

インドキシル硫酸の急性暴露はラット胸部大動脈における内皮依存性弛緩反応を減弱させる

○高柳 奎介¹、松本 貴之¹、小嶋 美帆香¹、香留 智樹¹、田口 久美子¹、小林 恒雄¹

¹星薬科大・医薬品化学研・機能形態

【目的】インドキシル硫酸は、トリプトファンから腸内細菌によって生成されたインドールが肝臓で硫酸抱合された物質で、尿毒素として生体内で様々な悪影響を来すことが知られている。糖尿病や慢性腎臓病等で腎機能が低下した際にインドキシル硫酸の血中濃度が増加し、さらなる腎機能の低下や循環器機能障害を惹起することや、血管平滑筋細胞増殖や大動脈石灰化への関与が報告されている。しかしながら、大動脈の直接的な血管機能に対する影響に関して検討したエビデンスは少ない状況である。そこでラットより胸部大動脈を摘出し、インドキシル硫酸を急性暴露させた条件で検討を行った。【方法】雄性 Wistar ラットより胸部大動脈を摘出し、脂肪組織や結合組織を丁寧に剥離しリング標本を作製した。Vehicle あるいはインドキシル硫酸 (10^{-4} M) を 30 min 処置し、phenylephrine で前収縮させた標本に対してacetylcholine (ACh)、sodium nitroprusside (SNP; nitric oxide ドナー)、及び A23187 (カルシウムイオノフォア) を累積投与することによる弛緩反応を検討した。さらに、細胞膜透過性の superoxide scavenger である PEG-SOD、organic anion transporter (OAT) 阻害薬である probenecid、NADPH oxidase 阻害薬である apocyninを処置した条件下に対する ACh、A23187 誘発弛緩反応についても検討した。【結果及び考察】Vehicle 処置群と比較して、インドキシル硫酸処置群において、ACh 誘発内皮依存性弛緩反応は減弱が認められた一方、SNP 誘発内皮非依存性弛緩反応では変化が認められなかった。これらのことより、ラット胸部大動脈においてインドキシル硫酸は内皮依存性弛緩反応の減弱を引き起こすことが示唆された。さらに、A23187によるカルシウム誘発弛緩反応にて減弱が認められたことからインドキシル硫酸は胸部大動脈において内皮細胞内のカルシウム誘発性弛緩反応に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、PEG-SOD や、probenecid 処置により ACh や A23187 誘発弛緩反応のインドキシル硫酸による弛緩反応の減弱が抑制されることから、インドキシル硫酸は OAT を介して細胞内へ移行し、superoxide を産生することでこれらの弛緩反応を減弱させていることが明らかとなった。また、apocynin はインドキシル硫酸による弛緩反応の減弱を改善しなかったことから NADPH oxidase 活性はその主たる要因ではないことが示唆された。

糖尿病時放出される MPs 中の ERK1/2 は血管内皮障害を引き起こす

○金子 望¹、田口 久美子¹、孫田 一輝¹、前田 莉邑¹、西浦 駿¹、舟見 佳夏¹、伊藤 智里¹、佐々木 実枝¹、松本 貴之¹、小林 恒雄¹

¹星薬科大学医薬品化学研究所機能形態学研究室

(目的) 糖尿病性合併症は血管内皮障害に起因しており、その要因の一つとしてマイクロパーティクル (MPs) が挙げられる。MPs は細胞膜から放出される細胞外小胞であり、当研究室において以前、糖尿病時に放出される MPs が血管内皮障害を引き起こすことを報告している。さらに、細胞外小胞が血管内の Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) の活性を調節し血管内皮障害を誘発すると報告している。そこで今回、糖尿病時に放出される MPs による血管内皮機能障害の発症機序について ERK1/2 に注目し検討した。(方法) Streptozotocin (STZ) を処置した糖尿病モデルマウス (STZ)、対照マウス (Cont)、さらに、ERK1/2 阻害剤である PD98059 (PD) を処置した STZ および Cont マウスから、それぞれ MPs を作成し、血管反応やタンパク発現について検討した。(結果・考察) STZ由来の MPs (STZ MPs) は Cont 由来の MPs (Cont MPs) と比較し MP 量の増加が認められた。STZ MPs および Cont MPs を処置した Cont 血管において共に内皮依存性弛緩反応の減弱が認められたが、MPs を洗い流した後、STZ MPs 処置群のみ、弛緩反応が減弱したままだった。このことから MPs には病態により量的な違いだけでなく性質的な違いがある可能性が示唆された。そこでまず、MPs 中に含まれるタンパクを検討した。その結果、MPs は ERK1/2 を内包しており、特に、STZ MPs では多くの ERK1/2 を内包していることが明らかとなった。また、STZ MPs を処置した Cont 血管において ERK1/2 の活性および発現の増大が認められた。このことから STZ MPs が血管内皮細胞へ接着することにより血管内の ERK1/2 活性および発現が増大し血管内皮障害を引き起こしたことが示唆された。そこで、次に ERK1/2 活性が血管内皮障害の原因ではないかと考え、PD を処置した STZ マウスの血管における弛緩反応を検討したところ、内皮依存性弛緩反応の減弱が改善された。さらに、MPs 中の ERK1/2 が血管内皮障害の原因ではないかと考え、PD を処置した糖尿病マウスより作成した STZ PDMPs を Cont 血管に処置した結果、内皮依存性弛緩反応の減弱が改善された。一方で、PD を STZ マウスの血管に直接処置しても内皮依存性弛緩反応の減弱は改善されなかった。これらから糖尿病時、MPs に含まれる ERK1/2 が血管内皮機能の低下に影響をおよぼした可能性が示唆された。以上、本研究により、糖尿病時、MPs に含まれる ERK1/2 活性を阻害することや ERK1/2 を含まない MPs の放出を目指すことが、血管内皮障害の発症を予防するのではないかと示すことが出来た。

薬物性torsade de pointes (TdP) 発生に必要な個体側の素因: 房室ブロックカニクイザルモデルでの検討

○光井 英晃¹、長澤(萩原) 美帆子²、神林 隆一²、布井 啓雄²、千葉 浩輝¹、後藤 愛¹、中瀬古(泉) 寛子^{1,2}、坂本 憲吾³、高原 章⁴、杉山 篤^{1,2}

¹東邦大・医・薬理、²東邦大・医・薬理、³(株)イナリサーチ、⁴東邦大学薬学部薬物治療学

【目的】カニクイザルに完全房室ブロック(AVB)を作製し、*dl*-sotalolによる薬物性torsade de pointes (TdP)の発生、心臓の組織・形態学的変化および神経体液性因子の反応を経時的に評価した。【方法】2-3歳齢の雄性カニクイザル(n=10)にAVBを作製後15ヵ月間、TdP誘発性、心電図、心エコー図検査による心行動態、血漿中神経体液性因子および血液・生化学的指標を1ヵ月ごとに評価した。TdPが誘発された一部の個体で病理組織学的検査および左室心筋の遺伝子発現解析を実施した。【結果】AVB作製により持続性徐脈が評価期間中維持され、*dl*-sotalolの投与によりTdPが10例中6例で観察された(～1ヵ月:1/10例、～4ヵ月:4/10例、～8ヵ月:5/10例、～12ヵ月:6/10例)。AVB作製直後には1回拍出量(5.0→4.7 mL)および左室駆出率(56→53%)が減少したが、1ヵ月後にAVB作製前の値よりも増加し(8.8 mL, 67%)、この状態は評価期間中維持された。心胸郭比はAVB作製前の52%から1ヵ月後に60%、8ヵ月後に63%へ増加した。QTcFはAVB作製前(396)と比べて作製後も変化を認めなかったが、15ヵ月の時点で初めて延長した(425)。平均血圧は、AVB作製直後に低下し(61→43 mmHg)、この低下は15ヵ月後まで維持された。血漿中神経体液性因子の内、ANPおよびアンジオテンシンIIはAVB作製前と比べて15ヵ月後に増加した(7.2→143.4 pg/mLおよび17.1→53.8 pg/mL)。血液・生化学的検査の指標は、評価期間中、正常範囲内に保たれていた。AVB作製後7ヵ月まで、*dl*-sotalolにより3回以上のTdPが誘発された個体(n=2)では、心筋線維の肥大、心筋層の線維化および心筋線維の変性・壊死が認められた。同個体の左室心筋の遺伝子発現解析では、KCMF1の発現量が1/2以下に低下していた。また、心臓の形態学的・機能的な経時変化は他の個体と同程度であったが、QT間隔がより延長していた。【結論】AVB作製後の心臓における形態学的・機能的・電気生理学的変化が薬物性TdP発生の必要条件であるが、ベースラインのQT延長が催不整脈モデルとしての完成条件と考えられた。

Microminipigの電気薬理学的特徴付け;多イオンチャネル遮断薬bepridilでの検討

○布井 啓雄^{1,2}、千葉 浩輝³、後藤 愛³、神林 隆一¹、長澤(萩原) 美帆子¹、中瀬古(泉) 寛子^{1,3}、渡邊 善則²、杉山 篤^{1,3}

¹東邦大学医学部薬理学講座、²東邦大学医学部外科学講座心臓血管外科学分野、³東邦大学大学院医科学研究科

【背景・目的】多イオンチャネル遮断薬であるazithromycin、fluvoxamineおよびoseltamivirはQT間隔をイヌでは延長したが、microminipigでは短縮した。これはmicrominipigはイヌに比べ、外向き電流(I_{Kr})よりも内向き電流(I_{Ca} , I_{Na})に対する遮断への感受性が高いことで説明されている。Bepridilの I_{Ca} , I_{Ks} , I_{Kr} および I_{Na} に対する IC_{50} はそれぞれ $0.5 < 6.2 < 13.2 < 30 \mu M$ であり、 I_{Kr} よりも I_{Ks} に対する阻害作用が約2倍強い。Microminipigに対するbepridilの電気薬理学的作用を評価し、 I_{Ks} 遮断に対する感受性を検討した。

【方法】体重約10 kgのmicrominipigをketamine (16 mg/kg)/xylazine (1.6 mg/kg)の筋注およびpropofol (1 mg/kg)の静注で全身麻酔を導入後、気管内挿管し、人工呼吸器を用いて、100%酸素通気下に1%halothaneで麻酔を維持した。0.3および3 mg/kgのbepridilを10分間かけて累積的に静脈内投与し、体血圧、左室圧および体表面心電図を測定した(n=4)。

【結果】低用量は各心血管指標に有意な変化を示さなかった。高用量は心拍数を5分で増加、15-60分で減少させた。左室圧最大上昇速度を10分で増加、平均血圧および左室拡張末期圧を5-10分で減少させた。また、QRS幅およびQT間隔を10-60分で、QTcFおよびJ-T_{peak,c}を5-60分で延長させ、T_{peak}-T_{end}を10分で短縮し、20-30分で延長した。PR間隔に有意な変化を認めなかった。再分極の各指標の薬物投与前値からQT間隔が最も延長した高用量投与後20分までの変化は、QT間隔 +196±38 ms、J-T_{peak,c} +91±15 msおよびT_{peak}-T_{end} +23±5 msであった。

【結論】Microminipigは I_{Ks} 遮断に高い感受性を有することが判明した。

チロシンキナーゼ阻害薬imatinibの心血管作用：ハロセン麻酔犬での評価

○千葉 浩輝¹、後藤 愛¹、神林 隆一²、長澤(萩原) 美帆子²、布井 啓雄²、中瀬古(泉) 寛子^{1,2}、杉山 篤^{1,2}

¹東邦大学大学院医学研究科、²東邦大学医学部薬理学講座

【背景・目的】チロシンキナーゼ阻害薬imatinibは慢性骨髄性白血病、Philadelphia染色体陽性急性リンパ性白血病およびKIT陽性消化管間質腫瘍に対する分子標的治療薬である。臨床使用ではうっ血性心不全などの心毒性が報告されているが、その発生機序を詳細に検討したin vivoの研究はない。本研究では、imatinibの心血管系に対する作用をハロセン麻酔犬モデルを用いて詳細に評価した。

【方法】体重約10kgの雌性ビーグル犬(n=4)を1%halothaneで吸入麻酔し、1および10 mg/kgのimatinibを10分間かけて累積的に静脈内投与した。心拍数、体血圧、左室圧、心拍出量、体表面心電図、His束電位図、洞調律時と心室ペーシング時の心室单相性活動電位および心室有効不応期を測定した。また、経胸壁心臓超音波検査で左室収縮能および拡張能を評価した。さらに、組織障害マーカーとして血中の心筋トロポニンI、CPK、ASTおよびLDH値を測定した。

【結果】低用量のimatinibは総末梢血管抵抗を低下、QTcを延長、血中ASTとLDH値を上昇、等容性弛緩時間を延長させた。高用量は、低用量での効果に加えて、左室内圧最大降下速度を低下、HV間隔を延長、CPK値を上昇、左室拡張末期径および左室拡張末期容積を増加させ、E/Aを1未満に低下させた。その他の指標に有意な変化を示さなかった。実験中に血行動態の破綻、左室収縮能の低下および致死性不整脈の発生は観察されなかった。

【結語】うっ血性心不全を示唆する左室拡張末期圧の上昇や肺水腫の所見を認めなかった。血中のCPK、ASTおよびLDH値が上昇したことから、細胞組織障害が左室拡張能低下に関与したと考えられた。

I_{Kr} 遮断薬による二次性QT延長症候群の病態に対する β 受容体遮断の影響の検討

○後藤 愛¹、千葉 浩輝¹、布井 啓雄²、神林 隆一²、長澤(萩原) 美帆子²、中瀬古(泉) 寛子^{1,2}、杉山 篤^{1,2}

¹東邦大学大学院医学研究科、²東邦大・医・薬理

【背景・目的】 I_{Kr} 遮断薬による二次性QT延長症候群の病態に対する β 受容体遮断の影響は明らかでない。*l*-Sotalolは I_{Kr} 遮断作用および β 受容体遮断作用を、*d*-sotalolは I_{Kr} 遮断作用のみを有するので、sotalolの光学異性体の薬理学的特徴を活用して、torsade de pointes (TdP)の発生率に対する β 受容体遮断作用の影響を検討した。

【方法】雌雄ビーグル犬にthiopental sodium(30 mg/kg, i.v.)で全身麻酔を導入後、房室結節をカテーテル焼灼し、完全房室ブロックを作製した(n=8)。作製後6週間以上経過した個体にホルター心電計を装着し、*d*-sotalol(3 mg/kg, n=4)または*dl*-sotalol(3 mg/kg, n=4)を無麻酔下で経口投与した。薬物投与前および投与後21時間の心電図を記録し、心電図各指標、および再分極過程の時間的ばらつき(STV)を評価した。STVは連続51心拍のQT間隔の1拍ごとの変化より算出した。

【結果】薬物投与前のQT間隔およびSTVは、*d*-sotalol群では 320 ± 21 msおよび 2.3 ± 0.7 ms、*dl*-sotalol群では 328 ± 21 msおよび 2.1 ± 0.4 msであり、2群間に有意差はなかった。*d*-SotalolはQT間隔を1時間後から延長し、1例で1.7時間後にTdPが発生した。TdP発生直前のSTV(Δ STV)は $3.8(+2.2)$ msであった(n=1)。その他の動物(n=3)にはTdPは発生せず、3時間後のSTV(Δ STV)は $4.4(+0.4)$ 、 $3.8(-0.2)$ および $3.2(+1.5)$ msであった。*dl*-SotalolはQT間隔を1時間後から延長し、3例で2.3、1.6および2.6時間後にTdPが発生した。TdP発生直前(n=3)のSTV(Δ STV)は $5.2(+3.0)$ 、 $4.5(+2.1)$ および $6.1(+3.8)$ msであった。残りの1例にはTdPは発生せず、3時間後のSTV(Δ STV)は $3.5(-0.2)$ msであった。STVの延長(>2 ms)が全てのTdPの発生に先行していた。

【結語】 β 受容体遮断作用により、 I_{Kr} 遮断によるTdPの誘発率が増加した。二次性QT延長症候群の高リスク患者においては、 β 受容体遮断薬は慎重に投与されるべきである。

神経幹前駆細胞における Progranulin の発現とその役割について

○長友 崇将¹、堀之北 一朗¹、林 秀樹¹、高木 教夫¹

¹東京薬科大・薬・応用生化学

【背景】脳梗塞は直接的な死を免れたとしても重篤な副作用を残す予後不良の疾患である。現在、脳梗塞慢性期に用いられている薬物は再発予防を第一義的な目的としており、治療を目的としたものはほとんど存在しない。これまでの研究で神経新生は脳梗塞によって一過性に増強されることで、障害を受けた神経回路の再生に部分的に寄与する可能性が示されている。その一方で脳梗塞後に惹起される神経新生は損傷を補えるほど十分な量の神経細胞が生まれないことに加え、新生した神経細胞の大半が神経回路に統合することなく死滅してしまう。つまり、相対的な幹細胞量および神経細胞数を増加させることが新たな治療戦略になると考えられる。Progranulin (PGRN) は糖タンパク質成長因子であり、増殖性細胞の細胞増殖、腫瘍形成に関与していることが報告されている。そこで本研究では神経幹細胞におけるPGRNの発現およびその影響について検討を行った。

【方法】ラット初代培養神経幹細胞をNeurosphere 法で培養し細胞レベルで発現量の変化を検討した。また、recombinant PGRN (rPGRN) 処置による自己増殖能および多分化能への影響について検討を行った。

【結果・考察】本研究で用いた神経幹細胞は経日的に sphere 径が増大し、かつ多分化能を有していた。また、oxygen-glucose deprivation (OGD) 処置により神経幹細胞は増殖し、これら細胞のPGRN は神経幹細胞のマーカーであるNestin と共局在していた。さらに、rPGRN 処置により、増殖能および神経細胞への分化が増強された。次に神経幹細胞の増殖機序について検討した結果、rPGRN 処置によりPI3K/Akt 経路が活性化されることで細胞増殖が増強される可能性を示した。また、神経幹細胞の分化能に及ぼす効果を検討した結果、rPGRN処置は神経細胞マーカーであるβ3-tubulin の割合を増大させた。これらの結果は、病態時においてPGRNが神経幹細胞の増殖と分化に寄与し、脳神経障害に対する新たな治療標的になる可能性を示した。

脳梗塞後のProgranulinおよびGranulinの変化

○橋木 りか¹、堀之北 一朗¹、林 秀樹¹、高木 教夫¹

¹東京薬科大・薬・応用生化学

【背景】Progranulin (PGRN) は、糖タンパク質成長因子であり、脳虚血や脳出血後の神経炎症や血管障害に対して保護的に作用することが報告されている。一方、好中球エラスターゼにより PGRN が切断されて生じる granulin (GRN) は炎症を誘導することが報告されている。本研究では脳梗塞モデル動物を用いて PGRN および GRN レベルの経日の変化を解析し、それらの病態生理学的意義について検討した。

【方法】ヒト多発性梗塞を模倣したラットマイクロスフェア脳塞栓 (ME) モデルを作製しPGRN および GRN 発現量の把握を試みた。PGRNおよびGRN の変化は western blot法、qPCR 法および免疫組織染色法を用いて検討した。また、PGRNの切断酵素である好中球エラスターゼ選択的阻害薬シベレスタットをME後の動物に投与し、PGRNおよびGRN の発現について検討した。

【結果・考察】PGRN のタンパク質量は、ME 後 3 日目で増加し、それらは虚血側大脳皮質のミクログリアに局在していた。大脳皮質エラスターゼ活性は ME 後 1 日目から上昇した。また、PGRN の分解産物である GRN タンパク質量は ME 後 1 日目から増加した。さらに、シベレスタット投与により好中球エラスターゼ活性の上昇が抑制され、PGRNタンパク質量が増加し、GRNタンパク質量は減少した。また、シベレスタット投与後のTUNEL陽性細胞数は減少した。本研究結果は ME 後のミクログリアで PGRN の発現が増加することを明らかとした。また、虚血後早期の脳内好中球エラスターゼ活性の上昇が、PGRN の切断を誘導し、GRNを産生することで炎症反応を惹起する可能性が示された。さらに、選択的好中球エラスターゼ阻害薬であるシベレスタットの投与により PGRN の切断が抑制され、かつ TUNEL 陽性細胞数が減少した。本研究結果は ME 後の GRN の産生が脳梗塞後の炎症性脳障害の進展に寄与する可能性と、シベレスタットが PGRN タンパク質量の増加と GRN 量の減少による多面的な作用を発揮することで脳梗塞急性期の脳障害改善に寄与する可能性を示した。

脳梗塞後の DNMTs の変化に関する研究

○菊入 健斗¹、村上 健二郎¹、岩崎 良¹、浅田 眞由美¹、林 秀樹¹、袁 博²、高木 教夫¹

¹東京薬科大・薬・応用生化学、²城西大・薬・薬品作用

プロモーター領域で DNA メチル化が起こると転写が抑制され、遺伝子発現が変化する。一般に、DNA メチル化は DNA methyltransferases (DNMTs) によりシトシンが 5-methylcytosine (5mC) になることを指す。近年、DNA メチル化は疾患の病態形成に関与していると注目されている。これまで、DNMTs 活性の抑制は脳梗塞後の梗塞領域を減少させ、また筋萎縮性側索硬化症では運動神経のアポトーシス誘導に DNMTs が関与していると報告されている。しかしながら、脳梗塞後の DNA メチル化の詳細な役割は明らかとなっていない。本研究では脳梗塞病態での DNA メチル化酵素の変化について検討を行った。

本研究では一過性局所脳虚血を模倣するラット中大脳動脈閉塞再灌流 (middle cerebral artery occlusion / reperfusion : MCAO/R) モデルを用いた。はじめに、明確な梗塞巣が観察される MCAO/R 後 24 時間目までの DNMT3a タンパク質量を検討した。その結果、梗塞巣周辺領域での DNMT3a タンパク質量は MCAO/R 後 10 時間目で sham 群と比較し変化しなかったが、16 時間目から増加し、その増加は 24 時間目まで持続していた。そこで、MCAO/R 後の DNA メチル化を確認するため、MCAO/R 後 16 および 24 時間目に 5mC 陽性細胞の局在を免疫組織学的に検討した。その結果、MCAO/R 後 16 および 24 時間目の 5mC 陽性細胞は、DNMT3a 量の増加が観察されなかった梗塞巣中心領域で増加していた。またそれらの 5mC 陽性細胞は NeuN 陽性の神経細胞であった。

以上の結果より、脳梗塞後の細胞障害と DNA メチル化の関係についてさらに検討する必要があるものの、脳梗塞後早期から DNA のメチル化が惹起され、DNMTs による DNA メチル化の制御は時間的および場所的に異なる可能性が示された。

虚血性脳神経障害時の LRP1 プロセッシングと神経細胞死の関連

○今村 唯¹、堀之北 一朗¹、林 秀樹¹、高木 教夫¹

¹東京薬科大・薬・応用生化学

【背景】脳血管が閉塞することにより細胞が虚血状態に陥ると興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の大量放出が惹起される。過剰なグルタミン酸の放出は *N*-methyl -D-aspartate (NMDA) 受容体を介した神経細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入を誘導し神経細胞死を惹起する。本研究ではこれまでの網膜神経節細胞を用いた研究で、グリア細胞から放出されるアポ E を含む lipoprotein (LP) がグルタミン酸誘発性の神経細胞死に対して保護効果を発揮することを報告している。その機序として low density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) を介する NMDA 受容体依存性の過剰なカルシウム流入の制御機構を明らかにした。本研究では初代培養大脳皮質神経細胞および初代培養神経幹細胞を用いて虚血性神経障害後の LRP1 の変化と神経細胞生存の関連を解析した。

【方法】初代培養大脳皮質神経細胞は、胎生 16 日目のラットから単離し 10 日間培養した。初代培養神経幹細胞は 7 日間培養した後、分化誘導を行った。分化誘導後 3 日目の細胞を実験に使用した。NMDA 受容体のリガンドである NMDA、グルタミン酸または oxygen-glucose deprivation (OGD) 処置により細胞死を誘導した。各処置後 4 時間目に western blot 法で各種タンパク質量、24 時間目に細胞生存率を検討した。

【結果・考察】初代培養大脳皮質神経細胞は NMDA 処置および OGD 処置により神経細胞死が誘導され、この細胞死に伴い処置後 4 時間目には LRP1 の細胞内ドメイン (ICD) の産生が惹起された。また、この細胞死に伴う ICD の産生は、グルタミン酸および OGD 処置後の神経幹細胞においても同様に観察された。すなわち、本研究は NMDA 処置により大脳皮質神経細胞の LRP1 の切断が誘導されるとともに ICD が産生されることを示した。また、この ICD の産生はグルタミン酸および OGD 処置後の分化誘導後神経幹細胞においても観察された。本研究結果は、大脳皮質神経細胞および神経幹細胞が LRP1 の切断機構を有し、この機構による ICD の産生が病態形成に関与する可能性を示した。これらのことから、本研究は LRP1 の切断機序の解明とその抑制が神経細胞保護に寄与する可能性を示した。

脳虚血後早期の DNA メチル化と神経細胞死

○浅田 眞由美¹、林 秀樹¹、菊入 健斗¹、村上 健二郎¹、袁 博²、高木 教夫¹

¹東京薬科大・薬・応用生化学、²城西大学薬学部薬品作用学

遺伝子発現制御機構の一つに、プロモーター領域の DNA メチル化が知られている。DNA メチル化は主に、CpG ジヌクレオチドのシトシンに起こるとされている。DNA methyltransferases (DNMTs) はシトシンの 5 位にメチル基を転移し 5-methylcytosine (5mC) を生成する。プロモーター領域の DNA メチル化は転写因子の結合を物理的に妨げることや、クロマチン構造の変化を介して遺伝子発現を転写レベルで制御している。近年、多くの疾患の病態形成に DNA メチル化が関与していることが報告され、注目を集めている。その中で、DNMTs 阻害薬の投与は脳梗塞モデル動物の梗塞面積を減少させることが報告されているものの、その詳細は未だに明らかにされていない。そこで本研究では、脳梗塞後の DNA メチル化の変化と病態形成との関連について検討した。

初めに、一過性局所脳虚血後の DNA メチル化をラット middle cerebral artery occlusion / reperfusion (MCAO/R) モデルを用い検討した。免疫染色法により 5mC の局在を検討した結果、MCAO/R 1日後の大脳皮質梗塞領域で 5mC 陽性細胞が観察され、かつこれらの細胞は NeuN 陽性の神経細胞であった。そこで、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いてさらなる検討を行った。脳梗塞病態を模倣するため、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 処置により神経細胞死を誘発した。NMDA 処置後の DNMT3a (*de novo* 型 DNA methyltransferase) タンパク質量を経時的に検討した結果、NMDA 処置 1 時間後までのタンパク質量はコントロール群と同程度に維持されていたものの、処置 8 時間後までのタンパク質量はコントロール群と比較し減少した。また、5mC 陽性細胞数は、NMDA 処置 30 分後をピークに増加し、それ以後の 5mC 陽性細胞数は減少に転じた。さらに、DNMT 阻害薬 (RG108) の投与は NMDA 誘発神経細胞死を抑制した。

これらのことから、虚血後早期に惹起される DNA メチル化は脳梗塞の病態形成に関与している可能性が示された。

担がんマウスにみられる恐怖記憶の変化に対するグリア細胞由来のサイトカインの関与

○菊田 みなみ¹、山岸 愛実¹、早川 夏美¹、米持 奈央美¹、亀井 淳三²、清水 孝恒³、武藤 章弘³、池田 弘子¹

¹星薬科大・薬・薬物治療、²星薬科大・薬・生体分子薬理、³星薬科大・薬・病態生理

がんは日本人の死因の第一位であり、その罹患率は年々増加している。がん患者では精神疾患の罹患率が高いことが報告されているが、その詳細は明らかではない。悪性腫瘍は、サイトカイン等の様々な物質を産生・放出し、全身に影響を及ぼす。一方で、最近になって精神疾患の発症にサイトカインが関与する可能性が指摘されている。したがって、がん患者における精神疾患の発症にサイトカインが関わる可能性が考えられる。そこで本研究では、骨肉腫細胞 (AXT細胞) を移植した担がんマウスを用いて、恐怖記憶の変化とサイトカインの関与について検討した。まず恐怖記憶の消去学習試験を行ったところ、対照群では経日的にすくみ行動持続率が低下したものの、AXT細胞移植群では試験期間中すくみ行動持続率は低下しなかった。このことから、担がんマウスでは恐怖記憶の消去学習が障害されていることが示唆された。次に、恐怖記憶に関与する海馬と扁桃体のサイトカイン量を測定した結果、AXT細胞移植群の海馬ではinterleukin (IL) -2およびkeratinocyte-derived cytokine (KC) が、扁桃体ではIL-17およびKCが増加した。そこで、これらのサイトカインのmRNA量をreal time PCR法で測定したところ、AXT細胞移植群の海馬および扁桃体のどちらにおいてもKC mRNA量のみ増加した。次に、未処置マウスにIL-2、IL-17またはKCを脳室内投与したところ、KC投与群のみすくみ行動持続率が増加した。一方、サイトカインはグリア細胞で産生されることが報告されていることから、海馬および扁桃体からMACS法によりミクログリアとアストロサイトを分画し、KC mRNA量を測定した。その結果、AXT細胞移植群の海馬および扁桃体のミクログリアとアストロサイトのどちらにおいてもKC mRNA量は有意に増加した。最後に、ミクログリア阻害薬のminocycline またはアストロサイト阻害薬のfluorocitrateを脳室内投与したところ、AXT細胞移植群におけるすくみ行動持続率の増加はminocyclineの投与によってのみ有意に抑制された。以上の結果より、悪性腫瘍の存在により海馬および扁桃体のミクログリアの活性化に伴ってKCが産生され、恐怖記憶の消去学習が障害されることが示唆された。

がん病態下における視床下部内活性化細胞の同定と脳-末梢免疫連関の解析

○吉田 小莉¹、濱田 祐輔¹、浅野 克倫¹、成田 道子¹、田村 英紀²、手塚 裕之³、山中 章弘⁴、葛巻 直子¹、成田 年^{1,2}

¹星薬科大学薬理学研究室、²星薬科大学先端生命科学研究センター、³藤田医科大学研究支援推進センター細胞機能解析室、⁴名古屋大学環境医学研究所神経系分野II

がん細胞は自身が増殖することで周囲の組織を侵食・破壊してだけでなく、多くの分子を血中に分泌することで遠位の組織にも影響を与え、内分泌系や神経系のバランスを崩し、様々な腫瘍随伴症状を引き起こす。また、腫瘍微小環境は、生体のホルモン分泌や末梢免疫応答等の均衡により制御されており、中枢を介した刺激応答はこれらの均衡を崩すことでがんを増悪させることが考えられる。一方、視床下部領域は、様々な刺激応答に伴う脳領域や末梢からの求心性シグナル入力の統合と、内分泌系や自律神経系を介した末梢への出力を担う脳領域であり、脳-末梢連関において重要な役割を担っている。従って、がん細胞から分泌された分子等が視床下部領域を介して様々な神経活動変化を引き起こしている可能性が考えられるが、詳細な検討は未だ行われていない。そこで本研究では、がん移植下における視床下部領域の活性化細胞を探索し、そこから同定された神経系を特異的に活動制御した際の腫瘍増殖への影響について検討を行った。がん移植モデルマウスは、Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞をマウスの右腰背部へ皮下移植することで作製した。視床下部領域における活性化細胞の標識は、cFos-CreER x EGFP^{Rpl10a} マウスを用いた活性化細胞標識法に従い、がん移植下で4-hydroxytamoxifen を投与することで行った。その結果、がん移植下の視床下部室傍核(hypothalamic paraventricular nucleus; PVN) 領域においてcorticotropin-releasing hormone (CRH)含有神経の著しい活性化が認められた。そこで次に、PVN 領域におけるCRH 神経を活動制御した際の腫瘍肥大化に与える影響について検討を行った。PVN-CRH神経の人為的活動制御は、CRH-Cre を用いた薬理遺伝学的手法を応用し、活性化型遺伝子改変受容体hM3Dq あるいは抑制型遺伝子改変受容体hM4Di をPVN-CRH 神経特異的に発現させたCRH-cre/hM3Dq マウスまたはCRH-cre/hM4Di マウスを作製し、遺伝子改変受容体の特異的リガンドであるclozapine N-oxideを腹腔内投与することで行った。その結果、PVN-CRH 神経の特異的活性化によって腫瘍は有意に肥大化し、一方、同神経の特異的抑制によって腫瘍肥大化の有意な抑制が認められた。さらに、CRH 神経制御下において血漿中液性因子の変化について検討を行ったところ、腫瘍増殖に相関した血漿中cortisol量の増加が認められた。以上、本研究により、がん病態下においてCRH神経の著しい活性化が引き起こされ、PVN-CRH神経の活性化により、腫瘍の増悪化が遠心性にコントロールされることが初めて立証された。