

# O1-1

## ニコチン継続投与が血小板凝集に及ぼす影響

○菅沼由唯、狩野泰輝、池本和久、一瀬千穂、近藤一直

藤田保健衛生大・医・薬理

【目的】喫煙は、循環器疾患をはじめとする様々な疾患のリスクファクターにあげられる。ニコチンはタバコ煙成分の1つとして知られており、血栓性疾患との関連について研究が進められているが、血小板に対する直接的な影響を検討したものはほとんどない。そこで我々は、マウスにニコチンを継続投与することで、血小板凝集に与える影響を検討した。【方法】ICR系雄性マウス（6ヶ月齢）に、30または100  $\mu\text{g/mL}$ のニコチンを飲水中添加し、ニコチン負荷モデルマウスを作製した。対照群には、ニコチンの溶解に用いた0.2% サッカリン溶液を投与した。投与中1週間ごとに、Tail cuff法により収縮期血圧を測定した。4週間飼育後、クエン酸ナトリウム添加採血し、血球計数装置により赤血球数、白血球数、血小板数を測定した。血液サンプルを遠心（200 $\times$ g、10分、室温）し、多血小板血漿（PRP）を採取した。PRPは、血小板数 $250 \times 10^3 / \mu\text{L}$ に調整後、37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間静置した。血小板凝集惹起剤としてコラーゲン（4~10  $\mu\text{g/mL}$ ）、もしくはADP（1~10  $\mu\text{M}$ ）を添加し、光透過法を用いて血小板凝集能を測定した。【結果】対照群における収縮期血圧は、投与前 $115 \pm 3.1$  mmHg、4週投与後 $122 \pm 3.0$  mmHgに対し、100  $\mu\text{g/mL}$ ニコチン投与群では、投与前 $122 \pm 4.6$  mmHg、投与後 $123 \pm 3.6$  mmHgと、変化は見られなかった。また、赤血球数は対照群 $7.05 \pm 0.05 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 、ニコチン投与群 $7.08 \pm 0.05 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 、白血球数は対照群 $3.2 \pm 0.3 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 、ニコチン投与群 $2.9 \pm 0.2 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 、血小板数は対照群 $543 \pm 17 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 、ニコチン投与群 $536 \pm 11 \times 10^3 / \mu\text{L}$ と変化は見られなかった。血小板凝集能測定実験においては、コラーゲン5~6  $\mu\text{g/mL}$ 添加による最大凝集率は、対照群 $76.5 \pm 2.9\%$ に対し、ニコチン投与群 $41.0 \pm 10.5\%$ と、血小板凝集は有意に抑制された。しかし、ADP添加による凝集率は、対照群とニコチン投与群に変化は見られなかった。【考察】ニコチンを自由飲水にて4週間継続投与することで、コラーゲン惹起性血小板凝集を抑制した。今後、ニコチンの血小板凝集に対する作用機序について検討を進める。

## O1-2

### 昆虫細胞を用いたヒト凝固第VII因子の生成方法の開発

○長橋ことみ<sup>1</sup> 岩城孝行<sup>2</sup> 梅村和夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup>遠州病院 産婦人科 <sup>2</sup>浜松医科大学 薬理学教室

血液凝固第VII因子は肝細胞で合成分泌され、N末端のG1a領域に存在するグルタミン酸 (Glu) がビタミンK依存性 $\gamma$ カルボキシグルタミナーゼ (GGCX) の触媒作用で $\gamma$ カルボキシグルタミン酸 (G1a) に変換され活性をもつ。血液凝固薬には動物が本来有する血液凝固因子が用いられており、昨今はGGCX活性を有する哺乳動物由来細胞を使用した組み換えタンパク質から精製されるものもある。本研究では、昆虫由来細胞を用いて活性を有するヒト凝固第VII因子 (hF7) を生成したため報告する。【方法】ショウジョウバエ由来である培養細胞株S2細胞に①MAK80:Bip (S2細胞の分泌シグナル遺伝子) +hF7、②MAK85:哺乳動物由来GGCX+Bip+hF7、③MAK86:哺乳動物由来GGCX+VKOR (ビタミンKエポキシドレクターゼ) +PDIA2 (タンパク質ジスフィルドイソメラーゼファミリーA、メンバー2) +Bip+hF7、④MAK132:哺乳動物由来の分泌シグナルを含むhF7全長遺伝子、⑤MAK219:哺乳動物由来GGCX+VKOR+Bip+hF7の各遺伝子を導入し、それぞれの形質転換細胞をビタミンK存在下と非存在下で培養し、タンパク質の発現を誘導した。各培養上清において、SDS-PAGE、ELISA法により分泌の有無と量を確認した。またhF7の活性を測定した。【結果】MAK132は培養上清中にhF7を確認できなかった。MAK80、85、86、219ではビタミンKの存在にかかわらずhF7の分泌を確認できたが、MAK80は活性をもたず、MAK85、86、219はビタミンK存在下でのみ活性を有した。比活性はMAK86が最も高かった。【考察】生成されたタンパク質の分泌には、昆虫細胞の分泌シグナルが必要であった。また、活性をもつhF7を分泌させるには哺乳動物由来のGGCX遺伝子と培養液中のビタミンKの存在が必須であり、VKORとPDIA2を過剰発現させることで最も比活性が高いhF7を得られた。【結論】昆虫細胞を用いて活性を有するhF7の生成が可能となった。昆虫細胞は哺乳動物細胞に比して培養速度、手技の簡便さ、安全性に優れており、本手法は安全で安価な凝固薬剤の精製に有用と考えられる。

## O1-3

### 急性下肢循環障害におけるCOX-2/mPGES-1の役割

天野英樹、伊藤義也、江島耕二、審良静男、馬嶋正隆

北里大学医学部薬理学、免疫学、外科学、大阪大学

プロスタグランジンE2 (PGE2) は血管新生促進作用があり、近年PGE2が制御性T細胞 (Treg) の増殖機能を高めることで免疫抑制作用を亢進させ癌の増殖を促進する報告が散見される。今回我々は下肢虚血の回復過程にTregが関与するか否か検討することにした。(方法) 6-8週の野生型 (Wild type=WT) 及びmPGES-1KOで右大腿動脈を結紮・切離することで下肢虚血モデルを作成した。虚血の改善はレーザードップラーによる左右血流比, 血管内皮細胞のマーカーであるCD31及びTreg特異的マーカーであるFOXP3の発現は免疫組織化学及び定量的PCRで検討した。(結果) WTでは下肢虚血後、5-7日目に虚血筋組織におけるCD31, FOXP3, COX2, mPGES-1の発現は非虚血部と比較し有意に増加を認めた。WTでの虚血の改善はCD25抗体により有意に抑制を認められたがmPGES-KOでは認められなかった。WTの虚血筋組織でのFOXP3の発現はmPGES-1KOと比較し有意に低下を認めた。(結論) 上記の結果より下肢虚血の改善にmPGES-1由来のPGE2がTregの集積を促して虚血の改善を促進していることが推測された。

## 01-4

### ヒト臍帯血管静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖に対するHIFの関与

○池本和久、菅沼由唯、狩野泰輝、一瀬千穂、近藤一直  
藤田保健衛生大学・医・薬理

【目的】 Hypoxia (低酸素) 環境下の組織では、酸素と栄養の確保のために血管系の細胞の増殖は促進されるものと考えられる。我々はこれまでに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) を用い、hypoxia (3% O<sub>2</sub>) が増殖能に及ぼす影響を検討してきた。その結果、その効果は観察されるまでに一定の時間を必要とすること、一度生じた効果は再酸素化しても一定時間持続すること、といった特徴を明らかにしてきた。今回、低酸素応答に関与する主要な転写因子の一つであるHIF (hypoxia-inducible factor) に着目し、その関与について検討した。

【方法】 HUVECは本学の疫学・臨床研究倫理審査委員会承認された方法に則って臍帯からコラゲナーゼ法により採取し、HuMedia EG2 (KURABO) 中で4~5代継代したものを使用した。Hypoxia環境は、窒素ガスにより培養器内部の酸素濃度を3%に低下させることにより作成した。HUVECは低血清培地 (1%FBS) で24時間プレインキュベーションを行った後、hypoxia下での培養を行って通常酸素環境下 (normoxia) で培養した細胞と比較した。共に抗酸化作用のある植物フラボノイドでありながら、一方でHIF阻害薬として知られるchrysin、一方でHIF分解を阻害することでHIFの作用を強めることが期待できるquercetinの添加を培養開始と同時に行った。細胞数は、培養終了後にエタノール固定とHoechst 33342による核染色を行い、細胞核の数を直接計数する方法 (直接計数法) により行った。HIFの発現解析はウエスタンブロット法にて行った。

【結果】 chrysin (10 μM) およびquercetin (10 μM) は、両者ともhypoxia環境下で72時間培養したHUVECの増殖を抑制した。この抑制はnormoxia環境下でも同様に観察された。現在、ウエスタンブロットによるHIF発現解析と、他のHIF阻害剤および活性化剤の使用を検討中である。

## O1-5

### ドーパ受容体 GPR143 はアドレナリン $\alpha 1$ 受容体応答を増強する

○増川太輝<sup>1</sup>、古賀資和<sup>1</sup>、横山詩子<sup>2</sup>、上窪裕二<sup>3</sup>、中村史雄<sup>1</sup>、櫻井隆<sup>3</sup>、石川義弘<sup>2</sup>、五嶋良郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>横浜市立大学 分子薬理神経生物学教室、<sup>2</sup>横浜市立大学 循環制御医学教室、  
<sup>3</sup>順天堂大学 薬理学講座

L-DOPA（ドーパ）はパーキンソン病における最も重要な治療薬である。従来、ドーパは生理活性を持たず、その薬理作用は L-アミノ脱炭酸酵素（AADC）によってドパミンに変換されることにより発現するものと考えられてきた。一方、我々はドーパ自体が神経伝達物質であるとの仮説を提起してきた。麻酔下ラットの延髄弧束核領域（NTS）に微量注入したドーパがドパミンへの変換を介さずに、G蛋白質連関型受容体の一つ GPR143 を介して血圧下降および徐脈応答を引き起こすこと等を明らかにしてきた。また、我々は GPR143 遺伝子欠損マウスにおいて NTS におけるドーパ応答が消失することを示した。このような現象が生理学的に機能しているか否かについて、フェニレフリンによる圧受容器反射を GPR143 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その経緯の中、GPR143 遺伝子欠損 (*Gpr143*<sup>-/-</sup>) マウスにおいてフェニレフリンによる昇圧応答が著減していることを新たに発見した。血管平滑筋特異的に GPR143 を欠損させた動物においてもフェニレフリン応答の著減が認められた。野生型と *Gpr143*<sup>-/-</sup> 摘出血管標本を用いて比較・検討したところ、*Gpr143*<sup>-/-</sup> 血管においてフェニレフリンに対する血管収縮作用は減弱していた。さらに、*Gpr143*<sup>-/-</sup> マウスにおけるストレス刺激による昇圧応答は野生型に比し減弱していた。GPR143 と  $\alpha 1$  受容体を HEK293 細胞に導入し、受容体間相互作用を免疫沈降法、全反射照明蛍光顕微鏡並びに fluorescence resonance energy transfer (FRET) 法により検討したところ、2 つの受容体は物理的に相互作用することが明らかとなった。これらの知見は、GPR143 と  $\alpha 1$  受容体がヘテロダイマーを形成し、 $\alpha 1$  受容体を介する生理学的な血管応答に影響を与えることを示唆する。

## O1-6

### 動物血栓モデルにおけるレーザー血栓溶解システムの有効性及び安全性

○松本祐直<sup>1</sup>, 外村和也<sup>1</sup>, 山下大輔<sup>2</sup>, 清水良幸<sup>2</sup>, 玉置善紀<sup>2</sup>, 小杉壮<sup>2</sup>, 岡田裕之<sup>2</sup>, 中山禎司<sup>3</sup>, 梅村和夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>浜松医大・医・薬理、<sup>2</sup>浜松ホトニクス、<sup>3</sup>浜松医療センター・脳外

脳梗塞急性期の治療薬としては、血栓溶解薬であるt-PA（組織型プラスミノゲン・アクティベータ）が、世界で広く使用されている。しかし、投与可能範囲が発症から4.5時間以内と短く、さらに脳出血のリスクもあり、全ての患者に使用可能ではないのが実状である。一方、t-PA投与によっても血流の再開が得られない場合や、t-PA治療の適応外の患者には、血管内手術により血栓を回収する機械的血栓除去術が行われているが、器具が硬いため操作性の問題や血管損傷のリスクは高いといわれている。そこで我々は、レーザー（光エネルギー）を使用し、血栓のみを溶解し、血管に傷害を来さない血栓除去システムを考案し、本システムの血栓溶解メカニズム、有効性及び安全性について検討した。本技術は光源として半導体励起の固体Neodymium: Yttrium Aluminum Garnet (Nd:YAG) レーザの2倍高調波（波長532 nm）を使用し、血栓と血管との光の吸収差を利用（Lasers Surg Med. 1996;19:397-406）し、直接血栓にレーザーを照射することにより血栓のみを選択的に溶解する。まず初めに、レーザー照射による血栓溶解機構の解析を行うため、高速度撮像カメラによる動態解析を行った。in vitro実験にて血栓を擬したゼラチンファントムに対してレーザー照射を行ったところ、光ファイバ照射端で気泡の発生を認めた。次いで、動物血栓モデルにおける有効性及び安全性を検討した。ラット下大静脈またはウサギ頸動脈に塩化鉄を用いて血栓を作製し、大腿静脈または大腿動脈から挿入した光ファイバを介してレーザー照射を複数回実施した。ラット血栓モデルにおいて、レーザー照射により有意な血栓溶解が認められた。ウサギ血栓モデルにおいては、非照射群に比して血流再開までの時間が有意に短縮した。ウサギ血栓モデルの血流再開から24時間後、神経症状、脳梗塞、脳出血は認められなかった。最後にレーザー照射による血管壁への影響をエバンスブルー染色法にて検討したところ、非照射群、照射群いずれにおいてもレーザー照射による血管壁への影響はないことが確認された。以上のことから、レーザー照射により発生した気泡が脳や血管へ影響することなく血栓を溶解することが明らかとなった。

## クルクミンはGATA4アセチル化を阻害することで高血圧性心肥大を抑制した

○清水聡史<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、船本雅文<sup>1,2</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、和田啓通<sup>2</sup>、島津章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】高血圧は心不全のリスクファクターであり、血圧のコントロールが心不全発症の予防につながる。我々はp300特異的HAT阻害剤である天然物クルクミンが、高血圧心不全モデルラットにおいて心筋特異的転写因子GATA4のアセチル化を減少させ心不全の進展を抑制し、新たな心不全治療薬となる可能性を見出した。しかしながら心肥大に対するクルクミンの効果は不明である。本研究では、高血圧性心疾患モデルである食塩感受性ダールラット（DSラット）を用いて、心肥大に対するクルクミンの効果を検討した。

【方法】6週齢のDSラット及び血圧正常であるDRラットとを、8%食塩食の開始と同時にランダムに2群に振り分け、クルクミン50g/kgあるいは溶媒を6週間連日経口投与を行った。投与前後での血圧測定及び心臓超音波検査解析、さらに肥大気である12週齢でサクリファイスを行い、組織学検査、Q-PCR法によるmRNA解析、心臓から核タンパクを抽出し、免疫沈降-ウエスタンブロッティング法で解析を行った。

【結果】12週齢のDSラットは著名な高血圧をきたし、両群で差を認めなかった。DRラットと比較してDSラットでは左室後壁厚の肥大や、心体重比の増加を認めたが、クルクミンは血圧や新機能に影響を与えずにこれらの変化を抑制した。またクルクミンは高血圧による個々の心筋細胞の肥大、血管周囲の線維化の増加、新肥大マーカーであるANFや $\beta$ -MHCのmRNAレベルの更新を優位に抑制した。DSラットの心臓の核タンパクではGATA4のアセチル化が亢進していたが、クルクミン投与によりこれは優位に抑制された。

【考察】以上より、クルクミンは既存降圧薬とは違ったメカニズムでの肥大抑制効果を持つと考えられる。今後ヒト臨床試験によってクルクミンがヒトの心肥大の予防薬としての効果が期待される。

## O3-2

### 柑橘系果皮成分であるNobiletinは圧負荷に起因する心不全の進展を抑制した

○砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、小川原慎太郎<sup>1</sup>、鈴木杏奈<sup>1</sup>、船本雅文<sup>1,3</sup>、櫻井涼賀<sup>1</sup>、  
刀坂泰史<sup>1,3,4</sup>、浅川倫宏<sup>2</sup>、菅敏幸<sup>2</sup>、和田啓道<sup>3</sup>、長谷川浩二<sup>3</sup>、森本達也<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>医薬品製造化学講座、<sup>3</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>4</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】我々は心筋細胞肥大抑制効果を指標に天然抽出物ライブラリーのスクリーニングを行い、柑橘類果皮成分のNobiletinがラット初代培養心筋細胞において心筋細胞肥大を抑制し、さらに心筋梗塞ラットにおいて心不全の進展を抑制することを見出した。しかしながら、心筋梗塞以外の心不全モデルでのNobiletinの効果は不明である。そこで本研究では圧負荷誘導性心不全モデルを用いてNobiletinの効果を検討することを目的とした。

【方法】8～10週齢の雄性C57BL6/Jマウスに大動脈縮窄（TAC）術及びSham手術を施し、TAC群、Sham群それぞれをランダムに2群に振り分け、Vehicle（1%アカシアガム）又はNobiletin（20 mg/kg/day）の連日経口投与を8週間行った。その後、心臓超音波検査による心機能測定、心体重比算出、心臓切片のHE染色やMT染色などの組織学解析、心不全マーカーであるANFやBNP、 $\beta$ -MHCのmRNA発現量の解析を行った。

【結果】Sham群、TAC群ともにNobiletin投与による血圧の変化はみられなかった。投与8週間後の心臓超音波検査の結果、TAC群では左室後壁厚の肥厚や左室内径短縮率が低下したが、Vehicle投与群と比較してNobiletin投与群で有意に改善した。心肥大の指標となる心体重比の増加もNobiletin投与により有意に低下していた。心筋細胞径及び心臓血管周囲の線維化はSham群に比べTAC群で増加したが、Nobiletinの投与で有意に抑制された。さらに、TAC群で増加したANF、BNP、 $\beta$ -MHCなどの肥大化マーカーのmRNA発現は、Nobiletinの投与で有意に減少された。

【考察】今回の結果より、Nobiletinは心筋梗塞モデルだけでなく、圧負荷に起因する慢性心不全の進展を抑制することが明らかになった。以上のことから、天然物由来成分であるNobiletinが新たな心不全治療薬となる可能性が示唆された。



## 柑橘系果皮成分であるNobiletinとARBの併用は相加的に高血圧性心不全モデルの進展を抑制した

○衣斐遥<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1,3,4</sup>、小川原慎太郎<sup>1</sup>、鈴木杏奈<sup>1</sup>、船本雅文<sup>1,3</sup>、刀坂泰史<sup>1,3,4</sup>、  
浅川倫宏<sup>2</sup>、菅敏幸<sup>2</sup>、和田啓道<sup>3</sup>、島津章<sup>3</sup>、長谷川浩二<sup>3</sup>、森本達也<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学講座、<sup>2</sup>医薬品製造化学講座、<sup>3</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>4</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】我々は柑橘系果皮含有成分であるNobiletinが心筋梗塞や圧負荷に起因する心不全の進行を抑制することを見出した。このNobiletin療法を臨床に応用するにあたり、既存の心不全治療薬との比較検討が必要である。そこで本研究では、心不全標準的治療薬であるARBのCandesartanとNobiletinの効果を高血圧性心不全モデルである食塩感受性ダールラット（DSラット）を用いて検討した。

【方法】11週齢のDSラット及びコントロールのDRラットをランダムに溶媒群（1%アカシアガム）、Nobiletin（20 mg/kg/日）群、Candesartan（1 mg/kg/日）群、併用療法（Nobiletin + Candesartan）群の4群に分け、連日経口投与を7週間行った。Candesartanは降圧効果を示さず心不全に効果のある1 mg/kg/日を投与量とした。11週齢、18週齢に対して心臓超音波検査と組織学的検査の解析を行った。

【結果】11週齢の時点で各群の血圧、心機能に差はみられなかった。18週齢では、各群の血圧に差は見られなかった。左室後壁厚は溶媒群でDRラット（2.4 mm）と比較して増大（3.7 mm）しており、Candesartan群では変化は見られなかった（3.6 mm）が、Nobiletin群（3.3 mm:  $p < 0.05$  vs DSラット溶媒群）や併用療法群（3.1 mm:  $p < 0.05$  vs DSラット溶媒群）で左室後壁の肥厚は有意に低下していた。心機能の指標である左室内径短縮率は、Candesartan群（50.1%:  $p < 0.05$  vs DSラット溶媒群）、Nobiletin群（49.7%:  $p < 0.05$  vs DSラット溶媒群）で同程度の収縮率低下阻害効果を認めた。さらに、併用療法群では、Nobiletinの相加的な効果を認めた（58.3%:  $p < 0.05$  vs Candesartan）。また、組織学的検査で個々の心筋細胞径を測定した結果、DRラットと比較して、DSラット溶媒群で有意に増大し、併用療法群で有意に減少していた。

【考察】天然物Nobiletinは心不全の標準的治療薬Candesartanと同程度の心機能改善効果と相加的な効果があったことより、Nobiletinが新たな心不全治療薬となる可能性が示された。

## PRMT5特異的阻害剤はp300のメチル化を抑制することで心筋細胞肥大を制御する

○筒井優介<sup>1, 2</sup>、刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、宮崎雄輔<sup>1</sup>、北條祐也<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>2</sup>、森本達也<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> 静岡県立大学 薬学部 分子病態学教室 <sup>2</sup> 京都医療センター 展開医療研究部

<sup>3</sup> 静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】心肥大は心不全の前段階として知られており、心肥大の発症機構を解明することは心不全の予防・治療に重要である。中でも、ヒストンアセチルトランスフェラーゼであるp300と心筋特異的転写因子GATA4からなるp300/GATA4経路が心筋細胞肥大反応において中心的役割を果たしていることが明らかとなってきた。我々はGATA4結合タンパク質であるProtein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) に着目し、p300/GATA4経路を介した心肥大誘導の制御機構を検討した。

【方法・結果】大腸菌で作成したGATA4全長及びp300の8つのフラグメントを用いて、PRMT5との結合をGST pull-down assayにより検討した結果、PRMT5はGATA4及びp300のaa1-450, aa1514-1922, aa1877-2160と直接結合した。続いて、GATA4及びPRMT5と結合の見られたp300の3つのフラグメントをPRMT5及びメチル基供与体であるS-adenosylmethionine (SAM) と反応させてin vitro methylation assayを行った結果、p300 aa1-450でメチル化が見られた。PRMT5によるp300のメチル化部位を明らかにするため、アルギニン残基をリジン残基に変異させたp300 mutantを作製し、同様に検討した結果、p300の200番目のアルギニン残基 (R200) がPRMT5によるメチル化部位であることが明らかになった。また、p300 aa1-450のメチル化はPRMT5特異的阻害剤であるEPZ015666により抑制された。ラット初代培養心筋細胞を $\alpha$ 1受容体刺激薬であるフェニレフリンで刺激すると心筋細胞肥大を誘導したが、EPZ015666添加によりフェニレフリンによる心筋細胞肥大が有意に抑制された。

【考察】PRMT5はp300のR200をメチル化することによりp300/GATA4経路を活性化させ、心肥大誘導に関与していることが示唆された。また、EPZ015666処理により心筋細胞肥大が抑制された。今後PRMT5阻害剤を用いた心筋細胞肥大抑制作用をより詳細に検討することで、PRMT5阻害剤が新たな心不全治療薬になることが期待される。

冷却条件下における $\alpha_1$ アドレナリン受容体を介した皮膚血管収縮応答性増強メカニズムの解析

○石田裕丈、菱沼瑛太、北山智章、齊藤真也、石川智久  
静岡県大・院・薬・薬理

(目的) 皮膚血管は体温低下時や寒冷暴露時に応答し、血流を減少させることにより体表面からの熱放散を防ぐ。皮膚血管では冷却時に細胞膜上の $\alpha_{2c}$ 受容体数の増加によって収縮力が増強することが知られているが、 $\alpha_1$ 受容体の応答性については不明である。本研究では摘出ラット尾動脈を用いて冷却刺激による収縮メカニズムを解明した。

(方法) Wistar rat の尾より、尾動脈を単離し、約2 mm幅のリング標本を作製した。標本に2本のタングステンワイヤーを通してトランスデューサーとホルダに固定し、等尺性収縮を測定した。

(結果・考察) Phenylephrine (PE) の濃度反応曲線は、37° Cに比べて24° Cでは反応の立ち上がりが低濃度側にシフトし最大収縮反応も上昇した。内皮除去処置、および大コンダクタンス $Ca^{2+}$ 活性化 $K^+$ チャネル ( $BK_{ca}$ チャネル) 阻害薬のtetraethylammonium 存在下では37° Cでの最大収縮反応は変化せずに反応の立ち上がりが低濃度側にシフトしたが、24° Cでは濃度反応曲線に変化は全くなかった。電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネル (VDCC) 阻害薬nifedipineあるいは受容体作動性 $Ca^{2+}$ チャネル (ROCC) 阻害薬SK&F96365存在下で37° C、および24° Cの濃度反応曲線を比較すると依然として24° Cの方が最大収縮反応は大きかった。しかし、Rho kinase阻害薬H-1152存在下で比較すると24° Cの方が最大収縮反応は小さかった。さらに $Ca^{2+}$ 除去0.2 mM EGTA 含有Krebs溶液でPEの累積投与を行った。37° Cでは全く収縮しなかったが、24° Cでは濃度依存性に収縮が生じ、H-1152によって大きく抑制された。以上のことから、低温条件下では $\alpha_1$ 受容体刺激に対して、内皮由来弛緩因子の放出が減弱し $BK_{ca}$ チャネルを介した収縮抑制が解除されることでPEの濃度反応曲線が左にシフトすることが示唆された。また低温条件下ではVDCC及びROCCに依存した収縮成分が減る一方で $Ca^{2+}$ 感受性亢進機構が活性化することでむしろ最大収縮反応を増強することが示唆された。

## O3-6

### ビオプテリン欠損がひきおこす不安定な高血圧・徐脈と Priapism(持続勃起症)

○一瀬(鷺見)千穂<sup>1</sup>、菅沼由唯<sup>1</sup>、狩野泰輝<sup>1</sup>、井平典子<sup>1</sup>、野村裕子<sup>2</sup>、池本和久<sup>1</sup>、畑 忠善<sup>2</sup>、加藤節子<sup>3</sup>、一瀬 宏<sup>4</sup>、近藤一直<sup>1</sup>

<sup>1</sup>藤田保衛大・医・薬理、<sup>2</sup>藤田保衛大・医療・臨床検査、<sup>3</sup>明海大・歯、<sup>4</sup>東工大・院・生命理工・

[目的] (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4) はモノアミンおよび一酸化窒素 (NO) 合成に必須のコファクターであり、セピアプテリン還元酵素 (SPR) はBH4生合成の最終段階を触媒する酵素である。SPR遺伝子ノックアウトマウス ( $Spr^{-/-}$ ) は多くが1-2ヵ月以内に死亡するため、これまでの研究は幼若マウスでの知見に限られていた。当研究室ではC57BL/6とBALB/cの雑種 (F1) が離乳以降も長期生存できることを見出し、性的成熟期以降 (4-6ヵ月齢) の $Spr^{-/-}$ マウスの循環器系機能について初めて解析を行った。

[方法]  $Spr^{-/-}$ マウス (OYC32) はLexicon Pharmaceuticals Incで作製された。マウス血圧はTail-Cuff法で測定した。プテリジン化合物はFukushima-Nixonの方法によりHPLC-蛍光検出器で、モノアミンはHPLC-電気化学検出器で測定した。血管弛緩反応はマウス胸部大動脈から2 mm長のリング標本作製し、オーガンバス中でPhenylephrine (Phe) によって前収縮を行わせ、Acetylcholine (ACh)、およびNOS阻害薬存在下でSodium Nitroprussideを累積投与しておこなった。ペントバルビタール麻酔下に心電図を記録し、heart rate variability (HRV) を測定した。

[結果]  $Spr^{-/-}$ マウスは中枢および末梢神経系と組織中のビオプテリン、モノアミンが減少しているにも関わらず、野生型マウスに比べ収縮期・拡張期とも有意に高い血圧と、徐脈を示した。 $Spr^{-/-}$ マウスの収縮期血圧の変動幅は、野生型に比較して有意に大きかった。4ヵ月齢以降、 $Spr^{-/-}$ マウスは高頻度にPriapism (持続勃起症) を示した。 $Spr^{-/-}$ マウス大動脈リング標本のPheに対する収縮反応は野生型マウスに比べて有意に増強し、AChに対する内皮依存性弛緩反応は減弱していた。HRVの解析では交感神経系入力が増大を示すLF/HFが高値であった。

[考察]  $Spr^{-/-}$ マウスでは、交感神経系の伝達物質であるノルアドレナリンが枯渇し、その代償としてシナプス前後でのsupersensitivityが生じていると考えられる。同時に血管内皮細胞ではNO産生の低下により血管の弛緩性が低下し、これらが不安定な高血圧の原因であろうと推測される。ヒトのParkinson病を含む神経疾患および脊髄損傷では反射性の血圧変動など交感神経機能の不安定性が報告されており、 $Spr^{-/-}$ マウスはこれらの疾患の自律神経症状のモデルになることが期待できる。

## O5-1

### II a型家族性高脂血症においてプラスミノゲン欠損は動脈硬化を抑制する

○<sup>1</sup>宮嶋 ちはる, <sup>1</sup>岩城 孝行, <sup>2</sup>Victoria A. Ploplis, <sup>1</sup>梅村 和夫,  
<sup>2</sup>Francis J. Castellino

<sup>1</sup>浜松医科大学 医学部 薬理学講座, <sup>2</sup>W.M. Keck Center for Transgene Research,  
Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame

家族性高脂血症は血清脂質濃度やリポ蛋白濃度の上昇パターンから5つのタイプに分類される。中でも対象患者が半数以上を占めているのが、低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体の発現異常や機能不全から総コレステロール (T-cho) 値の及びLDLコレステロール (LDL-C) の上昇が認められるII a型家族性高脂血症である。高脂血症が原因で発症する粥状動脈硬化は、虚血性心疾患や脳血管疾患など生死に関わる病態の主な原因にも関わらず症状が乏しく、粥状動脈硬化の進展や経過について明らかになっていることは少ない。当研究室ではII a型高脂血症モデルマウスであるLDL受容体およびAPOBEC1のダブルノックアウトマウス*Ldlr*<sup>-/-</sup>/*Apobec1*<sup>-/-</sup>を用いて、粥状動脈硬化に対する様々な血液凝固線溶系因子の機能を解析している。本研究では、プラスミンの前駆体として血栓溶解の中心的役割を担っている血液凝固線溶系因子プラスミノゲン (Plg) に注目し、II a型高脂血症の粥状動脈硬化形成に対するPlgの機能を解析した。樹立した*Ldlr*<sup>-/-</sup>/*Apobec1*<sup>-/-</sup>/*Plg*<sup>-/-</sup> マウスでは*Ldlr*<sup>-/-</sup>/*Apobec1*<sup>-/-</sup>マウスに比べてT-choレベルが顕著に高く、ほぼLDL領域で蓄積していることが明らかになった。そこで、動脈硬化層の形成に対するPlgの影響について検討したところ、Plg欠損マウスは*Ldlr*<sup>-/-</sup>/*Apobec1*<sup>-/-</sup>マウスに比べてT-cho及びLDL-Cが高いにも関わらず、動脈洞におけるプラークは10%程度に抑えられていた。以上の結果から、II a型家族性高脂血症モデルマウスにおいて、Plgは血中LDL-Cが動脈硬化を形成する過程に重要な役割を持つことが示唆された。粥状動脈硬化の発展機序には、マクロファージのLDL取り込みによる泡沫化が大きく関与しており、LDL受容体非存在下、マクロファージによるLDLの取り込みにはスカベンジャー受容体を介している。そこで、II a型家族性高脂血症においてPlgはマクロファージのスカベンジャー受容体の発現を制御し粥状動脈硬化の形成に関与すると推測し検討した。

## 高吸収クルクミンによりCOPD患者の動脈硬化に関連する炎症が抑制された

○船本雅文<sup>1,2</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、宮崎雄輔<sup>1,2</sup>、今泉厚<sup>4</sup>、掛谷秀昭<sup>5</sup>、山陰一<sup>2</sup>、浅原哲子<sup>2</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学大学院 薬学研究院 分子病態学講座、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部、<sup>4</sup>株式会社セラバリュース、<sup>5</sup>京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 制御分子学分野

【目的】慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、喫煙を主な原因とする肺の生活習慣病である。COPDは、肺胞隔壁の損傷を伴う炎症性疾患であり、肺における炎症が体循環により波及し、全身性炎症を引き起こす。これによって心血管疾患などの併存症を引き起こす可能性が示唆され、COPDの全身性疾患としての側面が注目されるようになった。そのため、虚血性疾患の独立した危険因子の一つとしてCOPDは考えられている。クルクミンの生理作用として抗酸化作用や抗炎症作用などが知られている。そこで本研究は、COPD患者を対象として高吸収クルクミン（セラクルミン<sup>®</sup>）、対照としてプラセボを服用して頂き二重盲無作為化比較試験を施行し、各炎症マーカーに対する効果を比較検討することが目的である。

【方法および結果】禁煙後4ヶ月以上経過した京都医療センターに通院中で、日本呼吸器学会による分類でI期～II期のCOPD患者を対象とした。担当医師による説明および同意を文書で取得した。無作為にプラセボ群とセラクルミン<sup>®</sup>群の2群に分けて、プラセボまたはセラクルミン<sup>®</sup>90mgを朝晩2回、24週間内服して頂いた。48名の患者が本試験に登録され、脱落やデータ欠損により39名の患者が解析対象となった。プラセボ群（17名、70歳）、セラクルミン<sup>®</sup>群（22名、70歳）で、年齢及び性分布に両群間の差を認めなかった。両群とも、内服前後で、BMI、体重、血圧、HbA1c、LDL-C、TG、HDL-Cには変化を認めなかった。CRPおよびSAA-LDLの%変化率は、プラセボ群とセラクルミン<sup>®</sup>群で有意な差を認めなかった。しかし、いずれのマーカーにおいてもプラセボ群では%変化率がプラス値である一方、セラクルミン<sup>®</sup>群で%変化率はマイナス値であった。さらに、動脈硬化促進性の酸化修飾LDLであるAT-LDLの%変化率はプラセボ群（ $14.8 \pm 23.8 \mu\text{g/mL}$ ）と比較して、セラクルミン<sup>®</sup>群で（ $-1.6 \pm 16.7 \mu\text{g/mL}$ ,  $p = 0.020$ ）と有意に低下した。

【考察】高吸収クルクミンは、動脈硬化促進作用を有する炎症性AT-LDLを減少させたことから、COPD患者における将来的な心血管イベントを防ぐことが期待される。

## 冠動脈疾患患者の心外膜脂肪組織中ではAngptl4発現量が増加していた

○齋藤アユミ<sup>1</sup>、刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、秋本剛秀<sup>4</sup>、植木力<sup>4</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、  
島津 章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>2</sup>、坂口元一<sup>4</sup>、森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター

<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部、<sup>4</sup>静岡県立総合病院 心臓血管外科

【目的】高齡化社会の進展に伴い、冠動脈疾患（CAD）の罹患者数は増加しており、社会的問題となっている。心外膜脂肪組織（EAT）とは冠動脈周囲に蓄積される脂肪組織であり、EATの量とCADの罹患者率は相関する。脂肪組織はアディポカインを分泌し、動脈硬化の発症に関与する。中でもAngptl4はCADと関連する可能性が高いことが、最近の研究により明らかとなった。しかしEATにおけるアディポカインの発現とCAD発症の関連性はまだ明らかにされていない。そこで本研究ではCADの発症または進展に関与すると考えられるアディポカインのEATにおける発現量を検討することを目的とした。

【方法】本研究は、静岡県立大学および静岡県立総合病院の倫理委員会の承認を得て行った。静岡県立総合病院にて開心手術を行う患者から同意を文書で得た後、手術時に剥離されたEATを採取した。EATは冠動脈バイパス手術を行った患者（CAD群）14人と、心臓弁膜手術を受けた患者（non-CAD群）22人から採取した。EATにおけるアディポカインの発現量はqRT-PCRで評価した。続いて、CAD群とnon-CAD群の間で発現量に有意差のみられた因子と臨床検査値との相関解析を行った。

【結果】EATにおけるアディポカインのmRNA発現レベルを検討した結果、non-CAD群と比較して、CAD群でAngptl4の発現が有意に増加していた（ $p = 0.036$ ）。また臨床検査項目との相関解析ではAngptl4発現量と血中インスリン値との間に有意な相関関係が見られた（ $r = 0.553$ ,  $p < 0.001$ ）。

【考察】以上の結果より、CAD患者のEATにおいてAngptl4の分泌が亢進していることが示唆された。分泌されたAngptl4は局所的に冠動脈に作用し、CADの発症や進展に寄与すると考えられる。今後、CAD発症及び進展におけるAngptl4の役割を詳細に検討することにより、CADの診断・治療経過をモニターするバイオマーカーや治療標的となることが期待される。

## 天然化合物による心臓線維化治療の探索研究

○佐藤 光<sup>1</sup>、村田騰行<sup>1</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、 島津 章<sup>2</sup>、  
長谷川浩二<sup>2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>静岡県大葉、<sup>2</sup>京都医療センター、<sup>3</sup>静岡県立総合病院、

【目的】心臓に高血圧などのストレスがかかると、代償機構として心肥大が起こるが、ストレスが持続的にかかると、さらなる心肥大と間質のコラーゲン蓄積による線維化が亢進する。これら心臓のリモデリングが進行することで最終的に心不全へと至る。近年、心不全における心臓線維化の重要性が指摘され、注目を浴びている。心臓線維化発症の分子機構の解析が進んでいるが、心臓線維化を標的とする治療薬の開発は進んでいない。そこで本研究の目的は、心臓線維化を制御する新規天然化合物の探索を行い、心臓線維化を標的とした心不全治療を開発することである。

【方法】新生仔ラットから単離した初代培養心臓線維芽細胞を用いて線維化阻害剤の探索を行った。用いた化合物は、Curcumin (Cur, 1, 3  $\mu\text{M}$ ) , Nobiletin (Cur, 0.1, 0.3  $\mu\text{M}$ ) , Auraptene (Aur, 10, 30  $\mu\text{M}$ ) , Cacao Beans Polyphenol (CBP, 1, 3  $\mu\text{M}$ ) である。これら化合物で前処理し、2時間後、線維化を誘導するAngiotensin II (Ang II, 100 nM) を添加し、トリチウム標識したL-Proline (0.5  $\mu\text{Ci}$ ) を添加、48時間のインキュベーション後、細胞を溶解・回収して、液体シンチレーションカウンターにて測定を行い、線維化の指標であるL-Proline取り込み量を検討した。

【結果】ウコンの主成分であるCurは3  $\mu\text{M}$ で、柑橘類果皮成分のNobは0.3  $\mu\text{M}$ で、八朔の抽出成分であるAurは30  $\mu\text{M}$ でAng IIによるL-Proline取り込み増加を有意に抑制し、加えてカカオ豆の抽出成分であるCBPも抑制傾向を示した。

【考察】天然化合物であるCurやNob、Aurで線維化抑制効果が示され、これら化合物が新規心臓線維化阻害剤となる可能性が示唆された。今後はこれら化合物をリードとした構造活性相関解析や、既存の心不全治療薬との併用による効果を病態モデルの動物を用いて検討することで、心臓線維化を標的とする新たな心不全治療の開発につながると考える。



## O5-5

### 心臓のNCX1に対する新規NCX阻害薬YM-244769の細胞電気生理学的特徴

○山下寛奈<sup>1)</sup>、渡邊泰秀<sup>1)</sup>、喜多紗斗美<sup>2)</sup>、岩本隆宏<sup>2)</sup>、木村純子<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>浜松医科大学医学部健康科学領域医療薬理学、<sup>2)</sup>福岡大学医学部薬理学講座、

<sup>3)</sup>福島県立医科大学医学部薬理学講座

【背景】2006年に岩本と喜多は、<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> fluorescent 法を利用してNCXを遺伝子導入した培養細胞に対してYM-244769のNCX抑制作用を検討し、YM-244769が強力な新規Na/Ca交換体抑制薬であることを報告した。しかしながら、現在までYM-244769の心臓型NCXに対する抑制作用を示す報告は見当たらない。

【方法】我々は、モルモット単離心室筋細胞に対してパッチクランプ法を用いNCX電流を採取しYM-244769の抑制効果を検討した。

【結果】YM-244769は0.01 μM付近から両方向型NCX電流を濃度依存性に抑制した。両方向型NCX電流抑制作用を示すYM-244769のIC<sub>50</sub>値は、外向き成分、内向き成分それぞれ約0.1 μM、Hi11の係数は1であった。片方向型外向きNCX電流に対しても、YM-244769は0.01 μM付近から濃度依存性に抑制作用を示した。しかしながら、片方向型内向きNCX電流に対しては10 μMの高濃度を投与しても50%程度しか抑制しなかった。細胞内Na<sup>+</sup>濃度 ([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>) を変化させてYM-244769の抑制作用を検討すると、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>が10、20、30mMと濃度が高くなると両方向型NCX電流抑制効果は増強した。片方向型内向きNCX電流に対しては、有意ではないが[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>依存性の傾向を示した。細胞内に蛋白分解酵素トリプシンを負荷しても両方向型NCX電流に対する抑制作用には変化がなかった。

【結論】YM-244769は、両方向型NCX電流と片方向型外向きNCX電流を濃度依存性に抑制した。YM-244769の片方向型外向き電流 (Ca<sup>2+</sup>流入) 抑制作用は、片方向型内向き電流 (Ca<sup>2+</sup>排出) よりも強かった。YM-244769のNCX電流抑制作用は、[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>依存性、細胞内トリプシン非感受性であった。ベンジルオキシフェニル誘導体NCX抑制薬の中で、YM-244769はKB-R7943やSN-6よりも強く、SEA0400と同等の抑制効果を示した。

## 人工知能による画像認識を用いた薬物副作用の予測

○高 夢璇<sup>1, 2</sup>, 井形 秀吉<sup>1</sup>, 佐藤 薫<sup>2, 3</sup>, 池谷 裕二<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>東京大学薬学系研究科薬品作用学教室, <sup>2</sup>iNCENS (iPSC Non-Clinical Experiments for Nervous System) プロジェクト, <sup>3</sup>国立医薬品食品衛生研究所薬理部

てんかん・けいれんは、筋肉の不随意的な収縮などを症状とし、主に脳を起源とする。けいれんが発生する原因は様々あるが、その中で、医薬品の中枢神経系（CNS）に対する副作用が一つとして挙げられる。医薬品の研究開発では、ヒトを対象とする臨床試験の前段階として、非臨床試験による安全性の確認が行われているが、この段階で医薬品のCNS副作用を予測することが困難である。一方、臨床試験以降の段階で医薬品のCNS副作用が発覚すると、患者の病状の悪化や重篤な後遺症を引き起こす可能性があり、さらに医薬品の開発中止につながると、膨大なコストを損失することになってしまう。従って、薬物開発の安全性および効率性を向上させるため、臨床段階で生じるCNS副作用をよりの確に予測できる前臨床評価法の確立が重要な課題である。そこで、私たちは64チャンネル多電極アレイ（MEA）および機械学習を組み合わせて、薬物のけいれん誘発作用をin vitroで検出するスクリーニング系を構築した。この系では、私たちがマウスの海馬急性スライスを用いて、薬物を一連の濃度で還流しながら、MEAでスライスから局所場電位（LFP）の変化を多点同時記録した。記録したLFPトレースに対して、薬物の作用によって現れた波形を全て検出し、濃度ごとに検出した波形のイメージを重ね合わせて画像化した。その後、機械学習のネットワークであるCaffeを利用し、各LFP画像からその特徴を抽出してデータに変換した。私たちはけいれん誘発作用が高い頻度で報告されている薬物と報告されていない薬物を計12種類使い、得られたデータセットに主成分分析（PCA）を行ったところ、けいれん誘発性の薬物（ピクロトキシン、テオフィリン、ジフェンヒドラミン、エノキサシン）を全てサポートベクターマシン（SVM、機械学習の一種）で区別することができた。従って、この系はけいれんを誘発する薬物を精度よく検出でき、非臨床試験の段階で医薬品のけいれん誘発作用を予測するのに有用であろう。