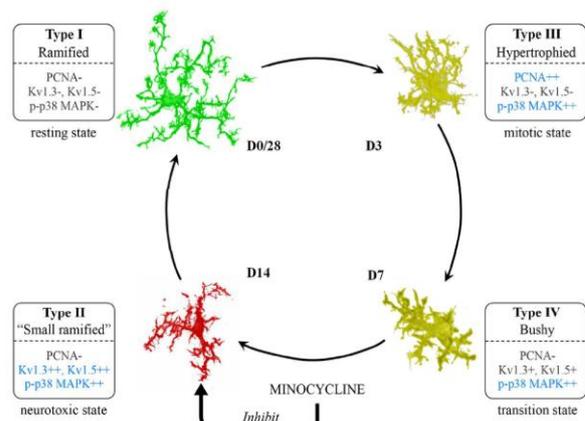
(4) Kv1.3、Kv1.5 はともに、正常な舌下神経核のニューロンやグリアにおいて発現は見られない。また、舌下神経切断後 3 日目のニューロンやミクログリアには発現していなかった。一方で、舌下神経切断後 7~14 日目には Kv1.3、Kv1.5 の発現が見られ、それはミク

ログリア特異的に発現していた。傷害後 28 日目には、発現レベルが低下していた。

(5) したがって、傷害後 7 日目以降の神経障害的性質を持つミクログリアにおいて、Kv1.3、Kv1.5 が発現している可能性が示唆される。

(6) 抗生物質であるミノサイクリンは、ミクログリアの活性化を抑えることが知られている。しかし、その作用機序は解明されていない。そこで、ミノサイクリンの投与が神経の生存とミクログリアのカリウムチャンネル発現にどのような影響を与えるのかを解析した。舌下神経軸索切断後のミノサイクリンの投与は、神経細胞の脱落を抑制した。ミノサイクリンの投与は、ミクログリアの PCNA 発現と細胞増殖には全く影響を与えなかった。しかしながら、Kv1.3、Kv1.5 および p-p38 の発現レベルを有意に低下させた。

(7) 以上のことから、ミノサイクリンの神経保護効果は、Kv1.3、Kv1.5 チャンネルの発現抑制と p-p38 の発現低下に関与している可能性が示唆される。本研究の結果は、以下の図のようにまとめられる。



(8) 本研究の結果は、Kv1.3 および Kv1.5 の阻害薬が神経保護薬として作用する可能性を示唆している。ミクログリアのイオンチャンネルをターゲットとした創薬の観点から、新たな標的分子を提示することができる。

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 3 件)

① Jinno Shozo, Yamada Jun. (2012) Using comparative anatomy in the axotomy model to identify distinct roles for microglia and astrocytes in synaptic stripping. *Neuron Glia Biol.* In press. (査読有)

② Yamada Jun, Jinno Shozo. (2011) Alterations in neuronal survival and glial reactions after axotomy by ceftriaxone and minocycline in the mouse hypoglossal nucleus. *Neurosci Lett.* 504:295-300. (査読有)

③ Yamada Jun, Nakanishi Hiroshi, Jinno Shozo. (2011) Differential involvement of perineuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy. *Neuroscience.* 2011 182:1-10. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 山田純、神野尚三 S100A6は活性化アストロサイトと神経幹細胞の選択的マーカーである 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨、2012年3月

② 関善弘、山田純、神野尚三 ペリニューロナルネットを有するニューロンの神経化学的多様性 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨、2012年3月

③ Yamada Jun, Jinno Shozo. Time course alterations in immunophenotypic and morphological features of microglia following hypoglossal axotomy in mice. 第

34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月

④ Yamada Jun, Nakanishi Hiroshi, Jinno Shozo. Differential involvement of astrocytes and microglia in neuronal survival after hypoglossal nerve axotomy. The 29th Naito conference on glia world, kanagawa, Japan, 2010, 10月

[図書] (計 1 件)

① Yamada Jun, Jinno Shozo, Nakanishi Hiroshi. (2012) Synaptic stripping and beyond: microglia or astrocyte? Microglia: Biology, Functions and Roles in Disease, Nova Science publishers.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 純 (YAMADA JUN)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70582708