

奨励 01. ラット脊髄膠様質ニューロンにおける自発性の GABA やグリシンを介する抑制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, 馬郡信弥, 鈴木里佳, 楊 帆, 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)

オレキシン B 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が、その詳細は不明である。我々は以前、その作用機序を知るために成熟雄性ラット脊髄横断薄片の後角第 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でオレキシン-2 受容体の活性化により神経終末から起こるグルタミン酸の自発放出の増加や膜の脱分極が生じることを明らかにした。今回、自発性の GABA やグリシンを介する抑制性のシナプス伝達に及ぼすオレキシン B (0.05 μ M) の作用を調べた。その結果、調べたニューロンの 71% においてグリシン作動性のシナプス伝達の促進が見られる一方、GABA 作動性のものはほとんど影響を受けないことを発見した。その抑制性シナプス伝達の促進はオレキシン-1 受容体阻害薬 SB334867 に抵抗性である一方、電位作動性 Na⁺チャンネル阻害薬テトロドトキシンやオレキシン-2 受容体阻害薬 JNJ10397049 により抑制された。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グルタミン酸の自発放出の増加や膜の脱分極を生じて活動電位が発生し、その結果、自発性のグリシン作動性の抑制性シナプス伝達が促進されることが明らかになった。こ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)

奨励 02. 甲状腺機能異常症におけるグリアと神経細胞の形態変化およびその性差

吉岡優作¹, 片岡俊彦², 北原陽介³, 首藤隆秀³, 西 昭徳³, Marcus Semtner⁴, Helmut Kettenmann⁴, 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同医学研究院加齢病態修復学, ³久留米大学医学部薬理学講座, ⁴Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany)

以前、我々は活性化甲状腺ホルモンである T3 が初代培養マイ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、また甲状腺機能亢進症マウスの脳におけるグリアの形態変化には性差及び年齢による影響があることを示した。甲状腺機能亢進症マウスにおける性差について、マウスの行動を観察したところ、若齢雄マウスでのみ行動量の増加が見られ、一方、若齢雌マウスでは不安、鬱様行

動が見られた。そこで、神経活動の指標になるスパイン密度に及ぼす T3 の影響を観るため、海馬歯状回を用いて電子顕微鏡により検討したところ、甲状腺機能亢進症の雄マウスにおいてスパイン密度が有意に増加していた。これらのことから、雄では T3 によるグリアの活性化と神経スパイン密度の亢進が、行動量増加として現れていることが示唆された。さらに T3 の初代培養マイクログリアにおける電気生理学的作用をパッチクランプ法を用いて検討したところ、予想に反して T3 投与により電流が抑制され、従来知られている ATP などのマイクログリア活性化物質とは異なるメカニズムでマイクログリアに作用していることが示唆された。(利益相反 なし)

奨励 03. 人工再構成系を用いた温度感受性 TRP チャネルの機能解析

内田邦敏^{1,2}, 富永真琴², 山崎 純¹ (福岡歯科大学細胞分子生物分子機能制御,² 岡崎統合バイオ (生理研) 細胞生理)

我々の研究目的は、温度感受性 TRP チャネルが温度によって活性化されるメカニズム並びにその生理的意義を明らかにすることである。温度はすべての分子の動きや活性に影響を与えることから、温度によって活性化されるメカニズムを明らかにするためには単純な実験系が必要であると考え、人工再構成系の構築並びにチャネル解析を行なっている。これまでに、侵害的な熱によって活性化される TRPM3 並びに温かい温度で活性化される TRPM5 の解析を行った。Nifedipine は単独で TRPM3 を活性化したが pregnenolone sulfate は PIP₂ 存在下においてのみ活性がみられた。温度による TRPM3 の活性化は PIP₂ 存在下においてのみみられたが、他の温度感受性 TRP チャネルと比較するとその温度依存性はとても小さいものであった。TRPM5 は PIP₂ 存在下においてカルシウムイオンによる活性化がみられたが、その用量反応性は HEK293 細胞を用いた強制発現系の結果と比較して弱かった。また、PIP₂ 並びにカルシウムイオン存在下においてのみ TRPM5 の温度依存的な活性化はみられたが、さらに温度を上昇させると強い不活性化がみられた。人工再構成系において温度感受性 TRP チャネルの温度依存的活性化に違いがみられたことから、活性化メカニズムがチャネル間で異なることが示唆された。(利益相反 なし)

奨励 04. tRNA 修飾異常による神経障害の分子機構に関する研究

榊田光倫^{1,2}, 魏 范研¹, 荒木栄一², 富澤一仁¹ (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野, ²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るが、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。そのため、Cdkal1 の一塩基多型変異を持つヒトでは、リジン tRNA のチオメチル化修飾が低下し、プロインスリンのリジン翻訳が障害されることで、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。そのため、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た。我々は、Cdkal1 欠損マウスを用いて神経感覚の変化およびその分子機序について検討を行った。全身型 Cdkal1 欠損マウスでは、行動テストにおいて早期から感覚低下を認め、免疫組織学的染色において神経繊維の減少、神経栄養因子の低下を認めた。一方、膵β細胞特異的 Cdkal1 欠損マウスでは、感覚異常、神経繊維の減少並びに神経栄養因子の低下はいずれも認めなかった。これらのことから神経組織における Cdkal1 欠損が神経障害を誘発することが示唆された。(利益相反 なし)

一般(神経 1)-01. Cdkal1 による下垂体ホルモンの産生・分泌機構

武末吉広^{1,2}, 魏 范研¹, 矢野茂敏², 森岡基浩³, 富澤一仁¹ (¹熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野, ²熊本大学医学部附属病院脳神経外科, ³久留米大学医学部脳神経外科)

Cdkal1 は小胞体に局在し、リジンに対応する tRNA をチオメチル化修飾する酵素である。リジン tRNA のチオメチル化修飾は、膵β細胞においてプロインスリンの翻訳を最適化することでインスリンの分泌を調節する。Cdkal1 欠損マウスや Cdkal1 遺伝子異常を有するヒトでは、膵β細胞においてインスリンの翻訳が障害されることでβ細胞機能が低下し、2型糖尿病を発症する。Cdkal1 は膵β細胞以外に全身の細胞に発現しているため、CDKAL1 がインスリン以外にも多くの分泌系タンパク質の翻訳の安定化に寄与している可能性がある。そこで、我々は下垂体ホルモンを過剰に分泌する下垂体腺腫における Cdkal1 の役割について検討した。Growth hormone (GH) 産生性下垂体腺腫に由来する細胞株において Cdkal1 遺伝子の発現を抑制したところ、GH の mRNA レベルが有意に低下し、GH の分泌量も低下したことから、Cdkal1 は下垂体ホルモンの分泌に

も関連することが示唆された。(利益相反 なし)

一般(神経 1)-02. 加齢遺伝子改変ラットの視床下部-下垂体系におけるウロコルチン増加を伴うオキシトシン蛍光蛋白の増加

大野重雄^{1,5}, 丸山 崇¹, 橋本弘史⁴, 藤原広明², 藤木通弘², 吉村充弘¹, 元嶋尉士¹, 齋藤玲子¹, 上野啓通¹, 園田里美¹, 大野素子⁵, 梅津祐一⁵, 浜村明德⁵, 佐伯覚³, 上田陽一¹ (¹産業医科大学医学部第1生理学, ²同産業生態科学研究所人間工学, ³同 医学部リハビリテーション医学, ⁴獨協医科大学生理学(生体制御), ⁵小倉リハビリテーション病院)

下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシンが、分娩時の子宮収縮や授乳時の射乳反射に関与することはよく知られている。最近、オキシトシン受容体が脳内に豊富に存在し、社会的認知、信頼感、絆などに関与することが報告されている。また、オキシトシンは老化においても重要なホルモンである可能性がある。我々は以前、オキシトシンの動態を可視化することを目的に赤色蛍光蛋白(monomeric red fluorescent protein 1: mRFP1) 遺伝子をオキシトシン遺伝子に挿入した融合遺伝子を用いてオキシトシン-mRFP1 遺伝子改変ラットを作出した。この遺伝子改変ラットを用いて視床下部におけるオキシトシン-mRFP1 とウロコルチンの加齢に伴う変化を観察した。本研究では成熟雄性(3ヵ月, 12ヵ月, 18ヵ月と24ヵ月齢)のオキシトシン-mRFP1 トランスジェニックラットを使用し、オキシトシン-mRFP1 の赤色蛍光定量及びウロコルチンの免疫組織化学染色による同定を行った。

その結果、視床下部-下垂体系における mRFP1 の赤色蛍光は加齢遺伝子改変ラットで著明に増加した。ウロコルチンは、視床下部で加齢に伴って増加し、オキシトシン-mRFP1 を発現した細胞に、ほぼ共発現していた。加齢ラットの視床下部において、オキシトシン発現が増加すること及びオキシトシンとウロコルチンが共発現することの生理学的役割を考察する。(利益相反 なし)

一般(神経 1)-03. ラット副腎髄質細胞および PC12 細胞における M 型 K チャネル発現制御

原田景太, 松岡秀忠, 井上真澄(産業医科大学医学部第2生理学)

我々は、ラット副腎髄質 (AM) 細胞において TASK1 チャネルが静止膜電位形成関与していること、ムスカリン受容体刺激によるカテコールアミンの分泌は TASK1 チャネルの抑制によることを見出した。一方、交感神経節細胞では M 型 K チャネル (M チャネル) が静止膜電位形成に関

与し, slow EPSP はムスカリン受容体刺激による M チャネルの抑制によることが知られている。生体内では副腎髄質は皮質に覆われており、髄質は常に高濃度の副腎皮質ホルモンに暴露されている。我々は共に神経堤から分化した両細胞間における静止膜電位形成に関与する K チャネルの違いは、副腎皮質ホルモン暴露の有無によると考え、PC12 細胞を用いてこの仮説を検討した。合成糖質コルチコイドであるデキサメタゾン存在下で PC12 細胞を培養すると M チャネルの発現抑制が見られたが、TASK1 チャネルの発現には影響を及ぼさなかった。一方、糖質コルチコイドおよび鉍質コルチコイド阻害剤存在下では M チャネルの発現促進が観察された。M チャネル阻害剤による細胞内 $[Ca^{2+}]$ 増加は、これら阻害剤存在下で培養した PC12 細胞はコントロールに比べ有意に大きかった。以上の結果より、PC12 細胞において M チャネルの発現は糖質コルチコイドにより糖質コルチコイド受容体もしくは鉍質コルチコイド受容体を介して制御されていることが考えられる。(利益相反 なし)

一般(神経 1)-04. 遺伝子改変マウスのための 3 分インスタンタ gDNA 標本の開発

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)

遺伝子改変マウスは、生理学研究の有用なツールだ。しかし、遺伝子改変マウスを使う場合には、繁殖した産仔の頭一つづつから、ゲノム DNA (gDNA) を調製し、PCR によって遺伝子型を確認する必要がある。その作業に費やす時間と労力と資金は、生理学の小さなラボにとっては深刻な問題だ。そこで、作業の大半をしめる gDNA 標本の調製を、簡便かつ安価におこなう方法を開発した。マウスから乾燥ろ紙血を採取し、小片を 50 mM-NaOH に浸して 95°C で 1 分間加熱した。そこに 7 倍容の 10 mM-Tris-HCl (pH 5.0) を加えて中和し、gDNA 標本とした。標本中の gDNA は、ろ紙に吸着していた。このろ紙片をテンプレートにして PCR を行うと、明瞭なバンドが再現性よく得られた。加熱するかわりに、室温で 15 分間放置しても、明瞭なバンドが得られた。これは、PCR を血液タンパクが阻害する問題を、アルカリ変性と希釈によって、うまく回避できることを示す。また、乾燥ろ紙血は、常温で 5 年間保存しても、明瞭な PCR バンドが得られた。乾燥ろ紙血の熱アルカリ処理や長期常温保存が、gDNA の品質におよぼす影響は、DOP-PCR 全ゲノム増幅法をもちいて検討した。本法は、gDNA の調製と保存を簡便かつ安価にし、生理学の小さなラボの問題を解決する。さらに本法は、保存ろ紙血からの変異遺伝子のスクリーニングなどにも、有用だと考えられる。(利益相反

なし)

一般(神経 2)-05. PirB は海馬神経回路の非対称性形成を制御する

古賀恒行¹、鶴飼ひかり¹、川原愛子¹、脇田 健¹、平山景子¹、大城遼平¹、Matthew J. Case²、川島志保美¹、杉本俊一¹、近松佳奈子¹、新田記隆¹、重本隆一²、高井俊行³、伊藤 功¹ (¹九州大学大学院理生物、²IST Austria、³東北大学大学院加齢医学研究所)

中枢神経系の非対称性は高次脳機能の基本的な特徴であるが、非対称性形成のメカニズムはまだ未解明である。近年、我々はマウス海馬の錐体細胞間に形成される興奮性アミノ酸シナプスは $\epsilon 2$ -dominant シナプス、 $\epsilon 2$ -non-dominant シナプスに分けられ、これらのシナプスに関して海馬神経回路の構造的、機能的な非対称性があることを見出した。 $\epsilon 2$ -dominant シナプスは NMDA 受容体サブユニットの一つである GluR2 の密度が大きいシナプス、 $\epsilon 2$ -non-dominant シナプスは密度が小さいシナプスである。さらに、これまでに我々は主要組織適合複合体クラス I (MHCI) を機能的に欠損したマウス ($\beta 2m$ KO マウス) が海馬錐体細胞の $\epsilon 2$ -dominant/ $\epsilon 2$ -non-dominant シナプスに関して、神経回路の非対称性を欠失していることを明らかにした。本研究では MHCI 受容体の一つである paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) を欠損した PirB KO マウスにおいても $\epsilon 2$ -dominant/ $\epsilon 2$ -non-dominant シナプスに関して神経回路の非対称性が消失し、 $\beta 2m$ KO マウスと同様の形質を示すことを見出した。これらの結果より、MHCI-PirB シグナル経路がマウス海馬錐体細胞の非対称な神経回路特性の形成に重要であることが示唆された。(利益相反 なし)

一般(神経 2)-06. 舌への刺激がラットの記憶力に及ぼす影響

田中哲子¹、土井 篤²、申 敏哲² (¹熊本保健科学大学医学検査学科、²同 リハビリテーション学科)

舌には味覚のみならず体性感覚を伝える感覚神経が密に分布している。今まで、舌の味覚受容については多くの研究がなされているが、舌のもう 1 つの重要な役割である体性感覚についての研究は少ない。特に舌への触・圧覚刺激のみの刺激と脳の記憶力に関する報告は少なく、まだ殆ど解明されていない。従って、本研究では舌への触・圧覚刺激が脳の発達と記憶力に及ぼす影響を行動学的手法、分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、8 方向放射状迷路試験、Step-down 試験では、0.73N 群でコントロール群に対し記憶力の増強が認められた。神経活性化マーカーであ

る c-Fos を測定した結果、0.28N 群、0.73N 群共にコントロール群に対し、有意な増加が認められた。また、細胞新生への影響を検討するために BrdU 陽性細胞を測定した結果では、0.73N 群のみに有意な増加が認められた。これらの結果から、舌への触・圧覚刺激はラットの海馬を活性化させ、成長因子の増加や細胞新生を促進させることで、記憶力の増強に影響した可能性が示唆された。本研究の結果は、歯磨き等の舌への刺激が記憶力や集中力などに影響を与える可能性と、高齢者には脳の活性化を誘導することで記憶力低下予防、脳虚血と認知症などの脳疾患の予防と治療などに寄与できると考えられる。(利益相反 なし)

一般(神経 2)-07. 時間精度が要求される動作における脳内時間生成機構の解明を目指す動物モデルの確立

王 馳, 西村方孝, 白見優大, 宋 文杰 (熊本大学大学院生命科学研究部知覚生理学分野)

我々が日常的に何気なく行っている動作の中には、タイミングが重要な動作が少なからずある。例えば発語では、次の音節のタイミングが伝えたい意味や感情によって意識的または無意識的に制御され、それによって発せられた言葉の意味を変化または修飾させることができる(例:『すこし』と『すこ〜し』)。更に我々は、動作のタイミング制御を極めることで、動作にゲーム性を与えることができる。その例がスポーツである。このように身近なタイミング制御に関わる脳内時間生成機構の解明には動物モデルが必要になるが、条件反射的ではない意識的な時間生成を行っていることが証明された実験系及び動物モデルは十分に確立されていない。本研究では、実験が容易な齧歯類を時間生成の動物モデルとして確立することを目的とした。実験にはモルモットを用い、発表者らが考案した時間生成課題を用いて合図提示後 0.2~2 秒で応答動作をさせるオペラント条件づけを行った。合図に対する応答が、条件反射的ではなく意識的な応答であることを証明するため、合図が持つ報酬の確率を変化させたところ、その確率と対応して合図を無視する率が変化した。この結果は、動物が合図の持つ報酬確率を考えた上で応答動作をするか否かを決定したこと以外での説明ができないため、条件反射的な応答であることが否定され、意識的な時間生成の動物モデルとしてのモルモットの可用性が証明された。(利益相反 なし)

一般(神経 2)-08. リナロール香気に誘発される抗不安効果

原田浩輝^{1,2}, 上村裕², 桑木共之¹, 柏谷英樹¹ (1)鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学, ²同 侵襲制御学)

香気は不可視な存在でありながら強く情動をコントロールし、時として抗不安効果をもたらすことが経験的に知られている。しかしながら、本当に嗅覚刺激が抗不安効果をもたらすのか?それはどのような神経回路によってもたらされるのか?は明らかになっていない。我々は抗不安効果を持つとされるラベンダー精油の主成分の一つ、リナロールの香気に着目し、リナロール香気の抗不安作用と、その神経メカニズムについて検証した。野生型雄マウス (C57BL/6) を用いて高架式十字迷路試験及び明暗箱試験を行ったところ、無臭空気暴露群と比較して、リナロール香気暴露群では有意に抗不安様行動を示した。この抗不安様行動は嗅覚遮断マウスでは消失することから、リナロール香気により惹起される嗅覚入力抗不安作用を示すことが明らかになった。また、この抗不安作用にはフルマゼニル事前投与により消失することから、 $\alpha 2$ サブタイプ型 GABAA 受容体がリナロール香気誘発性鎮痛に関与することが明らかになった。(利益相反 なし)

一般(神経 2)-09. HCN チャネルはマウスの酸感受性味覚細胞に発現するが、主たる酸受容体ではない

中島則行, 鷹野 誠 (久留米大医生理統合自律機能部門)

哺乳類の味覚において、5つの基本味に対しての受容機構が明らかにされつつある。その中で、G 蛋白共役型受容体(甘み、苦味、うま味)がクローニングされる一方で、塩味、酸味の受容メカニズムは不明な点も多い。

4種類の味細胞のうち、III型味細胞が酸受容を担うとされ、プロトンの受容にイオンチャネルが関与すると想定されているが、その本体はいまだ不明である。酸受容体の候補として、Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated (HCN1 & HCN4) チャネルが報告されている (Stevens et al. Nature 413, 631-635, 2001)。以前、我々は遺伝子改変マウスを用いて、III型味細胞が HCN4 チャネルを発現することを確認したうえで、その細胞死を誘導することに成功した。それによって酸味覚は障害を受けたが、依然として HCN チャネルが酸の受容に関わるかは不明であった。

今回、HCN1 ノックアウトの背景を持つマウスにおいて、HCN4 チャネルを条件的ノックダウンすることに成功した。結果として、酸の忌避行動および味細胞の酸応答がなくなることを明らかにした。

よって HCN1, 4 チャネルは主たる酸受容体ではない、と結論した。(利益相反 なし)

一般(心臓・循環)-10. 心筋細胞内カルシウム過負荷に

起因する microRNA 発現制御とカリウムチャンネル発現異常

岩田英里子, 森島真幸, 高成広起, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

頻脈性不整脈, 特に心房細動の持続は心筋細胞内のカルシウム (Ca^{2+}) 過負荷, または心筋伸展の結果として心筋細胞形質膜に発現するイオンチャンネルを質・量的に変化させる。心房細動の持続が転写後制御機構によって心筋に発現するイオンチャンネルの機能を変化させるという仮説を立て、洞調律患者と持続性心房細動患者の心筋筋(右心耳)に発現する microRNA (miR) のプロファイルを解析した。また、その miR 発現変化が心筋細胞内 Ca^{2+} 過負荷に起因するシグナル伝達異常によるものであることを証明するため、 Ca^{2+} イオノフォアを作用させた心筋細胞のイオンチャンネルの発現プロファイルを検討した。その結果、細胞内 Ca^{2+} 過負荷は C キナーゼ活性を介して miR-30d 発現を高め、最終的にアセチルコリン作動性カリウムチャンネルの発現を低下させた。また、この機序には心筋の伸展による細胞内シグナル伝達とは無関係であることが明らかになった。(利益相反 なし)

一般(心臓・循環)-11. ラット摘出心房標本に誘発した頻拍性不整脈 (tachycardia-like excitation : TE) で見られた異常自動能発現の光学的膜電位イメージングによる画像化

酒井哲郎, 与那覇 健, 山里雄飛 (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細胞内 Ca^{2+} dynamics の擾乱を加えた条件下で、tetanus 刺激を与え頻拍性不整脈 (tachycardia-like excitation : TE) を誘発した。cMOS カメラと merocyanine-rhodanine 系膜電位感受性色素 (NK 2761) の吸光測定による膜電位計測を用いて不整脈発現時における興奮波伝播の時間的・空間的パターンの光学的計測をおこない、その画像化/動画化をおこなった。得られた動画では、多くの例において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 が観察されたが、一部の標本では異常自動能 (abnormal automatism) による自発性興奮の興奮巣 (focus) が発現し、その部位から rhythmic に生成された興奮波が標本全体に伝播していくパターンがみられた。また、ひとつの標本に興奮巣が同時に複数存在する例も見られた。abnormal automatism および micro re-entry はヒトの心房細動を発現させる病態電気生理学的現象である。TE は摘出されたラット心房の小片で起こる現象で、発現条件も生理的状态からかなり deviate したものであるが、ヒトの心房細動と一定の類似性を持った

電気生理学的現象であることが示唆される。(利益相反 なし)

一般(心臓・循環)-12. チロシンキナーゼ FYN が肺動脈高血圧の病態生理に果たす役割

倉原 琳¹, 平石敬三¹, 張 影², 山村 彩³, 岸 博子², 小林 誠², 古賀佳織⁴, 鬼塚美樹⁴, 阿部弘太郎⁵, 塩井成留実⁶, 井上隆司¹ (1 福岡大学医学部生理学, 2 山口大学大学院医学系研究科分子細胞生理学講座, 3 愛知医科大学医学部生理学, 4 福岡大学医学部病理学, 5 九州大学大学院医学研究院循環器内科, 6 福岡大学理学部化学科)

【背景・目的】肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、血管収縮、血管リモデリング、血栓形成などにより肺血管抵抗増大→肺動脈圧上昇→右心不全を引き起こす疾患である。非受容体型チロシンキナーゼ Src ファミリーの一員 FYN は、血管リモデリングに深く関わる。本研究は、PAH 時の病態形成における FYN の重要性やその活性を制御する n-3 系脂肪酸エイコサペンタエン酸 (EPA) の治療効果について *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。【方法】免疫染色、免疫プロット、モノクローリン PAH モデルラット (MCT ラット) の作成、心エコー、組織染色、細胞増殖アッセイ 【結果】① TGF- β 2 刺激による肺動脈内皮細胞 (HPAEC) ストレスファイバー形成は、不活性型 FYN の導入や EPA の添加によって抑制された。IL-6 による STAT3 のリン酸化は不活性型 FYN の導入や EPA の添加によって抑制された。② TGF あるいは IL6 で刺激によって肺動脈平滑筋細胞 (HPASMC) FYN のチロシンリン酸化パターンは活性化型に変化した。EPA やその代謝産物である Resolvin E1 添加によって回復した。PAH 患者由来 HPASMC の異常増殖に対して EPA は有意な抑制効果を示した。③ MCT ラットに EPA を投与することにより、右室流出路の増大、肺動脈血流速度ピーク到達時間の減少、肺動脈肥厚、右心肥大、心筋線維化の亢進が抑制され、生存期間が有意に延長した。

【結論】肺動脈平滑筋細胞や内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ FYN が、PAH 時の肺血管リモデリングの進行に関与し、EPA による FYN の活性抑制が新たな PAH 治療法の開発に繋がることを期待される。(利益相反 なし)

一般(心臓・循環)-13. プロポフォールは敗血症時の血管炎症反応を抑制する

高橋貴理子^{1,2}, 沼田朋大¹, 山浦 健², 井上隆司¹ (1 福岡大学医学部生理学, 2 同 医学部麻酔科学)

敗血症の多臓器不全では炎症性サイトカインによる血管内皮障害が密接に関与している。臓器障害は、炎症に起因

した酸化ストレスと細胞内カルシウムホメオスタシスの異常が関与していることが知られているが、詳細なメカニズムは不明である。そこで私たちは、麻酔薬プロポフォールが抗炎症作用を有する報告があることに着目し、敗血症患者へのプロポフォール投与が血管内皮への酸化ストレスとカルシウムシグナリングに及ぼす影響を検討した。

*in vivo*の実験ではLPSにて惹起された敗血症モデルマウス(C57/BL6)を用いた。プロポフォールの投与により、敗血症モデルマウスの生存率は改善した。また、ELISA法を用いた血清IL-6値はプロポフォールの前投与で有意に低下した。*in vitro*の実験では血管内皮細胞株を使用し、LPS惹起による炎症時のプロポフォールの影響をROS測定、細胞生存率で評価した。その結果、炎症時と比較してプロポフォール投与によりROSの産生が低下し、細胞生存率が改善した。また、プロポフォールの前投与で炎症時の細胞内カルシウム濃度上昇が抑制された。以上より、プロポフォールがROSの産生を抑制することで細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制し、血管内皮炎症反応および臓器障害を改善する可能性が示唆された。(利益相反 なし)

一般(フィトケミカル・カンボウほか)-14. 植物由来物質によるラット脊髄膠様質のTRPA1チャンネル活性化とその構造活性関連

余 婷, 藤田亜美, 王 翀, 鈴木里佳, 馬郡信弥, 楊 帆, 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)

痛み伝達の制御に重要な役割を果たす脊髄後角第II層(膠様質)に存在する1次感覚ニューロンの中枢端に発現しているTRPA1チャンネルは痛み伝達の修飾に働いている。我々は今まで、このTRPA1チャンネルは*in vitro*の脊髄薄切片標本において多くの植物由来物質により活性化されることを明らかにしてきた。例えば、アリルイソチオシアネート、オイゲノール、ジゲロン、カルバクロール、チモール、(-)-カルボン、1,8-シネオール、シト랄ールによる活性化である。そのTRPA1チャンネルの活性化により神経終末から膠様質ニューロンへ起こるグルタミン酸の自発放出が増加する。今回、成熟ラット脊髄横断薄標本の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、植物由来のグアニアコール、バニリン、バニリン酸および*p*-シメンが自発性の興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。その結果、(1)オイゲノールやジゲロンの置換基の一部を持たないグアニアコール、(2)バニロイド類に属する単純な化合物のバニリンやバニリン酸、さらに、(3)カルバクロールやチモールのベンゼン環に結合している水酸基を持たない*p*-シメンは、いずれも自発性興奮性シナプス後電流の発生頻

度や振幅に影響を及ぼさないことを発見した。以上より、膠様質のTRPA1チャンネルの活性化のためには植物由来物質のベンゼン環に結合した特定の官能基が必要であることが明らかになった。(利益相反 なし)

一般(フィトケミカル・カンボウほか)-15. ヒノキチオールとその関連物質による蛙坐骨神経の複合活動電位の抑制

馬郡信弥, 藤田亜美, 鈴木里佳, 王 翀, 楊 帆, 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)

台湾ヒノキ成分である不飽和7員環化合物ヒノキチオールは抗炎症など様々な作用をもつが、神経伝導に及ぼす作用は不明である。我々は以前、様々な植物由来物質が化学構造特異的に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た。今回、ヒノキチオールがCAPを抑制するかどうか、抑制するならばどのような化学構造が重要であるかを明らかにするために、ヒノキチオールとその関連物質がCAPに及ぼす作用を調べた。実験は蛙坐骨神経にair-gap法を適用して行った。その結果、ヒノキチオールは濃度依存的にCAPの振幅を減少させ(IC₅₀=0.56 mM)、同様な作用はその構造異性体γツヤプリシンでも見られることを発見した。一方、ヒノキチオールの7員環に結合しているイソプロピル基、カルボニル基、ヒドロキシ基のいずれかを欠いたトロポロン、コウジ酸、グアニアズレンはCAPに作用しなかった。また、ベンゼン環にイソプロピル基やヒドロキシ基が結合したビオゾールや4イソプロピルフェノールはヒノキチオールと同程度のCAP抑制を示したが、それらの基がシクロヘキサノールに結合した4イソプロピルシクロヘキサノールでは作用が弱かった。以上より、ヒノキチオールがCAPを抑制し、これにはπ電子系の環に結合したイソプロピル基やヒドロキシ基が重要であることがわかった。ヒノキチオールに局所麻酔作用があることが示された。(利益相反 なし)

一般(フィトケミカル・カンボウほか)-16. 慢性便秘薬「潤腸湯」の作用メカニズムの解明

沼田朋大¹, 佐藤(沼田)かお理^{1,2}, 井上隆司¹(¹福岡大学医学部生理学, ²日本学術振興会)

便秘の有訴者は、高齢者に限ると約10%に達し、超高齢化社会において便秘症の改善は喫緊の課題となっている。便秘の解消には、食習慣の改善や水分摂取、運動など日常生活の改善が優先されるが、重篤な便秘に対しては積極的な治療が必要になる。近年、腸刺激性、浸透圧性、膨張性便秘薬のいずれにも属さない新規クロライドチャンネルアク

チペーター性便秘薬が開発され注目されている。漢方薬の中でも囊胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) を刺激する可能性がある潤腸湯は、便秘改善に向けて同様の効果が期待されている。しかし、この薬物に CFTR 分子を直接活性化作用があるか否かについては明確になっていない。そこで本研究では、潤腸湯による CFTR 活性化機序について分子電気生理学的手法による検討を行った。ヒト CFTR 発現 HEK293T に潤腸湯を投与すると、CFTR の特性を示す陰イオン電流が惹起された。さらに、内在的に CFTR を発現する小腸上皮様細胞株においても、CFTR 様の電流成分が惹起され、CFTR 阻害剤や siRNA 処置によって抑制された。次に CFTR 活性化に伴う水の細胞外流出を確認するために細胞容積を測定した。潤腸湯投与によって引き起こされた細胞容積減少は、CFTR 阻害剤や siRNA 処置によって抑制されたことから、潤腸湯には CFTR チャンネルの活性化効果があり、小腸における水分泌に関与することが示唆された。(利益相反 なし)

一般(フィトケミカル・カンボウほか)-17. 非ステロイド性抗炎症薬による蛙坐骨神経の複合活動電位の抑制とその化学構造

鈴木里佳, 藤田亜美, 水田恒太郎, 馬郡信弥, 王翀, 楊帆, 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)

NSAID は神経伝導を抑制するが詳細は不明である。今回、NSAID による伝導抑制の構造活性連関を明らかにするために、様々な構造の NSAID が蛙坐骨神経の複合活動電位 (CAP) に及ぼす効果を調べた。CAP は air-gap 法を用いて記録した。その結果、酢酸系 NSAID のジクロフェナク ($IC_{50} = 0.94mM$) やアセクロフェナク ($0.47mM$) が CAP を抑制することを見出した。他の酢酸系 NSAID について、同様な抑制はエトドラク、インドメタシン、アセメタシンで見られ、 $0.5mM$ の濃度で、それぞれ 5, 20, 40% だけ CAP の振幅を減少させたが、スリダクやフェルビナク ($1mM$) は影響しなかった。ジクロフェナクと似た構造を持つフェナメ酸系 NSAID のトルフェナム酸 ($IC_{50} = 0.36mM$) やメクロフェナム酸 ($0.19mM$) も CAP を抑制したが、それらの置換基が変化したメフェナム酸や N-フェニルアントラニル酸では抑制が弱かった。一方、サリチル酸系 NSAID アスピリン、プロピオン酸系 NSAID (ケトプロフェン、イブプロフェン、ナプロキセン、ロキソプロフェン) およびオキシカム系 NSAID (メロキシカム) は CAP に作用しなかった。以上より NSAID は構造特異的に CAP を抑制することが明らかになった。NSAID による神経伝導抑制にはその化学構造が重要であることが示唆される。(利益相反

なし)

一般(イオンチャンネルほか)-18. TRPM7 キナーゼを介するリン酸化シグナルとエナメル質形成制御

進正史¹, 緒方佳代子^{1,2}, 圓谷智之³, 岡暁子², 岡本富士雄¹, 鍛冶屋浩¹, 片桐千秋³, 尾崎正雄², 松下正之³, 岡部幸司¹ (¹福岡歯科大学細胞生理学分野, ²同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)

TRPM7 はイオンチャンネルとキナーゼの機能を合わせ持つユニークな分子で、歯に高発現する。我々はエナメル質形成における TRPM7 のキナーゼとしての機能的重要性を検討するため、TRPM7 キナーゼ機能欠失型点変異 K1646R マウス (KR) と野生型マウス (WT) の解析を行った。① in situ hybridization と免疫染色により、WT と KR では共に TRPM7 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞に強い発現を認めた。② μ CT と電顕解析により、KR のエナメル基質の結晶構造の脆弱化や石灰化の低下を認めた。③ KR のエナメル芽細胞の TRPM7 様電流を測定した結果、WT に比較し電流密度に有意差は認められず、KR 変異によるイオンチャンネル機能への影響は少ないと考えられた。④ TRPM7 キナーゼが制御する下流シグナルを検討するために、歯の発生における重要なシグナルである BMP 転写因子 Smad1/5/9 と p38, 及び CREB のリン酸化解析を行った。その結果、WT では Smad1/5/9, p38, CREB のリン酸化活性を認めたが、KR ではリン酸化が減弱していた。また、免疫沈降法により CREB は TRPM7 と共沈することより、TRPM7 キナーゼの基質の一つの可能性が示唆された。以上より、TRPM7 はキナーゼとして、BMP 及び CREB シグナルのリン酸化カスケードを介して、エナメル質形成に重要な役割を持つことが明らかとなった。(利益相反 なし)

一般(イオンチャンネルほか)-19. Cav1.2 型 Ca^{2+} チャンネル C 末端部における PKA リン酸化のチャンネル活性調節機序

高青華¹, 雷明^{1,2}, 徐建軍¹, 冀悦子¹, 朱曜南³, Hao 麗英², 亀山正樹¹ (¹鹿児島大医歯総合神経筋生理学, ²中国医科大薬学院薬理毒理学, ³中国科学技術大ソフトウェア工学)

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、細胞の興奮や筋収縮や遺伝子発現調節などに関与している。 Ca^{2+} チャンネル活性調節には CaM と CT1 領域 (α サブユニット C 末近位部) の結合が重要である。我々は最近の研究 (Lyu et al., J Pharmacol Sci 133, 2017) で、CT3 領域 (同 C 末遠位部) が CT1 に結合して CaM と CT1 の結

合を抑制し、チャネル活性を調節することを報告した。そこで、今回、PKA のリン酸化が CaM および CT3 の CT1 への結合に与える影響について検討した。CT1 の断片ペプチドの GST 融合体を作成し、CaM との結合を pull-down 法にて検討した。その結果、低 Ca^{2+} 条件下で、CT1 の PKA リン酸化処理は、CaM の結合を有意に増加させた。一方、CT3 の CT1 への結合は有意に減少させた。これらより、PKA による CT1 のリン酸化には 2 つの作用があることが示唆された。第一に、CT1 のリン酸化が CaM の CT1 への結合を直接的に促進すること、第二に、CT1 のリン酸化が CT1-CT3 結合を抑制して、間接的に CaM の結合を促進することである。さらに、高 Ca^{2+} 条件下では、CT1 のリン酸化は CaM の結合を逆に減少させた。このことは、PKA リン酸化が Ca^{2+} 依存性不活性化にも影響を与えることを示唆している。(利益相反 なし)

一般(イオンチャネルほか)-20. 受容体刺激・機械刺激協働時の TRPC6-actin 相互作用と cGMP による影響

市川 純, 中川 緑, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

背景・目的: TRPC6 チャネルは G タンパク共役型受容体刺激によって活性化されるカチオンチャネルであり、PKG による T69 のリン酸化を介し負の制御を受けること、また機械刺激により電流活性が増強されることがわかっている。本研究では、T69 をアラニンあるいはグルタミン酸で置換したマウス TRPC6 変異体 (T69A, T69E) を HEK 細胞に強制発現させ、機械刺激時の TRPC6 チャネル活性の比較を fura-2 による細胞内 Ca 測定を用いて行った。結果: 2,4,6-trinitrophenol (TNP) による膜伸展刺激時の Ca 応答増強は 69A では wt に比べ減弱したが 69E では増強した。さらに、機械刺激受容変換機構で重要な役割を果たす細胞骨格と TRPC6 との関連を明らかにするため、刺激前後の TRPC6 と actin タンパク間の物理的相互作用の有無について共免疫沈降法を用いて調べた。TRPC6 と actin の共沈量は、受容体刺激と機械刺激の同時投与により増加し、69A および 69E 変異体では異なる傾向を示した。これらの Ca 応答および TRPC6-actin 共沈量は、cGMP アナログである 8Br-cGMP 前処理により影響を受けた。結果: 以上より機械刺激による TRPC6 チャネル活性増強時には TRPC6 と actin 分子間の相互作用が強化されること、それらは PKG によるリン酸化の制御を受ける可能性が示唆された。(利益相反 なし)

一般(イオンチャネルほか)-21. サーカディアンリズムの加齢変化と生殖機能

高須奈々, 織田善晃, 中村 渉 (長崎大学医歯薬学総合研究科加齢口腔生理学)

視床下部・視交叉上核は、生体の内的環境を制御するサーカディアンリズムの発振と、外部環境への生体適応とを担う体内時計中枢として機能する。げっ歯類を用いた破壊実験により、視交叉上核の損傷はサーカディアンリズムの消失だけでなく、視床下部-下垂体-卵巣系における黄体形成ホルモンサージや排卵の消失を引き起こすことが知られている。雌性生殖機能は加齢と共に減退し、閉経を迎えるまでの移行期間には性周期の不整や消失を伴う。サーカディアンリズム機能もまた加齢の影響から逃れることはできず、中年期にはすでに自由継続周期の変化、リズム位相の不整、視交叉上核神経出力の減弱がみとめられる。時計遺伝子 Cryptochrome (Cry) KO マウスは、自由継続周期に変調をきたし Cry1 KO は周期の短縮を、Cry2 KO は周期の延長を呈するが、24 時間周期の明暗サイクルに同調し、野生型と同等の繁殖が可能である。我々は Cry KO 雌性マウスが、本来、妊娠・出産可能な 8~12 ヶ月齢期に早期性周期不整を伴う不妊を呈することをみいだした。一方、Cry1, 2 KO マウスに生じる早期不妊は、環境明暗サイクルをマウス遺伝型固有の周期に調整することで劇的に改善された。以上の結果は、環境生体適応において内的環境を制御するサーカディアンペースメーカーと外部環境サイクルとの調和が重要であることを明示している。(利益相反 なし)

学部 01. 三角食べによる食後血糖値上昇抑制効果について

東 真理, 日高 舞, 山部奈々, 吉福 楓, 石松 秀 (西九州大学健康栄養学部健康栄養学科)

摂食順序により食後血糖値が影響を受けることが知られている。このため糖尿病患者に対する栄養指導では、ご飯を食べる前に野菜を食べよう指導している。以前、学校では「三角食べ」が推奨されていたが、その血糖値に対する影響は明らかとなっていない。そこで今回我々は、三角食べの効果を検討したので報告する。健康成人 8 名 (21~22 歳, 男性 1 名, 女性 7 名) を被検者とし、空腹時採血を行なった後、試験食を摂取してもらい、食後 30 分から 240 分にかけて計 7 回の採血を行った。食前後の血糖値、血中インスリン、中性脂肪の変化を検じた。試験食は、ご飯 (150 g)、サラダ (150g)、味噌汁 (150g) とし、試験 1 (T1) ではサラダ、味噌汁、ご飯の順で、試験 2 (T2) ではサラダ、ご飯、味噌汁を各 50g ずつ交互に (三角食べ)、試験 3 (T3) では、ご飯、味噌汁、サラダの順で摂取してもらった。各試験は、1 口 30 回咀嚼し 20 分かけて食べてもらった。T1 と T2 の食後 30 分血糖値 (T1₃₀ と T2₃₀) は、T3₃₀ より有意

に低かった。食後 60 分の血糖値は、T2₆₀で T3₆₀より有意に低かった。また食前から食後 240 分までの累積血糖値下面積は、T2 で T1 や T3 より小さい傾向にあった。Δインスリン値（食後 30 分値－食前値）は、T3 で T1 及び T2 より有意に高かった。中性脂肪は、各群間で有意差を認めなかった。以上の結果から、三角食べは、少ないインスリン分泌で食後血糖値を低く保つことが分かった。（利益相反 なし）

学部 02. ブルガダ症候群の予後予測を旨す変異心筋 Na チャネルの機能解析

下河舞子, 木本浩貴, 石川泰輔, 蒔田直昌 (長崎大学医学部分子生理学)

ブルガダ症候群 (BrS) は、心電図 ST 上昇を特徴とする心室細動である。患者の一部に心筋 Na チャネル遺伝子 SCN5A の変異が報告されているが、変異が BrS の予後を予測できるかに関しては否定的な見解が多かった (FIN-GER study, Circulation 2010)。最近我々は日本人 BrS 発端

者の長期予後を SCN5A 変異の有無で比較する多施設共同研究を行い、変異保有者は致死性イベントが有意に高率で若年発症であることを報告した (Yamagata et al. Circulation 2017)。この研究では SCN5A 変異の機能を勘案していないが、変異キャリアの予後は必ずしも均一ではなく、むしろ機能異常の強い変異保有者の予後はさらに不良だと推測される。そこで、本研究の 55 個の変異のうち、ナンセンス変異やフレームシフト変異のような明白な無機能変異と、すでに機能異常が報告されている変異を除いた、9 個のミスセンス変異の SCN5A プラスミドを作成し、tsA201 細胞にトランスフェクション後、パッチクランプ法で機能解析した。その結果 9 個の変異は、無機能 (3 個)、電流抑制 (4 個)、正常 (2 個) と機能異常の程度に大きなばらつきを示した。今後、変異を機能的に分類して生存曲線を再解析し、致死性イベントと関連する機能特性の層別化と、BrS の予後を発症前に予測する手法の樹立を目指したい。（利益相反 なし）