

RNA制御異常が関与する軸索変性・運動失調の発症機序

○岡野 ジェイムス洋尚¹¹東京慈恵会医科大学再生医学研究部

家族性神経変性疾患の原因遺伝子の探索がすすみ、その病態生理の一端が分子レベルで明らかになってきた。興味深い事に、多くの報告で神経変性の原因にRNA結合タンパク質をコードする遺伝子の変異やRNAプロセッシング異常が関与する可能性が示唆されてきた。神経特異的RNA結合タンパク質Huファミリーは標的RNAに特異的に結合し、RNAの安定化や翻訳促進、スプライシング制御により神経前駆細胞からニューロンへの分化・成熟を促進することが知られている。HuCのノックアウト(KO)マウスは生後7ヶ月になると歩行障害などの運動失調症状を呈する。KOマウス小脳における電子顕微鏡解析によりプルキンエ細胞の軸索膨大部に様々な細胞内小器官が蓄積し、細胞質の構成成分が軸索へと流出している所見が観察された。このことから軸索輸送の障害に加え、細胞体から軸索に細胞内小器官等の異常流出が生じている可能性が考えられた。通常、ニューロンでは細胞体と軸索の間に拡散障壁(AIS)が形成されており、軸索へ移行できる細胞内小器官やタンパク質は制限されている。我々はHuCの標的RNAの網羅的スクリーニングを行い、Ankyrin-Gを含む多くのHuC標的候補遺伝子を同定してきた。実際、HuC KOマウス小脳ではAISの最も重要な構成因子の1つであるAnkyrin-Gの発現量および選択的スプライシングのパターンが有意に変化していた。野生型に比べHuC KO小脳ではexon 34を有するAnkyrin-Gのバリエーションが増加しており、ZU5ドメイン中にexon 34が挿入されることによりSpectrinとの結合親和性に変化が起こっていることがわかった。同バリエーションは胎生期に多く発現するものの成体脳では極めて少ないため、成体のHuC KO小脳では異時性に"胎仔型Ankyrin-G"が出現していると考えられ、Huタンパク質の欠失によりAIS機能の低下が起こっている可能性が強く示唆された。軸索が球状に肥大する変性所見は様々な神経変性疾患で観察されるが、神経症状発症との関連性については不明な点が多く、球状変性が出現する分子機序も詳細はわかっていない。HuC KOマウスはヒトの疾患の病態を研究する上で極めてユニークかつ有用な小脳変性症モデル動物であるとともに軸索変性を標的とした創薬研究に貢献できるだろう。

脳の傷害と修復を制御する生体システム

○村松 里衣子¹

¹(独)国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部

脳神経疾患に罹患すると、病巣が形成された部位に応じて様々な症状があらわれる。症状の発症や悪化の原因のひとつとして神経回路の傷害があげられ、傷ついた神経回路を修復できれば症状も緩和すると期待されている。かつては、傷ついた脳の神経回路が自然に修復することはないと考えられていたが、疾患の種類や個人差はあるものの、脳の神経回路もわずかではあるが自発的に修復する。この神経回路の修復のメカニズムは、特に脳の内部の細胞や分子によって制御されるという視点で研究が進められきた。一方、私たちは、脳神経疾患の病巣ではしばしば血液脳関門が破綻している点に着目し、血中の細胞や分子が神経回路に与える作用について検討してきた。本発表では、神経回路の傷害と修復を制御する生体システムについて、私たちのこれまでの検討を紹介する。

自閉スペクトラム障害の動物モデル作成と解析

○池田 和隆¹、古田島 浩子¹、田中 美歩^{1,2}、柏井 洋文^{1,3}、佐藤 敦志^{1,4}

¹(公財)東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野、²東京大学大学院医学系研究科精神医学、³東京都立神経病院小児神経、⁴東京大学大学院医学系研究科小児科

自閉症スペクトラム障害(ASD)は社会的コミュニケーションの障害と限局された興味という特徴を持つ神経発達障害である。ASDの病態メカニズムはほとんど不明であり、主症状に対する治療薬は未だに無い。一方、ASD患者の観察や症状の分析から、遺伝子メカニズムや分子メカニズム、リスクファクターなどが推測され、それを基にASDの動物モデルが作成され、患者では不可能な解析を動物で行うことで病態メカニズムの解明が進んでいる。さらにメカニズム解明から新たな治療方法が示唆されてきている。本シンポジウムでは、演者らが進めている3つの例を紹介する。第一に、結節性硬化症はその約半数がASD症状を示す。結節性硬化症患者の研究から、原因遺伝子は*TSC1*と*TSC2*であることがわかっていった。*Tsc1*と*Tsc2*の遺伝子欠損マウスは、それぞれホモ接合体は致死であることから、それぞれのヘテロ接合体の行動を解析したところ、社会性行動の低下などASD様の行動を示すことが明らかになった。また、*Tsc1*や*Tsc2*の機能不全により、その下流分子であるmTORが活性化していることが予想されるため、mTOR阻害剤のラパマイシンを*Tsc1*と*Tsc2*それぞれのヘテロ接合体欠損マウスに投与するとASD様行動が改善することが明らかとなった。第二に、抗てんかん薬や気分安定薬として広く用いられているバルプロ酸を妊娠中に摂取すると産児がASDを発症するリスクが高まることが知られていた。また、胎生期にバルプロ酸に暴露されたマウスがASD様行動を示すことも知られている。そこで、胎生期バルプロ酸暴露マウスの脳におけるmTORシグナル系分子であるS6蛋白質のリン酸化解析を行ったところ、リン酸化が亢進していることが明らかとなった。さらに、ラパマイシン投与によりASD様症状が改善することも明らかとなった。第三に、ASD患者においてセロトニン系の異常が報告されている。そこで、セロトニントランスポーター欠損マウスの行動を解析したところ、ヘテロ接合体とホモ接合体のいずれもASD様行動を示すことが明らかとなった。さらに、セロトニン前駆体であるトリプトファンを欠乏させた食餌を摂取させると、ASD様行動が改善することが明らかとなった。このようにASD患者の観察や症状の分析を基に基礎研究へ展開することで、治療法の新たな開発が進むことが期待できる。

大規模臨床研究やヒト検体から得られる結果を統合的に活用する次世代型“リバーストランスレーショナルニューロサイエンスリサーチ”の新展開

○成田 年^{1,2}、近藤 貴茂¹、濱田 祐輔¹、須田 雪明²、葛巻 直子^{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 (L-StaR)

最近の疼痛研究領域において、最先端神経科学研究や遺伝子工学領域研究との融合や応用により、疼痛制御における脳-末梢間クロストーク解析を基盤とした神経-免疫連関に関する研究が展開されるようになってきた。こうした、オープンシステム疼痛科学への取り組みが始まってきたことで、大規模臨床研究で明らかになった「痛みの残存が様々な生体応答に負の影響を与え、生命予後を悪くする」という結果を科学的に立証することができる期待が高まってきている。我々は、神経科学研究領域の新しい技術を駆使し、人工的に知覚神経活動を制御することで、様々な疾患モデル動物に特定の期間、特定の刺激頻度で“痛み刺激”を負荷することを可能としたことから、現在、痛みによる免疫変動と生命予後に関する統合的解析を行っている。一方、iPS 細胞は多能性幹細胞であり、患者を含む特定の個人由来の体細胞より樹立され、目的の細胞へ分化誘導を行うことにより、難治性疾患の病態解析や治療法開発への応用が可能である。我々は、難治性神経疾患の病態解析を行う目的で、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞におけるエピジェネティクス修飾を伴った網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、いくつかの遺伝子の劇的な発現変動を見出した。こうして抽出された候補遺伝子と、パーキンソン病の表現系との相関関係を解析するために、Cre-loxp システムに従い、マウスの黒質ドパミン神経細胞特異的に候補遺伝子の発現を調節したところ、ドパミン関連行動の著しい低下を見出した。こうした“リバーストランスレーショナルニューロサイエンスリサーチ”を展開することで、大規模臨床研究やヒト検体から得られる結果を基礎的に再現、立証し、さらには新しい治療指針を導き出すことが可能となる。本講演では、こうした次世代型リバーストランスレーショナルリサーチの新展開について紹介し、その必要性、重要性について言及する。

Toll-like receptor 3 リガンドの血管平滑筋機能への影響

○松本 貴之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

循環器系と自然免疫系のクロストークに関するエビデンスが構築されつつあるが、循環器疾患の病態形成における自然免疫系の役割については完全に明らかとされていない。特に、免疫系における主要な分子の一つであるtoll-like receptors (TLRs) に関し、高血圧、脳卒中、動脈硬化といった循環器疾患の病態生理学的意義について焦点を当てた研究が近年加速しつつある。しかしながら、TLRsシグナルを活性化する分子の血管機能への直接的な影響については、未だ不明な点が多い。TLRファミリーメンバーのうち、TLR3は、様々な細胞に発現が認められ、血管平滑筋細胞にも発現していることが知られているが、血管収縮、弛緩といった機能における役割についてのエビデンスは少ない。TLR3は、細胞内のエンドソームに局在する細胞内受容体であり、ウイルス由来のdouble-strand RNA (dsRNA) あるいはネクローシスを起こした細胞から放出されたdsRNAにより活性化される。そこで、演者らはTLR3リガンドであるウイルスRNAを模倣するdsRNAアナログのpoly I:Cを用い血管機能に対する直接的な影響を検討した。器官培養法を用いて、poly I:Cをラット上腸間膜動脈に暴露したところ、nitric oxideによる弛緩反応が減弱することを見出した。本シンポジウムでは、TLR3リガンドが血管平滑筋機能に影響を与えることについて、また、そのメカニズムについて、演者等の検討を中心に述べ、さらにTLR3関連シグナルの血管病に対する治療標的としての可能性について議論したい。

向精神薬による尿排出機能障害の評価—膀胱及び尿道の収縮機能に対する影響—

○小原 圭将¹、八巻 史子¹、田中 芳夫¹

¹東邦大・薬・薬理

精神疾患の患者数は近年増加しており、そのなかでも特にうつ病の患者数の増加が顕著である。うつ病の治療はイミプラミンの登場以来、抗うつ薬による薬物治療が基本である。イミプラミンをはじめとする三環系抗うつ薬の治療効果は、セロトニン及びノルアドレナリン(NA)トランスポーター阻害作用による脳内モノアミン濃度の増加によりもたらされると考えられている。脳内モノアミン濃度の増加の一部は、 α_2 -アドレナリン受容体(α_2 -受容体)拮抗作用によりもたらされる可能性も示唆されている。その一方で、三環系抗うつ薬は、抗コリン作用に起因する口渇や尿排出機能障害を出現させるという問題が指摘されていた。この欠点を改善するため、これらのトランスポーターや標的受容体に対する選択性をより高め、抗コリン作用を軽減した各種抗うつ薬[選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)、ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬(NaSSA)]が登場したことにより、口渇や尿排出機能障害などの副作用の発生頻度が有意に減少するという期待が寄せられた。そこで、当教室では、モルモット膀胱平滑筋を用いてアセチルコリン(ACh)誘発性収縮に対する影響を検討することにより、各種抗うつ薬が尿排出機能障害を引き起こす可能性を検証することにした。その結果、三環系薬や四環系薬のマプロチリンに加え、NaSSAであるミルタザピンにも臨床用量範囲内でACh誘発性収縮に対する有意な抑制作用を見出し、抗コリン作用に起因すると考えられる尿排出機能障害を引き起こす可能性が示された。一方、抗うつ薬のうちNAトランスポーター阻害作用をもつものは、交感神経終末と尿道平滑筋間のシナプス間隙でのNA量を増加させるため、尿道平滑筋の収縮力の増強と尿道抵抗の増大により尿排出機能障害を引き起こすと考えられる。さらに、 α_2 -受容体拮抗作用を有する抗うつ薬は、交感神経終末からのNAの遊離を促進するため、尿道抵抗を増大させる可能性がある。本発表では、膀胱平滑筋の収縮機能に対する影響に加え、尿道平滑筋および精管平滑筋の収縮機能に対する各種抗うつ薬の影響を検討し、それらが尿排出機能障害を誘発する可能性とその機序について検証したので、その結果を報告する。

炎症病態における消化管ペースメーカー細胞の機能破綻とその治療法の探索

○梶 典幸¹、中山 晋介²、飯野 哲³、堀口 和秀³、堀 正敏⁴

¹麻布大学獣医学部薬理、²名古屋大・院医・細胞生理、³福井大学学術研究院医学系部門解剖、⁴東京大・院農・獣医薬理

消化管は食物の消化、栄養吸収、老廃物の排泄を行う臓器であり、これらの機能を十分に発揮するためには消化管が規則正しく運動する必要がある。消化管運動は従来、神経ネットワークによる平滑筋支配によって生み出されていると考えられてきたが、近年では平滑筋周囲に存在する様々な間質細胞が消化管運動を修飾していることが明らかとなってきた。カハール介在細胞は消化管運動におけるペースメーカーや神経伝達の仲介を担う間質細胞であり、運動の基礎的なリズムを作っている。カハール介在細胞の一部を遺伝的に欠損する動物では消化管輸送能が著しく低下することから、この細胞が正常な消化管運動の発現に必須であることが示されている。これまでに炎症性腸疾患や慢性偽性腸閉塞などの消化管炎症を伴う病態において、カハール介在細胞のペースメーカー機能やその細胞数が低下することが報告されている。しかし、その詳細な分子機構は十分に明らかとなっていなかった。そこで我々はこれまでに *in vitro*における炎症モデルおよび術後炎症による消化管運動機能低下の動物モデルを用いて炎症時におけるカハール介在細胞障害の分子機構を検討してきた。これらの検証から一酸化窒素や酸化ストレスがカハール介在細胞の障害を引き起こす因子であることがわかってきた。一方、一酸化窒素はカハール介在細胞の生存にとって必要な分子であることも示唆されている。本シンポジウムではこれまでの研究成果およびカハール介在細胞を標的とした創薬の可能性について議論したい。

平滑筋の興奮収縮連関を調節する新しい薬理的標的シグナル

○江藤 真澄^{1,2}、北澤 俊雄²、松井 利康¹、赤木 魁³、波多野 直哉³、勝木 秀一¹、竹谷 浩介¹、徳光 浩³

¹岡山理科大学獣医学部、²トマスジェファソン大学医学部、³岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学

臓器壁を構成する平滑筋細胞は機能的ドメインごとに特徴的な収縮応答することが知られるが、それを特徴づける機序についての知見は限られている。より効果的な治療薬や診断薬を開発したり、臓器壁の運動障害をもたらす「平滑筋病」病態を理解するためには興奮収縮連関を定義する細胞内シグナル経路を理解しなければならない。今回我々は、 α 毒素または β エシンを用いて限定的にスキンド処理を行い細胞膜電位変化の影響を取り除いたマウス回腸と膀胱壁平滑筋組織を用い、これら組織に特徴的な一過的収縮応答の分子機構を検討した。スキンド組織を $pCa > 8.0$ から $pCa 6.0$ の溶液に移すと、張力の発生は約30秒後に頂点を迎えた後に速やかに弛緩した。 $[Ca^{2+}]$ が一定であることから、この一過性の収縮応答はカルシウム感受性の変化を示す。そこで、薬理学的手法を用いスキンド組織内のMLCKとMLCP(ミオシン軽鎖キナーゼとホスファターゼ)活性を継時的に測定した。収縮の頂点と弛緩後を比べると後者ではMLCK活性が著しく減少していたが、MLCPの活性には有意な変化が見られず、最大収縮後に起こるMLCKの継時的な不活化が平滑筋の一過性収縮の原因であることが明らかとなった。MLCKの不活化とそれに伴う一過性収縮応答は過剰量の Ca^{2+} 、またはCaM添加によって消失した。MLCK不活化にはATPが必要であり、不活化に伴いMLCK Ser815のリン酸化が検出された。従って、MLCKのリン酸化に伴うCaM結合親和性の低下が一過性収縮の要因と考えられる。MLCKをリン酸化するとされるCaMKII, PKA, AMPKや脱リン酸化するとされるCaNの阻害剤は収縮の一過性に影響せず、MLCKの継時的な不活化には未知のキナーゼ・ホスファターゼ経路が関与していることが示唆された。ルブラトキシンで処理すると収縮の一過性が増加したことから、PP2Aを介した経路がMLCKを脱リン酸化していると思われる。シンポジウムでは新たなキナーゼ経路を含めてMLCKを介した平滑筋収縮制御機構を議論したい。