O-1. GIRK チャネルの変異による異常なイオン選択性の発生の新規機構の解明

○陳　以珊[1,2]，久保義弘[1,2]（[1]生理学研究所・神経機能素子，[2]総研大・生理科学）

GIRK チャネルは神経興奮性・心拍・膵島ホルモン分泌の調節において重要な役割を果たす分子である．GIRK チャネルの遺伝子変異による異常なイオン選択性は，過剰な Na^+ と Ca^{2+} の流入による細胞死を引き起こす．このような GIRK チャネルのミスセンス変異によるイオン調節機能の障害は，Keppen-Lubinsky 症候群や原発性アルドステロン症等先天性疾患の原因である．これまでの研究では，GIRK チャネルの変異体のホモロジーモデルを用いてイオン選択性フィルター（SF）の構造変化を予測し，変異により K^+ と SF の結合の安定性が乱れ，異常なイオン選択性に繋がることが推察されているが，この仮説を実証するデータは提示されていない．本研究では，GIRK2 チャネルの SF の G156S 変異体，第二膜貫通領域の L173R 変異体等の異常なイオン選択性を示す変異体の，種々の 1 価陽イオンの K^+ に対する選択性を，アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用い 2 電極固定法により電気生理学的に解析した．その結果，G156S 変異体は，K^+ に比して，Li^+ と Na^+ と Methylammonium に対する選択性が高く，L173R 変異体は Rb^+ と Cs^+ に対する選択性が高いことが明らかとなった．また，SF の構築するイオン透過路のブロッカーである Ba^{2+} の投与により，G156S 変異体のイオン選択性が変わり，L173R 変異体のイオン選択性は変化しないことが観察された．これらの結果から，G156S の変異により，L173R 変異体とは異なる構造変化が起こり，通常の SF の構築するイオン透過路とは異なるイオン選択性を持つ，第二のイオン透過路が新たに形成された可能性が示唆された．本研究により，従来と全く異なる解釈である「新規イオン通過路の形成による異常なイオン選択性の発生」の可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-2. LRRC8E による容積感受性アニオンチャネルの不活性化制御機構の解明

○清水貴浩，水口麻衣，藤井拓人，酒井秀紀（富山大学・薬学部・薬物生理学）

細胞の生死を制御する容積感受性外向き整流性（volume-sensitive outwardly rectifying：VSOR）アニオンチャネルの分子実体として，最近，leucine-rich repeat containing 8（LRRC8）ファミリーが報告されている．LRRC 8 蛋白質は，ヘテロ 6 量体を形成することで VSOR アニオンチャネルとして機能する．また，その構成蛋白質の差異により VSOR アニオンチャネルの性質が変化することが知られている．これまでに，LRRC8E を過剰発現しているヒト胎児腎臓 HEK293T 細胞において，LRRC8E がカチオンサイズ依存的に VSOR アニオンチャネルの不活性化を制御することを報告した．本研究では，LRRC8E によるチャネル制御機構を明らかにするため，LRRC8E をノックダウンした HEK293T 細胞を用いて，VSOR アニオンチャネル電流の電位依存的不活性化のカチオン感受性について検討した．LRRC8E の発現低下は，小さなカチオン存在下で見られる VSOR アニオンチャネル電流の不活性化の促進を抑制した．また細胞内カチオンがこのチャネル制御に必須であったことから，脱分極時に生じる細胞内カチオンの LRRC8E への結合が，VSOR アニオンチャネルの不活性化を促進する可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-3. Tonotopic differentiation of axon initial segment in slice culture of avian cochlear nucleus

○Jahan Israt, Ryota Adachi, Hiroshi Kuba（Cell Physiology, Graduate School of Medicine, Nagoya University）

The axon initial segment (AIS) is accumulated with voltage-gated sodium channels and involved in generation of action potentials. We previously showed in avian cochlear nucleus that length of the AIS differs according to tonotopic region; it is shorter in neurons tuned to high frequency than those to low frequency, which plays critical roles in processing of sound information across frequencies. However, mechanisms underlying this differentiation remain elusive. We explored this issue in slice culture of chicken brainstem. At 14 days in culture, the AIS was shorter in high-frequency neurons (～24 μm) than in low-frequency neurons (～30 μm). This tonotopic difference of AIS length disappeared due to elongation of the AIS in high-frequency neurons (～28 μm), when spontaneous activity was suppressed by inhibiting AMPA receptors and sodium channels with DNQX and TTX. On the other hand, the difference became larger due to shortening of the AIS in high-frequency neurons, when spontaneous activity was augmented by either blocking potassium channels with dendrotoxin-I (～21 μm) or lowering $[K^+]_o$ with a chelator, sodium polystyrene sulfonate (～18 μm). These results indicated that activity-dependent shortening of the AIS is regulated differentially in a cell-specific manner, creating the tonotopic difference of the AIS in the auditory nucleus. (COI: none)

O-4. 胎生脳内側基底核原基の神経前駆細胞における 2 種類の電位依存性陽イオン電流の発見

○秋田天平，福田敦夫（浜松医科大学・医学部医学科・神経生理学）

胎生期大脳の発達過程では，種々の神経前駆細胞の生成・増殖・移動が盛んに行われているが，それらの細胞におけるイオンチャネル機能，特に電位依存性チャネルについては，その発現の有無についてもよく知られていない．内側基底核原基は GABA 作動性神経前駆細胞が生成・増殖する部位であり，その前駆細胞が大脳皮質に向かって移動することにより消失する一過性の組織である．我々はマウス胎生 14 日目の内側基底核原基より前駆細胞を急性単離し，whole-cell patch clamp 法により細胞膜電位依存性の膜電流成分の有無を調べたところ，−30 mV 以上の膜電位での急峻な外向き整流成分と，それ以下の膜電位での小さい内向き電流成分が認められ，これらは細胞外 Na^+・K^+除去により消失した．細胞外 Na^+のみの除去でも内向き成分は消失し，外向き成分も減少したが，−30 mV 以上の膜電位で生じる明瞭な外向き電流が残存した．その残存電流は 4-AP（2 mM）で強く抑制され，TEA（1 mM）又は Dendrotoxin-I（100 nM）でも有意に抑制されたことから，Kv1 チャネルの関与が示唆された．細胞外 Na^+・K^+存在下で Gd^{3+}（10 μM）を投与すると，細胞外 Na^+除去と同様な効果が認められ，また脱分極ステップ直後の内向き tail 電流も消失したことから，電位依存性の非選択的陽イオンチャネルの活性化も示唆された．（利益相反　なし）

O-5. カリウム―クロライド共役担体（KCC2）のリン酸化による機能制御

○渡部美穂[1]，Kristopher T. Kahle[2]，福田敦夫[1]（[1]浜松医大・神経生理，[2]Depts of Neurosurgery, Pediatrics, and Cellular and Mol Physiol；Centers for Mendelian Genomics, Yale Sch Med）

KCC2 は Cl^-を細胞外にくみ出すトランスポーターで，細胞内 Cl^-濃度を低く保ち GABA による抑制性伝達を維持している．これまでに KCC2 はリン酸化による制御を受けており，KCC2 の 906 番目（Thr^{906}）と 1007 番目（Thr^{1007}）のスレオニン残基の脱リン酸化により KCC2 の機能が亢進することを *in vitro* の実験で報告している．本研究ではリン酸化による KCC2 機能制御の *in vivo* での役割について明らかにするために，Thr^{906} と Thr^{1007} をアラニンに置換し，脱リン酸化状態を模倣した $KCC2^{T906A/T1007A}$ マウスを作製し，解析を行った．$KCC2^{T906A/T1007A}$ マウスの行動解析を行ったところ，社会性テストで社会的新奇探索性が低く，高架式十字迷路試験で不安が低いこと，また，驚愕反応テストでは驚愕反応の低下が認められた．脳波を測定した結果，$KCC2^{T906A/T1007A}$ マウスで 45，55，80 Hz のパワースペクトル密度の減少がみられ，γ波帯域の活動の減少が認められた．さらに，$KCC2^{T906A/T1007A}$ マウスはピロカルピン誘発性のてんかん発作を起こしにくいことがわかった．よって，KCC2 の機能が亢進し，GABA による抑制力が強まることにより，不安と恐怖に対する感受性，社会的新奇探索性の低下がみられ，脳波のγ波は認知や知覚，意識と関わりがあることから，認知機能などに変化がみられる可能性が考えられた．（利益相反　なし）

O-6. 発達期皮質錐体細胞における Ca^{2+}動態とタウリンによる $GABA_A$ 受容体活性化

○石橋　賢[1]，阪東勇輝[2]，佐藤康二[2]，福田敦夫[1]（[1]浜松医科大学・医学部・神経生理学，[2]同　医学部・器官組織解剖学）

胎生期から出生直後の大脳皮質形成期では，まだ神経回路が十分に形成されていない．皮質発達に重要な役割を果たす $GABA_A$ 受容体の活性化は，脳間質に存在し GABA 受容体活性化作用を持つタウリンの持続的作用であると考えられる．このタウリンは，胎生期には合成能が低いにもかかわらず胎仔脳内に高濃度で存在し，そのほとんどが胎盤を介して母体より供給される．従って，タウリンは母体依存性の皮質発達調節因子の一つと考えられる．タウリンによる持続性の $GABA_A$ 受容体活性化を介した脱分極が細胞内 Ca^{2+}振動を誘発しうることが示唆されているが，詳しい機序はわかっていない．そこで本研究では，タウリンによる脱分極性の膜電流振動が電位依存性 Ca^{2+}チャネル開口のトリガーになりうるのかにつき検討した．

実験には，ICR マウス（E18〜P0）を用い，ダイナミッククランプ法によるタウリン誘発性コンダクタンス（0.25〜0.75 nS，$GABA_A$ 受容体反転電位 E_{rev_Cl}=−30 mV）による刺激，ならびにタウリン記録槽灌流によるカルシウム応答を記録した．

タウリンは，灌流投与により細胞内カルシウム（$[Ca^{2+}]i$）の上昇を引き起こした．また，タウリン誘発性コンダクタンスは，皮質板細胞においてカルシウム発火誘発に伴う $[Ca^{2+}]i$ の上昇を引き起こした．従って，これらの結果から母体より供給されるタウリンが発生期皮質板細胞の Ca^{2+}動態に直接影響を及ぼし皮質層構造形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-7. Identification of the GABAergic projections from arcuate nucleus involved in modulation of the CRH release

○Ruksana Yesmin, Miho Watanabe, Tianying Wang, Adya Saran Sinha, Tenpei Akita, Masaru Ishibashi, Atsuo Fukuda（Dept Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine）

Corticotropin-releasing hormone (CRH) plays a key role in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis regulation. The activities of CRH neurons are critically regulated by neurotransmitter γ-aminobutyric acid (GABA). CRH is synthesized in the cell bodies of CRH neurons in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and released from their axon terminals in the median eminence (ME). Previously we reported that the excitatory GABAergic inputs putatively from the arcuate nucleus (ARC) maintain a steady-state CRH release from the axon terminals of the CRH neuron in the ME (Kakizawa et al. Sci. Adv. 2016). In the ARC, the agouti-related peptide (AgRP) neuron is GABAergic and related with energy homeostasis as well as feeding behavior. In the current study, we aimed to investigate the AgRP neurons as a candidate of the excitatory GABAergic source to the ME. We confirmed AgRP neurons in the ARC project to the ME using the retrograde tracer fluorogold. In addition, AgRP neurons have direct interaction to the CRH neuronal terminal as revealed by immuno-electron microscopy. Next, we generated AgRP Cre: DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) transgenic mice in order to specifically activate AgRP neurons. An administration of clozapine-N-oxide (CNO) induced robust c-fos expression in AgRP neurons and significant increases in plasma corticosterone level, while CRH neuronal soma in PVN was also c-fos positive. To rule-out indirect activation of CRH neurons in PVN, we physiologically activated AgRP neurons by applying 60% food restriction. Here, c-fos expression in a subset of AgRP neurons was observed with moderate increase in corticosterone level. However, CRH neuronal soma in PVN lacked c-fos expression. By the food restriction, in addition to the the AgRP neurons, the other subgroups of ARC neurons were found to be c-fos positive. The identities of these neuronal populations were further investigated, regarding possibilities of GABA release involved in modulation of the CRH release in ME. (COI: none)

O-8. 嗅細胞における嗅覚マスキングの分子機構

○竹内裕子，倉橋　隆（大阪大学大学院・生命機能研究科・生体ダイナミクス講座・生理学研究室）

人類は，古くから経験的に嗅覚マスキングを生活の中で利用してきた．エジプト時代ミイラ作成の際の香料使用や中世の香水の流行は代表的な例である．生理学的には，その機構は中枢での感覚修飾であると考えられてきたが，我々は，嗅細胞の線毛において空気中の揮発性物質が嗅覚情報変換（=CNG）チャネルを抑制することを見出した．各種匂い物質で調査してみると，ヒト官能検査におけるマスキング能と CNG チャネル抑制効果の間に高い相関があることなどから，匂い物質による CNG チャネル抑制がヒト嗅覚マスキングの少なくとも一部を担っている可能性が高くなり，各種のフィールドで経験上よく知られる香りの利用方法と CNG チャネル抑制に関して検討してみると，匂い減弱と人々が指摘してきた例はことごとく CNG チャネル抑制によって説明でき，チャネル抑制が我々の日常生活では良し悪しの相反する影響を与えていることが分かってきた．メリットしては，香水や芳香剤による嗅覚マスキングを利用した QOL の向上，デメリットとしては嗅覚マスキング関連物質によるワインのコルク汚染や飲食品の風味低下などがあげられる．そこで今回は，嗅覚マスキングの分子メカニズム解明から，日常生活で匂いの抑制に関する身近な事象の検討結果を紹介したい．一見デメリットに思える食品の風味低下を効果的に調理に使用している「臭み消し」についても言及する．（利益相反　なし）

O-9. 猫がターゲット位置変化を予測したか否かが到達運動前の姿勢に反映される

○中島　敏[1]，高橋未来[2]，福山秀青[2]，高草木　薫[2]（[1]富山大学・医学部・統合神経科学，[2]旭川医科大学・神経機能分野）

動物は肢による到達運動に先立ち，標的の位置に合わせて異なった予期的姿勢調節（APA）を行うことが知られている．自身の行動履歴に基づいて標的の出現前にその出現場所を予測できると有用と思われるが，この予測が APA に反映されることを示した動物実験は乏しい．今回我々は 2 頭の猫（A, M）に対して 3 試行毎に標的が左右に交替する到達運動課題を課し，猫が標的位置の変化を予測でき，その予測が圧力中心（CVP；重心の位置の水平成分）に反映されるという作業仮説を検証した．

猫は毎試行開始時に床反力計上で四足にかかる荷重がほぼ均等になった状態で一定時間立位を保持するよう訓練された．次にビープ音が鳴ると猫は前肢を挙上せずに自由に重心位置を変更しつつ標的の提示を待つことができ，標的が提示されると猫は左前肢を素早く挙上して標的に到達し報酬を得た．課題中に床反力計にかかる荷重を記録し，

CVP を算出した．

両方の猫において，標的提示から前肢挙上までの CVP は標的位置に関連して変化した．データを，直前の試行と標的位置が同じ試行（STAY）と，異なる試行（SWITCH）に分けて解析したところ，SWITCH 試行での CVP は STAY 試行での CVP から時間と共に分離していった．猫 A ではこの分離が標的提示前に始まり，猫 M では標的提示後に起きた．この個体差は夫々の猫が標的位置の変化を予測したか否かを反映すると考えられた．（利益相反　なし）

O-10. 半側性/分節性多汗は代償性なのか？：生理的皮膚圧―発汗反射における類似した出力相の機序に基づいた病態解析

○犬飼洋子，岩瀬　敏，菅屋潤壹，小川徳雄，佐藤元彦（愛知医科大学・医学部・生理学）

発汗障害では半側性や分節性多汗を呈することがある．半側性多汗症のほとんどは原因不明である．両多汗症の一部は，発汗性交感神経活動の過多によるが，他の領域に無汗を伴う場合は，代償性である可能性が高い．これは無汗領域に潜在する病変に起因すると考えられるが，正確な機序は不明である．この型の多汗は，同じ皮膚分節の無汗部位の対側と，同側の無汗部位に隣接する吻側および尾側領域に起こる．この現象が生理的皮膚圧―発汗反射における，皮膚圧迫による同側同皮膚分節の発汗抑制をおそらく原因として，対側同分節領域と，同側の隣接した他皮膚分節領域で発汗が亢進する出力相と類似しており，この機序が病的な代償性発汗亢進にも関連すると思われる．そこで，半側性または分節性多汗の病態生理を，皮膚圧―発汗反射の研究結果に基づいて解析した．［研究 1］片側の皮膚圧迫により，マイクロニューログラフィによる発汗神経活動の振幅が，同側では抑制されるが対側では増加した．左右の同期性には変化が無いため，脊髄上を介さない．［研究 2］室温 40℃ で背臥位による両側背部圧迫により，換気カプセル法による発汗量は上半身で抑制され，下半身で増加した．体温に対する中枢性発汗神経活動は座位時よりも亢進していた．［結論］以上は，総発汗量を維持するために無汗部位以外で発汗が神経性に補正増強されることを示す．よって，障害部位以外の分節性/半側性多汗は代償性といえる．（利益相反　なし）

O-11. マウス洞房結節細胞における local Ca^{2+} release とミトコンドリアの関係

○竹田有加里，松岡　達（福井大学学術研究院医学系部門・形態機能医科学講座・統合生理学分野）

洞房結節細胞の自動能は，細胞膜イオンチャネルの協調作用に起因するが，家兎等の洞房結節細胞では筋小胞体リアノジン受容体からの local Ca^{2+} release（LCR）も自動能発生に関与することが提唱されている．一方，我々はマウス洞房結節細胞の自動能発生には，ミトコンドリア Na/Ca 交換（NCXm）が関与することを報告した．ミトコンドリアから放出された Ca^{2+} は，近傍の筋小胞体の Ca^{2+} 動態を調節すると示唆されているものの，LCR とミトコンドリアとの空間的な位置関係は不明である．そこで我々は，単離マウス洞房結節細胞にミトコンドリア膜電位感受性蛍光色素 TMRE および Ca^{2+} 指示薬 Calbryte™ 520 AM の同時負荷を行い，ミトコンドリアの空間分布と LCR の発生部位との位置関係を検討した．その結果，LCR は細胞内でランダムに発生しているのではなく，とくに早期の LCR はミトコンドリア近傍で発生することが明らかとなった．また，膜電位の深いミトコンドリアが集積する部位において，LCR の発生頻度が高かった．これらのことから，LCR とミトコンドリアとの近接した構造的連関が NCXm を介したミトコンドリアによる LCR および自働能の調節を可能としていると考えられた．（利益相反　なし）

O-12. ジャンクトフィリン 2 変異体の強制発現による心機能低下

○中田　勉[1,2]，川岸裕幸[2]，冨田拓郎[2]，山田充彦[2]（[1]信州大学・基盤研・機器分析，[2]同　医学部・分子薬理）

心筋や骨格筋が正常に収縮するためには，細胞膜と筋小胞体膜が近接する結合膜構造において，L 型カルシウムチャネル（LTCC）とリアノジン受容体が機能的に連関することが必要不可欠である．結合膜構造の維持には，ジャンクトフィリン（JP）が重要な役割を果たすことが知られている．これまでの研究により，骨格筋においては JP1 が LTCC に結合し，その細胞内局在を制御していることを明らかにしている．しかし，心筋の JP2 と LTCC の関係には不明な点が多い．

本研究では，JP2 のドミナントネガティブ体である C 末端欠失変異体（JP2Δ427）をアデノ随伴ウイルスベクターによってマウス心筋細胞に発現させ，in vivo での効果を検討した．発現にはトロポニン T プロモータを用いた．ウイルス投与 4 週間後に免疫染色およびウェスタンブロット法を行ったところ，心筋での JP2Δ427 の強い発現が確認できた．また，同時期に心重量を測定したところ，有意な増加が認められた．一方，肺重量，脈拍，血圧については有意な変化は見られなかった．心エコーでの解析を行ったところ，コントロール群の％FS が 43％ であったのに対し，JP2Δ427 群では 31％ に低下していた．また，定量性 PCR 法にて心房性ナトリウム利尿ペプチド mRNA 量の増加が観察

された．これらの結果から，JP2Δ427 の強制発現が心機能の低下を誘導することが示唆された．（利益相反　なし）

O-13. ヒト心室筋細胞における早期後脱分極の発生機序と合理的制御法の非線形力学的解析

○倉田康孝，津元国親，九田裕一，谷田　守（金沢医科大学・医学部・生理学 II）

【目的】心室筋に生じる早期後脱分極（EAD）は，QT 延長症候群における致死性不整脈の誘因と考えられている．EAD の発現は，非線形システムに生じる分岐現象とみなすことができる．本研究では，ヒト心室筋細胞モデルにおける EAD 発現・消失の機序とその制御方法を，分岐解析（Slow-Fast Decomposition 解析）により理論的に検証した．

【方法】ヒト心室筋細胞の数理モデル（Kurata 2005 モデル，ten Tusscher-Panfilov 2006 モデル）を用い，EAD の発現・消失に関与する分岐パラメータ（遅い状態変数）を探索した．速い状態変数からなるサブシステムの平衡点・周期解とその安定性・分岐点を遅い変数の関数としてプロットした「分岐図」を作成し，フルシステムの軌道を重ねることで EAD の発現・消失機序を検証した．

【結果と考察】1）EAD 発現には速いサブシステムの脱分極領域における安定平衡点とその不安定化（Hopf 分岐），分岐を介した安定周期解の出現が関与していた．2）EAD の消失（活動電位再分極）には遅延整流 K^+チャネル電流の遅い成分（IKs）の活性化と L 型 Ca^{2+}チャネル電流（ICaL）の Ca^{2+}依存性不活性化が関与していると考えられた．3）EAD 発現の抑制には速いサブシステムの Hopf 分岐点の制御とフルシステム軌道の制御が有効と考えられ，特に ICaL の抑制による Hopf 分岐点のシフト（安定平衡点領域の縮小）が有効であった．（利益相反　なし）

O-15. CXCR4$^+$CD45$^-$細胞は低酸素条件下で破骨細胞の分化を促進させる

○大塚勇斗[1]，後藤　洋[2]，関谷健夫[2]，青木啓将[1]，永谷祐子[3]，宮澤　健[2]，後藤滋己[2]，青山峰芳[1]（[1]名古屋市立大学・薬学部・病態解析学，[2]愛知学院大学・歯学部・歯科矯正学，[3]名古屋東部医療・整形外科）

骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞の骨リモデリングのバランスが破骨細胞優位に傾くと骨粗しょう症などの骨破壊疾患を引き起こす．破骨細胞の分化では RANKL/RANK シグナルが重要であるが，この他にも破骨細胞の分化を促進する因子が多数存在する．我々は CXCR4$^+$CD45$^-$細胞が SDF-1 などのケモカインを発現し，破骨細胞の分化を促進することを報告した．本研究では，破骨細胞の分化が促進される低酸素条件下で，CXCR4$^+$CD45$^-$細胞が破骨細胞の分化に与える影響を検討した．

マウス骨髄細胞から，全骨髄細胞，CXCR4$^+$CD45$^+$細胞（R1）を除いた細胞集団，CXCR4$^+$CD45$^-$細胞（R2）を除いた細胞集団をフローサイトメーターで回収し，RANKL と M-CSF を加え常酸素（20%）または低酸素（5%）で 2 週間培養した．酸素濃度にかかわらず，R2 を除いた細胞集団では破骨細胞の分化が抑制された．マウス骨髄細胞を常酸素または低酸素で破骨細胞に分化させ，破骨細胞と非破骨細胞に分けて遺伝子発現を解析した．低酸素では非破骨細胞の RANKL と TNFR1，破骨細胞の RANK と TNFR1 の発現が上昇していた．マウス上顎骨の骨切片の免疫組織染色により，マウスの骨切片での R2 の存在が確認された．

低酸素条件でも CXCR4$^+$CD45$^-$細胞は破骨細胞の分化に重要であることが明らかになった．低酸素によって TNFR1 の発現が上昇したことから，低酸素は TNF-α によるシグナルを増強し，破骨細胞が分化しやすい環境を形成している可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-16. ラット食道横紋筋の運動制御における ATP 感受性カリウムチャネルの役割

○椎名貴彦[1,2]，堀井和広[2]，志水泰武[1,2]（[1]岐阜大学・応用生物科学部・共同獣医学科・獣医生理学研究室，[2]岐阜大学大学院・連合獣医学研究科・生理学）

ATP 感受性カリウムチャネル（K_{ATP}チャネル）は，生体内の様々な臓器で発現しており，食道を含めた消化管平滑筋の運動制御に関与することが報告されている．一方，哺乳類の食道筋層は，横紋筋と平滑筋によって構成されており，食道横紋筋に対する K_{ATP}チャネルの役割は未解明である．そこで本研究では，横紋筋のみの筋層を持つラット食道を用いて，食道横紋筋運動に K_{ATP}チャネルが関与するかどうかを明らかにすることを目的とした．

ラット胸部食道を分離し，張力トランスデューサーを用いて，摘出食道標本の収縮反応を記録した．また，RT-PCR 法および免疫染色により，食道組織における K_{ATP}チャネルの発現および局在を調べた．

食道標本周囲の迷走神経を電気刺激したところ，食道横紋筋の収縮反応が誘発された．この収縮反応は，K_{ATP}チャネルの閉口薬をオルガンバスに適用することによって，増強された．これに対して，K_{ATP}チャネルの開口薬の投与は，食道横紋筋の収縮反応を抑制した．RT-PCR 法により，ラット食道組織では，K_{ATP}チャネルを構成するサブユニットの遺伝子が発現していることが示された．さらに，食道筋層の横紋筋細胞において，K_{ATP}チャネルサブユニットの特異抗体に対する免疫染色陽性像が検出された．

以上の結果より，K_{ATP}チャネルは食道横紋筋運動に発現しており，その運動制御に関与している可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-17. 消化管 NaCl 吸収における Na^+/H^+交換輸送体 NHE3 の役割の検討

○石塚典子，伊久美直毅，林　久由（静岡県立大学・食品栄養科学部・生理学）

消化管における Na^+吸収機構としては二つの機構が存在する．1）Na^+/H^+交換輸送体 NHE3 と Cl^-/HCO_3^-交換輸送体が共役する機構，2）Na^+依存性栄養素吸収機構である．NHE3 の生体での役割を検討するために，NHE3 の全身性 KO マウス，腸管特異的 KO マウスが作成されている．全身性 KO マウスでは腎，消化管関連の疾患が観察されるが～30% は離乳する．一方，腸管特異的 KO マウスは離乳前に全て死亡することから，腸管の NHE3 は Na^+吸収機構以外の重要な役割を担っている可能性が指摘されているが，その詳細は明らかにされていない．また，NHE3 特異的抑制剤を用いて NHE3 活性を in vitro で抑制すると，上皮細胞間隙の透過性が変化することが報告されている．NHE3 は小腸，大腸に発現しているが，部位により共役する輸送体は異なる．そこで本研究では NHE3 特異的阻害剤である s 3226 を用いて，腸管各部位の NaCl 吸収における NHE3 の役割を検討した．

マウスより小腸，盲腸，大腸 3 部位を採取し，ユッシングチャンバー法にて，経上皮コンダクタンスと，$^{22}Na^+$および $^{36}Cl^-$の経上皮 flux を測定した．NHE3 を抑制すると，経上皮コンダクタンスは，盲腸では低下傾向を示し，近位および中位大腸では有意に上昇した．小腸，盲腸及び中位大腸では，NHE3 を阻害すると Cl^- flux が抑制され，NHE3 と Cl^-/HCO_3^-交換輸送体がカップルして働いていることが示唆された．また，NHE3 を免疫染色するとタイト結合近傍で強く発現していることが観察され，傍細胞性輸送に関与することが示唆された．以上より，NHE3 は経細胞性の吸収のみではなく傍細胞性輸送にも影響していること，部位によりその NaCl 輸送様式が異なることが示唆された．（利益相反　なし）

O-18. 大腸塩分吸収の調節における細胞間接着分子クローディン-7 の役割

廣田智恵子[1]，髙階優衣[1]，眞鍋　綾[1]，石塚典子[2]，林　久由[2]，田渕圭章[3]，松永俊之[4]，○五十里　彰[1]（[1]岐阜薬科大学・薬学部・生化学，[2]静岡県立大学・食品栄養科学部，[3]富山大学・研究推進機構研究推進総合支援センター，[4]岐阜薬科大学・グリーンファーマシー教育推進センター）

体内の塩分濃度の低下により腎臓の傍糸球体装置からレニンが放出され，アンジオテンシンやアルドステロンの活性化を介して，腸管における塩分吸収と腎尿細管における再吸収が促進する．これまで細胞膜に分布するイオンチャネルやトランスポーターが塩分調節に関与することが報告されてきたが，細胞間を介したイオン輸送機構の関与は不明な点が多い．

タイトジャンクションに分布するクローディン（CLDN）は，細胞間接着を担うだけでなく，細胞間イオン透過性の制御に関与する．我々は低食塩食で飼育したマウスを用いて，結腸における CLDN7 の発現量が増加することを発見した．そこで本研究では，CLDN7 の発現制御機構と機能を検討した．

マウス結腸由来の MCE301 細胞において，アンジオテンシン II（ANGII）の濃度に依存して，CLDN7 の発現量が増加した．この効果は AT1 受容体アンタゴニストであるロサルタンの共処理によって阻害された．上皮膜間電気抵抗値（TER）とルシファーイエロー（LY，水溶性蛍光マーカー）の細胞間輸送に対する ANGII の効果を調べたところ，ANGII 処理で TER が低下したが，LY 輸送量は有意に変化しなかった．希釈電位法において，ANGII 処理により塩素/ナトリウム透過比が増大した．ANGII は核内の NF-κB 量を増加させ，CLDN7 発現の増加が NF-κB の阻害剤である BAY 11-7082 の共処理によって阻害された．

以上より，ANGII は AT1 受容体への結合，NF-κB の核移行を介して大腸における CLDN7 の発現量を増加させることにより，細胞間を介した塩分吸収を制御することが示唆された．（利益相反　なし）

O-19. Effect of claudin 15 knockout in the murine cecum and the large intestine

○Hempstock　Wendy，Nagata　Nozomi，Ishizuka Noriko，Hayashi　Hisayoshi（静岡県立大学・食品栄養科学部・生理学）

In the intestine, epithelial cells play an important role in nutrient uptake as well as a barrier. The kissing point where are located at the most apical part of lateral membranes is termed the tight junction. Tight junctions serve as a barrier to large molecules and as a pore to small ions such as Na^+ and K^+. The main proteins in the tight junctions are members of the claudin family, as well as occludin. Claudin family proteins from strand-like connections between epithelial cells with occludin, forming the tight junction. The permselectivity of the tight junction

depends on the expression patterns of claudin proteins. Claudin 15 is expressed in the villi of the small intestine and it forms a channel for the paracellular transport of cations like Na^+. This role has been shown to be important for sodium-coupled nutrient absorption as claudin 15 allows Na^+ to be recycled back to the lumen. However, claudin 15 has also been found to be expressed in the crypts of the cecum and large intestine. The importance of the presence of claudin 15 in the cecum and large intestine is not known, so the goal of this research was to examine the effect of claudin 15 knockout (KO) on the barrier and transport function in the cecum and the large intestine. Using claudin 15 KO mice, transepithelial electrical conductance and short circuit current were measured. Unidirectional $^{22}Na^+$ flux was determined using the Ussing chamber method. Water flux in the large intestine was investigated using the closed loop method. In claudin 15 KO mice, the conductance, as well as Na^+ flux, was found to be decreased in the cecum but not in the large intestine. Hyperosmotic-induced water flux was found to be decreased in the proximal large intestine of claudin 15 KO mice, but not in the middle large intestine. These results suggested that claudin 15 KO is important for water transport in the large intestine. (COI: none)

O-20. マウス腸管における三細胞タイト結合タンパク質アンギュリン 1 の役割の検討

○伊久美直毅[1]，杉岡汐里[1]，石塚典子[1]，古瀬幹夫[2,3]，林　久由[1]（[1]静岡県立大学・食品栄養化学部・生理学，[2]生理学研究所・細胞構造研究部門，[3]総合研究大学院大学・生命科学研究科・生理科学専攻）

腸管上皮は外界から栄養素を選択的に吸収し，同時に異物の侵入を防いでいる．上皮細胞は管腔側に近い場所でタイト結合によって隣り合う細胞と密に結合し，バリアを形成している．タイト結合のバリアは，膜タンパク質クローディンがジッパーのように二枚の細胞膜を繋いでいるが，上皮細胞が三つ接する部位では，このジッパー形式では完全に塞ぐことができず，特殊な構造の形成が想定されている．三細胞タイト結合部に特異的に局在するタンパク質としてアンギュリン 1（Angl）が同定されている．培養上皮細胞において Angl をノックダウンすると経上皮の電気抵抗が低下し，上皮バリア機能に関与することが示されている．しかし，Angl が腸管バリア機能に関与するかは検討されていない．そこで，本研究では腸管特異的 Angl 欠損（Angl cKO）マウスを用い，消化管における Angl の役割を解明することを目的とした．Angl　cKO およびコントロールマウスの摘出小腸を用い，ユッシングチャンバー法にて，経上皮性のイオンおよび有機溶質であるマンニトールの透過性を測定した．Angl cKO マウスでは，マンニトールの透過性の増大は観察されなかった．しかし，細胞間隙の Na^+の選択的透過性の低下が観察された．また，蛍光免疫染色により Angl cKO マウスでは，コントロールマウスでは観察されないバリア機能を有するクローディン 7 が二細胞タイト結合部へ局在が変化していることが観察された．以上より，三細胞タイト結合部に発現している Angl は，二細胞タイト結合部のイオン透過性を調節している可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-21. 新生仔低酸素虚血性白質障害へのオリゴデンドロサイト前駆細胞移植における免疫抑制剤の効果

○田尻直輝[1]，小川紫野[1,2]，大谷綾乃[1,2]，服部篤紀[1]，飛田秀樹[1]（[1]名古屋市立大学・大学院医学研究科・脳神経生理学，[2]同　大学院医学研究科・産科婦人科学）

オリゴデンドロサイト後期前駆細胞（pre-OL）の選択的虚血脆弱性により，早産児では脳室周囲白質軟化症（PVL）が生じる．これまでに軽症型 PVL モデルの新生児低酸素虚血性白質障害（NWMI）モデルラットを確立し，オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）の細胞移植により，移植された OPC が 8 週後まで生存していることを確認している．本研究では，移植 OPC の生存細胞増加と運動機能の回復を目的とし，NWMI モデルラットへの OPC 細胞移植における免疫抑制剤（サイクロスポリン）投与による効果を検討した．生後 3 日齢の Wistar 系雄ラットの右総頸動脈閉塞及び 6% 低酸素処置を 1 時間曝露し，NWMI モデルラットを作製した．モデル作製から 2 日後に，緑色蛍光タンパク質（GFP）標識した OPC を脳梁へ移植（2.0×10^5cells/2μl）した．2 週後に，サイクロスポリン（10mg/kg）を毎日経口投与し，4 週と 8 週間後に行動学的及び免疫組織学的評価を行った．その結果，NWMI＋OPC 移植群及び NWMI＋OPC 移植＋免疫抑制剤投与群で，NWMI 群（OPC 移植なし）と比較して 4 週と 8 週目において，Hindlimb retraction，Beam walking，Elevated body swing test の運動機能評価において有意な行動学的改善を示した．また，Rotarod test においては，8 週目に有意な改善効果を認めた．さらに，NWMI＋OPC 移植＋免疫抑制剤投与群では，NWMI＋OPC 移植群と比較して，Olig2/GFP 陽性細胞が脳梁や運動皮質領域において 8 週目に有意に生着・生存していることが確認された．NWMI モデルラットに対し，オリゴデンドロサイト前駆細胞移植と免疫抑制剤を併用することで，移植 OPC の生存細胞増加と運動機能の改善効果を

示すことが確証された．（利益相反　なし）

O-22. 肺高血圧症ラットの週齢差による病態変化

○川出有希子[1]，山村　彩[2]，鈴木良明[1]，山村寿男[1]（[1]名古屋市立大学・大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学，[2]愛知医科大学・医学部・生理学）

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は，持続的に肺動脈圧が上昇する難病であり，進行に伴って右心不全に陥る．PAH 患者は 20～60 歳に分布し，30 歳代がピークとなるが，根治療法は見つかっていない．本研究では，モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットを用いて，形態学的所見・死亡率を若年と高齢ラットで比較し，PAH 患者で認められる年齢差を再現できるかを検討した．雄性ラット（SD 系，4 週齢と 17 週齢）を用いて，モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットを作製した．モノクロタリン投与後 21 日目のラットから各種臓器を摘出し，臓器重量や形態学的変化を解析した．また，肺動脈におけるカルシウム感受性受容体（CaSR）の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法を用いて解析した．若年ラットでは，約 14 日目から体重が減少し，約 21 日目から死亡し始めた．最終的に，約 35 日間で全ての若年ラットが死亡した．一方，高齢ラットでは体重変化は認められず，35 日間で死亡するラットは皆無であった．モノクロタリン投与群の心臓，肺，肺動脈の組織重量は，対照群と比較して，両週齢とも増加していた．CaSR の発現も両週齢で増加していた．以上の結果は，PAH 患者で認められる年齢差を肺高血圧症モデル動物で一部再現できたことを示している．本研究成果は，PAH の病態機構の解明に有益な知見になると考えられる．（利益相反　なし）

O-23. フィンゴリモドは肺動脈平滑筋細胞の異常増殖を抑制し，肺高血圧症を改善する

○藤原萌園[1]，山村　彩[2]，鈴木良明[1]，山村寿男[1]（[1]名古屋市立大学・大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学，[2]愛知医科大学・医学部・生理学）

肺高血圧症は，慢性的に肺動脈圧が上昇する予後不良の血管疾患である．中でも，最も典型的な臨床像を示す肺動脈性肺高血圧症（PAH）は，肺血管の過収縮（攣縮）や肥厚（リモデリング）が要因となり，肺血流量が低下した後，最終的に右心不全に至る難病である．近年の治療薬開発により予後は改善しつつあるが，既存薬では効果が得られない患者も多く，新たな作用機序を有する薬剤が望まれている．本研究では，スフィンゴシン-1-リン酸受容体作用薬であるフィンゴリモド（FTY720）の PAH に対する薬効を評価した．正常ヒト肺動脈平滑筋細胞（Normal-PASMCs）と特発性肺動脈性肺高血圧症患者由来肺動脈平滑筋細胞（IPAH-PASMCs）の増殖に対するフィンゴリモドの効果を MTT 法で評価した．また，モノクロタリン（MCT）誘発性肺高血圧症ラットを作製し，肺高血圧症に対するフィンゴリモドの効果を解析した．Normal-PASMCs と比較し，IPAH-PASMCs の増殖率は有意に高く，その増殖はフィンゴリモドによって濃度依存的に抑制された．また，MCT ラットでは肺血管リモデリングや右室圧の上昇，右心肥大が認められたが，それらの病態はフィンゴリモド投与により改善し，死亡率も低下した．フィンゴリモドが PASMCs の異常増殖を阻害し，PAH リモデリングを抑制した結果，MCT ラットにおける肺高血圧症が改善したと考えられる．以上より，フィンゴリモドが新規 PAH 治療薬として有望であることが示唆された．（利益相反　なし）

O-24. 胃がん細胞における chloride intracellular channel 3 の発現と機能

○藤井拓人[1]，河合俊輔[2]，清水貴浩[1]，奥村知之[2]，藤井努[2]，酒井秀紀[1]（[1]富山大学・薬学部・薬物生理学，[2]同医学部・消化器・腫瘍・総合外科）

Chloride intracellular channel 3（CLIC3）は，膵がん，乳がん，卵巣がんにおいて高発現することで患者の生命予後を悪化させることが報告されているが，胃がんにおける発現および機能については不明である．我々は，胃がん患者について抗 CLIC3 抗体を用いた組織マイクロアレイ解析を行い，他のがん種とは異なり，CLIC3 高発現群では低発現群よりも生存率が有意に亢進することを見出した．また胃がん細胞において CLIC3 は，部分的に原形質膜に局在していた．ヒト胃がん細胞株である MKN7 細胞では CLIC3 の発現が見られ原形質膜に局在していたが，KATOIII 細胞および NUGC-4 細胞では有意な発現は見られなかった．MKN7 細胞においてパッチクランプホールセル解析を行ったところ，外向き整流性 Cl^- 電流が観測され，この電流は Cl^- チャネル阻害剤 NPPB により有意に減少した．興味深いことに，MKN7 細胞において，siRNA により CLIC3 をノックダウンしたところ，細胞増殖能が有意に亢進した．他方，KATOIII 細胞と NUGC-4 細胞に CLIC3 を過剰発現させたところ，細胞増殖能は有意に低下した．以上の結果より，CLIC3 は胃がん細胞の原形質膜において Cl^- チャネルとして機能し，その発現低下によるがん細胞の増殖亢進が患者の生命予後悪化に関連している可能性が示唆された．（利益相反　なし）

O-25. 前立腺癌に発現する血管内皮増殖因子受容体 3（VEGFR3）阻害薬の抗腫瘍効果

○山村　彩[1]，Md Junayed Nayeem[1]，村松洋行[2]，渡邊

將人[2]，高橋理恵[1]，林　寿来[1]，中村小源太[2]，佐藤元彦[1]（[1]愛知医科大学・医学部・生理学，[2]同　医学部・泌尿器科学）

前立腺癌にはアンドロゲン受容体が関与するため，抗アンドロゲン受容体を阻害するホルモン療法が有効である．しかし，一部には，治療抵抗性前立腺癌や転移性前立腺癌も存在する．転移性前立腺癌においては，アンドロゲン受容体とは別の経路が病態形成に関与している可能性がある．本研究では，アンドロゲン受容体陽性または陰性細胞株を用いて，チロシンキナーゼ受容体の一種である血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）の機能発現を解析した．前立腺上皮細胞株(PrEC)，アンドロゲン受容体陽性前立腺癌細胞株（LN-CaP），アンドロゲン受容体陰性前立腺癌細胞株(PC-3，DU145)を用いた．ウエスタンブロット法を用いて受容体タンパク質発現，MTT および BrdU アッセイを用いて細胞増殖，トランスウエル法を用いて細胞遊走，ヌードマウスを用いて in　vivo 腫瘍形成を解析した．VEGFR のうち，VEGFR3 の発現がアンドロゲン受容体非依存性の PC-3 細胞株で最も高かった．VEGFR3 のリガンドである VEGFC は VEGFR3 のリン酸化を亢進し，この効果は VEGFR3 の選択的阻害薬である MAZ-51 により抑制された．MAZ-51 は濃度依存的に細胞の生存率や増殖も抑制した．さらに，MAZ-51 はヌードマウスに移植した PC-3 細胞の腫瘍形成を濃度依存的・時間依存的に抑制した．本研究成果によって，VEGFR3 が転移性前立腺癌治療薬の新たなターゲットになる可能性が示された．（利益相反　なし）

O-26. トロンボモジュリンによる凝固線溶活性調節機構の可視化解析

○望月里依奈，鈴木優子，佐野秀人，本藏直樹，浦野哲盟（浜松医科大学・医学部・医生理学講座）

背景：血管内皮細胞表面に発現するトロンボモジュリン（TM）はトロンビンの凝固活性を無くし，抗凝固因子であるプロテイン C や抗線溶因子であるトロンビン活性化線溶抑制因子（TAFI）の活性化能を付与する．しかし一連の血栓形成溶解過程における各々の反応の詳細は明らかでない．

目的と方法：ヒト血小板含有血漿に種々濃度の TM（野生型，変異型：TAFI 活性化能有/無）を添加して，濁度法によりクロット形成/溶解時間を測定した．また共焦点レーザ顕微鏡により，血小板含有血漿クロット形成溶解過程での蛍光標識フィブリノゲン/プラスミノゲン（plg）の集積局在性を時空間的に解析し，凝固・線溶への影響を検討した．

結果と考察：野生型 TM によりクロット形成時間及び溶解時間の延長を認めたが，前者には高濃度の TM を要した．TAFI 活性化能（－）変異型 TM では後者は延長しなかった．可視化解析では，活性化血小板を中心としたフィブリン網形成は，高濃度の TM でも明らかな変化を認めなかったが，同部位への plg の集積時間は延長した．後者は TAFI 活性化能（－）変異型 TM では認めなかった．TM 結合トロンビンにより活性化された TAFI は，そのカルボキシペプチダーゼ活性により plg がフィブリンに結合するのに必要な C 末端リジンを切断し，plg の集積を抑制してフィブリン分解を阻害することが示された．可溶性 TM では抗線溶活性の発現が顕著であった．（利益相反　なし）

O-27. 内耳の感覚上皮帯を構成する外有毛細胞のナノ動態の同定

○任　書晃[1,2,3]，太田　岳[2,3]，崔　森悦[3,4]，日比野浩[2,3]（[1]岐阜大学・医学部・生理学，[2]新潟大学・医学部・分子生理学，[3]AMED-CREST，[4]新潟大学・工学部・電気電子）

音は，内耳蝸牛において電気信号へと変換され，脳へと伝達される．この変換は，音によってナノスケールで振動する感覚上皮帯で行われる．感覚上皮帯は，複数の細胞や組織により構成される．これらは，内・外有毛細胞，支持細胞，そして細胞外基質層などである．内有毛細胞は，求心性神経線維を活性化して，音情報を脳へと送る．一方，音受容の感度を調節する外有毛細胞は，感覚上皮帯の振動に合わせて自らの細胞体を伸縮させる．この動作は，フィードバック的に上皮帯の振動を修飾し，内有毛細胞の働きに影響することで，聴覚の高い鋭敏性や周波数特異性に寄与すると指摘されている．しかし，生体内での感覚上皮帯細胞個々の動態は未だ十分に明らかにされていない．本研究では，光干渉断層撮影法（Optical Coherence Tomography：OCT）を基盤とする新規イメージング振動計測装置を創製した．市販の装置を改造し，高い空間分解能と測定時間の短縮を実現し，計測系を蝸牛の生体内計測に最適化した．生きたモルモットを使った実験により，外有毛細胞の頂側と基底側，さらに細胞外基質層の 3 点にて異なる振動様式が計測された．本研究の成果により，聴覚機能の成立の鍵となる感覚上皮帯振動の生物物理的メカニズムの一端が抽出された．（利益相反　なし）

O-28. ダイヤモンド電極を用いた電気化学測定による薬物血中濃度の迅速測定

○齋木琢郎[1,2]，緒方元気[1]，澤村晴志朗[1]，ラズビナオリガ[1]，渡邊航太[1]，加藤里都[1]，浅井　開[1]，松本吉史[2]，森山雅人[2]，西條康夫[2]，楠原洋之[4]，栄長泰明[3]，日比野浩[1]（[1]新潟大・院医歯・分子生理，[2]同　院医歯・腫瘍内

科，[3]慶應大・理工・化学，[4]東京大・院薬学）

経口分子標的薬の抗がん剤は，殺細胞薬に比べ毒性が軽微とされるが，それでも固有の有害事象が散見される．これらの薬剤は，体表面積などの調節を行わない固定用量で投与されるが，血中濃度に関して，個体間の多様性や効果・安全性との関連を示す報告が増えており，薬物血中濃度に基づく，投与法の患者ごとの最適化が重要と考えられる．しかし，高速液体クロマトグラフ質量分析計（HPLC-MS/MS）による従来の測定法は，時間・コストを要し，臨床上有効活用されていると言い難い．そこで本研究では，最先端のダイヤモンドセンサを用い，電気化学的手法による薬物血中濃度測定を目指した．多標的チロシンキナーゼ阻害薬のパゾパニブをラット血漿に添加し，測定法を検証した．薬物を含む血漿サンプルにアセトニトリルを添加して除タンパクを行い，20,000G で 2 分間遠心した上清をダイヤモンドセンサに反応させた．その結果，推奨治療濃度域を含む 0～150 μM の範囲で定量可能であった．測定自体は約 35 秒で，サンプル処理を含めても 10 分以内の短時間で全工程が完了した．次に，パゾパニブをラットに経口投与し，その血中濃度を測定した．薬物投与前後に複数回採血を行い，上記と同様の手順にて測定を行ったところ，t_{max}：～4 時間と，先行研究と類似の結果を得た．迅速，簡便，安価な薬物血中濃度測定法の創出による，テーラーメイド医療への貢献が期待される．（利益相反　なし）

O-29. 神経軸索のサブタイプに依存したミエリン形成：ミエリン化オリゴデンドロサイトが産生する物理的な力を可視化する新しいアッセイシステムの構築

○清水健史[1]，村越秀治[2,3]，松本英俊[4]，石田章真[1]，田尻直輝[1]，飛田秀樹[1]（[1]名古屋市立大学・医学研究科・脳神経生理学，[2]生理学研究所・脳機能計測支援センター，[3]総合研究大学院大学・生理科学，[4]東京工業大学・物質理工学院・材料系）

オリゴデンドロサイト（OL）は，神経軸索の周りに髄鞘（ミエリン）を形成し，活動電位の伝導を速めている．中枢神経系には太い軸索と細い軸索の両方が存在するが，軸索の直径と［軸索＋ミエリン］の直径の比（g-ratio）は，各軸索に対して最適値になるよう調整されている．そのため，軸索の直径に応じてミエリン形成を制御する因子の存在が示唆される．g-ratio の最適化は高次脳機能を発現するために不可欠である．この g-ratio 制御メカニズムを明らかにするために，軸索の直径に依存した物理的因子に着目した．ミエリン形成 OL が生成する力を可視化するために，蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に基づく牽引力センサーを使用した．

本研究では，それら物理的因子を調べるために，神経軸索に類似した直径を有するポリスチレン製ナノファイバーを作製した．OL はナノファイバーに対してもミエリン膜を巻き付けることが確認できた．牽引力センサーの FRET 計測を行った結果，異なる直径のファイバーに対してミエリンを形成する OL が産生する力の変化が検出された．このことから，軸索径に応じた力学的因子がミエリン形成を制御する分子機構が新たに示唆された．さらに，ファイバー径に依存した OL 接着斑サイズの変化も観察されたことから，軸索上の接着斑を起点として力学的シグナルが惹起され，OL の動態やミエリン形成を制御する可能性が考えられた．（利益相反　なし）

O-30. X 線 1 分子動態計測法の開発

○清水啓史（福井大学・学術研究院医学系研究科・統合生理学）

蛋白質 1 分子の立体構造変化を実時間で動画記録する観測法である X 線 1 分子動態計測法について，現在の開発状況を発表します．X 線 1 分子動態計測法は金ナノ結晶を観測プローブとし，放射光白色 X 線を観測光として蛋白質の立体構造変化を蛋白質に取り付けた金ナノ結晶からの回折点の運動として記録する観測法です．基板およびナノ結晶との反応部位を導入した蛋白質を発現・精製し，基板に蛋白質の一端を，金ナノ結晶を他端に固定します．この時，適切な観測部位を選択することによって，蛋白質が機能する際の構造変化を実時間動画記録することができます．2008 年に KcsA カリウムイオンチャネルが開閉する際のねじれ構造変化を報告した後，X 線集光ミラーの設計・導入，高速観測カメラシステムの導入，光トリガー観測システムの導入，温度変化観測システムの導入と観測法の開発を進めてきました．現在はサブミリ秒の時間分解能と高い空間分解能（～0.1°）を両立しており，蛋白質の溶液条件による分子動態の変化を 1 分子レベルで記録することができる観測法となっています．最近では TRPV1 チャネルへの応用も開始しており，本発表を通して手法の特長を多くの研究者の方々にお伝えし，他の蛋白質への応用の可能性を探りたいと考えております．（利益相反　なし）

P-1. 大脳皮質神経細胞の電気刺激による *Ptprd* 遺伝子微小エクソンの選択的スプライシング調節

○出村舞奈[1]，今井彩子[1]，田端俊英[2]，森　　寿[1]，吉田知之[1]（[1]富山大学学術研究部医学系分子神経科学，[2]同学術研究部工学系生体情報処理）

脳神経回路は様々な神経活動に応じたシナプスの繋ぎかえによって，機能的に成熟することが知られているが，そ

の分子機構はよく分かっていない．シナプス前膜に発現する受容体型チロシン脱リン酸化酵素 PTPδ は 3 つの微小エクソン（meA3，meA6 および meB）の選択状態に応じて，様々なシナプス後部リガンドと結合することによってシナプスの分化誘導を担うシナプスオーガナイザーである．そこで本研究では，PTPδ 遺伝子（*Ptprd*）の 3 つの微小エクソンの選択的スプライシングが神経活動によって調節を受けるか否かの検証を行なった．マウス大脳皮質初代培養神経細胞に対してヒト胎児の脳波を模したバースト刺激を 4 日間（長期）もしくは 90 分間（短期）与えた後に *Ptprd* 微小エクソンの選択比率を調べた．meA3 選択比率は長期刺激群でのみ増加するのに対して，meA6 の選択比率は長期及び短期刺激の両群で増加した．meB の選択比率はいずれの電気刺激群でも有意な変化は認められなかったが，50 mM KCl で 4 時間処理することにより有意に減少することが明らかになった．これらのことから，*Ptprd* の 3 つの微小エクソンの取捨選択がそれぞれ異なる神経活動によって調節を受けることで，複雑な神経回路の再編が制御される可能性が示唆された．（利益相反　なし）

P–2. ラット松果体に発現する小コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルの機能解析

○山村寿男，三島寛貴，水谷浩也，村松　真，萩原由実子，鈴木良明，今泉祐治（名古屋市立大学・大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学）

松果体は，メラトニンの産生および分泌を介して，概日（サーカディアン）リズムを制御する．松果体の副交感神経系シグナル経路において，ニコチン性アセチルコリン受容体刺激は，細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ，最終的にメラトニン産生を抑制する．この経路に自発的かつ周期的な細胞内 Ca^{2+} 振動（Ca^{2+} オシレーション）と Ca^{2+} 関連イオンチャネルが関与し，その活性がメラトニン産生・分泌を調節することを明らかにしてきた．本研究では，ラット松果体に発現するニコチン受容体と機能連関する新たなイオンチャネルの発現機能解析を行った．発現解析の結果，小コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+（SK_{Ca}）チャネルおよび中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+（IK_{Ca}）チャネルの中で，$SK_{Ca}2$ チャネルが mRNA レベルで高発現していた．また，$SK_{Ca}2$ チャネルタンパク質は，松果体の細胞膜上に発現していた．Ca^{2+} イメージングの結果，Ca^{2+} オシレーションの強度と頻度は，SK_{Ca} チャネル阻害薬である apamin によって増加した．一方，その強度と頻度は，SK_{Ca} チャネル活性化薬である高濃度 DCEBIO によって減弱した．Ca^{2+} オシレーションは，IK_{Ca} チャネル阻害薬である TRAM-34 の影響を受けなかった．以上の結果，ラット松果体細胞に $SK_{Ca}2$ チャネルが機能発現し，メラトニンの産生および分泌機構を制御していることが示唆された．（利益相反　なし）

P–3. 視床下部―延髄縫線核オキシトシン神経系による熱産生交感神経反応の促進

○福島章紘，中村和弘（名古屋大学大学院・医学系研究科・統合生理学）

視床下部オキシトシンニューロンは様々な脳領域へ投射し，養育行動や性行動，社会行動の発現に関与することが知られる．本研究では，オキシトシンによる自律神経機能修飾とその機構を明らかにするため，視床下部室傍核から吻側延髄縫線核（rMR）へ投射するオキシトシン神経系の機能を，免疫組織学的手法および麻酔ラットの交感神経活動記録を用いて検討した．

オキシトシンニューロン選択的に遺伝子を発現させる Oxy-Tet ウイルスを用いて室傍核オキシトシンニューロンの軸索を可視化すると，rMR の VGLUT3 陽性交感神経プレモーターニューロンに対するシナプス様構造が観察された．また，rMR からの逆行性標識では，室傍核尾側部のオキシトシンニューロンが多く標識され，視索上核では標識されなかった．

Oxy-Tet ウイルスを用いて室傍核オキシトシンニューロンに光活性化陽イオンチャネルを発現させ，rMR のオキシトシン含有軸索終末を光刺激すると，交感神経反応（褐色脂肪組織の交感神経活動と温度の上昇，呼気中 CO_2 濃度，心拍数の上昇）が誘導された．さらに，rMR への NMDA 注入によって惹起される褐色脂肪熱産生が，室傍核オキシトシンニューロンの光刺激によって増強された．

以上より，室傍核オキシトシンニューロンは rMR へ軸索投射して交感神経プレモーターニューロンの興奮性を増強し，熱産生交感神経反応を促進することが示された．（利益相反　なし）

P–4. Involvement of thermosensitive TRP channels in temperature-dependent microglia movement

○Derouiche Sandra[1]，Nishimoto Rei[1]，Eto Kei[2]，Nabekura Junichi[2]，Tominaga Makoto[1]（[1]Division of Cell Signaling,（NIPS），Thermal Biology group（ExCELLS），[2]Division of Homeostatic Development,（NIPS））

Microglia maintains the homeostasis of the central nervous system and migrate via chemotaxis in their activated state. Interestingly, hypothermia was shown to reduce the microglial migration induced by ischemia, suggesting a modulation of microglia movement by temperature. Although several ion channels and transporters are known

to support the microglia movement, the molecular mechanisms behind the temperature-dependent movement of microglia have not yet been elucidated. Some members of the transient receptor potential (TRP) channels superfamily with thermosensitivity, constitute strong candidates for the mediation of this phenomenon. Here, we investigate the regulation of mouse microglia movement by temperature and the involvement of thermosensitive TRP channels. All together our in vitro and in vivo results suggest a role of TRPM2, TRPM4 and TRPV4 channels in the temperature-mediated microglia movement, both in physiological and pathological conditions. (COI: none)

P-5. 体温と代謝をつなぐ体温センサー TRPM2 機能の解明

○加塩麻紀子[1]，富永真琴[2]，増渕　悟[1]（[1]愛知医科大学・医学部・生理学，[2]生命創生探求センター・温度生物学研究グループ）

TRPM2 は，体温域の温度に感受性を有する非選択性カチオンチャネルである．TRPM2 の発現組織の多くは体温に保たれた深部組織である．そのような環境において，TRPM2 の体温下活性は，細胞の代謝状態に応じて濃度が変化する NAD^+ 代謝産物を含む内因性リガンド，細胞内カルシウムイオン等，種々の調節因子による調節を受けることで，その生理機能を発揮していると考えられている．本研究は，NAD^+ で活性化され TRPM2 の内因性リガンド o-acetyl adenosine phospho ribose を産生する脱アセチル化酵素 SIRT1 に注目したものであり，電気生理学，生化学，分子生物学実験により TRPM2 と SIRT1 の機能連関と TRPM2 リン酸化を介する制御機構を解析した．本発表では，その分子メカニズムおよび生理機能について討論したい．（利益相反　なし）

P-6. Monkey amygdalar neurons preferentially respond to snake pictures

Ha Trong Dinh[1,2], ○Yang Meng[1,2], Hiroshi Nishimaru[1,2], Jumpei Matsumoto[1,2], Tsuyoshi Setogawa[1,2], Taketoshi Ono[1,2], Hisao Nishijo[1,2]（[1]富山大学・医学部・システム情動科学，[2]同　アイドリング脳科学研究センター）

Snakes and conspecific faces are quickly and efficiently detected in primates. Because the amygdala (AM) has been implicated in avoidance and emotional behaviors to biologically relevant stimuli, we hypothesized that AM neurons might be highly responsive to snakes and conspecific faces. In this study, neuronal responses in the monkey AM were recorded, while monkeys discriminated 8 categories of visual stimuli including snakes, monkey and human faces, monkey hands, non-predators, raptors, carnivores, and simple geometrical figures. Of 527 AM neurons, 95 responded to one or more stimuli. Here, we show that the monkey AM neuronal responses to snakes and conspecific faces were unique. First, the ratios of the AM neurons that responded strongly to snakes and monkey faces were greater than those of the neurons that responded strongly to the other stimuli. Second, AM neurons responded stronger and faster to snakes and monkey faces than the other categories of stimuli. Third, neuronal responses to snakes were unaffected by low-pass filtering of the images. Finally, activity patterns of responsive AM neurons discriminated snakes and emotional faces from the other stimuli in the second 50-ms period and neutral faces in the third period after stimulus onset. These response features indicate that the AM processes fast and coarse visual information of snakes and faces, and support the hypothesis that snakes and social environments have shaped the primate visual system over evolutionary time. (COI: none)

P-7. 中脳ドーパミン神経が駆動するマウスの表情とその神経機構

○Wanru Li[1]，中野高志[2]，河谷昌泰[1]，松原崇紀[1]，向井康敬[1]，山中章弘[1]，山下貴之[1,3]（[1]名古屋大学・環境医学研究所・神経系分野 2，[2]藤田医科大学・医学部・情報科学，[3]同　医学部・生理学 II）

ヒトの感情が顔に表れるように，マウスでも様々な内的状態に対応する表情がある（Dolensek et al., Science, 2020）．しかしながら，報酬の獲得や予測に伴うマウスの表情の実態と神経機構は未解明である．そこで，私たちは，それ自体が報酬となる中脳ドーパミン神経の刺激によって誘発されるマウスの表情を調べた．ドーパミン神経特異的にチャネルロドプシン 2 を発現する遺伝子改変マウスを頭部固定し，マウスの顔面前部を上方から高速ビデオ撮影しながら，光ファイバーより中脳ドーパミン神経に青色光刺激（5ms ×20，20Hz）を行った．光刺激により，洞毛の前後運動（whisking）が誘発され，同時に鼻の伸縮・横振り運動も誘発された．また，マウスに音刺激（CS）とドーパミン神経刺激を連合させると，CS 開始直後に一過性の洞毛の前方運動と鼻の収縮運動が誘発された．さらに，鼻や洞毛の運動を司る一次運動野を muscimol 注入によって抑制

すると，これらの顔運動が大きく減弱した．一方，CRISPR-Cas9 により側坐核ドーパミン D1 受容体をノックアウトしたところ，ドーパミン神経刺激によって誘発される表情は抑制されたものの，CS 直後の顔運動は影響されなかった．以上の結果から，報酬獲得や報酬予測によりマウスに特徴的な表情が発現すること，一次運動野はこれらの表情発現に不可欠であること，側坐核ドーパミン D1 受容体は報酬獲得による表情発現に必要であるが報酬予測による表情発現には必要ないことが示唆された．（利益相反　なし）

P–8. シンチレータ・マイクロ粒子を用いた遠隔的神経機能操作法の開発

○松原崇紀[1]，柳田健之[2]，河口範明[2]，中野高志[3]，瀬崎真衣子[4]，滝澤　仁[4]，山中章弘[1]，山下貴之[1,5]（[1]名古屋大学・環境医学研究所・神経系分野 2，[2]奈良先端科学技術大学院大学，[3]藤田医科大学・医学部・情報科学，[4]熊本大学・国際先端医学研究機構，[5]藤田医科大学・医学部・生理学 II）

光遺伝学は，高い時間分解能で生きた動物の特定の神経機能を制御することが出来る強力な技術である．これまでに，埋め込み型の極小 LED やアップコンバージョン粒子などを用いて，深部脳を遠隔的（ワイアレス・ファイバーレス）に操作する光遺伝学的手法が開発されてきたが，自由行動中の動物において深部脳細胞を効率よく遠隔操作することは未だ容易ではない．この問題の解決を目指して，私たちは生体組織を透過する X 線と X 線を可視光へと変換する無機シンチレータを用いた新規な光操作技術を開発してきた．まず，非潮解性の固体シンチレータの中から最も明るいシンチレーション光を発するシンチレータの一つである Ce：GAGG を選び，Ce：GAGG からの発光に効率よく反応する興奮性および抑制性のオプシンを見出した．次に，Ce：GAGG をマイクロ粒子化し，脳内に注入することで，体外からの X 線照射により注入部位周囲のオプシン発現神経の活性化が可能であることを cFos 発現を read-out とすることにより確認した．さらには，本実験系をマウス中脳腹側被蓋野のドーパミン神経に応用し，神経幹細胞や血液幹細胞に影響を与えない程度の X 線照射により，マウスの場所嗜好性を変化させることに成功した．このように，X 線を用いた脳深部細胞の低侵襲・遠隔操作は実現可能であり，将来的には動物行動実験に広く使われるのみならず，光遺伝学の臨床応用に活用されることが期待される．（利益相反　なし）

P–9. 微弱な内耳前庭系電気刺激の，起立時血圧調節への残存効果

○田中邦彦[1]，原田大輝[2]，杉浦明弘[3]（[1]岐阜医療科学大学・大学院保健医療学研究科，[2]神戸大学医学部，[3]岐阜医療科学大学・保健科学部・放射線技術学科）

臥位から立位に姿勢を変化させると身体にかかる重力の方向が，前後方向から長軸方向へと変化する．これまでに我々は，このときの血圧調節に内耳前庭系，特に耳石器が重要な役割を果たしていること，起立と同時に微弱な内耳前庭系電気刺激（Galvanic Vestibular Stimulation, GVS）を行うと，この調節が増強されることを示してきた．今回，この微弱な GVS の，前庭系機能への残存効果を検証した．

健常被検者 8 名に，体感閾値より 0.1 mA 低い強度の GVS を 30 分間与えた．刺激波形は振幅が一定なホワイトノイズとした．GVS 前，直後，翌日（刺激後 16～20 時間）で起立時連続血圧，重心動揺を計測した．いずれも開眼および閉眼で行い，重心動揺の総軌跡長について閉眼/開眼（ロンベルグ率）を求めた．

開眼，閉眼ともに，GVS 直後の起立時の血圧応答は有意に改善した．改善効果は閉眼時の方が高かった．この効果は翌日やや低下するも，刺激前に比較して有意に高い状態を維持した．同様に，重心動揺のロンベルグ率も GVS 直後に低下し，この低下は翌日も維持された．ロンベルグ率と閉眼時の血圧変化は有意に相関した．

以上の結果から，体感閾値マイナス 0.1 mA の GVS は起立時血圧応答，重心動揺といった内耳前庭系に関連した調節機能を改善すること，これが 1 日は持続するものと考えられた．（利益相反　なし）

P–10. HL-1 マウス心筋細胞を用いた自動能機序の解明

○九田裕一[1]，倉田康孝[1]，池田崇之[2]，谷田　守[1]，津元国親[1]，芝本利重[1]，米倉秀人[2]（[1]金沢医科大学・医学部・生理学 II，[2]同　医学部・生化学 II）

【目的】心臓電気生理学的研究によく使われている HL-1 マウス心房筋細胞は自動能を持つため，ペースメーカー活動の研究に有用である．我々は，HL-1 細胞における自動性のイオン機序を検討した．

【方法】ホールセルパッチクランプ法と膜電位・細胞内 Ca^{2+} の蛍光イメージングにより，HL-1 細胞の活動電位，イオン電流，および細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した．自動能の発生における内向き整流 K^+ チャネル電流（IK1），過分極活性化陽イオンチャネル電流（If）および筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離の役割を，Ba^{2+}（IK1 ブロック），イバブラジン（If ブロック），カフェイン（筋小胞体 Ca^{2+} を枯渇）を使用して検証した．

【結果】HL-1 には自動能を持つ細胞と持たない細胞が混在していた．ホールセルパッチクランプ法により自動能を

持たない細胞でより大きな IK1 電流が検出された．ホールセルパッチクランプ法と膜電位の蛍光イメージング法で Ba^{2+} 誘発性自動能が観察された．カフェインは Ca^{2+} トランジェントを減弱し，自発性活動電位頻度の減少，自動性停止をもたらした．一方で，Ba^{2+} による自動能はカフェインまたはイバブラジン投与では消滅しなかった．

【結論】IK1 電流は，自動能発現の有無を決定する重要な因子であると考えられる．HL-1 細胞における自動能発現の有無と自動能機序は IK1 電流の大きさに依存している．自動能の発生機構は 2 つあり，IK1 電流が比較的大きいときは筋小胞体 Ca^{2+} 遊離（Ca^{2+} クロック），IK1 電流が小さいときは If-非依存性膜クロックが主に関与する．HL-1 におけるペースメーカー活性機構は IK1 電流量に依存する可能性がある．（利益相反　なし）

P-11. ヒト心筋細胞の早期後脱分極応答に起因した不整脈トリガー：*in silico* 研究

○津元国親[1]，島本貴生[2]，天野　晃[2]，九田裕一[1]，谷田守[1]，倉田康孝[1]（[1]金沢医科大学・医学部・生理学 II，[2]立命館大学・生命科学部・生命情報学）

【背景】心筋細胞の興奮異常である早期後脱分極（early afterdepolarization：EAD）応答は，多形性心室頻拍（torsades de pointes：TdP）のトリガーになると考えられている．しかし，TdP の発生に EAD がどのように関与しているのかは未だ明らかでない点が多い．

【目的】心室組織において，EAD を生じる心室筋細胞群（クラスター）の不連続分布は TdP 誘発を促進するか否かを明らかにする．

【方法】0.1 mm 角のヒト心室筋細胞ユニットモデルを 2 次元的に配列し，6 cm 角の心室筋シートモデルを構築した．このシート上に EAD ユニットと非 EAD ユニットを配置して，興奮伝播シミュレーションを実施した．EAD クラスター数，クラスターの空間分布の様相，クラスターのサイズを変化させて，旋回性興奮波（TdP）への遷移を再現することで，トリガーの発生機序を検討した．

【結果】単一の EAD クラスターによって旋回性興奮波を生成するには，心室筋シートの 80～90% が EAD ユニットで占有される必要があった．一方，2 つ（もしくは 4 つ）の EAD クラスターが，およそ 1～1.5 mm の距離で不連続に組織中央で発生すると仮定した場合，単一クラスターの場合と比較して，より低い組織占有率（組織占有率：30%～40%）で旋回性興奮波が発生した．これらの結果は，EAD クラスターの心室組織内での空間分布が TdP の発生に大きく影響することを示唆している．

【結論】EAD 誘発心筋細胞群の心室組織内における不連続分布が，TdP 発生を促進する可能性がある．（利益相反なし）

P-12. アナフィラキシーショック時の自律神経反応における肥満細胞の役割

○谷田　守，張　　涛，九田裕一，津元国親，芝本利重，倉田康孝（金沢医科大学・医学部・生理学 II 講座）

【目的】アナフィラキシーは，免疫グロブリンに依存した急速な反応で，我々の先行研究において，卵白アルブミンで感作したマウスのアナフィラキシー時には，血圧が上昇した後に血圧が低下するともに，腎臓交感神経が抑制して増大するといった二相性反応があることを確認した．本研究では，この仕組みにおける肥満細胞の役割について実験を行ったので報告する．

【方法】コントロールマウスと肥満細胞欠損マウスを用いて実験を行った．卵白アルブミンの皮下投与で感作後，抗原をペントバルビタール麻酔下で静脈内投与して，アナフィラキシーを惹起させた．遠心性交感神経腎臓枝の活動を計測して，大腿動脈から動脈圧と心拍数を連続的に測定した．

【結果・考察】肥満細胞欠損マウスでは，コントロールマウスのアナフィラキシーで惹起される抗原投与直後の血圧上昇と腎臓交感神経抑制反応が消失した．さらに，アナフィラキシーによる頻脈反応も肥満細胞欠損マウスで減弱していた．また，コントロールマウスではアナフィラキシー後に血中ヒスタミン濃度が上昇したが，肥満細胞欠損マウスでは上昇しなかった．これらの結果からマウスアナフィラキシーによる交感神経及び血圧反応の初期応答には肥満細胞が関与している可能性が高いことがわかった．（利益相反なし）

P-13. 下垂体腺腫摘出検体からのヒト下垂体幹細胞の同定

○齋藤加奈子[1]，西山悠也[2]，武藤　淳[2]，河田美穂[1]，小谷　侑[1]，亀山俊樹[1]，長崎　弘[1]（[1]藤田医科大学・医学部・生理学 1，[2]同　脳神経外科学）

脳下垂体は，ホルモンの働きをコントロールし，生体機能維持の中枢を担う重要な器官である．近年，齧歯類において，この下垂体の前葉組織内に成体幹細胞（PSC）が存在し，各種細胞へと分化能を有する事が示されている．その一方で，入手が困難であるヒトの正常下垂体組織における知見は非常に乏しい．我々は脳腫瘍手術時に微量ながらも摘出される，新鮮かつ正常なヒト下垂体前葉組織より PSC を同定し，分離培養することを最終目標と定め，PSC を未分化な状態で維持できる条件を探索し，ヒト下垂体前葉組

織の恒常性維持機構の解明を目指している．

今回，我々は最初の段階として，PSC 分子マーカー Sox 2, Sox9, S100β 抗体を用い，ヒト摘出検体内に PSC の存在を確認した．これらが腫瘍由来のものでないか識別しつつ，PSC を分離培養するための培養条件を，齧歯類組織を併用しながら検討中である．また，多様な組織型を示す下垂体腫瘍検体を組織学的に比較検討し，各々の腫瘍幹細胞との相違点についても解析していく．

今後，下垂体幹細胞の組織維持機構を明らかにしつつ，疾患モデル動物への移植実験をおこなう等の，下垂体術後後遺症に対する治療などの応用へと発展させていきたい．（利益相反　なし）

P-14. 17β-エストラジオールは卵巣内の周期的な原始卵胞発育を制御している

○小松紘司，増渕　悟（愛知医科大学・医学部・生理学）

哺乳類は周期的に一定数の卵子を排卵する．周期的な排卵の制御は視床下部―下垂体―卵子間のホルモンを介した相互作用によって制御されている．卵子は卵胞という組織の中で発育するが，卵胞の発育は下垂体から分泌されるゴナドトロピンの影響を受けるゴナドトロピン依存的発育ステージと影響を受けないゴナドトロピン非依存的な発育ステージに分類される．原始卵胞，一次卵胞という卵胞発育初期段階の卵胞は後者に属するが，これらの卵胞発育機構は明らかにされていない．特に原始卵胞は大部分が発育停止した休眠状態で卵巣内に存在しており，その休眠維持，解除の制御機構は生殖医療分野において重要な研究課題となっている．我々はこの原始卵胞の発育制御機構を解明するために，oog1pro3.9 マウス（卵母細胞特異的に発現する遺伝子 Oogenesin1（oog1）のプロモーターに AcGFP1 遺伝子が結合した組換え遺伝子を持つ遺伝子改変マウス）の卵巣組織培養による実験を行った．Oog1 は原始卵胞の段階から発現しており，卵胞発育にともなって発現が上昇する特徴がある．この特性を生かし，原始卵胞が一次卵胞へと発育した段階で AcGFP1 シグナルが検出できる撮影条件下で培養卵巣組織のタイムラプス撮影を行うことによって，原始卵胞の発育過程をリアルタイムにトレースする手法を確立した．この手法を用いて原始卵胞の発育制御に関わる因子を探索した結果，17β-エストラジオールが stefin A という cathepsin 阻害因子の発現制御を介して原始卵胞の休眠，活性化をコントロールしていることが明らかになった．17β-エストラジオールは性周期にともなって周期的に卵巣内の産生量が変化するホルモンである事から，これが卵巣組織内において原始卵胞の周期的な発育を制御していると考えられる．（利益相反　なし）

P-15. Roles of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles on outer blood-retina barrier

○Hisaki Hayashi, Motohiko Sato（Department of Physiology, Aichi Medical University）

Long time exposure of blue light in LED, with a wavelength between 400 and 450 nm, from smart phone or PC monitor causes eye stress and damage. Blood-retina barrier is essential for maintenance of retinal homeostasis, whose disruption is associated with retinal edema or age-related macular degeneration. On the other hand, mesenchymal stem cells (MSC) have been intensively investigated for a cell-based therapy in regenerative medicine. Extracellular vesicles derived from MSC has also recently known to have a potential to regenerate damaged organs as well; however, roles of MSC derived extracellular vesicles on blood-retina barrier has not been known yet. Here, we investigated an effect of MSC derived extracellular vesicles on blue light irradiation induced retinal barrier damage by measuring trans-epithelial electrical resistance (TEER) of retinal pigmental epithelial cell (RPE) on Transwell. The barrier function, represented by TEER, was significantly reduced by blue light irradiation. Interestingly, treatment of MSC derived extracellular vesicles recovered TEER. These observations suggested the presence of key entities for the blood-retina barrier recovery enclosed in extracellular vesicles from MSC. (COI: none)

P-16. マイクロ領域での腸ペースメーカ電位活動のパターン分類

○中山晋介，岩田尚子，高井千穂（名古屋大学・医学部・生理学）

消化管は滑らかに連携し，食事やバイオリズムなどに応じ精妙多彩な運動を作る．これまで医学の教科書では Bayliss-Starling「腸の法則」を引用し，内在神経回路で運動機序を説明する．一方，20 世紀後半にカハール間質細胞（ICC）のペースメーカ活動が確認された．さらにそのネットワーク状分布から，この細胞は協調的運動にも機能すると推定される．

そこで本研究では，ICC の興奮伝搬特性を検討した．筋層間神経叢領域にネットワーク状 ICC を発現するマウス小腸標本を，透析膜を用いて 8×8 微小電極アレイ（MEA：検出領域約 1 mm^2）上に固定することで，ガス・代謝産物交換と電気的条件を安定化し長時間計測が可能となった．

低インピーダンス MEA（0.1 Hz 帯域までの信号伝達可能）を用いることで，消化管に特徴的な緩徐な基礎電位を十分に検出した．

正常状態での電位画像化は，ペースメーカ電位マイクロ連携を 4 パターンに分類した．1）Bumpy パターンは大きなばらつきがあり，時間空間的な規則性を欠いた電位連携である．電気結合不全が示唆された．2）Expanding パターンでは，計測中の小さな領域から発生して拡大し，3）Migrating パターンでは，長方形状の活性化部位が移動する．これらはそれぞれ，ICC の 2 つの特徴である Ca オシレーションと電位依存性ペースメーカ電流特性を反映すると考えられた．4）Colliding/converging パターンでは，複数の活動が相互作用した．腸の推進運動を高進する 5-HT はパターン頻度を変化させたので，薬剤効果や機能評価への応用の可能性がある．（利益相反　なし）

P-17. 概日時計中枢視交叉上核による眼圧概日リズムの制御機構の解明

○池上啓介[1]，重吉康史[2]，増渕　悟[1]（[1]愛知医科大学・医学部・生理学，[2]近畿大学・医学部・解剖学）

緑内障は，眼圧上昇が主な原因となって視神経が傷害される難治性の疾患である．眼圧は眼房水の産生・排出バランスにより形成され，夜間に高くなりやすい眼圧は緑内障発症に関与すると考えられる．眼圧リズムは視交叉上核に制御されているが，その詳細な仕組みは不明なままであった．視交叉上核は主に副腎グルココルチコイド（GC）および交感神経経路により末梢組織の概日時計をリセットすることが知られている．そこで，副腎除去（ADX）または交感神経節である上頚神経節除去（SCGX）を C57BL/6J マウスに施した結果，眼圧リズムは消失しなかった．しかし，両方除去すると主観的夜に上昇する眼圧リズムが消失し，コルチコステロンまたはノルアドレナリンの点眼投与により回復した．これはリズム伝達経路が GC および交感神経系の 2 経路に複線化されていることを示唆する．さらに，β2 アドレナリン受容体, GC 受容体, 時計タンパク質の局在を調べたところ，眼房水を産生する毛様体上皮細胞で強く発現しており，毛様体における時計タンパク質の概日リズムも ADXSCGX では減衰していた．そこで，毛様体時計の関与を網膜・毛様体特異的 Bmal1 ノックアウトマウスを作成して検証したが，眼圧リズムが消失しなかった．これは，眼圧リズムは毛様体時計を介することなく，GC や交感神経に直接制御されることが示唆された．本研究により，視交叉上核による副腎 GC と交感神経による眼圧リズム制御経路を初めて明らかにした．（利益相反　なし）

P-18. Gad1 heterozygotes subjected to prenatal stress undergo epigenetic dysregulation of genes perturbing neurodevelopment and behavior

○Adya Saran Sinha[1], Tianying Wang[1], Hiroki Mutoh[1], Tenpei Akita[1], Yuchio Yanagawa[2], Tomoko Kawai[3], Kenichiro Hata[3], Atsuo Fukuda[1] ([1]Dept Neurophysiol, Hamamatsu Univ Sch Med, [2]Dept Genet Behav Neurosci, Gunma Univ Grad Sch Med, [3]Dept Maternal-Fetal Biol, Natl Res Inst Child Health Dev)

Exposure to prenatal stress (PS) and mutations in *Gad1*, which encodes the GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase (GAD) 67, are both risk factors for psychiatric disorders. Using GAD67-GFP knock-in heterozygous (HT) mice subjected to PS from embryonic day 15.0 to 17.5, we previously reported disruption of GABAergic neurogenesis in the MGE. Postnatally, the density of parvalbumin (PV) -positive GABAergic interneurons was significantly decreased in the medial prefrontal cortex (mPFC) of HT-PS mice, which is a common trait shared by different psychiatric diseases. These results suggested that these two key genetic and environmental susceptibility factors could specifically disturb the proliferation of PV-positive neurons. By contrast, these findings were not observed in wild type offspring. In this study we investigated effects of this gene-environment interaction model on epigenetic programming and consequential behavioral deficits. Our results indicated multiple genes functionally associated with neurogenesis and behavior were hyper- or hypomethylated in HT-PS mice. Some differentially expressed genes detected by high-throughput microarray expression were strongly correlated to their altered epigenetic status as validated by real-time PCR. In addition, we examined the behavioral phenotypes and found that HT-PS mice demonstrated significant deficits in sensorimotor gating, cognitive processes, social engagement. When assessing the underlying developmental alterations in inhibitory network in the mPFC of HT-PS, we found that both spontaneous and evoked inhibitory postsynaptic currents (IPSC) were enhanced. However, significant reduction of miniature (m) IPSC were observed. Furthermore, tonic inhibition was significantly enhanced indicating increased excitability of inhibitory network. Finally, in accordance to reduction of PV-positive neurons, electrocorticogram recording showed decrease in power spectrum density at gamma-frequency range in mPFC of HT-PS mice, indicat-

ing developmental GABAergic dysfunction could underlie the behavioral deficits. These findings may provide new insights into mechanisms of the pathogenesis of psychiatric disorders. (COI: none)

P-19. 低温培養はミクログリアの活性化を制御し神経細胞死を抑制する

○鳥内皐暉[1]，木村友香[1]，垣田博樹[2]，青木啓将[1]，田村哲也[3]，竹下　覚[2]，山田恭聖[2]，青山峰芳[1]（[1]名古屋市立大学・薬学部・病態解析学，[2]愛知医科大学・新生児集中治療部門，[3]名古屋市立大学・医学部・麻酔科学・集中治療医学）

新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）は新生児仮死に伴う脳内の低酸素虚血と再灌流により生じ，脳性麻痺などの重篤な後遺症につながる疾患である．現在，有効性が確認されている治療は低体温療法のみであるが，作用メカニズムは不明瞭である．ミクログリアは脳内の免疫担当細胞で，その活性化状態と脳虚血や神経変性疾患との関連が示唆されているものの，低体温療法の作用機序との関連は未だ不明な点が多い．本研究では，リポポリサッカライド（LPS）によって惹起されるミクログリアの活性化に対する低温培養の影響を検討した．ミクログリア細胞株 BV-2 に LPS 刺激を加えた後，常温群（37℃）と低温群（33.5℃）に分けて培養した．低温群では，LPS によって誘導される炎症性サイトカインおよび iNOS の発現が有意に抑制された．また，NF-κB のリン酸化および核内移行が低温培養により抑制された．続いて，蛍光ビーズを貪食した BV-2 細胞の数が低温培養により減少した．さらに，常温群の BV-2 を初代培養ニューロンと共培養した結果，ニューロンのアポトーシスが増加した．一方で，低温群との共培養ではニューロンのアポトーシスが有意に抑制された．以上の結果から，低温状態は LPS によって惹起されるミクログリアの神経傷害的な活性化を抑制することが示唆された．この知見は，低体温療法のミクログリア活性化制御メカニズムに基づいた，新規脳保護治療の開発につながるものと考えられる．（利益相反　なし）

P-20. miR-126-3p は血管内皮細胞の単球接着性を変化させ動脈硬化の病変形成に関与する

○鳥内皐暉[1]，木村友香[1]，垣田博樹[2]，青木啓将[1]，田村哲也[3]，竹下　覚[2]，山田恭聖[2]，青山峰芳[1]（[1]名古屋市立大学・薬学部・病態解析学分野，[2]愛知医科大学・新生児集中治療部門，[3]名古屋市立大学・医学部・麻酔科学・集中治療医学）

動脈硬化症は，血管壁に沈着した代謝産物による血管内皮細胞傷害に起因し，心筋梗塞や脳梗塞などの生命を脅かす疾患につながる．しかし，初期段階では臨床症状がほとんどなく，早期発見，早期治療が難しいとされる．一方，microRNA（miRNA）は，様々な疾患で発現量が大きく変動し，診断バイオマーカーとして注目されている．また，標的 mRNA の発現を調節することで重要な生理機能を果たす．本研究では，動脈硬化の初期段階において単球と内皮細胞の接着が起こるという点に着目し，動脈硬化促進性サイトカイン IL-6 による病変形成と miRNA の関連について検討を行った．

ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 に IL-6 刺激を加え，miRNA の発現量解析を行うと，hsa-miR-126-3p の発現が減少することが明らかとなった．続いて，IL-6 存在下もしくは hsa-miR-126-3p の阻害条件下の EA.hy926 と蛍光標識したヒト単球細胞株 THP-1 を共培養することにより，内皮―単球接着性の変化を解析した．また，血管内皮細胞における接着分子 ICAM-1 の発現量の解析を行った．その結果，IL-6 刺激，hsa-miR-126-3p の阻害条件下，どちらにおいても内皮―単球接着性，ICAM-1 発現量は有意に増加した．

最後に，hsa-miR-126-3p を過剰発現させた EA.hy926 に IL-6 刺激を行うと，hsa-miR-126-3p を過剰発現させた群では，IL-6 刺激により増加する内皮―単球接着性と ICAM-1 発現誘導が有意に抑制された．

本研究により，IL-6 による内皮―単球接着性の増加は，hsa-miR-126-3p の発現減少によって引き起こされる可能性が示唆された．また，hsa-miR-126-3p が内皮―単球接着性を抑制し，動脈硬化の初期病変の進行を抑える効果をもつことが示唆された．この知見は miRNA をターゲットとした動脈硬化症の新規治療法の開発やバイオマーカーとしての応用につながるものと考えられる．（利益相反　なし）

P-21. NO 作動性神経および内皮由来 NO によるラット膀胱血管の収縮抑制

○三井　烈，田中秀和，橋谷　光（名古屋市立大学大学院医学研究科・細胞生理学）

【背景】Phosphodiesterase type 5（PDE5，cGMP 分解酵素）の抑制剤である tadalafil は膀胱蓄尿障害の治療薬として用いられており，作用機序として膀胱循環改善が考慮されている．本研究では，膀胱壁内外の動脈系における NO を介した収縮抑制に対する tadalafil の作用を検討した．

【方法】ラット膀胱より排尿筋層および上皮組織を除去し，膀胱壁内細動脈を含む粘膜固有層標本を作製した．膀胱栄養動脈を含むシート状標本も作製した．血管壁追跡ビデオシステムを用いて血管径の変化を経時的に記録し，3 分おきに電場刺激（EFS；100 μs，20-25 Hz，2 s）を加えた．

【結果】EFS により，壁内細動脈および栄養動脈で guanethidine 感受性の交感神経性収縮がみられ，この収縮は tadalafil（100nM）により減弱した．壁内細動脈における tadalafil の抑制作用は，nNOS 阻害剤 L-NPA により阻害された．非特異的 NOS 阻害剤 L-NA は，細動脈の持続的収縮を惹起した．栄養動脈における tadalafil の抑制作用は，L-NPA では阻害されず，L-NA により阻害された．いずれの血管の近傍にも nNOS 免疫陽性 NO 作動性神経線維が観察された．

【結論】Tadalafil は，膀胱動脈系における神経および内皮に由来する NO の作用を増強し，交感神経性収縮を抑制することが示唆された．（利益相反　なし）

P-22. グリオーマ幹細胞に対する新たな化学療法パラダイム

○中川結理[1]，杉森道也[1]，早川由美子[2]，田村了以[1]，黒田　敏[2]（[1]富山大学・医学部・生理学，[2]同　医学部・脳神経外科学）

本研究において，我々は，腫瘍再発起源となるグリオーマ幹細胞の集団サイズを定量し，化学療法薬剤の薬理効果を検討するモデル実験系を確立した．そこでは，グリオーマ幹細胞クローンの生存確率と増殖を定量し，クローンあたりの細胞数を頻度分布に表すことができる．本実験系を用いて，代表的抗グリオーマ化学療法薬剤であるテモゾロマイド（TMZ）と TOPK に対する新規抗腫瘍薬 OTS964 について，それぞれの単独投与，および組み合わせ投与（T&O）について検討した．U87 および U251 細胞株由来のグリオーマ幹細胞クローン集団において，TMZ はクローンの増殖を強く抑制し，OTS964 は投与後速やかにクローンの生存確率を低下させ，集団サイズ拡大を抑制した．さらに T&O は，それぞれの単独投与より強く抑制し，集団サイズを縮小させた．TMZ 抵抗性細胞株である T98G においては，TMZ の効果は認められず，T&O は組み合わせ効果による効果増強は認められなかった．そこで，幹細胞増殖抑制効果を有する PI3K に対する LY294002 と OTS 964 の組み合わせ投与（L&O）を行った．LY294002 は，幹細胞クローンの増殖を強く抑制し，L&O においても OTS 964 単独よりも強く，長期にわたり集団サイズ拡大を抑制した．化学療法薬剤の組み合わせ投与を確立し，長期にわたる腫瘍サイズコントロール療法に繋げる．（利益相反　なし）

P-23. PDGFRα signaling is important for the growth of androgen-independent prostate cancer cells

○Md Junayed Nayeem[1], Aya Yamamura[1], Rie Takahashi[1], Hisaki Hayashi[1], Hiroyuki Muramatsu[2,3], Kogenta Nakamura[3], Naoto Sassa[3], Motohiko Sato[1]（[1]Dept Physiol, Aichi Med Univ, [2]Dept Gen Int Med, Jpn Org Occupat Health and Safety Asahi Rosai Hosp, [3]Dept Urol, Aichi Med Univ）

Prostate cancer (PC) is a common malignancy in men. Due to high proliferation, migration, invasion and metastasis rate of prostate cancer cell, it has become a major challenge to treat the PC. Although androgen receptors (ARs) play important roles in PC progression, growth of a metastatic prostate cancer cell line, PC-3 is independent of ARs. The platelet-derived growth factor (PDGF) signaling is closely related with cancer development. However, a role of PDGF receptor (PDGFR) signaling in PC is not well elucidated yet. In this study, we examined a role of PDGFR signaling in PC. PC-3 cells expressed higher level of PDGFRα compared with the normal prostate epithelial cell (PrEC). On the other hand, there was no significant difference on PDGFRβ expression between PC-3 and PrEC cells. PDGFBB stimulated phosphorylation of PDGFRα and downstream molecules including Akt in PC-3 cells, dose dependently. Knockdown of PDGFRα by siRNA effectively reduced PDGFRα mRNA, and inhibited the viability of PC-3 cells. Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor, significantly inhibited the phosphorylation of PDGFRα and Akt. Imatinib also reduced the viability, migration and proliferation of PC-3 cells. These observations suggest that PDGFRα signaling is important for the growth of androgen-independent PC-3 cells. An inhibition of PDGFRα may be a novel therapeutic target to control hormone-refractory prostate cancer. (COI: none)

P-24. 皮膚線維化病巣由来培養線維芽細胞の特徴とナフトキノン誘導体 lapachol の細胞増殖抑制効果の検討

○松井卓哉[1]，塩野裕之[1]，横尾和久[2]，井藤千裕[3]，増渕悟[1]（[1]愛知医科大学・医学部・生理学，[2]同　医学部・形成外科学，[3]名城大学・薬学部）

【背景】慢性炎症疾患の肥厚性瘢痕やケロイドの成因は明らかでなく，また治療も困難である．その病巣の主体を成す線維芽細胞に着目した．

【目的】ケロイド線維化病巣組織由来培養線維芽細胞の特徴を非病巣部位の細胞と比較解析し，その培養細胞に対する *Avicennia rumphiana* Hall. f.のから単離したナフトキノン誘導体 lapachol の薬理効果を検討する．

【結果】非病巣部位由来の線維芽細胞に比べ線維化病巣部

由来の細胞は ^{3}H-thymidine 取り込みの増加，S 期と G2/M 期の細胞の増加，リン酸化 p38MAPK の増加傾向を示した．更に IL-6, GRO-α, PAI-1 などの炎症性因子の放出能も高値を示した．

ナフトキノン誘導体である lapachol を線維化病巣由来培養線維芽細胞に添加すると細胞増殖を容量依存的，時間依存的に抑制した．しかしながら LDH 活性や細胞周期は非添加群と添加郡で有意な違いは無かった．lapachol は I 型コラーゲン（COL1A1）と PAI-1 の mRNA 量と培養上清内の IL-6 と PAI-1 量を低下させた．

【考察】線維化病巣内では，線維芽細胞自体が非病巣部位の細胞に比べて炎症性因子が高い放出レベルの状態であることが線維化の成因の 1 つ考えられた．また lapachol は創傷治癒過程の細胞外マトリックスの過形成を抑え，線維性疾患の予防につながるシード化合物として有用と考えられた．（利益相反　なし）