

演題1. 妊娠ラットの腎臓における ACE2 発現と、その生理的・病的意義

○菊田優羽¹, 風間逸郎² (¹宮城大・看護・4年, ²宮城大・看護・専門基礎領域 (医学))

妊娠時には循環血液量と腎血流量の増加に伴い、糸球体濾過量 (GFR) が増加するが、メカニズムの詳細は明らかでない。アンギオテンシン変換酵素 (ACE2) は、レニン・アンギオテンシン系を不活化して血管拡張作用を発揮する一方で、新型コロナウイルス感染時には、ウイルスが細胞内へ侵入する際の受容体にもなる。

本研究の結果、妊娠ラットの腎臓では腎血流量の増加を反映し、間質の動静脈および糸球体の毛細血管が有意に拡張していた。そこで、ACE2 に対する抗体染色を行ったところ、妊娠ラットの腎臓では妊娠前後と比較して、近位尿管における ACE2 発現が有意に増加していた。さらに、ACE2 の分解産物で血管拡張作用を示すアンギオテンシン (1-7) (Ang (1-7)) と、ACE2 と協働してウイルスの侵入を促す膜蛋白 TMPRSS2 に対する抗体染色を行ったところ、いずれも ACE2 と同様の発現変化を示した。

妊娠時の腎臓における ACE2 発現の増加は、Ang (1-7) を介して腎血管を拡張させ、腎血流量と GFR の増加に関与すると考えられた。一方で、TMPRSS2 発現の増加と併せ、妊婦における新型コロナウイルス感染症の重症化にも関与している可能性があると考えられた。

本研究発表に利益相反はない。

演題2. *Gata3* ヘテロ変異における皮膚の表現型とコラーゲンとの関連

○原田拓弥¹, 林 もゆる¹, 浅香智美¹, 高井 淳², 上村聡志², 森口 高², 河合佳子¹ (¹東北医科薬科大・医・生理学教室, ²同 医化学教室)

我々は、皮下リンパ管の機能を *Gata* 転写因子に注目し解析を進めてきた。これまでに、*Gata2* ヘテロ欠損 (*Gata2*^{+/-}) マウスにおいて、リンパ節切除後のリンパ管再疎通が遅延する一方で、*Gata2*^{+/-};*Gata3*^{+/-} マウスでは、野生型と同程度のリンパ管再疎通を見出ししてきた。リンパ管伸長には、周辺組織の適度な柔らかさが必要であるが、*Gata3*^{+/-} マウスの皮膚は非常に柔らかく、このことがリンパ管疎通の状況に影響していると予想された。

そこで、Elastica-Masson 染色により膝窩部皮下の膠原線維を観察すると、コラーゲン線維の太さや形状に変化が認められたことから、走査型電子顕微鏡を用いて、皮下のコラーゲン線維の構造を比較した。また、*Gata3*^{+/-} マウスの皮下組織における遺伝子発現を、線維芽細胞の機能に関連す

る遺伝子群に注目して RNAseq により解析したところ、*Gata3*^{+/-} において *Col6* と *Col9* の発現が大きく変化していた。*Col9* はコラーゲンの束を支えるアンカーとして機能しており、*Gata3*^{+/-} マウスにおける皮膚の表現型をもたらす要因の一つと考えられる。

本研究発表に利益相反はない。

演題3. ドキソルビシン耐性を持たせたヒト骨肉腫細胞株 U2OS における蛍光 L-グルコース取り込みの検討

○田名部貴博¹, 佐々木綾子¹, 大鹿周佐¹, 山田勝也² (¹弘前大院・医・整形外科, ²弘前大院・医・分子輸送学/オルパバイオ (株))

L-グルコースは D-グルコースの鏡像異性体であり、自然界には存在せず、哺乳類の正常細胞には取り込まれないことが知られている。これまでに我々は L-グルコースに蛍光基 NBD を結合させた 2-NBDLG が、スフェロイドを形成したマウスインスリノーマ細胞株 (MIN6) や、ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS) に取り込まれることを示した。しかし、これまで薬剤耐性細胞株への 2-NBDLG の取り込みに関する報告はない。

そこで、まずは骨肉腫治療のキードラッグであるドキソルビシン (DOX) に耐性を持たせた U2OS 株 (DOX-U2OS 株) を樹立した。蛍光 D-グルコース誘導体 2-NBDG、ならびに蛍光 L-グルコース誘導体 2-NBDLG の取り込み量を U2OS 細胞及び DOX-U2OS 細胞で比較した。特異的取り込みの程度はフロレチンを用いて評価した。更に、Hoechst 33342 を用いて両株の薬剤排出能を検討した。排出阻害剤としてベラパミル及びノボピオシンを用い、Hoechst33342 排出能と DOX 耐性との関連を検討した結果について報告する。

演題4. 漢方薬「防己黄耆湯」の水排出機構に関与する Cl⁻チャンネルの分子同定

○鈴木太郎¹, 齊藤遥菜¹, 加藤正太郎², 酒井彩子³, 佐藤 (沼田) かお理³, 沼田朋大³ (¹秋田大・医, ²秋田大附属病院・薬剤部, ³秋田大院医・器官・統合生理学)

防己黄耆湯 (BOT) は水太りやネフローゼの緩和に有効で、体内の水分排出を促進する漢方薬として知られているが、その有効性を裏付ける科学的根拠は乏しい。本研究では、BOT の水排出作用における Cl⁻チャンネルの関与を明らかにするため、基礎と臨床研究を合わせた橋渡し研究を行った。

秋田大学附属病院で BOT を服用した患者の服用前後の臨床検査結果を分析したところ、BOT 服用後の血清 Cl⁻濃度が高いことを見出した。次に、HEK293T 細胞を用いた細

胞容積測定実験では、BOT が濃度依存的な細胞縮小を示し、この縮小は Cl⁻チャンネル阻害剤 DIDS, DCPIB で抑制された。更に、パッチクランプ実験により、BOT が誘導する Cl⁻電流は容積感受性 Cl⁻チャンネル (VSOR) の生物物理的特性を持つことが示され、これも Cl⁻チャンネル阻害剤、および siRNA (LRRC8A) 処理で抑制された。最後に、BOT 誘導性細胞縮小における Cl⁻排出経路は LRRC8A ノックダウン細胞で抑制効果が見られたことから VSOR であることが判明した。

以上の結果より BOT は VSOR を活性化し、水分排出作用を促すことが示された。

演題 5. ヒスタミン誘発性細胞縮小における Cl⁻チャンネルの関与

○青山碧透¹, 佐藤(沼田)かお理², 酒井彩子², 沼田朋大² (¹秋田大・医, ²秋田大医・器官・統合生理学)

細胞の水排出を伴う細胞縮小は、Cl⁻チャンネルなどのイオン輸送体を介した KCl の排出が関与することが知られている。これまでの研究で、炎症性物質であるヒスタミンは受容体を介した U937 細胞の縮小を誘発することを明らかにしたが、詳細なメカニズムは分かっていない。本研究では、ヒスタミン誘発性細胞縮小に関与する Cl⁻排出経路について検討した。

ヒスタミン投与による細胞容積の変化を調べるために、コールターカウンター法を用いて細胞容積測定を行った。ヒスタミン誘発性細胞縮小は、Cl⁻チャンネル阻害剤である DIDS または DCPIB の投与により、細胞縮小が抑制された。上記の薬物感受性より Cl⁻排出経路は容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャンネル (VSOR) の可能性が高まったため、U937 細胞において VSOR の構成要素に必須であるロイシンリッチリピート含有タンパク質 (LRRC) 8A の発現を RT-PCR 法で確認した。更に LRRC8A への siRNA 処理で発現をノックダウンした細胞でヒスタミンによる細胞縮小を評価すると、コントロールと比べて細胞縮小が抑制された。

以上の結果より、ヒスタミン誘発性細胞縮小は、VSOR 活性を介した Cl⁻排出が関与していることが示唆された。

演題 6. 新規大腸菌遺伝子発現システムの開発と分子間相互作用

○村上 学, 村上アグニエシュカ, 長友克広, 國府田 滉, 丹羽康貴 (弘前大・医・病態薬理)

遺伝子クローニングと発現による機能解析はチャンネル分子の機能解析に大きな知見をもたらした。我々は 2019 年に大腸菌、および哺乳類細胞で遺伝子発現を行う発現プラス

ミドを開発した。この遺伝子発現システム (pgMAX) を改善したものを 2023 年に報告した。2021 年に 2 つの遺伝子を個別に発現誘導する系も報告した。カルシウムチャンネル $\alpha 1$ サブユニットと β サブユニットは AID および BID と呼ばれるホモロジーの高いアミノ酸配列間を介して結合することが知られている。しかし、一部の $\alpha 1$ サブユニットの N 末端、あるいは C 末端においても、結合することが報告されている。心筋収縮に重要な $\alpha 1$ サブユニットをコードする CaV1.2 と $\beta 2$ サブユニットにおいては、AID と BID 間の結合しか報告がない。

本研究では CaV1.2 遺伝子を DNaseI でランダムに切断、トキシンペプチドと in-frame で結合させ、上記発現系にて、キメラ遺伝子のエピトープライブラリーを作製した。キメラ遺伝子からできるペプチドトキシン活性が保たれる条件では大腸菌が増殖することはできないが、 $\beta 2$ と結合すると、トキシンの立体構造が変化し、活性が低下する。すなわち大腸菌が増殖し、コロニーを形成する。この方法により、CaV1.2 の C 末端領域に $\beta 2$ と結合する配列があることを見出した。

(結語)

二分子発現誘導系の応用により、電位依存性カルシウムチャンネルサブユニット間の分子間結合を解析した。

本研究発表に利益相反はない。

演題 7. C57BL/6J マウスにおける脳軟膜局在メラノサイトの分布解析

○長友克広 (弘前大・医・統合機能生理)

黒色素細胞メラノサイトは有害な紫外線による DNA 損傷を守る役割があり、光透過性の高い魚類や両生類の幼体では、体表以外の身体深部にも局在し、造血器官の背側を覆っている。哺乳動物においても、皮膚以外一内耳、心臓、脳軟膜など暗環境に局在することが知られている。マウス脳軟膜のメラノサイトは主に嗅球の根元付近や大脳縦裂に網目構造を形成しており、細胞突起が脳表面から脳実質に深く伸びており、一部は脳深部にも散在することから、ニューロンやグリア細胞などと密に機能連関している可能性が示唆された。また、脳軟膜からメラノサイトを単離する方法を検討する過程で、脳軟膜局在メラノサイト不在の個体が 2 割ほど散見された。そこで、メラノサイトを有する家系と無い家系に分かれるのか、12 週齢 (3 家族) と 4 週齢 (3 家族) の同腹仔について解析したところ、全ての家族のおよそ 7 割の個体にメラノサイトを目視確認できた。さらに、より若い 2 週齢 (4 家族) の同腹仔では、ほとんどの個体にメラノサイトが認められた (9 割)。以上の結果について、メラノサイトに特異的な抗体による検討を要

するが、2週齢以降において、脳軟膜局在メラノサイトが不在になるか、もしくは、メラニン色素が消失する個体が一部存在するようである。(COI:NO)

演題 8. ヒト肺静脈標本を用いた心房細動病因の同定

五十嵐 亘¹、高木大地¹、岡田大瑚²、尾野恭一³、岡本洋介⁴ (¹秋田大・院医・心臓血管外科講座, ²京都大・院医・附属ゲノム医学センター, ³秋田大・本部, ⁴秋田大・院医・細胞生理学講座)

【背景】心房細動という心臓不整脈は主に肺静脈という心臓区域から発生し、これを肺静脈トリガーという。肺静脈トリガーはヒト以外の哺乳類でも観察され、これまで我々は実験動物における肺静脈トリガー機構を解明して来た。しかし、ヒト患者における心房細動の分子機構にはいまだ不明な点がある。【方法】今回我々は心房細動の原因分子をヒトにおいて同定するため、ヒト患者検体から肺静脈心筋細胞を単離し、パッチクランプ法で過分極活性化電流の種類を同定した。また、肺静脈を含む複数の心臓サンプルを購入しRNA-seqにより心房細動で生じる遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。【結果】ヒトにおける過分極活性化電流の種類はイス、ラットとは異なり非選択的陽イオンチャンネルだった。慢性心房細動で遺伝子発現のリモデリングが最も顕著な心臓区域は肺静脈であり、FOXC1やFOXCUTなどの癌関連遺伝子が亢進していた。【結論】術後心房細動には医療用薬品イブプラジンが有効な可能性がある。また、慢性心房細動予防にはがん予防と同様に生活習慣の改善が有用であると予想される。本研究発表に利益相反はない。

演題 9. レプチンがラット末梢交感神経活動に及ぼす影響

○榎 佑嘉子¹、リーヌルシャフィカミアラ¹、芳賀海翔²、佐藤大介²、坂野僚一³ (¹山形大・工・化学・バイオ工学科, ²山形大・院理工・化学・バイオ工学専攻, ³名古屋大・総合保健体育科学センター)

レプチンは脂肪細胞から分泌され、視床下部を介して摂食調節に関与していることが知られているほか、1型糖尿病(T1D)モデル動物において血糖値を低下させることが報告され、その作用経路として交感神経系を介している可能性が示唆されている。本研究では9週齢のオスラットを用い、脳室内にカニューレを留置した2日後にストレプトゾトシン(60 mg/kg ip.)によってT1Dを誘発させ(T1D群; n=5)、対照群にはvehicleのみを投与した(n=3)。これらの処置から約1週間後に、麻酔下にてマイクロニューログラム法によって片側坐骨神経内交感神経より神

経信号を導出し、脳室内へレプチン10 µgを単回投与するとともに神経活動を記録した。その結果、T1D群では、レプチン投与後90分のバースト頻度が投与前に対して有意に高値(P<0.05)であった一方で、対照群ではレプチン投与前後で有意な変化は見られなかった。これらのことは、T1Dモデルラットにおいて、レプチンが90分以内に交感神経活動を亢進する可能性を示唆している。

演題 10. セロトニン誘発性細胞縮小に対する半夏瀉心湯の影響

○高山 遼¹、酒井彩子²、佐藤(沼田)かお理²、沼田朋大² (¹秋田大・医, ²秋田大院医・器官・統合生理学)

過敏性腸症候群(IBS)は、自律神経失調などが原因で腸管の活動が亢進する疾患である。半夏瀉心湯(HST)はIBSに対する漢方薬の第一選択薬として使用されており、腸管に作用して神経性収縮活動を抑制する効果が報告されている。本研究では、神経性の関与を調査するために副交感神経様PC12細胞の興奮に対するHSTの効果について検討した。

IBSにおいては、腸管神経叢の過剰なセロトニン(5-HT)分泌が知られているため、まずRT-PCR法を用いてPC12細胞における5-HT受容体の発現を確認した。次に、5-HT刺激時の興奮性細胞容積変化を断面積測定法で評価した。5-HT刺激や高濃度カリウム溶液添加による脱分極刺激により、細胞の縮小が観察された。さらに、パッチクランプ法の電流固定モードを用いて細胞の膜電位を測定したところ、5-HTによって膜電位が脱分極し、5-HT受容体阻害剤およびHSTによって抑制されることが分かった。最後に、5-HT受容体阻害剤およびHSTの投与が5-HT誘発性細胞縮小を抑制することも確認された。

以上の結果から、HSTは、5-HT受容体の活性を抑制して5-HT誘発性細胞縮小を抑える可能性が示唆された。

演題 11. 漢方薬「芍薬甘草湯」の心筋保護作用とその作用機序の解明

○阿部史葉、田頭秀章、沼田朋大(秋田大院医・器官・統合生理学)

心不全は予後が不良な病態であり、日本における三大死因の一つである。近年、心不全の罹患率が急増しており、「心不全パンデミック」とも表現される。心不全の治療には西洋薬に加えて漢方薬の利用も検討されているが、科学的な証拠が十分でないため、臨床現場では慎重な姿勢がとられている。

本研究では新生児ラット心室筋細胞(NRVMs)を用いて、アンギオテンシンII(AngII)誘導性心筋細胞肥大に対

する芍薬甘草湯 (SKT) の有効性および作用機序を免疫細胞染色や蛍光検出系などの生化学的手法で検証した。

AngII を NRVMs に刺激すると、細胞肥大や細胞障害に関わる細胞内 Ca^{2+} および ROS の上昇が観察され、細胞容積の増加、細胞生存率の低下、細胞毒性の増加が確認された。SKT を AngII 誘導性肥大大心筋細胞に投与すると、これら細胞内 Ca^{2+} および ROS の上昇を有意に抑制した。また、SKT の効果は、L 型 Ca^{2+} チャネル拮抗薬であるニフェジピンでも同様に観察され、併用により拮抗的抑制を示す組み合わせ指数が確認された。

以上の結果から、SKT が心筋細胞に直接作用し、L 型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入や細胞内 ROS 産生を阻害することによって、心筋保護作用を有することが明らかになった。

演題 12. 背側運動前野は行動を多重に準備する

○鈴木萌々華¹、坂本一寛^{1,2}、斎藤尚宏²、虫明 元²
(¹東北医科薬科大・医・神経科学教室、²東北大・医・生体システム生理学研究室)

大脳皮質運動前野は知覚情報に基づく行動準備に関わる。ここでは、迷路課題、つまり、迷路画面中のゴールまで段階的にカーソルを動かす課題を遂行中のサル背側運動前野から単一神経細胞活動を記録した。その結果、各カーソル操作に必要な腕の運動準備に関わる神経細胞、個々の段階におけるカーソルの認知的操作の準備に関連する細胞、カーソルの認知的操作のシーケンスの準備に対応するもの等、背側運動前野が多重な行動準備、多重な観点で行動選択を行なっていることを示唆する結果が得られた。このような霊長類の脳の多重な行動準備機構は、複雑な環境の中でロバストに目標行動を行うための重要な神経基盤の一つであると考えられる。

演題 13. IRBIT 欠損による恐怖条件づけへの影響

○岡田風蘭、志田陽向、秋田虎太郎、小山太郎、藤原浩樹、金子健也、藤井 聡、山崎良彦 (山形大・医・生理学講座)

IRBIT (IP₃R binding protein released with inositol 1,4,5-trisphosphate) は、細胞内カルシウムチャネルである IP₃ 受容体の活性を抑制的に制御する因子として知られている。IRBIT は中枢神経系において強く発現しているが、その機能の理解はまだ限定的である。

今回、神経機能における IRBIT の役割を検討するために、IRBIT 欠損マウスを用いて恐怖条件づけの行動解析を行い、恐怖記憶の獲得・想起・消去について評価した。被験体には 8~16 週齢の雄性マウスを用い、野生型 (WT 群)

10 匹、IRBIT 欠損群 (KO 群) 10 匹を使用した。行動解析には、条件刺激 (CS: 光刺激) と無条件刺激 (US: 足への電気刺激) を対呈示する条件づけ期間と、CS のみ呈示する消去期間 (3 日間) を設けた。恐怖記憶の獲得では KO 群と WT 群との間に差はみられなかったが、消去期間の 1 日目で評価した想起では、KO 群での有意な低下がみられた。消去については、両群間で有意差はなかった。

以上の結果から、IRBIT 欠損マウスでは恐怖記憶の想起に影響が生じていることがわかり、IRBIT が学習・記憶を可能にしているプロセスの制御に関与していることが示唆された。

演題 14. IP₃ 受容体結合タンパク質 IRBIT が海馬シナプス可塑性に及ぼす影響の解析

○後藤純一¹、藤井 聡¹、藤原浩樹¹、御子柴克彦²、山崎良彦¹ (¹山形大・医・生理学講座、²上海科技大・免疫化学研究所・Lab of Cell Calcium Signaling)

IRBIT (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein released with IP₃) は IP₃ 受容体のリガンド結合部位に結合し、IP₃ によるカルシウム放出を競合的に阻害するタンパク質である。IP₃ 受容体活性化による情報伝達においては細胞内ストアからのカルシウム放出以外にも、IP₃ 受容体から乖離した IRBIT が他の標的に作用することが腎尿管上皮などの系で報告されている。我々は IRBIT が海馬シナプス可塑性に関与しているかを調べる為に IRBIT ノックアウトマウスの海馬急性スライス標本を用いて電気生理学的記録を行った。

海馬 CA1 領域におけるシナプス可塑性のうち、脱増強 (depotentiation) と長期増強抑制 (LTP suppression) は IRBIT ノックアウトマウスでは障害されており、1 型 IP₃ 受容体ノックアウトマウスと同様の結果であった。一方で 1 型 IP₃ 受容体ノックアウトマウスにおいて見られた短いテタヌス刺激 (100Hz, 10 発) による LTP は IRBIT ノックアウトマウスでは見られなかった。

これらの結果は脱増強や長期増強抑制の誘導においては IP₃ 受容体シグナルの活性化は IRBIT の機能を介していること、及び短いテタヌス刺激による LTP では IRBIT は関与しないことを示唆し、海馬シナプス可塑性における IP₃ 受容体シグナルの多様性に関して新たな知見を与えるものである。本研究発表に利益相反はない。

演題 15. ニホンザルの「斜め歩き」のバイオメカニクス

○望月 圭、鈴木 享、中崎克己 (岩手医大・医・統合生理)

ヒトの二足歩行は、必然的に両下肢を交互に着いて前進

する。これに比べ動物の四足歩行の脚運びは、よりバリエーションに富む。たとえばネコやウマなど多くの四足動物は、後肢に続いて同側の前肢を着く。一方ニホンザルなどのサル類には、後肢の直後に対側の前肢を着くものがある。この接地パターンは、同側前後肢が物理的に干渉し易い。にも関わらずサルがこのような歩容をとるのは、相応の利点があるからだと考えられる。しかしその生体力学的な意義は未解明であった。

われわれの教室では、二足歩行の動物モデルとして、無拘束のニホンザルで歩行の研究を行なっている。その実験の過程では、二足歩行だけでなく、四足歩行の詳細なキネマティクスが記録できる。これについて運動生理学的解析を行なうことで、サルの四足歩行に隠された特徴やその意義が明らかになってきた。たとえばサルは四足歩行時、体幹軸を直進方向から傾けて斜に構えることで、前後肢の干渉を回避していた。またその結果、対をなしてはたらく対角前後肢のペアには「直進方向に推進力を生むペア」と「左右方向にバランスをとるペア」という役割分担が生じていた。本発表では、われわれの研究からみえてきた、こうしたニホンザルの「斜め歩き」のバイオメカニクスについて紹介したい。(利益相反 なし)

演題 16. 軸索伝導可塑性へのオリゴデンドロサイトの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}$ 共輸送体 1 の関与

○山崎良彦, 藤原浩樹, 後藤純一, 藤井 聡 (山形大・医・生理学)

オリゴデンドロサイトは、跳躍伝導を可能にすることに加えて、脱分極を始点とする機序により、活動電位の軸索伝導を促進的に変化させる(有髄線維の軸索伝導可塑性)。オリゴデンドロサイト特異的に光感受性チャネルを発現させたマウスの実験から、この可塑的变化の中には、伝導速度の高速化と複数の活動電位の同期化が含まれていることがわかった。今回は、このオリゴデンドロサイトが関与する可塑性の、年齢依存的な特性と分子メカニズムについて検討した。軸索伝導可塑性の基となる機序として、細胞容量の変化が考えられたこと、また、オリゴデンドロサイトは GABA 投与により脱分極することから、オリゴデンドロサイトの $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}$ 共輸送体 1 (NKCC1) に着目した。若年期(生後 30 日以下)での軸索伝導可塑性は、成体期(生後 35 日超)に比べて 1.2 倍程度大きく、この増大部分は NKCC1 の阻害により消失した。また、NKCC1 の発現も若年期では高く、生後日数が経つにつれて減少していき、生後 30 日前後を境にして有意な差がみられた。逆に、成体期における軸索伝導可塑性は、オリゴデンドロサイトにおける *Nkcc1* の過剰発現によって若年期と同程度にまで増大した。これらの結果は、オリゴデンドロサイトの NKCC1 発現量が、有髄線維の軸索可塑性と深く関与していることを示している。