

A 会場



**A1-1** **$\alpha$ -Synuclein毒性に対するkaempferolの神経保護効果**

○高木 彩圭、北井 葉月、栗田 尚佳、位田 雅俊  
岐阜薬科大・薬・薬物治療学研究室

パーキンソン病 (PD) は、黒質におけるドパミン作動性神経の変性・脱落を主徴とする神経変性疾患である。その病理学的特徴としてレビー小体の出現が認められ、主要な構成成分に  $\alpha$ -synucleinがある。 $\alpha$ -Synucleinの凝集・蓄積はPDの発症に深く関与すると考えられている。プロポリスは、ミツバチが集めた樹木の新芽や樹皮などに、自らの唾液を混ぜ合わせて作る樹脂製物質である。様々な成分を含有しており、例としてポリフェノールが挙げられる。これまでの我々の検討により、プロポリス含有ポリフェノールのなかでkaempferolが、家族性ALSの原因遺伝子のひとつである変異SOD1のタンパク質蓄積をオートファジー誘導機序を介して抑制することが示された。そこで他の神経変性疾患に係わる蓄積タンパク質へ効果があることが予想された。本研究では、マウス神経芽細胞腫のneuro2a (N2a) 細胞にPiggyBacベクターシステムを用いて  $\alpha$ -synucleinを遺伝子導入し、誘導性の安定発現モデルを作製した。このモデル系を用いて、 $\alpha$ -synucleinの発現による細胞毒性とkaempferolの保護効果を評価した。また、ウエスタンブロット法を用いて  $\alpha$ -synucleinの細胞内タンパク質量を検討した。リコンビナント  $\alpha$ -synucleinを作製し、凝集に対するkaempferolの効果についてチオフラビンアッセイをした。結果として、野生型および変異型  $\alpha$ -synuclein発現細胞では細胞生存率が低下した。Kaempferolを処置することで生存率の回復が認められた。また、kaempferolは野生型および変異型  $\alpha$ -synucleinの細胞内タンパク質量を低下させた。kaempferolのオートファジー誘導に関する検討をおこなったところ、リソソーム関連遺伝子の誘導を確認した。リコンビナント  $\alpha$ -synucleinを用いたチオフラビンアッセイにより、kaempferolは  $\alpha$ -synucleinの  $\beta$  シート構造の形成を抑制することを確認した。以上より、kaempferolの  $\alpha$ -synuclein毒性に対する保護効果には凝集体形成への抑制作用が関与することが示唆された。

**A1-2****マウスの慢性社会ストレスによる末梢臓器でのPG合成酵素COX-1とPGE受容体EP1への影響**

○本岡 弓佳<sup>1</sup>、北岡 志保<sup>1,2</sup>、篠原 亮太<sup>1</sup>、越智 裕太<sup>3</sup>、崔 翼龍<sup>3</sup>、渡辺 恭良<sup>4</sup>、古屋敷 智之<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大・院医・薬理学分野、<sup>2</sup>兵庫医科大・医・薬理学講座、<sup>3</sup>理研・生命機能科学研究センター・生体機能動態イメージング研究チーム、<sup>4</sup>理研・生命機能科学研究センター・健康・病態科学研究チーム

慢性ストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を誘導し、うつ病など精神疾患のリスクを高める。我々はマウスの慢性社会ストレスモデルを用い、プロスタグランジン(PG)<sub>2</sub>E<sub>2</sub>とその受容体EP1が慢性社会ストレスによる情動変容に必須であることを示した。脳内では2-arachidonoylglycerolがmonoacylglycerol-lipase (MAGL) に代謝されて遊離アラキドン酸を生じ、ミクログリアに発現するPG合成酵素cyclooxygenase (COX)-1を介してPGE<sub>2</sub>産生に至る。MAGL阻害薬は慢性社会ストレスによる脳内のPGE<sub>2</sub>産生増加とともに抑うつ行動を阻害したが、興味深いことに、不安亢進は抑制されなかった。しかし抑うつ行動と不安亢進のいずれにもPGE<sub>2</sub>-EP1経路は必須であることから、末梢臓器におけるPGE<sub>2</sub>-EP1経路の役割が示唆された。本研究では、慢性社会ストレスにおいてPGE<sub>2</sub>-EP1経路が働く末梢臓器を探索するため、慢性社会ストレスを受けたマウスを[<sup>18</sup>F]FKTP-MeによるCOX1 PETイメージングに供した。その結果、慢性社会ストレスは脳と末梢臓器におけるCOX-1 PETリガンドの結合能が変化した。その経時的変化は脳と末梢臓器で異なっており、臓器選択的であった。さらに、慢性社会ストレスによりCOX-1 PETリガンドの結合能が減少した臓器で、EP1のmRNA発現量も減少していた。これらの結果は、慢性社会ストレスが脳だけでなく末梢臓器でもPGE<sub>2</sub>-EP1経路に影響を与えることを示し、この経路を標的としたPETイメージングがうつ病などストレス関連疾患のバイオマーカーとなる可能性を提示している。

## A1-3 CGRPの鼻腔内投与による恐怖記憶への影響

○米山 佳和、三宅 里奈、森永 有美、橋川 成美、橋川 直也  
岡山理科大・理学研究科

### [目的・背景]

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は痛みの伝達物質として知られている神経ペプチドの一種で、血管拡張作用や片頭痛の誘発などが知られている。また、これまでの研究より、恐怖体験曝露直後のマウスにCGRPを脳室内投与すると恐怖記憶を抑制することが明らかとなった。この結果よりCGRPはPTSDに対する新たな治療薬候補になりえると考えられたが、脳室内へのCGRP投与は臨床応用を考えると現実的でない。そこで我々は鼻腔内投与の可能性について検討を行った。鼻腔内投与は脳血管閉塞に阻害されることなく低分子の薬剤を脳へ移行でき、速やかな効果が期待できる投与方法である。本研究ではマウスにCGRPを鼻腔内投与した時の恐怖記憶における影響について検討した。

### [方法]

8週齢のC57BL/6J雄性マウスにSalineまたはCGRPを鼻腔内投与した。投与30分後、60分後に脳脊髄液、脳海馬および血液を採取した。その後ELISA kitを用いてCGRP量の測定を行った。また、恐怖記憶への影響は恐怖条件付け試験を行った。脳海馬におけるCGRPのシグナル伝達機構の影響を検討するため、Western blottingを行った。

### [結果・考察]

CGRP鼻腔内投与後のCGRP量を測定した結果、血清では変化が見られなかったが、脳脊髄液、脳海馬において有意な上昇が見られた。これらの結果より、CGRPの経鼻投与により脳海馬および脳脊髄液への移行することが明らかとなった。次に恐怖記憶に対する影響を検討した結果、CGRPは脳室内投与と同様に記憶保持に影響を与えるが、再固定や消去の過程においては影響を与えないことが明らかとなった。また、CGRP受容体拮抗薬により記憶保持の抑制がキャンセルされたことから、CGRP鼻腔内投与はCGRP受容体を介して記憶に影響を及ぼすと考えられる。脳海馬において、CGRP鼻腔内投与によりPKD、リン酸化HDAC5、Npas4の有意な増加が確認された。以上の結果よりCGRPは経鼻投与によっても脳へ移行し、恐怖記憶の保持を抑制することが示唆された。

## A1-4 クロザピンの作用機序に関する脳領域・神経活動変化の解明

○平戸 祐充<sup>1</sup>、勢力 薫<sup>1,2</sup>、笠井 淳司<sup>1</sup>、橋本 均<sup>1,3,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院薬・神経薬理学分野、<sup>2</sup>大阪大・国際共創、<sup>3</sup>大阪大・院連合小児発達、<sup>4</sup>大阪大・データビリティフロンティア機構、<sup>5</sup>大阪大・先導的学際研究機構、<sup>6</sup>大阪大・院医・分子医薬

【背景・目的】クロザピンは、他の治療薬では十分な効果が得られない治療抵抗性の統合失調症に有効性を示す唯一の薬物であるが、無顆粒球症など重篤な副作用を引き起こす場合がある。クロザピンの薬効機序をより詳細に解明することは、有効性を維持しつつ副作用を低減した新薬の開発につながる可能性がある。しかし、クロザピンが標的とする複数種の受容体はいずれも脳の広範な領域に分布するため、脳全体における神経活動変化や、クロザピンにより活動化する細胞の神経投射など、神経回路レベルの作用機序には不明な点が多い。本研究では、クロザピンにより活性化する細胞が形成する神経回路や、神経活動が亢進する脳領域を明らかにするため、全脳イメージング装置FAST (block-face serial microscopy tomography) を用いたマウス全脳の解析を行った。

【方法】内側前頭前皮質 (mPFC) においてクロザピンにより活性化する細胞の解剖学的な特徴を明らかにするため、*c-fos* 遺伝子下流にCreERT2をノックインしたTRAP2マウスのmPFCに、Cre依存的にGAP43パルミトイル化ドメインを融合した赤色蛍光タンパク質mScarletを発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入し、クロザピンにより活性化するmPFCニューロンから投射する軸索の分布を解析した。また、クロザピンにより神経活動が亢進する脳領域を探索するため、*c-fos* プロモーター制御下でEGFPを発現するFos-EGFPマウスにクロザピンを投与し、EGFP陽性細胞の分布を解析した。

【結果・考察】mPFCは扁桃体基底外側核、視床背内側核、視床内側腹側核などに投射するが、クロザピンにより活性化された細胞の軸索は、扁桃体基底外側核では少なく、主に視床背内側核などの視床垂核で検出された。脳全体の神経活動解析では、クロザピンにより、全ての脳領域においてEGFP陽性細胞数の増加傾向が認められ、その中でも体性感覚皮質で有意な増加が見られた。以上より、内側前頭前皮質―視床背内側核の活動亢進や体性感覚皮質の神経活動亢進が、クロザピンの薬効に関与する可能性が考えられる。今後、これら脳領域の神経活動変化と治療効果の因果関係を、統合失調症モデルマウスなどにおいて検証することで、クロザピンの作用機序に関与する新たなメカニズムの解明につながることを期待される。

## 胎生期バルプロ酸投与マウスは熱刺激およびカプサイシン誘発痛の増大と機械的アロディニアを示す

○今戸 瑛二<sup>1,2</sup>、浅野 智志<sup>1</sup>、中村 庸輝<sup>3</sup>、中島 一恵<sup>3</sup>、森岡 徳光<sup>3</sup>、津賀 一弘<sup>4</sup>、入船 正浩<sup>2</sup>、田熊 一徹<sup>5</sup>、吾郷 由希夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医・細胞分子薬理、<sup>2</sup>広島大・院医・歯科麻酔、<sup>3</sup>広島大・院医・薬効解析、<sup>4</sup>広島大・院医・先端歯科補綴、<sup>5</sup>大阪大・院歯・薬理学

【背景と目的】自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder: ASD) は、社会性やコミュニケーションの障害、常同行動や興味・活動の限局化を中核症状とする神経発達障害の一種であるが、感覚刺激の反応亢進または低反応といった症状から、痛覚感受性の異常がみられる。現在、非定型抗精神病薬リスペリドンやアリピプラゾールがASD患者の易刺激性 (かんしゃく、他害など) や興奮性 (興奮、パニックなど) に対する薬物療法として米国FDAに承認されているが、中核症状に対する治療薬は無く、また痛覚感受性の変化をコントロールする治療法も見いだされていない。痛覚過敏や、特にアロディニア (異痛症) といった通常では疼痛をもたらさない微小刺激がすべて疼痛として非常に痛く認識される状態は、ASD患者のQOLを著しく損なう要因となっているが、ASDの痛覚感受性異常に関する研究はほとんど行われておらず、その神経基盤は未解明である。本研究では、疼痛制御の面からASDの病態分子基盤を解明することを目的に検討を行った。【方法】ASD様モデル動物には、胎生期バルプロ酸投与マウスを用いた。妊娠12.5日目のICR系マウスにバルプロ酸ナトリウム500 mg/kgを腹腔内投与し、得られた出生仔を実験に供した。【結果と考察】バルプロ酸を投与した妊娠マウスから出生したオスの成体 (8週齢) マウスは、ホットプレート試験、カプサイシン誘発痛試験において痛覚過敏を示し、またフォンフライ試験での機械性非侵害刺激に対するアロディニアを示した。一方、これらの行動学的異常は、メスマウスではみられなかった。オスの胎生期バルプロ酸投与マウスでは、4週齢においても痛覚過敏とアロディニアが認められ、幼若期から痛覚感受性の異常を発症していることが明らかになった。また、オスの胎生期バルプロ酸投与マウスの脊髄後角の広範囲において、Iba1陽性細胞の増加が観察された。以上の結果から、胎生期バルプロ酸投与によるASD様モデルマウスでは、発育早期から痛覚感受性に変化が認められること、またそこには性差の存在が示唆された。現在、痛覚関連分子や免疫系細胞・グリア細胞の機能変化に着目しながら、末梢そして中枢レベルでの解析を進めている。

## 抗精神病薬pimozideの構造展開による新規選択的T型カルシウムチャネル阻害薬の創製: 新たな難治性疼痛治療薬の開発に向けて

○木野 貴博<sup>1</sup>、笠波 嘉人<sup>1</sup>、石川 千浩<sup>2</sup>、高島 康宏<sup>1</sup>、長南 百香<sup>3</sup>、岡田 卓哉<sup>2,3</sup>、関口 富美子<sup>1</sup>、吉田 繁<sup>4</sup>、大久保 つや子<sup>5</sup>、豊岡 尚樹<sup>2,3</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>富山大院・理工、<sup>3</sup>富山大・工・生命工学、<sup>4</sup>近畿大・理工・生命科学、<sup>5</sup>福岡看護大・基礎・基礎看護

【目的】Ca<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害薬は、神経障害性疼痛や内臓痛の治療に応用できる可能性が示唆されている。定型的抗精神病薬pimozideは、ドパミンD<sub>2</sub>受容体 (D<sub>2</sub>R) 遮断作用に加えて、強力なT型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を有しており、我々はpimozideがマウスの内臓痛を抑制することを報告している。今回は、pimozideの構造展開研究を実施し、D<sub>2</sub>R遮断作用のない新規T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬の創製を試みた。【方法】Pimozide誘導体 (KTtp-1~50) を合成し、ヒトCa<sub>v</sub>3.2発現HEK293細胞においてwhole-cell patch-clamp法により測定したT型Ca<sup>2+</sup>チャネル依存性電流 (T-currents) に対する阻害活性を評価した。また、ラット線条体粗膜分画の [<sup>3</sup>H]-spiperone結合を過剰濃度のsulpiride存在下と非存在下で測定して調べたD<sub>2</sub>R特異結合に対する阻害活性を評価した。D<sub>2</sub>R結合活性が低くてT-currents阻害活性が高かった化合物について、マウスにおいて硫化水素供与体Na<sub>2</sub>S 10 pmol足底内投与により誘起されるCa<sub>v</sub>3.2依存性機械的アロディニアに対する抑制効果と、中枢D<sub>2</sub>R遮断によるカタレプシー誘発活性 (異常姿勢保持時間) を調べた。【結果】KTtp-5とKTtp-14はpimozideと同等のT-currents阻害活性を保持しており、IC<sub>50</sub>値 (μM) はpimozideの0.157に対して、それぞれ0.461および0.153であった。また、pimozideは10 μMで [<sup>3</sup>H]-spiperoneのD<sub>2</sub>R特異的結合をほぼ完全に阻害したのに対して、同濃度のKTtp-5の阻害活性は約50%で、KTtp-14は全く阻害活性を示さなかった。マウスにおいて、pimozide 0.8 nmolを側脳室内投与するとカタレプシーが認められたが、KTtp-5と14はカタレプシーを全く誘起しなかった。マウスにおけるNa<sub>2</sub>S誘起アロディニアは、KTtp-5あるいはKTtp-14を1-10 mg/kgの範囲で腹腔内投与することで用量依存性に抑制された。【結論】T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を保持しD<sub>2</sub>R結合活性を減弱させた新規pimozide誘導体KTtp-5およびKTtp-14は、難治性疼痛治療薬として有望である。

## H<sub>2</sub>S供与体Na<sub>2</sub>Sのマウス頬皮内投与により誘起されるCa<sub>v</sub>3.2依存性搔痒および疼痛に対する定型抗精神病薬pimozideとD<sub>2</sub>受容体遮断活性を減弱させた新規pimozide誘導体KTtp-5の作用

○倉橋 翔太郎<sup>1</sup>、西山 伊代<sup>1</sup>、南野 莉那<sup>1</sup>、木野 貴博<sup>1</sup>、高島 康宏<sup>1</sup>、笠波 嘉人<sup>1</sup>、木野 志織<sup>1</sup>、西川 裕之<sup>1,2</sup>、石川 千浩<sup>3</sup>、岡田 卓哉<sup>3,4</sup>、関口 富美子<sup>1</sup>、坪田 真帆<sup>1</sup>、豊岡 尚樹<sup>3,4</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>扶桑薬品工業株式会社、<sup>3</sup>富山大院・理工、<sup>4</sup>富山大・工・生命工学

一次知覚神経に豊富に発現するCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルは、疼痛および搔痒の発現に関与することが報告されている。我々は、気体メディエーターのH<sub>2</sub>Sが、Ca<sub>v</sub>3.2のチャネル活性を亢進させることで難治性疼痛の発症に関与することを明らかにしている。一方、定型抗精神病薬pimozideは、ドパミンD<sub>2</sub>受容体遮断作用に加えて、強力なT型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を有することが知られており、我々はpimozideがCa<sub>v</sub>3.2依存性の内臓痛を抑制することを最近報告している。さらに、pimozideの構造展開研究により、T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を保持しD<sub>2</sub>受容体遮断活性を減弱させた新規pimozide誘導体KTtp-5を開発した。本研究では、H<sub>2</sub>S供与体Na<sub>2</sub>Sをマウス頬皮内へ投与した場合に誘起される痛みおよび痒み反応の特徴を解析し、このモデルを用いて、定型抗精神病薬のうちT型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を有するpimozideと同活性のないhaloperidol、さらにKTtp-5の作用を評価した。C57BL/6J野生型マウスにおいてNa<sub>2</sub>Sの頬皮内投与後60分間に痒み（投与側頬を後肢で引っ掻く行動）および痛み（投与側頬を前肢で拭う行動）反応が認められたが、これらの反応はCa<sub>v</sub>3.2ノックアウトマウスでは見られなかった。ICRマウスの頬皮内にNa<sub>2</sub>Sを投与した場合にもT型Ca<sup>2+</sup>チャネル依存性の痒みおよび痛み反応が認められた。そこで、pimozide、haloperidolあるいはKTtp-5を30分前に腹腔内投与し、Na<sub>2</sub>S誘起搔痒および疼痛反応に対する作用を調べた。その結果、pimozideとhaloperidolはいずれも0.3 mg/kg以上で痒みと痛みを強く抑制したが、同用量でカタレプシー（異常姿勢保持）反応を誘起した。一方、KTtp-5を10 mg/kgの用量でICRマウスの腹腔内へ投与したところ、カタレプシーは全く誘起されず、Na<sub>2</sub>S頬皮内投与により誘起される痒みおよび痛み行動は強く抑制された。以上より、T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害活性を保持しD<sub>2</sub>受容体遮断活性を減弱させた新規pimozide誘導体KTtp-5は、錐体外路症状を誘起することなくCa<sub>v</sub>3.2依存性の搔痒および疼痛を抑制することが明らかとなり、新たな鎮痒・鎮痛薬となり得る可能性が示唆された。

## セロトニン5-HT<sub>2A</sub>受容体刺激薬の抗うつ作用における外側中隔核の役割

○高羽 里佳<sup>1</sup>、衣斐 大祐<sup>1,2</sup>、中齋 玄紀<sup>1</sup>、渡邊 香輝<sup>2</sup>、阿知波 瑞紀<sup>2</sup>、前田 恭佑<sup>2</sup>、水谷 健人<sup>2</sup>、早川 昂汰<sup>2</sup>、吉田 圭介<sup>3</sup>、間宮 隆吉<sup>1,2</sup>、北垣 伸治<sup>3</sup>、平松 正行<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>名城大・薬・薬品作用、<sup>2</sup>名城大・薬・薬品作用、<sup>3</sup>名城大・薬・薬化学

### 目的

最近の臨床研究から、幻覚薬のシロシピンが、治療抵抗性うつ病患者に対して、即効かつ持続的な抗うつ作用を示すことが明らかとなった。さらに、シロシピンなどの幻覚薬は、大脳皮質の視覚野第V層のセロトニン5-HT<sub>2A</sub>受容体（5-HT<sub>2A</sub>）を刺激し、幻覚作用を誘発することがわかっている。しかしながら、抗うつ作用におけるシロシピンの5-HT<sub>2A</sub>刺激作用の役割、およびそれに関わる神経基盤については不明である。そこで、本研究では、5-HT<sub>2A</sub>刺激薬による抗うつ作用の発現と、それに関わる神経ネットワークについて検討した。

### 方法

6～8週齢の雄性C57BL/6Jマウスに、5-HT<sub>2A</sub>刺激薬であるDOI（0.1 mg/kg）を腹腔内投与した24時間後に、うつ様行動を調べる目的で強制水泳試験（FST）を行った。FSTにおいて、マウスは、水を張ったビーカー内に泳がせた際、逃げられないと感じ、次第に無動となる。その持続時間をうつ様行動の指標とした。また、5-HT<sub>2A</sub>刺激薬の抗うつ作用に関わる脳領域を調べるため、神経細胞活動性の指標であるc-Fos染色を実施し、5-HT<sub>2A</sub> mRNA (*Htr2a*) の局在を調べるために*In Situ* Hybridizationを行った。また、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて*Htr2a*-shRNAを脳内に発現させ、*Htr2a*のノックダウンを行った。関連脳領域からの神経投射先を探索するために、逆行性神経トレーサーであるコレラ毒素（CTB）を脳内に微量投与した。

### 結果

マウスへのDOI処置は、コントロール群と比較し、FSTにおける無動時間を有意に短縮し、抗うつ様行動を誘発した。さらに、ストレス関連脳領域である外側中隔核（LS）のc-Fos陽性細胞数を有意に増加させた。さらに、5-HT<sub>2A</sub>刺激によって増加するLSでのc-Fos陽性細胞の約80%が、5-HT<sub>2A</sub>を発現するGABA作動性神経であることがわかったため、*Htr2a*-shRNAによりLSの5-HT<sub>2A</sub>をノックダウンしたところ、DOI投与によるFSTでの無動時間の短縮、およびLSにおけるc-Fos陽性細胞数の増加が抑制された。さらに、視床下部前野（AHA）にCTBを微量投与したところ、LSのc-Fos陽性細胞においてCTBのシグナルが認められた。

### 考察

本研究より、5-HT<sub>2A</sub>刺激薬処置は、LSからAHAに投射する5-HT<sub>2A</sub>発現GABA作動性神経を刺激し、GABA神経を活性化させることで抗うつ作用を発揮することが示唆された。以上から、LS-AHA神経回路におけるGABA作動性神経の活性化が新たな抗うつ薬の治療標的として有用である可能性がある。

## 幼若期社会的敗北ストレス単回負荷マウスの社会性行動障害におけるGluN2A-ERK1/2シグナル経路の関与

○吉田 樹生<sup>1</sup>、鈴木 千晴<sup>2</sup>、長谷川 章<sup>2</sup>、谷口 将之<sup>2</sup>、毛利 彰宏<sup>3</sup>、吉見 陽<sup>2,4</sup>、尾崎 紀夫<sup>4</sup>、野田 幸裕<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名城大・院薬・病態解析学 I、<sup>2</sup>名城大・薬・病態解析学 I、<sup>3</sup>藤田医科大・院保健・レギュラトリーサイエンス分野、<sup>4</sup>名古屋大・院医・精神医学

**【背景】** 幼児虐待などのトラウマ体験は、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などのストレス関連精神疾患の発症リスクとなる。また、幼児における精神疾患の有病率は15%にもものぼることが報告されている。しかし、幼少期におけるストレスの暴露が発達期の脳に及ぼす影響については詳細に検討されていない。グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体とそれを介する情報伝達系が、PTSDなどのストレス関連精神疾患の病態に関与していることが示唆されている。本研究では、幼若期に社会的敗北ストレスを単回負荷したマウスにおける社会性行動障害の発現にNMDA受容体やそれを介する情報伝達系が関与しているかどうかを行動薬理学的および神経化学的に検討した。

**【方法】** 3週齢 (幼若期) の雄性C57BL/6J系マウスに10分間の社会的敗北ストレスを負荷し、翌日に社会性行動試験を行った。非競合的NMDA受容体拮抗薬であるメマンチンは、社会性行動試験の開始30分前に投与した。社会性行動試験前後のNMDA受容体サブユニット (GluN2A、GluN2B、GluN1) およびNMDA受容体情報伝達系に関与する分子 (ERK1/2、CaMK II、Akt) のタンパク質の発現は、ウェスタンブロッティングにより解析した。

**【結果】** 幼若期に社会的敗北ストレスを単回負荷したマウスの社会性行動障害は、メマンチンの急性投与によって緩解された。ストレス負荷マウスの前頭前皮質におけるNMDA受容体サブユニットであるGluN2AおよびNMDA受容体情報伝達系に関与する分子であるERK1/2のリン酸化は、非ストレス負荷マウスのそれらと比較して社会性行動試験後に増加していた。メマンチンは、社会性行動試験後のストレス負荷マウスにおいて認められるGluN2Aのリン酸化の増加を抑制し、行動試験前のERK1/2のリン酸化を増加させることで、行動試験後に認められるERK1/2リン酸化の増加を抑制した。

**【結論】** 幼若期社会的敗北ストレスを単回負荷したマウスにおける社会性行動障害の発現にGluN2A-ERK1/2シグナル経路の活性化が関与し、メマンチンはこの経路の活性を調節することで社会性行動障害を緩解させた。GluN2A-ERK1/2シグナル経路の活性の制御が、発達期におけるストレス関連精神疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

## Activities of orexin neurons in motivative behavior

○董 彧弼<sup>1</sup>、溝口 博之<sup>1,2</sup>、山中 章宏<sup>3</sup>、山田 清文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院医・医療薬学講座、<sup>2</sup>名古屋大・環医研、<sup>3</sup>名古屋大・環医研・神経系II

Orexin neurons in the hypothalamus regulate physiological functions, including energy homeostasis and wakefulness, and are also related to motivation. Here, we examined the roles of orexin neurons in motivated behaviors. We measured the activities of orexin neurons related to motivated behavior under the fixed ratio (FR) schedule of a touchscreen-based automated operant task using fiber photometry. For this purpose, AAV-FLEX-hM3Dq-mCherry or AAV-FLEX-GCaMP7s was injected into the hypothalamus of Orexin-Cre rats. We found that orexinergic activation induced an increase of breaking point in a progressive ratio test. Under FR5 conditions in which rats were able to obtain a food pellet by touching the screen consecutively five times, the activity in orexin neurons was increased after the fifth screen touch (after which food would be delivered) but not after the fourth touch. The activity peaked before rats obtained reward, and then decreased after food intake. These observations suggest that the orexin activities changed in motivative behaviors, and that orexin neurons may be involved in craving and reward prediction.





B 会場



## 胎生期異常免疫応答による行動および神経組織学的変化の世代間継承に関する研究

○中齋 玄紀<sup>1</sup>、衣斐 大祐<sup>1,2</sup>、宮城 凜<sup>2</sup>、黒岩 愛<sup>2</sup>、高羽 里佳<sup>1</sup>、間宮 隆吉<sup>1,2</sup>、平松 正行<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名城大・院薬・薬品作用、<sup>2</sup>名城大・薬・薬品作用

### 目的

胎生期の重篤な感染症が子の精神疾患発症リスクを高める。妊娠マウスにウイルス感染様免疫応答を引き起こすpoly I:Cを処置すると、生まれる仔マウスにおいて行動障害が認められる。このような行動障害は仔から孫へと継承されることが報告されている。また、統合失調症患者の死後脳において、GABA作動性神経の数が減少することが分かっている。そこで、本研究では胎生期にpoly I:Cを曝露された仔マウスの行動学的解析およびGABA作動性神経関連分子の評価を行った。さらに仔マウスの表現型が孫マウスへと継承されるかどうかについても検討した。

### 方法

C57BL/6N妊娠マウスにpoly I:C (20 mg/kg) を妊娠12日目から5日間連続で腹腔内投与し、得られた仔マウスをF1、雄性F1マウスと無処置雌性マウスの交配により得られた孫マウスをF2マウスとした。マウスが8週齢となった時点から、新奇物体認知試験 (NORT) を行った。NORT終了後、海馬におけるGABA作動性神経関連分子について免疫組織化学的に調べた。その中でも今回は、神経発火のタイミングを制御しているparvalbumin (PV)、興奮性シナプスの入力を調節しているsomatostatin (SOM) および神経発達や認知機能に関与するReelinの発現を調べた。

### 結果

NORTにおいて、胎生期にpoly I:Cを曝露されたF1マウスおよび雄性F1マウス由来のF2マウスは、コントロール群と比較して、物体認知記憶を低下させた。免疫組織化学染色の結果から、胎生期にpoly I:Cを曝露されたF1およびF2マウスにおいて、海馬CA1領域におけるPV陽性細胞数が減少、海馬DG領域におけるSOMおよびReelin陽性細胞数が減少した。ReelinはSOM陽性細胞から分泌されることが分かっている。そこで、SOMとReelinとの共局在についても調べたところ、胎生期にpoly I:Cを曝露されたF1およびF2マウスは海馬DG領域において、SOMとReelinが共局在する細胞数を減少させた。

### 考察

本結果から、胎生期poly I:C処置は、海馬におけるGABA作動性神経系を障害し、物体認知機能障害を引き起こすことが示唆された。さらに、これらの変化は、父親を介して次世代へと継承されることが示唆された。

## アミロイドβ注入による認知機能低下におけるトリプトファン代謝を介した興奮-抑制バランスの関与

○倉橋 仁美<sup>1</sup>、毛利 彰宏<sup>1,4</sup>、國澤 和生<sup>1</sup>、窪田 悠力<sup>1</sup>、長谷川 眞也<sup>1</sup>、山本 康子<sup>3</sup>、齋藤 邦明<sup>3,4</sup>、鍋島 俊隆<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大学・院保健・レギュラトリーサイエンス分野、<sup>2</sup>藤田医科大学・院保健・先進診断システム探索部門、<sup>3</sup>藤田医科大学・院保健・病態制御解析学、<sup>4</sup>NPO法人医薬品適正使用推進機構

【目的】アルツハイマー病の発症機序として、アミロイドβ (Aβ) 蓄積による神経炎症があり、その背景には興奮-抑制バランス (EIバランス) の破綻が示唆されている。トリプトファン代謝経路は炎症により活性化され、NMDA受容体アゴニストであるキノリン酸 (QA)、同受容体アンタゴニストであるキヌレン酸 (KA) が産生される。本発表では、Aβによる認知機能低下におけるトリプトファン代謝を介したEIバランスの関与について報告する。

【方法】Aβ注入によるアルツハイマー病モデル動物は、Aβ<sub>25-35</sub>を超純水に溶解し、インキュベーション後、3nmol/3μLの容量で側脳室内投与 (intracerebroventricular; *i. c. v.*) して作成した。Aβ注入30分前にメマンチンは腹腔内投与し、キヌレニン3-モノオキシゲナーゼ (KMO) 阻害薬 (R061-8048) は*i. c. v.*投与した。認知機能は新奇物体認知試験で評価した。Aβ注入2および6時間後にマウスの各脳部位を摘出し、リアルタイムPCRにより一連のトリプトファン代謝酵素のmRNA量を測定した。

【結果】Aβ注入により、新奇物体に対する探索時間の低下が認められた。Aβ注入2時間後には、海馬におけるトリプトファン代謝酵素キヌレニナーゼおよびキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QPRT) の増加が認められた。また、メマンチンおよびKMO阻害薬投与によりAβによる認知機能低下の抑制効果が認められた。

【考察】Aβにより、キヌレニナーゼおよびQPRTの発現が増加したため、QAへのトリプトファン代謝経路の活性化が認知機能の低下に関与していることが示唆された。KMO阻害薬はトリプトファン代謝基軸をQAからKAへ変化し、EIバランスを補正し、Aβによる認知機能の低下を抑制することが示唆された。また、メマンチンは、興奮性を抑制し、EIバランスを補正し、Aβによる認知機能の低下を抑制することが示唆された。

**B1-3**

## プロトカドヘリン15(PCDH15)遺伝子欠失がマウスの行動および脳内アミノ酸神経に与える影響

○高橋 礼貴<sup>1</sup>、伊藤 貴博<sup>1</sup>、吉田 樹生<sup>1</sup>、吉見 陽<sup>1</sup>、森 大輔<sup>2</sup>、尾崎 紀夫<sup>2</sup>、野田 幸裕<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名城大・薬・病態解析学 I、<sup>2</sup>名古屋大・院医・精神医学

【背景】複数の双極性障害患者において、細胞間接着を媒介するカドヘリンスーパーファミリーのひとつであるプロトカドヘリン15 (PCDH15) 遺伝子の欠失が見出されている。双極性障害などの精神疾患では、アミノ酸神経系のバランス異常が認められるが、精神行動の発現との関連については詳細に検討されていない。本研究ではPCDH15欠失がマウスの精神行動および神経伝達系に与える影響について、行動学的および神経化学的に検討した。

【方法】8~10週齢のPCDH15欠失マウスにおける自発運動活性、断崖回避試験での断崖回避反応、および受動的回避試験での反応潜時を調べた。PCDH15欠失マウスの脳内グルタミン酸、グルタミンとγ-アミノ酪酸 (GABA) の含有量は、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。また、アミノ酸の生合成酵素のグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) と GABAトランスポーター (GAT) の脳内タンパク質発現量は、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

【結果および考察】PCDH15欠失マウスでは、野生型マウスと比較して、自発運動活性の増加、断崖回避反応の低下や受動的回避反応の亢進が認められ、衝動性や恐怖記憶が増強していた。これらの表現型は双極性障害の症状に類似していた。また、PCDH15欠失マウスの側坐核では、GABA含量やGADタンパク質発現が野生型マウスのそれらより増加しており、GABA神経が亢進していた。以上の結果から、PCDH15遺伝子の欠失は、GADタンパク質の発現を変化させ、GABA神経機能に異常をきたすことで、その異常が双極性障害の発症に関与していることが示唆された。

**B1-4**

## 神経障害性疼痛モデルマウスにおける脳内ミトコンドリア由来DAMPs発現変化とミトコンドリア機能障害に関する検討

○吉本 夏輝、中島 一恵、中村 庸輝、森岡 徳光

広島大院医系科学・薬効解析

目的：我々は神経障害性疼痛 (NP) モデルマウスにおける認知機能低下および不安・うつ様行動に、damage-associated molecular patterns (DAMPs) の一種であるhigh mobility group box-1により惹起される中枢神経系の炎症反応が関与することを明らかにした。一方で、脳内におけるミトコンドリア機能障害は中枢神経系の炎症を惹起し、様々な神経疾患への関与が示唆されているが、NPとの関連性は不明である。そこで、本研究ではNPモデルマウス脳においてミトコンドリア由来のDAMPsであるcytochrome c (CytC) 及びmitochondrial transcription factor A (TFAM) の発現変化について検討を行った。また、細胞質のmitochondrial DNA (mtDNA) を定量することで、ミトコンドリア機能障害の有無についても検討した。

方法：ddY系雄性マウス (5週齢) の坐骨神経を部分結紮することによりNPモデルマウス (partial sciatic nerve ligation: PSNL群) を作製した。対照群として坐骨神経を露出したのみのマウス (sham群) を用いた。海馬と前頭皮質におけるCytCとTFAMの発現はWestern blottingを用いて解析した。また、海馬組織を細胞分画した後、細胞質画分に含まれるmtDNAをreal time PCRを用いて解析した。

結果：PSNL術後8週の反対側海馬においてCytCとTFAMの発現量の低下が認められたが、同側海馬と前頭皮質では発現量に変化は認められなかった。またPSNL術後2週の後海馬および前頭皮質においてCytCとTFAMの発現量に変化は認められなかった。細胞質画分でのmtDNAの発現量は、PSNL術後8週の両側海馬で増加が認められたが、PSNL術後2週では変化は認められなかった。

考察：PSNL術後8週の後海馬において、CytCとTFAMは細胞外に、mtDNAは細胞質へとそれぞれ放出されたことからミトコンドリア機能に障害が生じている可能性が示唆された。したがって、海馬でのミトコンドリア機能障害による炎症反応が、NPモデルマウスで観察される不安・うつ様行動に関与している可能性が示唆された。

## エストロゲンはマクロファージにおけるパクリタキセル誘起HMGB1遊離とマウスにおけるHMGB1誘起アロディニアを抑制する:エストロゲン低下によるパクリタキセル誘発性末梢神経障害重症化との関係について

○貫戸 綾乃<sup>1</sup>、坪田 真帆<sup>1</sup>、平本 志於里<sup>1</sup>、松永 浩明<sup>1</sup>、宮本 朋佳<sup>1,2</sup>、小泉 祐一<sup>2</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>(医)生長会 府中病院・薬剤部、<sup>3</sup>岡山大・院医歯薬・薬理

我々は、抗がん剤paclitaxel (PCT) 投与により誘起される末梢神経障害 (PIP) の発症に、PCTによってMφから分泌される核内蛋白HMGB1が関与することを明らかにしている。また、臨床および基礎研究によって、閉経後エストロゲンが低下している女性ではPIPが重症化することを証明している。本研究では、PIPとエストロゲンの関係を解明するため、マウスおよびMφ様RAW264.7細胞を用いてHMGB1の上流および下流シグナルに及ぼすエストロゲンの効果を解析した。雌性および雄性ddY系マウスへのPCT 4 mg/kgの反復投与により生じるPIPは17β-estradiol (E2) 反復投与により部分的に抑制された。一方、正常雌マウスでは無効量であるPCT 1 mg/kgを卵巣摘出 (OVX) マウスに反復投与するとPIPが発症し、さらにOVXマウスで無効量のPCT 0.2 mg/kgをアロマトーゼ阻害薬letrozoleと併用投与した場合にもPIPが発症した。次にOVXマウスでPCT 1 mg/kg投与により誘起されるPIPは、抗HMGB1中和抗体またはE2の反復投与、あるいはMφ枯渇薬liposomal clodronateにより消失した。Mφ様RAW264.7細胞において、E2はPCT誘起HMGB1遊離を抑制し、エストロゲン受容体ERα阻害薬はE2のこの抑制効果を消失させた。さらに、マウスにおいて、HMGB1、TLR4刺激薬lipopolysaccharideあるいはCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネル活性を上昇させる硫化水素 (H<sub>2</sub>S) 供与体Na<sub>2</sub>Sの足底内投与によるアロディニア誘発効果は、いずれもOVXマウスにおいて著しく増大していた。このOVXマウスにおけるHMGB1足底内投与に対する感受性増大は、E2の反復投与により消失した。以上より、エストロゲンはPCTによるMφからのHMGB1遊離を抑制するとともに、HMGB1を含む痛みのメディエーターに対する感受性を低下させることでPIPの発症・増悪を抑制している可能性が示唆された。本研究結果は、女性がん患者において閉経に伴うエストロゲン低下によりPIPが重症化する理由を解明する手掛かりになりうるものと考えられる。

## 一細胞解析による内側前頭前皮質のミクログリアのサブタイプとストレス応答性の多様性

○三島 零、谷口 将之、松下 和敏、古屋敷 智之  
神戸大・院医

社会や環境から受けるストレスは抑うつや不安亢進、認知機能低下を誘導し、うつ病などの精神疾患のリスク因子となる。うつ病患者の血液検体や脳画像イメージングを用いた臨床研究により、うつ病と炎症の関連が示唆されてきたが、その役割は不明であった。我々はマウスうつ病モデルとされる慢性社会挫折ストレスを用いて、慢性ストレスが内側前頭前皮質のミクログリアを活性化し、炎症性サイトカインを放出してうつ様行動を誘導することを示してきた。ミクログリアにはサブタイプがあることが知られるが、ミクログリアのサブタイプによるストレス応答性の違いを調べた研究はない。そこで我々は一細胞RNA-seq解析を用いてミクログリアのサブタイプを可視化し、各サブタイプが慢性社会挫折ストレスによりどのように変化するかを解析した。CX3CR1-EGFPマウスの内側前頭前皮質からミクログリアを含むEGFP発現細胞をFACSで単離し、Chromiumによる一細胞RNA-seq解析に供した。その結果、ストレスを与えていない対照群のマウスでは、遺伝子発現のパターンから、食能の亢進が推測される食食関連ミクログリア、恒常性の維持への関与が推測される恒常性関連ミクログリア、免疫応答への関与が推測される免疫応答関連ミクログリアに大別され、それぞれに遺伝子発現の異なる複数のサブタイプが観察された。慢性社会挫折ストレスにより、食食関連ミクログリアに含まれる一部のサブタイプは増加し、恒常性関連ミクログリアに含まれる一部のサブタイプは減少した。慢性社会挫折ストレスによるうつ様行動の度合いを指標として、ストレス感受性群とストレス抵抗性群に分けて解析したところ、ストレス感受性に応じて挙動の異なるサブタイプも認められた。これらの結果は、内側前頭前皮質ミクログリアには機能的に異なる複数のサブタイプが存在し、サブタイプごとに慢性社会ストレスに対する応答性が異なることを示唆している。

## B2-2 セロトニン5-HT<sub>2A</sub>受容体刺激薬の抗うつ作用に関わる分子メカニズムの検討

○阿知波 瑞紀<sup>1</sup>、衣斐 大祐<sup>1</sup>、高羽 里佳<sup>2</sup>、前田 恭佑<sup>1</sup>、水谷 健人<sup>1</sup>、間宮 隆吉<sup>1</sup>、平松 正行<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>名城大・薬・薬品作用学研究室、<sup>2</sup>名城大学院・薬・薬品作用学研究室

### 目的

うつ病の生涯有病率は約1割であり、そのうちの3割は既存抗うつ薬による治療で奏功しない治療抵抗性うつ病とされている。最近の臨床研究より、セロトニン5-HT<sub>2A</sub>受容体 (5-HT<sub>2A</sub>R) 刺激薬のシロシビンが、治療抵抗性うつ病患者に対し、即効かつ持続的な抗うつ効果を示すことが明らかとなったが、そのメカニズムは不明である。そこで、本研究では5-HT<sub>2A</sub>R刺激薬投与による抗うつ作用の検証と、それに伴う脳機能関連分子の発現変化について調べた。

### 方法

実験には6~8週齢のC57BL/6J雄性マウスを用いた。選択的5-HT<sub>2A</sub>R刺激薬としてDOI (0.1 mg/kg) を、選択的5-HT<sub>2A</sub>R遮断薬としてvolinanserin (1 mg/kg) を、それぞれ用いた。DOIの抗うつ様作用の評価のために、DOI投与24時間後に強制水泳試験 (FST) を行った。FSTは、マウスを水の中に入れた際に無動となった時間をうつ様行動の指標とした。DOI誘発性の幻覚様行動の評価のために、DOI投与直後30分間の首振り運動 (幻覚様行動) を観察した。また、DOIによる抗うつ様作用に関わる脳部位を、神経細胞活性の指標であるc-Fos染色により探索した。DOI投与24時間後の脳内における神経栄養因子関連遺伝子の発現変化を、定量PCR法により検討した。

### 結果

DOI処置はマウスの幻覚様行動に変化を与えなかった。一方、FSTによるマウスの無動時間を短縮した。さらにc-Fos染色の結果から、DOI処置はストレス関連脳領域の外側中隔核 (LS) において、c-Fos陽性細胞数を有意に増加させた。これらDOIによる変化は、いずれもvolinanserinの前処置により拮抗された。また、DOI処置マウスのLSにおける遺伝子発現を調べたところ、コントロール群と比較し、神経栄養因子neurotrophin-3 (NT-3) の有意な減少が認められた。一方で脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、変化が認められなかった。

### 考察

皮質下領域において、ストレスやうつ病により神経栄養因子の発現およびシナプス数が増加することが報告されており、本研究により、DOI投与によって発現低下するLSのNT-3が、抗うつ様作用の発現に関与する可能性が予想された。

## B2-3 社会的敗北ストレス負荷によるうつ様行動はユビキチン化酵素Nedd4L発現低下によるグルタミン酸神経機能低下を介している

○小菅 愛加<sup>1</sup>、國澤 和生<sup>1</sup>、飯田 翼<sup>1</sup>、齋藤 邦明<sup>2,3,4</sup>、鍋島 俊隆<sup>2,4</sup>、毛利 彰宏<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大・院保健・レギュラトリーサイエンス、<sup>2</sup>藤田医科大・院保健・先進診断システム、<sup>3</sup>藤田医科大・院保健・病態制御解析学、<sup>4</sup>医薬品適正使用推進機構

**目的:** うつ病は現代における重大な社会問題の一つであり、その克服は喫緊の課題である。しかし、うつ病の発症機序および病態は未だ不明である。近年我々は、MAGE-D1遺伝子欠損マウスのうつ様行動は、ユビキチン化によるセロトニントランスポーターの代謝低下によることを明らかにした。脳内ユビキチン化異常がうつ病発症の要因の一つとなる可能性が示唆されたことから、社会的敗北ストレス (CSDS) 負荷によるうつ病モデルマウスの脳内ユビキチン化酵素に着目し解析を行い、うつ様行動との関連について検討した。

**方法:** 7週齢C57BL/6Jマウスに対し、攻撃性を示すICRマウスを10日間暴露させ、CSDS群を作製した。ストレス負荷1日後、社会性行動試験により社会性を評価した。脳内グルタミン酸組織含有量及びマイクロダイアリスにより、グルタミン酸遊離量を測定した。また、グルタミン酸トランスポーター (GLT-1) のユビキチン化および、そのユビキチン化酵素であるNedd4Lの発現変化を評価した。加えてアデノ随伴ウィルスを用いてNedd4L遺伝子ノックダウンおよび過剰発現によるCSDS群の行動評価を行った。

**結果:** 対照群と比較して、CSDS群ではストレス負荷1日後に、社会性の有意な低下が認められ、更に前頭前皮質においてグルタミン酸神経伝達不全が示唆された。また、CSDS群においてユビキチン化GLT-1並びにNedd4Lの有意な低下が認められた。さらに、前頭前皮質特異的なNedd4Lノックダウンにより、CSDS負荷時における社会性低下の増悪が認められた。前頭前皮質特異的なNedd4L過剰発現によるCSDS群の行動評価は、現在検討中である。

**考察:** CSDS負荷はユビキチン化酵素Nedd4Lの発現を低下し、その結果GLT-1のユビキチン化低下を惹起し、グルタミン酸神経系制御の破綻を来してうつ様行動を惹起する可能性が示唆された。更に、前頭前皮質特異的なNedd4LノックダウンによりCSDS負荷による社会性低下が増悪されたことから、Nedd4Lはストレス適応に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

## B2-4 Behavioral analysis of a mouse model carrying a mutation on *Twinfilin 1* gene

○Dong Geyao<sup>1</sup>、Liu Yue<sup>1</sup>、池山 竜一<sup>1</sup>、澤幡 雅仁<sup>1</sup>、Liao Jingzhu<sup>1</sup>、森 大輔<sup>2</sup>、伊藤 教道<sup>1</sup>、溝口 博之<sup>1</sup>、永井 拓<sup>3</sup>、鍋島 俊隆<sup>3</sup>、尾崎 紀夫<sup>2</sup>、山田 清文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院医・医療薬学・病院薬剤部、<sup>2</sup>名古屋大・院医・精神科、<sup>3</sup>藤田医科大

Reelin plays an important role in normal formation of the cortical layer during brain development and synaptic plasticity in adult brain. In reelin signaling, tyrosine phosphorylation functions importantly in many processes including phosphorylation of intracellular adaptor protein Disabled-1 by Src family kinase leading to enhancement of long-term potentiation, a proposed cellular correlate to memory and learning.

Twinfilin1 (TWF1), an actin-monomer-binding protein, is composed of two actin depolymerizing factor (ADF)-homology domains. It plays an important role in the regulation of actin dynamics by inhibiting nucleotide exchange on actin monomers and preventing assembly of the monomer into filaments. Our previous studies have found that tyrosine phosphorylation level of TWF1 was decreased in *reelin* mutant mice. Besides, we found that TWF1 was phosphorylated by Src mainly at the position of tyrosine 309. Therefore, we have hypothesized that tyrosine phosphorylation of TWF1 may be involved in reelin signaling to process synaptic plasticity. To test this working hypothesis, we have generated a mouse line in the C57BL/6J strain with *TWF1* gene mutation (TWF1-Y309F), in which phosphorylation on the tyrosine 309 site was inhibited.

In the present study, we analyzed the behavioral phenotypes of TWF1-Y309F mice by using touchscreen-based visual discrimination (VD) task and other general behavioral tests. As results, we found some cognitive deficits in TWF1-Y309F mice both in the fear conditioning test and VD task. These results suggest that tyrosine phosphorylation of TWF1 is involved in processing cognition, learning and memory.

## B2-5 低毒化G欠損狂犬病ウイルスベクターの開発 Generation of a novel G-deleted rabies viral vector with lower toxicity.

○山口 真広<sup>1</sup>、恩田 将成<sup>1</sup>、正木 佑治<sup>1</sup>、竹内 遼介<sup>1</sup>、森本 菜央<sup>1</sup>、小坂田 文隆<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院創薬・細胞薬効解析、<sup>2</sup>JST・CREST

【背景・目的】 多彩な脳機能は、神経回路での情報処理により産まれる。神経回路の破綻は、パーキンソン病や認知症などの神経疾患では運動障害、記憶障害、行動障害などの症状を、統合失調症やうつ病などの精神疾患では意識、自我、社会性などの高次機能の障害を引き起こす。したがって、脳機能の解明、神経・精神疾患における病態や病因の解明、予防・治療法の開発には神経回路レベルの解析が必須である。我々は神経回路の構造と機能を解析するために、これまでに経シナプス感染を特徴に持つG欠損狂犬病ウイルスベクター (RVΔG) を開発してきた。しかし、RVΔGは細胞毒性を示し、感染細胞の機能を阻害するため、長期間を要する生理学実験や行動実験には適用が困難であった。そこで本研究ではこの問題点を解決する目的で、新規の低毒性RVΔGの開発を行った。

【方法・結果】 RVΔGゲノム中の各ウイルス構成遺伝子配列および転写を制御するシグナル配列を最適化し、新たなRVΔGゲノムを遺伝子工学的手法により構築した。この新規RVΔGをプラスミドDNAからマイナス鎖一本鎖RNAウイルスとして再構成する系を確立した。作製した新規RVΔGの細胞毒性を *in vivo*において2光子励起顕微鏡を用いて感染細胞を経時的に評価した。その結果、新規RVΔGに感染した細胞は、従来のRVΔGよりも長期間生存していることが観察された。さらに、新規RVΔGに感染したマウス1次視覚野 (V1) の神経細胞は、視覚野に特徴的な機能である方位選択性応答を示した。次に、新規RVΔGの経シナプス感染能を評価した。大脳皮質第5層神経細胞に特異的にCreを発現するTlx3-Creマウスを用いたところ、新規RVΔGはV1の第5層神経細胞に対する入力細胞を標識することができた。

【考察】 新規RVΔGは、既存のRVΔGと比較して、感染細胞の生存率を有意に改善し、経シナプス感染能を有することが明らかになった。本研究より、新規RVΔGは生理学・薬理学実験や行動実験において神経回路レベルでの解析を可能にすると期待される。

## 薬物乱用防止製剤の開発に関するガイドライン作成のための行動薬理的評価法の検討

○張 心健<sup>1</sup>、毛利 彰宏<sup>2</sup>、鍋島 俊隆<sup>3</sup>、沖川 沙佑美<sup>1</sup>、山田 清文<sup>4</sup>、永井 拓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大学・精神神経病態解明セ・神経行動薬理、<sup>2</sup>藤田医科大学・医療科学・レギュラトリーサイエンス、<sup>3</sup>藤田医科大学・医療科学・先進診断システム探索、<sup>4</sup>名古屋大・院医・医療薬学・附属病院薬剤部

目的：米国では鎮痛剤として処方されるオピオイド系薬物の乱用による依存症が蔓延している。オピオイド・クライシスと呼ばれるこの深刻な問題に対してFDAは乱用防止製剤に関する製薬企業向けガイダンスを発表し、様々な乱用防止製剤を認可している。日本でも、鎮痛薬の習慣的使用が問題となっていることから乱用防止製剤が開発されているが、これらの乱用防止製剤は各製薬企業による独自の基準により乱用防止機能を主張するものであり、国内ガイドラインは作成されておらず、科学的根拠も不足している。乱用防止製剤のガイドラインを作成するために、本研究ではオピオイド受容体拮抗薬を配合した乱用防止製剤に対する薬理的な評価方法を検討した。

方法：実験には8週齢の雄性C57BL/6マウスを使用した。対象薬物は臨床で広く使用されている麻薬性鎮痛薬のモルヒネ、オキシコドンおよびフェンタニルとした。オピオイド受容体拮抗薬を配合した乱用防止製剤のモデル薬物として麻薬性鎮痛薬とオピオイド受容体拮抗薬ナロキソンの混合液を作成した。薬物依存性の評価は、条件付け場所嗜好性試験により実施し、試験薬物は条件付けの直前に腹腔内投与した。

結果：麻薬性鎮痛薬の用量に依存してマウスの場所嗜好性が延長し、生理食塩水を投与したコントロールマウスと比較して30  $\mu$ mol/kgモルヒネ、3  $\mu$ mol/kgオキシコドンまたは0.4  $\mu$ mol/kgフェンタニルを投与したマウスでは有意な場所嗜好性反応が観察された。モルヒネ、オキシコドンまたはフェンタニルにより惹起される場所嗜好性反応は、ナロキソンを3  $\mu$ mol/kg、3  $\mu$ mol/kgまたは4  $\mu$ mol/kgの用量をそれぞれの麻薬性鎮痛薬に混合して投与することにより有意に抑制された。

考察：乱用防止製剤の効果に関する薬理的検証試験法として条件付け場所嗜好性試験は有効であることが示された。また、麻薬性鎮痛薬とナロキソンを同時投与した際に場所嗜好性を示さないナロキシンの含有量が乱用防止製剤として効果的であると考えられた。

## ミクログリアのカンナビノイド受容体2型を介したアルツハイマー病における神経炎症調節機構について

○祖父江 顕<sup>1,2</sup>、小峯 起<sup>1</sup>、遠藤 史人<sup>1</sup>、村山 繁雄<sup>3</sup>、斉藤 貴志<sup>1,4</sup>、西道 隆臣<sup>5</sup>、山中 宏二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・環境医学研究所・病態神経科学分野、<sup>2</sup>名古屋大・環境医学研究所・MIRAIC-未来の医学研究センター、<sup>3</sup>東京都健康長寿医療センター研究所・高齢者ブレインバンク、<sup>4</sup>名古屋市立大・脳神経科学研究センター・認知症科学分野、<sup>5</sup>理化学研究所・脳神経科学研究センター・神経老化制御研究チーム

認知症の主要な原因疾患であるアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)の中核となる病理は、アミロイド $\beta$  (A $\beta$ )・タウ蛋白の異常蓄積であり、これらは神経変性につながる主要因子である。一方、AD脳の老人斑に集簇するグリア細胞の一種であるミクログリアはA $\beta$ クリアランスや神経炎症に寄与し、ADの病態に関与することが注目されてきている。しかし、AD病態に関わる神経炎症因子とその制御については不明な点が多い。

本研究では早期AD病理脳の楔前部およびAD患者脳内のアミロイドの蓄積を忠実に再現するApp<sup>M-G-F/M-G-F</sup>マウス(App-KIマウス)から磁気細胞分離法で単離したミクログリアを用いて次世代シーケンスを行い、神経炎症関連遺伝子の発現変化を解析したところ、主に免疫関連細胞に発現し、炎症調節に関与するカンナビノイド受容体2型(CB2)が共通して上昇していることが確認できた。このことから、活性化ミクログリアに対するCB2の機能を解析する目的で、IFN- $\gamma$ を用いて活性化した培養ミクログリアに対してCB2アゴニストであるJWH133を添加した後、炎症性サイトカインの発現変化を定量RT-PCRにより解析した。その結果、IFN- $\gamma$ 処置により上昇したTnf- $\alpha$ やCxc110の発現はJWH133処置により有意に抑制されることが確認できた。さらに、脳内におけるミクログリアのCB2の機能を解析する目的で、5ヶ月齢のApp-KIマウスにJWH133を5.5ヶ月間連続飲水投与し、新奇物体認探索試験を用いて認知機能への影響を解析した。その結果、App-KIにおいて低下した認知機能はJWH133投与により有意に改善することが明らかとなった。また、JWH133連続投与後に大脳皮質を摘出し、磁気細胞分離法でミクログリアおよびアストロサイトを単離し、定量RT-PCRを行った結果、単離ミクログリアにおいて活性化アストロサイトの誘導因子であるC1qや単離アストロサイトにおいて活性化アストロサイトのマーカーであるH-2dおよびPsm80の発現の低下などが確認できた。

これらのことからミクログリアにおけるCB2の刺激によりアストロサイトの活性化が抑制され、それによって神経炎症および認知機能の低下が改善されることが示唆された。



## RELN遺伝子欠失を有するマウスの大脳皮質由来初代培養細胞におけるReelinシグナルの解析とADAMTS-3ノックダウンの効果

○常浦 祐未<sup>1,2</sup>、澤幡 雅仁<sup>1</sup>、伊藤 教道<sup>1</sup>、宮島 遼也<sup>1</sup>、森 大輔<sup>3,4</sup>、河野 孝夫<sup>5</sup>、服部 光治<sup>5</sup>、松木 亨<sup>2</sup>、中山 敦雄<sup>2</sup>、祖父江 顕<sup>6</sup>、永井 拓<sup>7</sup>、溝口 博之<sup>1</sup>、鍋島 俊隆<sup>8</sup>、尾崎 紀夫<sup>3</sup>、山田 清文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院医・医療薬、<sup>2</sup>愛知県医療療育総合センター・発達障害研・細胞病態、<sup>3</sup>名古屋大・院医・精神医、<sup>4</sup>名古屋大・脳とこころの研究センター、<sup>5</sup>名古屋市立大・院薬・病態生化、<sup>6</sup>名古屋大・環境医学研・病態神経科、<sup>7</sup>藤田医科大・精神・神経病態解明センター・神経行動薬理、<sup>8</sup>藤田医科大・院保健・先進診断システム探索

【目的】Reelinは正常な脳構造形成や機能発現に必須な分泌タンパク質であり、その機能低下による精神疾患発症が示唆されている。本研究では、日本人統合失調症患者から同定された新規RELN遺伝子欠失が神経細胞の発達と機能に与える影響を明らかにするため、この欠失を模倣した遺伝子改変マウス (*Reln-del*) の大脳皮質由来初代培養神経細胞の形態学的・生化学的解析を行った。また、Reelin機能増強が神経細胞に与える影響を明らかにするため、Reelin分解酵素であるa disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3 (ADAMTS-3) の発現抑制がReelinシグナルカスケードに与える影響を調べた。

【方法】野生型 (WT)、ヘテロ欠損 (*Reln-del*<sup>+/-</sup>)、ホモ欠損 (*Reln-del*<sup>-/-</sup>) マウスより大脳皮質由来初代培養神経細胞を得た。細胞内ReelinおよびDisabled-1 (Dab1) の発現量は、ウエスタンブロッティング (WB) によって解析した。神経突起長と分岐数は、生細胞イメージングシステムIncuCyteによって解析した。神経細胞の機能に関わるスパイン形成能については、樹状突起上のPSD95のクラスター数を免疫細胞化学的手法により解析した。ADAMTS-3ノックダウンがReelinシグナルカスケードに与える影響については、Reelin分解とDab1発現量の変化をWBにより解析した。

【結果】Reelinの発現量は、*Reln-del*<sup>+/-</sup>で減少し、*Reln-del*<sup>-/-</sup>ではほぼ確認できなかった。Dab1の発現量はWTに比べて*Reln-del*<sup>+/-</sup>と*Reln-del*<sup>-/-</sup>で有意に増加し、Reelinシグナル減弱が示唆された。神経突起長、分岐数、スパイン密度はWTに比べて*Reln-del*<sup>+/-</sup>と*Reln-del*<sup>-/-</sup>で減少した。ADAMTS-3をノックダウンすると、培養上清中のReelin分解抑制に伴う活性化Reelin増加と細胞内Dab1の減少が確認された。

【考察】*Reln-del*の初代培養神経細胞では、Reelin発現量減少、Reelinシグナル活性低下、神経形態異常が認められた。またADAMTS-3ノックダウンにより、Reelin分解が抑制されReelinシグナル活性の増強が示された。

## ミクログリアのストレス応答を担う転写・エピゲノム制御

○谷口 将之<sup>1</sup>、松下 和敏<sup>1</sup>、三島 零<sup>1</sup>、北岡 志保<sup>1,2</sup>、門田 満隆<sup>3</sup>、工樂 樹洋<sup>3,4</sup>、古屋敷 智之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大・院医、<sup>2</sup>兵庫医科大・院医・薬理学、<sup>3</sup>理研・BDR・分子配列比較解析チーム、<sup>4</sup>遺伝研・分子生命史研

慢性ストレスを受けた動物やうつ病患者では脳内で炎症反応が生じていることが示唆されてきた。我々は、マウスの社会挫折ストレスを用いて、慢性ストレスが自然免疫受容体を介して内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex; mPFC) のミクログリアを活性化し、神経細胞の樹状突起退縮やうつ様行動を促すことを示してきた。慢性ストレスによるミクログリア活性化は脳領域選択的であり、mPFCでは誘導されるが、側坐核では誘導されない。また、ミクログリア活性化はストレスの反復で次第に増強するプライミングを示す。従って、ミクログリアのストレス応答には脳領域選択的な転写・エピゲノム制御の関与が推測されるが、実態は不明である。本研究では、脳領域かつミクログリア選択的なエピゲノム解析を行い、ヒストンH3K27アセチル化を伴うスーパーエンハンサーがmPFCと側坐核のミクログリアのゲノム上で異なる分布を示すこと、この脳領域選択性は慢性ストレスにより生じることを見出した。このスーパーエンハンサーの変化には、mPFC選択的な局所的変化と、mPFCと側坐核で共に生じる広域的变化が含まれており、近傍の遺伝子の発現変化とも合致していた。さらに、慢性ストレスにより変化したスーパーエンハンサーのnucleosome-free領域には、異なる転写因子結合モチーフが濃縮していた。以上の結果は、慢性ストレスがミクログリアにおいて脳領域選択性の異なる複数の転写・エピゲノム制御を誘導し、ミクログリアのストレス応答を決定することを示唆している。

## B3-5 MDMAによる向社会効果誘導における扁桃体基底外側核5-HT<sub>1A</sub>受容体の関与

○佐々木 祐輝<sup>1</sup>、大嶋 祥高<sup>1</sup>、江崎 博仁<sup>2</sup>、釜田 ひかり<sup>2</sup>、向井 沙和子<sup>1</sup>、中田 早音<sup>1</sup>、  
齊藤 隆太郎<sup>1</sup>、西谷 直也<sup>1,2</sup>、出山 諭司<sup>1,2</sup>、金田 勝幸<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>金沢大・薬・薬理、<sup>2</sup>金沢大・院薬・薬理

3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) は社交性や共感力の増強といった向社会効果を誘導する。この効果にセロトニン (5-HT) の関与が示唆されているが、詳細な神経機構には不明な点が多い。そこで本研究では、社会性評価試験であるsocial approach test (SAT) を用いてMDMAの向社会効果誘導機構を検討した。

SATでは、1日目は無処置で、また、2日目と4日目はsalineまたはMDMA (5 mg/kg, i. p.) を試験マウス (雄性ICRマウス、6-12週齢) に全身投与した後、新奇マウスを入れたカゴ近傍エリア (social area, SA) での滞在時間を計測し、この時間が長いほど社会性が高いと評価した。

2日目および4日目において、MDMA投与によりSA滞在時間が顕著に上昇する個体と、そのような作用の認められない個体が存在したため、1日目から2日目にかけてSA滞在時間が一定時間以上増加した個体をHighグループ、増加しなかった個体をLowグループに分類した。Highグループでは4日目にも顕著なSA滞在時間の上昇が認められたため、4日目にHighグループのみを使用して各種阻害薬の効果を検討した。

選択的5-HTトランスポーター (SERT) 阻害薬 ((S)-Citalopram, 10 mg/kg, s. c.) をMDMA投与前に全身投与したところ、MDMAによるSA滞在時間の上昇が有意に抑制された。また、5-HT<sub>1A</sub>、5-HT<sub>1B</sub>、5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>、および、5-HT<sub>4</sub>受容体阻害薬を全身投与したところ、5-HT<sub>1A</sub>受容体阻害薬のWAY100635 (3 mg/kg, s. c.) のみがMDMAによるSA滞在時間の上昇を有意に減少させた。さらに、WAY100635 (0. 2-0. 4 μg/site) を社会性に関与するとされる内側前頭前野、側坐核、あるいは、扁桃体基底外側核 (BLA) に局所投与したところ、BLA内投与によりSA滞在時間の上昇が抑制された。

以上の結果から、MDMAはSERTを介した5-HT遊離促進と、それに続くBLAの5-HT<sub>1A</sub>受容体刺激によって向社会効果を誘導することが示唆された。

## B4-1 セピアプテリン還元酵素遺伝子ノックアウトマウスの持続勃起症とテトラヒドロビオプテリン反復投与の効果

○一瀬 (鷺見) 千穂、菅沼 由唯、狩野 泰輝、池本 和久、近藤 一直  
藤田医科大・医・薬理

【緒言】テトラヒドロビオプテリン (BH4) は、フェニルアラニン代謝、モノアミンおよび一酸化窒素 (NO) の生合成に必須のコファクターである。BH4合成の第3段階を触媒するセピアプテリン還元酵素 (SPR) の遺伝子ノックアウトマウス (*Spr*<sup>-/-</sup>) は高率に持続勃起症 (Priapism) を発症する。Priapismを発症した*Spr*<sup>-/-</sup>マウスにBH4の反復投与を行い、Priapismへの影響を解析した。【方法】C57BL6/J-Balb/cバックグラウンドの4-11ヵ月齢オスマウスを使用した。*Spr*<sup>-/-</sup>マウスにBH4・2HCl 50 mg/kgとvehicleを10日間腹腔内投与した。タンパク定量はBradford法で行った。モノアミンは、高速液体クロマトグラフィ- (HPLC)-電気化学検出器で定量した。プテリジン誘導体はポストカラム法によりHPLC-蛍光検出器で定量した。チロシン水酸化酵素 (TH)、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS)、ホスホジエステラーゼ5型 (PDE5A)、神経型NOS (nNOS) をウェスタンブロッティング法で検出した。NO代謝物はNO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> assay fluorometric kit (Dojindo) で測定した。【結果】*Spr*<sup>-/-</sup>マウスPenile homogenate中のBH4およびtotal Biopterin量は、野生型のそれぞれ0. 69%、8. 1%の低値であり、ノルアドレナリン (Nad) 量は、野生型の17. 4%であった。eNOS、PDE5Aのタンパク質量には*Spr*<sup>-/-</sup>と野生型で有意差がなかったが、THは*Spr*<sup>-/-</sup>で大きく減少し、nNOSは有意に増加していた。*Spr*<sup>-/-</sup>マウスのNO代謝物は、野生型の1. 59倍の高値であった。*Spr*<sup>-/-</sup>マウスへのBH4反復投与ではPriapism症状が有意に改善した。BH4投与群のpenile homogenate中のNad量、BH4量、total Biopterin量は、vehicle投与群のそれぞれ7. 12倍、3. 58倍、15倍に達した。これに対し、BH4投与群のNO代謝物は、vehicle投与群の46. 3%の低値であった。【考察】*Spr*<sup>-/-</sup>マウスへのBH4の反復投与により交感神経系の活動が回復し、一方NOの産生は抑制されるため、Priapism症状は改善すると考えられる。

## Rhoシグナル関連遺伝子*Arhgap10*変異マウスの行動薬理的・神経化学的解析

○羽田 和弘<sup>1</sup>、Wulaer Bolati<sup>1</sup>、永井 拓<sup>1</sup>、伊藤 教道<sup>1</sup>、祖父江 颯<sup>1</sup>、森 大輔<sup>2</sup>、久島 周<sup>2</sup>、鍋島 俊隆<sup>3</sup>、尾崎 紀夫<sup>2</sup>、山田 清文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院医、<sup>2</sup>名古屋大・院医・精神医学、<sup>3</sup>藤田医科大・院保健

【目的】統合失調症は人口の約1%を占める重大な精神疾患であり、環境因子と遺伝因子の両因子が発症に関連しているとされているが、未だその病態は不明で、病態に即した根本的な治療法は確立していない。我々は、これまでにRho-GTPase activating protein 10 (ARHGAP10) に稀なゲノム変異を持つ7名の日本人統合失調症患者を同定している。その中で最も症状の重篤であった患者では*Arhgap10*遺伝子内にコピー数変異及び一塩基変異がみられた。このことから*Arhgap10*ゲノム変異と統合失調症との関係性を調べるために、*Arhgap10*ゲノム変異を模したモデルマウス (Mt) を作製し、行動学および組織学的解析を行った。【方法】qPCR法及びin situ hybridization法を用いて野生型マウス (WT) の脳内における*Arhgap10* mRNAの発現解析、WTとMt間における網羅的な行動解析、Rhoシグナルの変化、神経細胞の形態学的変化および神経活動の変化を評価した。【結果・考察】WTにおける*Arhgap10* mRNAレベルは、週齢に依存して増加し、8週齢のマウスでは皮質や海馬と比べて線条体、側坐核および小脳で発現が認められた。一連の行動解析を行った結果、MtはElevated plus maze testにおいて不安障害およびMETH誘発性運動過多・視覚弁別試験において行動異常が観察された。また、Mtの線条体および側坐核では、Rhoシグナルの下流に存在するpMYPT1およびpPAK1が上昇しており、METH投与後のc-Fos陽性細胞数がWTに比べて有意に増加した。さらに、Mtでは線条体及び側坐核神経細胞の突起複雑性およびスパイン密度が増加していた。これらの結果から、Mtで認められる行動異常には大脳基底核における神経細胞の機能的および形態学的変化が関与している可能性がある。

## Treatment of intracerebral hemorrhage with humanized anti-HMGB1 mAb in non-human primate brain

○王 登莉、喬 寒棟、逢坂 大樹、西堀 正洋

岡山大・院医歯薬

### Background

Intracerebral hemorrhage (ICH) is recognized as a serious clinical problem lacking effective treatment. High mobility group box-1 (HMGB1) exhibits inflammatory cytokine-like activity once released into the extracellular space from the nuclei. We previously demonstrated that intravenous injection of rat anti-HMGB1 monoclonal antibody (mAb) remarkably ameliorated brain injury induced by hemorrhage in the striatum of rat. In the present study, we will examine whether and how humanized anti-HMGB1 mAb effects on ICH injury in common marmoset, one of the non-human primates, which will provide insights into a new treatment for human ICH diseases.

### Method

Collagenase IV was delivered into the right striatum to make ICH model. Humanized anti-HMGB1 mAb or control IgG was administrated through the tail vein after ICH induction. During the experiment, body weight, routine blood test, plasma HMGB1 level and plasma 4-HNE level was examined at different time points of ICH (pre, 1d, 2 d, 4 d, 7 d and 12 d after ICH). Plasma inflammatory cytokines were detected by cytometric bead array assay. Grip strength test was performed to evaluate neurological function at different time points. Finally, brains were fixed and embedded in paraffin for immunohistochemistry.

### Result

We show that administration of humanized anti-HMGB1 mAb inhibited the release of HMGB1 into the extracellular space in the peri-hematoma area. Plasma HMGB1 were reduced in association with decreased expression of plasma inflammatory cytokines by anti-HMGB1 mAb. As one of the oxidative stress biomarkers, 4-HNE adduct was accumulated mostly in microglia and neurons at the border of hematoma area, while located specifically in migrated microglia surrounding the pericytes in peri-hematoma area. Administration of anti-HMGB1 mAb decreased the 4-HNE accumulation in the brain and plasma. Moreover, anti-HMGB1 mAb reduced body weight loss and improved the behavioral performance.

### Conclusion

We conclude that intravenous injection of humanized anti-HMGB1 mAb has potential as a novel therapeutic strategy ICH disease.

**B4-4****microRNAを介した内向き整流性カリウムチャネルKir2.1発現亢進による骨芽細胞分化制御機構**

○鬼頭 宏彰、遠藤 京子、梶栗 潤子、大矢 進  
名古屋市立大・院医

【背景・目的】骨組織は、骨形成と骨吸収のバランスにより恒常性が維持されている。前骨芽細胞の細胞増殖・分化は骨芽細胞の成熟において重要な役割を果たしており、骨芽細胞分化障害は骨代謝性疾患の原因となると考えられている。Orai1を介したストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入 (SOCE) が骨芽細胞分化を制御することが明らかにされ、骨形成におけるCa<sup>2+</sup>シグナルの重要性が注目されている。内向き整流性K<sup>+</sup>チャネル (Kir) は、静止膜電位形成に寄与することでSOCE等の細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の制御に関与すると考えられる。本研究では網羅的遺伝子発現解析の結果からKir2.1の発現が骨芽細胞分化により亢進することを明らかにしている。そこで骨芽細胞分化に関わるCa<sup>2+</sup>シグナルの調節因子としてKir2.1に着目し、骨芽細胞分化に対する役割について検討した。

【結果・考察】骨芽細胞分化を誘導したマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1において、Kir2.1発現が顕著に増大することを明らかにした。Kir2.1発現亢進による細胞膜電位への影響を評価するためにKir2阻害薬ML133 (10 μM) 誘発性脱分極反応を測定したところ、分化誘導細胞において有意に大きな脱分極反応が生じた。SOCEを介したCa<sup>2+</sup>流入に対するKir2阻害の影響を検討したところ、分化誘導細胞においてSOCEを介したCa<sup>2+</sup>流入が有意に抑制された。Kir2.1阻害は、骨芽細胞分化マーカーの発現抑制、マウス胚中足骨の軟骨内骨化を有意に抑制した。また、Kir2.1の発現亢進メカニズムを明らかにするためにmiRNAによるKir2.1の発現制御についてmiRNA阻害薬を用いて検討したところ、骨芽細胞分化にとまらぬmiR-106b-5pの発現低下がKir2.1の発現を亢進させることが明らかとなった。以上の結果より、骨芽細胞分化におけるKir2.1発現・活性亢進はCa<sup>2+</sup>シグナルを制御することで骨形成に一部寄与する可能性が明らかとなった。

**B4-5****RAW264.7細胞およびゼブラフィッシュ再生鱗を用いた10-gingerolの破骨細胞阻害作用の発見**

○島田 康人<sup>1,2,3</sup>、臧 黎清<sup>2,4</sup>、籠谷 和弘<sup>2,5</sup>、中山 寛子<sup>2,4</sup>、ジャッキー ジャッキー<sup>2,4</sup>、藤本 祐希<sup>6</sup>、林 彰人<sup>6</sup>、園 良治<sup>6</sup>、勝崎 裕隆<sup>7</sup>、西村 訓弘<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>三重大・院医、<sup>2</sup>三重大・ゼブラセ、<sup>3</sup>三重大・先端セ・バイオインフ、<sup>4</sup>三重大・院地域イノベ、<sup>5</sup>三重大・辻H&B研、<sup>6</sup>辻製油 (株)、<sup>7</sup>三重大・院生資

私たちは2016年にショウガのヘキササン抽出物がRAW264.7細胞の破骨細胞への分化を阻害することを報告したが (Ito et al., Biosci Biotechnol Bichem. 2016;80:779-785)、その有効成分は不明であった。今回、このヘキササン抽出物の分画を行い、LC/MS、培養細胞・ゼブラフィッシュを用いた解析の結果、10-gingerolを同定したので報告する。

ショウガヘキササン抽出物からシリカゲルクロマトグラフィーを用いて10個の画分を調製し、RAW264.7細胞を用いた試験系で評価、破骨細胞分化阻害作用を認めた画分を決定した。それらのHPLCにおけるピークをLC/MSにて解析した結果、gingerol類が想定された。RAW264.7細胞に加え、プレドニゾロン誘導による骨粗しょう症モデルゼブラフィッシュにおける再生鱗の評価系も用いて、各gingerolを試験した結果、10-gingerolに強力な破骨細胞分化阻害作用を認めた。私たちはさらに、この10-gingerolの作用機序を、ゼブラフィッシュ鱗再生過程・遺伝子発現プロファイル・酵素活性への影響の3点から解析し、「Nfatc1の核内移行阻害による分化阻害」・「CTSK活性阻害による破骨細胞機能抑制」という2つの作用メカニズムを明らかにした (Zang et al., Front Cell Dev Biol. 2021;9:588093)。

## ゼブラフィッシュ稚魚の肥満試験とマウス3T3-L1細胞を用いた抗肥満作用を持つ天然物の探索

○中山 寛子<sup>1,2</sup>、臧 黎清<sup>1,2</sup>、松岡 いづみ<sup>1,2</sup>、金 英一<sup>3</sup>、朱 政治<sup>3</sup>、ジュネジャ レカ ラジュ<sup>3</sup>、西村 訓弘<sup>1</sup>、島田 康人<sup>1,2,4,5</sup>

<sup>1</sup>三重大・院・地域イノベ、<sup>2</sup>三重大・次世代創薬ゼブラ・スクリーニングセ、<sup>3</sup>ロート製薬(株)、<sup>4</sup>三重大・院医・統合薬理、<sup>5</sup>三重大・先端科学・バイオインフォ

肥満の蔓延は急激に進行しており、2025年までに世界の成人の5人に1人が肥満になると予測されている。肥満の進行に伴い、心疾患や糖尿病、高血圧、脂質異常症、がんなどの併存疾患が発症するリスクが高くなる。また、肥満は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）を重症化し死亡するリスクが高くなる危険因子であり、肥満対策は緊急の課題の1つである。肥満の治療には食事療法や運動療法が主となるが、効果が期待できない場合、抗肥満薬による薬物療法が必要とされている。しかし、多くの抗肥満薬がその副作用のために市場から撤退しており、近年、副作用の少ない天然物の利用が活発化している。ゼブラフィッシュは、ゲノム配列や臓器の構造がヒトと高い類似性を有し、生体イメージングへの適合、薬物スクリーニングの最適性、動物愛護管理法との調和などの点から、創薬のあらゆるプロセスに活用されている。私たちはこれまで食餌性肥満ゼブラフィッシュを構築し、天然物由来の抗肥満成分の発見およびその作用機序などを明らかにしてきた。肥満ゼブラフィッシュはマウスなどの哺乳類動物よりスループットは高いが、成魚を用いるため100匹/月の試験が限界であり、大規模スクリーニングには不向きであった。そこで我々は、体長1cm程度のゼブラフィッシュ稚魚を用いることでよりスループットの高いスクリーニング技術（Zebrafish Obesogenic Test: ZOT）を開発し、抗肥満作用を持つ天然物を探索した。ZOTは、生後1ヶ月齢体長1cm程度の稚魚を用い、高脂肪食を1日2回与え、内臓脂肪の蓄積は中性脂肪特異的蛍光色素ナイルレッドを用いて生体染色で評価する。ZOTとマウス3T3-L1前脂肪細胞を用いて38個の天然物を用いて試験を行った結果、ゼブラフィッシュの内臓脂肪組織では7個、マウスの脂肪細胞においては11個の天然物がそれぞれ脂質の蓄積を抑制、このうちの5つの天然物がゼブラフィッシュと3T3-L1脂肪細胞の両方で脂質の蓄積を抑制した（Nakayama H, et al. *Molecules* 25, 2020）。さらにZOT、DIO-zebrafish、3T3-L1 adipocyteの3種類の評価法のアドバンテージと限界について総括したので報告する。



## C 会場





## PDE3阻害剤K-134の脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける脳卒中発症後の治療効果

○吉田 英雄<sup>1,2</sup>、伊藤 晋介<sup>2</sup>、磯田 博子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>筑波大・理工情報生命学術院・生命地球科学研究群、<sup>2</sup>興和・医薬事業部・東京創薬研究所、<sup>3</sup>筑波大・生命環境系

【目的】抗血小板剤の脳梗塞再発予防効果を裏付ける薬理試験として、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)における脳卒中発症後の治療効果を比較検討した。

【方法】SHRSPの脳卒中初発日(前肢持ち上げ、運動抑制、過敏性亢進などの神経症状発現日)よりPDE3阻害剤(K-134、シロスタゾール)またはP2P12阻害剤(クロピドグレル)を経口投与し、脳卒中初発日からの生存日数、神経症状スコア、脳病変などに対する影響を検討した(各群10例)。

【結果】K-134(1日2回30, 100 mg/kg)は対照群に比し有意な生存日数の延長を認め(110.7 ± 17.5, 112.5 ± 26.5 vs. 75.4 ± 29.5 days,  $P < 0.01$ )、その効果は神経症状の軽減、脳血管病変の発症抑制、脳病変面積の縮小ならびに脳重量の減少などの薬理作用によって裏付けられた。一方、シロスタゾール(1日2回300 mg/kg)投与でも同様な効果を認めたが、平均生存日数はK-134に比較して約10日間短縮した。他方、クロピドグレル(1日1回3, 10 mg/kg)は対照群に比較して生存日数を延長させたが、脳血管病変の発症率においては差が認められず、逆に大出血塊が散見され脳病変面積では対照群に比較し増加傾向を示した。このような脳出血はK-134ならびにシロスタゾールでは観察されず、クロピドグレル特有の作用と考えられた。

【総括】これまでPDE3阻害剤のSHRSPの生存期間に対する影響はシロスタゾールを脳卒中発症前から投与することにより評価されてきたが、有意な生存期間延長効果は報告されていなかった。本研究において我々は脳卒中初発日から酵素選択的かつ強力なPDE3阻害剤であるK-134の投与を開始することにより、生存期間延長効果や神経症状の軽減効果を認めるとともに、クロピドグレルに比べ低い脳出血リスクを示すことができた。

## マウス滲出型加齢黄斑変性モデルにおける転写因子ATF4の関与

○安田 啓人<sup>1</sup>、田中 美留豊<sup>1</sup>、西中 杏里<sup>1</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、嶋澤 雅光<sup>1</sup>、原 英彰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬・薬効解析学研究室、<sup>2</sup>岐阜薬科大

【背景と目的】滲出型加齢黄斑変性は脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization: CNV)を主徴とした加齢性疾患である。滲出型加齢黄斑変性に対して抗血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)療法が第一選択であるが、奏功しない症例も存在する。すなわち、VEGFとは異なる新たな治療ターゲットの探索が必要である。近年、統合的ストレス応答(integrated stress response: ISR)の異常な活性化が、種々の加齢性疾患の進行に寄与することが明らかとなり、滲出型加齢黄斑変性の病態形成にもISRの関与が推察される。また、ISRのシグナル伝達において、転写因子ATF4(activating transcription factor 4)が重要な役割を担うことが示唆されている。そこで本研究では、ATF4発現抑制薬であるISRIB(integrated stress response inhibitor)を用いてCNV形成におけるATF4の役割について検討した。

【方法】レーザー誘発CNVモデルを作製し、ATF4の発現及び局在をウエスタンブロット法及び免疫染色法によって検討した。また、レーザー照射直後にISRIB(9.03 pg, 9.03 ng/eye)を硝子体内投与し、照射後14日目におけるCNV面積及び血管外漏出を評価した。さらに、ヒト網膜毛細血管内皮細胞(human retinal microvascular endothelial cell: HRMEC)にrhVEGF(recombinant human VEGF, 10 ng/mL)を処置し、eIF2 $\alpha$ -ATF4経路の活性化、内因性VEGFの発現変動をウエスタンブロット法及びRT-PCRにて評価した。また、BrdU(bromodeoxyuridine)アッセイ及びスクラッチアッセイを用いて、ISRIB(0.1, 0.3, 1  $\mu$ M)がHRMECの増殖及び遊走に及ぼす影響を検討した。

【結果】レーザー誘発CNVモデルにおいて、レーザー照射後3日目にATF4の発現が著明に増大した。また、CNV病変部位でATF4と血管内皮細胞マーカーIsolectin B4が共局在した。さらに、ISRIB(9.03 ng/eye)はCNV面積及び血管外漏出を抑制した。*In vitro*の検討において、rhVEGF(10 ng/mL)はHRMECにおけるeIF2 $\alpha$ -ATF4経路の活性化及びVEGF mRNAの発現を増加させた。ISRIB(1  $\mu$ M)はrhVEGF誘発ATF4 mRNA発現増大と内因性VEGF分泌亢進を抑制した。また、ISRIB(1  $\mu$ M)はrhVEGF誘発性のHRMECの細胞増殖及び遊走を抑制した。

【結論】CNV形成には血管内皮細胞におけるATF4の発現増大が関与する可能性が示された。また、血管内皮細胞において、ATF4はオートクリン様VEGFシグナルを介し細胞増殖能及び細胞遊走能を亢進させることが明らかになった。以上の結果より、ATF4は滲出型加齢黄斑変性の病態機序の一つであるCNV形成の制御因子として働くことが示唆された。

## C1-3 マウス網膜静脈閉塞症モデルに対するアルクチゲニンの作用

○日高 八重<sup>1</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、西中 杏里<sup>1</sup>、田中 美留豊<sup>1</sup>、高城 雄一<sup>3</sup>、稲益 悟志<sup>3</sup>、与茂田 敏<sup>3</sup>、嶋澤 雅光<sup>1</sup>、原 英彰<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬・薬効解析学研究室、<sup>2</sup>岐阜薬科大・薬、<sup>3</sup>クラシエホールディングス株式会社

【背景】網膜静脈閉塞症 (Retinal vein occlusion: RVO) は、網膜の静脈が詰まり無灌流領域を形成し、眼内の浮腫や出血により視力低下を引き起こす疾患である。抗血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) 薬の硝子体内投与により、浮腫の退縮や視力改善が期待できるが、患者の身体的負担が大きいことから、より侵襲性の低い治療薬の開発が望まれている。リグナンポリフェノールのアルクチゲニンは生薬である牛蒡子、及びゴボウスプラウトやレンギョウ葉などに含まれる成分であり、経口投与において抗腫瘍作用や血管正常化作用を有する。そこで本研究では、*in vitro*網膜内皮細胞バリア機能評価モデル及び*in vivo*マウスRVOモデルを用いて、アルクチゲニンの作用について検討した。

【方法】ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (Human retinal microvascular endothelial cell: HRMEC) をTranswellインサート上で培養した。アルクチゲニンを添加し、その1時間後にVEGFを添加した。24時間後、経内皮電気抵抗 (Trans endothelial electrical resistance: TEER) 値及びFITCデキストランの蛍光強度を測定し、バリア機能を評価した。マウスRVOモデルは、8週齢雄性 ddYマウスに対し、光増感剤のローズベンガルを尾静脈内に投与し、低出力レーザー照射を行うことで作製した。アルクチゲニンは、血管閉塞1時間前、1、6及び12時間後に経口投与し、24時間後に眼球を摘出した。組織学的評価から網膜浮腫に対するアルクチゲニンの効果を検討した。また、網膜における各種タンパク質の発現変化をウェスタンブロット法により検討した。

【結果】HRMECにおいて、VEGFにより誘発されるTEER値の低下及びFITCデキストランの透過性亢進が、アルクチゲニンの処置によって抑制された。In vivoにおいて、アルクチゲニンの経口投与は、マウスRVOモデルの網膜浮腫形成を抑制した。また、静脈閉塞1日後の網膜において血液網膜関門の構成因子であるOccludin及びVE-cadherinの発現が低下し、アルクチゲニンの経口投与はそれらの発現低下を抑制した。

【結論】RVOにおけるVEGF依存的な網膜浮腫に対して、アルクチゲニンは予防的作用を有することが示唆された。本研究は、網膜浮腫に対するアルクチゲニンの経口投与の有用性を示すものであり、RVOをはじめとする網膜浮腫の治療において、アルクチゲニンが有用な治療薬となる可能性が考えられる。

## C1-4 RNA結合タンパク質Puf4による酸化ストレス応答に関わるシグナル制御機構の探索

○土屋 葵子<sup>1</sup>、高崎 輝恒<sup>1</sup>、佐藤 亮介<sup>1</sup>、神田 勇輝<sup>1</sup>、Deiter A. Wolf<sup>2,3</sup>、杉浦 麗子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬、<sup>2</sup>Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute、<sup>3</sup>Xiamen University

Pumilioタンパク質は、酵母からヒトまで高度に保存されたRNA結合タンパク質であり、標的mRNAの安定性や翻訳の制御を介して胚発生や神経細胞分化など多岐にわたる生命機能を調節することが知られている。さらに近年ではがんの原因遺伝子であることが明らかにされ、Pumilioには未解明な役割があることが示唆された。Pumilioタンパク質はヒトでは3種存在するのに対して、分裂酵母には9種存在することから、分裂酵母ではそれぞれの分子により細分化された生理的役割があると考えた。当研究室では、分裂酵母のPumilio タンパク質のひとつであるPuf4に焦点をあてた細胞機能の解析を行い、*puf4* 遺伝子破壊細胞 ( $\Delta puf4$ 細胞) は通常の生育条件では増殖に影響を認めなかったが、 $H_2O_2$ を始めとする複数の酸化ストレスに対して耐性を示すことを見出した。そこで、Puf4が酸化ストレス耐性に関わるメカニズムを明らかにするために、酸化ストレス応答に重要な役割を果たすシグナル伝達経路とPuf4の関わりを調べた。まず、分裂酵母のストレス応答MAPK (SAPK) 経路であるSty1/Spc1シグナルの活性がPuf4欠損により変動があるのか及びを調べた結果、Puf4欠損はSty1 MAPKの酸化ストレス依存的な活性化に影響を与えないことが明らかになった。次に、転写因子Pap1の酸化ストレス依存的な核移行を正常細胞とPuf4欠損細胞で比較した結果、有意な差は見られなかった。そこで、Puf4欠損細胞の遺伝子発現プロファイルに着目した解析を行った。その結果、酸化ストレス条件下において $\Delta puf4$ 細胞では野生細胞と比較して*ispd*をはじめとする5因子のmRNA量が顕著に変動していた。そこでこれらPuf4依存的な発現変動を示す因子の欠損細胞を作成し酸化ストレス下での細胞増殖に影響を与えるかを確認したところ、5因子のうち4因子が酸化ストレスに対して正常細胞とは異なる感受性を示すことが明らかになった。以上の結果から、Puf4はこれら4因子のmRNAの発現量を直接あるいは間接的に調節することで、酸化ストレス応答に関与する可能性が示唆された。

本学会では、酸化ストレス応答に重要な役割をもつシグナル伝達経路とPuf4の関わりや、Puf4のRNA結合タンパク質としての機能に注目した研究を展開したので、考察する。

## C1-5

# ストレス顆粒構成因子RNA helicase Ded1とPKC/MAPKシグナル制御機構の関係

○富本 尚史、神田 勇輝、佐藤 亮介、高崎 輝恒、Chun An Tsai、梅田 茉美、杉浦 麗子  
近畿大・薬・分子医療・ゲノム創薬

PKC/MAPKシグナル伝達経路は高度に保存された細胞増殖シグナル伝達経路であり、その過剰な活性化は発がんと密接に関わる。我々はPKC/Pck2過剰発現 (OP) がMAPKの活性化と細胞増殖抑制を誘導することを利用したMAPKシグナル制御因子探索法により、RNAヘリケースであるDed1を同定した。Ded1はヒトDDX3の分裂酵母ホモログであり、膜をもたない構造体である「ストレス顆粒 (SG)」の構成因子であることが報告されている。SGは翻訳やmRNA安定性の制御のみならず、シグナル伝達制御における役割が注目されている。現在までに我々は、PKC/Pck2が熱ストレス条件下でSGへ移行することを報告している。そこでDed1/DDX3 がPck2 OP依存的な細胞増殖抑制を回復するメカニズムとストレス顆粒形成の関わりに焦点をあて解析を行った。

まず、Pck2 OPによりSGが形成される可能性についてSGのマーカーであるPabpを用いて検証した。その結果、Pck2 を過剰発現することにより、正常細胞と比較してPck2とPabpはそれぞれ凝集体を形成し、さらに共局在を示した。次に、Pck2 OPによりDed1の凝集が観察されるのかを検証した。興味深いことに、Pck2 OPによりPck2は凝集体を形成したがDed1の凝集体は見られなかった。以上のことから、Pck2 OPはPabpの凝集体形成を誘導するが、Ded1に対しては凝集体形成を誘導しないと推測される。次に、Ded1 OPに伴うSGの形成の有無を、Pabpを用いて検証した。すると、Ded1 OPにおいて正常細胞と比較してPabpの凝集体は形成されることが明らかとなった。以上の結果は、Pck2 OPに伴うSGの構成因子の凝集体形成に選択性がある一方、Ded1 OPではSGの構成因子を凝集させる能力があることを示唆している。これらの結果から、Pck2 OPの細胞増殖抑制を回復させる上で、Ded1依存的なSG形成が重要である可能性を示唆する。今回はPKC/MAPKシグナルの過剰な活性化に対するDed1の抑制メカニズムについて議論する。

## C2-1

# 新規ERK活性調節剤ACA-28は骨肉腫由来細胞株においてアポトーシスとオートファジーを誘導する

○上山 紗依<sup>1</sup>、上野 七海<sup>1</sup>、當内 健太<sup>1</sup>、高崎 輝恒<sup>1</sup>、佐藤 亮介<sup>1</sup>、秋末 敏宏<sup>2</sup>、杉浦 麗子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大・院薬・ゲノム創薬学、<sup>2</sup>神戸大・院保・保健学

骨肉腫は、青年期に発症しやすい希少ながんであるが、骨にできるがんの中では最も代表的なものである。今日、技術の進歩により全体の生存率は70-80%にまで増加したものの、転移した場合の予後は非常に悪い。また、現在骨肉腫の治療に用いられている化学療法には毒性や耐性などの問題があるため、より効果的な治療法が求められている。ACA-28は当研究室の独自のスクリーニング法により得られたERK活性調節剤であり、ERKが亢進しているメラノーマ細胞に対して、ERK活性をさらに上昇させることで、正常細胞と比較して有意に細胞増殖を抑制することが明らかになっている。本研究では、ERKの活性化が報告されている骨肉腫細胞に対して、ACA-28がメラノーマ細胞と同様の細胞増殖抑制効果と細胞内シグナル変化を引き起こすかを検証した。

3種類の骨肉腫由来細胞株 (KTHOS、LM8、MG63) に対してACA-28を添加し、細胞増殖抑制効果を検証した結果、ACA-28はKTHOS細胞とLM8細胞においてメラノーマ細胞よりも低濃度で細胞増殖を抑制した。一方、MG63細胞に対するACA-28の増殖抑制効果は弱かった。次に、KTHOS細胞とLM8細胞における、ACA-28による細胞増殖シグナルへの影響を検証した。その結果、ACA-28はLM8細胞においては、メラノーマ細胞と同様にERKを活性化させ、アポトーシスを誘導した。一方、KTHOS細胞ではACA-28によるアポトーシス誘導は検出されたが、ERKのリン酸化レベルに有意な変化は見られなかった。このことから、ACA-28はKTHOS細胞個別の細胞内シグナルを介している可能性が示唆されたため、メラノーマ細胞との違いを明らかにすることはACA-28の作用メカニズムを理解する上で重要であると考えられる。興味深いことに、KTHOS細胞ではACA-28添加によりオートファジーが誘導されていたのに対し、LM8細胞ではオートファジー誘導が見られなかった。オートファジーの働きには、がん細胞に対して腫瘍促進的に働くものと抑制的に働くものが報告されていることから、現在、ACA-28添加により見られたKTHOSにおけるオートファジー誘導が、腫瘍促進的もしくは抑制的のどちらの働きを持つのか明らかにするため、オートファジー阻害剤を併用した検証を行っており、その結果についても報告する。

## 新規抗がん剤シーズACA-28のERK依存的抗がん活性と核外移行システムの関わり

○藤原 大輝、高崎 輝恒、Golam Iftakhar Khandakar、神田 勇輝、佐藤 亮介、杉浦 麗子  
近畿大・院薬・分子医療・ゲノム創薬学

ERK MAPKシグナル伝達経路は細胞増殖を司る経路であり、がん治療における重要な創薬標的である。当研究室ではこれまでに、分裂酵母を用いた独自の遺伝学的スクリーニング法により、ERK標的新規抗がん剤シーズとして Acetoxylcharvicol acetate (ACA)の誘導体であるACA-28を同定した。ACA-28はERKが恒常的に活性化しているメラノーマ細胞において、ERKのさらなる活性化を誘導することにより細胞死を誘導する。さらに、ACA-28はERK活性化モデル細胞であるHER2過剰発現細胞A4-15において、ERKの脱リン酸化酵素であるDUSP6のタンパク質量を減少させる。

本研究では、各種がん細胞（子宮頸がん細胞(ME180)、膀胱がん由来細胞(T24)、結腸がん細胞(HCT116)）を用いてACA-28がDUSP6ならびにERKシグナルに与える影響を解析した。RAS変異を持ちERKの恒常的な活性が報告されているT24細胞、HCT116細胞においてはDUSP6タンパク質量の減少とERKのリン酸化レベルの上昇が認められたのに対して、ME180ではこれらの変化が認められなかった。以上の結果より、ACA-28添加は各種ERK活性化がん細胞においてDUSP6のタンパク質量を減少させることが細胞増殖抑制機構の一因である可能性が示唆された。

一方、ACA-28は核外移行に影響を与える可能性が示唆されたので、報告する。我々は、核外輸送因子CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1 / XPO1 / Exportin 1) 依存的核外輸送システムにより、核内外をシャトルするAP1様転写因子 Pap1がACA-28添加により核内に蓄積することを明らかにした。Pap1は酸化ストレスにตอบสนองして核内に蓄積するが、ACA-28添加後、Pap1の局在変化のタイムコースを調べたところ、ACA-28はH2O2よりも高度に、かつ長時間にわたりPap1を核内に蓄積させた。核内外のタンパク質の輸送プロセスの制御不良は、腫瘍の成長やアポトーシスと密接な関係にある。本発表では構造活性相関により得られたACA-28の各種誘導体とPap1の局在制御、抗がん活性の相関についても解析を行ったので議論を行う予定である。

## 静脈麻酔薬PropofolによるPKCトランスロケーションと細胞内局所におけるPKC活性化

○野口 颯真<sup>1</sup>、梶本 武利<sup>4</sup>、卜部 智晶<sup>1,2</sup>、柳瀬 雄輝<sup>3</sup>、檜崎 壮志<sup>1,2</sup>、原田 佳奈<sup>1</sup>、田中 茂<sup>1</sup>、秀 和泉<sup>1</sup>、酒井 規雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医・神経薬理学研究室、<sup>2</sup>広島大・院医・麻酔蘇生学、<sup>3</sup>広島大・院医・皮膚科学、<sup>4</sup>神戸大・院医・生化学・分子生物学講座 生化学分野

【目的】プロテインキナーゼC (PKC) は様々な刺激によりその局在が変化し (トランスロケーション)、局在した部位でリン酸化酵素としての働きを発揮する。一方、我々は、静脈麻酔薬であるpropofolはPKCのトランスロケーションを誘発し、PKCを活性化することを過去に明らかにしている。今回、propofolによるPKC活性化機構の詳細と活性化部位を明らかにする目的でpropofolによるPKCトランスロケーションのさらなる解析と細胞内のPKC活性化の可視化を試みた。

【方法】PKCはconventional PKC (cPKC)、novel PKC (nPKC)、atypical PKC (aPKC)の3種類に分類される。本検討では、cPKCのPKC $\alpha$ 、nPKCのPKC $\delta$ 、aPKCのPKC $\zeta$ にGFPタグを付加したPKC-GFPをHeLa細胞およびHUVECに一過性に発現させた。Propofol誘発性PKCトランスロケーションは、蛍光顕微鏡下でタイムラプス撮影を行い観察した。細胞内局所のPKC活性化は、C kinase activity reporter (CKAR) を発現させたHeLa細胞を用いて、propofol投与によるFRET現象の経時変化から解析した。遺伝子導入はいずれも電気穿孔法を用いた。

【結果・考察】HeLa細胞において100  $\mu$ M以上のpropofol投与は、PKC-GFPのトランスロケーションを誘発した。PKC $\alpha$ とPKC $\delta$ は細胞膜に顕著にトランスロケーションし、PKC $\delta$ はGolgi体にもトランスロケーションした。PKC $\zeta$ は核膜及び核内へとトランスロケーションした。また、Ca<sup>2+</sup>を除去した状況下では、カルシウム感受性を有するPKC $\alpha$ は細胞膜ではなく核内へとトランスロケーションした。これらの結果からpropofolによるトランスロケーションはPKC分子種特異性を示すこと、一般的な受容体刺激によるトランスロケーションと異なりPKCを核内へと移行する機構が存在することが示唆された。CKARを用いたFRET解析ではpropofolによりトランスロケーションを起こしたPKCが細胞膜とGolgi体において活性化していることが観察された。本研究結果からpropofolは細胞内に浸透しPKCを局所で活性化させ、プロポフォールの機能の発揮に関与することが示唆される。

## C2-4 オートファジー誘導によるNSAIDs起因性小腸傷害治療戦略

○白川 誠<sup>1,2</sup>、中川 孝俊<sup>1</sup>、朝日 通雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪医科薬科大学・医・薬理学教室、<sup>2</sup>大阪医科薬科大学・医・4回生

非ステロイド系抗炎症薬NSAIDsは最も汎用される薬物の一つである。疼痛や発熱時には、頓服として、また、慢性関節リウマチ等の慢性疾患では、常用として内服されている。NSAIDsには胃粘膜傷害という有害事象があり、プロトンポンプ阻害薬などの胃粘膜保護薬が併用される。しかし、近年、胃粘膜傷害だけでなく、小腸粘膜にも傷害が及んでいることが分かり、胃粘膜保護薬では治療効果は限定的であり、より効果的な小腸傷害に対する予防、治療薬が望まれている。

我々は、オートファジー欠損マウス及び細胞では、酸化ストレスが高く、酸化ストレス応答の亢進が見られ、これが、NSAIDs起因性小腸傷害の軽減につながっていることを報告している。これは、オートファジーに関連する酸化ストレス応答、ERストレス応答、そして、直接、オートファジーを修飾する等、細胞保護系システムを人為的に制御できれば傷害を防げる可能性を示唆している。そこで、ERストレス応答、及びオートファジーを活性化する前処理がNSAIDs起因性小腸傷害に与える影響を調べた。NSAIDs起因性小腸傷害は、ラット小腸上皮細胞IEC6を用いて、インドメタシン (IM) による細胞傷害性をWST-8法にて、オートファジー活性の変化をウェスタンブロット法にて解析した。ERストレス誘導薬Thapsigargin による前処理は、IEC6に対する傷害を有意に抑制した。オートファジーは、栄養飢餓、AMP活性化キナーゼ活性化薬、AICAR, そして、ラパマイシンによって誘導した。これらの処理は、すべて、IMによる細胞障害をほぼ完全に抑制した。どの処理も、オートファジー指標LC3II/LC3I比を高めていた。この効果は、IEC6のオートファジーをノックダウンした細胞、IECsh*Atg5*では、観察されなかった。今回の結果は、NSAIDs投与前に、オートファジーを活性化できる薬物は、小腸粘膜傷害を防御する予防、治療薬となることを示唆している。

## C2-5 Suppression of proliferation of cholangiocarcinoma cells by miRNAs targeting L type amino acid transporter 1 downregulated in cholangiocarcinomas

○劉 星明<sup>1</sup>、大垣 隆一<sup>1,2</sup>、岡西 広樹<sup>1</sup>、奥田 傑<sup>1,3</sup>、徐 旻愷<sup>1</sup>、金井 好克<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・生体システム薬理、<sup>2</sup>大阪大・先導的学際研究機構・生命医科学融合フロンティア研究部門、<sup>3</sup>東京大・院農学生命科学・食品構造研

L-type amino acid transporter 1 (LAT1), which preferentially transports most of the essential amino acids, is highly upregulated in various cancer types and contributes to rapid growth and proliferation of cancer cells. However, molecular mechanisms responsible for the upregulation of LAT1 in cancer cell remain largely unknown. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs involved in gene silencing. They inhibit initiation of translation and induce mRNA decay, via binding to the target sequence in 3' untranslated region (3'UTR) of specific mRNAs. By using multiple open-online tools for target prediction, we previously reported 5 candidate miRNAs that are commonly predicted to regulate LAT1 expression. One of them was miR-126, a well-established miRNA targeting LAT1. One of the other candidate miRNAs indeed targeted 3'UTR of LAT1 mRNA in a luciferase reporter assay. Furthermore, transfection of the miRNA mimic significantly decreased the amount of LAT1 mRNA and protein in cultured cancer cell lines, confirming that miRNA could regulate LAT1 expression.

In this study, by using RNA-seq data from Cancer Genome Atlas, we revealed that 3 of the 5 miRNAs are significantly downregulated in cholangiocarcinoma compared to normal tissue. Correlation analysis using 284 miRNAs showed that the expression of the 3 miRNAs negatively correlate with that of LAT1 mRNA, classifying them in a group with top 5% negative correlation coefficients. Among those 3 miRNAs, we focused on the 2 miRNAs other than miR-126. Transfection of miRNA mimics significantly suppressed LAT1 expression at both mRNA and protein level in 5 cholangiocarcinoma cell lines. Moreover, proliferation of these cell lines were significantly inhibited by the miRNA mimics. Our results suggest that the decrease of these miRNAs could contribute to the upregulation of LAT1 in cholangiocarcinoma. These miRNAs could be potential tools for the suppression of cholangiocarcinoma through the attenuation of LAT1 expression.

### C3-1

## H<sub>2</sub>S産生酵素cystathionine-β-synthaseの阻害薬はボルテゾミブ耐性を獲得した多発性骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制する

○関口 富美子<sup>1</sup>、福島 志歩<sup>1</sup>、森口 晴香<sup>1</sup>、平本 志於里<sup>1</sup>、田中 宏和<sup>2</sup>、芦田 隆司<sup>2</sup>、松村 到<sup>2</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>近畿大・医・血液・膠原病内科

H<sub>2</sub>Sは、生体内においてcystathionine-γ-lyase (CSE)、cystathionine-β-synthase (CBS) または3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) によりL-cysteineから産生される。本研究では、多発性骨髄腫 (MM) におけるH<sub>2</sub>Sの役割を解明して新たな治療法を検討するため、ヒトMM由来KMS-11細胞およびプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブ (BTZ) に対する耐性を獲得したKMS-11/BTZ細胞の生存におよぼすH<sub>2</sub>S産生酵素阻害の影響を調べた。生細胞数はMTT法またはcalcein-AM法で、タンパク質発現量はWestern blotで測定した。BTZは、KMS-11細胞では10-1000 nM、KMS-11/BTZ細胞では100-1000 nMで濃度依存性に細胞数を減少させた。両細胞において、H<sub>2</sub>S供与体のNa<sub>2</sub>SとGY4173は細胞数を僅かに増加させたが、CSE阻害薬DL-propargylglycine (PPG) は1-3 mMで部分的に、CBS阻害薬aminooxyacetic acid (AOAA) は0.1-1 mMで顕著に細胞数を減少させた。なお、3-MST阻害薬の両細胞における効果は僅かであった。KMS-11/BTZ細胞はBTZ 10 nM存在下でも生存していたが、PPGおよびAOAAにより細胞数が減少し、GY4173添加によりこの細胞数減少がある程度抑制された。また、既存医薬品でCBS阻害活性を有することが報告されている芳香族L-アミノ酸デカルボキシラーゼ阻害薬のbenserazideは、0.03 mM以上でKMS-11、KMS-11/BTZ両細胞の細胞数を著しく減少させた。一方、KMS-11細胞において、BTZ 10 nMを24時間作用させるとCBSの発現量が劇的に増加したが、CSEと3-MSTの発現量は変化しなかった。以上より、KMS-11およびKMS-11/BTZ細胞の生存・増殖は主にCBSにより産生されるH<sub>2</sub>Sにより促進的に調節されており、benserazideを含むCBS阻害薬を、BTZ耐性を獲得したMMの治療に応用できる可能性が示唆された。

### C3-2

## 新規AGEs結合分子AGE-BP2がDAMPsの作用に与える影響の解析

○渡邊 政博<sup>1</sup>、豊村 隆男<sup>1</sup>、和氣 秀徳<sup>2</sup>、西中 崇<sup>2</sup>、逢坂 大樹<sup>3</sup>、王 登莉<sup>3</sup>、高橋 英夫<sup>2</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、森 秀治<sup>1</sup>

<sup>1</sup>就実大・薬、<sup>2</sup>近畿大・医・薬理、<sup>3</sup>岡山大・院医歯薬・薬理

【背景と目的】終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) とは、還元糖とアミノ基を有する分子が非酵素的に結合することによって生じる分子群である。過去に我々は、AGEsの作用メカニズムについて解析を行うなかで、AGEsが生体内の機能性分子と相互作用することにより、相手の分子の機能を変化させるメカニズムが存在する可能性を見出した。そこで、AGEs化した担体を用いて生体組織よりAGEsと結合する分子の探索を試みたところ、多くの細胞種に共通して発現する分子AGE-BP2 (仮称) を見出した。これまでの検討によりAGE-BP2は、細胞の損傷に伴い細胞外に放出され、炎症反応を引き起こすダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) と総称される分子と類似した作用をもつ可能性が示唆されている。本研究において我々はAGE-BP2の作用をより詳細に検討することを目的として、以下の検討を行った。

【方法】タグ配列を付加したリコンビナントAGE-BP2とHigh mobility group box-1 (HMGB1) の発現系を構築し、タグ配列を用いたアフィニティー精製によりリコンビナント分子を調製した。これらのリコンビナント分子をRAW264.7細胞に与え、細胞応答の変化を検討した。

【結果と考察】細胞を起炎分子、代表的なDAMPsであるHMGB1およびAGE-BP2により同時に刺激したところ、起炎分子とHMGB1によって誘導される炎症反応がAGE-BP2により抑制されることが示唆された。この結果は、AGE-BP2がDAMPsによる炎症反応の誘導に影響を与える作用をもつ分子である可能性を示唆している。

## 抗原抗体反応による肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離に対する新規ビベンジル化合物Perrottetin D及びジアセチル誘導体の抑制機序

○浅井 遥<sup>1</sup>、宮坂 真由<sup>1</sup>、初川 香穂<sup>1</sup>、村上 名誠<sup>1</sup>、武田 尚子<sup>1</sup>、加藤 紘一<sup>1,2</sup>、長島 史裕<sup>3</sup>、福石 信之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>金城学院大・薬、<sup>2</sup>名城大・薬、<sup>3</sup>第一薬科大

【背景】以前の検討により、オオケビラゴケから抽出された新規ビベンジル化合物であるPerrottetin D (PerD)及びPerrottetin Dのジアセチル誘導体 (Ac-PerD)は肥満細胞の抗原抗体反応による脱顆粒やヒスタミン遊離、サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。今回はPerD及びAc-PerDの抗原抗体反応による肥満細胞からのケミカルメディエーター遊離に対する抑制機序の検討を行った。

【方法】C57BL/6の骨髄細胞より、常法によって骨髄由来肥満細胞 (BMMC)を作成した。BMMCをIgEで感作後PerD, Ac-PerDを作用させ、FITC標識した抗IgE抗体を使用してBMMCに結合しているIgE量を測定した。また、感作後のBMMCにPerD, Ac-PerDを作用させたのち抗原を添加し、Syk, Gab2, p38, PLC $\gamma$ 2のリン酸化をWestern Blot法で検討した。さらに、PerD及びAc-PerDとFynとの結合についてドッキングシミュレーションを用いて計算を行なった。

【結果・考察】IgEの受容体であるFc $\epsilon$ RIへの刺激はFynなどのSrcキナーゼ活性化を経てSykやGab2, p38, PLC $\gamma$ 2などのリン酸化により伝達され、脱顆粒やヒスタミン遊離、サイトカイン産生につながる。薬物を作用させていないBMMCとPerDまたはAc-PerDを作用させたBMMCでは、細胞表面に結合したIgE量に有意な差はなかったが、薬物を作用させていないBMMCと比較して、PerDまたはAc-PerDを作用させたBMMCでは、Fynの下流に存在するSykのリン酸化が抑制されていた。そこで、PerDまたはAc-PerDのFynに対する影響をドッキングシミュレーションで検討したところ、PerD, Ac-PerDともFynのキナーゼポケットに結合する可能性が示された。また、Ac-PerDを作用させたBMMCではSykだけでなくGab2, p38, PLC $\gamma$ 2のリン酸化も抑制されていた。以前の検討において、PerDを作用させたBMMCは脱顆粒及びヒスタミン遊離を抑制し、Ac-PerDを作用させたBMMCは脱顆粒やヒスタミン遊離に加え、サイトカイン産生も抑制されていた。したがって、PerDはFynを阻害することでSykのリン酸化を抑制し、脱顆粒やヒスタミン遊離を抑制する可能性が示唆された。また、Ac-PerDはFyn阻害によるSykのリン酸化抑制に加え、さらにGab2のリン酸化を抑制することでその下流にあるp38, PLC $\gamma$ 2のリン酸化を抑制し、脱顆粒やヒスタミン遊離だけでなくサイトカイン産生も抑制している可能性が示唆された。

## アレルギー免疫療法を行ったマウス由来の血清エクソソームによる2型自然リンパ球からのIL-5産生の抑制

○松田 将也、清水 聖登、木下 雅稀、大森 美侑、北谷 和之、奈邊 健  
撰南大・薬

【目的】アレルギー免疫療法は、抗原に対する免疫寛容を誘導する治療法であり、その効果発現機序の一つとして、interleukin (IL)-5産生細胞であるTh2細胞ならびに2型自然リンパ球 (ILC2)の減少が報告されてきた。エクソソームは、細胞が分泌する膜小胞の一種であり、宿主細胞由来のmiRNAなどを含有することから、それを受容した細胞の機能を変化させる。しかし、アレルギー免疫療法の効果発現におけるエクソソームの役割は明らかでない。本研究では、アレルギー免疫療法の1つである皮下免疫療法 (SCIT)により喘息反応が抑制されたマウスの血清よりエクソソームを単離し、ILC2の炎症性応答に対する本エクソソームの効果を検証した。

【方法】卵白アルブミン (OVA)感作BALB/cマウスにOVA溶液を3回皮下投与することでSCITを行い、その後、OVA溶液を気管内投与することで反応惹起を行った。最終の反応惹起後、肺におけるIL-5産生、肺内の好酸球数ならびに気道過敏性を、それぞれELISA法、Diff-Quik染色法ならびにforced oscillation technique法により解析した。さらに、血清を回収し、total exosome isolation kitを用いてエクソソームを単離した。反応惹起後のマウス肺よりILC2 (Lineage<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>CD90.2<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>ST2<sup>+</sup>)をソーティングし、エクソソーム ( $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-5}$  g/ml)の存在下に72時間培養した。培養後、上清中IL-5濃度をELISA法により測定した。

【結果】(1)SCITを行ったマウスにおいては、肺におけるIL-5の産生、肺への好酸球浸潤、ならびに気道過敏性が有意に抑制された。(2)喘息マウス肺におけるIL-5産生細胞を解析したところ、ILC2のIL-5産生量は、Th2細胞のそれと比較して顕著に多かった。(3)SCITを行ったマウス由来の血清エクソソーム ( $2 \times 10^{-5}$  g/ml)存在下においてILC2を培養すると、IL-5産生が有意に減少した。

【結論】SCITを行うことで血中を循環するエクソソームのフェノタイプが変化し、そのエクソソームがILC2のIL-5産生を抑制した。今後、SCITにより変化したエクソソームのフェノタイプを詳細に明らかにすることは、アレルギー免疫療法の新規メカニズムの解明につながると考えられる。

## C3-5 Tリンパ球刺激に伴うGPR3発現上昇とNR4A2発現誘導に与える影響

○田中 茂、白榊 紘子、原田 佳奈、秀 和泉、酒井 規雄  
広島大

【背景と目的】 G-protein-coupled receptor 3 (GPR3)は神経細胞や卵母細胞に豊富に発現し、リガンド非存在下にG $\alpha$ s活性化能を有するG蛋白共役型受容体である。一方、我々はGPR3が神経細胞のみならず肥満細胞やTリンパ球刺激後早期に発現誘導することを新たに見出した。本研究ではDNAマイクロアレイを用いて、Tリンパ球刺激に伴うGPR3発現上昇が影響を及ぼす遺伝子発現を検索し、Tリンパ球におけるGPR3の役割と機能について検討した。

【方法】 Tリンパ球にはJurkat細胞（ヒト急性T細胞性白血病細胞由来）を使用した。細胞刺激にはphorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin (PMA) 100 nMとイオノマイシン1  $\mu$ g/mlを使用した。Tリンパ球刺激によるGPR3発現をsiRNAで抑制し、刺激6時間後におけるコントロールとの差異遺伝子をDNAマイクロアレイ（Affymetrix GeneChip®）にて解析した。

【結果】 Tリンパ球をPMA+イオノマイシンで刺激すると、刺激2-8時間後でGPR3 mRNA発現上昇を認めた。次に、Tリンパ球刺激に伴うGPR3発現をsiRNAで抑制し、有意なGPR3発現抑制が観察された刺激6時間後での差異遺伝子発現解析を行った。その結果、GPR3発現抑制に伴って発現減少する遺伝子として、転写因子NR4A2(nurr1)を同定した。Real-time RT-PCRを用いた発現解析により、Tリンパ球刺激に伴うGPR3発現誘導と、NR4A2発現には正の相関性を認めた。さらに、GPR3発現によるNR4A2発現上昇は、PKC、PKA、MAPキナーゼ阻害剤で有意に抑制されたが、PI3キナーゼ阻害剤では抑制されなかった。さらにNR4Aの転写活性はGPR3発現と正の相関性を認めた。

【結論】 Tリンパ球細胞刺激後早期に発現上昇するGPR3は、NR4A2発現やその後のプロモーター活性を上昇させ、Tリンパ球機能を修飾する可能性が示唆された。

## C4-1 BCG由来メンブレンヴェシクルによる宿主免疫誘導性の検討

○山口 雄大<sup>1</sup>、中尾 龍馬<sup>2</sup>、寒川 訓明<sup>1</sup>、徳留 健太郎<sup>1</sup>、松永 慎司<sup>1</sup>、富田 修平<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>大阪市立大・院医、<sup>2</sup>国立感染症研究所・細菌第一部

ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) によって引き起こされる結核は人類最古の感染症の一つでありながら、未だに年間140万の人命を奪い最大級の猛威をふるっている。唯一の確立された結核予防法は、ウシ型結核菌弱毒株BCGによるワクチン接種であるが、その予防効果は限定的である。BCGでは結核菌の侵入門戸となる呼吸器系の粘膜面での免疫成立が困難であることが、その原因の一つに挙げられる。そのため、粘膜免疫誘導性の高い新たなワクチン開発が求められている。本研究では、BCG由来の細胞外小胞（メンブレンヴェシクル；MV）を用いた粘膜免疫誘導型結核ワクチン開発を目指し、BCG由来MVによる免疫誘導性を検討した。

攪拌培養と静置培養の2つの異なる条件でBCGを培養し、その培養上清より超遠心法にてBCG由来MVを精製した。これら精製したMVでマクロファージ様細胞THP-1を刺激し、遺伝子発現を解析することで自然免疫誘導性を評価した。興味深いことに、静置培養で得られたMV (pellicle-MV) ではinterleukin (IL)-6やtumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  など炎症性サイトカインの遺伝子発現が有意に増加するのに対し、攪拌培養で得られたMV (planktonic-MV) では発現誘導は認められなかった。また、pellicle-MVによるIL-6やTNF  $\alpha$  の発現誘導は、Toll様受容体 (TLR) 2欠失THP-1細胞では完全に消失した。次に、MVの獲得免疫誘導性を評価するため、6週齢雌性BALB/cマウスに対し、MVの経鼻免疫を行った。唾液、肺胞洗浄液、鼻腔洗浄液中の抗結核菌抗体は、pellicle-MV免疫群で有意な増加が認められたが、planktonic-MVは増加していなかった。

以上の結果から、pellicle-MVは自然免疫誘導性と獲得免疫誘導性を有することが明らかになった。Pellicle-MVは、粘膜免疫誘導型の新たな結核ワクチン候補として有望であることが示唆された



## C4-2

### マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを用いた肺線維化におけるマクロファージ老化の関与の検討

○細谷 征矢<sup>1</sup>、酒井 梨玖<sup>1</sup>、竹之内 康広<sup>2</sup>、北風 圭介<sup>2</sup>、坪井 一人<sup>2</sup>、岡本 安雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>川崎医療福祉大学・医療技術学部、<sup>2</sup>川崎医科大・薬理学

【目的】様々な加齢関連疾患の発症や病態悪化に対し老化細胞の関与が強く示唆されており、特発性肺線維症の肺でも老化細胞が多く観察されている。我々の以前の研究においても抗がん剤ブレオマイシン腹腔内反復投与肺線維症モデルマウスの肺で肺胞上皮細胞とマクロファージの細胞老化を確認しているが、それぞれの細胞の老化が線維化に及ぼす影響は明らかになっていない。本研究では、細胞老化誘導因子であるp16をマクロファージ特異的にノックアウトしたマウスを用い、肺線維化におけるマクロファージの老化の関与を検討した。

【方法】p16-floxマウスとLysM-Creマウス（マクロファージ特異的Creマウス）を交配し、マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスを作出した。作出したマウスに4週間ブレオマイシン（2回/週、35 mg/kg body weight）を腹腔内投与することにより肺線維症モデルマウスを作製し、肺摘出および気管支肺胞洗浄液（BALF）の回収を行った。肺線維化の評価は、肺組織切片を用いたSirius Red染色とBALFを用いた可溶性コラーゲン定量、細胞数カウントおよびタンパク定量により行った。

【結果および考察】ブレオマイシン投与により野生型のマウスの肺は、Sirius Red染色によるコラーゲン蓄積が観察され、BALFにおいても可溶性コラーゲン、細胞数およびタンパク量の増加が見られた。マクロファージ特異的p16ノックアウトマウスにおいてもこれらの所見は認められ、野生型マウスと比べて差が見られなかった。今後、肺における線維化関連因子の遺伝子発現やタンパク発現について検討する予定である。

## C4-3

### 治療抵抗性前立腺癌におけるVEGFR3の寄与とMAZ-51の抗腫瘍効果の検討

○山村 彩<sup>1</sup>、Md Junayed Nayeem<sup>1</sup>、村松 洋行<sup>2</sup>、中村 小源太<sup>2</sup>、佐藤 元彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>愛知医科大・医、<sup>2</sup>愛知医科大・医・泌尿器科学

前立腺癌にはアンドロゲン受容体が関与するため、抗アンドロゲン受容体を阻害するホルモン療法が有効である。しかし、一部には、治療抵抗性前立腺癌や転移性前立腺癌も存在する。転移性前立腺癌においては、アンドロゲン受容体とは別の経路がその病態形成に関与している可能性が考えられる。本研究では、アンドロゲン受容体陽性または陰性細胞株を用いて、チロシンキナーゼ受容体の一種である血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）の機能発現を解析した。前立腺上皮細胞株（PrEC）、アンドロゲン受容体陽性前立腺癌細胞株（LN-CaP）、アンドロゲン受容体陰性前立腺癌細胞株（PC-3、DU145）を用いた。ウエスタンブロット法を用いて受容体タンパク質発現、MTTおよびBrdUアッセイを用いて細胞増殖、トランスウエル法を用いて細胞遊走、ヌードマウスを用いて *in vivo* 腫瘍形成を解析した。VEGFRのうち、VEGFR3の発現がアンドロゲン受容体非依存性のPC-3細胞株で最も高かった。VEGFR3のリガンドであるVEGFCはVEGFR3のリン酸化や細胞遊走を亢進し、この効果はVEGFR3の選択的阻害薬であるMAZ-51やVEGFR3ノックダウンにより抑制された。MAZ-51は濃度依存的に細胞の生存率や増殖も抑制した。さらに、MAZ-51はヌードマウスに移植したPC-3細胞の腫瘍形成を濃度依存的・時間依存的に抑制した。本研究成果によって、VEGFR3が転移性前立腺癌治療薬の新たなターゲットになる可能性が示された。

## ダイヤモンドセンサを用いた血漿中分子標的薬パゾパニブ迅速濃度測定機の開発

○緒方 元気<sup>1,2</sup>、齋木 琢郎<sup>3</sup>、澤村 晴志朗<sup>2</sup>、ラズビナ オリガ<sup>4</sup>、渡邊 航太<sup>4</sup>、加藤 理都<sup>4</sup>、浅井 開<sup>1</sup>、松本 吉史<sup>3</sup>、森山 雅人<sup>3</sup>、西條 康夫<sup>3</sup>、栄長 泰明<sup>1</sup>、日比野 浩<sup>2</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大・理工・化学科、<sup>2</sup>大阪大・院医・統合薬理、<sup>3</sup>新潟大・院医歯・腫瘍内科、<sup>4</sup>新潟大・医

経口分子標的薬の抗がん剤は、従来の殺細胞薬に比べ毒性が軽微とされている。しかしながら、それでもなお投与開始後の早期から特有の有害事象に遭遇することが少なくない。これらの薬剤は、体表面積などによる患者ごとの投与量調節を行わず固定用量で投与を開始するが、近年、患者間の血漿中濃度の多様性や、濃度と治療効果・有害事象との関連が着目されている。これらの知見から、患者一人ひとりに対し、血漿中の薬物濃度に基づいて投与法を個別化・最適化することが重要と考えられるようになってきた。しかし、薬物濃度測定の主流である質量分析は、高価であるため、多くの医療施設では設置できない。さらに外注の場合、検査結果を得るまで1~2週間を要する。つまり臨床現場での迅速かつ簡便な測定法が確立していないため、分子標的薬のモニタリングと治療への活用は不十分である。そこで本研究では、この課題にアプローチするため、従来の素材より安定した反応を示すダイヤモンドセンサを駆使して、小型の迅速測定装置を創出した。標的薬物として、チロシンキナーゼ阻害薬であるパゾパニブを選択した。基礎実験として、採取したラット血漿にパゾパニブを添加し測定法を検証した。除タンパクのために、薬を含む血漿サンプル100  $\mu\text{L}$  に対しアセトニトリルを添加し攪拌した。続けて、サンプルを20,000 Gで2分間遠心し、上清100  $\mu\text{L}$  をダイヤモンドセンサにて測定した。その結果、推奨治療濃度域をカバーする0~150  $\mu\text{M}$  で定量が可能であった。測定は約35秒の短時間で、サンプル処理を含む全工程が10分以内で完了した。次に、パゾパニブをラットにパゾパニブを経口投与したのちに採血し、血漿中濃度の経時変化を測定した。 $T_{\text{max}}$  は~4時間となり、先行研究における薬物動態の結果と類似していた。さらに、測定チャンバーの改良により、手のひらサイズのデバイスを作製した。これにより、測定感度は維持しつつ省スペースでの測定が可能となった。迅速、簡便、安価な本計測法の展開により、経口分子標的薬のオーダーメイド治療が可能になると期待される。

## マクロファージによるLPS細胞内取り込みに対する終末糖化産物の影響

○西中 崇<sup>1</sup>、北浦 淳寛<sup>2</sup>、ハティポール オメル ファルク<sup>1</sup>、和氣 秀徳<sup>1</sup>、森 秀治<sup>3</sup>、西堀 正洋<sup>4</sup>、高橋 英夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・医、<sup>2</sup>近畿大・医・麻酔科学、<sup>3</sup>就実大・薬・生体情報学、<sup>4</sup>岡山大・院医歯薬・薬理学

【目的】糖尿病患者は感染症に罹患しやすいことが知られており、その背景として免疫機能の低下が考えられる。グラム陰性菌がもつ内毒素であるlipopolysaccharide (LPS)に対する反応性やクリアランスの低下が糖尿病患者において認められる。したがって、LPSの認識に関与する分子 [Toll-like receptor 4 (TLR4)、CD14、MD-2] を介したシグナルの低下が糖尿病によって誘導されていることが示唆される。高血糖状態が持続することによって血液や組織中に advanced glycation end products (AGEs) が蓄積し、組織障害を誘導することが知られている。AGEsの中でも、glycolaldehyde とタンパク質の反応によって生成されるAGE3は特に強い生理作用を示す。本研究では、LPSに対するマクロファージの免疫応答におけるAGE3の影響について解析した。

【方法】マウス由来マクロファージ様細胞のRAW264.7細胞を用いた。LPSの細胞内取り込みを評価するために、蛍光標識したLPSを細胞に処置後、蛍光強度の変化をフローサイトメトリーならびに共焦点顕微鏡で測定した。LPSによる培養上清中サイトカイン(CXCL10)の遊離はELISAにて解析した。AGE3はglycolaldehydeとBSAを1週間インキュベートしたものを使用した。

【結果】LPSはCD14依存的にRAW264.7細胞に取り込まれた。LPS処置 24 時間後、培養上清中におけるCXCL10濃度が増加しており、このLPSによる作用は抗CD14中和抗体の処置によって抑制された。AGE3はCD14の細胞膜発現を低下させ、LPSの細胞内取り込みとCXCL10の遊離を抑制した。AGE3による抑制作用は、AGE受容体であるRAGEの阻害剤FPS-ZM1あるいは抗RAGE中和抗体の処置によって抑制された。

【考察】AGEsはRAGEを介してCD14の細胞膜発現を低下させることによってLPS細胞内取り込みを抑制し、CXCL10遊離を低下させることが示唆された。AGE-RAGE系の亢進は糖尿病において認められる免疫機能の低下に関与していることが考えられる。

D 会場



## AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) / O-GlcNAc転移酵素 (OGT) クロストークの解明

○長濱 渚<sup>1,2</sup>、中川 孝俊<sup>1</sup>、朝日 通雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪医科薬科大学・医・薬理学教室、<sup>2</sup>大阪医科薬科大学・医・5回生

運動療法は、食事療法、薬物療法と共に、主要な糖尿病治療の一つである。運動効果の一つとして、AMP活性化タンパク質キナーゼ (AMPK) の活性化が挙げられており、インスリンとは無関係に、グルコーストランスポーター4 (GLUT4) の膜移行を誘導し、インスリン抵抗性の改善に寄与している。一方、糖尿病患者は、血糖値が上昇する結果として、タンパク質のO-GlcNAc修飾が亢進している。O-GlcNAc修飾はO-GlcNAc転移酵素 (OGT) で酵素的に付加され、糖尿病に合併する心筋や血管内皮の機能不全などに関与している。AMPKはOGTの標的であり、OGTはAMPKでリン酸化されることが報告されているがその詳細は不明である。まずマウス筋芽細胞C2C12を用いて、AMPK活性化薬であるAICAR添加の影響を検討した結果、AMPKのO-GlcNAc修飾が亢進することを見出した。「AMPK/OGTクロストーク」の存在を示唆している。そのAMPK/OGTクロストークを詳細に検討するため、ヒト胎児腎細胞HEK293およびC2C12を用いて、インスリン抵抗性と関連性のあるGLUT4の膜移行を生細胞で解析するため、*Glut4*遺伝子をC2C12細胞からクローニングし、mCherryタンパク質との融合タンパク質 (GLUT4-mCherry) として発現させた。GLUT4-mCherryの発現が予想通り核周囲に認められたため、HEK293細胞及び、C2C12細胞でその安定発現株を樹立した。樹立した細胞では、AICAR及びインスリンによる膜移行が観察された。このシステムを用いてAMPK/OGTクロストークの詳細を明らかにできれば、運動療法の新たなプロトコールの開発につながる事が期待できる。

## Darbepoetin alfaの投与は、運動トレーニングを負荷した雌マウスにおいて、運動持久力を改善する

○佐和田 真一<sup>1</sup>、菅野 篤信<sup>1</sup>、遠 正太<sup>1</sup>、山田 幸佳<sup>2</sup>、村居 宏樹<sup>1</sup>、居場 嘉教<sup>1</sup>

<sup>1</sup>摂南大・大学院理工学研究科・病態薬理学研究室、<sup>2</sup>摂南大・理工・病態薬理学研究室

【背景・目的】Darbepoetin alfa (DPO) などの赤血球造血刺激因子製剤は、ドーピング禁止薬物に指定されているが、赤血球の増加が運動能力を向上させるという知見は限られている。本実験では、遊泳装置を用いた新規持久力評価系を用いて、DPOのドーピング効果を調べた。

【方法】実験には7週齢の雌性FVB/Nマウスを使用し、運動トレーニングを負荷する場合には、強制回転かごを用いた1時間の運動を、週5日間行った。トレーニングの有無による異なる条件で、DPO (10  $\mu$ g/kg/week, s.c.) を2週間投与した。遊泳試験は週1回行い、前半30分を5 L/minの流量で、5分のインターバルを挟んで、後半30分を7 L/minの流量で、流水口から35 cm地点の到達回数を計測した。持久力に及ぼす運動トレーニングの影響の検討では、マウスを2群に分け、片方の群にのみ、運動トレーニングを負荷し、上記の遊泳試験を週1回行った。運動負荷7週間後に、前脛骨筋および腓腹筋を摘出し、筋肉分解に関連する遺伝子のmRNA発現量を測定した。

【結果】DPOの投与は、運動負荷の有無に関わらず、ヘマトクリット値を顕著に増加させたが、前半30分の到達回数に有意な変化を及ぼさなかった。DPOの投与は、運動トレーニングを負荷していないマウスでは、後半30分の到達回数に影響を及ぼさなかったのに対して、運動トレーニングを負荷したマウスでは、対照群と比較して、到達回数を有意に増加させた。また、同一個体における投与前後の比較では、DPOを投与したマウスにおいて、後半30分の到達回数に有意な増加が認められた。運動トレーニングの負荷は、体重の増加を顕著に抑制し、後半30分の到達回数を顕著に減少させた。また、運動トレーニングの負荷は、前脛骨筋および腓腹筋において、myostatinおよびMuRF1のmRNA発現量を有意に減少させた。

【結論】我々が考案した持久力の評価系において、運動トレーニングの負荷が雌性マウスの持久力を低下させること、およびDPOの投与がこの持久力の低下を改善することが示された。本評価系を用いることにより、ドーピング禁止薬物の効果をマウスで検証することが可能になると考えられた。

## D1-3 新たな動物モデルを用いた肝疾患治療薬の探索

○樋口 愛菜、若井 恵里、小岩 純子、西村 有平  
三重大・院医・統合薬理学

[背景] 肝臓は代謝を担う主要臓器であり、その障害は個体機能低下の要因の一つとなる。様々な肝疾患における病態メカニズムの解明に伴い、新たな治療標的ネットワークの予測が加速する。これらの予測の検証において、遺伝子改変や薬物投与を容易に行うことができ、それらの肝臓における効果を簡便に評価できる動物モデルは有用な研究ツールとなる。

[目的] 肝細胞のアポトーシスを簡便に可視化できるゼブラフィッシュを用いて、薬物性肝障害に対する庇護薬の効果解析することにより、このアプローチを用いた肝疾患治療薬探索の有用性を検証すること。

[方法] 肝細胞におけるcaspase 3の活性化を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により可視化できるゼブラフィッシュ仔魚 (受精後4日目) に、アセトアミノフェン (APAP, 10 mM, 12時間) とイソニアジド (INH, 6 mM, 24時間) を投与し、薬物性肝障害モデルを作成した。また、庇護薬としてウルソデオキシコール酸 (UDCA, 100 microM) とオベチコール酸 (OCA, 25 microM) をAPAPやINHと同時に投与し、蛍光ライブイメージングを用いたFRET解析により肝細胞におけるcaspase 3の活性を定量化し、UDCAとOCAの肝保護作用を評価した。

[結果および考察] APAP、INHの単独投与によりcaspase 3活性化に伴うFRETシグナルは薬物非投与群に比べて有意に変化し、これらの薬物投与による肝細胞のアポトーシス増加が示唆された。UDCA、OCAを併用投与した場合のFRETシグナルは、薬物非投与群に比べて有意な変化は認められず、これらの庇護薬投与により、APAP、INHによる肝障害が抑制されたことが示唆された。本研究のアプローチは、様々な肝疾患に対する治療薬探索に有用であると考えられる。

## D1-4 ミトコンドリア蛋白p13の遺伝子欠損マウスにおけるグルコース恒常性の変化

○植野 寛貴<sup>1</sup>、原 さとみ<sup>1</sup>、松尾 若奈<sup>1</sup>、橋本 均<sup>1,2,3,4,5</sup>、新谷 紀人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大・薬、<sup>2</sup>大阪大・院連合小児・子どものこころセンター、<sup>3</sup>大阪大・データビリティフロンティア機構、<sup>4</sup>大阪大・先導的学際研究機構、<sup>5</sup>大阪大・院医・分子医薬

p13はII型糖尿病モデルマウスの膵島における発現減少を指標に同定されたミトコンドリア局在蛋白質である。これまでに私たちは、p13を膵島に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、本マウスではII型糖尿病下選択的に、平均膵島サイズの増加や酸化ストレスの減少などが認められることを明らかにした。そこで今回私たちは、内因性のp13の機能を明らかにするため、p13の遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、その膵内分泌機能を解析した。膵組織切片の組織化学的検討からは、膵臓量の有意な減少が示されたが、膵島数や平均膵島サイズには有意な変化は見られなかった。しかし、膵島を大きさ別に解析すると、切片上において面積 $0.001 \mu\text{m}^2$ 未満となる極めて小さい膵島の数や割合が、p13-KOマウスでは有意に増加していることが分かった。さらに、インスリンやグルカゴン染色の結果から、p13-KOマウスでは膵島面積に対するグルカゴン陽性面積が有意に増加しており、グルカゴン陽性面積をインスリン陽性面積で除した値も有意に増加していた。またグルコース負荷試験を行ったところ、p13-KOマウスではグルコース投与後の血糖値上昇が大きく低下することが分かった。これらの結果から、内因性のp13はグルコース恒常性において重要な働きを担うことが明らかになり、p13-KOマウスのグルコース恒常性異常の分子病態として、膵島のサイズ分布や、膵島内での $\alpha$ 細胞と $\beta$ 細胞の構成比の異常が示唆された。

## D1-5 ラット松果体細胞の電位依存性K<sup>+</sup>チャネルに対するメラトニンの抑制作用

○安藤 駿佑、三島 寛貴、鈴木 良明、山村 寿男  
名古屋市立大・院薬・細胞分子薬効解析学

松果体は脳内に存在する内分泌器官であり、ホルモンの一種であるメラトニンの合成・分泌が行われる。松果体より分泌されたメラトニンは、生体内に発現しているメラトニン受容体を活性化することで概日リズムの形成などの様々な生理作用を発揮し身体機能の調節を行う。当研究室ではこれまでに、松果体細胞には電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルやCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル、Ca<sup>2+</sup>活性化Cl<sup>-</sup>チャネルが発現し、これらのイオンチャネル活性が松果体機能の発揮に重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかし、メラトニン自身の松果体イオンチャネルに対する作用は不明である。本研究では、松果体細胞に発現する電位依存性K<sup>+</sup>チャネル (Kvチャネル)に対するメラトニンの作用を解析した。

ラット松果体において、リアルタイムPCR法を用いてKvチャネル (Kv1~12)のmRNA発現解析を行った結果、Kv4.2チャネルの高発現が認められた。ホールセルパッチクランプ法を適用し、ラット松果体細胞に脱分極刺激を行ったところ、電位依存性の外向き電流が観察された。この外向き電流はKvチャネル阻害薬である4-アミノピリジン (5 mM)に感受性を有した。これらの結果から、ラット松果体細胞において、Kv4.2チャネルが機能発現していることが示唆された。次に、メラトニン (1 μM)を投与したところKvチャネル電流の抑制が認められた。さらに、メラトニンによるKvチャネル電流の抑制作用にメラトニン受容体が関与するかを検討するため、メラトニン受容体阻害薬であるルジンドール (1 M)存在下でメラトニンの効果を解析した。その結果、ルジンドール存在下においてもメラトニンによるKvチャネル抑制作用が同様に認められた。

本研究より、メラトニンは松果体に発現するKv4.2チャネルなどのKvチャネルに直接作用し、そのチャネル活性を抑制することが示唆された。本研究成果は、メラトニンによる松果体機能調節の解明に有益な情報となることが考えられる。

## D2-1 免疫チェックポイント阻害剤非感受性LLC1腫瘍に対するPGE<sub>2</sub>-EP<sub>2/4</sub>阻害剤の抗腫瘍効果および作用機序の解明

○村田 紘規、Thumkeo Dean、成宮 周  
京都大・院医

抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体など、がんに対する獲得免疫反応を促進する免疫チェックポイント阻害薬の成功は、がん微小環境での免疫回避メカニズムの研究ががん細胞そのものの研究と同様、極めて重要であることを裏付けた。しかし、免疫チェックポイント阻害薬の課題は、有効ながんに対しても奏効率が約3割に止まり、無効ながんも多いことである。そこで本研究では、抗PD-1抗体非感受性マウス肺がんLewis Lung carcinoma (LLC1) 腫瘍皮下担がんモデルを用いて、脂質性炎症メディエーターの1つであるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)の受容体EP<sub>2</sub>とEP<sub>4</sub>の阻害剤における腫瘍増殖抑制作用を検討した。さらにsingle cell RNA sequencing (scRNA-seq)技術を取り入れることにより、EP<sub>2/4</sub>阻害剤投与下におけるLLC1がん微小環境内の免疫細胞種の遺伝子シグネチャー変化を網羅的に解析した。その結果、EP<sub>2/4</sub>阻害は、NFκB関連遺伝子のダウンレギュレーションを介した炎症性血管新生骨髄系細胞のリプログラミングおよびmregDC-制御性T細胞軸の抑制を介して抗腫瘍免疫を増強することを明らかにした。この結果は抗PD-1抗体が抗腫瘍作用を発揮できない原因に一部繋がるとともに、免疫チェックポイント以外の免疫抑制メカニズムの一端を明らかにする。これらの知見は、未知のがん免疫回避・増殖促進メカニズムの存在を示唆しており、新規薬物の開発及び臨床応用に結びつく可能性がある。

## D2-2 加齢に伴う骨恒常性維持機能の低下における間葉系幹細胞のCDK8の役割

○山田 孝紀<sup>1</sup>、深澤 和也<sup>1</sup>、堀江 哲寛<sup>1</sup>、徳村 和也<sup>1</sup>、岩橋 咲幸<sup>1</sup>、家崎 高志<sup>1</sup>、檜井 栄一<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬理、<sup>2</sup>岐阜大院・連合創薬

老化は全身の臓器に様々な影響を及ぼす因子である。特に骨組織においては、老化によってその組成や構造の変化、あるいは機能の慢性的な低下が生じ、骨粗鬆症を含む骨関節疾患が引き起こされる。Cyclin-dependent kinase 8 (CDK8) は CDKファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼの一種である。これまでに転写プロセスの調節等に関与することが報告されているが、骨恒常性維持機構における役割は不明である。本研究では、老化による骨恒常性維持機能の低下におけるCDK8の機能的役割の解明を試みた。バイオインフォマティクス解析より、若齢マウスの骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cell/mesenchymal stromal cell: MSC) よりも老齢マウスのMSCにおいてCDK8の発現レベルが高く、CDK8高発現MSC群では細胞老化関連シグナルが活性化していることが示された。遺伝子改変マウスを用いた解析では、MSC特異的CDK8欠損マウスにおいて骨量の増加および骨吸収パラメーターの減少が認められた。一方、骨芽細胞特異的CDK8欠損マウスでは著明な骨表現型は認められなかった。また、CDK8ノックダウンMSCは、signal transducer and transcription 1 (STAT1) のリン酸化低下、receptor activator of nuclear factor kappa- $\beta$  ligand (RANKL) の発現低下および破骨細胞形成支持能の低下を示した。さらに老齢マウス由来MSCは、若齢マウス由来MSCよりも高い破骨細胞形成支持能を示したが、CDK8ノックダウンによりその支持能は著明に抑制された。以上の結果から、MSCのCDK8は、STAT1/RANKLシグナルを介して破骨細胞形成を調節することで、加齢に伴う骨恒常性維持機能の低下に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## D2-3 Proximal tubules take up glucose under luseogliflozin treatment

○Zhang Anqi、中野 大介、西山 成  
香川大・医・薬理学

[Background and aim] SGLT2 at apical membrane takes glucose up into the cells, and the glucose flows across the cells and is transported to the interstitium via GLUT2 at basolateral membrane in the convoluted segments of proximal tubules. In this study, we evaluated the dynamics of a fluorescence glucose analogue, 2-NBDG, in the proximal tubules of live mice treated with or without a SGLT2 inhibitor, luseogliflozin. The influx (peak cytosolic fluorescence intensity and time to achieve the peak level), and efflux (time to halve the fluorescence intensity) of 2-NBDG in the proximal tubular cells were compared in hypo-, normo- and hyperglycemic state by multiphoton microscopy.

[Results] Neither hypo- nor hyper-glycemia did not significantly affect the 2-NBDG dynamics. There was no blood glucose level-dependent difference in the efflux of 2-NBDG. Treatment with luseogliflozin, which reduced blood glucose level in hyperglycemic group, did not show significant effects on these parameters.

[Conclusion] Neither blood glucose level nor SGLT2 inhibition affect glucose uptake dynamics in proximal tubules.



## アトピー性皮膚炎マウスの掻痒行動におけるアロプレグナノロンおよびテトラヒドロデオキシコルチコステロンの関与

○田中 里奈、田中 智之、藤井 正徳  
京都薬科大・薬学研究科・薬理学分野

【背景・目的】アトピー性皮膚炎（AD）の脳内における痒みのメディエーターはほとんど明らかではない。アロプレグナノロン（ALLO）およびテトラヒドロデオキシコルチコステロン（THDOC）は、それぞれプロゲステロンおよびデオキシコルチコステロンから5 $\alpha$ -レダクターゼを介して生合成される内因性物質であり、ともにGABAA受容体の強力な正のモジュレーターである。これまで当研究室では、ADモデルマウスにALLOを投与すると掻痒行動が増加することを明らかにしたが、THDOCがALLOと同様に掻痒行動を増強するかは不明である。また、ADマウスの自発的な掻痒行動に内在性のALLOおよびTHDOCが関与するかも明らかではない。そこで本研究では、1) THDOC投与により掻痒行動が増強するか、および2) ADマウスにおける慢性的な掻痒行動は5 $\alpha$ -レダクターゼ阻害薬フィナスチリドにより抑制されるかを検討した。

【方法】ヘアレスマウスに不飽和脂肪酸およびデンブン欠乏飼料を摂食させることにより中等度のAD症状を誘発した（ADマウス）。フィナスチリドを用いた検討では、ADマウスにダニ抗原を経皮的に反復暴露することにより掻痒行動および皮膚炎症状を増悪させた（重症ADマウス）。フィナスチリド（50 mg/kg, i. p.）は掻痒行動測定の前日および1時間前に2回投与した。

【結果】ADマウスにALLO（10 mg/kg, i. p.）を投与すると掻痒行動が有意に増加し、ALLOの作用が再現された。次にTHDOC（10 mg/kg, i. p.）を投与したところ、ALLOと同程度の掻痒行動の増強が認められた。重症ADマウスにみられる慢性的な掻痒行動はフィナスチリドの投与により有意ではないものの抑制される傾向が認められた。

【結論】THDOCはADマウスにおいてALLOと同様に掻痒行動を増強することが明らかとなった。また、フィナスチリド投与により重症ADマウスにおける掻痒行動が抑制される傾向がみられたことから、内因性に存在するALLOおよびTHDOCが重症ADに伴う痒みに関与する可能性が示された。

## 新規抗がん剤シーズACAGT-007aの膵臓癌細胞に対する効果とアポトーシス誘導機構:ERK MAPKシグナルおよびPI3K/AKTシグナルの関わり

○藤谷 佳奈<sup>1</sup>、Khandakar Golam Iftakhar<sup>1</sup>、佐藤 亮介<sup>1</sup>、高崎 輝恒<sup>1</sup>、田邊 元三<sup>2</sup>、杉浦 麗子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大・薬・分子医療ゲノム創薬学、<sup>2</sup>近畿大・薬・有機薬化学

ERK MAPKシグナル伝達経路は、増殖や分化など多様な生命機能に関わる。また、多くの臨床がんにおいて、ERKシグナル伝達経路の恒常的な活性化が報告されていることから、ERK活性を阻害する抗がん剤の研究開発が行われてきた。当研究室では、独自のMAPKシグナル調節薬スクリーニング法により、ACA（Acetoxy chavicol Acetate）の誘導体の一種であるACA-28、さらにそのリード化合物であるACAGT-007a（以下007）をERKシグナル調節薬として同定した。ACA-28および007の特徴は、ERK活性化癌細胞選択的に、ERKの活性化と細胞死を誘導することであり、これまでに悪性黒色腫やHER2過剰発現細胞に対する有効性を証明してきた。本研究では、007を用いて、ERKの異常な活性化が認められる難治性癌の一つである膵臓癌細胞に対する007のアポトーシス誘導機構について解析を行った。

膵管腺癌由来の3種の細胞株（MIA-Pa-Ca-2、T3M4、PANC-1）に対して007を添加し、細胞増殖抑制効果を測定した。その結果、007は3種の膵臓癌細胞全ての細胞増殖を抑制した。また、007はメラノーマ細胞と同様に全ての膵臓癌細胞でERKの活性化とアポトーシスを誘導したため、特に強くアポトーシス誘導がみられたT3M4細胞に焦点を当て解析した。007依存的アポトーシス誘導にERK活性が必要かを調べる目的で、007とMEK阻害剤U0126を併用した結果、ERKの活性化は阻害されたにも関わらず、アポトーシスは完全にはキャンセルされなかった。この結果から、T3M4細胞における007依存的アポトーシス誘導には、ERK MAPK経路以外のシグナル経路の関与が示唆された。そこで、細胞の生存に関わるPI3K/AKTシグナル経路に着目したところ、007はAKTの一過的活性化を誘導することが明らかになった。AKTの活性化は、アポトーシスを抑制し、細胞を生存させる方向に働くため、007によるAKTの活性化は、アポトーシスを阻害している可能性が示唆された。そこで、007とPI3K/AKT経路の阻害剤であるWortmanninを併用したところ、007によるアポトーシス誘導が明瞭に増強された。007依存的なERKとAKTの活性化に関わるシグナル因子についても検証を行ったので報告する。

## 大規模医療情報および遺伝子発現データベースを活用したバンコマイシン関連腎障害に対する予防薬の探索とその有用性の検討

○谷 友歩<sup>1</sup>、中馬 真幸<sup>2</sup>、合田 光寛<sup>3</sup>、坂東 貴司<sup>4</sup>、近藤 正輝<sup>4</sup>、國木 悠理香<sup>1</sup>、濱野 裕章<sup>5</sup>、新村 貴博<sup>4</sup>、岡田 直人<sup>4</sup>、相澤 風花<sup>4</sup>、八木 健太<sup>3</sup>、石澤 有紀<sup>6</sup>、座間味 義人<sup>4,5</sup>、石澤 啓介<sup>4,5</sup>  
<sup>1</sup>徳島大・薬・臨床薬理、<sup>2</sup>旭川医科大・薬剤部、<sup>3</sup>徳島大・総合臨床研究セ、<sup>4</sup>徳島大・薬剤部、<sup>5</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理、<sup>6</sup>徳島大・院医歯薬・薬理

【目的】バンコマイシン(VCM)は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症に対する標準治療薬である。VCMによる腎障害の発症は血中濃度に依存するため、薬物治療モニタリング(TDM)が有用である。しかし、TDM単独での完全な抑制は困難であり、新規予防法の開発が求められている。本研究では、ビッグデータ解析を活用したドラッグリポジショニング手法により、VCM関連腎障害(VIN)予防薬候補の探索、およびその薬剤の有用性を検証する基礎的実験と臨床研究を行った。

【方法】(1)ビッグデータ解析：遺伝子発現データベース(LINCS)を用いて、VINによる遺伝子発現変化を打ち消す既存承認薬を探索した。また、LINCS解析で抽出された薬剤のVIN発症に及ぼす影響をFDA有害事象自発報告データベース(FAERS)により解析した。

(2)基礎的実験：予防薬候補のVINに対する効果をVINモデルマウスで評価した。血清クレアチニン濃度(SCr)、血液尿素窒素(BUN)、尿細管障害度スコアを用いてVINを評価した。

(3)臨床研究：2006年1月～2019年3月に徳島大学病院においてVCMを使用した1115症例を対象に、VINに対する候補薬の有用性およびVCMの薬物動態に対する影響を評価した(倫理委員会承認済み)。

【結果】(1)ビッグデータ解析：LINCS解析により既存承認薬8種類が抽出された。そのうち同種同効薬である薬剤AおよびBは、FAERS解析においてもVINリスクを低下させた。2つのデータベースから共通して抽出された薬剤AおよびBを予防薬候補とした。

(2)基礎的実験：薬剤AおよびBは、VINモデルマウスにおけるSCr、BUN、尿細管障害度スコアの上昇を有意に抑制した。また、候補薬の腎障害抑制効果が示された。

(3)臨床研究：薬剤AまたはBの併用群におけるVIN発症率は、非併用群よりも有意に低く(7.7% vs 16.8%,  $P < 0.05$ )、この現象は傾向スコア解析でも確認された(併用群8.1% vs 非併用群21.6%,  $P < 0.05$ )。また、併用群と非併用群の2群間において、VCMクリアランスおよび分布容積は差を認めなかった。

【結論】ビッグデータ解析により抽出した既存承認薬AおよびBは、VINの抑制に有用であることが示された。得られた候補薬は、VIN予防薬になり得ることが示唆された。

## オキサリプラチン誘発末梢神経障害に対するスタチン系薬剤の予防効果

○梶本 春奈<sup>1</sup>、森山 大嗣<sup>1</sup>、相澤 風花<sup>2</sup>、新村 貴博<sup>2</sup>、座間味 義人<sup>1,2</sup>、合田 光寛<sup>3</sup>、八木 健太<sup>3</sup>、濱野 裕章<sup>1</sup>、石澤 有紀<sup>4</sup>、石澤 啓介<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理学分野、<sup>2</sup>徳島大学病院・薬剤部、<sup>3</sup>徳島大学病院・総合臨床研究センター、<sup>4</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学分野

【目的】オキサリプラチンは直腸・結腸がんに対して有効な白金系抗がん剤であるが、副作用として急性および慢性的末梢神経障害を高頻度で発現する。オキサリプラチン誘発末梢神経障害(OIPN)により、患者の生活の質が低下し、治療の継続が困難となる。しかし、OIPNに対する有効な治療薬はなく、治療薬の開発が喫緊の課題となっている。本研究では大規模医療情報データベースを活用したドラッグリポジショニング手法によりOIPNに対する予防薬を探索した。

【方法】OIPNを促進または抑制する遺伝子を文献レビューにより同定し、遺伝子発現データベース(LINCS)および有害事象自発報告データベース(FAERS)を用いて、予防薬となり得る既存承認薬を抽出した。C57BL/6J系統マウスの両脊髄後根神経節(DRG)を摘出し、初代培養DRG神経細胞を作製した。7日間培養した後にオキサリプラチン、予防候補薬を処置し、24時間後における神経細胞保護効果をWST8法により検討した。C57BL/6J系統雄性マウス(8週齢)にオキサリプラチン(6mg/kg, i.p)を週1回投与し、OIPNモデルマウスを作製した。予防候補薬を1日1回、2日1日間反復経口投与し、acetone testならびにvon Frey testにより冷痛覚過敏および機械的痛覚過敏に対する影響を評価した。

【結果】文献レビューにより9種類のOIPN関連遺伝子が同定され、LINCSおよびFAERSを用いた解析によりOIPN予防候補薬としてシンバスタチンが抽出された。マウス初代培養DRG神経細胞において、シンバスタチンおよびその同種同効薬であるアトルバスタチン、ロスバスタチンは、オキサリプラチンによる細胞死を抑制した。acetone testにおいて、3種類のスタチン系薬剤は冷痛覚過敏を予防しないことが示された。一方、von Frey testにおいて、3種類のスタチン系薬剤は、vehicle群と比較して、オキサリプラチンによる機械的痛覚過敏を有意に抑制した。

【考察】シンバスタチン、アトルバスタチン、ロスバスタチンは、オキサリプラチンによる慢性末梢神経障害に対する予防薬となり得ることが示唆された。

### D3-3 保険薬局における患者の睡眠状況と睡眠薬に関する満足度調査

○羽田野 光汰<sup>1</sup>、津田 理央<sup>1</sup>、松本 憲昭<sup>2</sup>、相宮 幸典<sup>2</sup>、笠松 瞳<sup>2</sup>、秋山 伶奈<sup>2</sup>、榊原 幹夫<sup>2</sup>、半谷 眞七子<sup>1</sup>、亀井 浩行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名城大・薬・病院薬学研究室、<sup>2</sup>株式会社スギ薬局

#### 【目的】

現在、不眠治療にはベンゾジアゼピン（以下BZD）及び非BZD系睡眠薬、ラメルテオン、スボレキサント（以下SUV）が主に使用されているが、特にSUVは精神科以外でのデータの蓄積が十分ではない。本研究では精神科以外の睡眠薬使用中の外来患者を対象に、不眠状況と睡眠薬への主観的評価について調査を行った。

#### 【方法】

本研究は単剤で睡眠薬を定期あるいは頓服で4週間以上使用している精神科以外の診療科の外来患者43名を対象とした。調査は、アテネ不眠評価尺度（以下AIS）による夜間の不眠と日中の眠気についての8項目の質問及び睡眠薬への主観的評価に関する21項目のアンケートを行った。なお、本研究はスギ薬局学術研究・倫理委員会の承認を得て行った。

#### 【結果】

AIS総スコアは、SUV群（ $6.0 \pm 3.2$ ,  $n=10$ ）とBZD/非BZD群（ $4.2 \pm 3.0$ ,  $n=32$ ）との間で有意な差は見られなかったが、AISの中でも日中の眠気のスコアは、SUV群がBZD/非BZD群よりも有意に高かった（ $p=0.022$ ）。また、睡眠薬に対する効果や副作用の実感等の各項目において、両群間で有意な差は認められなかった。睡眠薬の種類によらず、AIS総スコアと睡眠薬への満足度（ $r=-0.478$ ）及び効果の実感度（ $r=-0.495$ ）との間には負の相関が認められ、睡眠薬への満足度と効果の実感度には強い正の相関（ $r=0.795$ ）が認められた。さらに、AISの入眠困難のスコアと服用期間には正の相関（ $r=0.399$ ）が、AISの日中の眠気のスコアと薬識（睡眠薬の効果・副作用の知識）には負の相関（ $r=-0.362$ ）が認められた。

#### 【考察】

本研究において、SUVはBZD/非BZDと同程度の催眠作用を有しており、不眠治療の選択肢の1つになることが示唆された。しかし、SUVはBZD/非BZDと比較して、日中の眠気を誘発しやすいことが示唆されたことから、SUVを使用する際には、この点について注意喚起する必要がある。一方、睡眠薬の長期使用により入眠障害の慢性化を引き起こすことや、日中の眠気に関する副作用に対して、患者の薬識が十分でないことが示唆された。以上より、睡眠薬の適正使用において、早期介入により患者の睡眠薬への満足度や効果の実感度の向上を目指すことで入眠障害の慢性化を防ぐとともに患者の副作用に対する薬識の向上に努めることが重要である。

### D3-4 大規模医療情報データベースを用いたドラッグリポジショニングによる新規抗てんかん薬の探索

○高橋 志門<sup>1,2</sup>、武智 研志<sup>3</sup>、定作 奈津美<sup>2</sup>、濱野 裕章<sup>2</sup>、相澤 風花<sup>1</sup>、八木 健太<sup>4</sup>、合田 光寛<sup>4</sup>、座間味 義人<sup>1,2</sup>、石澤 有紀<sup>5</sup>、石澤 啓介<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>徳島大学病院・薬剤部、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理、<sup>3</sup>松山大・薬・医薬情報解析、<sup>4</sup>徳島大学病院・総合臨床研究セ、<sup>5</sup>徳島大・院医薬・薬理

【背景】 てんかんは、大脳ニューロンの過剰な放電によっておこり、けいれんなどの発作を繰り返す慢性疾患である。てんかん治療において、重要となるのが薬物治療であり、現在臨床では20種類を超える抗てんかん薬が開発され使用されている。しかし、てんかん患者の約20%は複数の抗てんかん薬に抵抗性を示す難治性てんかんであることが知られている。そのため既存の抗てんかん薬とは異なる新規薬理作用を有する抗てんかん薬の開発が望まれている。そこで、大規模医療情報データベースを用いてドラッグリポジショニングによる難治性てんかん治療薬候補の探索並びに動物実験による基礎的検証を行った。

【方法】 既存承認薬の中から抗てんかん作用を有する薬剤を探索するため、有害事象自発報告データベースであるFAERSを用いて網羅的に解析し、けいれんの発症を抑える可能性のある既存医薬品を探索した。データベース解析の結果得られた候補医薬品について、その抗けいれん作用を、てんかんモデルとして広く用いられるペンチレンテトラゾール（PTZ）キンドリングモデルを用いて検討した。

【結果】 FAERS解析の結果、ヘルペス治療薬であるacyclovirの服用患者は、cefepime投与による有害事象としてのけいれん報告割合が有意に少なかった。そこでacyclovirのプロドラッグであるvalacyclovirの抗てんかん作用を評価した。PTZキンドリングモデルマウスに対しvalacyclovir単独では抗けいれん作用を示さなかったが、キンドリング形成時の慢性投与では有意にキンドリングの形成を遅延させた。一方で、各種抗てんかん薬との併用実験を行ったところlevetiracetamとの併用で有意にけいれんスコアを低下させた。また、海馬歯状回におけるc-Fos陽性細胞の発現を有意に低下させた。

【結論】 FAERS解析の結果からてんかん治療の新たな候補薬剤として見いだされたvalacyclovirはキンドリング形成に対して有意な遅延効果を示した。既存抗てんかん薬との併用実験において、levetiracetamとの併用により抗てんかん作用を増強し、また、歯状回におけるc-Fos陽性細胞を有意に減少させた。以上の結果から、valacyclovirは興奮系の神経を抑制し抗てんかん作用を増強する可能性が示唆された。

**D3-5****ヒトiPS細胞由来アセチルコリン作動性神経細胞とpH click A $\beta$ を用いたA $\beta$ オリゴマー依存的細胞死モデルの構築と細胞死メカニズムの解析**

○福田 愛菜、西村 周泰、高田 和幸  
京都薬科大・薬・統合薬科学系

【目的】アルツハイマー病 (AD) 患者の脳内では、アミロイド $\beta$  (A $\beta$ ) が線維化して蓄積している。この過程で形成されるA $\beta$ 低分子量複合体 (オリゴマー) は特に神経毒性が高くAD病態形成に深く関与するというオリゴマー仮説が提唱されている。A $\beta$ オリゴマーの形成は一時的で、その後すぐに高分子凝集体となることから、A $\beta$ オリゴマーの解析は困難であり、本仮説に基づくモデル系の構築や機序の解明は不十分である。本解析では中性条件において凝集を開始する26-0-acyl iso A $\beta$ <sub>1-42</sub> (pH click A $\beta$ ) を用い、より安定したオリゴマー形成による*in vitro*細胞死モデルを構築し、A $\beta$ 凝集体と細胞死との関連性を解析した。さらに、AD発症初期から特異的な細胞死がみられるアセチルコリン作動性神経細胞をヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞から分化誘導し、AD病態をより反映した細胞死モデルの構築に応用した。

【方法】中性条件下でpH click A $\beta$ の経時的な凝集状態をWestern blot法で解析した。ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞やヒトiPS細胞由来アセチルコリン作動性神経細胞にpH click A $\beta$ を処置し、細胞生存率をWST-8 assayにて測定し、細胞形態は共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

【結果・考察】単量体とオリゴマーが存在するpH click A $\beta$ をSH-SY5Y細胞へ処置したところ、A $\beta$ が細胞に強固に接着して細胞死が誘導された。一方、予め線維化させたA $\beta$ を処置するとA $\beta$ の接着は確認できず、細胞死も誘導されなかった。ヒトiPS細胞由来アセチルコリン作動性神経細胞への分化誘導では、誘導から35日目においてコリンアセチルトランスフェラーゼの発現が確認され、その分化が確認できた。そこで、ヒトiPS細胞由来アセチルコリン作動性神経細胞にpH click A $\beta$ を処置したところ、A $\beta$ 接着による軸索の分断、さらにはA $\beta$ の濃度依存的な細胞死が誘導された。以上より、A $\beta$ オリゴマーの神経毒性にはA $\beta$ と神経細胞との接着が関与していることが示唆された。今回構築したヒトAD病態をより反映した細胞死モデルは、オリゴマー仮説による細胞死機序の解明やA $\beta$ オリゴマーを標的とした新規治療薬開発に応用されることが期待される。

**D3-6****スマートフォン・タブレットを用いたゼブラフィッシュ行動解析法の開発**

○若井 恵里<sup>1</sup>、後藤 太一郎<sup>2</sup>、西村 有平<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>三重大・院医・統合薬理学、<sup>2</sup>三重大・教育・理科教育

モデル動物の行動解析は、薬理学研究における基盤技術の一つであり、さまざまな手法が開発されている。小型脊椎動物であるゼブラフィッシュの行動解析を薬理学研究に利用した報告も増えており、その重要性が認識されつつある。ゼブラフィッシュの発生は比較的早く、受精後5日目には様々な行動レパートリーを示す。この時期のゼブラフィッシュの体長は3mm前後であり、特殊な装置を用いることにより、96穴プレートの各ウェル内におけるゼブラフィッシュの行動を網羅的に解析することも可能である。本研究では、近年著しく普及率が高まっているスマートフォンやタブレットのカメラ機能を利用したゼブラフィッシュの行動解析法の開発を試みた。3Dプリンターを用いて特殊なアダプターを作製し、スマートフォン・タブレットのカメラの上面に接着した。このアダプターにチャンバースライドを載せ、チャンバー内のゼブラフィッシュ仔魚の行動を記録し、公共画像解析ツールImageJのプラグインであるAnimal Trackerを用いて解析を行なった。その結果、4-aminopyridineによるゼブラフィッシュの痙攣誘発作用を定量的に評価することができた。本研究で開発した手法は、ゼブラフィッシュの行動解析を低コストかつ簡便に行うことを可能にし、様々な薬理学研究に活用しうると考えられる。

# 次世代薬理学セミナー

神経変性疾患

～診断・病態解明・予防／治療の最前線～



## A3-1 アルツハイマー病のタウ伝播を標的とした新規診断・治療法の開発

○武田 朱公<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・臨床遺伝子治療、<sup>2</sup>地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪精神医療センター・こころの科学リサーチセンター・診断・治療創生部門

認知症の原因疾患の大部分を占めるのがアルツハイマー病であるが、現時点で有効な治療法は確立されていない。病初期から強い記憶障害を呈するアルツハイマー病の臨床経過は、内側側頭葉から始まり脳内を定型的に広がる神経原線維変化（タウの細胞内凝集体）の進展様式とよく相関する。タウ病理が神経線維の連絡に沿った脳領域を進展するという病理学的知見と、細胞外タウが細胞内に取込まれて新たな凝集体を形成するという実験系から得られた知見を背景として、「タウ伝播仮説」が唱えられるようになった。タウ伝播の具体的なメカニズムは未解明の部分が多いが、アルツハイマー病の定型的な進行様式を説明する病態仮説として、また新たな治療標的として注目を集め、現在精力的に研究が進められている。

どのような種類のタウがどのような形態で細胞外へ放出され、どのような機構で次の神経細胞へ取り込まれて新たな病理を形成するのか。どのプロセスが診断や治療法開発のターゲットとなるのか。本演題では最近の研究結果を交えながら、アルツハイマー病の病態をタウ伝播の観点から考察し、新規診断・治療法開発に向けた展望と課題について論じてみたい。

### 【参考文献】

Wesseling, Takeda, et al. *Cell* 2020

Takeda et al. *Nature Communications*6:8490, 2015

Takeda et al. *Annals of Neurology*80(3):355-67, 2016

Takeda et al. *Neuroscience Research*Vol.14, pp36-42, 2019

Takeda et al. *Frontiers in Neuroscience*2019

Takeda et al. *American Journal of Pathology*187(6):1399-1412. 2017

武田朱公 『医学のあゆみ』 Vol. 273 No.1 2020 pp23-27

武田朱公 『実験医学』 Vol. 35 No.12 2017 pp210-215

## A3-2 パーキンソン病に対するiPS細胞を用いた細胞移植療法

○森実 飛鳥

神戸市立中央市民病院・CCRI・再生医療研究部

幹細胞技術の進歩を再生医療へ応用することが期待されている。パーキンソン病（PD）は2番目に頻度の高い神経変性疾患であり、細胞移植療法のターゲット疾患の1つである。PDに対する細胞移植治療では中脳型ドパミン神経前駆細胞を移植ドナーとして用いる。1980年以降、中絶胎児組織を用いたPDの細胞療法が行われてきた。症例を選べば有効であることが報告されてきた。しかし、胎児の組織を用いた治療には、ドナー供給の制限、質の不安定性、倫理的側面などの問題がある。また、米国で行われた二重盲検試験では期待された有効性が示されなかった。iPS細胞等、多能性幹細胞を用いれば理論上無制限にドナー細胞を供給でき、量と質の問題を解決できる可能性がある。我々はヒトiPS細胞から臨床グレードで使用可能なドパミン神経前駆細胞誘導のプロトコルを確立した。げっ歯類および霊長類のPD動物モデルを用い、これらの細胞の安全性と有効性を確認した。これらの非臨床研究に基づき、パーキンソン病を対象としたiPS細胞由来ドパミン作動性前駆細胞を移植する医師主導治験を2018年から行っている。本治験では移植後2年間の経過を観察する予定である。健常人由来のヒト白血球抗原（HLA）ホモ型のiPS細胞ストックを用いて、ドナー細胞の分化誘導を行っている。本治験ではドナー・ホスト間のHLAの意図的な適合は行っていない。代わりに全例で免疫抑制剤を併用している。効果判定は臨床症状の推移とMRI、PETによる画像評価で行う。

移植後の免疫反応の研究などを含め、最近の研究と今後の展望について紹介する。

### A3-3 脊髄小脳失調症治療の現状と発症予防薬の探索

○関 貴弘

熊本大学生命科学研究部薬物活性学分野

脊髄小脳変性症 (Spinocerebellar degeneration, SCD) は小脳を中心とし、脳幹・脊髄などの神経が変性する進行性の神経変性疾患であり、小脳性運動失調のほか、錐体外路障害・認知機能障害など様々な症状を示す。SCDの治療薬としては甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤であるタルチレリンが認可されているが、症状を一時的に改善する対症療法にすぎず、根本的治療法は開発されていない。日本でのSCDの有病率は10万人あたり18.6人 (2002年度調査) であり、そのうち約1/3が遺伝性と、アルツハイマー病、パーキンソン病などの他の神経変性疾患と比較して遺伝性の割合が高いという特徴がある。遺伝性SCDの大部分を占める常染色体優性遺伝性のものを脊髄小脳失調症 (Spinocerebellar ataxia, SCA) と呼び、原因遺伝子の違いによりSCA1-48に分類される。日本ではSCA3、SCA6、SCA31の順で患者が多い。様々なSCA原因タンパク質は小脳で発現が高いという特徴は持つものの、その機能は多種多様であり、共通性は見出せない。しかし、小脳神経の変性という共通の所見が観察されるため、何らかの共通の発症機序が存在すると想定される。私は様々なSCA原因タンパク質を発現させた初代培養小脳プルキンエ細胞 (PC) において、共通に樹状突起の発達低下が観察されることを見出した。PCは高度に発達した樹状突起を有する神経細胞で小脳機能に重要な役割を果たす。SCA患者死後脳ではPCの脱落が観察されることが多い。また、SCAモデルマウスでは運動失調が起こる段階ではPCは脱落しておらず、PC樹状突起の萎縮が観察される。以上の知見から、初代培養小脳PCの樹状突起発達低下はSCA共通のin vitro表現型の一つではないかと想定している。前述のようにSCAは常染色体優性遺伝性であるため、両親の病歴や遺伝子診断によりSCA原因遺伝子の保有を確認することは容易だが、現状では遺伝子診断を行っても発症を予防する方法はない。私はSCAの病態を改善し、かつ安全性の高い化合物はSCA予防薬として期待できると想定し、SCA原因タンパク質を発現する培養PCを用いて様々なSCAに共通に有効な予防薬の探索を試みてきた。本セミナーではその結果の一部を紹介する。

### A3-4 脳梗塞におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の役割

○眞木 崇州

京都大・院医・臨床神経学

神経疾患のうち、脳血管疾患は、我が国が直面する大きな課題の一つである。近年の寿命の延長に伴い、脳血管疾患の発症数は年々増加傾向にある。脳梗塞に対する超急性期の血栓溶解療法や血栓回収療法による治療法が進歩しているものの、これらの治療が可能な患者は脳梗塞全体の10%前後と限られている。脳血管疾患は、心疾患と合わせると日本人の死因の第1位であり、後遺症が残ることも多く、要介護の原因としても認知症と並んで最も多い。このことにより、脳・心血管疾患が、医療費の増大や健康寿命と平均寿命の乖離を引き起こし、社会問題となっている。

脳内に存在する神経系、グリア系、血管系細胞 (神経グリア血管単位) と、免疫系システム、血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) やリンパ管系を介した脳外細胞との多面的な細胞間相互連携により、脳恒常性が維持されている。神経疾患においては、疾患特異的な各細胞種の形質変化と細胞間相互作用の破綻が、発症や進行に関与すると考えられる。脳内の細胞種のうち、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC) がオリゴデンドロサイトの供給源という役割を超えて、脳内外の血管系・グリア系・神経系・免疫系との相互作用により、多彩な役割があることが報告されつつある。血管周囲に存在するOPCs ("Perivascular OPCs") が、発達段階においてBBB形成に関与する一方で、脳虚血病態ではBBBを破壊するサブタイプに変化することも見出されている。本発表では、脳梗塞におけるOPCの形質変化と病態への関与について紹介し、新規治療への応用可能性についても議論したい。



## A3-5 非神経細胞に着目した筋萎縮性側索硬化症の病態解明

○小峯 起、山中 宏二  
名古屋大・環境医学研究所・病態神経科学

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、大脳皮質運動野に存在する上位および脊髄前角や脳幹部に存在する下位運動神経の選択的変性と脱落によって、全身の骨格筋の筋力低下と筋萎縮を呈する進行性の神経変性疾患である。多くは孤発性であるが、5~10%は遺伝性に発症し、これまでに20種類以上の原因遺伝子が同定されている。最初に同定された *SOD1* 遺伝子は、活性酸素種であるスーパーオキシドを過酸化水素に変換する酵素をコードし、*SOD1* 遺伝子の優性変異によりALSを発症する。ヒト変異 *SOD1* タンパク質を全身に過剰発現するトランスジェニックマウス (変異 *SOD1* マウス) は、ALSの病態をよく再現するモデルとしてALS研究に頻用されている。また、このモデルは、変異による *SOD1* の酵素活性の有無に関わらずALS病態を示すことから、変異 *SOD1* タンパク質が、何らかの神経毒性を獲得していると予想されている。これまで、ALSの病巣で観察されるグリア細胞の活性化は、運動神経の変性に付随した二次的なものと考えられてきたが、グリア細胞特異的に変異 *SOD1* を除去できるモデルマウスを用いた研究により、グリア細胞に発現する変異 *SOD1* がグリア細胞にも病的変化をもたらすことが明らかになり、「非細胞自律性の神経細胞死」という概念が提唱され、近年、グリア細胞に着目した研究も盛んに行われている。さらには、近年の研究により、免疫細胞の関与も報告されており、運動神経のみならず、運動神経の周囲に存在する非神経細胞に着目したALSの病態メカニズムの解明および治療法の開発も期待されている。本講演では、非神経細胞であるグリア細胞と免疫細胞に着目した最近の我々の研究についてご紹介したい。

## A3-6 多発性硬化症の臨床と非リンパ系細胞に着目した病態解析

○白川 久志、金子 周司  
京都大・院薬

近年、中枢神経系 (central nervous system; CNS) の多くの疾患において、過剰な免疫応答が重要な役割を担うことが示されており、CNS炎症の制御が中枢神経疾患の有望な治療戦略となる可能性が挙げられているが、その詳細なメカニズムや治療標的分子に関する知見は十分ではなく、新たな病態解析に基づく創薬が求められている。

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、しびれなどの異常感覚や運動麻痺、視力障害等の多様な神経症状が再発・寛解を繰り返す慢性中枢性脱髄疾患であり、神経軸索を構成する髄鞘のミエリンタンパクに対する自己免疫応答を伴う。臨床の現場ではベースライン治療薬としてインターフェロンβ製剤等が用いられるが、強い倦怠感や消化器症状が大きな問題となっている。また、近年では末梢リンパ球の中枢への浸潤を抑制する薬物が一定の再発予防効果を発揮しているが、易感染性や進行性多巣性白質脳症等の重篤な有害事象が報告されており、末梢血リンパ球の広範かつ過度な抑制に基づく治療を長期的に継続することは非常に難しい。

TRPM2は脳や免疫系細胞に広く分布するカチオン透過性の活性酸素感受性TRPチャンネルであり、特に単球系細胞であるマクロファージやミクログリアにおける機能が数多く報告され、種々の炎症性疾患の病態に寄与することが明らかになっている。そこで我々はMSの動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおける役割を検討したところ、TRPM2欠損マウスでは野生型マウスにおけるEAE臨床スコアの増悪が顕著に抑制され、TRPM2阻害作用を有するmiconazoleの発症後投与によってもEAE臨床スコアの増悪が顕著に抑制されることが明らかとなった。骨髄キメラマウスを作製し、免疫組織化学も含めて詳細な解析を行ったところ、末梢血由来マクロファージに発現するTRPM2が活性化されることでケモカインCXCL2が過剰に産生・遊離され、好中球の局所浸潤が惹起されることで、EAEの臨床スコアが増悪していることが明らかとなった。

本発表では最後にMS病態における非リンパ系細胞の機能制御が及ぼす影響について紹介することで、新たな創薬標的に関する議論も展開したい。