

第64回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成24年10月27日（土）、28日（日）
場 所：高知市文化プラザ かるぽーと 小ホール
当番幹事：高知大学医学部生理学講座
循環制御学教室 佐藤隆幸
統合生理学教室 梶 秀人

第64回日本生理学会中国四国地方会は、平成24年10月27日、28日の2日間にわたって、高知市文化プラザかるぽーとで開かれた。当番幹事は高知大学医学部生理学講座で、84人が参加した。参加者のうち、32人が学部学生または大学院生で、学生の増加が会全体の雰囲気を活気づけることを改めて感じるものだった。28演題のうち学生が筆頭演者として発表したものが16演題で、いずれも堂々とした風格ある発表で、質疑応答にも指導教官に頼ることなく自身で応答している姿は、生理学会への新風が暴風になることを予感させることとなった。

生理学会をとりまく環境が日増しに厳しさを増しているが、とりわけ、人材育成不全は深刻である。光明を見いだすことははなはだ困難であるが、今回の地方会で見られたように、臨床テーマを入り口として、病態の解明、治療法の開発のため生理学的思考にもとづいた研究に着手した若手の姿が、処方箋のひとつとなることを願っている。

奨励賞（大学院生部門）受賞者：宮成健司（山口大学大学院）

奨励賞（若手研究者部門）受賞者：野口達哉（高知大学）

1. プロテインキナーゼ M_c 阻害が副嗅球シナプスの長期増強に及ぼす影響

村田芳博，梶 秀人（高知大学医学部生理学講座（統合生理））

雌マウスが獲得する交配雄フェロモンの記憶は、妊娠の成立を保障する。この記憶の座は鋤鼻系の最初の中継核である副嗅球にあり、記憶の成立には新規蛋白質合成を必要とする。また、副嗅球の中継ニューロン（僧帽細胞）から介在ニューロン（顆粒細胞）への興奮性シナプス伝達では記憶の基礎過程とされる長期増強（LTP）が入力特異的に誘導されると報告されており、昨年の本大会で我々は副嗅球シナプスのLTP維持に新規蛋白合成が必要であることを示す電気生理学実験の結果を報告した。今年は、LTP維持への関与が海馬で報告されているプロテインキナーゼ M_c (PKM_c) に着目し、 PKM_c を阻害することで副嗅球のLTPにどのような変化が生じるかを検討した。実験は昨年と同様に、副嗅球の急性スライス標本を作製し、顆粒細胞由来の集合電位 (eEPSP) を記録する方法を用いて行った。外側嗅索にテタヌス刺激を与えると、eEPSPのスロープ値は増大し、180minに渡って維持された。この条件下でテタヌス刺激後60minから PKM_c 阻害ペプチド・ZIPをバス

灌流液に投与したところ、テタヌス刺激後180minでeEPSPのスロープ値はテタヌス刺激前のレベルに戻った。一方、scrambled ZIPを投与した場合はLTPの維持に影響がなかった。以上のことから、副嗅球シナプスにおけるLTP維持に PKM_c の関与が示唆された。

2. 脳梗塞後の急性期運動負荷が認知機能回復に与える影響

氷見直之¹、高橋 尚²、古我知成²、岡部直彦¹、中村恵美¹、宮本 修¹（¹川崎医科大学生理学2、²川崎医療福祉大学リハビリテーション学科）

[目的]脳梗塞後の運動負荷による機能回復の促進効果が経験上良く知られているが、運動負荷を急性期に行うことの効果についての検討は未だ十分になされていない。本研究では、急性期運動の効果について、脳梗塞モデルラットを用い、特に認知機能の回復と海馬の脳由来神経栄養因子 (BDNF) 濃度の関係に着目して検討を行った。

[方法]9週齢SDラットを麻酔後、右内頸動脈に径45 μ mのマイクロスフェア (MS) を3,000個注入し、脳塞栓による梗塞を作製した。梗塞部位はHE染色法にて確認した。梗塞発症の1日後よりトレッドミルにて30分間の運動負荷を7日間与えた群（急性期運動群）、8日後より運動負荷を

7日間与えた群（遅延運動群）について、いずれも梗塞後15日目より水迷路試験を行い空間記憶能を測定し、認知機能の指標とした。さらに両群において8日目および15日目に海馬を摘出しタンパク質抽出を行い、ELISA法にてBDNF量を測定した。四肢の運動機能の指標として、ロータロッド上にラットを乗せ、ロータ回転開始から落下までの滞在時間を、MS注入前、注入1, 2, 4, 7および14日後に測定した。また、MS注入後全く運動を負荷しない群（非運動群）およびMSを注入しない偽手術群（sham群）を比較対象とした。

【結果】梗塞直後には体幹のねじれや回旋歩行などの麻痺が生じたが、1日後にはトレッドミル走行が可能な程度に回復した。梗塞は皮質、線条体および海馬に散見された。水迷路試験では、急性期運動群はsham群と同等レベルの記憶能を示した。一方、遅延運動群および非運動群の空間記憶能は、急性期運動群およびsham群と比較して有意に低下していた。ロータロッド上の滞在時間は、4, 7日目において急性期運動群に回復傾向が見られたが、遅延運動群との間に有意差はなかった。また8日目において早期運動群の海馬BDNFが遅延運動群に比べ有意に高かった。15日目については遅延運動群の海馬BDNFが早期運動群に比べ高めの傾向が見られた。

【結論】脳梗塞後の急性期に運動を課すことにより海馬BDNF濃度が上昇し、認知機能回復につながる事が示唆された。一方、遅い時期に開始した運動は、海馬BDNF濃度が上昇したものの認知機能の回復に効果は示さなかった。

3. 極低周波変動磁界慢性暴露による副腎皮質ホルモンの分泌増強作用

北岡和義¹、北村光夫¹、青井 駿^{1,2}、吉田朋広^{1,2}、清水紀之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徳島大学医学部学生センターラボ、³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）

【目的】

極低周波変動磁界（extremely low-frequency magnetic field, ELF-MF）は主に商用電力により誘起される50Hzないしは60Hzの周波数を持つ磁界のことを指す。近年、実験動物を用いた研究において、慢性のELF-MF暴露が副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンの血中濃度を増加させることが報告されている。その機序はELF-MFがストレスとして視床下部-下垂体-副腎皮質軸（HPA軸）を刺激するためであると推察されているが、その詳細は不明である。そこで、ELF-MF慢性暴露と副腎皮質ホルモンとの関

連について明らかにするために、マウスを用いて検討を行った。

【方法】

3週齢のICRオスマウスに対し、1日8時間のELF-MF暴露および疑似刺激群を合計200時間それぞれ行い、その後うつ行動・不安を定量する行動試験および血圧・心拍の測定を行った。その後両群の血漿中副腎皮質ホルモン濃度、視床下部・下垂体ホルモンおよび副腎における副腎皮質ホルモン合成酵素群の遺伝子発現量を検討した。

【結果と考察】

血漿中のコルチコステロン、アルドステロン濃度は、慢性ELF-MF暴露群において疑似刺激群と比較して共に有意に上昇していた。加えて、慢性ELF-MF暴露群には、副腎皮質ホルモン分泌上昇の影響であると推察される有意なうつ様行動の増大と、拡張期および平均血圧の上昇が認められた。一方で、副腎皮質ホルモンの上位ホルモンである副腎皮質刺激ホルモンの血漿中濃度、その上流に位置する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、および別の昇圧ホルモンであるバソプレシンの遺伝子発現量に差は認められなかった。さらに副腎皮質ホルモン合成酵素群の遺伝子発現量解析により、副腎アンドロジェンを合成する酵素である*Cyp17a1*に慢性ELF-MF暴露群において有意な減弱が示された。

これらの結果から、高強度のELF-MF慢性暴露は一般的なストレス反応系であるHPA軸を介することなく、副腎皮質ホルモン血中濃度を上昇させることが示唆された。

4. PPAR α ノックアウトマウスにおける情動行動

原田紗希^{1,2}、西 結奈^{1,2}、大浦寛奈^{1,2}、千田大樹^{1,2}、清水紀之¹、藤原広明¹、近久幸子¹、志内哲也¹、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徳島大学医学部 Student Lab）

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)は核内受容体ファミリーの一員であり、低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする。PPAR α は肝臓などの末梢組織において、脂肪酸化、細胞内脂肪酸輸送、絶食時のケトン体生成などに関与している。中枢におけるPPAR α の役割については、神経炎症時の神経保護作用などの報告はあるが、情動行動や記憶・学習など高次脳機能における役割は全く分かっていない。本研究では、PPAR α ノックアウトマウスを用い、各種行動実験を行うとともに脳内モノアミンを中心とする神経伝達物質の動態を調べた。open-field test, light-dark box test, elevated plus maze test, forced swimming testを用いて評価した不安・うつ様行動に関して、ノックアウトマウスと野生型マウスとの

間に大きな差異は見られなかった。一方, passive avoidance test によって評価した情動記憶に関して, ノックアウトマウスにおいて有意な促進が見られた。高速液体クロマトグラフィーを用いて, 各脳部位の組織に含まれるモノアミンおよびその代謝産物の濃度を測定したところ, 扁桃体の dopamine およびその代謝産物がノックアウトマウスにおいて有意に高かった。さらに, real time RT-PCR 法を用いてモノアミン代謝に関わる酵素などの mRNA 発現レベルを調べたところ, 扁桃体における catechol-O-methyltransferase mRNA の発現がノックアウトマウスで有意に高かった。PPAR α は dopamine に関わる神経機構を介して情動記憶に関与している可能性が示唆される。

5. 古典的な鎮静催眠薬ブロムワレリル尿素のパーキンソン病治療薬としての可能性

青野仁美, 檜垣ひろみ, 和田愛子, 河本智里, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

パーキンソン病では中脳黒質緻密部のドーパミン神経細胞が緩徐に変性脱落していくことがその病態の中心であり, この神経細胞死を抑制する治療法が渴望されているが, 臨床応用に至っているものはない。我々は, 神経細胞に傷害が加わった際に見られるマイクログリアの活性化に注目してきた。活性化マイクログリアは, 一酸化窒素 NO やインターロイキン 1 β などの起炎症性メディエーターを産生放出することで神経細胞死を促進することが知られ, パーキンソン病においても, マイクログリアの活性化抑制が神経細胞死の抑制につながる可能性がある。我々は, 古典的な催眠鎮静薬であるブロムワレリル尿素 (BU) が, マイクログリアの活性化を抑制できることを見いだした。BU は, リボポリサッカライド (LPS) 刺激したラット一次培養マイクログリアに対して, 濃度依存的に NO 産生を抑制した。また, 一次培養マイクログリアと一次培養大脳皮質神経細胞の LPS 存在下での共培養で観察される神経細胞死を抑制した。in vivo では, 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) の線条体内注入による, ラットパーキンソン病モデルに対し, BU を経口投与したところ, 黒質ドーパミン神経細胞の減少を有意に抑制し, 運動機能も改善させた。パーキンソン病態に対するブロムワレリル尿素の有効性が示された。今後は, この薬剤の機序の解明に取り組むとともに, 関連化合物の効果の検討も進めたい。

6. Functional and anatomical alterations induced by monocular enucleation in the visual system

K. Kameyama, Y. Tsuchie, H. Miyata, Y. Hata (Divi-

sion of Integrative Bioscience, Tottori University Graduate School of Medical Sciences)

Visual input is received by retinal ganglion cells and their axons project mainly to the lateral geniculate nucleus (LGN) of the thalamus. Then neurons in the LGN send their axons to the primary visual cortex (V1). In this visual pathway, topographic arrangement of the visual field is preserved, so that V1 has a complete retinal map called retinotopy. Both molecular guidance and neural activity are thought to play an important role during the developing stage, although the mechanism for forming the precise map is still unknown. A previous electrophysiological study using hamsters reported that monocular enucleation (ME) in early postnatal days induces a disarrangement of the retinotopic map in V1, resulting in that the center of the visual field is duplicated. We investigated the change of the retinotopic map more precisely by optical imaging of intrinsic signals. The duplication of the retinotopic map was observed clearly in V1 and the responding cortical area tended to expand. This functional change may reflect a reorganization of the neural connections. To examine possible changes in the geniculocortical and intracortical projections, we injected neural tracers into the LGN and V1. We found that the neural projections were altered by ME. These results suggest that the functional change of retinotopy is presumably accompanied with the anatomical alteration of the visual circuitry.

奨励賞対象演題

7. 血管平滑筋の異常収縮を特異的に抑制可能な新規の植物由来成分の探索

宮成健司, 野地本和孝, 岸 博子, 加治屋勝子, 高田雄一, 木村友彦, 小林 誠 (山口大学大学院医学系研究科器官制御医学講座生体機能分子制御学)

突然発症する血管攣縮は, 突然死の主因の1つである。その本態は, Rho キナーゼ (ROK) による血管平滑筋の Ca²⁺ 非依存性の異常収縮であるが, 我々は ROK 上流の病的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) を同定した。実際に脳血管攣縮患者の髄液中 SPC 濃度は, 対照群に比べ 20~30 倍も増加しており, さらにイヌ髄腔内に投与された SPC は, 重篤な脳血管攣縮を引き起こした。この血管攣縮は ROK 阻害剤で抑制されたことから, 血管攣縮における SPC/ROK 経路の重要性が示唆された。次に, 我々は, 血圧維持を担う血管の Ca²⁺ 依存性の正

常収縮を抑制せずに、SPCによる異常収縮のみを抑制する特効薬を探索し、エイコサペンタエン酸 (EPA) を見出した。実際に、EPAはヒトの脳血管攣縮に対して著効を示した。しかしながら、EPAの原材料となる魚油は、海洋汚染等の環境の影響を受け易く、供給が不安定である。そこで、我々は、環境と供給が安定している植物に着目し、再度、探索した結果、異常収縮を抑制する植物を発見した。しかし、同時に正常収縮も抑制したため、HPLCを用いて、異常収縮のみを抑制できる分画を見出した。さらにその分画をタンデム型質量分析計で分析し、4つの候補分子を同定した。これらの結果は、この植物中に血管攣縮の特効薬成分が含まれている事を示すと同時に、血管病を予防できる機能性食品としての可能性を示唆している。

奨励賞対象演題

8. ブロムワレリル尿素はマクロファージの活性化を抑制し、敗血症に対する治療効果を持つ

西原 佑, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) や敗血症は感染や外傷などの様々な疾患に合併する。中でも腹膜炎は非常に高い確率で敗血症を引き起こし、ICU死亡における大きな要因の一つである。

これまでマイクログリアや脳損傷部位に集積するマクロファージをターゲットとし、その働きを増強もしくは抑制することで脳疾患に対する治療に結びつけるための研究を行ってきた。様々な薬剤の中から、睡眠導入剤であるブロムワレリル尿素 (BU) が、初代培養マイクログリアのLPS刺激によるNO産生を抑制することを見出した。

BUが脳マクロファージだけではなく、末梢臓器に存在するマクロファージにも作用しうるのではないかという仮説から、Cecum Ligation and Puncture (CLP) による腹膜炎・敗血症モデルを用いて、肺マクロファージをターゲットとした急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) に対する治療、および、腹腔マクロファージをターゲットとした腹膜炎に対する治療のための研究を行った。

BUは *in vitro* において、肺マクロファージや腹腔マクロファージに作用し、LPS刺激によるiNOS発現やNO産生を抑制した。また、IL-1 β , TNF- α , IL-6などの起炎症性サイトカインの産生を濃度依存的に抑制した。一方、*in vivo* においてはCLPラットに対し1回につきBU 5mgを1日2回 (計10mg/day) 投与することにより、腹膜炎の程度が改善した。またARDSによる肺障害の程度も著しく低減し、人工呼吸下 (FiO₂=50%) における血液ガス分析におい

てsham群のPaO₂が237 \pm 3.160mmHg, sepsis群が202 \pm 12.0mmHg, BU投与群が240 \pm 7.75mmHgと有意にBU投与群で酸素化が改善した。また、1週間の継続投与により、CLPラットの生存率は20%から53%まで改善した。

これまでに様々な麻酔薬、鎮静薬が敗血症におけるサイトカインを抑制し、生存率を改善するといった報告がある。しかし、BUが腹膜炎の炎症反応を抑制し、ARDSにおける肺障害、更には腹膜炎や敗血症の生存率を改善できることを明らかにしたのは我々の研究が初めてである。今回のデータは、BUが敗血症のための新たな治療薬となり得る可能性を示すと同時に、敗血症やARDSの治療研究において、腹腔マクロファージや肺マクロファージが治療ターゲットとして有益であることを示している。

奨励賞対象演題

9. 小胞放出Ca²⁺センサーシナプトタグミンの中間型SNARE膜融合複合体への結合と解離

増本年男, 大守伊織, 道上宏之, 西木禎一, 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)

神経伝達物質は、小胞上のv-SNAREとシナプス前膜上のt-SNAREからなる膜融合複合体と、Ca²⁺センサーシナプトタグミンにより放出される。以前私達は、ラット脳から可溶化したシナプトタグミンとSNARE複合体がCa²⁺により解離することを示した。SNAREは、融合前に二膜間で形成されるトランス型複合体から融合後に同一膜上で形成されるシス型へと移行するが、以前の実験のような可溶性条件下ではシス型類似構造をとる。そこで、リボソームに再構成したSNAREを用いてシナプトタグミンが膜融合前のトランス型に結合するか解析した。大腸菌で発現させた組換えタンパク質は、界面活性剤存在下でクロマトグラフィーにより精製した。v-SNAREとt-SNAREを透析法により別々に再構成したりボソームを融合が生じない条件下で混和しトランス型複合体を形成させ、シナプトタグミンと反応させた。密度勾配遠心後、上層に回収されたリボソームをイムノプロットングにより調べたところ、シナプトタグミンはトランス型SNAREに結合し、Ca²⁺により解離することが分かった。以上の結果から、ドッキングした小胞とシナプス前膜間に形成されたSNARE複合体にシナプトタグミンが結合することが示唆される。シナプトタグミンの結合がSNAREの働きを抑制するならば、Ca²⁺による解離により抑制が解除され、伝達物質が放出されると考えられる。

奨励賞対象演題

10. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after transient forebrain ischemia in gerbils

F. Lu, T. Nakamura, T. Toyoshima, Y. Liu, T. Araki, A. L. Wei Wei, T. Itano (Department of Neurobiology, Kagawa University Faculty of Medicine, Miki, Japan)

The present study investigates the potential protective effects of G-CSF and underlying mechanisms in global brain ischemia models. We examined the neuronal death, inflammatory reaction and neurogenesis in hippocampus 72 hours after transient forebrain ischemia and investigated functional deficits. G-CSF administration was performed 24 hours before ischemia intraperitoneally and continued once per day. Treatment with G-CSF at 25 μ g/kg or 50 μ g/kg significantly reduced the neuronal loss in CA1 area of hippocampus but not with a dosage at 10 μ g/kg. A single dose of G-CSF at 50 μ g/kg significantly decreased the level of TNF- α , the number of Ibal positive cells and reduced loco motor activity 72 hours after transient forebrain ischemia. Furthermore, DCX-positive cells in dentate gyrus of hippocampus increased in G-CSF treated group. Our findings indicated that G-CSF may reduce hippocampal neuronal cell death with dose-dependent, and attenuate sensorimotor deficits after transient forebrain ischemia. These neuroprotective effects of G-CSF may be linked with the inhibition of inflammatory reaction and the increased neurogenesis in hippocampus.

奨励賞対象演題

11. Histone acetylation in the olfactory bulb of young rats facilitates aversive olfactory learning and synaptic plasticity

Y.-J. Wang, F. Okutani, M. Taniguchi, Y. Murata, H. Kaba (Dept. Physiology, Kochi Medical School)

It has become increasingly clear that epigenetic mechanisms play a critical role in synaptic plasticity and memory formation. Specifically, histone-associated heterochromatin undergoes changes in structure during the early stages of long-term memory formation. Before eye opening young rats depend on somatosensory and olfactory function for survival, as they can learn their dam's odor and approach

her without visual information. In order to establish olfactory learning, the pairing of odor and somatosensory stimulation is crucial. We have shown that synaptic plasticity in the OB underlies aversive olfactory learning. We examined whether intrabulbar infusion of trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, facilitates olfactory learning in young rats. TSA infusion during odor-shock training enhanced a conditioned odor aversion in a dose-dependent manner and prolonged the learned aversion. Western blot and immunohistochemical analyses showed that the expression of histone H4 acetylation significantly increased until 4 hours after odor-shock training in both mitral and granule cells in the OB, whereas histone H3 acetylation returned to the control level at 2 hours after the training. TSA infusion also elevated acetylation of histone H3 or H4. Moreover, in vitro electrophysiological analysis using slices of the OB revealed that application of TSA significantly enhanced the long-term potentiation (LTP) induced in synaptic transmission from mitral to granule cells at dendrodendritic synapses. Taken together, these results indicate that histone acetylation in the OB is an epigenetic mechanism associated with aversive olfactory learning in young rats.

奨励賞対象演題

12. ラット大脳皮質活動に対する麻酔薬の影響：光学的膜電位測定法を用いた興奮波伝播の時空間パターン解析による比較

濱 德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦 (島根大学医学部神経・筋肉生理学講座)

我々の研究室では光学的膜電位測定法を用いて、大脳皮質の数百ヶ所の領域から神経活動を同時記録し、興奮波伝播の時空間パターンを解析する手法が確立されている。この手法を大脳皮質感覚野に適用し、自発興奮時及び感覚刺激応答時に見られる脱分極性のシグナルが、皮質の限局した領域のみでなく、感覚野の広い範囲に伝播していくことを高時空間分解能で記録し、解析することに成功している。今回、我々は麻酔薬の違いが皮質ニューロン活動に与える影響を解析した。皮質のニューロン活動や脳波の自発活動あるいは誘発電位の波形が、麻酔薬の種類により異なった影響を受けることは、電気生理学的手法により知られているが、皮質の広範囲を詳細に解析した例は無く、興奮波伝播の時空間パターンがどのような影響を受けるのかは不明である。そこで我々はラットを用い、異なる麻酔薬（ウレ

タン (1.5g/kg) のみと α -クロラロース (80mg/kg) とウレタン (0.8g/kg) の混合麻酔による時空間パターンと個々のピクセルでの光学シグナル波形の違いを、光学的膜電位測定法を用いて記録、比較した。その結果、伝播速度では、誘発応答、自発興奮ともに混合麻酔下で有意に大きかった。光学シグナル波形では立ち上がり速度、半値幅と最大振幅を比較したが、誘発応答では半値幅のみで違いが見られた(ウレタン麻酔下で有意に大きい)。一方、自発興奮では、同様に半値幅がウレタン麻酔下で有意に大きく、さらにこれに加え、立ち上がり速度が混合麻酔下で有意に小さかった。これらの結果より、麻酔薬は、興奮波伝播速度や興奮の持続時間など、を変化させるが、自発興奮時と刺激応答時ではその影響が麻酔薬によって異なることが明らかになった。

奨励賞対象演題

13. 塩酸ドネペジルによる末梢動脈疾患の新たな薬物治療戦略

野口達哉, 柿沼由彦, 有川幹彦, 佐藤隆幸 (高知大学医学部生理学講座循環制御学教室)

当教室ではドネペジルは血管内皮細胞からの血管新生シグナルを促し、マウス片側下肢虚血モデルにおいて虚血肢の血管新生を促進させ、血流を改善することを報告している。現在、末梢動脈疾患に一般的に用いられる抗血小板薬のシロスタゾールは強力な血管拡張作用や血管内皮機能改善効果など多面的作用が報告されているが、これにドネペジルを併用することで、末梢動脈疾患患者への血管新生も促す新たな薬物療法となりうる可能性を研究している。現在のところ、シロスタゾールおよびドネペジルは共に血管内皮細胞に対し血管新生促進作用を有することが確認された。またマウス片側下肢虚血モデルではドネペジル投与量を前研究の5mg/kg/dayから0.2mg/kg/dayの臨床用量まで大幅に減量したにも関わらず、サーモグラフィーによる虚血肢皮膚温測定では、両薬剤併用群においてコントロール群より有意な皮膚温の改善が確認された。また今回ドネペジルは血管内皮細胞ばかりでなく、骨格筋細胞からのVEGFやbasic FGF, IL-1 β などの血管新生シグナルを増加させることを、筋原性幹細胞であるサテライト細胞の単離培養による *in vitro* 実験で確認した。これらの結果からドネペジルは血管内皮細胞および骨格筋細胞の両者に対し直接的な血管新生促進作用を有し、この作用は現在臨床で使用されるシロスタゾールと併用することで相乗効果を有する可能性が示唆される。

14. 暑熱暴露により誘導される視床下部神経新生と暑熱耐性形成の加齢による低下

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

ヒトやラットでは暑熱環境への持続的な暴露により中枢および末梢に存在する温度受容器と効果器の機能的あるいは器質的变化が誘導され、耐暑熱性が亢進を特徴とした暑熱馴化が形成される。これまでに我々は暑熱暴露により若齢ラットの視床下部では神経前駆細胞の分裂と分化が促進されるが、老齢ラットでは誘導されないことを見出し、視床下部神経新生の加齢による低下が暑熱馴化形成に影響を及ぼす可能性を示唆した。本研究では、暑熱暴露により新生した細胞の熱への応答性と暑熱耐性の獲得に対する加齢の影響を検討した。Wistar 系雄性ラット (5週齢, 若齢ラット; 24ヶ月齢, 老齢ラット) 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40日間暴露した。環境温 24°C で飼育し続けたラットを対照群とした。暴露開始直後からラットの腹腔内へBromodeoxyuridine (BrdU; 50mg/kg/day) を5日間連続投与した。暴露期間終了後, すべてのラットの耐暑熱性を確認し, ペントバルビタール麻酔下で脳を摘出した。脳組織の凍結切片を作成し, 抗 BrdU 抗体および抗 c-Fos 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。持続的な暑熱暴露によりすべてのラットの深部体温は低下し, また, 急性的な熱負荷に対する体温上昇も抑制された。しかし, この体温上昇抑制効果は若齢ラットで顕著であり, その差は老齢ラットと比較して有意であった。暑熱暴露により若齢ラット視床下部の BrdU 陽性細胞数は顕著に増加したが, 老齢ラット視床下部では変化しなかった。また, 若齢ラットの視床下部で新生した細胞の一部に c-Fos 二重陽性像を認めたが, 老齢ラットではほとんど検出されなかった。以上の結果より, すべてのラットは暑熱馴化を形成し得るが, その程度は加齢により低下することが示された。また, 暑熱暴露は若齢ラット視床下部において熱刺激に反応性を持つ機能的な神経細胞を新生するが, 老齢ラット視床下部にはほとんど影響しないことが示唆された。暑熱暴露による視床下部神経細胞新生の加齢による低下が, 暑熱に対する高齢者の体温調節機能変化に関与する可能性が考えられる。

15. 自発運動開始時の心拍応答に対する頸動脈洞血圧受容器反射および大動脈血圧受容器反射の役割は異なる

井手迫光弘, 松川寛二, 石井 圭, 梁 楠, 遠藤加業 (広島大学医学部保健学科)

動脈血圧受容器は、頸動脈洞および大動脈弓という異なる

る2つの場所に存在し、それらは共に動脈血圧の変動を緩衝する動脈血圧反射を構成する。自発運動の開始時には、血圧反射性の徐脈応答は抑制され、心拍数上昇を引き起こすことが知られている。我々は、除脳ネコの大動脈神経 (AN) あるいは頸動脈洞神経 (CSN) を電気刺激し、大動脈血圧受容器あるいは頸動脈洞血圧受容器反射を誘発し、自発運動がこれら血圧反射に及ぼす影響を既に調べた。その結果、自発運動の開始時には、大動脈血圧受容器反射は高位中枢からの下降性信号 (セントラルコマンド) によって抑制されるが、頸動脈洞血圧受容器反射はそのような抑制を受けないことを明らかにした (Matsukawa et al. *Am J Physiol* 303: H464-H474, 2012)。今回、電気刺激を用いずに、血圧変化に伴った自然圧刺激においても同様な現象が観察されるか否かを調べた。本実験では、AN あるいは CSN を切除した除脳ネコを用いて (各動物では、頸動脈洞血圧受容器反射または大動脈血圧受容器反射のみが作用する)、腹部大動脈の閉塞により昇圧を生じさせ機械的に動脈血圧反射を誘発した。その結果、先行研究と同様、自発運動開始時には大動脈血圧受容器反射による反射性徐脈は抑制されたが、頸動脈洞血圧受容器反射による反射性徐脈は自発運動の影響を受けなかった。以上の結果より、我々は、動脈血圧変化という自然圧刺激を用いて、自発運動の開始時にはセントラルコマンドは大動脈血圧受容器反射を抑制するが、頸動脈洞血圧受容器反射はそのような抑制を受けないことを確認した。

16. セントラルコマンドは自発運動開始期に活動筋血流量を増加させる

石井 圭, 松川寛二, 梁 楠, 遠藤加菜, 井手迫光弘 (広島大学大学院医歯薬保健学研究科生理機能情報科学教室)

ヒト運動時の活動筋血流量増加に自律神経性血管拡張が関与することについては否定的な意見が多い。一方で、筋収縮が生じない非活動筋では、片脚自発運動開始時に高位中枢由来の神経性血管拡張が生じることを私たちは最近報告した (Ishii et al. *J Appl Physiol* 112: 1961-1974, 2012)。さらに、同一運動の精神イメージは下肢骨格筋の血流量増加を両側に引き起こした。これらの結果から、自発運動初期では随意収縮に伴う高位中枢からのシグナル (セントラルコマンド) が活動筋血流量を増加させることが推測される。この仮説を検証するために、30秒間の自発的足背屈運動と電気刺激による誘発運動時にみられる活動筋血流量の応答を比較した。骨格筋組織血流量の指標として、近赤外線分光計を用いて前脛骨筋の酸素化ヘモグロビン濃度変化 (Oxy-Hb) を測定した。自発的筋収縮時では Oxy-Hb は緩や

かに低下したが、電気刺激による誘発筋収縮時には Oxy-Hb 低下は迅速に起こり、その大きさは自発運動時より顕著であった。以上の結果から、セントラルコマンドによる骨格筋血流量増加が筋収縮による酸素消費に伴って生じる Oxy-Hb 低下を軽減させることが示唆された。末梢骨格筋にて血流量増加が起こるならば、より上流側である導管動脈の血流量も増えることが予想される。そこで、超音波ドップラー血流計を用いて自発的および電気刺激による筋収縮時の大腿動脈血流量を計測した。大腿動脈血流量は電気刺激時より自発運動時に大きく増加した。以上の成績は、自発運動初期にセントラルコマンドが働き活動筋血流量の増加に寄与することを示唆する。

17. 脳梗塞モデルラットに対するトレッドミル運動の予後改善効果と脳梗塞巣におけるグリア細胞の反応について

西岡龍太郎, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

脳梗塞発症後の最も効果が確実な治療法はリハビリであると言われ、なるべく早期からのリハビリの開始が肝要とされる。しかしながら、リハビリの効果発現に関する分子細胞レベルでの機序解明は十分ではない。今回、我々は、脳梗塞後にトレッドミルによる運動負荷を行った群と行わなかった群に分けて、ラット脳梗塞モデルラットの病巣内あるいは周辺組織での細胞の反応を検討した。

ラット脳梗塞モデルは、中大脳動脈一過性閉塞により作成した。翌日小動物用 MRI により、脳梗塞病巣を撮像し、十分な大きさの脳梗塞が形成されているもののみをその後の実験に供した。MRI 撮像後から、トレッドミルを用いて、脳梗塞ラットにランニングをさせた。トレッドミルは水平にし、4~16m/min の速度で作動させ、10分間走らせた。走行速度は、当初は2日ごとに2m/min ずつ速めた。このトレッドミル運動を1ヶ月以上にわたり毎日続けると、麻痺側の前後肢の運動能力が明らかに向上し、その効果は Rota-rod test で検証できた。また、脳梗塞後に短期のトレッドミル運動 (7日以内) を負荷したラットに対して、脳梗塞組織およびその周辺組織を採取し、定量的リアルタイム RT-PCR やウエスタンブロッティングを行った。また、パラホルムアルデヒドを灌流し固定、免疫組織化学的検討に供した。その結果、梗塞巣核心部を取り囲む周辺領域で、運動負荷した場合に早期にネスチン陽性の反応性アストロサイト増加や、NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン陽性のマクローファージ (BINCs) の増加が観察された。現在更に、グリア細胞の反応を中心に検討を進めている。

18. 心筋梗塞ラットの運動トレーニングは中枢性交感神経賦活応答を抑制する

木場智史¹, 井上裕美子², 久留一郎², 渡邊達生¹ (¹鳥取大学医学部統合生理学分野, ²鳥取大学大学院医学系研究科再生医療学部門)

中枢コマンド(運動発現の意思に伴って惹起して運動系とともに自律神経系を調節する神経メカニズム)による交感神経賦活応答は心不全で過剰である(Koba et al. *AJPH*, 2006). 本研究では, 心筋梗塞由来の心不全ラットの中枢コマンド応答は運動トレーニングで抑制されるとの仮説を検証した. ラット左冠動脈結紮から6週以上で心機能が有意に低下した. 心不全ラットを運動トレーニング群(HF-ET)と非運動トレーニング群(HF-Sed)とに分け, HF-ET群ではトレッドミル運動(20m/min, 5度の傾斜, 週に5回)を8週以上行わせた. 除脳ラットの中脳歩行誘発野を電気刺激(1ms間隔, 60Hz, 35 μ A)してfictive locomotion (FL)を誘発することで, 中枢コマンドを選択的に刺激した. HF-Sed群のFLに対する腎交感神経活動応答は, 健常対照群およびHF-ET群よりも有意に($P < 0.05$)大きかった. このHF-Sed群での過剰な中枢コマンド応答は延髄吻側腹外側野に抗酸化薬(テンポール)を投与することで有意に抑制された一方で, 健常対照群・HF-ET群の応答はテンポールの投与に影響されなかった. ジヒドロエチジウム染色実験によって, HF-Sed群の延髄で見られる酸化ストレスは運動トレーニングによって軽減することが示された. これらの結果は, 心不全での中枢性交感神経賦活応答が運動トレーニングの抗酸化作用を介して抑制されることを示唆する.

19. 髄膜からのマイクログリアの発生

田中潤也, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野元(愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

脳の主たるグリア細胞の一つであるマイクログリアは, 長年その発生活動に関する議論が続けられてきた. 最初の報告者であるスペインのオルテガは, 詳細な鍍銀染色法によりマイクログリアが髄膜, 特に軟膜から発生してくるとした. その後, 血流中の細胞が脳実質に浸潤しそれがマイクログリアになるという血球由来説, 神経細胞やアストロサイトなどと同じ神経外胚葉由来説が唱えられた. これらの発生学的議論は半世紀以上にわたって続けられたが, 今世紀以降は新たな研究手法の導入などで, マイクログリアが中胚葉系細胞であり, 組織マクロファージの一つであることに疑いが持たれることはなくなった. しかしながら, 最初の中胚葉起源説であるオルテガの髄膜由来説に対する再検討は加えられていない. 今回我々は, 髄膜からのマイ

クログリアの発生の可能性について, 主に培養系を用いた検討を行った. ラット新生仔前脳髄膜には, Iba1+/CD68+/CD163+のマクロファージ様細胞が存在していた. 髄膜をはがし, EGF存在下で数日間培養し, その後血清存在下に移すと, 多数のラミファイト型マイクログリアが出現した. これらの細胞のCD68およびCD163の発現レベルは低く, 正常成熟脳に存在するマイクログリアに似たフェノタイプを示した. 今回の結果は, 髄膜からマイクログリアが発生するというオルテガの古典的な説を支持している.

20. コンドロイチン硫酸プロテオグリカン NG2 によるカドヘリン接着の抑制的制御

矢野元, 矢口明那, 下田健文, 塩田浩平, 杉本香奈, 高橋寿明, 田中潤也(愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

申請者らはこれまでに, 脳梗塞巣に対して骨髄から動員され, 脳保護的に機能する一群の細胞 Brain Iba1/NG2 macrophage-like cells : BINCs (*J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 603-615, 2010)を見出し, その治療への効用を模索している. この細胞の特徴は, マクロファージマーカー蛋白質の発現を伴い貪食能を示す一方で, それとは異なる細胞系譜のマーカーたるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン NG2 を発現することである. 本因子は当初, 脳を構成するグリア細胞のうちの一類のものに特異的に発現する因子として見出された. しかしながらその機能に関して, いくつかの報告がなされてはきたが, その特異的な発現の意義を十分に説明するものは今日に至るまでなされておらず, 懸案のままである. BINCs を利用した治療戦略を考えるうえで, NG2 は脳保護において促進的に作用するのか, あるいは抑制的なのかは切実な疑問である. 申請者はその機能解明を目指してこれまでに, NG2 を強発現するラット神経膠腫細胞 C6 を用いた解析を展開してきた. その結果 NG2 にカドヘリン接着を抑制的に制御する機能があることが明らかとなってきた. この制御の神経膠腫における病態生理学的意義について議論したい.

21. 神経膠腫細胞浸潤抑制における 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) の作用機序の解析

下田健文, 矢口明那, 塩田浩平, 矢野元, 杉本香奈, 高橋寿明, 田中潤也(愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

グリオーマの難治性の一因はその潜行性の浸潤にある. このために外科的切除の効果が減弱させられ, 結果として予後不良に至る再発を避けられないのが現状である. われ

われは先に、調べた限りのグリオーマ細胞において NHE1 が発現亢進しており、そのことと浸潤性が相関していることを見出した(矢口演題)。さらに、NHE1 阻害剤の一つである 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) が *in vitro* のみならず *in vivo* においてグリオーマ浸潤を抑制したことから、NHE1 阻害が浸潤抑制治療に結びつく可能性が示されたと考えている。今後、より効果的な浸潤抑制効果を得るために、阻害剤 EIPA の抑制効果はどのような作用機序で得られたのかを知ることが重要な助けになると考え、以下の解析を進行中である。

EIPA 処理による細胞形態を観察したところ、アクチン細胞骨格再構成が重篤に阻害された顕著な細胞形態の変化を観察した。アクチン細胞骨格再構成と関連深いいくつかの因子の EIPA 処理下における活性について検討したところ、Arf6 活性に有意な変化が観察されなかったのに対して Rac1 活性が低下しており、EIPA の影響はアクチン細胞骨格系再構成の制御に対しての Rac1 を介する成分に及んでいる可能性が見出された。一方 EIPA 処理に伴う NHE1 分子そのものの挙動に着目すると、興味深いことに NHE1 の分子量が 100kDa 付近から約 74kDa へと減少した。このことが Rac1 活性の低下とどのように関連しうるか、検討を進めている。

22. ナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 (NHE1) を標的とした神経膠腫細胞浸潤抑制治療の試み

矢口明那, 下田健文, 塩田浩平, 矢野 元, 杉本香奈, 高橋寿明, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

神経膠腫(グリオーマ)の進行における特徴のひとつは、脳実質内における浸潤的な増殖であることから、それを抑制する治療が長らく望まれている。われわれは初代培養ラットアストロサイトに比べてラットおよびヒトのグリオーマ細胞においてナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 (NHE1) の発現が亢進していることを見出したことから、グリオーマ細胞浸潤における NHE1 の働きを分析した。

NHE1 は、細胞外へのプロトン排出と細胞内へのナトリウムイオン流入を介して細胞内 pH 制御を行うとともに、細胞内ドメインにアクチン細胞骨格の連結点を持つことが知られている膜タンパク質である。

グリオーマ細胞に過剰に発現している NHE1 のノックダウン効果を検討したところ、マトリジェルアッセイにより浸潤が 90% 以上抑制された。こうした浸潤抑制効果は、NHE1 の pH 制御を阻害する試薬として広く用いられている 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) によっても得

られた。一方でわれわれは、グリオーマ細胞の浸潤性の特性を幾つかのグリオーマ細胞株を用いてマトリジェルチャンネル方を用いて比較検討した。血清を化学誘引物質としたところ、多くが血清依存的な浸潤を行う中、血清が抑制的に作用する一群が存在することを見出した。EIPA はこれらいずれの細胞浸潤も抑制したことから、浸潤抑制剤として有効である可能性が示された。*In vivo* における EIPA のグリオーマ浸潤抑制効果を検討するために、ヌードマウスの脳にラットグリオーマ細胞 C6 を移植するモデル系を作成した。そのモデルから採取した脳組織像の観察から、本系においてはヒトグリオーマで問題となる「潜行性浸潤」が再現されている可能性が高いことが判明した。本モデルを用いて EIPA によるグリオーマ細胞浸潤の抑制効果を測定したところ、約 75% の抑制を観察した。現在、EIPA の浸潤抑制効果について、その最大効果や、持続時間等の詳細を検討中である。EIPA の神経膠腫浸潤抑制剤としての可能性について議論したい。

23. ノルアドレナリンおよびアドレナリンアゴニストのマイクログリア活性化抑制作用と神経細胞保護効果

石井友里加, 檜垣ひろみ, 山泉文香, 和田愛子, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

橋背側の青斑核に多数存在するノルアドレナリンニューロンは、その軸索を脳全体にのばし、ノルアドレナリン NA を広範に放出している。青斑核の NA 神経細胞は、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患で変性脱落するが、NA はマイクログリアの活性化を抑制するため、NA の減少がマイクログリアの活性化を引き起こし、神経細胞変性を一層悪化させる可能性が提唱されている。今回我々は、マイクログリア活性化抑制によるノルアドレナリンの神経細胞保護効果を主に培養系を用いて検討した。定量的リアルタイム RT-PCR により、一次培養ラットマイクログリアには、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$ の各アドレナリン受容体 mRNA が発現していることを明らかにした。LPS 添加時のマイクログリアに、NA および $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ の各アドレナリン受容体アゴニスト (フェニレフリン Phe・クロニジン Clo・ドブタミン Dob・テルブタミン Ter) を添加したところ、NA, Phe, Dob, Ter が、濃度依存的に NO 産生を抑制した。このように、 $\alpha 1$ 受容体アゴニストにも顕著な効果が見られた。Dob の効果は、 $\beta 2$ 受容体を介したものと考えている。また、神経細胞—マイクログリア共培養系に LPS を添加すると、神経細胞死が誘発されたが、この神経細胞死もこれらのアゴニストにより抑制された。以上の結果に基づき、6-hydroxydopamine (6-OHDA) の線条体内注入

により作成するラットパーキンソン病モデルに対し、血液脳関門通過性のアドレナリンアゴニストが治療効果を発揮しうるのかどうか検討を進めている。

24. 脳梗塞巣核心部のマクロファージと周辺部のグリア細胞との相互作用

三瀬綾乃, 西岡龍太郎, 杉本香奈, 高橋寿明, 矢野元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学分野)

本研究では、中大脳動脈を90分間一過性に閉塞することで脳梗塞病態を作り出すラットモデルを用いて、虚血病巣核心部(虚血コア)とその周辺部(ペナンプラ)でのグリア細胞およびマクロファージの反応を解析した。脳梗塞巣核心部には、虚血傷害発生前に脳実質に浸潤してきた単球に由来するマクロファージが多数集積している。これらのマクロファージは多種多様な生理活性物質を産生するが、IGF-1やHGF等の神経保護的ペプチドの産生レベルが高いことが分かっている。今回我々は、マクロファージに由来と思われるTGFβ1、およびIL-18の産生レベルが虚血コアで非常に高いことを見いだした。一方、ペナンプラでは内在性マイクログリアが活性化して存在する。特に、虚血コアにごく近い領域(~100μm)では、マイクログリアがNG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)を産生していた。更に、これらのマイクログリアは貪食細胞マーカーであるCD68やアポトーシス神経細胞を認識する受容体であるTREM2を産生し、実際にNeuN陽性の神経細胞片を細胞内に取り込んでいた。ラット一次培養マイクログリアに対し、TGFβ1を作用させると、NG2の産生が誘導された。一方、IL-18はマイクログリア、アストロサイト、NG2グリアを含む混合グリア細胞培養に対して、反応性アストロサイトのマーカーであるネスチンの産生を誘導したほか、インターフェロンαなどの産生を増強させた。これらの結果は、梗塞巣核心部から放出される生理活性物質の濃度勾配がこのような様々なグリアの反応を引き起こし、脳梗塞後の病態を修飾していることを示唆している。

25. グリオーマ細胞の腫瘍血管新生におよぼすOct-3/4の関与

岩田真治, 高橋寿明, 河邊有哉, 杉本香奈, 矢野元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

【背景】幹細胞性の維持に必須の転写因子であるOct-3/4が膠芽腫を含む各種固形腫瘍においてその産生上昇が確認されているものの、腫瘍形成・増大過程における役割については未だ不明な点が多い。そこで、今回我々は膠芽腫の腫瘍形成過程におけるOct-3/4の関与について検討した。

【方法】ヒト膠芽腫細胞株(U251)にOct-3/4遺伝子を過剰発現させた細胞株(U251/EGFP-Oct-3/4)を樹立し、同細胞とコントロール細胞(U251/EGFP)を用いて膠芽腫マウス皮下移植モデルを作成した。腫瘍内の新生血管の状況は免疫組織学的に検討し、血管新生因子の産生についてはreal time-PCRを用いて評価した。さらに、ELISA法を用いて両細胞群の培養上清に含まれるVEGFの産生評価を行うと共に、ラット腹部大動脈3次元コラーゲン培養法により血管新生能の評価も併せて行った。【結果および考察】U251/Oct-3/4由来の腫瘍は移植8週間後の時点で、コントロール細胞に比べて約10倍の体積を持つ腫瘍を形成したにもかかわらず、壊死の割合は約20%であった。この壊死領域の低さは腫瘍内に形成された新生血管の数に依存していた。Oct-3/4発現細胞ではコントロール細胞に比べVEGF mRNAの産生および培養上清中のVEGF分泌が亢進し、*in vitro*での高い血管新生誘導能も有していた。以上の結果よりOct-3/4は血管新生を積極的に誘導することで、膠芽腫の腫瘍増大に関与している可能性が示唆された。現在、Oct-3/4による詳細なVEGF産生誘導機序に関しては、現在検討中である。

26. 動脈硬化初期の単球-血管内皮間相互作用におけるメカノセンサー(TRPV2)の役割

橋本謙¹, 氏原嘉洋¹, 片野坂友紀², 毛利聡¹ (川崎医科大学・生理学1, ²岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・システム生理学)

動脈硬化初期では単球の内皮下浸潤が重要であると考えられている。浸潤現象は、内皮細胞間隙の接着分子の種類や産生量などの主として“化学的”な観点から解釈されることが多い。しかし、実際の浸潤では両細胞の接触部における微細な膜の変形・伸展といった“物理的・機械的”な解釈が必須であり、機械刺激を感知し、適切な細胞反応を導く制御系の存在が想定される。我々は、既報の機械刺激感受性分子(メカノセンサー)のうち、Ca²⁺の流入経路としても機能するTRPV2に着目し、内皮細胞における役割を検討した。培養内皮細胞において、siRNAによりTRPV2産生をmRNAレベルで16%、蛋白レベルで34%までノックダウン(以下KD)することに成功した。TRPV2-KD細胞では細胞の動き(移動速度)が有意に阻害されていた。また、細胞層に形成した傷に対する遊走・回復が障害されており、動脈硬化等において形成され得る内皮層の傷に対する回復障害が示唆された。画像解析の結果、細胞形状はより円形に近くなっており、葉状・糸状仮足等の形成阻害が考えられた。基質との接着部ではtalins, vinculinがより強く染色されることから、適切に仮足を伸ばさず、基質に接

着していることが示唆された。また、コントロールの細胞層に傷を形成して遊走を促すと TRPV2 mRNA 発現が有意に上昇した。以上より、TRPV2 は内皮細胞が仮足を形成して動く、という生存に必須の応答に必要であると考えられた。また、細胞外 Ca^{2+} をキレートすると類似の表現型を示すことから、TRPV2 を介して流入する Ca^{2+} が重要であると考えられた。現在、本現象の分子機序を明らかにする為、TRPV2 及び Ca^{2+} の作用対象として細胞骨格系 (RhoA, Rac1, Cdc42, Arp2, ERM など)、及び細胞周期・増殖系に着目して解析を進めており、次の段階として単球浸潤との関連を検討していく予定である。

27. 低温保存時における赤血球の酸化傷害と紅参由来サポニン分画の抗酸化効果

河野佑典¹、河野広貴¹、和泉 遼¹、鈴木洋司¹、大久保信孝¹、青戸 守¹、寒川慶一²、満田憲昭¹ (¹愛媛大学大学院医学系研究科生理学、²愛媛大学大学院医学系研究科機能組織学)

輸血用の赤血球は保存に伴い、赤血球は有棘化し、血液流動挙動特性も低下する。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に酸化傷害を起こす。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 保存液と紅参由来サポニンまたはサポニン分画を加え 4℃ にて 1 週間保存し、赤血球膜の酸化度、血液レオロジー機能に関して測定した。

保存 1 週間後の血液において、保存前と比較すると赤血球膜の過酸化脂質は増加し、膜タンパク質のチオール残基量は低下した。また、血液粘度は増加し、赤血球変形能は低下した。一方、保存時にサポニン (0.05mg/mL) を入れた血液では粘度の増加と変形能低下が抑えられ、膜タンパク質のチオール残基の減少も抑制された。一方で、膜過酸化脂質量の変化について抑制効果は認められなかった。サポニン中の有効な成分を同定する目的で分画成分 (各 0.01 mg/mL) を保存時に加えてみた所、Ginsenoside-Rg2 および Rh1 が 1 週間血液保存による膜タンパク質チオール残基の減少を抑制したと同時に赤血球変形能の低下も抑制した。タンパク質電気泳動法のクマジー染色法において血液保存による膜タンパク質の変化はなかったが、膜タンパクのチオール基をピオチン化して Affinity blotting をすると Band-3 において保存によりチオール基が減少した。一方で Ginsenoside-Rg2 と Rh1 はチオール基の減少を抑制した。

コレステロール骨格を有した種々のサポニン分画中でアルコール基を 3 つ持つトリオール系ジシノサイドの Rg2 および Rh1 が Band-3 を始めとする膜タンパク質の酸化傷害を抑制することでレオロジー機能障害を抑えることが明らかになった。

28. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) 発現の p44/p42 MAPK-p90RSK シグナル経路による制御

神鳥和代、山口文徳、董 有毅、ホセイン モハメドアラム、平田祐子、徳田雅明 (香川大学医学部細胞情報生理学講座)

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) は多くの組織で発現しているが、癌組織や株化癌細胞では発現が低下している癌抑制タンパク質である。TXNIP の発現制御機構を分子レベルで解析することが、細胞の癌化機構の解明、および新たな癌治療法の開発につながると期待される。われわれはこれまでに、希少糖の一種である単糖 D-アロースが、TXNIP の発現を誘導することにより癌細胞の細胞周期を G1/S チェックポイントにおいて停止させることを明らかにした。最近の研究から、株化肝癌細胞 HuH-7 における TXNIP の発現制御に関するシグナル伝達経路が明らかになってきたので報告する。

D-アロースの添加後、p44/p42 MAPK のリン酸化レベルは速やかに、かつ一時的に増加した。さらに p44/p42 MAPK のターゲットである p90RSK のリン酸化レベルも一時的に増加した。その後 TXNIP の発現は、D-アロースの添加 2 時間後から増加し、この増加は持続的であった。これらの結果は、D-アロースにより活性化された p44/p42 MAPK-p90RSK シグナル伝達経路が TXNIP の発現上昇に関与していることを示唆している。

さらに TXNIP が減少するメカニズムについて検討した。D-アロースの添加により TXNIP 発現を増加させ、その後 10% 牛胎児血清により刺激すると、TXNIP は速やかに減少した。この過程で p44/p42 MAPK および p90RSK のリン酸化レベルが亢進した。この結果は、p44/p42 MAPK-p90RSK シグナル伝達経路が TXNIP の発現減少にも関与していることを示唆している。

これらの結果は、p44/p42 MAPK-p90RSK シグナル伝達経路が TXNIP の発現増加と減少の両方に関与している可能性を示唆している。今後さらに詳細なシグナル伝達経路の解明を続け、TXNIP の発現制御を介した細胞の癌化機構を明らかにするとともに、これまでにない新しい癌治療戦略の開発へとつなげたい。