

生き生きした公正な研究活動のために—ハラスメント防止を目指して—(S4) 男女共同参画委員会・研究倫理委員会合同ワークショップ報告

ハラスメントに関するワークショップはこれで2回目である。もともと昨年の大会の時に、発足したばかりの解剖学会男女共同参画委員会との共同で開催される予定であったが、東日本大震災の発生のために大会が誌上開催となってしまったために、再度今大会で開催したものである。

講演はまず、吉武清實先生（東北大学高等教育開発推進センター教授）の「学会および大学の研究活動におけるハラスメント問題を考える」から始まった。吉武先生は前回に続いて2回目の講演である。ハラスメントとは何かから始めて、新たな「調整」というハラスメントへの対応策についての紹介もいただいた。また、学会でできるハラスメント対策とその限界についても言及していただいた。次には、倫理綱領の中に、ハラスメント防止に関連した文言を入れることについても検討したいという委員会の希望から、「研究者と学会に求められる公正研究のあり方」について研究倫理委員会委員長の蔵田 潔先生（弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座教授）にお話しいただいた。また、大学ではかなりハラスメント対策が進んでいるとはいえ、そのレベルには大学間でかなり温度差がある。ハラスメント対策を生理学会会員が所属している大学で進める参考に、ということで、「名古屋大学におけるハラスメント防止体制の変遷」と題して福澤直樹先生（名古屋大学総長補佐，経済学部准教授）からお話しいただいた。

講演後グループに分かれて討論する予定であったが、質疑応答がかなりあったため、グループ討論をしないうちに2時間半が過ぎてしまった。本シンポジウムの参加人数は全体で30名程度と少なかったが、運よく解剖学会が前日まで近くの甲府で開催されていたので、1日延泊すれば参加できるように大会第一日目の開催を事務局側に強くお願いし、また、シンポジウム参加費も無料にいただいた結果、解剖学からは10名以上の参加があった。解剖学会では男女共同参画推進委員会がまだ設立されたばかりで、今後の活動の参考にしたい、ということであった。学会間の連携でハラスメント防止を含めた男女共同参画の取り組みが広まることは委員会としては大変意義深いことだと思っている。

参加人数がすくなかった理由の1つは、アカデミックなプログラムと同じ時間帯に開催したためだと思われる。今後はほかの時間帯、ほかの実施方法を考えて、ハラスメントについての理解を生理学会会員に広めていく必要があると思った。バトンタッチした24年度の男女共同参画推進委員会の活動に期待したい。

水村 和枝（オーガナイザー，中部大学生命健康科学部理学療法学科）

大学と学会におけるハラスメント対策を考える

吉武清實（東北大学高等教育開発推進センター）

ハラスメントはいじめ、虐待、DV同様、「優越した立場を利用してなされる力の不適切な行使」であり、相互尊重を欠いた関わりであり、人権侵害行為である。心理的には優越欲求・支配欲求が強い人によってなされる。研究者にとっては、「優

越欲求」がドライブであり、必要な資質でもあるが「支配欲求」が高まるとハラスメント問題につながる。加害行為を行う人で、反復する人は、しばしば力のある人で、外面良く支配術にたけている。被害者を「自分に非があるから」と思わせて不適切な力の行使の対象となっていることに気づきにくくさせてしまう。一方、被害を受けている人は相談することで、もっと事態が悪くなるので

〔オリジナルのカラー図版は学会ホームページ <http://physiology.jp/>を参照ください〕

はないかという不安やおそれを抱くものである。このため、被害が深刻化してから相談や訴えに至ることになりやすい。こうしたことを考慮するとともに、ハラスメント対策は同時に自殺防止対策でありメンタルヘルス対策でもあるという観点をもって、相談・解決システム整備ならびに防止活動の対策を考えていくことが必要になる。

近年、大学において、ハラスメント対策は大学評価の一項目とされていることもあって対策が押し進められてきたが、学会においても倫理綱領・規程とかかわって、問題意識がもたれ議論されるようになりつつある。問題は、学会としてどこまでのことをやった方がよくて、実際にどこまでのことができるのか、ということである。

予防活動の充実の面では、入会にあたって会員が遵守すべき条項や倫理・ハラスメントに関する規程の整備や見直し、アンケートを会員対象に行う被害実態の把握や、このようなシンポジウムも含めた継続的啓発活動が考えられる。

相談・問題解決システムの整備の面では、大学における取組と補完し合う形で何ができるか考えることになるだろう。大学同様、司法機関ではない学会のことであり、ましてや、学会の管理運営活動は他に本務を持ちつつのボランティアなものである。解決力（相談→調査・調停・調整行為→処分）には大きな制限があるなかで、何をするのがよくて、何ができるのか、どんな解決手続きを明文化できるか。

大学においては、調査や調停とも異なる「調整（通知も含んで）」の解決手続きを規程・ガイドラインにくみこみ、それに基づいて調整を実効的におこなえる仕組みを作ることが重要であり、全体にその方向に向かいつつある。学会としては「通知」を中心とする解決体制づくりがまずもって考えられるところである。

研究者と学会に求められる公正研究のあり方

蔵田 潔（日本生理学会研究倫理委員会委員長、弘前大学医学研究科統合機能生理学）

国立大学をはじめとする研究機関の法人化以降、今日の大学や研究機関にあっては、産学連携による研究が推進されてきている。医学研究においては特に臨床研究において特定の企業の活動と密接にかかわることにより、科学的真実が利益誘導によって歪められていないか、すなわち「利益相反」の有無を示すことが社会的に問われている。また、成果重視のあまり、弱い立場に立つ者への公正研究が脅されかねない事例が発生してきている。そのため個々の研究機関では、利益相反のマ

ネージメントや、利益相反を含めたさまざまなハラスメント対策がすでに行われているが、研究成果の発表の場である学会大会や学会誌にあっては、学会として社会に対して発信する情報が公正な研究に基づいて行われているか、つまり利益相反の有無について公開するよう日本医学会が提言を行っている。日本生理学会大会や主宰する学会大会や学術雑誌で発表される研究成果は基礎的研究が主たるものではあるが、臨床応用へのトランスレーショナル・リサーチをはじめ、さまざまな利益相反に関わる研究が増加しつつある。日本生理学会では日本医学会の提言を受け、利益相反委員会を新たに整備するとともに、平成23年の生理学会・解剖学会の合同大会から演題登録にあたって利益相反の有無を求めるなど、利益相反への対応に努めてきた。さらに、平成24年度中には日本生理学会利益相反指針を正式に策定し施行する予定であるが、今後はその指針に基づき、学会大会や地方会の演題募集や、本学会の機関誌である日本生理学雑誌および Journal of Physiological Sciences への投稿に際して、まず利益相反の有無を、また利益相反がある場合、利益相反の対象となる企業等から学会の定めた基準以上の金額の研究費等の該当項目について学会へ申告することに加え、発表時に利益相反があることを明記することが求められようとしている。それに伴い、公正研究のため、大会において欠かせない企業名の付いたランチョンセミナーのあり方を含め、研究者の協力を得ながら、さまざまな検討と継続的な対応が学会として必要になろう。

名古屋大学のハラスメント防止体制

福澤直樹（名古屋大経済・社会経済システム）
本報告では、ハラスメント防止対策体制についての一機関の事例紹介として、名古屋大学における制度概要および運用、そこで表れた問題点が、以下のように紹介された。

「名古屋大学ハラスメント防止基本宣言」に基づき、セクハラおよびアカハラ・パワハラ「防止対策ガイドライン」がそれぞれのハラスメントを定義し、ハラスメント相談センターの応談体制、申立て制度の仕組み、そこでのハラスメント防止対策委員会の役割などを規定する。ハラスメント相談センターは総長直属の独立の学内機関であり、大学構成員および関係者からの相談には、まずここが対応する。守秘義務は厳重であり、相談者が調停或いは相手方の処分などが想定される事実調査を求めた申立てを行うまでは、防止対策委員会に対しても一切明かさず、相談センターに

は臨床心理士・精神保健福祉士の資格を持った相談員や弁護士が配属され、相談者の立場に沿った助言やカウンセリングを行い、まずは自主解決を目指す。自主解決が困難なとき、上述の調停ないし事実調査を求める申立てをサポートする。申立てを受け付けるのが、大学当局としての対応機関であるハラスメント防止対策委員会であり、人権担当の理事（副総長）を長としつつ、全部局から送られた委員や弁護士などから構成されている。

さらに、申立人と相手方の「和解」に向けた手続きであり最後まで一貫して匿名性が維持される「調停」、申立書に記載されている事項（被害をもたらしたとされる相手方の言動）について聞き取りやメール・手紙等の証拠などの確認などが行われ、ハラスメントと認定された場合には処分等にもつながる「調査」について説明され、また深刻なストーカー被害などにより相談者の身に危険が及ぶ可能性が高いと判断された場合や、二次被害防止のために緊急の措置が必要と判断された場合の「緊急対応」のケースなども紹介された。

なお、ハラスメント防止対策体制としては、もともとセクハラのみが扱われていたところ、平成21年度からそれに限定せず、アカハラ・パワハラなどに対象を拡張した結果、相談件数が倍増したこと、具体的な相談の内訳においても、パワハラ、アカハラ等、セクハラ以外の問題の比率が多いことも示された。また当事者の関係性においては、教員—学生のみならず、教員—教員などがこのほか多く、また大学というさまざまな立場の人々が集う場における関係性の多様さも紹介された。

加えて、以下のような実際の運用の中で生じている諸問題も紹介された。

1. 大学という組織からどちらかもしくは双方が離れても、学会等のつながりが継続するケース、或いは大学として被申立人の非を認定して処分等に及んだ後、申立人個人に対し訴訟が起こされるケースなどにおいて、長期的な申立人の保護ができていないため、「合理的な」考慮の結果として相談者が申立てを見送り、ハラスメントが潜在化する、もしくは長期的な保護ができないまま二次被害が継続するという問題。

2. 申立てに至らない限り防止対策委員会は動けない（知らない）ため、多くの案件をハラスメント相談センターが抱え込むことになることも問

題。

3. 申立て受理の基準について、何でも受理すればよいのか、防止対策委員会が恣意的に切ることが許されるのかという問題。これは他方で、何でも受け付ける結果、些細（？）な揉め事に多忙なメンバーで構成される全学委員会が振り回されることが仕方ないことなのかという問題にもつながり、つまりはどこまでがハラスメントかというもっとも基本的な問題に対応できていないゆえの混乱がいまだに整理できていないという悩みを抱え続けていることになる。

4. 相手方に対して、対応の仕方に配慮を欠けば、相手方が過激ないし強硬な対抗手段に及ぶか、或いは逆に抑うつ状態に陥ることがあり得ることも、これまでの経験の蓄積の中で明らかになった。そのため現在は、相談センターの別の相談員が相手方のケアにあたるなど、慎重を期した体制がとられている。

問題の存在の一方で、目下次のような新たな対応が行われていることも紹介された。

1. 「通知制度」について、他機関の先行事例を研究中。先行事例では相手方を加害者と位置付けることが多いようだが、名古屋大学では、何も調査はされていないので「その人をめぐって繰り返し相談が持ちかけられる」という事実をもって当該人物を加害行為者であると推認はしないという方向で検討中。その際、二次被害の回避の方法、相談者の了解、通知対象者の判断の基準と責任主体など、まだなおクリアしなければならない問題も多く、すぐに導入できる見通しはたっていない。

2. つぎはぎ規定の集合として現在の規定の全体像があるため、その中での運用上の苦勞を軽減したい、人権にかかわる問題であり、論理的な一貫性は必要であるとの観点から、諸規定の整理、とくにセクハラ、アカハラ・パワハラの本一本化などを検討中（ただし単純な一本化ではなく、各々の特性に十分対応できるよう留意しつつ検討中）。

最後に質疑応答が行われたが、中でも、ハラスメント防止体制のもとにある諸機関と労働安全対策セクションとの連携はどうかとの問いに対しては、目下そのような連携はなく、大学に持ち帰って今後の検討課題にしたいとの回答がなされた。

細胞の興奮リズム生成における Ca クロック機構 (S6)

細胞内 Ca^{2+} は種々の刺激によって増加し、筋収縮、分泌、生理活性物質放出、受精、免疫、代謝等、多彩な細胞機能を調節している。興奮性細胞においては多くの場合活動電位に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加するが、活動電位を伴わない自発的な Ca^{2+} 濃度変動 (Ca^{2+} オシレーション) も知られている。近年、 Ca^{2+} オシレーション自体が興奮性細胞の興奮リズム形成に関与するという報告が相次ぎ、とりわけ心臓自動能を研究している領域においては Ca^{2+} クロックという概念が提唱されるに至っている。本シンポジウムは、生体内の様々な細胞において見られる細胞内 Ca^{2+} 濃度の周期的変動に着目し、 Ca^{2+} クロックが一体どのような分子機序で形成されるのかについて幅広く議論する事を目的として企画した。

本論に入る前に、 Ca^{2+} クロックの概念と、それが提唱されるに至った歴史的背景を少しだけ述べてみたい。発端は心臓自動能研究において見出された現象に由来する。洞房結節から単離したペースメーカー細胞が規則正しい興奮リズムを刻むのは、生物時計と同じように「時を刻むしくみ」、即ち、時計 (Clock) の機能が備わっているからと考えられる。従来、この自動能は細胞膜に存在するイオン輸送体の開閉が時間と膜電位に依存して変化し、膜電位が周期的な変化を刻むことによるとされ、心臓電気生理学が活発になった1970年代後半から唱えられてきた。ところが、2000年以降筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が膜電位とは無関係に周期的に起こり、放出された Ca^{2+} が細胞膜の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体によって細胞外へ排出される際に膜を脱分極させることで、ペースメーカー細胞の自動能へ関与しているという研究が相次いで報告されるようになった。前者をイオンチャネルクロック、後者を Ca^{2+} クロックと呼び、両クロックの相補作用が正常自動能の維持に重要と考えられている。

Ca^{2+} クロックという用語自体は比較的新しい概念かもしれない。しかし、細胞内 Ca^{2+} が振動性に变化する現象は「 Ca^{2+} オシレーション」として、興奮性、非興奮性細胞を問わず多くの細胞において古くから認められている。本シンポジウムでの発表を見てみよう。尾野は肺静脈心筋細胞の自動能は主として Ca^{2+} クロックにより惹起されていることを報告している。正常自動能が前述のごとくイオンチャネルクロックと Ca^{2+} クロックとの協調作用が主体とされているのとは対照的である。今泉先生は消化管の自発性蠕動運動がカハール系間質系細胞の Ca^{2+} クロックにより引き起こされることを報告していただいた。また、岡部先生には破骨細胞の細胞内 Ca^{2+} 振動をご紹介いただいた。破骨細胞は非興奮性の細胞であるが、その分化プロセスにおいて顕著な細胞内 Ca^{2+} オシレーションが見られるという。このように、 Ca^{2+} クロック機構については興奮性細胞のみならず多くの細胞に認められており、今泉先生が指摘しているようにユビキタな生理的意義を有するシステムと言えそうだ。最後に、倉田先生には心臓自動能のメカニズム研究で中心的な話題となっている「イオンチャネルクロック vs Ca^{2+} クロック」というテーマで発表していただいた。分岐解析 (Bifurcation analysis) など力学系理論に基づいた解析からは、「生理的条件下での洞結節自動能の発現には主にイオンチャネルクロックが寄与しており、 Ca^{2+} クロックは必須ではない」という結論が導かれるという。Wet な実験が細胞のばらつきや実験条件に左右されるのに対し、理論的なアプローチからこのような結論が得られたことはとても興味深い。

今後は、 Ca^{2+} クロックの生理学的意義についてはもちろんのことだが、一体どのようなメカニズムで周期的な放出が起こるのかという、 Ca^{2+} クロックの発生機転についての研究が発展していくと思われる。本シンポジウムでご発表いただいた先生方のますますの発展を期待したい。

尾野 恭一 (オーガナイザー, 秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学)

肺静脈心筋細胞におけるノルエピネフリン誘発自動能への Ca クロックの関与

尾野 恭一¹, 岡本 洋介¹, 安達 健¹, 大場 貴喜¹, 鷹野 誠² (¹秋田大学大学院医学系研究科・細胞生理学, ²久留米大学医学部・生理学講座統合自律機能部門)

現在、慢性の不整脈で最も頻度が多い心房細動は心房内を不規則に興奮が巡回するリエントリーが原因と考えられているが、多くの心房細動は肺静脈を起源とした期外収縮が引き金になって生じることが明らかとなっている [1]。肺静脈壁の内膜層は心筋細胞で占められており、左心房から肺

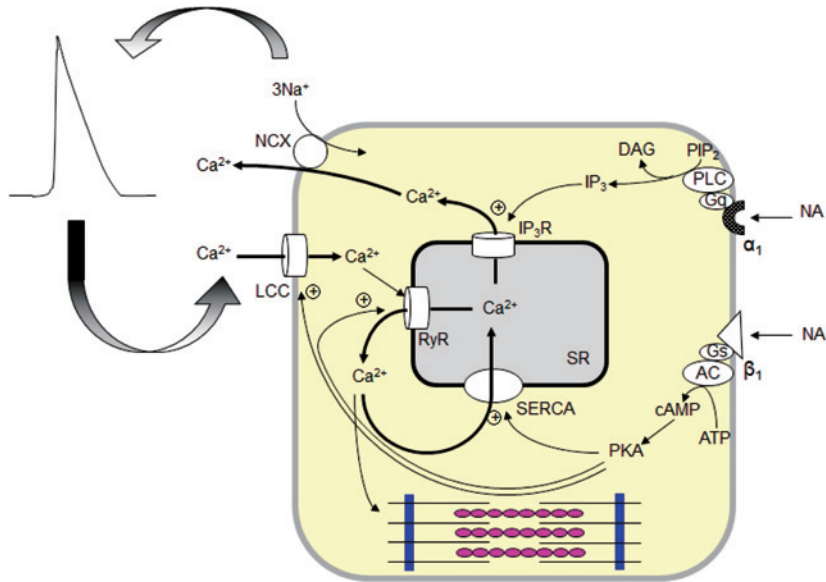


図1. 肺静脈心筋のノルアドレナリン誘発自動能のメカニズム

NA誘発自動能の出現には α_1 、 β_1 アドレナリン受容体の活性化が必要。詳細は本文を参照のこと。NA：アドレナリン、PLC：ホスホリパーゼC、 PIP_2 ：、DAG：ジアシルグリセロール、 IP_3 ：イノシトール三リン酸、 IP_3R ： IP_3 受容体、NCX：Na/Ca輸送体、LCC：L型Caチャネル、RyR：リアノジン受容体、SR：筋小胞体、SERCA：筋小胞体Caポンプ、PKA：cAMP依存性タンパクキナーゼ、AC：アデニル酸シクラーゼ

の比較的末梢まで血管壁を伝って長く延びている。

動物実験においては、肺静脈の心筋細胞が左心房筋細胞とは異なり、自動能を惹起しやすい性質を有していることが報告されている [2-4]。Doisneらはラット肺静脈心筋がノルアドレナリン(NA)により自動能を示すことを報告した[5]。そこで、我々は単離したラット肺静脈心筋細胞を用いて実験を行った [6]。単離細胞において認められるNA誘発自発性活動電位は、洞房結節細胞とは異なり、緩徐脱分極相が顕著ではなく静止電位から急速に活動電位立ち上がり相へ移行していた。また、NA投与後膜抵抗には変化が認められず、自動能発生に先行して細胞内 Ca^{2+} の周期的増加が観察された。これらのことから、 Ca^{2+} クロックによる自動能が示唆された。

自動能発生には α アドレナリン受容体、 β アドレナリン受容体の両者が関与しており[5,6]、肺静脈心筋のNA誘発自動能は IP_3 受容体を遮断することにより抑制された。肺静脈心筋細胞は形態的に心房筋とは異なる性質を有している。一般に心室筋細胞は大きく、横紋が明瞭で、T管が発達し

ている。肺静脈心筋細胞において IP_3 受容体及びNa/Ca交換体(NCX)はT管に沿って密に共局在しており、 IP_3 受容体を介して放出された Ca^{2+} が効率よくNCXを活性化できる構造的基盤となっていると考えられた [6]。

我々は、以下の仮説を提唱している(図1)。NAの α アドレナリン受容体刺激は IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を引き起こす。放出された Ca^{2+} は近接するNCXにより細胞外へ排出され、その際に膜を脱分極させ活動電位を惹起する。 β アドレナリン受容体刺激はcAMP系を介してL型 Ca^{2+} チャネルの活性化、リアノジン受容体の活性促進、筋小胞体の Ca^{2+} ポンプ活性化を引き起こす。そのため、活動電位発生に伴う細胞内への Ca^{2+} 流入量が増加し、筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みが増大する。結果として、 Ca^{2+} 過剰負荷がもたらされ、再び IP_3 受容体を介して Ca^{2+} が放出されて、次の活動電位発生サイクルへと移行することになる [6]。

以上のことから、肺静脈心筋細胞におけるNA誘発自動能はCaクロックによると結論した。

1. Haissaguerre, et al: N Eng J Med **339**: 659-666, 1998

- Cheung DW: J Physiol **314**: 445-456, 1981
- Honjo H: Circulation **107**: 1937-1943, 2003
- Namekata I: J Pharmacol Sci **110**:111-116, 2009
- Doisne N: Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**: H102-108, 2009
- Okamoto, et al: J Mol Cell Cardiol **52**: 988-997, 2012

平滑筋臓器におけるCa²⁺クロックとペースメーカーキング機能

今泉祐治 (名古屋市立大・薬・細胞分子薬効解析学)

消化管における自発性の蠕動運動は、受容体型チロシンキナーゼをコードする遺伝子c-kit陽性のカハール間質系細胞で発生するペースメーカー電位が平滑筋細胞へと伝播され、活動電位を誘発し、収縮を起こさせることによっている。カハール間質系細胞でのペースメーカー電位は自発的な周期性の細胞内Ca²⁺濃度上昇により、Ca²⁺感受性のイオンチャネルが活性化され脱分極が生じるためと推定されている [1]。自発的な周期性の細胞内Ca²⁺濃度上昇は、主に小胞体からのイノシトール3リン酸受容体Ca²⁺遊離チャネル(IP₃R)を介した自発的なCa²⁺遊離によっていると推測されており [2]。"Ca²⁺クロックによるペースメーカーキング"という概念に非常に適合する事象と考えられる。何故、自発的な周期性の細胞内Ca²⁺濃度上昇が生じるかについては、今のところ十分な知見が得られていないものの、ミトコンドリアの呼吸リズムと小胞体のCa²⁺ハンドリングの関連によることが示唆されている [1]。一方、ペースメーカー電位の発生には、一過性のCa²⁺シグナルが電気現象へと信号変換される必要があり、その分子素子としてかねてよりCa²⁺活性化Cl⁻チャネルが想定されていた。さらに2008年にCa²⁺活性化Cl⁻チャネルとして同定されたTMEM16A [3]が、カハール間質細胞でのこの信号変換素子の分子実体である可能性の高いことをSandersらが明らかにしている [4]。カハール間質系細胞においてCa²⁺クロック機構が機能している可能性は、消化管以外で尿道・門脈・卵管など他の自発運動を有する平滑筋組織でも示唆されており、よりユビキタな生理的意義を有するシステムかも知れない。組織培養したマウス消化管のカハール細胞や尿道のカハール細胞ではIP₃Rに加えてリアノジン受容体(RyR)がCa²⁺クロック機構に深く関与している可能性が示唆されている。我々は、HEK293細胞に3型RyR(RyR3)を遺伝子導入により高発現させると、1分間に数回程度の自発性Ca²⁺濃度上昇

が生じることを既に見出している [5]。この現象をCa²⁺クロックとして利用し、ペースメーカー電位への信号変換機能を有するモデル細胞としてTMEM16AとRyRを同時に発現させたHEK293細胞の作成を試みており、ペースメーカー機構の解明に役立つことが期待される。

- Berridge MJ: J Physiol **586**:5047-5061, 2008
- Suzuki H, et al: J Physiol **525**: 105-111, 2000
- Schroeder BC, et al: Cell **134**: 1019-29, 2008
- Hwang SJ, et al: J Physiol **587**: 4887-4904, 2009
- Aoyama M, et al: J Cell Sci **117**: 2813-2825, 2004

Ca²⁺オシレーションと破骨細胞の分化制御機構

岡部幸司, 鍛冶屋 浩, 岡本富士雄, 堤 貴司 (福岡歯科大学細胞生理学)

破骨細胞が種々の環境ストレスのもとで異常に増殖し活性化されると、様々な骨吸収性の疾患が発症する。従って、破骨細胞の分化誘導の起点を解明することは、骨疾患を制御する上で臨床的にも意義深い。この破骨細胞の分化過程には、誘導因子であるreceptor activator of NF-κB ligand (RANKL)の存在が必須である。破骨細胞の分化過程において、まずRANKL依存性に破骨前駆細胞に誘発されるCa²⁺オシレーションが、Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素(calcineurin)を活性化し、分化の必須転写因子である転写因子Nuclear Factor of Activated T-cells 1 (NFATc1)の活性化や標的遺伝子発現を誘導する(Takayanagi et al., 2002)。我々は破骨細胞の分化トリガーとなるCa²⁺オシレーションに注目し、これを構築するCa²⁺輸送体を同定し、そのオシレーション形成機序とその後引き続く分化シグナルの調節機構を検討した。

RANKL刺激により破骨細胞へ分化するRAW 264.7細胞を用いて、RANKL刺激48時間後のDNAマイクロアレイ解析を行った結果、RAW 264.7細胞にCa²⁺透過性の非選択性陽イオンチャネルの一つであるTransient Receptor Potential Vanilloid channels 2 (TRPV2)の発現が有意に上昇することが分かった。このTRPV2の発現上昇はRANKL刺激後24時間でピークを示し、その後、徐々に発現が低下する一過性の発現増加が認められた。この分化の初期過程では自発的で周期的なCa²⁺オシレーションと内向き陽イオン電流の活性化が誘発され、両者の発生頻度やパターンはよく一致すると共に、その発生もRANKLに依存性した。また、これらのオシレーション及び電流の発生はTRPV阻害剤により抑制され、TRPV2をsilencingした細胞では、両者の発生頻

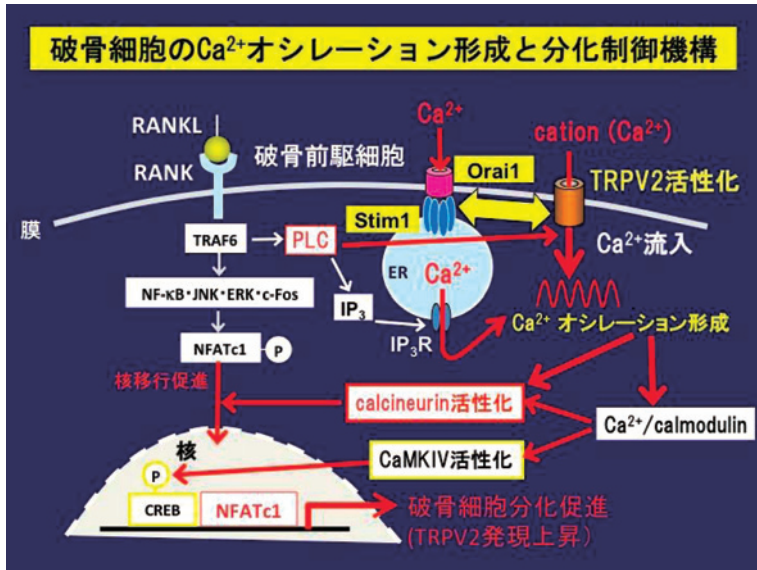


図2. 破骨細胞のCa²⁺オシレーション形成と分化制御機構

度が有意に減少した。さらに、PLC 阻害剤の投与、及び、store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) を形成する機能分子である Stim1 や Orai1 を silencing すると、両者の発生が抑制された。一方、TRPV2-silencing 細胞では転写因子 NFATc1 の発現やその核内移行、及び最終的な破骨細胞への分化・誘導が抑制された。以上の結果より、破骨細胞分化を誘発する Ca²⁺ オシレーション形成には、報告された IP₃ 受容体からの Ca²⁺ 放出だけでなく、TRPV2 を介した Ca²⁺ 流入が重要で、TRPV2 はこの Ca²⁺ オシレーションを構築する重要な機能分子であると考えられる(図2)。また、TRPV2 の活性化には PLC 系や SOCE 機構が関与することも明らかとなった (Kajiya et al., 2010)。このような破骨細胞の Ca²⁺ オシレーション形成の分子機序を解明することは、破骨細胞の分化増殖機構を理解すると共に、TRP 分子を標的とした異常骨吸収を制御する新規の薬剤や治療法の開発への基盤としても意義があると考えられる。

洞結節自動能の発現維持における細胞内 Ca²⁺ 動態ならびに Na⁺/Ca²⁺ 交換電流の役割：非線形力学モデルの分岐解析による理論的検証

倉田康孝¹、久留一郎²、芝本利重¹ (¹金沢医科大学 大学生理学 II、²鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医学)

[研究の背景]

心臓洞結節における自動能の発現は、形質膜イ

オンチャネル電流の相互作用 (membrane clock) によるとされてきたが、近年、筋小胞体 Ca²⁺ clock (細胞内 Ca²⁺ 動態) の役割が注目されている [1]。本研究では、最新のウサギ洞結節細胞モデルを用い、自動能の発現・維持における筋小胞体 Ca²⁺ clock 及び Na⁺/Ca²⁺ 交換体の役割を理論的に検証した。

[研究方法と成果]

ペースメーカー脱分極相での自発的な筋小胞体 Ca²⁺ 遊離を再現できるウサギ洞結節細胞モデル (Maltsev-Lakatta モデル) の平衡点 (定常状態) と周期解 (自発性活動電位振動) 及びその安定性をパラメータ (筋小胞体 Ca²⁺ 取込速度、Na⁺/Ca²⁺ 交換体密度、L 型 Ca チャネルコンダクタンス) の関数として計算し、これらのパラメータ依存性変化を表す“分岐図”を作成した。自動能が消失或は不規則となるパラメータ値 (分岐点) を求め、細胞内 Ca²⁺ 濃度及び膜電位の安定性の変化、自動能のロバスト性を解析した。

膜電位固定下でのモデル細胞の平衡点は安定であり、細胞内 Ca²⁺ 振動は生じなかったが、Na⁺/Ca²⁺ 交換電流の減少により平衡点の不安定化が生じ、自発性 Ca²⁺ 振動が出現した。Ca²⁺ clock を除去すると、L 型 Ca²⁺ チャネル電流抑制時に周期解の分岐 (自発性活動電位の不規則化) が生じ、平衡点の安定化が促進された。L 型 Ca²⁺ チャネル電流抑制下では筋小胞体 Ca²⁺ 取込抑制により平衡点の安定化が生じ、自発性活動電位が消失した。ま

た、自発性活動電位の消失或は不規則化を生じる過分極通電電流閾値はCa²⁺clock除去により低下した。

以上の結果から、生理的条件下での洞結節自動能の発現には主にmembrane clockが寄与しており、Ca²⁺clockは必須ではないと推察された。Ca²⁺clock (及びNa⁺/Ca²⁺交換体)の基本的な役割は、membrane clockの減弱や過分極負荷に対する自動能のロバスト性を強化することであるが、L型Ca²⁺チャンネル抑制下での洞結節自動能はCa²⁺clock依存性となり得ることが示唆された(詳細は[2]参照)。

[総括(研究の意義)]

洞結節自動能の機序として、membrane (volt-

age) clockとCa²⁺clockのいずれが主役を担っているかが議論されてきたが、本研究はこの論争に対する一つの解答を与えると同時に、Ca²⁺clockの役割についても明確な結論を与えている。成体の洞結節細胞ではCa²⁺clockによる自動能(自発性Ca²⁺振動)は生じ難いが、胎生期の心筋細胞や他の組織・細胞では明らかにCa²⁺clockによる自発性Ca²⁺振動がみられることから、自動能の多様性に関するさらなる実験的・理論的解析が必要であると考えられた。

1. Maltsev VA: Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**: H594-H615, 2009
2. Kurata Y: Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012 (in press)

ストレスに対する生体応答と調節因子 (S11)

現代社会はストレス社会と言われ、ストレス研究に注目が集まっている。精神的ストレスはうつ病や心身症などの精神性疾患だけでなく、心血管疾患や癌など日本人の死因の上位を占める疾患の危険因子であることが知られており、世界一を誇る日本の長寿を脅かす要因になっている。しかし、精神性ストレスがいかなるメカニズムでこれらの疾患を引き起こすのか、詳細は未だ明らかでない。

精神性ストレスに関する論文数は2000年以降徐々に増えている。PubMedを用い「Psychological stress」のキーワードで検索された論文数は2000年では約2500報だったのに比べ、10年後の2010年には約7000報と2.6倍に増加した。しかし、もうひとつの重要なストレスに関連するキーワードの「Oxidative stress」でヒットした論文数はこれを上回る伸び率(3.8倍)であり、2011年の論文総数は約12,000報で精神性ストレスの約2倍であった。それでは、両者を扱った論文数が増えているかと期待したが、年間二桁台と未だに少ない。一般的な話題としては、精神性ストレスが酸化ストレスを増大させるとよく耳にするが、それを実証した研究は意外に少ないのが現状である。

本シンポジウムでは、ストレス反応・応答に関する基礎研究から、ストレス関連疾患に関する研究に至る幅広いテーマでシンポジウムを企画した。末梢血管系のストレス反応と調節因子としてのエストロゲンの作用、幼少時のストレスが生育後の脳の可塑性に及ぼす分子基盤、脳のストレス応答とその調節因子としての緑の香のうつ病への予防・治療効果、ストレス・虚血による心臓の応答とその破綻としての突然死のメカニズムについてご講演いただいた。このように、本シンポジウムでは、生理学、組織学、生化学の幅広い観点からストレス応答を捉え、その調節因子を知ることにより、ストレス社会を生き抜くヒントを得る基礎データを示すことができた。

なお、本シンポジウムは日本発汗学会連携シンポジウムとして企画する機会をいただいた。第89回日本生理学会大会長の大橋俊夫先生始め関係各位に心より感謝申し上げます。

オーガナイザー：森本 恵子(奈良女子大学大学院生活環境科学系)
吉田 謙一(東京大学医学系研究科法医学講座)

精神性ストレスに対する循環反応におけるエストロゲンの調節作用：閉経モデルラットおよび中年女性の実験より

森本恵子, 小山禎子, 田積昇子, 尾本さよ, 鷹股 亮 (奈良女子大学生生活環境学部生活健康講座)

精神性ストレスは心血管疾患や癌など生活習慣病の危険因子である。また、女性においては、閉経そのものが心血管疾患の危険因子であることが疫学的に実証されている。しかし、エストロゲンの心血管保護作用のメカニズムには不明な点が多い。我々は、閉経後女性で心血管疾患が増加するのは、エストロゲンの欠乏によるストレス耐性低下が一因であると考え、卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充が精神性ストレス時の循環反応を緩和することを見出した [1]。本研究では、動物実験だけでなく、ヒトを対象とした実験において、エストロゲンの抗酸化作用を介したストレス時の循環調節への影響について検討した。さらに、エストロゲン作用を補充すると考えられる抗酸化ビタミン摂取の影響についても検討を加えた。

ヒトの実験では、閉経前後の中年女性を対象にマイルドな精神性ストレスとしてカラーワードテスト (CWT) を行い、超音波法による上腕動脈内径・血流量の経時的な測定と採血を実施した。さらに、CWT 前後で上腕圧迫により反応性充血を起こし、上腕動脈血管床における内皮機能の変化を検討した。その結果、閉経後女性では、CWT により上腕動脈血管抵抗が増加し、血漿ノルエピネフリン濃度が上昇した。しかし、ビタミンCの経口投与によってこれらの変化が改善されたことから、エストロゲン欠乏時の精神性ストレスによる血管抵抗増大には酸化ストレスが関与する可能性が示唆された [3]。

動物実験では、雌性ラットを用いて、環境変化によるマイルドな精神性ストレスであるケージ交換ストレス負荷時の循環反応及び酸化ストレスの変動におけるエストロゲンの影響について検討した [1]。卵巣摘出後プラセボ補充 (Pla) 群とエストロゲン補充 (E2) 群にケージ交換ストレスを負荷したところ、E2 群では昇圧反応が抑制された。酸化ストレスマーカーである血漿 Nitrotyrosine 濃度は、Pla 群でのみ上昇し、血漿一酸化窒素代謝産物は低下したが、E2 群では変化しなかった。この結果より、エストロゲンの精神性ストレス時の昇圧反応抑制には、酸化ストレス軽減に伴う一酸化窒素低下改善が関与すると考えられた。

エストロゲン欠乏時の精神性ストレスによる血管抵抗増大には酸化ストレスが関与している可能性があり、抗酸化ビタミン摂取は閉経後女性にお

いてはエストロゲンの精神性ストレス緩和作用を補完できる可能性を示しており、閉経後女性における血管機能障害の予防・治療法への応用が期待される。

1. Morimoto K: Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**: H1950-H1956, 2004
2. Uji M: Life Sci **80**: 860-866, 2007
3. Morimoto K: Life Sci **82**: 99-107, 2008

幼少期のストレスが脳の可塑性に及ぼす影響

西 真弓, 堀井-林 謹子, 笹川誉世, 松永 渉 (奈良県立医大・医・第一解剖学)

[イントロダクション]

急速に変化する現代社会における家族構成の変化は、親子関係、特に母子関係を中心とした社会環境に大きな影響を与えており、幼少期の養育環境の劣悪化等のストレスが、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA-axis) などのプログラミングに影響を及ぼし、それが成長後の脳の機能・構造に重大かつ継続的な諸問題を引き起こし、うつ病、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)、薬物依存などに罹患する確率が上昇すること等が報告されている [1, 2]。しかし、幼少期の一過性のストレスが、生涯にわたって行動に影響を及ぼす分子基盤は、未だ完全には解明されていない。そこで本研究では、母子分離 (maternal separation; MS) ストレス負荷動物を用い、遺伝子と環境との相互作用を切り口に、分子から行動レベルまで生物階層性の段階を追って研究を進め、幼少期ストレスが発達期および成長後の脳の可塑性に及ぼす影響の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

[研究方法・成果]

マウスに、MS によりストレス負荷した。生後 1-14 日 (P1-P14)、3 時間/日の MS を行う群 (repeated MS: RMS) と生後 14 日に一度のみ MS を行う群 (single MS: SMS)、および MS しない対照群を用いて行った。

>MS が HPA-axis にどのような影響を与えるのかを解析するため血中コルチコステロン (CORT) 濃度を測定した。P14 の RMS では CORT の有意な上昇は認めなかったが、SMS では有意に上昇した。一方、成体においては RMS 群では対照群に比して平常状態の CORT は有意に高値を示した。

>母子分離によって活性化される脳部位を c-Fos 蛋白質の発現を指標にして詳細に検討した。視床下部および辺縁系の多くの部位で RMS 及び SMS により c-Fos 発現は対照群に比して有意に増加したが、分界条床核と扁桃体中心核において

はRMSでは有意な増加は認めず、SMSでのみ有意な上昇を認めた。これらの脳部位がMSストレスの馴化などに関与する可能性について、種々のストレス関連マーカーにより解析を進めている。

>上記のc-Fosの発現を基に遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイにて解析した。今回は海馬のCA1およびDGにおいて、MSと対照群の2群間を比較検討した結果、海馬のCA1領域でcPLA2 (cytosolic phospholipase A2) の発現がMSにより減少する相関が見られた。

[当該分野における意義]

ストレス適応機構の衰退や破綻が、うつ病やPTSDなどの発症に構っており、幼少期の虐待等のストレスは最高レベルの危険因子と言われ、深刻な問題となっている。本研究課題達成時には、幼少期における劣悪な養育環境が生後のストレス応答、神経回路形成等に及ぼす分子基盤が解明され、精神神経疾患の予防・治療法の開発に結びつけることも期待される。

1. Levine S: Science **156**: 258-260, 1967
2. Lupien SJ, et al.: Nature Reviews Neuroscience **10**: 434-445, 2009

うつ病に対する緑の香りの予防・治療効果について～ラットを用いた検討～

渡邊達生 (鳥取大学医学部統合生理学分野)

うつ病はストレスを誘因として発症することが多い。実際、慢性ストレスを実験動物に負荷するとうつ病モデル動物が作成できる。一方、ストレスはグルココルチコイド (GC) の産生増加を介して海馬神経を障害したり海馬神経新生を抑制する。GCは海馬に高密度に分布するステロイド受容体に結合し、視床下部へネガティブフィードバックをかけているので、海馬の障害は視床下部・下垂体・副腎系 (HPA系) のフィードバック抑制を減弱させる。その結果、HPA系の活性上昇が起こり、GC分泌がさらに増して海馬がさらに障害されるという悪循環に陥る。近年、海馬の障害とうつ病との関連が注目されている。実際、抗うつ病薬は海馬神経新生を促進して抗うつ作用を示すと報告されている。したがって、慢性ストレスによるHPA系の活性上昇と海馬の障害ならびに海馬の神経新生抑制がうつ病の1つの原因となっていると推察される (事実、うつ病患者では、HPA系の活性上昇と海馬の萎縮が知られている)。近年私たちは、香料の一つである緑の香り (青葉アルコール/青葉アルデヒド) が慢性ストレスによる皮膚バリアー障害を抑制する事実を発見した[2]。緑の香りはストレスによるHPA系の活

性を抑制するので [3]、緑の香りにはストレス緩和作用があるものと考えられる。本研究では、慢性ストレス負荷ラットが香料を嗅ぐことにより、うつ病が治癒・予防できるか否かを検討した。うつ病の治癒効果を調べる実験では、強制水泳試験と学習性無力試験の二つの方法でラットをうつ状態とし、ラットに緑の香りを10~11日間嗅がせる群と嗅がせない群を用意した。実験の最終日に再び強制水泳試験または学習性無力試験を行い、うつ状態の判定を行なった。1日一回、3分間の強制水泳を7日間負荷すると無動時間は有意に長くなった。その後10日間緑の香りを嗅がせると無動時間は有意に短くなり、海馬の脳由来神経栄養因子の発現が増加した。学習性無力試験ではpost-shock screening test 後11日間緑の香りを嗅がせると、嗅がせない群と比較してfailureの回数が有意に減少した。さらに、うつ病の予防効果を検討する実験では、強制水泳試験を10日間行いながら緑の香りを嗅がせる群と嗅がせない群で無動時間を比較した。その結果、緑の香りを嗅がせた群では6日目以降の無動時間が有意に抑制された。以上の結果から、緑の香りにはうつ病の治癒効果と予防効果の両者があるものと考えられる。

1. Watanabe T: Behav. Brain Res **224**: 290-6, 2011
2. Fukada M: Chem Senses **32**: 633-9, 2007
3. Ito A: Neurosci Res **65**: 166-74, 2009

ストレス・虚血に関連した心臓突然死を心筋病変・不整脈の発生機序から見る

吉田謙一, 新谷 香 (東京大学大学院医学系研究科法医学講座)

法医解剖において、事故、暴行、身体拘束等の“外因”が作用している最中や直後、突然死する症例を経験することが多い。死に至る経過が短いため、剖検・組織診断、そして外因と死亡との因果関係の判断が難しい。このような突然死の約7割は心臓性突然死であり、多くに虚血性心疾患や不整脈が寄与している。また、心肥大、冠動脈硬化症に加えて、組織上、収縮帯 (Contraction Band Necrosis: CBN) を発現していることが多い。動物においては、虚血再灌流にCBNを伴い、その背景に、Ca²⁺ overload, 交感神経過緊張があると考えられている。

隣接する心筋をつなぐGap Junction (GJ) の主要な構成蛋白であるConnexin 43 (Cx43) は、虚血、心不全等で、GJから側方細胞膜に移動 (側方化) し、消失することが知られている。これが、収縮不全や不整脈の原因になると考えられてい

る。

私達は、ラットの冠動脈を結紮すると、GJのCx43が30分程度をピークに増加し、GJの伝導度が上昇し、その後、既報どおり、脱リン酸化、減少することを見出した。この短時間虚血による一過性Cx43上昇は、再灌流5分で、虚血領域全般に連続的に広がるCBNの原因であることが、GJ阻害剤(carboxoxolone:CBX)の効果より確認された。再灌流6時間後の梗塞サイズも、CBXで縮小したことから、GJを介して隣接細胞間に伝わる物質によって、Ca²⁺ overloadから、CBN、時間経過とともに心筋梗塞が進展すると考えられる。

異常に興奮した人の身体を警察官や精神病院職員が拘束した時、突然死することが少なくない。従来、胸郭圧迫による窒息死と考えられており、警察官等の責任が問われることがあった。私達は、解剖所見上、心肥大、冠動脈硬化症、肥満等の心血管系リスクに加えて、肺鬱血、担鉄マクロファージ(心不全細胞)を認めることから、心不全、不整脈による心臓突然死を疑ってきた。ラットの身体拘束は、H.セリエが、心理ストレスに対するHypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axisと交

感神経系の活性化による循環反応のモデルである。このモデルにおいて、Cx43がGJに転移し、心筋間伝導を促進することで、不整脈発生を抑えていることを見出した。Cx43は、心筋梗塞、心不全等において、減少、GJから側方へ転移、または脱リン酸化し、心筋間伝導低下、reentryから不整脈の発生源になると考えられている。このような病態を、ラットにGJ阻害剤前を投与することによって再現した上で、身体拘束すると約1/4に心室細動や心室頻脈を再現できた。この結果より、心疾患や危険因子を有する人を身体拘束、あるいは心理ストレスに暴露すると突然死することに関するエビデンスが得られたと考えられる。

これまで、Cx43のdownregulationが心不全や不整脈に寄与することばかりが目立ってきたが、私達は、Cx43のupregulationが心筋収縮帯病変の進展、不整脈の抑制に寄与することを見出した。

1. Shintani-Ishida: *Biochim Biophys Acta* **1812**: 743-51, 2011
2. Unuma K: *Circ J* **74**: 1087-95, 2010
3. Shintani-Ishida K: *Circ J* **73**: 1661-8, 2009

下垂体の機能調節に関わる新規分子の解明 (S17)

下垂体前葉は、末梢内分泌腺を支配するとともに、中枢神経系からの情報を内分泌情報へ変換するという重要な役割を担っている。最近数年間において、この下垂体前葉に関する精力的な研究によって、新たな機能調節系とそれに関与する分子が注目を浴びるようになってきた。本シンポジウムにおいて、山田からは、TRHノックアウトマウスを使ってTRHによって制御される遺伝子群を調べた結果が報告された。その結果は、TRHは、ERK1/2及びPKC経路を介しNR4A1遺伝子プロモーター発現を促進し、これによってTSHβ遺伝子を刺激しているという興味あるものであった。次に、三井からは、下垂体前葉プロラクチン細胞の増殖に対するエストロジェンの抑制作用の機構解明に関する結果が報告された。網羅的遺伝子解析によって同定された、NF-κBシグナル伝達系転写因子であるBcl3の遺伝子発現が抑制されることがエストロジェンの増殖抑制作用に関与すること、このBcl3がエストロジェン依存性腫瘍の創薬の有力な標的となることが示された。坂田からは、これまで不明な点が多かった下垂体隆起部の機能の解明を目指した研究結果が報告された。隆起部においても下垂体主部と同様にTSHβ mRNAが発現しているが、下垂体主部とは異なり、この発現はグルタミン酸がオートクラインまたはパラクライン様式によってグルタミン酸受容体KA2を介し促進されることが示された。吉田からは、下垂体の発生分化に関与するStem/Progenitor細胞と下垂体特異的転写因子PRO1及びPRX1・2との関連を組織化学的に解析し、この両者がStem/Progenitor細胞に発現しているだけでなく、成熟下垂体における細胞新生・ホルモン産生細胞の供給にも関与していることを報告した。最後に、堀口らは、下垂体細胞の中でホルモンを合成しない細胞(代表格が濾胞星状細胞)の新規の機能を調べ、細胞間結合であるギャップ結合を介した情報伝達ネットワークによって濾胞星状細胞が前葉細胞の機能を制御していることを報告し、濾胞星状細胞の新規機能の重要性を強調した。本シンポジウムに

において発表された研究成果が、今後の下垂体研究において大きな展開を引き起こし、下垂体の機能とその調節の理解がさらに深まることが期待される。

オーガナイザー：有田 順（山梨大学大学院医学工学総合研究部生理学第一）
加藤 幸雄（明治大学農学部生命科学科遺伝情報制御学研究室）

TRH ノックアウトマウスを用いた新たな生理活性経路の探索

山田正信, 中島康代, 田口 亮, 森 昌朋（群馬大学医学部病態制御内科学）

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は, Schally と Guillemin らにより最初の視床下部ホルモンとして 1969 年に単離され, 彼らは後にノーベル医学賞を受賞した. TRH は, 当初下垂体からの TSH の分泌を刺激するホルモンとして単離されたが, その後 TSH β 遺伝子の転写を刺激しているばかりでなくプロラクチンの合成分泌も刺激していることが明らかとなった. さらに TRH は視床下部以外の全脳や腸管, 膵 β 細胞にも存在することが判明している. しかし, 現在となっても TRH の TSH β 遺伝子転写刺激作用の詳細な機構や視床下部以外における TRH の作用についての詳細は明らかでない. 我々はこれらの疑問を解決するため TRH を全身で欠損するマウス (TRH ノックアウトマウス, TRHKO) を作製した [1]. TRHKO は, 甲状腺機能低下症となったが, 予想に反し血清 TSH は軽度上昇し, TRH は TSH の糖鎖などを制御することにより生物学的活性も制御していることが明らかとなった. また, TRHKO は, 膵臓からのインスリン分泌不全を伴う軽度耐糖能異常をきたすことも明らかとなった. また, TRH の高次脳機能作用のひとつとして小脳の cGMP 系に関与しエタノールの酪酐状態から回復させることが報告されていた. そこで, 小脳の cDNA マイクロアレイ解析を行い, TRH は細胞周期関連蛋白質 PFTK1 を制御し NO-cGMP に関与していることが明らかとなった [2]. また, 下垂体 TSH β 遺伝子への作用を検討するため, 野生型と TRHKO, TRHKO に甲状腺ホルモンを補充した下垂体をマイクロアレイ解析を行い, さらに, これらの群間において K-means クラスタ解析をおこなった. その結果, 下垂体で発現している約 15000 遺伝子の内, 最も強く TRH により刺激されさらに甲状腺ホルモンにより抑制される遺伝子は唯一 TSH β 遺伝子だけであることが判明し, TRH の TSH β への作用は生体において極めて特異性の高いことが判明した. また, 一方で TSH β と同じクラスターに所属する遺伝子として NR4A1 が発見された. NR4A1 は免疫組織化学的検討にて TRHKO 下垂体において TSH 産生細胞

特異的にその発現が低下していることが確認され, さらに *in vitro* の実験系でも TRH は ERK1/2 並びに PKC 経路を介し NR4A1 遺伝子プロモーター発現を刺激し, 一時間で mRNA を数十倍に増加させ, TSH β 遺伝子を刺激していることが判明した [3]. この様に, TRHKO を用いこれまで不明であった新たな TRH の生理活性経路が明らかになり, 最近では, 細胞内の ER-shaping 蛋白質への影響も明らかとなりつつある.

1. Yamada M, et al: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 10862-10867, 1997
2. Hashida T, et al: Endocrinology **143**: 2808-2811, 2002
3. Nakajima Y, et al: PLoS One 2012 (in press)

プロラクチン産生細胞の細胞増殖に対するエストロジェンの抑制作用の発現機構

三井哲雄, 石田真帆, 有田 順（山梨大学大学院医学工学総合研究部生理学第一）

エストロジェンは乳腺, 子宮, 下垂体前葉といった標的器官に作用して細胞増殖を促進することにより, これらの組織の正常な成長, 発達を調節している. 一方, エストロジェンはこれらの組織における腫瘍の発症および進展を促進することによって, エストロジェン依存性腫瘍の発症病理にも関与しており, 従来からこのエストロジェンの細胞増殖促進作用について多くの研究が行われている. これに対して我々は, 下垂体前葉のプロラクチン (PRL) 産生細胞の増殖に対するエストロジェンの作用について調べた結果, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 等の成長因子の存在下では, エストロジェンが細胞増殖を逆に抑制するという興味深い現象を見出した. さらに, このエストロジェンの細胞増殖抑制作用に関与する遺伝子を DNA マイクロアレイ法により調べた結果, 細胞増殖に関与する転写因子である, nuclear factor κ B (NF- κ B) ファミリー遺伝子が複数含まれることを見出した. このことからエストロジェンの細胞増殖抑制作用に NF- κ B シグナル伝達系の抑制が関与している可能性が考えられたため, NF- κ B 阻害剤である A77 1726, BAY 11-7082 により, IGF-1 依存性の PRL 産生細胞増殖に対する影響を調べた. その結果, A77 1726, BAY11-7082 共に, 用量依存的に IGF-1 による PRL 産生細胞の増殖

を減弱させた。このことから、PRL 産生細胞の IGF-1 による増殖促進作用は NF- κ B シグナル伝達系の阻害により抑制される事が示唆された。この薬理的な NF- κ B シグナル伝達系の抑制の結果、さらに遺伝子発現解析の結果から、NF- κ B ファミリー遺伝子の Bcl-3 遺伝子発現の低下に着目した。

アデノウィルスベクターを介して Bcl3 に対する siRNA を発現させ、Bcl3 遺伝子発現を抑制させたところ、IGF-1 による増殖促進作用が減弱された。また逆に、Bcl3 遺伝子を過剰発現させたところ、エストロジェンによる増殖抑制作用が消失する事を見出した。以上の事から、エストロジェンによる IGF-1 誘導性の PRL 産生細胞増殖の抑制作用発現のメカニズムには、少なくとも Bcl3 遺伝子発現の抑制が関わることが明らかになった。

今回、我々はエストロジェンの細胞増殖抑制作用発現メカニズムの一端を示したが、このエストロジェンの増殖抑制作用は多くのエストロジェン感受性組織に見られる普遍的な作用であると思われる。またエストロジェン依存性腫瘍の発症に、このエストロジェンの増殖抑制作用の破綻が関与する可能性が考えられる。このため、エストロジェンの細胞増殖抑制作用発現メカニズムのさらなる解明により、エストロジェン依存性腫瘍の発症メカニズムの解明と、これらの腫瘍に対する治療薬の開発にも大きく貢献することが考えられる。

下垂体隆起部の機能解明を目指した網羅的遺伝子解析—隆起部特徴的な TSH 遺伝子発現及び産生調節—

坂田一郎, 相澤清香, 坂井貴文 (埼玉大学大学院理工学研究科)

下垂体前葉はホルモン内分泌器官として知られ、下垂体主部と下垂体隆起部から構成される。下垂体主部については生理学的解析等多くの研究がなされているのに対し、下垂体隆起部は正中隆起を覆う薄い細胞層として存在する組織であり、その採取や摘除が難しいために、ホルモン制御機構や生理的機能について研究が進んでいない。本研究では、ラットを用いて下垂体隆起部の機能解明を目指した網羅的遺伝子解析を行い、さらに下垂体隆起部において主に産生されるホルモンである甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生細胞に着目し、隆起部 TSH の mRNA 発現及び産生の制御機構を用いて検討した。

マイクロアレイ解析の結果、下垂体隆起部にはメラトニン受容体タイプ 1 (MT1) とアデノシン受

容体 A2B の mRNA の高発現に加えて、新たにイオンチャンネル共役型グルタミン酸受容体カイニン酸型 2 (KA2) mRNA が高発現していることを見出した。さらに、グルタミントランスポーターのひとつである ATA2 やグルタミンナーゼ Gls 及び Gls2 が発現していた。そこで、グルタミン及びグルタミン酸の隆起部 TSH への影響を検討するために *in vitro* 隆起部スライス培養実験を行った。その結果、1 mM グルタミンまたは 1 mM グルタミン酸は隆起部 TSH β mRNA 発現を有意に増加させた。グルタミンは添加後 4 時間から TSH β mRNA 発現を増加させたのに対し、グルタミン酸は添加後 2 時間から顕著に TSH β mRNA 発現を増加させた。一方、グルタミン及びグルタミン酸は隆起部 α GSU mRNA 発現と下垂体主部 TSH β と α GSU mRNA 発現レベルを変化させなかった。

以上の結果から、隆起部における TSH β mRNA 発現及び産生は下垂体主部とは異なる制御機構により調節を受けていることが明らかとなった。また、隆起部における TSH β mRNA 発現は、グルタミン酸がオートクラインまたはパラクライン様式にグルタミン酸受容体 KA2 に作用することで促進され、これまでの研究から明らかとなっているメラトニンによる抑制的な制御を受けることにより日内変動を持つことが示唆された。

ホメオドメイン型転写因子 PROP1 と PRX は下垂体の発生・分化と再生を担っている

吉田彩舟, 加藤幸雄 (明治大学大学院農学研究科)

下垂体の発生・分化は多くの転写因子により時間的・空間的に制御され、固有のホルモンを産生する細胞へと分化する。一方で、近年では、成熟した下垂体において未分化状態を維持した Stem/Progenitor 細胞の存在が示唆されている。中でも、転写因子 SOX2 陽性細胞は *in vitro* 条件下で全てのホルモン産生細胞へ分化可能な多分化能を有する Stem/Progenitor 細胞であると報告されている。こうした下垂体 Stem/Progenitor 細胞は、ホルモン産生細胞の新生機構解明の観点からも注目を集めている。本研究では下垂体特異的転写因子 PROP1 ならびに新規下垂体転写因子 PRX1・2 陽性細胞に注目し、Stem/Progenitor 細胞との関わりを組織化学的に解析した。

その結果、PROP1 陽性細胞は下垂体原基であるラトケ囊において、Rostral tip を除く全ての細胞で発現し、常に未分化細胞として存在すること、また分化の進行に伴い過渡的 Commitment cell においても発現し、Terminal differentiated cell

では陰性であることを見出した。

一方で、間葉系転写因子として知られる PRX1・2 は下垂体発生中期に SOX2・PRO1 陽性未分化細胞に発現を開始し、その発現は Commitment cell さらに Terminal differentiated cell の一部においても維持されていた。また、PRX1・2 は下垂体発生過程において下垂体外部から浸潤する血管を構成する細胞群でも発現が観察された。このことから、PRX1・2 はホルモン産生細胞の分化だけでなく、分泌されたホルモンを全身に輸送するために必須な下垂体血管系の形成にも関与していると考えられる。

以上の結果から、PRO1 陽性細胞ならびに PRX1・2 陽性細胞は Stem/Progenitor 細胞で発現し、下垂体の発生に加え、成熟下垂体における細胞新生・ホルモン産生細胞の供給に関与していると考えられる。

細胞外マトリックスによる濾胞星状細胞の機能調節、さらに濾胞星状細胞による下垂体前葉の機能維持

堀口幸太郎, 屋代 隆 (自治医科大学医学部解剖学講座 (組織学部門))

下垂体前葉は、5 種類のホルモン産生細胞と非ホルモン産生細胞である濾胞星状細胞 (FS 細胞) から構成される。前葉細胞で唯一、FS 細胞間だけにギャップ結合が形成されることがわかっていて、このギャップ結合を介して情報を伝達するネットワークを形成し、前葉細胞もしくは組織の機能制御に関与している可能性が想定されている [1]。ホルモン合成分泌の調整は、視床下部ホルモンや末梢ホルモンのフィードバック機構で説明ができるかもしれない。しかし、前葉細胞の発生・分化・増殖やその他の現象を説明するには、他因子によるオートクライン、パラクライン、接着因子を介したジャクスタクラインによる制御等を想

定しなくてはならない。さらに我々は、細胞とその周囲の細胞外環境との相互作用、特に細胞外マトリックス (ECM) との相互作用に注目している。ECM は、以前から考えられてきた細胞間の繊維状、シート状の構造物にとどまらず、細胞の運命と挙動を支配する重要な細胞外環境因子であることが、近年明らかとなってきた。しかし、下垂体前葉細胞に関する知見はほとんどない。そこで、我々は、下垂体前葉細胞初代培養を経時撮影する技術を使って、ラミニンやコラーゲンといった ECM 存在下で、前葉細胞の動態を living 撮影し、ECM による前葉細胞の形態的、機能的変化を観察した。すると、ECM により、FS 細胞が、活発に突起状の細胞質を伸長させ、移動して、互いに接着する動態を顕著に増加させた [2]。さらに、詳細な解析を進め、ECM による細胞質の伸長、移動メカニズムを明らかにした [3, 4]。また、ギャップ結合を介した FS 細胞ネットワーク形成も ECM により促進され、その形成機構も明らかにした [5]。このように ECM が前葉細胞の機能制御因子として大変重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。今後、ホルモン産生細胞と ECM との相互作用はどうか、基底膜などの ECM に加え、他の線維性の ECM や、プロテオグリカンなどとの相互作用もあるのかないのか等を明らかにしていきたいと考えている。

1. Shirasawa N, et al: Anatomical Record **278**: 462-473, 2004
2. Horiguchi K, et al: J. Endocrinol **204**: 115-123, 2010
3. Horiguchi K, et al: J. Endocrinol **208**: 225-232, 2011
4. Ilmiawati C, et al: J. Endocrinol **212**: 363-370, 2012
5. Horiguchi K, et al: Endocrinology **153**: 1717-1724, 2012

リハビリテーションと自律神経機能 (S19)

リハビリテーションは通常、各種日常生活における運動機能改善を目標に行われるが、リハビリテーションにより、自律機能も同時に変化する。糖尿病における運動療法のように、自律機能 (血糖コントロール) 改善を狙ったリハビリテーションもある。本シンポジウムでは、リハビリテーションあるいはリハビリテーションとかわる種々の体性感覚刺激が自律機能におよぼす影響について取り上げた。今回の学会の主テーマであった「多分野との連携」を踏まえ、臨床 (リハビリテーション医学と理学療法) の立場から 2 名、基礎 (生理学) の立場から 2 名 (ヒトと動物

における研究)のシンポジストにお話をお願いした。

リハビリテーションにおいては、皮膚、骨格筋、関節に何らかの刺激が加えられる。その刺激情報は、脊髄を上行して各種感覚を起こすと同時に、情動も起こし、さらに運動機能と自律機能に反射性の反応を起こす。自律機能は情動の影響を特に受けやすいため、刺激によっておこる情動を介して反射性反応が修飾される(図1)。これらの反応は各種病態でも変化するものと思われる。したがって、リハビリテーションが自律機能におよぼす影響については、情動が起きにくい条件(たとえば麻酔下など)における反射性反応の研究、情動や認知機能が働く通常の状態での反応の研究、さらに各種病態(たとえば、脳梗塞、糖尿病など)あるいはそのモデルにおける研究が必要である。

本シンポジウムでは、最初に、リハビリテーション医学の立場から、中村健先生より、脳卒中患者に体性感覚刺激を加えた時の循環反応と、その中枢機構に関する動物実験研究のお話を頂いた。ついで、理学療法学の立場から、野村卓生先生より、血糖コントロールを目的とする糖尿病患者の運動療法と、重症の糖尿病合併患者(糖尿病自律神経障害など)における日常生活動作能力獲得のためのリハビリテーションについてお話頂いた。そして、生理学の立場から、小峰秀彦先生(生理学)より、正常のヒトにおいて持久的運動習慣が循環反応におよぼす影響についてお話頂き、さらに堀田晴美先生より、麻酔下の動物において体性感覚刺激が排尿機能に与える影響について、お話頂いた。

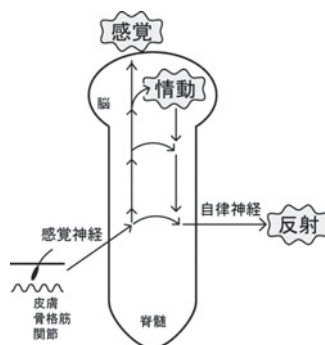


図1. 体性感覚刺激と生体反応

オーガナイザー：黒澤美枝子(国際医療福祉大学基礎医学研究センター)
松川 寛二(広島大学保健学研究科)

リハビリテーションと中枢性循環調節

中村 健(和歌山県立医科大学スポーツ・温泉医学研究所)

はじめに

リハビリテーションでは、筋力訓練や温度刺激など様々な外的刺激を身体に与える。外的刺激は中枢神経に伝えられたのち、自律神経を介して循環反応を誘発する。しかし、中枢神経による反応経路は不明な点が多く、脳卒中など中枢神経に障害を持った者では、外的刺激に対する循環反応が障害されている可能性もある。

脳卒中患者における外的刺激時の循環反応を評価し、さらに、外的刺激時の中枢性循環反応経路を解明する目的でラットを用い実験を行った。

脳卒中患者の外的刺激時の循環反応

脳卒中患者と健常者を対象に、寒冷刺激と静的運動を行い、筋交感神経活動を測定した。寒冷刺激時および静的運動時ともに、脳卒中患者と健常者で筋交感神経活動の上昇反応を認めた。しかし、脳卒中患者における筋交感神経活動の上昇率は、健常者に比べ抑制されていた[1, 2]。

以上の結果から、寒冷刺激および静的運動による外的刺激時の交感神経反応は、脳卒中病変により障害されると考えられた。

外的刺激時の中枢神経における循環調節経路の解明

寒冷刺激時の循環反応における、延髄吻側腹外側部(RVLM)、疑核(NA)、脊髄の中間外側核(IML)および大脳の関与を検討するために障害ラットを作製し、健常ラットとの寒冷刺激時の循環反応を比較した。障害ラットは、①RVLMのグルタミン酸受容体(GLUR)を障害、②NAのγ-アミノ酪酸受容体(GABAR)を障害、③NAのGLURを障害、④IMLのGLUR障害、⑤IMLのGLURと迷走神経を障害、⑥Decerebration(中脳より中枢側の大脳を切除)の6種類を作製した。

実験の結果より、寒冷刺激時における循環反応には以下に上げる神経経路の関与が考えられた。

まず、RVLMのGLURの障害により、血圧および心拍の上昇反応が抑制された。このことから、寒冷刺激時の反応は、RVLMのGLURを介して交感神経を刺激している事が考えられた。次に、NAのGLURの障害においては循環反応に変化は無く、GABARの障害により心拍数の上昇反応が抑制された。このことから、寒冷刺激時の反応は、NAにおけるGABARを介して心拍を上昇させていると考えられた。さらに、IMLのGLURの障害により血圧および交感神経の上昇反応が消失し、心拍数

の上昇反応が抑制され、さらに、迷走神経切断を加える事により心拍数の上昇反応が消失した。この事から、寒冷刺激時の反応は、脊髄おける IML の GLUR を介し交感神経活動を亢進させ、さらに迷走神経を介して心拍反応をおこしている事が考えられた。また、Decerebration において血圧および心拍の反応が抑制された。この事から、寒冷刺激時の反応は中脳より上位の脳を介した経路も存在すると考えられた [3]。

おわりに

外的刺激時の中枢性循環調節機序を解明する事は、中枢性神経障害者にリハビリテーションを行う上で大変重要であり、今後のさらなる解明が必要である。

1. Nakamura T, et al: Arch Phys Med Rehabil **86**: 436-441, 2005
2. Mizushima T, et al: Stroke **29**: 607-612, 1998
3. Nakamura T, et al: Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**: H1780-H1787, 2008

糖尿病とリハビリテーション

野村卓生（関西福祉科学大学保健医療学部リハビリテーション学科）

糖尿病治療の目標は、糖尿病最小血管合併症（網膜症、腎症、神経障害）および動脈硬化性疾患の発症・進展を阻止し、健常人と変わらない日常生活の質の維持と寿命を確保することにある [1]。運動療法は急性効果として、ブドウ糖・脂肪酸の利用を促進し血糖値を低下させる。慢性効果としてはインスリン抵抗性を改善させ、糖尿病合併症の発症・進展を阻止することから糖尿病患者においては基本治療の一つとなる。

一方、臨床において、糖尿病合併症が進展した患者、あるいは重症の運動麻痺を有する糖尿病合併患者では糖尿病治療としての運動療法が適応とならないが、日常生活動作能力獲得などを目的としてリハビリテーションを必要とする場合がある。

糖尿病合併症で最も合併頻度の高いのが糖尿病神経障害であり、神経障害の中でも臨床的に多く認めるのが自律神経障害である [2]。自律神経障害では胃不全麻痺、無自覚低血糖を認め、これらが血糖変動の原因となる。さらに、自律神経障害を有する患者では起立性低血圧、無症候性の心筋虚血を認める場合、および運動負荷に伴う適切な循環応答が得られないことがあり、これらの症状がリハビリテーションを進める上で大きな阻害要因となる。

リスク管理としては、血糖変動に対してリハビ

リテーション前・中・後の血糖測定、運動負荷に伴う適切な循環応答を認めない患者には自覚症状に加えて、血圧・心拍、心血管のモニタリングが必須となる。

糖尿病自律神経障害を有する患者にリハビリテーションを進める上では血糖変動や呼吸循環系のリスク管理が必要不可欠となる [3]。しかしながら、自律神経障害に対するリスク管理を徹底、チーム医療でのリスク管理体制を構築すれば、積極的なリハビリテーションを展開することが可能である。さらに、合併症がある中でも自立した生活を送るためには、自律神経障害に対する対応を患者自身が自己管理できるようにすることが必要であり、患者教育が非常に重要となる [4]。

1. 日本糖尿病学会編。糖尿病治療ガイド 2012-2013, 文光堂, 2012
2. 日本糖尿病学会編。科学的根拠に基づいた糖尿病診療ガイドライン 2010, 南江堂, 2010
3. 野村卓生, 他: 理学療法ジャーナル **36**: 771-777, 2002
4. 日本糖尿病療養指導士認定機構編。糖尿病療養指導ガイドブック 2012, メディカルレビュー社, 2012

運動トレーニングが動脈血圧反射を介した血圧調節に与える影響

小峰秀彦（（独）産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門）

リハビリテーションは、歩く・起き上がるといった身体動作の再獲得を主な目的とする。その際、自律神経を介した循環調節も重要となる。例えば、長期臥床後は動脈血圧反射や心肺圧受容器反射の機能が低下し、起立耐性が低下する。運動は長期臥床に対する対処策候補だが、興味深いことに、アスリートの起立耐性は低下することが報告されている。運動トレーニングは骨格筋の血管床を発達させるので、動脈血圧反射による血管調節が運動トレーニングに伴う起立耐性低下に関与する可能性がある。そこで我々は、運動トレーニングが動脈血圧反射を介した心拍および血圧調節に与える影響を調べた。

動脈血圧反射を介した心拍調節は、持久的運動習慣のある者とならない者を対象にベッド上仰臥位で呼気圧 40mmHg を 15 秒間維持し、呼気解放後の血圧変化に対する RR 間隔変化を評価した。血圧受容器が存在する頸動脈壁の硬化度が血圧-RR 間隔応答に与える可能性を考慮して、血圧変化に対する頸動脈血管径変化、頸動脈血管径変化に対する RR 間隔変化を超音波を用いて評価した。動

脈血圧反射を介した血圧調節は、持久的運動習慣のある者、筋力増強運動習慣のある者、運動習慣のない者を対象に、頭部60度拳上位にて頸部カラー内に+40mmHgから-80mmHgの圧力を負荷して頸動脈洞圧受容器を刺激し、生じた血圧応答を評価した。頸部陰圧陽圧負荷に対する血圧応答は、60分間の自転車運動前後で評価した。

15秒間の呼気圧維持終了後、動脈血圧反射応答としての血圧上昇およびRR間隔の延長が観察された。この時、 Δ RR間隔/ Δ 血圧および Δ RR間隔/ Δ 頸動脈血管径は、持久的運動習慣群が無運動習慣群と比較して高い値を示した。 Δ 頸動脈血管径/ Δ 血圧については運動習慣の影響はみられなかった。頸部陰圧陽圧負荷した時、頸動脈洞推定圧に対する平均血圧応答はシグモイド曲線を描いた。自転車運動前、運動習慣の違いは頸動脈洞推定圧-平均血圧曲線に影響しなかった。無運動習慣群は血圧応答曲線の傾きが自転車運動後に変化しなかったが、持久的運動習慣群は曲線の傾きが自転車運動後に上昇した。筋力増強運動習慣群は、血圧応答曲線の傾きが自転車運動前後で変化しなかったが、推定頸動脈圧に対して血圧が応答を始める閾値点が運動後に低下した。

以上の結果は、1)動脈血圧受容器-心拍反射は、反射感度が持久的運動習慣によって増加し、そのメカニズムは受容器が存在する動脈壁硬化度の変化ではなく、中枢を含めた神経性変化であること、2)頸動脈血圧受容器-血圧反射は、持久的運動習慣によって反射感度が一過性運動後に増加し、筋力増強運動習慣によって一過性運動後に低血圧域で作動することを示唆する。

軽い皮膚刺激による排尿収縮の抑制

堀田晴美（東京都健康長寿医療センター研究所自律神経機能研究室）

リハビリテーションの現場では、皮膚・筋・関節に様々な刺激を加える物理療法が用いられる。我々の研究室では、物理療法による自律機能調整作用メカニズムに関わる基礎研究を行なっている。排尿調節には自律神経が欠かせない役割を担う。膀胱が充満すると膀胱支配の骨盤神経活動が高まって排尿収縮がおこるが、皮膚や筋に侵害刺激を加えると、骨盤神経活動が抑えられて排尿収縮が抑制される[1, 2]。排尿の問題を抱える高齢者は非常に多く、このような高圧時の抑制効果は失禁や頻尿の治療に有用と考えられる。これまでの

研究では、皮膚の機械的刺激や温度刺激、筋の化学刺激などのいずれにおいても、侵害刺激では排尿収縮が抑制され、非侵害刺激では抑制効果が無いか非常に弱いことが示されてきた。ただし、皮膚や筋・関節には様々なタイプの低閾値受容器があり、膀胱機能の調節に適した刺激を与えるテクニックが、今後明らかにされる必要があることが指摘されていた[2]。

最近我々は、軽微な触刺激が麻酔ラットの体性神経の求心性刺激で起こる体性-心臓交感神経反射の抑制に効果的であることを見出した[3]。そこで膀胱についても、ごく軽い触刺激の効果を調べてみた。ローラーをゆっくり転がして皮膚表面に軽い触刺激を加えたところ、会陰部刺激では全例、後肢や腹部の刺激では一部の例で、抑制効果が見られた[4]。会陰部への刺激は膀胱の定圧伸展による骨盤神経の群発活動も抑制した。除神経された会陰部皮膚では、刺激効果は完全に消失した。この陰部神経皮枝から求心性神経活動を記録し、ローリング刺激に応じる単一ユニットが低閾値のメカノレセプターであり、伝導速度の測定から有髄A β 、A δ 及び無髄C線維に属し、ローリング中の平均発火頻度は各々2.2、2.9及び7.9Hzであることを見出した。

一方、交感神経反射の研究において軽微な触刺激による抑制効果がオピオイド受容体遮断薬ナロキソンで減弱することから、我々は軽い触刺激でオピオイドが放出され得ることを示唆した[3]。侵害刺激でオピオイド放出が促進されることは示されてきたが、ごく軽い皮膚刺激でもオピオイドの放出が起こる可能性がでてきた。そこで、排尿収縮の抑制に内因性オピオイドが関与する可能性を調べるため、ナロキソンを静脈内に投与した。すると、ナロキソン投与後には会陰部刺激による抑制効果がほぼ消失した。

以上の結果から、軽い機械的な皮膚刺激で誘発される皮膚のメカノレセプターからの低頻度活動がオピオイド放出を促し、膀胱伸展で起こる骨盤神経反射を抑制して、排尿収縮を抑えることが明らかとなった。

1. Sato A, et al.: Brain Res **94**: 465-474, 1975
2. Sato A, et al.: Physiol Biochem Pharmacol **130**: 1-328, 1997
3. Hotta H, et al.: Europ J Pain **14**: 806-813, 2010
4. Hotta H, et al.: Auton Neurosci **167**: 12-20, 2012

心不整脈基質形成機序研究の新展開 —家族性遺伝子異常から心リモデリングまで—(S21)

我が国において心疾患による死亡率は10万人当たり100人以上に昇り、そのうちの約半数は不整脈による。また循環器疾患の基礎調査によると、検診によって心電図に異常を指摘される割合は40代から急増し、65歳以上の高齢者では30%近くに達する。特に、心不全、心筋梗塞等の心リモデリングを伴う心疾患においては、加齢と共に致死的不整脈による突然死のリスクが増大することが指摘されている。

不整脈の発生原因としては、先天的な要因と後天的な要因がある。前者は、心臓の活動電位生成やその伝導に関わるイオンチャネル、トランスポーター等の発現レベルや機能の異常であり、その中には心臓発生過程の異常によって生じるものも含まれる。これに対して後者では、薬物誘発性に加え、心臓の肥大や線維化によって組織構築や電気的特性の変化(リモデリング)が生じ、これが不整脈を誘発したり悪化させたりする基質となっている場合が殆どである。先天性不整脈の帰結は、多くの場合、若年性突然死であるため悲劇的で強い印象を与えるが、頻度としては稀である。むしろ、心リモデリングと密接に関連する後天性不整脈の方が、心不全、心筋梗塞などの罹患率の高い心疾患に伴って起こるため、遙かに頻度が高い。

心臓活動電位を形成する個々のイオンチャネルの先天的異常や機能変調、チャネル相互間の機能バランスの破綻が種々の不整脈発生の基盤となることは、これまでの膨大な実験データの蓄積によって、広く認められている。更に、これらの蓄積されたデータの綿密な解析に基づいた活動電位モデルによるシミュレーションによって、遺伝子変異や薬物がどのようにして不整脈を誘発するかについては、多くの知見が得られてきた。しかし、これらの知識は単一心筋細胞の電気現象の解析から得られたものであり、3次元の複雑な入り組んだ構造をもち異種の細胞が混在する心臓全体の興奮や伝播に対する情報は乏しい。特に、異常興奮が旋回する現象(リエントリー)に関しては理解が依然として限られている。また代謝的・機械的ストレスと関連した心リモデリングによる不整脈基質形成の機序については、活動電位を形成するイオンチャネルの発現・機能変化に関する実験データが多く、心筋細胞のCaハンドリング異常や組織構造改変による興奮伝播の質的・量的変化に関する情報は決定的に不足している。

そこで本シンポジウムでは、これまで未解決の不整脈発生機序のうち、最近新たな理解の糸口が得られつつある分野から演題を選択し、今後の不整脈研究が向かうべき新しい方向性について議論をおこなった。以下では、それぞれの発表内容と今後の展望について、(1)貫壁性再分極のバラツキと催不整脈性との関連(相庭)、(2)心筋細胞内Caハンドリング異常と連関して不整脈性の異常興奮を引き起こす新規チャネル分子TRIC、TRPM4(山崎、井上)、(3)細胞間伝導を担うギャップジャンクションの遺伝子変異による心臓伝導障害(蒔田)、(4)Cx43の内在化を抑制する人工ペプチドのアポトーシスに対する心筋細胞保護効果(佐藤)をテーマとし、オムニバス方式で概説したい。

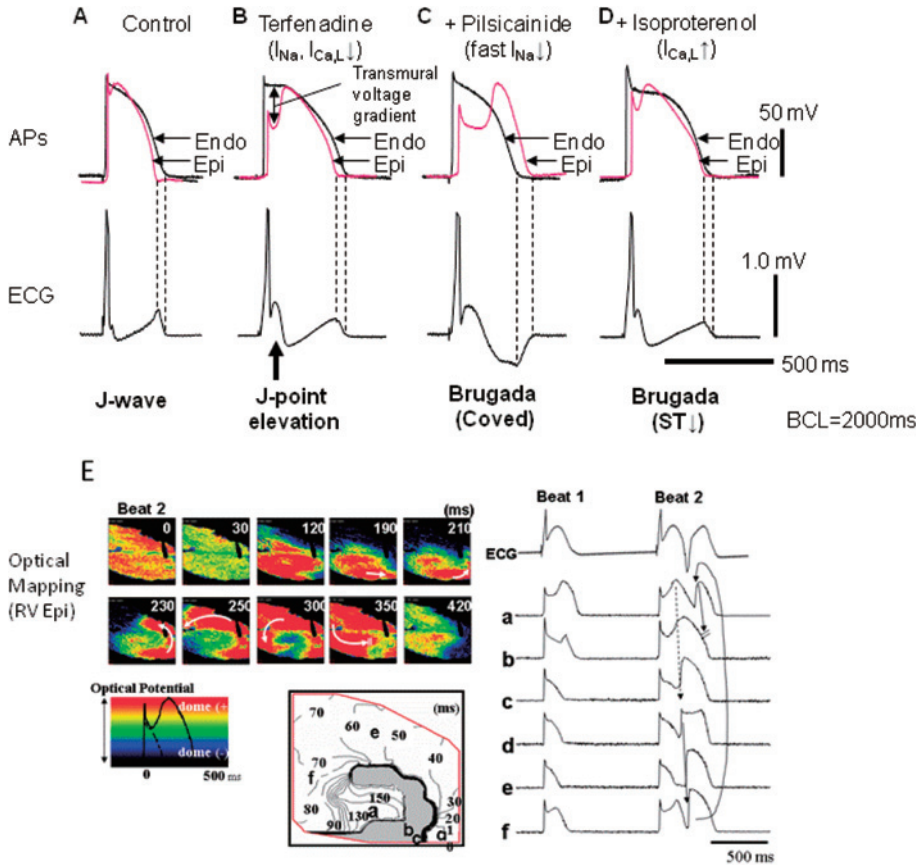
オーガナイザー：井上 隆司(福岡大・医・生理)
蒔田 直昌(長崎大・医・生理)

遺伝性致死性不整脈の発生基盤—貫壁性再分極時間の増大とその破綻

相庭武司¹、日高一郎²、上村和紀²、杉町勝²、鎌倉史郎¹、清水 渉¹(¹国立循環器病研究センター心臓血管内科不整脈科、²国立循環器病研究センター研究所循環動態制御部)

【背景】：心筋細胞の活動電位持続時間(APD)は様ではなく、特に心室においては心内膜～中層で長く、心外膜側で短い。このような心室筋の貫壁性再分極時間のばらつき(Transmural

Dispersion of Repolarization: TDR)は各層毎のイオンチャネル(主に遅延整流性カリウムチャネル(I_{Kr} , I_{Kf}))の発現の違いによって説明され健常者でも認められるが、遺伝性不整脈(QT延長症候群やBrugada症候群)ではTDRの増大が特徴的な心電図変化や不整脈の発生機序として重要である。近年の分子遺伝子的研究の進歩により先天性QT延長症候群やBrugada症候群などの遺伝性致死性不整脈は、心筋の活動電位を形成するイオンチャネル・膜蛋白あるいは受容体などをコード



Shimizu W and Aiba T. *Not Clin Pract Cardiovasc Med* 2005

図 1.

する遺伝子上の変異により機能障害をきたし、致死性不整脈を発症して心臓突然死の原因となることが明らかとなった [1]。この中で Brugada 症候群は明らかな器質的心疾患を有さず 12 誘導心電図 (ECG) の V1 から V2 (V3) 誘導における特徴的な ST 上昇と心室細動 (VF) を主徴とする症候群である [2]。我々はイヌ心室筋を用いた動脈灌流右室心筋切片標本を用いた Brugada 症候群モデルを作成し ST 上昇と VF 発生の細胞学的成因を検討した。

【方法】：浮動性微小電極を用いて貫壁性すなわち心内膜 (Endo)・中層 (M)・心外膜 (Epi) 細胞の活動電位と貫壁性双極 ECG の同時記録が可能な動脈灌流右室心筋切片を用い薬理的 Brugada 症候群モデル (Pilsicainide + Terfenadine) を作成し膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS を用いた光マッピング法を併用して心筋表面及び断面の

APD を同時記録した。

【結果】：心外膜 (Epi) 細胞には活動電位第 1 相 notch を認め、これに一致して ECG 上小さな J 波を認めた (図 1A)。 $I_{Ca,L}$ 拮抗薬の Terfenadine の投与により Epi 細胞では活動電位第 1 相 notch が増大し、Endo 細胞と電位差の増大により J 波が増高した (図 1B)。さらに I_{Na} 遮断薬のピルジカインドを追加すると、Epi 細胞ではさらに第 1 相 notch が深くなり dome のタイミングの遅延を認め Endo 細胞との電位勾配が逆転したため ECG 上 Brugada 症候群に典型的な coved 型 ST 上昇を認めた (図 1C)。 $I_{Ca,L}$ を増強させるイソプロテノールにより notch が減少し dome が回復し ECG 上 ST 上昇は消失した (図 1D)。近接する Epi 細胞間で dome の有無による APD のばらつきが大きくなり、ある閾値 (約 100ms/mm) を超えると phase 2 reentry による PVC が発生した (図 1

E). さらに発生した PVC から VF に移行するか否かは伝導障害の程度に依存し、伝導障害が強くなると興奮波が分裂し複数の spiral wave がお互いに融合と分裂を繰り返して続けることが証明された [3, 4].

【結語】QT 延長症候群では TDR の増大が致死性不整脈の発生に関係するのに対して、Brugada 症候群では TDR の増大に加え Epi 細胞間での再分極のばらつきの増大が phase 2 reentry の発生に関係し、さらに VF となるには伝導障害が重要であることが示唆された.

1. Shimizu W: Cardiovasc Res **67**: 347-356, 2005
2. Brugada P, et al: J Am Coll Cardiol **20**: 1391-1396, 1992
3. Shimizu W, et al: Nat Clin Pract Cardiovasc Med **2**: 408-414, 2006
4. Aiba T, et al: J Am Coll Cardiol **47**: 2074-2085, 2006

TRIC-A 欠損マウス心臓における不整脈性カルシウムシグナリング

山崎大樹, 竹島 浩 (京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野)

小胞体にはタンパク質・脂質合成, Ca^{2+} 貯蔵, Ca^{2+} 放出といった機能が備わっている. 中でも各種刺激に応じた Ca^{2+} 放出は, 筋収縮や神経伝達物質の放出など様々な生理機能を制御する. 小胞体にはリアノジン受容体 (RyR) 及びイノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) という 2 つの Ca^{2+} 放出チャネルが存在する. これらを介して細胞質中へ Ca^{2+} が放出されると小胞体内腔に負電荷が発生する. 効率的な Ca^{2+} 放出が持続するには, この負電荷を中和する機構が必要であり, その機構としてカウンターイオンチャネルの存在が示唆されてきた. その実体は長らく不明であったが, 2007 年に当研究室にてカウンターイオンチャネル機能の一端を担う TRIC (trimeric intracellular cation) チャネルが同定された [1].

心臓に豊富に発現する TRIC-A を欠損したマウスは正常に成育・繁殖するが, 浸透圧ポンプによる β 受容体刺激薬イソプロテレノール (Iso, 60 mg/kg/day) の持続刺激により心肥大及び線維化という病態を引き起こす (未発表データ). このことから TRIC-A 欠損マウスは潜在的に心機能異常を有していることが示唆された. そこで 80mg/kg Iso の静注投与により心電図にどのような影響があるかを検討した. その結果, TRIC-A 欠損マウスにおいてのみ Iso によって不整脈様イベントが観察された. *in situ* hybridization により, TRIC-

A は心室中隔及び左心室に高発現していたことから, 左心室筋細胞を急性単離し Ca^{2+} トランジェントについて検討を行った. 定常状態 Ca^{2+} レベルの上昇, 振幅の増大及び減衰時間の短縮という 3 つの異常が観察され, これらはウェスタンプロットの結果から RyR2 (S2808) 及びホスホランパン (S16) のリン酸化亢進が原因であることが示唆された. 次に成獣マウス由来心筋細胞と新生児由来心筋細胞での異常を比較するため, 新生児心筋細胞を単離・培養し Ca^{2+} 蛍光指示薬として Indo-1 を用い Ca^{2+} イメージングを行った. 定常状態 Ca^{2+} レベルを形成する Ca^{2+} スパークについては成獣のものと同様 TRIC-A 欠損心筋細胞において頻度が減少していた. しかし, Ca^{2+} トランジェントの振幅の大きさや減衰時間については WT と同程度であった. これは RyR2 (S2808) 及びホスホランパン (S16) のリン酸化レベルの亢進が観察されなかったためだと思われる. 以上のように, 原因は不明だが慢性的な TRIC-A 欠損により心臓では RyR2 (S2808) とホスホランパン (S16) のリン酸化が亢進し, 心筋細胞での Ca^{2+} ハンドリングに定常状態 Ca^{2+} レベルの上昇, 振幅の増大及び減衰時間の短縮という異常を与えた. このような状態で高濃度 Iso の適用により不整脈様のイベントが観察されたものと思われる.

心臓においては TRIC-A に加えて TRIC-B も発現していることから TRIC-A の欠損により致死性を有するものではないが, β 受容体刺激によって不整脈様イベントが観察された. このことは心機能における TRIC-A の重要性を示唆するものであり, 今後の詳細な解析が期待される.

1. Yazawa, et al: Nature **448**: 78-82, 2007

発現系及び心房筋由来培養細胞における TRPM4 チャネルによる不整脈基質形成の検討

井上隆司, デュアン ユービン, フ ヤオベン (福岡大学医学部生理)

代謝的・機械的ストレスが持続すると, 心筋組織に形態的・機能的変化 (心リモデリング) が生じる. このことによって, 心臓の興奮・伝導に異常を引き起こす基質が形成され, 心房細動や致死的な心室性不整脈を引き起こすことが知られている. 本研究では, 心血管病態との密接な関与が知られる, ストレス応答性 Ca^{2+} チャネル分子 TRP 蛋白質に焦点を絞り, その不整脈基質形成や異常興奮誘発に果たす役割について, (1) 発現系, 心筋細胞一次培養系, 不整脈モデル動物を用いた実証的研究を行い, (2) その結果を数理モデルで検証し, (3) 最終的には, 臨床医学的応用が可能なる

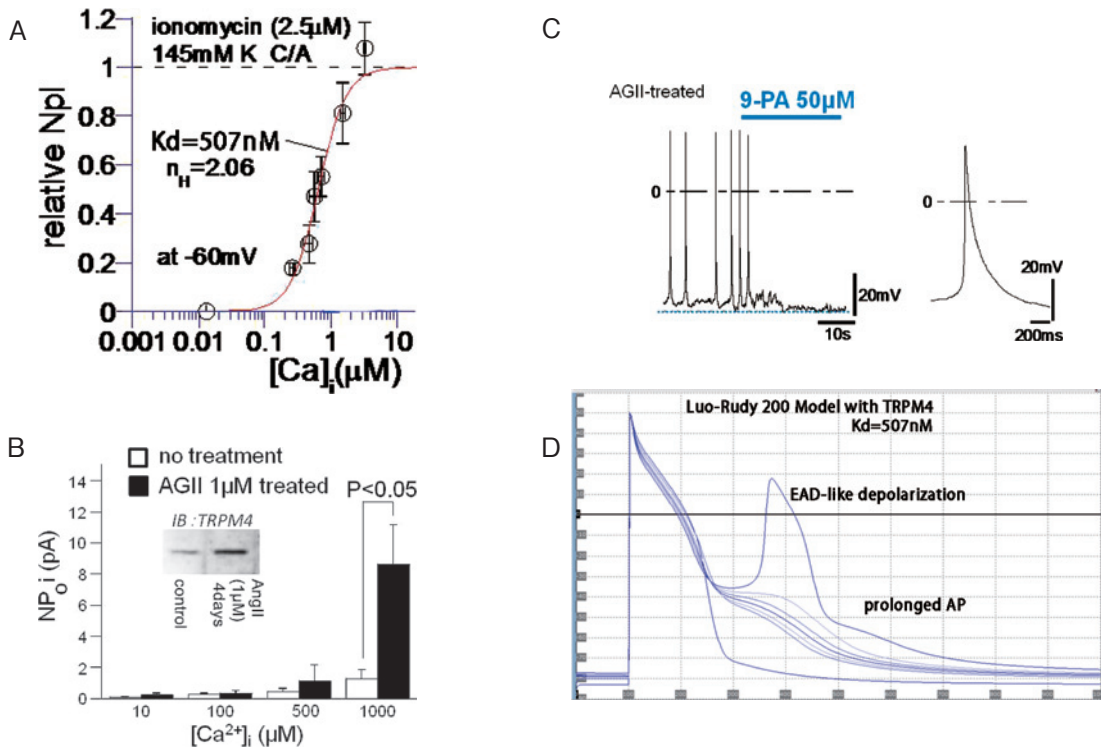


図2. (A) イオノマイシン法で再評価した TRPM4 チャンネル活性化の Ca²⁺ 濃度依存曲線. (B) アンジオテンシン II 刺激 (4 日間) 後の, HL-1 細胞における TRPM4 チャンネル蛋白質発現・電流密度. (C) HL-1 細胞の自発放電とその 9-PA による抑制. (D) TRPM4 チャンネルキネティクスを組み込んだ Luo-Rudy モデルによるシミュレーション結果.

多階層システムバイオロジープラットフォーム上のシミュレーションモデルに再現することを目指して研究を行った.

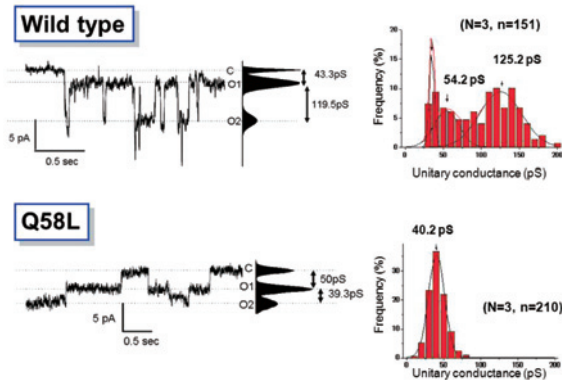
心臓のリモデリング時の不整脈基質形成機序を解明するため, Ca²⁺ 濃度上昇で直接活性化される陽イオンチャンネル TRPM4 の活性化機序や発現変化に関する検討を行った. (1) 細胞内成分をできるだけ保存した生理的状态に近い条件下で, TRPM チャンネルの Ca²⁺ 感受性の再評価を行った. 膜小孔形成作用のある β-escin や Ca²⁺ 透過小孔を形成する ionomycin 処置によって細胞内遊離 Ca²⁺ 濃度を変化させて得た TRPM4 チャンネル活性の Ca²⁺ 濃度依存性曲線から, このチャンネルの十分な活性化がマイクロモル濃度以下の範囲 (K_d 値: ~500nM) で起こることが明らかとなった (図 2A).

(2) 電位依存性 Ca チャンネルを TRPM4 チャンネルと共発現し, 前者を介した Ca²⁺ 流入と後者の活性化の定量的な関係を調べた. その結果, 心房筋

の活動電位持続時間に当たる 100ms 程度の Ca²⁺ 流入単独によって最大値の 50% 程度の TRPM4 チャンネルの活性化が起こること, 更に, これより短い Ca²⁺ 流入であっても連続誘発することで, TRPM4 チャンネルの活性化が長時間遷延することが明らかとなった.

(3) 心房筋の不活化細胞株 HL-1 を液性心肥大因子アンジオテンシン II で数日間前処置すると TRPM4 チャンネル蛋白質の発現が数倍に増加し (図 2B), これに伴う不規則な自発的活動電位の出現と静止膜電位の脱分極が観察された. これらの変化は, TRPM4 の選択的阻害薬 9-phenanthrol の投与でほぼ完全に消失した (図 2C). (4) NSC_{Ca} を導入した Luo-Rudy dynamic ventricular model や Nygren atrial model にこれらの結果を当てはめると, TRPM4 チャンネルの発現が増加した場合には, AP の延長や早期後脱分極 (EAD) (図 2D), 静止膜の脱分極等, 催不整脈性変化が生じることが確認できた.

Smaller single channel conductance in mutant Cx40 (Q58L)



Impaired hemichannel coupling and normal membrane trafficking in the mutant Cx40 (Q58L)

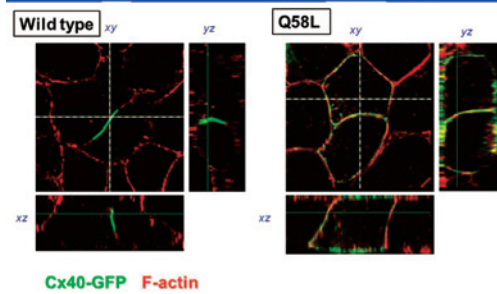


図 3.

(結論)以上より, TRPM4 チャンルの Ca 感受性は生理的範囲で活性化されるに十分なほど高く, その発現が病的に増加した場合は, 不整脈を引き起こす要因となり得ることが示唆された。また, リモデリング心における Ca ハンドリングの異常と TRPM4 発現の増加が, 相乗的に膜の異常興奮を誘発している可能性が強く示唆された。

1. Inoue R, et al: The pathophysiological implications of TRP channels in cardiac arrhythmia. In: Cardiac Arrhythmias—New Considerations—Ed. Breijjo-Marquez FR, In Tech Review Open Access Publisher, ISBN 978-953-51-0126-0, 2012

家族性進行性心臓伝導障害に同定されたコネクシン 40 遺伝子 *GJA5* の変異

蒔田直昌 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態生理学)

家族性進行性心臓伝導障害 Progressive cardiac conduction defect (PCCD) は, 刺激伝導系の特異的な障害によって, 失神や突然死をきたす遺伝性不整脈である。現在までに心筋 Na チャンネル *SCN5A* と非特異的のカチオンチャンネル *TRPM4* の遺伝子異常が知られている。我々は PCCD の診断基準を策定し, 発端者 52 人とその家族の臨床像分析と遺伝子解析を行った。 *SCN5A* 変異 9 例, 核膜タンパクのラミン A/C *LMNA* 変異 10 例のほかに, 2 例の突然死を伴う若年性悪性 PCCD 1 家系にコネクシン 40 (Cx40) 遺伝子 *GJA5* の変異 Q58L を同定した。Cx40 は心房筋と刺激伝導系に特異的に発現するギャップジャンクション(GJ)である。内因性 GJ を欠損する細胞 N2A に Q58L の

cDNA をトランスフェクションし, 細胞間コンダクタンスをダブルパッチクランプ法で測定した。Q58L 細胞ペアのコンダクタンスは, 正常 (WT) Cx40 の 1/40 に減弱していた (WT: 22.2 ± 1.7 nS, $n=14$; Q58L: 0.56 ± 0.34 nS, $n=14$; $P < 0.001$)。 (図 3 左) また, Q58L は, 膜の一部に集簇する正常の GJ 発現パターンが障害され, 細胞膜上にび漫性に発現しており, コネクソン間の連関異常が示唆された。 (図 3 右) 本変異は, 心血管疾患における GJ 遺伝子の生殖系列変異としては最初の報告である。以上の結果から, PCCD は活動電位を形成する心筋イオンチャンネルのみならず, 核膜タンパクや細胞間刺激伝導を担うギャップジャンクションを含めた多彩な分子病態を有する遺伝性不整脈であることが明らかになった。

我々は現在, 変異 Cx40 を安定発現する HL-1 心筋細胞株を樹立し, 64 点電極アレイシステム (MEA) を用いて伝導遅延の可視化を試みている。また, 大阪大学薬理学倉智嘉久教授が主催する新学術領域「多階層生体機能学」の共同研究を通じて, 心筋細胞間伝導障害のコンピュータシミュレーションを行い, その分子メカニズムの解明を目指している。さらに, PCCD の大家系の全エクソン解析によって心臓伝導障害の新規原因遺伝子の同定を目指す国際共同研究を, フランスの INSERM と行っている。

1. Makita N, et al: Circ Arrhythm Electrophysiol 5: 163-172, 2012

低酸素で機能する新規コネキシン 43 制御ペプチドの開発

佐藤元彦*, 平岡昌浩, 山根友紀子, Xianfeng Feng, 石川義弘 (横浜市立大学循環制御医学, *現所属先: 愛知医科大学生理学)

心筋虚血の発生には交感神経をはじめとする G 蛋白シグナルが重要な役割を果たす。我々はラット狭心症モデルより、虚血心筋で G 蛋白シグナルを制御する蛋白 (Activator of G-protein signaling 8; AGS8) を同定した [1]。AGS8 は低酸素により発現が特異的に上昇し、虚血心筋で G 蛋白質 (G β) シグナルを制御していた。AGS8 をノックダウンしたところ心筋細胞の低酸素誘導アポトーシスは著明に抑制され、AGS8-G β 経路が虚血心筋傷害に重要であることが示された [2]。その機序には AGS8-G β によるチャネル蛋白コネキシンの透過性制御が関与すると考えられた。

そこで我々は、AGS8 によって活性化される G β シグナルを阻害することにより、心筋細胞を低酸素誘導細胞死から保護することを試みた。すなわち、AGS8 の G β 結合ドメインを解析し、そのアミノ酸配列より AGS8-G β 結合を阻害するペプチド (AGS8 ペプチド) を合成した。これを培養心筋細胞に投与し、心室筋に発現するコネキシン 43 の透過性・局在に対する影響を検討した。コネキシン透過性は低酸素により減少したが、AGS8 ペプチドはこの変化を抑制した。また、AGS8 ペプチドは低酸素下で生じるコネキシン 43 のインターナリゼーションも抑制した。次に、AGS8 ペプチドの低酸素誘導心筋傷害 (1% 酸素 6 時間/再酸素化 18 時間) に対する抑制効果を検討したところ、AGS8 ペプチドは細胞死に伴う TUNEL 陽性細胞の増加および分裂型カスパーゼ 3 の増加を抑制した。これら結果は、AGS8-G β シグナルがコネキシン 43 制御を介して心筋保護の上で重要な役割を果たすこと、また今回用いた方法により G 蛋白活性制御因子の解析・制御が可能であることを示していた。

G 蛋白共役受容体を介する情報は、細胞の主要な情報伝達系であり、古典的には 7 回膜貫通型の受容体、三量体 G 蛋白、および効果器という 3

つのコンポーネントから構成される。しかし近年、受容体以外に G 蛋白を直接活性化する一群の蛋白質、G 蛋白活性制御因子が存在することが明らかになった [3]。佐藤らは病態特異的な G 蛋白活性制御因子を複数同定してきたが、その作用機構は従来の受容体由来のシグナルとは全く異なるものであった [4, 5]。G 蛋白活性制御因子は今まで知られていなかった調節経路をもたらす重要なスイッチと考えられ、その研究は新たな生理調節機構の解明につながるものと期待される。

1. Sato M, et al: Proc Natl Acad Sci U S A. **103**: 797-802, 2006
2. Sato M, et al: J Biol Chem **284**: 31431-40, 2009
3. Sato M et al: Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 151-87, 2006
4. Sato M, et al: J Biol Chem **286**: 17766-76, 2011
5. Sato M, et al: Pathophysiology **17**: 89-99, 2010

おわりに

本シンポジウムの結果、不整脈基質形成の機序やこれを改善する為の薬物標的や戦略について新しい知見を得ることができた。すなわち、(1)QT 延長症候群や Brugada 症候群の臨床的表現型の違いが、電位依存性 K, Na チャネルの遺伝性変異が引き起す心筋活動電位再分極・プラトー相の貫壁性不均一性への差異のある影響によって説明できること、(2)心リモデリング等で心筋細胞の Ca ハンドリングが変化すると、これまで考慮されていなかった新しいチャネル分子 (TRIC, TRPM4) が不整脈の基質となり得ること、(3) コネキシン 40 の遺伝的変異が細胞間電氣的結合を著しく低下させ重症の伝導障害を起こすこと、最後に (4) コネキシン 43 の細胞膜発現を人工的なペプチドで制御できることが明らかとなり、心筋細胞を虚血による死から保護する効果があるのみならず、今後同様の戦略を用いて心臓の刺激伝導障害を改善する可能性も視野に入ってきた。

今後これらの知見が不整脈研究の新たな展開の一助となることを、本シンポジウム発表者一同から祈念し、本稿を閉じたい。

多面的アプローチによる痛覚情報処理機構の解明 (S22)

従来、痛みは何らかの病気に伴う一症状として捉えられ、痛みそのものを治療の対象とはしてこなかった。しかし、痛みの元となる原因が治癒した後も痛みが持続する慢性疼痛はQOLの立場から、また、医療経済の面から大きな問題となり、慢性の痛みを一つの疾患とみなし治療の対象とする機運が高まっている。その発生機序については多くの基礎研究がなされているが、本シンポジウムでは多面的なアプローチによって痛覚情報処理機構を理解することを目的に企画され、4名の新進気鋭の若手研究者に最新の研究成果の発表をお願いした。まず、福井大学の池田先生は電位感受性色素を用い、脊髄内での痛覚情報伝搬様式の解析に加え、長期増強発生メカニズムに関する詳細な研究結果が示された。本方法は痛み情報の脊髄後角での2次元的伝搬についての情報を得ることができる。次に生理学研究所の加藤先生はcaged glutamateをレーザーで励起して細胞間のシナプスコネクションを明らかにすることを可能にした実験で、Prof Pealグループのdouble patch クランプ記録と比較検討することによって、脊髄後角における詳細な回路網を明らかにできることが期待される。従来の研究は主に膠様質を対象としてきたが、膠様質は介在ニューロンであり、そこでの変化が投射ニューロンに対し如何なる修飾を行うかは殆ど不明である。脊髄後角におけるシナプスコネクションとその機能的な役割の解明が待たれるところである。次いで、生理学研究所の古江先生の研究は青斑核刺激による脊髄膠様質細胞応答を*in vivo*パッチクランプ記録で解析したものである。従来はexogenousに投与したノルアドレナリンやセロトニンの作用の解析しかできなかったが、*in vivo*パッチクランプ法の確立によってendogenousに放出されたノルアドレナリンの作用を解析することを可能にした研究手法である。最後に生理学研究所の鍋倉先生と江藤先生からtwo photon microscopeを用いた体性感覚野での神経回路網の再編についての発表があった。この方法を用いシナプス終末の変化から、spineの消長まで多くの興味あるデータが示された。今後は、大脳皮質に加え脊髄レベルでも形態的にどのような可塑的な変化が起こっているか興味の有るところで、今後の研究成果が期待される。

痛覚情報伝達に関しては末梢神経から脊髄レベルまで多くの貴重な報告がなされてきたが、未だ脊髄内に入力された情報がどのレベルでどのように処理され、投射ニューロンのアウトプットをコントロールしているかという基本的な質問にはまだ確信をもって説明することはできない。更に上位中枢では体性感覚野に投射される上行系と辺縁系への上行回路の機能的役割については未だ推測の域を出ておらず、痛みの情動面における重要性を考える上では、脊髄からの外側系と内側系の上行路の機能的解析が重要になってくるものと推測され、これらの詳細を理解するためには画一的な方法論だけでは困難で、今後もPETやfMRIに加えて革新的な方法論の確立によって大きく理解が進むものと期待している。

最後に、今回発表をいただいたシンポジストの先生方、および早朝から参加していただいた多くの方に心から感謝の意を表したい。本シンポジウムが痛みの理解に少しでも資することができたのであれば、オーガナイザーとしてこれに勝る喜びはない。

オーガナイザー：吉村 恵 (熊本保健科学大学大学院)
鍋倉 淳一 (国立生理学研究所)

脊髄後角における神経可塑性機構の膜電位感受性色素を用いた光学的イメージングによる解析

池田 弘, 村瀬一之 (福井大院・工・知能システム, 福井大生命科学複合研究教育センター)

中枢性感作は、痛覚過敏の要因の1つであると考えられている [1]。また脊髄後角における神経可塑性は、中枢性感作のメカニズムであると考えられている [2]。しかし、脊髄後角における神経可塑性のメカニズムは、解明されていない。電位感受性色素は、細胞の膜電位に反応する色素であ

り、このような色素を用いた光学的計測法は、多数の神経細胞で形成される神経回路を伝播する神経興奮をイメージングするために有効な手法である。本研究では、光学的計測法を用いて脊髄後角スライス標本における神経可塑性のメカニズムを調べた。単発電気刺激によって引き起こされる脊髄後角の浅層の神経興奮は、低頻度条件刺激によって増強した。この増強は、シナプス前終末の活動電位の振幅が増加することによって起き、その増強にはグリア細胞が関与していることがわ

かった。したがって、脊髄後角における神経可塑性の誘発にグリア細胞が関与していることが示唆された。次に、痛覚過敏の持続に、中枢性感作が関与しているのか、またその感作にもグリア細胞が関与しているのかを、炎症モデルラットと神経損傷モデルラットを用いて調べた。実験の結果、どちらの痛覚過敏ラットにおいても脊髄後角の神経興奮が、コントロールラットよりも大きくなっており、その増強には、グリア細胞が関与していることがわかった。脊髄後角内のグリア細胞が、痛覚過敏に関与していることはすでに示唆されているが [3]、本研究によって、グリア細胞が神経細胞の可塑性の誘発に関与し、また、神経興奮を持続的に増強することで痛覚過敏を引き起こしていることが示唆された。

1. Ji RR, et al: Trends Neurosci **26**: 696-705, 2003
2. Ikeda H, et al: Science **312**: 1659-1662, 2006
3. Milligan ED, et al: Nat Rev Neurosci **10**: 23-36, 2009

Laser Scanning Photostimulation 法を利用した脊髄後角神経回路の解析 (痛覚情報処理シンポジウム)

加藤 剛 (生理学研究所)

脊髄後角には痛覚及び触覚情報を上位中枢に伝達する投射神経細胞と、局所での情報伝達修飾に寄与する介在神経細胞とが存在するがこの介在神経細胞が構築する微小局所神経回路網に関しては未知の点も多い。従来この問題に対するアプローチとして dual cell recording 法が用いられ (Lu Y. J Neurosci. **23** (25) : 8752-8. and J Neurosci. **25** (15) : 3900-7) 後角表層部において特異的な形態学的特徴を持つ細胞同士のシナプス結合パターンの存在が明らかとなった。しかしながら記録及び刺激電極を用いたランダムサンプリングにおいてシナプス結合を持つ細胞ペアを抽出できる可能性はかなり低く、また細胞ペア間の距離が離れている場合にはシナプス性応答の記録が得られる可能性は更に限定される為この手法には一定の技術的な制約があると言える。この問題に対処する為、我々は laser scanning photostimulation 法を構築し [1]、脊髄後角を含むスライス標本にこれを適用した。本法では記録細胞周辺において UV 照射によるケイジドグルタミン酸の局所光解除で励起されるシナプス性反応の検出を whole cell patch clamp 法を用い行うが、この光刺激の座標を pseudo-random パターンで移動させスライス内を隈なく走査することにより、ミリ単位四方の2次元平面内において記録細胞に単シナプス結合し

ている興奮性及び抑制性プレシナプス細胞の位置情報 (= 入力領域) を網羅的に検出する事ができる。本手法を用い第1-4層後角神経細胞の横断及び矢状断面内の興奮性及び抑制性入力領域を調べたところ、興奮性入力領域は内外側方向よりも頭尾側方向に広い範囲で存在している事が判明した。一方で、抑制性入力領域は興奮性入力領域よりも頭尾側方向及び腹背側方向に限局している事が多いことが判明した。大多数の細胞では興奮性入力領域は記録細胞が属している層内に限局しているが、樹状突起の分布密度の重心が腹側及び細胞体の腹背側方向に存在する細胞種では表層 (第1-2層) 及び深層 (第3-4層) いずれにおいても層間横断的な入力パターンを示した [2] (Kato G.: Soc. Neurosci. Abst. 2010)。この場合興奮性神経伝達の方向性は表層細胞では深層から、深層の細胞では表層からというレシプロカルな形であった。脊髄後角の各層は異なる modality の知覚情報の入力を受ける為、これらの層間横断的な伝達パターンは、知覚情報の統合という観点から重要な役割を果たしている事が予想され興味深い。現在の所、脊髄後角1-4層細胞の入力領域マッピングが進んでおり同部位の局所神経回路内の情報伝達の基本様式が少しずつ明らかとなってきた。

1. Kato G: J Physiol **580**: 815-33, 2007
2. Kato G: J Neurosci **29**: 5088-5099, 2010

青斑核および脊髄からの in vivo パッチクランプ法を用いた下行性痛覚抑制系の解析

古江秀昌 (自然科学研究機構生理学研究所神経シグナル研究部門, 総研大生理科学)

生体は、生命が脅かされるなど特殊な状況において一時的に痛みを抑制し、闘争や逃避を可能にする防御システムを備えていることが知られている。この系には大脳皮質、中脳など複数の部位が関与していると考えられるが、最終的には脳幹に存在する神経核 (青斑核や縫線核) から下行する線維によって、痛みの中核への入り口である脊髄後角において、末梢からの痛みの入力を選択的に、かつ有効に抑制するものと考えられる。現在まで、この下行性抑制系の細胞レベルでの詳細な抑制機序の解明は、主にスライス標本など *in vitro* の系を用いた電気生理学的研究によって行われてきたが、その全容を明らかにすることは困難であった。そこで、麻酔下の動物個体から直接単一ニューロンに誘起されるシナプス応答を詳細に記録する、*in vivo* パッチクランプ法を開発し、下行性抑制系の起始核の1つである青斑核および、その投射先である脊髄後角に誘起される応答をシナプスレベ

ルで詳細に解析した。また、青斑核にチャンネルロドプシンを発現させ、光依存性に青斑核ニューロンを選択的に活性化させ、脊髓後角に誘起されるシナプス応答を *in vivo* で解析した。 *In vivo* 青斑核から記録を行うと、青斑核ニューロンは自発性発火を伴い、皮膚への生理的な痛み刺激によってその発火頻度を一過性に上昇させた。一方、脊髓後角にノルアドレナリンを直接投与すると、脊髓後角細胞に外向き電流が発生したが、青斑核刺激では、外向き電流はほとんど観察されず、GABA や glycine を介した抑制性シナプス応答の著明な増大が見られた。以上より、ノルアドレナリンは下行性に主に脊髓抑制性ニューロンを賦活化させて鎮痛効果を現すことが示唆された。新規に開発した青斑核からの *in vivo* パッチクランプ法 (Sugiyama et al., J Physiol, in press) は痛みのみならず、意識、覚醒、睡眠や循環調節などにも、青斑核にチャンネルロドプシンを発現させた個体からの脊髓 *in vivo* パッチクランプ解析は鎮痛機構の詳細や新たな鎮痛薬の開発に有用であることが示された。

慢性疼痛に伴う大脳皮質体性感覚野神経回路再編

江藤 圭, 鍋倉淳一 (生理学研究所生体恒常発達機構研究部門)

慢性疼痛は末梢組織の炎症や神経損傷がきっかけとなって生じ、その発生・維持過程に脊髓を含む中枢神経系の異常が関与していることが示唆されている。近年、脊髓だけでなく大脳皮質も慢性疼痛に関与することが明らかになりつつある。その中でも、一次体性感覚野 (S1) は、慢性疼痛時に脳活動、構造が変化することから、この領域が慢性疼痛において重要な役割を担っていることが予想されている。しかし、従来の研究では、慢性疼痛時に S1 においてシナプス構造・単一神経活動がどのように変化し、疼痛行動に影響を及ぼすか不明であった。本研究ではこれらの問題に、最新の 2 光子顕微鏡を用いた生体脳イメージングを用いて取り組んだ。

まず、2 光子顕微鏡を用いてシナプス構造の慢

性イメージングを行い、神経因性慢性疼痛時の S1 におけるシナプス再編成を観察した。坐骨神経の傷害後、痛み行動は亢進し、1 週間後には最大になった。神経傷害初期において、神経シナプスであるスパインの形成と消失が盛んに起き、9 日以降 (慢性疼痛維持期) には正常レベルに戻った。傷害直後の末梢からの過剰な入力を神経活動抑制薬により抑制すると、傷害時にみられたスパインの変化は消失した。また、神経傷害前に存在していたスパインは、傷害後に小さくなり、神経傷害初期に生じたスパインは、大きくなり、定着した。観察期間の初期から安定して存在しているスパインは、正常群ではあまり消失しないのに対し、神経傷害群では多く消失した。本研究により、末梢神経傷害により、誘発された過剰な入力により、S1 のシナプス構造は傷害後数日以内に劇的に変化し、シナプス再編が起きることが明らかになった。さらに、傷害前に存在していたシナプスは消失し、異常な感覚情報に対応したシナプスが新生・強化し定着することが明らかになった。

次に、2 光子顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージングにより S1 から他の皮質へと情報出力を行なう第 2/3 層興奮性神経細胞の活動を単一細胞レベルで観察した。慢性疼痛時には感覚刺激、及び、S1 第 4 層の皮質内刺激で誘発された神経細胞活動が亢進していた。また、S1 の活動亢進を薬剤で抑制すると慢性疼痛行動が減弱した。S1 の過剰活動が疼痛行動を惹起する原因として慢性疼痛において重要な領域である前帯状回 (ACC) と S1 の相互作用を調べた。慢性疼痛時の S1 活動抑制により感覚刺激で誘発され ACC の神経活動が抑制された。この結果から、慢性疼痛の際に、S1 の出力細胞である第 2/3 層興奮性神経細胞の活動が亢進し、この皮質内可塑的变化が ACC の活動を亢進させることで、慢性疼痛行動を生じさせることが明らかになった。以上、これらの研究から、今まで不明であった S1 を中心とした慢性疼痛メカニズムを明らかにすることで、大脳皮質領域間の可塑的变化に着目した新たな慢性疼痛治療戦略の構築に寄与することが期待される。

骨形成と骨吸収の先端研究から探る、骨修復促進のストラテジー (S27)

外傷や腫瘍などで生じる、自然に修復されない大きな骨欠損を治療する方法は、骨移植と骨再生の二つである。骨移植は自家骨移植が理想的であるが、採取量が制限されることと採取部位に

侵襲が加わることが問題である。一方同種骨移植は、骨修復能力が落ちることと disease transfer の問題がある。そこで骨再生医療が 15 年以上前から脚光をあげ、再生医療の中では先駆的に臨床応用が達成された。その主役は Bone Morphogenetic Protein (BMP) であり、rhBMP-2 または rhBMP-7 によってほとんどの骨欠損は修復されるものと、大きな期待がかけられた。しかし、残念ながら BMP のヒトにおける骨形成能は思ったほど高くなく、価格が高価であることや腫瘍を形成する可能性があることなどから、現在においてもあまり普及していない。大きな骨欠損は相変わらず骨移植に頼っているのが、臨床の現実である。BMP 神話は、すでに崩れかかっている。

このような状況の中で、骨修復をもう一度生物学的視点から見直し、新しい骨修復技術を構築するためのアイデアを出し合おうというのが、本シンポジウムの目的である。このために、骨に関する生理学・生化学・組織解剖学・ナノサイエンスの専門家が集結し、それぞれの分野から「骨修復」をキーワードとして、現在行っている先端研究を発表した。まさに分野横断的境界領域であり、研究手法そのものが全く異なる、おもちゃ箱のようなシンポジウムになった。しかしそれ故に、それぞれの発表で多角的に活発な(時的的外れな?) 議論が交わされ、全体に与えられた時間を 30 分以上オーバーしてもまだ足りない、充実したシンポジウムを行うことができた。

もちろん、骨修復のストラテジーについて何ら結論は得られなかったが、一つでも二つでもはっと気が付くことがあれば、現時点ではこのシンポジウムは成功であったと考える。異分野の先端研究から、その突っ込んだ議論から、参加者は今後の研究のヒントが見いだせたのではないだろうか。少なくとも私には、複数の大きな収穫があった。この雑然としたシンポジウムの成果が問われるのはこれからである。自分の分野に持ち帰り、さらに独自の研究を進め、再度意見交換を行い、そうこうするうちに驚くようなブレイクスルーが生まれることが予感される。今後の生理学会においても「骨」のシンポジウムが何度も行われ、定着し、生理学という幅広いプラットフォームの上に新しい集学的研究成果が積み上げられ、世界に発信されていくことを期待している。

オーガナイザー：齋藤 直人 (信州大・医・保健)

宇田川信之 (松本歯大・歯・生化)

骨の再生を目指した破骨細胞・骨芽細胞・歯髄細胞に関する橋渡し研究

宇田川信之 (松本歯科大学学生化学講座, 総合歯科医学研究所)

骨組織は、骨吸収と骨形成のバランスにより調節されている。それらのバランス調節は、互いにあたかも連絡を取り合っているかのようにみえるため、この現象は、骨代謝共役(カップリング)と呼ばれる。また、様々なサイトカインやホルモンによって調節されている(図 1)。骨粗鬆症はこの骨代謝共役が破綻し、骨吸収が骨形成を凌駕するために発症する。

破骨細胞は高度に石灰化した骨組織を破壊・吸収する唯一の細胞である。その起源は、生体に広く分布するマクロファージ系の細胞である。破骨細胞とその前駆細胞は receptor activator of NF- κ B (RANK) を発現し、骨芽細胞との細胞間接触を介して破骨細胞分化因子である RANK ligand (RANKL) を認識し、破骨細胞に分化する。

破骨細胞分化因子 RANKL とその受容体 RANK、そして RANKL のデコイ受容体であるオステオプロテゲリン (OPG) の発見 (1997 年) から 10 年以上経過した現在、骨粗鬆症患者に対する RANKL 中和抗体(デノスマブ)が臨床応用された

ことは RANKL シグナルの解明の重要性を物語っている。

歯髄は、脱落乳歯や歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であり、自己移植材料として有用と考えられる。我々はこれまでに、マウスの下顎前歯から採取した歯髄および歯根膜組織を用いた簡便な培養方法の確立を目指してきた。その結果、マウス歯髄から採取した細胞は高いアルカリホスファターゼ活性を有しており、in vitro および in vivo において強力な石灰化能を有していることが明らかとなった。現在この石灰化の亢進メカニズムを歯髄細胞の遺伝子レベルでの特殊性で説明しようとしている。

患者自身の歯髄間葉系幹細胞を用いた骨・軟骨の再生療法に関しては、既に細胞培養技術が確立され、臨床応用が始まっている。我々の研究グループも、ヒト自己歯髄細胞を培養することにより、多血小板血漿 (PRP) と共に β -リン酸三カルシウム (β TCP) をキャリアにして、歯槽骨欠損部位に移植し骨増生を図るための臨床研究を開始している。

1. Udagawa N, et al: Proc Natl Acad Sci USA **87**: 7260-7264, 1990
2. Yasuda H, et al: Proc Natl Acad Sci USA **95**:

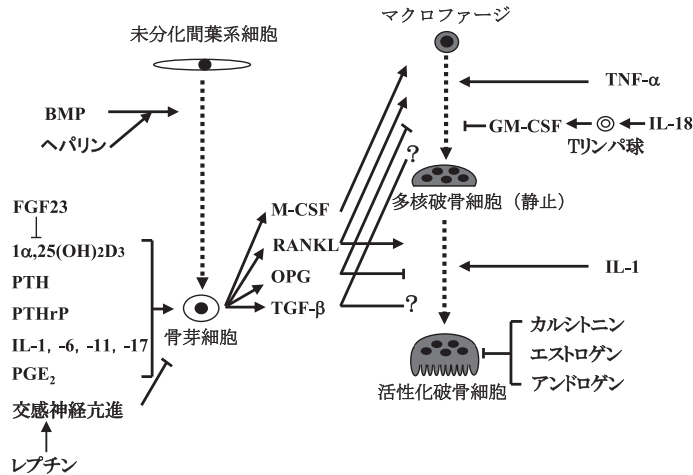


図 1.

- 3597-3602, 1998
3. Nakamura M, et al: Endocrinology **144**: 5441-5449, 2003
 4. Yamamoto Y, et al: Endocrinology **147**: 3366-3374, 2006
 5. Mizoguchi T, et al: J Cell Biol **184**: 541-554, 2009

骨細胞の細胞生理における形態学的アプローチ—骨細胞による石灰化骨基質の調節—

網塚憲生, 佐々木宗輝, 本郷裕美, 長谷川智香, 赤堀永倫香, 山田珠希 (北海道大学歯学研究科硬組織発生生物学)

骨細胞は骨芽細胞自らが産生した骨基質中に埋め込まれた細胞であり, 骨基質中の骨小腔という空間に存在している. このような骨細胞は細胞突起を周囲の骨細胞や骨芽細胞に向けて多数の細胞突起を伸ばす. 骨細胞の細胞突起は, 骨細胞同士や骨表面に位置する骨芽細胞の突起と互いにギャップ結合で連絡することで細胞間情報交換が可能となり, 骨細胞・骨細胞系を形成している. 従って, 骨細胞・骨細胞系は機能的合体を形成しており, 骨細胞は, まさに骨を支える細胞と考えることができる (図 2).

近年, 骨細胞における研究が進み, 骨細胞から産生される因子として sclerostin (骨芽細胞を抑制), FGF23 (腎臓の近位尿細管に作用して血中リン濃度を制御), DMP-1 (基質のリン酸カルシウムと高い親和性を有する) が注目を浴びている. また, このような因子の発見以来, 骨細胞はリン・カルシウムといった全身性ミネラルを調節する可能性が示唆されるようになってきた. その一方で,

成熟骨である皮質骨では規則的な配列を示す骨細胞・骨細胞系が, また, 骨改造が活発に行われている骨幹端骨梁では不規則な骨細胞・骨細胞系が発達している. 興味深いことに, sclerostin や FGF 23 の産生は規則的な骨細胞系を示す皮質骨に顕著に認められる.

副甲状腺ホルモン (PTH) に対して骨細胞が血中カルシウム調節に関与するのかわかりかするため, マウスの外頸静脈に PTH を注入後, 数時間の骨小腔の変化を観察した. その結果, PTH 投与後の皮質骨には骨小腔の拡大, すなわち, 骨細胞周囲から基質ミネラルの溶出が観察された. そのような皮質骨の骨細胞には FGF23, sclerostin およびプロトンポンプ陽性反応が認められた. さらに, 骨細胞特異的にジフテリア毒受容体を発現したマウスにジフテリア毒を投与すると, 骨細胞が死滅する前に, 周囲の骨基質を溶解したことから, 骨細胞は骨小腔周囲のわずかな基質ミネラルを溶出する可能性が強く示唆された.

さらに, 骨細胞が産生する FGF23 は腎臓の近位尿細管に作用し, 受容体である FGFR1c/klotho 複合体からのシグナルを介してリンの再吸収の抑制ならびに 1 α -hydroxylase を抑制することが知られている. すなわち klotho 遺伝子欠損 (klotho^{-/-}) マウスでは FGF23/klotho 軸が機能しないため, 血中リン濃度が上昇し, また血中カルシウム濃度も上昇傾向を示す. そこで, klotho^{-/-} マウスの骨基質を検索したところ, 高い血中リン・カルシウム濃度を示すにも関わらず, 基質ミネラルが溶出してしまっている領域が広範囲に認められた. また, そのような未石灰化基質に存在する

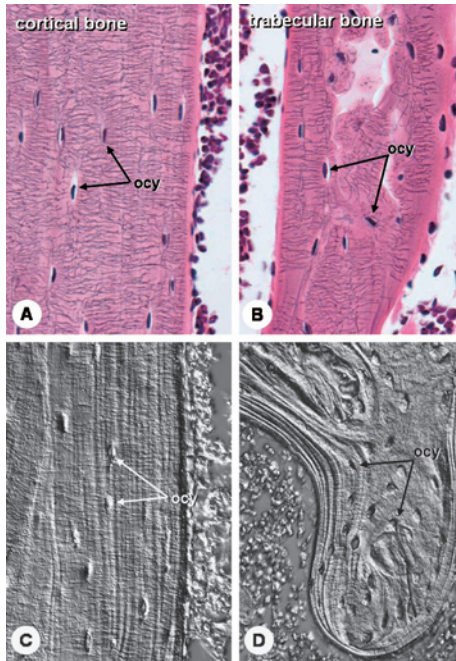


図2. 図はマウスの皮質骨 (A, C) および骨梁 (B, D) における骨細胞・骨細管系を鍍銀染色 (A, B) と位相差 (C, D) で観察した所見. 文献3) より改変

骨細胞・骨小腔は石灰化を受けていた. 骨細胞を観察すると, 細胞周囲には多量の DMP-1 が産生されており, そこにリン酸カルシウム石灰化結晶が侵入, すなわち, 石灰化が誘導されることが推察された. 恐らく, そのような骨細胞は, 周囲の骨基質ミネラル調節の機能を失っているものと思われる. すなわち, klotho 欠損で血中リン・カルシウム濃度が上昇しても物理化学的に骨基質石灰化が亢進するのではなく, 骨細胞による調節を受けていることが推察された.

以上のことから, 骨細胞・骨細管系の機能の一つとして石灰化骨基質の調節があげられた.

1. Amizuka N, et al: J Oral Biosci **54**: 37-42, 2012
2. Amizuka N, et al: Front Biosci **E4**: 2085-2100, 2012
3. Sasaki M, et al: Oral Science International **9**: 1-8, 2012
4. Hongo H, et al: Hokkaido Journal of Dental Science **32**: 93-103, 2012

異常骨吸収の新しい治療薬としての Cl⁻輸送体

岡部幸司, 岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 大城希美子 (福岡歯科大学細胞生理学)

ClC7 型 Cl⁻チャンネル/トランスポーター (Clcn7) は破骨細胞の酸分泌や骨吸収機能に重要な役割を持ち, この分子の変異は II 型の常染色体優性骨大理石病 (ADOII) を呈する. 従って, 破骨細胞の Clcn7 を介する酸分泌機構を解明することは, 骨疾患を制御する上で臨床的にも意義深い. しかしながら, Clcn7 を介する Cl⁻輸送の特性や ADOII における Clcn7 変異による Cl⁻輸送への作用については明らかではない. まず, 野生型 Clcn7 を HEK293 細胞に過剰発現させると外液酸性化により活性化される Cl⁻電流が誘導された. 次に ADOII 患者において報告された Clcn7 の変異部位である G215, P249, R286 に変異を挿入した Clcn7 を過剰発現させた HEK293 細胞ではこの酸活性化 Cl⁻電流が認められなかった. 従って, 破骨細胞に発現する Clcn7 は骨吸収窩中の酸性環境において活性化される Cl⁻輸送システムであり, ADOII の Clcn7 変異がこの Cl⁻輸送を阻害し骨吸収機能を抑制すると考えられた (図3). そこで, ADOII における変異部位が Clcn7 を介する Cl⁻輸送機能を修飾する重要な部位と考え, G215, P249, R286 に対するポリクロナール抗体を作製し, マウス破骨細胞の酸活性化 Cl⁻電流に対する効果を検討した. Clcn7 分子の細胞膜内側に位置する G215 に対する抗体 (Ab-G215) の細胞内投与, 及び細胞膜外側に位置する P249 及び R286 に対する抗体 (Ab-P249 及び Ab-R286) の細胞外液投与は酸活性化 Cl⁻電流が有意に抑制した. この3つの抗体の作用は野生型 Clcn7 を過剰発現させた Raw 264.7 細胞においても同様に認められた. また, 破骨細胞を象牙切片上に培養し Ab-P249 及び Ab-R286 を添加すると吸収窩面積が有意に減少したが, Ab-G215 投与は有意な効果を示さなかった. 従って, これらの抗体は破骨細胞の Clcn7 機能を特異的に阻害すると考えられ, 異常骨吸収の治療へ応用できる可能性が示唆された (図3). 一方, ビスホスホネートは破骨細胞の骨吸収を強力に抑制する薬剤として骨粗鬆症や癌骨転移の治療に広く用いられている. ビスホスホネートの抑制作用はメバロン酸代謝におけるファーンシルニリン酸合成酵素 (Fdps) の抑制により, 破骨細胞の細胞内骨格の形成阻害やアポトーシスを誘導すると報告されているが, 酸分泌機能に対する効果については不明である. そこで, 酸活性化 Cl⁻電流に対するビスホスホネートの効果について検討した結果, 窒素含有性ビスホスホネートであるゾレドロン酸は酸活性化 Cl⁻電流に対して急性的かつ濃度依存的な抑制作用を示したが, 窒素非含有性ビスホスホネートであるエチドロロン酸は作用を示さなかつ

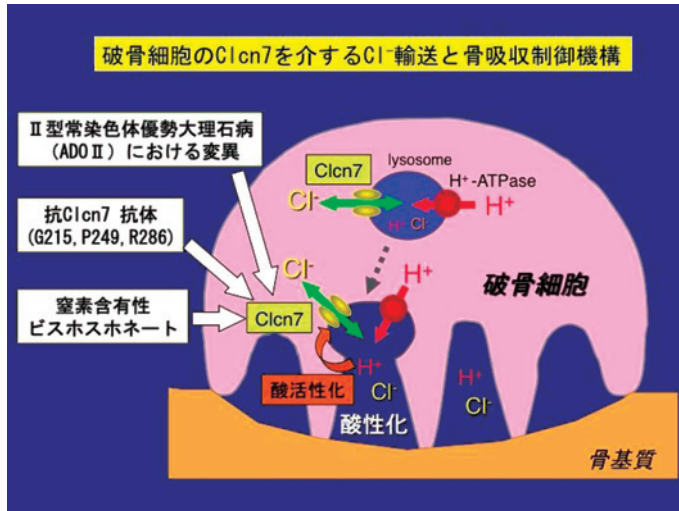


図 3.

た。また、Fdps の shRNA を用いたサイレンシングやゲラニルゲラニル転換酵素の阻害剤は Cl⁻ 電流を抑制したが、メバロン酸代謝産物のゲラニルゲラニル酸投与はゾレドロン酸による抑制作用を減弱した。従って、窒素含有性ビスホスホネートは破骨細胞の細胞内骨格形成抑制だけでなく、Fdps 阻害を介して早期に破骨細胞の Clcn7 等を介する酸分泌機能を抑制することが明らかとなった (図参照)。このような破骨細胞の Clcn7 を介する酸分泌機構の特性を解明することは、Clcn7 分子を標的とした骨修復を促進する新規の薬剤や治療法の開発への戦略としても意義があると考えられる。

カーボンナノチューブは骨芽細胞との相互作用により石灰化を誘導して骨形成を促進する

齋藤直人 (信州大・医・保健)

近年、ナノ材料の生体応用が注目され、癌治療や再生医療分野で重要な研究テーマになっている。その理由は、細胞より小さい、細胞内小器官に近いサイズのナノ材料が生体内で作用して、未知の生体活性を示すことが期待されているからである。すでにナノ材料から生体への作用、または生体からナノ材料への作用がいくつか観察され、その応用研究が試みられている [1]。

我々は *in vivo* で carbon nanotubes (CNTs) が骨形成を促進することを、2008 年に最初に発表した [2]。その後多くの追試が行われてこの現象が実証されたが、そのメカニズムは不明であった。我々はこのメカニズムの解明に取り組んでいる際

に、*in vitro* で CNTs が骨芽細胞と生化学的な相互作用を行うことを発見した。これは、*in vivo* の現象を解明し、しかも骨再生にきわめて有利に働く生体反応であった。そのメカニズムは、CNTs が骨芽細胞の放出する基質小胞に類似した働きを担うことである。すなわち、CNTs が Ca を引き寄せて周囲の Ca 濃度が上昇すること、骨芽細胞の分化促進により周囲の ALP が上昇して培養液中の β-グリセロリン酸が分解されリン酸濃度が高まることでハイドロキシアパタイト (HA) 結晶が形成されやすくなった。さらに基質小胞 (直径 40~200 nm) とサイズが近似する CNTs がエピタキシーとして作用し、初期石灰化が起こったと考えられた (図 4)。今後、CNTs と骨芽細胞の相互作用をさらに研究することにより、長年議論され続け未だに結論が得られていない骨石灰化が初動するメ

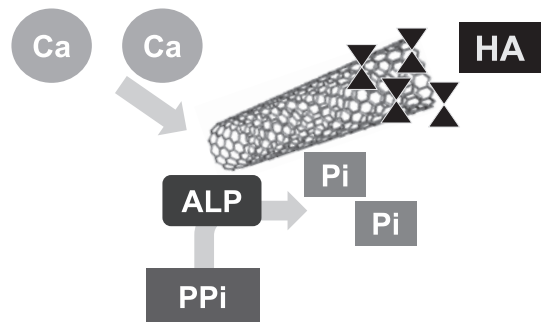


図 4. カーボンナノチューブによる HA 形成のメカニズム

カニズムが、詳細に解明されると考える。これにより骨形成を促進する技術が明らかになり、骨再生医療のブレイクスルーが達成されることが期待できる [3].

このようなナノ材料と生体が相互に作用しあい、その相乗効果によって生体に有利な機能を発揮した報告はこれまでにない。しかも、生体活性を示すほとんどの材料がその生体分解性を利用しているが、CNTs は異なるメカニズムで作用する、新しい概念の生体活性物質である。本研究のターゲットは骨組織および骨芽細胞であるが、今後他

の様々な組織や細胞でも、このようなナノ材料と生体の相互作用が明らかになってくるであろう。それらの知識が集積されれば、ナノ材料の生体における共通の機能が明らかになり、ナノサイズである特色を最大限に生かした生体材料が、多数開発されることが期待できる。

1. Saito N, et al: Chem Soc Rev **38**: 1897-1903, 2009
2. Usui Y, et al: Small **4**: 240-246, 2008
3. Shimizu M, et al: Adv Mater 2012 (in press)

上皮イオン輸送の細胞分子メカニズム (S28)

腎臓・消化管は、細胞外液の電解質組成や pH を維持する上で、重要な働きをしている。バソプレシニン (VP) やアルドステロン受容体 (MR) が、水電解質代謝だけではなく酸塩基調節に必要である (Nonoguchi H; Yasuoka Y)。海水から淡水に移行する魚の浸透圧調節の場合、単に VP の分泌変化だけではなく、消化管上皮細胞のイオンチャネル (内向き整流性 K⁺チャネル: Kir) の活性と発現が亢進する (Healy J, Takei Y)。また哺乳動物においても、腎機能が低下してくると、消化管における K⁺分泌能が亢進して、代償機能を発揮する。副腎摘除マウスを高 K 食で飼育すると、腎遠位尿管 (DCT2) の calbindin-D28 の発現量が増加した (Kobayashi M, Yasuoka Y, Kawahara K)。近位尿管の Kir 活性は、protein kinase/phosphatase で調節されている (Nakamura K, Kubokawa M)。上皮イオンチャネルの細胞分子メカニズムと役割を包括的に討議する。

オーガナイザー: 河原 克雅 (北里大学医学部生理学)
久保川 学 (岩手医科大学生理学)

腎消化管上皮細胞の水電解質輸送

河原克雅¹, 久保川 学² (¹北里大学医学部生理学, ²岩手医科大学生理学)

腎臓と消化管は、細胞外液の電解質組成や pH を維持する上で、重要な働きをしている。特に腎臓では、集合管細胞のバソプレシニン (VP)-cAMP-AQP2 系で水の再吸収 (二次的に血漿浸透圧) をコントロールし、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン (R-A-A) 系と協調し細胞外液量の調節を行っている。最近、VP の V1a 受容体 (V1aR) やアルドステロン受容体 (MR) が、水電解質代謝調節だけではなく、集合管間在細胞 (IC) に発現し、酸塩基調節に必須の役割をしていることが明らかになった。

安岡と野々口の研究グループは、V1aR KO マウスを使った実験で、個々に、管腔膜 AQP2 発現量減少による尿濃縮能の低下と尿中酸分泌能低下による代謝性アシドーシスの重症化を証明した。次に、丸中らは、上皮膜 Na⁺輸送を規定する因子と

して、上皮型 Na⁺チャネル (ENaC) の総リサイクル量と ENaC のインサーション/エンドサイトーシス比率の関係を重要視した。管腔膜と側底膜の内向き整流性 K⁺チャネル (Kir) は、各々、NKCC2 のリサイクル路 (管腔膜) と側底膜の駆動力として重要である。一方、近位尿管の Kir 活性は、protein kinase/phosphatase で調節されている。中村らは、インターフェロン γ が 40 pS K⁺チャネルに対して、急性の促進作用と遅発性の抑制作用を有することを示した。海水から淡水に移行する魚の浸透圧調節の場合、単に VP の分泌変化だけではなく、消化管上皮細胞の Kir の活性と発現が亢進する。Healy と竹井は、メダカを海水で飼育し、消化管上皮細胞に Kir が誘導されることを明らかにした。哺乳動物においても、腎機能が低下してくると、消化管における K⁺分泌能が亢進して、代償機能を発揮する。副腎摘除マウスを高 K 食で飼育すると、腎遠位尿管 (DCT2) の calbindin-D28 の発現量が増加した (Kobayashi

M et al, 2011). 腎・消化管上皮細胞に局在するイオンチャネルの細胞分子レベルでの調節機構とその役割を包括的に討議する。

尿濃縮における V1aR の役割

安岡有紀子¹, 佐藤雄一², 河原克雅¹ (¹北里大学医学部生理学, ²北里大学医療衛生学部遺伝子検査)

脳下垂体後葉ホルモン-バゾプレシン (VP) は, 腎集合管主細胞 (PC) 基底膜の V2 受容体 (V2R) に作用し, VP 調節性水チャネル (AQP2) の管腔膜発現量増加と活性化により水の再吸収を亢進する (VP-V2R-PKA-AQP2 軸). 一方, 集合管の V1aR シグナル (VP-V1aR-Ca²⁺-PKC 軸) は, V2R-AQP2 軸に拮抗すると考えられているが (管腔膜水透過性の抑制), その細胞内メカニズムは不明である. われわれは, 集合管水輸送における V1aR の役割を明らかにするため, V1aRKO マウス (KO) の水バランスと尿濃縮能について調べた. 方法: WT・KO マウスを自由飲水/24 時間絶水し, 尿・血液の浸透圧, 血漿 AVP 濃度, 尿中 AQP2 排泄量 (Western blotting), 腎集合管 V2R mRNA の発現量 (Tyramide-ISH 法) と AQP2 蛋白の細胞内局在/発現量変化 (IHC 法) を調べた. 結果: 自由飲水時には差異は認められなかったが, 絶水時の血漿浸透圧は, WT に比べ KO マウスが有意に高く (WT: 342, KO: 354 mOsm/kgH₂O), 尿浸透圧 (尿濃縮能) は, WT に比べ KO マウスが有意に低かった (WT: 3,610, KO: 3,361 mOsm/kgH₂O). KO マウスの血漿 [AVP] (pg/ml) は, 絶水で有意に増加したが, V2R mRNA 発現量 (腎皮質・髓質外層) は, 同一条件下で増加しなかった. さらに, V1aR KO マウスの AQP2 発現量は, WT に比べ有意に低下していたが, 絶水刺激で増加した. WT・KO マウスの集合管主細胞において, 細胞内 AQP2 蛋白は脱水刺激に呼応して管腔膜に移行した (V2R-cAMP-PKA-AQP2 軸シグナルを反映する移行率は, WT, KO マウス間で有意な差はなかった). 結論: V1aR シグナル欠如は, 脱水時の VP-V2R-PKA-AQP2 シグナル応答には影響しなかったが (抑制効果欠如による相対的促進効果は見られなかったが), V1aR シグナルは, 集合管主細胞の AQP2 基礎レベル発現に必要であった.

バゾプレッシン V1a 受容体による腎間在細胞でのミネラルコルチコイド受容体核内輸送制御

野々口博史¹, 永井孝憲¹, 堀加穂理¹, 泉裕一郎², 蓮池由紀子¹, 田上昭人³, 中山裕史¹, 河原克雅⁴, 富田公夫¹, 中西健¹ (¹兵庫医科大学

内科学腎・透析科, ²熊本大学生命科学部腎臓内科, ³国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部, ⁴北里大学医学部生理学)

私たちは, アルドステロンによる酸塩基平衡調節におけるバゾプレッシン V1a 受容体 (V1aR) の役割を検討した. V1aRKO マウスは, 低レニン性低アルドステロン症であることから 4 型腎尿細管性アシドーシス (RTA) が疑われた. V1aRKO マウスでは, 腎機能低下, 代謝性アシドーシス, 高 K 血症が見られた. 尿中総酸排泄量は正常状態ではワイルドタイプと差はなかったが酸負荷で V1aRKO マウスでは, 尿中アンモニア排泄が増加せず, ワイルドタイプに比べて, 強い代謝性アシドーシスになった. 外因性アルドステロンである fludrocortisone を補充すると V1aRKO マウスでは, 尿中アンモニア排泄が増加し, 代謝性アシドーシスの改善を認めた. V1aRKO マウスでは, Fludrocortisone 投与により, 低下していた H,K-ATPase, Rhcg 発現増加を認めたが, ワイルドタイプに比べて不十分で, V1aRKO マウスは 4 型 RTA であり, H, K-ATPase, Rhcg 発現低下による尿中アンモニア排泄低下が原因であることが判明した.

Fludrocortisone 投与により, ミネラルコルチコイド受容体 (MR), 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2) 発現はワイルドタイプでは著明に亢進したが, V1aRKO マウスではその効果が減弱していた. このことから, V1aRKO マウスで見られた H-ATPase, H,K-ATPase, Rhcg 発現変化は, MR 発現低下に起因すると考えられた. 腎臓における酸排泄は間在細胞で行われるので, 間在細胞 cell line を SV40 Tg ラットから作成した. IN-IC cell と名付けられたこの cell line は, V1aR や酸塩基平衡関連輸送体は発現するも, バゾプレッシン V2 受容体, アクアポリン 2, ENaC は発現しておらず, 間在細胞でした. この細胞を使って, アルドステロンによる MR 核内輸送を次に検討した. 細胞質と核に分けた分画での Western blot, 免疫染色で, アルドステロンは MR の細胞質から核への輸送を non-genomic に増加させた. バゾプレッシンでも, 同様の作用を認めた. さらにアルドステロンは, RCC-1 発現を増加させ, バゾプレッシンは Ran Gap1 発現を低下させることで, MR 核内輸送促進させることが判明した.

以上より, 腎集合尿管間在細胞に於けるアルドステロンによる酸塩基平衡調節作用には, MR の核内輸送を制御している V1aR の存在が必須であることが明らかとなった.

Recycling rates of ENaC depend on the total amount of recycled channels

Yoshinori Marunaka^{1,2}, Akiyuki Taruno¹
¹Kyoto Prefectural Univ. Med., Kyoto, Japan,
²Japan Institute for Food Education and Health, Heian Jogakuin (St. Agnes') University, Kyoto, Japan)

Epithelial Na⁺ channel (ENaC) in the cortical collecting duct of the kidney regulates body fluid content and blood pressure by mediating Na⁺ reabsorption. Trafficking is one of the most important mechanisms of ENaC regulation. The amount of apical surface ENaCs (S_{ENaC}) is determined by the total amount of recycled ENaCs (T_{ENaC}) and the rates of insertion and endocytosis. The relationship between T_{ENaC} and the recycling rates of ENaCs is unknown. However, it is hard to study the recycling of ENaCs; especially endogenously expressed ENaCs. The aim of the present study is to study if the total amount of recycled ENaCs affects the recycling rates of ENaCs. To clarify this point, we have established a novel method for estimation of the total amount and recycling rates of recycled ENaCs by using benzamil (a specific blocker of ENaC) with a high-affinity for ENaC. Using this method, we studied if a decrease in the total amount of ENaCs influences respectively the rates of insertion and endocytosis of ENaCs to and from the apical membrane in renal epithelial A6 cells. We conclude that: 1) insertion and endocytosis rates of ENaC increase as the total amount of recycled ENaCs decreases, and 2) the different magnitudes in the change of the rates (the greater increase in the insertion rate than the endocytosis rate) at the decrease in total ENaC amount maintain Na⁺ transport within a moderate range via a negative feedback system.

ヒト近位尿細管細胞の K⁺チャネル活性調節におけるインターフェロン-γ (IFN-γ) の関与

中村一芳¹, 真柳平², 駒切洋¹, 祖父江憲治², 久保川学¹ (¹岩手医科大学生理学講座, ²同 神経科学研究部門)

腎近位尿細管は糸球体濾液中 Na⁺ の約 70% を再吸収しており, この Na⁺ 再吸収のための駆動力形成において近位尿細管細胞基底側膜の K⁺チャネルは重要な役割を果たしている [1]. これに加え, K⁺チャネルの活性変化が炎症や虚血時の尿細

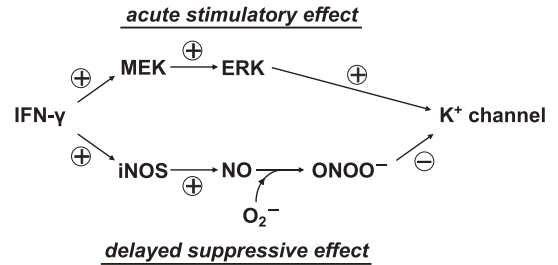


図1. 培養ヒト近位尿細管細胞の内向き整流性 K⁺チャネルに対する IFN-γ の急性促進作用と遅発性抑制作用

管細胞傷害に関与しているとの報告がある [2]. 炎症や虚血時には種々のサイトカインが細胞傷害の増悪をもたらすことはよく知られている. これらサイトカインの細胞傷害作用の一部が K⁺チャネルの活性変化を介している可能性も考えられるが, サイトカインが尿細管細胞の K⁺チャネル活性にどのような影響を及ぼすかについての報告はこれまでほとんど無かった [2]. そこで我々は, 正常腎由来の培養ヒト近位尿細管細胞に存在する内向き整流性 K⁺チャネル [1] に対する IFN-γ の効果を検討した. その結果, IFN-γ はこの K⁺チャネルの活性に対して急性の促進作用と遅発性の抑制作用を有することが明らかとなった (図 1). 急性促進作用については, パッチクランプ法の cell-attached patch において IFN-γ 投与後数分でチャネル活性の上昇が認められ [3], MAPK 阻害剤を使った実験からこの作用には MEK/ERK 経路が関与していることが示唆された. また, Western blotting により IFN-γ が実際に ERK を活性化していることが確認された. さらに inside-out patch で ERK を投与するとチャネル活性が上昇したことから, ERK がチャネル蛋白を直接リン酸化することが強く示唆された. 一方, IFN-γ での 24 時間処理により K⁺チャネルの出現頻度および開口確率は低下した [3]. RT-PCR と蛍光イメージング解析から, これらの細胞では II 型 NO 合成酵素 (iNOS) の mRNA 発現および NO 合成が著明に増加していた [3]. これら所見に基づき, iNOS 阻害剤またはスーパーオキシド阻害剤を投与したところチャネル活性が改善した [3]. 従って, IFN-γ の遅発性抑制作用には iNOS の発現誘導とそれに引き続く高濃度の NO 産生および NO 過酸化物の生成が関わっていることが示された. 以上の様な腎近位尿細管細胞の K⁺チャネル活性に対する IFN-γ の修飾作用は, 炎症性疾患時における腎機能障害の病態に関わっている可能性が考えられ

る。

1. Kubokawa M: Patch Clamp Technique, IN-TECH, Croatia, pp91-108, 2012
2. Nakamura K: Clin Exp Nephrol **16**: 55-60, 2012
3. Nakamura K: Am J Physiol **296**: F46-F53, 2009

海水馴化した魚の腸管上皮における K⁺チャネル

Jillian Healy¹, 竹井祥郎² (¹東京大学教養学部 ALESS プログラム, ²東京大学海洋研究所海洋生命科学部門生理学分野)

生物が海水で生きるためには、海水の高浸透圧による脱水に対処する仕組みが必要である。海水魚は、海水を飲み(消化管で能動的に Na⁺と Cl⁻を吸収して)、鰓から NaCl を分泌(排出)し、海水の高浸透圧による脱水を補正している。その Na⁺と Cl⁻の消化管吸収は、主に管腔膜上の NKCC2 共輸送体を介した二次性能動輸送によって行われている。内向き整流性 K⁺チャネル(Kir)は、静膜電位の維持と、管腔膜や基底膜を横切る K⁺リサイクルにおいて不可欠であることは良く知られている。しかし、浸透圧調節に寄与する消化管の K⁺チャネルの種類と機能は、ほとんど調べられていない。我々は、海水馴化したメダカ(*Oryzias latipes*)で mRNA の発現量が増加した2種類の K⁺チャネル(Kir)、Kir4.2 ホモログと Kir5.0(ウナギ *Anguilla japonica* でのみ報告がある)を調べた。種特異的 Kir4.2 抗体による免疫組織染色の結果は、メダカが海水に馴化するに従い小腸上皮で Kir4.2 が増加することを示した。本研究により、メダカが海水で生存するために、Kir4.2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A direct measurement of water movement across epithelia using CARS microscopy

Ying-Chun Yu, Yoshiro Sohma, Shinichi

Takimoto, Atsushi Miyawaki, Masato Yasui (Department of Pharmacology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan, Olympus Corporation, Tokyo, Japan, Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan)

Water transport is a major factor in epithelial transport comparable to ion transport. Actually water transport and ion transport are two sides of the same coin and impossible to be separated. However, compared with ion transport, the research for water transport has been behind by lack of a direct measuring method of water movement. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) laser-scanning microscopy being developed gives us an image of signals originated from vibration energy of inter-atomic bonds in molecules. By adjusting the wave length of multi-photon lasers best for exciting the O-H stretch vibration, we could obtain H₂O images from cells and tissues whereas no signal was released from D₂O under the same condition. With a rapid switching of the perfusion solution from H₂O-based one to D₂O-based one vice versa, we could directly observe the water movement across epithelia without any staining. We applied this technique to cysts formed by MDCK cells and succeeded to make a direct observation of H₂O/D₂O exchange process across the MDCK epithelium forming cysts. We analyzed the time-lapse image data with a computer simulation model and succeeded in determining the diffusional water permeability of luminal, basal and paracellular pathways. We will report our recent progress in development of the novel technique for the direct measurement of the water movement and its application for epithelial transport physiology.

体内環境センサー研究の新展開 (S29)

シンポジウムの目的は以下の通りであった。

呼吸・循環を調節する出力機構の神経メカニズムに比べ入力メカニズムの解明は遅れている。ひとつの理由は、呼吸・循環に影響を与える体内環境には様々な種類があり、更に個々のセンサー分子の動作原理が大きく異なる事であろう。このような研究分野を発展させていくには、技術的課題の克服と大局的研究指針、さらには地道な努力が必要になる。このシンポジウムでは、比較的最近見つかった分子が古くからの課題の解明に結びつき、また新たな研究分野の開拓に貢献した(するだろう)例をお話し頂く。技術的課題の克服にまつわる苦労話やユニークな発想の源泉

に触れ、この領域並びに関連領域の更なる発展に貢献することがシンポジウムの目的である。

シンポジストとして、高橋英嗣(佐賀大学)、高橋重成(京都大学)、高橋賢(岡山大)、大淵豊明(産業医大)を迎え(敬称略、発表順)、桑木を加えて5人が発表を行った。詳細は各演者の原稿に譲るが、酸素・メカニカルストレス(伸展度)・体液量・カルシウム濃度という多彩な内部環境に対するセンサーが呼吸・循環に影響を与える分子メカニズムを概観することが出来た。また技術的問題点や研究の進め方に関する独自の発想等に触れることも出来、専門外の聴衆にも触発的な目的どおりのシンポジウムになった。

オーガナイザー：桑木 共之(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学)

共同オーガナイザー：森 泰生(京都大学大学院工学研究科分子生物化学分野)

Some technical issues in cellular oxygen sensing studies

Eiji Takahashi (Advanced Technology Fusion, Graduate School of Science and Engineering, Saga University)

In this presentation, some technical issues that researchers might encounter were discussed with special interest in oxygen sensing in cells. We usually conduct experimentations on cellular oxygen sensing with an assumption that the input in the sensing system can be manipulated and thus under the control of researchers. Unfortunately, this is just a belief, which will not be rigorously tested in each individual experimentation. Because oxygen measurement in individual cells in vivo is in general technically difficult, "accurately controlling oxygen in cells" is now an important challenge. In this presentation, I discussed the effect of extracellular oxygen gradients and intracellular oxygen gradients in interpreting experimental results.

In standard cell culture systems, a number of reports has demonstrated that surprisingly large oxygen gradients may be established in the culture medium. Extracellular oxygen gradients have been demonstrated to vary depending upon various factors, including cell lines, cell density in culture dish, metabolic state of individual cells, and so on. As a result, oxygen concentration at the cell surface is usually difficult to predict, while it sometimes drops to zero even in the normal culture condition, 5% CO₂ in air. Therefore, accurate oxygen microenvironment in cultured cells may not be defined without actual measurements. In this case, oxygen microenvironment in cultured cells may become beyond our control.

HIF-1 α plays a pivotal role in sensing and adaptation to hypoxia in various cells. HIF-1 α significantly suppresses mitochondrial respiration by inducing PDK1 and BNIP3/BNIP3L. In relatively

large cells (i.e., cardiac myocyte) with elevated mitochondrial respiration, significant gradients of oxygen may be produced within a cell (intracellular gradients). Because the magnitude of oxygen gradients is proportional to the oxygen flux, HIF-1 α inductions are predicted to reduce intracellular oxygen gradients and thus relatively elevate oxygen concentration in the vicinity of cellular oxygen sensor molecule PHD2. Finally, HIF-1 α levels may be further modulated by these changes in oxygen microenvironment in the cell. Consequently, intracellular heterogeneities in oxygen concentration have to be carefully examined in hypoxia sensing studies.

TRPA1は体内への酸素供給を制御する酸素センサーである

高橋重成¹, 桑木共之², 清中茂樹³, 沼田朋大³, 森 泰生³ (京大院先端医工,² 鹿大院医歯,³ 京大院地球環境学堂)

私たちヒトを含める好気性生物の生存において、「酸素 (O₂: 分子状酸素)」は必要不可欠な物質である。しかし、体内に取り込まれたO₂は一部が過酸化水素や超酸化物イオンなどの活性酸素種に変化し、時として生物に対し「酸素毒性」を示す。高濃度のO₂の吸引はヒトを呼吸器疾患、未熟児網膜症など、最悪の場合には死に至らしめる。このようなO₂が示す両義性に対応するために好気性生物は、体内に取り入れ可能なO₂の分圧を感知し、組織へのO₂供給を厳密に制御する仕組みを備えている。今回私たちは、イオンチャネルタンパク質TRPA1が「O₂センサー」としてこの両義性に対応するために機能することを突き止めた。

TRPA1内のシステイン残基が酸化物に対して極めて高い感受性を示し、高濃度O₂溶液中においてTRPA1はO₂による酸化を受けて活性化・開口した。一方、TRPA1は低濃度O₂溶液でも活性化・開口した。ここでは、O₂濃度依存的なプロリン水酸化酵素による阻害から、TRPA1が低O₂濃

度で解放される機構が働いていることを発見したが、これは全く前例のない新しいイオンチャネルの活性化・開口機構を示すものである。活性化・開口した TRPA1 は感覚神経細胞や迷走神経細胞などにイオン電流を生じ神経活動を引き起こした。さらに、TRPA1 遺伝子欠損 (TRPA1 KO) マウスにおいては、高 O₂ 及び低 O₂ ガス吸入に伴う迷走神経の活動と、それに伴う呼吸反射が著しく損なわれていることを確認した。即ち、TRPA1 が生体内の O₂ センサーとして機能し、O₂ の体内供給を厳密に制御することが示された。

今回の研究は生命活動の根幹をなす O₂ に対する新たな生物学的理解を与え、感覚生物学全体に飛躍的な進歩をもたらすと考える。哺乳動物、特にヒトにおける大気中の O₂ の感知に関しては、旧来より化学受容器の中でも頸動脈小体が特に重要であると考えられ、頸動脈小体の glomus 細胞における様々な O₂ センサー機構が乱立して提案されてきた。私たちの研究は、肺や気管に感覚神経や迷走神経などが投射する化学受容器が、TRPA1 を介して生体の O₂ 感知に果たす重要な役割を新たに示したことになる。また今回、低 O₂ 分圧のセンサーに比べると見過ごされてきた、O₂ 毒性を避けるための高 O₂ 分圧のセンサーにも光を当てることになった。即ち、微生物、線虫、昆虫などのいわゆるより原初的な生物では広くみられる応答・行動様式である「酸素忌避」(oxygen avoidance) に準じる機能を哺乳類も備えていることを私たちの研究は示唆し、進化生物学的にも非常に興味深い知見である。

L-type voltage gated calcium channel is involved with the mechanosensitivity of the rat heart

Ken Takahashi¹, Shogo Fujii², Mari Hattori², Marei Omori², Keiji Naruse¹, Masahiro Sokabe³ (¹Grad. Sch. Med. Okayama Univ., Okayama, Japan, ²Sch. Med. Nagoya Univ., Nagoya, Japan, ³Grad. Sch. Med. Nagoya Univ., Nagoya, Japan)

触覚や聴覚などの感覚や、血圧や骨密度の調節、および組織分化や胚形成には、細胞の機械感受性が深く関わっている。心臓の機械感受性は心拍数や心収縮力の調節に大きく関わっているが、そのメカニズムには未だ解明の余地がある。近年、電位依存性チャネルが機械感受性を持つことが示唆されている [1]。本研究は、電位依存性カルシウムチャネル (Ca channel) と心筋の機械感受性との関係を明らかにすることを目的とする。

ラット摘出心のランゲンドルフ標本を作成し、

左心室内の容積を増大させたところ、これに伴って心臓の収縮力の指標である LVDP (left ventricular developed pressure) の増加が見られた。この標本に電位依存性 L 型 Ca channel の阻害薬である nifedipine を投与したところ、LVDP の増加が抑制された。

次に、心筋細胞の機械感受性機構の伝達経路を調べるため、ラット心筋培養細胞株 H9c2 を用いて実験を行った。この細胞は伸展刺激を与えることによって細胞内カルシウム濃度の上昇を示す。この伸展誘発性 Ca 応答は、機械感受性イオンチャネルの阻害剤である Gd³⁺ の投与により抑制された。細胞外液のカルシウムイオン (Ca) 非存在下でこの応答が消失したことから、伸展誘発性 Ca 応答には細胞外からの Ca 流入が必須であると考えられる。またこの応答は 100 μM ryanodine によっても抑制されたことから、ライアノジン受容体を介する細胞内ストアからの Ca 放出も関与するものと考えられる。

心筋細胞の機械感受性に対する L 型 Ca channel の関与を調べるため、H9c2 細胞に L 型 Ca channel の阻害薬 nifedipine, diltiazem および verapamil を投与したところ、それぞれにおいて伸展誘発性 Ca 応答の減弱が認められた。さらに siRNA を用いて L 型 Ca channel の発現を抑制したところ、同様に伸展誘発性 Ca 応答の減弱が認められた。このことから、心筋細胞株 H9c2 の伸展誘発性 Ca 応答には L 型 Ca channel が強く関与していることが示唆された。

H9c2 細胞の機械感受性における他のイオンチャネルの関与を調べるため mRNA の発現量解析を行ったところ、TRPA1, TRPC6, TRPM7, TRPV2 および ASIC3 の有意な発現が認められた。TRPC6 の阻害薬である SKF96365 および 2-APB を投与したところ、伸展誘発性 Ca 応答は抑制された。これらのことから、心筋の機械感受性には L 型 Ca channel が関与していること、およびそれ以外の分子として TRPC6 が関与していることが示唆された。心筋の機械感受性機構が明らかになることにより、心不全や不整脈などの病態が明らかになることが期待される。

1. Morris, CE: Front Physiol 2: 25, 2011

体液調節中枢における酸感受性イオンチャネル

大淵豊明^{1,2}, 佐藤かお理³, 岡田泰伸³, 鈴木秀明², 上田陽一¹ (¹産業医科大学・医・第1生理学, ²産業医科大学・医・耳鼻咽喉科学, ³生理学研究所・機能協同研究部門)

バゾプレッシン (arginine vasopressin :

AVP) は抗利尿ホルモンとも呼ばれ、血漿浸透圧の恒常性を維持するために極めて重要なホルモンである。視床下部視索上核 (supraoptic nucleus : SON) に局在する AVP ニューロンの活動性は多くの神経修飾因子や液性因子によって調節されることが知られているが、このニューロンの酸感受性についての報告はない。

酸感受性イオンチャネル (Acid-sensing ion channels : ASICs) は細胞外 H^+ により活性化される Amiloride 感受性電位非依存性 Na^+ チャネルである。現在までに 7 種のアイソフォーム (ASIC 1a, 1b, 1b2, 2a, 2b, 3, 4) が報告されており、中枢神経系にも発現が認められている。本研究では、AVP ニューロンに ASICs が機能的に発現していることを電気生理学的、免疫組織化学的、および分子生物学的に明らかにすることを目的とした。また、浸透圧負荷により惹起される視床下部の低酸素状態とそれに伴う La^- の産生増加が ASICs の機能を修飾し、AVP ニューロンの興奮性が変化する可能性についても検討した。

実験には、ウイスター系雄性幼若 AVP-eGFP (enhanced green fluorescent protein : eGFP) トランスジェニックラットの SON を含む脳組織を酵素処理後、単離・培養したニューロンを用いた。蛍光顕微鏡下で AVP-eGFP 発現ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法、蛍光免疫組織化学的染色法、および Multi-cell RT-PCR 法により ASICs の発現と機能を調べた。また、SON を含むスライス標本を作成して組織培養を行い、浸透圧や低酸素刺激の有無による La^- の放出量を比較した。さらに、浸透圧負荷を加えたラットから SON を含む脳スライスを作成し、組織内での解糖系を評価した。

ホールセルパッチクランプ法により細胞外の pH を瞬時に変化させた場合、pH 依存性に一過性の内向き Na^+ 電流 (平均減衰時間 : 1.94 ± 0.07 秒、閾値 : $\sim pH 6.8$, pH_{50} : 5.71 ± 0.04) と脱分極、活動電位が観察された。この反応は Amiloride 投与により抑制された。また、ASIC1a 拮抗剤である Psalmotoxin, ASIC3 拮抗剤である Salicylate 投与下で抑制されず、ASIC2a subunit のコアクティブータである Zn^{2+} 投与下で増強された。さらに、Multi-cell RT-PCR 法、免疫組織化学的染色法により、AVP ニューロンに ASIC1a と ASIC2a が発現していることが示唆された。また、酸刺激による電流は細胞外 Ca^{2+} 濃度を低下させることで増強され、 La^- 存在下でこの反応性増加が再現された。さらに、*in vivo* において浸透圧負荷を加えたラットの SON 組織中の La^- が増加し、*in vitro* におい

て SON を含むスライス組織を低酸素状態に暴露することで La^- 放出増加反応が再現された。

本研究は、ラット SON の AVP ニューロンにおける ASIC1a+ASIC2a heteromer の発現を見出した。浸透圧負荷により惹起される視床下部の局所的な低酸素状態が La^- の産生/放出の増加に関与し、増加した La^- が内因性 Ca^{2+} キレーターとして作用することで、ASICs を介した AVP ニューロンの興奮性を調節している可能性を示した。

1. Ohbuchi T, et al: J Physiol **588**: 2147-62, 2010

細胞外カルシウムセンサーによる髄液カルシウム濃度の検出

桑木共之¹, 小林-鳥居美佳子^{2,3}, 藤田 恵⁴, 市丸雄平³, 藤田敏郎⁴ (¹鹿児島大院医歯学統合分子生理, ²山梨県立大人間福祉, ³東京家政大臨床栄養, ⁴東京大腎臓内分泌内科)

脳脊髄液中のカルシウムイオン濃度は全身血圧に影響を与える。カルシウムの増加は血圧を減少させ、カルシウムの減少は血圧を増加させるのである。この現象は 50 年以上前から知られていたが、そのメカニズムは不明であった。

細胞外カルシウム受容体 (Calcium Sensing Receptor ; CaSR) は血液中のカルシウム濃度を検出し、副甲状腺ホルモンの分泌を調節するタンパク質として最初に副甲状腺細胞で発見された 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体であるが、後に脳にも分布していることが明らかになっている。この CaSR が髄液カルシウム濃度のセンサーとして血圧調節に関与しているのではないかと仮説を立て、これを検証した。

ウレタンで麻酔し人工呼吸下のラット大槽内に CaSR のアロステリック活性化剤である NPS R 467 を投与したところ、交感神経活動の抑制と心拍数の低下を伴う降圧が用量依存的に観察された。不活性化剤である NPS 2143 の投与では逆に交感神経活動の亢進、頻脈と昇圧が観察された。無麻酔無拘束のラットでも同様の結果が再現された。側脳室内投与ではこれらの効果はわずかであった。下部脳幹における CaSR の分布を免疫組織化学的に検索したところ、尾側延髄腹外側部の降圧中枢ニューロンに多く発現していた。

これらの結果から、下部脳幹、特に尾側延髄腹外側部の降圧中枢ニューロンに存在する CaSR は髄液中のカルシウム濃度を常時モニターし、血圧調節に関与していると結論された。食事に含まれるナトリウムやカルシウムの多寡は血圧に影響を与える事が疫学調査や動物実験から明らかになっている。また、食事に含まれるナトリウムやカル

シウムの多寡はそれらのイオンの血中濃度に影響を与え、ひいては脳脊髄液中濃度を僅かではあるが有意に変化させる。これらの知見を総合すると、高カルシウム食の抗高血圧効果の少なくとも一部

には脳内 CaSR が関与しているものと推測される。

1. Kobayashi-Torii M, et al: Brain Res **1367**: 181-187, 2011

基盤病態としてのアルブミン酸化還元比異常 (S43)

アルブミンは血清中で最も豊富な蛋白質であり、また最も原始的な脊椎動物である無顎類のメクラウナギから哺乳類のヒトまで、下等から高等に至る全ての脊椎動物に存在している [1]。すなわち血清におけるアルブミンの存在は、脊柱の存在や免疫グロブリンの存在などと並ぶ、脊椎動物の最も本質的な特徴の一つと考えられる。脊柱および免疫グロブリンの存在が脊椎動物の隆盛において極めて重要な役割を果たしていることを勘案すると、おそらくアルブミン合成能の獲得も生存競争を勝ち抜く上で有用な現象であったと推察される。

アルブミンを合成するためには、合成細胞において多くの合成過程を有し、エネルギーやアミノ酸の潤沢な供給が必要である。具体的には、アルブミンは肝実質細胞においてのみ合成され、核膜孔、細胞質を経て粗面小胞体のリボゾーム上で蛋白質に翻訳され、小胞体内腔でのシグナルペプチド切断および S-S 結合の形成による高次構造の形成の後、ゴルジ体に運ばれ、プロペプチドの切断を経て分泌小胞に移行し、ディッセ腔を通過して血中に分泌される。このことからアルブミンは“luxury protein (贅沢な蛋白質)”とも呼ばれている [2]。またこのことは、そうまでしてでもアルブミンを合成することの有用性、すなわちアルブミンの血清蛋白質としての重要性を示唆している。

アルブミンが営む機能は、物質の結合と運搬、浸透圧の維持、各組織へのアミノ酸供給、pH 緩衝作用、エステラーゼ様酵素活性など多種多様である。アルブミンはこれらの機能を、他の機能性蛋白質の「脇役」として営むのではなく、物質の結合と運搬、浸透圧の維持、各組織へのアミノ酸供給などを「主役」として営む。このように、「マルチ機能蛋白質」として多種の機能を営む蛋白質を合成しうる生物が、生存競争の観点より有利であることは想像に難くない。

さて、アルブミンの有する多彩な機能の一つに「酸化還元緩衝作用」がある。詳細は後述の「3S43E-1」にゆずるが、アルブミンは遊離の SH 基 (チオール基) を有しており (ヒトでは N 末端から 34 番目のシステイン残基: Cys-34)、この遊離チオール基が可逆的ないし不可逆的に酸化されることにより、細胞外における酸化還元状態を緩衝する。ちなみにヒトにおいては、Cys-34 のチオール基は細胞外における遊離チオール基の約 8 割を占める: Cys-34 (約 600 μ M) は血中のシスチン (約 40 μ M) とのチオール交換反応を介して遊離システイン (約 8~10 μ M) を供給し、血中の酸化還元緩衝に重要な役割を演じているのである [3]。もしもアルブミンの酸化還元状態が破綻した場合、それがいかなる原因によって起こったかに関わらず、ヒドロキシラジカル消去能に代表される抗酸化活性の低下 [3] を介して生体に重要な影響を及ぼすことが予想される。すなわち、アルブミンの酸化還元比異常は、種々の原疾患に伴う臓器障害・予後不良の基盤病態となっている可能性がある。

ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) における酸化還元比 (HSA-redox) の HPLC による分析法は、1980 年代の前半に、わが国の岐阜大学医学部第 2 生理学教室 (現: 分子生理学分野) のグループにより開発された。爾来約 30 年、分子構造の解析、各種病態との関連の検討など、HSA-redox に関する知見は徐々にしかし確実に集積している。そこで、現時点における HSA-redox に関する知見をまとめ、さらなる展開に資することを目的に、今回のシンポジウム「基盤病態としてのアルブミン酸化還元比異常」が立案された。

本シンポジウムでは、まず最初に、HSA-redox の HPLC を用いた分析法の開発グループの一人である恵良が HSA-redox 全般に関して概説した。第 2 演者の山田尚之先生には、肝硬変における

アルブミン酸化亢進, 特にHNA-1構造の詳細と, 分枝鎖アミノ酸製剤の投与が及ぼす影響についてお話しいただいた。第3演者の寺田知新先生には, 白血球系細胞が有するHSA還元能に関する検討結果を, 続く第4演者の林 知也先生には, HSA-redoxの性差につき, 運動負荷時の挙動を中心にお話しいただいた。最後に第5演者として寺脇が, 腎疾患, とくに慢性腎臓病の病態とHSA-redoxとの関連に関するこれまでの検討の結果についてお話しした。

本稿では, それぞれ5名の先生方によるシンポジウムでの発表のエッセンスをできるだけ分かり易くまとめていただいた。読者諸賢にいくばくかでも益するところがあれば, 本シンポジウムのオーガナイザーとしては望外の喜びである。

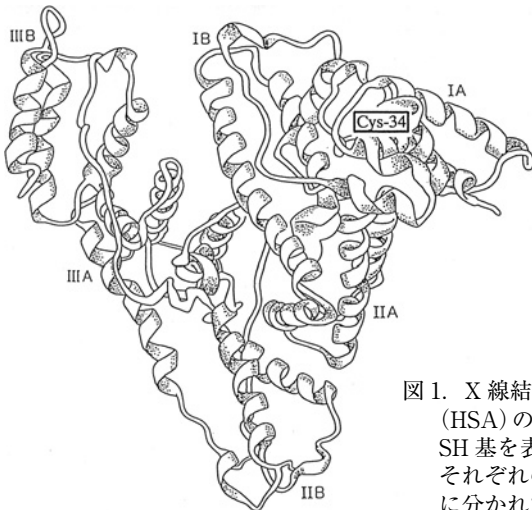


図1. X線結晶構造解析法によるヒト血清アルブミン(HSA)のリボンモデル(図中のCys-34はフリーのSH基を表す。番号I, II, IIIはドメインを, またそれぞれのドメインは2つのサブドメイン(A, B)に分かれている)。

1. Carter DC and Ho JX: Adv Protein Chem **45**: 153-203, 1994
2. 奥野正隆, 他: 栄養—治療と評価 **24**: 123-6, 2007
3. Kawakami A, et al: FEBS J **273**: 3346-57, 2006
4. Sogami M, et al: Int J Pept Protein Res **24**: 96-103, 1984

オーガナイザー:

寺脇 博之 (福島県立医科大学人工透析センター)

恵良 聖一 (岐阜大学大学院医学系研究科分子生理学分野)

血清アルブミンの構造・機能および酸化還元の状態生理

恵良聖一 (岐阜大学大学院医学系研究科分子生理学分野)

アルブミンは血清蛋白質の約60%をしめ, 比較的大量に単離できるので, 古くからよく研究されている蛋白質のひとつである。分子量が66kDaと, ネフロン糸球体膜で辛うじてろ過されない程度の比較的小さな分子であるが, 体内の種々のバリアーは多少なりとも透過可能なので, 血管内外のほぼ全身組織に分布している。したがって, 血管内プールに存在しているのは体内総量の約40%で, 残りの約60%は組織や皮膚などの血管外プールにあり, 両者間で動的平衡状態にある。アルブミンの分子構造上の特徴は, 図1に示すように, 相同性の高い3つのドメイン構造(ドメインI, II, III; それぞれのドメインはサブドメインA, Bに分かれる)をとる。分子内にはS-S結合が17個と非常に多く, さらに反応性の高いSH基(チオール基, Cys-34)が1個存在し, 二次構造では, 非常に α -ヘリックスが多い。そのような分子

構造をしたアルブミンは, ①血漿膠質浸透圧の維持機能, ②多数のリガンドに対する結合能, ③チオール(SH)酸化還元緩衝機能など, マルチな機能を営んでいる蛋白質である。

Cys-34(SH基)がフリーの状態のアルブミンを還元型アルブミン(HMA), 体液中のシスチンなどと可逆的にS-S結合を形成したものを酸化型アルブミン(HNA)とよぶ。このSH基が組織中のあらゆるフリーラジカルと不可逆的な反応をすると, よりさらに酸化された状態, すなわちスルフェン酸(-SOH), スルフィン酸(-SO₂H), スルホン酸(-SO₃H)など, 超酸化型アルブミンとなる。したがって, 酸化型アルブミン(HNA)は'可逆的な'酸化型アルブミン(HNA-1)と'不可逆的な'超酸化型アルブミン(HNA-2)の2種類よりなる。一般に, 健常者(成人男子)の場合, 還元型アルブミンが約75%, 酸化型アルブミンが約25%の割合で混在している。そのようなアルブミンの酸化還元比率の経時的な計測は, 体内の酸化還元緩衝機能の質的評価指標となり得る。病的な状態, 例えば肝疾患, とくに肝硬変症では病態が悪化する

るにしたがって血清アルブミン値は低下し、かつ酸化型アルブミンの比率が増加する。また、腎疾患、とくに人工透析を要する慢性腎不全患者になると、患者体内のチオール酸化還元は非常に酸化傾向にシフトする。透析前には酸化的状態であったものが、血液透析によってかなり改善される。しかし次回の透析までには、また元の状態へと戻る。

このような肝・腎疾患に限らず、蛋白質の翻訳後修飾と種々の疾患とのかかわり、各種ストレス（酸化ストレス、ニトロ化ストレス、カルボニルストレス）と老化・疾患とのかかわりを考えるなかで、アルブミンのSH基の酸化還元状態の動的变化（レドックス動態）の知見は、疾患の病態生理をより適確に把握するうえでの重要なポイントのひとつであると考えられる。

肝硬変患者におけるアルブミン酸化還元比の変動と分岐鎖アミノ酸製剤リーバクト[®]顆粒の効果について

山田尚之（味の素株式会社イノベーション研究所）

生体内のヒト血清アルブミン (human serum albumin : HSA) は、還元型アルブミン (HMA ; human mercaptoalbumin) 及び酸化型アルブミン (HNA ; human non-mercaptoalbumin), 糖化アルブミンなどの翻訳後修飾による不均一性が存在することが知られている [1]。特に、N末端から34番目のシステイン残基のチオール基が遊離であるHMAに対し、生体内の含硫生体内化合物がジスルフィド結合で付加した可逆的な酸化型アルブミン (HNA-1) の割合 ($f(\text{HNA-1})$) が、種々の疾患において増加することが報告されている。ジスルフィド結合は、短時間で可逆的に結合・解離することができるため、 $f(\text{HNA-1})$ は血中の酸化還元状態を鋭敏に反映していると考えられ、健常人の $f(\text{HNA-1})$ が約25%であるのに対して、肝硬変患者では約50%近くまで上昇している (図2) [2]。非代償性肝硬変患者に対する分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 製剤リーバクト[®]顆粒の投与はHSA濃度の回復に伴い易疲労感、倦怠感などの自覚症状や予後が改善されることが明らかとなっている。近年、肝硬変患者において、高い $f(\text{HNA-1})$ がBCAA製剤投与により、有意に低下することが示され、肝硬変治療マーカーとしての可能性が期待された [3]。しかし、HMAは採血後に室温で容易に酸化され、HNA-1となるため、病院等の医療機関での採血と血液保存の状況を考えると、正確な分析値を得る上で大きな課題であった。そこで

我々は、安定化法を種々検討した結果、採血後直ちにクエン酸緩衝液で希釈することにより、HMAのHNA-1への酸化を著しく抑制することに成功した [4]。これにより、多施設での臨床検体の採取と測定を容易に行うことができるようになった。

この方法をもちいて、300名以上の肝疾患患者の血漿サンプルを採取し、エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計 (ESI-TOFMS) でアルブミンの測定を行った。その結果、肝疾患患者のHNA-1の主成分は、健常人と同じく [5]、システイン付加型HNA-1であることを明らかにした。また、 $f(\text{HNA-1})$ は肝疾患の病態進行により上昇するが、リーバクト[®]顆粒の投与により改善することを確認することができた。これらの結果から、アルブミン酸化還元比は、肝疾患患者の病態マーカーとして、BCAA製剤投与効果のマーカーとしての有用性を示すことができた。

1. Sogami M, et al: Int. J. Peptide Protein Res **24**: 96-103, 1984
2. Sogami M, et al: J. Chromatogr **332**: 19-27, 1985
3. Fukushima H, et al: Hepatol Res **37**: 765-70, 2007
4. Kubota K, et al: Int. J. Biomed Sci. **5**: 293-301, 2009
5. Kawakami A, et al: FEBS J **273**: 3346-57, 2006

ヒト白血球系株化細胞は酸化型アルブミンを還元型アルブミンに変換する：アルブミンの酸化還元状態への影響と生理学的重要性

寺田知新（岐阜大学大学院医学系研究科分子生化学分野）

アルブミンに占めるHMAの比率 ($f(\text{HMA})$) は糖尿病、腎疾患、肝疾患といった種々の疾患や年齢によって減少することが知られている。一方、我々はこれまでにヒトアストロサイトや血管内皮細胞など一部の細胞には酸化型アルブミンを還元型に変換するはたらきがあることを明らかにしている [1]。血管内皮細胞と血液細胞はどちらも血球血管芽細胞 (hemangioblast) から分化するが、今回は白血球系細胞に着目し、ヒト白血球株化細胞 (HL60, Jurkat, KU812, Ramos, RPMI8226, RPMI8866, THP-1, U937) およびヒト単核球 (単球およびリンパ球)、好中球がアルブミンの酸化還元状態の動的变化 (レドックス動態) に与える影響を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討した。

コントロール群では自己酸化により経時的に f

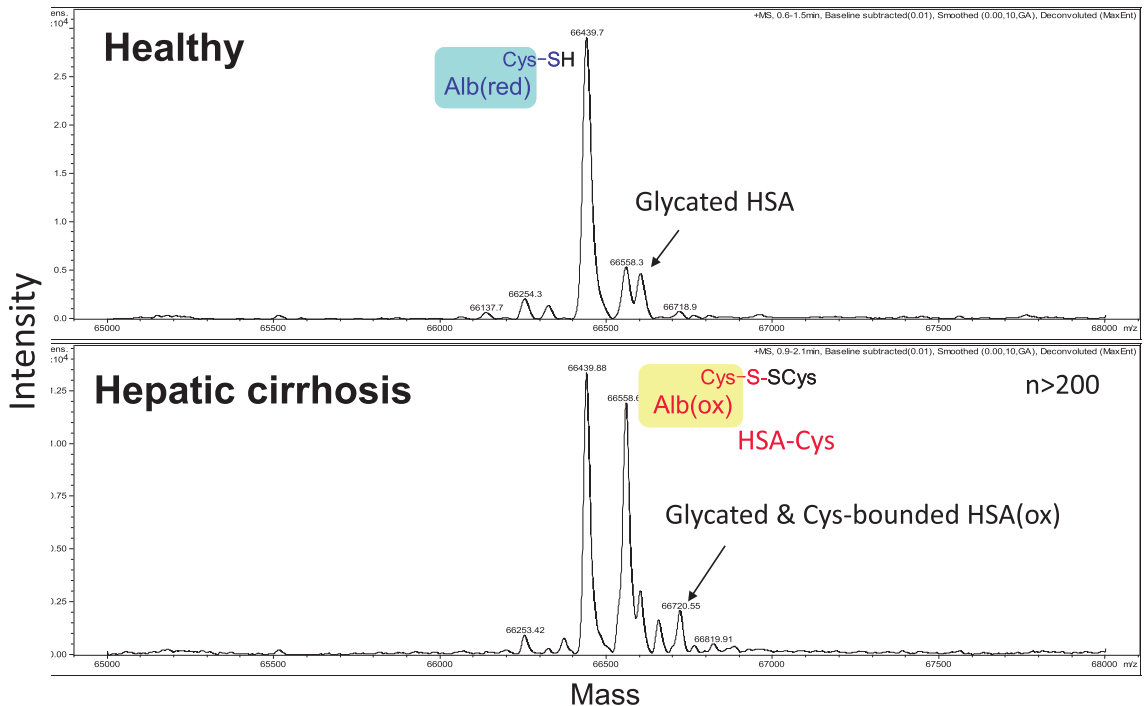


図2. 健常人および肝疾患患者のヒト血清アルブミン (HSA) のESI-TOFMS スペクトル
上：健常人, 下：肝疾患患者

(HMA) の減少が進む一方, すべてのヒト白血球株化細胞および単核球, 好中球ではHNAをHMAに変換することが示された. また, Jurkat や Ramos の還元能は弱かったが, THP-1 は非常に強い還元能を有していた.

以上の結果より, 白血球系細胞が, その分化段階や最終的にどの細胞に分化するかによって強弱はあるものの, その共通の性質として還元能を有する可能性が示唆された. また, 白血球系細胞が血管内皮細胞とともに血中でのアルブミンの酸化還元状態の動的変化 (レドックス動態) に影響を与える可能性が示唆された. さらに, 白血球系前駆細胞が骨髄での酸化還元緩衝機能に関与している可能性も示唆された.

1. Matsuyama Y, et al: J Physiol Sci **59**: 207-15, 2009

持久性運動トレーニング後の運動誘発性酸化ストレスと好気性エネルギー代謝状態における男女差
林 知也¹, 煙山奨也², 中山登稔¹ (1 明治国際医療大学生理学, ² 同 応用柔道整復学 II)

これまでにアルブミンの酸化・還元状態の運動による変化が, ラットの疲労困憊運動 [1] や, ヒ

トの高強度運動 [2] において報告され, アルブミンの酸化・還元状態は運動誘発性酸化ストレスの有用なマーカーになることが示されてきている.

このアルブミンの酸化・還元状態をマーカーとして, 我々は運動誘発性酸化ストレスの性差に関して研究を行ってきた. この性差に関して, 女性では男性に比し抗酸化能が高いゆえ酸化ストレスが低く, その要因として17β-エストラジオール (E₂) が抗酸化特性を持っていることが示唆されている [3]. その一方でE₂が性周期中に最も低値を示す卵胞前期において, 酸化ストレス状態の性差に関する報告はほとんどない. そこで, 卵胞前期の健康成人女性と健康成人男性の安静時代謝量 (REE) と '可逆的な' 酸化型アルブミン (HNA-1) 濃度の相関を見ると, 相関係数が $r=0.79$ ($p<0.01$) と有意に比較的高い正の相関を示し, REEが高いと, HNA-1濃度が高くなる関係が見られた. これらの結果と, 一般的に女性の基礎代謝量が男性に比し低いことから, 女性の低い酸化ストレス状態には, E₂以外に, 基礎代謝量が反映していることが示唆された.

これらの結果を踏まえて, 持久性運動トレーニングによる酸化ストレス軽減の性差に関して, 研

究を行った。週1回程度運動を行っている健康成人男女各々に4週間の比較的短期の持久性運動トレーニングを行わせ、その前後に高強度の定常運動にて、酸化ストレス状態を測定した。女性のトレーニング期間は、卵胞前期から次の卵胞前期までとした。結果として、トレーニング前後の最大酸素摂取量/除脂肪量は、男性ではトレーニング後に有意に増加した ($p < 0.05$) が、女性ではほぼ同じ値であり有意差が認められなかった。HNA-1濃度は、男性ではトレーニング前後ともに、安静時の値に比し、定常運動直後の値が有意に増加した ($p < 0.05$)。またこの値は、トレーニング前に比し、トレーニング後に有意に低下した ($p < 0.05$)。女性ではトレーニング前後ともに、安静時の値に比し、定常運動直後にやや増加する傾向であったが有意差はなく、トレーニングによる有意な変動も認められなかった。これらの結果から、女性では、比較的短期の持久性運動トレーニングによる抗酸化能の変動が生じにくいことが示唆された。

1. Hayashi T, et al.: J Chromatogr B **772**: 139-46, 2002
2. Imai H, et al.: Jpn J Physiol **52**: 135-40, 2002
3. Kerksick C, et al.: Med Sci Sports Exerc **40**: 1772-80, 2008

慢性腎臓病患者におけるアルブミン酸化還元比と心血管系疾患との関連

寺脇博之 (福島県立医科大学人工透析センター)

慢性腎臓病患者の死因として最も頻度が高いのは、虚血性心疾患、脳卒中、うっ血性心不全などの心血管系疾患 (CVD) であり、特に維持透析療法を施行されている末期腎不全患者では死因の4割以上がCVDである。このように慢性腎臓病においてCVDが多い背景として、近年、酸化ストレスの関与が推察されている。我々は実際に、腎機能の低下や尿毒物質の蓄積と相関する形で酸化ス

トレスが充進する状況を確認している [1,2]。

そこで我々は、酸化ストレスの指標としてHSA-redoxを用い、維持透析療法を施行されている慢性腎臓病患者におけるCVDとの関連について検討した。対象は血液透析患者86名・腹膜透析患者28名。研究に同意が得られた患者の血液を採取し (血液透析患者では透析操作の前後、腹膜透析患者では外来時)、還元型アルブミン比率 (f (HMA)) とその後2年間におけるCVD発症との関連を検討した。なおHSA-redoxはHPLCを用いて求めた。

血液透析患者における検討では、2年間に20名がCVDを発症。CVD発症者では透析前・透析後のいずれにおいても f (HMA) が有意に低値であった。透析後の f (HMA) が60%未満の場合、CVD関連死亡に関する危険率 (オッズ比) は、60%以上の場合の25.6倍であった [3]。腹膜透析患者における検討では、5年間に8名がCVDを発症。血液透析患者の場合と同様に、CVD発症者における f (HMA) は有意に低値であった。また f (HMA) が55%以上であった患者のCVD発症率が7.7%であったのに対し、55%未満であった患者の発症率は41.1%と有意に高値であった [4]。

このように、慢性腎臓病患者において、HSA-redoxの異常-特に還元型アルブミン比率の低下はCVD発症に関する極めて強い寄与因子である状況が確認され、将来的な治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

1. Terawaki H, et al.: Kidney Int **66**: 1988-93, 2004
2. Terawaki H, et al.: Nephrol Dial Transplant **22**: 968, 2007
3. Terawaki H, et al.: Ther Apher Dial **14**: 765-71, 2010
4. Terawaki H, et al.: Clin Exp Nephrol 2012 (in press)

新たな技術で探る血管構築から機能獲得へのメカニズム (S44)

血管は栄養と酸素を組織に送り、不要物を組織から取り除くための生命維持輸送路である。心臓から送り出される血液の通路は最初の太い弾性動脈から組織に分配される毛細血管まで、部位に応じて構造と機能が異なる。さらに血管は単なる管ではなく、例えば血管の最も内腔に位置する内皮細胞は、血流の変化を感知して自ら反応物質を産生し得る機能的臓器と考えられる。本シンポジウムでは、異なる分野の研究者との連携から生まれる新たな技術・方法を駆使し、これま

でに気付かれていなかった視点から観察することによって、血管が構築され、脈管としての機能を獲得する機構についての理解を深めることを企画した。

大阪大学・松崎典弥先生は、新たに開発した「細胞積層法」や「細胞集積法」によって、血管の三次元組織モデルを再構築することが可能となり、血管構造形成の分子機序を構成学的に解明する研究へと発展させてゆくことを示された。日本女子大学・佐藤香枝先生は、工学的手法によりマイクロ流体デバイスを開発され、生体血流を模した条件を培養細胞に与えた状態で、微小循環系の機能をより生体に近い環境で評価できることを示された。東京大学・狩野光伸先生はナノ粒子という新規研究素材を利用することによってはじめて、血管外への物質透過機序に血管壁細胞の存在が関わり、それが疾患の治療に密接に関与することを発見されたことを示された。横浜市立大学・横山詩子先生は分子生物学的手法を用いて、プロスタグランジンE刺激が血管弾性線維の形成・維持を抑制することを示された。浜松医科大学・浦野哲盟先生は融合緑色蛍光タンパクを全反射蛍光顕微鏡で動的に可視化し、血管内皮細胞で線溶系が持続的に活性化している機序を示された。放射線医学総合研究所・青木伊知男先生はMRIの高感度化や高分子ナノ粒子キャリアを利用することによって、これまでになく精緻な生体内での血管構築や組織微細構造を解析でき、機能評価も可能となり、血管研究の発展に大きく寄与することを示された。

今回のシンポジウムでは生理学会員以外に4名の異なる背景と研究手法を有する若手研究者が最新の研究成果を示していただいたことによって、従来の血管研究からは気付くことができなかった血管の姿を垣間見ることが出来、オーガナイザーとして当初に企画した以上に実り豊かなシンポジウムになった。

オーガナイザー：南沢 享（早稲田大学先進理工学部・生命医科学科）

横山 詩子（横浜市立大学大学院医学研究科・循環制御医学）

細胞積層技術による生体外での血管モデルの構築と血管機能評価への応用

松崎典弥，門脇功治，西口昭広，明石 満（大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻）

1. 緒言

人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた様々なヒト細胞の安定かつ大量な供給法が盛んに研究されており、医薬品の毒性および薬効評価試験への応用が期待されている。動物とヒトでは薬物代謝経路に差異があるため、実験動物をできるだけ使用せず、正常および疾患のヒト細胞を用いて薬剤の毒性や効果を評価する方針となりつつある。しかし、生体組織は複数種類の細胞が相互作用することで薬剤の代謝から効果発現への多段階プロセスを行っているため、細胞単体の薬剤応答だけで生体組織の薬剤応答を評価（予測）することは困難である。そのため、ヒト組織と同等の薬剤応答を評価できるヒト組織モデルの構築が求められている。

生体組織は、複数種類の細胞と細胞周辺に存在する細胞外マトリックス（ECM）が精密に配置制御された三次元構造である。従って、細胞やECMの種類を制御して組織化（三次元化）する新規技術の開発が重要となる。我々は、細胞外マトリックス（ECM）成分であるフィブロネクチンとゼラチンのナノ薄膜（FN-G薄膜）を細胞表面へ形成することで、細胞の種類や配置を制御して積層化す

る「細胞積層法」を考案した[1]。さらに、最近、本手法を改良し、短期間での厚い組織構造の形成を可能とした「細胞集積法」を確立した[2]。これらの手法を用い、特に血管壁構造の形成や毛細血管網を有する三次元組織モデルの構築と応用について研究を展開している（図1）[3-5]。

2. 細胞積層法

細胞は、外部との情報交換や機能発現を細胞膜界面で制御している。生体内で細胞の界面構造と機能の制御に重要な役割を果たしているのが、細胞周辺に存在するECMである。このECMの働きに着目し、ECMのように細胞の界面構造を制御できれば細胞の三次元組織化を操作できると考えた。ECM成分であるフィブロネクチン（FN）とゼラチン（G）の分子間相互作用を巧みに利用することでナノ薄膜を細胞表面に形成し、次の細胞が接着するための足場を提供することで、望みの細胞を一層ずつ積層することに初めて成功した（図1a）。また、わずか6nmの薄膜が細胞積層の足場として機能するメカニズムを明らかとした。

本手法を用い、ヒト臍帯動脈血管平滑筋細胞（UASMC）の積層構造の上にヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）層を形成した血管壁モデルの構築が可能であった[5]。さらに、本血管モデルを応用することで、ブラジキニンに応答した血管内皮細胞からの一酸化窒素（NO）の産出と平滑筋層への拡散の生体外での定量的な検出に成功した

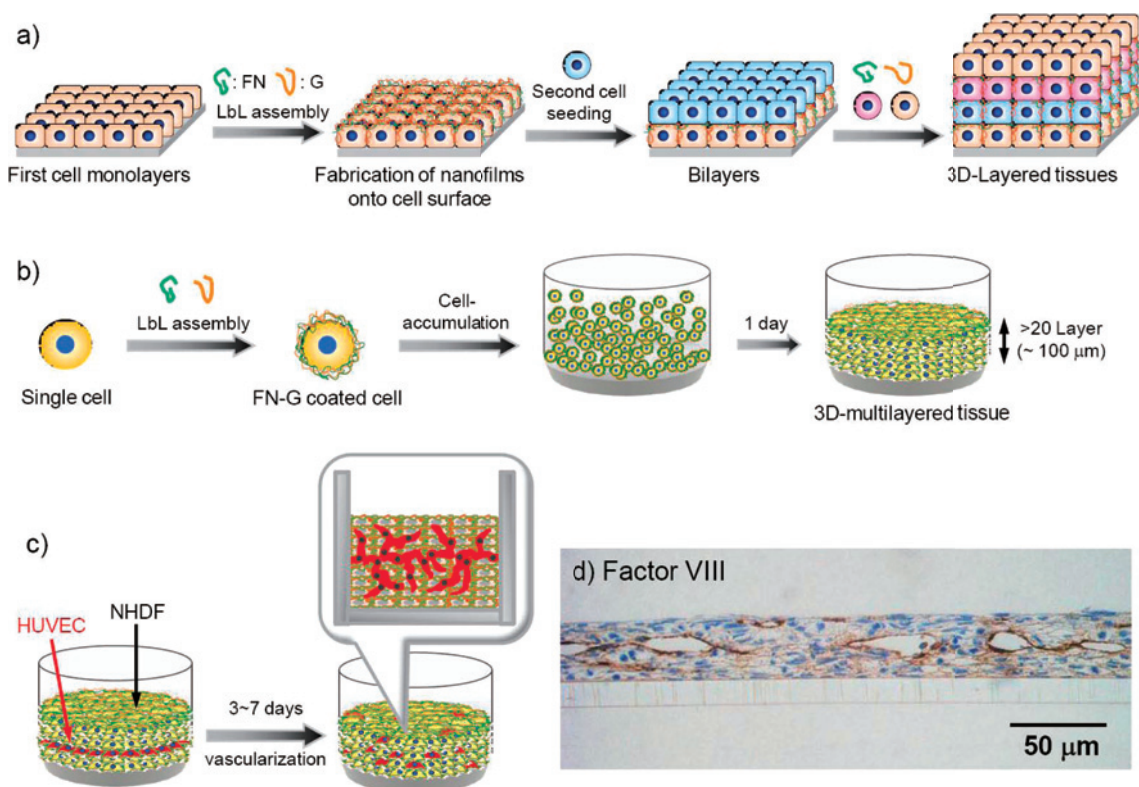


図1. 細胞積層 (a) と細胞集積層 (b) のイメージ図. 細胞集積層を用いたHUVECのサンドイッチ培養 (c) および構築した毛細血管網構造を含むヒト皮膚由来線維芽細胞組織の Factor VIII 染色組織像 (d).

[3]. 本手法で作製した血管壁モデルが、ヒト血管モデルとして薬剤応答評価に有用であることを明らかにした.

3. 細胞集積法

以上のように、細胞積層法は望みの細胞種を望みの場所に一層ずつ積層することができる簡便かつ画期的な手法であるが、各層の細胞が安定に接着するまで待つ必要があり、一日2層の作製が限度であった。そこで、単一細胞表面へのFN-Gナノ薄膜形成により短期間で積層構造が構築できる「細胞集積法」を考案した(図1b)[2]。各細胞がFN-G薄膜を介して三次元的に相互作用するため、最大23層(105μm)の厚さの積層組織を一日で作製することに成功した[4]。さらに、4層のヒト皮膚由来線維芽細胞(NHDF)層で1層のHUVECをサンドイッチ培養することで、毛細血管網に類似のHUVECのチューブネットワークが全体かつ均一に形成することを見出した(図1c, d)[2]。ネットワークが占める面積はおよそ63%であり、チューブ間距離は50~150μmであった。

4. まとめ

望みの細胞を望みの場所に一層ずつ積層した組織体を可能とする「細胞積層法」、10~20層の毛細血管網を有した三次元組織モデルを短期間で構築できる「細胞集積法」を考案した。得られた三次元構造体は、ヒト生体組織モデルとして医薬品の毒性および薬効評価に応用できると期待される。

本研究の一部は、最先端・次世代研究開発支援プログラム(LR026)により実施された。

1. Matsusaki M, et al: *Angew Chem Int Ed* **46**: 4689, 2007
2. Nishiguchi A, et al: *Adv Mater* **23**: 3506, 2011
3. Matsusaki M, et al: *Angew Chem Int Ed* **50**: 7557, 2011
4. Matsusaki M, et al: *Adv Mater* **24**: 454, 2012
5. Matsusaki M, et al: *J Biomater Sci Polymer Edn* **23**: 63, 2012

微小循環マイクロモデルの開発

佐藤香枝 (日本女子大学理学部物質生物科学科)

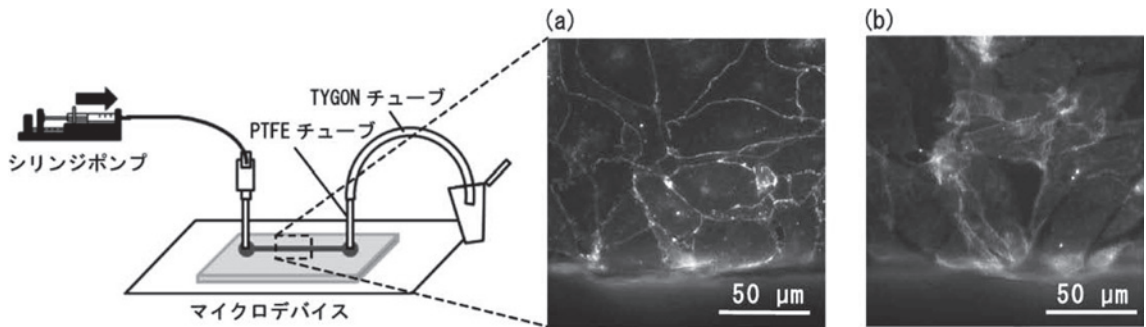


図2. ヒスタミン刺激のためのデバイスの模式図, 流路内のリンパ管内皮細胞の claudin-5 (a) コントロール (0 M ヒスタミン溶液) (b) 10^{-1} M ヒスタミン溶液

准教授)

微小循環は、血管とリンパ管などの微小な脈管とそれを取り巻く細胞および結合組織から構成されており、血管からの透過、リンパ管への吸収からなる血液と臓器組織の間の物質交換の場である。難治疾患に關与する微小循環の機構解明を目指す従来の研究では、実験動物や培養細胞が用いられてきた。本研究では、動物実験と培養細胞の実験の間をつなぐような実験プラットフォームの確立を目指し、マイクロ流体デバイスを用いた実験システムを開発した。ここでは血管およびリンパ管内皮細胞の正常機能発現に必要な流れ負荷を与えた状態で透過性を評価可能な微小循環系を模倣するようなモデル構築を目指している。

本研究で使用するマイクロ流体デバイスは、シリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン PDMS を材料とした。マイクロチャネル (幅 $300\mu\text{m}$, 高さ $67\mu\text{m}$, 長さ 2cm) を有する PDMS 基板の表面とカバーガラス表面を酸素プラズマ処理し、これらを接合させることによって、ヒスタミン刺激実験用デバイスを作製した。一方、透過試験のための膜を挟み込んだデバイスは 2 枚の PDMS 基板 (チャネル幅 $300\mu\text{m}$, 高さ $67\mu\text{m}$, 長さ 1cm) とトランスウェルから切り出した PET 膜 (ポアサイズ $1.0\mu\text{m}$, 厚さ $10\mu\text{m}$) を用いて作製した。

作製したマイクロ流体デバイス内に血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞を灌流培養したところ、コンフルエントに培養が可能であった。このとき、リンパ管内皮細胞の間隙に局在していた claudin-5 および VECD は、30 分間ヒスタミンで刺激したところ、静置培養の場合と同様に、細胞間から消失することが示され、機能を持って培養されていることが示された (図 2)。一方、透過試験デバイスでは、蛍光分子フルオレセインナトリウムおよ

びナノ粒子 PICsome の透過を観察することが可能であった。これらのデバイスは、送液する培地の流量を変化させることで、細胞に与えるシアストレスを制御することも可能である。今後、微小循環での物質透過を模倣する条件下で細胞の動態を観察していく予定である。

難治病巣における血管構築の生理学的意義をナノの視点で明らかにする

狩野光伸 (東京大学医学部 MD 研究者育成プログラム室, 大学院医学系研究科分子病理学)

医学生物学では、観察・解析技術の発達によって新たな局面が開かれてきた。我々は、新規技術を応用し、血管・リンパ管機能の研究にあらたな展開をもたらしたいと考えている。

ナノ物質を用いたヒトへの治療介入が近年盛んに進められるようになって、病気の存在する局所へ、こうしたナノ物質がどうやって届いていくのかという点に、新たな興味の焦点と、今まで光の当たっていなかった分野が広がっていることに気づかされるようになってきた。これまで、「血管内」を循環する物質といえば、サイズがマイクロメートルオーダーの血球、あるいはオンゲストロームオーダーの低分子化合物の二者が主に注目されてきた。しかしそれらに加えて、ナノメートルオーダーの物質が、血管内をどう循環し、末梢「微小循環」でどのように「血管外」へ移行していくのか、という点に、興味を持ちうるようになったということである。赤血球の血管外移行はつまり「出血」で血管の破たんを意味し、あるいは低分子化合物なら通常どこでも拡散可能で、「微小循環」での「血管外移行」はあまり注目されてこなかったことができる。ここにナノ物質の血管外移行という視点が加わって、我々は例えば血管壁細胞存在の難治病態における重要性を示しつつあ

る。

歴史的にも、医生物学は技術の進歩と両輪で進んできた。循環系に関しては、ギリシャ時代からルネサンスまでの1000年以上にわたりその説を維持してきたガレノスと続く人々は、主に動物解剖の結果、現在静脈と呼ばれる構造のみに血液が通り、血液は肝臓で産生され心室中隔を介して全身に供給される、という見解を示し、欧州ではこの見解が3世紀から16世紀まで信じられてきた。血液が心室中隔を介して移動しているのではない、という見方を初めて世に問うたのは、ようやく1500年代になって、人体解剖を行ったベザリウスであった。加えて血液が動脈から末梢に向かい、静脈を経て心臓へ還流するというのを、人体を直接用いて示したのはハーベイで、1600年代であった。1660年頃、動静脈の間に微小循環が存在することを示したのはマルピギーで、1600年代初頭にガリレオが発明した顕微鏡を応用したことが鍵であった。約150年を経て1800年頃以降発展した化学染料合成技術の応用は、微小循環を含めて様々な生体構造は全て細胞が構成しているという知見を1800年代中ごろからもたらした。病態の解析面でも、細胞病理学という発想はこの時代に提唱されたものである。このように、新たな技術は、医生物学に新たな展開をもたらしてきた。我々は、現代の新規技術であるナノテクノロジー・バイオマテリアル技術・MRIなどが、医生物学にいかなる展開をもたらさるかを探りつつ、治療との関連すなわち臨床との橋渡しも視野に入れた、病態生理学の新たな局面を拓きたいと考えている。

血管の弾性機能制御の分子メカニズム

横山詩子, 塩田亜樹, 石渡 遼, 鈴木伸一, 益田宗孝, 麻生俊英, 青木浩樹, 杉本幸彦, 中邨智之, 南沢 享, 石川義弘 (横浜市立大学医学部循環制御医学)

弾性線維の形成は血管の構造の維持と機能のために不可欠である。特に大血管では弾性線維は血圧の変動を緩衝して末梢に血流を循環させる働きがあり、心拍出量の増加とともに胎生後期から生後早期にかけて増加する [1]。弾性線維の形成過程は、その不可溶性の性質のため解明が遅れていたが、近年種々の弾性線維の構成成分が明らかになってきた。動脈管は胎生期に大血管と肺血管をバイパスする動脈であり出生後は速やかに閉鎖するが、弾性線維の形成が極端に低下していることが知られている [2]。本研究では、弾性線維形成の分子メカニズムを、動脈管を用いて明らかにすることを目的とした。

ラット動脈管平滑筋細胞を2週間 F12/DMEM 培地で培養すると弾性線維が形成されるが、プロスタグランジン E2 (PGE2) または、その受容体の一つである EP4 のアゴニストで刺激すると弾性線維の形成が有意に低下した。一方 EP1/3, EP2 アゴニストでは同様の効果は得られなかった。動脈管平滑筋細胞では EP4 アゴニストの刺激により、弾性線維を架橋する酵素であるリシルオキシダーゼ蛋白の発現が低下し、この効果はホスホリパーゼ C, Src 阻害薬 (U73122, PP2) でみられなくなった。さらに、EP4 アゴニストによるリシルオキシダーゼの減少は、ライソゾームやクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害薬の併用でみられなくなった。つまり、EP4 シグナルは PLC-Src を介してクラスリン依存性エンドサイトーシスを亢進させ、ライソゾームでのリシルオキシダーゼの分解を促進することで弾性線維形成を低下させることが示唆された。さらにこの作用を *in vivo*, *ex vivo*、臨床検体を用いた実験で確認した。EP4 欠損マウスでは、動脈管の弾性線維形成は亢進し大動脈様となり、出生後も閉鎖せず動脈管開存症となった。また大動脈と動脈管の臨床検体では、弾性線維形成の形成低下と EP4 の発現に相関を認め、EP4 発現とリシルオキシダーゼの発現低下にも相関を認めた。さらに EP4 による弾性線維形成への作用を、細胞積層化技術を用いた三次元血管モデルで検討したところ、EP4 アゴニストは *ex vivo* 三次元血管モデルにおける弾性線維形成を有意に低下させた。

これらの結果より、EP4 シグナルは PLC-Src を介してエンドサイトーシスによりリシルオキシダーゼの分解を促進することで、血管弾性線維形成を低下させることが明らかとなった。血管弾性線維形成のメカニズムの一端が明らかになったことで、弾性線維形成の異常を呈する疾患へのアプローチの可能性が示唆された。

1. Wagenseil JE, et al: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**: H257-264, 2010
2. Schaeffer JP: *J Exp Med* **19**: 129-142, 1914

血管内皮細胞における細胞表面滞留 tPA による新たな細胞表面線溶活性発現調節機構

浦野哲盟, 鈴木優子 (浜松医科大学生理学第二講座)

【背景】血管内皮細胞 (VECs) は凝固抑制、血小板凝集抑制、線溶促進に関わる様々な機構で抗血栓活性を発揮し血管開存性に寄与する。線溶系ではセリンプロテアーゼである tissue plasminogen activator (tPA) を活性型酵素として分泌し、

plasmin の生成を介してフィブリン血栓を除去する。我々は培養 VECs に発現させた緑色蛍光タンパク (GFP) 融合 tPA (tPA-GFP) の開口放出動態を全反射蛍光顕微鏡にて可視化し、VECs 特有の tPA-GFP 滞留現象を明らかにしてきた。この滞留 tPA による線溶活性発現-増幅機構について報告する。【方法】VECs に発現させた tPA-GFP と Alexa568 標識 plasminogen (plg-568) の局在を蛍光顕微鏡により解析するとともに VECs 上に作成したフィブリン網の溶解過程を解析した。【結果】1) plg-568 の集積は細胞表面滞留 tPA-GFP との共局在の他、細胞間/マトリックス接着領域にリジン結合部位を介して認められた。2) 不活性型あるいは重鎖欠損 tPA-GFP, あるいは plasmin inhibitor 存在下では plg-568 の集積は抑制された。3) 活性型 tPA 発現細胞を起点として常に溶解部先端 (境界) に LBS 依存性の帯状の plg 結合帯を示しながら同心円上に拡大する溶解過程が観察できた。【考察】滞留 tPA による plm 生成の促進により更なる細胞表面 plg 結合部位が形成され、細胞表面線溶活性の発現・増幅機構として tPA の滞留現象の重要性が示唆された。また滞留 tPA はフィブリン形成時にはその効率的な溶解の起点となる事実も示された。近年線溶系は血管内皮細胞上で継続的に血栓形成を予防する積極的な抗血栓機構であるという新しい概念で捉えられている。tPA は VECs から特異な開口放出動態で分泌され細胞膜上に滞留することにより、これに寄与すると考えられる。

1. Suzuki Y, Mogami H, Ihara Y, Urano T: Blood **113**: 470-478, 2009
2. Suzuki Y, Yasui Y, Brzoska T, Mogami H, Urano T: Blood **118**: 3182-3185, 2011

高磁場マイクロ MRI とナノ粒子造影剤による腫瘍の血管構築と微細構造の可視化

青木伊知男 (放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター)

MRI は医療での診断装置として広く普及し、また脳機能画像法を始めとする機能イメージングが、神経学研究にも多用されている。近年、小動物を対象とした前臨床用 MRI においても幾つかの技術的進展があり、適用範囲と利用者が拡大しつつある。一つは、感度が高い 7 テスラを超える高磁場 MRI が比較的安価な価格帯で提供され始めたこと、高感度な小型コイルを複数並べた並列受信技術あるいは過冷却により熱ノイズを低減さ

せたクライオコイルなどの高感度受信技術が小動物用として登場することで、空間分解能が高い撮像においても十分な信号が得られるようになったこと等が背景にある。また一方で、コンパクト MRI と呼ばれる 1 テスラ程度の永久磁石を使った小型 MRI 装置の登場により、導入・維持コストが大きく低減すると共に、その簡便さから MRI 専門家以外の研究者の利用が増大した。

微小循環の生理学的研究の歴史は古く、例えば色素、蛍光、放射性トレーサーなど多くの手法が実施されてきたが、多くは切片を観察するなど、侵襲性を伴った。MRI は非侵襲的に断層像が得られ、90 年代にかけて、巨視的な手法ながら、動脈の流れを可視化する血管造影法、反転した ¹H スピンの組織内流入を観測する灌流画像法など、複数の手法が提示された。近年の高磁場化・高感度化という技術展開は、MRI を用いた微小循環の評価に新しい視点をもたらした。例えば、高感度コイルを使用して、50 μ m を上回る空間分解能で生体を撮像すると、従来までは「大きな動脈のみ」を反映するとされてきた MR 血管造影法を用いて、腫瘍に新生した細動脈の分枝まで観察可能である。あるいは、磁化率強調画像法によって腫瘍内の静脈や出血痕の分布を反映させることが出来る。このように従来の MRI の撮像技法を、高磁場 MRI と高感度コイルを用いたマイクロイメージングに適用することで、従来には観察できなかった新しい「視点」を得ることができる。

加えて、ナノ粒子を用いた新しい高分子造影剤は、微小循環の研究に付加価値をもたらした。従来の造影剤は、Gd-DTPA 等の低分子 Gd 錯体が主流で、造影剤そのものには組織特異性や機能性は無かった。しかし、酸化鉄微粒子・ナノミセル・デンドリマー・PEG 化リポソームなどのナノ粒子は、その粒径調整と血中滞留性の向上により、EPR 効果と呼ばれる受動的な腫瘍集積能を獲得。加えて、治療薬・造影剤・蛍光色素など複数の機能要素を運搬可能な「キャリア」として報告されている。これにより、MR 血管造影では、より微小な血管の撮像が可能となり、さらに pH などの腫瘍環境に応答する造影剤、加温や光に応答して治療効果を発揮する薬剤など、多くの応用分野が拓かれた。今後、高感度化した MRI と高分子ナノ粒子キャリアの組み合わせは、生体の血管構築や組織微細構造を解析する研究に貢献すると共に、臨床応用へ向けても、より重要な役割を果たすと考えられる。