

(±)-Methylphenidateとその光学活性体が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響

○小菅 康弘¹、馬場 清香¹、三浦 基文²、宮岸 寛子¹、鳥山 正晴²、本橋 重康²、石毛 久美子¹

¹日本大・薬・薬理、²日本大・薬・薬品分子化

【目的】小胞体の機能不全により生じる小胞体ストレスは、脳梗塞やアルツハイマー病などで認められる神経変性に関係するだけでなく、双極性障害、自閉スペクトラム症あるいは注意欠陥/多動性障害 (AD/HD)などの精神神経疾患の病態形成にも関与することが明らかになりつつある。本研究では、マウス海馬由来の神経様細胞であるHT22細胞を用いて、我が国においてAD/HD治療薬として認可されている(±)-Methylphenidate (MPH)が、小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響について検討した。

【方法】HT22細胞は、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium中で、37°C、10% CO₂条件で培養した。細胞生存率は、MTT法により評価し、小胞体ストレス関連因子の発現レベルは、Western blot法により検討した。光学異性体の分離および精製には高速液体クロマトグラフィ(HPLC)法を用いた。

【結果・考察】(±)-MPH (0.1-1000 μ M)は、小胞体ストレスの誘導薬であるTunicamycin (TM)が誘発する細胞死を濃度依存的に抑制した。また、(±)-MPHはTM曝露によるcaspase-3の活性化体の発現増加を抑制するとともに、小胞体ストレス誘導性の転写因子であるC/EBP homologous protein (CHOP)の発現上昇を顕著に抑制した。市販の(±)-MPHは (+)-MPHと(-)-MPHの等量混合物であったが、これを光学分割して得た(-)-MPHはTM誘発細胞死に対して(+)-MPHよりも強力な細胞保護効果を示した。以上より、MPHはCHOP発現抑制により小胞体ストレス誘発細胞死を抑制することが明らかとなった。また、(-)-MPHは、細胞保護効果の本体として作用する優れた光学異性体であることが示唆されたため、MPHは光学分離することでCHOP発現上昇を伴う神経変性疾患の新たな治療薬となる可能性が示された。

HT22細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するLamin B1の関与

○石毛 久美子、海野 遥香、飯島 千陽、山頭 博彰、宮岸 寛子、小菅 康弘

日本大・薬

【目的】 マウス海馬神経由来のHT22細胞は、グルタミン酸 (Glu) により、酸化ストレスによる細胞死を誘発する。酸化ストレスは、脳梗塞などの種々の病態形成に関与することが明らかにされているが、そのメカニズムについては不明な点も残されている。そこで、本研究では、酸化ストレスによる細胞死誘発メカニズムについて詳細に調べることを目的として、核内で構造の維持と転写の調節を行うLamin B1に焦点を当てて検討した。

【方法】 HT22細胞は、10%ウシ胎児血清を含む低グルコースDulbecco's Modified Eagle's Medium中で、37°C、10% CO₂で培養した。細胞死は、LDH法により評価し、タンパク質の発現レベルは、Western blot法により検討した。

【結果・考察】 HT22細胞にGlu (2.5 mM) を曝露すると、曝露4時間後からLDH遊離量が上昇しはじめ、6時間後以降急激に上昇する。そこで、Glu曝露6時間後まで1.5時間毎にサンプルを調製し、Lamin B1の挙動を調べた。核抽出液におけるLamin B1は、Glu曝露1.5時間後から時間依存的な発現量の低下が認められ、3時間後以降は、有意な減少であった。これに対し、細胞質抽出液においては、3時間以降、Cleaved Lamin B1の時間依存的な発現量上昇傾向が認められた。なお、曝露6時間後までのいずれの時間においても、核抽出液でCleaved Lamin B1、および細胞質抽出液でLamin B1は、検出されなかった。次に、Histon H3 の発現量を調べたところ、核抽出液におけるHiston H3発現量は、Glu曝露4.5時間まで変化が認められなかった。以上より、Gluは、Histon H3には影響を及ぼさず、Lamin B1を分解していることが明らかとなり、Gluによる細胞死誘導にLamin B1の分解が関与することが示唆された。

ストレス適応形成に關与するセロトニン5-HT_{1A}受容体および輸送タンパク質KIF13Aの細胞内分布の變化

○宮岸 寛子^{1,2}、辻 稔¹、小菅 康弘²、石毛 久美子²、武田 弘志¹

¹国際医療福祉大・薬・薬理、²日本大・薬・薬理

【目的】 元來生体は、ストレスに対して適応し恒常性を維持するための機構（ストレス適応機構）を備えており、この機構の破綻によりストレス性精神疾患の発症リスクが高まると考えられている。我々はこれまでに、過度のストレス刺激の繰り返し負荷により適応機構が破綻したモデルマウスの情動行動の低下に対して5-HT_{1A}受容体作動薬が抑制効果を示すことから、ストレス適応の形成機構において5-HT_{1A}受容体が重要な役割を担っていることを示唆してきた。一方、5-HT_{1A}受容体は、キネシンスーパーファミリーに属する輸送タンパク質の一つであるKIF13Aの作用により、細胞質から細胞膜へ輸送されることが報告されている。そこで、本研究では、ストレスへの適応形成と脳内5-HT_{1A}受容体およびKIF13Aの細胞内分布との関連性について検討した。

【方法】 実験にはICR系雄性マウスを用いた。1時間または4時間の拘束ストレス刺激を1日1回14日間繰り返し負荷し、ストレスへの適応マウスおよび非適応マウスを作成した。これらモデルマウスの海馬および中脳を採取し、各種タンパク質の発現量をWestern blot法により定量した。また、Blue Native-PAGEおよびSDS-PAGEを用いた二次元電気泳動法により、5HT_{1A}受容体とKIF13Aの複合体の存在について検証した。

【結果および考察】 5-HT_{1A}受容体およびKIF13Aの発現量は、適応マウスの海馬組織全体では変化が認められなかったものの、細胞膜画分では有意に増加していた。一方、非適応マウスの海馬では、組織全体あるいは細胞膜画分いずれにおいても、5-HT_{1A}受容体およびKIF13Aの発現量に変化は認められなかった。また、非適応マウスの中脳組織全体および細胞膜画分では、KIF13Aの発現量は変化することなく5-HT_{1A}受容体の発現量が有意に増加していたが、適応マウスでは特筆すべき変化は認められなかった。さらに、二次元電気泳動法を用いた検討により、マウス海馬における5HT_{1A}受容体とKIF13Aの複合体の存在が確認された。以上の結果より、KIF13Aによる海馬における5-HT_{1A}受容体の細胞膜への輸送が、ストレス適応の形成に關与している可能性が示唆される。

セラミドキナーゼによる記憶形成制御機構の解明

○風間 皓大、穴田 幸平、本田 拓也、中村 浩之、村山 俊彦

千葉大・院薬・薬効薬理

[目的] セラミドキナーゼ (CerK) は、スフィンゴ脂質の中心代謝物であるセラミドをセラミド1リン酸 (C1P) に変換する酵素であり、脳において最も高い活性を示すことが知られている。このCerKを遺伝的に欠損したマウス (CerK-KOマウス) では、高次脳機能の一種である情動に異常がみられる事が報告されており、CerK/C1Pの情動への関与が示唆されている。しかし、情動以外の高次脳機能との関与については未だ解明されていない。そこで、高次脳機能の一種である記憶に着目し、記憶形成に対するCerK/C1Pの関与の解明を目的として本研究を遂行した。

[結果] まず、WTマウスとCerK-KOマウスの記憶形成能を比較する為、Y迷路試験、新奇物体認識試験、Social recognition testを行った。その結果、いずれの試験においてもCerK-KOマウスで記憶形成能が減弱し、CerK/C1Pが記憶形成を正に制御する因子である可能性が示された。続いて、CerK/C1Pによる記憶形成制御機構の解明のため、AMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA) に着目した。AMPAはGluA1/2/3/4の4種のサブユニットからホモ、またはヘテロ4量体を形成し、細胞内へのNa⁺やK⁺の流入によりニューロンを興奮させることで、記憶形成を促進する。また、AMPAの膜上存在量は記憶形成と密接に関与しており、サブユニットのリン酸化により、厳密に制御されている。特に、GluA2のリン酸化は内在化に必須の過程であることが知られている。そこで、WTマウスとCerK-KOマウスの海馬におけるp-GluA2の発現量を比較した。その結果、CerK-KOマウスの海馬において、p-GluA2量が有意に減少した。従って、CerK/C1PはGluA2のリン酸化を促進し、GluA2の内在化の誘導により、膜上GluA2発現量を減少させている可能性が示された。CerK-KOマウスの海馬において、膜上GluA2発現量の増加が示唆された為、CerK-KOマウスではAMPAシグナル系が過剰に活性化している可能性が考えられる。そこで、WTマウスとCerK-KOマウスにAMPAのアンタゴニストを処置し、Y迷路試験、新奇物体認識試験にて、記憶形成能を測定した。その結果、CerK-KOマウスにおいて減弱した記憶形成能が、AMPAアンタゴニストの処置により有意に回復した。このことから、CerK-KOマウスにおける記憶形成異常は、AMPAシグナル系の過剰な活性化を介している可能性が示された。

[結論・考察] 本研究において、CerK/C1PがAMPAサブユニットGluA2のリン酸化を促進することで、GluA2の内在化を促進し、膜上AMPA量を調節する可能性が示された。また、前述の機構により、CerK/C1Pが記憶形成を正に制御する因子である可能性が見出された。

δオピオイド受容体作動薬による痙攣誘発脳部位の探索

○坂本 光太郎¹、西田 萌乃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・IIIS・創薬化学

【背景・目的】 オピオイドδ受容体 (DOP) は、慢性疼痛や不安症、うつ病等に対する新規治療薬候補として注目されている。しかし、SNC80など一部のDOP作動薬は前臨床段階で痙攣の副作用が報告され、治療薬開発の障害となっている。このDOP作動薬による痙攣誘発には、海馬の関与が示唆されているものの、詳細は不明であり、メカニズム解明が求められている。一方最近我々は、痙攣誘発作用のない DOP 作動薬 KNT-127 を見出した。そこで本研究では、DOP 作動薬 (SNC80) の痙攣誘発脳部位の同定を目的として、各脳局所に投与した際のマウスの行動変化を、KNT-127と比較検討した。

【方法】 実験には、雄性ICRマウス (8~12週齢) を用いた。興奮性アミノ酸誘発性痙攣の起始部位として知られる左側腹側海馬 (vCA3)、扁桃体 (AMY)、さらに DOP が豊富に存在する島皮質 (IC) にガイドカニューレを留置した。覚醒下カニューレを介してSNC80 (1.5, 3.0, 9.0 μg) 及び KNT-127 (9.0 μg) を局所投与し、投与直後から10分間トレモア様行動の回数と潜時を記録した。なお、トレモア様行動はミオクローヌス様の四肢の不随意的な筋収縮と定義して解析を行った。

【結果】 SNC-80 (9.0 μg) は、vCA3への局所投与によってトレモア様行動の回数を有意に増加させた。一方、SNC-80 (9.0 μg) のICおよびAMYへの局所投与では、トレモア様行動の潜時に短縮傾向が認められたものの、その効果は有意ではなかった。また、KNT-127 (9.0 μg) は、トレモア様行動の回数および潜時に何ら影響を及ぼさなかった。

【考察】 トレモア様行動の発現は、痙攣発作の初期症状とされている。今回、SNC-80によるトレモア様行動の誘発には、ICやAMYに比べて、vCA3がより強く関与していることが示唆された。一方、KNT-127は、SNC80と異なりトレモア様行動を示さなかったことから、SNC80に比べ、痙攣誘発リスクの低いより安全な DOP 作動薬であることが示唆された。

【結論】 以上のことから、DOP 作動薬 SNC-80の痙攣誘発部位に、腹側海馬 (vCA3) の関与が示唆された。今後、腹側海馬におけるSNC80の痙攣誘発のメカニズムを明らかにしていく予定である。

摂取感覚効果を指標にした依存形成薬物の再分類化に関する統合的基礎研究

○高橋 巧¹、吾妻 弘基¹、原 皆斗¹、成田 年^{1,2}、森 友久¹

¹星薬大・薬理、²国立がん研セ・研・がん患者病態生理

【緒言】近年、分子生物学的解析技術の急速な発展により、薬物の作用機序を細胞レベルで評価することが可能となってきた一方で、薬物による生体の総合的反応、特に薬物の中枢反応を精度高く捉える実験系についての有用性の再検証に対するニーズが高まっている。一般に、薬物による動物における摂取感覚効果を高感度で評価することができる実験系として、弁別刺激実験がある。そこで本研究では、この弁別弁別法に従って、様々な依存形成薬物の摂取感覚効果の統合的解析を行い、再分類化を行った。特に、摂取感覚効果についてはほとんど明らかにされていない tetrahydrocannabinol (THC) を中心に、その弁別刺激特性を統合的に解析した。

【方法】80% 体重にて摂餌制限を行なった Fischer 344系雄性ラットを使用し、餌を強化子として、THC (2.0 mg/kg)あるいはMDMA (2.0 mg/kg)と溶媒による弁別を獲得させた。この後、methamphetamine、morphine、phencyclidineおよび diazepamを用いて般化試験を行なった。般化試験では、薬物側のレバーを押した割合が80% 以上を般化、50% 以上80% 未満を部分般化とした。

【結果・考察】THCの弁別刺激効果に対して、morphineあるいはphencyclidineは、全く般化を示さなかったが、興奮作用を発現するmethamphetamineあるいはMDMAは部分的な般化を示し、diazepamによっても部分的な般化が認められた。また、MDMAの弁別刺激効果に対してTHCならびにdiazepamは部分的般化を示した。これまでに、弁別刺激効果は、中枢興奮あるいは中枢抑制薬の2種類に分類され、議論がなされてきたが、本研究結果から、THCならびにMDMAの弁別刺激効果は、アッパー系とダウンナー系といった相異なる感覚を併せ持つ極めて珍しい感覚から成り立っていることが示唆された。

ラット島皮質錐体細胞における興奮性シナプス応答に対するサブスタンスPの減弱効果

○松村 幸恵^{1,2}、山本 清文¹、白川 哲夫²、小林 真之¹

¹日本大・歯・薬理学講座、²日本大・歯・小児歯科学講座

神経ペプチドの一つとして知られるサブスタンスP (SP) は、脊髄後角における疼痛情報の伝達や種々の炎症応答を惹起することが知られている。近年、SPの標的であるニューロキニン1 (NK1) 受容体が脳内に広く分布し、基底外側扁桃核や海馬ニューロンの興奮応答やシナプス伝達を修飾することが示された (Cuello and Kanazawa 1978; Mantyh et al. 1989; Maubach et al. 2001)。また、免疫組織化学的手法によって、SPやNK1受容体がそれぞれ異なるタイプのGABA作動性抑制性ニューロンに発現することが明らかになっている (Vruwink et al., 2001)。一方、皮質錐体細胞などのグルタミン酸作動性ニューロンの膜特性やシナプス伝達におよぼすSPの影響はほとんど解明されていない。そこで、生後21-29日齢のVGAT-Venusトランスジェニック・ラットから島皮質を含む急性スライス標本を作製し、蛍光顕微鏡下にてVenus陽性・陰性ニューロンを同定し、II/III層のGABA作動性ニューロンと錐体細胞からwhole-cell patch-clamp記録を行った。Tetrodotoxin存在下にて錐体細胞から記録されたminiature EPSC (mEPSC) の発生頻度は、SPによって減少した ($p = 0.02$, $n = 9$)。一方、mEPSCの振幅に有意な変化は認められなかった ($p = 0.1$, $n = 9$)。また、DNQX存在下で錐体細胞から記録されたminiature IPSCもその振幅の変化を伴わない頻度の減少が観察された。そこで、記録細胞の近傍に設置した同心円電極の電気刺激によって誘発した微小電気刺激法、所謂minimal stimulation法によって評価されるEPSCを記録したところ、failure rateは、SPの投与によって $27.5 \pm 3.1\%$ から $39.8 \pm 5.0\%$ に増加することが示された ($p = 0.03$, $n = 14$)。これらの結果は、SPが神経伝達物質の放出確率を減少させることを示唆している。

「カイニン酸受容体—一酸化窒素」経路で誘発する島皮質シナプス長期可塑性

○山本 清文^{1,2,3}、小林 真之^{1,2}、Min Zhuo³

¹日本大・院歯・口腔構造機能、²日本大・歯・薬理、³トロント大学・医・生理

シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation)は、海馬、扁桃体、小脳や多くの領域の大脳皮質で盛んに研究され、記憶・学習プロセスに関わる基盤的なメカニズムであると考えられている。島皮質は、味や顔面口腔周辺部の体性感覚、内臓感覚および一部の痛覚に関連した情報が収斂することが知られ、下歯槽神経切断モデル動物や坐骨神経結紮モデル動物において、島皮質の興奮性シナプスの亢進が示唆されている。シナプス後膜側のニューロンで生じる島皮質でのLTPの発生機序には、NMDA受容体とその下流カスケードであるI型アデニル酸シクラーゼの活性化を介することが知られる (postsynaptic LTP)。しかし、島皮質で生じる、シナプス前終末からのグルタミン酸の放出増大に起因するLTP、所謂presynaptic LTPの詳細な誘発機序は解明されていない。そこで我々は、マウス急性脳スライス標本から興奮性シナプス伝達応答をパッチクランプ法で記録し、既に前帯状回のpresynaptic LTP誘発に汎用される刺激プロトコル (2 Hz, 240 パルス, 2 連刺激)にて、島皮質での同LTPを誘発した。前帯状回で生じるpresynapticLTPと異なり、島皮質でのLTPはカイニン酸受容体拮抗薬ならびに一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬で抑制された。Double whole-cell patch-clamp法による錐体細胞間シナプスでの興奮性単一シナプス応答においてもLTPが生じ、放出確率の増加, failure rateの低下などのシナプス前終末に起因する変化やNOS阻害薬の感受性が認められた。加えて、LTP誘発刺激を受けたシナプス (homo synapse) だけでなく、記録ニューロンに投射するLTP誘発刺激を受けていないシナプス (hetero synapse) においても、NOS阻害薬で抑制されるLTP応答が誘発された。これらの結果は、カイニン酸受容体—一酸化窒素産生経路で生じるpresynaptic LTPが、島皮質で生じる興奮性シナプスの亢進に寄与する可能性を示唆する。

オキシトシンと低出力レーザーの併用は眼窩下神経半結紮が誘発する異所性疼痛を抑制する

○藤田 智史¹、野間 大地²、小林 真之³

¹日本大・歯・生物、²日本大・歯・矯正、³日本大・歯・薬理

神経損傷はしばしば神経障害性疼痛と呼ばれる痛覚過敏やアロディニアのような症状を誘発する。三叉神経領域における神経障害性疼痛モデルの一つとして眼窩下神経半結紮ラットが知られている。近年、このモデル動物の三叉神経節にオキシトシンを投与すると、半結紮が誘発する口髭部への機械刺激に対する逃避閾値の低下が抑制されることが報告されている。しかしながら、三叉神経節に対する薬物の直接投与は、手技的に臨床で行うのが困難と考えられる。そこで、本研究では神経損傷部位にオキシトシンを処置することで、神経損傷が誘発する症状を軽減できないかを検討した。また、低出力レーザー照射が神経障害性疼痛に対して有効であることが、モデル動物を用いた基礎研究やヒトにおける臨床研究から示唆されている。そこで、オキシトシン処置と併用することで協力作用が得られるかを検討した。

実験には雄性のWistar系ラットを用いた。眼窩下神経の半結紮が誘発する逃避閾値の低下は3日後にプラトーに達することが報告されている。そこで、右側眼窩下神経半結紮から3日後に、侵害刺激が誘発する大脳皮質興奮伝播を、膜電位感受性色素を併用した光学計測法によって記録した。ウレタン麻酔を行ったラットを脳定位固定装置に固定し、左側の体性感覚野および島皮質を覆う頭蓋骨に開窓を行った。膜電位感受性色素 (RH1691) を1時間負荷した後、実体顕微鏡に搭載されたCCDカメラを用いて、右側下顎臼歯歯髄に電気刺激をした際の大脳皮質応答を光学的に記録した。

その結果、半結紮時にオキシトシン ($0.5 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$) を神経損傷部位に処置することで、刺激時の初期応答部位における輝度変化率が有意に低下したが、興奮伝播した面積には差を認めなかった。また、半導体レーザー (810 nm) を用いた低出力レーザー照射 (0.1 W, 500 sec, continuous mode) を眼窩下神経半結紮後から光学計測の1日前まで行うことで、同様に刺激時の輝度変化率に有意な低下を認めたが、興奮伝播した面積には有意な差は認められなかった。一方で、オキシトシン処置と低出力レーザー照射を併用すると、輝度変化率が有意に低下するのに加えて、興奮伝播した面積も有意に減少した。これらの結果から、神経損傷部位に対するオキシトシン処置および低出力レーザー照射は、半結紮が増強する侵害刺激受容時の大脳皮質興奮伝播を抑制し、また、これらの処置を併用することで協力作用が得られることが示唆された。

脳虚血障害におけるミクログリアVNUTの役割

○平山 友里^{1,2}、Le Pham Ngoc Ha²、小泉 修一²、安西 尚彦¹

¹千葉大・院医・薬理、²山梨大・院医・薬理

生体のエネルギー通貨ATPは、細胞外へ放出されて細胞間情報伝達物質として機能する。脳虚血障害時に細胞外ATP濃度の上昇が起こるが、これは脳虚血障害に対して保護作用を示すのか、あるいは有害作用をもたらすのかは不明であり、またそのATP放出メカニズムも分かっていなかった。我々は、小房型ヌクレオチドトランスポーターVNUT (vesicular nucleotide transporter) を介するATP開口放出が、脳虚血障害に対して保護作用をもたらすことを明らかにした。中大脳動脈閉塞 (MCAO) を用いて一過性脳虚血を負荷し、マイクロダイアリシス法と組み合わせて細胞外ATP濃度を測定した結果、野生型マウス (WT) で起こる虚血後の細胞外ATP濃度上昇は、VNUT欠損マウス (VNUT-KO) では見られず、さらにVNUT-KOはWTと比較して脳虚血障害に脆弱であった。免疫組織化学染色とin situハイブリダイゼーションの二重染色にて脳虚血後のVNUTの局在を確認したところ、VNUTは主にミクログリアで発現亢進していることが明らかとなった。次に、VNUTによる脳保護作用の分子メカニズムを調べるために、ATP受容体及びアデノシン受容体に注目し、各種阻害薬を用いて脳虚血障害における影響を解析した。その結果、P2受容体阻害薬であるSuraminとアデノシンA_{2A}受容体阻害薬であるSCH58261の投与により脳虚血障害が悪化することが明らかとなった。以上のことから、脳虚血後のミクログリアはVNUT依存的ATP開口放出により、P2受容体、アデノシンA_{2A}受容体を介して脳保護効果をもたらすことが示唆された。

ラットの側坐核のacetylcholine放出の制御における α_2 受容体の役割

○青野 悠里、川島 央暉、三枝 禎

日本大・松戸歯・薬理

中脳辺縁系dopamine (DA) 神経が投射する側坐核には、青斑核や延髄からnoradrenaline (NA) 神経が入力している。側坐核にはacetylcholine (ACh) 性介在神経が分布しており、同部位のACh神経活動の賦活化に依存したラットの移所行動を α 受容体subtypeの非選択的なagonistとantagonistはいずれも抑制することが示されている (Ikeda et al., 2007)。側坐核には α_2 受容体が発現しているが、ラットの側坐核への選択的 α_2 受容体agonistまたはantagonistの灌流投与は同部位のDAとNA放出に目立った変化は起こさないことを我々は報告した (Saigusa et al., 2012)。しかし、選択的 α_2 受容体ligandが同部位のACh放出に及ぼす効果は明らかでない。そこで本研究では、ラットの側坐核の細胞外ACh量に対して α_2 受容体のagonistのUK 14304とantagonistのRX 821002が及ぼす影響について*in vivo*脳微小透析法により検討した。

実験にはS-D系雄性ラット (体重約200 g) を用いた。無麻酔非拘束の条件下で*in vivo*脳微小透析法により側坐核から回収した細胞外液中のAChは15分毎に、DAは20分毎にそれぞれHPLC-ECD法により測定した。使用薬物は透析プローブから逆透析で側坐核に60分間灌流投与した。 α_2 受容体ligandの投与量は灌流液中の総量 (mol) で示した。細胞外AChの分解を低下させるため低濃度 (50 nM) のcholinesterase阻害薬のphysostigmineを灌流液へ添加した。比較のため、このphysostigmineを含む灌流液を使用した条件で α_2 受容体ligandが側坐核のDA放出へ及ぼす効果についても観察した。

その結果、 α_2 受容体agonistのUK 14304 (300 pmol) の投与は側坐核のAChを約30%減少させた。 α_2 受容体antagonistのRX 821002 (600および6000 pmol) の投与は側坐核のAChを最大約175%増加させた。UK 14304 (300 pmol) が誘発したAChの減少は、基礎的なACh量に影響を与えない用量のRX 821002 (0.6 pmol) の併用により抑制された。RX 821002 (6000 pmol) またはUK 14304 (300 pmol) の投与では側坐核のDA量に顕著な変化が認められなかった。

以上の結果から、UK 14304およびRX 821002の側坐核への灌流投与は同部位のACh放出を減少または増大させることが示された。このUK 14304による側坐核のACh放出抑制効果の発現には、同部位の α_2 受容体刺激が関与することが示唆された。また、側坐核の α_2 受容体はacetylcholine放出を抑制的に制御することが示唆された。

Imidazoline系 α_1 受容体作動薬のcirazolineが誘発したラットの側坐核のdopamine放出促進作用の特徴

○渡邊 由梨子¹、青野 悠里²、川島 央暉²、三枝 禎²

¹日本大・松戸歯・口腔外科、²日本大・松戸歯・薬理

中脳辺縁系dopamine (DA) 神経が投射する側坐核には、青斑核などからnoradrenaline (NA) 神経が入力しており、両神経は同部位で機能的相互作用を示す。側坐核には α 受容体のほかimidazoline系薬物が結合するimidazoline受容体が分布している。我々は、選択的 α_2 受容体作動薬のUK 14,304 と、 α_2 受容体作動薬でimidazoline受容体も刺激するclonidineは、いずれもラットの側坐核へ灌流投与しても同部位のDAおよびNA放出に著しい変化はないことを報告している (Saigusa et al., 2012)。一方、選択的 α_1 受容体作動薬のmethoxamineの側坐核への灌流投与は α_1 受容体を介し同部位のDA放出を抑制する (Saigusa et al., 2012)。しかし、imidazoline系の α_1 受容体作動薬cirazolineが側坐核のDA放出に及ぼす効果は不明である。そこで側坐核の細胞外液中のDA量がcirazolineにより受ける影響を *in vivo* 脳微小透析法で解析した。Methoxamineは側坐核のNA放出に著変を起こさないが α_1 受容体拮抗薬のprazosinが誘発したNA放出は抑制するため (Saigusa et al., 2012), cirazolineが基礎NA量とprazosinによるNAの増大へ及ぼす効果も観察した。CirazolineのDA量に対する作用への α_1 受容体の関与を検討するため、prazosinを併用投与した。

実験には体重約200 gのS-D系雄性ラットを用いた。無麻酔非拘束の条件下で *in vivo* 脳微小透析法により側坐核から回収した細胞外液中のNAおよびDAは、HPLC-ECD法により20分毎に定量した。薬物は透析プローブから逆透析で側坐核に60分間灌流投与した。

その結果、cirazoline (1.0×10^{-4} M) の投与でNAには目立った変化がなかったが、DAは約150%増加した。NAとDAに著変を起こさない用量のcirazoline (1.0×10^{-7} M) はprazosin (1.0×10^{-4} M) によるNAの約220%の増加を約140%まで低下させたが、DAの約60%の減少には特に影響を及ぼさなかった。Cirazoline (1.0×10^{-4} M) が誘発したDAの増加は、methoxamineのDA放出抑制作用を打ち消す用量のprazosin (1.0×10^{-7} M) で減弱する傾向だったが、このprazosinの効果は統計学的には有意ではなかった。

以上のことから、cirazolineの側坐核への灌流投与は、同部位でprazosinが示したNA放出促進作用を抑制するが、DA放出抑制作用には影響を与えないことが示された。また、cirazolineの側坐核への灌流投与は、 α_1 受容体刺激を介さずに同部位のDA放出を促進することが示唆された。

小胞体CaセンサーSTIM1によるCa_v1.2チャネル抑制メカニズムの解明

○富田 拓郎、高橋 弘毅、山田 充彦

信州大

血管平滑筋細胞などの興奮性細胞において、G_qタンパク質に共役した細胞膜受容体刺激は、ホスホリパーゼC (PLC) の活性化を介して、細胞膜を脱分極させる。これによりL型電依存性カルシウム (Ca) チャネル (Ca_v1.2) が活性化し、細胞内への強力なカルシウム流入が引き起こされる。しかし同時にPLCの活性化はイノシトール3リン酸 (IP₃)産生により、小胞体のIP₃受容体を活性化し、細胞内CaストアからCa放出をさせる。それにより細胞内Caストアの枯渇が生じる。ストア内Ca濃度の低下を感知し、細胞膜上のストア作動性Caチャネルを活性化するstromal interacting protein 1 (STIM1)は、Ca_v1.2チャネルを抑制する機能を有することが近年報告された。しかしながら、このSTIM1依存的Ca_v1.2抑制の詳細な機構および生理的重要性はほとんど明らかにされていない。本研究において我々は、STIM1依存的Ca_v1.2の抑制機構を電気生理学的に解析した。STIM1の過剰発現は、C末端依存的にCa_v1.2のチャネル活性を抑制した。Gating currentの解析から、STIM1の過剰発現は、Ca_v1.2チャネルの細胞表面発現を抑制することが示唆された。しかしながら、STIM1の過剰発現系ではCa_v1.2の形質膜上発現が抑制されている可能性が考えられた。そこでストア枯渇による内在的なSTIM1活性化について検討した結果、内在的なSTIM1の活性化もCa_v1.2のGating currentを抑制した。また共免疫沈降により、Ca_v1.2とSTIM1が物理的な相互作用を有することも明らかになった。以上から、STIM1によるCa_v1.2チャネル活性抑制機構には、Ca_v1.2の形質膜発現制御が関与すると考えられた。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の収縮能に対するチロシンキナーゼ阻害剤の影響

○柳田 翔太^{1,2}、佐塚 文乃¹、林 紗代¹、小野 敦²、諫田 泰成¹

¹国立医薬品食品衛研・薬理部、²岡山大・院医歯薬・薬科学専攻

【目的】 チロシンキナーゼ阻害剤などの分子標的薬により、がん患者が長期間生存できるようになってきたが、その一方で、抗がん剤による心毒性の発生が顕在化してきた。抗がん剤によって引き起こされる心毒性には、不整脈、心収縮障害、高血圧など多岐にわたるが、特に心収縮障害は心不全につながる重篤な副作用を引き起こすため、医薬品候補化合物の心収縮障害リスクの評価は非常に重要である。これまで我々は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて薬剤性不整脈の発生リスクを予測できることを明らかにしてきた。しかしながら、抗がん剤の心収縮障害評価系は未だ確立されておらず、簡便でスループット性の高いインビトロ評価法の開発が期待されている。そこで、本研究では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて抗がん剤の心筋収縮障害について検討を行った。

【方法】 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は、iCell心筋細胞 (CDI) を用いた。また、心筋細胞の収縮能は、動きベクトルシステムSI8000 (ソニー) により収縮速度として評価した。

【結果】 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を β アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールで刺激した場合、拍動数および収縮速度が濃度依存的に増強した。VEGF阻害剤であるスニチニブの刺激により、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の収縮速度が濃度依存的に減少した。他のVEGF阻害剤であるソラフェニブやバンデタニブによっても、同様の作用が認められた。一方、溶媒であるDMSOではこのような変化は認められなかった。

【結論】 以上の結果から、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は抗がん剤心毒性の心収縮障害の評価に有用であることが示唆された。

hERGスクリーニングにおける内因性エストロゲンの影響

○杉本 真菜¹、杉本 真太郎¹、岡 貴之²、坂本 多穂¹、黒川 洵子¹

¹静岡県立大・薬・生体情報分子解析学分野、²ナニオン

【目的】心電図QT_c間隔の延長および致死性心室頻拍 (TdP: torsades de pointes)を所見とするQT延長症候群は、様々なクラスの薬剤の重篤な副作用としてごくまれに発症し、男性よりも女性で発症率が高いという性差が報告されている。主要な分子標的は心筋カリウムチャネルのhERGであることから、全ての内服薬を対象とした安全性試験がガイドライン化されている。当分野では、これまでに、エストラジオールが選択的I_{Kr}阻害薬E-4031によるhERG阻害作用を増強することを見出し、インシリコ手法と合わせて、エストロゲンがhERG薬物結合部位にアクセスできる可能性を示唆してきた。そこで、この相互作用が、臨床で使用されている他のhERG阻害薬においてもみられるかどうかを調べるために、今回、hERG阻害活性を有する化合物中心に22剤選定し、内因性エストロゲンの影響をハイスループットで検討したので、その結果を報告する。

【方法】hERGチャネルを安定発現させたヒト胎児腎由来 (HEK293) 細胞を標本とし、オートパッチクランプ装置SyncroPatch384PE (ナニオン) を用いて、室温にてhERG電流を測定した (刺激電位20 mV, 0.1 Hz)。細胞培養はステロイドを除去した条件で行い、内因性エストロゲンとしてエストラジオールと硫酸エストロン存在下と非存在下で用量阻害曲線から得られたIC₅₀を比較した。hERG阻害活性を有する化合物は、阻害様式や結合部位の違いを意識しつつ、临床上の不整脈誘発のリスクについてCredibleMedsおよび論文等から得られる情報を基に22剤を選定した。

【結果および考察】エストラジオールもしくは硫酸エストロンの添加によりhERG阻害活性に影響があった化合物は、22個中E-4031を含む4個であった。いずれの4化合物とも発症性差を調べた臨床研究はないものの、QT延長による不整脈誘発のリスクが高いことが動物実験・臨床データで示されており、内因性エストロゲンがリスクを増悪する可能性が考えられる。以上より、本研究結果は、薬物誘発性不整脈を忌避する非臨床安全性試験において、エストロゲン類の影響について議論する必要性を示唆している。

hERGチャネル内腔における阻害薬と合成エストロゲンの相互作用

○杉本 真太郎¹、田村 文弥²、岡 貴之³、杉本 真菜¹、家田 真樹⁴、坂本 多穂¹、黒川 洵子¹

¹静岡県立大・薬、²慶應義塾大・医、³ナニオン、⁴筑波大・医

【目的】心電図QT間隔延長を伴う薬剤誘発性の不整脈は薬物クラスによらず発症するため予測が難しく、QT延長毒性として、医薬品開発における安全性試験の対象となっている。このQT延長毒性には性差があり、我々は性ホルモンが関与する分子機構を報告してきた。一部のエストロゲン類が関わる機構として、エストロゲンが有する芳香環がhERGチャネルの薬物結合部位に相互作用し、選択的hERG阻害剤E-4031の反応を増大することを見出した。さらに、hERGへの薬物結合部位でのドッキングシミュレーションから、エストラジオールとhERG阻害剤が同時に結合する可能性が示された。2019年のJAMAで、健常女性において、経口避妊薬（OC）の併用によりソタロールによるQT延長リスクが増大することが報告された。この臨床報告の分子的背景を理解するために、OCの基材として広く用いられているエチニルエストラジオール（EE2）に注目し、今回、hERGチャネルにおける阻害薬との相互作用を検討した。

【方法】標本はhERGチャネルを安定発現させたヒト胎児腎由来（HEK293）細胞もしくは一過性にhERGチャネルを発現させたCHO-K1細胞を、ステロイドを除去した条件で培養し、マニュアルパッチクランプ法もしくはオートパッチクランプ装置SyncroPatch384PE（ナニオン）を用いて、室温にてhERG電流を測定した。エストロゲン類およびhERG阻害薬は細胞外から投与した。合成エストロゲンは経口避妊薬や乳癌治療薬として用いられているEE2を使用し、hERG阻害薬には阻害様式や催不整脈リスクが異なる22剤を使用した。

【結果および考察】hERG電流に対し、EE2単独での作用は見られなかったが、EE2は選択的hERG阻害薬E-4031によるhERG電流阻害作用を部分的に回復した。一方、キニジンによる阻害の場合は、EE2により阻害作用が増強した。以上より、EE2はhERG阻害薬それぞれに対しそのQT延長リスクを減弱もしくは増強する、両方向性の作用を示した。

SyncroPatch384PEを用い、さらに多くの阻害薬との相互作用を検討したところQT延長リスクが増加する薬物が見つかった。以上より本研究はエストロゲンの存在を考慮した薬物安全性試験の必要性を示唆している。

モルモット肺静脈心筋細胞のCa²⁺トランジェント初期相の共焦点レーザー顕微鏡解析:心室筋細胞、心房筋細胞との比較

○尾高 棕介、大森 瑤乃、濱口 正悟、行方 衣由紀、田中 光

東邦大・薬・薬物学教室

肺静脈は血管ではあるが、左心房から続く心筋層が存在している。肺静脈心筋で発生する電氣的興奮は心房細動の原因となることが臨床的に示されており、注目されている。そこで、単離したモルモット肺静脈心筋の細胞形態とCa²⁺トランジェントの時空間的パターンを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて心室筋細胞および心房筋細胞と比較した。

肺静脈心筋細胞は横紋を有し、筋小胞体に富んでいたが、T管は存在していなかった。これは心房筋細胞に類似しており、T管が細胞全体に存在していた心室筋細胞とは異なっていた。電気刺激により誘発した肺静脈心筋細胞のCa²⁺トランジェントでは、Ca²⁺濃度の上昇が細胞膜直下領域から細胞中心部へ向かってウェーブ状に伝播した。この現象は心房筋細胞に類似しており、Ca²⁺濃度が細胞質全体にわたって同時に上昇する心室筋細胞とは異なっていた。また、多数の肺静脈心筋細胞で自発活動が観察された。自発活動を示す肺静脈心筋細胞のCa²⁺トランジェントに先行してCa²⁺スパークの発火頻度増加がみられ、Ca²⁺スパークの増加が、Ca²⁺トランジェントつまり活動電位の発生を引き起こしていることが示唆された。Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬であるSEA0400を処置したところ、Ca²⁺トランジェントの発生が抑制され、Ca²⁺スパークは抑制されなかった。したがって、筋小胞体から放出されたCa²⁺が、Na⁺/Ca²⁺交換機構を介して細胞外に排出される際に、内向き電流が生じ、これにより活動電位が発生すると考えられた。

以上の結果より、T管を欠くモルモット肺静脈心筋細胞において、Ca²⁺トランジェント初期相のCa²⁺濃度上昇は細胞膜直下領域から細胞中心部へとウェーブ状によって伝播すること、そしてCa²⁺スパークは、肺静脈心筋細胞の自発的Ca²⁺トランジェントの発生に原因的に関与していることが示唆された。

肺静脈心筋に対する I 群抗不整脈薬の緩徐脱分極相におけるNa⁺電流遮断作用の違い

○日色 啓仁、加藤 州、倉持 瑞季、入江 雅彦、濱口 正悟、行方 衣由紀、田中 光
東邦大・薬・薬物学教室

【目的】心房細動は高齢化に伴い罹患率が増加し、心原性脳梗塞の原因となる治療必要性の高い疾患である。近年の研究により、心房細動は肺静脈に存在する心筋からの異常興奮（肺静脈心筋自発活動）が原因であることが明らかとなった。肺静脈心筋自発活動には活動電位の引き金になる緩徐な脱分極が関与しており、これに寄与する電流成分は新たな心房細動治療ターゲットとして注目を集めている。一般に心筋の急速な脱分極はNa⁺電流成分のうち一過性の大きな電流であるpeak I_{Na}が担っているが、当研究室では肺静脈心筋の緩徐脱分極相にpeak I_{Na}とは異なる持続性のNa⁺電流成分（緩徐脱分極相Na⁺電流と呼ぶ）が寄与しており、これを遮断することで肺静脈心筋自発活動を抑制できることを報告した。現在心房細動の治療にはNa⁺チャンネル遮断薬である I 群抗不整脈薬が汎用されるが、肺静脈心筋への影響はほとんど検討されていない。そこで本研究では、I 群抗不整脈薬の肺静脈心筋自発活動および緩徐脱分極相Na⁺電流への影響を検討した。

【方法】自発的活動電位は、Hartley系雄性モルモットから作製した肺静脈組織標本にtertiapinを処置して誘発し、ガラス微小電極法を用いて測定した。緩徐脱分極相Na⁺電流は、単離肺静脈心筋細胞にwhole-cell voltage clamp法により緩徐脱分極相を模したramp pulseを与えて惹起し、20 μM tetrodotoxin感受性電流成分として測定した。

【結果】6つの I 群抗不整脈薬について1~10 μMの濃度で検討したところ、いずれも自発的活動電位の最大立ち上がり速度を減少させた。Aprindine, flecainide, propafenoneは自発活動の緩徐脱分極相の勾配(slope)と発火頻度を有意に減少させたが、cibenzoline, disopyramide, pilsicainideはそのような効果を示さなかった。緩徐脱分極相Na⁺電流に対し、aprindine, flecainide, propafenoneは電流量を濃度依存的に減少させたが、cibenzoline, disopyramide, pilsicainideは影響を与えなかった。

【考察】Aprindine, flecainide, propafenoneは緩徐脱分極相Na⁺電流遮断を介してslopeを抑制し、発火頻度を減少させたと考えられる。一方、cibenzoline, disopyramide, pilsicainideは緩徐脱分極相Na⁺電流を遮断しないため、slopeと頻度を減少させないことが確認された。以上より、I 群抗不整脈薬の中には緩徐脱分極相Na⁺電流遮断を介した肺静脈心筋自発活動抑制作用を有する薬物と有さない薬物があることを明らかにした。

ATPのノルアドレナリン(NA)遊離促進作用が及ぼすモルモット心筋収縮力への影響

○假谷 茉鈴、濱口 正悟、行方 衣由紀、田中 光

東邦大・薬・薬物学教室

【目的】 ATPはcotransmitterとしてノルアドレナリンとともに交感神経終末から遊離して様々な作用を示すが、そのひとつにNAの遊離を促進する作用がある。本研究では、神経終末が存在した状態のモルモットの右心室乳頭筋標本を用いて、ATPによるNAの遊離促進が心筋の収縮機能にも影響を及ぼしうるか否かを検討した。

【方法】 Hartley系雄性モルモットから右心室乳頭筋標本を作製し、1 Hz, 3ms, 閾値1.5倍矩形波で刺激し、心筋を駆動した。伝達物質の遊離は、200 Hz, 50 μ sの矩形波8発の電気刺激を、心筋刺激の直後に行うことで引き起こした。すべての実験はアトロピン(1 μ M)存在下で行った。

【結果・考察】 電気刺激により心筋を駆動させている状態で、さらに神経刺激すると心筋の収縮力が増大した。この神経刺激による心収縮力増大は、Na⁺チャンネル遮断薬テトロドトキシン(300 nM)の前処置、もしくはプラゾシン(1 μ M)とプロプラノロール(1 μ M)の前処置によりほぼ完全に抑制された。したがって、神経刺激による心収縮力増大は、神経興奮により遊離されたNAにより引き起こされることが示唆された。

次に、神経刺激による心収縮力増大にATPが関与するか否かを明らかにするため、P2X受容体およびP2Y受容体の拮抗薬を用いて検討した。神経刺激による心収縮力増大は、P2X受容体遮断薬PPADS(10 μ M)の前処置により有意に抑制されたが、P2Y受容体遮断薬MRS2179(30 nM)の前処置では抑制されなかった。また、ATP(100 μ M)存在下では心収縮力は増大しなかった。したがって、神経終末から遊離されるATPはP2X受容体を介して心収縮力増大を引き起こしていることが明らかとなった。

さらに心筋にNAを累積投与すると、濃度依存的に心収縮力が増大した。同様にATP(100 μ M)存在下、PPADS(10 μ M)存在下でNAの累積投与を行ったが、どちらもNAに対する反応性には影響を与えなかった。したがって、ATPは心筋のNAに対する反応性を高めているのではなく、神経終末からのNA遊離を促進させていることが示唆された。

以上の結果から、神経終末から遊離されるATPには、P2X受容体を介してNAの遊離を促進させる働きがあり、その作用は心収縮力にも影響を及ぼし得ることが明らかとなった。

β アレスチンバイアスアンジオテンシン1型受容体アゴニストは、新生児特有の持続性陽性変力作用を示す

○川岸 裕幸^{1,2}、柏原 俊英²、富田 拓郎²、中田 勉³、山田 充彦²

¹信州大・バイオメディカル研、²信州大・医・分子薬理、³信州大・基盤研究支援セ・機器分析支援

アンジオテンシンII (AngII) は、アンジオテンシン1型受容体 (AT₁R) を介し、Gタンパク質と β アレスチンを活性化する。我々は、新生児マウスの心筋細胞において、AngIIが β アレスチン経路を活性化させ、心筋細胞のL型Ca²⁺チャンネル (LTCC) の活性を約2倍に増強することを報告した。そこで、 β アレスチン経路のみを活性化するAT₁Rバイアスアゴニストである"TRV027"の、新生児マウスの心臓に対する効果を検討した。

新生児マウスにTRV027を投与すると、0.1~3mgの範囲で濃度依存的に有意な陽性変時作用を示した。陽性変力作用は、注射後2時間で最大となり、8時間後まで有意であった。またTRV027は血漿中のアドレナリン濃度を上昇させたが、その陽性変力作用は心臓のAT₁R受容体に作用することによるものであり、アドレナリン受容体を介したものではなかった。TRV027は、新生児マウスから単離した心室筋細胞、および胎児~新生児の表現型を示すヒトiPS細胞由来心筋細胞の単収縮Ca²⁺トランジェントを大幅に増加させた。また、自発的に拍動している単離心室筋細胞の酸素消費量を約30%増加させたが、新生児の心臓では酸化ストレスを増加させなかった。さらに我々は、TRV027が小児心不全のモデルマウスにも作用を示すか検証した。その結果、ヒト拡張型心筋症モデルマウスの新生児にTRV027を投与すると、心臓の収縮性を有意に増強させた。これらのことから、新生児期のマウスでは、AngIIがAT₁R- β アレスチン2-LTCCを介して、持続的な陽性変力作用を引き起こすことが明らかになった。また、TRV027が小児心不全に対する新たな治療薬となる可能性が示された。

カテコラミン(CA)代謝物の β -アドレナリン受容体(β -AR)を介した薬理作用の評価-マウス・モルモット(GP)気管及びラット大動脈平滑筋の弛緩反応を指標とした活性評価と β -ARサブタイプの検討-

○八巻 史子、小池 杏奈、河野 曜、張 瀟月、吉岡 健人、小原 圭将、田中 芳夫
東邦大・薬

【背景と目的】 Noradrenalineやadrenalineの代謝物(CA代謝物)は一般に薬理活性を示さないと考えられてきたが、その一部はARを刺激する可能性が報告されている。我々は、ラット胸部大動脈/脾臓/前立腺を用いて、CA代謝物の α -ARを介した薬理作用を評価し、normetadrenaline(NMA)、metadrenaline(MA)が α_{1D} -/ α_{1A} -ARの部分刺激薬もしくは完全刺激薬として作用する可能性を報告した。本研究では、CA代謝物の β -ARを介した薬理作用を評価するため、気管平滑筋でのCA代謝物の弛緩作用と気管・血管平滑筋でのisoprenaline(ISO)の弛緩作用に対するCA代謝物の影響を評価した。

【方法】 Carbachol (10^{-6} M) で収縮させたマウス/モルモット(GP)気管平滑筋に対する7種類のCA代謝物 (10^{-4} M) の弛緩作用を評価した。また、上記の平滑筋とphenylephrine ($\geq 10^{-7}$ M) で収縮させたラット胸部大動脈でのISOの弛緩作用に対するCA代謝物 (10^{-4} M) の影響も評価した。

【結果】 1) マウス気管 (β_1 -AR dominant) では、いずれの代謝物も有意な弛緩作用を示さなかった。2) GP気管 (β_2 -AR dominant) では、MAのみが有意な弛緩作用を示し、この作用はICI-118551 (β_2 -AR拮抗薬) により抑制された。3) マウス気管では、いずれの代謝物もISOの弛緩作用に影響しなかった。ただし、NMA、MAはclorgiline (CLG; MAO_A阻害薬) 存在下で、3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) は3,5-dinitrocatechol (DNC; COMT阻害薬) 存在下で、ISOの弛緩作用を有意に抑制した。4) GP気管では、NMA、MA、3,4-dihydroxymandelic acid (DOMA)、DHPGはISOの弛緩作用を有意に増強した。ただし、NMA、MAはCLG/DNC存在下で、DHPGはDNC存在下でISOの弛緩作用を有意に抑制した。5) ラット胸部大動脈では、DHPGはDNC存在下で、CGP-12177A (β_3 -AR部分刺激薬) の弛緩作用を有意に抑制した。

【考察】 本研究から以下の知見が得られた：1) MAは β_2 -ARを刺激する；2) NMA、MAは β_1 -/ β_2 -AR拮抗作用を有するが、代謝阻害薬非存在下では β_2 -ARを介した気管の弛緩反応を増強する；3) DHPGは β_1 -/ β_2 -/ β_3 -AR拮抗作用を有する。これらの結果は、CA代謝物が顕著に増加する褐色細胞腫などの病態の理解に役立つ可能性がある。

マウスにおけるOVA及びLPS曝露誘発ステロイド治療抵抗性気道炎症に対する抗凝固薬の効果

○木村 元気、高橋 里沙、岡 咲希、中林 萌、長本 彩花、吉野 琴美、西本 裕樹、木澤 靖夫
日本大・薬

【目的】喘息患者における呼吸器感染症による重症化は、ステロイド抗炎症薬に対する感受性の低下を引き起こし、生命予後に重篤な影響を及ぼすため、新たな治療薬開発が求められている。近年、慢性呼吸器疾患の病態形成に血液凝固・線溶系の関与が示唆されている。これまでに我々は、ovalbmin (OVA)曝露で作製した喘息モデルマウスにおいて、抗凝固薬であるdabigatranが気道炎症を抑制したことを報告している。そこで本研究では、OVA及びLPSを曝露させてステロイド治療抵抗性気道炎症を誘発させたマウスを用いて、抗凝固薬の局所適用効果について検討した。

【方法】OVA感作した雄性A/Jマウスに、OVAを6回隔日曝露させた後、LPSを1日2回3日間経鼻曝露させた。各薬物はLPS曝露2時間前に経鼻投与した。薬物投与終了翌日、気管支肺胞洗浄液 (BALF)を採取した。BALF中の全細胞数を計測後、flow cytometryにより好中球数及び好酸球数を測定した。また、BALF中のCXCL-1及びTNF- α 量、凝固・線溶系に関連する因子として、D-dimer及びPAI-1量をELISA法により、肺組織におけるTNF- α 及びIFN- γ のmRNA発現量をRT-qPCR法により測定した。

【結果及び考察】OVA/LPS曝露マウスにおいて増加したfluticasone propionate (FP)によって抑制されないBALF中の好中球数及び好酸球数は、トロンビン阻害薬であるdabigatranによって有意に抑制された。一方、第Xa因子阻害薬であるedoxabanには、そのような効果は認められなかった。また、BALF中のCXCL-1、TNF- α 、D-dimer及びPAI-1量や肺組織中のTNF- α 及びIFN- γ のmRNA発現量においても、dabigatran投与群で同様の効果が観察された。以上の結果から、慢性呼吸器疾患におけるステロイド治療抵抗性気道炎症に対して、dabigatranのような抗凝固薬が有効である可能性が示唆された。

医薬品・食品の品質保証に関する薬学教育の現状と課題

○黒川 洵子¹、合田 幸広²、小松 かつ子³、伊藤 美千穂⁴、堤 康央⁵

¹静岡県立大・院薬、²国立医薬品食品衛研、³富山大・和漢研、⁴京都大・院薬、⁵大阪大・院薬

【目的】日本学術会議薬学委員会医療系薬学分科会では、プライマリケア(PC)やセルフメディケーション(SMed)に対する薬学の立ち位置と薬学教育の役割を再認識することを目的とし、2019年6～9月、全国の薬学部を設置する75大学にアンケート調査「食品・医薬品の品質保証に関する薬学教育の実態調査」を実施した。アンケートでは、I) 保健機能食品、健康食品、食薬区分等に関する講義及びII) 医薬品の品質保証の講義について、講義の有無、重要項目が説明されているか、各項目を説明する科目名・教員の専門分野と受講学生の学年などを質問した。医療系薬学は、薬系薬理学を含み本学会の範疇である。

【方法】回答の処理では、(ア) レギュラトリーサイエンス(RS)、(イ) 医薬品、保健機能食品及び健康食品の区別点、(ウ) 食薬区分、(エ) 特定保健用食品、(オ) 栄養補助食品、(カ) 機能的表示食品、(キ) 食品の品質保証の各重要項目別に、担当科目が属する学系を日本薬学会の一般学術発表分類に準じ整理した。さらに、これらの項目が説明されるかどうか、薬学教育モデル・コアカリの達成目標や薬学アドバンス教育GLの記載を調査した。

【結果及び考察】回答は60校(80%)からあり、その内16校で6年制課程の他に4年制課程でも回答があった。講義を担当する科目は全て広義の医療系薬学に含まれた。

I) 保健機能食品等の講義は60校中58校で行われており、半数以上の大学で全項目が説明され、主に衛生科学系及び医療薬学系の講義中で扱われていた(68～96%)。(ア) RSを概説することはモデル・コアカリの達成目標であるが、36.7%の大学では講義で説明されていなかった。また、(ウ) 食薬区分及び(キ) 食品の品質保証は20-25%で説明されておらず、モデル・コアカリ等に記載がないことを反映しているかもしれない。食薬区分は、健康食品を医薬品から区別する法規範であり、また保健機能食品の品質は医薬品に準ずるべきものと考えられることから、(イ)に関連して説明できる。

II) 医薬品の品質保証の講義は60校中58校で行われていたが、薬学の根幹を為すと考えられる「品質の定義」と「品質保証」について約20%の大学でしか説明されておらず、疎かになっている傾向があった。今後、薬学教育の中で品質保証に関する正しい概念が定着すれば、RSの必要性および保健機能食品や健康食品の品質保証への理解が深まり、PCやSMedにおける薬学の立ち位置が明確になるであろう。

大腸がんの腫瘍形成に関わる亜鉛トランスポーターZIP7

○大橋 若奈^{1,2}、仙田 幸音²、洞口 龍介²、井村 穰二²

¹慶應義塾大・薬・生化学、²富山大・医・病理診断

亜鉛は必須微量元素であり、生体内での恒常性は亜鉛トランスポーターによって維持されている。亜鉛トランスポーターは輸送の方向性によりZIPとZnTの二つのファミリーに分類され、これまでに哺乳類では20種以上が同定されている。ZIPトランスポーターの一つZIP7は、小胞体に局在し、小胞体から細胞質への亜鉛の輸送を媒介するトランスポーターである。我々のこれまでの遺伝子改変マウスを用いた検討により、ZIP7は小腸において腸上皮幹細胞の機能維持に必要な不可欠な役割を果たすことを示してきた。本研究では、病態におけるZIP7の役割に着目し、大腸がんにおけるZIP7の発現の意義の明らかとすることを目指した。

ヒト大腸癌由来の細胞株（HCT116, HT29, SW480, DLD1, Lovo）を用いた検討から、多くの株においてZIP7が発現していることを見出した。これらの細胞株を用いて、ZIP7を高く発現する株と低い株の選抜を行なった。ZIP7高発現株を用いてノックダウン法により ZIP7の発現低下を誘導すると腫瘍形成能が低下した。フローサイトメトリーを用いた解析から、ZIP7のノックダウンによりアポトーシス性の細胞死が惹起していたことから、ZIP7は大腸がん細胞の生存に機能していることが示唆された。発現レベルの低い大腸がん細胞にレンチウイルス法を用いてZIP7の過剰発現株を作出した。ZIP7の過剰発現株はコントロールに比べ高い腫瘍形成能を示した。ウエスタンブロットによる解析から、ZIP7の過剰発現によりがん関連分子のリン酸化が亢進していることを見出した。以上の結果から、ZIP7は腫瘍シグナル活性を制御する分子であり、腫瘍促進的に寄与することが示唆される。

ヒト腎有機酸トランスポーターOAT1およびOAT3とイソフラボンおよび麩多糖の相互作用

○霊園 良恵¹、佐賀 樹¹、森尾 花恵¹、安藤 敬佑¹、北村 里衣¹、天海 智博²、平山 友里¹、橋本 弘史¹、中谷 晴昭¹、安西 尚彦¹

¹千葉大・院医・薬理学、²ニチモウバイオティックス株式会社

食物中のflavonoidsのantioxidant効果は、虚血性心疾患や糖尿病など酸化ストレス関連慢性疾患予防の役割と関連して大きな注目を集めている。Flavonoidsは植物界に広く分布し、flavonol, flavanol, flavanone, flavone, anthocyanidin, isoflavoneなどに分類される。腸管内より吸収されるこのflavonoidsの殆どは抱合型代謝物に変換されて血液循環に入り、最終的には速やかに腎臓より尿中に排泄される。これまでに安西らはquercetin, apigenin, kaempferol, luteolin, naringeninなどのflavonoidsがヒト腎有機酸トランスポーターOAT1およびOAT3による有機酸輸送を抑制することを明らかにし、OATsがそれらflavonoidsの腎臓排泄経路となる可能性を示唆した (Abe et al. Dokkyo J Med Sci, 45:27-34, 2018)。本研究では高い抗酸化力をもつダイゼインリッチなアグリコン型イソフラボンAglyMax (ニチモウバイオティックス) および麩菌発酵により新たに生み出された産生物 (多糖類・ペプチド) を含む健康食品ImmuBalance (ニチモウバイオティックス) とヒト腎有機酸トランスポーターOAT1およびOAT3の相互作用を検討した。ヒト有機酸トランスポーターのOAT1およびOAT3遺伝子安定発現細胞を用いて、それらの代表的輸送基質PAH (OAT1)、estrone sulfate (OAT3)の細胞内取込みが、細胞外液中に存在するAglyMaxおよびImmuBalanceがどの程度抑制するかを50, 200 uMの濃度を用いて調べた。その結果、AglyMaxが濃度依存性にOAT1およびOAT3による有機酸輸送を抑制することが明らかになった。ImmuBalanceの低濃度 (0.1 %) および高濃度 (0.4 %) はOAT1およびOAT3をとともに抑制しなかった。OAT1とOAT3は腎近位尿細管基底側膜に存在する有機酸の取込み口となることが知られており、本実験結果よりOATsが血中のAglyMaxに含まれるアグリコン型イソフラボンの腎臓排泄経路となる可能性を明らかにした。腎臓有機酸輸送を制御することによりアグリコン型イソフラボンの体内のbioavailabilityの調節に道を開くものと考えられる。

前立腺癌におけるアミノ酸トランスポーターLAT1選択的阻害薬の検討

○安藤 敬佑¹、斎藤 心平¹、金子 明夏¹、森尾 花恵¹、霊園 良恵¹、平山 友里¹、橋本 弘史¹、坂本 信一²、安西 尚彦¹

¹千葉大・院医・薬理、²千葉大・院医・泌尿器

【背景】LAT1(*SLC7A5*)はアミノ酸トランスポーターの一種であり、Leucineを含む多くの必須アミノ酸を細胞内に輸送している。LAT1は癌特異的に高発現していることが知られており、癌細胞に必要な栄養を供給している。消化器癌などの研究においてLAT1高発現が予後不良であり、LAT1選択的阻害薬(JPH203)による癌細胞の増殖抑制効果が報告されている。近年、我々は治療抵抗性前立腺癌(CRPC)モデルである細胞株C4-2でLAT1の発現が亢進することを報告した。治療抵抗性であるCRPCに対する治療標的としてLAT1阻害薬(JPH203)に対する期待は大きい。

【目的・方法】前立腺癌においてJPH203が治療薬となりうるか検討を行った。ホルモン感受性モデル株LNCaP細胞と去勢抵抗性モデル株C4-2細胞をもちいてJPH203投与下に¹⁴C Leucine up takeを行った。細胞毒性試験としてJPH203投与下にWST-8 assayを行った。さらに、細胞遊走・浸潤能を評価する目的でCorning™ Falcon™ Cell Culture Insertsを用いてMigration・Invasion assayを行った。RNA sequenceを行い、JPH203暴露の有無による遺伝子変動を解析し、Pathway解析を行った。

【結果・考察】抵抗性株のC4-2細胞ではJPH203投与によりLeucineの取り込みが優位に阻害された。また、in vitroでJPH203は細胞毒性を持ち、前立腺癌の遊走・浸潤能を阻害することが示された。RNA sequence解析ではJPH203暴露によりApoptosis pathwayが活性化していた。これらの結果から去勢抵抗性前立腺癌において、LAT1を標的としたJPH203が治療薬となる可能性が示された。

抜歯後組織修復におけるメタロチオネインの関与

○西田 優花^{1,2}、十川 千春³、宮崎 育子⁴、浅沼 幹人⁴、富田 美穂子⁵、大須賀 直人²、
十川 紀夫¹

¹松本歯大・歯・歯科薬理学、²松本歯大・歯・小児歯科学、³岡山大・院医歯薬・歯科薬理学、⁴岡山大・院医歯薬・脳神経機構学、⁵松本歯大・院・健康増進口腔科学

【目的】

メタロチオネイン(MT)は、亜鉛など必須微量元素の恒常性維持に関与していると考えられている低分子量の金属結合タンパク質である。亜鉛は、DNA・RNAポリメラーゼやスーパーオキシドジスムターゼを始めとする亜鉛酵素の活性中心に存在し、これら酵素の活性を制御しており、亜鉛欠乏は組織修復の遅延をもたらす。

歯科診療において、抜歯は通常処置の1つであるが、抜歯後の組織修復は上皮組織修復と骨組織修復の双方を必要とする特異的な病態であり、これら修復時にも亜鉛の関与が想定される。しかし、MTと抜歯後組織修復との関連については未だ明らかになっていない。

したがって、今回、抜歯窩修復に対するMT関与の有無について、主要なMTアイソフォームであるMT-1およびMT-2を遺伝的に欠損したマウス(MT欠損マウス)と野生型マウスを用いて、抜歯部の上皮組織修復と抜歯根部の骨組織修復の両面から、その差異を比較・検討した。

【方法】

4週齢のMT欠損マウスと野生型マウスを麻酔下で固定し、上顎右側第一臼歯を抜歯した。抜歯0, 3, 5および7日後に上顎を摘出し、抜歯部位の実体顕微鏡画像をNIH ImageJで測定することにより創傷面積を算出した。また、上顎骨のCT画像を解析して抜歯根部(近心頬側根)の修復骨量を定量した。

【結果】 抜歯後の創傷面積は、MT欠損マウスおよび野生型マウス共に経時的に減少した。なお、MT欠損マウスでは野生型マウスと比べて創傷面積は大きく、抜歯3, 7日後において、有意な差が認められた。

一方、抜歯根部(近心頬側根)の修復骨量は、MT欠損マウスおよび野生型マウス共に経時的に増加した。また、MT欠損マウスと野生型マウスとの間に抜歯7日後の骨量に有意な差は認められなかったが、抜歯後初期ではMT欠損マウスにおける骨量の回復が遅延している傾向が見られ、抜歯5日後ではMT欠損マウスの修復骨量は野生型マウスに比べて有意に低値であった。

【考察】

MTは生体内亜鉛量の調節に関わっており、亜鉛欠乏時には、核酸合成やタンパク質合成が抑制されることから、細胞増殖や骨代謝に影響を及ぼすことが報告されている。MT欠損マウスと野生型マウスにおいて抜歯後初期の上皮創傷治癒と骨形成に差異が認められた今回の結果は、MTが抜歯後組織修復に関与していることを示すとともに、細胞により亜鉛感受性が異なり、上皮組織修復と骨組織修復では修復時期による亜鉛要求性の差異が存在することを示唆していると考えられた。

薬物誘発性歯肉増殖症とメタロチオネインの誘導に関する研究

○田村 幸彦¹、楠本 康香²、スパチャットウオン チャヤポン⁵、米田 憲哉⁵、河崎 万鈴³、脇能広^{1,4}、春日井 昇平⁵

¹東京医科歯科大・院医歯・硬組織薬理学(歯薬理)、²東京医科歯科大・院医歯・小児歯科学障害者歯科学、³東京医科歯科大・歯・6年、⁴日本薬科大・薬・一般薬学部門、⁵東京医科歯科大・院医歯・イ

【目的】薬物誘発性歯肉増殖症は、抗てんかん薬のひとつであるPhenytoin (PHT) や免疫抑制剤のCiclosporinなどの投与により惹起され、口腔内環境が著しく悪化する。この歯肉増殖の発現機序は、薬物の直接作用による線維芽細胞の過剰増殖やコラーゲン代謝障害などが考えられているが詳細は不明である。ところで重金属結合蛋白質であるメタロチオネイン (MT) は、亜鉛などの微量元素のhomeostasis維持やカドミウム (Cd) などの重金属の解毒など生体内で様々な機能を持つ多機能蛋白質として注目され 増殖との関連性も示唆されている。本研究ではMTと薬物誘発性歯肉増殖症の関連性を検討する目的で以下の実験を行った。

【方法】マウス歯肉上皮細胞を通常に従って培養後、PHTおよびCdを培地に添加し1、3、24時間後に倒立顕微鏡にて細胞を観察後、培地中のLDH (乳酸脱水素酵素) 活性を測定した。RNAはTRIZOLにて抽出し、MTのisoformのひとつである*Mt1*、*Mt2*および*Mt3*の遺伝子発現をRT-PCRで定量解析した。

【結果・考察】PHT添加群はCd添加群と同様に、1、3、24時間後に細胞の形態的な変化は観察されず、細胞毒性や増殖に差は見られなかった。*Mt1*および*Mt2*の遺伝子発現はコントロール群に比較して有意に増加したが、*Mt3*の発現誘導は認められなかったことから、isoformの違いによる機能の差が示された。すでに我々は、*in vivo*でPHT (100 mg/kg) 連続皮下投与により下顎臼歯部歯肉における歯肉増殖症を定量化し、投与3日目にBrdU positive cellの増加を報告した。MTは新生児や悪性腫瘍などの増殖が盛んな組織で含有量が高いことが知られている。本実験から、PHTにより誘導されたMTは薬物により歯肉細胞に誘導される蛋白質として、時間単位の初期段階で発現機序に関与していることが明らかとなり、この蛋白質の発現を制御することで薬物誘発性歯肉増殖症を抑制する可能性が示唆された。

加齢に伴う歯肉微小循環変化に対する歯肉マッサージ(物理的刺激)の効果

○高橋 聡子、高橋 俊介

神奈川歯科大・院歯・循環制御歯科学・薬理学

【目的】加齢に伴う歯肉微小循環機能の低下は、歯肉マッサージ（物理的な刺激）と機械的な清掃を組み合わせることで緩和される可能性がある。身体各部への物理的刺激は、血液循環の改善等、全身への効果に関する報告も多い。一方、歯肉マッサージによる歯肉微小循環への影響の報告は少なく、とくに加齢に伴う口腔内の循環動態の変化への効果についてはほとんど研究されていない。本研究は、歯肉マッサージが加齢に伴う歯肉微小循環変化にどのような影響を与えるかを検討することを目的として行った。

【方法】7週齢，6ヶ月齢，1年齢のWistar rat（雄）を歯肉マッサージ群とコントロール群の2群に分けた。歯肉マッサージは、市販の電動ハブラシと高速反転タイプ専用ヘッドにプロフィーカップを装着して、イソフルラン吸入麻酔下で、上顎左側第一臼歯近心歯肉に5秒間，刺激圧5～10 gfで週に2回の頻度で4週間，合計8回行った。マッサージから3日後に吸入麻酔下で，レーザードップラー血流計を用いて，同部の血流速度を測定し，反応性充血を指標に機能的解析を行った。4週間の血流測定終了後に，ペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg, *i.p.*）麻酔下でラットを屠殺し，Hematoxylin and Eosin (HE) + 墨汁染色標本，レジン鑄型標本を作製し，形態学的解析を行った。

【結果および考察】歯肉の血流測定では，1年齢のコントロール群で，7週齢と比較して，基底血流量（Base flow）の低下が認められた。また，7週齢，6ヶ月齢と比較して，最大血流量と基底血流量の差（Peak）は減少し，最大血流量の半減時間（ $T_{1/2}$ ）は短縮した。歯肉マッサージ群では，コントロール群と比較して， $T_{1/2}$ が7週齢と1年齢で延長し，増加総血流量（Mass）が6ヶ月齢と1年齢で増加した。HE + 墨汁染色標本では，6ヶ月齢，1年齢のコントロール群に対して歯肉マッサージ群で，墨汁染色血管が多く見られた。レジン鑄型標本では，6ヶ月齢，1年齢群において，血管内腔が粗造なコントロール群と比較して歯肉マッサージ群ではループ状の血管が多く認められた。本研究では，加齢に伴う歯肉微小循環機能の低下と血管構築の変化が認められた。これに対し，歯肉マッサージは，機能・形態の両面から歯肉微小循環を賦活化し，口腔の健康保持に有効である可能性が示唆された。

骨および歯の恒常性維持におけるグルココルチコイド受容体の機能—遺伝子改変メダカを用いた解析—

○畔津 佑季、茶谷 昌宏、唐川 亜希子、坂井 信裕、高見 正道

昭和大・歯・歯科薬理学講座

【背景・目的】 グルココルチコイド(GC)の合成製剤は副作用で骨や歯の恒常性に悪影響を及ぼすため、その機序解明の重要性は高い。しかしGCが生体内で作用する様子を直接観察した研究はほとんどなく、また全身性GC受容体(GR)欠損マウスが生存できず成体での解析が難しいという理由から、GCの骨に対する生理的・病理的作用は十分に解明されていない。本研究では体の透明度が高く、生きのまま顕微鏡下で骨や細胞を観察できるメダカをGC研究に応用し、骨に対するGCの役割を検討した。

【方法】 骨芽細胞と破骨細胞をそれぞれ蛍光タンパク質で標識した*osterix promoter-DsRed/TRAP promoter-EGFP*遺伝子改変メダカを用いて以下の実験で細胞の蛍光面積を定量することで、GCが各細胞の動態や活性化に及ぼす影響を解析した。GC製剤プレドニゾロン(PN)を32日間投与して咽頭歯骨の形態と鰭条骨の骨折修復に与える影響を観察した。次にCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を用いて全身性GR2欠損メダカ(GR2変異体)を作製し、11日間のGC製剤デキサメタゾン(DX)投与実験と共に骨折修復に対するGR2の機能を検討した。

【結果】 PN長期投与により咽頭歯骨の骨芽細胞と破骨細胞の面積が有意に減少し、歯を支持する骨の形態異常が生じた。また鰭条骨に常在する骨芽細胞も有意に減少した。鰭条骨の骨折部位では修復時に動員される骨芽細胞と破骨細胞の面積が対照群と比べて約10分の1まで減少し、骨修復に障害が生じた。一方でGR2変異体の骨折部位は骨芽細胞と破骨細胞が野生型と比べ約2倍増加したが、DXを短期間投与するとGR2変異体と野生型の両方で破骨細胞のみ有意に減少し、骨リモデリングに障害が生じた。

【考察】 PN長期投与はメダカの骨芽細胞と破骨細胞に対して抑制的に作用して骨代謝異常を誘発し、DX短期投与は骨折修復の破骨細胞にのみ抑制的に作用することが示唆された。またメダカにはGR1とGR2が存在し、GR2はGR1より機能的でメダカの主要なGRシグナルを担うとされている。GR2変異体の骨折部位では両細胞の面積が増加する一方、DX短期投与で破骨細胞の面積が減少した。これはDXがGR1を介して破骨細胞に対し抑制的に作用した可能性があり、GR2が骨芽細胞と破骨細胞の動員を調整して骨折修復を制御している可能性が示唆された。

抗RANKL抗体とゾレドロネートがマウスの成長と歯の恒常性に及ぼす薬理作用の比較

○唐川 亜希子^{1,2}、坂井 信裕^{1,2}、茶谷 昌宏^{1,2}、高見 正道^{1,2}

¹昭和大・歯、²昭和大・薬理科学研究センター

【目的】 小児の骨疾患には骨粗鬆症、骨形成不全症、骨巨細胞種などがあり、その治療にはデノスマブやビスホスホネート製剤が用いられている。しかし、骨量増加や癌性疼痛の改善をもたらすこれらの骨吸収抑制薬が、成長にいかなる影響を及ぼすのかは不明な点が多い。本研究では異なる作用機序をもつ2種類の骨吸収抑制薬、すなわち破骨細胞分化誘導因子RANKLに結合して破骨細胞分化を阻害するデノスマブと、破骨細胞の骨吸収機能を阻害するビスホスホネートが、成長や歯の萌出に及ぼす影響を解析した。

【方法】 デノスマブはマウスのRANKLには結合しないため、本研究ではデノスマブと同じ作用機序をもつ抗マウスRANKL抗体を用いた。また、ビスホスホネート製剤としてゾレドロネートを使用した。これらを生後1週齢のマウスの腹腔皮下に、1回または7回(週1回, 7週間)投与し、成体である8週齢時の成長(身長・体重)、骨および歯の萌出を解析した。

【結果】 いずれの投与群でも、成長期の骨吸収抑制薬投与はマウスの骨量を増加した。抗RANKL抗体投与群では、大腿骨および歯槽骨で破骨細胞数が有意に減少したが、成長や歯の萌出は対照群と同等であった。一方、ゾレドロネート投与群では、著しい成長抑制と歯根形成不全を伴う臼歯の萌出不全が生じた。この時、歯槽骨では骨芽細胞数が減少し、破骨細胞数が増加した。

【考察】 抗RANKL抗体およびゾレドロネートはいずれも骨吸収抑制作用を示したが、成長期の骨代謝や歯の萌出に対して異なる作用を示すことが明らかとなった。すなわち、抗RANKL抗体はマウスの成長に影響を及ぼさなかったのに対し、ゾレドロネートは成長を強く抑制した。また、ゾレドロネート投与群では歯槽骨における骨芽細胞抑制と臼歯の歯根形成不全が認められたことから、破骨細胞だけでなく骨芽細胞も歯の形成や萌出に関与する可能性が考えられた。以上より、ビスホスホネートは抗RANKL抗体よりも小児に対する有害作用が大きいと推察され、本薬の投与量や投与時期の決定には詳細な解析が必要であると考えられる。

脂質の過量摂取が歯の恒常性維持機構に及ぼす影響

○坂井 信裕^{1,4}、黒滝 優太郎^{1,2,4}、佐藤 ゆり絵^{1,3,4}、畔津 佑季^{1,4}、唐川 亜希子^{1,4}、
茶谷 昌宏^{1,4}、高見 正道^{1,4}

¹昭和大・歯・歯科薬理、²昭和大・歯・地域連携歯科、³昭和大・歯・障害者歯科、⁴昭和大・医・薬理科学研究センター

【目的】脂質異常症は、血中低密度リポタンパク質（LDL）レベルの上昇を特徴とし、動脈硬化、脂肪肝、骨密度低下等を誘発する生活習慣病である。本研究で我々は、脂質異常症が歯の形成に及ぼす影響を及ぼすか解明するため、実験動物に高脂肪食を与えて歯の伸長や構造変化を解析した。

【方法】野生型マウス（雄8週齢）を、脂肪含有率14%の餌を与えた「標準食群」と脂肪含有率36%の餌を与えた「高脂肪食群」に分け、3週間毎に切歯の μ CT撮影を実施し、12週間後に屠殺して血液生化学検査、 μ CTによる下顎骨および大腿骨の骨形態計測、および下顎切歯の組織切片観察を行った。また、摂餌10週間後に直径1 mmの歯科用ラウンドバーで下顎右側切歯唇側歯頸部にマーキングし、それを指標として2週間の歯の伸長距離を計測した。さらに、脂質異常症を発症するLDL受容体欠損（*Ldlr*^{-/-}）マウスを用いて上記と同様の実験を行った。【結果】野生型マウスを用いた実験では、高脂肪食群は標準食群に比べて総コレステロール（T-CHO）値が2倍に増加しており、切歯の伸長速度の低下と象牙質の肥厚を伴う歯髄の狭窄を認めた。この切歯を詳しく観察したところ、象牙前質の消失や象牙芽細胞とエナメル芽細胞の形態変化が観察された。白歯では異常は認められなかった。一方、*Ldlr*^{-/-}マウスの標準食群と高脂肪食群のT-CHO値は、野生型マウス（標準食群）に比較してそれぞれ約3倍と約20倍を示した。*Ldlr*^{-/-}マウスの標準食群では、野生型の標準食群に比べて切歯の伸長速度の低下傾向と象牙質の肥厚を伴う歯髄の狭窄傾向および、根中央部付近の象牙前質の異常を認めた。*Ldlr*^{-/-}マウスの高脂肪食群では、切歯の伸長速度の低下と象牙質肥厚を伴う歯髄の狭窄がより顕著となり、象牙前質の消失および、エナメル芽細胞の分化促進が観察された。【考察】野生型と*Ldlr*^{-/-}マウスは、いずれにおいても高脂肪食の摂餌により、著しい歯髄の狭窄が生じたことから、餌中に含まれる脂質が歯の形成や構造をコントロールする要因の1つであることが明らかとなった。また、*Ldlr*^{-/-}マウスは標準食群でも歯髄の狭窄傾向を示したことから、LDL受容体を介した脂質代謝が歯の形成と恒常性の維持に関与するものと推察された。以上より、脂質異常症は歯の形成と恒常性維持に深く関与すると考えられる。

AnnexinA5は腱・靭帯付着部(enthesis)石灰化を負に制御する

○小松 浩一郎¹、出野 尚¹、新井 嘉則²、和田 悟史³、中島 和久¹、山下 照仁⁴、江面 陽一⁵、二藤 彰¹

¹鶴見大・歯、²日本大・歯、³鶴見大・歯・矯正、⁴松本歯科大・総合歯科医学研・硬組織疾患制御再建、⁵東京医科歯科大・難治研・分子薬理

アネキシンA5 (Anxa5)は、細胞膜裏打ちタンパク質として多彩な機能が報告されており、筋骨格組織では関節軟骨、骨膜、および骨と腱・靭帯付着部に強く発現するが、そこでの機能については不明な点が多い。Annexin A5欠損 (Anxa5^{-/-}) マウスは発生期ならびに出生直後においては、筋・骨格系組織含めて大きな変化は認められない。ところが、Anxa5^{-/-}マウスは生後7週以降に、野生型に比べて腱・靭帯の骨への付着部の肥大、しかも石灰化の亢進を認めた。この表現型は脛骨、大腿骨、上腕骨、下顎骨など、調べた骨でいずれも同様に認められた。Anxa5^{-/-}マウスの骨格系組織の変化が発生・出生直後には無く、成長するに従って変化が認められることから、表現型について力学的負荷の関与が想定された。そこで、力学的負荷の軽減を図る2つのアプローチを行った。まず、前脛骨筋の腱組織を切除することで、骨への付着部への力学的負荷を軽減し、その影響を調べたところ、Anxa5^{-/-}、野生型マウスともに同部位の大きさが減少していた。さらに、別のアプローチとして尾部懸垂によって下肢への力学的負荷を減少させたところ、場合も同様にAnxa5^{-/-}、野生型マウスともに骨への付着部の石灰化が減少していた。これらの結果は、筋張力誘導性の力学的負荷を介して、Anxa5が腱・靭帯の骨への付着部の石灰化を制御することを強く示唆する。さらに、石灰化制御のメカニズムを調べるため、腱・靭帯の骨への付着部を構成する腱細胞、軟骨細胞、骨芽細胞におけるAnxa5ノックダウンを試みた。軟骨細胞では、Anxa5ノックダウンにより、石灰化制御に関わる分子Ank、Enpp1の発現が低下した。以上のことからAnxa5は石灰化制御因子の制御を介して、腱・靭帯付着部の石灰化を負に制御する可能性が示唆された。

歯の移動に関連する痛みに対する2種の歯科用レーザー照射の治療効果

○土屋 隆子¹、湯川 未郷²、長谷川 尚哉²、佐々木 会²、須田 直人²、横瀬 敏志¹、安達 一典³

¹明海大学歯学部・保存治療学分野、²明海大学歯学部・歯科矯正学分野、³明海大学歯学部・薬理学分野

【目的】矯正治療では、歯の移動に疼痛が伴う。その疼痛に対し低レベルレーザー治療（LLLT）の効果が報告されているが、一貫していないそこで、1) 歯科で頻用のCO₂または半導体レーザーによる照射が矯正力負荷に伴う疼痛を定量評価可能な動物モデルを用いて矯正治療に関連する疼痛を軽減するか、2) 各レーザーの最適な照射プロトコルの設定、3) 他の生物学的指標（例：歯の移動量、三叉神経節（TG）のGFAPの発現、温度変化）に対するレーザー照射の影響を評価し、4) レーザー照射による鎮痛作用のメカニズムを解明することを目的として実験を行った。

【試料および方法】

イソフルラン全身麻酔下で雄性Wistar系ラットの上顎両側門歯と上顎右側第一臼歯間(M1)にコイルスプリングで矯正力(50 g)を負荷した。1日後に、全身麻酔下で、筋電図（顎二腹筋）採取用電極と、電気刺激用電極を上顎両側M1部歯肉に留置し、電気刺激に由る開口反射誘発閾値（TH）を測定した。各レーザー（CO₂：10,600 nm; 半導体：808 nm）にて右側M1領域に照射を行い、THを再測定した。もう一方の群は、矯正力負荷直後にレーザー照射し、翌日にTHの評価をした。THの評価後、灌流固定を行い、両側TGを摘出、GFAP免疫蛍光染色を行い観察した。また、温度刺激ならびに局所麻酔薬の投与（浸潤麻酔、表面麻酔）を行うことで、レーザー照射による鎮痛作用の機序を検討した。

【結果および考察】

一日間の矯正力負荷は、反対側と比較し右側THを有意に減少させた。また、GFAP発現を有意に増加した。右側上顎M1へのCO₂レーザー照射は、右側THと同部位歯肉溝温度を有意に上昇させた。同様のTH上昇は表面麻酔によっても引き起こされた。半導体レーザーではこれらの反応は認められなかった。矯正力負荷直後に各レーザーを照射（30秒）すると、翌日の右側THの有意な上昇とGFAP発現の有意な減少を認めた。矯正力負荷直後のレーザー照射は七日間に亘る歯の移動量を変化させなかった。これらの結果から、いずれのレーザーも、矯正治療に伴う疼痛を防ぐことが認められた。さらに、CO₂レーザー照射で得られる急性の鎮痛効果の発現のためには組織温度の上昇が必要であり、表面麻酔と同等の効果であることが示された。