

特別講演

染色体工学技術によるヒト化モデル動物の作製と応用

○香月康宏^{1,2} (¹鳥取大学医学部生命科学科染色体医工学講座, ²鳥取大学染色体工学研究センター)

トランスジェニック技術は遺伝子を破壊または導入し、その表現型を解析することにより、これらの遺伝子がどのような機能を持つかを知る上で非常に重要な技術となっている。しかし、クローン化 DNA 断片を使用するこれまでのトランスジェニック技術では、細菌人工染色体 (BAC) を用いても導入可能な DNA サイズは通常 200kb が限界であり、1Mb を超える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。上述の課題を克服するために、我々は哺乳類細胞において自立複製・分配が可能なヒト人工染色体 (human artificial chromosome : HAC) およびマウス人工染色体 (mouse artificial chromosome : MAC) を構築し、Mb 単位の巨大なヒト遺伝子クラスターのマウス・ラットへの導入、すなわちトランスクロモソミック (Trans-chromosomal : TC) マウス・ラットの作製に世界で初めて成功した。これまでにヒト薬物代謝酵素遺伝子クラスター (1.5Mb)、ヒト抗体遺伝子群 (3.5Mb)、ヒト 21 番染色体長腕全長 (30Mb) 等を上記 HAC/MAC ベクターに搭載することに成功している。本講演ではヒト巨大遺伝子の機能解析、疾患モデルマウス・細胞による発症メカニズムの解明と治療研究、ヒト化動物による創薬研究への応用を中心に紹介し、生理学研究への染色体工学技術の活用の可能性を議論したい。

COI : (株)Transchromosomics との共同研究、科学技術顧問を実施

奨励賞候補演題

1. K_{ATP} チャンネル開口薬および閉口薬がマウスの甘味受容に及ぼす影響

○澤井千佳^{1,2}, KuanyuWang², 堀江謙吾^{2,3}, 美藤純弘^{2,3}, 植田紘貴^{1,3}, 上岡 寛^{1,3}, 吉田竜介^{2,3} (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生理学分野, ³岡山大学学術研究院医歯薬学域)

【緒言】甘味の受容経路は 2 種類考えられる。一つは甘味受容体 (T1R2/T1R3) を介する経路で、糖だけでなく人工甘味料、甘味タンパク質、甘味アミノ酸など様々な甘味物質の検出に働く。もう一つはグルコーストランスポーターを介した経路で、流入したグルコースが細胞内で代謝され、生成された ATP により ATP 感受性 K (K_{ATP}) チャンネルが

閉口することで細胞が脱分極することが想定される。甘味応答はこの 2 種類の経路により媒介される可能性がある。本研究では、K_{ATP} チャンネルの開口剤 (Diazoxide) および閉口剤 (Glibenclamide) の投与により甘味感受性がどのように変化するのか行動実験を行い、検討した。

【方法】短時間リック試験では、マウスに Diazoxide および Glibenclamide を腹腔内投与した後、5 秒間で各種味溶液を舐める回数を調べた。味覚嫌悪学習 (CTA) を用いた行動実験では、スクロース溶液を摂取させた後、LiCl を腹腔内投与することで内臓不快感を生じさせ、甘味溶液への嫌悪条件付けを行った。その後 Diazoxide および Glibenclamide を投与し、各種味溶液に対するリック応答を記録した。

【結果】Diazoxide を投与した場合は短時間リック試験、CTA 試験共に二糖類、人工甘味料、単糖において有意な応答の低下を認めた。一方、Glibenclamide を投与した場合、両試験において二糖類、人工甘味料の応答に有意な差は認めず、単糖に対してのみ有意な応答の低下を認めた。

【考察】Diazoxide による K_{ATP} チャンネルの開口はグルコーストランスポーター経路と競合し、この経路を介する単糖への応答を低下させると考えられる。一方、T1R2/T1R3 経路を介する二糖類や人工甘味料の応答も抑制されたことから、Diazoxide の影響は味細胞全体に及ぶことが示唆される。一方、Glibenclamide は K_{ATP} チャンネルを持続的に刺激するために閉口状態が続くので、新たな刺激に対してグルコーストランスポーター経路は活性化し難いと考えられる。それに対して T1R2/T1R3 経路は K_{ATP} チャンネルを介さないで新たな刺激を受け入れ易いことが考えられる。(COI : No)

2. 加齢に伴うニューロンの核構造異常の分子機構

○雨宮巳奈¹, 長谷川孝一², 桑子賢一郎² (¹島根大学医学部医学科, ²島根大学医学部神経・筋肉生理学)

記憶や認知といった脳機能は加齢とともに低下していくが、生理的な脳老化のしくみは未だにほとんど解明されていない。これまでに、大脳皮質視覚野などのニューロンで加齢によって核の構造異常が惹起されることが報告されている。しかし、その分子メカニズムは全く明らかにされておらず、また、加齢に伴う核の構造異常とニューロンの機能低下との関連もわかっていない。

そこで、本研究では、まずニューロンにおける加齢による核の構造異常のメカニズムを解明するために、核膜 LINC 複合体に着目した。LINC 複合体は、内膜を貫通する Sun タンパク質と外膜を貫通する Nesprin タンパク質からなり、両者は核膜腔内で結合することで複合体を形成する。

Sun は、核内で核ラミナと結合し、また Nesprin は細胞質側でアクチン線維や微小管などの細胞骨格と結合しており、LINC 複合体は細胞内外からの機械的圧力を核に伝導する重要な役割を担っている。

まず、若齢・老齢マウスにおいてニューロンの核構造を解析したところ、老齢マウスでは大脳皮質前頭前野などの様々な領域で異常な核構造をもつニューロンが有意に増加していた。一方、老齢マウスでは広範な脳領域のニューロンで LINC 複合体分子群 (Sun1, Sun2, Nesprin1, Nesprin2) の発現が劇的に低下していることが明らかになり、老齢ニューロンでは LINC 複合体の機能が喪失している可能性が考えられた。そこで、LINC 複合体と核構造の因果関係を調べるために、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて大脳皮質ニューロンへの遺伝子導入実験を行った。その結果、若齢ニューロンに LINC 複合体の機能阻害型変異体を発現させると核構造の著しい異常が誘導され、逆に、老齢ニューロンで Sun1 の発現レベルを上昇させると加齢による核の構造異常が強く抑止されることが明らかになった。

以上のことから、加齢に伴う LINC 複合体、特に Sun1 の発現低下が核の構造異常を惹起する大きな要因であることが示唆された。核構造の異常は、クロマチン動態の変化を介してグローバルな遺伝子発現に影響を与えることから、LINC 複合体の加齢変容が生理的脳老化のトリガーになる可能性が考えられる。(COI : No)

3. Regulation of olfactory and non-olfactory behaviors by melanocortin 4 receptor signaling in the ventral striatum

○Md Tasnim Alam, Md Monjurul Ahasan, Shogo Shimizu, Yoshihiro Murata, Mutsuo Taniguchi, Masa-hiro Yamaguchi (Department of Physiology, Kochi Medical School, Kochi University)

Various feeding-related neuromodulatory signaling molecules (both appetite stimulating and suppressing) are expressed throughout the olfactory system. Feeding-related neuromodulatory molecules regulate neuronal activities on the basis of metabolic state and hedonic values and have important roles in the modulation of feeding behaviors. Among the appetite suppressing molecules, Melanocortin 4 and its receptor are key regulators of energy homeostasis, food intake and body weight. Previous study showed that Melanocortin 4 receptor (MC4R) is highly expressed in the antero-medial domain and weakly expressed in the lateral domain of the olfactory tubercle

(amOT and IOT, respectively), which belongs both to the olfactory cortex and the ventral striatum and mediates odor-guided motivated behaviors. Injection of a MC4R agonist in the amOT strongly suppressed the odor attractive behavior and conversely induced aversion, but injection in the lateral OT or nucleus accumbens (NAc) did not influence the odor attraction. These results indicate that olfactory feeding behavior is crucially regulated by appetitive signals in the amOT. Further, MC4R agonist injection in the NAc induced yawning and stretching behaviors, which occurred following brain temperature elevation. These observations indicate the contribution of feeding-related signaling to various behaviors by acting on different regions of the ventral striatum, the OT and NAc. (COI: No)

4. Targeting Cellular Senescence with Probiotics and genetic senolysis Improves Experimental Inflammatory Bowel Disease

○Gaopeng Li¹, Lin-Hai Kurahara¹, Kensuke Kumamoto², Ryou Ishikawa³, Katsuya Hirano¹ (¹Department of Cardiovascular Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa 761-0793, Japan, ²Genome Medical Science and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa 761-0793, Japan, ³Department of Diagnostic Pathology, Kagawa University Hospital, Kagawa 761-0793, Japan)

Background:

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is a disease with a poor prognosis and limited treatment options. Cellular senescence contributes to the chronic inflammation and tissue damage in IBD. Targeting senescent cells could be a potential therapeutic strategy. The present study investigated the effects of the probiotics and genetic senolysis on DSS-induced colitis with a focus on cellular senescence.

Methods:

p16-CreERT2-tdTomato (PT) mice were used to trace senescent cells, whereas p16-CreERT2-DTR-tdTomato (PD) mice enabled selective elimination of p16-positive cells upon diphtheria toxin (DT) treatment. Colitis was induced in 10-week-old female mice using three cycles of oral treatment with 2% dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water. Lactobacillus rhamnosus Probio-M9 (Probio-M9) was administered in drinking water through-

out the experimental period, except for that during DSS exposure. The molecular signaling and senescence markers were evaluated.

Results:

In PT mice, DSS induced colon shortening, splenomegaly, mucosal inflammation, and STAT3 activation, accompanied by accumulation of tdTomato-positive senescent cells. The tdTomato fluorescence was observed in the cells positive for either α -SMA, CD31, or PDGFR α . Probio-M9 supplementation significantly alleviated these pathological changes and reduced senescent cell burden, without altering colonic p21 or p53 expression. In PD mice, DT-mediated senolysis markedly attenuated inflammation and splenomegaly, reduced Il17a/Tgfb expression, STAT3 phosphorylation, and p21 expression, while increasing p53 expression and AMPK phosphorylation. Clinical specimens of IBD showed greater numbers of p16-positive senescent cells in the areas of inflammation and cancer than in the normal areas.

Conclusion:

Both probiotic intervention and genetic senolysis improved DSS-induced colitis by reducing p16-positive senescent cells. These findings highlight senolysis as a promising therapeutic avenue and suggest Probio-M9 as a novel senotherapeutic probiotics. (COI: No)

5. ナトリウム-グルコース共輸送体 hSGLT3 の酸性条件下における糖輸送機構の解析

○市原智子^{2,2}, 神島和代^{2,3}, 藤原祐一郎^{1,2} (¹広島大学大学院医系科学研究科生理学及び生物物理学, ²香川大学医学部分子生理学, ³香川大学国際希少糖研究教育機構)

ナトリウム-グルコース共輸送体 (SGLT) は、糖の輸送やエネルギー恒常性の維持に重要な役割を担っている。SGLT ファミリーには、6つのサブタイプがあることが知られており、それぞれ異なる性質を有している。そのうち、ヒト SGLT3 (hSGLT3) は小腸の神経に多く発現しているが、他のサブタイプとは異なり、輸送体ではなくグルコースセンサーとして機能することが示唆されていた。しかしながら、これまでの我々の研究結果から、細胞外が酸性条件の場合にのみ、hSGLT3 もグルコース輸送能を獲得することが新たに分かってきた。

本研究では、hSGLT3 における酸性条件下での糖輸送機構解明のため、電気生理学的手法を用いて、異なる pH 環境下でのグルコース親和性 (Kd) 及びその構造変化について検証した。その結果、外液の pH 変化に対して、グルコース

の Kd 値はほとんど変化しなかった。また、leak subtraction 処理を行って得られたデータを元に、hSGLT3 の gating currents を解析したところ、hSGLT3 では外液が酸性条件の場合のみ、gating currents が出現することが分かった。

これらの結果から、hSGLT3 のグルコース輸送能獲得には、酸性条件下での hSGLT3 の構造的な状態の変化が関与している可能性が示唆された。本研究は、病態における組織酸性化と hSGLT3 によるグルコース代謝調節との新たな関連性を示すものである。(COI: No)

一般演題

1. チオレドキシンの持続的機能低下は、ミトコンドリア機能障害および炎症を介して慢性腎臓病を発症し、短命になる

○大守伊織¹, 大内田 守², 竹下浩平³, 内田治仁⁴, 豊國伸哉⁵, 真下知士⁶ (¹岡山大学学術研究院教育学域, ²岡山大学学術研究院医歯薬学域病態生理・創薬学分野, ³理化学研究所放射光科学研究センター, ⁴岡山大学学術研究院医歯薬学域, ⁵名古屋大学大学院医学系研究科病理病態学, ⁶東京大学医科学研究所実験動物研究施設)

目的: チオレドキシン (Trx) は、Txn1 遺伝子によってコードされる高度に保存された酸化還元活性タンパク質であり、細胞内酸化還元恒常性の維持に不可欠である。Trx の過剰発現は癌を含む様々な疾患に関与しているが、慢性的な Trx 欠損の長期的な影響は依然として不明である。そこで我々は、Trx 活性が約 1/3 に低下した Txn1-F54L 変異ラットの生涯にわたる自然発生的表現型を調査し、Trx 欠損の生理的役割の解明を目的とした。

方法: N-エチル-N-ニトロソウレアによる突然変異誘導で作成した Txn1-F54L 変異ラットの包括的な生涯モニタリングを実施し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で結果を検証した。分析には生化学検査、組織病理学的検査、免疫組織化学、透過型電子顕微鏡検査、RNA シーケンシング、ウエスタンブロッティング、サイトカインレベル測定が含まれた。

結果: Txn1-F54L 変異ラットは自然発生的に進行性慢性腎臓病 (CKD) を発症し、ホモ接合体の生存期間は 110~119 日、ヘテロ接合体は 303~346 日と短命であった。血中尿素窒素値上昇、低アルブミン血症、高コレステロール血症、高血圧、動脈中膜硬化などの臨床的特徴はヒト CKD に類似していた。組織病理学的検査では、広範な尿細管障害、間質性線維化、糸球体硬化が認められた。RNA シーケンシングにより、免疫および線維化経路の活性化が同定された。ミトコンドリア機能障害は近位尿管で顕著であり、

酸化ストレス蓄積と複数の制御細胞死経路 (Apoptosis, Necroptosis, Pyroptosis) の同時活性化を伴っていた。

結論：慢性的な Trx 欠損が酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、細胞死調節を誘導し、炎症と進行性 CKD を引き起こすと考えられた。(COI: No)

2. Development of a pulmonary fibrosis model using human lung epithelial cells, fibroblasts, and vascular endothelial cells

Qiang Li, Keiji Naruse, ○Ken Takahashi (Department of Cardiovascular Physiology, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University)

Pulmonary fibrosis is a fatal disease characterized by irreversible tissue remodeling caused by alveolar epithelial cell injury and fibroblast activation, eventually leading to respiratory failure and lung cancer. Conventional animal models do not sufficiently recapitulate human pathophysiology, and therefore, new human cell-based models are required. In this study, we established a co-culture system consisting of alveolar type II epithelial cells, fibroblasts, and vascular endothelial cells, aiming to develop a pulmonary fibrosis model. Using transwell culture and a microfluidic device (lung-fibrosis-on-a-chip), we evaluated morphological changes and the expression of fibrosis markers (α -SMA, E-cadherin, Vimentin, etc.) under TGF- β 1 stimulation. Fibroblasts exhibited TGF- β 1-dependent morphological alterations with increased α -SMA expression. Moreover, epithelial-mesenchymal transition was observed in the tri-culture system, and air-liquid interface culture was successfully achieved. Furthermore, three-dimensional culture within the microfluidic chip enabled the initial construction of a lung-fibrosis-on-a-chip model. Collectively, this study provides useful insights into the development of a human cell-derived in vitro pulmonary fibrosis model, which may serve as a foundation for drug discovery and elucidation of disease mechanisms. (COI: No)

3. 希少糖 D-allose は腸内細菌叢の多様性とマクロファージ機能を改善し、炎症性発癌を抑制する

○倉原 琳¹, 李 高鵬¹, 石川 亮², 隈元謙介³, 石川 昌和⁴, 松本 薫⁴, 平野勝也¹ (¹香川大学医学部自律機能生理学講座, ²香川大学病院病理診断科, ³香川大学医学部ゲノム医科学・遺伝医学, ⁴香川大学バイオインフォマティクス解析センター)

背景と目的：潰瘍性大腸炎とクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) は、特に潰瘍性大腸炎において、高い発癌リスクを伴う。D-グルコースエピマーである希少糖 D-allose は、抗酸化作用および抗腫瘍作用が報告されている。本研究は、大腸炎関連発癌モデルマウスを用いて、腸内細菌叢の多様性とマクロファージ機能に及ぼす D-allose の影響と治療効果を検討した。

方法：マウスマクロファージ RAW 264.7 細胞を用いて、定量 PCR、遊走、活性酸素種 (ROS) 産生、ミトコンドリア電位、小胞体 (ER) ストレスマーカーを評価した。IBD 患者腸組織の免疫染色でマクロファージおよび ER ストレスマーカーの発現を評価した。大腸炎関連発癌モデルマウスは、アゾキシメタン (AOM) 腹腔内投与とおよびデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 飲水投与 (1 週間投与の 3 回反復) により作成した (AOM/DSS 群)。最後の DSS 投与 1 週間後から D-allose (1g/kg B.W.) を飲水投与した。糞便中の腸内細菌叢のアンプリコンシーケンスを解析した。

結果：RAW 264.7 細胞において、D-allose は LPS が引き起こす炎症性サイトカイン産生、遊走、ROS 産生、ミトコンドリア電位低下を改善した。D-allose はタブシガルギンによって誘導される ER ストレスマーカー BIP や CHOP の発現上昇を抑制した。消化管正常部位と比較して、IBD 患者の炎症部位と発癌部位の両方でマクロファージ浸潤や BIP や CHOP の増生が観察された。AOM/DSS 群への D-allose 投与は、腫瘍数、消化管出血、炎症サイトカイン発現、マクロファージ浸潤、BIP および CHOP 発現細胞数を抑制した。AOM/DSS 群において腸内細菌叢の α 多様性 (Chao1 index, Shannon index) が顕著に低下した。D-allose は、正常群において α 多様性 (Chao1 index, Shannon index) を有意に増加させ、AOM/DSS 群において α 多様性 (Faith's Phylogenetic Diversity) を増加させた。正常群、D-allose 群、AOM/DSS 群、D-allose 投与 AOM/DSS+ 群の 4 群間すべてにおいて β 多様性 (Jaccard, Bray-Curtis) に有意差が認められた。

結論：D-allose は、大腸炎関連発癌モデルマウスにおいて、腸内細菌叢の多様性やマクロファージの機能を回復することで、炎症と腫瘍の増殖を抑制した。D-allose は、IBD および炎症関連発癌の有望な治療薬および予防薬であることが示唆される。(COI: No)

4. 希少糖のトランスポーターによる輸送解析；体内動態の予測に向けて

○神鳥和代^{1,3}, 望月 進^{2,3}, 秋光和也^{2,3}, 何森 健^{2,3}, 藤原祐一郎⁴ (¹香川大学医学部分子生理学講座, ²香川大

学農学部,³香川大学国際希少糖教育研究機構,⁴広島大学大学院医系科学研究科)

希少糖は自然界に稀に存在する単糖の総称であり、その中には生体に有用な機能を持つものがある。例えば、D-アルロースは糖尿病抑制効果を示し、D-アロースはがん細胞の増殖や酸化ストレスを抑制する。このような機能を発揮するため、これらの糖はさまざまな臓器においてグルコーストランスポーター (GLUT) またはナトリウム/グルコーストランスポーター (SGLT) を介して細胞内に輸送される必要がある。しかし個々の希少糖の輸送の全容は、分析方法が限られていることからこれまでほとんど不明であった。希少糖の輸送解析が進めば、それぞれの生体内動態および作用点を予測することができ、報告されている生理作用の裏付けとなる。

本発表では、ヒト由来のトランスポーターを発現するアフリカツメガエル卵母細胞を用いた、希少糖の定量的な輸送解析の結果を紹介する。種々の生理作用が報告されている D-アルロースと D-アロースを中心に、以下の 3 種類の実験系を用いて検討した。

- ・HPLC 解析により、D-アルロースを含む複数の希少糖が GLUT2 と GLUT5 によって輸送されることを明らかにした。さらに、D-アルロースは D-グルコースと D-フルクトースの輸送を阻害した。また、GLUT1 により輸送される希少糖を同定した。

- ・電気生理学的解析により、D-アロースは SGLT1 によって輸送されるが、その他の糖は輸送されないことを明らかにした。

- ・RI ラベル体糖を用いた解析により、D-アロースのグルコース輸送への影響を検討した。

以上の解析から、それぞれの希少糖の細胞内への輸送において重要な役割を担うトランスポーターを同定し、糖輸送阻害を介した作用機序が明らかになってきた。今後さらに網羅的に解析を進め、これまで報告されているさまざまな生理作用の分子基盤を明らかにするとともに、有効な摂取、投与方法を提案するための情報を提供する。(COI : No)

5. Fyn-paxillin 相互作用による血管平滑筋細胞遊走を制御する

○張 影, Salman Ahmad, Sabrina Haque, Nesyana Nurmadilla, 前嶋 翔, 松崎健太郎, 岸 博子 (島根大学医学部生理学講座 (環境生理学))

Rho キナーゼを介する血管平滑筋細胞の遊走は、動脈硬化性プラークの形成や血管内治療後の再狭窄など、心血管疾患の病態進展において重要な役割を担う。その分子機構

は複雑で未解明な点が多いが、近年我々は、細胞接着斑における活性型 Fyn と paxillin の直接的結合が、アクチンストレスファイバー形成および血管平滑筋細胞遊走に必須であることを明らかにした。ブルダウンアッセイとプロテオミクス解析により、活性型 Fyn の下流分子 paxillin を同定した。さらに、表面プラズモン共鳴アッセイにより、活性型 Fyn と paxillin N 末端との直接結合を確認した。また、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) による Rho キナーゼ活性化、アクチンストレスファイバー形成および細胞遊走は、paxillin ノックダウンにより抑制され、この効果は全長 paxillin で回復したが、N 末端 paxillin では回復しなかった。これらの結果から、全長 paxillin と活性型 Fyn の直接結合がストレスファイバー末端で共局在することが、Rho キナーゼ依存的なストレスファイバー形成と細胞遊走に必須であることが示された。以上より、paxillin は新規シグナル分子として、活性型 Fyn との直接結合を介し、Fyn/paxillin/Rho キナーゼ経路を通じて血管平滑筋細胞における SPC によるアクチンストレスファイバー形成および遊走を制御することが明らかとなった。この Fyn-paxillin の相互作用は、心血管疾患に対する新規治療標的となり得る可能性が示唆される。(COI : No)

6. 老化血管内皮細胞における脂肪滴沈着の機能的影響

○須長大輝^{1,2}, 平野真弓², 平野勝也² (¹香川大学医学部医学科 5 年次生, ²香川大学医学部自律機能生理学)

【目的】血管内皮細胞は血管機能の恒常性維持に重要な役割を果たす。内皮細胞の老化は内皮機能障害を引き起こし、加齢性血管障害の発症の基盤となる。脂肪食負荷したマウス個体の血管内皮および脂肪酸負荷した培養内皮細胞において脂肪滴が沈着し、内皮機能障害を引き起こすと報告されている。また、貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入は内皮間葉転換を誘導すると報告されている。本研究では、複製老化させた培養内皮細胞を用いて、老化内皮細胞における脂肪滴沈着と内皮機能に及ぼす影響を明らかにする。

【研究方法】ブタ大動脈由来内皮細胞を 15~19 継代した低継代細胞 (若年内皮細胞) と 24~30 継代した高継代細胞 (複製老化内皮細胞) を比較解析した。老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性および p16 蛋白質発現により細胞老化を評価した。BODIPY 493/503 蛍光染色により脂肪滴を観察した。Fura-2 蛍光法により細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 変化を観察した。貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入ならびに平滑筋マーカー関連蛋白質の発現をウエスタンブロットによって解析した。

【研究結果】低継代細胞と比べ、高継代細胞で老化関連 β -ガラクトシダーゼ活性および p16 蛋白質発現が高く、高輝

度の脂肪滴沈着が認められた。高継代細胞における脂肪滴沈着は、10 μ M フォルスコリン 48 時間処理により減じた。細胞外 Ca^{2+} を除去して小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤タプシガルギン (1 μ M) で処理すると、一過性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が発生し (小胞体からの Ca^{2+} 放出)、引き続いて細胞外 Ca^{2+} を 2 mM に上昇させると持続性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が発生した (貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入)。高継代細胞では、低継代細胞と比べ、貯蔵部作動性 Ca^{2+} が増強した。フォルスコリン処理した高継代細胞において、貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入の増強が有意に抑制された。貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入に関わる STIM2 の蛋白質レベルは低継代細胞と比べて高継代細胞で若干低かったが、STIM1, Orai1, Orai2 の発現レベルには有意差を認めなかった。低継代細胞では平滑筋特異的 α アクチンの発現を認めなかったが、高継代細胞では顕著な発現が観察された。

【結論】老化血管内皮細胞において脂肪滴沈着は貯蔵部作動性 Ca^{2+} 流入を増強する。老化血管内皮細胞において内皮間葉転換が生じた。老化血管内皮細胞における脂肪滴沈着は内皮の機能的脱分化を引き起こすことが示唆される。(COI : No)

7. 麻酔直後の覚醒時興奮の動物モデル確立とその神経科学的機序解明

○古賀エミリ^{1,2}, 山内大翔^{1,3}, チョードリエマムツサレヒン¹, 田中潤也¹, 西原 佑¹ (1愛媛大学医学系研究科麻酔・周術期学, 2愛媛大学医学部医学科 1 年次学生, 3愛媛大学医学部医学科 5 年次学生)

【目的】

覚醒時興奮は、吸入麻酔薬からの覚醒時に一過性の精神運動興奮が生じる現象であり、特に小児で高頻度に発生する。激しい場合には転倒や自己抜管などの危険行動を引き起こし、術後管理を困難にする。現在、科学的根拠に基づく対処法は確立されておらず、動物モデルの不在がその一因と考えられる。本研究では、ADHD モデルラットである Lister Hooded Rat (LHR) を用いて、覚醒時興奮の動物モデルとしての妥当性を検討し、その神経科学的機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

8~9 週齢のオス LHR および Wistar ラットにイソフルラン (3%, 流量 0.8L) を 15 分間吸入させ、麻酔終了後の行動を Recovery test および Fall test により評価した。脳内の遺伝子発現は RT-PCR により、モノアミン量は HPLC により定量した。Fos 遺伝子発現を指標として前頭前野および扁桃体の神経活動を評価した。術後せん妄との鑑別のため、麻酔終了 5 時間後にも Fall test および明暗箱試験を

実施した。

【結果】

LHR では麻酔終了後 4~8 分間に転倒・落下行動が多発し、Wistar ラットでは顕著な体動は認められなかった。Fos 発現比 (扁桃体/前頭前野) は麻酔群で上昇し、前頭前野による扁桃体の抑制低下が示唆された。興奮性シナプス後部タンパク質の PSD95 の発現上昇も認められた。測定したモノアミンのうち、セロトニンが脳で増加傾向していた一方、小脳では、ばらつきが大きかった。術後せん妄様行動は LHR では観察されず、覚醒時興奮とは異なる病態である可能性が示された。

【結論】

LHR ラットにおける麻酔後の短時間の過活動は、覚醒時興奮の動物モデルとして有用である可能性が高い。扁桃体と前頭前野の神経活動のアンバランスが、覚醒時興奮の一因であることが示唆された。セロトニンの急激な濃度変化が神経活動の不均衡を引き起こし、覚醒時興奮に関与している可能性がある。今後は責任脳部位の特定とセロトニン受容体や代謝に関する薬理学的介入による抑制効果の検討を進める。(COI : No)

8. 術後せん妄の神経科学的メカニズム解明を目指して

○山内大翔, チョードリエマムツサレヒン, 田中潤也, 西原 佑 (愛媛大学医学系研究科麻酔周術期講座)

全身麻酔を伴う手術侵襲は術後に術後せん妄 (post operative derilium ; POD) を誘発することがあり、患者の術後管理における大きな問題となっている。POD は現在、複数の誘発因子によって生じる病態とされており、特に高齢や全身状態不良、服薬状況、併存疾患などがリスク因子として临床上重要視されている。しかし、発症機序に関する神経科学的解明が進んでいないこともあり、明確なエビデンスに基づく有効な治療法あるいは予防法は確立されていない。POD の神経科学的機序を明らかにすべく今回私たちは 8 週齢正常オス Wistar ラットを用いて POD モデルの作成を試みた。手術侵襲が誘発する神経炎症が病態に関与していると予想していたが、予想に反して肝部分切除による手術侵襲は神経炎症を惹起しなかった。しかし、3% イソフルラン 15 分間吸入による全身麻酔処置を受けた動物 (手術をしない対照群、腹壁切開のみの偽手術群) で前頭葉ドーパミンの低下が麻酔終了 6 時間後に観察された。また、麻酔後 6 時間においてオープンフィールドテストでは、手術侵襲を加えないイソフルラン吸入麻酔群で総移動距離の延長、突発的な行動の増加がみられた。さらに、高架式十字迷路試験では実験開始直後からの落下の危険があるオープンアーム侵入が見られ、明暗箱試験では明室滞在時間の延

長がみられた。これらの行動実験の結果は、イソフルラン吸入麻酔の影響による見当識障害、危険認知の低下を示唆するものであり、POD は手術侵襲とは関係なく、吸入麻酔薬の影響により発症する可能性が強いと考えている。今後はこの実験系を用い、行動異常と関連付けた分子生物学的解析および予防的あるいは治療的介入法の確立を目指したい。(COI: No)

9. 生き方が脳と行動に与える影響：ラットを用いた研究

○田中潤也, 品部凜太郎, チョードリエマムッサレヒン, 西原 佑 (愛媛大学医学系研究科医学専攻麻酔・周術期学)

「40 歳を過ぎたら自分の顔に責任を持て」という言葉をエイブラハム・リンカーンが残したように、人の生き様は人柄や行動を変化させ、容貌にも影響すると言われる。しかし、生き方の違いが脳や行動にどのようなメカニズムで影響を与えるのか、ほとんど何もわかっていない。本研究では、オス Wistar ラットに生後 9 ヶ月まで異なる飼育方法を行い、その行動と脳内遺伝子発現への影響を調べた。生後 21 日で親から離れた同腹兄弟のオス Wistar ラットを、人に毎日可愛がられる enhanced affectionate handling (EAH) 群、通常の実験動物として飼育する Control (CNT) 群の 2 群にわけ生後 2.5 ヶ月まで 4 匹 1 ケージで飼育した。その後同じ飼育方法で育った 2 匹を 1 ケージで飼育する独身群 unmated (u), 見知らぬ成熟メスラットと 1:1 で同居させ仔を産ませる結婚群 mated (m) に分け、uCNT, uEAH, mCNT, mEAH の 4 群を作成して生後 7 ヶ月まで飼育し、その後種々の行動実験を行った。見知らぬ若いオスラット 2 匹と一緒にいる集団オープンフィールドテストでは、mEAH 群のみが自身と見知らぬラットの不安様行動を減弱させた。8 方向放射状迷路や水迷路では、EAH 群が優れた空間認知・学習能力を示した。遺伝子発現では mEAH 群のみ、内側前頭前野および海馬で、神経細胞活動を反映する Fos や Egr1, ミクログリアマーカーの CD11b, 脳由来神経栄養因子 BDNF の発現が上昇していた。下垂体前葉では、ACTH 前駆体の POMC の発現が結婚群で減少し、プロラクチンの発現が上昇していた。ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンの脳内含量には変化が見られなかった。これらの結果は、幼少期の愛情ある養育環境は前頭前野や海馬の神経細胞活動を上昇させて認知機能の向上に繋がることを示唆する。一方、メスと同居して仔の誕生・養育に関わることは、内側前頭前野を活性化して社会性を向上、ストレスの減少にも関わっていると考えられた。神経細胞活動の活性化は、ミクログリアの BDNF 産生増強

に関連している可能性がある。(COI: No)

10. うつ様モデルマウスに対する漢方薬の効果の比較

○秋田大輝¹, 中村一丸山恵美², 川村駿翔¹, 氷見直之², 宮本 修^{2,3}, 中村丈洋² (¹ 川崎医科大学医学部 3 学年, ² 川崎医科大学生理学 2, ³ 川崎医療福祉大学医療技術学部臨床工学科)

【目的】多くのストレスに晒されている昨今では全人口の約 3% から 5% が生涯うつ病にかかると言われており、その罹患率は近年増加傾向にある。しかし治療法が確立しておらず現行の治療薬では効果がみられない場合も少なくない。近年では新たな治療法として漢方薬が注目されているがその効果のエビデンスが少ない。今回の研究では、特に精神神経症状や不安症に効果があるとされている半夏厚朴湯、抑肝散、人參養榮湯について、うつ様モデルマウスを用いてその効果の違いの有無を検討した。

【方法】C57BL/6J マウス (7 週齢♂) を 2 週間にわたり拘束水浸ストレス負荷を与えうつ様モデルマウスを作成した。モデルマウス作成 3 日前から作成後 2 週間の計 4 週間、蒸留水と 3 種類の漢方を自由摂取させ比較した。NSF (新奇環境摂食抑制試験), FST (強制水泳試験), LA (自発運動量) を行い、行動学的にうつ様状態を検討した。またモデル完成後から BrdU を投与し、DCX と二重染色することで海馬歯状回の新生神経細胞密度を計測して組織学的にも検討した。

【結果】BrdU による海馬歯状回の神経新生の数を比較すると漢方投与群においてストレスによる減少が抑制されたが群間に大きな差は見られなかった。一方、行動試験では全ての漢方摂取群において改善傾向が示されたが、半夏厚朴湯はより強い傾向が示された。これらの結果より半夏厚朴湯が最もうつ様症状の改善に効果があることが示唆された。(COI: No)

11. マウス皮質拡延性脱分極の発生時における神経細胞種特異的な活動動態

○半田高史, 張 晴, 馬中 琪, 相澤秀紀 (広島大学大学院医系科学研究科神経生物学)

皮質拡延性脱分極 (cortical spreading depolarization, CSD) は、病的な興奮性を示す神経組織 (神経細胞とグリア細胞) でしばしば見られる現象で、1 分以上にわたり持続する脱分極状態が大脳皮質全域に伝播する。近年、この CSD が片頭痛・てんかん・脳卒中・脳外傷などの多くの神経疾患の病態に関係することが明らかとなってきた。しかし、臨床医学上の重要性が高いにも関わらず、CSD の発生の基盤となる分子・細胞機構は未だ十分に解明されてい

ない。大脳皮質の神経細胞は興奮性錐体細胞と多様な抑制性介在細胞から構成されるので、CSD の発生機構を理解するうえで細胞種による役割の違いを明らかにすることは重要である。そこでこの問題に取り組むために、マウス一次視覚野に塩化カリウムを局所的に添加して CSD を惹起し、両側の運動野から局所フィールド電位 (local field potential, LFP) とマルチユニット活動を *in vivo* 記録した。スパイクソーティングにより単一神経細胞ごとのスパイクデータを分離し、そのスパイク波形と発火パターンから 3 つの細胞サブタイプ [興奮性細胞, fast spiking (FS) 介在細胞, wide 型介在細胞] に分類し、CSD 発生時の活動動態の特徴を細胞サブタイプ間で比較した。CSD が起こった同側では発火頻度の上昇に伴い徐波帯域 (0.1-4 Hz) でのスパイク-LFP コヒーレンスが全てのサブタイプで減少した。一方、FS 介在細胞はガンマ帯域 (30-80 Hz) でのスパイク-LFP コヒーレンスが増加し、局所神経回路活動に関与することを示唆した。更に、CSD 発生時の発火頻度は、FS 介在細胞が他の細胞種よりも早く上昇することを見出した。組織学的解析では、CSD によって活性化したパルプアルブミン陽性介在細胞が大脳皮質 3 層と 4 層に局在した。これらの結果は、FS 介在細胞が他の細胞種と相互作用することで CSD 発生に関与することを示唆した。(COI: No)

12. 脳発達における核膜 LINC 複合体の重要性

○伊藤泰行¹, 濱 徳行^{1,2}, 鈴木禎史¹, 積山みるひ^{1,3}, 桑子賢一郎¹ (¹島根大学医学部神経・筋肉生理学, ²山陽女子短期大学臨床検査学科, ³N 高等学校)

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD) に代表される神経発達症ではシナプス異常が発症機構に深く関与するとされているが、その分子メカニズムは不明な点が多く、未だ有効な治療法は存在していない。一方、ASD 患者においては、核と細胞骨格を物理的につなぐ核膜 LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) 複合体分子 Nesprin1 や活動電位生成に必須の軸索起始部 (Axon Initial Segment: AIS) の主要構成分子 Ankyrin-G に多数の遺伝子変異が報告されている。しかし、LINC 複合体や AIS の脳発達における重要性は十分に理解されておらず、また ASD の発症機構への関与は全く明らかになっていない。

そこで、本研究では、脳発達期における LINC 複合体の機能不全が、AIS や神経活動、さらにシナプス形成に与える影響を解析した。まず、ニューロン特異的プロモーター下で LINC 複合体のドミナントネガティブ変異体 (LINC-DN) を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを構築した。そして、この AAV ベクターを新生仔マウスに投与

して発達期の脳内全域のニューロンで LINC 複合体の機能不全を誘導し、脳発達が完了した生後 8 週齢に AIS の形態学的解析や電気生理学的解析を行った。その結果、大脳皮質前頭前野の LINC-DN 発現細胞では、AIS の顕著な短縮が認められ、また、活動電位生成の閾値が上昇してスパイク発火頻度が低下することも明らかになった。さらに、マウス大脳皮質由来の初代培養ニューロンでは、LINC-DN 発現により樹状突起スパイン密度の変化が観察された。

以上の結果より、脳発達期における LINC 複合体の機能不全は AIS の異常を惹起し、神経活動の低下やシナプス形成異常を介して神経回路形成に影響を及ぼす可能性が示唆された。(COI: No)

13. 下オリブ核によるサブセカンド・タイミング行動の顕在制御

○岡田佳奈¹, 井樋 慶², 崎村建司³, 橋本浩一¹ (¹広島大学大学院医系科学研究科神経生理学, ²東北大学大学院情報科学研究科情報生物学分野, ³新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野)

数百ミリ秒近辺の間隔時間に関する知覚は、動物の認知活動の根源的な部分にあたる。時間知覚には大脳皮質や大脳基底核、小脳などが分散的に関与していると現在では考えられているが、中でも小脳とその前後核を含む小脳回路は、この数百ミリ秒近辺のタイミング制御に関与しているとされる。しかし、これまでに報告されてきた小脳回路に関連するタイミング制御とは、学習行動に伴って起こる潜在的なタイミング制御のことがほとんどであり、小脳回路が顕在的に遂行されるタイミング制御に関与していることを示す報告はない。そこで本研究では、齧歯類に顕在的サブセカンド・タイミング制御をさせる課題を作成し、小脳回路の一部である下オリブ核が顕在的サブセカンド・タイミング制御に関与するかどうかに関して検討した。まず、オペラント箱を用いた手掛り開始型タイミング課題と自己開始型タイミング課題を作成し、野生型 C57BL6J マウスに獲得させた。これらの課題では、音刺激呈示または動物の自発的なノーズボーク行動の後、スタンバイ期間 (250ms, 750ms) を空けてノーズボーク反応を遂行した場合を正反応として報酬を与えた。スタンバイ期間が終了するのを待たずに反応した場合は早発誤反応として試行を終了した。1 日 100 試行 15 日間これらの課題をマウスに訓練させたところ、訓練の進行につれて、マウスのノーズボーク反応潜時の分布が両課題のスタンバイ期間終了点前後にピークを形成するようになった。音刺激呈示または動物の自発的なノーズボーク行動の後、スタンバイ期間を設けずにノーズボーク反応に対して報酬を与えるという、手掛かりや自

発的行動に対する単純反応課題においても、マウスのノーズポーク反応潜時は一定の値に自律的なピークを形成した。その後、光遺伝学的手法を用いて、課題遂行中の音刺激、あるいは自発的ノーズポーク行動より下オリーブ核の神経細胞の活動を抑制したところ、学習されたスタンバイ期間終了点前後のピークが低下した。一方、手掛かりや自発的行動に対する単純反応課題でのノーズポーク反応潜時においては、下オリーブ核の神経細胞の活動による影響は見られなかった。これらの結果は、マウスの顕在的なサブセカンド・タイミング制御に下オリーブ核の神経細胞の活動が重要な役割を果たしていることを示す。(COI: No)

14. 腸管神経系のドーパミン β -ヒドロキシラーゼ発現神経細胞の解析

○井上実咲¹、吉村祐貴¹、近藤邦生¹、中山祐二²、水上洋一³、小林和人⁴、檜山武史^{1,5} (¹鳥取大学医学部生理学講座統合生理学分野、²鳥取大学研究推進機構研究基盤センター、³山口大学研究推進機構総合科学実験センター、⁴福島県立医科大学医学部附属研究施設生体機能研究部門、⁵鳥取大学国際乾燥地研究教育機構)

消化活動を自律的に制御する腸管神経系は、食道から肛門に至るまでの消化管壁に存在し、多数の神経細胞群が神経線維によってネットワークを形成している。腸管神経系には複数の神経細胞種が含まれるが、その詳細は未だ不明である。近年のシングルセル RNA-Seq 解析による分類で、ドーパミンをノルアドレナリンに変換する酵素ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ (DBH) を発現する腸管神経細胞 (腸管 DBH ニューロン) の存在が示唆された。本研究では、腸管 DBH ニューロンの分布や利用する神経伝達物質、機能について検討した。

我々は、DBH 発現細胞で特異的に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するマウス (B6.Cg-Tg (DBH-tauGFP) 17) を解析し、腸管 DBH ニューロンが消化管全体に存在することを確認した。細胞体は主に粘膜下層に分布し、絨毛などの粘膜へと神経線維を伸ばしていた。上述のシングルセル RNA-Seq 解析では、一部の腸管 DBH ニューロンはコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) を発現するコリン作動性ニューロンであるとされていたが、ChAT 陽性細胞が標識された ChAT-Cre; LSL-tdTomato マウスと交配し解析したところ、両者は全く重ならなかった。さらに、小腸組織からセルソーターで GFP 陽性細胞を回収し RNA-Seq 解析を行った結果、GABA 合成を担うグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の発現が認められ、免疫組織化学的解析でも一部の腸管 DBH ニューロンが GAD 陽性であることを確認した。一方で、興味深いことに DBH の基質

であるドーパミンを産生するチロシンヒドロキシラーゼの発現は確認できなかった。次に、腸管 DBH ニューロンの活性化と消化管機能の関連を検討するため、リポポリサッカライド (LPS; 2 mg/kg BW, i.p.) 投与による化学的ストレスと、高温多湿環境 (温度 38℃, 湿度 70%, 2 時間) 曝露による物理的ストレスの 2 種類の全身性炎症モデルを作製した。両モデルで消化速度の指標である消化管通過時間が有意に延長し、糞便量は減少していた。一方、神経活動の指標である Fos の発現を調べたところ、高温多湿環境群では LPS 投与群より腸管 DBH ニューロンが活性化していた。

以上より、腸管 DBH ニューロンは暑熱などのストレス条件下における消化管機能抑制に関与している可能性が考えられる。(COI: No)

15. 暑熱順化による熱中症モデル動物の神経・臓器障害への保護効果の検討

○松崎健太郎¹、前嶋 翔¹、張 影¹、杉本直俊²、紫藤 治¹、岸 博子¹ (¹鳥根大学医学部生理学講座 (環境生理学)、²金沢大学医薬保健研究域保健学系)

【目的】

重症の熱中症患者では、小脳や肝臓、腎臓などに機能障害が生じ、後遺症として長期に持続することが報告されている。本研究では、熱中症モデルラットを用い、暑熱順化 (自発的運動トレーニング) が神経および主要臓器に及ぼす保護効果について、協調運動機能、酸化ストレス、炎症反応、凝固系異常、ならびに血液生化学的指標を通じて多角的に検討した。

【方法】

Wistar 系雄性ラット (10 週齢) を、通常飼育群 (NT)、熱中症誘導群 (HS)、運動トレーニング群 (TR)、および運動 + エタラボン併用群 (TR + ED) の 4 群に分けた。TR 群はランニングホイール付きケージで 30 日間飼育して暑熱順化を行い、TR + ED 群には熱中症誘導後にエタラボンを腹腔内投与した。熱中症誘導後には、ローターロッド試験による協調運動機能の評価を行った。脳組織については組織学的解析および生化学的解析を行い、脂質過酸化レベル (TBARS 法)、炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α)、および NF- κ B リン酸化を測定した。また、血漿を用いて D-dimer 濃度を測定した。さらに、血液生化学検査を実施し、肝機能 (AST・ALT) および腎機能 (クレアチニン) を評価した。

【結果・考察】

HS 群では、協調運動機能の低下、小脳プルキンエ細胞マーカー (Calbindin) 発現の減少、TBARS 値の上昇、NF-

κB リン酸化の亢進、炎症性サイトカインの増加、血漿 D-dimer 濃度の上昇、肝機能マーカー (AST・ALT) の増加、クレアチニンの上昇、さらには血小板減少など、複数の異常が認められた。一方、TR 群では協調運動機能と生存率が有意に改善し、炎症性サイトカインも NT 群と同等レベルにまで抑制されていた。さらに、TR+ED 群では TBARS 値が顕著に抑制されるとともに、D-dimer 濃度および肝・腎機能マーカーも改善し、NT 群に近い水準を示した。これらの結果から、暑熱順化は熱中症による中枢神経障害、炎症反応、酸化ストレス、凝固系異常および臓器障害を抑制し、小脳機能と生存率を高める可能性が示唆された。なお、エダラボンの併用効果は探索的検討の段階にあり、今後の詳細な検証が求められる。(COI: No)

16. 温度によるヒト表皮角化幹細胞制御機構の解明

○難波大輔¹, 坂部純一^{2,3}, Yann Barrandon^{2,3} (¹鳥取大学医学部再生医療学分野, ²Duke-NUS Medical School, Singapore, ³Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Singapore General Hospital, Singapore)

表皮角化幹細胞は、表皮の恒常性維持や損傷修復に必須であるだけでなく、生体外で表皮を再生する能力を持つため、ヒト表皮角化幹細胞培養によって作製される培養表皮は、熱傷などの再生医療に用いられている。したがって、ヒト表皮角化幹細胞を制御する方法の開発は、生体での組織恒常性維持機能の向上だけでなく再生医療の進展にもつながる。表皮角化幹細胞を含む組織特異的幹細胞は、ニッチと呼ばれる特殊な細胞外微小環境のもとに維持されている。ニッチの構成要素として細胞外マトリックスや増殖因子などが知られているが、表皮は個体と外部環境の境界に存在することから、我々は温度が物理的なニッチとして表皮角化幹細胞動態に影響を与える可能性を考え解析を行った。その結果、通常の培養温度である 37℃ から 2~5℃ 低下させると、温度感受性陽イオンチャネルである TRP チャネルを介して細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、その結果、細胞内代謝を司る mTORC1 シグナルが抑制されることを見出した。さらに、mTORC1 の阻害剤であるラパマイシンを培養系に添加したところ、ヒト表皮角化幹細胞の枯渇を抑制できた。以上の結果は、ヒト表皮角化幹細胞に TRP チャネル-mTORC1 シグナル軸が存在し、その活性を温度やラパマイシンで制御することで、培養系において角化幹細胞を長期にわたって維持できることを示唆している。本発表ではこの結果に加え、我々の研究室で進めている温度と表皮恒常性に関する研究についても紹介する。(COI: No)

17. 高血圧に伴う頻尿の脳内メカニズム

○清水翔吾¹, 田中健二郎², 村田芳博¹, 谷口睦男¹, 山口正洋¹ (¹高知大学医学部生理学講座統合生理学, ²高知大学医学部解剖学講座)

目的: 膀胱および尿道からなる下部尿路の生理学的役割は、蓄尿と排尿である。これら機能は末梢神経のみならず中枢神経によって制御されている。しかし、加齢や脳血管障害などにより、その機能が障害されると排尿障害が生じる。トイレが近くなる頻尿とは、1 日 8 回以上の排尿を特徴とし、生活の質を著しく低下させる症状である。高血圧は頻尿の危険因子とされるが、その発症メカニズムは詳しく明らかになっていない。生理活性物質であるアンジオテンシン II (Ang II) は末梢のみならず中枢においても産生され、血圧制御、水分・塩分調節等に関与している。我々はこれまでに、Ang II が脳内 Ang II タイプ 1 (AT1) 受容体を介して排尿反射を亢進 (頻尿を惹起) することを動物実験により示してきた。本研究では、高血圧に伴う頻尿における脳内 Ang II または AT1 受容体の関与を検討した。

方法: 自然発症高血圧ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) は遺伝的に高血圧かつ頻尿を呈するモデル動物である。本研究では、18 週齢の雄性 SHR および正常血圧ラット (Wistar 系ラット) を用いた。ウレタン麻酔下ラットの膀胱内へカテーテルを留置し、膀胱内圧測定を行った。そして、Ang II や関連薬剤を脳室内または経口投与し、排尿パラメーターを評価した。本実験計画は高知大学動物実験委員会の審査・承認を受けた。

結果: 正常血圧ラットに比して、SHR は排尿間隔の短縮がみられたが、最大排尿筋圧には有意差はみられなかった。脳室内投与した AT1 受容体拮抗薬バルサルタンは、SHR において排尿間隔を一部に延長させたが、Wistar 系ラットには効果を示さなかった。また、中枢移行性のある AT1 受容体拮抗薬テルミサルタンを SHR に慢性経口投与したところ、溶媒投与群に比して、1 回排尿量および膀胱容量などの排尿パラメーターが改善された。

結論: 高血圧に伴う頻尿のメカニズムとして、脳内 Ang II 産生、AT1 受容体発現増加による排尿反射亢進が関与する可能性が示唆された。中枢移行性を有する AT1 受容体拮抗薬は、高血圧に伴う頻尿の新たな治療薬になりうることを示唆された。(COI: No)

18. 入浴における心機能および脳血流の解析

○永見天媛¹, 清水結菜¹, 上元美咲¹, 城朝朝陽¹, 中島人輔¹, 榊原未幸^{2,5}, 矢野英樹³, 奥田泰子⁴, 山口 豪⁵
(¹四国大学看護学部 4 年生, ²徳島赤十字病院, ³新見公立大学健康科学部看護学科基礎看護学領域, ⁴広島文化学

園大学大学院看護学研究科,⁵四国大学看護学部解剖生理学研究室)

【背景】入浴事故の根幹には熱中症があり、随伴症状として意識障害と疲労があることがSuzuki らによって報告されている。また、健康成人男性においても入浴中に立ち上がり動作を行うと、めまいなどの自覚的症状を呈するときには脳血流量が減少していることが報告されている。しかし、入浴事故予防に有効な解決方法は確立されていない。【目的】本研究は脳血流量がその血流の原動力となる左室駆出率 (EF) や拡張能の指標 (EV, E/A) とどの程度関わり、入浴可否判断指標のパラメータとなりうるかどうかを明らかにすることを目的とする。【方法】被験者は体調等に問題のない健康成人男性 6-14 名 (21~22 歳) を対象とした。入浴前~出浴 10 分後の間の近赤外線分光法を用いた脳血流量の測定、および心エコーによる左室駆出率 (EF) および拡張能の指標である E 波の速度の測定を行い、相関分析を行った。EF 計測は modified Simpson 法を用いた。その他、血圧測定やホルター心電計による心拍変動解析を行った。【結果・考察】入浴前に比べ入浴中は脳血流量が有意に増加した。さらに出浴直後も増加していた。出浴直後の EF は入浴前と比較して有意に増加していた。相関分析の結果、相関係数は 0.77、決定係数が 0.59 であり、脳血流と EF の間には有意な相関関係にあることがわかった。一方、拡張能とは有意な相関関係は認めなかった。(COI: No)

19. アクティブ・ラーニングの実施例：タンパク質を手のひらに取る AlphaFold プログラムを利用して

○宮野 佳¹、岡本秀一郎²、逸見百江¹、大橋武文¹、中村一丸山恵美³、水見直之³、庵谷千恵子⁴、中村丈洋³、西松伸一郎¹ (¹川崎医科大学・自然科学、²川崎医科大学・生化学、³川崎医科大学・生理学 2、⁴川崎医科大学・医学教育センター)

【背景】川崎医科大学では、1 年生前期から「生物化学」を必修科目とし、「視認できない生体の化学物質」を化学式で示す試みを実施してきた。医学部の解剖学教育において、人体を構成する組織や細胞は光学顕微鏡により観察可能であり、学生はそれらの形態を生理機能や病態と結びつけて理解を進めることができる。一方、タンパク質や酵素といった生体分子の立体構造を機能と関連させて直感的に理解させることは難しい。

【方法】そこで、本科目では、AI プログラム AlphaFold を活用したアクティブ・ラーニングを導入し、以下の手順で演習を行った。(1) 学生が講義ノート(アクティブ・ラーニング実施前の第 1~15 回分) から任意のタンパク質または酵素を選択、(2) 和名を英語名に変換後、タンパク質デー

タベス UniProt で正式名称を確認、(3) AlphaFold で立体構造モデルを検索し観察、(4) 二次構造要素 (α -ヘリックス、 β -シート) の数をカウント、(5) 英語名および構造情報を Google フォームに入力し、課題を完了する。

【結果】AlphaFold プログラムを用いることで、学生は立体構造をまるで手のひらで転がすかのように 360 度自在に操作し、さまざまな角度から観察できた。その結果、多くの学生が集中して取り組み、タンパク質の構造を直感的に把握する学習体験を得た。演習に参加した全学生が講義ノートの幅広い領域から分子を選択し、操作を通じて立体構造の特徴を把握した。多角的な観察により、化学式だけでは捉えきれない分子の大きさや立体配置を視覚・触覚的に体験することができた。一方で、UniProt の検索手順や英文命名規則に不安を抱える学生も一定数おり、個々のタンパク質名の理解が不十分なケースが散見された。

【考察と今後の展望】演習は理論と実感を結びつける上で有効であり、特に視認できない立体構造を自分の手で操作できる体験が学生の興味と理解を促進したと考えられる。今後はデータベースの基礎操作や命名規則の事前指導を強化し、検索プロセスの定着を図る。また、教員間でピア・レビューを実施し、教材構成や演習手順の改善点をフィードバックとして報告する予定である。これらの成果をもとに、さらに効果的な生体分子教育プログラムの構築を目指す。(COI: No)

20. 母乳授乳に伴う母親の心拍・脳波・感情変化の検討

○大村菜美^{1,2}、小野健太郎¹、笹岡貴史¹、黒田公美³、山脇成人¹ (¹広島大学脳・こころ・感性科学研究センター、²日本学術振興会特別研究員 RPD、³東京科学大学生命理工学院)

授乳は哺乳類において最も基本的な育児行動である。子の栄養や免疫学的な面だけでなく、母子間の愛着形成にも重要である。授乳は、母親において心理的ストレスや不安を軽減し、乳児に対するポジティブな感情認知を高めることがわかっている。授乳には射乳を伴うが、その知覚や感じ方の種類・頻度は人によって様々であり、射乳に伴う気分・感情変化を訴える人もいる。

授乳中には心拍数が減少し、副交感神経優位状態となることが明らかになっているが、授乳中の脳活動についての報告はほとんどなく、授乳や射乳に起因する母親の感情変化のメカニズムもよくわかっていない。現在、授乳中の心拍や脳波といった生理反応と感情変化の関係を明らかにすることを目的として調査・解析を行っている。

乳児とその母親に実験に参加してもらい、母親から心電

図と脳波を記録しながら、一人で安静、子を抱っこ、直接母乳授乳の3つのタスクを行った。併せて、授乳前後に質問紙を利用して母親の感情を評価した。まだサンプル数は少ないが、授乳中は安静時や抱っこ時と比較して、母親の心拍変動や脳波の周波数成分に違いが見られてきている。また、質問紙から、授乳後に母親の状態不安や否定的感情が減少し、安静状態が増加する傾向が見られた。さらに、現在、内受容感覚との関連も視野に入れて調査を進めている。授乳が母親の感情に及ぼす影響を様々な視点から検討し、授乳・射乳によって変化する母親の感情について検討していく予定である。(COI: No)

21. 芍薬甘草湯は筋トレによる筋肥大やマイオカイン分泌に影響するか？

○川村駿翔¹、水見直之²、秋田大輝¹、中村一丸山恵美²、中村文洋² (¹川崎医科大学医学部3学年, ²川崎医科大学生理学2教室)

筋力トレーニング(筋トレ)により損傷した筋は超回復により主に速筋で肥大することが知られている。また筋活動により、筋組織から様々な臓器に対し生理活性を誘発する因子群であるマイオカインが分泌される。一方、芍薬甘草湯(SKT)はふくらはぎの痙攣などの抑制効果があることで知られている漢方薬である。しかしこのSKTによる筋収縮抑制効果が筋トレによる筋肥大やマイオカイン分泌能に影響を及ぼすことも考えられるため、本研究においてこの影響の有無を確認した。

方法として、健康ラットに2週間、経皮電気刺激による筋強縮または下肢筋への負荷が高い下り坂走行を行った後、腓腹筋とヒラメ筋を摘出および抽出し、MHC-1(遅筋マーカー)、MHC-2(速筋マーカー)、CD16(M1型マクロファージマーカー)、CD206(M2型マクロファージマーカー)、IGF-1およびIL-6(代表的なマイオカイン)の濃度をwestern blotまたはELISA法により測定した。結果として、腓腹筋、ヒラメ筋双方で、全ての測定項目においてSKTによる発現の差は見られなかった。これらの結果から、SKTの筋活動抑制効果は遅筋と速筋の組成やマイオカインの分泌能には影響しないと考えられた。

また、CD206はヒラメ筋で発現が高く、CD16は腓腹筋で発現が高かったことから、ヒラメ筋では炎症を抑え組織修復を促すM2型マクロファージが多く存在している可能性が示唆された。(COI: No)

22. 巨大弾性コネクチン分子解析による軟骨魚類と哺乳類の心臓収縮進化

○花鳥 章, 木元弥咲, 大平桃子, 橋本 謙, 毛利 聡

(川崎医科大学生理学1教室)

【背景】脊椎動物の心臓は血液供給方法により、冠循環心臓と類洞循環心臓に大別される。哺乳類や鳥類の心室は高いポンプ機能を発揮する冠循環心臓を持ち、緻密な心筋組織による高い収縮性を発揮する。一方、冠血流を維持するため拡張性は抑制されており、この心室拡張性の抑制は心筋バネ分子コネクチンの弾性領域短縮としても確認できる。このことから化石試料として残らない心室の拡張機能の進化を現生生物のコネクチン分子解析によって評価可能であるとの着想を得た。進化における冠循環の出現は脊椎動物進化におけるエネルギー消費の高い哺乳類や鳥類の登場に多大な影響を及ぼしたと考えられるが、その獲得時期や理由については不明である。本研究では哺乳類と同様に冠循環心臓を持つ軟骨魚類ゾウギンザメのコネクチン遺伝子と心筋・骨格筋に発現するコネクチン分子を解析することで進化的な知見を得ることを試みた。

【結果】心臓切片の組織染色、電子顕微鏡や免疫蛍光顕微鏡観察では、哺乳類心臓と類似した冠血管と緻密心筋の存在、心筋サルコメアとコネクチン局在が観察された。ゾウギンザメゲノムから予測したコネクチン遺伝子は238 kbの大きさで300エキソンを含んでおり、ヒトコネクチン遺伝子(293 kb, 363 exon)と比べて遺伝子サイズが小さくエキソン数も少なかったが、予測されるコネクチンのドメイン構造は基本的に共通していた。PCR解析の結果、N2BA isoformが心臓、N2A isoformが骨格筋で発現しており、組織特異的な発現様式や、骨格筋と比べた心臓コネクチンの短縮は哺乳類と共通だった。分子系統解析では、ゾウギンザメコネクチンには6個の6-Igと1個の10-Ig super-repeatが存在し、ヒト(6-Ig×3, 10-Ig×3)やゼブラフィッシュ(6-Ig×3, 10-Ig×1)と構造的な特徴が異なっていた。

【考察】これらの結果、約4.5億年前の顎口類共通祖先は硬骨魚類型のコネクチン構造を持っており、軟骨魚類と哺乳類がそれぞれ独立にコネクチン弾性領域を伸長させて、軟骨化によるしなり運動や陸上進出に伴う重力適応と横隔膜などの骨格筋の役割を進化させたことが示唆された。しかし伸長した領域は心臓のコネクチン内から軟骨魚類と哺乳類で共通して取り除かれており、これは冠循環の獲得と心筋緻密化による心臓ポンプ機能向上に必要な、コネクチン短縮による心臓拡張制限の収斂進化によるものと考えられる。これらの知見は、運動と循環機構の進化的適応に新たな視点を与えるものである。(COI: No)

23. プラナリアの匂い源定位における確率的探索戦略

○井上 武, 宇島金太郎, 中津快成, 香川泰輝, 鈴木麗菜, 恵祖茂オージェイル金寿朗, 松尾 聡 (鳥取大学・医学

部・適応生理学)

摂食はエネルギーと物質の獲得に直結する、生物にとって根源的な行動であり、体内外感覚入力の統合・意思決定・運動制御が密接に連携するため、進化の過程で神経系の設計原理を規定してきた中心的課題である。一般に、嗅覚に依存する摂食行動では、濃度差を手掛かりに匂い源へ定位すると考えられている。しかし、匂い物質の濃度は距離の逆二乗則に従って減衰し、匂い源から離れるにつれて匂配は急速に弱まる。さらに水中環境では、水流の影響によって匂いが断続的かつ不安定に到達するため、単純な匂配追従だけでは行動原理を十分に説明できない。加えて、個体が受容する匂い入力を直接かつ安定に計測することが難しい点も、行動原理の特定を妨げてきた。

淡水性であるプラナリアは、頭部の化学感覚器で餌から拡散した化学物質を受容し、匂い源に定位して摂食に至る。また、より複雑な脳で見られる原理を簡素化した原型の特徴を備える中枢神経系をもつため、脳の基本設計を解析するうえで適したモデルである。本研究では、運動変化を高い時間分解能で、かつ多個体にわたり偏りなく定量するため、ディープラーニングによる自動追跡と姿勢推定を導入し、全身位置・体軸方位・進行方向ベクトルをフレームごとに抽出した。その結果、低濃度の匂い刺激が想定される条件では平均速度が低下し旋回率が増大する一方、高濃度の条件では速度が上昇し旋回率が低下する傾向が観察された。これらの結果は、匂い源から遠い段階では低速で蛇行し、匂い源に近づくにつれて直進性を高めつつ速度を上げる段階的戦略により最終的に到達することを示している。すなわち、この濃度依存的な速度・旋回率の調節は、低濃度域で蛇行による探索空間を広くカバーし、高濃度断片へ遭遇確率を高め、感知後は直進性の向上が到達時間の短縮と迷走の抑制に寄与するため、確率的な到達効率を高めると考えられる。

さらに、濃度差による行動変化の誘導要因を検討するため、餌に含まれる分子の分子量に着目した。一般に低分子は水中で拡散係数が大きく、遠方へ希薄かつ断続的に到達しやすいと考えられるが、低分子のアミノ酸や単糖類を用いた場合に、平均速度の低下と旋回率の増大が確認され、この遠方・低濃度局面に対応する挙動と一致した。以上の行動指標（速度・旋回率）を用いることで、個体が受け取る匂い刺激の相対的入力強度を間接的に推定できる可能性が示された。(COI: No)

24. Ultradian organization and nocturnal preference shaped by light-dark cycles in planarians

○Ojeiru Felix Ezomo, Rena Suzuki, Satoshi Matsuo, Takeshi Inoue (Department of Adaptation Physiology, Faculty of Medicine, Tottori University Graduate School of Medical Science, Yonago-shi, Tottori-Ken, Japan)

Biological rhythms are fundamental to the physiology of all higher animals, yet the evolutionary mechanisms that couple these rhythms to the brain remain poorly understood. To explore the relationship between brain rhythms and behavior, we studied the planarian *Dugesia japonica*, an animal with a simple brain that evolved early. The absence of a suitable automated tracking system has limited the characterization of planarian baseline behavior hitherto. We developed a novel deep-learning-based automated tracking system for long-term recording and quantification of planarian behavior. Using this system, we first demonstrated that brief external stimuli induce sustained increases in activity lasting over 24 hours, which exhibit ultradian rhythms. These findings indicate that environmental cues have long-lasting effects. After a pre-recording acclimation period, we performed five-day continuous recordings in both light-dark cycles and constant darkness.

Our findings suggest that planarians are more active in darkness than in light, showing a preference for nocturnal behavior. However, prolonged darkness significantly reduced overall activity, suggesting that strong nocturnal behavior relies on external rhythmic cues, particularly the light-dark cycle. These findings highlight the importance of environmental rhythms for maintaining consistent behavioral activity and offer a new approach to understanding how brain rhythms are influenced by the environment. Our approach establishes a versatile platform for long-term behavioral analysis in simple nervous systems and offers a tractable model for exploring the evolutionary origins of brain-environment interactions.

Keywords: Biological rhythms, Planarian behavior, Deep-learning tracking, Environmental cues, Light-dark cycle. (COI: No)