



Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl⁻ homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 池田, 昌彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1259

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 406号	学位授与年月日	平成15年 9月19日
氏 名	池 田 昌 彦		
論文題目	<p>Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl^- homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus (発達過程のラット皮質視覚野、外側膝状体背側核における GABA 作用の差異に寄与する陽イオン-Cl^-共輸送体と Cl^-ホメオスタシスの発達の違い)</p>		

博士 (医学) 池田昌彦

論文題目

Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl^- homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus

(発達過程のラット皮質視覚野、外側膝状体背側核における GABA 作用の差異に寄与する陽イオン- Cl^- 共輸送体と Cl^- ホメオスタシスの発達の違い)

論文の内容の要旨

[はじめに]

哺乳類の皮質視覚野と外側膝状体背側核では、発達の初期に活動電位依存性の機能的かつ解剖学的な改良が起こる。その結果、皮質視覚野では神経細胞が、どちらの眼からの入力により強く反応するかに関する眼優位円柱の発達につながり、外側膝状体背側核では当初両眼の網膜から過剰に投射していた神経線維が正常の配列になるために脱落し segregation が生じる。近年これらの神経細胞の発達に、本来は抑制性神経伝達物質である GABA (γ -Aminobutyric Acid) が逆に興奮性に作用し、神経細胞の移動やその後のシナプス形成に関与するなど、細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) が高いために起こると考えられる GABA の作用が明らかになりつつある。更に GABA を合成する酵素の GAD65 を欠損させたマウスを用いた研究により、その感受性期に片眼遮蔽を行った際、皮質視覚野は影響を受けるが外側膝状体背側核は影響を受けず、両部位の発達におけるシナプス可塑性での GABA の役割が異なる可能性が報告された。よって発達に伴う皮質視覚野、外側膝状体背側核での GABA に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化、 $[\text{Cl}^-]_i$ 変化、これらの原因となる分子メカニズムについて検討した。

[材料ならびに方法]

1. Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fura-2 を用いた Ca^{2+} イメージングを行い、0-17 日齢における皮質視覚野、外側膝状体背側核神経細胞の GABA に対する反応の経時変化を比較検討した。
2. Cl^- ホメオスタシスを調節する Cl^- トランスポーターの KCC2 (Cl^- 汲み出し)、NKCC1 (Cl^- 取り込み) mRNA の皮質視覚野、外側膝状体背側核での 0-28 日齢における発現量の経時変化を in situ hybridization 法を用いて解析した。
3. Cl^- 感受性蛍光指示薬の 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) を用いた Cl^- イメージングを行い、皮質視覚野、外側膝状体背側核神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 、KCC2 と NKCC1 の活動性の変化を比較検討した。

[結果]

1. Ca^{2+} イメージング: GABA 投与により 0 日齢の皮質視覚野では著しい $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を認め、日齢と共にその反応は徐々に減少した。一方外側膝状体背側核では、0 日齢ですでに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を認めず、その後 17 日齢まで変化を認めなかった。
2. 0 日齢の皮質視覚野では KCC2 mRNA の発現量は低く、逆に NKCC1 mRNA の発現量は

高度であった。日齢と共にこの関係は逆転し、KCC2 mRNA の発現は増加傾向となり NKCC1 mRNA の発現は減少傾向となった。0 日齢の外側膝状体背側核では KCC2 mRNA の発現量は高く、NKCC1 mRNA の発現量は中等度であり、両トランスポーターともその後の経時的な発現量の変化を認めなかった。

3. Cl⁻イメージング:皮質視覚野の 0-2 日齢では 28.0 ± 7.3 mM と高値であったが、13-15 日齢では 6.9 ± 2.6 mM まで低下した。外側膝状体背側核の 0-2 日齢ではすでに 13.5 ± 3.3 mM であった。更に細胞外 K⁺濃度を 7.5 mM とし KCC2 の活動性について [Cl⁻]_i 変化を指標に調べたところ、0 日齢の皮質視覚野では反応を認めず、13 日齢でわずかに反応を認めた。0 日齢の外側膝状体背側核では強い反応を認めた。細胞外 Na⁺濃度を 27 mM とし NKCC1 の活動性について調べたところ、0 日齢ですでに強い反応を認め、13 日齢では反応が減少傾向にあった。0 日齢の外側膝状体背側核でも強い反応を認めた。

[考察]

生後初期の皮質視覚野では、GABA 投与により細胞外への Cl⁻の流出と、それに伴う著しい細胞内 Ca²⁺濃度の上昇がみられ、GABA が興奮性に作用しており、発達に伴ってこの反応は徐々に減少した。外側膝状体背側核では生後初期から興奮性の反応は認められず、両部位での生後発達過程の GABA への反応は明らかに異なっていた。この背景に Cl⁻ホメオスタシスの発達に伴う変化があると考え、両部位での Cl⁻トランスポーターの発現変化を調べた。生後初期の皮質視覚野では Cl⁻を細胞外へ汲み出す KCC2 より Cl⁻を細胞内へ取り込む NKCC1 が優位であり、発達に伴いこの関係は逆転した。外側膝状体背側核では、発達初期から KCC2 がより優位であった。これらの結果より、Cl⁻ホメオスタシスの発達の变化があり、これに伴う Cl⁻の平衡電位の変化の過程が両部位で異なる可能性があると考えられた。また、神経細胞の発達の観点から考えると、この時期のラット皮質視覚野では神経細胞の移動が見られ、その後に外側膝状体背側核からの線維投射を受ける。しかし、この時期の外側膝状体背側核では既に神経細胞の移動、網膜からの線維投射は終了しており、網膜からの活動依存性の線維投射の脱落が生じている。よって神経細胞の移動や、シナプス形成には GABA は興奮性に作用し、その後のシナプス脱落期には抑制性に作用する可能性があるかと判明した。

論文審査の結果の要旨

網膜から外側膝状体背側核(dLGN)に投射する線維は発生と共に過剰に生産されるが、臨界期を境にして余分な線維が取り除かれる。また、外側膝状体から皮質視覚野(VC)に投射する線維は発生直後は広い範囲に及んでいるが、やはり臨界期を境にして二つの眼からの入力線維が明確に分離するようになる。このように、左右それぞれの眼から dLGN を経由して VC に至る神経線維の結合は、適切な時期に適切な視覚刺激を経験することにより、正常な配列を獲得する。最近、GABA 合成酵素(GAD65)欠損マウスを用いた研究から、発達に伴う両部位の可塑的变化における GABA の役割が異なるという可能性が指摘されている。一方、申請者らのグループによる研究などから、GABA は、本来抑制性の神経伝達物質であるが、発達の早い時期には細胞内 Cl⁻濃度を変えることにより、興奮性に作用して神経細胞の移動やその後のシナプス形成に関与することが示唆されている。そこで、本研究では、発達初期の VC と dLGN

における Cl^- ホメオスタシスと GABA 作用の特徴を調べる目的で、両部位の GABA に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応、 Cl^- ホメオスタシス関連遺伝子の発現、および $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度の発達にともなう変化を調べた。

対象の選定と方法は以下のとおりである。

- (1) *fur-2* を用いた Ca^{2+} イメージングにより、Wistar 系仔ラット 0-17 日齢における VC と dLGN スライス標本の GABA ($100 \mu\text{M}$) に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の変化を測定した。
- (2) *in situ hybridization* 法により、Wistar 系仔ラット 0-28 日齢での VC と dLGN 切片における Cl^- トランスポーター KCC2 (Cl^- の汲み出し) と NKCC1 (Cl^- の取り込み) の mRNA 発現量の変化を測定した。
- (3) 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) を用いた Cl^- イメージングにより、Wistar 系仔ラット 0-15 日齢の VC と dLGN スライス標本における $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度の変化を測定した。

おもな結果は以下の通りである。

- (1) VC 神経細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度は、GABA 添加により上昇した。上昇反応は 0 日齢において最も強く、日齢と共に徐々に減少した。また、GABA 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度の上昇は picrotoxin の前処置により完全に抑制された。一方、dLGN 神経細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 濃度は、いずれの日齢においても、GABA に対して大きな変化を示さなかった。
- (2) VC では、0 日齢の KCC2 mRNA の発現は弱く、逆に NKCC1 mRNA は強く発現した。しかし日齢が進むと両者の関係は逆転した。dLGN では、0 日齢において既に KCC2 mRNA の強い発現と NKCC1 mRNA の中等度の発現が認められ、両者の発現パターンは日齢による変化を示さなかった。
- (3) VC 神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度は、0-2 日齢の標本では $28.0 \pm 7.3 \text{ mM}$ ($n=83$) の高値、13-15 日齢の標本では $6.9 \pm 2.6 \text{ mM}$ ($n=34$) の低値を示した。一方 dLGN 神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度は、0-2 日齢の標本で既に $13.5 \pm 3.3 \text{ mM}$ ($n=71$) にまで低下していた。また、 K^+ の細胞内外の濃度勾配を低下させると、0 日齢の dLGN 神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度は大きく増加した。しかし、VC 神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度は、13 日齢で僅かに増加したものの、0 日齢では変化しなかった。一方、 Na^+ の細胞内外の濃度勾配を低下させた場合には、VC と dLGN の両神経細胞の $[\text{Cl}^-]_i$ 濃度は、0 日齢において共に大きく低下した。

申請者はこれらの結果に基づいて、 Cl^- ホメオスタシスの発達過程は皮質視覚野と外側膝状体背側核では異なると結論し、発達初期の VC における GABA の興奮性作用には NKCC1 の作用による $[\text{Cl}^-]_i$ 高値が関与し、dLGN では KCC2 が早期に発達するため、GABA が抑制的に作用していると考えた。

これに対し審査委員会は、本研究が GABA の興奮性作用における Cl^- ホメオスタシスの役割を視覚系において初めて明らかにしたものであり、視覚系神経回路の発達における GABA ニューロンの役割やヒトの発達性視覚障害機序の解明のための基礎的知見を提供するもの、と高く評価した。

本論文の審査過程において、主として次のような質疑が行われた。

- 1) MEQ は核内に移行するか
- 2) 低濃度細胞外 Na^+ 液を用いた時、等浸透圧に保つために何を加えたか
- 3) ラットの視神経交叉の割合は
- 4) 外側膝状体腹側核の機能は何か
- 5) 外側膝状体の層構造はラットにもあるか
- 6) 弱視は先天性か後天性か
- 7) 皮質視覚野の GABA を遊離する細胞は何か
- 8) GABA 受容体とグルタミン酸受容体の発達に違いはあるか
- 9) 外側膝状体におけるシナプス可塑性に関与する神経伝達物質は何か
- 10) 活動依存的可塑性とは何か
- 11) GABA 濃度が実験により異なるが、どのように決めたか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中 原 大 一 郎
副査 梅 村 和 夫 副査 寺 川 進