

【一般演題】

01. 内側扁桃体の可塑性が恐怖記憶の形成をサポートする

○母 愷, 中川真美子, 夏目季代久, 粟生修司 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

脳の扁桃体は嫌悪情報の取得と統合の基礎となる可塑的場所である。以前の研究では恐怖条件付けの記憶が扁桃体の基底外側核で確立している。最近の研究では他の脳領域における可塑性は、恐怖条件付けをサポートすることが可能であることを示唆した。そこでニオイで恐怖条件付けしたラットの嗅覚情報の中継である内側扁桃体の神経活動への影響を細胞外記録で調べた。オレンジのニオイで恐怖条件づけしたラットは条件刺激オレンジに対するニューロンの応答性が抑制性から興奮性に転換した。青葉アルデヒドで恐怖条件づけしたラットはその青葉アルデヒドの反復曝露で、順応作用が減弱し、応答が増強した。さらに、オレンジのニオイの恐怖条件付け群では、条件刺激(オレンジ)に対する特異的な持続的応答が発現した。条件刺激以外の生得的嫌なニオイに対して、対照群で興奮性応答が多かったニオイ(ジュンパーベリー(ネズミ避け))が、恐怖条件づけ群では抑制性応答を示すようになった。これらは内側扁桃体が恐怖記憶に関する重要な役割を果たしていることを示唆する。その可塑的变化の特徴は、i) ニオイ応答特性の逆転(抑制から興奮あるいは興奮から抑制への転換)、ii) 恐怖関連ニオイ刺激に対する応答強度の増大、iii) ニオイ応答持続時間の遷延化であった。(利益相反 なし)

02. AMPA 受容体における N 型糖鎖修飾の役割

○若園佳彦¹, M.B. Kandel¹, 緑川良介¹, 岡 昌吾², 高宮孝悟¹ (1 宮崎大学医学部統合生理, 2 京都大学医学部人間健康科学学生化学)

AMPA 受容体の N 型糖鎖修飾の役割を検討するため、海馬の初代培養細胞を PNGase-F 処理し、全細胞記録下、グルタミン酸応答を記録したところ、AMPA 受容体特有の速い脱感作が消失し、緩徐な再感作が現れた。そこで、次に AMPA 受容体のサブユニットである GluA1 の N 型糖鎖修飾部位、6ヶ所にアミノ酸変異を加え、HEK293T 細胞に強制発現させ、同様にグルタミン酸応答を記録したところ、401 番目のアスパラギン (N401) における糖鎖修飾が再感作に重要であることを見出した。さらに、GluA1 ノックアウト (KO) マウスの海馬 CA1 領域にウイルスベクターを用いて、野生型と変異型 (N401Q) の GluA1 を発現させた後、長期増強 (LTP) の誘導実験を行った。GluA1KO マウスでは、LTP が誘導されないことが報告されているが、野

生型 GluA1 の発現において、LTP の誘導の回復が認められた。一方、変異型 (N401Q) GluA1 においては、一過性の増強は認められたが、その増強の持続は認められなかった。(利益相反 なし)

03. ノックインマウスを使った HCN4 発現ニューロンの可視化

○中島則行¹, 鷹野 誠² (1 京都大学医学部生理学教室, 2 久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門)

過分極誘発・環状ヌクレオチド感受性陽イオンチャネル (HCN 1~4) のうち、HCN4 は洞房結節ペースメーカー細胞や嗅神経細胞の自発発火を制御する。しかしながら、中枢神経系の他の部位における HCN4 の発現分布や機能は殆ど未解明のままである。我々は HCN4 遺伝子の翻訳開始点にテトラサイクリントランスアクトベータとその応答配列をノックインしたマウス (HCN4^{+/TETRE}) を作製した (Nakashima et al., J. Physiol., 591, 1749-69, 2013)。このマウスと、テトラサイクリン応答配列制御下で GFP を発現するトランスジェニックマウス (TRE-GFP Tg) とを交配し、HCN4 を発現するニューロンの細胞体や軸索を容易に可視化することに成功した。既に報告されている嗅神経細胞以外に、脊髄後角、大脳皮質感覚野および連合野、線条体、黒質などで、GFP シグナルが強く認められた。免疫染色を使った報告とは異なり、視床での HCN4 の発現は、他の部位と比較してそれほど高くないことが判明した。(利益相反 なし)

04. メラノサイト由来ドーパミンによる新規皮膚感覚調節機構

○小野堅太郎^{1,2}, C.T. Viet², Y. Yi², D. Dang², 人見涼露¹, 稲永清敏¹, B.L. Schmidt² (1 九州歯科大学生理学分野, 2 ニューヨーク大学ブルーストーン研究所)

ヒト皮膚色の多様性は異なる太陽光環境下の進化の過程で獲得された。太陽光による葉酸分解やビタミン D 合成の観点から、人種間で皮膚の熱感受性に違いがあるのではないかと考えた。人種間と体色の異なるマウス系統間におけるメタアナリシスにて、濃い体色群は薄い群よりもゆらい熱感受性が高かった。皮膚色を調節するメラノサイトからの何らかの情報伝達物質の放出を探るために、ヒトメラノサイト由来細胞の培養上澄みを HPLC 法にて解析したところ、L-ドパの分泌が確認された。これをうけ、L-ドパをアルビノマウスに投与したところ、局所的に黒マウスと似た感覚感受性を示すようになった。この反応はドーパミンおよびドーパミン受容体 D1 受容体アゴニストにても同様引き起こされた。D1 受容体刺激は、感覚神経節における

熱受容体チャネル TRPV1 の発現を増加させることが明らかとなった。この皮膚ドーパミン性感覚調節は色素沈着と同時に引き起こされ、各人種特有の太陽光環境への適応に有利であったと考えられる。(利益相反 なし)

05. 放射線被ばく骨髄抑制に対する消化管ホルモン「グレリン」の保護効果の検討

○西 芳寛¹, 那須沙織², 久志野彰寛², 細田洋司³, 田中永一郎¹ (¹久留米大・医・生理学(脳・神経), ²同 放射線同位元素施設, ³国循研・生化学・再生医療部)

【緒言】消化管障害を惹起する被曝線量 (5-9Gy) 下で, Brain-Gut ホルモン「グレリン」はラットの生存率を改善する。今回, 骨髄抑制線量の 3Gy X 線被曝 (Ir-3Gy) に対するグレリンの血球保護効果を確認する目的で, Ir-3Gy マウスの末梢血 RBC, WBC 数に対するグレリンの効果, Ir-3Gy 後の培養末血リンパ球 (PBL) 生存率に対する同効果, Ir-3Gy マウスのグレリン分泌動態を検討した。【材料と方法】BL/6J マウスに Ir-3Gy を施行。照射後に 5 μ g/body のグレリンを 3 日間 (4 回) 投与。照射前・後 6hr, 1~30 day の末血中 RBC 数, WBC 数を計測した。ヒト PBL に Ir-3Gy を施行。照射後の PBL 培養液にグレリンを添加し Trypan-blue 法で 24hr 後の死細胞率を計測した。Ir-3Gy マウスから day 0-30 で血漿・胃を回収しグレリン濃度 (C8-, T-, C10-Ghr) を測定した。【結果】グレリンによる *in vivo* の血球保護効果が確認され, *in vitro* でも Ir-3Gy PBL の死細胞率が抑制された。血中の活性型グレリン (C8-Ghr) 濃度は照射後 1 週間をピークに上昇。胃内でも同時期に C10-Ghr 量が増加した。【考察・結語】マウス体内でのグレリン産生は Ir-3Gy で増加し, 骨髄障害抑制的に作用すると推定された。(利益相反 なし)

06. 腫瘍細胞遊走の酸素濃度勾配依存性

矢原大裕, 吉田拓磨, 榎田祐也, 大久保魁馬, 鶴野雄介, 馬場 嵐, ○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)

腫瘍の血行性遠隔転移の初期ステップである腫瘍内血管侵入のメカニズム解明のため, 「低酸素微小環境中の腫瘍細胞は酸素濃度勾配に沿って, 酸素濃度の高い血管へと方向性の遊走を行う」との仮説を立て, 培養細胞を用いた *in vitro* モデルで検証した。単層培養した MDA-MB-231 細胞組織中に, 新しく考案した gap cover glass (GCG) を用いて酸素濃度勾配を形成し, 酸素濃度勾配下の細胞の遊走を 12 時間にわたって追跡した。GCG 外の酸素濃度を生理的なレベル (3%) とした時, GCG の酸素流入端から 300 μ m, 500 μ m, 1500 μ m 内部で酸素流入端に向かう細胞遊走が見

られた (Rayleigh 検定)。以上より, 低酸素領域からより酸素濃度の高い領域に向けての細胞遊走は, 細胞の存在する微小領域の酸素濃度に依存すると考えた。(利益相反 なし)

07. Anthrocylic glycoside aloin inhibit NF κ B pathway during osteoclastogenesis in RAW-264.7 cells

○Y. Pengjam^{1,2}, H. Madhyastha¹, R. Madhyastha¹, 山口優也¹, 中島融一¹, 丸山真杉¹ (¹宮崎大学医学部機能制御学講座応用生理学分野, ²Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Thailand)

Background: Osteoporosis is a bone pathology leading to increased fracture risk and challenging the quality of life. As current treatments can exhibit deleterious side effects, the use of phyto-compounds with therapeutic and preventive activities against orthopedic related problems represents a promising alternative. Purpose: We investigated the effect of aloin, an anthrocylic compound, on inhibition of osteoclastogenesis using Receptor of the nuclear factor κ B (NF- κ B) ligand (RANKL)-induced RAW 264.7 macrophage cells. Study design/methods: The inhibitory effect of aloin on *in vitro* osteoclastogenesis was evaluated by reduction in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) content and expression levels of osteoclast-specific gene, cathepsin K. Multinuclear formation of osteoclast was assessed with haematoxylin & eosin staining. The marker of the murine monocyte/macrophage cells, F4/80 content, was evaluated by immunocytochemistry. The underlining mechanisms were assessed by Western blots and EMSA. Effect of aloin on generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was estimated by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Bone degradation effect was evaluated by bone pit assay. The bone pit culture supernatant was studied by Fluorescein assay. Results: We demonstrated that aloin reduced TRAP content and levels of osteoclast-specific gene, cathepsin K. Treatment with aloin (75 μ M) prevented multinuclear formation (haematoxylin & eosin staining), reduced intracellular TRAP content (TRAP Staining) and increased F4/80 content (F4/80 immunohistochemistry) in RANKL (20ng/ml) treated RAW cells. Treatment of the RAW cells with aloin suppressed RANKL-induced NF- κ B pathway components like IKK α , IKK β , Phospho-IKK α/β , NF- κ B-p65, Phospho-NF- κ B-p65 and I κ B α . EMSA studies showed aloin dose dependently reduced DNA binding activity of NF- κ B. Additionally, *in*

in vitro bone pit assay revealed that aloin prevented bone degradation and also decreased the fluorescence content in cells, thus confirming the role of aloin in inhibition of osteoclastogenesis. Conclusion: Collectively, this study identifies aloin as a potent inhibitor of osteoclastogenesis and bone resorption, and provides evidence for its therapeutic potential to treat diseases involving abnormal bone lysis. (利益相反 なし)

08. ヒ素による細胞遊走阻害と老化作用

○山口優也, M. Harishkumar, M. Radha, Y. Peng-jam, 中島融一, 丸山真杉 (宮崎大学医学部機能制御学講座応用生理学分野)

ヒ素に汚染された水を飲むことにより、様々な障害を引き起こすことが報告されており、その1つとして、皮膚への障害を引き起こすことが報告されている。また、*in vitro* においてヒ素添加により細胞遊走や細胞増殖が阻害されるという報告があり、我々は、ヒ素による皮膚線維芽細胞への影響に対するこれらの分子メカニズムの解明を試みた。

本研究において、10ppmのヒ素を皮膚線維芽細胞に16時間添加することにより、細胞遊走と細胞増殖が阻害されたが、その濃度における細胞毒性は示さなかった。さらに、細胞内 reactive oxygen species 産生が増加し、DNA への酸化ストレスが誘導された。また、酸化ストレスにより、mammalian Ste20-like protein kinase 1 (MST1) のリン酸化が増加した。その一方で、serin/threonine kinase Akt のリン酸化は減少していた。その結果、それらの下流に存在する Forkhead box O (FOXO) transcription factor は MST1 の活性化により FOXO1 と FOXO3a の核内移行が促された。これにより、FOXO の転写遺伝子により細胞周期が制御され、G1 期の減少、G2/M 期の増加を確認した。これらの変化は、細胞が細胞老化マーカーである senescence β -Galactosidase の発現増加を示したことから、細胞老化へと導かれていることによるものであると分かった。以上の結果より、ヒ素に暴露された皮膚線維芽細胞は MST1-FOXO シグナル伝達経路の活性化により細胞老化を引き起こし、細胞遊走が阻害することが示唆された。(利益相反 なし)

09. 消化管筋線維芽細胞 TRPA1 チャンネルを介するステロイドの抗線維化作用の分子機序

○倉原 琳¹, 平石敬三¹, 胡 耀鵬¹, 青柳邦彦², 井上隆司¹ (¹福岡大学医学部生理学, ²同 消化器内科学)

<背景・目的>ステロイドの作用機序としては、古典的 genomic mechanism 以外に、ステロイド受容体を介さず、短時間に細胞膜に直接作用する non-genomic mechanism

が知られている。本研究では、ヒト消化管筋線維芽細胞株 InMyoFib を用い、術後イレウスや手術後腸管癒着の軽減に広く用いられてきたプレドニゾロンなどの抗線維化薬の non-genomic 作用について検討を行った。この細胞に最も高発現している TRPA1 チャンネルが消化管線維化過程に果たす役割を探索した。<方法>パッチクランプ法, Ca^{2+} イメージング法, リアルタイム PCR 法, 免疫プロット法, 免疫染色法を用いた。<結果>①グリチルリチン, グリチルレチン酸, プレドニゾロン, メチルプレドニゾロンなどステロイド様成分は TRPA1 チャンネルの活性化を介して抗線維化作用を示した。②TRPA1 アゴニスト AITC (1 μ M) は, TGF- β 1 (5ng/ml) 刺激による InMyoFib 細胞の線維化マーカーの増加を顕著に抑制した。③siRNA 処置で TRPA1 発現を抑制すると, TGF- β 1 下流の Smad-2 リン酸化や転写調節因子 MYOCD の発現が増加した。④可溶性コラーゲンを細胞外に添加すると TRPA1 の発現が増加し, 同時に抗線維化作用が観察されたが, TRPA1-siRNA で前処理した細胞ではこの作用が見られなかった。⑤クローン病患者の線維化狭窄部位では, TRPA1 チャンネルの発現が上昇していた。<考察>消化管筋線維芽細胞の TRPA1 チャンネルを活性化すると, 線維化シグナルに対する抑制効果があることが分かった。以上の結果は, ステロイドの non-genomic mechanism を理解する上でも重要な鍵となる可能性がある。(利益相反 なし)

10. TRPM7 は歯の石灰化に関与する

緒方佳代子^{1,2}, 福島秀文¹, 圓谷智之³, 岡 暁子², 岡本富士雄¹, 片桐千秋³, 鍛冶屋浩¹, 松下正之³, 尾崎正雄², 岡部幸司¹ (¹福岡歯科大学細胞生理学分野, ²福岡歯科大学成長小児歯科学分野, ³琉球大学大学院医学研究科分子細胞生理学講座)

【目的】エナメル質は生体内で最も硬い組織であるがその分子機構は不明なことが多い。今回我々は、 Ca^{2+} や Mg^{2+} 等のミネラルイオンチャンネルであり、キナーゼドメインを併せ持つユニークな“Chanzyme” TRPM7 に着目し、歯の石灰化における役割について検討を行った。【方法と結果】①マウスにおいて TRPM7 の発現部位を mRNA・タンパクレベルで検討すると、全身の他の組織に比べ歯のエナメル芽細胞、象牙芽細胞突起に高い発現を認めた。②エナメル芽細胞株 SF2 及び象牙芽細胞株 mDP 細胞では TRPM7 の高い発現を認め、TRPM7 様電流が検出された。SF2, mDP 細胞は石灰化誘導培地により、ALP 染色, VonKossa 染色は陽性像を認め、石灰化マーカーの発現も認めた。③ shRNA により SF2, mDP 細胞の TRPM7 ノックダウンを行うと、TRPM7 発現の低下と、TRPM7 様電流も減少し

た。一方、石灰化誘導での ALP 染色に優位な変化は認めなかったが、VonKossa 染色は陰性となった。④ポイントミューテーションによりキナーゼ機能を欠失させた KR マウスの切歯は白色を呈し、走査性電子顕微鏡で観察を行うと WT と比較してエナメル小柱間隙が粗であり、エナメル質形成不全が疑われた。【結論】以上のことから、TRPM7 は歯質の石灰化において、石灰化活性には影響を及ぼさないが、石灰化機構における TRPM7 の重要性が示唆された。(利益相反 なし)

11. 金ナノ粒子を用いた温度感受性イオンチャネル活性の光制御

○沼田朋大^{1,2}, 中辻博貴², 諸根信弘³, 金子周司⁴, 森泰生², 井上隆司¹, 今堀 博², 村上達也³ (福岡大学医学部生理学講座, ²京都大学大学院工学研究科, ³京都大学物質—細胞統合システム拠点 (WPI-iCeMS), ⁴京都大学大学院薬学研究科)

光照射による細胞機能制御法は、現在、多くの方法で遺伝子改変が必要であり、新たな方法の開発が望まれている。そこで、私達は光熱変換ナノ材料である金ナノ粒子に着目して細胞機能制御を行った。まず、金ナノ粒子表面を陽イオン化した高比重リポ蛋白質で被覆することにより目的の細胞の細胞膜にナノ材料を局在化させた。次に光照射による温度変化が与える細胞機能変化を評価するために HEK 293 に温熱感受性イオンチャネルとして知られる TRPV1 を強制発現させた細胞を用いて機能評価を行った。その結果、金ナノ粒子を細胞膜に取り込ませた細胞は、光照射により、目的の細胞膜付近のみの温度が上昇すること、また、TRPV1 活性を介して細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が起こることが分かった。最後に TRPV1 が豊富に発現する後根神経節 (DRG) 細胞を用いて、同様な実験を行った。野生型マウスから単離した DRG 細胞では、光照射により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られたが、TRPV1 欠損マウスから単離した DRG 細胞においては、光照射による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、見られなかった。これらの結果により、TRPV1 を標的とした光照射治療法開発の可能性が示された。(利益相反 なし)

12. テストステロンの長期作用による緩徐活性化遅延整流カリウムチャネル I_{Ks} の心筋発現の増大

増田季美子, 高成広起, 森島真幸, 王 岩, 馬 芳芳, ○小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

心電図のパラメータには性差が存在し、成人男子では成人女子より有意に QT 間隔が短い。男性ホルモン—テストステロンが心筋細胞のイオンチャネルの発現を制御するという仮説を立て、その検証を行った。去勢後の雄性成獣ラッ

トにテストステロンを投与すると投与 2 日目より有意に心電図 QT 時間が短縮した。また同心筋細胞では緩徐活性化遅延整流カリウムチャネルをコードする遺伝子 Kv7.1 の有意な増加と I_{Ks} 密度の増加が認められた。この Kv7.1 の有意な発現増加は去勢術を施行しない雄性ラット群及び雌性ラット群でも同様に確認された。急速活性化遅延整流カリウムチャネルをコードする Kv11.1 及び補助サブユニット (minK, MiRP1) の発現は変化しなかった。β 受容体作動薬 イソプロテレノールによる Kv7.1 の発現増加と異なり、テストステロンの Kv7.1 に対する増加作用は転写因子 CREB の発現増大を伴わず、転写因子 SP1 の活性遮断剤 (mithramycin) の存在によってその作用が消失した。また Kv7.1 の発現増大は CREB-siRNA の存在下でイソプロテレノールの効果は消失したがテストステロンの効果は遮断を受けなかった。以上の結果より、テストステロンは転写制御によって心筋細胞の緩徐活性化遅延整流カリウムチャネル I_{Ks} の心筋発現を増大させ、電気的活動性を調節することが示唆された。(利益相反 なし)

13. 高齢者の運動強度 (Mets) の決め方。心拍数、心拍出量、最大酸素摂取量からの検討

○今永一成, 原 寛 (社会医療法人原土井病院)

健康寿命の延伸には生活習慣病の予防・改善が戦略であり、運動が有効であることは論を待たない。摂取熱量消費には、基礎代謝量、食餌性熱量そして運動性熱量 (生活活性 (NEAT) と運動の合計) が関与しているが、肥満・動脈硬化予防改善には特に運動が重要な要素である。厚生省労働省が提示 (2013 年) した運動指針は、20~65 歳の成人に関しては「23Exercise/週、その中の運動には 3Mets 以上強度で 4Exercise/週」を推奨している (運動強度: Mets, 運動量: Exercise [Mets と時間の積])。しかし、3Mets 以上が示されているものの最適強度は記載されていない。一方、65~70 歳以上の高齢者に関しては、「10Exercise/週」を掲げているが、適切な運動強度の記載はない。高強度運動によるデメリットを回避するため最適 Mets を定めることは重要と考えられる。そこで私共は、高齢者の心拍出量、酸素摂取量の特性を鑑み、20~90 歳 (主にフィットネス会員、新老人の会会員) を対象に、最大酸素摂取量 50% を目標として最適 Mets の推定を試みた。結論: 運動に関しては、20~30 歳若年者には 7Mets が、50~65 歳壮年者には 6Mets が適切であり、70~80 歳高齢者には 4~5Mets が適切であることが想定された。尚、高齢者に対する運動指針として、「15Exercise/週、そのうち 4Mets 強度運動 4 Exercise/週」を提唱したい。(利益相反 なし)

14. ラット摘出心房標本において細胞内 Ca^{2+} 負荷により発現した micro re-entry 性 tachycardia-like excitation

○酒井哲郎 (琉球大学・大学院医学研究科・システム生理学)

ラット摘出心房標本において、細胞内 Ca^{2+} の負荷をかけた状態で tetanus 刺激を加え頻拍性不整脈 tachycardia-like excitation (TE) を誘発した。256 素子 matrix photodiode array と merocyanine-rhodanine 系膜電位感受性色素 (NK2761) の吸光測定による膜電位イメージングを用いて頻拍時における興奮波伝播の時間的・空間的パターンの mapping をおこなった。Mapping の結果から、その多くの例で中心に解剖学的障壁を伴わない興奮旋回、すなわち micro re-entry が観察された。さらに micro re-entry 発現の背景には 1) 興奮伝導速度の不均一な低下、2) 不安定な blocked area の発現、3) 一方向性 (unidirectional) block の発現がみられた。ここでみられる TE は細胞内 Ca^{2+} 負荷によって発現することから、細胞内の Ca^{2+} dynamics の擾乱がこの興奮旋回を発現させていると考えられる。さらにこの micro re-entry は心房細動の基礎となる電気生理学的病態と考えられており、この疾患の背景にも細胞内 Ca^{2+} dynamics の異常が存在することが示唆された。(利益相反なし)

15. ペースメーカーチャンネル HCN4 の陰性変時作用における新たな機能

○小佐々優子^{1,2}, 武谷三恵¹, 中島則行³, 牛島一男², 鷹野 誠¹ (¹久留米大学医学部生理学講座, ²久留米大学医学部麻酔学教室, ³京都大学医学研究科神経生物学)

心臓洞房結節には過分極誘発陽イオンチャンネル (HCN1-4) のうち HCN4 が最も多く発現している。我々は、HCN4 の機能を明らかにするために、HCN4 を生理的発現部位において過剰発現した遺伝子改変マウス HCN4^{+/TET} (tTA) と、ドキシサイクリン投与により発現抑制できる遺伝子改変マウス HCN4^{Luc/TET} (TET-off) を作成した。

TET-off の心電図では洞性不整脈や徐脈を認めた。しかしイソプロテレノール (Isp; 0.1mg/kg) を腹腔内投与した後の心拍数は、野生型マウス (WT) と有意な差はなかった。次に頸部迷走神経を露出し電気刺激を行ったところ、TET-off では WT と比べて有意に心拍数が低下した。一方、tTA にこれらの刺激を加えても、心拍数は WT と有意な差は認めなかった。

この機構を解明するために微小電極法により右心房標本の HCN4 発現領域から活動電位を記録した。TET-off では不安定な自発発火と閾値付近の膜電位変動を示していたが、0.03 μ M Isp 投与により緩徐脱分極相が明瞭になり、安

定して自発発火することが判明した。一方 30 μ M アセチルコリン投与では、TET-off, tTA 共に徐脈と過分極を生じたが、tTA では過分極の程度が小さかった。これらの結果より、HCN4 は陽性変時作用よりも過度の陰性変時作用を制限する機能が主体である事が示唆された。(利益相反なし)

16. 成熟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シトラールの作用

○朱 蘭, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 王 翀, 余 婷, 平尾 峻, 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))

膠様質 (後角第 II 層) は皮膚末梢から脊髄に入力する痛み情報の制御に働く重要な部位である。この制御に働くタンパク質の 1 つとして、後根神経節ニューロンの中枢端に発現している TRP チャンネルがある。レモンガラスの精油成分シトラールは鎮痛効果を持つが、その作用機序は明らかにされていない。シトラールは異種細胞発現系で TRPV1, TRPA1 および TRPM8 の活性化能を持つが、ニューロンにおいて、どのタイプの TRP を活性化するか不明である。また、シトラールがシナプス伝達に及ぼす作用も調べられていない。本研究では、成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンへホールセル・パッチクランプ法を適用し、シトラールが自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を TRP 活性化に焦点を当てて調べた。シトラールは、濃度依存性に自発性の興奮性シナプス後電流の発生頻度を増加させ、その EC₅₀ 値は 0.58mM であった。この作用は繰り返し見られることより、同じニューロンで薬物効果を調べた所、電位作動性 Na⁺ チャンネル阻害薬テロドトキシン、TRPV1 阻害薬カプサゼピンおよび TRPM8 阻害薬 BCTC による影響を受けない一方、TRPA1 阻害薬 HC-030031 により抑制された。以上より、シトラールは膠様質の TRPA1 を活性化し、グルタミン酸の自発放出を増加させると結論される。この作用はシトラールの鎮痛効果に寄与することが示唆される。(利益相反なし)

17. (-)-カルボンと (+)-カルボンは成熟ラット脊髄膠様質の神経終末において異なった種類の TRP チャンネルを活性化する

○康 欽, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 王 翀, 余 婷, 平尾 峻, 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))

脊髄後角第 II 層 (膠様質) において痛み伝達の修飾に働くタンパク質の 1 つに、後根神経節 (DRG) ニューロンの中枢端に発現している TRP チャンネルがあるが、その性質

はまだ十分に調べられていない。我々は今まで、植物由来の構造異性体であるカルバクロールとチモールが、TRPA1 を異なった効率で活性化することを報告した。スペアミント成分 (-)-カルボンは DRG ニューロンの細胞体で TRPV1 を活性化するが、その構造異性体 (+)-カルボンの作用は不明である。今回、成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンへホールセル・パッチクランプ法を適用し、(-)-および(+)-カルボンが自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。これらは濃度依存性に自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度を増加させ、それらの EC₅₀ 値はそれぞれ 0.70mM と 0.72mM であった。(-)-カルボン作用は TRPV1 阻害薬カプサゼニンにより抑制されたが、TRPA1 阻害薬 HC-030031 による影響を受けなかった。一方、(+)-カルボン作用はカプサゼニンによる影響を受けなかったが、HC-030031 により抑制された。以上より、膠様質において (-)-カルボンは TRPV1 を、(+)-カルボンは TRPA1 をそれぞれ活性化することが示された。DRG ニューロンの中枢端に存在する TRP の活性化はカルボンの構造異性体間で異なることが示唆される。(利益相反 なし)

18. 半夏瀉心湯による口内炎疼痛抑制には shogaol および gingerol の Na_v1.8 抑制作用が関与する

○人見涼露¹、小野堅太郎¹、山口喜一郎¹、寺脇 潔²、松本千波²、大宮雄司²、稲永清敏¹ (九州歯科大学・生理学分野、²株式会社ツムラ・ツムラ研究所)

最近、ガン治療患者に発症する口内炎の痛みに、半夏瀉心湯の含漱が有効であることが報告されたが、その鎮痛メカニズムは不明である。本研究では、半夏瀉心湯に含まれる 20 以上の化合物について、疼痛関連チャネルの一つである電位依存性ナトリウムチャネル Na_v1.8 に対する抑制効果をイオンチャネルアッセイにて検討した。次に抑制作用を認めた化合物について感覚ニューロンからの神経ペプチド substance P 放出に対する作用を検討した。さらに、最近我々が開発した覚醒下ラットに対する疼痛評価法を用いて、口内炎モデルラットに発症した機械的アロディニアに対する鎮痛効果を調べた。その結果、半夏瀉心湯含有化合物のうち、乾姜に含まれる [6]-shogaol および [6]-gingerol が Na_v1.8 抑制作用および substance P 放出抑制作用を示した。これらの化合物は、半夏瀉心湯構成生薬の一つであり、組織内浸透作用を持つサポニンを多く含む人參と合わせることで、機械的アロディニアを抑制した。以上の結果より、半夏瀉心湯による口内炎疼痛の抑制には、[6]-shogaol および [6]-gingerol の Na_v1.8 抑制作用が関与し、人參中のサポニン成分がその薬効を増強する可能性が示唆

された。(利益相反 あり)

19. ミトコンドリア機能抑制による副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌促進：ラットとモルモットとの違い

○井上真澄、原田景太、遠藤 豊、薬科 明 (産業医科大学医学部第 2 生理学講座)

モルモット副腎髄質 (AM) 細胞では、低酸素によりカテコールアミン分泌が誘発されるが、ラットではされない。この低酸素に対する感受性の違いはモルモットとラットの AM 細胞のミトコンドリアの性質が異なることによる可能性が考えられる。そこでこの可能性を機能的・生化学的解析により検討した。Complex IV 抑制薬のシアン及び protonophore の CCCP は、単離モルモット AM 細胞からのカテコールアミン分泌を促進したが、ラット AM 細胞からの分泌は促進しなかった。シアンによるミトコンドリア膜電位の脱分極は、ラットよりモルモット AM 細胞の方が有意に遅延した。Complex V 抑制薬の oligomycin はこのシアンによる脱分極の遅延を消失させた。ミトコンドリア機能抑制による ATP 濃度の減少は、ラットよりモルモット AM 細胞の方が著明であった。副腎髄質の inhibitor factor の発現量は、ラットよりモルモットの方が少なかった。一方、Complex V の発現量は逆に多かった。これらの結果は、モルモット AM 細胞ではミトコンドリア膜電位の脱分極時に Complex V の逆動作の程度が大きいこと、そしてその結果 ATP の減少が著明であることを示している。(利益相反 なし)

20. 活性酸素除去が血液凝固・線溶に果たす役割

○菊池清志^{1,2}、伊藤隆史^{3,4}、川原幸一⁵、丸山征郎⁴、村井恵良¹、森岡基浩²、田中永一郎¹ (久留米大学医学部生理学講座脳・神経機能部門、²久留米大学医学部脳神経外科学講座、³鹿児島大学病院救命救急センター、⁴鹿児島大学大学院医歯学総合研究科システム血栓制御学、⁵大阪工業大学工学部生命工学科)

急性期脳梗塞患者の治療において、本邦で開発されたラジカスカベンジャーのエダラボンは、rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator; アルテプラゼ) と併用することで、再開通率が増加することが知られている。そこで、健康成人血液を用いて、新規デバイス T-TAS (Total Thrombus-formation analysis system 血流下血栓形成能解析システム: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info862/index.html>) で解析すると、H₂O₂ は rt-PA の線溶効果を減弱する一方、エダラボンは rt-PA の線溶効果を増強した。さらに血栓形成能測定後の排液中の D-dimer 値は、rt-PA 群

よりエダラボン+rt-PA 群において、有意に高値であった。これらの結果から、エダラボンは rt-PA による血栓溶解を促進する可能性がある。(利益相反 あり)

21. 連通標本槽を用いたカエル心臓八木式灌流法による心拍出量測定および心電図同時記録

○顛原嗣尚^{1,2}, 坂元 駿¹, 浦川勇哉¹, 石井賢介¹, 田中千智¹, 柳本琴美¹ (長崎国際大学薬学部生理学研究室, ²正光会松ヶ丘病院)

伝統的な生理学実習項目の一つであるカエル心臓の八木式灌流実験法に改良を加え、心室拍動をより定量的に観察記録できるようにした。すなわち、収縮・拡張サイクル中の心室の容積変化を気圧変化に変換して捉える簡便な装置(連通標本槽)を考案し、圧変化を拍出量の指標として連続描記できるようにした。連通標本槽は心室を浸す槽と圧変化を発生する気密な槽とを連結したものである。この方法により、前負荷の増減に適応する心拍出量の増減、すなわちフランク・スターリング機構を明確に示すことができる。また、大動脈内静水圧を増加させる装置を考案した。これを用いることにより、後負荷増加に対応する心室拍動動態のユニークな変化を観察できる。さらに、この実験系における安定した心電図の記録法を考案した。すなわち静脈側貯留槽内と連通標本槽内に心臓を挟むように対電極を設置してヒト心電図の aVF 記録に相当する心電図波形を得る。これにより心臓の機械的活動と電気的活動とを同時に対応させることができる。この新しい実験法は学生実習において学生に心臓の生理学的性質を学ばせるために大変有用である。(利益相反 なし)

(発表論文)顛原 他:カエル心臓八木式灌流法の定量的実験への改良—心拍出量測定から心電図同時記録まで—。長崎国際大学論叢 15:157—166, 2015。

(<http://library.niu.ac.jp/NiuDA/RNS/PDF/RN15-014.pdf>)

22. アンジオテンシン (AG) II 処置による Ba 誘発性心筋細胞異常興奮亢進の分子機構

○胡 耀鵬¹, 朱 欣², 井上隆司¹ (福岡大学医学部生理学, ²会津大学コンピュータ理工学部生体情報学)

(背景・目的)代謝的・機械的ストレスに持続的に曝された心臓では、しばしば病的な自発リズムが発生し、頻脈性不整脈発生の原因となる。本研究では、不死化心房筋細胞株 HL-1 で形成させた律動的な自発収縮を示すクラスターを用い、病的自発活性発生における Ca 活性化陽イオン透過型チャネル TRPM4 の潜在的な役割を探索した。(方法)

パッチクランプ法による電流固定 (β -escin 変法) 及び Fluo-4 による細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定を使用した。(結果) 内向整流型 K チャネル活性を 50% 程度抑制することが報告されている Ba^{2+} (0.1mM) を投与すると、自発 AP 活動の亢進が得られた。この亢進は、細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇と同期しており、アンジオテンシン II (1 μ M) 前処理で増強される傾向が見られた。また、 Na^+/Ca^{2+} 交換機構 (NCX) の選択的阻害薬 SEA0400 (2 μ M) や TRPM4 チャネルの比較的选择的阻害薬 (9-PA; 10 μ M) の投与で拮抗されたが、過分極活性化陽イオンチャネルの阻害薬 iv-abradine (0.2 μ M) はほぼ無効であった。更に、TRPM4 の電位・ $[Ca^{2+}]_i$ 依存性活性化のキネティクスを組み込んだ HL-1 モデルを用いた解析から、 Ba^{2+} で誘発される異常な AP 亢進は、TRPM4 と NCX が協働的に作動することによって生じていることが示唆された。(利益相反 なし)

23. 重症不整脈を伴う QT 延長症候群の新規原因遺伝子 CALM2 の同定

○石川泰輔¹, 須田憲治², 本村秀樹³, ダニエル・ハーレル¹, 辻 幸臣¹, 蒔田直昌¹ (長崎大学分子生理学, ²久留米大学小児科, ³長崎大学小児科)

QT 延長症候群の中には小児期から先天性致死性不整脈を繰り返す一群が存在するが、その原因は不明である。本研究ではこのような小児重症不整脈症例に対して不整脈との関連が報告あるいは疑われる 240 遺伝子について次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行ったところ CALM2 遺伝子内に 2 つの変異 (D130G, D134H) を、また全エクソン解析を行ったところさらに 2 つの変異 (N98S, N98I) を発見した。そこでさらに CALM1-3 を集中的に遺伝子解析したところ、2 つの変異 (D132E, Q136P) を見つけた。これら変異はいずれも両親に見られず、de novo 変異で、各種ゲノムデータベース (dbSNP, 1000G, Human Genetic Variation Database) にも登録されていなかった。また変異は Ca 結合サイトである EF ハンドに存在し、Ca 親和性を悪化させた。これまでに CALM2 類縁遺伝子である CALM1, CALM3 遺伝子変異が小児重症 QT 延長症候群症例に見つかっており、小児の先天性致死性不整脈の原因として細胞内 Ca 制御機構の重要性が示唆された。(利益相反 なし)

24. Mechanisms underlying PKA-mediated facilitation of cardiac Cav1.2 channels

L.Liting*, L.Ming*, ○Jianjun X., E.Minobe, K. Yazawa, M.Kameyama (*equal contribution) (Dept. Physiol., Grad. Sch. Med. Dent. Sci., Kagoshima Univ.)

To test the hypothesis that PKA-mediated facilitation is mediated by modulation of the calmodulin (CaM) binding to the channel, we examined bindings between fragments of C-terminus (CT) of Cav1.2 channel $\alpha 1c$ subunit and CaM in the pull-down assay. We found that CT3 (distal CT) binding to CT1 (proximal CT) was inhibited by CaM. Furthermore, binding of CT3D (distal CT without DCRD, the distal C-terminal regulatory domain) to CT1B (proximal CT without PCRD, the proximal C-terminal domain) was also inhibited by CaM, suggesting a CaM competing domain (CCD) in the distal C-terminus. To explore the role of PKA-mediated phosphorylation in the binding to CT1, we examined the binding of CaM and CT3 to CT1_{SA} (the dephosphorylation mimetic CT1 mutant) and CT1_{SD} (the phosphorylation mimetic CT1 mutant). We found that phosphorylation significantly reduced either CaM or CT3 binding to CT1. Our results suggest that PKA-mediated facilitation of Cav1.2 channel might be via releasing the blocking of the CaM binding sites by the distal C terminus. (no COI)

25. 心臓収縮の光学的測定装置の開発と学生実習への応用

○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】心臓の収縮波形を、安価な装置で簡便に記録する方法を、新規に開発した。【方法】フォトランジスタと赤外線 LED と組み合わせたフォトリフレクタ素子を用いて、光学的に収縮波形を記録する装置を作成した。ウシガエルを開胸して心臓を露出し、本装置を用いて収縮波形を記録した。これと同時に、専用 IC (AD8232) を用いた心電図の記録、または吸引電極を用いた心臓活動電位の記録を行った。【結果】本装置は、心臓表面とフォトリフレクタ素子との距離を反映する電圧を出力した。本装置を用いて、ウシガエル心の収縮波形を非接触で簡便に記録できた。また、心室の収縮波形と心房の収縮波形は、分離してそれぞれ独立に記録できた。さらに、本装置は小型であり、心電図や活動電位との同時記録も容易に行えた。本学の学生実習において本装置を用いたところ、学部 2 年生がウシガエル心の収縮波形を自らの手で記録できた。【結論】本装置は、心臓収縮波形の記録を極めて容易にした。本装置による光学的な心臓の収縮記録は、学生実習に適した方法だと考えられる。(利益相反 なし)

26. Cav1.2 型チャンネル C 末端遠位部切断変異体に対す

るカルモジュリンと ATP の作用

○蓑部悦子¹、森 誠之²、亀山正樹¹ (¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学、²京都大学大学院工学研究科合成・生物専攻分子生物化学分野)

Cav1.2 型チャンネルはカルモジュリン (CaM) により制御されるが、その分子機構は解明されていない。従来のモデルでは 1 分子の CaM がチャンネルの活性を制御するとされる。これに対して我々は複数の CaM がチャンネル活性調節に関与する 2-site モデルを提唱している。本研究ではこの仮説を検証するため、チャンネル C 末端遠位部切断変異体 ($\alpha 1C\Delta$) と、その C 末端に 1 分子の CaM を結合させた変異体 ($\alpha 1C\Delta$ CaM) の活性を inside-out patch 法で比較した。 $\alpha 1C\Delta$ は CaM 付加で活性化し、さらに ATP 付加により活性が長期間維持された。 $\alpha 1C\Delta$ CaM も同様に ATP 付加で活性が安定した。野生型ではオカダ酸が ATP 様の作用を示したが、両変異体にその効果はなかった。Inside-out から 5 分後 (チャンネル活性は低下)、 $\alpha 1C\Delta$ に CaM と ATP を、 $\alpha 1C\Delta$ CaM に ATP を付加すると、活性が回復した。これらの結果から、CaM は動的にチャンネルに結合すること、ATP には直接的な結合作用とチャンネルのリン酸化を介した作用があること、変異体では CaM のチャンネル活性化作用を補助する ATP の働きはリン酸化に無関係だが、野生型では C 末端遠位部の自己抑制と脱リン酸化への拮抗作用があることが示唆された。両変異体は野生型と同様に Ca^{2+} 濃度と CaM 濃度依存性不活性化を示し、2-site モデルを支持する。(利益相反 なし)

【学部セッション】

01. 甲状腺ホルモン機能亢進症および低下症モデルマウスにおける性差・週齢に依存したグリア細胞の形態学的変化

○吉岡優作¹、末松史也¹、毛利優希¹、片瀧俊彦²、野田百美¹ (¹九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野、²九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

甲状腺ホルモンは、主に T4 がトランスポーターを介して脳内アストロサイトに取り込まれ、活性化型 T3 に変換され、トランスポーターを介してアストロサイトから放出される。以前、我々は T3 がミクログリアの遊走性・化学走性・貪食性・形態変化を誘発することを明らかにした。甲状腺ホルモン機能亢進症および低下症はいずれも認知症や精神疾患と深い関係にあるので、グリア細胞の変化がどのように関与しているのか、まず形態学的に解析することにした。甲状腺ホルモン機能亢進症および低下症モデルマウスの脳切片を作成し、ミクログリア・アストロサイトを蛍

光免疫組織学的に解析した。その結果、亢進症および低下症のいずれにおいても、ミクログリア・アストロサイトの蛍光強度が性差・週齢に依存して変化することがわかった。また、グリア細胞の蛍光強度が顕著に増加する若齢オスの甲状腺ホルモン機能亢進症マウスを用いてオープンフィールドテストを行ったところ、有意に行動量が増加した。これらの結果は、甲状腺ホルモンによるグリア細胞の機能形態がシナプス活動に影響を与え、記憶・学習、不安等の精神状態に影響を与えることを示唆している。したがって、今後はグリア細胞のみならず、ニューロンとの相関を検討する必要があると思われる。(利益相反 なし)

02. 糖代謝・脂質代謝・耐糖能に及ぼす性差・体格の影響

○川上真代¹、佐々木 亨¹、西 芳寛²、田中永一郎²
(¹久留米大学医学部医学科学生、²久留米大学医学部生理学講座脳・神経機能部門)

【緒言】生理学実習(内分泌の生理)の学習内容を深める目的で、糖・脂質代謝、耐糖能に対する性差・体格の影響について検討した。【材料と方法】倫理委員会の承認を得て、学生・教職員に被験者を募り血液検体を採取した。検体中の血糖値、インスリン・C-Peptide・グレリン濃度、血清脂質(TG, T.Chol, HDL, LDL)濃度を測定し、算出したインスリン分泌能・インスリン抵抗性と血清脂質・内分泌パラメータとの相関を検討した。【結果】男性と比較して女性では空腹時血糖値が有意に低値、脂質利用を反映する遊離脂肪酸濃度は有意に高値を示し、血中グレリン濃度も有意に上昇していた。体格指数(BMI)はインスリン抵抗性指数:HOMA-IRと弱い正相関を示し、BMI 25以上の肥満群で有意に上昇していた。75g-OGTT中のインスリン分泌能(AUC-insulin)はHOMA-β、HOMA-IR、QUICKIと有意な相関を示し、AUC-insulinとHOMA-IRとの相関が最も強かった。【考察・結語】今回の被験者中に耐糖能異常・肥満例は少なく、血糖値・インスリン濃度のバラツキが少なかったことがAUC-insulinとHOMA-IRの相関をより強くしたと推定される。糖・脂質代謝の男女差、インスリン抵抗性と体格との相関、インスリン抵抗性の簡易指標:HOMA-IRの有効性が確認された。(利益相反 なし)

03. 高脂肪負荷食に対する烏龍茶の影響

○諏訪あかね、川口未来、小柳 遥、瀬高 茜、谷本絵美、宮城萌子、石松 秀(西九州大学健康栄養学部健康栄養学科)

【目的】今、話題になっている保健機能食品の中でも特に特定保健用食品として知られている黒烏龍茶(サントリー)

には、ウーロン茶重合ポリフェノール(OPTT)が1本350ml当たり70mg含まれており、脂肪の吸収を抑え、食後の血中脂質上昇を抑制するとの報告がある。そこで今回我々は、高脂肪負荷食(1750kcal, エネルギー脂質割合40%)における黒烏龍茶が血糖値、インスリン、血清脂質に与える影響を検討した。【方法】健常被験者(12人)を無作為に水群(6人)黒烏龍茶群(6人)に割り振り毎日1L飲用させ、高脂肪負荷食を2週間摂取させたときの体重、体脂肪率、空腹時血糖、血中インスリン、中性脂肪、LDL-chol, HDL-chol, 総-cholを負荷前と負荷1週間目、負荷2週間目とを比較検討した。【結果・考察】水群は1週間目のみ血中インスリンが有意に低下したが、他の評価項目はすべて前値と変化なく水群と黒烏龍茶群とで有意差はなかった。試験前のエネルギー量は被験者により1000~2000kcal/日と幅があり、エネルギー量が高い被験者は、試験1週間目でインスリン分泌量が低下していた。このため試験前の標準食を統一させる必要があると考えられた。また実験期間が2週間と短かったため、より長期の検討を行う必要がある。動物実験ではOPTTを500~1000mg/kg投与すると食後5時間の血清中性脂肪を抑えたとの報告がある。これをヒトに当てはめると1日379本~758本摂取する必要がある。特定保健用食品の利用には注意が必要だと示唆された。(利益相反 なし)

【日本生理学会九州奨励賞候補口演】

01. 実験的脳虚血による神経細胞死に対するカテプシンL阻害薬の神経保護効果

○喜久田翔伍^{1,2}、村井恵良¹、田中永一郎¹(¹久留米大学医学部生理学講座脳・神経機能部門、²久留米大学医学部歯科口腔医療センター)

ラット海馬薄切標本を用いてCA1錐体細胞から細胞内記録を行い、ブドウ糖・酸素除去液を灌流すると約5~6分で急峻な脱分極電位が発生する。その後、直ちにブドウ糖・酸素含有Krebs溶液で再灌流すると持続性脱分極電位が生じ、5分後には細胞膜障害(膜電位消失)が発生する。この実験的脳虚血による神経細胞死に対し、リソソーム内酵素であるカテプシンLの阻害薬(calpain inhibitor II(1~10nM), cathepsin L inhibitor I(0.5~2nM), cathepsin L inhibitor IV(1~20nM))を投与したところ、虚血負荷後に生じる持続性脱分極電位は認めずに、濃度依存性に膜電位が静止膜電位付近まで回復した。続いて、カテプシンL阻害薬の細胞形態に対する影響を観察した。虚血負荷のみでは、急峻な脱分極電位が発生し約3分後には細胞体の膨隆、樹状突起の断裂が起き細胞膜障害が起こる。しかし、

カテプシンL阻害薬投与群では、ブドウ糖・酸素含有 Krebs 溶液で再灌流後、静止膜電位付近まで回復した細胞では膜障害は認めず、細胞形態は維持されていた。以上の結果より、カテプシンLの活性化が、実験的脳虚血による不可逆性細胞膜障害の重要な因子であると考えられた。(利益相反 なし)

02. ニューロン酸感受性外向整流性アニオンチャネル (ASOR) のアシドーシス性脳神経細胞障害に対する低温救済への関与

○佐藤 (沼田) かお理^{1,2}, 沼田朋大¹, 井上隆司¹, 岡田泰伸³ (福岡大学医学部生理学講座,²日本学術振興会特別研究員 (RPD),³総合研究大学院大学)

脳虚血や激しい外傷性脳障害がもたらすアシドーシスは、脳浮腫を生じさせ、脳に不可逆的なダメージを与える事が知られている。アシドーシス性脳傷害は、頭部の体温を低く保つと軽減されるという最近の報告があるが、そのメカニズムはまだ解明されていない。本研究では、初代培養した胎児のマウス大脳皮質神経細胞を用いて、酸性条件下における神経細胞ダメージへの温度変動の影響を検討した。パッチクランプ法を用いて実験を行った結果、体温・酸性条件下で観察される酸感受性外向整流性アニオンチャネル (ASOR) 電流は、温度を低下させていくと、約 26°C 以下で著しく抑制されることが明らかになった。PI/Hoechst 染色によって酸性条件下における細胞死の検出を行った結果、体温・酸性条件下で観察された PI 陽性細胞の割合が、ASOR 阻害剤存在下または低温条件では減少した。Caspase-3 の活性化は観察されなかった事から、酸性条件下による細胞死はネクローシスによるものであると考えられた。さらに、酸性条件下における細胞容積の変化を測定した結果、体温・酸性条件下で観察された細胞膨張が、ASOR 阻害剤存在下または低温条件によって抑制された。以上の結果より、脳虚血や外傷によって脳神経が受けるネクローシス性細胞死は、ASOR の低温性抑制によって抑制される事が明らかになり、これが今後の脳低温治療の重要な治療戦略となる可能性が示唆された。(利益相反 なし)

03. アジュバント関節炎モデルラットにおける下垂体後葉系および視床下部—脊髄系のオキシトシンの役割の検討

○松浦孝紀^{1,2}, 元嶋尉士^{1,2}, 上野啓通¹, 齋藤玲子¹, 吉村充弘¹, 橋本弘史¹, 鈴木仁士³, 川崎 展², 大西英生², 酒井昭典², 上田陽一¹ (産業医科大学医学部第1生理学,²産業医科大学医学部整形外科学,³産業医科大学若松病院整形外科学)

【目的】最近我々は、慢性炎症モデルの一つであるアジュバント関節炎 (AA) において、下垂体後葉および視床下部脊髄系のオキシトシン (OXT) 発現が増加していることを報告してきた (Matsuura *et al.*, J Neuroendocrinol 2015)。今回は、AA ラットで増加したオキシトシンの末梢ならびに中枢における病態生理的役割について検討した。【方法】実験1) 結核死菌を成熟雄性ウィスター系ラットの尾部に 0.1ml (10mg/ml) 接種し、AA を発症させた。抗原接種後 14 日から 22 日目にかけて、OXT 受容体拮抗薬 (L-368, 899) を 1mg/kg 腹腔内投与し、隔日に Arthritis Index・体重・食餌量・飲水量・尿量について代謝ゲージを用いて計測した。コントロールには生理食塩水を腹腔内投与した。実験2) 同系ラットの髄腔内もしくは第4脳室に、麻醉下で OXT-サポリンおよび blank-サポリンを 10 もしくは 5μl (0.06μg/μl) を投与した。これらの投与3週間後、結核死菌を尾部に接種し、隔日に Arthritis Index・体重・食餌量・飲水量・尿量について代謝ゲージを用いて計測した。【結果】実験1) L-368, 899 の腹腔内投与では、コントロール投与群と比較して AA における Arthritis Index などに有意差はなかった。実験2) OXT-サポリン髄腔内投与では Arthritis Index の有意な増悪が見られ、OXT-サポリンの第4脳室内投与では AA 発症時の摂食抑制の有意な減弱見られた。【考察】AA でのオキシトシンは、視床下部—脊髄系では抗炎症作用を有すること、視床下部—延髄系では摂食抑制作用を有することが示唆された。(利益相反 なし)

04. 細胞外ヒストンによる炎症性サイトカイン IL-1β 放出機構の解明

○大池加恵¹, 勝野涼太², 藤本靖真³, 安田 哲⁴, 丸山征郎⁵, 菊池清志⁶, 川原幸一¹ (大阪工業大学大学院,²JCR ファーマ株式会社,³西奈良中央病院,⁴高の原中央病院,⁵鹿児島大学,⁶久留米大学医学部生理学講座脳・神経機能部門/脳神経外科)

【背景・目的】二面性を持つヒストンは、細胞内では生命維持、細胞外では DAMPs としての機能を発揮し細胞傷害や血栓を引き起こすことが知られている。細胞外ヒストンが敗血症の致死因子であることが既に知られているが、敗血症の指標となる IL-1β 放出機構は不明瞭な点が多い。本研究の目的は、ヒストン刺激による IL-1β 放出機構の解明である。【方法】マウスマクロファージ由来細胞 J774A.1 (ASC+) と RAW264.7 (ASC-) を使用した。IL-1β の発現確認にはウェスタンブロットおよび ELISA、Caspase-1, 8 の活性化確認にはウェスタンブロット、細胞の生存確認には MTT Assay 法を用いて検出を行った。【結果・考察】ヒストン刺激により Caspase-1, 8 の活性を介して IL-1β

産生を確認した。また Caspase-1, 8 の阻害剤を単独で添加した際より, 両阻害剤を添加した方が有意な差を持って IL-1 β 抑制を示したことから, ヒストン刺激により Caspase-1, 8 の活性が関与していることが考察される。ASC 非依存性のインフラマソームが活性化することで IL-1 β 産生に関与

している可能性を秘めており, 今後の展望として, ヒストン刺激による IL-1 β 産生メカニズムをより明確にする必要がある。【結論】本研究より, ヒストン刺激による IL-1 β 放出機構において ASC 非依存的に Caspase-1, 8 が関与していた。(利益相反 なし)