

## A-1

# 神経障害性疼痛における帯状回皮質ミクログリアの役割

○大澤 匡弘、宮本 啓補、桑 和彦

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 神経薬理学分野

【目的】痛み刺激は、体性感覚の認知にかかわる脳領域のほかに、扁桃体や帯状回皮質、前頭前野、島皮質など、情動にかかわる脳領域を活性化することが magnetic resonance imaging (MRI) などの検討から明らかにされている。また、神経障害や炎症などにより痛みが長期的に持続している状態では、これら脳領域の神経伝達が可塑的变化を示すことが明らかにされている。しかし、これらの神経伝達の変化が慢性的な痛みの発現に、どのように寄与するかについての詳細は明らかにされていない。脊髄では、神経障害によりミクログリアやアストロサイトの機能が変化し、神経伝達の可塑的变化が生じることが明らかにされている。そこで、本研究では、帯状回皮質に注目しミクログリアの機能変化と神経障害による痛みの発現の関係について検討を行った。【方法】実験にはddY系雄性マウスを用い、神経障害性疼痛には spared nerve injury (SNI) モデルを用いた。痛み閾値はvon Frey テストに従い評価し、タンパク質発現はウェスタンブロットおよび免疫組織化学的検討により解析した。ミクログリアの阻害薬であるミノサイクリンはSNI手術直前から投与を開始し、その後1日1回投与した。【結果】神経障害により帯状回皮質におけるミクログリアのマーカータンパク質であるIba-1およびアストロサイトのマーカータンパク質であるGFAPの発現が上昇した。このIba-1およびGFAPの発現上昇は、ミノサイクリンの脳室内投与 (10  $\mu$ g) により抑制された。また、神経障害により触刺激に対するアロディニアが認められたが、ミノサイクリンを脳室内および帯状回皮質内 (5  $\mu$ g) へ処置すると有意に抑制された。さらに、神経障害により帯状回皮質におけるグルタミン酸AMPA受容体GluA1サブユニットの831番目のセリン残基のリン酸化が亢進し、ミノサイクリンにより抑制された。【考察】これらのことから神経障害による痛みの出現に、帯状回皮質におけるミクログリアの活性化に起因するグルタミン酸AMPA受容体の機能亢進が関与することが示唆された。

## A-2

# デキサメタゾンによる培養アストロサイトのエンドセリンET<sub>A</sub>およびET<sub>B</sub>受容体のDown-regulation

○小山 豊<sup>1</sup>、浮田彰乃<sup>2</sup>、阿部華奈<sup>2</sup>、岩前邦明<sup>2</sup>、田中啓介<sup>2</sup>、小竹優希<sup>2</sup>

<sup>1</sup>神戸薬大・薬理、<sup>2</sup>大阪大谷大・薬・薬理

【目的】脳虚血や頭部損傷時に生じる脳浮腫に対し、デキサメタゾン (Dex) など糖質コルチコイドの投与が、これを抑制する事が示されている。しかし、その脳浮腫抑制の機序は明確でない。我々はこれまでに、脳損傷部位で増加するエンドセリン (ET) がアストロサイトのET<sub>B</sub>受容体を介して脳浮腫を惹起する事を示した (*PLoS One*, 7:e102009 (2014)、*Eur J Neurosci.*, 42:2356-2370 (2015) )。今回、Dexの脳浮腫抑制の機序について、アストロサイトのET受容体の関連を検討した。【方法】培養アストロサイトは生後0~2日齢のWistar系ラット大脳皮質より調製した。ET受容体およびMatrix Metalloproteinase (MMP) のmRNA量は定量的PCRで、タンパク量はイムノブロット法あるいはELISAで測定した。Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化は、リン酸化ERKタンパク量により評価した。【結果】ラット培養アストロサイトにおけるET受容体mRNAコピー数の比較は、ET<sub>B</sub>受容体がET<sub>A</sub>受容体の約10倍多く発現している事を示した。Dex (300nM) による培養アストロサイトの処置は、6-48時間でET<sub>A</sub>およびET<sub>B</sub>受容体のmRNAを減少させた。この作用は用量依存的であり、30nM以上の濃度で有意となった。ET<sub>A</sub>およびET<sub>B</sub>受容体タンパク量もDex処置で減少した。DexによるET受容体の発現低下は、糖質コルチコイド受容体拮抗薬mifepristoneで抑制された。ET-1 (100nM) は、培養アストロサイトのMMP3およびMMP9の発現量を増加させた。培養アストロサイトのDex前処置 (300nM, 48時間) は、ET-1によるMMP3およびMMP9 mRNAの増加を抑制した。ET-1によるERK活性化は、Dex前処置により減弱したが、PKC活性化剤phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によるERK活性化は影響されなかった。【考察】今回、DexはアストロサイトのET受容体発現を抑制する事が示された。DexによるアストロサイトET受容体のdown-regulationは、Dexによる脳浮腫抑制の機序のひとつを説明するかもしれない。

## A-3

### 非ステロイド性抗炎症薬Flurbiprofenのセロトニントランスポーター(SERT)に対する効果

○酒井規雄、平川明樹、村川青矢、浅野昌也、秀和泉、白藤俊彦、田中茂

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 神経薬理学

【背景と目的】セロトニントランスポーター (SERT) の機能は膜輸送によって調節される。以前の検討で、ケミカルシャペロンの4-phenylbutyric acid (4-PBA) が、SERTの膜輸送を促進させてSERTの機能を調節することを明らかにした。本研究では、ケミカルシャペロン活性を持つと報告のある非ステロイド性抗炎症薬のFlurbiprofen のSERTの機能に対する効果を調べた。

【方法】実験には、一過性に野生型SERT、あるいはフォールディング不全により小胞体 (ER) に停留するC末端欠損SERT (SERT  $\Delta$ CT) を発現させたCOS-7細胞を用いた。SERTのセロトニン取り込み活性、タンパク発現、糖鎖修飾に対するFlurbiprofenの効果を、蛍光基質とトリチウムセロトニンの取り込み測定、western blotting法により検討した。

【結果と考察】Flurbiprofenの24時間処置は、WT SERTの取り込み活性と完全糖鎖修飾体を増加させた。このことから、Flurbiprofenは、WT SERTの膜輸送を促進する効果を有すると考えられた。一方、Flurbiprofenは、SERT  $\Delta$ CTの取り込み活性とタンパク発現を減少させた。また、SERT  $\Delta$ CTは、小胞体で凝集体を形成しERストレスを惹起するが、Flurbiprofen は、SERT  $\Delta$ CTタンパク凝集体を抑制した。このように、FlurbiprofenはSERT機能に対し、ケミカルシャペロンの4-PBAと類似した作用を示し、その機序として、自身の持つケミカルシャペロン活性が関与していることが示唆された。Flurbiprofenは、SERTが関連する精神神経疾患の病態の理解やERストレスが起こす障害の改善に繋がる可能性がある。

## A-4

### 肝臓における脳梗塞誘導性炎症性サイトカイン増加に対するorexin-Aの関与

○原田 慎一、徳山 尚吾

神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

【目的】我々はこれまでに、脳梗塞後に誘発される肝臓における糖代謝異常に対し、視床下部から産生される神経ペプチドの一つである orexin-A (OXA) が、迷走神経の活性化を介してそれを抑制する知見を得た。肝臓における糖代謝異常に対し、炎症性サイトカインの増加が関与し、これらは自律神経系によって調節されることが報告されている。そこで、本研究では、脳虚血後の糖代謝異常および肝臓における炎症性サイトカインの増加に及ぼすorexin-Aの影響について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、局所脳虚血モデルは、2 時間の中大脳動脈閉塞法 (MCAO)、vagotomy モデルは、肝臓枝迷走神経を切除することによって作成した。OXA (5 pmol/mouse) は、再灌流直後に視床下部内局所投与した。血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定し、各種タンパク質の発現変化はwestern blot 法によって解析した。

【結果】OXA は、MCAO 1 日後の FBG の上昇および、MCAO 3 日後の梗塞巣形成ならびに行動異常の発現を有意に抑制した。さらに、MCAO 1 日後の肝臓におけるtumor necrosis factor (TNF)  $-\alpha$  ならびにinterleukin-1  $\beta$  の有意な発現上昇、insulin receptor substrate のチロシンリン酸化の抑制およびセリンリン酸化の増加は、orexin-Aによって有意に抑制された。これらの作用は、vagotomy によって消失した。一方、TNF- $\alpha$  受容体に関しては、MCAOによる影響は認められなかった。

【考察】以上の結果から、orexin-Aは迷走神経を介して肝臓における脳虚血後の炎症性サイトカインの増加を抑制する可能性が示唆された。

**A-5****オランザピンは海馬歯状回の神経脱落に伴う認知機能障害を抑制する**

○尾中 勇祐、和田 翔汰、米山 雅紀、山口 太郎、荻田 喜代一

摂南大学・薬学部・薬理学研究室

【目的】成体動物の海馬は、認知機能の調節に関わる重要な領域であり、アルツハイマー病などの神経変性疾患の患者では、海馬の機能異常と認知機能障害との関連が示唆されている。トリメチルスズ (TMT) は、マウスの海馬歯状回において選択的な神経細胞の脱落とともに、認知機能障害を引き起こすことが知られており、海馬障害後の認知機能障害を解析するモデルとして有用である。TMTが引き起こす海馬の機能障害および認知機能障害を改善する薬物を探索する目的で、本研究では統合失調症治療薬であるオランザピンを用いた検討を行った。

【方法】8週齢のddY系雄性マウスに2.6 mg/kg TMTを腹腔内投与した。行動解析では、TMT投与30分後から1日1回3日間、0.6 mg/kg オランザピンをマウスに投与し、最終投与30分後から新奇物体認識試験 (NORT) を行った。免疫組織化学的解析では、TMT投与30分後から1日1回2日間、0.6 mg/kg オランザピンをマウスに投与し、最終投与24時間後の脳サンプルを用いて、Fluoro-Jade B (FJB、神経障害マーカー) 染色およびIba1の免疫染色を行った。

【結果・考察】TMTの投与4日後において認められた認知機能障害は、オランザピンの慢性投与により改善された。また、TMTの投与2日後において認められたFJB陽性細胞数の増加はオランザピンによって顕著に抑制された。さらに、オランザピンは、TMTによるIba1陽性細胞数の増加には影響を与えないものの、活性化状態のIba1陽性細胞数 (活性型ミクログリア) を減少させた。以上の結果から、オランザピンは、TMTが誘導するミクログリアの活性化や神経脱落の抑制を介して認知機能障害を抑制する作用をもつ可能性が示唆される。

**A-6****自閉スペクトラム症患者に高頻度で *de novo* 変異が認められる遺伝子産物の機能解析**

○馬場 優志<sup>1</sup>、松村 憲佑<sup>1</sup>、中澤 敬信<sup>1, 2</sup>、永安 一樹<sup>1, 3</sup>、  
笠井 淳司<sup>1</sup>、田熊 一徹<sup>2</sup>、橋本 均<sup>1, 4, 5, 6</sup>

<sup>1</sup>阪大・院薬・神経薬理、<sup>2</sup>阪大・院歯・薬理、<sup>3</sup>京大・院薬・生体機能解析、

<sup>4</sup>阪大・院連合小児・子どものこころセンター、<sup>5</sup>阪大・院薬・附属創薬センター、

<sup>6</sup>阪大・データビリティフロンティア機構

自閉スペクトラム症 (ASD) は脳発達の異常が原因の一つと考えられる神経発達障害である。ASDの病因や病態の分子メカニズムは不明な点が多く、根本的な治療薬の開発は難航している。ASDはその発症に遺伝的な要因が関与すると考えられているが、多くの孤発例も報告されている。近年、患者の両親にはなく、患者に生じる *de novo* 突然変異もASD発症の原因として注目されており、ASD患者から多くの *de novo* 変異が同定されている。特に複数の家系から変異が同定される遺伝子については、その変異とASDとの関連性が強く示唆されるが、遺伝子産物の神経系における機能は未知なものが多い。そこで本研究では、脳発達におけるASD関連遺伝子産物の機能を解析した。

まず、複数の家系から変異が同定されているASD関連遺伝子 (*CHD8*, *ARID1B*, *SYNGAP1*, *DYRK1*, *SCN2A1*, *ANK2*, *ADNP*, *DSCAM*, *CHD2*, *KDM5B*, *SUV420H1*, *GRIN2B*, *ASH1L*, *PRKD2*) の脳発達期における発現パターンを解析した。その結果、多くの遺伝子が胎生期における神経細胞の発達期に高発現することが明らかになった。次に、ASD関連遺伝子をノックダウンすることによって、脳発達、特に神経発達過程における機能を予備的に解析したところ、*PRKD2*等のノックダウンにより、神経細胞の発達に異常が生じることが明らかになった。以上より、神経発達の異常がASDに繋がる可能性を支持する結果を得た。本研究をさらに推進することによってASDの分子病態解明のための重要な知見が得られることが期待される。

**A-7**

## 末梢組織中のチオール型およびジスルフィド型high mobility group box 1により誘起される痛覚増強へのマクロファージの関与

○中島夏奈、堂本莉紗、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史

近畿大・薬・病態薬理

High mobility group box 1 (HMGB1) は、3つのシステイン残基 (C<sup>23</sup>、C<sup>45</sup>、C<sup>106</sup>) を持つ核内タンパクで、還元状態ではすべてのシステイン残基がチオール型であるall-thiol-HMGB1 (at-HMGB1) として存在するが、酸化状態ではC<sup>23</sup>とC<sup>45</sup>がジスルフィド結合したdisulfide-HMGB1 (ds-HMGB1) に変換される。HMGB1は傷害時や炎症時に細胞外へ放出されてdamage-associated molecular patterns (DAMPs) として機能することが知られており、at-HMGB1はreceptor for advanced glycation end-products (RAGE)、ds-HMGB1は Toll-like receptor4 (TLR4) を活性化することで炎症シグナルを増悪させる。我々は、マウス足底内に投与したat-HMGB1とds-HMGB1が、それぞれRAGEとTLR4を介して痛覚を増強することを報告している。HMGB1は活性化マクロファージ (M $\phi$ ) によって能動的に分泌されるが、細胞外のHMGB1がM $\phi$ を活性化することも知られている。そこで、本研究では、ds-HMGB1あるいはat-HMGB1によって誘起される機械的アロディニアにM $\phi$ が関与するか否かを検討した。マウス後肢の侵害受容閾値をvon Frey法で測定し、at-HMGB1とds-HMGB1を足底内投与したところ、それぞれ100 および10 ng/pawで明らかな機械的アロディニアが認められた。M $\phi$ からのHMGB1遊離を抑制するethyl pyruvate、M $\phi$ /microglia活性化阻害薬のminocycline、M $\phi$ 枯渇薬のリボソーム化- clodronate は、ds-HMGB1誘起アロディニアをほぼ完全に、またat-HMGB1誘起アロディニアを部分的に抑制した。NF- $\kappa$ B阻害薬は、at-HMGB1誘起アロディニアを強力に抑制し、またds-HMGB1誘起アロディニアを僅かに減弱させた。以上より、末梢組織においてat-HMGB1およびds-HMGB1により誘起される痛覚増強にM $\phi$ の活性化が関与することが明らかとなり、特にds-HMGB1の作用発現におけるM $\phi$ の役割がより大きいことが示唆された。

**A-8**

## 脊髄後角における HMGB1 による疼痛誘発メカニズムの解明

○宮内 一希、張 芳芳、中島 一恵、仲田 義啓、森岡 徳光

広島大院・医歯薬保・薬効解析

【目的】 これまでに神経障害性疼痛モデルの脊髄後角においてhigh mobility group box-1 (HMGB1) が増加し、疼痛閾値の低下に関与していることを明らかにしているが、詳細な疼痛誘発メカニズムは十分に解明されていない。そこで本研究ではrecombinant HMGB1 (rHMGB1) を投与したマウスを用いてHMGB1による疼痛誘発メカニズムの検討を行った。

【方法】 ddY 系雄性マウス (5週齢) の坐骨神経を絹糸で結紮し神経障害性疼痛モデル (Partial Sciatic Nerve Ligation: PNL) を作製した。rHMGB1、抗HMGB1中和抗体、各阻害薬はddY 系マウスの脊髄L4-L6 領域のくも膜下腔内にマイクロシリンジを用いて投与した。機械的疼痛は von Frey filament により後肢足蹠を刺激し、逃避閾値を測定することで評価した。

【結果】 PNL 14 日後における機械的疼痛閾値の有意な低下は、抗 HMGB1 中和抗体の反復投与により有意に抑制された。 rHMGB1 (10 - 500 ng) の投与により、機械的疼痛閾値の有意な低下が観察された。さらに rHMGB1 (100 ng) による機械的疼痛閾値の低下は、toll like receptor 4 (TLR4) 拮抗薬 (TLR4-IN-C34)、NMDA受容体拮抗薬 (MK-801) 及びカルシウムチャネル  $\alpha_2\delta_1$  サブユニット拮抗薬 (gabapentin) の前処置によりそれぞれ有意に抑制された。加えて、アストロサイト阻害薬 (fluorocitrate、L-2-aminoadipic acid) の前処置により、rHMGB1による疼痛閾値の低下は抑制された。

【考察】 以上の結果より、脊髄後角において HMGB1 はTLR4、グルタミン酸神経伝達の亢進及びアストロサイトの活性化を介して機械的疼痛閾値の低下を誘発していることが示唆された。

## 反復社会的敗北ストレスによる痛覚閾値の低下に対する帯状回皮質ノルアドレナリン神経系の役割

○大森 翔太<sup>1</sup>、高岸 良典<sup>2</sup>、上岡 万莉<sup>2</sup>、辻 諒佑<sup>2</sup>、北尾 優花<sup>1</sup>、糸 和彦<sup>1</sup>、  
笠原 二郎<sup>2</sup>、大澤 匡弘<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学 大学院薬学研究科 神経薬理学、

<sup>2</sup>徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 神経病態解析学分野

【目的】現代社会では、慢性的なストレスに起因する疾患が問題となっている。その一つに、うつ病や不安障害に頻繁にみられる心因性疼痛がある。この心因性疼痛のメカニズムの解明を目指し、反復社会的敗北ストレス (chronic Social Defeat Stress;cSDS) モデルマウスを用いて痛覚閾値の変化と前帯状回皮質 (ACC) のノルアドレナリン (NA) 神経の関与について検討した。

【方法】cSDSモデルマウスは、C57BL/6J雄性マウスをICR雄性マウスに10分間攻撃させ、その後から金網で仕切り身体的接触のない状態で翌日まで隣接飼育を行う試行を繰り返して作製した。痛覚閾値はvon Frey testにより測定し、うつ様行動はsocial interaction testにより評価した。また、cSDSモデルマウスのNA量は高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

【結果】5日間及び10日間のcSDSにより機械刺激に対する痛覚閾値が低下した。一方、social interaction testのスコアはcSDSを10日間負荷した群では低下したが、5日間負荷した群では変化が認められなかった。cSDSを5日間負荷することで低下した機械痛覚閾値は、デュロキセチンの腹腔内投与 (30 mg/kg) やNAのACCへの微量注入 (0.06  $\mu$ g) によって回復した。また、健常マウスのACCへNA神経毒であるDSP-4 (10  $\mu$ g) やアドレナリン $\alpha$ 2遮断薬であるヨヒンビン (0.05  $\mu$ g) を処置すると機械刺激に対する痛覚閾値が低下した。さらに、cSDSマウスのACCにおいてはチロシンヒドロキシラーゼの減少ならびにNA量の減少がみられた。

【考察】反復的社会的敗北ストレスによる機械刺激に対する痛覚閾値の低下は、うつや不安様行動が認められるよりも早期に出現することが明らかになった。また、cSDSによる痛覚閾値の低下にはACCに投射するNA神経系の機能低下が関与することが示唆された。

## マクロファージ由来high mobility group box1はbortezomib誘起神経障害性疼痛に関与する

○宮崎貴也<sup>1</sup>、坪田真帆<sup>1</sup>、富田詩織<sup>1</sup>、出口智代<sup>1</sup>、関口富美子<sup>1</sup>、西堀正洋<sup>2</sup>、  
川畑篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>岡山大・院・医歯薬学総合・薬理

核内タンパクhigh mobility group box1 (HMGB1) は壊死細胞から受動的に、活性化マクロファージ (M $\phi$ ) などから能動的に細胞外へ放出され、TLR4、RAGEおよびCXCR4などの細胞膜上の標的分子を活性化し炎症反応を促進する。我々は抗がん剤paclitaxelにより誘起される神経障害性疼痛にM $\phi$ 由来HMGB1が関与することを明らかにしている。一方、プロテアソーム阻害作用を有する抗がん剤bortezomib (BTZ) によっても神経障害性疼痛が発症することが知られているが、そのメカニズムはあまりよく分かっていない。そこで本研究ではBTZ誘起神経障害性疼痛にM $\phi$ 由来HMGB1が関与するか否かを検討した。マウスにBTZ 0.4 mg/kgを1週間に3回、2週間で計6回反復腹腔内投与し、von Frey法により機械的侵害受容閾値を測定したところ、投与開始5日後より閾値が低下し、12日後にはほぼ最低レベルに達した後、その状態が少なくとも21日後まで持続していた。このBTZ誘起機械的アロディニアは、抗HMGB1中和抗体 (Ab)、HMGB1の吸着・分解促進作用を有する遺伝子組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン (rhsTM)、RAGE拮抗薬FPS-ZM1、あるいはCXCR4拮抗薬AMD3100をBTZ反復投与時に毎回腹腔内前投与することで消失したが、TLR4拮抗薬TAK-242は無効であった。さらに、Ab、rhsTMおよびFPS-ZM1は、神経障害性疼痛成立後に単回腹腔内投与することによってもアロディニアを抑制した。BTZ処置マウスの脊髄後根神経節ではHMGB1タンパク量の減少およびRAGEタンパク量の増加が認められた。M $\phi$ /ミクログリア活性化阻害薬 minocycline、M $\phi$ からのHMGB1遊離を阻害するethyl pyruvate、またはM $\phi$ 枯渇薬 liposomal clodronateはBTZによるアロディニアを強く抑制した。最後に、マウスM $\phi$ 様RAW264.7細胞をBTZで24時間刺激し、上清中HMGB1量を測定したところ、10-100 nMの用量で明らかなHMGB1遊離が認められた。以上より、BTZ誘起神経障害性疼痛の発症にはM $\phi$ 由来HMGB1によるRAGEおよびCXCR4活性化が関与する一方、疼痛の維持にはRAGE活性化が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

**A-11****ハロペリドールによるオキシトシスとフェロトシスの抑制**

○山本昇太郎、大橋憲太郎、平田洋子

岐阜大学大学院 工学研究科 生命工学専攻

ブチロフェノン系の抗精神病薬であるハロペリドールは、小胞体シャペロンのシグマ 1 受容体に対してアンタゴニストとして作用すること、脳虚血によって誘導される酸化ストレスから神経細胞を保護することなどが報告されている。ハロペリドール、シグマ 1 受容体間における相互作用の神経保護作用との関連が示唆される一方、その制御機構の詳細は明らかとなっていない。本研究では、酸化ストレス誘導性の細胞死であるオキシトシスとフェロトシスに及ぼす、ハロペリドールの影響を解析した。高濃度のグルタミン酸はマウス海馬神経細胞由来 HT22 細胞においてシスチン・グルタミン酸アンチポーターを阻害し、グルタチオンの枯渇による細胞死、オキシトシスを誘導する。ハロペリドールはグルタミン酸による細胞死を抑制し、シグマ 1 受容体のアンタゴニストである BD1047 または NE-100 による共処理はハロペリドールによる細胞死の抑制を阻害した。また、エラスチンはシスチン・グルタミン酸アンチポーターを阻害し、細胞内グルタチオンの低下による鉄依存的な細胞死、フェロトシスを誘導する。エラスチンとハロペリドール、BD1047 または NE-100 で共処理した場合でも、ハロペリドールによる細胞死の抑制が阻害された。以上の結果から、ハロペリドールは HT22 細胞において誘導されるオキシトシスとフェロトシスの双方を抑制し、シグマ 1 受容体に対してアゴニストとして作用することが示唆された。

**A-12****冬眠動物における硫化水素による体温制御機構**

○吉岡寛美、湯澤桃圭、河村理沙、神川澪香、宮本玲菜、門田麻由子、渡邊正知、田村豊

福山大学 薬学部 薬理学研究室

【目的】シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*: 以下ハムスター) の冬眠サイクルは、その体温変化から導入期・維持期・覚醒期に分けることができる。我々はこれまでに、導入期は $A_1$ 受容体を介したアデノシン系によって、維持期は $\mu_1$ 受容体を介したオピオイド系によって、覚醒期は甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによって体温が調節されることを明らかにしてきた。しかし、冬眠開始を制御する分子機構や、3相の切り替わり機構は未だに不明である。近年、ガス状生理活性物質の硫化水素が、脳内で産生されることやマウスの低体温・低活動（冬眠様状態）を誘導することが報告されている。そこで本研究では、ハムスターの冬眠時の体温調節における硫化水素の役割を検討した。

【方法】体温測定実験には、非冬眠ハムスターを冬眠誘発環境（環境温度 5°C）で3時間馴化させた後用いた。体温測定にはデータロガーを用い、非拘束下で連続的に測定した。薬物は、ガイドカニューレを介して側脳室内に5  $\mu$ Lの容量で投与した。硫化水素のドナーには、NaHSを用いた。

【結果及び考察】NaHSは、非冬眠ハムスターの体温を濃度依存的に低下させた。このNaHSによる体温低下は、非競合的NMDA受容体アンタゴニスト (MK801) により抑制された。さらに、冬眠導入期や維持期における体温制御機構との関連性を検討したところ、NaHSの体温低下作用は、アデノシン $A_1$ 受容体アンタゴニスト8-cyclopentyl-theophyllineでは抑制されず、オピオイド $\mu$ 受容体アンタゴニストnaloxoneで抑制された。以上の結果から、硫化水素による体温下降作用には、NMDA受容体の活性化を伴うオピオイド系の賦活化が関与しており、硫化水素は冬眠維持期の体温調節において重要な役割を担っていることが示唆された。

**A-13****家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける  
学習・記憶障害とGABA transporter 2タンパク発現解析**

○平嶋 一貴, 衣斐 大祐, 角谷 佳保里, 間宮 隆吉, 平松 正行

名城大学薬学部・薬品作用学研究室

【目的】近年、わが国では超高齢社会の進展に伴い、老年期疾患の増加が問題となっている。特にアルツハイマー型認知症 (AD) の患者数は増加しているが、ADの病因および認知障害を引き起こす分子機構は十分に解明されてない。本研究室ではAmyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) の活性フラグメントをマウスに脳室内投与することで、学習・記憶障害の発現と海馬におけるGABA transporter 2 (GAT2) の発現が変化することを報告している。そこで本研究では、ADとなるリスクの高い家系で見つかった $A\beta$ 前駆体、プレセニン1およびタウタンパク質の変異型遺伝子が導入されている3xTg-ADマウスを用いて、経時的に認知機能変化およびGAT2のタンパク発現変化を解析した。

【方法】3xTg-ADマウスの短期記憶および物体認知記憶を調べる目的で各々、自発的交替行動試験および新奇物体認知試験を3、6および9ヶ月齢時に行った。コントロールとしては、同月齢の野生型 (WT) マウスを用いた。さらに、9ヶ月齢での行動試験終了後、マウスから脳サンプルを採取し、GAT2タンパク発現量をWestern blot法により解析した。

【結果】3および6ヶ月齢では、WTおよび3xTg-ADマウスの間で認知機能の違いは認められなかったが、9ヶ月齢時において3xTg-ADマウスは、WTマウスと比較して短期記憶および物体認知記憶の低下が認められた。9ヶ月齢時におけるタンパク発現を解析したところ、WTマウスでは認められない $A\beta$ タンパク質の発現が確認できた。さらに3xTg-ADマウスでは、WTマウスと比較して海馬のGAT2タンパク質発現量が有意に減少していた。

【考察】本研究において3xTg-ADマウスの学習・記憶障害は9ヶ月齢以降で出現することが確認された。9ヶ月齢時の3xTg-ADマウスで認められた $A\beta$ タンパク質発現とGAT2タンパク発現量低下が認知機能障害と関連した変化かどうか、今後明らかにする必要がある。

**A-14****学習・記憶障害モデルマウスにおけるベタイン飲水摂取の効果**

○角谷 佳保里, 衣斐 大祐, 平嶋 一貴, 間宮 隆吉, 平松 正行

名城大学薬学部 薬品作用学研究室

【目的】認知症患者の認知機能と血中ホモシステイン (Hcy) 量との間には正の相関があり、過剰なHcyは認知機能を障害することが明らかにされている。また、ベタインはHcyをメチオニンに転換するアミノ酸である。そこで本研究では学習・記憶障害モデルマウスの認知機能低下に対するベタインの作用および慢性処置に適したベタインの濃度について調べるため、まず、ベタインの異なる用量での検討を行った。さらに、アルツハイマー型認知症 (AD) モデル (3xTg-AD) マウスに対する、ベタイン飲水摂取の効果を解析するため、経時的に認知機能の変化を解析した。

【方法】ADの原因物質であるアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) 活性フラグメント [ $A\beta$  (25-35)] をマウス脳室内に投与することで、認知機能が障害される。そこで、 $A\beta$ 投与の4週間前から異なる濃度のベタインを6週齢のddY系雄性マウスに慢性飲水摂取させ、 $A\beta$  (25-35) 投与後5~8日目に物体認知記憶を調べる目的で新奇物体認知試験を行った。また、6および9ヶ月齢の3xTg-ADマウスにおいて、新奇物体認知試験と短期記憶を調べるために自発的交替行動試験を経時的に行った。コントロール群としては、同月齢の野生型 (WT) マウスを用いた。

【結果】10 g/L濃度のベタイン飲水により $A\beta$  (25-35) 投与マウスにおける物体認知記憶障害が有意に改善された。一方、80 g/Lのベタインを慢性飲水させたマウスでは、顕著に体重低下と肝細胞数の減少がみられたが、10 g/Lではそのような変化が認められなかったことから、この濃度のベタインで慢性飲水の効果を確認した。また、3xTg-ADマウスの6ヶ月齢時では、WTとの間で認知機能の違いは認められなかったが、9ヶ月齢時では、WTと比較して物体認知記憶および短期記憶が有意に低下していた。

【考察】本研究において、3xTg-ADマウスの学習・記憶障害は9ヶ月齢以降で出現することが確認されたため、本発表では、10 g/Lのベタイン飲水を6ヶ月齢の3xTg-ADマウスに3ヶ月間処置し、9ヶ月齢時における認知機能変化も報告する予定である。

## マウスの記憶・学習行動に熱ショックタンパク質発現誘導が与える役割の検討

○田上凌 宇高裕太 橋川成美 橋川直也

岡山理科大学院・理・臨床

【背景と目的】生物における学習・記憶機能は、食物摂取や危険回避など全ての動物において生命維持に直接つながる重要な機能であり、下等生物から高等生物に至るまで類似した機構が数多く存在する。熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: HSP) とは、細胞が熱、紫外線、火傷などのストレスを受けることで発現するタンパク質群で、新生タンパク質のフォールディングや変性タンパク質の修復を行う分子シャペロンとして働く。近年、HSPが脳内、海馬の神経系機能改善に効果を発揮し、中枢神経系の疾患と深く関連していることが、報告されているが、HSPと記憶・学習行動の関係性はまだ明らかになっていない。本研究では、HSP発現誘導剤であるGeranyl-geranyl acetone (GGA) を野生型マウスに自由飲水投与を行い、記憶・学習行動におけるHSPの役割の検討を行った。

【方法】C57B6/J雄マウスにGGAを自由飲水投与し、一般行動の評価として、オープンフィールド試験、記憶・学習行動の評価として、空間的記憶をモーリス水迷路試験により、運動・学習行動をローターロード試験により、恐怖記憶を受動回避試験により、短期記憶をY迷路試験により行った。また、GGA自由飲水投与による脳内のHSP発現の確認はリアルタイムPCR法により行った。

【結果と考察】一般行動試験において、コントロール群とGGA投与群で変化は見られず、GGA投与が一般行動に与える影響はないと考えられる。記憶・学習行動試験においてはローターロード試験、受動回避試験、Y迷路試験では、コントロール群とGGA投与群で変化は見られなかった。しかし、モーリス水迷路試験において、GGA投与により空間的記憶能力の上昇が見られた。これらの結果より、GGA投与によるHSP発現誘導は、空間的記憶を向上させる可能性が示唆された。

## 6-OHDA片側パーキンソン病モデルマウスにおける新規オキシインドール化合物の神経保護作用

○伊藤友紀<sup>1</sup>、鈴木弘美<sup>2</sup>、古田享史<sup>1</sup>、大橋憲太郎<sup>1</sup>、平田洋子<sup>1</sup>、澤田誠<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岐阜大学大学院 自然科学技術研究科 生命科学・化学専攻、

<sup>2</sup>名古屋大学環境医学研究所 脳機能分野

パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、その症状や病態は異なるものの、神経細胞死には酸化ストレスや小胞体ストレスなどが関与することが示唆されている。これらの疾患の根治的な治療法はほとんどなく、症状を緩和する薬剤による対症療法が主流となっている。脳には血液脳関門が存在するため、薬剤の脳内移行が困難であることから、血液脳関門を容易に通過し神経保護作用をもつ薬剤を開発することが早急に望まれる。我々は、新規オキシインドール化合物のGIF-2165X-G1がマウス海馬由来HT22細胞でグルタミン酸誘導性の活性酸素種の蓄積を低下させ酸化ストレスを抑制することを見出した。また、質量分析の結果、マウスにおいてGIF-2165X-G1が血液脳関門を通過し脳内へ移行する可能性を見出した。本研究では、GIF-2165X-G1の*in vivo*における酸化ストレスに対する神経保護作用を6-hydroxydopamine (6-OHDA) 片側パーキンソン病モデルマウスで検討した。GIF-2165X-G1をC57B1/6マウスに腹腔内投与した後、右側線条体に6-OHDAを局所微量投与してモデルマウスを作製した。傷害作製6日後、GIF-2165X-G1投与群において、アポモルフィン誘導性旋回運動に改善が見られ、同モデルマウス脳組織を用いてチロシン水酸化酵素染色を行ったところ、注入側線条体のドーパミン神経の脱落が抑制された。さらにLC-MSを用いた生化学的分析によりGIF-2165X-G1投与群の線条体でドーパミン量の改善が見られた。以上の結果から、GIF-2165X-G1は*in vivo*における酸化ストレスによるドーパミン神経の変性に対して保護効果が示された。



**A-17****6-OHDA誘発ヘミパーキンソン病モデルマウスの痛覚過敏に対するパロキセチン慢性投与による改善効果**

○成清 綾<sup>1,2</sup>, 長谷部茂<sup>1</sup>, 中澤敬信<sup>1</sup>, 丹羽 均<sup>2</sup>, 田熊一徹<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>大阪大院・歯・薬理, <sup>2</sup>大阪大院・歯・麻酔, <sup>3</sup>大阪大院・連合小児発達

【目的】 Parkinson病 (PD) は黒質-線条体ドパミン神経の変性に伴う運動機能障害を主症状とする神経変性疾患であるが、半数近い患者において、主症状に加えて痛覚過敏が認められる。我々は最近、6-OHDA誘発ヘミPDモデルマウスにおいて、5-HT作動性下降性痛覚抑制経路の機能低下により痛覚過敏が発現することを示唆し、パロキセチン (PXT) 慢性投与が痛覚過敏を改善することを見出した。本研究では、PXT慢性投与によるヘミPDモデルマウスの痛覚過敏改善作用に関わる発現機序を追究した。

【方法】 8週齢C57BL/6J系雄性マウスを用いた。ペントバルビタール麻酔下で線条体 (ブレグマよりAP +0.5 mm, ML +1.7 mm, DV -3.0 mm) に6-OHDA (4 µg/2 µl) を注入した。術後2週間より、プランター試験、カプサイシン誘発疼痛試験およびvon Frey試験により痛覚感受性変化を解析した。各脳部位の神経活動はc-Fos発現細胞数を指標に評価した。

【結果・考察】 6-OHDA誘発ヘミPDモデルマウスは、熱刺激、化学刺激、機械刺激のいずれに対しても痛覚過敏を示した。6-OHDA注入マウスでは、中脳水道周囲灰白質 (PAG) および吻側延髄腹内側部 (RVM) においてカプサイシン足底投与により発現するc-Fos陽性細胞数が減少していた。このPAGおよびRVMでのc-Fos陽性細胞数の減少は、痛覚過敏を改善するPXT慢性投与 (10 mg/kg, i. p., 2週間) により抑制された。PXT単回投与が効果を示さなかった以前の知見を考え合わせると、以上の成績は、PXTが5-HT作動性下降性痛覚抑制経路の長期的な機能回復によって痛覚過敏を改善することを示唆する。

**A-18****腸内細菌により産生される脂肪酸のミクログリア活性化に対する抑制作用**

○池口詩織<sup>1</sup>, 泉安彦<sup>1</sup>, 赤池昭紀<sup>1</sup>, 久米利明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大院・薬・薬品作用解析学

【目的】 神経変性疾患をはじめとした脳疾患において、脳内炎症の抑制は重要な治療戦略の一つである。腸内細菌により産生される脂肪酸は、消化管内において腸管バリア機能制御、腸管免疫制御機能、炎症抑制作用など免疫に対して重要な働きをもつことが近年報告されている。しかし、脳内での作用については未だ明らかにされていない。そこで、腸内細菌により産生される脂肪酸の脳内炎症への作用を検討する目的で、マウス由来ミクログリア細胞株BV-2細胞を用いてLPSにより惹起される活性化に対する作用を検討した。【方法】 BV-2細胞は10%FCSを含むDMEM中で培養した。ミクログリア活性化の指標として、培地中に遊離されるNO量をGriess法により測定した。タンパク質の発現量はWB法により検出した。受容体の発現はRT-PCRを用いて検出した。【結果・考察】 腸内細菌により産生される脂肪酸の中で10-Hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) および10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid (KetoC) が抗炎症作用を有するため、これらの脂肪酸に着目しミクログリア活性化に対する作用を検討した。HYAおよびKetoCはBV-2細胞において、LPS誘発NO産生を抑制した。LPS誘発iNOS発現上昇に対する作用を検討したところ、HYAおよびKetoC処置によりその発現上昇が抑制された。両脂肪酸が作用する受容体としてPPARが報告されており、HYAが作用する受容体としてGPR120が報告されている。そこでこれら受容体の拮抗薬存在下における脂肪酸のNO産生に対する作用について検討したが、脂肪酸によるNO産生抑制作用への影響は見られなかった。次に、脂肪酸のLPS誘発iNOS発現上昇に対する抑制作用機序について検討する目的で、NF-κBおよびMAPKの活性化に対する脂肪酸の作用を検討した。LPS誘発のNF-κBの核内移行、IκBの発現減少に対して両脂肪酸ともに影響を与えなかった。また、LPS誘発のp38およびJNKのリン酸化に対して影響を与えなかった。しかし、ERKのリン酸化、さらにその上流のMEKのリン酸化を抑制する傾向を示した。以上の結果より、腸内細菌により産生される脂肪酸であるHYAおよびKetoCはGPR120やPPARを介さず、ERK、MEKのリン酸化を抑制することでLPS誘発のNO産生を抑制することが示唆された。

## 末梢免疫活性が及ぼすマウス大脳皮質における免疫関連因子の発現誘導

○祖父江 颯<sup>1</sup>、伊藤 教道<sup>1</sup>、単 偉<sup>1</sup>、羽田 和弘<sup>1</sup>、中島 晶<sup>1</sup>、村上 由希<sup>2</sup>、毛利 彰宏<sup>3</sup>、山本 康子<sup>3</sup>、鍋島 俊隆<sup>4</sup>、齋藤 邦明<sup>3</sup>、永井 拓<sup>1</sup>、山田 清文<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>名古屋大院・医・医療薬学、<sup>2</sup>同志社大院・脳科学・神経発生分子機能、藤田保健衛生大院・医療科学・<sup>3</sup>病態制御解析学、<sup>4</sup>先進診断システム探索講座&藍野大学

【背景】従来、中枢神経系は免疫学的特権部位とされてきたが、サイトカインや主要組織適合遺伝子複合体クラスI (major histocompatibility complex class I; MHC I) などの発見によりその概念が変化してきている。また、ウイルス感染時など全身性の炎症からうつ様症状などの精神疾患が誘発されることも報告され神経と免疫の関係が注目されている。しかし、血液脳関門による脳内移行制御のもと末梢免疫活性と中枢での免疫関連因子の発現変化についての相関は不明な点が多い。本研究では、末梢免疫活性による中枢神経系における免疫関連因子の発現変化や神経免疫疾患において鍵となる因子の探索をする目的で末梢での免疫を活性化し、中枢神経系での免疫関連因子のmRNA変化を解析した。

【方法・結果】実験には7-8週齢のC57BL/6J雄性マウスを用い、Toll-like receptor 3を介して自然免疫を活性化する合成2本鎖 RNA アナログのpolyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C) を3 mg/kgの用量で腹腔内投与し、投与6および24時間後に前頭前皮質を摘出し各mRNAレベルを解析した。その結果、投与6時間後にMHC IおよびInterferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) のmRNAレベルの有意な上昇が認められ、その上昇は24時間後まで持続した。さらに、IFN- $\beta$  およびTNF- $\alpha$  のmRNAレベルは、投与6時間後に一過性の上昇を示した。また、IL-6については6および24時間後でmRNAレベルの上昇が確認された。ハイドロダイナミクス法を用いて尾静脈からIFN- $\gamma$  遺伝子を導入したマウスについても、MHC I mRNAレベルの有意な上昇が認められた。

【結論】末梢免疫活性化によるIFNの発現上昇は、脳内のMHC I、IFITM3および炎症性サイトカインの上昇を介して、sickness 症候群などの発現に関連することが示唆された。

## 脳卒中後疼痛における 脊髄の high mobility group box-1/nitric oxide synthetase シグナルの関与

○松浦 渉<sup>1</sup>、原田慎一<sup>1</sup>、劉 克約<sup>2</sup>、西堀正洋<sup>2</sup>、徳山尚吾<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 神戸学院大薬・臨床薬学 <sup>2</sup> 岡山大院医歯薬・薬理学

【背景】我々は、脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) の発症機序に脊髄の high mobility group box-1 (HMGB1) が関与する可能性を提唱してきた。HMGB1 はその受容体である receptor for advanced end products や toll-like receptor を介して、神経障害性疼痛に関与する nitric oxide synthetase (NOS) の調節に関わっていることから、本研究では、CPSP の発現における HMGB1/NOS シグナルの関与について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、CPSPモデルは 30 分の両側総頸動脈閉塞法 (bilateral carotid arteries occlusion: BCAO) によって作成した。BCAO 3 日後に、マウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数の変化を von Frey test を用いて行った。BCAO 3 日後における NOS 活性を比色定量法を用いて測定した。さらに、BCAO 3 日後に抗 HMGB1 抗体 (2, 20  $\mu$ g/mouse) および L-NAME (100, 300  $\mu$ g/mouse: NOS 阻害剤) を脊髄腔内投与し、疼痛評価を行った。

【結果】BCAO 3 日後において、機械的刺激に対して有意な逃避行動回数の増加が確認された。さらに、BCAO 3 日後における有意な逃避行動回数の増加は、抗 HMGB1 抗体 (20  $\mu$ g/mouse) および L-NAME (300  $\mu$ g/mouse) の脊髄腔内投与によって有意に抑制された。また、BCAO 3 日後の脊髄において、sham 群と比較して NOS 活性の増加が確認され、それは抗 HMGB1 抗体 (20  $\mu$ g/mouse) を投与することによって NOS 活性の減少傾向が確認された。

【考察】CPSP の発症機序の一部に、脊髄における HMGB1/NOS シグナルの変動が関与している可能性が考えられた。

**A-21**

## **Insulin potentiated leptin-induced anti-obesity signal through GRP78 in neurons**

○Mina Thon, Toru Hosoi, Koichiro Ozawa

Department of Pharmacotherapy, Graduate School of Biomedical and Health Sciences,  
Hiroshima University

A lack of exercise and excess food intake in modern lifestyle is likely to contribute to overweight and obesity. Obesity is a risk factor for mortal diseases including diabetes mellitus, hypertension, cardiovascular, and other chronic diseases. Leptin has been considered as a potential anti-obesity hormone due to its role in suppressing appetite and enhancing activity. However, a major of obese subjects are in a state of leptin resistance, and its underlying mechanisms are still being elucidated in details. Our group has reported the involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in the pathophysiology of leptin resistance. In this context, being able to alleviate ER stress is critical in ameliorating leptin resistance. GRP78 is an important chaperone protein that is required to maintain ER capacity and protect against ER stress by assisting in protein folding. In the present study, we examined the function of GRP78 on leptin-induced phosphorylation of STAT3, a major anti-obesity signal of leptin. Interestingly, knocking down GRP78 inhibited leptin-induced STAT3 activation, which was enhanced in GRP78-overexpressing cells. Of note, insulin also regulates energy homeostasis in the central nervous system (CNS), and it was known to induce GRP78. Based on this, we evaluated whether insulin can enhance leptin-induced STAT3 phosphorylation through induction of GRP78. A human neuronal cell line, SH-SY5Y-ObRb was co-stimulated with insulin and leptin. As a result, pretreatment with insulin enhanced leptin-induced STAT3 phosphorylation, which was ameliorated by the knockdown of GRP78. Overall, our study suggests that GRP78 plays a key role in the activation of leptin signaling.

**A-22**

## **TASK1-TALK2異種2量体形成によるチャネル特性の変化**

○鈴木良明、堤香菜子、宮本達也、山村寿男、今泉祐治

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

【目的】Two-pore-domain  $K^+$  ( $K_{2p}$ ) チャネルは、pHや温度、揮発性麻酔薬など多様な刺激によって活性を変化させることで、静止膜電位の形成に寄与する。現在までに15種類のサブタイプが同定されており、同種2量体形成によりチャネルポアを構成する。さらに、異なるサブタイプ間で異種2量体を形成することで、多様な機能を獲得すると想定されるが、異種2量体に関する報告は極めて限られている。そこで我々は発現部位が重複し、細胞外pHや揮発性麻酔薬ハロタンに対して異なる感受性を持つTASK1 (TWIK-Related Acid-Sensitive  $K^+$  channel) とTALK2 (TWIK-Related Alkaline pH-Activated  $K^+$  channel) に着目し、TASK1-TALK2新規異種2量体のチャネル特性の変化とその生理的意義を解明することを目的とした。

【方法】蛍光タンパクを標識したヒトTASK1あるいはTALK2、またはTASK1-TALK2タンデム体を、ヒト胎児腎由来 (HEK) 293細胞あるいはヒト臍島細胞株 (QGP-1) に一過性発現させて以下の実験を行った。(1) 蛍光イメージング法による異種2量体形成能の解析。(2) ホールセルパッチクランプ法による電流特性解析。

【結果及び考察】(1) より、TASK1とTALK2がHEK293およびQGP-1細胞膜上で異種2量体を形成することを明らかにした。また、FRET解析から、TASK1-TALK2間と各同種サブタイプ間の結合親和性に有意な差はなかった。(2) より、TASK1-TALK2タンデム体の細胞外pH感受性およびハロタン感受性は各チャネル同種2量体と異なることが明らかとなった。TASK1及びTALK2は、発現が重複する脳や心臓、臍臓などにおいて異種2量体を形成することで、細胞内外の環境変化に対するより精密な反応が可能になると考えられる。また、 $K_{2p}$ チャネルを標的とした創薬を行う上で、異種2量体形成による薬物感受性の変化を考慮することが重要であると推測される。

**A-23****小胞体ストレス応答によるタンパク質メチル化とゴルジ体形態制御**

○松崎伸介<sup>1</sup>, 天野元揮<sup>2</sup>, 森泰丈<sup>3</sup>, 雑賀史浩<sup>1</sup>, 小林大地<sup>1</sup>, 木口倫一<sup>1</sup>, 高村明孝<sup>2</sup>, 韓薩日娜<sup>2</sup>, 鹿田星<sup>2</sup>, 佐藤大樹<sup>2</sup>, 伊藤麻衣<sup>2</sup>, 三好耕<sup>2</sup>, 片山泰一<sup>2</sup>, 岸岡史郎<sup>1</sup>

1 和歌山県立医科大学薬理学講座 2 大阪大学大学院連合小児発達学研究所 分子生物遺伝学  
3 国際医療福祉大学 医学部 解剖学講座

我々は神経変性疾患の発症過程における小胞体 (ER) ストレス応答の重要性について研究を進め、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMT1) がERストレス応答の下流で変動することを見出した。一方、PRMT1が転写因子と相互作用することでシャペロンタンパク質GRP78の転写誘導効率を上昇させると報告されている。しかし、従来のPRMT1の作用であるタンパク質メチル化修飾のERストレス応答における意義は明らかとされていない。そこで我々はPRMT1発現低下細胞を作成し観察を行った結果、ゴルジ体の形態異常が誘導されていることを見出した。膜タンパク質・分泌の合成・成熟過程でERとゴルジ体がクロストークしていることから、PRMT1が両者のクロストークに作用していることが予想された。そこで、ERストレス応答の下流でメチル化修飾を受ける蛋白質群を質量分析によりER・ゴルジ体画分を網羅的に解析し、Scy1-like protein 1 (SCYL1) を見出した。本発表では、ERストレス応答の下流でSCYL1がメチル化修飾を受けることを明らかにし、このSCYL1のメチル化がcoat protein complex I (COPI) 小胞によるゴルジ体からERへの逆行性輸送を調節することでゴルジ体の形態制御に関わる可能性について検討した結果を報告する。

**A-24****中枢神経系におけるAplnrの翻訳後修飾が薬理的な機能を変更する可能性**

○山田孝紀<sup>1</sup>, 大塩美知子<sup>1</sup>, 海老澤俊<sup>1</sup>, 川嶋秀和<sup>1</sup>, 山下卓哉<sup>1</sup>, 平野 聖<sup>1</sup>, 東 紘史<sup>1</sup>, 金城俊彦<sup>1</sup>, 前田定秋<sup>2</sup>, 倉本展行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>摂南大・薬・薬効薬理 <sup>2</sup>摂南大・薬・薬物治療

アペリン受容体 (Aplnr) は、Gタンパク質共役型受容体の一種であるが、翻訳後の修飾が受容体の機能に与える影響については解析が進んでいない。アミノ酸配列からAplnrには2つのN-グリコシル化サイトの存在が示唆されている。本研究では、中枢神経系の神経細胞に発現するAplnrの機能について解析する目的で、HEK293細胞に強制発現させたAplnr及びマウス中枢神経系から調製したAplnrについて、そのタンパク質の分子量の比較を試みた。ウエスタンブロット法の結果、HEK293細胞に強制発現させたAplnrでは、既に報告されているAplnrの分子量付近に二本のバンドを検出することができた。このうち、泳動度の遅いバンドは、試料をNグリコシル化切断酵素と処理することで消失した。一方、Aplnrを強制発現させたHEK293細胞にapelinを曝露しても受容体作動に伴う生化学変化は認められなかった。一方、マウスの脊髄を用いてAplnrの検出を試みたところ、予想される分子量より約20kDa大きいところに複数バンドが検出された。これらのうち最も泳動が遅いバンドが同様に、試料をNグリコシル化切断酵素と処理することで消失したが、強制発現させた分子量より依然大きかった。また、脱small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化酵素と処理しても変化は認められなかった。以上の結果より、中枢神経系のAplnrは、SUMO以外のイソペプチド化等の翻訳後修飾を受けることで安定化すると共に、受容体としての機能を発揮する可能性が示唆される。

○稲野辺厚、倉智嘉久

大阪大学大学院医学系研究科分子・細胞薬理学講座

ROMK1は腎尿細管のヘンレ係蹄の太い上行脚、集合管に発現し、管腔からのイオンの再吸収に機能する内向き整流性K<sup>+</sup> (Kir) チャンネルである。このチャンネル分子の機能消失型変異は低K<sup>+</sup>血症、腎不全を特徴とするII型Bartter症候群を引き起こし、ROMK1のKOマウスも同様の症状を示す。そのため、ROMK1は利尿薬の新規作用点と目され、欧米を中心にその阻害薬の探索が行なわれてきた。しかし、これまでに同定された阻害薬は全てポアブロッカーであり、その結合部位は中心洞と呼ばれる空間的制約の低い領域であった。同領域は4量体型、疑似4量体型カチオンチャンネルに共通する構造である。そのため、ROMK1阻害薬の分子特異性の向上には限界が存在する。

最近我々は、Kirチャンネル阻害薬のスクリーニングシステムを構築し、静菌薬proflavineがG蛋白質制御KirチャンネルKir3.2を阻害することを見出した。この阻害様式は膜電位と細胞外K<sup>+</sup>濃度に依存するため、本薬物はポアブロッカーであると推定された。一方、proflavineはKir3.2と同様にROMK1も阻害したが、阻害作用の発現と解除は俊敏で、可逆的であった。本薬物によるKir3.2の抑制は不可逆的で、進行は緩慢であったため、本薬物はROMK1の中心洞以外の新規薬物結合部位を介して、阻害作用を発現していることが想定された。そこで、電気生理学的に両者の相互作用を解析した。まず、11種類の類似薬物のチャンネル阻害作用を検討したところ、proflavineを含む3種の薬物が同様の効果を有していた。また、13種のホモ、ヘテロKirチャンネルの中で、ROMK1が一番高い感受性を示した。さらに、薬物非感受性のチャンネルとのキメラ解析から、細胞外領域が薬物感受性を決定していること、作用には電位依存性が無く、阻害のHill係数が3を超えることが明らかとなった。以上の知見から、proflavineによるROMK1の阻害様式は、新規の薬物結合部位であるチャンネルの細胞外領域への4分子の結合が基盤であることが判った。