

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	阪東 勇輝
論文題目	KCNK カリウムチャネルによる神経活動依存的な大脳皮質神経細胞移動の制御機構		
(論文内容の要旨)			
<p>大脳皮質は高等動物で高度に発達した器官であり、複雑かつ正確な神経回路を有する。大脳皮質神経回路形成は、神経活動によって部分的に制御される。しかし、神経活動制御に関わるイオンチャネルのうち、いずれが大脳皮質発生に寄与するかはほとんど研究がなされていない。私は神経細胞の興奮性の調節に重要であると考えられている KCNK ファミリーカリウムチャネルに注目し、大脳皮質の発生における役割の解明を目指し、本研究を行った。</p> <p>まず、<i>in situ</i> hybridization により、発生期の大脳皮質において、KCNK2、9、10 が、2/3 層神経細胞で発現することを確認した。次に、子宮内電気穿孔法を用いて、2/3 層神経細胞において KCNK2、9、10 をノックダウンしたところ、生後 3 日齢 (P3) において、神経細胞移動の遅れが認められた。KCNK9 のノックダウンが最も強く細胞移動を抑制したため、私は KCNK9 に特に注目してさらなる解析を行った。KCNK9 のノックダウンにより引き起こされた細胞移動の異常は、RNAi 抵抗性の変異型 KCNK9 の共発現により回復した。さらに、遺伝性の発達障害の患者で見つかったドミナントネガティブの作用を示す変異体を発現させたところ、RNAi と同様に、細胞移動が抑制された。これらの結果より、KCNK9 のイオンチャネルの機能が神経細胞移動に必要であることが明らかになった。電気生理学実験により、KCNK9 をノックダウンした細胞では、コントロールと比べて細胞膜抵抗が有意に高く、また静止膜電位が有意に脱分極していることが分かった。移動中の神経細胞よりカルシウムイメージングを行うと、KCNK9 をノックダウンした細胞では、コントロールと比べて自発性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度が高いことが明らかになった。また、ドミナントネガティブ変異体の発現も、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度を増大させた。さらに、RNAi 抵抗性の変異型 KCNK9 を shRNA と共発現させると、細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度は、コントロールと比べて有意に上昇しなかった。これらの結果より、過剰な細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、大脳皮質興奮性神経細胞の移動を抑制することが示唆された。また、KCNK9 のノックダウンは、細胞増殖、アポトーシス、放射状グリアの形態、細胞分化に影響を及ぼさないことを確認した。最後に、私は KCNK9 のノックダウンにより移動できなかった細胞の分布、形態の変化を調べた。移動できなかった細胞の一部は、発生が進んでもその場に留まり、樹状突起の発達が遅れることを見出した。</p> <p>本研究により、KCNK9 は、静止膜電位の制御を通して、自発性細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度を低く抑えることで、大脳皮質興奮性神経細胞の移動を制御することが明らかになった。また、神経細胞移動の異常はヒトの神経疾患と密接に関わることから、KCNK9 の機能不全による神経細胞移動の異常は、発達障害の原因の一つである可能性が考えられる。</p>			

哺乳類の脳皮質では、複雑・精緻な神経回路が形成されており、知覚・認知・学習・記憶・意思決定等の高次情報処理を行っている。こうした脳皮質がどのような機構で作られるかの解明は、神経科学における重要な課題であり、遺伝的に決定されている機構と動物への外界からの刺激等による神経活動に依存する機構の関与が知られている。しかしながら、脳皮質発生の初期過程に神経活動がいかなる関与をしているかについてはよくわかっていない。阪東勇輝は、神経活動の制御にかかわるイオンチャンネルを発生初期の神経細胞で阻害する手法を用いて、この問題を検討した。

阪東は、神経活動レベルに大きな影響を及ぼす静止膜電位の決定に重要な KCNK タイプのカリウムイオンチャンネルに着目した。まず、In situ hybridization 法を用いて、KCNK2、9、10 が発生初期の脳皮質神経細胞で発現していることを確認した。次に、RNAi と子宮内電気穿孔法を用いて、脳皮質 2/3 層神経細胞の KCNK2、9、10 をノックダウンした。そうしたところ、生後 3 日齢 (P3) において、神経細胞移動の遅れが認められた。KCNK9 のノックダウンが最も強く細胞移動を抑制したため、KCNK9 に注目してさらなる解析を行った。KCNK9 のノックダウンにより引き起こされた細胞移動の異常は、RNAi 抵抗性の変異型 KCNK9 の共発現により回復した。また、ドミナントネガティブ作用を有する KCNK9 変異体の発現も、細胞移動を抑制した。これらの結果は、KCNK9 のイオンチャンネル機能が神経細胞移動に必要であることを示している。電気生理学実験により、KCNK9 をノックダウンした細胞では静止膜電位が有意に脱分極していることが分かった。さらに、カルシウムイメージングにより、KCNK9 をノックダウンした神経細胞では、自発性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇の頻度が高いことが明らかになった。以上の結果は、KCNK9 の機能欠損により、静止膜電位が浅くなって神経活動が亢進し、過剰な細胞内カルシウムイオン濃度上昇がおり、脳皮質興奮性神経細胞の移動が抑制されることを示唆している。つまり、KCNK9 は静止膜電位を適正なレベルに維持することにより、神経活動のレベルを調節して、正常な細胞移動を可能にしていると推定される。さらに阪東は、KCNK9 のノックダウンは、細胞増殖、アポトーシス、放射状グリアの形態、細胞分化に影響を及ぼさないことを確認した。また、移動できなかった細胞の一部は、発生が進んでもその場に留まり、樹状突起を伸長することも示した。

上述したように阪東勇輝は、子宮内電気穿孔法による遺伝子導入・免疫組織化学等形態学・電気生理学・細胞内カルシウムイオンイメージング等様々な研究手法を駆使した研究を行い、カリウムイオンチャンネルの一種である KCNK9 が、神経活動の制御を介して、脳皮質形成過程での神経細胞移動に関与していることを明らかにした。これらの成果は、哺乳類脳皮質形成機構の解明に寄与する重要な知見である。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成 25 年 1 月 16 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。