

S-1

血栓溶解反応における血管内皮細胞の役割

○鈴木優子、佐野秀人、田中宏樹、浦野哲盟

浜松医科大学医生理学講座

生体における重要な防御反応の一つに止血機構がある。血管壁の破綻時には即座に止血血栓が形成され出血は止まり、一方で血管内の不要血栓は速やかに溶解され血液の流動性は維持される。後者には、血管の内層を被覆する一層の血管内皮細胞の有する抗血栓作用が重要な役割を果たす。動脈硬化症や炎症、外傷など様々な病態で内皮の抗血栓機能が減弱すると、病的血栓（本来生じてはならない場所での血栓）が形成され心血管病・脳血管障害などの血栓症の発症につながる。逆に過剰な抗血栓機能は止血血栓形成不全、止血血栓の早期溶解など、出血を助長してしまう。必要な時に必要な場所で生じる血栓形成溶解反応の制御に対する理解は、近年の光技術の進歩によるリアルタイムイメージング解析により大きく進んできた。本講演では血管内皮細胞に由来する血栓溶解機構について次の2点に焦点をあて概説する。

(1) 血栓溶解反応開始因子の分泌様式:血管内皮細胞が発現・分泌する組織型プラスミノゲンアクチベータ (t-PA) はプラスミノゲンをプラスミンに活性化し、生じたプラスミンがフィブリン血栓を溶解する。緑色蛍光タンパク (GFP) 融合t-PA (tPA-GFP) 遺伝子を血管内皮細胞に導入し、その分泌顆粒からの開口放出動態を全反射蛍光顕微鏡にて可視化した。分泌後のt-PAは細胞表面に滞留するという血管内皮細胞特有の分泌動態が明らかとなった。

(2) 細胞表面PA活性解析:t-PAは、他のセリン酵素と異なり一本鎖でも活性化を有し、またフィブリンや細胞膜などの固相に結合することにより酵素活性が増強することが知られている。分泌後の細胞表面滞留t-PAのPA活性発現を可視化解析しその調節機構を明らかにするとともに、線溶活性修飾薬剤等の影響についても論ずる。

S-2

線溶促進薬TAFIa阻害剤の臨床開発に向けたアプローチ

野口 研吾、三吉 直樹

第一三共株式会社 研究開発本部 臓器保護ラボラトリー

線溶反応は高度に制御された生体反応であり、血管内の不要なフィブリンの除去に不可欠である。線溶反応は、プラスミノゲンアクチベーター (PA) の作用を介してプラスミノゲンがプラスミンに活性化されることで始まり、プラスミンがフィブリンを分解する。さらに、フィブリンの分解により表出したフィブリンC末端Lys残基にプラスミノゲンと組織型PA (tPA) が結合し、さらなるプラスミンの産生が促進されて線溶反応が加速化される。

Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) は血中に存在するカルボキシペプチダーゼの前駆体であり、凝固反応あるいは線溶反応に伴い活性化されてactivated TAFI (TAFIa) となる。TAFIaはフィブリンC末端Lys残基を切断することにより線溶反応を抑制することから、TAFIaの阻害は線溶促進効果が期待される。

低分子TAFIa阻害剤DS-1040は、in vitroでnmol/Lオーダーの濃度にてTAFIa阻害活性を示した。ラット静脈血栓塞栓症モデルにて、DS-1040は静脈内投与あるいは経口投与のいずれによっても同様の線溶促進作用が認められ、本剤は静注剤あるいは経口剤のいずれにもなりうることが示された。血栓塞栓性ラット脳梗塞モデルにて、DS-1040は脳血流に対する改善作用を示し、虚血性脳梗塞の急性期治療に対する本剤の有用性が示唆された。他方で、DS-1040はラット尾出血モデル及びラット脳出血モデルにて出血を増悪せず、出血リスクの低い線溶促進薬としての特性が示唆された。

第I相臨床試験にて、DS-1040の静脈内投与は健常成人で忍容性が高いことが確認された。さらに、同じく健常成人にてアスピリンとの併用投与の忍容性も確認された。現在、血栓症患者を対象とした臨床試験が進行中である。

S-3

PAI-1阻害薬:線溶系制御の新展開と臨床への応用

段 孝

東北大学大学院医学系研究科分子病態治療学分野

PAI-1は、最も研究が進んでいる線溶系の抑制因子である。演者らは PAI-1の生理作用の解明とPAI-1阻害薬の開発に取り組んでいる。t-PA-PAI-1複合体に着目したin silicoスクリーニングから始めて、PAI-1阻害薬のリード化合物TM5275が、抗血栓薬クロピドグレルと遜色のない抗血栓作用を示すが、出血性副作用はないことを示した。さらに500以上の新規化合物から最適化したTM5509の医師主導治験を進めている。

TM5509の当初の開発目標は抗血栓薬であった。しかし、マウスにおける放射線照射後の骨髄移植において、造血幹細胞因子を遊離して骨髄ニッチから造血幹細胞を離脱させ、造血再生を著明に促進する画期的発見をした。それを契機に「造血幹細胞移植後の造血促進薬」として臨床試験を進めている。

さらに、慢性骨髄性白血病（CML）治療への応用を検討している。CMLは、原因遺伝子BCR-ABLを標的とするチロシンキナーゼ阻害薬（TKI）の登場で不治の病ではなくなったが、投与を中止すると半数以上の患者で再発する。造血幹細胞に由来するCML幹細胞は骨髄ニッチに存在し、TKIに抵抗性を示す。そこで、PAI-1阻害薬でCML幹細胞を骨髄ニッチから離脱させ、分化したCML細胞をTKIで殺す「CML根治療法」の発想を得た。BCR-ABLを導入した細胞株をマウスに移植したCMLモデルにおいて、TKI投与で延命効果が見られたものの投与中止により全例が死亡したが、新規PAI-1阻害剤TM5614を併用すると、生存期間は延長し生存率は60%に達した。TM5614併用群は、骨髄中のCML細胞株数は明らかな低値を示した。さらに、その作用機序として細胞内PAI-1が関わっている新知見を得ている。

本論では、最新の話題であるPAI-1による骨髄の線溶系制御機構とPAI-1阻害薬の臨床応用について述べる。

S-4

発達障害と複雑性PTSDへの薬物療法

杉山登志郎

浜松医科大学児童青年期精神医学講座

精神科領域の多剤大量処方、我が国において今や社会的問題になっている。発達障害では、パニックや、暴力的噴出、癩癩などに対して、抗精神病薬を処方し、改善がないので徐々に増量し、比較的大量の薬物療法が続いているという例をよく見る。ここで鍵となるのはトラウマとの複雑な絡み合いである。トラウマが多彩で多様な精神症状を呈することについては、ようやく広く知られるようになった。特に診断が遅れた時は、発達障害はトラウマを招きやすく、また問題行動を頻発させる発達障害は、実は背後に迫害体験を抱えることが多い。この議論が複雑になるのは、子ども虐待によって生じる愛着障害が発達障害類似の臨床像を呈するからであり、カテゴリー診断に頼る限り、この両者の要因を鑑別することは不可能と言って良い。

つまり、子ども虐待（およびトラウマ体験）は発達障害の最大の増悪因子になる。その一方で、子ども虐待の後遺症として生じる愛着障害の臨床像は発達障害に類似した臨床像を示すので、相互にニワトリにもタマゴにもなり得る。世代間連鎖が生じ、何代かにわたったとき、どちらが一義的であったのか分からない状況が生じる。この様な症例において、親の側も子の側も共に、社会性や共感性の障害、多動性行動障害、および複雑性PTSDの臨床像を呈する。

実は今日、児童精神科外来において難治性と言われているのはこの様な組み合わせの親子であり、われわれは親子併行治療を行ってきた。この様な症例に対して、通常の薬物療法は無効であるが、向精神薬の極少量処方、漢方薬の活用、さらに工夫されたトラウマ処理という3者の組み合わせによって安全に治療ができることをわれわれは見いだした。

本講演ではこれらの知見を紹介し、発達障害への薬物療法について、臨床的な視点からまとめらる。

S-5

オキシトシン経鼻剤による社会的コミュニケーションの障害の治療法開発

山末英典

浜松医科大学精神医学講座

代表的な発達障害である自閉スペクトラム症の中核的な症状として認められる社会的コミュニケーションの障害は、表情や声色あるいは言語を介した意思疎通の障害を主徴とする。この障害は一般人口の100人に1人以上で認められ、幼児期から一生涯にわたって続くが、有効な治療薬が無い。そのため、多くの当事者と家族が困窮する巨大なunmet medical needsとなり、社会経済的にも大きな損失を生じさせている。

一方で、遺伝要因の有意な関与が報告されているこの社会的コミュニケーションの障害の中間表現型 (Endophenotype) と位置付けられる脳基盤については、前頭側頭頭頂領域の様々な脳部位が関与していることについて数多くの論文が発表されている。報告間で結果のバラツキも認められるが、メタ解析も複数発表されて共通する所見も確定しつつある。また、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシンは、従来から広く知られている子宮平滑筋収縮や乳汁分泌促進に加えて、向社会性を促進することが知られる様になった。1990年代に実験動物で明らかにされていったこの社会性への作用は、2005年ごろから、ヒトでも表情の読み取りを行う能力の改善や仲間集団内での信頼関係増強などの作用として明らかにされて来た。そして近年では、自閉スペクトラム症の社会的コミュニケーションの障害の治療薬候補として注目されている。本演題では、演者がオキシトシン経鼻剤を用いて取り組んで来た、症状評価に加えて、脳機能や代謝を測定するマルチモダリティMRIなどの脳画像解析をSurrogate endpointとして用いて薬効を評価した自主臨床試験の成果や医師主導多施設治験の計画を紹介し、新規中枢神経系治療薬開発においてMRIをEndophenotype-associated surrogate endpoint (EASE) として活用する戦略を提案したい。

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 μM ）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 ± 3.1 mmHg、4週投与後 122 ± 3.0 mmHgに対し、100 $\mu\text{g/mL}$ ニコチン投与群では、投与前 122 ± 4.6 mmHg、投与後 123 ± 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¹ 岩城孝行² 梅村和夫²

¹遠州病院 産婦人科 ²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 γ カルボキシグルタミナーゼ (GGCX) の触媒作用で γ 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。

O1-4

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% O₂) 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¹、古賀資和¹、横山詩子²、上窪裕二³、中村史雄¹、櫻井隆³、石川義弘²、五嶋良郎¹

¹横浜市立大学 分子薬理神経生物学教室、²横浜市立大学 循環制御医学教室、
³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*^{-/-}) 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*^{-/-} 摘出血管標本用いて比較・検討したところ、*Gpr143*^{-/-} 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*^{-/-} 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および安全性

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

¹浜松医大・医・薬理、²浜松ホトニクス、³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、有効性およ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と安全性を検討した。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¹、砂川陽一^{1,2,3}、船本雅文^{1,2}、刀坂泰史^{1,2,3}、和田啓通²、島津章²、長谷川浩二²、森本達也^{1,2,3}

¹静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、²京都医療センター 臨床研究センター、³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-ウェ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β-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^{1,2,3}、小川原慎太郎¹、鈴木杏奈¹、船本雅文^{1,3}、櫻井涼賀¹、
刀坂泰史^{1,3,4}、浅川倫宏²、菅敏幸²、和田啓道³、長谷川浩二³、森本達也^{1,3,4}

¹静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、²医薬品製造化学講座、³京都医療センター 臨床研究センター、⁴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、 β -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、 β -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¹、砂川陽一^{1,3,4}、小川原慎太郎¹、鈴木杏奈¹、船本雅文^{1,3}、刀坂泰史^{1,3,4}、浅川倫宏²、菅敏幸²、和田啓道³、島津章³、長谷川浩二³、森本達也^{1,3,4}

¹静岡県立大学 薬学部 分子病態学講座、²医薬品製造化学講座、³京都医療センター 臨床研究センター、⁴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^{1, 2}、刀坂泰史^{1, 2, 3}、宮崎雄輔¹、北條祐也¹、砂川陽一^{1, 2, 3}、和田啓道²、長谷川浩二²、森本達也^{1, 3}

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

³ 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 α 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 α_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 α_{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、 α_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 α_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¹、菅沼由唯¹、狩野泰輝¹、井平典子¹、野村裕子²、池本和久¹、畑 忠善²、加藤節子³、一瀬 宏⁴、近藤一直¹

¹藤田保衛大・医・薬理、²藤田保衛大・医療・臨床検査、³明海大・歯、⁴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

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

¹浜松医科大学 医学部 薬理学講座, ²W.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*^{-/-}/*Apobec1*^{-/-}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*^{-/-}/*Apobec1*^{-/-}/*Plg*^{-/-} マウスでは*Ldlr*^{-/-}/*Apobec1*^{-/-}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*^{-/-}/*Apobec1*^{-/-}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^{1,2}、砂川陽一^{1,2,3}、刀坂泰史^{1,2,3}、宮崎雄輔^{1,2}、今泉厚⁴、掛谷秀昭⁵、山陰一²、浅原哲子²、和田啓道²、長谷川浩二²、森本達也^{1,2,3}

¹静岡県立大学大学院 薬学研究院 分子病態学講座、²京都医療センター 臨床研究センター、³静岡県立総合病院 臨床研究部、⁴株式会社セラバリュース、⁵京都大学大学院 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[®]）、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[®]群の2群に分けて、プラセボまたはセラクルミン[®]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[®]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[®]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[®]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[®]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¹、刀坂泰史^{1, 2, 3}、砂川陽一^{1, 2, 3}、秋本剛秀⁴、植木力⁴、和田啓道²、
島津 章²、長谷川浩二²、坂口元一⁴、森本達也^{1, 2, 3}

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

³静岡県立総合病院 臨床研究部、⁴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¹、村田騰行¹、刀坂泰史^{1,2,3}、砂川陽一^{1,2,3}、和田啓道²、 島津 章²、
長谷川浩二²、森本達也^{1,2,3}

¹静岡県大葉、²京都医療センター、³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 μM) , Nobiletin (Cur, 0.1, 0.3 μM) , Auraptene (Aur, 10, 30 μM) , Cacao Beans Polyphenol (CBP, 1, 3 μM) 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 μCi) 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 μM で、柑橘類果皮成分のNobは0.3 μM で、八朔の抽出成分であるAurは30 μM 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¹⁾、渡邊泰秀¹⁾、喜多紗斗美²⁾、岩本隆宏²⁾、木村純子³⁾

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

³⁾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、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 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_{50} 値は、外向き成分、内向き成分それぞれ約0.1 μM 、Hill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^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) を変化させてYM-244769の抑制作用を検討すると、 $[\text{Na}^+]_i$ 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 $[\text{Na}^+]_i$ 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^{2+} 流入) 抑制作用は、片方向型内向き電流 (Ca^{2+} 排出) よりも強かった。YM-244769のNCX電流抑制作用は、 $[\text{Na}^+]_i$ 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^{1, 2}, 井形 秀吉¹, 佐藤 薫^{2, 3}, 池谷 裕二^{1, 2}

¹東京大学薬学系研究科薬品作用学教室, ²iNCENS (iPSC Non-Clinical Experiments for Nervous System) プロジェクト, ³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。

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、抗癌剤のドキシ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を経口ゾン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¹¹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。

Angiotensin II 受容体作動薬及び拮抗薬がモルモット肺静脈心筋自発活動に与える影響

○田中悠介、入江雅彦、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
東邦大学薬学部薬物学教室

肺静脈は肺から心臓に血液を運ぶ血管であるが、隣接する左心房から連続する心筋層を有している。この肺静脈に存在する心筋、即ち肺静脈心筋は自動能を持ち、心房細動 (Af) の主要な発生源となることが示されている。モルモットから摘出した肺静脈標本は一定確率で自発的な拍動 (自発活動) を起こしており、当研究室ではその発生メカニズムを検討してきた。今回着目したAngiotensin II (Ang II) は血管収縮性の内因性ペプチドであり、慢性的な増加は心臓負荷を増大し、リモデリングを促進することでAfの発生に関与する。実際、AT₁受容体拮抗薬の持続的な処置がAfの発症を抑制することが報告されている。しかしながら、Afの発生源となる肺静脈心筋へのAng IIの急性作用には不明な点が多く、それを解明することを目的として肺静脈心筋の活動電位を取得、薬物処置前後の自発活動の頻度や活動電位波形の変化を解析した。自発活動が発生していない肺静脈標本にAng IIを処置した所、自発活動の発生は誘発されなかったが、自発活動が発生している標本にAng IIを処置するとその発生頻度が増大した。AT₁受容体拮抗薬であるLosartanはAng II処置の有無に関わらず自発活動を抑制した。AT₂受容体拮抗薬であるPD 123319を前処置した後にAng IIを処置すると自発活動を発生していない一部の標本で自発活動の誘発が確認され、既に自発活動が発生している標本に同様の処置を行った場合、Ang IIによる自発活動発生頻度の増大が増強された。これらの結果から、Ang II単独処置が肺静脈心筋の自発活動に促進的に働くこと、Ang IIによるAT₁受容体刺激が自発活動に促進的に働く一方で、AT₂受容体刺激は自発活動に抑制的に働くことが示唆された。また、LosartanがAng II未処置でも自発活動を抑制したことから、内因性のAng IIが自発活動に関与している可能性が考えられる。今後はこれらの作用がどのようなメカニズムで起こるのかを追求するとともに、他のRenin-angiotensin系に作用する薬物を用いた検討も行っていきたい。

The molecular mechanism by which PDGF activates $Ca_v1.2$ channels in vascular smooth muscle cells

Xiaoguang Guo, Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiko Yamada

Dept. Mol. Pharmacol., Shinshu Univ. Sch. Med., Matsumoto, Japan

In atherosclerosis, platelet-derived growth factor (PDGF) predisposes abnormal vasoconstriction, but its mechanism remains unclear. Calcium influx through $Ca_v1.2$ L-type Ca^{2+} channels plays a crucial role in contraction of vascular smooth muscle cells (VSMC). Here, we investigated the effect of the chronic exposure of VSMC to PDGF on $Ca_v1.2$ channels by using a rat aortic smooth muscle cell line, A7r5. A7r5 cells were stimulated with vehicle or PDGF-BB (10 ng/ml) for 24 hours. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured with fluo-4, and LTCC currents were measured with the whole-cell patch-clamp method. Extracellular 60 mM K^+ solution increased $[Ca^{2+}]_i$ significantly more strongly in PDGF-treated than control cells. This effect was inhibited by a Src/Abl inhibitor, bosutinib (2 μ M) but not a protein kinase C inhibitor, Go6983 (0.5 μ M). As assessed with immunoblot, PDGF did not alter α_{1C} subunit expression; however, it significantly increased LTCC current amplitude by ~ 1.5 fold between -30 and +50 mV. This effect of PDGF on LTCC currents was completely inhibited by overexpression of C-terminal Src kinase, an endogenous inhibitor of Src-family tyrosine kinases (SFK). Overexpression of c-Src significantly increased the activity of a recombinant full-length smooth muscle type of $Ca_v1.2$ channels but not that of the C-terminally truncated $Ca_v1.2\Delta 1763$ channel with or without coexpression of its distal C-terminus in tsA201 cells. Immunoblot revealed that most $Ca_v1.2$ channels exist as a full-length form in A7r5 cells. These results suggest that PDGF causes functional upregulation of full-length $Ca_v1.2$ channels through SFK in VSMC.

Goto-Kakizaki rat尾動脈交感神経からのノルエピネフリン遊離作用に対するアンギオテンシンⅡの作用

○小石川 衛、野澤(石井) 玲子、加賀谷 肇

明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】Wistarラットを起源とするGoto-Kakizaki (GK) ラットは、非肥満、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性という特徴を併せ持つ日本人の2型糖尿病に近いモデル動物である。糖尿病性神経障害は糖尿病患者における重大な合併症の一つである。その中でも自律神経障害は、発汗異常、起立性低血圧など起こし、患者のQOL低下に大きくかかわっている。しかし、心血管系自律神経機能障害はその進行が心血管系イベントの発症にきわめて重要であるにもかかわらず、知覚神経障害に比べてそれ自体による症状が乏しいため、見過ごされることが多い。そこで交感神経障害の病態を明らかにするために、2型糖尿病モデル動物を用いて検討することにした。当研究室ではすでに、GKラット尾動脈交感神経において、神経側にある受容体を介した反応性の低下を報告している。今回は、GKラットを用いて、電気刺激 (ES) によるノルエピネフリン (NE) 遊離作用に対するアンギオテンシンⅡ (AngII)、およびPPAR- γ アゴニストであるピオグリタゾン (Pio) の影響について検討した。

【方法】12週齢のWistarおよびGKラットから尾動脈を摘出した。尾動脈標本は白金電極に装着し、栄養液中で30分ごとに3分間のES (1Hz、50V) を2回行った。栄養液中に放出されたNEは、アルミナにより抽出し、HPLC-電気化学検出器により測定した。

【結果および考察】AngIIはシナプス前AT1受容体に作用して、NE遊離を促進的に調節しており、GKラットではAngIIによりNEの遊離が促進された。PioはNE遊離に対して影響を示さなかったが、AngIIによるNE遊離促進作用を抑制する傾向が見られた。一方、WistarラットではAngIIによってもPioによっても顕著な効果が見られなかった。

Goto-Kakizaki ratの大動脈からのヒドロキシラジカル発生作用とNO遊離作用に対するエンドセリン-3の影響

○丸茂 圭太郎、野澤(石井)玲子、加賀谷 肇

明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】血管内皮におけるNOの生物学的活性の低下や酸化ストレスは、様々な経路を介し、糖尿病性血管障害の発症や進展に深く関与している。我々は第132回日本薬理学会関東部会において、血管内皮細胞由来の血管収縮ペプチドであるエンドセリン-1 (ET-1) が2型糖尿病モデルラットであるGoto-Kakizaki (GK) ラット大動脈からのヒドロキシラジカル発生作用を増強させることを報告している。今回、ET-1とは受容体親和性が異なるエンドセリン-3 (ET-3) を用いて、GKラット大動脈からのNO遊離作用とヒドロキシラジカル発生作用について、正常血糖値のWistarラットと比較検討した。

【方法】12週齢のWistarおよびGKラットから大動脈を摘出した。血管標本は、Krebs液で洗浄後、30 mMの4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA) を添加したKrebs液中で、薬物を30分作用させた。4-HBAは、ヒドロキシラジカルをトラップすることにより3,4-Dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA) を生成する。Krebs液中の3,4-DHBAはHPLC-電気化学検出器で、NOはGiese法を応用したHPLC法で測定した。

【結果】Wistarラットと比較してGKラットでは自発的なヒドロキシラジカル発生作用が増強する傾向がみられた。GKラットにおいて、ET-3 (10^{-8} M) はヒドロキシラジカル発生作用を抑制し、ET-3 (10^{-6} M) はNO遊離作用を有意に促進した。

【考察】以上の結果から、Wistarラットでは、ET-3によってNO遊離作用やヒドロキシラジカルの発生作用に顕著な影響は見られなかった。一方、GKラットでは、ET-3によってヒドロキシラジカルの発生が抑制され、NO遊離作用が促進されたことから、ET-1と異なり血管を保護する可能性が示唆された。

P-5

マウスの耐糖能及び腸間膜動脈血管機能に及ぼす運動トレーニングの効果

○伊藤政明、小島卓也、松岡 功
(高崎健康福祉大・薬・薬効解析)

糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病は、動脈硬化に起因する心筋梗塞や脳梗塞、腎障害などを引き起こす。その根底には血管内皮機能障害が想定されている。有酸素運動はこれら生活習慣病の基本治療であるだけでなく、健康の維持・増進として推奨されていることは周知の事実である。しかしその有益な効果の機構は、諸説唱えられているものの実態は明らかではない。本研究では、運動トレーニングの有益性の機構を探るべく、まずは正常動物の耐糖能および血管機能を指標として運動負荷の影響を検討した。

マウスへの運動負荷は、回転かご式自発運動量測定装置を用いて3週間行った。一日当たり自発的に7~8km走行した。体重や随時血糖値は、運動負荷の有無により大きな影響を受けなかった。しかしながら、糖負荷試験を行ったところ、運動負荷3週目において、非運動群に対して耐糖能が有意に向上した。血管機能は抵抗血管のモデルである腸間膜動脈の灌流により評価した。その結果、ノルアドレナリン (NA) の血管収縮作用に基づく灌流圧の上昇は、運動負荷の有無により差を認めなかった。一方、NAによる灌流圧上昇に対するアセチルコリンの血管拡張応答は、運動負荷群で有意に向上していた。また、アデノシン三リン酸 (ATP) をはじめとする細胞外ヌクレオチドは、血管のずり応力等により血中に放出され特異的な受容体を介して血管機能を調節することが報告されている。ATPはNAによる血管収縮に対して拡張応答を示したが、その作用は運動群マウスで有意に亢進していた。さらに、ATPおよびUDPは血管収縮応答も示したが、運動の有無による差は認められなかった。

以上の結果から、正常動物においても運動負荷により耐糖能および血管弛緩機能の向上が認められ、運動トレーニングによる健康維持・増進作用を確認できた。今後は、本モデルを詳細に解析するとともに高血糖や肥満などの病態モデル動物を用いた運動トレーニングの効果を検討していきたい。

P-6

血管内皮細胞における小胞体カルシウム放出とカルモジュリンによるNADPHオキシダーゼ由来の活性酸素種生成の調節機構

○小田切圭一^{1,2}、袴田晃央¹、神谷千明¹、乾直輝¹、渡邊裕司¹

¹浜松医科大学医学部 臨床薬理学講座 ²浜松医科大学医学部附属病院臨床研究管理センター

背景:今までにカルシウム/カルモジュリン ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) がNADPHオキシダーゼ (NOX) を活性化することが報告されている。血管内皮細胞におけるカルシウム応答はストア調節性カルシウムイオン流入 (SOCE) により調節されている。SOCEは小胞体における Ca^{2+} 放出と引き続き生じる Ca^{2+} チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入の2つのコンポーネントにより構成されるが、いずれのコンポーネントが $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ によるNOXの活性化に寄与するかは明らかではない。

目的:本研究の目的は小胞体からの Ca^{2+} の放出とNOX由来の活性酸素種 (ROS) 生成の関連性を明らかにすることである。

方法:初代培養豚大動脈内皮細胞を用いて、ブラジキニン (BK: $1\ \mu\text{M}$) 刺激によるROSの産生について、ROS感受性蛍光色素 (C-DCDHF-DA) を用いて検討した。

結果: (1) BKの投与により、C-DCDHF-DAの蛍光強度は速やかに上昇を認め、活性酸素種のスカベンジャーであるTrolox (10mM) の前投与により抑制された。この反応はブラジキニンB2受容体阻害薬であるHOE-140 ($1\ \mu\text{M}$) の前投与により抑制された。

(2) BKによるROS生成はNOX阻害薬であるVAS2870の前投与により抑制された。

(3) 細胞外カルシウム濃度を1mMおよび0mM (EGTA:1mM) の条件下でBKによるROS生成反応を比較した時、両群間で差を認めなかった。

(4) 細胞外カルシウム濃度0mMの条件下において、BKによるROS生成は、BAPTA ($100\ \mu\text{M}$) あるいはタプシガルギン ($1\ \mu\text{M}$) の前投与で完全に抑制された。

(5) CaM阻害薬 (W-7: $100\ \mu\text{M}$) の前投与によりBKによるROS生成は完全に抑制された。

結語:豚大動脈血管内皮細胞における $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ によるNOX由来のROS生成は、小胞体からのカルシウム放出により調節を受けることが明らかとなった。

エキソソーム様小胞封入GLP-2の経鼻投与による抗うつ様作用

○秋元俊希¹、濱田幸恵^{1,4,5}、伊豫田拓也^{2,4}、梅澤雅和³、岡淳一郎^{1,4}

¹東京理科大 薬 薬理、²分子病態、³基礎工 材料、⁴総研院 TRセンター、⁵北里大 医療衛生 生理

【背景・目的】 Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) は、腸管や脳でプログルカゴンから産生されるアミノ酸33個からなるペプチドで、我々は、側脳室内投与により治療抵抗性うつ病モデルマウスで抗うつ様作用を示すことを報告した。側脳室内投与法は臨床では使用できないため、我々は、経鼻投与法をもちいて中枢移行させることを目的として、これに適したGLP-2誘導体を作製し、その中枢移行性と抗うつ様作用について報告している。本研究では、経鼻投与で中枢移行させることが報告されている別の方法として、植物由来エキソソーム様小胞にGLP-2を封入した経鼻投与剤を作製し、抗うつ様作用の発現について検討した。

【方法】 オニオン (*Allium cepa*) は皮をむき-20℃で保存し、凍結させたまますり潰した液を遠心分離した。上清を口径450 nmのフィルターに通した後、Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Sci.) を用いてオニオン由来小胞を抽出した。ここにGLP-2または蛍光色素ICGをC末に付加したGLP-2をエレクトロポレーションにより導入した。PBSまたはDMSOで希釈し、ddY系雄性マウス (5-6週齢) の鼻腔内に、方鼻3.6 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ (全量7.2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を2日間投与した。抗うつ様作用は、強制水泳試験 (FST) を用いて5分間における無動時間で評価した。

【結果・考察】 エキソソーム様小胞封入GLP-2及びICG付加GLP-2は、FSTの無動時間を短縮させ、抗うつ様作用を示した。ICG付加GLP-2の経鼻投与30分後に灌流固定を行い、脳凍結切片 (30 μm) を作製して蛍光分布を観察中である。また、使用したICG付加GLP-2のエキソソーム様小胞内包埋率を計測中である。

【結論】 これまでに種々の細胞からエキソソーム様小胞を回収して調べた結果、今回用いたオニオン由来の小胞が、経鼻投与後に封入体を効率良く中枢移行させることを見出している。GLP-2も本エキソソーム様小胞に封入することにより、包埋率は現在不明であるが側脳室内投与 (3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) と類似した投与量で抗うつ様作用を示すことが明らかとなり、今後の臨床応用に重要な製剤化の技術基盤となることが示された。

吃逆に対する柿蒂湯の効果 ～柿蒂トリテルペノイドの抗けいれん作用の検討～

○石川 知穂¹、竹内 万純¹、上村 紗英¹、野澤(石井)玲子¹、福田枝里子²、馬場正樹²、岡田嘉仁²、加賀谷 肇¹

¹明治薬科大学 臨床薬剤学教室、²天然薬物学教室

【目的】がん患者においては、化学療法の施行期や終末期にしゃっくり（吃逆）の症状を呈する患者が散見される。吃逆は横隔膜のけいれんで、一般的にメジャーランキライザーや抗けいれん作用のあるベンゾジアゼピン系の薬物が使用されているが著効を示す薬剤は少ない。一方古くから吃逆に用いられてきた柿蒂湯は、柿蒂、生姜および丁字の3種の生薬から構成される漢方処方である。柿蒂湯の構成生薬の一つである柿蒂の煎じ液を吃逆の治療に用いる施設もあり、また全身性ミオクローヌスに有効であるという報告もなされている。そこで我々は、柿蒂は抗けいれん薬としての作用を有するのではないかと考え、薬物により誘発されるけいれんに及ぼす影響を検討し、柿蒂の水エキス、メタノールエキス、酢酸エチルエキスの各エキスにも抗けいれん作用が認められることを報告している。そこで今回、より吃逆に効果的な成分を探索することを目的に、柿蒂酢酸エチルエキス分画およびその成分である柿蒂に含まれるリテルペノイドの抗けいれん作用について検討した。

【方法】柿蒂を酢酸エチルで抽出し、オープンカラムで分画した。分画は脂溶性の高い順に作成した。マウスに柿蒂酢酸エチルエキス分画サンプルまたは柿蒂トリテルペノイドの混合物を経口投与後、ストリキニーネまたはピクロトキシンをそれぞれ腹腔内投与し、間代性けいれん開始時間、強直性けいれん開始時間、死亡までの時間を計測した。

【結果および考察】酢酸エチルエキス分画サンプルは、ストリキニーネ誘発けいれんに対して、けいれん開始時間や死亡までの時間を延長させた。柿蒂トリテルペノイド単品より混合物に抗けいれん作用が認められた。以上の結果より、柿蒂の酢酸エチルエキス分画成分には、ストリキニーネけいれん誘発までの過程に対して作用することが示された。柿蒂トリテルペノイドの作用時間や高濃度をさらに検討する必要がある。

カラゲニン処置ラットの脊髄後根神経節由来の神経細胞にKClが誘発した細胞内Ca²⁺量の増加に対するorexin-Aの抑制効果

○石川 学¹、青野 悠里²、木村 全孝³、鈴木亜沙子³、卯田 昭夫¹、
河相 安彦³、久保山 昇²、渋谷 鑛¹、三枝 禎²

日本大学松戸歯学部¹歯科麻酔学講座、²薬理学講座、³有床義歯補綴学講座

Orexin-Aの髄腔内投与は、実験動物で抗侵害効果を示す (Yamamoto et al., 2003)。しかし侵害刺激下の個体の感覚神経に対するorexin-Aの作用の詳細は細胞レベルでは明らかでない。そこで本研究では起炎物質のカラゲニンを後肢足底へ投与したラットを用い、同部位の圧刺激からの回避閾値 (paw withdrawal threshold: PWT) を解析したのち、この個体の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) からC線維と想定される小型神経細胞を分離した。つぎにこの神経細胞へのKCl刺激による細胞内Ca²⁺量 ([Ca²⁺]_i) の増加に対するorexin-Aの作用におけるorexin受容体サブタイプの役割について、OX₁とOX₂受容体拮抗薬のMK-4305とOX₁受容体拮抗薬のSB 334867を用いて検討した。

実験には約10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。対照群にはsaline、処置群には2% カラゲニンを含むsalineを両後肢足底へそれぞれ0.25 ml皮下投与した。これらの投与の直前から投与後7日まで24時間毎に、後肢足底へのvon Frey filamentによる刺激からの回避を起こす閾値 (g) を測定しPWTとした。炭酸ガスで安楽死させた個体のDRGより分離した神経細胞は細胞接着剤のCell Takで観察用容器に接着固定し、Ca²⁺蛍光指示薬のFluo-4/AMを負荷した。KCl (25 mM) 処置による直径約20 μmの神経細胞内のFluo-4の蛍光強度の変化を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。薬物は少量のDMSOを含む超純水に溶解し観察用容器に滴下した。KClを除く使用薬物の用量は観察用容器 (2 ml) における絶対量 (pmol) で示した。

その結果、基礎的なPWTは対照群、処置群とも26 gだった。対照群と異なり処置群は処置後7日にわたりPWTが約10 gまで低下した。処置後1日の個体のDRG由来の神経細胞の蛍光強度は、KCl刺激で対照群、処置群とも約2.1倍増加した。基礎蛍光強度を変化させない用量のorexin-A (20 pmol) の併用でKClによる蛍光強度の増加は、対照群には影響が見られなかったが処置群は約1.3倍に減弱した。この蛍光強度の増大のorexin-Aによる抑制はMK-4305 (200 pmol) で消失したがSB 334867 (2 pmol) の影響は認められなかった。

以上の結果から、対照群および処置群のDRG由来の神経細胞の[Ca²⁺]_iはKCl刺激により同程度増大することが示された。またカラゲニン処置によりPWTが低下した個体のDRGの神経細胞にKClが誘発した[Ca²⁺]_iの増加を、orexin-AはOX₁ではなくOX₂受容体刺激を介して抑制することが示唆された。

ナノサイズシリカ粒子による神経細胞への影響

○山名智人(1)、上窪裕二(1)、井上由理子(2)、櫻井隆(1)

(1)順天堂大学・医学部・薬理学講座 (2)昭和大学・医学部・解剖学講座 肉眼解剖学部門

【背景・目的】 ナノテクノロジーの発展に伴い、様々な素材、サイズ、形状のナノ粒子が作成され、食品、化粧品、工業用などの方面で利用されている。医療面においては、直径数十ナノメートルサイズのシリカ (SiO₂) 粒子は血液脳関門を通過することから、薬物や遺伝子のキャリアとしての利用が期待されている。一方で、ナノ粒子による細胞障害性、胎児の発達障害、アレルギー反応などが報告されており、環境・健康両面への影響が懸念されている。ナノ粒子の障害性については主に培養株化細胞を用いて評価されており、中枢神経系に対する作用はほとんど分かっていない。そこで私たちは、初代培養神経細胞を用いてナノシリカ粒子が神経細胞に与える影響について検討を行った。

【方法】 ラット海馬由来の初代培養神経細胞を用い、ナノシリカ粒子暴露による神経細胞障害性を検討した。ナノシリカ粒子は培地に添加し、一定時間後の細胞の内在性のATPを測定することで細胞障害性を評価した。細胞に対する酸化ストレスの誘導は活性酸素種を定量する蛍光プローブを用いて検出した。ナノシリカ粒子の局在および神経細胞の形態変化については、赤色蛍光ナノシリカ粒子の暴露とMAP2、GFAPの免疫染色によって評価した。

【結果・考察】 ナノシリカ粒子の暴露は、細胞内のATP量を低下させること、細胞内の活性酸素種を増加させること、神経突起を破壊することが確認された。さらに、ナノシリカ粒子の細胞障害性は粒子の表面積に依存することが明らかになった。以上の結果はナノシリカ粒子の神経細胞障害性を示すものであり、医療等に応用するためには、その細胞障害性を軽減させる方法を検討する必要がある。

クエン酸によるオロパタジン口腔内崩壊錠の苦味抑制効果

○外山真衣¹、内田信也¹、田中紫茉莉¹、袴田晃央²、小田切圭一²、乾直輝²、
渡邊裕司²、並木徳之¹

¹静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府実践薬学講座 ²浜松医科大学医学部臨床薬理学講座

【目的】不快な味の薬物を口腔内崩壊錠（ODT）とするためには、アドヒアランス低下を防ぐための苦味マスキングが必要とされる。食品や医薬品に利用されるクエン酸は一般に苦味を抑制することが知られているが、*in vivo*による定量評価はほとんど行われていない。本研究では抗ヒスタミン薬のオロパタジン塩酸塩を用いて、ヒト味覚官能試験によりODTにおけるクエン酸の苦味抑制効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】錠剤重量の0、0.1、1.0、2.5、5.0及び10%のクエン酸を添加したオロパタジンODT（C0-, C0.1-, C1-, C2.5-, C5-, C10-ODT）を作製した。被検ODTを精製水100 mL中に溶解させ、電子味覚システムASTREE（アルファ・モス社製）による分析を行い、ユークリッド距離を算出した。また、溶液中の薬物濃度及びpHを測定した。さらに健康成人10名（平均22.9歳）を対象とした味覚官能試験において、被験者は錠剤を口腔内で崩壊させ visual analogue scale（VAS）を用いてODTの苦味（0:なし～100:たいへん苦い）を評価した。本試験は浜松医科大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得た。

【結果・考察】被検ODTを溶解させた水溶液のオロパタジン塩酸塩濃度は40.9～43.5 µg/mL、pHは3.28～6.26を示した。またC0-, C0.1-, C1-, C2.5-, C5-及びC10-ODTのユークリッド距離はそれぞれ373、346、137、51、94及び34であり、味覚官能試験におけるODTの苦味VAS値はそれぞれ47、39、30、23、27及び20を示し、ODT中へのクエン酸添加量の増加に伴い、ODTのユークリッド距離及びVAS値は減少した。またODTのユークリッド距離とVAS値との間に有意な直線関係が認められた（ $r^2=0.922$, $p=0.0024$ ）。さらに、ユークリッド距離と各溶液のpHの間には有意な直線性（ $r^2=0.934$, $p=0.0017$ ）が認められたが、薬物濃度との間には有意な相関は認められなかった（ $r^2=0.528$, $p=0.102$ ）。以上、電子味覚システム及び味覚官能試験により、クエン酸は添加量依存的にオロパタジンODTの苦味を抑制することが示唆された。

マウス胚由来ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーターの酵素活性検証のための線溶を利用した実験法の確立

○浅野有希子¹⁾ 岩城孝行²⁾ 梅村和夫²⁾ 金山尚裕¹⁾

¹⁾浜松医科大学産婦人科学教室 ²⁾浜松医科大学薬理学講座

【目的】ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクティベーター (uPA) は血栓溶解反応 (線溶反応) においてプラスミノゲンをプラスミンに活性化するセリン酵素である。マウスの着床においては受精後4日以降の胚盤胞の栄養外胚葉からuPAが分泌され直接的・間接的に子宮内膜の細胞外マトリックスを分解して子宮間質への浸潤に関与する。またマウス胚盤胞のuPA活性が線溶を誘起することも報告されている。着床に関与する胚由来uPAの酵素活性を *in vitro* で検討するため線溶を利用した実験系を確立したので報告する。【方法】ICRマウス凍結胚盤胞を融解し培養した。実験①胚盤胞のディッシュへの接着、増殖の検討: 凍結胚盤胞を融解後最大6日目まで培養し、フィブリン固相上とコラーゲン固相上の培養と比較した。実験②胚周辺のフィブリン溶解可視化の検討: 蛍光色素Alexa488でラベルしたフィブリノゲンを用いてフィブリンを作製・固相したディッシュ上で胚を培養し、細胞周辺の発色を欠く領域をフィブリン溶解面積として計測した。実験③胚由来uPAの線溶への関与の検証: uPA阻害薬であるBC11 hydrobromideとAmiloride hydrochloride hydrateを終濃度が各10、30、100 μ Mになるように培養液に加え、細胞面積と溶解面積を測定した。

【結果】実験①融解後2日目で胚はディッシュに接着、3日目以降に増殖した。フィブリン固相とコラーゲン固相でも差はなく発生した。実験②2日目接着時から細胞周辺に線溶が生じ始め、3から4日目にかけて溶解面積は約2.5倍に拡大した。融解時に細胞変性した胚周辺に線溶は見られなかった。実験③対象群に比べuPA阻害薬群の溶解面積は濃度依存的に抑制されたが、100 μ Mでは細胞増殖も抑制されたため10 μ Mが阻害実験に適していた。

【考察】蛍光フィブリンを利用した胚培養により経時的な線溶を可視化定量できた。またuPA阻害薬で線溶が抑制されたことから胚由来uPAが線溶に直接的に関与することを明らかにした。今後胚由来uPA酵素活性に着目した本実験法をヒト胚に適応させ種差の検討を行う予定であり、倫理面で試供数の少ないヒト胚でもuPA分泌量の推測が可能になった。

P-13

甘草含有成分の抗ヘルペスウイルス活性に対する定量的構造活性相関解析

植沢芳広¹、福地邦彦²、坂上宏²、加賀谷肇¹、大野裕和⁴、山本正次⁴

¹明治薬科大学、²昭和大学大学院、³明海大学歯学部、⁴丸善製薬

【緒言】我々は、甘草の含有成分であるフラボノイドおよびカルコン誘導体が示す抗腫瘍活性および腫瘍細胞に対する選択毒性について報告した（第86回日本薬理学会年会）。本研究では、これらの甘草中成分が示す抗ヘルペスウイルス活性に焦点を当て、定量的構造活性相関（QSAR）解析法により抗ウイルス活性に寄与する化学構造的特徴の抽出を試みた。

【方法】（1）選択係数（SI値）の評価：10種類の甘草含有フラボノイドおよびカルコン誘導体、5種類のポリメトキシフラボノイド、および4種類のポリフェノール類からなる合計19種類の被検化合物を本解析に使用した。MTTアッセイ法により、これらの化合物が単純ヘルペスウイルス（HSV-1）感染ベロ細胞および非感染ベロ細胞（mock）に及ぼす毒性を評価し、EC50値およびCC50値をそれぞれ求めた。さらに、各化合物のSI値（= CC50 / EC50）を算定した。なお、SI値は値が大きいほど抗ウイルス薬として優れていることを意味する。（2）QSAR解析：各化合物の化学構造に基づき、物理化学的特徴等を含む1705種類の分子構造記述子を算定し、各記述子と対数化SI値の間の相関を観察した。

【結果・考察】本研究の他の被検化合物と比較して、甘草含有成分には極めて高いSI値を示す化合物を認めた。特に、Liquiritin apioside, Isoliquiritin apioside, および LucurzidはSI値が400以上を示す優れた抗ヘルペスウイルス活性を示した。QSAR解析の結果、甘草含有成分を含む全ての被検化合物のSI値は、分子の極性、イオン化ポテンシャル、分子サイズおよび環構造数に関連する記述子と良好な相関を示すことが判明した（ $r^2 > 0.6$, $P < 0.0001$ ）。この結果は、これらの化合物の抗ヘルペスウイルス活性が構造的なカテゴリーを超越した構造的・物理化学的特徴に依存することを示唆している。以上の知見は、甘草の機能の解明のみならず、新規抗ウイルス薬の創製に有用な知見となるものと期待される。

P-14

持続的なアストロサイト性脳虚血耐性の分子メカニズム解析

○平山友里^{1,2}、小泉修一¹

¹山梨大院・医・薬理、²山梨大院・医・リエゾンアカデミー

脳虚血耐性とは、あらかじめ非侵襲的虚血 (Preconditioning; PC) を経験しておく、その後の侵襲的な虚血に対して抵抗性を示し、脳梗塞傷害が軽減する現象である。我々はこれまでに中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、PC後に活性化するアストロサイトが虚血耐性獲得に重要であること、その分子メカニズムとしてP2X7受容体/HIF-1 α 経路が関与していることを報告した。PC後のHIF-1 α 発現亢進は神経細胞とアストロサイトで認められるが、なぜ神経細胞由来のHIF-1 α ではなく、アストロサイトのHIF-1 α が虚血耐性獲得に重要であるかは不明であった。今回、初代培養細胞を用いた*in vitro*実験とMCAOモデルを用いた*in vivo*実験の検討により、神経細胞とアストロサイトでHIF-1 α の発現メカニズムに違いがあることを見出し、この違いがアストロサイトHIF-1 α の重要性を説明する上で鍵となることを明らかにした。低酸素時、酸素依存的にHIF-1 α を分解する酵素PHD2の阻害によりHIF-1 α は蓄積し、さまざまな神経保護分子の産生が誘導されることが知られている。神経細胞のHIF-1 α はこのメカニズムを介して発現するのに対し、アストロサイトのHIF-1 α 発現は低酸素非依存的であり、その代わりにP2X7受容体に依存的であった。また、PHD2の発現レベルは、神経細胞と比較し、アストロサイトでは顕著に低かった。さらに、低酸素により誘導される神経細胞HIF-1 α の発現亢進は一過性であるのに対し、P2X7受容体活性化によるアストロサイトHIF-1 α の発現亢進は持続的であった。これらの結果から、アストロサイトHIF-1 α はPHD2による分解を受けないため、発現が持続することが考えられた。以上のことから、アストロサイト性脳虚血耐性は、P2X7受容体を介する持続的なHIF-1 α 発現亢進により、神経保護効果を誘導することが示唆された。

転写因子低酸素誘導因子-1 α によるヒト EP4 受容体発現制御機構の 解明

○清良尚史¹, 藤野裕道², 大竹翔¹, John W. Regan³, 村山俊彦¹

¹千葉大院・薬、²徳島大院・医歯薬、³アリゾナ大・薬

【目的】ヒト結腸癌細胞株 HCA-7 細胞を用いた検討より、Prostaglandin E₂ をリガンドとする EP4 受容体が、主に Gi 型 G タンパク質経路を活性化することで結腸癌増悪に寄与する可能性を当研究グループは報告している。また HCA-7 細胞の EP4 受容体発現は、転写因子低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) 依存的に抑制されることも報告している。本研究では、HIF-1 α による EP4 受容体転写制御機構の詳細の解明を目的とし、検討を行った。

【方法】ヒト EP4 受容体プロモーター配列の転写因子結合サイト検索を行った。また HCA-7 細胞において、野生型ヒト EP4 受容体プロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼレポーター遺伝子 (EP4 WT) やコントロールベクター (vec) をトランスフェクトし、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により HIF-1 α が EP4 受容体プロモーター領域に直接結合するかどうかの検討を行った。

【結果及び考察】ヒト EP4 受容体プロモーター配列に HIF-1 α が結合することが知られている低酸素応答性領域 (HRE) の存在を同定した。また ChIP 法より、EP4 WT 由来の EP4 受容体プロモーター配列を検出した。さらに vec をトランスフェクトしたサンプルにおいて、HCA-7 細胞由来の EP4 受容体プロモーター配列を検出した。EP4 WT 上の HRE 配列に変異導入したレポーター遺伝子 (EP4 mut) を作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。しかしながら、EP4 mut では、HIF-1 α 依存的な EP4 受容体転写活性減少の回復は見られなかった。再度 EP4 受容体プロモーター配列の検索を行った所、HRE 配列とは1塩基だけ異なる配列が複数存在していることが明らかとなった。以上の結果から、HIF-1 α は、ヒト EP4 受容体プロモーター領域に直接結合するが、HRE 配列1カ所だけで転写制御されているだけでなく HRE 配列と類似した配列にも結合することで EP4 受容体発現レベルを制御している可能性があることが示唆された。今後、HIF-1 α が HRE 類似配列のどの部分に結合しているのかを ChIP-qPCR を用いて明らかにしたいと考えている。

オキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛モデルにおける種差の検討 ②

○志田原由華^{1,2}、中村まり¹、Aldric Hama¹、鈴木純子¹、松田明久¹、高松宏幸¹、
間賀田泰寛²

¹株式会社浜松ファーマリサーチ ²浜松医科大学 光先端医学教育研究センター フォトニクス
医学研究部 分子病態イメージング研究室

オキサリプラチンは大腸がんの治療に広く用いられる白金系抗がん剤である。オキサリプラチンは投与直後から数時間以内に寒冷刺激で誘発・増強される急性の末梢神経障害 (cold allodynia) がほぼ全例において発症することが知られている。しかしながら現在のところ有効な予防法や対処法は確立されていないため、临床上大きな問題となっている。本研究では、遺伝学的・解剖学的にヒトに近いカニクイザルに着目し、カニクイザルを用いたオキサリプラチン誘発急性末梢神経障害性疼痛モデルの開発を行った。また既存のラットを用いたオキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛モデルとの比較を行った。覚醒下のカニクイザルにオキサリプラチン (5 mg/kg) を2時間かけて静脈内投与した。オキサリプラチンは2週間に1回、計3回投与を行った。寒冷刺激の評価として tail immersion test を行った結果、オキサリプラチン単回投与3日後に全例で cold allodynia を発症した。オキサリプラチン投与3日後に疼痛の治療で用いられる既存薬の薬効評価を行ったところ、duloxetine (30 mg/kg, p. o.) では有意な cold allodynia の改善が認められたが、pregabalin (30 mg/kg, p. o.) 及び tramadol (30 mg/kg, p. o.) では cold allodynia の改善は認められなかった。一方、ラットにオキサリプラチン (5 mg/kg) を2日間腹腔内投与した。寒冷刺激の評価として acetone test を行った結果、オキサリプラチン投与3日後では cold allodynia の発症が観察されなかった。そのためさらに2週間オキサリプラチンの投与を行った結果、オキサリプラチン投与16日後に約65%のラットで cold allodynia の発症が観察された。Cold allodynia の発症が認められたラットを用いて薬効評価を行ったところ、duloxetine (30 mg/kg, p. o.)、pregabalin (30 mg/kg, p. o.) 及び tramadol (30 mg/kg, p. o.) のいずれの薬剤についても有意な cold allodynia の改善が認められた。以上の結果から、オキサリプラチン誘発急性末梢神経障害性疼痛モデルにおいて、cold allodynia の発症率や薬剤に対する反応に種差が認められ、カニクイザルはよりヒトの病態に近いモデルであることが示唆された。次に、それぞれの動物モデルにおいて DRG に器質的変化が認められるかどうかを調べるため、病理組織学的検査を行った。その結果、カニクイザルではわずかではあるが神経細胞の変性が認められた。一方、ラットでは神経細胞の変性は認められず、細胞が小型化している傾向が認められ、DRG における組織学的変化についても種差があることが明らかとなった。