

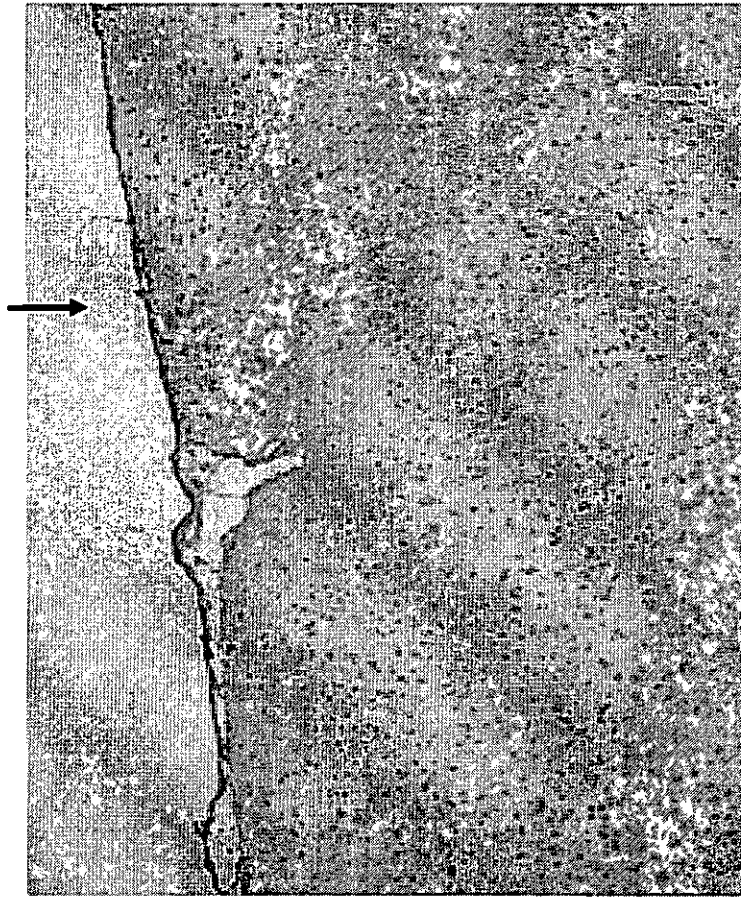
# GABA-A染色

大腦皮質形成異常



# GABA-B染色

大脳皮質形成異常



大脳皮質形成異常とその周囲



反対側の大脳皮質

厚生科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

## 幼若脳の興奮性を規定する分子群の解析

分担研究者 佐藤 康二

(浜松医科大学解剖学第一講座教授)

研究要旨 クロライドコトランスポーターの発達期大脳皮質, amygdala kindling model, 顔面神経切断モデルにおける発現変動を in situ hybridization 法を用い検討し, 更に生理学的手法により神経細胞内のクロライド濃度の変動に伴い GABA の応答性が変化することを確認した。幼若脳あるいは病的な脳における易興奮性の一因はクロライド・コトランスポーターバランスが崩れ, 細胞内クロライド濃度が高く保たれ, GABA やグリシンの抑制作用が十分に働かないことであると考えられた。更に, Differential Display 法を用いて培養アストロサイトより新規の骨形成因子阻害蛋白をクローニングに成功した。この蛋白を神経幹細胞から神経細胞への分化を促進し, 脳の形態形成に密接に関わるものと考えられた

### A. 研究目的

本研究では, 乳幼児におけるけいれんの特異性を考える上で重要となる諸因子の発達に伴う発現変化を具体的に解明することを目的とする。成熟脳に比し, 幼若脳に関する基礎的研究はかなり遅れているのが現状であり, それらの情報の欠如が臨床研究を著しく困難にしている。本研究を推進することによって乳幼児期の脳の特異性が明らかになっていくことが期

待され, それらの新知見を共同研究者に還元することにより, より有効な共同研究が推進できると考える。さて, 成熟した神経細胞の細胞内クロライド濃度は, 他の細胞よりもかなり低く保たれており, そのことが GABA-A 受容体を介した細胞内へのクロライド流入を可能にし, ひいては細胞内電位を過分極側に導き, 結果的に神経細胞の抑制を可能ならしめる生理学的基盤となっている。近年, クロライドの細胞内

濃度、ひいては神経細胞の興奮性を規定すると考えられる三種のクロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の遺伝子が発見され注目を集めている。生理的条件下では、NKCC1 は細胞外からのクロライド流入を司り、KCC1, KCC2 は細胞内から外へのクロライドの汲み出しを司ることが報告されており、この三者のバランスにより各々の神経細胞の興奮性が決定されることが推定されている。また、最近の知見では、幼若な神経細胞では従来抑制系神経伝達物質と考えられていた GABA やグリシン等によって脱分極が引き起こされること、更に神経細胞の発達に伴って KCC2 の発現が増強され、GABA やグリシン等の伝達物質によって過分極を起こす成熟型に転換されることが明かとなってきた。よって、乳幼児に生じるけいれん発作の病態と治療に関する研究を進めていく上で、三種のクロライド・コトランスポーターの発現動向を調べておくことが不可欠である。従って、本年度も前年度に引き続き、三者の遺伝子発現の発達変化、amygdala kindling model, 顔面神経切断モデルにおける発現変化の検討を詳細に行った。また、実際にそのような生理現象が観察されるかどうかを明かとするためにクロライドイメージング等の生理学的な検討も行った。

また近年、神経幹細胞に関する研究が進んで来ており、脳の発達障害を考えると避けて通れない話題となっている。更に、神経幹細胞が正常に神経細胞に分化していくためには、アストロサイトの働きが不可欠であると考えられている。そこで我々は、Differential Display 法により、アストロサイトに接触阻害がかかると発

現が増強する新規遺伝子の cloning も試みた。

## B. 研究方法

### 1. in situ hybridization 法

KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA にそれぞれ特異的な oligo cDNA プローブを作成した。それぞれの cDNA の 3' 端に酵素を用いて <sup>35</sup>S-dATP を結合した。発達の様々なステージのラット脳を取りだし、クライオスタットで 20 $\mu$ m の切片を作成し、上記のプローブをハイブリし、洗浄後、乳剤を塗布し暗箱中にて数週間保存後、現像した。その切片を暗視野顕微鏡下で観察し、脳内に於ける遺伝子発現を in situ hybridization 法にて調べた。

### 2. GABA に対する神経細胞応答性を検出するための生理実験

発達の様々なステージのラット脳を取りだし、更に嗅球を単離し、スライスを作成した。チャンバー内に固定し、クロライドイオン感受性色素を神経細胞に取り込ませた後、GABA あるいは glycine を投与し、励起光を与えたときの色素からの発色を検出し、細胞内クロライド濃度を推定した。

### 3. 新規蛋白のクローニング

confluent 状態と subconfluent 状態のアストロサイトからそれぞれ total RNA を抽出し、それを基に常法に従い、differential display 法を施行した。そこで二つの状態で発現が変動した 10 クローンについて、更にノーザン法で、変動を確認した。その結果変動が確認された 1 ク

ローンの部分断片を用い、ブランクハイブリ法、RACE 法等で、全長の cDNA を得、kjr 蛋白と名付けた。

(倫理面への配慮)

浜松医科大学の動物実験倫理指針に則って実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 大脳皮質における KCC1, KCC2, NKCC1mRNA 発現の発達変化(図 1 参照)

生直後においては、全般的に NKCC1 mRNA の発現が強く、KCC2 mRNA の発現は弱かった。しかし、その傾向は生後 4 日から生後 10 日の間で劇的に変動し、生後 10 日後には、KCC2 mRNA の発現が優位になった。KCC2 は神経細胞特異的に発現し、クロライドを細胞内から細胞外に汲み出すことから、生後一週において大脳皮質の神経細胞の GABA に対する応答性が興奮性から抑制性に転換することを示唆している。更に、生直後において詳細に観察してみると、NKCC1 mRNA の発現は、脳室帯で最も強く、次ぎに皮質板そして、大脳皮質 5/6 層の順に弱くなっていった。それに対し KCC2 の発現は全く逆のパターンであった。このことは上述した原理により、細胞内のクロライド濃度は脳室帯、皮質板、大脳皮質 5/6 層の順に低下していくことを示唆する。我々は実際に細胞内クロライド濃度をイメージングで測定し、脳室帯では 37 mM、皮質では 30 mM、5/6 層では 20 mM という値を得た。このことは、形態学的予測とよく一致す

るものであり、三者の mRNA の発現パターンを基に細胞内クロライド濃度を予測することができることを示している。また、このことから神経細胞内のクロライド濃度は神経細胞の成熟の過程で次第に低下していくことが明かとなった。

#### 2. amygdala kindling model における KCC1, KCC2, NKCC1mRNA 発現の変化(図 2 参照)

amygdala kindling model は脳の興奮性が亢進した状態を解析する上で適したモデルと考えられる。我々はこのモデルにおける興奮性の亢進と KCC1, KCC2, NKCC1 の発現によって規定される神経細胞内のクロライド濃度の変動が関係しているのではないかという仮説を立て、本モデルにおける KCC1, KCC2, NKCC1mRNA 発現を in situ hybridization 法を用いて検討を加えた。その結果、まず梨状葉において、NKCC1 mRNA の著明な発現上昇が観察された。更に、海馬歯状回において、NKCC1 mRNA の著明な発現上昇と KCC1 mRNA の発現低下が観察された。この変動の方向性は両者とも神経細胞内のクロライド濃度を上昇させる方向に働くことになり、おそらくこれらの領域では、GABA による抑制が働きにくくなっている状況があるものと推測される。以上の結果より、amygdala kindling model における興奮性の亢進の一因として、クロライドコトランスポーターの発現変動があげられることが明かとなった。

#### 3. 顔面神経切断モデルにおける KCC1, KCC2, NKCC1mRNA 発現の変化(図 3 参照)

顔面神経切断モデルは末梢神経の修復機序を検討する上で良く用いられるモデルである。本モデルにおいては、顔面神経切断後、数ヶ月かかって軸索が修復し機能も回復することが知られている。我々は、この系において、KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA の発現がどのように変化するかということに興味を持ち、in situ hybridization 法を用いて検討を加えた。その結果非常に興味深いことに、切断側において KCC2 mRNA の発現が切断3日後より著明に低下することを発見した。この低下は切断後一ヶ月ほど続き、その後数ヶ月かけて、切断前の発現レベルまで復帰することが明かとなった。

次に、我々は、この形態学的変化が機能的意味を有するか否かを確定するため、生理学的な実験を行った。まず、gramicidin-perforated patch-clamp 法を用いて、GABA に対する顔面神経核運動ニューロンの反応を検討した。その結果、顔面神経の切断前は GABA の投与に対して過分極性の応答を示していた顔面神経ニューロンが、KCC2 mRNA の発現が顕著に低下する切断3日後には、著明な脱分極性の応答が観察された(図 4)。また、細胞内クロライド濃度を測定したところ、切断前に比べて、切断後は細胞内クロライド濃度の上昇が観察された。このことより、軸索切断後の末梢神経修復過程において、クロライド濃度の変化が必要であることが推測され、その理由としては、1) クロライド濃度を低下させておくと、細胞自体の損傷を修復するために不利に働くため、あるいは 2) GABA の入力が興奮性に伝達された方が、修復過程が

促進されるため、等のことが推察される。今後、この現象についての生理学的な意味づけについて検討していくつもりである。

#### 4. アストロサイト由来の新規遺伝子のクローニング(図 5)

神経幹細胞が正常に神経細胞に分化していくためには、アストロサイトの働きが不可欠であると考えられている。そこで我々は、Differential Display 法により、アストロサイトに接触阻害がかかると発現が増強する新規遺伝子の cloning を試みた。

初代培養アストロサイトが confluent 状態になると発現誘導がかかる遺伝子を differential display 法で探索したところ、Cystein rich domain を三つ持つ、新規遺伝子 *kjr* を cloning することができた。本遺伝子がコードする蛋白質はコンピューター解析により、骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein; BMP)と結合する蛋白と考えられた。そこで、まず、アフリカツメガエルの受精卵に本遺伝子を導入したところ、神経組織を伴った二次軸の形成が観察された。このことは、in vivo においても *Kjr* 蛋白が BMP 阻害活性を有することを示している。次に、本遺伝子及び蛋白の発現分布を in situ hybridization 法及び、免疫組織化学法を用いて解析したところ、脳内のアストロサイトに広く発現しているものの、脳室下帯や、海馬歯状回などの神経幹細胞が存在する領域のアストロサイトにより強い発現が認められた。この事実は、*kjr* 蛋白が幹細胞の分化に密接な関係を持つことを示唆する。そこで、我々は海馬歯状回より

培養した神経幹細胞を用いて, kjr 蛋白の生理活性を探索したところ, kjr 蛋白は, BMP-4 の作用を阻害することにより, 神経幹細胞から神経細胞への分化を促進することが判明した。このことは, kjr 蛋白は神経系の形態形成に密接に関与していることを示唆している。

#### D. 考察

本年度の研究で明かとなったことは, まず, 大脳皮質における詳細な KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA の発現変動の観察から, ある一つの神経細胞の成熟性の変化に伴って KCC1, KCC2, NKCC1 mRNA の発現が劇的に変化するということである。例えば, 脳室帯に存在する神経幹細胞は, NKCC1 を強発現しており, 細胞内クロライド濃度が高値を示すが, ニューロンにコミットして, 遊走を開始して, 皮質板まで到着した神経細胞では, NKCC1 の発現が低下し, さらに KCC2 の発現が増強してくるので, 細胞内クロライド濃度は比較的低くなっている。更に, 分化が進んでいる皮質の 5/6 層の神経細胞では, より低い細胞内クロライド濃度となっていることを証明することができた。このことは, 発生の各 stage において, 様々な程度の細胞内クロライド濃度を持った神経細胞が混在することを意味している。いずれにしろ, 幼若脳においては, 十分に細胞内クロライド濃度が低下していない神経細胞が多く存在することが予測され, このことは GABA が抑制性に働けないことを意味しており, 幼若脳の興奮性が高いことの一因となっているもの

と考察できる。

さて, 我々は更に, amygdala kindling model と顔面神経切断 model においてもクロライドコトランスポーターの発現を観察し, 興味深い所見を得た, このことは, 発生過程における変動のみならず, 何か病的な変化が生体に起こった場合にも, クロライドコトランスポーターの発現は変動することを意味する。特に, amygdala kindling model において, GABA の抑制性が低下する方向に変動が観察されたことは, 特筆に値し, 本モデルにおける興奮性の亢進の一因となっているものと考察できる。

もう一つ, 今回注目したのは, 神経幹細胞を効果的に神経細胞に分化させることができる新規遺伝子 kjr を cloning したことである。本遺伝子が脳の形態形成においてどのような働きをしているかということ进行を明らかにするために, 現在ノックアウトマウスを作成中であり, 近日中にその生理機能を明らかにできるものと期待している。

#### E. 結論

本研究では, クロライド・コトランスポーター (KCC1, KCC2, NKCC1) の発達脳, amygdala kindling model, 顔面神経切断 model における遺伝子発現を詳細に検討し, 脳の発達につれて KCC2 mRNA の発現が上昇していくことを確認した。また, 病的な状態においてもこれらの遺伝子が発現変動することを明かした。このことから, 幼若脳あるいは病的な脳における易興奮性の一因はクロライド・コトランスポーターバランスが崩れ, 細胞内クロライド濃度が高く保た



れ, GABA やグリシンの抑制作用が十分に働かないことであると考えられた。

また, アストロサイト由来の新規 BMP アンタゴニストをクローニングした。この蛋白は, 神経幹細胞を効果的に神経細胞に分化させることができ, 脳の形態形成に密接に関与していると考えられた。今後, 幼若脳の興奮性に対する本蛋白の影響を検討していく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Mitsuda N., Hori O., Yamaguchi A., Tohyama M.

Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 100 , 67-73.2002

Mikawa S., Wang C., Shu F., Wang T., Fukuda A., Sato K.

Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Dev. Brain Res* 136,93-100.2002

Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Tohyama, M.

Identification and characterization of a novel

mitochondrial tricarboxylate carrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295 ,463-468.2002

Wang C., Shimizu-Okabe C., Watanabe K., Okabe A., Matsuzakia H., Ogawa T., Mori N., Fukuda A., Sato K.

Developmental Changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the Rat Brain. *Dev. Brain Res.* 139 , 59-66.2002

Okabe A., Ohno K., Toyoda H., Yokokura M., Sato K., Fukuda, A.

Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter, in the rat piriform cortex. *Neurosci. Res.* 44 , 223-227.2002

Shimizu-Okabe C., Yokokura M., Okabe A., Ikeda M., Sato K., Kilb W., Luhmann H. J., Fukuda A.

Layer-specific expression of Cl<sup>-</sup> transporters and differential [Cl<sup>-</sup>] in newborn rat cortex. *Neuroreport* 13 , 2433-2437.2002

Toyoda H., Ohno K., Yamada J., Ikeda M., Okabe A., Sato K., Hashimoto K., and Fukuda A.

Induction of NMDA and GABA-A receptors-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured motoneurons. *J. Neurophysiology.* in press



## 2. 学会発表

佐藤 康二

「Kohjirin, アストロサイト由来の新規骨形成因子阻害蛋白」平成14年度 日本解剖学会中部地方会

## H, 知的財産権の出願・登録状況

なし

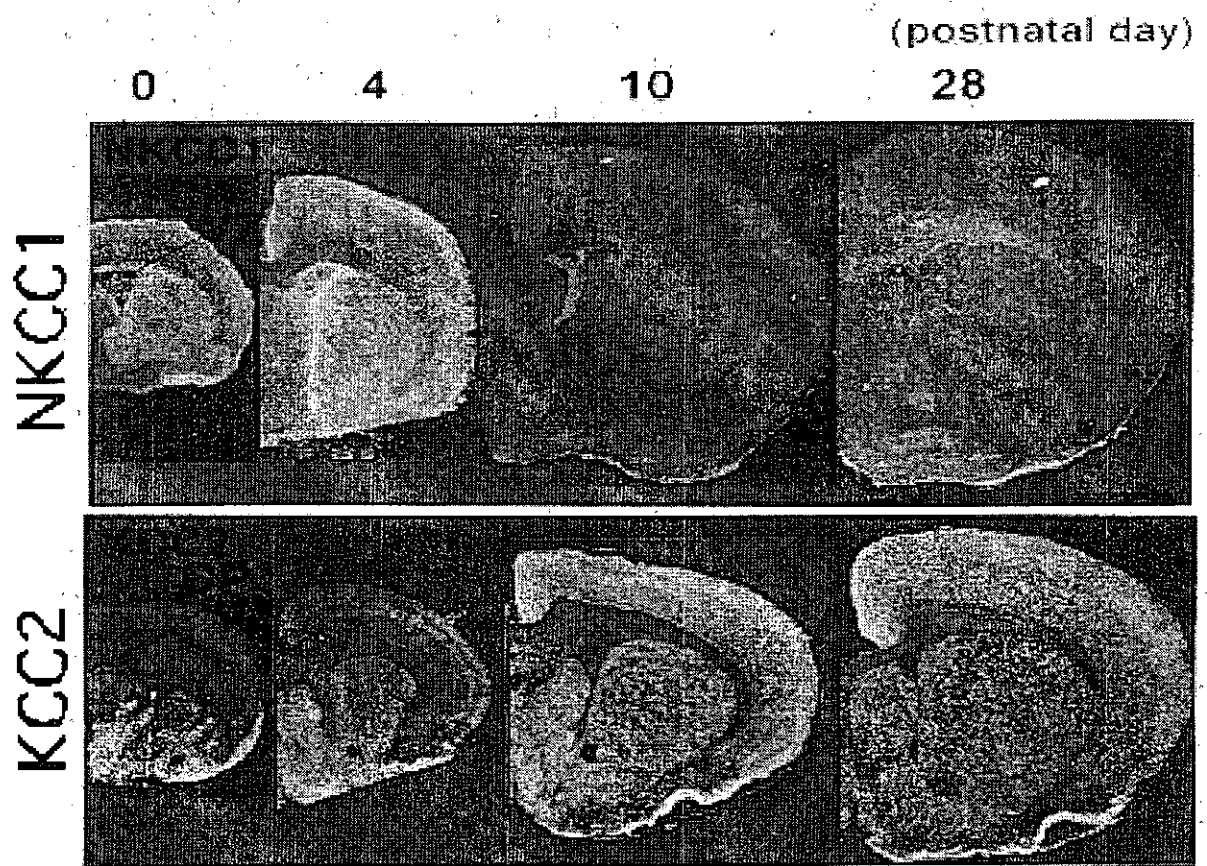


図1 大脳皮質の生後発達におけるNKCC1及び  
KCC2 mRNAの発現変動

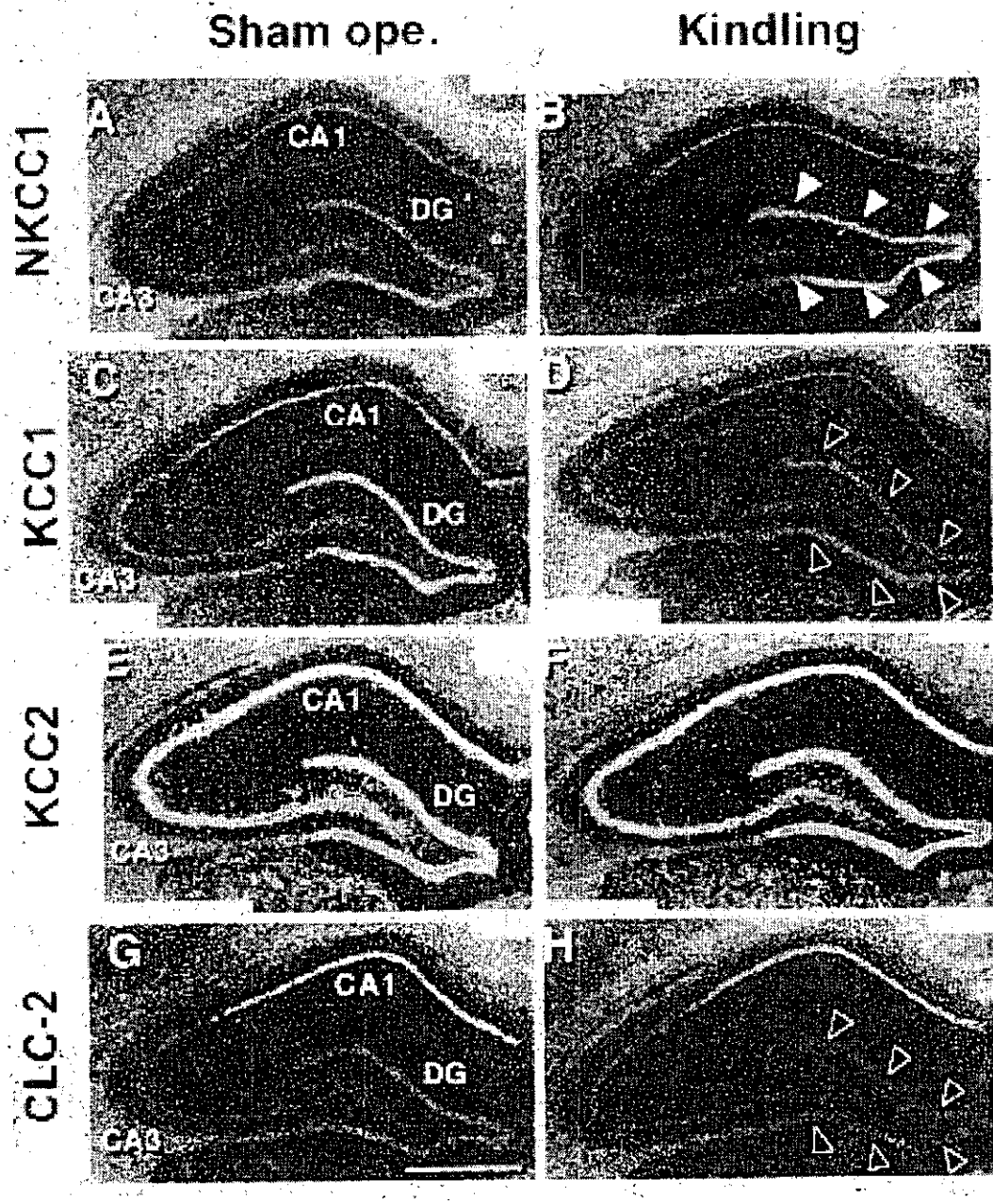


図2 Amygdala Kindling modelにおける  
 クロライドコトランスポート遺伝子の  
 海馬における変動

# Facial nerve transection downregulated KCC2 mRNA A Dark-field photomicrographs

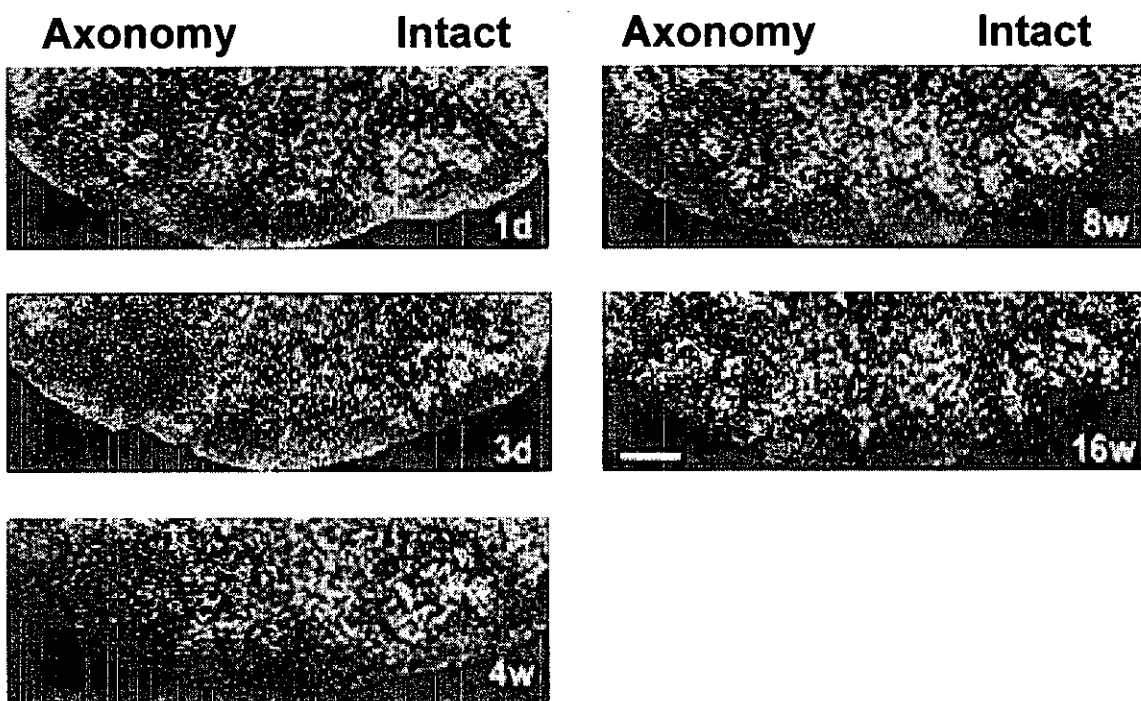


図3 顔面神経切断におけるKCC2遺伝子の  
の発現変動

## Gramicidin-perforated patch-clamp (current-clamp)

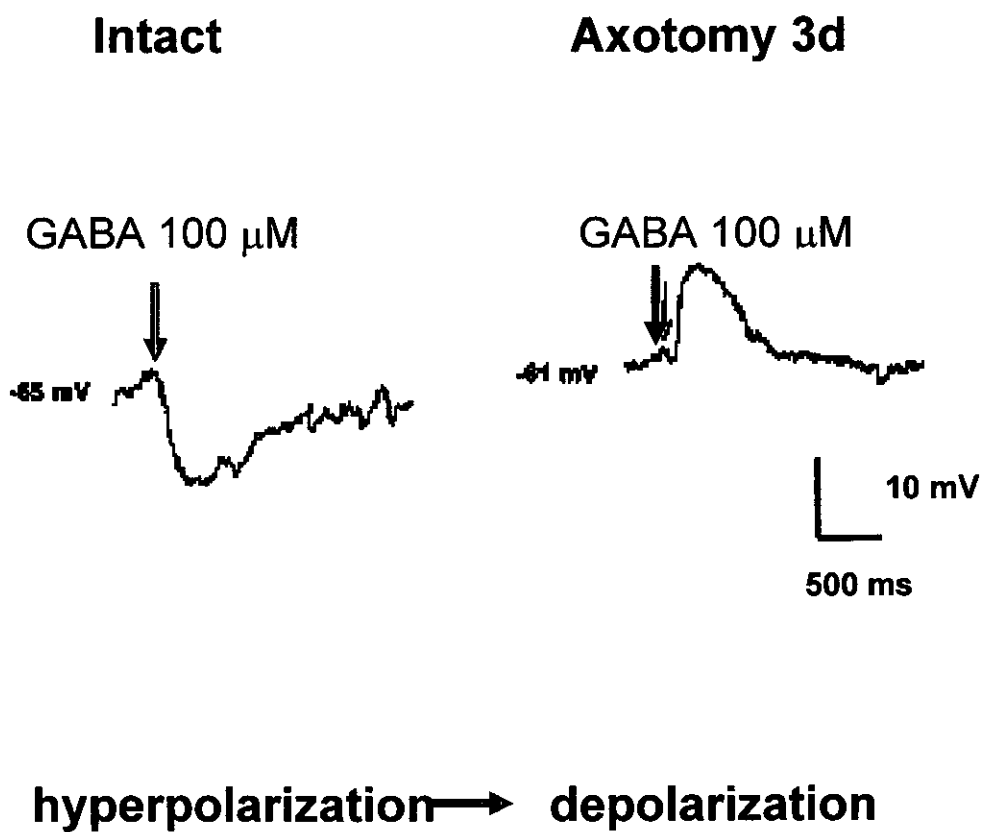


図4 顔面神経切断により、顔面神経細胞のGABA応答性が過分極から脱分極に変化する。

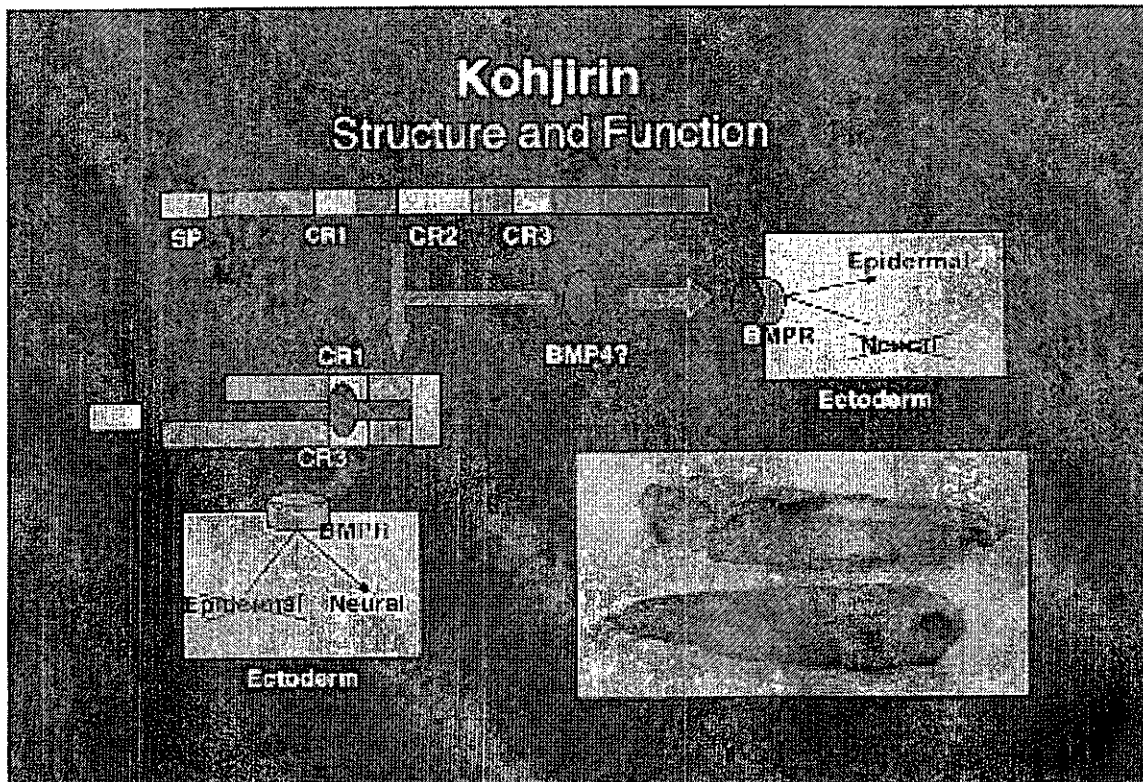


図5 新規蛋白Kohjirinの構造と機能模式図

KohjirinはBMPを阻害することにより神経幹細胞を神経細胞に分化誘導する。

右下の写真の上の個体はKohjirinの強制発現により二次軸が形成されている，下の個体はコントロール

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takayanagi M, Yamamoto K, Nakagawa H, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, Haginoya K, Iinuma K.	Two successful cases of bromide therapy for refractory symptomatic localization-related epilepsy	Brain Dev	24	194-196	2002
Haginoya K, Munakata M, Kato R, Yokoyama H, Ishizuka M, Iinuma, K.	Ictal cerebral haemodynamics of childhood epilepsy measured with near-infrared specrophotometry.	Brain	125	1960-1971	2002
Munakata M, Haginoya K, Soga T, Yokoyama H, Noguchi R, Nagasaka T, Murata T, Higano S, Takahashi S, Iinuma K.	Metabolic properties of band heterotopia differ from those of other cortical dysplasias: A proton magnetic resonance spectroscopy study.	Epilepsia	44	366-371	2003
Kure S, Kojima K, Ichinohe A, Maeda T, Kalmanchey R, Fekete G, Berg SZ, Filiano J, Aoki Y, SuzukiY, Izumi T, Matsubara Y.	Heterozygous <i>GLDC</i> and <i>GCSH</i> gene mutations in transient neonatal hyperglycinemia.	Ann Neurol	52	643-6	2002



Toone JR, Applegarth DA, Kure S, Coulter-Mackie MB, Sazegar P, Kojima K, Ichinohe A.	Novel mutations in the P-protein (glycine decarboxylase) gene in patients with glycine encephalopathy (non-ketotic hyperglycinemia).	Mol Genet Metab	76	243-9	2002
Kanno K, Suzuki Y, Yang A, Yamada Y, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y.	Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population.	J Hum Genet	47	269-274	2002
Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M.	Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response.	Mol. Cell. Biol	23	1163-1174	2003
Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y, Aoki Y, Kobayashi T, Matsubara Y.	Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness.	Hum Mol Genet			in press
Matsubara Y, Kure S	Detection of single nucleotide substitution by competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with immunochromatographic strip.	Human Mutation			in press

Sawamura A, Hashizume K, Tanaka T	Electrophysiological, behavioral and metabolical features of globus pallidus seizures induced by a microinjection of kainic acid.	Brain Research	935	1-8	2002
Hasegawa D, Orima H, Fujita M, Hashizume K, Tanaka T	Complex partial status epilepticus induced by a microinjection of kainic acid into unilateral amygdala in dogs and it brain damage.	Brain Research	955	174-182	2002
Sawamura A, Hashizume K, Tsuda H, Tanaka T	Regional calcium accumulation and kainic acid-induced substantia nigra seizures in rats.	Epilepsia	43 (Suppl7)	13	2002
Hashizume K, Matsuo A, Tsuda H, Tanaka T	Antiepileptic effect of electrical stimulation of unilateral subthalamic nucleus on experimental neocortical seizures(1): Electrophysiological study.	Epilepsia	43 (Suppl7)	139-140	2002
Matsuo A, Hashizume K, Tsuda H, Tanaka T	Antiepileptic effect of electrical stimulation of unilateral subthalamic nucleus on experimental neocortical seizures(1): Metabolic study.	Epilepsia	43 (Suppl7)	140-141	2002
Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Mitsuda N., Hori O., Yamaguchi A., Tohyama M.	Expression of mitochondrial tricarboxylate carrier TCC mRNA and protein in the rat brain.	Mol. Brain Res	100	67-73	2002
Mikawa S., Wang C., Shu F., Wang T., Fukuda A., Sato K.	Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum.	Dev. Brain Res	136	93-100	2002

Miyake S., Yamashita T., Taniguchi M., Tamatani M., Sato K., Tohyama, M.	Identification and characterization of a novel mitochondrial tricarboxylate carrier	Biochem. Biophys. Res. Commun.	295	463-468	2002
Wang C., Shimizu-Okabe C., Watanabe K., Okabe A., Matsuzakia H., Ogawa T., Mori N., Fukuda A., Sato K.	Developmental Changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the Rat Brain.	Dev. Brain Res	139	59-66	2002
Okabe A., Ohno K., Toyoda H., Yokokura M., Sato K., Fukuda A.	Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> cotransporter, in the rat piriform cortex.	Neurosci. Res	44	223-227	2002
Shimizu-Okabe C., Yokokura M., Okabe A., Ikeda M., Sato K., Kilb W., Luhmann H. J., Fukuda A.	Layer-specific expression of Cl <sup>-</sup> transporters and differential [Cl <sup>-</sup> ] in newborn rat cortex.	Neuroreport	13	2433-2437	2002
Toyoda H., Ohno K., Yamada J., Ikeda M., Okabe A., Sato K., Hashimoto K., and Fukuda A.	Induction of NMDA and GABA-A receptors-mediated Ca <sup>2+</sup> oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured motoneurons.	J. Neurophysiology			in press
飯沼一字	特集:てんかん1ー診断治療の進歩 てんかんの機能的画像診断	小児内科	34	719-724	2002
飯沼一字	非侵襲的脳機能検査法の進歩と小児神経.	脳と発達	35	907-104	2003