

奨励 01. Macrophage Induces Hypertension in Angiotensin II salt Mice Model

Peter Joseph Kasyoki^{1,2}, Ryusuke Umene^{1,3}, Kavoo Linge², Joseph K. Kweri⁴, Caroline Ngugi⁵, Tsuyoshi Inoue¹ (¹Department of Physiology of Visceral Function and Body Fluid, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, ²Department of Medical Physiology, School of Medicine, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya, ³Department of Nephrology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, ⁴Department of Human Anatomy, School of Medicine, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya, ⁵Department of Medical Microbiology, School of Biomedical Sciences, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya)

The concept that, the immune system contributes to hypertension has been of scientific interest in recent past with the hope that interventions in the immune system could offer hypertensive control to patients not achieving control with the available treatment options. This study explored involvement of the immune cells' activation in the kidneys in the development of hypertension. Hypertension was induced in male C57BL/6J mice by use of angiotensin II (1000 μ g/Kg/Min) delivered via mini osmotic pump for two weeks. Blood pressure was measured via tail plethysmography. Results showed significantly elevated blood pressure in the group receiving ang II and taking saline. Flow cytometry detected macrophages and CD4⁺ cells were elevated in the kidney in the hypertensive group. Kidney immunohistochemistry with F4/80 showed increased macrophage concentration in the hypertensive group. Trichrome kidney staining results showed increased fibrotic areas by hypertension induction. Depletion of macrophages with clodronate led to decreased blood pressure. This study revealed that macrophages are involved in hypertension development and could be a target for therapy in management of hypertension. (COI : no)

奨励 02. ラット口腔粘膜へのメントール滴下は濃度の違いにより疼痛に対して異なる作用を示す

福崎まり¹, 中富千尋², 徐嘉鍵², 川元龍夫¹, 小野堅太郎² (¹九州歯科大学顎口腔機能矯正学分野, ²同 生理学分野)

メントールは TRPM 8 の代表的なアゴニストであり、疼

痛誘発と鎮痛どちらの作用も示すことが報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、口腔内滴下法を用いて、高濃度 (1 M) メントールの疼痛誘発作用、低濃度 (1~100 mM) メントールの TRPV1, TRPA1 誘発性疼痛への鎮痛作用を解析した。実験には 300~500g の野生型 Wistar 系雄性ラットを使用した。ラットの下顎口腔前庭部に刺激溶液を滴下し、疼痛関連行動である顔面ラビング時間を 5 分間測定した。滴下溶液として、メントール、AITC、カプサイシン、1%DMSO (Vehicle) を使用した。また、TRPM 8 アンタゴニストである AMG-333 の胃内投与を行い、TRPM 8 を介した反応であるかを確認した。野生型ラットに高濃度メントール (1 M) を滴下すると、Vehicle 滴下群と比較してラビングが有意に増加し、この作用は AMG-333 投与で抑制されたことから、高濃度メントールが TRPM 8 を介して疼痛を誘発する可能性が示唆された。ラビングの有意な増加が認められなかった低濃度メントール (10, 100 mM) は、100 mM AITC によるラビングの増加は抑制しなかったが、100 μ M カプサイシンによるラビングの増加を有意に抑制し、AMG-333 投与によってその抑制効果が消失した。これは、低濃度メントールによる TRPM 8 の活性化が TRPV1 を介した疼痛を抑制している可能性を示唆している。メントールは TRPM 8 を活性化し、高濃度では疼痛誘発作用を、低濃度では TRPV1 に対する鎮痛作用を示す可能性が示唆された。(利益相反あり)

一般 01. TRPC3/6 チャンネル阻害剤 L862 はマウスポドサイトにおける PAN 誘発細胞障害に対して保護効果を示す

松田由宗^{1,2}, 坂口怜子², 岡田 亮^{1,3}, 木原隆典¹, 永田龍⁴, 森 誠之² (¹北九州市立大学国際環境工学研究科環境システム専攻, ²産業医科大学医学部, ³同 産業保健学部, ⁴大阪大学薬学研究科)

非選択的カチオンチャンネル Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 6 は、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) に発現を認め、糸球体濾過機能の維持に寄与していると考えられている。難治性ネフローゼ症候群の一つ巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) 患者の一部において、TRPC6 の不活性化遅延が生じ、ポドサイトのアクチンフィラメント乱れを引き起こすことが報告されている。従って、TRPC6 活性を阻害することは、糸球体障害を抑制するための有力なアプローチである。一方、TRPC6 の欠損に伴う類縁体 TRPC3 の代償的発現増加が報告されていることから、TRPC3/6 の双方を阻害できれば、更に治療に有効であると考えられる。

本研究では、薬物動態に優れた新規 TRPC3/6 チャンネル

阻害剤である L862 のポドサイトに対する効果を評価した。まず、MPC5 (Mouse Podocyte Clone 5) に L862 を投与し、その細胞毒性について MTSassay により評価した。L862 投与群と非投与群で、有意差はなく、L862 は細胞レベルで毒性を示さないことを確認した。次に、ポドサイト障害を引き起こすことが知られているピューロマイシニンアミノヌクレオシド(PAN)を処置した MPC5 細胞を用意した。これらの損傷を受けた MPC5 に L862 を投与したところ、既知の TRPC6 阻害剤 SAR7334 および TRPC3 阻害剤 Pyr 10 の単剤投与と比較して、より顕著な細胞形態の保護効果を示したため、TRPC3/6 の同時阻害の有用性が確認された。これらの結果は、蛋白尿抑制薬としての L862 の可能性を示唆している。(利益相反 なし)

一般 02. tRNA 修飾酵素, Cdkal1 の糸球体足細胞における生理機能の解明

永田裕子^{1,2}, 永芳 友¹, 中條岳史¹, 仲里仁史², 富澤一仁¹ (熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座,²同 生命科学研究部小児科学講座)

ゲノムワイド関連解析により *CDKAL1* 遺伝子は 2 型糖尿病の原因であることが報告された。我々は、*CDKAL1* が 37 位の tRNA^{Lys(UUU)} をチオメチル化する酵素であることを報告し、その遺伝子変異はインスリン分泌低下を引き起こすことを明らかにした。また、*CDKAL1* 遺伝子変異は、慢性腎臓病 (CKD) 進行の危険因子であることが報告されていたため、腎臓における *CDKAL1* の生理機能と CKD との関連に着目した。

まずマウス糸球体の免疫組織染色により *Cdkal1* がポドサイトに存在することを明らかにした。次に全身性 *Cdkal1* KO マウスを用いて、腎負荷に伴うアルブミン尿出現と電子顕微鏡上ポドサイト足突起の展退を明らかにした。より詳細な足細胞機能と *CDKAL1* との関連を評価するために *Cdkal1* KO ポドサイト培養細胞を作製した。*Cdkal1* KO 細胞では移動能が有意に低下しており、リジン翻訳効率が有意に低下していた。*Cdkal1* KO 細胞のプロテオーム解析においてリジン含有量の多いタンパク質ほど、発現量が低下していた。GO 解析では基底膜や足細胞機能に関連しているタンパク質が有意に低下していた。以上の結果から *CDKAL1* の欠損に伴い、腎足細胞においてリジンの翻訳効率が低下し、足細胞機能障害を呈することでアルブミン尿などの表現型と関連することが示唆された。(利益相反 なし)

一般 03. NPGL/NPGM システムの不安様行動における生理機能解析

鹿野健史朗, 寺西仁志, 花田礼子 (大分大学医学部神経生理学講座)

NPGL 及び NPGM は、視床下部に局在するエネルギー代謝調節に関わる分泌性小タンパク質として発見された。我々の先行研究により、NPGL 及び NPGM 両遺伝子欠損マウス (dKO マウス) では摂食量の減少及びエネルギー代謝の亢進により痩せを呈することが明らかになっている。一方、これまでにエネルギーホメオスタシスに基づくエネルギー代謝調節に NPGL/NPGM システムが関与することが示されてきているが、脳内報酬系などの高次脳機能が関わる摂食行動調節に本システムが関与するか否か明らかになっていない。そこで本研究では、NPGL/NPGM システムが高次脳機能に関与するかについて NPGL/NPGM dKO マウスを用いて行動学的解析を行った。オープンフィールド試験を施行したところ、野生型マウスに比べて dKO マウスではセンターゾーンへの侵入回数が減少した。また、受動回避試験では、dKO マウスではフットショックによって生じる恐怖記憶が减弱した。これらの行動学的解析から、dKO マウスでは不安様行動が减弱することが示唆された。(利益相反 なし)

一般 04. β -NMN の投与が脳血管性認知症モデルラットに対する効果検討

小牧龍二^{1,2}, 福永貴之^{2,3}, 上村太亮², 柳原久², 房野良樹², 申 敏哲² (1)リハビリテーションセンター熊本回生会病院, (2)熊本保健科学大学リハビリテーション学科, (3)くまもと南部広域病院)

脳血管性認知症モデルラットを用いて β -NMN の投与が脳血管障害による脳神経損傷と認知機能に及ぼす影響を行動学的手法、分子生物学的手法を用いて検討し、 β -NMN の臨床応用での可能性を検討することを目的とした。Wister システムを用い、全身麻酔下で 5-0 絹糸を用いて初めに右側総頸動脈を結紮し、その 1 週間後左側総頸動脈を結紮することで脳血管性認知症モデルラットを作成した。 β -NMN はそれぞれの濃度を蒸留水に溶かし、経口投与器を用いて 1ml ずつ、胃の中に直接投与した。実験最終日に短期記憶検査の Y-maze 試験と Step Down 試験を実施後、深麻酔下で脳標本を作製し、免疫染色法と Western Blot 法を用いて脳血管性認知症モデルラットに対する β -NMN の効果を検討した。その結果、両側総頸動脈結紮後蒸留水を投与した脳血管性認知症モデルラット群に対し、両側総頸動脈結紮後 β -NMN を投与したラット群では、Y-Maze 試験と Step Down 試験での記憶の改善効果、c-Fos 陽性細胞の増加、Caspase-3 タンパク質の有意な減少、BCL-2 タンパク質の増加、Bax タンパク質の減少傾向など Sham Control

群に近い値の変化がみられた。これらの結果から、 β -NMN 投与は脳血管性障害による機能不全が起きたミトコンドリアに作用し、機能を改善させることでミトコンドリア性細胞死内因性カスケードを抑制し、海馬内の細胞死を減少させることで記憶力低下改善に影響を与えた可能性が示唆された。(利益相反 なし)

一般 05. ストレス時の予期不安における NMU システムの役割の解明

早田暁伸, 鹿野健史朗, 梅田涼平, 寺西仁志, 花田礼子
(大分大学医学部神経生理学講座)

Neuromedin U (NMU) および Neuromedin S (NMS) は摂食やサーカディアンリズムの制御など様々な生理作用を有する神経ペプチドである。近年, NMU/NMS システムが、脳高次機能に関与していることが報告され、我々の予備実験にて「ストレス時の予期不安」に関与していることが示唆された。そこで本研究では恐怖記憶形成における NMU/NMS の役割を検討するため NMU/NMS 両遺伝子欠損 (dKO) マウスを樹立し、受動回避試験および脳内シグナル発現解析を行った。受動回避試験では、暗箱における電気ショック (EFS) 1 日後において、dKO 群はコントロール (WT) 群に比べ、著しい恐怖記憶の増強が認められた。また、EFS7 日後の恐怖記憶を解析したところ、WT 群では恐怖記憶の消去が認められたが、dKO 群においては認められなかった。さらに、EFS28 日後においても dKO 群では恐怖記憶の消去は認められなかった。また、EFS28 日後の背側海馬における未成熟神経細胞として知られている Doublecortin 陽性細胞数の有意な減少がみられ、形態学的な変化が認められた。さらに、EFS1 日後の脳内 c-Fos 陽性細胞数を計測したところ、dKO 群は WT 群に比べ扁桃核 LA 核において有意な c-Fos 陽性細胞数の増加が認められた。以上の結果から脳内 NMU システムは恐怖記憶の形成に密接に関与していることが示唆され、現在その詳細な分子メカニズムを追究している。(利益相反 なし)

一般 06. ラットは食物中の微細粒子を認知している

中富千尋¹, 若尾拓俊^{1,2}, 徐嘉鍵¹, 乾賢³, 小野堅太郎¹ (¹九州歯科大学生理学分野, ²同顎口腔機能矯正学分野, ³北海道大学口腔生理学分野)

おいしさは、味、香り、食感といった多様な要素により形成されるが、食感に関する研究はほとんど為されていない。これは、食品物性の認知を客観的に評価する動物実験系が存在しないためと考えられる。本研究の目的は、動物実験を用いて食物粒子性認知を評価することである。粒子性物質として結晶セルロースを用い、動物実験に雄性 Wis-

tar ラットを用いた。粒子性認知の確認には、グルコースとフルクトースを用いた嗜好学習試験法を応用した。ラットに 8% グルコースおよびフルクトース溶液を繰り返し呈示するとグルコース溶液への嗜好学習が成立するが、同時に、グルコースに添加したフレーバーへの嗜好学習も成立することが知られている。本研究では、フレーバーではなく粒子を用い、嗜好学習の成立により粒子性認知を評価することとした。φ20 μm 粒子液にグルコース、その濾液にフルクトースを加えると、φ20 μm への嗜好学習が成立したことから、ラットは φ20 μm 粒子を認知していることが明らかとなった。さらに、φ20 μm の濾液にグルコース、蒸留水にフルクトースを加えると、濾液への嗜好学習が成立した。これは、ラットが濾液中に存在する 3 μm 以下の微細粒子の認知が可能であることを示唆している。本研究手法を用いることにより、ラットの粒子性認知を客観的に評価することが可能となる。本手法を受容や神経回路メカニズムの解明に利用することにより、今後の食感認知研究の発展に寄与すると考えられる。(利益相反 なし)

一般 07. うつ病態における咀嚼の有用性の解明

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

現代は「ストレス社会」と言われるが、過度の精神的ストレスは生体のホメオスタシスを破綻し、うつ病などを発症する。以前より咀嚼はストレス緩和につながると言われているが、その詳細な分子メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。本研究では野生型マウスを用いて、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 (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 (SIT) を施行し、ビデオ解析システムにて行動解析を行った。その結果、R-SDS にて Defeat ストレスを与えたマウスのうち粉末飼料群では固形飼料群と比較して、SIT におけるストレス回避ゾーンでの滞在時間が有意に増加することが判明した。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 LC/MS/MS を用い解析したところ、Defeat 群マウスにおいて粉末食群では固形食群と比較して背側海馬におけるセロトニンが有意に低下していることが明らかとなった。また定量 PCR 法を用いた解析では、Defeat 群マウスでは、粉末食群は固形食群と比較して腹側海馬においてミクログリアのマーカーである Iba-1 が有意に増加していた。

以上より、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 08. 迷走神経の *in vivo* カルシウムイメージングを用いた腸内感覚サブモダリティーの解明

武島光里, 今井 猛 (九州大学大学院医学研究院疾患情報研究分野)

摂取された食物は腸において消化吸収されると同時に、膨大な種類の化学物質として腸内腔で感知され、その情報は脳へと送られる。この情報伝達機構として、従来から、消化管ホルモンによる液性制御が関わっていることが知られてきた。一方で、近年の研究により、腸上皮に存在する腸内分泌細胞 (EEC) が、舌咽迷走神経下神経節 (NPG) ニューロンとシナプス結合することで、腸内腔の情報を速やかに脳へと伝達していることも明らかになった。しかしながら、栄養素や腸内細菌代謝物をはじめとする様々な腸内腔の化学物質の情報を NPG ニューロンがどのようにコーディングし、脳へと伝達しているのかは十分に解明されていない。そこで本研究では、腸管腔内を複数の化学物質で刺激しながら、*in vivo* カルシウムイメージングを用いて NPG ニューロンの活動を計測した。その結果、各化学物質特異的に応答する NPG ニューロンが観察され、NPG において腸内腔の様々な化学物質に対応する機能的なサブモダリティーが存在することが示唆された。今後は、先行研究において遺伝子発現パターンに基づいて定義された NPG ニューロンの細胞種と機能的なサブモダリティーとの対応関係を明らかにするとともに、遺伝学的操作を用いて各サブモダリティーの生理学的意義の解明を目指す。(利益相反 なし)

一般 09. 神経変性疾患における VRK1 の役割の解明

梅田涼平¹, Magdeline Elizabeth Carrasco Apolinario², 鹿野健史朗², 寺西仁志², 花田礼子² (¹大分大学医学部先進医療科学科, ²同 医学部神経生理学講座)

Vaccinia-related Kinase 1 (VRK1) は、主に核内に存在するセリン/スレオニンキナーゼの一種であり、細胞増殖の制御や DNA 損傷に対する応答に関与していることが報告されている。ヒトにおいて VRK1 遺伝子の変異は、小頭症、運動神経障害、橋小脳低形成などの表現型を伴う神経変性疾患と深く関連することが知られている。しかし、これらの神経変性疾患と VRK1 との相関や詳細な分子メカニズムについてはいまだ明らかとなっていない。本研究では、*in vivo* における VRK1 の役割を解明するために、VRK1 遺伝子を欠損させたゼブラフィッシュ (VRK1^{-/-} フィッ

シュ) を作製し、形態学や生理学、分子生物学的な視点から多角的に解析を行った。その結果、VRK1^{-/-} フィッシュで野生型のゼブラフィッシュ (VRK1^{+/+} フィッシュ) と比較して成長遅延や小頭症、脳面積の減少、不安様行動を伴う自発活動の障害を認めた。さらに VRK1^{-/-} フィッシュで VRK1^{+/+} フィッシュと比較して、大脳領域での神経細胞の減少、神経細胞増殖の障害、核内ヘテロクロマチンの増加を認めた。以上より VRK1 は、神経細胞障害を介して不安や自発行動量に異常をきたす可能性が示唆された。(利益相反 なし)

一般 10. ガドリニウムによるシナプス伝達の双方向性調節

オドゲレル ゴリグト¹, 安田浩樹², 中島崇仁¹, 対馬義人¹ (¹群馬大学医学部放射線診断核医学, ²佐賀大学医学部生理学分野)

MRI 検査で使われるガドリニウム造影剤 (GBCA) は近年、ヒト小脳歯状核、基底核等に沈着すること、また動物モデルでは海馬等多くの組織で長期残留することが報告されている。そこでガドリニウムによる海馬シナプス伝達に対する作用、及び GBCA のシナプス伝達に対する影響を検討した。低濃度ガドリニウム (100 μ M) はシナプス伝達をシナプス前性に軽度増強するのに対し、高濃度ガドリニウム (500-1000 μ M) はシナプス前性長期抑圧を誘発した。グループ 1 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) 阻害剤、カンナビノイド受容体 (CBR) 阻害剤で 50% ほど抑制された。さらに ATP 受容体である P2X 受容体 (P2XR) 阻害剤 PPADS によって mGluR/CBR 依存性シナプス前性長期抑圧だけでなく、シナプス後性長期抑圧も抑制されたので、高濃度ガドリニウムは P2XR 活性によってシナプス後性長期抑圧とともに、P2XR \cdot mGluR 活性化によって内因性カンナビノイド 2-AG が放出されてシナプス前性長期抑圧が誘発されることがわかった。最後に、造影剤静注時の脳室内濃度に近い 100 μ M GBCA を投与すると、環状型 GBCA である Gd-DOTA はシナプス伝達に影響はなかったものの、線状型 GBCA である Gd-DTPA はシナプス伝達を軽度増強したので、Gd-DTPA ではキレートからはずれたガドリニウム存在可能性が示唆された。(利益相反 なし)

学部 01. 腎臓線維化における Bst1 の機能解明

橋本典樹, Chia-Hsien Wu, 中村恭菜, 梅根隆介, 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】核内に存在するスフィンゴシンキナーゼ 2 (SphK 2) により産生される 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、遺伝子の発現を促進する。網羅的遺伝子発現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】代表的な腎臓線維化モデルである片側尿管閉塞 (UUO) モデルを用いて、腎臓における Bst-1 の発現量の変化の評価を行う。Bst1 の機能を調べるために、Bst1 遺伝子のクローニングを行う。

【結果】UUO を行い、線維化した腎臓内で、経時的に Bst-1 の発現量が増加していることを確認した。また、pDsRed-Monomer-N In-Fusion[®] Ready Vector を用いて Bst-1 のクローニングに成功した。マウス胎児線維芽細胞 (NIH/3T3) において Bst-1 を過剰発現させると、TGF- β 刺激による細胞の線維化が促進されることが明らかとなった。

【結論】Bst1 遺伝子の発現が腎臓の線維化誘導と共に促進され、線維芽細胞において Bst1 過剰発現によって線維化が誘導されることが判明した。しかしながら、Bst1 を介した線維化機序および Bst1 の発現細胞については未だ不明点が多く、今後これらについて評価を行う。(利益相反 なし)

学部 02. SIK3 の ARHGEF2 Ser151 のリン酸化による細胞内局在の変化の検証

加藤亜美^{1,2}, 西田 慧², Gao Qianyun², 北園智弘², 柳沢正史² (¹大分大学医学部神経生理学講座, ²筑波大学国際統合睡眠医学科学研究機構)

睡眠は覚醒時に蓄積し、睡眠時に減衰する睡眠要求により制御されていると考えられているが、その制御機構についてはほとんど明らかになっていない。近年、所属研究室における先行研究により、セリンスレオニンキナーゼ SIK3 と低分子量 G タンパク質 RhoA が睡眠要求の制御に関与していること、グアニンスクレオチド交換因子 ARHGEF2 が SIK3 の基質候補であることが明らかになった。ARHGEF2 は細胞質の微小管に凝集しており、SIK3 のリン酸化候補である 151 番目のセリン残基 (Ser151) のリン酸化を介して細胞質内へ拡散し、RhoA を活性化することが知られている。そこで我々は SIK の活性変化による ARHGEF2 の細胞内局在の変動を調べ、ARHGEF2 が SIK3 の基質であるかを検証した。

本研究では、SIK 阻害薬 (HG-9-91-01) を SIK3 と ARHGEF2 を共発現させた HEK293T 細胞に投与し、ARHGEF2 の局在変化を観察した。投与前では細胞質内に拡散していた ARHGEF2 は、投与後は微小管へ凝集した。また、この局在変化は ARHGEF2 の Ser151 をアラニンに置換し、リン酸化を阻害すると見られなかった。以上より、SIK3

は ARHGEF2 Ser151 をリン酸化することを確認した。本結果と先行研究を踏まえ、SIK3 は ARHGEF2 を介した RhoA の活性化により、睡眠要求を制御すると推察される。(利益相反 なし)

一般 11. 心筋細胞の後脱分極は局所的な細胞内カルシウム上昇によって生じる

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)

心筋細胞に生じる EAD や DAD の後脱分極は、心室性不整脈を誘発する。後脱分極が生じる時には、細胞内 Ca^{2+} 依存性の膜電位ゆらぎが観察される。そこで、この膜電位ゆらぎと、細胞内 Ca^{2+} 動態との関連性を、カルシウムイメージングによって調べた。成獣 C57BL マウスから単離した心室筋細胞に、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-4 を負荷して、37°C の生理的条件下で $[Ca^{2+}]_i$ 動態を観察した。Fluo-4 蛍光は、倒立蛍光顕微鏡に取り付けた冷却 CCD カメラで録画し、細胞の膜電位はホールセルクランプ法で記録した。膜電位の脱分極ゆらぎにともなって、 $[Ca^{2+}]_i$ の一過性上昇が局所的に観察された。この局所 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は Ca^{2+} sparks より大きく、直径 5-10 μm の領域を占めた。細胞内には、この高 $[Ca^{2+}]_i$ 領域が多数まだら状に出現して (Ca^{2+} speckles)、膜電位にゆらぎを生じていた。それぞれの Ca^{2+} speckle は決まった位置に現れ、そこでは CICR が局所的に亢進していると考えられた。高 $[Ca^{2+}]_i$ 領域の伝播は、ある Ca^{2+} speckle から別の Ca^{2+} speckle へと、飛びとびに起こった。心室筋細胞に EAD や DAD の後脱分極をもたらすのは、 Ca^{2+} speckles の局所 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇だと結論する。(利益相反 なし)

一般 12. プルキンエ線維における TRPM4 チャネルの機能亢進型変異による、不整脈誘発機構の解明

胡 耀鵬¹, 平石敬三¹, 倉 傑輝¹, 李 欽², 朱欣², 井上隆司¹, 藤田孝之¹ (¹福岡大学医学部生理学, ²会津大学生体医用情報工学講座)

心臓の刺激伝導系、特にプルキンエ線維 (PF) においては、TRPM4 チャネルの発現が豊富である。家族性房室伝導ブロックのゲノム解析によって同定された TRPM4 の変異体 (E7K, Q854R) は、「機能亢進型」の性質を示すことが報告されている。しかし、この性質がどのように不整脈を引き起こすのかについては、不明な点が多い。

この点について明らかにするために、当研究室では、TRPM4 チャネルの変異体 (E7K, Q854R) について電気生理学的実験と数理モデルシミュレーションを用いて検討した。TRPM4 変異体 (E7K, Q854R) を HEK293 細胞に導入

し、イオノマイシン透過型細胞接着記録法を利用して、チャネルの開閉における電位依存性と Ca^{2+} 依存性を定量的に評価した。ゲーティング解析の結果、変異体では野生型と比較して開放状態の持続時間が著しく延長していることが明らかとなった。また、得られた速度定数をPFの心筋細胞モデルに組み込み、シミュレーションを行った結果、変異体チャネル活性と組織の不均一性が増加すると、興奮伝導の途絶だけでなく、興奮伝播の分裂、蛇行、融合などの複雑な興奮伝播異常が生じることが観察された。これを踏まえ、Langendorff灌流心モデルにおいて、心内膜側からPFに機械的な刺激を与えることで誘発される心室性不整脈へのTRPM4チャネルの関与を検討した結果、それを支持する知見を得た。

これらの検討からTRPM4機能は、刺激伝導系の異常のみならず心室性不整脈の発生においても重要であると考えられた。(利益相反なし)

一般13. 長鎖 lncRNA による動脈硬化進展抑制機構についての検討

呉 家賢 (Wu Chia-Hsien), 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)

動脈硬化関連疾患は世界的に長年にわたり死亡原因の1位となっており、動脈硬化の克服は喫緊の課題である。脂質を標的とした治療法は動脈硬化の進展抑制には非常に有効である。しかしながら、動脈硬化性疾患の克服には未だ不十分であり、さらなる治療法の開発が望まれている。動脈硬化の発生原因の一つとして、血管内皮機能の障害が挙げられる。特に、動脈硬化好発領域では血流の乱れにより、血管内皮の細胞周期が再開し、機能障害が早期に起こることがよく知られている。我々は新規に見出した長鎖ノンコーディング (lnc) RNA を *in vivo* および *in vitro* にて欠損させることで、動脈硬化進展が抑制され、血管内皮機能が維持されることを発見した。さらに、網羅的遺伝子発現解析では、動脈硬化好発領域にて報告されている細胞周期に関連する遺伝子など内皮障害と関わる遺伝子が本 lncRNA によって調整されている可能性が明らかになった。さらに、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析した結果、本 lncRNA ノックダウンにより細胞周期が停止することが確認できた。以上の結果から、本 lncRNA の欠損は内皮細胞の細胞周期調節を介して、内皮機能に良い影響を与え、動脈硬化の進展を抑制することが予想された。(利益相反なし)

一般14. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway by GTS-21 attenuates LPS-induced acute kidney injury in mice

ney injury in mice

Yang Aobing, Chia-hsien Wu, Tsuyoshi Inoue (Department of Physiology of Visceral Function and Body Fluid, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University)

Sepsis-associated acute kidney injury (S-AKI) is a common complication in hospitalized and critically sick patients that is linked to a very high fatality rate. The cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP) is a vagus nerve-mediated reflex that suppresses inflammation via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7\text{nAChRs}$), which has been reported to exert a protective effect in a variety of renal disease models. Here single cell RNA-seq targeting the spleen were employed to determine whether $\alpha 7\text{nAChR}$ agonist GTS-21 activates the CAP, while RNA-seq targeting human renal proximal tubule cells (HK2), pre-treated with LPS and GTS-21, was utilized to identify important genes. The results demonstrated that GTS-21 attenuated the severity of sepsis and renal outcomes by activating the CAP. GTS-21 also reduced the expression of cytokines and chemokines, including CCL20, a potent chemokine attracting macrophages, accompanied by a decrease in the number of infiltrating macrophages. Collectively, our results provide new evidence that GTS-21 has the ability to attenuate LPS-induced kidney injury, suggesting that CAP may be a promising therapeutic tool for acute kidney injury. (COI: No)

一般15. 気管支肺胞洗浄液の解析による放射線関連嚙下障害モデルマウスの検討

副島駿太郎¹, 呉 家賢², 井上 剛², 熊井良彦¹ (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：頭頸部癌に対する放射線治療の合併症のひとつに、放射線関連嚙下障害があり、致死的となる場合もある。この嚙下障害の原因としてさまざまなものが考えられるが、未だにはっきりとしたメカニズムは明らかになっておらず、根本的な治療法の報告も無い。このメカニズム解明のためには放射線関連嚙下障害動物モデルの確立が必要と考える。今回、放射線照射を受けたマウスの気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BAL) を解析し、嚙下障害動物モデルとしての妥当性について検討した。方法：マウスの頸部だけに8Gyx6日間のトータル48Gyの放射線を照射する。照射開始1日目にシスプラチン (6mg/kg) を腹腔内投与する化学療法併用放射線照射群と、生食を投

与する照射単独群，照射を行わず鎮静のみ行うコントロール群を作成する．さらに，照射開始後 1 週間で評価する群と，1 ヶ月で評価する群を作成する．評価日に BAL を回収し，FACS にて洗浄液中の好中球を測定した．結果：照射をうけていないコントロールと比較して，放射線照射群では有意差をもって BAL 中の好中球が上昇する傾向が見られた．結論：8Gyx6 回のトータル 48Gy の頸部への放射線照射により生じた軽微な嚙下性肺炎を BAL の解析により検出できた可能性が考えられた．（利益相反 なし）

一般 16. 障害後の副交感神経刺激による抗炎症効果の検討

松尾さゆみ^{1,2}，Chia-Hsien Wu²，中村恭菜²，西野友哉¹，井上 剛²（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】自律神経系は炎症の制御に重要な役割を果たしており，副交感神経（迷走神経）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．

しかし，障害後の副交感神経刺激により抗炎症効果が得られるかどうかは不明である．【方法】RAW 264（マウスマクロファージ）に，リポポリサッカライド（LPS）で炎症を惹起した後，副交感神経刺激を加え，TNF- α 発現レベルの測定により抗炎症効果を確認した．C57BL/6 野生型マウスに LPS を投与し，急性腎障害/敗血症モデルを作成後，副交感神経刺激を加え，同様に抗炎症効果を評価した．また，RAW 264 を用いた RNA-seq を行い，分子メカニズムの解明を試みた．【結果】RAW 264 に LPS を投与後，ニコチンまたは選択的 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニストである GTS-21 を投与すると，TNF- α 発現レベルが低下し，抗炎症効果が確認された．また，マウス急性腎障害/敗血症モデルにおいても，GTS-21 の投与により，抗炎症効果が得られた．【結論】障害後においても副交感神経刺激を加えることにより，抗炎症効果が得られた．この結果は，急性腎障害，敗血症治療に副交感神経刺激が応用できる可能性を示唆している．（利益相反 なし）