

1. eGFP ペプチドを用いた悪性脳腫瘍に対する新規治療法の開発

Development of the novel treatment to the malignant brain tumor using eGFP peptide

赤田しおり, 道上宏之, 山口晃正, 大守伊織, 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研究室)

近年, 様々な生理活性を有するペプチドが発見され, 実験的薬剤から臨床薬剤に至るまで広く用いられている. 特に, 我々の研究室では, 悪性腫瘍特異的に増殖抑制効果を有する抗癌ペプチドのスクリーニングとその効果の評価を行い, さらにその抗癌機序を解明する研究を行っている. それらの研究の中では, Cell Penetrating Peptide (CPP, poly-arginine domain, 11R 細胞膜通過ペプチド) を用いたタンパク質セラピー法を応用している. 通常, 抗腫瘍効果を持つペプチドスクリーニングにおいては, 癌抑制たんぱく質などのフラグメントペプチドを使用する. 本研究では, 逆に抗腫瘍効果を有さないタンパク (eGFP, 緑色蛍光タンパク質) をテンプレートとし, そのタンパク質に存在する様々なフラグメントペプチドに細胞膜通過ペプチド (11R) を結合させ, 悪性脳腫瘍細胞へ導入し, 抗癌作用を有する抗癌ペプチドスクリーニングし, 最も強力な抗癌ペプチドを同定した. 細胞の増殖や細胞死には影響を与えないと言われていた eGFP タンパク質の中に, 悪性腫瘍細胞の細胞死をもたらす細胞死誘導フラグメントペプチド配列 (eGFP 38-11R, eGFP52-11R) を発見した. 本学会にてさらに, これらのペプチドの腫瘍抑制効果について詳細な検討を加え, 報告する.

2. S100 蛋白質による Helix Repeat 蛋白質の機能制御—β カテニンを介した癌細胞増殖の調節機構—

山口文徳, 平田裕子, ホセインアクラム, 神鳥和代, 董有毅, 徳田雅明 (香川大学医学部細胞情報生理学講座)

S100 蛋白質はカルシウムイオン結合部位である helix-loop-helix (“EF-hand type”) 構造を持つ低分子量の蛋白であり, ヒトでは 25 種類以上の S100 蛋白質が存在し異なった Target や生理機能をもつことが知られている. 我々は S100 蛋白質の新たな Target として, Helix Repeat 蛋白質ファミリーに注目し研究をおこなっている. このファミリーは, Helix 構造を構成するアミノ酸の反復配列を含む一群の蛋白質よりなり, HEAT, Armadillo, TPR (Tetratricopeptide repeat), Ankyrin Repeat ファミリーなどが含まれる. 我々はこれまでに S100 蛋白質が TPR をもつ Protein Phosphatase 5 の活性を調節することを報告した.

今回, S100 蛋白質による Armadillo Repeat をもつ β カ

テニンの機能調節について報告する. β カテニンは細胞内で Destruction complex (複合体) を形成し, その蛋白量が調節されているが, 大腸癌などでは遺伝子異常によりその蛋白量が増加し, 細胞増殖に関与する遺伝子群の発現が促進され, 異常な細胞増殖をおこしている. 我々は, S100 蛋白質の中で S100A2, S100A6 が β カテニンに結合し, さらに β カテニンと転写促進因子である BCL9 の結合を阻害することを見出した. 培養系癌細胞を用いた実験では, S100A6 は β カテニンによる細胞増殖に関与する遺伝子の転写活性を阻害し, また細胞増殖抑制作用をもつことがわかった. 現在, そのメカニズムの詳細について検討している.

3. D-allose により発現される癌抑制遺伝子産物 TXNIP の調節機構

久岡雅弘¹, 神鳥和代², 董有毅², アクラムホセイン², 平田裕子², 片木絢子², 野口知里², 山口文徳², 張影³, 加治屋勝子³, 岸博子³, 小林誠³, 徳田雅明^{2,4} (¹山口大学医学部医学科 4 年次学生, ²香川大学医学部形態・機能医学講座細胞情報生理学, ³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, ⁴香川大学希少糖研究センター)

希少糖・D-allose は, ヒト肝細胞癌株化細胞である HuH7 細胞をはじめ各種癌細胞において, がん抑制遺伝子産物・TXNIP (Thioredoxin interacting protein) を強く誘導する. TXNIP は, 細胞周期を G1/S 期で抑制する作用が知られているが, D-allose による TXNIP 発現誘導とその後の調節機構はまだ不明瞭である. TXNIP の癌細胞内での量や活性を高く保つことは, 抑制活性を高めることにおいて有効であり, その因子を in vitro の系で検討した結果, D-allose の濃度の他, D-glucose の濃度, 血清濃度, TXNIP のリン酸化, 分子内の Arrestin ドメインなどが重要であることが判ってきた.

本研究ではこれらのうち, 培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 中の D-allose 濃度を中心に, 細胞の増殖促進に関係する D-glucose 濃度および血清 (FCS/Fetal calf serum) 濃度に着目し, それらの因子を変化させた場合 HuH7 において TXNIP の発現や分解にどのような影響があるかを検討した.

培地中の D-allose と D-glucose の濃度に着目した実験においては, 20mM D-allose 添加時の TXNIP mRNA の発現量は 5.5mM D-glucose 条件下と比較して 20mM D-glucose 条件下では約 40% 低下した. D-glucose との構造上の類似性から D-allose は Glucose transporter (GLUT) を介して細胞内に取り込まれると考えられている. 20mM D-glucose

条件下での TXNIP mRNA 発現の低下は、D-glucose との GLUT の競合で D-allose の取り込みが抑制されたためと考察した。本結果はこれまでの D-allose の細胞内への取り込み経路に関する研究と TXNIP 誘導能に関する研究をリンクさせるものと言える。

また、FCS は D-allose とは逆に TXNIP タンパクの分解促進と mRNA 量を低下させる作用を有することが判った。培地の D-allose と FCS の濃度に着目した実験では、FCS 無添加の場合を基準とした場合 TXNIP タンパク発現量は、培地に 20mM D-allose を添加した場合は最大で約 40% 抑制されたが、D-allose を添加しなかった場合は最大で約 70% であった。さらに TXNIP の発現抑制は培地への低濃度の FCS の添加でもたらされることが明らかになった。TXNIP の発現系と分解系のさらなる解析が今後の課題である。

4. ペプチドを応用した新規皮膚導入法の開発とチロシナーゼ抑制美白ペプチドのスクリーニング

The development of percutaneous drug delivery system and screening of the whitening peptide

大久保奈々子, 道上宏之, 澄田憲祐, 鎌村真帆, 大守伊織, 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)

経皮的なドラッグデリバリーシステム (pDDS) の発展は、臨床皮膚薬剤から化粧品や発毛剤に至るまで、多くのニーズを有している。その中で皮膚導入の最大の課題は、表皮角質層バリアの克服であるが、極性・分子量に依存しない経皮的導入法はまだ確立されていない。我々の研究室では、塩基性アミノ酸のアルギニンを 11 個連ねた細胞膜通過ペプチド 11R をタンパク質・ペプチド・低分子化合物等と結合し細胞機能を制御することに成功している。また、この細胞膜通過ペプチドを応用し、GFP のような 27kDa を超える水溶性タンパク質の経皮的導入に成功している。

今回我々は、ポリアルギニンを用いた皮膚導入システムの確立とメラニン合成阻害効果を有するペプチドスクリーニングを検討する。メラニン合成において中心的な役割を果たすチロシナーゼを抑制するペプチドを細胞内スクリーニングにより同定し、マウス悪性黒色腫細胞 (B16A5) を用いてメラニン定量実験により、最も効果を有するペプチドを同定した。また、細胞毒性等を評価し、最も安全なペプチドを決定した。さらに、モルモット日焼けモデルにて、動物モデルにおけるメラニン合成阻害効果を検討し、より安全で効果の高い美白剤の開発を目的とした、製剤開発の研究結果を報告する。

5. 甲状腺機能亢進症モデルマウスにおける心臓のリモデリングの評価

笹江友美, 橋本 謙, 氏原嘉洋, 毛利 聡 (川崎医科大学生理学 1 教室)

【背景】心臓は液性因子や力学的負荷などにより環境に適応した機能制御を行う。甲状腺ホルモンは全身で基礎代謝の調節を司っており、心臓に対しても心拍数増加、酸素消費量増加などを起こすと共に、血管抵抗の低下によって全身の循環動態も変化させる。また、甲状腺ホルモンは他の心機能を亢進させるホルモンや薬剤と比べ Ca ハンドリングに必要な酸素消費量が少ないことが報告されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。

【目的】甲状腺機能亢進症モデルマウスを用いて心室形態を含めた心機能評価を行うとともに Ca ハンドリングに関係する分子である Na-Ca 交換輸送体 (NCX) や筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (SERCA) の発現調節を検討する。心筋細胞を収縮させた細胞質内の Ca は NCX および SERCA により、それぞれ細胞外、筋小胞体へと排出されるが、この 2 つの Ca 排出経路はエネルギー効率が異なる。甲状腺ホルモンはこれらの経路を調節してエネルギー抑制的な心機能亢進を可能にしているとの仮説を検証する。

【方法】8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに甲状腺ホルモン T3 (triiodothyronin) を 300 μ g/kg を 3 週間腹腔内投与した群を T3 投与群、同様にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 3 週間腹腔内投与した群を対照群とした。評価は①心臓超音波にて左心室の形態変化をみる② Ca ハンドリングに関係するタンパク質や mRNA の発現変化を比較検討する③単離心筋細胞に Ca 指示薬 (indo-1) をロードして、Ca トランジェントを計測し、NCX の活性や筋小胞体 Ca 貯蔵量の变化を比較した。

【結果】心臓超音波では対照群と比較し T3 投与群では左室の収縮率の低下や拡張期容積の拡大がみられた。またタンパク質や mRNA の定量では NCX, SERCA とともに差は見られなかったものの、活性を比較すると NCX は低下しており、SERCA は増加していた。

6. 単離心筋細胞への高伸張刺激時における負荷依存性

金子智之, 成瀬恵治, 入部玄太郎 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

心臓は血液ポンプとして生体内で絶えず収縮・弛緩を繰り返しているため、その構成要素である心筋細胞は常に機械的負荷下にあり、そのような環境こそが心筋細胞にとって生理的であるといえる。これまでに我々は一対のカーボンファイバーを単離心筋細胞両端に装着、保持することで細胞に伸張刺激を加え、機械負荷環境下の細胞実験を可能

にしてきたが、生理的に十分といえる範囲まで細胞を伸展させるに足る保持力を得るには至らず、改良の余地を残していた。そこで我々は 2 本のカーボンファイバーで細胞を上下両面から挟み込むことによってより強固な保持を可能にする系を作製し、その有効性を確認した。その結果、従来方法におけるマウス単離心筋伸展時の最大サルコメア長が $1.943 \pm 0.012 \mu\text{m}$ ($n=20$) であったのに対し、今回の方法では $2.195 \pm 0.029 \mu\text{m}$ ($n=20$) と、大きく改善された。伸展量が少ない過去の実験では、収縮期末長さ・張力関係は負荷非依存性に直線に近似できたが、今回の大きな伸展刺激下では顕著な後負荷依存性がみられた。筋短縮時の組織粘性抵抗のために、同様の現象が全心臓標本において観察できるが、今回その現象を単一細胞ではじめて確認することができた。さらに、時変弾性曲線を比較 (各 $n=7$) すると、弾性が最大となる時相 (T_{max}) は無伸展時には後負荷が増加するに従い有意に延長したのに対し、伸展時は後負荷に依存した変化は見られなかった。また、後負荷の高い収縮では伸展量の増大に応じて T_{max} は有意に増加するのに対して、後負荷が低い場合には伸展の影響は見られなかった。拡張期の弾性減衰時定数 (τ) は、伸展の有無に関わらず、後負荷が増加するに従い有意に延長した。これらのことは単細胞系において細胞内部の粘性抵抗だけでなく、収縮蛋白における収縮・弛緩速度依存のカルシウム親和性の変化が収縮期末長さ・張力関係や弾性曲線の負荷依存性に関与している可能性を示唆しているものと思われる。

7. 伸展刺激誘発性カルシウムスパーク増加におけるミトコンドリアの役割

貝原恵子, 成瀬恵治, 入部玄太郎 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

カルシウムスパークは、心筋において拡張期に観察される筋小胞体リアノジン受容体からの自発的・局所的なカルシウム放出現象である。我々はこれまで、単離心筋細胞に伸展刺激を加えるとカルシウムスパークが増加する事を明らかにしてきた。この現象のメカニズムとしては、伸展刺激により活性化された形質膜上の NADPH オキシダーゼ (NOX2) で産生された活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) がリアノジン受容体を刺激、活性化させることが報告されている。他の ROS の発生源としては、ミトコンドリアが電子伝達系において酸素分子を還元する際に ROS を発生させることが知られている。そこで今回我々は、伸展刺激誘発性カルシウムスパーク増加におけるミトコンドリア由来の ROS の関与の有無について検討を行った。

方法: 10~12 週令雄マウスよりランゲンドルフ還流にて心筋細胞の単離を行った。心筋細胞の両端に径 $10\mu\text{m}$ の

カーボンファイバーを装着し、ファイバー位置をコンピュータ制御のピエゾアクチュエータで動かすことにより心筋細胞に 10% の伸展刺激を加えた。カルシウムスパークの測定は蛍光性カルシウム指示薬 fluo-4 を、細胞内 ROS 産生測定には 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。

結果: 伸展刺激を加えると、カルシウムスパークは有意に増加した ($147.3 \pm 7.9\%$, $n=19$)。しかし、ミトコンドリア脱共役剤の FCCP ($5\mu\text{M}$) にてミトコンドリアの機能を阻害すると、この増加は消失した ($95.7 \pm 7.3\%$, $n=24$)。また、ROS 産生は、伸展刺激時には有意に増加したが ($108.4 \pm 2.6\%$, $n=17$)、FCCP ($5\mu\text{M}$) にて増加は消失した ($99.4 \pm 1.4\%$, $n=16$)。以上の結果より、伸展刺激によるリアノジン受容体からのカルシウムスパークの増加には、ミトコンドリア由来の ROS の関与が示唆された。

8. 心筋細胞の Slow force response における TRPC チャンネル関与の可能性

山口陽平, 金子智之, 成瀬恵治, 入部玄太郎 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

心筋に数分間の持続的な伸展刺激を加えると収縮力が徐々に増加する。この現象は、Slow force response (SFR) として知られている。SFR は、伸展刺激誘発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により起こることが知られている。このときの細胞内への Ca^{2+} 流入経路としては、伸展刺激によるアンギオテンシン III 型 (AT1) 受容体の活性化に始まり、最終的に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体や伸展感受性陽イオンチャンネルなどの活性化を介した Ca^{2+} 流入が考えられているが、未だ不明な点が多い。今回、我々はカーボンファイバー (CF) を用いた単離心筋細胞伸展装置により単一心筋細胞に対して持続的伸展刺激を加えることにより、単離心筋細胞における SFR に AT1 受容体及び TRPC チャンネルが関与しているかを検討した。

方法としては、生後 8~12 週のマウス心室筋をランゲンドルフ灌流下に酵素灌流して単離心筋細胞を得た。顕微鏡下で、心筋細胞の両端を CF にて保持し、1Hz 刺激下で細胞長を記録した。コンピュータ制御のピエゾモーターにて CF の位置を正確にコントロールすることにより、細胞に 3~10% の伸展刺激を加え、その状態を 200~300 秒間維持した。CF のたわみ量から心筋細胞の発生張力を計算し、伸展開始直後の張力と比較して張力増加率を計算した。

その結果、伸展開始直後の発生張力に対して、200~300 秒後には張力は有意に増加 ($15.7 \pm 3.7\%$, $n=16$) し、単離心筋細胞にて SFR を確認することができた。一方、SFR は AT1 受容体阻害薬である Olmesartan ($10\mu\text{M}$) ($3.5 \pm$

1.0%, n=8) 及び TRPC チャネル阻害剤である BTP-2 (10 μ M) ($1.1 \pm 2.4\%$, n=8) により有意に抑制された。

以上の結果から, SFR において伸展刺激により活性化した AT1 受容体が TRPC チャネルの活性化を起こし, 細胞内への Ca^{2+} 流入に関与していることが示唆された。

奨励賞対象演題

9. 実験的ラット脳梗塞に対する急性期運動療法の浮腫抑制効果: 副腎皮質ステロイドの関与

西岡龍太郎, 杉本香奈, 三瀬綾乃, 湖城 桂, 青野仁美, 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)

【緒言】リハビリテーション (リハビリ) は脳梗塞発症後の治療法としてその有効性が確立されている。しかし, その分子細胞レベルでの機序解明は遅れており, リハビリの科学的な進歩発展や, 実施困難例に対する代替医療開発を阻む理由となっている。今回我々は, 中大脳動脈一過性閉塞 (tMCAO) によるラットの重症脳梗塞モデルに対し, リハビリとしてトレッドミルによる運動療法を施行, その効果と機序の解明を目指した。

【方法】tMCAO の翌日, 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をその後の実験に供した。トレッドミルを用いて, 脳梗塞発症翌日 (1 day post reperfusion: 1dpr) から 3 日間歩行運動 (運動療法: $1 \cdot 2$ dpr は 4m/sec, 3dpr は 6m/sec を 10 分間ずつ) させた。4dpr にふたたび MRI 撮像し脳梗塞による浮腫の程度を脳体積の左右差により測定, 組織を採取して定量的リアルタイム RT-PCR により, mRNA 発現の変動を調べた。一部のラットは, 4dpr 以後運動させないまま 1 ヶ月間飼育し, ロータロッドによる運動能力測定を行った。3dpr の運動終了後, 採血し, 血中コルチコステロン濃度を ELISA により測定した。また, 運動療法に代えてコルチコステロン, あるいは, 運動療法施行群に対して, 抗アルドステロン薬であるスピロノラクトン, または抗グルココルチコイド薬ミフェプリストンの皮下注射を行った。ラット新生仔前脳の分散培養より開始した混合グリア細胞培養にステロイドを添加し, その効果を qPCR により検討した。

【結果】脳梗塞によって, 対照群の体積は浮腫により約 1.2 倍に増加していたが, 運動群では約 10% の有意な減少をみた。さらに, 両群を運動させないまま 26 日間飼育し, 29 dpr でロータロッドによって運動機能を検討したところ, 運動群は有意に改善していた。血中コルチコステロン濃度は運動群で約 10% 有意に増加していた。コルチコステロンが歩行運動による浮腫抑制効果を説明できるか否かを見る

ために, 非運動群にコルチコステロンを経口投与したところ, 運動群と同等の浮腫抑制効果があった。一方, 運動群にミフェプリストンまたはスピロノラクトンを皮下注射すると, 運動の浮腫抑制効果は消失した。qPCR による検討により, 運動群ではナトリウムプロトン交換輸送体 1, 7, 9 (NHE1, 7, 9), 水チャネルタンパク質であるアクアポリン 4 (AQP4), Na^+/K^+ ATPase の有意な発現減少が見られた。また, 混合グリア細胞培養にコルチコステロン, デキサメサゾン, アルドステロン, スピロノラクトン, ミフェプリストンを単独または混合投与したところ, コルチコステロン 10nM で, NHE7, 9 および AQP4, Na^+/K^+ ATPase の発現が最小になった。デキサメサゾン, アルドステロンの効果は, コルチコステロンに劣っていた。また, コルチコステロンの効果は, スピロノラクトン, ミフェプリストンそれぞれ単独では打ち消すことが出来なかった。

【考察】運動療法が脳梗塞発症後急性期の脳浮腫軽減に有意に貢献することを見いだした。重症脳梗塞ラットにとって, わずか 10 分の歩行運動でも相当のストレスであり, 血中コルチコステロンの上昇を引き起こしたものと考えられる。コルチコステロンの血中濃度上昇は, 単なる拘束ストレスなどより, 強制運動の方が効果的に誘導されることが報告されている (Hayes et al. Acta Neuropathol 2008, 115: 289-296)。コルチコステロンは, グルココルチコイドとミネラルコルチコイド両方の作用を有するが, 浮腫抑制効果は両者の相乗効果による可能性が高い。

【結論】急性期運動療法は浮腫軽減に有効である。この効果は, 血中コルチコステロンの上昇によるグルココルチコイドおよびミネラルコルチコイド作用双方の相乗効果が, グリア細胞のナトリウムチャネル, 水チャネルの発現を抑制することでもたらされると考えられた。本研究より, 運動療法実施困難例に対して, コルチコステロン投与でその効果を部分的に代替できる可能性が示唆された。

奨励賞対象演題

10. TRPM4 チャネル阻害薬 9-Phenanthrol はラット心臓を虚血再灌流障害から保護する

朴 虎林^{1,3}, 王 静², 高橋 賢³, 成瀬恵治³ (1 吉林大学第二病院心臓外科, 2 大連医科大学第二病院心臓病学, 3 岡山大学大学院医歯薬総合研究科システム生理学)

虚血性心疾患は世界人口の死因の第一位であるにもかかわらず, 有効な治療方法はいまだに確立されていない。Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4 (TRPM4) チャネルは循環器系の組織に発現して種々の疾患に関与している。本研究はこのチャネルの選

拮抗阻害薬 9-phenanthrol (9-Phe) の虚血再灌流障害抑制効果、すなわち心臓保護作用を明らかにすることを目的とする。SD ラットの摘出心臓に虚血再灌流処置を行ったところ、対照群は心筋梗塞の進行および心収縮能の低下が顕著であったのに対し、9-Phe 投与群ではこれらの指標の劇的な改善が認められた。心電図の記録により 9-Phe の心臓保護作用は不整脈の抑制によることが示唆された。麻酔下のラットの冠動脈左前下行枝結紮により心筋梗塞を誘発する *in vivo* 実験では、9-Phe 投与により致死率の改善が見られた。さらに心筋細胞培養株 H9c2 を虚血再灌流の模擬環境に暴露したところ、対照群の細胞活性は著しい低下を示したのに対し、9-Phe 投与群の細胞活性は有意に高く維持されていた。これらの結果から、TRPM4 阻害薬 9-Phe はラットにおいて虚血再灌流後の心筋梗塞の進行を抑制することが示され、かつその作用は心筋細胞に対する直接作用であることが示唆された。

奨励賞対象演題

11. 生後動物における生理学的に同定した脳部位への遺伝子導入法

川崎一葉¹、大村菜美²、佐藤武正¹、畠 義郎^{1,2} (鳥取大学医学部生命科学科神経生物学分野,²鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体高次機能学部門)

エレクトロポレーションは身体の様々な臓器への遺伝子導入技術として広く使われている。この方法は、遺伝子発現が早い、導入する遺伝子サイズが制限されない、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入と比較して安全、という多くの利点を持っている。しかしながら、生後の動物の中樞神経系におけるエレクトロポレーションによる遺伝子導入のターゲットは、これまでのところ、海馬、皮質、脳室に面した部位に限定されている。視床のような脳の深部にある構造をターゲットとするエレクトロポレーションは未だ報告されていない。我々は、生理学的に位置を同定した脳の深部領域への遺伝子導入を可能にする新しいエレクトロポレーションの技術を紹介する。

生後の発達期以降のマウスを用いて、CAG プロモーター下で GFP を発現する DNA プラスミドを充填したガラス管電極を、視床外側膝状体 (LGN) に刺入した。ガラス管電極より神経活動を記録し、視覚反応の観察によって LGN の位置を確認した後、記録した部位にプラスミド溶液を圧注入し、記録に用いたガラス管電極を通して電圧パルスを与えてエレクトロポレーションを行った。

数日後に脳を固定標本として観察したところ、視床でいくつかの細胞体や樹状突起に GFP の発現が認められた。数

週間後には、皮質で視床からの投射軸索が標識されていた。電圧パルスのパラメータ、プラスミド溶液の濃度、生存期間を比較し、エレクトロポレーションの最適パラメータを検討した。さらに、薬剤を使つての核への輸送効率の改善、部位特異的組換え反応を利用した発現効率の改善についても検討した。

この方法は、生理学的に確認した脳領域の中の少数の細胞に、様々な遺伝子導入をするために有益である。今回の実験では生後 60 日齢以上のマウスでも GFP 発現が認められたことから、成熟脳への遺伝子導入法としても有望である。加えて、この技術はげっ歯類だけでなく、ネコにも適用できることを確認しており、様々な動物種に応用できると考えられる。

奨励賞対象演題

12. T 管膜構造維持における Na⁺/Ca²⁺交換体の役割

氏原嘉洋^{1,2}、岩崎慶一朗²、高津理美^{2,3}、西辻光希^{2,3}、橋本 謙¹、成瀬恵治²、毛利 聡^{1,2}、片野坂友紀^{2,3} (川崎医科大学生理学 1,²岡山大学医歯薬学総合研究科シテム生理,³NEXT program)

心筋細胞の T 管膜は、筋収縮に利用するための効率的な筋小胞体からの Ca²⁺ リリースを可能とするための特殊構造であり、電位依存性 Ca²⁺ チャネル (LTCC) や Na⁺/Ca²⁺ 交換体 (NCX1) が集積している。重篤な不全心筋細胞では、T 管膜構造が部分的に崩壊するために、筋小胞体からの Ca²⁺ リリースの単一細胞内での同調性が失われることが知られている。これは、収縮力低下の原因となることが知られているが、現在までに T 管膜構造の崩壊がどのようなメカニズムで生じるかについては不明である。我々は、T 管膜構造の維持機構を明らかにするために、マウスの大動脈を結紮して心不全を誘導し、心機能、T 管膜構造、興奮収縮連関効率および細胞内 Ca²⁺ ハンドリング能を 16 週間にわたって経時的に測定した。この過程で、不全心筋では、T 管膜構造崩壊を招く前段階で NCX1 活性が極端に低下するフェーズがあることを発見した。我々は、これまでに、薬物投与により心筋細胞特異的に T 管膜分子である NCX1 の発現を亢進することが可能なトランスジェニックマウスを作製している。このマウスの大動脈を結紮して心不全を誘導した後に、NCX1 活性低下を回避するように NCX1 分子の発現を亢進させることによって、NCX1 活性を常に正常マウスレベルで維持する操作を施したところ、T 管膜構造を長期にわたって維持することができた。このマウスの心筋細胞の構造と機能は一定レベルに維持されたままで、重篤な心不全への進行は見られなかった。以上の

結果は、NCX1 活性は T 管膜構造の維持に必須であること、心不全病態では低下した NCX1 活性の改善が有効に働くことを示している。

奨励賞対象演題

13. 光学的膜電位測定法を用いたラット感覚運動野における後肢興奮波伝播パターンに対する前肢同時刺激の影響の解析

河合美菜子, 濱 德行, 伊藤眞一, 廣田秋彦 (島根大学医学部神経筋生理学講座)

我々の研究室では、ラット大脳皮質の神経活動を記録する多領域光学的膜電位測定法を確立し、時間分解能 1msec で単一掃引により定量解析が可能な良質のシグナルを数百ヶ所から同時に得ることが可能となった。この手法を用いて、四肢の電気刺激に対する誘発応答の伝播パターンを記録した結果、興奮波は体性感覚地図上の対応する領域から始まり、体性感覚野を広範囲に渡って伝播していくことが判明し、既に報告した。今回は、後肢の興奮波伝播パターンおよびシグナル形状に前肢を同時刺激することでどのような変化が見られるのかについて解析した。ラットは、ウレタン・ α -クロラロス混合薬で麻酔後、体性感覚野を露出させ、電位感受性色素 (RH-414) で染色した。刺激は前後肢共に 1mA, 0.5msec を適用した。両肢を同時刺激した時、それぞれの興奮波は体性感覚野内を伝播していったが、互いの興奮波が衝突した所 (collision line) から先には広がらないようであった。そこで、後肢刺激による興奮波の起始部から collision line までの領域に着目し、この領域内の後肢刺激による応答シグナルの波形 (振幅のピーク, 立ち上がり速度, 半値幅) を、前肢を同時刺激した場合としない場合と比較した。その結果、シグナルの半値幅にのみ違いが見られ、前肢の同時刺激によって有意に短くなっていた。これより、後肢興奮波伝播に対し、前肢の同時刺激は応答波形を変化させるが、伝播パターンには影響を与えないことが示唆された。

14. 摂食関連ペプチドの嚥下反射におよぼす作用

水谷諭史, 小橋 基, 藤田雅子, 美藤純弘, 松尾龍二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生理学分野)

空腹時や満腹時には血中あるいは脳内に摂食を調節するペプチドが分泌される。嚥下は摂食の初期過程であるが、摂食関連ペプチドが嚥下にどのような作用をおよぼすのかはあまり明らかになっていない。そこで、我々はウレタン・クロラロス麻酔下のラットを用い、摂食に関して相反する作用をもつオレキシンと Glucagon-like peptide-1 (GLP-

1) の嚥下反射におよぼす作用を調べたので報告する。

オレキシンは視床下部外側野で合成される摂食亢進作用をもつペプチドで、脳の広範な部位に投射していることが知られている。オレキシン-A の第四脳室内滴下投与により嚥下反射が抑制された。さらに、背側迷走神経複合核群中へのオレキシン-A 微量注入により、この抑制に関与する脳部位の同定を行った。最後野や孤束核交連部を含む部位へのオレキシン-A 微量注入により、嚥下反射が抑制された。これらの結果よりオレキシン-A は最後野あるいは孤束核交連部のニューロンを介して嚥下反射を抑制することが示唆された。

GLP-1 は腸管 L 細胞で分泌され、インスリン分泌を促進すると共に摂食抑制作用をもち、最後野や孤束核に受容体があることが知られている。最後野や孤束核交連部を含む部位への GLP-1 微量注入により嚥下反射が抑制された。この結果より GLP-1 はオレキシンと同部位のニューロンを介して嚥下反射を抑制することが示唆された。

15. ストループ認知課題と前頭前野酸素化ヘモグロビン動態：高齢者と若年者の比較

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

認知課題の Stroop color word test (SCWT) は、若年者において、前頭前野の酸素化ヘモグロビン濃度 (Oxy-Hb) を増加させる (Endo et al. J Physiol Sci 2013)。SCWT は画面上に表示される色名単語の“カラー”を答えさせる課題であり、100 問の回答の所要時間および誤答数から認知機能を評価する。今回、加齢が認知機能に関わる脳活動に及ぼす影響を調べるため、高齢者 (62 \pm 1 歳, 4 名) に対して SCWT を実施した。脳活動を反映する指標として、近赤外線分光法を用いて前頭前野 Oxy-Hb を測定した。これらのデータを若年者 7 名 (23 \pm 1 歳) の結果と比較した。SCWT の所要時間は、若年者 (69 \pm 5 秒) よりも高齢者において増加した (87 \pm 6 秒)。誤答数は、若年者と高齢者で有意差がなかった (若年者 4 \pm 1, 高齢者 3 \pm 2)。SCWT は高齢者において、若年者と同様に、Oxy-Hb を増加させた。しかし、この SCWT に対する Oxy-Hb の変化量 (Δ Oxy-Hb) を SCWT 開始前ベースラインからの差分として求めると、右前頭前野の Δ Oxy-Hb は若年者の約 60% に減弱した (高齢者 1.22 \pm 0.76 μ M, 若年者 2.06 \pm 0.63 μ M)。また、 Δ Oxy-Hb の時間経過を比較すると、高齢者では若年者よりも SCWT に対する Oxy-Hb 増加は緩やかであった。 Δ Oxy-Hb は、若年者において左右前頭前野で同程度であったが、高齢者では右側よりも左側 (0.48 \pm 0.09 μ M) で

特に大きく減弱した。以上の結果は、加齢に伴う SCWT 認知機能の低下には、SCWT に対する前頭前野、特に左前頭前野の脳活動減少が影響することを示唆する。

16. 妊娠期母親マウスの摂餌制限が仔マウスの睡眠調節機構に与える影響

清水紀之¹、近久幸子¹、志内哲也¹、北岡和義²、勢井宏義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)

現在、日本では低出生体重児は増加の一途をたどっている。妊娠期での栄養不良は低出生体重を招き、将来、2 型糖尿病や高血圧などの代謝性疾患のリスクを増大させることが報告されている。一方、睡眠を含む高次脳機能への影響に関しては未だ明らかとされていない。本研究は、妊娠期における摂餌制限が、成熟した仔マウスの睡眠調節に与える影響を調べることを目的とした。

妊娠後期(妊娠成立後 12 日目から出産するまで)に限定した摂餌制限を行い、母親マウスから生まれた雄仔マウスが成熟した段階(8.9 週齢)での睡眠を調べた。摂餌制限の割合は、妊娠期での摂餌量の 50% に設定した。その結果、妊娠後期に摂餌制限を施行した母親マウスから生まれた仔マウスは、睡眠深度の指標と考えられているノンレム睡眠期での脳波徐波成分の有意な上昇、暗期での活動量の低下を示すことが明らかとなった。また睡眠中での振動や光刺激に対する覚醒への潜時、6 時間の断眠による脳波徐波成分のリバウンドが、摂餌制限を行った母親マウスから生まれた仔マウスで増大した。覚醒・睡眠量およびそれらの持続時間や出現回数には有意な差がみられなかった。以上の結果から、妊娠期における摂餌制限は、仔マウスの成熟後の睡眠ホメオスタシスに影響を及ぼす可能性が明らかとなった。

17. 妊娠中の高脂肪食が仔マウスの脳機能に与える影響

四宮 圭¹、西 結奈^{1,2}、清水紀之¹、近久幸子¹、志内哲也¹、勢井宏義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)

妊娠中の母親の栄養状態は、胎児の代謝や脳機能に重大な影響を及ぼすことが知られている。妊娠期の摂餌制限が仔マウスの代謝性疾患のリスクを増大させる一方で、妊娠期の高脂肪食摂取は子供の不安やうつなどの精神・行動障害のリスクを増大させることも報告されている。しかしながら、母親の栄養状態について妊娠期や授乳期といった期

間限定的に調べた報告や、これらのメカニズムについてはわかっていない。そこで本実験では、妊娠期および授乳期に母親マウスへ高脂肪食を与えたとき、仔マウスの情動行動、睡眠などの高次脳機能にどのような影響が出るかについて検討した。ICR マウスを用い、高脂肪食を妊娠 12 日目から出産時まで与えたマウス(HC 群)、出産時から仔マウスが離乳するまで 3 週間高脂肪食を与えたマウス(CH 群)、コントロール食を与えたコントロールマウス(CC 群)を用意し、それらの雄仔マウスを用いて 8~9 週齢で各種行動実験を行った。その結果、妊娠期(HC 群)・授乳期(CH 群)に限定した母親マウスの高脂肪食が仔マウスの成熟期における不安様行動を増大させた。また、HC 群の仔マウスでは、運動学習機能を評価する Rota-rod test で落下するまでの時間が有意に長くなっていった。さらに、CH 群の仔マウスでは明期に睡眠が深くなる傾向にあった。これらのことから、母親の妊娠期および授乳期における高脂肪食は、仔マウスの情動行動、運動学習機能、睡眠などの脳機能に影響を与えることが示唆された。

18. 医学生の口腔内カプサイシン閾値と辛味嗜好性

村田芳博¹、村田紘子^{1,2}、椛 秀人¹、奥谷文乃¹ (高知大学医学部生理学講座(統合生理),²高知大学医学部医学科)

アジアの国々では辛味が食文化へ積極的に取り入れられ、これらの国で生まれ育った人々の辛味に対する嗜好性は高いと考えられる。一方日本人は、幼少期からの辛味経験が比較的少ないが、食文化のグローバル化に伴い、辛い食品への関心は高くなっている。本研究では、辛味に対する感受性と嗜好性の関係を明らかにするため、高知大学医学部医学科 2 年生 111 名(男性 70 名、女性 41 名)を対象に、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンに対する口腔内閾値を測定し、辛い食品・調味料に対する嗜好性についてアンケート調査を行った。濾紙ディスク法により、舌前方、舌後方、軟口蓋および頬粘膜のカプサイシン閾値を測定した結果、舌前方において、カプサイシンに対する閾値が低い群と高い群が存在した。また、舌前方のカプサイシンに対する閾値が低い群は、高い群に比べて辛い食品を嫌い、辛い食品に好ましくないイメージを持つ傾向がみられた。本研究は高知大学医学部倫理委員会の承認を受け、被験者に対して研究目的を十分に説明し同意を得た上で実施した。

19. 赤芽球の脱核におけるトランスフェリン-トランスフェリン受容体 1 シグナルの役割

満田憲昭、恩地裕史、河野竜馬、青戸 守(愛媛大学大

学院医学系研究科循環生理学講座)

哺乳類の赤芽球は、分化の最終段階において核を細胞外へと放出し網状赤血球となる。この「脱核」と呼ばれる現象の分子機構については、依然として不明な点が多い。

血漿タンパク質トランスフェリン (Tf) は、血液中における 3 価の鉄イオンの輸送を担っている。また、トランスフェリン受容体 1 (TfR1) は、赤芽球の成熟につれて発現量が増加することが知られている。

我々は、脱血により髄外造血を誘導したマウスの脾細胞由来成熟赤芽球や、マウス 14.5 日胚の肝臓由来未成熟赤芽球を用いた *in vitro* 脱核系により、赤芽球の脱核における Tf の役割を解析した。その結果、鉄結合型 Tf (holo-Tf) の添加によって赤芽球の脱核が促進されること、また holo-Tf のみならず非鉄結合型 Tf (apo-Tf) の添加によっても脱核が促進されることが分かった。また、TfR1 に対するモノクローナル抗体の添加や TfR1 のノックダウンによって脱核が阻害された。同時に、holo-Tf はヘモグロビンの合成を促進したが、apo-Tf は促進しなかったことから、Tf による脱核の促進は鉄イオンの取り込みとは独立した機能であると考えられた。

以上より、Tf-TfR1 シグナルはマウス赤芽球の脱核に重要であり、その機序は鉄イオンの取り込みとは独立していると考えられた。

20. 神経幹細胞の分化における多価不飽和脂肪酸受容体、GPR40 の役割

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

脳内特に海馬における神経新生の促進は、精神神経疾患の治療に有効であることが報告されている。我々は、これまで ω -3 多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) またはエイコサペンタエン酸 (EPA) の精神神経疾患の予防・改善効果には海馬での神経新生が関与しているとの仮説を立てて研究を進めており、DHA はラット海馬における神経新生を促進すること、培養神経幹細胞の bHLH 転写因子や細胞周期を調節することによりニューロンへの分化を促進することを報告した。しかしその作用機序には不明な点も多い。本研究では、多価不飽和脂肪酸の受容体である GPR40 と GPR120 の神経幹細胞における役割について検討した。

ラット胎生 14.5 日齢の前脳を採取し、線維芽細胞成長因子存在下で神経幹細胞を選択的に培養した。培養した神経幹細胞は、分散後にポリ-L-オルニチンコートしたディッシュに播種した。細胞は線維芽細胞成長因子を含まない培地に異なる濃度の DHA, GPR40 アゴニスト GW9805, GPR

40 アントゴニスト GW1100 を添加し、一定期間培養した。培養後細胞は、Tuj-1 (未成熟ニューロンマーカー)、GFAP (アストロサイト)、GPR40 の各抗体と DAPI (核) によって免疫染色した。全細胞数に対する各マーカー陽性細胞の割合を算出し、分化率とした。細胞から total RNA を回収し、逆転写後リアルタイム PCR 法にて Tuj-1, GFAP, Hes 1, γ -セクレターゼ mRNA の測定を行った。

未分化な培養神経幹細胞では GPR40 の発現はなかった。4 日間分化後の細胞では、Tuj-1, GFAP と共に GPR40 陽性細胞が認められた。二重免疫染色により、GPR40 は Tuj-1 陽性細胞だけでなく他の分化した細胞にも発現していることが示された。DHA 処置は Tuj-1 陽性細胞数、Tuj-1 mRNA を増加させたが、GFAP の発現には影響を与えなかった。GW9805 処置は、Tuj-1, GFAP 両方の陽性細胞数、mRNA の発現量を増加させた。GW1100 は、GW9805 の作用を抑制したが、DHA の作用は抑制しなかった。神経幹細胞の分化を抑制している転写因子 Hes1 mRNA および Hes 1 の上流で作用する γ -セクレターゼ mRNA 発現量は、DHA により減少したが、GW9805 による影響は認められなかった。

これらの結果から、GPR40 アゴニストは神経幹細胞のニューロン・アストロサイトのいずれの分化も促進していると考えられた。しかし、DHA によるニューロンへの分化促進機構には別の細胞内情報伝達経路が存在することが示唆された。

21. 脳虚血耐性獲得における Ryanodine Receptor の関与

中村一丸山恵美, 岡部直彦, 氷見直之, 陸 豊, 成田和彦, 宮本 修 (川崎医科大学生理学 2 教室)

あらかじめ細胞死が起こらない程度の虚血ストレスを負荷すると、次に致死的な虚血ストレスを受けた時に神経細胞死が軽減される (虚血耐性 ischemic tolerance ; IT)。一方、虚血性脳細胞障害の原因の一つとして、シナプス間での過剰なグルタミン酸放出とその後の細胞内 Ca^{2+} の上昇が指摘されている。我々は、IT の獲得機構においても Ca^{2+} 濃度の変化が関連しているとする仮説のもと、細胞内 Ca^{2+} release channel である ryanodine receptor (RyR) の関与を調べた。

スナネズミの総頸動脈閉塞モデルを用いて、海馬 CA1 領域の錐体細胞数を測定することで IPC の効果を評価した。RyR のアントゴニストである dantrolene を前投与すると IT は獲得されず、RyR のアゴニストである caffeine の前投与は耐性獲得を促進した。また、ラットの海馬神経細胞初代培養細胞に対して、oxygen-glucose deprivation (OGD) を行うことで虚血状態を再現した。この疑似虚血モ

デルにおいても *in vivo* 実験と同様に dantrolene および高濃度の ryanodine で IT 獲得が抑制された。この培養細胞の系で RyR の発現量を western blot および RT-PCR にて計測すると、IT 獲得後にいずれも減少していたが、時間経過とともに回復傾向が見られた。

以上のことから、RyR は脳の虚血耐性獲得機構において重要な役割を担っていることが示唆された。

22. シナプトタグミンによるスネア介在性膜融合の抑制と Ca^{2+} による解除

黒木健太郎, 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分野)

神経伝達物質の開口放出には、膜融合装置として働くスネアタンパク質複合体と Ca^{2+} センサーとして働くシナプス小胞タンパク質シナプトタグミンが必須である。シナプトタグミンがスネア複合体による膜融合に及ぼす影響を明らかにするために、*in vitro* リポソーム融合アッセイを行った。大腸菌で発現させた小胞膜 (v) スネアおよび標的膜 (t) スネアをそれぞれ別々に再構成したリポソーム同士を反応させたところ膜融合が観察された。膜貫通領域を欠失させた v スネア存在下では膜融合が顕著に抑制されたことから、この膜融合はスネア複合体依存性であることが確認された。シナプトタグミン細胞質フラグメント存在下で v スネアリポソームと t スネアリポソームを反応させたところ、スネア依存性膜融合が阻害された。シナプトタグミンによる膜融合の抑制は、 $CaCl_2$ の添加により回復した。以上の結果は、リポソーム膜間に形成されたスネア複合体へのシナプトタグミンの結合によりスネア介在性の膜融合が抑制されること、シナプトタグミンによる抑制は Ca^{2+} により解除されることを示唆する。シナプス小胞の Ca^{2+} 依存性開口放出において、シナプス小胞がシナプス前膜にドッキングした後、両者の間で形成されるスネア複合体にシナプトタグミンが結合し、活動電位の発生に伴い流入する Ca^{2+} により解離するまでスネア介在性の膜融合を抑制している可能性が考えられる。

23. 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

高橋寿明, 河邊有哉, 岩田真治, 細川裕貴, 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 Oct-3/4 が膠芽腫を含む各種固形腫瘍において発現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するとともに、腫瘍内部の低酸素状態は低酸素プローブを用いた検討も行った。血管新生因子の発現については 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中に含まれる VEGF の評価を行うと共に、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。Western blot や阻害剤を用い HIF1 を介したシグナルについても検討を行った。【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、壊死領域は小さかった。これは腫瘍内に形成された豊富な新生血管によるものと考えられた。Oct-3/4 発現細胞ではコントロール細胞に比べ VEGF mRNA の発現および培養上清中への 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。また Oct-3/4 発現細胞では HIF1 の分解抑制が認められ、Akt を介した効果であった。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ことが示唆された。

24. 神経分化誘導因子 ZFP521 は海馬歯状回の形成と個体の行動に関わりがある

大久保信孝¹, 赤澤里瑛¹, 土居千晃¹, 平田香穂里¹, 青戸 守¹, 鈴木洋司¹, 松原悦子², 山之内 純², 酒井郁也⁴, 松田正司³, 安川正貴², 満田憲昭¹ (¹愛媛大学大学院医学系研究科循環生理学講座, ²愛媛大学大学院医学系研究科血液・免疫・感染症内科学講座, ³愛媛大学大学院医学系研究科解剖学・発生学講座, ⁴松山大学薬学部医療薬学科病理病態学)

Zinc finger protein 521 (ZFP521) は骨芽細胞や脂肪細胞の分化、赤血球成熟など多くの組織で分化を調節する因子として知られている。神経科学分野では、エピプラスト細胞から神経外胚葉性幹細胞への分化に関与することが *in vitro* の実験で報告されている。しかし、これまでに生体を用いた実験で脳における ZFP521 の役割は明らかになっていない。そこで我々は ZFP521 欠損マウスを作製し、その脳を解析することで ZFP521 の脳における役割を明らかにすることとした。

作製した ZFP521 欠損マウスはメンデルの法則に従い生まれてきた。体重は生後すぐでは同腹仔の野生型マウスと

殆ど差がなかったが、成長に従い著しい体重の減少が見られた。また、ZFP521 欠損マウスでは異常な動きが観察された。そこでオープンフィールドテスト、高架式十字迷路テストを行った。その結果、野生型に比べ多動で、不安レベルが低下していることがわかった。次に、脳組織の観察を行った。肉眼所見では、野生型同腹仔の脳に比べ小さいものの異常は見られなかった。しかし脳切片の HE 染色標本の観察では、歯状回において顆粒細胞の減少と顆粒細胞層の構造に乱れがあることがわかった。さらに、Neural Progenitor Cell のマーカーである Sox-1 の抗体で免疫組織染色をしたところ、ZFP521 欠損マウスの海馬では Sox-1 陽性細胞が減少していることがわかった。

以上の結果から、ZFP521 は神経細胞の分化、海馬歯状回の細胞層の形成と個体の行動様式に関わりがあることがわかった。

25. ラット実験的脳梗塞巣における TGF β および IL-18 の発現とその病態生理学的意義

三瀬綾乃¹、杉本香奈¹、西岡龍太郎¹、高橋寿明¹、矢野元¹、久門良明²、大西丘倫²、田中潤也¹ (¹愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学、²同 脳神経外科学)

脳卒中は死亡率ではガン・心臓病・肺炎を下回るものの、後遺障害は重大であり、患者の苦しみに加えその社会的経済的負担は極めて大きい。脳卒中の最も頻度の高い(約 60%) 病型は脳梗塞であり、その予後改善のためには、急性期に神経細胞死が不可避的に生じる病巣核心部(コア)周辺領域(ペナンブラ)における二次的な神経細胞死を抑制することが重要である。我々はこのような視点から、右中大脳動脈一過性閉塞(MCAO; 90 分間)によるラット脳梗塞モデルを用いて、ペナンブラ領域の細胞反応の病態生理学的検討を続けてきた。ペナンブラには多くの変性しつつある神経細胞が存在するが、特にコアのすぐ健常側よりの領域に厚さ 150 μ m 程度のデマルケーションゾーン(demarcation zone; DZ)が、コアとペナンブラを分画する形

で広がっており、多くの NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)を発現する活性化マイクログリア(NG2⁺マイクログリア)が分布する。NG2⁺マイクログリアは、変性しつつある神経細胞の貪食に関与している。また、亜急性期以降には DZ のすぐ健常側よりでアストログリオシスが形成される。これらの病態生理学プロセスを誘発するシグナルが、コアに大量に集積する骨髄由来のマクロファージである BINCS (Brain Iba1⁺/NG2⁺ Cells) から発せられるものと推察した。

MCAO により作成した梗塞脳大脳皮質から、コア、DZ を含むペナンブラ、対称健常側(左側)の各組織を分離し cDNA を調製、定量的リアルタイム PCR により、さまざまな生理活性物質遺伝子の発現変化を調べた。その結果、コア領域では transforming growth factor-beta (TGF β) と interleukin-18 (IL-18) が、梗塞発症 5-7 日後に GAPDH-mRNA 比で約 20% の非常に高い発現を示すことが見いだされた。この二つのサイトカインはコアで主に BINCS によって産生され、ペナンブラに向かって拡散しペナンブラに存在する主にグリア細胞に対して作用するものと考えた。そこで、まず、TGF β 受容体を高発現するマイクログリアに TGF β を添加したところ、NG2 の発現が誘導され、アポトーシス細胞の認識と貪食に関与する TREM2 の発現上昇が確認された。また、細胞の移動能が上昇した。一方、IL-18 については、アストロサイト、マイクログリアあるいは NG2 グリア(オリゴデンドロサイト前駆細胞)に対する個々の影響は顕著ではないが、これら 3 種の細胞を含む混合グリア細胞培養に対して、IL-18 を添加すると NG2、肝細胞増殖因子 HGF、血管内皮細胞増殖因子 VEGF、血小板・内皮細胞接着分子 PECAM 等の発現上昇が誘導された。これらの結果は、コアに集積する骨髄由来細胞がペナンブラあるいは DZ 二分布する細胞の機能調節を積極的に行い、死細胞の除去と血管新生を促進することで、梗塞巣の二次的拡大を防いでいる可能性を示唆している。