

## 学部 01. 敗血症モデルマウスにおける迷走神経刺激の抗炎症性効果について

○柳下香織<sup>1</sup>, 松尾さゆみ<sup>1,2</sup>, 梅根隆介<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>長崎大院医歯薬内臓機能生理学, <sup>2</sup>長崎大院医歯薬腎臓内科学

【背景】迷走神経を介するコリン作動性抗炎症経路(cholinergic anti-inflammatory pathway; CAP)は、事前に活性化を行うと、抗炎症効果が発揮される。しかしながら、炎症が惹起された後も CAP の活性化が炎症を抑制するかどうかは未だにあまり明らかになっていない。

【目的および方法】本研究では、敗血症性炎症変化に対して、電気による迷走神経刺激(vagus nerve stimulation; VNS)が治療的効果を発揮するかどうかの評価を行う。敗血症モデルとして、野生型 C57BL/6J マウス(8 週齢、雄)へのリポポリサッカライド(LPS)腹腔内投与(5 mg/kg)を行い、ELISA 法を用いて血漿 TNF- $\alpha$ を測定した。LPS 投与 1 時間後に VNS を行い、非観血的および観血的血圧測定を行った。

【結果】予想に反して、血漿 TNF- $\alpha$ の値は、対照群と比べてむしろ VNS によって増加する傾向がみられた。血圧に関しては、VNS のみ行うと、刺激直後に血圧は低下し、代償的に上昇したものの、LPS を投与したマウスでは VNS によって血圧低下の持続がみられた。

【結語】敗血症誘導後の VNS は炎症を増悪させる可能性が示唆された。その原因として、炎症誘発後では VNS による血圧低下が代償できない可能性も考えられたため、今後さらなる検討を行う。(利益相反なし)

## 学部 02. ケトン体の DAMPs を介した ALD 病態改善機構の解明

○加藤亜美, Magdeline Elizabeth Carrasco Apolinaro, Shan Mengting, Phurpa, 梅田涼平, 花田礼子(大分大医学部神経生理学)

アルコール性肝障害(ALD)ならびにアルコール関連肝炎(AH)は、肝硬変や肝癌を引き起こすリスクファクターである。先行研究によると ALD 病態が AH に進行する要因の一つとして、アルコール代謝において酸化ストレスが蓄積することで肝細胞からのダメージ関連分子パターン(DAMPs)の放出が炎症を惹起することが報告されている。我々の研究室では DAMPs のひとつである細胞外アデノシン三リン酸(eATP), アデノシン(eADO)を GFP 漂度として定量化できるセンサーゼプラフィッシュ(GRABAt, GRABAAdo フィッシュ)を作製し、アルコール負荷を行い解析した。その結果、肝臓では eATP や eADO が増加しており、炎症が惹起され ALD/AH 様の病態になるこ

とを報告した。現在、わが国では ALD/AH の治療として禁酒や、嫌酒や減酒を目的とする治療薬があるが、炎症を抑えるための認証薬はまだ確立していない。アルコール負荷を行ったモデルにケトン体を体外的に投与すると炎症を抑制し、病態を改善する報告はあるが、肝臓における eATP/eADO を介した作用については未だ不明である。そこで我々は、アルコールに負荷した GRABAAdo フィッシュを用いて、ケトン体による eADO の動態変化と病態との関連を解析中であり、現在得られている結果を紹介する。(利益相反なし)

## 奨励 01. 慢性腎不全に伴い上昇する血中修飾ヌクレオシドによる血管内皮細胞の増殖メカニズム

○金子 瞳<sup>1</sup>, 永芳 友<sup>1,2</sup>, 山村遼介<sup>1,2</sup>, 中條岳志<sup>1</sup>, 富澤一仁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>熊本大院生命科学分子生理学, <sup>2</sup>熊本大院生命科学腎臓内科学)

腎機能の低下と心機能の低下がお互いに連関していることから「心腎連関」という概念が、2000 年以降提唱されてきたが、そのメカニズムは未だ全容が解明されていない。RNA の多彩な転写後化学修飾は、タンパク質翻訳の効率や RNA の構造維持に寄与する。修飾 RNA の分解産物である修飾ヌクレオシドは、尿中に排泄される。近年、修飾ヌクレオシドは単なる代謝物ではなく、様々な生理活性を有していることが明らかになった。我々は、腎不全に伴い血中に異常に蓄積した修飾ヌクレオシドが心筋細胞や血管内皮細胞に障害を与える、それが心腎連関発症機構に関与しているのではとの仮説を立てた。

まず 210 名の慢性腎不全患者から血清を採取し、修飾ヌクレオシドの濃度と腎機能の指標である eGFR との相関を比較検討した。その結果、腎機能の低下に伴い複数の修飾ヌクレオシドが血中に増加したが、特に eGFR と最も有意に逆相関した修飾ヌクレオシドとして 1-methylinosine(m1I)を見出した。次に、m1I を血管内皮培養細胞である HAoEC へ添加すると、細胞増殖の亢進が観察された。これは、アデノシン受容体の一つである A2A 受容体を介した ERK のリン酸化の活性が促進されて起こることを明らかにした。RNA-seq 解析により、m1I は MAPK シグナル伝達の活性化に加え、炎症関連マーカーの上昇を引き起こすことを明らかにした。以上より、腎不全により血中内に蓄積した m1I が血管内皮細胞の病的増殖を惹起し、血管の狭小化等血管疾患の発症を引き起こすことが示唆された。(利益相反なし)

## 奨励 02. 光遺伝学を用いた腎交感神経の特異的制御による新規腎保護メカニズムの解明

○梅根隆介<sup>1</sup>, 鷺峯紀人<sup>1,2</sup>, 松尾さゆみ<sup>1,2</sup>, 吳 家賢<sup>1</sup>, 中村恭菜<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長崎大院医歯薬内臓機能生理学, <sup>2</sup>長崎大医歯薬腎臓内科学)

【背景】急性腎障害 (Acute kidney injury, AKI) は心血管疾患や死亡リスクを高める重篤な疾患だが、根治療法が存在せず新たなアプローチからの治療法開発が急務である。そこで、腎臓に豊富に存在する交感神経の制御による新規腎保護戦略に着目し、本研究ではオプトジェネティクス技術を用いて腎交感神経を特異的に刺激し、AKIに対する保護効果を評価した。【方法】交感神経特異的にチャネルロドプシン (ChR2) を発現させたマウス (DbHCre-ChR2) を用い、光刺激で腎交感神経を特異的に活性化させる手法を確立した。この手法を用いて、両側腎虚血再灌流障害モデルの腎交感神経を刺激することで、腎保護効果を検討した。また、シングルセル RNA-seq 解析を行い、腎交感神経刺激による腎細胞の遺伝子発現変化を解析した。【結果】光刺激による腎交感神経活性化は、対照群に比べて腎臓における NGAL 発現と血漿クレアチニン値の上昇を抑制した。さらに、遺伝子網羅的解析によって、近位尿細管細胞が交感神経シグナルを受け取り、特定の遺伝子群の発現が亢進することが確認された。【結論】オプトジェネティクスを用いた腎交感神経の特異的制御は、AKI に対して有効な保護効果を示し、今後の新規治療法開発に貢献する可能性がある。（利益相反 なし）

#### 一般 01. 神経-免疫連関を介した腎臓マクロファージによる血圧制御機構

○鷺峯紀人<sup>1</sup>, Peter Joseph Kasyoki<sup>2</sup>, 梅根隆介<sup>1,2</sup>, Chia-Hsien Wu<sup>2</sup>, 中村恭菜<sup>2</sup>, 松尾さゆみ<sup>1</sup>, 西野友哉<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長崎大病院腎臓内科, <sup>2</sup>長崎大院医歯薬内臓機能生理学)

【背景】免疫細胞と高血圧との関連、特にマクロファージの心血管系への蓄積による高血圧発症メカニズムの存在が近年報告されているが、腎臓へのマクロファージの蓄積が高血圧の発症に与える役割は未だ解明されていない。また、神経-免疫連関は抗炎症効果や臓器保護作用を有しているが、血圧制御との関連性は明らかにされていない。【方法】アンジオテンシン II と塩分投与による高血圧モデルマウスを作成し、腎臓における免疫細胞のサブセットを確認した。また、マクロファージやマクロファージ上の自律神経受容体を欠失させた高血圧マウスを作成し、血圧を評価した。その他、高血圧誘導前後のマウスから腎臓マクロファージを単離し、RNA-seqを行った。【結果】高血圧誘導群では腎臓におけるマクロファージの蓄積を認めた。また、マクロファージの欠失やマクロファージ特異的な自律神経受容

体のノックアウトを行ったマウスでは、高血圧の発症が抑制された。その他、RNA-seq の結果から、高血圧誘導により腎臓マクロファージで経時に上昇する遺伝子群を特定した。【結論】マクロファージは腎臓に蓄積することで高血圧の発症に関与している可能性があり、腎臓マクロファージの解析から高血圧の発症に関連する因子の特定が期待される。また、マクロファージ特異的な自律神経受容体が高血圧発症に関与している可能性があり、腎臓マクロファージとの関連性の証明が待たれる。（利益相反 なし）

#### 一般 02. 敗血症マウスモデルにおいて腹部超音波刺激は腹部迷走神経を介して抗炎症効果を示す

○下山皓太郎<sup>1,3</sup>, 梅根隆介<sup>1,2</sup>, 鷺峯紀人<sup>1,2</sup>, 松尾さゆみ<sup>1,2</sup>, Chia-hsien Wu<sup>1</sup>, 中村恭菜<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長崎大院医歯薬内臓機能生理学, <sup>2</sup>長崎大病院第二内科腎臓内科, <sup>3</sup>東京慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科)

【背景】迷走神経刺激は敗血症を抑制することが動物実験でわかっており、急性腎障害や関節リウマチなど幅広い疾患モデルでも抗炎症効果が報告され注目されている。迷走神経刺激は免疫細胞を介して抗炎症効果をもたらし、この経路は Cholinergic Anti-inflammatory Pathway (CAP) と呼ばれる。迷走神経の直接的電気刺激だけでなく、腹部への超音波刺激 (Ultrasound stimulation; US) も CAP を誘発する可能性が報告されている。US はその侵襲性の低さから臨床応用への適応が期待される一方、メカニズムの詳細はわかっていない。そこで、本研究では、US が腹腔内の腸管などに広く分布している迷走神経求心路を活性化することで CAP を誘発していると仮説を立て、その抗炎症メカニズムの解明を目的とした。

【結果】まず敗血症モデル (C57BL/6 マウス、雄、8 週齢) へ LPS 1.5mg/kg を腹腔内投与) を用いて、両側の側腹部に US を 2 分ずつ実施し (Burst Mode, 14MHz, 6 秒に 1 秒刺激), 24 時間後に LPS を投与した。LPS 投与 4 時間後の血漿 TNF- $\alpha$  を測定し、US の抗炎症効果を確認した。control 群と比較し US 群で 24.0% 低下した (95% CI, 6.8%-41.2%; p=0.008)。また US 群では脾臓重量の有意な減少が見られた。続いて両側の迷走神経を横隔膜下で切断し (Subdiaphragmatic Vagotomy; SDVx) 同様に US を実施した。Sham 手術群では US によって TNF- $\alpha$  が低下したが、SDVx 群ではこの US の効果が消失した。

【結語】腹部超音波刺激は腹部迷走神経を介して CAP を誘発し敗血症を抑制する。（利益相反 なし）

#### 一般 03. マウスの聴覚視床亜核構成と視床皮質投射

竹本 誠, 孫 猛, ○宋 文杰 (熊本大医学知覚生理

学)

聴覚視床である内側膝状体 (MGB) は、従来腹側核 (MGv), 背側核 (MGd), 内側核, 膝上核と辺縁帯 (MGMZ) から構成されるとされている。一方、視床皮質投射に関して、MGv は皮質第 4 層と第 3 層の両方に投射する細胞のみを含むが、その他の全ての亜核の細胞は皮質第 1 層と第 3 層の両方に投射するとされている。本研究は MGB から皮質第 1 層への投射の様式と MGB の亜核構成を検討する目的で行われた。実験には全てマウスを用いた。聴覚皮質第 1 層へ投射する MGB 亜核を同定するために、皮質表面に逆行性トレーサーをアプライしたところ、第 1 層に投射するのは主に MGd と MGMZ であることが分かった。ウイルスベクターを用いた順行性標識の結果、MGd からの線維は第 1 層に均一な分布を示したが、MGMZ からの線維はクラスター状の分布を呈した。一方、MGB 亜核特異的な分子マーカーを探索する過程で、内側部に新規な亜核 (MGml) を同定し、それが皮質第 5 層と第 1 層に投射することが分かった。これらの結果は、MGd, MGMZ、および MGml の三つの亜核が皮質第 1 層に異なる作用を及ぼすことと、MGB の亜核構成は従来考えられているより複雑であることを示唆する。(利益相反なし)

#### 一般 04. Urolithin A enhances the amplitude of circadian clocks in human senescent cells

○Russul Kuatov<sup>1</sup>, Jiro Takano<sup>2</sup>, Hideyuki Arie<sup>2</sup>, Masaru Kominami<sup>2</sup>, Norifumi Tateishi<sup>2</sup>, Ken-ichi Wakabayashi<sup>2</sup>, Daisuke Takemoto<sup>2</sup>, Takayuki Izumo<sup>2</sup>, Yoshihiro Nakao<sup>2</sup>, Wataru Nakamura<sup>3</sup>, Kazuyuki Shinozaki<sup>1</sup>, Yasukazu Nakahata<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurobiology & Behavior, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, <sup>2</sup>Institute for Science of Life, Suntory Wellness Limited, <sup>3</sup>Department of Oral-Chrono Physiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University)

In many organisms, a wide variety of physiological, biological, and behavioral activities follow a 24-hour cycle, governed by the circadian clock, which operates via a feedback loop: CLOCK/BMAL1 heterodimer activate PER and CRY transcription, which then repress CLOCK/BMAL1 transcriptional activity to establish a 24-hour cycle. REV-ERBα represses BMAL1 transcription, while ROR activates it, regulating the rhythm. Aging attenuates the precision and robustness of the circadian clock, henceforth referred to as the aging clock, which leads to prolonged and dampened circadian gene oscillation rhythms

and amplitudes on the cellular and tissue levels.

A natural polyphenol Ellagic acid (EA) and its metabolites exhibit tumor-suppressing, inflammation-reducing, oxidative stress-relieving properties. We investigated the effects of these polyphenols on the aging clock at the cellular level using senescent human fibroblast cells, TIG-3 cells. Lentivirus-infected TIG-3 cells expressing *Bmal1* promoter-driven luciferase were used for real-time luciferase monitoring assays. We revealed that urolithins amplify the amplitude of circadian gene oscillations at different potentials; urolithin A (UA) demonstrates the highest efficacy, followed by urolithin B (UB), while urolithin C (UC) displays the lowest efficacy. We also discovered that UA promotes the stabilization of SIRT1 protein, which promotes deacetylation and the subsequent destabilization of PER2, thereby reducing CLOCK/BMAL1 repression by PER/CRY.

The findings suggest that urolithins, especially UA, have the potential to restore the aging clock and may serve as therapeutic nutritional supplements for age-related disorders associated with circadian dysfunction. As this study identified candidate compounds that restore the aging clock *in vitro*, it is required to investigate whether UA administration could restore the aging clock *in vivo* and recuperate aging in animals and humans. Finally, we propose that the assay used in this study is an efficient system for screening/discovering natural or chemical compounds that recuperate the aging clock *in vitro*. (COI: no)

#### 一般 05. カルモジュリン C-lobe が、低 Ca<sup>2+</sup>濃度での Cav1.2 チャネルの活性を制御する

○蓑部悦子<sup>1</sup>, 徐 建軍<sup>1</sup>, Lei Yang<sup>1</sup>, Feng Guo<sup>2</sup>, 亀山正樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鹿児島大院医歯神経筋生理学, <sup>2</sup>中国医科大学薬物毒理学)

Cav1.2 チャネルの活性は、低 Ca<sup>2+</sup> 条件下でも、カルモジュリン (CaM) 濃度依存性に活性化、不活性化のベル型を示すことを報告した。本研究では、CaM の C-lobe を N-lobe に置換した変異体 (CaMNN) と N-lobe を C-lobe に置換した変異体 (CaMCC) を作成し、チャネルの細胞内ドメインペプチドとの結合実験と、patch-clamp 法によるチャネル活性の解析を行った。すべての実験において Ca<sup>2+</sup> 濃度は 100 nM に固定した。その結果、CaMCC は野生型 CaM と同様に N 末端, preIQ, IQ ペプチドに結合した。CaMNN は、IQ ペプチドのみに結合し、野生型と CaMCC と比較し

て  $K_d$  値は高くなつた。チャネル活性は、 $0.5\mu M$  CaMCC をピークにして、濃度依存性のベル型を示した。野生型では  $1\mu M$  をピークにしたベル型となるため、CaMCC はチャネルの調節作用が強いことが示唆された。一方、CaMNN は  $1\mu M$  を最大とし、濃度依存性にチャネル活性は上昇するが、野生型や CaMCC のような不活性化作用はなかった。これらの結果は、1つの CaM の C-lobe が IQ 領域に結合することでチャネルが活性化され、2つめの CaM の C-lobe が preIQ または NT に結合することでチャネルが不活性化すると仮定したモデルに矛盾しない。（利益相反 なし）

#### 一般 06. 心房筋細胞の Calcium Speckles は、動的平衡によってリエントリー・ローターを持続させる

○塙谷孝夫（佐賀大医器官・細胞生理学）

傷害心筋細胞では、その催不整脈性とともに、まだら状の局所[Ca<sub>2+</sub>]i 上昇である Calcium Speckles が観察される。この Calcium Speckles の催不整脈作用には、心室筋と心房筋で違ひがあるだろうか。この問ひを、成獣マウスから単離した心室筋細胞と心房筋細胞を用いて、Fluo-4 による Ca<sub>2+</sub>イメージングとナイスタチン超穿孔パッチ法の同時記録により検討した。傷害された心室筋細胞では、Calcium Speckles により誘発された内向き Na/Ca 交換電流と、それに伴う EAD や DAD の発生が観察された。傷害された心房筋細胞では、心室筋細胞と同様な Calcium Speckles が観察され、これらは静止膜電位の連続的な脱分極が観察された。心房筋細胞は、心室筋細胞と違って膜電流の I-V 特性に負性抵抗領域を欠くため、静止膜電位は内向き電流の振幅に応じて連続的に脱分極した。心房の傷害部位の周囲では、心房筋細胞の静止膜電位が連続的に脱分極して、有効不応期の短縮と伝導速度の低下が連続的に生じる。そのため、傷害部位の周囲に発生したリエントリー・ローターは、その周回時間と有効不応期が釣りあうように、周回の直径を動的に増減させながら持続する。心房筋細胞の Calcium Speckles は、心室筋細胞と異なり、傷害部位の周囲でリエントリー・ローターを持続させるように作用する。（利益相反 なし）

#### 一般 07. 炎症惹起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<sup>1,2</sup>, Chia-Hsien Wu<sup>2</sup>, 中村恭菜<sup>2</sup>, 梅根隆介<sup>2</sup>, 鶩峯紀人<sup>1,2</sup>, 西野友哉<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>2</sup>（<sup>1</sup>長崎大院医歯薬内科学, <sup>2</sup>長崎大院医歯薬学内臓機能生理学）

【背景】自律神経系は炎症の制御に重要な役割を果たしている。これまでに炎症惹起前の副交感神経刺激により、抗炎症効果が発揮されること、その機序は免疫細胞を介して

いることが示されてきた。しかし、炎症惹起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】C57BL/6 野生型マウスにリボポリサッカライド (LPS) を投与し、急性腎障害/敗血症モデルを作成した。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 を投与し、TNF- $\alpha$  発現レベルの測定により、抗炎症効果を確認した。また、マクロファージに着目し、RAW 264 (マウスマクロファージ), U937 (ヒトマクロファージ) を用いた in vitro の実験を行った。それぞれの細胞に LPS を投与し炎症を惹起後、GTS-21 を投与し、同様に抗炎症効果を評価した。さらに RNA-seq を行い、分子メカニズムの解明を試みた。【結果】マウスマクロファージにおける GTS-21 の TNF- $\alpha$  発現レベルが低下し、抗炎症効果が発揮されることを確認した。また、これらの効果の発揮には、ケモカインの一つである Ccl2 の脾臓マクロファージにおける発現が関与していることを明らかにした。

【結論】炎症惹起後においても副交感神経刺激により、抗炎症効果が得られる。（利益相反 なし）

#### 一般 08. 迷走神経刺激による急性腎障害に対する腎保護メカニズム解明

○宮崎友理<sup>1,2</sup>, 松尾さゆみ<sup>1,3</sup>, 杨 傲冰<sup>1</sup>, 梅根隆介<sup>1,3</sup>, 吕 家賢<sup>1</sup>, 中村恭菜<sup>1</sup>, 井上 剛<sup>1</sup>（<sup>1</sup>長崎大院医歯薬内科学, <sup>2</sup>長崎大院医歯薬麻醉集中治療医学, <sup>3</sup>長崎大院医歯薬腎臓内科）

背景：近年、迷走神経刺激 (VNS) による抗炎症作用・臓器保護効果が着目されており、当教室では、脾臓のマクロファージに存在する  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7nAChR$ ) を介した間接的保護作用を明らかにしてきた。一方で先行研究にて、 $\alpha 7nAChR$  の刺激によって尿細管細胞が直接保護されることもわかっている。そこで当研究では、VNS による腎障害保護メカニズム解明を目的とする。

方法：C57BL/6 野生型マウスと尿細管特異的  $\alpha 7nAChR$  欠損マウス (SGLT2Cre :  $\alpha 7AChR^{flox/flox}$ ) に VNS を行い、その 24 時間後に両側腎動脈虚血再灌流障害を加えて、急性腎障害モデルを作成し、腎保護作用を評価した。また、 $\alpha 7nAChR$  刺激を加えた HK2 を用いて RNA-seq を行い、分子メカニズムの解明を試みた。

結果：SGLT2Cre :  $\alpha 7AChR^{flox/flox}$  マウスでは、野生型マウスと比較し、VNS による腎保護作用が減弱していた。また、 $\alpha 7nAChR$  刺激によって尿細管細胞に特異的に発現が亢進する遺伝子を同定した。

結論：VNS による AKI に対する保護効果を明らかにし

た。この保護作用発揮には、尿細管細胞に対する  $\alpha 7nAChR$  刺激が重要であることが示唆された。（利益相反 なし）

#### 一般 09. Role of Hepatic extracellular ATP/adenosine dynamics in zebrafish model of Liver steatosis

○Magdeline E. Carrasco Apolinario<sup>1</sup>, Tomoko Tokumaru<sup>1,2</sup>, Nobuyuki Shimizu<sup>3</sup>, Ryohei Umeda<sup>1,4</sup>, Koichi Honda<sup>2</sup>, Kenshiro Shikano<sup>1</sup>, Hitoshi Teranishi<sup>1</sup>, Takatoshi Hikida<sup>5</sup>, Toshikatsu Hanada<sup>3</sup>, Keisuke Ohta<sup>6</sup>, Yulong Li<sup>7</sup>, Kazunari Murakami<sup>2</sup>, Reiko Hanada<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurophysiology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>2</sup>Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>4</sup>Department of Advanced Medical Science, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>5</sup>Laboratory for Advanced Brain Functions, Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>6</sup>Advanced Imaging Research Center, Kurume University, <sup>7</sup>State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Peking University)

Damage associated molecular patterns (DAMPs) are endogenous molecules release as danger signals upon cellular damage to trigger inflammatory response. Hepatic inflammation is implicated in the development and progression of various liver diseases such as ALD (alcohol-associated liver disease) and MASLD (steatotic liver disease associated with metabolic dysfunction). Recently, ATP and adenosine (Ado) secreted from damage hepatocytes have been associated with the progression of inflammation in the liver. However, ATP and Ado implications in the pathogenesis of steatotic liver disease have not been fully studied. To evaluate the ATP and Ado role in liver steatosis, we generated a genetically encoded GPCR activation-based ATP or Ado sensor (GRABATP/GRA-BAdo) and analyzed the changes in the green fluorescence intensity as an indicator of ATP or Ado release after the exposure to various pathological conditions. The results show that exposure to ethanol (EtOH) or High fat diet (HFD) in vivo and in vitro causes fat droplet accumulation within liver cells, associated with significantly increased GFP fluorescent signal and expression of inflammatory markers. Conversely, clodronate administration suppressed the inflammatory expression and fluorescence intensity after exposure. In this study, we explore an existing link between the ATP/Ado dynamics and steatotic

liver disease. (COI: no)

#### 一般 10. NPGL/NPGM システムの高次脳機能における生理的役割の解明

○鹿野健史朗, 寺西仁志, 花田礼子（大分大医神経生理学）

Neurosecretory protein GL (NPGL) 及び Neurosecretory protein GM (NPGM) は、視床下部で產生される分泌性小タンパク質として発見され、摂食行動ならびに脂肪組織における de novo 脂肪合成の促進を介して肥満を誘導することが明らかになっている。我々の先行研究により、NPGL 及び NPGM 両遺伝子欠損マウス (NPGL/NPGM 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た。一方で、NPGL/NPGM dKO マウスは、孤立ストレスや絶食負荷などのストレス負荷条件下では摂食抑制作作用が認められないことが示された。このように、NPGL/NPGM システムがエネルギー代謝調節のみならず高次脳機能に関与することが示唆されている。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否かについて 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 NPGL/NPGM 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、NPGL/NPGM 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減弱した。これらの行動学的解析から、NPGL/NPGM dKO マウスでは不安様行動が減弱することが示唆された。また、ガラス玉覆い隠し試験においても、NPGL/NPGM dKO マウスで特徴的な行動が観察されており、NPGL/NPGM システムが高次脳機能に深く関与することが明らかになった。（利益相反なし）

#### 一般 11. Vitamin E improves metabolic associated steatotic liver disease (MASLD) via the hepatocyte extracellular ATP/adenosine (Ado) system

○Shan Mengting<sup>1</sup>, Ryohei Umeda<sup>1,2</sup>, Phurpa<sup>1</sup>, Magdeline Elizabeth Carrasco Apolinario<sup>1</sup>, Kenshiro Shikano<sup>1</sup>, Hitoshi Teranishi<sup>1</sup>, Takatoshi Hikida<sup>3</sup>, Toshikatsu Hanada<sup>4</sup>, Yulong Li<sup>5</sup>, Reiko Hanada<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurophysiology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>2</sup>Department of Advanced Medical Sciences, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>3</sup>Laboratory for Advanced Brain Functions, Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>4</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>5</sup>State Key Laboratory of Mem-

brane Biology, Peking University School of Life Sciences)

Background: MASLD, a condition associated with DAMPs, especially extracellular ATP (eATP), has no well-established treatment till date. Therefore, this study aims to find a novel way to treat MSLD with vitamin E at early stage of this condition called hepatic steatosis.

Method: Transgenic zebrafish larvae with fluorescent ATP/Ado sensor (GRAB<sub>ATP/Ado</sub>) were fed with high-fat diet to study the correlation between hepatic extracellular ATP/Ado dynamics and GFP fluorescence intensity. Next, vitamin E was added to the GRAB<sub>ATP/Ado</sub> zebrafish larvae on high-fat diet to examine the changes in ATP/Ado with liver GFP fluorescence intensity. In addition, vesicular nucleotide transporter inhibitors were administered to high-fat diet fed GRAB<sub>ATP/Ado</sub> zebrafish as positive controls. Decreasing in GFP fluorescence intensity was used as an indicator to determine the effect of therapeutic effect of vitamin E.

Result: GRAB<sub>ATP/Ado</sub> zebrafish liver GFP fluorescence was significantly increased on a high-fat diet. This fluorescence change was significantly reduced on adding vitamin E. At the same time, zebrafish on a high-fat diet immersed in vesicular nucleotide transporter inhibitors significantly reduced liver fluorescence intensity.

Conclusion: This study shows that vitamin E might substantially benefit in treating the early stage of MASLD. (COI: no)

#### 一般 12. Evaluation of Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) in a Zebrafish model of Heart Failure

○Phurpa<sup>1</sup>, Ryohei Umeda<sup>1,2</sup>, Schinichiro Kume<sup>3</sup>, Magdeline Elizabeth Carrasco Apolinario<sup>1</sup>, Shan Mengting<sup>1</sup>, Kenshiro Shikano<sup>1</sup>, Hitoshi Teranishi<sup>1</sup>, Takatoshi Hikida<sup>4</sup>, Toshikatsu Hanada<sup>5</sup>, Yulong Li<sup>6</sup>, Reiko Hanada<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Neurophysiology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>2</sup>Department of Advanced Medical Sciences, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>3</sup>Department of Cardiovascular Sciences, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>4</sup>Laboratory for Advanced Brain Functions, Institute for Protein Research, Osaka University, <sup>5</sup>Correspondence, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Oita University, <sup>6</sup>State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking University School of Life Sciences)

Background: Heart failure (HF) is a complex clinical syn-

drome with an elusive pathophysiology associated with DAMPs, particularly extracellular ATP (eATP). Vesicular nucleotide transporter (VNUT) mediated exocytosis of ATP followed by P2X7R activation plays substantial role in DAMPs attributed HF pathophysiology. Therefore, this study aims to assess therapeutic effect of VNUT and P2X7R inhibition in HF.

Methods: ZF larvae (wild type or transgenic: CMLC2: eGFP) were treated with terfenadine and verapamil to induce HF. HF was determined based on cardiac morphology, pericardial edema, venous congestion and cardiac function variables [heart rate (HR), fractional shortening, ejection fraction, stroke volume, cardiac output (CO), and end-diastolic volume (EDV)]. ZF with terfenadine- and verapamil-induced HF were treated with drug X (for VNUT inhibition), brilliant blue G (BBG, P2X7R antagonist) and drug X in combination with BBG. Furthermore, additive effect of drug X was tested with A2AR antagonist (istradefylline) and CaCl2 on both HF models.

Results: WT and Tg ZF (Cmlc2: eGFP) treated with terfenadine showed dilatation of ventricle, atrium with pericardial edema and venous congestion. HR was significantly lower in terfenadine and verapamil treated ZF compared to control. In addition, CO was significantly lower and EDV was significantly higher in terfenadine treated ZF. Both terfenadine- and verapamil-induced HF ZF treated with drug X, BBG, and BBG with drug X showed normal cardiac morphology, no pericardial edema and, HR and EDV comparable with the control. Terfenadine-induced HF treated with CaCl2 and istradefylline alone or in combination with drug X also showed normal cardiac morphology and pericardial area with HR and EDV similar to that of control.

Conclusion: These findings suggest that VNUT and P2X7R mediated reduction/inhibition of eATP could potentially have therapeutic benefit in heart failure. (COI: no)

#### 一般 13. ゼブラフィッシュを用いた不安様行動、うつ様行動における DAMPs の役割の解明

○早田暁伸<sup>1</sup>, 梅田涼平<sup>1,2</sup>, Magdeline Elizabeth Carrasco Apolinario<sup>1</sup>, Shan Mengting<sup>1</sup>, Phurpa<sup>1</sup>, 寺西仁志<sup>1</sup>, 鹿野健史朗<sup>1</sup>, 花田礼子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大分大医神経生理学, <sup>2</sup>大分大医先進医療科学科)

現代社会では、さまざまなストレス要因によって不安障害やうつ病の有病率が増加しており、重要な社会問題と

なっている。近年、脳の炎症がうつ病の病態生理に関与していることが報告され、損傷に関連する内因性分子である損傷関連分子パターン (DAMPs) の役割にも注目が集まっている。一方、クロドロン酸は、免疫細胞からの DAMP の一種である ATP の放出を抑制する薬理作用を有することが知られているが、不安障害やうつ病への影響は報告されていない。そこで本研究では、DAMPs のうち ATP とアデノシンに着目し、その役割の解析とともに、ゼブラフィッシュを用いた不安様、うつ病モデルに対するクロドロン酸の効果を検討した。

不安様行動の評価には Novel Tank Diving Test を行った。うつ様行動は 2 日間、回避不能な電気ショックを与えることで作製された学習性無力モデルに 3 日目に、電気ショックを回避するために隣のチャンバーに移動することで電気ショックを回避できる装置を使用し脱出成功数を測定し評価を行った。

使用薬物としてクロドロン酸を 0.1, 1.0, 10mg/L の濃度で水槽水に溶解したものを 12 日間経口投与した。実験の結果、当初の予想とは反してクロドロン酸の濃度依存的に不安様行動およびうつ様行動が惹起された。

ATP 受容体は複数報告されており、P2X2 受容体を刺激することによってうつ様行動が抑制されることが報告されているため、細胞外 ATP による情動調節機序に P2X2 受容体が関与している可能性が示唆された。（利益相反なし）

#### 一般 14. うつ病態における咀嚼の生理的意義の解明

○鎌手美栄<sup>1,2</sup>, 寺西仁志<sup>1</sup>, 鹿野健史朗<sup>1</sup>, 梅田涼平<sup>1</sup>,

河野憲司<sup>2</sup>, 花田礼子<sup>1</sup>（<sup>1</sup>大分大医神経生理学, <sup>2</sup>大分大医歯科口腔外科学）

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飼料群では固形飼料群と比較して GABA と Norepinephrine が有意に増加していた。また定量 PCR 法を用いた解析では、Defeat 群マウスでは、粉末飼料群は固形飼料群と比較して前頭前野においてミクログリアのマーカーである Iba-1 が有意に減少していた。

以上より、食餌形態の違い（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つた。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）