

生理学第一

1 構成員

	平成21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	1人
大学院学生（うち他講座から）	2人（0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）	1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20年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	4編（0編）
そのインパクトファクターの合計	37.489
(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）	1編（0編）
そのインパクトファクターの合計	2.817
(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. Koyama Y, Matsuzaki S, Gomi F, Yamada K, Katayama T, Sato K, Kumada T, Fukuda A, Matsuda S, Tano Y, Tohyama M: Induction of amyloid β accumulation by ER calcium disruption and resultant upregulation of angiogenic factors in ARPE19 cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 49: 2376-2383, 2008.
2. Saito H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Urano K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N: De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. Nat Genet 40: 782-788, 2008.
3. Kilb W, Hanganu IL, Okabe A, Shimizu-Okabe C, Fukuda A and Luhmann HJ: Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. J Neurophysiol 100: 698-707, 2008.
4. Tamada A*, Kumada T*, Zhu Y*, Matsumoto T, Hatanaka Y, Muguruma K, Chen Z, Tanabe Y, Torigoe M, Yamauchi K, Oyama H, Nishida K, Murakami F. (*; equally contributed): Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. Neural Dev 3: 29 2008.

インパクトファクターの小計 [37.489]

(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. Wang T, Fukuda A: Migration of GABAergic interneurons during the formation of microgyrus in aberrant cortical organization of mouse model. J Brain Sci 34: 57, 2008.

(3) 総 説

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 DB, 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 [2.817]

4 特許等の出願状況

	平成20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20年度
(1) 文部科学省科学研究費	5件 (1,430万円)

(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	1件 (833.6万円)
(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 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 320万円 (継続)

福田敦夫 (代表者) 特定領域研究 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 340万円 (新規)

福田敦夫 (代表者) 基盤研究 (B) Cl⁻分布変化とGABA_A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 500万円 (継続)

福田敦夫 (代表者) 萌芽研究 能動的クロライドホメオスタシス仮説にもとづく三叉神経痛メカニズムへのアプローチ 110万円 (新規)

熊田竜郎 (代表者) 基盤研究 (C) グリオーマの移動・浸潤時に起こる細胞内イオン変化の可視化とその応用性の検討 160万円 (新規)

(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 (継続) 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⁻ transporterにリンクしたGABA応答の関与の証明」833.6万円 (継続)

(5) 受託研究または共同研究

福田敦夫 (研究代表者) 奨学寄附金 (静岡県産業労働福祉協会), 10万円

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	2件
(2) シンポジウム発表数	1件	0件

(3) 学会座長回数	2件	1件
(4) 学会開催回数	2件	3件
(5) 学会役員等回数	0件	5件
(6) 一般演題発表数	1件	

(1) 国際学会等開催・参加

1) 国際学会・会議等の開催

1. Fukuda A, 運営委員, International Symposium on Physiology of Anion Transport (PAT) and Cell Volume Regulation (CVR). Japan, Okazaki, 2009.
2. Fukuda A, Official Member, The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, Busan, Korea, January 2009

3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

1. Fukuda A, Furukawa T, Morishima T, Kumada T: Ambient GABA and taurine during corticogenesis. 2009 IUPS, International Conference of Physiological Science and 8th Korea-Japan Joint Symposium, Busan, Korea, January 2009.

4) 国際学会・会議等での座長

1. 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.
2. Fukuda A, 2009 International Union of Physiological Sciences, International Conference of Physiological Sciences in conjunction with The 8th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. Symposium 9: Ion Channels as Therapeutic Targets, Busan, Korea, January 2009.

5) 一般発表

ポスター発表

1. Fukuda A, Wei B, Furukawa T, Kumada T and Sato K: Changes in KCC2 and NKCC1 expressions in spinal nucleus and ganglion of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. The 6th Forum of European Neuroscience, July 2008, Geneva, Switzerland.

(2) 国内学会の開催・参加

1) 主催した学会名

1. 福田敦夫: 「シナプス伝達の細胞分子調節機構」提案代表者, 平成20年度生理学研究所研究会, 2008年9月, 岡崎
2. 福田敦夫: 第17回メディカルホトニクスコース, 運営委員, 2008年8月, 浜松
3. 福田敦夫: 第32回日本神経科学大会: プログラム委員

2) 学会における特別講演・招待講演

1. 福田敦夫: 「てんかん病態の新しい仮説としての能動的Cl⁻ホメオスタシス」 第14回漆山てんかん懇話会, 2008年6月, 静岡
2. 福田敦夫: 「研究者に必要なidentityとは」 文部科学省特定領域研究「細胞感覚」第三回若手の会 メッセージ講演, 2008年12月, 蒲郡

4) 座長をした学会名

1. 福田敦夫: 精神・神経疾患研究委託「てんかんに対する内科・外科的治療に関する総合的研究」班会議, 2008年12月, 東京

(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 日本脳科学会 評議員

福田敦夫 日本神経科学学会 賞選考委員会委員長, 国際対応委員会委員

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

J Neurosci (USA) 1回, Brain Cell Biol (USA) 1回, Neurotoxicology (USA) 1回,
J Neurochem (USA) 1回

9 共同研究の実施状況

	平成20年度
(1) 国際共同研究	2件
(2) 国内共同研究	12件
(3) 学内共同研究	6件

(1) 国際共同研究

1. 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): 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

研究成果: Kilb W, Hanganu IL, Okabe A, Shimizu-Okabe C, Fukuda A, Luhmann HJ: Glycine

receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. J Neurophysiol 100: 698-707, 2008.

研究費：

2. テーマ：clomeleon遺伝子導入による大脳皮質の発達過程でのCl⁻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⁻ホメオスタシスの発達過程と病態の解析

Thomas Knopfel（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⁻ホメオスタシス解析，酵素反応を用いた細胞外アミノ酸測定

原 英夫（藤田保健衛生大学神経内科）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）GABA 作動性シナプスと Cl⁻トランスポーター局在の発達過程と病態の解析

松本直道（横浜市立大学大学院医学研究科）精神神経疾患発症素因の GABA 神経伝達への影響
岡野栄之（慶應義塾大学大学院医学研究科）KCC2 RNAi を用いた脊髄損傷モデル動物の機能評価

鍋倉淳一（生理学研究所生体恒常機能発達機構）*in situ* hybridization 法による虚血モデルにおける KCC2 遺伝子の発現パターンの変化

遠山正彌（大阪大学医学部）Ca²⁺ イメージング法によるアルツハイマー病原因物質 Aβ タンパク質の蓄積機構の解析

関野祐子（東京大学医科学研究所）酵素反応を用いた扁桃体での細胞外 GABA イメージング

(3) 学内共同研究

佐藤康二・大野浩司（解剖学）Cl⁻トランスポーター遺伝子発現と機能解析

片山泰一（解剖学）Ca²⁺ イメージング法によるアルツハイマー病原因物質 Aβ タンパク質の蓄積機構の解析

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

小杉伊三夫 (第二病理) 先天性サイトメガロウイルス感染性モデルマウスにおける発達期シナプス回路網形成異常の解析

10 産学共同研究

	平成20年度
産学共同研究	1件

1. アルプスエンジニアリング (株) 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. KCC2強制発現インビボモデルの作成：[福田]

胎齢15.5日でFlag-KCC2とEGFPのcDNA plasmidを電気穿孔法で遺伝子導入して移動細胞にKCC2を強制発現させ、胎齢18.5日と、生後7日の大脳皮質細胞に対して、パッチクランプ法を適用してGABA逆転電位 (E_{GABA}) を記録した。胎齢18.5日におけるKCC2強制発現細胞はリン酸化阻害剤 (スタウロスポリン) の投与により E_{GABA} は過分極側へシフトしたが、生後7日齢では変化なかった。チロシン脱リン酸化阻害剤 (5 酸化バナジウム酸) では、胎齢18.5日、生後7日齢いずれのKCC2強制発現細胞の E_{GABA} にも影響を与えなかった。すなわち、細胞移動期特異的にKCC2機能がリン酸化により抑制されていた。

2. タウリン受容体のセンシングモジュールとしてのダイバシティとモーダルシフト：[福田, 森島]

マウスの胎生期から生後にかけて、タウリン応答を仲介する受容体は $GABA_A$ 受容体であった。胎生期ではタウリンとタウリン輸送体は一致した分布で、脳室帯や基底核原基に存在せず、辺縁帯とサブプレート/中間帯に特に多く、皮質板がこれについて多かった。生後に両者とも減少傾向を示し、4週では殆ど認められなくなった。一方で胎生期のGABA細胞は基底核原基を始め、辺縁帯と脳室下帯に集積し、ついて皮質板に多かったが、タウリンと対照的にサブプレート/中間帯で少ない分布を示した。細胞外GABAの空間分布はGABA細胞の分布と良く一致していた。

3. タウリンのストレス応答の検討：[福田]

妊娠したGAD67-EGFPノックインマウスの+/+母体より+/-母体で顕著にコルチコステロンが上昇していたので、+/+母体を拘束ストレスの実験に供した。胎仔脳 (+/-) への影響ではHPLC法にてGABA含有量やタウリン含有量に減少傾向があったが有意差はなかった。しかし、細胞外GABAがストレス胎仔で上昇している可能性があった。

4. NKCC1の代償的発現増加と異所性KCC2蛋白の膜移行の検討：[古川, 熊田]

胎齢14.5日でFlag-KCC2 cDNA plasmidを子宮内電気穿孔法で遺伝子導入した胎仔脳の新生神経細胞でのNKCC1の発現増加はなかった。この細胞を3日間培養し、抗Flag抗体・共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察で、異所性KCC2局在を細胞膜に認めた。

5. KCC2蛋白の翻訳後修飾の発達的变化の検討： [福田]

胎齢18.5日では異所性KCC2発現細胞の細胞内Cl⁻イオン濃度 ([Cl⁻]_i)は異所性KCC2を発現していない細胞 (mRFP発現なし) と同等であったが、生後1日と7日において、有意に過分極側へシフトしていた。したがって、この異所性KCC2蛋白に対する抑制は胎生期特異的であると考えられた。

6. KCC2蛋白機能抑制因子の検討 (インビボと分散培養法での比較)： [福田]

胎内環境に存在する何らかのKCC2抑制因子が働いている可能性を明らかにするため、1.と同様の遺伝子導入を行った24時間後に胎仔脳を摘出し、2日間 Neurobasal Mediumで培養して、胎齢18.5-19.5日の急性スライス実験と異所性KCC2導入後の日数を一致させ、Flag-KCC2 とmRFPを共発現した細胞とmRFPのみを発現した細胞の [Cl⁻]_iをパッチクランプで測定して比較した。急性スライスの場合と異なり、培養細胞では、flag-KCC2とmRFPを共発現した細胞のGABA逆転電位は、mRFPのみを発現した培養細胞のGABA逆転電位と比べて有意に低かった。以上から、胎内環境に存在する何らかの因子が異所性KCC2機能を抑制していると考えられた。

7. 三叉神経痛モデルにおけるKCC2とNKCC1 mRNAの発現変化： [熊田, 福田]

1. で作製した三叉神経痛モデルの脊髓路核尾部と神経節でのKCC2とNKCC1のmRNA発現の変化を術後1 - 4週にin situ hybridization法を用いて半定量した。KCC2の発現は脊髓路核内の中継ニューロンで、痛覚閾値の低下や痛覚スコアの増加の時間的経過と良く一致して傷害側で術後1 - 3週の間低下し、4週後には回復した。従来の我々の報告どおり、KCC2の神経節での発現は認められなかった。NKCC1の発現は脊髓路核尾部では変化無く、傷害側の三叉神経節の一次ニューロンで時間的経過と一致して増加していた。細胞体の直径による神経節細胞の分類ではAβとC線維の細胞体でNKCC1発現が増加していた。

8. 神経回路の発達・再編と再臨界期へのCl⁻ transporterの関与の証明： [熊田, 森島]

胎生期にBrdUで発生細胞をラベルし、生後0日齢で新生仔の大脳皮質にfocal freeze-lesionを作成し、傷害部位への移動細胞の出生時期を同定した。GABA細胞の早期の移動とそれらから放出されるGABAが濃度勾配を形成しており、これが皮質板細胞の出生時期依存性の異常な細胞移動に関与して、その結果微小脳回が形成される可能性が示唆された。

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. 口腔内からのアプローチによって、右の三叉神経の第II枝の感覚神経の末梢部位 (眼窩下神経) を組織反応性の強い吸収糸で圧迫結紮し片側の三叉神経線維の圧迫傷害モデルを作製した。von Frey filamentによる顎顔面領域への刺激に対する引っ込み反射 (痛覚の指標) の閾値と触刺激 (0.4g) に対する行動評価による痛覚スコアを傷害側と健常側で比較して、各々痛覚過敏とアロディニア (触刺激による痛覚反応) を判定した。これらの評価を術前1週から術後4週まで毎週1回行った。痛覚過敏とアロディニアは術後1-3週間持続したが、4週後には回復した。

2. アストロサイトのGABA応答はGABA_A受容体を介したCl⁻の細胞外への流出を主とし、さらにギャップジャンクションを介してCl⁻を空間的に補填することで過剰神経活動時のCl⁻濃度勾配破綻を防いでいる可能性が考えられた。グリア細胞はシナプス間隙のイオン濃度を調整することで神経活動の調整に関わるとされ、特にギャップジャンクションによって回路網を形成するアストロサイトの機能近年のてんかん研究において注目を集めている。GAT阻害剤はシナプス間隙からアストロサイトへのCl⁻流入を減じることで、シナプス後膜でのCl⁻濃度勾配の破綻を抑制する可能性があり、抗てんかん薬のターゲットとなりうると思った。

3. Clomeleon遺伝子導入による移動細胞の [Cl⁻]_i測定： [熊田]

Clomeleon遺伝子を導入したグリオーマ細胞はClomeleonの蛍光を発生しながら移動するのを観察した。Cl⁻変化に応答したClomeleonのFRET効率の変化があったので、移動過程とCl⁻ホメオスタシスの変化を同時にしかも時空間的に解析出来た。NKCC1の阻害剤であるbumetanide添加によりグリオーマ細胞の [Cl⁻]_iを低下させると、移動速度が上昇することを見出した。

4. shRNA法を用いたインビボでのCl⁻トランスポーターknock-downモデルの作成： [福田, 熊田]

NKCC1遺伝子の発現が knock-downされた細胞を蛍光で同定できるGAD67-GFP knock-inマウスのインビボモデルを作製するため、マウスnkcc1のsiRNAを作製した。細胞株に新たに得たマウスnkcc1遺伝子と共発現させ、single-cell real-time PCR法でsiRNAの効果を判定した。単一細胞レベルのmRNAを用いてもNKCC1遺伝子の定量的な解析ができたので、knock-downの効果とNKCC1減少による [Cl⁻]_iの低下をパッチクランプ法で解析することが可能となった。

5. shRNA法を用いたCl⁻トランスポーターknock-downによるモーダルシフト： [熊田, 森島]

マウスNKCC1のsiRNAを作製し、single-cell real-time PCR法でsiRNAの効果を判定した。子宮内電気穿孔法で胎仔の新生神経細胞に選択的に導入することで、NKCC1減少による [Cl⁻]_iの低下をパッチクランプ法で解析できる。また電気穿孔法で遺伝子導入して移動細胞にKCC2を強制発現させた。 [Cl⁻]_iの低下を認めなかったが、リン酸化阻害剤の投与によりE_{GABA}は過分極側へシフトした。すなわち、KCC2の強発現とリン酸化阻害により [Cl⁻]_iのモーダルシフトを誘導し、細胞移動の変化を解析する系ができた。

6. 豊橋技術科学大学の吉田祥子との共同開発で酵素反応を用いた細胞外GABAのイメージング法を確立した。シナプス外に放出されたGABAの空間的分布を定量的に比較できる画期的方法で、今後はトニックGABA作用の詳細解明に多大な貢献が期待できる。

14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

発達期大脳皮質細胞の [Cl⁻]_iをパッチクランプ法で計測し、同時にsingle-cell RT-PCR法でKCC2, NKCC1の発現を解析した結果、移動期の皮質板細胞はKCC2を欠き [Cl⁻]_iが非常に高いが、移動後はNKCC1の低下とKCC2の増加により [Cl⁻]_iが低下しGABA応答も脱分極から過分極に発達することを見出し、大脳皮質形成過程の興奮性GABA作用とCl⁻ホメオスタシスの分子基盤を世界で初め

て明らかにした論文 (J. Physiol. 2004; 557: 829-841) の被引用数が114になった。

Fed. Eur. Neurosci. Soc.とInt. Brain Res. Org. が合同で行う若手教育プログラム (Programme of European Neuroscience Schools) の講師を依頼された。

神経科学・生理学の若手研究者の信望も厚く、文部科学省特定領域研究班の若手の会で「研究者に必要なidentityとは」と題してメッセージ講演を行った。

Korea Institute of Science and Technology に招待され (C. J. Lee) 細胞外GABA, タウリンと神経発達の講演をおこなった。国内では三重大学と名古屋市立大学において大学院特別セミナーを行った。