

1. alpha4beta2 型ニコチン受容体を介する鎮痛における NA 作動性下行性抑制系の関与

○林田健一郎¹, 河谷正仁¹, R. Takashi Sudo² (¹秋田大院・医・器官・統合生理学, ²Federal University of Rio de Janeiro Institute of Biomedical Sciences)

【目的】ノルアドレナリン (NA) 作動性下行性抑制系におけるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR), 特に alpha4beta2 型 nAChR の脊髄での鎮痛メカニズムを明らかにする。

【方法】マウス及びラットにおいて, alpha4beta2 型 nAChR 作動薬 (Epibatidine 及び新規化合物 Cris-104) の急性痛及び慢性痛に対する鎮痛効果, マイクロダイアライシス法を用いた脊髄における NA 放出に対する効果, 及び脊髄スライス標本における抑制性シナプス後電流に対する効果を検討した。

【結果】alpha4beta2 型 nAChR 作動薬 (Epibatidine 及び Cris-104) は, 急性痛及び慢性痛に対する鎮痛作用, 脊髄におけるノルアドレナリン放出作用を示し, alpha4beta2 nAChR を拮抗するとこれらの作用は抑制された。脊髄スライス標本において, Epibatidine は脊髄抑制性シナプス後電流を増加させたが, Cris-104 は無作用であった。

【結論】alpha4beta2 型 nAChR 活性化による鎮痛効果における, NA 作動性下行性抑制系の活性化の関与が示唆された。一方, 脊髄抑制性シナプス後電流の結果から, 脊髄 GABA 神経の alpha4beta2 型 nAChR は, 特定の variant が主に存在する可能性が考えられた。(利益相反 なし)

2. メダカの循環電気生理 (基礎的検討)

○村上 学¹, 韓 冲¹, 外山佑一², 富田泰史², 米倉学², 尾野恭一³, 大場貴喜³ (¹弘前大院・医・病態薬理学, ²同 循環器腎臓内科学, ³秋田大院・医・細胞生理学)

メダカは東アジアに生息する小型魚類で, 1920 年代より研究に用いられている。メダカの循環電気生理学への応用を考え, 基礎的検討を行った。

心電図では心拍数が約 120bpm で, げっ歯類よりも, ヒトの心拍数に近かった。波形解析では, 哺乳類同様, P 波, QRS, T 波などが記録された。周波数解析も行った。長時間心電図記録をするため, 各種麻酔を試みたが (トリカイン, プロポフォール, 低温麻酔), 各麻酔により, 相当程度, 心拍数が低下した。

カルシウムチャネルの心調律への影響を調べるために, ベラパミルを用いたところ, 有意に心拍数が低下した。自発収縮における心筋張力を測定したところ, ベラパミルによって有意な心拍数低下を認めたが, 張力には変化が認め

られなかった。

メダカにおいてもカルシウムチャネルが心調律に重要であると考えられたので, 電位依存性カルシウムチャネル β サブユニット遺伝子を解析した。RT-PCR により, 10 あるスプライスバリエーションのうち, タイプ 2 のみが, 心筋で発現していた。メダカはゲノムデータベースもあり, 分子生物学的手法を用いる上で有効であることが知られている。循環電気生理研究へも利用可能であると考えられた。(利益相反 なし)

3. iPS 細胞から誘導した心筋細胞の機能的分析

○秋田 発¹, 吉江 進², 竹石恭知¹, 挾間章博² (¹福島県立医科大学循環器内科学講座, ²同 細胞統合生理学講座)

心筋細胞の活動には様々なイオンチャネルが関わっていることは周知の事実である。しかし, ナトリウムイオンチャネル等の陽イオンチャネルに関しては多くの研究が存在するが, 特にクロライドイオンチャネルを始めとする陰イオンチャネルの特性に関しては報告が少なく, 心筋活動における役割については不明な点が多い。本研究では, 自己複製能と多分化能を有する iPS 細胞から心筋細胞へ分化誘導し, iPS 細胞由来心筋細胞を利用することで, 心筋細胞の機能とクロライドイオンチャネルの関係性を明らかにすることを目的とする。

iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の性状解析を行うため, RT-PCR や免疫染色で分化細胞を解析した結果, 心筋細胞特異的な遺伝子発現と心筋マーカーの適切な局在が観察された。また, iPS 細胞由来心筋細胞に β アドレナリン作動薬やカルシウムイオンチャネルブロッカー等を添加した結果, 自発的拍動リズムの変化が生じたことから薬剤に対する応答性が確認され, 生理学的に機能性を有する心筋細胞への分化が示唆された。さらに, クロライドイオンチャネルに作用する薬剤を添加することで, 自発的拍動リズムへの影響について解析を行ったので結果を報告する。(利益相反 なし)

4. Cl⁻チャネルブロッカーがウサギ ASC の脂肪分化へ与える影響

○大内佳奈江^{1,2}, 三宅将生¹, 吉江 進¹, 挾間章博¹ (¹福島県立医科大学医学部・細胞統合生理学講座, ²郡山健康科学専門学校・柔道整復学科)

脂肪組織由来幹細胞 (adipose tissue-derived stem cells, ASC) は, 様々な細胞への分化能を持つことが知られている。我々はウサギの脂肪組織を採取し, コラゲナーゼ処理で分散させて培養した。RT-PCR を用いて, ASC に特異的

なマーカーであるCD29, CD90の発現によってASCであることを確認して使用している。

本研究では、ASCを分化誘導培地により脂肪細胞へ分化させ、細胞内脂肪滴(Lipid droplets, LDs)を蛍光染色して、定量化した。分化誘導に伴って、細胞増殖の抑制と、LDsの蓄積が確認された。また、Cl⁻チャンネルブロッカー(NPPB, DIDS)を分化誘導培地に添加すると、濃度依存的にLDsの蓄積が抑制された。NPPB添加は細胞内のH₂O₂量を高め、特に大きなLDsの形成を阻害した。これらの結果から、Cl⁻チャンネルがウサギASC細胞の脂肪分化において重要な役割を果たすことが示唆された。(利益相反 なし)

5. ミトコンドリア機能の光操作

○横山超一¹, 坂田一生¹, 五十嵐敬幸², 石塚 徹¹, 八尾 寛^{1,2} (¹東北大・生命・脳機能解析, ²東北大・院医・神経細胞制御学)

動物、植物を含むあらゆる真核生物において、ミトコンドリアは生命活動に必須なオルガネラであり、その主要な機能は、O₂依存的なATP産生(有気呼吸)である。ミトコンドリアにおいては、電子伝達系を含む一連のエネルギー代謝により、内膜を介したH⁺の濃度勾配が形成されている。この濃度勾配を利用し、F型H⁺-ATPアーゼがADPをATPに変換する。われわれは、古細菌由来の光駆動性のプロトンポンプのひとつArchTをミトコンドリアの内膜にターゲティングし、ミトコンドリアエネルギー代謝に光で介入することを着想した。ミトコンドリア内膜を標的とするシグナル配列を加えたArchT(ArchT_{mito})を作製し、種々の細胞系(HEK293T, COS7, chick ciliary calyx)において発現させたところ、ArchT_{mito}は、mitotrackerなどのミトコンドリア選択的色素、ミトコンドリア標的YFPなどの分布と一致した。すなわち、ArchT_{mito}がミトコンドリア選択的にターゲティングされていることが示唆される。(利益相反 なし)

6. 神経活動は軸索投射再編にどのように寄与しているのか? CRISPR/Cas9による軸索間競合への介入

○金谷哲平¹, 江川 遼², 八尾 寛¹ (¹東北大・生命・脳機能解析, ²名古屋大・医・細胞生理)

発達期の中樞・末梢神経系における神経回路の再編は神経活動依存的な競合原理に基づき、活動の強い軸索のシナプス接続は維持、強化され、弱い軸索のシナプス接続は除去されると考えられている。しかし、神経活動依存的な競合原理の実体としての分子レベルのメカニズムについては、ほとんど解明されていない。本研究では、ニワトリ胚

毛様体神経節のカリックスシナプスに着目し、シナプス前細胞特異的な *in ovo* エレクトロポレーション遺伝子導入法とCRISPR/Cas9ゲノム編集法を組み合わせ、ある標的分子がノックアウトされた投射ニューロンを選択的に蛍光ラベルする標識細胞特異的ノックアウト法を検証した。具体的には、発達期軸索投射再編における神経伝達物質の寄与を調べるために、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)を標的分子とし、発達期軸索間の競合への介入を試みた。その結果、中脳において、tdTomato標識細胞のうち、85%でChAT発現が認められなかった。すなわち、tdTomato標識シナプス前ニューロン特異的に、ChATが高い効率でノックアウトされていることが示唆される。(利益相反 なし)

7. 海馬シナプス可塑性の刺激パターン依存性

○藤井 聡, 山崎良彦, 後藤純一, 藤原浩樹(山形大・医・生理学講座)

<目的>げっ歯類の海馬では脳波上、探索行動時およびレム睡眠時に5Hz前後の速波(シータ波)が出現し、覚醒不動時およびノンレム(徐波)睡眠時には1-2Hzの徐波が出現する。海馬CA1領域では、探索行動時に少数の錐体細胞が場所依存性に同期して興奮し、20-100Hzで2-4個のスパイクを発射している。不動時に覚醒不動時では多数の錐体細胞が同期しながら2-4個のスパイク(平均1.5個)を発射している。それ以外の非同期の錐体細胞は0.1Hz以下で自発興奮している。今回、我々は海馬スライスCA1ニューロンに上記パターンでシナプス入力し、シナプス可塑性を誘導した。

<方法>厚さ500μMのモルモット海馬スライス標本上でCA1シナプスの入力線維束を20秒に一回のモニター電気刺激を与えながら、CA1野の放線層と錐体細胞層からfield EPSPとpopulation spikeを導出した。シナプス可塑性を誘導する際には100Hz, 2-4発のバーストを重畳させながら周波数0.5Hz-5Hzで15秒~4分間刺激した。

<結果と結論>0.5-5Hz, 60秒までの入力刺激でLTPが誘導され、バースト数に依存してLTPの振幅が増大した。180秒以上の刺激ではバースト数に係らずLTPは誘導されず、1HzではLTDが誘導された。現在、*in vivo*で学習行動時に海馬脳波測定を行い、実験結果との相関を検討している。(利益相反 なし)

8. マウス用ヴァーチャル・リアリティ装置を用いた齧歯類の高次脳機能解明システムの開発

○洞口学志¹, J. Négyesi^{1,2}, 片山統裕³, 虫明 元¹, 坂本一寛^{1,4} (¹東北大学・院・医・生体システム生理, ²東北

大学・院・医・運動学,³東北大学・院・情報科学・バイオモデリング論,⁴東北医科大学・院・神経科学)

齧歯類での高次運動関連領域の機能局在研究は、霊長類と比べ未だ不十分である。なぜなら齧歯類においては霊長類のような精緻な行動課題の構築が難しいからである。齧歯類用のヴァーチャル・リアリティ (以下 VR) 装置は、頭部固定下にもかかわらず運動空間と視空間を自由に操作できるので複雑な認知・行動過程の精査に有用である。そこで本研究では、マウス用 VR 装置を導入し、視覚—運動対応変調に適応する VR 順応課題を開発した。この VR 順応課題は与えられた視覚目標へ到達すると報酬がもらえる課題で、次の二つの条件下で行わせる：①コントロール条件：視空間と運動空間が一致する条件、②左右シフト条件：視空間と運動空間を左右に乖離させた条件。実際にこれらの課題システムを構築し、動作を評価した。本研究は科研費・新学術領域「先端モデル動物支援プラットフォーム」生理機能解析支援・多機能電極・計測データ解析支援 (16H06276)、及び「オシロロジー」(#15H05879)の支援を受けた。(利益相反 なし)

9. 瞳孔径応答が示す異種感覚統合の個人差と性格特性の関係

○岩本憲宏, 大城朝一, 虫明 元 (東北大学・医・生体システム生理学)

瞳孔径は情動、知覚、認知等の精神活動を反映して変化し、しかも個人差があることが分かっている。そこで、我々は情動刺激に対する反応は、個人差として性格のような心理学的特性と相関するのではないかと仮説を立てた。この仮説を確かめるために、東北大学 学部生 260 人を被験者として、「怒り」と「喜び」を表現した顔画像単独刺激と音声単独刺激、両者を組み合わせた複合刺激に対する瞳孔径応答を測定した。同時に心理テストを受けてもらい、得られた性格特性と瞳孔径応答パターンの相関を調べた。

まず、聴覚単独刺激 (Voice) と視覚単独刺激 (Face)、聴覚+視覚複合刺激 (Voice&Face) に対する瞳孔径変化率 (%) の集団全体での平均値はそれぞれ、2.27 (散瞳)、-0.18 (縮瞳)、2.03 (散瞳)であった。次に重回帰分析によってこれらの変化率には、

$$R(\text{Voice}\&\text{Face}) = 0.99 + 0.48^*R(\text{Voice}) + 0.32^*R(\text{Face})$$

($R^2=0.42$)という関係があることが明らかとなった。つまり聴覚+視覚複合刺激の瞳孔径応答はその要素である聴覚単独刺激、視覚単独刺激の瞳孔径応答の単純和としては捉えられないことがわかった。さらに個人個人の値が集団平均から求めた線形モデルからの逸脱した差分が個人差を示す指標と考え、心理テスト得点との相関を調べた。すると異

種感覚統合指数 (回帰誤差として定義) とシステム化指数 (Systemizing quotient) に負の有意な相関が見られた ($r = -0.14$, $p=0.022$)。 (利益相反 なし)

10. Involvement of Pre-Supplementary Motor Area in Tactics-Action Transformation in Primates Brain

○M. Ali Haider Awan¹, Y. Matsuzaka², H. Mushiaki¹
(¹Tohoku University Graduate School of Medicine, ²Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

The pre-supplementary area (preSMA) is located between the post medial prefrontal cortex (pmPFC) and supplementary motor area (SMA). According to our previous studies, pmPFC and SMA are both involved in transformation from tactics to action in distinct ways. In this research, we discuss the role of pre-SMA in this transformation and comparison with functions of pmPFC and SMA.

The experiment design consists of two monkeys (*Macaca fuscata*) trained to perform under three distinct behavioral conditions. The behavioral tasks differ in the timing of the Cue (instructing away or toward illuminated button) and Go Signal. Neural activity (averaged spike number per second) was then recorded from pmPFC, SMA and pre-SMA while the animals performed behavioral tasks. We conducted epoch-based and moving-window statistical analysis for trials in which monkeys made no error. Epoch-based analysis divides neural activity into eight major epochs of 500ms demarcated by two events such as onsets of Cue and Go. We examined to what extent neuronal activities reflect selectivity of Tactics or selectivity of Action. Population analysis was done to ascertain about the behavior of neurons in the different epochs and how selectivity of neurons are changed from action to tactics. Second analysis technique includes introduction of moving window from the start of trial to the end. Time-resolved analysis of individual neuronal activity indicated that activity of each pre SMA neuron encoded either tactics, action or their combination, and the relative strength of their representation changed during the behavioral task, indicating preSMA contribution to selection of both tactics and action and the transformation of tactics to action. (The authors declare no conflicts of interest associated with this manuscript.)

11. 活動依存性マンガン造影 MRI による神経活動計測タイミングの検討

○谷平大樹¹, 菊田里美^{1,2}, 本間経康^{1,3}, 小山内 実^{1,3}
(¹東北大学・医・医用画像工学, ²京都大学・霊長類研・統合脳システム, ³東北大学・医工・知能システム医工学)

活動依存性マンガン造影 MRI (AIM-MRI) は, MRI を用いて定量化できる Mn^{2+} が, Ca^{2+} と同様に活動依存的に細胞内に流入するという原理を利用した非侵襲神経活動計測法である. AIM-MRI は $MnCl_2$ 投与後の自由行動下の神経活動を計測できるが, Mn^{2+} がいつの神経活動を反映して細胞内へと流入するか分からなければこの利点を活かさない. また, MRI では細胞内外の Mn^{2+} を見分けられず, 細胞内外の Mn^{2+} 濃度差が最も大きくなる最適な撮影タイミングで MRI 撮影を行う必要がある. これらを明らかにするため, 脳内の Mn^{2+} 濃度変化を経時的に計測した.

$MnCl_2$ 投与 1 時間後で脳室の Mn^{2+} 濃度は急激に上昇し, 脳室では $MnCl_2$ 投与 3 時間後まで Mn^{2+} 濃度が急上昇していた. 脳実質の Mn^{2+} 濃度は $MnCl_2$ 投与 48 時間後に最大となり, 脳室の Mn^{2+} 濃度は $MnCl_2$ 投与 48 時間後で投与前の濃度付近まで戻っていた. これらの結果から, AIM-MRI で計測される神経活動は, $MnCl_2$ 投与 3 時間以内のものを強く反映しており, 最適な撮影タイミングは $MnCl_2$ 投与 48 時間後であるということが明らかとなった. (利益相反 なし)

12. 視床下部脳弓周囲領域覚醒系ニューロンの聴覚性覚醒刺激に対する応答

○高橋和巳, 永福智志 (福島県立医大・医・システム神経)

我々はこれまでに視床下部・脳幹の覚醒系ニューロン群の睡眠・覚醒時における活動を記録し, 特にオレキシニューロンが聴覚性の覚醒刺激 (拍手) に対し他の覚醒系ニューロンよりも短い潜時で応答することを示した. しかし, 拍手による刺激のタイミングを決定することが難しく, 正確な潜時は不明であった. そこで本実験ではラットにおいて聴覚系の蝸牛神経核の聴覚応答を基準とし, 視床下部脳弓周囲領域の覚醒ニューロン群の反応潜時を計測した. オレキシニューロンを含むと考えられる, 覚醒時に持続的に活動し徐波睡眠時と逆説睡眠時にほぼ停止するニューロン群においては, 徐波睡眠時に与えられた覚醒刺激に対する応答潜時は蝸牛神経核活動の出現から 9.5 ± 2.4 ms ($n=23$) であった. これに対し, 他の活動パターンを示す覚醒ニューロン群の応答潜時は 100ms 以上であった. また, 頸部筋電活動に現れた驚愕反射の潜時は 7.3 ± 1.8 ms であった. これらの結果は, 視床下部オレキシニューロンおよび非オレキシ覚醒ニューロンの一部が聴覚性覚醒刺激の情報を受け取る入力経路は驚愕反射経路にほぼ匹敵する速

さであることを示しており, 自発性ではない外因性の覚醒開始機構において重要な役割を果たす可能性が示唆された. (利益相反 なし)

13. 成体マウス急性単離アストロサイトにおける脳部位特異的ドーパミン受容体発現

○長友克広¹, 山本欣郎², 小林和人³, 山田勝也¹ (¹弘前大院・医・統合機能生理, ²岩手大・農・獣医細胞システム, ³福島医大・医・生体機能)

中脳黒質は, パーキンソン病で変性するドーパミン (DA) ニューロンからなる緻密部 (SNc) と, 大脳基底核の出力を司る GABA ニューロンからなる網様部 (SNr) に分けられる. 興味深い事に SNr にはドーパミン D1 受容体 (D1R) が高濃度に発現し, 一方 SNc の DA ニューロンは SNr の隅々まで深く張り巡らせた樹状突起から DA を放出する. しかし, 樹状突起放出された DA の標的細胞は十分明らかでない. そこで, 急性単離した SNr 細胞の受容体発現を解析したところ, D1R は SNr アストロサイトの微細なプロセスに発現しており, SNr ニューロンでは細胞体や樹状突起表面に付着する軸索末端様構造に発現を認めたのみであった (Nagatomo 他, *Front Neuroanat* 2017). 同一スライス中の皮質視覚野アストロサイトには D1R は殆ど認められず, 線条体アストロサイトは D1R 陽性と陰性の二群に分かれた. 線条体ニューロンには D1R 陽性と D2R 陽性細胞が知られる為, 今回 D2R 発現をこれらの神経核で検討した結果, アストロサイトにおける DR 発現は脳部位により大きく異なっている可能性が示唆された. (利益相反 なし)

14. 心筋リモデリングの分子機序と細胞膜穿孔法の開発

○大場貴喜¹, 藤澤 進¹, 村上 学², 尾野恭一¹ (¹秋田大院・医・細胞生理学, ²弘前大院・医・病態薬理学)

心筋リモデリングは心筋細胞肥大と心筋線維化からなり, あらゆる心疾患に伴い, 心不全の素地となる. Ca^{2+} 流入は心筋細胞肥大にとって必須であり, 心不全治療のターゲットである. これまで我々は Ca^{2+} センサーである Stromal interaction molecule 1 (STIM1) が心肥大のトリガーになりうることを見出してきた. 今回, STIM1 ヘテロノックアウトマウス (STIM1 KO) に対し transverse aortic constriction (TAC) をおこない, 心筋線維化を検討した. STIM1 KO では有意に心筋線維化が抑制されていた. 遺伝子スクリーニングの結果, 心筋線維化に関わる新規候補として tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP4) を選び出した. STIM1, TIMP4 がそれぞれ心肥大, 心筋線維化の

進行過程に重要な役割を担っていることが考えられた。さらに、光酸化反応を応用した細胞膜穿孔法を共同研究により開発した。簡便に細胞内へ物質を導入できることが明ら

かとなった。この細胞膜穿孔法は新たな細胞改変技術であり、今後治療応用への使用が期待される。(利益相反 なし)