

### 1. 競合か共存か？—発達期神経回路再編成における単一の形態パターンの創発

○八尾 寛<sup>1,2</sup>, 酒井聡樹<sup>3</sup>, 江川 遼<sup>1</sup> (1東北大院・生命・脳機能解析, 2東北大院・医・創生応用医学研究センター, 3東北大院・生命・植物生態)

中枢・末梢神経系では、発達初期に形成された非特異的な回路が、臨界期に再編成され、機能的に成熟した神経回路が作られる。しかし、プレニューロンの形態パターンの変化やその分子メカニズムについて多くの未知が残されている。ニワトリ胚毛様体神経節シナプスは、発達期シナプスのモデルとして長年研究に用いられており、多くの生理学的・形態学的知見が蓄積している。われわれは、*in ovo* エレクトロポレーション法によるシナプス前細胞特異的な遺伝子導入法、まばら発現システムや組織透明化などの最先端技術を総合し、神経節内の軸索投射の形態発達の全体像を定量的に明らかにする方法論(定量コネクティクス解析法)を開発した。その結果、中脳プレニューロンから標的ニューロンへの投射が巨大な杯状シナプス(カリックス)を1つだけ持った単一の形態パターンに収束していくことを見出した。数理モデルに基づいて、このように均質なネットワークの形成には、従来のヘップ則競合ルールに加え、多数の標的を抱えたニューロンが競合不利になるとする「負のニューロトロフィズム」ルールが必要であることを見出した。(利益相反 なし)

### 2. Optogenetic silencing of neural activity using light-driven Na<sup>+</sup> pump rhodopsins

○M. R. Hoque, S. Hososhima, T. Ishizuka, H. Yawo (Department of Developmental Biology and Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Life Sciences)

Recently several light-driven Na<sup>+</sup> pump rhodopsins have been derived from marine flavobacteria (Inoue et al., 2013; Kato et al., 2015). Here we showed that one of them KR2 and its chimeric variants are candidate of novel optogenetic silencers. Rat cortical neurons were cultured and transfected to express a human codon-optimized KR2 gene fused with membrane trafficking signal and ER export signal. Voltage-clamp recordings showed that exposure to green light evoked a robust outward photocurrent. Under current-clamp mode, the generation of action potentials was completely blocked while the membrane potential was hyperpolarized by KR2-activation with green light. It is suggested that KR2 is optimized to the silencing of neural activity for a certain long period as it counteract the Na<sup>+</sup> influx through Na<sup>+</sup> channels and excitatory recep-

tors. (COI: none)

### 3. 大脳皮質—基底核—視床ループにおけるパーキンソン病責任領野の同定

○菊田里美<sup>1</sup>, 中村幸代<sup>2</sup>, 山村行生<sup>3</sup>, 本間経康<sup>1</sup>, 柳川 右千夫<sup>3</sup>, 田村 元<sup>1</sup>, 笠原二郎<sup>2</sup>, 小山内 実<sup>1</sup> (1東北大・医, 2徳島大・薬, 3群馬大・医)

パーキンソン病 (PD) は振戦, 固縮, 無動などの症状を呈する疾患である。PD は線条体のドーパミン量が減少することにより PD の症状に関連した大脳基底核の神経活動の変化を引き起こすと考えられている。しかし、基底核のどの領野の神経活動の変化が病態と関係しているのかは必ずしも明らかではない。そこで、我々は比較的新しい *in vivo* 全脳神経活動履歴計測法である活動依存性マンガン造影 MRI (activation-induced manganese-enhanced MRI, AIM-MRI) を定量的な計測法として発展させた。qAIM-MRI を健常マウスと PD モデルマウスに適用し、大脳基底核のどの領野の神経活動の変化が PD の病態と関連があるのかを解析した (Kikuta et al., Sci Rep, 2015)。線条体におけるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現量は運動機能と相関があることが報告されているため (Rozas et al., 1998)、免疫組織化学による TH の発現量を病態の重篤度の指標とした。その結果、PD により、背側線条体、視床の Pf 核、感覚運動皮質の神経活動が亢進していることに加えて、その神経活動の亢進度と病態の重篤度とが相関していることが明らかとなった。我々の結果は qAIM-MRI により PD の重篤度の判定を行うことができることを示唆しているだけでなく、PD 発症機序の解明に貢献する。(利益相反 なし)

### 4. がん細胞への蛍光グルコース誘導体取り込みの蛍光マイクロプレートリーダーを用いた解析方法

○佐々木綾子, 山田勝也 (弘前大院・医・統合機能生理)

当研究室では、グルコースの細胞内への取り込みをモニターする目的で、蛍光基を結合したグルコース誘導体を生きた細胞に適用し、種々の方法で解析を進めている。今回、がん細胞を対象として、グルコースの細胞内への取り込みを、蛍光マイクロプレートリーダーにより解析する方法を報告する。これまでに、複数のグループが蛍光グルコース誘導体の細胞内への取り込みを蛍光マイクロプレートリーダーを用いて計測して報告している。しかし、がん細胞を用いる場合、計測結果が細胞内への取り込みを適切に反映しているかを検証する方法が重要となる。特に、多くの蛍光指示薬とは異なり、蛍光グルコース誘導体は細胞に適用した後に洗い流すことが必要で、その手法は研究者により

様々である。完全に洗い流されていることの評価をどのように行うか、また、細胞の自家蛍光を蛍光グルコース誘導体の取り込みによる蛍光とどのように区別するかも重要な点である。そこで本発表では、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、定量的な蛍光計測を行う際の方法与課題について取り上げる。(利益相反 あり)

#### 5. 低温性細胞傷害における細胞外イオン環境の役割

○長江智紀<sup>1,2</sup>, 小林大輔<sup>2</sup>, 挟間章博<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福島県立医大・医・第2学年, <sup>2</sup>福島県立医大・医・細胞統合生理)

我々は HeLa 細胞を 4℃ の低温環境に暴露すると 24 時間で細胞腫大が起き細胞内ベジクル構造が破壊され、72 時間で細胞膜破綻が惹起されることを報告してきた。今回、細胞外液のイオン条件を変化させ、HeLa 細胞の低温性細胞傷害への影響を調べた。NaCl 溶液で 24 時間の 4℃ の低温暴露を行うと MTT アッセイによるミトコンドリア脱水素酵素活性が正常の 3.1% まで減弱するのに対して KCl 溶液では 5.2%, NaGluconate 溶液では 7.8%, KGluconate 溶液では 25.5% となった。また trypan blue を用いた生存率測定を行うと、NaCl 溶液では 0%, KCl 溶液では 11%, NaGluconate 溶液では 33%, KGluconate 溶液では 60% になった。これらの結果から、低温による細胞傷害には、細胞内への Na<sup>+</sup>イオンと Cl<sup>-</sup>イオンの流入が関与することが予想され、両者を K<sup>+</sup>イオン、Gluconate<sup>-</sup>イオンで置換することが低温性細胞傷害を防ぐのに有効であることが明らかとなった。(利益相反 なし)

#### 6. 生理学実習で行ったウシガエル小腸粘膜における糖・アミノ酸輸送

○大関 篤<sup>1</sup>, 内海滉人<sup>1</sup>, 小林大輔<sup>2</sup>, 挟間章博<sup>2</sup> (<sup>1</sup>福島県立医大・医・第3学年 (equal contribution), <sup>2</sup>福島県立医大・医・細胞統合生理)

福島県立医科大学では第3学年における生理学実習項目として、ウシガエル小腸の経上皮電位測定により糖・アミノ酸輸送機構の考察を行なっている。本発表は授業で行った実習結果に加えて、授業外で追加実験を行った有志の学生による発表である。

腸管に Na-ringer あるいは Na-free-ringer を灌流し、それらに種々の濃度の糖、アミノ酸を加え、生じた経上皮電位の変化を記録した。グルコース、ガラクトースは Na 存在下で経上皮電位の負方向の変化が観察され、フルクトースは電位に変化は見られなかった。アラニン、グリシン、ロイシン、バリン投与でも同様の電位変化が観察された。また糖及びアミノ酸についてヒルプロットを行い解析した結果、Na 濃度が一定条件下では、糖、アミノ酸輸送における

ヒル係数は 1 であった。親和性を比較するとグルコース>ガラクトースとなり、アミノ酸の親和性は分子量と逆相関があった。これらの結果は、既知のものであるが、学生実験で用いるシンプルな装置を用いてもこれらの結果を導くことが可能であった。(利益相反 なし)

#### 7. 代謝型グルタミン酸受容体活性化で誘導する海馬 CA1 ニューロンのシナプス可塑性への細胞外 ATP の関与—ATP を介するグリアとニューロン機能の cross-talking—

○藤井 聡, 金子健也, 藤原浩樹, 後藤純一, 山崎良彦 (山形大・生理学)

海馬シナプスで ATP (adenosine 5'-triphosphate) とグルタミン酸は、シナプス前終末から、および周囲のグリア細胞から放出される。グルタミン酸はシナプス後細胞の NMDA (N-methyl-D-aspartate) 型ないし代謝型受容体を活性化し、ATP は細胞外リン酸化を介してこれらグルタミン酸受容体活性化を増強する可能性がある。今回我々は、海馬 CA1 シナプスで入力刺激を化学物質で置換して誘導したシナプス可塑性について報告する。0.05Hz のモニター電気刺激を NMDA 灌流で置換しながら ATP ないし代謝型グルタミン酸受容体作動薬をスライスに投与すると、興奮性シナプス後電位で長期増強 (LTP) が誘導されたが、ATP および代謝型グルタミン酸受容体作動薬のみを灌流すると長期抑圧 (LTD) が誘導された。結果、シナプス由来の ATP は NMDA 型受容体リン酸化を介しての LTP 誘導へ、グリア由来の ATP は代謝型受容体リン酸化を介しての LTD 誘導への関与が示唆された。(利益相反 なし)

#### 8. 高血圧性心肥大ラットにおける心臓時間間隔変化

○安達 健, 大場貴喜, 尾野恭一 (秋田大院・医・細胞生理)

心機能を評価するために、超音波検査によって得られる心周期各相の時間 (心臓時間間隔, CTI) の測定が臨床的に行われている。我々はこれまでにピエゾ素子を用いた振動センサーにより小動物やヒトの呼吸循環動態を非侵襲的にモニターする方法を考案してきた。今回、高血圧性心肥大 (DIS/Eis) ラットを用いて振動センサーから得られる胸壁振動信号 (CSS) により CTI を測定できるかを検討した。〈方法〉動物実験は秋田大学動物実験委員会の許可を受け同実験規程に従って行った。高食塩食群では 6 週齢から 15 週齢まで 8% NaCl 食を、常食群では 15 週齢まで常食を給餌し、両群で比較検討した。統計は t 検定を行った。〈結果〉高食塩食群は常食群と比較して収縮期血圧、拡張期血圧、心体重比が増加し、心筋断面積は拡大していた。心臓超音

波上両群の EF に差はなかった。CSS で得られた CTI は前駆出時間、等容性収縮期、等容性弛緩期が高食塩食群で延長していたが、駆出時間は両群で変化を認めなかった。MPI は高食塩食群で増大していた。〈考察〉病態モデルにおいて心肥大の形成と共に CTI が変化しており、本センサーが CTI 評価へ応用できる可能性が示唆された。今後、循環監視システムとしてヒトへの応用を目指したい。(利益相反なし)

### 9. 電位依存性カルシウムチャネル $\beta 4$ サブユニットと自律神経

○村上 学<sup>1</sup>、柳澤輝行<sup>2</sup>、桑迫健二<sup>3</sup>、尾野恭一<sup>4</sup>、大場貴喜<sup>4</sup> (<sup>1</sup>弘前大学院・医・病態薬理学、<sup>2</sup>東北大学院・分子薬理、<sup>3</sup>宮崎大学院・生理活性物質探索病態解析、<sup>4</sup>秋田大学院・細胞生理)

電位依存性カルシウムチャネル  $\beta 4$  サブユニットは神経伝達に重要な P/Q タイプのカルシウムチャネル構成因子と考えられている。 $\beta 4$  サブユニット欠損マウス (lethargic mouse) は小脳失調症を呈し、生後数ヶ月で死亡する。我々は  $\beta 4$  サブユニット欠損マウスを用いて心電図を中心に解析した。心拍の揺らぎや自律神経系を薬理学的に修飾し、 $\beta 4$  サブユニット欠損による自律神経系への影響を検討した。生後 2 週程度では心電図に異常を認めなかったが、小脳失調を示す 4 週目になると心電図上に高い T 波を示すマウスが多かった。心電図 R-R 間隔の変動を計測したところ、 $\beta 4$  サブユニット欠損マウスでは心拍変動が大きくなっていった。心拍変動を示すポアンカレプロットにおいても、同じ傾向が認められた。洞房結節における  $\beta 4$  サブユニット発現が認められた。薬理学的にプロプラノロール ( $\beta$  遮断薬) やアトロピン (副交感神経遮断薬) に対する反応を検討したところ、両薬に対する反応性が低下していた。 $\beta 4$  サブユニットは自律神経系においても、電位依存性カルシウムチャネルの修飾因子として、機能していることが示唆された。(利益相反なし)

### 10. 生物学的ペースメーカーの構築を目的とした洞房結節のマイクロアレイ解析

○岡本洋介<sup>1</sup>、T. V. Kirilov<sup>2</sup>、Y. D. Tarasova<sup>2</sup>、B. D. Ziman<sup>2</sup>、E. G. Lakatta<sup>2</sup>、石井邦明<sup>3</sup> (<sup>1</sup>弘前大院・医・病態薬理、<sup>2</sup>Laboratory of Cardiovascular Science, National Institute on Aging, National Institutes of Health、<sup>3</sup>山形大院・医・薬理)

心臓拍動は発生初期から始まり、死ぬまで止まる事がない。しかし、そのメカニズムについては議論が続いており、未だ確立した見解はない。分子生物学的研究をさらに進め

るために、心臓ペースメーカーのモデル細胞である、生物学的ペースメーカーを構築する必要がある。本研究では、幹細胞から生物学的ペースメーカーを構築するその前段階として、洞房結節の遺伝子発現を網羅的に解析する事で、心臓ペースメーカーを特徴づける二つの転写因子を発見した。これらの転写因子は心臓内で発生初期から発現し、年齢になるまで高い発現レベルを維持していた。これらの転写因子を幹細胞に導入する事で生物学的ペースメーカーが構築されることが予想された。(利益相反なし)

### 11. ROMK1 遺伝子導入培養マウス集合管 M1 細胞に発現した $K^+$ チャネル活性に対する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ の影響

○林 光、木村真吾、中村一芳、駒切 洋、鈴木 享、久保川 学 (岩手医大院・医・統合生理)

これまで、種々の炎症性サイトカインが  $K^+$  チャネルに影響することが報告されてきた。今回、ROMK1 遺伝子導入 M1 細胞を用いて IL-1 $\beta$  の ROMK1 チャネル活性に対する影響について検討した。パッチクランプ法による電気生理学的解析で IL-1 $\beta$  投与後、ROMK1 チャネル活性は低下し、これは IL-1 受容体拮抗薬前投与にて抑制された。これまで、ROMK1 チャネルの活性低下因子として PKC によるリン酸化が報告されていることから、IL-1 $\beta$  の効果発現における PKC 経路に関する検討を行った。パッチクランプ法にて PLC 阻害薬である neomycin、あるいは PKC 阻害薬である GF103209X 投与にて IL-1 $\beta$  による ROMK1 チャネル活性低下反応は阻害された。Fura2AM を用いて M1 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定をしたところ、細胞外  $Ca^{2+}$  の有無に関わらず IL-1 $\beta$  投与後一過性の  $Ca^{2+}$  濃度上昇を認めしたが、PLC 阻害薬投与時には、その上昇は阻害された。以上より IL-1 $\beta$  による ROMK1 チャネルの活性低下には PIP2-IP3 を介した store 由来  $Ca^{2+}$  上昇による PKC 活性化が関与すると考えられた。(利益相反なし)

### 12. 蛍光 L-グルコース誘導体 fLG によるがん細胞可視化

○小野幸輝<sup>1</sup>、佐々木綾子<sup>1</sup>、横山良仁<sup>2</sup>、刀稱亀代志<sup>3</sup>、渡邊 純<sup>4</sup>、古川正仁<sup>1</sup>、今井麻智子<sup>1</sup>、長友克広<sup>1</sup>、山本敏弘<sup>5</sup>、大塚祐治<sup>5</sup>、豊島 正<sup>5</sup>、黒瀬 顕<sup>3</sup>、水沼英樹<sup>2</sup>、山田勝也<sup>1</sup> (<sup>1</sup>弘前大院・医・統合機能生理、<sup>2</sup>同 産科婦人科、<sup>3</sup>同 病理診断学、<sup>4</sup>同 保健・生命科学、<sup>5</sup>(株)ペプチド研究所・彩都研)

蛍光標識 D-グルコース誘導体 2-NBDG は、細胞内への D-グルコースの取り込みを可視化する目的で広く使用されている (Yamada et al., Nat Protoc 2007; Viale et al., Na-

ture 2014 等). しかし, 取り込みを蛍光強度の相対値のみで評価することには限界もある. そこで, 自然界にない L-グルコースを蛍光で標識した 2-NBDLG を陰性対照として開発した(特許 5682881, EP2325327, US8986656). 興味深いことに, 2-NBDLG は一部のがん細胞に選択的に取り込まれた(WO2012/133688 他). バックグラウンドの低い蛍光 L-グルコース誘導体 (fLG) を用いることで, 従来よりがんを精度よく検出できる可能性がある. 本発表では, fLG のヒトがん細胞への適用例等を紹介する. (利益相反 あり)

### 13. 視床枕の抑制は盲視サルにおける視覚誘導性サッケードを阻害する

○木下正治<sup>1</sup>, 加藤利佳子<sup>2</sup>, 伊佐かおる<sup>2</sup>, 小林憲太<sup>2</sup>, 小林和人<sup>3</sup>, 尾上浩隆<sup>4</sup>, 伊佐 正<sup>2</sup> (<sup>1</sup>弘前大院・医・統合機能生理, <sup>2</sup>生理学研究所, <sup>3</sup>福島県立医大, <sup>4</sup>理研ライフサイエンス技術基盤研究センター)

第一次視覚野 (V1) の損傷は対応する視野への視覚的な

気づきを阻害する. しかし V1 損傷のあるヒトでも損傷視野に提示された視覚対象を定位することができる. この現象は盲視 (blindsight) と呼ばれる. 盲視は V1 を経由しない視覚経路の働きによると考えられる. V1 を損傷した盲視サルを用いた実験により, 盲視には上丘が重要であることが報告されている. 従来は上丘から視床枕を経由して高次視覚野へ伝えられる経路が盲視の主要な神経経路と考えられてきた. しかし近年上丘から外側膝状体を経由する経路の役割についての報告がなされた (Schmid ら 2010). 本研究では視床枕経路の機能を明らかにするため, V1 損傷サルに視覚誘導性サッケード課題 (VGS) を行わせ, 視床枕経路を抑制し, その効果を調べた. 視床枕をムシモル注入により抑制した結果 VGS の成績が有意に低下した. さらに二重遺伝子導入法 (Kinoshita ら 2012) により上丘-視床枕経路を選択的に遮断した結果 VGS の成績が有意に低下した. これらの結果から上丘-視床枕経路が盲視の視覚情報を伝達していることが示唆された. (利益相反 なし)