

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し、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共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。