

O2-1

ササヘルスの細胞保護効果(1):抗癌剤の副作用に対して

○坂上宏¹、増田宣子¹、奥平准之²、勝呂まどか²、名取威徳²、大泉浩史²、大泉高明²
明海大学歯学部薬理学、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*における多様な生物作用、すなわち、抗炎症作用、抗菌作用、リグニン配糖体に特徴的な薬理作用（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、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。また、前回の大会において、抗癌剤のドキソルビシンが口腔ケラチノサイトの強く傷害することを報告した。今回、先ず、どのタイプの抗癌剤がケラチノサイト毒性を示すのかを調べ、次にSEの細胞保護効果の可能性について検討した。【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HSC-2, HSC-3, HSC-4）、3種の正常ヒト口腔間葉系細胞（歯肉線維芽細胞, 歯根膜線維芽細胞, 歯髓細胞）および2種の正常ヒト口腔上皮系細胞（HOK, HGEP）に対する9種の抗癌剤の細胞毒性、ササヘルスの保護効果について、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。細胞内微細構造は透過型電子顕微鏡で観察した。【結果】トポイソメラーゼI阻害薬（CPT, SN-38）（TS>1853, >979）、トポイソメラーゼII阻害薬（DXR, DNR）（TS=70, 55）、微小管阻害薬（DOC）（TS>2708）は、チロシンキナーゼ阻害薬（Gefitinib）（TS=4）よりも強い腫瘍選択性を示したが、間葉系細胞と比較して、上皮系正常細胞に対する毒性が、それぞれ57、81、40、38、1140倍強かった。DXR傷害により剥離した上皮系細胞傷害は、アポトーシスを示した。ササヘルスは、DXR処理上皮系細胞の生存率を10~20%増加させた。【考察】DXRに限らず多くの抗癌剤が上皮系細胞に対して強い傷害活性を示すことが明らかになった。この現象が培養条件の違いに因るのか（ヒト口腔上皮系細胞の培養には、増殖因子が添加された特殊な培地を用いている）、何故、間葉系細胞に比べて上皮系細胞が抗癌剤に対して高い感受性を示すのか、ササヘルスの保護作用がどの抗癌剤に対して最も強く発現するのか、につき検討する予定である。

O2-2

SUBSTRATE SELECTIVITY OF A L-TYPE AMINO ACID TRANSPORTER 3 LAT3

○Promsk Jutabha¹, Toru Oba², Rino Iwakami², Kota Miyata², Keitaro Hayashi¹, Tomoe Fujita¹ and Naohiko Anzai^{1,3}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan, ²Department of Material and Environmental Chemistry, Graduate School of Engineering, Utsunomiya University, Utsunomiya,

LAT (L-type amino acid transporter) family proteins are Na⁺-independent neutral amino acid transporters and mediate the transport of neutral amino acids such as L-leucine, L-isoleucine, and L-valine. It has been demonstrated that LAT1 and LAT3 express in a variety of cancers and play crucial roles in their cell growth, and both transporters have been recognized as promising targets for cancer therapies. LAT1 specific inhibitors such as JPH203 have been developed to show anti-proliferative activity. Boron neutron capture therapy (BNCT) is based on boron retention in the target cells given by LAT1-mediated uptake of 4-borono-L-phenylalanine (4-BPA). LAT3 has, however, been little studied as the target. We screened a library composed of boron-containing compounds. [¹⁴C]-leucine uptake was measured in the presence of 5 mM samples using *Xenopus* oocytes expressing LAT3. We found that the leucine uptake was inhibited by α -terpineol, citronellol, potassium butyltrifluoroborate, and 5-butoxy-2-fluorophenylboronic acid. These results suggest the binding affinity of (branched) butyl chain for LAT3. QSAR of LAT3 will also be discussed.

O2-3

ノビレチン高含有シークワーサーエキスの排尿機能改善作用

○伊藤 由彦¹、尾上 誠良¹、禹 濟泰²、照屋 勇人²、照屋 敏明³、山田 静雄⁴

¹静岡県大・薬・薬物動態、²(株)沖縄リサーチセンター、³琉球大・教育、⁴静岡県大院・薬・薬食研究推進センター

シークワーサー (*Citrus depressa*) は、その果皮にnobiletinやtangeretinなどの polymethoxyflavonoidを多く含むことを特徴とする。一方、排尿障害はQOLを著しく低下させる疾患であり、その患者数は高齢化に伴い増加の一途を辿っており、その対策は喫緊の課題である。そこでnobiletinを多く含むシークワーサーエキス (SE) が、排尿障害に応用できるのではないかと考え研究を行った。

まず、現在使用されている排尿障害治療薬のターゲットである下部尿路受容体に着目し、SE (0.001—0.3 mg/mL) の結合活性を評価した。その結果、SEは^[3H]NMS (ムスカリン性受容体) および^[3H]Pirenzepine (ムスカリン性受容体サブタイプM1受容体) の特異的結合を抑制した。またSEに含まれる各成分においても同様に評価を行い、受容体に作用する活性本体を精査したところ、nobiletinにおいて最も低濃度で^[3H]NMSおよび^[3H]Pirenzepineの特異的結合を抑制することが確認された。

次いでSEが排尿機能を改善するかどうかを確認するために、単回経口投与によるラット排尿機能への作用を検討した。排尿障害モデルラットとして酢酸誘発頻尿モデルラットおよびcyclophosphamide (CYP) の投与により膀胱炎を誘発したCYP誘発膀胱炎モデルラットを用いて検討を行った。シストメトリー法によりSE (50 mg/kg) 単回経口投与前後の膀胱内圧および排尿量を経時的に記録した。その結果、SEの投与によりラットの排尿間隔および1回排尿量は酢酸誘発頻尿モデルでそれぞれ38%、16%、CYP誘発膀胱炎モデルでそれぞれ29%、19%有意に増加した。

さらにSEの反復投与が排尿機能へ与える作用を検討するため、高血糖により頻尿状態を呈するstreptozotocin誘発糖尿病モデルラットにSE (50 mg/kg) を4週間反復経口投与し、ラットの活動期 (暗期) における排尿行動を観察・測定した。その結果、SE投与群はvehicle群と比較して排尿回数が20%有意に減少し、1回排尿量は46%有意に増加した。以上よりSEは、排尿障害モデルラットの1回排尿量を増加させ膀胱機能の改善に寄与することが考えられた。またその活性本体の一つとしてnobiletinが示唆され、その作用の一部はムスカリン性受容体を介していると考えられた。

O2-4

ガストリン放出ペプチドは、マウスにおけるアレルギー性鼻炎の成立に関与する

○松本 祐磨¹ 木村 徹² 櫻井 裕之²

¹杏林大学医学部耳鼻咽喉科教室 ²杏林大学医学部薬理学教室

【背景】神経ペプチドの一つであるGastrin Releasing Peptide (GRP) は脊髄後角における痒みの伝達に関与することが報告されており、アトピー性皮膚炎や気管支喘息においてその役割が研究されているが、アレルギー性鼻炎 (AR) においてはBaraniukらによる肥厚性鼻炎患者の鼻粘膜におけるGRPやGRP受容体 (GRPR) の局在について示した報告のみで、同疾患を含む I 型アレルギーとの関連については未だ検討されていない。

【対象と方法】ARの感作過程におけるGRPやGRPRの発現変化を確認する目的で、BALB/c 雌マウスに4種類の処置を施した。A群はコントロールとしてPBSの腹腔内注射に続けてPBSの点鼻を2週間、B群では全身感作のみとして卵白アルブミン (OVA) の腹腔内注射に続けてPBSの点鼻を2週間、C群では軽症ARモデルとしてOVAの腹腔内注射に続けてOVA及びPBSの点鼻を各1週間ずつ、D群では重症ARモデルとしてOVAの腹腔内注射に続けてOVAの点鼻を2週間行った。処置開始日より34日目にOVAによる抗原誘発を行い、くしゃみと鼻掻き回数を計測し、同 35日目に鼻粘膜を採取し、GRP及びGRPRの発現量とその局在をウエスタンブロット (WB) と蛍光免疫染色 (IHC) にて検討を行った。さらに重症ARモデルマウスにGRPR拮抗薬を投与して、その効果を観察した。

【結果】GRPは鼻粘膜上皮や鼻腺周囲に、GRPRは粘膜下腺や鼻粘膜上皮に局在した。GRP及びGRPRは全身感作のみでは鼻粘膜での発現に変化がないが、鼻粘膜のアレルギー炎症が成立すると共に鼻粘膜において発現量の増加を認めた。このGRPRの発現増加の少なくとも一部は鼻粘膜へのマスト細胞の浸潤によるものと考えられた。GRPR拮抗薬はARモデルマウスの鼻症状の改善を認めた。

【考察】鼻粘膜のGRPやGRPRは、鼻粘膜からの分泌増加とマスト細胞への刺激という少なくとも2方面からアレルギー炎症に関与し、GRPR 拮抗薬がARの新規治療薬となり得る可能性が示唆された。

炎症応答におけるJNK活性の可視化

○山口 君空、富田 太一郎、伊藤 雅方、村上 慎吾、三上 義礼、赤羽 悟美
東邦大学 医学部 生理学講座 統合生理学分野

ストレス応答MAPキナーゼ (MAPK) 経路はストレスやサイトカインの刺激を受けた細胞内で活性化されるキナーゼであり、刺激の情報はMAP3K、MAP2K、MAPKの各キナーゼを介するリン酸化シグナルによって下流へと伝えられる。JNK (c-jun N-terminal kinase) は代表的なストレス応答MAPK分子の1つであり、細胞死や細胞分化、遺伝子発現の制御を介して生体の恒常性を担う。JNK経路の異常は異常免疫やがん、神経疾患などとも関連する。近年、JNK活性化の強さや持続時間の違いによって引き起こされる細胞応答が異なることが明らかにされつつあるが、一方で、JNKの活性化動態およびその制御機構についての詳細は明らかでない。そこで本研究は、生きた細胞内におけるJNK活性のリアルタイムイメージングを行うことによりJNK活性の動態を観察し、その制御メカニズムと生理的意義の解明を目的とした。

我々は、新規にJNK FRETプローブを作成し、JNK活性のリアルタイムイメージングを試みた。その結果、HeLa細胞において炎症性サイトカインのIL-1 β 30ng/mlを用いて刺激をしながら10時間にわたりイメージングしたところ、刺激依存的に生じるJNK活性を1細胞レベルで定量することに成功した。このとき、IL-1 β を持続的に作用させているにも関わらず、JNKの活性化は一過性であった。また、繰り返し短時間のIL-1 β 刺激を行った場合、刺激後、一定時間は次の刺激に応答しない時間があることがわかった。生化学的にタンパク質の発現を調べたところ、JNKの活性化が抑制されるタイミングにおいて、JNKを不活性化させるホスファターゼのMKP-1が一過性に発現していた。これらの結果から、JNK動態はMKP-1による制御を受けている可能性が考えられる。

蜂蜜の鎮咳作用およびオピオイド様活性に関する研究

○窪田佑紀¹、植竹沙織¹、堀田瑞希¹、堀江一郎¹、谷 央子²、上園保仁³、
磯濱洋一郎¹

¹東京理科大学 薬学部 応用薬理学研究室、²山田養蜂場みつばち健康科学研究所、³国立がんセンター研究所

【背景・目的】蜂蜜は単糖類、ビタミンおよびミネラルなどを豊富に含む高栄養価の食品としてだけでなく、咳や咽頭痛などの上気道症状の緩和のために古くから民間療法としても使用されている。我々は、蜂蜜の鎮咳作用を実験薬理的に検証してきたが、少なくともモルモットを用いた動物実験で、dextromethorphan (DM) に匹敵する効果があることを示してきた。しかし、蜂蜜による鎮咳作用の機序や薬理学的特性、また含有する鎮咳活性成分等については十分に解明できておらず、今回はこれらを明らかにすることを目的とした。

【方法】Hartley系雄性モルモット（5～6週齢）に蜂蜜あるいは陽性対照薬のDMを経口ゾルデにて胃内投与した。その30分後に、クエン酸を5分間吸入させて咳を誘発し、プレスコモグラフ法により30分間に生じた咳の回数を測定した。また、オピオイド活性を評価した *in vitro* の実験では、 μ -opioid受容体を安定発現させたHEK293細胞（MOR細胞）を標本とし、細胞内cAMP量の変化を測定した。

【結果・考察】アカシア蜂蜜は投与量（0.1-1 g/kg）依存的に咳の回数を減少させ、1 g/kgではコントロールの約50%まで抑制し、DM（100 mg/kg）に匹敵する鎮咳作用を示した。本作用は蜂蜜の蜜源植物に依存せずアカシア、ソバおよびオレンジ由来など、今回調べた全ての蜂蜜で認められた。また、蜂蜜を疎水クロマトを用いて分画すると、鎮咳作用はフルクトースなどの糖質を含む水溶出分画には認められず、比較的疎水性のアセトン溶出分画に存在した。さらに細かく分画した結果、比活性は蜂蜜そのものの約35万倍と極めて活性の高い分画を得ることができた。興味深いことに、本分画による鎮咳作用はopioid受容体阻害薬naloxone（0.3 mg/kg）の前投与により一部抑制された。またMOR細胞を用いた *in vitro* の実験でも、蜂蜜（アセトン溶出分画）はforskolinで惹起した細胞内cAMPの増加を著明に抑制し、endomorphinと類似の作用を示した。これらの成績から、蜂蜜には μ オピオイド受容体に作用する物質が含まれており少なくとも一部、本物質の作用を介して鎮咳作用をもつと推定された。今後、オピオイド様物質の同定に向けて検討を進める予定である。

Riluzoleはラットの恐怖記憶消去学習を促進するが再固定化は阻害する

○赤木希衣^{1, 2}、山田美佐¹、斎藤顕宜¹、岡淳一郎²、山田光彦¹

¹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 ²東京理科大学 薬学部 薬理学研究室

【背景・目的】恐怖記憶は、固定化された後、想起されることで再び不安定となり再固定化される。しかし、安全な状況で想起されると消去学習が同時に成立し、恐怖記憶は減弱する。これまでに我々は、グルタミン酸神経に作用するRiluzoleが消去学習を促進することを報告している。しかし、再固定化に対する影響については結論が得られていない。そこで本研究では、再曝露時間を区別した文脈的恐怖条件付け試験を用い、消去学習及び再固定化への影響を検討することを試みた。また再曝露後に試験薬を投与することで、Riluzoleが持つ抗不安様作用及び認知記憶向上作用の影響を除外した。

【方法】動物は雄性Wistar/STラット（条件付け時8週齢）を用いた。装置は床に電気グリッドを設置したチャンバーを使用した。文脈的恐怖条件付け試験の1日目に、チャンバーで電気刺激（0.4 mA、1秒間、40秒間隔を3回）を与え条件付けを行った。2日目に、チャンバーへ10分間（消去学習実験）または3分間（再固定化実験）再曝露し、直後に試験薬を皮下投与した。3日目あるいは28日目の評価日に、チャンバーへ再曝露しすみ行動を10分間観察した。

【結果・考察】消去学習実験では、3日目の評価日にRiluzole（3 mg/kg, s.c.）群のすみ行動は減弱し、Riluzoleは恐怖記憶の消去学習を促進した。また28日目には、対照群と同等のすみ行動が見られたことから、恐怖記憶が自発的に回復したことが明らかとなった。一方、再固定化実験においても、Riluzole群のすみ行動は3日目に減弱しており、Riluzoleが恐怖記憶の再固定化を阻害した可能性が考えられた。興味深いことに、28日目には、消去学習実験の結果と異なり、恐怖記憶の自発的回復は制限されていた。この結果は、Riluzoleがラットにおいて恐怖記憶の再固定化を阻害した可能性をさらに強く示唆するものである。

【結論】先行研究では、消去学習を促進する薬物は再固定化も促進するとされており、相反する作用を併せ持つ薬物は報告されていない。しかし本研究により、Riluzoleはラットの恐怖記憶消去学習を促進するが、再固定化は阻害することが明らかとなった。

嗅球摘出ラットの内側前頭前野及び海馬における グルタミン酸及び GABA含有量の変化について

○早田暁伸^{1, 2}、斎藤顕宜¹、後藤玲央¹、鈴木聡史^{1, 2}、岡淳一郎²、山田光彦¹

¹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 ²東京理科大学 薬学部 薬理学研究室

【目的】嗅球摘出 (Olfactory bulbectomy; OB) ラットは、うつ・不安障害のモデル動物として知られている。これまでに当研究部では、OBラットの情動過多反応の発現に、内側前頭前野 (mPFC) におけるグルタミン酸神経伝達の亢進が関与することを示唆してきた。そこで本研究では、情動行動発現に重要な役割を果たすことが示唆されているmPFCと海馬領域に注目し、グルタミン酸及びGABA含有量に及ぼすOBの影響について検討した。

【方法】実験には、雄性 Wistar/ST rat (7~8週齢) を用いた。麻酔下で嗅球摘出術を行い、術後は暗所で隔離飼育を行った。隔離飼育開始2及び4週間後にラットの脳を分画した。分画した脳部位は、mPFCにおける前辺縁皮質領域 (PL-mPFC) 及び下辺縁皮質領域 (IL-mPFC)、前帯状皮質 (ACC)、背側海馬 (DHp)、腹側海馬 (VHp) とした。アミノ酸含量の測定には、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いた。

【結果】術後2週間の隔離飼育後では、偽手術群と比べ、OBラット群のいずれの脳部位においてもグルタミン酸、GABA含有量及びグルタミン酸/GABA比に変化がなかった。術後4週間の隔離飼育後では、偽手術群と比べ、OBラット群のIL-mPFC、ACC、DHpにおいてグルタミン含有量が有意に減少していた。また、全ての脳部位においてGABA含有量が有意に減少し、グルタミン酸/GABA比は有意に上昇していた。

【考察】術後2週間の隔離飼育後のOBラットでは、グルタミン酸及びGABA神経系に変化がないことが示唆された。一方で、術後4週間隔離飼育したOBラットでは、グルタミン酸及びGABA神経系の機能変化が認められ、相対的にグルタミン酸神経系が優位となっている可能性が示唆された。

運動による除痛効果における脳内報酬ドパミン系ネットワークの役割 ～Gi-DREADDによる特異的神経活動抑制を利用した研究～

○若泉謙太^{1,2}、近藤貴茂¹、成田道子¹、濱田祐輔¹、成田浩気¹、渡邊萌¹、
葛巻直子¹、森崎浩²、成田年^{1,2,3}

¹星薬科大学 薬理学教室、²慶應義塾大学医学部 麻酔学教室、³先端生命科学研究センター (L-StaR)

【背景】運動療法は慢性痛治療戦略の主軸の一つであるが、中枢神経系の機序に関するエビデンスはまだ不十分である。一方で、運動によりドパミン神経を中心とした脳内報酬系が活性化することが知られており、そのような脳内報酬系の機能向上は、痛みの閾値に影響を与える可能性が提唱されている。そこで本研究では、遺伝子改変動物を使用したケミカルジェネティクス手法により、トレッドミル運動による除痛効果に対する影響を検討した。

【方法】坐骨神経の結紮による神経障害性疼痛モデルマウスにトレッドミル運動をさせ、疼痛閾値が改善するプロトコールを作成した。次に、DAT-Creトランスジェニックマウスの腹側被蓋野 (VTA) にあるドパミントランスポーター (DAT) 陽性細胞に遺伝子改変型人工的抑制性GPCRであるhM4Diを特異的に発現させた。また、NeuRetウイルスによる逆行性感染を利用してVTAから側坐核へ投射する神経に特異的にhM4Diを発現させたマウスを用意した。それぞれ、hM4Diによる神経活動抑制下に運動を行い、疼痛閾値の変動を測定した。

【結果】VTAドパミン神経の活動抑制により運動の除痛効果が減弱した。また、VTAから側坐核に投射する神経の活動を抑制することでも、除痛効果が減弱した。

【結論】神経障害性疼痛モデルマウスに対するトレッドミル運動による除痛効果発現には、VTAから側坐核へ投射するドパミン神経の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

中枢神経系における抗ドーパ抗体を用いた免疫組織化学的検討

増川太輝、○ジョンソン実歌、古賀資和、中村史雄、五嶋良郎

横浜市立大学 分子薬理神経生物学教室

ドーパは現在でも最も多く使用されているパーキンソン病の治療薬である。ドーパの薬理作用はドパミンへの変換を介して発現し、ドーパ自体には活性がないものと考えられてきた。我々はドーパ含有神経の存在、ドーパの神経伝達物質様遊離、さらには延髄弧束核領域（NTS）に微量注入したドーパが血圧下降および徐脈応答を示すこと等を明らかにし、ドーパ神経伝達物質仮説を提起した。しかしながら、ドーパを含有するシナプス小胞の存在の有無については未だに明らかとなっていない。本研究では、使用可能なドーパに対する抗体の特異性を検証し、脳内におけるドーパの局在性を免疫組織科学的に検討した。まず、抗体の特異性をドットブロット法により検討したところ、ドーパ抗体はチロシン、ドパミン、アドレナリンを全く認識せずに、ドーパにおいてのみシグナルが観察された。また、シグナルはドパミンの抗体吸収試験によって影響されず、ドーパによってのみ阻害された。この抗体を用いてドーパの局在を免疫染色により検討した。その結果、ドーパ陽性シグナルは黒質および線条体に局在していた。また、ドーパ陽性細胞はNTS 領域においても認められた。また、ドットブロット法における場合と同様、組織切片における同シグナルはドパミンの抗体吸収試験によって影響されず、ドーパによってのみ阻害された。これらの結果は、この抗ドーパ抗体がドーパを特異的に認識することを示す。現在、我々は、チロシンヒドロキシラーゼ阻害剤の α -methyl-p-tyrosine のドーパ陽性シグナルに及ぼす効果について検討中である。

運動皮質梗塞ラットの運動機能回復と神経新生を促がす運動負荷法の検討

○森下紗帆^{1,2}、外村和也¹、縣信秀³、吉川輝⁴、梅村和夫¹、筒井祥博³、熊田竜郎³

¹浜松医大・医・薬理、²常葉大・健プロ、³常葉大・保健医療、⁴昭和大・医・生理

【背景・目的】近年、成体の脳は潜在的な可塑的能力を有することが見出され、脳障害後にはその能力を顕在化させ、かつ長期的に引き出していくような治療法の開発が重要である。脳梗塞後の運動療法は運動機能の回復に効果的であるが、脳内の可塑的能力に及ぼす影響については未だ不明点が多い。本研究では運動皮質梗塞モデルラットを用い、運動機能の回復度合いと神経可塑性、特に神経新生の能力に影響を与える運動負荷法を調べた。

【方法】8週齢の雄ラットに対して光増感剤であるローズベンガルを静脈内投与した後、緑色光を頭頂部から照射し局所脳梗塞を誘導するPIT法にて、運動皮質に梗塞巣をもつモデル動物を作製した。そのモデル動物に運動強度の異なるトレッドミル走、回転車を設置するケージ内で飼育し自発運動を促す運動、または両者を組み合わせた運動負荷を4週間課した。運動機能は、漸増加速する回転ローラー上の滞在時間を計測するロータロッド試験と細い角材上を歩かせ踏み外す回数を数えるビームウォーク試験を1週間毎に評価した。脳梗塞後の神経新生について調べるため、分裂細胞を標識するBrdUを腹腔内に術後1週間（1回/日）連続投与し、術後4週後に免疫組織化学的にBrdU陽性細胞の分布と同定を行った。

【結果・考察】運動の種類によらず、運動群は術後1週目より運動機能の回復が促進する傾向がみられ、時間経過とともにその差が顕著になった。一方、非運動群は一時的に運動機能が回復する様子が見られるものの、回復の程度は運動群に比べ小さかった。脳梗塞後1週間で新生したBrdU陽性細胞は脳梗塞群の脳梗塞巣周辺、脳室周辺、表層に観察され、非運動群に比べて運動群ではその数が多い傾向があった。BrdU陽性細胞の一部は、未熟な神経細胞のマーカであるDCXと共局在し、脳梗塞後1週間で新生した細胞が神経細胞へと分化している可能性が示唆された。今後、各運動と両陽性細胞の関係性について検証し、その効果を向上する薬物治療の可能性についてアプローチしていきたい。

O4-6

背側縫線核におけるムスカリン受容体を介したGABA作動性シナプスの調節

○齋藤文仁、鈴木秀典

日本医科大学 薬理学

脳内の殆ど全てのセロトニン細胞は脳幹正中部の縫線核群に存在し、とくに中脳の背側縫線核 (DRN) は前脳領域へ神経投射しており高次機能を制御していると考えられる。DRNにはセロトニン細胞以外にもドパミン作動性、グルタミン酸作動性およびGABA作動性ニューロンなどを含んでいる。とくにDRNにおける抑制性GABAシナプスはセロトニン作動性ニューロンの興奮性制御に関与しており、社会的行動の獲得に重要とされている。しかし、このGABAシナプス制御の様式はまだ不明な点も多い。本研究は外来性のムスカリン投与あるいは内因性のアセチルコリン動員によるDRN-GABA作動性シナプス修飾作用について5-7週齢マウスを用いて電気生理学実験を行った。DRNセロトニン神経細胞において、電気刺激により誘発された抑制性シナプス後電流 (IPSC) の振幅は、ムスカリンあるいはカルバコールの灌流投与により用量依存的、可逆的に抑制された。この反応はM₂受容体 (M₂-AChR) アンタゴニストであるAFDX-116により強く抑えられたことからシナプス前終末のM₂-AChRの活性化を介していたことがわかった。次に、内因性アセチルコリンの関与を調べるため、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬エゼリンを灌流投与するとゆっくりとしたIPSC振幅の抑制を認めた。また、脚橋被蓋核におけるコリン作動性神経はDRNに投射していることが知られている。DRN-GABA作動性シナプス電流は脚橋被蓋核のコンディショニング刺激で有意に振幅が抑制され、この効果はM₂-AChRアンタゴニストで消失したことから、脚橋被蓋核コリン作動性神経は背側縫線核セロトニン神経細胞におけるGABAシナプス制御に関わっていることが明らかとなった。先行研究により脚橋被蓋核のコリン作動性神経はセロトニン神経細胞に発現するニコチン性アセチルコリン受容体を介して興奮性シナプス応答を有することが示されている。よって、本研究で見いだされたGABAシナプス抑制作用は協同的に働いて、セロトニン神経細胞に作用して、脳内セロトニン放出を促す役割を担っていることが示唆された。

てんかん発作は母体免疫活性により悪化しない

○安藤めぐみ、小山隆太、池谷裕二

東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室

てんかんは自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder, ASD) の重要な合併症である。臨床研究から、ASD患者におけるてんかん有病率は30%と推定されている。ASDとてんかんの細胞分子生物学的関連を明らかにするためには、適切な動物モデルが必要となる。本研究では、母体感染モデル動物であるpoly (I:C) モデルマウスにおいて、てんかん発作の重症度が上昇する可能性を検証した。妊娠中の母体感染は産まれてくる子におけるASD発症の危険因子である。また、成体期のpoly (I:C) モデルマウスにおいて、社会性の障害を含むASD様症状が確認されている。小児期 (15日齢) または青年期 (30日齢) のマウスにカイニン酸を投与し、てんかん発作を誘導したところ、poly (I:C) モデル群とコントロール群の間で発作の重症度に差は確認されなかった。てんかん発作の発症には、脳内の興奮性と抑制性シグナルのバランスが関与している。そこで、小児期のマウスの海馬を免疫組織化学染色し、海馬の亜領域における興奮性および抑制性シナプスの密度を比較することで構造的な興奮抑制バランスを評価した。すると、poly (I:C) 群において、海馬CA1野の抑制性シナプス密度が増加したものの、他の亜領域のシナプス密度に有意な変化は確認されなかった。以上の結果から、カイニン酸により誘起したてんかん発作の重症度はpoly (I:C) モデルマウスでは増加しないこと、そして、海馬におけるシナプス密度の興奮抑制バランスは大きく変化しないことが明らかとなった。

O6-1

高食塩食による肥満を伴う2型糖尿病モデルWBN/Kob-*Lepr^{fa}*ラット に対する糖尿病発症への影響

○高木善市、杉本太一、小林郁美、白井明志、浅井史敏

麻布大 獣医・薬理

高血圧は肥満および糖尿病と重積する頻度が高いことが知られている。食事性の食塩を過剰摂取することが高血圧を引き起こすことが指摘されているものの、糖尿病における食塩過剰摂取の影響については不明な点が多い。我々は先の研究において、肥満を伴う2型糖尿病モデルのWBN/Kob-*Lepr^{fa}* (WBKDF) ラットが高食塩食負荷により、著しい食塩感受性高血圧を発症することを見出した。本研究では、WBKDFラットの2型糖尿病発症に対する高食塩食による影響を糖の吸収、代謝および排泄について検討した。6週齢の雄性WBKDFラット (N=16) を2群に分け、13週齢まで標準食 (0.26% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl) で飼育した。実験期間中、摂餌量、体重および非麻酔下で尾部カフ法による血圧の測定およびメタボリックケージによる24時間尿の採取を実施した。実験終了時に静脈内糖負荷試験を行うとともに、血液、尿の生化学解析および病理組織学解析を行った。標準食群と比較し、高食塩食群では摂餌量が有意に減少し ($P < 0.05$)、それに伴う体重および内臓脂肪重量の有意な低下がみられた ($P < 0.01$)。実験期間中、標準食群では収縮期血圧 (SBP) に有意な変化はみられなかったが、著しい血糖値の上昇がみられた (137.6 ± 7.3 mg/dl \rightarrow 344.8 ± 44.2 mg/dl)。一方、高食塩食群ではSBPの著しい上昇 (125.4 ± 4.1 mmHg \rightarrow 192.0 ± 8.2 mmHg) が観察されたのに対し、血糖値の有意な上昇はみられなかった。標準食群では血糖値上昇に伴い顕著な尿糖がみられたのに対し、高食塩食群では実験期間を通して尿糖はみられなかった。標準食群と比較し、高食塩食群ではインスリン分泌能に変化はみられなかったが、耐糖能およびインスリン抵抗性の著しい改善が認められた ($P < 0.05$)。標準食群と比較し、高食塩食群では肝重量は著しく減少し ($P < 0.01$)、肝組織においてグリコーゲン沈着の増加および脂肪滴の減少が認められた。高食塩食を負荷したWBKDFラットでは高血糖の発症が抑制されることが明らかとなった。高血糖発症の抑制機序として、過食の減弱による肥満の改善およびインスリン抵抗性の改善による可能性が示唆された。

膵β細胞機能に対する柑橘果皮成分ノビレチンの作用解析

○秋山季理子、金子雪子、瀧井美樹、青柳有紀、石川智久

静岡県立大学 薬学部 薬理学教室

【背景・目的】ノビレチン (NOB) は、柑橘果皮に含まれるフラボノイドであり、抗糖尿病効果を有する天然物由来の機能性成分として注目を集めている。しかしながら、膵β細胞を標的とした直接的な作用について検証されておらず、その効果は不明である。そこで、我々は、NOBの膵β細胞機能に対する作用とそのメカニズムについて解析した。

【方法】膵β細胞株であるINS-1細胞を用い、NOB含有溶液下におけるインスリン分泌や細胞内cAMP濃度変化を測定した。さらに、β細胞死に対するNOBの作用についてAnnexinV/PI染色により解析を行った。また、アポトーシス関連分子の発現をウェスタンブロッティング法により解析した。

【結果及び考察】10および100 μM NOBは11.1 mMグルコース誘発インスリン分泌を有意に増大した。一方で、2.8 mMグルコース存在下では、インスリン分泌の促進反応は認められなかった。次に、β細胞死に対するNOBの影響について検討した結果、thapsigargin誘発β細胞死に対し、10 μM NOBは有意に抑制作用を示した。また、10 μM NOBは細胞内cAMP量を有意に増大させた。さらに、NOBによるインスリン分泌促進反応はEpac阻害薬で抑制され、β細胞死抑制作用はPKA阻害薬により消失した。以上の結果から、NOBによるインスリン分泌促進作用、β細胞死抑制作用には細胞内cAMP上昇に続くEpacあるいはPKAを介した経路が関与していることが示唆された。さらに、thapsigargin誘発cleaved caspase-3の発現増大およびc-jun terminal kinase (JNK) のリン酸化は10 μM NOB処置により抑制された。一方、小胞体ストレスタンパク質CHOPの発現増大はNOB処置によっても変化しなかった。したがって、NOBはJNK依存的な小胞体ストレスを軽減することで、膵β細胞死を抑制することが明らかとなった。本研究により、NOBによるβ細胞保護、インスリン分泌促進作用を介した糖尿病発症予防効果の可能性が示唆された。

膵β細胞におけるI型ジアシルグリセロールキナーゼの機能抑制は細胞内Ca²⁺濃度に対して二面性を示す

○澤谷俊明、金子雪子、石川智久

静岡県立大学大学院 薬学研究院 薬理学教室

【目的】2型糖尿病におけるインスリン分泌不全に対する細胞内ジアシルグリセロール(DAG)の過剰な蓄積の関与が示唆されていることから、DAG量の調節はβ細胞機能維持に重要である。これまでに我々は、DAGの主要な代謝酵素であるDAGキナーゼ(DGK)の中で、type I DGKであるDGKαとγがβ細胞に高発現し、これらの機能低下によるDAGの過剰蓄積がインスリン分泌を低下させることを示している。一方、β細胞においてDAGはプロテインキナーゼCを介してインスリン分泌を促進することも知られており、DAGはインスリン分泌に対し二面的な作用を示すと考えられる。本研究では、インスリン分泌反応と相関する細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)に着目し、膵β細胞におけるtype I DGK機能低下がもたらすDAGの蓄積が[Ca²⁺]_i変化に及ぼす影響と、そのメカニズムについて検討する。【方法】膵β細胞株MIN6細胞において、type I DGK阻害薬R59949および膜透過性DAGアナログDiC8を用いて[Ca²⁺]_i測定およびパッチクランプ法による全細胞電流測定を行った。また、自然発症型2型糖尿病モデルNSYマウスに高脂肪食を12週間給餌したマウスの膵島を単離し、type I DGK mRNAの発現量を定量した。【結果・考察】NSYマウスから単離した膵島において、type I DGKの発現低下が認められたことから、2型糖尿病病態下では、type I DGKの機能低下によりβ細胞内でDAGが蓄積することが示唆された。また、MIN6細胞において、R59949(10 μM)およびDiC8(100 μM)処置により、グルコース誘発[Ca²⁺]_i上昇反応および電位依存性Ca²⁺チャネル(VDCC)電流の抑制が認められたことから、細胞内に蓄積したDAGによりVDCCが抑制され、[Ca²⁺]_iが低下することが示唆された。一方で、R59949(1 μM)およびDiC8(10 μM)処置では、高濃度グルコースによる[Ca²⁺]_iオシレーションは逆に増強された。以上の結果から、type I DGK機能低下により蓄積した細胞内DAGは、蓄積の程度により[Ca²⁺]_iを二面性に制御することが示唆された。すなわち、2型糖尿病の進行の程度により、DAGを介したインスリン分泌反応が大きく変化する可能性が示された。

O6-4

オルガネラ内腔Ca²⁺インジケーターおよびCa²⁺インジケーター発現マウスを用いたβ細胞Ca²⁺シグナル解析

○金丸和典¹、太向勇²、北島奈美¹、関谷敬¹、飯野正光^{1,2}

東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学¹、
日本大学 医学部 細胞分子薬理学²

膵β細胞からのインスリン分泌は血中グルコース濃度調節に極めて重要であり、Ca²⁺シグナルを含む細胞内情報伝達機構がその制御を行う。インスリン分泌を惹起するCa²⁺シグナルの形成には、主要経路として知られている脱分極依存性のCa²⁺流入に加えて、小胞体およびミトコンドリアの寄与が考えられているが、既存のCa²⁺インジケーターでこれを解析することは困難であるため、詳細は明らかでない。また、β細胞のCa²⁺シグナル解析は培養β細胞株や単離ランゲルハンス島を用いることがほとんどであり、血流や神経支配が存在する生体内におけるβ細胞のCa²⁺シグナルは明らかにされていない。本研究ではこれらを解明するため、当研究室で開発したオルガネラCa²⁺インジケーター群CEPIAを培養β細胞および単離ランゲルハンス島に適用し、また、β細胞特異的に細胞質Ca²⁺インジケーターYC-Nano50を発現する遺伝子改変マウスを作製することにより、培養細胞 (in vitro) /単離ランゲルハンス島 (ex vivo) /マウス生体内 (in vivo) それぞれの標本におけるβ細胞におけるCa²⁺イメージング解析を試みた。その結果、in vitroおよびex vivoイメージングでは、細胞質の周期的Ca²⁺濃度上昇であるCa²⁺オシレーションに伴う小胞体とミトコンドリア内腔のCa²⁺シグナルを可視化することに成功した。また、in vivoイメージングでは、麻酔下のマウス生体内のβ細胞が同一のランゲルハンス島内で同期した自発的Ca²⁺オシレーションを示す様子を可視化することに成功した。これらの手法による今後の解析は、インスリン分泌メカニズムの解明ならびにその破綻としての糖尿病の理解に繋がることが期待される。

カフェインによる肝星細胞活性化に対する抑制作用およびその作用機序

○山口桃生、西山良太、齊藤真也、石川智久

静岡県立大学・薬学部・薬理学教室

肝星細胞 (Hepatic stellate cell; HSC) は、類洞細胞の1つである。生理的条件下では星状の細胞突起を持ち、細胞内にビタミンAを含む油滴を有している。一方で、肝臓の炎症時に種々のサイトカインによってHSCが活性化すると、筋線維芽細胞様の形態を呈し、コラーゲンを産生するため、活性型のHSCは肝線維症の原因となる。疫学的には、caffeineの摂取によって肝線維症発症リスクが低下することが知られているが、そのメカニズムは不明である。そこで我々はマウスより単離したHSCを初代培養し、その活性化に対するcaffeineの作用およびその機序を検討した。HSCは可塑性プレート上に血清存在下で培養することで活性化される。Caffeineは濃度依存的に活性化を抑制し10 mMでほぼ最大であった。Ca²⁺キレート薬であるBAPTA-AMおよびryanodineはcaffeineによるHSCの活性化抑制作用に影響を及ぼさなかった。また、各PDEサブタイプ (PDE II ~ V) 選択的阻害薬によるHSCの活性化抑制を検討したが、caffeineとは異なりいずれのPDE阻害薬も抑制しなかった。さらに細胞内cAMP量の測定をしたところ、3 mM caffeineは細胞内cAMP量を変化させずに活性化を抑制することが示された。一方、HSCの活性化にはERK1/2の活性化が介在していることから、ERK1/2の活性化に対するcaffeineの作用を検討した。その結果3 mM caffeineがERK1/2のリン酸化を抑制する傾向があることが示された。ERK1/2はcAMPによって活性化されるが、caffeineが細胞内cAMP量の変化に影響を及ぼさなかったため、他にERK1/2を活性化させる経路があると考えられる。そこで、ERK1/2を活性化させる因子としてAktに対するcaffeineの作用を検討した。その結果、3 mM caffeine によってAkt1のリン酸化が有意に抑制された。このことから、caffeineはcAMPを介することなく、Akt1-ERK1/2経路を抑制することでHSCの活性化を抑制していることが示唆された。