



Temporal increase in ambient GABA during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse neocortex

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 天英 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1934

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558号	学位授与年月日	平成22年3月15日
氏名	王 天 英		
論文題目	Temporal increase in ambient GABA during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse neocortex (凍結損傷で引き起こしたマウス大脳皮質の微小脳回の形成過程における一過性の細胞外 GABA 濃度の上昇)		

博士(医学) 王 天 英

論文題目

Temporal increase in ambient GABA during organization of freeze lesion-induced microgyrus in mouse neocortex

(凍結損傷で引き起こしたマウス大脳皮質の微小脳回の形成過程における一過性の細胞外 GABA 濃度の上昇)

論文の内容の要旨

[はじめに]

てんかんの原因となる大脳皮質の皮質形成異常は、神経細胞の移動の障害が関与する。新生仔ラットの大脳皮質に凍結損傷させると限局的な皮質形成異常(微小脳回)が生じる。この成体ラットは、てんかん様の電気活動の発生機序を生理学的・解剖学的に調べる病態モデルとして解析されてきたが、微小脳回を形成する過程については未だ十分に解明されていない。近年、当研究室では、このモデルの微小脳回形成期に異常皮質の構成細胞が一過性の KCC2 発現低下と NKCC1 発現上昇を起こすことを見出し、移動時に $[Cl^-]_i$ 上昇による興奮性 GABA_A 受容体作用を再獲得する可能性を示唆した。

グルタミン酸作動性投射ニューロンと GABA 作動性介在ニューロンは大脳皮質を構成する主要なニューロンであり、正常な大脳皮質形成期では、それぞれのニューロンは、脳の異なる場所で産生され、異なる様式で大脳皮質内に移動・定着する。そこで、本研究では、将来グルタミン酸作動性投射ニューロンとなる皮質板細胞や GABA 作動性介在ニューロンとなる GABA 細胞が、どのように移動して微小脳回を形成するのかを調べるために、GABA 細胞の同定が可能な GAD67-EGFP ノックインマウスに皮質凍結損傷を施行した限局的皮質形成異常モデルを確立した。このモデルを用いて、各々の細胞の分布の変遷と異常皮質内の細胞外 GABA 濃度やその GABA の作用を興奮-抑制に切り替えられる内在的な Cl⁻ホメオスタシスの変化との関連について検討した。

[材料ならびに方法]

1. 皮質凍結損傷による限局的皮質形成異常モデルマウスの作成

新生仔(生後 0 日齢)の GAD67-EGFP ノックインマウスの片側頭骸骨上に液体窒素で冷却した銅棒を置くことで限局的に大脳皮質に凍結損傷を施行した。

2. BrdU ラベリング実験と免疫組織化学による細胞の同定・特徴づけ

妊娠 14.5 あるいは 17.5 日目に BrdU (50 mg/kg)を腹腔内投与した。脳標本中における各種細胞の同定は、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した脳から作製した凍結切片で、抗 BrdU 抗体、抗 GFP 抗体、抗 Cux-1 抗体、抗 Tbr1 抗体を用いた蛍光免疫組織化学法により行った。

3. *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学二重染色

PCR クローニングした KCC2, cxcl12, cxcr4 cDNA 断片から *in vitro* 転写反応により DIG 標識した cRNA プローブを作成した。このプローブで *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、脳組織における各遺伝子の発現レベルを調べた。また KCC2 の発現レベルが低下した細胞を同定するために、KCC2 の *in situ* ハイブリダイゼーションと抗 BrdU 抗体、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色を組み合わせた二重染色を行った。

4. 細胞外 GABA と細胞外グルタミン酸イメージング

GABA の分解酵素 GABase あるいはグルタミン酸の分解酵素 GDH を担持させた石英ガラス上に急性脳スライス標本を置いた。酵素の分解反応時に生成する NADPH を 340nm の表面 UV 光で励起させて、ガラス表面上の NADPH の蛍光輝度を測定することで、脳の各部位から放出される細胞外 GABA と細胞外グルタミン酸濃度を定量化した。

[結果]

凍結損傷を施行した GAD67-EGFP ノックインマウスでもラットモデルと形態的に類似する微小脳回が観察された。微小脳回の形成過程で GABA 細胞は生後 4 日齢で障害部位の表層と、障害部位の周囲に集積していた。一方、胎生 17.5 日に産生(標識)された BrdU 陽性細胞は、GABA 細胞の周囲に集まっていたが、胎生 14.5 日に産生された BrdU 陽性細胞の集積は認められなかった。これらの胎生 17.5 日に産生された BrdU 陽性細胞は、大脳皮質の浅層に位置するグルタミン酸作動性投射ニューロンに運命づけられた細胞のマーカーである Cux1 を発現していた。GABA 細胞の移動に関与することが知られるケモカインとその受容体 Cxcl12/Cxcr4 の発現や分布の変化は認められなかったが、脳スライスにおける細胞外 GABA を可視化したところ、細胞外 GABA 濃度が生後 4 日目に GABA 細胞が集積する傷害部位に顕著に上昇することが観察された。これに対しグルタミン酸の上昇は傷害部位に認められなかった。*in situ hybridization* 法と免疫組織化学染色の二重染色法により、胎生 14.5 日に産生された BrdU 陽性細胞には KCC2 の発現が認められるが、異常皮質の特定の部位に集積した GABA 細胞と胎生 17.5 日に産生された BrdU 陽性細胞には、その発現が見られなかった。

[考察]

微小脳回の初期形成過程では傷害部位への細胞の集積のパターンから、GABA 細胞が皮質板細胞に先行して移動して、細胞外へ GABA を放出していることが示唆された。GABA は、高い $[Cl^-]_i$ を有する未熟な神経細胞に対しては、脱分極性の作用を持ち、細胞の移動に関与することが報告されている。このモデルでは、GABA 細胞と遅く生まれた皮質板細胞が密集する領域で KCC2 の発現低下が認められることから、皮質凍結損傷は、これらの細胞に対して Cl^- HOMEOSTASIS の未熟型への回帰を引き起こし、細胞外 GABA の作用による細胞移動を誘導している可能性がある。一方、この未熟型への回帰は、深層に定着した早生まれの細胞には認められなかったことから、細胞移動による回路再編は本来の移動終了直後までが臨界期と考えられる。

[結論]

凍結損傷は、特定の皮質板細胞と GABA 細胞に対して KCC2 遺伝子の発現低下という内在的な変化と、異常皮質形成領域に GABA の放出を引き起こす外因性的な変化を起こすことで、細胞移動に異常をきたし、微小脳回を形成させる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

てんかんの原因となる大脳皮質の皮質形成異常は、神経細胞の移動の障害が関与する。しかし、皮質形成異常を形成する過程については未だ十分に解明されていない。そこで、申請者は、

GAD67-EGFP ノックインマウスに皮質凍結損傷を施行した限局的皮質形成異常(微小脳回)モデルを確立し、皮質形成に関与する神経細胞の分布の変遷と異常皮質内の細胞外 GABA 濃度やその GABA の作用を興奮-抑制に切り替えられる内在的な Cl^- ホメオスタシスの変化との関連について検討した。

微小脳回の初期形成過程では傷害部位への細胞の集積のパターンから、GABA 細胞が皮質板細胞に先行して移動して、細胞外へ GABA を放出していることが示唆された。GABA は、高い $[\text{Cl}^-]_i$ を有する未熟な神経細胞に対しては、脱分極性の作用を持ち、細胞の移動に関与することが報告されている。このモデルでは、GABA 細胞と遅く生まれた皮質板細胞が密集する領域で KCC2 の発現低下が認められることから、皮質凍結損傷は、これらの細胞に対して Cl^- ホメオスタシスの未熟型への回帰を引き起こし、細胞外 GABA の作用による細胞移動を誘導している可能性が示された。

審査委員会は、凍結損傷が、特定の皮質板細胞と GABA 細胞に対して KCC2 遺伝子の発現低下という内在的な変化と、異常皮質形成領域に GABA の放出を引き起こす外因性的変化を起こすことで、細胞移動に異常をきたし、微小脳回を形成させる可能性を世界で初めて報告したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与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 佐藤 康二
副査 中原 大一郎 副査 難波 宏樹