

1. 培養集合管M-1細胞における遺伝子導入したROMK1 K⁺チャネルの細胞膜発現とチャネル活性に対するNHERF1の役割

○鈴木 享¹, 中村一芳¹, 真柳 平², 駒切 洋¹, 林光¹, 祖父江憲治², 久保川 学¹ (¹岩手医大・医・統合生理, ²岩手医大・医歯薬総合研究所・神経科学)

腎皮質集合管主細胞に発現しているROMK1 K⁺チャネルは、管腔内へのK⁺の分泌経路の1つとして機能している。今回、我々はROMK1の細胞膜表面への発現機構を明らかにするために、EGFPをROMK1のN末端に結合させたEGFP-ROMK1を作製し、培養マウス集合管細胞M-1細胞へ導入しパッチクランプ法で細胞膜表面のK⁺電流を測定した。その結果、C末端のPDZ結合部位を欠失させるとK⁺チャネル電流が野生型に比べ有意に減少していることが確認できた。このPDZ結合ドメインと相互作用する因子として足場タンパク質であるNHERF1が知られているが、K⁺チャネル活性に影響を及ぼすかなどは調べられていない。そこで、ROMK1のK⁺電流におけるNHERF1の関与について検討した。NHERF1の発現をsiRNAにてノックダウンしたM-1細胞にてK⁺電流を観察した結果、チャネル電流が有意に減少した。これらの結果から、NHERF1はROMK1のPDZ結合ドメインを介してROMK1の細胞膜表面での発現とチャネル活性を制御していることが示唆された。(利益相反 なし)

2. ステロイド薬が有する“肥満細胞安定化作用”についての電気生理学的検討

○森 智裕¹, 風間逸郎², 虫明 元² (¹東北大・医・4年, ²東北大院・医・生体システム生理)

【目的】副腎皮質ステロイド薬は強力な抗炎症薬であるが、急性期には抗アレルギー作用をも発揮することが分かってきた。しかし、本薬剤が、肥満細胞からの開口分泌過程(エクソサイトーシス)そのものに及ぼす作用の詳細は明らかでない。

【方法】ラット腹腔より肥満細胞を単離後、ヒドロコルチゾンやデキサメタゾンの存在下でエクソサイトーシスを誘発し、脱顆粒現象を観察した。また、ホールセル・パッチクランプ法を用いて電氣的細胞膜容量の変化を測定し、これらの薬剤がエクソサイトーシスの過程に及ぼす作用について定量化した。

【結果】Compound 48/80の細胞外投与、またはGTP-γSの細胞内注入によりエクソサイトーシスが惹起され、脱顆粒現象の進行と共に細胞膜容量は増加した。比較的低用量のステロイド薬(1, 10μM)は、これらの変化に影響を与えなかったが、高用量のステロイド薬(100, 200μM)は速

やかに、脱顆粒現象や膜容量の増加を有意に抑制した。

【考察】ステロイド薬は用量依存性にエクソサイトーシスの過程を阻害し、“肥満細胞安定化作用”を発揮した。本作用は、ステロイド薬が有する“non-genomic”な即時作用の本体である可能性が高いと考えられた。(利益相反 なし)

3. 細胞状態の悪化を鋭敏に検出する蛍光L-グルコース誘導体2-TRLG;ヨウ化プロピジウム(PI)との比較

○長友克広¹, 小野幸輝¹, 萱場広之², 山田勝也¹ (¹弘前大院・医・統合機能生理, ²弘前大院・医・臨床検査医学)

緑色蛍光を発する2-NBDGは生きた細胞のグルコース輸送を可視化する目的で様々な研究に広く用いられている(Yamada et al, Nat Protoc 2007; Rouach et al, Science 2008; Zhong et al, Cell 2010; Viale et al, Nature 2014)。しかし、2-NBDGは細胞膜損傷のある細胞にも侵入するため、評価は慎重に行う必要がある。そこで、比較的大型の赤色蛍光基Texas redを自然界に見られないL-グルコースに結合した2-TRLGを細胞膜損傷マーカーとして用いる方法を提案してきた(Yamamoto et al, Bioorg Med Chem Lett 2011; Sasaki et al, Hum Cell 2016)。今回、2-TRLGと代表的な生死判定マーカーPIの違いを大腸菌で定量的に比較した。その結果、2-TRLGは細胞状態の悪化をPIより鋭敏に検出する可能性が示唆された。本法をヒト腸内細菌に適用した結果も併せて報告する。(利益相反 なし)

4. 細胞容積調節機構の再評価—低浸透圧負荷時の細胞膨張にNa⁺, Cl⁻が重要である—

○小林大輔, 大槻瑠志亜, 藤井あゆみ, 挾間章博(福島県立医大・医・細胞統合生理)

動物細胞の容積は一定の大きさに保たれており、一過性の浸透圧変化に曝されると細胞容積の収縮あるいは膨張が観察されるが、その後すみやかに元の容積へと回復する。低浸透圧による細胞容積膨張後の容積調節はregulatory volume decreaseと呼ばれこれまでに多くの研究が報告されている。しかしながら、低浸透圧負荷直後の細胞膨張に関する報告は少ない。我々はこれまでに、HeLa細胞を用いて、低浸透圧負荷により観察される細胞膨張には細胞外のNa⁺及びCl⁻が関与すること、薬理的手法により低浸透圧負荷直後の細胞膨張にNa-K-Clトランスポーター(NKCC)が関わることを示してきた。本発表では、低浸透圧負荷直後の細胞膨張に細胞外pHの関与が示唆されたのでこれを報告する。(利益相反 なし)

5. 麻酔下ラット大脳皮質における波状に伝播する内因性信号の観察

○大城朝一, 虫明 元 (東北大・医・生体システム生理学)

脳活動の振動現象は周波数で分類することが可能であり, その多くは神経基盤を含めて詳しく解析されている。しかしながら非常にゆっくりとした振動現象 (infra-slow oscillation) についてはその由来がまだ分かっていない。今回我々は麻酔下ラット大脳皮質の内因性信号がゆっくりと振動し (~0.1Hz), そしてそれが波状に大脳皮質上を伝播していくことを報告する。ラットはイソフルランで麻酔し脳定位装置に固定後, 両半球の大脳皮質を詳しく観察できるように頭骨を薄く削った (thin-skull preparation)。薄く削った頭骨を 530nm の光で照射し, 透過してくる反射光を CMOS カメラで観察した。内因性信号は大脳皮質全体にわたって 1~2 周期の空間周波数を持ち, 主に rostral-caudal 方向へ約 4mm/s のスピードで波状に伝播していくのが観察できた。皮質上の観察点を固定すると約 7~10 秒の周期 (~0.1Hz) で内因性信号は振動していた。この内因性信号の振動は皮膚への刺激や視覚刺激といった外部感覚刺激でトリガー可能で, 適切な周期で外部刺激を与えれば同期させ続けることも可能であった。これらのことからこの内因性信号は神経活動を反映したものであると結論できた。又, この現象に頭蓋中の二酸化炭素が重要な役割を果たすことも明らかになった。(利益相反 なし)

6. サルの洗練された知識利用行動から探索行動への移行は単純な行動—結果強化学習では説明されない

○坂本一寛 (東北医科薬科大・医・神経科学)

成功体験を生かして行動する。成功体験に囚われず新しいものごとを探索する。これらの一見両立しない行動戦略をどう適切に使い分けるかは, 探索—知識利用 (exploration-exploitation) トレードオフ問題と呼ばれ, 学習における大きな問題の一つである。本研究では, “ランダムな探索行動とその結果の強化学習” という単純なスキームが, ある行動が急に無効になった時, どのような行動をもたらすかを, 視覚探索課題 (Kawaguchi, et al., 2015) を例に, 計算機実験により検討した。その結果, 以前有効だった行動への固執傾向, つまり, 知識利用行動から探索行動への移行にかかる試行数と, 行動—結果関係についての記憶量との間に相関関係が見られる等, 体験についての記憶と探索—知識利用の使い分けの間に興味深い関連が見られた。しかしながら, 本計算期実験で用いた単純なスキームでは, 視覚探索課題に習熟したサルの洗練された知識利用行動から探索行動への移行は説明されなかった。このこと

は, サルが単なる行動—結果関係の学習では説明できない高度な課題構造等を学習していることを示唆している。(利益相反 なし)

7. 社会活動と新規環境でのラット扁桃基底外側核ニューロンの活動の比較

○片山規央, 浄土英一, 永福智志 (福島県立医大・医・システム神経科学)

扁桃体は, 社会的認知や社会的行動に重要な役割を果たしていることが知られている。臨床研究では, うつ病, 統合失調症, 自閉症などの主要な精神疾患にて扁桃体のなんらかの異常がみられることが報告されている。社会的行動における扁桃体の役割を解明することは, それらの精神疾患に新しい治療ストラテジーをもたらすことに寄与するかもしれない。我々は, これまでにラットの扁桃基底外側核群のニューロンの約半数が社会行動中に興奮することを報告してきた。しかし, この場合の扁桃体ニューロンの興奮が, 純粋に社会行動によるものなのか, 単に環境が変化したことによるものなのかは, はっきりしていない。その疑問を解決するため, 今回我々は, ラットの社会行動中と新規環境に移ったときの扁桃基底外側核ニューロンの活動を比較した。実験には SD ラットを用い, 事前に金属電極を扁桃体に埋め込む手術を行った。新規環境に移ったときの扁桃基底外側核ニューロンの活動を記録した後, 初対面のラットと社会的行動を行っているときの活動を記録した。その結果, 社会的行動と新規環境の両方で反応するニューロンと, いずれかのみで反応する群, いずれにも反応しない群がみられた。(利益相反 なし)

8. 恐怖条件づけ記憶の想起に対する慢性アルコール投与の影響

○藤原浩樹¹, 添川清貴¹, 金子健也¹, 山崎良彦¹, 後藤純一¹, 大津 芳², 藤井 聡¹ (¹山形大・医・生理, ²山形大・医・環境保全センター)

アルコールの急性的な摂取によるアルコール性記憶障害は一般に広く知られているが, アルコールの慢性投与による影響に関しては不明な点が多い。本実験では, 恐怖条件づけを用いて, 記憶の記録と想起について検討した。条件刺激には光刺激, 無条件刺激には電撃を対呈示し, アルコールの慢性投与が記憶にあたる影響について検討した。

[方法] 被験体はウィスター系雄性ラットを用いた。被験体は 7 日間, 食餌と水は自由摂取状況下で飼育され, 被験体は約 3 か月間, アルコール飼料またはコントロール飼料の食餌制限下で飼育した。[結論] 恐怖条件づけでは, 慢性アルコール投与が記憶の記録, 想起に影響を及ぼすか検討

した。条件づけでは、慢性アルコール投与の有無では差が認められなかったが、試行回数が増加するごとに恐怖が獲得された。よって、アルコールの慢性投与は記憶の記録に影響しなかった。また、消去手続きでコントロールに比べ慢性アルコール投与が恐怖記憶の想起されにくいことが示された。恐怖条件づけでは、慢性アルコール摂取が恐怖記憶の想起を悪くしたと結論した。慢性アルコール投与により恐怖記憶の想起に影響を及ぼすことが示された。(利益相反なし)

9. カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ IV と交感神経

○村上 学¹, 野崎修平¹, 韓 沖¹, 小湯佳輝¹, 瀬谷和彦¹, 米倉 学¹, 富田泰史¹, 大場貴喜², 阪上洋行³, 尾野恭一² (¹弘前大院・医・病態薬理, ²秋田大・医・細胞生理, ³北里大・医・解剖)

カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) IV は核内においては転写因子をリン酸化することで転写因子を調節し, 細胞質においては CaMKK や MAPK, PKA など他のシグナルカスケードとクロストークを形成している。

我々は CaMKIV の循環器における機能を調べるため, CaMKIV 欠損マウスを用い検討した。

RT-PCR において, CaMKIV 欠損マウスではカルシウムチャネル CaV1.2 の mRNA 発現レベルの低下が見られた。免疫染色においても, CaV1.2 が有意に低下していた。

心電図上, CaMKIV 欠損マウスでは, 心拍数に違いを認めなかった。頸動脈反射では心拍数の上昇が有意に減弱していた。また, プロプラノロールによる心拍数低下が有意に減弱していた。さらに, QT, QTc が有意に短縮していた。そのほか, 心筋収縮, CREB 活性においても, β 1-アドレナリン受容体刺激に対する反応性の低下が認められた。

以上の結果から, CaMKIV は β -アドレナリン受容体が関与するカスケードを介し, 心機能を調節する重要な因子であることが示唆された。(利益相反なし)

10. ドレブリン E は成体脳において神経新生を促進する

○梶田裕貴^{1,2}, 小金澤紀子², 児島伸彦³, 崎村建司⁴, 白尾智明² (¹東北大・医・生体システム生理, ²群馬大・医・神経薬理, ³東洋大・生命科学・分子神経生物, ⁴新潟大・細胞神経生物 (脳研究所))

F アクション結合タンパクであるドレブリンは胚性型のドレブリン E と, 成体型のドレブリン A の 2 つのアイソフォームが存在する。ドレブリン E は発達期の脳で一般的なアイソフォームで神経細胞の形態変化に関与している

が, 成体ラット脳でも神経新生が認められる場所でその発現が確認されている。側脳室下帯 (SVZ) は成体神経新生が起こる場所であり, そこで生まれた神経芽細胞は嗅球へ移動し, 既存の神経回路に組み込まれる。神経芽細胞が移動を停止し, 成熟神経細胞に分化すると, ドレブリン E に代わり, ドレブリン A が発現することからドレブリン E は成体脳の神経芽細胞において特別な役割を担っていることが予想される。本研究では成体脳におけるドレブリン E の役割を明らかにするため, ドレブリンノックアウトマウスを作成し, 免疫組織化学的解析を行った。このマウスでは SVZ において細胞分裂が減少し, 神経芽細胞の数が減少していた。細胞死や細胞移動の経路には異常が見られなかった。これらの結果からドレブリン E は成体脳の SVZ における細胞の分裂に促進的な働きをもつことが明らかとなった。(利益相反なし)

11. オリゴデンドロサイトのアデノシン A1 受容体活性化による活動電位の軸索伝導の修飾

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

オリゴデンドロサイト (OL) は髄鞘を形成することによって跳躍伝導を可能にし, 伝導速度を飛躍的に高速化している。さらに, 脱分極を介して軸索伝導を可塑的に促進することがわかってきた。このような OL による伝導速度調節は何らかの方法で正確に制御される必要があり, それには抑制的な制御も必要になってくる。今回, 海馬白質 (白板) での軸索伝導制御に対するアデノシン A1 受容体の関与について検討した。海馬白板の OL におけるアデノシン A1 受容体の発現は, アゴニスト投与による過分極によって確認した。そして, 海馬白板から複合活動電位を記録して A1 受容体アゴニストを投与したところ, 振幅の減少と幅の増大がみられた。また, 錐体細胞からのホールセル記録によって記録される逆行性活動電位の潜時も延長していた。これらの抑制的な効果は, A1 受容体アンタゴニストや PKA 阻害剤によって抑制された。また, OL にアーキロドプシンを発現させ光刺激によって過分極させたところ, 複合活動電位に変化はみられなかった。以上のことから, OL のアデノシン A1 受容体活性化による軸索伝導の抑制性修飾には, cAMP 依存性 PKA が関与していることが考えられた。(利益相反なし)

12. アストロサイト Ca^{2+} シグナルにおけるストア作動性 Ca^{2+} チャネルの役割

○櫻木繁雄^{1,2}, 丹羽史尋³, 小田洋一², 坂内博子^{2,3,4}, 御子柴克彦³ (¹東北大学・生命科学, ²名古屋大学・理・

生命理学,³理研BSI,⁴JST さきがけ)

グリア細胞アストロサイトは、脳神経系の構造維持、神経伝達への関与をはじめ多様な機能を有す。その多くはカルシウム動態の変化(Ca²⁺シグナル)を介しており、故にCa²⁺シグナルの理解はアストロサイトの生理的機能解明に必須である。しかしその発生機構には現在でも疑問が残る。発生に必要なCa²⁺はイノシトール三リン酸受容体を介した小胞体(ER)からの放出によるとされるが、他のCa²⁺チャネルの関与も報告されており、様々な可能性がある中で関与するCa²⁺チャネルが他にも存在しないか、それらが独立に機能するかは不明瞭である。本研究はその解明を目的とし、ストア作動性Ca²⁺(SOC)チャネルに焦点を当てた。SOCチャネルは、ER膜上のSTIMがER内Ca²⁺の減少を感知すると、細胞膜上のOraiを介してCa²⁺を流入させる。そこでラット海馬初代培養アストロサイトを用いてCa²⁺流入を薬理的に制限した際の影響を検証した結果、Ca²⁺シグナルはSOCチャネルとERからのCa²⁺放出の協調した機構で発生することを見出した。(利益相反 なし)

13. 神経細胞における小胞体Ca²⁺ダイナミクスの光操作

○杉原嘉一¹、五十嵐敬幸^{1,2}、石塚 徹³、八尾 寛^{1,3}
(¹東北大・医・神経細胞制御、²東北大・国際高等研究教育院、³東北大・生命・脳機能解析)

光によって開口する非選択的陽イオンチャネル(ChR)を発現させる技術(オプトジェネティクス)の発達により、高い時空間分解能での細胞活動操作が可能となった。しかし、神経細胞内のイオンダイナミクス操作をはじめとする細胞生理学への応用は十分に進んでいない。細胞内Ca²⁺はセカンドメッセンジャーとして様々な生理機能を司る。したがって、神経細胞の細胞内Ca²⁺動態を操作することによる神経細胞の発達、可塑性、疾患病態の解明が展望される。われわれは小胞体に局在する光操作ツールの開発を着想した。初代培養神経細胞にEGFP標識した小胞体局在型ChRを遺伝子導入したところ、小胞体マーカーKDELと共局在を示した。赤色蛍光Ca²⁺インジケータRhod-FFを用いたCa²⁺イメージングでは、青色光刺激と同期して細胞内Ca²⁺濃度が増加した。この応答は細胞外Ca²⁺非存在下において持続し、Thapsigargin、Bafilomycin投与後に頻回光刺激を与えると消失した。以上より、今回開発した小胞体局在型ChRを利用することで、小胞体からのCa²⁺放出が光により操作されることが示唆された。(利益相反 なし)

14. 低温性細胞傷害機構解明への分子生物学的アプローチ

○長江智紀、辻 真伍、小林大輔、狭間章博(福島県立医大・医・細胞統合生理)

我々はHeLa細胞を用いて、4℃の低温環境に曝露すると24時間で細胞が腫大し、ミトコンドリアが傷害を受けること、及び細胞外イオン環境を調節することによりこの低温性細胞傷害が軽減されることを報告してきた。しかしながら、低温ストレスを受けた細胞にどのようなイベントが生じているかについては明らかでない。そこで、分子生物学的アプローチにより低温性細胞傷害機構の解明を試みた。低温性細胞傷害としてミトコンドリアの変化が著明であったことから、ミトコンドリアと関わりの強いアポトーシス関連遺伝子(Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bad)、及びミトコンドリア膜結合タンパク質関連遺伝子(VDAC, HK)の転写物量についてqPCR法を用いて調査した。通常の培養条件(DMEM, 37℃, 5%CO₂)及び低温条件(HBSあるいはCI置換HBS培地, 4℃, 5%CO₂)で24時間培養したHeLa細胞よりRNA抽出を行い、逆転写反応によりcDNAを調製した。これを鋳型にqPCRを行った結果、各培養条件の違いによって著明な遺伝子転写物量の違いは見られなかった。(利益相反 なし)

15. 肺細動脈での炭酸ガス産生機構における流れ刺激の関与について

○河合佳子¹、林 もゆる¹、大橋俊夫²(¹東北医科薬科大・医・生理、²信州大・医・メディカル・ヘルスイノベーション)

【目的】生体内で血管内皮細胞は様々な物理的刺激に曝露されているが、中でも流れ刺激が重要な役割を果たしている。今回、ヒト肺細動脈内皮細胞に流れ刺激を加え、ATPと共分泌されるH⁺により炭酸ガスが産生される機序につき報告する。【方法】ヒト肺細動脈内皮細胞を培養系に移行し、流れ刺激に対するATP量の変化、共分泌されるH⁺と炭酸ガス産生量、炭酸脱水酵素IVの影響について検討した。【結果】流れ刺激により、ヒト肺細動脈内皮細胞からATPとH⁺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。炭酸ガス産生量は流れの強度依存的に増加し、F1/FO ATP synthase 阻害薬や炭酸脱水酵素阻害薬によって有意に低下した。また、ウサギを用いた動物実験でも本機構による炭酸ガス産生が認められた。【考察】肺細動脈内皮細胞表面のF1/FO ATP synthase から産生されるH⁺が血漿中のHCO₃⁻と炭酸脱水酵素存在下で反応し炭酸ガス化を行っていることが確認できた。従来の肺胞での赤血球酸素化による炭酸ガス産生機構とは異なり、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概念を提唱できた。(利益相反 なし)

16. 歯の喪失が顎運動時の脳活動に与える影響

○深見秀之, 石川瑛三郎, 柴田晃太郎, 佐原資謹 (岩手医大・歯・病態生理)

顎運動の遂行には中枢神経系のコントロールが重要である。しかし、加齢や歯の喪失による顎運動時の脳活動変化については不明な点が多い。本研究は加齢および歯の喪失が顎運動時の脳活動へ与える影響について fMRI で調べた。対象は若年有歯顎者, 80 歳以上で残存歯 20 本以上の 8020 群および無歯顎で行った。タスクは 30 秒間の下顎タッピング運動と安静を繰り返すブロックデザインとした。無視顎者は無歯顎 (8000-WOD 群) および義歯を装着し (8000-WD 群) タッピングを行った。画像解析の結果, すべての群で一次運動野および一次体性感覚野に賦活が見られた。高齢者群は若年者群に比較して一次運動野および一次体性感覚野の賦活領域が大きくなった。高齢者群では補足運動野, 運動前野, 視床, 小脳, 帯状回皮質, 大脳基底核に賦活を観察された。8020 群では前頭前野背外側部に賦活を観察されたが 8000-WOD 群では観察されなかった。8000-WD 群では前頭前野背外側部に賦活を観察されるようになった。また, 8000-WOD 群は補足運動野, 運動前野において 8000-WD 群と比べ賦活領域が小さくなっていた。義歯の装着による粘膜からの感覚入力 of 回復は顎運動の遂行に関与している可能性がある。(利益相反 なし)

17. 鍼を用いた酸素電極の試作

○中屋重行 (社会医療法人智徳会未来の風せいわ病院)
バイタルサインの指標として, 動静脈血酸素モニター「パルスオキシメータ (経皮的酸素飽和度測定器)」および心血管カテーテルによる血液ガス測定装置が臨床で用いられている。今回は生体内の組織酸素濃度測定用の酸素電極を試作した。

1) 八木式酸素電極法に準じて, 関電極を鍼, 不関電極を ECG 電極として「酸素分圧測定回路」を作成した。2) 銀鍼 0.34mm×60mm (カナケン) の鍼体をエナメル (カシューポリウレタンコート; インターメディカル) で被覆し, 先端を剥離剤で 1-2mm 剥離し「露出型酸素電極 cathode」とし, 対照電極は, ECG ディスポ電極 (Ag/AgCl) を皮膚 (四肢誘導) に貼付し「不分極電極 anode」とした。3) ボーラログラム酸素電極回路を構成し, DC プリアンプ (AM32 AZ; Unipulse) と DMM (PC7000; PCLINK; Sanwa) で増幅し, 3ch 心電計およびデジタルプリンタで経時的に記録した。4) 滅菌生理食塩液・O₂ 加および Na₂S₂O₄ 加脱酸素溶液中で, プラトー plateau 曲線で校正曲線を作成したのち, その鍼を表皮から皮下・筋層に向かって刺入し, 脱分極電流 (nA) が局所酸素分圧を代表するとみて, ECG と共に記録して, 鍼電極周囲組織の酸素分圧の測定を試みた。5) 鍼酸素電極法により末梢組織の微小循環動態を観察することができた。(利益相反 なし)