

# 生理学第一

## 1 構成員

	平成20年3月31日現在
教授	1人
准教授	0人
講師（うち病院籍）	0人（0人）
助教（うち病院籍）	3人（0人）
助手（うち病院籍）	0人（0人）
特任教員（特任教授，特任准教授，特任助教を含む）	0人
医員	0人
研修医	0人
特任研究員	0人
大学院学生（うち他講座から）	4人（1人）
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員（教務職員を含む）	1人
その他（技術補佐員等）	0人
合 計	9人

## 2 教員の異動状況

- 福田 敦夫（教授）（H10. 4. 1～現職，H10. 10. 1～H18. 3. 31静岡大学大学院電子科学研究科併任）  
 井上 浩一（助教）（H14. 4. 1～現職，H19. 4. 1より休職）  
 熊田 竜郎（助教）（H17. 6. 15～19. 3. 31 助手；19. 4. 1～現職）  
 古川 智範（助教）（H19. 4. 1～現職）  
 森島 寿貴（助教）（H19. 4. 1～現職）

## 3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成19年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	5編（0編）
そのインパクトファクターの合計	25.17
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	1編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	2編（0編）
そのインパクトファクターの合計	6.23
(4) 著書数（うち邦文のもの）	0編（0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

(1) 原著論文 (当該教室所属の者に下線)

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. Heck N, Kilb W, Reiprich P, Kubota H, Furukawa T, Fukuda A, Luhmann H J: GABA<sub>A</sub> receptors regulate neocortical neuronal migration *in vitro* and *in vivo*. *Cereb Cortex* 17: 138-148, 2007.
2. Nakanishi K, Yamada J, Takayama C, Oohira A, Fukuda A: NKCC1 activity modulates formation of functional inhibitory synapses in cultured neocortical neurons. *Synapse* 61: 138-49, 2007.
3. Yamada J, Furukawa T, Ueno S, Yamamoto S, Fukuda A: Molecular basis for the GABA<sub>A</sub> receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 17: 1782-1787, 2007.
4. Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A, Luhmann H J, Kilb W: Kinetic properties of Cl<sup>-</sup> uptake mediated by Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27: 8616-8627, 2007.
5. Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann H J, Fukuda A: Changes in the expression of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci Res* 59: 288-295, 2007.

インパクトファクターの小計 [25.17]

(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

1. Wei B, Sato K, Fukuda A: Rat facial hyperalgesia induced by the trigeminal nerve ligation is associated with changes in Cl<sup>-</sup> transporters expression in trigeminal spinal nucleus and ganglion. *J Brain Sci* 33: 40, 2007.

(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

1. Kumada T, Jiang Y, Cameron D B, Komuro H: How does alcohol impair neuronal migration? *J Neurosci Res* 85: 465-470, 2007.

インパクトファクターの小計 [3.268]

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. Jiang Y, Kumada T, Cameron D B, Komuro H: Cerebellar Granule Cell Migration and the Effects of Alcohol. *Dev Neurosci* 30: 7-23, 2008.

インパクトファクターの小計 [2.966]

#### 4 特許等の出願状況

	平成19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19年度
(1) 文部科学省科学研究費	4件 (1,400万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 ( 90万円)
(3) 他政府機関による研究助成	2件 (1,311万円)
(4) 財団助成金	0件 ( 0万円)
(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）	1件 ( 10万円)

##### (1) 文部科学省科学研究費

福田敦夫（代表者）特定領域研究「大脳皮質回路形成過程のGABA<sub>A</sub>受容体・Cl<sup>-</sup>輸送体・タウリンの機能協関」340万円（継続）

福田敦夫（代表者）特定領域研究「脳の発達環境におけるシナプス外シグナルとセンシング機構の普遍性とダイバシティ」330万円（新規）

福田敦夫（代表者）基盤研究（B）「Cl<sup>-</sup>分布変化とGABA<sub>A</sub>受容体を介した各種ストレスによる皮質神経回路の発達異常」670万円（新規）

熊田竜郎（代表者）若手研究（B）「神経細胞の移動時におけるCa<sup>2+</sup>シグナル伝達系と[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>の相関関係」60万円（継続）

##### (2) 厚生科学研究費

福田敦夫（分担研究代表）厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「てんかんに対する新たな治療開発と標準化に関する研究」班 「生理学的手法を用いた将来のてんかん治療開発に関する研究」90万円（新規）主任研究者 国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター 井上有史

##### (3) 他政府機関による研究助成

福田敦夫（研究参加者）科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業（CREST）研究領域「脳の機能発達と学習メカニズムの解明，研究総括 津本忠治」研究課題「発達および障害回復期における神経回路の再編成機構，研究代表者 自然科学研究機構生理学研究所教授 鍋倉淳一」研究題目「神経回路の発達・再編と再臨界期へのCl<sup>-</sup> transporterにリンクしたGABA応答の関与の証明」1,071万円（継続）

福田敦夫（分担者）文部科学省（21世紀COEプログラム「メディカルフォトンクス ― ころとからだの危険を探る ―」）：（事業推進担当者 拠点リーダー 寺川進）「こころの神経回路の光学的解析」240万円（継続）

## 7 学会活動

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

### (1) 国際学会等開催・参加

#### 1) 国際学会・会議等の開催

Fukuda A: Official Member, YIA Awards Committee, The 7th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Sendai, Japan, December, 2007, 50人.

#### 3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

1. Fukuda A, Wei B, Furukawa T, Kumada T, Okabe A, Ohno K, Sato K: Rat facial hyperalgesia induced by the trigeminal nerve constriction is associated with changes in Cl<sup>-</sup> transporters expression in the spinal nucleus and the ganglion. The 7th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, Sendai, Japan, December, 2007.
2. Fukuda A: The Cl<sup>-</sup> homeo-dynamics modulates GABA actions and hence the neural network dynamics. ISTC-RIKEN BSI workshop (44th Japan Workshop): Bridging non-linear dynamics with cellular and molecular neuroscience, Wako, March, 2008.

#### 4) 国際学会・会議等での座長

Fukuda A: The 7th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, Sendai, Japan, December, 2007.

Fukuda A: COE International Symposium: Medical Photonics "Viruses Shed Light on Neuroscience." Pavel Osten "Stereotaxic gene delivery in the rodent brain by recombinant viral vectors". Hamamatsu, Japan, February, 2008.

#### 5) 一般発表

##### ポスター発表

1. Morishima T, Hirano S, Hozumi N, Yanagawa Y, Takayama C, Yoshida S, Fukuda A: Transition of GABA releasing pattern modulates the tone of granule cell development, migration or proliferation. 37th Annual Meeting, Society for Neuroscience, November 2007, San Diego, CA.
2. Komuro H, Cameron D B, Kawanami A, Kumada T, Jiang Y: Intrinsic turning activity of neurons controlled by second messenger signaling pathways. 37th Annual Meeting, Soci-

ety for Neuroscience, November 2007, San Diego, CA.

(2) 国内学会の開催・参加

1) 主催した学会名

福田敦夫：第30回日本神経科学大会，シンポジウム"Mechanisms and functional significance of tonic GABA<sub>A</sub> receptor mediated conductance"「トニックGABA<sub>A</sub>コンダクタンスのメカニズムと機能的意義」オーガナイザー，2007年9月，横浜。

福田敦夫：第12回静岡健康・長寿学術フォーラム，実行委員，2007年10月，静岡。

3) シンポジウム発表

1. Fukuda A：Modal shift of the tonic GABA<sub>A</sub> receptor-mediated conductance during neocortical development，シンポジウム"Mechanisms and functional significance of tonic GABA<sub>A</sub> receptor mediated conductance"，第30回日本神経科学大会，2007年9月，横浜。
2. Fukuda A："How does chloride ion modulate brain function?"「塩素イオンはどのように脳の機能を変えるか？」第12回静岡健康・長寿学術フォーラム，2007年10月，静岡。
3. 福田敦夫：脳神経細胞の応答の多様性を調べる研究方法と課題。メディカルイノベーションフォーラム2007 HAMAMATSU，2007年11月，浜松。

4) 座長をした学会名

福田敦夫 第30回日本神経科学大会

福田敦夫 第12回静岡健康・長寿学術フォーラム

福田敦夫 平成19年度生理学研究所研究会「シナプス伝達ダイナミクス解明の新戦略－シナプス伝達の細胞分子調節機構－」

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

福田敦夫 日本生理学会 評議員，常任幹事，学術研究委員会委員

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 日本脳科学学会 評議員

福田敦夫 日本神経科学学会 賞選考委員

## 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）	1件	0件

(1) 国内の英文雑誌の編集

Epilepsy（メディカルレビュー社） 編集アドバイザー

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

## 9 共同研究の実施状況

	平成19年度
(1) 国際共同研究	3件
(2) 国内共同研究	9件
(3) 学内共同研究	4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<sup>-</sup>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）：マインツ大学生理-病態生理学研究所, Heiko J. Luhmann 教授, Werner Kilb 博士（ドイツ）

様式：研究者の派遣, 技術・アイデアの交換

研究費：

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）

テーマ：clomeleon遺伝子導入による大脳皮質の発達過程でのCl<sup>-</sup>ホメオスタシス評価

相手機関（国）：Duke 大学神経生物学講座, George J. Augustine 教授（アメリカ）

様式：技術の交換, 試料提供

研究費：

### (2) 国内共同研究

山田順子（弘前大学大学院医学研究科）パッチクランプと single-cell RT-PCR による細胞機能解析

柳川右千夫（群馬大学大学院脳神経発達統御学遺伝発達行動学分野）GAD67-EGFP knock-inマウスを用いたGABAとCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの発達過程と病態の解析

Thomas Knöpfel（理化学研究所神経回路ダイナミクス研究チーム）EYFPトランスジェニックマウスを用いたCl<sup>-</sup>ホメオスタシス解析

原英夫（国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部）アルツハイマー病モデルマウスのベクター治療効果の神経生理学的解析

光山冬樹（藤田保健衛生大学脳外科）海馬 LTP の細胞内情報伝達の解析

吉田祥子（豊橋技術科学大学物質工学系）酵素反応を用いた細胞外アミノ酸測定法の開発

高山千利（琉球大学医学部形態機能医科学講座）GABA作動性シナプスとCl<sup>-</sup>トランスポーター局在の発達過程と病態の解析

山本純偉（筑波大学大学院人間総合科学研究科）大脳新皮質トニックGABA作用の電気生理学

## 的解析

松本直道（横浜市立大学大学院医学研究科 環境分子医科学）精神神経疾患発症素因のGABA神経伝達への影響

### (3) 学内共同研究

佐藤康二・大野浩司（解剖学）Cl<sup>-</sup>トランスポーター遺伝子発現と機能解析

中原大一郎（心理学）マイクロダイアライシスを用いたタウリン分泌の解析，母体ストレスの胎仔脳への影響の生理学的解析

松島芳隆（化学）タウリン光学異性体を用いた脳機能変化の解析

沖 隆（第二内科）RIAを用いたマウス血清および胎仔に含まれるコルチコステロン濃度の測定

## 10 産学共同研究

	平成19年度
産学共同研究	2件

1. ノブオ電子(株)バイオイメージ用超高速高感度冷却CCDカメラシステムの研究開発
2. (株)アルプスエンジニアリング 軟X線顕微鏡による実用生体細胞観察装置の開発

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. Cl<sup>-</sup>トランスポーターKnock-downによる細胞移動の[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>依存性の検討 [熊田・福田]：

NKCC1 mRNAの転写を干渉するshRNAをコードするコンストラクトのプラスミドを調整し、HcRedプラスミドと同時に電気穿孔法で胎仔脳室帯の新生神経細胞に導入した。2種類のプラスミドは90%以上の高率で同一の細胞に導入されるので、HcRedを発現した細胞にはsiRNAも導入されていることになる。こうしてNKCC1遺伝子の転写をsiRNAでknock-downして、Cl<sup>-</sup>濃度を調節したホールセルパッチクランプで[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>を測定したところ平均値は過分極側にシフトした。しかし、目下のところradial移動の顕著な異常はでていないので、HcRedのみの場合の移動との比較の必要性が示唆された。NKCC1mRNAの減少を確認するためreal-time PCR法を行った。

2. 排出型Cl<sup>-</sup>輸送体KCC2の機能発現抑制因子の検討 [福田・古川・熊田]：

KCC2にはいくつかのリン酸化部位が知られており、リン酸化あるいは脱リン酸化によってCl<sup>-</sup>排出能が抑制されている可能性を検討するため、ラット胎生15日目にインビボ電気穿孔法でKCC2を強制発現させた細胞からCl<sup>-</sup>濃度を調節したホールセルパッチクランプで[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>変化を測定し、リン酸化阻害剤（スタウロスポリン）および脱リン酸化阻害剤（5酸化バナジウム酸）をスライスに投与して[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>変化を測定したところ、胎生18日の移動細胞ではいずれにおいても変化を認めなかった。ところが、生後1週前後のKCC2が機能し始める時期で同様の実験を行うとKCC2過剰発現細胞において[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が有意に減少し、広範性リン酸化阻害剤で[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>が低下した。すなわち、生後1週ではリン酸化によるKCC2機能抑制がおこるが、細胞移動期の胎生18日ではこのプロセスが起こらないことが示唆された。

### 3. タウリンの放出および取り込みメカニズムの検討 [福田・森島] :

免疫組織化学法で検討した taurine と taurine transporter の胎仔脳の分布は類似していた。すなわち、脳室帯を除く大脳皮質全体に多くみられ、特に辺縁帯と脳室下帯に集積していた。しかし、生後 1 週間で両者とも大脳皮質から消失した。また、GES で胎仔脳スライスを還流すると細胞外 taurine 濃度が約 50% 増加した。すなわち母体由来 taurine が皮質層構造形成に重要な部位に transporter により取り込まれる可能性を示唆している。taurine 抗体による免疫電顕では、E17 マウスの脳室下帯ではシナプス構造ははっきりせず、taurine は細胞体や線維に存在していた。一方、P0 ラットの辺縁帯ではシナプス構造は認めしたが、taurine は小胞には局在していなかった。

### 4. 胎仔脳内タウリン欠乏モデルの作成 [福田・古川・森島] :

胎仔タウリンは大部分母体由来なので D-システインスルフィン酸をマウスの妊娠 13-15 日に 24 時間毎に母体に腹腔内投与してタウリンの合成を阻害したところ、HPLC 法で測定した細胞外タウリン濃度は約 50% 減少していた。免疫組織化学法では、タウリンは辺縁帯と脳室下帯の細胞にきわめて高濃度に存在していた。しかし、タウリン欠乏モデルにおいてもこれらの分布に目下のところ顕著な差は無かった。パッチクランプ記録では taurine transporter 阻害剤の GES によりトニックカレントは増大した。細胞外 GABA が殆ど無い GAD67-GFP knock-in マウズホモ接合体でも細胞外タウリンによる GABA 受容体を介するトニックカレントが記録され、これは taurine 欠乏モデルでは消失していた。

### 5. 母体ストレスモデルマウスの作成と仔マウスへの影響の評価 [福田] :

妊娠 15 日目から 3 日間、45 分間の光刺激下での拘束ストレスを毎日 3 回母マウス (GAD67-GFP knock-in の +/- ないし +/+) に与えた。+/- の母体は +/+ の母体より、コントロール群でもストレス群でも有意に血中コルチコステロンが増加していた。胎生 17.5 日目の胎仔体重、コルチコステロンはストレス群で有意に減少、増加していた。また、+/- の母体の胎仔の変化がより大きかった。母体ストレスの有効性が確認されたので、+/+ の母体にストレスをかけ +/- 胎仔への影響を評価する系が出来た。

### 6. GAD67-GFP knock-in マウスの focal freeze-lesion (FFL) モデルの作成 [熊田・福田] :

GAD67-GFP knock-in マウス母体に BrdU を投与し、E14.5 あるいは E17.5 に発生した皮質板細胞をラベルした。生後 0 日齢で大脳皮質 FFL を作成し、4 日後に脳切片をつくり観察した。興味深いことに、necrotic center を囲むように GABA 細胞が集積していた。GABA 細胞の外周に皮質板細胞の移動が確認され、移動してくるのは E17.5 に発生した細胞で E14.5 発生の細胞は移動していなかった。

## 13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

我々は遺伝子導入 3 日後の胎齢 18 日では異所性 KCC2 発現細胞の移動は正常で  $[Cl^-]_i$  も変化しないことを発見した。そこでさらに生後 1 日、7 日で脳スライスを作製して異所性 KCC2 発現細胞を EGFP 蛍光で確認し、電極内液の  $Cl^-$  濃度を受動的  $[Cl^-]_i$  にあわせたパッチクランプで  $[Cl^-]_i$  を測定して



(GABA逆転電位), 異所性KCC2を発現していない細胞(EGFP発現なし)と比較したところ, 生後0日でも7日でも異所性KCC2発現細胞では有意に $[Cl^-]_i$ が低下していた。したがって異所性KCC2蛋白質は発現していても胎生期には機能しておらず, 生後に機能を獲得することを発見した。

GAD67-GFP knock-inマウス(群馬大 柳川, 理研 小幡)の生後0日齢で大脳皮質FFLを作成し, 4日後に脳切片をつくり観察したところ, necrotic centerを囲むようにGABA細胞(GFP陽性)が集積していることを発見した。つづいて豊橋技科大の吉田が開発したGABAイメージング法(GABAが $\alpha$ ケトグルタル酸存在下で分解酵素のアミノトランスフェラーゼとコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素によって最終産物のsuccinateに分解される際に, NADPが還元されて発生するNADPHの蛍光をイメージングシステムで観察する)を応用した共同研究を行い, 細胞外に放出されたGABAを空間定量的に測定することができるようになった。組織の障害再生の過程で一過性にGABA細胞の集積に一致して細胞外GABAが増加していることをつきとめた。今後, 皮質形成異常の形成とGABA細胞の移動, GABAの放出, それらのメカニズムについて検討していく。

以上の一連の業績は注目され, 福田が数箇所で開催された招待セミナーを行った(九州大学 1/31/2008, 京都大学 2/26/2008, 大阪大学 3/6/2008, 理研 3/12/2008)。今後はこのインビボ胎仔大脳皮質におけるクロライドトランスポーターKCC2の翻訳後修飾についてそのメカニズムの解明に取り組む。

#### 14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

GABA作用の脳発達に伴う逆転現象の原因が2種類の $Cl^-$ トランスポーターの発現バランスにあることを初めて分子レベルで明らかにした画期的な仕事として多くの研究者に注目された論文( $Cl^-$  uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 557: 829-841, 2004.)は順調にcitation (81)を伸ばしており世界的に注目されている。これらにより理化学研究所で開催されたISTC-RIKE BSI workshop (44th Japan Workshop) “Binding non-linear dynamics with cellular and molecular neuroscience.”に招待され講演を行った。

韓国の梨花女子大のChung教授の研究室から2名の大学院生が派遣され, 第16回メディカルホトニクスコースにCOE事業として招待し, 1週間イメージングの教育を英語で行った。また12月に仙台で行われたThe 7th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Musclesに上記のうち1名が発表を行いYoung Investigator Awardを受賞した。9月に第30回日本神経科学大会で“Mechanisms and functional significance of tonic GABA receptor mediated conductance”をAlexey Semyanov博士とともにオーガナイズした。また, 10月に同氏を本学に招きCOEセミナーを行い研究交流した。