

S-1

δ オピオイド受容体をターゲットとした新規向精神薬の創薬

齋藤 顕宜、山田 光彦

国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 精神薬理研究部

オピオイド受容体には μ 、 κ 、 δ の3種類のタイプが存在している。現在、モルヒネを代表とするオピオイド μ 受容体作動薬は鎮痛薬として、オピオイド κ 受容体作動薬ナルフラフィン¹は血液透析患者あるいは慢性肝疾患患者における掻痒症の改善薬として利用されている。しかし、医薬品として使用可能なオピオイド δ 受容体 (DOR) 作動薬は未だ開発されていない。DOR作動薬には様々な生理活性が報告されているが、これまでに合成されてきたプロトタイプ化合物の多くが痙攣誘発作用を示したことから、その開発が大きく制限されていたのである。一方我々は、共同研究先の北里大学長瀬ら (現筑波大学) が合成したDOR作動薬KNT-127が痙攣誘発作用を示さないことを見出し、KNT-127をリード化合物とした向精神薬開発を開始した。実際に、KNT-127は、様々な動物モデルにおいて、鎮痛作用、抗うつ様作用、抗不安様作用を示す。興味深いことに、KNT-127は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) よりも早期に抗うつ様作用を示すことが示唆されている。加えて、KNT-127はSSRIやベンゾジアゼピン系抗不安薬の有する有害な副作用を示さない。そのため、KNT-127をリードとしたDOR作動薬の創薬研究は、既存薬と比較してより安全で有効性の高いストレス性精神疾患に対する治療薬開発につながることを期待されている。最近では、DOR作動薬の大うつ病患者に対する臨床試験が実施され、大うつ病患者の不安症状を有意に改善することが報告されるなど、DORの情動制御に関わる概念は実証されつつある。本シンポジウムでは、DORをターゲットとした新規向精神薬の創薬について最近の知見を報告したい。

S-2

食中脂肪酸バランスによる情動制御とその神経メカニズム

山田大輔^{1,2}、関口正幸^{1,2}

¹ 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部

² AMED-CREST, 日本医療研究開発機構

【背景】多価不飽和脂肪酸（PUFA）は末梢・中枢機能に様々な影響を及ぼすことが知られており、学術的にも社会的にも大きな注目を集めている。特に情動性についてみると、例えばうつ病や不安症などストレス性精神疾患患者の血中では、健常者に比べてドコサヘキサエン酸などの ω 3 PUFAが少なく、リノール酸などの ω 6 PUFAが多いことが報告されている。またげっ歯類においても、 ω 3 PUFAの欠乏食を与えて飼育するとうつ様行動や不安様行動が増加することや、これらの動物に ω 3 PUFAを補給すると上記の情動行動異常が回復することが知られている。しかしその詳細な作用メカニズムはほとんどわかっていないのが現状である。

【目的】我々はマウスを対象として、餌に含まれる ω 3と ω 6 PUFAの比（3:6）が情動性恐怖記憶に与える影響、そして恐怖記憶を司る脳内神経回路に対する影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】3:6が異なる餌をそれぞれ与えて飼育したマウスで恐怖条件づけ試験を行った。また恐怖神経回路を構成する聴覚野にチャンネルロドプシンを発現させ、投射先である扁桃体外側核で、光刺激により誘発した聴覚野→扁桃体シナプス伝達を記録した。

【結果・考察】高3:6餌（=1.00）群では低3:6餌（=0.14）群に比べて恐怖記憶の程度が有意に低下していた。またこの恐怖記憶の低下はカンナビノイドCB1受容体インバースアゴニスト/アンタゴニスト投与で消失した。この行動変化と平行して、高3:6餌群の扁桃体では記憶の素過程と考えられている興奮性シナプス伝達の長期増強がCB1受容体依存的に減弱していること、同シナプス伝達に対するCB1受容体アゴニストの作用が増強していることが明らかとなった。カンナビノイド系はシナプスの過剰な興奮を抑えるフィードバック抑制機構として働くことが知られていることから、高3:6餌摂取によって扁桃体内CB1受容体活性が高まり、恐怖記憶に関連したシナプス伝達の長期増強を抑制することで恐怖記憶の低下がおこる可能性が考えられた。本研究の結果は、不安症等に対する介入研究においてPUFAを利用する際に有用な理論的背景を提示するものと考えている。

S-3

ストレス適応障害に対する抑肝散の改善効果とそのメカニズム

○宮岸寛子、辻 稔、齋藤淳美、宮川和也、武田弘志
国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野

生体は、外界からのストレス刺激に抵抗し適応するための生理機構（ストレス適応機構）を有しているが、過度なストレス刺激によりこの機構が減弱・破綻すると、ストレス性精神疾患の発症リスクが高まると考えられている。したがって、ストレス適応機構を維持・増強する薬物の探索は、気分障害に代表されるストレス性精神疾患の新たな治療薬開発につながることを期待される。そこで、本シンポジウムでは、過剰なストレス刺激を負荷したストレス非適応モデルマウスの情動異常に対する抑肝散の効果とその作用メカニズムに関する研究成果について紹介する。

我々はこれまでに、マウスに1日1回1時間の拘束ストレス刺激を14日間慢性負荷することで、急性ストレス刺激負荷時に認められる情動行動の低下が減弱するストレス適応モデルマウスを、一方、慢性負荷する拘束ストレス刺激を4時間に延長した場合には、依然情動行動の低下が認められるストレス非適応モデルマウスを作成できることを明らかにしている。そこで、ストレス非適応モデルマウスの作成過程において、連日、抑肝散を拘束ストレス刺激負荷直後に経口投与したところ、情動行動の低下が有意に回復した。また、マウス全脳より海馬及び大脳皮質を分画し、各脳組織中のグルタミン酸トランスポーター（EAAT1～EAAT4）の発現量を検討したところ、ストレス非適応モデルマウスの海馬においてEAAT2の特異的かつ有意な発現量の減少が認められ、この変化も抑肝散の慢性投与により有意に抑制された。

以上より、抑肝散は、ストレスへの適応障害に起因する情動異常を改善する効果を有することが示唆された。また、過剰かつ慢性的なストレス刺激は、海馬においてEAAT2の発現減少にともなうグルタミン酸の過剰状態を引き起こすこと、さらに、抑肝散は、このEAAT2発現量の減少を抑制することにより、グルタミン酸情報伝達の異常を改善する可能性も併せて示唆された。

S-4

グループⅡ代謝型グルタミン酸受容体を標的とした新規抗うつ薬の開発

茶木 茂之

大正製薬(株) 医薬研究本部

現在、うつ病治療の第一選択薬として選択的セロトニン再取り込み阻害薬およびセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬が広く使用されている。しかしながら、既存の治療法においても多くのうつ病患者が治療抵抗性として残されており、従来の治療法とは異なる機序に基づく創薬が求められている。近年、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬であるketamineが既存の治療法が奏功しない治療抵抗性うつ病患者に対して顕著な抗うつ作用を示し、その効果に即効性が認められていることから、うつ病治療におけるブレイクスルーとして注目されている。一方、ketamineは投与初期に精神症状・解離症状を引き起こし、また、長期投与における依存形成および神経細胞障害の懸念がある。そこで、ketamineの抗うつ作用の神経化学的機序を解明することにより、新しい抗うつ薬の創製に繋げようとする研究が活発に実施されている。我々は、グルタミン酸神経系の中で、グループⅡ代謝型グルタミン酸 (mGlu) 受容体拮抗薬にターゲットをあてた創薬を行っている。選択的グループⅡmGlu受容体拮抗薬はうつ病の種々動物モデルにおいて抗うつ作用を示し、既存の抗うつ薬が奏功しない動物モデルにおいても、ketamineと同様に抗うつ作用を示すことを見出している。また、その作用に即効性のあることが示されている。さらに、グループⅡmGlu受容体拮抗薬はketamineと同様の神経化学的機序を介して抗うつ作用を発現する可能性が示唆されている。即ち、グループⅡmGlu受容体拮抗薬はketamineと同様に、AMPA受容体刺激を介したBDNF-mTORシグナルを活性化することにより抗うつ作用を示す可能性が示唆されている。さらに、前頭前皮質におけるAMPA受容体活性化を介して、背側縫線核のセロトニン神経を活性化する経路の関与も示唆されている。本シンポジウムでは、グループⅡmGlu受容体拮抗薬の新規抗うつ薬としての可能性を、ketamineとの作用および作用機序の類似性から考察する。

PDK4阻害薬のマウスモデルによる心不全治療効果の検証

○日野光貴^{1, 5)}、相澤健一¹⁾、廣瀬友靖²⁾、大村智³⁾、砂塚敏明²⁾、藤生克仁⁴⁾、山下親正⁵⁾、永井良三⁶⁾、藤村昭夫¹⁾

1) 自治医科大学医学部臨床薬理学部門、2) 北里大学北里生命科学研究生物有機化学研究室、3) 北里大学、4) 東京大学大学院医学系研究科健康空間情報学講座、5) 東京理科大学大学院DDS・製剤設計学研究室、6) 自治医科大学

【背景・目的】心不全とは、心臓の血液拍出が不十分で、全身が必要とするだけの循環量を保てない病態である。薬物療法としてはACE阻害薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB) 等が挙げられ、非薬物療法としては心臓再同期療法 (CRT) が挙げられるが、急性心不全は依然として死亡率の高い疾患である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4 (PDK4) とはTCAサイクル (クエン酸回路) を抑制し、細胞内代謝を糖質から脂質に転換させる酵素で、心不全時に活性が亢進するという報告がされている。しかし代表的なPDK4阻害薬 (PDK4i) であるジクロロ酢酸 (DCA) は活性が低く、有害事象があるため治療薬としての使用が不可能であるため、これらを改善した新規PDK4iの開発が必要である。本研究では新規PDK4iの候補6種類に対しマウスを用いたスクリーニングを行い、薬効の高い新規PDK4iの選定を目的とする。

【方法】雄性8週齢C57BL/6Jマウスを用いて心機能の指標となる左室駆出率 (EF) を測定し、その後手術により心不全モデルマウスを作成した。手術後4週間に再びEFを測定し、その時点より7日間新規PDK4iを投与し、投与完了後に再びEFを測定した。

【結果】手術後4週間のマウスのEFは手術前のマウスのEFと比較して有意な低下が見られた。また投与完了後にはDCA (コントロール) 群に比べて2種類の新規PDK4i群でEFが有意に上昇していた。

【結論】本研究より2種類の新規PDK4iが心不全治療に有用である可能性が示された。

2型糖尿病モデルラット胸部大動脈におけるウロテンシン II 誘発収縮反応の検討

安藤眞、松本貴之、渡邊駿、小林翔太、田口久美子、小林恒雄

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態学研究室

【目的】 Urotensin II (U II) は強力な血管作動性ペプチドである。U II による血管収縮機構については様々な報告により明らかになりつつあるが、2型糖尿病病態下における U II 誘発収縮反応とそのシグナル伝達機構については未だ明らかとなっていない。そこで我々は2型糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki (GK) ラット摘出胸部大動脈を用いて U II 誘発収縮反応およびそれに対する各種阻害薬の影響について検討を行った。【方法】 雄性 GK ラットおよび Wistar ラットより胸部大動脈を摘出し、U II による収縮反応の検討を行った。また Urotensin II receptor (UT) および Rho kinase の阻害薬存在下における U II 誘発収縮反応の検討を行った。さらに Western Blot 法を用いて UT および Rho A、ROCK1、ROCK2、MYPT1、ERK、p38 MAPK のタンパク発現について検討を行った。【結果・考察】 GK群においてU II 誘発収縮反応が認められたが、Wistar 群においては認められなかった。GK 群における U II 誘発収縮反応は UT 拮抗薬 (SB657510) および Rho kinase 阻害薬 (Y27632) の前処置により減弱した。また胸部大動脈での UT 発現は Wistar 群と比較して GK 群において増加しており、U II 刺激 (3×10^{-9} M、20 min) 条件下における Rho A、ROCK1、ROCK2、MYPT1 のタンパク発現は両群間で変化は認められなかった。一方、ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化量は GK 群においてWistar群と比較して有意に増加していた。以上より、GK ラット大動脈における U II 誘発収縮反応は UT の発現上昇や Rho kinase および ERK1/2、p38 MAPK シグナルが関与する可能性が示唆された。

植物由来ポリフェノールのモリンの血管内皮保護効果

長谷川麻美、田口久美子、飛田麻里、松本貴之、小林恒雄

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学研究室

【目的】糖尿病は、心血管系疾患など合併症の発症及び進展のリスクを増加させ、患者のQOLを低下させる。また、糖尿病性合併症は血管内皮機能の低下により引き起こされており、内皮機能の改善は糖尿病性合併症を予防する上で重要である。以前、当研究室において、グアバの葉に含まれるポリフェノールであるモリン (MO) をストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルマウスに処置すると、減弱していた血管弛緩反応が改善することを報告している。しかしながらその作用機序は明らかになっていなかったため、今回はMOがどのような経路を介して血管弛緩反応を増強させるのか検討を行った。

【方法】STZ 誘発糖尿病モデルマウス (糖尿病群) から摘出した胸部大動脈を用いて、血管弛緩反応や NO_x 測定、各種タンパク発現をコントロールマウス (対照群) と比較した。

【結果】糖尿病群の ACh 誘発内皮依存性弛緩反応は対照群に比べ減弱していたが、MO の前処置により増大が認められた。また、糖尿病群において ACh 刺激時に減少していた NO 産生量は、MO 刺激時に顕著に増加しており、MO 濃度依存性血管弛緩反応も有意な増大を示した。そこで MO 刺激による NO 産生経路の探索を行った。MO 誘発血管弛緩反応において、NO 合成酵素阻害薬である L-NNA や Akt inhibitor を前処置すると、対照群、糖尿病群共に血管弛緩反応の消失が認められた。また、糖尿病群において、MO 刺激により p-Akt および p-eNOS の発現量が増加した。

【考察】MO は血管内皮細胞に作用し、Akt/eNOS 経路を活性化させることで NO 産生量を増加させ、血管を直接弛緩させる作用を持つことが明らかになった。さらに MO のこの作用は、血管内皮機能が低下し NO 産生量が減少している糖尿病時において、レスキュー的に機能を改善する可能性が示唆された。以上より、内皮機能を改善させる新たな治療方法として、MOの有用性が期待される。

新規マウス網膜血管新生異常モデルにおける血管伸長方向性調節機序の解析

○森田 茜¹、松村有希¹、郷古朋美¹、松村麻美¹、牛久保裕子¹、森 麻美¹、坂本謙司¹、石井邦雄^{1, 2}、中原 努¹

¹北里大・薬・分子薬理、²横浜薬大・薬・薬学教育センター

【背景】未熟児網膜症や糖尿病網膜症では、眼内に生じる異常な新生血管が視覚障害および失明の原因となる。正常時とは異なり、病態時に生じる新生血管のすべてが虚血/低酸素部位へ向かうわけではないという事実は、血管伸長の方向性調節機序の多様性を示唆している。本研究では、マウスの網膜血管が出生直後より形成されるという性質を利用して、新生仔マウス網膜において、まだ血管が形成されていない領域（血管未形成領域）と血管内皮成長因子（VEGF）受容体チロシンキナーゼ阻害薬 KRN633 を用いて血管を退縮させた領域（血管退縮領域）を作製し、それら領域への血管新生について検討を行った。

【方法】血管が網膜表層部の半分程度を覆う 4 日齢のマウスに KRN633 (10 mg/kg/day, s. c.) を 2 日間処置した。その後、網膜表層部における血管領域の面積と密度、血管新生芽の数および VEGF 発現分布について 14 日齢まで経時的に評価した。

【結果・考察】KRN633 処置マウスでは、6 日齢の網膜において、血管新生の抑制と著しい毛細血管の脱落が観察された。8 日齢以降の網膜において、再び新生血管が認められたが、それらは先ず血管退縮領域から生じ、次いで血管網先端部から血管未形成領域へ向けて伸長した。8 日齢の網膜では、VEGF は血管未形成領域で強く発現しており、そのレベルは正常よりも KRN633 処置マウスにおいて高かった。血管未形成領域へ向かう血管新生芽の数は VEGF が強く発現している KRN633 処置マウスにおいて少なかった。本実験結果は、新生仔マウスの網膜に血管未形成領域と血管退縮領域が存在する場合、血管未形成領域に大量の VEGF が存在しているにも関わらず、血管新生は血管退縮領域に優先的に生じることを示している。本現象は、血管伸長の方向性の多様性を示す新知見であり、血管伸長の方向性調節機序を明らかにするための有用な実験モデルとなると考えられる。

肥満細胞由来のPGD₂はDP受容体に作用してアナフィラキシーを抑制する

藤原祐樹、中村達朗、山田涼太、濱端大貴、村田幸久
東大・院・放射線動物科学

【背景・目的】重篤なアレルギー反応であるアナフィラキシーは、抗原刺激により活性化した肥満細胞が、血管透過性亢進物質を大量に放出することで引き起こされる。活性化した肥満細胞はプロスタグランジンD₂ (PGD₂) という脂質も大量に放出することが報告されているが、その生理作用は分かっていない。本研究は、アナフィラキシーにおけるPGD₂の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】PGD₂合成酵素であるH-PGDSの全身 (H-PGDS^{-/-}) もしくは肥満細胞特異的欠損マウス (Mcpt5-Cre⁺ H-PGDS^{f1/f1})、過剰発現マウス (H-PGDS TG)、PGD₂受容体であるDP (DP^{-/-}) またはCRTH2を欠損したマウス (CRTH2^{-/-}) を実験に用いた。マウス耳介に肥満細胞活性化剤 (コンパウンド48/80:C48/80) を皮内投与した後、エバンスブルー色素を静脈内投与して、その漏出量を測定することで血管透過性を評価した。また、C48/80を静脈内投与したマウスの血圧及び体温を測定した。野生型マウス (WT) の耳介におけるH-PGDSの発現細胞を免疫染色で検討した。

【結果】WTの耳介にC48/80を投与すると色素漏出が観察され、静脈内に投与すると血圧及び体温が低下した。H-PGDS^{-/-}ではWTに比べこれらのアナフィラキシー症状が劇的に悪化し、H-PGDS TGでは症状が抑制された。WTの耳介において、肥満細胞がH-PGDSを強く発現していた。Mcpt5-Cre⁺ H-PGDS^{f1/f1}では対照 (Mcpt5-Cre⁻ H-PGDS^{f1/f1}) と比べて血管構造や肥満細胞数に変化はなかったが、アナフィラキシー症状が悪化した。WTに比べDP^{-/-}ではアナフィラキシー症状が悪化した。CRTH2^{-/-}では違いが見られなかった。DP受容体作動薬の処置はWTとH-PGDS^{-/-}のアナフィラキシー症状を抑制した。

【結論】以上の結果から、肥満細胞由来のPGD₂がDP受容体に作用することで血管透過性を抑え、アナフィラキシー症状を抑制することがわかった。

O-4-1

Gタンパク質共役型受容体内在化における外液イオン感受性の新知見

奥水崇鏡、柏崎亜樹、谷口淳一

自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門

多くのGタンパク質共役型受容体 (GPCR) には、細胞外液の Na^+ と相互作用する構造が保存される。外液 Na^+ は、活性化薬の結合をアロステリックに阻害する。一方、細胞外液の NaCl 濃度上昇により、未知の機構によってクラスリン依存性の受容体内在化は阻害される。よって、外液 Na^+ は刺激薬の結合に続く受容体活性化と内在化の両方に関与する。しかし、外液 Na^+ 濃度を生理的な状態から低下させた際に、活性化薬の結合と受容体内在化について同時に解析した例はこれまでどのGPCRでも報告されていない。今回我々は、バゾプレッシンV1b受容体を発現するCHO細胞を用い、放射性標識バゾプレッシン ($[^3\text{H}]\text{AVP}$) の結合と内在化に及ぼす外液イオン、特に Na^+ の影響を報告する。

非刺激時の受容体細胞内局在について、抗V1b受容体抗体やタグ付き受容体を用いて検索したところ、細胞に発現させたV1b受容体や下垂体前葉細胞のV1b受容体の多くが細胞内に局在し、一部が細胞膜に発現することが明らかとなった。V1b発現細胞膜標本を用いた $[^3\text{H}]\text{AVP}$ 結合実験では、外液の NaCl 上昇とともに結合量の低下が観察された。一方、V1b発現細胞において細胞表面に結合した $[^3\text{H}]\text{AVP}$ の内在化を観察した場合、外液 Na^+ 濃度の低下に伴い細胞表面での $[^3\text{H}]\text{AVP}$ の結合量は増加し、内在化は Na^+ 感受性によって保たれるものの Na^+ 濃度が50 mM以下では抑制されることが判明した。さらに、受容体内在化は外液陰イオンにも大きく影響を受けることが判明した。V1b受容体は、一部のGPCR (カナビノイドCB1受容体、アドレナリン α 1D受容体等) や、病因に繋がる変異受容体 (バゾプレッシンV2受容体 $\text{Arg}^{137} \rightarrow \text{His}^{137}$ 変異) と同様、主に細胞内に分布するため、細胞表面の受容体の解析には困難を伴う。今回我々は、細胞外液のイオン組成を調整することにより、内在化を最小に抑え、高親和性V1b受容体を細胞表面に発現させる条件を見出すことに成功した。この成果は、今後の医薬品開発に容易に適用が可能と考えられた。

副腎細胞からのホルモン分泌並びにストレス負荷マウスに対するリンゴ葉成分の影響

○佐藤響¹⁾、斉藤萌菜美¹⁾、秋吉理沙¹⁾、猪瀬貴大¹⁾、川口貴史¹⁾、桑原直子¹⁾、吉江幹浩¹⁾、田村和広¹⁾、横須賀章人²⁾、三卷祥浩²⁾、佐藤弘人³⁾、小森貞夫⁴⁾、壽松木章⁴⁾、立川英一¹⁾

1) 東京薬大薬 内分泌・神経薬理学 2) 東京薬大薬 漢方資源応用学 3) 東京薬大薬 薬学基礎実習教育センター 4) 岩手大農 農学生命課程果樹園芸学

【背景・目的】ヒトはストレスを受けると、副腎皮質と髄質からそれぞれコルチゾルとカテコールアミン (CA) などのストレスホルモンを分泌し、各器官を活性してストレスに対抗する。しかしストレスが過剰になると大量に分泌されたストレスホルモンが組織を疲弊させ、疾病誘発の原因となる。そのため、ストレス下、これらのホルモン分泌を適度に調節することは疾病の予防につながる。一方、リンゴの栽培過程において、リンゴ葉は果実の生育を促進するため大量に摘み取られ廃棄される。これまでに当研究室では、リンゴ葉の有効利用を目的として、葉からの生物活性成分の探索を行い、リンゴ葉MeOH抽出物のHP-20カラム70%MeOH溶出画分からフロリジンなどいくつかの成分を単離した。そこで本研究では、副腎細胞におけるコルチゾル産生並びにCA分泌に対するリンゴ葉成分の影響を検討した。さらにストレス誘発性胃潰瘍モデルマウスに対する70%MeOH溶出画分の影響を検証した。【方法】ウシ副腎皮質および髄質から分離した細胞を培養し、リンゴ葉成分で処置してACTHおよびアセチルコリン (ACh) で刺激した。分泌されたコルチゾルおよびCAを蛍光定量した。BALB/cAJclマウスに寒冷拘束ストレス (CRS) を加え、胃潰瘍を発症させ、潰瘍スコア (UI) を用いて胃粘膜障害の程度を評価した。10週令のマウスを①普通飼料でCRS (-)、②普通飼料でCRS (+)、③0.05%リンゴ葉70%MeOH画分含有飼料とCRS (+)、④0.1%リンゴ葉70%MeOH画分含有飼料とCRS (+) ; の4群に分け、飼料を2週間摂取させた。CRS後、UIと血中コルチコステロンおよびアドレナリン (Ad) 濃度を測定した。【結果】リンゴ葉70%MeOH溶出画分の成分がACTHによるコルチゾル産生やAChによるCA分泌を抑制した。さらにCRSによる胃潰瘍形成に対して、リンゴ葉含有飼料摂取群③および④はUIと血中コルチコステロンやAd濃度を減少させた。これらの効果は④群で③群よりも強く認められた。【考察】以上の結果は通常は廃棄されてしまうリンゴ葉にストレスによって誘発される疾病を予防する成分が含まれていることを示しており、その抗ストレス作用がストレスホルモン分泌抑制に起因していることを示唆している。

ヒト絨毛栄養膜細胞におけるNLRP3インフラマソーム経路の機能

○大根田 若菜¹、田村 和広¹、吉江 幹浩¹、桑原 直子¹、立川 英一¹、石川 源²、
竹下 俊行²、西 洋孝³、井坂 恵一³

¹東京薬科大学・内分泌・神経薬理学教室、²日本医科大学・産科婦人科学教室、
³東京医科大学・産科婦人科学教室

[目的] 胎盤の絨毛は、TLRを介して前炎症性サイトカインやケモカインを産生することが知られている。TLRシグナリングの変化が早産を招く絨毛膜・羊膜炎に代表される胎盤の炎症や子宮内膜症に関与する可能性がある。そこで、胎盤におけるインフラマソームの意義を検証するために、NLRP3インフラマソーム関連因子に及ぼすDAMPsとPAMPsの効果を検討した。

[方法] 末期胎盤から単離培養した栄養膜細胞をLPS, ATP, NLRP3インフラマソーム活性化因子nigericinで処置した。培養ヒト絨毛栄養膜細胞におけるインフラマソーム構成因子並びに炎症性サイトカイン発現についてqRT-PCR法とイムノブロット法により解析を行った。

[結果] インフラマソーム関連因子、NLRP3並びにカスパーゼ1の発現は、マクロファージ細胞株U937の約1/3程度であった。また、IL-1 β 発現レベルはLPSに応答して著しく上昇した。しかし、ジブチリルcAMP (Db-cAMP) で分化誘導するとNLRP3, カスパーゼ1, IL-1 β の発現は、著しく低下した。一方、活性型カスパーゼ1蛋白質量は、LPS/ATP処置により増加し、さらに、LPSとATP共処置, nigericinはIL-1 β 分泌量を増加させ、その分泌はインフラマソーム阻害薬であるglybenclamide処置で抑制された。

[考察・結論] 胎盤絨毛栄養膜細胞において、TLR4を介したインフラマソーム系が機能しており、特に妊娠早期の未分化な細胞では、早産と関わる絨毛炎症に寄与する可能性が推察された。

O-4-4

ペプチドミクスによる妊娠高血圧症候群発症予知マーカーの探索

○福富俊之¹、木村徹¹、小寺義男²、岩下光利³、櫻井裕之¹

¹杏林大・医・薬理学、²北里大・理・物理、³杏林大・医・産科婦人科学

妊娠高血圧症候群 (pregnancy-induced hypertension: PIH) は、5~7%の妊婦に発症し、母体・胎児双方にとって重大な合併症の原因となる産科領域における代表的な疾患の一つである。PIHの重症化により、肝機能障害、凝固線溶系異常、呼吸・循環障害及び中枢神経系異常を含め、致命的な多臓器障害も惹起される。そのような事態を防ぐため、PIHの早期診断による治療介入が必要であるが、現在までに国内外を通じ、PIH発症を予知する決定的な手法は皆無である。よって、本研究ではPIHの早期診断につながる有用な発症予知マーカーの創出を目的とし、血液中のペプチドを対象とした網羅的な解析 (ペプチドミクス) による疾患マーカー探索を行った。血中のペプチドには、ペプチドホルモンやサイトカインなどの生理的に重要なものから、細胞の壊死、アポトーシスによって血中に放たれるタンパク質の断片が含まれており、病態を反映する重要な標的となる。本研究では、PIH非発症の帝王切開患者血清とPIH発症の帝王切開患者血清を用いた。血中・血清中には、高分子量タンパク質が圧倒的に多く存在しており、その存在が内因性ペプチドの解析を困難にさせていたが、我々は独自の手法を開発し (*J. Proteome Res*, 2010)、高分子量タンパク質を除去すると伴にペプチドを濃縮し、血清ペプチドを抽出した。抽出したペプチド試料は、アイソバリックなラベルとLC-MS/MS分析法を用いることにより、網羅的に、ペプチド・タンパク質の同定と比較定量を行った。その結果、PIH発症患者血清において、PIH非発症患者に比べて、増加および減少を示す数種類のタンパク質およびペプチドを検出、同定することができた。これらの分子がPIH早期診断のバイオマーカー候補となる可能性があり、同時にPIHの病態生理の解明に役立つ可能性もある。

萎縮骨格筋におけるL型カルシウムチャネル β サブユニットの発現増加

小松雅俊¹、中田勉²、山本竜星²、柏原俊英²、加藤博之¹、山田充彦²

¹信州大学医学部運動機能学教室 ²信州大学医学部分子薬理学教室

<背景>多くの筋萎縮を伴う病態では、筋力および筋断面積の減少とともに、単位面積当たりの筋力（特異張力）も低下することが知られている。しかし、筋の興奮収縮連関に重要な役割を果たすL型カルシウムチャネル（LTCC）やリアノジン受容体（RyR）などの発現量が、筋萎縮時にどのように変化するかは不明である。<方法>片側の坐骨神経を切除した除神経モデルマウスを用い、筋力および断面積の測定を行った。また、ウェスタンブロットと定量的PCRを用いて、興奮収縮連関に関わる分子群の発現量の変化を観察した。さらに老齢マウスを用いた検討も行った。<結果>坐骨神経を切除した側の前脛骨筋（TA）では、術後14日目の筋力、断面積、特異張力が低下していた。また、ウェスタンブロットの結果、LTCCの $Ca_v1.1$ サブユニットとRyRの発現量には変化が無かったが、LTCCの $Ca_v\beta_1$ サブユニットの発現量が10倍以上に増加していた。さらに長趾伸筋、ヒラメ筋でも $Ca_v\beta_1$ の有意な増加が認められた。しかし定量的PCRによる検討を行った結果、 $Ca_v\beta_1$ のmRNA量はTA、ヒラメ筋ともに増加していなかった。また、老化による筋萎縮でも $Ca_v\beta_1$ の量が有意に増加していた。<考察>除神経と老化という異なるモデルにおいて $Ca_v\beta_1$ が増加していたことから、この現象が多くの筋萎縮病態時に起きている可能性がある。また、mRNA量での増加が認められなかったことから、 $Ca_v\beta_1$ の増加はタンパク質分解系の異常などによって起こっている可能性が示唆された。過剰な $Ca_v\beta_1$ は興奮収縮連関を阻害することが報告されており、これが筋の特異張力低下に寄与している可能性がある。また、 $Ca_v\beta_1$ が転写因子として働くことも明らかにされており、この作用が筋萎縮の病態に関係している可能性も考えられる。

培養ニューロンにおけるTDP-43凝集体形成の経時的観察

石井智裕¹、河上江美子²、遠藤堅太郎²、三澤日出巳¹、渡部和彦³

¹慶應義塾大学薬学部、²東京都医学総合研究所基盤研究センター、

³杏林大学保健学部

【目的】 TAR DNA binding protein 43kDa (TDP-43) の細胞内凝集は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における90%以上の症例で観察され、最も重要な病理所見の一つである。神経前駆細胞より誘導した培養ニューロン・グリア細胞系へ正常TDP-43とそのC末断片を導入し、プロテアソーム阻害剤であるMG132で処理すると、ヒト症例に類似した凝集体が形成される。しかし、凝集体形成と細胞死の関連性は明確ではないため、本研究では、タイムラプス・イメージングにより経時的に観察を行い、両者の関係を検討した。

【方法】 ラット神経前駆細胞よりTubulin beta III promoter制御下EGFPを発現するstable lineを樹立した。同細胞株をレチノイン酸によってEGFP陽性ニューロンに分化させたのち、ヒト正常またはC末断片 (208-414) TDP-43をDsRed融合蛋白として発現する組換えアデノウイルスを共感染させた。感染24 時間後、プロテアソーム阻害剤MG-132 (0.5 μ M) を負荷し、DeltaVision (GE) によるタイムラプス蛍光撮影を72時間行い、細胞質凝集体の形成と細胞死を経時的に観察した。

【結果】 組換えアデノウイルスはEGFP陽性分化ニューロンの80%以上に感染発現した。この感染ニューロンにMG-132を投与すると、12時間後よりDsRed陽性凝集体が形成されはじめ、細胞質に徐々に充満し、やがて細胞膜の破綻とともに細胞死に至る像が多数観察された。凝集したTDP-43は不溶性となり、細胞膜破綻後も30時間以上残留することがわかった。

【考察】 培養ニューロンにおけるTDP-43凝集体の形成過程を経時的に観察することに成功した。また現在、凝集体の細胞間伝播の可視化についても検討を行っている。

O-2-2  YIA

抗腫瘍性抗生物質Mithramycinの筋萎縮性側索硬化症治療薬としての可能性

○兼古絵里菜、小菅 康弘、鈴木 里実、南郷 拓嗣、石毛久美子、伊藤 芳久
日本大・薬・薬理

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、運動ニューロン選択的な変性を特徴とする極めて予後不良の神経変性疾患である。我々は、これまでに放線菌由来の抗腫瘍性抗生物質であるMithramycin (MTM) が、培養海馬神経細胞のツニカマイシン誘発神経細胞死において、小胞体ストレス誘導性転写因子 C/EBP-homologous protein (CHOP) の発現レベルの上昇を抑制し、神経細胞保護効果を示すことを報告している。本研究では、ALSモデルとして汎用されている G93A superoxide dismutase 1トランスジェニックマウス (G93A) を用いて、MTMの治療薬としての可能性を検討した。

【方法】実験には、雄性G93Aを用い、MTMは、150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ で1日1回、週5日間、計4週間腹腔内投与した。対照群には、生理食塩液を投与した。腰髄におけるCHOP mRNAの発現レベルはreal time PCR法により、ALS症状はRotarod法により評価した。症状の発現をもって発症とし、発症までの期間および生存期間はKaplan-Meier法により評価した。タンパク質の発現は、Western blot法および免疫組織化学的手法により検討した。

【結果・考察】腰髄におけるCHOP mRNAの発現レベルは、発症前の11週齢と比べ、発症直前の13週齢以降で増加傾向を示し、17週齢で最大値を示した。13週齢からMTMを4週間投与したところ、17週齢におけるCHOP mRNAの増加は有意に抑制された。発症までの期間も、対照群では 100 ± 2.4 日、MTM投与群では 113 ± 6.4 日であり、有意に延長された。また、生存期間も、対照群では 139 ± 5.5 日、MTM投与群では 145 ± 9.3 日であり、延長傾向が認められた。さらに、MTMの投与は腰髄におけるミクログリアの増加を顕著に抑制した。以上より、G93AのALSの発症および症状の進行には、脊髄におけるCHOP mRNAの発現増加を伴う小胞体ストレスが重要な役割を演じていることが明らかとなった。また、MTMはCHOP mRNA発現やミクログリアの増加を抑制することで発症を遅延させることから、ALS治療薬となる可能性が示された。

カフェインは in vitro 海馬鋭波の頻度を増加させる

○渡邊 裕亮¹、乗本 裕明²、宮脇 健行¹、上村 成章¹、阿部 麗美¹、松本 信圭¹、池谷 裕二¹

¹東京大学大学院薬学系研究科 薬品作用学教室、²脳科学総合研究センター システム神経生理学研究チーム

【目的】睡眠時に海馬で観察される鋭波 (Sharp wave、以下SW) は、行動時の神経活動の再生を含み、また記憶固定化に寄与していることが知られている。また一方、カフェインは複数の行動試験で記憶固定化を促進することが報告されている。そこで我々は、カフェインが SW を調節しているのではないかと考え、これを薬理的に検討した。

【方法】C57BL/6J マウスから脳を取り出し、水平方向に12.7° 傾けて海馬急性スライスを作成した。そして人口脳脊髄液中において、この海馬急性スライスから多電極アレイを用いて 64 チャンネル同時に細胞外電位を記録し、自発的に発生する SW を観察した。今回、人口脳脊髄液中にカフェインを投与することによって、海馬急性スライス全体にカフェインを作用させ、SW の変化を観察した。

【結果・考察】海馬急性スライスにカフェイン (アデノシン受容体非選択的アンタゴニスト) を作用させると SW の発生頻度が上昇した。このとき平均ピーク強度は低下した。この作用は可逆的かつ濃度依存的であった。またアデノシン1受容体選択的アンタゴニストの DPCPX は SW の発生頻度を上昇させたが、アデノシン2A受容体選択的アンタゴニストの SCH58261には効果は観察されなかった。以上から、カフェインが SW に影響を与えること、この作用がアデノシン1受容体阻害を介している可能性が示された。本実験で用いたカフェイン濃度は生理的条件に近いと考えられるので、カフェインの持つ記憶促進作用のメカニズムに上述の SW の変化が関わっている可能性がある。

O-2-4  YIA

Parkinson 病患者 iPS 細胞由来神経細胞におけるメタボライトの変動と DNA メチル化変化の解析

石見華恵¹、葛巻直子^{1,2}、須田雪明¹、大西彩加¹、赤松沙綾¹、五十嵐勝秀³、
成田道子¹、竹島秀幸⁴、牛島俊和^{3,4}、服部信孝⁵、末松 誠⁶、岡野栄之²、
成田 年^{1,3}

1) 星薬科大学薬理学教室、2) 慶應大学医学部生理学教室、3) 星薬科大学先端生命科学
研究センター (L-StaR)、4) 国立がん研究センター研究所・エピゲノム解析分野、5) 順
天堂大学医学部脳神経内科、6) 慶應大学医学部医化学教室

生体恒常性の維持は、環境変化やストレス刺激などに対して生体が順応するための必須の生理機構であり、その破綻が疾患の発症に繋がると考えられている。一方、生体内には DNA や RNA、タンパク質のほかに、糖、アミノ酸、有機酸などの低分子代謝物が存在しており、疾患病態における生体恒常性の変動を理解するためには、ゲノミクスやプロテオミクスに加えて、メタボロミクスを把握することが重要である。そこで、本研究では、パーキンソン病 (PD) 病態下における中脳ドパミン (DA) 神経の器質的脆弱性を探索する目的で、疾患特異的 iPS 細胞技術を用いて PD 病態下における代謝変動ならびにエピゲノム変化の網羅的解析を行った。まず、健常者ならびに PD 患者由来 iPS 細胞から疾患感受性細胞である DA 神経細胞へ分化誘導し、網羅的メタボローム解析を行った。その結果、健常者と比較し、PD 患者 iPS 細胞由来の DA 神経細胞において、解糖系およびグルタチオン代謝経路に関連した種々の代謝物に変動が認められた。中でも、DNA 脱メチル化に関与する Ten-eleven translocation (TET) の働きを阻害する 2-hydroxyglutaric acid (2-HG) ならびにヒストンリジン残基のメチル化や DNA のメチル化においてメチル基供与体として働く S-adenosylmethionone (SAM) といったエピジェネティクス修飾に関連した代謝物の産生が、PD 患者 iPS 由来 DA 神経細胞において著明に亢進していることが明らかとなった。このことから、PD 病態下で認められる代謝変動が DA 神経細胞のエピゲノム変化へ影響している可能性が想定される。そこで、Infinium Methylation assay 法に従い、DNA メチル化の網羅的解析を行った。遺伝子の発現調節に最も重要な領域と考えられる転写開始点直上領域に照準を絞り、健常者と比較し PD 患者 iPS 細胞由来 DA 神経細胞において DNA メチル化の変動を解析したところ、HtrA4 および MEG3 遺伝子の DNA メチル化が著明に増加していることが明らかとなった。以上、本研究の結果より、PD 患者 iPS 細胞由来 DA 神経細胞において、代謝変動に連動した DNA メチル化の変化が認められ、こうした変化が PD 病態下における DA 神経細胞の脆弱性に一部関与をしている可能性が示唆された。

in vitroにおけるTRPV4チャネルの脳浮腫への関与

星雄高、小山隆太、池谷裕二、松木則夫

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室

脳浮腫は脳梗塞に伴う虚血やウイルス感染により脳組織に水分が過剰に溜まることで脳が膨張する疾患である。脳浮腫発症時における脳組織の容積変化に着目した知見は少なく、病態メカニズムも未解明である。また、これまでに有効な治療薬は見出されていない。本研究では、脳浮腫の発生を経時的に観察できるin vitro 評価モデルを用いた。このin vitro評価モデルは、マウスの脳から急性脳スライスを作製し、その断面積の経時変化を測定するというものである。まず、脳浮腫の原因の一つである脳梗塞時の虚血状態を模倣した環境として、脳スライス標本にOxygen-Glucose Deprivation (OGD) 処置を行ったところ、OGD 処置後に標本の断面積が有意に増加した。この断面積変化は虚血により脳組織が増大するという脳浮腫の一面を捉えている。

脳に豊富に発現している非選択的カチオンチャネルの一つ、TRPV4は、網膜神経細胞の容積制御に関与するという報告がある。OGD 処置と同時にTRPV4 アンタゴニストである HC-067047 を処置したところ、急性脳スライスの断面積増加が抑制された。逆に、TRPV4 アゴニストである GSK1016790Aを適用したところ、OGD処置をしなくても単剤で断面積が有意に増加した。これらの結果から、TRPV4 の活性化が脳浮腫を引き起こすことが示唆された。また、TRPV4は、温度感受性を持ち、熱により活性化することが知られている。そこで、in vitro評価系で熱刺激処置を行ったところ、急性脳スライスの断面積は有意に増加し、そしてこの増加はTRPV4の阻害により抑制された。発熱を伴う感染症が引き起こす脳浮腫は、ウイルスに応答した白血球が放出したサイトカインによる血管の障害が原因であると考えられてきた。しかし、発熱が脳浮腫を引き起こす一因となり得るという事実は本研究により初めて明らかとなった。この脳浮腫におけるTRPV4の関与の発見は、病態メカニズムの解明に新たな視点を提供するものである。

Methamphetamine による摂取感覚効果発現機序解明のためのニューラルサーキットジェネティクス法および ON cell 解析法の応用

菅 綾香¹、林 明音¹、長井雅子¹、佐々木雅大¹、岩澤千鶴¹、渡邊 萌¹、
濱田祐輔¹、成田道子¹、田村英紀²、葛巻直子¹、森 友久¹、成田 年^{1,2}

¹星薬科大学薬理学教室 ²星薬科大学先端生命科学研究センター(L-StaR)

覚せい剤である methamphetamine (METH) は日本で最も乱用されている依存形成薬物である。METH が精神依存を引き起こす機序には、中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化、さらには、側坐核における dynorphin や enkephalin といった内因性オピオイドならびに GABA を含有する中型有棘神経細胞 (MSN) への刺激が重要であることが知られている。一方、各脳領域に存在する細胞群は、個々にそれぞれ異なる分子発現を示す、いわゆる細胞特異性を持っている可能性が想定されるため、METH 依存形成機序を解明するためには、特定細胞の個別の役割をより詳細に理解し、依存時における変化を解析していく必要がある。そこで本研究では、まず初めに cFos-eNpHR マウスを使用し、側坐核領域における METH 活性化細胞の人工的活性制御を行った。その結果、METH 誘発自発運動促進作用には、側坐核領域における特定細胞の活性化が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。続いて、薬物弁別法に従い、METH 摂取感覚効果発現における D1-ならびに D2-受容体の関与を検討したところ、METH の摂取感覚効果に対して、D1-受容体作動薬によるのみ般化が認められた。これらのメカニズムを細胞レベルで確認するために、cFos-TetTag マウスを用い、側坐核領域における METH 活性化細胞および D1-受容体作動薬活性化細胞の解析を、免疫組織化学的染色法に従って行った。その結果、METH 活性化細胞および D1-受容体作動薬活性化細胞は、一部、同一細胞である可能性が示唆された。次に、内因性オピオイド遺伝子欠損マウスを用いて D1-受容体作動薬による般化試験を行った。その結果、METH の摂取感覚効果に対する D1-受容体作動薬による般化は、内因性オピオイド遺伝子欠損マウスにおいて有意に減弱した。続いて、METH 活性化細胞および内因性オピオイド含有神経の解析を行った結果、METH 活性化細胞の一部は内因性オピオイド含有神経であることが明らかとなった。さらに、METH 活性化細胞における GABA 発現の有無を検討したところ、METH 活性化細胞には、GABA 含有神経と GABA非含有神経が存在することが確認された。以上のことから、METH 誘発摂取感覚効果発現に対する D1-受容体作動薬による般化は、一部、側坐核における同一細胞の活性化によることが示唆され、さらには METH 活性化細胞は D1-受容体及び、一部内因性オピオイドを含有する神経細胞であることが明らかとなった。

O-5-1

ラット脊髄後角C-線維誘発性field-potentialsに対するcilnidipineの影響

山本昇平¹、鈴木悠馬²、大澤匡弘²、小野秀樹³

¹川崎医科大学薬理学教室、²名古屋市立大学大学院薬学研究科神経薬理学分野、

³武蔵野大学薬学部臨床薬剤学研究室

【背景】 CilnidipineはN型およびL型電位依存性Ca²⁺チャネル阻害作用を有するdihydropyridine誘導体である。我々は以前にC-線維の関与の大きい機械痛覚過敏行動を示すspared nerve injury (SNI) モデルマウスにおいて、脊髄くも膜下腔内投与されたcilnidipineが機械痛覚過敏を抑制する事を報告した。脊髄における痛覚過敏の電気生理学的モデルとして、脊髄後角C-線維誘発性field-potentials (FPs) の長期増強 (long-term potentiation: LTP) がある。そこで本研究ではC-線維誘発性FPsに対するcilnidipineの影響について検討し、その作用をシナプス伝達レベルで調べた。

【方法】 Wistar/ST系雄性ラットを麻酔し、坐骨神経電気刺激により起こるC-線維誘発性FPsを腰髄後角から記録した。LTPは坐骨神経への高頻度高強度刺激 (high frequency stimulation: HFS) により誘導した。薬物は脊髄上へ直接投与した。SNIモデルラットは麻酔下で坐骨神経の三枝のうち総腓骨神経と脛骨神経を結紮することにより作製し、痛覚過敏の発症を行動試験で確認した後、手術1週間後にC-線維誘発性FPsの測定を行った。

【結果および考察】 Cilnidipine (10 μM) 投与はnaïveラットにおけるbasalなC-線維誘発性FPsに影響しなかったが、投与後のHFSによるLTPの誘導を有意に抑制した。またLTP誘導後の投与では、増強したC-線維誘発性FPsを有意に減弱させた。SNIモデルラットではHFSを与えてもLTPが誘導されないため、既に脊髄後角シナプス伝達が過敏状態にあると考えられた。このモデルラットではcilnidipineはbasalなC-線維誘発性FPsを抑制した。これらのことから、cilnidipineの抑制作用はLTPや痛覚過敏のような過敏状態の脊髄後角シナプス伝達に特異的であることが示された。この抑制作用は同用量のL型電位依存性Ca²⁺チャネル阻害薬nicardipineよりも強かったことから、cilnidipineのように複数の電位依存性Ca²⁺チャネルを阻害する薬物が、神経障害性疼痛に対し特に有効であると考えられる。

O-5-2

2,4,6-トリニトロクロロベンゼン誘発疼痛モデルマウスにおけるインターロイキン-31の効果

辻 稔¹⁾、新井 巖^{1,2)}、宮川和也¹⁾、宮岸寛子¹⁾、齋藤淳美¹⁾、武田弘太郎¹⁾、
秋山暢丈²⁾、齋藤三郎²⁾、武田弘志¹⁾

¹⁾ 国際医療福祉大学薬学部・薬理学分野 ²⁾ 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所・分子免疫部門

我々はこれまでに、モルヒネ誘発抗侵害刺激効果が、インターロイキン-31 (IL-31) 受容体A (IL-31RA) を遺伝的に欠損させたノックインマウスで減弱することや、逆にIL-31の反復投与により知覚神経後根神経節 (DRG) におけるIL-31RA発現を亢進させたマウスでは増強することを見出し報告した。これらの知見は、生体の痛覚制御機構において、IL-31及びIL-31RAが重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。そこで本研究では、独自に炎症性疼痛モデルマウスを作成し、IL-31の鎮痛効果について検討した。実験にはBALB/c系雄性マウス (7週齢) を用い、疼痛閾値の変化はhot-plate法に従い評価した。起炎物質である2,4,6-トリニトロクロロベンゼン (TNCB; 0.3-3%, 0.04 mL/site) をマウス四肢裏に塗布した結果、塗布後1-6時間にかけて、濃度依存的かつ有意に疼痛閾値が低下した。また、TNCB塗布後の皮膚内におけるプロスタグランジン (PG) 類の産生量を測定したところ、PGD₂、PGE₂およびPGI₂の増加が認められた。したがって、TNCBはこれらPG類の作用を介して、疼痛閾値を低下させることが示唆された。そこで次に、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) であるアスピリン (10-100 mg/kg, p. o.) ならびにロキソプロフェン (1.5-15 mg/kg, p. o.) の効果について検討したところ、両薬物ともにTNCB誘発疼痛閾値の低下を用量依存的かつ有意に回復させた。また、DRGにおけるIL-31RA発現量が増加する条件でIL-31 (50 μg/kg, i. p.) を12時間毎に3日間反復投与した場合も、TNCB誘発疼痛閾値の低下は有意に回復した。さらに、TNCB誘発疼痛閾値の低下に対するロキソプロフェン (5 mg/kg, p. o.) の回復効果は、IL-31 (50 μg/kg, i. p.) の反復投与により有意に増強した。

以上、本研究の結果より、IL-31が鎮痛効果を有すること、さらには、モルヒネに加えてNSAIDsの鎮痛効果に対してもIL-31が増強作用を示すことが明らかとなった。したがって、新規鎮痛薬あるいは鎮痛補助薬としてのIL-31の可能性が示唆される。

O-5-3

疼痛閾値の調節におけるIL-31受容体Aの役割

新井 巖^{1,2)}、辻 稔¹⁾、宮川和也¹⁾、宮岸寛子¹⁾、齋藤淳美¹⁾、武田弘太郎¹⁾、
秋山暢丈²⁾、齋藤三郎²⁾、武田弘志¹⁾

¹⁾ 国際医療福祉大学薬学部・薬理学分野 ²⁾ 東京慈恵会医科大学DNA医学研究所・分子免疫部門

我々はこれまでに、インターロイキン-31 (IL-31) の反復投与が、マウス知覚神経後根神経節 (DRG) におけるIL-31受容体A (IL-31RA) の発現を増加させるとともに、オピオイド鎮痛薬であるモルヒネや非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) であるアスピリンならびにロキソプロフェンの鎮痛効果を増強することを見出している。これらの知見は、生体の痛覚制御にIL-31及びIL-31RAが関与している可能性を示唆するものである。そこで本研究では、起炎物質である2,4,6-トリニトロクロロベンゼン (TNCB) のマウス四肢裏への塗布により誘発される疼痛閾値の変動とIL-31RAとの関連性について検討した。

実験には野生型マウス (C57BL/6J系あるいはBALB/c系雄性マウス) 及びIL-31RAを遺伝的に欠損させたノックインマウス (IL-31RAKIマウス) を用い、疼痛閾値の変化はhot-plate法に従い評価した。

TNCB (0.3-3%, 0.04 mL/site) を野生型 (BALB/c系) マウス四肢裏に塗布した結果、塗布後1-6時間にかけて、濃度依存的かつ有意に疼痛閾値が低下した。一方、TNCB塗布後24-72時間では、有意な疼痛閾値の上昇が認められた。これら2相性の疼痛閾値の変化のうち、TNCB塗布後1-6時間で認められる疼痛閾値の低下は、DRGにおけるIL-31RA発現量が増加する条件であるIL-31 (50 μ g/kg, i.p.) の12時間毎3日間の反復投与により有意に抑制された。また、疼痛閾値の上昇が認められるTNCB塗布72時間後では、DRGにおけるIL-31RA発現量の増加が認められた。さらに、IL-31RAKIマウスでは、野生型 (C57BL/6J系) マウスで発現するTNCB塗布24時間後以降の疼痛閾値の上昇が減弱した。

以上の知見は、知覚神経におけるIL-31RAの発現状態に依存して疼痛閾値が変動すること、即ち、IL-31RAの知覚神経内密度が高い状態では疼痛発現が緩和され、低い状態では増強する可能性を示唆するものと考えられる。

μ および δ オピオイド受容体による無顆粒島皮質における抑制性シナプス伝達修飾作用の解明

横田英子^{1,2}, 大井良之¹, 小林真之²

1) 日本大学歯学部歯科麻酔学講座, 2) 日本大学歯学部薬理学講座

代表的な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネは、高次痛覚中枢である無顆粒島皮質 (AI) において、オピオイド受容体を介して下行性抑制を賦活化し、鎮痛作用を発揮することが報告されている。しかし、オピオイド受容体のAIにおける抑制性シナプス伝達の修飾メカニズムについては不明である。本研究では、AIの複数の細胞から同時ホールセル・パッチクランプ記録を行い、オピオイド受容体サブタイプ別による抑制性シナプス伝達修飾作用について検討した。さらに光学計測法を用いて、オピオイド受容体アゴニストによるAIの応答性の変化について *in vivo* 標本で検討した。

μ 受容体アゴニストである DAMGO (1 μ M) 灌流投与により、fast-spikingニューロン (FS) から錐体細胞 (Pyr) への抑制性入力 (FS \rightarrow Pyr) においては有意な uIPSC の振幅変化は認められなかったが、FS \rightarrow FS では uIPSC の振幅が減少した。一方、 δ 受容体アゴニストである DPDPE (1 μ M) により、uIPSC の振幅は FS \rightarrow Pyr および FS \rightarrow FS いずれにおいても有意に減少した。 κ 受容体アゴニストである U50488 (1 μ M) は、いずれのシナプスにおいても uIPSC の振幅を変化させなかった。また、DAMGO は皮質における興奮伝播を抑制し、逆に DPDPE は興奮伝播を増大させた。これらの結果から、オピオイド受容体サブタイプおよびシナプスを形成する細胞の種類によって抑制性シナプス伝達修飾作用が異なることが明らかとなった。さらに μ 受容体は、抑制性シナプス伝達において、Pyr よりも FS に対する uIPSC を選択的に抑制することで、AI からの出力を抑制して下行性抑制を賦活化している可能性が示唆された。

腹側被蓋野内モルヒネ活性化細胞の活動制御による疼痛閾値の変化

岡野秀嗣¹⁾、渡邊萌¹⁾、成田道子¹⁾、濱田祐輔¹⁾、新里達人¹⁾、岩山嘉孝¹⁾、
内山直彦¹⁾、山下哲³⁾、葛巻直子¹⁾、山中章弘³⁾、成田年¹⁾²⁾

1) 星薬科大学 薬理学教室 2) 星薬科大学 先端生命科学研究センター (L-StaR) 3) 名古屋
大学 環境医学研究所 神経系分野2

モルヒネは下行性抑制系の活性化を介した痛覚伝導路の遮断により鎮痛効果を発揮し、さらに腹側被蓋野から側坐核へと投射する中脳辺縁ドーパミン神経系を活性化することで快情動を発現させる。また、神経障害性疼痛下において中脳辺縁ドーパミン神経系の活性低下が知られている一方、香りや音楽といった「快」による痛みの軽減が報告されていることから、モルヒネは既知の鎮痛発現機序に加え、快情動に関わる中脳辺縁ドーパミン神経系の活性化により鎮痛効果を発揮する可能性が考えられる。そこで本研究では、特定細胞の人為的活動制御手法ならびに神経活動依存的に細胞標識が可能な遺伝子組換え動物を用いて、腹側被蓋野内モルヒネ活性化細胞の活動制御を行った際の疼痛閾値変化を検討した。まず、cFos プロモーターの下流にタモキシフェン誘導型 Cre-loxP システムにより興奮性の変異 G 蛋白共役型受容体 (hM3Dq) を発現する遺伝子組換え動物を作製した。この動物を用いてモルヒネ活性化細胞を hM3Dq にて標識し、免疫染色法により腹側被蓋野内での発現を検討した結果、モルヒネ活性化細胞の多くは TH 陽性ドーパミン神経であることが示唆された。こうした条件下、hM3Dq の特異的リガンド (Clozapine *N*-oxide) を投与し、腹側被蓋野内モルヒネ活性化細胞を再活性化した際の疼痛閾値を検討した結果、正常状態において疼痛閾値の変化は認められなかった。一方、前述したシステムを用い、神経活動依存的に光感受性陽イオンチャネル (ChR2) を発現する遺伝子組換え動物を作製し、神経障害性疼痛下において腹側被蓋野内モルヒネ活性化細胞を再活性化した際の疼痛閾値を検討したところ、疼痛閾値の一過性の回復が認められた。以上の結果から、神経障害性疼痛下においてモルヒネ鎮痛効果の発現には腹側被蓋野ドーパミン神経の活性化が一部関与している可能性が示唆された。

NMDA誘発緑内障モデルにおけるミクログリア依存的RGC傷害メカニズムの解明

○武田明子¹、篠崎陽一¹、柏木賢治²、小泉修一¹

¹山梨大・院・医・薬理、²山梨大・院・医・眼科

緑内障は日本における失明原因第1位、世界では第2位の神経変性疾患である。緑内障における失明は、網膜視神経節細胞 (RGC) の軸索機能低下および細胞死によって生じるが、その発症メカニズムは十分に明らかではない。現行の治療法は疾患の進行を遅らせる対症療法的な手段しかなく、新たな治療法の開発は緊急の課題である。我々は、緑内障患者の網膜においてミクログリアの活性化が報告されていることから、ミクログリアが緑内障発症に関与する、と仮説を立ててそのメカニズムを検討した。

緑内障モデル動物におけるRGC傷害機構の1つとして、グルタミン酸を介した興奮毒性が寄与すること、さらに緑内障患者眼房水ではグルタミン酸レベルが上昇することなどから、本研究では、NMDA (N-methyl-D-aspartate) による興奮毒性誘発モデルを用いた。NMDAを硝子体内に投与し、7日目までのRGCおよび網膜ミクログリアの経時的変化を解析した。NMDAはRGCの脱落を引き起こしたが、これに先行してミクログリアの活性化が認められた。次に、先行するミクログリア活性化とRGC脱落との因果関係を薬理的に検証した。ミクログリア活性化抑制薬であるMinocyclineの点眼投与は、ミクログリア活性化の抑制とともに、このRGC脱落を優位に抑制した。また、ミクログリアを除去するClodronateやColony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) 拮抗薬でも、同様のRGC脱落抑制作用が認められた。最後に、活性化ミクログリアによるRGC脱落の分子メカニズムを、特に炎症性サイトカインに着目して検討した。その結果、ミクログリア活性化と同様のタイムコースで、TNF α を含む炎症性サイトカインの発現上昇が認められた。

以上より、本研究モデルにおけるRGC脱落は、①先行して活性化するミクログリアに依存していること、②ミクログリア由来炎症性サイトカインの放出によって誘導されている可能性が示された。

O-7-1

Theophyllineは卵白アルブミン感作マウスにおけるタバコ主流煙及びallergen曝露誘発気道炎症のステロイド治療感受性を改善させる

木村 元気¹⁾, 上田 敬太郎¹⁾, 西本 裕樹^{1, 2)}, 益子 崇¹⁾, Kazuhiro Ito³⁾,
木澤 靖夫¹⁾

¹⁾ 日本大薬, ²⁾ シミックPMS株式会社, ³⁾ NHLI, Imperial College

【目 的】慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患においてみられるステロイド治療抵抗性に、phosphoinositide-3-kinase (PI3K) - δ の関与が報告されている。また、喫煙などで重症化した喘息患者においても、ステロイド治療に対する感受性の低下が生じており、治療が困難となっている。我々はこれまでに、マウスにおいてタバコ主流煙曝露により誘発させたステロイド治療抵抗性気道炎症が、PI3K- δ を阻害するtheophyllineとステロイド抗炎症薬を併用することで抑制されることを報告している。そこで、本研究では、卵白アルブミン (OVA) 感作マウスにタバコ主流煙とOVAを曝露させて誘発させたステロイド治療抵抗性気道炎症におけるtheophyllineの効果について検討した。

【方 法】OVA感作マウスに、タバコ主流煙は11日間連続、OVAは隔日曝露させた後、fluticasone propionate (FP) 及びtheophyllineを経鼻投与し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取した。BALF中のneutrophil及びeosinophilはflow cytometry法で、CXCL1、IL-17及びIL-33量はELISA法で計測した。

【結 果】OVA感作マウスにおいて、タバコ主流煙及びOVA曝露によりBALF中のneutrophil及びeosinophilは有意に増加し、FP単独投与によっては抑制されなかった。また、theophylline単独投与でも抑制効果はみられなかったのに対し、FPとの併用により、炎症細胞数の増加は有意に抑制された。BALF中におけるCXCL-1、IL-17及びIL-33量の上昇も、FPとtheophyllineの併用により有意に抑制された。

【考 察】OVA感作マウスにおけるタバコ主流煙及びallergen曝露誘発ステロイド治療抵抗性気道炎症には、ステロイド抗炎症薬とtheophyllineの併用が有効である可能性が示唆された。

O-7-2

腎尿酸排泄低下型マウスの創製とCa拮抗薬およびロサルタンによる尿酸降下作用の検討

大野 雄太^{1, 2}、堀 貴行^{3, 4}、大塚 裕介^{1, 5}、大谷 直由³、大内 基司³、
伊藤 善規²、安西 尚彦¹

¹千葉大学大学院医学研究院 薬理学、²岐阜大学医学部附属病院 薬剤部、³獨協医科大学 医学部 薬理学、⁴獨協医科大学 医学部 心臓・血管外科学、⁵日本医科大学 腎臓内科学

【目的】尿酸が生活習慣病と密接につながり、心血管疾患合併との関連が言われている。しかし、ヒトとそれ以外の動物では尿酸代謝に種差があり、高尿酸血症のよい動物モデルが無い事が尿酸研究進展の障害となっている。オキソニン酸投与マウスモデルは尿酸産生過剰型のモデルであり、ヒト高尿酸血症の約9割に見られる腎尿酸排泄低下型のモデルとはなり得ない。そこでピラジナミド (PZA) を用い腎尿酸排泄低下型マウスの創製を試み、過去に *in vitro* で、カルシウム (Ca) 拮抗薬およびURAT1を介した尿酸の取り込みを抑制することを報告しており、このモデルマウスにてCa拮抗薬の尿酸降下作用の検討を行った。また、臨床上尿酸降下作用が報告されているアンジオテンシン受領体拮抗薬 (ARB) のロサルタン (LO) についても同様に検討を行った。【方法】1) : ICR雄10週齢マウスを用い、PZAを400 μ g/g (体重) で投与し、6時間30分後の尿酸排泄率を求めた。2) : 1) のPZA投与30分後にベンズブロマロン (BENZ) を3, 10 μ g/g、ニルバジピン (NV) を1, 3.2 μ g/g、ニトレンジピン (NT) を3.2 μ g/g、ニフェジピン (NF) を3.2 μ g/g、LOを3.2 μ g/gで投与し、BENZもしくは各Ca拮抗薬もしくはLO投与6時間後の尿酸排泄率を求めた。【結果】各n数はcontrol (C) : 8、PZA: 9、BENZ3: 7、BENZ10: 6、NV1: 9、NV3.2: 9、NT3.2: 8、NF3.2: 9、LO3.2: 7で平均尿酸排泄率はC: 13.3、PZA: 1.24、BENZ3: 6.16、BENZ10: 21.27、NV1: 6.45、NV3.2: 7.28、NT3.2: 7.34、NF3.2: 6.84、LO3.2: 10.6であった。平均尿酸排泄率はCに比較してPZAでは有意に低下しており (P=0.006)、またPZAに比較してBENZ3、BENZ10、NV1、NV3.2、NT3.2、NF3.2、LO3.2で優位に高かった (各々P=0.012, 0.016, 0.0003, <0.0001, 0.0009, 0.0032, 0.0046)。【結論】PZA投与により尿酸再吸収を促進し尿酸排泄率を低下させ、腎尿酸排泄低下型高尿酸血症のモデルとして使用可のである可能性を示唆した。本モデルマウスを用いBENZ尿酸排泄促進作用を確認し、Ca拮抗薬であるNV、NT、NFおよびARBであるLOにおいても尿酸排泄促進作用があることが示唆された。

O-7-3

P2受容体は眼房水産生調節を負に制御する

○篠崎陽一¹、武田明子¹、柏木賢治²、小泉修一¹

¹山梨大・院・医・薬理、²山梨大・院・医・眼科

緑内障は全世界において7000万人が罹患する進行性の視神経症で、中途失明原因第2位の疾患である。緑内障の最大のリスクファクターの一つが高眼圧である。種々の眼圧下降薬単剤では十分な眼圧下降効果が得られない事や種々の副作用が生じるなど、眼圧下降作用の新たなターゲットが求められている。今回、我々はP2受容体、特にP2Y₆受容体活性化が眼圧下降作用を有する事を見出したので報告する。P2Y₆受容体の内在性かつ選択的アゴニストUDPの点眼は一過的に眼圧を低下させ、P2Y₆受容体アンタゴニストは眼圧を上昇させた。UDPの眼圧下降作用はP2Y₆受容体欠損 (P2Y₆KO) マウスでは観察されなかった。P2Y₆受容体の発現部位を検討したところ、眼房水産生に関わる毛様体突起の無色素上皮に発現する事が明らかとなった。フルオロフォトメトリー法の変法を用いて前房における眼房水ダイナミクスの解析を行ったところ、UDPの作用はチモロールに類似するがラタノプロストとは作用点が異なる事が明らかとなった。チモロールの作用点が眼房水産生抑制であることからUDPも眼房水産生調節に寄与すると推察された。一方、P2Y₆KOマウスは恒常的に眼房水産生が亢進しており、眼圧は野生型に比べて高値を示した。恒常的な高眼圧は網膜神経節細胞 (RGC) の傷害を誘導すると推察されることから、網膜光断層計 (OCT) を用いた *in vivo* イメージング及び網膜ホルマウント標本の免疫組織化学染色 (IHC) 評価を行った。OCTでは、P2Y₆KOマウスにおいて、特に老化 (≧ 6ヶ月齢) に伴ってRGC細胞層及び内網状層の菲薄化が観察された。IHCでも老化に伴うRGC数の減少が観察された。これらの傷害は長期的に眼圧下降薬を点眼する事で緩和され、高眼圧依存的なメカニズムであることが明らかとなった。以上の結果より、P2Y₆受容体シグナルは眼圧低下作用を示し、その異常は恒常的高眼圧とそれに続く視神経症を引き起こす事が明らかとなった。

O-7-4

クマザサ葉アルカリ抽出液と抗ウイルス剤との相乗作用

○坂上宏¹、福地邦彦²、金本大成³、寺久保繁美³、中島秀喜³、名取威徳⁴、
勝呂・北嶋まどか⁴、大泉浩史⁴、安井利一¹、大泉高明⁴

¹明海大学歯学部薬理学、²昭和大学大学院保健医療学研究科、³聖マリアンナ医科大学微生物学、⁴大和生物研究所

【緒言】クマザサ葉アルカリ抽出液（ササヘルス、SE）は、第三類医薬品に属する一般用医薬品である。我々はこれまでに、SEの*in vitro*における多様な作用、すなわち抗炎症作用、抗菌作用、卓越した抗ウイルス作用、紫外線に対する細胞保護作用、ビタミンCとの相乗作用、マウス破骨細胞成熟分化抑制作用、さらに臨床での経口摂取による口腔扁平苔癬様異形成症の改善例などにつき報告してきた。今回、SEと各種抗ウイルス剤との併用効果について検討した。【方法】96穴マイクロタイタープレートに、種々の濃度の試験物質とともにHIV感染MT-4細胞（ 3.0×10^4 /well, MOI:0.01）を感染直後に加えた。試験物質のMT-4細胞に対する細胞毒性を測定するために、ウイルス非感染細胞を同様に種々の濃度の試験物質とともに培養した。5日間培養後、MTT法で生存細胞数を測定した。抗ウイルス活性は、HIV感染による細胞傷害から50% protectionする濃度（EC₅₀）、細胞毒性は試験物質による50%細胞傷害濃度（CC₅₀）でそれぞれ表現した。また、有効係数（Selectivity Index; SI）はCC₅₀/EC₅₀として計算した。薬剤との組合せにつき5枚（5 replicates）のcombination plateを作成し、HIV感染細胞を加えて5日間培養後、MTT法で細胞生存率を算出した。抗HSV-1活性の測定は、Vero細胞を用いたプラーク・アッセイ（300 PFU）及びMTT法（MOI=0.01）を用いた。相乗効果の判定は、MacSynergy II およびcombination index（CI）を用いた。【結果・考察】SEの抗HIV活性（SI=80）は、AZT（SI=22893）、ddT（SI=11898）、curdlan sulfate（SI=10204）、dextran sulfate（SI=47619）よりも、顕著に低かったが、SEは、これらの抗HIV薬と相乗効果を示し、SEとの併用により、抗ウイルス薬の添加量を1/5～1/25まで減少させることができた。同様に、SEはHSV-1によるVero細胞の変性を抑制した。また、新たに開発したMTT法を用いることにより、SEとacyclovirが、相乗的に抗HSV-1活性を発揮することを新たに見出した。【結論】SEと既存の抗ウイルス薬とは相乗効果を示し、併用により、高い経済効果と薬剤耐性出現の回避の可能性が示唆された。

がん悪液質における代謝異常ならびに視床下部を介した脳-末梢連関の機能変化の解析

小嶋千潤¹、濱田祐輔¹、森美貴子¹、相内俊樹¹、須田雪明¹、成田道子¹、葛巻直子¹、成田 年^{1,2}

1) 星薬科大学 薬理学教室、2) 星薬科大学 先端生命科学研究センター (L-StaR)

がん悪液質は、体重減少や骨格筋減少を伴った複合的な代謝異常の症候群であり、多くの進行がん患者に認められ、QOLの低下や生存期間の短縮をもたらすため、臨床上問題となっている。一方、代謝などの様々な生理的恒常性は、中枢神経と末梢組織の密接な連関により維持されており、特に視床下部はこれらの調節の一端を担う重要な脳領域であると考えられる。しかしながら、がん悪液質に至るメカニズムやがん悪液質状態における脳機能変化については不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、がん悪液質における代謝異常ならびに視床下部を介した脳-末梢連関異常の解析を試みた。まず、体重の有意な減少が認められるLLC細胞誘発悪液質モデルマウスを用い、大腿四頭筋および後肢筋を摘出し、骨格筋重量の測定を行った。その結果、悪液質モデル群では両骨格筋重量の有意な低下が認められた。さらに、grip strength test、rotarod testおよび open field testにより、筋強度、筋持久力および身体活動量の変化を検討したところ、悪液質モデル群においてこれらすべての低下が認められた。このような条件下、悪液質モデルマウスにおける血中サイトカイン量の変化について検討したところ、IL-6、MCP-1、MIP-2、VEGFの有意な増加が認められた。一方、悪液質モデルマウスの視床下部領域における各種遺伝子発現変動を解析したところ、悪液質モデル群において NPY、AgRP の有意な発現上昇および POMC の発現低下が認められた。以上、本研究により、がん悪液質状態では、血中炎症性サイトカインの増加および視床下部領域における中枢性代謝調節異常が引き起こされている可能性が示唆された。

O-3-2 

漢方薬半夏瀉心湯は口内炎治癒促進作用を有する～ヒト口腔上皮細胞を用いた損傷治癒アッセイによる評価～

○江藤萌子^{1,2}、宮野加奈子²、平野絢音^{2,3}、大宮雄司⁴、野中美希²、白石成二²、藤井秀明³、樋上賀一¹、上園保仁^{2,5,6}

¹東理大院・薬・分子病理代謝、²国がんセ・研・がん患者病態生理、³北里大・薬・生命薬化学、⁴株式会社ツムラ・ツムラ研、⁵国がんセ・先端医療・支持療法開発、⁶国がんセ、中央病院、支持療法セ

【背景・目的】抗がん剤や頭頸部放射線治療を受けているがん患者は高頻度かつ広範囲に口内炎を発症する。これは痛みのみならず「食べる、飲む、話す」という基本生活を障害するため著しいQOLの低下をきたす。近年、漢方薬のひとつである半夏瀉心湯（HST）が第Ⅱ相二重盲検臨床試験において、抗がん剤治療中の大腸癌患者の口内炎発症期間を有意に短縮することが報告された。当研究室ではこれまでに、ヒト口腔上皮細胞（HOK細胞）において、HSTが炎症性メディエーターによるプロスタグランジンE₂産生を抑制することを明らかにし、HSTの構成生薬7種のうち黄連、黄芩、乾姜が抑制作用に関与していることを報告した。しかし、HSTの口内炎治癒メカニズムには抗炎症作用以外の作用も関与していると考えられる。そこで本研究では、口腔上皮の損傷治癒機能に焦点を当て、HSTの損傷治癒への効果を解析した。

【方法】HOK細胞の損傷治癒機能はWound healing assay法により評価した。コラーゲン・コートした96 well imagelock microplateにHOK細胞を播種し、専用の96 well woundmakerを用いて細胞を均一にスクラッチした後、HSTを添加した。その後IncuCyte ZOOM® live-cell imagingを用いて2時間ごとに損傷部の細胞像を撮影し、損傷部に占める遊走したHOK細胞の割合を定量化した。さらに、HSTの構成生薬エキス7種（半夏、黄芩、乾姜、甘草、大棗、人參、黄連）についても同様に評価した。

【結果・考察】確立したWound healing assay法により、HST（1-300 μg/mL）は濃度依存的にHOK細胞の遊走を促進し、損傷治癒機能を促進することが示唆された。さらに、HST構成生薬7種のうち、乾姜、人參に有意な遊走作用能が認められた。したがって、HSTによる損傷治癒機能には乾姜および人參成分が関与することが示唆された。現在、口内炎治癒を促進する漢方薬の作用メカニズム解明を目指し、HST構成生薬7種それぞれに含まれる成分レベルでの評価を行っているところである。

腸炎および腸炎関連大腸がんの進行における脂質メディエーター産生動態

宮崎悠介、濱端大貴、中村達朗、村田幸久

東京大学・院・放射線動物科学

【背景】潰瘍性大腸炎は、結腸粘膜のびらん形成を伴う炎症性腸疾患であり、原因不明で治療方法がない。この疾患が慢性化して寛解と再発を繰り返すと大腸がんの発症につながる。細胞膜のアラキドン酸 (AA) からシクロオキシナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) などの酵素活性依存的に、または酵素非依存的な酸化反応により合成される多くの脂質メディエーターが炎症を制御する。本研究では潰瘍性大腸炎と腸炎関連大腸がんの発症と進行に伴う脂質メディエーターの産生動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】マウスに発がん性物質であるアゾキシメタンを投与したのち、腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 17日おきに3回に分けて投与することで腸炎および腸炎関連大腸がんモデル作製した。腸炎症状から、発症期、再発期、腫瘍形成期と病期を設定し、結腸組織中の脂質メディエーター産生量を質量分析器を用いて測定した。

【結果】DSSの投与回数に依存して腸炎の症状が悪化し、3回目の投与時には腫瘍形成が確認された。AA由来脂質メディエーターはDSSの投与回数に関わらず計9種類検出された。COX由来脂質メディエーターは、発症期と腫瘍形成期で増加したが、上皮組織の剥離が見られた再発期には減少した。LOX由来脂質メディエーターは、発症期と腫瘍形成期に減少したが、炎症細胞の浸潤が顕著にみられる再発期には増加した。酸化反応由来脂質メディエーターは、発症期と再発期には増減は見られなかったが、腫瘍形成期に増加した。

【結論】腸炎および腸炎関連大腸がんモデルにおいて、AA由来脂質メディエーターの各合成経路活性が病態進行に伴い劇的に変動していることが分かった。今後、各病期におけるその役割を解明していきたい。

セラミドキナーゼによるアクチン細胞骨格制御機構の解明

○富澤智史、中村浩之、村山俊彦

千葉大学・大学院薬学研究院・薬効薬理学研究室

【背景・目的】セラミドキナーゼ (CerK) はスフィンゴ脂質のセラミドからセラミド-1-リン酸を産生する酵素である。CerKは細胞遊走を制御することなどが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。細胞遊走はがん細胞の転移や免疫反応など、様々な生命現象に関与しており、アクチンリッチな葉状仮足 (lamellipodia) の形成により調節されている。そこで、本研究ではCerKがlamellipodiaの形成を制御する可能性を考え解析を行った。

【方法・結果】ヒト乳腺癌由来MCF-7細胞やヒト肺胞基底上皮腺癌由来A549細胞などは、上皮成長因子 (EGF) 刺激依存的にlamellipodiaを形成する。そこで、EGF刺激によるlamellipodiaの形成へのCerKの関与を検討した。CerKの細胞内局在を観察したところ、EGF刺激により形成されるlamellipodiaにCerKが局在する様子が観察された。CerKのノックダウンはEGF刺激によるlamellipodiaの形成を促進した。一方で、CerKを一過性発現した細胞においてはlamellipodiaの形成が抑制された。EGF刺激によるlamellipodiaの形成はRhoファミリー低分子量G蛋白質のRac1の細胞膜への移行および活性化により調節される。CerKのノックダウンはEGF刺激によるRac1の細胞膜への移行を促進した。また、CerKのノックダウンによるlamellipodia形成の促進はRac1の阻害により抑制された。

【考察】CerKはEGF刺激依存的なRac1の細胞膜移行を抑制し、lamellipodiaの形成を負に制御していることが明らかとなった。

MDA-MB-231 CD44陽性細胞はTublin阻害剤曝露後miR-93増加によりp21発現を抑制する

飯島堅太郎、佐々木晶子、角田ゆう子、辻まゆみ、宇高結子、小山田英人、土屋洋道、古屋貫治、木内祐二

昭和大学医学部薬理学講座医科薬理学部門

【目的】 がん幹細胞は抗癌剤に治療抵抗性を有し、がんの再発や転移に関与する。治療抵抗性の要因としてp21を介するグルタチオン代謝経路に関わる遺伝子発現の上昇が報告された (Cell 160, 963-976, 2015)。本研究では乳癌のCD44陽性細胞を用いて、Tublin阻害剤のPaclitaxel, Eribulinおよび白金製剤Cisplatin曝露後のp21とグルタチオン代謝経路を観察した。さらにp21発現を抑制するmicroRNAを明らかとすることを目的とした。

【方法】 乳癌培養細胞はMDA-MB-231のCD44陽性細胞を用いた。PaclitaxelとEribulinおよびCisplatin 1nMを24時間曝露した後、MACS separatorを用いてCD44陽性細胞を抽出した。CD44陰性細胞をコントロールとしてp21とグルタチオンおよびCaspase-3を測定した。miRNA PCR arrayを用いてp21発現を調節するmicroRNAを検討した。

【結果】 Paclitaxel曝露後のCD44陰性細胞と陽性細胞のp21発現はそれぞれ0.36と0.34pg/ml, Eribulin曝露後は0.36と0.3 pg/ml, Cisplatin曝露後は0.41と0.31 pg/mlで、抗がん剤曝露後CD44陽性細胞のp21発現は減少し、miR-93はコントロールと比べて1.11倍増加した。グルタチオンの酸化率はPaclitaxel曝露後のCD44陽性細胞で65.3%, Eribulin曝露後は35.2%, Cisplatin曝露後は11.9%であった。グルタチオンの酸化率はPaclitaxel曝露後のCD44陽性細胞で高く発現した。Caspase-3はPaclitaxel曝露後のCD44陰性細胞と陽性細胞はそれぞれ1722と13483 nmol/mg/protein/hr, Eribulin曝露後は4040と6058 nmol/mg/protein/hr, Cisplatin曝露後は10378と8425 nmol/mg/protein/hrであった。Paclitaxel曝露後のCD44陽性細胞ではCaspase-3が有意に高く発現し、アポトーシスに導かれることが明らかとなった。

【結論】 MDA-MB-231 CD44陽性細胞はPaclitaxel曝露後miR-93増加によりp21発現を抑制することが明らかとなった。

O-3-6

3-Benzylidenechromanonesの定量的構造-細胞傷害性相関解析

○植沢芳広¹、坂上宏²、山下 毬藻³、高尾浩一³、杉田義昭³

¹明治薬科大学臨床薬剤学、²明海大学歯学部薬理学、³城西大学薬学部生物有機化学

【緒言】我々は、3-styrylchromone誘導体が高い腫瘍選択性を示すことを報告した。口腔扁平上皮癌細胞に対して高い選択毒性を有する化合物を探索するために、17種類の3-benzylidenechromanones誘導体の細胞毒性及び腫瘍選択性、そしてこれらに関する物理化学的特徴を定量的構造活性相関 (QSAR) 解析法を用いて検討した。【方法】2種のヒト口腔扁平上皮癌細胞 (歯肉由来Ca9-22, 舌由来HSC2) 及び2種の正常ヒト口腔間葉系細胞 (歯肉線維芽細胞, 歯髓細胞) に対する3-benzylidenechromanones誘導体の細胞毒性を、MTT法を用いて検討した。腫瘍選択性は、正常細胞に対する腫瘍細胞のCC50値の比として評価した。各化合物の物理化学的、構造的、量子化学的特徴量を、化学構造に基づいて取得した。すなわち、低振動モードにおける分子動力学配座解析により得られた最安定3次元配座を用い、計算機化学的手法に基づいてHOMOエネルギー、LUMOエネルギー、静電的特徴量等の多様な物理化学的特徴を算定するとともに、各特徴量のCC50値および腫瘍選択性に対する相関を解析した。【結果・考察】3-Benzylidenechromanones誘導体は全体的に高い腫瘍選択性を示した (TS=1.2~126.3)。特に、クロマノン環の7位の位置にOCH₃基、ベンゼン環の4'位にOH基あるいは、OCH₃基を置換した誘導体の腫瘍選択性 (TS = 55.2~126, 22.2~55.6) は、doxorubicin (TS=24.8~32.8)、5-FU (TS=1.9~13.1) を凌いだ。さらに、腫瘍選択性に寄与する構造的・物理化学的特徴を解明する目的でQSAR解析を実施した。化学構造式に基づき各官能基の有無を含む3000種類以上の特徴量を算出し、腫瘍選択性との相関を検討した。その結果、分子の3次元形状とサイズに関連する3D-MoRSE記述子および2次元形状と分極に関連するエッジ隣接指数が、本化合物群の腫瘍選択性を良く説明しうることを見出した ($r^2 = 0.54 \sim 0.61$)。さらに、ベンゼン環の3'位におけるOH基の導入が腫瘍選択性に対して有意に寄与していることが分った ($p = 0.0051$)。【結論】分子の形状、サイズ、および分極が3-benzylidenechromanones誘導体の腫瘍選択性の評価に有用であることが示唆された。

O-6-1

アルコール依存時のアルコール自発摂取に対するnifedipineの効果

○黒川和宏¹、山本昇平²、大熊誠太郎³

¹国際医療福祉大学薬学部、²川崎医大・薬理、³京都府立医科大学

【目的】アルコール依存状態では、中枢神経系において興奮性神経であるグルタミン酸作動性神経の活動が亢進し、興奮性神経伝達と抑制性神経伝達の間不均衡が生じていることが報告されている。従って、この亢進した興奮性神経伝達を抑制することで神経伝達の不均衡を是正すれば、飲酒欲求を抑制できると考えられている。これまでに、脳内の神経細胞内 Ca^{2+} 動態、特にL型カルシウムチャネルが興奮性に働き、アルコール身体依存発現に関与することを明らかにしている。しかしながら、アルコール自発摂取に対するL型カルシウムチャネルの役割については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、アルコールの自発摂取に対するL型カルシウムチャネルの関与について、アルコール慢性動物を用いて、行動薬理学的および神経化学的観点から詳細に検討した。

【方法】アルコール慢性処置は、Goldsteinの方法に従い、マウスにアルコール蒸気を間欠的(16時間/1日)に4日間吸入させ、3日間休薬することを1サイクルとし、2サイクル行った。アルコールの自発摂取は、2-bottle choice法に従い、15%アルコール摂取量により評価した。L型カルシウムチャネルの α_1 subunitであるCav1.2およびCav1.3のタンパク質の発現をWestern blot法ならびにmRNAの発現をReal-time PCR法により解析した。

【結果および考察】アルコール慢性処置を2サイクル処置した24時間後の側坐核領域において、対照群と比較してL型カルシウムチャネルの α_1 subunitであるCav1.2およびCav1.3のmRNAの有意な増加が認められた。さらに、アルコール自発摂取を始める時点での側坐核領域のPSD-95画分においてCav1.2およびCav1.3のタンパク質発現の増加が認められた。このような条件下で、アルコール慢性処置群において対照群と比較してアルコール自発摂取量の有意な増加が認められた。次に、アルコール慢性処置後におけるアルコール自発摂取量の増加へのL型カルシウムチャネルの関与について、L型カルシウムチャネルの阻害薬であるnifedipineを用いて検討したところ、アルコール慢性処置後に認められるアルコール自発摂取量の増加は、nifedipineを側坐核に微量注入することにより用量依存的に抑制された。以上の結果より、アルコール依存時での飲酒欲求には、側坐核のL型カルシウムチャネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

O-6-2

Ethanol 慢性処置によるmTOR 活性変動に対する dopamine 神経応答の変化

芝崎真裕、古谷絵菜里、青木萌、新井理沙、成田道子、葛巻直子、成田年
星薬科大学 薬理学教室

Mammalian target of rapamycin (mTOR) は、phosphoinositide 3-kinase に属する serin/threonine kinase であり、タンパク質と相互作用し、mTORC1 と mTORC2 と呼ばれる二つの異なった複合体を形成する。mTORC1 は細胞内外のアミノ酸、ストレス、酸素、エネルギー、増殖因子に応答し、タンパク質、脂質合成、オートファジーを含む多くの過程を調整し、神経機能を調節することが知られている。一方、ethanol は肝細胞において alcohol dehydrogenase および aldehyde dehydrogenase により酢酸にまで代謝されることで、ミトコンドリアでの TCA 回路の代謝活性を抑制し、エネルギーの生合成を抑制することが報告されていることから、ethanol によるミトコンドリアにおけるエネルギー生合成の変化が、mTOR の活性に関わると考えられる。一般に ethanol の長期曝露は、中脳辺縁 dopamine 神経系に可塑的变化を引き起こすことで ethanol 依存を誘導すると考えられている。しかしながら、ethanol が mTOR Signal に与える影響は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、ethanol 慢性処置モデルを作製し、mTOR の変化について、行動薬理的、免疫組織学的ならびに生化学的に検討を行った。

Ethanol 慢性処置モデルの腹側被蓋野領域における mTOR のタンパク質発現量の検討を行ったところ、有意な増加が認められた。mTORC1 は下流因子のリン酸化を介し、タンパク質、脂質合成、オートファジーを調節することが報告されている。そこで次に、下流因子およびオートファジー関連因子についてタンパク質発現量の検討を行ったところ、ethanol 慢性処置モデルの腹側被蓋野領域において p-S6K、p-4E-BP、p-LRRK2、p-FOXO1 のタンパク質発現量の有意な増加が認められた。そこで、ethanol 慢性処置における ethanol 誘発報酬効果に及ぼす影響を検討した。その結果、ethanol 慢性処置における ethanol 誘発報酬効果の増強は、mTOR 阻害薬である rapamycin (3 nomol/mouse, i. c. v.) の処置により有意に抑制した。以上、本研究により、ethanol 慢性処置は、腹側被蓋野領域において mTOR の活性変動を変化させ、ethanol に対する dopamine 神経応答の変化に関与する可能性が示唆された。

O-6-3

白血球の遺伝子発現情報を利用した新規うつ様状態評価系の開発

宮田茂雄^{1, 2}、三國雅彦²、柳川右千夫¹、福田正人²

群馬大学大学院医学系研究科・¹遺伝発達行動学分野、²神経精神医学分野

【目的】基礎薬理学研究において、抑うつ状態に関わると考えられる脳内ネットワークの解析や、抗うつ効果を有すると考えられる化合物の有効性評価は、主に動物の情動行動を指標にして行われている。しかし、モノアミン欠乏仮説に則った抗うつ薬以外はこれまでに開発されていないという事実と、うつ病の診断基準は徐々に見直されてきていることを考慮すると、時代の流れに即した新たな抑うつ様状態の指標を開発することも基礎薬理学の重要な課題といえる。近年、白血球に発現しているmRNAを指標にして、うつ病の客観的補助診断マーカーを開発する試みが精力的に行われている。本研究では、うつ病モデルマウスとうつ病患者の白血球における遺伝子発現情報の類似性について検討し、白血球mRNAを指標とした新たな抑うつ様状態評価系を開発する重要性について考察した。

【方法】8週齢の雌性C57BL/6Jマウスの卵巣を摘除 (OVX) し、慢性軽微ストレス (CMS) を負荷することで、更年期の女性に認められるうつ病の病態モデルを作製した。また、初発年齢が50歳以降の女性のうつ病患者10名と同年齢の健康な女性7名をリクルートし、ハミルトンうつ病評価尺度により抑うつ状態の重症度を評価した。血液 (白血球) に発現している遺伝子について、マイクロアレイ法による網羅的解析を行った。遺伝子発現情報に生物学的な注釈を付与し、モデルマウスと患者のデータを比較した。

【結果】非ストレス下で飼育したOVXマウスは対照群と同様の情動行動を呈したが、CMS負荷することによりOVXマウスにおいてのみうつ様行動および不安様行動が誘発された。マウスの白血球に発現している多くの遺伝子が、OVXおよびCMSの影響により有意な量的変化を示した。また、うつ病患者の白血球では健常者と比べて約4,000種の遺伝子プロンプに有意な発現量変化が認められた。発現量変化を認めた遺伝子群に生物学的な注釈を付与し、モデルマウスと患者のデータを比較した結果、マウスの白血球に対するOVXの影響はうつ病患者に認められた遺伝子発現変化と近似していた。一方、マウスの白血球に対するCMSの影響はうつ病患者に認められた遺伝子発現変化とは大きく異なっていた。

【考察】行動実験の結果に従えば、OVXとCMS負荷を併用したマウスがうつ病モデルと解釈できた。一方、遺伝子発現解析の結果からは、OVXがうつ病病態と近似した影響を与えており、CMS負荷はうつ病病態とは異なる影響を与えていることが示唆された。白血球に発現しているmRNAはうつ病の病態分類や治療反応性の客観的な指標になると期待されており、基礎薬理学研究への応用が期待される。

O-6-4

抑肝散とその活性成分のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への作用

植木俊之、今村幸子、田淵雅宏、川上善治、溝口和臣、五十嵐康、服部智久、加瀬義夫

株式会社ツムラ 製品戦略本部 ツムラ研究所

【目的】抑肝散は7つの生薬から構成される漢方薬であり、近年、認知症患者の攻撃性や幻覚などのBPSDを改善することが報告されている。本稿では抑肝散のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への作用と、それらを担う活性成分について報告する。

【方法】BPSDモデル動物や培養細胞系を用いて、抑肝散のセロトニンおよびグルタミン酸神経系への効果を検討した。その後、抑肝散のこれら神経系への作用を担う成分の同定を試みた。さらに、それら成分の血中や脳内への移行性、脳組織への結合特性を解析した。

【結果】抑肝散は5-HT_{1A}受容体の刺激を介して隔離飼育ストレスマウスの攻撃行動を改善した。釣藤鈎アルカロイドの一つであるガイソシジンメチルエーテル (GM) は5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を示し、隔離飼育ストレスマウスの攻撃行動を改善した。抑肝散はまた、チアミン欠乏ラットの興奮性神経症状を改善し、脳内の過剰なグルタミン酸放出を減少させた。チアミン欠乏条件下で培養したアストロサイトにおいて、抑肝散はグルタミン酸トランスポーターの減少を改善し、アストロサイトへのグルタミン酸取込みを促進した。甘草由来のトリテルペン、18β-グリチルレチン酸 (GA) もまた、アストロサイトへのグルタミン酸取込みを促進した。抑肝散の経口投与後に両成分は血中および脳で検出された。In vitro定量的オートラジオグラフィの結果、³H GMの結合部位は前頭前野に、³H GAの結合部位は海馬に高密度に分布した。

【まとめ】抑肝散はセロトニンおよびグルタミン酸神経系へ作用して攻撃性や神経興奮を改善し、それぞれの作用にはGMとGAが関与することが示唆された。これらの薬理作用と成分が抑肝散のBPSD改善効果に寄与していると考えられる。

O-6-5

成熟マウス大脳皮質におけるmGluRを介した経験依存性シナプス維持機構

大久保 洋平¹、久保田 淳¹、三上 義礼^{1, 2}、金丸 和典¹、関谷 敬¹、飯野 正光^{1, 3}

¹東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学、²東邦大学医学部医学科生理学講座統合生理学、³日本大学医学部細胞分子薬理学

感覚などの経験入力に依存して惹起される大脳皮質可塑性は、動物が周囲の環境へ適応するための基盤である。幼若期のみならず成熟期においても経験依存性の可塑性が観察されるが、その機構には不明な点が多い。本研究では、成熟マウス大脳皮質における、ヒゲ切除依存性の可塑性を解析した。五日間のヒゲ切除により、ヒゲ入力に対応する大脳バレル皮質の第4層-第2/3層シナプスにおいて、前シナプス放出確率の低下が惹起された。このヒゲ切除依存性の放出確率低下は、5型代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR5) のpositive allosteric modulatorの投与により阻害され、放出確率が維持された。さらに、ヒゲを切除しないマウスに対してmGluR5のnegative allosteric modulatorを投与したところ、前シナプス放出確率低下を再現することができた。さらに、後シナプス側の第2/3層錐体細胞選択的に、イノシトール三リン酸 (IP₃) 分解酵素の過剰発現によってmGluR5に共役するIP₃産生を阻害したところ、前シナプス放出確率低下を再現することができた。以上より、成熟マウスにおいては、ヒゲ入力により第2/3層錐体細胞においてmGluR5-IP₃シグナルが持続的に活性化されることで、なんらかの逆行性機構を介して前シナプス機能が維持されており、この維持機構の遮断がヒゲ切除依存性の可塑性をもたらすことが強く示唆される。

O-6-6

島皮質における抑制性シナプス伝達の短期可塑性に対する電位依存性カルシウムチャネルサブタイプの役割

山本清文, 小林真之

日本大学歯学部薬理学講座

中枢神経系のシナプスにおける神経伝達物質の放出は、神経終末に発現する電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) を介した $[Ca^{2+}]_i$ の流入によってトリガーされる。選択的なVDCC遮断薬を用いた実験によって、小脳、脊髄ならびに海馬における伝達物質放出は、主としてP/Q-typeおよびN-typeが関与することが報告されている (Takahashi and Momiyama, 1993; Minz et al., 1992)。しかしこれらVDCCのサブタイプの違いが、シナプス終末における神経伝達物質の放出様式におよぼす影響は不明な点が多い。そこで本研究では、シナプス前終末に存在するVDCCのサブタイプによって、GABAの放出効率が変化するか否かを明らかにする目的で、ラット島皮質の急性スライス標本を作製し、複数のニューロンから同時にホールセル記録を行った。抑制性ニューロンを2連の脱分極性パルス (刺激間隔50 ms) にて興奮させ、シナプス後ニューロンからGABA作動性シナプス後電流 (uIPSCs) を記録して各種VDCC阻害薬の効果を調べた。さらにuIPSCの振幅比 (paired-pulse ratio, PPR) を算出し、シナプス終末におけるGABAの放出特性を評価した。GABA作動性ニューロンの1つであるfast-spikingニューロンが投射している異なるタイプのシナプス後ニューロンから抑制性シナプス応答を記録したところ、N-typeの選択的な遮断薬である、 ω -conotoxin-GVIA (CgTx, 3 μ M) の投与に対して、一方は減弱し、他方は変化が認められなかった。これは、同じシナプス前ニューロンから投射するシナプス終末であってもN-typeの発現量が異なることを示している。またPPR値とシナプス応答に対する ω -agatoxin-IVA (AgTx) の感受性と相関をしらべたところ、正の相関性が認められた ($r = 0.45$, $P = 0.02$, $n = 28$, Pearson correlation) ことから、AgTxの感受性が高いシナプスほど、GABAの放出効率が高い可能性が示された。この可能性を検証するため、CgTxを投与しP/Q-type VDCCを介したシナプス放出の条件のもと、高濃度 (4 mM) の $[Ca^{2+}]_i$ で置換したところ、PPR値の増加が認められた。またCgTxとP/Q-type VDCCの賦活薬であるroscovitine (30 μ M) の併用投与においてもPPRの増加が認められた。これらの結果は、シナプス前ニューロンにおけるVDCCサブタイプの発現割合の違いが、シナプス後ニューロンに対する抑制効率を制御している可能性を示唆する。

O-8-1

致死性低ホスファターゼ症モデルマウスの硬組織石灰化不全治療を目的とした新規遺伝子治療

高橋(中村)有希^{1,2}、渡辺 淳^{2,3}、笠原 正貴¹

¹東京歯科大学薬理学講座、²日本医科大学生化学・分子生物学講座、³日本医科大学付属病院 遺伝診療科・ゲノム先端医療部

低ホスファターゼ症 (HPP) は、組織非特異的アルカリホスファターゼ遺伝子 (*TNALP*) の変異により、血中のアルカリホスファターゼ (ALP) 濃度が低下し、硬組織の石灰化不全、呼吸困難、痙攣発作、乳歯の早期脱落を主徴とする遺伝性疾患であり、本邦においては致死性である周産期型や乳児型の頻度が高い。現在、酵素補充療法が行われているが、酵素の半減期が短いため、長期反復投与の必要性があり、また侵襲性も高い。すでに我々は、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる遺伝子治療実験を行うことにより、単回投与で延命効果を得ることに成功している。しかしながら、硬組織石灰化不全の治療効果に関しては課題が残され、低身長や易骨折性、乳歯の早期脱落に対しての有効な治療法はない。したがって、本研究では、硬組織に分布するALP濃度を上昇させるための至適AAVベクター投与量を検討し、硬組織石灰化不全の改善の可能性を検討することを目的とした。生後1日齢のHPPモデルマウス大腿四頭筋に骨親和型TNALPを発現するよう構築したAAVベクターを筋肉注射し、90日齢で大腿骨のレントゲン撮影を行い、解析した。血中のALP活性を20 U/mLまで上昇させた結果、未治療マウスは30日以内に死亡するのに対し、治療マウスは90日までの延命効果が認められた。また、行動量も増加し、大腿骨の形態不正や伸長不全の改善が確認された。今回の結果より、硬組織に十分な量のALPを補充することにより、その石灰化不全の改善が可能であることが示唆された。今後、発現効率を向上させた投与ベクターの開発と、石灰化不全の改善に適したベクター投与量ならびに安全なALP濃度を検討していく予定である。本研究結果は、生後でも硬組織に十分な量のALPを補充することにより、重症乳児HPP患者のQOLを高められる可能性を示している。

O-8-2

アミノ酸トランスポーターLAT1特異的阻害薬による破骨細胞抑制

林啓太郎¹、Jutabha Promsuk¹、遠藤仁²、安西尚彦^{1,3}

¹獨協医科大学医学部薬理学講座、²ジェイファーマ株式会社、³千葉大学大学院医学研究院薬理学

L-type amino acid transporter 1 (LAT1) は必須アミノ酸を細胞内に取り込むトランスポーターである。その発現は、正常組織においては一部の限られた組織に極僅かにみられるのに対し、癌細胞においては非常に高いことがわかっている。このような知見から、LAT1は癌細胞におけるアミノ酸の取り込みを効率的に行うための重要なトランスポーターとして考えられている。

一方、我々はヒト末梢血単球におけるLAT1の発現がほとんど見られなかったのに対し、単球より分化させた破骨細胞におけるLAT1の発現が顕著に増加していることを見出した。そこで、破骨細胞分化におけるLAT1の機能を調べるために、LAT1特異的阻害薬存在下でヒト末梢血単球から破骨細胞分化を誘導させたところ、多核細胞およびTRAP活性陽性細胞の数が顕著に減少しており、LAT1特異的阻害薬によって破骨細胞への分化が抑制されていることがわかった。以上の結果から、LAT1は破骨細胞分化に必須であることが明らかとなった。

LAT1特異的阻害薬は癌患者に対する臨床試験が計画されているが、我々はLAT1がT細胞の活性化にも重要であることを最近明らかにしていることから、LAT1特異的阻害薬は既存の薬とは異なる薬理作用で炎症と骨破壊を抑制する新規のリウマチ治療薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

O-8-3

高度に保存されたs5Bのグリシンの変異はPAI-1欠損症を引き起こす

Iwaki T¹, Nagahashi K¹, Takano K², Suzuki-Inoue K², Kanayama N¹, Umemura K¹,
Urano T¹

¹Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan ²University of
Yamanashi, Yamanashi, Japan,

Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is a member of the serine protease inhibitor (SERPIN) superfamily and is the primary physiological regulator of urokinase and tissue type plasminogen activator (uPA and tPA). Complete PAI-1 deficient humans present with massive bleeding tendencies. We recently identified a new complete PAI-1 deficiency, which was caused by single amino acid replacement in PAI-1 molecule at its very C-terminus (G397R). Though the mutant is full length and its reactive site is conserved, the activity and the antigen levels of PAI-1 in plasma are nearly undetectable. In order to elucidate possible mechanisms how this mutation caused PAI-1 deficiency, recombinant Wt and G397R PAI-1 were expressed in S2 cells. Though the cells appeared capable to synthesize Wt and the mutated PAI-1 inside the cells, the mutated PAI-1 was hardly secreted due to intra-cellular multimerization. This multimerization was likely triggered by self-polymerization of the mutated PAI-1 in the cells, which is typically observed in serpinopathies in other SERPIN and causes disturbance of the secretion from the cells.

G397 of PAI-1 locates in strand 5B, and this glycine is well conserved in other Serpins. This glycine allows the close packaging of overlying phenylalanines that is essential to the stability of the serpin molecule. It was reported that mutation of this glycine in antithrombin III and neuroserpin also triggered self-polymerization, and caused antithrombin III deficiency and familial dementia, respectively. Therefore, the locus of the mutation appeared quite important to maintain the correct conformation of PAI-1.

O-8-4

ヒトiPS細胞のミトコンドリア機能に基づいたクロルピリホスの毒性評価

○山田茂、関野祐子、諫田泰成

国立医薬品食品衛生研究所薬理部

【目的】医薬品や化学物質の中には、ヒト発達期の曝露により神経毒性の誘発が懸念されるものがあり、安全性の評価は重要である。現在、妊娠動物を用いた発達神経毒性試験が行われているが、コストや種差などの問題もあり、新たなin vitro評価系が期待されている。そこで我々は、発達期のモデルとしてヒトiPS細胞および神経前駆細胞を用いて、in vitro発達神経毒性評価系の確立を試みた。

【方法】ヒトiPS細胞は253G1株を用いた。神経前駆細胞は、TGF β 及びBMPシグナル阻害剤によるDual SMAD阻害法により分化誘導を行い、分化マーカーであるNestinの発現により分化の確認を行った。陽性対照物質としては、ヒトでの発達神経毒性が報告されている有機リン系農薬クロルピリホス（CPF）を用いた。

【結果】まずヒトiPS細胞を用いて、CPFで72時間曝露を行ったところ、MTT法により細胞増殖の低下が認められた。また、CPFの作用点として細胞内エネルギー供給に着目し、ATPの定量を行った結果、CPFによるATP量の減少が認められた。ミトコンドリアはATPなどのエネルギー産生器官であり、分裂・融合の形態変化により品質管理を行う事が知られている。そこでCPF曝露によるミトコンドリア形態への影響を調べた。その結果、CPFによりMfn1タンパク質の発現が低下した。他のミトコンドリア制御因子には特に変化が認められなかった。さらに、分裂ミトコンドリアを持つ細胞の割合が増加した。次に、神経前駆細胞を用いて、同様の検討を行った。未分化iPS細胞とは異なり、CPF曝露によって細胞増殖・ATP量・ミトコンドリア形態にはほとんど影響が認められなかった。現在、ヒトiPS細胞の分化状態に対して感度の違いのメカニズムを検討中である。

【結論】ヒトiPS細胞において、CPFはMfn1発現低下を介したミトコンドリア機能障害により毒性を引き起こすことが示唆された。ヒトiPS細胞を用いたミトコンドリア機能評価系は、医薬品や化学物質の発達期における毒性評価に有用である可能性が示唆された。

P-1-1

アルコール依存マウスの休薬時における認知機能障害 -ガラス玉覆い隠し試験による評価-

○加藤 英明、辻 稔、武田 弘志

国際医療福祉大学薬学部薬理学分野

【目的】アルコール依存症の病態解明や新規治療法の開発には、アルコール依存マウスの行動変化を適切に評価することが重要となる。これまでに我々は、アルコール依存マウスでは休薬時において、情動性の異常あるいは認知機能の低下を示唆する行動変化が生じることを明らかにしている。本研究では、不安様行動の評価法として知られている高架式十字迷路試験およびガラス玉覆い隠し試験を用いて、アルコール休薬時に認められる行動変化のさらなる意味づけを試みた。【方法】本研究は、国際医療福祉大学動物実験規程を遵守して実施した。実験にはICR系雄性マウスを使用した。アルコール依存マウスは、4%エタノール混入液体飼料のみを7日間摂取させることにより作製した。エタノール休薬は、エタノール混入液体試料をエタノール非含有液体試料に置換することで行い、休薬24および48時間後に高架式十字迷路試験およびガラス玉覆い隠し試験を実施した。試験実施後には、胸腺、脾臓および副腎を摘出し重量を測定した。【結果および考察】高架式十字迷路試験では、対象群およびエタノール慢性処置群いずれにおいても、休薬時におけるオープンおよびクローズドアーム滞留時間に有意な差は認められなかった。一方、ガラス玉覆い隠し試験では、エタノール慢性処置群の休薬24時間後において、対象群と比較して試験15および30分後のいずれにおいても、ガラス玉覆い隠し数の有意な減少が認められた。また、休薬48時間後においても同様の結果が認められた。一般にガラス玉隠し行動は、新奇で奇異な異物の認識に基づく防御反応と考えられている。また、我々は以前に実施した新奇物体認識試験において、休薬時のアルコール依存マウスでは、新奇物体を認識する能力が低下していることを示唆する知見を得ている。これらのことを踏まえると、本研究で認められたガラス玉覆い隠し行動の減少は、アルコール休薬時の認知機能の低下を反映するものと考えられる。さらに、エタノール慢性処置群の休薬24時間後においては、対象群と比較して胸腺重量の有意な減少と副腎重量の有意な増加が認められたことから、アルコール休薬に伴う過度のストレス状態が、認知機能低下の一因となっている可能性が示唆される。

悪性腫瘍による不快情動反応の変化

○高橋美有、池田弘子、米持奈央美、清水孝恒、亀井淳三

星薬科大学 薬物治療学教室

悪性腫瘍組織では、サイトカイン等の様々な物質が産生・放出され、これが腫瘍の増殖のみならず血流を介して異所性に働き、がんの転移等を引き起こす一因になることが示唆されている。近年、様々な末梢の因子が脳機能に影響を及ぼすことが報告されていることから、悪性腫瘍由来のサイトカインが中枢機能にも影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では、不快情動反応に着目し、骨肉腫（AXT）マウスモデルを用いて恐怖記憶に変化が認められるか検討した。また、恐怖記憶の変化に対するサイトカインの関与について明らかにする目的で、脳内サイトカイン量を測定した。さらに、脳内において認められたサイトカイン量の変化が、脳内でのサイトカイン産生の変化によるものかを明らかにするために、脳内におけるサイトカインのmRNA発現量の変化についても検討を加えた。AXT移植マウスを用いて恐怖条件付け試験を行った結果、対照群マウスでは条件付けによるすくみ行動持続率の増加は経日時に低下したのに対し、AXT移植マウスでは条件付けによるすくみ行動持続率の増加は試験期間中低下しなかった。このことから、担がんマウスでは恐怖記憶の消去が障害されていることが示唆された。次に、恐怖記憶に重要な役割を果たすとされる扁桃体、海馬および前頭前皮質における脳内サイトカイン量を測定した。その結果、AXT移植マウスの海馬ではinterleukin (IL) -2、IL-9およびkeratinocyte-derived cytokine (KC) の有意な増加が認められた。そこで、KCに注目し、各脳部位におけるmRNA発現量の変化をRT-PCR法により検討した結果、AXT移植マウスの各脳部位においてKCのmRNA発現量の有意な増加が認められた。この結果より、KCは脳内で産生されている可能性が考えられる。以上の本研究の結果から、担がんマウスでは不快情動反応が亢進していることが明らかになった。また、悪性腫瘍による脳内のサイトカインの増加が精神機能に影響を与えている可能性が示された。

P-1-3



ストレス適応および非適応モデルマウス脳における5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の特徴

○新井崇紘、宮岸寛子、廣田賢志、齋藤淳美、宮川和也、辻 稔、武田弘志
国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野

【目的】生体は、外界からのストレス刺激に対して適応する生理機構（ストレス適応機構）を備えているが、過度なストレス刺激によりこの機構が破綻すると様々なストレス性精神疾患の発症リスクが高まると考えられている。これまでに、我々は、ストレス刺激に対して適応し情動行動の低下を示さないストレス適応モデルマウス（適応マウス）、および過度なストレス刺激により適応機構が破綻し、情動行動の低下を示すストレス非適応モデルマウス（非適応マウス）の作成に成功している。また、非適応マウスに5-HT_{1A}受容体完全作動薬であるflesinoxanを慢性投与すると情動行動の低下が回復することから、ストレス適応機構の形成や破綻において5-HT_{1A}受容体が重要な役割を担っている可能性を示唆してきた。一方、5-HT_{1A}受容体は、細胞質から細胞膜へ小胞輸送されることが明らかにされている。そこで、本研究では、適応マウスおよび非適応マウスの海馬と中脳における5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の変化について検討した。【方法】ICR系雄性マウスを用い、マウスに1時間あるいは4時間の拘束ストレス刺激を14日間慢性負荷し、適応マウスおよび非適応マウスを作成した。これらマウスの全脳より海馬と中脳を採取し、Subcellular Protein Fractionation Kitを用いて細胞分画を行い、細胞膜画分と細胞質画分に分画した。その後、両画分における5-HT_{1A}受容体の発現量をWestern blot法により定量した。

【結果および考察】適応マウスの海馬では、細胞膜画分において5-HT_{1A}受容体発現量が有意に増加したのに対し、細胞質画分では変化が認められなかった。一方、非適応マウスの海馬では、細胞質画分および細胞膜画分のどちらにおいても、5-HT_{1A}受容体の発現量に変化は認められなかった。また、中脳に関しては、適応マウスでは細胞質画分および細胞膜画分のどちらにおいても5-HT_{1A}受容体の発現量に変化は認められなかったが、非適応マウスでは有意に増加した。以上より、5-HT_{1A}受容体の細胞内分布の変化が、ストレス適応の形成や破綻に関与することが示唆された。

ATP感受性K⁺チャンネルKir6.2欠損マウスにおける急性ストレス応答の特徴

○浅沼 潮¹⁾、齋藤淳美¹⁾、小宮健人¹⁾、宮岸寛子¹⁾、宮川和也¹⁾、辻 稔¹⁾、
梅田 啓²⁾、岡田泰昌³⁾、武田弘志¹⁾

¹⁾国際医療福祉大学薬学部薬理学分野、²⁾国際医療福祉大学塩谷病院呼吸器内科、

³⁾独立行政法人国立病院機構村山医療センター内科

ATP感受性K⁺チャンネルの構成サブユニットの一つであるKir6.2は、脳内に広く分布していることが報告されている。我々はこれまでに、Kir6.2遺伝子欠損 (Kir6.2KO) マウスにおいて、自発運動量の低下、一般情動行動の低下、不安様行動の亢進が認められることを確認しており、これらの知見は、Kir6.2が情動調節に重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。そこで本研究では、Kir6.2KOマウスの急性ストレス刺激に対する反応性について、行動学および生化学的に検討した。

実験には、C57BL/6J系雄性・雌性マウスおよびKir6.2KO雄性・雌性マウスを使用した。マウスに急性拘束ストレス刺激を1時間負荷し、直後にhole-board試験に従い情動行動を測定した。その結果、雄性・雌性Kir6.2KOマウスにおいて共に、野生型マウスで認められる急性拘束ストレス刺激負荷による情動行動の低下（穴のぞき回数の減少）が増強することを明らかにした。

また、生体のストレス応答には、視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA系）が重要な役割を担っている。そこで本研究では次に、hole-board試験直後に断頭採血し、遠心分離により得られた血清を用いて、ストレス応答ホルモンであるコルチコステロンの血中濃度をELISA法に従い測定した。その結果、野生型マウスにおいて認められる急性拘束ストレス刺激負荷による血中コルチコステロン濃度の上昇が、雄性・雌性Kir6.2KOマウスで増強すること、また、この反応は雌でより顕著であることを見出した。

以上の結果から、Kir6.2の欠損により、急性ストレス刺激による情動性の低下が増強されること、また、この機構にHPA系の調節機能異常が一部関与している可能性が示唆された。

P-1-5 

Dibutyryl-cAMPによる Neuro2a分化誘導時におけるSNAP25とTyrosine hydroxylase との相互作用についての検討

○高橋 詩織、増子 瑞希、山本 彩佳、大井 ありさ、根本 佳奈、
高木 正史、中谷 善彦、天野 託

国際医療福祉大・薬・薬治

Synaptosomal-Associated Protein25 (snap25) は、神経伝達機構に関与するタンパク質の一つであり、哺乳類の神経終末部位に存在する。このsnap25はVesicle-associated membrane proteinおよびSyntaxinとともにSNARE複合体を形成することで、神経伝達物質を含有するシナプス小胞の開口放出の制御に関与していることが知られている。近年、メタアナリシス解析により、SNAP25のT1065G 対立遺伝子とADHDの間には統計的に有意な関連が見出されており、ADHDの発症に関与している可能性があることが報告されている。そこで本研究では、マウス神経芽細胞種であるNeuro2a細胞を用いて、snap25の発現抑制によるDibutyryl-cAMP分化誘導時への影響について検討した。

Neuro2aを低血清培地条件下でRetinoic acid およびDibutyryl-cAMPにより分化誘導を試みたところ、1mM Dibutyryl-cAMPによりsnap25とTyrosine hydroxylaseの発現が、それぞれ有意に増加した。この時、マウスsnap25のmicroRNA (snap25-miRNA) 配列を挿入したBLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP (Invitrogen) を用いてNeuro2a細胞におけるsnap25のノックダウンを試みたところ、snap25の発現抑制と共にTyrosine hydroxylaseの発現も有意に抑制された。

以上より、Neuro2aにおいてsnap25の発現変化とTyrosine hydroxylaseの発現変化とが相互に関連していることが明らかとなった。このことから、神経細胞の分化とそれに伴う神経細胞のキャラクター化に、snap25の発現変化が関与している可能性が示唆された。

大脳皮質神経細胞培養系において脱分極刺激により特定のマイクロRNAがエクソソーム中に増加する

田中 智美、高橋 徹、佐々木 幸生

横浜市大院・生命医科学・機能構造科学

【序論】

マイクロRNA (miRNA) は同一細胞内で遺伝子発現制御を行うだけでなく、エクソソームを介して他の細胞の発現調節を行うことが知られている。しかし、中枢神経系におけるエクソソームを介した遺伝子発現制御機構は解明されていない。今回、我々は軸索のmiRNAは神経活動によってエクソソームを介して他の神経細胞に運ばれ、遺伝子発現を制御するのではないかという仮説を立て、エクソソームを介した神経細胞間の情報伝達について検討することを目的として研究を行った。

【方法】

マウス大脳皮質神経初代分散培養系からエクソソーム画分をTotal Exosome Isolation試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出し、その中に含まれるタンパク質をウェスタンブロット法 (WB) で、miRNAをqRT-PCR法で解析した。

【結果・考察】

上記の試薬を用いて沈殿画分を抽出しWBにより解析したところ、エクソソーム特異的タンパク質であるAlixが検出され、エクソソーム画分の抽出を確認した。さらに、qRT-PCR法によるmiRNAの定量的結果、特定のmiRNAが同エクソソーム画分中に有意に多く含まれることが明らかになった。その一つであるmiR-382はKClによる脱分極刺激により、エクソソーム画分中の含有率が5倍上昇することが判明した。miR-382は軸索に多いmiRNAであることから、神経細胞の興奮により、miR-382を含む特定のmiRNAが細胞外に放出され、周辺の細胞の遺伝子発現制御に関わっている可能性が示唆される。miR-382は脆弱X症候群や統合失調症で発現が増減することから、これらの疾患との関連が注目される。

P-2-1

δ 受容体サブタイプ刺激が誘発したラットの側坐核ドパミン放出に対する muscimol の効果の特徴

青野悠里¹, 木口友里², 渡邊由梨子³, 三枝 禎¹

¹日本大学松戸歯学部薬理学講座, ²小児歯科学講座, ³口腔外科学講座

側坐核のドパミン (DA) 神経活動の μ または δ 受容体を介した促進には、DA神経を抑制する GABA 神経の opioid 受容体 subtype の刺激による抑制が関与することが考えられる。我々は、ラットの側坐核の μ 受容体刺激が誘発した DA 放出が同部位の GABA_A 受容体刺激により促進することを報告した (Aono et al., 2008)。一方、側坐核の δ 受容体 subtype の選択的刺激は同部位の DA 放出を増大させるが (Fusa et al., 2005)、この DA 放出への GABA_A 受容体刺激の影響は明らかでない。そこで本研究では、 δ_1 または δ_2 受容体 agonist が誘発した側坐核の DA 放出に対する GABA_A 受容体 agonist の muscimol の効果について検討した。実験には S-D 系雄性ラット (体重約 200 g) を用いた。無麻酔非拘束の条件下で *in vivo* 脳微小透析法により側坐核から回収した細胞外 DA は、HPLC-ECD 法により 5 分毎に測定した。使用薬物は透析プローブから逆透析で側坐核に 25 または 50 分間灌流投与した。投与量は灌流液中の総量 (mol) で示した。

δ_1 受容体 agonist の DPDPE (0.5, 5 nmol) または δ_2 受容体 agonist の deltrophin II (5, 25 nmol) を側坐核へ灌流投与したところ、同部位の細胞外 DA 量はそれぞれ約 160% または約 190% まで用量依存的に増加した。DPDPE (5 nmol) または deltrophin II (25 nmol) が誘発した DA の増加は、それぞれ基礎 DA 量に目立った影響がない用量の δ_1 受容体 antagonist の BNTX (0.15 nmol) または δ_2 受容体 antagonist の naltriben (1.5 nmol) の併用によりほぼ完全に消失した。DPDPE (5 nmol) とは異なり deltrophin II (25 nmol) が誘発した DA の増大は、基礎 DA 量に影響が認められない用量の muscimol (250 pmol) の併用投与により抑制された。

以上の結果から μ および δ_1 受容体とは異なり、 δ_2 受容体への刺激が誘発した側坐核の DA 放出は同部位の GABA_A 受容体刺激により抑制されることが示唆された。また、 δ_2 受容体刺激による側坐核の DA 放出の発現には、同部位の DA 神経終末の GABA_A 受容体への GABA 入力 of 低下が関与することが考えられた。

血糖調節における中枢ドパミンD₂受容体の関与

○三上 理沙、池田 弘子、米持 奈央美、亀井 淳三

星薬科大学 薬物治療学教室

糖尿病は慢性の高血糖状態を主徴とする疾患であり、腎症や末梢神経障害といった合併症を引き起こす。したがって、血糖値を正常にコントロールすることは糖尿病治療の最大の目的といえる。血糖調節においては末梢のみならず中枢も重要な役割を果たすことが報告されているが、その詳細は明らかではない。一方、血糖調節に交感神経および副交感神経が関与することが知られている。当教室ではこれまでに、中枢のドパミンD₂受容体が血糖調節に関与する可能性を示していることから、本研究では中枢のドパミンD₂受容体による血糖調節機構に交感神経および副交感神経が関与するか検討した。まず、ドパミンD₂受容体作動薬のquinpiroleを脳室内投与したところ、有意な血糖値の上昇が認められ、この作用はD₂受容体拮抗薬のl-sulpirideにより抑制された。このことから、中枢のドパミンD₂受容体の刺激により血糖値が上昇することが明らかになった。次に、quinpiroleの血糖上昇作用に対する交感神経の関与について検討する目的で、β₂アドレナリン受容体拮抗薬のICI118,551を末梢投与したが、quinpiroleによる血糖上昇作用は変化しなかった。一方、quinpiroleの投与により血中のインスリン濃度は有意に減少したが、グルカゴン濃度は変化しなかった。さらに、quinpiroleの投与により肝臓における糖新生酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) のmRNA発現量は有意に増加した。これらの結果から、中枢のドパミンD₂受容体の刺激による血糖上昇作用は、インスリンの分泌抑制および糖新生の亢進によることが示唆された。インスリン分泌や肝糖産生は副交感神経によっても支配され、副交感神経は視床下部外側野 (LH) により調節されることが報告されている。そこで、LHのドパミンD₂受容体の血糖調節への関与を検討した。LHへのquinpiroleの投与により血糖値は有意に上昇し、この作用はl-sulpirideの併用により抑制された。以上の結果より、LHのドパミンD₂受容体の刺激は、副交感神経を介してインスリンの分泌抑制ならびに肝糖産生の亢進により血糖値を上昇させることが示唆された。

幼若期発症1型糖尿病モデルラットにおける脳血管透過性の評価

○西村 翼、恒岡 弥生、岡 淳一郎

東京理科大学 薬学部 薬理学研究室

糖尿病では、高血糖による血管障害が原因となり様々な合併症が発症する。中枢性の合併症として、不安やうつ等の精神障害や認知機能障害が報告されており、これらはQOLを著しく低下させる。また、脳血管障害が主な原因とされる脳血管性認知症も糖尿病患者で発症しやすいとされており、精神神経疾患と糖尿病の間には関連性があるといえる。我々はこれまでに幼若期発症1型糖尿病ラット（JDM）を用いて、行動試験および電気生理学的手法により認知機能障害のメカニズムを検討してきた。その結果、JDMでは空間作業記憶が障害されていた。さらに、思春期発症1型糖尿病ラット（DM）でも認知機能障害が惹起されることが報告されているが、当研究室で行ったJDMおよびDMの比較では、両者の電気生理学的パラメータに差異がみられたため、発症時期の違いにより別々の機序で認知機能が低下したと推測される。

近年、脳血管障害と精神疾患との関連性が報告された。中枢神経系と脳血管は、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトからなる血液脳関門により物質交換が強固に制限されている。上述のJDMでの機能異常は、血液脳関門が高血糖によって破綻することで惹起されている可能性が考えられる。そこで本研究では、JDMの脳血管透過性を評価することを目的とした。モデルは両性Wistar/ST系ラット（17日齢）にstreptozotocin（85 mg/kg）を腹腔内投与して作製した。透過性の評価は麻酔下ラットに蛍光色素を尾静脈投与し、血漿含有量に対する脳実質への色素の取り込み率の比較により行った。また、血管内皮細胞やアストロサイトを免疫蛍光染色により可視化し、control群とJDM群で比較観察を行なった。その結果、JDMでは、蛍光色素取り込み率が有意に増加し、血管透過性が亢進していることが示された。以上より、JDMでは脳血管透過性が上昇し、認知機能障害のリスクファクターとなっている可能性が考えられる。

P-2-4

5/6腎摘慢性腎不全モデルマウスの海馬におけるストレス関連因子の発現変化

下村 晃子、長田 暢弘、小菅 康弘、石毛久美子、伊藤 芳久

日本大・薬・薬理

【目的】近年、本邦の透析患者の9.8%に認知機能障害が認められることが報告され、慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) が認知機能低下の危険因子となることが明らかにされつつある。これまで、CKD患者の認知機能障害の発症には、尿毒症物質による酸化ストレスの関与が指摘されているものの、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、本研究ではCKDモデルの1つである5/6腎摘慢性腎不全モデルマウスを用いて、学習・記憶に重要な役割を果たす海馬におけるストレス関連因子の発現変化を検討した。

【方法】実験にはC57BL/6雄性マウスを用い、8週齢時に左腎臓の2/3を摘出し、9週齢時に右腎臓を全摘出した。偽処置マウスには、皮膚及び筋肉の切開のみを行った。腎不全の重症度は尿素窒素 (BUN) の値から判断した。タンパク質の発現レベルは、Western blot法を用いて検討した。

【結果・考察】術後のBUN値が60~69 mg/dLを軽度CKD群 (mCKD)、70 mg/dL以上を重度CKD群 (sCKD) とし、偽処置マウス群 (Cont) とともに解析を行った。既報において記憶障害が生じると報告されている腎摘8週間後の体重および収縮期血圧には、顕著な変化は認められなかった。小胞体ストレスのマーカーであるglucose-regulated protein 78の海馬における発現レベルは、sCKDにおいて、ContおよびmCKDと比較し有意に増加した。しかし、小胞体ストレス依存性細胞死に関与するC/EBP homologous protein (CHOP) レベルの上昇やcaspase-12の活性化は認められなかった。また、酸化ストレスのマーカーである4-hydroxynonenal (HNE) 付加タンパク質の発現レベルは、sCKDにおいて有意に増加した。一方、シナプスマーカーであるPSD95、SNAP25、synaptophysinの発現レベルには、いずれの群でも顕著な変化は認められなかった。以上の結果より、CKDモデルマウスの海馬では、酸化ストレスだけでなく小胞体ストレスが誘導されていることが示唆された。

安静睡眠時ラットにおけるグリシン受容体機構の検討

井出令奈¹ 安達一典² 渡部 茂¹ 坂上 宏²

1) 明海大学歯学部 形態機能成育学講座 口腔小児歯科学分野 2) 明海大学歯学部 病態診断治療学講座 薬理学分野

【目的】我々は、睡眠時のラットの顎運動機能がグリシン神経機構を介した調節を受けている可能性を報告してきた。本研究では、安静睡眠時の刺激応答性変化に関わるグリシンの中枢作用部位の検討を行った。

【材料および方法】イソフルラン全身麻酔下のSD系雄性ラット（約5.5週齢）に心電図、筋電図（顎二腹筋前腹と咬筋）、脳波、眼電図記録用電極と刺激用電極（オトガイ舌筋）を留置した。さらに、両側三叉神経運動核顎二腹筋領域に薬物投与用ガイドカニューレを埋入した。約2週間の回復期間と馴化の後、観察を行った。安静覚醒（quiet awake：QW）時にオトガイ舌筋に電気刺激（200 μ s、0.2 Hz、5回）を加え、顎二腹筋活動を3/5以上発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値（TH）とし、5分間隔で3回計測した（QWB）。続いて、睡眠潜時の測定ならびに安静睡眠時（quiet sleep：QS）とその後の安静覚醒（QWA）時のTHを求めた。さらに、グリシン（0.1、0.2、0.4 M）もしくはsalineを両側三叉神経運動核顎二腹筋領域に投与（0.2 μ l / side）し同様の検討を行った。なお、QS時には、微小覚醒の発現回数も測定した。薬物投与部位は実験終了後に解剖学的に確認を行った。

【結果】Saline投与群で、投与前と同様にQS時の開口反射誘発閾値の有意な上昇を認めた。一方、グリシン投与群では、いずれの濃度においても安静睡眠時の開口反射誘発閾値が投与後の安静覚醒時と比較して有意（ $P < 0.05$ ）に低下した。また、グリシン投与は睡眠潜時を短縮する傾向を認めたが、微小覚醒の発現率や睡眠時脳波の徐波分布には影響を与えなかった。

【考察】三叉神経運動核顎二腹筋領域のグリシン受容体を活性化は、睡眠時の末梢刺激応答性を上昇させるが、睡眠の質の改善には積極的に関与していないことが示された。

P-3-1



Acetaminophenおよびその代謝産物AM404の種々のオピオイド受容体作動薬に対する効果の解析—新規ラベルフリーCellKey™アッセイシステムを用いて—

松出知子^{1,2}, 根本悦子^{1,2}, 横山明信¹, 西村瞳¹, 川合田恵美^{1,2}, 佐藤汐莉^{1,2},
江藤萌子¹, 大栗宝子^{1,2}, 宮野加奈子¹, 白石成二¹, 平山重人², 藤井秀明²,
上園保仁¹

¹国立がん研究センター研・がん患者病態生理 ²北里大・薬学部・生命薬化学教室

【目的】Acetaminophen (APAP) は古くから鎮痛薬として頻用されてきた安全性の高い薬であり, その鎮痛作用に代謝産物であるAM404が関与すると考えられている. がん疼痛薬物療法に関するガイドライン (2014) では, がん性疼痛にAPAPと医療用麻薬の併用が推奨されている. 医療用麻薬および内因性オピオイドはオピオイド受容体 (μ OR, δ OR, κ OR) を活性化することでその作用を発揮する. しかし私たちのこれまでの研究で, APAPならびにAM404はどのオピオイド受容体にも直接作用はないが, 両者はfentanyl (FEN) による μ ORの活性化を増強すること, さらにAM404はmorphine (MRP) による δ ORの活性化を増強することを明らかにした (第68回西南部会 (2015), 第89回薬理学会年会 (2016)). しかし, 鎮痛に頻用される弱オピオイドtramadol (TRA) ならびに内因性オピオイドに対する作用は全く不明である. そこで本研究では, 内因性オピオイドを含めたオピオイド受容体作動薬の μ , δ , κ OR活性に及ぼすAPAP, AM404の効果の網羅的解析を目的とした. 【方法】解析にはCellKey™システムを用いた. これは評価化合物をOR発現細胞に添加することで生じる電気抵抗変化を受容体の活性として評価できる解析方法である. 同システムを用い, μ OR, δ OR, κ ORを安定発現するHuman Embryonic Kidney 293細胞における各種オピオイド受容体作動薬の作用への, APAPとAM404の効果を解析した. 作動薬はMRP, FEN, oxycodone (OXY), TRAの活性代謝産物M1, および内因性オピオイドであるendomorphine-1 (EM-1), endomorphine-2 (EM-2), β -endorphinを用いた.

【結果】CellKey™システムを用いたアッセイによりMRP, FEN, OXYに加えTRA, M1の各オピオイド受容体活性に対するAPAPおよびAM404の影響について解析したところ, TRA, M1による活性化作用にAPAP, AM404は影響を与えなかった. さらに, 内因性オピオイドであるEM-1, EM-2, β -endorphinによる μ , δ , κ OR活性に対し, APAP, AM404は促進作用を示さなかった. 【考察】APAP, AM404は, FENによる μ OR活性を増強し, さらにAM404はMRPによる δ OR活性を増強した. 一方, 弱オピオイドであるTRAおよびM1ならびに内因性オピオイドに対してはAPAPもAM404も増強効果を有しないことがわかった. APAP, AM404はある種の医療用麻薬については受容体活性促進効果 (PAM (Positive Allosteric Modulator)) を有すること, また弱オピオイドや内因性オピオイドには影響を与えないことから, がん疼痛療法において, FENもしくはMRPとAPAPの併用は効果的な疼痛コントロールが期待できる可能性が考えられた.

P-3-2 

オピオイド耐性に関与するオピオイド受容体インターナリゼーションへの
AcetaminophenおよびAM404の効果解析 -可視化Halotag®オピオイド受
容体を用いて-

○大栗宝子^{1,2}、川合田恵美^{1,2}、根本悦子^{1,2}、石橋尚人^{1,2}、大道容子^{1,2}、
宮野加奈子²、山川央³、平山重人¹、白石成二²、長瀬隆弘³、藤井秀明¹、上園保仁²

1. 北里大・薬、2. 国立がん研究センター研究所 がん患者病態生理研究分野、
3. 公益財団法人 かずさDNA研究所

【目的】 Acetaminophen (APAP) は古くから鎮痛薬として用いられており、代謝産物であるAM404が鎮痛効果を示すと報告されている。がん疼痛の治療には医療用麻薬とAPAPの併用が推奨されているが、APAPおよびAM404のオピオイドOR (μ OR、 δ OR、 κ OR) への作用は明らかになっていない。これまでの研究でAPAP、AM404とも μ 、 δ 、 κ OR自身には作用を示さないが、APAPはFentanylによる μ ORの作用を増強し、AM404はMorphineによる δ ORならびにFentanylによる μ ORの作用を増強することがわかった (第68回西南部会 (2015)、第89回薬理学会年会 (2016))。しかしオピオイド鎮痛耐性に関与すると考えられているORインターナリゼーションへの効果は不明である。本研究ではAPAPおよびAM404が各種医療用麻薬によるORインターナリゼーションに与える影響を、受容体を可視化できるHalotag®融合OR発現細胞を用いて解析することを目的とした。

【方法】 HaloTag® を融合させた μ OR安定発現HEK293 (Human Embryonic Kidney293) 細胞を用い、pH感受性HaloTag® Ligandを15分間処置した後、医療用麻薬 (Fentanyl、Morphine)、APAP、AM404の単独処置および医療用麻薬とAPAP、AM404との同時処置をそれぞれ行い、蛍光顕微鏡を用いてインターナリゼーションの経時的可視化観察およびその解析を行った。

【結果・考察】 Fentanylは単独処置により急峻で持続的な μ ORインターナリゼーションを惹起した。一方Morphine はそれ自身で緩徐な持続的インターナリゼーションを引き起こした。APAPおよびAM404単独では μ ORのインターナリゼーションは引き起こさなかった。しかしAPAP、AM404両者ともFentanylとMorphineによる μ ORインターナリゼーションを増強することがわかった。以上の結果より、APAPおよびAM404はFentanylおよびMorphineによる μ ORインターナリゼーションを促進し、おそらく μ ORのPAM (Positive Allosteric Modulator) として作用することで、オピオイド鎮痛耐性にも何らかの影響を与えていることが示唆された。

牡丹皮を介した六味丸のNav1.7チャンネル電流抑制作用

塚田 和代¹⁾、○片所 真紀¹⁾、山内 美輝¹⁾、根来 加菜子¹⁾、山口 真里奈¹⁾、
塩川 真穂²⁾、遠藤 沙希子²⁾、中谷 善彦¹⁾、矢作 忠弘^{2,3)}、松崎 桂一³⁾、
天野 託¹⁾

国際医療福祉大・薬・薬治¹⁾、国際医療福祉大・薬・薬用資源²⁾、日大・薬・生薬³⁾

電位依存性ナトリウムチャンネルは、末梢及び中枢神経での神経細胞の興奮に関与するイオンチャンネルである。中でもNav1.7は、慢性疼痛の病態生理における神経細胞の過剰興奮に深く関与しているとされる。近年、牛車腎気丸がオキサリプラチンによる末梢神経障害やパクリタキセルによる末梢神経痛覚過敏に有効であることが報告されており、その効果は牛車腎気丸に含まれる附子末に起因すると考えられている。しかし、附子末以外の生薬において、神経伝導抑制効果や神経細胞の過剰興奮抑制効果の有無についての知見は皆無である。そこで本研究ではNav1.7に着目し、Nav1.7安定化発現HEK293細胞株を用いて、牛車腎気丸に含まれる生薬6種により構成される六味丸、並びに六味丸を構成するそれぞれの生薬について、Nav1.7チャンネル電流への影響を電気生理学的に検討した。

六味丸の投与により、Nav1.7チャンネルピーク電流の濃度依存的な抑制が認められ、そのIC₅₀は0.23 mg/mLであった。続いて、六味丸を構成する6種類の生薬単独でのNav1.7チャンネルピーク電流に対する影響を検討した。その結果、1 mg/mlの各生薬熱水抽出物存在下ではNav1.7チャンネルのピーク電流の抑制は見られなかったものの、5 mg/mLでは、牡丹皮のみに抑制作用が認められ、そのIC₅₀は2.65 mg/mLであった。

以上より、六味丸に含まれる牡丹皮によるNav1.7チャンネルのピーク電流抑制作用が、牛車腎気丸による末梢神経障害改善効果の一端を担う可能性が示唆された。

矯正歯科治療に伴う疼痛に対する新規疼痛制御物質の探索

長谷川 尚哉¹、佐々木 会¹、土屋 隆子¹、坂上 宏²、安達 一典²、須田 直人¹

1 明海大学歯学部 形態機能成育学講座 歯科矯正学分野、2 明海大学歯学部 病態診断治療学講座 薬理学分野

【目的】これまで我々は、ラットに負荷した矯正力が、電気刺激で誘発される開口反射誘発閾値 (TH) を矯正力負荷1~3日後まで有意に低下させることを報告した。そこで、既存の鎮痛薬ならびにTRPV1受容体拮抗薬 (A-889425) の鎮痛効果を歯の移動量と併せて検討した。【材料および方法】Wistar系雄性ラットの上顎両側門歯と上顎右側第一臼歯 (M1) 間にNi-Tiコイルスプリングを装着し、矯正力を負荷した。その後、Vehicle、アスピリン (25、50、100 mg/kg/day)、アセトアミノフェン (100 mg/kg/day)、A-889425 (1.25、2.5、5.0 μ mol/kg/day) を腹腔内投与 (3回/day) した。矯正力負荷1日後に全身麻酔下のもと筋電図 (顎二腹筋) 採取用ワイヤーと、電気刺激用電極を両側M1部歯肉に留置した。歯の移動側である右側と対照側である左側M1部刺激時のTHを比較し、各薬物の鎮痛効果を評価した。歯の移動量は、上顎のシリコーン印象から石膏模型を作製し測定した。

【結果】Vehicle投与群では、対照側と比較して移動側のTHが有意 ($P < 0.05$) に低下した。100 mg/kgのアスピリンの投与、あるいは、5.0 μ mol/kgのA-889425の投与は、移動側のTHの低下を有意 ($P < 0.05$) に抑制した。アセトアミノフェンの投与は、Vehicle投与群と比較しこのようなTHの低下に影響を与えなかった。矯正力負荷1日後の歯の移動量は、いずれの薬物の投与によっても有意な影響を受けなかった。【考察】本モデルを用いた検討より、歯の移動に伴う疼痛の緩和にはアスピリンが有効であるが、アセトアミノフェンは奏効しない可能性が考えられる。また、A-889425も鎮痛効果を発現したことから、TRPV1受容体が歯の移動に伴う疼痛制御に有効な標的であることが示唆された。シクロオキシゲナーゼならびにTRPV1受容体は破骨細胞活性を制御することが知られてきた。今後は、投与期間を延長し歯の移動量ならびに多核破骨細胞浸潤への影響をさらに検討する必要性がある。

抗悪性腫瘍薬開発を目指した新規ベンズインドール誘導体による抗グリオーマ作用とその作用機序の検討

○渡邊 有加里¹⁾、藤野 恵理¹⁾、高橋 詩織¹⁾、Nyo Mi SWE²⁾、中谷 善彦¹⁾、
渡邊 敏子²⁾、天野 託¹⁾

国際医療福祉大・薬・薬治¹⁾、国際医療福祉大・薬・創薬有機²⁾

インドール骨格は、天然・合成を問わず多くの生理活性化合物の基本的な構成骨格であり、医薬品を始めとした多くの化合物の存在が知られている。ベンズインドールは、このインドール環とベンゼン環が縮合した化合物であり、インドール環に対して縮合するベンゼン環の位置によりベンズ[e]インドール、ベンズ[f]インドール及びベンズ[g]インドールの3つに区分される。これらの性質については未知の部分が多く、中でも直線型のベンズ[f]インドールに関しての研究報告はほとんど無い。しかし、ベンズ[f]インドール-4,9-ジオールアナログが肺癌由来細胞株の細胞増殖を抑制することやインドール骨格を持つビンブラスチンおよびビンクリスチンが抗悪性腫瘍薬として神経膠腫（グリオーマ）治療に使用されることなどから、ベンズインドール誘導体が抗悪性腫瘍薬のリード化合物に成り得る事が考えられる。

本研究では、直線型のベンズ[f]インドール8誘導体における抗悪性腫瘍効果について、ヒトグリオーマ由来細胞株であるU87MG、T98G、SNB19の三種類を用いて検討を行った。その結果、ベンズ[f]インドール8誘導体のうち、ピロール環部分にBr、インドール環部分にピリジン環が導入された誘導体において、細胞増殖抑制作用が認められた。また、その作用機序について検討したところ、U87MGにおいてBcl-2とBaxの発現比に有意差が認められた。これに対し、T98G、SNB19において差は認められなかった。

以上より、少なくともU87MGにおいて、ベンズ[f]インドール誘導体がBclファミリータンパク質を介して細胞増殖抑制作用を引き起こした可能性が示唆された。

P-4-1



抗不整脈薬によるヒト心筋Naチャンネル抑制作用のチャンネルポア分子構造基盤

中川博揮¹、宗像達夫²、角南明彦¹

¹国際医療福祉大・薬・分子薬理学、²国際医療福祉大・薬・医薬資源情報科学

【目的】哺乳類の電位依存性Naチャンネルはその大きさがゆえに結晶化が困難であり、詳細な構造解析は十分に行われていない。そこで、ヒトの心筋Naチャンネルのチャンネルポアの構造を明らかにする目的で、結合部位がポアに存在すると考えられている抗不整脈薬を用い、局所麻酔薬の作用に影響を及ぼすことが知られている3つのドメイン (D)、膜貫通領域S6のアミノ酸に着目し、これら変異体の抗不整脈薬の作用に及ぼす影響を検討した。

【方法】ヒトの心筋Naチャンネル α サブユニット (Nav1.5) とNav1.5から作成した変異体 (局所麻酔薬結合部位の可能性が示唆されている膜貫通領域S6の変異体:N406A (DI)、L1462A/E/F (DIII)、F1760A (DIV)) をHEK293細胞に一過性に発現させた。発現させたNaチャンネル電流の記録は全細胞パッチクランプ法により行い、抗不整脈薬 (フレカイニド、メキシレチン、リドカイン) の影響を検討した。チャンネルポアの三次元分子構造モデリングと抗不整脈薬の結合配座はDiscovery Studio (Accelrys) で行った。

【結果】F1760Aではフレカイニド、メキシレチン、リドカインによるチャンネルブロックは著しく減少した。また、フレカイニド、メキシレチンによるチャンネルブロックはL1462Eで減少し、L1462Fで増加した。一方、N406Aでフレカイニドによる使用依存性ブロックは減少し、メキシレチンによるトニックブロックは増大した。N406A、L1462E、L1462Fのフレカイニドによるブロックに及ぼす影響は選択的な活性化状態に対する親和性の変化をともなった。

【考察】F1760は3つの抗不整脈薬の結合部位で共通の最も重要なアミノ酸の一つであることが判明した。また、N406とL1462はこれら抗不整脈薬の結合に影響を及ぼすが、それらの寄与はチャンネルの状態依存性であった。一方、これら抗不整脈薬とチャンネルポアとの相互作用に関する分子モデリングから、抗不整脈薬によるチャンネルの抑制作用は抗不整脈薬の結合によるポアの閉塞と不活性化状態の促進/安定化であることが示唆された。

トランスジェニックマウスを利用した心筋遅延整流性カリウムチャネル分子複合体の探索と解析

○福田俊¹、児玉昌美¹、永森収志²、五十棲規嘉²、藤塚美紀¹、喜多紗斗美³、岩本隆宏³、金井好克²、古川哲史¹、黒川洵子¹

¹東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 ²大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学 ³福岡大学医学部 薬理学教室

固有心筋細胞の再分極過程は、KCNQ1およびKCNE1から成る Ca^{2+} 感受性の遅延整流性カリウム (I_{Ks}) チャネルによって制御される。 I_{Ks} チャネルは分子複合体によって調節される事例が示されているが、調節機構の全容は解明されていない。そこで我々は、分子複合体を介した新規の I_{Ks} チャネル調節機構を探索するために、KCNQ1-KCNE1融合タンパク質を過剰発現させたトランスジェニック (I_{Ks} -TG) マウスを使用し、プロテーム解析および電気生理学的解析を実施した。まず、相互作用するタンパク質を探索するために、 I_{Ks} -TGマウスの心室筋を標本として、KCNQ1抗体による免疫沈降物のLC-MS/MS分析を実施した。その結果、 I_{Ks} -TGマウスと野生マウスのスコア比が2以上である163種のタンパク質を同定し、 I_{Ks} チャネル分子複合体を形成するタンパク質の候補とした。この163種のタンパク質に対し、IPAソフトウェア (Qiagen) を使用してパスウェイ解析を行ったところ、カルシウムシグナリングが最上位となった。そこで、 I_{Ks} -TGマウスの心室筋単離細胞を標本として、パッチクランプ法により I_{Ks} 電流を測定したところ、カルシウムシグナリング制御分子を薬理的に阻害する事で濃度依存的に I_{Ks} チャネルが活性化し、このカルシウムシグナリング制御分子が I_{Ks} チャネルを抑制的に調節することが示唆された。次に、この分子間相互作用について、イヌの心室筋細胞抽出液を使用し、KCNQ1細胞内部位のGST融合タンパク質を用いたGSTプルダウンアッセイで調べたところ、KCNQ1N末端およびC末端の近位部が相互作用に強く影響している事が示された。今後は、この相互作用が、 I_{Ks} チャネルの Ca^{2+} 感受性に及ぼす影響について、生化学的および電気生理学的解析により明らかにしていきたい。

心電図QT間隔に対するエストロゲン類の影響

田村文弥^{1,2}、家田真樹¹、鈴木岳之²、中谷晴昭³、原田信広⁴、古川哲史⁵、黒川洵子⁵

¹慶應義塾大学循環器内科、²慶應義塾大学薬学部薬学教育研究センター、³千葉大学医学部、⁴藤田保健衛生大学医学部、⁵東京医科歯科大学難治疾患研究所

種々の薬剤が誘発する致死性のQT延長不整脈は創薬開発上の大きな課題である。このQT延長毒性は、女性での発症が有意に多いものの具体的な策はとられていない。その理由の一つとして、メカニズムが未解明である点が指摘されている。そこで、我々のグループは、分子メカニズムの理解を目指して、性ホルモンが心電図波形に与える影響について、分子レベルの研究を行っている。これまで、エストロゲン類であるエストラジオールとエストロンサルフェートが、生理的濃度範囲内でhERGチャネルの細胞内薬物結合部位に結合することを見出した。これらのエストロゲン類の結合により、わずかにhERGチャネルの活性が抑制され、hERG阻害剤に対する感受性も上昇した。これらの作用には、エストロゲン化合物の芳香族環および側鎖の構造が関与しているということが、hERGチャネル変異体を用いた実験から示唆された。

そこで、本研究ではエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ欠損マウスを用いて、hERG阻害剤E-4031の心電図QT間隔に対する作用にエストロゲン類が及ぼす影響をin vivoモデルで調べた。アロマターゼ欠損により、E-4031によるQT延長作用が消失したことから、エストロゲン類がhERG阻害剤の感受性を増強することがin vivoで示された。次に、これまで調べられていないエチニルエストラジオールというエストロゲン化合物にも注目し、hERGチャネルに対する相互作用の有無を調べた。エチニルエストラジオールは、前立腺がんや男性ホルモン療法抵抗性の乳がんの治療だけでなく、経口避妊薬に含まれるエストロゲンとして広く利用されていることから、hERG阻害剤などQT延長薬剤との併用により不整脈リスクが高まるかどうか調べることは、予防的観点からも意義がある。以上の研究は、QT延長毒性の発症に対してエストロゲン類が影響する可能性を示唆するものである。

モルモット肺静脈心筋自発活動におけるアドレナリン受容体の役割

○望月颯¹、入江雅彦¹、恒岡弥生^{1,2}、長谷川直生¹、下林真梨子¹、田中悠介¹、
濱口正悟¹、行方衣由紀¹、田中光¹

¹東邦大・薬・薬物、²東理大・薬・薬理

肺から左心房に血液を送る血管である肺静脈の管壁には心房から続く心筋組織の層が存在しており、この肺静脈心筋で生じる電氣的興奮が心房に伝播することで心房細動が発症することが知られている。また、自律神経活動が心房細動の発症および維持に関与することも知られている。私達はモルモット摘出肺静脈組織標本を用いて、交感神経伝達物質 noradrenaline が肺静脈心筋の自発活動を誘発することを明らかにした。本研究では、この標本に収縮力測定法及びガラス微小電極法を適用し、noradrenaline 誘発肺静脈自発活動に関与するアドレナリン受容体の種類と役割を明らかにすることを目的とした。Noradrenaline は肺静脈心筋の自発活動を濃度依存的に誘発した。アドレナリン α 受容体刺激薬 methoxamine も自発活動を誘発し、その興奮頻度は低値であったが、 β 受容体刺激薬 isoproterenol の追加により頻度が著明に上昇した。Isoproterenol 単独では自発活動は誘発されなかった。noradrenaline 誘発肺静脈心筋自発活動に対し各種アドレナリン受容体選択的遮断薬を処置したところ、 α_1 受容体選択的遮断薬 prazosin および β_1 受容体選択的遮断薬 atenolol が自発活動を停止、あるいは頻度を減弱させた。 α_2 受容体選択的遮断薬 yohimbine、 β_2 受容体選択的遮断薬 ICI118551 および β_3 受容体選択的遮断薬 SR59230 は抑制効果を示さなかった。アドレナリン受容体刺激が肺静脈心筋活動電位に及ぼす影響を検討したところ、アドレナリン α_1 受容体刺激により静止膜電位の脱分極方向への移動に続いてオシレーションが見られ、続いて自発的かつ連続的な活動電位の発生が誘発された。一方、 β_1 受容体刺激によつては、静止膜電位の過分極方向への移動がみられた。1Hz の電気刺激により誘発した活動電位の持続時間は α 受容体刺激により延長し、 β 受容体刺激により短縮した。以上の結果から、noradrenaline はアドレナリン α_1 受容体および β_1 受容体の両方を介して、それぞれ異なる膜電流成分を活性化させることで肺静脈心筋自発活動を誘発することが示唆された。

胎盤栄養膜細胞の分化・融合におけるカルシウムイオンとcAMPの関係

毛野恵理子¹、吉江 幹浩¹、田村 和広¹、岡田美紗希¹、玉腰 琳奈¹、石川源²、
井坂 恵一³、桑原 直子¹、立川 英一¹

¹東京薬大・内分泌・神経薬理学、²日本医大・産婦人科学、

³東京医大・産科婦人科学

【目的】胎盤の絨毛を構成する合胞体栄養膜細胞は、細胞性栄養膜細胞が分化・融合（シンシチウム化）した細胞であり、妊娠維持に重要な絨毛性ゴナドトロピン（HCG）やプロゲステロン（P4）を産生・分泌する。この栄養膜細胞の分化・融合過程には、cAMPシグナル伝達経路の活性化が不可欠である。しかしながら、セカンドメッセンジャーであるCa²⁺と分化・融合との関係に関する知見は限られている。本研究では、ヒト栄養膜細胞におけるHCG、P4産生と細胞融合におけるCa²⁺とcAMPシグナル伝達との関連について検討した。

【方法】ヒト栄養膜細胞株（BeWo細胞）に電位依存性Ca²⁺チャネル阻害薬ニフェジピン、小胞体からのCa²⁺放出を阻害するダントロレン、細胞内にCa²⁺を流入させるアラメチシンを1時間処置した後、分化・融合刺激としてジブチリルcAMPを48時間処置した。その後、機能的分化の指標としてHCG α 、 β サブユニット、コレステロール側鎖切断酵素（P450scc）と3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素1（3 β -HSD1）のmRNA発現を定量的RT-PCR法で解析した。また、培養メディアウム中のHCGとP4量をそれぞれイムノブロットティング、EIAにて評価し、細胞融合は、顕鏡下にて多核化細胞をカウントすることにより評価した。【結果・結論】BeWo細胞にニフェジピンを前処置すると、ジブチリルcAMPにより誘導されるHCG α 、 β サブユニット、P450scc、3 β -HSD1のmRNA発現と培養メディアウムへのHCG、P4分泌量がさらに増加した。また、ダントロレンも同様の効果を示した。その一方、細胞内Ca²⁺流入促進薬であるアラメチシンは、ジブチリルcAMPによるHCG β と3 β -HSDの発現及びHCGとP4の分泌を抑制した。また、ニフェジピンとダントロレンは、細胞融合を促進した。以上、ヒト栄養膜細胞における細胞質内Ca²⁺レベルの増加は、cAMPシグナル経路を介したホルモン産生及び細胞融合に対して抑制的に機能することが示唆された。

P-5-1

チアジド系類似利尿薬インダパミドによるK排泄増加作用への腎カリクレインの関与

藤田朋恵¹、安田修一²、馬嶋正隆³

¹獨協医科大学薬理学、²北里大学医学部遺伝子高次機能解析センター、³北里大学医学部薬理学

【背景】チアジド系および類似利尿薬は高血圧治療薬の主要薬の一つである。その作用機序は、遠位曲尿細管でNa-CLトランスポーター阻害によりNa排泄が増加し、下流の接合尿細管でNaおよびKチャンネルを介したNaとKの交換により、最終的にK排泄を伴ってNa排泄が増加すると考えられている。長期使用による重大な有害作用に水電解質のバランス異常がある。腎カリクレイン-キニン系は、セリンプロテアーゼの腎カリクレインを律速として接合尿細管以降のNa、KおよびCa排泄を調節することが知られている。【目的】腎カリクレイン-キニン系がチアジド系および類似利尿薬による有害作用発現の予測因子になる可能性を考え、同薬の水電解質作用に対する腎カリクレイン-キニン系の関与を調べた。

【方法】6週齢、雄性Wistarラットに、カリクレイン阻害薬アプロチニンを一日2回、2.5日(32 mg/kg/回)、あるいはブラジキニン₂受容体拮抗薬イカチバントを1回(HOE-140、2.4 mg/kg/回)皮下投与後、チアジド系類似利尿薬インダパミド(0.1、0.3 mg/kg)を生理食塩水(4 mL/100g)とともに経口投与した。採尿ケージを用いて6時間蓄尿を行った。電解質排泄量は尿クレアチニン当たりと濾過された原尿のうち尿中に排泄された割合fractional excretion (FE %)として算出した。【結果】アプロチニン併用インダパミド投与により単独投与に比べ、K排泄量、FEKおよび尿量は用量依存性に増加した。血清K濃度およびNa、CLおよびCaの尿中排泄量と血清濃度は変化しなかった。HOE-140併用インダパミド投与では単独投与に比べ、尿量、上記電解質尿中排泄量のいずれも影響を受けなかった。【考察・結論】インダパミドによる尿中K排泄増加作用に腎カリクレインが関与すること、それは B_2 受容体と独立することが示された。血清K濃度が低値を示さなかったことや尿中Na排泄が変化しなかったことは、単回投与のため薬理作用の発現が一時的で、生体として代償されたことが考えられる。腎カリクレイン活性はチアジド系および類似利尿薬による有害作用のうちK排泄増加作用の結果生じる低K血症の個体差の予測因子になる可能性がある。

P-5-2

尿中で検出可能な炎症性マーカー高分子型量Lipocalin 2の同定

藤原葉子、土屋裕義、藤村昭夫、輿水崇鏡

自治医科大学医学部薬理学講座分子薬理学部門

【背景】 Lipocalin 2 (LCN2) は、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) とも呼ばれ、急性腎障害に伴い尿細管での再吸収が障害されると尿中に検出される糖タンパク質である。我々はこれまで、薬剤性腎障害モデルマウスの尿中には、他臓器や血中で検出される従来のLCN2に加え、高分子型量のLCN2が存在することを報告した。本研究では、尿管閉塞や腹腔内の炎症時における尿中LCN2分子種について検討した。【方法】 雄BALB/マウスの左尿管を結紮して回復させた後、閉塞側の腎盂尿および膀胱尿を採取し、ウエスタンブロッティングでLCN2を検出した。尿中LCN2の糖鎖型を糖鎖切断酵素の感受性により推定した。腹腔内炎症モデルはLipopolysaccharide (LPS) 投与により作成した。また、Dexamethasone (DEX) の前投与による炎症抑制効果が尿中LCN2に及ぼす影響を検討した。【結果】 閉塞側の腎盂尿中では、他臓器でも検出される22 kDaのLCN2が顕著に上昇した。この時の膀胱尿では24 kDaのLCN2が検出されたが、この高分子量LCN2は他のいずれの末梢組織でも検出されなかった。LPS投与後の尿中にも2種類のLCN2が検出され、血清、肺、腎臓に存在する22 kDaのLCN2と同様に、endoglycosidase Hによる消化には抵抗性であった。一方、LPS投与マウスの肝臓および尿管組織で検出される22 kDa LCN2は、この糖鎖切断酵素に感受性を示した。DEXの前投与は、LPSによるIL-1 β 上昇を有意に抑制したが、2種類の尿中LCN2の上昇には影響しなかった。【考察】 尿中高分子量LCN2は糖鎖付加により形成され、腹腔内の炎症反応を敏感に反映する尿中で検出可能な炎症性マーカーと考えられた。

P-5-3

ヒト骨髄間葉系幹細胞に対するフルバスタチンとデキサメタゾンの効果

○田邊 耕士¹、塚越 絵里¹、三浦 直²、吉成 正雄²、笠原 正貴¹

1. 東京歯科大学薬理学講座、 2. 東京歯科大学口腔科学研究センター

【目的】近年、HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチン系薬剤の骨再生能が報告されている。我々もこれまでに、*in vivo*においてスタチン系薬剤の骨再生の効果を検証してきたが、その詳細なメカニズムや至適濃度は十分に明らかにされていない。本研究では、スタチン系薬剤の1つであるフルバスタチンと、骨芽細胞への分化を促進するデキサメタゾンを用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell: hMSC) に対する効果を検証することを目的とした。

【方法】培養細胞にはhMSC (Cell Applications Inc. USA) を使用し、培地中にフルバスタチンナトリウム (Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada) を各濃度 (μM) :0 (control)、0.5、1、2、およびデキサメタゾン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を各濃度 (ng/mL) :0 (control)、10、100、1000、をそれぞれ添加し10% FBS- α MEMで培養を行った。2つの薬物が細胞増殖や骨分化に及ぼす影響について、それぞれMTT assay とALP assayを用いて検証した。

【結果および考察】フルバスタチンは、濃度依存性にhMSCの細胞増殖能を減少させた。しかしながら、デキサメタゾン存在下では、フルバスタチンによる細胞増殖能抑制効果が抑えられた。ALP assayでは、デキサメタゾン非添加群で、フルバスタチンのすべての濃度でALP活性の上昇はみられなかった。デキサメタゾン添加群では、各濃度でALP活性を増加させたが、フルバスタチン添加により濃度依存性にALP活性が抑制された。生体においては副腎皮質ホルモンの作用によってフルバスタチンの細胞毒性が緩和されている可能性が示唆された。さらに局所投与により骨再生を効率的に促進させる際には、フルバスタチンを低濃度に維持する必要性が示唆された。

P-5-4

異性化酵素Pin1は慢性骨髄性白血病原因分子BCR-ABLの分解を促進する

塚原富士子、丸 義朗

東京女子医科大学・医学部・薬理学教室

慢性骨髄性白血病原因分子BCR-ABLは、細胞内で強いチロシンキナーゼ活性を発揮し、細胞増殖を促進、アポトーシスを抑制する。我々は、既にBCR-ABL蛋白質の分解系には、2つのユビキチンリガーゼ（CHIPとc-Cbl）が関与することを報告した。CHIPは、蛋白質合成初期の段階で未成熟蛋白質の異常構造を認識するBag1と結合したBCR-ABL蛋白質をユビキチン化して分解を促進する。一方、c-Cblは、成熟後のBCR-ABL蛋白質をリン酸化依存性にユビキチン化して分解を促進する（Blood 2010）。本研究では、さらにプロリン異性化酵素Pin1がBCR-ABLの構造を変化させ、分解を促進する分子として働くことを認めたので報告する。

Pin1の細胞内過剰発現は、Hsp90阻害薬によるBCR-ABL蛋白質の分解を促進した。一方、Pin1阻害薬jugloneは、BCR-ABL蛋白質を安定化した。BCR-ABL分子標的薬であるイマチニブは、ABLキナーゼ領域へ結合することによりBCR-ABL蛋白質を安定化する。Pin1は、イマチニブによるBCR-ABL蛋白質安定化作用を抑制した。Pin1の結合は、BCR-ABL蛋白質のリン酸化依存性に強まり、またBCR-ABLとBag1との結合はPin1存在下で増強した。CHIPによるBCR-ABLの分解は、Pin1により促進されたが、一方c-Cblによる分解は抑制された。

以上の結果から、Pin1は成熟BCR-ABL蛋白質に結合してその構造を崩すことにより、異常構造センサーとして働くBag1による認識を促進し、その結果、CHIPによるBCR-ABL蛋白質のユビキチン化、分解を促進することが示唆される。