

### 奨励-1. 肺高血圧症における肺動脈リモデリングに対する血管内皮細胞 TRPM7 の役割

平石敬三<sup>1</sup>, 倉原 琳<sup>1</sup>, 胡 耀鵬<sup>1</sup>, 古賀佳織<sup>2</sup>, 鬼塚美樹<sup>2</sup>, 井上隆司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>福岡大学医学部生理学, <sup>2</sup>同 病理学)

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は, 肺動脈に叢状病変や内膜・中膜肥厚を生じる血管リモデリングを特徴とする病態である。一方, 血管内皮細胞に多く発現している TRPM7 チャンネルは, 皮膚や心臓のリモデリングに深く関わっていることが報告されている。そこで本研究では, PAH 時の血管リモデリングにおける TRPM7 の潜在的な重要性やその薬物治療分子標的としての可能性について, *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

TRPM7 チャンネルの機能を抑制するため, TRPM7 阻害薬の FTY-720 (冬虫夏草由来成分類似化合物), 冬虫夏草の抽出成分, 及び TRPM7-siRNA を使用した。これらの処置が, TGF- $\beta$ 2 刺激時にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に生じる内皮細胞・間葉系細胞各マーカーの発現変化に与える影響を評価した。また, PAH モデルラットの肺動脈や心臓の病理学的変化に対する冬虫夏草の改善効果を検討した。

HUVEC を TGF- $\beta$ 2 で刺激すると, ストレスファイバーの形成や内皮間葉転換 (EndoMT) マーカーの発現増加が観察された。これらの変化は, FTY-720 (1 $\mu$ M) や冬虫夏草エタノール抽出成分, あるいは siRNA 処置によって TRPM7 チャンネルの発現や機能を抑制することで拮抗された。このことから TRPM7 の活性は EndoMT を促進することが推察された。また PAH モデルラットに冬虫夏草を投与することにより, PAH に伴う右室肥大や右室圧上昇が抑制され死亡率が改善された。

以上の結果は, 血管内皮細胞の TRPM7 チャンネルが肺高血圧時の血管リモデリングに関与していることを示すとともに, これを分子の手掛かりとした研究が, PAH 病態の理解や新しい治療法の開発に資する可能性を強く示唆している。(利益相反 なし)

### 奨励-2. プラズマローゲンは神経細胞特異的オーファン G タンパク質共役型受容体を介して ERK と Akt を活性化化する

峰野くるみ, Md. S. Hossain, 片淵俊彦 (九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

エーテル型グリセロリン脂質プラズマローゲンは, 中枢神経系に豊富に存在しており, 当研究室での先行研究において, プラズマローゲンが ERK と Akt を活性化することにより神経細胞死を抑制することが報告された。しかし, その作用機序は未解明であったため, 本研究では, プラズ

マローゲンが作用する受容体の探索を行った。

受容体の探索にあたって, G タンパク質阻害剤による実験から, プラズマローゲンが G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介して作用していることを見出した。さらに, 培養細胞を用いて, 神経細胞に特異的に発現している 10 種類のオーファン GPCR のノックダウンを行ったところ, GPR1, GPR19, GPR21, GPR27, GPR61 をそれぞれノックダウンした細胞において, プラズマローゲンによる ERK の活性化が抑制されていた。この結果から, これら 5 つのオーファン GPCR がプラズマローゲンの作用発現に必要であることが示された。また, これらの GPCR 過剰発現細胞において, プラズマローゲンによる ERK と Akt の活性化が強められることや, 記憶関連遺伝子発現が増加することを見出した。さらに, マウス海馬内で GPR19 をノックダウンすると, 記憶形成が阻害されることを明らかにし, その要因として, GPR19 のノックダウンにより記憶関連遺伝子発現が減少すること, 樹状突起のスパイン密度が減少することを示した。(利益相反 なし)

### 奨励-3. 歯牙骨格形成異常を合併する家族性心房性不整脈に同定されたコネキシン 45 遺伝子変異とその機能異常

木本浩貴<sup>1</sup>, 石川泰輔<sup>1</sup>, 西井明子<sup>2</sup>, 斎藤加代子<sup>2</sup>, 三嶋博之<sup>3</sup>, 大槻早紀<sup>1</sup>, 辻 幸臣<sup>1</sup>, 吉浦孝一郎<sup>3</sup>, 萩原誠久<sup>2</sup>, 蒔田直昌<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子生理学, <sup>2</sup>東京女子医科大学大学院医学研究科循環器内科学, <sup>3</sup>長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学)

洞不全症候群及び房室ブロックは徐脈性不整脈疾患であり, 家族性や若年性に発症する場合は遺伝的素因の関与が疑われる。我々は, 家族性洞不全症候群及び房室ブロック 36 家系について遺伝子解析を行い, 原因遺伝子として心筋 Na チャンネル遺伝子である SCN5A や核膜タンパク質の遺伝子である LMNA を同定したが, 約 70% の症例は原因不明であった。そこで, 原因不明症例を対象に次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行った。進行性徐脈・房室ブロック・心房伝導障害と歯牙骨格形成異常を有する日本人の 3 世代家系とフランス人の房室ブロック *de novo* 症例に, 洞結節や房室結節の他, 歯や骨に特異的に発現するギャップ結合 (GJ) であるコネキシン (Cx) 45 の遺伝子変異 R75H を同定した。マウス神経芽細胞腫由来の N2A 細胞に発現させた Cx45-R75H は, ほぼ正常な GJ ブラークを形成したが, 細胞間の色素透過性及び GJ コンダクタンスは著明に低下していた。また, Cre-loxP システムを用いた心筋特異的ノックアウトマウスは, 遺伝子変異をもった患者と類似の表現型である心房性不整脈及び洞機能

の低下を示した。Cx45 の遺伝子変異は進行性心房伝導障害と歯牙骨格形成異常の合併を臨床像とする新たなコネキシン病の原因であることが判明した。(利益相反 なし)

#### 奨励-4. 唾液分泌と嚥下の調節機構における内臓感覚の役割

植田絳貴<sup>1</sup>, 菅 真有<sup>1</sup>, 八木孝和<sup>1</sup>, 楠本郁恵<sup>2</sup>, 柏谷英樹<sup>2</sup>, 桑木共之<sup>2</sup>, 宮脇正一<sup>1</sup> (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科矯正学分野, <sup>2</sup>同 統合分子生理学分野)

【背景】唾液分泌は、摂食嚥下に必要な消化液であるとともに、味覚や咀嚼など、口腔領域の感覚によって誘発される反射活動の一部である。近年、胃食道逆流により誘発される胸焼けが、唾液分泌や嚥下運動を誘発することが示唆されたが、その生理的意義と機序は十分に検討されていない。そこで、本研究は麻酔下のラットにおいて、内臓感覚を伝達する迷走神経求心路の活性化が唾液分泌と嚥下様運動に与える影響を検討した。

【資料および方法】Wistar 系雄性ラット (n=33) を用いた。全身麻酔下に左側迷走神経を頸部で切断後、内臓不快物質である塩化リチウムを腹腔内投与し、迷走神経活動を記録した。対照群では生理的食塩水の腹腔内投与を行った。次に、左側迷走神経を切断後、顎舌骨筋の筋電図を記録し、迷走神経刺激前後の唾液分泌量と嚥下様運動を記録した。電気刺激の条件は 5V, 5, 10, 20, 40Hz とした。嚥下様運動が唾液分泌に与える影響を検証するため、同様の非動化実験を行った。

【結果と考察】塩化リチウムは、唾液分泌および迷走神経活動を有意に増大した。また、迷走神経の電気刺激は、刺激頻度に依存して唾液分泌と嚥下様運動を有意に増大した。非動化実験では嚥下様運動が消失したが、唾液分泌は抑制されなかった。以上から、迷走神経求心路の活性化は唾液分泌と嚥下様運動を誘発することが示唆された。

【結論】迷走神経求心路の活性化は唾液分泌と嚥下様運動を誘発する。(利益相反 なし)

#### 奨励-5. YAP/TAZ による組織特異的な体性幹細胞への脱分化誘導法の確立

藤村篤史<sup>1</sup>, 富澤一仁<sup>1</sup>, ステファノ・ピッコロ<sup>2</sup> (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学, <sup>2</sup>イタリア・パドヴァ大学分子医化学)

iPS 細胞の作成法が確立されて以来、同様に種々の遺伝子を組み合わせることで、各種幹細胞を得る技術や目的とする細胞へ直接分化誘導する技術が派生してきた。今回我々は、Hippo シグナル経路の transducer である YAP/TAZ 単一因子を導入することで、組織特異的な体性

幹細胞へと脱分化させる技術を確認した。この手法は乳腺細胞、膀胱上皮細胞、神経細胞をそれぞれ組織特異的幹細胞へと限定して脱分化させる普遍的な技術であり、再生医療への応用の可能性を秘めたものである。(利益相反 なし)

#### 奨励-6. ファイバーフォトメトリー法を用いた急性ストレス負荷による循環応答時におけるオレキシン神経活動の測定

山下 哲<sup>1</sup>, 山中章弘<sup>2</sup>, 桑木共之<sup>1</sup> (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・統合分子生理学, <sup>2</sup>名古屋大学環境医学研究所・神経 2)

オレキシン神経は、視床下部を起始核として脳全体に投射し、睡眠覚醒、摂食、意欲、痛みの知覚など、多くの生理機能に関与することが知られている。また、ストレス負荷時の循環・呼吸・鎮痛・体温変化など「ストレス防衛反応」にも深く関わっている可能性が、オレキシン神経ノックアウトマウスを用いた研究により明らかとなっている。しかしながら、ストレスに暴露された際にオレキシン神経がどのようなタイミング・頻度で活動をしているのか、リアルタイム解析をした研究はほとんどない。そこで本研究では、これらのストレス負荷による循環応答(心拍数上昇)時のオレキシン神経の活動様式について、詳細に解析することを試みた。この目的を達成するためにまず、オレキシン神経特異的に高感度遺伝学的カルシウムプローブ(GCaMP6)を発現したマウスを作製した。この動物を用いることで、光ファイバーを介して自由に行動するマウスからオレキシン神経活動由来のカルシウム蛍光変化を検出することに成功した。今回はこの実験システムについて紹介する。(利益相反 なし)

#### 一般(神経 1)-1. ラット尾懸垂時の延髄および視床下部における Fos タンパクの発現動態

元嶋尉士<sup>1,2</sup>, 上野啓通<sup>1</sup>, 吉村充弘<sup>1</sup>, 丸山 崇<sup>1</sup>, 橋本弘史<sup>1</sup>, 齋藤玲子<sup>1</sup>, 園田里美<sup>1</sup>, 川崎 展<sup>2</sup>, 鈴木仁士<sup>2</sup>, 大西英生<sup>2</sup>, 酒井昭典<sup>2</sup>, 上田陽一<sup>1</sup> (産業医科大学医学部第 1 生理学, <sup>2</sup>同 整形外科)

背景：宇宙飛行技術の進歩に伴い、宇宙飛行士の微小重力環境暴露による精神的ストレスおよび骨・筋の萎縮が問題となっている。近年、オキシトシン (OXT) のストレス緩和作用および骨・筋形成作用が報告されているが、微小重力環境下における視床下部視索上核 (SON) および室傍核 (PVN) における OXT ニューロンの活動性を評価した報告はない。

目的：ラットにおいて、微小重力環境模倣モデルである

尾懸垂 (TS) 時の延髄および視床下部における神経活動を Fos タンパクを指標に可視化・定量化する。

方法：成熟雄性 Wistar 系ラットを用いて、TS 1.5 および 24 時間後に灌流固定し、厚さ 40 $\mu$ M の脳切片を作成した。SON, PVN, 延髄の前庭神経核 (VN) および孤束核 (NTS) における Fos タンパクおよび TS 1.5 時間後の SON および PVN における OXT を免疫組織化学的染色法 (LI) で染色し、結果を対照群と比較した。

結果：1.5 時間後の NTS, SON, PVN および 24 時間後の NTS における Fos-LI 陽性細胞、1.5 時間後の SON および PVN における Fos-LI 陽性 OXT ニューロンの有意な増加を認め、TS により OXT ニューロンが活性化されることが示唆された。

考察：尾懸垂により SON および PVN の OXT ニューロンが活性化され、分泌された OXT がストレス緩和および骨・筋形成に作用している可能性が示唆された。(利益相反なし)

#### 一般(神経 1)-2. 過重力負荷後の視床下部摂食関連ペプチド変化における前庭破壊の影響

園田里美<sup>1</sup>, 吉村充弘<sup>1</sup>, 元嶋尉仁<sup>1</sup>, 丸山 崇<sup>1</sup>, 橋本弘史<sup>1</sup>, 森田啓之<sup>2</sup>, 上田陽一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産業医科大学医学部第 1 生理学, <sup>2</sup>岐阜大学医学部生理学)

近年、宇宙への長期滞在が可能となってきたが、宇宙酔い、密閉空間でのストレス、宇宙放射線など、克服すべき課題は多い。我々は、宇宙酔いに伴う摂食抑制のメカニズムの一端を解明するために、前庭系を介した過重力の視床下部摂食関連ペプチドへの影響を検討した。成熟雄性 C57BL/6J マウスに偽手術 (Sham) もしくは前庭破壊術 (VL) を行い、過重力負荷装置を用いて 1g 環境下もしくは 2g 環境下でそれぞれ 3 日、2 週および 8 週間飼育した。実験終了後に深麻酔下で脳を取り出し、ドライアイス上で凍結した。クリオスタットを用いて切片を作成し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により視床下部の摂食関連ペプチド遺伝子発現 (*corticotrophin releasing hormone* (CRH), *proopiomelanocortin* (POMC), *cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART), *neuropeptide Y* (NPY), *agouti-related peptide* (AgRP), *melanin-concentrating hormone* (MCH) および *Orexin*) を定量化した。その結果、1g 環境下で飼育した Sham 群および VL 群において、上記摂食関連ペプチドの遺伝子発現に有意な変化はなかった。2g 環境下で飼育した Sham 群および VL 群では、3 日後に NPY, AgRP および *Orexin* が有意に上昇し、POMC および CART は有意に減少した。CRH は 2g 環境下の Sham 群で有意に上昇し、VL 群では有意な変化はなかった。2g 環境下の Sham 群では、

2 週後に CRH および POMC の有意な上昇を認めたが、VL 群では有意な変化はなかった。8 週後には上記摂食関連ペプチド遺伝子発現に有意差を認めなかった。以上より、過重力環境における摂食関連ペプチド遺伝子発現の増加は、前庭系を介していることが示唆された。(利益相反なし)

#### 一般(神経 1)-3. マウス舌部位における味情報伝達に関する遺伝子発現の定量的解析

松永絵里香, 大坪義孝 (九州工業大学生命体工学研究科人間知能システム工学専攻)

味物質に対する味神経の応答特性は、味神経ごとに異なっている。例えば、マウスでは舌前方の味蕾を神経支配する鼓索神経の味神経応答は、舌後方の味蕾を神経支配する舌咽神経の味神経応答に比べ、甘味・塩味に対する応答が大きい。一方、舌咽神経は、うま味・酸味・苦味に対して大きな応答を示す。このような味神経ごとの応答特性の違いは、神経支配を受ける味蕾に発現する味物質受容体の発現量の違いに起因する可能性がある。そこで、我々は、マウスの茸状乳頭または有郭乳頭を含む舌上皮を剥離し、各部位に発現する味情報伝達に関する遺伝子の発現を定量的に調べ、 $\Delta\Delta Ct$  法を用いて比較した。その結果、調べた 4 味質 (塩味, 甘味, うま味, 酸味) に対する味物質受容体の遺伝子発現量は、舌部位で有意に異なった。また、II 型細胞の味物質受容体の遺伝子発現量と味神経応答の関係は、遺伝子発現量が多いと味神経応答が大きいという単純な関係では無かった。味蕾細胞間の味情報伝達が味神経への出力を修飾しているのではないかと考えた。(利益相反なし)

#### 一般(神経 1)-4. マウス摂食行動に対するオレキシン神経光刺激の効果

山口 蘭, 桑木共之, 楠本郁恵 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学分野)

摂食行動は動物の生命維持に必要な不可欠な機構であり、中枢神経、末梢神経両方の作用によって制御されていると考えられている。しかし、それぞれの神経系やそれらを構成する多種多様な神経細胞が、摂食行動のどの部分に、どの程度関与しているかについては、まだ不明な点が多く残されている。我々は、摂食行動を調節すると考えられている神経系の中でも、これまでに摂食調節に関与することが知られていた視床下部オレキシン神経に着目した。本研究では、光により神経活動をコントロールするオプトジェネティクス技術を活用し、オレキシン神経のみの神経活動を活性化することで、マウスの摂食行動にどのような変化が見られるか検討した。マウスの摂食行動は条件検討の結果

から、内在性のオレキシン神経の影響が少ない、明期・摂食制限なしの条件で6時間摂食量を測定することで観察した。そして、オレキシン神経光刺激による摂食量の増大が確認できた。オプトジェネティクスは、細胞体への光照射による神経細胞活性化だけでなく、軸索への光刺激により投射先のみでの神経伝達物質の放出を促すことも可能である。今後はオレキシン神経投射先での摂食促進作用への関与を調べる予定である。(利益相反 なし)

#### 一般(心臓・循環)-1. 共培養系を用いた線維芽細胞による心房興奮伝播制御機構の検討

胡 耀鵬, 平石敬三, 倉原 琳, 市川 純, 沼田朋大, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

(目的) マウス心房筋由来細胞株 HL-1 細胞とマウス心房由来線維芽細胞を共培養して、心線維芽細胞が心房の興奮生成・伝播に与える影響について検討した。

(方法) HL-1 細胞と心線維芽細胞を共培養し自発収縮を示す単層クラスターを形成させた。活動電位 (AP) や膜電流の測定には  $\beta$ -escin による穿孔パッチクランプ法を用いた。

(結果) HL-1 細胞単層クラスターからは、細胞内 Ca 濃度上昇と同期した自発性 AP が記録された。この時、線維芽細胞数/HL-1 細胞数の比を大きくすると、自発性 AP の頻度と立ち上がり速度の減少、持続時間の延長が観察された。これらの変化はギャップ結合阻害薬 carboxolone で抑制された。これと同様の AP 時間延長や静止電位の脱分極は、心線維芽細胞から傍分泌されるサイトカイン TGF- $\beta$  によっても再現でき、それらの変化は TRPM4 の阻害薬 9-phenanthrol によってほぼ完全に抑制された。

一方、心線維芽細胞との共培養時には、しばしば早期脱分極現象 (EAD, DAD) が誘発され、更にこれが高度になると、不規則で振幅の小さい閾値下膜電位変動が観察された。これらの変化は、TRPM4 チャンネルを選択的に抑制する濃度の 9-PA でほぼ完全に消失した。

(結論) 以上の結果より、心線維芽細胞の共在によって心房筋細胞 AP の形態や発生頻度・パターンが修飾を受けること、そこではギャップ結合を介した電気的シンク効果や傍分泌されたサイトカインによる効果が、更には増強した TRPM4 チャンネル活性が密接に関与していることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般(心臓・循環)-2. Cav1.2型 $Ca^{2+}$ チャンネル C 末端部のチャンネル活性調節機序

高 青華<sup>1,2</sup>, 徐 建軍<sup>1</sup>, 呂 力婷<sup>1,3</sup>, 龔部悦子<sup>1</sup>, 郝麗英<sup>2</sup>, 亀山正樹<sup>1</sup> (鹿兒島大学医歯学総合研究科神経筋

生理学,<sup>2</sup>中国医科大学薬学院薬理毒理学,<sup>3</sup>中国東北大学機械工程・自動化学院過程装備・環境工程研究所)

Cav1.2 型  $Ca^{2+}$  チャンネルは神経系や心筋、平滑筋などに広く分布して細胞の  $Ca^{2+}$  シグナリングなど重要な機能を担っている。その主サブユニット ( $\alpha 1C$ ) の C 末端には PCRD (近位 C 末端部調節ドメイン) と DCRD (遠位 C 末端部調節ドメイン) があり、その相互作用を介してチャンネル活性を調節するとの報告があるが、その分子機構は不明である。我々は pull-down 法を用いた実験にて、C 末端近位ペプチド (CT1B, CaM 結合部位 preIQ と IQ 部位を含み PCRD を含まない) と遠位ペプチド (CT3D, DCRD を含まない C 末端最尾部) が結合することを見だし、両者の相互作用がチャンネル活性調節に関与するという仮説を提唱した。この仮説を検証するために CT1B と CT3D のモルモット心筋 Cav1.2 チャンネル活性に対する作用を patch clamp 法で調べた。Inside-out 法にて CT1B はチャンネル活性を維持するとともに、CaM + ATP 存在下で活性を増加させた。一方、CT3D はチャンネル活性を減少させた。また、whole-cell clamp 法で CT3D はチャンネルの  $Ca^{2+}$  依存性不活性化を促進させた。これらの結果は、C 末端の近位部と遠位部の相互作用が PCRD-DCRD 以外にもあって、チャンネル活性調節に関与するという我々の仮説を支持している。(利益相反 なし)

#### 一般(心臓・循環)-3. Kir2.1 チャンネルの細胞外 K イオンに依存する K イオン透過のメカニズム

柳 (石原) 圭子, 鷹野 誠 (久留米大学医学部生理学講座・統合自律機能部門)

Kir2.1 は心筋の静止電位を決定し、神経の興奮性を制御するはたらきを持つイオンチャンネルである。Kir2 ファミリーは構造上、膜電位センサーを持たない 2 回膜貫通型チャンネルであり、強い外向き電流抑制 (内向き整流性) をもたらすチャンネル開閉機構は、有機カチオンである細胞内ポリアミンによる電位依存性ブロックによるとされている。このチャンネルは細胞外 K イオンが無い状態で完全に抑制され、K イオン透過性は細胞外 K イオン濃度の平方根にほぼ比例して増加することが知られている。我々は HEK293 細胞に発現させた Kir2.1 の電流をインサイドアウト・パッチ膜、アウトサイドアウト・パッチ膜より膜電位固定下に記録し、それらのメカニズムを検討した。その結果、細胞外液に K イオンが無くても外向きの K イオン透過は可能であり、チャンネルの K イオン透過性は細胞外 K イオンによる調節を受けているわけではないことが分かった。(利益相反 なし)

#### 一般(心臓・循環)-4. 中心血圧, AI によって従来の Double Product (DP) を評価する—その妥当性

今永一成<sup>1,2</sup>, 原 寛<sup>1</sup> (1 社会医療法人原土井病院, 2 同 臨床検査科)

Double Product (DP) は [収縮期血圧と心拍数との積] で表され心負荷評価の一つに用いられている。従来から使われている上腕動脈の収縮期圧 (間接法) は駆動波成分が反映されたものである。一方, 上行大動脈の収縮期圧 (中心血圧) は反射波成分を反映している。反射波が心後負荷を左右するからには, 心負荷の評価には中心血圧の反射波の大きさを示す Augmentation Index (cAI) が有用と思われる。今回, 健常者, 高血圧症, 高脂血症, 動脈硬化症, 糖尿病の治療中, 既往歴の被検者を対象 (80 名, 60~89 歳) に, 安静時, 運動負荷において, 心負荷評価における上腕血圧 (間接法) bDP と中心血圧 (Mobil-O-Graph: 上腕動脈 Oscillometric 法 GTF による推定値) cDP 及び中心血圧 AI (cAI) との妥当性を検討した。cAI が年齢標準値以下を心負荷「安全域」, 以上を心負荷「危険域」とした。[結果] bDP < 12000 (正常範囲とされている) の群中に cAI が危険域にある者が約 30% 認められた。cDP < 12000 の群中に cAI 危険域にある者が約 30% 認められた。cAI 安全域群に bDP > 12000 の者は認められなかった。cDP < 8000 群中の cAI は全て安全域。運動負荷 (29 例) においては bDP > 12000 の群中に cAI が安全域にある者が約 50% 認められた。[結語] 心負荷を評価するには中心血圧 cDP 及び cAI が従来の上腕収縮期圧 bDP より有用であることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般(心臓・循環)-5. Raspberry Pi マイコンを用いた生理学実習支援システムの開発

塩谷孝夫 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

【目的】佐賀大学の, 平成 28 年度の教育研究費配分額は, 教員一人あたり 143,000 円であった。これは, 年度あけに突然 75% のカットが強行され, 教育研究費が 25% にまで削減された結果である。こんな状況で, 専任教員 1 名でも生理学実習を行うために, マイクロコンピュータを用いた支援システムを開発した。【方法】ケンブリッジ大学で開発された, 価格 35 ドルのマイコンである Raspberry Pi3 を用いて, 生理学実習の説明と指導を省力化する支援システムを組んだ。マウスだけで簡単に操作できるよう, OS にはメディアセンター OS である OSMC を用いた。この支援システムを実習班それぞれに設置して, 実験説明のスライドと実験手技のビデオを学生が自由に見られるようにした。【結果】このシステムの設置により, 教員の説明の負担は激減

し, 極少数の教員でも, 余裕をもって生理学実習を進めることができた。また, 学生にアンケートをとった結果, 実習のわかりやすさの評点は大きく上昇した。さらに, この支援システムの設置はよかったという旨のコメントが, 学生から多く寄せられた。【結論】この Raspberry Pi マイコンを用いた生理学実習支援システムは, 教員, 学生の双方にとって, きわめて効率的でわかりやすい実習環境を提供する。(利益相反 なし)

#### 一般(分子生理)-1. C-Phycocyanin shifts macrophage polarization towards pro-inflammatory phenotype

Q.I. Nurrahmah, R. Madhyastha, H. Madhyastha, Y. Nakajima, M. Maruyama (Department of Applied Physiology, University of Miyazaki, Faculty of Medicine)

C-Phycocyanin (C-PC), a fluorescent protein purified from the blue green algae, *Spirulina fusiformis*, has promising medicinal value, due to its antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, and hepatoprotective properties. Macrophages are immune effector cells, participating in wound healing and tissue repair by coordinating inflammatory processes. Resting M0 macrophages can be polarized towards pro-inflammatory M1 or anti-inflammatory M2 phenotypes, depending on the stimulus. We studied the effect of C-PC on M1/M2 polarization of macrophages, using cultured RAW 264.7 macrophage cells. RAW 264.7 cells are akin to resting M0 phenotype, and express very low amount of pro-inflammatory cytokines (iNOS, IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$ ). Treatment of RAW cells with C-PC caused an increase in ROS generation, and the expressions of M1 markers (iNOS, IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$ ), in a dose-dependent manner. M2 markers, IL-10 and Arginase 1 showed reduced expression, while IL-4 was not affected. Nitric oxide production was also increased in a dose-dependent manner. C-PC increased the phosphorylation and nuclear translocation of NFkappaB p65 and JNK. NFkappaB was necessary for C-PC's effect on TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and iNOS; JNK was necessary for C-PC's effect on IL1 $\beta$ , IL6 and Arginase 1. Interestingly, JNK inhibition had a reverse effect on C-PC's influence on Arginase 1. Our study shows that C-PC shifts the polarization of resting macrophages towards a pro-inflammatory phenotype, through the involvement of NFkappaB and JNK pathways. (COI none)

#### 一般(分子生理)-2. 酸素を必要としないミトコンドリ

## ア呼吸の可能性

高橋英嗣 (佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻)

細胞の酸素濃度は酸素の供給と需要のバランスで決定されるため、細胞レベルの低酸素に対し酸素需要を能動的に減少させるのは有効な適応戦略といえる。最近、低酸素による hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  の誘導がミトコンドリア呼吸を抑制することが明らかとなった。これを metabolic reprogramming (MR) と呼ぶ。一方で、ミトコンドリア呼吸、電子伝達、マトリクスから膜間腔への H<sup>+</sup> 汲み上げと膜電位形成、ATP 合成は共役しているため、MR で見られるミトコンドリア呼吸の低下は、ミトコンドリア膜電位に大きく影響することが予想される。しかしながら、われわれは培養細胞を用いた MR の *in vitro* モデルにおいて、ミトコンドリア呼吸抑制時にもミトコンドリア膜電位が維持される現象を見出した。(利益相反 なし)

## 一般(分子生理)-3. Plasmalogens attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory signaling in microglia

F. Ali, Md.S. Hossain, 片淵俊彦 (九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

これまでわれわれはエーテル型グリセロリン脂質であるプラズマローゲン (Pls) が、LPS によるミクログリアの活性化を伴う神経炎症を抑制することを報告したが (J Neuroinflammation, 2012)、その機序については不明であった。そこで本研究では、LPS による caspase3 および 8 の活性化および LPS-TLR4 の internalization に対する Pls の作用を、初代培養ミクログリアおよびミクログリア細胞株 (BV2) を用いて検討した。

その結果、LPS の投与による caspase 3 および 8 の活性化が Pls の前投与によって抑制されることがウェスタンブロットおよび免疫染色法で明らかになった。また Pls の合成酵素である glyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT) を sh-RNA レンチウイルスベクターを用いてノックダウンすると、逆に caspase3 および 8 が活性化され、NF- $\kappa$ B の核内への移動による炎症シグナルが増強することが示された。さらに LPS 投与による TLR4 のエンドゾームへの取り込みの亢進も、Pls の前投与によって抑制されることが明らかになった。これらの Pls 抗炎症作用は、Pls がミクログリアの活性化を伴う種々の神経変性疾患に対する治療薬として応用できる可能性を示唆している。(利益相反 なし)

## 一般(分子生理)-4. 歯芽細胞の核膜アドレナリン受容

## 体の発見

中島則行, 鷹野 誠 (久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門)

アドレナリンは、生体の恒常性維持に極めて重要なホルモンである。アドレナリン受容体は形質膜に存在する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) とされる。一方で、核膜に発現する GPCR が、近年になって注目を浴びている (J Physiol. 590 (6), 1313-1330, 2012)。

我々は、免疫組織染色にて、歯芽細胞であるエナメル芽細胞、象牙芽細胞の核膜にベータ 1 アドレナリン受容体 (ADRB1) が細胞核の付近に発現することを発見した。In Situ Hybridization 法にて、ADRB1 の mRNA が歯芽細胞に発現することも明らかとなった。さらに、ファルク=ヒラルブ染色法やカテコラミン結合蛍光試薬にて、細胞質内にカテコラミン類が存在することが分かった。歯芽細胞は、活動的なエンドサイトーシスを介してホルモンを核膜まで取り込んでいる可能性がある。

今後、詳細な ADRB1 の発現部位決定のため、光一電子相関顕微鏡での超微細構造の決定を目指す。(利益相反 なし)

## 一般(分子生理)-5. tRNA 修飾異常による糖尿病性神経障害の分子機構に関する研究

榊田光倫<sup>1,2</sup>, 魏 范研<sup>1</sup>, 荒木栄一<sup>2</sup>, 富澤一仁<sup>1</sup> (熊本大学大学院生命科学研究部・分子生理学分野,<sup>2</sup> 同代謝内科学分野)

神経障害は最も頻度の高い糖尿病合併症でありながら、その分子機序に不明な点が多い。我々は以前、2 型糖尿病のリスク因子である CDKAL1 の分子機能を明らかにした。CDKAL1 はリジン tRNA の 37 位のアデノシンをチオメチル化修飾することで、リジン翻訳時の誤翻訳を防止している。CDKAL1 の一塩基多型変異を持つヒトでは、リジン tRNA 修飾が低下することでプロインスリンのリジン翻訳時が障害され、2 型糖尿病の発症リスクが高くなる。一方、リジンは様々な神経栄養因子のプロセッシング部位に位置している。Cdkal1 機能欠損は神経栄養因子のリジン翻訳に異常を惹起し、その結果、プロセッシング異常の神経栄養因子が神経細胞内に蓄積することが神経障害発症の原因となるのではないかと仮説を立て、Cdkal1 欠損マウスを用いて同仮説の検証を行った。(利益相反 なし)

## 一般(分子生理)-6. メッセンジャー RNA (mRNA) に存在するチオメチル化修飾の探索

江村修平, 魏 范研, 藤村篤史, 富澤一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部・分子生理学分野)

ミトコンドリア (mt) に局在する転移 RNA (tRNA) 修飾酵素 Cdk5rap1 は, mt-DNA がコードする 4 つ tRNA (mt-tRNA<sup>Trp</sup>, mt-tRNA<sup>Trp</sup>, mt-tRNA<sup>Phe</sup> および mt-tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>) のアンチコドン近傍 37 位のアデノシンをチオメチル化 (ms<sup>2</sup>iA) することで, 効率的なミトコンドリアタンパク翻訳に重要である。一方, チオメチル修飾はミトコンドリアの tRNA のみならず, 核由来の RNA にも存在する可能性が近年の研究で示唆されている。この仮説を検証するために, 高感度質量分析法を用いて tRNA および mRNA に存在するチオメチル修飾を検討したところ, ms<sup>2</sup>iA 修飾が核ではなく, ミトコンドリア由来の mRNA に存在することを示唆する結果が得られた。さらに, ms<sup>2</sup>iA 修飾に対する抗体を作成し, 免疫染色で検討したところ, ミトコンドリア以外に染色が認められなかった。これらの結果から, ms<sup>2</sup>iA 修飾は核由来の RNA ではなく, ミトコンドリア特異的であることが明らかになった。(利益相反 なし)

#### 一般(神経 2)-1. ラット脊髄膠様質におけるオキシトシンの鎮痛作用機序の性差と生後発達

蔭 昌宇, 藤田亜美, 王 翀, 平尾 峻, 鈴木里佳, 馬郡信弥, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

オキシトシンは脊髄後角で鎮痛に働くが, その性差や生後発達は不明である。我々は以前, 成熟雄ラットの脊髄後角第 II 層 (膠様質) ニューロンにパッチクランプ法を適用して, オキシトシンがグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達に影響せずに, 膜の脱分極および自発性の GABA やグリシンを介する抑制性シナプス伝達を促進することを見出した。その抑制性シナプス伝達の促進は Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬テトロドトキシン存在下で消失した。今回, オキシトシンが, 幼若雄や成熟雌のラットの膠様質ニューロンにおける自発性の興奮性および GABA やグリシンを介する抑制性のシナプス伝達に及ぼす作用を調べた。その結果, 以下のことが明らかになった。(1) 幼若雄ラットでは, オキシトシンは膜を脱分極や過分極する一方, 自発性興奮性シナプス伝達を促進や抑制した。また成熟雄ラットと同様, GABA やグリシンを介する自発性抑制性シナプス伝達を促進した。(2) 成熟雌ラットでは, オキシトシンは膜を脱分極する一方, 自発性興奮性シナプス伝達に作用しなかった。また, 一過性に GABA やグリシンを介する自発性抑制性シナプス伝達を促進した。(3) 幼若雄や成熟雌のラットの自発性の抑制性シナプス伝達の促進はテトロドトキシン存在下で消失した。以上より, 脊髄後角におけるオキシトシンによるシナプスレベルの鎮痛作用機序は生後発達や性差を示すことが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般(神経 2)-2. ラット脊髄膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達に及ぼすオレキシン B の作用

王 翀, 藤田亜美, 平尾 峻, 鈴木里佳, 馬郡信弥, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

神経ペプチドであるオレキシンはオキシトシンと同様, それを含有する視床下部のニューロンは脊髄後角に投射して鎮痛に働くことが知られているが, その詳細は不明である。その作用機序を知るために, 成熟雄ラット脊髄横断薄切片の後角第 II 層 (膠様質) ニューロンにパッチクランプ法を適用し, オレキシン B がグルタミン酸作動性の自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。その結果, 調べたニューロンの約半数において, 自発性興奮性シナプス後電流の振幅を変化させずにその発生頻度を増加すること, また, この増加と無関係に保持膜電位 -70mV で内向き膜電流を生じることが明らかになった。これらの作用は濃度依存的で, EC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.051μM と 0.020μM であった。このオレキシン B の内向き膜電流誘起作用の効率はオキシトシンのものと同程度であった。これらのオレキシン B 作用は電位作動性 Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬テトロドトキシンやオレキシン-1 受容体阻害薬 SB334867 (1μM) に抵抗性である一方, オレキシン-2 受容体阻害薬 JNJ10397049 (1μM) の存在下で消失した。以上より, オレキシン B はオレキシン-2 受容体を活性化して神経終末から起こるグルタミン酸の自発放出を増加することや膜の脱分極を生じることが明らかになった。これらの作用はオレキシン B による鎮痛に寄与することが示唆される。(利益相反 なし)

#### 一般(神経 2)-3. 抗うつ薬は蛙坐骨神経の複合活動電位を抑制する

平尾 峻, 藤田亜美, 坂井愛子, 鈴木里佳, 馬郡信弥, 王 翀, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

神経線維における活動電位の伝導抑制は鎮痛薬の作用機序の一つである。我々は今まで, 様々な種類の鎮痛補助薬が蛙坐骨神経の複合活動電位 (CAP) を抑制することを明らかにしてきた。例えば, 局所麻酔薬, 抗痙攣薬および α<sub>2</sub> アドレナリン受容体作動薬 (デクスメデトミジンやオキシメタゾリン) の作用である。今回, 蛙坐骨神経に air-gap 法を適用し, 鎮痛補助薬である抗うつ薬の CAP に及ぼす作用を調べた。その結果, SNRI デュロキセチン, SSRI フルオキセチン, 三環系抗うつ薬 (アミトリプチリンとデシプラミン) は, それぞれ 0.39, 1.5, 0.16, 1.4mM の IC<sub>50</sub> 値で CAP の振幅を減少させることがわかった。デュロキセチンとアミトリプチリンの IC<sub>50</sub> 値は, 抗痙攣薬のラモト

リギン (0.44mM) やカルバマゼピンの値 (0.50mM), 局所麻酔薬のロピバカイン (0.34mM) やレボプロピバカインの値 (0.23mM),  $\alpha_2$  作動薬デクスメトミジン値 (0.40mM) に近かった。一方, フルオキセチンとデシプラミンの  $IC_{50}$  値は,  $\alpha_2$  作動薬オキシメタゾリン値 (1.5mM), 局所麻酔薬のリドカイン (0.74mM) やコカインの値 (0.80mM) に近かった。以上より, 今回使用した 4 つの抗うつ薬は, いくつかの抗うつ薬や局所麻酔薬, また  $\alpha_2$  作動薬のものに匹敵する効率で伝導抑制作用を持つことが示唆された。(利益相反なし)

#### 一般(神経 2)-4. Two N-glycosylation sites regulate cell surface expression of AMPA-type glutamate receptor in neurons

M.B. Kandel, R. Midorikawa, K. Takamiya (Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

Glutamate receptor is a major excitatory neurotransmitter receptor in central nervous system. AMPA-type glutamate receptor (AMPA), one of glutamate receptors, plays a main role in principal synaptic transmission and many neuronal functions, including synaptic plasticity underlying learning and memory. N (asparagine)-glycosylation is one of major posttranslational modification of membrane proteins, but its roles in neurons remain to be clarified in detail. AMPAR subunits are N-glycosylated at their extracellular domains during their biosynthesis in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi system, yet the functional role of this modification is not well understood. Six N-glycosylation sites are presumed to exist in extracellular domain of GluA1, which is a member of AMPAR subunits. We found that the intracellular trafficking and cell surface expression were strongly suppressed in the GluA1 mutants lacking N-glycan at N63/N363 in HEK 293T cells. Overexpression of Flag tagged 63S/363S GluA1 (S=Serine) in cortical neuronal culture of GluA1 knockout mouse rescued cell surface expression of 363S GluA1, but not 63S GluA1. Co-expression of GluA2 increased the cell surface expression of 363S GluA1 but not 63S GluA1 in HEK 293T cells. Immunofluorescence analysis showed that the mutants are not localized in ER and Golgi apparatus. Multimer analysis using BN-PAGE displayed the impaired tetramer formation in the glycosylation mutants and inhibitor experiment showed that the mutants are degraded by Lysosomal pathway. These data

suggested that site-specific N-glycans on GluA1 regulate intracellular trafficking and cell surface expression of AMPAR. (COI none)

#### 一般(神経 2)-5. $\beta$ 振動により抑制されるてんかん様発火

澤田豊宏, 夏目季代久 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

生体内の脳では脳波が見られ周波数毎に様々な役割がある。その中でも  $\theta$  や  $\beta$  リズムは記憶学習に関連しており, 脳内において中隔核から海馬へのアセチルコリン作動性神経の活性化により誘導されることがわかっている。 $\beta$  リズムはラットの海馬スライスにアセチルコリン受容体作動薬のカルバコール (CCh) を投与することで  $\beta$  振動として再現可能である。一方, 脳波の中には神経細胞の異常同期興奮発火によって起こるてんかん波がある。てんかん波も海馬スライスに GABAA 受容体阻害薬を投与すると ictal 波や interictal 波のてんかん様発火として再現可能で, 今回は Picrotoxin (PTX), Bicuculline (BIC), SR-95531 (GABA-zine) を用いた。先行研究において  $\theta$  リズムはてんかん波を抑制する結果が得られているが,  $\beta$  リズムについては明らかになっていない。本研究では  $\beta$  リズムにもてんかん波に対する抑制効果がある事を示し, さらに抑制効果は振動の存在が必要であることを示す。

Wistar 系ラットから海馬スライス (450 $\mu$ M) を作製し CA3 を測定部位として実験を行った。CCh によって  $\beta$  振動誘導し, その後 GABAA 受容体阻害薬いずれかを投与したが,  $\beta$  振動に変化は見られなかった。次に  $\beta$  振動が誘導されない濃度の CCh (15 $\mu$ M) 投与後に GABAA 受容体阻害薬を投与したところてんかん様発火が見られた。またこの時, 興奮性シナプス後電位 (EPSP) は減少しており, その減少度は CCh30 $\mu$ M 投与時と変わらないことから, てんかん様発火の抑制には振動現象が必要である可能性が示された。(利益相反なし)

#### 学部学生-1. RNA 修飾の代謝機構に関する研究

森岡太意気, 魏 范研, 藤村篤史, 富澤一仁 (熊本大学大学院生命科学研究部・分子生理学分野)

RNA はメチル化やアセチル化など様々な形の転写後修飾をうけることが知られている。これらの化学修飾は, RNA の安定性や翻訳の効率など RNA の機能制御に重要である。しかし, 一旦修飾された RNA スクレオチドがどのような経路を辿って代謝されるかは不明である。修飾スクレオチドの代謝経路を解明するために, 本研究は高感度質量分析器による網羅的分析法を確立した。次に, 同方法を



用いて細胞株の培養上清及び細胞内に存在するヌクレオチド量を比較検討することで、修飾ヌクレオチドの排出経路を検討した。また、修飾ヌクレオチドがどのようなトランスポーターを介して排出されるかを検討するために、既知のヌクレオチドトランスポーターの阻害剤を加えることで検討を行った。(利益相反 なし)

#### 学部学生-2. ヒトにおける高濃度茶カテキンによる食後血糖・脂質上昇の抑制効果の検証

伊藤佑見<sup>1</sup>, 島田尚子<sup>1</sup>, 草留 愛<sup>1</sup>, 高良麻美<sup>1</sup>, 伊藤聖也<sup>1</sup>, 香月里奈<sup>1</sup>, 坂本優子<sup>1</sup>, 高主祐加<sup>1</sup>, 石松 秀<sup>2</sup> (<sup>1</sup>西九州大学健康福祉学部健康栄養学科, <sup>2</sup>西九州大学健康栄養学部健康栄養学科)

茶カテキンには、血糖・血清脂質上昇抑制作用があるとされ、近年注目されている。そこで、ヒトで茶カテキンに血糖・血清脂質の上昇抑制効果がみられるのかを調べた。健康人 8 名をヘルシア緑茶群(茶カテキン 540mg 含有, 4 名)と、おーいお茶群(茶カテキン 40mg 含有, 4 名)の 2 群に分け、それぞれ 4 週間飲用してもらい、初日, 2 週間目, 4 週間目に採血を行った。血糖・血清脂質に有意な上昇は認められず、インスリンにも有意な上昇はなかった。しかし、結果にばらつきがあるなどリミテーションもあるため今後より詳細な検討を有する。(利益相反 なし)

#### 学部学生-3. 機械性疼痛に対する Odorant-X 香気誘発性鎮痛の効果

井上恵理<sup>1</sup>, 田代章悟<sup>1,2</sup>, 山口 蘭<sup>1</sup>, 上村裕一<sup>2</sup>, 桑木共之<sup>1</sup>, 柏谷英樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学, <sup>2</sup>同 侵襲制御学)

テルペン系化合物 Odorant-X の香気暴露により、化学性疼痛(ホルマリンテスト)、熱性疼痛(ホットプレートテスト)に対してマウスで著明な鎮痛効果が現れる。そこで、本研究では Odorant-X 香気暴露が機械性疼痛に対しても鎮痛効果を持つか検証することを目的とした。ホルマリンテスト中に Odorant-X を 5 分間のみ暴露すると、その後 10~15 分間のみ有意な鎮痛効果が観察されるため、短時間で機械的疼痛閾値が測定可能な Calibrated Forceps (Rodent Pincher (Bioseb 社))を用いた測定系の確立を行った。その結果、レミフェンタニル(超短時間作用型  $\mu$  オピオイド受容体アゴニスト)投与により一過性に観察される鎮痛効果を 5 分の時間分解能で計測できることが確認された。次にこの装置を用いて Odorant-X 香気暴露直後に誘発される鎮痛効果を測定したところ、無臭空気に暴露した時と比較して有意に疼痛反応閾値が上昇すること ( $45.3 \pm 5.50\%$  (変動の平均値  $\pm$  標準誤差),  $p < 0.0001$ ,  $n=10$ , (paired t-

test))が観察された。本研究により、Odorant-X 香気暴露は多様な疼痛に対して鎮痛効果を持つことが明らかになった。(利益相反 なし)

#### 一般(チャンネル)-1. TASK1 チャンネルは副腎髄質細胞においてアシドーシスを感知する

井上真澄, 松岡秀忠, 原田景太 (産業医科大学医学部第 2 生理学)

副腎髄質 (AM) 細胞においてアシドーシスは、TASK 様チャンネルを抑制してカテコールアミン分泌を誘発する。ラット副腎髄質のイムノプロットにおいて、TASK1 蛋白は確認されたが、TASK3 蛋白は確認されなかった。しかし、副腎髄質の TASK3 の mRNA レベルは、副腎皮質と同等であった。この結果は、TASK3 蛋白も AM 細胞で発現している可能性があることを示唆する。そこで、AM 細胞における TASK チャンネルの分子実体を、ノックアウトマウスを用いて検討した。pH6.8 のアシドーシスは、野生型マウス AM 細胞においてカテコールアミン分泌を誘発した。このアシドーシス誘発性分泌は、TASK3 のノックアウトでは影響を受けなかったが、TASK1 のノックアウトでは消失した。野生型マウスの AM 細胞において、外液の pH を 7.4 から 6.0 に段階的に下げると、K チャンネルの抑制による内向き電流が可逆的に誘発された。この H イオンによる K チャンネル抑制の IC50 は、7.1 であった。アシドーシスによる内向き電流発生は、TASK3 ノックアウトの AM 細胞では観察されたが、TASK1 ノックアウトの AM 細胞では観察されなかった。これらの結果は、マウス AM 細胞にはおもに TASK1 チャンネルが、発現していることを示している。(利益相反 なし)

#### 一般(チャンネル)-2. TRPA1 ノックアウトマウスにおける消化管炎症・線維化の亢進

倉原 琳, 平石敬三, 胡 耀鵬, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

これまでの我々の研究結果から、消化管筋線維芽細胞に多く発現する TRPA1 チャンネルが、大建中湯に含まれる乾姜・山椒の成分、ステロイドやビルフェニドンなどの抗線維化薬で活性化され、消化管筋線維芽細胞の線維化マーカーの発現を抑制することを見出した。

TRPA1 チャンネルの活性化と組織線維化との関連を in vivo で確認するために、CRISPR/Cas 法を用いて TRPA1 ノックアウトマウスを作製し、週に一回 TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 注腸投与(計 6 回)によって大腸炎症・線維化モデルマウスを作成した。腸の組織を固定して炎症や線維化の重篤度について TRPA1 ノックアウト

トマウスと正常マウスと比較検討した。Hematoxylin-Eosin 染色の結果から TNBS 投与によって惹起される炎症に関して、いずれのマウスに関しても粘膜固有層に軽度な慢性炎症細胞浸潤が観察され、WT と TRPA1+/- ノックアウト間で差はなく、TRPA1-/- ノックアウトマウスでは局所的な単核球の集簇巣を多数認めた。Masson Trichrome 染色の結果から、正常腸組織では粘膜筋板の走行に沿って、膠原線維が均等に分布しているのに対し、TRPA1-/- ノックアウトの TNBS 投与群では部分的に粘膜固有層に膠原線維が増生していることが確認された。

以上の結果から、TRPA1 チャンネルは消化管において、炎症やそれに伴う線維化に対して抑制的に働いている可能性が示唆されました。(利益相反 なし)

#### 一般(チャンネル)-3. K562 細胞の増殖・赤芽球分化における TRPM7 を介したイオン流入の役割

高橋貴理子<sup>1,2</sup>, 沼田朋大<sup>1</sup>, 山浦 健<sup>2</sup>, 井上隆司<sup>1</sup> (福岡大学医学部生理学,<sup>2</sup>同 麻酔科学)

(背景・目的) 白血病細胞株 K562 細胞は種々の化学刺激で赤芽球系細胞や巨核球系細胞に分化することが知られており、細胞異常増殖や分化過程のモデル細胞としてよく用いられている。しかしその機序については依然不明な点が多い。そこで K562 細胞に恒常的に発現している TRPM7 チャンネルに着目し、それを介して起こる陽イオン流が細胞増殖と分化過程に果たす役割について検討した。

(結果・結論) (1) K562 細胞にパッチクランプ法及び Ca イメージング法を適用して、TRPM7 の電気生理学的・薬理学的特徴を有する自発性陽イオン電流とそれに伴う Ca 流入を記録することができた。これらの電流や Ca 流入は、TRPM7 の比較的選択的阻害薬 FTY720 で濃度依存的に抑制された。(2) K562 細胞の増殖速度は細胞外カルシウムの除去や、ドキシクリン誘導型 siRNA による TRPM7 発現のノックダウンによって有意に減少した。このことから、TRPM7 を介したカルシウム流入が K562 細胞増殖の重要な調節因子であることが明らかになった。(3) 赤血球分化における TRPM7 チャンネルの役割を探るため、K562 細胞のヘモグロビン合成量を指標に検討した。分化誘導物質 NaB による K562 細胞のヘモグロビン合成量増加は、FTY720 処置や siRNA による TRPM7 ノックダウンによって有意に減少した。以上より、TRPM7 チャンネル活性は赤血球の分化過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。(利益相反 なし)

#### 一般(チャンネル)-4. 小胞体ストレスによる Cav3.1-T 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの時相依存性制御

劉 衍恭, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

イオンチャンネル蛋白は小胞体 (ER) にて糖鎖の修飾を受けてフォールディング (folding) とトラフィック (trafficking) の制御を経て細胞膜に輸送され、成熟イオン輸送体として機能する。補助サブユニット構造を持たない Cav3.2-T 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの HEK293 異種発現系を用いて、小胞体ストレスがどのような時間経過と機序でイオンチャンネル電流を制御するかを明らかにする実証を試みた。糖鎖形成阻害剤 tunicamycin は Cav3.2-T 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル電流 (I<sub>CaT</sub>) に対し 1~6 時間の短期作用では影響を与えなかったが、12 時間以上の長期作用では最大内向き電流を有意に抑制した。更に、24 時間の作用では向き電流の抑制に加え、1) 活性化曲線の脱分極偏位、2) 使用依存性遮断の促進、2) 不活性化からの回復過程の遅延、等のキネティクスに対する修飾作用も示した。Cav3.1-T 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの糖鎖はチャンネルの発現修飾に関わるだけでなく、その分子構造の修飾にとってチャンネルのゲーティング機構に深く関与することが示唆される。(利益相反 なし)

#### 一般(チャンネル)-5. Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate as a potent and specific inhibitor of KCNQ1/KCNE1

M. Wu<sup>1,2</sup>, H. Luo<sup>1,2</sup>, J.J. Xu<sup>3</sup>, T. Takumi<sup>4</sup>, M. Kamayama<sup>3</sup>, W.J. Song<sup>1,2</sup> (Department of Sensory and Cognitive Physiology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, <sup>2</sup>Program for Leading Graduate Schools HIGO Program, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, <sup>3</sup>Department of Physiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Japan, <sup>4</sup>RIKEN Brain Science Institute, Wako, Japan)

Tricyclodecan-9-yl-xanthogenate (D609) is known for its antiviral and antitumor properties, and its actions have been attributed to inhibiting phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelin synthase (SMS) (Adibhatla et al., 2012). Previously we found that chronic application of D609 to HEK293T cells that express the K<sup>+</sup> channel KCNQ1/KCNE1, resulted in drastic reduction of current density and alteration of channel kinetics and voltage-dependence (Wu et al., 2016). The alteration in channel voltage dependence by D609, however, was not observed after overexpression or knockdown of SMS1. These observations suggest that D609 may act directly on the channel, in addition to suppressing the enzymes. Here we tested this possibility in HEK293T cells. We found that D609 rapidly and reversibly inhibited KCNQ1/KCNE1 current in a

concentration-dependent manner with a high affinity. The IC<sub>50</sub> was much lower than that for its inhibition of SMS. To test collectively the effect of D609 on other depolarization-activated K<sup>+</sup> channels, we applied the drug on isolated striatal cholinergic interneurons, which are known to express both sustained and transient K<sup>+</sup> currents (genes of Kv1, Kv2, and Kv4 subfamilies; Song et al.,

1998; Baranauskas et al., 1999), and found that D609 had little effect on those currents. The action of D609 on KCNQ1/KCNE1 was also found to be use-dependent, similar to the widely used KCNQ1/KCNE1 blocker 293B; unlike 293B, however, D609 did not suppress KCNQ1 expressed alone. These results suggest that D609 is a potent and specific inhibitor of KCNQ1/KCNE1. (COI none)