

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390058

研究課題名（和文） 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研究課題名（英文） Cl-homeodynamics and resulting GABA_A-receptor-mediated functional changes underlying the cortical developmental disorder induced by stress.

研究代表者

福田 敦夫 (FUKUDA ATSUO)

浜松医科大学・医学部 生理学第一講座・教授

研究者番号：50254272

研究成果の概要（和文）：妊娠中の精神的ストレスが出生児の脳機能に与える影響が懸念されている。これらストレス脆弱性には臨界期が存在すると考えられる。そこで、神経細胞の種類と細胞発生時期を識別できるモデルマウスを作製し、母体ストレスあるいは出生直後の傷害ストレスが仔脳の GABA 作用を攪乱し、細胞の分化・移動の障害を誘発することを明らかにした。さらに細胞種や分化・移動ステージでの感受性の差を解析し、母体ストレスや周産期脳傷害による発達障害の発生メカニズムを検討した。

研究成果の概要（英文）：The major inhibitory neurotransmitter GABA necessarily evokes excitation in immature brain, in contrast to inhibition in normal adult brain. Such excitatory GABA actions are involved in neural circuitry development. The dynamics of GABA actions modulated by Cl-homeodynamics may underlie the cortical developmental disorder induced by various stress. By using pathological model mice, we have studied how Cl-homeodynamics works in pathogenesis of cortical malformations induced by maternal stress or neonatal cortical injuries.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：神経生理

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：①細胞移動②母体ストレス③GABA④グルタミン酸⑤大脳皮質⑥皮質形成異常
⑦線条体原基⑧神経発生

1. 研究開始当初の背景

本来は Cl⁻流入により抑制性に働く GABA が神経細胞発生期では Cl⁻流出による興奮作用でニューロンの分化や細胞移動に関与したり、シナプスの形成・強化を促進する可能性が示唆されるなど、大脳皮質発達初期の GABA の役割は古典的概念の“抑制性伝達物質”とは大きく異なることが最近明らかになってきた。すなわち、神経前駆細胞からの分化 (Kriegstein) や細胞移動 (Barker) などの神経回路発達過程で、本来は抑制性の GABA がむしろ興奮性に作用する (Ben-Ari, Luhmann, Misgeld, 小幡, 鍋倉, 福田ら)。特に申請者は遺伝子プログラムや環境に応じた‘能動的’ Cl⁻ホメオスタシスが、Cl⁻をチャージキャリアとする GABA_A 受容体作用の興奮/抑制の制御を行い、神経回路の形成や機能の発達に積極的に関与すると考え、[Cl⁻]_i は従来考えられていたほど‘静的’なものでなく、Cl⁻トランスポーターの相互作用によりダイナミックに変化するという仮説を提唱している。Kaila, Payne (*Nature* 1999)、Poo (*Cell* 2001)、De Koninck (*Nature* 2003) らはこれをニューロン選択的な排出型 Cl⁻トランスポーターの KCC2 で説明したのに対し、福田は KCC2 だけでなく取込型 Cl⁻トランスポーターの NKCC1 との発現バランスこそ重要と主張して国際的に高く評価されている (Ben-Ari: *Nature Reviews* 2002, *Curr Opin Neurosci.* 2005)。最新 Staley らによって NKCC1 が新生児けいれんの促進因子であることが示され (*Nature Med.* 2005) この主張はあらためて評価された (News & Views by Fukuda, *Nature Med.* 2005)。

一方、これまで大脳新皮質のニューロンはすべて脳室帯の神経前駆細胞から分化した後 radial migration して皮質板を構成すると考えられていたが、最近、GABA ニューロンはこれとは異なり、側脳室腹側壁で発生したのち新皮質に入り、脳表にそって tangential migration して新皮質全層に分布することがわかってきた。このように tangential 移動 (Rubenstein, 玉巻) や radial 移動 (仲嶋, 佐藤) に関する知見が GFP による標識化の成功によって飛躍的に増している。そうしたなか申請者は GABA 細胞特異的に GFP (緑色蛍光) を発現する GAD67-GFP knock-in マウスの子宮内胎仔の脳に、赤色蛍光を発する HcRed 遺伝子をインビボ電気穿孔法で導入し、任意の胎齢、生後日齢で仔マウス脳の新鮮スライス標本を共焦点顕微鏡で観察して、tangential 移動中の GABA 細胞 (GFP 蛍光) と radial 移

動中の glutamate 細胞 (HcRed 蛍光) を生きた状態で識別する方法を確立した。さらに、この knock-in マウスのホモ、ヘテロ、野生型間で細胞外に放出された GABA 量が異なるが、GABA_A 受容体のアゴニストになりえるタウリンが 1000-10000 倍も存在していることを明らかにした。これまで、細胞移動に paracrine 的に放出された GABA が重要であるという事実は知られているが、すべて GABA_A 受容体をブロックした結果であり、実際に細胞外に存在する GABA がどのような役割を持つかは知られていない。そこで、この GABA 含有量が異なるインビボモデルを用いて、細胞外の GABA やタウリンが GABA_A 受容体を介する興奮を惹起して、細胞移動に関与することを証明しようと考えた。このように、細胞移動における Cl⁻ホメオスタシスと抑制性アミノ酸の生理機能に着目しているのは世界でも我々だけであった。細胞ストレスの研究に関しては研究協力者の Luhmann らが開発した大脳皮質凍結損傷 (focal freeze-lesion, FFL) による層構造形成異常モデルを用いて、異常皮質の形成過程で、周囲の皮質板から神経細胞が lesion 部位の表層部に新たに移動してくることを見出した。これら移動してきた細胞にのみ興奮性 GABA/グリシン作用が見られたが、これは移動中の未熟細胞にみられる特性であるので、Cl⁻ホメオスタシスと GABA/グリシン作用に関するある種の脱分化が誘導された分化後間もない皮質板細胞は FFL に移動したが、5-6 層の細胞はそれより発生が早い段階で脱分化が起こらず、そのため移動も起こらずに、結果として微小脳回が形成されたと考え、今回の実験プランを着想した。一方、環境ストレスとしての母体ストレスの胎仔脳への影響は行動科学 (Welzl, 中村, 中原) や分子・形態 (Peters, 岡戸) では良く調べられているが、細胞生理機能、特に細胞移動との関連は本研究が世界で初めてであった。

2. 研究の目的

妊娠中の精神的ストレスや、母体ストレスの動物実験で出生児 (仔) の脳機能の低下が報告されている。これらストレス脆弱性には臨界期が存在し、興味深いことにそれは新生した神経細胞が移動して大脳皮質を形成する時期に一致する。また出生直後の新生仔脳への傷害ストレスが局所的細胞移動障害を起こすことが報告されている。そこで、GAD67-GFP knock-in マウスの胎仔脳に遺伝子を導入して、ニューロン各タイプの細胞内 Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) 動態と Cl⁻トランスポーター

発現量、GABA 作用と細胞移動状態を解析する。このモデルを用いて、母体ストレスあるいは出生直後の傷害ストレスが仔脳の $[Cl^-]_i$ 異常を誘発して GABA 作用を攪乱し、細胞移動を障害すること、さらにストレス感受性がどの移動ステージで高いのかを明らかにし、母体ストレスや周産期脳傷害と脳機能発達障害の因果関係を証明し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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：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。

(2) GAD67-GFP knock-in マウスの focal freeze-lesion (F F L) モデルの作成：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。

(3) 胎仔脳内タウリン欠乏モデルの作成：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 (10 mM/kg) を GAD67-GFP knock-in 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。

(4) Clomeleon 遺伝子導入による移動細胞の $[Cl^-]_i$ 測定：Clomeleon 遺伝子を導入したグリオーマ細胞は Clomeleon の蛍光を発しながら移動するのを観察した。

(5) 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：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。

(6) KCC2 強制発現インビボモデルの作成：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 E_{GABA} を記録した。

(7) focal freeze-lesion (FFL) による細胞ストレスの影響の評価：GAD67-GFP knock-in マウス母体の妊娠 14.5 または 17.5 日に BrdU を腹腔内投与し、出生直後の仔に FFL を行い、細胞種間ならびに細胞発生時期による細胞

ストレスに対する反応の差異を検討した。

(8) 母体ストレスによる環境ストレスの影響の評価：GAD67-GFP knock-in マウスに妊娠 9-21 日の拘束ストレスをかけ、HPLC 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 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： +/- 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。

(2) GAD67-GFP knock-in マウスの focal freeze-lesion (F F L) モデルの作成：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。

(3) 胎仔脳内タウリン欠乏モデルの作成：genotype に関係なく 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おり、モデルが完成した。

(4) Clomeleon 遺伝子導入による移動細胞の $[Cl^-]_i$ 測定：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。

(5) 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：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。

(6) KCC2 強制発現インビボモデルの作成：胎齢 18.5 日における KCC2 強制発現細胞は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。

(7) focal freeze-lesion (FFL) による細胞ストレスの影響の評価: 「細胞移動には NKCC1 が KCC2 に比べて優位で $[Cl^-]_i$ が高い必要がある」という我々の仮説どおり、tangential 移動の GABA 細胞、radial 移動の glutamate 細胞いずれにおいても、FFL 後の移動細胞では顕著な KCC2 発現減少と NKCC1 の増加がみられた。胎生 17.5 日発生の細胞はこれらの幼若回帰が誘導されたが、胎生 14.5 日発生の細胞には見られなかった。したがって、異常移動によって微小脳回を形成したのは、本来 II/III 層を構成するはずの胎生 17.5 日発生細胞であった。一方 GABA 細胞は発生時期にかかわらず幼若回帰を示し FFL 後 4 日目に傷害創周囲に集積した。細胞外 GABA の局在を GABA イメージング法で解析したところ FFL 後 4 日目をピークに傷害創で高濃度となっており、FFL による分化・移動の障害との関連が強く示唆された。

(8) 母体ストレスによる環境ストレスの影響の評価: 胎仔脳内の GABA やタウリン量に有意な差はなかった。そこで、妊娠 15-17 日の拘束ストレスに変更した。皮質板細胞の発生や移動に変化はなかったが、拘束ストレス暴露中の胎仔 GABA 細胞の発生が有意に減少した。また、細胞外 GABA 濃度はむしろ増加傾向があり、発生障害との関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Saitsu, H., Tohyama, J., Kumada, T., Egawa, K., Hamada, K., Okada, I., Mizuguchi, T., Osaka, H., Miyata, R., Furukawa, T., Haginoya, K., Hoshino, H., Goto, T., Hachiya, Y., Yamagata, T., Saitoh, S., Nagai, T., Nishiyama, K., Nishimura, A., Miyake, N., Komada, M., Hayashi, K., Hirai, S., Ogata, Kazuhiro., Kato, M., Fukuda, A. and Matsumoto N. Dominant negative mutations in α -II spectrin cause early onset West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am. J. Human Genet.* 査読有, in press, 2010.
2. Morishima, T., Uematsu, M., Furukawa, T., Yanagawa, Y., Fukuda, A. and Yoshida, S. GABA imaging in brain slices using immobilized enzyme-linked photo analysis. *Neurosci. Res.* 査読有, in press, 2010.
3. Kameyama, K., Sohya, K., Ebina, T., Fukuda, A., Yanagawa, Y. and Tsumoto, T. Difference in binocularity and ocular dominance plasticity between GABAergic and excitatory cortical neurons. *J. Neurosci.* 査読有, 30, 1551-1559, 2010.
4. Kilb, W., Hanganu, I.L., Okabe, A., Shimizu-Okabe, C., Fukuda, A. and Luhmann, H. J. Glycine receptors mediate excitation of subplate neurons in neonatal rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 査読有, 100, 698-707, 2008.
5. Koyama, Y., Matsuzaki, S., Gomi, F., Yamada, K., Katayama, T., Sato, K., Kumada, T., Fukuda, A., Matsuda, S., Tano, Y. and Tohyama, M. Induction of amyloid β accumulation by ER calcium disruption and resultant upregulation of angiogenic factors in ARPE19 cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 査読有, 49, 2376-2383, 2008.
6. Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., Okada, I., Yoshimura, Y., Hirai, S., Kumada, T., Hayasaka, K., Fukuda, A., Ogata, K. and Matsumoto, N. *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* 査読有, 40, 782-788, 2008.
7. Shimizu-Okabe, C., Okabe, A., Kilb, W., Sato, K., Luhmann, H. J. and Fukuda, A. Changes in the expression of cation- Cl^- cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci. Res.* 査読有, 59, 288-295, 2007.
8. Achilles, K., Okabe, A., Ikeda, M., Shimizu-Okabe, C., Yamada, J., Fukuda, A., Luhmann, H. J. and Kilb, W. Kinetic properties of Cl^- uptake mediated by Na^+ -dependent K^+ - $2Cl^-$ cotransport in

immature rat neocortical neurons. *J. Neurosci.* 査読有, 27, 8616-8627, 2007.

9. Yamada, J., Furukawa, T., Ueno, S., Yamamoto, S. and Fukuda, A. Molecular basis for the GABA_A receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* 査読有, 17, 1782-1787, 2007.
10. Yamamoto, S., Yamada, J., Ueno, S., Kubota, H., Furukawa, T., Yamamoto, S., and Fukuda, A. Insertion of $\alpha 7$ nicotinic receptors at neocortical layer V GABAergic synapses is induced by a benzodiazepine, midazolam. *Cereb. Cortex* 査読有, 17, 653-660, 2007.

[学会発表] (計 58 件)

1. Fukuda, A. Chloride homeo-dynamics causing GABA modal shift during development and pathogenesis. FENS/Hertie WINTER SCHOOL 2010 Obergurgl, Austria, 1/10-17, 2010. (Invited)
2. 福田敦夫: 幼少時の麻酔暴露による脳障害と脳発達過程の興奮性 GABA 作用. 第 29 回日本臨床麻酔学会大会, 浜松, 10/29-31, 2009. (招請講演)
3. Fukuda, A., Furukawa, T., Morishima, T. and Kumada, T. Endogenous taurine tonically activates GABA_A receptors in embryonic mouse neocortex. The 40th NIPS International Symposium: International Joint Symposium 2009 "Physiology of Anion Transport" and "Cell Volume Regulation" (PAT-CVR, 2009), Okazaki, 8/3-6, 2009. (Symposium • Invited)
4. Fukuda, A. Physiological significance of taurine-mediated Cl⁻ conductances during corticogenesis. In Symposium, "Modulation of brain development by paracrine activation of Cl⁻ conductances." The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto, 7/21-8/1, 2009. (Symposium • Organizer and Chair)
5. Yoshida, S., Morishima, T., Okochi, K., Takayama, C., Yanagawa, Y. and Fukuda, A. Cl⁻ mediated GABA release from Bergmann glia in developing cerebellar cortex. In Symposium, "Modulation of brain development by paracrine activation of Cl⁻ conductances." The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto, 7/21-8/1/2009. (Symposium)
6. Luhmann, H. J., Kilb, W. and Fukuda, A. Ionotropic GABA receptors control neuronal migration in neonatal rat cerebral cortex. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009), Kyoto, 7/21-8/1, 2009. (Poster)
7. Fukuda, A. Physiological roles of taurine-mediated tonic GABA_A-receptor activation in corticogenesis. The 2nd International Symposium Topical Problems of Biophotonics-2009, Nizhny Novgorod, 7/19-24, 2009. (Invited)
8. Fukuda, A., Furukawa, T., Morishima, T. and Kumada, T. Ambient GABA and taurine during corticogenesis. 2009 IUPS, International Conference of Physiological Science and 8th Korea-Japan Joint Symposium, Busan, Korea 1/15-17, 2009. (Symposium • Chair • Invited)
9. 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, Geneva, Switzerland, 7/12-16, 2008. (Poster)
10. Fukuda, A. The Cl⁻ 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, 3/18-19, 2008. (Symposium • Invited)
11. Fukuda, A., Wei, B., Furukawa, T., Kumada, T., Okabe, A., Ohno, K. and Sato, K. Rat facial hyperalgesia induced by the trigeminal nerve constriction is associated with changes in Cl⁻ transporters expression in the spinal nucleus and the ganglion. The 7th Japan-Korea Joint Symposium of Brain

Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, Sendai, 12/7-9, 2007. (Symposium)

12. 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」, 浜松, 11/20, 2007 (シンポジウム)
13. 福田敦夫: 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, 静岡, 10/19-20, 2007. (シンポジウム、オーガナイザー)
14. Atsuo Fukuda: Modal shift of the tonic GABA_A receptor-mediated conductance during neocortical development, "Mechanisms and functional significance of tonic GABA_A receptor mediated conductance. 第30回日本神経科学大会, 横浜, 9/10-12, 2007 (Symposium・Organizer and Chair)

[図書] (計 4 件)

1. 福田敦夫: 組織標本(脳スライス)への各種イメージング法適用の実際. 第18回メディカルホトニクスコース講習テキスト, 95-114, 2009.
2. 福田敦夫: 動物モデルからヒトへ. ベビーサイエンス, 8, 33-35, 2008.
3. 福田敦夫: 組織標本(脳スライス)への各種イメージング法適用の実際. 第17回メディカルホトニクスコース講習テキスト, 101-120, 2008.
4. 福田敦夫: 組織標本(脳スライス)への各種イメージング法適用の実際. 第16回メディカルホトニクスコース講習テキスト, 113-132, 2007.

[その他]

ホームページ等

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1a/phys1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 敦夫 (FUKUDA ATSUO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50254272

(2) 研究分担者

熊田 竜郎 (KUMADA TATSUROU)

浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00402339
(H20→H21: 連携研究者)

古川 智範 (FURUKAWA TOMONORI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60402369
(H20→H21: 連携研究者)

森島 寿貴 (MORISHIMA TOSHITAKA)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60456548
(H20→H21: 連携研究者)