

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關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、疼痛の制御に關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關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C57BL6J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) 発現をウエ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。