

## 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<sup>1</sup>、前岡 侑二郎<sup>1,2</sup>、岡元 拓海<sup>1</sup>、今泉 和則<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学医系科学研究科医学分野分子細胞情報学、<sup>2</sup>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लगリセロールキナーゼalphaを介した糖尿病性腎症改善機構の解明

○白井 康仁<sup>1</sup>、林 大輝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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लग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लग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alpha-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DGKalpha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DGKalpha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DGKalpha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DGKalphaを活性化し、糖尿病性腎症を改善するのかは不明であった。そこで本研究では、VtEやEGCgによるDGKalpha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DGKalphaを活性化すること、DGKalpha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<sup>1</sup>、山本 優<sup>2</sup>、荒木 啓吾<sup>2</sup>、竹之内 康広<sup>3</sup>、北風 圭介<sup>3</sup>、坪井 一人<sup>3</sup>、○岡本 安雄<sup>3</sup>

<sup>1</sup>奈良県立医科大学医学部、<sup>2</sup>川崎医科大学医学部、<sup>3</sup>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(LPA<sub>1</sub>)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 $\alpha$ SMAとcollagen type I  $\alpha$  1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 $\alpha$ SMAおよび $\beta$ -cateninのタンパク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LPA<sub>1</sub>およびLPA<sub>2</sub>遺伝子発現の増加、LPA<sub>3</sub>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<sup>1</sup>、劉 克約<sup>1</sup>、和氣 秀徳<sup>1</sup>、王 登莉<sup>1</sup>、高橋 英夫<sup>2</sup>、森 秀治<sup>3</sup>、西堀 正洋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大・院医歯薬総合・薬理、<sup>2</sup>近畿大・医・薬理、<sup>3</sup>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】健常妊娠期に血漿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(IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )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<sup>1</sup>、西山 成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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言われている。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<sup>1</sup>、細井 徹<sup>1</sup>、田中 景吾<sup>2</sup>、野村 靖幸<sup>3</sup>、小澤 光一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院医系科学研究科治療薬効学研究室、<sup>2</sup>広島大学薬学部薬学科治療薬効学研究室、<sup>3</sup>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<sup>1</sup>、位田 雅俊<sup>1</sup>、金子 由希<sup>1</sup>、栗田 尚佳<sup>1</sup>、保住 功<sup>1</sup>



<sup>1</sup>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<sup>1</sup>、宇野 恭介<sup>1,2</sup>、葛 斌<sup>1</sup>、宮本 嘉明<sup>1</sup>、村松 慎一<sup>3,4</sup>、新田 淳美<sup>1</sup>



<sup>1</sup>富山大・院医薬・薬物治療、<sup>2</sup>摂南大・薬・機能形態、<sup>3</sup>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、<sup>4</sup>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- $\beta$ スーパーファミリーGDF15の神経保護作用



○岩田 悠暉<sup>1</sup>、稲垣 賢<sup>1,2</sup>、両角 歩<sup>1</sup>、船戸 道徳<sup>2</sup>、川瀬 千鶴<sup>2</sup>、関 順子<sup>2</sup>、金子 英雄<sup>2</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、嶋澤 雅光<sup>1</sup>、原 英彰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬効解析、<sup>2</sup>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  $\mu$ 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<sup>1</sup>、朴 奎珍<sup>1</sup>、稲葉 有香<sup>2</sup>、家崎 高志<sup>1</sup>、金田 勝幸<sup>1</sup>、井上 啓<sup>2</sup>、檜井 栄一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>金沢大・医薬保健域・薬・薬理、<sup>2</sup>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<sup>f/f</sup>*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<sup>f/f</sup>*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<sup>f/f</sup>*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<sup>f/f</sup>*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<sup>f/f</sup>*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 $\beta$ -Amyloid protein<sub>25-35</sub>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<sup>1</sup>、衣斐 大祐<sup>1</sup>、大谷 駿人<sup>1</sup>、間宮 隆吉<sup>1</sup>、平松 正行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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 $\beta$ -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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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<sup>1</sup>、石澤 有紀<sup>2</sup>、合田 光寛<sup>3</sup>、近藤 正輝<sup>1,3</sup>、今西 正樹<sup>4</sup>、座間味 義人<sup>1,3</sup>、堀ノ内 裕也<sup>5</sup>、武智 研志<sup>6</sup>、中馬 真幸<sup>6</sup>、池田 康将<sup>5</sup>、石澤 啓介<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理、<sup>2</sup>徳島大学AWAサポートセンター、<sup>3</sup>徳島大・病院・薬剤部、<sup>4</sup>MDアンダーソンがんセンター、<sup>5</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部薬理学分野、<sup>6</sup>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 $\beta$ -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- $\alpha$ )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<sup>1,2</sup>、船戸 道德<sup>2</sup>、川瀬 和秀<sup>3</sup>、川瀬 千鶴<sup>2</sup>、関 順子<sup>2</sup>、安藤 栞<sup>1,2</sup>、神谷 聡<sup>1,2</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、嶋澤 雅光<sup>1</sup>、家島 大輔<sup>4</sup>、岩田 岳<sup>4</sup>、山本 哲也<sup>3</sup>、金子 英雄<sup>2</sup>、原 英彰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬効解析、<sup>2</sup>国立病院機構長良医療センター臨床研究部、<sup>3</sup>岐阜大学医学部眼科学、<sup>4</sup>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<sup>E50K</sup>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<sup>E50K</sup>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<sup>E50K</sup>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<sup>E50K</sup>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<sup>E50K</sup>凝集形成はOPTN<sup>E50K</sup>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<sup>E50K</sup>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<sup>1</sup>、大垣 隆一<sup>1</sup>、奥田 傑<sup>1</sup>、永森 収志<sup>1,2</sup>、金井 好克<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・生体システム薬理、<sup>2</sup>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<sup>1</sup>、杉山 智紀<sup>1</sup>、山内 圭太<sup>1,2</sup>、澤田 重信<sup>1,2</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、嶋澤 雅光<sup>1</sup>、原 英彰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬効解析、<sup>2</sup>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  $\mu$ 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 dismutase 1(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<sup>1</sup>、泉 安彦<sup>2</sup>、片岡 春恵<sup>1</sup>、小山 豊<sup>2</sup>、金子 周司<sup>3</sup>、久米 利明<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>京都大・院薬・薬品作用解析、<sup>2</sup>神戸薬科大・薬・薬理、<sup>3</sup>京都大・院薬・生体機能解析、<sup>4</sup>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  $\mu$ 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)のタンパク量が增加したが、 $\gamma$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\gamma$ の機能解析



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

<sup>1</sup>神戸大・院農・動物資源利用化学、<sup>2</sup>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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$  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 $\gamma$ 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 $\gamma$  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 $\delta$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ は少なくともPKC $\delta$ 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<sup>1</sup>、朝間 友香<sup>1</sup>、五島 蒼<sup>1</sup>、福島 瞳<sup>1</sup>、宮原 有里<sup>1</sup>、左高 侑奈<sup>1</sup>、白井 茂之<sup>1</sup>、北市 清幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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 ( $\geq 59$  歳) とアルブミン値 ( $\leq 3.4$  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<sup>1,2</sup>、椎森 仁美<sup>1</sup>、市田 悠<sup>1</sup>、藤原 由紀<sup>1</sup>、星崎 みどり<sup>1</sup>、久場 敬司<sup>3</sup>、藤野 裕士<sup>2</sup>、今井 由美子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>医薬基盤健康栄養研究所、<sup>2</sup>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、<sup>3</sup>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<sup>1</sup>、狩野 泰輝<sup>1</sup>、菅沼 由唯<sup>1</sup>、一瀬 千穂<sup>1</sup>、近藤 一直<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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% O<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub> 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、ウェ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<sup>1</sup>、西中 崇<sup>1</sup>、丹羽 淳子<sup>1</sup>、森 秀治<sup>2</sup>、和氣 秀徳<sup>3</sup>、劉 克約<sup>3</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、高橋 英夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・医・薬理、<sup>2</sup>就実大・薬、<sup>3</sup>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。