

第 60 回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成 20 年 11 月 15 日（土）

会 場：愛媛大学城北キャンパス，総合情報メディアセンター

当番幹事：愛媛大学大学院医学系研究科 田中潤也，満田憲昭

第 60 回中国四国地方会は 63 名の参加者を得て，朝 9 時 15 分からの開会挨拶に引き続き，東京女子医科大学教授，川上順子日本生理学会副会長から IUPS2009 についてご説明をいただきました。9 時 30 分より 17 時近くまでにわたり，24 演題の発表が行われました。今回中国四国地方会初めての試みとして，若手による研究振興を目的として奨励賞を設けることになり，5 名の候補者による研究発表も行われました。奨励賞候補口演では，5 分間の質疑応答は不足であるのご指摘を受けたように，活発な討論が行われたことは特筆すべきことだったと思われます。正午からの評議員会でも，多くの議論があり，今後も奨励賞を継続すること，地方会活性化と参加者の交流促進のために 2 日間での開催が検討されました。このように有意義に地方会が開催できましたのも，参加者皆様のご協力ご支援の賜と感謝しております。第 61 回中国四国地方会は，山口大学大学院医学系研究科，器官制御医科学講座・生体機能分子制御学の小林誠教授が中心になって開催されることになりました。

1. 酸化ストレスによる赤血球膜の酸化障害と Ginseng 由来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，前田信治¹，満田憲昭¹（¹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，²同 生体機能解析学講座機能組織学分野）

【目的】Ginseng 由来のサポニンには，酸化ストレスによる赤血球の流動挙動障害に対する保護効果がある。その機構について報告する。

【方法】酸化ストレスによる赤血球膜タンパク質の傷害に対する各種サポニン分画の保護効果を，膜タンパク質中の SH 基残存量にて評価した。健康成人から採取した赤血球を洗浄後，0.05mg/ml サポニン分画の存在下，1mM 硫酸鉄/5mM アスコルビン酸で 37°C 1 時間処理した。赤血球膜 ghost 試料を作製し，イールマン試薬にて膜タンパク質の SH 基残存量を定量した。また，SH 基を N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl)-ethylenediamine にて標識し，電気泳動後，HRP 標識 streptavidin による immunoblotting 法にて，酸化を受けたタンパク質を検出した。

【結果】赤血球に酸化ストレスを加えると，赤血球膜タンパク質中の SH 基は減少した。サポニンの Rg2 分画および Rh1 分画はその減少を抑制した。これらは，特にスペクトリン，Band3，Band4.2 における SH 基の減少を抑制した。一方，酸化ストレスによる膜過酸化脂質の増加に対してはサポニンによる保護効果はなかった。

2. Essential role of p38 MAPK in caspase-independent, iPLA₂-dependent cell death under hypoxia/low glucose conditions

青戸 守¹，新沢康英²，鈴木洋司¹，大久保信孝¹，満田憲昭¹，辻本賀英²（¹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，²大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座遺伝子学）

【背景】低酸素や虚血によって誘導される細胞死のメカニズムはいまだ十分に理解されていない。我々はこれまでに，低酸素/低グルコース刺激によって誘導される細胞死がアポトーシス実行因子である caspase に依存しない非アポトーシス型細胞死であること，また，この細胞死がホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) に依存することを報告してきた。

【結果】我々はこの刺激によって p38 MAPK が活性化されること，p38 MAPK の阻害剤や p38α の siRNA によってこの細胞死が阻害されること，p38 MAPK の阻害剤がこの刺激による PLA₂ の活性化を阻害することを見出した。以上より，この刺激による細胞死において，p38 MAPK が PLA₂ の上流で機能している可能性が示唆された。

また，抗酸化剤 N-acetyl-cysteine がこの刺激による細胞死や p38 MAPK の活性化を阻害したことから，活性酸素種 (ROS) が p38 MAPK の上流で働いている可能性が示唆された。

【結論】これらの結果から ROS→p38 MAPK→PLA₂ とい

うシグナルが低酸素/低グルコース刺激による Caspase 非依存性細胞死において重要な働きをしていると考えられた。

3. STAT3 コンディショナルノックアウトマウスにおける貧血の解析

大久保信孝, 鈴木洋司, 青戸 守, 青野賢治, 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)

STAT3はサイトカインのシグナル伝達などに関与する転写因子である。一方、Tie2は血管内皮細胞や骨髄造血細胞などで発現が見られる。我々はSTAT3の活性化に必要なチロシン残基の前後にloxP配列を挿入したSTAT3 Flox マウスとTie2遺伝子のプロモーター配列の下流にCreリコンビナーゼのコード領域の配列を挿入したTie2-Creマウスを掛け合わせて、STAT3コンディショナル欠損マウス(STAT3CKOマウス)を作製した。この交配の結果得られたSTAT3CKOマウスの中には、正常な表現型を持つ個体と体が小さく貧血をもった個体とが含まれていた。これら2種類のマウスから得た初代培養線維芽細胞の遺伝子型を調べたところ、貧血を持つマウスでのみSTAT3遺伝子の欠損が見られた。線維芽細胞では通常Tie2の発現は見られないことから、通常Tie2を発現していない細胞でのSTAT3遺伝子の欠損が貧血に関与している可能性が示唆された。現在このマウスの貧血がどのような機序により起こるのかを解析している。

4. ドコサヘキサエン酸による神経幹細胞のbHLH転写因子の発現量と細胞周期の変化

片倉賢紀, 橋本道男, 松崎健太郎, 紫藤 治 (鳥根大学医学部環境生理学)

ドコサヘキサエン酸(DHA)は、n-3系多価不飽和脂肪酸で脳の発達・維持に重要である。DHAは神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することが報告されているが、その分子機構は明らかではない。本研究では、この機構を解明するために、神経幹細胞をDHAで処置したときの細胞周期と塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス(bHLH)転写因子発現量の変化を測定した。

ラット胎児から単離した神経幹細胞は、線維芽細胞増殖因子(bFGF)存在下で、ニューロスフェア法により培養した。得られたニューロスフェアを分散後bFGF非存在下でDHAを添加し培養した。一定時間培養後、細胞周期をフローサイトメーターで解析した結果、DHAの添加によりコントロールと比較してG0/G1期の細胞が有意に増加し、S期の細胞が有意に減少していた。次に、培養後の細胞から

total RNAを抽出し、bHLH転写因子のmRNA発現量を定量した。神経幹細胞のニューロンへの分化を抑制するbHLH転写因子Hes1の発現量は、DHA処置によりコントロール群と比較して有意に低下した。一方、神経幹細胞からニューロンへの分化を促進するbHLH転写因子NeuroDの発現量は、DHA処置後24、96時間で有意に増加した。以上のことからDHAはbHLH転写因子の発現量と細胞周期を調節することにより、神経幹細胞からニューロンへの分化を促進することが明らかとなった。

5. Targeting of sodium borocaptate (BSH) to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His

B. Feng¹, Tomizawa K.^{1,2}, Michiue H.¹, Han X.-J.¹, Fujimura A.¹, I. Ohmori¹, T. Nishiki¹, H. Matsui¹ (¹Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ²Kumamoto University)

Nanoparticles are effective carriers to deliver cargos into cells. Here we constructed BSH encapsulated liposomes containing 10mol% nickel lipid (DOGS-NTA-Ni) and 1% DSPE-PEG₂₀₀₀ using reverse-phase evaporation (REV) method, and anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies were conjugated to the liposome using the antibody affinity motif of protein A (ZZ) as an adaptor. Ultracentrifugation analysis showed that nickel-liposome could form a liposome-ZZ-mAb complex (immunoliposomes). The diameter and Z-potential of the immunoliposome are 130 nm and -24.67 mV, respectively. Three human glioma cell lines of U87 were used in this study and western blotting was carried out to identify the expression of EGFR. U87 ΔEGFR expresses EGFRv III (145kDa) and U87 WT expresses wild-type EGFR (170kDa), EGFR expression was under-detectable in PAU 87 (parental). Antibody-mediated ZZ delivery analysis by western blotting indicated that anti-EGFR mAb is capable of targeting to glioma cells and deliver conjugated ZZ-His. The immunoliposomes were used to target BSH in EGFR-overexpressing glioma cells. Immunohistochemical analysis using anti-BSH monoclonal antibody indicated that BSH was effectively delivered into EGFR-overexpressing glioma cells but not in EGFR-deficient glioma cells or primary astrocytes. Z-dimension scan of the immunostained cells revealed that BSH was delivered into nucleus. Moreover, high ¹⁰B contents in U87 WT and U87 ΔEGFR were

measured by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) after cells were incubated with immunoliposomes for 3 hours, and the ^{10}B delivery was antibody concentration and temperature-dependent. In the model mice of brain tumor, both NBD-liposome and BSH were only observed in brain tumor. Moreover, high efficiency of ^{10}B delivery in tumor was confirmed by ICP-AES measurement *in vivo*. These results suggest that the new drug delivery system with immunoliposomes provides an effective method to deliver BSH into glioma cells in boron neutron capture therapy (BNCT).

6. CaM kinase α -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology

韓 小建¹, 陸 雲飛¹, 李 順愛², 貝塚多久⁴, 佐藤泰史⁴, 富澤一仁¹, アンガス・シ. ネアン³, 竹居孝二², 松井秀樹¹, 松下正之^{1,4} (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経科学, ³エール大学医学部精神医学, ⁴三菱化学生命科学研究所)

Mitochondria are dynamic organelles that frequently move, divide, and fuse with one another to maintain their architecture and functions. However, the signaling mechanisms involved in these processes are still not well characterized. In this study, we analyze mitochondrial dynamics and morphology in neurons. Using time-lapse imaging, we find that Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) causes a rapid halt in mitochondrial movement and induces mitochondrial fission. VDCC-associated Ca^{2+} signaling stimulates phosphorylation of dynamin-related protein 1 (Drp1) at serine 600 via activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase α (CaMKI α). In neurons, phosphorylation of Drp1 at serine 600 is associated with an increase in Drp1 translocation to mitochondria, whereas *in vitro*, phosphorylation of Drp1 results in an increase in its affinity for Fis1. CaMKI α is a widely expressed protein kinase, suggesting that Ca^{2+} is likely to be functionally important in the control of mitochondrial dynamics through regulation of Drp1 phosphorylation.

7. LIM キナーゼ 2b のミリスチン酸化修飾による細胞内局在と酵素活性の制御

高橋寿明¹, 船越 洋², 中村敏一², 田中潤也¹ (¹愛媛大院医分子細胞生理学, ²阪大院医分子再生医学)

LIM キナーゼ (LIMK) は分子内に LIM ドメインと呼ば

れる特徴的な Zn フィンガー構造をもつキナーゼ分子である. LIMK は低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー分子による活性化を受け, アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化するアクチン細胞骨格の再構築に重要な制御因子であり, LIM 蛋白質ファミリーの新しいカテゴリーに属する情報伝達分子として関心が持たれている. LIMK には LIMK1 および LIMK2 の2つのサブファミリーが同定されているが, さらに私達は通常型 LIMK2 (LIMK2a) に加え, スプライシングの違いにより LIM ドメインの一部を欠失した LIMK2b, および LIM ドメインを完全に欠失した tLIMK2 が存在することを明らかにしている. 興味深いことに LIMK2a は幅広い組織に発現しているのに対し, LIMK2b は脳・神経系に特異的, tLIMK2 は精巣特異的であり組織特異的な制御を受けていることが分かった. LIMK2 遺伝子欠損マウスの性状解析から LIMK2/tLIMK2 が精子形成の進行や維持に重要な役割を担っていることは明らかにしたものの, LIMK2b の生理的機能については不明のままであった.

今回私達は LIMK2b が脂質修飾の一つであるミリスチン酸化を受け, 小胞体に局在することを明らかにした. LIMK2b のミリスチン酸化の有無はキナーゼ活性やストレスファイバー形成などのアクチン細胞骨格制御には影響を及ぼさなかったが, LIMK2b の小胞体への局在に必須な修飾であった. さらに LIMK2b 変異体を用いた結果から, LIMK2b が小胞体の構造維持に重要であることも明らかにした. 現在, LIMK2b の脳・神経系における機能について解析を進めている.

8. 血管平滑筋の異常収縮における細胞膜上マイクロドメイン「ラフト」の重要性

加治屋勝子, 岸 博子, 川道穂津美, 小林 誠 (山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学)

【目的】血管平滑筋の Ca^{2+} 依存性の正常収縮は, 血圧維持を担っている. これに対して, Rho キナーゼ (ROK) を介する血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性収縮は, 血管異常収縮の主因として注目されている. 我々は, その上流の因子としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) と Fyn チロシンキナーゼを同定し, SPC が, 既知の G 蛋白質や C キナーゼ系とは独立して, SPC→Fyn→ROK という新規の経路によって異常収縮を引き起こすことを見出した. さらに, ヒト血管では, SPC による異常収縮の大きさは, 血清総コレステロール (Chol) 値および LDL-Chol 値と正相関を示し, HDL-Chol 値とは逆相関を示した. 一方, 脂質異常症で増加した Chol は, 細胞膜の中でも, 膜ラフトというマイクロ

メインに局限して蓄積することが知られている。そこで、本研究では、SPCによって引き起こされる血管の異常収縮と膜ラフトとの関係について検討した。

【方法と結果】膜ラフトのマーカ分子を用いて、血管異常収縮の病因シグナル分子の細胞内局在を調べると、SPCにより Fyn と ROK は細胞質から膜ラフトへ移動した。Chol 除去剤によって膜ラフトを消失させると、SPC による Fyn と ROK の移動および異常収縮が抑制されたが、カルシウム依存性の正常収縮には無効であった。また、分子間相互作用解析装置を用いて、人工モデル膜に対する SPC の結合性を調べると、ラフト特有脂質である Chol とスフィンゴ脂質の膜中含有率の増加により、SPC の結合量が増加した。さらに、走査型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いて、ラフトモデル膜の表面形状と性状を超ナノレベル解析したところ、血管異常収縮のシグナル伝達と膜ナノ構造の均一性と安定性との関連が示唆された。

【結論】Chol とスフィンゴ脂質に富んだ膜ラフトは、血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達において重要な役割を果たし、安定な反応の場を提供していると考えられた。

9. 起立動作時における予測的血液変動の検討

北岡和義¹、北村光夫¹、稲垣明浩¹、芥川正武²、木内陽介²、吉崎和男¹ (¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学分野、²徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門)

座位から立位など起立を伴う動作を行うと心拍、血圧などの全身の血流動態に大きな変化をもたらす。一時的な脳虚血により引き起こされる起立性低血圧症の原因ともなることが知られている。一方で、そのような動作は姿勢の動揺を同時に引き起こすが、それを効果的に抑える神経機構として、姿勢を調節する筋が主動作以前に活動し動揺を予測的に抑制する予測的姿勢調節 (anticipatory postural adjustment) の存在が報告されている。

ヒトの起立時の血流動態においては、これまで起立による血圧減少に対する圧受容器反射などのフィードバック制御を中心に検討が行われているが、動作以前からのフィードフォワード的制御機構の検討は現在まで行われていない。我々は血流動態においてもフィードフォワード的な調節機構が姿勢調節機構と同様に存在し、その不調が起立性低血圧の原因のひとつになっているのではないかと仮説している。この点について明らかにするために、徳島大学工学部が独自に開発した運動時でも連続血流速度記録が可能な携帯型ドップラー頸動脈血流計測装置を用い、起立動作時の連続した頸動脈血流の記録を行った。

健康な成人男性 8 名の記録、解析の結果、起立動作に先

行した頸動脈血流の最大血流速度の有意な減少が認められた。また起立動作を行った後には心拍、頸動脈血流の最大血流速度、最大血流加速度および最低血流速度において大きな変動が認められた。今後、起立動作前後の血流変化の相互関係、および起立時の血圧変化との関連より、予測的な血流変化の生理学的意義およびその起立性低血圧との関連を検討する。

10. 加算処理が不要な光学的膜電位多部位同時測定システムを用いたラット大脳運動感覚野における神経活動の時空間パターンの解析

濱 德行¹、吉田勇氣²、藤田恭介³、伊藤眞一¹、廣田秋彦¹ (¹鳥根大医神経筋肉生理、²鳥根大総合理工電子機能システム工学、³鳥根大総合理工電子制御システム工学)

非常に多数の領域の神経活動を同時記録する方法の一つとして、膜電位感受性色素を用いた光学的膜電位測定法が広く普及しつつある。しかし、市販の装置を用いた通常の測定では、単一掃引で解析可能なシグナル・ノイズ比 (SN 比) を持った記録を生体内の脳から記録することは事実上不可能であり、SN 比を改善するために加算処理が必要である。この結果、適用可能な実験パラダイムは限られ、測定法の限界を規定することとなっている。我々はこのような現状を打破することを目的として、単一掃引で充分解析可能な高 SN 比を有するデータの記録が可能な測定システムの開発を進めてきており、昨年の本会では、新たに開発した透明電極を用いた大脳皮質表面からの脳波記録を併用することにより、ノイズに埋もれがちな微小な光学シグナルであっても、単一掃引で的確に捉えることが可能になったことを報告した。今回は、上記手法を用いて大脳運動感覚野における自発的な神経活動を記録し、その時空間パターンを感覚応答時のものと比較した。その結果、両者共に、微小な領域から活動が始まりそれが周囲に広がっていくパターンを示した。しかし、感覚応答時の活動では起始領域が局限し時空間パターンも似通っていたのに対し、自発的な活動では起始領域や時空間パターンが毎回大きく異なり、同時記録した脳波の波形が似通っている場合でもこれらは一致しないことが明らかになった。

11. 代謝型グルタミン酸受容体 II 型によるマウス副嗅球僧帽細胞—顆粒細胞間相反性シナプス電流の調節

谷口陸男¹、椛 秀人^{1,2} (¹高知大学医学部生理学講座、²生理学研究所環境適応機能発達研究部門)

交尾刺激を契機として雌マウスに形成されるフェロモンの記憶には、副嗅球が重要な働きを果たしているが、副嗅球の主要な神経回路である僧帽—顆粒細胞間の相反性シナ

ブスの性質については不明な点が多い。そこで我々はマウス副嗅球のスライス標本を作製し、ホールセル法を用いて各種薬物の相反性シナプス電流に対する効果を膜電位固定下で解析してきた。僧帽細胞に脱分極刺激を与えると、抑制性シナプス後電流(IPSC)が生じる。我々はこれまでに、細胞外 Mg^{2+} を除去した場合、この IPSC が代謝型グルタミン酸受容体 2 型 (mGluR2) 作動薬の DCG-IV により顕著に抑制され、mGluR2 拮抗薬である LY341495 の投与では増大されることを報告した。

今回は、上記相反性シナプス伝達における mGluR2 の役割を調べる一環として、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達における mGluR2 作動薬の効果を調べた。ホールセル法を顆粒細胞に適用して興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を測定したところ、DCG-IV の投与により mEPSC の平均強度、頻度ともに減少した。この結果は、mGluR2 が僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性伝達にも関与していることを示唆した。

12. アデノウイルスベクターを用いた鋤鼻受容体の *in vitro* 発現・フェロモン応答評価系の確立

難波利治¹、村本和世²、梶 秀人^{1,3} (高知大医生理、²明海大歯形態機能成育、³生理研環境適応機能発達)

多くの哺乳類は主として一般的な匂いを検知・処理する主嗅覚系の他に、フェロモンを検知・処理する鋤鼻系を持っている。多くの哺乳類において、フェロモンは種・性・発情周期・順位など社会的な関係を構築する上で重要な情報源となっている。また、フェロモンはその影響が極めて大きく、受容体に対し神経内分泌系を介して妊娠障害などの生理的变化を惹起させることが知られている。フェロモンは鋤鼻器に存在する鋤鼻神経で受容され、情報は投射先の副嗅球へ伝達される。鋤鼻神経に存在する鋤鼻受容体には V1R と V2R の二種類が存在し、齧歯類ではそれぞれ 100 個程度のレパートリーが知られている。また、V1R は揮発性の低分子フェロモンを、V2R はペプチドのような非揮発性のフェロモンを受容することも知られている。しかし、どの化合物がフェロモンとして働いているのか、どの受容体によって受容されているのかという点はほとんど明らかにされていない。受容体とフェロモンの対応関係を明らかにするために、特定の受容体のみが発現し、しかも簡便な応答検出が可能な系の確立が望まれる。そこで、ラット鋤鼻培養細胞に対し鋤鼻受容体遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを感染させ、Cre-loxP 系を介して特定の鋤鼻受容体を強制発現させた。強制発現の後、カルシウムイメージングで発現・応答の評価を行ったところ、投射先の副嗅球と共培養を行った場合に特定の化合物に対する選択

的な応答が得られた。

13. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) の細胞周期 G1/S チェックポイントにおける役割

神島和代¹、山口文徳¹、波多野直哉²、徳田雅明¹ (香川大学医学部細胞情報生理学講座、²神戸大学大学院医学研究科質量分析総合センター)

細胞周期が G1 期から S 期へ進行する際には、サイクリン E/CDK2 複合体が重要な役割を果たしており、p27^{kip1} はその活性を阻害する。このため p27^{kip1} の安定性は細胞周期の制御に非常に重要であるが、この分子の安定性はそのリン酸化状態に依存していると考えられている。また p27^{kip1} は JAB1 と結合することにより、核外に移行して分解が促進されていることが明らかになっている。

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) は、さまざまな癌組織において、正常細胞と比較して発現が著しく減少していることが報告されている分子である。最近 p27^{kip1} と JAB1 との結合を阻害することにより、p27^{kip1} を安定化させるという機能が報告され、新規の細胞周期調節タンパク質として注目されている。これまでに当グループでは、株化肝癌細胞 HuH-7 において、希少糖(自然界に希に存在する単糖の総称)の一種である D-アロースの添加により TXNIP 遺伝子の発現が顕著に上昇し、そのことが細胞周期を G1/S チェックポイントにおいて停止させ、さまざまな癌細胞の増殖を抑制することを報告した。今回、D-アロースの添加により増加した TXNIP が p27^{kip1} の安定性を制御していること、また TXNIP が Cyclin E および CDK2 と直接または他の分子を介して結合することを示す結果が得られた。これらの結果は、癌細胞の細胞周期 G1/S チェックポイントにおいて、D-アロースの添加により増加する TXNIP が Cyclin E/CDK2 複合体および p27^{kip1} の機能を制御する分子であることを示唆しており、D-アロースが新しいタイプの抗癌剤となりうる可能性を提示している。

14. 心臓に発現する新規 Ca^{2+} トランスポーターの単離

竹内 崇、片野坂友紀、山田 章、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生理)

心筋細胞の形質膜や筋小胞体には、多数の Ca^{2+} 輸送体が発現している。心筋細胞でみられる収縮・弛緩、細胞分化や肥大応答等の生理機能は、これらの Ca^{2+} 輸送体が担う緻密な Ca^{2+} ハンドリングによって維持されている。これらの Ca^{2+} 輸送体のうち、 Na^{+}/Ca^{2+} 交換体 (NCX1) は、心臓の拍動ごとに流入してくる Ca^{2+} を、細胞膜を介した Na^{+} の濃度勾配を利用して細胞外へと汲み出す、実質上唯一の Ca^{2+} 排出系として働くことが知られている。最近の肥大発

症メカニズムの研究から、細胞内 Ca^{2+} 濃度の持続的上昇は、特定の転写因子機能やプロテアーゼ活性を変化させることが明らかとなってきた。しかしながら、病態発症の鍵となる Ca^{2+} 輸送体は、未だ同定されていない。今回我々は、ヒト心筋細胞に発現する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体ファミリーに属する cDNA を再検索した。その結果、ヒト心筋由来の cDNA より、RT-PCR 法を用いて、現在までに心筋細胞における発現が報告されていない新たな $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体ファミリーに属するクローンと、そのスプライシングアイソフォームを単離することに成功した。これらのクローンは、それぞれ便宜的に S2 および S3 と名付けた。ヒトの各組織由来の cDNA において、このクローンの発現パターンを RT-PCR 法で検討したところ、S2 はどの組織にも一様に発現していることが明らかとなった。一方で、S3 は、心筋に多く発現しているという結果が得られた。現在、哺乳類培養細胞にこれらのクローンを強制発現させ、この分子の局在や $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 輸送特性を調べているので、その結果を報告する。今後、この新規 Ca^{2+} 輸送体の機能解析や生理的意義の解明を通して、病態での心筋細胞 Ca^{2+} 代謝異常メカニズムに迫りたいと考えている。

15. ラット運動時の心拍数調節のメカニズム：副腎摘出ならびに自律神経系遮断薬の効果

若杉理恵，中本智子，梁 楠，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）

運動時の心拍数は、心臓交感神経、心臓副交感神経および副腎髄質から放出されるカテコラミンによって制御されている。しかし、これらの相対的役割についてはよくわかっていない。そこで、本実験はラットの運動開始時、運動中、運動後の回復時における心拍数の調節に対する副腎髄質由来のカテコラミンならびに自律神経系の影響を調べることを目的とした。実験操作として副腎摘出と自律神経系遮断薬の投与を用いた。心電図計測用電極はラットの胸部皮下に埋め込み、心拍数は心電図の RR 間隔を用いて計測した。運動はラット用トレッドミルで、20m/min の速さで 30 分間行った。運動負荷試験は、①薬投与なし、② β_1 受容体遮断薬投与 (atenolol 3mg/kg)、③ムスカリン受容体遮断薬投与 (atropine methyl nitrate 1.5mg/kg)、④両遮断薬同時投与という 4 つの条件においてそれぞれ別の日に行った。その後、副腎摘出を行い 1 週間以上の回復期間を設けたあと、同様に 4 つの条件で運動負荷試験を行った。運動開始時および運動中の心拍数増加や運動後の心拍数回復は、自律神経系遮断薬の投与によって低下し、 β_1 受容体遮断薬投与とムスカリン受容体遮断薬同時投与において最も低下した。運動開始時の心拍数増加は β_1 受容体遮断薬投与で大きく

低下したため、心臓交感神経活動の亢進が運動開始時の心拍数増加にとって重要であると考えられる。しかし運動中や運動後の回復時の心拍数においては、 β_1 受容体遮断薬やムスカリン受容体遮断薬投与の効果には差はみられず、心臓交感神経、心臓副交感神経の両方が重要であると考えられる。副腎摘出後、安静時心拍数は一時的に上昇したが運動負荷試験時には摘出前まで回復した。副腎摘出後の安静時動脈血圧に変化はみられなかった。副腎摘出前後でどの条件においても、運動開始時、運動中、運動後の回復時の心拍数に差はみられなかった。以上の結果は、運動時の心拍数調節には副腎髄質由来のカテコラミンよりも心臓交感神経、心臓副交感神経の活動の方が重要であることを示唆している。特に、運動開始時の心拍数増加には心臓交感神経活動の役割が大きいと考えられる。

16. 生細胞ベースアッセイ自動解析装置を用いた細胞の定量的解析方法の開発

—スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) が細胞に与える影響—

徳森大輔^{1,2}，高田雄一^{1,2}，岸 博子^{1,2}，加治屋勝子^{1,2}，川道穂津美^{1,2}，小林 誠^{1,2}（¹山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学，²小林プロジェクト JST イノベーションプラザ広島）

当研究室では、これまでに血管異常収縮のシグナル分子としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を見出している。また、ブタ冠状動脈平滑筋条片の Ca^{2+} 非依存性収縮を選択的に測定することで、SPC の異常収縮活性や、その抑制物質をスクリーニングするためのバイオアッセイ系も確立している。しかしながら、この方法は操作が複雑で、熟練した技術が必要とされるうえ、一回の実験で検証することができるサンプル数が限られているため、多数の検体を検証する場合には不向きである。そこで今回、96 穴プレートに播種した細胞の変化を自動的に撮影し、それらの画像を定量的に解析することができる生細胞ベースアッセイ自動解析装置 (Array Scan VTI, Cellomics 社) を用いた解析方法を開発した。以前、我々は、ヒト冠状動脈平滑筋細胞を SPC で刺激すると、血管異常収縮の原因酵素の一つである Fyn および Rho キナーゼが細胞膜へ移動し、その結果、細胞が収縮して丸くなることを見出した。これらの細胞変化を利用して SPC の異常収縮活性を検討するにあたり、あまりに強い SPC 刺激をおこなうと、細胞がプレートから剥がれてしまい、弱すぎると変化が見られなくなるため、まずは最適な SPC 濃度や刺激時間の検討をおこなった。また、解析時のアルゴリズムやパラメーターを調節することにより、細胞の変化を詳細に解析できるようにした。

この解析方法を応用することができれば、SPCを用いた初期のスクリーニング系で大きな力を発揮すると考えられる。

17. 血管平滑筋異常収縮におけるカベオリン-1の役割

岡田裕子¹、岸博子^{2,3}、川道穂津美^{2,3}、加治屋勝子^{2,3}、高田雄一³、徳森大輔³、小林誠^{2,3} (¹山口大学医学部医学科4年生(学部学生)、²山口大学大学院医学系研究科器管制御医学講座生体機能分子制御学、³小林プロジェクト JST イノベーションプラザ広島)

血管平滑筋の異常収縮のメカニズムに重要な機構のひとつとして Rho キナーゼによるミオシンホスファターゼの不活性化がある。Rho キナーゼはミオシンホスファターゼを不活性化することでミオシン軽鎖の脱リン酸化を抑制し、その結果、ミオシン軽鎖のリン酸化レベルが上がり、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇がない状態でも収縮が引き起こされる。つまり、血管平滑筋の異常収縮は、 Ca^{2+} 感受性の増強 (Ca^{2+} -sensitization) による収縮である。

これまでに我々は、スフィンゴ脂質の1種である sphingosylphosphorylcholine (SPC) が、Fyn および Rho キナーゼを介して血管平滑筋異常収縮を引き起こす事を見出した。更に、Fyn や Rho キナーゼが、異常収縮の際、細胞質内から膜ラフトという細胞膜ドメインに移動するという知見を得た。膜ラフトの局在蛋白であるカベオリン-1が、足場ドメインを介して多くのシグナル分子と直接相互作用することから、本研究では、カベオリン-1が血管平滑筋異常収縮の情報伝達にも関与しているのではないかと、という仮説を立て、カベオリン-1足場ドメインペプチドを用いて、それを検証した。

実験方法としては、スキンド法を用いて、カベオリン-1足場ドメインペプチドを、血管組織中の平滑筋細胞の細胞内に導入し、収縮に与える影響を検討した。スキンド法では、 β -escin 処理によって、細胞膜の情報伝達機構を温存したまま細胞膜に小孔を開け、細胞質 Ca^{2+} 濃度を自由に調節し、同時に、調べたい蛋白やペプチドなどを細胞内に直接投与することができる。

その結果、カベオリン-1の足場ドメインペプチドは、SPC による異常収縮のみならず、カルシウム依存性の正常収縮を抑制した。このことから、カベオリン-1は正常収縮・異常収縮の両方の情報伝達系に関与していると考えられた。

18. 除脳ラットにおける上喉頭神経刺激による2つの相反性反射の出現について

山形隆造、古我知成 (川崎医療福祉大学医療技術学部リハビリテーション学科)

我々は、除脳ラットにおいて、上喉頭神経への電気刺激パラメーターを変化させることにより、2つの相反的な反射が引き起こされることを見いだしている。低頻度刺激を与えた場合には、食塊を食道へと送り込む、いわゆる嚥下反射が誘発される。逆に高頻度刺激を与えると、喉頭および食道内の食物を逆流させる、いわゆる gag reflex が誘発される。本研究は、この2つの相反的な嚥下反射と gag reflex の誘発に関わる中枢性神経機構において、NK₁ および NMDA 受容体拮抗薬の影響について検討した。両反射を区別するために、舌骨上筋群、横隔膜、外肋間筋、腹直筋の筋活動および食道の運動パターンを測定した。NMDA 拮抗薬である MK-801 は、嚥下反射だけでなく gag reflex も有意に抑制した。NK₁ 拮抗薬である WIN51,708 は、gag reflex を有意に抑制したが、嚥下反射に対しては影響を与えなかった。これらの結果から、グルタミン酸受容体は両反射の誘発に関与し、NK₁ 受容体は嚥下反射から gag reflex へ切り替える神経機構において重要な役割を果たしていることが示唆された。

19. Fasting と Refeeding 期間にみられる睡眠変化

清水紀之、近久幸子、妹尾廣正、藤木通弘、勢井宏義 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野)

絶食 (fasting) や制限給餌 (food restriction) を行うと覚醒の増加、REM 睡眠の減少がみられることが報告されている。しかし、NREM 睡眠の深さの指標である脳波デルタパワーが fasting や fasting 後の再給餌 (refeeding (RF)) 期間においてどのように変化するかということに関する報告はされていない。そこで今回、fasting と RF 期間の睡眠、特に NREM 睡眠時におけるデルタパワーが fasting 前の基準値と比較してどのように変化するかを調べた。明暗周期 12 時間、自由摂水、室温 26°C の下で ICR 系雄マウス (8W) を用いて 1 日目に baseline、2 日目に fasting、3 日目に RF における睡眠ならびに体温変化を測定した。飼料の除去・再投与は ZT1 を起点として行った。その結果、RF 後 NREM 睡眠時のデルタパワーに有意な増大がみられた。そこでこれらの影響が、fasting によるものなのか、RF によるものなのか、検討するために RF を ZT7 に設定しさらに実験を行い、また視床下部の脂質代謝系をターゲットに脳内メカニズムについて検討中である。

20. PPAR α の選択的アゴニストによる睡眠への影響

大浦雅博、佐藤俊介、近久幸子、藤木通弘、勢井宏義 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野)

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) は脂肪酸をリガンドとする核内受容体であり、脂肪代謝や免疫等に関わっているとされている。我々はこれまで、PPARs の非選択的アゴニストである bezafibrate の投与により NREM 睡眠時のデルタパワーの上昇が見られることを見出した。今回の実験では PPARs の α 、 β/δ 、 γ の 3 種類のサブタイプのうちどのサブタイプがこの現象に関わっているかを明らかにするために PPAR α の選択的アゴニストである fenofibrate を使用した実験を行った。マウス (ICR 系雄 8 週齢) を fenofibrate (0.2%) 投与群、通常食群の 2 群に分け 2 週間食餌を与えた後、ベースラインとして睡眠時の脳波・筋電図・体温を記録した。さらに明期に断眠を 6 時間負荷し、その後 6 時間の回復を計測してデルタパワーの変化について検討した。その結果、fenofibrate 投与群のマウスの NREM 睡眠時のデルタパワーはベースラインにおいて通常食投与群のそれに比べて有意な上昇が見られた。また、断眠後の回復におけるデルタパワーの上昇率が fenofibrate 投与群では通常食群に比べ低いことも分かった。このことは NREM 睡眠時のデルタパワーの調節に、PPAR α が大きく関与していることを示唆している。

21. 妊娠後期・授乳期の母マウスの高脂肪食摂取が子マウスの行動に与える影響について

杉田真理, 佐藤俊介, 近久幸子, 藤木通弘, 勢井宏義 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野)

妊娠後期・授乳期の母マウスの食事が子マウスの成長後の行動に影響を及ぼすかを調べた。妊娠 12 日目から子マウスの離乳まで、母マウスに高脂肪食 [D12451 (45kcal%fat/ラード高脂肪飼料), リサーチダイエット] を与えてその子マウスの行動を、通常食を与えた母マウスの子マウスの行動と比較した。また母乳の成分を調べるために、授乳時の子マウスの胃の内容物も比較した。子マウスが 10~12 週齢の時期に、高脂肪食の母マウスから生まれた子マウス (HFmice) のオス・メス、通常食の母マウスから生まれた子マウス (NFmice) のオス・メス、それぞれについて行動実験を行った。結果、高架式十字迷路において、HFmice のメスは NFmice のメスより、総移動距離が長く、Close arm の滞在時間が短く、Open arm の滞在時間が長かった。さらに、HFmice のオスは NFmice のオスより、Close arm への侵入回数が多かった。これら高架式十字迷路の結果は、HFmice のメスは NFmice のメスに比較して不安が低いことを示している。このことより、妊娠後期・授乳期の母マウスの高脂肪食はその子マウスの成長後の行動に影響を及

ぼすと考えられる。そのメカニズムについて検討中である。

22. 新生血管の伸長する方向はどのようにして決まるか

昆 和典¹, 藤原 隆² (¹愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科, ²愛媛大学総合科学研究支援センター生物資源分野)

新生血管の伸長は、血管内皮細胞の分裂と遊走によって行われると考えられている。その際、新生血管の伸長の方向は内皮細胞の遊走が誘導され方向で決められると考えられている。本研究では、伸長の方向がどのようにして決められるか検討を行った。

血管新生の観察は、マウス角膜を用いて実体顕微鏡下で行った。また、新生血管の先端部の構築は免疫組織学的に調べた。その結果を以下に示す。

(1) 新生血管の伸長の様子：毛細血管のループの先端から新しい血管の芽 (sprout) が出現し、枝を伸ばす。その枝は隣のループと結合し、新たなループを形成する。この過程を繰り返し新生血管網が形成された。

(2) 新生血管の先端部は、血管内皮細胞で覆われていなかった。

(3) ループの血流を途絶させると新たな新生血管網の形成が阻害された。

(1)、(2)の結果から、血管新生のはじめに起こることは、透過性の亢進した血管からの血液の漏出で、組織間に血液漏出路が形成されることと考えられる。そして、その血液漏出路が隣接するループに吸い込まれるようにしてループが形成されることが (3) の結果から示唆された。従って、新生血管の伸長していく方向は、内皮細胞の遊走が先導しているのではなく、血液の漏出部位、局所の血流状態などによって決められると考えられる。

23. Generation of ramified microglia-like cells from leptomeninges *in vitro*

A. Smirkin, H. Takahashi, H. Yano, J. Tanaka (Department of Molecular and Cellular Physiology, Graduate School of Medicine, Ehime University)

Although del Río Hortega originally reported that leptomeningeal cells are the direct source of ramified microglia in the developing brain, recent views seem not to pay much attention to this notion. In this study, *in vitro* experiments were conducted to determine whether leptomeninges generate ramified microglia. The leptomeninges of neonatal rats containing Iba1⁺ macrophages were peeled off the brain surface. Leptomeningeal macrophages expressed CD68 and CD163 strongly, but not microglia in the

brain parenchyma. Leptomeningeal macrophages expressed epidermal growth factor receptor (EGFR) as revealed by RT-PCR and immunohistochemical staining. Cells obtained from the peeled-off leptomeninges were cultured in a serum-free medium containing EGF for 4 or 6 d resulting in the formation of large cell aggregates, in which many proliferating macrophages were present. In contrast to EGF, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) did not enhance the generation of Iba1⁺ cells from the leptomeningeal culture. The cell aggregates generated ramified Iba1⁺ cells in the presence of fetal calf serum, which express CD68 and CD163 at much lower levels than primary microglia isolated from a mixed glial culture. Therefore, the leptomeninge-derived cells resembled parenchymal microglia better than the primary microglia. This study suggests that microglial progenitors expressing EGFR reside in the leptomeninges and that there is a population of microglia that grow independently of M-CSF.

24. 難治性てんかんの治療法であるケトン食療法がグリア細胞に及ぼす効果

小林加奈¹, 鈴木由香², 高橋寿明¹, 石井榮一², 矢野元¹, 田中潤也¹ (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学, ²愛媛大学大学院医学系研究科小児医学)

てんかんでは神経細胞の異常興奮とともに周囲のグリア細胞の過剰な活性化も引き起こされる。活性化したグリア細胞は炎症性サイトカインや活性酸素などを産生し、病態

をさらに増悪させると考えられている。てんかんには抗てんかん薬による治療が一般的であるが、抗てんかん薬に抵抗性を示す難治性てんかんにおいては、炭水化物の摂取を抑えた高脂肪食(ケトン食)療法が用いられる。ケトン食療法は世界中の臨床現場で一定の効果を上げてはいるものの、詳細な作用機序は不明な点が多く経験的に用いられているのが現状である。そこで私達はケトン食療法の治療効果はグリア細胞に対する機能修飾も一因であると考え、アストロサイトを用いてケトン体の効果を検討した。

新生仔ラット脳より脳混合培養を行った後、常法に従いアストロサイトを調製した。アストロサイトはグルコースを含まない基本培地にケトン体の1つであるβ-ヒドロキシ酪酸(10mM)を添加したものをを用いて一定期間培養を行った。てんかん発作では抑制性神経伝達物質γ-アミノ酪酸(GABA)の脳内濃度が減少することが報告されている。そこでGABA分解酵素であるGABAトランスアミナーゼ(GABA-T)の遺伝子発現変化をRT-PCRにより検討したところ、β-ヒドロキシ酪酸添加5日後にはGABA-T mRNAの発現を顕著に抑制し、その抑制効果はβ-ヒドロキシ酪酸濃度依存的であった。またGABA-TによるGABA分解活性も、遺伝子発現と同様に顕著に抑制されることが明らかとなった。

難治性てんかんに対するケトン食の治療効果は複合的なものと言われている。今回の結果より、少なくともアストロサイトでのGABA分解活性がケトン体により抑制されることが治療効果を示す一因であると考えられた。現在、他の効果についても検討中である。