

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500413

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた幼弱期 GABA シグナルの機能に関する分子形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of the GABA function using knockout mice lacking of molecules involved in 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) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：(1) GABAニューロン、シナプス、排出機構の脊髄における時間的空間的発達変化を明らかにし、ノックアウトマウス解析のための指標を作成した。(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。運動神経核において幼弱期に逆戻りすることから、神経再生にGABAが関与する可能性が強く示唆された。(3) GABAシグナルに関与する3つの分子(GAD、VGAT、KCC2)のノックアウトマウスを解析した。その結果、脊髄の後角において、カルビンジン、カルレチニン陽性介在ニューロンの分布、数に異常が認められたことから、GABAは、介在ニューロンの移動、生存に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. We investigated the ontogeny of GABAergic neurons, GABAergic synapses, and GABA removal system in the developing mouse spinal cord as the normal control of knockout mice. 2. We investigated the changes in GABAergic signaling during degeneration and regeneration of hypoglossal and facial nerves. We found that GABAergic signaling changed to the immature form during regeneration, suggesting that GABA may act as an excitatory transmitter and be involved in regeneration of axons. 3. We morphologically investigated the knockout mice lacking three molecules involved in GABAergic signaling, glutamic acid decarboxylase (GAD), vesicular GABA transporter (VGAT), and potassium chloride cotransporter (KCC2). We found that the number and localization of calbindin-positive or calretinin-positive interneurons in the dorsal horn of spinal cord of three types of knockout mice, suggesting that GABA might be involved in migration and proliferation of interneurons in the spinal cord during development.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：GABAergic signaling GAD VGAT KCC2 GABAergic synapse GABA transporter spinal cord calbindin

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 の作用を興奮性に変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 9 件)

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

Kim J, Kosaka J, Shimizu-Okabe J, Niizaki A, Takayama C*. (2014) Characteristic development of the GABA-removal system in the mouse spinal cord. *Neuroscience* 査読有, 262, 14: 129-142

Takayama C*, Kim J, GABAergic signaling during regeneration of peripheral nerve. (2013) *Facial N Res Jpn.* 査読有, 33: 1-4

Kobayashi S, Takayama C, Ikeda Y (2013) Distribution of glutamic acid decarboxylase immunoreactivity within the brain of oval squid *Sepioteuthis lessoniana*. *Aquatic Biology* 査読有 19: 97-109

Kobayashi S, Takayama C, Ikeda Y, (2013) Ontogeny of the brain in oval squid *Sepioteuthis lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae) during the post-hatching phase. *JMBA* 査読有 93; 1663-1671.

Kosaka Y, Kin H, Tatetsu M, Uema I, Takayama C* (2012) Distinct development of GABA system in the ventral and dorsal horns in the embryonic mouse spinal cord. *Brain Res* 査読有 1486:39-52.

Tatetsu M, Kim J, Kina S, Sunakawa H, Takayama C* (2012) GABA/glycine signaling during degeneration and regeneration of mouse hypoglossal nerves. *Brain Res* 査読有 1446:22-33.

Egawa K, Kitagawa K, Inoue K, Takayama M, Takayama C, Saitoh S, Kishino T, Kitagawa M, Fukuda A (2012) Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 査読有 4:163ra157.

Yang M, Kim J, Kim T, Kim SH, Kim JC, Takayama C, Hayashi A, Joo HG, Shin T, Moon C (2012) Possible involvement of galectin-3 in microglial activation in the hippocampus with trimethyltin treatment. *Neurochem Int* 査読有 61:955-962.

[学会発表](計 19 件)

Jeongtae Kim, Chitoshi Takayama, GABAergic Signaling during Degeneration and Regeneration of Mouse

Facial Nerves. 2013KSVS International Symposium on One Health and the Role of Veterinary Medicine. 2013年10月10日、The Korean Society of Veterinary Science. The-K Hotel, Seoul.

Chigusa Shimizu-Okabe, Aya Niizaki, Masato Kobayashi, Chitoshi Takayama, GABAergic System in the hypothalamus、分子からみたエネルギーバランスと摂食行動の制御、第36回内藤コンファレンス2013年9月10日~9月13日、札幌市 Akihito Okabe(岡部明仁), Akiko Arata 荒田晶子, Chigusa Shimizu-Okabe(清水-岡部千草), Shiro Konishi(小西史朗), Atsuo Fukuda(福田敦夫), Chitoshi Takayama(高山千利)、マウス舌下神経核における吸息性リズム発火の発達変化。Developmental changes in the respiration-related rhythmic activity in mouse hypoglossal nucleus.、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日~6月23日、国立京都国際会館

Jeongtae Kim (金正泰), Chitoshi Takayama(高山千利)、顔面神経損傷後のマウスにおける GABA シグナルの変化 GABAergic signaling during degeneration and regeneration of mouse facial nerves、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日~6月23日、国立京都国際会館

Chitoshi Takayama(高山千利)、Jeongtae Kim (金正泰), Yoshinori Kosaka (小坂祥範) Chigusa Shimizu-Okabe(清水千草) Aya Nizaki(新崎綾)、マウス脊髄における GABA 排出機構の発達変化。Distinct development of GABA removing system in the ventral and dorsal horns in the mouse spinal cord.、2013年6月20日~6月23日、第36回日本神経科学大会

高山千利、末梢神経再生時の GABA シグナルについて、第36回日本顔面神経研究会総会・学術講演会 特別講演、2013年4月26日 ロワジールホテル(沖縄)

江川潔, 北川恭子, 井上浩一, 高山理和, 高山千利, 斉藤伸治, 木住野達也, 北川正敏, 福田敦夫、母性 Ube3a 欠失マウス小脳顆粒細胞における GABA トランスポーター過剰によるトニック抑制の減弱と小脳機能障害、第59回中部生理学会、11月16日-11月17日 2012、岡崎生理学研究所

新崎綾, 清水千草, 高山千利、視床下部における GABA 作動性神経回路の形態学的解析、日本解剖学会第68回九州支部学術集会、10月13日 2012、久留米大学

金武秀道 高山千利、Developmental changes in GABA signaling in the embryonic trigeminal nucleus (マウス脳幹三叉神経核における GABA シグナル

の発達変化)、第11回アジア太平洋神経化学学会大会・第55回日本神経化学学会大会、9月30日-10月2日 2012、神戸国際会議場

砂川昌信, 金正泰, 高山千利、Development of Embryonic mouse spinal cord、第11回アジア太平洋神経化学学会大会・第55回日本神経化学学会大会、9月30日-10月2日 2012、神戸国際会議場

吉田祥子, 山田ひかり, 栗本侑依, 小林和仁, 高山千利, 山本清二, 福田敦夫, 穂積直裕: 発達期小脳皮質のグリアからの GABA 放出はトランスポーターで制御される。第35回日本神経科学大会、9月18日-9月21日 2012、名古屋国際会議場 高山千利, 小坂祥範、マウス胎児脊髄における GABA システムの発達、第35回日本神経科学大会、9月18日-9月21日 2012、名古屋国際会議場

金正泰, 砂川昌信, 高山千利、Development of Embryonic mouse spinal cord(マウス胎児脊髄における発達変化)、第35回日本神経科学大会、9月18日-9月21日 2012、名古屋国際会議場

仲宗根綾乃, 高山千利、脊髄発達過程における 416 セリンリン酸化 Tau (PS416-Tau)の局在変化、日本解剖学会第67回九州支部学術集会、2011.10.22、宮崎大学

上間一樹, 高山千利、マウス脊髄における GABA シナプスの生後発達、日本解剖学会第67回九州支部学術集会、2011.10.22 宮崎大学

岡部明仁, 荒田晶子, 清水-岡部千草, 高山千利, 小西史朗, 福田敦夫、マウス舌下神経核における呼吸様リズム発火における Cl-ホメオスタシスの生後発達変化、第34回日本神経科学大会、2011.9.14-9.17、パシフィコ横浜

栗本侑依, 米澤優, 小林和人, 穂積直裕, 高山千利, 福田敦夫, 山本清二, 吉田祥子、培養小脳グリア細胞における GABA 制御にはトランスポータータンパク質が関与している、第34回日本神経科学大会、2011.9.14-9.17、パシフィコ横浜

Jeongtae Kim, 高山千利、脊髄損傷後のマウスにおける GABA シグナルの変化 The changes in GABA signaling after spinal cord injury. 第34回日本神経科学大会、2011.9.14-9.17、パシフィコ横浜

Shiori Kobayashi, Chitoshi Takayama and Yuzuru Ikeda, Distribution of glutamic acid decarboxylase(GAD) immunoreactivity in oval squid brain. International ethological conference, 7月27日 2011 Indiana University

〔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://w3.u-ryukyu.ac.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

岡部 明仁 (OKABE Akihito)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10313941