

1. 催眠鎮静薬ブロムワレリル尿素の 6-OHDA 誘発ラットパーキンソン病モデルに対する治療効果とマイクログリア活性化抑制作用

宮本圭介, EM チョードリ, 檜垣ひろみ, 宮西和也, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

我々は催眠鎮静薬であるブロムワレリル尿素 (BU) が, マクロファージの活性化を抑え, 盲腸結紮穿孔 (CLP) により作成したラット敗血症モデルの生存率を改善することを見いだした. BU の作用機序を解明するため, ラット腹腔および肺胞マクロファージを用いた培養実験において起炎症性シグナル伝達経路を検討した.

BU は LPS 刺激したマクロファージからの NO 産生や, IFN γ , IL-6 などの起炎症性サイトカインの発現を抑制した. LPS が誘発する起炎症反応の時間的経過をタンパク質レベルで解析すると, I κ B の分解や MyD88 非依存的経路の TBK1 のリン酸化は刺激後約 1 時間で起こり, BU はその反応を抑制しなかった. しかし, STAT1 のリン酸化の後に iNOS を産生する反応は刺激後 3 時間程を要し, これを BU は抑制した. これらから, BU は JAK1/STAT1 依存的シグナル伝達経路を抑制することで抗炎症効果を発揮し, CLP による敗血症ラットの生存率を改善したと考えられた. 起炎症性反応中心の敗血症初期の治療ターゲットは JAK1/STAT1 経路であり, これまで言われてきた LPS \rightarrow TLR4 \rightarrow NF κ B 経路は炎症反応開始のスイッチの役割だと考えられた.

2. 脳梗塞後リハビリテーションによる機能回復と神経新生の関連について

城本高志, 岡部直彦, 陸 豊, 中村-丸山恵美, 氷見直之, 成田和彦, 宮本 修 (川崎医科大学医学部生理学 2 講座)

目的

脳梗塞後, 側脳室下帯において神経細胞新生が亢進することが知られているが, この細胞新生が障害脳の機能回復にどのように寄与するかについては十分に解明されていない. 脳梗塞後リハビリテーション (以下リハビリと略す) により機能回復が促進される事は知られている. 今回我々は脳梗塞後のリハビリと神経細胞新生との関係を明らかにすることを目的として研究を行った. これらを検討する為に, まずリハビリによる機能回復と, 大脳皮質再構築の関連を検討した (実験 1). また神経新生の抑制効果を調べるために脳梗塞後, それが最大となる時期を特定した (実験 2).

方法

ラット (F344, wt.160-180g, ♂) の大脳皮質運動野の尾側前肢領域に光増感反応血栓法によって脳梗塞を作製した. 梗塞作製後, リハビリ群と非リハビリ群に分け, 4 週間のリハビリを行った. リハビリはリーチテストのトレーニングをすることによって行い, 運動機能はリーチテストのスコアで判定した. 実験 1 では大脳皮質の再構築を皮質内微小電気刺激 (ICMS) 法により電気生理学的に検討した. 実験 2 では bromodeoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し, 脳梗塞後 2, 4, 7, 14, 28 日後に灌流固定した. BrdU/Nestin で 2 重染色されたものを新生神経細胞として, 側脳室下帯の陽性細胞を測定した.

結果

リハビリ群は非リハビリ群に比べて, 有意に機能が回復し, ICMS 法で大脳皮質前肢領域の拡大を認めた. 神経細胞新生については, 脳梗塞後 2 日目より増加し, 7 日目に最大となる事が明らかになった. 以上の結果より, 脳梗塞後 3 日目から 1 週間に渡って細胞新生を抑制する事で, 機能回復と大脳皮質の再構築にどのような影響が及ぶのか検討し, その経過について報告する.

3. ER stress inhibits synaptic plasticity in the olfactory bulb underlying aversive olfactory learning

全 加¹, 村田芳博¹, 奥谷文乃^{1,2}, 椛 秀人¹ (¹高知大学医学部生理学講座, ²高知大学医学部地域看護学講座)

Tunicamycin (TM) induces endoplasmic reticulum (ER) stress in the lumen, which is linked to neuronal death in neurodegenerative diseases. Aversive olfactory learning was prevented by intrabulbar infusion of TM. Using electrophysiology, we revealed TM has an inhibitory effect on the late phase of long-term potentiation induced at dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. These results suggest that ER stress impaired olfactory learning by inhibiting synaptic plasticity in the olfactory bulb.

4. ノルアドレナリンによるマイクログリアの LPS 誘発活性化抑制のメカニズム

石井友里加, 川上愛由, 高本真澄, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

神経変性疾患では, ノルアドレナリン (NA) 作動性神経細胞が集積する青斑核の変性も顕著に見られる. NA は, MG の活性化を抑制するといわれており, 青斑核の変性による NA の減少が変性疾患における神経細胞死促進につながるとされる. NA の MG 活性化抑制作用は, 主にアドレナリン β 2 受容体を介した作用だとされ, 実際, β 2 受容体アゴニストのテルブタリンは顕著なマイクログリア活性化

抑制作用を示す。しかし、大腸菌由来 LPS とアドレナリン受容体アゴニストをラット一次培養マイクログリアに同時添加し、主に一酸化窒素 (NO) 産生に対する影響を調べたところ、 $\alpha 1$ アゴニストのフェニレフリンも同レベルの抑制効果を示した。また、NA は活性化 MG において、I κ B の分解の抑制から NF κ B の核内移行を、STAT1 のリン酸化抑制から IRF1 発現を抑制することが分かった。これは、NA の MG に対する抑制作用が NF κ B 系と JAK/STAT 系の抑制による相乗効果であることを示唆している。しかし、マイクログリアの NF κ B 発現を siRNA によりノックダウンすると、LPS 刺激によって生じる STAT1 のリン酸化や IRF1 発現は消失した。更に、IL-6 刺激によるマイクログリアにおける STAT1 リン酸化を NA は抑制することが出来なかった。以上より、NA によるマイクログリア活性化抑制は $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 受容体を介して NF κ B の核内移行を抑制することによりもたらされると考えられる。

5. アデノシン類似化合物 COA-CI による VEGF 分泌促進機序の検討

岡本隆司¹、五十嵐淳介²、山下哲生²、橋本 剛²、平野勝也²、高田麻紀³、小西良士³、塚本郁子³、小路和代⁴、窪田泰夫⁴ (¹香川大学医学部医学科三年生、²香川大学医学部自律機能生理学、³香川大学医学部薬物生体情報学、⁴香川大学医学部皮膚科学)

【目的】アデノシン類似新規合成低分子 COA-CI (2Cl-C. OXT-A) は強力な血管新生促進作用を有する。一方、ポリペプチド型の成長因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) は新生血管の出芽過程において重要な役割を果たす。本研究では、ヒト由来培養線維芽細胞を用いて VEGF の分泌に及ぼす COA-CI の影響とその機序を明らかにする。【方法と結果】ヒト培養線維芽細胞に COA-CI を添加すると培養液上清中の VEGF 濃度が有意に増加した (COA-CI 100 μ M, 48 時間, 1.3 倍, $p < 0.05$, ELISA 法)。COA-CI は、VEGF の転写制御因子の一つである PGC-1 α の mRNA 並びに、そのスプライスバリエーションの一つである NT-PGC-1 α のタンパク質の発現を増加させた (RT-PCR 法及びウエスタンブロット法)。一方、siRNA によって PGC-1 α をノックダウンすると、COA-CI による VEGF 分泌促進作用は減弱した。【結論】ヒト培養線維芽細胞において、COA-CI は PGC-1 α の NT-PGC-1 α 型アイソフォームの発現上昇を介して VEGF の分泌を促進することが示唆された。

6. 脳腫瘍幹細胞による血管内皮細胞への分化と抗血管新生薬の評価

中山大輝、道上宏之、林 桂一郎、松下博昭、西木慎

一、松井秀樹 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学講座)

中枢神経系を構成する神経細胞、星状膠細胞、乏突起膠細胞は神経幹細胞 (NSC; Neural Stem Cell) により分化、発生するとされている。さらに近年では悪性脳腫瘍においても神経幹細胞に似た特徴を持つ脳腫瘍幹細胞 (Glioma Stem Cell; GSC) についての報告が数多くされている。GSC は神経系の細胞に分化することができ、少数の細胞でも腫瘍 (グリオーマ) を形成することができる。また、腫瘍部においてグリオーマ細胞は急速に増殖するため多くの酸素・栄養などを必要とし、その結果、腫瘍血管新生が盛んに行われる。血管新生は通常、腫瘍細胞が血管内皮増殖因子 (VEGF) などを放出し、正常血管から腫瘍血管をリクルートすることで行われる。さらに、近年の研究では腫瘍環境を維持するために、外胚葉系の GSC が中胚葉系の血管周皮細胞、血管内皮細胞へと分化し、血管新生を担うことも報告されている。

我々は悪性脳腫瘍の血管新生についてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、マウス脳腫瘍幹細胞 (mGSC)、ヒト脳腫瘍幹細胞由来の内皮細胞の特徴についての検討を行った。さらに、その特徴の違いを元に抗血管新生阻害薬について新たな治療標的を提案する。

7. 希少糖 D-allose による glucose transporter 1 (GLUT 1) 発現制御と癌細胞増殖への関与

野口知里¹、山口文徳¹、片木絢子¹、神鳥和代¹、隋麗¹、塚本郁子²、ホセインアクラム³、徳田雅明^{1,4} (¹香川大学医学部細胞情報生理学講座、²同 薬物生体情報学講座、³松谷化学工業、⁴香川大学希少糖研究センター)

これまでの研究で、希少糖 D-allose が癌細胞増殖抑制効果を有することが明らかになり、すでに動物実験においても効果が得られている。そのメカニズムとしては、D-allose が癌抑制遺伝子の一つである Thioredoxin interacting protein (TXNIP) の発現を著しく増強し、細胞周期のブレーキ役となる p27^{kip1} を核内で安定化させ、G1/S チェックポイントで停止させることを明らかにした。さらに、このメカニズムには p44/p42 MAPK-p90RSK のシグナル伝達経路が関連しているということも示した。

今回、D-allose により発現増強する TXNIP が、糖代謝に係わる GLUT1 の発現を低下させる可能性について解析を行った。ヒト肝臓癌細胞 HuH-7 細胞をはじめとする種々の癌細胞は GLUT1 を高発現しているが、D-allose を培地中へ添加することにより発現が明らかに減少した。その結果として細胞への D-glucose の取り込みも抑制された。D-

allose によって発現誘導された TXNIP を介した GLUT1 のダウンレギュレーションにより、癌細胞への D-glucose の取り込み減少の結果、エネルギー供給が抑えられる機構が、先述の p27^{kip1} 安定化の細胞増殖抑制メカニズムと一緒に働いて、癌細胞増殖を抑制するのではないかと考えられる。

8. 癌細胞の遊走における、Fyn 下流の新規シグナル分子パキシリンの重要性

藤井敬也¹、張 影²、岸 博子²、宮成健司²、木村友彦²、高柿了大²、小林 誠² (山口大学医学部医学科 4 年生、²山口大学大学院医学系研究科生体機能分子制御学)

Rho キナーゼを介するストレスファイバー形成は、細胞形態や細胞遊走の制御において、主要な役割を果たしている。以前、我々は、この ROK 上流の新規シグナル分子として Fyn チロシンキナーゼを発見した。さらに、機能プロテオミクスにより、Fyn が活性化した場合にのみ Fyn と直接結合する、Fyn 下流の新規分子としてパキシリンを見出した。

本研究では、乳腺癌細胞を用いて、細胞遊走におけるパキシリン自身およびパキシリン/Fyn 相互作用の重要性について検討した。まず、表面プラズモン共鳴法を用いて、パキシリンと Fyn のリコンビナント蛋白の分子間相互作用を解析したところ、活性型 Fyn はパキシリンの N 末端にのみ結合し、非活性型 Fyn は結合能がなかった。RNA 干渉によるパキシリンのノックダウンは、細胞遊走を著明に阻害した。この阻害は、ノックダウンの後、全長パキシリンを再発現するとレスキューされた。また、パキシリンの N 末端の Fyn 結合部位の過剰発現により、細胞遊走が著明に抑制された。

以上の結果より、パキシリンは、Fyn 下流の新規シグナル分子として、その N 末端において活性化された Fyn と結合することによって、癌細胞遊走を制御することが示唆された。

9. Neuroprotective effect of yokukansan in the acute phase of experimental ischemic stroke

Y. Liu, T. Nakamura, T. Toyoshima, T. Yamamoto, T. Itano (Department of Molecular Neurobiology, Kagawa University Faculty of Medicine)

Our previous study demonstrated the traditional herbal medicine yokukansan (YKS) has preventive effect on ischemic dementia induced by cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. The present study investigates the neuroprotective effect of YKS in the acute phase of experi-

mental ischemic stroke with therapeutic time window and underlying mechanism.

Transient forebrain ischemia was induced by occluding the bilateral common carotid artery for 5min. YKS was administered to the animals 30min before and 3h after ischemia and then daily (300mg/kg). We examined neuronal death, inflammatory reaction, oxidative stress in the hippocampus 72h after ischemia/reperfusion injury, and investigated functional deficits.

YKS treatment significantly reduced hippocampal neuronal loss, decreased the number of Iba1 (microglia marker) also 8-OHdG (a marker of oxidative stress) positive cells and 72h after brain ischemia, inhibited ischemia-induced the level of TNF- α and HEL. YKS treatment also reduced the locomotor activity deficit 72h after ischemia and improved memory impairment.

In conclusion, these findings suggest that YKS treatment has antioxidant properties resulting in the suppression of oxidative DNA damage and lipid peroxidation, as well as anti-inflammatory effects of YKS resulting in reduction of microglial activation and leukocyte infiltration leading to reduced neuronal death and enhancing functional recovery in ischemia/reperfusion injury. Our results are considered important for extension of the therapeutic time window of YKS treatment in acute cerebral ischemia, which might be a potential candidate for the treatment of human stroke.

10. ドネベジルは、RAW264.7 マクロファージにおいて、LPS 刺激で誘発される NF- κ B の核移行を抑制することにより抗炎症作用を示す

有川幹彦¹、柿沼由彦²、野口達哉¹、佐藤隆幸¹ (高知大学医学部循環制御学教室、²日本医科大学大学院医学研究科生体統御学教室)

【目的】コリンエステラーゼ阻害剤であるドネベジルは生体内アセチルコリン (ACh) 濃度を増加させ、副交感神経活動の活性化を引き起こす。我々はこれまでに、心筋梗塞による急性心不全モデルマウスにおいて、ドネベジルが炎症性組織傷害を抑制することにより心破裂による死亡リスクを低減することを明らかにした。本研究では、ドネベジルの抗炎症作用の分子機序解明を目的として、内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激によるマクロファージの炎症反応に対するドネベジルの効果を検討した。

【方法】RAW264.7 マウスマクロファージ細胞において、LPS 刺激により炎症反応を惹起し、細胞内外における炎症

性サイトカインの合成・放出量や核内因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) の局在性の変化に対するドネベジルの効果を検討した。また、LPS 誘発性の炎症反応に対するドネベジルの効果におけるコリン作動性抗炎症経路の関与についても検討を行った。

【結果】ドネベジルは、LPS 刺激により誘発される TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-18 などの様々な炎症促進性サイトカインの遺伝子およびタンパク質の発現量増加を有意に抑制した。さらに、LPS 刺激による NF- κB の核内への移行を減弱させた。これらの結果は、ドネベジルが NF- κB を下方制御することにより、LPS 誘発性の炎症反応を抑制したことを示している。ドネベジルに認められた抗炎症作用は ACh には認められず、また、ACh 受容体拮抗薬により抑制されなかった。さらには、他種のコリンエステラーゼ阻害剤では再現できなかった。これらのことから、ドネベジルの抗炎症作用はコリン作動性抗炎症経路を介さないこと、さらにはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用とは独立した本剤特異的なものであることが示唆された。

【結論】ドネベジルは LPS 誘発性の NF- κB 活性化を減弱させることにより、炎症促進性サイトカインの合成・放出を抑制する。これにより、ドネベジルは、急性虚血性心不全病態のうち炎症性組織障害による心筋リモデリング過程において、抗炎症作用を示し心筋保護に寄与すると考えられる。

11. 脳梗塞後の運動野再構成に対するリハビリテーションの時間空間的影響の検討

岡部直彦¹、城本高志¹、陸 豊¹、中村恵美¹、氷見直之¹、岩知道伸久²、成田和彦¹、宮本 修¹ (川崎医科大学生理学²、²同 組織・電子顕微鏡センター)

運動野障害時のリハビリテーションが機能回復を促進することはよく知られた事実であり、その作用機序として運動野再構成が知られているが、そのメカニズムはよくわかっていない。今回我々はリハビリテーションによる機能回復と運動野再構成を経時的に観察し、リハビリテーションがどのようにして運動野再構成に影響を与えるのかを考察した。

実験では、Caudal Forelimb Area (CFA) に梗塞を作成し、皮質内微量電気刺激 (ICMS) 法を用いて運動野地図の評価を経時的に行った。

運動野地図の評価において、梗塞直後には CFA 領域は梗塞によりほぼ完全に消滅しており、Rostral Forelimb Area (RFA)、髭、顎の領域も縮小する傾向が見られた。また、髭および顎の領域が梗塞後 1 週間で急速に回復するのに対し、RFA 領域は回復期間中を通してほぼ一定の割合で

の回復を示しており、脳梗塞後の運動野の変化は支配領域によって異なるパターンを示した。また、リハビリテーションは RFA 領域の回復を特異的に促進し、他の部位の変化には変化を及ぼさなかった。さらに、別の実験で GABA_A 受容体の特異的作動薬であるムシモルを CFA 領域に注入したところ、RFA 領域が縮小し、髭および顎領域の拡大がみられた。

これらの結果は、RFA 領域の大きさが CFA 領域の神経活動に依存しており、リハビリテーションは RFA 領域への神経入力を変化させていることを示唆していると考えられた。

12. ラット培養神経幹細胞の分化に対する多価不飽和脂肪酸合成酵素の役割

片倉賢紀¹、橋本道男¹、奥井俊之¹、松崎健太郎¹、杉本直俊²、紫藤 治¹ (高根大学医学部環境生理学、²金沢大学医薬保健研究域医学系)

多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸は、脳の発達・成熟に重要である。アルツハイマー病やうつ病の患者ではこれらの脂肪酸量、合成酵素が低下すること、また、これらの疾患では、神経幹細胞の増殖・分化に異常をきたしていることも報告されている。本研究では、多価不飽和脂肪酸合成酵素発現量が神経幹細胞の分化に与える影響を検討した。

神経幹細胞を線維芽細胞成長因子を含まない培地にウシ胎児血清 (FCS)、B27 サプリメント (B27) または DHA を添加した培地で培養し、様々な神経細胞に分化誘導した。FCS 処置によりアストロサイトマーカー GFAP 陽性細胞数は増加した。B27 または DHA 処置によりニューロンマーカー Tuj-1 陽性細胞数は増加した。各処置後、分化した細胞中の不飽和脂肪酸合成酵素 mRNA 発現量を定量した。DHA 以外の処置は、 $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases, fatty acid elongase-5 および sterol regulatory element-binding protein 1c mRNA 発現量を亢進させた。一方、stearoyl-CoA desaturase mRNA 発現量はいずれの処置でも亢進した。いずれの処置でも細胞内の不飽和脂肪酸量は増加した。以上から、不飽和脂肪酸の合成亢進が神経幹細胞の分化促進に関与することが示唆された。

13. Geniculocortical projections in the visual cortex with the duplicated retinotopic map induced by monocular enucleation

K. Kameyama, Y. Tsuchie, H. Miyata, Y. Hata (Division of Integrative Bioscience, Tottori University Graduate School of Medical Sciences)

Visual input is received by retinal ganglion cells and their axons project mainly to the lateral geniculate nucleus (LGN) of the thalamus. Then neurons in the LGN send their axons to the primary visual cortex (V1). Precise projections of the retinogeniculate and geniculocortical pathways render the topographic arrangement called retinotopy in the visual cortex. During the developing stage, both molecular guidance and neural activity are thought to play an important role in the formation of the retinotopic map, although the precise mechanism is still unknown.

A previous electrophysiological study using hamsters reported that monocular enucleation in early postnatal days induces a disarrangement of the retinotopic map in V1, resulting in the duplication of the central visual field. We used an optical imaging technique to investigate the change of the retinotopic map more precisely in the monocularly enucleated (ME) animals. We observed the duplication of the retinotopic map clearly across V1 which is ipsilateral to the intact eye. The responding cortical area in the ME animals was larger compared with the ipsilateral eye region of normal animals. This functional change may reflect a reorganization of the neural connections. Here, we focused on the geniculocortical pathway which is the primary afferent input to V1. To examine possible changes in the geniculocortical projections, we injected neural tracers into the LGN. We visualized the geniculocortical afferents in V1 and compared their location in V1 with the retinotopic map. The results suggest that the functional change of retinotopy is presumably accompanied with an anatomical alteration of the visual pathways.

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25830013.

14. ATP 感受性カリウムチャンネル阻害による精巣虚血再灌流障害の軽減効果

清水翔吾¹, 清水孝洋², 谷内恵介², 齊藤源顕² (¹高知大学医学部附属先端医療学推進センター, ²高知大学医学部薬理学講座)

【目的】ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルの機能は心臓を中心に研究されてきたが, 開口による虚血保護は全身臓器で起こるのか不明である. そこで精巣虚血前後における K_{ATP} チャンネルの役割を検討した.

【方法】8 週齢雄性 SD ラットの右精巣動静脈及び精管を遮断し, 2 時間の虚血後, 24 時間の再灌流状態を作り, 虚

血再灌流 (IR) モデルとした. 薬物投与群としてミトコンドリア選択的 K_{ATP} チャンネル開口薬ジアゾピサイド (10mg/kg), 非選択的 K_{ATP} チャンネル開口薬クロマカリム (300 μ g/kg), ミトコンドリア選択的 K_{ATP} チャンネル阻害薬 5-HD (40 mg/kg) 及び非選択的 K_{ATP} チャンネル阻害薬グリベンクラミド (5mg/kg) を虚血 15 分前, 75 分後にそれぞれ腹腔内投与した. 対照として IR 群と正常群を用いた. そして, 酸化傷害マーカー MDA 濃度及び好中球浸潤マーカー MPO 活性の測定, HE 染色及びアポトーシスを検出する TUNEL 染色を行った.

【結果】 K_{ATP} チャンネル開口薬の虚血前投与は IR 群で上昇した MDA 濃度, MPO 活性, 組織傷害スコア及び TUNEL 陽性細胞数を有意に軽減した. 一方, 虚血中投与においては, グリベンクラミドのみが各傷害マーカーを有意に軽減した.

【結語】精巣虚血中ではグリベンクラミドによる細胞膜上の K_{ATP} チャンネル阻害が精巣 IR 障害を軽減する可能性が示唆された.

15. フェロモンの記憶を支える副嗅球シナプス可塑性のメカニズム

村田芳博, 梶 秀人 (高知大学医学部生理学講座 (統合生理))

雌マウスにおいて, 交配雄フェロモンの記憶は妊娠の成立を保障する. この記憶の座は鋤鼻系の最初の中継核である副嗅球にあり, 記憶の成立には新規蛋白質合成を必要とする. また, 副嗅球の中継ニューロン (僧帽細胞) から介在ニューロン (顆粒細胞) への興奮性シナプス伝達では記憶の基礎過程とされる長期増強 (LTP) が入力特異的に誘導される. 以前の本大会で, 我々は副嗅球シナプスの LTP 維持に新規蛋白質合成が必要で, その蛋白質の 1 つが海馬の LTP 維持への関与が報告されているプロテインキナーゼ M_c である可能性を報告した. 今回は, 副嗅球の LTP に対するアクチン重合化の関与を検討した. 実験は以前と同様に, 副嗅球の急性スライス標本を作製し, 顆粒細胞由来の集合電位 (fEPSP) を記録する方法を用いて行った. 外側嗅索にテタヌス刺激を与えると, fEPSP のスロープ値は増大し, 180min に渡って維持された. この条件下で阻害薬・サイトカラシン D を灌流投与したところ, テタヌス刺激後 0min, 30min では変化が見られなかったが, 150min で fEPSP のスロープ値はテタヌス刺激前のレベルに戻った. 一方, 促進剤・ジャスプラキノリドの灌流投与下では, 短期増強のみ誘導されるテタヌス刺激で LTP が維持された. 以上より, 副嗅球シナプスにおける LTP 維持には新規蛋白質合成とアクチン重合化がともに関与すると考えられる.

16. 生後発達期の小脳におけるミクログリアの形態および分布の変化

森本千恵, 中山寿子, 橋本浩一 (広島大学大学院医歯薬保健学研究科神経生理学)

誕生直後の小脳プルキンエ細胞には複数の登上線維が入力しているが、発達の過程で不必要なシナプスが刈り込まれ、マウスでは生後3週目までに1本の登上線維だけが入力するようになる。過剰な登上線維は形態学的に消失するが、その機序の詳細は明らかになっていない。一つの可能性として、ミクログリアなど脳内の構造体を貪食して排除する機能を持つ細胞の関与が考えられる。本研究では、登上線維シナプス刈り込みへのミクログリアの関与の可能性を検討するため、生後発達期の小脳におけるミクログリアの分布と形態の変化について解析を行った。生後5日(P5)からP60のマウスを灌流固定し、ミクログリアの特異的マーカー(Iba1)による免疫組織染色でミクログリアを可視化した。P5-P10では、ミクログリアの密度は白質で顕著に高く、大きな細胞体と少数の突起を持っていた。皮質の発達に伴い、ミクログリアの白質への偏在は目立たなくなり、P60以降では小脳全体で均等に分布するようになった。分布変化に加えて、ミクログリアの細胞体は小さくなり、長くて分枝の多い突起を持つように変化した。また層内分布の解析より、登上線維の刈り込みが始まるP8-P10において、一過性にプルキンエ細胞層での密度が高いことが分かった。本結果により、登上線維の刈り込みが起こる時期と平行してミクログリアの形態・分布が小脳内で大きく変化することが明らかになった。

17. 出血性脳障害に対する新規核酸アナログ(2Cl-C.OXT-A; COA-Cl)の脳細胞保護効果

F. Lu¹, N. Okabe¹, N. Himi¹, E. Nakamura-Maruyama¹, T. Shiromoto¹, K. Narita¹, I. Tsukamoto², T. Maruyama², N. Sakakibara³, O. Miyamoto¹ (¹Physiology 2, Kawasaki Medical School, ²Department of Pharmacology-Bio-Informatics, Faculty of Medicine, Kagawa University, ³Kagawa School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University)

2Cl-C.OXT-A (COA-Cl) is a novel synthesized adenosine analogue with the molecular weight of 284. It is soluble, stable and easy to synthesize. It has been reported that COA-Cl exerts a strong angiogenetic activity in human umbilical endothelial cells (HUVEC). Our previous study showed the neuroprotective effects of COA-Cl on ischemia stroke that it reduced infarct volume, inhibited apoptotic

cell death and attenuated the neurological deficits. The purpose of our present study is to evaluate the neuroprotective effects of COA-Cl on intracerebral hemorrhage (ICH), another common type of stroke, and investigate the potential mechanism of action. Sprague-Dawley (SD) rats were used for this study. ICH models were performed by the injection of 100µl autologous blood from femoral artery into the right basal ganglia. COA-Cl (30µg/kg) was injected intracerebroventricularly 10min after ICH. A battery of behavioral tests, including body swing test, forelimb placing test and corner turn test, were performed to examine sensorimotor deficits with a time course as 1d, 3d and 7d after ICH. To understand the potential mechanism of how COA-Cl work at the acute phase of ICH, we examined brain edema 1day after ICH using water content test, and evaluated the anti-apoptosis role of COA-Cl. Oxidative stress, a primary cause for the edema formation, was also examined by a DNA oxidative marker (8-OHdG). Our results showed that the rats in COA-Cl group significantly attenuates the sensorimotor deficits and reduces brain edema compared with ICH ones. By immunohistochemistry method, we found that both TUNEL positive cells and 8-OHdG positive cells were fewer around the hematoma of COA-Cl treated rats compared with ICH ones. These results indicated that COA-Cl may have neuroprotective effects on ICH that it reduces brain edema, inhibits neuronal loss and improves ICH-induced motor deficits. Furthermore, we provide the first evidence that COA-Cl may have an anti-oxidative role, which may be one of the potential mechanisms for its neuroprotective effects on the acute phase of ICH.

18. ホワイトノイズ音曝露時のラット心拍数調節における中脳中心灰白質の役割

木場智史, 井上 峻, 渡邊達生 (鳥取大学医学部統合生理学分野)

恐怖心は交感・副交感神経系の両方を刺激する。恐怖時の自律生理反応を生成する脳内機構は未解明である。本研究の目的は恐怖時の副交感神経活性に関与する脳部位を特定することであった。覚醒・自由行動ラットにホワイトノイズ音(90 dB)を曝露すると、恐怖の行動指標であるすみ行動が誘発され、また、腎交感神経活動の増加と徐脈応答が観察された。この徐脈応答はアトロピン(100µg)を静注することで消滅し、また、中脳中心灰白質の外側野・腹外側野(l/vIPAG, bregma -7.8~-7.2mm)の両側に

GABA_A 受容体アゴニストであるムシモールを局所注入 (300 pmol/100 nl) することで抑制された ($P < 0.05$)。ラット 1/vIPAG 領域における c-Fos タンパク質の発現 (活性神経細胞のマーカー) はホワイトノイズ音曝露によって 3~4 倍に増加した ($P < 0.05$)。さらに、逆行性神経トレーサーである True Blue (TB) を延髄疑核に局所注入すると、同側の 1/vIPAG 領域内で TB 陽性神経が多く見られた。これらの結果から、恐怖心は 1/vIPAG の活性化を介して延髄疑核・副交感神経系を刺激し、徐脈応答を引き起こすと考えられた。

19. ラット体性感覚野における前肢刺激の後肢刺激誘発興奮波に対する抑制効果

濱 德行, 河合美菜子, 伊藤眞一, 廣田秋彦 (島根大学医学部神経・筋肉生理学講座)

我々は、独自に開発した光学的膜電位測定システムを用いて、ラット体性感覚野の数百カ所の領域から同時に神経活動を記録し、時空間パターンを解析する研究を行っており、皮膚刺激によって体性感覚地図の対応する部位に生じた興奮性の応答シグナルが体性感覚野の興奮波として広範囲に伝播することを報告してきている。今回は、後肢刺激に先行して時間間隔 (ISI) を変えて前肢を刺激し、後肢刺激誘発性の興奮波の発生やその伝播に対する前肢刺激の影響を解析した。前肢誘発興奮波は発生してから約 50msec 後に後肢応答起始部に到達することがわかっている。ISI が 50msec 未満の時は、前肢誘発興奮波に続いて後肢誘発興奮波が発生し、両者は衝突後消失した。ISI が 50msec の時は前肢誘発興奮波が後肢応答起始部に到達したのとはほぼ同時に後肢誘発興奮波が発生すると予想されたが、前肢誘発興奮波には一切変化が観測されず後肢誘発興奮波の発生が抑制された。ISI が 50msec より大きく、前肢誘発興奮波が後肢応答起始部を通過後に後肢の応答が発生するタイミングの時は、後肢誘発興奮波の発生はみられたが、その伝播範囲は起始部周辺に留まり、広範囲に伝播することはなかった。以上のことより、感覚刺激に伴い発生する興奮波は、別の興奮波の発生やその伝播を相互に抑制していることが示され、広範に興奮波が広がる現象の役割の一つが明らかになった。

20. 概日リズムへのマイクログリアの関与の可能性

宮西和也, 宮本圭介, ME チョードリ, 矢野 元, 田中順也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

シナプス伝達は神経細胞のみで完結するものではなく、シナプス周辺のグリア細胞もその調節に関わっているとされる。マイクログリアは、貪食能・遊走能を持つ脳に常在

するマクロファージの一種であり、シナプス間隙に突起を伸ばして入り込み、前後シナプスを分断したり一部を貪食したりする (synaptic stripping と呼ばれる) ことでシナプス伝達の調節に関与するとされてきた。我々は、synaptic stripping と同様の機序で、マイクログリアがラット大脳皮質におけるシナプス伝達に関与し、概日リズム (睡眠-覚醒リズム) を調節している可能性を追究している。ラットは夜行性の動物であり、飼育室が明るくなる (点灯午前 7 時) と眠り、暗くなる (消灯午後 7 時) と目覚める。まず、この 2 つのタイミングで成熟ラット雄大脳皮質を採取し、total RNA から cDNA を調製し、定量的リアルタイム PCR により、マイクログリアの機能調節因子やグルタミン酸受容体 mRNA の発現変化を調べた。その結果、入眠時に相当する午前 7 時のサンプルでは interferon regulatory factor 8 (IRF8) の発現が、午後 7 時のものに比べ亢進し、代謝型グルタミン酸受容体一部のサブタイプの発現が減少していた。IRF8 はマイクログリアの活性化に関わる転写因子であることから、マイクログリアが入眠時に活性化することでグルタミン酸作動性興奮性入力を synaptic stripping のような機序で抑制している可能性を示唆するものと考えている。

21. バソプレッシンによる海馬神経細胞生存維持の分子機構の解明

森野未来, 松下博昭, 山本紘一郎, 道上宏之, 西木禎一, 松井秀樹 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学)

バソプレッシンは、抗利尿ホルモンとしての作用が古くから知られているが、近年脳内での作用が注目されている。バソプレッシン受容体は、大脳皮質および海馬等脳内に広く発現しており、情動行動、社会行動、記憶・学習等を調節している。バソプレッシンと精神機能との関連が明らかになっているが、その神経細胞内での詳細な分子機構は不明である。またバソプレッシンは海馬神経細胞での抗アポトーシス作用が知られているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究の目的は、バソプレッシンによる海馬神経細胞生存維持の分子機構を解明することである。雄マウスの海馬スライスを作成し、バソプレッシンを還流後に海馬スライスのタンパク質の発現変化を解析した。その結果、バソプレッシンによって神経細胞の生存やアポトーシス誘導の阻害作用がある AKT と、AKT によって活性化される GSK-3 β のリン酸化が増加した。また、バソプレッシン受容体アンタゴニストを還流後にバソプレッシンを還流すると AKT と GSK-3 β のリン酸化が抑制された。本結果から、バソプレッシンは、AKT の活性化を介して神経細胞の生存

や抗アポトーシス作用等により、神経細胞の生存維持を調節していることが示唆された。

22. 出生時の肺呼吸開始による酸素分圧上昇が心筋細胞の分裂停止に果たす役割の検討

橋本 謙, 氏原嘉洋, 毛利 聡 (川崎医科大学生理学 1)

心筋細胞は胎生期には活発に分裂するが、哺乳類では出生後 1-2 週間で細胞周期から完全に離脱し、分裂能を失う。この現象の制御機構は不明である。一方、両生類や魚類の一部では成体心臓においても分裂・再生能が残されており、進化学的な観点からも心筋細胞の分裂制御機構には謎が多い。哺乳類のような陸生胎生動物では出生時に、1) 肺呼吸開始による酸素分圧の上昇 ($\text{PaO}_2: 20 \rightarrow 100 \text{ mmHg}$)、2) 血行動態の変化(臍帯動静脈、卵円孔・動脈管の閉鎖)、3) 母体血途絶による一時的な飢餓、のような劇的な変化が生ずるが、我々は 1) が心筋細胞分裂停止のトリガーではないかとの仮説を着想した。胎児の低酸素環境を模擬した条件 (3% O_2) にて妊娠 14-18 日のマウスから胎児心筋細胞を分離し、低酸素 (3%) vs 通常酸素 (21%) で培養したところ、後者では増殖が抑制され、増殖マーカー (Ki67) の発現比率も低下していた。このことは、出生時の大気酸素への曝露が心筋細胞の分裂を抑制することを示唆している。次に、このような変化を制御する因子を特定する為、(a) 胎児心筋 vs 新生児心筋、及び、(b) 培養胎児心筋: 3% vs 21% O_2 の 2 種類の条件でマイクロアレイ解析を行い、胎児心筋細胞に大気レベルの酸素を暴露すると出生時と類似した遺伝子変化 (細胞周期関連 pathway の劇的な低下) が起こることを確認した。更に 2 種のアレイで共通の発現プロファイルを示す 56 遺伝子を抽出し、各々のノックダウン実験により最も強い表現型を示す 2 遺伝子を特定した。現在、これら 2 つの遺伝子と酸素センシング及び細胞周期・分裂系との関連を探索中である。将来的には、酸素による細胞分裂制御機構が進化学的に保存された普遍的なシステムであることを提唱したいと考えている。

23. デヒドロエピアンドロステロンが酸化ストレスによる赤血球レオロジー機能障害におよぼす影響

和泉 遼, 村上慶匡, 鈴木洋司, 大久保信孝, 青戸 守, 満田憲昭 (愛媛大学医学部循環生理学)

デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) は神経保護効果や皮膚の老化抑制効果が知られている。しかしながら、その詳細な保護のメカニズムは分かっていない。また、酸化ストレスは老化のみでなく糖尿病や動脈硬化など種々の疾患において促進因子である。そこで、酸化ストレスを加

えた赤血球のレオロジー機能を測定評価することで DHEA の抗酸化能を調べた。

健康成人から採取した赤血球は洗浄後、酸化ストレスを加えるため 0.2mM $\text{FeSO}_4/0.10\text{mM}$ アスコルビン酸存在下で、DHEA 最終濃度が 0-100 μM になるよう加えて、37°C 1 時間処理した。血液粘度は円錐-平板型粘度計にて、赤血球変形能は高ずりレオスコープにて測定した。赤血球膜の酸化傷害の指標として膜タンパク質のチオール基をイールマン氏薬により測定した。

鉄アスコルビン酸法処理で酸化ストレスを加えた赤血球浮遊液の粘度は増加し、赤血球変形能は低下した。鉄アスコルビン酸法処理時に 1 μM DHEA を加えた場合、粘度の増加および赤血球変形能の低下が抑制された。酸化ストレスにより赤血球膜タンパク質のチオール基は減少したが、DHEA 添加時は減少を抑制した。

酸化ストレスを赤血球に加えると膜タンパク質の酸化傷害により赤血球変形能の低下などレオロジー機能の障害が生じるが DHEA は酸化ストレスによる赤血球膜酸化傷害を減らすことでレオロジー機能障害を抑制することが明らかになった。

24. 心筋メカニクスとカルシウム動態の力学的負荷依存性のシミュレーション解析

入部玄太郎, 成瀬憲治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

収縮期末左心室圧容積関係は生理的な範囲では前負荷および後負荷に依存せずにはほぼ直線関係を示すことが知られている。一方で収縮波形及びカルシウムトランジェント波形は負荷依存的に変化する。今回我々はこれらの負荷依存性と非依存性がどのように関連しているのかを心筋細胞数値モデルを用いたコンピューターシミュレーションにて検討した。

シミュレーションに用いる電気生理及びカルシウム動態モデルは Iribe-Kohl-Noble モデルのものを用いた。クロスブリッジ動態モデルはアクチンフィラメントの活性化過程を含む Schneider モデルをベースに収縮速度依存性を新たに組み込み、収縮機構には Negrone-Lascano のサルコメアモデルを用いた。この細胞モデルを 1Hz で刺激、前負荷及び後負荷を広い範囲に変化させたときの時変弾性波形及びカルシウムトランジェント波形を得た。

心筋細胞の収縮期末長さ張力関係は、収縮速度依存性のクロスブリッジ解離もしくは収縮の粘性抵抗のいずれかを設定することにより拡張期末のサルコメア長が 2.1 μm 以下ではほぼ負荷非依存的に直線関係を維持したが、それ以上では後負荷依存的に乖離していった。しかし収縮波形及

びカルシウムトランジェント形状の負荷依存性は、粘性抵抗では再現されず、収縮速度依存性のクロスブリッジ解離、特にアクチンフィラメント不活化の収縮速度依存性のみ影響された。

今回の結果より、心筋メカニクスの負荷依存・非依存性にはアクチンフィラメントの不活化過程が重要であることが示唆された。

25. 大動脈弓血圧受容器反射による心拍数調節ゲインはトレッドミル運動の強度に依存して低下する

井手迫光弘, 松川寛二, 石井 圭, 梁 楠, 遠藤加菜 (広島大学大学院医歯薬保健学研究所生理機能情報科学教室)

動脈血圧受容器は頸動脈洞および大動脈弓という異なる2つの場所に存在し、それらは共に動脈血圧反射弓を構成し動脈血圧の変動を緩衝する。動脈血圧反射は昇圧時に徐脈を誘発し毎分心拍出量を減少させ、動脈血圧を元に戻す働きを持つ。我々は、意識動物の随意運動や除脳動物の自発運動を用いて、動脈血圧反射性の心拍数調節は大動脈弓血圧受容器反射が主な働きを持ち、随意運動や自発運動の開始時には高位中枢からの下降信号(セントラルコマンド)が大動脈弓血圧受容器反射の心拍数調節ゲインを低下させること、すなわち動脈血圧反射の心臓成分を抑制することを報告した (Komine et al. 2003; Matsukawa et al. 2006, 2012, 2013)。今回は、セントラルコマンドが運動開始時のみならず運動継続中にも働き動脈血圧反射の心臓成分を抑制するという仮説を検証した。そのため意識下ネコにトレッドミル運動(歩行速度 20~60m/min, 1 分間)を実施させ、腹部大動脈の閉塞 (occlusion) により一時的に動脈血圧を増加させ動脈血圧反射を反復して誘発した (運動開始前, 運動開始時, 15 秒後, 30 秒後, 45 秒後, そして運動終了後 10 秒, 30 秒)。平均動脈血圧の増加量に対する心拍数応答の大きさを比較した。さらに、大動脈弓血圧受容器反射単独の働きを調べるため、頸動脈洞神経の除神経後に同様のトレッドミル運動を実施させた。運動前には occlusion による昇圧 (平均血圧 14~20mmHg) に対して、血圧反射性徐脈応答 (30~45 beats/min) が生じた。トレッドミル運動中には心拍数、収縮期血圧および平均血圧は増加し、occlusion でより大きな昇圧 (平均血圧 16~40mmHg) を伴った。20~40m/min の運動では、運動開始時に occlusion に対する徐脈応答が減少したが、運動中および運動後は徐脈応答が増加した。50~60m/min の運動では、運動開始時および運動中に徐脈応答が減少した。徐脈応答の減少は、高強度かつ運動後半ほど顕著であった。運動終了後には徐脈応答は増加した。また、頸動脈洞神経の除神経後も、トレッド

ミル運動の強度や時間経過に依存した同様な血圧反射性心拍応答の変化を観察した。以上の結果から、動脈血圧反射による心拍数調節には大動脈弓血圧受容器反射が主な役割を果たし、この調節機構は動的運動時の開始時のみならず、運動強度に依存して運動中にも抑制を受けることが示唆された。

26. 大豆加工品より見出された血管攣縮抑制成分

高柿了大, 岸 博子, 張 影, 木村友彦, 宮成健司, 呂 博超, 小林 誠 (山口大学大学院医学系研究科器官制御医学講座生体機能分子制御学)

狭心症、心筋梗塞、脳梗塞といった疾患は、合計すると死亡者数がかんとほぼ並び、我が国の死因の第2位となっており、突然死の原因の大部分を占めている。これらの疾患の本態は、心臓や脳といった臓器自身の異常ではなく、血管の異常による血行障害、即ち血管病である。動脈硬化と並んで血管病の主因となる血管攣縮は、突発的な血管の異常な収縮であり、血圧の維持に必要な正常の血管収縮とは制御機構が異なる。

血管攣縮は突発的かつ激急な血管の異常収縮を引き起こすため、発症後の医薬品投与による治療は迅速性を要求され、緊急時に対処することが難しい。このため、日用の食品による予防を目指すことにした。

今回、一般的に健康食品と考えられている食品群を、ブタ冠状動脈平滑筋を用いた収縮実験によって調べたところ、大豆加工品であるオカラが強い血管攣縮抑制作用を示した。

オカラ中に含まれる薬効成分を同定するため、固相抽出による前処理と、タンデム型質量分析計による分析を行ったところ、強い血管攣縮抑制作用と弱い正常収縮抑制作用を併せ持った成分を見出したので、本地方会で報告する。

27. 盲腸結紮穿孔によるラット敗血症モデルと腹腔・肺胞マクロファージを用いたブロムワレリル尿素の抗炎症効果および起炎症性シグナル伝達経路の検討

川崎 俊, 河本智里, 檜垣ひろみ, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

我々は催眠鎮静薬であるブロムワレリル尿素 (BU) が、マクロファージの活性化を抑え、盲腸結紮穿孔 (CLP) により作成したラット敗血症モデルの生存率を改善することを見いだした。BU の作用機序を解明するため、ラット腹腔および肺胞マクロファージを用いた培養実験において起炎症性シグナル伝達経路を検討した。

BU は LPS 刺激したマクロファージからの NO 産生や、IFN γ , IL-6 などの起炎症性サイトカインの発現を抑制し

た。LPS が誘発する起炎症反応の時間的経過をタンパク質レベルで解析すると、I κ B の分解や MyD88 非依存的経路の TBK1 のリン酸化は刺激後約 1 時間で起こり、BU はその反応を抑制しなかった。しかし、STAT1 のリン酸化の後に iNOS を産生する反応は刺激後 3 時間程を要し、これを BU は抑制した。これらから、BU は JAK1/STAT1 依存的シグナル伝達経路を抑制することで抗炎症効果を発揮し、CLP による敗血症ラットの生存率を改善したと考えられた。起炎症性反応中心の敗血症初期の治療ターゲットは JAK1/STAT1 経路であり、これまで言われてきた LPS \rightarrow TLR4 \rightarrow NF κ B 経路は炎症反応開始のスイッチの役割だと考えられた。現在のところ、我々はこの 2 つの経路をつなぐ分子は IFN γ ではないかと考えている。

28. マウス桑実胚および胚盤胞のせん断応力に対する細胞変化観察

浅野友香, 松浦宏治, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学)

哺乳類の初期胚は卵管の蠕動運動によって卵管内移動し、その際に流体移動に伴うせん断応力 (Fluid Shear Stress: FSS) が負荷されている。ある閾値以上の FSS (1.2 dyne/cm²) を初期胚に負荷した際にはアポトーシスを起こすことが知られている。初期胚に FSS を負荷した際に胚内で起こるイベントを調べることによって、アポトーシスに至る作用機序の解明につながる。そこで、顕微授精用保持ピペットを用いてマウス桑実胚および胚盤胞をマイクロ管路内に保持した実験系を構築した。このマイクロ管路を共焦点蛍光顕微鏡のステージに設置し、シリジポンプを用いて管路内の初期胚に FSS を数分間負荷した。15 秒ごとに FSS 負荷前後の共焦点像における蛍光を示す部分面積変化を計測した。観察対象とする部分を以下、「細胞質面積」と記載する。

0.13, 0.65dyne/cm² の FSS 負荷を開始してから約 2 分後には、桑実胚の細胞質面積は開始前のそれぞれ 1.4, 1.7 倍に増加した。0.13, 1.3dyne/cm² の FSS を負荷した場合、胚盤胞の細胞質と胞胚腔を含む部分の面積は同様に 1.3, 1.4 倍に増加した。桑実胚では透明体内部の空隙の面積が大きいため、胚盤胞と比較して細胞質面積増加率が大きくなった。この面積増加速度は FSS 値が大きくなるにつれて上昇し、胚盤胞の方が桑実胚と比較して面積増加が早く終了した。本結果から、上記閾値近傍の FSS が負荷された際には細胞質体積の増加が起こり、この変化が胚発育に好ましくない影響を与える一因と考えられる。

29. 腫瘍関連マクロファージの腫瘍促進型 (M2) フェノ

タイプの誘導

馬越陽大, 小林加奈, 後藤克宏, 矢野 元, 田中潤也 (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学)

脳腫瘍、特にグリオブラストーマ組織内には、非常に多くの腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated-macrophage = TAM) が集積する。TAM は抗炎症性/腫瘍増殖促進性の M2 フェノタイプを示し、腫瘍細胞増殖や血管新生を促進するとされるが、M2 フェノタイプの誘導機序はよく分かっていない。今回我々は、ラット脳腫瘍細胞である C6 グリオーマ細胞 (C6) をラット新生仔脳内に移植し、腫瘍内に集積した TAM の性質を観察した。移植 3-4 週後に形成された脳腫瘍を摘出し、内部の TAM を分離した。TAM 単独、C6 単独、C6-TAM 共培養で、定量的リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現の違いを調べた。その結果、C6-TAM 共培養では、細胞増殖因子であるインスリン様成長因子 1 (IGF-1) やプログランニューリンの発現が TAM 単独に比べて高値になる一方、IL-1 β や CCL2, 3, 4 などの起炎症性サイトカイン、ケモカイン発現が抑制されていた。また、C6 細胞のコンディションドメディウムでは TAM に対する抑制効果は見られなかったが、C6 細胞由来細胞外マトリックス (ECM) 上で培養した場合一部のケモカイン発現が抑制された。ECM タンパク質のうち、我々は特にテネシシン C (TNC) に着目した。siRNA を用いて TNC-ノックダウン C6 細胞を作成して TAM と共培養すると、起炎症性サイトカインの発現が増加した。これらの結果から、C6 細胞の産生する TNC が TAM の M2 フェノタイプを誘導し、腫瘍増殖促進に寄与していると考えられる。

30. 口腔扁平上皮がんリンパ節転移における前転移期ニッチ形成機構の解析

矢野 元¹, 上田哲平², 桐野由衣¹, 小林祐介¹, 羽藤直人², 田中潤也¹ (愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学, ²愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

口腔扁平上皮がんは全身性の転移に先立って流入域リンパ節への転移を経ることが多いため、リンパ節転移の有無によりその予後が大きく左右される。われわれはこれまでに、高転移性ヒト口腔扁平上皮がん SASL1m 細胞のヌードマウス舌への移植による流入域リンパ節への転移モデルを構築し、標的リンパ節における前転移期ニッチの形成と考えられる現象を観察してきた。この現象はマウス腹腔への腫瘍細胞培養上清の注入によっても惹起されたことから、腫瘍細胞から分泌される前転移期ニッチ形成促進性の液性因子の存在が想定された。そこで SASL1m 細胞において高発現する分泌性因子の遺伝子群を非転移性腫瘍細胞との比較において検索し、TGF β 1 やリジロキシダーゼ様

因子 2 (LOXL2) ら四つの因子を見出した。加えて、非分泌性の因子としてナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 (NHE1) の発現亢進を今般見出し、リンパ節転移および *in vitro* 浸潤性に対するそのノックダウンによる抑制効果までを観察した。LOX ファミリーが TGF β の細胞外基質への沈着過程に寄与しうること、および NHE1 が TGF β の活性化において機能しうることが報告されており、見出した因子群の前転移期ニッチ形成への貢献の仕組みが、TGF β 動員への寄与である可能性について議論したい。

31. 悪性黒色腫に対する抗腫瘍 p53 Fragment Peptide スクリーニングと経皮的導入による治療効果の検討

澄田憲祐¹, 道上宏之¹, 北松瑞生², 松下博昭¹, 西木禎一¹, 松井秀樹¹ (1岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学講座, 2近畿大学理工学部応用化学科生物物理化学講座)

Protein Transduction Domain (PTD) を用いた細胞内導入手法は、非侵襲的かつ簡便に導入することが可能である。我々の研究室の松下らは、11 個の連続する Arginine からなる Poly-arginine peptide (11R) を用い、様々な生理活性物質を細胞内へと導入する「タンパク質セラピー法」を確立した。現在 当研究室では、この 11R を用いた細胞内導入技術を基盤に、生理活性物質を経皮的に導入する、生体レベルでの応用に取り組んでいる。その応用例として、発毛剤や美白剤が挙げられるが、こうした直接的かつ効率的な「経皮的アプローチ」は皮膚がん（悪性黒色腫）においても有効であると考えられる。

本研究では、まず悪性黒色腫に対する抗腫瘍活性分子の探索を行った。近年、p53 について、転写因子として機能的に重要な DNA 結合部位以外に、元の Full-Length p53 蛋白質同様、もしくはそれ以上の抗腫瘍活性を示すペプチドが報告されている。今回、p53 蛋白質より Fragment Peptide Library を作製し、悪性黒色腫に対する新規抗腫瘍活性ペプチドをスクリーニングした。さらに、悪性黒色腫動物モデルを作製し、スクリーニングにより得られた抗腫瘍活性候補ペプチドを、皮膚深部に広がる悪性黒色腫細胞まで到達させ、その治療効果を検討した。詳細については、本会発表にて報告する。

32. Rare sugar D-psicose prevents progression and development of diabetes in Type 2 Diabetes Mellitus model Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF) rats

A. Hossain^{1,2}, L. Sui¹, F. Yamaguchi¹, K. Kamitori¹, Y. Dong¹, I. Tsukamoto¹, T. Iida², M. Tokuda¹ (1Cell Physi-

ology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan, 2Research Institute, Matsutani Chemical Industry Co. Ltd., Hyogo, Japan)

Background: Prevalence of global obesity has emerged as the single most life-style-related health problem, mostly due to excess calorie leading to one of its complications, insulin resistance followed by concomitant increase of T2DM. To cope with the increased demand of insulin pancreatic β -cells become over active and in turn hypertrophic and injured, leading to β -cell failure followed by glucose intolerance. This circumstance demands age-adjusted balanced food intake in obese-tendency subjects.

Objectives: We introduce a zero-calorie sweet-taste food additive, D-psicose, a rare sugar produced in Kagawa University, which has been evaluated as a unique metabolic regulator against hyperglycemia and hyperlipidemia, and thus represents as a safe and non-toxic compound to maintain blood glucose levels through the preservation of pancreatic β -cells in OLETF rats.

Methods: Treated OLETF rats were fed 5% D-psicose in drinking water for 60 weeks. Control OLETF and non-diabetic control, LETO rats were fed water only. Body weight, food and drink intake were measured weekly, and blood glucose and insulin monthly. Serum was collected for biochemical analysis. Oral glucose tolerance test was performed. Liver, pancreas and other organs were preserved and stained as per need.

Results: D-psicose significantly controlled abdominal fat accumulation and thus prevented excess body weight increase. D-psicose improved insulin resistance through constant maintenance of blood sugar levels. Oral glucose tolerance test showed reduced blood glucose levels suggesting also the improvement of insulin resistance. D-Psicose significantly attenuated progressive β -islet fibrosis and preserved islets, evaluated by hematoxylin-eosin staining, Masson's trichrome staining and immunostainings of insulin and α -smooth muscle actin.

Serum levels of proinflammatory and anti-inflammatory adipocytokines were also controlled well by D-psicose treatment.

Conclusions: Rare sugar D-psicose might be a promising strategy for the prevention of obesity, maintenance of blood sugar, and preservation of pancreas β -cells.