

C-1

骨芽細胞におけるオピオイド増殖因子受容体シグナルの生理的役割

○田中 健二郎、戸苺 彰史

愛知学院大学歯学部薬理学講座

【背景と目的】骨形成を担う骨芽細胞には種々の受容体が発現していることが知られ、その生理的機能の解明が進められている。今回、我々はオピオイド受容体に着目し研究を行ったところ、骨芽細胞では通常のオピオイド受容体 (μ -、 κ -、 δ -受容体) に比し、オピオイド増殖因子受容体 (OGFR) が強く発現していることを見出した。OGFRは、通常のオピオイド受容体とは構造や機能も異なり、核周囲に局在している受容体である。OGFRは多くのがん細胞で発現が確認されており、細胞増殖に関与することが報告されている。現在までに、がん細胞での研究は進展しているものの、骨芽細胞等における生理的役割についてはほとんど知られていない。本研究では、骨芽細胞におけるOGFRシグナルの生理的役割を細胞実験および動物実験で検討した。【方法】細胞実験では、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞を、OGFRの作動薬であるメチオニン・エンケファリン (Met5) や遮断薬であるナルトレキソン (NTX) で処理した際の細胞増殖活性をWST法で、細胞増殖関連遺伝子の発現変動をリアルタイムPCR法で解析した。動物実験では7週齢ICR雄性マウスに、NTX (0.1 mg/kg、1 mg/kg) を28日間腹腔内投与し、対照群には生理食塩水を投与した。投与終了後、摘出した大腿骨の μ CT解析と脛骨の骨形態計測解析を行った。【結果】MC3T3-E1細胞をMet5で処理すると、p21遺伝子発現の増加と細胞増殖活性の低下がみられた。一方、NTX処理では細胞増殖が促進する傾向にあった。また、マウスにNTXを28日間投与したところ、NTX投与群 (0.1 mg/kg) では対照群と比較してBV/TV (骨量/組織量) 値の有意な増加を認めた。さらに、骨形態計測解析の結果、NTX投与群ではOb. S/BS (骨芽細胞数/骨表面積) 値の有意な増大がみられた。【考察】以上の結果より、OGFRシグナルの遮断は骨芽細胞増殖の促進を介して骨量の増加に寄与する可能性が示唆された。

C-2

破骨細胞分化誘導系に及ぼすヘリオキサンチン誘導体の影響に関する研究

○犬伏正和、岩城 太、天野 均、大浦 清

大阪歯科大学 薬理学講座

【目的】ヘリオキサンチン誘導体は、MC3T3細胞のALP活性を亢進するスクリーニングにより見出された低分子化合物である。BMP様作用を持ち骨芽細胞分化・骨形成亢進に関与することが報告されている。本研究は、ヘリオキサンチン誘導体の *in vitro*での破骨細胞分化過程における影響を明らかにする目的で行った。

【方法と結果】ddY系マウスの大腿骨、脛骨から調整した造血幹細胞に、培養開始時よりヘリオキサンチン誘導体を2または5 μ M添加したものと、非添加の対照群とに分け37°C 5%CO₂, 95% air気相下にて培養した。CSF-1とRANKLを共添加し6日間培養後、破骨細胞を同定した。ヘリオキサンチン誘導体添加群においてTRAP陽性多核細胞及びFアクチンリングを有する細胞の大きさ、数ともに濃度依存的に減少した。また、培養上清中のNO濃度が濃度依存的かつ時間依存的に上昇した。NOのシグナル伝達経路を阻害するグアニル酸シクラーゼ作用阻害剤のODQ[1H - [1, 2, 4]oxadiazolo-[4, 3 - a]quinoxalin-1-one]を添加したところ、破骨細胞分化抑制が解除された。ヘリオキサンチン誘導体による破骨細胞分化阻害にNOが関与している可能性が示唆された。

【結論】ヘリオキサンチン誘導体には、*in vitro*での破骨細胞の分化過程を抑制する効果があることがわかり、骨形成を促進し、骨吸収を抑制する理想的な骨粗鬆症治療薬につながる可能性が示唆された。

C-3

歯周病が進行している歯槽骨に対する、破骨細胞抑制剤(リベロマイシンA)の局所投与の効果の検討

○玉岡佑将、宮澤健、後藤滋巳

愛知学院大学歯学部歯科矯正学講座

【目的】特異的破骨細胞抑制剤であるリベロマイシンA (RMA) はビスフォスフォネートと同様に歯周病の進行抑制剤として注目されている。今回我々は、マウスに歯周病を誘発させ、この破骨細胞の活性を抑制するRMAを用いて、口腔内への直接局所投与によってその効果を検討することとした。

【資料及び方法】生後8週齢の雄性マウスを用い、麻酔下にて、上顎左側第一臼歯、第二臼歯間に0.1mm径の矯正用結紮線を結紮し、実験的歯周病モデルマウスを作成した。結紮後、1日に2回の割合でRMA0.1ml (1.0 mg/kg) を8週間、実験的歯周病モデルマウスに局所注射した。屠殺後、骨形態的、組織学的変化について検討した。

なお、controlとして生理食塩水を投与する群を用いた。

【結果】マイクロCT画像を用いて歯槽骨残存率を計測したところ、RMA群の方がcontrol群よりも歯槽骨残存率は有意に高いことが確認された。一方、組織学的所見においてはRMA群では破骨細胞数や、アタッチメントロスの抑制が有意に認められた。

【考察】RMAの局所投与は歯槽骨の破骨細胞の活性を抑制し、歯周病進行時における歯槽骨吸収を防止する効果があることが示唆された。

C-4

マウス前骨芽細胞におけるビタミンD受容体を介したCa²⁺活性化K⁺チャネルK_{Ca}3.1の活性制御

○鬼頭宏彰、森広晴香、川岸怜子、榊原侑香、大矢 進

京都薬大 薬理

骨組織は、骨形成と骨吸収の動的なバランスにより恒常性が維持されている。ビタミンDは小腸上皮細胞からのCa²⁺吸収を促進することにより骨量の維持に寄与しているが、マウス前骨芽細胞へのビタミンD刺激は細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとされている。中コンダクタンスCa²⁺活性化K⁺チャネル (K_{Ca}3.1) は、細胞内Ca²⁺濃度の上昇により活性化するK⁺チャネルであり、ストア作動性Ca²⁺流入 (SOCE) を介した細胞内Ca²⁺シグナルを制御することで細胞増殖に関与すると考えられる。本研究では、ビタミンD刺激によるマウス前骨芽細胞の細胞増殖抑制における細胞内Ca²⁺シグナル変動とそれに対するK_{Ca}3.1の役割を明らかにすることを目的とした。マウス前骨芽細胞MC3T3-E1におけるK_{Ca}3.1の生理機能を検討するために、SOCEを介したCa²⁺流入に対するK_{Ca}3.1阻害の影響を検討したところ、K_{Ca}3.1阻害薬TRAM-34 (1 μM) 投与によりSOCEを介したCa²⁺流入が有意に抑制された。また、MC3T3-E1の細胞増殖能に対するTRAM-34の効果を検討したところ、培養後72時間においてTRAM-34 (1, 10 μM) 投与により有意に細胞生存能が低下した。次に、ビタミンD刺激によるマウス前骨芽細胞への影響を検討した。活性型ビタミンD3 (Calcitriol) 処置によるK_{Ca}3.1発現変化を検討したところ、Calcitriol (10, 100 nM) 48時間処置によって有意にK_{Ca}3.1 mRNA発現が低下した。Calcitriol処置によるK_{Ca}3.1活性変化を評価するためにDCEBIO (K_{Ca}3.1活性化薬) 誘発性Ca²⁺濃度上昇を測定したところ、対照群と比較してCalcitriol処置群の前骨芽細胞において有意にK_{Ca}3.1活性が低下していた。以上の結果より、ビタミンD刺激によるマウス前骨芽細胞の細胞増殖抑制作用には、K_{Ca}3.1発現・活性の低下が少なくとも一部関与しており、Ca²⁺シグナルの抑制を介して細胞増殖が抑制されることが示唆された。

C-5

矯正的歯の移動に及ぼす交感神経β受容体遮断薬の役割

○佐藤 琢麻¹、宮澤 健¹、戸苅彰史²、後藤滋巳¹

¹愛知学院大学歯学部歯科矯正学講座、²愛知学院大学歯学部薬理学講座

【目的】近年、交感神経系の骨代謝に及ぼす効果が注目されており、骨リモデリングは交感神経系により制御されることが知られている。今回我々は、交感神経系の活動亢進が知られている高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた歯の移動実験を行い、交感神経系が歯の移動時の歯槽骨代謝に及ぼす影響を調べた。

【方法と結果】SHRに非選択的β受容体遮断薬（プロプラノロール）、選択的β1受容体遮断薬（アテノロール）、選択的β2受容体遮断薬（ブトキサミン）を6週間経口投与し、SHRコントロール群およびWistar Kyoto rat（対照ラット）群には生理食塩水を経口投与した。投薬開始2週間後から、上顎門歯と臼歯の間にクローズドコイルスプリングを装着し、4週間牽引を行った。その後、上顎臼歯の移動距離の計測、骨構造解析、組織学的解析を行った。歯を移動させたSHRコントロール群では歯槽骨密度の減少が認められ、歯の移動距離が増加していた。また、プロプラノロール投与群、アテノロール投与群、ブトキサミン投与群では、歯槽骨密度が回復し、歯の移動距離が減少していた。さらに、組織学的解析より、ATN投与群では骨細胞からのスクレロスタチンが減少した結果、骨形成が増加しており、BUT投与群では骨吸収が減少していた。

【結論】交感神経の活動が亢進しているSHRの歯の移動実験において、β受容体の遮断により、歯槽骨密度が改善され、その結果、歯の移動距離が抑制されることが示唆された。

C-6

ビタミンD欠乏による食物感作の促進と食物アレルギーの増悪に関する検討

○實安健市¹、松井照明^{1,3}、山下弘高^{1,2}、田中宏幸^{1,2}、伊藤浩明³、稲垣直樹^{1,2}

¹岐阜薬科大学・薬理、²岐阜大学・院・連合創薬、

³あいち小児保健医療総合センター アレルギー科

【目的】秋冬出生や日光曝露量の不足は、食物アレルギー（FA）の増悪因子として報告されている。その原因として日光照射を介した経皮的なビタミンDの合成不足が推察されるが、ビタミンD欠乏状態とFAとの関連は明らかではない。そこで本研究ではマウスFAモデルを用いて、ビタミンD欠乏が感作や症状を増悪させるか検討した。

【方法】雌性BALB/cマウスをビタミンD欠乏飼料で飼育し、ビタミンD欠乏状態とした。ビタミンDが欠乏した状態で、卵白アルブミン（ovalbumin: OVA）とアジュバントである水酸化アルミニウムゲルの混合物を腹腔内投与することで感作した。その後、OVAを経口投与することでFA症状を誘導した。FAは経時的に採取した血漿中のOVA特異的IgE値、IgG1値、および、OVAの経口投与により誘導される下痢症状によって評価し、ビタミンDが充足している通常飼料で飼育したマウスと比較検討した。

【結果】通常飼料群に比しビタミンD欠乏群では、OVA特異的IgE値、IgG1値、OVA経口投与により誘導されたアレルギー性の下痢スコアならびに下痢症状の頻度において、いずれも高値を示した。

【結論】ビタミンD欠乏状態は食物抗原に対する感作を促進し、FAを悪化させる可能性が示唆された。

皮下免疫療法の効果発現におけるIL-10⁺ Foxp3⁻ CD4⁺ T細胞の関与の可能性

○森榮勇貴、松田将也、小瀬弘尚、堤 達哉、土井加菜、奈邊 健

摂南大学・薬・薬効薬理

【背景】免疫療法は、抗原を長期間反復投与する治療法であり、アレルギー疾患を根治できる可能性が示唆されている。免疫療法の効果発現機序には、制御性T (Treg) 細胞の誘導が関与していると考えられている。Treg細胞には、様々なサブセットが報告されており、核内転写因子Foxp3の発現の有無によって大きく2つに分類できる。しかし、免疫療法の効果発現に関与するサブセットは明らかでない。本検討では、マウスのアレルギー性気道炎症モデルにおいて、皮下免疫療法により肺内にFoxp3⁺ Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T) 細胞ならびにFoxp3⁻ Treg (CD4⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ T) 細胞が増加するか否か検討を行った。

【方法】BALB/cマウスに抗原 (卵白アルブミン、OVA) +Al (OH)₃を腹腔内投与することにより感作後、OVA溶液を4回気管内投与することにより反応惹起を行った。免疫療法は、反応惹起前にOVA溶液 (1 mg/mouse) を3回皮下に投与することにより行った。最終反応惹起後に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、サイトカイン濃度をELISA法により測定した。さらに、左肺を摘出しperiodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い、気管支上皮の肥厚ならびに粘液貯留の程度を解析した。また、最終惹起前に摘出した左肺を酵素処理し、得られた細胞をOVAによりin vitro刺激してIL-10産生細胞をflow cytometryによって検出するとともに、各種表面抗原を解析した。

【結果】皮下免疫療法により、肺へのアレルギー性の好酸球浸潤、BALF中のIL-5およびIL-13の増加、ならびに気管支上皮における粘液貯留がいずれも有意に抑制され、気管支の肥厚は抑制される傾向が認められた。肺組織におけるTreg細胞数に関しては、皮下免疫療法により、Foxp3⁻ Treg細胞数の有意な増加が認められたが、Foxp3⁺ Treg細胞数はほとんど影響を受けなかった。

【考察】皮下免疫療法の効果発現にFoxp3⁻ Treg細胞が関与する可能性が示唆された。

ABCA7欠損肥満細胞における脱顆粒への影響

○浅井遥¹、深見優衣¹、美尾優希¹、藤井理紗子¹、堂前純子²、福石信之¹

1: 金城学院大学 薬学部 薬理学教室 2: 中部大学 応用生物学部 管理栄養

【目的】

以前の我々の検討により、脂質運搬との関連が示唆されるABCA7タンパク質をノックアウトしたマウスから得た肥満細胞 (A7KO) は、分化の程度には違いは見られないが、抗原抗体反応による脱顆粒率が低下することが明らかとなっている。今回、C57BL/6マウスより得た肥満細胞 (WT) とA7KOにおける脱顆粒時の細胞内伝達メカニズムの相違を観察し、脱顆粒率低下の機序について検討を行った。

【方法】

脱顆粒における細胞内伝達経路としては、主に2つの経路が知られている。そこで、各々の経路におけるタンパク質の一つであるSyk及びGab2のリン酸化をwestern blot法を用いて検討した。一方、ABCA7はコレステロールトランスポーターとしての機能が推定されることから、各肥満細胞におけるコレステロール含量を、定法を用いて測定した。

【結果および考察】

抗原抗体反応惹起後のWTでは、SykおよびGab2のリン酸化が見られた。ところが、A7KOでは、Sykのリン酸化は見られたもののGab2のリン酸化はほとんど認められなかった。従って、A7KOにおける脱顆粒率の低下は、Gab2のリン酸化抑制と関連があるものと考えられた。一方、コレステロール含量はWTとA7KOでは違いが認められず、A7KOでの抗原抗体反応による脱顆粒率の低下は、コレステロール含量とは関連がないものと考えられた。ABCA7は、コレステロールトランスポーターとしての機能が推定されているだけでなく、マクロファージやT細胞の増殖に関わるシグナルに関与するなど、他の機能に関する報告も見られることから、A7KOにおけるGab2リン酸化の抑制には、コレステロールトランスポーター以外の機能も関与している可能性があると考えられた。

C-9**熱ショックタンパク質発現誘導は鼻炎モデルマウスの鼻炎症状を緩和する**

○山本紗由美、宇高裕太、橋川成美、橋川直也

岡山理科大学院・理・臨床

[背景・目的]アレルギーとは、免疫反応が過剰に反応するために見られる生体の有害反応のことである。鼻炎はアレルギーの一つで、日本国民の約40%がアレルギー性鼻炎であると言われており、主な症状としては、くしゃみ・水性鼻汁・鼻閉の3主徴が現れる。今回注目した熱ショックタンパク質 (HSP) は、熱や紫外線などのストレスで発現誘導され、変性したタンパク質を修復する分子シャペロンの一つである。しかし、HSPと鼻炎の関係性は明らかになっていない。今回は、マウスに抗原性の強い卵白アルブミンを投与することで鼻炎モデルマウスを作製し、同時にHSPを発現誘導することによって、鼻炎におけるHSPの役割について検討した。また、鼻炎モデルマウス作製後にHSP発現誘導することによる影響についても解析を行った。

[方法]BALB/cCrSlc 5週齢雌マウスにOVAとアジュバンドを混合して1、8、15日目に腹腔内投与し、3週間OVAを朝、夜の2回左右の鼻に鼻腔内投与を行った。その後、行動試験を行い、脾臓のmRNA量 (HSP、サイトカイン)、total IgE量、OVA-IgE量、くしゃみ回数、鼻こすり回数の測定を行った。また、鼻炎モデルマウス作製と同時にGGAを投与する同時投与群と、鼻炎モデルマウス作製後にGGA投与する鼻炎モデルマウス作製後投与群に分けて実験を行った。

[結果・考察]同時投与群では、GGA投与をすることにより、脾臓のHSP25、72の有意な増加が見られた。また、アレルギーで増加するIL-4、5の減少傾向が見られ、total-IgE量およびOVA-IgE量においても、GGA投与により有意な減少が見られた。くしゃみ回数、鼻こすり回数においても、有意な減少が見られたことから、GGA投与によって鼻炎症状が緩和されたと考えられた。さらに、鼻炎モデルマウス作製後投与群でも同時投与群と同様にGGA投与における鼻炎症状の緩和が見られたことから、GGAは抗アレルギー効果を持つと示唆された。

C-10**レンコンに含まれる花粉症発症抑制成分の単離**

○湧川朝治¹、平松美春¹、永峰賢一²、田辺英矢²、篠原啓子³、沢田英司³、
藤野裕道¹、福井裕行⁴、水口博之¹
徳島大学大学院医歯薬学研究部¹分子情報薬理学分野、⁴分子難病学分野、
²(株)ニチレイバイオサイエンス、³徳島県立農業総合技術支援センター

ヒスタミン_{H1}受容体 (H1R) 遺伝子は花粉症の疾患感受性遺伝子であり、抗ヒスタミン薬によるH1R遺伝子発現シグナルの抑制により症状が改善される。しかし、抗ヒスタミン薬の効果が部分的であることから抗ヒスタミン薬により抑制されない花粉症発症に関与するシグナル経路の存在が予想され、我々はそれがNFATシグナルを介したIL-9遺伝子発現シグナルであることを明らかにしてきた。一方、我々は、抗アレルギー効果の伝承のあるレンコン節部の抽出物がH1R遺伝子発現は抑制しないが、IL-9遺伝子発現を抑制することを見出した。そこで、本研究では、レンコン由来IL-9遺伝子発現抑制化合物の単離を試みた。レンコンの各部において、RBL-2H3細胞におけるイオノマイシン刺激に伴うIL-9遺伝子発現亢進抑制効果を検討したところ、節部に強い抑制活性が認められた。レンコン節部の水抽出物よりIL-9遺伝子発現抑制活性を指標に有効成分を単離した。有効成分は、RBL-2H3細胞におけるIL-9遺伝子発現を抑制した。また、アレルギー性鼻炎モデルラットにおいても抗ヒスタミン薬との併用により、抗ヒスタミン薬単独投与の場合と比較して顕著に鼻炎症状を改善し、また、抗ヒスタミン薬で抑制できない鼻粘膜IL-9遺伝子発現を強く抑制した。以上の結果から、レンコン由来有効成分と抗ヒスタミン薬による花粉症発症シグナルの抑制が花粉症症状改善に有効であることが明らかとなった。

破骨細胞形成のための微小環境を構成するCXCR4⁺CD45⁻細胞は、SDF-1、CXCL7およびCX3CL1シグナルを介して破骨細胞を巨大化する

○ 大塚勇斗¹ 後藤洋² 関谷健夫² 朝霧成挙¹ 岩城壮一郎¹ 宮澤健² 後藤滋巳²
浅井清文³ 青山峰芳¹
¹名古屋市立大学 薬学部 病態解析学講座 ²愛知学院大学 歯学部 歯科矯正学講座
³名古屋市立大学 医学部 分子神経生物学講座

骨形成に関与する骨芽細胞と骨破壊に関与する破骨細胞の骨リモデリングのバランスは重要であり、このバランスが破骨細胞優位に傾くと骨粗しょう症をはじめとする骨破壊疾患の原因となる。骨芽細胞は間葉系細胞から分化するのに対し、破骨細胞は骨髄球系細胞から分化することが報告されている。破骨細胞の分化には、骨芽細胞で発現するRANKLから破骨前駆細胞で発現するRANKへのRANKL/RANKシグナルが重要であるが、その他の破骨細胞分化を誘導する微小環境に関わる細胞集団の存在はいまだはっきりしていない。そこで、フローサイトメーターを用いて破骨細胞形成に重要な微小環境を構成する細胞を同定し、破骨前駆細胞との相互作用の検討を行った。その結果、ケモカインSDF-1の受容体であるCXCR4を発現する間葉系細胞CXCR4⁺CD45⁻細胞に注目し、マウスの骨髄細胞からCXCR4⁺CD45⁻細胞を除いた細胞群をRANKLおよびM-CSF存在下で培養したところ、破骨細胞の巨大化が抑制されることを明らかにした。さらに、遺伝子発現解析を行ったところCXCR4⁺CD45⁻細胞は、RANKおよびRANKLの発現が低くRANKL/RANK経路には直接的に関与しない細胞集団であることが確認された。さらにCXCR4⁺CD45⁻細胞は、SDF-1、CXCL7、CX3CL1といった重要なケモカインの発現が高いことが判明した。そこで、各種ケモカインに対する中和抗体添加実験を行ったところ、SDF-1、CXCL7、CX3CL1中和抗体をそれぞれ加えると破骨細胞形成が抑制されることが確認された。これらの結果からCXCR4⁺CD45⁻細胞は、SDF-1、CXCL7、CX3CL1を発現し、これらの受容体をもつ細胞に作用し、適切な破骨細胞形成のための微小環境を構成する役割を果たしていることが推測された。すなわち、CXCR4⁺CD45⁻細胞の機能をコントロールすることは、骨粗しょう症をはじめとする骨恒常性の維持を喪失した疾患に対する治療法の開発に貢献できる可能性を示唆した。

1,2-ナフトキノンによる酸化修飾を介したEGFシグナリングへの影響

○ 中原 健吾, 平岡 秀樹, 浜田 恭平, 高杉 展正, 上原 孝

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学

近年、環境汚染物質による健康被害は世界中で深刻な問題となっている。環境汚染物質の一つであり、大気中の光化学オキシダントやタバコ中に豊富に含まれるナフタレン代謝物である1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) は、一酸化窒素やメチル水銀と同様に親電子性を有している。親電子性物質は、タンパク質中のシステインチオール基に共有結合することでその機能を変化させ、様々な生理応答を引き起こすことが知られている。本研究では、1,2-NQによる細胞内シグナル伝達系、とくに細胞増殖や抗アポトーシスに関わるPI3K-Akt経路に着目し、以下の検討を行った。

ヒト肺胞上皮腺癌由来A549細胞に1,2-NQを処理したところ、濃度依存的なAktのリン酸化が認められた。このリン酸化はPI3K阻害薬wortmanninやPDK1阻害薬OSU-0312 / BW-795の前処理によって抑制されたことから、1,2-NQの作用点はこれらキナーゼのさらに上流にあることが示唆された。次に、受容体チロシンキナーゼであるEGFR、IGF-1R、IRの活性化について特異的リン酸化抗体を用いて検討した。その結果、1,2-NQ処理によってEGFRでのみリン酸化が認められた。また、この1,2-NQによるEGFRのリン酸化は特異的EGFRチロシンキナーゼ阻害薬であるtyrphostinA25によって抑制された。さらに、EGFRアンタゴニストであるcetuximabの前処理によっても、1,2-NQによるEGFRのリン酸化が著明に抑制されたことから、1,2-NQはEGFRを介してPI3K-Akt経路を活性化することが示唆された。つぎに、1,2-NQの抗細胞死効果について検討した。A549細胞を無血清下で培養すると核の凝縮を伴うアポトーシスが観察される。1,2-NQの前処理は血清除去によって惹起される細胞死を濃度依存的に回復させることがわかった。この効果はwortmanninで阻害されたことから、PI3K-Akt経路が関与していることが示唆された。

以上より、1,2-NQはEGFRとそれに続くPI3K/PDK1を介したAkt経路の活性化を誘導することが明らかになった。

ヒト乳癌細胞増殖におけるクロライドチャネルの役割とクロライドチャネル阻害によるHER2転写抑制

○藤本万由¹, 井上隆浩¹, 鬼頭宏彰¹, 丹羽里実¹, 村木克彦², 大矢 進¹

¹京都薬大・薬理、²愛知学院大・薬・薬効解析

容量依存性 (CLC) 及びカルシウム活性化 (ANO) クロライドチャネルは、細胞容量調節を介した細胞増殖の制御や静止膜電位の維持に重要な役割を果たしている。また最近では細胞内シグナル情報伝達機構への関与が報告されており、クロライドチャネルは転写調節因子と機能することが明らかとなった。本研究では、ヒト上皮細胞増殖因子受容体HER2陽性乳癌細胞株であるYMB-1とMDA-MB-453を用いてクロライドチャネル阻害 (CLC-3及びANO1) による細胞増殖能とHER転写への影響について検討した。遺伝子発現解析にはリアルタイムPCR法、タンパク発現解析にはWestern blot法、イオンチャネル機能解析にはパッチクランプ法を用いた。はじめに、YMB-1細胞とMDA-MB-453細胞における上皮成長因子EGF-1とHER2阻害剤trastuzumabの細胞増殖能に対する作用を検討したところ、YMB-1細胞とMDA-MB-453細胞はともに上皮成長因子EGF-1により細胞増殖能が促進されるが、YMB-1細胞はtrastuzumabに対して抵抗性を示した。次に、クロライド阻害剤やANO1及びCLC-3 siRNAの細胞増殖能に対する作用を検討したところ、YMB-1細胞ではANO1阻害剤T16inh-A01処置及びANO1 siRNAによるANO1阻害により細胞増殖が有意に抑制され、CLC-3阻害では細胞増殖は抑制されなかった。一方、MDA-MB-453細胞ではCLC-3阻害により細胞増殖が有意に抑制され、ANO1阻害では細胞増殖は抑制されなかった。カルシウム活性化クロライド電流は、YMB-1細胞でのみ観察された。以上の結果より、HER2陽性乳癌細胞において、クロライドチャネル阻害によるHER2転写抑制を介して細胞増殖能を抑制することが示唆された。HER2分子標的治療薬に対する抵抗性を獲得した乳癌患者において、クロライドチャネル阻害薬が有用である可能性がある。HER2転写調節に関与するシグナル伝達分子については現在検討中である。

新生タンパク質成熟機構におけるポリサルファーの役割

○山地 賢一、奥田 将、高杉 展正、上原 孝

岡山大学薬学部薬効解析学

硫化水素 (H₂S) は内因性ガス状シグナル分子として、受容体、酵素、転写因子をはじめとする多くのタンパク質を標的とし、多様な生理機能に影響を与えると考えられてきた。しかし、近年H₂Sシグナルの真の活性分子はL-システインのチオール基に過剰に硫黄が結合したシステインパースルフィド (Cys-SSH) などの活性硫黄種 (Reactive Sulfur Species : RSS) であることが明らかとなりつつある。RSSは強力な還元作用を有し、レドックスシグナル調節機能を持つことが示唆されているが、その生理的意義については未解明な部分が多く残されている。

本研究では、小胞体内分子シャペロンであるジスルフィド結合形成に関わるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) に着目し、RSSがPDIに与える影響について解析を進めた。まず初めに、PDIのポリサルファー化修飾の有無について、改変ビオチンスイッチ法により検出を試みた。PDIは定常状態において一部が既にポリサルファー化を受けていることがわかった。変異体を用いた解析から、この修飾はC末端活性中心のシステイン残基で起こっていることが分かった。

次に、ポリサルファー化による酵素活性への影響についてリコンビナントPDIを用いて検討した。その結果、還元型PDIをポリサルファードナーでインキュベートしたところPDIの酵素活性の回復が濃度依存的に認められた。このときPDI活性はポリサルファードナー硫黄原子の数に応じて回復した。さらに、内因性ポリサルファードナーであるN-アセチルシステイン-S2 (NAC-S2) でインキュベートしたところ、より低濃度で酵素活性が回復することが分かった。

以上より、RSSがPDI活性中心システイン残基の酸化修飾 (スルフヒドリル化) を介して酵素活性を正に調節している可能性が示唆された。

Protective effects of histidine-rich glycoprotein on barrier function of vascular endothelial cells

○Shangze Gao¹⁾, Yuan Gao¹⁾, Hidenori Wake¹⁾, Keyue Liu¹⁾, Kiyoshi Teshigawara¹⁾, Shuji Mori²⁾, Masahiro Nishibori¹⁾

¹⁾ Department of Pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences. ²⁾ Department of Pharmacology, Shujitsu University.

Sepsis has been a leading cause of death worldwide. The barrier dysfunction of vascular endothelial cells (VECs) is one of the key processes of the systemic inflammation in septic pathogenesis. Our laboratory has proved that supplementary treatment with plasma protein histidine-rich glycoprotein (HRG) can improve the survival rate of septic mice, maintain the quiescence of neutrophils and prevent the dysregulated adhesion of neutrophils to VECs. Rearrangement of cytoskeleton and cell-cell adhesion and cell-matrix adhesion all participate in the regulation of endothelial cell morphology, migration ability and the permeability control. Therefore, in the present study, we focus on the effects of HRG on the barrier dysfunction of VECs and cytoskeleton rearrangement, cell-cell adhesion and cell-matrix adhesion of VECs after stimulation with LPS/TNF- α .

Our results show that HRG can effectively reduce the VEC monolayer permeability induced by TNF- α using FITC-labeled dextran transwell assay. Pretreatment with HRG also can maintain the monolayer integrity of VECs through inhibiting the cytoskeleton rearrangement and stress fiber formation. HRG prevented the lost of intercellular adhesion protein VE-cadherin and β -catenin at the cell border after stimulated with LPS/TNF- α . Moreover, HRG inhibits the cell detachment and cleavage of cell-matrix junction focal adhesion kinase (FAK) after LPS/TNF- α stimulation. Taken together, these results suggest that HRG may play a protective role on vascular barrier integrity through the maintenance of cell morphology and cellular interactions, which result in the relief of the uncontrolled inflammatory conditions.

インドキシル硫酸蓄積はヘプシジン制御を介して鉄代謝恒常性破綻に関与する

○濱野裕章^{1,2)}、池田康将¹⁾、渡邊大晃³⁾、堀ノ内裕也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⁾徳島大学薬理学分野、²⁾徳島大学病院薬剤部、³⁾徳島大学臨床薬剤学分野、

⁴⁾徳島大学病院臨床試験管理センター、⁵⁾徳島大学医薬品機能生化学分野

【目的】ヘプシジンは肝臓由来鉄制御ホルモンであり、慢性腎臓病（CKD）において、その血中濃度は増加していることが報告されており、生体内鉄代謝への関与が示唆される。また、CKD進行に伴う尿毒素蓄積による酸化ストレスや炎症の増加は、様々な臓器障害の原因となるが、生体内鉄代謝との関連は不明である。本研究では、CKDにおける尿毒素蓄積がヘプシジン制御に関与するか、生体内鉄代謝を含めて検討した。

【方法】培養肝細胞HepG2を用いた *in vitro* 解析とアデニン誘導性CKDマウスモデルを用いた *in vivo* 解析を行った。*in vitro* 解析では、尿毒素質物質インドキシル硫酸（IS）で刺激を行いヘプシジン発現変化とその機序について検討した。加えて、CKDマウスにおけるヘプシジンおよび生体内鉄代謝が変化するか、加えて、尿毒素吸着薬AST-120の鉄代謝変化への効果を調べた。

【結果】HepG2へのIS刺激は濃度依存性にヘプシジン発現を増加させ、培養上清へのヘプシジン分泌も増加させた。また、ISの受容体である芳香族炭化水素受容体（AhR）の阻害または抗酸化薬によってIS刺激によるヘプシジン発現増加は抑制された。CKDマウスでは、肝臓ヘプシジン発現ならびに血中ヘプシジン濃度は増加していた。鉄排出輸送体フェロポルチン発現は十二指腸において減少し、脾臓において増加を認めた。また、脾臓の鉄蓄積が増加、血中フェリチンは増加、血清鉄は減少していた。AST-120投与によって、これらの変化は改善した。さらに腎不全マウスでみられた貧血も軽度回復した。

【結論】尿毒素蓄積はAhRおよび酸化ストレスを介してヘプシジン産生を増加させ、CKDの生体内鉄代謝恒常性の破綻に関与すること、また、尿毒素除去はヘプシジン増加による鉄利用障害を是正することで貧血改善に寄与することが示唆された。

C-17**統合薬理学的アプローチによる抗悪性黒色腫化合物の探索**

○山田英嗣¹、西村有平^{1,2}、島田康人^{1,2}

¹三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野

²三重大学先端医科学研究支援センター バイオインフォマティクス部門

悪性黒色腫（メラノーマ）は神経堤由来の色素産生細胞であるメラノサイトが、BRAFやRASの変異により形質転換することで発症する悪性腫瘍である。悪性黒色腫は最も予後の悪いがんの1つであり、2015年現在、世界では年間35万1880人が罹患、5万9782人が死亡している（Karimkhani C *et al.*, Br J Dermatol. 2017: in press）。悪性黒色腫に対する新規治療薬として免疫チェックポイント阻害薬のニボルマブやイピリムマブ、変異型BRAF阻害剤のベムラフェニブが近年上市されたが、これら新薬の2年生存率は30%程度であり、生命予後はほとんど改善できていない。

我々の研究グループではゼブラフィッシュを用いた化合物スクリーニングを実施している。今回、新たな抗悪性黒色腫化合物の探索を目的として、受精後48時間のゼブラフィッシュの下大静脈にゼブラフィッシュ悪性黒色腫を移植する同種移植ゼブラフィッシュのモデルを構築した。このモデルを用いて2320化合物をスクリーニングしたところ、6化合物に抑制効果を認めた。これらの化合物に対し、細胞培養系（*in vitro*）、ヒト悪性黒色腫移植ゼブラフィッシュ・マウス（*in vivo*）を用いて検討し、増殖抑制・転移抑制、そしてそれらの作用メカニズムなど、一部ヒトへの外挿性の可能性を示唆する結果が得られたので報告する。

C-18**フコキサンチンのアトピー性皮膚炎の治療に関する研究**

○夏目 知佳¹、高西 美沙紀¹、水野 佳奈¹、島田 侑季¹、仙田 圭祐¹、
田邊 甫樹¹、青山 朋子¹、田中 公輔¹、東 泰孝²、藤田 隆司¹

¹立命館大学 薬学部 分子薬効毒性学、²大阪府立大学 獣医学部 薬理

フコキサンチン（FX）はキサントフィルの1つで、我々の研究室ではβカロテンでは観察されない皮膚バリアを強くする効果を有することを明らかにしてきた。また、FXはアトピー様の皮膚炎の発症を抑制し、そのメカニズムは、肥満細胞の成熟を抑制することで抗アレルギー作用を発揮される可能性について*in vitro*系で示唆してきた。今回、*in vivo*でFXがGATA-1、GATA-2を特異的に制御する知見を得たので報告する。

アトピー皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを3群にわけ、アトピー性皮膚炎発症前に5週齢からFX群、tacrolimus（FK）群、対照（Vaseline）群を一日一回外用塗布した。2週間搔痒時間や耳介圧、経皮水分蒸散量（TEWL）、皮膚症状の測定を行った。また、qPCRによる遺伝子解析と組織学的解析を行った。トルイジンブルー染色の組織学的解析において、FX群では肥満細胞の減少がみられた。qPCR解析によると、アトピー性皮膚炎発症が認められたコントロール群と比較した時、FK群、FX群ではGATA-1の発現量が減少し、GATA-2の発現量が増加するのがわかった。加えて、搔痒時間や経皮水分蒸散量がFX群において有意に減少した。FXは*in vivo*でGATA-1転写因子を抑制し、肥満細胞の形成に抑制的に働くことがわかり、この効果はFKと他のカロテノイドにはないGATA制御効果を有しており、かゆみを抑える効能があることが示唆された。NC/Ngaアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた検討から、FXはFKと同等以上の効能であった。

○高西 美沙紀¹、夏目 知佳¹、水野 佳奈¹、島田 侑季¹、青山 朋子¹、田中 公輔¹、
野口 亜友美²、宮本 國寛²、川瀬 直子²、野口 秀人²、藤田 隆司¹

¹立命館大学薬学部分子薬効毒性学研究室、²(株)ロジック

脂漏性角化症は加齢とともに生ずる褐色から黒褐色の扁平隆起性の小腫瘤である。早ければ20歳代、主に40歳代以降に顔面、頭部及び体幹などに発症し、80歳代以上ではほぼ全員にみられる。日常生活上不便を来す場合や美容上の問題がある場合には治療の対象となり、現在では特に美容上の問題から治療を希望する人が増えている。従来は液体窒素や炭酸ガスレーザーなどを用いた外科的治療が用いられている。また、ケラチノサイトまたは線維芽細胞の増殖抑制作用を示す物質を治療に用いることが提唱されているが、これらの薬剤には既に形成されたイボを解消する効果はないため、その効果はイボの発生・進展を阻害するといった限定的なものであると考えられている。我々はこれまでにキサントフィル類の1つであるフコキサンチン（以下FX）は皮膚バリア形成促進効果を有することを報告した。FX含有製剤でモニター試験を行ったところ、脂漏性角化症の改善がみられたため、脂漏性角化症の予防または改善作用メカニズムについて調べた。

皮膚線維芽細胞の細胞増殖に対するフコキサンチンの効果を調べたところ、濃度依存的に抑制効果が観察された。3T3-L1細胞を脂肪細胞分化培地で培養しフコキサンチンの分化に及ぼす影響を調べたところ、濃度依存的に抑制効果が観察された。脂漏性角化症の発症メカニズムには不明な点が多いが、推定されるフコキサンチンの作用機序として、皮膚線維芽細胞の細胞増殖抑制作用、脂肪細胞の新陳代謝亢進が考えられた。これらの作用機序により、FX含有製剤は非侵襲性に脂漏性角化症を治療できたと考えた。

○松井 未来¹、寺澤 杏子¹、村岸 沙也加¹、村瀬 実希¹、鬼頭 宏彰¹、丹羽 里実¹、
藤井 正徳¹、鈴木 孝禎²、大矢 進¹

¹京都薬大・薬理 ²京都府医大・医薬品化学

炎症性腸疾患（IBD: inflammatory bowel disease）は、下痢および血便が長期的に持続する原因不明の難病である。ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC: histone deacetylase）阻害剤は抗がん剤として使用されているが、IBDモデルをはじめ炎症性疾患モデルにおける病態を改善することが近年報告されており、IBDの新規治療薬として期待されている。我々は、IBDモデルマウスにおけるCD4陽性T細胞 $K_{Ca}3.1$ 転写・活性亢進がIBDの病態進行に関与し、 $K_{Ca}3.1$ 阻害薬がIBD病態を改善することを最近報告した。また、ヒト乳がん細胞株YMB-1において、HDAC阻害により $K_{Ca}3.1$ 転写・活性が顕著に抑制されることを報告した。本研究では、CD4陽性T細胞 $K_{Ca}3.1$ 転写・活性制御に対するHDAC阻害剤の影響について検討した。C57BL/6J（6-7週齢、雄性）にデキストラン硫酸ナトリウムを7日間自由飲水させ、急性IBDモデルを作製した。IBDモデルマウス脾臓由来CD4陽性T細胞をコンカナバリンA刺激下HDAC阻害剤で24時間処置した際の $K_{Ca}3.1$ 転写・活性をリアルタイムPCR解析および膜電位感受性蛍光試薬を用いた膜電位イメージング解析により検討した。リアルタイムPCR解析の結果、CD4陽性T細胞においてHDACサブタイプのうちHDAC1、HDAC2、およびHDAC3が高発現しており、IBDモデルにおいていずれの発現も有意に亢進していた。 $K_{Ca}3.1$ 転写・活性に対する非選択的HDAC阻害剤vorinostat（1 μ M）24時間処置の効果を検討したところ、CD4陽性T細胞における $K_{Ca}3.1$ 転写・活性が有意に抑制された。以上の結果から、IBDモデルマウスCD4陽性T細胞においてHDACが $K_{Ca}3.1$ 転写制御に重要な役割を果たしており、 $K_{Ca}3.1$ 活性の下流シグナル（細胞内カルシウムシグナル、サイトカイン産生等）の調節に関与していることが示唆された。

アセトアミノフェンによる肝障害に対するkamebakaurinおよび誘導体の防御効果の検討

○吉岡弘毅¹、青柳 裕¹、福石信之¹、竹谷孝一²、一柳幸生²、桂 明玉³、金 永日³、李 諸文³、野々垣常正¹

¹金城学院大・薬、²東京薬大・薬、³吉林大学化

【目的】シソ科狗日草 (*Rabdosia excisa*) は、古くから民間薬として感冒発熱、乳腺炎、関節痛、打撲傷抗炎症薬として利用されてきた。また、同植物からは、ent-カウレン型ジテルペンが比較的容易かつ大量に単離出来ることが明らかとなっている。このうち、kamebakaurin (KA) は抗炎症作用を示すことが報告されているが、in vitroでの報告が多く、in vivoでの報告はほとんどない。アセトアミノフェン (APAP) は比較的安全性の高い、解熱鎮痛剤であるが、大量に服用した際は劇症肝炎ならびに炎症を引き起こすことが問題となっている。そこで本研究では、KAやその誘導体の抗炎症作用がAPAPによる肝障害に対して、防御作用が認められるか否かマウスを用いたin vivoにて検討を行った。

【方法】実験には7週齢のC57BL/6Jマウスを用いた。(1) APAPを投与する1週間前からKAを100 mg/kgの用量で経口投与した。その後、16時間の絶食を行い、APAPを400 mg/kgの用量で腹腔内投与し、24時間後に安楽死をさせ、血漿中のALTおよびAST、肝臓中の酸化ストレスマーカー (GSH、MDA)、および炎症性サイトカインの測定を行った。また、さらにKAの抗酸化力、CYP誘導能を測定した。(2) KAおよびKA誘導体を50 mg/kgの用量で1週間経口投与を行い、16時間後の絶食の後にAPAPを450 mg/kgの用量で腹腔内投与した。その16時間後に、安楽死をさせ、同様の検討を行った。

【結果および考察】(1) APAP投与によって、ALT、AST、酸化ストレスマーカーおよび炎症性サイトカインの上昇が認められた。それに対して、KAの前投与を行うと、これらの改善が確認された。また、KAは、抗酸化作用は確認されたが、CYP1A2およびCYP2E1には有意な変動は認められなかった。(2) KAおよびKA誘導体を前投与すると、APAPと比較して、各パラメーターの抑制または抑制傾向が認められた。また、KA誘導体では防御作用がより増加することが明らかとなった。以上の結果より、KAおよび誘導体はin vivoにおいても、抗炎症作用を示し、さらに抗酸化作用も有することが示唆された。

新規2型糖尿病モデルゼブラフィッシュの創成

○島田康人¹、臧黎清²、西村有平¹、西村訓弘²

¹三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野 ²三重大学大学院地域イノベーション研究学科

ゼブラフィッシュはそのゲノムがヒトと高度に類似しており、遺伝子操作のしやすさ・多産・生体イメージングへの適合・動物愛護管理法との調和・ケミカルスクリーニングの最適性などの点から、創薬のあらゆるプロセスに活用されている。我々の研究グループでは、2010年に食餌性肥満ゼブラフィッシュを発表して以降、本モデルを用いて天然由来抗肥満成分の発見および治療メカニズムの解明、新規内臓脂肪蓄積・脂肪肝発症メカニズムなど数多く発表してきた。今回はこれまでの研究成果を概覧しつつ、新たな研究展開として2型糖尿病 (Type 2 Diabetes Mellitus; T2DM) の構築に成功したので報告する。

T2DMゼブラフィッシュは、空腹時血糖の上昇に加え、グルコース負荷試験における耐糖能の低下、既存の血糖降下薬への応答性を示した。ランゲルハンス島のサイズおよびインスリン分泌量の増加を認め、インスリン抵抗性発症の可能性が強く示唆された。膵臓・肝臓における網羅的遺伝子発現解析の結果、インスリン分泌やSTAT3シグナルなどヒト臨床と類似のパスウェイ変化が確認できた (Sci Rep. 2016, in press)。

以上の結果より、T2DMゼブラフィッシュは糖尿病およびその周辺領域におけるヒト疾患モデル動物としての展開が可能となった。

C-23**不可逆的聴力損失に対するクロロゲン酸の効果**

○山口太郎、三羽尚子、米山雅紀、尾中勇祐、荻田喜代一

摂南大学・薬学部・薬理学研究室

【目的】感音難聴は、高齢者に最も高頻度に発症する身体障害の一つとされており、大部分が内耳蝸牛障害に由来する。原因不明の突発性難聴やメニエール病を除くと、環境騒音による内耳障害の蓄積による進行性の聴力悪化であり、自覚する頃には補聴器や人工内耳治療に頼らざるを得ない状況となることが少なくない。この現状を打開するためには感音難聴に対する予防薬の開発が強く望まれている。本研究では、騒音反復曝露による感音難聴モデル動物を用いて、不可逆的な聴力損失に対するクロロゲン酸の効果について検討した。【方法】5-6週齢BALB/cCr雌性マウスに、騒音刺激（8 kHz、90 dB）を1日1回、1時間曝露し、この曝露を5日間反復した。クロロゲン酸（10 mg/kg）は、初回騒音曝露の3日前より最終騒音曝露日まで1日1回、経口投与した。聴力は、聴性脳幹反応を用いて測定した。初回騒音曝露1日後に蝸牛を摘出し、固定後、Myosin7a（有毛細胞のマーカー）、CtBP2（プレシナプスのマーカー）およびGluA2（ポストシナプスのマーカー）の免疫染色により内有毛細胞-らせん神経節細胞間シナプス数を解析した。【結果】騒音反復曝露は、曝露回数に依存して周波数12・20 kHzの聴力が悪化させた。この聴力の悪化は、最終曝露後にも自然回復しなかった。クロロゲン酸（10 mg/kg）投与は、騒音反復曝露による聴力の悪化を有意に軽減させた。また、騒音曝露1日後では、内有毛細胞-らせん神経節細胞間シナプス数が曝露前と比較して有意に減少したが、クロロゲン酸投与は騒音曝露誘発性のシナプス数の減少をほぼ完全に抑制した。【考察】クロロゲン酸投与は、騒音曝露による不可逆的な聴力損失に対する聴力保護に有用であることが示唆される。また、本条件下で作製した騒音反復曝露による聴力低下メカニズムに、内有毛細胞-らせん神経節細胞間シナプスの減少が少なくとも一部は関与することが推察される。

C-24**恒常的Gs活性化型受容体GPR3のT細胞における発現と機能**

○田中 茂¹、嶋田直人¹、平野耕一¹、亀岡 翼¹、林 亜紀¹、小栗直人¹、宮城達博¹、
秀 和泉¹、白藤俊彦¹、柳瀬雄輝²、酒井規雄¹

¹広島大院・医歯薬保・神経薬理、²広島大院・医歯薬保・皮膚科

【背景と目的】GPR3は中枢神経系に豊富に発現する受容体であり、リガンド非依存的にGsを活性化させ、細胞内cAMPを一定レベルに維持する機能を有する。我々はこれまでに、神経細胞におけるGPR3発現が、神経突起伸張、生存、分化に深く関与することを報告してきた。しかしながら、GPR3の中枢神経系以外の発現や機能に関する報告は少ない。最近、我々は、T細胞でもGPR3が発現する事を新たに発見した。本研究では、T細胞刺激によるGPR3発現変化を検討すると共に、T細胞におけるGPR3発現がIL-2産生に与える影響を検討した。【方法】Jurkat細胞（ヒト急性T細胞性白血病由来細胞株）、マウス脾臓由来CD4陽性T細胞を、PMAとイオノマイシン存在下で刺激し、GPR3、IL-2 mRNA発現をReal-time RT-PCR法により検討した。【結果】Jurkat細胞をPMA（0.1nM～100nM）で刺激すると、濃度依存的なGPR3 mRNA発現誘導を観察した。この、GPR3 mRNA発現は細胞刺激後3時間まで増加し、以後漸減した。また、T細胞刺激に伴うGPR3発現誘導をGPR3 siRNA導入により抑制すると、IL-2 mRNA発現誘導の増加傾向を観察した。さらに、GPR3ノックアウトマウス脾臓由来CD4陽性T細胞刺激においても、同様のIL-2 mRNA発現増加傾向を観察した。【結論】T細胞刺激に伴うGPR3発現増加は、IL-2サイトカイン産生に対し抑制的に作用する可能性が示唆され、GPR3は中枢神経系のみならずT細胞が関与する免疫系においても重要な役割を果たすことが示唆された。

C-25**Structure-activity relationship of novel inhibitors for cancer type amino acid transporter LAT1**

○Pornparn Kongpracha, Shushi Nagamori, Pattama Wiriyasermkul, Yoko Tanaka, Kazuko Kaneda, Suguru Okuda, Ryuichi Ohgaki, Yoshikatsu Kanai
Department of Bio-system Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) is a cancer-type amino acid transporter upregulated in various types of cancers. LAT1 is responsible for cellular uptake of large neutral amino acids including leucine that activates mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), regulating growth and proliferation of cancer cells. Therefore, the compounds that specifically inhibit LAT1 are expected to suppress tumor growth. In this study, we developed a novel series of LAT1 inhibitors, SKN101-105, based on the structure of triiodothyronine (T3), a known blocker of LAT1. The compounds consist of core structure of 2-amino-3-[3,5-dichloro-4-(naphthalene-1-methoxy)-phenyl]-propanoic acid and different modifications on the naphthalene. Among them, the compounds including SKN103 with a modified phenyl group at C-7 position of naphthalene inhibited LAT1-mediated leucine transport, whereas SKN102 with a phenyl group at C-6 position did not. This indicates that the position of substituents on the naphthalene contributes to the inhibition properties. Among the compounds, we studied SKN103 more in detail. SKN103 inhibited LAT1 in a competitive manner with K_i value of $2.10 \pm 0.12 \mu\text{M}$. SKN103 was a non-transportable blocker of LAT1. Furthermore, we showed that SKN103 suppressed mTOR activity and inhibited cancer cell growth. The growth suppression was enhanced by the combination with cisplatin. Our study on this novel series of LAT1 inhibitors provides a new insight into the structures required for the competitive inhibitors of LAT1.

C-26**寒冷刺激で見られるPRIP遺伝子欠損マウスのUCP1発現の亢進**

大植香菜^{1,2}、入船正浩²、○兼松隆¹

¹広島大学大学院医歯薬保健学研究科細胞分子薬理学

²広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯科麻酔学

我々は、Ins (1, 4, 5) P_3 結合性分子であるphospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)を見出し、PRIP遺伝子欠損 (*Prip*-KO) マウスを作製してこの分子の生理機能の解明研究を行ってきた。これまでに、我々は、*Prip*-KOマウスが白色脂肪細胞における脂肪分解亢進と褐色脂肪細胞における非ふるえ熱産生の亢進を示すことを細胞レベルで明らかにした。そこで、*Prip*-KOマウスに寒冷刺激を与えて、個体レベルでもエネルギー代謝の亢進が起きているかを明らかにすることを目的に実験を行った。

個体における脂肪代謝が変動しているかを調べるために、血液中のトリグリセリド濃度を測定した。野生型マウスに比べて*Prip*-KOマウスで総トリグリセリド濃度は高く、VLDLやLDL分画でのトリグリセリド量が高値を示すことが分かった。しかしながら、20週齢まで通常摂餌したマウスにおいて、*Prip*-KOマウスは血糖値の異常や耐糖能異常を示さなかった。次に寒冷環境下 (4 °C) で1週間飼育して解析を行った。寒冷環境下において、野生型マウスと*Prip*-KOマウスの自由摂餌量は同程度であったが、直腸温は*Prip*-KOマウスで有意に高かった。この結果に一致して、褐色脂肪組織におけるuncoupling protein1 (UCP1) のタンパク質発現の亢進が見られ、また白色脂肪組織においてもUCP1が誘導されその発現量も亢進していた。

今回、寒冷環境下で飼育する実験を行い、*Prip*-KOマウスでは野生型マウスに比べて個体レベルのエネルギー代謝の亢進が起きていることが明らかとなった。またPRIP遺伝子を欠損させることで褐色脂肪細胞の非ふるえ熱産生亢進のみならず白色脂肪組織におけるベージュ細胞の誘導も亢進することが明らかとなった。本実験からPRIPが生体のエネルギー代謝に関わる新しい調節分子であることが分かった。