

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430066

研究課題名(和文)胎児期における抑制性GABAシナプスの構築と呼吸リズム

研究課題名(英文)The formation of GABAergic network and rhythm of respiratory in the embryonic development

研究代表者

清水 千草 (SHIMIZU, Chigusa)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：70435072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GABAの開口放出に関与するVGATや発達期に興奮性に働くGABAを抑制性に導くKCC2欠損マウスは呼吸不全で生直後に死亡する。このことから、GABAは呼吸リズムの形成に重要な役割を果たしていると考えられているが、詳細は不明である。本研究において呼吸リズム様発火が胎児期には増加するが、出産後は変化しないことを明らかにした。VGAT及びKCC2遺伝子欠損動物を用いた研究から、呼吸リズムの発生そのものにはGABAの開口放出が、呼吸リズム自体の形成にはGABAの興奮性から抑制性への変化が重要であることを解明し、GABAシナプスの構築とその応答性の変化が呼吸リズム形成に果たす役割の違いを見出した。

研究成果の概要(英文)：GABA plays important roles in the respiratory rhythm. Role of GABAergic transmission in regulation of medullary respiration-related rhythmic activity (RRA) perinatally, however is yet to be determined. In this study the numbers of RRA were significantly increased in embryonic development but there were no significant changes after birth. VGAT transports GABA to synaptic vesicles. GABAergic action is changed from excitatory to inhibitory by expression of KCC2. Both VGAT and KCC2 deficient mice die in their birthday by respiratory failure. By compared these mice, it found that exocytosis of GABA is necessary to generate RRA, however KCC2 needs for making of rhythm of respiratory.

研究分野：神経生化学・神経解剖学

キーワード：GABA KCC2 hypoglossal

1. 研究開始当初の背景

胎児は母体を離れ外界に出たとき、オギャーと泣き、呼吸を始める。出生直後、呼吸をすぐに開始できるように、胎児は正しい呼吸リズムを周到に準備している。胎児期において、呼吸リズム形成の鍵となる分子が、抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸(GABA)である。なぜならば、GABAの合成酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、GABAをシナプス小胞に充填する小胞型 GABA トランスポーター(VGAT)のいずれの欠損マウスも生直後に呼吸不全で死亡するからである(Fujii et al, 2007)。呼吸を司る延髄で正しい呼吸リズムが形成されていないことが、理由として挙げられる。

では、GABA がシナプス間隙に存在すれば、呼吸不全は起こらないのか？これまでにGABAが脳の発達期や神経損傷時には、興奮性に働くことやそのメカニズムについて研究してきた(Shimizu-Okabe et al. 2012, 2011 他)。その結果、GABAが興奮性か、抑制性かを決定するのは、細胞内 Cl^- 濃度($[Cl^-]_i$)にあることを明らかにした。高 $[Cl^-]_i$ の場合、GABAはGABA_A受容体(GABA_AR)に結合すると、細胞外に Cl^- を排出し、興奮性神経伝達物質へと役割を変える。そして、 $[Cl^-]_i$ を低く保ち、抑制性として働くためには、細胞外へ Cl^- を排出する K^+ - Cl^- 共輸送体(KCC2)が発現していることが重要である。KCC2欠損マウスもGAD、VGAT同様に、呼吸リズムの失調により、生直後に死亡する(Hübner et al. 2001)。これらの背景から、胎児期における呼吸リズムの形成には、「GABAが抑制性に働くこと」が重要である。しかし、胎児期の延髄における抑制性GABAシナプスの構築と呼吸リズム形成の関連について、未解明な点が多い。

2. 研究の目的

1で述べた背景から、胎児期の延髄における抑制性GABAシナプスの構築と呼吸リズム形成との関連を解明することため、以下の3つのことを検討することを明らかにすることを目的とした。

(1) 延髄における抑制性GABAシナプスの構築過程

(2) 呼吸リズム形成の発達とGABAシナプス構築過程との関連

(3) VGAT及びKCC2欠損マウスにおける呼吸リズム失調の原因解明

3. 研究の方法

本研究では、胎児期の延髄における抑制性GABAシナプスの構築と呼吸リズム形成との関連を解明するため、下記の研究方法を用いた。

(1) 呼吸リズムの形成に必要な抑制性GABAシナプスが、胎児期の延髄で、どのように構築されるのかを調べるため、免疫組織化学法を用いて、GAD、VGAT、KCC2の発現変化を検討した。

(2) 呼吸リズムがいつ生まれ、どのように発達するのかを明らかにするため、呼吸様

リズム性の自発的な発火を再現できる胎児等より延髄急性スライス標本を作成し、電気生理学的に検討した。

(3) GABAの開口放出ができないVGATの欠損マウス及び $[Cl^-]_i$ が高いと考えられるKCC2の欠損マウスの呼吸リズム失調の原因を解明するため、これらの欠損マウスの延髄から作製したスライス標本から得られる呼吸様リズム性の自発的な発火を記録した。

4. 研究成果

(1)呼吸リズムの形成に必要な抑制性GABAシナプスが、発達期においてどのように構築されるのかを調べるため、(2)以降の電気生理学的手法を用いて呼吸様リズム性発火を記録する舌下神経核におけるGAD、VGAT、KCC2の発現変化について免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、GABA作動性神経の終末に局在するGAD及びVGATは胎齢16日ではあまり発現していないが、発達とともに増加することがわかった。また、連携協力者である柳川右千夫教授が作成したGAD67-GFPノックインマウスを用いてGABA作動性神経細胞の分布を調べたところ、舌下神経核にはGAD67を発現している神経細胞が認められなかった。これらの結果から、舌下神経核外から、GABA作動性神経は入力することが示唆された。

また、KCC2の発現もGADやVGATと同様に胎齢16日ではあまり発現が見られなかったが、発達に従い著しく増加した。このことから、胎児期にはKCC2の発現が少ないため $[Cl^-]_i$ が高く、GABAが興奮性に働く可能性が示唆された。

(2)呼吸リズムがいつ生まれ、どのように発達するのかを明らかにするため、呼吸様リズム性の自発的な発火を再現できる、胎齢16日、18日、生後0~7日の延髄領域を含む急性スライス標本を作成し、人工脳脊髄液の K^+ 濃度を8mMとし、生じた呼吸様リズム発火を舌下神経核より電気生理学的に記録した。その結果、1分間あたりの呼吸様リズム発火数は胎齢16日から生後0日まで有意に増加したが、その後変化は見られなかった。GABAを添加した場合には、GABA添加前を比較して胎児期には呼吸リズムが減少したが、生後0~2日までは変化なく、生後3日以降は逆に有意に増加した。これらの結果から、胎児期には出産に伴う呼吸の開始にむけて、呼吸リズムを形成していることが考えられた。

また、(1)における発達に伴うKCC2の発現変化から、KCC2の阻害剤であるDIOAを添加したところ、胎児期における呼吸様リズム発火数は増加するのに対し、生後3日以降では減少した。よって、呼吸リズムにはKCC2の発現即ち $[Cl^-]_i$ の変化に伴うGABAの応答性変化が関与していると思われる。

(3)(1)及び(2)の結果等より呼吸リズム形成にGABA作動性神経とGABAの応答性変化が関連していると考えられた。そこで、VGATとKCC2の欠損マウスにおける呼吸リズ

ム様発火を記録した。これらのマウスは生直後に呼吸不全と運動失調で死亡するため、胎齢 18 日を使用した。その結果、VGAT の遺伝子欠損マウスは呼吸リズム様発火数が野生型に比べ有意に減少していた。それに対し KCC2 の遺伝子欠損マウスは、呼吸リズム様発火数は野生型と比較して変化はなかった。しかし、呼吸リズム様発火とは認められない小さなバーストが多数認められた。これらの結果から、呼吸リズムの発生には GABA の開口放出が必須であり、呼吸リズムのリズム形成には GABA の応答性が重要であることがわかった。

5. 主な発表論文等 (総件数 35 件)
(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 7 件)

1. Kozuka C., Sunagawa S., Ueda R., Higa M., Ohshiro Y., Tanaka H., Shimizu-Okabe C., Takayama C., Matsushita M., Tsutsui M., Ishiuchi S., Nakata M., Yada T., Miyazaki J.I., Oyadomari S., Shimabukuro M., and Masuzaki H. (2015) : A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived -oryzanol via the suppression of local dopamine D₂ receptor signaling in mouse islet. *Br. J. Pharmacol.*, 172, 4519-4534, doi: 10.1111/bph.13236 査読有
2. Kozuka C., Sunagawa S., Ueda R., Higa M., Tanaka H., Shimizu-Okabe C., Ishiuchi S., Takayama C., Matsushita M., Tsutsui M., Miyazaki J.I., Oyadomari S., Shimabukuro M., and Masuzaki H. (2015): Gamma-oryzanol protects pancreatic β -cells against endoplasmic reticulum stress in male mice. *Endocrinology*, 156, 1242-1250, doi: 10.1210/en.2014-1748 査読有
3. Okabe A., Shimizu-Okabe C., Arata A., Konishi S., Fukuda A., and Takayama C. (2015): KCC2-mediated regulation of respiration-related rhythmic activity during postnatal development in mouse medulla oblongata. *Brain Res.*, 1601, 31-39, doi: 10.1016/j.brainres.2015.01.007. 査読有
4. Higa M., Katagiri C., Shimizu-Okabe C., Tsumuraya T., Sunagawa M., Nakamura M., Ishiuchi S., Takayama C., Kondo E., and Matsushita M. (2015): Identification of a novel cell-penetrating peptide targeting human glioblastoma cell lines as a cancer-homing transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 457, 206-212, doi: 10.1016/j.bbrc. 査読有

5. Suzuki H., Kanagawa D., Nakazawa H., Tawara-Hirata Y., Kogure Y., Shimizu-Okabe C., Takayama C., Ishikawa Y., and Shiosaka S. (2014): Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. *Front. Cell Neurosci.*, 8, 1-10, doi: 10.3389/fncel.2014.00420. 査読有
6. Kin H., Kim J., Shimizu-Okabe C., Okabe A., and Takayama C. (2014): Embryonic development of GABAergic signaling in the mouse spinal trigeminal nucleus interpolaris. *Neurosci. Lett.*, 566, 221-225, doi: 10.1016/j.neulet.2014.02.057. 査読有
7. Kim J., Kosaka Y., Shimizu-Okabe C., Niizaki A., and Takayama C. (2014): Characteristic development of the GABA-removal system in the mouse spinal cord. *Neuroscience*, 14, 129-142, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.066. 査読有

[学会発表](計 23 件)

国際学会発表

1. Kim J., Kosaka Y., Shimizu-Okabe C., Niizaki A., Takayama C.: Unique development of the GABA-removal system in the mouse spinal cord. 第 33 回韓国解剖学会学術集会、2014 年 10 月 17 日、ソウル (韓国)
2. Kim J., Kosaka Y., Shimizu-Okabe C., Niizaki A., Takayama C.: Characteristic development of GABA-removal system in the mouse spinal cord 第 63 回 韓国獣医解剖学会、2014 年 10 月 16 日 ~ 17 日、ソウル (韓国)

国内学会発表

3. 小坂祥範、屋富祖司、金正泰、清水千草、高山千利、マウス坐骨神経損傷モデルにおける GABA 伝達関連分子の発現変化、第 121 回日本解剖学会、2016 年 3 月 2 日 ~ 30 日、パレットふくしま (郡山市)
4. 清水千草 Development of inhibitory system in the mouse spinal cord. 女性研究者によるシンポジウム「神経回路の発達の解明」、第 93 回日本生理学会、2016 年 3 月 22 日 ~ 24 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
5. 小坂祥範、屋富祖司、金正泰、清水千草、高山千利、マウス坐骨神経損傷モデルにおける GABA 伝達関連分子の発現変化、第 93 回日本生理学会、2016 年 3 月 22 日 ~ 24 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
6. C. Shimizu, C. Kozuka, S. Kobayashi,

- Y. Miyazaki, J. Kim, H. Masuzaki, C. Takayama. wx/ae brown rice reduced the fat accumulation and improved dyslipidemia. 第 93 回日本生理学会、2016 年 3 月 22 日 ~ 24 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
7. Shimizu-Okabe C., Kobayashi M., Kim J., Niizaki A., Matsushita M., Masuzaki H., and Takayama C. Sequential embryonic development of GABAergic input the hypothalamus 第 38 回日本神経科学会、2015 年 7 月 28 日 ~ 31 日、神戸国際展示場 (神戸市)
 8. Sunagawa M., Shimizu-Okabe C., Kim J., Kobayashi S., and Takayama C. Development of glycinergic system in the mouse spinal cord. 第 38 回日本神経科学会、2015 年 7 月 28 日 ~ 31 日、神戸国際展示場 (神戸市)
 9. 小塚智沙代、比嘉盛丈、田仲秀明、砂川澄人、植田玲、清水千草、高山千利、松下正之、親泊政一、島袋充生、益崎裕章 玄米由来生理活性物質が担う新規の膵島機能・インスリン分泌調節機構の解明、第 58 回 日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21 日 ~ 24 日、海峡メッセ下関 (下関市)
 10. 小塚智沙代、砂川澄人、比嘉盛丈、池間朋己、田仲秀明、清水千草、高山千利、松下正之、親泊政一、島袋充生、益崎裕章 玄米有効成分による膵内分泌機能改善の新たな分子機構、第 52 回 日本臨床分子医学会学術集会、2015 年 4 月 10 日 ~ 11 日、みやこめっせ (京都市)
 11. Katagiri C., Taku K., Shimizu C., Kozuka C., Konishi M., Tomizawa K., Takayama C., Mazuzaki H., Kozak A., and Matsushita M. Kinase activity of TRPM7 regulates lipid metabolism. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日、国際展示場 (神戸市)
 12. Takamatsu G., Shimizu C., Katagiri C., Tsumuraya T., Hayakawa T., Kondo T., and Takayama C., Matsushita M. Identification of novel target genes of mood stabilizer treatment. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日、国際展示場 (神戸市)
 13. Takayama C., and Shimizu C. GABAergic signaling in the developing CNS-GABAergic neurons and GABA_A receptors. 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日、神戸国際展示場 (神戸市)
 14. Okabe A., Shimizu C., and Takayama C. Perinatal modulations of the respiration-related rhythmic activities by GABA and Cl⁻ co-transporters 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日、神戸国際展示場 (神戸市)
 15. Shimizu C., Kozuka C., Kobayashi C., Miyazaki Y., Kim J., Kotaniguchi M., Nakaya M., Kitamura S., Masuzaki H., and Takayama C. 難消化米(wx/ae)による脂肪肝及び脂質異常症の予防・改善効果、第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日、神戸国際展示場 (神戸市)
 16. 高松岳矢、清水千草、片桐千秋、圓谷智之、早川朋子、近藤 毅、高山千利、松下正之 双極性障害治療の新規標的分子の同定、第 36 回沖縄精神神経学会、2015 年 2 月 7 日、沖縄県医師会館 (南風町)
 17. 清水千草、小塚智沙代、小林しおり、宮崎悠、金正泰、益崎裕章、高山千利 高脂肪食摂取マウスにおける脂肪肝及び脂質異常症の難消化米(wx/ae)による改善効果、2014 年 10 月 24 日 ~ 25 日、第 35 回日本肥満学会、シーガイア (宮崎市)
 18. 砂川昌信、金正泰、小林しおり、清水千草、高山千利 マウス脊髄におけるグリシン作動性神経回路の発達変化、日本解剖学会、第 70 回九州支部学術集会、2014 年 10 月 25 日、産業医科大学 (北九州市)
 19. 清水千草、岡部明仁、高山千利 周産期における呼吸リズム形成に対する GABA 応答性の変化、第 57 回日本神経化学会、2014 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂 (奈良市)
 20. 鈴木春満、金河大、中澤瞳、清水千草、高山千利、塩坂貞夫 ErbB4/パルプアルブミン陽性ニューロンを会したニューロプシンもよる海馬興奮性神経細胞の制御、第 57 回日本神経化学会、2014 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日、奈良県文化会館・奈良県新公会堂 (奈良市)
 21. Shimizu-Okabe C., Niizaki A., Kobayashi M., and Takayama C.: GABAergic system in the hypothalamus. 第 36 回内藤カンファレンス、シャトラーゼガトーキングダムサッポロ (札幌)、2013 年 9 月 10 日 ~ 13 日
 22. Okabe A., Arata A., Shimizu-Okabe C., Konishi S., Fukuda A., and Takayama C.: Developmental changes in the respiration-related rhythmic activity in mouse hypoglossal nucleus. 第 36 回日本神経科学会、2013 年 6 月 2 日 ~ 23 日、国立国際会議場 (京都市)
 23. Takayama C., Kim J., Kosaka Y., Shimizu-Okabe C., and Niizaki A.: Distinct development of GABA removing system in the ventral and dorsal horns

in the mouse spinal cord. 第 36 回日本神経科学会、2013年6月20日～23日、国立国際会議場（京都市）

〔その他〕(計5件)

1. **清水千草**、ランチオンセミナー「仕事も家庭もあきらめない！ 女性研究者の強くしなやかな生き方」にて講演、第93回日本神経科学会、2016年3月22-24日、札幌コンベンションセンター（札幌市）
2. **清水千草**、ライフワークバランス実現のために、第37回日本神経科学会、2014年9月11-13日、パシフィコ横浜（横浜市）
3. **清水千草**、**岡部明仁** RBC（琉球放送）より研究補助員制度についての取材・放送 2014年3月
4. **清水千草**、**岡部明仁**「女性研究者研究活動支援事業」に基づく「研究補助員制度配置制度」について、琉球新報に掲載。2013年9月
5. **清水千草** (2013):「子持ち研究者, 日本解剖学会男女共同参画ワークショップに参加する」解剖学会誌 88 巻、4 号、67-68

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 千草 (SHIMIZU, Chigusa)
琉球大学大学院 医学研究科 特命助教
研究者番号：70435072

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

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
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