

1. 嫌気条件と NAD(P)H は Apoptosis-inducing factor の大腸菌膜からの解離を抑制する

山下哲生¹, 松本 感², 橋本 剛¹, 五十嵐淳介³, 小坂博昭¹, 平野勝也¹ (香川大学医学部自律機能生理学,²同医学部医学科 5 年,³森ノ宮医療大学大学院保健医療学研究科)

【背景と目的】Apoptosis-inducing factor (AIF) はミトコンドリア膜に局在する蛋白質でカスパーゼ非依存性にアポトーシスを誘導する。従来、ミトコンドリア型 AIF (AIF_{mit}) は膜を貫通して存在し、N 末端が限定分解されることによって可溶性 AIF (AIF_{sol}) に変換されると考えられてきた。我々は、マウス AIF を大腸菌に発現させ、大腸菌膜との相互作用を解析することから、AIF_{mit} も AIF_{sol} もイオン結合依存性に膜に結合することを見出した。また、AIF は NAD(P)H 依存性に二量体を形成する。本研究では、AIF_{mit} および AIF_{sol} とミトコンドリア膜との相互作用に及ぼす嫌気条件および NAD(P)H の影響を明らかにする。

【方法および結果】マウス AIF_{mit} および AIF_{sol} を発現した大腸菌を低イオン強度 (7mM) の緩衝液で破碎し、得られる懸濁液を超遠心 (98,000×g, 90min, 4℃) して膜画分を得た。この膜画分を、イオン強度の異なる緩衝液 (7~500 mM) で懸濁し、4℃, 1.5 時間処理後超遠心を行い、上清中の AIF 量をウェスタンブロット法により検出し、膜画分からの解離を評価した。嫌気条件は、グルコースオキシダーゼおよびカタラーゼを添加することにより溶存酸素を消去することで設定した。嫌気条件下で AIF_{mit} および AIF_{sol} はイオン強度依存的に膜から解離したが、解離の程度は好気条件下の解離に比べ低下した。嫌気条件による解離抑制は、イオン強度 100~200mM の範囲で、AIF_{sol} において最大であった。両蛋白質の解離抑制は 1 mM NAD(P)H の添加でさらに促進した。また、エピトープタグ特異的な抗体を用いた共免疫沈降実験により、両蛋白質とも膜画分で二量体を形成していることが示された。

【結論】嫌気条件および NAD(P)H は AIF_{mit} および AIF_{sol} の膜からの解離を抑制する。両蛋白質の膜結合には NAD(P)H 依存的二量体形成が影響を及ぼす。(利益相反なし)

2. ヒト iPS 細胞を用いた虚血性心疾患モデルの構築

魏 恒, 王 晨, 高橋 賢, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

心疾患は日本の死亡原因の二番目であり、その内の心疾患は 2015 年において年間 19 万人以上の命を奪っている。これを受け、虚血性心疾患を予防する薬物や幹細胞を用いた再生医療の研究が進んでいる。虚血性心疾患の研究には

動物モデルがしばしば用いられるが、動物種によって心拍数や心筋細胞の活動電位は大きく異なる。そこで我々は心筋虚血状態を模擬し、ラット心室筋細胞株 H9c2 で条件検討を行った後、ヒト iPS 細胞 (201B7) から分化誘導した心筋細胞を用い、虚血性心疾患の細胞モデルの確立を試みた。2% 酸素, 0mg/ml グルコースで 24 時間培養し、細胞生存率及び心筋細胞の拍動強度を MTT Assay 及び拍動動画解析でそれぞれ解析した。その結果、20% 酸素, 2mg/ml グルコースで培養したものと比べ、2% 酸素, 0mg/ml グルコースで 24 時間培養した細胞の生存率及び拍動の強度は低下した。この結果より本研究の方法で培養した心筋細胞は虚血性心疾患の状態を再現していることが示唆された。この細胞モデルによって、不必要な動物実験を避けられることが期待される。(利益相反なし)

3. Zinc finger protein 521 欠損マウスで見られる行動異常は Dopamine-beta-Hydroxylase の上昇が関与する

大久保信孝, 平田香穂里, 青戸 守, 満田憲昭 (愛媛大学大学院医学系研究科循環生理学)

【背景】Zinc finger protein 521 (Zfp521) は ES 細胞から神経前駆細胞への分化促進因子として知られている。我々はこれまでに Zfp521 欠損マウスを作製し、Zfp521 の欠損により多動および不安行動の減弱などの行動異常が起こることを明らかにしてきた。個体の行動異常は、脳内モノアミン量の変化と密接に関わる事が知られている。そこで、脳内モノアミンとその合成タンパク質の変化が Zfp521 欠損マウスで見られた行動異常に関与しているか調べた。

【結果】脳を各領域に分離し、それぞれの部位におけるドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニン濃度を計測した。その結果、Zfp521 欠損マウスのドーパミン量は前頭前皮質、線条体、海馬、中脳のそれぞれにおいて減少、ノルアドレナリン量はそれぞれにおいて増加していた。セロトニン量については、どの部位においても差が見られなかった。次に、モノアミン合成タンパク質の発現量を qPCR 法にて調べた。その結果、ドーパミンからノルアドレナリンを合成する酵素である Dopamine-β-Hydroxylase (DBH) の発現が増加していた。さらに DBH の阻害剤である Nopicastat をマウスに投与したところ、多動や不安行動の減弱といった行動異常が抑制された。

【結論】Zfp521 欠損マウスの行動異常は、DBH の増加による脳内ドーパミンの減少及びノルアドレナリンの増加により起こっていることが示唆された。以上より、ZFP521 は DBH 発現を抑制的に制御しており、このことが個体の正常な行動に影響を与えていると考えられた。(利益相反なし)

4. Mild heat exposure promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells *in vitro*

Hossain Md Emon¹, Kentaro Matsuzaki¹, Masanori Katakura^{1,2}, Naotoshi Sugimoto^{1,3}, Eri Sumiyoshi¹, Osamu Shido¹ (¹Department of Environmental Physiology, Faculty of Medicine, Shimane University, ²Department of Nutritional Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, ³Department of Physiology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University)

Heat acclimation in rats is associated with enhanced neurogenesis in thermoregulatory centers of the hypothalamus. To elucidate the mechanisms for heat exposure-induced neurogenesis, we investigated the effects of direct mild heat exposure on the proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs). NSCs from 14.5-day-old rat fetuses were propagated as neurospheres at either 37.0°C (control) or 38.5°C (mild heat exposure) for 4 days and the effects of temperature on proliferation were investigated by MTS cell viability assay, measurements of neurosphere diameter, and counting the total number of cells. The mRNA expressions of heat shock proteins (HSPs) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), CREB and Akt phosphorylation levels, and intracellular ROS levels were analyzed by real time PCR, Western blotting and CM-H₂DCFDA assay, respectively. During proliferation, heat exposure increased NSCs viability, neurosphere diameter, and cell count. BDNF mRNA expressions, CREB phosphorylation, and ROS level were also increased by heat exposure. Heat exposure increased HSP27 mRNA expressions concomitant with enhanced p-Akt level. Moreover, heat exposure increased the proportion of cells positive for Tuj1 (a neuronal marker) during differentiation. These findings suggest that mild heat exposure increases NSCs proliferation possibly through activation of the Akt pathway and also enhances neuronal differentiation. Direct effects of temperature on NSCs might be one of the mechanisms involved in hypothalamic neurogenesis in heat-acclimated rats. (No conflict of interest)

5. 血液凝固第 XI 因子が引き起こす血管平滑筋細胞の Ca²⁺シグナルの発生メカニズムの解明

劉 文華, 橋本 剛, 山下哲生, 平野勝也 (香川大学医学部自律機能生理学)

【目的】蛋白質分解活性を有する凝固第 II, VII, X 因子

はプロテイナーゼ活性化型受容体を介して血管平滑筋作用を発揮することが報告されている。我々は、内因系凝固因子である第 XI 因子 (FXIa) もこの受容体を介して平滑筋細胞に Ca²⁺シグナルを発生させることを見出し、昨年の本会で報告した。本研究では FXIa による Ca²⁺シグナルの発生機構を明らかにする。

【方法と結果】Fura-2 蛍光法によりラット平滑筋細胞 A7r5 の細胞質 Ca²⁺濃度変化を記録した。FXIa は、濃度依存性に 100nM で最大に達する細胞外からの Ca²⁺流入を引き起こし、300nM においてわずかながら小胞体からの Ca²⁺放出を引き起こした。FXIa による Ca²⁺流入 (27.8±1.8%, n=7) は、電位作動性 L 型 Ca²⁺チャネル阻害剤ジルチアゼムにより完全に阻害され (0.5±0.4%, n=4)、貯蔵部作動性 Ca²⁺チャネル阻害剤 YM58483 (23.6±1.3%, n=4) および TRPC3 阻害剤 Pyr3 (23.9±1.0%, n=4) には抵抗性を示した。なお、ジルチアゼムは高 K⁺脱分極刺激による Ca²⁺流入を、YM58483 および Pyr3 はタブシガルギンによる貯蔵部作動性 Ca²⁺流入を、それぞれ特異的に阻害した。逆転写 PCR 解析により A7r5 細胞には、L 型 Ca²⁺チャネル α_{1c} および貯蔵部作動性 Ca²⁺チャネル Orai1, Orai2, Orai3 が発現し、TRPC3 は発現しないことを明らかにした。RNA 干渉法を用いて α_{1c} , Orai1, Orai2, Orai3 の mRNA 発現を抑制したところ、FXIa による Ca²⁺流入 (0.180±0.011, n=6) は、 α_{1c} の発現抑制により抑制され (0.087±0.009, n=4)、Orai1 (0.156±0.007, n=4)、Orai2 (0.175±0.013, n=4)、Orai3 (0.183±0.017, n=4) の発現抑制には抵抗性を示した。一方、タブシガルギンによる Ca²⁺流入 (0.746±0.038, n=4) は、Orai1 (0.415±0.023, n=4) の発現抑制によって抑制され、 α_{1c} (0.791±0.034, n=4)、Orai2 (0.837±0.030, n=4)、Orai3 (0.775±0.037, n=4) の発現抑制に抵抗性を示した。

【結論】FXIa は、電位作動性 L 型 Ca²⁺チャネルを活性化して Ca²⁺流入を引き起こし、血管平滑筋に持続的な Ca²⁺シグナルを発生させる。(利益相反 なし)

【奨励賞候補演題】

6. がんの遠隔転移に及ぼす腫瘍免疫の影響：CD200 強制発現細胞移植によるラットがん遠隔転移モデルを用いた解析

馬越陽大, 住田悠太郎, 大角翔太, 宇佐英香, EM チョードリ, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学)

我々は、免疫抑制分子とされる CD200L, およびそのスプライシングバリエーションである CD200S をラット C6 グリ

オーマ細胞に強制発現させた株 (CD200L および S 株) を樹立した。これらをウイスターラット新生仔脳内に移植し、実験的脳腫瘍を作成したところ、CD200S 株移植では生存期間の延長が見られた。CD200S 脳腫瘍内では樹状細胞様の腫瘍関連マクロファージ (TAM) が増加し、T 細胞によると考えられる抗腫瘍免疫の活性化が認められた。

我々は、ウイスターラット新生仔背部皮下に C6 細胞を移植すると、高率に肺への遠隔転移を起こすことを見出した。今回我々は、CD200L または CD200S 細胞を背部皮下に移植する遠隔転移モデルを作成した。その結果、原発巣の大きさには有意差はないものの、CD200S 腫瘍は L 腫瘍に比べ有意に遠隔転移率が低く、生存期間も延長した。次世代シーケンサーにより各腫瘍原発巣の遺伝子発現を網羅的に調べたところ、CD200S 腫瘍では L 腫瘍に比べ、免疫細胞を誘引するケモカインや腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するグランザイムの発現が高いことが判明した。FACS を用いて L/S 腫瘍を比較したところ、S 腫瘍では、原発巣内の CD45 陽性細胞、特に CD8+ T 細胞や一部の樹状細胞、および腫瘍関連マクロファージの増加が顕著であり、NK 細胞の増加も推測された。これらの結果は、抗腫瘍免疫の活性化が、遠隔転移の抑制につながることを強く示唆している。(利益相反 なし)

7. 唾液腺再生モデルにおける雌雄差の影響

畑 美緒^{1,2}、赤松徹也^{2,3}、姚 陳娟²、前田さおり^{2,4}、宮地裕司^{2,4}、金山宏幸^{2,4}、長谷川敬展²、吉村 弘² (¹徳島大学歯学部歯学科 4 年、²徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子生理学分野、³同 社会産業理工学研究部生体分子機能学分野、⁴同 口腔科学教育部)

唾液腺の主導管結紮-再開放系は、唾液腺再生モデルとして知られるが、その分子メカニズムは不明である。これまでに、本再生モデルでサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の関与や雌雄差があること等を見出している。今回、雌雄差の影響について、卵巣摘出または精巣摘出ラットを用いて検討した。

5 週齢時に卵巣または精巣を摘出した SD ラットを用い、7 週齢時に右側顎下腺主導管を結紮し、左側は非結紮対照とした。結紮 3, 5 週間後、および結紮 1 週間後に再開放して更に 2, 4 週間後に各々顎下腺を摘出して解析した。

雌雄共に結紮群では顎下腺の萎縮と腺重量の減少を確認したが、対照群の変化は殆ど認められなかった。この変化は再開放群でも同様に認められたが、♀は♂より有意に腺重量が回復した。卵巣摘出群の腺重量の変化は♀より♂に近い傾向にあり、回復する割合も低下した。一方、精巣摘出群の変化は♂と同様であった。各顎下腺での PACE4 お

よび AQP5 の発現をウエスタンブロットにより解析した結果、結紮側でのみ PACE4 発現の誘導・変動が認められ、♂では両者の発現レベルに逆相関関係が示唆されたが、♀では認められなかった。精巣摘出群での変化は認められなかったが、卵巣摘出群では♂同様の逆相関関係が示唆され、唾液腺再生モデルにおける雌雄差は性ホルモン、特に雌性ホルモンの影響が考えられた。(利益相反 なし)

8. ラット中脳歩行誘発野から延髄吻側腹外側野への投射神経刺激による昇圧反応

熊田奈桜、木場智史、花井映里、渡邊達生 (鳥取大学医学部生理学講座統合生理学分野)

運動発現のために高位中枢から生じる神経シグナル (セントラルコマンド, CC) は中枢回路を刺激して自律神経・循環反応を生成する。CC の中枢回路は未解明である。我々は、ラット延髄吻側腹外側野 (RVLM) に局在する C1 神経細胞は随意運動によって興奮することを発見した (Kumada *et al. in revision*)。CC の中枢回路の解明を目指し、本研究では RVLM の上位の中枢経路を調査した。

まず、脳のどの領域から RVLM に投射するかを調査した。ラット RVLM に逆行性神経トレーサーを注入した実験から、中脳楔状核 (CNF)・橋脚被蓋核 (PPTg) や中脳中心灰白質において、RVLM への投射神経が多く確認された。CNF/PPTg を含む脳領域は刺激されると歩行活動・昇圧応答が生じることから、中脳歩行誘発野 (MLR) として知られている。

そこで MLR から RVLM への投射神経 (MLR-RVLM 神経) の生理機能を調査した。光受容タンパク質 ChIEF を発現させるためにアデノ随伴ウイルスベクター [片岡直也・中村和弘博士 (名大) の恵与] をラット MLR に注入した (N=7)。麻酔ラット RVLM に青光を照射することで MLR-RVLM 神経を選択的に刺激したところ、動脈圧は有意に上昇した (+7 ± 1 mmHg, P < 0.05)。一方で心拍数・腎交感神経活動は変化しなかった。また免疫染色実験から、MLR-RVLM 神経はグルタミン酸作動性であり、RVLM C1 神経に直接つながることが分かった。

以上の結果から、MLR-RVLM 神経の興奮は腎交感神経活動と関連せずに昇圧をもたらすことが示された。MLR-RVLM 神経が運動時の昇圧反応の生成を司るかは今後の追求課題である。(利益相反 なし)

9. Oxytocin prevents corticosterone-induced dendritic atrophy in mouse hippocampal neurons

Hein Min Latt, Aki Sato, Yuuri Koga, Hiroaki Matsu-shita, Hiroyuki Michiue, Atsushi Fujimura, Teichi

Nishiki, Hideki Matsui (Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

Glucocorticoids, corticosterone (CORT) in rodents and cortisol in humans, are released from the adrenal cortex in response to stress. Glucocorticoid receptors (GR) are expressed in many brain structures, particularly in the hippocampus. This makes hippocampal neurons vulnerable to elevated glucocorticoid levels as seen in a stress response. Although they help individuals to combat stress, their overexposure in animals has been implicated in dendritic atrophy and apoptosis of hippocampal neurons. On the other hand, oxytocin (OT), a neuropeptide produced from the paraventricular nucleus of the hypothalamus, has been shown to mediate antistress and antidepressant-like effects in mice and rats. OT receptors (OTRs) are strongly expressed in mouse hippocampus and amygdala. We explored the effect of OT on the dendritic growth in primary mouse hippocampal neurons. Both OTRs and GRs were expressed in primary mouse hippocampal neurons starting from day in vitro 1. While OTR expression was confined to the cytosol of the soma of neurons, GRs was located in both the cytosol and the nucleus as well as in dendrites. Primary mouse hippocampal neurons were treated with different concentrations of CORT and the degree of dendritic growth was measured by Sholl's analysis. In a dose-dependent manner, CORT decreased the degree of dendritic arborization in the hippocampal neurons. Cotreatment with OT attenuated the atrophic effect of CORT on dendritic branching. However, in the presence of a MEK inhibitor, OT failed to rescue neurons from CORT-induced atrophy. These results suggest that OT prevents corticosterone-induced dendritic atrophy of primary mouse hippocampal neurons via MAPK signaling. (No conflict of interest)

10. 希少糖 D-タガトースと D-ブシコースの口腔内細菌に対する増殖抑制効果

永峰優一¹, 小川尊明¹, 三宅 実¹, 神鳥和代², 山口文徳², 徳田雅明² (¹香川大学医学部歯科口腔外科学講座, ²同 細胞情報生理学講座)

[背景と目的]我々は、希少糖 D-タガトース, D-ブシコースの様々な生理作用の解明のための研究をしてきた。口腔領域においては、う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* に対する希少糖の作用について研究を進めた。今回、被験

者より採取した唾液中の *S.mutans* やその他の口腔内細菌に対する作用について、検証した。

[材料と方法] 口腔内細菌を全般的に培養できる BHI 培地と、*S.mutans* を選択的に培養できる MSB 培地に、D-タガトース, D-ブシコースを 2.5% または 5.0% 添加した寒天培地を作成した。対照として糖を無添加の培地と、*S.mutans* に効果があるとされているキシリトールを含む培地を用いた。被験者 10 名より唾液を採取後、培地に塗布し、好気、嫌気の 2 条件で培養を行った。

[結果] D-タガトースと D-ブシコースを添加した培地では、嫌気、好気条件ともに、コントロール、キシリトールを添加した培地に比べ、コロニー数が抑制された。5.0% D-タガトース, D-ブシコースを加えた培地における、コントロールと比較した抑制率は、BHI 培地 (好気条件) で、それぞれ $94.2 \pm 6.0\%$, $90.0 \pm 6.0\%$, MSB 培地 (嫌気条件) で、それぞれ $79.9 \pm 12.6\%$, $77.3 \pm 11.7\%$ であった。

[まとめ] D-タガトースと D-ブシコースは、2.5% や 5.0% の比較的低濃度で増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。BHI, MSB の好気、嫌気条件ともに増殖抑制作用を示し、*S.mutans* のみならず、歯周病原菌など、他の口腔内細菌に対しても広く増殖抑制作用を示すことが示唆された。(利益相反 なし)

11. 持久運動が高インスリン血症を伴う肥満の脂質代謝と骨格筋内毛細血管に及ぼす影響

藤田直人¹, 青野沙紀¹, 唐崎航平¹, 世羅布実¹, 黒瀬智之¹, 藤野英己², 浦川 将¹ (¹広島大学大学院医歯薬保健学研究科, ²神戸大学生命医学系保健学域)

肥満の特性に応じた運動処方最適化を図るべく、高インスリン血症に対する運動の影響を検討した。本研究では、持久運動が高インスリン血症を呈する肥満の脂質代謝に及ぼす影響を骨格筋内毛細血管に着目して検証した。高インスリン血症を伴う肥満モデルとして 18 週齢の OLETF ラット (OLETF) 及び非肥満の LETO ラット (LETO) を用いた。各ラットは運動群と非運動群に区分し、運動群にはトレッドミルを用いた持久運動を 1 日合計 60 分、週に 5 回の頻度で 4 週間実施した。OLETF のヒラメ筋の VEGF mRNA 発現量と毛細血管密度は LETO に比較して有意に高値を示した。一方、ヒラメ筋の NOS 活性は、OLETF と LETO の間に有意差を認めなかった。運動は OLETF のヒラメ筋の NOS 活性に顕著な影響を与えなかったが、VEGF mRNA 発現量と毛細血管密度を有意に減少させた。OLETF の精巣上体脂肪量と肝臓トリアシルグリセロール (肝 TAG) 量は LETO に比較して有意に高値を示した。運動は OLETF の精巣上体脂肪量を減少させるには至らな

かったが、肝 TAG は有意に減少させた。持久運動が脂肪組織よりも肝臓における TAG を優先的に減少させたことには、骨格筋内毛細血管密度の増加に伴うリポ蛋白質リパーゼの活性化と、それによる TAG の分解促進が関与した可能性がある。(利益相反 なし)

12. 豊かな環境飼育が parvalbumin 陽性ニューロンと perineuronal nets に与える影響—脳領域の違いによる影響の検討

越智亮介¹、藤田直人¹、黒瀬智之¹、西丸広史²、小野武年²、西条寿夫²、浦川 将^{1,2} (¹広島大学大学院医歯薬保健学研究科、²富山大学大学院医学薬学研究部)

運動や社会性などの多様な刺激を含む豊かな環境で動物を 5 週間飼育すると、扁桃体基底外側核 (BLA) の parvalbumin (PV) 陽性ニューロンが増加する (Urakawa et al., 2013)。PV 陽性ニューロンの周囲には、perineuronal nets (PNNs) と呼ばれる細胞外基質が形成される。PV 陽性ニューロンと PNNs には関連があり、PNNs を除去すると PV の発現強度が減少する (Yamada et al., 2015)。前頭前野では、1 日間の豊かな環境飼育による PNNs の変化が報告されている (Slaker et al., 2016)。しかし、BLA では、PNNs に対する豊かな環境飼育の影響は不明である。よって、豊かな環境飼育が PV 陽性ニューロンや PNNs に与える影響は、飼育期間や脳領域の違いによって異なる可能性があるが、十分に検証されていない。本研究では、短期間の豊かな環境飼育が PV 陽性ニューロンと PNNs に与える影響を調べるために、25 日齢の Wistar 系雄ラットを豊かな環境で 1 週間飼育し、BLA と扁桃体外側核 (LA)、海馬 CA1 area (CA1) における PV 陽性ニューロンと PNNs を組織学的に解析した。1 週間の豊かな環境飼育により、LA における PNNs は減少した。また、CA1 における PV 陽性ニューロンと PNNs が減少した。一方、CA1 では、PNNs に囲まれた PV 陽性ニューロンの割合が増加した。以上の結果は、1 週間の豊かな環境飼育が脳領域によって PV 陽性ニューロンと PNNs に異なる影響を与えることを示唆している。今後、5 週間など、長期飼育の影響を解析する予定である。(利益相反なし)

13. 慢性ストレスにおける睡眠・代謝異常と肥満細胞の関係

谷岡大輔¹、近久幸子¹、原田紗希^{1,2}、清水紀之¹、志内哲也¹、大塚愛理¹、勢井宏義¹ (¹徳島大学大学院医歯薬学研究部統合生理学分野、²徳島大学医学部 Student lab)

肥満細胞は、炎症やアレルギー反応などの生体防御に重要な役割をもつ。さらに、最近では肥満細胞はストレス等

の刺激により数が変動することや、肥満や糖尿病の代謝異常にも関与することが報告されている。これまでの研究で我々は、肥満細胞が睡眠の制御に重要な役割を持つことを明らかにした。そこで、我々は慢性的に軽度なストレスを受けるモデルマウスを作製し、これを用いて、糖代謝と睡眠における肥満細胞の役割を明らかにするため実験を行った。ストレスモデルマウスは、10 週齢 ICR 雄性マウスを 3 週間金網飼育することで作製した。糖代謝能を測るために糖負荷試験を行い、睡眠を調べるため睡眠記録を行った。その結果、慢性的に軽度なストレスを受けたマウスは、耐糖能異常を示した。そして、このストレスモデルマウスでは、睡眠総量の減少や、睡眠の深さの指標となるノンレム睡眠時の slow-wave activity (SWA) の減弱、及び睡眠の断片化が引き起こされた。ヒスタミン H1 受容体アンタゴニストを投与すると、糖代謝とノンレム睡眠時の SWA が改善されたが、睡眠薬のベンゾジアゼピン系薬物の投与では、糖代謝も SWA も改善されなかった。また、このモデルマウスでは、脂肪組織と脳組織において肥満細胞の増加が認められた。肥満細胞阻害剤の投与により糖代謝異常と睡眠異常は改善された。これらのことから、ストレスモデルマウスの示す代謝異常や睡眠変化は肥満細胞の増加を介する可能性が高いと考えられる。これらの発見は、肥満細胞が睡眠や代謝調節において病態生理学的役割を担っていることを示唆している。(利益相反 なし)

14. 視床下部室傍核の CRF ニューロンの脳内投射部位の特定とその機能

堀尾修平 (徳島大学大学院医歯薬学研究部分子情報薬理学)

視床下部室傍核 (PVH) の CRF ニューロンは内分泌ニューロンとして正中隆起に投射する一方で、脳内の様々な部位にも神経線維を送っている。すなわち、PVH の CRF ニューロンには様々なタイプのニューロンが存在し、それらは別々の機能を担うと考えられる。従来の研究方法では、それらのタイプを区別し同定することは容易ではなかった。本研究では、PVH の CRF ニューロンをその脳内投射部位に従って細分類するという新しい試みを行なった。

第 1 に、PVH の CRF ニューロンの投射部位を明らかにした。CRF-Cre マウスの PVH に、Cre recombinase (Cre) 依存性に GFP と小麦胚芽レクチン (WGA) を発現するウイルスベクターを注入し、CRF ニューロン選択的に GFP と WGA を発現させた。GFP により投射経路を、WGA により投射 2 次ニューロンを調べた。主として、孤束核、腕傍核、青斑核、縫線核、視床下部外側野への投射がみられた。

第 2 に、それらの投射部位ごとに Cre 依存性に GFP を発現する逆行性ウイルスベクターを注入し、PVH の CRF ニューロンに GFP を発現させた。これらの GFP 発現ニューロンは、特定の脳部位に投射する CRF ニューロンと考えられる。明らかに、投射部位によって CRF ニューロンの分布が異なっており、またこれらは、ほとんど神経内分泌ニューロンではなかった。

第 3 に、投射部位に Cre 依存性に機能分子を発現する逆行性ウイルスベクターを注入し、CRF ニューロンに機能分子（テタヌトキシン）を発現させ、そのニューロンの生理機能を調べることが可能である。

以上の方法により、PVH の CRF ニューロンを細分類し、その経路を正確に辿り、生理機能を調べることが可能である。（利益相反 なし）

15. 海馬 CA1 野における新規の短期可塑性—paired burst facilitation (PBF)

富永貴志, 富永洋子 (徳島文理大学神経科学研究所)

The theta oscillation (4-8Hz) is a pivotal form of oscillatory activity in the hippocampus that is intermittently concurrent with gamma (25-100Hz) burst events. In in vitro preparation, a stimulation protocol that mimics the theta oscillation, theta burst stimulation (TBS), is used to induce long-term potentiation. Thus, TBS is thought to have a distinct role in the neural network of the hippocampal slice preparation. However, the mechanisms that make TBS uniquely induce such neural circuit modifications are still unknown. Using electrophysiology and voltage-sensitive dye imaging (VSDI), we have found that TBS induces augmentation of spike firing. The augmentation was apparent in the first couple of brief burst stimulation (100Hz four pulses) on a TBS-train in a presence of NMDA receptor blocker (APV 50 μ M). In this study, we focused on the characterises of the NMDA-independent augmentation caused by a pair of the brief burst stimulation (the first pair of the TBS; PBS). We found that PBS enhanced membrane potential responses on VSDI signal and intracellular recordings while it was absent in the current recording under whole-cell clamp condition. The enhancement of the response accompanied the augmentation of excitatory postsynaptic potential (epsp) to spike firing (E-S) coupling. The paired burst facilitation (PBF) reached a plateau when the number of the first burst stimulation (priming burst) exceeds three. The interval between the bursts of 150 ms resulted in the maximum PBF. Gabazine (a GABAA recep-

tor antagonist) abolished PBF. The threshold for spike generation of the postsynaptic cells measured with a current injection to cells was not lowered by the priming burst of PBS. These results indicate that PBS activates the GABAergic inhibitory system to cause short-term E-S augmentation without raising postsynaptic excitability. We propose that a GABAergic inhibitory system of area CA1 of the hippocampus produce the short-term E-S plasticity that could cause exaggerated spike-firing upon a theta-gamma activity distinctively, thus making the neural circuit of the CA1 act as a specific amplifier of the oscillation signal. (No conflict of interest)

16. 脳梗塞後のリハビリテーションによる下降性脊髄路の再構成

岡部直彦, 氷見直之, 中村恵美, 林 範人, 成田和彦, 宮本 修 (川崎医科大学生理学 2)

リハビリテーション (リハビリ) による機能回復のメカニズムとして、脳梗塞後に残存した神経細胞が軸索や樹状突起の形態を変化させることにより既存の神経回路を再構成することが考えられている。当研究室ではこれまでの研究で、巧緻作業によるリハビリが皮質脊髄路の軸索リモデリングを促進することにより、運動機能を回復することを明らかにした。しかし、巧緻作業による軸索リモデリングは梗塞側の脳皮質でのみ促進され、一次・二次運動野の全体を破壊するような重度の脳梗塞では機能回復を改善できなかった。そこで、今回の実験では幾つかのリハビリ法を重度の脳梗塞モデルに施すことにより、巧緻作業訓練とは異なる効果が機能回復及び神経回路再構成に見られるかを調べた。

実験はラットの、一次・二次運動野の両方を破壊する梗塞を作成したのち巧緻作業訓練 (Reach)、拘束誘導運動療法 (CIMT)、有酸素運動 (Run)、協調運動 (Rotarod) のいずれかのトレーニングを 3 週間行い、その後さらに巧緻作業訓練によるトレーニングを 1 週間行った。また、トレーニング終了後に逆行性トレーサーを脊髄に注入し、下降性脊髄路の軸索リモデリングを調べた。

この実験の結果、4 つの訓練のうち CIMT のみが巧緻作業における運動機能を有意に改善した。また、組織学的解析において、CIMT は梗塞側一次運動野の皮質脊髄ニューロンを増加させたが、他の脳領域 (健常側脳皮質、中脳、間脳、延髄) ではいずれの訓練も有意な変化を示さなかった。これらの結果はリハビリによる機能回復は訓練の種類に関わらず、梗塞側脳皮質の皮質脊髄経路に大きく依存していることを示していると考えられる。(利益相反 な

し)

17. 甘味とニオイのミスマッチが甘味認知に与える影響

前田さおり^{3,4}, 宮地裕司^{3,5}, 金山宏幸^{3,6}, 長谷川敬展¹, 姚 陳娟¹, 赤松徹也^{1,2}, 吉村 弘¹ (徳島大学大学院医歯薬学研究所口腔分子生理学分野,²同 社会産業理工学研究部生体分子機能学分野,³同 口腔科学教育部,⁴梅花女子大学看護学部口腔保健学科,⁵大阪人間科学大学人間科学部医療心理学科,⁶大阪急性期・総合医療センター歯科口腔外科)

【目的】食べ物の味とニオイは美味しさに大きく関わるが、これらの感覚は、記憶を呼び起こしたり、感情を動かしたりする。大脳皮質味覚野と嗅覚野はともに大脳辺縁系と強い連絡があり、そのため記憶や感情と深い関係にあると考えられている。それぞれの食物が持つ本来の味とニオイの組み合わせは経験により獲得されるが、それらが一致しなかった場合、脳内情報処理過程に影響が出ると考えられる。そこで、実際に感じる味と脳波の発現様式を指標に味覚認知に対する嗅覚刺激の影響を検証した。

【方法】簡易脳波計測装置を用いて被験者の前頭部より脳波計測を行った。チョコレートに口を含んだ状態でニオイ刺激をおこなった。エアー(コントロール)、チョコレート(マッチ刺激)、ニンニク(ミスマッチ刺激)をニオイ刺激として用いた。計測終了後に、実際に感じた甘味の程度を聞き取りし、スコア化した。計測した脳波は、アルファテック IV を用いて周波数分析をおこない、各周波数帯について出現比率を求めた。その後、主観的味覚スコアとの相関を検討した。

【結果】脳波の各周波数帯の出現比率と甘味スコアについて、ニオイと味のマッチの場合に比べてミスマッチの場合、甘味スコアが低下し、 θ 波帯の出現比率が増大する傾向が見られた。また、甘味を強く感じるほど α 波帯の出現比率がわずかではあるが増大する傾向にあった。

【考察】今回、甘味に注目して、味覚認知に対する嗅覚刺激の影響を検証した。「ニオイと味の一致」時に、記憶想起的な精神作業で α 波の占有率高くなり、「ニオイと味の不一致」時においては、味と匂いの記憶のミスマッチという違和感が生じ、「ニオイ」の記憶から「味」を想起させるという精神活動が高まり、 θ 波の占有率が高くなったという仮説が考えられる。(利益相反 なし)

18. ラット皮質前頭前野の電気刺激は副交感神経を介する口唇領域の血管拡張を引き起こす

浅原亮太^{1,2}, 松川寛二¹ (1) 広島大学大学院医歯薬保健学

研究科生理機能情報科学研究室, (2) 日本学術振興会)

ヒトの快情動を動画視聴刺激で誘発した際に、顔面皮膚血流量が減少することを報告した(Matsukawa et al. *J Physiol Sci* 2017)。この快情動刺激は、皮質前頭前野の脳血流量を減少させ、その応答は顔面皮膚血流量減少と相関を持つことを明らかにした(Matsukawa et al. in submission)。前頭前野の脳活動低下が顔面皮膚血流量の減少を引き起こした可能性がある。しかし、皮質前頭前野領域が顔面皮膚血流量の制御の役割を担っているか否かは、ヒトならびに動物でも明らかでなかった。本研究では、麻酔下ラットの皮質前頭前野領域を電気刺激した際に、口唇領域の皮膚血流量が変化するかを調べた。皮質表面から3-4mm深部に位置する prelimbic area を電気刺激した際には、口唇皮膚血流量は変化しなかった。皮質表面から4-5.5mm深部に位置する infralimbic area を刺激すると、口唇皮膚血流量が増加した。さらに、この増加はアトロピンの静脈内投与により消失した。この結果は、皮質前頭前野が顔面皮膚血流量の制御の役割を担う可能性を示唆した。(利益相反 なし)

19. 快情動の映像刺激は皮質前頭前野の酸素化ヘモグロビン濃度を減少させる

松川寛二¹, 遠藤加菜¹, 吉川美穂¹, 浅原亮太^{1,2}, 楠信哉¹ (1) 広島大学大学院医歯薬保健学研究所生理機能情報科学研究室, (2) 日本学術振興会)

ヒトの快情動を動画視聴刺激で誘発した際に、顔面皮膚血流量(特に口唇領域の皮膚血流量)が減少することを報告した(Matsukawa et al. *J Physiol Sci* 2017)。他方、動脈血圧・心拍出量・末梢血管抵抗など全身循環動態や手背・前腕の皮膚血流量には大きな変化は観察されなかった。この所見は、快情動が顔面皮膚血流量の減少として特異的に捉えられることを示唆した。今回、近赤外分光法(NIRS)を用いて感情・情動と関係する高次中枢の一つである皮質前頭前野の酸素化ヘモグロビン濃度変化を記録し、快情動刺激による前頭前野の局所組織血流量の応答を解析した。そして前頭前野の組織血流量応答が顔面皮膚血流量の減少と相関するか否かを調べた。その結果、前頭前野酸素化ヘモグロビン濃度は快情動の刺激時に減少し、この変化は顔面皮膚血流量の減少と正の相関関係($P < 0.05$)を示した。以上より、皮質前頭前野の脳活動は顔面皮膚血流量の制御に影響を及ぼすこと、そしてその脳活動変化は快情動にともなう顔面皮膚血管の収縮に関与する可能性が示唆された。(利益相反 なし)

20. 脊髄損傷ラットの下腿骨格筋電気刺激による運動

機能改善の可能性とメカニズムの検討

林 範人^{1,2}, 氷見直之¹, 丸山恵美¹, 岡部直彦¹, 長谷川 徹², 宮本 修¹ (¹川崎医科大学生理学², ²同 整形外科学)

【目的】近年、脊髄損傷後のトレッドミルによる歩行運動が運動機能を改善するという報告がなされているが、詳細な機序は未だ明らかではない。本研究では骨格筋の収縮そのものが逆行性の経路を通して脊髄における神経栄養因子の産生亢進と軸索再生を引き起こし、その結果運動機能の改善が起こるとする仮説を立て、その検証を行った。

【方法】Sprague-Dawley の雄ラット (8 週齢) の胸椎 T9 の椎弓を切除し、25mm の高さから先端径 2mm, 20g の重りを落下させ脊髄損傷 (SCI) ラットを作製した。骨格筋の収縮は脊髄損傷直後から両下肢を経皮的に電気刺激 (ES) することで生じさせた (刺激強度: 10mA, 2Hz, 刺激時間: 10 分/日×週 5 日×4 週間)。ラットは SCI 群, SCI+ES 群, Sham 群の 3 群に分けた。運動機能は Basso-Beattie-Bresnahan Locomotor Scale (BBB スコア)、傾斜台試験、Rotarod 試験で評価し、傷害の程度は損傷 4 週間後の脊髄矢状断の組織切片を用いて空洞体積を計測し評価した。また、損傷 1 週間後に損傷中心部および頭尾側 5mm, 10mm の脊髄水平断切片を用いて、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の免疫染色を行い、脊髄灰白質の BDNF 陽性細胞の密度を比較した。データは平均値±SEM で表し、空洞体積は Mann-Whitney の U 検定、その他は Kruskal-Wallis (Steel Dwass 多重比較) で統計評価を行った。

【結果】損傷 4 週間後の BBB スコアの平均値は SCI 群 (n=16) と SCI+ES 群 (n=10) との間に有意差を認めた (それぞれ、 6.37 ± 1.3 と 17.4 ± 1.3 , $p < 0.001$)。傾斜台試験の平均角度についても、SCI 群 (n=12) と SCI+ES 群 (n=10) との間に有意差を認めた (それぞれ、 60.8 ± 2.4 と 79.0 ± 3.8 , $p = 0.004$)。一方、Rotarod 試験の平均走行時間については SCI 群 (n=7) と SCI+ES 群 (n=7) とで有意差を認めなかった。また、損傷 4 週間後の空洞体積は、SCI 群 (n=5) に対して SCI+ES 群 (n=5) で縮小傾向は見られたが有意差は無かった。損傷 1 週間後の BDNF 陽性細胞の平均密度 (個/mm²) は SCI 群 (n=5) と SCI+ES 群 (n=5) とで有意差を認めた (それぞれ、 15.8 ± 1.6 と 24.5 ± 2.6 , $p = 0.032$)。

【結論】脊髄損傷ラットに対する下肢骨格筋の経皮的電気刺激は、損傷早期からの実施が可能であり、損傷後の運動機能の改善に効果があることが示され、そのメカニズムとして BDNF の関与が示唆された。(利益相反 なし)

21. 脳内ノルアドレナリンによるマイクログリアの機能調節

宇都宮 諒, チョードリ EM, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学講座)

我々は、脳常在性マクロファージであるマイクログリアがアドレナリン受容体を発現し、 $\alpha 1$ および $\beta 2$ 受容体を介して抗炎症作用や、増殖抑制作用を受けることを示してきた。今回、我々は生体内でのノルアドレナリン (NA) のマイクログリアへの影響を検討するために、神経毒 N-(2-クロロエチル)-N-エチル-2-プロモベンジルアミン (DSP-4) をウイスターラットに投与し、脳内 NA 作動性ニューロンを選択的に除去した。行動実験では、DSP-4 投与群で有意な行動量の減少と不安様行動が観察された。また、DSP-4 投与群では、フローサイトメトリーにおいて脳内マイクログリアの割合が有意に増加しており、マイクログリアマーカーである CX3CR1 の発現量にも増加が見られた。そこで、DSP-4 投与群に、マイクログリアに対し抑制作用をもつ合成コルチコイド、デキサメタゾン (Dex) を投与し、同様の行動実験を行った。結果、Control 群に比べて DSP-4 投与群では、行動量が有意に上昇し、不安様行動にも改善が見られた。以上の結果から、NA の減少によるマイクログリアの増加がラットの行動異常に関与しており、マイクログリアを抑制することで行動異常が改善されることが示唆された。今後、これらの分子機序について、研究を進めていきたい。(利益相反 なし)

22. 高齢ラット脳内における、マイクログリアをはじめとするグリア細胞の変化

藤田滉大, EM チョードリ, 木上侑香, 武田遥奈, 佐藤安里紗, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学系研究科分子細胞生理学講座)

加齢に伴いラットもヒトと同様、脳機能の低下が生じる。今回我々は、22 ないし 24 ヶ月齢のラットを用い、その学習記憶能力の低下を脳内グリア細胞を中心とした脳内の細胞構築の変化と関連づけようとする研究を行った。

まず、高齢ラットにおいて学習・記憶能力の低下が確認された。高齢ラットの脳凍結切片を作成、グリア細胞及び神経細胞マーカーを染色し、共焦点顕微鏡等で観察した。高齢ラット大脳皮質では層構造がやや崩れているほか、GFAP 陽性のアストロサイトの増生が顕著であった。マイクログリアは数が減少し、突起が乏しくなっていた。オリゴデンドロサイト前駆細胞である NG2 グリアも突起が乏しく、数の減少が見られた。フローサイトメトリー (FACS) やウエスタンブロッティングによってさらに検討した。FACS では、高齢ラットではマイクログリアの数が減少す

る一方で細胞の大きさが大きくなり、おそらくは活性化していると思われた。M1 型マイクログリアマーカーたる CD 86 を発現しているマイクログリアの割合は有意に増加していた。ウエスタンブロットングでは、NG2 プロテオグリカンの減少が確認できた。

高齢ラットではマイクログリアの数が低下し、残存するマイクログリアが活性化していると思われたが、その活性化の度合い、起炎症性の有無等の活性の質を調べる事で、老化した脳内環境におけるマイクログリアの振る舞いについて明らかにしていきたい。(利益相反 なし)

23. 脳損傷増悪因子としての浸潤白血球と活性化マイクログリア：催眠鎮静薬プロモフレリル尿素を用いた解析
田中潤也, 阿部尚紀, チョードリ EM, 渡辺みのり, 矢野 元 (愛媛大学医学研究科分子細胞生理学講座)

脳梗塞や脳損傷など重症脳傷害では、血流中からの大量の白血球の浸潤と脳常在性マクロファージであるマイクログリアの活性化が生じる。これらはともに、重症脳傷害の予後を増悪させる細胞としてその制御方法の開発に多くの力が注がれてきた。

我々は、古典的な催眠鎮静薬であるプロモフレリル尿素 (BU) の抗炎症作用に注目してきた。今回ラット針刺し脳損傷モデルに対し、損傷作成後より BU の皮下注射 (急性期 1 回) および経口投与を 1 週間続けた。その結果、2 ヶ月後の脳損傷による脳組織喪失体積が大きく縮小し、空間認知能力、記憶力が改善し、CCL2 や起炎症性サイトカインの発現は BU 投与群で持続的に抑制されていた。FACS により、BU 投与による傷害組織への単球、好中球の集積抑制が示された。FACS による解析を通じて、マイクログリアはサイズの違いにより Large (L), Medium (M), Small (S) に分類でき、L マイクログリアは、マクロファージよりも活性酸素産生能が高いことを見出した。BU 投与は L マイクログリアの数を抑制し、M マイクログリアを増やしていた。これらは、マイクログリアの活性化を BU が抑制したことを示している。実際に、脳損傷組織周辺での酸化ストレス障害の程度を 8OHdG 定量により検討したところ、BU 投与群では、8OHdG は、対照群と同程度まで抑制されていた。今回の結果は、脳損傷においては、白血球の浸潤抑制のみならず、マイクログリアの脳傷害的活性化を抑制することが重要であることを示している。(利益相反 なし)