

A-01 C57BL/6マウスを用いたアトピー性皮膚炎の慢性痒みモデル

○藤井 正徳¹、大塚 崇人¹、榎本 大誠¹、安井 悠真¹、田中 智之¹

¹京都薬科大・薬・薬理

アトピー性皮膚炎 (AD) は痒みを主徴とする慢性炎症性の皮膚疾患である。AD患者では、自発的な痒みとともに、皮膚への軽微な機械的刺激により痒みが生じやすいこと (alloknesis)、また、アルコールの摂取および夜間に痒みが増悪することが知られている。したがって、ADでは、皮膚末梢および中枢神経レベルで痒みシグナル伝達が亢進していることが考えられるが、そのメカニズムは十分に解明されていない。これまで当分野では、食餌誘発性のユニークなADマウスモデルを開発してきた。すなわち、HR-1系ヘアレスマウスに、多価不飽和脂肪酸およびスターチを欠乏させた特殊飼料を摂食させるとAD類似の皮膚炎症状が発現することを明らかにした。しかしながら、HR-1マウスは非近交系であり遺伝子改変実験の応用が困難である。そこで、今回、遺伝子改変マウスの背景系統として汎用されるC57BL/6マウスを用いて、AD様の慢性痒みモデルが作製可能か検討した。雌性C57BL/6Nマウスに特殊飼料を摂食させると、摂食8週間後から、ドライスキン症状および皮膚バリア機能低下が認められた。特殊飼料摂食マウスの自発的な搔痒行動を解析したところ、11週間後より、通常飼料を摂食させている正常マウスに比べて有意に搔痒行動が増加した。von Frey filament (0.7 mN) を用いてalloknesisの有無を検証したところ、特殊飼料摂食群では刺激した部位への搔痒行動が増加した。また、特殊飼料摂食群において、ethanolやphenobarbitalの投与により搔痒行動が顕著に増強した。一方、皮膚組織学的検討を行なったところ、特殊飼料摂食マウスでは、肥満細胞数は増加したものの、好酸球数の増加は認められなかった。そこで、皮膚炎症および痒みを増悪させる目的でダニ抗原の曝露の影響を検討した。コナヒョウヒダニの抽出物を含む軟膏を特殊飼料摂食6週間後から、1日1回5日間塗布 (1クール) し、9日間のインターバルを空けて、3クール繰り返し行ったところ、皮膚症状の増悪を伴って、自発的搔痒行動およびalloknesisがさらに増加した。以上より、C57BL/6マウスを用いて、AD様の慢性痒みモデルを作製することができた。

A-02 肥満細胞刺激におけるGPR3発現誘導と脱顆粒に与える影響

○田中 茂¹、浜川 雄輝¹、柳瀬 雄輝²、白榊 紘子¹、山本 真弘¹、原田 佳奈¹、秀 和泉¹、酒井 規雄¹

¹広島大学大学院医系科学研究科神経薬理学、²広島大学大学院医系科学研究科皮膚科

【背景と目的】 G-protein-coupled receptor 3 (GPR3)は神経細胞に豊富に発現し、リガンド非存在下にGas活性化能を有するG蛋白共役型受容体である。最近我々は、齧歯類虚血脳におけるGPR3発現解析から、GPR3が神経細胞のみならず脳肥満細胞にも発現することを新たに見出している。本研究では骨髄由来肥満細胞 (BMMC)を用いて、脱顆粒刺激に伴うGPR3発現と、GPR3発現がBMMC脱顆粒に与える影響について検討した。

【方法】 C57BL/6マウス骨髄よりBMMCを作製し、IgE受容体刺激 (DNP-HSA) (10-100ng/ml)、ATP (10-300 μ M)、Adenosine (10-300 μ M)により脱顆粒刺激を加え、細胞からの β ヘキソサミニダーゼ遊離を測定し、脱顆粒の程度を評価した。

【結果】 DNP-HSA、ATP刺激により、濃度依存的に有意な脱顆粒増加を認めた。一方、Adenosine単独刺激では高濃度 (300 μ M)においても顕著な脱顆粒の増加は認められなかった。一方、AdenosineにATPを加え同時刺激すると顕著な脱顆粒増強効果が認められた。GPR3mRNA発現はBMMC刺激後1-2時間で上昇し、以後急速に低下した。ATP (300 μ M)、Adenosine (30 μ M)+ATP (300 μ M)による脱顆粒増加は、細胞内cAMPアクチベーター (dbcAMP 1mM)により有意に抑制された。GPR3ノックアウトマウスBMMCでは野生型マウスBMMCと比較し、DNP (10-50ng/ml)、ATP (100-300 μ M)刺激により、有意な脱顆粒増加を認めた。

【結論】 GPR3はBMMC細胞刺激により発現上昇し、脱顆粒を抑制的に制御する可能性が示唆された。

L-アスパラギナーゼアレルギーに対するシクロホスファミド併用の影響と抗IgE抗体の効果

○原（野上） 愛¹、堀 優太¹、須々木 健太郎¹、光畑 知恵¹、梶山 光司¹、嶋田 明²、見尾 光庸¹

¹就実大学薬学部薬効解析学、²岡山大学病院小児・血液腫瘍科

【目的】小児急性リンパ性白血病（ALL）の治療薬であるL-アスパラギナーゼ（L-ASP）は大腸菌由来製剤であり、高頻度アレルギーを発症する。我々が作製したL-ASPアレルギーのモデル動物において、シクロホスファミド（CY）の併用は、150 mg/kgではL-ASPアレルギーを増悪するが、300 mg/kgでは影響しないこと、増悪したアレルギー反応は抗IgE抗体で抑制可能であることを報告してきた。本研究では、IgEやIgGに対するシクロホスファミドの影響や、L-ASPの抗腫瘍作用に対する抗IgE抗体の影響を検討した。

【方法】RBL-2H3細胞を、CYを併用してL-ASP感作を行ったマウス血清で感作し、L-ASPを添加した際の脱顆粒反応を、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離率を指標に評価した。IgGを選択的に吸着するプロテインGセファロースで血清を処理して同様の検討を行うことで、IgGの影響について評価した。細胞をマウス血清で感作する前に、抗IgE抗体を添加することで、抗IgE抗体の有効性を評価した。マウス血清中の総IgE量をELISAで測定した。ヒトT細胞由来急性リンパ性白血病細胞（MOLT-4）へのL-ASPの抗腫瘍作用に対する抗IgE抗体の影響について、MTTアッセイにより評価した。

【結果・考察】L-ASPを投与したマウス血清で感作したRBL-2H3細胞は、L-ASP添加で脱顆粒し、CY 150 mg/kgを併用したマウス血清ではより強い脱顆粒が認められた。CY 300 mg/kgを併用したマウス血清では、CY 150 mg/kgよりも脱顆粒は有意に低かったが、血清をプロテインG処理すると、脱顆粒は増強された。血清中総IgE量は、CYの併用でいずれの用量においても増加した。これらより、CYはIgE産生を増強するが、高用量ではIgG産生も誘導する可能性が示唆された。一方、抗IgE抗体を採血前日に投与したCY 150 mg/kg併用のマウス血清では、総IgE量が無感作マウス以下にまで低下しており、RBL-2H3細胞で脱顆粒を生じなかった。L-ASPを投与したマウス血清と抗IgE抗体存在下に、L-ASPを作用させた場合のMOLT-4細胞の生存率は、抗IgE抗体を添加していない場合と差がなかった。以上より、抗IgE抗体はL-ASPの治療効果に影響を及ぼさないことが示唆された。

U373細胞におけるヒスタミン刺激に伴うヒスタミンH₁受容体遺伝子発現亢進シグナル

○水口 博之¹、中野 誠一²、北村 嘉章²、武田 憲昭²、福井 裕行^{2,3}

¹大阪大谷大・薬・薬理、²徳島大・院医歯薬・耳鼻咽喉科、³(医)錦秀会

ヒスタミンH₁受容体（H1R）遺伝子は花粉症の疾患感受性遺伝子であり、その発現状態は花粉症症状の重篤性と強く関連する。我々は、HeLa細胞において、ヒスタミン（HA）刺激によりH1Rを介してH1R遺伝子発現が亢進し、これがPKC δ -ERKシグナルを介することを明らかにしてきた。一方、アストロサイトにもH1Rが発現し、HA刺激によりH1R遺伝子発現が亢進することを見出しているが、その遺伝子発現シグナルに関しては明らかでない。そこで、本研究ではU373ヒトアストロサイトーマにおけるHA刺激に伴うH1R遺伝子発現亢進のシグナル経路について検討した。

U373細胞において、HAは濃度依存的にH1R遺伝子発現を亢進した。この遺伝子発現亢進は、*m*-chlorpheniramineにより抑制されたが、ranitidineやciproxifan、JNJ7777120では抑制されなかった。また、HeLa細胞においてはHA刺激後5~10時間をピークとする緩やかな遺伝子発現亢進が見られるが、U373細胞では、刺激後2~3時間後に急激な一過性の遺伝子発現亢進が見られた。さらにこの遺伝子発現亢進はpan-PKC阻害薬Ro-31-8220により抑制され、PKC α / β 1阻害薬Go6976によっても部分的に抑制されたが、PKC δ 選択的阻害薬rottlerinやPKC β 選択的阻害薬Ly333531では抑制されなかった。また、HeLa細胞におけるIL-4刺激に伴うJAK3-STAT6シグナルを介したH1R遺伝子発現亢進を抑制するスプラタストによっても抑制されなかった。SwanらはヒトH1Rに複数のプロモーター領域の存在を報告しているが、RT-PCRの結果、U373細胞では、HeLa細胞とは異なるプロモーター領域が働いていることが示唆された。

以上の結果から、U373細胞において、HAはH1Rを介してH1R遺伝子発現を亢進するが、HeLa細胞と異なり、その遺伝子発現は急激で一過性であり、そのシグナル経路もPKC δ は関与しないことが明らかとなった。また、ラット三叉神経においても急激な一過性の遺伝子発現が認められており、神経組織と末梢組織ではH1Rの機能が異なり、マーキアインなどPKC δ 抑制化合物は、末梢H1R遺伝子発現のみを抑制し、抗ヒスタミン薬より副作用の少ない花粉症治療薬として有効であることが示唆された。

Interleukin (IL)-10の気管内投与は、重症喘息マウスモデルにおける好中球浸潤およびthymic stromal lymphopoietin (TSLP)の産生を抑制した

○松田 将也¹、稲葉 美樹¹、濱口 淳平¹、富田 尋¹、美奈川 茉里¹、北谷 和之¹、奈邊 健¹

¹摂南大・薬・薬効薬理

【背景】我々は、これまでにovalbumin (OVA) 感作マウスに大量のOVA を気管内投与することで、ステロイド抵抗性の重症喘息マウスモデルを確立してきた。ステロイド抵抗性喘息患者の肺には顕著な好中球浸潤が認められることや、別のマウスモデルでTSLPがステロイド抵抗性の獲得に関与することが報告されている。しかしながら、本モデルにおけるステロイド抵抗性の獲得機序は明らかではなく、有効な治療薬も不明である。一方、我々は、本モデルの好中球浸潤の制御に内因性のIL-10が関与する可能性を報告してきた。本研究では、IL-10を外因性に気管内投与することによるステロイド抵抗性喘息に対する治療的効果の可能性について検討した。

【方法】OVA 感作BALB/cマウスにOVA溶液 (500 μ g/mouse) を4回気管内投与し反応惹起を行った。反応惹起期間中にデキサメタゾン (1 mg/kg) を腹腔内投与、あるいはIL-10 (25 ng/mouse) を気管内投与した。最終反応惹起後に気管支肺胞洗浄液を回収し、好酸球および好中球数を定量した。メタコリンに対する気道過敏性は、forced oscillation techniqueにより測定した。肺ホモジネート中のIL-33およびTSLP量は、ELISA法により定量した。

【結果】(1) デキサメタゾン投与群では、好酸球および好中球浸潤に対する抑制効果は認められなかった。一方、IL-10投与群では、好酸球浸潤に対する抑制は認められなかったが、好中球浸潤に対する顕著な抑制が認められた。

(2) デキサメタゾンあるいはIL-10のいずれの投与群においても、気道過敏性に対する抑制は認められなかった。

(3) 本モデルにおいてOVAの反応惹起を行うことで、肺におけるTSLPの産生は顕著に増強した。デキサメタゾンの投与では、TSLPの産生に影響を及ぼさなかったが、IL-10投与群では、TSLP産生の明らかな抑制が認められた。

【結論】IL-10は、肺への好中球浸潤およびTSLPの産生を抑制することが明らかとなった。一方、IL-10は単独では気道過敏性を抑制しなかったが、好中球浸潤およびTSLPの産生を抑制することにより、ステロイド抵抗性を解除できる可能性が期待できる。

ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞のシート作製とその評価

○葉 珂¹、伊藤 ありさ¹、恩田 将成¹、竹内 遼介¹、森本 菜央^{1,2}、小坂田 文隆^{1,2,3}



¹名古屋大・院創薬科学・細胞薬効解析、²名古屋大学高等研究院神経情報処理研究チーム、³名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所

【背景・目的】視覚障害の一つである加齢黄斑変性では加齢により黄斑部の網膜色素上皮細胞 (RPE) が障害され、視野の中心部に歪みや盲点を生じる。近年、加齢黄斑変性の新規治療法として、変性したRPE細胞をヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来RPEシートに置換する再生医療に期待が寄せられている。しかし、iPS 細胞由来RPEシートを用いた臨床研究は進んでいるものの、iPS細胞由来RPE細胞からRPEシートの安定的な作製法、RPEシートの安全性・有効性・品質の評価法は未だに不十分である。そこで本研究では、iPS 細胞由来RPEシートを再生医療等製品として創出する目的で、RPEシートの作製法およびその評価法を検討した。

【方法・結果】始めにヒトiPS細胞からRPE細胞への効率的な分化誘導法を確立した。分化誘導12日目にRPE前駆細胞マーカーであるPAX6/MITF二重陽性細胞が認められ、多能性幹細胞マーカーであるNANOGやOCT3/4の発現量の低下が認められた。分化32日目に成熟RPEマーカーであるRPE65およびTyrosinaseの発現量が上昇し、分化35日目には茶色の色素を有する多角形状の細胞が観察された。分化60日目には細胞の色素がさらに濃くなった。次に、高純度のRPEシートを作製するために、分化誘導35日目の細胞をサイズにより選別し、transwell insertに再播種した。RPE細胞の純度を免疫染色により評価したところ、作製したiPS細胞由来RPEシートの純度は99%であった。さらに、RPEシートを長期間培養すると、培養期間に応じて色素が沈着し、経上皮抵抗値が上昇した。次に、iPS細胞由来RPEシートを非破砕的に品質評価するために、画像解析法に着目した。生体RPE細胞は、加齢と共に細胞機能の低下と細胞の大きさの変化を起こす。そこで、iPS細胞由来RPEシートの細胞の大きさを非破砕的に解析することで機能を推定できると考えた。培養中のRPEシートを位相差顕微鏡で撮像し、細胞の面積を計測した。続いて、ライブ観察したRPEシートを固定しPhalloidinでf-actinを染色することで、細胞の面積を比較したところ、培養RPE細胞の面積は固定RPE細胞の面積とほぼ一致した。

【考察】本研究では、高純度のiPS細胞由来RPEシートを短期間で作製することができた。敷石状のRPEシートの特徴を利用し、RPEシート内の細胞の大きさの非破砕的な評価法は、RPEシートの品質評価に使用できることが示唆された。

A-07 食物アレルギーの即時型症状に対するステロイド薬の有効性の検討



○森 翔太¹、山下 弘高^{1,2}、松井 照明³、伊藤 浩明³、田中 宏幸^{1,2}、稲垣 直樹^{1,2}

¹岐阜薬科大・薬理、²岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科、³あいち小児保健医療総合センターアレルギー科

【目的】食物アレルギーは、近年患者数が増加している疾患であるが、根本的な治療法は確立されていない。ステロイド薬は、一般的に遺伝子の転写を介した効果の発現に 4～6 時間かかるとされているが、アナフィラキシーの二相性反応の予防のための追加治療として使用されることがある。しかしながら、ステロイド薬がアナフィラキシーショックに対して短時間で作用を発現する機序は明らかとなっていない。そこで、当研究室におけるマウス食物アレルギーモデルを用いて、食餌性アナフィラキシーの惹起直前に静脈内投与したステロイド薬による即時型症状の抑制効果を検討した。【方法】食物アレルギーモデルは、BALB/c マウスに卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムを 1 週間隔で 2 回腹腔内投与し、その 1 週間後から 10 mg もしくは 30 mg の OVA を週 3 回の頻度で 4 回経口投与した。4 回目の経口投与の 1 週間後に 50 mg の OVA を経口投与し、食餌性アナフィラキシーを惹起した。惹起の 3 日前にマウス血清から OVA 特異的 IgE 値を測定し、OVA 特異的 IgE 値の平均が等しくなるようにマウスを各群に割り付けた。ステロイド薬 (Hydrocortisone、Prednisolone、Betamethasone) は 50 mg の OVA の経口投与直前に静脈内投与にて行った。効果は惹起 30 分後および 60 分後の直腸温変化、下痢症状、肥満細胞の脱顆粒の指標となる mouse mast cell protease 1 (mMCP-1) の血中濃度により評価した。【結果】Hydrocortisone の投与により下痢および 30 分後の体温低下が抑制された。同様に Prednisolone および Betamethasone の投与により 30 分後の体温低下の抑制傾向が確認された。一方、各ステロイド薬の投与は血中 mMCP-1 濃度に影響を及ぼさなかった。

【考察】ステロイド薬の静脈内投与は、食物アレルギーにおける急性のアナフィラキシーショックを抑制する可能性が示唆された。また、その機序に消化管の肥満細胞の脱顆粒の抑制は関与していない可能性が示唆されており、詳細な機序について検討中である。

A-08 一酸化窒素応答性遺伝子発現による神経細胞死惹起機構の解析



○中原 健吾¹、高杉 展正¹、上原 孝¹

¹岡山大・院医歯薬学総合・薬効解析

【目的・背景】

パーキンソン病 (PD) は黒質線条体のドパミン神経細胞が変性、脱落することで運動障害を呈する神経変性疾患である。PD発症メカニズムに関する研究は精力的に行われているものの、未だ不明な点が多く残されている。近年、PD発症にエピゲノム異常の関与が示唆されている。しかし、どのようなストレスがエピゲノム異常を惹起するのかはほとんど不明である。本研究では、NOによるエピジェネティックな変化を介した遺伝子発現と神経細胞死との関連を明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

【方法】

NO依存的に発現上昇する遺伝子はDNAマイクロアレイ解析により探索した。遺伝子発現変化はRT-PCR法、Western blot法、免疫組織化学染色法により行った。細胞生存率はクリスタルバイオレット染色法により検討した。

【結果・考察】

DNAマイクロアレイ解析の結果、ラット胎児初代培養線条体細胞において、NO依存的に発現が上昇する遺伝子を数十種同定することに成功した。その中、神経における発現に関して全く報告がない内向き整流性カリウムイオンチャンネルKCNJ1に着目し、その誘導機構および神経細胞死への関与について解析を行った。まずKCNJ1はNO供与体の濃度依存的に発現が上昇することを確認した。また、培養株化細胞であるマウス神経芽細胞種Neuro-2a細胞においてもNOによってKCNJ1が誘導された。さらに、PD様症状誘発試薬6-hydroxydopamine (6-OHDA) をマウス線条体終末部に投与したところ、KCNJ1の発現が亢進することが明らかとなった。つぎに、DNMT阻害薬5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) をNeuro-2a細胞に処理したところ、KCNJ1発現レベルは有意に上昇した。続いて、KCNJ1をHEK293T細胞に過剰発現させたところ、アポトーシス様の細胞死が観察された。この現象は高濃度のK⁺イオンの添加により抑制されたことから、KCNJ1による細胞外へのK⁺イオンの流出が細胞死を惹起していることが示唆された。

以上の結果から、NOはエピジェネティック変化をもたらすことでKCNJ1を誘導し、細胞死を惹起する可能性が示唆された。

A-09 疼痛モデルマウスにおける脳内脂肪酸関連因子の変動



○橘 男¹、中本 賀寿夫¹、徳山 尚吾¹

¹神戸学院大・薬・臨床薬学

【背景】 これまでに、術後痛モデルマウスの視床下部領域において、ドコサヘキサエン酸などの長鎖脂肪酸が疼痛の強さに応じて、変動することを確認している。これらは、脳内の長鎖脂肪酸が疼痛制御に関与していることを示唆するが、その詳細は不明のままである。脂肪酸の作用発現などに影響をおよぼす可能性がある関連因子（脂肪酸関連因子）として、脂肪酸をリン脂質から切り出す酵素である calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) , cytosolic PLA₂ (cPLA₂) や脳内における脂肪酸の輸送、代謝、情報伝達に関与する fatty acid binding protein 3, 5, 7 (FABP3, 5, 7) などが知られている。そこで本研究では、疼痛モデルマウスにおける脳内の脂肪酸関連因子の変動について検討を加えた。

【方法】 動物は、5-7週齢の ddY系雄性マウスを使用して、術後痛モデルマウスまたは Complete Freund's adjuvant (CFA) 誘発炎症性疼痛モデルマウスを作製した。疼痛評価には、von Frey filament を用いて機械的刺激に対する反応回数を測定した。各種脂肪酸関連因子の発現変化は、リアルタイム PCR 法を用いた。

【結果】 術後痛モデルマウスでは、機械的刺激に対して過敏反応を示した術後 2 日目の視床下部領域において、コントロール群と比較して、iPLA₂ mRNA, や FABP3 mRNA 発現は有意に増加した。しかしながら、FABP7 mRNA 発現は、上記と同条件下の術後痛モデルマウスで有意に低下した。これらの変動は、過敏反応が減弱する 4 日目において、iPLA₂ mRNA は 2 日目のそれに比較して低下し、FABP3 mRNA や FABP7 mRNAはコントロール群レベルまで回復した。なお、cPLA₂ mRNA や FABP5 mRNA は、術後痛モデルマウスにおいて何らの変化も示さなかった。さらに、CFA 投与 1 日後の痛覚過敏を示したマウスの視床下部領域で iPLA₂ mRNA や FABP3 mRNA はコントロール群に比較して、有意に増加した。

【考察】 疼痛モデルマウスの視床下部領域において、疼痛シグナルに応答して iPLA₂ mRNA や FABP3, 7 mRNA の発現が変動したことから、疼痛時の脳内脂肪酸の作用発現においてこれらの因子が関与することが示唆される。

A-10 特発性基底核石灰化症 (IBGC) における血管内皮細胞に対するラロキシフェンの保護効果



○金子 由希¹、位田 雅俊¹、高瀬 奈央子¹、栗田 尚佳¹、保住 功¹

¹岐阜薬科大・薬物治療

特発性基底核石灰化症 (idiopathic basal ganglia calcification: IBGC) は脳の両側基底核に石灰化を認める神経変性疾患であり、様々な神経症状を呈する。石灰化は脳微小血管周辺部に生じることが知られているが、そのメカニズムは不明である。2013年にIBGC患者における血小板由来成長因子B (platelet-derived growth factor-B; PDGF-B) の遺伝子変異が報告された。PDGF-Bが形成するホモダイマーであるPDGF-BBは主に血管内皮細胞から分泌され、血液脳関門の形成に関与している。健常者と比較してPDGFB変異を持つIBGC患者では血清中での発現量が減少していることから、IBGCの治療戦略の一つとしてPDGF-BBの補充が考えられる。我々は患者由来iPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞でPDGF-BBの発現低下を報告している。本研究では、女性より男性のほうがIBGCの発症率が高いこと、PDGFB変異を有する患者では男性のほうが石灰化の度合いが高いことから女性ホルモンに着目した。17β-estradiolと同様のエストロゲン作用を示すRaloxifeneを用い、IBGCで想定される病態モデルにおける細胞障害と、これらの細胞障害に対するPDGF-BBの役割について検討した。マウス由来脳血管内皮細胞 (bEnd. 3) を高リン培地 (Pi 3mM) で培養し、細胞生存率と細胞毒性を評価した。高リン酸負荷によって誘発される細胞障害は、ウエスタンブロット法を用いたeNOS活性の定量と、CellROX、MitoSOXを用いた酸化ストレスの定量によって評価した。Raloxifene処置によるPDGF-BB発現量の変化はELISA法にて定量した。高リン酸負荷によってeNOS活性の低下、酸化ストレスの増加がみられたが、Raloxifene処置はこれらの細胞障害を有意に改善した。さらにRaloxifeneはPDGF-BBの発現を増加させた。またPDGF-BBはRaloxifeneと同様に高リン酸負荷によって誘発される細胞障害に対しeNOS活性の回復、酸化ストレスの抑制を示し、保護的に働くことも示唆された。今後は患者由来のiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞に対するRaloxifeneの効果を検討する予定である。

○田中 景吾¹、金子 周司¹、植田 弘師^{1,2}¹京都大・院薬・生体機能解析、²長崎大・院医歯薬総合・創薬薬理

【序論】近年、リゾホスファチジン酸(LPA)というリン脂質メディエーターが神経障害性疼痛の形成と維持にとっての重要な分子であることが明らかになりつつあり、新たな治療創薬ターゲットの一つとして注目されている。LPAは神経障害後の早期段階において新たに脊髄後角で産生され、このLPAはミクログリアLPA1/3受容体、サイトカインを介して新たに神経からLPA産生を誘発させるフィードフォワード機構を有する。こうして増産されたLPAは逆行性シグナルとして後根や後根神経節に働き、脱髄、カルシウムチャンネル発現を誘発し、疼痛シグナルとしてもフィードフォワード的に機能する。従って創薬標的としてはLPA受容体拮抗薬とLPA生合成阻害剤が有望となるが、本研究では後者の生合成機構に着目した。

LPA生合成機構としてLPA前駆体のLPCがPLA2によって増産され、一部が細胞外のATXによってLPAに変換される。PLA2はsPLA2、cPLA2、iPLA2の3つのファミリーに分類されており、組織炎症時による疼痛刺激とは異なり神経損傷では知覚神経が非特異的に刺激されることにより脊髄後角神経のPLA2活性が異常に活性化され、cPLA2のみならずiPLA2までもが活性化される。近年の研究により、神経障害後の早期段階でcPLA2とiPLA2阻害剤を処置すると痛みを抑制しており、cPLA2とiPLA2の関与が報告された。しかし、c/iPLA2は3時間以内に活性が低下するがLPA産生は6時間以上持続することからsPLA2の関与を推定した。【結果・考察】まず、神経損傷後の時間を追ってc/i/sPLA2の各アイソフォームの遺伝子発現を測定したとき、sPLA2の特定のアイソフォームの遺伝子発現の増加が見られたことから、そのAS-ODNやsiRNAの脊髄くも膜下腔投与を行うと疼痛が抑制された。さらにshRNAの脊髄後角実質への前投与を行ったとき、異常痛の有意な減弱が観察された。そこで、東京大学の化合物ライブラリーや公開されている化合物ライブラリーデータベースを用いたin silicoスクリーニングを経て創薬スクリーニングを行い、候補化合物を得た。実際にはそうした化合物は神経損傷の前投与あるいは障害5日後からの1週間連続の全身投与により、疼痛遮断が観察された。

○澤井 優輝¹、鈴木 良明¹、今泉 祐治¹、山村 寿男¹¹名古屋市立大・院薬・細胞分子薬効解析

マクロファージ(M ϕ)はサイトカイン産生やファゴサイトーシスなどの機能を介して自然免疫の制御に重要な役割を果たしており、その機能異常は関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態形成に深く関与している。M ϕ の機能調節において、細胞内イオン動態の制御は重要であり、ATPによって活性化されたプリン受容体(P2X7)を介するCa²⁺流入とK⁺流出はNLRP3インフラマソーム複合体の形成を促進することが知られている。当研究室では以前より細胞内イオン動態の制御に関与するカベオリン1(Cav-1)に着目して研究を行ってきた。Cav-1は細胞膜上のくぼみ構造であるカベオラを形成してCa²⁺シグナル関連分子を集積することで、細胞内Ca²⁺シグナルを効率化する役割を担っているが、M ϕ におけるP2X7受容体の活性化に対するCav-1の機能は未だ不明である。本研究では、Cav-1ノックアウト

(KO)マウスを用いてP2X7受容体の活性化に対するCav-1の寄与の解明を目指した。

野生型マウスとCav-1 KOマウスより単離した骨髄細胞をM ϕ へと分化させ、リアルタイムPCR法を用いて各群のM ϕ におけるカベオリンのmRNA発現解析を行ったところ、mRNAレベルでCav-1の発現が認められた。全反射蛍光顕微鏡を用いてCav-1とP2X7の局在を解析した結果、M ϕ 細胞膜においてCav-1とP2X7が共局在していることが明らかとなった。さらに、Ca²⁺及びK⁺の蛍光指示薬を用いてATP刺激時の各イオン濃度変化をリアルタイムで測定した結果、Cav-1 KOマウス由来のM ϕ でATP刺激による細胞膜を介したCa²⁺流入とK⁺流出が増大することが明らかとなった。核染色色素TO-PRO3の取り込み量を測定したところ、Cav-1 KO群において核染色色素の細胞内取り込みが増大したため、P2X7の活性が上昇していることが示唆された。

マウス骨髄由来M ϕ において、Cav-1はATPによるP2X7受容体の活性化を負に制御することが示唆された。Cav-1はP2X7受容体を介したイオン動態を制御することで、M ϕ の免疫反応の制御に寄与する可能性が考えられる。

神経細胞分化に伴うGPR3発現誘導がシナプシンの発現とリン酸化に与える影響



○猪川 文朗¹、田中 茂¹、佐々木 健太¹、野口 智裕¹、原田 佳奈¹、秀 和泉¹、酒井 規雄¹

¹広島大学大学院医系科学研究科神経薬理学

【背景と目的】G-protein-coupled receptor 3 (GPR3)は、リガンド非存在下でGas活性化能を有する受容体で、様々な神経細胞に豊富に発現する。小脳顆粒神経細胞におけるGPR3発現は、神経突起伸張や細胞生存に寄与するが、我々は最近、小脳顆粒神経細胞においてGPR3小胞が神経突起先端へ運搬され、神経突起先端局所のPKA活性化に寄与することを明らかにした。一方、シナプシンは、cAMP依存性蛋白キナーゼの主要な基質でシナプス前終末に豊富に存在することが報告されている。以上の背景から、GPR3はシナプス前終末でシナプシン機能を調節する可能性が考えられる。そこで本研究では、ラット副腎褐色腫細胞 (PC12細胞) を用いて、GPR3発現がシナプシン蛋白に与える影響について検討した。

【方法】PC12細胞を血清減少とNGF添加により分化誘導し、GPR3、シナプシンmRNA発現変化をReal-time PCR法により評価した。神経細胞分化に伴うGPR3動態観察には、PC12細胞にGPR3-GFP融合蛋白を遺伝子導入し、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察を行った。また、GPR3がシナプシンリン酸化に与える影響を検討するために、PC12細胞にGPR3shRNAを遺伝子導入し、シナプシンリン酸化をウェスタンブロッティング法により評価した。

【結果】PC12細胞を血清減少とNGF添加により分化させると、分化刺激12~48時間後で GPR3mRNA発現上昇を認めた。同様に、シナプシン2 mRNAは刺激後48時間後まで発現上昇を認めたが、シナプシン1、シナプシン3 mRNAの発現量は低下した。また、PC12細胞においてGPR3-GFP融合蛋白は神経突起先端方向に運ばれ突起先端に集積した。細胞分化に伴うGPR3発現をshRNAにより抑制すると、分化48時間後においてシナプシン2リン酸化の減弱傾向を認めた。

【結論】GPR3は神経細胞分化に伴い発現が増加し、シナプシン2の発現とリン酸化に影響を与えることにより、プレシナプス機能を修飾する可能性が示唆された。

新規タンパク質S-ニトロシル化阻害薬の構造活性相関



○野村 亮輔¹、奥田 洗作¹、浮川 太一²、高杉 展正¹、竹内 靖雄²、上原 孝¹

¹岡山大・院医歯薬学総合・薬効解析、²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科合成薬品製造学

【目的・背景】

生体内で産生される一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) は、血圧調節や記憶形成など多岐にわたる生理機能を担っている。NOの作用機序の一つとしてタンパク質システイン残基チオール部の酸化修飾 (S-ニトロシル化 ; SNO化) が知られている。タンパク質のSNO化は可逆的であることから、翻訳後修飾として様々なタンパク質の機能調節を担い、生体の恒常性維持や病態形成に関与している。当研究室ではこれまで、タンパク質のSNO化を介した活性変化と病態発症との因果関係を明らかにしてきた。最近、新たなNO標的タンパク質としてDNAメチル基転移酵素 (DNA methyltransferase ; DNMT) の同定に成功した。さらに、*in silico*スクリーニングおよび生化学的解析によりDNMT3のメチル基転移活性を抑制せず、SNO化修飾のみを特異的に阻害する化合物をDBICと命名・単離した。本研究では、DBIC誘導体を用いてSNO化阻害能との相関を明らかにすることを目的とし、以下の知見を得た。

【方法】

*In silico*によるドッキングシミュレーションの結果から、DBICのカテコール部位およびベンゾイミダゾール部位のそれぞれで構造を変換した誘導体を設計、合成した。合成化合物のSNO化阻害能の評価にはDNMT3Bを過剰発現させたHEK293T細胞を用い、biotin-switch assayにより検討した。

【結果・考察】

DBICおよびその誘導体に関するDNMT3BのSNO化阻害能をbiotin-switch assayにより評価したところ、カテコール部位のヒドロキシ基がSNO化阻害活性に深く関与していることが明らかとなった。次に、ベンゾイミダゾール部位に関して調べたところ、イミダゾール環の窒素原子はSNO化阻害活性に関与せず、部位のかさ高さあるいは疎水性相互作用が重要であることがわかった。さらに、*in silico*スクリーニングにおいてDBICよりもSNO化阻害作用が強い可能性のある化合物について検討したところ、予想通りの結果を得た。以上より、分子特異的SNO化阻害薬の作出に成功し、その阻害作用に重要な官能基を同定することに成功した。

A-15 ペプチド免疫療法剤の開発を目的とした魚アレルギーマウスモデルの確立



○末吉 賢也¹、下條 尚志^{2,3}、中村 政志^{2,3}、山下 弘高^{1,4}、稲垣 直樹^{1,4}、矢上 晶子^{5,6}、松永 佳世子³、田中 宏幸^{1,4}

¹岐阜薬科大・薬理、²ホーユー(株)総合研究所、³藤田医科大学医学部アレルギー疾患対策医療学、⁴岐阜大・院連合創薬医療情報、⁵藤田医科大学ばんだね病院総合アレルギー科、⁶藤田医科大学総合アレルギーセンター

【背景】食物アレルギーは患者数が増加しており、小児から成人まで幅広く発症が認められている疾患である。また、原因となる食物の種類も年齢によって様々である。その中で、魚類は特に成人食物アレルギーの原因となる代表的な食品の一つであるが、臨床では原因となる魚種を特定し、摂食可能な、あるいは摂食制限すべき魚種の指導を行うに留まることが多い。これに対し、近年、魚を少量ずつ計画的に摂食する経口免疫療法が行われているが、魚の身そのものを用いるため摂食により免疫応答が生じ、アレルギー症状が誘発されるリスクは否定できない。したがって、魚アレルギーに対するアレルギー症状を誘発するリスクの少ない免疫療法剤の開発が期待されるが、その評価系は確立されていない。【目的】① 抗原、もしくはペプチドを主体とした免疫療法剤のスクリーニングを想定し、*in vitro*における抗原特異的な T 細胞増殖の評価を可能にしたモデル作製を試みた。② 免疫療法剤の投与による症状抑制試験の前段階として、マウスへの鮭抗原の経口反復投与による症状誘発モデルの作製を試みた。【方法・結果】① 加工を施した種々の鮭由来粗抽出物を抗原として用いた。マウスに鮭由来粗抽出物を計 2 回腹腔内投与し感作を行った。別の感作方法として、マウスの背部を除毛し、テープストリッピングを行った後に、鮭由来粗抽出物をパッチに塗布し、マウス背部へ週に 1 回、計 4 週間固定し、経皮的に感作を行った。その結果、どちらの感作方法においても、血清中総 IgE 値の有意な上昇が認められた。マウス血清を用いた免疫ブロットや ELISA において、感作方法および感作で用いた抗原の種類によって反応するタンパク質が異なっていた。また、脾細胞単離後、鮭抗原の再刺激により、顕著な IL-13 の産生が認められた。② ①の方法と同様に感作した後に、週に 3 回、計 9 回抗原を経口的に反復投与し、直腸温低下を評価項目としてアレルギー症状を観察した。この際、抗原吸収能を高めるために aspirin を併用投与する群も設けた。その結果、抗原の反復経口投与により、血清中総 IgE 値の上昇ならびに直腸温低下が認められた。【結論】本研究で確立したマウス魚アレルギーモデルを用いることにより、抗原特異的なサイトカイン産生を指標としたスクリーニングならびに免疫療法剤を用いた症状抑制試験が可能であることが示唆された。

A-16 マウス海馬シナプス可塑性におけるN-アセチル転移酵素Shati/Nat81の役割



○遠藤 晃助¹、宇野 恭介^{1,2,3}、池島 大貴¹、宮本 嘉明^{1,2}、村松 慎一^{4,5}、新田 淳美^{1,2}

¹富山大学薬学部、²富山大・院医薬・薬物治療、³摂南大・薬・機能形態、⁴自治医科大学オープンイノベーションセンター神経遺伝子治療部門、⁵東京大学医科学研究所遺伝子・細胞治療センター

認知症患者が年々増加しており、深刻な問題となっている。認知症の症状には記憶障害を示す中核症状に加えて、抑うつや不安等を示す周辺症状がある。認知症の研究が精力的に行われているが、抜本的な治療薬の開発には至っていない。

我々は、アスパラギン酸からNAAを合成する酵素であるShati/Nat81の欠損マウス (Shati KO) では、野生型マウス (WT) と比較して、雌雄とも認知症の周辺症状が観察され、雌のみで記憶障害が観察されることを報告している (Uno et al., CINP 31st World Congress)。NAAはグルタミン酸と結合しN-アセチルアスパラギン酸-グルタミン酸 (NAAG) となり、mGluR3を活性化させることが知られている。本研究ではShati KO海馬CA1領域での長期増強 (long-term potentiation; LTP) を評価し、Shati/Nat81とシナプス可塑性の関係について検討した。

LTPの検討には、MED64システムによる多電極細胞外電位測定を行った。刺激電流強度は最大応答 (fEPSP amplitude) の40%の電圧となる刺激電流の大きさとした。シータバースト刺激前5分間の平均を基準として、刺激後120分間の測定を行った。さらに、雌性のShati KO マウスの海馬CA3領域にShati/Nat81 を組み込んだAAVベクターを注入した (AAV-Shati)。GFPのみを組み込んだAAV を注入したShati KOマウスをmock群とし、そのLTPに対する影響の変化を検討した。

【結果および考察】雌雄のShati-KOとも、それぞれのWTと比較して刺激後の電位の変化が低下しており、LTPが有意に障害されていた。海馬CA3へのAAV注入は注入領域のCA3およびCA1領域でも陽性細胞が観察され、Shati KOマウスで観察されたLTPの障害はAAV-Shatiの雌性Shati-KO海馬CA3領域への注入によって、有意に回復した。

Shati/Nat81の欠損は、LTPの障害を誘発し、特に海馬CA1およびCA3領域のShati/Nat81が重要であることが示唆された。雌雄のShati KOで海馬のLTPが障害され、記憶障害は雌性マウスのみ観察されたことについては、今後の検討が必要である。Shati/Nat81、NAAまたはNAAGが新たな認知症治療薬の開発標的となることが期待される。

A-17 Piezo 1の活性化は緑内障病態様の線維柱帯細胞障害を引き起こす



○両角 歩¹、稲垣 賢¹、岩田 悠暉¹、中村 信介¹、嶋澤 雅光¹、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析

【背景】緑内障は本邦の中途失明原因の1位を占める疾患である、その原因の一つとして高眼圧が挙げられる。眼圧の調節は毛様体からの眼房水の産生と、線維柱帯-シュレム管経路/ぶどう膜-強膜経路を介した眼房水の排出により恒常性が維持されている。特に線維柱帯細胞の異常は高眼圧を引き起こす原因になることが知られており、高眼圧条件下において線維柱帯細胞の減少や小胞体ストレスの蓄積及びミトコンドリア機能障害が認められている。しかしながら、高眼圧のような物理的刺激が障害を与えるメカニズムは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、機械刺激依存性チャネルの一つであるPiezo 1に着目し、線維柱帯Piezo 1の活性化が線維柱帯に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】免疫染色により、線維柱帯にPiezo 1が発現することを確認した。初代培養ヒト線維柱帯細胞にPiezo 1アゴニストであるYoda 1を1~20 μM の濃度で添加し、24時間及び1週間培養した。Yoda 1を添加した線維柱帯細胞について、Hoechst/Propidium Iodideによる細胞死、細胞増殖評価、スクラッチアッセイによる遊走評価及びウェスタンブロッティング法による小胞体ストレスマーカーの発現量変化の評価を行った。

【結果】線維柱帯細胞にはPiezo 1が発現し、20 μM Yoda 1の24時間処置はヒト線維柱帯細胞の増殖及び遊走を抑制し、わずかに細胞死を誘導した。また、Yoda 1の1週間の処置は、小胞体ストレスマーカーであるBiP及びGrp94を有意に増加させた。

【考察】Piezo 1の活性化は、ヒト線維柱帯細胞に緑内障病態下と類似した障害を引き起こした。線維柱帯のPiezo 1の活性化による軽度の細胞死亢進と小胞体ストレスの活性化は、Piezo 1活性化が高眼圧を示す緑内障において、二次的に線維柱帯細胞に障害を与える可能性を示唆しており、今後新規の緑内障治療標的となる可能性がある。

A-18 新規ピリドクロメン誘導体 KY-640 のリードスルー誘導作用および Hurler 症モデルマウスに対する作用

○伊東 佑真¹、古川 翔平¹、門田 卓也¹、三池 知紘¹、北尾 達哉¹、白波瀬 弘明¹

¹京都薬品工業(株)研究開発本部

【背景・目的】ナンセンス変異型希少疾患は、変異により生じた終止コドンで原因遺伝子の翻訳が中断し、原因蛋白質が欠損することにより発症する。ムコ多糖症 I 型 (Hurler 症) では原因蛋白質 α -L-iduronidase (IDUA) の欠損により細胞内に Glycosaminoglycan (GAG) が蓄積し、臓器の機能障害を惹起する。これまでに、アミノ配糖体 G418 や低分子化合物 Ataluren が、変異により生じた終止コドンを読み飛ばすリードスルー誘導作用により、欠損蛋白質の合成を回復させることが知られている。今回、新規ピリドクロメン誘導体 KY-640 が強力なリードスルー誘導作用を示すことを見出した。

【方法】変異 IDUA cDNA (Q70X, W402X) フラグメントを用いた Luciferase アッセイ、IDUA 変異 cDNA 導入細胞における IDUA 酵素活性および蛋白質発現測定、ならびに、Hurler 症患者由来細胞における IDUA 酵素活性および細胞内 GAG 蓄積量測定を行い、KY-640 の作用を G418 および Ataluren と比較した。さらに、Hurler 症モデルマウスにおける KY-640 の効果を検討した。

【結果・考察】KY-640 (0.3 - 10 μM) は Luciferase アッセイにおいて、G418 および Ataluren より強力なリードスルー活性を示した。また、KY-640 (1 - 10 μM) は変異 IDUA cDNA 導入細胞において、IDUA 酵素活性および蛋白質発現を増加させた。一方、G418 は 10 μM 以上で酵素活性増加作用を示し、Ataluren は 100 μM でも影響しなかった。さらに、KY-640 (0.3 - 1 μM) は Hurler 症患者由来細胞において IDUA 酵素活性を増加させ、細胞内 GAG 量を減少させた。G418 は IDUA 酵素活性を 30 μM 以上で増加させたが、Ataluren は 100 μM でも影響しなかった。Hurler 症モデルマウスにおいて、KY-640 (100 mg/kg, p.o., BID, 1 週間) は肝臓、脾臓および脳の IDUA 酵素活性を有意に増加させた。以上の結果から、KY-640 がナンセンス変異型 Hurler 症患者において、リードスルー誘導作用により IDUA 蛋白質を増加させる可能性が示された。

○椎森 仁美¹、市田 悠¹、藤原 由起¹、星崎 みどり¹、久場 敬司²、今井 由美子¹

¹(独)医薬基盤・健康・栄養研究所感染病態制御ワクチンプロジェクト、²秋田大・院医・代謝機能

インフルエンザウイルスの転写・複製は感染細胞の核内で行われるため、感染に伴ってヒストンの翻訳後修飾を含む宿主のエピジェネティックな制御機構が影響を受ける可能性が考えられる。ヒストン修飾の一つであるヒストンタンパク質のユビキチン化は、転写伸長やDNA修復に関与することが報告されている。しかし、インフルエンザウイルス感染における宿主のヒストンタンパク質のユビキチン化状態、またヒストンユビキチン化のインフルエンザの病態における役割はわかっていない。

CCR4-NOT複合体はユビキチン転移酵素を有し、タンパク質のユビキチン化に関わっていることが知られている。今回、ユビキチン転移酵素活性に必須なRINGドメインに変異をもつ細胞 (L16A) では、野生型細胞に比べインフルエンザウイルスの増殖が亢進していることを見出した。この結果は、宿主のユビキチン転移反応がインフルエンザウイルスの複製を抑制することを示唆する。さらにRINGドメイン依存的に、ヒストンH2Bタンパク質がユビキチン化されることを明らかにした。また、同ドメインはウイルスタンパク質や宿主のヒストンH3リジン4 (H3K4) 脱メチル化酵素 Jarid1Cのユビキチン化にも関与することがわかった。これらのことから、CCR4-NOT複合体はヒストンH2Bのユビキチン化を介して、インフルエンザウイルスの複製に関わっている可能性が示唆された。

○渡邊 政博¹、豊村 隆男¹、和氣 秀徳²、劉 克約²、勅使川原 匡²、高橋 英夫³、西堀 正洋²、森 秀治¹

¹就実大・薬・応用薬学・生体情報、²岡山大・院医歯薬総合・薬理、³近畿大・医・薬理

【背景と目的】 これまでに我々は、還元糖とアミノ基を有する分子が非酵素的に結合することによって生じる終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が、内在性の起炎分子として作用するメカニズムについて解析を行ってきた。その結果、従来知られていたAGEs受容体 (Receptor for AGEs, RAGE) を介したメカニズムに加えて、AGEsが生体内の機能性分子と相互作用することにより、相手の分子の機能を変化させるメカニズムが存在する可能性を見出した。これをうけて、AGEs化した担体を用いて生体組織よりAGEsと結合する分子の探索を試みたところ、多くの細胞種に共通して発現する分子AGEs-BP (仮称) を見出した。この分子もまた、AGEsとの相互作用によりその作用が変化する可能性が考えられる。そこで、この可能性を検討するための第一段階として、本研究において我々はAGEs-BPの作用を検討することを目的として、以下の検討を行った。

【方法】 タグ配列を付加したリコンビナントAGEs-BPの発現系を構築し、タグ配列を用いたアフィニティー精製によりリコンビナントAGEs-BPを調製した。このリコンビナントAGEs-BPを免疫担当細胞に与え、細胞機能の変化を検討した。

【結果と考察】 検討の結果、AGEs-BPは単独で免疫担当細胞を活性化し、炎症反応を誘起する可能性が示唆された。また、この分子の局在を検討したところ、通常細胞内に局在することが示唆された。これらの特徴は、通常細胞内に存在し、細胞の損傷に伴い細胞外に放出され、炎症反応を引き起こすダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) と総称される内在性起炎分子群の特徴と一致している。従って、AGEs-BPは新規DAMPs分子であると同時に、AGEsとの結合によって作用が変化する分子である可能性が見出された。

A-21 ホワイトサポテ由来フラボノイドによるlysyl oxidase発現抑制作用

○神谷 哲朗¹、跡部 卓¹、竹本 竜平¹、原 宏和¹、幅 愛実²、大山 雅義²、足立 哲夫¹

¹岐阜薬科大・臨床薬剤、²岐阜薬科大・生薬

「目的」ホワイトサポテ(*Casimiroa edulis*)は南米を原産とするミカン科カシミア属の植物であり、その果実は果物として食されている。これまでに、本植物から種々のフラボノイドが単離・精製されており、炎症性疾患に対する改善効果が期待されている。Lysyl oxidase (LOX)は、活性中心に銅イオンを配位するアミノキシダーゼであり、細胞外マトリックスの構成成分であるコラーゲンを架橋することで組織の弾性維持に貢献している。一方、がん微小環境においては、銅イオンの蓄積が認められること、LOX発現の増大が認められることから、LOXの発現・活性亢進に起因するがん増悪機構の存在が示唆されている。本研究では、がん微小環境を構築するキープクターである腫瘍関連M2型マクロファージ(M2Mac)におけるLOX発現制御機構を解析するとともに、LOX発現に及ぼすホワイトサポテ葉部および地下部に含有されるフラボノイドの影響を解析した。

「方法」細胞は、ヒト単球系細胞株THP-1細胞を用いた。THP-1細胞由来M2Macは、THP-1細胞をホルボールエステルで処理することによりM2Macへと分化誘導した後、IL4およびIL13で処理することで得た。各種遺伝子のmRNA発現はqRT-PCR法、タンパク質発現はWestern blotting法により解析した。ホワイトサポテ由来フラボノイドは、本植物の葉部および地下部より抽出・精製した後、DMSOに溶解して各種実験に供した。

「結果と考察」THP-1細胞をM2Macへと分化誘導したところ、LOX発現の顕著な亢進が認められた。また、本発現亢進は転写レベルで制御を受けていると考えられた。次に、LOX発現増大へのホワイトサポテ由来フラボノイド(#1-#7)の影響を検討した。各種フラボノイドの存在下でM2Macへと分化誘導したところ、フラボノイド(#5-#7)の存在下において、LOX発現増大は顕著に抑制された。IL4およびIL13はJAK/STAT経路を活性化することから、JAK2/3阻害剤(AG490)およびJAK1/2阻害剤(ruxolitinib)を用いてLOX発現に及ぼすJAK/STAT経路の関与を検討した。その結果、AG490はLOX発現増大抑制作用を示さなかったのに対して、ruxolitinib存在下においてLOX発現増大は顕著に抑制された。このことから、M2MacにおけるLOX発現増大にJAK1の関与が示唆された。また、JAKシグナルの下流に位置する転写因子STAT3のリン酸化は各フラボノイドの存在下において抑制された。以上より、ホワイトサポテ由来フラボノイド(#5-#7)は、JAK1/STAT3経路を阻害することでM2MacにおけるLOX発現増大を抑制すると考えられた。

A-22 インフルエンザウイルス感染における宿主ゲノム3D構造の変化

○市田 悠¹、椎森 仁美¹、藤原 由起¹、星崎 みどり¹、久場 敬司²、今井 由美子¹

¹医薬基盤健康栄養研究所、²秋田大・院医・代謝機能

ゲノムは核内でTopologically associating domains (TADs)と呼ばれるドメイン構造からなる3次元(3D)構造をとっている。TADsは、活性型のエピジェネティクス修飾を持つ“A”コンパートメントと、抑制型のエピジェネティクス修飾を持つ“B”コンパートメントに分離され、長距離の相互作用を介してエピジェネティクスな転写制御に関わっている。

インフルエンザウイルスの転写・複製は感染細胞の核内で行われるので、ウイルスタンパク質は宿主のエピジェネティック機構に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかしながら、インフルエンザウイルス感染がクロマチンの空間配置および核内の宿主のゲノム3D構造にどのように影響を与えるのかについては不明である。

本研究では、ChIP-seq法により、インフルエンザウイルス感染によって宿主の特定の遺伝子領域におけるヒストン修飾が変化することが示された。そこで、我々はヒストン修飾が変化した遺伝子領域に焦点を当て、ゲノム3D構造の変化について検証した。ゲノム3D構造の解析法である4C-seqおよびHi-Cを用いて、インフルエンザウイルス感染によって、クロマチン間の相互作用の変化やTADsおよびA/Bコンパートメント形成の動的変化が示された。さらにこの領域はインフルエンザウイルスの増殖に必須の領域であることがわかった。従って、我々の結果は、インフルエンザウイルス感染に対する宿主ゲノム3D構造の動的変化を示しており、これはインフルエンザウイルス感染の新規治療的となり得ることが示唆された。

口腔インプラント治療におけるオッセオインテグレーション促進作用を有する抗体医薬の開発

○河井 まりこ¹、大浦 清²

¹大阪歯科大・歯・薬理、²太成学院大学看護学部

[目的] インプラント体と顎骨との確実なオッセオインテグレーションはインプラント治療における成功の鍵である。そこで、われわれは口腔上皮細胞の接着を制御することを目的とし、上皮細胞の接着に関与する基底膜成分の1つであるlaminin 332の立体構造変化に応答する抗体を作製することを目的とした。

[方法] laminin 332の立体構造変化に関与するプロセッシング部位のアミノ酸配列を同定した。同定したアミノ酸配列を抗原として、モノクローナル抗体をマウスにて作製した。作製されたクローン50個について、laminin 332との結合能解析をEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法にて行い、結合能の高いクローンを選定した。次に、ヒト歯肉由来細胞Ca9-22を用いて、選択したクローン添加群の細胞接着能試験を行い、無添加群との比較検討を行った。

[結果] クローン添加したヒト歯肉由来細胞株では培地のみを添加したコントロール群と比較し、有意に接着能が低下した。

[考察および結論] laminin 332は高次立体構造の変化により生理的活性を有し、また、その立体構造はプロセッシングによって変化する。今回の結果から、口腔上皮細胞の接着を制御する抗体医薬開発の可能性が示唆された。今後はクローンの間葉系細胞への影響についても検討を行い、上皮細胞と間葉系細胞の両方を制御することが可能な抗体医薬開発へと繋げていく予定である。

内向き整流性Kir2.1K⁺チャネル発現亢進による骨芽細胞分化促進

○鬼頭 宏彰¹、大矢 進¹

¹名古屋市立大・院医・薬理

【背景・目的】骨組織は、骨形成と骨吸収のバランスにより恒常性が維持されている。前骨芽細胞の細胞増殖・分化は骨芽細胞の成熟において重要な役割を果たしており、骨芽細胞分化障害は骨代謝性疾患の原因となると考えられている。近年Orai1を介したストア作動性Ca²⁺流入 (SOCE) が骨芽細胞分化を制御することが明らかにされ、骨形成におけるCa²⁺シグナルの重要性が注目されている。内向き整流性K⁺チャネル (Kir) は、静止膜電位形成に寄与することでSOCE等の細胞内Ca²⁺動態の制御に関与すると考えられる。本研究では網羅的遺伝子発現解析の結果からKir2.1の発現が骨芽細胞分化により亢進することを明らかにしている。そこで骨芽細胞分化に関わるCa²⁺シグナルの調節因子としてKir2.1に着目し、骨芽細胞分化に対する役割について検討した。

【結果・考察】骨芽細胞分化を誘導したマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1において、Kir2.1発現が顕著に増大することを明らかにした。Kir2.1発現亢進による細胞膜電位への影響を評価するためにKir2阻害薬ML133 (10 μM) 誘発性脱分極反応を測定したところ、分化誘導細胞において有意に大きな脱分極反応が生じた。また、SOCEを介したCa²⁺流入に対するKir2阻害の影響を検討したところ、分化誘導細胞においてSOCEを介したCa²⁺流入が有意に抑制された。さらに、Kir2.1阻害は、骨芽細胞分化マーカーの発現抑制、マウス胚中足骨の軟骨内骨化を有意に抑制した。以上の結果より、Kir2.1はCa²⁺シグナルを制御することで骨芽細胞分化による骨形成に一部寄与する可能性が明らかとなった。

A-25 染色体パッセンジャー複合体による未分化能維持機構

常松 貴明¹、石丸 直澄¹、○工藤 保誠¹

¹徳島大・院医歯薬・口腔科学

染色体パッセンジャー複合体 (Chromosome passenger complex: CPC) は、Aurora-B、INCENP、Borealin、およびSurvivinよりなり、正確な染色体分配を制御するキー調節因子として機能している。我々は、Borealinタンパクが体細胞においてG1期にAnaphase promoting complex/cyclosome-Cdh1 (APC/C^{Cdh1}) によってユビキチン化されることを見出した。Aurora-BタンパクもG1期において、APC/C^{Cdh1}によりユビキチン分解されることが報告されていることから、G1期においてAPC/C^{Cdh1}によりBorealinおよびAurora-Bがユビキチン分解されることで、CPC活性が消失することが示唆された。一方、胚性幹細胞では、細胞周期を通じてAPC/C^{Cdh1}の活性が低いため、BorealinおよびAurora-Bは安定化していた。レチノイン酸 (RA) の投与による胚性幹細胞の分化過程において、BorealinはAPC/C^{Cdh1}によってユビキチン分解された。Borealinの非分解型変異体は、RAによる分化誘導をレスキューした。胚性幹細胞において、Borealinおよび他のCPC構成因子はクロマチンに局在し、複合体を形成するとともに、間期においてもAurora-Bの活性化が認められた。これら結果は、CPC活性が胚性幹細胞の未分化能維持に重要な役割を果たすことを示唆している。実際に、胚性幹細胞において、BorealinあるいはAurora-BのknockdownおよびAurora-Bキナーゼ阻害剤の投与は自発的に分化を誘導した。以上より、APC/C^{Cdh1}によるBorealinおよびAurora-Bのユビキチン分解は、CPCの活性低下を介して多能性幹細胞の分化を誘発することが示唆された。

A-26 涙腺炎発症後の雄性NODマウスにおけるAQP5およびYAPの発現の検討

○大野 雄太¹、佐藤 慶太郎¹、柏俣 正典¹

¹朝日大・歯・歯科薬理

【背景】シェーグレン症候群 (Sjogren's syndrome、以下SjS) は、涙腺や唾液腺といった外分泌腺における慢性炎症により生じる外分泌機能の低下から、ドライアイやドライマウスなどの症状を呈する。これらの病態生理に関与する外分泌機構には不明な部分が多く、原因療法の開発は実現に至っていない。Non-obese diabetes (NOD) マウスは涙腺および唾液腺において炎症性細胞の浸潤がみられるため、SjSモデルとして応用されている。NODマウスにおける涙腺炎および唾液腺炎は、それぞれ雄および雌で高率に発症する。我々は性周期に影響されない雄性マウスを用いて外分泌を解析することが、外分泌不全症状における外分泌機構解明の手がかりになると考えた。そこで本研究では、雄性NODマウスの涙腺を用いて、涙液分泌低下機序の病態について検討した。

【方法】実験には雄性NODマウス、およびその対照としてBALB/cマウスを用いた。発症時期について検討するため、4、6、10週齢において、三種混合麻酔下でピロカルピン0.5 mg/kgを腹腔内投与前、および投与後2分毎に涙液分泌量を30秒間計測した。また、涙腺および各大唾液腺の重量を測定し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を行った。10週齢において、水分泌に関与するaquaporin 5 (AQP5) および細胞増殖に関与するyes-associated protein (YAP) とそのリン酸化体タンパクの発現を、ウェスタンブロット法により検討した。

【結果】涙液分泌量は対照に比して10週齢の雄性NODマウスにおいて有意に減少していた。また、10週齢のNODマウスの涙腺は肥大しており、対照マウスに比して体重補正重量あたり約1.3倍であった。大唾液腺は舌下腺を除きNODマウスと対照マウスで有意差は認められなかった。HE染色から、10週齢のNODマウスの涙腺においてリンパ球が浸潤する病巣が複数認められた。涙腺炎発症後のAQP5の発現は、対照マウスに比してNODマウスの涙腺において、タンパクレベルで低下していた。涙腺炎発症後のYAPおよびそのリン酸化体の発現についてはNODマウスと対照マウスで有意差は認められなかった。

【考察】涙腺炎発症後の雄性NODマウスにおける涙液分泌低下はAQP5の減少が関与している可能性が示唆された。涙液分泌機能低下に伴い肥大化した涙腺において、10週齢の時点ではYAP関連シグナルは関与していないと考えられた。

○西川 恵三^{1,2}、檜崎 綾子²、吉原 利忠³、坂口 怜子⁴、飛田 成史³、森 泰生⁴、石井 優^{1,2}

¹大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫細胞生物学、²大阪大学大学院生命機能研究科免疫細胞生物学、³群馬大学理工学府分子科学部門、⁴京都大・院工・分子生物化学

哺乳類の成体における中心的な造血組織である骨は、骨破壊を担う破骨細胞と骨形成にかかわる骨芽細胞の協調的な働きによって新陳代謝する組織である。近年、破骨細胞の制御にかかわる環境因子として酸素が注目されているが、生体内で個々の細胞を取り巻く酸素環境は実に曖昧としておりその実体はほとんど明らかとなっていない。これまで、硬組織に囲まれた骨髄中の酸素分圧を定量解析することは困難であった。しかし、近年の生体イメージング技術の長足の進歩に伴って、二光子励起顕微鏡を用いたリン光観察によって生体の酸素イメージングが可能となってきた。即ち、リン光が酸素によって消光される性質を利用することで、生体内の酸素分圧の変化を観察することが可能になった。しかし、従来法では細胞膜透過性が悪いリン光プローブが用いられていたため、骨髄内の酸素分圧を細胞レベルで解析するには至っていない。そこで、本研究では、細胞膜透過性が高いリン光プローブBTPDM1を用いることで、生体骨組織内の破骨細胞が晒されている酸素分圧を解析することを目的とした。成熟破骨細胞を蛍光タンパク質EGFPで標識したマウスにBTPDM1を投与し、二光子励起顕微鏡によってマウスを生かしたまま骨髄内の蛍光とリン光を同時にイメージングする系を立ち上げた。実際、マウスを低酸素曝露することで、破骨細胞内のリン光がリアルタイムに低下することを観察した。さらに、リン光の変化を定量的に解析する方法としてリン光寿命イメージングを活用することで、破骨細胞が晒される酸素分圧や低酸素曝露に伴うその変化を定量解析する方法を確立した。本成果は、生体骨組織内で破骨細胞を取り巻く酸素環境の実体を定量的に明らかにした。本法は、破骨細胞に加えて、骨髄内の種々の細胞にも応用可能であることから、生体内の酸素環境を詳細に明らかにできる画期的な方法論になることが期待される。

パーキンソン病原因遺伝子*PARK9*の発現低下に起因する細胞内二価鉄イオンの局在変化

○位田 雅俊¹、木内 政徳¹、中井 岳¹、栗田 尚佳¹、平山 祐²、永澤 秀子²、保住 功¹

¹岐阜薬科大・薬物治療、²岐阜薬科大・薬化

パーキンソン病 (PD) は、黒質におけるドパミン神経細胞の脱落を主徴とする神経変性疾患である。発症機序は不明であるが、10%の家族性と90%の孤発性に大別される。病理学的な特徴として、残存ドパミン神経細胞内にLewy小体の出現がある。また、通常でも加齢により脳内の鉄レベルが上昇するが、PD患者において大脳基底核で鉄蓄積が認められる。また、家族性PD原因遺伝子*PARK9*であるCation-transporting ATPase13A2 (ATP13A2) 患者では脳内においても鉄沈着が報告され、脳内の鉄沈着異常症であるNeurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) の一型とも報告されている。鉄は生理学的に必要な不可欠な元素である。その一方で、鉄恒常性の破綻は、酸化ストレスなどを引き起こし、それに伴い神経変性疾患の発症に寄与すると考えられる。しかし、これまで鉄、特に二価鉄に関する選択的プローブがなかったため、PD病態時における細胞内鉄動態は不明なままであった。近年、二価鉄イオン選択的蛍光プローブが開発された。そのプローブを用いて、ATP13A2に関してその細胞内鉄動態に与える影響を検討した。ヒト肝癌由来細胞HepG2細胞に二価鉄として硫酸アンモニウム鉄(II)を処置し、ミトコンドリア、リソソームおよび小胞体に特異的な二種類の蛍光プローブを用いて染色を行い、観察した。その結果、鉄濃度依存的に蛍光強度が増大した。さらに、同時に鉄キレート剤として2,2'-bipyridylを処置すると、蛍光強度が減少した。この結果より、これらの蛍光プローブが二価鉄イオンを検出していることが確認された。続いて、HepG2細胞にATP13A2選択的siRNAを処置して作成したATP13A2ノックダウン細胞に対して、これらのプローブを用いて染色を行い、蛍光強度を測定した。その結果、ミトコンドリア、リソソームにおいても蛍光強度が増大した。一方で小胞体では蛍光強度には変化がなかった。以上より、ATP13A2ノックダウンにより細胞内鉄動態が攪乱されていることが示唆される。今後は、鉄動態攪乱が細胞死与える影響を検討することで、PDやそれに関連する鉄沈着性の疾患のメカニズム、および創薬ターゲットの構築に貢献していきたいと考えている。

LPS 誘発性炎症反応はHDAC の活性化を介してミクログリア $\alpha 7$ ニコチン受容体発現を減少させる

○中村 庸輝¹、木村 小百合²、高田 直樹¹、武村 昌俊²、児玉 景太郎¹、岩本 桃香²、中島 一恵¹、仲田 義啓¹、森岡 徳光¹

¹広島大学大学院医系科学研究科薬効解析科学、²広島大学薬学部

[目的] 中枢神経系における免疫担当細胞であるミクログリアを介した脳内炎症が、アルツハイマー病などを含む神経変性疾患の進行に寄与する可能性が報告されており、これらの炎症制御機構の解明が新規治療薬の開発に繋がると考えられる。 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体 ($\alpha 7$ -nAChR) は、ミクログリアにおける食食能の炎症反応制御や食食能の亢進に関与することが報告されている。しかしながら、アルツハイマー病モデル動物において、病態進行に伴ってミクログリアの $\alpha 7$ -nAChR 発現低下が認められ、この反応がアミロイドベータの沈着や炎症反応の増悪に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。そこで、本研究では炎症時のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を介した $\alpha 7$ -nAChR の発現制御機構を検討した。

[方法] マウスミクログリア細胞株 BV2 細胞を用いて、各種薬物処置後に $\alpha 7$ -nAChR 発現量は real-time PCR 法により、ヒストン H3 のアセチル化量の変化は Western blotting 法により解析した。

[結果] LPS による炎症性刺激は BV2 細胞における $\alpha 7$ -nAChR 発現量を時間依存的に減少させ、この反応は LPS の受容体である toll-like receptor 4 (TLR4) の阻害剤により拮抗された。また、LPS 刺激はヒストン H3 のアミノ末端から 9 番目のリジン (K9) のアセチル化量を時間依存的に減少させた。さらに pan-HDAC 阻害剤である trichostatin-A、HDAC2 並びに HDAC3 に対する阻害剤である MI-192 の前処置は LPS 刺激による $\alpha 7$ -nAChR 発現量の減少を抑制した。

[考察] ミクログリアにおける $\alpha 7$ -nAChR 発現量の減少は TLR4-HDAC 系を介してヒストン H3 (K9) が脱アセチル化されることにより引き起こされるエピジェネティクス制御が関与する可能性が示唆された。以上の結果から、HDAC 阻害剤は炎症反応による $\alpha 7$ -nAChR 発現量の減少を抑制することで、ミクログリアを介した脳内環境の恒常性維持に寄与する可能性が推察される。

エンドセリン受容体拮抗薬Bosentanによる頭部外傷後の血管原生脳浮腫に対する抑制効果

○道永 昌太郎¹、井上 杏奈¹、山本 隼人¹、龍 亮太郎¹、水口 博之¹、小山 豊²

¹大阪大谷大・薬・薬理、²神戸薬科大・薬・薬理

【背景】血管原生脳浮腫は頭部外傷などの脳傷害によるBlood-brain barrier (BBB)の破綻によって惹起される致命的な病態であるが、有効な治療薬はかなり限定されており、新たな治療薬の確立が必要とされている。本研究では、脳傷害後の様々な病態の形成に関わる生理活性ペプチドであるEndothelin (ET)に注目し、ET受容体拮抗薬Bosentanによる頭部外傷後の血管原生脳浮腫に対する効果を検討した。

【方法】Fluid percussion装置により発生させる水圧によって麻酔下のマウス（雄性ddY, 6-7 週齢）にFluid percussion injury (FPI) による頭部外傷を与えた。BBBの破綻は尾静脈より投与したEvans blueの脳組織への漏出により評価し、脳浮腫はwet-dry法により脳組織の水分含有率を算出することで評価した。血管透過性亢進因子 (metallopeptidase 9: MMP9およびvascular endothelial growth factor: VEGF) と血管修復因子 (Angiopoietin -1: ANG-1) の発現はReal-time PCR法により確認した。Bosentan (0.6, 3および15 mg/kg/日)は尾静脈内へ投与し、FPIの2日後から5日後にかけて反復投与した。

【結果・考察】FPIを与えたマウスの脳では2日後から5日後にかけてBBBの破綻による血管原生脳浮腫が惹起されたが、Bosentanを投与したマウスでは血管原生脳浮腫が抑制されていた。また、脳浮腫改善薬として使用されている高張液D-mannitolとBosentanを併用したところ、それぞれの単独投与よりもFPI後の脳水分含有率の増加が抑制されていた。さらに、FPIを与えたマウスの脳組織ではMMP9やVEGFの発現が増加していたが、Bosentanの投与によってこれらの発現増加は抑制されていた。その一方で、ANG-1の発現はBosentanの投与によって増加していた。これらの結果より、Bosentanは血管透過性亢進因子の発現抑制および血管修復因子の発現増加を介して、頭部外傷後の血管原生脳浮腫を抑制できることが示され、血管原生脳浮腫に対する新たな治療薬となりうることを期待される。

脳内出血病態形成過程におけるロイコトリエンB₄の機能解析

○肱岡 雅宣¹、懐 理紗¹、香月 博志²、北村 佳久¹

¹立命館大・薬・薬効解析、²熊本大・院生命科学(薬)・薬物活性

【目的】脳内出血は脳血管が破れることにより脳実質内に血液が漏出する疾患である。近年の研究により、脳内出血発症後に好中球が脳内へ浸潤することで病態を悪化させることが見出されている。我々の過去の研究において、好中球の走化性因子として知られる生理活性脂質であるロイコトリエンB₄ (LTB₄) の受容体 (BLT1) 遮断薬が脳内出血に対して治療効果を示すことを見出した (Hijioka *et al.*, 2017)。しかしながら、脳内出血時にLTB₄が増加するか、また、LTB₄の詳細な作用プロファイルは不明であったため、解明に取り組んだ。

【方法】8週齢の雄性C57BL/6Jマウスの線条体へVII型コラゲナーゼを0.025 U注入することで脳内出血を惹起し、その後、脳を摘出し、LC-MS/MSによる脂質の定量解析を行った。マウスミクログリア細胞株BV-2細胞にトロンビン (0-30 U/mL) を処置し、iNOS mRNA量をReal-time PCR法により、培地中のLTB₄量をELISA法により測定した。LTB₄受容体BLT1の選択的遮断薬としてU-75302を用いた。好中球の遊走能を調べるために、好中球様に分化させたヒト骨髄性白血病細胞HL-60細胞 (dHL-60細胞) を用いた。dHL-60細胞を3.0 μm径の多孔質膜をもつTranswell®の上層に載せ、下層にBV-2細胞の培養上清を処置し、下層へ遊走するdHL-60細胞を計数した。

【結果・考察】脳内出血惹起後LTB₄の量は著明に増加した。一方で、プロスタグランジン類をはじめとした他のアラキドン酸代謝物は減少する傾向を示した。血液成分であるトロンビンをBV-2ミクログリアに処置したところ、iNOS mRNAおよび培養上清中のLTB₄が有意に増加した。U-75302の前処置はトロンビンによるiNOS mRNAの増加を抑制したことから、LTB₄はトロンビンによるミクログリアの活性化を増悪させることが示唆された。また、dHL-60細胞はトロンビンを処置したミクログリアの培養上清に対して走化性を示したが、U-75302はこれを抑制した。以上の結果より、脳内出血時にはミクログリアから産生されたLTB₄がミクログリア自身の活性化を増悪させるだけでなく、好中球の浸潤を促進させることで脳内出血病態の形成に関与することが示唆された。

B-05 肝障害はボルテゾミブ誘発性末梢神経障害の発症リスクを増大させる

○宮本 朋佳^{1,2}、富士谷 昌典²、堂本 莉紗¹、畑中 重克³、福山 紘基²、関口 富美子¹、小泉 祐一²、川畑 篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²(医)生長会 府中病院薬剤部、³(医)生長会 府中病院臨床検査室

【背景・目的】我々は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）の発症にdamage-associated molecular patternsの1つであるhigh mobility group box 1（HMGB1）が関与することを明らかにしている。一方、飲酒やウイルス感染に伴って肝細胞から分泌されるHMGB1が肝障害（線維化を含む）に関与することが報告されている。第134回日本薬理学会近畿部会において、我々は、オキサリプラチン投与開始後、肝障害マーカーであるALTの上昇が見られた患者ではその後CIPNが重症化すること、また、実験的に肝障害を誘発したマウスではオキサリプラチン投与後に血中HMGB1が濃度上昇しCIPNが増悪することを報告した。今回は、多発性骨髄腫治療薬ボルテゾミブ（BTZ）によるCIPNの発症と肝障害との関係を明らかにするため、患者の臨床データをレトロスペクティブに解析し、さらに、マウスにおいてBTZ誘発性CIPNに及ぼす実験的肝障害の影響を検討した。【方法】2014年～2019年に生長会府中病院でBTZを投与した患者63人についてCIPNの発症率とgrade（1-4）に影響する因子を解析した。統計解析はスピアマンの順位相関分析の他、連続変数を2値変数に変換した後、フィッシャーの正確確率検定、Log-rank検定およびcox比例ハザード回帰分析を用いて行った。マウスCIPNモデルはBTZ反復腹腔内投与により作製し、実験的肝障害はCCl₄腹腔内投与により誘起した。【結果】臨床データ解析により、BTZ投与開始前後のビリルビン（Bil）値および投与開始後のγ-GTP値とCIPN gradeとの間に有意な正相関が認められた。検査値を2値変数へ変換後に行った解析では、Bil値が投与開始前0.44以上、開始後0.88以上であることは時間経過とともにCIPN発症率を上昇させる有意な因子であること、また投与開始後Bil値は、投与前Bil値を考慮しても独立した寄与因子であることが判明した。一方、マウスにおいて実験的肝障害はBTZ誘発性CIPNを増悪させた。【考察】臨床データ解析により、肝障害がBTZによるCIPNのリスク因子であることが示唆され、動物実験によってそれを裏付けることができた。

B-06 好中球様細胞におけるHistidine-Rich Glycoprotein(HRG)の影響

○吉井 将哲¹、和氣 秀徳¹、高橋 陽平¹、王 登莉¹、勅使川原 匡¹、西堀 正洋¹

¹岡山大・院医歯薬総合・薬理

【背景】好中球の血管内壁に対する細胞接着による過剰な血栓形成(immunothrombus)は、好中球細胞外トラップ(NETs)の放出と活性酸素の産生により敗血症患者における多臓器不全を引き起こし、高い死亡率の原因となっている。我々のこれまでの研究で、マウス敗血症病態モデルにおいて低下した血漿タンパクの一つ、Histidine-rich glycoprotein (HRG)の補充的投与が好中球の接着、NETsの放出、immunothrombusの形成を阻害することによりマウスの生存率を有意に改善することを明らかにしてきた。これらの結果から、HRG補充療法は最も有力な敗血症治療戦略の一つであることが示唆されたが、HRGのヒト好中球への影響は十分には明らかにされていない。一方、ヒト好中球は試験管内環境では長時間の生存が出来ず、また好中球には個人差もあり、好中球を使用した安定的な実験系を得ることは難しい。ヒト骨髄球性白血病由来の細胞株であるHL-60およびNB-4は、レチノイン酸(ATRA)によって好中球様細胞へ分化が促されることが知られている。我々はこれらの細胞株由来の好中球様細胞が、末梢血から分離精製したヒト好中球と同様の反応を示すことを確認するとともに、HRGの好中球様細胞における影響を調査した。【方法】HL-60およびNB-4をレチノイン酸により好中球様細胞へ分化誘導した。これらの細胞をHBSS、human serum albumin (HSA)、HRGによる処理を行った。HRGの好中球様細胞に対する影響を、細胞形態の観察、微小毛細管通過時間測定、接着分子の測定、ROS産生量測定を用いて評価した。【結果】HRGは好中球様細胞の形態を球状に維持し、微小毛細管通過時間を短縮した。これらのデータはHRGが好中球様細胞の球状形態を維持することで、微小流路への接着を抑制することを示唆している。また、HRG処理は、刺激物質により誘導された活性酸素の産生を抑制することが明らかとなった。【結論】HRGの影響を調査する上で、分化誘導した好中球様細胞が、ヒト好中球と同様の反応を示したことから、HRG研究の新たな手段となることが示された。

B-07

低酸素処置によるゼブラフィッシュ脳虚血モデルの作出と薬効評価系の構築



○松本 真実¹、宮本 萌里¹、澤幡 雅仁¹、小田 果奈¹、泉 安彦^{1,2}、赤池 昭紀^{1,3}、久米 利明^{1,4}

¹京都大・院薬・薬品作用解析、²神戸薬科大・薬・薬理、³和歌山県立医科大学、⁴富山大・院医薬・応用薬理

【背景・目的】我々はこれまでにゼブラフィッシュ稚魚の飼育水を窒素還流することで低酸素処置を行い、その後再酸素化により、脳虚血モデルの作出に成功した。この処置で稚魚の脳血流の停止および再灌流が惹起され、脳での細胞死および神経細胞障害が起こることを報告してきた。しかし、この方法では一頭体ずつの評価しか行えないため、薬効評価を行うにはスループットが低い。そこで本研究では、脳梗塞治療薬の効率的な探索のため、よりスループットの高い薬効評価系の構築を試みた。

【方法】実験には、赤血球前駆細胞にmRFPを発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュTg (gata1 : mRFP) を用いた。窒素灌流法では、窒素でバブリングしたE3 mediumに置換し、窒素ガスを灌流させたチャンバー内で維持することで低酸素処置を行った。脱酸素剤法では、窒素でバブリングしたハンクス液に置換し、容器内に脱酸素剤を入れて低酸素処置を行った。その後、通常のE3 mediumに戻すことで24時間の再酸素化を行った。再酸素化後にアクリジンオレンジ (AO) 染色を行い、細胞死を評価した。

【結果・考察】最初に窒素灌流法にて、受精後4日目の稚魚に脳血流が停止するまで低酸素処置 (50 - 120分間) を行った。再酸素化24時間後にAO染色を行ったところ、死細胞を示すAO陽性細胞数が対照群と比べて有意に増加した。またモデルの妥当性を評価するために、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの作用を検討した。エダラボン (5 μM) を再酸素化時の24時間処置した際には、低酸素により惹起されたAO陽性細胞数を有意に抑制した。次に、より効率的に薬効評価を行うために脱酸素剤を用いて低酸素処置を行った。脱酸素剤による低酸素を2時間以上行うことで、AO陽性細胞数は対照群と比べて有意に増加した。加えて、脱酸素剤を用いたモデルの有用性を検討するためにエダラボンおよび非競合型NMDA受容体アンタゴニストであるMK-801を処置した。エダラボン (750 - 1000 μM) を再酸素化時の1時間処置したところ、低酸素により惹起されたAO陽性細胞数を有意に抑制した。さらにMK-801 (20 - 40 μM) を低酸素処置中の2時間および再酸素化時の3時間の合計5時間処置したところ、低酸素により惹起されたAO陽性細胞数を有意に抑制した。以上から、ゼブラフィッシュ稚魚に脱酸素剤を用いて低酸素処置することにより、窒素灌流法よりもスループットの高い脳虚血モデルの薬効評価系の構築に成功したと考えられる。

B-08

p-coumaric acidのオートファジーを介した変異SOD1毒性に対する神経保護効果



○上田 智之¹、伊藤 泰生¹、栗田 尚佳¹、位田 雅俊¹、保住 功¹

¹岐阜薬科大・薬物治療

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は運動ニューロンの選択的な変性を特徴とする進行性の神経変性疾患である。この疾患に対する明確な治療法は存在していない。家族性ALSの原因遺伝子としてCu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) が同定された。野生型SOD1が安定したホモダイマーを形成するのに対し、変異型SOD1は3次構造に異常をきたし、凝集体を形成、細胞質内に蓄積する。過去の報告より、蓄積した変異SOD1タンパク質がミトコンドリア障害や小胞体ストレス、軸索輸送障害、神経栄養因子欠如などを惹起することで運動神経が脆弱になり、神経細胞死が起こることが明らかにされている。我々はこれまでにエタノール抽出ブラジル産グリーンプロポリス (EBGP) 及び、その含有成分であるケンフェロールが変異SOD1細胞内蓄積を有意に減少させることを確認した。さらに、その抑制効果にはタンパク分解経路であるオートファジーが関与していることも確認した。また、EBGP中にはp-coumaric acid、artepillinCなどを始めとする桂皮酸誘導体が多く含有されている。しかし、変異SOD1毒性と桂皮酸誘導体との関係は未だ不明である。そこで、変異SOD1蓄積に対する桂皮酸誘導体の影響について培養細胞系を用いて検討した。結果、p-coumaric acid、artepillinCの双方において有意な変異SOD1凝集体抑制効果を確認した。細胞生存率、細胞毒性においてもp-coumaric acid、artepillinC双方が変異SOD1誘発性の毒性を抑制することを確認した。そこでこれらの神経保護効果を示す機構を解明するため、蛋白分解系路の一つであるオートファジーとの関連性について検証した。結果、p-coumaric acidによりオートファジーマーカーであるLC3-IIの上昇、及び、p62の低下を確認した。以上より、p-coumaric acidには変異SOD1に対するオートファジーを介した細胞内凝集体抑制による神経保護効果があることが示唆された。これらの成果はALSのような難治性神経変性疾患だけではなく他のオートファジー関連疾患に対する進行抑制薬としての分子基盤が構築できると考えられる。

マウスにおけるbortezomib誘発性末梢神経障害の発症および維持におけるHMGB1の役割とその起源

○池田 裕哉¹、宮崎 貴也¹、坪田 真帆¹、富田 詩織¹、関口 富美子¹、西堀 正洋²、川畑 篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²岡山大・院医歯薬総合・薬理

核内タンパクhigh mobility group box1 (HMGB1) は、種々の細胞から放出され、TLR4、RAGEおよびCXCR4などの標的分子を介して炎症や痛みのシグナルを促進する。我々は、抗がん剤paclitaxelにより誘起される末梢神経障害にMφ由来HMGB1が関与することを明らかにしている。一方、多発性骨髄腫の治療に用いられる第一世代プロテアソーム阻害薬bortezomib (BTZ) も末梢神経障害を誘起する。そこで本研究ではBTZ誘発性末梢神経障害へのHMGB1の関与とその起源について検討を行った。マウスにBTZ 0.4 mg/kgを2週間で計6回反復腹腔内投与し、von Frey法により侵害受容閾値を測定したところ、BTZ投与開始7日後に閾値が最低値に達した後、14日後以降もこの状態が持続していた。抗HMGB1中和抗体 (Ab)、RAGE拮抗薬FPS-ZM1、CXCR4拮抗薬AMD3100、Mφ/ミクログリア活性化阻害薬 minocycline (Mino)、MφからのHMGB1遊離を阻害するethyl pyruvate (EP) またはMφ枯渇薬liposomal clodronate (Clo) の腹腔内投与により、BTZ誘起アロディニアの発症は阻止された。一方、BTZによる末梢神経障害成立後に各薬物を腹腔内投与した場合、Ab、FPS-ZM1およびMinoは低下した侵害受容閾値を上昇させたが、AMD3100、EPおよびCloは無効であった。次に、脊髄後根神経節 (DRG) への F4/80陽性Mφの浸潤・蓄積を蛍光免疫染色法により検出したところ、BTZ投与開始3日後にMφ数の有意な増加が認められ、この変化は14日後には消失していた。培養マウスMφ様RAW264.7細胞において、BTZと第2世代プロテアソーム阻害薬carfilzomibあるいはixazomibを作用させたところ、いずれによってもHMGB1の細胞外放出が認められたが、BTZが最も低濃度で効果を示した。また、BTZ刺激後、HMGB1の細胞質移行に関与するhistone acetyltransferase (HAT) であるCBTおよびPCAFの発現誘導が見られた。最後に、抗酸化薬N-acetyl-L-cysteineは、BTZによるRAW264.7細胞からのHMGB1放出を抑制し、マウスにおける末梢神経障害の発症を阻止した。以上より、BTZ誘発性末梢神経障害の発症にはレドックス依存性にMφから放出されたHMGB1によるRAGEおよびCXCR4の活性化が、また、症状の持続にはMφ以外の細胞由来のHMGB1によるRAGE活性化が関与する可能性が示唆された。

マウスにおいて肝障害により放出されるHMGB1はボルテゾミブ誘発性末梢神経障害を増悪させる。

○堂本 莉紗¹、宮本 朋佳^{1,2}、関口 富美子¹、坪田 真帆¹、小泉 祐一²、西堀 正洋³、川畑 篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²(医)生長会 府中病院、³岡山大・院医歯薬総合・薬理

【目的】核内タンパクhigh mobility group box 1 (HMGB1) は炎症や組織損傷に伴って細胞外へ放出され炎症や痛みのシグナルを増強する。我々はHMGB1が化学療法誘発性末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy; CIPN) の発症に重要な役割を果たすことを明らかにしている。一方、飲酒やウイルス感染などに伴って肝細胞から細胞外へ放出されるHMGB1が、肝機能障害の進行に関与する可能性が示唆されている。第134回日本薬理学会近畿部会において、我々は、オキサリプラチン投与後のCIPNが肝障害により増悪するとの臨床および基礎研究結果を報告した。本研究では、多発性骨髄腫の治療に用いられるプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ (BTZ) によるCIPNに及ぼす肝障害の影響と、内因性HMGB1の関与を検討した。【方法】ddY系雄性マウスにBTZ 0.04, 0.1あるいは0.4 mg/kgを1週間に3回、2週間で計6回反復腹腔内投与し、von Frey法で後肢足底における機械的侵害受容閾値を測定した。肝障害は四塩化炭素 (CCl₄) 50 mg/kgを腹腔内投与することで誘起した。臨床データ解析は、生長会府中病院のBTZ投与患者61人の電子カルテ情報を収集して実施した。【結果】マウスにおいてBTZの投与量に依存的して機械的アロディニアが誘発された。CCl₄単回投与24時間後、血清AST、ALTの劇的上昇とHMGB1濃度の有意な上昇が見られた。そこで、単独ではアロディニアを誘起しない 0.1 mg/kgのBTZを投与し、CCl₄をBTZ投与開始1日前と、2~6回目のBTZ投与1時間前に反復投与したところ、明らかなアロディニアが誘発された。BTZ投与開始14日後の血清中AST、ALT、HMGB1濃度は、BTZまたはCCl₄単独投与群では変化していなかったが、両者を併用投与した群ではいずれも有意に増加していた。このBTZ、CCl₄併用投与により誘発されるアロディニアは、抗HMGB1中和抗体あるいはHMGB1不活性化作用を有する遺伝子組換えヒト可溶性トロンボモジュリンの反復腹腔内前投与により完全に阻止された。臨床データ解析の結果、BTZ投与患者におけるCIPN発症率は、BTZ投与前の総ビリルビン値が0.45以上の患者で有意に高かった (ハザード比4.28)。【考察】動物実験の結果から、肝障害により放出されるHMGB1がBTZによるCIPNを増悪させる可能性が示唆され、臨床においても肝障害傾向のある患者ではBTZ投与後のCIPN発症のリスクが高いことが明らかとなった。

B-11

ツボクサ抽出物及びasiaticosideの酸化ストレス及び小胞体ストレス誘発神経細胞障害に対する保護作用



○三上 雅史¹、大庭 卓也¹、中村 信介¹、伊藤 賢一²、小島 弘之²、高橋 達治²、Iddamalgoda Arunasiri^{2,3}、嶋澤 雅光¹、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²株式会社一丸ファルコス、³岐阜薬科大・化粧品健康

【背景・目的】現代社会において、治療ニーズの高まっている疾患の一つにアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患が挙げられる。しかしながら、それらに対する十分な治療薬は存在していない。これらの疾患は、異常タンパクの蓄積による酸化ストレス及び小胞体ストレスの発生が神経細胞死の原因の一つと考えられている。酸化ストレス及び小胞体ストレスに対して、インドで認知機能低下の予防を目的として伝承的に用いられているツボクサ抽出物及び成分のasiaticosideの作用を検討した。本研究は、ツボクサ抽出物及び成分のasiaticosideの神経細胞保護効果及びその作用機序の解明を目的とした。

【方法】96 wellプレートに3,000 cells/wellのマウス海馬神経細胞由来 (HT22) 細胞を播種し、23時間後にツボクサ抽出物又はasiaticosideを添加した。添加から1時間後、L-グルタミン酸 (2 mM) により酸化ストレスを、tunicamycin (50 ng/mL) により小胞体ストレスを惹起した。本検討ではヨウ化プロビジウム染色及び核染色を行い、死細胞率を定量した。酸化ストレスに対する検討は、活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の産生量測定により行った。96 wellプレートに播種したHT22細胞に対し、L-グルタミン酸により酸化ストレスを惹起した。その後、ROSインジケータであるCM-H₂DCFDAを添加し、吸光度を測定した。小胞体ストレスに対する検討は、ウエスタンブロット法により行った。12 wellプレートに30,000 cells/wellで同細胞株を播種し、抽出物添加及びストレス惹起を行った。その後サンプリングし、ウエスタンブロット法によりPKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、Immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) 及びGlucose-regulated protein (GRP94) について検討した。

【結果】ツボクサ抽出物及びasiaticosideを添加した群において、グルタミン酸及びtunicamycin添加による死細胞率の上昇が抑制された。また、ツボクサ抽出物はROSの産生量を有意に減少させた。さらに、ツボクサ抽出物はPERKのリン酸化を抑制し、BiP及びGRP94の発現量を減少させた。

【考察】ツボクサ抽出物及びasiaticosideは酸化ストレス及び小胞体ストレスに対し細胞保護作用を有しており、そのメカニズムとしてROS産生の抑制と小胞体ストレス発生の抑制が関与することが示唆された。

B-12

ファスジルの投与は皮質—線条体回路を介してメタンフェタミン単回投与により誘発されるC57BL/6Jマウスの認知障害を改善する



○Liao Jingzhu¹、永井 拓¹、Wulaer Bolati¹、鍋島 俊隆^{2,3}、山田 清文¹

¹名古屋大・院医・医療薬学・病院薬剤部、²藤田保健衛生大・医療科学・先進診断システム探索、³藍野大学

Touchscreen-based cognitive tasks have been developed for rodents to provide a better translational approach across species for further understanding of the cognitive impairments observed in various neuropsychiatric disorders. In the present study, we aimed to explore the effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on cognitive impairments in methamphetamine (METH)-treated mice, using a touchscreen-based visual discrimination task. METH is one kind of highly addictive drugs, and METH-treated animals have been widely used as a pharmacological animal model of schizophrenia for the screening of compounds with antipsychotic properties. Mice were initially trained to discriminate between a pair of stimuli. On the testing day, mice were treated saline or fasudil (3, 10 or 20 mg/kg, i.p.) after pretreatment with METH (1.0 mg/kg, i.p.). METH significantly reduced the accuracy in the visual discrimination task, and the cognitive deficit was ameliorated by fasudil in a dose-dependent manner. We also analyzed the changes in neuronal activity by METH treatment using c-Fos immunostaining. METH treatment markedly increased the number of c-Fos-positive cells in the medial prefrontal cortex and dorsomedial striatum, which was also restored by fasudil treatment. We demonstrated that cognitive function is highly vulnerable to acute METH treatment, while this impairment could be restored by fasudil.

B-13 HRGの作用により球状化したヒト好中球の貪食能解析



○高橋 陽平¹、和氣 秀徳¹、吉井 將哲¹、阪口 政清²、劉 克約¹、勅使川原 匡¹、高橋 英夫³、森 秀治⁴、西堀 正洋¹

¹岡山大・医歯薬総合・薬理、²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学、³近畿大・医・薬理、⁴就実大・薬・薬理

【背景・目的】 Histidine-rich glycoprotein (HRG)は肝臓で合成される75kDaの糖タンパクであり、健常ヒト血漿中に約1 μ M存在する。我々は精製ヒト血漿HRGを用いて、*in vitro*下で好中球の球状化作用、微小血管様流路での通過性の向上、Reactive Oxygen Species (ROS)の産生抑制を確認している。しかし、球状化した好中球は一見してアポトーシス細胞様に見え、またROS産生能の低下は細胞活動性が低下しているようにも見える。そこで我々はHRGにより球状化した好中球の貪食能を解析することで好中球機能評価を行ったので報告する。

【方法】 ヒト好中球の単離：ヘパリン加全血とPolymorphprepを用い密度勾配遠心分離法で好中球を分離後、HBSSで懸濁し測定に応じた細胞数に調整し使用した。好中球貪食能解析：ヒト好中球をHoechst33342、Calcein-AMで染色し、各被験試薬と混合して96-Well Plateに分注した。HBSSで溶解したpHrodo *E. coli*, *S. aureus*を加え、37°C、CO₂環境下でインキュベートした後、画像撮影を行った。解析は細胞内に取り込まれ発色した1細胞当たりのpHrodoの面積 (TotalArea : μ m²)を評価項目とした。(* pHrodo = 酸性環境下のみで蛍光発色する色素) 細胞外ROS測定：ヒト好中球浮遊液にIsoluminol、Horse radish peroxidase type IVを添加した後、各被験試薬と混合して96-Well Plateに分注する。分注後速やかにFlexstation3にて、37°C環境下での化学発光量の経時的変化及び、30分時の発光量の比較を行った。

【結果および考察】 好中球貪食能解析では、HBSS、HSA処理ではほとんど貪食を認めなかった(*E. coli* : 0.37、0.15、*S. aureus* : 0.73、2.16)。それに対し、HRG処理を行った場合は、*E. coli*、*S. aureus*共にHRG濃度依存性の貪食量増加を認めた(1 μ M時 = 17.5、21.7)。またHRG処理による貪食量の増加は抗HRG抗体の添加により有意に低下した (p<0.001)。ROS産生測定では、HBSS、HSA処理ではそれぞれ286、273 RLUと、高い発光量を示すのに対し、HRG処理では140 RLUと、細胞外ROSの産生が抑制された。HRG処理の好中球にZymosan Aを添加すると267 RLUと発光量の増加が確認された。HRG処理により球状化した好中球は、貪食能解析において、対照群と比較し高い貪食能を認めた。また産生が抑えられていた細胞外ROSは菌体成分の刺激により誘導されることが確認された。スライドやプレート上で観察される扁平様の好中球は底部に強固に接着し、刺激を受けている状態と考えられる。そのため貪食活性を示さず、高ROS産生状態であると推測した。球状化した好中球は正常な貪食活性を示し、また必要に応じROSが産生されることから、血中循環状態により近い状態であり、HRGが好中球機能維持の一端を担っていることが推測された。

B-14 トウゲシバ抽出物及び含有成分による認知機能低下抑制作用



○大庭 卓也¹、中村 信介¹、嶋澤 雅光¹、林 祥裕²、河野 宏行²、田平 武^{3,4}、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²アピ株式会社、³順天堂大学大学院認知症診断・予防・治療学、⁴岐阜河村病院

【目的】アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は進行性の認知機能低下を特徴とする疾患であり、アミロイド β タンパク質 (Amyloid beta; A β) が発症に関わる重要な因子として知られている。A β の蓄積は酸化ストレスの発生と密接に関与しており、酸化ストレスが神経細胞死を促進すると考えられている。また、A β の蓄積は認知機能が低下するより早期の段階から発生していることが示唆されており、AD発症前からの予防的介入も重要と考えられる。本研究は、トウゲシバ抽出物及びその含有成分の細胞死及び認知機能低下に対する作用について検討した。【方法】熱水抽出を行ったトウゲシバ (*Huperzia serrata*) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、成分の分離を行い、ピークから主要成分の同定を行った。マウス由来海馬細胞 (HT22細胞) に対して、過酸化水素 (H₂O₂) 及びA β による障害を惹起し、トウゲシバ抽出物及び含有成分の細胞死抑制作用を、核染色法により検討した。活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) 産生量の測定にはCM-H₂DCFDA (ROSプローブ) を用いた。アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用は、脳ホモジネート及び血清を用いてEllman法により測定した。認知機能に対する作用は、Y字型迷路試験及び受動回避試験により評価した。トウゲシバ抽出物は1日1回経口投与し、投与開始12日目から14日目に受動回避試験、13日目にY字型迷路試験を行った。【結果】HPLCの結果から、トウゲシバの主要な成分としてhuperzine A、caffeic acid、ferric acidを同定した。H₂O₂及びA β 誘発細胞死に対して、トウゲシバ抽出物は濃度依存的に保護作用を示した。Caffeic acidはH₂O₂誘発細胞死、huperzine AはA β 誘発細胞死に対してそれぞれ抑制作用を示した。細胞死抑制作用が認められた濃度 (30 μ g/ml ~) で、細胞内ROS産生量が減少した。トウゲシバ抽出物はAChE活性抑制作用を示した。Y字型迷路試験及び受動回避試験において、トウゲシバ抽出物 (100 mg/kg) は認知機能障害モデルマウスの低下したアーム交替率及び暗室への侵入時間をそれぞれ有意に上昇させた。【考察】トウゲシバ抽出物及びその含有成分はAChE阻害作用及び酸化ストレスを有しており、認知機能の低下予防に有用であることが示唆された。

精神疾患モデルマウスにおける情動異常および認知機能障害と海馬Reelinの解析



○中齋 玄紀¹、衣斐 大祐¹、小出 菜優¹、木下 真帆¹、間宮 隆吉¹、平松 正行¹

¹名城大・薬・薬品作用

【目的】 GABA作動性神経から分泌されるReelinは、神経発達や神経可塑性、さらには認知機能やストレス反応においても重要な役割を担っている。統合失調症やうつ病患者の死後脳を用いた研究において、海馬でReelinの発現が減少することが報告されているが、その病態生理学的意義は分かっていない。そこで、本研究ではうつ病および統合失調症モデルマウスを用いて、行動異常および海馬のReelinの発現量とその意義について調べた。

【方法】 うつ病モデルマウスとして、6週齢のC57BL/6N雄性マウスに21日間連続でコルチコステロン (CORT, 20 mg/kg) を腹腔内投与したマウスを用いた。投与20日目に高架式十字迷路試験、最終投与の24時間後に強制水泳試験を行った。

統合失調症モデルマウスとして、妊娠9日目のC57BL/6Jマウスに自然免疫応答をひき起こすpoly I:C (20 mg/kg) を腹腔内投与し、得られた仔マウスを用いた。仔マウスが成獣となった時点から、オープンフィールド試験、新奇物体認知試験および、(+)-MK-801誘発性多動による運動量測定を行った。両モデルとも行動試験終了後、免疫組織化学染色を行った。

【結果】 CORT慢性投与したマウスは、高架式十字迷路試験において、コントロール群と比較してopen armの滞在時間および侵入回数が有意に減少した。また、CORT慢性投与マウスは、強制水泳試験において、コントロール群と比較して無動時間が有意に延長した。このことよりCORT慢性投与は、うつ病様の情動行動異常を示すことがわかった。胎生期poly I:C処置マウスは、コントロール群と比較して新規環境下における探索行動が有意に増加、物体認知記憶が有意に低下、および、(+)-MK-801誘発性多動が有意に増加していた。このことより、胎生期poly I:C処置マウスは、統合失調症様の精神病様行動異常および認知機能障害を示すことが示唆された。免疫組織化学染色ではCORT慢性投与および胎生期poly I:C処置マウスともに、海馬のReelin陽性細胞数が有意に減少を示していた。

【考察】 これらの結果から、精神疾患で認められる行動異常に、海馬のReelinシグナルの障害が関与している可能性があることが示唆された。本発表では、あわせて両疾患モデルに対してReelinを海馬内に微量投与をした結果を示し、両疾患モデルにおける海馬のReelin陽性細胞数低下の病態生理学的意義についても考察する予定である。

脳卒中後疼痛に対する脳内ニコチン投与の影響



○松浦 渉¹、田中 智朗¹、中本 賀寿夫¹、徳山 尚吾¹

¹神戸学院大・薬・臨床薬学

【背景】 脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) は、脳卒中後に生じる難治性の合併症として知られている。しかしながら、現行の治療法を用いても CPSP を根治させることが困難であるため、有効な治療戦略の開発が急務である。近年、ニコチンは炎症を抑制し、脳梗塞巣を縮小することが報告されている。ニコチンが作用するニコチン性アセチルコリン受容体は、青斑核の下行性疼痛制御系に関与するノルアドレナリン作動性神経および大縫線核のセロトニン作動性神経の起始核に発現し、疼痛の制御に関与していることが示されている。そこで本研究では、CPSPに対するニコチンを介した下行性疼痛制御系の関与について検討した。

【方法】 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。全脳虚血モデルマウスは 30 分間の両側総頸動脈結紮 (bilateral carotid arteries occlusion: BCAA) によって作製した。マウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数は von Frey test を用いて評価した。ニコチン (10, 20 nmol/mouse) を脳室内投与後、60 分間疼痛評価を行った。Yohimbine (α_2 受容体アンタゴニスト; 16 μ g/mouse) の脊髄腔内投与は、ニコチンを投与する 15 分前に投与した。ノルアドレナリン作動性神経マーカー tyrosine hydroxylase (TH) および神経活性化マーカー c-Fos との共局在を二重免疫組織染色法により検討した。

【結果】 BCAA 3 日後の後肢において機械的刺激に対するアロディニアが示された。その機械的アロディニアの増加は、ニコチンの投与により用量依存的に有意に抑制した。また、ニコチンの投与によって認められた機械的アロディニアの抑制は、yohimbine の前処置によって拮抗された。ニコチン投与後、青斑核における c-Fos マーカー発現誘導が増加し、これらの陽性細胞は TH マーカーと共局在した。

【考察】 ニコチンは、ノルアドレナリン作動性神経を介して CPSP による機械的アロディニアを抑制する可能性が示された。

B-17 マウスうつ様行動に対する*Lactobacillus gasseri* OLL2809の効果



○大塚 青海¹、福永 拓実¹、山本 里華子¹、橋川 直也¹、橋川 成美¹

¹岡山理科大・理・臨床生命

【目的】脳と腸はホルモンやサイトカイン、また自律神経系のネットワークを介して互いに強く影響しあっており、脳-腸相関が存在することが知られている。近年、プロバイオティクスによる腸内環境の改善がヒトのうつ様症状に有益な効果を及ぼすことが報告されており、うつ病の発症要因として注目されている。*Lactobacillus gasseri* OLL2809は、健康な成人から単離したナチュラルキラー細胞刺激性を指標にスクリーニングされた株であり、死菌の場合でも効果が存在する乳酸菌の1種である。そこで我々は、*Lactobacillus gasseri* OLL2809の投与はうつ様症状の改善に効果を示すのではないかと考え、社会的敗北ストレスモデルを使用し、その影響について検討を行った。

【方法】8週齢、雄性C57BL/6Jマウスを間使用し、4週間社会的敗北ストレスの負荷を行った。その後OLL2809を 2×10^9 cfuになるように餌に混ぜ2週間投与した。投与後、オープンフィールド試験、強制水泳試験、尾懸垂試験およびスクロース嗜好試験を行い、OLL2809投与によるうつ様症状への影響について検討を行った。

【結果】オープンフィールド試験では、自発行動量、探索行動量、中央滞在時間において、OLL2809投与による影響は見られなかった。しかし強制水泳試験において、OLL2809投与による不動時間の減少が見られた。またスクロース嗜好性試験において、OLL2809投与によるスクロース嗜好性の有意な増加が認められた。これらの結果より、OLL2809は抗うつ効果をもつ可能性が示唆された。

B-18 内分泌ペプチドVGFの耐糖能制御及びSTZ誘発糖尿病モデルマウスへの関与



○藤田 峻介¹、嶋澤 雅光¹、溝口 貴洋¹、中村 信介¹、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析

【目的】糖尿病はインスリン分泌低下やインスリン抵抗性により高血糖をきたす疾患であり、その患者数は増加の一途をたどっている。現在、糖尿病の治療は対症療法にとどまっており、根本的な治療法の創出が望まれている。VGF (vascular endothelial growth factor) はペプチド前駆体であり、様々なペプチドへと切断され、糖代謝やエネルギー貯蔵に関与している。糖尿病においては、VGF由来ペプチドがインスリン分泌促進作用を示すこと、2型糖尿病患者の血漿においてVGFの発現が減少していることが報告されているがVGFと糖尿病の関与については不明な点が多い。本検討において、糖尿病におけるVGFの役割を解明するために、VGF過剰発現マウス及びVGF誘導作用を有するSUN N8075を用いて検討を行った。【方法】VGF過剰発現の耐糖能への影響を評価するためにVGF過剰発現マウスを用いて経口糖負荷試験を行った。BDF1マウスにストレプトゾトシン (STZ) を1日1回5日間 (50 mg/kg) 腹腔内投与することでSTZ誘発糖尿病モデルを作製した。また、本モデルにおける血糖値の変化をマウスの尾静脈より採血しGlucose PILOTにより測定した。STZ投与15日後における膵臓のVGFの発現量をウェスタンブロット法によって評価した。また、SUN N8075の作用を評価するためSTZ誘発糖尿病モデルに対して、SUN N8075をSTZ投与7日前より23日間 (30 mg/kg) 皮下投与し、STZ投与0, 7, 10, 14日後に血糖値の測定及びSTZ投与15日後における膵臓のVGF及びインスリン受容体シグナル伝達分子の発現量をウェスタンブロット法により評価した。【結果】経口糖負荷試験において、VGF過剰発現マウスは野生型マウスと比較して糖負荷後の血糖値が低下した。また、STZ誘発糖尿病モデルにおいて、膵臓におけるVGFの発現量が低下した。SUN N8075投与は、STZ誘発糖尿病モデルにおける血糖値の上昇を抑制し、膵臓におけるVGFの発現量の減少及びAkt及びGSK3 β のリン酸化の減少を抑制した。【考察】経口糖負荷試験の結果より、VGF過剰発現マウスは耐糖能が向上していることが示唆された。STZ誘発糖尿病モデルにおいて、膵臓におけるVGFの発現が減少していること、VGFの発現誘導が血糖値上昇の抑制及びインスリン受容体シグナル伝達分子の発現減少を抑制したことから、VGFがSTZ誘発糖尿病モデルの病態に関与しており、病態下におけるVGFの発現誘導が糖尿病病態の改善することが示唆された。以上より、膵臓におけるVGFの発現誘導は糖尿病の治療標的として有用であることが示唆された。

グリオーマ病態におけるGPNMBとheme oxygenase 1のバイオマーカーとしての有用性

○中村 信介¹、千葉 信輔¹、山田 哲也^{1,2}、辻 翔平¹、矢野 大仁²、小野 洋子¹、大野 雄太³、嶋澤 雅光¹、岩間 亨²、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²岐阜大学医学部脳神経外科、³朝日大・歯・歯科薬理

【背景】グリア細胞に由来するグリオーマの中でも、特にグレード4に分類されるグリオブラストーマは脳内浸潤力と増殖力が強いいため、特に予後不良の疾患である。化学療法においては血液脳関門が脳内への十分な薬剤浸透を阻むことから、適用となる薬剤は限られている。中でもテモゾロミドは分子量が小さいことから浸透率が高く、生存期間の延長を示した数少ない薬剤である。グリオーマに対する新規薬剤の開発が望まれる中、今回、我々は乳癌の病態進行に関与することで知られるGPNMBに着目した。この分子がグリオブラストーマの病態に関与するか否か、また、治療ターゲットになり得るかについて検討した。

【方法】マウスグリオーマモデルを作製し、GPNMB過剰発現マウスを用いて腫瘍サイズを評価した。マウスグリオーマモデルの脳腫瘍部位を採取し、ウェスタンブロッティング法及び組織免疫染色によりGPNMBとNa⁺/K⁺-ATPaseの発現及び局在について検討した。さらに、ヒトグリオブラストーマ組織を用いて、免疫沈降法によりGPNMBとNa⁺/K⁺-ATPaseの結合について評価した。加えて、同臨床サンプルを用いて、ウェスタンブロッティング法によりGPNMBとheme oxygenase 1 (HO-1) の発現量を検討した。

【結果】マウスグリオーマモデルを用いた検討で、GPNMB過剰発現マウスで腫瘍面積が増大し、Na⁺/K⁺-ATPase阻害薬ウアバインを投与することでGPNMB過剰発現マウスにおける腫瘍面積の増大が抑制された。GPNMBはNa⁺/K⁺-ATPase αサブユニットと結合及び共局在することを見出した。また、ヒトグリオブラストーマ組織でGPNMBとHO-1の発現に正の相関が認められた。

【結語】GPNMBはNa⁺/K⁺-ATPaseを介してグリオーマの病態形成に関与し、GPNMB及びHO-1はバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

B-20 C3orf70は神経の発達に関与する

○西村 有平¹、芦川 芳史¹、白水 崇¹、安達 優華¹、田中 利男²

¹三重大・医・統合薬理学、²三重大・院医・システムズ薬理

神経分化は様々な神経疾患の病態に密接に関与している。神経分化に関与する分子を同定し、その機能を解析することは、様々な神経疾患の病態解明や治療法開発に繋がりうる。本研究では、神経分化に関与する新規分子の同定を目的として、幹細胞にachaete-scute family bHLH transcription factor 1 (Ascl1) またはneurogenin 2 (Neurog2) を過剰発現させて神経分化を誘導した公共トランスクリプトームデータの比較解析を行なった。その結果、Ascl1とNeurog2により共通して発現誘導される16種類の遺伝子 (C3orf70を含む) を同定した。このうち15種類の遺伝子は神経分化との関連性が既に報告されているが、C3orf70の機能に関してはこれまでのところ報告が見当たらない。そこで、ゲノム編集技術を用いてc3orf70ノックアウトゼブラフィッシュを作成し、神経細胞マーカーの発現と、個体の行動を解析した。その結果、野生型のゼブラフィッシュに比べて、c3orf70ノックアウトゼブラフィッシュでは神経細胞マーカーであるELAV like neuron-specific RNA binding protein 3とenolase 2の発現が低下していること、c3orf70ノックアウトゼブラフィッシュは夜間の行動量が多く、日中の行動量が少ないこと、明暗変化に対する反応が低下していることを見出した。C3orf70の挿入や欠失を有する患者に行動障害や発達遅滞が認められることが報告されている。また、ゲノムワイド関連解析でC3orf70とうつ病との有意な相関が報告されている。これらの知見から、C3orf70が神経の発達に関与すること、C3orf70の機能をより詳細に解析することは様々な神経疾患の病態解明に有用であることが示唆される。

○彌永 祐輔¹、笠井 淳司¹、五十嵐 久人¹、原 雄大¹、三浦 大樹¹、勢力 薫¹、田沼 将人¹、山浦 港生¹、中澤 敬信^{1,2}、吾郷 由希夫³、山口 瞬^{5,6}、田熊 一徹²、橋本 均^{1,7,8,9}

¹大阪大・院薬・神経薬理、²大阪大・院歯・薬理、³大阪大・院薬・薬剤学、⁴近畿大学薬学部細胞生物、⁵岐阜大・院医・高次神経形態、⁶岐阜大学生命の鎖研究センター、⁷大阪大学大学院連合小児子どものこころセンター、⁸大阪大学データビリティフロンティア機構、⁹大阪大学先導的学際研究機構

【背景・目的】自閉スペクトラム障がい (ASD) は、社会性の低下を主症状とする神経発達障がいである。罹患率は1～2%と高く、その有効な治療薬の少なさから、新たな創薬が期待されている。近年、ASD患者の約3割がてんかんを併発することや、抗てんかん薬クロナゼパムが、社会性障害を改善させることが報告され、抗てんかん作用を有する医薬品がASDの新規治療薬となる可能性が考えられる。そこで本研究では、ASD治療薬の開発に向けた基礎研究として、複数の既存医薬品から、ASDモデルマウスの社会性行動異常を改善させる薬物を探索した。さらに、全脳活動マッピングを用いて、その改善効果に寄与する脳領域を探索した。

【方法】ASDモデルマウスとして、胎仔期にバルプロ酸 (VPA) を曝露したマウスを用いた。胎生12.5日目のC57BL/6JまたはArc-dVenusマウスにVPA (500 mg/kg) を腹腔内投与し、その雄性出生仔 (6～8週齢) を用いて社会性行動を評価した。被験マウスに各種薬物または生理食塩水を腹腔内投与し、30分後に新奇マウスをケージに入れ、社会性行動の指標として匂い嗅ぎ行動の時間を計測した。全脳活動マッピングには、神経活動レポーターマウスであるArc-dVenusマウスを用い、社会性行動試験の5時間後に脳をサンプリングし、後固定後にイメージングを行った。全脳を22領域に分割し、dVenus陽性細胞数を計数し多群間比較を実施した。

【結果・考察】ASDモデル群は、コントロール群と比較して、新奇マウスへの匂い嗅ぎ行動時間が有意に減少した。社会性行動時のASDモデルマウスの脳全体のdVenus陽性細胞数は、コントロール群と比較して、有意に増加していた。その増加の程度は、特に大脳新皮質、大脳基底核の一部の領域で顕著であった。また、ASDモデルマウスの社会性行動の低下は、調べた抗てんかん薬の中には、コントロール群と同程度まで回復させるものがあつた。抗てんかん薬を投与したASDモデルマウスの脳において、複数の薬物に共通して、dVenus陽性細胞数が野生型レベルまで抑制された領域が認められた。以上より、抗てんかん薬の一部がASDの新規治療薬となる可能性が示され、その作用機序に共通する脳領域を見出した。今後、これら同定した脳領域の活動の操作などにより、その治療効果への関与について詳細に明らかにしていく予定である。

○中本 賀寿夫¹、谷口 彩華¹、徳山 尚吾¹

¹神戸学院大・薬・臨床薬学

【背景・目的】幼少期ストレス (early life stress, ELS) は、成熟期において精神疾患や慢性疼痛などの発症リスクを増加させることが知られているが、その機序は不明である。オピオイド受容体機構は、痛みの制御だけでなく、情動の調節においても重要な役割を担っている。最近、被虐待児の脳内における各種オピオイド受容体が成人期において発現変化していると報告されている。本研究では、ELS 負荷マウスの脳内各領域におけるオピオイド受容体機構の変化が、疼痛制御機構に与える影響について検討を行った。

【実験方法と材料】ELS マウスは、生後 2 週目から 3 週目の間に、1 日 6 時間母子分離ストレスを与え、その後、実験開始10週目までの間、単独飼育を行う隔離飼育ストレスを負荷した。各種オピオイド受容体 (*oprm1*, *oprd1* と *oprkl*) およびオピオイドペプチド (*pomc*, *penk*, *pdyn*) の mRNA 発現変化は、リアルタイム PCR を用いて解析した。モルヒネの鎮痛効果は、tail flick 試験を用いた。神経活性化マーカーのc-Fos 発現変化は、免疫組織染色法を用いて評価した。

【結果と考察】ELSマウスの中脳水道周囲灰白質 (PAG) 領域の *oprm1*, *oprd1* および *oprkl* mRNAは、コントロール群と比較して有意に低下した。さらに、大縫線核領域の *oprd1* は、コントロール群と比較してELSマウス群で有意に低下した。一方、扁桃体領域の *oprkl* は、コントロール群と比較して ELSマウス群で有意に増加した。脊髄およびその他の脳領域においては、変化は認められなかった。各種オピオイドペプチドの mRNA 発現は、両群間で変化は認められなかった。ELS マウスにおけるモルヒネ鎮痛効果は、コントロールマウスと比較して、顕著に減弱した。モルヒネ投与後の c-Fos 発現変化は、コントロールマウスのPAG 領域、側坐核領域などでは、多数の c-Fos 陽性細胞が認められたが、ELSマウスではほとんど観察されなかった。以上の結果から、ELS は PAG 領域などの各種オピオイド受容体の発現低下を介して、疼痛制御機構に影響を与えており、慢性疼痛などの発症に関与していることが示唆された。

マウス反復社会挫折ストレスによる社会忌避行動の誘導におけるHMGB1の役割

○北岡 志保¹、友廣 彩夏¹、請島 慎也¹、劉 克約²、和氣 秀徳²、勅使川原 匡²、西堀 正洋²、古屋敷 智之¹

¹神戸大・院医・薬理、²岡山大・院医歯薬総合・薬理

社会や環境から受けるストレスは認知機能の低下や情動変容を誘導し、精神疾患のリスク因子となる。我々は、反復社会挫折ストレスがToll様受容体TLR2/TLR4を介して内側前頭前皮質ミクログリアを活性化し、社会忌避行動を誘導することを見出した。しかし、反復社会挫折ストレスにおいてTLR2/TLR4が活性化される分子機序は不明であった。近年、細胞ストレスや組織損傷により細胞から放出されるダメージ関連分子（DAMPs）がTLRを活性化することが提唱されている。HMGB1は多様な細胞に発現する核内タンパク質であるが、炎症性刺激により細胞外に放出されTLR2/TLR4を活性化するDAMPsの一つである。本研究では、反復社会挫折ストレスにより内側前頭前皮質選択的に神経細胞、特に興奮性神経細胞の核内HMGB1シグナルが減少することを見出した。また、内側前頭前皮質へのHMGB1中和抗体の局所投与も反復ストレスによる社会忌避行動の誘導を部分的に抑制した。一方、HMGB1中和抗体の脳室内投与は反復社会挫折ストレスによる社会忌避行動の誘導を促進し、HMGB1タンパク質の脳室内投与は反復社会挫折ストレスによる社会忌避行動の誘導を抑制した。以上の結果は、反復社会挫折ストレスが内側前頭前皮質神経細胞からのHMGB1放出を惹起し、社会忌避行動の誘導に寄与することを示している。また、HMGB1は他の脳領域を介して社会忌避行動の誘導を抑制することも示唆している。

(プロ)レニン受容体をターゲットとした大腸癌治療の開発

○西山 成¹

¹香川大・医・薬理

【背景・目的】最近我々は、膵臓癌において(プロ)レニン受容体発現が亢進しており、Wnt/ β -catenin経路の活性化を介して癌の進展に寄与していることを明らかにした (Sci Rep, 2015)。本研究では、Wntコンポーネントの恒常的活性化を促す遺伝子変異が多い大腸癌における(プロ)レニン受容体の発現および機能的役割を検討した。

【方法・結果】大腸癌患者の正常および癌部位の組織を用いて、ウエスタンブロット法によってタンパク発現を検討したところ、癌部位の組織で(プロ)レニン受容体発現の顕著な亢進が認められた。さらに免疫染色による評価により、正常粘膜と比較して病変部で(プロ)レニン受容体発現が亢進していることが明らかとなった。一方、 β -cateninに体細胞変異をもつヒト大腸癌細胞株HCT116およびAPCに体細胞突然変異をもつDLD-1細胞株において、(プロ)レニン受容体を遺伝的に阻害することにより、 β -cateninが低下して増殖能力は低下した。このような(プロ)レニン受容体阻害の効果には、Wnt3の発現低下を伴っていた。同様の結果がヌードマウスの皮下への移植担癌モデルでも確認され、(プロ)レニン受容体に対するsiRNAあるいは抗体投与が癌の増殖を著明に抑制した。

【結論】大腸癌においても(プロ)レニン受容体発現が亢進し、Wnt/ β -catenin経路の活性化を介して大腸癌の進行に寄与していることから、治療ターゲットとなる可能性が示唆され、(プロ)レニン受容体に対する治療抗体の開発が望まれる。

B-25 Th2型誘発性大腸炎におけるIL-19の新規調節作用

○東 泰孝¹

¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻応用薬理学教室

【目的】インターロイキン (IL) -19は乾癬や喘息など様々な疾患に幅広く関与するサイトカインである。演者の研究グループでは炎症性腸疾患におけるIL-19の免疫学的役割解明を目指して、ヘルパー1型T細胞 (Th1) 優位な炎症応答を示す炎症性腸疾患モデルを用いてIL-19が抗炎症作用を示すことを第128回本学会近畿部会において報告した。今回、オキサゾロンを用いてTh2優位な炎症性腸疾患モデルを作製し、IL-19の免疫学的役割をさらに追究した。

【方法】BALB/Cを遺伝背景とする野生型マウス (WT) およびIL-19遺伝子欠損マウス (IL-19KO) を用いて毛剃りした腹部に、4%オキサゾロン150 μ Lを塗布した。塗布7日後、カテーテルを肛門から4 cm挿入して、3%オキサゾロン100 μ Lを直腸投与して腸炎を惹起した。投与後に、遠位結腸およびリンパ節を採材して各種アッセイを用いて評価した。

【結果】投与5日後まで体重を比較検討したところ、IL-19KOはWTよりも体重減少の割合が悪化することが明らかとなった。遠位結腸のHE染色像の観察によって、IL-19KOはWTよりも上皮細胞の欠損および炎症性細胞の浸潤など、炎症の明らかな増悪が認められた。免疫染色による評価でも、IL-19KOはWTよりも多数の好中球およびマクロファージ浸潤が認められた。また、遠位結腸中のIL-4発現量をQPCRにより定量したところ、IL-19KOはWTよりも有意に増加していた。さらに、リンパ節T細胞を用いた抗CD3/CD28抗体刺激によるサイトカイン産生能については、IL-4産生能はWTに比べてIL-19KOでは有意に増加していた。

【考察】以上の結果より、オキサゾロン誘発性Th2型腸炎においてIL-19はT細胞のIL-4産生能の調節を介して炎症を制御することが示唆される。

B-26 腸粘膜バリア機能の破綻を診断しうる新規診断薬の確立

○臼田 春樹¹、新林 友美¹、Kazi Helal Hossain¹、Israt Jahan¹、田中 徹也¹、岡本 貴行¹、和田 孝一郎¹

¹島根大・医・薬理

【背景】糖尿病やNASH、慢性腎不全などの種々の全身疾患において慢性的な腸粘膜バリアの破綻が生じることが報告されている。この状態はleaky gut syndrome (LGS) とよばれ、リポポリサッカライドや食物抗原などの有害分子が全身循環に漏出し、全身疾患の発症や悪化を引き起こす可能性のある病的な状態であると考えられている。LGS状態を評価する方法はラクツロース/マンニトール (L/M) 試験のみであり、342 Daまでの分子の透過を評価できる。しかしながら、LGSによって漏出する有害分子の大きさは少なく見積もっても1000 Da以上であり、L/M試験だけでは評価に限界がある。そこで本研究ではマウスに種々の負荷をかけることでLGS状態を引き起こし、大きな分子の透過を評価できる新規診断指標を確立した。

【方法】C57BL6Jマウスに100 mg/kg のaspirin (*p. o*) と10 mg/kgのomeprazole (*i. p*)を1日2回、6日間投与して軽度のLGS状態を誘発し、翌日L/M試験を行った。L/M試験と並行して、FITC-dextran (動物のLGS評価試薬、4000 Da)、新規指標候補 (以下、試薬C: 1100, 3000, 7900, 11600 Da) を経口投与し、1時間後に小腸から吸収された各試薬の血中濃度を測定した。また、重度のLGSモデルとして、小腸に至る血流をクランプで一時遮断、再灌流させる実験系を用いて同様の検討を行った。血流を遮断する30分前にFITC-dextran、試薬Cを投与し、再灌流後に各試薬の血中濃度を測定した。

【結果】軽度LGSモデルでは、尿中L/M比は増加したが、FITC-dextranと試薬Cの血中濃度は増加しなかった。一方、重度のLGSモデルではFITC-dextranと試薬Cいずれの血中濃度も有意に増加した。試薬Cについては分子量が大きくなるにつれて血中濃度が低くなり、吸収量の分子量依存的な変動が認められた。

【考察】試薬CはL/M試験やFITC-dextranと比較して、遜色なくLGSの重症度を適切に評価することができた。したがって、本試薬はLGSを診断する新規指標として有用であることが示された。

B-27 騒音性難聴における蝸牛内オートファジーの保護的役割

○米山 雅紀¹、中野 美穂¹、佐藤 麻由香¹、山口 太郎¹、尾中 勇祐¹、荻田 喜代一¹

¹摂南大・薬・薬理

【目的】感音性難聴は主に内耳蝸牛内の障害によって起こる聴覚機能障害であり、その発症メカニズムについては不明な点が多く、有効な治療薬も存在しない。また、哺乳類の蝸牛は再生能力が極めて低いため、環境騒音といった刺激に対する保護機構が存在する可能性は高い。本研究では、オートファジーに着目し、騒音性難聴誘発モデルマウスを用いて、音響曝露に伴う蝸牛内でのオートファジー活性化部位の同定とその役割について解析した。

【方法】5週齢Std-ddY系雄性マウスに8 kHz、90 dBあるいは110 dBの音刺激を1時間曝露した後、各周波数(4、12および20 kHz)について聴性脳幹反応(ABR)を指標に聴力を測定した。また、110 dBの騒音曝露1時間後にマウス蝸牛からコルチ器、外側壁および蝸牛軸を切り出し、各タンパク質抽出液を調整し、LC3-I/II (LC3-II、オートファゴソームマーカー)発現をウェスタンブロットティング法により解析した。続いて、マウス蝸牛内正円窓にクロロキン(CQ、オートファジー阻害剤)を1時間留置し、蝸牛内に浸透させた後、90 dBの騒音曝露1時間後にABRを測定した。さらに、CQ処置後に騒音曝露したマウスから蝸牛切片を作成し、LC3に対する抗体を用いて免疫組織化学法により解析した。

【結果】ABRの結果、90 dB音響曝露群では聴力変化はみられなかったが、110 dB騒音曝露群では有意な聴覚閾値の上昇(聴力悪化)が認められた。音響曝露(110 dB)では蝸牛外側壁でLC3-IIの有意な発現増加がみられたが、同条件下のコルチ器および蝸牛軸では変化は認められなかった。90 dB曝露では有意な聴覚の悪化はみられなかったが、CQ処置により90 dB曝露群の有意な聴力悪化が認められた。さらに、免疫組織化学法の結果、対照群(CQおよび音響曝露未処置群)では蝸牛内にLC3抗体陽性反応はみられなかったが、90 dB騒音曝露群、CQ処置群およびCQ処置90 dB騒音曝露群では外ラセン溝細胞と外側壁II型線維細胞の一部に強いLC3抗体陽性反応が認められた。

【考察】以上の結果から、外部からの騒音刺激に対して蝸牛内にはオートファジーによる保護的機構が存在し、その一部に外ラセン溝細胞と外側壁II型線維細胞が重要な役割をもつことが推察される。

B-28 蝸牛内マクロファージの活性化は内有毛細胞—蝸牛神経間シナプスを減少させる

○山口 太郎¹、谷 千咲¹、米山 雅紀¹、尾中 勇祐¹、荻田 喜代一¹

¹摂南大・薬・薬理

【目的】感音難聴は、高齢者に最も高頻度に発症する身体障害の一つである。特に、後天的な難聴は、「きこえ」の障害だけでなく、コミュニケーションを障害することから認知症のリスクファクターとして位置づけられている。近年、加齢性難聴、騒音性難聴の発症初期に、内有毛細胞—蝸牛神経間のシナプス数が減少することが示唆されている。一方、発達期の中枢神経系などにおいて、シナプスの機能的成熟や刈り込みに組織マクロファージが関与することが知られている。本研究では、反復騒音曝露によるシナプス数の減少における蝸牛マクロファージの関与について解析した。【方法】5-6週齢BALB/cCr雌性マウスに、騒音(8 kHz、90 dB)を1日1回、1時間曝露し、これを5日間反復した。蝸牛マクロファージは、CD11b(ミクログリアマーカー)についての免疫染色で可視化し、騒音曝露による蝸牛マクロファージの蝸牛内局在変化を解析した。曝露後継時的にmyosinVIIa(有毛細胞マーカー)、CtBP2(シナプス前部マーカー)およびGluA2(シナプス後部マーカー)について免疫染色を行い、内有毛細胞—蝸牛神経間のシナプス数を解析した。また、反復騒音曝露によるシナプス数の変動に対するPLX3397(マクロファージ枯渇薬)およびminocyclin(ミクログリア活性化抑制薬)の影響について同様に解析した。PLX3397(290 mg/kg)は、飲水中に懸濁し、初回騒音曝露7日前より最終騒音曝露日まで自由摂取させ、minocycline(10 mg/kg)は、各騒音曝露3時間前に腹腔内投与した。【結果】反復騒音曝露はシナプス数を曝露回数に依存して減少させた。また、内有毛細胞から50 μm以内に局在する蝸牛マクロファージは初回騒音曝露1日後に有意に増加した。非騒音曝露群へのPLX3397の継続的摂取はCD11b陽性細胞数を減少させたが、シナプス数に影響を及ぼさなかった。一方、反復騒音曝露群へのPLX3397の継続的摂取はシナプス数の減少を有意に抑制した。また、minocyclineの投与は、反復騒音曝露によるシナプス数の減少を有意に抑制した。【考察】以上の結果から、反復騒音曝露によるシナプス数の減少には蝸牛マクロファージの活性化が少なくとも一部は関与することが示唆される。

C-01 腎集合管に発現するユビキチンリガーゼRNF183の高浸透圧に対する誘導機構

○金子 雅幸¹、前岡 侑二郎^{1,2}、岡元 拓海¹、今泉 和則¹

¹広島大学医系科学研究科医学分野分子細胞情報学、²広島大学病院腎臓内科学

腎集合管に発現するユビキチンリガーゼRNF183の高浸透圧に対する誘導機構

Induction mechanism of ubiquitin ligase RNF183 expressed in the renal collecting duct under hypertonic conditions

金子雅幸、前岡侑二郎、岡元拓海、今泉和則

我々はバイオフィニクスの手法を用いて、膜貫通型のユビキチンリガーゼ遺伝子を37種同定した。それらの組織分布を調べたところ、腎臓特異的に発現するRNF183を見いだしたが、腎臓における機能は不明であった。そこで、本研究ではRNF183の腎臓における役割を明らかにすることにした。まず、CRISPR/Cas9法を用いてGFPノックインマウスを作成し、RNF183の腎臓における発現分布を調べたところ、GFP-RNF183は腎髄質内層集合管に高発現していた。腎髄質の間質は極めて高い浸透圧を形成していることから、RNF183が高浸透圧環境下で発現が誘導されるかマウス髄質内層集合管細胞mIMCD-3を用いて検討した。その結果、塩化ナトリウムやスクロースを添加した高浸透圧環境下で、RNF183の発現量が顕著に上昇することが明らかとなった。そこで、高浸透圧ストレス応答転写因子であるNFAT5をノックダウンしたところ、高浸透圧に対するRNF183の発現誘導が有意に減弱した。さらに、RNF183遺伝子のプロモーター領域に哺乳類で保存されているNFAT5結合モチーフが存在していたため、レポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降を用いて解析した結果、NFAT5がその結合モチーフに作用することが証明された。これらの結果より、RNF183は高浸透圧環境においてNFAT5による発現制御を受けることが明らかとなった。また、高浸透圧環境でRNF183をノックダウンすると、アポトーシスが增強されたことから、RNF183は高浸透圧への適応に重要な役割を担っていることが示唆された。一方、RNF183の機能を明らかにするために基質の同定を試みた。ビオチンリガーゼBirAをRNF183に融合した近位ビオチン標識法により、RNF183の近傍タンパク質を同定したところ、様々なSLCトランスポーターが検出された。以上をまとめると、RNF183は浸透圧調節に関するトランスポーターなどユビキチン化により制御することで、高浸透圧環境に細胞を適応させていると推測される。今後は、浸透圧調節に関するRNF183基質タンパク質のユビキチン化の役割を明らかにしていく予定である。

C-02 ジアシルグリセロールキナーゼ α を介した糖尿病性腎症改善機構の解明

○白井 康仁¹、林 大輝¹

¹神戸大・院農・生命機能科学

糖尿病性血管合併症の発症及び増悪化には様々な要因が存在するが、血中グルコースから合成されるジアシルグリセロール(DG)によるプロテインキナーゼ(PKC)の活性化もそのひとつである。一方、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)はDGをリン酸化し、ホスファチジン酸に変換することから、間接的にPKCの活性を抑制することができる。そこで、我々はこのDGKに着目し研究を行ってきた。これまでに、ビタミンE(VtE)である α -トコフェロールやエピガロカテキンガレート(EGCg)が*in vitro*で特異的にDGK α を活性化することや、実際にVtEやEGCgを糖尿病マウスに経口投与すると糖尿病性腎症が改善することを見出した。さらに、このVtEやEGCgによる糖尿病性腎症の改善はDGK α ノックアウトマウスでは消失することから、*in vivo*においてもVtEやEGCgはDGK α を介して糖尿病性腎症を改善させていることが明らかになっている。しかし、VtEやEGCgがどのようにDGK α を活性化し、糖尿病性腎症を改善するのかが不明であった。そこで本研究では、VtEやEGCgによるDGK α の活性化機構並びに糖尿病性腎症改善機構の解明を試みた。その結果、VtEやEGCgは共に67kDaラミニン受容体(67LR)に結合し、Src系チロシンキナーゼを介してDGK α を活性化すること、DGK α や67LRは共に腎糸球体のポドサイトに局在し、ポドサイトの脱落を抑制することで、糖尿病性腎症を改善させていることが明らかとなった。

虚血後再灌流腎間質線維化モデルにおける脂質メディエーターリゾホスファチジン酸受容体の遺伝子発現変化

中川 靖仁¹、山本 優²、荒木 啓吾²、竹之内 康広³、北風 圭介³、坪井 一人³、○岡本 安雄³

¹奈良県立医科大学医学部、²川崎医科大学医学部、³川崎医科大・医・薬理

【背景・目的】腎線維化は慢性腎不全に対応する尿細管の萎縮と間質の線維化を主体とした組織変化であり、末期腎不全への進行を阻止するための良い治療標的と考えられる。脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸

(LPA)は様々な臓器の線維化に関与することが明らかとなっている。これまで、1型LPA受容体(LPA₁)の薬理的阻害および遺伝子欠損が糖尿病性腎症マウスモデルや片側尿管結紮マウスモデルにおいて保護的に働くことが報告されている。本研究では、虚血後再灌流腎間質線維化モデルマウスを用い、線維化の評価およびLPA受容体の遺伝子発現変化について検討した。

【方法】8週齢の雄性C57BL/6Jマウスに麻酔下で左側腹部を切開し、非外傷性クリップを用い左腎動静脈の血流を27分間遮断し虚血状態とした後に再灌流させた。この間、ホットプレートによりマウスの直腸温を35°C~36°Cに維持した。再灌流処置後24時間から8週間経過したマウスの腎臓を摘出し、組織学的解析、定量的PCR法による遺伝子発現解析およびウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析を行った。対照群には開腹処置のみを行った。

【結果および考察】虚血再灌流後2週間以上経過した左腎は右腎や対照群に比べ萎縮し、腎臓重量の減少が認められた。虚血再灌流後24時間から尿細管の萎縮・円柱形成および間質への炎症細胞の浸潤が観察された。また虚血再灌流後2週間から右腎や対照群に比べ間質線維化が認められ、経時的な線維化の進展も観察された。また、虚血再灌流群では対照群に比べ尿細管細胞障害マーカーKIM-1、線維化マーカーαSMAとcollagen type I α1およびマクロファージマーカーF4/80の遺伝子発現の増加が認められた。さらに虚血再灌流群では対照群に比べ線維化マーカーαSMAおよびβ-cateninのタンパク質発現が増加していた。LPA受容体の遺伝子発現変化を検討したところ、虚血再灌流群では対照群に比べLPA₁およびLPA₂遺伝子発現の増加、LPA₃遺伝子発現の減少が見られ、受容体のタイプにより遺伝子発現の変化に違いが認められた。今後、虚血後再灌流腎間質線維化モデルにおけるLPA受容体拮抗薬の効果を検討する予定である。

周産期における高ヒスチジン糖タンパク(HRG)の生理的役割の解析

○勅使川原 匡¹、劉 克約¹、和氣 秀徳¹、王 登莉¹、高橋 英夫²、森 秀治³、西堀 正洋¹

¹岡山大・院医歯薬総合・薬理、²近畿大・医・薬理、³就実大・薬・応用薬学・生体情報

【背景】妊娠高血圧症候群(HDP)は、胎盤の形成異常による高血圧・血管内皮細胞障害(炎症)を伴った病的状態である。重篤化したHDPは、妊娠高血圧腎症、子癇、子宮内胎児発育遅延などを合併し、母児の予後不良につながる。HDPの根本的な治療法・予防法は、未だ確立していない。近年、ヒト妊婦において血漿高ヒスチジン糖タンパク(histidine-rich glycoprotein, HRG)の減少が、妊娠高血圧腎症の進展と相関することが報告された。血漿HRGは、全身性炎症病態の進行を制御する抗炎症因子である。しかし、HDP病態や周産期生理に対するHRGの関与は、その解析が殆どされていない。本研究は、血漿HRGが妊娠期の母体と胎児に与える影響について解析した。

【方法】妊娠期のHRG遺伝子欠損(HRG KO)マウスや野生型C57BL/6Nマウスから、血漿・胎盤・胎児などを採取し、炎症関連因子や血管新生関連因子の発現、及び、胎盤や胎児の発達について解析した。

【結果と考察】健常妊娠時に血漿HRGが減少することは、ヒト妊婦において既に報告されているが、マウスにおいても妊娠期の血漿HRGの減少が確認できた。妊娠HRG KOマウスは、胎児発育障害と胎盤過形成がみられた。また、HRG KOマウスは、炎症惹起因子であるHMGB1の血中濃度が恒常的に高値だった。HRG KOマウスの胎盤における炎症因子(IL1β, TNF-α)や炎症性血管拡張因子(iNOS)の発現量に変化はなかった。一方、HRG KOマウスの胎盤における血管新生因子(VEGF, PlGF)の発現量の増加、及び、生理的血管拡張因子(eNOS)の発現量の減少がみられた。さらに、HRG KOマウスは、妊娠によって高血圧症状を呈していた。これらの結果は、病態制御因子であるHRGが、健常妊娠において何らかの生理的役割をもつ可能性を示唆する。妊娠HRG KOマウスは、HRGによって制御される胎盤形成機構に異常を生じるHDP様病態モデルとなる可能性がある。

C-05 貧血はネフロン数減少に伴う腎代償機能の発揮を妨げる

○中野 大介¹、西山 成¹

¹香川大・医・薬理

【背景】腎移植において、ドナーの腎ネフロン数は移植により約50%減少する。しかし、腎移植ドナーの腎機能は、移植前と比べて50%よりも高い値で推移する。これは残存ネフロンにおいて1ネフロン当たりが担う機能が移植前よりも代償的に高くなることに起因するとされている。この代償機能の発揮はドナーのみでなくレシピエント側移植腎にとっても重要と考えられる。一方で、レシピエントにおいて好発する病態のひとつに貧血がある。今回我々は、貧血がネフロンロス後の腎代償性機能に与える影響を検討した。

【方法】エリスロポエチン欠損 (EPO-KO) マウスを用い、ネフロンロスは片腎摘により行った。片腎摘1および4週間後におけるクレアチニンクリアランスと腎肥大を測定した。

【結果】片腎摘1週間後における代償機能はEPO-KOマウスと野生型で差は観られなかった。片腎摘4週間後において、EPO-KOマウスにおいて、クレアチニンクリアランスが片腎摘前と比べ50%以下まで下がる例が見受けられ、腎肥大も破綻している例が観察された (23例中11例)。野生型マウスは全てのマウスにおいて代償機能が発揮されていた (12例)。EPO欠損は代償機構の成否にかかわらず腎血流へ有意な影響は与えなかったが、代償失敗例において、mTOR-S6-細胞肥大の経路に障害が生じていた。エリスロポエチン受容体全身欠損マウスに対して、造血細胞へのエリスロポエチン受容体導入を行い救済したマウスにおいては代償機能に問題は観られなかった。したがって、EPO-KOマウスにおける変化は、貧血によるものだと考えられる。

【結論】貧血はネフロンロスに伴う代償性反応の長期的維持を破綻させる。

C-06 p62とアミロイド前駆体タンパク質 (APP) のC末端断片を発現させたときに起きる凝集体および小胞形成

○藏本 滉平¹、細井 徹¹、田中 景吾²、野村 靖幸³、小澤 光一郎²

¹広島大学大学院医系科学研究科治療薬効学研究室、²広島大学薬学部薬学科治療薬効学研究室、³久留米大・医・薬理

【目的】

アルツハイマー病 (AD) は認知機能障害と記憶力の低下を伴う不可逆的な進行性の中枢性疾患である。詳細な発症メカニズムは未だ不明な点が残されているが、現在アルツハイマー病発症機構の1つとしてアミロイド仮説が提唱されている。本仮説では、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) がβセクレターゼやγセクレターゼによって切断され、毒性を持つamyloidβ (Aβ) を産生し、Aβが蓄積することで老人斑の形成・神経変性による細胞死によってADが発症すると考えられている。またAβ産生過程における他のAPP切断断片もAD発症に関与していると考えられている。一方近年p62は特定のタンパク質をオートファジーの隔離膜につなぎとめるアダプタータンパク質としての役割を持っており、選択的にタンパク質を分解していることが報告され、選択的オートファジーとしての役割が明らかにされた。そこで本研究では、APP切断断片とp62の関連を明らかにし、AD発症メカニズムの解明を目的とした。

【結果・考察】

現在までの当研究室の検討の結果、p62はAPPのC末端領域に結合することを明らかにしている。そこで今回APPのC末端断片であるC60とp62をN2a細胞において発現させWestern blotting解析により検討した。その結果、APP-C末端抗体によるWestern blotting解析の結果、C60が凝集体を形成している可能性が示された。本凝集体は可溶性画分・不溶性画分の両方に認められ、還元剤処置により可溶性画分の凝集体は消失した。一方、不溶性画分における凝集体は還元剤処置でも消失しなかったことより、不溶性画分では強固な凝集体が形成されている可能性が示された。次に細胞内におけるC60とp62の局在を免疫染色法で検討した。その結果C60とp62を共発現させた細胞では小胞の形成が認められ、さらにC60とp62は小胞において共局在していた。以上より、p62がC60凝集体および小胞の形成に関与している可能性が示唆された。

C-07

SH-SY5Y細胞における細胞内リン酸異常に起因した細胞障害に対するPDGF-BBの神経保護効果

○高瀬 奈央子¹、位田 雅俊¹、金子 由希¹、栗田 尚佳¹、保住 功¹



¹岐阜薬科大・薬物治療

特発性基底核石灰化症 (idiopathic basal ganglia calcification: IBGC) は、大脳基底核や小脳歯状核に石灰化を認め、様々な進行性の神経症状を示す。これまでに家族性IBGCの患者において*SLC20A2*や*PDGFB*の変異が報告されている。*SLC20A2*によってコードされるPiT-2は、*SLC20A1*によってコードされるPiT-1とともにⅢ型ナトリウム依存性リン酸輸送体 (NaPiTs) に分類され、生体内で広汎に発現している。*SLC20A2*変異により、リン酸輸送能の低下に起因した細胞内のリン酸恒常性の破綻から神経障害が生じることが予想される。血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) は間葉系細胞の増殖因子の1種で、サブタイプB (PDGF-B) のホモダイマーであるPDGF-BBは、脳神経系において神経保護に関与することが知られている。本研究では、ヒト神経芽細胞種SH-SY5Y細胞を用いて、IBGCで想定される細胞内リン酸異常によって生じる細胞障害と、これらの障害に対するPDGF-BBの役割を評価・検討した。IBGC病態を再現するために、リン酸輸送体の阻害剤PFA (phosphonoformic acid) を負荷したところ細胞生存率の低下がみられた。PFAによる細胞内へのリン酸輸送阻害では、細胞内が低リン酸状態になると想定し、低リン酸培地 (0mM及び0.5mM) で培養したところ、PFA負荷と同様に細胞生存率が低下した。さらにJC-1試薬を用いたミトコンドリア膜電位及びMito Sox試薬を用いた酸化ストレスの評価から、低リン酸負荷による神経細胞障害を確認した。PDGF-BB処置はこれらの細胞障害を改善し、細胞生存率の回復を示した。また、ウェスタンブロット法を用いてPDGF-BBがAktシグナルを活性化することを確認した。細胞膜表面に発現するリン酸輸送体についてMETA screen SLC Profiling kitを用いて評価したところ、PDGF-BBはPiT-1の膜移行を促進し、細胞内へのリン酸輸送を増加させた。以上より、PDGF-BBはAktシグナルを介してPiT-1の膜移行を促進することでリン酸輸送を増加させ、神経細胞保護に働くことが示唆された。

C-08

マウス側坐核におけるプレシナプスタンパク質Piccoloの発現減少によるメタンフェタミンの依存形成抑制作用

○楠井 優香¹、宇野 恭介^{1,2}、葛 斌¹、宮本 嘉明¹、村松 慎一^{3,4}、新田 淳美¹



¹富山大・院医薬・薬物治療、²摂南大・薬・機能形態、³自治医科大学オープンイノベーションセンター神経遺伝子治療部門、⁴東京大学医科学研究所遺伝子治療センター

メタンフェタミン (METH) の乱用は深刻な問題となっている。依存の形成には、中脳辺縁系のドーパミン (DA) 作動性ニューロンが関与し、METHも中脳辺縁系の一部である腹側被蓋野 (VTA) から側坐核 (NAc) へと投射しているDAニューロンの機能に影響していると考えられている。我々は、NAcにMETHを連続投与した時に発現が増大する遺伝子としてPCLOを見出した。PCLOをコードするタンパク質であるPiccoloは、アクティブゾーンに存在し、他のタンパク質と相互作用して、シナプス小胞のエキソサイトシス、エンドサイトシスを制御している。また、Piccoloが多くの精神疾患と関連があることも分かっており、生理機能の解明は薬物依存や精神疾患の原因究明に重要であると考えられているが、十分ではない。本研究では、Piccolo miRNA を組込んだAAVベクター (miPiccolo-AAV) を注入することによって、依存形成に関係しているNAcでPiccolo発現抑制 (miPiccolo) マウスを作成し、METHの薬理作用に対するPiccoloの役割について検討を行った。miPiccoloマウスでは、Mock-AAVを注入したマウスと比較して、METHによる自発運動量増加や場所嗜好性が抑制された。*in vivo* マイクロダイアリス法を用いてDAを測定したところ、miPiccoloマウスでは基礎遊離量が減少し、METHを7日間投与した場合には、さらに減少した。また、METH連続投与後のDAの遊離量の増加は抑制され、さらにmiPiccolo マウスのNAcの細胞内GABA量は、有意に減少していた。これらの結果から、miPiccoloマウスでは、NAcのGABA作動性中型有棘ニューロン (MSN) からのGABA遊離量が減少し、VTAのGABA作動性介在ニューロンへの脱抑制がより強く起った結果、VTAのDAニューロンのNAcへの投射能力が減弱したことが考えられる。その結果、NAcでのDA遊離量が減少するため、METHによる場所嗜好性や行動量増加が抑制されたと考えられる。今後は、NAcの投射先のVTAで組織化学的免疫染色法を用いて、miPiccoloマウスのVTA内の神経細胞種の分布やGABA量の測定を行い、VTAでのGABA介在ニューロンによるDAニューロンの変化について検討する予定である。

マウス視神経挫滅モデルに対するTGF- β スーパーファミリーGDF15の神経保護作用



○岩田 悠暉¹、稲垣 賢^{1,2}、両角 歩¹、船戸 道徳²、川瀬 千鶴²、関 順子²、金子 英雄²、中村 信介¹、嶋澤 雅光¹、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²長良医療センター臨床研究部

【背景】緑内障は網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cells: RGC) 死を特徴とする眼疾患である。また、緑内障患者の線維柱帯細胞では小胞体ストレスが亢進していることが報告されている (Ramesh B., et al., Sci Rep., 2017)。当研究室では、実験的緑内障モデルであるDBA/2Jマウス網膜を用いた解析から、高眼圧下の網膜では小胞体ストレスが亢進していることも報告している (Ojino K., et al., JNR, 2013)。今回我々は、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yにおいて、tunicamycin誘発小胞体ストレス下で、growth differentiation factor 15 (GDF15) の発現が増加することを明らかにした。また、緑内障患者の眼房水においてGDF15の発現が増加することが報告されたことから (Ban N., et al., JCI., 2017)、緑内障病態におけるGDF15の関与が示唆される。しかし、RGC死に対するGDF15の作用は明らかにされていない。本研究では、マウス視神経挫滅モデル及び健常者iPS細胞由来RGCに対するGDF15の神経保護作用について検討した。【方法】マウス視神経挫滅モデルの作製は、8週齢雄性ddYマウスに対しケタミン・キシラジン麻酔下で、結膜を切開し、慎重に視神経を露出させ、ピンセットで10秒間視神経を挫滅することにより行った。視神経挫滅1, 3及び7日後に視神経におけるGDF15の発現量について抗GDF15抗体を用いたWestern blot法により検討を行った。視神経挫滅直後、1, 3及び7日後にGDF15を硝子体内投与し、視神経挫滅10日後にサンプリングを行い、網膜フラットマウントを作製した。逆行性のトレーサーであるフルオロゴールドによって標識されたRGC数を計測した。健常者由来iPS細胞から分化させたRGCに対し、0.01, 0.1及び1.0 μ g/mLのGDF15を添加し、3日後にサンプリングを行い、TUJ1抗体を用いた免疫染色法により、神経突起及び軸索の長さを計測した。【結果・考察】Precursor GDF15 (40kDa) の発現量が視神経挫滅後に変化しなかったのに対し、活性を有するとされているMature GDF15 (25kDa) は、視神経挫滅の1, 3及び7日後に視神経において発現量が上昇した。Mature GDF15の硝子体内投与により、視神経挫滅によって誘発されるRGCの減少が有意に抑制された。また、Mature GDF15の添加により健常者由来iPSRGCの神経突起及び軸索が濃度依存的に伸長した。これらの結果よりMature GDF15は、RGCに対して直接的な神経保護作用を有することが示唆された。本研究では、Mature GDF15が視神経挫滅後に視神経において発現が上昇し、RGCに対して神経保護作用を有することを明らかにした。したがって、Mature GDF15は緑内障及び他の神経変性疾患における治療標的になる可能性が示唆された。

中枢神経系におけるErk5がエネルギー代謝調節に与える影響



○堀江 哲寛¹、朴 奎珍¹、稲葉 有香²、家崎 高志¹、金田 勝幸¹、井上 啓²、檜井 栄一¹

¹金沢大・医薬保健域・薬・薬理、²金沢大学新学術創成研究機構栄養・代謝研究ユニット

生体はエネルギーの摂取と消費とのバランスを厳密に制御することで適切な体重を維持している。エネルギー代謝調節には様々な細胞が関与しているが、その中でも中心的な役割を果たしている細胞の一つとして視床下部の各神経細胞が挙げられる。これらの細胞はレプチンやインスリンなどのホルモンや様々な刺激によって活性が制御され、摂食や熱産生などを調節することで体重とエネルギー代謝の恒常性維持に寄与している。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属するextracellular signal-regulated kinase 5 (Erk5) はセリン/スレオニンキナーゼの一種であり、MAPK/Erk kinase-5 (Mek5) によって特異的にリン酸化され活性化する。これまでに、Erk5は中枢神経系において匂いの識別や長期記憶の形成に関与していることが報告されているが、神経細胞に発現するErk5がエネルギー代謝に与える影響については明らかになっていなかった。そこで本研究では、レプチン受容体 (LepR) 陽性細胞特異的Erk5欠損マウス (*Lepr-Cre; Erk5^{f/f}*マウス) を作製し、視床下部神経細胞に発現するErk5がエネルギー代謝調節に対してどのような役割を果たしているのかを検討した。*Lepr-Cre; Erk5^{f/f}*マウスでは視床下部弓状核及び腹内側核においてErk5の欠損が認められた。雌性*Lepr-Cre; Erk5^{f/f}*マウスでは白色脂肪組織の増大や褐色脂肪組織の白色化を伴う肥満を呈しており、組織学的解析から白色脂肪組織に存在する脂肪細胞の肥大化が認められた。雌性*Lepr-Cre; Erk5^{f/f}*マウスでは定常状態における高血糖及び耐糖能の悪化を示し、さらに運動量や摂食量、エネルギー消費量の低下も認められた。一方で、雄性*Lepr-Cre; Erk5^{f/f}*マウスでは体重に変化が認められなかった。以上の結果から、視床下部神経細胞におけるMek5/Erk5シグナルは、体重とエネルギー代謝の恒常性維持に重要な役割を果たしており、肥満や2型糖尿病をはじめとする種々の代謝性疾患に対する新規治療薬のターゲットとなることが期待される。

Neuro2A細胞株における β -Amyloid protein₂₅₋₃₅の細胞毒性におけるGABAトランスポーター2の役割



○田中 柊¹、衣斐 大祐¹、大谷 駿人¹、間宮 隆吉¹、平松 正行¹

¹名城大・薬・薬品作用

【目的】 当研究室では、マウスの脳室内にアルツハイマー型認知症の原因物質の1つである β -Amyloid protein ($A\beta$)の活性フラグメント $A\beta_{25-35}$ を投与すると学習・記憶障害が発現し、マウス海馬においてGABAトランスポーター2 (GAT2) の発現量が増加することを報告している。また、マウスにベタインを前投与しておくこと、 $A\beta_{25-35}$ 脳室内投与による学習・記憶障害の発現が抑制されること、さらにこの作用はGAT2阻害薬で消失することを明らかにしている。しかし、認知機能障害の発現抑制作用に関するベタインの詳細な分子メカニズムについては分かっていない。そこで本研究では、ベタインを前処置することが $A\beta_{25-35}$ による細胞毒性に与える影響、およびGAT2の関与について、Neuro2A (N2A) 細胞を用いた培養細胞系により検討した。

【方法】 本研究では、まずN2A細胞株への $A\beta_{25-35}$ 処置することによる細胞生存率の変化とGAT2タンパク発現量の変化をそれぞれMTT assay、およびWestern blot法により検討した。 $A\beta_{25-35}$ が細胞毒性に与える影響を調べるために、 $A\beta_{25-35}$ の濃度を0~10 nmol/ μ Lに振り濃度依存性を、処置時間を4、8および12時間にて時間依存性を検討した。また、GAT2発現量の変化がみられた $A\beta_{25-35}$ 処置の条件を用いて、ベタインを前処置することが細胞生存率およびGAT2発現量に与える影響について検討を行った。

【結果】 N2A細胞株において、1 nmol/ μ L以上の濃度の $A\beta_{25-35}$ を8時間以上処置すると、コントロール群と比較して有意に細胞生存率を低下させた。この条件でベタインを前処置したところ、 $A\beta_{25-35}$ 処置による細胞生存率の低下が抑制された。また、その際のGAT2タンパク発現量の変化を検討したところ、 $A\beta_{25-35}$ を処置することによってGAT2タンパク発現量は増加していたが、ベタイン前処置することによる影響は見られなかった。

【考察】 N2A細胞株において $A\beta_{25-35}$ は、濃度依存性および時間依存性に細胞死を引き起こし、GAT2発現量を増加させた。一方、ベタインを前処置すると、 $A\beta_{25-35}$ 誘発性の細胞死が抑制されたが、GAT2発現量には影響がなかったことから、本条件において、ベタインはGAT2を介さずに細胞保護作用を示す可能性があることが示唆された。

薬剤誘発性急性大動脈疾患に対するケルセチンの効果



○鈴木 琴子¹、石澤 有紀²、合田 光寛³、近藤 正輝^{1,3}、今西 正樹⁴、座間味 義人^{1,3}、堀ノ内 裕也⁵、武智 研志⁶、中馬 真幸⁶、池田 康将⁵、石澤 啓介^{1,3}

¹徳島大・院医歯薬・臨床薬理、²徳島大学AWAサポートセンター、³徳島大・病院・薬剤部、⁴MDアンダーソンがんセンター、⁵徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野、⁶徳島大・病院・臨床試験管理センター

【目的】 大動脈瘤破裂や大動脈解離などの急性大動脈疾患は致死的病態であり、中高齢者の死因のうち重要な位置を占め、今後も患者数の増加が予想されている。しかし、現在これらの疾患に有効な予防薬は知られていない。一方、タマネギなどに豊富に含まれるフラボノイドの一種であるケルセチンは血管機能を改善するなどの心血管保護効果が期待されている。そこで本研究では、ケルセチンの大動脈瘤および大動脈解離発症に対する効果に関して、薬剤誘発性急性大動脈疾患モデルマウスを用いて検討した。

【方法】 大動脈瘤モデルマウスとして、C57BL/6J雄性マウスに浸透圧ポンプを用いてアンギオテンシンII (AngII) およびリジルオキシダーゼ阻害薬である β -アミノプロピオニトリル (BAPN) を持続投与する群 (AB群) を作製した。解離モデルとして、AB群にL-NAMEを添加した群 (LAB群) を作製した。ケルセチンはポンプ埋め込み2週間前から試験終了まで連日経口投与した。死亡時あるいは試験終了時に大動脈を摘出し、最大径が最小径の1.5倍以上であるものを大動脈瘤とした。病理組織学的解析により弾性線維の断裂と解離発症の有無、マクロファージの浸潤を観察した。また大動脈組織を用いて各種タンパク質発現、mRNA発現、matrix metalloproteinase (MMP) 活性等について評価した。さらに、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いてケルセチンの影響を*in vitro*にて検討した。

【結果】 AB群、LAB群においてケルセチン投与により大動脈瘤および解離発症率が抑制された。大動脈瘤発症マウスで増加した血管内皮細胞接着分子-1 (VCAM-1) 発現、マクロファージの浸潤、MMP-2/9活性はケルセチン投与により抑制された。HUVECにおいてもケルセチンは腫瘍壊死因子 (TNF- α) によるVCAM-1発現を抑制し内皮保護作用を示した。

【結論】 本研究の結果からケルセチンは内皮機能不全、炎症およびエラスチン変性に対する保護効果を介して大動脈瘤の形成を抑制する可能性が示唆された。

家族性緑内障患者iPS細胞由来網膜神経節細胞を用いたドネペジルの神経保護作用



○稲垣 賢^{1,2}、船戸 道德²、川瀬 和秀³、川瀬 千鶴²、関 順子²、安藤 栞^{1,2}、神谷 聡^{1,2}、中村 信介¹、嶋澤 雅光¹、家島 大輔⁴、岩田 岳⁴、山本 哲也³、金子 英雄²、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²国立病院機構長良医療センター臨床研究部、³岐阜大学医学部眼科学、⁴国立病院機構東京医療センター臨床研究センター感覚器センター

【背景】緑内障は、網膜神経節細胞（RGC）の軸索変性・脱落を原因とする進行性の神経変性疾患であり、2040年世界総緑内障患者数は推計1億人に上る。眼圧下降が唯一の治療法であるが、本邦では患者の7割が正常眼圧緑内障であることや眼圧下降を得ても視野障害が進行する患者が存在するため、RGC保護薬の探索が重要である。しかしRGCは培養細胞株が存在せず、その変性機構も不明であることから、*in vitro*病態モデルの作成は困難でありRGC保護薬の探索は進んでいない。したがって、我々は家族性正常眼圧緑内障原因遺伝子である*Optineurin (OPTN)* にE50K変異を有する患者iPS細胞（E50K-iPSCs）よりRGCを作製し（E50K-iPSCs-RGC）、緑内障病態に対するRGC保護薬の探索を行った。これまでにOPTN^{E50K}変異体は細胞内で特徴的な凝集を形成し、RGC変性を誘発することを確認している。そこで、OPTN^{E50K}細胞内凝集形成を抑制する薬剤スクリーニングを行った結果、アルツハイマー型認知症治療薬のドネペジル塩酸塩（以下ドネペジル）がOPTN^{E50K}凝集を著明に減少した。本研究では、ドネペジルのRGC変性に対する機序の解明を試みた。

【方法】0.01 μM-10 μMのドネペジルのE50K-iPSCs-RGCに対するOPTN^{E50K}凝集形成抑制作用及び神経突起伸長作用について評価した。また正常眼圧緑内障原因遺伝子であるTANK-binding kinase 1（*TBK1*）重複複製患者iPS細胞由来網膜神経節細胞（TBK1-iPSCs-RGC）においてもドネペジルの神経突起伸長作用を評価した。

【結果】ドネペジルはE50K-iPSCs-RGCに対して、OPTN凝集の減少作用及び神経突起伸長作用を示した。OPTN^{E50K}凝集形成はOPTN^{E50K}及びTBK1の相互作用の増強により誘発されることから、ドネペジルのTBK1発現への影響を検討したところ、TBK1発現が抑制され、本作用はσ1受容体遮断薬の処置により消失した。ドネペジルがE50K-iPSCs-RGCにおいてTBK1発現抑制作用を有したことから、TBK1-iPSCs-RGCにおいても本薬剤の薬効評価を行った結果、ドネペジルはTBK1発現抑制作用及び神経突起伸長作用を示した。さらに、ドネペジルは健常者iPS細胞由来RGC（WT-iPSCs-RGC）に対しても神経突起伸長作用を示した。

【考察】ドネペジルはOPTN^{E50K}変異及び*TBK1*重複複製による家族性正常眼圧緑内障におけるRGC保護薬として有用であることが示唆された。我々はWT-iPSCs-RGCにおいても、緑内障との関与が示唆されるRGC障害性ストレス（小胞体ストレス、TNF-α処置及びオートリソソーム障害）下ではOPTN凝集が生じることを見出している。さらにドネペジルはWT-iPSCs-RGCに対しても神経突起伸長作用を示したことから、家族性正常眼圧緑内障だけではなく広範な正常眼圧緑内障に対するRGC保護薬となり得ることが示唆された。

Expression of amino acid transporter LAT1 in the endothelial cells of tumor tissues and its contribution to angiogenesis



○全 麗麗¹、大垣 隆一¹、奥田 傑¹、永森 収志^{1,2}、金井 好克¹

¹大阪大・院医・生体システム薬理、²奈良県立医科大・生体分子不均衡制御学

Tumor angiogenesis, a process of new blood vessel formation from preexisting vessels in tumor, plays an essential role for tumor growth and metastasis. Therefore, controlling tumor-associated angiogenesis is a promising tactic against cancer progression. L-Type amino acid transporter 1 (LAT1), which mediates the transport of large neutral amino acids, shows high expression in various types of cancers. Thus, LAT1 has been proposed as a potential molecular target for cancer therapy. Recently, we found a high expression of LAT1 in endothelial cells of pancreatic cancer tissues as well as in tumor cells. However, in normal tissues, its expression in the endothelial cells is considerably low. In our study, we examined the involvement of LAT1 in tumor angiogenesis. Suppression of LAT1 by LAT1 inhibitors exerted an anti-angiogenic effect in *ex vivo* aortic ring assay, *in vivo* matrigel plug assay and xenograft tumor model. Moreover, contribution of LAT1 in angiogenesis was further verified using human umbilical vein endothelial cells in *in vitro* tube formation assay. It is proposed that not only the suppression of amino acid uptake of cancer cells but also the anti-angiogenic effect of LAT1 inhibition contribute to the anti-tumor effect of targeting LAT1 in cancers.

脳出血後二次性神経障害における新規Nrf2活性化薬RS9の保護メカニズムの解明



○今井 貴彦¹、杉山 智紀¹、山内 圭太^{1,2}、澤田 重信^{1,2}、中村 信介¹、嶋澤 雅光¹、原 英彰¹

¹岐阜薬科大・薬効解析、²岐阜大学医学部脳神経外科

【背景・目的】脳出血病態において、血管破綻により形成された血腫はヘモグロビン、鉄、炎症性サイトカインなどを周辺組織に放出し、酸化ストレスを惹起することで二次的な組織障害を引き起こす。これらは脳浮腫や片麻痺につながることから患者の転機を大きく左右するが、有効な治療薬は未だ存在しない。Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) は種々の抗酸化因子を誘導する転写因子であり、生体内の抗酸化機構において重要な役割を担っている。RS9は新規Nrf2活性化薬であり、すでに脳虚血再灌流障害モデルにおいての保護効果が報告されている。我々はこれまでの検討で、RS9の術後投与により脳出血モデルの脳浮腫が抑制されることを明らかにした。しかし、その保護メカニズムに関しては不明である。本検討では、RS9の脳出血病態における神経保護メカニズムの解明を目的に、*in vivo*脳出血モデル並びに*in vitro*神経細胞障害モデルを用いて検討を行った。

【方法】ddY雄性マウス(12週齢、40-50 g)の頸静脈より採取した血液(25 μ L)を脳の線条体領域(ブレグマから側方2 mm、深さ3.5 mm)に注入し、脳出血モデルを作製した。RS9(0.2 mg/kg)は脳出血誘導直後、1日後、2日後に腹腔内注射し、対照群にはリン酸緩衝液を同様に投与した。誘導1日後または3日後にサンプリングを行い、摘出脳を用いて凍結切片を作製した。その後、組織染色により神経障害領域の面積を測定した。加えて、誘導8時間後または3日後にサンプリングを行い、摘出した脳の血腫周辺組織におけるタンパク質発現量をウェスタンブロット法により評価した。*In vitro*実験系においては、ヒト神経芽細胞種(SH-SY5Y)を用いて血液代謝産物であるヘミン処置神経障害モデルを作製し、ヘミンとRS9を24時間併用処置後のタンパク質発現量をウェスタンブロット法により評価した。

【結果】脳出血誘導により1日後及び3日後に組織障害が生じたが、RS9の術後投与により誘導3日後の神経障害領域が有意に減少した。加えて、RS9投与は血腫周辺組織において発症8時間後にリン酸化Aktを上昇させ、3日後においてはNrf2の下流に存在する抗酸化因子であるheme oxygenase-1(HO-1)やsuperoxide dismutase1(SOD1)を有意に上昇させた。*In vitro*ヘミン処置神経障害モデルにおいては、ヘミン処置群に対してRS9併用処置は抗酸化因子であるHO-1、SOD1に加え、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dehydrogenase, quinone oxidoreductase(NQO1)を上昇させ、アポトーシスマーカーであるpoly(ADP-ribose) polymerases(PARP)の増加を抑制した。

【結論】新規Nrf2活性化薬RS9は抗酸化機構活性化により脳出血後の神経細胞傷害を抑制することが示唆され、脳出血後の二次障害に対する新規治療薬となり得る。

新規Nrf2-ARE活性化物質のヘムオキシゲナーゼ-1を介した抗パーキンソン病作用



○猪瀬 由莉¹、泉 安彦²、片岡 春恵¹、小山 豊²、金子 周司³、久米 利明^{1,4}

¹京都大・院薬・薬品作用解析、²神戸薬科大・薬・薬理、³京都大・院薬・生体機能解析、⁴富山大・院医薬・応用薬理

【目的】パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落を特徴とする神経変性疾患であり、その病態形成に酸化ストレスの関与が挙げられている。当研究室では、酸化ストレスに対する生体防御システムであるNrf2-ARE経路の活性化物質として1-chloro-3-methanesulfinyl-6,7-dihydro-5H-2-benzothiophen-4-one(TPNA10168)を化合物ライブラリーから見出した。しかし、TPNA10168の*in vivo*での作用はこれまで検討されていなかったため、本研究では、6-hydroxydopamine(6-OHDA)誘発パーキンソン病モデルマウスに対するTPNA10168の末梢投与の影響について検討した。【方法】5週齢雄性BL6/Nマウスの黒質に6-OHDA(3 μ g)を投与し、片側パーキンソン病モデルを作出した。TPNA10168を6-OHDA投与24時間前のマウスに皮下投与した。6-OHDA投与から2週間後に、メタンフェタミン誘発回転運動試験を行った。また、胎生16日齢Wistar系ラット胎仔より初代培養中脳細胞を調製し、免疫染色によりドパミンニューロンを同定した。【結果】TPNA10168(100-200 mg/kg)をマウスに皮下投与することにより、6-OHDAにより誘発される回転運動が用量依存的に抑制された。この時、6-OHDAにより誘発される中脳黒質ドパミンニューロン数の減少および線条体ドパミン神経線維密度の低下も抑制された。また、TPNA10168の皮下投与24時間後に、中脳黒質において抗酸化タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)のタンパク量が増加したが、 γ -グルタミルシステイン合成酵素には影響はなかった。ラット初代培養中脳細胞にTPNA10168(30 μ M)を処置すると、HO-1の発現誘導がニューロンではなく、主にアストロサイトにおいて観察された。中脳初代培養細胞における6-OHDA誘発ドパミンニューロン死に対してTPNA10168(30 μ M)は保護作用を示し、それはHO-1阻害薬zinc protoporphyrin-IXによって消失した。【考察】以上の結果より、末梢投与したTPNA10168は脳内でHO-1発現を誘導し、パーキンソン病モデルマウスにおける中脳ドパミンニューロン変性に対して保護作用を示すことが明らかとなった。

C-17 皮膚老化におけるDGK γ の機能解析



○近藤 可奈子¹、菊永 佐紀子¹、山之上 稔¹、上田 修司¹、菅澤 薫²、白井 康仁¹

¹神戸大・院農・動物資源利用化学、²神戸大・バイオシグナル研究センター

皮膚は表皮、真皮、皮下組織の3つの層で構成されている。表皮には少なくとも5つのプロテインキナーゼC (PKC) サブタイプが発現しており、ケラチノサイトの分化に関与していることが知られている。一方、本研究の対象であるジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、PKCの活性化剤であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する脂質キナーゼで、間接的にPKC活性を抑制することで、ケラチノサイトの分化を制御していると考えられる。当研究室では、10種あるDGKサブタイプのうち、DGK γ が表皮に発現しており、分化に伴いその発現量が上昇すること、またDGK γ をノックアウトしたマウスでは、基底層から顆粒層の薄層化、角質層の肥厚化というような、老化現象と類似した症状が起きることを明らかにした。しかし、これらの関連性や詳細なメカニズムに関しては未だ不明である。そこで本研究では、DGK γ と皮膚老化との関連性を明らかにすることを目的に、以下の実験を行った。ヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞にDGK γ inhibitorを添加後、UVA照射を行い、皮膚のシワ形成を引き起こすとされているマトリックスメタロプロテアーゼ1 (MMP-1) およびその上流の酵素の発現量をqPCRおよびウエスタンブロッティングにより評価した。また、DGK γ ノックアウト (KO) マウスを作製し、8週齢、48週齢、60週齢における各マウスの背中皮膚を採取し、同様に各発現量を評価した。その結果、DGK γ inhibitorを添加した群において、MMP-1の発現が有意に上昇し、更にPKC δ 阻害剤であるrotterlinを添加すると、MMP-1の発現が抑制される傾向が見られた。また、UVAによるMMP-1およびERK1/2のリン酸化の発現誘導は、rotterlinにより抑制された。一方、野生型マウスは老化とともにMMP-1の発現が上昇したのに対し、DGK γ ノックアウトマウスはすでに8週齢から、MMP-1の発現が上昇する傾向が見られた。このことから、DGK γ は少なくともPKC δ の活性と、それに続くERKのリン酸化を調節することにより、皮膚の光老化予防に関与していることが示唆された。

C-18 発熱性好中球減少症に対するカスポファンギンの治療効果とPK/PDに関する検討

○曾田 翠¹、朝間 友香¹、五島 蒼¹、福島 瞳¹、宮原 有里¹、左高 侑奈¹、白井 茂之¹、北市 清幸¹

¹岐阜薬科大・薬物動態

【目的】発熱性好中球減少症 (FN) は、血液疾患や固形がんの治療中に好中球減少に伴って起こる感染症によって発熱した状態であり、適切な早期治療および発症予防を行うことが重要である。海外ではFNに対するエンピリックセラピーとしてのカスポファンギン (CPFPG) の有効性および忍容性が示されているが、日本人におけるエビデンスは十分に確立されていない。また、CPFPGの薬物動態に関して、日本においては血漿中濃度に影響する因子の検討はほとんどされていない。そこで本研究では、日本人FN患者におけるCPFPGの有効性・安全性と、薬物動態学 (PK) / 薬力学 (PD) 的特性との関係の解明を試みた。

【方法】FNと診断されてCPFPG (初日70 mg、2日目以降50 mg) を1日1回投与された日本人患者24名を対象に、有効性および安全性の評価、血漿中CPFPG濃度の測定を実施した。血漿中CPFPG濃度測定のための採血は、1日目の投与直後 (ピーク値) と、2、3、4日目の投与直前 (トラフ値) に実施した。母集団薬物動態解析モデルに2-コンパートメントモデルを適用し、各種PKパラメータを算出した。さらに、血漿中CPFPG濃度、有効性や安全性に関連する因子を探索した。

【結果】対象患者24名中18名が有効と判定された。残る6名のうち、CPFPG投与終了後にブレイクスルー感染症を発症した患者、皮疹発現のためCPFPG投与を中止した患者はそれぞれ1名であった。なお、肝機能や腎機能に関する臨床検査値への影響は見られなかった。有効例と無効例を群分けして各種PKパラメータを比較した結果、トラフ値は有効群が無効群と比較して高値となったが、AUCに有意な差は見られなかった。また、血漿中CPFPG濃度は体重と、年齢 (≥ 59 歳) とアルブミン値 (≤ 3.4 mg/dL) はトラフ値の上昇と関連することが明らかとなった。しかし、血漿中CPFPG濃度推移や治療効果の指標となる因子は見出されなかった。

【考察】以上の結果より、CPFPGの治療有効率は海外の既報よりも高く、CPFPGは日本人FN患者におけるエンピリックセラピーとして有効かつ安全な薬剤であることが示唆された。

C-19 下肢固定マウスを用いたICU関連筋力低下の病態の検討

○貫和 亮太^{1,2}、椎森 仁美¹、市田 悠¹、藤原 由紀¹、星崎 みどり¹、久場 敬司³、藤野 裕士²、今井 由美子¹

¹医薬基盤健康栄養研究所、²大阪大学大学院医学系研究科生体統御医学講座麻酔集中治療医学教室、³秋田大・院医・代謝機能

集中治療室 (ICU) 管理の進歩に伴い、集中治療を要する重症患者の生命予後は改善したが、救命出来た場合も、集中治療に関連した筋力低下; ICU acquired weakness (ICU-AW) を合併し、生活の質 (QOL) が低下して ICU 退院後の社会復帰を困難としている。これまでのところ、ICU-AW の分子病態、特に急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) とのかかわりには未解明な点が多い。今回、下肢の固定を塩酸吸引によるマウス ARDS モデルに施して ICU-AW の病態を解析した。

C57BL/6J マウスを、非下肢固定+非 ARDS、下肢固定+非 ARDS、非下肢固定+ARDS、下肢固定+ARDS の 4 群に分けて、経時的に臓器 (肺、横隔膜、前脛骨筋、腓腹筋)、血清をサンプリングした。筋肉は抗ラミニン抗体による免疫染色を行い萎縮の程度を評価した。肺はマッソントリクローム染色を行い線維化の程度を検討した。RT-qPCR 法で炎症性サイトカイン、筋萎縮マーカーの mRNA 発現量を解析した。また血清からエクソソームを抽出し、プロテオミクス解析を行った。その結果、下肢固定+非 ARDS、下肢固定+ARDS 群では、それぞれ、非下肢固定+非 ARDS 群、非下肢固定+ARDS 群と比較して筋重量は低値、筋萎縮マーカーは高値であった。また、非下肢固定+ARDS 群は非下肢固定+非 ARDS 群に比べ、筋萎縮が高度である傾向を認めた。一方、肺組織では下肢固定+ARDS 群では非下肢固定+ARDS 群と比較し、肺傷害、線維化が高度であった。

以上のことから、同マウスモデルにおいて、下肢固定ならびに ARDS、あるいはその両者により筋萎縮が惹起されることがわかった。また ARDS 群では下肢固定による筋萎縮を誘導すると肺傷害、線維化が増強することから、筋萎縮と ARDS が相互の病態に影響を及ぼし合っている可能性が示唆された。

C-20 低酸素環境におけるヒト血管内皮細胞の増殖について

○池本 和久¹、狩野 泰輝¹、菅沼 由唯¹、一瀬 千穂¹、近藤 一直¹

¹藤田医科大学医学部薬理

【目的】

近年、生体内における低酸素 (hypoxia) 環境が、従来から広く知られてきたがんのみならず、それ以外の様々な疾患にも関係している可能性が注目されている。我々は hypoxia が正常のヒト血管内皮細胞の増殖に及ぼす影響について検討してきており、これまでに 3% O₂ 濃度の hypoxia により細胞増殖が促進されること、その促進効果は観察されるまでに比較的長時間 (48 時間) が必要であること、一度生じたその促進効果は再酸素化しても一定時間持続すること、といった内容を報告してきた。今回、これらの特徴的な細胞増殖促進メカニズムを解明する一環として、低酸素応答に関与する代表的な転写因子である HIF (hypoxia-inducible factor) のうち HIF-1 と HIF-2 に着目し、これらの細胞増殖への関与について検討した。

【方法】

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) は本学の疫学・臨床研究倫理審査委員会で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たものを使用した。Hypoxia 環境は、培養器内部の酸素濃度を窒素ガスにより 3% に低下させることにより作成した。HUVEC は 50000 cells/mL の密度で播種し、低血清 (1% FBS) 培地で 24 時間前培養した後、通常濃度の血清 (4% FBS) 培地中での本培養を 72 時間行った。HIF-1 および HIF-2 を増加させる目的で塩化コバルト (II) (1-100 μM) を、減少させる目的でクリシン (0.1-10 μM) を、それぞれ本培養開始と同時に添加した。細胞増殖は Cell Counting Kit-8 (同仁化学) により、培養終了後の生細胞に由来する発色の吸光度を測定することにより評価した。

【結果】

3% O₂ の hypoxia に増加する HUVEC はクリシン添加により減少した。一方、塩化コバルト添加により予想される HUVEC の増加は観察されなかった。現在、ウエスタンブロット法による HIF-1 と HIF-2 の発現量変化の確認により、この現象に対する HIF-1 と HIF-2 の関与を解析中である。

Advanced glycation end products による血管新生促進機序に対するエンドサイトーシスの関与

○山崎 由衣¹、西中 崇¹、丹羽 淳子¹、森 秀治²、和氣 秀徳³、劉 克約³、西堀 正洋³、高橋 英夫¹

¹近畿大・医・薬理、²就実大・薬、³岡山大・院医歯薬総合・薬理

【目的】血管新生の誘導は、組織傷害時や虚血性疾患における組織の修復に重要である一方で、糖尿病などでは、過剰な血管新生の誘導による脆弱な血管の形成が、網膜症などの病態を増悪させることが知られている。我々が着目している advanced glycation end products (AGEs) は、糖による蛋白や脂質の非酵素的糖化反応によって生成され、糖尿病病態において全身に蓄積することが知られている。この AGEs が、糖尿病病態下における過剰な血管新生に関与することが報告されているが、その詳細な促進機序は明らかとされていない。そこで我々は、この機序を明らかとするために、AGEs の中でも特に毒性が強いとされている AGE3 を用いて検討を行った。

【方法】マウス由来血管内皮細胞 (b.End5) をマトリゲル上に播種し、AGEs 添加 16 時間後における血管管腔形成を共焦点顕微鏡により観察し、定量化した。b.End5 細胞による Alexa Fluor 488-標識 AGEs の取り込みはフローサイトメトリーによって解析した。血管管腔における AGEs の分布は透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

【結果】b.End5 細胞による血管管腔形成は AGE3 の処置により濃度依存的かつ有意に促進された。AGE3 は濃度依存的かつ有意に b.End5 細胞内へ取り込まれた。管腔形成後の b.End5 細胞の小胞内に AGE3 が取り込まれていることが示された。エンドサイトーシス阻害剤の sucrose、chlorpromazine によって、AGE3 の取り込みおよび管腔形成促進作用は有意に抑制された。また、スカベンジャー受容体の非選択的阻害剤である fucoidan の処置によっても、これらの AGE3 の作用を有意に阻害した。さらに、スカベンジャー受容体のうち数種の中和抗体の共処置によって、AGE3 による管腔形成の促進作用は有意に抑制された。

【考察】以上から、AGE3 はエンドサイトーシスによって血管内皮細胞内へ取り込まれ、その結果、過剰な血管新生を誘導している可能性が考えられた。また、血管内皮細胞による AGE3 の取り込みには、複数のスカベンジャー受容体が複合して関与している可能性が示された。