

B-1 **β アレスチンを介する PACAP-PAC1受容体シグナルの解析**○¹新谷 勇介, ^{1,2}早田 敦子, ^{1,2}橋本 均¹大阪大院・薬・神経薬理, ²大阪大院・連合小児発達

【背景・目的】下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) は神経細胞の分化・生存維持などに関与するポリペプチドである。行動薬理学や臨床疫学研究から、PACAP シグナルの変化が統合失調症などの精神疾患に関連することが示唆されており、PACAP シグナルの分子メカニズムの解明は様々な精神疾患の発症や治療機構の理解に重要と考えられる。これまで当研究室では、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) である I 型 PACAP 受容体 (PAC1R) の刺激により、Gタンパク質共役シグナルを介して PAC1R の細胞内への内在化が生じることを見出してきた。一方で、GPCR はGタンパク質非依存的なシグナルである β アレスチン (β -arr) による調節を受けることが知られている。 β -arrはGPCR の脱感作を促進し、足場タンパク質としても機能し、近年、非定型抗精神病薬 Aripiprazole の薬理作用に β -arr2が関与するという興味深い知見が報告されている。そこで、本研究では β -arrを介した PACAP-PAC1R シグナルの調節とそのメカニズムについて解析した。

【方法】PAC1R と β -arr1/2 との相互作用を、Nano Bi T タンパク質間相互作用アッセイ系を用いて化学発光により検出した。各 β -arrをsiRNAを用いて発現抑制したのち、Halo-tagを融合したPAC1Rを発現させ、その細胞内在化を可視化した。また、ERKのリン酸化はWestern blottingにより定量化した。P

【結果・考察】PAC1R と β -arr1あるいは2 との相互作用は、PACAP刺激により増加し、両者の濃度依存性はほぼ同様であった。PAC1Rと両 β -arrとの相互作用は、PACAP刺激直後は細胞膜周辺で観察されたが、 β -arr2との相互作用のみが細胞内在化する様子が認められた。また、PACAPによるPAC1Rの細胞内在化やERKのリン酸化は β -arr2のsiRNAにより低下したが、 β -arr1のsiRNA による影響は認められなかった。これらの結果は、PACAPシグナル系における β -arr1 および2 の役割の違いを示唆するものであり、PACAPの持つ多様な生理機能の解明の一端となることが期待される。

B-2**大気中やたばこ煙中に含まれる9,10-phenanthrenequinoneはTRPA1のシステイン残基621と665を介してチャネルを活性化する**

○村木克彦、安藤優奈、鈴木裕可、波多野紀行、村木由起子

愛知学院大学 薬学部 薬効解析学

侵害受容体のTRPA1は様々な化学物質で活性化されることが知られている。本研究では、大気中やたばこ煙中に含まれる9, 10-phenanthrenequinone (9, 10-PQ) のTRPA1に対する作用を検討した。ヒトTRPA1を発現させたHEK細胞に0.1-10 μ Mの9, 10-PQを投与すると細胞内Ca濃度の上昇及びカチオン電流の活性化が観察された。この9, 10-PQによるTRPA1活性化効果はTRPA1活性化薬のallyl isothiocyanateやZnSO₄と比較し、強力であった。

さらに9, 10-PQと類似の構造をもつ1, 10-phenanthroline-5, 6-dione, phenanthrene, 1, 10-phenanthrolineを用いた解析により、TRPA1の活性化には9, 10-PQ構造中のキノン構造が重要であることが明らかとなった。またcell-freeのoutside-out patch やinside-out patch条件下でも9, 10-PQ のTRPA1活性化効果が観察されたことから、TRPA1の活性化には細胞内因子は関与しないことが示唆された。TRPA1中のシステイン残基 (C) をセリン残基 (S) に置換した6種類の変異型TRPA1 (C414S, C421S, C621S, C633S, C641S, C665S-muTRPA1) を作製し、9, 10-PQの効果を検討したところ、C621S-muTRPA1を発現させたHEK細胞で9, 10-PQが無効となった。C665S-muTRPA1を発現させたHEK細胞でも、9, 10-PQ誘発のチャネル活性化は有意に減弱したが、チャネル感受性を3 μ Mの細胞内Ca²⁺で増大させると、9, 10-PQの効果は回復した。一方、C621S-muTRPA1は3 μ Mの細胞内Ca²⁺でチャネル感受性を増大させても、9, 10-PQの効果の回復は弱かった。細胞を9, 10-PQで長期曝露するとKeap1を介したストレス応答反応が起こることが報告されている。本研究の結果より、9, 10-PQの短期曝露がTRPA1の活性化を引き起こし、気道系組織の生理機能を変化させる可能性があることが示唆された。

B-3**HSP70 阻害剤の去勢抵抗性前立腺癌における抗腫瘍効果の検討**

北和晃¹、○塩田正之²、田中昌子³、松永慎司⁴、三浦克之⁵、富田修平⁴

¹大阪市大院・医・泌尿器、²大阪市大院・医・研究支援プラットフォーム、

³早大・先進理工・生命医科、⁴大阪市大院・医・分子病態薬理、⁵大阪市大院・医・薬効安全性

進行性前立腺癌に対して第一選択である抗ホルモン療法は約1~2年有効であるが、その後抵抗性となり去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer : CRPC) の病態となる。前立腺癌の増殖や転移、さらにホルモン療法耐性においてアンドロゲン受容体 (AR) やそのスプライスバリエーション (Androgen Receptor-variant7 : AR-V7) は重要な因子であり、それらの発現や下流シグナルの抑制が有効な治療標的となる。分子シャペロンであるHeat Shock Protein (HSP) は様々ながん種において発現が上昇し、がんの増殖、転移、薬剤耐性などに関与している。そこでCRPCにおけるHSP70の機能の解析とHSP70阻害剤の治療有効性を検討した。2種類のHSP70阻害剤 (Quercetin、VER155008) を用いてin vitroでの評価を行った。HSP70阻害剤は用量依存的に細胞増殖を抑制し、アネキシン陽性細胞を増加させた。また阻害剤の用量、あるいは時間に依存したARと AR-V7の発現低下を認めた。この際、ARおよびAR-V7で発現制御を受ける下流分子の発現も低下していた。一方、一過性の熱刺激によりHSP70の発現を誘導するとAR、AR-V7共に発現が上昇した。以上より、HSP70はAR、AR-V7の発現制御に関与することが示唆された。したがって、CRPCにおいてHSP70阻害剤はARと AR-V7経路を効率的に抑制し、有効な治療手段となりうることを示唆された。

B-4**グルココルチコイドによる金属結合蛋白質metallothionein-4の誘導**

今村泰弘¹、十川千春²、宮崎育子³、浅沼幹人³、○十川紀夫¹

¹松本歯科大学歯科薬理学講座 ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科薬理学分野

³岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経機構学分野

Metallothionein (MT) は、多くの生理的、非生理的的刺激で誘導され、微量元素の恒常性維持や重金属毒性軽減、酸化ストレス防御などに関与すると考えられている低分子量の金属結合蛋白質である。MTには4つのアイソフォームがあり、この内、MT-4は扁平上皮に特異的に発現することが報告されているが、その生理的意義は未だ明らかになっていない。われわれは、MT-4の生理的機能を明らかにする一助として、今回、グルココルチコイドによるMT-4誘導について検討し、若干の知見を得たので報告する。

ヒトMT-4プロモーター領域1.5Kbを精査したところ、2つのグルココルチコイド応答領域 (GRE) の存在が示唆されたため、これらGREのグルココルチコイドに対する応答をレポーターアッセイにて検討した。上流GREと下流GREを共に含むプロモーター領域1.5Kbでは、コルチコステロン (CORT) あるいはデキサメタゾン (DEX) 添加によりルシフェラーゼ活性は増加した。しかし、下流GREを含む0.8Kbフラグメントでは、CORTあるいはDEXによるルシフェラーゼ活性の増加は認められず、同様に下流GREを含む1.1Kbフラグメントでも、CORTによるルシフェラーゼ活性の増加は認められなかった。さらに、上流GRE相当部を削除した改変1.5Kbフラグメントによっても、CORTによるルシフェラーゼ活性の増加は認められなかった。一方、0.8KbフラグメントにおけるCORT無添加のルシフェラーゼ活性は1.5Kbフラグメントと比べ増加したが、1.1Kbフラグメントでは同等であり、上流GRE相当部を削除した改変1.5Kbフラグメントでは、逆に1.5Kbフラグメントと比べ減少した。

以上の結果より、グルココルチコイド応答に上流GREが必要であること、および、今回削除した上流GRE相当部に自発的なMT-4プロモーター活性が、0.8Kbと1.1Kbフラグメント間にサイレンサー領域の存在が示唆された。

B-5**AGEsによるTNF関連サイトカインの機能阻害メカニズムの解析**

○渡邊 政博¹⁾、豊村 隆男¹⁾、和氣 秀徳²⁾、劉 克約²⁾、勅使川原 匡²⁾、
高橋 英夫³⁾、西堀 正洋²⁾、森 秀治¹⁾
¹⁾ 就実大・薬、²⁾ 岡山大院・医歯薬、³⁾ 近畿大・医

【背景と目的】近年、種々の炎症性疾患との関係が注目されている終末糖化産物 (AGEs) は、還元糖やその代謝産物とアミノ基を有する生体分子から非酵素的に生成し、加齢や高血糖に伴い生体内に蓄積することが知られている。これまでに我々は、AGEsの作用メカニズムを探索する過程で、TNFスーパーファミリーに属する分子 (仮称:TNFLF) が、AGEsと相互作用する可能性を見出した。そこで、これらの分子の作用を培養細胞系において検討したところ、AGEsの共存によってTNFLFが誘導する炎症性サイトカインの産生が抑制されることが示された。また、プルダウンアッセイによりAGEsとTNFLFが直接的に結合することが示された。これらの結果は、AGEsがTNFLFに結合することによってTNFLFの機能阻害が生じる可能性を示唆している。そこで本研究において我々は、AGEsがTNFLFの機能を阻害するメカニズムの解明を目的として、TNFLFの変異体を用いた解析を行った。

【方法】大腸菌発現系を用いてHisタグを付加した各種TNFLF変異体を作製した。これらの変異体はHisタグを介してコバルトが固定化されたアフィニティービーズに結合させた。続いて、このビーズを用いてAGEsのプルダウンアッセイを行い、TNFLF変異体とAGEsとの相互作用を評価した。

【結果と考察】N末端にタグ配列を付加した全長TNFLF (153アミノ酸残基) のN末端側およびC末端側を段階的に欠損させた変異体を作製し、プルダウンアッセイを行った。その結果、N末端側の欠損体はいずれもAGEsに結合することが示された。一方で、C末端側から約60アミノ酸残基を欠損させた変異体はAGEsに結合するのに対して、約80アミノ酸残基を欠損させた変異体 (Δ C14) はAGEsに結合しないことが示された。そこで、 Δ C14に特異的な欠損部位 (20アミノ酸残基) のみを欠損させた変異体を用いて解析を行ったところ、AGEsと結合することが示された。これら結果から、TNFLFはC末端側の複数カ所の領域を介してAGEsに結合することが示唆された。

B-6**ドーパミン産生PC12細胞におけるProtein Kinase R
阻害剤の小胞体ストレス誘導性アポトーシス抑制機構の解明**

○柳生和耶、大橋憲太郎、平田洋子

岐阜大学大学院 自然科学技術研究科 生命科学・化学専攻

インターフェロン誘発性二本鎖依存性プロテインキナーゼ (PKR) は、哺乳動物細胞で恒常的に発現しているセリン/スレオニンキナーゼで細胞死の制御に重要である。アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患では、PKRのリン酸化が亢進することが報告されている。しかし、神経細胞死に関与すると考えられる小胞体ストレスや酸化ストレスなどのストレス応答におけるPKRのリン酸化の役割についての詳細は明らかとなっていない。本研究では、ドーパミン産生細胞のPC12を用いてPKR阻害剤のC16が小胞体ストレス誘導性アポトーシスのシグナル経路に及ぼす影響を検討した。PC12細胞は小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシン、タブシガルギンによりDNAの断片化を伴うアポトーシスを起こし、C16はこれらのDNA断片化を抑制した。そこでC16のアポトーシス制御機構における小胞体ストレス応答経路について解析した。その結果、C16はDNA断片化を抑制する濃度では、3つの小胞体ストレス応答反応のうち、PERK-ATF4経路及びATF6経路には影響を与えず、IRE1経路下流のJNKのリン酸化を抑制することが明らかとなった。C16によるPKR阻害は、小胞体ストレス応答の3つの経路のうち、IRE1/JNK経路を介して、アポトーシスを抑制することが示唆された。さらに、C16処理によりErk1/2のリン酸化が亢進した。したがって、Erk1/2経路の活性化も小胞体ストレス誘導性アポトーシスの抑制に関与すると考えられる。以上の結果より、C16はPKRが関与するストレスシグナル研究のツールとして、また、神経変性疾患の治療薬のシーズとしても有用性の高い化合物であることが示唆された。

B-7

ベタイン飲水摂取によるamyloid- β peptide (25-35) 誘発学習・記憶障害発現抑制作用

○近藤 早梨、野村 知弘、衣斐 大祐、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】当研究室では、マウスを用いた実験から、植物などに含まれるアミノ酸の一種のベタインの単回投与が、amyloid- β peptide (25-35) [A β (25-35)] 脳室内投与による学習・記憶障害の発現を減弱することを報告してきた。また、Sirt1は転写因子などの脱アセチル化を介して、抗酸化・抗炎症作用を示すこと、培養アストロサイトにおけるA β 処置によってSirt1タンパク発現が減少することが報告されている。そこで本研究では、A β (25-35) 脳室内投与マウスにおけるベタインの慢性飲水摂取が、学習・記憶障害およびマウス海馬のSirt1発現に与える影響について調べた。

【方法】A β (25-35) 脳室内投与の1日前に精製水に溶かしたベタイン10 g/Lの飲水を開始し、8日間自由摂取させた。A β (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い、さらに、Sirt1の発現量を調べる目的で、定量PCR法を行った。

【結果】A β (25-35) 脳室内投与により、物体認知記憶の障害およびSirt1発現の低下が認められた。ベタイン慢性飲水摂取は、物体認知記憶の障害およびSirt1の発現低下をそれぞれ有意に抑制した。

【考察】ベタインの慢性飲水摂取は、A β (25-35) 脳室内投与により誘発される学習・記憶障害およびSirt1の発現低下を抑制する事が明らかとなった。今後は、ベタインによる学習・記憶障害改善作用とSirt1発現低下の抑制作用との関係を明らかにしていく予定である。

B-8

c-Fos expression in the dorsol striatum and elevated repetitive and compulsive-like behaviors in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice

○Bolati Wulaer¹⁾, Taku Nagai¹⁾, Akira Sobue¹⁾, Keisuke Kuroda²⁾, Kozo Kaibuchi²⁾, Toshitaka Nabeshima³⁾, Kiyofumi Yamada¹⁾

1)Department of Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, 2)Department of Cell Pharmacology, Nagoya University Graduate School of Medicine 3)Advanced Diagnostic System Research Laboratory, Fujita Health University, Graduate School of Health Science and Aino University

The disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1) is known as a risk gene for the development of mental disorders. It is also involved in neurodevelopment, cognition, and memory. We have previously generated mice lacking exons 2 and 3 of the Disc1 on a C57BL/6J genetic background (Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice).

In the present study, we investigated if Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice had any impairment in visual discrimination learning and memory, using a translatable touchscreen-based visual discrimination task. To investigate the neuronal activation related to the visual discrimination task, we conducted c-Fos immunohistochemistry. The total number of c-Fos immuno-positive cells was counted in the dorsal striatum.

Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice exhibited retarded performance in the visual discrimination task, which was mainly due to high perseverative response compared to wild-type animals. The daily treatment of clozapine ameliorated the impairment by normalizing the perseverative behavior. Moreover, c-Fos expression was specifically increased in the dorsomedial, but not dorsolateral striatum after the first visual discrimination day in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice compared to the wild-type animals. Taken together, these results show that enhanced repetitive and compulsive-like behaviors in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice may lead to cognitive impairment. Daily treatment with clozapine could ameliorate the impaired performance. Functional changes in Disc1 Δ 2-3/ Δ 2-3 mice in the dorsomedial striatum might be responsible for the abnormal phenotype.

B-9**GPR40/FFAR1 欠損雌性マウスは情動・養育行動の異常を示す**

○相澤風花¹、大垣圭弘¹、京谷奈月¹、中本賀寿夫¹、栗原崇³、平澤明²、宮田篤朗³、徳山尚吾¹

1. 神戸学院大学・薬・臨床薬学 2. 京都大院・薬学研究院・薬理ゲノミクス分野
3. 鹿児島大医歯学総合・生体情報薬理学

【目的】脳内には多様な脂肪酸が存在し、中でもn-3系脂肪酸は脳の機能維持に重要な役割を果たしている。これまでに、食餌性にn-3系脂肪酸の欠乏を誘発させた雌性マウスにおいて、出産後の養育行動が障害されることが報告されているが、その詳細な機序は明らかとなっていない。GPR40/FFAR1は脳内に発現するGタンパク質共役型受容体であり、n-3系脂肪酸などを含む長鎖脂肪酸によって活性化される。本研究では、GPR40/FFAR1欠損(GPR40^{KO})雌性マウスを用いて、GPR40^{KO}が情動・養育行動に及ぼす影響について検討した。

【方法】未交配および出産を経験したGPR40/FFAR1野生型(GPR40^{WT})およびGPR40^{KO}の雌性マウス(8-12週齢)を使用した。情動行動は、高架式十字迷路試験(EPM)などを用いて評価した。出産後のGPR40^{WT}およびGPR40^{KO}における養育行動は、離乳までの期間における育児放棄・喰殺数をカウントした。レトリービング試験では、3匹の仔マウスを巣に戻す時間を測定した。

【結果】EPMにおいて、GPR40^{KO}は、GPR40^{WT}と比較してopen armへの滞在時間が有意に増加した。その他の情動行動試験においても異常行動が観察された。出生後の仔マウスの生存率はGPR40^{KO}は、GPR40^{WT}と比較して、出生後1日目以降から有意に低下した。GPR40^{KO}は、GPR40^{WT}と比較して、育児放棄および喰殺数が増加した。レトリービング試験において、未交配のGPR40^{WT}およびGPR40^{KO}はいずれも同程度のレトリービング行動を示した。出産後のGPR40^{KO}は出産後のGPR40^{WT}と比較して、レトリービング開始時間が有意に遅延した。

【考察】雌性マウスにおいて脂肪酸—GPR40/FFAR1を介したシグナルは、情動・養育行動の制御に重要な役割を果たすことが示めされた。

B-10**ニューロンへの乳酸輸送を介した、神経障害時の痛覚過敏発現に対する脊髄後角アストロサイトの関与**

○宮本啓補、石倉啓一郎、桑和彦、大澤匡弘

名古屋市立大学大学院薬学研究科 神経薬理学分野

【目的】神経障害時に、脊髄後角のアストロサイトでは反応性アストロサイトと呼ばれる形態への変化が見られ、痛覚過敏の維持期に関わることが知られている。また一般にアストロサイトは細胞内の解糖系により生じるL-乳酸をニューロンに輸送する経路であるアストロサイト-ニューロン乳酸シャトル(ANLS)を介して神経伝達の維持に関わる。そこで本研究では、神経障害時の反応性アストロサイトにおいてANLSが亢進し、神経伝達を増幅させることで疼痛維持期のみでなく発症期にも関与すると仮定し検証を行った。

【方法】アデノ随伴ウイルス(AAV)による感染を利用した実験には6-8週令のC57BL/6J系雄性マウスを、その他の実験については6-8週令のddY系雄性マウスを用いた。痛覚閾値はvon Frey testにより測定し、脊髄におけるタンパク質発現については免疫組織化学的方法、およびウエスタンブロット法により評価した。

【結果および考察】アストロサイトのマーカータンパク質であるGFAPのプロモーター下にデザイナー薬物clozapine N-oxide(CNO)により活性化するデザイナー受容体hM3DqをコードしたAAVを脊髄後角に感染させ、脊髄後角アストロサイト選択的な活性化をCNO処置により起こしたところ、機械痛覚閾値が低下し、L-乳酸の取り込みや放出を行うモノカルボン酸トランスポーター(MCT)阻害薬である α -cyano-4-hydroxycinnamate(4-CIN)により抑制された。また、L-乳酸の脊髄くも膜下腔内投与により機械痛覚閾値が低下し、これはL-乳酸をピルビン酸に変換する酵素LDHの阻害薬isosafrole、アデニル酸シクラーゼの阻害薬NB001、PKAの阻害薬KT5720、および4-CINにより抑制された。また、L-乳酸の投与により痛覚伝達の亢進に関与するcAMP response element binding protein(CREB)、および細胞骨格の脱重合を起こすコフィリンのリン酸化が亢進し、これらは4-CINにより抑制された。以上の結果より、神経障害による痛みはANLSの亢進によるニューロンへのL-乳酸の過剰供給により生じることが示唆された。

マウス脊髄後根神経節細胞におけるHMGB1誘起神経突起伸長とそれに対する遺伝子組み換えヒト可溶性thrombomodulinの効果

○中武ゆい¹、関口富美子¹、坪田真帆¹、辻田隆一^{1,2}、本田剛一²、川畑篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²旭化成ファーマ

傷害時や炎症時に種々の細胞から放出されるdamage-associated molecular patterns (DAMPs) の1つである核内タンパクhigh mobility group box1 (HMGB1) は、N末端側から23、45、106番目に3つのシステイン残基 (Cys) を有しており、全てのCysがチオール型であるall-thiol- HMGB1 (at-HMGB1) およびCys23とCys45がジスルフィド結合したdisulfide-HMGB1 (ds-HMGB1) は、それぞれreceptor for advanced glycation endproduct (RAGE) およびToll-like receptor 4 (TLR4) を活性化し炎症反応や痛みを増強する。一方、血管内皮細胞に発現するthrombomodulin (TM) はHMGB1を吸着し、thrombinによるHMGB1の分解を促進する。ラット脊髄後根神経節 (DRG) 細胞においてHMGB1が神経突起伸長に関与するとの報告があることから、本研究では、マウスDRG細胞におけるat-HMGB1とds-HMGB1の神経突起伸長効果を比較検討し、それに及ぼす遺伝子組み換えヒト可溶性TM (TM α) およびthrombinの影響を調べた。マウスから採取したDRG細胞を培養し、HMGB1による神経突起伸長を観察した。その結果、ds-HMGB1は無効であったが、at-HMGB1は刺激24~72時間で神経突起伸長を有意に促進した。このat-HMGB1の効果にDRG細胞の大きさによる違いはほとんど認められなかった。また、at-HMGB1誘起神経突起伸長はRAGE阻害薬FPS-ZM1によって完全に阻止された。TM α は100 nMでat-HMGB1誘起神経突起伸長を有意に抑制したが、1~10 nMでは有意な抑制効果を示さなかった。Thrombinは0.1~1 U/mlの単独刺激ではat-HMGB1による神経突起伸長を抑制しなかったが、10 nMの TM α 存在下では、1 U/mlで強力な抑制効果を示した。以上より、マウスDRG由来神経細胞において、ds-HMGB1は効果を示さないが、at-HMGB1はRAGEを介して神経突起伸長を促進すること、また、TM α は高濃度では単独で、低濃度ではthrombinとの協働作用によってat-HMGB1を不活性化し神経突起伸長を抑制することが示唆された。

TRPM2を介したケモカインCXCL2産生が多発性硬化症の増悪に関与する

○平瀬僚、筒井真人、永安一樹、白川久志、金子周司

京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野

【背景】代表的な中枢性脱髄疾患であり、慢性的な炎症応答を伴う多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、末梢リンパ球の中核への浸潤を抑制する薬剤が一定の効果を発揮しているものの、感染症や徐脈などの重篤な副作用が報告されていることから、新たな作用機序に基づく創薬が強く望まれている。TRPM2は活性酸素感受性TRPチャネルであり、脳や免疫系細胞に広く分布する。これまでに当研究室では、マクロファージやミクログリアに発現するTRPM2がCXCL2やiNOS産生を媒介し、神経障害性疼痛などの炎症性疾患の病態に寄与することを明らかにしてきた。そこで本研究では、MSにおけるTRPM2の病態生理学的役割を検討した。【方法】実験にはC57BL/6系雌性の野生型およびTRPM2-KOマウス (7-9週齢) を用いた。MOG35-55ペプチドおよび免疫賦活剤を含むエマルジョンをマウス背側部に皮下投与することにより、MS病態を模した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を惹起した。臨床スコアは病態の悪化に応じて7段階で評価し、摘出したL3-L5の脊髄を用いて定量的RT-PCR、ELISA、組織学的評価を行った。【結果・考察】野生型EAEマウスにおける臨床スコアの上昇は、TRPM2-KOマウスでは顕著に抑制された。TRPM2阻害作用を有するミコナゾールの発症後投与によってもEAE臨床スコアの上昇は顕著に抑制された。免疫惹起21日目のEAEマウス脊髄におけるT細胞の浸潤や特徴的転写因子の増大はTRPM2-KOにより影響を受けなかった。一方、病態早期である免疫惹起14日目のEAEマウス脊髄における各種炎症性サイトカインやケモカインのうちCXCL2産生・遊離がTRPM2-KOにより特異的に減弱していた。また、マクロファージ/ミクログリアの指標であるIba1免疫活性の上昇や、好中球と想定されるGr1陽性細胞の浸潤がTRPM2-KOにより減弱していた。以上の結果より、TRPM2はEAE病態の悪化に関与し、その病態形成メカニズムには、マクロファージ/ミクログリアに発現するTRPM2によるケモカインCXCL2の産生・遊離、および好中球の局所浸潤が寄与すると考えられる。

B-13

コンドロイチン硫酸抗体CS-56を用いたウェスタンブロット法によるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの評価

○長瀬 春奈¹、平田 洋子¹、Herbert M Geller²、Yasuhiro Katagiri²

¹岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科 創薬科学専攻、²NHLBI NIH

コンドロイチン硫酸やヘパラン硫酸のような硫酸化した直鎖状糖鎖は、プロテオグリカンとして細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、細胞の生物学的機能を調節している。直鎖状糖鎖の生物活性は、分子量、糖組成や結合によって左右される。中でも硫酸基に由来する負電荷は、直鎖状糖鎖が持つ最も重要な特性である。細胞内におけるシグナル伝達を調節するリン酸化に対して、硫酸化は細胞-細胞や細胞-細胞外マトリックスのような細胞外のシグナル伝達を調節し、神経軸索伸長やその再生にも関与している。

モノクローナル抗体であるCS-56は、コンドロイチン硫酸を評価するために1980年代からこれまで、主に免疫組織化学染色を用いた研究に使用されて来た。CS-56がアイソタイプIgMの糖鎖に対する抗体であり、実験操作が煩雑であることから、ウェスタンブロット法での再現性は低く、検出したバンドがコンドロイチン硫酸由来であるか正しく評価されていなかった。

本研究では、CS-56を使用したウェスタンブロット法を改良し、マウス脳組織溶解物の評価を可能とした。さらに、コンドロイチン硫酸分解酵素であるコンドロイチナーゼABCと糖鎖還元末端を認識する抗体であるMAB2030を利用し、検出したバンドのコンドロイチン硫酸特異性を示した。また、生体内で硫酸基のドナーとして働く3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸の阻害剤である塩素酸ナトリウムによって硫酸修飾が阻害されたラット副腎髄質由来PC12細胞のサンプルにおいても、塩素酸ナトリウムの濃度依存的なバンド強度の減少を検出することに成功した。

B-14

松果体Ca²⁺活性化Cl⁻チャネルを構成するTMEM16AとTMEM16Bのホモ・ヘテロ複合体の電流特性

○萩原由実子、山村寿男、西村歌織、鈴木良明、今泉祐治

名古屋市大・院薬・細胞分子薬効解析学

松果体はメラトニン分泌を介してサーカディアンリズムを調節する器官である。松果体細胞に発現している数種類のイオンチャネルがメラトニン分泌制御に寄与していることが知られている。我々は、ラット松果体において、Ca²⁺活性化Cl⁻ (Cl_{Ca}) チャネル阻害薬がノルエピネフリン誘発性メラトニン分泌を抑制することを見出した。また、ラット松果体細胞において、Cl_{Ca}チャネルを構成するTMEM16AとTMEM16Bの機能発現を認めた。

さらに、それらの分子がホモ複合体だけでなく、ヘテロ複合体としても存在していることが示唆された。本研究では、ラット松果体よりクローニングしたTMEM16AとTMEM16BをHEK293細胞に共発現させて、松果体Cl_{Ca}電流を再構築することを目指した。まず、TMEM16AまたはTMEM16BをHEK293細胞に単独発現させた。TMEM16Aチャネルは、比較的高いCa²⁺感受性 (~0.3 μM)、脱分極刺激による緩やかな活性化 (τ_{act} ~ 250 ms) と脱活性化 (τ_{deact} ~ 150 ms) を示した。一方、TMEM16Bチャネルは、低いCa²⁺感受性 (>1 μM)、脱分極刺激による速やかな活性化 (τ_{act} ~ 20 ms) と脱活性化 (τ_{deact} ~ 10 ms) を示した。しかし、それらの電流特性は、松果体Cl_{Ca}電流のもの (τ_{act} ~ 90 ms, τ_{deact} ~ 85 ms) と異なっていた。次に、TMEM16AとTMEM16BをHEK293細胞に1:2で共発現させたところ、そのCl_{Ca}電流特性は、松果体Cl_{Ca}電流のものと類似していた。さらに、TMEM16AとTMEM16Bのタンデム体を作製してHEK293細胞に発現させたところ、TMEM16AとTMEM16Bの中間的な特性を有するCl_{Ca}電流が観察された。以上より、ラット松果体細胞において、TMEM16AとTMEM16Bがホモ複合体に加えて、ヘテロ複合体としてもCl_{Ca}チャネルを構成している可能性が示唆された。Cl_{Ca}チャネルを構成する分子の多様性が、メラトニン分泌を含む松果体機能の最適化に寄与している可能性が考えられる。

神経活動依存性プロトカドヘリン Arcadlin の2つのスプライスバリエーションの発現を検討する

○井次陸¹、高屋拓伸¹、高坂和芳¹、杉浦弘子²、安田新²、山形要人²、田中秀和¹

¹立命大院・生命・薬理、²都医学研・シナプス可塑性

神経活動依存的に脳海馬の神経細胞に誘導されるプロトカドヘリン Arcadlin (Acad/protocadherin-8) は、カドヘリンスーパーファミリーの一つであり、樹状突起スパイン密度を減少させる。Acad 遺伝子は哺乳類で高度に保存されており、その転写産物に short variant (Acad-s) と long variant (Acad-l) が存在することも、多くの哺乳類で共通している。一方で、それらの発現比や機能的差異は明らかではない。我々は海馬で神経活動が起きたとき、タンパク質および mRNA レベルで両バリエーションの発現がどのように変動するかを調べた。脳海馬における神経活動時の Acad mRNA の発現を検討するために、ICR マウス (6週齢、♂) に電気けいれん (electroconvulsive seizure, ECS) を誘発し、0.5 ~ 4時間後に total RNA を抽出して逆転写後、各バリエーションの発現量を定量的 PCR により比較した。同様に ECS 誘発後、0.5 ~ 8時間後に取り出した海馬からタンパク質を抽出して western blot を行った。ECS 後2時間をピークに、Acad-s mRNA が強く誘導され、Acad-l mRNA 誘導は弱かった。また刺激後4時間をピークに ACAD-S と推定されるタンパク質が強く誘導され、ACAD-L タンパク質は発現に変化がなかった。本実験により、ECS で誘発される神経活動によって mRNA およびタンパク質で Acad-s が優位に誘導される可能性が示唆された。Acad-l については発現に変化がなかったため、ECS に対する応答性は低いと考えられる。両バリエーションの塩基配列を比較すると、Acad-l は Acad-s に比べて第1エクソンの5' 末端側に 291 bp の挿入があるが、それ以外はすべて共通している。このことから、両バリエーション間で mRNA の安定性や一方のバリエーションへスプライシングが片寄っている可能性がある。また、先行研究で胎生10日マウスでは Acad-l mRNA は頭部にのみ発現するという報告があり、胚発生期でスプライスバリエーションの発現比が異なるかを検討している。

高血糖誘発性心不全の改善メカニズムにおけるTRPC6チャネルの役割

○小田 紗矢香^{1,2}、富田 拓郎^{1,2}、北島 直幸^{1,3}、外山 喬士^{1,3,4}、原田 英里⁵、島内 司^{1,3}、西村 明幸^{1,2}、石川 達也^{3,5}、熊谷 嘉人⁴、Lutz Birnbaumer^{6,7}、西田 基宏^{1,2,3,8}

¹生理研・岡崎統合バイオサイエンスセンター・心循環シグナル、²総研大・生理科学、³九州大院・薬・創薬育薬研究、⁴筑波大・医学医療・環境生物学、⁵味の素株式会社、⁶Laboratory of neuroscience, NIEHS, NIH、⁷Institute for Biomedical Research (BIOMED)、⁸JSTさきがけ

高血糖に伴う心不全において、過剰な活性酸素 (ROS) の産生が主たる原因として知られている。我々は最近、圧負荷による心線維化を引き起こす過剰なROS産生に、非選択的カチオンチャネルtransient receptor potential canonical (TRPC) 3とNADPH oxidase 2 (Nox2) の複合体形成によるNox2タンパク質の安定化が重要な役割を果たすことを明らかにした。TRPC3と同じチャネルファミリーに属するTRPC6はTRPC3と類似した構造・活性化機能を有し、TRPC3とヘテロテトラマー形成により機能的なチャネルを構成し得ることも報告されている。しかしながら、TRPC6の心臓における酸化ストレス蓄積への関与は明らかにされていなかった。我々は、TRPC6の欠損は、圧負荷による心線維化をTRPC3欠損と同様に有意に抑制するが、心機能の増悪化や酸化ストレスを抑制しないことを見出した。一方、圧負荷後の心臓における炎症性サイトカインの発現が、TRPC6欠損マウスにおいてはWTマウスおよびTRPC3欠損マウスよりも顕著に上昇していた。また、ストレプトゾトシン処置により1型糖尿病を発症したTRPC6欠損マウスはWTマウス、TRPC3欠損マウスと比較して心機能が増悪し、尿中・心臓における酸化ストレスが有意に上昇していた。高血糖状態になったマウスの心臓では、TRPC6のmRNA発現量は増加し、Nox2のタンパク質発現量は減少していた。初代ラット心筋細胞においても、高グルコース条件下 (25 mM) で培養した細胞においては、低グルコース条件下 (5.5 mM) で培養した細胞よりも、TRPC6のmRNA発現が上昇し、Nox2タンパク質発現が低下していた。さらに、TRPC6の発現低下は、高血糖条件における酸化ストレスの上昇、炎症性マーカーmRNAの発現を上昇させることも見出した。以上の結果から、高血糖時のTRPC6の発現上昇は、TRPC3-Nox2複合体形成を阻害しNox2の発現を抑制することで、高血糖誘発性心不全において心保護作用を有することが示唆された。

血管平滑筋におけるカベオラと筋小胞体膜間のシグナル伝達-変換機構を効率化させるCa²⁺マイクロドメイン基盤分子の解明

○佐伯尚紀¹、鈴木良明¹、山村寿男¹、竹島浩²、今泉祐治¹

¹名古屋市大・院薬・細胞分子薬効解析学 ²京都大・院薬・生体分子認識学

平滑筋細胞では、リアノジン受容体 (RyR) を介した筋小胞体 (SR) からの自発Ca²⁺放出 (Ca²⁺スパーク) が、近傍の細胞膜 (PM) 上に発現するBK_{Ca}チャネルを活性化させ、自発一過性外向き電流 (STOCs) を惹起する。この電流は、膜電位を過分極させて筋緊張を抑制的に制御する。我々は、脂質ラフトの一種のカベオラが、この機構を効率化する中心的構造として機能する可能性を報告してきた。本研究ではさらに、カベオラとSRを結び付ける因子として、平滑筋での機能が未解明な構造タンパク質・ジャンクトフィリン (JP、筋発現型; JP2) に着目した。JP2は横紋筋では横行小管とSR膜間を架橋する。一方、横行小管が存在しない平滑筋では、JP2はカベオラとSR膜間を架橋すると仮定し、平滑筋におけるJP2機能の解明を目指した。これまで、JP2とcav1 (カベオラ構成因子、カベオリン1) の物理的な相互作用を報告した。そこで本研究では、カベオラとSR間の機能的な相互作用におけるJP2の役割を解析した。

まず、JP2をノックダウンしたマウス血管平滑筋細胞 (mVSMCs) を使用し、二重免疫染色したcav1とRyRの局在を全反射蛍光顕微鏡によって分子群レベルで解析したところ、共局在率が対照群と比較して有意に減少した。生細胞を用いたCa²⁺イメージングおよびパッチクランプ法では、Ca²⁺スパークやBK_{Ca}チャネル自体の活性に減少は見られなかったが、一方でSTOCsの電流量は有意に減少した。また、カベオラ構造が欠損したcav1ノックアウトマウス由来のmVSMCsでは、JP2とBK_{Ca}チャネルの共局在率、及び分子集積効率が、野生型由来と比較して有意に減少していた。

以上より、血管平滑筋においてJP2はカベオラとSRを結び付け、SRからのCa²⁺シグナルをPM上で電気的シグナルに効率良く変換するCa²⁺マイクロドメインの形成に重要な役割を果たすことが示された。

低酸素培養下におけるHIF-1 α -Dynamin2-Kir2.1シグナルは、脳血管内皮細胞の細胞増殖亢進に寄与する

○山村 英斗¹、鈴木良明¹、山村寿男¹、浅井清文²、今泉祐治²

¹名古屋市大・院薬・細胞分子薬効解析学 ²名古屋市大・院医・分子神経生物学分野

【背景】血液脳関門は脳血管内皮細胞 (BECs) から構成され、循環血液中から脳への物質の移行を制限することで、脳の恒常性維持に重要な役割を果たしている。低酸素ストレスによるBECsの異常な細胞増殖亢進が、血液脳関門を崩壊させ、低酸素脳症の悪化に関与することが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。当研究室では、低酸素ストレスがBECsにおけるKir2.1チャネルmRNA発現量を変化させることなく、タンパク質発現を上昇させていること、そして、このKir2.1発現上昇がストア作動性Ca²⁺流入の増大を介し、BECsの細胞増殖亢進に寄与することを見出した (Yamamura H et al., BBRC, 2016)。本研究では、低酸素培養下BECsの細胞増殖亢進に重要なKir2.1チャネルのタンパク質発現上昇機構の解明を目的とした。

【方法】ウシ脳血管内皮細胞株t-BBEC117細胞を、低酸素条件下 (4~5% O₂) で72時間培養した。定量的PCR/ウエスタンブロッティング法とホールセルパッチクランプ法により、HIF-1 α 、Dynamin2、Kir2.1の発現及び活性変化を解析した。

【結果・考察】Kir2.1などの膜タンパク質の細胞内局在を制御する分子であるDynamin2の発現を調べたところ、低酸素培養によりmRNA及びタンパク質発現が上昇した。Dynamin阻害薬は、低酸素ストレス誘発性のKir2.1電流密度及び細胞膜発現上昇を有意に抑制した。そして、Bimolecular Fluorescence Complementation法により、117細胞においてDynamin2とKir2.1は分子間相互作用することが明らかになった。また、低酸素培養によるHIF-1 α タンパク質の発現低下がDynamin2の発現上昇に寄与していた。低酸素培養によるHIF-1 α 、Dynamin2を介したKir2.1活性増大がBECsの細胞増殖の異常亢進を生じさせることから、この機構が低酸素脳症における血液脳関門破綻メカニズムの一端を担う可能性が示唆された。

B-19**大動脈粥状硬化症における熱ショックタンパク質発現誘導の影響**

○森田裕奈 林勝己 橋川成美 橋川直也

岡山理大学院・理・臨床

【背景と目的】分子シャペロンはタンパク質の立体構造の形成や、変性タンパク質の修復などに関与し、その一種である熱ショックタンパク質（HSP）は、熱や紫外線などの様々なストレスによって発現量が増加して、変性タンパク質の修復・保護を行っている。本研究は、HSP発現と大動脈粥状硬化症の進行の関係を明らかにするために、動脈硬化症自然発症マウスであるApoE欠損マウスにHSP発現誘導剤として知られているGeranyl-geranyl acetone (GGA) の投与を行い、大動脈粥状硬化症進行にHSPがどのような影響を与えるのか解析を行った。

【方法】大動脈硬化症を発症前（5週齢）から5週間 HSP発現誘導を行った群と、大動脈硬化を発症後（10週齢）から5週間 HSP発現誘導を行った群の2群の解析を行った。HSP発現誘導の方法はGGA（800 mg/kg/day）を与える方法と、41°C30分の温浴を週に2回行う方法の2通りで行った。それぞれ大動脈を摘出後、oil red O染色を行い大動脈硬化の進行を評価した。また、大動脈硬化を発症後（10週齢）にHSP発現誘導剤であるGGAを与え、24時間後にHSPおよび炎症性サイトカインであるIL-6、接着因子であるIcam、Vcamなどの発現解析をリアルタイムPCR法によって行った。

【結果・考察】ApoE欠損マウスにおいて、大動脈硬化症発症前にHSP発現誘導を行うと大動脈硬化の進行が抑制された。しかし、大動脈硬化発症後のHSP発現誘導は大動脈硬化を著しく進行させた。また、大動脈硬化発症後（10週齢）のHSP発現誘導は炎症性サイトカインや接着因子を有意に増加させた。以上のことから、大動脈硬化症においてHSPは、発現誘導する時期によって全く異なる影響を与えること可能性が示唆され、大動脈硬化発症後においてHSPは、大動脈での炎症を促進させ、動脈硬化を悪化させていると示唆される。

B-20**Proteinase-activated receptor-1阻害による腎保護**

○Guan Yu¹、中野大介¹、Liu Wenhua²、Yifan Zhang¹、Lei Li¹、人見浩史¹、平野勝也²、西山 成¹

¹香川大学医学部薬理学・²同自律機能生理学

【目的】本研究はProteinase-activated receptor-1（PAR1）の腎障害進展における役割と、阻害薬の腎保護効果について検討した。

【方法】雄性Balb Cマウスにdoxorubicin（15 mg/kg, i. v.）を投与したネフローゼモデルに対し、溶媒（n=5）あるいはPAR1拮抗薬Q94（5 mg/kg/day, s. c., n=5）を2週間投与し、各種腎障害パラメーターを検討した。糸球体組織はレーザーキャプチャー法にて採取した。また、培養マウス不死化ポドサイトにおいてfura-2を使用して細胞内カルシウム濃度を測定し、caspase-9にてアポトーシスの評価を行った。

【成績】糸球体組織中のPAR1遺伝子発現量は尿中アルブミン排泄と正の相関を示した。Q94の投与は、尿中アルブミン排泄量の増加、ならびに血漿クレアチニン値の増加は有意に抑制した。また、同時にdoxorubicinの投与による糸球体組織中のポドシン・ネフリンの遺伝子発現量の減少を抑制した。さらに、Q94はdoxorubicinによって生じる糸球体ポドサイト障害（デスミン陽性部位）と糸球体硬化病変（PAS陽性面積増加）を有意に抑制した。このようなQ94の作用は、腎組織中4-HNE陽性部位の減少を伴っていた。培養ポドサイトにはPAR1が有意に遺伝子レベルで発現しており、トロンビン投与（1 U/mL）による細胞内カルシウム濃度の上昇、ならびにdoxorubicin投与（0.5 μmol/L）によるcaspase-9活性の上昇を認めたが、いずれもQ94により抑制された。

【結論】以上の結果より、PAR-1と腎障害の関連が示唆され、Q94によるPAR1の阻害は腎障害進展、特に糸球体障害の進展を抑制することが示された。

B-21**セピアプテリン還元酵素遺伝子ノックアウトマウスの血圧変動の機序**

○一瀬(鷺見)千穂¹、菅沼由唯¹、狩野泰輝¹、井平典子¹、野村裕子²、池本和久¹、
畑 忠善²、加藤節子³、一瀬 宏⁴、近藤一直¹
¹藤田保衛大・医・薬理、²藤田保衛大・医療・臨床検査、³明海大・歯、
⁴東工大・院・生命理工

【目的】 (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4) はモノアミンおよび一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) に必須のコファクターであり、セピアプテリン還元酵素 (SPR) はBH4生合成の最終段階を触媒する。Spr^{-/-}マウスは変動の大きい高血圧と徐脈を示した。その機序を明らかにする。

【方法】 Spr^{-/-}マウス (OYC32) はLexicon Pharmaceuticals Incで作製された。マウス血圧はTail-Cuff法で測定した。血管弛緩反応は、マウス胸部大動脈リング標本をオーガンバス中でPhenylephrin (Phe) によって前収縮させ、Acetylcholine (ACh)、およびNOS阻害薬存在下でSodium Nitroprussideを累積投与しておこなった。ペントバルビタール麻酔下に心電図を記録し、heart rate variability (HRV) を測定した。17時間絶食時の血糖値はHK-G6PDH法で測定した。絶食時および給餌1時間後の血圧を測定し、変化を比較した。

【結果】 Spr^{-/-}マウス大動脈リング標本はPheで野生型マウスに比べて強い張力を生じたが、高濃度K⁺添加時の張力で補正するとその差は有意ではなかった。AChに対する内皮依存性弛緩反応は減弱していた。HRVの解析では交感神経系入力が増大を示すLF/HF、LF/TFが高値であった。Spr^{-/-}マウスは17時間絶食時、著明な低血糖を示した。Spr^{-/-}マウスの血圧は、給餌後絶食時に比べて低下する傾向があった。

【考察】 Spr^{-/-}マウス血管の収縮性の増大は α 受容体の機能亢進とは異なる機序と考えられた。交感神経系と副交感神経系のImbalance、NO産生障害により血管の弛緩性が低下していることが高血圧の原因であろうと推測される。給餌により血糖値が変化すること、あるいは消化管への刺激は血圧を変動させる一因となる可能性がある。

B-22**虚血性網膜症マウスモデルにおける異常網膜血管新生に対するapelin受容体APJアンタゴニストの抑制作用**

○石丸 侑希、柴垣 郁弥、金沢 裕美、四斗邊 学、小西 寛子、藤井 雄也、
山室 晶子、吉岡 靖啓、前田 定秋
摂南大学 薬学部 薬物治療学

【目的】 増殖性糖尿病網膜症などの虚血性網膜症では、網膜において脆弱な異常血管が新生し、これらの破綻が原因で失明に至る。現在、この異常な血管新生の抑制を目的として、血管内皮増殖因子 (VEGF) の阻害療法が用いられているが、本治療法は、効果的な治療効果を示す一方で、正常血管に障害を与えることが知られている。これらの背景より、異常血管新生を特異的に抑制する治療薬の開発が強く求められている。これまでに我々は、虚血性網膜症マウスモデルを用いた研究において、異常血管新生に伴い網膜のapelin発現が著明に上昇することや、apelin受容体APJが網膜血管内皮細胞に高発現していることを明らかにした。そこで今回、虚血性網膜症で生じる異常網膜血管新生に対するAPJアンタゴニストML221の効果について検討した。

【方法】 虚血性網膜症マウスモデルには、Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) モデルを用いた。網膜血管内皮細胞は、イソレクチンB4染色により検出した。ML221 (10 mg/kg) およびVEGFR2阻害剤SU1498 (9 mg/kg) は、OIRモデルの生後12日齢 (P12) からP16まで1日1回腹腔内投与し、P17における網膜血管像を解析した。

【結果および考察】 OIRマウスモデルのP17の網膜では、異常血管新生および無血管領域が広くみられた。OIRモデルへのML221の投与は、異常血管新生を抑制し、さらに無血管領域を減少させた。一方、SU1498の投与は、異常血管新生を抑制したが、無血管領域の大きさには影響を与えなかった。以上の結果より、APJアンタゴニストは、VEGFR2阻害剤と比較して、虚血性網膜症で生じる異常血管新生を特異的に抑制できることが示され、APJアンタゴニストが虚血性網膜症に対する新たな治療薬となる可能性が示唆された。

B-23**低酸素環境下における血管内皮細胞の増殖に対するHIFの関与**

○池本和久、菅沼由唯、狩野泰輝、一瀬千穂、近藤一直

藤田保健衛生大学・医・薬理

【目的】近年、生体内における低酸素環境と疾患の関わりが注目されている。我々はこれまでにhypoxia (3% O₂) が血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響を検討してきており、hypoxiaによる細胞増殖促進効果は観察されるまでに一定の時間を必要とすることや、一度生じた促進効果が再酸素化しても一定時間持続することを明らかにしてきた。今回、低酸素応答に関与する主要な転写因子であるHIF (hypoxia-inducible factor) に着目し、その細胞増殖への関与について検討した。

【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) は本学の疫学・臨床研究倫理審査委員会で承認された方法に則って臍帯からコラゲナーゼ法により採取したものを使用した。Hypoxia環境は、培養器内部の酸素濃度を窒素ガスにより3%に低下させた条件を用いた。HUVECを低血清培地 (1%FBS) で24時間培養した後、hypoxia下での培養を行って通常酸素環境下 (normoxia) で培養した細胞と比較した。HIFの阻害薬であるchrysin、あるいはHIF分解を阻害することでHIFの作用を強めることが報告されているquercetinの添加は、前培養後の本培養開始と同時にを行った。細胞数は、培養終了後にエタノール固定とHoechst 33342による核染色を行い、細胞核の数を直接計数する方法 (直接計数法) により行った。HIFの発現解析はウエスタンブロット法にて行った。

【結果】chrysin (10 μM) およびquercetin (10 μM) は、両者ともhypoxia環境下で72時間培養したHUVECの増殖を抑制した。この抑制はnormoxia環境下でも同様に観察された。現在、ウエスタンブロットによるHIF発現解析を検討中である。

B-24**間歇的低酸素暴露によるインターロイキン-6の発現増加を介した上皮成長因子の遺伝子発現**○京谷陽司¹、趙晶¹、高沢伸²、吉栖正典¹¹奈良医大・医・薬理学、²奈良医大・医・生化学

【背景】閉塞性睡眠時無呼吸 (obstructive sleep apnea; OSA) は、睡眠時における血中酸素分圧の低下と飽和を繰り返す間歇的低酸素症 (intermittent hypoxia; IH) を特徴とし、アテローム性動脈硬化の危険因子であることが知られている。我々は、以前IHが上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) ファミリーとその受容体であるerbB2受容体の増加を介して培養ラット大動脈血管平滑筋細胞の増殖を促進させることを報告した。しかしながら、IHによるEGFファミリー誘導メカニズムは不明である。近年、我々は脾臓のB細胞においてIHがinterleukin (IL) -6 mRNAを誘導することを報告している。そこで本研究では、ヒト冠動脈血管平滑筋細胞を用いてIHによるIL-6の発現およびEGFファミリーであるepiregulin (EREG) の発現へのIL-6の影響を検討した。【方法】細胞の各暴露条件は、normoxia (21%O₂, 5%CO₂)、sustained hypoxia (1%O₂, 5%CO₂) 又はIH (10 min normoxiaと5 min sustained hypoxiaを繰り返す) とした。各mRNAの発現定量および発現抑制は、それぞれquantitative RT-PCRおよびsiRNAにて行った。IL-6刺激による検討は、normoxiaにて行った。細胞培養液中のIL-6の定量にはELISA法にて行った。【結果】IH暴露群 (72サイクル; 24時間) ではEREG mRNAの発現がnormoxia群のそれと比較して有意に増加したが、sustained hypoxia群では増加しなかった。また、IL-6 mRNAの発現量はIH暴露のサイクル数依存的に増大した (3~72サイクル; 1~24時間)。細胞培養液中におけるIL-6は、IH暴露 (18~72サイクル) により50 ng/mL以上まで増加した。100 ng/mL IL-6にて細胞を刺激するとEREG mRNAの増加を認めた。IL-6またはIL-6受容体に対するsiRNAによりIHによるEREG mRNAの発現誘導が有意に抑制された。【結語】IHがIL-6を誘導することで、血管平滑筋細胞の増殖において重要な役割を担うEREGの発現を引き起こすことが示唆された。OSA患者におけるアテローム性動脈硬化の進展には、IL-6によるEREGの発現増加が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

○堀ノ内 裕也¹、池田 康将¹、石澤 有紀¹、今西 正樹²、座間味 義人^{2,3}、
武智 研志⁴、石澤 啓介^{2,3}、土屋 浩一郎⁵、玉置 俊晃¹

¹徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野 ²徳島大学病院薬剤部

³徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床薬理学分野 ⁴徳島大学病院臨床試験管理センター

⁵徳島大学大学院医歯薬学研究部医薬品機能生化学分野

【背景】近年、凝固カスケードにおいて重要な役割を果たす第Xa因子 (Factor Xa:FXa) が炎症に関与すること並びにFXa阻害剤が糖尿病性腎症や動脈硬化などにおいて保護効果を示すことが報告された。慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease:CKD) における腎機能低下にはマクロファージ浸潤による炎症反応を介した腎間質線維化が深く関わっているが、腎間質線維化におけるFXaの関与並びにFXa阻害剤の効果は明らかにされていない。

【目的】本研究では、片側尿管結紮 (Unilateral Ureteral Obstruction:UUO) 誘導腎間質線維化モデルマウスを用いて、腎間質線維化におけるFXa阻害剤エドキサバンの効果を検討した。

【方法】C57BL/6Jマウスをsham群、UUO群、UUO+エドキサバン群の3群に割り付け、UUO作製1週間後に腎臓を評価した。エドキサバンは、1日1回経口投与した。

【結果】UUO作製1週間後、FX、FXa受容体であるprotease-activated receptor (PAR) -1、PAR-2の発現がsham群と比較してUUO群で有意に増加していた。エドキサバン投与は、UUO群で上昇したTGF- β 、collagen I、IIIならびにfibronectinの発現を抑制した。加えて、エドキサバン投与はUUO群で上昇したIL-1 β やTNF- α などの炎症性サイトカインの発現を抑制した。免疫組織化学染色において、UUO群における腎間質線維化とマクロファージ浸潤をエドキサバン投与が抑制することを確認した。

【結論】以上の結果から、FXa阻害剤エドキサバンが抗炎症作用を介してCKDにおける腎間質線維化を抑制する可能性が示唆された。