

第 62 回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成 22 年 11 月 20 日（土），21 日（日）

会 場：鳥根大学医学部看護学科棟 N11 教室

当番幹事：鳥根大学医学部 紫藤 治，廣田秋彦

第 62 回日本生理学会中国四国地方会は 61 名の参加者を得て，11 月 20 日，21 日の二日間にかけて開催された。20 日は 13 時からの開会挨拶に引き続き，13 時 5 分より 16 時 25 分まで，21 日は 9 時から 12 時 15 分まで，合計 27 演題の発表が行われた。また，地方会の活性化と参加者の交流促進や情報交換のため，20 日の夕刻から懇親会を行った。前回の第 61 回大会より日本生理学会公認となった地方会奨励賞の選考においては，7 名の候補者による研究発表が行われ，厳正なる審査が行われた。その結果，学生からは岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学教室の櫃田 隆氏が，一般からは同所属の道上宏之氏の 2 名が選出され，受賞した。20 日の 16 時 30 分から開催された評議員会では，常任理事会からの報告の他，2 日間開催と懇親会について，本地方会の活性化につながることが期待されるとの意見が多く出された。また，第 63 回日本生理学会中国四国地方会は，広島大学医歯薬学総合研究科・神経生理学の橋本浩一教授が中心になって開催されることとなり，次々回は高知大学が当番校に決まった。このように有意義に地方会が開催できたのも，参加者皆様のご協力ご支援の賜と感謝し，この場を借りてお礼申し上げます。

一般演題

1. ラット吻側無顆粒島皮質の侵害受容ニューロン

伊藤真一（鳥根大学医学部神経・筋肉生理学講座）

ラット大脳皮質の嗅裂背側部吻側の前頭眼窩野から無顆粒島皮質にわたる領域には痛覚に関する領野のあることが知られており，薬理的ブロックによる抗侵害行動の変化，他の領野との線維連絡，などの知見から，複数の痛み関連領野が示唆される。しかしニューロン応答のかたちで侵害入力が証明されているのは一部の領野に限られる。今回，電気生理学的報告の従来なかった場所で侵害受容ニューロンを記録したので報告する。麻酔下のラットでニューロン活動を細胞外記録し，体表面の自然刺激（侵害性および非侵害性の機械および温熱刺激）に対する応答を検索した。得られた応答はすべて侵害刺激に対するものであった。すなわち特異的侵害受容ニューロンのみが記録され広作動域ニューロン，低閾値機械受容ニューロンは見つからなかった。受容野は大きく四肢すべてにまたがるがあった。記録部位は，顆粒皮質の吻側端近傍で，前障の背側端からみて腹外側に分布していた。これらの結果から，痛覚特異的な身体再現領域の存在が示唆されるが，外側眼窩前頭野，無顆粒島皮質，感覚運動野の交錯するところであって，この場所が一つの機能的領野であるか否か，周辺の痛覚関連領野と連続であるか否か，今後の検討が必要である。

2. 性周期は活動筋反射に影響する Estrous cycle in female rats affects the muscle reflex

木場智史，吉永健嗣，藤田小矢香，渡邊達生（鳥根大学医学部統合生理学分野）

The level of estrogen during proestrus and estrus phases (P-E) in the estrous cycle of most mammalian females is higher than that during metestrus and diestrus phases (M-D). Muscle contraction stimulates thin fiber muscle afferents and reflexly evokes sympathoexcitation. Previous literature has shown that estrogen attenuates the muscle reflex in female cats. We tested the hypothesis that the estrous cycle affects the muscle reflex. In female rats, the estrous cycle was judged by vaginal smear. Electrically induced 30 s hindlimb muscle contraction in decerebrate rats during P-E ($n = 11$) evoked less ($P < 0.05$) renal sympathoexcitatory and pressor responses as compared to rats during M-D ($n = 12$) [$+167 \pm 34$ vs. $+340 \pm 65$ arbitrary unit (a.u.) ; $+12 \pm 2$ vs. $+21 \pm 3$ mmHg ; P-E vs. M-D]. Renal sympathoexcitatory response to 1 min intermittent (1-4 s stimulation to relaxation) bouts of static contraction, which dominantly stimulate mechanically sensitive muscle afferents, was also significantly less in rats during P-E ($n = 10$) than that in rats during M-D ($n = 13$) ($+34 \pm 11$ vs. $+67 \pm 9$ a.u.). Sympathoinhibition seen when

phenylephrine (20 μ g) was intravenously infused did not differ between rats during P-E (n=7) and M-D (n=8), suggesting that arterial baroreflex function is independent of the estrous cycle in decerebrate rats. These observations in total suggest that the estrous cycle in rats influences the muscle reflex through an effect on mechanically sensitive muscle afferents. Estrogen may play a role in attenuating the muscle reflex seen during P-E. Supported by Kaken 22790226.

3. 単球の内皮下浸潤により誘発される内皮細胞間隙分子の変化が次の単球浸潤を促進する

橋本 謙¹, 片岡則之², 辻岡克彦¹, 梶谷文彦², 毛利聡¹ (¹川崎医科大学生理学 1, ²川崎医療福祉大学臨床工学科)

動脈硬化形成初期過程では、血中を循環する単球が傷害を受けた血管内皮細胞に接着し、内皮下組織へ浸潤・蓄積することで病変が形成される。単一の接着・浸潤プロセスについては徐々に分子機構の解明が進んでいるが、一つの浸潤イベントがその後の単球の浸潤活性に与える影響については殆ど知られていない。培養内皮細胞へのヒト単球の2段階添加実験を行ったところ、1度目の添加に比べて2度目では有意に浸潤率が上昇していた(約1.5倍)。単球の添加により、内皮細胞間隙においてPECAM-1が有意に増加、VE-cadherinが有意に減少しており、このことが2度目の浸潤率上昇を招く機構であることが示唆された。PECAM-1について、その分子動態を詳細に解析する為、GFPを付加した融合蛋白を発現させて解析したところ、単球の浸潤完了後、浸潤部位周囲に内皮細胞PECAM-1が徐々に集積することが明らかとなり、このことが同一部位での次の単球の浸潤を促進していることが示唆された。以上より、単球の浸潤によって起こる内皮細胞間隙分子の変化(PECAM-1増加、VE-cadherin減少)が次の単球の浸潤を促進し、このことが動脈硬化における長期的な単球の蓄積につながっている可能性が考えられた。

4. Differential effects of carotid sinus and aortic depressor nerve stimulation on heart rate at the onset of spontaneous fictive motor activity in decerebrate cats

A. Kadowaki, K. Matsukawa, N. Liang, K. Ishii, S. Myoi, T. Takakuwa, A. Inoue (Department of Physiology, Graduate School of Health Sciences, Hiroshima University)

We have reported that the baroreflex bradycardia induced by stimulation of the aortic depressor nerve (ADN)

is blunted at the onset of voluntary static exercise in conscious cats and at the onset of spontaneous muscle contraction in decerebrate cats. Central command contributes to the blunted baroreflex bradycardia, because the blunted bradycardia is observed at the onset of spontaneous muscle contraction, but not during electrically evoked muscle contraction and during passive stretch of skeletal muscle in decerebrate cats. In this study, we examined whether the baroreflex bradycardia induced by stimulation of the carotid sinus nerve (CSN) is also attenuated by central command at the onset of exercise. The baroreflex bradycardia was evoked by stimulation of either CSN or ADN before, during, and after spontaneous fictive motor activity in decerebrate, paralyzed cats. The ADN stimulation-induced bradycardia was temporarily attenuated at the onset of spontaneous motor activity as we previously reported. In contrast, the CSN stimulation-induced bradycardia was not affected by the motor activity. Therefore, we conclude that central command does not inhibit the cardiac component of the carotid sinus baroreflex but attenuates the cardiac component of the aortic baroreflex at the onset of spontaneous exercise.

5. NMR 検出コイルの製作と生物試料測定への応用

早野尚志^{1,2}, 北村光夫¹, 浜岡建城³, 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大津市民病院, ³京府医大大学院小児循環器・腎臓病学)

核磁気共鳴(NMR)法は、原子核の磁気モーメントがゼロでない核種であれば測定可能である。今回、²³Naおよび³¹P-NMR信号を検出するコイルを試作し、拡散係数計測のための問題点とその対策を報告する。

NMR装置はVarian社製Unity INOVA 300 swbである。Bore径120mmのOxford社製7T縦型超伝導磁石、最大傾斜磁場30G/cmまで発生できるDoty Scientific社製傾斜磁場コイル(内径85mm)を備える。その中に内径57mmの¹H-MRI送受信コイルがあり、共鳴周波数300MHzである。¹H-MRIを測定しないときはこのコイルを取り外し、試作コイルを挿入した。²³Naおよび³¹Pの共鳴周波数70および120MHzのソレノイド型ならびにサドル型コイルを作成し、試料にfrog Ringer液および500mM KH₂PO₄溶液を用いた。拡散係数測定にはスピン・エコー法の180度パルスの前後に傾斜磁場パルスを印加するStejskal-Tanner法を用いた。

¹H-MRI送受信コイルを用いた水の拡散係数計測か

ら、最大強度 30G/cm まで傾斜磁場が印加できていることを確かめた。つぎに、傾斜磁場印加後の静磁場への回復時間を調べた。30G/cm の強さで 10ms のパルス傾斜磁場を印加した後、0.6ms 以上の待ち時間で、静磁場が回復した。ところが試作したコイルでは静磁場への回復に 10ms 以上の時間を要した。その原因として、傾斜磁場のスイッチング時にコイルを保持するアルミ円筒に渦電流が発生したためと考えられた。対策としてプラスチック円筒に変更し、さらに渦電流補正回路の調整で回復時間の短縮ができた。frog Ringer 液中の Na イオンの拡散係数の測定が可能となった。

6. 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

谷口睦男, 梶 秀人 (高知大学医学部生理学講座)

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プ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。一方、電位刺激により顆粒細胞に生じる Ca 電流は DCG-IV の投与により抑制された。以上の結果から、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おり、DCG-IV の mEPSC 抑制作用は Ca^{2+} チャネルの抑制を介して生じることが示唆された。

奨励賞対象演題

7. セントラルコマンドは運動開始期に非活動筋血流量を増加させる

石井 圭¹, 松川寛二¹, 梁 楠¹, 佐藤耕平², 大上安奈², 平澤 愛², 定本朋子² (¹広島大学大学院保健学研究

科生理機能情報科学教室, ²日本女子体育大学基礎体力研究所)

運動時には非活動筋血流量が減少し、その減少は活動筋への血流配分に寄与すると考えられている。その機序として運動筋受容器反射による筋血管収縮が重要であると思われる。しかし、運動開始時には反射性調節ではなくセントラルコマンドによる feed forward 制御が重要である。セントラルコマンドに関わる中枢機構の詳細は解明されていないが、高位中枢の一つである視床下部の刺激により骨格筋血管拡張が生じることが報告された。そこで本実験では、運動開始時には運動筋受容器反射による筋血流量減少ではなく、セントラルコマンドによる筋血流量増加が生じるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、1 分間の自発的および他動的片脚サイクリング中に、近赤外線分光法 (NIRS) による非活動肢外側広筋での酸素化ヘモグロビン (OxyHb)・脱酸素化ヘモグロビン濃度変化 (DeoxyHb) と超音波ドップラー法による大腿動脈血流量の同時測定を 6 人の被験者で行った。自発的運動では、OxyHb は運動開始とともに迅速に増加し、運動終了までこの増加は維持された。一方、他動的運動では OxyHb は徐々に増加するが、自発的運動時と比較するとその増加は軽度であった。DeoxyHb は運動様式に関わらず変化はみられなかった。以上の結果は、自発的運動時には運動開始から筋血流量が増加し、他動的運動時には運動開始から時間的遅延を伴って緩やかに筋血流量が増加することを示唆した。また、超音波ドップラー法による大腿血流量の結果も NIRS 法による局所筋血流量の結果と同様であった。これらの成績から、本研究は運動開始時にはセントラルコマンドが非活動肢の血流量を増加させることを明らかにした。また、時間的遅延を伴って筋機械受容器反射も非活動肢の血流量増加に寄与することが示唆された。

8. 希少糖 D-アロースによるマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞の破骨細胞への分化抑制

野口知里¹, 山田佳奈¹, 山口文徳², 神鳥和代², 徳田雅明² (¹徳島文理大学香川薬学部機能生物学講座, ²香川大学医学部細胞情報生理学講座)

破骨細胞は骨芽細胞とともに骨の代謝に重要な役割を果たし、両者の良好なバランスにより骨の機能が維持されている。破骨細胞の分化には、細胞質の Thioredoxin の核内への移行が引き金になっていることが知られている。一方、Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) は、細胞質に存在し Thioredoxin を結合するタンパク質であるが、これまでの我々の研究から、希少糖 (自然界にまれに存在する単糖の総称) の一種である D-アロースが TXNIP の発現を顕

著に上昇させることがわかっている。したがって、我々は D-アロースが破骨細胞の分化に影響を及ぼすのではないかとの仮説を立て、実験を行った。マウスマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞を Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) により破骨細胞へ分化誘導する系に D-アロースを添加し、その影響を検討した。分化の評価には TRAP (酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ) 染色や Pit formation による骨吸収能を調べた。その結果、前駆細胞から破骨細胞への分化段階では TXNIP の減少を伴うこと、D-アロースの添加により TXNIP の発現が増加するとともに分化が抑制されることが確認できた。

現在、TXNIP 遺伝子発現機構や破骨細胞分化における Thioredoxin の動態についても検討している。

9. Poly-arginine domain による細胞内導入効率と細胞制御について

櫃田 隆, 道上宏之, 山口晃正, 藤村篤史, 富澤一仁, 松井秀樹 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学教室)

【目的】

Poly-arginine domain (PAD) を使った、直接タンパク質細胞内導入法は分子生理学分野における重要な実験手法であり広くに使用されている。ウイルスベクターの使用や遺伝子の導入が無い安全性の高い方法として確立され、iPS 作製など様々な分野で応用されている。

アルギニン鎖長を変えた PAD 融合タンパク質を作製し、細胞内エンドソームよりの放出を促進する Pyrene Butyrate (PB) を使用し、Poly-arginine domain 組成が導入効率と細胞内活性にどのように影響するか検討した。

【方法・結果】

細胞膜通過ドメイン融合タンパク (EGFP-PAD, p53-PAD) を大腸菌より作製した。EGFP-PAD タンパク質、蛍光ラベルペプチドを使用し、細胞内局在の観察や定量化を行い、p53-PAD タンパクを使用し細胞内での活性や細胞増殖抑制効果を検討した。

【結論】

蛍光標識されたタンパク質およびペプチドでの細胞内導入では、PB 併用群と非併用群で細胞内における局在の変化が見られた。また、導入効率では Arginine の多いほうが高いが、転写活性の面では 3R domain が高いことが確認された。この技術は、11R を使った細胞内導入法において問題となっている、転写活性因子タンパク質導入における細胞内制御の効率化を改善させる上で、非常に有用であると考えられた。

10. スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) による、Fyn チロシンキナーゼ-アクチン細胞骨格-細胞接着斑キナーゼ (FAK) の細胞接着斑の局在における、パキシリンの関与

張 影, 岸 博子, 加治屋勝子, 高田雄一, 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)

Stress fiber は、重合したアクチンを主体として構成される細胞骨格であり、細胞形態や細胞運動に重要な役割を果たす。我々は、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) が、stress fiber 形成を引き起こす事、更に、この SPC 依存性の stress fiber 形成における、Fyn チロシンキナーゼおよび Rho キナーゼ (ROK) の活性化の役割を報告した。活性化された Fyn と stress fiber 末端、および、細胞接着斑キナーゼ (FAK) は、細胞接着斑に共局在し、SPC によって Fyn が活性化され、Fyn-アクチン細胞骨格-FAK が関連した細胞内の一連の反応を引き起こして、stress fiber の形成と維持を行う事が示唆されたが、その三つの分子の活性化機構の解明には至っていない。

近年、分子量 68kDa のパキシリンが、細胞接着斑に関与し、また、細胞骨格に関するアクチン結合タンパク質と結合している事が知られている。また、パキシリンは、FAK によってチロシンリン酸化されることも報告された。しかし、パキシリンが、SPC による、Fyn-アクチン細胞骨格-FAK の細胞接着斑における局在に果たす役割については、まだ報告されていない。

そこで本研究では、SPC による、Fyn-アクチン細胞骨格-FAK の細胞接着斑の局在におけるパキシリンの役割を検討した。HaloTag-Fyn 野生型と、HaloTag-Fyn 変異体 (活性型と非活性型) を、ヒト冠状動脈平滑筋細胞にトランスフェクションして、SPC で刺激し、western blotting, 免疫沈降および免疫蛍光染色により、Fyn-アクチン細胞骨格-FAK, および、パキシリンの細胞内局在と相互結合活性を調べた。以上の結果によって、パキシリンは、Fyn-アクチン細胞骨格-FAK の細胞接着斑への局在において、重要な働きをしていると考えられた。

11. タンパク質導入法を用いた新規 siRNA 導入法の開発

Novel siRNA delivery system with protein transduction method

道上宏之¹, A. Eguhi², S. Dowdy², 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教室, ²カリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) 医学部細胞分子医学)

【目的】

RNA 干渉 (RNA interference) は 21-23 塩基対の 2 本鎖 RNA (siRNA) を用いることにより配列特異的に mRNA が分解される現象である。今回我々は、タンパク質導入法を用いて数種の siRNA を *in vitro* 及び *in vivo* の実験系にて導入することを試み、次にこの手法を用いて siRNA を悪性脳腫瘍に対して投与し、その腫瘍抑制効果について検討した。

【方法・結果】

細胞膜通過ドメインを RNA 結合タンパクに融合させたタンパク (siRNA 導入タンパク) を大腸菌より生成した。まず、GFP を発現させた細胞株に対し、GFP の siRNA と siRNA 導入タンパクの複合体を作り細胞内へ導入し、GFP の発現抑制を確認した。

次に、3 種類の悪性神経膠腫細胞に EGFR と Akt の siRNA を *in vitro* において導入し、腫瘍増殖抑制効果を確認した。さらに、マウス頭蓋内脳腫瘍モデルに対して siRNA 導入タンパク複合体を注入し、コントロール群と比較して有意な生存期間延長を認めた。

【結論】

siRNA 導入タンパクを用いて siRNA を *in vitro* および *in vivo* にて導入することに成功した。また脳腫瘍に発現している標的遺伝子を 2 種類の siRNA を用いて RNA 干渉にて抑制することにより、細胞増殖抑制効果を認めた。今後、siRNA を用いた創薬へ向けての可能性が示唆された。

12. 改良型光学的膜電位測定法を用いたラット運動感覚野における感覚応答及び自発活動の時空間パターンの比較

濱 徳行, 伊藤眞一, 廣田秋彦 (島根大学医学部神経・筋肉生理学講座)

我々の研究室では独自の光学的膜電位測定システムの開発・改良を行っている。ファイバー照明の導入やタンデムレンズの見直しなど光学系の性能向上に並行して開発してきたソフトウェアが最近完成し、心拍動由来のアーティファクトを自発呼吸下の心周期が変動している条件下で除去することに成功した。これにより加算処理をすること無しに定量解析が行える、ノイズの少ないデータを長時間連続して記録することが可能になった (Hama et al., *J Neurosci Meth*, in press)。本システムを用い、分単位での連続記録を行う事で、予見出来ない自発活動を全体的に検出し、定量解析することが可能である。この方法を用いてラット大脳皮質の運動感覚野より自発活動を記録し、興奮の広がり方をそれぞれの活動ごとに等時線図を作成して解析した結果、起始部は活動毎に異なって、記録した領野内に広く分布しており、近接した部位から始まった興奮の広がるパ

ターンも同一でないことがわかった。これは起始部が限局し、毎回類似したパターンで広がる刺激応答時の活動とは大きく異なる。更に、活動の起始部近傍における興奮が広がる速度を計測した結果、自発活動の方が刺激応答時の活動より、有意に速いことがわかった。これらの結果より、自発活動と刺激応答時の興奮の広がり方は、異なる要因によることが強く示唆された。

13. Mechanosensitive ion channels in a rat cardiomyocyte cell line H9c2

K. Takahashi¹, M. Hattori², S. Fujii², K. Naruse¹ (¹Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ²Nagoya University School of Medicine)

Mechanosensitivity is inseparable from cardiac function. For example, stretch of the myocardium modulates the electrical activity of cardiac muscle, and also increases the contractility of the myocardium. These functions are thought to be due to the activation of stretch-activated channels. Cardiomyocytes show calcium transients in response to stretch. To identify stretch-activated channels responsible for this calcium response, we examined the expression level of putative mechanosensitive channels on rat heart. Quantitative RT-PCR revealed that mRNAs of TRPA1, TRPC6, TRPM7, TRPV2, and cardiac L-type calcium channel (LTCC) are expressed in both adult rat heart and H9c2, a rat cardiomyocyte cell line. In addition, protein expression of TRPC6 and LTCC were confirmed by Western blot analysis in H9c2.

To find out whether these channels are participating in mechanosensing in the heart, we recorded stretch-activated calcium response of H9c2 using a calcium indicator Fura2. Transient mechanical stretch was applied to the cells grown on elastic silicone chambers. Intracellular calcium level was increased proportional to the extent of stretch. In addition, 10 μ M-gadolinium, which is known to block activities of mechanosensitive ion channels, drastically reduced the intensity of the stretch-induced calcium response by 74%, suggesting that the response was mediated by stretch-activated channels. Next, we examined calcium signaling pathway using pharmacological blockers. 2-APB, a TRPC channel blocker, reduced the stretch-activated calcium response in a dose-dependent manner. Meanwhile, nifedipine, diltiazem and verapamil, blockers of the LTCC, also reduced the stretch-activated calcium

response in a dose-dependent manner. While removal of extracellular calcium eliminated the stretch-induced calcium response, IP₃ receptor antagonist xestospongine C did not alter the response, suggesting that the stretch-activated calcium response requires extracellular calcium.

To confirm that these ion channels are involved in stretch-activated calcium response in H9c2, expression of these proteins was knocked down by RNA interference. Small interfering RNAs (siRNAs) of TRPC6 and LTCC were transfected to H9c2. The knockdown efficiency on mRNA expression was >90% in TRPC6-siRNA and 70% in LTCC-siRNA. In the cells transfected LTCC-siRNA, the stretch-activated calcium response was drastically reduced by 73%. These results suggest that LTCC has a crucial role in stretch-activated calcium response in a rat cardiomyocyte cell line H9c2. Involvement of other mechanosensitive channels must be studied to clarify the entire picture of stretch-activated calcium response in cardiomyocytes.

一般演題

14. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) のリン酸化を介した細胞周期 G1/S チェックポイントにおける制御機構の解明

神鳥和代, 山口文徳, 董 有毅, 徳田雅明 (香川大学医学部細胞情報生理学講座)

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) はさまざまな癌組織および癌細胞において発現が著しく減少している癌抑制タンパク質で, 細胞周期, 細胞死, タンパク質輸送などに関与している. CDK 阻害タンパク質 p27^{kip1} は細胞周期の G1/S 期への進行に際し, ブレーキとして働く分子であり, シヤトルタンパク質 JAB1 と結合することにより核外に移行して分解される. この過程で TXNIP は p27^{kip1} と JAB1 の結合を阻害することにより p27^{kip1} を安定化させ, そのことが細胞周期の進行阻害, 細胞増殖抑制につながり, 癌抑制作用を示すと考えられる.

当グループは, 希少糖 D-アロースが TXNIP 遺伝子の発現を顕著に誘導し, さらに細胞周期 G1/S 期への進行を抑制することによりさまざまな株化癌細胞の増殖を抑制することを報告してきた. 今回 TXNIP の更なる作用機構について解析を進めた. *in vivo* において TXNIP のセリン 361 がリン酸化されており, さらに株化肝癌細胞 HuH-7 でこのリン酸化が TXNIP による細胞周期進行抑制に影響を与えているという結果が得られた. またセリン 361 のリン酸化

は JAB1 との結合能に関与することも明らかにした. さらに TXNIP のアミノ酸 174-296 に相当する領域も細胞周期進行抑制に関与しており, この領域は TXNIP の核内局在に必須であることが明らかになった. 以上のことから, TXNIP による細胞周期進行抑制には, この分子と JAB1 との結合および核内局在の両方が重要であると考えられる.

15. 青色 LED 光の白血病細胞の増殖抑制作用

田中啓充¹, 高橋智紀¹, 岡本研正¹, 平田祐子², 山口文徳², 神鳥和代², 徳田雅明³ (¹香川大学大学院工学研究科, ²香川大学医学部細胞情報生理学講座)

我々はこれまで LED の波長依存性の癌細胞増殖作用を HepG2 などの肝臓癌細胞などを用いた *in vitro* 実験で明らかにした. 今回は慢性骨髄性白血病細胞 K562 が青色 LED 光 (470nm) 照射によりその増殖が抑制されることを明らかにした. 本研究では青色 LED 光による増殖抑制メカニズムに関する研究を行った. Control (光無照射の場合) と, 青色 LED 光を 1~3 日間照射しながら培養した K562 において, アポトーシス解析, 細胞周期解析および Western blot などの実験を行い, 青色 LED 光による細胞増殖の抑制メカニズムの足がかりを模索した.

実験の結果, アポトーシス解析では有意な差は見られなかったが, 細胞周期解析では, 細胞に青色 LED 光を照射した場合, Control の細胞と比較して G2/M 期の細胞数上昇が見られた. また Realtime PCR の結果より青色 LED 光を照射した場合, 細胞の増殖抑制に関連する p21, p53, Bcl-2 および Cryptochrome1 (Cry1) が Control に比べて多く発現していることが分かった. Cry1 は光感受性蛋白質であり, LED による増加があることは興味深い. 現在, 細胞周期関連蛋白質や Cyp1 を中心に, 青色 LED 光によるがん細胞増殖抑制メカニズムの解明を行っている.

16. Wavelength dependent response of plasma N-acetylserotonin to the LED light during dark period in mice

S. Ogawa¹, S. Harada², M. Aihara³, N. Shimizu¹, S. Chikahisa¹, M. Hashizume², H. Sei¹ (¹Department of Integrative Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ²Department of Electrical and Electronic Systems, Institute of Technology and Science, The University of Tokushima Graduate School, ³JST innovation satellite Tokushima)

OBJECTIVE : Light does not only mediate visual information but widely regulates biological functions. However, wavelength dependent effects of the light on the physi-

ological functions remain to be still investigated. In the present study, we observed whether there is wavelength dependent effect on N-acetylserotonin (NAS) which has been considered having anti-depressant effect in mice.

METHODS: Male CBA/N mice (10-12 weeks) were used. At first, we observed visual evoked potentials (VEP) against a variety of wavelengths of LED light. Then, in the dark period, each LED light was administered for three hours from zeitgeber time (ZT) 18 to ZT21. At ZT21, mice were decapitated and trunk blood and brain tissue were sampled. Plasma NAS concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

RESULTS AND DISCUSSION: At the red light, it was specifically observed that VEP amplitude was low and its peak latency was significantly prolonged. NAS was suppressed by the white LED but it was not suppressed by the yellow LED. As well as melatonin, non-image forming system may be involved in the plasma concentration of NAS.

17. 妊娠マウスのカロリー制限が仔マウスの情動行動に及ぼす影響

岩城洋平¹, 清水紀之¹, 近久幸子¹, 北岡和義², 勢井宏義¹ (¹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, ²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)

近年、妊娠中毒症対策だけでなく出産後の体型維持の観点から、妊娠中のカロリー制限を行う妊婦も多く、低出生体重児は増加の一途をたどっている。胎児期の栄養不足による低体重は、成人後における高血圧や心臓病、糖尿病などの生活習慣病のリスクを増大させることが知られているが、情動行動など高次脳機能に対する影響については未だ検討されていない。

そこで本研究ではICR系雌マウスを用い、妊娠成立後12.5日目から20% (20%群)と50% (50%群)のカロリー制限を行った。生まれてきた雄マウスについては8~9週齢になるまで自由に餌を与え、その後不安及びうつ行動に関して行動実験を行った。その結果、オープンフィールドテストではカロリー制限を行った妊娠マウスから生まれた20%群と50%群は、自由に餌を与えた妊娠マウスから生まれた仔マウス(コントロール群)と比べてtotal center timeが有意に減少した。強制水泳実験では50%群のtotal freeze percentが有意に増加した。また、50%群はコントロール群に比べて出生体重が有意に低かった。これらの結果から、妊娠中のカロリー制限は、仔マウスの成熟後の情

動行動に影響を及ぼすことが明らかになった。現在そのメカニズムについて検討中である。

18. 心室筋細胞の収縮性に対するアゼルニジピンの影響

貝原恵子, 入部玄太郎, 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学講座)

ジヒドロピリジン (DHP)系カルシウム拮抗薬は現在最も普及している高血圧治療薬の一つであり、血管拡張作用が強く心筋への作用が比較的少ないことが特徴である。中でもアゼルニジピンは他のDHP系カルシウム拮抗薬と比較しても心筋への陰性変力作用がほとんど見られないと報告されているが、心室筋細胞レベルで詳細に変力作用を検討した報告はない。そこで、今回我々はアゼルニジピンとDHP系カルシウム拮抗薬として広く用いられているアムロジピンを比較し、単離細胞レベルで収縮性に及ぼす影響を検討することにした。単離したマウス心室筋細胞の両端にカーボンファイバーを装着し、37℃、4Hzで刺激した細胞を伸展することにより前負荷を変化させ、このときの長さ張力関係から収縮性の指標としての収縮期末弾性を測定した。薬剤投与後の収縮性の変化を見ると低濃度(10nM)ではアゼルニジピン、アムロジピン共に投与前と比較して収縮性に有意な変化は見られなかった(アゼルニジピン群: 89.4±8%, n=9, アムロジピン群: 86.8±8.3%, n=8)(mean±SEM)。高濃度(100nM)ではアゼルニジピンには収縮性に有意な変化が見られなかったのに対して、アムロジピンは有意に収縮性を下げた(アゼルニジピン群: 88.7±4.6%, n=10, アムロジピン群: 73.7±5.8%, n=9)。今回の結果から、アゼルニジピンはDHP系カルシウム拮抗薬の中でも陰性変力作用が少ないことが示唆された。

19. 脳梗塞巣におけるiNOSの発現とToll様受容体

越智満久^{1,2}, 西原 佑^{1,2}, 杉本香奈^{1,2}, 高橋寿明^{1,2}, 矢野 元^{1,2}, 田中潤也^{1,2} (¹愛媛大学プロテオ医学研究センター難治性神経疾患分子制御部門, ²愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学)

脳梗塞など種々の重症脳病態において、マイクログリアまたは脳マクロファージが誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を発現、産生されたNOによる病態修飾が報告されてきた。培養マイクログリアやマクロファージを用いたiNOS発現の実験系では、Toll様受容体4(TLR4)のリガンドであるリポポリサッカライド(LPS)を発現誘導因子としてしばしば用いられてきたが、通常無菌的である脳梗塞においてLPSがiNOSの誘導因子となることは考えにくい。そこで、我々はiNOSの発現誘導因子として他のTLRリガ

ンドが作用する可能性を想定し、脳梗塞巣から分離培養したマクロファージにおいて高発現しているTLRを、定量的リアルタイムRT-PCR法により検討した。その結果、脳マクロファージはTLR4以外にもTLR3やTLR9など多くのTLRを発現していることが判明した。さらに、分離培養脳マクロファージに対し、TLR3の人工のリガンドであるpoly I:C (pIC)を添加すると、iNOSタンパク質の発現およびNOの産生が見られた。また、ラット脳梗塞組織に対する免疫組織化学染色を行った結果、iNOS陽性細胞は梗塞巣核心部に集積するマクロファージであり、TLR3陽性細胞と一致することが判明した。これらの結果は、無菌的な脳傷害におけるiNOS誘導因子はTLR3リガンドであることを示唆している。

20. 脳梗塞後のグリオーシス形成に関与するケモカイン

杉本香奈^{1,2}、西原 佑^{1,2}、高橋寿明^{1,2}、矢野 元^{1,2}、田中潤也^{1,2} (愛媛大学プロテオ医学研究センター難治性神経疾患分子制御部門、²愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学)

我々は、ラットの中大脳動脈一過性閉塞(MCAO)による脳梗塞モデルにおいて、梗塞発症1週間後の病巣核心部に多数のマクロファージ様細胞が集積することに着目してきた。この細胞は、マクロファージマーカーIbalとオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカーのNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)を同時に発現するため、BINCs (Brain Ibal⁺/NG2⁺ Cells)と称している。

梗塞巣では、BINCsの著しい増殖に引き続き、アストロサイトの急激な反応性の増殖または移動による集積(アストログリオーシス)がみられる。今回我々は、アストロサイトがグリオーシスを形成する際に移動方向を決定する因子の一つとして、BINCs由来のケモカインに着目し検討を行った。

migration assayにより、ラット一次培養アストロサイトはBINCsに強く誘引されることが判明した。既知のすべてのラットケモカインmRNAの発現レベルを定量的リアルタイムPCRを用いて比較した。その結果、BINCsには特定のケモカインが高発現しており、その受容体がアストロサイトにも発現していた。また、migration assayにより検討したところ、一部のケモカインはアストロサイトを誘引できた。

以上の結果より、BINCsの産生するケモカインにアストロサイトが誘引され、アストログリオーシスが形成される可能性が示唆された。

21. 脳損傷に対するサイトカイン治療の試み

西原 佑^{1,2}、越智満久^{1,2}、杉本香奈^{1,2}、高橋寿明^{1,2}、矢野 元^{1,2}、田中潤也^{1,2} (愛媛大学プロテオ医学研究センター難治性神経疾患分子制御部門、²愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学)

血液由来マクロファージが脳傷害組織に集積することは古くから言われている。脳傷害組織に集積するマクロファージの多くはマクロファージマーカーであるIbalだけでなく、NG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)も発現しており、我々はBINCs (Brain Ibal⁺/NG2⁺ Cells)と称している。ラット脳梗塞モデルを用いた研究により、BINCsは多種類のペプチド性神経保護因子を発現するなど脳保護的作用が明らかとなってきている。最近我々は、重症脳傷害モデルとしてラット針刺し脳損傷モデルを作成、損傷部より分離されたBINCsの脳保護効果を増強するための薬物治療法開発を行っている。脳傷害組織から分離されたBINCsは、サイトカインのIL-3およびGM-CSFに対する受容体mRNAを発現し、この両サイトカイン混合物に反応して増殖するとともに、NG2発現レベルも増加した。このサイトカイン混合物の皮下注射は、損傷作成72時間後での開始でも、脳喪失体積減少や運動機能回復に顕著な効果を有しており、現在適切な治療薬がない重症脳傷害に対し有望な治療法となる可能性がある。

22. 神経膠腫細胞浸潤性におけるNa⁺/H⁺Exchanger (NHE1)の寄与について

矢野 元^{1,2}、塩田浩平^{1,2}、杉本香奈^{1,2}、高橋寿明^{1,2}、田中潤也^{1,2} (愛媛大学プロテオ医学研究センター難治性神経疾患分子制御部門、²愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学)

神経膠腫の脅威は、その増殖性もさることながら脳実質内での潜行性の浸潤にあるといえ、「浸潤抑制治療」の開発が渴望されている。今般、神経膠腫細胞において、初代培養アストロサイトに比してNa⁺/H⁺Exchanger (NHE1)の発現亢進が認められることを見出した。NHE1は、細胞内へのナトリウムイオンの取り込みとともにプロトンの排出を行うことで細胞内pH制御の中心的役割を担っているのみならず、アクチン細胞骨格が細胞膜を裏打ちするうえで、細胞膜への結合の「足場」としての役割をも果たしている。NHE1ノックダウンにより神経膠腫細胞の浸潤性が著しく抑制されたことから、NHE1過剰発現と細胞浸潤が相関することが判明した。一方、数株の神経膠腫細胞株についてその浸潤における浸潤誘引物質に対する依存性を検討したところ、誘引物質依存的な浸潤を行う神経膠腫細胞群に加え、興味深いことに、誘引物質が浸潤抑制的である群が存

在した。これらいずれの神経膠腫細胞群においても NHE1 発現亢進が観察された。NHE1 に対しては、有効な阻害剤として 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) が知られているが、本剤は上記のいずれの神経膠腫細胞浸潤に対してもその活性を抑制した。神経膠腫の「浸潤抑制治療」開発において NHE1 に着目することの意義・可能性について議論したい。

23. ラットパーキンソン病モデルにおけるサイトカイン皮下注射の治療効果

田中潤也^{1,2}, Md. Emamussalehin Choudhury³, 野元正弘³, 杉本香奈^{1,2}, 高橋寿明^{1,2}, 矢野 元^{1,2} (愛媛大学プロテオ医学研究センター難治性神経疾患分子制御部門,²愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学,³同 病態治療内科学)

パーキンソン病の治療薬として、L-ドーパおよびその他のドーパミンアゴニストが重要であり広く用いられている。しかし、これらの薬物はパーキンソン病の神経症状の改善には有効であるが、着実に進行するドーパミン神経細胞の変性脱落というパーキンソン病の本質的病態に対しては何ら有効性を持たない。我々は、ラット針刺し脳損傷モデルに対して顕著な有効性を認めた、IL-3 と GM-CSF からなるサイトカイン混合物の皮下注射を、黒質ドーパミン神経細胞死を誘導する 6-OHDA の線状体内注入パーキンソン病モデルに対しても適用し、その効果を検討した。生後 50 日齢のラットの両側線状体内に 6-OHDA を注入、24 時間後からサイトカイン注射を開始、最大 7 回の皮下注射を行った。その結果、黒質緻密質のドーパミン神経細胞は生理食塩水注射群では多数が死滅したのに対し、サイトカイン注射群では殆どが生存していた。しかしながら、6-OHDA 投与後 1 週間では線状体のドーパミン含量は、sham 群に比べサイトカイン群でも顕著に減少し、運動機能の低下も明らかであった。これらの結果は、サイトカイン注射と L-ドーパあるいは他のドーパミンアゴニストを併用することにより、神経症状を軽減しながら、ドーパミン神経細胞の変性脱落を抑えることが可能になることを示唆している。

24. シナプス可塑性に対する逆説的 Ca²⁺効果の再検討 前野 巍, 榎本浩一 (鳥根大学医学部神経・筋肉生理学講座)

シナプス可塑性に Ca²⁺イオンが関与するという residual Ca²⁺ hypothesis が提唱されて以来、これが定説となっている。しかし residual Ca²⁺ hypothesis は本当にシナプス可塑性の全てを説明できるのだろうか？すでに Maeno &

Edwards (1969) は、Mg²⁺処理して伝達物質の枯渇を防止したカエルの神経筋標本を用いて、低頻度連続刺激で増強され定常状態に達した神経筋伝達の刺激周波数依存性を調べ、シナプス可塑性には Ca²⁺イオンが関与しない可能性が高いことを示唆している。だが、シナプス可塑性は一般に過渡現象として捉えられているため、この連続刺激増強の定常状態における解析法の結果はなかなか受け入れられなかった。この低頻度連続刺激増強の解析法を再検討したので、その結果を報告する。

25. 紅参由来サポニンの血液保存時の機能障害に対する保護効果

河野広貴¹, 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 (愛媛大学医学部生理学,²愛媛大学医学部機能組織学)

輸血用の赤血球は保存日数が経過するに従い、赤血球内 ATP 濃度は減少し、赤血球形態は変化し、血液レオロジー特性も血液粘度の増加、赤血球変形能の低下など機能障害を認める。保存条件は低温環境ではあるが、酸素存在下では酸化ストレスの影響から免れないため赤血球膜タンパク質の酸化傷害が起こる。そこで、酸化ストレスに対して保護作用のある紅参由来サポニンの血液保存時における効果を検討した。

健康成人から採取した血液に CPD 保存液を加え 4℃ にて 1 週間保存し、赤血球形態、高エネルギーリン酸代謝物、血液レオロジー機能に関して測定した。

走査電子顕微鏡観察による有棘赤血球の増加、化学発光法による赤血球内 ATP 濃度の低下について、サポニン添加で改善効果はなかった。しかしながら、血液粘度の増加および赤血球変形能の低下については、サポニンがあると数値が改善した。また、膜タンパク質の酸化傷害の指標としてのチオール基の残量の減少をサポニンが抑制することが明らかになった。

紅参由来サポニンは赤血球保存時の赤血球膜への酸化ストレス傷害に対して抑制する効果があることが明らかになった。

26. Green tea catechins prevent memory impairment in Alzheimer's diseases model rats by decreasing amyloid β levels and oxidative stress in cerebral cortex

A. Haque, M. Hashimoto, K. Matsuzaki, O. Shido (Department of Environmental Physiology, Shimane University Faculty of Medicine)

Amyloid β (A β) is cytotoxic to neurons and plays an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease

(AD). We reported that long-term administration of green tea catechins prevents impairment of cognitive learning ability in an animal model of AD, rats infused with A β into cerebral ventricle. To understand the mechanism, we investigated the effects of green tea catechins (Polyphenon E : PE) on the levels of A β , lipid peroxide (LPO) and reactive oxygen species (ROS) in cerebral cortex of A β -infused rats. Additionally, the effects of PE administration on gene expression of BACE1 and transthyretin (TTR) were examined.

Five-week-old male Wistar rats were randomly divided into two groups : Control group, received water only and PE group received 0.5% PE. Twenty weeks after PE administration, the control group was further sub-divided into two groups : vehicle group (rats infused with the solvent used for dissolving A β), and AD group (rats infused with A β). Similarly PE group was divided into PE + Veh (PE-preadministered vehicle infused rats) and PE + AD (PE-preadministered A β -infused rats). A β ₁₋₄₀ or vehicle was infused into the cerebral ventricle by mini osmotic pump. Learning-related behavioral changes of rats were assessed by an 8-arm radial maze. The level of A β was measured by ELISA and the levels of LPO and ROS were measured by colorimetric assay. The gene expression of BACE1 and TTR were examined by real time PCR with gene specific primers.

Administration of PE (304 \pm 7mg/kg/day) for 26 weeks prevented A β -induced impairment of learning ability with a concomitant decrease of detergent insoluble A β levels and, also LPO and ROS in cortex. Additionally, green tea catechins administration down-regulated the mRNA levels of BACE1 and up-regulated TTR in hippocampus and cerebral cortex, respectively. Regression analysis revealed significant positive correlations between the levels of A β and each of the number of reference memory errors and ROS levels.

We suggest that green tea catechins-induced protection against cognitive impairment in A β -infused rats is in-

olved an amelioration of oxidative stress at least in part by restoring normal A β levels in the cerebral cortex.

27. 長期暑熱馴化形成時に視床下部で新生した神経細胞の機能性解析

松崎健太郎, 片倉賢紀, 井上隆之, A. Haque, 原 俊子, 橋本道男, 紫藤 治 (鳥根大学医学部環境生理学)

ヒトやラットでは, 持続的な暑熱環境への暴露により自律的な熱放散機能の向上を特徴とする暑熱馴化が形成されるが, 中枢における制御機構は明らかになっていない. 体温調節中枢は前視床下部/視索前野 (POA/AH) に存在し, 特にここから視床下部背内側核 (DMH) に投射する神経細胞は皮膚血管運動の調節に関与することが知られている. これまでに我々は長期暑熱馴化が形成されたラットの視床下部で神経前駆細胞の分裂と分化が促進されていることを見出した. 本研究では, 長期暑熱馴化したラット視床下部で新生した神経前駆細胞の局在や分化, 神経投射などを解析し, 新生した神経細胞の暑熱馴化形成への関与について検討した. Wistar 系雄性ラット (5 週齢) を明暗周期 12 : 12 時間, 自由摂食・摂水下, 環境温 24°C で 2 週間飼育した後, 32°C の暑熱環境に暴露した. 暴露開始直後から Bromodeoxyuridine (BrdU ; 50mg/kg/day) を腹腔内へ 5 日間連続投与した. 曝露開始から 40 日目に逆行性ニューロントレーサー (Cholera toxin b-subunit : CTb) を POA/AH や DMH などに局所投与し, 2 日後にペントバルビタール麻酔下でラット脳を摘出し, 免疫組織学的な解析を行った. 暑熱暴露により新生した神経細胞は POA/AH や DMH, 視床下部腹内側核 (VMH) などに多く発現していた. これら視床下部で新生した細胞のうち, 約 16% が GABA 作動性神経細胞マーカーで染色され, さらに約 11% が Glutamate 作動性神経細胞マーカーにより染色された. また, CTb を DMH に局所投与したラットでは, POA/AH の BrdU 陽性細胞の一部に二重陽性像を認めた. 一方, CTb を POA/AH に投与したラットでは他の視床下部内に二重陽性細胞は検出されなかった. 暑熱暴露により新生した POA/AH から DMH へ投射する神経細胞が長期暑熱馴化形成時の皮膚血管運動の向上に関与する可能性を考えた.