

奨励01. ゲラニオール香気による月経前症候群の抑うつ緩和

マークル 遙, 桑木共之, 柏谷英樹 (鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科統合分子生理学)

女性の生涯うつ病罹患リスクは男性の2倍であると言われる。その背景には様々な心理的・社会的要因が挙げられるが、月経周期や妊娠、出産や更年期といった女性特有のライフイベントに伴う女性ホルモン変動も女性のうつ病に影響を与えることが示唆されている。月経前に生じる精神的・身体的症状は月経前症候群 (premenstrual syndrome: PMS) と定義され、特に不安や抑うつなどの精神症状が重篤なものは月経前不快気分障害 (premenstrual dysphoric disorder: PMDD) とされる。PMS/PMDDは月経開始とともに軽快ないし消失するが、その原因はまだ明らかになっていない。PMS/PMDDの様々な症状に対し、アロマセラピー (芳香療法) で軽減したという臨床報告が多数ある。しかし、その作用機序は不明のままであり、民間療法の域をでない。本研究ではPMS/PMDDモデルマウスを作成し、香気暴露によりPMS/PMDDの症状の一つである抑うつ行動が軽減されるかを行動実験で検証した。病態モデルはプロゲステロン溶液0.5mg/mlを10ml/kgの割合で、5日間連続で腹腔内投与し、その後3日間離脱させて作成した。離脱3日目にモデルマウス群と対照群の尾懸垂試験を行い、さらに香気暴露群と対照群に分けて無動時間を比較した。香気成分は、ローズ精油やゼラニウム精油などに含まれるゲラニオールを使用した。実験の結果、香気暴露したモデルマウス群の無動時間が対照群と比較して短縮する傾向が確認されたため、ここに報告する。(利益相反なし)

奨励02. Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway attenuates monocyte-endothelial adhesion through FUT7 inhibition

Chia-Hsien Wu (呉 家賢), Tsuyoshi Inoue (Department of Physiology of Visceral Function and Body Fluid, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University)

Cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP) describes a vagus nerve-mediated systemic inflammation regulatory reflex, which the mechanism centered on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) activation of spleen-residue macrophages. However, CAP attenuating distal tissue inflammation despite a low level of systemic inflammation, with the unclear mechanism. Here, we hypothesized that

CAP regulates monocyte accessibility by influencing their adhesion to endothelial cells. Using RNA-seq analysis, we identified that $\alpha 1,3$ -Fucosyltransferase 7 (FucT-VII), the enzyme required for processing selectin ligands, was significantly downregulated by $\alpha 7$ nAChR agonist among other cell-cell adhesion genes. Flow cytometry experiments showed that the $\alpha 7$ nAChR agonist inhibited monocytic cell line U-937 binding to P-selectin, and adhesion to endothelial cells were attenuated by adhesion assays. Furthermore, $\alpha 7$ nAChR agonist selectivity was confirmed by $\alpha 7$ nAChR knockdown assays, showing that FUT7 inhibition and adhesion attenuation by the agonist was directly through $\alpha 7$ nAChR activation. To confirm the crucial role of FUT7 in cell-cell adhesion, knockdown or overexpression experiments of FUT7 were performed in U-937. Consistently, FUT7 knockdown inhibited the adhesive properties of U-937 and prevented them to adhere to endothelial cells. Overexpression of FUT7 also abrogated the adhesion attenuation induced by GTS-21 indicating that FUT7 inhibition was sufficient for inhibiting adhesion by $\alpha 7$ nAChR activation. Our work demonstrated that $\alpha 7$ nAChR activation regulates monocyte adhesion to endothelial cells through FUT7 inhibition, providing a novel insight into the CAP mechanism. (COI: Yes)

一般01. 自発運動量, 感覚閾値を用いたベンゾピレン暴露ラットに対するケイヒの効果検討

申 敏哲¹, 行平 崇^{1,2}, 小牧龍二^{1,3}, 福永貴之^{1,4} (熊本保健科学大学保健科学部リハビリテーション学科,² 帝京大学福岡医療技術学部理学療法学科,³ リハビリテーションセンター熊本回生会病院,⁴ くまもと南部広域病院)

ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレン投与により中毒されたラットに対するケイヒの効果、自発運動量計測法、定量的閾値評価法、分子生物学法で検討した。その結果、自発運動については、対象群に対し、ベンゾピレン投与群で夜の自発運動の減少がみられ、ケイヒ投与群ではその減少が改善された。5Hz, 250Hz, 2000Hzの電気刺激周波数を用いた感覚刺激による定量的閾値評価法では、2000Hzのみ、ベンゾピレン投与群で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒの投与によりその上昇が抑制された。また、酸化ストレス度についても、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で酸化ストレス状態の改善が見られた。Western Blotを用いたcytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1), myelin basic protein (MBP), myelin-associated glycoprotein (MAG) proteinの発現変化の検討では、ベン

ゾピレン投与群でCYP1A1の発現増加, MAGの発現低下がみられ, ケイヒの投与群ではCYP1A1の発現増加の抑制, MAGの発現低下の抑制がみられた。これらの結果から, ベンゾピレンの投与は, その毒性により触・圧覚を伝える線維の損傷を引き起こし, 脱髄を起こした結果, 感覚異常等が発生した可能性が考えられる。また, ケイヒの投与は, これらのベンゾピレンの作用をケイヒが持つ抗酸化作用とAHR活性化阻害作用によって抑制させることで感覚異常を改善させた可能性が考えられる。(利益相反なし)

一般02. マクロファージにおける交感神経と副交感神経を介した相乗的抗炎症メカニズムの解明

牟田久美子¹, 梅根隆介^{1,2}, Chia-Hsien Wu², 中村恭菜², 井上 剛², 西野友哉¹ (長崎大学病院腎臓内科,²長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

【背景】迷走神経あるいは交感神経を刺激することで, 免疫細胞を介した抗炎症効果が発揮されることが示されているが, 同時に刺激した場合の抗炎症効果への影響は不明である。【方法】RAW 264.7 (マウスマクロファージ) に様々な条件下で自律神経刺激を与えることで抗炎症効果やマクロファージの変化を評価した。【結果】RAW 264.7にLPSとGTS-21 ($\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト)あるいはLPSとサルブタモール ($\beta 2$ アドレナリン受容体アゴニスト)を投与すると, いずれも濃度依存的に抗炎症効果が得られた。さらに, GTS-21, サルブタモールを同時に投与すると, 単独で投与した場合と比較して相乗的な抗炎症効果が得られた。また, RAW 264.7にGTS-21またはサルブタモールを投与した際のRNA-seqデータを基に, 相乗的抗炎症メカニズムに関与する可能性のある遺伝子を見出した。その中でも *Tspan13* (Tetraspanin-13)をRAW 264.7に過剰発現させたところ, 抗炎症効果が誘導されることを確認した。【結論】迷走神経および交感神経刺激によって相乗的な抗炎症効果が得られる。*Tspan13*は自律神経による相乗的抗炎症メカニズムにおいて重要なはたらきをもつ。(利益相反あり)

一般03. 幼少期ストレスモデルラットにおける排尿機能と行動への影響

上條中庸, 宮里 実 (琉球大学大学院医学研究科システム生理学)

幼少期のネグレクトや虐待などのストレス経験は脳機能(中枢)に構造的, 機能的に影響を及ぼすだけでなく, 腸や膀胱など排泄機能(末梢)の障害にも関わり, その影響は成長後も続くことが示唆されている。本研究では, 幼

児期に適切な学びを要する膀胱機能に着目し, 生後間もない仔を母親から一時的に分離す母子隔離(maternal separation: MS)モデルを用いた。未成熟ラットと成熟ラットの経時的な下部尿路機能変化と行動変化との関連を検討した。具体的には, ラットの仔を生後2日から14日まで1日6時間母親から隔離した後, 21日齢で離乳させた群を母子隔離群(MS群)とした。3週齢と9週齢で行動実験(Y字迷路, 高架式十字迷路)・代謝ケージによる覚醒下排尿行動を測定した。その後膀胱内圧測定を行い, 最後に膀胱の病理形態学的評価を行った。結果, 3週齢MS群では, 行動量が減少, 代謝ケージ測定では排尿回数に差はないが, 24時間尿量と1回排尿量が有意に減少した。9週齢MS群では, 行動量が増加, 膀胱内圧測定では排尿間隔が有意に短くなった。形態学的評価ではいずれも差は見られなかった。本研究では, 母子隔離ストレスによって, 未成熟ラットでは行動, 排尿機能ともに低下, 成熟ラットではともに増加した。したがって, 母子隔離ストレスモデルは, 下部尿路と行動とともに障害, その機序として末梢—中枢連関が示唆された。(利益相反なし)

一般04. C-terminus of caveolin-1 promotes mitochondrial fission during vascular smooth muscle cell migration

Yuko Kato¹, Shiho Satomi², Hemal H. Patel^{3,4} (Department of Advanced Medical Sciences, Faculty of Medicine, Oita University, ²Department of Anesthesiology and Critical Care, Hiroshima University, ³Department of Anesthesiology, University of California, San Diego, ⁴Veterans Affairs San Diego Healthcare System)

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration plays a crucial role in vascular physiology and pathology. During cell migration, mitochondria are fragmented within lamellipodia to produce large amounts of ATP. Caveolin 1 (Cav1) is an integral membrane protein abundant in VSMCs. We reported that Cav1 localizes to mitochondria and plays a non-canonical role in regulating mitochondrial function. Moreover, it was reported that the expression of genes involved in mitochondrial function was abnormal in fibroblasts expressing mutated Cav1, in which the C-terminal 18 amino acid residues are truncated. In this study, we examined the role of Cav1 in VSMC migration, focusing on the C-terminus. Lentiviral vectors carrying the truncated C-terminal 18 amino acid residues-on human Cav1 cDNA, full-length Cav1, or eGFP-control plasmid were transfected into human primary VSMCs and mitochondrial function upon (PDGF)-BB-induced migration

were examined. Migrating VSMCs transfected with C-terminus-truncated Cav1 showed significantly decreased oxygen consumption and phosphorylation of Drp-1, which promotes mitochondrial fission, compared to those transfected with the control vector, and mitochondrial fission was attenuated. These results suggests that the C-terminus of caveolin-1 is involved in promoting mitochondrial fission during vascular smooth muscle cell migration. (COI: Yes)

一般 05. Cav1.2 と Nav1.2 の機能亢進変異はマウス大脳皮質において異なる様式で回路形成を障害する

玉川(中川) 直¹, 菅生厚太郎², 永田英孝², 田川義晃¹
(¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学分野, ²住友ファーマ株式会社基盤技術研究ユニット)

L型カルシウムチャンネル Cav1.2 と電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.2 は、神経細胞の活動強度とカルシウムシグナルを制御し、大脳皮質の回路形成に重要な役割を担う。両チャンネルの様々な変異は、回路形成異常を伴う生後早期発症の脳障害を引き起こす。ティモシー症候群 (Timothy Syndrome) は、Cav1.2 の機能獲得型変異を原因とする、QT 延長症候群や自閉症スペクトラム障害など心臓や神経系の症状を伴う多臓器障害である。我々は、ティモシー症候群の原因変異である I1166T 変異体や他の変異体を、マウス大脳皮質の一次体性感覚野の第 2/3 層神経細胞に子宮内電気穿孔法で導入したところ、一定割合の神経細胞で移動障害が認められ、反対側皮質への軸索投射も顕著に減少した。一方、発達性てんかん性脳症 11 (Developmental and epileptic encephalopathy-11) は、Nav1.2 の機能獲得型変異を原因とする、幼少期に発作発症と発達遅延を特徴とする神経疾患である。我々は Nav1.2T773I 変異体を同様に第 2/3 層神経細胞に導入したところ、細胞移動の障害は限定的なのに対し、同側大脳皮質第 5 層の軸索発達と白質での軸索伸長に強い障害が生じることを見いだした。Cav1.2 と Nav1.2 の神経回路形成への寄与は異なる可能性があり、本発表で議論したい。(利益相反 あり)

一般 06. 神経系・免疫系のクロストークを介した血圧制御メカニズムの解明

梅根隆介^{1,2}, Chia-Hsien Wu², 中村恭菜², 井上 剛², 西野友哉¹ (¹長崎大学病院腎臓内科, ²長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

【背景】免疫細胞は高血圧発症に寄与することがわかっている。一方で、自律神経刺激により脾臓の免疫細胞が修飾を受け、動脈や腎臓へ作用することがわかっている。この

ことから、神経系・免疫系のクロストークが血圧制御に関与することが示唆されるが、そのメカニズムは不明な点が多い。【方法】アンジオテンシン II 誘導高血圧マウスを作成し、このマウスから取り出した脾臓を野生型マウスに移入することで血圧への影響を評価した。また、野生型マウスから取り出した脾細胞に様々な条件で自律神経刺激を行い、ATII 誘導高血圧マウスに移入することで、高血圧が誘導されるか抑制されるかを評価した。【結果】ATII 投与により高血圧が誘導されることを確認し、そのマウスから取り出した脾細胞を野生型マウスへ移入したところ、高血圧が誘導された。一方、ATII 誘導高血圧マウスに自律神経刺激を行った脾細胞を移入したところ、ニコチンまたは生理食塩水で処理した脾細胞を移入したマウスでは高血圧が誘導されたが、ノルアドレナリンで処理した脾細胞を移入したマウスでは高血圧誘導が抑制された。【結論】脾細胞は高血圧誘導に寄与するが、交感神経刺激を受けた脾細胞は高血圧誘導を抑制する。(利益相反 あり)

一般 07. 舌への痛覚、触・圧覚刺激が脳血管性認知症モデルラットに及ぼす影響

小牧龍二^{1,2}, 行平 崇^{1,3}, 福永貴之^{1,4}, 田中哲子¹, 今井玲華¹, 可徳晶子¹, 羽田野雄太¹, 申 敏哲¹ (熊本保健科学大学保健科学部リハビリテーション学科, ²リハビリテーションセンター熊本回生会病院, ³帝京大学福岡医療技術学部理学療法学科, ⁴くまもと南部広域病院)

舌には味覚だけではなく体性感覚を伝える感覚神経が密に分布しており、これまでの先行研究において、舌の体性感覚についての研究は少ない現状にある。近年、我々は正常ラットの舌への体性感覚刺激が、海馬を活性化させ成長因子の増加や細胞新生を促進し、記憶力の増強を及ぼす可能性を明らかにした。これらの結果は、舌への体性感覚刺激が脳血管性認知症の症状改善にも十分効果的である可能性を示している。本研究では、正常ラットで一番効果的であった舌への触・圧覚、痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットに及ぼす影響を行動学的手法、免疫学的手法を用いて検討した。その結果、学習・記憶機能評価では、脳血管性認知症+触・圧覚刺激群 (P2VO+TPS 群)、脳血管性認知症+痛覚刺激群 (P2VO+PS 群) で脳血管性認知症群 (P2VO 群) に対し、学習・記憶力の改善が認められた。さらに、P2VO+TPS 群、P2VO+PS 群では、P2VO 群に比べラットの海馬における c-Fos と BrdU 陽性細胞の増加、成長因子の増加がみられた。これらの結果から、舌への触・圧覚刺激は、ラットの脳を活性化させ、記憶力の改善に影響を与えることで脳血管性認知症の症状を改善させる可能性が示唆される。(利益相反 なし)

一般08. The physiological role of VRK1 in the central nervous system

Magdeline E. Carrasco Apolinario, Ryohei Umeda, Kenshiro Shikano, Hitoshi Teranishi, Reiko Hanada (Department of Neurophysiology, Faculty of Medicine, Oita University, Oita, Japan)

Vaccinia-related kinase 1 (VRK1) is a mainly nuclear serine/threonine kinase implicated in several cellular processes, such as chromatin condensation, transcription regulation, and cell proliferation. Several recessive mutations found in the VRK1 gene are associated with motor neuropathies and different phenotypic features; ranging from microcephaly, and pontocerebellar hypoplasia, to motor and sensory neuropathy syndrome. Therefore, VRK1 has been identified as potentially involved in developing and maintaining the nervous system, but this role is not yet elucidated. In this study, we established a VRK1 deficient zebrafish model (VRK1^{-/-}) and evaluated the neurological features resulting from the lack of VRK1 expression. We found that VRK1^{-/-} zebrafish results in growth retardation and microcephaly, characterized by a reduced brain area, and also showed decreased locomotor activity and anxiety-like behavior. Our data shows VRK1^{-/-} zebrafish to be a useful model of microcephaly and neurological involvement, to examine VRK1 role in neurological development and motor activity. (COI: No)

一般09. LC-MSによる修飾ヌクレオシド測定で行うCOVID-19診断・重症度判定技術の開発

永芳 友^{1,2}, 西口栞世^{1,2}, 山村遼介^{1,2}, 中條岳志¹, 富澤一仁¹ (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座,²同 腎臓内科学講座)

RNAは多彩で複雑な化学修飾がなされることで適切な機能を果たすことが知られている。RNA化学修飾酵素は100種類以上同定されているのに対し、脱修飾酵素はほとんど報告されていない。我々は化学修飾を持つRNA(修飾RNA)の転機に着目した。修飾RNAは細胞の中でヌクレオシドまで分解されたのち、化学修飾が存在する部位(修飾ヌクレオシド)は細胞外に排泄されることを明らかにした。COVID-19は世界中で感染流行を来し、大きな社会的影響を与えている。COVID-19はSARS-CoV-2と呼ばれるRNAウイルスが原因であることが知られており、ウイルス内部には未知の修飾RNAの存在が報告されている。これらの背景から我々は「COVID-19患者の血液や尿には、感染特異的修飾ヌクレオシドが多く排泄されているのではない

か?」という着想に至った。我々は培養細胞にSARS-CoV-2を感染させることで、バイオマーカーとなり得る修飾ヌクレオシドを探索した。その後、実際のCOVID-19患者の血清および尿中の修飾ヌクレオシドをLC-MS/MSを用いて分析し、バイオマーカーとして有用な2種類の修飾ヌクレオシドを同定した。またCOVID-19患者の血清中修飾ヌクレオシドと臨床経過との関連を検討したところ、修飾ヌクレオシドの上昇は重症度判定、治療効果を反映することを明らかにした。(利益相反 あり)

一般10. *Ophiocerdyceps sinensis*による肺高血圧症改善効果の検討

平石敬三¹, 胡 耀鵬¹, 藤田孝之¹, 井上隆司¹, 倉原琳² (福岡大学医学部生理学,²香川大学医学部自律機能生理学)

肺高血圧症(PH)は、肺動脈の血栓形成・過収縮とリモデリングにより肺血管抵抗が上昇し、右心不全をきたす難治性の血管病である。冬虫夏草*Ophiocerdyceps sinensis*(OCS)は、増殖や組織リモデリングへの抑制作用をもつ。またTRPM7チャンネルは、炎症や組織リモデリングに関与し、その特異的阻害剤FTY-720が冬虫夏草に由来することが知られている。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した。

モノクローリン誘導PHラットへのOCS投与は、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、肺動脈の筋性化が少なかった。PHラット及びPH患者の肺動脈肥厚病変部位にTRPM7チャンネルの発現が観察された。OCSは、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-β2による内皮間葉転換、IL-6によるSTAT3のリン酸化や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はトロンボキサンA2アナログU46619収縮を抑制した。OCSはPHの病態改善効果を示し、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を示唆した。(利益相反 なし)

一般11. アセチルコリン受容体刺激は脾臓のマクロファージ細胞連関を惹起し抗炎症効果を発揮する

中村恭菜, 井上 剛 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

【背景】迷走神経刺激がコリン作動性抗炎症経路を活性化し腎臓保護効果を発揮することがわかっている。この経路

は脾臓内のマクロファージ (M ϕ) 上の $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ nAChR) を介し惹起されると考えられているが、生体内では介在しうる因子が多く不明な点も多い。【方法】M ϕ 特異的 $\alpha 7$ nAChR 欠損マウス (LysMCre ; $\alpha 7$ flox) を作成し LPS 誘導敗血症モデルで全身炎症・腎障害を評価した。脾臓の single cell-RNA seq を行い ACh 受容体が脾臓の免疫細胞に及ぼす影響を評価した。【結果】 $\alpha 7$ nAChR 特異的アゴニスト (GTS-21) 投与は、野生型マウスでは LPS による全身炎症・腎障害共に改善を認めたのに対し、LysMCre ; $\alpha 7$ flox マウスにおいてはその改善効果が消失した。続いて脾臓の single cell-RNA seq 行い、LPS による炎症下で GTS-21 を投与した場合に M ϕ の細胞数の変化は認めないものの、ligand-receptor 解析にて M ϕ -M ϕ 間の相関の増加を認めた。更に In vitro で M ϕ 細胞株を用いた遊走実験にて、GTS-21 が M ϕ の遊走を増やすことを確認した。脾臓を摘出したマウスではこの抗炎症作用は消失した。【結論】GTS-21 は脾臓内で M ϕ -M ϕ 間の相関を増やすことで抗炎症効果を発揮する。(利益相反 なし)

一般 12. 夜行性動物であるラットの習性を用いた黒酢と黒高麗人参の抗疲労効果検討

福永貴之^{1,2}、小牧龍二^{1,3}、行平 崇^{1,4}、石原光菜¹、齊田葉里¹、竹田陸人¹、宮崎真里奈⁵、松本祥幸⁵、申 敏哲¹ (¹熊本保健科学大学保健科学部リハビリテーション学科、²くまもと南部広域病院、³リハビリテーションセンター熊本回生会病院、⁴帝京大学福岡医療技術学部理学療法学科、⁵えがお健康研究所)

本研究では夜行性動物であるラットの習性を利用し、夜の自発運動量を小型運動量計 (ナノタグ) で測定し黒酢と黒高麗人参の摂取が疲労に及ぼす効果を検討した。雄の Wistar 系ラットを用い蒸留水、黒酢、黒高麗人参投与群に分けた。黒酢、黒高麗人参投与群ではそれぞれを蒸留水に溶かし、1ml/day ずつ胃に直接投与した。ラットの自発運動量計測はナノタグを使用し、疲労誘導はラット専用トレッドミルランニング装置を用いた。その結果、ラットの自発運動量は、夜に対し昼の運動量が有意に減少した。またトレッドミルランニング速度変化で誘発される疲労により夜の自発運動量は速度依存的に減少した。夜の自発運動量が3割減少するトレッドミルランニング速度を使用し黒酢、黒高麗人参の抗疲労効果検討では、黒酢、黒高麗人参の1回投与による昼夜行動量は群間有意な変化はみられなかったが、1週間投与では蒸留水投与群に対し、黒酢、黒高麗人参で1日目と2日目で夜の自発運動量の増加がみられた。1ヶ月間投与では蒸留水投与群に対し、黒酢、黒高麗人参で1日目と2日目で夜の自発運動量の有意な増加がみら

れた。また、黒酢、黒高麗人参投与群で TPH と 5-HT 発現量の低下、酸化ストレスの抑制がみられた。従って、継続的な黒酢、黒高麗人参の摂取は、酸化ストレスを抑制させ、TPH と 5-HT の発現量を減少させた結果、酸化ストレスにより誘導される疲労や中枢性疲労の軽減と疲労回復を促進させる可能性が考えられた。(利益相反 あり)

一般 13. 喉頭部の味蕾様構造における陰イオンチャンネル発現

徐 嘉鍵、中富千尋、氏原 泉、小野堅太郎 (九州歯科大学歯学部健康増進学講座生理学分野)

水嚥下反射において咽頭喉頭部での水受容機構については不明である。最近の知見では、喉頭部の味蕾様構造からの ATP 放出による嚥下誘発神経の活性化が報告されている。一方で、水嚥下は NaCl、特に Cl⁻ により抑制作用を受けることが古くから知られている。細胞内への水刺激は Cl⁻ チャンネルから Cl⁻ の流出により細胞を脱分極させる。そこで我々は、喉頭部味蕾様構造における Cl⁻ チャンネル発現が水受容に関与するとの仮説を立てた。ラット喉頭蓋披裂ヒダ (アルテノイド) における RT-PCR 解析において、CICファミリーの中で CIC-3 が最も高発現していた。さらに、咽頭喉頭部の凍結切片を作製し、味細胞マーカーである CK8、味細胞 II 型・III 型マーカーおよび神経線維マーカーである PGP-9.5 で蛍光染色したところ、喉頭蓋披裂ヒダに免疫陽性の味蕾様構造を確認した。CIC-3 蛍光染色では粘膜上皮全体に陽性像を認めた。また、CK8 と CIC-3 との蛍光免疫2重染色を行ったところ、CK-8 陽性の味蕾様構造物の味孔相当領域に CIC-3 の強い陽性像を認めた。我々は以前の研究により咽頭喉頭部の界面活性剤処理により水嚥下が強く抑制されることを見出している。そこで、Triton-X 処理後の喉頭蓋披裂ヒダ切片で CIC-3 蛍光染色を行ったところ、味孔相当領域の CIC-3 陽性像が消失していた。以上の実験結果により、喉頭蓋披裂ヒダの味蕾様構造物における CIC-3 発現が水嚥下における水受容に関与していることが示唆された。(利益相反 なし)

一般 14. てんかんモデルゼブラフィッシュへの抗てんかん薬投与時の脳内神経伝達物質動態の解析

梅田涼平^{1,2}、岡成和夫³、寺西仁志¹、鹿野健史朗¹、花田礼子¹ (¹大分大学医学部神経生理学、²同 先進医療科学科、³同 小児科学講座)

てんかんは、脳内の異常な神経活動を伴う、最も頻度の高い慢性神経疾患であり、国内外において深刻な健康問題となっている。てんかん発作の病態は、興奮性と抑制性の脳内神経伝達物質のバランス障害に起因していると考えら

れているが、てんかん発作時や AED 投与時の詳細な神経伝達物質動態は未だ明らかになっていない。

そこで我々は、野生型成体ゼブラフィッシュを用いてペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発性てんかん発作モデルを作製し、脳内の一連の神経伝達物質動態を解析した。次に、AED であるカルバマゼピン (CBZ)、レベチラセタム (LEV) やフェンフルラミン (FFR) を投与した際の際の非発作時および PTZ による発作誘発時の行動変化ならびに主要な神経伝達物質に及ぼす影響を解析した。その結果、PTZ による発作誘発直後の脳内のセロトニンとドーパミンのレベルが有意に増加することが判明した。非発作時に AED を投与した際は、FFR 投与群でセロトニン、LEV 投与群ではアセチルコリンレベルの上昇が認められた。同時に、LEV の投与群では行動の変化が認められた。最後に PTZ による発作誘発時に AED を投与した際には全ての AED 投与群においててんかん発作が抑制され、CBZ 群で脳内のグルタミン酸が減少し、FFR 群で脳内の GABA とコリンのレベルが上昇した。しかし、LEV での神経伝達物質の変化は観察されなかった。以上より、各 AED は異なる神経伝達物質の動態によって異なる薬理作用メカニズムを有することが示唆された。(利益相反 なし)

一般 15. 迷走神経刺激によるマウス嚙下関連筋線維化抑制を介した誤嚥予防法の検討

副島駿太郎^{1,2}、呉 家賢²、井上 剛²、熊井良彦¹ (長崎大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室、²長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

背景：頭頸部癌放射線治療による誤嚥性肺炎は致死的な場合もあるが、メカニズムが不明で根本的な治療法開発に至っていない。我々は、頭頸部癌放射線治療後に見られる嚙下障害について、「放射線照射後による様々な影響の一つに、嚙下関連筋（前頸筋）の線維化があり、これが喉頭の挙上運動を制限するため、誤嚥に至る」との仮説を立てた。

目的：本研究は、まず放射線照射動物モデルを作製し、これが近年腎臓の抗線維化作用で着目されている迷走神経電気刺激により、改善されるか検証することを目的とした。また、これらのメカニズムを *in vitro* で検証することを目的とした。

方法：二つの照射量 24Gy と 72Gy の単回照射マウス (週齢 6~7 週, SLC, C57BL6J, 各群約 N=6) を作製した。嚙下関連筋採取時期を照射後 10 日, 1 ヶ月, 3 ヶ月に設定した。RT-PCR により線維化マーカーの発現量を定量化し、組織学的にも比較検討した。72Gy の 1 ヶ月待機による線維化が、照射直前の迷走神経刺激により抑制されるのかを比較検討した。

結果：当然、24Gy より 72Gy の方がより線維化が強い傾向にあった。待機 10 日より 1 ヶ月の方がより線維化が強い傾向にあったが、予備実験の段階では 3 ヶ月待機すると逆に線維化は低下する傾向にあった。発表の際は再現をとって提示する。また、照射による線維化が迷走神経刺激により抑制される傾向が見られた。(利益相反 なし)

学部 01. 細菌特異的修飾ヌクレオシドによる自然免疫応答メカニズムの解明

高村美帆¹、永芳 友^{1,2}、西口葉世^{1,2}、山村遼介^{1,2}、中條岳志¹、富澤一仁¹ (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座、²同 腎臓内科学講座)

リボ核酸 (以下、RNA) はタンパク質翻訳を主とした重要な役割を担っている。RNA には複雑で多彩な化学修飾が存在しており、様々な生理機能を担っている。近年細菌やウイルス由来の外來 RNA が免疫原性をもち、自然免疫の中心的な役割を果たす Toll 様受容体の一部には単一ヌクレオシドを認識するものが報告されている。しかし無修飾のヌクレオシドは細胞内外に多量に存在するため、修飾を持つヌクレオシドが真のリガンドとしての機能を持つ可能性がある。これらの背景から、「細菌やウイルスに特異的な修飾ヌクレオシドが免疫反応を惹起するのではないか?」という仮説を立て、研究を行った。まず、単球由来白血病細胞である THP-1 細胞に大腸菌由来のヌクレオシドを添加し、IL-6 の発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。その結果コントロールと比較し IL-6 の発現が上昇した。また、大腸菌以外の菌株においても同様の反応が引き起こされるのか調べてみたところ、他の 3 菌種で大腸菌と同程度の IL-6 の発現上昇が確認された。そこで、今回用いた 10 種類の菌に含まれる RNA 化学修飾を高速度液体クロマトグラフ質量分析計で解析したところ、上記の反応を引き起こす候補物質として 1 種類の細菌特異的修飾ヌクレオシドが候補に挙がった。今後はこの細菌特異的修飾ヌクレオシドがどのような分子メカニズムを介して免疫反応に関わっているのかを詳細に検討していく。(利益相反 なし)

学部 02. スフィンゴシンキナーゼ 2 の下流遺伝子 Bst1 は、腎虚血再灌流障害および腎臓線維化の進展に重要である

橋本典樹、中村恭菜、呉 家賢、井上 剛 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科内臓機能生理学)

【背景】スフィンゴシンキナーゼ 1 (SphK1) および SphK2 はともにスフィンゴシン 1 リン酸 (SIP) を産生する。産生される SIP はヒストン脱アセチル化酵素を阻害し、ヒストンのアセチル化を促進し、SphK2 により調節される遺伝子

の発現を促進する。網羅的解析および機能解析により、Sphk2の下流にある腎臓線維化に関連する新規の遺伝子 Bone marrow stromal cell antigen-1 (Bst1) を同定した。【目的および方法】腎臓線維化進展には Bst1 発現が重要であることが判明した。Bst1 およびその上流の SphK1, SphK2 の機能を調べるために、遺伝子の Cloning を行い、in vitro で機能を評価する。【結果】pDsRed-Monomer-N In-Fusion[®] Ready Vector を用いて Bst-1, SphK1, SphK2 の Cloning に成功した。【結語】Cloning には成功したものの Bst-1 の細胞上での発現時、Ds-Red の発現が弱いという課題は残っている。今後はこの改善と、これらの遺伝子を使い、線維芽細胞における機能を評価する必要がある。(利益相反 なし)

一般 16. 暑熱環境下における運動負荷時の生体影響

丸山 崇, 上田陽一 (産業医科大学医学部第1生理学)

暑熱環境下で労働作業を行う際は熱中症リスクが高まることが知られており、時に生命の危機をおよぼすこともあるため、労働現場では予防すべき重要な疾病の一つである。熱中症には、熱失神、熱痙攣、熱疲労、熱射病の病態があり、脱水や電解質の喪失、深部体温上昇などの要因が重なり発症するとされている。暑熱環境での運動負荷時の生体変化の特徴を把握することで、熱中症の予防策を検討するため、健康成人男性 19 名を被験者とし、人工気候室における暑熱環境下 (気温 35°C, 湿度 50%) および通常環境下 (気温 25°C, 湿度 50%) で、トレッドミルによる運動負荷 (80w) を 2 回 (18 分×2 回) 加える実験を行った。この時、深部体温 (直腸温)、心電図、血圧 (3 分毎)、自覚症状等の測定を運動負荷前後も含め継続的に行った。また、運動負荷前後の精密体重や各種尿・血液検査を行った。運動負荷により、心拍が増大すると共に、深部体温の上昇を認め、脱水による体重変化を認めた。血液及び尿検査から得られたデータからは、運動負荷及び熱ストレスによる変化と考えられる指標が抽出出来た。これらの実験より暑熱環境下での運動負荷時の生体影響の特徴をまとめ、今後の熱中症予防の可能性を考察する。(利益相反 なし)

一般 17. 非選択的カチオンチャンネル TRPC6 における不活性化機構の破綻と腎疾患発症年齢との関連性

岡田 亮^{1,2}, 森 誠之² (1 産業医科大学産業保健学部人間情報科学, 2 同 医学部生命科学分野生体物質化学)

TRPC6 (Transient Receptor Potential Classical 6) は G 蛋白質共役型受容体等の刺激により活性化される非選択的カチオンチャンネルで、主に Na⁺・Ca²⁺ を細胞内に透過させる。TRPC6 遺伝子変異は腎疾患 (ネフローゼ症候群、

MCNS/FSGS) の原因であり、その発症年齢は幼児期から成人後まで幅広く分布する。腎疾患発症年齢の推測は治療方針の決定の際に有益であると考えられるが、発症に寄与する TRPC6 の分子機構には不明な点が多く、発症年齢推測の実現には至っていない。近年、我々は腎疾患に関連する TRPC6 変異体の構造・機能解析の結果、本来機能しているはずのカルシウム依存的不活性化機構 (CDI) と呼ばれるブレーキ機構が破綻し、結果として発生する遅延性シグナルが本症の発症に繋がるとの知見を得た (Polat and Uno *et al.*, 2019, *JASN*)。本研究では腎疾患に関連する TRPC6 変異体についてパッチクランプ法による定量的なチャンネル活性評価を行い、発症年齢との関連性を検討した。さらに、CRISPR-Cas9 システムにより CDI 破綻に繋がる変異を TRPC6 遺伝子へ導入した腎細胞株を樹立し、CDI 破綻から発症に至るまでの分子機構について検討を行ったことを報告する。(利益相反 なし)

一般 18. カルモジュリンを介した Cav1.2 チャンネルの 2 つの不活性化機構

菟部悦子, 徐 建軍, 亀山正樹 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学)

Cav1.2 チャンネルは細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に伴い不活性化化する。この Ca²⁺ 依存性不活性化 (CDI) には、カルモジュリン (CaM) が不可欠であるが、その分子機構は十分に解明されていない。我々は、2 分子の CaM がチャンネル C 末端領域に結合する仮説を提唱した。パッチクランプ (inside-out) 法では、Ca²⁺ 濃度一定の条件で CaM の濃度を変えると、ベル型の濃度—活性関係を示すこと、また、チャンネル C 末端ペプチドと CaM の結合実験では同時に 2 分子の CaM が結合することを報告した。この CaM 濃度依存性の不活性化は CDI の一部であり、生体内では相互に関連していると考えられる。本研究では、CaM を C 末端部に結合したチャンネル変異体とさらに N 末端ドメインを欠損したチャンネル変異体を作成し、不活性化を調べた。その結果、N 末端ドメインを欠損したチャンネル変異体は、高濃度 Ca²⁺ (外部 CaM の付加なし) では不活性化せず、高濃度の外部 CaM (かつ低濃度 Ca²⁺) により不活性化した。よって、1 分子の CaM による CDI にはチャンネル N 末端ドメインが必須であり、2 分子の CaM による不活性化は N 末端ドメインを必要としないことが示唆された。そこで、両者の優位性を調べるために、1 μM CaM 存在下で、野生型チャンネルとその N 末端ドメインを欠損したチャンネルの Ca²⁺—活性関係を比較した。(利益相反 なし)

一般 19. 生理学のための PCR ジェノタイプング:

Genome Trail 法による gDNA の Fast PCR 増幅

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)

生理学研究に遺伝子改変マウスを使うとき、手間と時間を浪費する PCR ジェノタイピングは不可避だ。そこで本講では、血液から PCR 用ゲノム DNA (gDNA) を簡便迅速に調製する「Genome Trail 法」を紹介する。さらに、新規開発の本法を既存の Fast PCR 法と組み合わせた、迅速 PCR ジェノタイピングの手技を紹介する。Genome Trail 法は、わずか3分で gDNA を調製する。No.2 定性ろ紙にマウスの血液を一滴 (1 μ L) 採取し、風乾して乾燥血痕 (DBS) にした。DBS は常温で5年以上保存できた。DBS 小片を PCR チューブ内にパンチアウトし (1.5mm Φ)、17mM-NaOH 溶液を加えて (50 μ L)、95 $^{\circ}$ C で1分間加熱した。これに等量の 20mM-Tris \cdot HCl 溶液を加えて中和し、上清を除去した。中和の確認と溶液の相互識別のため、溶液には 0.006% の Thymol Blue を加えた。チューブ内に残った DBS 小片は、PCR に適した gDNA を吸着していた。そこに PCR 反応液と PCR プライマーを加えて、ワンチューブで PCR ジェノタイピングを完了できた。PCR 増幅は Fast PCR 法によって最適化し、45分で完了した。また、Sry 遺伝子を目的遺伝子と Multiplex PCR して、性別も同時に判定できた。本法は、PCR ジェノタイピングの負荷を、大きく軽減すると確信する。(利益相反 なし)

一般 20. うつ病モデルマウスにおける咀嚼の生理的意義の解明

鎌手美栄^{1,2}, 寺西仁志¹, 河野憲司², 花田礼子¹ (大分大学医学部神経生理学講座,²同 歯科口腔外科学講座)

【背景】現代社会は「ストレス社会」と言われるが、過度のストレスは生体のホメオスタシスを破綻し、うつ病などの精神・神経疾患に進展することが知られている。「噛む」という行為 (咀嚼) はストレス緩和につながるとの報告があるが、これらの詳細な関連や分子メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。

【方法】食餌形態による咀嚼強度の異なるマウス群 (固形飼料摂取群と粉末飼料摂取群) に「社会的敗北ストレス: Repeated Social Defeat Stress (R-SDS)」を施行し、行動解析を行った。10日間の R-SDS 後に社会性行動試験 (Social interaction test: SIT) を施行し、ビデオ解析システムにて行動解析を行った。さらに、R-SDS における脳内モノアミンや脳内アミノ酸などの神経伝達物質動態を HPLC 測定系および GC-MS 測定系を用い解析した。R-SDS によるストレス負荷の評価としては、血中コルチコステロン濃度を測定した。

【結果】10日間の R-SDS により、Defeat 群マウスでは非 Defeat 群マウスに比較し血中コルチコステロン濃度の増加を認めた。また、SIT においては、Defeat 群マウスの粉末飼料摂取群では、固形飼料摂取群と比較してストレス回避ゾーンでの滞在時間が有意に増加していた。現在、脳内前頭前皮質、背側海馬、腹側海馬、扁桃核、青斑核での神経伝達物質を測定中である。

【結語】食事形態の違い (咀嚼強度の違い) がストレス耐性に影響を及ぼすことが判明し、咀嚼強度の低下によりストレスに対する耐性が低下することが明らかとなった。今後さらなる詳細な分子メカニズムを解明していく予定である。(利益相反 なし)

一般 21. 細胞内 Ca²⁺ は MEK1,2-ERK1,2 経路および CaM-CaMK 経路を介する転写制御作用によって hERG チャネル電流を調節する

魏 孟焱, 糸 慎一郎, 小山内博基, 吉村健司, 黒川竜紀, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

ラット新生獣心筋細胞および hERG チャネル発現 HEK (hERG-HEK) 細胞を Ca²⁺ イオノフォア (A23187) を含む培養液で培養すると、hERG (KCNH2) mRNA の発現が増大する。本研究は hERG-HEK 細胞に対し、パッチクランプ法を用いて hERG チャネル電流 (I_{hERG}) を測定し、細胞内 Ca²⁺ を介した I_{hERG} の制御作用に関わる分子機序の解明を目的とした。培養液中に A23187 を添加、または培養液中の Ca²⁺ 濃度を上昇させると、同細胞の I_{hERG} の電流密度は増大した。同増大作用は Ca²⁺ キレート剤 (EGTA-AM)、カルモジュリン (CaM) 阻害剤 (W-7, bepridil)、CaM キナーゼ阻害剤 (KN93)、MEK1, 2 阻害剤 (PD98059)、ERK1, 2 阻害剤 (FR180204) の添加によって消失したが、カルシニューリン阻害剤 (FK506, Rapamycin) や NFAT 阻害剤の影響を受けなかった。また、転写阻害剤 (アクチノマイシン D) や翻訳阻害剤 (シクロヘキサミド) の添付によって A23187 の I_{hERG} 増大作用は消失した。細胞内 Ca²⁺ は MEK1, 2-ERK1, 2 経路、および CaM-CaMK 経路を介する転写制御作用によって hERG チャネル電流を調節することが示唆される。(利益相反 なし)

一般 22. 抗がん剤曝露による非ホジキンリンパ腫細胞 KARPAS299 のサイトカイン発現量の変化

宮里優人, 柳迫和徳, 砂川昌範, 花城和彦 (名桜大学大学院看護学研究科病態生理学領域)

血液がんに対する化学療法の副作用に倦怠感があり、その病態生理学的機序の理解は有効な看護援助の実践に重要となる。倦怠感出現に関連して TNF- α 、IL-6 及び TGF- β

などの血中レベル上昇が知られているが、化学療法時のこれらサイトカインの由来については明らかではない。本研究では、抗がん剤曝露血液がん細胞のサイトカイン遺伝子発現量の変化について検討した。血液がん細胞には非ホジキンリンパ腫細胞 KARPAS299 を用い、抗がん剤には倦怠感出現率が比較的高率 (53.6%) にみられるベンダムスチン塩酸塩を用いた。サイトカインの遺伝子発現はリアルタイム PCR により定量化した。ベンダムスチン曝露後の細胞生存率は、50 μ M より高濃度では曝露 6 時間以降 70% 未満となり、RNA の回収が困難であった。したがって、ベンダムスチン 50 μ M を細胞に曝露し、TNF- α 、IL-6 及び TGF- β mRNA の発現量の変化について検討した。その結果、TNF- α の mRNA 発現は曝露 2 時間後から上昇し、3 時間後には非曝露群の 2.5 倍に達した。また、IL-6 では、同様に 3 時間後には 3.7 倍の mRNA 発現の上昇がみられた。一方、TGF- β については、3 時間後までに変化はみられなかった。抗がん剤治療後にみられる倦怠感の出現について、腫瘍細胞由来の TNF- α や IL-6 などのサイトカインが関与している可能性がある。(利益相反 なし)

一般 23. 嗅神経細胞における多様な匂い応答は嗅覚受容体に結合するアゴニストとアロステリックエフェクターの組み合わせによって決まる

深田幸平, 稲垣成矩, 今井 猛 (九州大学大学院医学研究院生体情報科学講座疾患情報研究分野)

個々の嗅神経細胞 (OSN) はそれぞれ 1 種類の嗅覚受容体 (OR) を発現している。個々の匂い分子は複数の OR に対しアゴニストとして作用し、活性化した OR の組み合わせで認識されることが知られている。一方、環境中の匂いの多くは多種類の匂い分子で構成される混合臭である。複数の匂い分子を作用させると、OSN の応答は拮抗的に抑制されたり、相乗的に増強されたりする例が知られているが、混合臭の匂い応答がどのようなロジックで決まるのかについてはよくわかっていない。そこで本研究では、OSN のアゴニストに対する応答が、応答を生じない分子 (ノンアゴニスト) によってどのように調整されるのかを包括的に *in vivo* で計測した。OSN 特異的な GCaMP3 トランスジェニックマウスに濃度の異なる酢酸アミルと 3 種類のアルデヒド、酢酸アミルと特定のアルデヒドで構成された混合臭をそれぞれ嗅がせ、OSN の応答を *in vivo* 2 光子イメージングにより観察した。酢酸アミルのみがアゴニストとして作用する OSN を抽出、ノンアゴニストの存在・非存在下において、各細胞のアゴニストに対する濃度応答曲線を作成した。その結果、約 33.6% の細胞でノンアゴニストが OR のアロステリック部位に作用し応答が増強された。さらに OR ごとにアロステリックエフェクターに対する選択性、結合親和性が異なっていた。これらの結果は、OSN における多様な匂い応答が、アゴニストだけでなくアロステリックエフェクターも含めた多様な組み合わせによって表現されることを示唆している。(利益相反 なし)