

O-01. ホスホン酸誘導体によるガラス表面改質に伴う酵素担持量の変化

高橋信人¹, 渡邊一徳¹, 穂積直裕², 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学環境生命工学系, ²豊橋技術科学大学電気電子情報工学系)

神経伝達物質の時空間放出量は、神経細胞間の情報処理や神経分化、活動を知る上で重要な情報の一つである。本研究では、ガラス基板上に有機化学担持した酵素を用い、特異的な伝達物質放出測定法を開発している。これまでグルタミン酸、 γ アミノ酪酸(GABA)、ATP などの放出測定系を開発し、報告してきた。この光学測定法は、神経細胞からの伝達物質放出を、数十 msec の時間分解能、10 μ m 程度の空間分解能で観察できるものだが、アルツハイマー症やパーキンソン病などの疾患研究に対応するためには、いくつかの問題を解決して行く必要がある。

本研究で開発した GABA 放出を可視化・測定する光学デバイスは、GABA を分解する酸化還元酵素である GABA 分解酵素 (GABase) を、ガラス基板上にシラン化剤を用いて固定化している。酵素による GABA の分解と同時に生成する還元型補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を蛍光測定する。シラン化剤はガラスへの有機分子を結合する能力が高い一方、加水分解による酵素の離脱、形成した分子膜の密度や安定性などに課題があった。

そこで本研究では、シラン化剤よりも安定で、加水分解されにくい高密度な分子膜を形成できるホスホン酸を用いた酵素固定化を試みた。従来用いているシラン化剤 APTES またはホスホン酸で酵素固定化を行い、固定化方法やガラス表面の前処理(洗浄方法、水酸化処理など)が、ガラス表面に及ぼす影響、形成する分子膜の密度などを比較した。作成したデバイスを用いて小脳スライスからの GABA 放出を光学測定し、最も適した酵素固定化が行える手法を検討している。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-02. 胎生期 HDAC 阻害剤曝露による発達期小脳皮質での伝達物質放出変化と行動観察

中嶋さりい¹, 勝股大樹¹, 笹田由紀子², 上野 晋³, 関野祐子³, 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学環境生命工学系, ²産業医科大学, ³国立医薬品食品研究所)

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は遺伝子の転写制御に重要な役割を果たしている。近年、各種の HDAC を抑制する HDAC 阻害剤のうち、HDAC I 阻害剤が抗がん剤、抗てんかん薬として広く使われるようになった。一方、HDAC 阻害効果を持つ抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウ

ム (VPA) は、胎生期被曝によって出生児に自閉症が発症することが報告されている。しかし、自閉症は高次機能障害であり、動物実験で薬物スペクトルを広く実験することが難しかった。本研究では、バルプロ酸ナトリウム (VPA) などの HDAC 阻害剤を妊娠 16 日 (E16) ラットに投与し、出生仔の小脳皮質から放出される伝達物質を光学測定して、それぞれの薬が小脳発達にどのような影響を与えるかを検証してきた。その結果、VPA、スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) が、発達期小脳の伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) および ATP の放出を増強し、プルキンエ細胞の発達を促進する効果があることが分かった。さらに、発達期小脳の刺激に対する反応が大きく変化していることが示唆された。今回、小脳発達に HDAC 阻害剤が及ぼす影響を、上記の伝達物質放出の光学測定に加え、生後 10 日までの VPA 被曝ラットの行動観察を行い、VPA がラットの行動に与える影響を検証した。被曝ラットは出生後早い時期に、けいれん状の行動を示し、一方正常ラットではそのような行動は見られなかった。今後、各種の構造を持つ HDAC 阻害剤が、被曝ラットの行動や外見の変化、伝達物質放出に与える影響を観察する。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-03. 胎生期バルプロ酸投与動物由来の培養グリア細胞の発達変化

富田達朗¹, 山田ひかり¹, 笹田由紀子², 上野 晋³, 関野祐子³, 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学環境生命工学系, ²産業医科大学, ³国立医薬品食品研究所)

グリア細胞は、脳内で神経細胞の 50 倍ほど存在していると見積もられ、従来神経細胞の構造的補助や栄養因子の供給など、神経細胞を補助する働きをすると考えられてきた。近年、グリア細胞に多種多様な神経伝達物質の受容体が発現していること、受容体へのリガンド結合を経てグリア細胞自身もイオンの放出を行っているなど、神経細胞と同様の働きをしていることが報告されている。さらに神経伝達物質の放出と取り込み、さらに一部の伝達物質の合成を行うなど、発達期の脳ではグリア細胞が神経の機能を担っていることが考えられる。当研究室では、以前より発達期の小脳においてグリア細胞が GABA 合成酵素 GAD65/67 を発現し、GABA を放出していること、またベシクル性 GABA トランスポーター (VGAT) がグリア細胞の生体膜に分布していることを報告している。

本研究では、胎生期被曝によって自閉症などの行動異常が報告されている抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム (VPA) の投与動物由来の小脳培養グリア細胞の変化を観察した。胎生 16 日で VPA を投与された生後 1 日のラット

小脳を OptiCell™ 内で一ヶ月培養した。動物は VGAT-Venus 遺伝子発現ラットを用い、生きた細胞での VGAT 発現を共焦点レーザー顕微鏡で追跡した。

この結果、VPA 投与ラットは対照動物と比べて VGAT タンパクの蛍光が少なかった。さらに、増殖能力が高い傾向が見られ、VPA 投与によりグリア細胞の分化状態が変化していることが示唆された。今後は発現タンパク質の抗体染色や GABA 放出量の測定を行い、VPA がグリア細胞に及ぼす影響を精査する。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-04. ジクロフェナックがアストロサイトとミクログリアの iNOS/NOx 産生および活性化に及ぼす影響

垣田博樹^{1,2}, 青山峰芳¹, 浅井清文¹ (¹名古屋国立大学大学院医学研究科分子神経生物学分野, ²名古屋国立大学大学院医学研究科新生児小児医学分野)

目的: インフルエンザウイルス感染に伴う脳症は、5 歳以下の小児に多く発症し、死亡率が 30% 前後と高く同時に後遺症を残す例が多い。一方、インフルエンザ脳症発症時におけるジクロフェナックナトリウム (DCF) の使用は、その死亡率を上げることが知られている。しかしながら、インフルエンザ脳症の発症機序および治療法などについて、いまだ十分に解明されていない。今回われわれは、ラットのアストロサイトとミクログリアにおいて炎症性サイトカインと DCF の同時刺激が細胞障害性および活性化に及ぼす影響について検討した。

方法: 日齢 1 の Wistar rat の培養アストロサイトおよびミクログリアへ IL-1 β , TNF- α , IFN- γ の炎症性サイトカインと DCF の単独または同時刺激を行い、培養細胞における iNOS の遺伝子および蛋白発現、培養液中の NOx を測定した。さらに、NF κ B シグナルの関与について解析を行った。また、炎症性サイトカインと DCF の単独または同時刺激がアストロサイトの細胞障害とミクログリアの形態変化および食欲能に及ぼす影響について検討した。

結果: アストロサイトおよびミクログリアにおいて、炎症性サイトカイン存在下で DCF の刺激が加わると、炎症性サイトカイン単独の場合よりも NOx, iNOS の産生はさらに亢進し、NF κ B の阻害剤および NF κ B RNA 干渉によって抑制された。iNOS/NOx の産生はアストロサイトでは細胞障害を誘導し、ミクログリアではその活性化および食欲能が亢進した。アストロサイトの細胞障害、ミクログリアの活性化および食欲能の亢進は、いずれも iNOS 阻害剤により抑制された。

考察: アストロサイトとミクログリアにおいて DCF は炎症性サイトカイン存在下でさらに NF κ B シグナルの活

性を増強し、NOx/iNOS の産生を増強させることが明らかになった。NOx/iNOS の産生はアストロサイトの細胞障害を引き起こし、ミクログリアの活性化を促進することが明らかになった。この結果は、インフルエンザ脳症における DCF 投与による増悪メカニズムを明らかにするのみならず、脳症の *in vitro* 増悪モデルとして病態の解明に役立つ可能性があると考えられた。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-05. GAD67-GFP knockin マウスを用いた CRH ニューロン制御における GABA の役割についての検討

柿沢圭亮^{1,2}, 渡部美穂², 柳川右千夫³, 沖 隆⁴, 福田敦夫² (¹浜松医科大学第二内科, ²浜松医科大学神経生理学講座, ³群馬大学大学院医学系研究科遺伝発達行動学分野, ⁴浜松医科大学地域家庭医療学)

ストレス時の内分泌応答調節において、視床下部室傍核小細胞領域に偏在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) ニューロンは重要な役割を果たしている。CRH ニューロンは GABA ニューロンの入力を受けることから、CRH ニューロン制御への GABA の関与が示唆されているが、未だ十分に解明されていない。本研究では、GABA の合成酵素である GAD67 の遺伝子座に GFP を knockin することで胎生期より体内の GABA 産生量が半分以下になっている GAD67-GFP knockin ヘテロマウス (GAD マウス) を用い、CRH ニューロンを軸とした各種ストレスホルモンと GABA の関連を検討した。その結果、GAD マウスでは、血漿 corticosterone, ACTH 値が野生型マウスと比べて有意に低値であった。CRH mRNA 発現量には差を認めなかった。CRH の蛍光免疫染色により、GAD マウスでは CRH 免疫陽性細胞数が野生型マウスより有意に多く、細胞毎の染色強度が強いことが示された。両側副腎摘出による CRH ニューロンの活性化およびコルヒチンによる軸索輸送の阻害により、野生型マウスの CRH 免疫陽性細胞数および染色強度は GAD マウスと同程度まで増加し、差が認められなくなった。また、日齢別の室傍核 CRH 免疫染色において、生後 0 日では野生型マウスと GAD マウスの間に差を認めなかったが、生後 7 日では、成熟マウスと同様、GAD マウスの CRH 免疫陽性細胞数が野生型マウスより有意に多く、細胞毎の染色強度が強いことが示された。更に、室傍核での CRH 含有量は GAD マウスで有意に多かった。以上の結果より、GAD マウスはストレス脆弱性を示し、生後早期より、CRH ニューロンの細胞体に CRH が蓄積し、CRH 分泌が障害されていることが明らかになった。このことから、GABA は CRH 分泌を促進している可能性が考えられ、その作用部位としては、GABA 受容体や小胞性

GABA 輸送体 (VGAT) の発現が免疫染色により認められたことから, CRH ニューロンの神経終末である正中隆起の可能性が示唆された. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-06. スナネズミ網膜発達過程の神経節細胞におけるヒスタミンの免疫組織化学

今田英己¹, 酒井一由², 山崎将生², 宮地栄一³ (¹東海学院大学健康福祉学部管理栄養学科, ²藤田保健衛生大学医療科学部臨床工学科, ³藤田保健衛生大学医学部生理学 II)

ヒスタミンは生体の各組織に含まれており脳内においては, ヒスタミンニューロンが存在し, ヒスタミンが中枢神経系において様々な脳の活動と関係していることが知られている. 脳の一部とみなせる網膜においてもヒスタミンは含まれていることが知られており, 哺乳類においてはヒスタミン受容体 (HR) が網膜細胞で存在することが報告されている. 我々は網膜におけるヒスタミン受容体の局在を免疫組織学的方法を用いて, 生理学的現象をカルシウムイメージング法を用いて探求した.

方法: 生後 1 日齢から成獣までのスナネズミ (*Meriones unguiculatus*) を使用し, ペンバルビタール (30mg/kg) 麻酔後, 左心室から 4% パラホルムアルデヒドを含んだ 0.1 M リン酸緩衝液で灌流固定した. 眼球摘出後 18 μ m の凍結切片を作製し, ヒスタミン受容体 (HR) 抗体を用いて免疫染色をした. 成獣スナネズミ網膜スライスによるカルシウムイメージング法は, 細胞内蛍光色素は Fura2 を使い, AR-GUS/AC 蛍光測定装置により, ヒスタミン投与による細胞内カルシウム濃度変化を測定した.

結果: 網膜組織のカルシウムイメージングを行い, 神経節細胞がヒスタミンに反応をしていた. 網膜組織を単離し神経節細胞をカルシウムイメージングし, 成獣の神経節細胞は非常に強い反応が確認された. ヒスタミンに応答した細胞のレセプターの種類と局在を調べるために, ヒスタミン H1 受容体 (H1R), ヒスタミン H2 受容体 (H2R), ヒスタミン H3 受容体 (H3R) のサブタイプを免疫染色した. 神経節細胞において 3 種類のヒスタミン受容体サブタイプは陽性反応を確認した. H1R は生後 2 日齢から生後 350 日齢まで確認でき, 14 日齢では視神経節細胞と軸索が非常に強い反応をした. 14 日齢以降は反応が弱くなるが生後 350 日齢まで確認できた. H2R は生後 8 日齢から約 30 日齢まで確認できた. 生後 14 日齢では H1R 同様, 非常に強く反応が確認でき, 生後 26 日齢以降は非常に弱く成獣では確認できなかった. H3R は生後 6 日齢から生後 70 日齢まで確認できた. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-07. 2光子カルシウムイメージングによる上丘浅層における側方抑制機構の解明

笠井昌俊¹, 伊佐 正^{1,2} (¹生理学研究所認知行動発達機構研究部門, ²総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

上丘は, 視野内の対象物への素早い視線の移動 (saccade) をおこなうための視覚—運動変換をつかさどる神経核である. Saccade は, 複雑な視覚情報の中から目立つ対象を選び出しそこに注意をむけるという動作の基盤になっている. 複雑な視覚対象からどのようにして saccade の対象が選ばれるかに関しては, 上丘における側方抑制が重要であると考えられている. しかし, 視覚情報を処理する上丘浅層において, この側方抑制を作り出す抑制性の回路機構には, まだ不明な点が多い. 本研究では, 2光子顕微鏡による *in vivo* カルシウムイメージング法をもちいて, 神経細胞集団レベルでの側方抑制パターンを調べた. とくに, 側方抑制機構神経に注目し, 2点刺激による側方相互作用 (lateral interaction) と周辺抑制 (surround suppression) について解析をおこなった.

空間的に離れた 2 点の刺激を同時に提示した場合, 2 点の距離が近い場合 (視野角 3°) では, 視覚応答は増加する傾向にあった. しかし 2 点間の距離を離していくと (視野角 9° 以上) 視覚応答の減少が見られた. また, 視覚刺激のサイズを変化させた場合, 刺激サイズが大きくなるにつれて, 上丘内で応答するニューロンの範囲が広がる一方, 応答の中心付近のニューロンでは応答の減少が観察された. さらに, GAD67-GFP ノックインマウスをもちいて, GABAergic ニューロンと non-GABAergic ニューロンについて, surround suppression に対する活動パターンを比較したところ, いずれも同様に応答の中心部における応答の減少が確認された. これらの結果から, 上丘浅層においては, 近接する GABAergic ニューロンによる局所的な抑制というよりも, 遠くからの抑制によって上丘浅層の側方抑制が作り出されていると考えられた. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-08. 大脳皮質高次視覚領野における奥行き運動情報 (Motion-in-depth) の符号化

眞田尚久¹, G. C. DeAngelis² (¹自然科学研究機構生理学研究所感覚認知情報研究部門, ²Center for Visual Science, University of Rochester)

我々は物体が近づいてきたり, 遠ざかってゆく, 奥行き方向の動き (Motion-in-depth) を知覚することができる. 奥行き方向の運動は主に二つの両眼性の手がかりによって知覚できることが知られている. 一つは両眼視差が時間的

に変化する手がかり (Change in horizontal disparity, CD) であり、もう一つは物体が奥行き運動することによって生じる、左右網膜像上の速度の差 (Interocular velocity difference, IOVD) である。これらの手がかりのどちらが奥行き運動知覚に寄与しているのかは心理物理学的研究において議論されているが、その生理学的基盤は十分明らかにされていない。

覚醒状態のマカクザル MT 野細胞から細胞外電位記録を行い、奥行き運動が脳内でどのように符合化されているのか、またどちらの手がかりが知覚に寄与しているのかを調べた。視覚刺激にランダムドット刺激 (RDS) を用い、刺激の両眼視差を動的に変化させることで奥行き方向に運動する刺激を作成した。RDS 刺激の両眼視差を変化させると、左右眼のドットパターンは水平軸上でお互いに逆向きに動く。例えば被験者に向かって物体が近づいてくる時、左目刺激は右方向の運動、右目刺激では左方向の運動が生じる。左右眼間で速度が違い、且つ両眼視差も変化することから、視覚刺激には両眼間速度差 (IOVD cue) 及び両眼視差の時間的変化 (CD cue) の両方の手がかりが含まれる (Combined 条件)。RDS 刺激は、MT 細胞の受容野上に提示され、面状の RDS 刺激が前進もしくは後退の 2 方向どちらかに運動する。この 2 方向の運動を複数の速度条件で提示することにより、単一細胞における Motion-in-depth 選択性曲線を測った。記録した 86 個の MT 野細胞の内、約半数の神経細胞が有意に刺激の前進、もしくは後退運動に選択的に反応することがわかった。

さらに、これらの細胞の選択性に、CD cue, IOVD cue のどちらの手がかりが寄与しているかを調べるために、それぞれの手がかりを単体で含む刺激を用いて Motion-in-depth 選択性を調べた。その結果、多くの MT 野細胞は IOVD cue のみを含む条件 (IOVD 条件) では、強い奥行き運動選択性を示したが、CD cue のみの条件 (CD 条件) では選択性が弱かった。IOVD 条件における選択性の強さは、Combined 条件と同程度であることから、MT 野細胞は主に両眼間速度差によって奥行き方向の運動を符号化している可能性が示唆される。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-09. 均衡する視覚運動制御の再帰的連環が二人の体動を同期させる

岡崎俊太郎¹、小池耕彦¹、廣谷昌子²、J. Bosch-Bayard³、高橋陽香⁴、橋口真帆⁴、定藤規弘^{1,4} (¹生理学研究所心理生理学研究部門, ²School of Linguistics and Language Studies, and Institute of Cognitive Science, Carleton University, ³Cuban Neuroscience Center, ⁴総合研究大学

院大学生命科学研究科)

社会的場面において行動が時間遅れなしで同調(同期)するメカニズムを探るため、対面で静立する被験者ペア (44 名 22 組) の体動をモーションキャプチャーで計測した。被験者ペアが見つめ合っている場合、一方または両者が目隠しした場合の各条件において体動の無意識的な同期を解析した。相互相関解析の結果、一方が目隠しした状態では体動が時間遅れを伴い同調していたが、見つめ合っている場合は同期していた。また因果解析では、二者間の因果的影響量を影響の出し手と受け手の視覚条件によって比較した。受け手が目隠しをすると影響量は有意に減少した。見つめ合っている条件においても、二者の受ける影響量が均衡している場合に体動は同期するが、影響量が異なる場合は、相対的に受ける影響量の大きい被験者が相手に追従する傾向があった。これらの結果から、均衡する視覚運動制御の再帰的連環が二者の体動の無意識的な同期に重要であることがわかった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-10. 軸索起始部における入力依存的な K チャネルの発現変化

久場博司、山田 玲、石黒 剛 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

神経細胞の軸索起始部 (AIS) は活動電位の発生部位であり、神経活動決定の要である。これまで我々はトリの蝸牛神経核である大細胞核 (NM) において、聴覚入力への遮断により神経細胞の AIS が長くなり、膜興奮性が増すことを明らかにした。一方、AIS はその分布だけでなくその電気的特性も、細胞の興奮性に大きく影響する。従って今回は、膜特性の重要な決定要因である K チャネルに焦点を絞って、その AIS 可塑性に伴う発現変化を解析した。まず、免疫染色を行ったところ、NM 細胞の AIS では聴覚入力への遮断に伴って Kv1 の減少と Kv7 の増加が見られた。NM 細胞の K 電流は非常に大きいため、通常の K イオン濃度では正確な電流記録が困難である。そこで、電極内液に K チャネル透過性の低い Cs イオンを用いることで K 電流の詳細な解析を行った結果、聴覚遮断により Kv1 を介した電流成分は減少するのに対して、Kv7 を介した電流成分には増加が見られた。Kv1 は活性化の閾値が低く、速度も速いため、Kv7 に比べて活動電位の発生を抑える効果が強い。実際、聴覚遮断後の NM 細胞では活動電位の閾値が低下し、膜抵抗は増加する。また、この細胞で Kv7 電流を阻害した場合、細胞体の静止膜電位には変化が見られないのに対して、活動電位の閾値と振幅は減少する。さらに、聴覚遮断後の NM 細胞にみられる自発神経活動の頻度は、Kv7 を活性化させ

ると減少し、Kv7を阻害すると増大する。これらの所見は、Kv7が聴覚遮断後のAISにおいて静止膜電位の安定化に関わることを示している。以上、NM細胞ではAIS可塑性時にKチャンネルの発現を相補的に変化させ、このことにより細胞の静止膜電位を大きく変えることなく、膜興奮性を増加させている可能性が示唆された。本発表について、過去1年間に申告すべき利益相反はない。

O-11. 入力周波数に応じた樹状突起形態変化の聴覚同時検出における意義

山田 玲, 久場博司 (名古屋大学医学系研究科細胞生理学)

トリ層状核(NL)神経細胞は両耳からのシナプス入力の同時検出器として働く事で両耳間時差検出を行い、音源定位に関わる神経核である。NLでは音の周波数ごとの同時検出を行うために、担当する周波数に応じた様々な最適化が行われている。特に形態学的特徴として低い周波数に回答する細胞ほど長い樹状突起を持つことが知られているが、樹状突起上でのシナプス入力様式の詳細が明確に示されていないため、樹状突起の長さの変化がどのような機能的意義を持つのかについては明らかになっていない。そこで我々はまず、2光子レーザー顕微鏡とcagedグルタミン酸を用いた局所刺激によって、樹状突起におけるグルタミン酸受容体の密度分布を調べた。その結果、短い樹状突起を持つ高周波数領域の細胞においては受容体分布が均一であるのに対して、長い樹状突起を持つ低周波数領域の細胞(LF細胞)においては、樹状突起遠位にグルタミン酸受容体が集中している事が分かった。さらにスクロース溶液を用いてLF細胞の樹状突起近位および遠位に分布するシナプス終末からmEPSCを選択的に誘発させたところ、mEPSCの振幅および時間経過は両者の間でほぼ均一であった。このことから単一シナプスにおける受容体密度やその特性は樹状突起上で均一であることが分かる。これらの結果からNLのLF細胞においては興奮性シナプスが主に樹状突起の遠位側に集中していることが示唆された。今後はこのような樹状突起遠位への入力がどのような形で細胞体へ届くのかを詳細に解析することで、入力周波数依存的に樹状突起の長さが異なることの意味を明らかにする予定である。本発表について、過去1年間に申告すべき利益相反はない。

O-12. リポポリサッカライド誘発性脳炎におけるPlexin-A1の役割

伊藤卓治, 吉田謙二, 根岸隆之, 湯川和典 (名城大学薬学部生理)

セマフォリンは、当初神経ガイダンス因子とされてきた分子群であるが、近年、免疫調節、血管・脈管形成、がんの転移・浸潤、骨代謝調節、網膜恒常性維持などの多彩な作用を有していることが明らかになってきた。ミクログリアは中枢神経系(CNS)の免疫系において重要であり、神経炎症の制御に重要な役割を果たしている。Plexin-A1はラットミクログリアに発現しており、神経損傷時のミクログリアのアポトーシスに関与していることが明らかとなっていたが、免疫制御への関与は明らかになっていなかった。Plexin-A1欠損マウスでは、神経損傷により活性化されたミクログリアは損傷ニューロンが分泌するSema3Aによるアポトーシスが誘導されにくいと考えられるので、LPSに過剰に反応し神経炎症が亢進すると予想された。しかしながら予想に反して、Plexin-A1欠損マウスでは脳室内LPS急性投与後のミクログリア細胞数や炎症関連分子の増加は起こらず、炎症関連分子の発現量は野生型と比較して有意な減少を認めた。そのため、脳内ミクログリアのLPS受容体であるTLR4とセマフォリン受容体のPlexin-A1がミクログリア細胞内の信号伝達において協調的に作用して、ミクログリア活性化を強く敗血症性脳症を進展させることが判明した。したがって、ミクログリアにおけるセマフォリン・プレキシシン信号伝達系の制御が敗血症性脳症やその他の神経炎症関連性精神疾患の治療に応用できることが示唆された。本発表について、過去1年間に申告すべき利益相反はない。

O-13. リポポリサッカライドは紫外線照射によるBV-2細胞のアポトーシスを抑制する

金子葉子, 中島 昭, 長崎 弘, 小谷 侑, 太田 明 (藤田保健衛生大学医学部生理学I)

マウス初代培養ミクログリアは、通常単離後数日で死滅する。ところが、至適濃度のリポポリサッカライド(LPS)で刺激するとアポトーシスおよびオートファジーが抑制されて1か月以上生存することをこれまでに明らかにした。本研究では、株化ミクログリアであるBV-2細胞の紫外線照射によるアポトーシスにLPSがどのような影響を及ぼすか検討した。

BV-2細胞に0.1J/m²紫外線を照射すると、3時間後には50%以上の細胞でアポトーシスが認められた。procaspase-3は分解され、活性化型のcaspase-3に変化していた。一方、0.1μg/mL LPSで24時間処理したBV-2細胞では、紫外線照射後もアポトーシスおよびprocaspase-3の活性化が認められなかった。

LPS処理によりBV-2細胞の細胞周期はG1期で停止していた。DNA microarray, ウェスタンブロットの結果か

ら, LPS 処理した BV-2 において cyclin-dependent kinase inhibitor である p21^{Waf1/Cip1} (p21) と growth arrest and DNA damage-inducible (GADD) 45 α の発現が上昇していた. そこで, p21 と GADD45 α を siRNA を用いてノックダウンし, 紫外線照射によるアポトーシスに及ぼす影響を同様に検討した. その結果, p21 と GADD45 α の発現を抑制すると procaspase-3 の活性化が起こり, アポトーシスによる細胞死が増加した.

以上の結果から, LPS は p21 および GADD45 α の発現を上昇させることにより BV-2 細胞の細胞周期を G1 期に停止し, それによって紫外線照射によるアポトーシスを回避していると考えられる. ミクログリアの過剰な活性化がパーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患の病態の進行に関与していると報告されていることから, ミクログリアの活性化とアポトーシスによる制御機構を明らかにすることが神経変性疾患の治療法のターゲットになると考えられる. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-14. Cathepsin C and Cystatin F gene interaction during demyelination

J. Lih^{1,2}, W. Wisessmith^{1,2}, T. Shimizu², K. Tanaka², Y. Kimori³, K. Ikenaka² (¹Department of Physiological Sciences, Graduate University for Advanced Studies, School of Life Science, Okazaki City, Japan, ²Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, ³Imaging Science Division, Center for Novel Science Initiatives, National Institutes of Natural Sciences)

Cystatin F, a papain-like lysosomal cysteine proteinase inhibitor, and its main substrate, cathepsin C, have been demonstrated to be crucial factors in demyelinating diseases. It is found that the expression of cathepsin C and cystatin F are profoundly elevated and matched with ongoing demyelination/remyelination. However, their accurate functional role in demyelinating diseases is still unclear. To clarify their function in the pathological process of demyelination, we used a spontaneous chronic demyelination mouse model, named heterozygous PLP transgenic 4e (PLP4e/-) mice. Meanwhile, Flexible Accelerated-STOP-Tetracycline Operator Knock in (FAST) system is applied to up or down regulate cathepsin C or cystatin F gene expression. In situ hybridization revealed that in PLP4e/- mice conditional knock down of cystatin F gene in microglia lead to the down regulation of cathepsin C

mRNA levels. When cystatin F is over expressed, cathepsin C expression was slightly up regulated in the wild type background. On the contrary, cystatin F expression was not influenced in cathepsin C over expression mice. It means that cathepsin C gene and cystatin F gene interact with each other and cystatin F locates upstream of cathepsin C through some unknown mechanism during demyelination. In order to clarify their function in this disorder furthermore, we also detected microglia morphology changes in cystatin F over expression PLP4e/- mice. Further study is needed to estimate the possible pathway and substrate of cystatin F that influences cathepsin C gene expression in microglia. COI none.

O-15. ミエリン—軸索間相互作用に依存して発現変化するニューロン遺伝子の同定

國澤和生^{1,2}, 清水健史², 長内康幸^{1,2}, 小林憲太³, M. A. Bhat⁴, 池前一裕^{1,2} (¹総合研究大学院大学生命科学, ²生理学研究所分子神経生理, ³生理学研究所ウイルスベクター開発室, ⁴Department of Physiology, University of Texas Health Science Center)

中枢神経系は, 脳高次機能の主たる役割を担うニューロン, およびそれを取り巻くグリア細胞から構成される. グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイト (OL) は神経軸索に対して髄鞘 (ミエリン) を形成する. 近年, ミエリンの軽微な異常が統合失調症様症状を招くことが報告された. 加えて, 慢性脱髄モデルマウスにおいても脱髄発症以前より認知機能障害が生じることが明らかとなった. これらの観点は, OL が認知や学習機能の一端を担うと共に, 精神疾患の原因解明にむけた治療ターゲットとなりえる可能性を示唆している. 我々は脱髄疾患といった OL の多大な機能欠損ではなく, ミエリン—軸索間相互作用に着目し, 軽微な OL の機能異常が脳高次機能にどのような影響を与えるか検討した.

OL は髄鞘間に一定の間隔でランビエ絞輪とよばれるギャップを形成し, 活動電位の跳躍伝導を可能にしている. このランビエ絞輪の隣接領域ではミエリン—軸索間で paranodal junction を形成し, ニューロンの活動電位の伝導速度を維持している. NF155 はこの paranodal junction 形成に必須のタンパク質であり, これまでに OL における NF155 コンディショナル KO により, paranodal 領域の崩壊と, それに伴う伝導速度の遅延が報告された. 本研究では, paranodal junction が崩壊した際に, ニューロン側で誘起される遺伝子発現変化を解析した. 我々は, paranodal junction 崩壊後の当該マウス網膜の total RNA を抽出し,

マイクロアレイ法により遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、発現が上昇した遺伝子と減少した遺伝子を多数同定した。このうち、強く発現上昇が認められた遺伝子を選出し、その発現及び局在を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて確認した。その結果、ニューロンマーカーである NeuN と非常に高い割合で共局在する遺伝子を発見することに成功した。以上のことから、ミエリン軸索間情報伝達の破綻がニューロン側の遺伝子、ひいては脳高次機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-16. サル海馬脳波の睡眠による変化

田村了以¹、西田 悠²、永福智志³ (¹富山大学大学院医学薬学研究部(医学)統合神経科学、²富山大学大学院医学薬学研究部(医学)耳鼻咽喉科頭頸部外科学、³福島県立医科大学医学部システム神経科学)

げっ歯類の海馬では、レム睡眠期には θ 波、ノンレム睡眠期には鋭波リップルが優位に出現し、これらは、記憶の形成(海馬内での入力情報の処理)および固定(海馬から皮質領域への同期出力)に関わる機能をそれぞれ反映した活動であることが示唆されている。しかし霊長類では海馬神経活動と睡眠との関連性はあまり報告されていない。本研究で我々は、サル海馬から脳波を記録し、その睡眠ステージとの相関を検討した。

2頭のニホンザルを用いた。海馬脳波電極を歯状回または CA1 領域に慢性埋め込みした。また睡眠ステージを分類するため、皮質脳波電極を前頭骨、眼電図電極を外眼角、筋電図電極を脊柱起立筋にそれぞれ慢性埋め込みした。

サルは一晩に 7-8 時間眠り、そのうち浅いノンレム睡眠(ステージ I-II)が 68.2%、深いノンレム睡眠(ステージ III-IV)が 11.4%、レム睡眠が 20.4% あった。海馬脳波は、歯状回と CA1 領域ともに皮質脳波に類似した変化を示し、覚醒期には低振幅速波が主体であるが、浅いノンレム睡眠期になると中振幅の徐波が出現しはじめた。さらに深いノンレム睡眠期には高振幅徐波が優位になり、CA1 領域では鋭波リップル事象が出現した。このうち、鋭波は放線層(CA1 領域の浅層)に、リップルは錐体細胞層(CA1 領域の深層)で最大振幅を示した。レム睡眠期には覚醒期と類似の速波を主体とする脳波が出現したが、持続的な θ 波はほとんど見られず、また短期的な θ 事象の出現頻度も覚醒期より減少していた。

以上の結果より、サルでもノンレム睡眠期(特に深い睡眠ステージ)に海馬から皮質領域へ同期した出力が起こり、これが記憶固定を促進していることが示唆される。一方、サルではレム睡眠期に θ 波はほとんど出現せず、したがっ

て海馬における睡眠時の入力情報処理様式は、霊長類とげっ歯類で異なっている可能性が高い。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-17. Decreased fear-related evoked potential in rat's amygdala during social buffering

F. Felipe¹, J. Matsumoto¹, Y. Kiyokawa², Y. Mori², T. Ono¹, H. Nishijo¹ (¹System Emotional Science, University of Toyama, ²Laboratory of Veterinary Ethology, University of Tokyo)

In social mammals, signals from a non-fearful conspecific animal alleviate stress responses (Kiyokawa et al., 2004). This phenomenon is referred as "social buffering". It is reported that the presence of a conspecific animal decreased freezing and c-fos expression in the rat amygdala during presentations of a fear conditioned tone, suggesting that amygdala inactivation is important for social buffering. However, it is unknown when and how activity of the amygdala is inactivated although c-fos expression reflects neural activity. To investigate this issue, in this study, local field potentials in the rat lateral amygdala were recorded during presentation of an aversive conditioned tone, with or without a non-fearful conspecific rat. Nineteen male Wistar rats were used in this study. Two days before the recording, for the fear conditioning, a tone (800 kHz) was presented for 3 sec that contaminated with a single scrambled electric footshock (0.8 mA, 0.5 s) for 7 times. On the recording day, the conditioned tone was presented to the rats for 20 times in a social buffering condition with a conspecific (n=9) or in a control condition without a conspecific (n=10). In data analysis, the tone evoked potentials were compared between the two conditions. A two-way repeated measured ANOVA (time x condition) revealed a significant main effect of time [F (59, 1003)=2.18, p<0.001] and a significant interaction between time and condition [F (59, 1003)=1.37, p<0.05]. Post-hoc tests by simple main effect revealed that the amplitude of the evoked potential (latency: 21-25 ms) was significantly lower in the social buffering condition than in the control condition (p<0.05). The results suggest that social buffering might attributed to a decrease in amygdalar synaptic neural responses to the aversive conditioned stimulus. COI none.

O-18. 脊髄損傷からの回復過程において側坐核は運動関連皮質を活性化するか

澤田真寛^{1,2}, 加藤健治^{1,4}, 尾上浩隆³, 伊佐 正^{1,4}, 西村幸男^{1,4,5} (1)生理学研究所認知行動発達機構研究部門, (2)京都大学医学部脳神経外科, (3)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター, (4)総合研究大学院大学, (5)JST-PRESTO)

【背景】脊髄損傷患者の多くは運動機能の麻痺と併発し、うつ症状を示すことが観られる。このうつ症状は運動行動の減少へ繋がり、運動機能の回復の妨げとなることが問題となっている。しかし、モチベーションと運動機能回復との関係を示した神経メカニズムは未だ不明である。先行研究では、脊髄損傷から機能回復したサルにおいて、モチベーションを形成する側坐核と一次運動野間の機能的結合が見られるという相関関係を示すことができたが、手の機能回復に対する側坐核と一次運動野間活動様式の因果関係については未だ不明である。本研究では、手の巧緻性に対する側坐核及び大脳皮質運動野活動の因果律を明らかにするため、大脳皮質運動関連領域の皮質脳波を測定しながら脊髄損傷前後において側坐核を薬理的に一時的に不活性化し、手指の巧緻性と皮質脳波の変化を観察した。

【方法】マカクザルに精密把持運動を行うようトレーニングした。運動関連領域上に皮質脳波電極を慢性的に留置した。電極を留置してから数ヶ月後にC4/C5境界部で左側索背側部のみを切断した。4頭のサルで脊髄損傷前、機能回復過程において、側坐核にGABAAのアゴニストであるムシモルを注入し、注入の前後で精密把持運動の成功率の変化を観察した。また、4頭中2頭のサルで皮質脳波の変化を観察した。

【結果】健常状態では、側坐核の不活性化は精密把持へ影響を与えなかったが、損傷後は、側坐核の不活性化によりいったん回復した精密把持の成功率は低下した。健常状態では、手の運動中の脳波に対する側坐核の不活性化による影響はみられなかった。しかし、損傷後の回復期に側坐核を不活性化すると、120Hz以上のhigh- γ 波の消失と、80-120Hzのhigh- γ 波の増強を認めた。

【考察】今回の実験で側坐核-大脳皮質運動野間のネットワークが、脊髄損傷からの巧緻運動機能の回復を支えていることが示唆された。本発表について、過去1年間に申告すべき利益相反はない。

O-19. 聞き手の肯定的反応が話し手にもたらす報酬効果の神経基盤の解明

角谷基文^{1,2}, 小池耕彦², 岡崎俊太郎², 定藤規弘^{1,2} (1)総合研究大学院大学生命科学研究科, (2)生理学研究所心

理生理学研究部門)

我々はなぜ会話のような社会的相互作用を楽しむことができるのかを考えると、会話の内容だけでなく、会話という行為そのものが楽しさを引き起こしているように感じられる。会話という行為は、話し手の行動(例:発話)と聞き手の反応(例:相槌)が繰り返されるという構造を持っている。我々は、会話という行為そのものが楽しい理由は、遊びが楽しいのと同様に、自分の行動に対して即座で直接的なフィードバックを得られることに拠るのではないかと考えた(Csikszentmihalyi, 1996)。実際に共同作業を用いた近年の研究では、自分が思ったように相手が動いてくれる場合に、報酬に関連する脳領域である腹側線条体が賦活することが報告されている(Schilbach et al., 2010)。これらのことから我々は、「会話における楽しさとは、話し手の発話に対して、聞き手が適切な反応を返してきた場合に、それが話し手にとって報酬として機能することによって生じる」という仮説を立てて、fMRIを用いた研究を行った。話し手の発話に随伴して予想通りの反応を聞き手が返す状況を模した実験系として、ユーモアを用いた実験を考案した。被験者はユーモアの話し手として実験に参加し、面白いユーモアを聞き手に向かって喋る。それに対して、聞き手が笑いという反応を返す(実際には笑いは、実験的に統制された割合でPCが生成する)。反応を受けた後の主観的な嬉しさは、7件法で測定された。41名の被験者を対象に実験を行った結果、自分が行動してか笑い声が返ってきたときに、主観的嬉しさは最も高かった。そして、この嬉しさに対応して、側坐核の活動が高くなることを示された。これらの結果は、仮説通りに、自分の行動に随伴した反応は報酬として機能しており、またその行動-反応連合にとりも報酬の生起には、側坐核が関連していることが強く示唆される。本発表について、過去1年間に申告すべき利益相反はない。

O-20. 筋機械痛覚過敏を惹起する伸張性収縮の機械的因子

林 功栄¹, 阿部真博², 山中章弘¹, 水村和枝³, 田口徹¹ (1)名古屋大学環境医学研究所神経系分野II, (2)ビタカイン製薬株式会社学術部, (3)中部大学生命健康科学部理学療法学科)

伸張性収縮(Lengthening contraction, LC)により生じる遅発性筋痛(筋機械痛覚過敏)は患者や高齢者、アスリートの身体活動を著しく制限する。本研究では、LCによる筋への機械的負荷が遅発性筋痛の発症に関わるか、また、関わるならばどの機械的因子が痛覚過敏の程度を決定するかを調べた。

イソフルラン吸入麻酔下で、ラット総腓骨神経に電気刺激を与え、下腿伸筋群に異なる伸張関節範囲 (ROM: 30, 60, 90, 120°) と伸張角速度 (VEL: 50, 100, 200, 400°/s) の LC を負荷した。LC 負荷筋の機械逃避閾値を、LC 前、3 時間後、1~5 日後に測定し、痛覚過敏の程度を定量した。

遅発性筋痛は LC の ROM、および VEL 依存的に生じた。興味深いことに、VEL を固定した条件では、LC 中に発生する積分トルクのピーク値は ROM 依存的に増加し、痛覚過敏の程度とも有意に相関した。逆に、ROM を固定した条件では、LC 中に発生するトルクの上昇速度は VEL 依存的に増加し、痛覚過敏の程度とも有意に相関した。

これらは LC の ROM と VEL が筋機械痛覚過敏の発症程度に影響を及ぼすパラメータであり、ROM と VEL では異なる機械的因子が痛覚過敏の発症に寄与することを示す。以上の結果は、患者や高齢者、アスリートへの運動処方の方立案に有用であると考えられる。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-21. マウス末梢性痒み感覚へのリゾフォスファチジン酸による TRPA1 および TRPV1 活性化の関与

橘高裕貴^{1,2}、内田邦敏^{1,2}、福田直美²、齋藤くれあ²、富永真琴^{1,2} (¹総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻、²岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理研究部門)

痒みとは皮膚に対する搔搔欲求を惹起させる感覚である。リゾフォスファチジン酸 (LPA) は胆汁うっ滞における痒み物質の 1 つであることが示唆されているが、作用機序の詳細は未だ不明である。本研究では末梢感覚における LPA の生理学的作用および作用機序について詳細に検討した。

はじめに、マウスに cheek injection model を適用し LPA の発痛作用および起痒作用について検討したところ、LPA は痒み関連行動を惹起した。次に、マウスより単離した後根神経節細胞 (DRG ニューロン) を用いたカルシウムイメージングによって LPA の作用を検討した。LPA は DRG ニューロンの一過的な細胞内カルシウム濃度の上昇をもたらし、またこの応答は細胞外カルシウムに依存的であった。痒みシグナルへの関与が示唆されているカルシウム透過性分子として、非選択的のカチオンチャネルである transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) および vanilloid 1 (TRPV1) がこれまでに報告されている。したがって TRPA1 と TRPV1 の選択的アンタゴニストである A967079、capsazepine を処置したところ、LPA 応答ニューロンの割合が減少した。また、TRPA1 および TRPV1 ノック

アウトマウスより単離した DRG ニューロンを用いた検討においても LPA 応答ニューロンの割合の減少が認められた。さらに、LPA の惹起する痒み関連行動は TRPA1 および TRPV1 ノックアウトマウスで減少が認められた。これらのことより、LPA は TRPA1 および TRPV1 の活性化を介して DRG ニューロンを活性化し、痒み関連行動を惹起することが示唆された。また、LPA の DRG ニューロンに対する作用メカニズムとして LPA 受容体を介した作用および TRP チャネルに対する直接作用について検討したところ両者の関与が示唆された。

以上、本研究により、LPA は TRPA1 および TRPV1 依存的にマウスに痒み関連行動をもたらすことが明らかになった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-22. 慢性広範痛症の末梢神経・脊髓機構

若月康次¹、片野坂公明²、安井正佐也⁴、林 功栄¹、山下麻衣¹、木山博資⁴、山中章弘¹、水村和枝³、田口 徹¹ (¹名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II、²中部大学生命健康科学部生命医科学科、³中部大学生命健康科学部理学療法学科、⁴名古屋大学大学院医学系研究科機能組織学分野)

慢性広範痛症 (Chronic widespread pain, CWP) は全身性の疼痛を主症状とする難治性疾患であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究ではレセルピン皮下投与による線維筋痛症モデルを用い、CWP の末梢神経・脊髓機構を調べ、以下の所見を得た。1) 単一神経記録による電気生理学実験では、筋 C 線維侵害受容器の機械反応が有意に増大していた。2) 皮膚では機械感受性 C 線維侵害受容器の機械反応は増大したものの、その割合が有意に低下しており、機械感受性の逆説的な変化が観察された。3) 後根神経節における疼痛関連イオンチャネル (ASIC1-3, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV4, P2X₃, Piezo1-2, Nav1.7-1.9) の発現を Real-time PCR により定量したところ、ASIC3 のみの有意な発現増大がみられた。4) ASIC3 の選択的阻害薬 (APETx2) の皮下投与は、モデル動物の皮膚痛覚過敏行動を 1 時間程度抑制した。5) 脊髄後角における Iba1 陽性ミクログリアの細胞直径を指標に、ミクログリアの動態を定量したところ、痛覚受容に重要である第 II 層において、顕著な活性化がみられた。6) 活性化ミクログリアの阻害剤であるミノサイクリンをモデル作成前から連続投与しておくことで、機械痛覚過敏の発症が有意に減弱した。以上の結果より、末梢神経レベルでは ASIC3 チャネルの発現増大を介した C 線維侵害受容器の機械感受性亢進が、また、脊髄レベルではミクログリアの活性化が本研究で用いたモデル動物

の痛覚過敏に関与すると考えられる。これらの変化は線維筋痛症のような CWP の神経機構にも関わる事が推測される。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-23. ミラーイメージペイン発症における一次体性感覚野の役割

石川達也¹, 石橋 仁³, 鍋倉淳一^{1,2} (¹生理学研究所生体恒常機能発達機構研究部門, ²総合研究大学院大学生理学専攻, ³北里大学医療衛生学部生理学研究室)

近年、不快な痛みが長期間持続する病態を示す慢性疼痛の発症には中枢神経系の可塑的变化が関与することが示唆されている。これまで我々は慢性疼痛モデルマウスを用い患肢と対側の大脳皮質一次体性感覚野において、(1) 2/3 層錐体細胞の神経活動亢進、(2) 5 層錐体細胞の樹状突起スパインの形成・消失並びに運動性亢進が認められ、この大脳皮質の神経回路再編が慢性疼痛の一因であることを報告した。一方、慢性疼痛患者の一部には患肢と対側の領域においても慢性疼痛の症状(ミラーイメージペイン)が現れることがある。しかし、ミラーイメージペイン発症の機序はほとんど未解決である。

本研究ではミラーイメージペイン発症における大脳皮質一次体性感覚野の関与とその発症機序を検討するため、坐骨神経を結紮したモデルマウスを用い、患肢と同側の大脳皮質一次体性感覚野(以下、*ipsi-S1*)における神経細胞やアストロサイトの活動を *in vivo* 2 光子カルシウムイメージング法を用いて観察した。

その結果、*ipsi-S1* において 1 層抑制性神経細胞とアストロサイトの活動上昇が確認されたが、5 層錐体細胞の樹状突起スパイン形成・消失に有意な差は認められなかった。しかし、この慢性疼痛モデルマウスの *ipsi-S1* に GABA_A 受容体のアンタゴニストである gabazine (SR95531) を慢性的に投与すると、5 層錐体細胞の樹状突起スパイン形成・消失が増加し患肢と対側の後肢(坐骨神経を結紮していない後肢)で機械刺激に対する閾値の低下が認められた。

以上の結果から、慢性疼痛発症時 *ipsi-S1* において抑制性神経回路の機能の減弱に起因してシナプス再編が生じた場合ミラーイメージペインを発症する可能性があることと示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-24. モルモット肝静脈収縮の細胞内機構の検討

高野博充, 橋谷 光 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学分野)

肝臓は血液の貯蔵部位としてのはたらきを持つ一方で、

その血管抵抗の増加によって静脈還流量の減少を引き起こすというはたらきも指摘されているが、肝臓内に分布する血管の収縮メカニズムは明らかになっていない。そこで今回我々は出口側の抵抗を司る肝静脈の収縮機構について検討した。モルモット肝臓右葉から剥離した肝静脈ストリップ標本を作製し、神経刺激およびアゴニスト刺激に対する張力の変化を測定した。標本に経壁神経刺激(持続時間 50 μ s, 頻度 3-100Hz, 1sec)をすると、刺激頻度依存的に一過性の収縮を観察した。この反応は tetrodotoxin (3 μ M) 存在下では見られなくなり、phenolamine (3 μ M) によって抑制された。これらの収縮反応は nifedipine (1 μ M) では有意な変化を見せず、cyclopiazonic acid (10 μ M) や Y-27632 (10 μ M) によって抑制された。SKF96365 (10 μ M) は収縮抑制を見せたが、N ω -nitro-L-arginine 存在下ではその抑制作用はみられなくなった。phenylephrine と acetylcholine は収縮反応を起こした。Phenylephrine による収縮反応も Y-27632 により 50% 抑制された。一方、sodium nitroprusside は phenylephrine 収縮を 50% しか抑制しなかった。以上の結果より、モルモット肝静脈は主にアドレナリン作動性興奮性神経支配を受けていることが分かった。その収縮メカニズムに電位依存性 L タイプ Ca²⁺チャネルや store operated entry の関与は小さく、筋小胞体からの Ca²⁺放出機構と Rho-associated protein kinase 経路を介する信号伝達経路が主であると考えられた。また、内皮依存性弛緩機構は存在するが収縮制御への関与は小さく、特に一酸化窒素による弛緩作用に対して平滑筋の感受性が低いことがわかった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-25. スンクス食道平滑筋運動におけるセロトニンの関与

椎名貴彦, 内藤清惟, 中森裕之, 志水泰武 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学研究室)

【背景と目的】セロトニンは、消化管運動を制御する重要な生理活性物質のひとつである。これまでに発表者たちは、嘔吐する小型実験動物であるスンクスの食道平滑筋がセロトニンにより収縮することを報告してきた。セロトニンによって引き起こされる収縮反応は、嘔吐に関わる現象であると予想される。本研究では、セロトニンの作用機序について、より詳細に明らかにすることを目的とした。

【方法】スンクスから摘出した食道標本をオルガンバスにセットし、張力トランスデューサーを用いて機械的応答を記録した。薬物はオルガンバス内の栄養液に適用した。

【結果と考察】セロトニンを外部適用したところ、スンクス食道標本は縦走方向に収縮した。この反応は、神経およ

び横紋筋の活動を阻害する薬物の存在下でも引き起こされたことから、平滑筋の反応であると考えられる。次に、この収縮反応に関与する受容体サブタイプの同定を行った。5-HT₁ および 5-HT₂ 受容体の拮抗薬を前投与しておく、セロトニンによる収縮反応は抑制された。また、それぞれの受容体の作動薬を適用することにより、セロトニンを適用した場合と同様の反応が再現された。

【結論】以上の結果から、セロトニンはスinks食道平滑筋の縦走方向運動を制御すること、その制御には 5-HT₁ および 5-HT₂ 受容体に関与することが明らかとなった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-26. ラット子宮オキシトシンレセプターのエストロゲンによる調節

村田拓也, 成田和巳, 市丸 徹, 松岡 達 (福井大学医学部統合生理学)

ラット子宮オキシトシンレセプター (OTR) は、分娩の直前に著増し、子宮のオキシトシン感受性を増大させる。この OTR の増加は、妊娠末期に増加するエストロゲンの作用によるとされ、卵巣摘出 (OVX) した雌ラットに 17β-estradiol (12.5μg/rat) を投与すると、OTRmRNA 量は 1 時間後から増加し、その効果は 24 時間後まで続く。エストロゲンの作用は、核内エストロゲンレセプター (ER) である ERα と ERβ に加え、細胞膜に存在する膜 ER を介していると考えられている。OVX ラットにおいて、ERα agonist である PPT (200μg/rat) 投与では、OTRmRNA 量は 3 時間および 6 時間後に有意に増加したが、ERβ agonist である DPN (200μg/rat) 投与では、3 時間後にはのみ増加し 6 時間後には効果は見られなかった。本研究は、膜 ER に対する agonist と考えられている estren (4-estren-3α, 17β-diol) が、OTRmRNA 量にどのような作用を及ぼすのかについて、ERα および ERβ mRNA 量の変化とともに検討した。

OVX ラットに estren (800μg/rat) を投与すると、OTRmRNA 量は、DPN 投与の場合と同様に、3 時間までに増加したが、6 時間後には効果は見られなかった。また、ERα および ERβ mRNA 量は、3 時間および 6 時間後に減少し、6 時間後まで効果が見られた。さらに、ER antagonist である ICI182,780 あるいは tamoxifen で前処置した OVX ラットに estren を投与したところ、3 時間後に観察される OTRmRNA 量の増加は見られなかったことから、estren は ICI182,780 および tamoxifen 感受性の ER を介していると考えられる。

これらのことにより、estren は子宮 OTRmRNA 量を増加させること、そしてエストロゲンによる子宮 OTR の調節は、短時間では ERα, ERβ, および estren が刺激する膜

ER を介した複数の経路によることが示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-27. 日中の高照度光暴露がヒトの末梢の時計遺伝子発現に与える影響

佐藤麻紀¹, 若村智子², 森田 健³, 岡本暁彦⁴, 明石真⁴, 松井卓哉¹, 佐藤元彦¹ (¹愛知医科大学医学部生理学講座, ²京都大学医学研究科人間健康科学系専攻, ³福岡女子大学人間環境学部生活環境学科, ⁴山口大学時間学研究科)

光は、サーカディアンリズムを同調させる最も強力な因子である。日中の光暴露は、うつ状態における気分や社会的行動の改善につながるとされている。一方で、夜間の光暴露は、メラトニンやコルチゾールの分泌低下、睡眠の質の低下、時計遺伝子発現の減弱がみられる。

今回、我々は、日中の光暴露がヒト時計遺伝子の発現に影響を与えるかどうかを検討した。7 人の健康男性 (20.4 ± 2.2 歳; 172.3 ± 5.8cm; 64.3 ± 8.5kg; BMI 21.7 ± 3.1kg/m², mean ± SD) が、2 泊 3 日の実験を 2 回行った。実験 1 日目は Dim light (50lx) 環境下で過ごし、2 日目に Bright light (5000lx) の条件下か、もしくは Dim light (50lx) の条件下の光暴露を 7 時から 18 時で行った。実験 2 日目の 15 時、18 時、21 時と 3 日目の 7 時に毛根を採取した。毛根サンプルは、明石らの方法 (PNAS, 2010) に従い、ターゲットとする時計遺伝子 (*Per1*, 2, 3, *Cry1*, 2, *Rev-erb-α*, *Rev-erb-β*, *Dec1*) に蛍光色素で染色した専用のマイクロビーズ (Quanti Gene Plex 2.0, Affymetrix) を結合させ、フローサイトメトリーを用いて、mRNA 発現量を測定した。今回毛根細胞から時計遺伝子を測定することができ、特に *Per3*, *Rev-erb-β* においては、時間経過とともに両条件下において有意に遺伝子発現の上昇が見られた。しかし、時計遺伝子の発現の条件間 (Bright 条件と Dim 条件) における有意な差は見られなかった (*Rev-erb-β/TBP* at 7; Bright 4.81 ± 0.72, Dim 4.02 ± 0.13)。これらの結果から、日中における (7 時から 18 時) 光暴露によっては、ヒトの毛根細胞での時計遺伝子の発現に影響が見られないことが示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-28. 低酸素は癌細胞時計の位相を変える

増淵 悟¹, 八木田和弘², 中村 渉³, 本間さと⁴, 本間研一⁴ (¹愛知医科大学医学部生理学 (旧生理学第一), ²京都府立医科大学大学院医学研究科統合生理学, ³大阪大学大学院歯学研究科口腔時間生物学, ⁴北海道大学大学院医学研究科時間医学)

生物時計は時計遺伝子産物が自身の転写を抑制するネガ

タイプフィードバックによってドライブされている。この分子時計振動は時計中枢である視床下部視交叉上核だけではなく末梢臓器さらにはそこから派生する癌細胞においても存在する。しかし、固形癌の組織は均一ではなく、血管から離れた酸素供給が乏しい低酸素部位が存在する。この生物学的に過酷な環境はリズム振動に影響を与えることが考えられる。低酸素の概日リズムへの影響としてウスグロショウジョウバエ羽化リズムの低酸素(窒素 100%)への反応 (Pittendrigh, C.S. (1974) *The Neurosciences*. Third Study Program. The MIT Press p437-458) が知られているが、本研究ではこれをもとに培養細胞への短時間の低酸素暴露実験を行った。

大腸癌細胞株に分子時計振動をモニタリングするレポーター遺伝子を導入した細胞株を作製し (HCT116: DBP-luciferase) 実験に使用した。血清刺激により開始された大腸癌細胞株のリズム位相は低酸素暴露 (24h 後から 6h, 酸素濃度 10% もしくは 5%) により著しくシフトしたが、非癌細胞 (線維芽細胞株) では低酸素暴露の影響はほとんど見られなかった。また、このときの低酸素暴露により癌細胞培地の pH は低下するが、この pH 低下を培地中に緩衝剤を添加して抑制したところ、位相シフトも減弱した。この結果は固形癌の組織低酸素環境も癌細胞リズムに影響を与えている可能性を示している。また、低酸素下での癌細胞特有の代謝異常により生じた水素イオン (プロトン) がリズム異常の原因となる可能性を示している。

近年、癌治療において一日のうちに最も適した時刻に治療を行う方法、いわゆる「時間治療」のレジメンが作成され臨床試験が行われている。一方、組織内低酸素部位は治療抵抗性、転移再発の原因となると考えられており臨床的に重要である。そのため時間治療を考える上でも治療抵抗性である低酸素部位の癌細胞リズムを知ることが重要となる。本研究の結果に基づき固形腫瘍での低酸素部位のリズム構築、さらにそれに配慮した時間治療について考察する。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-29. ミカン科植物 *Clausena lansium* から精製した SB-204900 が rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) に対する薬理効果

松井卓哉¹, 井藤千裕², 糸魚川政孝³, 塩野裕之¹, 清水祐樹¹, 増淵 悟¹ (1愛知医科大学医学部生理学, 2名城大学薬学部薬化学, 3東海学園大学スポーツ健康科学部)

【背景と目的】活性化マスト細胞は、ヒスタミンなど多くの chemical mediator を放出することで喘息、アトピー性皮膚炎、肺線維症などの炎症性疾患に深く関与することが知られている。天然植物成分ケルセチンなど多くのフラボノ

イドはマスト細胞の膜の安定化作用などの多岐の薬理作用によって chemical mediator の放出を抑制することが知られている。我々もこれまでも natsudaidain が炎症性サイトカインの放出を抑制することを報告している。本研究ではミカン科植物 *Clausena lansium* (Lour.) Skeels から得られた lansiumamide B と SB-204900 のマスト細胞に対する薬理活性を検討する。

【方法】lansiumamide B と SB-204900 でそれぞれ前処置した rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) をカルシウムイオノフォア A23187 で刺激し、その細胞からの chemical mediator の放出抑制といくつかの細胞内シグナル分子の動態について検討した。

【結果】lansiumamide B と SB-204900 は用量依存的に RBL-2H3 細胞からのヒスタミン放出と TNF- α 分泌を抑制した。しかしながら細胞内 cyclooxygenase-2 (COX2) の発現には影響を示さなかった。mRNA の発現において SB-204900 は TNF- α を著しく低下させた。この結果より lansiumamide B と SB-204900 は histamine と TNF- α を抑制することが示唆された。次に signal 分子の発現解析では、SB-204900 で処理した RBL-2H3 細胞においてリン酸化 p38 MAPK の発現が低下した。p38MAPK 阻害剤 SB202190 を用いて RBL-2H3 細胞からの chemical mediator の放出を検討すると p38MAPK 経路は培養液中の TNF- α 量を低下させた。このことより p38MAPK 経路が TNF- α の産生や分泌に関与することが明らかになった。

【結論】*Clausena lansium* (Lour.) Skeels から得られた lansiumamide B と SB-204900 はマスト細胞の p38MAPK のリン酸化を抑制することでアレルギー性炎症疾患や慢性炎症性疾患を減弱する可能性を示唆した。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-30. 新たに開発した密度勾配連続細胞分離装置による希少細胞の分離

塩野裕之¹, 松井卓哉¹, 清水祐樹¹, 増淵 悟¹, 伊東洋一郎² (1愛知医科大学医学部生理学, 2Lab of Bioseparation Technology, Biochemistry and Biophysics Center, NIH, USA)

近年、細胞の分離はフローサイトメトリー (FACS) や磁気細胞分離法 (MACS) が汎用され、抗体を使って、高純度で分離されている。一方、従来の密度勾配細胞分離法は抗原抗体反応による副反応やレーザー等による障害もなく、費用もあまりかからず、FACS や MACS の前処理としても利用されている。そこで、我々は新たに密度勾配連続細胞分離装置を開発し、密度勾配細胞分離法における煩雑な操作を省き、細胞の回収率及び細胞の含有率を改善した。

回転する円板状のカラムの中に、密度の異なる 5 種の等張 Percoll 液を流し続け、同心円状に流れる密度勾配層を形成させる。そして、回転の中心に近い層から細胞浮遊液を注入しながら、連続して遠心分離すると、それぞれの細胞の密度に従って 5 種のフラクションに自動的に分離される。

ヒト末梢血中の好塩基球は白血球の約 0.5% 程度しか含まれておらず、その研究は遅れている。装置のカラム内に Percoll の密度勾配を 1.071, 1.075, 1.080, 1.084 そして 1.090 g/ml の 5 層形成させ、ヒト末梢血 10ml を 1,500rpm で分離した。約 90 分間で好塩基球が密度 1.080g/ml の分画に約 64% の含有率で分離された。anti-IgE 刺激による好塩基球の活性化マーカー CD203c 抗原の発現亢進は、この方法で分離した好塩基球分画でも、分離前の末梢血中の好塩基球とほぼ同様であった。また、分離した好塩基球分画ではカルシウムイオノフォア A23187 刺激によるヒスタミン放出能を測定することが可能となり、それは約 90% であった。Percoll の密度勾配の組み合わせを 1.073, 1.079, 1.090, 1.095 そして 1.102g/ml 変えると、好塩基球は 1.079g/ml に約 65%、同時に好酸球は 1.102g/ml に約 87% で分取できた。

本装置では抗体を使用せず、簡便な操作で回収率良く細胞を分離できるため、いろいろな細胞への応用が可能である。また、この装置を使用するだけで細胞を 90% 以上に精製できるよう、分離条件等を改善したいと考えている。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-31. Endogenously Generated Plasmin at the Vascular Wall Injury Site Amplifies Lysine Binding Site-Dependent Plasminogen Accumulation in Microthrombi

T. Brzoska¹, A. Tanaka-Murakami^{1,2}, Y. Suzuki¹, H. Sano¹, N. Kanayama², T. Urano¹ (¹Department of Medical Physiology, Hamamatsu University School of Medicine, ²Department of Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine)

Background: The fibrinolytic system plays a central role in thrombolysis, however, it remains unclear how and when the system is triggered to induce thrombus dissolution. Using intra-vital confocal fluorescence microscopy, we investigated the process of plasminogen binding to laser-induced platelet rich microthrombi generated in the mesenteric vein of transgenic mice expressing green fluorescent protein (GFP).

Methods: The accumulation of GFP-expressing platelets as well as exogenously infused Alexa Fluor 568-labeled Glu-plasminogen (Glu-plg) on the injured vessel wall was

assessed by measuring the increase in the corresponding fluorescence intensities.

Results: Glu-plg accumulated in a time-dependent manner in the center of the microthrombus, where phosphatidylserine is exposed on platelet surfaces and fibrin formation takes place. The binding of Glu-plg in the presence of ϵ -amino caproic acid, and of mini-plasminogen lacking kringle domains 1-4 and lysine binding sites (LBSs), were significantly less than that of Glu-plg alone, suggesting that the binding is dependent on LBS. Furthermore, aprotinin significantly suppressed the accumulation of Glu-plg, suggesting that endogenously generated plasmin activity is a prerequisite for the accumulation. In spite of endogenous generation of plasmin and accumulation of Glu-plg in the center of microthrombi, the microthrombi did not change in size during 2 hours of observation. When human tissue plasminogen activator was administered intravenously, Glu-plg further accumulated and the microthrombi were lysed.

Conclusion: Glu-plg appeared to accumulate in the center of microthrombi in the early phase of microthrombus formation, and plasmin activity and LBS were required for this accumulation. COI none.

O-32. 市販ヒト血清アルブミン製品の分子不均一性に関する研究

南 武志^{1,2}, 寺田知新¹, 高橋哲平¹, 有川 一¹, 松山幸枝¹, 恵良聖一¹ (¹岐阜大学大学院医学系研究科分子生化学分野, ²岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科)

【目的】ヒト血清アルブミン (HSA) は血清中に多量に存在するために、血清からの精製法も確立され、現在、種々の精製度の製品 (血清由来製品 (pHSA)) が市販されている。さらに近年では、遺伝子組み換え (リコンビナント) アルブミン (rHSA) 製品も得られる。それらの市販品は、基礎研究では ELISA 法の標準タンパク質や細胞培養液への添加剤として、また臨床分野では輸液用アルブミン製剤として使用されている。ところで、それらの市販品には精製過程で生じたと示唆されるオリゴマーの存在や SH 基の酸化還元状態による分子不均一性が知られている。本研究では、それらの分子不均一性に加えて、構造の安定性や機能特性の相違について、系統的に研究した。

【材料と方法】対象として、現在世界中で広く使用されている Sigma-Aldrich 社製の研究用 HSA 製品 (5 種の pHSA 製品 (A1653, A9511, A1887, A8763, A3782)) とイネ胚芽系による 2 種の rHSA 製品 (A9731, A9986)) を用いた。

SH 基とオリゴマー含量は全試料を対象に HPLC 測定にて行った。しかし熱安定性 (CD 測定) ならびに細胞増殖活性 (U937 と THP-1 細胞株) に対しては、代表として A1653 (初期精製 pHSA), A3782 (最終精製 pHSA) 及び A9731 (rHSA) の 3 種を用いた。

【結果と考察】HPLC 測定による還元型アルブミン (HMA) の割合の平均値は 30.1% (n=22) となり、健康成人男子の値 (約 75%) に比して有意に低値であった。CD 測定による二次構造解析では、ヘリックス含量の平均値は 56.7% (n=22) で、他のタンパク質と比較して、 α -ヘリックスに富むタンパク質であった。また熱変性曲線から算出した熱安定性のパラメーター値 (T_m , ΔG) ならびに WST-1 試薬による細胞増殖活性の程度は、いずれも “A9731 (rHSA) > A1653 (pHSA) > A3782 (pHSA)” の順であった。HSA の生理機能のうち多分子結合能がよく知られているが、それらのリガンドのうち、とくに脂肪酸は重要なリガンドである。これまでの報告ならびに脂肪酸の有無における実験から、今回得られた HSA 製品の熱安定性や細胞増殖活性の結果の成因として、各種 HSA 製品に対する結合脂肪酸の影響が示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-33. クラス II 型 PI3 キナーゼ-C2 α による TGF β 血管内皮作用の調節機構

安藝 翔¹, 吉岡和晃¹, 多久和典子^{1,2}, 岡本安雄¹, 多久和 陽¹ (¹金沢大学医薬保健研究域医学系血管分子生理, ²石川県立看護大学看護学科健康科学)

ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) は、8 つのアイソフォームが存在し、中でもクラス I α 型 PI3K p110 α は血管内皮成長因子 (VEGF-A) により誘導される血管新生に必須であることが知られている。我々はこれまでに、生理機能が不明であったクラス II α 型 PI3K (PI3K-C2 α) の全身型及び内皮特異的 KO マウスが発生中期において致死となり、その死因は血管新生、特に血管成熟過程の異常であることを明らかにしてきた。しかし、血管内皮細胞において PI3K-C2 α がどのような分子機構を介して血管新生を調節するのことはまだ不明な点が多い。

本研究では、主要な血管新生因子の 1 つであるトランスフォーミング成長因子 β 1 (TGF β 1) によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の血管新生調節における PI3K-C2 α の機能的役割を解析した。RNA 干渉法を用いた PI3K-C2 α ノックダウンにおいて、TGF β 1 刺激による転写因子 Smad2/3 のリン酸化及び核移行が顕著に低下していた。興味深いことに、PI3K-C2 α ノックダウン細胞において、TGF β 1 刺激後の TGF β 受容体のエンドソームへの内在化が抑制され

た。TGF β 1 による Smad2/3 のリン酸化は、Smad2/3 及び TGF β 受容体と結合する足場タンパク Smad anchor for receptor activation (SARA) のエンドソームへの局在を必要とする。PI3K-C2 α ノックダウンは、SARA のエンドソーム局在は阻害しなかった。しかし、PI3K-C2 α ノックダウンにより、エンドソーム上での Smad2/3 と SARA との複合体形成、及び TGF β 受容体と SARA の共局在がともに阻害された。したがって、エンドソーム上での SARA 依存的な TGF β 1 受容体による Smad2/3 リン酸化が PI3K-C2 α を必要とすると考えられた。また、PI3K-C2 α ノックダウン細胞において、TGF β 1-Smad2/3 系を介した VEGF-A 産生が有意に減少しており、これにより TGF β 1 刺激により誘導される細胞遊走及び管腔形成能が著しく障害されていた。さらに、マトリゲルプラグ・*in vivo* 血管新生アッセイにおいて、野生型及び平滑筋特異的 PI3K-C2 α KO マウスでは、TGF β 1 はマトリゲル内の微小血管数を著しく増加させたのに対し、内皮特異的 PI3K-C2 α KO マウスにおいてマトリゲル内の微小血管数の増加は見られなかった。

以上のことから、血管内皮細胞において、PI3K-C2 α は TGF β 受容体のエンドソームへの内在化及びエンドソーム上での SARA-Smad2/3 複合体形成に関与することにより、TGF β 1-Smad2/3 シグナル伝達経路を介した血管新生調節に必要であることが明らかになった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-34. 血管新生における G 蛋白活性調節因子の役割

林 寿来, AAL Mamun, 佐喜真未帆, 鈴木洋子, 西村直記, 犬飼洋子, 岩瀬 敏, 佐藤元彦 (愛知医科大学医学部生理学講座)

我々はラット狭心症モデルから G 蛋白活性調節因子である Activator of G-protein Signaling (AGS) 8 を同定し、AGS8 が低酸素刺激によって発現が上昇し直接 G 蛋白 Gbサブユニット (G β) に結合すること、AGS8-G β は心筋細胞の低酸素誘導アポトーシスを制御することを明らかにしてきた。用いたラット狭心症モデルでは側副血行路が著しく発達していることから AGS8 の血管形成への関与が考えられる。そこで、本研究では内皮細胞における AGS8 の機能について、また血管形成を促す血管内皮増殖因子 (VEGF) シグナルと AGS8 の相互作用について検討した。

まず、血管内皮培養細胞において解析を行ったところ、SiRNA で AGS8 を knockdown した細胞では VEGF による細胞増殖および管腔形成が阻害された。AGS8 knockdown では細胞膜表面上の VEGF2 型受容体 (VEGFR2) の発現減少、また VEGF による VEGFR2, ERK1/2, p38/MAPK のリン酸化抑制が認められた。さらに、AGS8-G β

の結合を特異的に阻害したところ, knockdown によるものと同様の結果が認められた。これらの結果から, AGS8 は Gbg を介して VEGFR2 の膜局在を制御し, VEGFR2 とその下流分子の活性化を調節することで血管新生を制御していることが考えられた。本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-35. 流れ刺激による肺での新しい炭酸ガス産生機構について

河合佳子¹, 大橋俊夫² (¹信州大学医学部器官制御生理学, ²信州大学医学部メディカル・ヘルスイノベーション)

生体内では血管内皮細胞は様々な物理的刺激に暴露されているが, 中でも流れ刺激により血管内皮細胞表面から ATP が分泌され, その ATP が生理活性物質として様々な情報伝達を行っていることはすでに知られている。今回は, ヒト肺細動脈内皮細胞に流れ刺激を加えたところ, ATP と共分泌される水素イオンにより炭酸ガスが産生される機序につき新知見を得られたので報告する。

ヒト肺から肺細動脈を分離し, 肺細動脈内皮細胞を培養系に移行した。その細胞を用いて, 流れ刺激に対する ATP 量の変化, 同時に分泌される水素イオンと炭酸ガス産生量, 炭酸脱水酵素 IV (CAIV) の影響について検討した。すると, 流れ刺激により, ヒト肺細動脈内皮細胞から ATP が分泌され, 炭酸ガスも同時に産生されることが確認できた。ATP と炭酸ガス産生量は流れの強度依存的に増加し, F_1/F_0 ATP synthase の阻害薬である piceatannol や angiotensin にて有意に低下した。また, 流れ刺激による炭酸ガス産生量は炭酸脱水酵素阻害薬である acetazolamide によって有意に低下した。

ヒト肺細動脈内皮細胞表面に存在する F_1/F_0 ATP synthase から産生される水素イオンが血漿中の重炭酸イオンと反応し, 内皮細胞表面にある CA IV を用いて炭酸ガス化を行っていることが確認できた。従来の肺胞における炭酸ガス化の概念 (赤血球の酸素化により分泌される水素イオンを用いたガス化) とは異なり, 肺細動脈領域が炭酸ガス化の中心的領域であるという新しい肺換気システムを提唱できた。現在, ウサギを用いた in vivo 実験で本概念を検証中であり, その結果についてもお示ししたい。本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-36. 継続的な発声を伴う剣道実施は, 実施者の呼気二酸化炭素排出を抑制する

有川 一^{1,2}, 寺田知新¹, 高橋哲平¹, 木崎一葉³, 今井一⁴, 恵良聖一¹ (¹岐阜大学大学院医学系研究科分子生理学分野, ²中部学院大学短期大学部幼児教育学科, ³黒部市

民病院整形外科, ⁴岐阜大学教育学部保健体育講座)

【目的】継続的な発声を行う運動様式を有する剣道の実施中は, 発声による「行動性呼吸」が運動実施による「代謝性呼吸」の増加を抑制していることが考えられる。したがって, 発声を伴わない一般の運動実施時に比べて, 剣道実施時の実施者の①呼吸パターンや②換気状態は大きく異なることが考えられる。しかしこれらの点については, これまでまったく明らかにされてこなかった。そこで本研究では, 「運動中に継続的な発声を行う」という, 他に類をみない剣道の特徴を, 呼吸生理の観点から明らかにすることを目的とした。

【方法】男子大学生剣道部員 8 名を対象とし, 剣道の練習形式で最も運動強度が高い「かかり稽古」の実施中において, 発声時と無発声時の①呼吸パターンおよび②換気状態を測定した。測定にはブレスバイブレス方式の携帯型呼気ガス分析装置 AT-1100A ((株) アニマ製) を用いた。今回実施した「かかり稽古」は 5 分間とし, 20 秒間の運動と 20 秒間の休息を 8 回繰り返した。

【結果】①呼吸パターンにおいては, 発声時は無発声時と比較して, 1 回あたりの呼気所要時間(sec)の有意な増加, 分時呼気量 (L/min) と分時呼吸数 (times/min) の有意な減少が認められた。②換気状態においては, 発声時は無発声時と比較して, 分時 O_2 摂取量 (mL/min) に差はみられなかったが, 分時 CO_2 排出量 (mL/min) の有意な抑制, 呼気終末 CO_2 濃度 (%) の有意な増加が認められた。

【考察】今回得られた結果から, 発声による「行動性呼吸」が運動実施による「代謝性呼吸」を大きく変化させ, 特に運動実施中に, 実施者の呼気を抑制することが明らかになった。このような呼気の抑制が, (i) 呼気 CO_2 排出の抑制, (ii) 呼気終末 CO_2 濃度 (= 血中 CO_2 濃度) の上昇を導いていると考えられた。一般に, 血中 CO_2 濃度の上昇は脳血流の増加を誘起するとされているので, 継続的な発声を行う剣道の実施中は, 実施者の脳血流は増加している可能性が考えられる。本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-37. オレキシン神経特異的な活動操作・細胞死誘導による, 摂食・代謝調節機構の解析

犬東 歩¹, 乾 あずさ¹, 田淵紗和子¹, 常松友美¹, M. Lazarus², 山中章弘¹ (¹名古屋大学環境医学研究所, ²筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

視床下部の外側野に発現している神経ペプチドであるオレキシンは, 睡眠・覚醒や摂食, 代謝など多様な行動・生理応答を調節している。オレキシンを産生するオレキシン神経は, 青斑核や弓状核などを含む脳のほぼ全領域にわ

たつてその軸索を投射していることが知られており、オレキシン神経を選択的に脱落させたマウスでは睡眠・覚醒の分断化、摂食量の低下や体重増加などの変化が観察される。オレキシン神経はオレキシンだけでなくグルタミン酸やダイノルフィン等の神経伝達物質も含んでおり、従来のオレキシンペプチドの局所投与といった手法では、オレキシン神経が果たしている生理機能を十分明らかにしているとは言えない。我々はオレキシン神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *orexin-Cre* マウスを作成し、これに Cre リコンビナーゼ特異的に遺伝子発現が誘導されるアデノ随伴ウイルスベクターを局所投与することで、オレキシン神経特異的な遺伝子発現を達成した。まず、薬理遺伝学的手法を用いてオレキシン神経を特異的に活性化することによって、オレキシン神経が摂食、代謝に果たす役割を解析した。代謝量測定ケージによる統合的な解析では、オレキシン神経の活性化による行動量の増加、摂食量の増加、飲水量の増加、呼吸交換率の上昇が観察された。また、絶食条件下でもオレキシン神経の活性化は血糖値の上昇を引き起こした。一方、ジフテリア毒素 A 断片を発現させてオレキシン神経特異的に細胞死を誘導した場合には、摂食量、飲水量の低下や血糖値の低下、体重の増加が観察された。こうした摂食行動や代謝に対する影響はオレキシン神経の 85% 以上が失われて初めて出現した。こうした結果はオレキシン神経による摂食行動と代謝のロバストかつ統合的な調節機構を示している。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-38. ラット視床下部腹内側核に投与したオキシトシンにより誘発される走行運動

成田和巳, 村田拓也, 松岡 達 (福井大学医学部統合生理学)

オキシトシンは神経分泌ホルモンとして分娩と射乳を引き起こすことが知られているだけでなく、中枢神経系で作用し性行動、母性行動など様々な行動に関与することが明らかとなってきている。演者は視床下部腹内側核に視床下部走行ニューロンが存在し、走行運動の発現に関与していることを明らかとしてきた。また雄または雌ラットではオキシトシン受容体が視床下部腹内側核に発現していることが知られている。そこで本研究では視床下部腹内側核のオキシトシンが走行運動の発現に関与するか検討した。またエストロゲンはオキシトシン受容体の発現を増加する作用があるが、エストロゲンの前処置がオキシトシンによる走行運動の発現に関与するか検討した。

7~10 週齢のウイスター系雄および雌ラットを用いて実験を行った。脳内への薬物投与は脳定位固定装置を用いて

設置したステンレスカニューラより行い、走行運動は回転かごを用いて測定した。

雄ラットにおいて視床下部腹内側核へのオキシトシン投与により濃度依存性に走行運動が誘発された。このオキシトシンの効果は同時投与したオキシトシン受容体拮抗薬により抑制された。投与したオキシトシンの走行運動発現に対する部位特異性を検討したところ、視床下部腹内側核への投与により強い走行運動が引き起こされた。雌ラットを用いた実験では、卵巣摘出したラットにおいても視床下部腹内側核内オキシトシン投与により走行運動が上昇したが、エストロゲン前処置はオキシトシン投与により引き起こされる走行運動をさらに増加した。雌ラットは性周期の発情前期から発情期にかけて、血中エストロゲンが上昇し暗期の運動量が増加する。この暗期開始の直前に視床下部腹内側核にオキシトシン受容体拮抗薬を投与したところ、暗期走行運動の発現が抑制された。

これらの結果よりラット視床下部腹内側核においてオキシトシンが走行運動の発現調節を行っていることが明らかとなった。また雌ラットではエストロゲンによるオキシトシン受容体発現の増加が、オキシトシンにより引き起こされる走行運動に関与している可能性が示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-39. 神経障害性疼痛下における前帯状回アストロサイトの活性化が睡眠障害に関与する

山下 哲^{1,2}, 成田道子², 葛巻直子², 山中章弘¹, 成田年² (¹名古屋大学環境医学研究所神経 2, ²星薬科大学薬学部薬理)

痛みの慢性化した慢性疼痛患者は、不安障害や抑うつ状態、さらには睡眠障害に陥りやすく、QOL の低下が引き起こされていることが、臨床において問題となっている。そこで本研究では、神経障害性疼痛に伴う脳機能変化と睡眠障害の関連について検討した。まず、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、脳波・筋電図測定により睡眠障害が引き起こされていることを明らかにした。次に、functional magnetic resonance imaging (fMRI) を用いて神経の活性変化の可視化を試みたところ、本神経障害性モデルマウスに熱負荷を与えた際に、前帯状回領域において活性上昇が認められた。このような条件下、同領域においてグルタミン酸遊離量の著明な増加が認められた。また、神経障害性疼痛下において熱負荷を与えた際のアストロサイトの形態変化を、免疫組織化学的染色法を用いて検討したところ、アストロサイトの樹状突起の伸張が認められた。続いて、アストロサイトがグルタミン酸により直接応答するか否か、初代培養アストロサイトを用いて観察したところ、グ

ルタミン酸処置により、GAT-3 の細胞質から細胞膜上への移行が観察された。さらには、神経障害性疼痛モデルマウスの前帯状回領域における GABA 遊離量を測定したところ、GABA 遊離量の持続的な低下が認められた。このような変化と睡眠障害との関係を明らかにするために、前帯状回領域に GAT-3 inhibitor である SNAP-5114 を微量注入し脳波・筋電図を測定したところ、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて認められた睡眠障害は、SNAP-5114 の微量注入により改善した。最後に、オプトジェネティクス法を用いて、前帯状回アストロサイト活性化と睡眠障害の因果関係を明らかにすることを試みた。光受容体 channelrhodopsin-2 (ChR2) を前帯状回アストロサイトにのみに発現させたマウスを作製し、同領域に光ファイバーを留置し、光照射によりアストロサイトを人為的に活性化したところ、覚醒時間の増加および non-REM 睡眠時間の減少が認められた。この結果は、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて認められた睡眠障害様症状と類似していた。以上より、神経障害性疼痛により誘発された前帯状回領域におけるグルタミン酸の過剰な遊離が、アストロサイト内の GAT-3 の細胞膜移行を誘導し GABA 神経伝達を低下させ、睡眠障害を引き起こしている可能性が示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-40. 遺伝子改変によるマウス胚性幹細胞由来バゾプレシン細胞の蛍光標識

長崎 弘, 小谷 侑, 須賀英隆¹, 山本直樹², 金子葉子, 中島 昭, 太田 明 (藤田保健衛生大学医学部生理学講座 I, ¹名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌学, ²藤田保健衛生大学共同利用研究施設)

『背景と目的』近年、マウス胚性幹細胞 (mESC) から種々の中枢神経組織を分化誘導する手法が開発され、新たな in vitro 実験系および再生医療への応用が期待されている。mESC から神経組織を誘導する場合、まず無血清培地での浮遊凝集培養 (SFEBq) が行なわれるが、このときインスリンを含む全ての成長因子を培地から取り除くと、視床下部前駆細胞群への自発的分化が起こる。最も多く含まれるバゾプレシン細胞について、単離した生細胞レベルでの機能解析を可能にするため、遺伝子改変による蛍光標識を行なった。

『方法』TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) により、Rx20-10 株のバゾプレシン遺伝子座に eGFP 遺伝子を挿入した (Rx20-10 株 : mESC, EB5 株に、視床下部マーカーである Rax 遺伝子座に eGFP がヘテロにノックインされている)。抗生剤耐性遺伝子により eGFP 挿入株を選択し、その中から PCR 法によりヘテロにノックインされた細

胞株を選択した。この細胞株を SFEBq して 5~7 日目に Rx : : GFP による FACS ソーティングにより純化、その後分散培養あるいは半気相培養下で成熟分化を行なった。GFP の自家蛍光を有するニューロンについて、Ca²⁺ イメージング法等で解析を行った。

『結果及び考察』TALEN システムにより、高効率で AVP : : GFP ノックイン細胞が得られた。EB5 株でも同様の操作を行ない、ノックイン細胞株を得たが、分化させてみるとバゾプレシンニューロンの発現は無かった。Rax による純化操作がバゾプレシンニューロンの分化成熟に必要であり、除去された細胞から抑制因子が放出された可能性が示唆された。蛍光標識されたニューロンにおいて、カリウム等の脱分極刺激に対する細胞内カルシウム応答を確認した。今後この系を用いて、バゾプレシン系の機能解析を更に進めたい。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-41. マウス骨格筋における緑茶エピガロカテキンガレートによる糖取り込み増強作用

小原一男, 石川智久 (静岡県立大学大学院薬学研究院薬理)

緑茶は世界中で最も飲用されている飲み物の一つである。緑茶には多量のカテキンが含まれており、なかでもエピガロカテキンガレート (EGCG) が最も多く含まれていることが知られている。緑茶カテキンは強い抗酸化作用を持つほか、脂質低下作用、血圧低下作用、抗がん作用など様々な作用を持つことが報告されている。最近、緑茶カテキンが血糖低下作用を持つことが示されたが、その作用機序については不明な点が多い。一方、血糖低下には骨格筋の糖取り込みが重要な働きをしている。本研究では、マウス骨格筋における糖取り込みに対する EGCG の作用を検討した。

マウスヒラメ筋において、EGCG は濃度依存的に糖取り込みを増強した。また、EGCG による糖取り込み増強は H₂O₂ 分解酵素カタラーゼおよびプロテインキナーゼ C (PKC) のアイソフォームの一つ PKC δ の活性を特異的に阻害するロトレリンによって抑制された。さらに、EGCG により PKC δ の 311 番目のチロシン残基 (Tyr-311) のリン酸化が増強された。この EGCG による PKC δ (Tyr-311) のリン酸化はカタラーゼにより抑制された。PKC δ は H₂O₂ により Tyr-311 が特異的にリン酸化され、活性化することが報告されていることから、EGCG による PKC δ (Tyr-311) のリン酸化に H₂O₂ が関与すると考えられる。

以上の結果より、骨格筋における EGCG による糖取り込み増強に H₂O₂ を介する PKC δ の活性化が関与することが

示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-42. 食事誘導性熱産生に及ぼす UCP1 と骨格筋 AMPK の調節作用

高木一代^{1,2}, 箕越靖彦^{1,2} (1 総合研究大学院大学生命科学研究科, 2 生理学研究所生殖・内分泌系発達機構研究部門)

褐色脂肪組織 (BAT) と骨格筋は、エネルギーバランスの調節に重要な組織として知られている。しかしながら、食餌誘導性熱産生 (DIT) における BAT と骨格筋の役割は不明である。本研究では、野生型マウス (WT), UCP1 ノックアウトマウス (UCP1-KO), 骨格筋特異的 dominant-negative-AMPK 発現マウス (dnAMPK-mTg), 両者を合わせた UCP1-KO&dnAMPK-mTg マウス (KO-Tg) に高脂肪食 (HFD) を摂取させ、室温環境下で 1 日のエネルギー消費量 (total EE) を測定した。その結果、KO-Tg マウスの EE は WT に比べて有意に低下した。UCP1-KO および dnAMPK-mTg マウスは WT と差がなかった。EE から、安静時代謝 (RMR), 運動によるエネルギー消費 (Ex) および DIT を算出したところ、RMR と Ex は 4 群の間に差はなかった。しかしながら、KO-Tg マウスの DIT が WT に比べて有意に低下していた。DIT には交感神経が関与することが報告されている。そこで、絶食下においてマウスにノルエピネフリン (NE) を投与し、total EE を測定した。その結果、NE 投与によって WT マウスの total EE は速やかに上昇したが、KO-Tg マウスの total EE は全く増加しなかった。次に、HFD を長期間摂取した時のマウスの体重変化を調べた。摂取エネルギーを一定にするため摂食時間を暗期に固定し、ペアフィーディングをおこなった。その結果、KO-Tg マウスは摂取エネルギー量を一定にしても対照群に比べ体重が増加した。以上の結果から、total EE 及び DIT の調節に、UCP1 と骨格筋 AMPK の両方が重要であることが明らかとなった。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-43. 頸椎椎間板ヘルニアによる脊髄障害が原因と考えられた顔面半側発汗障害の病態生理～頸髄内発汗系交感神経下行路の解明への応用

犬飼洋子, 岩瀬 敏, 西村直記, 清水祐樹, 佐藤麻紀, 鬼塚知里, 菅屋潤壹, 佐藤元彦 (愛知医科大学医学部生理)

頭頸部を支配する発汗神経に投射する頸髄内交感神経下行路はヒトでは解明されていない。本研究では、顔面半側発汗障害の原因が頸椎椎間板ヘルニアであると思われた

11 例で、その病態生理を検討し、発汗に関与する頸髄内交感神経下行路を推察した。

対象は顔面半側の多汗を訴え、頸椎椎間板ヘルニアが認められた 37~74 歳の男性 7 名と女性 4 名である。他の自律神経症状や運動症状はなく、2 名で上肢しびれがあった。室温 40℃, 相対湿度 50% の人工気候室で、Minor 法による全身発汗分布、サーモグラフィによる全身皮膚温分布、神経学的所見とで病巣を推察し、MRI で確認した。

発汗分布は一側性多汗型 (54.5%) と分節性半側多汗型 (45.5%) を認め、椎間板最突出部位はそれぞれで正中 (100%), 傍正中 (正中より 3mm 外側) (100%) であった。後者の 80% で突出側は無汗側に一致しており、無汗の頭側境界髄節が突出髄節と一致していた。神経学的検査を施行できた 4 名のうち、1 名の上肢しびれ側、3 名の腱反射亢進側、そのうち 2 名の Babinski 反射陽性側も無汗側に一致していた。MRI で脊髄内病変は全例で認められなかったが、以上より、2 型とも椎間板ヘルニアによる圧迫が原因であると思われる。

椎間板突出正中型では、頸髄前角の後角部辺りの発汗神経下行路を灌流する。圧迫された側の中心動脈の末梢循環不全により、運動麻痺や感覚障害をほぼ免れる同側の一側性無汗をきたし、その代償性に対側の顔面を含む一側性多汗が生じたと考える。ラットで、胸腰髄の中間外側核へは主に脊髄背外側路 (DLF) を通る交感神経前運動ニューロンが投射するが、同様に中間外側核へ投射する灰白質の spinal segmental autonomic interneuron と脊髄固有ニューロンに、シナプス接合している可能性が報告されている。本症例の椎間板突出傍正中型では、無汗の頭側境界髄節が圧迫された髄節と一致することから、おそらく突出側 DLF を圧迫し、その上位の各髄節の前記シナプス接合による発汗が障害を免れたといえ、前記のシナプス接合の存在の推察がヒトで支持された。これにより顔面を含むその同側上位に代償性の分節型多汗をきたしたと考察する。同症候の機序の検討は、ヒトにおける頸髄の発汗系交感神経下行路の解明に寄与する。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-44. Role of sympathetic nerve activity in the process of fainting

S. Iwase¹, N. Nishimura¹, T. Mano² (1 Department of Physiology, School of Medicine, Aichi Medical University, 2 Gifu University of Medical Sciences)

Syncope is defined as a transient loss of consciousness and postural tone, characterized by rapid onset, short duration, and spontaneous recovery, and the process of syn-

cope progression is here described with two types of sympathetic change. Simultaneous recordings of microneurographically-recorded muscle sympathetic nerve activity (MSNA) and continuous and noninvasive blood pressure measurement has disclosed what is going on during the course of syncope progression. For vasovagal or neurally mediated syncope, three stages are identified in the course of syncope onset, oscillation, imbalance, and catastrophe phases. Vasovagal syncope is characterized by sympathoexcitation, followed by vagal overcoming via the Bezold-Jarisch reflex. Orthostatic syncope is caused by response failure or a lack of sympathetic nerve activity to the orthostatic challenge, followed by fluid shift and subsequent low cerebral perfusion. Four causes are considered for the compensatory failure that triggers orthostatic syncope: hypovolemia, increased pooling in the lower body, failure to activate sympathetic activity, and failure of vasoconstriction against sympathetic vasoconstrictive stimulation. Many pathophysiological conditions have been described from the perspectives of 1) exaggerated sympathoexcitation and 2) failure to activate the sympathetic nerve. We conclude that the sympathetic nervous system can control cardiovascular function, and its failure results in syncope; however, responses of the system obtained by microneurographically-recorded MSNA would determine the pathophysiology of the onset and progression of syncope, explaining the treatment effect that could be achieved by the analysis of this mechanism. COI none.

O-45. 心筋における異常自動能の発生機序：ヒト心室筋細胞モデルを用いた非線形力学的解析

倉田康孝, 谷田 守, 九田裕一, 芝本利重 (金沢医科大学医学部生理学 II)

【目的】心室筋に生じる早期後脱分極 (EAD) は QT 延長症候群 (LQTS) における致死的不整脈の原因と考えられており, その発生機序と制御方法を解明することが, 致死的不整脈の予防・治療法の確立に必要な不可欠である. 本研究では, ヒト心室筋細胞モデルの数学的構造解析 (分岐解析) を行い, LQTS における EAD の発生機序を非線形力学的観点から検証した.

【方法】ヒト心室筋細胞の非線形力学系モデル (Kurata et al, Biophys J, 2005; O'Hara et al, PLOS Comput Biol, 2011) を用い, 遅延整流 K^+ 電流の遅い成分 (I_{Ks}) または速い成分 (I_{Kr}) の抑制と Na^+ 電流の非不活性化成分 (I_{Nass}) を想定して, LQT1-3 モデル細胞を作成した. モデルシステム

の平衡点・ダイナミクスとその安定性のパラメータ依存性変化を表す「分岐図」を作成し, 分岐パターンと EAD 出現との関連を解析した.

【結果】1) I_{Kr} 抑制下での I_{Ks} 減少, L 型 Ca^{2+} 電流 (I_{CaL}) 増強あるいは I_{Nass} 増大により, 活動電位持続時間の延長に伴って EAD が再現された. 2) LQT1-3 モデル細胞での EAD 出現閾値は正常細胞より低く, 脱分極領域でのホップ分岐 (平衡点安定化) 点のシフトがその原因であった. 3) I_{Ks} の遅い活性化ゲート変数をパラメータ (遅いサブシステム) とみなして遅い変数に関する速いサブシステムの分岐図を作成したところ, 遅い変数の増加に伴って安定平衡点のホップ分岐 (平衡点不安定化) が生じ, 安定リミットサイクル (極限周期軌道) が出現した. 周期軌道は, 遅い変数のさらなる増加によって生じるホモクリニック分岐を経て消失した.

【総括】EAD は, I_{Ks} の遅い活性化に伴って速いサブシステムの安定平衡点とホップ分岐 (平衡点不安定化) 点近傍で生じる一過性の電位振動とみなすことができる. 心筋システムの分岐構造解析 (分岐制御) は EAD 抑制方法の体系的解明に極めて有用であり, LQTS における EAD の抑制には I_{Ks} 活性化の促進が極めて有効であると考えられた. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-46. マウス洞房結節細胞におけるミトコンドリア一筋小胞体の構造的・機能的クロストーク解析

竹内綾子, 松岡 達 (福井大学医学部統合生理学)

我々は, ミトコンドリア Na^+Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX が, 培養心房筋細胞 HL-1 において筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ SERCA と機能的に連関し, ミトコンドリア一筋小胞体クロストークを構成することを見出した. HL-1 細胞においては, NCLX を介したミトコンドリア一筋小胞体クロストークは拍動リズムの制御に関与する (Takeuchi et al, *Sci Rep*, 2013; Takeuchi et al, *J Physiol Sci*, 2014). しかし, 実心臓のペースメーカーである洞房結節細胞における NCLX 及びこれを介したミトコンドリア一筋小胞体クロストークの寄与は不明である. 本研究では, マウス洞房結節の電子顕微鏡解析と数理モデル解析により, 洞房結節細胞におけるミトコンドリア一筋小胞体クロストークの役割を考察した.

マウス洞房結節細胞において, ミトコンドリア及び筋小胞体はそれぞれ細胞の $19.6 \pm 4.8\%$ 及び $6.4 \pm 1.1\%$ を占め, 両オルガネラの一部は極めて近傍に局在した. そこで, 既存の洞房結節細胞数理モデルに, 新たにミトコンドリア Ca^{2+} 動態ならびにミトコンドリア一筋小胞体間サブスペースを導入し, 数理解析を行った. もととなるモデルは, 拍動リズムの発生における筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の寄与

が異なる 2 種類を用いた (Himeno et al., *Am J Physiol*, 2010; Maltsev and Lakatta, *Am J Physiol*, 2009). その結果, いずれのモデルにおいても, NCLX 発現量の減少に応じて筋小胞体 Ca^{2+} 含量が減少した. また, 筋小胞体に接するミトコンドリアの割合の増大に伴って, 筋小胞体 Ca^{2+} 含量における NCLX の寄与が大きくなった. 一方, 拍動リズムは, NCLX の発現量の減少に応じて Himeno model では短縮し, Maltsev and Lakatta model では遅延した. これは, 拍動リズム発生における持続性内向き電流 I_{st} ならびに筋小胞体 Ca^{2+} 動態の寄与の違いに依存すると考えられる. 以上の結果から, ミトコンドリア-筋小胞体クロストークは, 洞房結節細胞の Ca^{2+} 動態や拍動リズム発生に深く関与することが示唆された. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-47. ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX による B リンパ球細胞走化の調節

松岡 達¹, 金 鳳柱², 竹内綾子¹ (¹福井大学医学部統合生理学, ²徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター)

我々は, ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX が, 抗原受容体刺激に対する B リンパ球細胞内 Ca^{2+} 応答に必須のタンパクであることを報告した (Kim et al., *J Physiol*, 2012). しかし, B リンパ球細胞の重要な機能のひとつである「細胞走化」における NCLX の役割については不明である. 本研究では, マウス由来培養 B リンパ球細胞 A20 ならびにマウス脾臓由来 B リンパ球細胞を用いて, NCLX の細胞走化における役割について調べた.

transwell を用いてケモカイン (CXCL12) に対する A20 細胞の走化を調べたところ, 細胞走化の程度は, NCLX の阻害剤 CGP-37157 の添加や, siRNA による NCLX ノックダウンによって著しく減少した. これは, NCLX が A20 B リンパ球細胞の走化性に関与することを示唆する. 次に, コラーゲンゲルマトリクスを用いて, 個々の細胞の運動性を観察した. その結果, NCLX ノックダウン A20 細胞では, CXCL12 非存在下におけるランダムな動きが増大したが, CXCL12 に対する走化性は認められなかった. マウス脾臓由来 B リンパ球の細胞走化に対しても, CGP-37157 は同様の効果を示した. また, 細胞内 Ca^{2+} 濃度を調べたところ, CXCL12 非存在下では, コントロールと比較して NCLX ノックダウン A20 細胞において細胞質 Ca^{2+} 濃度の増大が認められた. 一方, コントロール細胞では CXCL12 刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度の増大が認められたが, NCLX ノックダウン A20 細胞では増大しなかった.

以上の結果から, NCLX を介した細胞内・ミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態が, B リンパ球細胞走化の制御に関与すると

考えられる. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-48. 腎尿管における細胞間接着分子 claudin-2 発現に対する高浸透圧の影響

五十里 彰¹, 藤井尚子¹, 遠藤智史¹, 松永俊之¹, 山崎泰広², 山口賢彦², 菅谷純子² (¹岐阜薬科大学薬学部生化学, ²静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学)

上皮細胞は細胞間にタイトジャンクションを形成し, 電解質や薬剤の細胞間透過性を制御する. タイトジャンクションは膜貫通型蛋白質の claudin や足場蛋白質の ZO-1 などによって構成される. ナトリウム透過性のポアを形成する claudin-2 は, 腎臓の近位尿管に局限して発現するが, 発現調節機構は不明なままである. 我々は claudin-2 の発現調節機構を解明するため, 浸透圧の影響について検討した.

イヌ尿管由来の MDCK II 細胞を高浸透圧処理すると claudin-2 発現が低下し, この効果はプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤の Go6983 や PKC β 選択的阻害剤の共処理によって阻害された. 同様の結果が, ラット腎スライスおよびヒト尿管由来の HK-2 細胞で観察された. 高浸透圧処理によって PKC β のリン酸化量が増加した. 等張圧下で PKC 活性化剤の phorbol 12-myristate 13-acetate は claudin-2 発現を低下させた. 以上の結果から, claudin-2 発現の低下に PKC β が関与することが明らかになった.

Claudin-2 のプロモーターアッセイにより, -469/-6 の領域に高浸透圧感受性の部位が存在すると示唆された. この部位には, GATA の推定上の結合部位が存在する. 高浸透圧処理により核内の GATA-2 発現が低下し, この効果は PKC β 阻害剤の共処理によって阻害された. プロモーターの GATA 結合部位に変異を導入したところ, 高浸透圧の効果が阻害された. クロマチン免疫沈降アッセイにおいて, プロモーター領域への GATA-2 の結合が確認された.

以上の結果から, 腎尿管では浸透圧の上昇により, PKC β の活性化, GATA-2 の発現低下を介して, claudin-2 発現が低下すると示唆された. 近位尿管では尿の浸透圧が等張に保たれるため, claudin-2 が発現すると考えられる. 本発表について, 過去 1 年間に申告すべき利益相反はない.

O-49. KCNQ1/KCNE1 チャネルを開きにくくしている分子メカニズム

中條浩一^{1,2}, 久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所神経機能素子, ²総研大生理科学専攻)

電位依存性カリウムチャネル KCNQ1 は, 心臓などで発

現し、修飾サブユニットである KCNE タンパク質とイオンチャンネル複合体を構成していると考えられている。特に KCNE1 との組み合わせである KCNQ1/KCNE1 チャンネルは、心臓の非常にゆっくりと活性化するカリウム電流 I_{Ks} を担っているとされている。KCNQ1 チャンネルは単独でもイオンチャンネルとして機能することができるが、KCNE1 が共発現すると、その活性化キネティクスは 100 倍程度遅くなり、さらに電位依存性が 50mV ほど脱分極側にシフトする。両遺伝子とも QT 延長症候群等の遺伝性不整脈の原因遺伝子であることからわかるように、この開きにくい性質が心臓生理学的にも重要であると考えられるが、KCNE1 がどのようにして KCNQ1 チャンネルを開きにくくしているかについての分子機構はまだよくわかっていない。

我々は、KCNQ1 チャンネルの電位センサードメインとその周辺部位に着目し、S4 セグメント（電位センサードメイン）にある 232 番目のフェニルアラニン (Phe232)、および S5 セグメント（ポアドメイン）にある 279 番目のフェニルアラニン (Phe279) を、それぞれさまざまなアミノ酸残基に変異させたところ、KCNE1 共発現時に限り、アミノ酸側鎖の大きさに依存して活性化の電位依存性がシフトすることを見出した。フェニルアラニンは比較的大きなアミノ酸であり、これらが KCNQ1/KCNE1 チャンネルの活性化時にぶつかることで開きにくくなることが示唆された。Voltage clamp fluorometry 法で電位センサーの動きを蛍光強度変化でイオン電流と同時に測定したところ、KCNQ1/KCNE1 チャンネルにおいては、1) 電位センサーが動いたあと遅れて電流が活性化すること、2) この遅延が Phe232 および Phe279 によって作られていることを見出した。以上のことから、KCNQ1/KCNE1 チャンネルは、Phe232 と Phe279 の物理的相互作用が開状態を不安定化することで、開きにくいイオンチャンネルになっていると考えられた。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-50. 脂質平面膜法を用いた TRP チャンネルの機能解析

内田邦敏^{1,2,3}, L. Demirkhanyan¹, 富永真琴^{2,3}, E. Zakarian¹ (¹Department of Cancer Biology and Pharmacology, University of Illinois College of Medicine Peoria, ²生理学研究所 (岡崎統合バイオサイエンスセンター) 細胞生理研究部門, ³総合研究大学院大学生理学専攻)

脂質平面膜法は水、塩類、イオンチャンネル及びリン脂質のみで構成される実験系であり、特定のイオンチャンネル分子そのものの性質、分子機構を単純でコントロールされた環境で解析するための方法の 1 つである。今回、2013 年にその温度感受性が報告された (Vriens et al. Neuron)

TRPM3 チャンネルを用いた再構成系を確立し、機能解析を行った。その結果、TRPM3 のリガンドは用量依存的に TRPM3 の開口確率を増加させた。PIP₂はいくつかの TRP チャンネルの活性化に必須であると報告されているが他の TRP チャンネルとは異なり TRPM3 活性は PIP₂非存在下でも認められた。さらに高濃度の PIP₂を添加すると TRPM3 活性は増強された。温度による活性化についても検討した結果、42°C までの温度上昇は TRPM3 を活性化しなかった。一方、リガンド存在下ではコンダクタンスが高温になるほど大きくなる傾向が認められたが、その温度依存性はとても小さいものであった。また、温度依存的な開口確率の大きな変化も認められなかった。温度依存的な活性化にはこの再構成系に存在しない何らかの因子が重要な役割を担っている可能性がある。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-51. 高濃度炭酸泉浸漬時の皮膚血管拡張と温度感覚上昇機序—TRP チャンネルの関わり—

西村直記, 西村のみ子, 岩瀬 敏, 佐藤元彦 (愛知医科大学医学部生理学講座)

【目的】高濃度炭酸泉 (以下、炭酸泉) への浸漬中には、①浸漬部位のみでの皮膚血管拡張作用と②温度感覚の上昇作用の 2 つの明らかな作用がみられる。この機序については、経皮的に吸収された CO₂ が感覚神経末端に発現している温度感受性 TRP (transient receptor potential) チャンネル作用した結果であると考えているがその詳細については明らかではない。本研究では、温度以外に TRP チャンネルを活性化させるカプサイシン溶液やメントール溶液を皮膚に塗布させた後に、炭酸泉もしくはさら湯へ浸漬させた時の皮膚血流量や皮膚温度感覚の変化について検討した。

【方法】健康成人男性を被験者とした。被験者の両側の前腕屈側部位 (約 7×5cm) に、① 0.1% カプサイシン溶液 (カプサイシン 65%, ジヒドロカプサイシン 35%; アルドリッチ社) または② 10% メントール溶液 (ハッカ油, メントール 30% 以上含有; 健栄製薬) を塗布した。その後、右前腕を炭酸泉 (1000ppm; 三菱レイヨン) に、左前腕をさら湯にそれぞれ同時に 10 分間浸漬させた際の、皮膚血流量および主観的温度感覚 (VAS スケール) の測定を行った。水温はいずれも 33°C に維持した。また、5% リドカインクリーム (LC; AstraZeneca 社) 塗布により経皮麻酔 (電位作動性 Na⁺チャンネルの活動をブロック) を行った後に、炭酸泉およびさら湯へ浸漬させた時の温度感覚の変化についても検討した。

【結果と考察】カプサイシン溶液塗布時において、炭酸泉への浸漬側ではピリピリとした痛みを感じると共に、さら

湯への浸漬側よりも温かく感じた。この機序については、カプサイシンが感覚神経細胞の TRPV1 を活性化させ、同時に経皮的に吸収された CO₂ により形成された H⁺ によっても TRPV1 が活性化された結果であると推察される。また、メントール溶液を塗布した際には、さら湯への浸漬側では明らかな冷感を感じたのに対し、炭酸泉への浸漬側では冷感が抑制された。これについては、CO₂ により TRPV1 の活性化（温感の上昇）とメントールによる TRPM8 の活性化（冷感の上昇）の情報がそれぞれ別の神経線維を通過して脳に伝えられた結果であると思われる。また、リドカインクリーム塗布により麻酔効果が認められると共に、皮膚血管の拡張が抑制されたことから、温度感覚上昇機序とあわせて皮膚血管拡張機序について詳細に検討する。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-52. 容積感受性アニオンチャネルの活性化におけるアクチンフィラメントの役割

清水貴浩¹、大竹宏尚¹、尾野純也¹、藤井拓人¹、岡田泰伸²、酒井秀紀¹（¹富山大学医学薬学研究部（薬学）薬物生理学、²総合研究大学院大学）

容積感受性外向き整流性 (VSOR) アニオンチャネルは、細胞容積調節機構および細胞死誘導において重要な役割を果たしていることが知られている。これまでの研究で、ヒト口腔類表皮癌 KB 細胞では VSOR 活性が観察されるが、KB 細胞を抗癌剤（シスプラチン）耐性にした KCP-4 細胞では VSOR チャネル活性が消失していることを明らかにしている。本研究において、これら 2 つの細胞株の膜画分を用いて、二次元電気泳動法と MALDI-TOF-MS によるプロテオーム解析を行ったところ、KCP-4 細胞における β アクチンの発現量が、KB 細胞に比べ顕著に低いことが明らかとなった。また免疫細胞染色により KB 細胞ではアクチンフィラメント構造が観察されたが、KCP-4 細胞では消失していた。それ故に、アクチンフィラメント構造が VSOR チャネル活性を制御するのかわパッチクランプホールセル記録法および細胞容積測定法により検討した。β アクチンをノックダウンした KB 細胞だけでなく、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を処理した KB 細胞において、細胞膨張により活性化する VSOR 電流が著しく減少した。またこれらアクチンフィラメントが消失した KB 細胞において、細胞膨張後の容積回復過程（調節性容積減少：

RVD）が有意に抑制された。以上の結果から、VSOR アニオンチャネルの活性化に細胞骨格系の構造維持が必要不可欠であることが示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。

O-53. 癌細胞膜マイクロドメインにおけるナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャネルとの機能連関

藤井拓人¹、山本翔太¹、清水貴浩¹、竹島 浩²、酒井秀紀¹（¹富山大学院薬物生理学、²京都大学院生体分子認識学分野）

ナトリウムポンプ (Na⁺, K⁺-ATPase) の特異的阻害剤である強心配糖体は、近年癌治療における有用性が注目されている。我々は、ヒト癌細胞において、強心配糖体のウアバインが、Na⁺, K⁺-ATPase のイオン輸送活性を阻害しない低濃度 (nM レベル) で容積感受性アニオンチャネル (VSOR) を活性化させることで癌細胞増殖抑制を引き起こすことを見出した。これらの効果は、コレステロールを細胞膜より除去することで膜マイクロドメインを破壊する methyl-β-cyclodextrin を処理することにより阻害されたことから、ウアバインによる VSOR 活性化に膜マイクロドメインの関与が示唆された。また、ヒト大腸癌細胞において、細胞膨張時に活性化される VSOR チャネルの重要な構成分子として報告された leucine rich repeat containing 8 family member A (LRRC8A) の発現を、siRNA によりノックダウンしたところ、ウアバイン (100nM) による VSOR チャネルの活性化および細胞増殖抑制効果が阻害された。興味深いことに、LRRC8A ノックダウンは、Na⁺, K⁺-ATPase α1 アイソフォーム (α1NaK) の発現量を有意に減少させたが、Na⁺, K⁺-ATPase による ⁸⁶Rb⁺ 輸送活性に有意な変化は見られなかった。従って、低濃度ウアバインは、膜マイクロドメインに存在するイオン輸送活性を持たない受容体型 α1NaK に結合し、LRRC8A により構成される VSOR チャネルを活性化することで、癌細胞の増殖抑制を引き起こすことが示唆された。また、ウアバインによる VSOR 活性化や増殖抑制効果および LRRC8A ノックダウンによる効果は、非癌細胞では観察されなかったことから、膜マイクロドメインにおける α1NaK-VSOR (LRRC8A) クロストークは、強心配糖体による癌細胞選択的な増殖抑制機構に関与している可能性が示唆された。本発表について、過去 1 年間に申告すべき利益相反はない。