

A-01 脳卒中後疼痛に対する orexin-Aおよび orexin 受容体の関与

○原田慎一、松浦渉、徳山尚吾

神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

【背景】神経障害性疼痛の一つである脳卒中後疼痛（central post-stroke pain: CPSP）は、脳卒中後の難治性合併症として知られている。現状において有効な治療法がほとんど無く、治療戦略の開発が求められている。近年、摂食や睡眠の調節に重要な機能を有している神経ペプチドの orexin-A が、痛みへの制御に関わっていることが報告されてきている。しかしながら、CPSPに対するorexinの作用に関しては、不明なままである。そこで本研究では、我々が確立したCPSPを模倣するモデルマウスである全脳虚血モデルマウスを用いて、CPSPに対する orexin-A およびその受容体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て、全脳虚血モデル（bilateral carotid artery occlusion: BCAO）を作製した。BCAO 3 日後に、orexin-A（50、150 pmol/mouse）を脳室内投与し、マウスの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 を用い評価した。さらに、SB334867（orexin-1受容体 antagonist: 15 nmol/mouse）または TSC 0X2 29（orexin-2受容体 antagonist: 150、300 nmol/mouse）を orexin-A を投与する 30 分前に脳室内投与し、疼痛評価を行った。

【結果】BCAO 3 日後の後肢において認められた機械的刺激に対する機械的アロディニアは、orexin-A（50、150 pmol/mouse）の脳室内投与によって用量依存的かつ有意に抑制された。さらに、orexin-A の脳室内によって認められた鎮痛効果は、SB334867の投与によって拮抗されたが、TSC 0X2 29 の投与では拮抗されなかった。

【考察】以上の結果から、CPSP の緩和に脳における orexin-A およびそのシグナル系の活性化が有用である可能性が示唆された。また、orexin-Aによる鎮痛作用は、orexin-1 受容体を介していることが明らかとなった。

A-02 アトピー性皮膚炎モデルマウスの掻痒様行動におけるallopregnanoloneの関与

○藤井正徳¹、浅野絵里香¹、大神彩佳¹、美淋都子¹、渡辺保志¹、大矢 進^{1,2}

¹京都薬大・薬理、²名市大院医・薬理

Allopregnanolone (ALLO) は、脳内で生合成される神経ステロイドの一つである。うつ病やアルツハイマー病などの中枢性疾患にALLOの減少が関与することが示唆されているが、ALLOと痒みとの関連性を示す報告は今のところ全くない。これまで我々は、特殊飼料（HR-AD）を摂食させたヘアレスマウス（HR-ADマウス）がアトピー性皮膚炎様症状を発症すること、およびエタノールやバルビツール酸系薬をHR-ADマウスに投与すると掻痒様行動が著しく増強することを明らかにしてきた。他方、ALLOは、中枢神経系においてエタノールやバルビツール酸系薬と類似した薬理作用を示すことが報告されている。そこで、今回我々は、ALLOがアトピーマウスの掻痒様行動に関与するか否かを検討した。通常飼料を摂食させた正常マウスおよびHR-ADマウスにALLO（5もしくは10 mg/kg）を腹腔内投与したところ、HR-ADマウスにおいてのみ掻痒様行動が有意に増加した。次に、少量のALLO（2.5もしくは5 µg/10 µL/site）を大槽内、髄腔内、もしくは皮内に投与したところ、大槽内投与した場合のみ顕著な掻痒様行動が観察されたことから、作用部位は脳と考えられた。つづいて、種々薬物の併用実験を行ったところ、GABA_A受容体アンタゴニストpicROTOXINの併用によりALLO誘発掻痒様行動が有意に抑制されたことから、本掻痒様行動の発現にGABA_A受容体の機能亢進作用が関与することが示唆された。他方、ラットにエタノールを投与すると、脳内ALLO量が一過性に増加することが報告されている。そこで、HR-ADマウスにエタノール（2.4 g/kg, p. o.）を投与した場合の脳内ALLO量を測定したところ、掻痒様行動発現のピークとほぼ一致して脳内ALLO量の増加が認められた。さらに、ALLO合成酵素阻害薬finasterideを前処置した後、エタノールを投与したところ、脳内ALLO量の増加とともに掻痒様行動が有意に抑制された。以上から、飼料誘発アトピーモデルマウスにおいて、ALLO が掻痒様行動を増加させること、およびエタノール誘発掻痒様行動に内因性に産生されたALLOが関与することが示唆された。

A-03**天然物由来神経栄養因子様化合物neovibsanin core structure (NVC) はマウス脳におけるTrkBシグナリングを活性化し抗うつ作用を示す**

○松井敦聡¹, 田辺聡¹, 小関真由美¹, 小松加奈², 清水奈津美², 葛西祐介², 今川洋², 福山愛保³

¹徳島文理大・薬・薬理, ²徳島文理大・薬・薬品製造学, ³徳島文理大・薬・薬品物理化学

【背景・目的】SSRI等の抗うつ薬の機序には、長期投与による脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現増強が関与していると考えられている。また、近年注目されているケタミンの即効性かつ持続的な抗うつ作用にもBDNFとその受容体TrkBの活性化が関与するという。これらのことから、TrkBを活性化する化合物は新規抗うつ薬の候補となると考えられる。我々の以前の研究は、スイカズラ科植物サンゴジュ由来のネオビブサニン類が、PC12細胞において、神経成長因子（NGF）存在下での神経突起の伸長促進活性を示すことを示した。さらに、その活性を保持した最小構造を持つ化合物としてneovibsanin core structure (NVC) を同定した。本研究では、NVCのTrkB及び下流シグナルの増強作用と抗うつ作用についてマウスを用いて検討した。

【方法】実験には8週齢雄性ddYマウスを用いた。NVCは100 mg/kgの用量で腹腔内投与した。一定時間経過後、前頭前皮質及び海馬組織を採取し、NP-40を含むlysis bufferを用いてタンパク抽出液を調製した。ウェスタンブロット法でTrkBおよび下流シグナルタンパクのリン酸化について検討を行った。抗うつ作用の検定には尾懸垂試験を用いた。

【結果】マウス前頭前皮質ならびに海馬において、NVC投与30分後にTrkBリン酸化の増加が観察された。また、TrkB下流シグナルであるAkt、GSK-3β、p70S6Kリン酸化の増加も観察された。NVC投与24時間後に、海馬において、グルタミン酸AMPA受容体 GluR1サブユニットのリン酸化の増加が観察され、尾懸垂試験において不動時間の減少が観察された。

【結論】NVCはTrkBシグナリングの増強を介して海馬神経可塑性を変化させ、即効性の抗うつ作用を示す可能性が考えられた。

A-04**若年期隔離ストレス負荷による社会性行動変化に対するシナプス小胞蛋白質SV2A遺伝子変異の影響**

○徳留 健太郎^{1,2}, 大西 奏子², 嶋田 梓², 田中 敏博², 清水 佐紀², 芹川忠夫², 大野 行弘²

¹大阪大学大学院医学系研究科分子細胞薬理学教室, ²大阪薬科大学薬品作用解析学研究室

【背景・目的】シナプス小胞蛋白質SV2Aは神経終末において、神経伝達物質の遊離を調節している。我々は以前より、SV2AがGABAの遊離を促進することで、てんかんの発症を抑制することを報告してきた（Sci. Rep., 6, 27420, 2016）。また近年、SV2A遺伝子にミスセンス変異を導入した*Sv2a*^{L174Q}ラットが、methamphetamine (MAP) により誘発される逆耐性現象に対して高い感受性を示すことを見出し、SV2Aの機能障害が統合失調症などの精神疾患の発症に関与する可能性を報告した（第89回日本薬理学会年会）。今回は、若年期隔離飼育ストレス負荷による社会性行動に対する*Sv2a*^{L174Q}変異の影響を検討した。

【方法】実験には、生後21日齢より35日間の孤立飼育あるいは群居飼育を行った*Sv2a*^{L174Q}ラットおよびF344ラット（対照動物）を使用した。始めに、各動物の社会相相互作用および攻撃行動を計測し、各動物の自発運動活性をopen-field法により評価した。次に、社会性行動時の脳内興奮部位の違いを、神経の興奮マーカーであるFos蛋白質を指標とした免疫組織化学染色により評価した。

【結果および考察】*Sv2a*^{L174Q}ラットは通常飼育時にはけいれん発作などの異常行動を示さなかった。若年期隔離飼育による社会性行動への影響を評価した結果、隔離飼育ストレス負荷は社会相相互作用に有意な影響を与えなかった。しかし、孤立飼育を行った*Sv2a*^{L174Q}ラットは群居飼育を行った動物と比較して攻撃行動の有意な増加を示した。また、open-field法による自発運動活性の評価では、孤立飼育を行った*Sv2a*^{L174Q}ラットは対照動物と比較して、高い自発運動活性を示した。さらに、若年期隔離飼育負荷による社会性行動時の脳内興奮部位を免疫組織化学染色により探索した結果、隔離飼育を行った*Sv2a*^{L174Q}ラットは側坐核および無顆粒島皮質で有意なFos蛋白質の発現上昇を示した。本研究結果より、*Sv2a*^{L174Q}変異は若年期隔離ストレスにより情動障害を悪化させ、この情動障害の悪化は側坐核および無顆粒島皮質神経の過剰興奮に起因することが示唆された。

高頻度に*de novo*変異が認められる自閉スペクトラム症関連遺伝子POGZの患者由来iPS細胞を用いた分子病態解析

○岡田 翔太¹、松村 憲佑¹、中澤 敬信^{1,2}、永安 一樹^{1,3}、馬場 優志¹、笠井 淳司¹、吾郷 由希夫¹、田熊 一徹^{2,4}、山森 英長⁵、安田 由華^{5,6}、橋本 亮太^{4,5}、橋本 均^{1,4,7,8}

¹阪大・院薬・神経薬理、²阪大・院歯・薬理、³京大・院薬・生体機能解析、⁴阪大・院連小児・子どものこころセンター、⁵阪大・院医・精神医学、⁶阪大病院・オンコロジーセンター、

⁷阪大・院薬・附属創薬センター、⁸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) は神経発達障害であり、脳発達の異常が原因と考えられているが、根本的な治療薬はない。発症の分子基盤は不明な点が多いが、ASD患者の多くは孤発例であるため、健常者の両親にはなく、患者に生じる*de novo*突然変異が自閉症の発症に関与する可能性が指摘されている。著者らを含む多くの研究室が*de novo*変異を同定したPOGZ遺伝子は、報告された*de novo*変異の数が最も多い遺伝子の1つであり、ASDとの関連性が強く示唆されるが、神経系における機能は多くは未知である。当研究室では、マウスを用いた研究において、POGZの機能低下が神経発達の異常に関与することを明らかにしてきた。そこで本研究では、我々が同定したQ1042R変異の表現型に加え、POGZの神経系細胞における役割を患者由来iPS細胞を用いて解析した。まず、患者および健常者の両親の不死化リンパ芽球からiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞から誘導した神経幹細胞および神経細胞において定量的RT-PCR法を実施したところ、分化に伴いPOGZの発現量が上昇することが明らかになった。次に、分化誘導した神経幹細胞において網羅的RNA発現解析を実施したところ、患者において神経分化に関わる遺伝子群の発現量が低く、神経幹細胞の増殖に関わる遺伝子群の発現量が高いことが明らかになった。これらの結果から、POGZのQ1042R変異が、神経幹細胞において細胞の増殖や分化に関わる可能性が示唆された。ASDの*de novo*変異研究において、個々の変異に注目した研究は少なく、本研究の成果はASDの分子病態解明に貢献することが期待される。

自閉スペクトラム症モデルマウスの社会性行動障害に有効な抗てんかん作用を有する医薬品の探索

○三浦 大樹¹、笠井 淳司¹、彌永 祐輔¹、原 雄大¹、中澤 敬信^{1,2}、吾郷 由希夫¹、田熊 一徹^{2,3}、橋本 均^{1,3,4,5}

¹阪大・院薬・神経薬理、²阪大・院歯・薬理、³阪大・院連小児・子どものこころセンター、

⁴阪大・院薬・附属創薬センター、⁵阪大・データビリティフロンティア機構

【背景・目的】自閉スペクトラム症 (ASD) は社会性の障害などを主症状とする神経発達障害である。本邦において約120万人の患者がいるとされるものの、ASDの主症状に対する治療薬は未だ無く、医療ニーズが高い。これまでの多くの研究から、ASD病態では、興奮性—抑制性の神経活動バランス (E/Iバランス) が興奮性に傾いていることが示唆されている。このE/Iバランスの破綻はてんかん患者にもみられ、ASDとてんかんの密接な関係が示唆されている。実際、ASD患者の約3割がてんかんを併発することや、ASDモデル動物のけいれん閾値が低下することが知られている。最近、抗てんかん薬クロナゼパムが、ASDモデル動物の社会性行動の異常を改善させることが報告され、抗てんかん作用を有する医薬品がASDの新規治療薬となる可能性が考えられる。そこで本研究では、ASD治療薬開発に向け、複数の既存医薬品から社会性行動障害を改善させる薬物を探索した。

【方法】ASDモデルマウスとして、胎仔期にバルプロ酸 (VPA) を曝露したマウスを用いた。妊娠12.5日目のC57BL/6J系マウスにVPA 500 mg/kgを腹腔内投与し、その雄性出生仔 (5~6週齢) を行動実験に用いた。対照群として生理食塩水を腹腔内投与した妊娠マウス由来の出生仔を用いた。薬物には、抗てんかん作用を有することが報告されている9種類の既存薬を使用した。被験マウスに各種薬物を腹腔内投与し、30分後に新奇マウスをケージに入れ、社会性行動の指標として新奇マウスに対する匂い嗅ぎ行動の時間を計測した。

【結果・考察】胎仔期VPA曝露群は、対照群と比較して社会性行動時間が有意に減少していた。抗てんかん薬クロナゼパムとフェニトイン、利尿薬ブメタニドとアミロライドの投与は、胎仔期VPA曝露群の社会性行動時間を有意に増加させた。その一方で、降圧薬ロサルタンや非ステロイド性鎮痛薬セレコキシブなどは、社会性行動障害を改善しなかった。以上より、有効性を示した既存医薬品は、ドラッグリポジショニングによりASDの新規治療薬となる可能性が示される。

A-07

内側前頭前皮質のドパミンD1受容体によるストレス抵抗性増強と神経細胞形態制御



○谷口 将之¹、篠原 亮太¹、エーリック アリザ²、横川 賢多朗²、出口 雄一²、小川 淳史²、北岡 志保¹、澤 明³、成宮 周²、古屋敷 智之¹

1 神戸大院・医・薬理、2 京都大院・医・メディカルイノベーションセンター、
3 ジョンスホプキンス大・医・精神医学

社会挫折や孤独から受けるストレスは、抑うつや不安亢進など情動変容を惹き起し、精神疾患に深く関わる。我々はマウス社会挫折ストレスを用いて、短期的なストレスは内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex; mPFC) に投射するドパミン系を活性化してストレスによる社会忌避行動の誘導を抑制すること、長期的なストレスはmPFCドパミン系を抑制し社会忌避行動を誘導することを示してきた。しかしmPFCドパミン系がストレス抵抗性を増強するメカニズムは不明であった。そこで、本研究ではストレス抵抗性の増強に関わるmPFCでのドパミン受容体サブタイプとその作用機序を解析した。反復ストレス後ではmPFCのD1受容体が選択的に減少していたことから、Cre存在下でのみD1受容体を標的とした人工マイクロRNAを発現するアデノ随伴ウイルスと、興奮性または抑制性神経細胞にCreを発現するマウスを用いて、mPFCの神経細胞種特異的なD1受容体発現抑制マウスを作出し、社会挫折ストレスに供した。その結果、mPFCの興奮性神経細胞選択的なD1受容体発現抑制マウスでのみ社会忌避行動の促進が認められた。さらに、神経細胞を低密度に可視化して単回ストレスによる神経細胞形態変化を観察したところ、浅層錐体神経細胞の先端樹状突起とスパインの造成がD1受容体依存的に認められた。以上の結果から、mPFC興奮性神経細胞のD1受容体はストレス抵抗性の増強に重要であること、その過程にはmPFCのD1受容体を介した神経細胞の形態的造成が伴うことが示された。ストレス抵抗性増強のメカニズムにさらに迫るため、単回ストレス後にmPFCでD1受容体依存的に変動する遺伝子群を網羅的遺伝子発現解析により調べた。その結果、これらの遺伝子群には神経細胞の形態を制御する因子が多数含まれていることを見出している。現在、これらの遺伝子群が単回ストレスによる神経細胞の形態的造成やストレス抵抗性の増強に関与するかについて解析を進めている。

A-08

急性ストレス負荷によるコカイン欲求行動増強における内側前頭前野ノルアドレナリン神経伝達的作用



○柳田 淳子、和田 進太郎、堂本 将輝、笹瀬 人暉、張 彤、松下 夏子、出山 諭司、檜井 栄一、金田 勝幸

金沢大学大学院 医薬保健研究域薬学系 薬理学研究室

薬物依存症患者では、ストレスにより薬物を再び摂取することが問題となるが、その神経機構には不明な点が多い。脳内報酬系の一部である内側前頭前野 (mPFC) は青斑核からノルアドレナリン (NA) 作動性神経投射を受けている。ストレス負荷時にはmPFCにおいて細胞外NA濃度が上昇することが知られている。これまでに我々は、条件付け場所嗜好性試験 (CPPテスト) において、ラットに急性拘束ストレスを負荷するとコカイン欲求行動を反映すると考えられる場所嗜好性が増大すること、また、スライス標本での電気生理学的解析からNAがmPFC V層錐体細胞の興奮性を上昇させることを報告してきた。しかし、NAによるmPFC錐体細胞の興奮性応答の増大とストレスによるコカイン欲求行動の増強との関連についてはよく分かっていない。そこで本研究では、CPPテストとスライスホールセルパッチクランプ記録法を用いてこの点を検討した。C57BL/6Jマウス (4-5週齢) を用いて、mPFC V層錐体細胞からボルテージクランプ記録を行ったところ、NA適用時と同様に、 α_1 受容体刺激薬phenylephrine (100 μ M) の適用により、脱分極性電流の誘導と自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の頻度の有意な増加が引き起こされた。次に、C57BL/6Jマウス (8-12週齢) を使用し、弱い場所嗜好性を誘導する低用量のコカイン (3 mg/kg) で条件付けを行い、ポストテストの直前に30分間の拘束ストレスを負荷したところ、ストレス負荷群は非負荷群と比較して有意に高いCPP scoreを示すことが分かった。ストレス負荷直前に α_1 受容体阻害薬であるterazosin (2.5 nmol/0.2 μ L/side) をmPFCに局所投与したところ、vehicle投与群と比較して有意に低いCPP scoreを示した。さらに、ストレス負荷の代わりにポストテストの30分前にmPFCにphenylephrine (10 nmol/0.2 μ L/side) を局所投与したところ、vehicle投与群よりも有意に高いCPP scoreを示した。以上の結果から、mPFCでのNA遊離亢進に伴う α_1 受容体刺激を介した錐体細胞の活動亢進は急性拘束ストレス負荷によるコカイン欲求行動の増強に関与することが示唆された。

A-09

ケタミンの前頭前野セロトニン遊離作用におけるアセチルコリン神経核の関与



○木ノ下晴子¹、西谷直也¹、浅岡希美¹、河合洋幸¹、澁井紀宏¹、永井佑茉¹、安藤千紘¹、永安一樹¹、白川久志¹、中川貴之²、金子周司¹

¹京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野、²京都大学医学部附属病院薬剤部

【目的】低用量のケタミンは抗うつ作用を示すことが知られており、その作用には一部セロトニンの関与が示唆されている。当研究室では以前、ケタミンが背側縫線核（DRN）内の $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体を介して、前頭前野（mPFC）におけるセロトニン遊離を引き起こすことを報告した。DRNへ投射するコリン作動性神経としては、脚橋被蓋核（PPTg）および背外側被蓋核（LDTg）に由来するものが知られているが、ケタミンのセロトニン遊離作用にいずれの神経核が寄与しているのかは不明である。そこで本研究では、マイクロダイアリス法を用いて、いずれのアセチルコリン神経核がケタミンによるセロトニン遊離作用において重要であるのか検討を行った。【方法】動物は8-12週齢のWistar/ST雄性ラットを使用した。PPTgあるいはLDTgを電気刺激（25 V、25 s）により破壊し、ケタミン（30 mg/kg）皮下投与前後60分間のmPFCにおけるセロトニン遊離量を測定した。また、片側PPTgあるいはLDTgに、リング液もしくはケタミン（0.1 mM）を局所灌流した際のmPFCにおけるセロトニン遊離量を測定した。【結果・考察】PPTg、LDTgの電気刺激により、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）陽性細胞数がそれぞれ約76%、85%減少していることを確認した。PPTgを電気刺激により破壊したラットでは、ケタミン皮下投与後のmPFCにおけるセロトニン遊離量の増加が有意に抑制された一方で、LDTgを破壊したラットでは、ケタミン皮下投与後のセロトニン遊離量の増加はsham処置群と同程度であった。これらの結果は、LDTgではなくPPTgのコリン作動性神経が、ケタミンによるmPFCにおけるセロトニン遊離に必要である可能性を示唆している。さらにPPTgにケタミンを局所灌流すると、mPFCにおけるセロトニン遊離量が有意に増加した一方で、LDTgにケタミンを局所灌流してもセロトニン遊離量は増加しなかった。これらの結果は、ケタミンがPPTgに直接作用し、DRNに投射するコリン作動性神経を活性化させることで、mPFCにおけるセロトニン遊離を引き起こしている可能性を示唆している。

A-10

ニコチン誘発振戦に対するセロトニン神経系の調節メカニズム



○國澤直史、Higor A. Iha、清水佐紀、大野行弘

大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室

【目的】我々はこれまでに、ニコチンが $\alpha 7$ nACh受容体を介して下オリーブ核を過剰興奮させることにより、本態性振戦と類似した振戦行動を誘発することを明らかにした（Behav. Brain Res. 2016; 314, 173-180）。一方、nACh受容体は前シナプス性の機能としてセロトニンの遊離を促進することが知られている。そこで今回、セロトニン神経系によるニコチン誘発振戦の調節機構を明らかにする目的で、ニコチンによる振戦発現に対する各種セロトニン5-HT受容体関連薬の影響を評価した。

【方法】実験にはddY系雄性マウス（6~8週齢）を用いた。ニコチン（1 mg/kg, i.p.）投与の15分前に、各種5-HT受容体関連薬を前処置し、ニコチン誘発振戦に及ぼす影響を評価した。また、前シナプス性5-HT_{1A}自己受容体の影響を除去する目的で、トリプトファン水酸化酵素阻害薬（PCPA）の反復投与実験を行った。

【結果および考察】ニコチン誘発振戦の振戦強度は5-HT_{1A}受容体作動薬8-OH-DPATの投与により有意に増強し、この増強は5-HT_{1A}受容体拮抗薬WAY-100135投与により有意に拮抗された。また、8-OH-DPATのニコチン誘発振戦に対する増強作用は、PCPA投与によってセロトニンを枯渇させた動物においても顕著に認められた。一方、5-HT₂受容体作動薬DOIは、ニコチン誘発振戦を濃度依存的に抑制し、その抑制は5-HT₂受容体拮抗薬リタンセリンにより拮抗された。5-HT₃受容体作動薬SR-57227Aは、ニコチン誘発振戦に影響を及ぼさなかった。次に、ニコチン誘発振戦に対する5-HT受容体拮抗薬の単独効果を評価した結果、ニコチン誘発振戦はWAY-100135により有意に抑制されたが、リタンセリン、5-HT₃受容体拮抗薬オランダセトロン、5-HT₆受容体拮抗薬SB-258585によっては影響を受けなかった。本研究結果より、ニコチン誘発振戦の発現にはシナプス後膜に存在する5-HT_{1A}受容体が一部関与しており、また、5-HT₂受容体が振戦発現を抑制的に調節していることが示唆された。

A-11

胎生期ニコチン曝露誘発行動障害に対するガラントミンの作用: ドパミンD₁受容体の関与



○伊藤愛¹、間宮隆吉¹、加藤俊佑¹、森美奈¹、衣斐大祐¹、鍋島俊隆²、平松正行¹

¹名城大学薬学部薬品作用学研究室、²藤田保健衛生大学・NPO J-DO

【目的】妊娠中の喫煙は、胎児の脳神経系の発達に影響を及ぼし、行動障害を引き起こすことが知られている。これまでに我々は、母マウスの飲水を介して胎生期にニコチンを曝露すると、マウスの前頭皮質において神経細胞増殖が抑制されること、衝動性の亢進や注意機能、認知機能の低下などの行動障害が誘発されることを見出してきた。本研究では、このモデルを用いて衝動性の亢進に対するガラントミンの作用を行動薬理的に検討した。

【方法】2%サッカリン溶液に溶解したニコチン (0.2 mg/L) を胎生14日目から出生まで母マウスに飲水させた(胎生期ニコチン曝露群)。出生6週以降に断崖回避試験 (Cliff avoidance test) を行った。行動試験の40分前に選択的ドパミンD₁受容体拮抗薬であるSCH 23390 (0.01 mg/kg) を腹腔内投与し、30分前にガラントミン (1 mg/kg) を皮下投与した。

【結果および考察】母マウスは1日当たり約 4.3 mL飲水したことから、ニコチンを約 0.9 mg摂取したと推定される。断崖回避試験において、胎生期ニコチン曝露群で観察された断崖回避潜時の短縮及び回避イベント (%) の低下は、ガラントミンによって有意に緩解された。さらに、SCH 23390の前投与によってその緩解作用は抑制された。このことから、ガラントミンはドパミンD₁受容体を介して衝動性の亢進を緩解していることが示唆された。

A-12

新規強迫性障害モデルの作成:妥当性評価から治療ターゲット探索まで



○浅岡希美¹、西谷直也¹、永安一樹¹、白川久志¹、中川貴之²、金子周司¹

¹京都大学大学院 薬学研究科 生体機能解析学分野 ²京都大学 医学部附属病院 薬剤部

強迫性障害 (OCD) は、繰り返す『強迫観念』と『強迫行為』を主徴とする精神疾患である。本邦では、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のみが治療薬として認可されているが、長期・高用量の服用が要求されるにもかかわらず奏効率は50%程度であり、より良い治療法が求められている。しかし、OCD治療薬の開発は、妥当性ある評価系が構築されておらず長らく停滞している。一方で、臨床研究よりOCDの病態はモノアミン異常に由来する不安症状の一種ではなく、前頭皮質などのグルタミン酸性興奮性入力に由来する認知・行動調節の異常であるとの知見が得られつつある。そこで、本研究では臨床で得られた新規知見を反映する利便性・妥当性の高いOCDモデル評価系の確立を目指した。ドパミンD₂受容体アゴニストquinpirole (QNP) を反復投与したラットのモデルは、現行のOCDモデルの中でも「反復する確認行動」という高い表面妥当性を持つモデルとして評価される一方、構成・予測妥当性においては不十分であった。今回、利便性の高いマウスを用いてQNP反復投与モデルを作成したところ、ラットと同様に確認行動の増加を認めたが、この症状はSSRIの長期・高用量投与で改善されなかった。そこで、固執傾向の増加という臨床知見を評価項目とするため、モデルマウスの逆転学習効率を検討した。すると、モデルマウスでは逆転学習効率が著しく低下しており、この症状はSSRIの長期・高用量投与により改善が認められた。さらに、眼窩前頭皮質 (OFC) の神経活動を電気生理学的手法により記録したところ、OCD患者での報告と同様にモデルマウスにおいてもOFC錐体細胞への興奮性入力の増加と錐体細胞の発火応答性亢進が認められ、これら神経機能の異常はSSRIの長期・高用量投与により改善した。最後に、OCD治療効果が期待されている5-HT_{2c}受容体阻害薬の効果をモデルマウスで検討したところ、短期間の投与・処置で行動・神経機能の異常が改善された。以上の結果より、本QNPモデルマウスはOCD治療薬スクリーニングのための妥当性を備えた評価系として有用であることが示唆される。

A-13

SphK2/S1Pシグナルによるアルツハイマー病治療法の開発



○野田 祐佳、上原 孝、高杉 展正

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬科学専攻

【背景・目的】アポリポタンパク質の一つであるApolipoprotein E (ApoE) は、そのアイソフォームの一つであるε4型がアルツハイマー病 (AD) の強力な遺伝的リスクファクターとして知られる。ApoEは、ADの病因因子の一つであるAmyloid-β (Aβ) の代謝・線維化を制御することによりAD発症機構と深く関与すると考えられており、その活性・発現制御はAD根治療法のターゲットとして有望である。実際ApoEの発現を誘導する核内受容体 (LXR・RXR) アゴニストの一つであるBexaroteneはADモデルマウスにおける治療効果が報告されている。一方で、Bexaroteneの効果は研究グループにより大きく異なり、ApoEの機能制御に他の制御因子が関与している可能性が考えられた。そこで我々はHDL (高比重リポタンパク質) 中において、ApoEと共存しているスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に注目した。シグナル脂質であるS1Pは、脳内において神経炎症反応の制御や転写制御にも関わっており、その産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼ2 (SphK2) はADにおいて活性が亢進することが明らかになっている。

【方法・結果】本研究において我々はアストロサイト由来細胞株であるU87細胞を用い、SphK2を恒常的に過剰発現すると、LXR/RXRアゴニストによるApoEの誘導が転写レベルで抑制されること、またRNA interference法によるSphK2の発現誘導抑制、またはSphK2特異的阻害薬処理時にApoEの発現誘導が大きく促進することを見出した。一方、同様にLXR/RXRアゴニストの発現誘導を受けるABCA1についてはSphK2活性の影響は受けなかった。

【考察】これらの結果は、SphK2活性が特異的にApoEの転写を制御し、SphK2阻害薬はApoEの発現を増加させるAD創薬ターゲットであることを示唆している。SphK2/S1Pシグナルという新たなAD発症制御機構の解明とともに、脂質代謝機構の調節という新たなメカニズムに基づいたAD根本治療法の開発に繋がることを期待される。

A-14

神経障害性疼痛モデルマウスにおけるうつ様行動とHMGB1発現解析



○富村昌暉¹、中島一恵¹、吉井稔紀¹、張 芳芳¹、劉 克約²、西堀正洋²、仲田義啓¹、森岡徳光¹

1) 広島大院・医歯薬保・薬効解析 2) 岡山大院・医歯薬学総合・薬理

〈背景〉近年、慢性疼痛患者においてうつ病の発症率が高いことが報告されているが、その生物学的基盤は不明である。そこで我々は神経障害性疼痛モデルを作製し、うつ様行動について解析を行った。また、うつ病の病因・病態に中枢神経系の炎症が関与するとの報告が集積していることから、炎症惹起因子high mobility group box 1 (HMGB1) に着目して検討を行った。

〈方法〉ddY系雄性マウス (5週齢) の坐骨神経を部分結紮し神経障害性疼痛モデルマウス (partial sciatic nerve ligation: PSNL群) を作製した。対照群は坐骨神経を露出したのみのマウス (Sham群) を用いた。疼痛閾値はvon frey filamentを用いて評価した。social interaction test、forced swim test、novelty suppressed feeding testによりうつ様行動を解析した。血漿中HMGB1濃度はELISA法、脳HMGB1発現はWestern blotting法により解析した。

〈結果・考察〉PSNL群において術後10週目まで持続的な疼痛閾値の低下が確認された。経時的に行動解析を行ったところ、術後6週及び8週目のsocial interaction testにおけるPSNL群の相手マウスに対する接触時間の減少、術後8週目のforced swim testにおける無動時間の延長、及びnovelty suppressed feeding testにおける摂食までの時間延長が認められたことから、PSNL群においてうつ様行動が増加していることを確認した。一方で、血漿中HMGB1濃度と前頭前皮質におけるHMGB1発現は、術後2週目では両群に差が見られなかったが、術後8週目のPSNL群において有意な増加を確認した。以上の結果より、持続的な痛み刺激がうつ様行動を惹起する可能性が示唆された。また、うつ様行動が認められた時点で血漿中及び前頭前皮質のHMGB1が増加したことから、HMGB1が慢性疼痛により誘発されるうつ様行動に関与する可能性が推測される。

A-15

脊髄後角におけるHMGB1 による疼痛惹起メカニズムに対するIL-1 β の関与



○宮内 一希¹、張 芳芳¹、中島 一恵¹、劉 克約²、西堀 正洋²、仲田 義啓¹、森岡 徳光¹

¹広島大院・医歯薬保・薬効解析 ²岡山大院・医歯薬学総合・薬理

【目的】我々は神経障害性疼痛の発症機序において、high mobility group box-1 (HMGB1) の役割に着目し、検討を行ってきた。これまでに脊髄後角におけるHMGB1 はtoll like receptor 4 (TLR4) を介して疼痛を惹起しており、さらにそのメカニズムにはグルタミン酸神経伝達の亢進やアストロサイトの活性化が関与する可能性を明らかにしている。近年、神経障害性疼痛発症において、炎症性サイトカインの発現増加が要因の一つとして報告されている。そこで本研究では、HMGB1により惹起される疼痛（機械的アロディニア）への炎症性サイトカインの関与について検討を行った。

【方法】機械的アロディニアは 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。Recombinant HMGB1は脊髄クモ膜下腔内 (intrathecal:i. t.) に投与した。各種中和抗体及び拮抗薬はrHMGB1投与1 時間前にi. t. 投与を行った。炎症性サイトカインのmRNA発現はreal-time PCR法により測定した。

【結果】rHMGB1 (100 ng) の投与によってinterleukin-1 β (IL-1 β) mRNA、interleukin-6 (IL-6) mRNA及び、C-C motif chemokine-2 (CCL-2) mRNA発現が有意に増加することが確認された。さらに、IL-1 β 中和抗体を前処置することによってrHMGB1による機械的アロディニアは有意に抑制された。一方で、IL-6中和抗体およびCCL-2受容体拮抗薬 (RS504393) の前処置によってはrHMGB1による機械的アロディニアに対して影響を及ぼさなかった。

【考察】以上の結果より、脊髄後角におけるHMGB1による疼痛惹起メカニズムにはIL-1 β 発現増加が関与する可能性が示唆された。

A-16

脳卒中後疼痛に対する脊髄 HMGB1 関連受容体シグナルおよびグリア細胞の関与



○松浦 渉¹、原田慎一¹、劉 克約²、西堀正洋²、徳山尚吾¹

¹ 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室 ² 岡山大学 大学院医歯薬総合研究科 薬理学研究室

【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。近年、HMGB1 がその受容体である receptor for advanced end products (RAGE)、toll-like receptor 4 (TLR4) を介し、疼痛に関与するグリア細胞の活性化および nitric oxide synthetase (NOS) を調節することが示唆されている。そこで、本研究では、CPSP の発現における HMGB1 関連受容体/グリア細胞/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。さらに、BCAO 3 日後に抗 HMGB1 抗体、L-NAME (NOS 阻害剤)、LPS-RS (TLR4 アンタゴニスト) および LMWH (RAGE アンタゴニスト) を脊髄腔内投与し、疼痛評価を行った。また、BCAO 3 日後におけるグリア細胞の活性化および NOS 活性はそれぞれ免疫染色法および比色定量法を用いて測定した。

【結果】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 μ g/mouse)、L-NAME (300 μ g/mouse)、LPS-RS (10 μ g/mouse) および LMWH (70 μ g/mouse) の投与によって有意に抑制された。さらに、BCAO 後に脊髄グリア細胞の活性化および NOS 活性の上昇が確認され、それらは抗 HMGB1 抗体 (20 μ g/mouse) および LPS-RS (10 μ g/mouse) を投与することによって、有意に抑制された。一方で、LMWH (70 μ g/mouse) の投与は、グリア細胞の活性化に影響せず、NOS 活性を有意に抑制した。

【考察】CPSP の発症機序の一部に、脊髄におけるHMGB1/TLR4/グリア細胞の活性化、HMGB1/TLR4/NOS および HMGB1/RAGE/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-17 ミクログリアにおいてTRPV4の開口はLPS誘発IL10産生を促進する



○富澤恵里、三宅崇仁、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】脳内の免疫担当細胞であるミクログリアは、病態時に活性化して神経傷害的に働く一方で、抗炎症性サイトカインの産生により過度の炎症を抑制することも知られている。当研究室ではこれまでに、ラット新生仔由来ミクログリアにおいて非選択的カチオンチャンネルであるtransient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)を刺激すると、LPS刺激により惹起される活性化が抑制されることを報告した。しかしながら、LPS刺激により誘発される抗炎症性の応答におけるTRPV4の関与については明らかではない。そこで本研究では、抗炎症性サイトカイン産生におけるTRPV4の役割に着目して検討を行った。【方法】実験には、野生型およびTRPV4欠損C57BL/6マウスの子孫全脳から調製したミクログリアを用いた。【結果】まず、マウス培養ミクログリアにおけるTRPV4 mRNAの発現をRT-PCR法により確認した。次に、ホールセル電流記録および細胞内Ca²⁺蛍光イメージングにより、TRPV4がアゴニストの適用で機能することを確認した。次に、LPSにより誘発される抗炎症性サイトカインのmRNA発現変動をリアルタイムRT-PCR法で検討したところ、TRPV4選択的アゴニストであるGSK1016790A (1 μM) 刺激によりLPS誘発IL10 mRNA発現が増加することが明らかとなった。また、ELISA法により、LPS誘発IL10産生はGSK1016790A (1 μM) 刺激で増加し、その作用はTRPV4選択的アンタゴニストであるGSK2193874 (1 μM) の共処置でほぼ完全に抑制された。TRPV4欠損マウス由来のミクログリアではこれらの現象は観察されなかった。さらに、LPS誘発TNF α 産生は、IL10中和抗体 (50 ng/ml) により増加することが明らかとなった。【考察】以上の結果より、ミクログリアのTRPV4開口刺激はLPS誘発IL10産生を促進し、過度の炎症性応答を抑制することが示唆された。TRPV4は炎症性中枢神経疾患の治療標的となる可能性が考えられる。

A-18 ライソゾームに局在するユビキチンリガーゼRNF182はmTORC1シグナルを介して神経分化を制御する

○金子雅幸、金本聡自、郭曉鵬、今泉和則

広島大学大学院医歯薬保健学研究科分子細胞情報学

タンパク質ユビキチン化は、不要なタンパク質の分解に限らず、ユビキチン鎖の様式の違いにより様々なシグナルを調節し、生体機能制御に重要な役割を果たしている。そのユビキチン化を触媒する酵素として、ユビキチンリガーゼがある。これまでに我々は、ヒトの膜貫通型ユビキチンリガーゼを37種類同定した。さらにその中から、中枢特異的な発現パターンを示すRNF182を見いだした。RNF182は、マウス胚性腫瘍細胞P19の神経分化誘導過程で37種のユビキチンリガーゼ遺伝子のうち、最も顕著な発現上昇が認められた遺伝子であった。つぎに、RNF182をノックアウトしたP19細胞を用いて神経系へ分化誘導したところ、神経への分化が抑制されたことから、RNF182は神経分化に重要であることが示唆された。本研究では、膜貫通型ユビキチンリガーゼRNF182の基質の同定とそのユビキチン化による制御機構を明らかにすることを目的とした。RNF182は主にライソゾームに局在するが、RNF182結合タンパク質としてライソゾームタンパク質LAPTMファミリーを同定した。そこで、RNF182によるLAPTMのユビキチン化様式について検討したところ、RNF182は分解に関与する48番目のリジンを介したユビキチン鎖ではなく、タンパク質の結合を促進する63番目のリジンを介したユビキチン鎖を形成することが判明した。LAPTMはアミノ酸トランスポーターLAT1と結合し、LAT1を形質膜からライソゾームにリクルートさせ、その結果、細胞の成長を調節するmTORC1を活性化させることが報告されている。そこで、LAPTMとLAT1の結合に対するRNF182の関与を検討したところ、RNF182によってLAT1とLAPTMの結合がLAPTMのユビキチン化により増強されることが判明した。つぎに、RNF182を安定的にノックダウンした細胞を用いてmTORC1シグナルへの影響を検討したところ、mTORC1活性化時にその基質であるp70S6Kと4EBP1のリン酸化が抑制された。これらのことから、RNF182はLAPTMのユビキチン化を介してアミノ酸トランスポーターLAT1のライソゾームへの移行を促進し、mTORC1を活性化させることで神経の分化・成熟を促進していると推測される。

A-19 ヒトiPS細胞からセロトニン神経細胞への分化誘導法の開発

○梶中このみ¹、永安一樹^{1,2}、中澤敬信^{1,3}、吾郷由希夫¹、田熊一徹^{3,4}、橋本均^{1,4,5,6}

¹大阪大院・薬・神経薬理、²京都大院・薬・生体機能解析、³大阪大院・歯・薬理、⁴大阪大院・連合小児発達・子どものこころ研セ、⁵大阪大院・薬・附創薬セ、⁶大阪大・データビリティフロンティア機構

【背景・目的】セロトニン神経系は、情動や摂食、睡眠など多岐にわたる脳機能に関与しており、その機能破綻は、うつ病や統合失調症といった様々な精神疾患の原因となっていると考えられている。これらの精神疾患の病態を分子レベルで解明する上で、患者由来のセロトニン神経を用いた解析は極めて有用であると考えられるが、ヒト脳へのアクセスの困難さから、このような解析はほとんど行われていないのが現状である。近年、ヒト iPS 細胞からセロトニン神経への分化系が開発されているが、①長い培養期間を要すること、②分泌タンパク質シグナリングの精密な調節が必須であり、ヒト iPS 細胞のクローンごとの性質の差による影響を受けやすいことから、多数の患者から一定の品質でセロトニン神経を得られる水準には達していない。そこで本研究では、上記の問題点を克服するべく、より簡便であり、分泌タンパク質の影響を受けにくいセロトニン神経分化系の開発を試みた。【方法】本研究では、セロトニン神経の発生過程で重要な役割を果たす遺伝子群を発現するレンチウイルスを用いた。ヒトiPS細胞に各遺伝子を様々な組み合わせで発現させたのち、分化誘導培地中で12日間培養した。培養後、神経マーカーTuj1と、セロトニンに対する免疫染色を行った。【結果・考察】ASCL1に加えてFEVまたはLMX1Bを発現させたところ、Tuj1陽性かつセロトニン陽性の神経が観察された。また、分化誘導培地中に腹側化因子であるソニックヘッジホッグ (Shh) を添加する検討を行ったところ、セロトニン陽性細胞数に変化は見られなかった。さらに、分化後の神経を高濃度カリウム溶液で刺激したところ、細胞外セロトニン濃度が有意に上昇した。これらの結果は、ASCL1に加えて、FEVまたはLMX1Bを発現させることで、分泌タンパク質シグナリング非依存的にヒトiPS細胞をセロトニン神経へと分化誘導することが可能であることを示唆している。

A-20 GPR3を介した海馬神経極性形成促進のメカニズム

○田中 茂、嶋田直人、白榊紘子、猪川文朗、宮城達博、秀 和泉、白藤俊彦、酒井規雄

広島大院・医歯薬保・神経薬理

【背景と目的】G-protein-coupled receptor 3 (GPR3) はclass A rhodopsin-type GPCR familyにガンド非存在下でG α s活性化能を有するG蛋白共役型受容体である。これまでに我々は、神経細胞におけるGPR3発現が下流のPKA、PI3キナーゼ経路を介して、神経突起伸張や神経細胞生存に深く関与することを報告してきた。最近では、GPR3がラット海馬神経細胞の極性形成を促進することを見出している。本研究では、GPR3を介した神経極性形成促進のメカニズムについて検討を行った。

【方法】Wistar系E18.5ラット海馬神経細胞にGPR3遺伝子を導入し、24-72時間後の神経極性化を、抗Tau1抗体を用いた免疫組織化学染色法により評価した。また、GPR3による神経極性形成促進作用に及ぼす、PKA、PI3キナーゼ阻害剤の効果を検討した。さらに、神経細胞極性形成への関与が報告されているCollapsin Response Mediator Protein- 2 (CRMP2) 脱リン酸化に、GPR3発現が影響を及ぼす可能性についても検討を行った。

【結果】GPR3遺伝子導入24時間後にTau1陽性神経突起形成の促進傾向を認めた。GPR3による神経極性形成促進効果は、PI3キナーゼ 阻害剤 LY294002 (10 μ M) により有意な消失を認めたが、PKA阻害剤 KT5720 (2 μ M) では影響は認められなかった。また、神経突起内の脱リン酸化CRMP2を有する神経細胞の割合は、培養24時間から60時間後まで経時的な増加を認めたが、この増加はGPR3発現抑制により有意に減少した。

【結論】海馬神経細胞分化における神経極性形成に、GPR3下流のPI3キナーゼ経路を介したCRMP2脱リン酸化の関与が示唆された。

プロスタグランジンD₂受容体DP1を介したマウス神経細胞の形態変化の解析

○奥田 健太¹、早田 敦子^{1,2}、毛利 育子³、新谷 勇介¹、加茂 俊彦¹、中澤 敬信^{1,4}、
谷池 雅子³、橋本 均^{1,2,5,6}

¹大阪大院・薬・神経薬理、²大阪大院・連合小児発達・子どものこころ研セ、³大阪大院・連合小児発達・小児発達神経学、⁴大阪大院・歯・薬理、⁵大阪大院・薬・附属創薬センター、⁶大阪大・データビリティフロンティア機構

[背景・目的] プロスタグランジンD₂ (PGD₂) は、その受容体であるDP1、DP2 / CRTH2を介して、睡眠の調節、炎症などに関わることが知られている。これまでに、活性化したミクログリアがPGD₂を産生し、炎症性サイトカインの産生を促進するなど、脳炎症におけるPGD₂の役割が明らかになっているが、PGD₂が神経細胞に与える影響は未だ不明な点が多い。近年、PGD₂合成酵素は神経細胞の発達期に強く発現することが見出されており、PGD₂が神経細胞の発達に関わる可能性が示唆される。そこで本研究では、PGD₂の神経細胞における役割を解明することを目的に、PGD₂受容体の発現やその特異的作動薬による神経細胞の形態への影響について解析を行った。[方法] 胎生16日目のICRマウス大脳皮質から初代培養皮質神経細胞を調製した。受容体発現はRT-PCR法を、形態変化は免疫染色法を用いて解析した。また、ゴルジ染色法により生後14日目のマウスにおける神経細胞の形態を解析した。[結果・考察] 初代培養皮質神経細胞において、DP1の発現は確認されたが、DP2は検出限界以下であった。そこでDP1特異的作動薬による作用を検討したところ、初代培養皮質神経細胞の一次樹状突起の数が増加した。このことからPGD₂はDP1を介して神経細胞の樹状突起の形成を促進することが示唆された。神経細胞の形態変化は、発達障害の一部の患者やそのモデル動物で認められることが報告されている。また、新生児の脳における低酸素暴露は、発達障害発症のリスクを高める一因と考えられているが、このときPGD₂の過剰な産生が引き起こされる。そこで次に、DP1を介したPGD₂の過剰なシグナルが神経細胞の形態に与える影響を検討するため、新生仔期マウスにDP1特異的作動薬を7日間腹腔内投与した。その結果、前頭前皮質第5層の錐体神経細胞において樹状突起の複雑性の低下と、樹状突起スパインの密度の増加が観察された。この結果は、DP1シグナルが発達障害に関わる可能性を示唆するものである。

膵臓から分泌される因子による中枢神経系の修復効果

○村松里衣子^{1,2}、山下俊英^{1,2,3}

1. 大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学、2. 大阪大学免疫学フロンティアセンター、
3. 大阪大学大学院生命機能研究科

脳と脊髄から成る中枢神経系は、個体全体の恒常性維持に重要な役割を担っている。様々な疾患により脳脊髄が傷害されると、運動、感覚、記憶学習など、多様な神経症状があらわれる。症状は、疾患の種類や個人差こそあるものの、わずかではあるが自然回復する。症状の改善には、疾患により傷ついた神経回路が修復する必要があるが、神経回路の修復を制御する分子メカニズムには、不明な点が多い。私たちはこれまでに、神経回路の修復には、傷害後の旺盛な血管新生が必要であること、そして血管内皮細胞が産生する分子が神経軸索の伸長を促すことを報告している。しかしその研究を進めていく中で、新しく出来た血管の構造上、病巣では血液が漏れ出しやすいことに気付いた。また、血液が漏れ出ている部位では、神経回路の修復、特に髄鞘の修復が盛んであることが、他のグループから報告された。血液には、末梢の臓器が産生するホルモンが豊富に含まれている。そして脳内や脊髄内の細胞の一部は、末梢の臓器が産生するホルモンに対する受容体を発現していることから、我々は、血液の中に神経回路の修復を促す因子が含まれており、中枢神経傷害後に血液が病巣に流入し、血液中の因子が脳脊髄内の細胞に作用することで、髄鞘の修復が促される、と考えた。

髄鞘の修復は、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖から始まる。マウスの培養細胞ならびにマウスの血液サンプルを用いた実験から、成体マウスの血液にはオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進させる因子が含まれることがわかった。薬理的なスクリーニングを行い、血液中のFibroblast growth factor (FGF) 21がオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促すことがわかった。脱髄モデルマウスを用いた検討から、FGF21は主に膵臓から分泌されること、内在性のFGF21が髄鞘の自然修復に寄与することがわかった (*J. Clin.*

Invest., 2017)。中枢神経系の神経回路の修復は、脳や脊髄の内部の細胞や分子により制御されることは知られていたが、本結果から、脳や脊髄の外部の分子も、中枢神経系の回路修復に関与することが示唆された。

新規T型Ca²⁺チャネル阻害薬6-prenylnaringeninとその誘導体はカンナビノイドCB₁受容体を介して神経前駆NG108-15細胞の神経様突起伸長を誘起する

○関口富美子¹、野田紗友理¹、洞口大和¹、山岡 桜¹、笠波嘉人¹、大野 董¹、Nguyen Huy Du²、豊岡尚樹²、村田和也³、松田秀秋³、吉田 繁⁴、原田成信^{1,5}、伊藤由香里^{1,5}、大久保つや子⁶、川畑篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²富山大院・生命融合、³近畿大・薬・薬用資源、⁴近畿大・理工・生命科学、⁵医療法人恵成会・原田聴覚研、⁶福岡看護大

我々は、生薬の苦参からT型Ca²⁺チャネル (T-channel) 阻害活性を有する成分としてsophoraflavanone G (SG) を抽出・精製・同定し、その類縁体である6-prenylnaringenin (PNG) と8-PNGが同様のT-channel阻害作用を示すことを見出している。興味深いことに、ある種のT-channel阻害薬がカンナビノイドCB₁あるいはCB₂受容体刺激作用を有すること、また、CB₁/CB₂受容体作用薬でT-channel阻害作用を示すものがあることが報告されている。本研究では、新規T-channel阻害薬として見出したSG、6-PNG、8-PNGと、6-PNGの構造展開により得られた新規化合物 (KAWA化合物) のCB₁受容体への作用を、CB₁を自然に発現する神経前駆NG108-15細胞を用いて検討した。初めに、Ca_v3.2を発現させたHEK293細胞において、whole-cell patch-clamp法により測定したT-channel電流 (T-current) への作用を調べたところ、SG、6-PNG、8-PNGいずれも3 μMでT-currentをほぼ完全に抑制し、KAWA化合物はそれらと同等以上のT-channel阻害活性を示した。NG108-15細胞では、CB₁刺激によってCa²⁺依存性に神経様突起の伸長が誘起されることが報告されていることより、各化合物の突起伸長効果を調べた。その結果、CB₁刺激薬ACEAおよびCB₁/CB₂刺激薬CP55940は0.3~3 μM、6-PNGは0.3~10 μMの範囲で濃度依存性に突起伸長を誘起した。一方、CB₂刺激薬AM1241、SG、8-PNGおよび既知のT-channel阻害薬TTA-A2は突起伸長を誘起しなかった。6-PNG、ACEA、CP55940による突起伸長効果はCB₁遮断薬AM251により抑制された。Fluo4-AMを取込ませたNG108-15細胞において、6-PNGは細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。KAWA化合物のうち6-PNGのprenyl基を長くあるいは大きくした化合物はより強い突起伸長効果を示す傾向が認められた。以上より、6-PNGおよびそのprenyl基を修飾した数種のKAWA化合物は、T-channel阻害作用以外に、CB₁受容体刺激作用を有し、それによってNG108-15細胞においてCa²⁺依存性に突起伸長を誘起することが示唆された。

Proflavine類似体による内向き整流性K⁺(Kir)チャネル阻害様式の解析

○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

<背景>4量体型、疑似4量体型カチオンチャネルは循環器疾患、精神疾患に用いられる多くの臨床薬の作用点である。これらの薬物の主要な結合部位は、チャネル分子内のイオン透過経路に位置するcentral cavity (中心洞) である。以前、我々はG蛋白質制御KirチャネルKir3.2の阻害薬の探索を行い、化合物ライブラリーから、静菌薬proflavine (Prof) を見出した。<目的>本研究では、Profとその類似体のKirチャネルファミリーメンバーに対する作用機序、サブユニット・化合物の特異性、阻害作用の電位依存性を網羅的に検討する。そして、Prof感受性-非感受性サブユニットのキメラの薬物感受性、Kir1.1に対する用量依存特性について解析する。<研究方法>生理的に存在する13種類のKirチャネルサブユニット及びその組み合わせを、*Xenopus*卵母細胞に発現させ、電気生理学的にProfの薬理作用を検討した。<結果>ProfはKir3.2を電位依存性に阻害する。そして、その作用点は中心洞である。これと同様の様式でKir2.2、Kir3.x、Kir4.2、Kir6.2Δ36は抑制された。一方、Kir1.1、Kir4.1/Kir5.1はこれらとは異なる様式で阻害され、その作用は電位非依存的であった。Prof類似体による阻害の程度はサブユニットに選択的であり、上記以外のサブユニットは薬物に非感受性だった。このため、ProfのKirチャネルに対する作用はマルチモードであり、相互作用は特異的であることが判った。キメラ分子の機能解析から、Kir1.1に対するProfの作用にはチャネルの細胞外領域が重要であることが判った。さらに、用量依存曲線は高いHill係数を示した。<考察>当該カチオンチャネルの開閉における細胞外領域の構造変化には賛否がある。本研究で得られた用量依存特性はチャネルへの複数の薬物の結合と、同領域におけるチャネル分子の協奏的な動きを示唆する。Kir1.1に対してProf類似体はアロステリックモジュレーターとして作用する。一般的に、同種薬物には、高い結合特異性が期待される。そのため、本研究はKirチャネルに特異的な活性修飾薬が創製できる可能性を強く示唆する。

A-25 Kir4.1チャンネルの阻害はアストロサイトBDNF発現を促進する

○金星 匡人、向井 崇浩、松葉 勇亮、辻 佳美、田中 志歩、清水 佐紀、大野 行弘

大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室

【背景】アストロサイトに発現する内向き整流性カリウムチャンネルKir4.1は、空間的カリウム緩衝機構を仲介することにより、神経細胞の興奮性を制御している。一方、ヒトおよび動物モデルにおいて、Kir4.1チャンネルの機能不全がてんかん発症に関与することが報告されているが、Kir4.1チャンネルのてんかん原性に対する調節メカニズムに関しては明らかではない。本研究は、てんかん原性を調節する因子である脳由来神経栄養因子(BDNF)に着目して、Kir4.1チャンネルの阻害およびノックダウンのBDNF発現に対する影響を検討した。

【方法】アストロサイト初代培養細胞に対して、Kir4.1チャンネル阻害作用を有する抗うつ薬の添加、および、siRNA導入によるKir4.1のノックダウンを行った。mRNA発現レベルはリアルタイムPCRで、タンパク質発現レベルはウエスタンブロット法またはELISA法を用いて評価した。

【結果】選択的セロトニン再取り込み阻害薬のフルオキセチンは、濃度依存的にBDNFのmRNA発現を増加させ、また、BDNFのタンパク質発現も増加させた。他の抗うつ薬(セルトラリン、イミプラミンなど)も、Kir4.1チャンネルの阻害作用と相関して、BDNFのmRNA発現を増加させた。一方、Kir4.1を標的としたsiRNA導入は、Kir4.1のmRNAおよびタンパク質レベルを有意に減少させた。このKir4.1のノックダウンによっても、BDNFのmRNAおよびタンパク質レベルは有意に増加した。また、Kir4.1のノックダウンによるBDNFの発現誘導は、MEK1/2阻害薬のU0126によって抑制された。

【結論】本結果から、アストロサイトKir4.1チャンネルの阻害は、Ras/MEK/ERK経路を介してBDNF発現を促進し、これがてんかん原性の獲得に関与する可能性が示された。

A-26 神経傷害後の末梢マクロファージによる脊髄ミクログリア調節作用

○木口倫一、小林大地、雑賀史浩、松崎伸介、岸岡史郎

和歌山県立医科大学医学部 薬理学

神経障害性疼痛の末梢性分子基盤には、傷害神経に浸潤する種々の免疫担当細胞が重要な役割を果たす。その中でも、マクロファージは数的に最大であるとともに多くの疼痛関連分子を産生することから、末梢神経炎症の中心的役割を担う細胞として考えられている。我々はこれまでに、炎症性マクロファージの抑制因子であるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR) $\alpha 4 \beta 2$ サブタイプ特異的リガンドを用いることで、坐骨神経部分結紮(PSL)後の神経障害性疼痛が改善することを報告している。本研究では、炎症性マクロファージに起因する末梢神経炎症(末梢感作)と脊髄ミクログリアが関与する脊髄感作の機能的連関について検討を行った。

PSL後の傷害坐骨神経におけるフローサイトメトリー解析により、F4/80陽性マクロファージの浸潤が観察された。PSLにより誘発される傷害坐骨神経でのinterleukin-1 β (IL-1 β)発現増加ならびに機械的アロディニアは、nAChR $\alpha 4 \beta 2$ サブタイプの特異的リガンドであるTC-2559を傷害直後より1日1回4日間、坐骨神経周囲に反復局所投与することにより抑制された。またTC-2559を傷害7日後から1日1回4日間局所投与しても、形成されたアロディニアが改善された。PSL後の脊髄後角では、活性型ミクログリアと関連の深いCD68、Iba1、interferon-regulatory factor 5およびIL-1 β などの発現増加が観察されるが、これらはいずれもnAChR $\alpha 4 \beta 2$ リガンドを傷害直後または7日後から坐骨神経周囲に反復局所投与することで抑制された。加えて、TC-2559は全身皮下投与することによっても、PSL誘発アロディニアの形成ならびに維持を抑制することが明らかになった。

これらの結果より、傷害末梢神経に浸潤した炎症性マクロファージが担う末梢感作は、脊髄ミクログリアの持続的活性化に重要であると考えられる。マクロファージを標的とした薬理的アプローチは末梢感作のみならず脊髄感作の改善にも有効であることから、神経障害性疼痛の治療標的として期待できる。

A-27

ミクログリアによるアミロイド β 取り込みにおけるmilk fat globule EGF factor 8 proteinとトランスグルタミナーゼの関与

○高野 桂¹、河邊 憲司²、森山 光章¹、中村 洋一¹

¹大阪府立大・院・生命環境科学・獣医・統合生理学 ²岡山大・院・医歯薬学・組織機能修復学

【背景・目的】トランスグルタミナーゼ (TG) は蛋白質のグルタミン残基とリジン残基との架橋結合を形成する酵素であり、哺乳類ではTG1~7および血液凝固第13因子 (FXIIIa) の8種類が知られている。中でも、TG2は神経変性疾患に特徴的な凝集体形成に関与する可能性や患者死後脳での発現上昇、炎症応答における発現・活性増加が報告されており、神経変性疾患の発症メカニズム等に重要な役割を果たす可能性が示唆されている。我々はこれまでに本学会において、グリア細胞をリポポリサッカライド (LPS) によって活性化することにより、TG2の発現およびTG活性が増加すること、増加したTG2が一酸化窒素 (NO) 産生や食食能に寄与する可能性を報告した。本研究では、ミクログリアによるアミロイド β ($A\beta$) 取り込みへのTGの関与を検討した。【方法】ニューロン-グリア細胞混合培養系に $A\beta$ を添加し、一定時間インキュベート後に、各細胞のマーカー蛋白質および $A\beta$ 、食食関連蛋白質milk fat globule EGF factor 8 protein (MFG-E8) に対する抗体を用いた免疫染色を行うことにより、細胞内への $A\beta$ 取り込みを評価した。【結果】ニューロン-グリア細胞混合培養系に100 nMの $A\beta$ を添加し3日間インキュベートしたところ、 $A\beta$ は主にミクログリアに取り込まれていた。また、その取り込みはTG活性阻害剤であるシスタミンの添加により、有意に抑制された。 $A\beta$ を添加した混合培養系における免疫染色の結果、 $A\beta$ はMFG-E8と共局在している様子が観察された。ミクログリア単独培養系において、MFG-E8およびTG2の蛋白質発現がwestern blotting法により検出され、 $A\beta$ 添加によりTG2発現が有意に増加した。さらに、免疫沈降法によりMFG-E8とTG2の結合が認められた。【考察】ミクログリアによる $A\beta$ 取り込みにMFG-E8とTG2が関与する可能性が示唆された。ミクログリア活性化時に上昇するTGは、蛍光ビーズや死細胞だけでなく、 $A\beta$ 取り込みを促進する可能性が示唆される。

A-28

ミクログリアの死細胞食食のイメージング解析とP2Y₂受容体の関与

○秀 和泉¹、白榊紘子¹、益田顕拓¹、柳瀬雄輝²、白藤俊彦¹、田中 茂¹、秀 道広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・皮膚科学

【目的】ミクログリアは脳内の異物や死細胞を食食し神経組織の恒常性維持に働く一方、その過剰な食食が様々な神経疾患の病態に関与することが明らかにされつつある。我々は第122回本部会において、LPS活性化ミクログリアによる死細胞食食が非特異的ATP受容体遮断薬スラミンにより抑制されることから、死細胞食食にスラミン感受性ATP受容体 (おそらくP2Y₂) が関与する可能性を報告した。今回は、ミクログリアのリアルタイムイメージングから死細胞食食の定量解析を行い、P2Y₂受容体選択的遮断薬 (AR-C118925XX) および非特異的P2遮断薬 (スラミン、PPADS) の効果を検討した。

【方法】ラット新生児大脳より調製した初代ミクログリアを細胞培養装置付き位相差顕微鏡により18時間のタイムラプス観察を行った。各視野の個々のミクログリアを、A死を起こす細胞、B生存するが死細胞に接触しない細胞、C死細胞に接触し食食する細胞、D死細胞に接触するが食食できない細胞の4グループに分け、それぞれの細胞の割合 (%) を算出した。P2Y受容体遺伝子発現はリアルタイムPCRにより定量した。

【結果】無刺激では約半数のミクログリアが徐々に死んでいくが、LPS刺激では約60-70%の細胞に速やかな死が引き起こされた。いずれの場合も死細胞は10-20%の生存ミクログリアにより食食除去された。P2Y₂受容体選択的遮断薬AR-C112589XXはミクログリアの死細胞への遊走や接触到影響を及ぼすことなく食食を阻害し、その抑制効果はLPS刺激においてより強く認められた。また、非特異的P2遮断薬のうちP2Y₂に作用するスラミンは同様の抑制作用を示したが、P2Y₂に作用しないPPADSには影響は認められなかった。また、LPS刺激はP2Y受容体のうちP2Y₂受容体の遺伝子発現を特異的に亢進させた。

【考察】以上の結果から、初代ミクログリアには死細胞食食能の高いサブセットが1-2割存在し、その死細胞食食にはLPS刺激において発現亢進するP2Y₂受容体が重要な役割を果たすことが確認された。

シュワン細胞から分泌されるperoxiredoxinの変異SOD1 (G93A) 導入およびA23187 誘発神経細胞死に対する保護作用

○山室晶子、三田裕貴、近藤香菜、木村友紀、永野えりな、石丸侑希、吉岡靖啓、前田定秋
撰南大・薬・薬物治療

【目的】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞が選択的に障害され、筋萎縮と筋力低下により死に至る難治性の神経変性疾患である。これまでに当研究室では、ヒトシュワン細胞株 YST-1 細胞の培養上清に含まれる peroxiredoxin (PRDX) が過酸化水素による運動神経細胞死に対して保護作用を有することを見出してきた。本研究では、家族性 ALS の原因遺伝子である変異 SOD1 (G93A) 導入による神経細胞死や孤発性ALS の原因とされている細胞内Ca²⁺ 流入による神経細胞死へのシュワン細胞培養上清の影響について検討を行った。

【方法】

実験は、マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞および YST-1 細胞を用いて行った。細胞死の判定は Hoechst33342/Propidium iodide 染色法により、また活性酸素種 (ROS) の産生はdihydroethidium を用いた蛍光強度の測定により行った。YST-1 細胞におけるPRDX mRNA の発現はreal-time RT-PCR 法により検討した。

【結果・考察】

Neuro-2a 細胞において 変異SOD1 (G93A) の遺伝子導入およびカルシウムイオノフォア A23187処置により経時的にROSの産生増加と細胞死が誘発された。これらの細胞死は YST-1 細胞培養上清により有意に抑制された。また、免疫沈降法によりPRDXを除去した YST-1細胞培養上清では、保護作用が消失した。一方、YST-1 細胞への変異SOD1 (G93A) の導入によりPRDX mRNA の発現低下がみられた。以上の結果から、ALS における運動神経細胞死にシュワン細胞からの PRDX の分泌低下が関与している可能性が示唆された。

Cyclophosphamide誘起膀胱炎マウスにおけるH₂S/Ca_v3.2系を介する膀胱痛の発現:NF-κB系の役割と亜鉛による制御

○尾崎友香¹、松岡順紀¹、坪田真帆¹、富田詩織¹、関口富美子¹、南武志²、川畑篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理 ²近畿大・理工・生命科学科

Cystathionine-γ-lyase (CSE) などにより産生されるH₂Sは、Ca_v3.2 T型Ca²⁺チャネルを介して痛みを増強する。我々はcyclophosphamide (CPA) 誘起膀胱炎に伴う膀胱痛に、CSE発現誘導とCa_v3.2の機能亢進が関与する事を証明している。一方、Ca_v3.2の機能は亜鉛によって抑制的に調節されており、亜鉛供与体であるポラプレジンクがCPA誘起膀胱痛を抑制すること、また亜鉛キレーターであるN,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) がCa_v3.2依存的に結腸痛を誘起することを報告している。さらに最近、知覚神経におけるCa_v3.2のタンパク量が神経興奮依存的に増加することが示唆されている。今回は、CPA 誘起膀胱炎マウスにおいて、膀胱組織中のCSE発現誘導へのNF-κB系の関与と、生体内の亜鉛を欠乏させた場合のCPA誘起膀胱痛への影響およびCa_v3.2の挙動を解析した。マウスにCPA 400 mg/kgを腹腔内投与したところ、膀胱痛 (侵害受容行動と関連痛覚過敏) が誘起され、膀胱組織ではCSEの発現量と酵素活性の上昇およびNF-κB p65のリン酸化亢進が、また後根神経節 (DRG) においてCa_v3.2発現量の増加が認められた。NF-κB阻害薬は、CPAにより誘起される膀胱痛および膀胱組織中のp65リン酸化亢進とCSE発現誘導を抑制した。次に、14日間の亜鉛欠乏食摂取あるいはTPEN単回腹腔内投与の影響を検討したところ、対照マウスでは無効な低用量 (200 mg/kg) のCPA投与によって膀胱痛が誘起され、これはT型Ca²⁺チャネル阻害薬あるいは亜鉛の投与、さらにCa_v3.2ノックダウンによって抑制された。対照マウスではCPA 400 mg/kg、亜鉛欠乏マウスではCPA 200 mg/kgの投与により、DRGにおいてCa_v3.2と、その転写を促進するEgr-1およびプロテアソーム分解を抑制する脱ユビキチン化酵素USP5の発現量が有意に増加した。一方、亜鉛欠乏マウスでのCPA 200 mg/kg投与では、膀胱のCSE発現増加は見られなかったが、膀胱痛およびDRGにおけるCa_v3.2、Egr-1、USP5の発現増加がCSE阻害薬により抑制された。以上より、CPA誘起膀胱炎マウスでは、NF-κB に依存したCSE発現誘導が膀胱痛の発現に関与すること、また亜鉛欠乏状態ではCSE由来H₂SによるCa_v3.2の機能亢進が増強され、神経興奮依存的にCa_v3.2の転写促進と分解抑制が起こることでタンパク量が増加し、膀胱痛が増強されることが示唆された。