

慢性胃食道逆流症モデルラットの下部食道周辺組織における温度感受性TRPV1およびTRPM8チャネル発現神経の変化

○小出 恵未¹、篠木 智晴¹、松本 健次郎²、田嶋 公人¹、堀江 俊治¹

¹城西国際大・薬・薬理、²京都薬科大・薬・薬物治療

【目的】我々はこれまでにマウスの下部食道において温度感受性 transient receptor potential (TRP) V1チャネルが急性逆流性食道炎の病態に関与している可能性を報告した(Histchem. Cell Boil., 2014)。本研究では、慢性胃食道逆流症(GERD)モデルラットの下部食道組織においてTRPV1発現知覚神経の変化および疼痛関連受容体であるTRPM8チャネルの局在について検討した。【方法】SD系雄性ラットの幽門部を2.5 mm幅の18Frもしくは20 Frネラトンカテーテルにて被覆した後、前胃部と胃体部の境界部を結紮してGERDモデルとした。施術後1~2週間飼育し、摘出した食道の凍結切片におけるTRPチャネルおよび神経マーカーの局在について免疫組織化学染色にて検討した。【結果】病態モデルの下部食道粘膜層および括約筋(LES)においてTRPV1発現神経線維数は正常群と比較して増加した。病態モデルにおいてTRPV1とCGRPあるいはサブスタンス Pを二重染色したところどちらも共存が観察され、CGRPとTRPV1、サブスタンスPとTRPV1の共発現神経線維の数は正常群と比較して増加が観察された。病態モデルのLESにおいて神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)とTRPV1の二重染色を解析したところ、筋間神経叢においてnNOS発現細胞体にTRPV1発現神経線維が巻きつくように局在していることが観察された。TRPM8免疫活性の検討では病態モデル群のLESの筋間神経叢においてTRPM8が発現する細胞体の増加がみられ、その細胞体にnNOSの共存も観察された。【考察】GERDが慢性化するとLESにおいてTRPV1発現神経線維が増加すること、さらに内在性NO作動性TRPM8発現ニューロンが増加することが示唆された。よって、これらのTRPチャネル発現神経からのNO遊離が増大しLESの収縮が抑制されやすくなっていると推察した。下部食道粘膜層においては、TRPV1発現神経線維が増加することで熱や酸の刺激に過敏な状態になり、これが胸やけ症状として知覚されているのではないかと推察した。【結論】慢性胃食道逆流症モデルラットの下部食道組織では、TRPV1およびTRPM8の発現神経が増加することで、胸やけなどの痛覚過敏やLESの収縮抑制異常が起きていることが示唆された。

抗がん剤エルロチニブによる下痢発症メカニズムの解析

○豊永 実里¹、加藤 咲¹、山本 みちる¹、井上 七海¹、小沼 和寛¹、大熊 麻友美¹、富本 麗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)のチロシンキナーゼを選択的に阻害する内服の抗がん剤であり、非小細胞肺癌や膵臓がんに対して高い効果を発揮している。一方で、エルロチニブはがん細胞以外のEGFRにも作用するため、様々な副作用が発現する。なかでも下痢は、発現頻度の高い副作用であり、重篤化すると脱水や電解質異常を引き起こし、患者のQOLを低下させるため、その緩和が重要視されている。このエルロチニブによる下痢は、腸のEGFRを阻害することによる粘膜障害が原因で生じるものと考えられているが、その詳細は明らかとなっていない。本研究では、エルロチニブによる下痢の発症メカニズムを解析し、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤による下痢に対する新規予防法や治療法の提案を試みた。

【方法】8週齢の雄性Wistarラットにエルロチニブ(6 mg/kgあるいは30 mg/kg)を14日間連続経口投与し、排泄された糞便の水分量を測定することで下痢の程度を評価した。また、最終投与5時間後の大腸を摘出し、タイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションのmRNA発現量をreal time PCRにより、AQP3タンパク質発現量をwestern blottingによりそれぞれ解析した。

【結果および考察】エルロチニブ低用量群では軟便傾向が認められたが、糞中水分量に有意な差は認められなかった。これに対して、エルロチニブ高用量群では投与翌日より糞中水分量が有意に増加し、下痢の発症が認められた。また、この糞中水分量の増加の割合は、投与期間中一定であった。このときの大腸AQP3のタンパク質発現量は、コントロール群と比べて約70%まで有意に低下していた。一方、タイトジャンクションを構成するClaudin-1、ZO-1およびアドヘレンスジャンクションを構成するCadherin-1のmRNA発現量はいずれもコントロール群との間に差は認められなかった。以上のことから、ラットにエルロチニブを投与すると、大腸AQP3の発現量が低下し、腸管側からの水の吸収が抑制されることにより下痢が発症するものと考えられた。

シスプラチン誘発筋萎縮時の Ubb、Ubc、Rps27a および Uba52 遺伝子の発現増加とユビキチン化タンパク質の分解機序

○月村 友香¹、猪俣 茉耶¹、里 史明²、今 理紗子¹、五十嵐 信智¹、山田 岳史³、千葉 義彦⁴、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学、³日本医科大学消化器外科、⁴星薬科大学生理分子科学

[目的]骨格筋量の減少はがん患者の予後不良因子として知られている。したがって、化学療法中に骨格筋量減少を予防することができれば予後の改善に繋がる可能性がある。我々はマウスモデルを用いて、シスプラチン投与によって骨格筋における筋萎縮原因遺伝子 (MuRF1 および Atrogin-1; 両者ともE3 ubiquitin ligase) の著明な発現上昇が引き起こされると同時に筋萎縮が引き起こされることを報告している。そこで、本研究ではシスプラチンを投与したマウス骨格筋において、ユビキチン化タンパク質が増加されるかを検討した。[方法] C57/BL6 雄性マウス (7 週齢) を用い、4 日間、1日1回シスプラチン (3 mg/kg, i.p.) を投与した。コントロールとして、シスプラチンの代わりに生理食塩水を投与した群、およびシスプラチン投与による体重減少と同等にまで食事制限により体重を減少させた群 (DR 群) を用いた。最終投与の 24 時間後に大腿四頭筋サンプルを摘出し、各種実験に用いた。さらに、C2C12 myoblast を常法により myotube に分化させ、シスプラチン (5および15 μ M) 存在下24時間インキュベートし、サンプルを回収後各種実験に用いた。[結果および考察]シスプラチンを投与したマウスにおいて大腿四頭筋の筋萎縮が引き起こされていることを骨格筋質量の減少により確認した。Western blot 法および Dot Blot 法にてユビキチン化タンパク質の発現を確認したところ、シスプラチン投与群では溶媒コントロール群および DR 群と比較してユビキチン化タンパク質量が有意に増加していた。そこで、ユビキチン遺伝子である Ubb、Ubc、Rps27a および Uba52のmRNA を定量的 RT-PCR 法にて比較解析したところ、シスプラチン投与群では溶媒コントロール群および DR 群と比較して有意に増加していた。C2C12 myotube でもシスプラチン処置により同様の結果が得られた。以上の結果より、シスプラチン投与によって骨格筋中のユビキチン分子の発現増加が引き起こされ、さらに、発現増加した MuRF1 および Atrogin-1 によって種々タンパク質のユビキチン化が蓄積され、筋萎縮が引き起こされている可能性が示唆された。

エイコサペンタエン酸によるシスプラチン誘発筋萎縮時のユビキチンおよびユビキチン化タンパク質量の低下作用

○猪俣 茉耶¹、月村 友香¹、里 史明²、今 理紗子¹、五十嵐 信智¹、山田 岳史³、千葉 義彦⁴、亀井 淳三¹、酒井 寛泰¹

¹星薬科大学学生体分子薬理学、²星薬科大学疾患病態解析、³日本医科大学消化器外科、⁴星薬科大学生理分子科学

【目的】シスプラチンを含む数種の抗がん薬は筋萎縮を引き起こす可能性がある。さらに、がん患者において骨格筋量の減少は予後不良因子であることが報告されており、化学療法中に骨格筋量の減少を予防することができれば予後の改善に繋がる可能性がある。我々はマウスにシスプラチンを投与すると骨格筋のMuRF1 および Atrogin-1 の著明な発現増加を介した骨格筋萎縮が引き起こされていることを報告している。この筋萎縮にオメガ3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) の投与が抑制効果を有することも見いだしている。本研究では EPA のシスプラチン誘発筋萎縮の抑制効果のメカニズムを明らかにすることを目的として、シスプラチン処置によって引き起こされるユビキチン遺伝子およびユビキチン化タンパク質への効果を検討した。【方法】①C57BL/6 雄性マウスにシスプラチン (3 mg/kg, i.p.) および EPA (300 mg/kg, p.o.)を Day 0 - Day 3の4日間投与し、Day 4 で大腿四頭筋を採取した。②C2C12 myoblasts を常法により myotubes に分化させ、シスプラチン (15 μ M) および EPA (150 μ M) 存在下 24 時間インキュベートした。①②から得られた組織及び細胞より、定量的RT-PCR法を用いて遺伝子発現を、Western blot 法および Dot Blot 法を用いてユビキチンおよびユビキチン化タンパク質の定量を行った。【結果および考察】マウスにおいては、シスプラチン投与による MuRF1 および Atrogin-1 の発現増加ならびに体重減少は EPA 投与により抑制されなかったが、大腿四頭筋質量および筋原線維径の減少は有意に抑制された。一方、シスプラチン投与によるユビキチン遺伝子およびユビキチン化タンパク質の発現増加は EPA 投与により抑制された。さらに C2C12 myotubes においてもシスプラチン投与によるユビキチン遺伝子およびユビキチン化タンパク質の発現増加は EPA の処置により抑制された。以上の結果より、EPA の処置はシスプラチンによるユビキチン遺伝子およびユビキチン化タンパク質の増加を低下させることでシスプラチン誘発筋萎縮を抑制できる可能性があることが示唆された。

肝類洞閉塞症候群におけるトロンボキサン受容体の役割

○大高 史聖^{1,2}、伊藤 義也^{2,3}、井上 智仁^{1,2}、西澤 伸恭^{2,3}、中本 修司^{2,3}、津留 世里^{2,4}、服部 響子^{2,5}、本田 雅子^{2,5}、
細野 加奈子²、小泉 和三郎¹、馬嶋 正隆²

¹北里大学病院消化器内科、²北里大・院医療系・分子薬理、³北里大学病院外科、⁴北里大・病院・麻酔科、⁵北里大学
病院産婦人科

背景目的:肝類洞閉塞症候群(Sinusoidal Obstruction Syndrome: SOS)は、造血幹細胞移植後や大腸癌の化学療法後に発症し、重症化すると80%以上の死亡率がみられる。SOSの原因は十分理解されていないが、肝類洞内皮障害とその後続く類洞内外での血小板凝集が関与する可能性が示唆されている。一方、トロンボキサン A_2 (TxA_2)は血小板凝集作用および血管内皮細胞との相互作用によって局所微小循環を増悪させる。われわれは、これまでに TxA_2 受容体(TP)シグナルが肝微小循環や肝障害に関与することを報告した。そこで本研究では、SOSにおけるTPシグナルの役割を明らかにすることを目的とした。

方法:実験動物として8-10週齢の雄性C57BL/6マウス(野生型)とTPノックアウト(KO)マウスを使用した。モノクロタリン(monocrotaline, MCT)を投与し、SOSモデルを作成した。MCT投与48時間後までの肝障害(血清ALT値)、肝および血中血小板数、肝類洞内皮障害などについて比較検討した。

結果: MCT投与48時間後に血清ALT値はピークとなり、野生型マウスに比べ、TPKOマウスで有意に増加した。MCT投与後、肝臓中のTP受容体発現は亢進し、免疫二重染色でTP受容体は血小板および類洞内皮細胞に共発現した。血中血小板数はMCT投与48時間後に両群とも減少した。また肝集積血小板数は両群ともMCT投与48時間後に増加した。しかしながら血小板数については血中、肝内ともに両群に有意差はなかった。MMP-9, MMP-13, PAI-1などの類洞内皮障害関連マーカーの肝組織中における発現は経時的に増強し、MCT投与48時間後では野生型マウスに比べ、TPKOマウスで有意に増加した。単離培養した肝類洞内皮細胞にMCTを加えると、野生型マウスに比べてTPKOマウスの類洞内皮細胞の生存率が低下した。また類洞内皮障害関連マーカーの発現が野生型マウスに比しTPKOマウスで有意に増強した。

結論: マウスMCT誘発SOSモデルにおいて、TP受容体シグナルは肝類洞内皮障害を軽減し、肝障害を抑制する可能性が示唆された。

細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝線維化責任細胞HSCに対する作用の解析

○大岡 央¹、古川 翔平^{1,2}、山口 桃生¹、齊藤 真也^{1,3}、菊地 晴久⁴、石川 智久¹

¹静岡県立大・院薬・薬理、²京都薬品工業(株)、³岡山理科大学獣医学部、⁴東北大・院薬・薬理

【目的】 肝臓は再生能が高い臓器として知られているが、肝炎ウイルスや脂肪蓄積等により慢性的な損傷を受けると、肝再生時に分泌されるコラーゲンなどが過剰に蓄積することで線維化を起こし、肝炎から肝硬変、肝がんへと不可逆的に進行する。このため、慢性肝疾患において肝線維化は予後不良を決定づける因子であると考えられている。しかしながら、肝線維化の有効な治療薬は未だ開発されていない。肝星細胞 (hepatic stellate cell, HSC) は、肝傷害時にTGF- β などのサイトカインにより活性化し、コラーゲンを産生することから、肝線維化の責任細胞であると考えられている。そのためHSCの活性化抑制および活性型から静止型への脱活性化は肝線維化の治療標的となり得る。 Differentiation inducing-factor-1 (DIF-1) は細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の分化誘導因子として単離されたモルフォゲンである。本研究ではDIF-1のHSC活性化および脱活性化に対する作用とその機序について検討した。

【方法】 ddYマウスの肝臓より、密度勾配遠心法により静止型HSCを単離した。静止型HSCを10%FBS含有DMEMで7日間培養し、活性化させた。HSCの活性化は活性型の指標である α -SMAの免疫染色およびWestern blottingにより検討した。各種化合物を静止型および活性型に処置し、HSCの活性化および脱活性化に対する影響を調べた。

【結果および考察】 DIF-1 (1–100 μ M) は濃度依存的にHSCの活性化を抑制し、その抑制作用はGSK3 β 阻害薬 TWS119 (1 μ M) により解除された。また、DIF-1 (50 μ M) はGSK3 β のリン酸化 (不活性型GSK3 β) を減少させ、さらに β -cateninの核への移行を抑制した。さらに、DIF-1 (100 μ M) はHSCを脱活性化させる傾向を示し、この作用はTWS119 (1 μ M) によって阻害されなかった。以上の結果より、DIF-1はGSK3 β の活性化を介して β -cateninの核移行を抑制することにより、HSCの活性化を抑制すること、また、DIF-1はHSC脱活性化作用を有し、この作用は活性化抑制作用とは異なる機序であることが示唆された。

脳内に侵入した微粒子に対するマイクログリアネットワークの形成

○大柿 安里¹、河野 玲奈¹、池谷 裕二¹、小山 隆太¹

¹東京大・院薬・薬品作用

大気中の環境汚染物質である PM_{2.5} のような外因性微粒子のうち、特に直径が 1 μm 以下のナノ粒子がヒトの脳内で発見されている。また、若齢期からナノ粒子に曝露されることで、認知機能の低下や ADHD、うつ病につながることを示唆されている。しかし、ナノ粒子の脳内侵入メカニズムや、ナノ粒子が脳構造や脳機能に影響を与えるメカニズムは未解明である。そこで我々は、脳内に侵入したナノ粒子に対する脳内免疫応答メカニズムの解明を目的とし、脳常在性の免疫細胞であるマイクログリアの関与を検証した。我が国に飛来する代表的な PM_{2.5} である黄砂の主成分「シリカ」のナノ粒子を小児期のマウスに投与すると、3 日後には脳実質へのシリカナノ粒子の侵入が確認された。また、妊娠マウスに投与したシリカナノ粒子も、出生した生後 1 日齢のマウスの脳実質で確認された。小児期投与群では、シリカナノ粒子は主に脳血管の周囲で観察され、血管周囲に集積したマイクログリアに貪食されていた。また、ナノ粒子を貪食したマイクログリアの突起同士が接触している様子が頻繁に観察された。さらに、培養マイクログリアのリアルタイムイメージングにより、シリカナノ粒子を貪食したマイクログリアが、シリカナノ粒子を内包する小胞を、他のマイクログリアに渡す様子が観察された。最後に、ナノ粒子を投与した仔マウスは、成体期に攻撃行動と不安様行動が上昇した。以上の結果は、シリカナノ粒子に応答した活性化マイクログリアが、マイクログリアネットワークを形成し、脳機能に何らかの影響を与えている可能性を示唆する。

大脳皮質における細胞外ATP動態の *in vivo* 蛍光イメージング

○北島 奈美¹、瀧川 健司¹、関谷 敬¹、並木 繁行¹、飯野 正光²、廣瀬 謙造¹

¹東京大・院医・細胞分子薬理、²日本大・医・細胞分子薬理

ATPは、細胞内に高濃度に存在し、エネルギー通貨として働く。加えて、細胞外では低濃度にてシグナル分子として作用する。脳では、ATPはアストロサイトや神経細胞から放出され、脳血流の制御や神経活動の抑制などのシグナル伝達を担う。また、偏頭痛などの病態では、一過性の神経活動が大脳皮質を伝播する際に、細胞外ATP濃度が上昇することが知られている。これらのATPシグナルの時空間動態やその機能を解明するため、これまで様々なATP測定法が開発されてきた。その1つであり、時空間分解能に優れる蛍光イメージング法では、多くのプローブが開発され、細胞内ATP動態の可視化が実現されてきた。一方、細胞外ATPシグナルは100 nM ~ μ M程度の濃度域で作用する。このため、数mM程度である細胞内ATPの可視化に比べ、より高感度のプローブが必要であり、細胞外ATPの可視化は困難だった。そこで本研究では、より感度の高いATPプローブを開発することで、生体内における細胞外ATPシグナルを可視化し、その機能を解明することを目的とした。高いATP感受性の実現のため、ATP認識能の高いF₀/F₁ ATPaseの ϵ サブユニットを用いた。また、生体内での安定した蛍光イメージングのため、低分子量赤色蛍光色素Cy3を用いた。そして、蛍光色素Cy3と ϵ サブユニットとの結合部位を網羅的に探索し、高感度 ($K_d \approx 100$ nM) かつ高変化率 (100%) のATPプローブATP Optical Sensor (ATPOS) を作製した。さらにこのATPOSを、神経細胞膜上へ結合するガングリオシド結合タンパク質を用い、神経細胞膜に安定的に固定する方法を確立した。続いて、ATPOSを細胞外に固定した大脳皮質へATPを局所投与したところ、ATPOSの蛍光強度は増加した。このATPOSシグナルは、ATP分解酵素Apyraseの存在下では減弱したため、ATPOSシグナルは細胞外ATP動態を示す。さらに、この細胞外ATPイメージングを、神経活動が伝播する偏頭痛などの病態モデルへ応用し、ウェーブ状に広がるATP濃度上昇を捉えた。このATPウェーブは、脳血管の収縮・拡張を伴っており、ATPは病態における血流制御でも重要な働きを示すことが示唆される。以上より、我々は高感度ATPプローブを用いて、細胞外ATP動態の可視化に成功した。

神経細胞におけるタンパク質高速分解システムの構築

○中野 利沙子¹、伊原 尚樹¹、森川 勝太¹、中嶋 藍¹、鐘巻 将人²、池谷 裕二^{1,3}、竹内 春樹^{1,4}

¹東京大・院薬・薬品作用、²国立遺伝学研究所分子メカニズム研究系分子細胞工学研究所、³脳情報通信融合センター、⁴東京大学大学院薬学系研究科化学物質安全性評価システム構築

近年の生物学は、特定の遺伝子の機能を欠損させる遺伝子改変技術によって目覚ましい進展を遂げた。しかし単純なノックアウト実験の場合、発生初期から遺伝子が欠損しているため「その遺伝子がいつ機能したのか？」という時間情報を含めたメカニズムの理解には至らない。

Auxin inducible degron system (AID法) は標的タンパク質をデグロンと呼ばれる短いタグで標識することで、植物ホルモンであるAuxin依存的に標識タンパク質の高速かつ可逆的な分解を可能とする。この方法は酵母や培養細胞での報告があるものの、非分裂細胞である神経細胞への導入は試みられていない。そこで、本研究では海馬神経細胞をモデルにAID法の神経細胞における有用性を検討した。

アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて、デグロン標識された緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子とユビキチンリガーゼをコードする*OsTIR1*遺伝子を海馬神経細胞の初代培養系およびマウスの海馬領域に導入した。その後オーキシンを添加し、共焦点顕微鏡を用いてGFPの蛍光変化を観察した。

海馬神経初代培養系及びマウス個体から作出した急性海馬スライスの両条件において、Auxin添加後90分でGFPの蛍光強度が大幅に減退することがわかった。また、海馬初代培養系においてAuxinの除去によりGFPの蛍光が回復することがわかった。

これらの結果は、Auxin依存的に標的タンパク質の高速かつ可逆的な分解が生じていることを表しており、AID法が神経細胞において機能しうることを示唆している。

脳報酬系活性化による血清中サイトカイン濃度の変化

○鹿山 将¹、池谷 裕二¹、佐々木 拓哉^{1,2}¹東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室、²(独)科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業さきがけ

腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) のドパミン神経細胞は、脳内の報酬系において重要な役割を担っている。脳報酬系の活性化は、脳内にとどまらず、末梢臓器にも広く影響を与える可能性がある。実際に近年では、遺伝薬理学的手法のDREADD法を用いて VTA のドパミン神経細胞を活性化させると、がんや細菌への抵抗性が増加することが報告されている (Shaanan et al., 2016; 2018)。しかしながら、この手法では、神経細胞が活性化する時間や頻度を制御できないため、VTAのドパミン神経細胞がどのように活性化されれば、末梢免疫活性化されるのかは不明であった。そこで本研究では、光遺伝学的手法を用いて、より生理的条件に近い実験系でこの現象を再現することを試みた。DAT-Cre マウスと RCL-ChR2(H134R)/EYFP マウスを掛け合わせ、VTAのドパミン神経細胞特異的にチャンネルロドプシン2が発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの VTA に光ファイバーを埋め込み、光刺激しながら投射先である海馬の脳波を測定したところ、光刺激に合わせた脳波の変動が見られた。この結果から、VTAを光刺激することでVTAのドパミン神経細胞を活性化することに成功したと考えられる。その後、VTAのドパミン神経細胞を活性化させることにより末梢免疫に影響を与えるか検証するために、このマウスのVTAを生理条件で起こり得るような頻度で、12時間の光刺激を行った。光刺激してから3, 9, 24時間後に、尾静脈から血液サンプルを採取し、血清サンプルを作製した。Bio-Plex assay を用いて血清中サイトカイン濃度を測定したところ、光刺激したマウスで数種のサイトカイン濃度の増加が見られた。また、生理的条件での検討として、メスのマウスと10日間共に飼育した群と、玩具や回し車のある環境で10日間飼育した群を用意した。前者において、ある種の血清中サイトカイン濃度の増加が見られたが、後者では見られなかった。これらの結果は、脳の報酬系の活性化が末梢免疫の活性化に繋がる可能性を示唆している。

依存性薬物感受性“オンセル”の同定と解析

○大坪 政幸¹、芝崎 真裕¹、若井 涼輔¹、大田 悠人¹、東 加奈子¹、飯塚 桃子¹、中西 将也¹、葛巻 直子^{1,2}、成田 道子¹、濱田 祐輔¹、佐藤 大介¹、及川 大亮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

一般に、依存性薬物による精神依存の形成には腹側被蓋野から側坐核に投射する中脳辺縁 dopamine 神経系の活性化が重要な役割を果たすことが知られている。依存症を引き起こす薬物は、upper 系あるいは downer 系に大別され、これらの薬物はそれぞれ異なる作用機序により精神依存を形成することが知られている。また、腹側被蓋野領域における dopamine 神経細胞には heterogeneity が報告されており依存形成に関与する神経ネットワークの解析を困難にしている。そこで本研究では、神経活動依存的に細胞標識が可能な遺伝子組み換え動物を用いて、依存性薬物による活性化神経細胞の同定と解析を行った。まず、cFos-TRAP マウスを用いて、依存性薬物感受性神経細胞を Rpl10a-EGFP により標識し、活性化神経細胞を分取した。その結果、依存形成能を示す薬物の処置に共通して腹側被蓋野の cFos-EGFP positive cell において tyrosine hydroxylase (TH) および dopamine transporter (DAT) の高い発現が認められた。さらに、他の遺伝子についても同様に解析を行ったところ、ethanol感受性神経細胞においては、glutamic acid decarboxylase (GAD) の顕著な発現が認められた。一方、dopamine 神経の投射先である側坐核において同様の解析を行ったところ、methamphetamine 感受性神経細胞において dopamine D1 receptor の高発現が認められた。以上の結果より、中脳辺縁 dopamine 神経系を介した中型有棘神経細胞の活性化が依存性薬物による薬物依存形成には重要であることが確認されたが、その活性調節機構は個々の薬物によって異なる可能性が示唆された。

特異性の高い抗体と超解像顕微鏡により明らかになったニューロペプチドY受容体の *in vivo* 局在

○村瀬 真一¹

¹国際医療福祉大学医学部薬理学講座

G蛋白質共役型受容体(GPCR)は神経伝達物質、ホルモン、薬物などをリガンドとする細胞膜蛋白質である。複数の抗GPCR抗体の特異性がノックアウトマウスを用いて検討されたが、それら抗体による免疫組織化学反応は概して非特異的と判定された(Michel他、2009年、Naunyn-Schmied Arch Pharmacol)。従来用いられてきた抗体特異性の基準(抗原による吸収、ウエスタンブロット法で単一バンド、抗体に特徴的な染色パターン)を満たしただけでは特異性の高い抗体とは言えないため、ノックアウト動物に反応しないという特異性を持った抗体が求められている。私達は、神経伝達物質ニューロペプチドYに対するGPCRであるY₅蛋白質のマウス脳内局在を検討する過程で、用いた抗Y₅ポリクローナル抗体がY₅ノックアウトマウスの組織と反応することを見出した。そこで、このポリクローナル抗体に含まれる非特異的抗体をY₅ノックアウトマウス脳切片(パラフォルムアルデヒド固定)に吸着させ、Y₅蛋白質と選択的に反応する抗体のみを回収することを試みた。回収した抗体は、新たに準備したY₅ノックアウト脳切片とは反応しないが、野性型マウス脳切片において細胞膜に沿う球状の免疫組織化学陽性像を示したため、この陽性像を真のY₅局在分布と考えた。この球状のY₅陽性像の大きさは共焦点顕微鏡下(平面分解能250 nm)では約600 nmであったが、超解像顕微鏡下(平面分解能100 nm)では200 nm以下であり花弁状であったりドーナツ状であったりと不整形であった。現時点で、このY₅陽性像の中に何個のY₅分子が局在しているのか、またY₅分子が単量体であるのか、多量体であるのか、両者が混在しているのかなどの疑問に答えるデータは得られていない。さらに、Y₅蛋白質と近縁にあり同蛋白質と同様に摂食促進受容体として知られるY₁蛋白質が超解像顕微鏡下でどのような集合像を示すのか、*in vitro*で報告されたようにY₅とY₁からなる多量体が*in vivo*でも形成されるのかなど未解決の問題がある。ノックアウトマウスと反応しない特異性の高い抗体、解像度の高い超解像顕微鏡と他の実験技術を組み合わせることにより、これらの疑問に答えることが可能になる。