

C-01**がん微小環境変化が抗癌剤感受性に与える影響の検討**

○松永慎司¹、西出峻治¹、北島正二郎¹、山口雄大¹、塩田正之²、三浦克之³、富田修平¹

¹大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学 ²大阪市立大学大学院医学研究科研究支援プラットフォーム共同実験機器施設 ³大阪市立大学大学院医学研究科薬効安全学

腫瘍組織内を走向する血管は正常組織の血管と異なり、不規則かつ蛇行している。微小血管を構成する血管内皮細胞同士の結合も未熟であるため、血液漏出が生じている。そのため組織内血流は悪く、灌流性も低い状態である。従って、組織への酸素・栄養供給は低下し、薬物送達も十分でない環境である。このような環境は腫瘍組織特異的なことから、がん微小環境と呼ばれ、抗癌剤抵抗性や放射線抵抗性といった治療抵抗性の一因となっている。また、癌細胞はその組織内および周囲の細胞と相互作用し、その組織環境を形成している。また、がん微小環境では種々の成長因子の分泌亢進が生じており、これらが腫瘍の増殖・進展、転移など関わっていると報告されている。がん微小環境を変化させることが、腫瘍の増殖・進展抑制につながると考えた。そこで我々は、腫瘍血管正常化によるがん微小環境変化が抗癌剤感受性に与える影響について検討する為、腫瘍移植モデルマウスを用いて検討を行った。がん微小環境を変化させるため、腫瘍血管を構造的に変化させ、組織の血流、灌流性を増加させる目的でプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬を用いた。マウス腫瘍皮下移植モデルとしてマウス肺癌細胞株であるlewis lung carcinoma (LLC) をC57BL/6マウス側腹部に皮下注射することにより行った。PHD阻害薬投与後に抗癌剤を投与し、腫瘍増殖及び抗癌剤感受性の評価を行った。PHD阻害薬投与群と非投与群では癌細胞の細胞周期に優位な差は認められなかった。しかし、PHD阻害薬投与後に抗癌剤を投与した群においては、抗癌剤非投与群に比し、腫瘍の増大が抑制された。さらに、PHD阻害薬投与後に抗癌剤を投与した群においては抗癌剤投与後の腫瘍組織においてはアポトーシス細胞数の増加およびDNA損傷修復応答マーカーが上昇しており、PHD阻害薬投与群において抗癌剤感受性が上昇していることが示唆された。これらの結果から血管構造変化によるがん微小環境改善は、抗癌剤抵抗性を低下させ抗癌剤治療の効果を増強させると考えられる。

C-02**日本薬用植物エキスイブラリーを用いた骨転移性前立腺がん治療薬探索**

○島田 康人¹⁻³、中山 寛子⁴、山田 英嗣^{1,2}、梶野 裕之⁵、小川 琢也¹、西村 訓弘⁴

¹三重大・院医・統合薬理、²次世代抗がん・ゼブラ・研究セ ³先端医科研究セ・バイオインフォ、⁴三重大・院地域イノベ、⁵医薬基盤研

前立腺がんは世界で2番目に患者数が多く、かつ5年生存率が約80%と予後良好な悪性腫瘍だが、骨転移を発症した場合の5年生存率は30%以下と低い。この原因の1つに癌幹細胞の存在が考えられている。いわゆるtriple markers (ALDH^{high}/CD44⁺/α2β1⁺) を保持する癌幹細胞は従来型の抗がん剤が効かず、転移先である周辺組織 (骨髄) からのシグナルを受けることによって、自己複製が亢進し悪性分化や腫瘍形成が活性化される。初期の前立腺がんでは癌幹細胞の存在割合は低い (1%以下)、骨転移巣ではその量が増加し、予後不良の原因の1つとなっていると考えられている。

我々は日本の薬用植物から抽出したエキス約500種類を用いて、前立腺がん細胞に対するスクリーニングを行った。使用したがん細胞は、in vivoにおける骨転移能の高いPC-3M-Pro4細胞を使用した。この細胞株は、PC-3細胞をヌードマウスに移植後、骨髄転移巣から再度回収した細胞であり、培養下での増殖能、マウス・ゼブラフィッシュ移植時の増殖・転移能が高く (Ghotra VP, *et al.*, Cancer Res. 2015;75:230-240)、またALDH^{high}分画が25%前後と非常に高いことから癌幹細胞が多く含まれていると考えられている。

これまで我々は、ヒトがん細胞および癌幹細胞をゼブラフィッシュ稚魚に移植し、in vivo試験系として投与化合物の抗がん作用評価について報告してきた。今回、PC-3M-Pro4細胞の培養条件下での作用を認めたエキスについて、この細胞を移植したゼブラフィッシュにおけるエキスの抗がん作用評価・メカニズム解析を明らかにしたので報告する。

C-03**Non-Competitive LAT1 inhibitors suppress mTORC1 signaling similarity to competitive LAT1 inhibitors**

○Pornparn Kongpracha^{1,2}, Suguru Okuda², Ryuichi Ohgaki², Yoshikatsu Kanai², Shushi Nagamori^{1,2}

¹Laboratoy of Biomolecular Dynamics, Department of Collaborative Research, Nara Medical University, ²Department of Bio-system Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University

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. We have demonstrated that competitive LAT1 inhibitors suppress tumor growth. In this study, we have further examined the effects of LAT1 inhibitors; competitive and non-competitive LAT1 inhibitors on mTORC1 signaling and cancer cell growth. We showed that competitive inhibitors and non-competitive inhibitors showed the similar effects on suppression of the phosphorylation on p70S6K, a downstream effector of mTORC1. Furthermore, to reveal the overall alterations by inhibitors, we performed the comprehensive phosphoproteomics in the presence or absence of LAT1 inhibitors. Although the modes of inhibition are different, we found that both types of inhibitors induced a quite similar profile of phosphoproteomes. Thus, no matter what or how to inhibit LAT1, it was shown that LAT1-mediated leucine transport affects multiple cellular events beyond cell growth such as, cellular assembly and organization, cell motility, cell cycle and so on. This result strongly supports that LAT1 is an attractive molecular target for cancer therapeutics.

C-04**短寿命 α 線核種を利用したがん治療プローブの開発**

○兼田加珠子¹、張子見^{1,2}、真鍋良幸^{1,2}、下山敦史^{1,2}、樺山一哉^{1,2}、渡部直史^{1,3}、豊嶋厚史¹、畑澤順^{1,3}、金井好克⁵、吉村崇^{1,3}、深瀬浩一^{1,2}、篠原厚^{1,2}

¹大阪大学大学院理学研究科附属基礎理学プロジェクト研究センター、²大阪大学大学院理学系研究科化学専攻、³大阪大学大学院医学系研究科核医学、⁴大阪大学RI総合センター、⁵大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理学

現在、我が国のがん患者の1/3は初診時において隣接臓器への浸潤あるいは遠隔転移などを起こしている、いわゆる「進行がん」であり、5年生存率は15%以下という状況で新しい治療法の開発が望まれている。そのような中、放射線医薬品が注目を集めている。放射線医薬品には放射線核種 (RI) から出る γ 線を計測や画像化して診断する用途、あるいは β 線を放出するRIを薬剤に組み込み、経口あるいは静注により腫瘍など特定の細胞を殺傷する、いわゆるRI内用療法として用いられるものがある。しかしながら、内用療法に用いられる β 線核種の飛程は数ミリ程度あるため、周囲の正常組織にも影響し、副作用が問題であった。一方、 α 線は体内での飛程が短く、この α 線を用いる事で、これまで問題となっていた副作用が低減出来る利点を持つ。また、既存のRI内用薬は原料を原子炉で作る必要があるため、国内製造において様々な制限がある。

我々は短寿命 α 線核種の中でも、半減期が7.2時間である²¹¹At (アスタチン211) のRI内用薬としての応用を目指して検討を行っている。²¹¹Atは加速器で製造できる完全国内自給可能、且つ完全 α 壊変核種であり、RI内用療法に用いる核種として大いに期待できる。

我々は¹³¹Iと同様に²¹¹Atを直接投与による抗腫瘍効果の検討も進めている。同時に、²¹¹Atを様々な分子標的薬と複合化する事により、特異性の高い抗腫瘍薬の開発を目指して検討を続けている。現在、標識抗体のみならず、がん特異的アミノ酸トランスポーターを標的とした新規治療プローブの開発が進行中である。本演題では我々の取り組みの進捗状況を紹介したい。

C-05**TRKB is a potential therapeutic target for poorly-differentiated oral squamous cell carcinoma**

○Kazumasa Moriwaki¹, Yusuke Ayani², Hiroko Kuwabara³, Shuji Ohomura², Tetsuya Terada², Ryo Kawata², and Michio Asahi¹

¹Dept. Pharmacology, Med., Osaka Medical College, ²Dept. Otorhinolaryngology, Med., Osaka Medical College, ³Dept. Pathology, Med., Osaka Medical College

TRKB has been reported to function in tumor progression. However, the role of TRKB in patients with cancer is not fully elucidated. Here, we investigate the clinical significance of TRKB in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) by immunohistochemistry and evaluation of clinicopathologic features. The expression level of TRKB was extremely low (TRKB^{low}) in the normal epithelium and well-differentiated (WD) OSCC, whereas much higher expression (TRKB^{high}) was observed in the moderately- or poorly-differentiated (MD/PD) OSCC. In TRKB^{high} OSCC, lymphovascular invasion was increased and disease-free survival was reduced, whereas there was no clinical significance in TRKB^{low} OSCC. Moreover, the same result was observed in orthotopic transplantation mouse model of OSCC using two human OSCC cell lines, WD HSC-4 and PD HSC-3. Both of TRKB expression and growth rate in HSC-3-derived tumor were significantly higher than in HSC-4-derived tumor. Importantly, the significant reduction of tumor growth was observed only in HSC-3-derived tumor by administration of a TRKB-specific inhibitor. Moreover, *in vitro* culture system, the TRKB inhibitor selectively blocked BDNF-induced tumor cell proliferation and migration in HSC-3 but not in HSC-4. Taken together, these data suggest that TRKB may regulate tumor progression in OSCC, especially for PD-OSCC and be an attractive target for new OSCC therapies.

C-06**Augmented O-GlcNAcylation Alleviates Inflammation-mediated Colon Carcinogenesis via Suppression of Acute Inflammation**

○中川孝俊¹、平田好正²、森脇一将、光林栄子、柿本一城、竹内利久、井上拓也、樋口和秀、朝日通雄¹

大阪医科大学医学部¹薬理学、²第二内科学

(背景) 大腸癌有病率は世界的に高く、ますます西洋化が進んでいるアジア地域においては増加傾向にある。タンパク質のセリン/スレオニン残基へのNアセチルグルコサミン修飾、O-GlcNAc化は大腸癌を含む様々な癌での増加が報告されている。しかし、ガン発症との関わりについて詳しい機序は明らかではない。

(目的) O-GlcNAc化修飾が亢進したO-GlcNAc転移酵素遺伝子高発現マウス (*Ogt-Tg*) を使用したガン発症モデルでO-GlcNAc化と大腸癌発症との関連を明らかにする。

(方法) 炎症性発癌モデル、Dimethylhydrazine (DMH) /dextran sodium sulfate (DSS) 法 (DMH腹腔内投与及びDSS含有水自由摂取の併用)。炎症性腸疾患モデル、DSS法 (DSS含有水自由摂取) を用いた。

(解析) 組織学的解析にはHE染色法およびメチレンブルー染色を用い、発現タンパク質及び転写物の解析にはWestern blot法及びReal-time PCR法をそれぞれ使用した。

(結果) DSS/DMHを用いた炎症性大腸癌発癌モデルで*Ogt-Tg*において野生型マウス (WT) に比べ、有意に発癌が抑制されていた。体重減少率、腸管長、そしてガンの数ともに*Ogt-Tg*において改善がみられた。タンパク質解析の結果、炎症に関わるNF- κ Bタンパク質のリン酸化が有意に低下していたため、我々は初期の炎症の低下がそれに続く発癌抑制につながった元の予想し、タンパク質O-GlcNAc化が実際に炎症抑制能を有するかをDSS方による炎症性腸疾患モデルを用いて解析した。体重減少、腸管長共に有意差はなかったが、*Ogt-Tg*において改善傾向がみられた。炎症性サイトカイン発現をReal-time PCR法を用いて解析したところ*IL-1 β* の発現が有意に*Ogt-Tg*では減少していた。*IL-6*、*Tnf- α* の発現も減少傾向を示した。これらの結果を裏付けるように、NF- κ Bのリン酸化は*Ogt-Tg*において有意に減少していた。組織学的には両マウスにおいてDSS投与により粘膜及び粘膜下層に多数の炎症性細胞の浸潤が認められたが、粘膜剥離等の組織障害は*Ogt-Tg*では抑制されていた。

(結論) O-GlcNAc化の亢進は炎症性大腸癌および炎症性腸炎の発症を抑制した。これらの結果はO-GlcNAc化の制御が新たな治療標的となる可能性を示唆している。



○渡邊大晃¹⁾、池田康将²⁾、濱野裕章²⁾³⁾、堀ノ内裕也²⁾、石澤有紀²⁾、今西正樹³⁾、座間味義人¹⁾³⁾、武智研志⁴⁾、宮本理人⁵⁾、土屋浩一郎⁵⁾、玉置俊晃²⁾、石澤啓介¹⁾³⁾

¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部 臨床薬理学、²⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬理学分野、³⁾徳島大学病院 薬剤部、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

【目的】生体内鉄量増加が肥満、糖尿病の危険因子であることが報告されており、我々は鉄キレート薬によって肥満・糖尿病が改善することを報告した (Am J Physiol Endocrinol, Metab. 2012)。肥満においてマクロファージは脂肪細胞との炎症連関から脂肪肥大の悪循環を形成する。マクロファージにはM1、M2の2種類のサブタイプがあり、M1は鉄を保持する性質を有し、炎症に関与することが知られている。しかしながら肥満・糖尿病とマクロファージの鉄制御との関連は不明である。本研究では、鉄保持タンパクフェリチンをマクロファージで欠失したマウスを用いて、肥満・糖尿病発症におけるマクロファージ鉄制御機構について検討した。

【方法・結果】マクロファージ特異的フェリチン欠損 (Ft-KO) マウスと野生型 (WT) マウスで比較・検討した。Ft-KOマウスでは野生型マウス (WT) と比べて、マクロファージならび脾臓の鉄量は低値であった。次に高脂肪飼料 (HFD) を与えた群と対照飼料 (ND) を与えた群で比較した。HFDによる体重増加はFt-KOマウスでは約5g抑制され、同様に、脂肪組織重量・脂肪細胞径の増加も軽度であった。グルコース負荷、インスリン負荷では、HFDによる耐糖能異常、インスリン感受性低下がWTではみられたが、Ft-KOではその程度は軽度であった。精巣上体脂肪において、HFDによるWTでのマクロファージ浸潤増加や炎症性サイトカインの発現増加はFt-KOにおいて抑制された。またFt-KOでは脂肪肝が抑えられ、肝臓中のトリグリセリド値も減少していた。

【結論】高脂肪飼料負荷による肥満・糖尿病の発症は、Ft-KOマウスでは軽減され、脂肪組織の炎症も抑制された。肥満におけるマクロファージ鉄は、炎症のトリガーとなることが示唆され、マクロファージ特異的な鉄制御は肥満・糖尿病の治療につながる可能性がある。



○増田 智美¹⁾、嶋澤 雅光¹⁾、中村 信介¹⁾、末森 晋典²⁾、望月 清文²⁾、川上 秀昭³⁾、川瀬 和秀^{1), 2)}、原 英彰¹⁾

1) 岐阜薬科大学薬効解析学 2) 岐阜大学大学院医学系研究科眼科学 3) 岐阜市民病院眼科

【目的】アディポネクチンは、善玉ホルモンと呼ばれる脂肪から分泌されるサイトカインであり、緩やかな脂肪燃焼促進作用を示すことが知られている。糖尿病患者血清中でアディポネクチンの減少が報告されているが、糖尿病網膜症患者の眼内におけるアディポネクチンに関する報告は少ない。そこで我々は、糖尿病網膜症患者硝子体液中のアディポネクチン濃度を測定し、さらに糖尿病網膜症に対するアディポネクチンの役割について検討した。

【方法】黄斑円孔 (対照群)、糖尿病黄斑浮腫、増殖糖尿病網膜症患者のそれぞれの硝子体液中のアディポネクチン及び血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) の濃度をELISAキットを用いて測定した。また、ヒト網膜毛細血管内皮細胞を用いてアディポネクチンの細胞遊走に対する作用を検討した。

【結果】対照群に比べ糖尿病黄斑浮腫及び増殖糖尿病網膜症患者において、アディポネクチン及びVEGFの濃度が有意に増加していた。増殖糖尿病網膜症患者のうち抗VEGF治療 (Bevacizumab, 硝子体内投与) を行った患者の硝子体液中では、VEGF濃度は有意に低下していたが、アディポネクチン濃度に有意な変化は認められなかった。In vitroの作用検討では、アディポネクチン単独処置群において細胞遊走促進作用を示さなかったが、VEGFとアディポネクチン併用群においては有意な細胞遊走促進作用を示した。さらに、アディポネクチンの細胞遊走促進作用は、アディポネクチン受容体AdipoR1及びAdipoR2のノックダウンによって抑制された。

【結語】アディポネクチンは糖尿病網膜症の病態形成への関与並びに糖尿病黄斑浮腫及び増殖糖尿病網膜症に対する新規治療標的分子となる可能性が示唆された。

C-09

シュワン細胞由来 galectin-3のパクリタキセル誘発末梢神経障害におけるバイオマーカーとしての有用性



○松本 真有奈、今井 哲司、小柳 円花、中里 唯、荻原 孝史、中川 貴之、松原 和夫

京都大病院・薬剤部

タキサン系抗がん剤は有害反応として、抗がん剤誘発末梢神経障害（CIPN）を高率で発症する。CIPNの病態やその重症度は抗がん剤の累積投与量に依存しており、病態が進行すると投薬を中止しても難治化しやすくなることが知られている。しかし、CIPNの病態評価は、患者の主訴に基づいた重症度分類のみに依存しており、客観的かつ定量的な指標は存在しない。本研究では、CIPNの病態を定量的に把握するための血中バイオマーカーの探索を試みた。我々はこれまでに、タキサン系抗がん剤により、感覚神経を髄鞘化する成熟シュワン細胞がgalectin-3 (Gal-3) 陽性の脱分化シュワン細胞へと遷移することを明らかにし、CIPN発症の一因となる可能性を指摘している。Gal-3は分泌性タンパク質であり、米国においては、障害された心筋細胞由来のGal-3が、慢性心不全の血中バイオマーカーとして臨床活用されている。そこで我々は、タキサン系抗がん剤に応答してシュワン細胞より分泌されるGal-3が、CIPNの血中バイオマーカーになり得るという仮説を立てた。本仮説を検証するため、まず、ラット坐骨神経由来初代培養シュワン細胞にパクリタキセル (PT, 0.01 μ M) を48時間処置してGal-3の発現変化について検討した。その結果、対照群と比較して、PT群ではシュワン細胞の脱分化を伴ったGal-3発現増加、ならびに条件培地中のGal-3濃度の有意な増加が認められた。つまり、PT処置に応答して脱分化シュワン細胞よりGal-3が分泌されることを明らかにした。次に、PT (20 mg/kg) をマウスに反復腹腔内投与 (2回/1週間 \times 8 週間) し、投与開始後2-8週間まで機械的アロディニアを呈するCIPNモデルマウスを作製した。本モデルマウスの坐骨神経では、疼痛関連行動の発現と相関して、シュワン細胞におけるGal-3の免疫活性及びmRNA発現量の増加が認められた。一方、血漿中Gal-3濃度は、PT投与開始2週間後をピークとして、一過性ではあるものの有意に増加していた。以上より、PT投与に応答して脱分化シュワン細胞から分泌されるGal-3は、CIPN発症初期を客観的に検知するための血中バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

C-10

LAT1 in endothelial cells as a novel target of anti-angiogenic cancer therapy



○Lili Quan¹, Ryuichi Ohgaki¹, Suguru Okuda¹, Shushi Nagaori¹, Yoshikatsu Kanai¹

¹阪大院・医・生体システム薬理

Angiogenesis is the process of capillary generation from pre-existing vasculature, which occurs when more supply of nutrients or oxygen are required. It plays a critical role in regulating tumor growth and metastasis. L-type amino acid transporter 1 (LAT1), a transporter for large neutral amino acids, is expressed at a high level in a wide range of cancers. LAT1 has, thus, been proposed as a molecular target for cancer therapy. We have recently found that LAT1 is highly expressed in the endothelial cells of human pancreatic cancer tissues as well as xenograft tumors in nude mice. However, the expression of LAT1 is limited in normal tissues. This finding suggests the involvement of LAT1 in tumor angiogenesis. In this study, by means of *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* angiogenesis assays, we set out to examine whether LAT1 inhibitors and the inhibition of LAT1 expression affect angiogenesis. From the result of *in vitro* angiogenesis assay, we found that LAT1 inhibitors as well as siRNA-mediated LAT1 knockdown suppress the tube formation of HUVEC cells. The effect of LAT1 inhibitors was also confirmed by invasion assay and wound healing assay. *Ex vivo*, aortic ring assay demonstrated that LAT1 inhibitors significantly reduce the number of vessels sprouting from aortic rings compared with the control. The inhibition of angiogenesis by LAT1 inhibitors was further confirmed in the *in vivo* Matrigel plug assay and Xenograft tumor model. Because LAT1 is expressed in the endothelial cells of tumor tissues, the LAT1 inhibitors are supposed to exert an anti-angiogenic effect through the inhibition of LAT1 in the endothelial cells of tumors, which could, together with the suppression of amino acid uptake of cancer cells, contribute to the anti-tumor effect *in vivo*.

C-11

Protein degradation of $K_{Ca}1.1$ K^+ channel by androgen receptor inhibition in breast cancer cells



○Anowara Khatun¹、下澤 基¹、鬼頭宏彰¹、川口真由¹、藤本万由¹、丹羽里実¹、藤井正徳¹、大矢 進^{1,2}

¹京都薬大・薬理、²名市大院医・薬理

The large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel $K_{Ca}1.1$ plays an important role in the promotion of cancer cell migration and invasion, and is a therapeutic target and biomarker for breast cancer. We investigated the effects of the treatment with antiandrogens on the functional activity, activation kinetics, transcriptional expression, and protein degradation of $K_{Ca}1.1$ in human breast cancer MDA-MB-453 cells using real-time PCR, Western blotting, voltage-sensitive dye imaging, and whole-cell patch clamp. Treatment with antiandrogens, bicalutamide and enzalutamide for 48 hr significantly elicited the significant inhibition of 1) depolarization responses induced by paxilline (PAX), a specific $K_{Ca}1.1$ blocker and 2) PAX-sensitive outward currents induced by depolarizing voltage step. Both the expression levels of $K_{Ca}1.1$ transcripts and proteins were significantly decreased in MDA-MB-453 cells, and protein degradation of $K_{Ca}1.1$ mainly contributed to the dysregulation of $K_{Ca}1.1$ activity. Among eight regulatory β and γ subunits, LRRC26 alone expressed at high level in MDA-MB-453 cells, but treatment with antiandrogens did not affect the expression level of LRRC26 and activation kinetics in MDA-MB-453 cells. The treatment with antiandrogens upregulated the ubiquitin E3 ligases, FBW7, MDM2, and MDM4 expressions in MDA-MB-453 cells, and protein degradation of $K_{Ca}1.1$ was significantly inhibited by the siRNA-mediated blockade of FBW7 and MDM2, respectively. In line with the above findings, we concluded that $K_{Ca}1.1$ is a androgen-responsive gene in human breast cancer MDA-MB-453 cells, and down-regulation of $K_{Ca}1.1$ through enhancement of $K_{Ca}1.1$ protein degradation by FBW7 and/or MDM2 contribute, at least partly, to the anti-proliferative and anti-invasive effects of antiandrogens in breast cancer cells.

C-12

Critical moieties of aromatic amino acid for renal accumulation of tumor imaging probes



○Chunhuan Jin¹、Ling Wei¹、Ryuichi Ohgaki¹、Hideyuki Tominaga²、Suguru Okuda¹、Shushi Nagamori¹、Yoshikatsu Kanai¹

¹Bio-system Pharmacology, Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan ²Advanced Clinical Research Center, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

3- $[^{18}F]$ fluoro- α -methyl-L-tyrosine ($[^{18}F]$ FAMT) and 3- $[^{123}I]$ iodo- α -methyl-L-tyrosine ($[^{123}I]$ IMT) have been developed as amino acid probes for tumor imaging. FAMT and IMT are highly specific to cancer due to their high selectivity to amino acid transporter LAT1 (L-type amino acid transporter 1) expressed specifically in tumor cells. FAMT and IMT, however, show a high degree of renal accumulation only in the kidney, which generates strong physiological backgrounds. Preceding evidences indicated that the renal accumulation of IMT is inhibited by probenecid, an inhibitor of organic ion transporters. Our previous study confirmed that FAMT is a substrate of organic anion transporters. Among them, OAT1 that mediates urinary excretion of organic anions is supposed to be the most important because the renal excretion of the probe was inhibited by probenecid. Therefore, we speculate that OAT1 plays a pivotal role in the accumulation of FAMT and IMT in the kidney. Here, we examined the interaction of aromatic amino acid derivatives with OAT1 to determine the critical moieties of the probes responsible for their renal accumulation. Our results showed that both halogen and hydroxyl group on the benzene ring of FAMT and IMT are important to interact with OAT1, whereas the α -methyl moiety essential for the selectivity to LAT1 is not critical for the interaction. We also found that the position of hydroxyl group and halogen group on the benzene ring affects the interaction with OAT1, suggesting the importance of hydrophobicity around particular position of the aromatic ring to form a "hydrophobic core", which is essential to be the substrates of OAT-member transports. The results would provide a theoretical and experimental basis to develop molecular probes in tumor imaging to avoid physiological renal accumulation.

PGE₂-EP2/EP4シグナリングによるTh17細胞の増殖制御機構とその病理に対する寄与



○Jinju Lee¹, 青木友浩¹, Dean Thumkeo^{1,2}, 成宮周^{1,2}

1. Alliance Laboratory for Advanced Medical Research, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan 2. Department of Drug Discovery Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8501, Japan

Th17細胞は、様々な炎症疾患や自己免疫疾患の病態形成において重要な役割を担うCD4陽性T細胞のサブセットの一つである。これまで、我々は脂質メディエーターであるprostaglandin (PG) 経路がTh17細胞増殖を促進することを明らかにしたが、本研究では、さらにこのPG経路によるTh17細胞の増殖に分子制御機構に着目し、詳細な解析を行なった。その結果、PG経路の中でもPGE₂経路が特に重要であり、4つ存在しているPGE₂受容体のうち、EP2及びEP4の2つの受容体を介してTh17細胞の増殖を促進的に働くことを見出した。さらにはこの作用はEP2/4の下流でcAMPを介していることを明らかにした。また、興味深いことにPGE₂-EP2/4-cAMPのシグナル伝達はTh17細胞増殖を促進するサイトカインIL-23と協調して働き、その分子機構としてPGE₂-EP2/4-cAMPがIL-23受容体の遺伝子発現を誘導することによりIL-23の作用を増強し、Th17細胞の増殖を促進することが明らかとなった。一方、我々は、IL-23の皮下投与による乾癬のモデル動物を用い、EP2/EP4の遺伝子欠損または薬理的阻害が乾癬の病態を強く抑制することを見出し、in vitroで観察されたPGE₂経路によるTh17細胞増殖の促進がin vivoの乾癬病態形成に関与することを示した。また、乾癬患者の包括的遺伝子発現プロファイルデータのメタアナリシスにおいて、*Il23r*発現と*Ptger4* (EP4) 発現について正の相関が認められ、乾癬におけるPGE₂経路の臨床的意義が示唆された。以上の結果により、Th17細胞増殖の促進因子としてのPGE₂シグナル伝達が重要な役割を担うこと、そして乾癬の新しい治療の標的としてのEP2/EP4の可能性が示唆された。

小青竜湯によるアレルギー性鼻炎疾患感受性遺伝子発現抑制



○浪花志帆¹、水口博之²、小西由貴¹、北村嘉章³、武田憲昭³、柏田良樹⁴、藤野裕道¹、福井裕行⁵

徳島大学薬学部¹分子情報薬理学分野、³耳鼻咽喉科学分野、⁴生薬学分野、⁵分子難病学分野、²大阪大谷大学薬学部薬理学講座

【目的】アレルギー疾患など遺伝子発現異常を伴う多因子疾患において、遺伝子発現レベルが症状の重篤性に相関する疾患感受性遺伝子の発現に寄与する細胞内シグナル分子を治療標的とすることは有効であると考えられる。我々は、アレルギー性鼻炎の急性症状発症にヒスタミンH1受容体 (H1R) 遺伝子発現シグナルが、また、慢性症状発症にはIL-33遺伝子発現シグナルが関与することを明らかにした。一方、抗アレルギー性漢方薬の小青竜湯は急性・慢性症状を改善できるとされているがその科学的検証はない。そこで、本研究では、小青竜湯及びその構成生薬におけるH1R遺伝子及びIL-33遺伝子発現抑制効果について検討した。

【方法】種々濃度における生薬熱水抽出物のHeLa細胞におけるH1R遺伝子発現亢進及びSwiss3T3細胞におけるIL-33遺伝子発現亢進に対する抑制効果を検討した。H1R及びIL-33 mRNA量はリアルタイムPCRにより定量した。

【結果】小青竜湯を構成する8種類の生薬のうち、半夏を除く7種にH1R及びIL-33遺伝子発現亢進抑制効果が認められた。H1R遺伝子発現に対するIC₅₀値とIL-33遺伝子発現に対するIC₅₀値の間には正の相関 (R²=0.97) が認められた。

【結論】構成生薬における両遺伝子発現抑制のIC₅₀値に相関が認められたことから、有効成分は両遺伝子発現シグナルに共通のシグナル分子を標的とすると考えられた。また、小青竜湯はアレルギー性鼻炎慢性症状を改善するだけでなく、他の好酸球性炎症に対する治療薬としても有効である可能性が考えられた。現在、小青竜湯の構成生薬のうち両遺伝子発現亢進を強く抑制した桂皮から有効成分の単離を進めている。

C-15

苦参由来抗アレルギー化合物(-)マーキアインのステロイドシグナルへの影響



○岡島菜津希¹、水口博之²、給田愛結美¹、河井真季子¹、北村嘉章³、武田憲昭³、藤野裕道¹、福井裕行⁴

徳島大学大学院医歯薬学研究部¹分子情報薬理学、³耳鼻咽喉科学、⁴分子難病学、²大阪大谷大薬学部薬理学

ヒスタミン_{H1}受容体 (H1R) 遺伝子はアレルギー性鼻炎の疾患感受性遺伝子であり、その遺伝子発現抑制により症状を軽減できる。我々は、和漢薬として知られる苦参にH1R遺伝子発現抑制活性を見出し、その有効成分として (-) マーキアインを同定した。そして、(-) マーキアインのH1R遺伝子発現抑制の分子機構を検討し、(-) マーキアインがH1R遺伝子発現シグナルにおいてヒートショックタンパク質90 (Hsp90) とタンパク質キナーゼC δ (PKC δ) の結合を抑制することを明らかにした。Hsp90はステロイドシグナルの調節に重要であることから、(-) マーキアインがH1Rシグナルだけでなく、ステロイドシグナルにも何らかの影響を及ぼすことが考えられた。そこで本研究では、(-) マーキアインのステロイドシグナルへの影響について検討した。

(-) マーキアインは、蛍光標識したHsp90阻害剤ゲルダナマイシンのHsp90への結合を弱いながらも抑制したが、Hsp90のATPase活性は抑制しなかったことから、(-) マーキアインはHsp90のATP結合部位の近傍に結合し、PKC δ とHsp90の結合を阻害することが明らかとなった。次に、GREを含むプラスミドベクターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、Hsp90阻害剤17-AAGがデキサメタゾン (Dex) 刺激に伴うプロモータ活性の亢進を阻害したのに対し、(-) マーキアインはプロモータ活性を増強することが明らかとなった。また、17-AAG処理によりグルココルチコイド受容体 (GR) は速やかに分解されたが、(-) マーキアイン刺激によるGRの分解は見られなかった。さらに、HeLa細胞において (-) マーキアインによるGRE下流のタンパク質発現への影響を検討したところ、Dex刺激に伴うDUSP-1 mRNA発現は増強したが、SLC19A2のmRNA発現には影響を与えなかった。

本研究の結果から、(-) マーキアインはHsp90に結合しPKC δ とHsp90の結合を阻害することでH1Rシグナルを抑制するのに加えて、ステロイドシグナルを増強することが明らかとなった。さらに、その増強効果はGRE下流のタンパク質によって異なり、GREを介した転写に異なる機構が存在する可能性が示唆された。

C-16

生薬セイタイ含有成分は潰瘍性大腸炎モデルマウスの症状を改善する



○小澤佳¹、森大地¹、山本朱音¹、畑中歩夢¹、山内優子²、高坂和芳¹、池谷幸信³、西澤幹雄²、田中秀和¹

¹立命館大 生命 薬理学、²立命館大 生命 医化学、³立命館大 薬 生薬

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, UC) は血便、下痢、発熱、体重減少などを主徴とする炎症性腸疾患で、現在行われている治療では対処しきれない症例も存在する。近年、UC患者に対して生薬の一つである青黛 (セイタイ、Qing-Dai、Indigo Naturalis) が顕著な改善効果を示すとの報告がなされている。また青黛はUCモデルマウスの症状を抑制し、複数の有効成分が含まれる可能性が示唆されている。そこで今回我々は、青黛に含まれる有効成分候補物質であるtryptanthrinおよびindigoについて、インターロイキン1 β (IL-1 β) によるラット初代培養肝細胞の一酸化窒素 (NO) 産生誘導に対する抑制効果の検討と、UCモデルマウスに対する有効性の検討を行った。

Wistarラットから初代培養肝細胞を調製し、tryptanthrinおよびindigoとIL-1 β を同時に添加した後、培地中に遊離するNO量をGriess法により測定した。また6週齢のオスマウス (C57BL/6J) に対してdextran sulfate sodium (DSS) を飲用水に混入して10日間経口投与し、UCモデルマウスを作成した。このマウスにtryptanthrinおよびindigoを投与し、UC様症状の抑制度合いを測り有効性を検討した。投与後、血清電気泳動を行うと共に、結腸を摘出し組織学的評価および炎症関連遺伝子の発現量測定を行った。

tryptanthrinおよびindigoにより、IL-1 β によって誘導されるNO産生が濃度依存的に抑制された。DSSのみを投与したマウスではUC様症状が徐々に重症化していった。tryptanthrin投与マウスでは、体重減少の顕著な抑制がみられたが、下痢便、血便症状では青黛ほどの抑制効果は見られなかった。またindigo投与マウスでは、血便症状は顕著に抑制されたものの、体重減少、下痢便症状では青黛ほどの抑制効果は見られなかった。これらの結果から、tryptanthrinおよびindigoはいずれも抗炎症作用を持つと考えられるが、UC病態に対する作用メカニズムが異なることが示唆された。青黛は、両物質を含む複数の有効成分が総合的に作用することにより強い抗UC作用を発揮していると考えられる。

活性酸素産生酵素NOX1/NADPHオキシダーゼの腸管粘膜バリア機能における役割



○劉 俊傑、岩田 和実、松本 みさき、矢部 千尋

京都府立医科大学・大学院医学研究科・病態分子薬理学

【目的】腸管組織においてリポポリサッカライド（LPS）により産生が誘導される活性酸素種（ROS）は、腸管粘膜バリア機能を障害し腸管上皮層の透過性を亢進させることが報告されている。腸管透過性亢進は、腸内細菌の組織への移行Bacterial Translocation（BT）を誘発し、敗血症に続く多臓器不全など重大な合併症を引き起こす。ROS産生酵素であるNOX1/NADPHオキシダーゼは腸管上皮細胞に高発現しており、LPSにより発現が誘導されることが知られている。

そこで今回、我々はLPS投与による敗血症モデルを用いて腸管粘膜バリア障害におけるNOX1/NADPHオキシダーゼの役割について検討した。

【方法】8から12週齢の野生型マウス（WT）と*Nox1*遺伝子欠損マウス（NOX1-KO）にLPS（6mg/kg）を腹腔内投与して敗血症モデルを作製した。腸管粘膜バリア機能はLPS投与12時間後にフルオレセインイソチオシアナート-デキストラン（FD-4:500 mg/kg）を経口投与し、その1.5時間後の血中FD-4レベルを指標に検討した。ROS産生は化学発光試薬L-012を腹腔内投与し、*In Vivo* Imaging Systemを用いて測定した。

【結果と考察】LPS投与により、WTでは血中FD-4レベルが有意に増加したが、NOX1-KOで有意に抑制されていた。*In Vivo* Imaging Systemを用いた解析ではLPSを投与したWTでは腹部のROS産生が対照群と比較して有意に増加したが、NOX1-KOでは完全に抑制されていた。LPSを投与したWTの臓器を摘出しROS産生部位を検討したところ、回腸で明らかな増加が認められた。同時に回腸の部位において*Nox1*および*iNOS*遺伝子発現の著明な増加が認められた。LPSで増加したROS産生はNO合成酵素阻害薬L-NAMEの投与により有意に抑制された。

L-012は O_2^- とNOとの反応生成物であるONOO⁻とも強く反応することから、LPSはNOX1由来 O_2^- とiNOS由来NOを介しONOO⁻を増加させ、腸管粘膜透過性を亢進させた可能性が考えられる。以上の結果からNOX1がBTにおける新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

腎線維化病態における転写因子OASISの役割



○守沖 瞳¹、尾花 理徳¹、山本 彩葉¹、金本 聡自²、前田 真貴子³、今泉 和則²、中山 博之¹、藤尾 慈^{1,3}

¹大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野、²広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 分子細胞情報学、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】慢性腎臓病（CKD）は新たな国民病と言われ、予防、治療の重要性が唱えられている。しかしながら、その病態の形成機序に不明な点が多く、治療満足度も極めて低い。そこでCKD病態形成機序の解明を目的に、腎線維化に焦点を当て、新たな線維化関連因子の探索及びその機能について検討を行った。【方法・結果】新規腎線維化制御因子を見出すべく、雄性C57BL/6マウスに一側尿管結紮（UUO）を施し、腎線維化を惹起させた。その線維化腎を用いてDNA マイクロアレイを行った結果、腎臓において機能が未知である転写因子OASISの発現が上昇することを見出した。また、定量的PCR法及びwestern blot法により、UUOモデルにおいてOASISが経時的に発現上昇することを明らかにした。次に、OASIS発現細胞を同定するため、免疫組織学的検討を行った。その結果、OASISは主に筋線維芽細胞に局在することが明らかとなった。そこで、筋線維芽細胞におけるOASISの機能を明らかにするため、ラット腎線維芽細胞NRK49FにTGF-β1処置を行い、筋線維芽細胞へと分化させた。この時、TGF-β1によりOASISが発現上昇することを見出した。また、レンチウイルスを用いたshRNAによりOASISをノックダウンさせ、wound healing assayにより細胞の遊走能について評価した。その結果、TGF-β1による遊走能の上昇が、OASISのノックダウンにより抑制されることが明らかとなった。一方、OASISは、TGF-β1による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化には影響を及ぼさなかった。【考察】OASISが腎臓において筋線維芽細胞の遊走を促進し、線維化を制御する可能性が示された。OASISが、新規CKD治療標的となることが示唆された。

C-19

父マウスへのバルプロ酸連続投与が仔マウスの行動に与える影響



○藤木佑有、衣斐大祐、小出菜優、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】ヒトにおいて父親の薬物曝露などの経験は、生殖細胞のエピジェネティック変化を介して子の脳内における遺伝子転写に影響を与えることで行動を変化させることが報告されている。てんかんや双極性障害の治療薬であるバルプロ酸（VPA）は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有しており、遺伝子の転写調節に関与しているが、父親のVPA処置が子の行動に与える影響は不明である。そこで、本研究では、マウス父獣に長期VPA曝露を行い、無処置雌マウスとの交配により得られた仔マウスの行動学的変化を解析した。

【方法】8週齢のC57BL/6J雄性マウスにVPA（100 mg/kg）を1ヶ月間、連続して腹腔内投与した。連続投与中の最終週に無処置雌マウスと交配させ、産まれた仔マウスが成獣となった時点から、プレパルス抑制（PPI）、MK-801誘発性多動および物体認知記憶を調べるためにPPI試験、運動量測定および新奇物体認知試験をそれぞれ行った。

【結果】VPA処置父獣の仔マウスは、溶媒処置父獣の仔マウス（コントロールマウス）と比較してPPIでは雌において有意な障害が認められ、MK-801誘発性多動においては雌雄共に有意な増加が認められたが、物体認知記憶における変化は認められなかった。

【考察】父親へのVPA処置が子の行動に影響を与え得ることが示唆された。VPAによるこのような作用には、生殖細胞におけるヒストンの脱アセチル化が考えられるため、今後は父獣の生殖細胞及び仔獣の脳内におけるヒストンアセチル化について調べていく予定である。

C-20

葉酸欠乏により誘発されるうつ様行動と歯状回における神経細胞の成熟異常



○西田 将治¹、竹中 裕子¹、原田 郁代¹、竹村 凌¹、浅利 颯太¹、橘 新¹、壺井 美里²、中村 吉孝²、荒木 良太¹、矢部 武士¹

¹摂南大・薬・複合薬物解析学、²株式会社 明治・研究本部・技術研究所

【背景・目的】葉酸はDNAメチル化を含むメチル基転移反応の一端を担うなど、生体機能の発達・維持において重要な栄養素である。これまでに疫学調査や臨床研究から、葉酸の欠乏がうつ病態のリスクファクターとなることが示唆されており、葉酸が精神機能の調節に関与するものと考えられる。本研究では、葉酸の欠乏が精神機能に及ぼす影響を明らかにするため、葉酸欠乏飼料で飼育したマウスの行動解析・神経生化学的解析、および葉酸欠乏培地で培養した神経幹細胞の分化・成熟評価を行った。

【方法】3週齢のddY系雄性マウスに葉酸欠乏飼料（葉酸含量0.07 mg/kg）、または対照飼料（葉酸含量2 mg/kg）を与えて飼育し、9週齢時に各種行動解析、免疫染色による海馬神経新生の評価、ドットプロット法によるDNAメチル化解析を行った。神経幹細胞はneurosphere法により調製し、葉酸欠乏培地（葉酸含量0.66 mg/L）、または対照培地（葉酸含量2.66 mg/L）で接着培養した後に、免疫染色により分化・成熟を評価した。

【結果及び考察】対照飼料で飼育したマウスと比べて葉酸欠乏飼料で飼育したマウスでは、強制水泳試験における無動時間の増加および海馬歯状回において新生成熟神経細胞数の減少、未熟神経細胞数の増加、DNAメチル化の減少が見られた。また、葉酸欠乏条件で培養した神経幹細胞では、接着培養7日目において未熟神経細胞数の増加と成熟神経細胞数の減少が見られ、葉酸欠乏飼料で飼育したマウスと同様の神経細胞の成熟異常が観察された。こうした葉酸欠乏により引き起こされるうつ様行動や神経細胞の成熟異常、DNAメチル化の減少は、メチルドナーであるS-アデノシルメチオニンの補充により改善した。以上の結果から、葉酸の欠乏が歯状回における神経細胞の成熟異常とDNAメチル化の減少を引き起こし、うつ様行動が誘発されるものと考えられる。本研究成果は、体内葉酸量がうつ病態の発症において重要である可能性を示唆するものである。

C-21

エピゲノム制御酵素のS-ニトロシル化を介した活性調節



○奥田 洸作、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

【目的・背景】後天的な遺伝子発現制御を担うエピゲノムは、酵素的な支配を受けているが、生体内の活性調節機構はほとんど不明である。当研究室はこれまで、タンパク質システイン残基の一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) による酸化修飾 (S-ニトロシル化 ; SNO化) と、それを介した活性変化を解析し、病態発症との因果関係を明らかにしてきた。そこで、新たなNO標的タンパク質を探索したところ、複数のエピゲノム制御酵素の同定に成功した。本研究では、SNO化修飾を介したエピゲノム制御酵素の活性調節機構を検討し、NOによる細胞内のエピゲノム変化とその意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】タンパク質のSNO化はbiotin-switch assayにより検討した。NOのエピゲノム制御酵素活性に対する影響は、化学発光法を利用した特異的アッセイキットを用いて解析した。標的遺伝子プロモーター部のCpGメチル化パターンの解析はbisulfite sequencingにて、また、各遺伝子発現はRT-PCR法を用いた。

【結果・考察】エピゲノム制御酵素の一つは、外来性および細胞内産生NOによりSNO化を受けることが分かった。また、変異体を用いた解析から、SNO化部位は活性中心と推定されるシステイン残基であることを明らかにした。つぎに、酵素活性に対するNOの影響を検討したところ、濃度依存的に抑制されることを見出した。続いて、ヒト胃がん由来AGS細胞においてCpGメチル化依存的に発現が抑制されている遺伝子群を探索し、それらの遺伝子のプロモーター部CpGメチル化および発現に対するNOの影響を検討した。DNAマイクロアレイを実施した結果、NO刺激依存的かつCpG脱メチル化依存的に発現が上昇する標的遺伝子を複数同定することに成功した。とくに、がん遺伝子であるCCND2 (サイクリンD2) はNO刺激により遺伝子プロモーター部のCpG脱メチル化が惹起され、一過的な発現誘導が起こることを見出した。以上より、NOは一部のエピゲノム制御酵素の活性を負に制御することで、遺伝子発現レベルを調節する生体内因子である可能性が示唆された。

C-22

酸化ストレス依存性細胞死に対するポリサルファードナーの影響



○奥田将¹、山地賢一²、島田裕伎²、高杉展正¹、上原孝¹

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬効解析学 ²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サルフィド (Cys-SSH) などの活性硫黄種 (Reactive Sulfur Species:RSS) であることが分かってきた。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。

パーキンソン病 (PD) における、中脳黒質緻密部のドパミン作動性神経細胞死の原因として酸化ストレスの関与が示唆されている。様々な要因により生成した活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) が酸化ストレス状態を維持し、ドパミン作動性神経のアポトーシスを誘発・伝播すると考えられている。MPP⁺ (1-methyl-4-phenyl-pyridinium) は、ROS/RNSの過剰産生により、酸化ストレス依存的なアポトーシス関連経路を活性化して、PD様症状を誘発する外因性の神経毒である。そこで、本研究では、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において、MPP⁺による細胞死に対し、ポリサルファードナーであるNAC-S2が与える影響について検討した。

まず、位相差観察により、細胞形態を観察した。NAC-S2前処理を行ったSH-SY5Y細胞では、MPP⁺による細胞死の抑制が認められた。次に、クロマチン蛍光色素Hoechst 33342により核を染色し、その形態から生細胞と死細胞を判別した。その結果、NAC-S2前処理により、MPP⁺による細胞生存率の低下が有意に抑制された。その際、アポトーシス時に観察されるカスパーゼ依存的なPARPの切断は、NAC-S2の濃度に依存して抑制された。以上より、NAC-S2はSH-SY5Y細胞において、酸化ストレス依存的な細胞死に対して保護的に作用する可能性が示唆された。



○堀江哲寛、家崎高志、深澤和也、金田勝幸、檜井栄一

金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 薬理学研究室

【背景・目的】Mechanistic target of rapamycin (mTOR) は様々な細胞機能を制御するセリン/スレオニンキナーゼであり、哺乳類ではRaptorを含むmTOR complex1 (mTORC1) とRictorを含むmTOR complex2 (mTORC2) の2種類の独立したシグナル複合体を形成する。mTORシグナルと骨格形成の関連性については、阻害剤を用いた *in vitro* 解析が行われてきたが、実験条件の差異等により一定の結果は得られていない。さらに、骨格形成における *in vivo* でのmTORC1シグナルの重要性は、mTORC1関連遺伝子の全身遺伝子欠損マウスが胎生致死のためほとんど明らかとなっていない。本研究では、組織特異的な遺伝子改変マウスを用いてmTORが骨格形成にどのように寄与するかについて検討した。

【方法】間葉系細胞特異的遺伝子欠損マウス作製を目的として *Prx1-Cre* マウスと、*Mtor^{fllox}* マウス、*Raptor^{fllox}* マウス及び *Rictor^{fllox}* マウスを用い、*Prx1-Cre;Mtor^{fl/fl}* マウス、*Prx1-Cre;Raptor^{fl/fl}* マウス及び *Prx1-Cre;Rictor^{fl/fl}* マウスを作製した。胎生18.5日齢のマウス胎児を用いて骨格標本を作製した。さらに、各遺伝子欠損マウスの四肢から間葉系細胞を単離し、micromass culture法により軟骨細胞への分化誘導を行った。また、細胞での遺伝子発現及びタンパク質発現をqPCR法及びimmunoblot法により解析した。

【結果・考察】*Prx1-Cre;Mtor^{fl/fl}* マウス及び *Prx1-Cre;Raptor^{fl/fl}* マウスは胸郭の形成異常により、出生後間もなく死亡した。また、胎生18.5日目での解析では、四肢の著明な短縮及び頭蓋骨の形成異常が観察された。一方、*Prx1-Cre;Rictor^{fl/fl}* マウスでは著明な骨格形成異常は確認されなかった。また、*Mtor* 欠損細胞および *Raptor* 欠損細胞では、軟骨細胞への分化が著明に抑制されていた。さらに *Raptor* 欠損細胞では転写制御因子 Sox9 のタンパク質発現が著明に低下していたが、mRNA発現は野生型細胞と比較して有意な変動は認められなかった。以上のことから、mTORC1はSox9のタンパク質発現制御を介して、骨格形成に重要な役割を果たしている可能性が示された。

○狩野泰輝、菅沼由唯、天方崇雄、池本和久、一瀬千穂、近藤一直

藤田保健衛生大学 医学部 薬理学

【目的】ニコチンは煙草に含まれる化学物質の中でも特に知られたものであり、摂取により生体に酸化ストレスを負荷すると言われている。我々はニコチンの慢性投与がコラーゲン惹起性マウス血小板凝集能を抑制することを報告したが、その機序は未だ不明である。今回はその機序を明らかにする一環として、*in vitro* によるニコチン単回添加の影響を慢性投与の効果と比較検討した。

【方法】ICRマウス(6ヶ月齢♂)に30、100 $\mu\text{g/mL}$ のニコチンまたは0.2%サッカリン溶液 (vehicle) を自由飲水にて摂取させ、4週間飼育後ペントバルビタール麻酔下で下大静脈から採血を行った (0.38%クエン酸添加)。弱遠心により多血小板血漿 (PRP) を得た後、血小板数を25万/ μL に調整した。凝集惹起剤としてコラーゲン (4~10 $\mu\text{g/mL}$)、ADP (1~10 μM) を用い、血小板凝集能を光透過法で測定した (MCMヘマトレーサー712)。一方 *in vitro* による単回添加実験では、上記と同様に採血し血小板数を調整した後、ニコチン100 $\mu\text{g/mL}$ 慢性投与時に推定される血中濃度0.05 μM に基づき、最終濃度0.01~1 μM のニコチン溶液を添加して30分後に凝集能を測定した。

【結果】コラーゲン5 $\mu\text{g/mL}$ 惹起性血小板凝集率は、vehicle群77.1 \pm 3.5%に対し、ニコチン30、100 $\mu\text{g/mL}$ 慢性投与群ではそれぞれ54.5 \pm 9.7%、46.4 \pm 9.4%と有意に抑制された。しかしADP惹起凝集では有意な変化は見られなかった (既報)。これに対してニコチン単回添加のコラーゲン惹起性血小板凝集率は、対照群85.5 \pm 2.9%であったのに対し、0.01、0.1、1 μM でそれぞれ83.8 \pm 1.2%、87.3 \pm 2.8%、80.3 \pm 1.4%と、有意な変化は見られなかった。またADPによる凝集においても有意な変化は見られなかった。

【考察】ニコチンが血小板凝集に対して及ぼす影響は、単回添加と慢性投与とで異なることが見出された。血小板表面にはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR α 7) の発現が報告されているが、慢性投与による凝集抑制効果はこれを介さない別の機序によるものと考えられる。

Histidine-rich glycoprotein(HRG)の好中球制御による敗血症治療薬の可能性

○ 和氣 秀徳¹、高 遠¹、森 秀治²、劉 克約¹、勅使川原 匡¹、西堀 正洋¹

¹岡山大・院・医歯薬・薬理, ²就実大・薬・応用薬学・生体情報

【背景・目的】

敗血症は、炎症担当細胞の強い活性化、血管内皮細胞の活性化と障害、凝固・線溶系の異常、血小板凝集などの生体反応が相互に連動して、全身性の微小循環障害から、多臓器不全となり死に至る疾患病態である。抗菌薬による感染症治療とICUにおける全身管理の進歩にも関わらず、約30%という高い死亡率が現在も継続しており、敗血症治療薬の開発は急務となっている。本研究では敗血症性微小循環障害を引き起こす引き金となる好中球性血栓（免疫血栓）形成に着目して、血液血管系の機能維持に重要な役割を持つことが示唆されている高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）の敗血症性微小循環障害に対する効果と作用機序を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】

盲腸結紮穿孔（CLP）モデル作製後、HRGを尾静脈より投与し、肺のNETosis や免疫血栓形成に対するHRG補充効果を組織学的に評価した。ヒト血液より分離した好中球にHRGを処置し、微小流路の通過性と好中球形態への影響を調べた。

【結果および考察】

敗血症CLPマウス実験において、血漿中HRG濃度が著明に低下しており、HRGを補充すると劇的な生存率改善効果があることを明らかにした。また、その死因の一つとして、免疫血栓形成と随伴する肺炎を起因とする急性呼吸窮迫症候群によるものであることを明らかにした。細胞レベルでの検証の結果、HRGは細胞形態を正球状で細胞表面が平滑化した状態に保つ作用があり、この作用により、微小循環での好中球の通過性をスムーズに保つことが明らかとなった。以上の結果から、HRGが有力な敗血症治療薬となる可能性が示された。

テリパラチド誘発悪心に対する六君子湯の有用性検討とその作用機構の解明

○ 山本 浩一¹⁾、磯谷 幸宏²⁾、石田 隆行¹⁾、萩原 圭祐³⁾

1) 大阪大院・医・保健、2) 旭化成ファーマ、3) 大阪大院・医・先進融合医学

【目的】テリパラチドによる骨粗鬆症治療では患者に悪心が見られることがある。この悪心は治療継続に影響するため、予防や治療が必要となる。ところで、六君子湯は蒼朮や陳皮など8種の生薬から構成され、食欲不振や悪心など消化器症状を緩和するために処方される漢方薬である。本研究ではまず、テリパラチド誘発悪心病態ラットを作成し、その病態に対する六君子湯の予防効果を確認することで有用性を検討した。ところで、六君子湯はグレリン分泌促進による消化管運動亢進を介して消化器症状を改善するとされる。そこでテリパラチド誘発悪心発症時のグレリンの役割について解析することで、六君子湯の治療機構についても検討した。

【方法】卵巣摘出ラットに六君子湯1%含有餌を2週間摂取させ、テリパラチド（400 μg/kg）皮下投与により惹起される悪心、血漿グレリン分泌変化、消化管運動能変化に対する六君子湯の有用性を確認した。ラットは悪心・嘔吐を惹起するとカオリンなどの餌ではないものを摂食するため、本実験ではテリパラチド投与24時間後のカオリン摂取量を悪心の指標とした。また、グレリン受容体遮断薬（[D-Lys³]-GHRP-6: 200 nmol/rat）投与が六君子湯によるテリパラチド誘発悪心抑制作用や消化管運動亢進に対してどのような影響を与えるか検討した。

【結果】テリパラチド投与によってカオリン摂取量は有意に増加したが、六君子湯含有餌をあらかじめ摂取させることで、その増加を有意に抑制された。また、テリパラチドによって血漿グレリン濃度ならびに上部消化管運動能は対照群の70%程度にまで抑制されたが、いずれも六君子湯によってコントロール群レベルまで回復し、有意な改善作用が認められた。また、グレリン受容体遮断薬の投与は六君子湯によるテリパラチド誘発悪心抑制作用に拮抗して再燃させただけでなく、六君子湯による消化管運動能改善作用も抑制した。

【考察】テリパラチドが誘発する悪心の発症機序の一つとして、グレリン分泌低下に伴う消化管運動機能障害が考えられた。また、六君子湯によるグレリン分泌亢進を介した消化管運動能の改善がテリパラチド誘発悪心の予防作用に関与することが判明した。

C-27 交感神経細胞による骨細胞制御

○近藤久貴、豊田浩章、中山慶美、戸苅彰史

愛知学院大学 歯学部 薬理学講座

【背景】交感神経系による骨芽細胞や破骨細胞を介した骨代謝調節機構について明らかになりつつある。近年、骨細胞による骨代謝制御が注目されているが、交感神経系による骨細胞の制御機構については不明な点が多い。

【目的】本研究ではマウス骨細胞様細胞MLO-Y4を用い、交感神経系による骨細胞制御について検討を行った。

【方法】

交感神経細胞と骨細胞の直接的な繋がりを調べるため、in vitro共培養系を用いた。細胞はマウス骨細胞様細胞MLO-Y4とマウス上頸神経節（SCG）由来交感神経細胞を用いた。alpha 1 アドレナリン受容体とreceptor activator of nuclear factor- κ B ligand（RANKL）のmRNA発現はリアルタイムPCRにより評価した。

【結果】

マウス骨細胞様細胞、MLO-Y4細胞に交感神経の受容体として α 1B受容体が発現していることを確認した。ノルアドレナリン、 α 1受容体作動薬フェニレフリンによりMLO-Y4細胞の細胞内カルシウム濃度が増加した。続いて、マウス骨細胞様細胞MLO-Y4とマウス上頸神経節（SCG）由来交感神経細胞を共培養し、神経細胞のみ刺激するサソリ毒にて処理したところ、サソリ毒は一過性に神経細胞と接合しているMLO-Y4細胞のカルシウムを増加させた。そしてこの反応は α 1遮断薬プラゾシンによりブロックされた。この結果はMLO-Y4細胞の α 1受容体を介し、MLO-Y4細胞が神経の活性化に直接応答して活性化したことを示唆する。また、ノルアドレナリン、フェニレフリンをMLO-Y4細胞に作用させるとRANKLの発現が増加した。以上の結果から、交感神経細胞と骨細胞とが直接機能的に繋がりを、RANKLの発現が増加することが示唆された。

C-28 慢性腎臓病打倒のための簡便なマウスモデル作成

○Guan Yu、中野大介、Zhang Yifan、西山成

香川大学薬理学

【目的】慢性腎臓病に対する効果的な治療法はない。病態が進行した先には透析・腎移植という腎死しかなく、患者のQOLは著しく制限されることになる。治療法開発が鋭意なされているが、効率的な研究進展を阻む因子の一つとして、慢性腎臓病病態を再現できる動物モデルの不在が挙げられる。候補薬物が存在しても、薬効を確かめるモデルに限界があることが現況である。そこで、本研究では、虚血イベント後に進行する慢性腎臓病の実験的マウスモデルの作製に取り組んだ。

【方法】6週齢雄性C57B1/6マウスの左腎に虚血（30-45分）および再灌流刺激を加え、その一週間後に右腎を摘出した。

【成績】腎機能低下（血中尿素窒素上昇）、ヘマトクリット低下、多尿は右腎摘出後1週間以内に生じた。その後、腎機能は部分的に回復して正常高値にて遷延し、貧血、多尿には回復は観られなかった。8週目において、左腎において著明な糸球体硬化および間質線維化が確認された。これらの変化は虚血時間の長さ依存していた。18か月齢の老齢マウスでは、若齢マウスでの45分虚血による病態を、短時間虚血（30分）により再現可能であった。虚血イベントを起こしやすいと言われる糖尿病マウスにおいては、右腎摘出までの間に血糖コントロールを行うことにより、その後の症状を緩解することができた。いずれのモデルにおいても、右腎摘出24時間後における血中尿素窒素値が100 mg/dLを超えた処置において、8週間後に広範な腎間質線維化像が得られた。

【結論・考察】簡便かつ高い再現性を持つモデルの開発に成功した。モデル作成成功の可否は片腎摘1日後（実験開始8日後）に判断可能であり、一定レベルの慢性腎臓病を発症するモデルにおける投薬介入試験などのデザインが容易になる。また、リスクファクター（血糖値）のコントロールが、現状選ぶ重要な対抗策のひとつであることが確認できた。

エイコサペンタエン酸による糖尿病性血管内皮機能障害に対する慢性投与の治療効果および血管への直接作用

○竹之内康広^{1, 2}、坪井一人¹、大竹一男²、加園恵三²、岡本安雄¹

¹ 川崎医科大学薬理学教室 ² 城西大学薬学部生理学講座

【目的】糖尿病による死亡原因は、血管障害による合併症が大部分を占め、比較的初期に血管内皮機能障害が生じることが広く知られている。初期に起こる内皮機能障害が改善されれば合併症を発症するリスクを軽減できる。食事由来の魚油の成分であるエイコサペンタエン酸（EPA）は、中性脂肪低下作用、血小板凝集抑制作用などを有し、高脂血症・閉塞性動脈硬化症治療薬としてethyl esterが薬剤化されており、さらにサプリメントとしても幅広く用いられている。しかしながら、動脈硬化性疾患のハイリスク要因である2型糖尿病を対象としたEPAによる動脈硬化性疾患の発症を抑制する効果を検討した報告は少ない。本研究は糖尿病性血管内皮機能障害に対するEPAの有効性およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】 KK-Ay雄性6週齢マウスに高脂肪食を8週間投与し2型糖尿病モデルを作成した。EPA ethyl ester（EPA-E）は高脂肪粉末給餌中に混ぜ14週齢からの4週間投与を行った。対照群には同週齢のC57BL/6Jを用いた。摘出胸部大動脈において、内皮依存性弛緩反応であるacetylcholineによる弛緩反応は対照群に比べKKAy-高脂肪食群で減弱が見られたが、EPA-E慢性投与により改善した。EPA-Eの代謝物であるEPAの血管への直接作用をマグヌス法にて検討したところ、EPAは胸部大動脈に対し用量依存的な弛緩反応を示したが、一酸化窒素（NO）合成酵素阻害薬の前処置によりその弛緩反応は右にシフトした。また、ヒト血管内皮細胞株EA.hy926に対し30分間EPA刺激を与えることにより、用量依存的にeNOSのリン酸化の増加が認められた。

【考察】 EPA-Eの慢性投与は糖尿病による血管内皮機能障害に対し治療効果を有する事が明らかとなった。また、EPAは直接血管を弛緩させる作用を有し、EPAによる改善メカニズムとして中性脂肪低下や血小板凝集抑制作用のみではなく、血管内皮保護因子であるNOを遊離するeNOSの活性化が一部関与している可能性が示唆された。

時系列検査データと薬物代謝関連遺伝子多型の統合解析によるsitagliptinの薬効影響因子の探索

○西村有平¹、岡部志功¹、鈴木祐矢¹、柿本彰¹、豊島侑¹、中谷中²

三重大学医学部 ¹統合薬理学、²附属病院中央検査部

情報科学技術の発達に伴い、多くの病院で電子カルテシステムが導入される時代となっている。患者の通院に伴い蓄積される医療ビッグデータを用いて、様々な医学的発見が可能であることが世界中で実証されており、注目を集めている。電子カルテ情報には、各患者の検査データが時系列として蓄積されているが、データの間隔は同じ疾患を有する患者間でも異なる場合が少なくない。このような不均一な時系列検査データをうまく活用することにより、例えば同じ薬物を投与された患者の応答性を、薬効と密接に関係する検査データの時系列パターンに基づいて分類することができる。この分類を基盤として、同じ時系列パターンを示す患者間で共通する属性や、異なる時系列パターンを示す患者間で異なる属性を探索することが可能になる。

本研究では、DPP4阻害薬であるsitagliptinを投与された患者のHbA1cの時系列データを動的時間伸縮法を用いて比較解析し、類似するパターンを示す患者群を層別化した。これらの患者のHbA1c以外のデータを用いて、異なる層に分類された患者間で有意な違いを示す属性を探索した。また、これらの患者の薬物代謝関連遺伝子多型をAffymetrix社のDMET（Drug Metabolizing Enzyme and Transporter）-Chipを用いて網羅的に解析し、HbA1cの時系列データの層別化と相関する遺伝子多型を同定し、その機能的意義について考察した。本研究で用いた手法は、様々な薬物の薬効影響因子の探索に応用可能であると考えられる。