

マウス心筋細胞の生下後の機能的最終分化の分子メカニズムの解析

○川岸 裕幸^{1,2}、中田 勉³、富田 拓郎²、山田 充彦²

¹信州大・バイオメディカル研、²信州大学医学部分子薬理学教室、³信州大学基盤研究支援センター機器分析支援部門

哺乳類の心筋細胞は、出生時には依然未分化で、興奮収縮連関機構が未熟なため収縮力が弱い。しかし心筋細胞は、生下後急速に高まる全身の酸素需要に対応すべく、新生児期に肥大成長する。またこれと同時に、心筋細胞、特に心室筋細胞は機能的に高度に分化する。心室筋細胞の表面細胞膜が、細胞内に管状に入り込みT管という構造を形成する。T管では、興奮収縮連関の要であるL型Ca²⁺チャンネルが集積増加し、細胞の奥深くで活動電位に同期したCa²⁺流入を生じるようになる。流入したCa²⁺は、この時期にT管のL型Ca²⁺チャンネルと密接に配置されるようになる筋小胞体のリアノジン受容体から、細胞内で均一で強いCa²⁺遊離を生じ、安定した強い収縮力を生み出す。このような生下後の機能的分化による心機能の向上は、哺乳類にとって必須であり、その不全は致死的である。しかし、このような心筋細胞の最終分化の分子メカニズムは、未だ明らかではない。生下後の心臓内では、種々の液性因子の発現が変化することが知られている。そこで我々は、これらの液性因子を介した細胞間シグナルが、心筋細胞の最終分化に関与する可能性を考えた。そこで出生直後から30日齢までのマウスに、種々の受容体阻害薬を継続投与し、心筋細胞の最終分化への影響を評価した。その結果、SC144(gp130阻害薬)またはNintedanib(VEGF、PDGF、FGF受容体阻害薬)を投与したマウスでは、その心筋細胞の最終分化が抑制されるという知見を得た。具体的には、これらの薬物はT管形成異常、L型Ca²⁺チャンネル電流密度上昇の抑制、活動電位に伴う細胞内Ca²⁺濃度上昇の抑制、および左心室収縮能低下を引き起こした。しかしこれらの薬物による左心拡張期径増大や不整脈、心筋の繊維化は見られなかった。以上の結果は、gp130やVEGF、PDGF、FGF受容体が、心筋細胞の生下後最終分化に関与することを示唆している。我々は、これらの薬理学的スクリーニングの結果を受け、現在アデノ随伴ウイルスによる細胞種特異的CRISPR-Cas9誘導モデルマウスで、各受容体の役割についてより詳細な解析を行っている。

心筋梗塞後不全心の HSPA9 の病態生理学的変化

○矢野 絵美¹、丸ノ内 徹郎¹、鈴木 智子¹、鈴木 千春¹、田野中 浩一¹

¹東京薬科大・薬・分子細胞病態薬理

【目的】心筋梗塞後の心筋組織への過度な血行動力学的・代謝的負荷は、心筋の代償機構を破綻させ、心不全に陥らせる。慢性心不全では、ミトコンドリア機能の低下により心機能が低下する。Heat shock protein (HSP) A9 は、ミトコンドリアに局在する分子シャペロンタンパク質で、ミトコンドリアタンパク質の恒常性への関与が考えられている。しかしながら、心不全進展過程での HSPA9 の役割については未だ明らかにされていない。そこで本研究は、心筋梗塞後心不全を発症する過程での HSPA9 の病態生理学的変化を把握するために企画された。

【方法】Wistar 系雄性ラットの左冠状動脈を結紮することで、心筋梗塞動物を作製した。心筋梗塞後 2 および 8 週目の心機能を評価した後、生存心筋組織のミトコンドリア機能および各種タンパク質含量を測定した。さらに、共免疫沈降法を用いてタンパク質の相互作用について検討した。

【結果・考察】心筋梗塞後の心ポンプ機能の測定から、術後 2 週目では心機能が代償されており(心機能代償期)、8 週目で心不全に陥ったことが示された(心不全期)。心機能代償期ならびに心不全期での左心室筋組織およびミトコンドリア画分の HSPA9 含量は、Sham 群のそれよりも増加した。細胞質および核画分 HSPA9 含量は、心機能代償期では Sham 群のそれと同様であったのに対し、心不全期では増加した。さらに、心不全期に、アポトーシス関連タンパク質 p53 との HSPA9 の共免疫沈降量が増大した。これらの結果から、心機能代償期に HSPA9 はミトコンドリアへ移行することで、心筋梗塞後の生存心筋を保護する可能性が示された。加えて、心不全期に HSPA9 は p53 と複合体を形成することで細胞質および核へ移行し、アポトーシスの調節に寄与することが考えられた。

ラット網膜において神経由来の NO はグリア細胞のアラキドン酸カスケード活性化を介して血管を拡張させる

○森 麻美¹、染谷 英理子¹、浅野 大樹¹、森田 茜¹、坂本 謙司^{1,2}、中原 努¹

¹北里大・薬・分子薬理、²帝京大・薬・医薬品作用

【目的】我々はこれまでに、*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) をラットの硝子体内に投与すると、視神経節細胞あるいはアマクリン細胞に発現している神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 由来の NO 産生・遊離が亢進することにより、グリア細胞を介して網膜血管が拡張することを見出している。しかし、グリア細胞から産生・遊離される因子やその作用機序は明らかではない。そこで本研究では、NO によるグリア細胞を介した網膜血管拡張機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】7-9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、独自に構築した小動物用網膜血管径計測システムにより網膜血管径の変化を測定し、以下の検討を行った。グリア毒である fluorocitrate (450 pmol/eye), disialoganglioside-GD1b (15 nmol/eye) 及び L-alpha-aminodipic acid (250 nmol/eye), シクロオキシゲナーゼ阻害薬である indomethacin (10 nmol/eye), エポキシエイコサトリエン酸 (EETs) のアナログである 14,15-EE5(Z)-E (0.7 nmol/eye), リアノジン受容体遮断薬である dantrolene (1.7 nmol/eye) あるいは IP₃ 受容体遮断薬である 2-APB (6.4 nmol/eye) を硝子体内に投与し、約 90 分後に NO 供与体である NOR3 (5 nmol/eye) による反応を検討した。

【結果】NOR3 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、3 種類のグリア毒いずれによっても有意に抑制された。また、NOR3 による網膜血管拡張反応は、indomethacin 及び 14,15-EE5(Z)-E により有意に減弱した。さらに、NO 誘発網膜血管拡張反応は、dantroleneにより有意に抑制されたが、2-APB による影響を受けなかった。

【考察】以上より、ラット網膜において、神経細胞から産生・遊離した NO は、グリア細胞のリアノジン受容体に作用して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させ、アラキドン酸カスケード活性化に伴うプロスタグランジンあるいはEETs の産生・遊離を介して網膜血管を拡張させることが明らかになった。

L-PGDSはがん血管内皮細胞の薬剤感受性を低下させる

○小林 唯¹、宮崎 悠介¹、大森 啓介¹、小林 幸司¹、村田 幸久¹

¹東京大・院農・放射線動物科学

【背景・目的】

がんの治療では抗がん剤が広く用いられているが、がんが耐性を獲得することが問題となっている。薬剤耐性を克服するために様々な研究がなされており、がん血管内皮細胞が新たな標的として注目されている。L-PGDSはプロスタグランジン合成酵素の1つで、アラキドン酸から変換されたPGH₂を元にPGD₂を合成する。L-PGDSはがん内の血管内皮細胞で高発現していることが報告されているが、その働きは明らかにされていない。本研究では、がん内の血管内皮細胞で発現しているL-PGDSが薬剤感受性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

□野生型マウスとL-PGDS欠損マウスにLewis Lung Carcinoma (LLC) を皮下移植した。低容量の抗がん剤 (doxorubicin, 1 mg/kg) を腹腔内投与したところ、野性型マウスでは移植したがんの成長に影響がなかったのに対して、L-PGDS欠損マウスに移植したがんの成長は顕著に抑制された。免疫染色法によって、doxorubicinの処置は、L-PGDS欠損マウスに移植したがん内の血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、血管を退行させていることが分かった。野生型マウスに移植したがんでは、このような現象はみられなかった。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にがんの上清を処置することで、がん内の血管内皮細胞をin vitroで模倣し、そのdoxorubicin (0.3 μM) に対する感受性を評価した。がん上清を処置したHUVECではL-PGDSの発現が上昇した。L-PGDSの選択的阻害剤であるAT-56 (30 μM) の前処置によって、がん上清を処置したHUVECのdoxorubicin感受性が著しく上昇した。細胞内のdoxorubicinの量を、その自家蛍光を測定することで評価したところ、AT-56の前処置によってHUVEC内のdoxorubicin量が増加することが分かった。qRT-PCR法により、薬剤排出トランスポーターとして知られるABCトランスポーターのmRNA発現を確認した。がんの上清の処置によってABCB1とABCC2のmRNA発現が上昇し、これはAT-56の前処置によって低下することも明らかになった。

【考察】

以上の結果より、がん内の内皮細胞で発現しているL-PGDSは、ABCトランスポーターの発現を上昇させることで抗がん剤の排出を促進し、内皮細胞の抗がん剤感受性を低下させることが示唆された。

抗がん剤エルロチニブによる皮膚乾燥メカニズムの解析

○田中 李歩¹、金子 未歩¹、高山 直也¹、横山 貴俊¹、吉野 真花奈¹、川崎 藍¹、今 理紗子¹、五十嵐 信智¹、
酒井 寛泰¹、亀井 淳三¹

¹星薬科大学薬学部生体分子薬理学

【目的】エルロチニブは、上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とした選択的チロシンキナーゼ阻害剤であり、肺がんや膵臓がんなどの治療に広く用いられる。エルロチニブは強力な抗がん活性を示す一方で、副作用として皮膚乾燥を訴える患者が多く、その割合は7割以上に達する。現在、この皮膚乾燥に対しては、保湿剤を用いた対症療法が行われているものの、完治させるには至っていない。本研究では、エルロチニブによる皮膚乾燥に対する新たな治療法や予防法を提案する目的で、エルロチニブによる皮膚乾燥メカニズムについて検討した。

【方法】マウスにエルロチニブを14日間経口投与し、角質水分量を測定した。また、皮膚における各種保湿因子関連分子の発現量を解析した。さらに、表皮角化細胞株であるHaCaT細胞にエルロチニブを添加し、アクアポリン3(AQP3)、リン酸化EGFRおよびリン酸化ERKの発現量を解析した。

【結果および考察】エルロチニブ投与群の角質水分量は、コントロール群と比べて有意に低く、皮膚乾燥が認められた。また、エルロチニブ投与群の皮膚保湿因子を解析したところ、セラミド分解酵素、セラミド合成酵素、ヒアルロン酸分解酵素、ヒアルロン酸合成酵素、I型コラーゲン、ロリクリンおよびフィラグリンの発現量には変化が認められなかったものの、水チャネルAQP3であるの発現量は有意に低下していることがわかった。さらに、表皮角化細胞株にエルロチニブを添加した結果、エルロチニブは細胞生存率に影響を及ぼさずに、AQP3を濃度依存的に低下させることが明らかとなった。また、この際に、リン酸化EGFRおよびリン酸化ERKがいずれも低下していることがわかった。以上の結果から、エルロチニブによる皮膚乾燥は、皮膚AQP3の発現低下により、血管側から角質側への水の移動が制限された結果、生じている可能性が考えられた。また、エルロチニブは表皮角化細胞に作用し、Ras/MAPK経路の活性を抑制し、AQP3を低下させた可能性が示唆された。したがって、エルロチニブによる皮膚乾燥に対しては、Ras/MAPK経路以外の経路でAQP3を増加させる物質や、表皮特異的にRas/MAPK経路を活性化させる物質が有効であると考えられた。

2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) 誘発接触皮膚炎時における搔破阻止の効果

○石田 琢¹、里 史明²、千葉 義彦³、今 理紗子¹、五十嵐 信智¹、亀井 淳三¹、酒井 寛泰¹

¹星薬科大学生体分子薬理学、²星薬科大学疾患病態解析、³星薬科大学生理分子科学

[目的]アレルギー性接触皮膚炎 (ACD) は、遅延型アレルギー反応である。主な症状として、炎症による肥厚や強い搔痒感ならびに皮膚バリアー機能の低下などが挙げられる。従来、これらの症状が複雑に関連し接触皮膚炎症状を悪化させていると考えられている。一方、当研究グループは、最近、炎症部位の好中球蓄積が接触皮膚炎の発症の一端を担うことを示唆している。しかしながら、皮膚の搔破と好中球遊走／蓄積との関連性を示す知見は非常に少ない。そこで本研究では、皮膚の搔破が接触皮膚炎モデルにおける皮膚肥厚ならびに好中球蓄積に影響を与えるのか否かを検討する目的で、接触皮膚炎モデルマウスに搔破阻止のためエリザベスカラーを装着し、疾患部の好中球遊走性ケモカインの遺伝子発現変化について検討した。[方法]BALB/c 雌性マウスを用い、2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) を腹部皮膚にて感作した (Day0)。その後、Day5, 8, 11 において、マウスの両耳介に TNCB を曝露 (Challenge) し、接触皮膚炎モデルを作製した。Day5 における Challenge 以降、マウスの首にエリザベスカラーを装着し、耳介皮膚が搔破されるのを阻止した。最終 Challenge の 24 時間後に耳介を摘出し、定量的 RT-PCR 法に従い、各種遺伝子発現の解析を行った。[結果及び考察]TNCB を反復塗布することにより、耳介において著明な耳介肥厚が認められた。一方、エリザベスカラーを装着した群において耳介肥厚の有意な抑制が認められた。また、この際のサイトカインおよび好中球遊走性ケモカインの遺伝子発現について検討した結果、TNF-alpha、IL-1 beta、IL-6、Cxcl1、Cxcl2、Cxcl5 などの遺伝子発現増加の有意な抑制が認められた。また、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF-Neo) およびヒト皮膚表皮角化細胞 (HaCaT) において TNF-alpha、IL-1 beta の処置は、Cxcl1、Cxcl2、Cxcl5 のヒトホモログである IL-8 の発現を亢進した。以上の結果から、皮膚の搔破は TNF-alpha および IL-1 beta やケモカインの発現上昇を介し、好中球の遊走を促進し、ACD を悪化させる可能性が示唆された。

アポE含有リポタンパク質による初代培養網膜グリア細胞の $\alpha 2$ マクログロブリン発現調節機構の解析

○竹村 映美¹、林 秀樹¹、向垣内 千早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

【目的】緑内障は日本における第1位、世界では第2位の失明原因疾患である。本疾患の患者前房水中では $\alpha 2$ マクログロブリン($\alpha 2M$)含量の上昇が報告されている。しかし、緑内障で観察される視神経変性への $\alpha 2M$ の関与は明らかではない。我々は以前の研究で、アポリポタンパクE含有リポタンパク質(E-LP)が網膜神経節細胞の変性に対し保護効果を発揮すること、また $\alpha 2M$ がこのE-LPの保護効果を妨害することを明らかにした。本研究では、視神経保護の妨害因子として働く $\alpha 2M$ の発現抑制が緑内障治療につながると考え、E-LPによる初代培養網膜グリア細胞の $\alpha 2M$ 発現変化とその機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】新生児マウス網膜由来の初代培養グリア細胞と神経細胞の共培養、およびグリア細胞の単独培養を行った。共培養に対してはグルタミン酸処理およびグルタミン酸 + E-LP処理、単独培養にはE-LP処理を行い24時間後の細胞および培養上清を回収した。E-LPによる $\alpha 2M$ の発現量変化をウェスタンブロット法で解析した。また、エレクトロポレーション法を用いたsiRNA導入により $\alpha 2M$ の発現調節に関わる受容体の特定を試みた。

【結果・考察】グリア細胞と神経細胞の共培養に対するグルタミン酸処理は $\alpha 2M$ の発現量および放出量を上昇させ、E-LP処理はその上昇を抑制した。次に網膜グリア細胞単独培養へのE-LP処理は $\alpha 2M$ のmRNAおよびタンパク質発現量、さらに培養液中への放出量を抑制することが明らかとなった。このE-LPによる $\alpha 2M$ 発現抑制機構への受容体の関与を検討するため、LDL受容体ファミリーの受容体に結合し、他のリガンドの結合を阻害するreceptor associated protein(RAP)を使用した。RAP処理により、E-LPの $\alpha 2M$ 発現抑制効果は減弱した。また、LRP1 siRNAを網膜グリア細胞に導入後E-LP処理を行ったところ、E-LPによる $\alpha 2M$ 発現抑制効果が減弱した。これらの結果から、網膜グリア細胞に対するE-LP処理は、細胞膜上のLRP1を介して $\alpha 2M$ の発現および放出を抑制することが示唆された。以上より、E-LPは網膜グリア細胞のLRP1を介して神経保護妨害因子である $\alpha 2M$ の増加を抑制することにより、緑内障で誘導される視神経変性に対する視神経保護療法に応用できる可能性が考えられた。

各種麻酔薬がマウスNMDA誘発網膜神経節細胞傷害に与える影響

○坂本 謙司^{1,2}、石原 陽平¹、浅野 大樹¹、森田 茜¹、森 麻美¹、中原 努¹

¹北里大・薬・分子薬理、²帝京大・薬・医薬品作用

【目的】*N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 誘発網膜神経傷害モデルは、実験的緑内障モデルとして神経保護薬のスクリーニングに広く用いられている。本モデルを用いた実験を行う際には動物を麻酔する必要がある。近年では、動物福祉の観点から、使用できる麻酔薬は限定されている。本研究では、近年動物実験に広く用いられているイソフルラン吸入麻酔、ケタミン・キシラジン混合液による麻酔、および α_2 アドレナリン受容体作動薬であるメドミジン・GABA_A受容体作動薬であるミダゾラム・オピオイド κ 受容体作動薬であるブトルファノールを混合した三種混合麻酔薬が、NMDA誘発網膜神経節細胞傷害に与える影響を検討した。

【方法】全ての実験には7-8週齢のICR系雄性マウスを用いた。ケタミン(90 mg/kg)・キシラジン(10 mg/kg)混合麻酔薬、または三種混合麻酔薬(メドミジン(0.6 mg/kg)、ミダゾラム(8 mg/kg)、ブトルファノール(10 mg/kg))を腹腔内投与することにより、あるいはイソフルランを吸入(導入期: 4% 維持期: 3%, 流量2 mL/min)させることによりマウスを麻酔した後、NMDA(40 nmol/eye)を硝子体内投与した。7日後に網膜伸展標本を作製し、Alexa Fluor 488標識抗NeuN抗体により網膜神経節細胞を染色することにより、残存した網膜神経節細胞数を検討した。

【結果】三種混合麻酔を使用した場合、ケタミン・キシラジン麻酔やイソフルラン麻酔を使用した場合と比較して、NMDAにより誘発される網膜神経節細胞傷害が有意に減弱した。イソフルラン麻酔を使用した場合も、ケタミン・キシラジン麻酔を使用した場合と比較すると、NMDAにより誘発される網膜神経節細胞傷害が若干減弱する傾向を示した。ケタミン・キシラジン混合液と同時にメドミジン、ミダゾラム、あるいはブトルファノールを投与したところ、メドミジンを同時投与した場合のみ、網膜神経節細胞傷害が若干減弱した。

【考察】三種混合麻酔薬は、網膜におけるグルタミン酸興奮毒性に対して保護作用を示すことが明らかとなった。この作用にはメドミジンの神経保護作用が一部寄与している可能性がある。しかし、詳しい作用機序に関しては、今後のさらなる検討が必要である。

mu-オピオイド受容体-V1bバゾプレシン受容体複合体と相互作用するbeta-アレスチンの解析

○Nuttawadee Ngamlertwong¹、土屋 裕義¹、藤原 葉子¹、東 森生¹、輿水 崇鏡¹

¹自治医科大・医・分子薬理

It is difficult in characterizing heteromer-specific functions of G-protein coupled receptors (GPCRs) and finding a chemical that can act on the specific heteromers. Heteromeric GPCRs may have a new character, which is not shared between each participating receptor. The difficulty associated with the analysis of heteromeric receptors partly comes from the fact that homomeric receptors formed by the protomer of heteromer receptor co-exist with heteromeric receptors in a cell. We recently discovered that opioid signal originating from morphine uses heteromer receptor between mu-type opioid receptor and V1b vasopressin receptor in a beta-arrestin-dependent way to generate analgesic tolerance. Here, we report a method to detect three molecule interactions using split luciferase and a fluorescence protein as a BRET (bioluminescence resonance energy transfer) acceptor. This method allowed us to sensitively monitor access of beta-arrestin specifically to the heteromeric or homomeric receptors. Therefore, our system provides a screening method for a chemical that can reduce development of morphine tolerance during pain management.

ネオニコチノイド系薬剤によるマウス大脳皮質のゲノムDNAのメチル化の変化および脳内遺伝子の発現変動

○清水 仁美¹、和賀 央子¹、横森 将輝¹、宇和野 水優¹、内野 茂夫¹

¹帝京大学大学院理工学研究科

ネオニコチノイド系薬剤は、昆虫のアセチルコリン受容体に種選択的に作用することから、世界各国で農薬として汎用されている。しかし、近年の動物実験において、本剤が脳に移行・蓄積されること、また、妊娠期の過剰な暴露は仔マウスに不安行動を惹起させる可能性が示唆され、その使用に懸念が生じつつある。我々は、ネオニコチノイド系薬剤がエピジェネティクスな遺伝子発現の制御機構であるゲノムDNAのメチル化に影響を与える可能性を見出し、標的遺伝子の特定を行っている。本発表では、ネオニコチノイド系薬剤が脳の遺伝子発現におよぼす影響を明らかにするために、メチル化の標的遺伝子、ならびにそれらの遺伝子の脳内での発現変動について紹介する。

12週齢のICR雌マウスにイミダクロプリド75mg/kg体重/DMSO、ジノテフラン100mg /Kg体重/saline、各薬剤のコントロール(DMSO、saline)を経口投与し、4時間後の大脳皮質において、MDB2抗体を用いた網羅的なゲノムDNAのメチル化解析を行った。その結果、イミダクロプリド投与マウスでは58遺伝子、ジノテフラン投与マウスでは181遺伝子のゲノムDNAのメチル化にコントロールマウスと違いが見られた。これらの遺伝子の中には、ネオニコチノイド系の両薬剤でメチル化の変動がみられた遺伝子に加え、各薬剤で異なるメチル化の変動を示した遺伝子が複数みられた。そこで、脳内で発現が確認されている11の遺伝子について、薬剤投与4時間後、1日後、2日後の大脳皮質から全RNAを調整し、RT-PCRおよびリアルタイムPCRを用いて定量的な遺伝子発現解析を行った。その結果、両薬剤ともに神経突起の形成・伸長に関わるCux1の発現が投与4時間後に一過的に増加、また、シナプス関連分子であるSynapsinの発現が投与1日後に一過的に低下した。一方、イミダクロプリド投与マウスのみ、ムスカリン性アセチルコリン受容体であるChrm3の発現が投与4時間後に一過的増加、また、シナプス関連分子であるNeurexinの発現が投与1日後に一過的に低下した。

以上の結果から、ネオニコチノイド系薬剤の過剰な経口投与は、ゲノムDNAのメチル化や遺伝子の発現に影響をおよぼすが、その標的遺伝子や発現変動は各薬剤により異なることが判明した。

神経成長因子NGFを介したセラミドキナーゼによる神経伝達制御機構の解明

○安江 匡隆¹、堀 真悠子¹、五木田 緑¹、本田 拓也¹、中村 浩之¹、村山 俊彦¹¹千葉大・院薬・薬効薬理

[目的] 神経細胞は分化の過程で神経突起を伸長し、シナプスを形成することで神経回路を構築する。神経回路の構築は高次脳機能の獲得に重要であるが、分化やシナプス間情報伝達を調節する機構は未だ不明な点が多い。セラミドをセラミド-1-リン酸(C1P)に変換するセラミドキナーゼ(CerK)は脳において最も活性が高く、CerK欠損マウスは情動的な異常を示すことが知られている。このことからCerK/C1Pは高次脳機能に関与している可能性があるがその多くは未解明である。そのため本研究では神経機能におけるCerK/C1Pの役割を解析した。

[方法・結果] 実験にはnerve growth factor (NGF)により神経細胞様に分化するPC12細胞に、CerKを安定的にノックダウン(KD)あるいはHAタグを付加したCerK-HAを過剰発現させた細胞株を用いた。初めに、NBD蛍光基を付加したNBD-セラミドを細胞に処置し、NBD-C1Pを定量したところ、NGF刺激により産生量が増大した。またCerK KD細胞ではNGF刺激によるC1P産生量増大は見られなかった。次にウェスタンブロット法によりCerK-HAの発現レベルを解析すると、NGF刺激によりCerK-HAの増大が観察された。さらに無血清培養により、CerK-HA発現レベルが低下、NGF刺激ではその低下が抑制された。NGF刺激によりCerK発現レベルが増大する機構を解明すべく、real-time PCR法を用いて、NGF刺激時のCerK mRNA発現量を解析したところ有意な差は認められなかった。そこでNGFがCerKの分解を抑制する可能性を考え、プロテアソーム阻害剤、E1ユビキチンリガーゼ阻害剤を処置したところ、CerK-HA発現レベルの低下は抑制された。NGFにより分化したPC12細胞では神経伝達物質の放出が亢進することが報告されている。そこでCerK/C1Pが神経伝達物質の放出を制御している可能性を検証するため、細胞内に³Hラベルされたノルエピネフリン(³H]NE)を取り込ませ、放出量を解析した。その結果、³H]NE放出はCerK-HAの過剰発現により増加し、CerKのKDにより減少した。一方でPC12細胞の形態を観察したところ、神経突起伸展にはCerKレベルの変化による差は見られなかった。

[考察] PC12細胞において、CerK-HAはユビキチン-プロテアソーム経路により分解されることが示唆された。さらにNGFはCerKの分解を抑制することでCerK発現レベルを制御している可能性が示唆された。またCerK/C1Pは神経突起伸展には関与しないが、神経伝達物質の放出を正に制御することが示唆された。脳におけるセラミド代謝は様々な神経変性疾患に関わることから、CerKによる神経機能制御メカニズムの解明によって新規治療戦略の開発が期待される。

オキシトシンはA β による海馬シナプス可塑性の障害を回復させる

○高橋 純平¹、山田 大輔¹、植田 雄大¹、岡 淳一郎¹、斎藤 顕宜

¹東京理科大学薬学部薬理学研究室

【背景・目的】オキシトシンは視床下部室傍核で合成されるペプチドホルモンである。子宮収縮や乳汁分泌促進などの末梢作用がよく知られているが、近年では報酬系、社会性、学習記憶などの中枢機能にも関与することが報告されており注目されている。我々はこれまで、細胞毒性を有しアルツハイマー病患者の脳内に沈着が見られるアミロイド β タンパク(A β)を脳室内に投与したモデルマウスで、短期作業記憶を評価するY-maze試験、長期空間記憶を評価するMorris water maze試験いずれにおいても学習記憶障害を呈すること、またこの障害がオキシトシンの脳室内投与により回復することを明らかにしてきた。しかし、オキシトシンによる学習記憶障害回復のメカニズムは不明である。そこで本研究では、学習記憶において中心的な役割をもつ海馬のシナプス可塑性に与えるオキシトシンの影響を調べることで、オキシトシンがA β による学習記憶障害を回復させるメカニズムを検討した。

【方法】6-7週齢のddYマウスから海馬を取り出し、厚さ400 μ mの急性海馬スライスを作製した。刺激電極をシャツファー側枝、記録電極を放射状層に置き、細胞外集合電位記録法によりフィールド興奮性シナプス後電位(field-excitatory postsynaptic potential: fEPSP)を記録した。fEPSPの立ち上がりの20%-80%の傾きを指標として、シナプス可塑性の一つである長期増強(Long-term potentiation: LTP)の程度を評価した。LTPはシータバースト刺激により誘導した。スライスにA β (0.1 μ M)、オキシトシン(2 μ M)及びオキシトシン受容体拮抗薬であるL-368,899(2 μ M)を灌流させたときのfEPSPのLTPの変化を評価した。

【結果・考察】A β の灌流によりLTPの障害が認められた。また、オキシトシンをA β とともに灌流することにより、A β 誘発性のLTP障害がControl群と同程度まで回復した。このオキシトシンの作用は、オキシトシン受容体拮抗薬であるL-368,899を灌流することにより消失した。以上の結果から、オキシトシンは、オキシトシン受容体を介してA β によるLTP障害を回復させることが示唆された。海馬の同シナプスにおけるLTPは学習記憶の素過程と考えられていることから、本研究で得られたA β 誘発性のLTP障害、そしてオキシトシンによるLTPの回復は、これまでの行動実験の結果と矛盾しないものと考えられる。現在、より詳細なメカニズムを解明するため、オキシトシン受容体の下流に存在し、LTP、記憶形成に重要であると考えられている分子の関与について検討を行っている。