

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13802
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011
 課題番号：23659535
 研究課題名（和文） クロライドホメオダイナミクス仮説で読み解く胎児・新生児脳障害の病態と新仮説の提案
 研究課題名（英文） Perturbation of developmental Cl⁻ homeodynamics may underlie fetal and neonatal brain disorders
 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

研究成果の概要（和文）：中枢神経系の最も主要な抑制性神経伝達物質である GABA（ γ -アミノ酪酸）の発達期の脳における作用は Cl⁻ホメオダイナミクスに代表されるように、実にマルチモーダルなものである。すなわち、①神経発生期と細胞移動期には非シナプス性の傍分泌的な脱分極作用で、細胞分裂の促進と抑制、ついで移動のブレーキあるいはアクセルとして移動速度を調節し、②回路形成期には興奮性伝達物質としてシナプスの形成・強化に関与する。そして③成熟後に初めて抑制性神経伝達物質として作用するのである。このように、GABA には発達段階に応じた3つの役割があり、発達初期における役割は古典的概念の抑制性伝達物質とは大きく異なっている。したがって、胎児・新生児期の疾患の病因や病態には、種々の外的要因がこれらマルチモーダルな GABA の作用に影響することで起こるものが含まれている可能性がある。そこで、種々のモデル動物を用いこの仮説の当否を検討した。

研究成果の概要（英文）：The most major inhibitory neurotransmitter, GABA, induces synaptic inhibition in the adult brain. In immature neurons, however, [Cl⁻]_i is high due to balance of Cl⁻ transporters, promoting depolarizing GABA action by efflux of Cl⁻ along with its electrical gradient. Thus GABA evokes excitation and/or non-synaptic tonic depolarization in immature brain. Such multimodal GABA actions during development are necessary for neurogenesis, differentiation, migration, and synaptogenesis. Therefore, perturbation of the developmental Cl⁻ homeodynamics may underlie fetal and neonatal brain disorders. By using various pathological model mice, we have studied how Cl⁻ homeodynamics work in pathogenesis of fetal and neonatal disorders of cortical development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：発達神経生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：(1)クロライドホメオスタシス (2)皮質板細胞 (3)大脳皮質 (4)細胞移動
 (5)GABA (6)タウリン (7)母体ストレス (8)発達障害

1. 研究開始当初の背景

本来 Cl⁻流入に働く GABA の役割は“抑制性伝達物質”では収まらないことが最近明らかになってきた。すなわち、未熟な神経細胞では高い細胞内 Cl⁻濃度 ([Cl⁻]_i) のため濃度勾配が小さく、神経発生や細胞移動、シナプス形成などの神経回路発達過程では GABA はむ

しろ Cl⁻流出により興奮性に作用する (Rivera, *Nature* 1999; Poo, *Cell* 2001; Staley, *Nat Med* 2005; Song, *Nature* 2005; Khazipov, *Science* 2006; Fukuda, *J Neurophysiol* 1998, *J Neurosci* 2002, 2004, 2007, 2010; *J Physiol* 2004; Review: Kriegstein, *Nat Rev Neurosci* 2002; Ben-Ari, *Nat Rev Neurosci* 2002; Kaila, *Neuron*

2009; Fukuda, *Nat Med* 2005)。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 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⁻トランスポーター (KCC2 と NKCC1) の相反作用による Cl⁻ホメオダイナミクス仮説をいち早く提唱した。現在は胎生期の GABA 作用のモデルシフトに着目し、神経発生・分化・移動・シナプス形成に必須の脳形成の普遍的メカニズムであると考えている。そこでこの胎児期のマルチモーダルな GABA 作用が何らかの影響を受けた場合に、脳にどのような異常が起こるのか検討するのが本課題である。

2. 研究の目的

胎仔・新生仔の機能的な脳障害の動物モデルに関しては生理学のアプローチが困難なため評価系が殆どない。そのために詳細な生理学的な検討はこれまで殆どなされてこなかった。したがって動物モデルの確立と機能評価を行う本研究は世界に先駆けたものである。特に、パッチクランプとイメージングにより異常な神経回路の形成過程を評価し、Cl⁻ホメオダイナミクス仮説に則って [Cl⁻]_i—脱分極 GABA 作用—非シナプス性放出—神経発生異常—細胞移動異常の関連を脳スライス標本レベル (細胞、神経回路) で微細構造 (2 光子顕微鏡) と電気生理 (パッチクランプ) の両面で解析し、遺伝子・環境的ストレス・エピジェネティック修飾の三位一体的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ①胎仔 Cl⁻ホメオスタシス破綻モデル②母獣のタウリン合成阻害による胎生期タウリン欠乏モデル、③胎仔のインビボ (胎盤低環流) 脳虚血モデル④母体拘束ストレスモデル、などのモデル動物を作製し、(2) モデル動物大脳皮質の皮質板細胞や GABA 細胞の発生と移動、GABA や glutamate の放出と分布、生理的な細胞機能と微細構造、などの異常を検討し、(3) 脳特異的 DNA メチル化領域の解析と併せて、モデル動物の各発達段階によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の生理的变化とその異常を解析する。

4. 研究成果

(1) モデル動物の作製: ①Cl⁻ホメオスタシス破綻モデル: マウス胎仔脳に、変異 KCC2 遺伝子をコードする cDNA を IUEP 法で導入し Cl⁻ を低下させた。皮質凍結損傷では KCC2 発現低下が惹起された。②母体タウリン欠乏モデル: D-システインスルフィン酸やタウリントランスポーター阻害剤を、妊娠マウス腹

腔内に投与して母体のタウリン合成を阻害し、脳のタウリン含有量が半減した胎仔を得た。③インビボ (胎盤低環流) 脳虚血モデル: 妊娠 14.5 日に片側子宮動脈を結紮し体重が 30%低下した IUGR モデルを確立した。④母体拘束ストレスモデル: GAD67-GFP knock-in マウスの妊娠 15 日目から 3 日間、45 分の拘束・光刺激ストレスを一日 3 回野生型母マウスに与え、胎仔コルチコステロンが優位に増加するモデルを確立した。

(2) モデル脳細胞の発生・移動・生理機能・微細形態・アミノ酸分泌の解析: Cl⁻ホメオスタシス破綻モデルでは [Cl⁻]_i を強制的に低下させると放射状移動も接線移動も遅くなった。GABA_A 受容体阻害で移動速度が変化し Ca²⁺ 振動頻度が減少した。イメージング法で、自己/傍分泌的に容積感受性陰イオンチャネルから GABA が放出されることを証明した。また、胎仔でのパラクリン分泌は GABA が glutamate より優位であった。免疫組織化学と HPLC によるタウリンの細胞内外の分布を解析した結果、大脳皮質に多く存在しタウリントランスポーターで取り込み、容積感受性陰イオンチャネルから放出していた。母体 D-システインスルフィン酸投与による胎仔脳タウリン欠乏モデルで放射状移動が速くなることが明らかになった。

(3) モデル動物の DNA メチル化解析の準備: モデルマウス脳から、部位別に数マイクログラムのゲノム DNA を抽出し、MeDIP 法により回収された DNA 断片を、DNA マイクロアレイを用いて解析する方法をほぼ確立できた。したがって、モデル脳で特異的にエピジェネティックな遺伝子発現制御を受けている候補遺伝子群を網羅的に同定する準備が出来た。

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 4 件)

1. Kuroiwa, M., Snyder, G.L., Shuto, T., Fukuda, A., Yanagawa, Y., Benavides, D.R., Nairn, A.C., Bibb, J.A., Greengard, P. and Nishi, A. Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex. *Psychopharmacology*, 219: 1065-1079, 2012. 査読有
2. Inada, H., Watanabe, M., Uchida, T., Ishibashi, H., Wake, H., Nemoto, T., Yanagawa, Y., Fukuda, A. and Nabekura, J. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic

- interneurons in living neonatal mice. *PLoS ONE*, 6: e277048, 2011. 査読有
- Hirata, T., Kumada, T., Kawasaki, T., Furukawa, T., Aiba, A. Conquet, F., Saga, Y. and Fukuda, A. Guidepost Neurons for the Lateral Olfactory Tract: Expression of Metabotropic Glutamate Receptor 1 and Innervation by Glutamatergic Olfactory Bulb Axons. *Dev. Neurobiol.*: in press. 査読有
 - Inoue, K., Furukawa, T., Kumada, T., Yamada, J., Wang, T., Inoue, R. and Fukuda, A. Taurine inhibits the K^+Cl^- cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl^- homeostasis via the with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.*: in press. 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
- Nakanishi, Y., Kumada, T., Furukawa, T., Egawa, K. and Fukuda, A. Regionally differential calcium oscillation of radially migrating cells in embryonic cortex. 第 89 回日本生理学会大会, 長野, 3/29-31, 2012. (Poster)
 - Furukawa, T., Yamada, J., Inoue, K., Yanagawa, Y., Matsushima, Y. and Fukuda, A. Ambient taurine controls radial migration in developing cerebral cortex. 細胞外タウリンは発達期大脳皮質の radial migration を制御する. 第 89 回日本生理学会大会, 長野, 3/29-31, 2012. (Poster)
 - Fukuda, A., Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T. and Inoue, R. Intracellular taurine modulates KCC2 function by phosphorylation. 細胞内タウリンによる KCC2 蛋白活性のリン酸化を介した修飾. 第 89 回日本生理学会大会, 長野, 3/29-31, 2012. (Poster)
 - 福田敦夫: 大脳皮質形成における非シナプス性 GABA. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨, 3/26-28, 2012. (招待講演)
 - Fukuda, A. Abnormal Chloride Transportation in Cortical Dysplasia. International Symposium on Surgery for Catastrophic Epilepsy in Infants (ISCE), Tokyo, Japan, 2/18-19, 2012. (招待講演)
 - 福田敦夫: 三叉神経痛の動物モデルと病態仮説. 第 14 回日本脳神経減圧術学会, 東京, 1/19, 2012. (招待講演)
 - 江川 潔, 井上浩一, 斉藤伸治, 木住野達也, 福田敦夫: アンジェルマン症候群における小脳顆粒細胞 tonic inhibition の低下と小脳機能障害. 平成 23 年度生理学研究会 シナプス 2011, 岡崎, 12/5-6, 2011. (Oral)
 - Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T., Inoue, R. and Fukuda, A. Taurine prevents KCC2 from functioning in a phosphorylation-dependent manner to render embryonic Cl^- homeostasis. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A., 11/12-16, 2011. (Poster)
 - Egawa, K., Inoue, K., Saitoh, S., Kishino, T. and Fukuda, A. Impairment of tonic inhibition in cerebellum granule cells causes cerebellum dysfunction in Ube3a maternal-deficient mice. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A., 11/12-16, 2011. (Poster)
 - Fukuda, A., Morishima, T., Kumada, T., Takayama, C. and Yoshida, S. Ambient GABA released from Bergmann glial cells promotes proliferation of cerebellar granule cell precursors. 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., U.S.A., 11/12-16, 2011. (Poster)
 - 森島寿貴, 熊田竜郎, 高山千利, 吉田祥子, 福田敦夫: 生後初期に一過性のバグマン グリア由来の細胞外 GABA が小脳顆粒前駆細胞の分裂を促進する. 第 58 回中部生理学会, 福井, 11/1-2, 2011. (Oral)
 - 中西康彦, 福田敦夫, 熊田竜郎, 古川智範, 江川 潔: 発達期の大脳皮質の各領域における移動細胞のカルシウム振動. 第 58 回中部生理学会, 福井, 11/1-2, 2011. (Oral)
 - 江川 潔, 井上浩一, 斉藤伸治, 木住野達也, 福田敦夫: アンジェルマン症候群における小脳顆粒細胞 tonic inhibition の低下と小脳機能障害. 第 38 回日本脳科学学会, 沖縄, 10/8-9, 2011. (Oral)
 - Fukuda, A., Wang, T., Kumada, T.,

- Morishima, T. and Yanagawa, Y. Temporal paracrine GABA and KCC2 downregulation underlie the formation of microgyrus in a model of focal cortical malformation. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9/14-17, 2011. (Poster)
15. Egawa, K., Inoue, K., Saitoh, S., Kishino, T. and Fukuda, A. GABAergic dysfunction in Ube3a deficient mice, models of angelman syndrome. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9/14-17, 2011. (Poster)
 16. Inoue, K., Furukawa, T., Yamada, J., Kumada, T., Wang, T., Inoue, R. and Fukuda, A. Developmental regulation of KCC2 activity by taurine in a phosphorylation-dependent manner. 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9/14-17, 2011. (Poster)
 17. Egawa, K., Inoue, K., Saitoh, S., Kishino, T. and Fukuda, A. Impairment of tonic inhibition in cerebellum granule cells causes cerebellum dysfunction in Ube3a maternal-deficient mice. Angelman Syndrome Foundation Scientific Symposium, Salt Lake City, U.S.A., 7/26-30, 2011. (Oral)
 18. Uchida, T., Oki, Y., Yanagawa, Y. and Fukuda, A. Bidirectional interaction of Maternal stress with fetal and maternal γ -amino butyric acid (GABA) systems. International Symposium "Interaction of nervous and immune systems in health and disease", Saint Petersburg, Russia, 6/7-10, 2011. (招待講演)
- [図書] (計 5 件)
1. Shimizu-Okabe, C., Okabe, A. and Fukuda, A. Does elevated intracellular chloride cause epilepsy in focal cortical dysplasia? In: Dysplasia: Causes, Types and Treatment Options. eds. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, U.S.A. In press.
 2. Fukuda, A., Nakanishi, Y., Kumada, T. and Furukawa, T. Multimodal GABA_A receptor functions on cell development. Chapter 125. In: Comprehensive Developmental Neuroscience. eds. Pasko Rakic and John Rubenstein. Elsevier, Oxford, United Kingdom. In press.
 3. Fukuda, A. Chloride homeodynamics underlying pathogenic modal shifts of GABA actions. Chapter 10. In: Comprehensive Developmental Neuroscience. eds. Pasko Rakic and John Rubenstein. Elsevier, Oxford, United Kingdom. In press.
 4. 福田敦夫: 神経回路機能の発達と病態 (GABAを中心に), 日本小児神経学会教育委員会編: 小児神経学の進歩, 40, 129-142, 診断と治療社, 2011.
 5. 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 20 回メディカルホトニクスコース講習テキスト, 57-64, 2011.
- [その他]
ホームページ等
<http://www2.hama-med.ac.jp/wla/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
該当なし
 - (3) 連携研究者
井上 浩一 (INOUE KOICHI)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80345818

江川 潔 (EGAWA KIYOSHI)
浜松医科大学・医学部・特任研究員
研究者番号: 40450829

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)
国立成育医療研究センター・部長
研究者番号: 60360335