

## P1-1

### L-DOPAの肺高血圧モデル肺血管におけるフェニレフリン応答の修飾作用

○古賀資和<sup>1)2)</sup>、増川太輝<sup>1)</sup>、中村史雄<sup>1,3)</sup>、菅原陽<sup>2)</sup>、水野祐介<sup>2)</sup>、後藤隆久<sup>2)</sup>、五嶋良郎<sup>1)</sup>

1)横浜市大・分子薬理神経生物学 2)横浜市大学・麻酔科学

3) 東京女子医大・生化学

これまでに我々は、カテコラミン前駆物質、L-ドーパ (DOPA) が、神経伝達物質として作動しうることを報告してきた。近年DOPA受容体候補分子としてGタンパク共役型受容体GPR143が発見され、中枢神経系以外の末梢組織に広く分布していることが分かった。最近、我々は、DOPAが、末梢 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の修飾を介して末梢血管抵抗を制御することを見出した。本研究は、正常及び肺高血圧モデルラットにおける肺血管においてDOPAによる血管収縮応答制御と病態に伴う変動の有無を検証することを目的とした。

SD ラット から麻酔下で心臓と肺を摘出し肺血管を採取、リング標本を作成した。作成した標本は、マイクロマグヌス装置にセットし、0.1gの負荷を与えた状態で張力を計測した。血管収縮薬として、フェニレフリン (1nM-3 $\mu$ M)、セロトニン (5HT<sub>2</sub> 10 $\mu$ M-100 $\mu$ M)、プロスタグランジンF<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF, 10 $\mu$ M-100 $\mu$ M)、エンドセリン (ET, 10pM-100nM) を累積積算で処理し濃度反応関係を確認した。その後、DOPA (1 $\mu$ M) 前処置による濃度反応関係の変化の有無を検討した。さらに、肺高血圧を誘発する薬物、モノクロタリン (MCT) 60mg/kgをラットに単回皮下投与後7、14、そして肺高血圧症を呈する21日後に、摘出肺血管応答の変化の有無を比較・検討した。

DOPAは、フェニレフリンによる血管収縮応答を増強した。一方、DOPAは、5HT<sub>2</sub>、PGF、ETの収縮応答に対し、いずれも無作用であった。フェニレフリン応答に対するDOPAの効果を、肺高血圧モデルで解析したところ、モノクロタリン投与後7日目以降において、DOPAのフェニレフリン誘発血管収縮の増強作用は消失することが明らかになった。

今回我々は、DOPAが肺血管において選択的にフェニレフリン誘発性収縮応答を増強する事、並びに、この増強効果が肺高血圧発症前の早期に消失することを見出した。本知見は、DOPAによる血管収縮応答の修飾作用が、肺高血圧症の進展過程や病態に関与する可能性を示唆する。

## P1-2

### 2型糖尿病ラット大動脈培養内皮細胞からのヒドロキシラジカル発生作用とNO遊離作用に対するエンドセリンの影響

○野澤(石井)玲子 丸茂圭太郎 高村雅夫 加賀谷肇  
明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】Wistarラットを起源とするGoto-Kakizaki (GK) ラットは、非肥満、インスリン分泌不全、インスリン抵抗性という特徴を併せ持つ日本人の2型糖尿病に近いモデル動物である。糖尿病性血管障害は、その発症・進展に内皮細胞の機能変化が大きく関与している。そこで本研究では、糖尿病病態時における血管障害について検討する目的で、GKラット摘出大動脈と大動脈培養内皮細胞を用いて、ヒドロキシラジカル発生作用と一酸化窒素(NO)遊離作用について検討した。

【方法】12週齢のWistarおよびGKラットから大動脈を摘出した。血管標本は、30 Mの4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA) を添加したKrebs液中でエンドセリン-1 (ET-1) とエンドセリン-3 (ET-3) で刺激し、NO遊離作用およびヒドロキシラジカル発生作用を検討した。また、摘出した大動脈から外植片法により内皮細胞を培養した。培養細胞も同様に実験を行った。4-HBAは、ヒドロキシラジカルをトラップすることにより3,4-Dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA) を生成する。Krebs液中の3,4-DHBAはHPLC-電気化学検出器で、NOはGriese法を応用したHPLC法で測定した。

【結果】GKラットにおいて、 $10^{-8}$  MのET-1は3,4-DHBAの発生量を有意に増強した。一方、Wistarラットにおいて、 $10^{-8}$  MのET-3でNO遊離量が減少から増加に転じた。アンブリセンタンは、3,4-DHBA発生量を減少させた。一方、ボセンタンは3,4-DHBAの発生量を増加させた。

【考察】GKラットでヒドロキシラジカルの発生量が増えていることから、糖尿病血管障害により内皮機能が低下していることが考えられる。拮抗薬の作用は、受容体選択性の違いにより差が出たと考えられる。

## P1-3

### 心筋遅延整流性カリウムチャネルとカルシウムシグナリング分子複合体の解析

○児玉昌美<sup>1</sup>、永森収志<sup>2</sup>、五十棲規嘉<sup>2</sup>、木村彩瑛<sup>3</sup>、福田俊<sup>1</sup>、藤塚美紀<sup>1</sup>、山口賢彦<sup>3</sup>、山崎泰広<sup>3</sup>、喜多紗斗美<sup>4, 5</sup>、岩本隆宏<sup>4</sup>、金井好克<sup>3</sup>、古川哲史<sup>1</sup>、黒川洵子<sup>1, 3</sup>

1東京医科歯科大学 難治疾患研究所 生体情報薬理学分野 2大阪大学大学院 医学系研究科 生体システム薬理学 3静岡県立大学 薬学部 生体情報分子解析学分野 4福岡大学医学部 薬理学教室 5徳島文理大学 薬学部 薬理学

固有心筋細胞の再分極過程は、KCNQ1およびKCNE1から成る  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の遅延整流性カリウム ( $I_{\text{Ks}}$ ) チャネルによって制御される。 $I_{\text{Ks}}$ チャネルは分子複合体によって調節される事例が示されているが、その全容は解明されていない。

$I_{\text{Ks}}$ チャネルを含む分子複合体を網羅的に探索するため、ヒトKCNQ1-KCNE1融合タンパク質を過剰発現させたトランスジェニック ( $I_{\text{Ks}}$ -TG) マウスの心室細胞抽出液から、抗KCNQ1抗体の免疫沈降物を単離し、LC-MS/MS分析を行い、 $I_{\text{Ks}}$ -TGマウスと野生型マウスのスコア比が2以上のタンパク質を163種、同定した。これらのタンパク質に対してパスウェイ解析 (IPAソフトウェア) を行ったところ、カルシウムシグナリングが最上位となった。同定された16種のカルシウムシグナリング関連因子の内、 $\text{Ca}^{2+}$ 膜輸送体タンパク質 ( $\text{Ca}^{2+}$ -transporting protein, CTPX) に注目し、解析を進めた。 $I_{\text{Ks}}$ -TGマウスと同様、野生型モルモット・イヌの心室を用いて、抗KCNQ1抗体による免疫沈降を行ったところ、ウェスタンブロットティングによって、内在性KCNQ1とCTPXの分子複合体形成が示された。KCNQ1上のCTPX相互作用部位を同定するため、KCNQ1のアミノ (N) 末端 (a. a. 1-125)、カルボキシル (C) 末端 (a. a. 355-619) の細胞内領域のGST (Glutathione S-Transferase) 融合タンパク質を作製し、イヌの心室細胞抽出液を用いてGST pull-down assayを行ったところ、両領域ともCTPXとの相互作用を示した。そこで、それぞれの領域の一部を含むGST融合タンパク質を作製し、相互作用部位を絞り込んで行った結果、N末端では近位部 (a. a. 71-125) が、C末端では4つあるヘリックス構造 (近位部から順にA, B, C, D) の内、ヘリックスB (a. a. 504-538) が、CTPXとの相互作用に関与することが示唆された。また、KCNQ1ヘリックスBは、CTPXの細胞内領域と相互作用することが、CTPXの細胞内領域のMBP (マルトース結合タンパク質) 融合タンパク質とのGST pull-down assayにおいて示された。今後は、この相互作用が、 $I_{\text{Ks}}$ チャネルの $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に及ぼす影響について、生化学的および電気生理学的解析により明らかにしていきたい。

## P1-4

### ヒトiPS細胞由来心筋の活動電位形成に関連する遺伝子の定量的発現解析

児玉昌美<sup>1</sup>、木村麗子<sup>1</sup>、酒徳航平<sup>2</sup>、岩崎菜々美<sup>2</sup>、古谷和春<sup>3</sup>、永森収志<sup>4</sup>、  
芦原貴司<sup>5</sup>、古川哲史<sup>1</sup>、関野祐子<sup>6,7</sup>、諫田泰成<sup>7</sup>、○黒川洵子<sup>1, 2</sup>

1東京医科歯科大学難治疾患研究所、2静岡県立大学薬学部、3大阪大学医学部、  
4大阪大学医学部、5滋賀医科大学医学部、6東京大学薬学部、  
7国立医薬品食品衛生研究所

【背景】ヒトiPS由来心筋を利用することにより、非臨床心臓安全性試験の予測性を向上させようという国際的な動きがある。我々の共同研究チームは、ヒトiPS由来心筋の細胞株や培養条件による細胞特性のばらつきをインシリコ技術で理解し、もし薬剤評価結果に影響した場合には、それを補正する技術を開発することを目指している。

【目的および方法】本研究では、細胞特性のばらつきを定量化するために、ヒトiPS由来心筋の電気的特性の株間差に影響する心筋マーカーを選出し、定量性リアルタイムPCRにより、市販ヒト心臓サンプル (Clontech) におけるmRNAの発現と、定量的に比較した。

【結果】標本として、CDI Fujifilm社 (iCell-cardiomyocytes) とAxiogenesis社 (Cor. 4U)

とCellartis社が販売している3種のヒトiPS由来心筋細胞株を用いた。各社の説明書通りに細胞培養を行い、MEA実験の開始と同じタイミングで、それぞれの細胞から全RNAを回収した。リファレンス遺伝子10種類をgeNormソフトで検証し、細胞株等の違いによらず安定に発現している内在性コントロールとしてGAPDHを選出した。

今回、心筋マーカーとして、SCN5A, CACNA1C, KCNJ2, KCNH2, KCNQ1, HCN4, NCX1, ATP1A1, ATP2A2, MYH6, MYH7, PLN, GJA1について、ヒト心臓における発現との相対値を表としてまとめた。発表では、株間差について議論したい。次に、タンパク発現量およびチャンネル電流と比較し、インシリコモデル作成に反映させる予定である。

なお、本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) のご支援により行われた (16mk0104007h9903)。

## P1-5

### 舌乾燥に起因する三叉神経脊髄路核尾側亜核のAMPA受容体のリン酸化

○中谷 有香<sup>1)</sup>、岩田 幸一<sup>2)</sup>、小林 真之<sup>1)</sup>

1) 日本大学歯学部薬理学講座、2) 日本大学歯学部生理学講座

口腔乾燥症の患者は原因不明の舌痛を訴えることが多いが、その発症機序は不明である。われわれは、口腔乾燥により引き起こされる舌痛のメカニズムを解明することを目的とした。SD系雄性ラットを2時間イソフルラン吸入による浅麻酔下にて、毎日2時間、1週間、舌を含む口腔内を乾燥状態にさせ、口腔乾燥モデルラット (dry群) を作製した。同様の吸入麻酔を与えたラットをsham群とした。乾燥開始後7日目、dry群において、舌には組織学的変化は認められなかったが、舌の侵害機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値 (HWT) は有意に低下した。また舌へ侵害機械刺激したのち5分後、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) においてPhosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) 陽性細胞数が有意に増加した。また、髄腔内へのERKリン酸化阻害薬である MEK1 inhibitor (PD98059) の持続投与により、舌の侵害機械刺激に対するHWTの低下およびVcのpERK陽性細胞数の増加が有意に抑制された。さらに乾燥開始後7日目、舌への侵害機械刺激に対するVcの侵害受容ニューロンの発火頻度は有意に増加した。また、PD98059の持続投与により、舌への侵害機械刺激に対するVcの侵害受容ニューロンの発火頻度は有意な抑制を認めた。さらに乾燥開始後7日目、Vcにおけるリン酸化AMPA受容体陽性細胞数が有意に増加した。また、PD98059の持続投与により、リン酸化AMPA受容体陽性細胞数の有意な増加の抑制を認めた。以上のことから、口腔乾燥に起因する舌の機械痛覚過敏発症にはVcの侵害受容ニューロンにおけるERKのリン酸化を介したAMPA受容体のリン酸化が関与している可能性が示された。

## P1-6

### ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における $5\alpha$ 還元酵素の役割

○吉江 幹浩<sup>1</sup>、田村 和広<sup>1</sup>、千葉 翼<sup>1</sup>、井坂 恵一<sup>2</sup>、桑原 直子<sup>1</sup>、立川 英一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京薬科大学、内分泌・神経薬理学教室、<sup>2</sup>東京医科大学、産科婦人科学教室

【目的】ヒト子宮内膜間質細胞（ESC）は、月経周期の分泌期や妊娠時に敷石様形態の脱落膜細胞へと分化し、インスリン様成長因子結合タンパク質-1（IGFBP-1）やプロラクチンを産生する。この分化（脱落膜化）には、プロゲステロン（P4）やcAMPを介したシグナル伝達経路の活性化が促進的に調節している。ESCには、テストステロンからジヒドロテストステロンへの変換やプロゲステロンの代謝に関わる $5\alpha$ 還元酵素の存在が報告されているが、その機能については不明である。そこで、ESCの脱落膜化における $5\alpha$ 還元酵素の役割をその阻害薬であるデュタステリドとフィナステリドを用いて検討した

【方法】ESCにI型及びII型 $5\alpha$ 還元酵素阻害薬のデュタステリド、または、I型 $5\alpha$ 還元酵素阻害薬のフィナステリドを1時間処置した後、脱落膜化誘導刺激であるP4とcAMPアナログ（ジブチリルcAMP）とともに72時間培養した。脱落膜化マーカーであるIGFBP-1とプロラクチンの発現をリアルタイムRT-PCRにて解析し、培養メディウム中のIGFBP-1をELISAにて測定した。

【結果・考察】ESCにP4とジブチリルcAMPを処置すると脱落膜化マーカーのIGFBP-1とPRLのmRNA発現が顕著に増加した。デュタステリド、または、フィナステリドの前処置は、P4とジブチリルcAMPにより誘導されるIGFBP-1とPRLの発現をさらに促進した。また、培養メディウム中のIGFBP-1タンパク質量もデュタステリドやフィナステリドの処置により増加した。これら結果から、ヒトESCには、I型及びII型の $5\alpha$ 還元酵素が存在すること、また、それらの活性阻害は、脱落膜化を促進することが明らかとなった。脱落膜化過程で $5\alpha$ 還元酵素の発現が低下することが最近報告されており、その知見と併せると、 $5\alpha$ 還元酵素を介したP4の代謝機構が脱落膜化過程では抑制されることが推察された。

## P1-7

## マスティック画分の生物活性の化学療法係数に基づいた再評価

○坂上宏<sup>1</sup>、鈴木龍一郎<sup>6</sup>、天野滋<sup>2</sup>、須永克佳<sup>7</sup>、金本大成<sup>8</sup>、福地邦彦<sup>9</sup>、  
寺久保繁美<sup>10</sup>、白瀧義明<sup>6</sup>、増田宜子<sup>1,3</sup>、横瀬敏志<sup>7</sup>、友村美根子<sup>1,4,5</sup>、友村明人<sup>4</sup>、  
中島秀喜<sup>10</sup>、渡邊博文<sup>11</sup>、大川原正喜<sup>11</sup>、又平芳春<sup>11</sup>

明海大学歯学部<sup>1</sup>歯科医学総合研究所(M-RIO)・<sup>2</sup>微生物学・<sup>3</sup>保存治療学・<sup>4</sup>生化学、  
<sup>5</sup>明海大学総合教育センター、城西大学薬学部<sup>6</sup>生薬学・<sup>7</sup>薬物療法学、<sup>8</sup>昭和薬科大学薬学部  
微生物学、<sup>9</sup>昭和大学大学院保健医療学、<sup>10</sup>聖マリアンナ大学微生物学、  
<sup>11</sup>三生医薬株式会社

【緒言】マスティックとは、東エーゲ海に浮かぶギリシャのヒオス島南部にしか生育しないウルシ科の低木 *Pistacia lentiscus* var. *Chia* の樹液状滲出液である。ギリシャの伝統医学では、胃痛や、消化性潰瘍などの病気に 3000 年以上使用されてきた。マスティックは、抗腫瘍活性、抗酸化作用、抗菌活性、薬物代謝酵素の発現や活性に及ぼす作用や抗ウイルス作用、創傷治癒作用、抗動脈硬化作用を示し、ピロリ菌や、クローン病に対して有効であるとされている。そのユニークな形と多彩な作用により、「キリストの涙」と称されている。ヒオスマスティックは、海外に輸出され、香味、芳香を提供するため、化粧品、歯磨剤、軟膏、食品などに添加されている。しかしながら、これまでのマスティックの生物活性の研究者は、マスティックが強い細胞傷害活性を示すにも関わらず、化学療法係数（安全域）による生物活性を評価して来なかった。我々は、マスティックを有機溶媒により、5つに分画し、化学療法係数により生物活性を再評価した。【方法】マスティックガムを砕き、*n*-ヘキサンに続いて酢酸エチルで抽出、または、メタノールあるいは*n*-ブタノールで直接抽出を行った。抗菌活性は、殺菌効果と正常細胞に対する傷害活性から算出した。腫瘍選択性は、4種のヒト口腔扁平上皮癌細胞と3種のヒト口腔正常細胞（歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髓細胞）の感受性の比率により求めた。抗ウイルス活性は、ウイルス感染細胞、非感染細胞に対する保護活性および細胞傷害活性の比率により算出した。CYP3A4阻害活性は、テストステロンの $\beta$ -水酸化活性により算出した。【結果】酢酸エチル抽出液は、他の抽出液よりも僅かに強い腫瘍選択性、一桁強い抗菌活性を示した。特に、*Porphyromonas gingivalis*に対する殺菌活性が顕著であった。全ての抽出液は、抗HIV活性を示さなかったが、抗HSVの感染を完全ではないが、一部抑制した。全ての抽出液は、強いCYP3A4阻害活性を示した。【考察】*n*-ヘキサンにより細胞傷害活性とCYP3A4阻物質を除去することにより、マスティックの抗腫瘍活性、抗菌活性が増大することが明らかになった。

小胞体Ca<sup>2+</sup>のモニタリングによる2型リアノジン受容体抑制薬の探索

○田村真衣<sup>1</sup>、呉林なごみ<sup>1</sup>、村山 尚<sup>1</sup>、湯浅磨里<sup>2</sup>、森 修一<sup>2</sup>、影近弘之<sup>2</sup>、  
鈴木純二<sup>3,4</sup>、金丸和典<sup>3,5</sup>、飯野正光<sup>3,5</sup>、櫻井 隆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>順天堂大・医・薬理、<sup>2</sup>東京医科歯科大・生材研、<sup>3</sup>東大院・医・細胞分子薬理、

<sup>4</sup>カリフォルニア大、<sup>5</sup>日本大・医・細胞分子薬理

2型リアノジン受容体 (RyR2) は心筋の興奮収縮連関に重要な役割を果たしている小胞体膜上のCa<sup>2+</sup>遊離チャネルである。RyR2のアミノ酸変異はカテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) をはじめとする多くの致死性不整脈疾患の原因となることが知られる。CPVT変異RyR2では不整脈誘発の引き金となる自発的Ca<sup>2+</sup>遊離が起りやすいため、RyR2を抑制する薬物は抗不整脈効果を持つことが期待される。我々はこれまでHEK293細胞発現系を用いた研究から、小胞体Ca<sup>2+</sup>インジケータR-CEPIA1erによる小胞体Ca<sup>2+</sup>シグナルが1型リアノジン受容体 (RyR1) およびRyR2のCa<sup>2+</sup>遊離活性をよく反映することを示した (Murayama et al, Human Mut., 2016、Uehara et al. J. Gen. Physiol., 2017, Fujii et al. Heart Rhythm, 2017)。さらに、小胞体Ca<sup>2+</sup>モニタリングがRyR1抑制薬のスクリーニングに有用であることを報告した (Suzuki et al., 第90回日本薬理学会年会)。今回我々は、小胞体Ca<sup>2+</sup>モニタリングによるRyR2抑制薬の探索を行った。FlexStation II分光光度計を用いてRyR2を発現するHEK293細胞のR-CEPIA1erシグナルを96ウェルプレートで測定した。1700種類の機能既知化合物ライブラリについてスクリーニングを行った。設定した閾値を超えて小胞体Ca<sup>2+</sup>を増加させた化合物について、HEK293細胞の単一細胞イメージングおよび心筋由来株化細胞のCa<sup>2+</sup>イメージングにより、薬物作用の可逆性や活動電位誘発性Ca<sup>2+</sup>トランジェントに対する影響を調べ、治療薬への発展性を検証した。我々のスクリーニング法はRyR2抑制薬の探索にも有用な事が示された。



## WDR5によるp300/GATA4誘導性心筋細胞肥大抑制効果の検討

○杉山優雅<sup>1</sup>、刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、天野七菜<sup>1</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、  
船本雅文<sup>1, 2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター 展開医療研究部、<sup>3</sup>静岡県立総合病院

【目的】当研究室はp300/GATA4経路が心筋細胞肥大に重要な役割を果たすことを見出した。我々は新規GATA4結合タンパク質としてWD repeat-containing protein 5 (WDR5) を同定したが心筋細胞肥大に対する役割は不明である。WDR5はリジンメチルトランスフェラーゼMLL1と複合体を形成し、転写調節に関与することが知られている。そこで本研究ではp300/GATA4経路に対するWDR5/MLL1複合体の役割について検討した。

【方法】大腸菌で作製したGST-GATA4と放射性同位体標識したWDR5を用いてGST pull-down assayを行った。次にHEK293T細胞を用いたIP-WB法によりGATA4のアセチル化とWDR5、MLL1、GATA4の直接結合を検討した。ラット初代培養心筋細胞にWDR5を過剰発現させ、フェニレフリン (PE) 刺激後、細胞面積測定とレポーターアッセイを行った。さらにMLL1との結合部位を変異させたWDR5 S91Kを用いてラット初代培養心筋細胞でレポーターアッセイと細胞面積測定を行った。最後にWDR5とMLL1の結合阻害剤であるMM102を用いて、ラット初代培養心筋細胞の面積測定を行った。

【結果】GST pull-down assayによりWDR5はGATA4と直接結合することを確認した。GATA4のアセチル化はWDR5の過剰発現により有意に抑制された。さらにWDR5共発現によりMLL1とGATA4の結合が増加した。PEによって誘導された心筋細胞肥大と心肥大反応遺伝子の転写活性はWDR5過剰発現により有意に抑制された。一方、WDR5 S91Kは心肥大反応遺伝子の転写を亢進させた。WDR5 S91K及びMM102はPEによる心筋細胞肥大を抑制せず亢進させた。

【考察】以上の結果からWDR5はp300/GATA4を介した心肥大反応遺伝子の転写を抑制することが明らかになった。またWDR5による心筋細胞肥大抑制効果にMLL1が関与することが示唆された。今後、WDR5/MLL1複合体によるメチル化とp300/GATA4との関連について検討することで、新たな心不全治療戦略の確立につながることを期待される。

## カカオ豆由来ポリフェノールCBPは心筋細胞肥大を抑制した

○本多大樹<sup>1</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、  
島津章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学薬学部分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター、  
<sup>3</sup>静岡県立総合病院

【目的】心臓に高血圧などの負荷がかかると心臓は肥大して代償しようとするが、ストレスが持続するとこの代償機構は破綻し、心不全へと至る。近年、ポリフェノールの健康に対する有用性に注目が集まっている。ポリフェノールは多くの食品に含まれており、代表的なものとしてチョコレートに含まれるCacao beans polyphenol (CBP) がある。CBPは未発酵カカオ豆由来のエタノール抽出物であり、Epicatechin, Procyanidin B2, Procyanidin Cなどが豊富に含まれている。これまでの報告からCBPには抗酸化作用や抗炎症作用、降圧作用があることは知られているが、CBPの心筋細胞肥大への作用は明らかになっていない。そこで、本研究の目的はCBPの心筋細胞肥大に対する作用を検討することである。

【方法】新生児ラット初代培養心筋細胞をCBP (3, 10, 30  $\mu$ M) で前処理し、2時間後に心筋細胞肥大を誘導するフェニレフリン (PE) を用いて刺激した。48時間後、心筋細胞を抗 $\beta$ ミオシン重鎖抗体を用いて免疫染色し細胞面積の測定を行った。次に同様に処理した心筋細胞のmRNAを抽出し、肥大反応遺伝子である心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) および脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の発現量を定量的逆転写PCR法を用いて検討した。

【結果】PEによって誘導された心筋細胞肥大はCBP 30  $\mu$ Mで処理することで有意に抑制された。また、肥大反応遺伝子のmRNAの発現量はPE刺激によって亢進したが、CBP 30  $\mu$ MによりANF, BNPともに有意に抑制された。

【考察】以上の結果より、CBPは心筋細胞に直接作用し心筋細胞肥大を抑制する作用を持つことが示された。今後、*in vivo*におけるCBPの心不全抑制作用を持つかについて詳細な検討を行うことによりCBPを用いた新規心不全治療薬の開発につながることを期待される。

## アルギニンメチル化酵素PRMT5は老化マウスの心機能を低下させた

○花島一真<sup>1</sup>、刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、若林弘樹<sup>1</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、  
船本雅文<sup>1, 2</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、森本達也<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター 展開医療研究部、<sup>3</sup>静岡県立総合病院

【目的】心不全は高齢者の生命予後を悪化させる要因であり、加齢そのものが心疾患の危険因子であると考えられている。これまでに我々は、Protein Arginine Methyltransferase 5 (PRMT5) が、心不全につながる心肥大の誘導に関与することを明らかにしてきたが、加齢に伴う役割は明らかになっていない。そこで本研究では、PRMT5が加齢に伴う心肥大においてどのように働いているのか解析を行った。

【方法】3カ月齢及び24カ月齢の野生型C57BL/6Jマウスの心臓を用いて、加齢に伴うPRMT5の発現量変化をウエスタンブロット (WB) 法及び定量的逆転写PCR (qRT-PCR) 法で検討した。また、心臓におけるPRMT5の働きを解析するため、心臓特異的PRMT5過剰発現 (TG) マウスを作成し、3カ月齢と24カ月齢で野生型及びTGマウスの心臓を摘出して、心重量体重比 (HW/BW) を測定した。さらにヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、WB法、qRT-PCRによる解析を行った。

【結果】24カ月齢の野生型マウスの心臓では3カ月齢に比べてPRMT5の発現がタンパク、mRNAともに有意に亢進した。TGマウスでは9カ月齢以降、野生型に比べHW/BWは有意に亢進した。24カ月齢TGマウスの心臓HE染色像では野生型に比べ心筋細胞径の有意な増加と、心肥大関連遺伝子のmRNAレベルの有意な亢進が見られた。TGマウス心臓では野生型に比べヒストンH3K9のアセチル化が有意に亢進した。また老化マーカー分子であるp53のタンパク発現量、p53下流遺伝子のp21とp16のmRNAレベルが24カ月齢のTGマウスで野生型に比べ有意に亢進した。

【考察】以上の結果より、加齢に伴い心臓でPRMT5の発現が亢進することで、ヒストンのアセチル化やp53及びその下流遺伝子の発現が亢進し、心肥大を促進させる可能性が示唆された。今後、さらに加齢に伴うPRMT5の役割を明らかにしていくことにより、PRMT5を標的とした高齢者の心疾患治療法開発につながることを期待される。

## 新規Nobiletin標的因子であるNBP1は フェニレフリンによる心筋細胞肥大反応を抑制した

○江部綾華<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、鈴木杏奈<sup>1</sup>、船本雅文<sup>1,2</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、  
宮崎雄輔<sup>1,2,3</sup>、村上明<sup>4</sup>、今泉厚<sup>5</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1,2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部、<sup>4</sup>兵庫県立大学環境人間学部、

<sup>5</sup>株式会社セラバリュース プロテオミクスリサーチセンター

【目的】心不全の発症の危険因子として心筋細胞肥大が挙げられ、この問題を解決することは心不全治療において極めて重要である。我々は、近年様々な生理活性を有することが報告され、機能性物質として注目されている柑橘類果皮成分ノビレチンが、心筋細胞肥大を抑制すること、心筋梗塞モデルラットにおいて心機能を改善することを見出し、Nobiletinが新たな心不全の治療薬となる可能性が示された。しかしNobiletinが肥大抑制作用を示すメカニズムは解明されていない。そこで、本研究の目的はNobiletin標的因子を同定することで、Nobiletinの心筋細胞肥大抑制メカニズムを解明することを目的とした。

【方法と結果】SDラット心臓組織から抽出した蛋白質にBiotin標識Nobiletinを混和、Streptavidin Sepharoseで回収することでNobiletin結合因子を精製した。これをLC/LC-MS/MS解析し、新たなNobiletin標的候補因子Nobiletin binding protein 1 (NBP1)を見出した。次にリコンビナントNBP1とBiotin標識Nobiletinのプルダウンアッセイを行ったところ、NBP1とNobiletinの直接結合が確認された。*In vitro* NBP1酵素活性測定を行ったところ、NobiletinはNBP1の酵素活性を増強させた。培養心筋細胞にNBP1を過剰発現させるとフェニレフリン (PE) 刺激によって亢進するANFやET-1の転写活性、心筋細胞肥大を有意に抑制させた。反対にNBP1をノックダウンさせると、Nobiletinによる肥大抑制作用が消失した。

【考察】今回新たにNobiletin標的因子としてNBP1を同定した。またNobiletinはNBP1に直接結合し、NBP1の酵素活性を増強させること、Nobiletinによる肥大抑制にNBP1が関与していることが示唆された。今後NBP1の心筋細胞での作用を詳細に解析することでNobiletinの作用機序の解明に繋がることが期待される。

## Curcumin誘導体であるPyrazocurcuminはCurcuminよりも強力な 心筋細胞肥大抑制作用を示した

○片山歩実<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、船本雅文<sup>1, 2</sup>、清水果奈<sup>1, 2</sup>、源平麻衣<sup>1</sup>、  
刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター <sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】我々は、心筋細胞核内においてp300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を特異的に阻害する天然ウコン抽出物Curcumin (CUR) が心筋細胞肥大反応や心不全の進展を抑制することを見出した。CURは様々な生理活性を持つことが知られているが、生物学的利用率が低いため、より効果的な治療薬を開発すべくCURをリード化合物としたCUR誘導体の研究も数多く行われている。本研究では、炎症系サイトカインの強力な抑制効果を持つCUR誘導体であるPyrazoprenylcurcumin (PPC) 及びPyrazocurcumin (PyrC) のp300-HAT活性阻害作用と心筋細胞肥大抑制作用を検証した。

【方法】まず、*in vitro* HATアッセイ法によりCUR, PPC, PyrCのp300-HAT活性阻害作用を検証した。次に、初代培養心筋細胞にCUR, PPC, PyrCを処理し、フェニレフリン (PE) 刺激による肥大誘導後、ウェスタンブロット法によるヒストンH3K9のアセチル化の評価、定量的q-PCR法による肥大反応遺伝子ANF、BNPのmRNAレベルの測定、抗 $\alpha$ -MHC抗体による免疫染色後に心筋細胞面積測定を行った。

【結果】*in vitro* HATアッセイ法の結果、CURは60  $\mu$ Mで有意なp300-HAT活性阻害作用を示したが、PPCやPyrCは200  $\mu$ Mでもp300-HAT活性阻害作用を示さなかった。PE刺激により増加したヒストンH3K9のアセチル化、ANFとBNPのmRNAレベル、及び心筋細胞肥大に関して、CURとPPCは10  $\mu$ Mで有意な抑制作用を示したが、PyrCはより低濃度の3  $\mu$ Mで有意な抑制作用を示した。

【考察】PPCはCURと同程度に、PyrCはさらに低濃度で心筋細胞肥大抑制作用を示すことが判明した。PPC及びPyrCはp300-HAT活性阻害作用を示さなかったことからCURとは異なる機構で心筋細胞肥大抑制効果を示す可能性が示唆された。今後、PPC及びPyrCの心筋細胞肥大抑制作用メカニズムを詳細に解明することで、より効果的な心不全治療薬の開発に繋がること期待される。

## ATPによるウシ大動脈内皮細胞の一酸化窒素産生にはプリン作動性P2X<sub>4</sub>受容体サブタイプが主に関与する

○清水 祐希、川地 理加、黄 洋一、野部 浩司

昭和大学薬学部 生体制御機能薬学講座(薬理学部門)

ATP受容体は、P2X受容体およびP2Y受容体に大別され、それぞれに複数のサブタイプが存在するが、血管内皮細胞のNO産生に関与する受容体サブタイプについては、不明な点がある。ウシ大動脈内皮細胞には、P2X受容体ファミリーのP2X<sub>4</sub>およびP2X<sub>7</sub>サブタイプ、P2Y受容体ファミリーのP2Y<sub>1</sub>およびP2Y<sub>2</sub>サブタイプの存在が報告されている。本研究ではNO産生に関与するATP受容体サブタイプについて薬理的に検討した。まず、培養ウシ大動脈内皮細胞をNO蛍光プローブDAF-FM存在下でATP受容体刺激薬ATP  $\gamma$  Sにより刺激し、遊離したNOとDAF-FMとの反応産物であるDAF-FMTを逆相HPLCにより蛍光検出した。その結果、ATP  $\gamma$  S (0~10  $\mu$ M) によるNO遊離量の濃度依存的な増加を測定することができた。次に、ATP  $\gamma$  S (3  $\mu$ M) によるNO産生がP2XあるいはP2Y受容体のいずれを介しているかを検討した。非選択的P2X受容体遮断薬のPPADSは、培養内皮細胞のATP  $\gamma$  SによるNO遊離を濃度依存的に抑制し、そのIC<sub>50</sub>値は5.8  $\mu$ Mであった。この値は、PPADSによるP2X受容体阻害作用の文献値 (IC<sub>50</sub> = 1~10  $\mu$ M) とほぼ一致した。一方、非選択的P2Y受容体遮断薬であるReactive Blue 2のNO遊離阻害作用は、報告されているP2Y受容体阻害作用に比べ著しく弱かった。そこで、このNO産生がP2X<sub>4</sub>あるいはP2X<sub>7</sub>受容体のいずれを介しているかを検討した。選択的P2X<sub>4</sub>受容体遮断薬の5-BDBDは、培養内皮細胞のATP  $\gamma$  SによるNO遊離を濃度依存的に抑制し、そのIC<sub>50</sub>値は2.2  $\mu$ Mであった。この値は、5-BDBDによるP2X<sub>4</sub>受容体阻害作用の文献値 (IC<sub>50</sub> = 1.2  $\mu$ M) とほぼ一致した。一方、選択的P2X<sub>7</sub>受容体遮断薬のA438079のIC<sub>50</sub>値は0.1~0.3  $\mu$ Mと報告されているが、培養内皮細胞のNO遊離は1  $\mu$ MのA438079存在下でも抑制されず、また、10  $\mu$ Mでもその抑制率は29%程度であった。以上の結果から、ウシ大動脈内皮細胞のNO産生は、主にP2X<sub>4</sub>受容体を介していると結論した。

## アスタキサンチンによる心筋細胞肥大及び線維化改善効果の検討

○村田騰行<sup>1</sup>、佐藤 光<sup>1</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、宮崎雄輔<sup>1,2,3</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1,2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>3</sup>静岡県立総合病院

[目的]心疾患は我が国における死亡原因の第2位であり、克服すべき重要な課題である。中でも心不全は予後不良であり、心筋細胞肥大、心臓線維化が発症-進展に関与している。当研究室ではこれまでに、ウコンの主成分であるクルクミンや柑橘類果皮成分であるノビレチンなどの天然化合物が、心筋細胞肥大ならびに心臓線維化を抑制することを見出した。また、サケなどに多く含まれるカロテノイドの一種であるアスタキサンチン (Ast) は、抗酸化作用、抗炎症作用など多彩な生理活性を示す機能性成分として、注目を浴びている。そこで本研究では、Astの心筋細胞肥大と心臓線維化に対する効果の検討を目的とした。

[方法]まず、ラット初代培養心筋細胞をAst (3, 10  $\mu$ M) で前処理し、2時間後、フェニレフリン (PE) 刺激によって心筋細胞肥大を誘導し、抗 $\beta$ -MHC抗体による免疫染色を行い、心筋細胞面積測定を行った。さらに心筋細胞肥大のマーカーとなるロイシン取り込み量を検討した。次に、新生仔ラットから単離した初代培養心臓線維芽細胞をAst (3, 10, 30  $\mu$ M) で前処理し、2時間後、線維化を誘導するAngiotensin II (Ang II, 100 nM) とトリチウム標識したL-Proline (0.5  $\mu$ Ci) を添加し、48時間のインキュベート後回収し、線維化の指標であるL-Proline取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

[結果] 培養心筋細胞において、PEによる心筋細胞肥大を、Astは有意に抑制した。さらに、PE刺激によるロイシン取り込み量の増加も抑制した。また、心臓線維芽細胞においてAstは、Ang IIによるL-Proline取り込みを有意に抑制した。

[考察]以上の結果から、Astは心筋細胞肥大および線維化を抑制した。今後、*in vivo*での検討とともに、Astによるこれらの抑制効果の詳細なメカニズムを検討していくことで、新たな心不全治療薬の開発につながると考える。

## イソフルラン麻酔モルモットにおけるアゼラスチン及びクレマスチンのQT間隔延長作用 –テルフェナジンとの比較–

○大村 賢介<sup>1</sup>、永澤 悦伸<sup>1</sup>、小林 加寿子<sup>2</sup>、曹 新<sup>1</sup>、相本 恵美<sup>1</sup>、高原 章<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東邦大学・薬学部・薬物治療学、<sup>2</sup>東邦大学医療センター大橋病院・薬剤部

【目的】抗ヒスタミン薬のアゼラスチンとクレマスチンは季節性アレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の治療を目的に医療用医薬品として使用されるとともに、一般用医薬品の有効成分としても利用されている。両薬物は主作用であるヒスタミン受容体阻害作用の他に、心室筋の再分極相形成に関与するhERG K<sup>+</sup>チャネルに対して強い阻害作用（IC<sub>50</sub>:約10<sup>-8</sup>M）を有することが報告されている。本研究では、アゼラスチンとクレマスチンの心臓電気薬理学的作用を*in vivo*モルモットモデルで評価し、これらの作用を薬物性QT延長症候群の陽性対照薬であるテルフェナジンと比較した。

【方法】Hartley系モルモットをイソフルランで麻酔し、体表面心電図および頸動脈圧を継続的に測定した。右外頸静脈から右心室に単相性活動電位（MAP）記録/電気刺激兼用電極カテーテルを挿入し、右心室のMAP波形を記録した。アゼラスチン、クレマスチンまたはテルフェナジンの3用量（0.03、0.3および3 mg/kg）をそれぞれ10分間かけて静脈内に持続投与し、心電図指標ならびに90%MAP持続時間（MAP<sub>90</sub>）の変化を経時的に観察した。

【結果】アゼラスチンとクレマスチンはQT間隔とMAP<sub>90</sub>を用量依存的に延長させた。クレマスチンによるQT間隔延長作用の程度はテルフェナジンと同程度であったが、アゼラスチンの作用はテルフェナジンに比べて強力であった。

【考察】クレマスチンのQT間隔延長作用はテルフェナジンとほぼ同等であったが、アゼラスチンはさらに強力なQT間隔延長作用を示した。これらの結果は、従来報告されていたクレマスチンによるQT間隔延長に関する有害事象の因果関係を説明しうるものと考えられるが、有害事象報告の無いアゼラスチンについては臨床において更なる慎重な観察が必要と考えられた。



## クルクミンのp300-HAT活性阻害作用及び心筋細胞肥大抑制効果にはβ-ジエノンの二重結合が関与する

○衣斐遥<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、船本雅文<sup>1, 2</sup>、清水果奈<sup>1, 2</sup>、源平麻衣<sup>1</sup>、  
刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、島津章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、  
森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学大学院 薬学研究院 分子病態学講座、

<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部

【目的】心筋細胞核内に存在するp300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性が心不全進展に重要な役割を果たしており、p300特異的にHAT活性を阻害するクルクミン (CUR) が新規心不全治療薬となる可能性が示唆された。しかし、より効果的な心不全治療薬の開発のためCURの構造活性相関を行う必要がある。そこで、本研究では、クルクミノイド及び、CUR代謝物であるTetrahydrocurcumin (THC) を用いてp300-HAT活性阻害作用及び心筋細胞肥大抑制作用の比較検討を行った。

【方法】in vitro HATアッセイによりクルクミノイドであるCUR、Demethoxycurcumin (DMC)、Bisdemethoxycurcumin (BDMC)、CUR代謝物のTHCのp300-HAT活性阻害作用を比較した。次に、初代培養心筋細胞を各々10 μMで処理し、フェニレフリン (PE) 刺激による肥大誘導後、ヒストンH3K9のアセチル化をウエスタンブロット法にて検証した。さらに定量的q-PCR法により肥大反応因子ANF、BNPのmRNA量を測定した。また、β-MHC抗体による免疫染色後に心筋細胞面積測定を行った。

【結果】In vitro HATアッセイ法の結果、DMCとBDMCは20, 60 μMで濃度依存的にCURと同程度のp300-HAT活性阻害作用を示したがTHCは200 μMでもp300-HAT活性阻害作用を示さなかった。PE刺激により増加したヒストンH3K9のアセチル化、ANFとBNPのmRNAレベル、及び心筋細胞肥大に関して、CUR、DMC、BDMCは10 μMで抑制作用を示したがTHCでは有意な抑制は見られなかった。

【考察】これらクルクミノイドの構造の差異は、両端のフェノール基の3位のメトキシ基であり、クルクミノイドとTHCの構造の差異は炭素鎖の二重結合の有無であることから、p300-HAT活性阻害作用及び心筋細胞肥大抑制作用にはメトキシ基は関与せず、炭素鎖の二重結合が重要である可能性が示唆された。今後、さらに構造活性相関を行うことで、新規心不全治療薬の開発に繋がると期待される。(縦22行)

## 主要なCurcumin代謝物であるCurcumin glucuronidはp300HAT活性阻害及び心筋細胞肥大抑制作用を保持していた

○源平麻衣<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1, 2, 3</sup>、船本雅文<sup>1, 2</sup>、清水果奈<sup>1, 2</sup>、宮崎雄輔<sup>1, 2, 3</sup>、  
刀坂泰史<sup>1, 2, 3</sup>、高橋伸明<sup>4</sup>、掛谷秀昭<sup>4</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、島津章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1, 2</sup>、  
森本達也<sup>1, 2, 3</sup>

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

<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部、<sup>4</sup>京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムケモセラピー・制御分子学分野

【目的】我々は心不全の進展に心筋核内転写コアクチベーターであるp300のHAT活性が大きく関与していること、p300特異的HAT阻害作用を有する天然物Curcumin (CUR) が新たな心不全治療薬となる可能性を見出した。CURを経口摂取した場合、腸管からの吸収過程でCURはCurcumin glucuronid (CUR-G) へと変換され、血中では代謝物のうち約99%がCUR-Gとして存在することから、我々はCUR-G が生体内でp300-HAT阻害作用及び、心筋細胞肥大抑制作用を発揮している可能性を考えた。そこで、本研究の目的はCUR-Gがp300-HAT阻害作用及び、心筋細胞肥大抑制作用を保持しているか検討することである。

【方法】CUR-GのIC<sub>50</sub>を算出するため、p300-HATリコンビナントタンパクを用いた *in vitro* HATアッセイ法を行った。次に、ラット初代培養心筋細胞にCUR またはCUR-G 処理を行い、フェニレフリン (PE) 刺激によって心筋細胞肥大を誘導した。その後、ヒストンH3K9のアセチル化をウェスタンブロット法にて評価した。また、RT-PCRにより肥大反応遺伝子であるANF、BNP のmRNA量の定量化を行った。さらに抗β-MHC抗体による免疫染色後、心筋細胞面積測定を行うことで心筋細胞肥大を評価した。

【結果】p300-HAT活性に対するCUR-GのIC<sub>50</sub>は38.5 μMであり、CUR (IC<sub>50</sub>: 9.4 μM) よりもp300-HAT阻害作用は弱かった。PE刺激により亢進するヒストンH3K9のアセチル化、肥大反応遺伝子ANF、BNPのmRNAレベル、心筋細胞肥大はCUR 10 μMで抑制したが、CUR-G 10 μMでは抑制がみられず、CUR-G 100 μMで抑制した。

【考察】CUR-G はCURよりも弱いながらもp300-HAT活性阻害作用及び、心筋細胞肥大抑制作用を保持していることが判明した。今後、CURとCUR-Gの心筋細胞への取り込み量の比較や、動物を用いた *in vivo*でのより詳細な検討を行うことで、生体内でのCURの作用メカニズムの解明に繋がることが期待される。

## 合成Nobiletinは圧負荷誘導性心不全モデルマウスにおいて、天然Nobiletinと同程度に心不全の進展を抑制した

○佐々木華<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1,3,4</sup>、鈴木杏奈<sup>1</sup>、船本雅文<sup>1,4</sup>、清水果奈<sup>1,4</sup>、刀坂泰史<sup>1,3,4</sup>、宮崎雄輔<sup>1,3,4</sup>、村上明<sup>5</sup>、浅川倫宏<sup>2</sup>、菅敏幸<sup>2</sup>、和田啓道<sup>4</sup>、島津章<sup>4</sup>、長谷川浩二<sup>1,4</sup>、森本達也<sup>1,3,4</sup>

静岡県立大学 薬学部 <sup>1</sup>分子病態学分野 <sup>2</sup>医薬品製造化学分野、<sup>3</sup>静岡県立総合病院 臨床研究部 <sup>4</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>5</sup>兵庫県立大学 環境人間学部

【目的】心肥大は心不全の重要なリスクファクターであり、この問題を解決することは極めて重要である。我々は天然抽出物ライブラリーのスクリーニングを行い、柑橘類果皮成分のNobiletinがラット初代培養心筋細胞において心筋細胞肥大を抑制すること、心筋梗塞や圧負荷による心不全の進展を抑制することを見出した。しかし、柑橘類に含まれるNobiletin含有量は極めて低い。Nobiletinの臨床応用を目指すためには、合成Nobiletin (S-Nobi) が天然抽出Nobiletin (N-Nobi) と同等の作用を有しているのか検討する必要があると考えた。本研究では、圧負荷誘導性心不全モデルマウスを用いて、圧負荷に起因する心不全におけるS-NobiとN-Nobiの心不全進展抑制効果を比較した。

【方法】8~10週齢の雄性C57BL6/Jマウスに大動脈縮窄 (TAC) 術またはSham手術を施した。TAC群、Sham群それぞれをランダムに3群に振り分け、手術翌日からVehicle (1%アカシアガム)、S-Nobi (20 mg/kg/day) およびN-Nobi (20 mg/kg/day) を8週間連日経口投与し、心臓超音波検査を行った。その後心臓を単離し、心体重比、qPCRによる心肥大反応遺伝子の発現検討および組織学的検査を行った。

【結果】心臓超音波検査の結果、TACにより左室内径短縮率は20%程度低下したが、S-NobiまたはN-Nobi投与により、いずれもShamと同程度まで改善した。また、S-NobiはTACによる左室後壁厚の肥厚をN-Nobiと同程度に改善した。TACにより心体重比は1.5倍に増加したが、S-NobiおよびN-Nobi投与により同程度に改善した。また、S-NobiはTACにより増加した心肥大反応遺伝子であるANF、BNP、 $\beta$ -MHCのmRNA発現をN-Nobiと同程度に抑制した。組織学的検査の結果、TACによる心筋細胞径および血管周囲の線維化の増加を、S-NobiおよびN-Nobiは同程度に抑制した。

【考察】本研究より、S-Nobiは圧負荷によって誘導される慢性心不全の進展をN-Nobiと同程度に改善することが明らかになった。以上のことから、S-Nobiが新たな心不全治療薬として利用できる可能性が示唆された。

## 柑橘果皮由来天然物オーラプテンはPPAR $\alpha$ の活性化を介して 心筋梗塞後の心不全進行を抑制した

○薮田亜沙美<sup>1</sup>、砂川陽一<sup>1,2,3</sup>、船本雅文<sup>1,2</sup>、宮崎雄輔<sup>1,2,3</sup>、刀坂泰史<sup>1,2,3</sup>、村上明<sup>4</sup>、和田啓道<sup>2</sup>、島津章<sup>2</sup>、長谷川浩二<sup>1,2</sup>、森本達也<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>静岡県立大学 薬学部 分子病態学分野、<sup>2</sup>京都医療センター 臨床研究センター、<sup>3</sup>静岡県立総合病院、<sup>4</sup>兵庫県立大学 環境人間学部

【目的】心不全はあらゆる心疾患の最終像であり、その発症過程には心筋細胞肥大が関与している。我々は天然抽出物ライブラリーから心筋細胞肥大抑制を指標としたスクリーニングを行い、柑橘類の果皮から抽出したオーラプテンに着目した。近年オーラプテンは核内受容体PPARのリガンドとして作用することが報告された。そこで、本研究では培養心筋細胞を用いてオーラプテンが心筋細胞肥大を抑制するかどうか、さらにオーラプテンが心筋梗塞モデルラットの心不全進行を抑制するか検討した。

【方法】心筋細胞にオーラプテン処理後、フェニレフリン (PE) 刺激を行い、細胞面積を測定した。またmRNAを抽出し、肥大反応因子の転写活性を定量的PCRにて検討した。心筋細胞にPPAR応答領域 (PPRE) とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入し、オーラプテンやPPAR $\alpha$ 阻害剤MK886処理を行い、レポーターアッセイを行った。SDラットに心筋梗塞手術を行い、その後、溶媒あるいはオーラプテン50 mg/kgを7週間連日経口投与し、心臓超音波検査や組織学的検査、mRNAの定量を行った。

【結果】オーラプテンはPEによって亢進する心筋細胞肥大や、ANFやBNPのmRNAレベルを抑制した。オーラプテンは用量依存的にPPREを活性化させた。MK886処理により、オーラプテンによる肥大抑制効果が消失した。心筋梗塞によって肥厚した左室後壁厚や低下した左室短縮率はオーラプテン投与で有意に改善した。また心筋梗塞により増加した心筋細胞径や血管周囲の線維化はオーラプテンによって有意に減少した。さらに心筋梗塞により亢進したANFやBNPはオーラプテン投与群で有意に改善した。

【考察】オーラプテンが心筋細胞肥大を抑制し、心筋梗塞後の心不全の進展を抑制することを見出し、その肥大抑制作用にはPPAR $\alpha$ が関与していることが示唆された。以上のことから、天然物由来のオーラプテンが新たな心不全治療薬となる可能性が示唆された。

## Aldosterone慢性負荷で生じる心房細動の持続化におけるNFATの関与—動静脈モデルラットを用いた検討—

○小田原 一功、相本 恵美、永澤 悦伸、高原 章  
東邦大学 薬学部 薬物治療学研究室

【目的】心房に対して容量負荷およびaldosteroneを慢性的に与えることにより、心房細動の持続時間が5倍以上に延長することを動静脈瘻 (AV shunt; AVS) ラットを用いた研究で明らかにしてきた。しかし、本モデルにおける心房細動の持続化に関わるメカニズムは十分に明らかにされていない。本研究では、本モデルに対するNFATを介したシグナル経路の関与について、間接的NFAT機能抑制薬fingolimod (FTY720) を用いて検討した。

【方法】8週齢のWistarラットにAVSを作製し、aldosterone (Aldo; 0.5  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) およびFTY720 (12.5  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) の投与の有無によりラットを4群 (AVS群、AVS+FTY720群、AVS+Aldo群、AVS+Aldo+FTY720群) に分けた。薬液は浸透圧ポンプにより4週間持続投与した。術後25-28日の時点でラットを麻酔し、心房中隔に留置した電極カテーテルを用いて電気生理学的評価を行った。

【結果】バーストペーシングにより誘発された心房細動の持続時間は、AVS群に比べてAVS+Aldo群で約7倍に延長した。AVS+FTY720群の心房細動持続時間はAVS群と同程度であったが、AVS+Aldo+FTY720群の心房細動持続時間はAVS+Aldo群と比べて約50%短縮した。AVS+Aldo群の心房有効不応期はAVSより短かったが、AVS+Aldo+FTY720群はAVS群と同程度であった。AVS+Aldo群の心房重量はAVS群に比べて大きかったが、AVS+Aldo+FTY720群はAVS群と同程度であった。

【結語】AVSモデルラットにおける検討において、FTY720はAldo慢性負荷による心房拡大および心房有効不応期短縮を改善し、心房細動の持続化を抑制した。この機序にNFATを介したシグナル経路が関与する可能性が示唆された。

## セルモーションイメージングによるマウス心筋の力学的機能の解析

○佐野優介<sup>1</sup>、鈴木結衣<sup>1</sup>、高橋健太郎<sup>2</sup>、児玉昌美<sup>2</sup>、山口賢彦<sup>1</sup>、笹野哲郎<sup>3</sup>、  
早川智広<sup>4</sup>、松居恵理子<sup>4</sup>、古川哲史<sup>2</sup>、黒川洵子<sup>1, 2</sup>

1 静岡県立大学薬学部、

2 東京医科歯科大学難治疾患研究所、

3 東京医科歯科大学医学部、

4 ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ株式会社

固有心筋の収縮・弛緩は生命維持の根幹ともいえる生理機能であり、心筋細胞膜の活動電位が引き金となる興奮収縮連関機構には多くの研究者が注目してきた。近年、我々は、ヒトiPS細胞の創薬応用を目指し、自律拍動をするヒトiPS細胞由来分化心筋細胞のセルモーションイメージングの実験系を構築した (Hayakawa et. al., JMCC 2014)。本法では動き検出 (MVP) 法を応用することによって、非染色で長時間観察を可能にしていることから、汎用性が高く簡便であり創薬応用に有利な点が多い。しかしながら、本セルモーションイメージングで得られた各種パラメータと心筋収縮関連分子との相関はいまだ不明な点を多く残す。

そこで、本研究では、マウス心臓から酵素処理により単離した心室筋細胞および心房筋細胞に対して白金電極から1 Hzの刺激を印加すること (ペーシング) により収縮を惹起し、セルモーションイメージングによって心室筋と心房筋の力学的機能を比較解析した。MVP法によって得られた動きデータから、心房筋は心室筋に比べて、収縮速度および弛緩速度が有意に速いことが示された。収縮—弛緩持続時間については、心室筋の方が心房筋よりも15-20%程度長いという結果が得られたものの、心室筋と心房筋の活動電位持続時間で報告されている差 (1.5-2倍) に比べて軽度であった。興奮収縮連関に関わる分子の発現量が心室と心房で異なることが関与していると推察できる。

以上の結果より、MVP法を応用したセルモーションイメージングを用いて、マウス心臓から単離した心房筋細胞と心室筋細胞の力学的機能の差異を明らかにすることに成功した。今後は、阻害剤等を用いて、動きデータの各種パラメータに寄与する分子を同定し、本手法を用いて心筋の力学的機能を分子レベルで解析することを目指す。

なお、本研究の一部は、ソニーサポートファンドのご支援により行われた。

## 脳梗塞後の神経幹・前駆細胞の増殖・分化とGSK-3 $\beta$ 情報伝達系の変化

○ 折田 真以子<sup>1)</sup>、喜早 慧士<sup>1)</sup>、新井 美穂<sup>1)</sup>、伊藤 剛志<sup>1)</sup>、林 秀樹<sup>1)</sup>、  
袁 博<sup>1)</sup>、 田野中 浩一<sup>2)</sup>、高木 教夫<sup>1)</sup>

東京薬科大学・薬学部・<sup>1)</sup>応用生化学教室、<sup>2)</sup>分子細胞病態薬理学教室

【背景・目的】脳梗塞慢性期の薬物療法は再発予防が第一義的な目的であり、新たな治療の開発が望まれている。神経新生の過程は、神経幹・前駆細胞の増殖・分化・遊走・統合で構成され、脳梗塞後に一過性に増強することが知られている。しかし、その詳細な機序は明らかでない。GSK-3 $\beta$ は中枢神経系に豊富に存在し、神経幹・前駆細胞の増殖や分化にも関与していると考えられている。本研究は、脳梗塞後神経新生の初期段階である神経幹・前駆細胞の増殖・分化過程におけるGSK-3 $\beta$  情報伝達系の役割を検討した。

【方法】Wistar系雄性ラットの右内頸動脈内に直径45 $\mu$ mのマイクロスフェアを700個注入し、脳塞栓を誘発した。術後に惹起される細胞の増殖・分化過程の評価およびGSK-3 $\beta$  情報伝達系に関わる各種タンパク質量の解析は、蛍光免疫染色法とウエスタンブロット法で行った。GSK-3 $\beta$  情報伝達系の変化を検討するため、その上流のPI3K/Akt経路の阻害剤であるWortmannin (30  $\mu$ g/kg) を静脈内投与した。さらに、胎生14日目のラットから神経幹・前駆細胞を単離し、低酸素を負荷した後GSK-3 $\beta$  情報伝達系の変化を検討した。

【結果・考察】GSK-3 $\beta$  情報伝達系の経時的変化を観察した結果、術後7日目でリン酸化Aktおよびリン酸化 (Ser9) GSK-3 $\beta$  量が顕著に増加した。また、術後7日目の右海馬では、Ki67およびDCX両陽性新生神経細胞が観察され、神経分化に必須因子であるNeuroD陽性細胞数も増加していた。次に、GSK-3 $\beta$  の上流を阻害した結果、術後7日目で観察されたNeuroD陽性細胞数の増加が抑制された。最後に、単離した神経幹・前駆細胞に低酸素を負荷し、上述のシグナル変化を検討した。その結果、低酸素負荷はGSK-3 $\beta$  情報伝達系を活性化し、細胞増殖能も増強した。本研究は、脳梗塞後神経新生の過程にGSK-3 $\beta$  情報伝達系を介したNeuroD発現の増強が関与する可能性を示した。

## 即断は学習を遅滞させる

○八幡洋輔、牧野健一、池谷裕二

東京大学 大学院薬学系研究科 薬品作用学教室

常に変化し続ける環境においては、適切なタイミングで、適切な決定を下すことが重要である。しかしながら、意思決定の早さ（タイミング）と行動成績（適切さ）との関係はいまだに明らかになっていない。本研究ではラットを用いて、光をCue（手掛かり）として適切な穴に鼻先を入れる（ノーズポーク）と報酬が得られる、というオペラント条件づけをラットに行い、その学習の過程を観察した。本研究で用いた22匹すべてのラットが4日間のテスト期間中に学習を成立させたが、正解率80%という学習成立の基準に初めて至るまでにかかったセッション数（学習成立セッション）は個体差が大きく、その分布は広範囲（4～27セッション）にわたった。個体ごとに解析を行ったところ、学習成立直前の4セッションにおける反応潜時（Cue提示からノーズポークまでの時間）は学習成立セッションと負の相関関係にあった。この結果から、意思決定の早い個体ほど、学習成立が遅くなるということが示唆される。続いて、各試行における思考時間の長さが正しいルールの理解につながっている可能性があると考えた。そこで、反応潜時を課題正解時と不正解時に分けて解析を行ったところ、正解時の反応潜時の方が不正解時に比べて有意に長いことが示された。この結果から、各試行における迅速な意思決定は課題の正解にはつながらないことが示唆される。最後に、正解時の反応潜時に対する、不正解時の反応潜時の比を「不注意さ」の指標として用い、学習成立セッションとの関係を解析したところ、潜時比と学習成立セッションとの間に負の相関関係が認められた。このことから、学習中に急いだ意思決定をして不正解に終わった個体ほど、ルールの学習が遅くなることが示唆される。なお、テスト開始から学習成立までの正解率に、学習成立の早さとの有意な相関関係は認められなかったため、各試行で正解するかどうかはルールの学習に重要ではないことが示唆される。正解すること自体よりも、むしろ、各試行で時間をかけて思案を重ねることが早期での学習成立に重要であると考えられる。



## 糖尿病性末梢神経障害に対するファスジルの影響

○小石川衛、梅田雄也、野澤(石井)玲子、加賀谷肇

明治薬科大学 臨床薬剤学研究室

【目的】糖尿病の合併症の一つとして糖尿病性神経障害が知られている。糖尿病性神経障害のヒトでの症状としては、早期では足の先や足裏などのしびれを左右対称に認めることが多く、進行すると感覚の鈍麻や下痢と便秘の繰り返しが起こるようになる。今回、2型糖尿病モデルラットであるGoto-Kakizaki (GK) ラットを用いて、末梢神経障害の治療薬候補として脳虚血改善薬のファスジルを用いて検討した。ファスジルは、Rhoキナーゼを阻害することで脳血管れん縮を抑制することが知られている。近年、Rhoキナーゼ阻害薬に、脊髄損傷後の機能回復を促進する効果があることが報告されている。今回は、GKラットにファスジルを5日間投与し、糖尿病性神経障害の改善が見られるか否かについて検討した。正常血糖モデルとしてWistarラットを用い、比較した。

【方法】12週齢の雄性WistarおよびGKラットを使用した。疼痛関連行動は、機械刺激としてVon Freyテスト、侵害性熱刺激としてTail flickテストを行った。さらにファスジルを5日間投与した後、両ラットから尾動脈を摘出し、電気刺激 (ES) によるNE遊離実験を行った。

【結果】疼痛関連行動テストの結果から、12週齢でもGKラットには神経障害が生じていることが確認された。またファスジル投与によって、機械刺激に対する閾値が低下した。ESによるNE遊離実験では、Wistarラット及びGKラットともに、ファスジルを投与してもNE遊離作用に対して影響は見られなかった。

【考察】ファスジルは、知覚神経に関わる神経障害に効果があることが示唆された。また、交感神経終末からのNE遊離作用に対しては、作用しないことが示唆された。

## ヒト脂肪細胞におけるP2受容体の機能解析: 分化に伴う発現変化と脂肪分解に及ぼす作用

○牧口知樹、吉田一貴、伊藤政明、松岡功

高崎健康福祉大学薬学部薬効解析研究室

脂肪細胞は生体の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、その機能は様々な液性因子により調節されている。一方、細胞外のATPやUTPはプリン受容体を刺激することにより細胞間伝達物質として生体機能の調節に関与することが明らかになっているが、脂肪細胞の分化およびエネルギー代謝に及ぼす作用は知られていない。そこで、本研究ではヒト白色脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞への分化、脂肪細胞から分泌されるアジポカインの発現および脂肪代謝に及ぼすP2受容体を介する作用を検討した。ヒト白色脂肪前駆細胞は分化誘導により増殖を停止し、継続した培養により顕著な脂肪蓄積が認められた。この時、ヒト白色脂肪前駆細胞には、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub>およびP2Y<sub>12</sub>受容体が発現していたが、分化誘導に伴いP2Y<sub>1</sub>およびP2Y<sub>12</sub>受容体の発現上昇が認められた。成熟した脂肪細胞では、アディポネクチン発現の著増が認められたが、ATPやADPはアディポネクチン発現には大きな作用を示さなかった。また、ATPやADPは、単独では成熟脂肪細胞の脂肪代謝に影響しなかったが、イソプレナリンによって誘発される脂肪分解に対しては用量依存的な抑制作用を示した。このATPとADPによる脂肪分解の抑制は、P2Y<sub>1</sub>受容体阻害薬のMRS2179では影響されなかったが、選択的P2Y<sub>12</sub>受容体阻害薬のチカグレロルで拮抗され、百日咳毒素によりGiを不活性化した細胞では認められなかった。さらに、同条件で細胞内cAMP濃度の変化を検討した結果、ATPやADPはイソプレナリンによるcAMPの上昇を抑制し、その効果は百日咳毒素処理やチカグレロル存在下では消失した。以上の結果から、成熟した培養ヒト白色脂肪細胞では細胞外ATPやADPは脂肪分解を阻害し、この作用は発現上昇したP2Y<sub>12</sub>受容体を介する応答であると考えられた。

## B16メラノーマ細胞におけるP2X7受容体の機能解析

○武藤 魁杜、吉田 一貴、伊藤 政明、松岡 功

高崎健康福祉大学 薬効解析学

P2受容体は細胞外ATPを認識する受容体であり、Gタンパク質共役型状態であるP2Y受容体とリガンド開口型受容体であるP2X受容体に大別される。これらの受容体のうち、P2X7受容体はマクロファージ、マスト細胞などの免疫細胞に高発現しており、炎症反応や免疫反応において重要な役割を担っている。一方で、P2X7受容体は癌細胞にも発現しており、腫瘍の増殖や転移の促進に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、P2X7受容体がどのようなメカニズムによって腫瘍の増殖や転移を促進させているかは明らかでない。そこで本研究では、機能的なP2X7受容体を発現しているマウスメラノーマB16細胞を用いて、細胞増殖および生存シグナル分子の遺伝子発現に及ぼすP2X7受容体活性化の影響を調べ、細胞内シグナル伝達経路との関連について解析を行った。

まず、B16細胞を用いた担癌モデルマウスにおいて、P2X7受容体の阻害が腫瘍の成長を抑制するか検討を行った。B16細胞担癌マウスにP2X7受容体阻害剤であるAZ10606120を投与すると腫瘍の増大は抑制された。次に、P2X7受容体の活性化がB16細胞の増殖を促進するか検討を行った。しかしながら、P2X7受容体刺激薬であるBzATPや阻害剤であるAZ10606120は*in vitro*における培養細胞の増殖に影響しなかった。そこで、腫瘍の増殖や生存・転移を促進するVEGFや抗アポトーシス因子・マトリックスメタロプロテアーゼ等の生体内の腫瘍環境に影響する遺伝子発現量がP2X7受容体の活性化によって変化するか検討を行った。BzATPでB16細胞を刺激するとVEGFとBcl-xLの遺伝子発現量が増加し、この反応はAZ10606120によって阻害された。一方、P2X7受容体刺激によって、どのような細胞内シグナル伝達経路が活性化するか検討を行った。B16細胞をBzATPで刺激するとp38 MAPキナーゼやJNK、Jak 2、STAT 3のリン酸化が増加し、これらの反応はAZ10606120によって阻害された。

これらの結果から、P2X7受容体は細胞の増殖を直接制御するのではなく、抗アポトーシスや腫瘍内の環境制御を行うことによって腫瘍の増殖を増強させていることが示唆された。

## 炎症性腸疾患における膜型プロスタグランジンE合成酵素-1の役割

○関谷広樹<sup>1,2</sup>、河喜多智美<sup>3</sup>、鈴木沙織<sup>1</sup>、京極美帆<sup>1</sup>、倉本大輔<sup>1</sup>、市川尊文<sup>2</sup>、北里英郎<sup>3</sup>、小島史章<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>北里大学 医療衛生学部 薬理学 <sup>2</sup>北里大学大学院 医療系研究科 生体制御生化学

<sup>3</sup>北里大学大学院 医療系研究科 環境微生物学

炎症性腸疾患（IBD）は、免疫異常を伴う慢性炎症性疾患であり、その病態形成機序は解明されていないことから難病に指定されている。これまでに、IBD患者の腸管組織においてプロスタグランジン（PG）E<sub>2</sub>の生合成系の最終段階で働く膜型PGE合成酵素-1（mPGES-1）の発現を認めることが報告されているが、その役割の詳細は不明である。そこで本研究では、IBD病態におけるmPGES-1/PGE<sub>2</sub>系の役割を解明することを目的として、IBDに類似した腸管炎症病態を呈するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発腸炎モデル、トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発腸炎モデルならびにmPGES-1欠損マウスを利用して検討をおこなった。DSS投与後のmPGES-1欠損マウスでは野生型マウスに比べて、著しい体重減少と下痢・血便症状の増悪を認めた。また、DSSで腸炎を誘発したmPGES-1欠損マウスの大腸では、野生型マウスよりも重度の粘膜障害と筋層の肥厚を認めた。更に、TNBS誘発腸炎モデルにおいても、mPGES-1欠損マウスは野生型マウスに比べて重篤な大腸の炎症病態を呈し、重度の潰瘍状の病変も確認された。この病変部位には炎症性細胞の浸潤や壁肥厚、盂細胞の消失や腺構造の消失なども認められ、これらを総合的に評価した病態スコアはmPGES-1欠損マウスで高値を示した。また、DSSおよびTNBSの両モデルで腸炎を誘発した野生型マウスの大腸においては、mPGES-1とその上流酵素のシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の発現の増加を認めた。更に、mPGES-1欠損マウスの大腸において、IBD病態の増悪因子として知られるT細胞性サイトカインのIFN $\gamma$ とIL-17Aの著しい発現増加を認めた。以上の結果より、COX-2/mPGES-1系で産生されるPGE<sub>2</sub>は、IBD病態で亢進を認めるTh1/Th17免疫系を抑制的に制御することでIBDの病態に対して保護的に働く可能性が示唆された。

### 抗酸化ペプチド・カルノシンによる急性肺傷害の予防効果の解析

○高藤綾香、川原正博、田中健一郎

武蔵野大学薬学部

#### 目的

急性呼吸窮迫症候群（ARDS）は好中球性炎症や細胞死（肺胞上皮、血管内皮）を伴う急性の呼吸器疾患であり、その発症や増悪には活性酸素が重要な役割を果たしている。医療技術の進歩した現在においても、ARDS発症後の予後を改善できる薬がないため、ARDSの発症や増悪を抑制することのできる治療方法を確立することは大変重要である。一方、カルノシンはβアラニンとヒスチジンからなる内因性のジペプチドで、抗酸化作用、金属キレート作用、pH調整作用、タンパク質の糖化抑制作用など種々の生体保護効果を持つことが知られている。そこで我々は、カルノシンの抗酸化作用に注目し、ARDSの代表的な動物モデルであるLipopolysaccharide（LPS）肺傷害に対する予防効果を解析した。

#### 方法

雄性ICRマウスにLPS（1 mg/kg）を経気道投与し、肺傷害を作成した。カルノシン（0, 10, 50, 100 mg/kg）を1日1回経口投与した。肺傷害の程度は、組織学的解析や肺胞洗浄液中の炎症性細胞数により評価した。活性酸素は、*in vivo* imaging systemを用いて定量した。

#### 結果

LPSを経気道投与することにより、肺の透過性亢進、組織傷害、炎症反応が誘発されたが、これらはカルノシンの経口投与により顕著に抑制された。In vivo imaging systemを用いて肺の活性酸素を測定した結果、LPSによる活性酸素産生が、カルノシンの経口投与により抑制された。また、カルノシンは、LPSによる好中球性炎症の亢進（ミエロペルオキシダーゼ活性上昇、好中球細胞外トラップの形成）を顕著に抑制した。さらに、我々は、カルノシンがLPSによる肺組織の細胞死や小胞体ストレス応答の誘導を抑制することも見出した。

#### 考察

これらの結果から我々は、カルノシンがLPSによる活性酸素産生の抑制作用を介して、好中球性炎症や肺の細胞死を抑制し、LPS肺傷害を抑制することを示唆した。したがって我々は、カルノシンがARDS予防薬（サプリメント）として非常に有望であると考えている。

## 吃逆に対する柿蒂湯の効果 ～柿蒂トリテルペノイドの抗けいれん作用の検討～

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

1明治薬科大学 臨床薬剤学教室、2天然薬物学教室

【目的】がん患者においては、化学療法の実行期や終末期にしゃっくり（吃逆）の症状を呈する患者が散見される。吃逆には、メジャーランキライザーや抗けいれん作用のあるベンゾジアゼピン系の薬物が使用されているが著効を示す薬剤は少ない。一方、柿蒂湯は柿蒂、生姜、丁字からなり、古くから吃逆に用いられてきた。そこで、柿蒂は抗痙攣薬としての作用を有するのではないかと考え、薬物により誘発される痙攣に及ぼす影響を検討し、柿蒂の水エキス、メタノールエキス、酢酸エチルエキスの各エキスにも抗痙攣作用が認められることを報告している。そこで今回、より吃逆に効果的な成分を探索することを目的に、柿蒂に含まれるトリテルペノイド（ウルソール酸、オレアノール酸、ベツリン酸）の抗痙攣作用について検討する。

【方法】マウスに柿蒂トリテルペノイドをそれぞれ経口投与後、ストリキニーネまたはピクロトキシンをそれぞれ腹腔内投与し、間代性けいれん開始時間、強直性けいれん開始時間、死亡までの時間を計測した。

【結果および考察】間代性痙攣開始時間はストリキニーネ誘発痙攣において、ベツリン酸の1時間前投与で有意な延長がみられ、ピクロトキシン誘発痙攣において、オレアノール酸の1時間前投与で有意な延長がみられた。死亡時間ではピクロトキシン誘発痙攣において、ウルソール酸、オレアノール酸の4時間前投与で有意な延長がみられた。このことから、柿蒂に含まれるトリテルペノイドのうち、どれかただ1つの成分が効果をもつというのではなく、3つの成分それぞれに延長がみられたので、これらが混合した柿蒂湯で抗痙攣作用を持つと考えられる。

## ローズヒップ抽出物のキサンチンオキシダーゼ阻害作用および高尿酸血症モデルマウスにおける血清尿酸値低下作用の検討

○木暮 里美<sup>1</sup>、菊地 秀与<sup>1</sup>、新井 理絵<sup>2</sup>、齋野 幸樹<sup>1</sup>、大久保 温子<sup>1</sup>、津田 整<sup>3</sup>、須永 克佳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>城西大学大学院 薬学研究科 医療栄養学専攻 薬物療法学講座

<sup>2</sup>城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 <sup>3</sup>城西大学 薬学部 医療栄養学科

【背景・目的】当研究室では、メディカルハーブの安全で有効な活用を目指して薬との相互作用や新しい機能性を見いだすことを目的に研究を行っている。ローズヒップはイヌバラ (*Rose canina*,バラ科)の果実であり、豊富にビタミンCを含んでいることからハーブティーやサプリメントとして利用されている。今回、ローズヒップ抽出物のキサンチンオキシダーゼ (XOD) 活性および高尿酸血症モデルマウスに対する効果、更に薬物併用における安全性の観点からCYP3A4活性に及ぼす影響について検討を行った。【実験方法】ローズヒップは熱水、エタノールおよび酢酸エチルにより抽出した抽出物を用いた。XOD活性の測定はXODと水またはローズヒップ抽出物を含むTris-HCl bufferを5分間インキュベート後、基質であるキサンチンを添加し、30分間インキュベーション後、生成した尿酸量を測定した。熱水抽出物による血清尿酸値低下作用はオキシソニン酸投与による高尿酸血症モデルマウスを用いて検討した。CYP3A4活性測定はテストステロン6β-水酸化活性を指標に行った。【結果】*In vitro*試験により各ローズヒップ抽出物がXOD阻害作用を示し、その作用は熱水抽出物 (IC<sub>50</sub>: 259.6±50.6 μg/mL) ≒エタノール抽出物 (IC<sub>50</sub>: 242.5±46.2 μg/mL) >酢酸エチル抽出物 (IC<sub>50</sub>: 1462±544.2 μg/mL)の順であった。高尿酸血症モデルマウスの検討では、ローズヒップ熱水抽出物群 (1 g/20 mL抽出物を5 mL/kg, p.o.) がオキシソニン酸投与後2から8時間においてコントロール (水5 mL/kg, p.o.) と比較して有意に尿酸値を低下させ、この作用は1 mg/kgアロプリノール群とほぼ同じだった。更に、CYP3A4活性に対する影響を検討した結果、ローズヒップ熱水抽出物は弱い阻害作用を示した (IC<sub>50</sub>: >1 mg/mL)。【考察】ローズヒップ抽出物には、XOD阻害による尿酸産生抑制作用があり、高尿酸血症モデルマウスにおいて尿酸値低下作用を示すことを明らかにした。また、弱いCYP3A4阻害作用が認められたが、CYP3A4基質薬物との併用において相互作用のリスクは低いものと思われる。ローズヒップのセルフメディケーション分野での活用が期待される。