

氏 名 戸田 拓弥

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1948 号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Downregulation of KCC2 accelerates motor functional
recovery after axonal injury

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子
教授 鍋倉 淳一
教授 川口 泰雄
教授 福田 敦夫 浜松医科大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The K^+-Cl^- co-transporter 2 (KCC2) is the neuron-specific co-transporter molecule responsible for the GABA/Glycine mediated inhibitory response. In immature neurons with a lower expression of KCC2, GABA induces membrane depolarization and promotes Ca^{2+} oscillation, which activates the downstream signaling cascades underlying dendritic growth and synapse formation. Thus, GABA depolarization is necessary for the maturation of the neuronal circuit in development. Recent studies have shown that KCC2 expression was decreased after nerve injury in mature neurons. In addition, an injury-associated decrease in KCC2 expression induces a shift of GABA action from hyperpolarization to depolarization. Thus, injured neurons reacquire immature characteristics in terms of their response to GABA. Therefore, KCC2 downregulation in injured neurons might contribute to the reestablishment of neural circuits and promote functional recovery after injury. However, little is known about the causal relationship between injury-induced KCC2 downregulation and the functional recovery of neuronal circuits—for instance, whether the lack of GABA depolarization in injured neurons could impair their functional recovery.

To elucidate this issue, I investigated motor function recovery after sciatic nerve crush (SNC) in mice in which injury-induced KCC2 downregulation in spinal motoneurons had been disturbed (CaMKII-tTA/tetO-KCC2 [KCC2^{+/+}] mice). Motor function, measured by the rotarod test showed impaired recovery in KCC2^{+/+} mice at 42 days after SNC. In addition, in the control mice that were receiving an injection of the GABA_A blocker, bicuculline, into the spinal ventral horn at 3 days and 5 days after SNC in an attempt to block GABA depolarization, functional recovery was significantly impaired at 42 days after SNC. GABA excitatory action induced by the downregulation of KCC2 is therefore apparently responsible for the recovery of motor function after peripheral nerve injury.

To understand the mechanism underlying the impairment of functional recovery by the blockade of KCC2 downregulation, I next examined 1) neuronal survival, 2) axonal regeneration, and 3) the number of synapses attached to the spinal motoneurons of KCC2^{+/+} and control mice. To check whether KCC2 downregulation affects neuronal survival, I assessed the number of motoneurons stained with an antibody to choline acetyltransferase (ChAT) at 42 days after SNC. The number of motoneurons was decreased in the ipsilateral, but not the contralateral, side of the lumbar spinal cord; there was, however, no significant difference between wild type and KCC2^{+/+} mice. This result suggested that the downregulation of KCC2 did not exert a crucial effect on neuronal survival after axonal injury. Next, to investigate whether KCC2 downregulation promotes axonal regeneration, I examined the sciatic static index (SSI), which is known as one of the indices of the recovery of connections between the motor axons and the planta muscles after sciatic nerve injury. The SSI score had recovered to its pre-SNC level at 42 days after injury in both wild type and KCC2^{+/+} mice. The time required for SSI score recovery was not significantly

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

different between the two groups. Muscle volume of the ipsilateral lower limb was decreased in both groups. These results suggested that the regeneration/elongation of motor axons is apparently undisturbed even by the prevention of KCC2 downregulation of motoneurons after axonal injury.

To examine whether the downregulation of KCC2 affects the remodeling of synapses attached to injured motoneurons, I finally stained the inhibitory (glutamic acid decarboxylase 67; GAD67) and excitatory terminals (vesicular glutamate transporter 1; VGLUT1) attached to the motoneuron at 42 days after SNC. The GAD67-positive terminals had decreased in number on the ipsilateral side in wild type mice, but not in KCC2^{+/+} mice. The VGLUT1-positive synapse terminals on the motoneurons were significantly reduced in both groups. These results suggested that KCC2 downregulation promotes the compensatory reduction of GABAergic terminals attached to motoneurons to the decreased glutamatergic inputs to injured motoneurons.

In conclusion, the downregulation of KCC2 accelerates motor functional recovery after peripheral nerve injury and affects synaptic rearrangement for maintaining the excitation–inhibition balance in the neural circuit of the spinal cord in long-term after nerve injury.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

神経伝達物質である GABA や Glycine は通常、神経細胞の活動を抑制する。この抑制性作用は神経細胞内の塩素イオン濃度に依存しており、細胞内塩素イオン濃度はカリウム-塩素共輸送体 K^+-Cl^- co-transporter 2 (KCC2) により調節されている。神経損傷後には KCC2 の発現が抑制され、GABA/Glycine 作用が抑制性から興奮性にスイッチされることが報告されている。この興奮性作用が損傷後の機能回復に関与するかは未だ実証されていない。そこで、出願者は損傷後の KCC2 発現低下と機能回復の関連を検討するため、運動機能回復過程を観察するモデルとして広く用いられている末梢神経（坐骨神経）損傷モデルマウスを作成し、軸索損傷後の運動神経細胞の KCC2 発現低下が運動機能回復に関与するかについて検討した。

マウスの末梢神経を損傷した後、脊髓前角の KCC2 の mRNA 発現量を検討した結果、損傷後 3 日の損傷側脊髓前角で有意な減少が観察され、損傷後 42 日では非損傷側と同程度まで回復していた。rotarod test により評価された運動機能は、損傷後 42 日には回復した。損傷後にみられた一過性の KCC2 発現低下が運動機能回復に関与するかを検討するために、CaMKII プロモーター下で KCC2 転写を誘導する CaMKII-tTA/tetO-KCC2 マウス (KCC2^{+/+}) を使用した。この KCC2^{+/+}マウスにおいて、神経損傷後の KCC2 発現変化を、real time RT-PCR および western blot 法、免疫組織化学染色法を用いて検討し、KCC2^{+/+}マウスでは損傷後 3 日で見られる KCC2 発現低下が阻害されることを確認した。そこで KCC2^{+/+}マウスと野生型マウスの坐骨神経損傷後の運動機能を評価した結果、KCC2^{+/+}マウスでは運動機能の回復が低下していた。また、野生型マウスにおいて GABA_A 受容体拮抗薬ピククリンを脊髓前角へ損傷早期に投与すると、運動機能の回復が阻害された。これらの結果は、損傷後の KCC2 発現低下による GABA の興奮作用が運動機能回復を促進することを示す。

次に、KCC2^{+/+}マウスの運動機能回復を阻害した神経基盤を明らかにするために①運動神経細胞死、②軸索再伸長および③シナプス再編に着目した解析を実施した。①運動神経細胞の数は、野生型マウスと KCC2^{+/+}マウスにおいて有意な差は認められなかった。また、②末梢神経損傷モデルと野生型マウスにおいて、末梢筋への軸索再投射の程度には差がなかった。従って、①運動神経細胞死および②軸索再伸長が機能回復阻害の神経回路基盤とは考えにくい。最後に③シナプス再編について、興奮性シナプスは小胞グルタミン酸トランスポーターVGLUT1 発現を、抑制性シナプスは GABA 合成酵素の一つである GAD67 の発現を指標に評価した。神経損傷後 42 日における脊髓前角において、野生型、KCC2^{+/+}マウスともに VGLUT1 の mRNA の発現が低下していたが、GAD67 の mRNA は野生型でのみ低下していた。損傷後 42 日の野生型マウスおよび KCC2^{+/+}マウス共に、運動神経細胞に隣接する VGLUT1 陽性ターミナル数が減少していた。一方、運動神経細胞に隣接する GAD67 陽性ターミナル数は野生型マウスでは損傷後に減少していたが、KCC2^{+/+}マウスではこの減少が見られなかった。以上の結果から、神経損傷後の KCC2 発現低下は損傷回路における抑制性入力の減少を誘引することで、興奮と抑制のバランスを維持し、運動機能回復を促進する可能性が示された。

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

本研究は、神経損傷から運動機能が回復する過程において、KCC2 の発現変化およびその機能的役割について詳細かつ多面的に明らかにした内容で、神経損傷後の機能回復における分子・神経回路機構の理解に大きく貢献する成果を得ている。出願者自身により、分子生物学的、行動学的、組織化学的手法を駆使した多面的な解析が行われており、解析方法も適切である。従って、本研究が学位論文にふさわしいとして、審査委員全員の意見が一致した。