

B-01 IgE抗体によるヒト好塩基球の活性化

○柳瀬雄輝¹、川口智子¹、石井 香¹、酒井規雄²、秀 道広¹

¹広島大学医歯薬保健学研究科皮膚科学、²広島大学医歯薬保健学研究科神経薬理学

【目的】

好塩基球の細胞膜上には高親和性IgE受容体が発現しており、受容体上に結合したIgE抗体と多価抗原の結合によりヒスタミン等の起炎性物質が放出され、その結果アレルギー炎症が誘発される。慢性蕁麻疹やアトピー性皮膚炎のような皮膚アレルギー疾患では、血中IgE抗体、IgE受容体共に発現が上昇していることが知られている。好塩基球はライフサイクルが数日と短く、IgE抗体未結合の状態では血液中のIgE抗体にさらされる頻度が高いため、IgE抗体による活性化を受ける可能性が考えられる。そこで本研究では、高濃度のIgE抗体がヒト好塩基球を直接活性化し得るか検討した。

【方法】

ヒト末梢血から比重遠心法により単核球（PBMC）を得た。好塩基球は、PBMCから磁気分離法を利用してネガティブセレクションにより分離した。好塩基球のIgE受容体に結合しているIgE抗体は0.1%乳酸処理によりを除去した。好塩基球の刺激にはヒトミエローマIgE、ヒト血清由来IgEを使用し、刺激に伴うヒスタミン遊離、形態変化は、それぞれHPLC、細胞骨格染色後の蛍光画像によって確認した。

【結果】

乳酸処理によりIgE受容体に結合しているIgE抗体を除去したヒト末梢血由来好塩基球は、抗原非存在下でも、 $1\mu\text{g/ml}$ 以上のIgE抗体にさらされると、ヒスタミンを遊離し、細胞形態変化を起こすことが示された。またそれらはIL-3存在下で増強されることを見出した。

【考察】

アトピー性皮膚炎、慢性蕁麻疹患者のIgE抗体値は、抗原非存在下で好塩基球を活性化し得る $1\mu\text{g/ml}$ を超えることも多い。そのため、これらの皮膚アレルギー疾患においてはIgE抗体により常に好塩基球が活性化を受けている可能性があり、それが慢性的なアレルギー症状の誘発に関与しているかもしれない。

B-02

皮下免疫療法（SCIT）は、スギ花粉症患者の末梢血中の抗原特異的Breg細胞を増加させた

○松田将也¹、辻本奈有¹、森榮勇貴¹、石田有希¹、濱口淳平¹、田淵雄基¹、土井加菜¹、寺田哲也²、河田 了²、奈邊 健¹

¹摂南大・薬・薬効薬理、²大阪医大・耳鼻咽喉科・頭頸部外科

【目的】アレルギー免疫療法は、抗原を少量から投与し漸増することで、抗原に対する免疫寛容を誘導する治療法である。その効果発現機序には、抗炎症性サイトカインIL-10を産生する制御性T（Treg）細胞や遮断抗体とされるIgG4抗体が関与することが示唆されてきた。さらに、近年、IgG4抗体の産生細胞とされる制御性B（Breg）細胞、および制御性の単球系細胞の存在も報告されてきたが、アレルギー免疫療法の効果発現とこれらの制御性細胞との関連は明らかではない。本研究では、スギ花粉症患者において、SCIT処置により、末梢血単核球（PBMC）中にBreg細胞ならびに制御性の単球系細胞が増加するか否かを検討するとともに、IL-10転写因子の遺伝子変動を解析した。

【方法】健康人、スギ花粉症患者およびSCITを5年以上施行した患者より、2017年の花粉飛散期終了後に採血した。血中のスギ花粉特異的抗体を定量し、PBMCを比重遠心法により採取した。PBMCを抗原（Cry j 1）で刺激後、flow cytometryにより、Breg細胞（IL-10⁺ CD19⁺細胞）および制御性の単球系細胞（IL-10⁺ CD14⁺細胞）を検出した。IL-10転写因子E4BP4、c-maf、Egr-2およびFoxp3のmRNAを、リアルタイムPCR法により定量した。

【結果】（1）SCIT処置群の抗原特異的IgE抗体量は、花粉症患者群に比べて有意に少なかった。一方、抗原特異的IgG4抗体量は、SCITを行うことにより顕著に多かった。（2）SCIT処置群では、PBMC中のBreg細胞は花粉症患者群に比べて有意に多かった。PBMC中のBreg細胞の割合と血清中の抗原特異的IgG4抗体量の間には正の相関が認められた。（3）制御性の単球系細胞は、花粉症患者群とSCIT処置群の間で差は認められなかった。（4）4つのIL-10転写因子のなかで、E4BP4 mRNA量はSCIT処置群において顕著に高く、花粉症患者群との間に有意な差が認められた。

【考察】Breg細胞ならびにE4BP4は、アレルギー免疫療法の効果発現機序に関与する可能性が示唆された。

B-03 FTY720依存的な遺伝子発現変動の解析

○萩原加奈子¹、亀岡佳則¹、北條志穂美¹、近重裕次²、佐藤亮介¹、高崎輝恒¹、杉浦麗子¹

¹近畿大薬、²情報通信研究機構・未来ICT研究所

多発性硬化症の内服製剤であるフィンゴリモド塩酸塩（FTY720; イムセラ、ジレニア）は、スフィンゴシン1-リン酸受容体（S1P）を抑制することで免疫抑制作用を示し、多発性硬化症の神経炎症を抑制する。一方で、FTY720は、様々ながん種に対し、S1Pシグナル非依存的にアポトーシスを誘導することが報告されていることから、抗がん剤としての応用も期待されている。しかしながら、FTY720の細胞内シグナル伝達経路の全容は明らかにされていないことから、ヒトと共通した薬の標的分子や細胞内シグナル伝達経路が高度に保存された分裂酵母モデル生物を用いて解明を試みた。

我々は、DNAマイクロアレイ法を用いて、FTY720依存的な遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、FTY720依存的に発現が上昇する84の遺伝子を同定した。Gene Ontology解析の結果、酸化ストレス応答において機能する遺伝子群が濃縮していた。我々はこれまでにFTY720依存的にROS産生が上昇した結果、ストレス応答MAPK経路が活性化することを報告している。そこで、これらの遺伝子発現についてさらに詳細に調べるために、Real-time PCR法を行った。その結果、これらの酸化ストレス関連遺伝子の多くが、ストレス応答MAPKの標的転写因子であるAtf1依存的に制御されていることが確認された。

興味深いことに、FTY720依存的な発現誘導を示す遺伝子群として、鉄ホメオスタシスの制御に関わる遺伝子が濃縮していることも明らかになった。これらの鉄ホメオスタシス調節因子群のFTY720依存的な発現上昇もReal-time PCRによっても確認された。驚くべきことに、FTY720依存的な細胞増殖抑制機構に鉄ホメオスタシスの調節に関わることも明らかになった。本学会では、FTY720依存的な細胞増殖抑制の分子機構に関わる酸化ストレス制御、ならびに細胞内鉄ホメオスタシスの変動の関係について考察する予定である。

B-04 ゲノム編集によるAGEsの作用メカニズム解析プラットフォームの構築

○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、発症メカニズムが未同定の炎症性疾患の原因として加齢や高血糖に伴い生体内に蓄積する終末糖化産物（AGEs）が注目を集めている。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する分子群の総称である。これまでに、AGEsの細胞表面受容体としてRAGEが同定されている。AGEsのRAGEへの結合は、炎症性サイトカインの産生促進をはじめとする炎症反応を活性化させる。このことから、生体内におけるAGEsの蓄積とAGEs-RAGE系の活性化が、炎症性疾患の要因となる可能性が見出された。

一方で、AGEsがRAGE以外の受容体に作用する可能性については、ほとんど検討されていない。RAGEはマルチリガンド受容体であり、内在性の起炎分子群（Damps分子）の受容体としても機能する。Damps分子のひとつであるHMGB1はRAGE以外にも、Toll様受容体（TLR）2や4に結合することが示されている。この知見は、AGEsもまたTLRsに作用す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の作用メカニズムを詳細に解析することを目的として、ゲノム編集によりRAGEやTLRsの遺伝子を破壊した細胞を作製し、その評価を試みた。

【方法】CRISPR/Cas9システムによりRAW264。7細胞においてRAGE、TLR2およびTLR4遺伝子を破壊し、限界希釈法により遺伝子破壊細胞のクローニングを行った。得られたクローンについて、ゲノムシーケンシングにより目的遺伝子が破壊されていることを確認した。さらに、各受容体に特異的なリガンドに対する応答を検討した。

【結果と考察】TLR2およびTLR4遺伝子を破壊した細胞では、各受容体に特異的なリガンドに対する反応性が有意に低下していることが見出された。さらに、RAGE遺伝子破壊細胞においてAGEsに対する反応性を検討したところ、AGEsがRAGE以外の受容体を介して作用する可能性が示唆された。今後、今回作製した細胞を用いてAGEsの作用メカニズムをより詳細に検討する予定である。

B-05**TCRシグナル伝達におけるformin依存的なアクチンの機能解析**

○桂 義親、タムケオ ディーン、成宮 周

京都大学大学院 医学研究科 創薬医学講座

末梢T細胞は獲得免疫応答の中心を担う細胞である。T細胞は、細胞表面に発現しているT細胞受容体 (TCR) を介して抗原提示細胞に提示された抗原を認識することにより、免疫シナプス (IS) を形成する。この過程は増殖・分化に不可欠である。これまでの研究から、抗原を認識したTCRが細胞内で種々のシグナル分子を活性化して細胞内へ情報を伝搬する過程に細胞骨格アクチンの関与が知られている。しかし、TCRシグナル伝達におけるアクチンの分子作用機序および分子制御機構については未だ不明な点が多い。本研究では主要なアクチン核化・重合活性をもつタンパクの一つであるforminに着目し、TCRシグナル伝達における寄与を検討した。その結果、CD8陽性T細胞において、forminのアクチン重合活性の阻害がTCR刺激依存的なZAP-70のリン酸化の亢進と、LATのリン酸化の減弱を引き起こすことがわかった。さらに、IS形成時のF-アクチン重合とISの広がり、formin活性の阻害によって抑制されることが明らかとなった。また、その後のTCRマイクロクラスターの中心への集合や、ISの辺縁に特徴的にみられるリン酸化LATの局在も顕著に減弱した。これらの表現型がどのformin分子によって制御されているのかを明らかにするため、発現や局在解析及び遺伝子改変マウスを用いた実験により検討を行った。その結果、forminの中でもmDia1とmDia3が重要であることがわかった。本研究において得られた知見から、formin依存的なF-アクチンの時空間的なリモデリングがTCRシグナル伝達に不可欠であることが示された。

B-06**Lysophosphatidic acid induces Filaggrin expression and promotes skin barrier function in human keratinocyte**

○Ratklao Siriwach, Akiko Sumitomo, Kentaro Ito, Kohei Tanabe, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya

Department of Drug Discovery Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine

Filaggrin (FLG), an epidermal cross-linked keratin protein, plays a crucial role in skin barrier system. It was previously shown that loss-of-function of *FLG* gene results in poor stratum corneum formation, prone to water loss and clinical symptoms, e.g. skin ichthyosis vulgaris, as a result of impaired skin barrier function. Mutation of *FLG* also enhances percutaneous transfer of allergens. Reduced FLG leads to high risk of atopic dermatitis (AD), asthma and other allergies. In this study, we screened for a GPCR ligand that could induce *FLG* expression in Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEKs). First, we examined the GPCRs expression in NHEKs and found that LPA1 and LPA5 are among the highly expressed. We then next determined the effect of a natural ligand for LPA1 and LPA5, oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA), on *FLG* expression and found that it could strongly induce both *FLG* mRNA and protein. Moreover, utilizing siRNA and selective antagonist, we confirmed that LPA1 and LPA5 are the responsible receptors among the six LPA receptors (LPA1-6) found in mammals for *FLG* induction by LPA in NHEKs. Furthermore, we performed microarray experiments to dissect the underlying molecular mechanism and found that not only *FLG*, but other skin barrier genes, actin and GTPase related genes are also induced upon LPA stimulation. These gene expression induced by LPA are mediated through the Rho-ROCK axis, as we confirmed by pharmacological inhibition of ROCK and Rho-GTPase pull down assay. Finally, we confirmed the LPA-dependent *FLG* induction in 3D human keratinocyte culture and mouse skin *in vivo*. These results together suggested that augmenting LPA signaling may serve as a novel therapeutic approach for treating skin barrier dysfunction, including AD.

B-07**長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1の抑制は慢性ストレス暴露後の術後痛を悪化させる**

○相澤風花、中本賀寿夫、徳山尚吾

神戸学院大薬・臨床薬学

【目的】うつ病などの情動機能異常は慢性疼痛のリスクを増大させることが知られているが、この機序は未だ不明な点が多い。現在これらの病態下においては、脳内の n-3 系脂肪酸が減少しているとの報告があり、n-3 系脂肪酸を介したシグナル機構の低下が関与していることが示唆される。近年、n-3 系脂肪酸は長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 に作用し、様々な生理作用を発揮することが明らかにされている。我々も、GPR40/FFAR1 が痛みを抑制することや抗うつ様作用を示すことを示してきた。本研究では、脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの低下が、慢性ストレス暴露後の術後痛に伴う痛みの慢性化に関与するかどうか検討した。

【方法】GPR40/FFAR1 欠損 (GPR40^{KO}) 雄性マウス (8 週齢) および C57BL/6J 雄性マウス (9 週齢) を使用した。C57BL/6J を用いて 10 日間連続の社会敗北 (SD) ストレスを負荷し、慢性ストレスモデルを作製した。SD ストレス中に脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルを抑制するため、浸透圧ポンプを用いて GPR40/FFAR1 アンタゴニストである GW1100 (1.0 μg/12 μL/day/mouse) をカニューレ存在下、側脳室へ持続投与した。術後痛の惹起は、Brennan らの方法を用いた。機械的痛覚過敏は von Frey 試験を用いて、フィラメント 10 回の刺激に対する反応回数を評価した。

【結果】GPR40^{KO}マウスは、野生型と比較して術後痛惹起後の機械的痛覚過敏性が有意に増加し、これは術後痛惹起 7 日目まで持続した。SD ストレス負荷マウスは、非ストレスマウスと比較して機械的痛覚過敏性が有意に増加し、術後痛惹起 21 日目まで持続した。SD ストレス負荷中の GW1100 の持続投与は、vehicle 群と比較し 28 日目以降も持続し、これは 63 日目に消失した。

【考察】以上の結果から、脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの低下は、慢性ストレス負荷マウスの痛みを慢性化させることが示された。

B-08**p62のAPPへの結合によるアルツハイマー病発症への関わり**○田中景吾¹、細井徹²、野村靖幸³、小澤光一郎²¹広島大薬、²広島大院医歯薬、³久留米大医 薬理学

【目的】近年、p62/Sequestosome1が細胞内の主要なタンパク質分解経路であるオートファジーを介し、異常タンパク質の選択的分解に関わることが明らかとなり、p62を介した選択的オートファジーと神経変性疾患との関係が注目されている。アルツハイマー病 (AD) などの神経変性疾患では、オートファジー不全によって異常タンパク質が蓄積し発症すると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究はAD関連タンパク質とp62を介した選択的オートファジーとの関連を明らかにし、AD発症の分子機構を解明することを目的とした。

【結果・考察】Amyloid-β precursor protein (APP) は、AD発症の原因物質と考えられているAβの産生に関わる膜一回貫通前駆体タンパク質である。そこで、APPがp62を介した選択的オートファジーによって分解されていると仮定し、p62とAPPとの結合を免疫沈降法によって検討した。その結果、APPとp62は結合することが明らかとなった。また、p62のAPP結合領域を検討したところ、p62はAPPのC末端領域 (C99、C60) と結合することが明らかとなった。さらに、N2a細胞にC99もしくはC60とp62を過剰発現させると、不溶性画分において凝集体が形成された。その凝集体はオートファジー活性化薬 (SMER28) により減少し、オートファジー阻害薬 (3-MA) 処置により増加したことから、オートファジーによって分解されていることが示唆された。

以上から、p62はC99、C60と結合し、凝集体を形成することで、オートファジー経路による分解へと誘導し、ADの進行に関与している可能性が考えられた。

B-09**糖尿病マウスにおける認知機能障害におけるアストロサイトの関与**

○丸岡 純也¹、石倉 啓一郎¹、加藤 慎也²、糸 和彦¹、大澤 匡弘¹

¹名古屋市大・院薬・神経薬理、²名古屋市大・薬・神経薬理

【目的】糖尿病は全世界的に有病率の上昇が著しい疾患で、認知機能障害のリスクファクターである。しかし糖尿病に起因する認知機能障害のメカニズムは未だ解明されておらず、有効な治療方法は確立されていない。これまでの我々の研究から、糖尿病マウスでも認知機能が低下しており、海馬における乳酸合成酵素（LDH5）やモノカルボン酸トランスポーター（monocarboxylic acid transporter; MCT）の発現量の低下が認知機能低下に関与すること、アストロサイトの機能変化が関与することを示唆してきた。そこで本研究では、糖尿病マウスにみられる認知機能障害に対するアストロサイトの直接的な関与について薬理遺伝学的手法を用いて検討した。【方法】6-10週齢のICR系雄性マウスを用いた。糖尿病はストレプトゾトシン（200 mg/kg）を尾側静脈より投与し誘発した。認知機能は、新奇物体認識試験に従い評価した。【結果および考察】アストロサイトからニューロンへ輸送されるL-乳酸を脳室内へ投与したところ、糖尿病マウスにおいて新奇物体への探索時間の割合が用量依存的に延長することが明らかになった。また、不活性化体であるD-乳酸の脳室内投与により対照群マウスにおける新規物体への探索時間の割合が減少した。乳酸を輸送するMCTの阻害剤である α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-CIN) の前処置によっても同様に、対照群マウスにおける新規物体への探索時間の割合は減少し、糖尿病マウスで見られたL-乳酸による新規物体への探索時間の割合の増大が有意に抑制された。このことから、糖尿病マウスにおける認知機能障害に海馬アストロサイトの乳酸供給能力の低下が関与していることが示唆された。次に、海馬にアデノ随伴ウイルスベクター（AAV-GFAP-HA-hM3Dq-mCitrine）を用いて、クロザピン N-オキシド（CNO）により活性化するDesigner Receptors Exclusively Activated by Designer Drug（DREADD）である、hM3Dqを海馬CA1領域のアストロサイトに発現させて検討したところ、糖尿病マウスの新規物体への探索時間の割合がCNOにより増大した。これらの結果より、糖尿病マウスにみられる認知機能障害は海馬アストロサイトの機能低下に伴うANLS機能不全が関与していることが示唆された。なお、DREADDによるアストロサイト選択的活性化が乳酸輸送を促進するかについては現在検討中である。

B-10**Expression of MHCI in astrocytes leads to impairments in a visual discrimination task in mice**

○Bolati Wulaer, Akira Sobue, Norimichi Itoh, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada

Department of Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, Nagoya University Graduate School of Medicine

Immune molecules, such as cytokines, complement, and major histocompatibility complex (MHC) proteins in the central nervous system (CNS) are frequently associated with neuropsychiatric disorders. In particular, neuronal MHC class I (MHCI), such as H-2D and H-2K regulates neurite outgrowth, establishment and function of cortical connections, and activity-dependent refinement in mice. However, the role of astroglial MHCI remains unclear. In this study, in order to investigate the role of astroglial MHCI in cognitive functions, the ability of associative learning and memory were evaluated in mice expressing soluble form of H-2D (sH-2D) in the prefrontal cortex, using a touchscreen-based visual discrimination (VD) task. The task requires learning that one of two shapes displayed simultaneously on the screen is associated with reward. In the pre-training stage, control mice spent approximately 360 trials to reach the stage criterion whereas the sH-2D-expressed mice required 463 trials. In the VD task, control mice generally spent 5 training sessions to the criterion whereas sH-2D-expressed mice spent more than 8 training sessions. Number of normal trials to reach the task criterion in the sH-2D-expressed mice was significantly higher than that of control mice (172 in control and 262 in sH-2D, $p < 0.05$). Number of correction trials, which is the next trial after the incorrect response, was also higher in sH-2D-expressed mice than control mice (97 in control and 161 in sH-2D, $p < 0.05$). However, there were no significant differences in accuracy between the control mice and sH-2D-expressed mice on either the first nor the last training session, indicating that sH-2D-expressed mice was able to learn the task to criterion, but required more trials than control mice. These results suggest that sH-2D in astrocytes impairs the ability of associative learning process.

B-11 マウス網膜発生期におけるミクログリアの関与



○久世祥己、大内一輝、中村信介、嶋澤雅光、原英彰

岐阜薬科大学 薬効解析学

【目的】ミクログリアは、中枢神経系に存在する常在性のマクロファージとも呼ばれている。主な機能として、神経変性に応答して種々のサイトカインの放出や死細胞の貪食を担うことが知られている。他にも、ミクログリアは脳室下帯においてインスリン様成長因子1やトランスフォーミング増殖因子 β (Transforming growth factor β : TGF β) といった成長因子の発現が確認されており (Shigemoto-Mogami et al., *J Neurosci.*, 2014, Pang et al., *PLoS One*, 2016)、近年ミクログリアと神経新生の関与が示唆されている。生後の網膜発生期に網膜組織に存在するミクログリアの数は、生後直後から増加するが、その網膜発生に及ぼす影響は明らかになっていない。本研究は、網膜発生期におけるミクログリアの作用を明らかにすることを目的として行った。

【方法】生後3日目の仔マウスにLipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与することで、生後7日目の脳内で炎症性M2型ミクログリアの増加が報告されている (Pang et al. *PLoS One*, 2016)。同様の手法を用いて、生後3日目にLPSの投与を行い、網膜内の増殖細胞の数を評価するために、5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) を生後3日目から7日目まで1回/日腹腔内投与した。仔マウスの眼を生後7日目に摘出し、発達期におけるミクログリアの関与を明らかにするために免疫染色による評価を行った。

【結果】LPSの投与により、生後7日目の網膜においてミクログリアの増加が認められた。また、そのミクログリアはM2型のマーカーであるCD206及びTGF β を発現していた。さらに、網膜末端部においてBrdU陽性の増殖細胞の増加及び網膜前駆細胞の増加が認められた。

【考察】仔マウスへのLPS暴露は、M2型ミクログリアを増加させ、網膜発生中の網膜前駆細胞の数を増加させた。以上、ミクログリアは網膜前駆細胞増殖を正に調節する可能性が示唆された。

B-12 アストロサイト由来CCL6による培養大脳皮質ニューロンの保護作用



○中川 翔太、泉 安彦、赤池 昭紀、久米 利明

京都大・院薬・薬品作用解析

【背景】アストロサイトは種々のケモカインを介してニューロン保護的な作用を示すことが報告されている。ケモカインの一種であるCCL6の中枢神経系細胞における報告では培養ミクログリアでの発現が示されているが、ニューロン、アストロサイトでの作用について未解明な点が多い。そこで本研究では、培養大脳皮質ニューロン、アストロサイト、さらにそれらの混合培養系を構築し、CCL6の発現並びにグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。【方法】ニューロンとアストロサイトの混合培養、ニューロンの単独培養、アストロサイトの単独培養の三つの培養系をWister/STラット胎仔もしくは新生仔の大脳皮質より調整した。混合培養からのアストロサイトの単離にはFACSを用いた。ケモカインの発現はRT-PCRおよびELISAを用いて評価した。ニューロンの生存率の測定はMTT法、およびLDH法を用いた。【結果】ニューロン単独培養とニューロン・アストロサイト混合培養にそれぞれグルタミン酸を処置すると両方でニューロン死が観察されたが、ニューロン単独培養はより低濃度のグルタミン酸によりニューロン死が惹起された。またニューロン・アストロサイト混合培養由来培地をニューロン単独培養に前処置すると、グルタミン酸神経毒性が抑制された。ニューロン単独培養およびアストロサイト単独培養では、CCL6の発現は観察されなかった。一方、ニューロン・アストロサイトの混合培養からFACSを用いて分離したアストロサイトにはCCL6の発現が観察された。ニューロン・アストロサイト混合培養由来培地はニューロン単独培養由来培地に比べてより高いCCL6濃度を示した。次にニューロン単独培養にCCL6を24時間前処置すると、グルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示した。またこの保護作用はケモカイン受容体CCR1拮抗薬により抑制された。さらにニューロン・アストロサイト混合培養におけるグルタミン酸神経毒性はCCR1拮抗薬を前処置することで増強された。既報により、CCL6はCCR1の下流において、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を活性化することが知られているため、PI3K阻害薬をCCL6と同時処置したところ、CCL6によるニューロン保護作用は消失した。【考察】アストロサイトはニューロンとの共存によりニューロンのCCR1の活性化を介してニューロンにおいて保護作用を示すことが示唆された。またこの保護作用の一部はアストロサイトがニューロンとの共存により産生・遊離するCCL6がCCR1およびその下流のPI3Kの活性化を介して発揮していることが示唆された。

B-13

HSP90によるMAPKシグナル制御機構の解析



○池畑拓実、大谷夏実、松浦一貴、佐藤亮介、高崎輝恒、萩原加奈子、杉浦麗子

近畿大学薬学部 分子医療ゲノム創薬学研究室

Hsp90 (heat shock protein 90) は高度に保存された分子シャペロンの一種であり、各種ストレスに応答して発現量が上昇する。Hsp90は多彩な細胞内タンパク質のフォールディングに関わるが、そのクライアントタンパク質には細胞増殖に関わるシグナル分子が含まれることから、抗がん剤開発における魅力的な標的でもある。当研究室では、遺伝学を応用した独自のスクリーニング法を用いてMAPKシグナルの制御因子を多数同定するとともに、MAPKシグナル調節剤の創薬スクリーニング法を確立することにより、悪性黒色腫選択的な細胞死誘導剤であるACA-28など、抗がん剤シーズの取得に成功している。

今回我々はこのスクリーニングによってMAPKシグナルの活性が低下している変異体としてHsp90の機能低下変異体である*swo1-26*を同定するとともに、MAPKシグナルを阻害する化合物としてHsp90阻害剤Geldanamycinを同定した。これらの結果は、Hsp90がMAPKシグナル経路の調節に関与することを示唆している。そこで遺伝学的手法を用いて、Hsp90とMAPKシグナルの機能的関係について解析を行ったところ、MAPKKKの上流因子であるRho2、およびPck2 (PKC) 過剰発現細胞におけるMAPKシグナルの活性化依存的な細胞増殖抑制がHsp90/*swo1-26*変異により低減することが明らかとなった。このことから、Hsp90はMAPKシグナルにおけるPck2 より下流の分子を標的とする可能性が示唆された。さらに興味深いことにHsp90/*swo1-26*変異細胞においてMAPKKKおよびMAPKのタンパク質量が有意に低下していることが分かった。本発表ではこれらの結果を踏まえ、Hsp90によるMAPKシグナルの制御機構について考察を行ったので報告する。

B-14

酸化ストレス応答におけるPumilioファミリータンパク質Puf4 のリン酸化修飾とその生理的役割



○稲荷正大¹、佐藤亮介¹、原伸樹¹、田中千晶¹、萩原加奈子¹、高崎輝恒¹、Dieter A. Wolf²、杉浦麗子¹

¹近畿大学 分子医療・ゲノム創薬学研究室 ² Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute

Pumilioタンパク質は、酵母からヒトに至るまで、進化上高度に保存されたRNA結合タンパク質であり、高等生物においては、標的mRNAの安定性や翻訳制御を介して胚発生や樹状突起形成、自然免疫応答に関与するなど、多岐にわたる生命現象への関与が報告されている。一方、分裂酵母には9種のPumilioタンパク質が存在するが、それらの生理機能は不明である。そこで私たちは、分裂酵母のPumilioタンパク質のひとつであるPuf4に焦点をあて、細胞機能の解析を行った。

興味深いことに、リン酸化プロテオミクスの手法を用いて酸化ストレス条件においてリン酸化されるタンパク質群を同定した結果、Puf4が含まれていた。しかも*puf4* 遺伝子破壊細胞 (*puf4* KO細胞) は、通常の培養条件では顕著な表現型は見られなかったが、H₂O₂を始めとする複数の酸化ストレスに対して耐性を示すことを見出した。この結果は、Puf4が酸化ストレス依存的なリン酸化修飾を受けることにより酸化ストレス応答に関与する可能性を示唆している。そこで、我々は、酸化ストレス応答におけるPuf4のリン酸化修飾の意義を明らかにするため、同定したPuf4の3カ所のリン酸化サイトに擬似リン酸化変異、非リン酸化変異を導入し、Puf4 KO細胞の表現型に対する解析を行った。その結果、非リン酸化状態のPuf4が酸化ストレス応答において重要な役割を果たす可能性が示唆された。本学会では、これらの解析結果をもとにリン酸化依存的なPuf4による酸化ストレス応答の可能性とともに、現在行っているPuf4のリン酸化修飾に関わる上流因子の探索についても報告をする。

B-15**1,2-ナフトキノンによるEGFシグナリング活性化機構**○中原 健吾¹、平岡 秀樹¹、浜田 恭平¹、高杉 展正¹、熊谷 嘉人²、上原 孝¹¹岡山大院・医歯薬・薬効解析学,²筑波大・医・環境生物学

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、特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阻害薬であるwortmanninやPDK1阻害薬OSU-03012/BX-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、受容体型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。

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。

B-16**メチル水銀による小胞体ストレスを介した細胞死惹起機構**○平岡 秀樹¹、中原 健吾¹、藤村 成剛²、熊谷 嘉人³、高杉 展正¹、上原 孝¹¹岡山大院・医歯薬・薬効解析学,²国水研・毒性病態,³筑波大・医・環境生物学

水俣病の原因物質として広く知られるメチル水銀 (MeHg) は中枢神経系を傷害し神経細胞死を惹起するが、細胞死に至るまでの詳細な分子機構については不明な点が多い。当研究室ではこれまでに、小胞体局在タンパク質 protein disulfide isomerase (PDI) が S-水銀化によって酵素活性を消失すること、その結果、新生タンパク質成熟化が阻害されることで小胞体 (endoplasmic reticulum:ER) ストレスが惹起され、神経細胞死が観察されることを明らかにした。そこで本研究では、MeHg が ER ストレス応答 (unfolded protein response:UPR) に及ぼす影響と細胞死との因果関係を解明することを目指した。

まず UPR センサータンパク質 inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α)、protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6) の MeHg による活性化を検討したところ、IRE1 α 及び PERK のリン酸化と ATF6 の限定分解が起こることを確認した。しかしながら、活性化 IRE1 α による x-box binding protein 1 (XBP1) mRNA のスプライシングはほとんど観察されなかった。そこで、IRE1 α のリボヌクレアーゼ活性部位近傍の Cys 残基を Ser 残基に置換した C931S 変異体を用いて検討したところ、MeHg 処理により低下した XBP1 mRNA のスプライシングが C931S 変異体では著明に回復することを見出した。したがって、MeHg は IRE1 α の C931 を修飾することでリボヌクレアーゼ活性を阻害し、IRE1 α 経路を抑制することが示唆された。PERK 及び ATF6 経路の活性化は、C/EBP homologous protein (CHOP) 誘導を介して細胞死を惹起することから、PERK 阻害薬の影響を検討した。その結果、PERK 阻害薬 GSK2606414 は濃度依存的に MeHg 誘発性細胞死を抑制することが明らかとなった。

以上の結果より、MeHg による細胞死惹起には、ER ストレスを介した IRE1 α 経路の抑制とPERK/ATF6 経路の活性化が関与することが強く示唆された。PERK や ATF6 阻害薬だけでなく、IRE1 α の酸化修飾を特異的に抑制する薬物が、水俣病などの MeHg 毒性を軽減する可能性が推定された。

B-17 マウス骨髄由来マクロファージ機能に対するKir2.1の役割



○前田和輝、鈴木良明、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

【背景】内向き整流性K⁺チャネルの一つKir2チャネルは、心筋細胞や神経細胞といった興奮性細胞から、内皮細胞やマクロファージのような非興奮性細胞にまで広く発現し、膜電位の維持やK⁺恒常性を担う。マクロファージにおいてKir2サブファミリーの一つであるKir2.1の発現は、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）によって増大する一方、グラム陰性菌の内毒素（LPS）によるToll様受容体の刺激によって減少することが報告されている。しかし、マクロファージにおいて、Kir2.1がどのような役割を担っているか、未だ不明な点が多い。そこで、我々はマウス骨髄由来マクロファージを用いて、Kir2.1の細胞内Ca²⁺シグナリング、及びマクロファージ機能を解明することを目的とした。

【方法】マウス骨髄から単離した細胞をM-CSFで刺激してマクロファージへ分化させ、ウエスタンブロットティング、パッチクランプ法を用いてKir2.1の発現解析を行った。Kir2阻害剤であるBa²⁺を用いて、以下の実験を行った。(1) Ca²⁺蛍光プローブ fura-2を用いたStore-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) の測定。(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いたビーズ貪食能の評価。(3) 核染色による細胞増殖能の評価。

【結果及び考察】(1) よりマウス骨髄由来マクロファージにおいて、SOCEを介したCa²⁺流入をKir2.1活性が亢進させることを明らかにした。(2) よりコントロール群、Ba²⁺投与群の2群間で比較したところ、ビーズを貪食している細胞の割合、また一細胞あたりの貪食しているビーズの個数ともに有意な差はなかった。(3) よりマクロファージの増殖をKir2.1が正に制御する可能性が示唆された。以上の結果よりKir2.1活性がSOCEを介したCa²⁺流入を増大させ、流入したCa²⁺がセカンドメッセンジャーとしてマクロファージの増殖を促進させると考えられる。

B-18 細胞死抑制因子Dad1の心筋細胞における意義



○木村 瑠美¹、松本 浩太郎¹、森原 啓文²、尾花 理徳¹、前田 真貴子³、藤尾 慈^{1,3}、中山 博之¹

¹大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野、²大阪医科大学 薬理学教室、³大阪大学大学院 薬学研究科 附属実践薬学教育研究センター 先進臨床薬理学研究プロジェクト

【背景・目的】心筋細胞は、生後間もなく増殖能を失うため、心筋細胞死を抑制することは心不全の重要な治療戦略の一つと言える。これまでの多くの心筋細胞死研究は、細胞死誘導因子を抑制することに焦点を当ててきたが、未だ新規の心不全治療法にはつながっていない。そこで、心臓における新規細胞死抑制因子に着目し、心不全治療標的としての可能性を検討した。

【方法・結果】マウスの心臓で高発現し、かつ他組織で細胞死を抑制すると報告されている因子をマイクロアレイにより抽出した。それらの因子の中から、未だ心臓における機能が解明されていないDefender Against Cell Death 1 (Dad1)に着目した。新生仔ラット心筋細胞を単離、培養し、siRNAを用いてDad1の発現を抑制した。その後、細胞生存率をCell Viability Assayにより評価した。その結果、Dad1の発現抑制によって、生存率が有意に低下した (96.3±11.2% vs. 44.1±12.7%, ctrl siRNA vs. Dad1 siRNA, p<0.01)。Dad1は小胞体における、タンパク質の糖鎖修飾に関与することが報告されている。そこで、Dad1の発現抑制後、小胞体ストレス関連因子GRP78の発現を評価した結果、発現の上昇が認められた。他方、興味深いことに、Dad1の発現抑制による生存率の低下は、アポトーシス阻害剤であるz-VAD-fmkにより抑制されなかった (51.4±10.1% vs. 60.8±11.3%, NS)。

【結論・考察】心筋細胞において、Dad1はERストレスに関与し、非アポトーシス性細胞死を抑制していることが明らかとなった。本検討により、Dad1の発現誘導が新たな心不全治療戦略となる可能性が示唆された。

B-19

心筋炎回復過程における心筋細胞の内因性増殖機構の解析



○¹折本 彩、¹中安 佑介、¹松井 理紗、¹宮脇 昭光、¹尾花 理徳、
²前田 真貴子、¹中山 博之、^{1,2}藤尾 慈

¹大阪大学臨床薬効解析学分野、²大阪大学大学院薬学研究科附属実践薬学教育研究センター先進臨床薬理学研究プロジェクト

【背景】心筋細胞は生後間もなく増殖能を失う終末分化細胞であり、心臓は再生・修復能が著しく低いと考えられてきた。しかしながら、最近、我々の研究室では、マウス実験的自己免疫性心筋炎（EAM）において、心筋細胞が増殖性を示し、組織の修復・再生に寄与すること、その過程にSTAT3シグナルが重要であることを見出した。しかし、他のシグナル分子の寄与に関しては、不明であった。本研究では、これまで、心筋細胞増殖制御に関係するといわれている、Agrin, Meis1, YAPに関して、EAMにおける活性化を検討した。

【方法・結果】EAMは、8週齢の雄性BALB/cマウスに心筋特異的 α ミオシン重鎖ペプチドをアジュバントとともに1週間おきに二度皮下投与し作製した。EAMでは、炎症とそれに伴う組織傷害が初回免疫後3週（EAM3w）をピークに誘導され、その後、初回免疫後7週（EAM7w）において炎症の消褪と組織修復が見られた。EAM誘導前とEAM3wにおいてAgrin, Meis1の発現の差をreal time RT-PCRで検討した。その結果、Agrin, Meis1何れにおいても差が見られなかった。一方で、免疫染色による検討の結果、増殖に関わるHippo経路の構成要素である転写調節因子YAPが、EAM回復過程において有意に核に集積していることを見出した。加えて、YAPシグナルの上流に存在する、細胞接着関連因子 α -cateninが減少し、YAPの活性化が促進されていることが示唆された。

【考察・展望】心筋炎回復過程において、YAPが活性化されることが示唆された。また、 α -cateninの発現低下に伴い、YAPが核内に移行することが確認された。今後は、EAMにおけるYAPの核移行と心筋細胞増殖との関係を明らかにする必要がある。

B-20

N-アセチルグルコサミン転移酵素(OGT)過剰発現マウスではGSK-3 β のO-GlcNAc修飾の亢進により圧負荷による心不全が悪化する

○松野真人¹, 横江俊一¹, 伊井正明², 朝日通雄¹

¹大阪医科大学・医・薬理,²大阪医科大学・医・実験動物部門

N-アセチルグルコサミン転移酵素（OGT）は、蛋白質のセリン/スレオニン残基にN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を結合させてリン酸化と競合することで、タンパク質の機能を調節することが知られている。しかしながら、心機能関連タンパク質への影響はまだ不明な点が多い。我々は、OGTを過剰発現するトランスジェニックマウス（*Ogt*-Tgマウス）を作製し、心不全を誘導することで、OGTによる蛋白質へのO-GlcNAcの付加（O-GlcNAc修飾）が心不全にどのように影響を与えるかを調べ、その分子メカニズムについて検討した。

Ogt-Tgマウスに、Transverse Aortic Constriction（TAC）により心不全を誘導し、4週間後の心臓の機能を心エコーにより、形態変化を組織染色（HE染色）により、心不全マーカー（ANP, BNP）をウェスタンブロットで調べた。

Ogt-Tgマウスでは、心機能（心臓の収縮力（FS:Fractional shortening））は有意に低下し、代償性心肥大が起こらなかった。心肥大関連分子がO-GlcNAc修飾され機能の調節を受けた可能性が示唆されたため、検討した結果、GSK-3 β のO-GlcNAc修飾、ならびにリン酸化の減少（GSK-3 β の活性化）を見出した。*Ogt*-TgマウスにおけるGSK-3 β の活性化が、代償性心肥大の欠如および心不全の悪化の一因であると考えられたため、*Ogt*-TgマウスにTACにより心不全の誘導した1週間後から3週間、GSK-3 β 阻害剤（TDZD8）を毎日10mg/kg腹腔内投与し、心機能や心肥大の程度を解析した。その結果、GSK-3 β 阻害剤を投与したTAC処理*Ogt*-Tgマウスは、代償性心肥大が回復し、心機能の低下も抑制された。

今回我々は、TAC処理心不全誘導*Ogt*-Tgマウスでは、O-GlcNAc修飾により不活性化状態のリン酸化GSK-3 β が減少し、優位になった活性化GSK-3 β がNFATをリン酸化することで、心肥大に関わる遺伝子の活性化が起こらず、心肥大は起こらなかったと推察した。O-GlcNAc修飾の制御が心肥大、心不全の治療戦略になる可能性が示唆された。

B-21

脳微小血管内皮細胞におけるTMEM16Aの機能解析



○鈴木貴久、山村寿男、安本美貴、鈴木良明、今泉祐治

名古屋市大・院薬・細胞分子薬効解析学

血液脳関門は、循環血液中から脳への物質移行を制限し、脳の恒常性維持に重要な役割を果たすが、その実体は脳微小血管内皮細胞 (BCECs) である。BCECsの細胞増殖と細胞死のバランスが、血液脳関門の恒常的な機能維持に寄与することは知られているが、その分子基盤については殆ど不明であった。本研究では、BCECsのような非興奮性細胞において、静止膜電位の安定化・陰イオンの輸送・細胞容積の調節などの基本的な生理機能を担当するCl⁻チャネルのうち、細胞増殖に重要な役割を担う細胞内Ca²⁺濃度によって活性が制御されるCa²⁺活性化Cl⁻ (Cl_{Ca}) チャネルに着目した。現在、Cl_{Ca}チャネルの分子実体としてTMEM16ファミリーに属するTMEM16AやTMEM16Bが知られている。最初に、ウシ脳微小血管内皮細胞株 (t-BBEC117) におけるTMEM16遺伝子群の発現を解析した結果、TMEM16A、F、KのmRNA発現が認められた。その中で、Cl_{Ca}チャネルとして報告されているTMEM16Aに着目し、解析を進めた。また、t-BBEC117細胞にCl⁻チャネル阻害薬である100 μM ニフルミ酸またはTMEM16A選択的阻害薬である10 μM T16A_{inh}-A01を投与した結果、過分極が引き起こされたため、静止膜電位の形成にCl_{Ca}チャネルが寄与することが明らかになった。さらに、BCECsの細胞増殖に対するCl_{Ca}チャネルの寄与を検討した。BCECsの細胞増殖は、実験開始から96時間後まで時間依存的に起こった。その細胞増殖は、T16A_{inh}-A01によって、濃度依存的に抑制された (IC₅₀ ~10 μM)。以上の結果、TMEM16A Cl_{Ca}チャネルが、BCECsにおいて機能発現することが明らかとなり、細胞増殖及び細胞死等に関与する可能性が示唆された。

B-22

運動持久力に及ぼすドーピング禁止薬物の影響



○松下昇平、居場嘉教

摂南大学 理工学部 生命科学科

【背景・目的】2020年の東京オリンピックに向け、効果的な運動持久力の向上策が求められている。しかしながら、持久力向上のメカニズムは十分に解明されていない。本実験では、FVBマウスを用いた持久力評価系を構築し、持続型赤血球造血刺激因子製剤であるダルベポエチンアルファ (DPO) およびアドレナリンβ2受容体刺激薬であるクレンプテロール (CLE) の作用について検討した。

【方法】雄性FVBマウスに7週齢時から、強制遊泳試験日を除き、毎日1時間のカゴ運動を強制負荷した。DPO (10 μg/kg) は週に1回皮下投与し、CLE (2 mg/kg) は毎日腹腔内投与した。薬物投与開始2および4週間後に、30分間の強制遊泳試験を行い、流水口から35 cm地点の到達回数を計測した。持久力は、10-20分および20-30分の到達回数をそれぞれ0-10分の回数で割った値で評価した。また、赤血球数の指標としてヘマトクリット (Ht) 値を、運動強度の指標として乳酸値を、筋力の指標としてgrip strengthを測定した。

【結果・考察】カゴ運動の負荷により、体重増加は顕著に抑制された。強制遊泳試験において、35 cm地点の到達回数は、経時的に減少し、個体間のばらつきも小さいことから、運動疲労の評価に有用であると考えられた。DPOの投与により、Ht値は有意に増加し、強制カゴ運動直後の乳酸値は、有意に抑制された。しかしながら、強制遊泳試験における運動持久力は、DPOの投与により有意な変化を示さなかった。一方、CLEの投与はgrip strengthを有意に増加させたが、強制カゴ運動直後の乳酸値に影響を及ぼさなかった。また、強制遊泳試験における運動持久力は、CLEの投与により著しく低下した。以上の結果より、DPOは持久力の向上作用を有していないこと、およびCLEは、持久力をむしろ減少させることが明らかとなった。

hERGチャネル阻害薬の心室筋活動電位への影響:心室性不整脈のトリガーアクティビティとの関連において

○津元国親¹、倉田康孝²、古谷和春³、倉智嘉久¹

¹大阪大学医学系研究科分子細胞薬理学、²金沢医科大学医学部生理学II、³カリフォルニア大学医学部生理学

【背景】心筋細胞の活動電位再分極を担うカリウム (K^+) チャネル (特に急速活性型遅延整流性 K^+ 電流 (I_{Kr}) を構成すると考えられているhERGチャネル) を阻害する薬物は、活動電位持続時間を延長することで抗不整脈作用を発揮する。一方で、 I_{Kr} 電流の過剰な抑制が不整脈誘発の危険性を増加する (薬物誘発性不整脈)。その不整脈発生のきっかけは、心筋活動電位第2~3相で一過性の脱分極を伴う早期後脱分極 (EAD) の発生にあると考えられている。【目的】心筋細胞に発生するEADの動的発生機序を明らかにする。

【方法】心室筋細胞の数学モデルを用いて、 I_{Kr} 電流の減少に伴った活動電位応答の変化をコンピュータシミュレーションにより検討した。更に、分岐解析と呼ばれる数理的解析手法を用いて、活動電位応答の動的安定性の変化を解析した。

【結果】 I_{Kr} 電流の減少は、正常活動電位の活動電位持続時間 (APD) を延長するが、saddle-node分岐の発生により動的に消失した。その消失の後、EADを伴う異常興奮応答が顕在化することが明らかとなった。更に、異常興奮応答を含むAPDの異なる複数の活動電位応答が、同じ I_{Kr} 電流強度下において安定に存在することが明らかとなった。どの活動電位応答が顕在化するかは、細胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 濃度に依存した。APDの異なる複数の活動電位応答の共存は、心室におけるAPD不均質性を局所的に増大する可能性を示唆した。

【結論】本結果は、EADの発生をきっかけとするAPD不均質性の増大が、不整脈トリガーの生成要因である可能性を示唆するものである。

ヒトiPS細胞におけるCRISPRiを用いた心ファブリー病の病態形成メカニズムの解明

○森原 啓文¹、友田 紀一郎¹、若林 繁夫¹、朝日 通雄¹

¹大阪医大・医・薬理学

【目的】ファブリー病は、細胞のライソゾーム内で機能する α -ガラクトシダーゼという酵素活性の欠損や低下により、Gb-3 という糖脂質が分解されにくくなり、その結果全身に症状を引き起こす病態である。その中でも、左室肥大が見られるものを心ファブリー病とし、特定心筋症に分類される。ファブリー病は、X染色体上の *GLA* という遺伝子の異常により生じると言われており、現在その治療は酵素補充療法による対症療法に限られている。本研究では、心ファブリー病の詳細な病態形成メカニズムの解明とその過程を標的とする新規治療法の開発を目的に、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS細胞) を用いて検討を進めた。

【方法】ファブリー病は *GLA* 酵素活性の欠損や低下により発症することから、CRISPR interference (CRISPRi) 法を用いて *GLA* の発現を抑制し、病態モデル化を行った。CRISPRi はゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 の変法である。発現を抑制したい目的遺伝子の転写開始点近傍に single guide RNA (sgRNA) を設計し発現させることで、細胞内の dCas9-KRAB (転写阻害因子) を sgRNA 依存的に転写開始点付近に局在化させ、RNA ポリメラーゼによる目的遺伝子の転写を阻害する。今回、hiPS細胞にあらかじめ doxycycline (Dox) で誘導される dCas9-KRAB を導入しておき、Dox 処理により *GLA* の発現抑制を可能にする hiPS細胞 (*GLA* hiPS細胞) の作製を行った。このシステムを用いると Dox 添加の有無により、同一 hiPS細胞クローン内で *GLA* 低下の効果が比較可能となる。この *GLA* hiPS細胞株から心筋を分化誘導し、*GLA* を抑制した際の心筋機能への影響を解析した。

【結果】Dox 処理により、*GLA* の発現が抑制され、それに伴って心筋細胞の拍動が低下していることを確認した。また、*GLA* の発現が低い心筋細胞では、異常タンパク質の分解に関与するとされる p62 の発現が上昇していた。現在この結果を踏まえ、p62 に関連するシグナルに関しても検討を行っている。

遠隔臓器の一過性虚血処置はエクソソームを介した細胞間情報伝達によって心筋梗塞慢性期の心リモデリングを抑制する

○山口 雄大¹、泉 康雄^{1,2}、塩田 正之^{1,3}、富田 修平¹、岩尾 洋^{1,4}

¹大阪市立大学大学院医学研究科 薬理学、²高石加茂病院、³大阪市立大学大学院医学研究科 共同実験機器施設、⁴四天王寺大学教育学部

【目的】遠隔臓器の一過性虚血処置 (Remote Ischemic Conditioning; RIC) は、心筋梗塞急性期の再灌流障害を軽減することが知られている。本研究では、心筋梗塞慢性期におけるRICの効果について検討した。
【方法と結果】冠動脈結紮によりMIモデルラットを作製し、4週後に超音波法による心機能評価を行い、無作為に非処置群とRIC群に分けた。RIC群のラットには、両側後肢に対し5分の虚血と5分の開放を行う処置を1日5クール、4週間行った。【結果】両群間で血圧や心拍数、梗塞サイズに差はなかったが、RICは心筋梗塞に伴う左室機能の悪化を抑制した。梗塞周辺領域における左室間質の線維化や酸化ストレスの上昇はRIC群で有意に抑制されていた。興味深いことに、組織の線維化の抑制に重要な役割を果たすmicroRNA-29aの心臓での発現は、RICにより上昇していた。microRNAの運び手である、血清由来のエクソソーム中でもmicroRNA-29aはRICにより発現が上昇していた。さらに、マウス骨格筋由来C2C12細胞から放出されるエクソソーム中のmicroRNA-29aもまた、低酸素条件下でその発現が上昇していた。【結論】RICは心筋梗塞慢性期の心リモデリングの進行を抑制した。また、その機序において骨格筋由来エクソソームを介した細胞間情報伝達が強く関与している可能性が示唆された。

心筋細胞におけるR-spondin1の形態学的機能

○¹関谷有紀子、¹尾花理徳、¹宮脇昭光、¹松本浩太郎、¹榎本大智、²前田真貴子、¹中山博之、^{1,2}藤尾 慈

¹大阪大学臨床薬効解析学分野、²大阪大学大学院薬学研究科附属実践薬学教育研究センター先進臨床薬理学研究プロジェクト

【背景と目的】R-spondin (以下Rspo) はLGR受容体を介して古典的Wnt/ β カテニンシグナルを活性化する分泌タンパクである。Wntシグナル経路は動物の発生や器官再生において重要な役割を果たしており、骨格筋再生においてRspo1が筋前駆細胞の分化と遊走を制御することが報告されている。本研究では、心臓におけるRspo1の発現と機能を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】心疾患病態とRspo1の関連性を検討するため、実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) モデルと心筋梗塞 (MI) モデルを用いて、Rspo1 mRNAの心臓における発現を定量的RT-PCR法により検討した。EAMは、雄性Balb/cマウスを、ミオシン重鎖ペプチドを用いて免疫し誘導した。免疫後0、3、5、7週において心臓を回収したところ、Rspo1 mRNA発現は、5週において有意に上昇し、その後、0週時と同程度まで低下した。またMIは、雄性C57BL/6Jマウスの左冠動脈を結紮して誘導した。結紮後1、3、4、7、14日において心臓を回収したところ、14日において、Rspo1 mRNA発現がコントロール群と比較して有意に上昇することを確認した。

そこで、Rspo1を発現するアデノウイルスを作製し、新生児ラット心筋細胞に、Rspo1を過剰発させることでその機能を検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

- ①Rspo1過剰発現は細胞生存率に影響を与えないこと。
- ②蛍光免疫染色により、Rspo1過剰発現が心筋細胞の肥大化を誘導すること、さらに、コントロール群と比較してサルコメアの発達を促すこと。
- ③病的肥大のマーカーであるANFのmRNA発現を定量的RT-PCR法により検討したが、コントロール群と有意な差が認められないこと。

【結論】Rspo1は心筋のリモデリング過程において、心臓での発現が上昇することが明らかとなった。またRspo1の過剰発現は心筋細胞の肥大化を誘導するが、これは生理的な形態の変化が起こっているものと考えられた。

B-27 低酸素誘発性肺高血圧症における血管平滑筋NCX1の関与

○喜多紗斗美^{1,2}、田頭秀章²、永田 旭^{2,3}、阿部弘太郎⁴、岩崎昭憲³、岩本隆宏²

¹徳島文理大・薬・薬理、²福岡大・医・薬理、³福岡大・医・呼吸器外科、⁴九大病院・循環器内科

【目的】肺高血圧症は、肺動脈の異常な収縮とリモデリングにより肺動脈圧が上昇し、後負荷の上昇により右心不全を引き起こす予後不良の疾患である。現在、種々の治療薬が使用されているが、その効果は限定的であり、より詳細な病態機序の解明と新規治療薬の開発が望まれている。近年、TRPC6やKCNK3などのイオンチャネルを介した細胞内Ca²⁺濃度の増加が肺動脈平滑筋細胞の収縮や増殖を亢進し、肺高血圧症に寄与することが示唆されているが、その機序の全容は明らかになっていない。本研究では、イオンチャネルとイオン輸送体の機能連関に着目して、肺高血圧症の発症・維持における1型Na⁺/Ca²⁺交換輸送体 (NCX1) の役割について検討した。

【方法】血管特異的NCX1高発現マウス (hSMA-NCX1-Tgマウス)、血管特異的NCX1欠損マウス (hSMA-NCX1-KOマウス) および野生型マウスを用いて、10%低酸素条件で4週間飼育することにより低酸素誘発性肺高血圧モデルを作製した。肺高血圧の評価は、頸静脈からのカテーテル挿入により麻酔下での右室収縮期圧を測定した。また、右室心筋重量比 (RV/(LV+S)) および肺病理組織の肺動脈筋性化率を評価した。対照群には通常飼育 (21% 酸素) した同週齢の各マウスを用いた。

【結果・考察】 4週間の低酸素飼育により、hSMA-NCX1-Tgマウスの右室収縮期圧は、野生型マウスに比べて有意な上昇が見られた。一方、hSMA-NCX1-KOマウスでは右室収縮期圧の上昇が有意に抑制された。また、これらマウスの肺病理組織の血管筋性化を比較したところ、hSMA-NCX1-Tgマウスにおいてより顕著な筋性化の亢進が認められ、hSMA-NCX1-KOマウスでは筋性化の抑制が見られた。さらに、マイクロアレイ解析により、低酸素飼育した野生型マウスの肺動脈では、HIF1 α 、Endothelin-1と共にNCX1の遺伝子発現が増加していることを確認した。以上の結果より、低酸素誘発性肺高血圧症の発症には、血管平滑筋NCX1の発現増加や活性亢進が関与することが示唆された。

B-28 トロンビン受容体PAR₁の阻害は肺高血圧症の病態形成を抑制する

○平野勝也¹、桑原志実²、田中真理子³、阿部弘太郎²、平野真弓⁴

¹香川大学医学部自律機能生理学、²九州大学大学院医学研究院循環器内科学、³九州大学大学院医学研究院麻酔・蘇生学、⁴九州大学大学院医学研究院分子細胞情報学

【目的】肺高血圧症は肺血管抵抗の進行性上昇を特徴とする。血管抵抗の上昇には、血管収縮、血管リモデリング、血栓形成が重要な役割を果たす。肺高血圧症には凝固系の亢進、血栓性肺動脈病変を高率に合併する。トロンビン受容体PAR₁はトロンビンなどの凝固因子に対する受容体で、血管収縮および血管リモデリングを引き起こす。本研究では、肺高血圧症の病態形成に及ぼすPAR₁拮抗薬およびPAR₁遺伝子欠損の抑制効果を検証する。

【結果】ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおいて、モノクロタリン (60mg/kg) 皮下注の同日から (予防的投与) あるいは14日後から (治療的投与)、PAR₁拮抗薬Atopaxar (30 mg/kg/day) を経口投与し、3週後に病態を解析した。モノクロタリン投与により、右室収縮期血圧は25.3 \pm 1.6 mmHg (n=8) から76.5 \pm 7.1 mmHg (n=11) へ、肺血管抵抗 (右室収縮期血圧/心係数比) が0.11 \pm 0.01 mmHg \cdot min \cdot kg/mL (n=7) から0.41 \pm 0.04 mmHg \cdot min \cdot kg/mL (n=10) へ、右室/左室+中隔重量比が0.28 \pm 0.01 (n=8) から0.49 \pm 0.02 (n=15) へ上昇した。Atopaxarの予防的投与により、右室収縮期血圧が45.4 \pm 3.9 mmHg (n=10) に、肺血管抵抗が0.20 \pm 0.03 mmHg \cdot min \cdot kg/mL (n=8) に、右室/左室+中隔重量比が0.37 \pm 0.02 (n=10) に有意に抑制された。治療的投与では、肺血管抵抗が0.28 \pm 0.04 mmHg \cdot min \cdot kg/mL (n=10) に、右室/左室+中隔重量比が0.40 \pm 0.03 (n=12) に有意に低下した。Atopaxarの予防的および治療的投与いずれも生存率を有意に改善した。また、Atopaxar予防的投与は肺動脈の中膜肥厚病変を有意に抑制した。マウスを3週間10%低酸素下で飼育すると、右室収縮期血圧が27.6 \pm 0.6 mmHg (n=4) から42.9 \pm 2.0 mmHg (n=7) へ、右室/左室+中隔重量比が0.26 \pm 0.02 (n=5) から0.43 \pm 0.01 (n=13) へ上昇した。PAR₁欠損マウスにおいて、右室収縮期血圧は34.5 \pm 1.5 mmHg (n=5) に、右室/左室+中隔重量比は0.36 \pm 0.01 (n=12) に有意に抑制された。肺動脈の筋性化も有意に抑制された。

【結論】 PAR₁の阻害は、実験的肺高血圧症の病態形成を有意に抑制し、生存を延長させる。PAR₁拮抗薬の新たな肺高血圧治療薬としての有用性が示唆される。

可溶性グアニル酸シクラーゼの酸化的修飾と cGMP 産生薬による血管反応性

○田和正志、山下優香、益岡尚由、吉田純子、西尾眞友、石橋隆治

金沢医科大学薬理学

【背景】可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) は一酸化窒素 (NO) の受容体的な役割を担っており、血管緊張度調節に深く関与している。本研究では、sGC の酸化的修飾部位として知られているシステイン残基チオールあるいはヘム鉄の酸化が各種 cGMP 産生薬による血管反応性に及ぼす影響について検討した。

【方法】雄性 Wistar ラットから胸部大動脈および肺外肺動脈を単離し、栄養液中で以下のいずれかに曝露させた:1) 超純水 (diamide の溶媒) に 30 min 曝露;2) diamide (100 μ M、チオール酸化剤) に 30 min 曝露;3) diamide に 15 min 曝露後 dithiothreitol (100 μ M、チオール還元剤) と 15 min 共曝露;4) ethanol (ODQ の溶媒) に 30 min 曝露;5) ODQ (10 μ M、ヘム鉄酸化剤) に 30 min 曝露;6) ODQ に 15 min 曝露後 dithionite (1 mM、ヘム鉄還元剤) と 15 min 共曝露。各条件への曝露後、phenylephrine 収縮下での NO 供与薬、sGC 刺激薬、sGC 活性化薬添加により生じる等尺性張力変化を観察した。

【結果】Diamide は NO 供与薬である sodium nitroprusside (SNP) による血管弛緩反応を減弱させたが、sGC 刺激薬である BAY 41-2272 あるいは sGC 活性化薬である BAY 60-2770 による反応には影響を与えなかった。この SNP の反応性減弱は dithiothreitol により完全に回復した。一方、ODQ は SNP あるいは BAY 41-2272 による血管弛緩反応を減弱させたが、BAY 60-2770 による反応は増強させた。これらの反応性減弱および増強は dithionite により部分的に回復した。なお、胸部大動脈と肺外肺動脈に反応性の違いは認められなかった。

【考察】血管に対する cGMP 産生薬の効力はチオールあるいはヘム鉄の酸化還元状態によって増減することが明らかとなった。病的な状態では酸化ストレスが亢進し、多くのタンパク質が酸化的修飾を受けることを考慮すると、今回得られた成果からは NO 供与薬 < sGC 刺激薬 < sGC 活性化薬 という有用性の序列が示唆される。