

第58回日本生理学会中国四国地方会

会 期：平成18年10月20日（金）

会 場：岡山国際交流センター

当番幹事：成瀬恵治，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理学

参加人数：85人

第58回中国四国地方会は岡山国際交流センターにて開催され、25の一般演題の発表・討議が行われた。評議員会では日本生理学会常任幹事会、将来計画委員会、教育委員会、JJP編集委員会、IUPS組織委員会からの報告があった。本会は開催順序では徳島大学が当番幹事の予定であったが、都合により順序を入れ替え岡山大学システム循環生理が担当した。次期開催は徳島大学の予定である。

1. 食道癌手術後の血液流動性の変化

末盛智彦，片野坂友紀，毛利 聡，成瀬恵治（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理）

急性呼吸窮迫症候群（Acute respiratory distress syndrome：ARDS）は肺領域の非特異的炎症による透過性亢進型肺水腫であり、広範な肺損傷を特徴とする。感染症や手術などの侵襲を誘引に発症することが知られており、特に開胸操作を伴う食道癌根治術後においては発生頻度14.5%、発症後の死亡率50%と報告されており、軽視できない問題となっている。

ARDSを発症した肺には活性化した好中球が集積しており、炎症反応の主体を担っていると考えられている。その機序として、活性化に伴う好中球の細胞骨格F-actinの増加が、変形能の低下を招き、肺微小循環への集積、血管外への遊走、組織障害を招くと考えられている。このため、白血球変形能の変化を測定することでARDS発症のリスクを評価できる可能性がある。

MCFAN（Micro Channel Flow Analyzer）はマイクロチャンネル（幅7 μ m）内に20cmH₂Oの陰圧で全血を通過させ、通過時間を測定することにより血液の流動性を評価する機器である。今回、血液10 μ m通過毎の通過速度の変化を調べることでマイクロチャンネルの閉塞率を評価し、チャンネルを通過できない白血球の数を測定することとした。

食道癌術後、2～6日目において血清CRP値上昇のピークを認め、以後、鎮静化する傾向を認めた。MCFANによる検討において、術後2～4日目にチャンネルの閉塞率が増加し、チャンネルを通過できない白血球の増加が示唆された。検討期間中にARDSを発症した症例はなかったが、手術後の炎症反応に伴い白血球が肺に集積しやすくなり、ARDS

を発症しやすくなっている可能性が示唆された。

2. 細胞接着斑パターン化細胞を用いたストレッチ依存性チロシンリン酸化の解析

包 金花，片野坂友紀，小松智代，末盛智彦，山田 章，岸尾正博，毛利 聡，成瀬恵治（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム循環生理学）

（目的）血管内皮細胞に周期的一軸ストレッチ刺激を与えるとストレッチ方向とは垂直方向に配向し、このストレッチ依存的形態変化には細胞接着斑蛋白質のチロシンリン酸化亢進が重要であるが細胞接着斑はランダムに形成されるためにストレッチ方向とチロシンリン酸化パターンを定量的に評価することは困難であった。そこで人為的に細胞接着斑形成部位を行列化し各接着斑に番地を割付けストレッチ刺激を与える方法を開発した。

（方法）polydimethylsiloxane（PDMS）樹脂を用いたマイクロコンタクトプリンティング法にて10列×10行の2 μ mファイブロネクチドットをプリントしたシリコンエラストマー製ストレッチチャンバーを作成した。このファイブロネクチンパターン化ストレッチチャンバー上に血管内皮細胞を培養し一軸周期的ストレッチ刺激を与えストレッチ方向とチロシンリン酸化パターンを解析した。

（結果）同じ形・大きさの細胞で同じ数・パターンの接着斑を持つ細胞を作り出すことが出来た。多数の細胞の同じ番地の細胞接着斑に同じストレッチ刺激を与えることが出来、そこで起こるストレッチ刺激依存的チロシンリン酸化反応を番地ごとに統計的に処理することにより統計的に高S/N比でチロシンリン酸化パターンを解析することが出来た。

3. 延髄の嘔吐反射発現経路における Neurokinin 1 受容体の関与

水見直之¹, 上田由伊², 古我知成³, 辻岡克彦^{1,2} (¹川崎医科大学 生理学, ²川崎医療福祉大学 医療情報学科, ³川崎医療福祉大学 リハビリテーション学科)

嘔吐反射については、従来より延髄の疑核周辺部の網様体に存在する Neurokinin 1 受容体 (NK1 受容体) が反射経路の一部を担っていると言われてきた。本研究では、この領域のニューロンの応答特性を調べ、NK1 受容体が嘔吐の発現機構においてどのような働きをしているかをニューロンレベルで明らかにすることを目的とした。

6~12日齢のSDラットより摘出した延髄のスライス標本(厚さ250 μ m)において疑核周辺部網様体のニューロン活動を whole cell 法にて連続記録した。NK1 受容体の代表的アゴニストであるサブスタンス P (SP) の投与(1~2 μ M)や、記録ニューロンより背内側領域への電気刺激による記録ニューロンの活動変化を記録した。

SPの灌流により、疑核周辺部網様体のニューロンの自発活動は促進(39%)、または抑制(28%)された(n=18)。また、周辺部の電気刺激により誘発されたEPSCもSPにより促進(28%)または抑制(21%)された(n=29)。

延髄の疑核周辺部の網様体における嘔吐反射の発現経路は、単一のニューロンにより構成されているものではなく、NK1 受容体の活性化により亢進および抑制されるニューロン群の混在したネットワークにより構築されていると思われる。

4. 覚醒イヌにおけるバロスタットを用いた胃噴門部弛緩能評価：消化管運動作用薬の胃腸運動と胃噴門部弛緩能に対する効果

古川直裕¹, 椎原英文¹, 畑野瑞恵¹, 高谷智彦², 楠 裕明³, 本多啓介³, 田中俊昭³, 春間 賢³, 辻岡克彦¹ (¹川崎医科大学 生理, ²広島大学病院総合診療科, ³川崎医科大学 内科食道胃腸科)

動物実験においてバロスタットによる胃噴門部弛緩能評価を行うことを目的とした。今回は消化管運動に影響を与えると報告のあるモサプリド(5HT₄受容体刺激薬)とイトプリド(D₂受容体遮断薬)、スマトリプタン(5HT₁受容体刺激薬)、パロキセチン(5HT再取り込み阻害薬)の4種の薬物の効果を検討した。慢性的に胃ろう管、静注用カテーテル、フォーストランスジューサ(胃体部近位側、胃前庭部、十二指腸)を装着したビーグル犬を用いた。覚醒下にて胃ろう管より胃近位部に伸展用バッグを挿入し、バロスタットに接続して以下の実験を行った。1) 最低基準伸展圧(MDP)の決定。2) MDPから+2mmHgずつの段階的伸

展による圧-容積関係の投薬前後での測定。3) MDP+4mmHgの定圧伸展時の胃噴門部容量に対する薬物の効果の検討。また、同じ手順の実験を24時間の絶食後と、流動食摂取3時間後の食後期の2つの相で行った。[結果]胃噴門部のコンプライアンスは食後期の方が絶食期よりも有意に大きかった。定圧下における胃噴門部容量は、スマトリプタン投与によって増加し、パロキセチン投与によって減少した。一部の薬物で胃前庭部や十二指腸の収縮性が亢進したが、どの薬物も胃体部の収縮性には一定の変化をもたらさなかった。薬物の効果は絶食期と食後期で異なる場合があった。胃噴門部の受け入れ容量の変化は、フォーストランスジューサで計測した収縮性の変化とは必ずしも一致しなかった。

5. ヒト肝癌細胞株 HuH-7 における希少糖 D-アロース感受性に関する解析

斎藤まど香³, 平田祐子^{1,2}, 塚本郁子³, 山口文徳², 神鳥和代¹, 藤本真千子¹, 真田恵子¹, 十河美弥子¹, 小西良士³, 徳田雅明² (¹かがわ産業支援財団, ²香川大学医学部細胞情報生理学, ³香川大学医学部薬物生体情報学)

希少糖の一種であるD-アロースはD-グルコースのC-3エピマー体であり、培養癌細胞の増殖抑制効果が認められている。D-アロースに対する感受性は様々な培養細胞で認められているが、我々はその中でもD-アロースに対する感受性が高いヒト肝癌細胞株HuH-7について調べた。D-アロースの作用機序の解明を進めたところ、HuH-7ではD-アロース処理をすることによって、癌抑制遺伝子の一つであるTXNIPがD-アロース非処理群に比べて特異的な発現増加が認められた。HuH-7のD-アロースに対する感受性の高さは、D-アロースを細胞内に優先的に取り込む機能があると予想し、グルコトランスポーター(GLUT)について検討した。GLUTには14種類のサブタイプが知られており、この発現パターンをリアルタイムRT-PCRを用いて解析を行った。また、Carbon-14標識をしたD-アロースなどを用いて細胞内への取り込みの様子を調べた。

1) D-アロースはD-グルコースの取り込みを一定程度阻害した。

2) D-アロースは、D-グルコースの半分程度ではあるが、細胞に取り込まれることが判明した。

3) 癌化した肝臓細胞では、正常で多く認められるGLUT2が著明に減少し、逆にほとんどなかったGLUT1が増加することが判った。

4) GLUT1の発現をsiRNAで抑制すると、D-アロースの効果が悪くなった。

D-アロースによりTXNIP(thioredoxin interacting pro-

tein)の特異的な発現が起こり、それが細胞周期を抑制することを示しており、D-アロースの代謝系への影響と合わせ、今後も解析を進める。

6. ドコサヘキサエン酸による神経幹細胞のニューロンへの分化促進

片倉賢紀, 橋本道男, 紫藤 治 (鳥根大学・医学部・環境生理学)

本研究室では以前、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が、若齢ラットの空間認知機能を向上させることを明らかにしている。本研究では、この空間認知機能を向上させる機序を解明するため神経幹細胞の分化誘導に対する DHA の作用を *in vitro* と *in vivo* で検討した。

In vitro 実験では、ラット胎児脳より神経幹細胞を分離後、ニューロスフィア (NS) 法で神経幹細胞を培養した。NS を分散後、DHA 添加培地で7日間培養した。培養後、Tuj-1 (未成熟ニューロンマーカー) と細胞核の二重染色を行い、神経幹細胞のニューロンへの分化率を測定した。その結果、Tuj-1 陽性細胞の割合が DHA 添加で有意に増加した。これは神経幹細胞のニューロンへの分化を DHA が促進させたことを示している。*In vivo* 実験では、若齢ラットに分裂細胞標識試薬 (BrdU) を連続5日間腹腔内投与し、同時に DHA の経口投与を開始した。4週間の投与後脳を固定し、冠状断切片作製後、BrdU と NeuN (成熟ニューロンマーカー) の免疫組織染色を行い、海馬歯状回領域の神経幹細胞数を計測した。海馬歯状回領域の BrdU/NeuN 二重陽性細胞数は、DHA 投与群で非投与群に比べ有意に増加していた。これは、DHA により海馬歯状回領域でニューロンの新生が増加したことを示している。これらのことから DHA は、神経幹細胞のニューロンへの分化を促進させることが明らかとなった。

7. 光学的多部位膜電位連続記録システムを用いたラット大脳皮質感覚運動野自発興奮の記録

廣田秋彦¹, 伊藤真一¹, 平川正人² (¹鳥根大学医学部神経・筋肉生理学, ²鳥根大学総合理工学部情報工学)

膜電位変化を光学的に多数ヶ所から同時記録する方法が広く普及しつつあるが、生きたままの大脳皮質から記録するには落射蛍光法を用いた測定となる。この場合、市販の測定装置を用いて通常に測定を行った場合、単一掃引で解析可能な SN 比 (シグナル・ノイズ比) の記録は得られず、加算処理により SN 比を大きくする必要がある。このため、測定対象は繰り返して同じ現象を観察することが可能なもの、すなわち刺激-応答パラダイムに限られている。我々は膜電位の光学的測定法を大脳皮質における自発活動に適

用するため、光学系や測光系に様々な改良を加え、単一掃引で解析に堪えるだけの高 SN 比を有し、かつ高い時空間分解能で記録出来る測定システムの開発を続けて来ており、このほど、ラットの大脳皮質感覚運動野の自発興奮を光学的に記録することに成功した。

ウレタンとクロラロースの混合液による麻醉下で、ラット感覚運動野の下肢領域を露出し、膜電位感受性色素 RH414 で生体染色後、光学測定と同時に測定領域内の硬膜上から脳波を記録した。光学記録には心拍動に由来する大きなアーティファクトが重畳しているが、心電図に同期させて膜電位変化の見られなかった時の光学シグナルをソフトウェアで差し引く処理により、このアーティファクトを大幅に軽減することに成功した。この結果、脳波に大きな自発性のスパイク様電位が記録された時間帯に、脳波シグナルに対応する光学シグナルが得られた。この光学シグナルは感覚運動野の広範囲で記録され、形、振幅、時間経過などに測定領域内で多少の差異が見られ、立ち上がる時間にもわずかに差が認められた。また、脳波と光学記録との間に時間的にかなりのずれが認められた例もあった。これらの結果は、測定領域内での神経活動の違いを反映したものであることが強く示唆される。このことから、我々が開発した測定システムは、大脳皮質の自発的神経活動に伴う膜電位変化を光学的に直接記録することが可能であり、最大1000秒の連続記録能力も兼ね備えていることより、生きたままの状態の大脳皮質神経活動の研究にも極めて有用であると考えられる。

8. アルツハイマー病モデルマウス海馬における加齢依存的 GABA 作動性ニューロンの減少

高橋寿明^{1,2}, 田中潤也¹, H. Steinbusch², C. Schmitz² (¹愛媛大・医・分子細胞生理, ²Maastricht Univ., Cellular Neuroscience, The Netherlands)

【目的】アルツハイマー病は記憶障害などの異常を引き起こし、 β -アミロイド斑の沈着やタウ蛋白質の異常蓄積などが神経病理学的な特徴である重篤な神経変性疾患のひとつである。これまでにアルツハイマー病患者の脳では GABA 作動性ニューロンの減少が多数報告されているものの、その一方で変化が無いとの報告もあり、明確な結論が出ていないのが現状である。そこで我々はアルツハイマー病モデルマウスを用い、海馬における GABA 作動性ニューロンの加齢に伴う変化を神経病理学的に解析した。

【方法】アルツハイマー病モデルマウスは β -amyloid precursor protein (APP) 変異トランスジェニックマウス (APP751^{SL}) と Presenilin1 変異ノックインマウス (PS1KI) の2ヶ月齢と10ヶ月齢を用いた。GABA 作動性ニューロ

ンマーカーには calretinin (CR) と parvalbumin (PV) を用い、組織免疫染色により陽性となった細胞をステレオロジカル顕微鏡により計測し、定量した。

【結果および考察】APP751^{SL}はいずれの年齢、海馬領域においてもCRおよびPV陽性細胞の減少は認められなかった。一方、APP751^{SL}/PS1KIとPS1KIではPV陽性細胞の減少がCA1-2領域に、CR陽性細胞の減少が歯状回に、それぞれ加齢依存的に認められた。本研究によりCRやPVといったカルシウム結合蛋白質の発現抑制がPS1の変異により引き起こされる事が明らかとなった。つまり加齢に伴うアルツハイマー病の病態悪化はPS1の変異に基づくGABA作動性ニューロンの細胞内カルシウム調節の異常が一因であると考えられた。

9. Iba1-HSV1tk トランスジェニックマウスの作製

今井嘉紀, 坂本愛子, 高橋寿明, 田中潤也(愛媛大・医・分子細胞生理)

神経疾患・脳損傷時に活性化マクログリアが出現することが知られている。そのとき活性化マクログリアが神経細胞に対し保護的に働くか、あるいは損傷を悪化させる方向に働くかについては様々なデータ・学説が存在し完全な結論には至っていない。今回我々は、マクログリア・マクロファージに特異性の高いIba1プロモーター領域の解析・同定を行い、Iba1プロモーターの支配下に単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)由来のチミジンキナーゼ(tk)を発現させる系を作製した。抗ウイルス剤ガンシクロビルはHSV1tk発現細胞の核・ミトコンドリアDNAに効率的に取り込まれ、その細胞の増殖能・代謝機能を抑制する。この系を用いIba1-HSV1tkトランスジェニックマウスの作製を試みた。得られた3系統のマウスの内1系統にtk遺伝子・タンパク質の発現が確認された。今後、このマウスを用いてマクログリアの生体内機能の解析を進める。

10. 脳損傷・脳虚血病巣核心部におけるレジデントマクログリアとNG2陽性マクロファージ様細胞について

田中潤也¹, 松本洋明², 高橋寿明¹, 坂本愛子¹, 今井嘉紀¹ (¹愛媛大・医・分子細胞生理, ²愛媛大・医・脳神経外科)

大脳皮質を貫通する針刺し脳損傷モデルと、中大脳動脈一過性閉塞による脳卒中モデルを用いて、マクログリアおよびマクロファージ様細胞の反応を調べた。傷害後36時間までに病巣核心部で多くのレジデントマクログリアはアポトーシス様の変性を来す一方、マクログリアマーカーとされてきたCD11bやレクチンに陽性の好中球が多数集積した。損傷部位では、活性化マクログリアが一酸

化窒素(NO)を産生するといわれてきたが、誘導型NO合成酵素は好中球に発現していた。傷害後3日目には再びIba1陽性のマクロファージ様細胞が集積し始めたが、これらは、単球やレジデントマクログリアとは異なり、NG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを発現していた。NG2陰性の単球やマクログリアと区別するために、NG2陽性のマクロファージ様細胞をBINCs (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells)と命名した。BINCsは血小板由来増殖因子 α 型受容体(PDGFR)を発現し、傷害部位で激しく増殖していた。分離したBINCsは培養下でPDGF-AAに反応して増殖し、神経細胞やアストロサイトの形質を持つ細胞に分化転換した。以上の結果は、レジデントマクログリアは、むしろ脳の生理的機能の維持に関与し、重篤な脳障害部位には血中由来の細胞が損傷の修復に当たることを示唆している。

11. 血管平滑筋のカルシウム非依存性異常収縮を特異的に阻害する新規物質の探索

松尾さやか¹, 岸 博子¹, 郭 鳳玲¹, 王 晨¹, 高田雄一^{1,4}, 三輪さおり¹, 森田直樹², 扇谷 悟², 細川雅史³, 宮下和夫³, 徐 丹¹, 加治屋勝子¹, 川道穂津美¹, 小林 誠¹ (¹山口大学大学院 医学系研究科 器官制御医学領域 生体機能分子制御学,²産業総合研究所 ゲノムファクトリー研究部門,³北海道大学大学院 水産科学研究科 機能性物質化学研究室,⁴独立行政法人 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ広島)

突発する血管病の原因となる血管攣縮は、Rhoキナーゼを介する血管平滑筋のカルシウム非依存性異常収縮が関与しているとされる。しかしながら、現存する血管病治療薬は、この異常収縮を特異的に抑制するものはなく、むしろ血圧の維持に重要な正常なカルシウム依存性収縮を抑制するものばかりである。当教室では、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)がSrcファミリーチロシンキナーゼを介してRhoキナーゼを活性化し、カルシウム非依存性収縮を引き起こすことを見出し、SPCが血管攣縮の重要なシグナル分子であることを同定した。さらに、n-3多価脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸(EPA)が正常なカルシウム依存性収縮には影響を与えず、カルシウム非依存性異常収縮のみを選択的に抑制することを見出した。現在、EPAは血管病の治療薬として使用され始めているが、未だ経口薬のみであるため、経口摂取が不可能な場合や救急の際にも投与可能な注射薬の開発を検討している。そこで、注射薬にできる組成であり、尚且つEPAに代わる新規の血管異常収縮抑制物質を探索し、候補物質として物質mG, 物質dG, 物質DLY及び物質Sを同定したので報告する。本研究

では、ブタ冠状動脈平滑筋条片の張力測定を行った。SPC (30 μ M)は、持続性のある血管平滑筋収縮を引き起こした。SPC刺激による収縮が最大かつ安定した時点で、候補物質を投与した。候補物質はすべてSPC刺激による収縮を抑制したが、抑制効果には差が生じた。候補物質の立体構造は、一部EPAとの類似性が認められた。これらの候補物質は、将来EPAに代わり血管病の治療薬及び注射薬として使用できる可能性があると考えられる。

12. 動的運動時の心循環応答と筋機械受容器反射： Gadolinium 動脈内投与の影響

土持裕胤，萩原絵美，中本智子，松川寛二（広島大学大学院保健学研究科・生理機能情報科学）

動的運動時には心拍数と動脈血圧がともに増加する。これらの心循環応答の神経性循環調節機構として、上位中枢由来のフィードフォワード制御（セントラルコマンド）、ならびに動脈圧・心肺受容器反射および活動筋由来の筋機械受容器反射・筋代謝受容器反射といったフィードバック制御系が考えられている。麻酔下や除脳動物標本において、骨格筋の機械的伸展は反射的に呼吸運動や動脈血圧を増加させることから、筋機械受容器反射が運動時の循環調節に重要な役割を果たすと考えられてきた。しかしながら、意識下のヒトおよび動物において筋機械受容器反射が全身性の動的運動時の循環応答に果たす役割は良くわかっていない。そこで本研究は、stretch-activated ion channelsを阻害するガドリニウム（Gd³⁺）を用いて動的運動時における循環応答への筋機械受容器反射の影響を調べた。ネコをトレッドミル上で走るように訓練した後、ハロセン麻酔下で左大腿動脈および左頸静脈にカテーテルを留置した。1週間以上の回復期間の後、トレッドミル上で動脈血圧および心拍数を計測しながらネコを走らせた。20, 30, 40, 50, 60m/minの速度でそれぞれ60秒間走らせた後、Gd³⁺を動脈内投与（60 μ mol/kg）し、再びコントロール条件と同じプロトコルで走らせた。コントロール条件では、運動時の心拍数および平均動脈血圧は歩行速度に依存した増加を示した。すべての歩行速度において、心拍数応答および平均動脈血圧応答はGd³⁺の投与前後で変わらなかった。また、運動時の後肢の動きをビデオ撮影して解析した結果、後肢の動きもGd³⁺投与の影響を受けていなかった。以上の結果から、意識下の動物において、動脈内に投与されたGd³⁺は歩行時の肢運動ならびに心循環応答に影響を及ぼさないことを明らかにした。この所見から、意識下動物の動的運動時における心循環応答への筋機械受容器反射の関与は少なく、セントラルコマンドあるいは筋代謝受容器反射の影響が大きいものと考えられる。

13. 廃用性萎縮筋の毛細血管—吻合毛細血管ネットワークのリモデリングとプレコンディショニング運動による退行抑制の効果

藤野英己^{1,2}，上月久治^{1,2}，武田 功²，宮坂武寛²，梶谷昌史¹，毛利 聡¹，成瀬恵治¹，梶谷文彦^{1,3}（¹岡山大学大学院・システム循環生理学，²姫路獨協大学・医療保健学部，³川崎医科大学・医用工学）

廃用性萎縮筋では、毛細血管—吻合毛細血管ネットワークの減衰がみられる。特に吻合毛細血管の消失が観察され、赤血球速度の増加等の血流動態に変化がみられる。本研究では、プレコンディショニング運動（pre-Ex）が毛細血管ネットワークのリモデリングに与える影響について、共焦点レーザー法による毛細血管ネットワークの三次元構造解析、及びreal time RCR法によるangiogenic factorの関与について検討した。Morey法による2週間の尾部懸垂でラットヒラメ筋の萎縮を誘導した結果、HIF-1 α 、KDR/Flk-1、Flt-1、angiopoietin-1、Tie-2 mRNAは減少したが、pre-Exでは、angiogenic factorの低下率は少なかった。一方、Flt-1、KDR/Flk-1やTie-2レセプターmRNAに関しては、増加がみられた。また、毛細血管—吻合毛細血管ネットワークの減衰は抑制され、特に吻合毛細血管部の温存が観察された。これらの結果から、pre-Exは毛細血管—吻合毛細血管ネットワークの変化を抑制する作用をもち、特に血管リモデリングに関与するAngiopoietin-1/Tie-2レセプター系の作用が関連していることが示唆された。

14. ヒト臍帯内皮細胞（HUVEC）における伸展刺激依存Ca²⁺上昇に対するTRPV2の役割：ストレッチセンサー感度を左右する伸展刺激速度と細胞膜直下細胞骨格の構造

片野坂友紀，末盛智彦，成瀬恵治（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・システム循環生理）

我々は以前より、ヒト臍帯内皮細胞（HUVEC）を用いて、一軸方向の周期的伸展刺激に対して、その伸展率依存的に細胞内のCa²⁺が上昇することを報告しているが、現在までにその分子メカニズムの解明には至っていない。一方近年の研究において、いくつかのTRPチャネルは物理的刺激により活性化される可能性があることが明らかになってきた。我々は現在、これらのTRPチャネルのうち、HUVECに発現している複数のTRP分子について、その伸展刺激依存性を調べている。今回は、TRPV2強制発現細胞を用いた実験により得られた知見を中心に、（1）細胞形態により伸展刺激の感受性が変わることで、（2）一定の伸展率であっても伸展速度により感受性が変わることで、（3）細胞特異的な細胞膜直下の細胞骨格構造が細胞の伸展刺激感受性を反

映している可能性があること、を報告する。これらのことは、HUVECにおける伸展刺激依存的なCa²⁺上昇にTRPV2が関与している可能性が考えられると同時に、細胞の伸展刺激受容には単に伸展刺激センサータンパク質が発現していることが必要なだけでなく、そのセンサーが高感度で作動するために細胞膜直下の細胞骨格の適切な構造が存在することを示唆する。

15. ラット背部皮下及び毛包周囲微小血管内血流に及ぼす塩化カルプロニウムの効果

南山 求¹、山本明美²、開啓啓之³、角田健司³ (¹ 広島国際大学保健医療学部、² 大阪薫英女子短期大学、³ 第一三共ヘルスケア研究開発部)

近年、多くの育毛素材が注目されており、それらの効能と作用機序について毛包周囲組織の血流改善が関与しているとされてきた。しかし、生体での皮下及び毛包周囲の微小血管内血流量を直接的に観察解析した報告は少ない。本研究では育毛成分の1つである塩化カルプロニウムを生体顕微鏡下で皮下の毛包周囲に投与し、その微小血管内の血流変化を測定して、血流改善作用を直接的に明らかにすることを目的とした。実験にはアルファクロラロス・ウレタン麻酔下のラットを用い、自発呼吸下で側臥位とした。背部皮膚を実体顕微鏡下で切開し、皮膚を反転させて皮下組織を露出した。皮筋および皮下脂肪組織を削除し、毛包および毛包周囲微小血管内の赤血球流を生体顕微鏡下で確認し、解放部位を保生液で灌流した。生体顕微鏡に取り付けたテレビカメラで背部皮下及び毛包周囲の微小血管像を撮影し、ビデオカセットレコーダに記録した。ビデオ画像をパーソナルコンピュータでデジタル化してファイルとし、静止画上で血管口径を計測するとともに、微小血管内血流量についてはテレビ二窓法で得られた輝度信号の相互相関関数を求める方法で赤血球速度の計測を行った。0.2%塩化カルプロニウム100マイクロリットルを灌流液中に添加することにより、微小血管口径及び赤血球速度の増加を認め、毛包内及び周囲の微小血管網への血流改善効果を直接的な結果により明らかにできた。

16. アポリポ蛋白E由来ペプチドによるマイクログリア活性化の抑制機構の解析

大久保信孝、鈴木洋司、青戸 守、満田憲昭 (愛媛大学大学院医学系研究科 統合生体情報学講座生理学分野)

(目的) アポリポ蛋白E (ApoE) は血液中や脳髄液中において脂質を運搬している。最近この脂質運搬の働きに加えて、活性化マイクログリア細胞から分泌されるIL-6、TNFalpha、一酸化窒素を抑制する事が報告された。ApoE

によるこの作用は、ApoEのN末端の受容体結合領域133-149番目のアミノ酸残基の働きによる。本研究では、この133-149番目のアミノ酸からなるペプチド(Cog133)を作製してApoEのモデルとして用い、Cog133がマイクログリア細胞の活性化を抑制する分子メカニズムについて調べた。

(結果) LPSにより刺激されたマイクログリア細胞ではp38MAPキナーゼやNFkappa Bの活性化が見られた。しかしCog133の存在下では、これらの蛋白質の活性化は抑制された。さらにApoEの受容体であるLDL受容体やLRPをRNA干渉法で減弱させても、Cog133の効果に影響はなかった。

(考察) Cog133はp38MAPキナーゼやNFkappa Bの活性化を抑制することで、マイクログリア細胞の活性化を抑制することが示された。さらに、Cog133はApoE受容体であるLDL受容体やLRPを介さずにこの働きを行うことがわかった。

17. 酸化ストレスによる赤血球の機能障害に対するサポニンの保護効果

鈴木洋司¹、大久保信孝¹、寒川慶一²、青戸 守¹、満田憲昭¹ (愛媛大学大学院医学系研究科 ¹ 統合生体情報学講座生理学分野、² 生体機能解析学講座機能組織学分野)

赤血球は肺と末梢組織の間を循環し酸素運搬を行うために酸化ストレスを受け易い。循環血液中に長期間存在した赤血球は流動挙動が低下する。寿命が尽きた赤血球が網内系にて除去される指標には赤血球表面の構造変化が指摘されており、その要因としての酸化ストレスが考えられている。一方、人参由来のサポニンには酸化ストレスに対する保護効果がいわれている。そこで、赤血球に酸化ストレスを加え、血液の流動挙動に関してサポニンの効果を調べた。

【方法】健康成人から採取した赤血球を洗浄後、酸化ストレスとして、0.5mM硫酸鉄と2.5mMアスコルビン酸存在下(0-0.05mg/mlサポニンを含む)で37度1時間処理した。処理後、赤血球浮遊液をヘマトクリット45%に調整し、円錐—平板型粘度計で粘度を測定した。また、高ずりレオスコープを用いて赤血球の変形能を計測した。

【結果】酸化ストレスを加えると、赤血球浮遊液の粘度は増加し、赤血球変形能は低下した。サポニン存在下で酸化ストレスを加えた場合は、粘度の増加および赤血球変形能の低下を抑制した。別に、酸化ストレスを加えない条件では、サポニンの有無で粘度、変形能に差を認めなかった。酸化ストレスは赤血球の膜に障害を与え、赤血球変形能を低下させ、血液粘度を増加させた。一方、サポニンは赤血球への酸化ストレスによる障害を抑制した。

18. 人体における尿への酸排泄の計測

植松英士, 吉崎和男 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 分子細胞生理学)

尿中への酸排泄量とその日内変動について検討した。尿への酸排泄として尿中の滴定酸とアンモニウム濃度を測定した。滴定酸の測定には NaOH 溶液を用い、滴定終点は室温で pH7.6 とした。なお就寝前に採尿して翌日夕方に測定すると、尿 pH 値のアルカリ化することが夏期に観察された。このアルカリ化を防ぐために防腐剤としてトルエンを加えた。尿中のアンモニウム濃度の測定では、被検尿に NaOH の固形ペレットを加えてアルカリにしてアンモニア電極法で測定した。

生理学実習の男子学生 33 人について、昼食後の 13 時半頃の尿中への酸排泄量は平均 $41\mu\text{mol}/\text{min}$ であったが、その 4 倍からゼロ付近まで大きな個人差がみられた。酸排泄の 83% がアンモニアとしてで、残り 17% が滴定酸であった。次に、1 名の同一被験者 (男性, 25 歳) について睡眠中を除き 3 時間おきに 24 時間にわたり採尿した。日内変動は分時尿量が夜間には最低で、日中は増加し、食事等の飲水によって著明に増加した。尿 pH は起床後から上昇し、夜になると下がった。酸排泄量は夜間に多い傾向がみられ、滴定酸排泄量が夜間に増加し日中はむしろ減少する傾向がみられた。しかしアンモニア排泄には日内変動はみられなかった。

19. 動的運動が認知機能に及ぼす影響

遠藤加菜, 中塚千絵, 土持裕胤, 中本智子, 加島絵理, 松川寛二 (広島大学大学院保健学研究科・生理機能情報科学)

近年、運動は認知機能の向上や維持に有効であることが示唆されつつある。これらの報告の多くは継続的な運動習慣と認知機能の向上との関連性を示唆したが、運動が認知機能にどのような影響を与えているかという定量的な評価は残された課題であった。運動の前後に認知機能を評価できるストループ課題を実施しその所要時間および誤答数を比較することで、運動と認知機能の因果関係を定量的に検討した。対象は 20 歳代の健康女性 9 名とし、被験者の最大運動能力をあらかじめ自転車エルゴメーターを用いた運動負荷実験で調べた。実験では自転車エルゴメーター運動を最大運動負荷値の 20%, 40%, 60% に相当する負荷強度で 15 分間行った。運動直前と運動終了後 5 分間安静にした後に認知課題を行った。認知課題としてモニター画面上に色名単語をその意味とは異なる“カラー”で表示し、“カラー”を答えさせるというストループテスト (50 問) を用いた。3 種類の異なる強度の運動を行った場合にどの運動強度で

最も認知課題の所要時間が短縮するかを検討した。対照として運動を行わずに 25 分間の間隔をおきストループテストを実施した。その結果、ストループテストの所要時間は最大運動負荷値の 40% と 60% の運動を行った後において対照よりも有意に短縮したが (-3.7 ± 1.4 秒, -2.8 ± 1.2 秒短縮)、20% 強度の運動では運動をしない場合と比較してほとんど違いはなかった (-0.8 ± 0.8 秒短縮)。ストループテストの誤答数はどの運動強度においても運動前後で有意差はなかった。以上の結果は 40~60% 程度の中強度の動的運動により認知機能が向上することを示唆した。

20. 脳腫瘍を標的としたバイオナノカプセルの開発

筒井佑美¹, 富澤一仁¹, 西木禎一¹, 大守伊織¹, 名木田真奈², 妹尾昌治³, 松井秀樹¹ (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・細胞生理学, ²株式会社ビークル・研究所, ³岡山大学大学院自然科学研究科・機能分子化学)

バイオナノカプセル (BNC) は、B 型肝炎ウイルスの表面抗原粒子をベースとした直径 100~150nm の中空状粒子であり、ウイルスベクターの特徴とリポソームの特徴をそれぞれ引き継いだハイブリッド型デバイスである。BNC は内部に低分子化合物、核酸、タンパク質を封入することにより肝細胞に特異的にこれら分子を送達することができ、DDS キャリアとして有用である (Nat Biotech 21, 885 (2003))。脳腫瘍は、脳というきわめて重要な場所に発生するため広範囲切除が困難であり再発率が高い。近年ガンマナイフなどの 3 次元位置計測による精密な放射線治療も実施されているが、やはり再発率が高い。そこで脳腫瘍を特異的に標的する DDS の開発は、新しい脳腫瘍治療法確立のために重要である。

本研究では、神経腫腫に上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) が高発現していることに注目し、BNC の表面に存在する肝細胞結合部位 (Pre-S 領域) をプロテイン A の抗体親和性モチーフに置換し、さらに抗ヒト EGFR 抗体を結合させたハイブリッド型 BNC を作製した。この BNC の神経腫腫特異性について *in vitro* ならびに *in vivo* で検討した。EGFR 抗体付加型 BNC は、*in vitro*, *in vivo* のいずれにおいても神経腫腫に特異的に導入されることを確認した。本研究結果より BNC が脳腫瘍を標的とした DDS として有用であることが示唆された。

21. スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) 依存性のストレスファイバー (SF) 形成における Rho キナーゼと Fyn チロシンキナーゼの関与

徐 丹, 岸 博子, 川道穂津美, 加治屋勝子, 郭 鳳玲, 松尾さやか, 王 晨, 小林 誠 (山口大学大学院医

学系研究科・器官制御医学領域・生体機能分子制御学)

我々は、NIH3T3細胞において、SPCがSrcファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) 及び Rho キナーゼ (ROK) 依存性経路によってストレスファイバー (SF) を形成する事を見出し報告した。本研究では、SPC 依存性の SF 形成における、ROK の活性化および Src-TK の一種である Fyn チロシンキナーゼの役割を検討した。SPC による ROK の活性化に関する実験では、ROK によって特異的にリン酸化される事が知られている、myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) の Thr853 のリン酸化について、western blot で検討した。SPC 刺激によって MYPT1 の Thr853 がリン酸化され、ROK 阻害薬 Y27632 の前投与により抑制された。ROK を活性化する既知物質 lysophosphatidic acid (LPA) を陽性対照として検討したところ、LPA も SPC と同様に MYPT1 の Thr853 をリン酸化し、Y27632 の前投与によって抑制された。次に、Fyn チロシンキナーゼの役割に関する検討では、siRNA によって Fyn をノックダウンさせた NIH3T3 細胞では、SPC による SF 形成が抑制された。RNA 干渉作用の無いコントロール siRNA 或いは MAP kinase (MAPK) に対する siRNA を作用させても、SPC による SF 形成には影響がなかった。以上より、Rho キナーゼと Fyn チロシンキナーゼは、SPC 依存性の SF 形成に関与していると考えられた。

22. CaMKI を介した Drp1 リン酸化によるミトコンドリア形態制御

韓 小建¹, 松下正之², 富澤一仁¹, 西木禎一¹, 大守伊織¹, 松井秀樹¹ (¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・細胞生理学, ² 三菱化学生命科学研究所 脳梗塞研究グループ)

Mitochondrial morphology is regulated by balance of fission and fusion events. Certain dynamin family members such as dynamin-related protein 1 (Drp-1) are involved in the regulation of mitochondrial fission. Drp-1 specifically controls mitochondrial outer membrane fission. However, very little is known about the mechanism that initiates mitochondrial fission by Drp-1. In the present study, we detected Drp-1 was phosphorylated by CaMKI *in vitro*. In primary cultured hippocampal neurons, high K⁺ stimulation induced phosphorylated Drp-1 increment and Drp-1 transition from cytoplasm to mitochondria and mitochondrial fragmentation. The effect of high K⁺ was inhibited by KN93 (CaMK inhibitor). *In vitro* experiment, we also found phosphorylation of Drp-1 promoted the complexes formation of Drp-1 and hFis1. These results suggest that Drp-1

localization and mitochondrial morphology may be regulated by CaMKI-induced Drp-1 phosphorylation.

23. 膜伸展依存性 BK チャネルは細胞接着部位で停留する

小林 剛¹, 武田美江¹, 成瀬恵治², 曾我部正博^{1,3} (¹ 名大院・医・細胞生物物理, ² 岡山大院・医歯薬・システム循環生理, ³ 科技振・ICORP/SORST・細胞力覚プロジェクト)

細胞は、伸展やずり応力などの機械刺激を感知し応答反応を示す。その過程で、多くの場合、機械刺激に対するセンサーの一つである MS (mechano-sensitive) チャネルが関与していると考えられている。細菌由来の MS チャネルは、細胞膜の膜張力の変化を直接感知していることが明らかになりつつある。一方、高等生物の MS チャネル (特に stretch-activated チャネル) の場合、細菌のチャネルとは異なり、チャネル単独で膜張力の変化を感知するのではなく、細胞膜裏打ち骨格や骨格関連タンパク質を介して膜伸展を間接的に感知している可能性が指摘されている。本研究では、この作業仮説を、生体分子計測法を用いて、チャネルを直感的に可視化することにより検証した。観察対象として、我々の研究グループが見出した MS チャネル、SAKCA チャネル (膜伸展依存性 BK チャネル) を選択し、その N 末端に遺伝子工学的に単量体 GFP-タグを付加し (SAKCA-mGFP)、培養細胞に導入し発現させた。この細胞を蛍光分子観察したところ、SAKCA-mGFP 分子には細胞膜上で拡散運動しているもの (平均の拡散係数 0.4 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) と、ほとんど運動停止しているものが存在することがわかった。また、接着部位と SAKCA 分子の同時観察を行ったところ、細胞接着部位上、あるいは、その近傍で、SAKCA 分子の運動性が低下していることがわかった。これらの実験結果は、機械刺激受容センサーである SAKCA チャネルが、細胞骨格—接着分子と相互作用し超分子複合体を形成し、膜伸展を効率的に感知している仮説を支持するものである。

24. 心筋機械受容 Kca チャネルの全細胞電流解析

岸尾正博, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理学)

トリ初期胚 (受精 10-12 日後) 心室筋培養細胞 (chick cultured ventricular myocytes, CCVM) からクローニングされた心筋機械受容 (SAKca) チャネルは、Ca²⁺ 活性化型大コンダクタンスカリウム (BK) チャネルとしての基本的性質に加えて、細胞膜の伸展によって活性化される機械受容チャネルの性質を併せ持つことが単一電流解析により明らかになっている。その一方で、この SAKca チャネルが

心血管系においてどのような生理学的役割を担っているかについては依然として不明である。そこで今回、SAKcaチャンネルの生理学的役割を明らかにするために、SAKcaチャンネル遺伝子を異所発現させたHEK293細胞とCCVMの全細胞電流をwhole-cell patch clamp法によって計測し、その電気生理学的性質を調べた。実験の結果、各々の細胞から記録された電位依存性の外向き電流は、BKチャンネルの特異的ブロッカーであるCharybdotoxin (10nM)によって阻害された。この結果から、我々はCCVMの活動電位再分極相終末部はCharybdotoxin投与によって延長するという仮説を立てた。この仮説を検証するために、CCVMにcurrent-clamp法を適用し、誘発活動電位に対するCharybdotoxinの効果を検討した。結果は予想に反して、Charybdotoxin (30nM)投与によってCCVMの誘発活動電位再分極相の延長は認められなかった。以上の結果から、CCVMに発現するSAKcaチャンネルは生理的条件下においては活性化されない可能性があると考えた。そしてSAKcaチャンネルは機械的刺激過剰負荷時や虚血時といった何らかの病的条件下において活性化されることで、この際起こる活動電位再分極相の延長に対して防御的役割を担うのではないかと第二仮説を立てた。そこでこの仮説を検証すべく、CCVMに対して非侵襲的に伸展刺激を負荷する技術を新たに開発した。現在この新技術をパッチクランプ法と組み合わせることによって、全細胞SAチャンネル電流記録に着手している。

25. マイクロチャンネルを用いた単一細胞周辺環境の空間的・時間的制御

山田 章, 片野坂友紀, 毛利 聡, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 システム循環生理)

近年、単一細胞レベルでの各種イオン、タンパク質などの刺激に対する応答解析ますます重要になってきている。しかし、既存技術では刺激物質の灌流においてその過程を十分に速くかつ正確に行うことはできない。溶液の完全な置換には数百ミリ秒以上を要し、遷移過程における二液の攪拌状態は不可避である。

これらの問題を解決するため、我々はマイクロチャンネル内に形成される層流(laminar flow)を用い、細胞周辺溶液を高速に置換可能な装置をシリコンラバー(PDMS)を基盤とするソフトリソグラフィの技術を用いて作製した。マイクロチャンネル内では乱流を生じないので同時に流れる複数の溶液は混ざり合わず、二液間にはシャープな境界面を形成する。境界面を素早く移動し、かつその位置を正確にコントロールすることで、周辺溶液を瞬時に切替えることが可能となる。

開発した装置性能検証のため、HEK 293細胞を用いてATP含有溶液に瞬時に切替えた際の細胞内Ca²⁺上昇を計測した。Ca²⁺指示薬にはFura-2 AMを用い、340/380nmレシオイメージングにより濃度に対応する蛍光強度変化を導出した。その結果、ATP含有溶液に切替後直ちに細胞内Ca²⁺濃度上昇を確認した。これらのことから、細胞周辺の溶液環境の空間的・時間的制御を高分解能・高速で実現した。