

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500444

研究課題名(和文)小脳皮質の葉形成過程における時空間的に制御されたGABAの役割とその変遷

研究課題名(英文)The role of ambient GABA in cerebellar foliation

研究代表者

熊田 竜郎 (KUMADA, Tatsuro)

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00402339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：生後初期の小脳における葉形成期にはGABA-A受容体の発現分布とGABA-A受容体を介する応答性(興奮性)がダイナミックに変化するが、その発達過程における役割についてはよく分かっていない。我々は共同開発した細胞外GABAイメージング法を用いて十葉構造が出現する時期(生後0週齢)に合わせて一過性に細胞外GABAが小脳外顆粒層に著増することを見出し、この作用がin vivoで小脳顆粒前駆細胞の増殖に関与することを明らかにした。また、小脳顆粒前駆細胞の増殖に関わる分子であるSonic hedgehogシグナルとの関連性について、免疫組織学およびカルシウムイメージング法にて検討した。

研究成果の概要(英文)：Although distribution of GABA-A receptors and GABA-A receptor-mediated responses (excitability) are dynamically changed during stages of cerebellar morphogenesis, its roles on foliation and lobulation of cerebellar cortex have still remained unknown. Here, we addressed this issue by using various imaging methods and in vivo blockade experiments. Optical imaging method of extracellular GABA linked to enzymatic reaction of GABAse enabled us to show temporal abundance of ambient GABA in the outer EGL region which have Granule precursor cells (GPCs). We also show that in vivo blockade of GABA-A receptor perturbed the proliferation of these GPCs in the posterior vermis of the early neonatal cerebellum. Furthermore, we have investigated the interaction between GABA-A receptor and sonic hedgehog (SHH) signaling by histochemical and Calcium imaging technique and suggested that SHH signaling seemed not to affect the GABA-A receptor-mediated responses.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学(神経化学・神経薬理学)

キーワード：小脳 細胞外GABA

1. 研究開始当初の背景

神経発達期の未熟な神経細胞は、シナプスを形成する前より、しばしば、その発達のプロセス(細胞分化や細胞移動、神経突起形成など)に特異的な自発的かつ律動的な神経活動(自発的な Ca^{2+} 振動や(活動)電位の発生など)を示し、その神経活動に依存して発生プログラムが実行される(Komuro H. & Rakic P. *J. Neurobiol.* 1998; Zhasng L. & Poo M. M. *Nat. Neurosci.* 2001; Komuro H. & Kumada T. *Cell Calcium* 2005; Spitzer N. C. *Nature* 2009 など)。生後における小脳顆粒細胞は、このような神経活動に依存して発達していくモデルとしてよく研究されている(Shibata R. et al. *J. Neurosci.* 2000; Kumada T. & Komuro H. *PNAS* 2004; Nakanishi S. *J. Physiol.* 2006; Kumada T. et al. *J. Neurosci.* 2006; Guan C. B. et al. *Cell* 2007 など)。細胞外(微小環境)にある神経伝達物質は、この神経活動を変化させて神経発生に貢献する候補として(Komuro H. & Rakic P. *Science* 1992 など)重要な役割を担う。

抑制性神経伝達物質である GABA は、脳の発達期にある未熟な神経細胞では細胞内 Cl^- 濃度が高いため Cl^- の流出が起こり興奮性に作用する(Rivera C. et al., *Nature* 1999; Yamada J. et al. *J Physiol* 2004; Fiumelli H. et al. *Neuron* 2005 など)。この興奮性に働く GABA は、シナプス外にある受容体に緊張的(トニック)に作用して、中枢神経系の発生・発達に寄与することが明らかになってきた(Ben-Ari Y. *Nat Rev Neurosci* 2002; Ge S. et al. *Nature* 2005; Achilles K. et al. *J. Neurosci.* 2007; Spitzer N. C. *J Physiol* 2010 など)。生後初期の小脳においても GABA_A 受容体の発現分布がダイナミックに変化する(Laurie D. J. et al. *J Neurosci*, 1992 など)が、その発達過程における役割についてはよく分かっていなかった。

申請者は、共同研究者である橋科学技術大学の吉田祥子先生らと共に細胞外 GABA 濃度の時空間的变化をイメージングする技術を開発・発展させ(特許:吉田祥子)生後直後のラットの小脳皮質の外顆粒層で細胞外 GABA 濃度が高くなることを明らかにしていた(Morishima T. et al. *Neurosci. Res.* 2010)。齧歯類において生後直後の小脳では、その葉形成が進み十葉構造が生じる時期に相当する(Sudarov A. & Joyner A. *Neural Dev* 2007)。そこで、細胞外 GABA 濃度上昇の生理学的な役割を調べるため GABA_A 受容体の拮抗的阻害剤の投薬を申請前の予備的実験として行ったところ小脳顆粒細胞の分裂を抑える事を見出した。

2. 研究の目的

本研究課題では小脳の葉形成と細胞外 GABA の時空間的な関係を明らかにする。そして生後初期の小脳外顆粒層の分裂における細胞外 GABA の役割を見出すことを目的とす

る。

3. 研究の方法

(1)細胞外 GABA 濃度の時空間的变化の計測:生後 0 週齢の Wister ラットより急性小脳スライス標本を作成後、カスタムメイドの細胞外 GABA イメージング装置を用いて、小脳各領域における細胞外 GABA 濃度の計測を行った。必要時に投薬を行い、経時的な変化を調査した。

(2)Elvax 樹脂による GABA_A 受容体の拮抗的阻害剤の投薬:試薬を徐放性に放出することができる Elvax 樹脂の薄片を作製した。作製時に投薬に使用した試薬(GABA_A 受容体の拮抗的阻害剤(Bicuculline methiodide)など)を添加した。生後 3 日齢のラットの後頭部を麻酔下で開頭し、試薬を含む Elvax 樹脂を頭蓋骨下に小脳上に被るようにインプラントした。

(3)小脳皮質形成の評価:麻酔後灌流固定したラットより小脳を取り出し、凍結切片を作製した。切片をクリスタルバイオレット液で染色して各葉の観察を行った。

(4)組織染色法:(3)と同様に凍結切片を作製後、免疫組織染色法や *in situ* hybridization 法により候補分子やマーカー分子の発現と分布を調査した。

(5)細胞培養とカルシウムイメージング:ラット小脳を取り出し初代培養を行った。カルシウムイオンの蛍光指示薬である Oregon Green BAPTA-1, AM を初代培養細胞に負荷した後、タイムラプス蛍光観察法により細胞内のカルシウムイオン濃度の経時的な変動を観察した。

4. 研究成果

(1)細胞外 GABA 濃度の時空間的な変化と小脳の葉形成の関係性についての検討:生後 0~1 週齢のラットから調整した急性小脳スライス標本を用いて細胞外 GABA イメージングを行ったところ、生後 1 週齢以内のラットの小脳皮質において外顆粒層の表層側(oEGL)で細胞外 GABA 濃度が著しく高くなり、1 週齢以降では消失することが確認できた。外顆粒層の表層側では分裂中の小脳顆粒前駆細胞で占められるため、細胞外 GABA が細胞分裂に関与する可能性が示唆された。各葉での細胞外 GABA 濃度の分布については違いが認められたが、励起光照射法などのイメージング法自体の問題の改良に現時点で限界があり、各葉間での濃度差についての比較は出来ず、今後の課題として残った。また、ラットと異なり、マウスの小脳では細胞外 GABA に相当するシグナルがほとんど検出されず、細胞外 GABA 濃度の分布に種差があることが示唆された。

(2) 生後初期の小脳外顆粒層における細胞外 GABA を放出するソースの同定: ラット小脳外顆粒層では GABA ニューロンがまだ存在しないにも関わらず、生後初期に一過性に細胞外 GABA 量の増加が認められた。これまで免疫組織染色法からグリア細胞の1種であるバグマングリア細胞が細胞外 GABA のソースとなりうる可能性を見出してきた。さらに、2 光子励起顕微鏡による免疫組織染色像の観察や二重 *in situ* hybridization 法などによりバグマングリアが一過性に GABA 合成酵素の1種である GAD65 遺伝子を発現し、細胞外 GABA のソースとなることを明らかにした。また、細胞外 GABA イメージングと薬理実験を組み合わせることにより、バグマングリア細胞から放出させる分子としてアニオンチャンネルが重要な候補分子となることが分かった。

(3) 細胞分裂に関わる分子との関係性についての検討: Elvax 樹脂により GABA_A 受容体の拮抗的阻害剤を投薬した動物では、小脳の葉形成の不全が認められた。細胞分裂に関わるマーカー分子に対する抗体を用いた免疫組織化学実験から、GABA_A 受容体拮抗阻害剤投薬動物では、PCNA や Cyclin D1 などの発現量が低下することが示唆された。一般に小脳顆粒前駆細胞の分裂には、Sonic hedgehog (SHH) が寄与することが知られている。近年、この SHH が細胞内カルシウム変動に影響を与えることが報告されている (Belgacem Y. H. & Borodinsky, R. 2011) ことから、細胞分裂を調節する共通経路の存在を仮定して *in vitro* 培養系とカルシウムイメージング法を用いた実験を行った。検証する培養系の条件設定を行いながらカルシウムイメージングを行ってきたが、これまでのところ、SHH を投与しても著しい細胞内カルシウムイオン濃度の変化自体は認められていない。しかし、GABA_A 受容体・SHH 共にカルシウム変動のリズムに影響を及ぼすことが報告されていることから、より長期にわたる培養・観察で詳細に検討する必要があると考えられる。

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 6 件)

Qian, T., Chen, R., Nakamura, M., Furukawa, T., Kumada, T., Akita, T., Kilb, W., Luhmann, H. J., Nakahara, D., and Fukuda, A. Activity-dependent endogenous taurine release facilitates excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats. *Front. Cell Neurosci.* 2014, 8:33. doi: 10.3389/fncel.2014.00033. 査読有り

Nakamura, K., Kodera, H., Akita, T., Shiina, M., Kato, M., Hoshino, H., Terashima, H., Osaka, H., Nakamura, S., Tohyama, J., Kumada, T., Furukawa, T., Iwata, S., Shiihara, T., Kubota, M., Miyatake, S., Koshimizu, E., Nishiyama, K., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Hayasaka, K., Ogata, K., Fukuda, A., Matsumoto, N., and Saitsu, H. De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a G_o Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 93:496-505. 2013. 査読有り

Wang, T., Kumada, T., Morishima, T., Iwata, S., Kaneko, T., Yanagawa, Y., Yoshida, S. and Fukuda, A. Accumulation of GABAergic neurons, causing a focal ambient GABA gradient, and downregulation of KCC2 are induced during microgyrus formation in a mouse model of polymicrogyria. *Cereb. Cortex* 24: 1088-1101. 2014 査読有り

Wei, B., Kumada, T., Furukawa, T., Inoue, K., Watanabe, M., Sato, K. and Fukuda, A. Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl⁻ homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroscience* 228: 334-348, 2013 査読有り

Hirata, T., Kumada, T., Kawasaki, T., Furukawa, T., Aiba, A., Conquet, F., Saga, Y. and Fukuda, A. Guidepost neurons for the lateral olfactory tract: Expression of metabotropic glutamate receptor 1 and innervation by glutamatergic olfactory bulb axons. *Dev. Neurobiol.* 72:1559-1576, 2012 査読有り

Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada, J., Wang, T., Inoue, R. and Fukuda, A. Taurine inhibits the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl⁻ homeostasis via the with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287: 20839-20850, 2012

[学会発表](計 19 件)

Kumada, T., Nakanishi, Y., Furukawa,

T. and Fukuda, A. Regional difference in GABA_A Receptor Mediated Ca²⁺ responses of radially migrating neurons in the mouse embryonic neocortex. The 23th CDB meeting, Kobe, Japan, 1/22-23, 2013

熊田竜郎, 中西康彦, 古川智範, 福田敦夫: 大脳皮質の発生過程における移動神経細胞の領域特異的な GABA_A 受容体応答. 第 40 回日本脳科学学会, 浜松, 2013

Kumada, T., Qian, T., Nakamura, M., Furukawa, T., Yamada, J., Akita, T., Kilb, W., Luhmann, H.J., Nakahara, D. and Fukuda, A.: Activity dependent release of taurine facilitates the excitatory neurotransmission in the marginal zone of developing cerebral cortex. 第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013

熊田竜郎: マウス大脳皮質の移動神経細胞における領域特異的な GABA_A 受容体応答. 文部科学省科学研究費補助金「新学術領域・動く細胞と秩序」第 7 回領域班会議, 名古屋, 2013

熊田竜郎, 千太哲, 中村直人, 古川智範, Werner Kilb, Heiko J Luhmann. 中原大一郎, 福田敦夫: 活動依存的な内因性タウリンの放出が新生ラット大脳新皮質辺縁帯の興奮性シナプス伝達を促進する. 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 3/27-29, 2013.

熊田竜郎: マウス大脳皮質の移動神経細胞における領域特異的な GABA_A 受容体応答. 冬の班会議, 神戸, 2013

Kumada, T., Wei, B., Furukawa, T., Inoue, K., Watanabe, M., Sato, K. and Fukuda, A. Pre- and post-synaptic switches of GABA actions in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. The 12th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium Hamamatsu Meeting, Hamamatsu, Japan, 9/26, 2012

Fukuda, A., Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T. and Inoue, R. Intracellular taurine inhibits the functioning of KCC2 protein by phosphorylation via with-no-lysine (WNK) protein kinase

pathway. The 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.

熊田竜郎, 千太哲, 中村直人, 古川智範, Kilb Werner, Luhmann Heiko J., 中原大一郎, 福田敦夫: 活動依存的な内因性タウリンの放出が新生ラット大脳新皮質辺縁体の興奮性シナプス伝達を促進する. 生理学研究所研究会, 岡崎, 2012

熊田竜郎, 中西康彦, 古川智範, 江川潔, 福田敦夫: マウス大脳皮質の移動神経細胞における領域特異的な GABA_A 受容体応答. 第 59 回中部生理学会, 岡崎, 2012.

熊田竜郎, 中西康彦, 古川智範, 江川潔, 福田敦夫. 胎仔脳の移動細胞におけるカルシウム振動の領域による相違. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9/18-21, 2012.

熊田竜郎: 発達期大脳皮質における細胞外 GABA とタウリンの分布の違いとそれに伴う移動神経細胞の異なる GABA_A 受容体応答. 平成 24 年度新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」夏の班会議, 神奈川, 2012

井上浩一, 古川智範, 熊田竜郎, 福田敦夫: タウリン-WNK-SPAK/OSR1 シグナルによる神経特異的なイオン輸送体 KCC2 の活性制御と大脳皮質構築への影響の検討. 平成 24 年度新学術領域「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」夏の班会議, 仙台, 2012.

Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T., Inoue, R. and Fukuda, A. Taurine prevents KCC2 from functioning in a phosphorylation-dependent manner to render embryonic Cl⁻ homeostasis. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, 2011.

熊田竜郎: 発達期大脳皮質における細胞外 GABA とタウリンの分布の違いとそれに伴う移動神経細胞の異なる GABA_A 受容体応答. 平成 23 年度新学術領域「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」の班会議, 大阪, 2011

中西康彦, 熊田竜郎, 古川智範, 江川潔, 福田敦夫. 胎仔脳の移動細胞におけるカルシウム振動の領域による相違. 第 89 回日本生理学会大会, 長野, 2012.

福田敦夫, 井上浩一, 古川智範, 山田順子, 熊田竜郎, 王 天英, 井上利恵子. 細胞内タウリンによる KCC2 蛋白活性のリン酸化を介した修飾. 第 89 回日本生理学会大会, 長野, 2012

Fukuda, A., Wang, T., Kumada, T., Morishima, T. and Yanagawa, Y. Temporal paracrine GABA and KCC2 downregulation underlie the formation of microgyrus in a model of focal cortical malformation. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9/14-17, 2011

福田敦夫, 王 天英, 熊田竜郎, 森島寿貴, 柳川右千夫: 実験的皮質形成異常の成因におけるパラクリン GABA と KCC 2 発現抑制の役割. 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, 横浜, 2011

〔図書〕(計 6 件)

秋田天平、熊田竜郎、福田敦夫：塩素チャンネル, 脳科学辞典, 2013

Fukuda, A., Nakanishi, Y., Kumada, T., and Furukawa, T. Multimodal GABA_A Receptor Functions on Cell Development. In: Comprehensive Developmental Neuroscience (Rubenstein, J., Rakic, P., eds), Oxford: Elsevier. pp921-939, 2013

Komuro, Y., Kumada, T., Ohno, N., Foote, K. D., and Komuro, H. (2013) Migration in the cerebellum. In: Comprehensive Developmental Neuroscience "Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections, Oxford: Elsevier, pp281-297, 2013

Fahrion, J. K., Komuro, Y., Ohno, N., Littner, Y., Nelson, C., Kumada, T., Lamb, B., and Komuro, H. (2013) Cerebellar patterning. In: Comprehensive Developmental Neuroscience, "Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS", Oxford: Elsevier, pp211-223, 2013

Komuro, Y., Fahrion, J. F., Foote,

K.D., Fenner K. B., Kumada, T., Ohno, N., and Komuro, H. Granule Cell Migration and Differentiation, Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders, Chapter 11, 2012

Kumada, T., Komuro, Y., Li, Y., Littner, Y., and Komuro, H. Neuronal cell migration in fetal alcohol syndrome. Handbook of Behavior, food and Nutrition, Chapter 182, 2915-2930, 2011

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊田 竜郎 (KUMADA, Tatsuro)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：00402339

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

福田 敦夫 (FUKUDA, Atsuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50254272

井上 浩一 (INOUE, Koichi)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80345818
2012 年～：研究協力者

研究協力者

古川 智範 (FURUKAWA, Tomonori)
浜松医科大学・医学部・技術補佐員
研究者番号：60402369