



## Induction of NMDA and GABAA receptors-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons

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: 豊田, 博紀 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1243">http://hdl.handle.net/10271/1243</a>

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 390号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏名	豊田博紀		
論文題目	<p>Induction of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons                      (傷害を受けた顔面神経運動細胞における KCC2 発現減少に伴う NMDA と GABA<sub>A</sub>受容体を介した Ca<sup>2+</sup>オシレーションの誘導)</p>		

博士(医学) 豊田博紀

## 論文題目

Induction of NMDA and GABA<sub>A</sub> receptors-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons

(傷害を受けた顔面神経運動細胞における KCC2 発現減少に伴う NMDA と GABA<sub>A</sub> 受容体を介した Ca<sup>2+</sup> オシレーションの誘導)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) は Cl<sup>-</sup> コンダクタンスを増加させることにより膜を過分極させる脳における最も重要な抑制性伝達物質である。最近、神経細胞の発生期には GABA がシナプスを介さない paracrine 的な作用で脱分極と Ca<sup>2+</sup> 流入を惹起して神経細胞への分化や細胞移動を促したり、その後の神経回路形成期には興奮性伝達物質としてシナプスの形成や強化に関与する。これらは細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度 ([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>) が高いために起こると考えられるこれまで知られていなかった作用が明らかになりつつある。われわれは、損傷を受けた神経が生存・再生する際にも、このような GABA の興奮性作用が必要とされるのではないかと予測した。剥離した培養細胞や軸索を切断した急性単離細胞で、GABA 作用が抑制性から興奮性に変化することが示されたが、これがもしも再生に向けたプロセスであるならば、シナプス形成に必須の Ca<sup>2+</sup> オシレーションが存在するはずである。しかし、これまでそのような報告はない。そこで、ラット顔面神経切断モデルを用いて、[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> の変化、GABA 作用の変化、Ca<sup>2+</sup> オシレーションとその同期現象、およびこれらの分子メカニズムについて検討した。

### [材料ならびに方法]

1. ラットの片側の顔面神経を本幹で切断し、Cl<sup>-</sup> ホメオスタシスを調整する Cl<sup>-</sup> トランスポーターの KCC2 (Cl<sup>-</sup> 汲み出し)、NKCC1 (Cl<sup>-</sup> 取り込み) mRNA の顔面神経核での発現量の経時的变化を *in situ* hybridization 法を用いて解析した。
2. Cl<sup>-</sup> 感受性蛍光指示薬の 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) を脳スライス標本の顔面神経核細胞内に負荷し、Cl<sup>-</sup> イメージングを行い [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を測定した。さらに、グラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて、GABA 応答と [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を記録した。これらを正常細胞と軸索切断細胞で比較した。
3. Ca<sup>2+</sup> 感受性蛍光色素の fura-2 を用いた Ca<sup>2+</sup> イメージングを行い、GABA 作動性抑制の神経損傷による興奮性への変化と Ca<sup>2+</sup> オシレーションの解析を行った。

### [結果]

1. 切断3日後には、軸索切断細胞のほとんどで KCC2 mRNA の発現低下が認められたが、正常細胞では発現量は変化しなかった。4週後より徐々に回復し始め、16週後にはほぼ正常レベルに回復していた。一方、NKCC1 mRNA においても経時的な発現変化を観察したが、変化を認めなかった。
2. グラミシジン穿孔パッチクランプ法および Cl<sup>-</sup> イメージングにより [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> を計測した結果、切断3日後には、軸索切断細胞で約2倍に [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> が上昇し、GABA 反応は過分極から脱分極に変化していた。
3. 正常細胞では GABA は Ca<sup>2+</sup> 変化を起こさなかったが、軸索切断細胞では [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が惹起された。この [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は GABA<sub>A</sub> レセプター拮抗薬である bicuculline および L 型の電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネル

拮抗薬である nifedipine や  $\text{Na}^+$  チャネルブロッカーの tetrodotoxin によってブロックされた。静止時  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は軸索切断細胞で有意に上昇していた。また軸索切断細胞では glutamate による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の閾値を低下させていた。正常細胞では全くみられなかった細胞外  $\text{Mg}^{2+}$  依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが、軸索切断細胞では誘発された。この  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは bicuculline または D-AP5 によってブロックされ、かつ、tetrodotoxin によっても消失した。

#### [考察]

上記の結果から、軸索切断により以下のような神経回路機能の変化が起こることが予想される。正常細胞においては  $[\text{Cl}^-]_i$  が低いために GABA による  $\text{Cl}^-$  流入が起こり、GABA 作動性の過分極反応が起こる。一方軸索切断細胞においては  $\text{Cl}^-$  排出機構である KCC2 mRNA の低下のため静止時  $[\text{Cl}^-]_i$  が上昇し、 $\text{Cl}^-$  濃度勾配が減少することにより GABA による  $\text{Cl}^-$  流入は  $\text{Cl}^-$  流出へと逆転する。結果として GABA 作動性の過分極反応は逆に脱分極性になる。このため GABA の脱分極性作用は電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルを活性化して活動電位を発生させ、これがさらに電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを活性化して  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を誘発する。すなわち GABA 作用は抑制から興奮に逆転する。その結果、過剰興奮による膜電位のネットワークオシレーションを誘発し、NMDA 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションを誘発するものと考えられる。さらに内在性 GABA による GABA<sub>A</sub> 受容体の持続性活性化による脱分極反応により、 $\text{Mg}^{2+}$  による NMDA レセプターのプロックの解除が起こりやすいため、内在性グルタミン酸による NMDA レセプターの持続性活性化により、静止時  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇も起こるのではないかと考えられた。このように軸索切断により、KCC2 の発現低下による  $[\text{Cl}^-]_i$  上昇、その結果の GABA の抑制から興奮への逆転が誘導され、神経回路機能に変化して、神経発生やシナプス形成に重要な  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが誘発されることが明らかとなった。これは神経再生に関与しているものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) は  $\text{Cl}^-$  コンダクタンスを増加させることにより膜を過分極させる脳における最も重要な抑制性伝達物質である。最近、神経細胞の発生期には GABA が脱分極と  $\text{Ca}^{2+}$  流入を惹起して神経細胞への分化や細胞移動を促したり、その後の神経回路形成期には興奮性伝達物質としてシナプスの形成や強化に関与することが明らかになりつつある。申請者は、損傷を受けた神経が生存・再生する際にも、このような GABA の興奮性作用が必要とされるのではないかと考え、ラット顔面神経軸索切断モデルを用いて、 $[\text{Cl}^-]_i$  の変化、GABA 作用の変化、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションとその同期現象、およびこれらの分子メカニズムについて検討した。

方法を以下に示す。

1.  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素の fura-2 を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングと  $\text{Cl}^-$  感受性蛍光指示薬の 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) を用いた  $\text{Cl}^-$  イメージングを顔面神経核を含む脳スライス標本で行った。
2. グラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて、顔面神経核細胞の GABA 応答と  $[\text{Cl}^-]_i$  を記録した。
3. 顔面神経軸索切断モデルにおける  $\text{Cl}^-$  トランスポーターの KCC2 ( $\text{Cl}^-$  汲み出し) と NKCC1 ( $\text{Cl}^-$  取り込み) の顔面神経核での発現量を *in situ* hybridization 法を用いて解析した。

この研究により以下の結果を得た。

1. 切断3日後には、軸索切断細胞で KCC2 mRNA の発現低下が認められたが、正常細胞では変化しな

かった。4週後より徐々に回復し始め、16週後にほぼ正常レベルに回復した。一方、NKCC1 mRNA においては変化を認めなかった。

2. 切断3日後には、軸索切断細胞で約2倍に $[Cl^-]_i$ が上昇し、GABA反応は過分極から脱分極に変化していた。
  3. GABAは軸索切断細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を惹起し、この上昇はGABA<sub>A</sub>レセプター拮抗薬であるbicuculline、L型の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル拮抗薬であるnifedipine、Na<sup>+</sup>チャンネルブロッカーのtetrodotoxinによってブロックされた。静止時 $[Ca^{2+}]_i$ は軸索切断細胞で有意に上昇していた。
  4. 軸索切断細胞ではglutamateによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の閾値が低下し、細胞外Mg<sup>2+</sup>依存性のCa<sup>2+</sup>オシレーションが誘発された。このCa<sup>2+</sup>オシレーションはbicuculline、D-AP5、tetrodotoxinによって消失した。
- 上記の結果から、申請者は軸索切断細胞においてはCl<sup>-</sup>排出機構であるKCC2 mRNAの低下のため静止時 $[Cl^-]_i$ が上昇し、Cl<sup>-</sup>濃度勾配が減少することによりGABAによるCl<sup>-</sup>流入はCl<sup>-</sup>流出へと逆転することを明らかにした。このためGABAの脱分極性作用は電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルを活性化して活動電位を発生させ、これがさらに電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを活性化して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を誘発したと考えた。すなわちGABA作用は抑制から興奮に逆転することを明らかにした。その結果、過剰興奮による膜電位のネットワークオシレーションを誘発し、NMDA受容体を介したCa<sup>2+</sup>オシレーションを誘発したものと申請者は考えた。

申請者は、軸索切断によりKCC2の発現低下が起こり $[Cl^-]_i$ が上昇し、その結果としてGABAによる作用が抑制から興奮へと逆転したことが、神経回路機能を変化させ、神経発生やシナプス形成に重要なCa<sup>2+</sup>オシレーションを誘発したことを明確に示した。委員会では、そのことを高く評価した。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) KCC2発現のdown regulationのメカニズムとtime courseについて
- 2) 顔面神経の再生について
- 3) 神経軸索切断後の逆行性変性、損傷電流、逆行性インパルスについて
- 4) KCC2とNKCC1のin situ hybridization法における発現の違いについて
- 5) 顔面神経の分化、発達について
- 6) GABA添加時の反応性低下について
- 7) 神経軸索切断による静止電位への影響について
- 8) 顔面神経の機能回復について
- 9) 他の運動神経軸索切断時の神経細胞における変化について
- 10) 神経軸索切断による神経細胞体膜表面蛋白の変化について
- 11) Ca<sup>2+</sup>オシレーションの頻度と振幅の変化について

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 梅村和夫  
副査 難波宏樹 副査 寺川進