

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系マウスを用いて、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系マウスを用いて、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 μg/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¹

¹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/Nat8l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/Nat8l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/Nat8l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/Nat8l 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/Nat8l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/Nat8l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/Nat8l、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BTPDMI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BTPDMI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。