

1. 新生児培養心筋細胞の介在板形成と筋成熟化における TRPV2 の役割

氏原嘉洋^{1,2}, 毛利 聡^{1,2}, 成瀬恵治², 片野坂友紀²
(¹川崎医科大学生理学, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・システム生理)

細胞内外からのメカニカルストレスは、筋細胞の成熟に重要な役割を果たすことが知られているが、詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。我々は、これまでに、成熟した心筋細胞の介在板には、メカノセンサーである TRPV2 が発現しており、心筋細胞の構造や機能に必須の分子であることを示してきた。本研究では、心筋細胞の成熟過程における TRPV2 の役割を明らかにするために、新生児から単離した心筋細胞を培養し、心筋細胞の成熟過程を経時的に解析した。正常心筋細胞では、培養後 24 時間以内に伸展刺激依存的な細胞内 Ca^{2+} 流入が観察された。さらに 48 時間以内に E-C coupling に伴う Ca^{2+} トランジェントが生じ、隣り合う心筋細胞同士の同調した拍動を確認した。このような細胞では、 Ca^{2+} ハンドリング分子である NCX1 の形質膜への局在や、介在板構造やサルコメア構造の発達が観察できた。その後 72 時間までの過程では、心筋細胞が生理的に肥大し、 Ca^{2+} トランジェントの amplitude の増大や decay speed の亢進、筋小胞体の Ca^{2+} コンテンツの増大が観察され、形態的にも機能的にも成熟化が進んでいた。一方、TRPV2 欠損細胞では、伸展刺激依存的な Ca^{2+} 応答が消失し、介在板構造の形成が観察できなかった。48 時間以上経過しても Ca^{2+} トランジェントは観察されず、NCX1 の発現の増大や膜への局在、サルコメアの発達、細胞の肥大も認められなかった。このような TRPV2 欠損細胞では、同調拍動が見られなかった。さらに、正常心筋細胞でも、TRPV2 の阻害剤であるルテニウムレッドを添加した培地で培養した場合、介在板やサルコメアが未成熟のままであった。これらの結果は、新生児心筋細胞の成熟過程には、TRPV2 を中心とした介在板形成やメカニカルシグナルが必要であることを示唆する。(利益相反 なし)

2. Docosapentaenoic acid (DPA) n-6 不飽和脂肪酸による新たな血管攣縮の抑制作用の発見とその分子機構の解明

張 影, 張 敏, 呂 博超, 岸 博子, 小林 誠
(山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学分野)

Rho キナーゼを介する血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性異常収縮は、血管攣縮の本態であり、突発性の血管病の主因として恐れられているが、その分子機構は長い間不明なままであった。当研究室では、血管攣縮の原因分子として sphin-

gomylphosphorylcholine (SPC) を同定し、SPC が、Fyn チロシンキナーゼ/Rho キナーゼ経路を介して血管平滑筋の細胞質カルシウム濃度を変化させることなく、 Ca^{2+} 非依存性異常収縮を引き起こす事を見出した。さらに、この病的なシグナル経路を特異的に阻害する物質の探索を行い、n-3 不飽和脂肪酸の一種である eicosapentaenoic acid (EPA) を同定した。一方、docosapentaenoic acid (DPA) は EPA と類似し、魚油に多く含まれる必須脂肪酸の一種であるが、血管攣縮に対する作用は過去に報告が無い。今回、我々は DPA が、 Ca^{2+} による正常収縮にはほとんど影響を与えず、SPC による血管異常収縮のみを特異的に抑制できることを発見したので、報告する。DPA は二重結合の位置によって n-3 と n-6 不飽和脂肪酸の二つの異性体がある。通常、n-3 不飽和脂肪酸は血流を改善する“善玉”脂肪酸であるのに対して、n-6 不飽和脂肪酸は体内でアラキドン酸に代謝され炎症を誘発し血管に対して悪影響のある“悪玉”脂肪酸である、と言われている。しかしながら、この常識とは反して、本研究においては、驚くべき事に、DPA n-6 不飽和脂肪酸は DPA n-3 と同じく、 Ca^{2+} による正常収縮をほとんど抑制せず、SPC による異常収縮を著明に抑制することを見出した。また、張力-細胞質 Ca^{2+} 濃度同時測定実験において、DPA n-6 不飽和脂肪酸は細胞質 Ca^{2+} 濃度を変えないことなく、SPC による異常収縮を抑制する効果を示した。更に、DPA による異常収縮抑制の分子機構を調べたところ、DPA n-6 不飽和脂肪酸は、SPC による Rho キナーゼの細胞膜への移動を抑制することによって Rho キナーゼの活性化を抑制し、その結果として、ミオシン軽鎖のリン酸化も抑制し異常収縮を抑制することを見出した。今回の結果より、DPA n-6 不飽和脂肪酸は新たな血管攣縮の抑制作用があり、血管病の予防・治療薬として使用できる可能性があることが示唆された。(利益相反 なし)

3. トロンビンによる内皮バリアー機能障害の初期事象としてのミオシン軽鎖 2 リン酸化の特異的役割

平野勝也 (香川大学医学部自律機能生理学)

【背景と目的】内皮バリアー機能障害は、動脈硬化、肺高血圧などの血管病の初期病態形成に重要な役割を果たす。内皮バリアーの破綻には、ミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化によるミオシン ATPase の活性化と続くアクチン線維形成が重要な役割を果たす。MLC は、T18 および S19 の 2 箇所でもリン酸化あるいは 2 リン酸化を受ける。本研究は、内皮バリアー障害において MLC の 1 リン酸化 (pMLC) と 2 リン酸化 (ppMLC) に機能的違いがあるか否かを明らかにする。

【方法と結果】培養ブタ大動脈内皮細胞において、トロン

ピンは3~5分で最大に達する経内皮細胞電気抵抗 TEER の低下を引き起こした。Phos-tag SDS-PAGE 法により pMLC と ppMLC を定量解析すると、pMLC は刺激前値 25% からトロンピン刺激3分後には 35% に軽度上昇し、ppMLC は 2% から 35% へ上昇した。その後、pMLC は刺激 10 分後に刺激前値に復した後、15 分後から再び 30% 程度にまで上昇した。ppMLC は 15 分以内にほぼ刺激前値に復した。トロンピンによる TEER 低下、ppMLC の上昇は ROCK 阻害剤により消失したが、3 分後の pMLC は抵抗性を示した。トロンピン刺激3分後、ppMLC は細胞辺縁に局在し、これに一致してアクチン線維の形成が認められた。pMLC は核周辺の細胞質に局在した。刺激 10 分以降、アクチン線維はストレスファイバーを形成した。T18 と S19 の両者を A に変異させた MLC を発現する内皮細胞では、トロンピンによる細胞辺縁部のアクチン線維形成と TEER 低下が抑制された。どちらか一方の変異ではこの抑制作用は認められなかった。

【結論】 pMLC と ppMLC は異なる制御を受け、異なる細胞内局在を示す。細胞辺縁部における ppMLC とアクチン線維形成は、バリアー破綻の初期事象として重要な役割を果たす。(利益相反 なし)

4. 低酸素安定化ドメインを用いた脳腫瘍治療ペプチドの開発

山口貴博¹、道上宏之¹、北松瑞生²、松下博昭¹、西木禎一¹、松井秀樹¹ (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学、²近畿大学理工学部応用化学科生物物理化学)

悪性脳腫瘍治療においては、腫瘍細胞を特異的に殺傷し、正常脳細胞へ毒性を示さない薬剤の開発が求められる。しかし、脳腫瘍組織には様々な腫瘍細胞が存在しており、それら全てに効果を示し、且つ、正常細胞に影響を与えない生理活性物質を発見することは非常に困難である。そこで我々は、脳腫瘍を含む悪性腫瘍(がん)の組織微小環境に着目した。がん微小環境において、正常部と腫瘍部の違いのひとつは、酸素濃度である。腫瘍部では、細胞密度が高く、腫瘍細胞増殖速度が速いため、低酸素環境となっており、嫌気性解糖が起きている。低酸素環境にて発現する主要因子として、低酸素誘導因子 HIF (Hypoxia inducible factor) が報告されている。また、HIF には、酸素を感知する領域である ODD (Oxygen dependent degradation domain) が存在する。

今回我々は、低酸素安定化ドメインの ODD の最小単位の ODD ペプチドを探索・評価した。さらにミトコンドリア膜を破壊し細胞殺傷効果を有する pro-apoptotic domain (PAD) と細胞膜透過ペプチド (CPP: Cell-penetrating pep-

tides) を結合させた、脳腫瘍治療ペプチド (PAD-ODD-CPP) を開発し、*in vitro* およびマウス脳腫瘍モデルを用いた *in vivo* でその効果について検討し、本学会で報告を行う。(利益相反 なし)

5. 統合生理学的手法によるマウス心筋細胞 TRPC3 チャネルの局在部位推定

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

心筋に数分間の持続的な伸展刺激を加えると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により心筋の収縮力が徐々に増加する現象が観察される。この現象は、伸展誘発遅発性張力増加反応として知られている。我々は、これまで持続伸展時の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 増加にアンジオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体-TRPC3 系が関与していることを報告した。TRPC3 は、非選択型陽イオンチャネルであるが、持続伸展時のカルシウム濃度増加反応は、TRPC3 が心筋細胞内のどこに局在するかによって影響される可能性がある。TRPC3 の心筋細胞内での局在部位については、形質膜上や筋小胞体 (SR) 上など様々な報告があり、未解明である。そこで、我々は TRPC3 が形質膜上と SR 上のどちらに局在するかを推定するために持続伸展による SR 内 Ca^{2+} 容量 ($[Ca^{2+}]_{SR}$) の変化を検討した。方法としては、生後 8~14 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。心筋細胞に伸展刺激を負荷するため、顕微鏡下で細胞の両端をカーボンファイバー (CF) にて把持し、1Hz の電気刺激下で、心筋細胞長を記録した。コンピュータにて CF の位置をコントロールし、細胞に $11.55 \pm 3.446\%$ の伸展刺激を加え、その状態を 300 秒間維持した。伸展刺激時の $[Ca^{2+}]_{SR}$ を測定するために Fura-4F を負荷した細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を電気刺激下で測定し、電気刺激を停止すると同時にカフェイン (10mM) を負荷し、 $[Ca^{2+}]_{SR}$ を評価した。その結果、持続伸展刺激は $[Ca^{2+}]_{SR}$ を増加させた ($43.6 \pm 6.22\%$, $n=9$)。この増加は TRPC3 阻害剤である C36I-A (5 μ M) により抑制傾向を示した ($12.5 \pm 13.2\%$, $n=2$)。心筋細胞数理モデル (Iribe-Kohl-Noble モデル) を用いたコンピュータシミュレーション実験では、TRPC3 を形質膜上に置いた時にのみ、この実験結果が再現された。以上の結果から、持続伸展時には形質膜上の TRPC3 が $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、結果として $[Ca^{2+}]_{SR}$ が上昇していることが示唆された。(利益相反 なし)

6. ジャトロファの種からの抽出物であるイソアメリカノール A は MCF-7 ヒト乳癌細胞を G2/M 期で停止することで増殖抑制作用を示す

片木絢子¹, 隋麗¹, 神鳥和代¹, 鈴木利貞², 片山健至², アクラム・ホセイン¹, 野口知里¹, 董有毅¹, 山口文徳¹, 徳田雅明¹ (¹香川大学医学部細胞情報生理学講座, ²香川大学農学部生物分子化学領域バイオマス化学研究室)

ジャトロファ (*Jatropha curcas*) の種から採れる油は主にバイオディーゼルとして使用される一方, 大量の搾りカスを生じる。この搾りカスの酢酸エチル抽出物から精製したイソアメリカノール A (IAA) を用いヒト癌細胞に対する増殖抑制効果を調べた。MCF-7 (乳癌), MDA-MB231 (乳癌), HuH-7 (肝癌), そして HeLa (子宮癌) 細胞に対し IAA を作用させたところ, 濃度依存的な増殖抑制が認められた。次いで MCF-7 を使い IAA の癌細胞抑制メカニズムの解明を目指した。マイクロアレイ解析では, IAA 処理した細胞では, 細胞周期関連, アポトーシス関連の数種類の遺伝子に変化が表れた。しかし, TUNEL アッセイでは IAA によるアポトーシス誘導が認められなかったため, 主なメカニズムとは考えられなかった。一方フローサイトメトリ解析では IAA により G2/M 期における強い細胞周期停止が見られた。マイクロアレイで選別した細胞周期関連遺伝子 BTG2 (B-cell translocation gene 2), GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha), p21 (p21^{WAF1/CIP1}), CDK1 (cyclin-dependent kinase 1), cyclin B1 と cyclin B2 に焦点を絞りタンパク質や RNA の変化をみた。マイクロアレイの結果と同様, IAA によって BTG2, GADD45A や p21 の発現は増加し, また CDK1, cyclin B1 や cyclin B2 が減少することが確認された。これらの結果から IAA の細胞増殖抑制作用機序として, BTG2, GADD45A や p21 の発現増加により G2/M 期を進めるのに必要な cyclins B/CDK1 complex 形成が阻害されること, さらに CDK1, cyclin B1, cyclin B2 の発現減少も合わせて起こることで, G2/M 期で停止するためと考えられた。ジャトロファの種の抽出物 IAA による癌細胞抑制の報告は我々が初めてであり, 今後 IAA を使用した癌の治療への期待が膨らむ。(利益相反 なし)

7. セロトニンによる海馬歯状回の貫通線維—顆粒細胞間シナプス伝達に対する直接的な抑制作用

野崎香菜子¹, 久保怜香², 古川康雄¹ (¹広島大学大学院総合科学研究科, ²広島大学大学院医歯薬保健学研究所)

セロトニン (5-HT) は様々な生理機能に関与し, 縫線核より様々な脳領域へその軸索を投射している。海馬歯状回においても, 5-HT はこの領域の主要情報伝達経路である貫通線維—顆粒細胞間 (PP-GC) シナプス伝達を調節することが知られているが, その作用は, 抑制性介在ニューロンを

介した間接的なものであると報告されている。一方で, 貫通線維や顆粒細胞に対する 5-HT の直接的な作用についての報告例は極めて少なく, その作用機序はおろか, その修飾経路の有無でさえ明確になっていない。そこで, 我々は PP-GC シナプス伝達に対する 5-HT の直接的な作用について検討を行った。

嗅内皮質から投射する貫通線維はその起始核により, 外側貫通線維 (LPP) と内側貫通線維とに分けられる。GABA_A 受容体のアンタゴニストを添加した条件下で, 入力線維ごとに EPSP を誘発し, 5-HT を添加したところ, LPP 由来の EPSP に対してのみ, 5-HT は顕著な抑制作用をもたらすことが明らかとなった。また, 薬理学的解析やコンピュータシミュレーションにより, この 5-HT による抑制作用が 5-HT_{1A} 型受容体と 5-HT₂ 型受容体の両者の活性化により引き起こされており, これらがそれぞれシナプス後細胞における伝導効率の低下, シナプス前終末における伝達物質放出過程の抑制に関わることが示唆された。本研究により, これまで主流とされてきた間接的な調節経路とは別に, PP-GC シナプス伝達に対する直接的な 5-HT の神経伝達修飾作用とその機構が明らかとなった。(利益相反 なし)

8. Tunicamycin inhibits synaptic plasticity via a pre-synaptic mechanism in the olfactory bulb underlying aversive olfactory learning

全加¹, 村田芳博¹, 奥谷文乃^{1,2}, 椛秀人¹ (¹高知大学医学部生理学講座, ²高知大学医学部地域看護学講座)

It is well known that tunicamycin (TM) can yield endoplasmic reticulum (ER) stress of eukaryote's cells, that generates the unfold protein response in ER lumen and causes series of cascade reactions induced by activated ER-stress response, which is linked to neuronal death in neurodegenerative diseases. In our experiments, aversive olfactory learning was prevented by intrabulbar infusion of TM in young rats. Using electrophysiology, we revealed TM has an inhibitory effect on the late phase of long-term potentiation induced at dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. Histological results showed the significant upregulation of C/EBP-homologous protein (CHOP-10) in mitral cell layer after intrabulbar infusion with TM under aversive olfactory learning. These results suggest that ER stress impaired olfactory learning by inhibiting synaptic plasticity in the olfactory bulb via a presynaptic mechanism.

The authors have no financial conflicts of interest (COI: none)

9. 新規アデノシン類似化合物 COA-Cl (コアクロル) は cAMP/CREB/PGC-1 α の経路を介して血管内皮成長因子 (VEGF) の産生を促進する

岡本隆司¹, 五十嵐淳介², 橋本 剛², 山下哲生², 菊田咲子³, 窪田泰夫⁴, 高田麻紀⁵, 小西良士⁵, 塚本郁子⁵, 平野勝也² (¹香川大学医学部医学科四年生, ²香川大学医学部自律機能生理学, ³香川大学医学部医学科三年生, ⁴香川大学医学部皮膚科学, ⁵香川大学医学部薬物生体情報学)

【目的】我々は新規に開発したアデノシン類似合成低分子 COA-Cl が血管新生促進作用を持つことを既に報告した。COA-Cl の血管新生作用は線維芽細胞共存下に増強する。本研究では、線維芽細胞における血管新生促進性ポリペプチド型成長因子 VEGF の産生に及ぼす COA-Cl の影響とその機序を明らかにする。【方法と結果】正常ヒト由来培養線維芽細胞 (NHDF) に COA-Cl (100 μ M) を添加すると、VEGF の mRNA 発現が増加し (刺激 48 時間, 2.1 ± 0.3 倍, $p < 0.05$, RT-PCR 法), 培養上清中の VEGF 濃度が有意に増加した (17 倍, $p < 0.05$, ELISA 法)。COA-Cl は、VEGF 遺伝子の制御に関わる転写補助因子 PGC-1 α の発現を、mRNA, タンパク質いずれのレベルにおいても増加させた。PGC-1 α 遺伝子の発現を抑制すると (siRNA 法), COA-Cl の VEGF 誘導能は有意に低下した。骨格筋や肝臓では PGC-1 α の発現は cAMP とその下流で働く転写因子 CREB により調節される。COA-Cl は、NHDF において、cAMP を増加させ、CREB の活性化を引き起こす Ser133 のリン酸化を誘導した (ELISA 法及びウエスタンブロット法)。cAMP 依存性プロテインキナーゼ阻害剤 H89 は、COA-Cl による PGC-1 α の発現誘導を抑制する一方、アデニル酸シクラーゼ刺激薬フォルスコリンが NHDF 培養上清中の VEGF 濃度を上昇させた。CRE 配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した COS-7 細胞において、COA-Cl はプロモータ活性を高めた。【結論】正常ヒト培養線維芽細胞において、COA-Cl は cAMP と CREB を介して PGC-1 α を誘導することにより、VEGF の発現を誘導し、産生を促進する。(利益相反 なし)

10. Paxillin ノックダウンが癌細胞の浸潤・遊走、およびストレスファイバー形成に与える影響について

松永一真¹, 張 影², 小林 誠² (¹山口大医学科 4 年, ²山口大学大学院医学系研究科・生体機能分子制御学分野)

ストレスファイバー形成は細胞遊走に重要な役割を果たしている。当研究室では、ストレスファイバーと細胞遊走の新規シグナル分子として Fyn チロシンキナーゼを同定した。さらに、ブルダウンアッセイにより非活性型 Fyn

とは結合せず、活性型 Fyn とのみ結合する新規分子を質量分析で解析し paxillin を同定した。

Paxillin は FAK などとともに接着斑を構成する分子である。本研究では、paxillin が癌細胞のストレスファイバー形成、および遊走や浸潤を制御する分子であるかを検討するために、paxillin を shRNA を用いてノックダウンし、シグナル経路が異なる 3 種類の遊走因子 (EGF, TGF- β 1, SPC) で刺激をして trans-well invasion assay および wound healing assay を使って浸潤能・遊走能について検討したほか、免疫染色によってストレスファイバー形成における paxillin の役割について考察した。

Control の細胞については 3 種類どの刺激においてもストレスファイバーの形成が増加するが、中でも TGF- β 1 および SPC による刺激はストレスファイバー形成を強く誘導した。paxillin をノックダウンした細胞はいずれの刺激によってもストレスファイバー形成が著明に抑制されることが判明した。一方、control の細胞の遊走や浸潤を強く誘導したのは TGF- β 1 および EGF の刺激のみであった。ただし、paxillin をノックダウンした細胞についてはいずれの刺激においても細胞の浸潤・遊走が抑制されていた。そこで TGF- β 1 の刺激についてその刺激と paxillin の発現量について western blotting で検討したところ、TGF- β の刺激時間に応じて paxillin の発現が増加することが認められた。

本研究の結果より、shRNA を用いて paxillin をノックダウンすると、遊走因子によって刺激してもストレスファイバー形成がなされなくなり、浸潤・遊走が抑えられることが判明した。また、接着斑分子である paxillin は、これまで発現量が不変で、安定していると信じられてきたが、TGF- β 1 の刺激についてはストレスファイバー形成を誘導するだけでなく短時間 (分) に paxillin の発現を高めることによって浸潤・遊走を増加させる可能性を見出した。

今後の展望としては、paxillin をノックダウンした癌細胞を動物に移植し、in vivo で癌細胞の浸潤や遊走を抑制できるか検討したい。(利益相反 なし)

11. 実験的ラット脳腫瘍モデルにおける CD200 分子の役割の解明

小林加奈^{1,2}, 馬越陽大¹, 三瀬綾乃¹, 船橋 祐¹, M.E. チョードリ¹, 矢野 元¹, 上野義智², 高田泰次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講座, ²愛媛大学大学院医学系研究科肝胆脾・乳腺外科学講座)

CD200 とその受容体 CD200R は、type1 膜貫通型タンパク質であり、両者の相互作用により CD200R を発現する骨髄系免疫細胞の起炎症性反応を抑制するため、癌の転移・進展などに関係する可能性がある。CD200 には、全長を持

つ CD200L に加え、分子量の小さいスプライシングバリエーションの CD200S が存在する。ヒト癌組織でも CD200L と CD200S の発現を認めた。腫瘍内における CD200 の作用を検討するため、CD200L・CD200S をそれぞれ発現させた C6 グリオーマ株を樹立し、ラット新生仔脳内に移植し脳腫瘍を作成した。親株・CD200L 発現株に比べ CD200S 発現株では、腫瘍容積が減少し、有意に生存期間が延長した。CD200L の発現は、腫瘍増大に作用した。腫瘍内には骨髄由来腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) が集積するが、CD200S 腫瘍内では TAM は樹状細胞様の形態を示し、CD8, パーフォリン, グランザイムの発現が亢進し、アポトーシス細胞が多数存在した。CD200S 腫瘍および TAM-CD200S 発現細胞共培養系では、樹状細胞マーカーの発現が上昇した。以上の結果は、CD200S は TAM の樹状細胞様への分化を促進し、腫瘍排除に作用している可能性を示唆する。CD200L は腫瘍増悪に作用する可能性があるが、なお検討が必要である。(利益相反 なし)

12. 一次運動野における AMPA/GABA シナプス可塑性による運動学習のメカニズム

木田裕之¹, 津田廉正¹, 山本由似², 大和田祐二², 美津島 大¹ (¹山口大学大学院医学系研究科システム神経科学, ²同 器官解剖学)

AMPA 受容体および GABA 受容体を介したシナプス可塑性は、記憶・学習などの高次脳機能に関与することが知られている。随意運動の起点となる大脳皮質一次運動野 (M1) においては、運動学習後に長期にわたりシナプス伝達効率が上昇することが報告されているが、その神経メカニズムはよく分かっていない。この点を明らかにするために、本研究ではスライスパッチクランプ法を用いてラット (4 週齢) 一次運動野 II/III 層のニューロン活動を記録した。運動学習課題としてローターロードテスト (1 日 10 試行) を最大 2 日間行い、運動学習が成立した後、電気生理学的特性の変化を調べ、非学習群と比較した。ラットは 1 日目のトレーニング中からロード上滞在時間を徐々に延長させ、2 日目には学習スコアがプラトーに達することを確認した (n=22)。運動学習後、M1 の II/III 層水平結合を電気刺激すると、誘発された AMPA 電流は増加し、特に運動 1 日目には AMPA/NMDA 比の有意な上昇 (1.48 倍) が観察された。微小興奮性シナプス後電流は運動 1 日目では振幅のみ、運動 2 日後には、振幅・頻度ともに非学習群と比較して有意に上昇した。M1 のウエスタンブロット解析からは、運動学習直後より AMPA 受容体のリン酸化が増加していることが分かった (1.38 倍)。これらの結果は運動学習後では

AMPA 受容体がシナプスへ移行したことを示唆する。さらに運動 2 日後には連続刺激応答 (100 ミリ秒間隔) は減弱し、シナプス前終末側のグルタミン酸放出確率の増加が確認された。一方で、抑制性シナプスの可塑性に関しては、微小興奮性シナプス後電流の頻度は運動 1 日目でのみ有意に減少し、GABA 応答の連続刺激応答は増加した。これは運動学習直後で GABA 抑制が減少していることを示唆する。以上より、M1 の II/III 層ニューロンでは、学習段階に応じて、プレ・ポストシナプス両側でダイナミックな可塑的变化が起こることが判明した。M1 における運動学習メカニズムには興奮性・抑制性シナプスの両者が貢献していると考えられる。(利益相反 なし)

13. 睡眠-覚醒リズムへのマイクログリア関与の可能性: グルタミン酸とノルアドレナリンによるマイクログリアの機能調節

武田遥奈, EM チョードリ, 宮西和也, 金久浩大, 矢野元, 田中潤也 (愛媛大学医学系医学系研究科分子細胞生理学講座)

シナプスは睡眠時に減少し、覚醒時に増加するとの報告がある。我々は、ラット前頭葉皮質から一定時間ごとに cDNA サンプルとウエスタンブロットングサンプルを調製し、シナプス要素の発現変化を検討した。その結果、前シナプスのシナプシン 1 や後シナプスの PSD95 はタンパク質レベルでラットの入眠時刻である午前 7 時に減少し、覚醒時にあたる午後 7 時に増加していたが、mRNA レベルでは明らかな差異はなかった。これらの結果から、シナプスの日内変動がマイクログリアによるシナプス貪食によってもたらされる可能性を想定し検討を進めた。午前 7 時には、マイクログリアの細胞体の拡大と細胞移動に関与するマトリックスメタロプロテアーゼや貪食と関連する MFG-E8 の高発現があった。共焦点顕微鏡による観察により、マイクログリア細胞内エンドソームにシナプス成分の存在を確認した。ラット一次培養マイクログリアを用い、赤色蛍光色素 PKH26 の食べ込みを計測する培養実験では、グルタミン酸により PKH26 の食べ込みが上昇し、ノルアドレナリンにより減少することを観察した。これらの結果は、入眠時にマイクログリアの活性化が起りシナプスの除去を行うことで、上行性賦活系の遮断が起している可能性。また、覚醒時には青斑核の NA 作動性神経細胞の活性化によりマイクログリアの機能的抑制が生じ、シナプス伝達が回復し覚醒が生じる可能性を示している。(利益相反 なし)

14. マイクログリアに対するインターロイキン 6 の役

割の解明

森 菜都子, 宮本圭介, EM チョードリ, 小林加奈, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学系医学系研究科分子細胞生理学講座)

インターロイキン 6 (IL-6) が発見されて以来, その機能や作用機序についてさまざまな研究がなされてきたが, 脳常在性マクロファージであるマイクログリアに対する IL-6 の作用については未知の部分が多い。我々は, LPS を負荷し活性化させたラット培養マイクログリアに IL-6 を添加し, サイトカイン mRNA 発現や一酸化窒素 (NO) 産生量の変化などを調べた。しかし, 活性化マイクログリアは IL-6 の産生量が非常に多く, それが自己に作用すると考えられ, 外来的に IL-6 を添加してもその働きを分析することはできなかった。そこで, IL-6 受容体構成分子である gp130 のノックダウン (KD) を行った。gp130KD は NO 産生量を減少させ, TNF α , IL-1 β などの起炎症性サイトカイン mRNA の発現も減少させた。また, SOCS1, IRF-1 の発現と, STAT1 リン酸化を抑制することも判明した。しかし, gp130 は IL-6 以外にも, leukemia inhibitory factor 等の受容体も構成する。今回の KD 実験結果が, IL-6 効果の減弱によるものかを明らかにするために, IL-6 受容体の特異要素である, IL-6 受容体 α 鎖の KD を行う計画である。(利益相反 なし)

15. 研究医育成を目指す愛媛大学医学部の取り組みとその限界

田中潤也 (愛媛大学医学系医学系研究科分子細胞生理学講座/研究者育成委員会委員長)

生涯にわたって医学を自ら学び続ける能動的学習態度の醸成を主たる目的に, また研究のプロフェッショナル (研究医) の育成を従たる目的として, 愛媛大学医学部では入学当初から必修の研究室配属科目「医科学研究 I」を開講している。「医科学研究 I」では論文形式のレポート提出が必要であり, 他講座教員の peer review に基づき合否判定がなされる。この科目は, 2~4 年次の選択科目の医科学研究 II~IV に続く。3 年次以上の意識の高い学生は, 科目等履修制度による大学院講義科目の単位を正式に取得できる。平成 24 年度からの文科省予算によって, 初・中・上級とステップアップしていく「学生研究員制度」を設け, 学会発表や論文発表に応じて給与が支給される。これらの取り組みは学生の研究マインドを大いに刺激し, この 1 年間の学生の学会発表演題数は 100 演題を, 英文筆頭原著論文も 10 報を超えるようになった。このように, 「能動的学習態度の醸成」の部分で, 我々の取り組みは明らかに成功を収めつつある。一方, 基礎医学で生きていこうとする学生も大い

に増えたにも関わらず, 国の施策でもある研究医の育成については, ポストの問題に阻まれ, 成功を見通しがたい。いかに学生が基礎に残ることを希望していたとしても, 就職先の姿が見えず最終的には断念するしかない。地方会の場で, 我々の取り組みの成果と矛盾を紹介し, 解決策を議論したい。(利益相反 なし)

16. ラットの尺骨神経挫減後急性期における感覚野興奮波伝播パターンの変化

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

我々の研究室では, 独自に開発した光学的多領域膜電位同時測定システムを用い, ラット大脳皮質感覚野の神経活動を解析している。末梢刺激により, 体性感覚地図上で対応する領域に始まった興奮波は, 体性感覚野を広範囲に渡って伝播することが知られているが, このシステムにより, その伝播パターンを時間分解能 1ms, 空間分解能 250 μ m で等時線図を用いた解析が可能となっている。今回は, 右前肢の尺骨神経を完全挫減した直後の急性期において, 左体性感覚野における感覚刺激の応答パターンの変化を解析した。ウレタン・ α -クロラロース混合薬麻酔下で, 左体性感覚野を露出させ, 膜電位感受性色素 (RH-414) で染色した。右前肢尺側掌球に電極を刺入し, 1mA, 0.5msec の電気刺激を与えることで感覚野に感覚応答を誘発した。光学記録は, 右尺骨神経を完全挫減する直前 (PRE), 直後 (t0), 30 分後 (t30) に実施した。その結果, 応答の潜時は, PRE と比較して t30 で有意に長くなっていた。振幅は PRE と比較して t0 で有意に大きくなり, t30 では PRE の約 80% に減少していた。しかし, 応答の起始部から周辺部への興奮波の伝播速度を比較した時, PRE と比較して t0 では伝播速度が有意に遅くなり, t30 では PRE と有意差はなかった。上記の結果から, 末梢神経損傷後の非常に早期の段階で, 中枢の神経活動も影響を受けていることが示唆された。(利益相反 なし)

17. 体性感覚ニューロンの capsaicin 応答に対する nor-adrenaline の抑制作用

松下有美¹, 坂本 恵¹, 北村直樹^{1,2}, 澁谷 泉^{1,2} (¹鳥取大学農学部共同獣医学科獣医生理学教室, ²山口大学大学院連合獣医学研究科)

アドレナリン作動性神経は痛みの調節を行っていると考えられるが, 一次体性感覚ニューロンの TRPV1 の活性に対するアドレナリン作動性神経の作用はほとんど研究されていない。本研究ではラット後根神経節 (DRG) より得たニューロンからパッチクランプ法により膜電流を記録し, nor-

adrenaline (NA) の作用を検討した。(1) Capsaicin (1 μ M) により生じる内向き電流を NA は濃度依存性に抑制し、その抑制率は 10^{-12} M で最大 (約 84%) に達した。(2) 非分解性の GDP 類似物質である GDPBS の細胞内添加および Gi/o 型 G 蛋白を不活化する百日咳毒素の前処置により capsaicin 電流に対する NA (10^{-12} M) の抑制作用は消失した。(3) α_1 受容体拮抗薬の prazosin, は capsaicin 電流に対する NA の抑制作用に影響を与えなかったが, α_2 受容体拮抗薬の yohimbin, β 受容体拮抗薬の propranolol は capsaicin 電流に対する NA の抑制作用を減弱した。以上の成績から, DRG ニューロンにおける TRPV1 の活性化は極めて低い濃度の NA によって抑制され, この作用が Gi/o 型 G 蛋白を介した反応であることが示唆された。しかし, この作用に yohimbin と propranolol の両者に対する感受性があつたことから現時点では受容体を特定できなかった。新規の受容体が関与している可能性も含め, 慎重に検討していく計画である。(利益相反 なし)

18. 感覚情報処理におけるバゾプレッシンの作用—V1 受容体を介したマウス副嗅球相反性シナプス電流に対するバゾプレッシンの抑制効果

谷口陸男, 難波利治, 椛 秀人 (高知大学医学部生理学講座 (統合生理))

中枢性バゾプレシンは, 社会的認知の促進などほ乳類における複雑な社会的行動に関与することが報告されている。バゾプレシン受容体は副嗅球 (フェロモン情報の最初の中継核) にも発現しているが, この部位におけるシナプスレベルでの作用等は不明な点が多い。そこで我々はマウス副嗅球のスライス標本作製し, whole-cell clamp 法を用いてバゾプレシン (AVP) が僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプス電流に及ぼす効果を膜電位固定下で解析した。細胞外 Mg^{2+} 非存在下で僧帽細胞に脱分極刺激を与えると, 上記相反性シナプス由来の抑制性シナプス後電流 (IPSC) が生じる。この IPSC は AVP により抑制された。AVP による IPSC 抑制作用は, その V1a 受容体阻害薬の Manning 化合物を共投与すると減弱された。一方, V1b 受容体阻害薬の SSR149415 は AVP の抑制作用に影響しなかった。V1a 受容体作動薬の単独投与では, IPSC は有意に抑制された。以上の結果は, 上記相反性シナプス電流に対するバゾプレッシンの抑制作用が V1a 受容体を介していることを示唆した。(利益相反 なし)

19. 脳梗塞後のリハビリテーションによる運動野再構成の作用機序

岡部直彦, 城本高志, 氷見直之, 中村恵美, 成田和彦,

宮本 修 (川崎医科大学生理学 2)

脳梗塞は要介護となる最も主要な疾患であり, 後遺症の治療にはリハビリテーションが主に用いられている。運動野には機能局在が存在することが古くから知られているが, 運動野の機能局在は運動訓練や神経障害により変化することが知られており, これを運動野の再構成という。脳梗塞後のリハビリテーションによっても運動野再構成がおこることが分かっており, さらに運動野再構成の程度と機能の回復には相関が見られることが報告されている。しかし, リハビリテーションによる運動野の再構成がどのような作用機序で起こるのかはわかっていない。当研究室ではこれまでの研究で, ラットの前肢一次運動野 (Caudal Forelimb Area; CFA) に限局した脳梗塞を作成すると, ①前肢機能の回復はリハビリテーション依存的におこること, ②梗塞後に前肢二次運動野 (Rostral Forelimb Area; RFA) は一時的に縮小するが, 時間の経過とともに回復し, リハビリテーションはその回復を増強する, という事実を明らかにした。そこで, 今回の実験ではリハビリテーションがどのような作用機序で運動野再構成に影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的として実験を行った。実験では前肢二次運動野における逆行性・順行性トレーサーによる神経回路変化の解析, およびシナプスタンパクの定量解析を行った。実験の結果, 梗塞後のリハビリテーションは前肢二次運動野へ投射する神経細胞の数および分布, 前肢二次運動野において発現するシナプスマーカータンパク (Synaptophysin, GluR2, GABAAR α 1) の量には変化を与えないが, 前肢二次運動野から脊髄に投射する皮質脊髄路の軸索線維を白質・灰白質の両部位において増加させることが分かった。この結果は脳梗塞後のリハビリテーションにより脊髄内の神経回路が変化していることを示しており, この現象がリハビリテーションによる運動野再構成の作用機序の一因となっていることが考えられた。(利益相反なし)

20. 視聴覚刺激による快・不快の情動反応が顔面皮膚血流量に及ぼす影響

遠藤加菜, 伊藤百花, 石井 圭, 梁 楠, 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)

ヒトの情動の変化は複雑であり, 顔表情から予測することができても客観的に判断することは難しい。情動の喚起は, 前腕および足背の皮膚交感神経活動に影響を及ぼすことが報告されている (Klein et al., 2010; Muller et al., 2013) 一方で, 交感神経および副交感神経を介して顔面皮膚血流量にどのような影響を及ぼすかについては残された課題で

あった。本研究では、健常若年者 9 名（男性 7 名 21 ± 0.5 歳、女性 2 名 22 ± 0.3 歳）を対象として、2 次元レーザー血流計を用いて、快・不快の情動に対する顔面皮膚血流反応を調べた。視覚刺激に対する顔面皮膚血流変化を 12 秒毎に計測し、同時にみられる心拍数(HR)、平均動脈血圧(MAP)、前腕皮膚血流量、ならびに手背皮膚血流量の変化との関係を明らかにした。視覚刺激として漫才、ホラーおよび夜景という 3 種類の動画をそれぞれ 2 分間提示した。さらに静止画の刺激として International affective picture system から Positive 画像、Negative 画像を抜粋し、10 枚 1 セットとして 2 分間提示した。各刺激の視聴前後に 30 秒以上の安静をとった。視聴刺激後には主観的快・不快度を -5（最高に不快）～5（最高に快）の 11 段階評価で聴取し、続いて気分プロフィール検査 (Profile of mood states : POMS) を改訂した 36 項目からなる気分アンケートを実施した。顔面皮膚血流は口唇において他の領域よりも高い値を示し、刺激に対する変化量も大きかった。顔面皮膚血流はホラーおよび夜景の動画視聴中よりも、漫才視聴中および Positive 画像刺激で有意に減少した。主観的聴取から評価した快の情動および気持は漫才視聴後に増加し、これは顔面皮膚血流と有意な相関をみとめた。HR、MAP は、動画・静止画の種類に関わらず有意に変化しなかった。前腕および手背皮膚血流量の変化量は顔面皮膚血流量の変化量と弱い相関を示した。視覚刺激により誘発された快の情動は顔面血管収縮を引き起こし、顔面皮膚血流が減少することが示唆された。情動の変化は HR および MAP に影響を及ぼさない場合でも、顔面皮膚血流に影響を及ぼすことが分かった。以上の結果は、顔面皮膚血流が上肢皮膚血流、心拍数、血圧よりも情動変化の評価に有用であることを示唆する。今回、静止画視聴中の連続的記録において情動が顔面皮膚血流に及ぼす影響を合わせて報告したい。(利益相反 なし)

21. 除脳ラットを用いた中枢循環調節機構の探索

石井 圭, 浅原亮太, 梁 楠, 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)

高次中枢は運動開始時に、運動指令だけでなく、循環指令 (セントラルコマンド) を発することで運動実施に遅れることなく心循環調節を行うと考えられている。間脳レベルの除脳動物では自発活動に伴う頻脈・昇圧応答が観察されるが、そのような応答は橋吻側レベルの除脳動物では認められない (Hayashi, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003)。従って、セントラルコマンドの発生源は中脳領域に存在することが推測されるが、中脳領域の何れの神経核がその役割を担うか不明であった。これを調べるために、ラッ

トの中脳腹側被蓋野尾側レベル (Bregma -6.5mm) において除脳を行った。筋弛緩薬投与後、左膈骨神経活動を自発筋活動の指標とした。その結果、間脳レベル (Bregma -4.0 mm) での除脳後は自発活動に伴う頻脈・昇圧応答が見られたが、中脳腹側被蓋野尾側レベルの除脳後では自発活動は認められなかった。(利益相反 なし)

22. ウサギの頸部前屈と後屈が血圧に及ぼす影響

松尾 聡, エゾモ オージェイル フェリックス, 中村陽佑, 河合康明 (鳥取大学医学部適応生理学分野)

私たちは麻酔ウサギを用い 45 度頭部下方に体位を回転させる (HDR) と一過性に血圧が減少することを報告した。前庭が腎交感神経活動の抑制を介し、一過性血圧低下をおこなっていると考えた。しかし頸部の求心線維の入力が HDR 時の一過性血圧低下に関与しているかもしれない。この仮説を検証するため、前庭破壊ウサギを用い、腹臥位と側臥位で頸部の前屈と後屈を行い交感神経活動と動脈圧を記録した。頸部の前屈は交感神経活動低下と動脈圧を低下させた。頸部の後屈は動脈圧を上昇させた。前庭を破壊するとこれらの動脈圧の変化は小さくなった。これらの結果は前庭と頸部求心線維が交感神経を介し、動脈圧に影響を及ぼし、頸部の求心線維よりも前庭の影響が大きいかもしれないことを示唆している。(利益相反 なし)

23. 高麗人蔘由来の成分のマウスへの経口投与が赤血球膜タンパク質の酸化傷害に与える影響

武智佳菜¹, 鈴木洋司¹, 大久保信孝¹, 寒川慶一², 青戸守¹, 満田憲昭¹ (¹愛媛大学医学部循環生理学講座, ²同機能組織学講座)

高麗人蔘は古来生薬の材料として用いられて来た。高麗人蔘を材料とする生薬紅蔘から抽出したサポニン分画は抗酸化作用、抗炎症作用など種々の効果が知られている。一方、酸化ストレスは老化を促進する大きな要因である。そこで、マウスにサポニン分画を投与し、種々の酸化還元指標と代謝を調べることで酸化傷害指標の改善効果を調べた。

C57BL/6 マウス (10~20 週齢) に経口グンデにて生理食塩水 (対照群) または紅蔘由来サポニン (0.02mg/g 体重: サポニン投与群) を投与し、1 日後に麻酔下にて血液を採取。赤血球膜タンパク質の SH 基 (チオール基) を測定した。また、紅蔘由来サポニンの Rb1, Rg1, Rg2, Rh1 分画をそれぞれ投与し、対照群と比較した。

マウス週齢が増加すると赤血球膜タンパク質チオール基は減少し、マウス週齢とチオール基量の間には負の相関関係が認められた。サポニン投与群は対照群より赤血球膜タン

パク質チオール基が増加した。

酸化傷害の指標である赤血球膜タンパク質チオール基はマウスの個体老化と共に減少した。高麗人蔘由来のサポニン成分は経口投与により酸化傷害指標を改善する効果があることが明らかになった。(利益相反 なし)

24. 新規アデノシン類似化合物 COA-C1 (コアクロル) はヒト皮膚由来線維芽細胞において結合組織成長因子 (CTGF) の発現を抑制する

菊田咲子¹, 五十嵐淳介², 岡本隆司³, 山下哲生², 橋本剛², 窪田泰夫⁴, 塚本郁子⁵, 小西良士⁵, 平野勝也² (香川大学医学部医学科三年生, ²香川大学医学部自律機能生理学, ³香川大学医学部医学科四年生, ⁴香川大学医学部皮膚科学, ⁵香川大学医学部薬物生体情報学)

【背景】現在開発中のアデノシン類似化合物 COA-C1 は血管新生促進作用・神経保護栄養作用を有することを最近明らかにした。COA-C1 は低分子であり経皮投与が可能と考えられる。臨床応用に当り皮膚線維化に及ぼす影響を明らかにする必要がある。結合組織成長因子 (CTGF) は CCN ファミリーに属する細胞マトリックスタンパク質の一つである。CTGF による線維芽細胞の活性化と細胞外マトリックス産生は、サイトカイン TGFβ1 による組織線維化の主要なメカニズムの一つである。本研究では、COA-C1 の CTGF 発現に及ぼす影響を明らかにする。【方法と結果】正常ヒト皮膚由来培養線維芽細胞において、COA-C1 は CTGF の mRNA 発現を時間依存的に低下させた (投与後 8 時間において投与前の $12 \pm 3\%$, RT-PCR 法, $p < 0.01$)。TGFβ1 (5ng/mL, 24 時間) によって CTGF の mRNA およびタンパク質の発現は、それぞれ刺激前の 8.8 ± 0.9 倍および 9.3 ± 0.4 倍に増加したが、TGFβ1 刺激に先立って COA-C1 を用いておくと (100μM・30 分前処置), TGFβ1 刺激 24 時間後の CTGF の発現誘導は、mRNA, タンパク質いずれのレベルにおいても有意に抑制された (mRNA : $52 \pm 4\%$ ・RT-PCR 法, タンパク質 : $66 \pm 8\%$ ・ウエスタンブロット法)。TGFβ1 による遺伝子発現の調節には Smad2 のリン酸化が関与する。しかしながら、COA-C1 は TGFβ1 (5ng/mL, 20 分) による Smad2 のリン酸化には影響を与えなかった (ウエスタンブロット法)。【結語】COA-C1 はヒト由来線維芽細胞において TGFβ1 の有無に関わらず CTGF の発現を抑制した。TGFβ1 による CTGF 発現誘導に対する COA-C1 の抑制作用には、Smad2 リン酸化の抑制以外の仕組みが関与することが示唆された。(利益相反 なし)

25. Peptide Zippering を介した新規タンパク質細胞内

導入法の検討

湯浅啓生¹, 道上宏之¹, 北松瑞生², 松下博昭¹, 西木慎一¹, 松井秀樹¹ (岡山大学医歯薬学総合研究科医歯科学専攻細胞生理学講座, ²近畿大学理工学部応用化学学科生物物理化学講座)

タンパク質導入法とは、細胞膜透過性ペプチド (Cell-Penetrating Peptide : CPP) を用いることで、タンパク質やペプチド、核酸をはじめとする生理活性物質を、非侵襲的かつ簡便に細胞内へ届けて機能させる技術であり、「タンパク質セラピー法」としての治療応用も期待されている。

低分子・ペプチド・ペプチド核酸に対する CPP 結合の作製は、有機合成による手法が一般的である。一方、タンパク質を用いる場合には、「CPP-融合タンパク質」として大腸菌などのタンパク発現系により発現させ、精製する手法が一般的である。しかし、(1)CPP 融合により、CPP-融合タンパク質の発現効率が低下 (1/100 程度)、(2)細胞内導入後、CPP の転写調節タンパク質に対する機能障害、などの問題が、これまでの研究から示唆されている。

本研究では、上記の問題点を解決するため、タンパク質と CPP を別々に作製後、Peptide Zippering 結合を用いることにより、「タンパク質複合体」として細胞内導入する手法を確立した。また、細胞内導入後の転写調節因子の活性について検討を行った。今回、新規タンパク質導入法の詳細に関して報告を行う。(利益相反 なし)

26. 舌味覚感受性と心血管病

水田栄之助 (山陰労災病院循環器科)

【背景・目的】狭心症・急性心筋梗塞といった心血管病を引き起こす誘引として肥満・高血圧などの生活習慣病が挙げられる。一方、個々の舌味覚感受性は甘いものや塩辛いものなどの摂取行動に大きな影響を与えることが考えられる。そこで我々は個々の舌味覚感受性と生活習慣病、および心血管病との関係について検討した。【対象・方法】対象は鳥取県内 5 医療機関の外来・入院患者約 250 名。5 大基本味のうち、甘味・塩味・うま味について個々の舌味覚感受性 (認知閾値) を測定した。甘味・塩味感受性検査にはろ紙ディスク法を用いた。またうま味感受性検査ではグルタミン酸ナトリウム 0.03% 溶液を口腔内に 1ml 滴下し、味を感じなかった群をうま味感受性低下群と定義した。舌味覚感受性検査を行った同日、身体測定並びに空腹時採血・採尿を行った。【結果】急性冠症候群 (急性心筋梗塞・不安定狭心症) 患者では発症時塩味感受性が著明に低下していた。また高血圧患者・透析患者では健常人に比べて塩味感受性が有意に低下していた。一方、甘味感受性と各臨床パラメタとの間には有意な関係を認めなかったが、うま

味感受性低下群では有意に肥満者の割合が多かった。【考察・結論】結果より舌塩味感受性低下は高血圧・心血管病の危険因子であると考えられた。また舌うま味感受性低下は肥満の危険因子であると考えられた。減塩食やうま味を多く含む食事（和食など）は塩味やうま味感受性を改善させると言われており、舌味覚感受性を改善・維持させることは心血管病発症予防に非常に重要であると考えられた。（利益相反 なし）

27. ラット視索上核ニューロンに発現する中枢性浸透圧感知分子の解明

中島純一¹, 守屋大樹^{1,3}, 柴崎梨奈¹, 北村直樹^{1,3}, 浅野淳^{2,3}, 澁谷 泉^{1,3} (1鳥取大学農学部共同獣医学科獣医生理学教室, 2鳥取大学農学部共同獣医学科獣医化学教室, 3山口大学大学院連合獣医学研究科)

哺乳類の体内では浸透圧受容器が体液浸透圧を感知し、その調節に貢献している。中枢神経系内部にも浸透圧受容器は存在しているが、その感知分子の実体は不明である。視索上核 (SON) ニューロンは脳内で体液浸透圧を感知しており、マウスではその感知分子が TRPV1 の N 端変異体であることが示唆されている。我々はラット SON ニューロンに野生型 (wt) TRPV1 が発現していることを見出し、この分子が浸透圧感知に関与している可能性を報告した。本研究では、ラットの中枢性浸透圧感知分子の解明を目的として、SON に発現する TRPV1 関連分子の探索を行い、発見した分子を HEK293 細胞に発現させて細胞内 Ca^{2+} 濃度測定とパッチクランプ法によりその機能を解析した。

ラット SON には wtTRPV1 の他にマウスとは異なる N 端変異体 (TRPV1_SON) が発現していた。SON ニューロンは 36°C では capsaicin と高浸透圧に、24°C では高浸透圧のみに応答したのに対し、wtTRPV1 発現細胞はいずれの温度でも capsaicin と高浸透圧に応答した。TRPV1_SON 発現細胞はいずれの温度でも capsaicin にも高浸透圧にも応答しなかった。wtTRPV1 発現細胞で記録された capsaicin 誘発電流と高浸透圧誘発電流の逆転電位は、SON ニューロンのものより正の値であった。wtTRPV1 は四量体として細胞膜にチャネルを形成するので、これらの成績はラット SON ニューロンの中枢性浸透圧感知分子が wtTRPV1, TRPV1_SON のいずれのホモ四量体でもない可能性を示唆している。（利益相反 なし）

28. 神経伝達物質放出の Ca^{2+} センサー Doc2 の神経系における局在解析

岩藤亮太¹, 藤野加奈子¹, 西木禎一¹, 松下博昭¹, 道上宏之¹, 高橋正身², 松井秀樹¹ (1岡山大学大学院医歯薬学

総合研究科細胞生理学, 2北里大学大学院医療系研究科分子神経生物学)

神経伝達物質の放出は Ca^{2+} の流入により誘発される。この Ca^{2+} 流入を感知する分子の候補の一つは Doc2 である。Doc2 は、分子量約 5 万の可溶性タンパク質で、 Ca^{2+} 結合ドメインを 2 つもつ。脳には 2 種類のアリソフォーム、Doc2A と Doc2B が発現しているが、シナプス前終末に存在するか不明である。本研究では、アリソフォーム特異的抗体を作製し、Doc2 の組織分布および細胞内局在を調べた。

抗 Doc2 抗体は、各アリソフォームのカルボキシ末端のアミノ酸配列に相同な合成ペプチドに対するウサギ抗血清から精製した。抗原ペプチド同士は 50-60% 相同であるにもかかわらず、イムプロットングにおける組換えタンパク質との反応性から精製抗体のアリソフォーム特異性が示された。どちらの抗体もラット脳ホモジネート中の期待される分子量のシングルバンドを認識した。ラット小脳の免疫組織染色において、Doc2B はシナプスが多い領域に加え、ブルキンエ細胞の細胞体にも発現していることが示された。マウス海馬の初代培養細胞において、Doc2B は神経細胞だけでなくグリアにも発現していた。マイクロアレイ上に培養した単一神経細胞を用いより詳細な局在を調べたところ、Doc2B はシナプス前終末に存在することが明らかとなった。以上の結果は、Doc2B がシナプス前終末において伝達物質放出の Ca^{2+} センサーとして働いていることを裏付けると共に、グリアにおいて別の役割を担っていることを示唆する。（利益相反 なし）

29. 無拘束状態での床歩行時とトレッドミル歩行時にみられる大脳皮質運動野活動

浅原亮太, 石井 圭, 遠藤加菜, 梁 楠, 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)

ヒトの歩行時には、大脳皮質の感覚運動野、補足運動野で活性化が生じる (Miyai et al., 2001; Kurz et al., 2012)。しかしトレッドミル歩行中に認められたこの脳活動が、日常床歩行時の脳活動と一致しているかは不明である。そこで本研究では、ポータブル光脳機能イメージング装置を用い、無拘束というあるがままの状態、トレッドミル歩行と床歩行時における大脳皮質一次運動野領域の活性化を調べた。大脳皮質一次運動野における活性化の指標として、酸素化ヘモグロビン濃度 (Oxy-Hb) 変化を計測し 2 条件間で比較した。その結果、トレッドミル歩行時には一次運動野内側領域で Oxy-Hb が増加し活性化を認めた。床歩行時にも一次運動野内側領域で Oxy-Hb の増加を認めたが、この

増加はトレッドミル歩行と比べて、床歩行で亢進した。さらに、床歩行時には、一次運動野内側領域だけでなく外側領域でも Oxy-Hb の増加が認められた。以上の結果から、トレッドミル歩行と比べ、実際の日常床歩行時には大脳皮質一次運動野の活性化がより強く惹起され歩行を制御していると考えられる。(利益相反 なし)

30. アミロイドβ脳室投与はラット行動性体温調節機能と暑熱馴化形成機能を減弱させる

松崎健太郎¹、片倉賢紀¹、杉本直俊^{1,2}、原 俊子¹、橋本道男¹、紫藤 治¹ (¹鳥根大学医学部環境生理学講座、²金沢大学医薬保健研究域医学系)

本研究ではアミロイドβ (Aβ) をラット側脳室に注入して作製した認知症モデルラットの行動性体温調節および暑熱馴化形成機能を解析した。Wistar ラット (10 週齢：雄性) の左側脳室に塩化アルミニウムを 0.5μg 注入し、さらに Aβ₁₋₄₀ (5.5nmol, 250μl) を内蔵した浸透圧ポンプをラット背皮下に留置し、ガイドカニューレを右側脳室に挿入した (Aβ 群)。対照として Vehicle を用いた (対照群)。ラット行動性体温調節の指標として、約 10℃ から 42℃ の温度勾配

を形成した装置の中にラットを入れて、ラットの位置の環境温度 (選択環境温度) を測定した。また、ラットを 32℃ の高温環境に 28 日間暴露し暑熱馴化の形成を試みた。暴露期間終了後、36℃ の高温環境に暴露して腹腔内温の上昇を確認し、暑熱馴化形成の指標とした。測定後にラット脳を摘出し、免疫組織学解析を行った。対照群の選択環境温度は暗期に低く明期に高い二相性を示したが Aβ 群ではその二相性が消失した。Aβ 持続投与によりラット行動性体温調節機能が傷害される可能性が示唆された。暑熱馴化後、Aβ 群では対照群と比較して耐暑熱性が有意に減弱した。Aβ 群の視床下部上衣層では神経前駆細胞の増殖マーカーなどの発現量が低下する傾向であった。先に我々はラット暑熱馴化の成立には視床下部上衣層における神経前駆細胞の分裂と成熟神経細胞への分化が関与する可能性を報告している。これらの結果から、Aβ 側脳室投与が視床下部上衣層における神経前駆細胞の増殖を抑制し、暑熱馴化の形成を減弱させる可能性が示唆された。AD 患者において脳内に蓄積した Aβ が行動性体温調節機能だけでなく暑熱馴化の形成を減弱させ、熱中症の罹患率を増加させる可能性を考えた。(利益相反 なし)