

生理学第一

1 構 成 員

	平成15年3月31日現在
教授	1人
助教授	1人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助手（うち病院籍）	2人（0人）
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	1人
大学院学生（うち他講座から）	6人（4人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技官（教務職員を含む）	1人
その他（技術補佐員等）	0人
合 計	12人

大学院学生の中に静岡大学からの大学院学生を含む。

2 教官の異動状況

福田 敦夫（教授）（H10. 4. 1～現職，H10. 10. 1～静岡大学大学院電子科学研究科兼任）

上野 伸哉（助教授）（H14. 8. 31 福岡大学医学部講師 H14. 9. 1～現職）

岡部 明仁（助手）（H11. 4. 1～現職）

井上 浩一（助手）（H14. 4. 1～現職）

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成14年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	14編（0編）
そのインパクトファクターの合計	55.34
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	0編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	0編（0編）
そのインパクトファクターの合計	0.00
(4) 著書数（うち邦文のもの）	2編（2編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0編（0編）
そのインパクトファクターの合計	0.00

(1) 原著論文 (当該教室所属の者に下線)

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Ueno S, Yamada H, Moriyama T, Honda K, Takano Y, Kamiya H, Katsuragi T: Measurement of dorsal root ganglion P2X mRNA by SYBR Green fluorescence. *Brain Res Protocol* 10: 95-101, 2002.
2. Okabe A, Ohno K, Toyoda H, Yokokura M, Sato K, Fukuda A: Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter, in the rat piriform cortex. *Neurosci Res* 44: 225-229, 2002.
3. Shimizu-Okabe C, Yokokura M, Okabe A, Ikeda M, Sato K, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A: Layer-specific expression of Cl⁻ transporters and differential [Cl⁻]_i in newborn rat cortex. *Neuroreport* 13: 2433-2437, 2002.

インパクトファクターの小計 [5.43]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

1. 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.
2. Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki 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.

インパクトファクターの小計 [3.32]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

1. Ueno T, Okabe A, Akaike N, Fukuda A, Nabekura J: Diversity of neuron-specific K⁺-Cl⁻ cotransporter expression and inhibitory postsynaptic potential depression in rat motoneurons. *J Biol Chem* 277: 4945-4950, 2002.
2. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, Fukuda A, Imai M, Okada H: CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation of homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol* 539: 537-545, 2002.
3. Nabekura J, Ueno T, Okabe A, Furuta A, Iwaki T, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Akaike N: Reduction of KCC2 expression and GABA_A receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *J Neurosci* 22: 4412-4417, 2002.
4. Kilb W, Ikeda M, Uchida K, Okabe A, Fukuda A, Luhmann HJ: Depolarizing glycine responses in Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. *Neuroscience* 112: 299-307, 2002.
5. Tsuda M, Shigemoto Mogami Y, Ueno S, Koizumi S, Ueda H, Iwanaga T, Inoue K: Downregulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. *Eur J Neurosci* 15: 1444-1450, 2002.

6. Wada K, Inoue K, Hagiwara M: Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. *Biochim Biophys Acta* 1591: 1-10, 2002.
7. Zama T, Aoki R, Kamimoto T, Inoue K, Ikeda Y, Hagiwara M: A novel dual-specificity phosphatase SKRP1 interacts with the MAPKK MKK7 and inactivates the JNK MAPK pathway: Implication for the precise regulation of the particular MAPK pathway. *J Biol Chem* 277: 23909-23918, 2002.
8. Zama T, Aoki R, Kamimoto T, Inoue K, Ikeda Y, Hagiwara M: Scaffold role of a MAP kinase phosphatase, SKRP1 for the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 23919-23926, 2002.
9. Oka T, Akisada M, Okabe A, Sakurai K, Shiosaka S, Kato K: Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. *Neurosci Lett* 321: 141-144, 2002.

インパクトファクターの小計 [46.59]

(2) 論文形式のプロシーディングズ

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(3) 総 説

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
- B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）
- C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(4) 著 書

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの
 1. 福田敦夫, 豊田博紀: 障害性K⁺-Cl⁻ cotransporter (KCC2) 発現減少による内在性GABA作動性興奮の出現とCa²⁺オシレーション, 赤池紀扶, 東 英穂, 阿部康二, 久保千春 編: 脳機能の解明-生命科学の主潮流-, ガイア出版会, p145-151 2002.
 2. 福田敦夫: 脳スライス標本を用いた細胞内イオンイメージング, 第11回浜松医科大学メディカルホトニクスコース講習テキスト, p163-175 2002.

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(5) 症例報告

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

4 特許等の出願状況

	平成14年度
特許取得数（出願中含む）	0件

5 医学研究費取得状況

	平成14年度
(1) 文部科学省科学研究費	5件 (1,150万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 (129.5万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1件 (312万円)
(4) 財団助成金	2件 (95万円)
(5) 受託研究または共同研究	0件 (0万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	0件 (0万円)

(1) 文部科学省科学研究費

福田敦夫（代表者）特定領域研究（2）「大脳新皮質形成過程におけるカハール・レチウス細胞と皮質板細胞のクロストーク」530万円（新規）

福田敦夫（代表者）基盤研究（B）（2）「てんかん原性大脳皮質形成異常モデル動物の確立とアンチセンス治療法への展開」190万円（継続）

福田敦夫（代表者）萌芽研究「てんかん原性皮質形成異常におけるCl⁻ホメオスタシスとGABA機能異常の分子機構」90万円（新規）

岡部明仁（代表者）基盤研究C（2）「視交叉上核ニューロンにおける[Cl⁻]_iの周期変動解析」220万円（新規）

清水千草（代表者）特別研究員奨励費「てんかん原性Cl⁻ホメオスタシス分子機構のヒト摘出病巣及びモデル動物を用いた解析」120万円（継続）

(2) 厚生科学研究費

福田敦夫（分担者）厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「発達期における高次脳機能障害の病態解明研究」班 「細胞移動障害モデルによる大脳皮質神経回路形成過程の細胞内Cl⁻調節の役割に関する研究」129.5万円（継続）代表者 国立精神・神経センター部長 加我牧子

(3) 他政府機関による研究助成

福田敦夫（代表者）日本学術振興会日独科学協力事業（共同研究）「大脳皮質の発達及び発達障害過程でのCl⁻ホメオスタシスと抑制性シナプス伝達の変化」312万円（継続）

(4) 財団助成金

福田敦夫（代表者）財団法人静岡総合研究機構学術教育研究推進事業費補助金「てんかん原性皮質形成異常の成因におけるCl⁻ホメオスタシスの役割」45万円（新規）

福田敦夫（代表者）財団法人日本脳神経財団平成14年度学術研究助成金「皮質形成異常組織摘出標本のパッチクランプ，光学イメージング，in situ hybridizationによるてんかん原性メカニズムの解析」50万円（新規）

6 特定研究などの大型プロジェクトの代表，総括

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	1件	0件
(2) シンポジウム発表数	3件	2件
(3) 学会座長回数	0件	4件
(4) 学会開催回数	1件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	6件
(6) 一般演題発表数	14件	

(1) 国際会議等開催・参加：

2) 国際学会・会議等における基調講演・招待講演

Fukuda A: GABAergic excitation-mediated Ca²⁺ oscillations induced by KCC2 downregulation. Invited Speaker on International symposium on "Synaptic Transmission, Modulation and Plasticity", Düsseldorf Germany, July 2002.

3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

1. Fukuda A: Axotomy induces GABAergic excitation-mediated Ca²⁺ oscillations by K⁺-Cl⁻ cotransporter (KCC2) downregulation. The Third International Symposium on the Study of Brain Function, Fukuoka Japan. May 2002.

4) 一般発表

ポスター発表

1. Okabe A, Toyoda H, Yokokura M, Yamada J, Shimizu-Okabe C, Fukuda A: Expressional changes in the Cl⁻ homeostasis-related genes in the rat brain after amygdala kindling. The Third International Symposium on the Study of Brain Function. May 2002, Fukuoka, Japan.
2. Shimizu-Okabe C, Yokokura M, Ikeda M, Okabe A, Sato K, Fukuda A: The differential expression patterns of NKCC1 and KCC2 underlie in the regulation of intracellular Cl⁻ concentration during the cortical development. The Third International Symposium on the Study of Brain Function. May 2002, Fukuoka, Japan.
3. Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Fukuda A: The developmental change in GABA_A receptor-mediated responses in the rat neocortical neurons demonstrated by gramicidin-perforated patch-clamp recordings and single cell RT-PCR. The Third International Symposium on the Study of Brain Function. May 2002, Fukuoka, Japan.
4. Ueno S, Moriyama T, Kamiya H, Sakurada T, Katsuragi T: Possible involvement of P2X2 and P2X3 subtypes in neuropathic pain in mice. 7th International Symposium on Adenosin & Adenine Nucleotides. May 2002, Gold Coast, Australia
5. Fukuda A, Toyoda H, Ohno K, Okabe A, Ikeda M, Yamada J, Sato K: Calcium oscillations in axotomized facial motoneurons are attributable to GABAergic excitation caused by intracellular chloride increases following K-Cl cotransporter (KCC2) downregulation. The 3rd Forum of European Neuroscience. July 2002, Paris, France.
6. Okabe A, Kilb W, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Hanganu I, Fukuda A, Luhmann HJ: Mechanism of intracellular chloride regulation in Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. The 3rd Forum of European Neuroscience. July 2002, Paris, France.
7. Farkas I, Fukuda A, Yamamoto N, Miyachi T, Tateyama H, Okada N, Okada H: Complement C5a receptor mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. The 3rd Forum of European Neuroscience. July 2002, Paris, France.
8. Shimizu-Okabe C, Yokokura M, Ikeda M, Okabe A, Sato K, Fukuda A: The differential ontogenesis of NKCC1 and KCC2 expression and of intracellular Cl⁻ concentration in the cortical subregions of the neonatal rats. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.
9. Toyoda H, Sato K, Okabe A, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Hashimoto K, Fukuda A: Differential expressions of KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat trigeminal nuclei. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.
10. Ikeda M, Toyoda H, Okabe A, Sato K, Hotta Y, Fukuda A: Differential developmental profile of the cation-Cl⁻ cotransporter expression and Cl⁻ homeostasis contribute to differential GABAergic actions in rat dorsal lateral geniculate nucleus and visual cortex. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.
11. Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Fukuda A: Development of GABAergic responses and Cl⁻

homeostasis are regulated by differential expression of cation-Cl⁻ cotransporters: gramicidin-perforated patch-clamp and single cell multiplex RT-PCR study. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.

12. Kilb W, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann HJ: Chloride regulation in Cajal-Retzius cells of the neonatal rat cerebral cortex. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.
13. Nakanishi K, Fukuda A: Role of Cl⁻ transporters in synaptically-driven recurrent depolarizing potentials in cultured neocortical neurons. The 32nd Annual Meeting, Society for Neuroscience. November 2002, Orlando, FL.
14. Kilb W Okabe A, Hanganu I, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Luhmann HJ: Homogenous glycine receptor expression in Cajal-Retzius and cortical-plate neurons of neonatal rat cerebral cortex. 82nd Deutsche Physiologische Gesellschaft. March 2003, Bochum, Germany.

(2) 国内学会の開催・参加

2) シンポジウム発表

福田敦夫 (2002) 抑制性ニューロンとCl⁻ホメオスタシスのクロストーク, 平成14年度生理学研究所研究会『抑制性ニューロンの役割』, 12月, 岡崎

福田敦夫 (2003) 大脳皮質形成異常モデルを用いた神経細胞移動障害メカニズムの検討. シンポジウム「精神神経疾患研究の最前線: 分子から画像まで」, 第13回日本病態生理学会, 1月, 千葉

3) 座長をした学会名

1. 福田敦夫 (2002) 第11回浜松医科大学メディカルホトニクスコース講演会, 7月, 浜松
2. 福田敦夫 (2002) 厚生労働省精神・神経疾患研究委託事業「発達期における高次脳機能障害の病態解明研究」班会議, 11月, 東京
3. 福田敦夫 (2002) 平成14年度生理学研究所研究会『抑制性ニューロンの役割』, 「脳幹および脊髄の抑制性ニューロン」, 12月, 岡崎
4. 福田敦夫 (2003) 第80回日本生理学会大会, 3月, 福岡

5) 役職についている学会名とその役割

福田敦夫 日本生理学会 評議員

福田敦夫 日本病態生理学会 評議員

福田敦夫 日本赤ちゃん学会 評議員

福田敦夫 第26回日本神経科学大会 実行委員

福田敦夫 文部科学省特定領域研究「脳科学の先端的研究」企画運営会議・作業部会 委員

上野伸哉 日本薬理学会 評議員

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリー数は除く）	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

レフリー (reviewer)の回数：10回

雑誌名（国）：Science（米）1回，J. Neurophysiol.（米）1回，Brain Res.（欧）3回，Neurosci. Lett.（欧）1回，Neurosci. Res.（日）4回

9 共同研究の実施状況

	平成14年度
(1) 国際共同研究	3件
(2) 国内共同研究	5件
(3) 学内共同研究	5件

(1) 国際共同研究

テーマ：大脳皮質の発達及び発達障害過程でのCl⁻ホメオスタシスと抑制性シナプス伝達の変化

相手機関（国）：デュッセルドルフ大学神経生理学研究所，Heiko J. Luhmann教授（ドイツ）

様式：研究者の来訪（Luhmann教授），研究者の派遣（福田敦夫，岡部明仁），技術・アイデアの交換

研究成果：Shimizu-Okabe C, Yokokura M, Okabe A, Ikeda M, Sato K, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A: Layer-specific expression of Cl⁻ transporters and differential [Cl⁻]_i in newborn rat cortex. Neuroreport 13: 2433-2437, 2002.

Kilb W, Ikeda M, Uchida K, Okabe A, Fukuda A, Luhmann HJ: Depolarizing glycine responses in Cajal-Retzius cells of neonatal rat cerebral cortex. Neuroscience 112: 299-307, 2002.

研究費：Deutsche Forschungsgemeinschaft, 日本学術振興会日独科学協力事業（共同研究）

テーマ：補体システム活性化による神経細胞死に関する細胞特異性の研究

相手機関（国）：アルバートセントセルジ医科大学，Imre Farkas博士（ハンガリー）

様式：研究者の来訪（Farkas博士），技術・アイデアの交換

研究成果：Farkas I, Baranyi L, Ishikawa, Y, Okada, N, Bohata C, Budai D, Fukuda A, Imai M, and Okada H: CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation of homologous C5b-8 as well as C5b-9. J Physiol 539: 537-545, 2002.

テーマ：大脳皮質・海馬の痙攣発作波へのNOの関与

相手機関（国）：Tbilisi大学生理学教室，Nanuli Doreulee博士（グルジア共和国）

様式：技術・アイデアの交換，研究指導

研究費：The International Science and Technology Project（ロシア）

(2) 国内共同研究

- 鍋倉淳一（九州大学大学院医学系研究科）発達・障害による神経細胞Cl⁻ホメオスタシス変化
田中正樹（国立静岡神経医療センター）大脳皮質形成異常とCl⁻ホメオスタシス異常の関係
山田順子（静岡大学大学院電子科学研究科）パッチクランプとsingle-cell RT-PCRによる細胞解析
中西圭子（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 生理学部）培養大脳皮質神経回路形成過程のCl⁻ホメオスタシスの役割
磯村宜和（東京都神経科学総合研究所統合生理研究部門，日本学術振興会特別研究員（PD））
海馬介在ニューロン高頻度発火による錐体細胞へのCl⁻流入のイメージング

(3) 学内共同研究

- 佐藤康二・大野浩司（1解剖）Cl⁻トランスポーター遺伝子発現と機能解析
堀田喜裕（眼科）視覚系におけるCl⁻ホメオスタシスとGABA作用の発達的变化
金山尚裕（産婦人科）UTIによるイオンチャンネル機能修飾の解析
橋本賢二（口腔外科）顔面神経障害によるCl⁻ホメオスタシスと関連遺伝子発現変化
菱田 明・宮嶋裕明（1内科）大脳皮質形成異常発生のメカニズムとCl⁻ホメオスタシス

10 産学共同研究

	平成14年度
産学共同研究	1件

1. ノブオ電子（株）超高速高感度冷却CCDカメラシステムに関する研究開発

11 受賞

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. Cajal-Retzius細胞の生理学的特性と辺縁帯におけるシグナル伝達の解析：

皮質板細胞から分泌されるタウリンをシグナルとして受ける可能性のあるCajal-Retzius細胞の生理学的特性を検討するため、辺縁帯のtangential sliceを作成した。グラミシジン穿孔パッチクランプ法でグリシン応答と[Cl⁻]_iを記録した後、Cl⁻トランスポーターのNKCC1（取り込み）とKCC2（排出）及びglycine受容体subunit（alpha1, alpha2, alpha3, beta）mRNAのsingle-cell multiplex RT-PCRを行って単一細胞でのそれぞれの発現パターンを解析した。Cajal-Retzius細胞は皮質板細胞に比べてNKCC1発現が優位で[Cl⁻]_iが約30mMと高い原因であると考えられた。また、グリシン応答のEC50は皮質板細胞より小さいが、受容体subunit構成はいずれもalpha2/betaのheteroであり、受容体密度がCajal-Retzius細胞>皮質板細胞であると考えられた。すなわちCajal-Retzius細胞は皮質板細胞からnon-synapticに放出されたタウリンに対し高感受性を有しており、パラクライン的なシグナルとして受ける可能性が示唆された。次いで、電位感受性色素を用いた膜電位イメージングを行って辺縁帯の興奮伝播をリアルタイムで可視化した。電気刺激によりTTX感受性の興奮の伝播が辺縁帯に認められた。この伝播はCNQX/AP5の影響を受けず、picrotoxinおよびbumetanide

により完全にブロックされた。したがって、Cajal-Retzius細胞間のクロストークではNKCC1>>KCC2による高 $[Cl^-]_i$ によりGABAが興奮性伝達物質として作用していることが示唆された。

(岡部, 清水, 千, 豊田, 上野, Luhmann¹, 福田)¹デュッセルドルフ大学

2. ニューロン分化と移動による大脳皮質層構造形成過程の Cl^- ホメオスタシスとその分子基盤

神経前駆細胞・皮質板細胞・錐体細胞の $[Cl^-]_i$ をグラミシジン穿孔スライスパッチクランプ法, Cl^- イメージング法で計測し, Cl^- トランスポーターのKCC2, NKCC1の発現をsingle-cell multiplex RT-PCR法, *in situ* hybridization組織化学法を用いて解析した。脳室帯の神経前駆細胞は Cl^- 取込のNKCC1のみを発現し最も $[Cl^-]_i$ が高く, 皮質板細胞に分化すると Cl^- 排出のKCC2も発現してくるが依然 $[Cl^-]_i$ 高値を維持し, 錐体細胞に成熟後はKCC2>NKCC1となって $[Cl^-]_i$ が低下した。すなわち神経前駆細胞はニューロン特異的なKCC2を欠き非常に高い $[Cl^-]_i$ 値を示すが, 分化・移動による皮質層構造の形成過程でNKCC1の発現低下とKCC2の発現増加により $[Cl^-]_i$ が低下しGABA応答も脱分極から過分極に逆転することが明らかとなった。

(井上, 岡部, 清水, 山田², 福田)²静岡大学大学院

3. focal freeze-lesionモデルの層構造形成異常の病態生理と分子メカニズムの解析:

生後0日齢ラットのfocal freeze-lesion法により局所的大脳皮質形成異常モデルを作成し, 障害部位に移動してくる神経細胞からスライスパッチクランプ法で膜電位記録を行った。これらの細胞を正常部位の錐体細胞と比較すると, 電気生理学的膜特性がほぼ同様であるにもかかわらず, $[Cl^-]_i$ が上昇しており, 正常部位の細胞では起こらないGABA/グリシンによる異常な Ca^{2+} 流入が認められた。周囲を電気刺激してもこれらの細胞でシナプス後電位は記録されなかった。以上は, 未熟な移動中の皮質板細胞の特徴に類似していた。ついで, Cl^- トランスポーター(KCC2, NKCC1)および細胞移動関連分子reelin mRNAの発現状態を*in situ* hybridization法を用いて解析した。lesion部位における微小脳回の形成過程では, 周囲の皮質板からのMAP2陽性の神経細胞の移動がlesion部位上部に認められ, この部位ではNKCC1 mRNA発現が増加していた。また, 異常皮質形成後のI層でのreelin遺伝子の発現は正常部位と同様であった。

(杉本, 清水, 山本, Luhmann¹, 上野, 福田)¹デュッセルドルフ大学

4. ヒトてんかん原性皮質形成異常組織の Cl^- トランスポーター・チャンネルとreelin発現の解析:

ヒトのKCC2, NKCC1及びreelinのmRNAのオリゴcDNAプローブを合成し, 国立静岡神経医療センターでの外科手術により摘出された皮質形成異常組織を凍結保存して浜松医大に送り, 超薄切片を作成して*in situ* hybridization組織化学法を行った。ヒトてんかん原性皮質形成異常のひとつである皮質異形成組織では皮質は層構造を呈さずNKCC1遺伝子の発現増加もなかった。異形成組織に特徴的な巨大細胞のKCC2の遺伝子発現は正常部位と同程度であったが, その周囲の小型細胞では発現が減少しており, 異形成組織におけるてんかん原性への Cl^- 調節異常の関与が示唆された。またreelin遺伝子の発現量は著しく低下していた。

(清水, 井上, 田中³, 山田², 福田)²静岡大学大学院, ³国立静岡神経医療センター

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. マウス胎仔脳への電気穿孔法を用いたEGFP遺伝子導入による移動細胞の可視化：

移動中の細胞に特異的にEGFPを発現させて移動後の細胞と識別する為、ラット胎仔を用いて、CMVプロモーターによるEGFP発現プラスミドを用いた遺伝子導入を電気穿孔法により行った。しかし、有効な遺伝子発現が得られず、プロモーターをEF1に変更しても同様であった。そこで、マウス胎仔を用いてCAGプロモーターによる遺伝子導入を行ったところ、脳室帯の細胞にEGFPの蛍光を確認できた。今後は移動中の細胞のみを識別することを可能にするため、各種プロモーターによる発現時期の違いを検討する。

2. 超高速超高感度背面照射型CCDカメラを用いた神経組織の興奮伝播の可視化：

新生大脳皮質辺縁帯のtangential sliceを作成し、超高速超高感度背面照射型CCDカメラを用いた膜電位イメージングを行って、辺縁帯の水平方向の興奮伝播を世界で初めて可視化した。辺縁帯では高 $[Cl^-]_i$ によりGABAが興奮性伝達物質として作用して、それによって活動電位が放射状に伝播することを実際に示したことは大きな意義がある。

3. 大脳皮質形成異常の成因の解析：

モデル動物も含め皮質形成異常と Cl^- トランスポーターに着目した研究は他になく、細胞移動と Cl^- ホメオスタシスに関するこれまでの研究成果があつてこそその着想である。I-IV層のみの異常皮質を形成し polymicrogyria のモデルと考えられる focal freeze-lesion では、傷害部位近傍の細胞だけに Cl^- トランスポーターの発現バランスの幼若化がおこることにより $[Cl^-]_i$ が再び上昇し、GABA/グリシンによる Ca^{2+} 流入がおこり、それらの細胞だけが移動することが、microgyrus形成の原因ではないかとの仮説を立てることができた。一方、ヒト皮質形成異常組織を用いた研究はMcGill大、UCLA、ロンドン精神研などの研究グループによって行われているが、 Cl^- ホメオスタシスの重要性に着目した研究はまだ無い。今回、異形成組織における Cl^- 調節の異常を示唆することができたので、この研究領域に先鞭を付けることができた。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

脳の発達初期には本来は抑制性神経伝達の主役であるGABAがむしろ興奮性伝達の主役ではないかとの仮説が世界的に注目を集め、米国のKriegstein, Barker, Schwartzkroin, Payne, Delpire, Sun, フランスのBen-Ari, ドイツのMisgeld, Luhmann, イタリアのCherubini, フィンランドのKailaなどと共に福田もこの領域のトップランナーの一人と認識され、彼らと親密に交流している。我々は Cl^- トランスポーターが Cl^- ホメオスタシスを変化させることにより脳の最も重要な抑制性神経伝達物質であるGABAの作用を調節し、神経回路機能の発達、可塑性や病態のあらゆる局面に深く関わっていることを示してきた。特に、発達初期や神経損傷時にはGABAがむしろ興奮性に作用することを見いだしたのはGABA=抑制性伝達物質という固定概念を崩す発見である。NKCC1も発達・病態に伴い変化することを見だし、両者の発現バランスこそが重要であると主張している点がユニークで、特に神経細胞の分化・移動や定着におけるKCC2/NKCC1の発現バランス調節による Cl^- ホメオスタシス変化の役割に着目しているのは世界でも我々だけである。こうしたことから、

「細胞内Cl⁻濃度は従来考えられていたほど‘静的’なものでなく、種々のCl⁻トランスポーターの作用によりダイナミックに変化し、それに応じてCl⁻をチャージキャリアとするGABA_A受容体を介する作用も抑制から興奮までダイナミックに変化する」と、福田が提唱している「能動的Cl⁻ホメオスタシス仮説」は世界的に注目されており（Ben-Ari, *Nature Reviews* 2002），国際シンポジウムの講演やScience等一流国際誌のrefereeの依頼も多い。本年5月に福岡で開催された「脳機能の解明国際シンポジウム」にLuhmannが来日し、福田とともに「トランスポーター」セッションのシンポジストとして講演を行った。このシンポジウムには世界第一線の研究者が数十名集まり、大変貴重な情報交換が出来た。なかでも、我々の研究分野のleading personであり、かつcompetitorでもあるKaila, Cherubiniといった著名研究者と確固たる親交が築けたのは大きな収穫であった。

日本学術振興会の日独科学協力事業では平成13-15年度事業として、Luhmannと福田の共同研究の助成を受けている。本年度は岡部が6-7月に訪独してKilb, Luhmannらと共同でCl⁻ホメオスタシスの調節分子やグリシン受容体の発現状態を解析した。また、福田も7月に訪独して、共同研究の結果の解析や今後の研究の打ち合わせを行うとともに、当地で行われたInternational Symposium on "Synaptic Transmission, Modulation and Plasticity"でシンポジストとして研究成果を発表した。さらに、7月13-17日に行われたヨーロッパ神経科学学会（パリ）に福田、岡部はLuhmann, Kilb両博士とともに参加し、共同研究の成果をヨーロッパ諸国の神経科学者達に広くアピールした。

本年4月から井上が助手として研究に加わった。細胞生物学のエキスパートである井上は早速Yeast two-hybrid法によるKCC2結合蛋白質の検索とその機能解析を行い、電気穿孔法による胎仔神経細胞への遺伝子導入も開始した。さらに、9月からは上野が助教授として赴任した。上野はATP/プリン受容体の先進的研究で国内外から注目される第一線の神経生理学者であり、引き続きこれらの研究を発展させるとともに、発現系を用いた生理実験のノウハウを活かして井上らと協力し、グリシン α 1受容体とKCC2を共発現した細胞系を確立してCl⁻トランスポーターの蛋白レベルでの機能調節の解析に道を開いた。彼ら二人の新加入は、これまでの我々の神経Cl⁻ホメオスタシスの研究に、細胞生物学・分子生物学的手法で新展開をもたらした。今後の成果が大いに期待される。

15 新聞、雑誌等による報道

1. 福田敦夫（2002）「Genes and Cognition」のめざすもの（先端脳ニューズレター3巻2号，P 2-4）
10月1日