

ラットの側坐核のdopamine放出促進へのOX₂受容体の関与

○川島 央暉、青野 悠里、三枝 禎

日本大・松戸歯学部・薬理学

【目的】

睡眠覚醒サイクルや摂食などの調節に関与する神経ペプチドのorexin-Aとorexin-Bは、orexin受容体subtypeのOX₁とOX₂受容体を介して作用する。側坐核は、意欲や情動に関わる中脳辺縁系dopamine (DA) 神経の投射先のひとつである。我々はorexin受容体subtypeの非選択的antagonistのMK-4305が側坐核のDA放出を促進することを報告した(第93回日本薬理学会年会)。しかし、このMK-4305によるDA放出促進において各orexin受容体subtypeが果たす役割は明らかでない。そこでMK-4305が誘発したDA放出へのOX₂受容体の関与について、OX₂受容体の選択的なagonistのorexin-BとantagonistのEMPAを用いて*in vivo*脳微小透析法により無麻酔非拘束ラットで検討した。

【方法】

実験には体重約200 gのS-D系雄性ラットを用いた。透析プローブ装着用ガイドカニューレの植立手術から約1週間後、無麻酔非拘束の条件下で脳微小透析実験を行った。透析プローブに改良リンゲル液を2 μl/分で灌流し、微小透析膜(直径220 μm, 長さ2 mm)を介して側坐核の細胞外液を試料として5分毎に回収した。試料中のDAはHPLC-ECD法で定量した。Orexin-B, EMPA, MK-4305は透析膜の近傍に配置した薬物投与用微小ニードルを介してmicrosyringeで局所投与し、電位依存性Na⁺チャンネル阻害薬のTTXは灌流液に溶解し逆透析により灌流投与した。Orexin-Bはsalineへ、EMPAとMK-4305はDMSOを0.1%含むsalineへ溶解し、注入液量は0.5 μlとした。Orexin-B, EMPA, MK-4305の投与量は注入液中の絶対量(g), TTXの投与量は灌流液の濃度(M)で示した。

【結果】

DA量は溶媒の局所投与で目立った変化がなかった。またorexin-B (500 pg, 5 ng)の投与でもDA量に著変はなかった。これに対しEMPA (90, 900 pg, 9 ng)の投与は、DAを用量依存的に約140%まで増大させた。EMPA (9 ng)が誘発したDAの増大はTTX (2 μM, 2時間)の投与で消失した。Orexin-B (500 pg)の併用投与により、EMPA (9 ng)のみならずMK-4305 (5 ng)が誘発したDA放出の促進も抑制された。

【考察】

Orexin-Bとは異なりEMPAの側坐核への局所投与は、同部位の神経活動に依存したDA放出を促進することが示された。Orexin-BはEMPAが誘発したDA放出を抑制したことから、OX₂受容体の遮断は側坐核のDA放出を促進することが示唆された。また、MK-4305の側坐核への局所投与が誘発した同部位のDA放出促進にOX₂受容体の遮断が関与することが示唆された。

睡眠中のラットの中枢および末梢神経活動に対するラメルテオンの効果

○吉本 愛梨^{1,2}、山城 皓太郎²、鈴木 岳之¹、池谷 裕二²、松本 信圭²

¹慶應義塾大・薬・薬学教育センター、²東京大・院薬・薬品作用

不眠症は日常活動、生産性、QOLに対し負の影響をもたらす睡眠障害である。不眠症に対しては、ベンゾジアゼピン系催眠薬が広く用いられている一方で、反跳性不眠を含む退薬症状や、依存性を引き起こすことが問題となっている (Zammit, Drug Saf, 2009)。ベンゾジアゼピン系催眠薬に対して、ラメルテオンは、主に視床下部視交叉上核に存在するメラトニン受容体 (MT1/MT2受容体) のアゴニストであり、自然睡眠に近い催眠作用を示す (Kato et al., Neuropharmacology, 2005)。このようにラメルテオンの有効性が報告されている一方で、生体動物の中枢の神経活動や末梢の活動に対する作用を調べた知見は少ない。本研究の目的は、睡眠中および覚醒下の動物の中枢の神経活動および末梢の活動に対するラメルテオンの作用を明らかにすることである。

本研究では、ラメルテオン (薬液群)、または生理食塩水 (コントロール群) をラットの腹腔内に投与した。投与の前後各3時間、ラットにオープンフィールドを探索させ、探索中および睡眠中の脳皮質電図、筋電図、心電図を記録した。脳皮質電図は両半球の嗅球、一次体性感覚皮質、一次運動皮質からビス電極を用いて記録した。筋電図と心電図はワイヤー電極を用いて記録した。

嗅球の脳皮質電図と筋電図により覚醒時と睡眠時に二分して解析した結果、薬液群ではプラセボ群に比べて、有意な全睡眠時間の増加、平均睡眠潜時の減少、中途覚醒回数の減少がみられた。さらに脳皮質電図から睡眠のスコアリングを行った結果、薬液群ではコントロール群に比べ、一次体性感覚皮質の脳皮質電図の低周波数帯の強度が有意に高く、徐波睡眠の時間が増加した。末梢神経活動に着目すると、薬液群では軽度の心拍数低下が見られた。さらに、薬液群では、心拍変動における低周波変動成分と高周波変動成分の比の増加が見られた。このことから、ラメルテオンによる副交感神経優位な睡眠の誘導が示唆された。

以上のことからラメルテオンは、自然な睡眠時間を誘導、延長させながら睡眠中の中枢および末梢の神経活動に影響を与え、睡眠の質を改善する薬物であることが示唆された。

視床下部外側野のドーパミン神経の活性化は摂食行動を抑制する

○米持 奈央美¹、亀井 淳三²、池田 弘子¹

¹星薬科大・薬物治療、²星薬科大・生体分子薬理

摂食調節において視床下部は中心的な役割を担うことから、本研究では視床下部のなかでも摂食中枢として知られる視床下部外側野のドーパミン神経機能が摂食調節にどのような役割を果たすか検討した。実験にはICR系雄性マウスを使用した。摂餌ならびにグルコースの投与により、マウスの視床下部外側野のドーパミン量は増加した。視床下部外側野へ投射するドーパミン神経の起始核を明らかにするため、逆行性トレーサーである Fluoro-Gold (FG) を視床下部外側野に投与すると、FG陽性細胞は腹側被蓋野ならびに黒質緻密部で認められた。また、これらの細胞の多くはドーパミン合成の律速酵素である tyrosine hydroxylase 陽性だった。これらの結果より、摂餌により腹側被蓋野ならびに黒質緻密部から視床下部外側野に投射するドーパミン神経が活性化することが示唆された。そこでこの神経を抑制することを目的に、Ca²⁺チャネル阻害薬の pregabalin を投与したところ、グルコースによる視床下部外側野のドーパミン量の増加は抑制されることを確認した。また、pregabalin の投与により摂餌量が増加したことから、視床下部外側野のドーパミンD₁およびD₂受容体の摂食調節における役割を検討した。ドーパミンD₁ (SKF 38393) およびD₂ (quinpirole) 受容体作動薬の視床下部外側野への投与によって摂餌量は減少し、この効果はそれぞれの拮抗薬により抑制された。また、ドーパミンD₁およびD₂受容体の刺激が視床下部の神経ペプチドに与える影響を検討したところ、SKF 38393の投与により視床下部の neuropeptide Y および agouti-related peptide の mRNA 量は減少した。一方、quinpirole の投与により視床下部の proopiomelanocortin の mRNA 量は増加し、preproorexin の mRNA 量は減少した。以上、本研究の結果から、摂餌により腹側被蓋野ならびに黒質緻密部から視床下部外側野に投射するドーパミン神経が活性化し、この活性化により遊離されるドーパミンがドーパミンD₁およびD₂受容体を刺激することで摂食行動を終結させることが示された。また、ドーパミンD₁およびD₂受容体の刺激により、視床下部のペプチド神経の活性が変化することで摂食行動が抑制されることが示唆された。

新奇環境の探索を介した海馬場所細胞による再活性化パターンの変化の解析

○八木 佐一郎、池谷 裕二、佐々木 拓哉

東京大・院薬

海馬では動物が特定の位置にいるときに発火する場所細胞が存在しており、ある環境の位置情報をもつ空間地図が形成されている。動物が初めて訪れる新奇環境を探索するとき、海馬では一部の細胞が新たに場所細胞として活動し始め、空間地図が変化する。新奇環境の探索時に獲得した記憶の固定には、変化した空間地図を構成する場所細胞の再活性化と、それに伴う海馬神経回路の可塑的変化が必要であると考えられている。場所細胞の再活性化は、課題中の報酬時と課題後の休息時に多く発生する。この二つの期間における場所細胞の再活性化パターンを比較した研究は少なく、新奇環境探索中と探索後における再活性化パターンの違いは明らかではない。我々は、新奇の部屋において報酬を獲得しながらU字のトラックを探索しているラットからマルチユニット記録を行い、海馬CA1の細胞の活動を記録した。課題中の報酬時と課題後の休息時における場所細胞の再活性化パターンを比較したところ、両者が正に相関していた。一方で課題中の走行時の活動と休息時の再活性化パターンを比較した場合、比較的弱い相関があることが明らかとなった。このことは、課題中の報酬時における場所細胞の再活性化の方が海馬神経回路に可塑的変化を誘導することを示唆している。さらに、新奇環境と慣れた環境の空間地図の類似度を調べるため、慣れた部屋における課題中の場所細胞の活動を追加で解析した。両方の部屋での活動を比較することで、新奇の部屋での課題中の場所細胞の一部は、慣れた部屋での課題中と同じ位置で発火することが明らかになった。さらに、それらの場所細胞と新しく出現した場所細胞との再活性化パターンを比較したところ、有意な差は認められなかった。このことは、既存の情報と新奇の情報をもつ場所細胞の再活性化が学習後の海馬神経回路の可塑的変化に寄与していることを示唆している。

生後初期の Maus 脳内におけるマイクログリアの新形態 Bubbly Dense Organization (BUDO) の発見

○河野 玲奈¹、池谷 裕二¹、小山 隆太^{1,2}

¹東京大・院薬・薬品作用、²JST・さきがけ

我々は、生後初期 Maus 脳内において、ブドウのような形態をとるマイクログリアが散見されることを発見した。そして、この葡萄様構造は、生後初期脳内で生じる出血に反応したマイクログリアが形態を変化させた構造であることを明らかにした。

脳内免疫細胞であるマイクログリアは、脳内に侵入した異物や死細胞などを貪食・除去することで発達や恒常性に寄与する。被貪食物の消化を担うリソソームは、リソソームマーカーである CD68 により可視化され、通常はマイクログリア内部で不規則な形状で存在している。しかし、生後初期の Maus 脳内においては球状の CD68 が集積したブドウのような構造物が局所的に存在することを発見した。我々はこの特徴的な未知の構造物を Bubbly Dense Organization (BUDO) と名付け、その局在や分布量、機能の解析を試みた。

まず時空間的分布を詳細に検証した。BUDO は全脳に広く分布していたが、特に脳表付近や側脳室横に多く見られる傾向があった。また BUDO は、生後 0, 7, 14 日齢の Maus 脳内には存在したが、60 日齢では存在しなかったことから、発達期に特有の構造であることが示唆された。

続いて免疫組織染色により BUDO を持つ細胞種を詳細に確認したところ、マイクログリア特異的マーカーである P2Y12R・Siglec-H 陽性であったため、末梢マクロファージではなくマイクログリアが構造を変化させたものであることが示唆された。

さらに我々は、BUDO の内部やその周辺領域に、赤色の自家蛍光が常に存在することを発見した。自家蛍光を持つ生体由来の物質として血液を想定し、以降は BUDO が血液漏出に反応した構造であるという仮説を検証した。まず、赤血球の抗体染色を行なったところ、自家蛍光部位特異的に赤血球が漏出しており、その一部は BUDO 内部に取り込まれている様子が観察された。そこで、生理条件下では BUDO が存在しない成体 Maus の脳内に血液を投与したところ、投与領域周辺に赤血球が集積するとともに、BUDO が誘導された。以上の結果から、BUDO に見られるブドウのような形態の CD68 は、マイクログリアが赤血球を貪食することで形成される構造であることが示された。

本研究より、生後初期脳内において未成熟な血管から脳実質への血液漏出が生じており、それにマイクログリアが反応して赤血球などを貪食・除去することで、正常な脳発達に寄与していると考えられる。

ドライアイモデルラット三叉神経核における神経障害性疼痛とグリア細胞および抑制性介在ニューロンの関連

○鄭 有人^{1,2}、三上 義礼¹、伊藤 雅方¹、富田 太一郎¹、大島 大輔¹、堀 裕一²、赤羽 悟美¹

¹東邦大・医・生理学講座統合生理学分野、²東邦大・医・眼科学講座

ドライアイにより引き起こされる眼痛はQOLを著しく低下させる。そこで疼痛緩和を目的とした治療法の開発が求められている。ドライアイに伴う眼痛は、角膜上皮障害のみならず三叉神経の神経障害性疼痛にも起因すると考えられているが、そのメカニズムは未だ明らかではない。そこで我々は、ドライアイによって引き起こされる眼痛のメカニズムを明らかにすることを目的として、ドライアイモデルラットを用いて三叉神経核のグリア細胞および神経細胞の変化を解析した。実験にはSDラット（6週齢）を用い、左側の眼窩外および眼窩内涙腺を摘出し（涙腺摘出側）、右側は涙腺露出後に摘出せず皮膚縫合した（sham側）。涙液量および角膜上皮障害スコアを測定したところ、涙腺摘出1週後において涙液減少と角膜上皮障害が生じていることが確認された。術後1週以降、涙腺摘出側では、瞬目回数が増加し、5 M NaCl溶液食塩水点眼による角膜感覚試験においても過敏性が上昇していた。これらの表現型から、上皮障害の増悪に加えて三叉神経の末梢神経障害も起きていることが推察された。そこで、角膜由来の知覚神経が主に投射する三叉神経核 (Vi/Vc) 領域に着目し、涙腺摘出術3日後、1週後、2週後、8週後において組織染色ならびに免疫組織学的解析を実施した。ミクログリアのマーカー (CD11b) は、涙腺摘出3日後と1週後に涙腺摘出側のみ体積およびシグナル強度が上昇し、2週後以降はsham側との差異が消失した。活性化アストロサイトのマーカー (GFAP) は、術後3日において両側とも体積およびシグナル強度が増加した。その後、涙腺摘出側のアストロサイト活性化は術後8週まで維持されていたが、sham側では術前のレベルまで戻った。一方、Nissl染色では、術後2週と8週において涙腺摘出側の神経細胞密度が低下していた。そこで免疫染色により細胞種を特定したところ、抑制性介在ニューロンのマーカーである抗Parvalbumin抗体陽性の神経細胞数の割合が術後2週と8週の涙腺摘出側において有意に減少していることを見出した。上記の結果から、ドライアイによる角膜上皮障害に起因した眼痛において、三叉神経核におけるミクログリアおよびアストロサイトの活性化と抑制性介在ニューロンの減少を介して角膜からの痛覚情報が亢進し、神経障害性疼痛が引き起こされていることが示唆された。

選択的 δ オピオイド受容体作動薬 KNT-127 はマウス内側前頭前野において PI3K-Akt-mTOR-p70S6K シグナル伝達経路を介して抗うつ様作用を示す

○吉岡 寿倫¹、山田 大輔¹、飯尾 啓太²、長瀬 博²、斎藤 顕宜¹

¹東京理科大・薬・薬理、²筑波大・IHS・創薬化学

【背景】 うつ病は罹患者数が世界総人口の 5% に達するが、現存するうつ病治療薬は効果発現に長期投与を要するため、即効性をもつ新規治療薬の開発が期待されている。我々はこれまで、選択的 δ オピオイド受容体作動薬 KNT-127 が、 δ オピオイド受容体を介して抗うつ様作用を示すことを報告してきた。しかし、その分子メカニズムは依然として未解明のままである。そこで本研究では、行動薬理学および生化学的手法を用いて、マウス強制水泳試験における KNT-127 の抗うつ様作用の発現機構の解明を試みた。

【方法】 雄性 ICR 系マウス（6週齢）を用いた。強制水泳試験では、水温 25°C の水槽中にマウスを入れて 15 分間のトレーニングを実施し、その翌日に 10 分間のテストを実施した。この際、テストの 60 分前に rapamycin（選択的 mTOR 阻害剤、20 nmol）あるいは LY294002（PI3K 阻害剤、0.2 nmol）を側脳室内投与し、30 分前に KNT-127（10 mg/kg）を皮下投与した。タンパク質リン酸化レベルの評価では、同様に薬物投与をした後、各脳部位（内側前頭前野、扁桃核、海馬）を分画し、ウェスタンブロット法により定量した。

【結果】 近年、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達経路が即効性の抗うつ作用機序に関与していることが報告されていることに着目し、マウス強制水泳試験において、選択的 mTOR 阻害剤をあらかじめ側脳室内投与したところ、KNT-127 の抗うつ様作用が消失した。さらに、mTOR の上流分子のひとつである PI3K の阻害剤を同様に前処置しても、KNT-127 の抗うつ様作用が消失した。次に、うつ病との関連性が強いとされている各脳部位での mTOR シグナル関連分子のリン酸化レベルを評価したところ、KNT-127 の投与によりマウス内側前頭前野において Akt および p70S6K のリン酸化の亢進が観察された。

【考察】 以上の結果から、KNT-127 はマウス内側前頭前野において PI3K-Akt-mTOR-p70S6K シグナル伝達経路を活性化することにより抗うつ様作用を示すことが示唆された。本報告は、うつ病治療の候補薬物としての δ オピオイド受容体作動薬の作用機序の解明のための大きな足掛かりになると考えている。今後、作用機序のさらなる追究を目指したい。

ATPによる気道上皮線毛運動の促進作用に関わるプリン受容体の同定

○関谷 知樹、磯濱 洋一郎

東京理科大・薬・応用薬理

【背景・目的】気道上皮の線毛運動は、気道の異物排出機構である粘液線毛輸送（MCT）系において、気道粘液によって捕捉された異物を排出するための駆動力を生み出す役割を担う。従って、線毛運動を促進することは、種々の呼吸器疾患時に低下するMCT能を回復させるために重要であるものの、これを標的とする医薬品はいまだに存在しない。一方、ATPなどのプリンヌクレオチドは線毛運動を促進する数少ない生理活性物質として知られている。しかし、気道系においてATPは気管支筋の収縮を始め、粘液の分泌亢進、咳嗽反応の誘発などを同時に生じるため、これをMCT促進薬として応用した例はない。そこで本研究では、選択的に線毛運動を促進させる医薬品の開発を究極の目的とし、線毛運動に関わるプリンヌクレオチド受容体の同定を目指した。

【方法】実験標本にはICR系雄性マウスの気道より急性単離した線毛上皮細胞を用いた。細胞をカバーガラス上に播種し、これを顕微鏡に装着したハイスピードカメラで撮影した。線毛運動は振動数（CBF：ciliary beat frequency）および振幅（CBA：ciliary beat amplitude）の両面から解析した。

【結果・考察】種々プリンヌクレオチドの作用を調べたが、まず、ATP（0.1～1 mM）は処理濃度依存的にCBFとCBAの双方を亢進した。一方で、ADP（0.01～1 mM）はCBFのみを亢進し、adenosine（1 mM）およびUTP（1 mM）はCBF、CBA共に著明な作用を示さなかった。ATPによる促進作用に注目すると、CBFはATP処理の直後から徐々に上昇し、観察エンドポイントである試薬投与5分後まで持続的に上昇したのに対し、CBAはATPの投与後約1分でピークとなりその後プラトーとなった。また、阻害薬を用いた検討では、細胞内Ca²⁺阻害薬であるBAPTA-AM（10 μM）をATPと共処理すると、CBFだけが抑制され、CBAには著明な影響がなかった。これらの成績から、ATPによるCBFとCBAの調節が異なると推定された。さらにこれらの薬理的性質から、P2Y₁受容体の選択的阻害薬であるMRS2179（10 μM）を併用すると、ATPによるCBFの亢進が抑制された。以上のことから、ATPは線毛運動のCBFおよびCBAを異なる受容体を介して亢進しており、そのうちCBFにはP2Y₁受容体に関わると考えられた。CBAに関与する受容体は未だ明らかでないが、今回同定したP2Y₁受容体は粘液の分泌などの他の気道系の反応に関わるとの報告はなく、線毛運動を選択的に促進させる医薬品の開発への応用が期待できる。

LPSで誘発した下痢症状および腸上皮細胞のアクアポリン3発現低下に対する五苓散の作用

○村上 一仁、磯濱 洋一郎

東京理科大・薬・応用薬理

【背景・目的】五苓散は、体内の水分代謝調節作用をもつとされる漢方薬で、広く臨床で用いられている。特に小児科領域では、感染性胃腸炎に伴う下痢および嘔吐症状に著効を示すとの症例報告もなされている。しかし、五苓散による消化器症状の改善作用については基礎薬理的に検証されておらず、その作用機序も不明である。一般に、腸管での炎症は、粘膜上皮のバリア機能が破綻させると共に、腸管内の水分の分泌・吸収のバランスが崩壊して下痢症状が生じる。また、腸管上皮に存在する水チャネルのアクアポリン-3 (AQP3) は腸管内の水の吸収を担うが、下痢症状を呈する種々の動物モデルでは発現が低下することも知られている。本研究では、五苓散の止瀉作用を実験薬理的に検証するとともに、その作用の特性を調べた。

【方法】実験動物には雄性ICRマウス（7週齢）を用いた。マウスにlipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg) を腹腔内投与して消化管感染を模した下痢を誘発した。五苓散はLPSの30分前に経口投与し、下痢スコア、腸管粘膜の病理観察およびサイトカインのmRNA量を評価するとともに、AQP3の発現をwestern blot法およびqRT-PCR法にて調べた。

【結果・考察】LPSを投与したマウスでは、TNF- α のmRNA量が時間依存的に増加し、腸粘膜の組織傷害および下痢スコアも同様に推移し、感染性の腸炎と類似の病態が認められた。一方、五苓散（1 g/kg）を前投与した動物では、TNF- α のmRNA量には影響しなかったものの、組織傷害および下痢スコアが著明に改善された。また興味深いことに、LPSを投与したマウスの腸上皮でのAQP3 mRNAおよびタンパク質の量はともに著しく低下したが、五苓散投与群では健常動物と同程度の発現量であった。さらに、AQP3欠損マウスを用いて同様の実験を行なったが、五苓散による組織保護作用および下痢改善作用は共に減弱した。これらの結果より、本動物モデルでの下痢の発症にはAQP3の発現減少が少なくとも一部関わりと考えられ、また、五苓散はこのAQP3発現量を調節することで下痢症状を改善すると推定された。本成績は、五苓散の感染性胃腸炎に対する実効性を基礎薬理的に示すとともに、本方剤の新たな作用機序を示唆するものとして興味深い。

Successful detection of agonist-induced interactions between receptor dimers and β -arrestin

○Nuttawadee Ngamlertwong、土屋 裕義、輿水 崇鏡

自治医科大・医

[Background] G-protein coupled receptors (GPCRs) form dimer and higher order of oligomer. However, current knowledge is very limited regarding interaction properties between dimerised GPCR and β -arrestin. Three subtype receptors for neuropeptide hormone vasopressin involve V1a, V1b and V2. Although they retain high sequence homology, kinetics of interactions with β -arrestin are significantly different between the V1a and V2 receptors. V1a and V2 receptors are expressed in plasma membrane, whereas majority of V1b receptor shows unique intracellular localization at unstimulated condition with a small part of the receptor locating in plasma membrane. Therefore, vasopressin receptors are excellent model system to study variety of the receptor- β -arrestin interactions. Here we established an analysis method to detect formation of homomeric V1a and V1b receptor dimers and interaction of the receptor dimers with β -arrestin 2.

[Methods] Carboxyl-terminal tail of the receptors were connected with each part of split luciferase and β -arrestin 2 with Venus fluorescent protein. We measured bioluminescence resonance energy transfer (BRET) between receptor dimer-luciferase and β -arrestin 2-Venus in HEK cells.

[Results] Agonist-dependent access of β -arrestin 2 to V1a receptor dimers was successfully detected. In contrast, basal BRET signal between V1b receptor dimers and β -arrestin 2 was significantly higher than that of V1a. Our results are direct evidence that receptor dimers can interact with β -arrestin 2 and form a three-molecule complex. In contrast, agonist stimulation of V1b receptor dimers was ineffective to show further increase in BRET signal in our initial method. We recently improved our experimental condition that allowed us to monitor agonist-induced conformational change in the V1b dimer- β -arrestin 2 signal complex.

[Conclusion] Our method enabled us for the first time to evaluate chemicals, which could modify β -arrestin 2 access to the V1b receptor dimers.

グルコシルセラミド合成酵素のチロシンリン酸化を介した活性制御

○本田 拓也¹、元吉 海星¹、笠原 潤也¹、山形 一行^{1,2}、中村 浩之¹、村山 俊彦¹

¹千葉大・院薬・薬効薬理、²千葉大・院医・分子病態解析

【目的】 グルコシルセラミド(GlcCer)はセラミドからGlcCer合成酵素(GCS)によって合成され、下流の糖脂質(ガングリオシド)合成の起点となる。GlcCerやガングリオシドはがん細胞の接着や遊走、転移能に寄与することが報告されている。Srcは非受容体型チロシンキナーゼであり、細胞の増殖・分化・接着など様々な生命現象に寄与している。当研究室では以前に、Srcによってセラミド代謝が変化することを報告している。現在までにGCSのチロシンリン酸化を介した活性制御機構は明らかとなっていないため、本研究ではSrcがGCSの活性に与える影響とそのメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】 SrcのGlcCer産生への寄与を調べるため、恒常活性型Src(v-Src)をDoxycycline依存的に誘導発現するHeLa S3細胞株を用いた。NBD蛍光基を付加したNBD-C6-セラミドを細胞に処置し、NBDセラミド代謝物を分離・定量すると、v-Srcの誘導発現によってNBD-GlcCer量が増加した。また、Srcの阻害剤であるSU6656を処置すると、v-SrcによるNBD-GlcCer量の増加は抑制された。一方で、Srcの下流シグナルであるMAPK経路や、PI3Kの阻害剤を処理してもv-SrcによるNBD-GlcCerの増加は抑制されなかった。次に、v-SrcによるGlcCer量増加のメカニズムを解析するため、HAタグを付加したGCS-HAとv-Srcを細胞に一過性発現させ、免疫沈降法にてGCS-HAのチロシンリン酸化を解析すると、v-Srcの発現によってGCS-HAがチロシンリン酸化された。さらにGCSの132番目のチロシンをフェニルアラニンに変異させた変異体(GCS-Y132F)を免疫沈降すると、野生型に比べてv-Srcによるリン酸化が2割減弱していた。野生型GCSとGCS-Y132FのNBD-GlcCer産生量を比較すると、GCS-Y132Fでは野生型に比べて産生量の低下が観察された。

【考察】 本研究により、GCSのチロシンリン酸化を介した活性制御機構の存在が明らかとなった。GlcCerはがんを含む疾患に関わるため、活性制御機構の解明により新規治療戦略の開発が期待される。

子宮内膜細胞の上皮間葉系転換におけるCXCL12-CXCR4系の役割

○草間 和哉¹、津端 夏王也¹、吉江 幹浩¹、小島 淳哉²、西洋孝²、田村 和広¹

¹東京薬科大・薬、²東京医科大・医・産科婦人科学

【目的】子宮内膜症は、女性のQOLを著しく低下させる罹患率が高い疾患である。この病変は逆行性月経血に由来する形質転換した異所性内膜組織と考えられている。病変では炎症反応や線維化がしばしばみられるが、その分子メカニズムは不明である。近年、内膜症病変(主に間質細胞と腺上皮細胞から構成)において上皮間葉系転換 (EMT) の誘導や低酸素誘導因子の発現亢進が報告されている。そこで、子宮内膜細胞における低酸素下での炎症性因子によるEMTの誘導の有無と、EMTへの関与が報告されているケモカイン受容体CXCR4の役割を検討した。【方法】以前、我々が示唆した内膜細胞の炎症誘導因子であるトロンビンとプロスタグランジン(PG)E2を、三次元培養したヒト子宮内膜細胞に処置し、低酸素条件下で培養した。炎症性因子、EMTマーカー、CXCR4の発現をウエスタンブロットおよびqPCRにて解析し、細胞遊走能の変化をトランスウェルアッセイにて評価した。【結果】子宮内膜間質細胞及び上皮細胞において、低酸素下のトロンビンとPGE2処置は、炎症性因子およびEMTマーカー、CXCR4発現を上昇させた。しかしながら、間質細胞においては典型的なEMTマーカーの発現変化はみられなかった。一方、上皮細胞の遊走能は増加した。また、CXCR4のリガンドであるCXCL12を上皮細胞に処置すると、EMTマーカー発現量は上昇し、遊走能も濃度依存的に増加した。さらに、間質細胞におけるCXCL12 mRNA発現を確認した。【結論】低酸素下でのトロンビンとPGE2の暴露は、子宮内膜上皮細胞のCXCR4発現上昇に加えて、間質細胞のCXCL12発現を誘導して、線維化や細胞遊走の亢進を起こすことを明らかにした。以上、病変での炎症や出血でもたらされる腹腔内環境が一部CXCL12-CXCR4介在性のEMTを起こし、内膜症病変の線維化や細胞遊走の促進に関わることが示唆された。