

1. マイクログリア起炎症反応へのグルタミン代謝系の関与についての解析

山口輝昌, 武田遙奈, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学医学部分子細胞生理学講座)

<研究目的と背景>

近年, アルツハイマー病や脳虚血後の二次変性などにおいてマイクログリアの過剰な起炎症反応が病態を増悪させている可能性が示唆されている. これらの病態の進行抑制のためにマイクログリアの起炎症反応を制御するという治療が考えられる. 今般, 我々はマイクログリアの起炎症反応においてグルタミン代謝が重要であることを見出し, 解析を行った.

<方法>

マウスマイクログリア細胞株の BV2 細胞を用いて解析を行った. BV2 を Lipopolysaccharide (LPS) により刺激した. この際にグルタミン含有培地 (グルタミン (+)) と不含培地 (グルタミン (-)) での BV2 の起炎症反応と細胞内でのグルタミン代謝状況について比較検討した.

<結果と考察>

グルタミン (+) では LPS 刺激により顕著な Nitric oxide (NO) 産生が認められるが, グルタミン (-) では LPS 刺激による NO 産生は大きく低下する. このことから BV2 での起炎症反応では細胞外からのグルタミン取り込みが必須であると考えた. グルタミンは細胞内ではまずグルタミン酸に代謝されることから, 細胞内グルタミン酸濃度を測定した. グルタミン (+) では LPS 刺激により一過性にグルタミン酸濃度が上昇するものの, グルタミン (-) ではその上昇は認められなかった. また, グルタミン代謝経路の中でグルタチオンを介した経路が BV2 の起炎症反応に影響を与えうることを示唆する結果も得た. 現在, BV2 での起炎症反応メカニズムと, ストレス応答転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor 2) との関与についても解析を進めており, これについても議論したい. (利益相反 なし)

2. プロモバレリル尿素の睡眠作用・抗炎症作用の解析

武田遙奈¹, 吉村由美子², 中島芳浩³, 山口輝昌¹, 佐藤安理沙¹, 木原奈那子¹, ME Choudhury¹, 矢野 元¹, 田中潤也¹ (愛媛大学医学部医学系研究科分子細胞生理学講座, ²自然科学機構生理学研究所視覚情報処理研究部門, ³四国産業技術総合研究所)

古典的催眠・鎮静薬であるプロモバレリル尿素 (BU) は, 様々な炎症性疾患の動物モデルにおいて, マイクログリア・マクロファージの起炎症性活性化を抑制して病態を改善する. その睡眠作用・抗炎症作用の作用点は明らかでなかったが, 今般有望な展開を見たので報告する.

①スライスパッチクランプ法を用いた検討により, BU は GABA A 受容体に結合し, 睡眠を誘発することが示唆された.

②Nrf2 (NF-E2-related factor 2) は, 抗炎症・抗酸化作用を持つ転写因子であり, 定常状態では Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) によるユビキチン化により, プロテアソーム分解による抑制制御を受けている. BU は Nrf2 のタンパクの安定化, 核内移行を促進し, Nrf2 の標的配列である Antioxidant Responsive Element の転写活性を有意に増強した. 連動して, 起炎症性メディエーターの産生抑制, Nrf2 の下流遺伝子群の発現上昇が見られた. 一方 Nrf2 のノックダウンは, BU の起炎症性メディエーター産生抑制効果を打ち消した. また BU が Nrf2 のユビキチン化を抑制する一方で Keap1 発現に影響を与えなかったことから, Keap1 阻害を通じて Nrf2 の安定化を引き起こすことで抗炎症メカニズムを担っていると考えられた.

抗炎症作用が得られる濃度は, 睡眠作用を示す濃度よりも低いため, 副作用の少ない抗炎症薬としての臨床応用が今後期待される. (利益相反 なし)

3. 頭頸部がん患者血清エクソソーム画分に局在する細胞外基質再構成因子 LOXL2 のがん転移への関与

矢野 元¹, 谷本玲奈¹, 吉光 華¹, 真田朋昌², 上田哲平², 羽藤直人², 田中潤也¹ (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学講座, ²愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座)

リジルオキシダーゼ酵素ファミリーはリジン残基のアミノ基に対するデアミナーゼとして働くことから, 種々のタンパク質の架橋構造を形成することに寄与する. 分泌性であることから, 特にコラーゲンやエラスチンなどの細胞外基質タンパク質の架橋構造形成を通じて, 細胞外基質構造の再構成因子と目されており, その知見も蓄積している. LOXL2 (lysyl oxidase-like 2) は同ファミリーの一員で, 遺伝子バンクの annotation において「分泌性」とされている.

われわれは頭頸部がんのリンパ節転移における責任因子の検索において, 遺伝子発現プロファイリングにより LOXL2 を見出し, さらにその遺伝子産物のエクソソーム画分への濃縮を観察した. このことは培養細胞のみならず患者血清においても観察され, とくに比較的早期ステージの頭頸部がんにおいて, 含量が高い傾向も見出した.

現在, 「LOXL2 ががんの転移に先立って転移標的の微小環境を再構成し, 腫瘍細胞の生着を容易ならしめ, したがってその存在が転移の危険性を示す指標足り得, さらには転移を阻害する治療標的の足る」という仮説に立ち, その蓋然性の検証を進めている.

ルシフェラーゼ標識したエクソソーム様画分の体内動態、およびエクソソームマーカーであるCD9, 63, 81 とのLOX12の共局在の様子など、最近の知見について議論したい。(利益相反 なし)

4. 冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* の肺高血圧症改善効果

平石敬三¹, 倉原 琳¹, 石川かおり², 平野勝也¹ (¹香川大学医学部自律機能生理学, ²同 総合内科学)

背景

肺高血圧症 (PH) は、肺動脈の過収縮とリモデリングにより肺血管抵抗が進行性に上昇し、やがて右心不全をきたす難治性の血管病である。TRPM7 チャンネルは、炎症や組織リモデリングに関与することが知られている。昆虫病原性真菌である冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (OCS) は、増殖や組織リモデリングに対して抑制作用をもつ。本研究では OCS の PH 病態改善効果を検討し、TRPM7 チャンネルの関与を検討する。

結果

OCS は、モノクローリン誘導 PH ラットの肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧の上昇、右室肥大を改善した。TRPM7 ノックアウトマウスを用いたモノクローリンピロール誘発 PH モデルでは、野生型と比較して右室収縮期圧が有意に低く、肺動脈の筋性化が減弱した。PH ラット及び PH 患者の肺動脈肥厚病変や叢状病変部位に TRPM7 チャンネルの発現が観察された。OCS は、肺動脈平滑筋細胞において TRPM7 チャンネルの特性を持つ電流を抑制し、肺動脈内皮細胞において TGF- β 2 が引き起こす内皮間葉転換、IL-6 による STAT3 のリン酸化、PDGF による Akt のリン酸化を抑制し、PH 患者由来肺動脈平滑筋細胞の増殖を抑制した。ヒト正常肺動脈摘出標本において OCS は血管弛緩を引き起こした。

結論

OCS は PH の病態改善効果を発揮する。その作用の一部は TRPM7 チャンネル活性の抑制を介する可能性がある。(利益相反 なし)

5. 糖質コルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストン単独の脂肪細胞分化促進作用

橋本 剛, 平野勝也 (香川大学医学部自律機能生理学)

【目的】

脂肪細胞分化の研究において、マウス由来線維芽細胞 (3T3-L1 細胞) を前駆脂肪細胞として、Insulin, Dexamethasone, Isobutylmethylxanthine の3剤を同時添加することにより成熟脂肪細胞へ分化誘導するモデルが汎用されてき

た。一方、糖質コルチコイドには、急性暴露による末梢の脂肪分解作用 (異化作用) と慢性暴露による体幹部の脂肪沈着作用 (同化作用) の2つの相反する作用が知られている。脂肪細胞の分化における糖質コルチコイドの役割には不明な点が残る。本研究は、3T3-L1 細胞およびマウス個体を用いて、糖質コルチコイド受容体拮抗薬ミフェプリストンの脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討した。

【方法】

脂肪細胞分化のマーカーの発現をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により解析した。脂肪細胞への分化は Bodipy493/503 蛍光染色により定量評価した。7週齢 C57BL/6NCrSlc 雄マウスに、ミフェプリストン含有普通食 (0.1, 1.0 and 30mg/kg 体重/日) を、自由摂食にて12週間与え、摂餌量、実体重を経時的に測定し、最終日に空腹時血糖値を測定した後、脂肪臓器を摘出し組織解析を行った。

【結果】

3T3-L1 細胞において、ミフェプリストンは、1)脂肪細胞分化マーカー遺伝子 aP2 の発現、2)脂肪滴の貯留、3) Adiponectin mRNA およびタンパク質の発現を、濃度依存的に増加させた。Adiponectin 中和抗体 (ANOC9104) および PPAR γ 阻害薬 (T0070907) の同時投与により、ミフェプリストンの効果は有意に抑制された。ミフェプリストン含有普通食で飼育したマウスは、対照群に比べ、1)空腹時血糖の上昇、2)実体重の増加、3)肝臓の湿重量比と脂肪滴の貯留、4)血清中高分子アディポネクチン比率の低下、5)精巢周囲脂肪組織、臀部皮下脂肪組織、腎臓周囲脂肪組織の重量の増加が認められた。しかしながら、腸間膜脂肪組織の重量には変化を認めなかった。

【結論】

ミフェプリストンは、培養細胞系において、アディポネクチンおよび PPAR γ 依存性に前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化を誘導する。個体においては、分化誘導作用は脂肪組織の種類に依存して異なることが示唆された。(利益相反 なし)

6. 母乳由来乳酸菌 Probio-M9 による炎症性発癌抑制作用の解析

倉原 琳¹, 平石敬三¹, Haiyan Xu², Heping Zhang², 平野勝也¹ (¹香川大学医学部自律機能生理学, ²Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural university, P.R. China)

背景

潰瘍性大腸炎は日本の指定難病中で患者数が最多で、炎

症の遷延により高い発癌リスクがあり、この過程における腸内細菌叢の役割が注目されている。一方、母乳育児の期間が長いほど、腸炎リスクが低くなることが報告されている。本研究は腸炎に伴う腫瘍形成に対する母乳由来乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* M9 (Probio-M9) の改善効果を検討した。

方法

6週齢の雄マウスにアゾキシメタン (AOM: 12mg/kg BW) を1回腹腔内投与し、2と4週目にデキストラン硫酸ナトリウム (DSS: 2%) をそれぞれ7日間飲水投与して炎症性発癌モデルを作成した (AOM/DSS グループ)。8と9週目に、Probio-M9 (2×10^9 個/日/マウス) をそれぞれ7日間経口投与し、AOM投与20週後に以下の解析を行った。免疫染色、免疫プロット、メタゲノム解析: 腸内細菌叢の α 多様性 (シャノン指数)、主座標分析 (PCoA)、および腸内細菌属と代謝経路の分布を比較した。

結果と考察

AOM/DSS グループでは、体重減少、下痢、腸の短縮、結腸腫瘍の数の増加、炎症スコア上昇、線維化、非腫瘍領域の漿膜下層の CD68⁺、CD163⁺ マクロファージ細胞の増加が観察された。Probio-M9 の投与は、腸内細菌叢多様性を増やし、炎症、線維化、発癌を抑制した。母乳由来乳酸菌に炎症性発癌の治療効果が示唆された。(利益相反なし)

7. 化学感覚情報処理におけるバソプレシンの作用—V1a 受容体を介したマウス副嗅球相反性シナプス電流に対する抑制効果

谷口睦男, 村田芳博, 山口正洋, 梶 秀人 (高知大学医学部生理学講座 (統合生理))

中枢性バソプレシンは、社会的認知の促進などは乳類における複雑な社会的行動に関与することが報告されている。バソプレシン受容体は副嗅球 (フェロモン情報の最初の中継核) にも発現しているが、この部位におけるシナプスレベルでの作用等は不明な点が多い。そこで我々はマウス副嗅球のスライス標本を作製し、whole-cell clamp 法を用いてバソプレシンが僧帽細胞—顆粒細胞間相反性シナプス電流に及ぼす効果を膜電位固定下で解析した。

細胞外 Mg^{2+} 非存在下で僧帽細胞に脱分極刺激を与えると、上記相反性シナプス由来の抑制性シナプス後電流 (IPSC) が生じる。各種バソプレシン V1 受容体作動薬および阻害薬を用いた実験から、IPSC が V1a 受容体を介して抑制されることを見いだした。

上記相反性シナプス伝達は、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性伝達と、顆粒細胞から僧帽細胞への

GABA 作動性伝達から形成されている。バソプレシンの上記相反性シナプスにおける作用点をさらに調べるため、グルタミン酸作動性伝達を CNQX (10 μ M) および AP5 (50 μ M) で遮断し、僧帽細胞の GABA (10 μ M および 100 μ M) に対する応答を測定した。バソプレシンの細胞外投与は、いずれの濃度の GABA 応答にも影響を与えなかった。このことは、バソプレシンの IPSC 抑制作用が顆粒細胞—僧帽細胞間 GABA 作動性シナプス伝達のシナプス後機構を介さずに生じることを示唆した。(利益相反なし)

8. The role of appetite-stimulating signaling molecules in the anteromedial olfactory tubercle in the odor-induced feeding behavior in mice

Md Monjurul Ahasan, Yoshihiro Murata, Mutsuo Taniguchi, Masahiro Yamaguchi (Department of Physiology, Kochi Medical School, Kochi University, Kochi, Japan)

Feeding is tightly coupled with olfaction, and odor-guided feeding behavior is regulated by neuromodulatory signals. The expression of feeding-related neuromodulatory signaling molecules were examined in the olfactory system including the olfactory bulb, olfactory tubercle (OT), and the other olfactory cortical area in mice, by quantitative real-time PCR. The OT was further divided into attraction-related anteromedial OT, aversion-related lateral OT and remaining central OT. Examination of 26 neuromodulatory molecules revealed that each molecule had different expression patterns and that many molecules showed higher expression in the OT, especially in the anteromedial and central OT. Among the molecules examined we first chose orexin, an orexigenic neuropeptide produced in the hypothalamus, for functional analysis because its receptor is abundantly expressed in the attraction-related anteromedial OT. We suppressed the orexin signaling in the OT region by the local injection of receptor antagonist. Compare to the vehicle injected mice, the antagonist injected mice showed reduced attraction to the cue odor associated with food reward, long latency approach to the cue odor during learning process and conversely exhibited odor avoiding behavior, indicating the crucial role of orexin signal in the odor-guided feeding behavior. (COI none)

9. ラット視床下部背側領域による歩行および循環反応の生成

奈良井絵美, 渡邊達生, 木場智史 (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より生じる遠心性神経シグナル (セントラルコマンド, CC) は, 体性運動神経系だけでなく自律神経系も制御すると考えられている. CC の機能生成に関わる脳領域は不明である. 本研究では, 視床下部背側領域 (DH) の刺激が CC 機能を生成するかを検討した. Sprague-Dawley 系成熟雄ラットの DH の両側にアデノ随伴ウイルスベクター液を注入して, DH 神経に青光感受陽イオンチャンネル ChR2 とレポータータンパク質 eYFP とを共発現させた. DH を照射標的とする光ファイバーを頭蓋骨に, また腹部大動脈圧を測定するテレメトリー送信機を腹腔内に留置した. ベクター液の注入から四週以上後, 自由行動ラットの DH を光遺伝学刺激した際の行動および循環反応を観察した ($n=6$). 両側 DH への二秒間の青光照射 (473nm 波長, 15-20mW) によって, 歩行および昇圧・頻脈が誘発された ($P<0.05$). 次にウレタン麻酔下で腎交感神経活動を観察した. DH への間欠的な青光照射 (0.5 秒オン・1.5 秒オフの繰り返し) に同期して, 交感神経活性が誘発された ($P<0.05$). これらの結果から, DH による CC 機能生成能が示唆された. ただし eYFP 陽性細胞は DH のみならずその周囲 (視床不確帯等) にも認められた. 調査領域を DH に限定した機能追求は今後の課題である. (利益相反なし)

10. 遺伝子改変動物を用いた孤束核グルタミン酸作動性ニューロンによる呼吸循環調節機構の解析

横田茂文¹, 武田湖太郎², 濱 德行³, 有馬陽介¹, 藤谷昌司¹, 岡田泰昌⁴ (¹鳥根大学医学部解剖学講座神経科学, ²藤田医科大学保健衛生学部リハビリテーション学科, ³鳥根大学医学部生理学講座神経筋肉生理学, ⁴独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部), 電気生理学研究室)

孤束核尾側部 (cNTS) には一般内臓性感覚情報が入力し, 脳内反射回路を形成することにより生体の恒常性を維持していると考えられる. とくに cNTS のグルタミン酸作動性ニューロン (cNTS/Glu ニューロン) は, 間欠低酸素刺激によって活性化することから, 呼吸および循環調節に関与することが考えられる. そこで本研究では, まず選択的神経路標識法により cNTS/Glu ニューロンの投射線維分布を解析した. cNTS/Glu ニューロンは延髄腹外側部 (VLM) および結合腕傍核 (PB) に密な終末野を形成し, VLM の終末野には横隔神経核 (PhN) 投射ニューロンおよびチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性ニューロンが, また, PB の終末野には VLM 投射ニューロンが認められた. 次に, 薬

理遺伝学を用いて cNTS/Glu ニューロンを興奮させると, 一回換気量は増大するが呼吸頻度に変化は認められず, 心拍数は減少するが血圧に変化はなかった. また, cNTS/Glu ニューロンの活性化は, 対照群と比較して多くの PhN 投射 VLM ニューロンおよび VLM 投射 PB ニューロンに Fos タンパク発現を認めた. さらに VLM に存在する TH 陽性ニューロンにも Fos タンパク発現の増加を認めた. 以上の結果より, cNTS/Glu ニューロンは, VLM に存在する PhN 投射ニューロンや TH 陽性ニューロンおよび PB に存在する VLM 投射ニューロンへ連絡することにより呼吸・循環調節を行っていることが示唆された. (利益相反なし)

11. 超高水圧加圧玄米の長期摂取は高齢者の骨密度低下を予防する

松崎健太郎¹, 矢野彰三², 住吉愛里¹, 紫藤 治¹, 勝部拓矢³, 田畑光正³, 奥田充顕⁴, 杉本八郎⁴, 吉野勝美³, 橋本道男¹ (¹鳥根大学医学部環境生理学講座, ²同 臨床検査医学講座, ³鳥根県産業技術センター, ⁴同志社大院脳科学研究科)

社会の高齢化が進み, 骨粗鬆症などの老人性疾患の予防・治療法の確立が待望されている. 玄米は白米に比べて各種ビタミン, ミネラル, γ アミノ酪酸, フェルラ酸など老人性疾患の予防に有効とされる物質が多く含まれている. しかし, 玄米は調理しにくく食べにくい, などの難点を有しており, 消費者から敬遠される傾向がある. 近年, 6000 気圧の水圧を印加して得られた超高水圧加圧玄米 (加圧玄米) が開発され, その機能性が期待されている. 本研究では, 加圧玄米の長期摂取が高齢者の骨密度に及ぼす効果について検証した. 鳥根県飯南町在住の健常高齢者 (平均年齢 73.1 歳) を対象とした. 対象者を白米摂取群 (白米群, 男性 8 名: 女性 12 名) と加圧玄米摂取群 (加圧玄米群, 男性 10 名: 女性 10 名) の 2 群にランダムに割り付けた. 加圧玄米群は 1 日あたり加圧玄米 100g と白米 100g の計 200g を, 白米群は 1 日あたり白米 200g をそれぞれ摂取した. 介入開始前と介入開始 12 ヶ月後に身体計測, 採血を行った. また, 骨密度の指標として踵骨の超音波透過速度 (SOS) を超音波骨量測定装置 (Venus α : 日本光電) で測定し, 骨梁面積率と若年成人平均値の割合 (%YAM) を算出した. 介入開始前における白米群と加圧玄米群の SOS, 骨梁面積率, %YAM に有意差は認められなかった. 介入開始から 12 ヶ月後における加圧玄米群の SOS, 骨梁面積率, %YAM は白米群に比較して有意に高かった. また, 介入開始前と 12 ヶ月後における各項目の変化値を解析したところ, 白米群では SOS, 骨梁面積率, %YAM は減少したが, 加圧玄米群ではこれらの値が有意に増加した. なお, 加圧玄米の長

期摂取は、身体所見や血液生化学所見に影響を及ぼさなかった。以上の結果より、加圧玄米の長期摂取は高齢者における骨密度低下を抑制し、骨粗鬆症の予防・改善に有効である可能性が示唆された。(利益相反 なし)

12. 迷走神経・体性感覚収斂皮質に投射する視床中継核

伊藤眞一(鳥根大学医学部生理学講座神経・筋肉生理学)

体性感覚皮質の辺縁部に2つの迷走神経投射野がある。口腔再現野の吻側(S1)と味覚皮質の尾背側(Ins)である。この2皮質には全身体表からの体性感覚(高域値)の投射もあり、誘発電位の層解析から、迷走・体性入力とも視床経由であることが示唆された。迷走神経入力と体性感覚入力は視床より下のどこかで収斂し、そののち分岐して2つの視床部位を経て皮質に投射するものと考えられる。本研究では、その視床部位を検討した。当該皮質にWGA-HRPを注入すると、それぞれ腹側基底核の別の所(後内側腹側核の腹内側端と後外側腹側核の腹内側端)に標識細胞が現れた。これらの近傍で、体性感覚刺激に対する応答を検索すると、それぞれに高閾値の身体再現が示唆された。これらの部位が迷走・体性感覚入力を各皮質へ中継するものと考えられる。次いで、これらの部位の刺激に対する皮質応答を検索した。視床微小刺激と皮質電場電位マッピングの組合せでは、視床と皮質の双方で電極を動かすため時間がかかってうまくいかず、皮質応答の検索に電位感受性色素による光学的マッピングを導入した。現在、末梢体性刺激で2皮質に限局して応答が出現することが確認でき、視床微小刺激を始めようとしているところである。(利益相反なし)

13. マウス孤束核興奮性ニューロンによる呼吸調節機構の解析

濱 德行¹, 横田茂文², 藤谷昌司^{1,2}, 岡田泰昌³, 越谷直弘⁴, 小泉英彦⁴ (¹鳥根大学医学部生理学講座神経・筋肉生理学, ²同 解剖学講座神経科学, ³村山医療センター臨床研究部電気生理学, ⁴Cellular and Systems Neurobiology Section, NINDS, NIH, Bethesda, MD, USA)

脳幹の呼吸パターン生成回路(CPG)で形成される呼吸リズムは、血中ガス分圧や肺の伸展などの臓器感覚によって自律的に調節されている。これらの臓器感覚は脳幹の孤束核を経由して入力してくることから、孤束核からの出力は呼吸調節に重要な役割を果たしていると考えられる。今回我々は、光遺伝学的手法により孤束核の興奮性ニューロンを選択的に刺激し、生じる呼吸リズムの変化を解析した。孤束核興奮性ニューロン特異的にチャンネルロドプシンを発現させたマウスを用いて経血管灌流標本を作成し、横隔神経及び頸部迷走神経の活動を記録することで呼吸神経出力をモニターした。光刺激は両側の孤束核に光ファイバーを刺入し、レーザー光(473nm)を照射することで行った。持続的(1min)な刺激では迷走神経活動が増強し呼吸が停止した。単一パルス刺激(5mW, 200ms)を行ったところ、吸息相での刺激では吸息が短縮し呼息が延長した。一方、呼息相での刺激は呼息の延長のみがみられた。これらの結果より、孤束核興奮性ニューロンは、吸息ニューロンを抑制するとともに呼息性ニューロンを興奮させることで吸息-呼息の相の切り換えを促進するとともに、呼吸周期特に呼息の延長に関与していると考えられる。(利益相反なし)