

特別講演. サピエント・パラドックス：人類の出アフリカと認知革命の神経生物学的起源

○入来篤史 (理化学研究所生命機能科学研究センター)

考古学的な行動痕跡や化石から推定される脳容量の変化から、ヒトの認知機能の進化にはいくつかの転換期があったらしい。ヒト脳は約 200 万年前に急激に拡大を始めるが (第一の転換)、これは、ホモ・ハビリスが石器を作り始めた時期と一致する。石器製作技術がより高度になるにつれて脳も大きくなるが、約 40 万年前に出現するネアンデルタール人以降は脳の拡大は起こっていない。ホモ・サピエンスは約 25 万年前に登場するが、絵画や彫像などの象徴的な人工物や目的に応じた多様な道具を作ったり、原棲地の熱帯アフリカ・サバンナを出て寒冷な地域や島嶼部に進出したりするのは約 5 万年前以降である (第二の転換)。生物種としてのホモ・サピエンス登場から、その認知能力が十分に発揮されるまで、これほど時間がかかったのは謎 (サピエント・パラドックス) だった。

第一の転換は、生物進化の一般原理としての受動的な自然選択から、脳一認知一環境の能動的相互作用による『三元ニッチ構築 (Triadic Niche Construction: TNC)』メカニズムの獲得による。第二の転換は、原始ホモ属によるサピエンスの前適応としての TNC-1 (高い生物学的コストを伴った緩徐な脳膨大の進行) から、サピエンスの高い適応力の発露となった TNC-2 (脳内再配線のための低コストで急激な発達進行) への移行による。これらの人類進化史上の相転移を実現する脳神経生物学的仮説について検討する。

Iriki A, Suzuki H, Tanaka S, Bretas R, Yamazaki Y. (2021) The sapient paradox and the great journey: Insights from cognitive psychology, neurobiology and phenomenology. *Psychologia*, doi.org/10.2117/psysoc.2021-B017 (利益相反 なし)

O-1. 内耳損傷の引き起こす下丘におけるニューロンの活動性変化

○小野宗範¹, 伊藤哲史², 馬 蘭蘭¹, 古山貴文¹, 加藤伸郎¹ (¹金沢医科大学・医学部・生理学 I, ²富山大学・医学部・システム機能形態学)

内耳損傷による聴力低下が中枢聴覚神経の活動性を変化させることはよく知られている。内耳損傷等により聴神経を通した中枢への音情報の入力低下した場合、入力の減弱を補償するために聴覚神経回路内での神経活動が過度に亢進する。この異常な神経活動が耳鳴を生み出すと考えられている。そして聴覚神経回路内での神経活動亢進は、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動バランスの障害によることが想定されてきたが、その実態は不明な部分が

多い。本研究では抑制性ニューロンと興奮性ニューロンを生体内で識別するために、抑制性ニューロンに光感受性イオンチャネルである ChR2 を特異的に発現した VGAT-ChR2 マウスを用いて単一ニューロン記録を行った。記録は聴覚経路内で中脳に位置し脳幹からの情報を統合する要となる神経核である下丘から行った。その結果、正常聴力群では下丘において抑制性ニューロンは興奮性ニューロンに比べて高い自発活動を示すのに対して、難聴群では興奮性ニューロンの活動が大幅に亢進しており抑制性ニューロンよりも高い自発活動を示すことが明らかになった。また興奮性ニューロン、抑制性ニューロンともに活動電位の形状が聴力低下により変化していたことから、ニューロン活動性を決定するイオンチャネル構成や形態に変化が生じることが示唆された。このようなニューロンの活動性を変化させる候補として、活動電位発生部位である軸索起始部の形状変化が知られていることから免疫組織学的実験による検証を行った。(利益相反 なし)

O-2. 細胞体に存在する Kv2 チャネルは背側蝸牛神経核カートホイール細胞の高頻度発火に重要である

○入江智彦 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

すべての電位依存性カリウム (Kv) チャネルの中で、Kv2 チャネルは哺乳類の脳では最も広く発現している。しかし、神経細胞における Kv2 の生理的役割を研究する事は、これまで高選択的阻害剤が無いことにより困難であった。近年、ペプチド毒素である guangxitoxin-1E (GxTX) が Kv2 の特異的阻害剤として同定されたことにより、Kv2 の生理学的研究が容易となった。

哺乳類の脳幹に存在する聴覚系中枢である背側蝸牛核 (DCN) は聴覚情報と体性感覚情報を統合し、モノラル音での音源定位の役割や、自己生成音の検出をキャンセルする働きを持つ。この DCN においてカートホイール抑制性インターニューロンは体性感覚情報を伝える平行繊維から興奮性シナプス入力を受け、in vivo において最大 130Hz で発火する。カートホイール細胞は DCN の principal cells を抑制する役割を持っているので、DCN の働きに重要な役割を持っていると考えられている。しかしながら、どの様に Kv2 がカートホイール細胞において高頻度発火をコントロールするかは不明のままであった。

本研究では、先ず始めに Kv2.1 と Kv2.2 を蛍光免疫染色し、カートホイール細胞での局在を検討した。その結果、Kv2.1 と Kv2.2 の両方は細胞体の細胞膜に存在しており、軸索起始部や樹状突起には存在していなかった。次に、ホールセルパッチクランプでカートホイール細胞から記録を行い、Kv2 を GxTX で阻害した。平行線維刺激で誘発された

活動電位に対する GxTX の作用は、平行線維が高頻度 (30-100Hz) で刺激された時のみ観察された。従って、カートホイール細胞の細胞体に存在する Kv2 は頻度依存的に活動電位の発生を制御する事が分かった。この Kv2 による制御は DCN の生理的機能に重要な役割を果たしているかも知れない。(利益相反 なし)

O-3. Effects of genetic manipulation of neuronal activity on Kv1.1 expression in avian cochlear nucleus during development

○陳 鶴昇 (CHEN Hesheng), 江川 遼, 久場博司 (名古屋大学大学院医学系研究科・医学部・細胞生理学)

The tonotopic organization is a topographic representation of sound frequency in the auditory pathway, in which neurons are arranged orderly according to their characteristic frequency (CF). Auditory neurons are differentiated morphologically and biophysically along this tonotopic axis, which is pivotal in accurate processing of sound signals, but the underlying mechanism remains elusive.

Avian nucleus magnocellularis (NM) is a homolog of mammalian anteroventral cochlear nucleus and is well known for the frequency-dependent expression of potassium channels (Kv1.1) at soma and axon initial segment; the expression is elevated in neurons with high-tuning frequencies. Our group previously revealed that this high level of Kv1.1 expression is attributed to a drastic increase of channel expression in response to peripheral input around hatching period, which is nearly 10 days after hearing onset. This raised a possibility that the ability of neurons to facilitate Kv1.1 expression via neuronal activity is still immature before hatch.

Thus, we tested this possibility by genetically manipulating the activity of NM neurons through introducing either Kir2.1 or PSAMs (pharmacological-selective-actuator modules), while examining the effects on Kv1 current before hatch. Overexpression of Kir2.1 hyperpolarized the cells by ~20 mV, and this reduced Kv1 current by ~70% in neurons with high-tuning frequencies. On the other hand, overexpression of PSAMs augmented generation of action potentials when pharmacological-selective-effector-molecule ligand was added, and this increased Kv1 current by two times. However, these effects were not observed in neurons with low-tuning frequencies.

These results indicated that the activity-dependent mechanism of Kv1.1 expression develops during maturation,

which underlies the period-specific acceleration and hence the frequency-dependent Kv1.1 expression in the nucleus. (COI: none)

O-4. トリ蝸牛神経核における周波数領域ごとの抑制性シナプスの違いとその意義

○山田 玲, Mohammed Al-Yaari, 小野木智加朗, 安達良太, 近藤大也, 久場博司 (名古屋大学・医学系研究科・細胞生理学)

音情報を周波数ごとに平行処理する聴覚系においては、入力周波数に応じた様々な最適化が行われている。トリ蝸牛神経核では、興奮性シナプスやイオンチャネル発現が周波数領域ごとに変化し、例えば高周波数領域の細胞 (HF 細胞) では少数の巨大な入力が高精度のシナプス伝達を行うのに対して、低周波数領域の細胞 (LF 細胞) では、複数の小さな入力統合されることで、その時間精度を高めることが知られている。さらに前回我々は、同神経核におけるフィードフォワード抑制について、聴神経活動と抑制入力の結合様式が周波数領域ごとに異なることを報告した。HF 細胞においては、抑制の閾値が高い一方、LF 細胞では抑制の閾値が低く、聴神経活動に応じて段階的に増加する。しかしながらこのような違いが、各周波数領域における出力調節にどのように関与するかは不明であった。そこで本研究では、主にスライス標本を用いて、周波数領域ごとの抑制性シナプス投射の性質を調べた。その結果、LF 細胞へはサイズの小さい多数の抑制線維が投射しており、段階的な抑制調節に適していた。さらに興味深いことに Cl⁻ の平衡電位が領域間で異なり、HF 細胞では脱分極方向にあることでカリウムチャネル活性を介した強力な抑制として働く一方、LF 細胞における平衡電位は静止膜電位付近であった。シミュレーションを用いてその作用を検討したところ、Cl⁻ 平衡電位が静止膜電位付近にあることで、LF 細胞における入力強度に応じた出力調節が可能になることが分かった。これらのことから、周波数領域ごとの抑制性シナプスの違いは、様々な周波数の幅広い音圧変化に対応するための仕組みの一つであると考えられた。(利益相反なし)

O-5. 延髄 C1 ニューロンの慢性刺激が代謝機能に与える影響

○安部 力¹, 岩崎有作², 任 書見¹, 森田啓之³ (¹岐阜大学・医学部・生理学, ²京都府立大学・生命環境科学研究科, ³東海学院大学・健康福祉学部)

アドレナリン作動性ニューロンのひとつである延髄 C1 ニューロンは、低換気、低血圧、低血糖、炎症などの身体

のおよび心理的ストレスによって活性化し、自律神経や視床下部-下垂体-副腎系の操作量を決定することで生体の恒常性維持に貢献している。我々はこれまで、光遺伝学を用いた短時間の C1 ニューロン刺激による自律神経を介した呼吸および循環器系への影響を明らかにしてきた。一方、C1 ニューロンの慢性刺激による生理機能への影響はいまだ不明な点が多い。そこで本研究では代謝機能を中心に、化学遺伝学を用いた長時間の C1 ニューロン刺激による体温、酸素消費量および摂食量への影響を調べた。DBH-cre マウスの両側延髄吻側腹外側野に AAV2-DIO-hM3Dq を投与し、Clozapine-N-oxide (CNO) にて C1 ニューロンを特異的に刺激できるマウスを作製した。CNO 投与により体温は $35.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ から $30.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ まで有意に低下した。また、酸素消費量および二酸化炭素産生量の有意な低下がみられた。一方、摂食量および血中アドレナリンの有意な増加がみられた。これらの結果から、延髄 C1 ニューロンの慢性刺激は、低代謝と同時に血糖値の増加を図るような生理現象を引き起こすことが示唆された。(利益相反 なし)

O-6. 日内休眠により引き起こされる Cold-inducible RNA-binding protein 遺伝子の選択的スプライシングの冬眠様変化

○白石茂菜実¹、堀井有希³、椎名貴彦^{1,2}、志水泰武^{1,2}
¹岐阜大学・応用生物科学部・獣医学部、²岐阜大学大学院・共同獣医学研究科・獣医生理学、³岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・糖鎖分子科学研究センター)

【背景と目的】Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) は、低温時に発現が増加し、細胞を保護する作用を発揮するタンパク質の一つである。私たちは、冬眠中のハムスターにおいて CIRP 遺伝子に特徴的な選択的スプライシングの変化が起こることを明らかにしてきた。また、非冬眠動物であるマウスにおいても強制的に体温を低下させる処置により、冬眠様の選択的スプライシングが誘導されることも明らかとなった。本研究では、マウスが自発的に体温を低下させる日内休眠を行うことに着目し、非冬眠動物においても自律的な CIRP 遺伝子のスプライシングの変化が起こるか検討した。【方法】C57BL/6J 系マウスの皮下に体温測定用ロガーを設置し、絶食により日内休眠を誘導した。脳及び心臓における CIRP mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。【結果と考察】平常体温時のマウスでは、脳および心臓で複数の CIRP 遺伝子スプライシングバリエントが発現していた。一方、日内休眠により体温が低下したマウスにおいては、機能的な CIRP タンパク質に翻訳されるスプライシングバリエントのみが発現していた。このパターンの変化は冬眠時のハムスターと同等であった。休

眠前および覚醒後のマウスの脳、心臓では平常体温時と同じ複数のバリエントが観察され、可逆的であることが示された。これらの結果から、細胞保護作用をもつ CIRP タンパク質の選択的スプライシングによる発現制御は、冬眠動物のみならず非冬眠動物においても普遍的に存在していることが明らかとなった。(利益相反 なし)

O-7. 冬眠様選択的スプライシングによる Cold-inducible RNA-binding protein 転写物の発現量の変化

○堀井有希¹、白石茂菜実²、椎名貴彦²、志水泰武²
¹岐阜大学糖鎖生命コア研究所糖鎖分子科学研究センター研究基盤部門動物実験分野、²同 応用生物科学部獣医生理学研究室)

我々は、冬眠動物であるハムスターにおいて、冬眠時に Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) の選択的スプライシングの発現パターンが変化することを見出してきた。また、人為的に、マウスにおいても冬眠様の発現パターンへ誘導することができた。我々は、選択的スプライシングの変化により、機能的な CIRP mRNA の量が増加しているのではないかと予想した。本研究では、ddY 系統のマウスにおける CIRP 遺伝子の発現パターンによる CIRP 転写物の発現量の変化を調べた。

採取したマウスの血液を、 37°C 、 28°C または 15°C で保温し、RT-PCR 法により発現を解析した。 37°C 及び 15°C で保温した場合には、PCR 産物の電気泳動により CIRP mRNA と共にスプライシングバリエントが検出された。一方、 28°C で保温した場合には、CIRP mRNA のみに発現が集約する、冬眠様のスプライシングパターンが確認された。リアルタイム RT-PCR による定量的解析では、全ての温度条件において、CIRP スプライシングバリエントと CIRP mRNA の総量は変化しなかった。一方、 28°C の条件では、 37°C 及び 15°C の条件よりも CIRP mRNA の発現量が高かった。冬眠様の選択的スプライシングの変化は、転写量を変化させずに素早く CIRP mRNA の発現効率を上昇させる機序である可能性が示唆された。(利益相反 なし)

O-8. Vasopressin neurons in the paraventricular hypothalamus promote wakefulness via lateral hypothalamic orexin neurons

○Md Tarikul Islam¹、Florian Rumpf^{1,2}、Yusuke Tsuno¹、Shota Kodani¹、Takashi Maejima¹、Michihiro Mieda¹
¹Department of Integrative Neurophysiology, Kanazawa University、²Faculty of Medicine, University of Wuerzburg)

Sleep-wake is regulated by complicated neural net-

works that include many different populations of neurons throughout the brain. Arginine vasopressin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH^{AVP}) regulate various physiology and behaviors, such as body-fluid homeostasis, blood pressure, stress response, social interaction, and feeding. Changes in arousal state often accompany these PVH^{AVP}-mediated adaptive responses. However, the contribution of PVH^{AVP} neurons to sleep-wake regulation has remained unknown. Here, we report the involvement of these neurons in arousal promotion. Optogenetic stimulation of PVH^{AVP} neurons rapidly induced transitions to wakefulness from both NREM and REM sleep. Similarly, chemogenetic activation of PVH^{AVP} neurons increased wakefulness, whereas chemogenetic inhibition of these neurons significantly reduced wakefulness. Monosynaptic rabies virus tracing revealed that PVH^{AVP} neurons receive inputs from multiple brain regions involved in sleep-wake regulation. We observed dense projections of PVH^{AVP} neurons in the lateral hypothalamus, close to orexin (LH^{Ox}) neurons. The optogenetic stimulation of PVH^{AVP} neuronal fibers in the LH immediately induced wakefulness as well. Blocking orexin receptors attenuated the arousal effect of PVH^{AVP} neuronal activation drastically. Moreover, PVH^{AVP} neurons mediated the arousal induced by the melanocortin agonist, at least partially. Our data suggested that PVH^{AVP} neurons promote wakefulness via LH^{Ox} neurons in the physiological regulation of sleep-wake and melanocortin-induced arousal. (COI: none)

O-9. がん細胞内小胞の Na⁺, K⁺-ATPase α 3-isoform の局在変化が関与するアノイキス回避機構

○藤井拓人¹, 清水貴浩¹, 加藤瑞希¹, 永森收志², 小泉桂一³, 奥村知之⁴, 藤井 努⁴, 竹島 浩⁵, 酒井秀紀¹
(¹富山大・薬・薬物生理, ²慈恵医大・臨床検査医学, ³富山大・和漢・未病創薬, ⁴同 医・消化器・腫瘍・総合外科, ⁵京都大・薬・生体分子認識学)

正常上皮細胞とは異なり, がん細胞は, 基質から剥離して血管内に侵入しても細胞死 (アノイキス) が引き起こされず転移を引き起こす。しかし, がん細胞のアノイキス回避機構の全容は明らかになっていない。我々は, Na⁺, K⁺-ATPase α 3-isoform (α 3NaK) が, 胃がんや大腸がんなど様々ながん種において異常に高発現することを見出した。興味深いことに, 原発がん組織では α 3NaK は原形質膜ではなく細胞質内に局在していたが, がん患者より採取した

腹水に存在する腹膜転移がん細胞では原形質膜に局在していた。ヒトがん細胞株を用いた解析において, α 3NaK はディッシュ接着時には細胞内の Rab10 発現小胞に局在したが, EDTA やトリプシンで剥離させることで原形質膜へと移行した。この α 3NaK の原形質膜移行には FAK/NAADP/Ca²⁺ シグナル経路の関与が示唆された。また, がん細胞の剥離により誘導されるアポトーシスは, α 3NaK をノックダウンすることで亢進し, 過剰発現させることで抑制した。 α 3NaK を過剰発現させたがん細胞を移植したマウスでは, がんの成長および肺転移が有意に促進した。以上より, がん細胞における, 剥離刺激に伴う α 3NaK の原形質膜移行は, アノイキスに対する耐性を引き起こすことが示唆された。(利益相反 なし)

O-10. TRPV1 チャネルの X 線 1 分子動態計測

○清水啓史¹, 小林琢也², 岩本真幸³, 梶原堅太郎⁴, 呉林なごみ², 小川治夫⁵, 村山 尚² (¹福井大学・医学部・統合生理学分野, ²順天堂大学・医学部・薬理学講座, ³福井大学・医学部・分子神経科学分野, ⁴Spring-8/JASRI, ⁵京都大学大学院薬学研究科薬科学専攻・構造生物薬学分野)

本研究では, 温度, カプサイシン, 酸性 pH で活性化することが知られている TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) チャネルの X 線 1 分子動態計測を行った。X 線 1 分子動態計測法は金ナノ結晶を観測プローブとし, 放射光白色 X 線を観測光として蛋白質分子の構造変化を長時間記録する観測法である。発表者は独自に X 線集光システムを導入することで, 高い時間 (サブミリ秒), 空間分解能 ($\sim 0.1^\circ$), 広い観測範囲 (傾斜 $\sim 30^\circ$, 回転 $\sim 360^\circ$) で蛋白質の構造変化を追跡できる観測システムとした。この測定法を用いて, カプサイシン存在下で TRPV1 チャネルの 1 分子動態計測を行った。その結果, TRPV1 チャネルの大きな揺らぎ運動とねじれ運動を計測した。また, この運動は, TRPV1 チャネルのアнтаゴニストによって抑制された。ねじれ運動は, 温度刺激, 酸性 pH 条件でも観測されたため, この動きが, 機能に密接に関連した構造変化であると考えている。発表では, 実験のセットアップ, 観測データの詳細について示し, 多様な刺激で活性化される TRPV1 チャネルの活性化機構について議論したい。(利益相反 なし)

O-11. アミロイド β とアミロイド前駆蛋白の協調による BK チャネル抑制様式

○山本兼司^{1,2}, 山本 亮¹, 加藤伸郎¹ (¹金沢医科大学・生理学 I, ²国立病院機構宇多野病院・脳神経内科/臨

床研究部)

細胞内アミロイドβ (Aβ) は large-conductance calcium-dependent potassium channel (BK チャンネル) を抑制し、細胞内 Ca²⁺ 負荷による神経細胞毒性を高める。細胞内に Aβ が蓄積する 3xTg AD モデルマウスでも BK チャンネルは抑制される。一方、細胞内に蓄積するマウスアミロイド前駆蛋白 (APP) も細胞毒性に関わる。本研究では、Aβ と APP によって生ずる BK チャンネルの抑制様式について調べた。野生型マウス (WT) や 3xTg の前頭葉皮質錐体細胞に全長 APP や APP・Aβ に対する種々の抗体をパッチピペットから投与して全細胞記録を行い、スパイク幅を BK チャンネル活性の指標として用いた。3xTg における BK 抑制は、抗 Aβ オリゴマー抗体 (11A1)、抗 APP 抗体で解除され、抗 Aβ モノマー抗体は効果がなかった。WT では APP と Aβ が各々単独で BK を抑制した。WT や 3xTg では、Homer1a は Long Homer のドミナントネガティブ体として発現して BK 抑制を解除する。Homer1a をノックアウトした 3xTg では、11A1、抗 APP 抗体は効果がなく APP・Aβ 双方に対する抗体 (6E10) によって BK 抑制が解除された。これらの結果から、APP と Aβ が協調し Long Homer/BK との結合を介して BK 抑制していると推察された。(利益相反 なし)

O-12. マウス体性感覚視床における末梢神経損傷後のシナプス改編制御

○植田禎史、宮田麻理子 (東京女子医科大学・医学部・生理学 (神経生理学))

体性感覚経路の視床では発達期の可塑的シナプス改編を経て緻密な体部位再現地図が構築され、維持されていく。しかし、末梢感覚神経が損傷を受けると再び可塑性が高まり、視床回路は大規模な改編を受ける。我々はマウスのヒゲ体性感覚視床 (VPM 核) に着目し、ヒゲ感覚神経 (眼窩下神経) の切断モデルにおいて、視床回路の改編を制御する神経機構の解明を進めてきた。成熟回路の VPM 核ヒゲ領域では、一個の視床皮質投射ニューロンには脳幹ヒゲ領域由来の一本の軸索が強いシナプスを形成する。一方、眼窩下神経が切断されると、五～六日後にはシナプス改編が生じ、VPM 核の一個の視床皮質投射ニューロンに脳幹由来の複数本の軸索が入力するようになる。これら軸索の多重支配には脳幹ヒゲ領域に由来するものだけでなく、ヒゲ以外の体部位領域に由来する異所性軸索も関与するため、視床におけるシナプス改編は体部位再現地図の再構築を招く。こうした視床回路の再構築は、マウスの下顎に機械刺激を与えた際の異所性感覚過敏 (疼痛様応答) と関係する。我々はこれら視床のシナプス改編を誘導する機構として、

視床における GABA 作動性の抑制性入力、あるいは脳幹におけるミクログリアが関与することを明らかにしてきた。また、これらシナプス改編の誘導に関わる機構を操作することで、疼痛様応答を抑制することにも成功した。今回の報告ではこれら近年の研究成果を紹介し、議論したい。(利益相反 なし)

O-13. セロトニン恒常性維持機構を捉えなおす～感覚免疫学の視点から～

○丸山健太 (自然科学研究機構生理学研究所)

一般にセロトニンは脳で産生されることで気分を落ち着かせる作用があると考えられているが、生体内に存在する 95% のセロトニンが腸で産生されて全身の様々な生理機能に影響を与えていることはあまり知られていない。血液をめぐるセロトニンは免疫細胞を活性化することで炎症を増悪させるのみならず、腸蠕動を促進したり、骨形成を負に制御することが報告されているが、腸におけるセロトニンの産生制御機構は謎に包まれている。本講演では、最近われわれが見出した腸内細菌の核酸成分を介した新しいセロトニン誘導機構を紹介する。(利益相反 なし)

O-14. ラットを用いた食道横紋筋における蠕動運動制御機構の解明

○川瀬里紗¹、堀井和広²、椎名貴彦^{1,2}、志水泰武^{1,2}
(¹岐阜大学・応用生物科学部・獣医生理学、²同 連合獣医学研究科・獣医生理学)

【背景】食道には横紋筋で構成される部分があり、その収縮は延髄を中枢とする迷走—迷走神経反射で誘発される。しかし食塊を胃側へ輸送する蠕動は、内容物の伸展刺激で一度求心性迷走神経が活性化されると食道全長で一連の収縮が誘発されて生じるのか、全領域で迷走神経反射による収縮を繰り返して生じるのかは明らかでない。そこで本研究は食道横紋筋の蠕動に対する迷走神経を介した制御機構の解明を目的とした。【方法】先端にバルーンを付けたカテーテルを麻酔下ラットの口および胃から挿入した。バルーン内圧を記録し、圧上昇を食道横紋筋の収縮反応とみなした。頸部迷走神経を片側切断し、その断端を電気刺激した。またバルーンを拡張し、食道壁へ伸展刺激を加えた。【結果と考察】迷走神経の中枢側断端の刺激により収縮が記録された。この収縮は刺激開始から遅れて持続的に生じること、反対側の迷走神経も切断すると消失することから、求心性神経からの刺激入力中枢で統合された後、反対側の遠心性神経を介し誘発されたものだと考えられる。しかしこのとき、食道の二か所で記録される収縮に時間的な差異は認められなかった。一方で食道の一点に拡張刺激を入

れた際、別部位でも収縮が生じること、またそれは蠕動の様式を示すことが確認された。以上の結果から、食道横紋筋部の蠕動には、中枢における情報の統合が大きな役割をはたしていることが示唆された。(利益相反 なし)

O-15. ラットの A11 領域ドパミン神経と縫線核セロトニン神経は脊髄排便中枢を介して大腸運動を制御する

○澤村友哉¹、堀井和広²、湯木夏扶¹、山口裕嗣³、山中章弘³、椎名貴彦^{1,2}、志水泰武^{1,2} (¹岐阜大学・応用生物科学部・獣医生理学、²同 連合獣医学研究科・獣医生理学、³名古屋大学・環境医学研究所・神経系分野 II)

【目的】私達は、脊髄排便中枢へドパミンやセロトニン(5-HT)が作用すると大腸運動が亢進することを明らかにしてきた。しかし、これらのモノアミンを供給する脳領域は不明である。本研究では、A11 領域がドパミン、縫線核がセロトニンの供給領域となることを想定し、これを実証することを目的とした。【方法】雄 SD ラットにおいて、排便中枢が存在する腰仙髄部(L6-S1)に逆行性アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを投与し、脳から脊髄に注射する神経に Cre リコンビナーゼを導入した。次に、Cre 依存的に hM3Dq を発現する AAV ベクターを A11 領域および縫線核に投与した。麻酔下のラットの大腸管腔内を生理食塩水で満たし、大腸内の圧変化と送液量から大腸運動を評価した。【結果と考察】A11 領域に神経活動を高める hM3Dq を発現させたラットに CNO を投与したが、大腸運動は亢進しなかった。一方、GABA 受容体阻害薬を脊髄に前投与した場合には、CNO に応答して大腸運動が亢進した。この応答は、脊髄へのドパミン受容体阻害薬の前投与により消失した。縫線核も同様に、脊髄に GABA 受容体阻害薬を投与した場合にのみ、CNO 投与後に大腸運動応答が認められ、その応答は 5-HT 受容体阻害薬の前投与により消失した。以上より、A11 領域のドパミン神経や縫線核の 5-HT 神経が中枢性の大腸運動促進に重要であることが示唆された。(利益相反 なし)

O-16. ラットの下行性疼痛抑制系による大腸運動制御の性差における性ホルモンの関与

○堀井和広、椎名貴彦、志水泰武(岐阜大学大学院・連合獣医学研究科・獣医生理学研究室)

【背景・目的】我々はこれまで下行性疼痛抑制系が大腸運動制御に関与することを解明してきた。興味深いことに、この大腸運動制御には性差がみられる。そのため、性ホルモンによって下行性疼痛抑制系による大腸運動制御が調節される可能性がある。そこで本研究では、この制御系に対する性ホルモンの影響を検討した。

【材料・方法】麻酔下の雌雄ラットの大腸内にカニューレを挿入した。内腔を生理食塩水で満たし、大腸内の圧変化と大腸から排出される液量を測定した。侵害刺激を与えるためにカプサイシンを大腸内に投与した。性ホルモンの影響を検討するため、雌雄ラットの性腺を摘出した。また、エストラジオール(E₂)を充填したカプセルを雄ラットの背部皮下に留置した。

【結果】雄ラットの大腸内にカプサイシンを投与すると大腸運動が促進された。一方雌では促進応答がみられなかった。また精巣を摘出した場合でも、無処置雄と同様にカプサイシン投与によって促進応答がみられた。一方で雌では、卵巣を摘出するとカプサイシン投与で応答がみられるようになった。次に雌性ホルモンの関与を検討した。E₂カプセルを処置した雄でも無処置と同じくカプサイシン投与によって応答がみられた。しかし、予め精巣を摘出した上で E₂処置した場合には促進応答はみられなくなった。

【考察】E₂が下行性疼痛抑制系による大腸運動制御の調節に関与し、その作用にテストステロンが拮抗的に働くことが示唆された。(利益相反 なし)

O-17. 心室不整脈トリガーの発生機序：シミュレーション研究

○津元国親¹、島本貴生²、青地悠馬²、天野 晃²、九田裕一¹、谷田 守¹、倉田康孝¹ (¹金沢医科大学・医学部・生理学 II、²立命館大学・生命科学部・生命情報学)

心臓不整脈の基本メカニズムはリエントリー興奮にある。旋回興奮波(スパイラル興奮波)はそのリエントリー興奮の典型であり、特に Torsades de pointes (TdP) と呼ばれる多形性心室頻拍は、心室内を蛇行しながら動くスパイラル興奮波であると考えられている。

QT 延長症候群患者において、早期後脱分極(early afterdepolarization: EAD)の発生が TdP の発生に先行するという臨床研究から、QT 間隔の過剰延長を媒介とする EAD 発生を引き金として、心室性不整脈が惹起されると考えられてきた。しかし、TdP の発生における EAD の役割については、まだ不明な点が多い。

本研究では、EAD と TdP 誘発の関係を調べた。Kurata ヒト心室筋細胞モデル(Kurata et al, Biophys J, 2005)を用いて 6cm 角(600×600 ユニット)のシートモデルを構築し、その興奮伝播シミュレーションを実施した。心室組織内で EAD が島状に発生する(クラスター)と仮定し、EAD クラスター数の変化とスパイラル興奮波(TdP)との関係を検討した。単一の島からなる EAD クラスター(400×400 ユニット)から、スパイラル興奮波は発生しなかった。一方、4, 9, 16 の島状に 400×400 ユニット EAD クラスター

を分割することでスパイラル興奮波が発生した。しかし、25 クラスターでは発生しなかった。本結果は、TdP の発生に EAD クラスターの空間分布だけでなく、クラスターサイズも影響することを示唆している。EAD 誘発心筋細胞が、島状に心室組織内で不連続に分布することが TdP の発生を促進する可能性がある。(利益相反 なし)

O-18. 心筋虚血・再灌流の数理モデル解析

○松岡 達¹, 嶋吉隆夫², 竹内綾子¹ (¹福井大学学術研究院医学系部門・形態機能医科学講座・統合生理学, ²九州大学・情報基盤研究開発センター・先端計算科学研究部門)

心筋虚血とその後の再灌流は心臓機能に障害を与える。虚血・再灌流で心筋障害が起こる機序として、アシドーシス, ATP 枯渇, Ca²⁺過負荷, Na⁺過負荷, ROS 産生などが関与することが知られている。しかしながら、虚血・再灌流障害の統合的かつ定量的な理解はまだ得られていない。我々は、心臓の虚血・再灌流障害をより統合的かつ定量的に理解することを目指して、細胞内 pH, ATP とイオン濃度恒常性に焦点を当て、虚血・再灌流障害を再現する心筋細胞数理モデルを開発した。実験データに基づき、膜興奮、収縮、細胞内イオン (Na⁺, K⁺, H⁺, Ca²⁺, Cl⁻) 恒常性、ATP 産生 (ミトコンドリア酸化的リン酸化) と消費 (ATPase) を数理モデルに実装し、チャンネル・トランスポーター・収縮の pH 依存性と ATP 依存性を加えた。数理モデルは、虚血・再灌流時の pH, イオン濃度、興奮収縮連関の変化をよく再現することができた。細胞内アシドーシスとそれに続く Na⁺過負荷が虚血初期から心筋細胞の収縮性に影響を与えることが示された。また、再灌流時の細胞膜 Na⁺-K⁺ ATPase の活性化が再灌流障害の低減に有効であることが示唆された。(利益相反 なし)

O-19. 高食塩水投与による内臓迷走神経求心路活性化の生理的意義

○木元雄一朗, 谷田 守, 九田裕一, 津元国親, 倉田康孝 (金沢医科大学・医学部・生理学 2)

【目的】高食塩水をラットの消化管に投与すると代謝が亢進することから、消化管で NaCl を刺激物質として認識する機構が存在する。本研究では、マウス自律神経活動を測定して、NaCl センサーとしての消化管の自律神経求心路が存在するか確認して、その生理的意義を明確にすることを目的とした。

【方法】麻酔下の ICR 系雄マウスを用いて、胃、小腸、肝臓を支配する迷走神経求心路活動を電気生理学的に計測した。さらに、遠心路自律神経活動として腎臓交感神経活動

も計測した。胃、十二指腸又は門脈内にカテーテルを留置して、vehicle (生理食塩水) 又は高食塩水 (1M NaCl) を投与した。

【結果・考察】高食塩水を胃内に投与すると、胃枝、小腸を支配する腹腔枝及び肝臓枝の迷走神経求心路活動は全て亢進した。阻害薬を用いた実験から、高食塩水による胃又は腹腔迷走神経求心路活動亢進作用には、TRPV1 チャンネルが関与しなかった。一方、高食塩水の胃内投与は、腎臓交感神経活動を抑制させたが、血圧や心拍数には影響しなかった。また、高食塩水による腎臓交感神経活動抑制反応は、内臓迷走神経切断マウスで消失した。

本研究では、高食塩水が消化管迷走神経求心路に作用して、脳を介して遠心路交感神経系に影響する「内臓自律神経反射」を初めて発見した。今後は、詳細な仕組みの解析や病態モデルを用いた解析を行っていく。(利益相反 なし)

O-20. 脳出血後の麻痺側集中使用による機能回復における小脳赤核路の関与

○上野新也¹, 清水健史¹, 小林憲太², 田尻直輝¹, 飛田秀樹¹ (¹名古屋市立大学・医学部・脳神経生理学, ²生理研・ウイルスベクター開発室)

【目的】脳内出血後の麻痺側上肢集中使用 (リハビリテーション) により麻痺肢の運動機能が改善し、この機能回復に皮質-赤核路が関与することを報告した (J Neurosci 36: 455-67, 2016)。しかしリハビリテーション後の上肢機能回復における運動調節機構は明らかになっていない。本研究は脳出血後の麻痺側集中使用による運動調節系変化の解析を目指し、小脳出力系の小脳外側核-赤核小細胞部に着目し、ウイルスベクター二重感染による DREADD 法により上肢運動機能の評価を行った。

【方法】AAV-DJ-EF1a-DIO-hM4D (Gi)-mCherry を小脳外側核へ FuG-E-MSCV-Cre を赤核小細胞部へ感染させ小脳外側核-赤核路の神経遮断を可能とした後に内包出血モデルを作製した。このモデルに出血 1-8 日後に麻痺側上肢集中使用を行い、12 日, 16 日, 20 日, 28 日後にリーチング試験により上肢機能を評価した。

【結果】リハビリ群においては非リハビリ群と比べリーチング試験の成功率が改善していた。しかし clozapine-N-oxide 投与により神経遮断すると、その成功率は有意に悪化していた。

【結論】上肢集中使用による障害運動機能の改善に、小脳外側核-赤核小細胞部の運動調節系回路が関与することが明らかになった。(利益相反 なし)

O-21. 恐怖条件づけ中の縫線核領域 DAT 陽性ニューロンの活動変化

○山本 亮¹, 古山貴文¹, 趙 駿¹, 益岡尚由², 伊藤哲史³, 堀 佳江¹, 小野宗範¹, 加藤伸郎¹ (金沢医科大学・医学部・生理学¹, ²同 医学部・薬理学, ³富山大学・医学部・システム機能形態学)

情動行動に関連する脳領域である分界条床核 (BNST) と扁桃体中心核 (CeA) は強い DAT 陽性線維入力を受けている。この DAT 陽性線維は縫線核領域に存在する DAT 陽性ニューロン群由来であることが近年明らかになってきた。本研究ではこの縫線核領域 DAT 陽性ニューロン群 (DAT^{DR-PAG}ニューロン) の恐怖条件づけ中の活動変化を解析した。恐怖条件づけの US には air puff を、CS には 8kHz の音を用いた。DAT-cre マウスの縫線核領域に AAV を用いて GCaMP7f を導入し、ファイバーカニューレを留置して、calcium fiber-photometry を行い、ニューロン活動計測を行った。音の馴化中には DAT^{DR-PAG}ニューロンの細胞体、BNST 投射線維、CeA 投射線維のいずれにも CS に対する反応はなかった。恐怖条件づけ中には US に対して、DAT^{DR-PAG}ニューロンの細胞体、BNST 投射線維、CeA 投射線維の活動は上昇した。一方で、恐怖学習成立後にも CS に対する応答は観察されなかった。以上より、DAT^{DR-PAG}ニューロンは侵害刺激に特に応答するニューロン群であると考えられる。この DAT^{DR-PAG}ニューロンから BNST/CeA へのシナプス入力は興奮性である。つまり、情動関連脳領域へ侵害情報を伝達し、情動行動制御に強い影響を与えると考えられる。(利益相反 なし)

O-22. 音圧レベルが恐怖条件付け時の防御行動に及ぼす影響

○古山貴文, 山本 亮, 小野宗範, 加藤伸郎 (金沢医科大学・医学部・生理学¹)

従来の古典的恐怖条件付けでは、すくみ行動 (Freezing) を恐怖記憶形成における条件付け反応 (conditioned response, CR) の行動指標として使用されている。しかし、近年の研究で、飛行行動 (Flight) もいくつかの条件下でマウスの恐怖記憶形成における CR の行動指標として報告されている。そこで本研究では、無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) または条件刺激 (conditioned stimulus, CS) の強度を変化させ、マウスの防御行動に対する影響を検証した。被験体として wld type マウス (C57Bl/6J) を使用した。CS として 8 kHz トーンバースト (時間長: 20 秒, 音圧レベル: 70, 90dB SPL), US として電気刺激 (時間長: 1 秒, 電流: 0.4, 0.9mA) を使用した。恐怖条件付けの手順として、1 日目に箱 A で CS×5 回 (馴化), 2-3 日目に箱 B

で US-CS 条件付け×5 回 (学習), 4 日目に箱 B で CS×15 回 (消去) 行った。この手順を、4つのグループ (2種類の CS×2種類の US) に適用し、各個体の総移動量, すくみ行動, 飛行行動を計測した。その結果, 4グループを比較すると, 3日目において, 90dB SPL の CS 提示中では, 総移動量および飛行行動回数が増加した。一方, 70dB SPL の CS 提示中では, すくみ行動量が増加し, 総移動量が減少した。この結果は, 近年の研究報告と一致しており, すくみ行動が恐怖条件付けにおける唯一の CR ではないことが示された。CR の表現は, US-CS 連合学習における様々な要因によって変化することが示唆された。(利益相反 なし)

O-23. 恐怖記憶生成における前頭前野情報処理と神経回路再編

○揚妻正和^{1,2} (¹生理学研究所・生体恒常部門, ²九州大学・生体防御医学研究所)

恐怖や不安に関わる神経回路として, 大脳皮質「前頭前野」は扁桃体と並び, ヒトから齧歯類まで広くその重要性が指摘される。前頭前野は他にも報酬記憶など多様な高次脳機能を処理し, その機能破綻は精神疾患をも導く。

こうした多様な情報の並列処理は, 増設可能な電子回路とは異なる, 限られた容量を効率的に利用するための「脳独自の並列処理様式」により支えると推察される。しかし, 特にその内部回路での演算様式に関する理解は, その複雑さと技術的制限により未だ不明な点が多い。

我々は, 光学技術と情報論的手法を組み合わせ, 恐怖記憶獲得過程におけるマウス脳内の神経細胞集団動態を多角的に観察・解析してきた。今回はその成果から「恐怖記憶コード」の実体を考察する。(利益相反 なし)

O-24. イソフルラン麻酔で強調される上丘の方位選択性マップ

○笠井昌俊¹, 伊佐 正^{1,2,3} (¹京都大学大学院・医学研究科・神経生物学, ²同 医学研究科・脳機能総合研究センター, ³京都大学高等研究院・ヒト生物学高等研究拠点 (ASHBi))

本研究は, 中脳の上丘における視覚情報処理メカニズム, 特に方位・方向選択性マップの特性を細胞集団レベルで明らかにすることを目的とする。

方位選択性カラムは, ネコやサルの大脳皮質で顕著に見られる大脳皮質の機能的な細胞構築である。2光子顕微鏡を用いた細胞集団の反応を一気に可視化することでマウスの第一次視覚野では見られないことが知られている (Ohki et al., 2005)。さらに最近になって, 網膜から直接入力を受ける上丘の浅層には, マウスの第一次視覚野には見つ

からなかった方位選択性カラムが報告された (Feinberg & Meister, 2014). 一方その後の研究では, 上丘の方位選択性マップの空間特性や, 存在そのものについて結果の異なる報告があり (Inayat et al., 2015; deMalmazet et al., 2018) 議論が続いている.

我々は今回, マウスの上丘から 2 光子カルシウムイメージングをおこない, 覚醒下と軽度のイソフルラン麻酔下で, 同一の細胞集団から視覚応答の記録をおこなった. Moving bar 刺激をおこない bar の方位に対する応答を比較し結果, イソフルラン条件下反応特性のそろった領域が広く観察されるのに対し, 覚醒下では個々の神経細胞の反応特性の類似性が下がり, 機能構造が曖昧になることを発見した. さらに bar の動きに対する選択性応答に着目したところ, null direction での抑制応答が減弱することや, 抑制性細胞の方向選択性が減弱することを見出した. これらの結果から, 上丘の方位選択性応答の生成に上丘内の抑制性回路が関与することが示唆される. (利益相反 なし)

P-1. マイクロ領域での腸ペースメーカ興奮連携のパターン分類による解析

○中山晋介, 岩田尚子, 高井千穂, 埜村友香 (名古屋大学・医学部・生理学)

消化管の精妙多彩な運動は, 医学・生理学の教科書にある Bayliss-Starling 「腸の法則」: 神経回路反射だけで構築できるであろうか? 一方, ペースメーカ細胞であるカハール間質細胞 (ICC) は, ネットワーク状に張り巡らされ, 協調的運動にも重要な働きが予測される.

そこで本研究では, マイクロ領域での ICC ネットワークの連携興奮の特性を, 透析膜補強低インピーダンス微小電極アレイ (MEA) 法を開発し探索した. Ca 拮抗薬で平滑筋活動を抑制し計測した 8×8 アレイデータ (検出領域約 1 mm²) を画像化しパターン分類を試みた. バッチクランプ法チャネル解析の open, closed のように微小領域の特徴をデジタル化し定量できないかと考えた.

電位活動発生の特徴を MEA 記録領域内から発生する expanding と領域外から移動してくる migrating 活動の 2 つのパターンに大別できた. それぞれ, ICC がもつ重複したペースメーカメカニズム: 内部クロック・Ca オシレーションと電位依存性内向き電流を反映すると考えられた. 後者の migrating パターンでは, (細胞膜を介した) 内向き電流の伝搬に先行して (細胞間電流を反映する) 外向き電流が記録された. 則ち, 本 MEA 法は, 数百 μm 程度の容積伝導体の移動を観測した. さらにペースメーカイベントを通じた特徴から, MEA 領域で異常伝搬をする bumpy/aberrant, および複数の活動が相互作用する colliding の 2

つのサブクラスに分類できた. 腸の推進運動を高進する 5-HT は, migrating と expanding 活動の比を優位に上昇した. これは, 消化管微少領域の伝導性改善により, 自発ペースメーカ活動がカバーする領域の拡大に相当する現象と考えられる. (利益相反 なし)

P-2. サル海馬神経活動記録用データロガーの小型軽量化

○田村了以 (富山大学・学術研究部医学系・統合神経科学)

これまで我々は, 自由行動下のサルの海馬から神経活動を記録してきた. その際, 記録信号は頭部に取り付けた伝送ケーブルを介して後段処理の機器に送っていたが, サルがケーブルを破損させる, ケーブルがサルの行動の邪魔になる等の問題があった. これを回避する方法としてテレメトリーやデータロガーが考えられるが, テレメトリーは, 伝送波の反射が起こりにくい比較的狭い環境内での記録には適している一方, 我々が行っているような干渉物のある広い環境内における自由行動下動物では安定した記録が困難である. そこで近年我々はデータロガーの開発に着手し, プロトタイプを完成させた. しかし, 電池を除いた重量が約 100g, 体積が約 120cm³ と比較的大きかったので, 今回その小型軽量化を試みた.

データロガーは, アンプ部とデータ収集・保存部に大別される. アンプ部では, 入力信号 (4Ch) を計装アンプで増幅後バンドパスフィルタリングし, 後段アンプで目的の倍率まで増幅した (総増幅率: 1000~2000 倍). データ収集・保存部では, アンプ部からの出力信号を PIC マイコンにより AD 変換 (50kHz/Ch) 後, マイクロ SD カードに保存した. 専用のプリント基板を設計・作製し, 極力小型の表面実装部品を用いた結果, 基本性能はプロトタイプと同じまま, 約 80% の小型軽量化 (20g, 18cm³) を達成できた. (利益相反 なし)

P-3. PDGFR α signaling is involved in the tumorigenicity of human androgen-independent prostate cancer cell PC-3

Md Junayed Nayeem¹, Aya Yamamura¹, Rie Takahashi¹, Hisaki Hayashi¹, Hiroyuki Muramatsu^{2,3}, Kogenta Nakamura², Naoto Sassa², Motohiko Sato¹ (¹Department of Physiology, Aichi Medical University, ²Department of Urology, Aichi Medical University, ³Department of General Internal Medicine Japan Organization of Occupational Health and Safety Asahi Rosai Hospital)

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed

cancer in men, and is the second to lung cancer as a cause of cancer deaths. Approximately 80-90% PCa is dependent on androgen receptor (AR) at initial diagnosis. However, AR dependent therapy fails, and the disease turns into androgen independent stage called hormone refractory PCa. The aberrant expression of oncogenic tyrosine kinase receptors such as platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs) has been reported in cancer progression. However, the role of PDGFRs in proliferation and migration of androgen-independent prostate cancer, PC-3 cell, is not clearly understood yet. Thus this study provides a role of PDGFR in androgen-independent prostate cancer. PDGFR expression was determined by quantitative real-time PCR and western blotting. PDGFR α was upregulated in androgen-independent PC-3 cells compared with normal prostate epithelial cells. PC-3 cells were found to secrete higher PDGF-BB level in the culture medium than PrEC cells. PDGF-BB induced the phosphorylation of PDGFR α and downstream signaling molecules, including Akt, in a dose-dependent manner. Tyrosine kinase inhibitor imatinib reduced the phosphorylation of the PDGFR α /Akt axis. Imatinib also suppressed the viability, proliferation, migration, and tumor growth of PC-3 cells. Furthermore, PDGFR α knockdown by small interfering RNAs (siRNA) decreased the viability and migration of PC-3 cells. These results demonstrated the distinct contribution of PDGFR α signaling to the proliferation and migration of PC-3 cells, and suggested the potential for PDGFR α as a therapeutic target for metastatic and androgen-independent prostate cancer. (COI: none)

P-4. Neural correlates to ultrasonic vocalizations in the rat frontal cortex

○Aamir Sharif, Chinzorig Chojiljav, Jumpei Matsmoto, Hiroshi Nishimaru, Tsuyoshi Setogawa, Take-toshi Ono, Hisao Nishijo (富山大学・医学部・システム情動科学)

Rodents and humans have a phylogenetically conserved the primary vocal motor network. Previous studies suggested an involvement of the frontal cortex in the vocal motor network in rodents. However, neuronal responses in the frontal cortex during vocalization are yet to be investigated. In this study, to characterize the response properties in each subarea in the frontal cortex, we electrophysiologically recorded neuronal activity during ultrasonic vo-

calizations in rats. A total of 2,760 neurons were recorded from the frontal areas, and the activity of 813 neurons was significantly modulated around the vocalizations. The responsive neurons were categorized into nine types based on their response patterns. We found that more excitatory responding neurons (Type-1 neurons) were located in the posterior motor cortices than the anterior ones. Interestingly, some of the Type-1 neurons (12/133 neurons) showed differential responses between the two different categories of vocalizations. The present results provide a neurophysiological basis of involvement of the frontal cortex in vocalizations, and should contribute to further unraveling of the neural mechanisms of vocalizations and social communications in rodents. (COI: none)

P-5. 活性化血小板による線維素溶解(線溶)抑制機構

○鈴木優子¹, 望月里依奈^{1,2}, 佐野秀人¹, 本藏直樹¹, 浦野哲盟^{3,4} (1)浜松医科大学・医学部・医理学講座, (2)同医学部・歯科口腔外科学講座, (3)同医学部・薬理学講座, (4)静岡社会健康医学大学院大学)

【背景】血栓形成とその溶解反応は互いにクロストークし時空間的に巧妙に制御される。トロンピンは血管内皮細胞表面に発現するトロンボモジュリン(TM)との結合により、凝固活性が抗凝固活性へと変換され、またトロンピン活性化線溶抑制因子(TAFI)を活性化して線溶を抑制する。活性化TAFI(TAFIa)はカルボキシペプチダーゼ作用により、プラスミノゲン(plg)のフィブリンへの結合に必要なC末端リジンを切断し線溶を抑制する。これまでに正常ヒト血小板血漿を用いて、活性化血小板が凝固線溶反応の起点となることを本会で報告してきた。【目的】血漿中の微量TMによるTAFIの活性化と線溶抑制機構を検討する。【方法と結果】1)正常血小板血漿にて組織型plgアクチベーター(tPA)惹起クロット溶解時間(CLT)を計測した。活性化血小板によりCLTは延長し、抗TM中和抗体/TAFIa阻害薬にてその延長効果は抑制された。2)共焦点顕微鏡にて凝固線溶過程を蛍光標識凝固線溶因子にて可視化した。抗TM中和抗体/TAFIa阻害薬にて、活性化血小板を中心とした密なフィブリン網へのplgの集積は促進され、かつ周辺への素早い伝播を認めた。3)全血流速存在下では、tPAにより血栓形成能は減弱し、さらにTAFI阻害薬を加えると減弱効果は増強した。【結語】活性化血小板による血漿中TM結合トロンピン-TAFI系活性化を介した線溶抑制機構が示唆された。(利益相反なし)

P-6. 発達性てんかん性脳症を引き起こすKv2.1 R306C

変異の大脳皮質錐体神経発火活動への影響について

○秋田天平¹, 青戸一司², 才津浩智², 福田敦夫¹ (¹浜松医科大学・医学部医学科・神経生理学, ²同 医学部医学科・医化学)

次世代シーケンサーによる全エクソーム解析の世界的な普及により, これまで原因不明とされていた, 難治性の重篤な精神運動発達障害をもたらす様々な発達性てんかん性脳症 (DEE) の原因遺伝子変異が, この十数年間で多数同定されるに至った. しかし, 変異により病態が引き起こされる機序については, 未だ多くの変異についてほとんど解明されていない. 以前我々は, 大脳皮質・海馬の主たる遅延整流性電位依存性 K⁺チャネル Kv2.1 (KCNB1) の新生突然 (*de novo*) 変異が原因の DEE 患者を同定し, その患者と同じ変異 Kv2.1 (p.R306C 及び p.G401R) を培養錐体神経に強制発現すると, 連続発火活動が強く抑制されることを報告した (Saitsu, Akita et al, Sci Rep, 5 : 15199, 2015). しかし, 強制発現による変異の効果は, 実際の患者よりも誇張される可能性があるため, 我々は CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて患者と同じ R306C 変異を導入したノックインマウスを作成し, 正常型・ヘテロ接合型・ホモ接合型マウス胎仔大脳皮質より得た培養錐体神経の発火活動を比較した. その結果, 刺激電流入力中の連続発火活動について, ヘテロ接合型・ホモ接合型神経で有意な発火間隔の延長と発火間欠期の膜電位レベルの上昇が認められた. 今後, これらの違いが発火の同期性等に与える影響について検討する. (利益相反 なし)

P-7. 神経軸索の直径に依存したミエリン形成: ミエリン化オリゴデンドロサイトが産生する物理的な力を可視化する張力センサーの解析

○清水健史¹, 村越秀治^{2,3}, 松本英俊⁴, 上野新也¹, 石田章真¹, 田尻直輝¹, 飛田秀樹¹ (¹名古屋市立大学・医学研究科・脳神経生理学, ²生理学研究所・脳機能計測支援センター, ³総合研究大学院大学・生理科学, ⁴東京工業大学・物質理工学院・材料系)

オリゴデンドロサイト (OL) は, 神経軸索の周りに髄鞘 (ミエリン) を形成し, 活動電位の伝導を飛躍的に速めている. 中枢神経系には太い軸索と細い軸索が混在しているが, [軸索]の直径と[軸索+ミエリン]の直径の比 (g-ratio) は, 各軸索に対して最適値になるよう調整されている. この軸索の直径に依存した g-ratio の最適化は高次脳機能を発現するために不可欠であるが, その制御メカニズムは不明である. 本研究では, 各々の軸索に依存して惹起される物理的因子に着目し, 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく張力センサーを使用した.

まず初めに, 神経軸索に類似した直径を有するポリスチレン製ナノファイバーを調製し, OL がナノファイバーに対してミエリン形成することを確認した. 張力センサーの FRET 計測を行った結果, 直径の異なるナノファイバーと接触している OL 突起では, 産生される張力がそれぞれ有意に異なることが分かった. この力の差異は, 単一の OL 細胞内でも検出できたことから, 細胞の成熟度に依存しない物理的な現象であると考えられる. このことから, 軸索の直径に応じた力学的因子によってミエリン形成が制御される分子機構が明らかになった. さらに, ファイバー径に依存して OL 接着斑のサイズも変化したことから, 各々の軸索上に形成された接着斑を起点として力学的シグナルが惹起される可能性も新たに示唆された. (利益相反なし)

P-8. Two-pore channel 3 の膜電位依存の活性化とそのホスホイノシチドによる制御

○平澤輝一^{1,2}, 下村拓史^{1,2}, 久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所・神経機能素子, ²総合研究大学院大学・生命科学研究科)

Two-pore channel 3 (TPC3) は電位依存性カチオンチャネルであり, その単量体中に, 6本の膜貫通ヘリックスからなるリピート構造 (6TM) を 2つ連結して持つ. 2番目のリピート中の 4番目のヘリックス (2nd S4) が膜電位の感知に重要である一方, 1番目のリピートにはホスホイノシチド (PI) が結合し, TPC3 の電位依存性を亢進する. 1番目のリピートへの PI 結合と 2nd S4 の構造変化の関係を解明するために, ツメガエル卵母細胞を発現系として用い, 二電極膜電位固定法により解析を行った. まず 2nd S4 の細胞外領域にシステイン (Cys) 変異を導入し, TPC3 電流の変化をもとに Cys 修飾試薬による導入 Cys の修飾速度を解析した. PI 結合が修飾を加速したことから, PI 結合が 2nd S4 の構造に影響したことが示された. 続いて TPC3 の 527番目のセリン残基を蛍光非天然アミノ酸 Anapへと変異させることで 2nd S4 の細胞内領域を蛍光ラベルした. Voltage clamp fluorometry 法によって電位依存的な蛍光強度変化を測定し, 2nd S4 の構造変化を解析したところ, PI 結合によって 2nd S4 の電位依存的な構造変化が促進されることが示された. これらの結果から, 1番目のリピートへの PI 結合が, 異なるリピートにある 2nd S4 に影響を及ぼすことで TPC3 のチャネル活性を亢進することが示唆された. (利益相反 なし)

P-9. 褐色脂肪細胞分化における機械刺激感受性陽イオンチャネル Piezo1 の関与

○剣持麻奈斗¹, 川原崎聡子², 岡村和彦³, 後藤 剛², 内田邦敏^{1,4} (¹静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学術環境科学専攻, ²京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻, ³福岡歯科大学学生体構造学講座病態構造学分野, ⁴静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科)

褐色脂肪は非ふるえ熱産生によって、蓄えたエネルギーを消費することから肥満の治療ターゲットとして注目されている。脂肪前駆細胞において、細胞内への Ca^{2+} の流入は脂肪細胞への分化を抑制すること (Neal and Clipstone, 2002), 並びに前駆細胞への機械刺激は成熟脂肪細胞への分化を抑制することが報告されている (Sun *et al.* 2016)。機械刺激感受性陽イオンチャネル Piezo1 は腎臓や血管などに発現しており、それぞれ尿圧や血流の感知に関与していることが報告されており、その他組織においても Piezo1 の発現や機能が報告されつつある。一方、褐色脂肪においては Piezo1 の発現や機能に関する報告はほとんどされていない。そこで本研究では、褐色脂肪細胞における Piezo1 の発現並びに褐色脂肪細胞分化への関与について検討した。

褐色脂肪細胞における Piezo の発現を RT-PCR 法および Ca^{2+} -imaging 法を用いて検討した結果、Piezo1 の発現が認められた。また、マウスの褐色脂肪組織においても Piezo1 タンパク質の発現が認められた。分化誘導時に Piezo1 作動薬である Yoda-1 を処置すると分化は用量依存的に抑制された。この分化抑制作用は Piezo1 阻害薬処置および siRNA による Piezo1 knock-down によって回復した。さらに、Piezo1 作動薬による分化抑制作用は Calcineurin 阻害薬の同時処置によって回復した。

以上の結果より、褐色脂肪細胞の分化過程において Piezo1 の活性化が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こし Calcineurin 経路を介して分化を抑制することが示唆された。(利益相反 なし)

P-10. リン酸化によるカリウムクロライド共輸送体 (KCC2) の機能制御

○渡部美穂¹, Kristopher T. Kahle², 福田敦夫¹ (¹浜松医大・神経生理, ²Depts of Neurosurgery, Pediatrics, and Cellular and Mol Physiol; Centers for Mendelian Genomics, Yale Sch Med)

KCC2 は Cl^- を細胞外にくみ出すトランスポーターで、細胞内 Cl^- 濃度を低く保ち GABA による抑制性神経伝達を維持している。これまでに KCC2 はリン酸化による機能制御を受けており、KCC2 の 906 番目 (Thr⁹⁰⁶) と 1007 番目 (Thr¹⁰⁰⁷) のスレオニン残基のリン酸化状態を模倣した遺伝子改変マウス (KCC2^{T906E/T1007E}) では KCC2 の Cl^- くみ出し能が低下し、てんかん様の重積発作を示し、生後 10 時間前

後で死亡することを報告している。本研究ではリン酸化による KCC2 機能制御についてさらに検討するために、Thr⁹⁰⁶ と Thr¹⁰⁰⁷ をアラニンに置換し、脱リン酸化状態を模倣した KCC2^{T906A/T1007A} マウスを作製し、解析を行った。KCC2^{T906A/T1007A} マウスでは KCC2 の Cl^- くみ出し能が増加していた。行動解析を行ったところ、社会的新奇探索性の低下、不安様行動の低下、驚愕反応の低下が認められた。自発脳波を測定した結果、KCC2^{T906A/T1007A} マウスでは 45, 55, 80Hz のパワースペクトル密度の減少がみられ、 γ 波帯域の活動の減少が認められた。さらに、ピロカルピン誘発性のてんかん発作を調べたところ、KCC2^{T906A/T1007A} マウスは死亡率が高く、けいれん重積を示すまでの時間が短く、脳波では発作前に γ 波帯域の活動の増加が認められた。よって、KCC2 の機能が亢進し、GABA による抑制力が強まることにより、行動に変化がみられ、脳波の γ 波帯域が減少していたことから、認知機能などに変化がみられる可能性が考えられた。また、てんかん発作を起こしやすいことがわかった。よって、KCC2 の Thr⁹⁰⁶ と Thr¹⁰⁰⁷ のリン酸化が適切に制御されることが、抑制性神経伝達に重要であることが示唆された。(利益相反 なし)

P-11. オレキシンは縫線核セロトニン作動性ニューロンにおいて非選択的陽イオンチャネルの閉口による発火後過分極を誘発する

○石橋 賢¹, 福田敦夫¹, Leonard S Christopher² (¹浜松医科大学・医学部・神経生理, ²Department of Physiology, New York Medical College)

背側縫線核 (DR) のセロトニン作動性 (5-HT) ニューロンは、睡眠-覚醒状態、報酬や気分の創出を含む多くの脳機能に関与する。これまでにオレキシンが DR の 5-HT ニューロンを脱分極させるだけでなく、発火後過分極 (AHP) を増強 (oeAHP) し発火頻度順応を大きくすることを報告した。しかし、oeAHP のうち Ca^{2+} 依存性カリウムチャネルの阻害薬である Apamin に非感受性な成分 (ai-oeAHP) が未同定で残っていたため更なる検討を行った。

ai-oeAHP はカリウムチャネルを非選択的に阻害する Cs^+ によって阻害されなかったことから、カリウムチャネルの閉口によるものではないと考えられる。ai-oeAHP は細胞内カルシウムの除去により消失するが、オレキシン誘発性内向き電流 (I_{ox}) と ai-oeAHP の両方が細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) の低下により増加したが、その振幅の比は ai-oeAHP が I_{ox} のおよそ半分で常に一定であった。またオレキシンを誘発する膜ノイズとコンダクタンス変化は、ai-oeAHP 発生中に約半分に減少していた。

これらの結果から ai-oeAHP はカリウムチャネルの閉口

に伴う過分極ではなく、オレキシンにより活性化された非選択的陽イオンチャネルが活動電位に伴って細胞内に流入した Ca^{2+} により一過性に抑制されるため過分極した発火後過分極であると考えられる。(利益相反 なし)

P-12. 感覚異常から迫る ASD 神経回路基盤と病態メカニズムの解明

○渋下 碧¹, 加藤大輔^{1,2}, 竹田育子¹, 和氣弘明^{1,2}
(¹名古屋大学大学院・医学系研究科・分子細胞学, ²生理学研究所・多細胞回路動態研究部門)

自閉スペクトラム症 (ASD) は社会性の低下, 興味の限局, 反復行動を中核症状とする神経発達症である。遺伝要因として 100 以上の ASD 関連遺伝子が報告されており, 加えて妊娠中の母体免疫などの環境要因が発症に関与していることが知られているが, その病因の多様性から ASD の発症機序は解明されていない。着目すべき症状として, ASD 患者は触覚過敏や痛覚鈍麻などの感覚異常を呈することが臨床的に広く知られている。これまで視床-感覚野における神経細胞の過活動との関連が示唆されているが, この病態を反映する詳細な神経回路基盤は明らかになっていない。本研究では 2 光子励起顕微鏡を用いて ASD モデルマウスの覚醒下生体イメージングを行い, 第一次感覚野パレル領域 (SIBF) において触覚刺激に応答する細胞の活動変化を検証した。その結果, ASD モデルマウスでは触覚刺激に応答する細胞間の活動の同期性が自発時, ヒゲ刺激時の両方において健常マウスよりも低下していることが明らかになった。さらにホログラフィック顕微鏡を用いることで最大 100Hz の時間分解能で神経細胞 Ca^{2+} 活動を捉え, ASD モデルマウス SIBF における神経細胞の微細な活動変化を抽出した。本研究は ASD の感覚異常に着目し, 神経回路活動変化を捉えることで, ASD の感覚異常をきたす神経回路基盤の解明に挑戦する。(利益相反 なし)

P-13. HL-1 細胞における I_{K1} 電流の解析と発現制御

○九田裕一¹, 倉田康孝¹, 池田崇之², 谷田 守¹, 津元国親¹, 芝本利重¹, 米倉秀人² (¹金沢医科大学・医学部・生理学 II, ²同 医学部・生化学 II)

【目的】HL-1 マウス心筋細胞は自動能を持っており, ペースメーカー活動のイオン機序及び動力的メカニズムの研究に有用である。自動能の有無は内向き整流 K^+ チャネル電流 (I_{K1}) に依存すると考えられるが, HL-1 細胞における I_{K1} の動態・特性に関する詳細な解析はなされていない。そこで我々は, HL-1 細胞における I_{K1} 電流の特性および自動能との関連性を解析した。

【方法】HL-1 細胞の Kir チャネルを qPCR により測定した。超穿孔パッチ法と膜電位の蛍光イメージングにより, I_{K1} の動態, Ba^{2+} 投与の効果を解析し, さらに Kir2.1 の過剰発現, ノックダウンの自動能への影響を検証した。

【結果】1) HL-1 細胞にはマウス心筋細胞と同様に Kir2.1 及び Kir2.1 variant が発現していた。2) Kir2.1 の発現量には継代による有意な変化は見られなかった。3) 超穿孔パッチ法と膜電位の蛍光イメージング法で Ba^{2+} 誘発性自動能が観察された。4) I_{K1} 電流-電圧特性では過分極領域での内向き電流の減弱が認められた。5) Kir2.1 を過剰発現させると膜電位が過分極し, 正常の HL-1 でみられた自動能が消失した。また, 内向き電流の減弱は観察されず, 正常な I_{K1} と同様の電流-電圧特性が認められた。6) Kir2.1 を shRNA でノックダウンすると I_{K1} が減弱し, 脱分極状態になったが, 自動能は発現しなかった。

【結論】HL-1 細胞は正常マウス心筋細胞と同様の Kir チャネルの発現パターンを示し, 自動能の有無は I_{K1} の密度に依存していた。また, HL-1 への遺伝子導入による I_{K1} の発現制御が可能であることが証明された。現在 Kir2.4 の発現量の解析, Kir2.1 と他の Kir チャネルサブタイプの複合体が内向き I_{K1} 電流に与える影響を検討している。(利益相反 なし)