

O-1. Loss of astrocytic Na-K-Cl cotransporter type 1 hastens seizures promoted by GABAergic excitation of neurons

○Dao Trong Nguyen, Masaru Ishibashi, Miho Watanabe, Adya Saran Sinha, Ruksana Yesmin, Atsuo Fukuda (Dept. - Neurophysiol., Hamamatsu Univ. Sch. Med., Hamamatsu, Japan)

Excitatory action of the main inhibitory neurotransmitter gamma amino butyric acid (GABA) has been investigated in brain slices of patients with temporal lobe epilepsy and in many *in-vitro* seizure-like event models. This is caused by collapse of neuronal Cl^- gradient during intense activation of inhibitory synapses. Astrocyte processes tightly wrap around an inhibitory synapse, enabling astrocytes to regulate synaptic cleft ion concentration. The astrocytic GABA_A receptor activation leads Cl^- efflux. We therefore investigated the function of astrocyte in moderating the excitatory GABA action via spatial Cl^- homeostasis in epilepsy. We used the astrocyte conditional sodium potassium chloride cotransporter type 1 knock-out (astroNKCC1 KO) mice, in which the astrocytic NKCC1 expression is reduced and astrocytic GABA_A mediated Cl^- efflux is reversed. We found that the seizure-like events (SLEs) duration was longer and the stimulation intensity threshold of SLEs was smaller in astroNKCC1 KO hippocampus pyramidal neurons, compared to in wild-type littermates (WT). The bicuculline-sensitive excitatory GABA current was significantly larger in astroNKCC1 KO pyramidal neurons compared to in WT neurons. Consistent with these *in vitro* results, astroNKCC1 KO mice were prone to seizure with *in vivo* pilocarpine induced seizure model. Thus, our findings suggest a protective role of astrocytic NKCC1 in excitatory GABA-mediated seizures. (COI: No)

O-2. 腸管神経系による腸上皮膜バリア機能調節と TTX 耐性電位依存性 Na チャネルの関与

○池谷舞桜, 唐木晋一郎, 鈴木裕一 (静岡県立大学大学院・薬食生命科学総合学府・環境生理学)

腸上皮は栄養素の吸収と有害物の進入防止という相反する機能を実現するバリア機能を有している。本研究では、腸管神経系 (ENS) による腸上皮バリア機能制御について検討するために、粘膜下神経叢を含むマウス小腸粘膜-粘膜下組織標本を Ussing chamber に装着し、ENS を電気刺

激した際の起電性経上皮膜イオン輸送 (短絡電流 Isc) 変化と上皮膜コンダクタンス Gt 変化を測定した。その結果、電気刺激は Isc 上昇と Gt 減少を惹起した。電気刺激による Gt 減少作用の最も大きかった小腸中央部において、その作用機序を検討するために、まず神経遮断薬 TTX (10^{-6}M) の作用を確認したところ、この Isc 上昇を有意に抑制したが、 Gt 減少は有意に抑制しなかった。このことから、TTX 耐性電位依存性 Na チャネル (Nav) 1.5, 1.8, 1.9 を介した神経伝導の関与が示唆されたため、TTX 耐性 Nav を抑制することが報告されている tetracaine (10^{-4}M) と Nav1.5 を抑制することが報告されている lidocaine (10^{-4}M) の効果を検討した結果、電気刺激による Isc 上昇と Gt 減少を共に抑制した。ENS は、腸管内からの有害刺激に対する防御応答として Isc 上昇 (水分分泌) と Gt 減少 (バリア強化) を惹起させていると考え、管腔側に熱耐性エンテロトキシン STb ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$) を投与したところ、小腸中央部において Isc 上昇と Gt 減少を惹起した。これらの結果から、管腔側の毒素を感受した ENS は Nav1.5 発現神経を介して腸液分泌の促進と腸上皮バリアを強化するシグナルを腸上皮に送っている可能性が示唆された。(利益相反 なし)

O-3. THIK-1 チャネルの Gq 共役型受容体依存性活性化における第 4 膜貫通部位の役割

○立山充博^{1,2}, 久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所・神経機能素子研究部門, ²総合研究大学院大学・生理科学)

THIK-1 チャネルは、4 つの膜貫通部位と 2 つのボア領域を有し、2 ボア型カリウム (K2P) チャネルファミリーに属する。我々は、THIK-1 チャネルが Gq 共役型受容体 (Gq-R) により活性化されることを見出したが、活性化機構については不明であった。K2P チャネルでは、第 4 膜貫通部位 (M4) がチャネル機能の制御に重要であるとの報告から、人工光クロスリンクアミノ酸 (4-azido-phenylalanine, AzP) を利用し、Gq-R のチャネル活性化作用における M4 の関与について検討した。先ず、アンバーコドンとこれに対応する tRNA を利用し AzP を M4 の任意の部位に導入した。AzP 導入チャネルを CHO 細胞に発現させホールセルパッチクランプ法により電流記録を行ったところ、チャネル活性および Gq-R 応答が確認された。次に、AzP 導入チャネルに紫外線を照射した後に Gq-R 応答を調べた。その結果、Y273, F276 および I281 に AzP を導入したチャネルでは、紫外線照射後に Gq-R 応答が有意に減弱することが明らかとなった。以上の結果は、AzP が光クロスリンク反応により THIK-1 チャネルの構造を固定化し、Gq-R 依存性構造変化を阻害する部位が M4 に存在することを示唆する。即ち、Gq-R 応答により起こる THIK-1 チャネルの構造変化にお

いて M4 が重要な役割を担うことが示唆された。(利益相反なし)

O-4. 肺動脈平滑筋細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体の発現変動

○山村 彩¹, 中浜光哉², Md Junayed Nayeem¹, Alamgir Hossain¹, 林 寿来¹, 高橋理恵¹, 山村寿男², 佐藤元彦¹ (¹愛知医大・医・生理, ²名古屋市大・院薬・細胞分子薬効解析)

喫煙は癌だけでなく、虚血性心疾患や脳梗塞などの循環器疾患、肺炎や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの呼吸器疾患の原因となる。タバコの煙には 200 種類以上の有害物質が含まれ、定常的な摂取は低酸素状態や炎症を引き起こす。このような応答は、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病態メカニズムに類似している。PAH は、肺血管の不可逆的なリモデリングを特徴とする進行性および致命的な疾患である。肺血管リモデリング (肥厚、線維化、炎症) は、共通して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) の上昇によって起こる。そのため、細胞内 Ca^{2+} シグナルに関連する受容体の一種であるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に注目し、PAH や低酸素ストレス時の発現変化について検討した。正常ヒト (Normal) および特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 患者由来の肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) における nAChR α サブユニットの発現を RT-PCR 法で解析した。Normal 細胞には、nAChR $\alpha 5$ と $\alpha 9$ が発現していた。一方、IPAH 細胞には、nAChR $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ が発現していた。IPAH 細胞においては、nAChR $\alpha 1$ と $\alpha 7$ のタンパク質発現亢進も認められた。また、モノクローリン誘発性肺高血圧症 (MCT) ラット由来の PASMCs においても、nAChR $\alpha 1$ の発現が増加していた。さらに、低酸素曝露 (1% O_2) は、正常細胞の nAChR $\alpha 7$ の発現を増加させた。本研究によって、PAH や低酸素ストレスによって、nAChR $\alpha 1$ や $\alpha 7$ が発現亢進することが明らかになった。これらのサブユニットの発現亢進が、PAH や慢性呼吸器疾患などの病態メカニズムに関与することが推察される。(利益相反なし)

O-5. 可聴域外超音波による骨導刺激が惹起するモルモットの聴性脳幹反応と蝸牛マイクロフォン電位

○小川博史^{1,2}, 堀井和弘¹, 安部 力¹, 森元伊織¹, 任書晃¹ (¹岐阜大学大学院医学系研究科生命原理学講座生理学分野, ²同耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

本研究は～

ヒトの可聴範囲は 20kHz 以下とされるが、骨を介して音が入力されると超音波を聴取できるが、その機構の詳細は不明とされてきた。今回我々は、蝸牛における超音波受容

の可能性を検討するため、in vivo モルモットに対して電気生理学的計測を行った。

はじめに側頭骨に骨導刺激を行い、聴性脳幹反応 (ABR) を計測した。その結果、モルモットの可聴域である 40 kHz 以下の刺激だけでなく、80 kHz 以上の刺激でも ABR 波形が記録された。その閾値は、周波数が高くなるほど上昇した。次に、蝸牛マイクロフォン電位 (CM) を計測した。CM とは、聴覚の一次受容細胞「有毛細胞」の興奮を反映する音刺激に同調する細胞外電位記録である。刺激波形は 127 kHz 130 dB、持続時間が 200 msec の tone burst を用いた。得られた細胞外電位変化に対して周波数解析を行うと、3 つの周波数に信号のピークを認めた。それぞれの信号と刺激波形の関係を検討すると、202.85 kHz と 245.85 kHz では同期せず、刺激周波数と同じ 127 kHz でのみ同期していた。すなわち、127 kHz の信号が CM と考えられ、超音波を受容する有毛細胞の存在が強く示唆された。刺激圧力を増加させると、CM 振幅も増加したが、その入出力関係は「非線形」であった。また、無酸素負荷後の値との比較から、CM が好気性代謝に立脚して増幅されることも確認された。(利益相反なし)

O-6. The role of axon initial segment in neuronal output of avian cochlear nucleus

Sristy Halder, Rei Yamada, Ryo Egawa, Hiroshi Kuba (Cell Physiology・Graduate School of Medicine・Nagoya University)

The axon initial segment is a specialized neuronal compartment that is responsible for initiation of action potentials (APs). This highly excitable nature of the AIS owes primarily to its smaller diameter, segregation from the soma, and accumulation of voltage-gated Na^+ (Na_v) channels. Structural and biophysical features of the AIS are finely tuned in individual neurons and can be modulated by neural activity. However, it is not experimentally addressed whether the specialized AIS structure is a prerequisite for AP initiation, or it is required for the fidelity of neuronal firing. To answer this question, we focused on the AIS of neurons in avian nucleus magnocellularis (NM), a homologue of mammalian anteroventral cochlear nucleus. Neurons in NM generate precisely timed APs in response to synaptic inputs from the auditory nerve. To evaluate how the AIS contribute to the spike generation in NM neurons, we perturbed the AIS structure by CRISPR-Cas9 system to knock out ankyrinG, which is a key molecule in the structure of the AIS and examined the effect

by immunohistochemistry and patch clamp recording. The results demonstrated that disruption of ankyrinG prevented the accumulation of Na_v channels at the AIS and resulted in dispersion of the channels along the axon. Surprisingly, this axon still could generate action potentials but with impaired excitability and could not follow a high-frequency stimulus train. This study implied that the specialized AIS structure with high-density Na_v channels is not prerequisite for AP initiation but rather responsible for maintaining precise and reliable AP generation during the processing of ongoing auditory signals. (COI: No)

O-7. 運動に伴い感覚を調節するボトムアップ/トップダウン神経回路機構

○河谷昌泰^{1,2}, 山下貴之¹ (¹藤田医科大学・医学部・生理学, ²名古屋大学・医学系研究科・機能組織学)

感覚は運動により様々な修飾を受ける。マウス大脳皮質一次体性感覚野洞毛領域 (wS1) では洞毛の自発運動 (whisking) に伴い神経活動が変化し感覚応答を調節することが知られている。しかしこれを可能にする神経回路機構の詳細は明らかになっていない。我々はシリコンプローブによる神経活動記録と光遺伝学を用いることで、他の脳領域から wS1 への入力を抑制し whisking に伴う wS1 神経活動に対する影響を検証した。wS1 にはよく知られた入力として、視床 (Thal) からのボトムアップの入力、一次運動野 (wM1) や二次感覚野 (wS2) からのトップダウンの入力が存在する。そこで Thal, wM1, wS2 のそれぞれの領域に対し AAV を用いて抑制型の GPCR オプシンである eOPN3 を発現させ wS1 に光照射することで、wS1 における神経終末のみ選択的に抑制を行った。wS1 の神経活動は whisking に伴って 3-5 割の細胞で発火頻度が減少し、1-2 割の細胞では発火頻度の増加がみられた。また、深層では浅層に比べ発火頻度が増加するユニットが多く存在した。wM1→wS1 の光抑制を行ったところ whisking に伴う神経活動に変化は見られなかった。一方、Thal→wS1 では浅層の細胞で自発発火頻度が上昇し、whisking に伴う発火頻度の減少が抑制された。また、wS2→wS1 の抑制では、自発発火に対して影響は見られなかったが、whisking に伴う発火頻度の減少/増加が抑制された。以上より、whisking に伴う神経活動の変化には高次感覚野からの入力が重要である可能性が示唆された。(利益相反 なし)

O-8. オリゴデンドロサイトは活動電位の伝導を同期化し運動学習の成立に関与する

○杉尾翔太¹, 加藤大輔¹, 和氣弘明^{1,2} (¹名古屋大学・

大学院医学系研究科・分子細胞学, ²自然科学研究機構・生理学研究所・多細胞回路動態研究部門)

オリゴデンドロサイト (OC) は中枢神経系において髄鞘を形成するグリア細胞である。近年、OC が学習や記憶の形成の過程で生じる神経活動の変化を感知し、髄鞘に可逆的な形態・機能変化が生じることで、特定の脳領域の活動電位の伝導を時空間的に制御することが提唱されてきている。しかしながら、神経活動に依存した髄鞘の変化が活動電位の伝導にどのような影響を及ぼすのか、また運動学習や記憶の形成に重要であるかは明らかになっていない。

本研究では、運動学習に関連する視床運動核—大脳皮質運動野の神経回路に着目し、視床運動核の神経細胞にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させたマウスを用いて運動学習の成立する前後での活動電位の伝導を計測した。ChR2 活性化のためのブルーライトを大脳皮質運動野の脳表に設置し、ChR2 によって誘発されたスパイク電位を視床運動核に刺入したマルチユニット電極で記録し、活動電位の伝導性を評価した。各ユニットのスパイク電位の到達する時間分散を算出した結果、運動学習の成立後にスパイク電位の時間分散が優位に低下することを見出した。また、OC に Gi-DREADD を発現したマウスを作成し、運動学習課題を与える間に OC を機能抑制するとスパイク電位の時間分散の低下が認められず、運動学習の習得が損なわれる結果が得られた。以上の結果から、OC による活動電位の伝導制御が運動学習の成立に重要であることが示唆された。(利益相反 なし)

O-9. Acylglycerol acyl transferase mediates thermal preference via changes in gene expression of ionotropic receptors in *Drosophila* larvae

○Xiangmei Deng^{1,2,3}, 水藤拓人^{2,3}, 曾我部隆彰^{1,2,3} (¹総合研究大学院大学・生理科学専攻, ²生理学研究所・細胞生理研究部門, ³生命創成探究センター (ExCELLS)・温度生物学研究グループ)

Thermotaxis is an important physiological function for seeking an optimal range in a thermal landscape. In *Drosophila melanogaster* larvae, ionotropic receptor (Ir) genes expressed in dorsal organ cool cells (DOCCs) are involved in thermotactic behaviors. These genes mediate cool temperature sensation in the DOCCs, and the defect leads to an accumulation of larvae in an abnormal cool range. Recent studies showed that fatty acid composition and lipid metabolism in the plasma membrane affected temperature preference in *Drosophila*, however, the physiological importance of the lipids and its functional correlation with

the sensory molecules have not been clarified.

To seek novel functions of lipids and their regulatory enzymes in the temperature preference, we selected candidate genes involved in fatty acid metabolic pathways and tested them in larval thermotaxis. Here, we report that multiple genes encoding acylglycerol acyl transferase (AGAT) regulate thermotactic behaviors in larvae. Compared with control that prefers 24°C, AGAT-2 and AGAT-3 KO larvae migrated toward cooler region (~21°C) in a temperature gradient assay and did not discriminate 20°C and 24°C in a two-way choice assay. Knocking down these genes in the DOCCs also led to the same thermotactic phenotype. We observed a reduced cool response in the DOCCs when AGAT genes were knocked out in those sensory neurons, and such reduction could be caused by disturbances in the expression level of several Irs involved in temperature sensation.

Our findings provide a line of evidence for the physiological importance of lipid metabolic enzymes in the thermotaxis of animals. (COI: No)

O-10. マウスの日内休眠時における低温ショックタンパク質遺伝子の冬眠様選択的スプライシング

○高橋愛佳¹, 白石茂菜実¹, 堀井有希², 宮脇慎吾³, 椎名貴彦¹, 志水泰武¹ (¹岐阜大学・応用生物科学部・獣医生理学研究室, ²同 糖鎖生命コア研究所・研究基盤部門, ³同 応用生物科学部・獣医外科学研究室)

【背景と目的】低温ショックタンパク質は低温により誘導され、細胞保護作用を担う。私たちは、冬眠動物であるハムスターにおいて、低温ショックタンパク質の一つである Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子で冬眠時に特徴的な選択的スプライシングが起こることを明らかにしてきた。本研究では、マウスが自発的に体温を低下させる日内休眠に着目し、日内休眠に伴う CIRP 遺伝子の発現様式と、その役割について明らかにすることを目的とした。【方法】C57BL/6J 系の野生型マウスおよび CIRP 遺伝子のスプライス部位を編集した CIRP 遺伝子編集マウスにおいて、絶食により日内休眠を誘導した。臓器における CIRP mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。【結果】野生型マウスにおいて、絶食により日内休眠が誘導された。また、脳および心臓で冬眠様の選択的スプライシング変化が引き起こされた。一方、遺伝子編集マウスでは、冬眠様の選択的スプライシング変化は誘導されなかったものの、日内休眠は引き起こされた。【考察】数時間の軽度な低体温を呈する日内休眠においても冬眠時と同様のスプライシン

グ変化は起こることが示された。冬眠様スプライシング変化の起こらない遺伝子編集マウスにおいても日内休眠が誘導されたことから、CIRP 遺伝子の選択的スプライシングの冬眠様変化は日内休眠の導入に必須ではないことが示された。(利益相反 なし)

O-11. 体温調節行動に関する温度感覚神経路の探索

○八尋貴樹, 中村和弘 (名古屋大学大学院医学系研究科統合生理学)

行動性体温調節は寒冷や暑熱からの逃避などの行動を通じた体温調節機構であり、その中枢神経機序は不明な点が多い。これまでに我々は、脳の橋にある外側腕傍核 (LPB) を介した皮膚温度情報の上行性伝達が体温調節行動に必須であることを明らかにした。今回、体温調節行動に必要な温度感覚情報を伝達する LPB から前脳への神経路を探索した。

まず、LPB から扁桃体中心核 (CeA) へ投射する LPB→CeA 神経細胞群の中に、寒冷曝露と暑熱曝露でそれぞれ活性化するサブグループがあることを見出した。LPB には、体温調節中枢である視索前野 (POA) へ冷覚と温覚を入力する LPB→POA 神経細胞群も存在するため、LPB→POA と LPB→CeA 神経細胞群がそれぞれどのように行動性体温調節に関与するかを調べた。順行性と逆行性のアデノ随伴ウイルスを用いて LPB→POA または LPB→CeA 神経細胞群に破傷風毒素軽鎖を発現させ、それぞれの伝達を抑制した。温度選択行動を検証する行動解析を行うと、LPB→POA 神経細胞群を抑制したラットは寒冷逃避ができたが、暑熱逃避行動が減弱した。一方で LPB→CeA 神経細胞群を抑制したラットでは寒冷・暑熱逃避行動の両方が減弱した。現在、化学遺伝学と光遺伝学技術を用いて投射先の神経末端での神経伝達を抑制することによって、体温調節行動におけるこれらの神経路の役割をより厳密に検証している。(利益相反 なし)

O-12. 覚醒ラットのアナフィラキシー低血圧時の体温低下に対する低血圧と化学伝達物質の役割について

○芝本利重, 九田裕一, 谷田 守, 津元国親, 倉田康孝 (金沢医科大学・医学部・第二生理学講座)

本研究はラットアナフィラキシー低血圧時の体温低下に対する低血圧の関与について、同程度に血圧を低下させる一酸化窒素放出剤 sodium nitroprusside (SNP) と血管拡張剤 nicardipine (NCP) の反応を比較検討した。さらに、化学伝達物質の関与も検討した。実験は無麻酔ラットにおいて血圧と体温を測定した。体温は体表温度 (SBT) をサーモグラフィーを用いて、深部温度 (CBT) を腹腔内留置の

nano-tag により測定した。感作ラットでは卵白アルブミン抗原の静注により体血圧は115mmHgから7分後に53mmHgに低下した。SBTとCBTは、それぞれ35分と30分に1.6℃と1.9℃低下した。また、体温はSNPでは低下し、NCPでは変化なかった。化学伝達物質の検討では、血小板活性化因子とヒスタミンH1受容体の阻害が血圧と体温の低下を大きく抑制した。以上より、ラットアナフィラキシー時の体温低下には血圧低下の関与はなく、血小板活性化因子とヒスタミンが関与していることが示唆された。(利益相反 なし)

P-1. 誘発電位記録システムの自作とその有用性評価

○小熊裕太郎, 田村了以(富山大学・学術研究部医学系・統合神経科学)

電気刺激による誘発電位記録は汎用的な生理学的実験法の一つである。誘発電位記録実験ではしばしば、刺激の強度、持続時間、頻度などの各種パラメータを、柔軟かつ速やかに変えることが求められる。そこで今回我々は、遠隔でこれらパラメータを柔軟に設定することが可能な誘発電位記録システムを開発し、その有用性を評価した。

本システムは、刺激部(電気刺激装置とアイソレータ)、記録部(増幅器)および制御部(PICマイコン, Bluetoothおよびタブレット)からなる。刺激部とタブレット本体は既製品を用いたが、記録部と制御部の大部分は自作した。androidアプリケーションからBluetoothを介しPICマイコンを制御し、刺激は目的とする刺激パラメータを持つDA出力(12bit, 10kHz)を刺激装置のmodulation入力に入れることにより行った。また誘発電位は、ローカットフィルタ後に計装アンプで増幅し(100倍)、AD変換(12bit, 20kHz)後にタブレットへと送信して表示・保存した。

有用性評価として、まずヒト(1名)で正中神経を刺激し(強度: 20~32Vの範囲で漸増, 持続: 1ms, 頻度: 1Hz), 母指球筋から漸増性の表面筋電図が記録されることを確認した。次にラット(1匹)で、海馬歯状回に記録電極、貫通路に刺激電極を置き、単発刺激(頻度: 1Hz)の強度または持続を漸増させ(それぞれ、強度: 4~220μA, 持続: 1ms, または、強度: 60μA, 持続: 0.1~1.5ms), それに伴って漸増性の誘発電位が起きることを確認した。(利益相反なし)

P-2. QPRTの欠損はキノリン酸によるドーパミン作動性神経系における酸化ストレスを増強し、運動・認知機能障害を惹起する

○毛利彰宏^{1,5}, 新島 萌¹, 國澤和生¹, 高野一輝², 山田雅之², 窪田悠力¹, 平川茉実¹, 森 優子¹, 山本康

子³, 藤垣英嗣³, 齋藤邦明^{3,5}, 鍋島俊隆^{4,5} (1藤田医科大学・大学院保健学研究科・レギュラトリーサイエンス分野, 2藤田医科大学大学院保健学研究科分子イメージング学分野, 3同 先進診断システム開発分野, 4同 先進診断システム探索部門, 5NPO法人医薬品適正使用推進機構)

キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(QPRT)はキノリン酸を代謝し、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド(NAD+)のde novo生合成を行う律速酵素である。キノリン酸は脳内においてNMDA受容体アゴニスト作用を有し、興奮毒として神経変性疾患に関与することが報告されている。中枢神経系におけるQPRTの生理学的役割を明らかにすべく、本研究ではQPRT遺伝子ノックアウト(KO)マウスの学習、情動および運動機能を行動評価し、それに関連した神経化学的解析を行った。QPRT KOマウスにおいて、運動機能の低下と共に学習機能の低下が認められた。ガラス玉覆い隠し試験におけるガラス玉覆い隠し数の低下以外に情動機能には顕著な変化は認められなかった。QPRT KOマウスの前頭前皮質、側坐核、線条体においてドーパミンおよびその代謝物量の低下が認められたが、ノルアドレナリンやセロトニンおよびそれら代謝物量に顕著な変化は認められなかった。さらに、QPRT KOマウスではドーパミン受容体作動薬による運動量増加、その拮抗薬によるカタレプシーの増悪から、ポストシナプスにおけるドーパミンD1およびD2受容体を介した運動障害が示唆された。メチルフェニデートの投与はQPRT KOマウスの行動障害を緩解した。QPRT KOマウスの脳内において、NMDA受容体を介したカルパイン活性化、Cdk5活性化サブユニットp35のp25へと限定分解によるタウのリン酸化および酸化ストレスの亢進が認められた。QPRT欠損によりキノリン酸が増加し、NMDA受容体を介したカルシウムシグナルによるカルパインの活性化→タウのリン酸化・酸化ストレスが亢進した結果、ドーパミン作動性神経系の機能に障害が生じ、運動・認知機能障害が惹起されることが示唆された。(利益相反 なし)

P-3. レバミピドは大腸杯細胞の増殖を促し、社会的隔離ストレスによる行動異常を緩解する

○國澤和生¹, 田辺萌夏¹, 齋藤いまり¹, 小菅愛加¹, 河合智貴¹, 窪田悠力¹, 齋藤邦明^{2,4}, 鍋島俊隆^{3,4}, 毛利彰宏^{1,4} (1藤田医科大学・大学院保健学研究科・レギュラトリーサイエンス分野, 2藤田医科大学大学院保健学研究科先進診断システム開発分野, 3同 先進診断システム探索部門, 4NPO法人医薬品適正使用推進機構)

幼若期におけるネグレクトなどの虐待はうつ病や統合失調症等の精神疾患のリスク要因となるが、その発症機構は

未だ解明されていない。近年、精神疾患の発症に脳腸相関が関与することが提唱されている。本研究では、幼若期での社会的隔離ストレスにより惹起される行動異常に腸内細菌叢の変容と共に大腸機能の変化が関与するか検討した。3 週齢の C57BL/6J マウスに 4 週間の社会的隔離ストレスを負荷後、認知・情動機能を評価する行動試験（社会性行動試験、強制水泳試験、物体位置認知試験など）を実施した結果、社会的隔離ストレスは海馬ミクログリアを活性化し、社会性低下および無動時間延長などのうつ様行動及び空間認知機能障害を惹起した。また、ストレスにより大腸粘液成分であるムチンを産生する大腸杯細胞数の有意な減少及び、ムチンを栄養源とする *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) が著しく減少した。一方、大腸杯細胞の増殖を促すレバミピドを社会的隔離ストレス負荷期間に投与すると、ストレス負荷による空間認知機能障害は認められなくなった。よって、社会的隔離ストレスにより誘発される行動異常に大腸杯細胞の減少に伴う *A. muciniphila* の低下が関与する可能性が示唆された。加えて、レバミピドが精神疾患の発症リスクを抑制する可能性が示唆された。（利益相反 なし）

P-4. エクソーム解析による筋損傷・筋疾患の原因となる新たな遺伝子変異の同定

○伊藤祐太郎^{1,2}, 常陸圭介¹, 土田邦博¹ (¹藤田医科大学・医学研究センター・難病治療, ²同・医学部・医学科)

【背景】骨格筋は、運動や姿勢の維持に必要な重要な器官である。骨格筋のサイズは通常は一定に保たれているが運動により肥大し、老化・疾患・外傷・不動によって萎縮する。我々は C57BL/6J マウス系統を用いて筋機能を解析する過程で、通常よりも筋量が増加したマウスを発見した。本研究ではゲノム解析の手法により、このマウスの骨格筋が肥大した原因についての解明をおこなった。

【方法】筋肥大したマウスからゲノム DNA を単離し、筋肥大を示さない兄弟間での比較エクソーム解析を行うことで、筋肥大に関連した変異が導入された箇所の特定を試みた。また筋肥大を示したマウスの前脛骨筋を単離し、筋組織の解析を行なった。

【結果】比較エクソーム解析から得られたデータから、既知の変異やタンパク質機能に影響を及ぼさない変異を目視で除外した結果、筋肥大を呈したマウスでは *Pdzn4* 遺伝子の最終エクソンに 1571C>A の変異 (Thr524>Asn) が存在することを発見した。この変異を有するマウス同士を交配することでホモ変異を有するマウスを得て筋組織の解析を行なったが、筋量の増加は認められなかった。そこで

次に、エクソーム解析データを用いてコピー数解析を行なった。その結果、筋肥大を呈するマウスでは *Naip6* 遺伝子座が欠失している (Chr13: 100283391-100316666 の欠損) ことが明らかとなった。現在、*Naip6* 遺伝子座を欠失したマウスで筋肥大が観察されるかについて解析を進行させている。

【考察】当初の予想とは異なり、発見した筋肥大を呈するマウスの筋組織では筋再生の促進が観察されており、筋損傷が生じたことで一時的な筋肥大サイクルが観察された可能性が示唆された。これまでの解析では既知の筋損傷や筋疾患に関わる遺伝子変異は同定されておらず、本研究により筋損傷や筋疾患に関わる新たな変異・欠損を明らかにすることができると考えられる。（利益相反 なし）

P-5. メラノコルチン受容体発現神経細胞の形態変容と肥満発症の関連機構

○大屋愛実, 中村和弘 (名古屋大学大学院・医学系研究科・統合生理学)

恒温動物は外部の温度環境に適応するために代謝熱産生量を調節し、温熱恒常性を維持する。この代謝型熱産生量は発達や加齢に伴い変化するが、その調節メカニズムは未だ不明である。特に、加齢に伴う代謝熱産生量の低下は、加齢性肥満の発症につながると考えられるため、調節メカニズムの解明は重要な課題である。

代謝熱産生機構の一つとして、褐色脂肪組織における非ふるえ熱産生が挙げられる。これまでの研究で、褐色脂肪熱産生を制御する視床下部背内側部に 4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) mRNA が発現することが分かっている。MC4R は視床下部において摂食および代謝を制御し、MC4R 欠損マウスは著しい肥満を呈するが、野生型と比較して食欲の亢進し、代謝量が低いことが知られている。

そこで我々は、視床下部に発現する MC4R が発達や加齢によってどのように変化するかを調べることにした。独自に作製した抗 MC4R 抗体を用いて免疫組織染色を行うと、MC4R が視床下部の背内側部と室傍核の神経細胞の特定の細胞内構造に強く局在することを見出した。さらに、MC4R 陽性の細胞内構造の形態が発達や加齢と共に変容した。今回の発表では、MC4R 遺伝子プロモーター下で Cre を発現する遺伝子改変動物とアデノ随伴ウイルスを用いて人為的に MC4R 発現神経細胞の構造形態を変化させて得られた、最新の知見を発表する。（利益相反 なし）

P-6. 運動による転写制御機構の解明

○榊原伊織¹, 福島 拓^{1,2}, 藤岡大樹¹, 増渕 悟¹ (愛知医科大学・医学部・生理学講座, ²徳島大学大学院・医

歯薬学研究所・生体栄養学分野)

高齢社会の現在、全身の筋力低下（サルコペニア）は重要な課題である。運動はサルコペニアの予防作用を有しており、運動の骨格筋への作用機構を分子レベルで解明することは新しいサルコペニアの予防・治療薬の開発につながるため、非常に有意義である。運動による骨格筋の転写制御には、1 回の運動による一過性の転写誘導と継続的な運動による持続する転写変化に分けることができる。継続的な運動トレーニングによって引き起こされた骨格筋の形質変化は、運動刺激を取り去っても、しばらくの間維持されることから、エピゲノムの改変による転写制御機構の存在が示唆される。エピゲノムは、エピゲノム修飾酵素によって制御されるため、運動によって制御されるエピゲノム修飾酵素を同定することが重要である。そこで、運動時の骨格筋におけるリン酸化プロテオミクス解析により脱リン酸化制御を受けるエピゲノム修飾酵素 PHF2 を同定した。続いて、Phf2 の機能を解析するために、C2C12 細胞株に対してアドレナリン刺激と電気刺激を用いて *in vitro* の運動モデルを構築した。CRISPR/Cas9 により Phf2 を欠損した C2C12 細胞株を作製し、*in vitro* 運動モデルを用いて解析したところ、Phf2 を欠損することで電気刺激誘導性の骨格筋ファイバタイプ変化が起こらなくなるを見出した。（利益相反 なし）

P-7. 自己増幅型 RNA を用いた新規遺伝子治療法の開発研究

○家崎高志、佐藤元彦（愛知医科大学・医学部・生理学）

【背景】遺伝性疾患は染色体や遺伝子の変異により発症する病気である。近年、ゲノム解析や遺伝子編集技術により、遺伝性疾患の原因遺伝子の特定や遺伝子治療法の開発が進んでいる。

しかしながら、遺伝子編集技術による遺伝性疾患の治療は、倫理的な問題点からヒトへ適用するのは難しいのが現状である。また、遺伝子編集技術を体組織に導入する方法としてはウイルスベクターを用いた方法が現在の主流となっているが、人体に遺伝子治療用のウイルスを導入する手法は未だ危険性が高いことが問題となっている。

そこで本研究では、より安全性の高い遺伝子治療法の開発を目指すために、自己増幅型 RNA (saRNA) を用いて、遺伝性疾患の治療法開発を検討した。

【方法】本研究では、指定難病の一つである遺伝性疾患の進行性骨化性線維異形成症 (FOP) をターゲットとして saRNA の効果を検討した。

FOP の原因変異である ACVR1^{R206H} 変異遺伝子を発現さ

せるレトロウイルスベクターを HEK293GP 細胞に生産させた。ウイルスを筋芽細胞株 C2C12 細胞に感染させ ACVR1^{R206H} 発現筋芽細胞株を作製した。ACVR1^{R206H} 発現を抑制する TALE-TF を導入した saRNA をトランスフェクションした後、作製した細胞株を軟骨細胞へ分化培養し、筋芽細胞が軟骨細胞へ分化した程度をアルカリホスファターゼ (ALP) 染色により検討した。

【結果】ACVR1^{R206H} 変異遺伝子発現により ALP 染色強度が増加していた。一方で、TALE-TF 導入した saRNA をトランスフェクションした群では ACVR1^{R206H} 変異遺伝子発現による ALP 染色増加が抑えられていた。

【考察】以上の結果から、saRNA による ACVR1^{R206H} 発現抑制は、FOP における筋芽細胞の軟骨細胞分化を抑制することが示唆された。本検討は saRNA を用いた新規遺伝子治療法の開発に繋がることが期待される。（利益相反 なし）

P-8. カワラケツメイ由来フラボノイドによるメラニン産生抑制効果

○高橋寿明^{1,2}、大和由乃¹、高橋達雄^{1,2}、鈴木宏一^{2,3}、川田幸雄³、三浦雅一^{1,2}（¹北陸大学・薬学部・薬学臨床系、²同 健康長寿総合研究グループ、³同 薬学部・医薬品化学系）

皮膚が紫外線を浴びると、表皮細胞はメラノサイトが産生したメラニンを取り込み、「傘」のように利用することで紫外線から皮膚を守ろうとする。通常、皮膚の新陳代謝に伴ってメラニンは排出されるが、炎症が強すぎたり、加齢などで代謝機能が低下したりすると、メラニンが排出しきれず、しみやそばかすの原因となる。我々は、北陸地方に自生するカワラケツメイから抽出したフラボノイド (KF) が、強い抗酸化作用を有することを明らかにしている。メラニンは、チロシナーゼによるチロシンの酸化を経て産生されることから、今回、抗酸化作用を有する KF のメラニン産生抑制効果について検討した。

マウスメラノーマ B16F10 細胞は、メラニン刺激ホルモン (αMSH) の刺激によりメラニン産生が亢進する。B16 F10 細胞を KF 存在下で αMSH 刺激したところ、KF は細胞内メラニン量を濃度依存的に抑制し、チロシナーゼ阻害活性も示した。しかしながらチロシナーゼ阻害の IC₅₀ は高濃度であり、抗酸化作用以外の機序がメラニン産生抑制に大きく関与している可能性が考えられた。そこで、チロシナーゼ遺伝子の転写因子である MITF の発現を調べたところ、KF は MITF の mRNA およびタンパク発現を濃度依存的に抑制していることが明らかとなった。

以上の結果より、KF は抗酸化作用によるチロシナーゼ

活性の阻害に加え、MITF の発現抑制を介したチロシナーゼ発現の抑制により、メラニン産生を強く抑制していることが明らかとなった。(利益相反 なし)

P-9. 新生仔低酸素虚血性白質障害：オリゴデンドロサイト前駆細胞移植に対する免疫抑制剤の併用が移植後の生存・分化に与える影響

○田尻直輝¹, 小川紫野^{1,2}, 富永 栞¹, 上野新也¹, 清水健史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 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 モデルの新生仔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、行動学的改善が得られることを確認した。本研究では、NWMI モデルラットに対して、移植 OPC の生存細胞増加を目的とし、免疫抑制剤 (サイクロスポリン) による投与でさらなる運動機能の改善に繋がるかどうか、移植した OPC が脳内で、生存・分化・成熟するかどうかを検証した。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 (2.0×10^5 cells/ 2μ l) 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+免疫抑制剤投与群の両者間では 4 週と 8 週目において、Hindlimb retraction, Beam walking, Elevated body swing test, Rotarod test の運動機能評価において有意な行動学的改善は認められなかった。しかし、免疫抑制剤投与群では、非投与群と比較して、Olig 2/GFP 陽性細胞が脳梁や運動皮質領域において 8 週目でも有意に生着・生存が確認された。また、免疫抑制剤投与群で CC1/GFP 陽性細胞数が、4 週目において増加傾向にあり、移植した OPC が分化・成熟していることが観察された。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、運動機能の改善と移植 OPC の生存と分化の促進に寄与することが示唆された。(利益相反 なし)

P-10. 脳出血後の麻痺側集中使用による機能回復における小脳一赤核路の関与

○上野新也¹, 清水健史¹, 小林憲太², 田尻直輝¹, 飛田秀樹¹ (¹名古屋市立大学・医学部・脳神経生理学, ²生理

研・ウィルスベクター開発室)

【目的】脳内出血後の麻痺側上肢集中使用により麻痺肢運動機能が改善し、この機能回復に皮質一赤核路が関与する (J Neurosci 36: 455-67, 2016)。しかし、この上肢運動機能回復に伴う運動調節系の変化は未だ不明である。小脳外側核から赤核小細胞部への出力系に着目し、DREADD 法によりこの経路を神経遮断することで上肢運動機能に及ぼす調節系の役割を検討した。

【方法】AAV-DJ-EF1a-DIO-hM4D (Gi)-mCherry を小脳外側核に、FuG-E-MSCV-Cre を赤核小細胞部にそれぞれ感染させることで、小脳外側核一赤核路の遮断を可能とした。その後に脳内出血モデルを作製し、出血 1-8 日後に正常側上肢をギプスで固定し、麻痺側上肢の集中使用を行わせた。上肢運動機能は出血 28 日後までリーチング試験で評価し、DeepLabCut を用い詳細な上肢機能の解析を実施した。

【結果】麻痺側上肢集中使用群では非使用群に比べ、リーチング試験の成功率が向上し、clozapine-N-oxide (CNO) で小脳外側核一赤核路を遮断すると、その成功率は有意に低下した。更に、同神経経路の遮断効果は電気生理学的にも確認された。また、非脳内出血群では CNO を投与しても影響は認められなかった。

【結論】上肢集中使用による障害運動機能の改善に、小脳外側核一赤核小細胞部の運動調節系回路が関与することが明らかになった。(利益相反 なし)

P-11. ラット脳出血後の前肢伸長運動は小脳オリゴデンドロサイト新生を促し、運動機能回復を促進する

○清水健史, 上野新也, 飛田秀樹 (名古屋市立大学・医学研究科・脳神経生理学)

脳内出血 (ICH) モデルラットに対しリハビリテーション (前肢強制使用) を行くと、皮質一脊髄路から皮質一赤核路への代償が誘導され、運動機能の回復が促進することを報告した。しかし、ICH 後のリハビリテーションによって運動調節系の小脳での動的な適応変化が惹起されるか否かは明らかでない。近年、オリゴデンドロサイト (OL) リモデリングが運動学習に関与し、また神経活動の亢進が髄鞘形成を調節していることが示されている。本研究では、OL リモデリングの観点から小脳の運動調節系の適応変化に着目し、前肢伸長運動による ICH 後リハビリテーションが小脳 OL に影響を与えるかどうかを検討した。

ICH モデルラットに対し前肢の伸長運動のリハビリテーションを ICH の 1~8 日後まで行わせると、前肢運動機能の回復が促進されることが示された。また、前肢伸長運動の実施群における小脳核では、OL 新生および CC1 陽性の成熟 OL が増加していることを見出した。一方で、小脳

における OL 分化・新生を阻害剤の脳内投与により抑制すると、前肢伸長運動による運動回復効果が減弱することが分かった。

これらの結果から、損傷した神経機能をリハビリテーションによって再構築する過程で、OL リモデリングが運動機能回復に作用したと考えられる。(利益相反 なし)

P-12. WNK3 kinase maintains neuronal excitability by regulating trafficking of KCC2 and inward rectifying K⁺ channels in layer V pyramidal neurons

○Adya Saran Sinha¹, Tianying Wang¹, Miho Watanabe¹, Eisei Sohara², Tenpei Akita¹, Shinichi Uchida², Atsuo Fukuda¹ (¹Dept. Neurophysiol., Hamamatsu Univ. Sch. Med., Hamamatsu, Japan, ²Department of Nephrology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan)

The with-no-lysine (WNK) family of serine-threonine kinases and its downstream kinases of STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress responsive kinase-1 (OSR1) regulate intracellular Cl⁻ homeostasis through phosphorylation of cation-Cl⁻ cotransporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 and K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2. WNK3 is expressed initially in fetal brain followed by a reduction after birth. Subsequently, their mRNA levels increase peaking at postnatal day 21 (P21). Here, using a constitutive WNK3 knockout (KO) mice, we investigated the role of WNK3 in regulation of the intracellular Cl⁻ concentration [Cl⁻]_i and excitability of layer V pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex (mPFC). Gramicidin-perforated patch-clamp recordings in neurons from acute slice preparation at P21 showed depolarized reversal potential for GABA_A receptor-mediated currents in KO neurons than wildtype (WT) neurons. However, phosphorylation levels of SPAK/OSR1 and those of NKCC1 and WNK1 did not significantly differ between KO and WT mice. In addition, total KCC2 expression levels were unchanged. Meanwhile, the resting membrane potential (RMP) of neurons was more hyperpolarized in KO mice. These effects were confirmed to be due to an increased inwardly rectifying K⁺ conductance in KO neurons mediated by classical inwardly rectifying (Kir) channels. Introduction of kinase active WNK3 fragment into the recorded neurons reversed these changes indicating phosphorylation dependent regulation of IRK currents. To confirm if KCC2 functional changes could explain both

the depolarized E_{GABA} and increased IRK conductance, WNK3 KO neurons were treated with KCC2 activator drug CLP 290. The increase of IRK currents in KO neurons were reversed by enhancement of KCC2 membrane stability following CLP 290 treatment and current amplitudes were observed to be similar to WT neurons. (COI: No)

P-13. ラットにおけるプリン作動性食道運動制御に対するカリウムチャネルの関与

○椎名貴彦^{1,2}, 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・共同獣医学研究科)

【背景と目的】食道筋層は、横紋筋および平滑筋から構成される。横紋筋は主にコリン作動性、平滑筋はコリン作動性に加えて、非コリン作動性の調節を受けている。ATP は、代表的な非コリン作動性の細胞外情報伝達物質であり、細胞膜上のプリン受容体を介して、血管や消化管などの平滑筋運動を調節することが知られている。本研究では、プリン作動性食道運動制御に対するカリウムチャネルの関与を検討した。【方法】ラット摘出食道標本をオルガンバスにセットし、張力トランスデューサーを用いて縦走方向の機械的反応を記録した。RT-PCR により、食道組織におけるカリウムチャネルの発現を調べた。【結果と考察】ラット食道標本にカルバコールを投与したところ、食道粘膜筋板平滑筋は収縮した。ATP を外部適用すると、平滑筋は弛緩した。この弛緩反応は、プリン受容体に対する阻害薬によって抑制された。高濃度のカリウムを適用して拘縮を起こした食道標本において、ATP による弛緩反応は起こらなかった。ATP 感受性カリウムチャネルの阻害薬であるグリベンクファミドを前投与したところ、ATP による弛緩反応は抑制された。RT-PCR によって、食道組織において ATP 感受性カリウムチャネルを構成するサブユニットの発現を検出した。【結論】以上の結果から、プリン作動性食道運動制御に ATP 感受性カリウムチャネルが関与していることが示唆された。(利益相反 なし)

P-14. TRPV1 チャネルのホスホイノシタイドによる制御機構

○清水貴浩, 柳瀬宜広, 藤井拓人, 榊原陽香, 酒井秀紀 (富山大学・薬学部・薬物生理学)

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は、様々な物理刺激や化学刺激により活性化する Ca²⁺-透過型非選択性カチオンチャネルであり、温度、辛味、痛覚など様々な感覚受容に重要な役割を果たしている。TRPV1 過

刺発現細胞は室温で外向き整流性電流を生じるが、その詳細な制御機構は知られていない。本研究において、我々は、ヒト TRPV1 を過剰発現させたヒト胎児腎臓上皮 HEK293 T 細胞で観測される TRPV1 外向き整流性電流が細胞内 ATP 非存在下でランダウンすることを見出した。この TRPV1 電流は、細胞内 ATP 存在下でも phosphatidylinositol 4-kinase 阻害剤である LY294002 の処理によりランダウンした。また細胞内 ATP 非存在下で $PI(4, 5)P_2$ を細胞内に投与すると、TRPV1 チャネル電流が維持された。一方、細胞内 ATP は、濃度依存的に TRPV1 外向き電流の時間依存的な活性化を速めただけでなく、その電位依存性を負の方向にシフトした。これらの結果から、細胞内 ATP によるホスホイノシタイド産生が、TRPV1 チャネルのゲーティングを制御することが示唆された。(利益相反 なし)

P-15. 胎生期 HDAC 阻害剤投与による発達期ラット小脳の発達変化の性差の観察

○松井紗羅沙¹、諫田康成²、吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学応用化学・生命工学生命機能科学研究室、²国立医薬品食品衛生研究所)

自閉症スペクトラム障害 (ASD) の誘発因子として知られる抗てんかん薬のバルプロ酸 (VPA) には HDAC 阻害作用があり、胎生期投与ラットでは小脳発達の異常が観察される。従来、ASD の発症率は男性に偏っており、動物を用いた研究も主に雄性動物を用いて行われてきた。本研究では、HDAC 阻害剤による小脳発達異常への性の影響を検討する。HDAC 阻害剤のトリコスタチン A (TSA) 2 mg/kg を胎生 16 日のラットに投与し、生後 7 日 (P7) と P14 の雄・雌の小脳を観察したところ、VPA 投与動物と同じく小脳の形態が変化することが確認された。TSA 投与の雄のプルキンエ細胞 (PC) は細胞体が細長く変化したが、雌では対照動物と同様に丸い細胞体が観察された。また、P7 では雄雌ともにプルキンエ細胞の並びが乱れ、P14 の雄では第 V/VI 葉全体で PC の欠損と、第 VI 葉側の先端部分の PC の乱れが観察できた。雌では比較的対照動物と変わらず、末端部での PC の欠損が観察できた。P14 の NeuN の発現細胞の数は、雄雌ともに増加傾向にあった。P14 の分子層における H3K9me の発現は雄雌ともに減少していた。これらの結果は、HDAC 阻害剤の胎生期曝露が神経細胞の分化を誘導して雄雌ともに小脳発達に変化を及ぼす一方、PC の発達異常に至るには性差があることを示しており、自閉症の発症等にかかわる二次的な因子の存在を示唆した。(利益相反 なし)

P-16. 有機リン系農薬曝露動物由来ミクログリアの活性化の解明

○Yap Pey Shin¹、Christine Lee Li Mei¹、穂積直裕²、諫田泰成³、吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学応用化学・生命工学、²同 電気電子・情報工学、³国立医薬品食品衛生研究所)

ミクログリア (MG) は、中枢神経系において免疫を担当し、神経細胞の損傷などで刺激されると、静止状態から顕著な形態学的変化を伴って活性化する。活性化した MG には、病原菌や細胞の残骸を貪食するアメボイド型の M1 型と、組織の修復と治癒に作用する M2 型が存在する。本研究では、胎児期のクロロピリホス (CPF) 曝露が、出生仔の MG に及ぼす影響を調査した。CPF は世界中で広く利用されている有機リン系の殺虫剤であり、アセチルコリンエステラーゼを阻害して、持続的な神経興奮を引き起こす。本研究室ではこれまで、胎生期 CPF 被曝ラットの小脳において、プルキンエ細胞の不整、樹状突起の伸長抑制やミクログリアの増加などの異常を観測してきた。本研究では、胎生 16 日で 2.5 mg/kg の CPF を母ラットに投与し、出生 2 日目の仔ラット小脳からグリア細胞を採取、ミクログリアを単離し、生きた細胞の生理的变化を超音波顕微鏡を用いて観察した。走化性誘導因子 ATP (600 μ M) を MG に添加すると、MG の形態が活発に変化することが観察された。免疫細胞化学染色により ATP 受容体 P2Y12 の発現を観察したところ、対照動物由来の MG では ATP 添加による P2Y12 の変化があまり見られないのに対し、CPF 投与動物由来の MG では ATP 添加によって P2Y12 の増加が観察され、胎生期の化学物質投与が MG の反応性を増加させることを示唆した。(利益相反 なし)

P-17. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の胎児期曝露が引き起こす顆粒細胞遊走異常の異方性及びその性差

○田中健吾¹、諫田康成²、吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学応用化学・生命工学、²国立医薬品食品衛生研究所)

近年、大きな社会問題となっている高次機能障害の例として自閉症スペクトラム障害 (ASD) がある。また、ASD 等の高次機能障害は男性に多く、男女の性差による症状の違いにも注目が向けられている。これらの発症の要因として、神経細胞の発達異常が示唆されている。本研究室ではこれまで、抗てんかん薬、またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) でもあるバルプロ酸ナトリウム (VPA) を胎生期ラットに投与し、生まれてきた自閉症モデルラットの小脳の構造や組織などの変性を報告してきた。胎児期の VPA 曝露により、出生仔の小脳で神経細胞が早期・過剰な発達を示すこと、小葉の過褶曲、ADHD 様の行動などの異

常を観察してきた。また、類似した神経変性をもたらす有機リン系農薬であるグリホサート (GLY) にも焦点を当て HDACi との機能的な違いを観察した。

本研究では HDACi である VPA, および類似の HDACi である酪酸 (BA), 有機リン系農薬である GLY を胎児期のラットに経口投与し、顆粒細胞の遊走異常、小脳神経層の分子層の変化、および小脳葉の部位による変化の違いを観察した。

HDACi 及び GLY の胎生期曝露が神経分化異常を誘発する部位は、小脳虫部・第一裂の中でも深部、そして V 葉に近い部位という影響の異性性が観察された。性による変化の違いを含めて解析し、報告する。(利益相反 なし)

P-18. オレキシン誘発性の発火後過分極増強が背側縫線核セロトニン作動性ニューロンのスパイクエンコーディングに及ぼす影響

○石橋 賢¹, 福田敦夫¹, Leonard S Christopher² (¹浜松医科大学・医学部・神経生理, ²Department of Physiology, New York Medical College)

背側縫線核 (DR) のセロトニン作動性 (5-HT) ニューロンは、睡眠-覚醒状態、報酬や気分の創出を含む多くの脳機能に関与する。これまでにオレキシが発火後過分極 (AHP) を増強 (oeAHP) し発火頻度順応を大きくすること、さらに、oeAHP のうち Apamin に非感受性成分 (ai-oeAHP) が、オレキシにより活性化された非選択的陽イオンチャネル (NSCC) の閉口に伴う過分極であることを報告した。そこで我々は、ai-oeAHP が一般的な K⁺チャネル開口に伴う AHP とは異なり、ai-oeAHP 中に膜抵抗を増加させることによってシナプス入力感受性を維持すると仮定し、脳スライス標本に対して電流固定法およびダイナミッククランプ法を用いて検討した。

ダイナミッククランプによりカリウムチャネル開口による AHP コンダクタンス (v-kAHP) と NSCC 閉口による AHP コンダクタンス (v-ai-oeAHP) を DR 5-HT ニューロンに印加し、過分極中における仮想興奮性シナプスコンダクタンス (vEPSC) に対する発火応答を記録したところ、v-kAHP に比べ v-ai-oeAHP ではより小さな vEPSC によって発火応答が誘発された。

この結果から ai-oeAHP は、発火頻度順応により定常状態での発火頻度を低くするとともに、発火後過分極による過分極中であっても膜抵抗を増加させることで外部からのシナプス入力に対する感受性を維持することで、刻々と変化する環境刺激への DR 5-HT ニューロン応答を可能にしていると考えられる。(利益相反 なし)

P-19. Enzyme-linked photo-assay による性ホルモン投与時のマウス網膜グルタミン酸動態の解析

○大熊真人¹, 金田 誠², 宮地栄一¹ (¹藤田医科大学・医学部・生理学 II, ²日本医科大学・感覚情報科学)

Enzyme-linked photo-assay は、NADH の蛍光強度変化を指標として組織からのグルタミン酸放出を可視化し、グルタミン酸による神経活動をモニターする手法である。本研究では、この系を C57BL/6J マウスの網膜スライス標本に適用し、性ホルモン投与時の網膜の活動を観察した。性ホルモンであるプロゲステロンは網膜で神経ステロイドとして作用する。また、ヒトでは妊娠中の視覚変化の報告があるが、その詳細は不明である。黄体ホルモンであるプロゲステロン (1 μM) を雌マウスの網膜標本に灌流投与すると、網膜全層で蛍光強度の増強が検出された (n = 11)。卵胞ホルモンであるエストロゲン (1 μM; n = 5) や男性ホルモンであるテストステロン (1 μM; n = 5) の投与では蛍光強度は増強されなかったが、TRPM チャネルのアゴニストである Pregnenolone sulfate の投与では蛍光強度の増強が観察された (n = 3)。また雄マウスの網膜標本でもプロゲステロンにより蛍光強度は増加したが (n = 5)、雌マウス程有意な効果は見られなかった。プロゲステロンは卵巣や副腎皮質で作られる黄体ホルモンであり、ヒトでの妊娠時の血中濃度は最大 190 ng/mL (0.6 μM) に達する。本研究から、妊娠中には性ホルモンにより網膜レベルで視覚情報伝達が修飾される可能性が示唆される。(利益相反 なし)

P-20. 特定の触刺激に対するマウスの生得的嗜好性とその神経機構

○堀尾佳世¹, 大熊真人¹, 中野高志², 山下貴之¹ (¹藤田医科大学・医学部・生理学 II, ²同 情報生命科学)

ヒトでは肌触りの良いシーツを好むといった触覚嗜好が見られるが、マウスがどのような触刺激を生得的に好むかはよく分かっていない。そこで、本研究では、まず、P40, P400, P1000, P2000 の異なる粗さの紙やすりを床に用いた場所嗜好性試験によりマウスが好む床の質感を探索した。それぞれの紙やすりの粗さにつき 9 例ずつ試験を行ったところ、滑らかなアクリル床と比較して粗さ P1000 の床 (P1000 床) での滞在率が有意に増加し、他の粗さでは変化はなかった。したがって、マウスは特定の触刺激に対して生得的な嗜好性を持つことが示唆された。次に、P1000 床に対する嗜好性の神経メカニズムを調べるため、cFos 発現誘導実験を行った。マウスを P1000 床上あるいは対照として滑らかな床の上に 30 分間滞在させ、神経活性化マーカーである cFos の発現を免疫染色により調べた。その結果、P1000 床上に滞在させた群では、外側結合腕傍核の中央部で対照

群に比べて有意な cFos 陽性細胞の増加が確認された ($n = 3$)。また、神経毒であるイボテン酸 (10 mg/ml で両側に 40 nl ずつ) を局所注入し、外側結合腕傍核中央部の神経回路を破壊すると、P1000 床への嗜好性が消失した ($n = 6$)。以上の結果から、特定の触刺激に対する生得的嗜好性には外側結合腕傍核中央部の神経細胞群が関与することが示唆された。(利益相反 なし)

P-21. マウス大脳皮質異顆粒帯に投射する大脳皮質領域の探索

○阿部真悠子, ○縣 徹, 檀上輝子, 山下貴之 (藤田医科大学・医学部・生理学 II)

大脳皮質異顆粒帯 (SIDZ) は一次体性感覚野内の小領域であり、社会性行動などの高次脳機能への関与が示唆されている (Yim ら, Nature, 2017; Reed ら, Nature, 2020) が、メカニズムは明らかでない。その解明には SIDZ に入力する情報の性質を知る必要があるものの、SIDZ に投射する神経細胞の脳部位についての詳細な報告がない。そこで、本研究では、逆行性蛍光トレーサー (CTB-Alexa 555) を用いてマウス SIDZ に投射する神経細胞を可視化・計数することにより、SIDZ の前シナプスネットワークを調べた。マウス SIDZ を経頭蓋内存在性シグナルイメージング法によって同定した後、CTB-Alexa555 (0.5%) を SIDZ の浅層と深層にそれぞれ 25 nl ずつ (計 50 nl) 注入し、注入から約 1 週間後のマウスから固定脳スライス標本を作成した。同側の大脳皮質内で蛍光標識された細胞を探索したところ、SIDZ は二次運動野や二次体性感覚野、二次聴覚野、側頭連合野から強い投射を受けていた。一次体性感覚野であるバレル皮質には、一次/二次運動野や二次体性感覚野からの入力強くあるが、二次聴覚野や側頭連合野からの投射はほとんどない。したがって、SIDZ は高次の感覚・運動情報を統合する機能を持つと考えられ、特に聴覚に関連が深いことが予想される。(利益相反 なし)

P-22. Neuronal mechanisms underlying reward-related expressive orofacial movements in mice

○Wanru Li¹, Takashi Nakano², Takayuki Yamashita¹ (藤田医科大学・医学部・生理学, ²同 情報生命科学)

In reward-based learning tasks, mice exhibit orofacial movements which are not instructed or necessary for task execution. Such expressive orofacial movements correlate with global neuronal activities in the brain. However, how the brain regulates expressive orofacial movements remains enigmatic because of the difficulty of extracting them among other task-related motor activities such as

licking. Here, to address this issue, we used a Pavlovian learning paradigm in which a sound cue presentation is paired with optogenetic stimulation of midbrain dopamine neurons (oDAS) as a reward. Learning of the sound-oDAS pairing induced stereotypical orofacial movements at the timing of reward expectation and acquisition. Inhibition of dopamine D1 receptors (D1Rs) abolished only reward-acquiring orofacial movements but left reward-expecting movements intact. However, pharmacological inhibition of the whisker primary motor cortex (wM1) largely attenuated both reward-acquiring and reward-expecting orofacial movements. Silicon probe recordings from wM1 revealed that wM1 contains specific cellular populations encoding either reward-expecting or reward-acquiring movements. Thus, wM1 forms a key node of neural circuits driving expressive orofacial movements, mediating both D1R-dependent reward-acquiring movements and D1 R-independent reward-expecting movements. (COI: No)

P-23. 空間的培養条件検討による視床下部神経分化誘導因子の探索

○鈴木つくし¹, 塚本舜也¹, 目良義也¹, 久野萌花¹, 河田美穂¹, 小谷 侑¹, 斎藤加奈子¹, 中島 昭², 亀山俊樹¹, 長崎 弘¹ (藤田医科大学・医学部・生理学, ²同 生理化学)

自律神経系の中核である視床下部は、多くの神経核から構成されているが発生過程には不明な点が多い。近年再生医療への期待から、*in vitro* での視床下部神経の分化誘導の試みが多くなされている。代表的な培養法として無血清浮遊培養法 (SFEBq 法) がよく知られるが、最終的に視床下部神経細胞を分化成熟させる際、分散単層培養 (2D) と細胞凝集塊の 3 次元培養 (3D) する 2 通りの手法がある。そこで本研究では免疫組織化学、定量 PCR 及び RNA-seq により、2D 培養と 3D 培養の分化誘導能の比較を行った。特に今回は、室傍核および視索上核に存在するパソプレシン神経の分化に関わる遺伝子に焦点を当てた。

細胞の再凝集を伴う無血清浮遊培養法 (SFEBq) で、マウス ES 細胞から背側視床下部神経を分化誘導させた。培養 14 日目から、2D 分散培養と 3D 凝集塊での培養に分け、培養 28 日で細胞を回収し定量 RT-PCR 及び免疫組織化学による解析を行った。また、培養 14 日、28 日目 2D 分散、3D 凝集塊の各サンプルで RNA-Seq 解析を行い網羅的な遺伝子発現の比較解析を行った。

定量 PCR による解析から、興味深いことに汎神経細胞マーカーの発現には差が無いにもかかわらず AVP 遺伝子

の発現量は 2D よりも 3D で培養した方が多かった。これは RNA-Seq でも、同様の結果が確認できている。さらに、14 日目神経前駆細胞および 2D や 3D 培養下での分化細胞に発現する遺伝子群の RNA-seq による解析から、分化に伴い共通で発現変動する遺伝子群や、2D や 3D それぞれで特異的に発現変動する遺伝子群の特徴を報告する。また 2D と 3D との遺伝子発現を直接比較した結果も併せて報告したい。

培養方法によって AVP 遺伝子の発現量が変わること、パソプレシン神経の分化にも関わる神経分化因子の発現変動も複数確認できた。今後は分化誘導の鍵となる因子の発見を目指したいと考えている。(利益相反 なし)

O-13. 副甲状腺ホルモン関連蛋白による排尿筋収縮由来の求心性神経活動の抑制

○橋谷 光, 杉浦有優, 三井 烈 (名古屋市立大学・医学研究科・細胞生理学)

【背景】排尿筋自発収縮に由来する一過性膀胱内圧上昇 (TPR) は、機械的に求心性神経を刺激し、その頻度や振幅の増加は尿意切迫感を来す。副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) は、排尿筋から放出されて排尿筋収縮を抑制する。本研究では、外因性 PTHrP の TPR と求心性神経活動に対する作用を検討した。

【方法】麻酔下ラットで、膀胱内圧変化および左骨盤神経 (中枢端切断) の求心性神経活動を記録した。対側も切断 (中枢遮断) ないし保持された (中枢保持) 膀胱を用い、薬剤は経静脈投与した。PTHrP 受容体 (PTHrP-R) を蛍光免疫染色し、等尺性張力測定により排尿筋収縮を記録した。

【結果】PTHrP-R は排尿筋に発現していたが神経線維には発現していなかった。PTHrP (10nM) は、自発収縮を約 80% 抑制したが、神経性収縮は約 20% 抑制したのみであった。PTHrP は、中枢遮断膀胱においてニフェジピン感受性の TPR の振幅を抑制、求心性神経活動を抑制した。PTHrP は、中枢保持膀胱におけるアトロピン感受性の Large-TPR とそれに伴うスパイク状の求心性神経活動を抑制した。

【考察】PTHrP は、排尿筋の自発収縮に由来する TPR、副交感神経から放出される少量のアセチルコリンにより増強された Large-TPR を抑制し、求心性神経活動を抑制した。内因性 PTHrP は、排尿筋収縮の抑制を介して、TPR 由来の求心性神経活動を抑制して蓄尿機能を促進すると考えられた。(利益相反 なし)

O-14. 血管を介した物質交換の生体多次元ナノ計測

○本藏直樹^{1,2}, 諸岡七美¹, 浦野哲盟³, 鈴木優子¹ (¹浜

松医科大学・医学部・医生理学, ²JST・さがけ, ³静岡社会健康医学大学院大学)

哺乳類をはじめとした多細胞生物は、臓器間情報伝達を時間精度よくおこなうことで、外的変動にも即座に対応できる生体システムを作り上げている。これは体恒常性と説明されるが詳細は理解されていない。この問題を解決するために時空間解像にすぐれ、計測に依存した生体反応を誘導しない、非侵襲生体光イメージング技術を開発することで、本質を明らかにすることを目指している。そこで生体恒常性維持機構の本質を見極めるための第一段階として、局所の環境変化に応じて変動する物質交換を制御する血管機能の解明を試みた。その中でも酸素交換の場を同定するための方法論を確立するために、これまでに自身で確立してきた高調波発生・多光子励起同時観察法をさらに改良し、赤血球の酸素化状態を可視化する装置が完成した。この装置により単一の赤血球から放出される第 3 次高調波発生を検出することで、その強度が酸素および二酸化炭素濃度に依存することを、*in vitro* の実験系によって明らかにした。それと併せて生体内での酸素動態を検出するため、マウスに蛍光色素を注入することで生体内の血管を可視化し、毛細血管から放出されると推定される酸素分子の時空間動態の解析を試みている。また毛細血管網のどこで酸素放出が生じるのか直接計測を進めており、より厳密な酸素放出場所と機構の同定を試みているので、その一端を議論する予定である。(利益相反 なし)

O-15. マウス超音波発声を計測する音響カメラ US-VCAM の開発と応用

松本惇平^{1,2}, 菅野康太³, 加藤雅裕^{4,5}, 西丸広史^{1,2}, 瀬戸川 剛^{1,2}, Chojiljav Chinzorig¹, 柴田智広⁶, 西条寿夫^{1,2} (¹富山大学医学系, ²同 アイドリング脳科学研究センター, ³鹿児島大学法文学部, ⁴加藤建築環境研究所, ⁵関東学院大学建築・環境学部, ⁶九州工業大学生命体工学研究科)

マウスの超音波発声 (ultrasonic vocalizations, USV) を介した社会的コミュニケーションは、社会行動やその異常の神経メカニズムを調べるための有効な実験モデルとして近年注目されている。こうした研究では、複数のマウスが相互作用する状況下において計測された USV がどのマウスから発声されたのかを判別することが必要とされている。発声個体の判別には、マイクアレイを用いた音源定位が有効であるが、従来の USV 用の音源定位システムでは、ケージの周囲を囲う分散型のマイクアレイが用いられており、そのため音透過性を有する特殊ケージの使用や、コンピュータ・クラスターを使用するほどの膨大な計算処理が

必要である等の欠点があった。そこで、本研究では、様々な実験環境に設置でき、高速処理が可能な音響カメラシステム USVCAM を開発した。さらに、本開発システムを応用し、従来システムでは測定が困難であった居住者—侵入者パラダイムにおける C57BL/6 及び ICR 系統のマウスの超音波コミュニケーションを明らかにした。USV の音源定位をより広範な実験に適用することを可能にした本システムは、今後、マウスの社会行動およびその神経メカニズムの研究に大きく貢献することが期待される。(利益相反 なし)

O-16. モルモットにおける光干渉断層撮影装置 (OCT) を用いた超音波刺激による感覚上皮帯のナノ振動計測

○堀井和広¹, 小川博史^{1,2}, 安部 力¹, 森元伊織¹, 任書 晃¹ (岐阜大学大学院・医学系研究科・生命原理学講座・生理学分野, ²同 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

ヒトは、鼓膜から伝わってきた 20 Hz~20 kHz までの幅広い周波数の音を弁別できる。この特性は、内耳蝸牛に備わる「感覚上皮帯」というシート様組織が、音の周波数と一致してナノスケールで振動することに依拠する。上皮帯に惹起されるこの振動は、そこに局在する有毛細胞を活性化し、神経を介して中枢へと音の情報が伝達される。20 kHz よりも高い周波数の音は超音波とされ、鼓膜を通した入力では受容できない一方、頭部の骨に直接振動を与える「骨伝導」を用いれば、ヒトでも超音波を聴取できる。しかしながら、「超音波聴覚」と呼ばれるこの特徴の詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では超音波刺激によって感覚上皮帯にナノ振動が惹起される蝸牛内領域を探索した。

超音波受容領域として蝸牛の最も入り口にあたる Hook region に着目した。麻酔下のモルモットを対象に光干渉断層撮影 (OCT) 装置を用いた感覚上皮帯の in vivo イメージングを行った。上皮帯の断層画像を Hook region と基底回転と比較したところ、組織の厚さは同じであった一方、幅は有意に小さかった。さらに、超音波刺激を与えて上皮帯振動を計測したところ、刺激に一致した超音波の周波数で振動していた。これらの結果から、Hook region の上皮帯が物理的に超音波を受容して超音波聴覚に寄与している可能性が示唆された。(利益相反 なし)

O-17. EAD の発生を契機とする心室性不整脈の発生機序: in silico 研究

○津元国親¹, 島本貴生², 青地悠馬², 姫野友紀子², 天野 晃², 九田裕一¹, 谷田 守¹, 倉田康孝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

命情報学科)

致死性不整脈である心室頻拍/細動の電気的実体は、心室内を巡回する興奮波ならびに巡回性興奮波の分裂と消滅をランダムに繰り返す興奮波であると考えられている。また、QT 延長症候群患者で度々観察される多形性心室頻拍 (Torsades de Pointes: TdP) は、心室内をふらふらと蛇行しながら動き回る巡回性興奮波によって引き起こされると考えられている。多くの臨床的観察研究から、早期後脱分極 (early afterdepolarization: EAD) が TdP の発生に先駆けて起きることが報告されてきた。しかし、TdP の発生における EAD の役割についてはまだ不明な点が多い。我々はこれまでに、Kurata ヒト心室筋細胞モデル (Kurata et al., Biophys J, 2005) からなる 2 次元心室組織モデル上での興奮伝播シミュレーションにより、EAD 誘発心筋細胞が島状 (クラスター) に心室組織内で不連続に分布することで TdP の発生を促進する可能性があることを報告した (第 68 回中部日本生理学会)。TdP の発生機序の更なる解明を目的として、TdP の発生と EAD クラスター間距離の関係を調べた。6 cm 角の心室組織に 2 cm × 4 cm の EAD クラスター 2 つを一定の距離で並行に配置し、EAD の発生に続く 2 次性興奮波の発生の有無を検討した。EAD クラスター間距離が 2.4 ± 4 mm の時に TdP を惹起する 2 次性興奮波が発生した。しかし、クラスター間距離が 2.0 mm 以下、2.8 mm 以上の場合、EAD の発生に続く 2 次性興奮波は発生しなかった。以上より、TdP を惹起する危険性が高まる EAD クラスター間距離の存在が示唆された。(利益相反 なし)

O-18. 洞房結節細胞内脂肪滴過剰蓄積による洞機能不全発症のメカニズム解析

○竹田有加里¹, 佐藤さつき², 鈴木仁弥^{2,3}, 松岡 達¹ (福井大学学術研究院医学系部門医学領域形態機能医科学講座統合生理学分野, ²福井大学医学部病態制御医学講座内科学 (3), ³医療法人安川病院内科)

洞房結節細胞の自動能発生には、筋小胞体リアノジン受容体からの local Ca²⁺ release (LCR) と細胞膜イオンチャネルの協調作用が関連する。我々はマウス洞房結節細胞において、ミトコンドリアが近傍の筋小胞体 Ca²⁺ 動態を調節することを見だし、“ミトコンドリア—筋小胞体—細胞膜 Ca²⁺ 連関”が自動能発生に関与するとの仮説を提唱した。この研究においては、心筋細胞ミトコンドリア近傍に脂肪滴が過剰蓄積する Perilipin2 過剰発現マウス (PLIN2-Tg) を用いて、“ミトコンドリア—筋小胞体—細胞膜 Ca²⁺ 連関”の異常が自動能に及ぼす影響を検討した。PLIN2-Tg マウスでは、洞房結節細胞に脂肪滴が過剰蓄積し筋小胞体

の膨化が観察された。麻酔下の心電図記録では、野生型に比べて R-R 間隔の変動が大きかった。単離洞房結節細胞においては、PLIN2-Tg マウスでは、LCR 及び Ca^{2+} トランジェントの振幅が野生型に比べて減弱していた。またミトコンドリアの ROS が野生型より有意に高かった。洞房結節細胞での脂肪滴蓄積は、“ミトコンドリアー筋小胞体—細胞膜 Ca^{2+} 連関”の異常を来して、洞機能不全を引き起こす可能性が示唆された。(利益相反 なし)

O-19. プラスミン活性亢進による血管内皮細胞動態への影響について

○佐野秀人¹、伊藤昌彦²、鈴木哲朗²、浦野哲盟³、鈴木優子¹ (¹浜松医科大学・医学部・医生理学、²同 微生物学・免疫学、³静岡社会健康医学大学院大学)

線維素溶解(線溶)反応は、Plasminogen Activator (PA) がプラスミノゲンをプラスミンに活性化しフィブリンを分解する反応である。PA の阻害因子である PA Inhibitor-1 (PAI-1) の欠損症では、線溶活性増強に伴う重篤な出血をきたすほか、創傷治癒の遅延を認める。組織修復の過程では、プラスミン反応による直接・間接的な細胞外基質の分解、血管新生などの時空間的な線溶活性による制御が必要であると考えられる。この過程において重要な役割を果たす血管内皮細胞動態が、プラスミン活性によりどのように制御されるかについて検討を行った。

ゲノム編集技術により PAI-1 欠損血管内皮細胞 (PAIKO-EC) を樹立した。PAIKO-EC では、野生型 EC より高い細胞表面のプラスミン活性を示した。PAIKO-EC は Scratch assay を用いた細胞遊走実験において野生型 EC に比し細胞欠失部位への移動性の低下を認めた。また細胞密集部位における PAIKO-EC の細胞動態追跡により、移動距離の延長とランダムな方向への移動が示された。これらはプラスミン阻害剤であるアプロチニン投与により回復した。細胞外基質や細胞間接着の破壊等により、制御された細胞移動が障害された可能性を示唆した。血管内皮細胞周囲の PAI-1 による線溶活性の時空間的制御が、血管新生時の内皮細胞動態に重要である可能性が示された。(利益相反 なし)

O-20. 生体局所におけるリンパ管の物質取り込み機構の解析

○諸岡七美¹、本藏直樹^{1,2}、佐野秀人¹、浦野哲盟³、鈴木優子¹ (¹浜松医科大学・医学部・医生理学、²JST・さきがけ、³静岡社会健康医学大学院大学)

リンパ管は体の各組織において、血管から漏出した血漿成分のうち余剰な物質・水分や、細胞の代謝によって排出

された老廃物を含む組織液を回収し、循環系へと戻す役割を担う。そのためリンパ管は末梢から中枢へと階層性のあるネットワーク構造を形成している。このような機能的なリンパ管の形成には、発生中期に、間葉系細胞が発現する細胞外マトリックス蛋白質 Polydome が内皮細胞に作用し、リンパ管のリモデリングが誘導されることが必須である (Morooka, 2017, Circ. Res.)。リモデリング不全は浮腫を引き起こし出生後に個体は致死となるため、リンパ管による物質・水循環機構は重要であることが伺える。

リンパ管が物質を取り込むメカニズムについてはこれまでに、構造学的特徴から推定がなされてきたが、これを生体で直接実証する研究はなされておらず、真の生理機能や回収のメカニズムは未解明のままである。そこで本研究では、いつ・どこで・どのようにリンパ管が物質を取り込むかを、生体イメージングによって明らかにすることに取り組んでいる。これまでに、二光子励起顕微鏡を用いて、生きた個体を非侵襲に観察し、リンパ管に物質が取り込まれる様子を逐次捉えることに成功している。実際の観察では、物質の取り込み場所や、これと構造学的特徴との相関について、これまでの推定と異なる結果を得ており、本発表において議論したい。(利益相反 なし)

O-21. ラットにおける視床下部背内側核の活性化は、脊髓排便中枢でのモノアミン放出を介して大腸運動を促進する

○湯木夏扶¹、堀井和広²、澤村友哉²、山口裕嗣³、山中章弘³、椎名貴彦^{1,2}、志水泰武^{1,2} (¹岐阜大応用生物・獣医生理、²岐阜大院共同獣医・獣医生理、³名古屋大環境医学研究所神経系分野 II)

【背景と目的】げっ歯類において、ストレス負荷時に排便が誘発されるメカニズムについては未だ不明な点が多い。最近、内側前頭前野から視床下部背内側核 (dorsomedial hypothalamus: DMH) に投射するグルタミン酸作動性神経が、ストレスを受けた時の交感神経反応 (心拍、血圧、体温の上昇) を引き起こすことが報告された。そこで本研究では、DMH に着目し、ストレス誘発性排便に関与する神経経路を明らかにすることを目的とした。【方法】実験には麻酔下の雄の SD ラットを用いた。遠位結腸および肛門にカニューレを挿入・固定し、結直腸の内腔を生理食塩水で満たすことにより、内腔圧の変化と送液量を測定した。【結果】DMH に AMPA agonist および NMDA agonist を投与すると、大腸内腔圧の顕著な変動とそれに伴う送液量の増加が引き起こされた。DMH 刺激による大腸運動の亢進反応は、脊髓へのセロトニン受容体阻害薬およびドパミン受容体阻害薬により抑制された。脊髓へ投射するセロトニン

およびドパミン作動性神経は、それぞれ延髄縫線核および間脳 A11 領域に神経核を持つ。DMH-縫線核神経あるいは DMH-A11 神経を特異的に抑制すると、DMH 刺激による大腸運動の亢進反応は抑制された。【考察】以上の結果より、DMH-縫線核および DMH-A11 のルートがストレス時の排便誘発に関与することが示唆された。(利益相反 なし)

O-22. ラットにおける間脳 A11 領域および延髄縫線核から脊髄へ投射するモノアミン作動性神経は大腸運動を制御する

○澤村友哉¹, 堀井和広¹, 湯木夏扶², 山口裕嗣³, 山中章弘³, 椎名貴彦^{1,2}, 志水泰武^{1,2} (¹岐阜大学・共同獣医・獣医生理, ²同 応用生物・獣医生理, ³名古屋大学・環境医学研究所・神経系分野 II)

【目的】私達は、間脳 A11 領域および延髄縫線核から脊髄排便中枢に投射するモノアミン作動性神経が大腸運動に関与することを明らかにしてきた。しかし、これらの脳領域がどのような状況で大腸運動を制御するのかは解明されていない。そこで本研究では、神経活動を人為的に操作することで、A11 領域および縫線核による大腸運動の中枢性制御を解明することを目的とした。【方法】実験には雄の SD ラットを用いた。アデノ随伴ウイルスベクターの二重感染により、A11 領域および縫線核から脊髄排便中枢に投射する神経に hM4Di を発現させた。大腸運動を評価するために、麻酔下のラットの結直腸内を生理食塩水で満たして大腸内の圧変化と送液量を測定した。また、意識下のラットに水回避ストレス負荷を行い、排出された糞便数を定量した。【結果と考察】A11 領域または縫線核に hM4Di を発現させたラットでは、CNO 投与により神経活動を抑制しても、大腸内への侵害刺激による大腸運動は変化しなかった。一方、A11 領域と縫線核の両方に hM4Di を発現させたラットでは、CNO 投与により、侵害刺激による大腸運動応答が消失した。また、ストレス負荷による排糞応答は、A11 領域または縫線核を抑制することで減弱した。以上の結果より、大腸内への侵害刺激およびストレス負荷による大腸運動の促進応答は A11 領域と縫線核を介して引き起こされることが示唆される。(利益相反 なし)

O-23. 電位画像パターン分類により明らかとなった小腸ペースメーカー時空間連携への細胞内 Ca 放出チャネルが関連する 5-HT の効果とその深層学習による検証

岩田尚子, 高井千穂, Md Sajjad Hossen Md, 木原直大, ○中山晋介 (名古屋大学・医学部・生理学)

消化管の滑らかで精妙な協調的運動には、内在神経回路だけでなく筋層間神経叢などに存在するペースメーカー細胞

(Cajal 間質細胞) のネットワークも重要な働きをすることが分かってきた。私たちは、透析膜補強微小電極アレイ (MEA) を用いて、ICCs の細胞組織レベルでの時空間連携の特徴を調べている。

マウス小腸から剥離した筋層標本において、8×8MEA (計測領域≒1mm²) を用いてペースメーカー細胞の発生するフィールド電位自発変動を記録した。この時系列アレイデータをもとに擬似カラー画像ビデオを作成しパターン分類した。目視下で、expanding (観測領域で発生) と migrating (領域外から移動) 活動の 2 つが主要パターンとして分類できた。小腸の蠕動様運動を高進することが知られる 5-HT の投与で、顕著な migrating パターン頻度の上昇を伴う、ペースメーカー活動発生頻度の上昇が観察された。

ICCs の細胞内 Ca 濃度上昇には 2 種類の細胞内 Ca 放出チャネル、リアノジン受容体 (RyR) とイノシトール 3 リン酸受容体 (IP₃R) の関与が知られている。そこで、それぞれの阻害薬 Carvedilol と 2-APB の効果を調べた。~40μM 程度の Carvedilol と 2-APB は、ペースメーカーイベントの発生を強く抑制し、消失前にそれぞれ migrating パターンと expanding パターン頻度を顕著に上昇させた。この結果をもとに、5-HT においてパターン変化を齎す作用点を考察する。

目視でのパターン分類を客観的に検証するため深層学習を用いて解析した。ペースメーカー活動が発生する期間 (数百 ms) を、一つのシーンとしてラベル付けし学習させたところ、分類の整合性を 95% 以上と検証する分類器 (DNN net) を作成できた。(利益相反 なし)

O-24. 直腸粘膜毛細血管ペリサイトにおける自発細胞内 Ca²⁺ 上昇の発生・維持機構

○三井 烈, 西村恭子, 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】消化管では壁伸展により粘膜血流量が低下するため、これを抑止する機構が必要となる。本研究では、粘膜毛細血管ペリサイトの自発活動と、その細動脈への伝播について検討した。【方法】NG2-GCaMP マウス直腸の粘膜・粘膜下層標本作製し、NG2 を発現するペリサイトの細胞内 Ca²⁺ イメージングを行った。【結果】毛細血管ペリサイトは、細胞間で同期した周期的な自発細胞内 Ca²⁺ 上昇を示した。自発活動は、ギャップ結合 (3 μM carbenoxolone), 小胞体 Ca²⁺-ATPase (10 μM CPA), IP₃ 受容体 (100 μM 2-APB) および Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ チャネル TMEM16A (3 μM Ani9) の阻害により抑制された。ペリサイトは TMEM16A 免疫陽性であった。COX (1 μM indomethacin) やプロスタグランジン I₂ (PGI₂) 受容体 (1 μM Ro1138452) の抑制

剤により、ペリサイトの Ca^{2+} レベルが上昇し、細胞間で同期した自発 Ca^{2+} 上昇がみられなくなった。毛細血管ペリサイトの自発 Ca^{2+} 上昇は、毛細血管前細動脈へ伝播した。【考察】直腸粘膜毛細血管ペリサイトの自発 Ca^{2+} 上昇は、小胞体からの Ca^{2+} 放出とそれに続く TMEM16A の開口 (Cl^- 流出を誘発) による脱分極および、そのギャップ結合を介し

た細胞間伝播に依拠していると考えられた。一方、自発活動は内皮からの PGL_2 放出により維持されていると考えられた。毛細血管の自発活動は、細動脈へ伝わり周期的な自発収縮を惹起することで血管抵抗を低下させ、粘膜血流を維持すると推察された。(利益相反 なし)