

DNA付加体の網羅的解析手法（DNAアダクトーム）の 現状と将来展望

日本大学薬学部 環境衛生学/国立がん研究センター研究所
戸塚 ゆ加里

がんの発生には環境因子が大きく係っていることが良く知られている。環境中に存在する化学物質が生体内に取り込まれ、細胞内に侵入し、核内のDNAに結合する。これらを総称してDNA付加体と呼び、これらDNA付加体がゲノムに変異を誘発する基であると考えられている。従って、化学物質のDNA付加体生成能を調べるのが、医薬品や食品添加物などの安全性を評価する上で有用な情報となるとみなされている。DNA付加体の解析手法として、最近では液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)を用いる網羅的解析手法（DNAアダクトーム）が主流となってきた。汎用されているDNAアダクトームは化学構造が既知のDNA付加体を対象としたターゲット分析によるものとなっている。これに対し、我々が改良・開発に携わった高分解能精密質量分析装置(HRAM)を用いたHRAM-アダクトームでは、化学構造が不明のDNA付加体も対象としたノンターゲット分析が可能となっている。これまでに同手法を用い、酸化鉄ナノ粒子、1,4-ジオキサンおよび職業性胆管がんの原因物質である1,2-ジクロロプロパンによる遺伝毒性誘発メカニズムを明らかにした。さらに、中国食道がんの候補要因のスクリーニングに成功し、ある種のニトロソ化合物が食道がん発生に寄与することを見出した。本講演では、DNA付加体解析の歴史的背景について簡単に解説した後、HRAM-アダクトームによるDNA付加体と変異誘発及び発がんとの関係解明について最近の知見を基に紹介する。さらに、同手法を応用した化学物質の安全性評価法の開発についても述べる。

動画を用いたマウスの自発行動の解析

○宮崎 優介、小林 幸司、松下 誠司、清水 直行、村田 幸久

東京大・院農学生命科学・放射線動物科学研究室

【背景】

マウスの自発運動は、マウスの体調や精神の状態を評価するための重要なパラメータである。マウスの自発運動の測定方法として、赤外線センサーによる動きの検出、回転かごを回した数の測定、肉眼的な観察による行動量の評価などの方法が用いられている。しかし、これらの方法には特別な機器が必要である、通常の飼育環境とは異なる、感度が低い、などの問題点がある。我々は簡便かつ汎用性の高いビデオ撮影機器を用いて、黒い被毛を持つ実験用マウスの自発運動を通常飼育環境下、24時間連続で測定できる方法を開発した (Kobayashi 2020)。しかし、白い被毛を持つ実験用マウスの撮影・解析方法は確立できていない。

【目的】

本研究では、白いマウスの自発運動を24時間にわたって評価できる撮影環境と解析方法を確立し、それを用いて馴化、週齢、性別による自発運動の違いを評価することを目的とした。

【結果】

最大15個の黒いケージの中に黒い床敷を入れ、その中で白いBALB/cマウスを12時間周期の明暗周期の下で飼育した。ケージ上方にカメラを設置してマウスの動きを撮影し、撮影した動画をリアルタイムで解析用のコンピュータに転送した。動画の各フレーム画像を二値化してマウスの位置を検出し、1秒ごとのマウスの重心の移動量を自発運動量として表した。24時間の自発運動量を解析した結果、マウスは20-60分の積極的に運動する期間と、60-120分の休息している期間を繰り返していることがわかった。更に、明期の終盤において運動の頻度が増加し、暗期の終盤において運動の頻度が減少する様子が見られた。また公知の様に、明期と暗期を比較すると、暗期の自発運動量の方が大きいことも確認された。飼育環境の変化に対する馴化の自発運動量への影響を検討するため、マウスをケージに入れた日から3日ごとに3回撮影したところ、日を追うごとにマウスの自発運動量が減少した。更に、4, 8, 12, 16, 32週齢のマウスで自発運動量を比較したところ、週齢の増加と共に自発運動量が減少した。一方、雌雄間では自発運動量に有意な差は見られなかった。

【結論】

白いマウスを24時間撮影し、その移動軌跡を追跡できる環境を構築した。飼育環境への馴化や性別、週齢が自発運動に与える影響を評価し、今後の研究応用への基礎となるデータを得た。

畳み込みニューラルネットワークを用いたマウスのグルーミング行動を自動判別する手法の開発

○坂本 直観¹、小林 幸司¹、山本 晃子¹、益子 櫻¹、山本 雅人²、村田 幸久¹

¹東京大・院農学生命科学・放射線動物科学、²北海道大・院情報科学・自立系工学

【背景・目的】

実験動物として広く用いられているマウスは、顔や体を毛繕いする。このような行動をグルーミングと呼ぶ。グルーミングの頻度や長さ、対象部位はマウスの心理的、身体的な状態を知るための有用な指標として知られており、薬剤投与やストレス刺激などによってそのパターンが変化する。現在、多くの研究において目視によるグルーミング行動の評価が行われているが、この方法は実験者の負担が大きい上に客観性や再現性が不十分である。本研究では、画像の特徴を学習することに優れた深層学習手法、畳み込みニューラルネットワークを用いて、動画からマウスの顔と体のグルーミング行動を自動判定する方法の開発を試みた。

【方法・結果】

マウス (BALB/c) をケージに入れ、上部に固定したビデオカメラを用いて、約10分の動画を30本撮影した。各動画をフレームごとに分割した画像の集合に変換し、それぞれの画像を「グルーミングなし」、「顔のグルーミング」、「体のグルーミング」のいずれかに分類・ラベル付けした。30動画のうち23動画を畳み込みニューラルネットワークの学習に使用した。つづいて、学習に用いていない7動画のうち2動画を用いて、各フレームがどの分類にあたるかを学習済み畳み込みニューラルネットワークに予測させ、人によるラベル付けと比較した。その結果、体のグルーミングを約87%、顔のグルーミングを約78%の精度で識別することができた。一方で、不自然な誤判定や中断判定によって、体のグルーミング回数が過推定されていた。そこで、それらを改善するためのフィルターを定義して適用し、改善を試みた。最後に、確立したシステムを用いて、残る5動画の評価を行った結果、体のグルーミングを約88%、顔のグルーミングを約81%の精度で識別することができた。また、5動画におけるグルーミング回数の評価は人の観察と畳み込みニューラルネットワークの予測で同等であった。

【結論】

本研究によって、畳み込みニューラルネットワークを用いた部位別のグルーミング行動の自動判定法が確立できた。

神経回路形成における同期発火の役割

○鹿島 哲彦、池谷 裕二

東京大・院薬・薬品作用学教室

正常な脳機能の発現には、適切な神経回路が形成されることが必要不可欠である。神経回路の担い手であるシナプスは発達初期に過剰に形成され、その後シナプス刈り込みによって適切な数へと調節されることが知られている。また、そのシナプス刈り込みは神経活動依存的に生じ (Schafer *et al.*, 2012)、シナプスの寿命は神経活動の中でも特に同期活動の程度によって変化することが知られている (Wiegart *et al.*, 2018)。さらに、成体での神経回路において、解剖学的に結合しているニューロン同士、すなわちシナプスが形成されているニューロン同士の同期発火確率は高いことが知られている (Takahashi *et al.*, 2010)。しかし、同期発火したシナプスが選択的なシナプス刈り込みを逃れて結合を形成するのか、すなわち、同期活動と神経結合形成の必要十分性はいまだ検証されておらず、人工的な刺激によって同期発火を誘導した場合、同期発火ニューロン間に結合が形成されるかどうかは明らかではない。本研究は発達期のマウス皮質ニューロンに同期発火を誘導し、成長後に同期発火誘導細胞間に結合が形成されるか否かを検証することを目的とする。

子宮内電気穿孔法によりマウスの体性感覚皮質2/3層にチャンネルロドプシン2 (ChR2) を発現させ、この個体に頭上から青色光照射を行うことで非侵襲的な同期発火誘導を試みた。その結果、光刺激後、最初期遺伝子であるc-Fosが発現した。すなわち、青色光が皮膚・頭蓋骨を透過し、体性感覚皮質のChR2を活性化することを発見した。また、この活性化が同期発火を誘導していることを、生体の局所場電位を記録することで明らかにした。本同期発火誘導手法を生後9-13日目のマウスに適用し、成長後in vitroパッチクランプ法により結合の有無を確認すると、同期発火を誘導したChR2陽性細胞間では他の神経細胞間と比較して有意に高い結合確率を示していた。この結果は、発達期のシナプス形成において同期発火した神経細胞が結合を形成しやすい、というHebb則に一致するものである。

神経細胞内在的に軸索伸長を制御する新規因子の探索

○樋口 京香^{1,2,3}、田辺 章悟¹、成田 年^{2,4}、村松 里衣子¹

¹国立精神・神経医療研究センター・神経研・神経薬理、²星薬科大・薬・薬理、³東京医科歯科大・院医歯・NCNP脳機能病態学、⁴国立がん研・がん患者病態生理研究分野

脊髄損傷は外傷などを契機に、神経系に重篤な障害を引き起こす病態である。症状が現れる原因の一つに神経回路の損傷が挙げられるが、成体の中枢神経系は自発的な再生が困難なため、症状の自然回復は難しいと考えられていた。しかし、個人差こそあるものの脊髄損傷後にも部分的な機能回復が見られ、これは代償的な神経回路が形成されたためと考えられている。この代償的な神経回路の形成機構を賦活化させることができれば、症状が緩和できると期待されている。本研究では、表現型や遺伝子発現に関する複数のデータベースを組み合わせて新規の神経回路形成分子を探索し、その作用をin vitroで検証した。

運動機能と関連する遺伝子を探索することを目的として、OMIMで”motor dysfunction”の情報を含む遺伝子を抽出した。さらにその中で脳での発現が相対的に高い遺伝子をProtein Atlasを用いて探索し、その後に神経細胞で豊富に発現する遺伝子をBrain RNAseqにより探索した。このようにして得た脳の神経細胞で発現が豊富な遺伝子から上位20種類に対するsiRNAを、それぞれマウス大脳皮質初代培養系へ導入し、培養後の神経突起伸長を計測した。その結果、Synaptotagmin 4 (Syt4) 遺伝子の発現を抑制させた神経細胞で、対照群と比較し突起長が短い様子が観察され、Syt4遺伝子が神経突起の伸長の維持に促進的に作用することが示唆された。Syt4による神経突起伸長の促進作用の機序の解明を目的として、Syt4の発現を抑制した培養大脳皮質神経細胞での遺伝子発現をRNAseqにより解析した。対象群と比較し有意に発現変動する遺伝子に対して、pathway解析(KEGG)を実施したところ、Syt4発現抑制細胞では細胞接着分子やPhosphoinositide 3 kinase (PI3K)シグナルに関わる遺伝子の発現が低下していた。今後、これらの分子群がSyt4による神経突起伸長作用の分子メカニズムを担うか解析するとともに、脊髄損傷モデルでの代償的神経回路形成に対するSyt4遺伝子の機能を解析し、Syt4が新規の神経回路の形成因子である可能性を検証する予定である。

糖尿病マウスに認められる恐怖記憶の増強における脳内 AMP 活性化プロテインキナーゼの役割

○小林 和花、山岸 愛実、村田 佳織、齊藤 朝美、米持 奈央美、池田 弘子

星薬科大・薬・薬物治療学研究室

糖尿病患者では精神疾患の罹患率が高いことが報告されているが、糖尿病が精神障害をひき起こす機序は不明である。当研究室ではこれまでに、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスでは恐怖記憶が増強されることを報告している。中枢において glucose は L-lactate に代謝され、神経のエネルギー源となることが知られている。一方で、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) はエネルギー調節に関わる酵素であり、L-lactate によりその活性が抑制されることが報告されている。このことから、STZ 誘発糖尿病マウスでは高血糖に伴って中枢の L-lactate が増加し、これが AMPK を抑制することにより恐怖記憶が増強される可能性が考えられる。そこで本研究では、中枢の L-lactate や AMPK が糖尿病による恐怖記憶の増強に与える影響について検討した。まず、STZ 誘発糖尿病マウスにおいて脳内の L-lactate 量が増加するか検討したところ、恐怖記憶に重要な役割を果たす海馬や扁桃体における L-lactate 量が増加していた。そこで、正常マウスに L-lactate を脳室内投与し恐怖条件付け試験を行ったところ、すくみ行動持続率は L-lactate の用量依存的に増加した。これらの結果から、糖尿病における高血糖により中枢の L-lactate 量が増加し、恐怖記憶が増強することが考えられる。続いて、恐怖記憶における AMPK の役割について検討した。正常マウスに AMPK 阻害薬の compound C を脳室内投与すると、すくみ行動持続率は増加し、この増加は AMPK 活性化薬の AICAR の併用によって抑制された。また、STZ 誘発糖尿病マウスに AICAR を脳室内投与したところ、STZ 誘発糖尿病マウスにおけるすくみ行動持続率の増加は抑制された。このことから STZ 誘発糖尿病マウスでは脳内 AMPK の活性低下が恐怖記憶を増強することが考えられる。さらに、L-lactate で見られたすくみ行動持続率の増加は AICAR を併用することにより抑制された。以上のことから、STZ 誘発糖尿病マウスでは中枢で産生される L-lactate が AMPK を抑制することで恐怖記憶を増強することが示唆された。

選択的オピオイド δ 受容体作動薬KNT-127による消去学習促進作用の脳内メカニズム

○河南 絢子¹、山田 大輔¹、柳澤 祥子¹、白方 基揮¹、飯尾 啓太²、長瀬 博²、斎藤 顕宜¹

¹東京理科大・薬・薬理学研究室、²筑波大・国際統合睡眠医科学研究機構

【目的】 恐怖記憶の消去学習は、過度な恐怖を抑制する記憶過程の一つである。心的外傷後ストレス障害 (PTSD) は、この消去学習の異常が報告されており、消去学習を促進する薬物はこれら疾患の治療薬として有用であると考えられている。当研究室ではこれまで、選択的オピオイド δ 受容体 (DOP) 作動薬KNT-127が消去学習促進作用を持つことを報告してきた。しかし、その詳細な脳内メカニズムは不明であった。そこで本研究では、KNT-127の作用部位の同定を目的として、ウエスタンブロッティング法、脳内局所投与法を用いて検討を行った。

【方法】 雄性C57BL/6Jマウス (8週齢) を用いて文脈的恐怖条件づけ試験を行った。1日目に実験箱内で電気刺激(0.8mA、1秒間、30秒間隔で8回)を与え条件づけを行い、2日目と3日目には1日目と同じ実験箱にそれぞれ6分間再暴露した。恐怖記憶の程度は、各試験中にマウスが示したすくみ行動時間を計測することにより評価した。KNT-127は2日目の再暴露30分前に、選択的DOP拮抗薬ナルトリンドール (NTI) はKNT-127の30分前に皮下投与した。また、再暴露の60分後に扁桃体 (AMY)、海馬 (HPC)、内側前頭前野 (mPFC) を採取し、ERKのリン酸化率をウエスタンブロット法により検討した。次に、KNT-127をAMY、HPCおよびmPFCの前辺縁皮質 (PL)・下辺縁皮質 (IL) に局所投与した。

【結果・考察】 KNT-127を皮下投与したマウスでは、2日目の再暴露におけるfreezing率が有意に低下し、その効果は3日目の再暴露時においても確認できた。この効果はNTIにより抑制されたことから、KNT-127は、DOPを介して消去学習を促進することが示唆された。さらに、2日目の再暴露60分後にAMYとHPCにおけるERK1/2のリン酸化率が有意に上昇していた。一方、mPFCでは変化がみられなかった。したがって、KNT-127の消去学習促進作用の経路には、AMYとHPCにおけるERK1/2の経路が関係していることが示唆された。そこで次に、KNT-127をAMY内に局所投与したところ、2日目の再暴露におけるfreezing率は有意に低下し、その効果は3日目の再暴露時においても確認できた。また、KNT-127をHPCおよびPLに局所投与したところ、2日目と3日目の再暴露におけるFreezing率には変化がなかった。一方、KNT-127をIL内に局所投与したところ、3日目の再暴露時にfreezing率が有意に低下した。以上の結果から、KNT-127はAMY内においてはERK1/2のリン酸化を介して、一方IL内においてはそれ以外の経路を介して消去学習を促進する可能性が示唆された。

選択的 δ オピオイド受容体作動薬KNT-127は代理社会的敗北ストレスモデルマウスが呈する下痢型過敏性腸症候群様症状を改善する

○吉岡 寿倫¹、山田 大輔¹、大橋 美咲¹、岡野 功太郎¹、小林 里帆¹、小俣 知貴¹、濱野 匠¹、山崎 万有奈¹、飯尾 啓太²、羽田 紀康³、松本 健次郎⁴、加藤 伸一⁴、長瀬 博²、斎藤 顕宜¹

¹東京理科大・薬・薬理学、²筑波大・IHS・創薬化学、³東京理科大・薬・生薬・薬用植物学、⁴京都薬科大・薬・薬物治療学

【背景】代理社会的敗北ストレスモデル (ES) マウスは、情動的ストレスのみの慢性曝露によって抑うつ・不安様症状を示すことなどから、妥当性の高いうつ病モデル動物として近年注目を集めている。一方、過敏性腸症候群 (IBS) は原因となる器質的疾患がないにも拘らず腸由来の消化器症状を慢性的に呈する疾患で、約半数の患者がうつ病を罹患しているとの報告がある。そこで本研究では、ESマウスにおけるIBS様の消化器症状の有無を検討した。さらに、我々が先行研究において抗うつ・抗不安様作用を見出している選択的 δ オピオイド受容体 (DOP) 作動薬KNT-127が、ESマウスのIBS様症状に与える影響について評価を行なった。

【方法】雄性C57BL/6Jマウス (6週齢) に、同種他個体が雄性ICRマウスに攻撃される様子を1日あたり10分間、10日間連続で目撃させることによりESマウスを作製した。腸管蠕動運動能はチャコールミール試験 (CMT)、小腸および大腸の器質的变化はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を用いて評価した。IBSの陽性対照薬として桂枝加芍薬湯 (1 g/kg、経口投与) を使用した。KNT-127は皮下 (10 mg/kg)、脳室内 (30 nmol) または島皮質内 (0.6 nmol) に投与した。

【結果・考察】慢性ストレス負荷直後および30日後のCMTにおいて腸管輸送率の有意な上昇が認められ、それは桂枝加芍薬湯の投与によって抑制された。一方、小腸および大腸のHE染色では炎症所見および損傷所見は観察されなかった。これらのことから、ESマウスでは腸管蠕動運動機能が慢性的に亢進しており、それが既存のIBS治療薬によって改善することが示された。次に、KNT-127は全身投与、脳室内投与、島皮質内投与のいずれにおいてもCMTにおけるESマウスの腸管輸送率を有意に低下させた。なお、KNT-127は正常マウスの腸管輸送率には影響を与えなかった。以上より、DOPは内臓感覚の最高中枢である島皮質において腸管蠕動運動機能を調節していることが示唆された。

【結論】ESマウスは妥当性を有する下痢型IBSモデル動物となる可能性が示唆された。また、KNT-127が島皮質のDOPを介して中枢性にIBS様症状を改善したため、DOPはうつ病および不安症に加えて、IBS治療の新規創薬ターゲットになり得ると考えられる。

C線維特異的知覚神経活性制御による脾臓リンパ球における免疫変容解析

○牟田 武尊¹、田中 謙一^{1,2}、濱田 祐輔^{1,2}、成田 道子^{2,3}、佐藤 大介^{1,2}、山下 健介¹、手塚 裕之⁴、山中 章弘⁵、
落谷 孝広³、葛巻 直子^{1,2}、成田 年^{1,2}

¹星薬科大・薬・薬理、²国立がん研・がん患者病態生理研究、³東京医科大・医学総合研究所・分子細胞治療、⁴藤田医科大・研究支援推進センター・細胞機能解析、⁵名古屋大・環境医学研究所・神経系Ⅱ

知覚神経の活動は、痛みシグナルの伝達に関与するだけでなく、末梢免疫細胞の活性制御にも関わると考えられているものの、その詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、薬理遺伝学的手法に従い、人工的に疼痛刺激を付加した際の末梢免疫細胞への影響について検討した。まず、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、遺伝子改変型ヒトムスカリン M3 受容体 (Gq-coupled human muscarinic M3 DREADD; hM3Dq) を C57BL/6J マウスの右後肢坐骨神経に微量注入することで、坐骨神経に存在する知覚神経のうち主に C 線維に hM3Dq の発現が誘導されることを確認した。このマウスにおいて、hM3Dq の特異的リガンドである clozapine *N*-oxide (CNO) を投与することで痛覚過敏を惹起させることが明らかとなった。このように作製したモデルマウスを用いて、CNO の連続投与による人工的な知覚神経の活性化が脾臓内免疫細胞へ与える影響について fluorescence-activated cell sorting を用いた細胞分離法に従って検討した。その結果、知覚神経刺激を付加した hM3Dq 発現群においてコントロール群と比較して natural killer (NK) 細胞内で、標的細胞のアポトーシス誘導に重要な *perforin* ならびに *granzyme B* の mRNA 発現量の有意な減少が確認された。しかしながら、この条件では、坐骨神経に存在する C 線維以外の感覚神経の神経活動も活性化している可能性が考えられる。そこで、C線維のマーカである Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (Trpv1) 特異的に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスを用いて、Cre 酵素存在下でのみ hM3Dq の発現誘導が可能となるアデノ随伴ウイルスベクターを右後肢坐骨神経に微量注入することで C 線維特異的に知覚神経活動を活性化させることの可能なモデルマウスを作製した。このように作製したモデルマウスを用いて、C 線維特異的に知覚神経活動を活性化させた際の脾臓リンパ球の免疫変容について現在解析している。本研究により、痛みを伴う各種疾患における免疫機能低下機構の解明が期待される。

ミクログリア置換によるアレキサンダー病への介入

○小林 憲司^{1,2}、繁富 英治^{1,2}、パラジュリ ビージェイ^{1,2}、檀上 洋右^{1,2}、久保田 友人^{1,2}、齋藤 光象^{1,2}、田中 謙二³、池田 一裕³、小泉 修一^{1,2}

¹山梨大・院医・薬理、²山梨大・院医・GLIAセンター、³慶應大・医・精神神経、⁴生理研・分子神経生理

Alexander disease (AxD) は、アストロサイトの間径フィラメントである glial fibrillary acidic protein (GFAP) 遺伝子の変異で生じる一次性アストロサイト病で、非常に希少な神経変性疾患である。AxDでは大脳白質病変および Rosenthal Fiber (RF) と呼ばれる GFAP を主な構成成分とする異常な凝集体が特徴的な組織病変として存在する。これら組織学的特徴に加えて、AxDはミクログリアの活性化を伴う神経炎症を示すことが明らかになっている。しかしミクログリア活性化の炎症状態および病態への関与は一様ではなく、疾患や環境に応じて様々に変化することから、ミクログリアがAxDの病態に対してどのように関与しているかは明らかではなかった。そこで我々は、AxDにおけるミクログリアの役割を明らかにすることで、いまだ十分な治療法の存在しないAxDに対する新たな治療法の確立に寄与することを目的として本研究を行った。我々はすでに、R239Hの変異が入ったヒト *GFAP* 遺伝子をもつマウス (AxDマウス) において、ミクログリアが脳保護作用を有する可能性を報告したがその作用は限定的であった。そこで本研究では、既存ミクログリアを除去し新しいミクログリアと置換することでその脳保護作用を増強させることを計画した。方法には、colony stimulating factor-1受容体拮抗薬 PLX5622 (PLX) の ON/OFF による置換法を用いた。AxDマウスに PLX を 1 週間与えると、既存ミクログリアはほぼ完全に除去され、PLX を中止すると新しいミクログリアが自己増殖し約 1 週間後には PLX を与えなかった AxDマウス群を上回る数まで回復した。このミクログリア置換により (置換 14 日後)、RF マーカーである Fluoro Jade B 陽性シグナルは有意に減少した。さらに AxDマウスのトランスクリプトーム解析で最も発現が亢進していた分子は炎症惹起物質 Lipocalin2 であったが、ミクログリア置換は Lipocalin2 発現を有意に減少させた。以上、PLX の ON/OFF によるミクログリア置換により、AxDマウスの病態が改善されることが明らかとなった。これは、一次性アストロサイト病である AxD に対し、ミクログリアへの介入が新たな治療戦略として有用である可能性を示唆するものである。

P2Y₁受容体活性化はeNOSを介して眼圧を下降させる

○濱田 健太郎^{1,2}、篠崎 陽一^{1,2}、行方 和彦³、大野 伸彦^{4,5}、原田 高幸³、柏木 賢治⁶、小泉 修一^{1,2}

¹山梨大・院医・薬理、²山梨大・院医・GLIAセンター、³東京都医学総合研・視覚病態、⁴生理学研・超微形態、⁵自治医科大・医・解剖、⁶山梨大・医・眼科、⁶山梨大・医・眼科

緑内障は本邦における失明原因第1位の眼疾患であり、視神経障害及び網膜神経節細胞(RGC)の脱落を特徴とする。本疾患の最大の危険因子は眼圧上昇であり、眼圧下降薬による治療が第一選択である。しかし、既存の治療薬は作用が不十分な場合がある事、薬剤抵抗性が生じる事や副作用などの問題から、新たな分子標的探索が急務となっている。我々は、緑内障患者の眼房水ではATPレベルの異常が生じる事からP2受容体が眼圧の制御に関わると仮説を立てて検証し、P2Y₁受容体が眼圧制御に関わる事を発見した。本発表ではP2Y₁受容体活性化が眼圧を抑制的に制御する事を報告する。P2Y₁受容体作動薬を点眼したところ、野生型マウスの眼圧が用量依存的かつ一過性に低下した。この作用はP2Y₁受容体欠損(KO)マウスでは認められなかった。眼圧は眼房水の産生及び排出により制御される。免疫組織化学染色から、P2Y₁受容体は眼房水排出に関わる線維柱帯やシュレム管近傍に発現している事を見出した。眼房水排出には一酸化窒素(NO)が関与する事が知られている。NOS阻害薬L-NAMEはP2Y₁受容体活性化時の眼房水排出を大きく減弱させた。血管内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現は、線維柱帯及びシュレム管近傍に広範に発現しており、特に線維柱帯ではP2Y₁受容体と共局在していた。リン酸化を指標としてeNOS活性をモニターしたところ、P2Y₁受容体活性化により線維柱帯のリン酸化eNOSレベルが顕著に増加し、そのような変化はP2Y₁KOマウスで消失した。同様に、P2Y₁受容体活性化による眼圧低下はL-NAMEによって完全に消失した。これらの結果より、P2Y₁受容体活性化はeNOSを介して眼房水排出を促進する事によって眼圧低下作用をもたらすと考えられた。P2Y₁KOマウスの定常時の眼圧を測定すると、月齢に関わらず慢性的に高眼圧であり、高眼圧緑内障症状が推定された。若齢(3カ月齢)P2Y₁KOマウスのRGC数を計測したところ、高眼圧にも関わらず脱落は認められなかった。一方、中年齢(12カ月齢)では、野生型に比べて有意にRGCの脱落を認めた。その他に、中年齢P2Y₁KOマウスでは、RGCのアポトーシスや網膜神経線維層の菲薄化、視覚機能の減弱などの所見も認められ、高眼圧型緑内障様症状を呈する事が明らかとなった。

マウスNMDAおよびツニカマイシン誘発網膜神経細胞傷害に対するAM404の保護効果

○坂本 謙司、小島 有紗、増田 茜、水野 玖美子、森 麻美、上園 崇

帝京大・薬・医薬品作用

【目的】 緑内障の患者において認められる網膜神経節細胞(RGC)傷害には、神経興奮毒性が関与している可能性が考えられている。また、網膜色素変性の患者において認められる視細胞の進行性の変性には、小胞体ストレスが関与している可能性が考えられている。アセトアミノフェンの代謝産物であるAM404は、脳虚血再灌流傷害に対する保護作用を示すことが報告されている。AM404は、内因性カンナビノイドであるアナンダミドを輸送するトランスポーターを抑制する作用やTRPV1受容体を刺激する作用を示すことが報告されている。本研究では、マウスにおいて、神経興奮毒性を惹起するNMDAおよび小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンにより誘発される網膜傷害に対するAM404の保護作用を検討した。

【方法】 ①NMDA誘発網膜傷害:RGCにECFPを発現させたトランスジェニックマウスをケタミン(90 mg/kg)・キシラジン(10 mg/kg)混液の腹腔内投与により麻酔した。NMDA(40 nmol/eye)とAM404(3 nmol/eye)の混液を作製し、硝子体内投与した。硝子体内投与7日後に眼球を摘出し、網膜伸展標本を作製した。共焦点レーザー顕微鏡で観察し、視神経乳頭に近接する 0.2 mm^2 に存在するRGC数を測定した。

②ツニカマイシン誘発網膜傷害:ICR系雄性マウスをケタミン・キシラジン混液の腹腔内投与により麻酔した。ツニカマイシン(60 ng/eye)とAM404(0.3 nmol/eye)の混液を作製し、硝子体内投与した。眼球を固定後、パラフィン包埋して視神経乳頭を通る厚さ $4 \mu\text{m}$ の水平切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。視神経の中心から $500 \mu\text{m}$ 離れた位置において長さ $50 \mu\text{m}$ の領域に含まれる視細胞核の総数を計数した。

【結果】 NMDAにより誘発される網膜神経節細胞の脱落、およびツニカマイシンにより誘発される視細胞核の脱落は、AM404の同時投与により有意に抑制された。

【考察】 AM404は、マウス網膜におけるグルタミン酸興奮毒性によるRGCの脱落や小胞体ストレスによる視細胞の脱落を抑制することが示された。AM404の神経保護作用にカンナビノイド受容体あるいはTRPV1受容体の活性化が関与しているのかどうかは、今後の検討課題である。

Poly-dipeptide linked to C9-ALS/FTD causes neuronal cell death by inhibiting ADARs

○鈴木 宏昌、松岡 正明

東京医科大・医・薬理

A GGGGCC hexanucleotide repeat expansion within the non-coding region of the *C9orf72* gene is frequently linked to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia (C9-ALS/FTD). Unconventional translation of the hexanucleotide repeat expansion generates five dipeptide repeat proteins (DPRs) including poly-proline-arginine (poly-PR). DPRs accumulate in the neurons of C9-ALS/FTD patients and are hypothesized to be toxic to the neurons. In this study, we show that poly-PR, the most neurotoxic DPR *in vitro*, interacts with both adenosine deaminase acting on RNA (ADAR)1 and ADAR2 and inhibits their RNA editing activity. We further show that poly-PR impairs cellular stress response mediated by ADAR1. Combined with the finding that the loss-of-function of ADARs causes cytotoxicity, these results suggest that poly-PR-mediated inhibition of the ADAR activity contributes to C9-ALS/FTD-linked neurotoxicity.

頭部外傷後のBlood-brain barrier破綻に対するSonic hedgehogの抑制効果

○道永 昌太郎¹、栗根 宙生²、稲月 直樹²、江崎 愛永²、大西 一也²、清水 かほり³、水口 博之²、小山 豊⁴、菱沼 滋¹

¹明治薬科大・薬効、²大阪大谷大・薬・薬理、³大阪大谷大・薬・生化、⁴神戸薬科大・薬理

【背景】交通事故や転倒などによる頭部外傷は、脳内のバリア機能を担うBlood-brain barrier (BBB)を破綻させることによって脳組織に致命的なダメージをもたらす。本研究では、脳血管障害を抑制する因子として知られているSonic hedgehog (SHH)に注目し、頭部外傷モデルマウスにおけるSHHの発現変化およびBBBの破綻に対する作用を検討した。

【方法】Fluid percussion装置により発生させる水圧によって麻酔下のマウス（雄性ddY, 6-7週齢）にFluid percussion injury (FPI)による頭部外傷を与えた。BBBの破綻はマウスの尾静脈より投与したEvans blueの脳組織への漏出により評価した。脳組織のSHH発現はReal-time PCR法、Enzyme immunoassay法および蛍光免疫組織染色により確認した。SHHの作用に関わる膜タンパク質であるpatched-1 (PTCH-1)およびsmoothed (SMO)の発現はウエスタンブロット法および蛍光免疫染色法により確認した。Recombinant SHH (1 mg/日)はFPIの2から5日後にかけてマウスの側脳室内へ反復投与し、SHH阻害薬Jervine (50 nmol/日)はFPIの2から7日後にかけて投与した。

【結果・考察】FPIを与えたマウスの脳では2から5日後にかけてBBBの破綻が顕著にみられたが、7日後以降はBBBの破綻が抑制されていた。SHHの発現はFPI後に増加し、特にBBB破綻の抑制がみられたFPIの7日後で顕著に増加した。また、FPI後の脳組織ではPTCH-1とSMOの発現も増加していた。脳組織におけるSHH、PTCH-1およびSMOの発現細胞を確認したところ、SHHは主にアストロサイトで発現が観察され、PTCH-1とSMOは血管内皮細胞で発現が観察された。Recombinant SHHを投与したマウス脳では、FPIによるBBBの破綻が抑制され、Jervineを投与するとBBBの破綻が悪化していた。これらの結果より、SHHは頭部外傷によるBBBの破綻を抑制できることが示され、頭部外傷に対する新たな治療薬の候補となりうることを期待される。

ロテノン鼻腔内投与マウスにおける感覚・認知機能障害

○佐藤 元、佐藤 慶太郎、安達 一典

明海大・歯・病態診断治療学講座 薬理学分野

[目的] パーキンソン病 (PD) 患者は運動障害発症前から多彩な非運動障害を高頻度に発症する。特に感覚・認知障害は病初期から発症し、PDの進行に伴い憎悪することが知られている。しかしながら、それら前駆症状の病態には不明な点が多く、その解明には適切なモデル動物を用いた研究が必要である。農薬のロテノンを動物に投与すると、ヒトPDと類似の病態を示すが、その信憑性には未だ疑問の余地がある。そこで、本研究では、ロテノン投与マウスにおける感覚・認知を運動機能障害と併せて評価し、その有用性を検討する。

[方法] マウス (雄, C57BL/6J, 20-25週齢) の右側鼻腔内にロテノン (0.35 mg/kg) もしくは溶媒 (対照群) を1日1回1週間 (1w-R)、もしくは、4週間 (4w-R) に亘り反復投与してモデル動物を作成した。1w-Rにおいて、ロテノン投与終了後8日目から主に感覚・認知機能を、下記の方法で評価した。嗅覚機能: Y字迷路を用い、初日に蒸留水を用いて運動機能を確認し、翌日に酪酸忌避行動を評価。味覚機能: 23時間断水後、10秒間短時間暴露法で苦味忌避を、3日間、濃度を変えて繰り返し評価。また、非断水下で2瓶法による長時間 (24時間) 味覚嗜好性を、6日間濃度を変えて評価。認知機能: 味覚嫌悪条件付け (CTA) および恐怖文脈条件付け (FC) を用いて、条件付け記憶の想起/消去を3-6日間評価。運動機能: ロータロッドを用いて四肢協調運動を評価。また、4w-Rでは、ロテノン投与開始8日後から1週間毎にロータロッド用いた運動機能評価を5週に亘って行った。

[結果と考察] 1w-Rでは、対照と比べて酪酸に対する忌避行動が有意に減弱し、苦味感受性も有意に低下した。また、CTA直後の味覚嫌悪は両群で同程度であったが、その記憶の消去が1w-Rで有意に短縮した。一方、FC直後の強い恐怖が1w-Rで有意に減弱したが、その記憶の消去は両群で同程度であった。しかしながら、運動機能には異常は認められなかった。一方、4w-Rでは投与2週目からロッドからの落下までに要する時間が有意に短縮し、投与1週目 (或いは1w-R) では認められなかった運動障害が出現し、観察期間を通じて維持された。これらの結果から、1w-Rマウスは、PDの前駆症状を示すモデルマウスとしてPDに関連した非運動障害の病態解明に有用である可能性が示唆された。

新規Nobiletin標的因子であるNBP1はp300の翻訳後修飾を介して心筋細胞肥大を抑制した

○高井 秀通¹、内藤 汐美¹、砂川 陽一^{1,2,3}、船本 雅文^{1,2}、清水 果奈^{1,2}、清水 聡史^{1,2}、刀坂 泰史^{1,2,3}、宮崎 雄輔^{1,2,3}、
和田 啓道²、長谷川 浩二²、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態学分野、²NHO京都医セ、³静岡県総病院

【目的】 心臓は、高血圧や心筋梗塞などのストレスが持続的に加わると、心機能の低下した心不全へと至る。この過程で心筋細胞が肥大することが明らかになっているため、この心筋細胞肥大を抑制することが心不全の予防や治療につながると期待されている。当研究室では柑橘類果皮成分Nobiletinが心筋細胞肥大を抑制すること、Nobiletinの標的因子として新たにNobiletin Binding Protein1 (NBP1)を同定し、NBP1がNobiletinの心筋細胞肥大の抑制に必須であることを見出した。しかし、NBP1がどのように心筋細胞肥大を抑制しているのかは不明である。そこで、本研究では心筋核内で肥大応答を制御する主要なタンパク質の一つであるp300に着目し、NBP1の心筋細胞肥大抑制メカニズムの解析を目的とした。

【方法】 HEK293T細胞にp300を過剰発現させLC-MS/MS解析を行うことでp300の翻訳後修飾部位を同定した。同定した翻訳後修飾部位において、p300の1568番目のリジン残基をアルギニン残基に変異させた(K1568R) 変異体でレポーターアッセイ、翻訳後修飾をミミックした(K1568m) 変異体を用いてHEK293T細胞でレポーターアッセイ、さらに心筋細胞で蛍光免疫染色を行った。

【結果】 p300の翻訳後修飾部位は1568番目のリジン残基が受けていた。p300-K1568R変異体は野生型p300と比較して肥大反応遺伝子であるANFやET-1プロモーターの亢進が消失していた。NBP1は野生型p300によって増加するANFやET-1プロモーターの活性を有意に抑制したが、p300-K1568m変異体を共発現させるとNBP1の抑制能が消失した。p300-K1568mによって引き起こされる心筋細胞肥大やANFやET-1のプロモーター活性の亢進はNobiletin処理で抑制しなかった。

【考察】 NBP1はp300の1568番目のリジン残基を翻訳後脱修飾し、p300のHAT活性を減少させることで、心筋細胞肥大を抑制している可能性が示唆された。今後、さらにp300とNBP1の関係をより詳細に検討していくことでNobiletinによる心肥大抑制メカニズムの解明につながることが期待される。

天然物ショウガ由来成分であるCompound Aは圧負荷による心機能の低下を抑制した

○川瀬 裕斗¹、清水 果奈^{1,2}、船本 雅文^{1,2}、砂川 陽一^{1,2,3}、刀坂 泰史^{1,2,3}、宮崎 雄輔^{1,2,3}、清水 聡史^{1,2}、長谷川 浩二^{1,2}、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態学分野、²国立病院機構京都医療センター・臨床研究センター・展開医療研究部、³静岡県立総合病院・臨床研究部

【目的】心臓に高血圧や心筋梗塞などのストレスがかかると、代償機構として心筋細胞肥大や間質の線維化の亢進を伴う心臓のリモデリングが引き起こされる。しかしながら、ストレスが持続するとこの代償機構が破綻し、心不全へと至る。そのため心筋細胞の肥大と心臓の線維化の両者に対して抑制効果を有する化合物は、効果的な心不全の予防薬となると考えられる。そこで我々は、培養心筋細胞や培養心臓線維芽細胞でのスクリーニングにより、天然物ショウガの抽出物であるCompound Aを同定した。本研究では、心筋細胞肥大及び心臓線維化抑制の詳細なメカニズムと心不全抑制効果について検討を行った。

【方法&結果】ラット初代培養心筋細胞に天然物ショウガの抽出物であるCompound Aを1 μ Mで処理し、フェニレフリン刺激により心筋細胞肥大を誘導した。刺激48時間後に抗 α -actinin抗体による蛍光免疫染色及び心筋細胞面積の測定、qPCRにて肥大反応遺伝子であるANF, BNPのmRNA量を測定した。その結果、Compound Aは1 μ Mでフェニレフリンによる心筋細胞面積及びANF, BNPのmRNA量の増加を抑制した。次にラット初代培養心臓線維芽細胞に1 μ MのCompound Aを処理し、Transforming growth factor-beta (TGF- β)刺激により筋線維細胞への分化を誘導した。刺激48時間後に液体シンチレーションカウンターにてL-Proline取り込み量を測定した結果、Compound AはTGF- β によるL-Proline取り込み量の増加を有意に抑制した。また、刺激24時間後に筋線維細胞への分化の指標である α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現量について、qPCRにてmRNA量を、Western Blottingにより α -SMAの発現量を検討した。その結果、Compound AはTGF- β による α -SMAのmRNA量及びタンパク質レベルの増加を抑制した。最後にC57BL/6Jマウスに心不全モデル作成術である大動脈縮窄術(TAC)を行った。手術翌日、TACマウスを溶媒(0.5% CMC-Na)、0.2又は1 mg/kgのCompound Aの3群に振り分け、8週間の連続経口投与を行った。心臓超音波検査の結果、1 mg/kgのCompound AはTACによる左室後壁の肥厚や左室内径短縮率の低下を有意に抑制した。さらに1 mg/kgのCompound AはTACによって増加した心体重比を有意に抑制した。

【考察】Compound Aが*in vitro*において心筋細胞肥大や心臓線維化を抑制した。また、*in vivo*において、Compound Aは圧負荷による心不全の進展を抑制した。以上よりCompound Aが新規心不全予防薬となる可能性が示唆された。

オオイタドリ若芽抽出物は心筋梗塞モデルラットにおいて左室収縮能の低下を抑制した

○上原 渉¹、森本 達也^{1,2,3}、船本 雅文^{1,2}、清水 果奈^{1,2}、刀坂 泰史^{1,2,3}、宮崎 雄輔^{1,2,3}、清水 聡史^{1,2}、Nurmila sari¹、長谷川 浩二^{1,2}、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態学分野、²独立行政法人国立病院機構京都医療センター・展開医療研究部、³静岡県立総合病院・臨床研究部

【目的】虚血性心疾患や高血圧性心疾患をはじめとするあらゆる心疾患は最終的に心機能の低下した心不全へと至る。これまでの研究において、心肥大時にヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を有する核内転写コアクチベータのp300がヒストンH3K9をアセチル化し、左室リモデリングを増悪させることを見出した。さらにHAT活性を欠損させたp300を心臓特異的にマウスに過剰発現させると心筋梗塞後の左室リモデリングの進行が抑制されたことより、p300-HAT活性は心不全治療のターゲットとなると考えられる。本研究では心筋細胞肥大を指標に天然抽出物ライブラリーからスクリーニングを行い、オオイタドリ若芽抽出物に着目し、心不全に対する直接的な効果を初代培養心筋細胞および心筋梗塞ラットモデルを用いて検討した。

【方法・結果】初代培養心筋細胞にオオイタドリ若芽抽出物を処理後、フェニレフリン (PE) で刺激し心筋細胞肥大を誘導した。PE刺激によって亢進した心筋細胞面積、心肥大反応遺伝子であるAtrial natriuretic factor (ANF), Brain natriuretic peptide (BNP) の転写活性、ヒストンH3K9のアセチル化はオオイタドリ若芽抽出物処理により抑制された。次に*in vitro* p300-HAT assayを行った結果、オオイタドリ若芽抽出物はp300のHAT活性を直接阻害していることが示唆された。心不全モデル動物におけるオオイタドリ若芽抽出物の効果を検討するため、7~8週齢の雄性SDラットに左前下行枝血管を結紮する心筋梗塞 (MI) 手術を施し、MIモデルラットを作成した。左室内径短縮率 (FS) が40%以下のラットをランダムに群分けし、Vehicle(1%アカシアガム)、オオイタドリ若芽抽出物 (0.3 g/kg、1 g/kg) を術後1週間後から8週間連日経口投与した。術後9週間における心臓超音波検査の結果、1 g/kgオオイタドリ若芽抽出物投与群ではMI手術によるFSの低下と左室後壁厚の肥厚を有意に改善した。さらに心臓の組織学的解析を行った結果、MIにより増加した個々の心筋細胞の肥大や細胞間質の線維化をオオイタドリ若芽抽出物は有意に抑制した。またMI手術によって亢進した心肥大反応遺伝子および線維化遺伝子の転写活性、ヒストンH3K9のアセチル化も1 g/kgオオイタドリ若芽抽出物は有意に抑制した。

【考察】オオイタドリ若芽抽出物は心筋細胞核内に存在するp300のHAT活性を直接阻害することで、心筋細胞肥大および心筋梗塞後心不全の増悪を抑制することが示唆された。今後さらなる検討を進めることでオオイタドリ若芽抽出物が新規心不全予防薬・治療薬に繋がることが期待される。

ツルアラメ抽出物は心不全モデルラットにおいて心不全進展を抑制した

○片桐 宇大¹、前川 健也¹、船本 雅文^{1,2}、砂川 陽一^{1,2,3}、刀坂 泰史^{1,2,3}、宮崎 雄輔^{1,2,3}、清水 果奈^{1,2}、清水 聡史^{1,2}、
和田 啓道²、長谷川 浩二^{1,2}、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態、²国立病院機構 京都医療セ 臨床研究セ・展開医療研究部、³静岡県立総合病院・臨床研究部

【目的】心疾患は日本人の死亡原因の第2位であり、あらゆる心疾患の最終像は心不全であることから、心不全を治療・予防することは重要である。心筋梗塞や高血圧などのストレスが心臓に加わると、心臓は代償的に肥大するが、これには限度があり、最終的に心機能の低下した心不全へと至る。この時、心筋細胞の肥大が起こっていることから、心筋細胞肥大を抑制することは心不全の治療・予防のターゲットになると考えられる。そこで、心筋細胞肥大を指標に天然抽出物ライブラリーからスクリーニングを行い、褐藻類であるツルアラメ抽出物 (*Ecklonia stolonifera* okamura extract: ESE) に着目した。本研究では、ESEが心筋細胞肥大反応抑制作用および心不全モデルラットにおける心不全進展抑制作用をもつかどうか検討した。

【方法・結果】1-3日齢ラットの心臓から初代培養心筋細胞を播種し、24時間後にESE (100~1000 µg/mL) で処理した。処理2時間後にフェニレフリン (PE) 刺激を行うことで心筋細胞肥大を誘導した。刺激48時間後にα-actinin抗体による蛍光免疫染色を行い、細胞面積を測定した。さらに定量的逆転写PCRにより肥大反応遺伝子である atrial natriuretic factor (ANF), brain natriuretic peptide (BNP) のmRNA量の測定を行った。また、ヒストンの回収を行い、ヒストンH3K9のアセチル化をWBにて評価した。最後に *In vitro* HAT Assayにより、ESEが直接p300のヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性を阻害しているか検討を行った。PE刺激により増加した心筋細胞面積、ANF, BNPのmRNA量、H3K9のアセチル化をESEは濃度依存的に抑制した。*In vitro* HAT AssayによりESEはp300のHAT活性を直接抑制することが示唆され、IC₅₀は505 µg/mLであった。また、SDラットに左前下行枝血管を結紮する心筋梗塞 (MI) 手術を行い、術後1週間にて左室内径短縮率 (FS) が40%以下のラットを群分けし、Vehicle、ESE (0.3 g/kg)、ESE (1 g/kg) を8週間連日経口投与した。術後9週間において、ESE投与群ではMI手術により低下したFSや肥厚した左室後壁厚を有意に改善した。MIにより増加した個々の心筋細胞の肥大や血管周囲の線維化、心肥大反応遺伝子および線維化遺伝子の転写活性、ヒストンH3K9のアセチル化はESE投与により有意に抑制された。

【考察】本研究により、ESEはp300によるHAT活性を阻害することで、心筋細胞の肥大を抑制し、心筋梗塞後の心不全進展を抑制することが示唆された。今後、詳細な検討を進めていくことで新規心不全治療薬・予防薬としての活用が期待される。

アルギニンメチル化酵素PRMT5は転写因子Smad3と結合して線維化転写反応を制御した

○矢部 晴海¹、刀坂 泰史^{1,2,3}、曾布川 実里¹、船本 雅文^{1,2}、Nurmila Sari¹、清水 果奈^{1,2}、清水 聡¹、宮崎 雄輔^{1,2,3}、砂川 陽一^{1,2,3}、和田 啓道²、長谷川 浩二^{1,2}、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態学分野、²国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター・展開医療研究部、³静岡県立総合病院・臨床研究部

【目的】慢性心不全は予後不良であり、その発症と進展には心臓線維化が大きく関与している。当研究室ではアルギニンメチル化酵素PRMT5が線維化のキーとなる筋線維芽細胞への分化において重要な役割を担っていることを明らかにした。心臓線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化において、TGF- β /Smad3シグナル経路が重要であることが報告されている。そこで本研究では、PRMT5とTGF- β /Smad3シグナル経路の関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】GST pull-down assayおよび免疫沈降法にてPRMT5とSmad3の結合を検討した結果、PRMT5とSmad3の特にMH2ドメインとの結合が確認された。次に、クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)にて、新生児ラット初代培養線維芽細胞におけるPRMT5のDNA上へのリクルートを検討したところ、TGF β 刺激により線維化関連遺伝子(α SMA, Col1A1)プロモーター部位へのリクルートが増加した。さらにこのPRMT5のリクルートはSmad3のノックダウンにより抑制された。また、同様にTGF- β で刺激し、ChIP assayによりヒストンH3R2対称的ジメチル化の変動を検討した結果、Col1A1および α SMAのプロモーター部位においてヒストンH3R2の対称的ジメチル化が増加していた。このヒストンメチル化はPRMT5阻害剤であるEPZ015666およびPRMT5ノックダウンにより抑制された。さらに、H3R2の対称的ジメチル化を認識して起こる、WDR5/MLL1複合体のH3K4トリメチル化を検討するため、初代培養心臓線維芽細胞にWDR5/MLL1複合体の阻害剤であるMM102およびEPZ015666を処理し、H3K4me3抗体にてChIP assayを行った。その結果、線維化関連遺伝子プロモーター部位において、TGF β 刺激により亢進したH3K4のトリメチル化は、MM102およびEPZ015666処理の両者において、抑制が確認された。

【考察】以上の結果から、TGF- β /Smad3シグナル経路において、PRMT5はSmad3と直接結合し、線維芽細胞の核内におけるヒストンメチル化反応を介して、線維化関連遺伝子の発現を促進することが示唆された。今後PRMT5を標的とした分子標的薬が、新たな心不全治療薬の開発につながることを期待される。

紫菊花抽出物はドキソルビシンによる心筋障害を抑制した

○小野 雅也¹、望月 沙穂¹、槌谷 佳那子¹、砂川 陽一^{1,2,3}、船本 雅史^{1,2}、清水 果奈^{1,2}、Nurmila Sari¹、清水 聡史^{1,2}、刀坂 泰史^{1,2,3}、宮崎 雄輔^{1,2,3}、長谷川 浩二^{1,2}、森本 達也^{1,2,3}

¹静岡県立大・薬・分子病態学教室、²国立病院機構京都医療セ・臨床研究セ・展開医療研究部、³静岡県立総合病院・臨床研究部

【目的】アントラサイクリン系の抗がん剤であるDoxorubicin (DOX) は、乳がん、消化器がん、骨肉腫など幅広い悪性腫瘍に適応があるが、心筋細胞のアポトーシスを引き起こすことによって不可逆的な心毒性をもたらすが報告されており、悪性新生物患者の生命予後やQOLを低下させる要因となっている。当研究室が保有している天然物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、紫菊花抽出物に着目した。近年、紫菊花抽出物 *Chrysanthemum morifolium extract* (CME) が抗酸化作用や抗炎症作用など様々な生理活性を有している。そこで本研究では、DOXの心毒性に対するCMEの効果を検討することを目的とした。

【方法】ラット心臓由来H9C2細胞を播種し、24時間後にCME (0.3, 1 mg/mL) で前処理した。処理2時間後に1 μM DOX刺激を行い、24時間培養することで細胞傷害を誘導した。その後MTT assayにより細胞生存率、ウエスタンブロットでCleaved-Caspase3の発現量を評価することでDOX誘導性の細胞傷害に対するCMEの抑制作用を検討した。次に、8週齢の雄性C57BL/6JマウスにDOX (20 mg/kg) の単回腹腔内投与を行い心不全モデルマウスを作成した。DOX投与の2日前から15日間、CME (400 mg/kg/day) の連日経口投与を行い生存率を検討した。また、DOX投与後7日目に心臓超音波検査を行った。単離した心臓から薄切切片を作成しTUNEL染色を行うことで、心筋アポトーシスに対するCMEの効果を検討した。

【結果】MTT assayの結果、DOX刺激により29%まで有意に低下した細胞生存率をCMEは75%まで有意に改善した。ウエスタンブロットの結果、CMEはDOX刺激によるCleaved-Caspase3の発現量の増加を抑制した。*In vivo*の検討において、CMEはDOXによる生存率の低下、減少した左室内径短縮率を有意に改善させた。また、心臓組織において増加したDOX誘発性 TUNEL 陽性細胞を有意に減少させた。

【考察】本研究より、CMEがDOX誘導性の細胞傷害及び心機能低下を抑制することが示された。今後CMEのDOX誘導性心毒性抑制作用についてより詳細なメカニズムの検討を行うことで、心不全の新規治療薬の開発につながることを期待される。

心筋KCNQ1チャネル分子複合体の病態生理学的意義に関する研究

○ 稲田 理毅¹、児玉 昌美²、山崎 泰広^{1,3}、永森 收志⁴、黒川 洵子¹

¹静岡県立大・薬・生体情報分子解析学分野、²東京大・定量生命科学研、³湘南医療大・薬、⁴慈恵医科大・医

【目的】 心筋活動電位の再分極相の形成に寄与する緩徐活性型遅延整流性カリウム(I_{Ks})チャネルは、 α サブユニットKCNQ1と β サブユニットKCNE1から構成され、細胞内 Ca^{2+} 、cAMP、NOなどのシグナル調節を受ける。KCNQ1/KCNE1の遺伝子変異はそれぞれQT延長症候群を発症し、自律神経系調節やホルモンなどの影響を受ける。これまで、我々の研究チームは、KCNQ1分子を中心としたシグナル分子複合体が交感神経系や性ホルモンによる調節を制御することを示してきたが、 I_{Ks} チャネルのシグナル調節の生物学的意義はいまだ不明である。そこで、ヒトKCNE1とKCNQ1の融合タンパク質を心臓特異的に発現させた遺伝子改変マウスを用いて、KCNQ1と相互作用する膜タンパク質をプロテオミクス解析したところ、QT延長との関連が報告されているNCX分子が同定された。そこで、本研究では、KCNQ1とNCXの相互作用が心臓活動電位幅の調節にもたらす病態生理学的意義を探索することを目的とし、生体心筋細胞での形態機能解析を行う。

【方法】 イヌ心室筋抽出液とGST-KCNQ1融合タンパク質を用いたPull-down assayとそれに続くWestern Blottingを行い、イヌ内因性NCXとの結合解析を行う。また、ヒトiPS細胞由来心筋細胞およびモルモット心臓から単離した心室筋細胞を標本に、細胞免疫染色を利用したPLAによりNCX1とKCNQ1の共局在を形態学的に解析する。パッチクランプ法により活動電位および膜電流を計測し、KCNQ1-NCXの機能連関を解析する。

【結果・考察】 Pull-down assayによりKCNQ1の細胞内部位であるN末端およびC末端においてNCXとの結合部位があることが示された。またPLAにより、ヒトおよびモルモット心室筋細胞内においてKCNQ1とNCX分子の共局在が確認できた。パッチクランプ法による機能解析からは、生理的条件に加え病理学的解析の必要性が示唆されており、KCNQ1-NCXの機能連関の病態生理学的意義の理解に近づくことが期待される。

本研究は、科研費(18K06683, 19H03380)およびAMED/BINDS (JP21am0101080)の支援を受けました。

hERG阻害薬の活性に対するエストロゲンの影響

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

¹静岡県立大・院薬・生体情報分子解析学分野、²慶應義塾大・医、³ナニオン株式会社

【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。2019年のJAMAでは、健常女性において、経口避妊薬の併用によりIII群抗不整脈薬ソタロールによるQT延長リスクが増大することが報告されたことから、エストロゲンに類似した構造を有する物質がhERG阻害に影響する可能性が示唆された。そこで、本研究ではエストロゲン様化合物とhERG阻害薬の相互作用のメカニズムを探索するために、内因性エストロゲンもしくは合成エストロゲン存在下および非存在下にて代表的なhERG阻害薬の作用を比較解析した。

【方法】標本はhERGチャネルを安定発現させたHEK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SyncroPatch384i（ナニオン）を用いて、室温にてhERG電流を測定した。エストロゲン及びhERG阻害薬は細胞外から投与した。

【結果&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。

SyncroPatch384i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IC50値の増減はエストロゲンと阻害薬の組み合わせごとに様々であることが分かった。今後、エストロゲンがhERG阻害による薬物の心毒性に与える影響を予測することを目指し、以上の結果をもとに構造活性相関を解明したい

メチルグリオキサールはラット頸動脈におけるウリジンニリン酸誘発収縮反応を増大させる

○永井 瀬名、松本 貴之、下山 瑠惟、田中 佑奈、新谷 涼葉、佐藤 悠太、山田 愛子、加藤 麻衣、小澤 恵介、垣花 志帆、田口 久美子、小林 恒雄
星薬科大・薬・機能形態学研究室

【目的】メチルグリオキサール (MGO) は、高反応性のジカルボニル化合物として知られ、血管内皮細胞をはじめ様々な細胞へ悪影響を及ぼす。一方、細胞外核酸の一つであるウリジンニリン酸 (UDP) は、動脈部位や種により、収縮や弛緩といった異なる反応を来すことが知られており、また、病態でその反応性が変化することも知られている。血管反応の病態生理的な意義を考えるうえで、UDPやMGOの血管機能へ及ぼす影響を明らかにすることは重要である。しかしながら、MGOのUDP誘発血管反応への影響は未だ不明である。我々は、ラット頸動脈において、UDPは収縮反応を誘発することを見出しているため、今回、MGO暴露によるUDP誘発収縮反応の検討を行った。さらに、血管収縮反応に関与することで知られているリン酸化酵素についても検討した。【方法】雄性 Wistarラットより頸動脈を摘出し、オルガンバス法によって血管反応を検討した。MGO (60 min) を処置あるいは非処置した標本に対して、UDPによる累積収縮反応検討した。また、一酸化窒素合成酵素阻害薬存在下、UDP誘発収縮反応におけるSB203580 (p38 MAPK阻害薬) の影響について検討した。さらに、MGO存在下、非存在下におけるp38 MAPKのリン酸化量についてUDP刺激の有無でウェスタンブロット法にて検討した。さらに、bisindolylmaleimide I (BIM) (protein kinase C阻害薬) の影響について検討した。【結果・考察】ラット頸動脈において、UDP誘発収縮反応は、MGOの濃度依存的に増強が見られた。また、p38 MAPK 阻害薬処置により、両群でUDP誘発収縮反応の抑制が認められ、p38MAPK阻害薬存在下では、control群、MGO処置群における収縮反応の差が消失した。また、p38 MAPKのリン酸化量は、UDP刺激下、非刺激下にて、MGO処置によりいずれも増加した。さらに、PKC阻害薬処置によりMGO処置群のみ、UDP誘発収縮反応が抑制した。これらの結果から、MGOによる頸動脈におけるUDP誘発収縮反応の増強には、p38 MAPKが一部関与する可能性が明らかとなった。MGOによりPKCを介するUDP誘発収縮反応が特異的に現れることも見出した。これらのリン酸化酵素のクロストークについては、今後検討していく予定である。

インドキシル硫酸はラット胸部大動脈におけるエンドセリン-1誘発収縮を増大させる

○小澤 恵介、松本 貴之、新谷 涼葉、垣花 志帆、加藤 麻衣、佐藤 悠太、田中 佑奈、下山 瑠惟、永井 瀬名、山田 愛子、田口 久美子、小林 恒雄
星薬科大・薬・機能形態学研究室

【目的】ウレミクトキシンの一つであるインドキシル硫酸 (IS) は、生体内で様々な悪影響を及ぼすことが知られている。一方、エンドセリン-1 (ET-1) は、主として血管内皮細胞から産生・遊離する血管収縮ペプチドであり、血管におけるその反応性やシグナル伝達が慢性疾患 (糖尿病、高血圧症等) において変化することが報告されている。こういった背景の中で、ISのET-1誘発収縮反応に対する影響に関してはこれまで全く報告がなかった。そこで、今回我々は、ラット摘出胸部大動脈を用いて、ISのET-1誘発収縮反応への影響について検討した。【方法】Wistarラットより胸部大動脈を摘出し、内皮保持、内皮除去標本を作成した。オルガンバスに懸垂し、ISを60分処置・非処置 (control) 群においてET-1誘発収縮反応を検討した。また、ET受容体拮抗薬、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 阻害薬存在下におけるET-1収縮反応、ET_B受容体アゴニストによる反応について検討を行った。【結果及び考察】IS (1 mM、60分) を処置することによって、ET-1誘発収縮反応の増大が観察された (vs. 非処置群)。内皮除去あるいはNOS阻害薬により、IS処置群、非処置群いずれもET-1誘発収縮反応が増大した。BQ123 (ET_A受容体拮抗薬) により、IS処置群、非処置群いずれもET-1誘発収縮反応が減弱し、一方、BQ788 (ET_B受容体拮抗薬) 処置により、control群のみET-1収縮の増大が認められた。IS処置群において (vs. control群)、IRL1620 (ET_B受容体アゴニスト) 誘発弛緩反応の減弱が認められた。IRL1620による収縮は両群で認められなかったことから、ISで平滑筋におけるET_B受容体活性化に伴う収縮を誘発していないことが明らかとなった。ODQ (sGC阻害薬) により、IS処置群、非処置群いずれもET-1誘発収縮反応が増大した。以上のことより、ISは胸部大動脈におけるET-1誘発収縮反応を増大させ、これには、NO/cGMPシグナルの障害が関与する可能性が示唆された。内皮細胞におけるET_B活性化に伴うNO産生とそのシグナル以外にもISが影響している可能性も示唆された。

循環血液量変化が大動脈と大腿動脈の血管弾性と末梢循環動態に与える影響 —stiffness parameter β 法を用いた検討—

○先崎 希恵¹、永澤 悦伸¹、八尾 雅¹、佐藤 修司²、高橋 真生²、相本 恵美¹、高原 章¹

¹東邦大・薬・薬物治療学、²東邦大・医療センター佐倉病院・内科

【目的】動脈を流れる血液は心ポンプ機能に加えて動脈弾性によるWindkessel効果を通じて効果的に末梢臓器を灌流する。循環血液量に増減が生じるとこれらポンプ機能の変化に応じて末梢循環動態が変動するが、循環血液量の変化が動脈弾性に与える影響を経時的に観察した情報は少ない。本研究では、動脈弾性の指標としてstiffness parameter β 法に基づき算出された値を用い、人工膠質液製剤ヘスパンダーの血管内投与による循環血液量の増加が血管弾性指標 (β 値) に与える影響を検討した。同時に、末梢循環動態の変化を観察し、動脈弾性の生理機能に対する調節機構について考察した。

【方法】イソフルラン麻酔下でNZWウサギの血圧 (上腕動脈、脛骨動脈、総腸骨動脈起始部、中心静脈)、総頸動脈血流量、大腿動脈血流量、心電図および心音図を記録し、大動脈領域と大腿動脈領域の各々の動脈血管の β 値 ($=\ln(P_{\text{systolic}}/P_{\text{diastolic}})/(P_{\text{systolic}}-P_{\text{diastolic}}) \cdot PWV^2$) を経時的に計測した。ヘスパンダー (1, 2, 5, 10 mL/min) を10分間で静脈内投与し、各指標の変化を観察した (n=6)。さらに、自律神経節遮断薬ヘキサメトニウム 100 mg/kg 投与下でヘスパンダーの作用を同様に検討した (n=6)。

【結果】ヘスパンダーの投与により血圧、中心静脈圧、総頸動脈血流量および大腿動脈血流量が容量依存的に増加した。ヘキサメトニウム非存在下では、大動脈領域の β 値は1および2 mL/minの投与時に低下し、それ以上の投与量では有意な変化を認めなかった。大腿動脈領域の β 値は1, 2, 5 mL/minでは有意な変化を認めず、10 mL/minで上昇傾向を認めた。一方、ヘキサメトニウム存在下では、ヘスパンダーにより同程度の血圧上昇が観察され、大動脈領域で見られたヘスパンダーの投与による β 値の減少反応が増強され、大腿動脈領域の β 値は有意な上昇を示した。このとき、ヘスパンダーの投与による大腿動脈血流量の増加反応はヘキサメトニウム非存在下に比べ増強された。

【結論】循環血液量の増加は大動脈領域の硬さを低下させるが、大腿動脈領域の硬さにほとんど影響を与えず、血管部位により特異的な応答を示すことが確認された。ヘキサメトニウムを用いた検討により、自律神経による血管平滑筋の緊張緩和は大動脈領域では血管の硬さを低下させる方向に、大腿動脈領域では血管の硬さを上昇させる方向に作用し、血管領域により異なる応答性の存在が明らかとなった。

HCNチャネル阻害薬ivabradineの催不整脈作用 —急性房室ブロックウサギを用いた評価—

○川上 聡士、永澤 悦伸、相本 恵美、高原 章

東邦大・薬・薬物治療学

【背景と目的】 HCNチャネル阻害薬ivabradineは洞房結節に作用し、徐拍化を目的として慢性心不全を対象に臨床使用されている。一方で、ivabradineを処方された患者の中に致死性不整脈に関する有害事象が報告されており、in vitro研究では同薬のhERG K⁺電流抑制作用が報告されているものの、有害事象との因果関係は明らかにされていない。本研究ではivabradineの心室作用の評価を通じて有害事象との因果関係を明確にするため、ivabradineの催不整脈作用および心房と心室の自動能に対する抑制作用を催不整脈モデルである急性房室ブロックウサギを用いて同時評価した。

【方法】 Isofluraneで麻酔したNZWウサギ (n=5) にカテーテル焼灼法を適用し完全房室ブロックを作成した。心室補充調律が安定して出現した状態で体表面心電図および右心室の单相性活動電位 (MAP) を記録し、ivabradine (0.01、0.1、1 mg/kg) を累積的に30分間隔で静脈内投与した。Ivabradine投与前後における心房拍動数 (AR) と心室拍動数 (VR) の変化、MAP持続時間 (MAP₉₀) の変化、およびR on T型心室期外収縮 (PVC) とtorsade de pointes (TdP) の発生を観察した。

【結果】 房室ブロック作成後のAR、VRおよびMAP₉₀はそれぞれ305±9 bpm、96±8 bpmおよび179±32 msであった。Ivabradineの0.01 mg/kgは心電図に影響を与えなかったが、臨床用量に相当する0.1 mg/kgはARとVRを低下させ、それぞれの変化量は-8±12 bpmと-13±9 bpmであった。このとき、MAP₉₀は25±7 ms延長し、R on T型PVCおよびTdPの発生が5例中1例に認められた。1 mg/kgはARとVRをさらに低下させ、それぞれの変化量は-61±14 bpmと-45±17 bpmであった。このとき、MAP₉₀は77±42 ms延長し、R on T型PVCおよびTdPの発生が5例中2例に認められた。

【結論】 Ivabradineは心房調律を抑制する用量で心室自動能を低下させ、同時に再分極過程の遅延ならびに催不整脈作用を示す薬物であることが明らかとなった。この催不整脈作用は臨床相当用量で出現したことから、同薬服用中の患者に認められた有害事象の原因を分析する上で有用な情報になると考えられる。

慢性房室ブロック(AVB)サルモデルを用いた薬物の催不整脈リスク評価法の検証

○後藤 愛¹、坂本 憲吾²、神林 隆一³、中瀬古(泉) 寛子^{1,3}、武井 義則^{1,3}、松本 明郎⁴、川合 眞一⁵、杉山 篤^{1,3,4,5}

¹東邦大・院医・薬理、²イナリサーチ、³東邦大・医・薬理、⁴東邦大・医・加齢薬理、⁵東邦大・医・炎症・疼痛制御学

【背景・目的】 ICH S7B/E14ガイドラインに関するQ&Aが2020年8月に発表され、包括的in vitro催不整脈アッセイ (CiPA) のためのin silicoモデルが画期的な催不整脈リスク予測法として注目されている。近年、我々は慢性AVBサルモデルを用いた催不整脈リスク評価法 (高リスク： $\leq 3 \times$ 臨床用量でTdP発生；中リスク： $> 3 \times$ 臨床用量でTdP発生；低/無リスク：TdP発生なし) を開発し、CiPA in silicoモデルを補完する情報を獲得できることを示してきた。今回、この評価法の有用性をさらに検証するため、CiPA薬物のastemizoleとその他5薬物の催不整脈リスク評価を行った。

【方法】 雌雄カニクイザルを全身麻酔し房室ブロックを作成した。7か月以上経過した個体にホルター心電計を装着し、astemizole (1、5、10 mg/kg、各n=6)、haloperidol (1、10、30 mg/kg、各n=5)、amiodarone (30 mg/kg、n=4)、famotidine (10 mg/kg、n=4)、levofloxacin (100 mg/kg、n=4) およびtolterodine (0.2、1、4.5 mg/kg、各n=4) を無麻酔下で経口投与した。薬物投与1時間前から投与後21または24時間までの心電図を測定した。

【結果】 Astemizoleは5 mg/kgで6例中3例、10 mg/kgで6例中全例に、一方、haloperidolは10および30 mg/kgで各5例中1例にTdPを誘発した。他の薬物はTdPを誘発しなかった。以上の結果から、催不整脈リスクの大きさは、astemizole・haloperidol (中リスク) $>$ amiodarone・famotidine・levofloxacin・tolterodine (低/無リスク) と分類された。

【結語】 慢性AVBサルモデルの結果は、CiPA in silicoモデル (astemizole) および過去の慢性AVB犬モデル (astemizole・haloperidol・amiodarone・famotidine・levofloxacin) での評価と一致した。また、tolterodineは低/無リスクと判定された。慢性AVBサルを用いた催不整脈リスク評価法はヒトのリスク予測手段として有用と考えられた。

アルツハイマー型認知症治療薬memantineによる心血管系有害作用の解析：ハロセン麻醉犬を用いたreverse-translational研究

○神林 隆一¹、後藤 愛¹、長澤(萩原) 美帆子¹、中瀬古(泉) 寛子¹、武井 義則¹、松本 明郎²、川合 眞一³、杉山 篤^{1,2,3}

¹東邦大・医・薬理、²東邦大・医・加齢薬理、³東邦大・医・炎症・疼痛制御

【背景】NMDA受容体拮抗薬memantineは、コリンエステラーゼ阻害薬と比較し、忍容性の高いアルツハイマー型認知症治療薬として広く用いられている。一方、徐脈、高血圧、心筋梗塞および薬物性QT延長症候群といった心血管系有害事象がmemantineを投与された患者で報告されている。しかしながら、memantineの投与とこれら心血管系有害事象の直接的な因果関係の有無は明らかとなっていない。そこで、これら心血管系有害事象の発生機序を解明するため、ヒトにおける薬物の心血管系への作用を推定可能なハロセン麻醉犬を用いてreverse-translational研究を実施した。

【方法】体重約10 kgのビーグル犬を1% halothaneで麻醉維持し、臨床有効血中濃度の約0.1、1および10倍の血中濃度を達成すると推定される用量として、0.01、0.1および1 mg/kg/10minのmemantine hydrochlorideを累積的に静脈内投与し、心行動態および電気生理学指標を測定した (n=4)。

【結果】低用量から高用量のmemantineは平均血圧および左室収縮力を増加させたが、心拍数、心拍出量、末梢血管抵抗、左室拡張末期圧には有意な変化を示さなかった。また、低用量から高用量のmemantineは房室伝導を促進させたが、心室内伝導を遅延させた。さらに、memantineは高用量においてのみ心房内伝導を遅延させた。一方、memantineはST部分、再分極時間および心室有効不応期を有意に変化させなかった。

【考察】Memantineは心房および心室内伝導を遅延させたことから、 I_{Na} 抑制作用を介した洞結節および心室伝導障害が臨床で報告された徐脈の発生に寄与する可能性がある。また、memantineは陽性変力・変伝導作用とともに血圧上昇作用を示したことから、交感神経緊張亢進作用を有し、種々の心血管系有害作用に関与すると推測される。一方、memantineの投与によりST変化および再分極時間延長は認められなかったことから、memantine単独での心筋虚血および薬物性QT延長症候群の誘発リスクは低いことが示された。

子宮内膜細胞の分化過程におけるフォークヘッド型転写因子FOXO1を介した細胞老化とプロゲステロン受容体膜構成因子(PGRMC1)との関係

○津留 涼也¹、吉江 幹浩¹、小島 淳哉²、草間 和哉¹、西洋孝²、田村 和広¹

¹東京薬科大・院薬・内分泌薬理学、²東京医科大・医・産科婦人科

【背景・目的】子宮内膜間質細胞(ESC)は、月経周期の分泌期において主に黄体から分泌されるプロゲステロン(P4)の作用により脱落膜細胞へと分化(脱落膜化)し、胞胚の着床準備を整える。この過程では、意義については不明であるが、老化様細胞が出現し、炎症性サイトカインなどを分泌する老化随伴分泌現象(SASP)が起こる。フォークヘッド型転写因子FOXO1は、脱落膜化を誘導するとともに、細胞老化にも関与することが報告されている。我々は、典型的なP4受容体とは異なるP4受容体膜構成因子1(PGRMC1)の発現が脱落膜化と共に減少し、この発現低下が脱落膜細胞への分化を促進することを明らかにした。しかしながら、脱落膜化過程でのPGRMC1発現低下と細胞老化との関係は不明である。本研究では、脱落膜化に伴う細胞老化におけるPGRMC1の役割を検討した。

【方法】初代培養ESCにPGRMC1阻害薬(AG205)又はPGRMC1 siRNAを処置した後、脱落膜化刺激(P4とcAMP誘導體(db-cAMP))を加えて2日間培養した。細胞老化に対するPGRMC1機能阻害の効果について老化関連βガラクトシダーゼ(SA-β-Gal)活性及びSASP因子発現を指標に調べた。また、脱落膜化刺激により誘導されるFOXO1および着床関連因子シクロキシゲナーゼ2(COX2)発現に対するPGRMC1機能阻害の効果、さらに細胞老化に対するFOXO1ノックダウンの効果について検討した。

【結果】AG205及びPGRMC1 siRNA処置によるPGRMC1機能阻害は、脱落膜化を促進すると共にSA-β-Gal活性を増加させ、IL-8などのSASP因子の発現を変動させた。また、PGRMC1機能阻害は、脱落膜化刺激によるFOXO1発現をさらに増加させると共にCOX2発現も増加させた。FOXO1ノックダウンは、この脱落膜化刺激によるSA-β-Gal活性およびCOX2発現の上昇を抑制した。

【考察】脱落膜化過程で起こるPGRMC1発現の減少は、FOXO1発現の増加を介して脱落膜化と細胞老化を誘導すること、さらに、分化過程で起こるCOX2発現の誘導にも寄与することが示唆された。

肝虚血再灌流障害後の肝修復におけるiNKT細胞の役割

○後藤 卓也^{1,2,3}、伊藤 義也^{1,2}、佐藤 雅⁴、細野 加奈子^{1,2}、畑中 公^{1,2}、馬嶋 正隆⁵、天野 秀樹^{1,2}

¹北里大・院医療・分子薬理学、²北里大・医・薬理学、³北里大・医・外科学、⁴北里大・医・免疫学、⁵神奈川工科大学・健康医療科学部

【目的】 肝虚血再灌流障害後の肝修復過程が障害されると、肝不全となり患者の予後は不良となる。しかしながら肝修復機構は明らかではない。NKT (Natural Killer T) 細胞はT細胞の一種であり、CD1d分子によって提示された糖脂質抗原を認識することで活性化し、炎症および抗炎症サイトカインのいずれも産生する免疫調整細胞である。肝臓には他臓器と比較しNKT細胞が豊富に存在しており、肝臓に存在するNKT細胞の多くはインバリアントTCRを有したInvariant NKT (iNKT)細胞である。iNKT細胞の特異的リガンドとして α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer)が知られている。マクロファージは急性肝障害後の肝修復に重要な役割を果たす。IL-4やIL-13などの抗炎症性サイトカイン刺激により、炎症性マクロファージから修復性マクロファージへ分化することで肝修復に寄与する。本研究では、iNKT細胞がマウスの肝虚血再灌流後の肝修復およびマクロファージ分化に寄与するかどうかを調べることを目的とした。

【方法】 α -GalCerまたはPBSを投与したC57BL/6マウスに肝虚血再灌流を施行した。再灌流障害後の肝修復を血液生化学、組織検査などで評価した。また集積するマクロファージの表現形式をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】 α -GalCer投与マウスでは、PBS投与マウスと比較して肝逸脱酵素レベル・肝壊死面積の早期改善および肝細胞増殖マーカーであるPCNAの発現の増強を認めた。さらに α -GalCer投与マウスでは肝集積マクロファージのなかで、炎症性マクロファージよりも修復性マクロファージが増加した。また α -GalCer投与マウスではiNKT細胞からのIL-4産生の増加を認めた。そこで α -GalCer投与マウスにIL-4中和抗体を投与し肝虚血再灌流を施行した。IL-4中和抗体投与マウスではコントロールマウスと比較して肝逸脱酵素レベル・肝壊死面積の増加、およびPCNA発現の減少を認め、さらに修復性マクロファージの割合の減少を認めた。

【結論】 これらの結果よりiNKT細胞により産生されるIL-4が炎症性マクロファージから修復性マクロファージへの分化を刺激することで肝虚血再灌流障害の肝修復の促進に関与していることが示唆された。

ハチ毒に対する生体防御反応においてプロスタグランジンD₂受容体CRTH2が果たす役割

○木田 美聖、中村 達朗、藤原 祐樹、村田 幸久

東京大・院農学生命科学

【背景・目的】肥満細胞がIgE抗体を介して抗原を認識し、活性化することで起こるアレルギー反応は、本来ハチ毒やヘビ毒などの動物毒に対する生体防御反応とされている。脂質メディエーターの1つであるプロスタグランジンD₂ (PGD₂) は受容体CRTH2を介して、多様なアレルギー反応を促進する働きがあると報告されている。しかし、動物毒に対する生体防御反応において果たす役割は不明である。本研究は、CRTH2シグナルがハチ毒に対する生体防御反応において果たす役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】野生型マウス (WT) に、ハチ毒を皮下投与した30分後に皮膚を採材し、質量分析装置にてPGD₂量を測定するとハチ毒を投与しなかった時に比べて有意に検出量が増加した。また、CRTH2遺伝子欠損マウス (*Crth2*^{-/-}) においてもWTと同程度にPGD₂が検出された。WTにハチ毒640 mgを投与すると、約5時間後に体温が約10°C低下し、腎障害が生じた。*Crth2*^{-/-}においてもWTと同程度の体温低下と腎障害が観察された。WTに80 mgのハチ毒を前投与 (感作) した後、再びハチ毒640 mgを投与すると、感作せずにハチ毒640 mgを投与した時と比較して、体温低下が有意に抑制され、腎障害が低減された。一方同様のハチ毒投与を行った*Crth2*^{-/-}では、感作による体温低下の抑制が観察されなかった。次にCRTH2を介してハチ毒に対する生体防御反応が成立する機構を解明するため、この反応が成立するのに必須なIgE産生に着目した。ハチ毒を投与したマウスから採血した血清中に含まれるハチ毒特異的なIgE値をELISAにて測定したところ、投与前に比べてWTではIgE値が上昇したが、*Crth2*^{-/-}ではこの上昇の程度が有意に小さかった。樹状細胞は、生体に侵入した抗原を捕捉して活性化し、抗原提示能を有して所属リンパ節内に遊走することでIgE産生を促進する。ハチ毒を投与した24時間後の所属リンパ節内において、活性化樹状細胞の数が、WTと比較して*Crth2*^{-/-}で有意に少なかった。

【結論】PGD₂/CRTH2シグナルはハチ毒特異的なIgE産生を促進することで、ハチ毒に対する生体防御反応を成立させていることが示された。またそのメカニズムとして、活性化樹状細胞のリンパ節遊走を促進している可能性が示された。

補腎剤による細胞保護作用の評価

甲藤 大智、金 理志、山口 優也、間木 重行、田丸 輝也、○内藤 篤彦

東邦大・医・細胞生理

【背景・目的】 八味地黄丸をはじめとする補腎剤は認知症や頻尿等の老化に伴う症状に対して処方されており、抗老化作用を示す漢方薬であると考えられている。一方、補腎剤の抗老化作用について培養細胞モデルを用いて直接的に検証した基礎研究は限られている。本研究の目的は補腎剤の抗老化作用について初代培養細胞モデルを用いて評価することである。

【方法】 補腎剤としては八味地黄丸および六味丸を利用した。初代培養細胞モデルとしてはヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) およびヒト心臓線維芽細胞 (NHCF-V) を利用した。これらの細胞を補腎剤の存在下で培養した後、 H_2O_2 で処理することで酸化ストレス誘導性の細胞老化を誘導した。細胞死の評価はMTT法で、DNA損傷応答の評価はgH2AXおよびリン酸化p53 (Ser15) に対する蛍光抗体染色法で行った。

【結果】 HCAECを補腎剤 (0.3 mg/mL) の存在下で培養 (2週間) した後に H_2O_2 処理 (100 μ M, 1時間) を行ったところ、 H_2O_2 による細胞死を補腎剤が強く抑制した。細胞死抑制作用が強いため細胞老化に対する作用は評価できなかった。一方、NHCF-Vを補腎剤存在下で培養した後、同様に H_2O_2 処理を行なったが細胞死は抑制されなかった。また、 H_2O_2 処理後のgH2AXおよびリン酸化p53陽性細胞の割合はどちらの細胞においても補腎剤により減少した。

【考察】 本研究では当初、補腎剤が酸化ストレス誘導性の細胞老化に対して与える影響を評価しようと試みたが、想定外に補腎剤による強い細胞死抑制作用を確認した。補腎剤による細胞死抑制作用はHCAECでは認められたもののNHCF-Vでは認めず、細胞種特異的な作用であると示唆される。細胞死抑制作用のメカニズムとして、酸化ストレス後のDNA損傷応答を評価したが、DNA損傷応答を抑制する作用はHCAECでもNHCF-Vでも認めたことから、補腎剤によるDNA損傷応答抑制は直接的には細胞死抑制作用と関連していない可能性が示唆された。

【結語】 補腎剤は酸化ストレスに伴う内皮細胞の細胞死を強く抑制し、DNA損傷応答を抑制した。これらのメカニズムが補腎剤の抗老化作用に関連している可能性がある。

水チャネルaquaporin-5の刺激依存的な細胞膜移行におけるezrinの役割

○室井 慎一、村上 一仁、磯濱 洋一郎

東京理科大・薬・応用薬理

【背景・目的】 Aquaporin 5 (AQP5) は主に外分泌組織での水分分泌に関わる水チャネルであり、その機能異常はシェーグレン症候群などに随伴する乾燥症状と密接な関係にある。AQP類は開閉しない孔状の膜タンパク質であり、腺細胞でのAQP5はアセチルコリン刺激等によって速やかに細胞内から細胞膜へと移動して水分分泌を効率化させると推定されているが、その詳細な調節メカニズムは不明である。一方、ezrinは、細胞骨格と細胞膜を架橋するERMタンパク質類の1つであり、種々の膜タンパク質の細胞膜局在に関わる。そこで本研究では、AQP5の細胞膜局在に対するezrinの役割を調べた。

【方法】 内因性のAQP5を発現するマウス肺上皮細胞株MLE-12細胞を実験標本とし、HAタグを付加した野生型あるいはC末端領域のactin binding domainを大きく欠失させたdominant negative (DN) ezrin発現plasmidを遺伝子導入した。AQP5の細胞膜局在は蛍光免疫染色法または細胞表面のタンパク質をbiotin化、回収してwestern blot法で調べた。

【結果・考察】 野生型およびDN ezrinを遺伝子導入した細胞で、無刺激状態でのAQP5細胞内局在に影響は認められず、細胞膜表面のAQP5量にも著明な差はなかった。一方で、細胞をionomycin (1 μ M, 15分) 処理すると細胞膜表面のAQP5が増加し、細胞内から細胞膜への移行が促進されたが、DN ezrinを導入した細胞ではこのionomycinによる膜移行が著明に抑制された。また、ezrin阻害薬であるNSC305787 (10 μ M) の共処理、ezrinと相互作用するアクチン繊維および微小管の阻害薬cytochalasin D (20 μ M) あるいはvincristine (10 μ M) の前処理 (2時間) でも、ionomycinによる膜移行が抑制された。これらの結果から、ezrinは刺激によって促進されるAQP5の細胞内貯蔵部位から細胞膜への移行に選択的に関わることを示唆しており、またこれにはezrinと細胞骨格タンパク質との相互作用が重要であると推定された。本成績は、AQP5細胞膜移行の機序が刺激の有無によって異なることを示唆しており、外分泌機能異常を呈する疾患の病態生理や治療を考える上で興味深い知見である。

チリダニ抽出物を抗原とした気管支喘息モデルマウスにおける病態形成、およびステロイド感受性に対するIL-17Aおよび-17Fの役割

○大野 秀顕¹、村上 一仁¹、岩倉 洋一郎²、磯濱 洋一郎¹

¹東京理科大・院薬・応用薬理学研究室、²東京理科大・院生命科学・実験動物学研究部門

【背景・目的】 気管支喘息の治療には、吸入ステロイド薬が広く病態の管理に使用されている。ステロイド薬は、その強力な抗炎症作用から喘息の治療満足度の向上に大きく貢献したが、本薬物が奏功しない重篤な患者のケアや、粘液の過剰産生など、ステロイド薬の効果が不十分な症状への対応には課題が残っている。一方、炎症性サイトカインのIL-17AおよびIL-17Fは臨床において気管支喘息の重症度との相関が示唆されている。当研究室でも、チリダニ抽出物（HDM）を抗原とした気管支喘息マウスで、IL-17Aの高発現とステロイド薬が奏功しない気道粘液の産生亢進が生じることを見出している。そこで本研究では、気管支喘息の病態形成およびステロイド感受性の両面でのIL-17AおよびIL-17Fの役割を、欠損マウスを用いて調べた。

【方法】 野生型（WT）、IL-17A欠損、IL-17AおよびFの両欠損の雄性BALB/cAマウス（6-8週齢）の気管内にHDM 20 µgを頻回投与して気管支喘息を誘発した。また、ステロイド薬dexamethasone（DEX: 1 mg/kg, i. p.）をHDM投与の前日および当日に投与した。

【結果・考察】 IL-17A欠損あるいはIL-17AおよびFの両欠損マウスにHDMを投与した群では、WTと比較してBALF中の炎症細胞数に有意な変化はなかったが、methacholine感受性で評価した気道過敏性および気道粘液の主成分であるMUC5ACのmRNA発現はむしろ亢進する傾向にあった。また、WTではBALF中の炎症細胞数および気道過敏性の亢進はDEXによって著明に抑制されたのに対し、MUC5ACのmRNA発現には影響がなく、本モデルでの気道粘液の産生はステロイド抵抗性であった。一方、IL-17A欠損あるいはIL-17A, Fの両欠損マウスでは、DEXは炎症、気道過敏性に加えてMUC5ACのmRNA発現を有意に抑制した。さらに健常マウスの気道内にIL-17AおよびIL-13を投与して誘発したMUC5ACの発現亢進もDEXで抑制されなかった。以上の成績から、IL-17Aが気管支喘息罹患時に生じるステロイド抵抗性の粘液産生に少なくとも一部関わりと推定された。その詳細な機序は未だ不明だが、これらは難治性の喘息治療を考える上で興味深い基礎データである。

5,6-DiHETEの経口投与はマウスにおけるDSS誘発性腸炎の回復を促進する

○竹ノ内 晋也、今井 大貴、中村 達朗、村田 幸久

東京大・院農学生命科学・応用動物科学専攻 放射線動物科学

炎症性腸疾患は、重篤な消化器症状により患者の生活の質を下げる慢性疾患であり、副作用の少ない新たな治療法の開発が求められている。我々は過去に、i) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎の回復過程にある結腸組織において、エイコサペンタエン酸 (EPA) 代謝産物である5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid (5,6-DiHETE) の濃度が上昇することに加え、ii) この脂質が*in vivo*と*in vitro*で血管透過性の亢進を抑制する作用をもつことを報告してきた。しかし、実際にこの脂質が腸炎の病態にどのような影響を与えるかは不明である。本研究では、5,6-DiHETEの経口投与がDSS腸炎の治療に有効か否かを検証した。まず、健常なC57BL/6マウスに150もしくは600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の5,6-DiHETEを経口投与し、投与後0.5, 1, 3, 6時間後の血中5,6-DiHETE濃度を質量分析装置で測定した。Vehicle投与マウスの血中5,6-DiHETE濃度は常に低値を維持したが、経口投与により血中5,6-DiHETE濃度は投与濃度依存的に上昇し、時間経過とともに低下していった。マウスに2%DSSを4日間与えたところ、開始4日目から7日目まで体重が減少し、8日目以降は増加に転じて徐々に回復した。このマウスはDSS投与開始3日目から、軟便・水様便・潜血便といった下痢症状を呈し、その症状は6日目以降改善していった。DSS投与14日目の結腸を病理観察したところ、粘膜下組織の浮腫、粘膜の糜爛、顆粒球浸潤、陰窩膿瘍が見られた。このマウスに150もしくは600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の5,6-DiHETEを9~14日目に経口投与した結果、vehicle処置と比べて回復期におけるマウスの体重に差はなかったが、下痢の回復が有意に促進された。150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の5,6-DiHETEの投与によりDSS処置による結腸の浮腫や糜爛、顆粒球浸潤が抑制され、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与ではさらに陰窩膿瘍が抑制された。以上より、5,6-DiHETEの150~600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の経口投与はDSS誘発性腸炎からの回復を促進することが分かった。

老化促進マウス耳下腺における脂肪酸輸送体CD36発現の検討

○佐藤 慶太郎、安達 一典

明海大・歯・薬理

唾液には漿液性と粘液性があり、前者は主に耳下腺から、後者は主に顎下腺と舌下腺から分泌される。相対的に漿液性唾液の分泌量が減少すると口腔乾燥状態になる。この状態が持続する病態を口腔乾燥症（ドライマウス）という。ドライマウスは、齲蝕や歯周病の増悪、発音障害、嚥下障害などによりQOLの低下をもたらす。実際にドライマウスに悩む患者には中高齢者が多い。よって加齢現象は、漿液性唾液の分泌量減少を引き起こす要因の一つと考えられる。しかし、耳下腺の加齢変化がドライマウス発症にどう関与するか明らかではない。一方、ヒトやラットを用いた由来唾液腺別の唾液成分解析において、総脂肪酸量は耳下腺由来の唾液が顎下腺および舌下腺由来の唾液よりも多い報告がある。耳下腺細胞に取り込まれた脂肪酸は、エネルギー代謝やタンパク質修飾などを介して唾液分泌に影響すると考えられる。そこで我々は、耳下腺は加齢により脂肪酸の取り込み量が増加し、漿液性唾液の分泌量が影響を受けると仮説を立てた。本研究では、48週齢の老化促進マウス（SAMP1マウス）とその対照マウス（SAMR1マウス）を用いて、臨床で口腔乾燥状態改善に用いるムスカリン受容体作動薬ピロカルピン刺激による唾液分泌量と耳下腺における脂肪酸輸送体CD36発現量との関連性を検討した。メドミジン・ミダゾラム・ブトルファノールによる三種混合麻酔下にてピロカルピン（0.5 mg/kg体重）を腹腔内投与し、その後20分間の唾液分泌量を測定した。SAMP1マウスはSAMR1マウスに比べて、唾液分泌量が有意に減少した。両マウスの耳下腺ライセートを作製し、抗CD36抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、SAMP1マウスではSAMR1マウスに比較してCD36が有意に減少した。以上より、48週齢のSAMP1マウス耳下腺では、CD36の発現量が低下することにより脂肪酸の細胞内への取り込み量が減少し、そのことが漿液性唾液の分泌量の変化に関わる可能性が考えられた。今後、耳下腺の加齢変化における脂肪酸の取り込み、および耳下腺細胞に取り込まれた脂肪酸の役割について検討を進める。

マウス前海馬支脚の分子マーカー探索

○劉 佳妍¹、鹿島 哲彦¹、森川 勝太¹、野口 朝子¹、池谷 裕二^{1,2}、松本 信圭¹

¹東京大・院薬・薬品作用学教室、²東京大・Beyond AI研究推進機構

海馬体とその周囲の海馬傍回は動物の記憶、学習、空間探索に重要である。中でも海馬傍回に含まれる前海馬支脚は、空間的な情報処理の役割を担っている。特に、前海馬支脚の興奮性ニューロンは、動物が特定の方向を向いた時に選択的に発火し、その方向選択性は前海馬支脚内のソマトスタチン陽性インターニューロンと興奮性ニューロンとの相互作用により生み出されている。さらに、前海馬支脚ニューロンの方向選択的な発火は動物の開眼前（およそ生後14日齢）から生み出されることが知られている。

しかし、従来の研究では、発達に応じた前海馬支脚の空間表象が電気生理学的に研究されてきた一方で、その組織学的な特徴は明らかではなかった。

本研究の目的は、前海馬支脚の発達に応じた組織学的な特徴を解明することである。具体的に、前海馬支脚表層が小胞性グルタミン酸トランスポーター2（VGluT2）によって定義できることを証明し、発達に応じた前海馬支脚内のインターニューロンの分布の推移を明らかにした。

当研究室の先行研究から、VGluT2が前海馬支脚表層のマーカータンパク質の候補であると予想した。本研究では、まず、順行性トレーサー（アデノ随伴ウイルス（AAV））を視床前腹側核（前海馬支脚の表層に投射している）にインジェクションし、2週間の回復期間の後、脳切片を作製し、VGluT2で免疫染色をおこなった。その結果、AAVの投射先の領域が抗VGluT2抗体による染色領域と高い相関を示すことを見出した。以上の結果から、VGluT2が前海馬支脚表層を定義できることが示唆された。

次に、VGluT2を前海馬支脚表層のマーカーとして利用し、動物の発達に伴う前海馬支脚の変化について、インターニューロンの分布に注目して検討した。その結果、前海馬支脚表層に存在するパルブアルブミンインターニューロンの細胞密度が発達に応じて増大する傾向を示す一方、ソマトスタチンインターニューロンはそのようなことが見られなかった。また、VGluT2陽性のパッチ構造がP12以降に出現することを発見した。これらの特徴は前海馬支脚の空間選択性と関連する可能性があると考えられた。

慢性炎症性疼痛モデルラットの側坐核のDA放出へorexin受容体ligandが及ぼす効果

○川島 央暉、青野 悠里、三枝 禎

日本大・松戸歯学部・薬理学

【目的】

我々は睡眠・覚醒や摂食などを調節する orexin-A の知覚神経への作用機序に関する一連の研究から、一次知覚神経へ入力する orexin 神経の活動性が慢性炎症性疼痛により低下する可能性を指摘した (Ishikawa et al., 2018)。また中脳辺縁系 dopamine (DA) 神経が投射する側坐核では、orexin-A の作用する orexin 受容体を介して orexin 神経が基礎的な DA 神経活動を抑制することを昨年の本学会で報告した。しかし、慢性炎症性疼痛が側坐核の DA 神経活動の orexin 受容体による制御へ及ぼす影響は明らかでない。そこで本研究では、慢性炎症性疼痛モデルラットの側坐核の DA 放出の orexin 受容体による制御の特徴について、orexin 受容体の agonist の orexin-A と antagonist の MK-4305 の側坐核への灌流投与が同部位の細胞外 DA 量に及ぼす効果を指標として脳微小透析法で検討した。

【方法】

実験には S-D 系雄性ラット (約 200 g) 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、後肢足底へ 2% carrageenan を含む saline または saline のみをそれぞれ 0.25 ml 皮下投与し、投与部位への機械的刺激が起こす回避行動を 24 時間毎に解析して実験的な慢性炎症性疼痛の発症を確認した。Carrageenan または溶媒の投与から約 48 時間後、側坐核に留置した透析プローブに改良リンゲル液を流速 2 μ l/分 で灌流し、無麻酔非拘束の条件下で微小透析膜 (直径 220 μ m, 長さ 2 mm) を介して 5 分毎に回収した細胞外液中の DA を HPLC-ECD 法で定量した。Orexin-A と MK-4305 は灌流液に溶解し逆透析で側坐核に 60 分間灌流投与した。これらの投与量は灌流液中の絶対量 (g) で示した。

【結果】

対照群の側坐核の DA 量は orexin-A (35 ng) の投与では著しい変化がなかったが、MK-4305 (50 ng) の投与で約 49% 増加した。この MK-4305 による DA の増大を orexin-A (35 ng) の併用は抑制した。Carrageenan 処置群の側坐核の DA 量は、orexin-A (35 ng) による影響がなかったほか、MK-4305 (50 ng) の投与では約 25% しか増加しなかった。基礎 DA 量は対照群と carrageenan 処置群との間で殆ど差がなかった。

【考察】

MK-4305 による側坐核の DA 放出促進作用は、慢性炎症性疼痛モデルラットで減弱することが示された。その一因として、このモデル動物の側坐核の orexin 受容体を介した DA 神経活動の抑制の低下が推察された。また側坐核の基礎 DA 神経活動には本研究の実験的な慢性炎症性疼痛による影響は少ないことが考えられた。

GABAトランスポーターサブタイプの選択的阻害薬がラットの側坐核の細胞外液中のGABAおよびグルタミン酸量へ及ぼす効果

○青野 悠里¹、川島 央暉¹、渡邊 由梨子²、三枝 禎¹

¹日本大・松戸歯・薬理、²日本大・松戸歯・口外

【目的】

中脳辺縁系dopamine (DA) 神経の主たる投射領域の側坐核には、GABA神経が分布している。我々はこれまで側坐核の δ または μ 受容体刺激誘発性のDA放出の促進には、同部位のGABA神経活動の抑制が関与する可能性を指摘している (Saigusa et al., Pharmacol. Rep., in press)。一方、細胞外液に含まれているGABAは、細胞膜上のGABAトランスポーター (GAT) を介して細胞内に取り込まれる。脳内のGATサブタイプのうち、GAT1は神経細胞、GAT3はグリア細胞にそれぞれ発現することが知られており、側坐核にはGAT1とGAT3がいずれも認められる。しかし、これらのGATの側坐核の細胞外GABA量の制御への関与の詳細は明らかでない。そこで本研究では、無麻酔非拘束ラットを用いた*in vivo*脳微小透析法により検出した側坐核のGABA量に選択的GAT1またはGAT3阻害薬が及ぼす効果を指標とし、GAT1とGAT3が側坐核の細胞外GABA量の調節で果たす役割について検討した。GABAの前駆物質で側坐核の細胞外液に含まれるグルタミン酸 (Glu) 量へ各薬物処置が及ぼす影響も比較のため観察した。

【方法】

実験にはS-D系雄性ラット (体重約200 g) を用いた。全身麻酔下で微小透析プローブ装着用のガイドカニューレの植立手術を行ったのち約1週間の回復期をおき、無麻酔非拘束の条件下で*in vivo*脳微小透析実験を行った。側坐核に留置した微小透析プローブにインフュージョンポンプで改良リンゲル液を2 μ l/minで灌流し、同部位の細胞外液を試料として20分毎に回収した。試料中のGABAとGlu量はHPLCシステムで分離し蛍光検出器で定量した。使用薬物は灌流液に溶解し、微小透析プローブから逆透析で側坐核に60分間にわたり灌流投与した。GAT阻害薬の投与量は灌流液中の総量 (mol) で示した。

【結果】

試料中のGABA量は、選択的GAT1阻害薬のNNC711 (600, 6000 pmol) により最大約220%まで用量依存的に増大したが、選択的GAT3阻害薬の(S)-SNAP-5114 (12, 120 nmol) では目立った変化がなかった。一方、NNC711, (S)-SNAP-5114は試料中のGlu量に著しい影響は及ぼさなかった。

【考察】

以上の結果から側坐核の細胞外GABA量は、GAT3ではなくGAT1の阻害で増大することが示された。また、側坐核のGABAの細胞内への取り込みにはGAT1が関与するが、GAT3は目立った役割を果たさない可能性が示唆された。さらにGAT1またはGAT3の阻害は、側坐核の細胞外Glu量には殆ど影響がないことが考えられた。

KCNQ(Kv7)K⁺チャンネル開口薬retigabineは急性疼痛及び急性搔痒を抑制する。

○中村 友哉、尾山 美沙、渡辺 俊、岩井 孝志、田辺 光男

北里大・薬・薬理

痛みや痒みは、それぞれ末梢の侵害受容体及び搔痒受容体刺激により一次求心性神経を介して脊髄後角へ入力後、上位中枢へと伝達されることで認識される。近年、痛みや痒みのシグナル伝達経路において、一部共通した神経回路が存在することが報告されている。痛みや痒みの病態時に神経の過剰興奮が生じていることから、中枢神経をターゲットとした疼痛や搔痒の制御は治療戦略として重要である。当研究室では、神経興奮制御に重要な役割を担っているKCNQ(Kv7)K⁺チャンネルの開口薬であるretigabineが、神経障害性疼痛と急性搔痒のそれぞれのモデルマウスにおいて抑制作用を示すことを先行研究で明らかにしている。マウスなどのげっ歯類の頬に発痛物質または起痒物質を皮内投与すると、それぞれwiping (痛みを反映する)とscratching (痒みを反映する)という異なる行動を示すことが知られている(cheek model)。本研究では、このcheek modelを用いてretigabineの急性疼痛及び急性搔痒に対する効果の検討を行った。

マウスの頬に皮内投与したクロロキン(0.1, 0.2及び0.4 $\mu\text{mol}/10\ \mu\text{L}$)は、用量依存的にscratching回数を増加させ、wiping回数には影響を与えなかった。一方、カプサイシン(1, 10及び40 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$)は、用量依存的にwiping回数を増加させたが、scratching回数には影響を与えなかった。鎮痒薬の選択的オピオイド κ 受容体作動薬ナルフラフィン(10, 20及び40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)をクロロキン(0.4 $\mu\text{mol}/10\ \mu\text{L}$)あるいはカプサイシン(40 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{L}$)の皮内投与30分前に腹腔内投与すると、カプサイシン誘発性のwiping回数を変化させずにクロロキン誘発性のscratching回数を有意に抑制した。このようにcheek modelでは、痛みと痒みそれぞれが異なる行動として表れ、一つの評価系で痛みと痒みに対する薬物の作用を調べることが可能である。このcheek modelでretigabine (10及び30 mg/kg)をクロロキン(0.4 mmol/10 mL)あるいはカプサイシン(40 $\mu\text{g}/10\ \text{mL}$)の皮内投与15分前に腹腔内投与すると、retigabine (30 mg/kg)は、カプサイシン誘発wiping回数を有意に減少し、クロロキン誘発scratching回数を減少させる傾向を示した。よってretigabineは、痛みと痒みの両方を抑制するが、痒みよりも痛みに対してより強い抑制作用を有すると考えられる。

ラクトフェリンはERK経路を介してPC12細胞の神経突起を伸長する

○南條 佑磨¹、古川 恵²、水上 乃愛³、東方 優大¹、長嶋 大地²、日塔 武彰³、速水 耕介³、星野 達雄⁴、出雲 信夫¹

¹横浜薬科大・薬・薬物治療学、²横浜薬科大・薬・薬学教育センター、³横浜薬科大・薬・機能性物質学、⁴株式会社NRLファーマ

【目的】ラクトフェリン (LF) は母乳に含まれるタンパク質であり、免疫機能の改善や骨代謝への作用が報告されている。また、中枢神経系への作用も報告されており、我々は卵巣摘出モデルラットを用いた自発運動量の低下を改善することを報告した (Current Molecular Pharmacology, 2021,14,245-252)。しかしながら、その作用機序は明らかとなっていない。ここで、LFが骨芽細胞様細胞においてERK経路を介し細胞増殖を促進することが報告されている。そこで本研究ではラット副腎髄質由来PC12細胞の神経突起伸長作用を用いLFのERK経路の関与について検討を行った。また、転写因子であるCREBへの関与についても検討を行った。

【方法】ラット副腎髄質由来PC12細胞を12well組織培養プレートに播種 (1.2×10^4 個/1 well) し、1日経過後LF単独添加およびLF (250 μ g/mL) とERK阻害剤であるPD98059 (10^{-5} M)、LFとCREB阻害剤であるKG-501 (5.0×10^{-6} M) の同時添加を行った。薬剤添加1日後と3日後にカメラ付き位相差倒立顕微鏡で撮影した細胞のデジタル画像を用いて、神経細胞伸展定量ソフト (KURABO) で形態計測分析 (Joint、Pass、Length) を実施し、PC12細胞におけるLFの神経突起伸長作用を検討した。またPC12細胞を6well組織培養プレートに播種 (3.0×10^5 個/1well) し、播種から1日経過後、LF単独添加およびPD98059、KG-501の各種阻害剤の同時添加を行い、1日間及び3日間培養しリアルタイムRT-PCRによりニューロフィラメント (NF-L) の遺伝子発現レベルについて解析を行った。

【結果・結論】LFの添加により、PC12細胞は神経突起伸長作用を示すことが明らかとなった。また、PD98059との同時添加によりその効果は消失し、LFによるPC12細胞の神経突起伸長作用にERKの経路が関与していることが考えられた。また、KG-501の同時添加によっても同様の効果が認められ転写因子CREBの関与が考えられた。また、リアルタイムRT-PCR法の結果、NF-Lの遺伝子発現レベルがLFにより有意に上昇し、それら阻害剤の添加によりその上昇作用が抑制された。以上の結果よりLFはERK/CREB経路を活性化することによりNF-Lの発現量増加し神経突起伸長を促進することが示唆された。

過酸化水素によるPC12細胞の神経突起伸長抑制に対するパクチーの効果

○平石 直人¹、古川 恵²、石山 優奈³、東方 優大¹、日塔 武彰¹、速水 耕介³、出雲 信夫¹

¹横浜薬科大・薬・薬物治療、²横浜薬科大・薬・薬学教育センター、³横浜薬科大・薬・機能性物質

【目的】 コリアンダー（パクチー：*Coriandrum sativum*）は、伝統的に香辛料や薬用植物として用いられており、解毒作用や抗酸化作用、抗炎症作用などを有することが報告されている。パクチーの抗酸化作用は、老化及び生活習慣病の他にも、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患への保護作用も期待されている。我々はSAMP8マウスを用いた研究により、パクチーが記憶障害に対し効果を示すことを明らかとした（Nutrients 2020,12,455）。そこで今研究ではラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞を用いて、過酸化水素（ H_2O_2 ）の酸化ストレスによる神経突起伸長抑制に対するパクチーの作用について検討を行った。

【方法】 細胞培養プレートに播種したPC12細胞（ 1.2×10^4 個/1well）を10%FBS含有D-MEM培地で培養した。播種から1日後、神経成長因子（Nerve Growth Factor：NGF 25ng/mL）を添加した。それと同時に、 H_2O_2 単独添加と H_2O_2 及びパクチーの葉抽出物（CSLE）、パクチーの果実抽出物（CSSE）またはアスコルビン酸（AA）の同時添加を行った。CSLE及びCSSEの濃度は $0.01 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ の4種類に分けて添加を行なった。薬剤添加から3日後にカメラ付き位相差倒立顕微鏡で1wellにつき2視野の画像を撮影し、形態計測分析を行なった。薬剤添加3日後の細胞からRNA抽出を行い、リアルタイムRT-PCR法を用いて、ニューロフィラメント（NF-L）及びカスパーゼ-3（caspase-3）の遺伝子発現レベルを解析した。なお、内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPDH）を用いた。

【結果・考察】 H_2O_2 添加によりPC12細胞の神経突起伸長作用は有意に抑制された。また、その抑制作用はCSLE、CSSEともに $0.01 \mu\text{g/mL}$ と $0.1 \mu\text{g/mL}$ によって改善され、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ による改善効果はAA $50 \mu\text{g/mL}$ による効果と同等レベルであることが明らかとなった。CSLE、CSSE $1 \mu\text{g/mL}$ と $10 \mu\text{g/mL}$ では改善が見られなかったことからパクチーによる抗酸化作用は $0.1 \mu\text{g/mL}$ が最適な濃度であると考えられた。リアルタイムRT-PCR法の結果、NF-Lの遺伝子発現レベルにおいて H_2O_2 により有意な抑制が認められ、CSLE及びCSSEがその作用を改善した。以上の結果から、パクチーは、 H_2O_2 によるPC12細胞の神経突起抑制作用を改善することが考えられた。

矯正力負荷が誘発する疼痛に対するTRPV1およびTRPA1拮抗薬の歯肉塗布の効果

○湯川 未郷¹、須田 直人¹、安達 一典²

¹明海大・歯・歯科矯正学、²明海大・歯・歯科薬理学

【目的】我々は、矯正力負荷による疼痛を、開口反射誘発電気刺激閾値（TH）の変化で定量評価可能な動物モデルを報告した。本モデルでは、THが矯正力を負荷した右側で、反対側よりも有意に低下し、三叉神経節（TG）のサテライトグリア細胞にグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）の発現を伴う興奮を惹起する。先行研究で、transient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）拮抗薬の腹腔内投与が、開口反射ならびに三叉神経節の興奮を有意に抑制した。しかしながら、TRPV1拮抗薬の全身投与は深部体温上昇といった副作用があり、臨床応用は困難と考えられる。そこで本研究では、歯の移動に対する疼痛や三叉神経節興奮に対する、TRPチャンネル拮抗薬の局所投与効果を検討した。

【方法】イソフルラン全身麻酔下で、雄性Wistarラットの上顎両側門歯と右側第一臼歯（M1）間にコイルスプリングを装着し、矯正力を負荷した。矯正力負荷1日後に、全身麻酔下で気管挿管を行い、TH1を測定、継続して60分間に亘り閾値（TH2-4）を計測する（0.006 Hz）。薬物塗布は、矯正力負荷直後（D0群）、もしくはTH1測定後（D1群）に右側M1歯頸部歯肉に行った。TH測定中に、直腸温および歯肉溝温度を測定した。その後ラットを灌流しTGを摘出し、厚さ10 μ m水平断凍結切片を作製し、免疫蛍光染色にて、V1、V2、V3領域のGFAP発現を評価した。（n = 5）

【結果】D0群におけるTRPV1拮抗薬（AMG9810: 2-4%）塗布は、1日後の右側THをvehicle塗布よりも有意に上昇させた。D1群では、TRPV1拮抗薬のAMG9810、A-889425ならびにTRPA1拮抗薬のA-967079、HC030031の塗布（2-4%）は、TH1と比較して、TH3とTH4を有意に上昇させた。また、4%AMG9810と4%A-967079の同時塗布により鎮痛効果に協力作用が認められた。一方、いずれの塗布もTGのGFAP発現に影響を与えず、直腸温と歯肉温度も変化しなかった。

【考察及び結論】TRPチャンネル拮抗薬の歯肉塗布は、矯正力負荷による疼痛抑制に有効であり、また、全身投与で起こる体温上昇などの副作用を生じなかった。以上より、歯の移動に伴う疼痛の抑制には、複数のTRPチャンネルを抑制することが効果的と示唆された。

ドコサヘキサエン酸(DHA)はプロスタノイドTP受容体の抑制を介してU46619、プロスタグランジン(PG) $F_{2\alpha}$ によるブタ冠動脈、脳底動脈の収縮を抑制する

○吉岡 健人、小原 圭将、追川 俊也、上村 洸平、山口 明奈、藤澤 和輝、花澤 瞳、欧 光瀚、徐 可悦、田中 芳夫

東邦大・薬・薬理

DHAは代表的なn-3系多価不飽和脂肪酸であり、数多くの疫学調査や臨床研究により、DHAの摂取が様々な循環器系疾患に対して有益な予防効果を発揮することが示されている。これらの効果は、DHAの長期摂取による収縮性・炎症性プロスタノイドの産生の抑制によるものだと考えられてきた。一方、当教室では、DHAがラット大動脈・腸間膜動脈のU46619 (TP受容体刺激薬) およびPGF $_{2\alpha}$ による収縮を即時的かつ著明に抑制することを見出し、これがDHAの循環器系保護効果の一端を担う可能性を示した。トロンボキサンA $_2$ やPGF $_{2\alpha}$ は冠動脈や脳動脈においても強力な攣縮因子となることが示されていることから、これらの血管においてもDHAが同様な抑制効果を示すかどうか非常に興味深い、これまでのところ検討はされていない。そこで、本研究では、U46619およびPGF $_{2\alpha}$ で誘発される冠動脈及び脳動脈(脳底動脈)の収縮に対してDHAが抑制効果を示す可能性をブタ由来組織を用いて検証することにした。また、TP受容体がDHAの主たる標的となりうる可能性を検証する目的で、TP・FP受容体安定発現細胞株を用いて細胞内Ca $^{2+}$ 濃度変動を指標にDHAの影響を検討した。

摘出ブタ冠動脈および脳底動脈のいずれにおいても、DHAはU46619およびPGF $_{2\alpha}$ による持続性収縮を濃度依存的に強力に抑制したが、80 mM KClによって誘発される脱分極性収縮にはほとんど影響を与えなかった。SQ 29,548 (TP受容体拮抗薬) は、U46619/PGF $_{2\alpha}$ による収縮を冠動脈では約90%/70%、脳底動脈では約100%/60%抑制した。ヒトTP受容体発現細胞において、DHAはU46619およびPGF $_{2\alpha}$ による細胞内Ca $^{2+}$ 濃度の上昇を非常に強力に抑制した。しかし、ヒトFP受容体発現細胞では、DHAはPGF $_{2\alpha}$ による細胞内Ca $^{2+}$ 濃度の上昇に影響を与えなかった。

これらの結果から、DHAはブタ冠動脈および脳底動脈のTP受容体を介した収縮を強力に抑制することが明らかとなり、この収縮抑制作用の主たる機序としてTP受容体の抑制が関与する可能性が示された。また、DHAが収縮性プロスタノイドによりTP受容体を介して誘発される冠・脳血管の攣縮に対して有効な予防効果を示し、これがDHAの循環器系保護効果の一端を担う可能性が改めて示された。

Streptozotocin誘発糖尿病マウス心筋の弛緩機能に対するQuercetinの作用

○石井 帆風、阿部 滉平、濱口 正悟、行方 衣由紀、田中 光

東邦大・薬・薬物学

【背景・目的】

心臓の機能制御とCa²⁺動態の間には密接な関係が存在し、病態により収縮・拡張機能に障害が起きることが知られている。近年、心不全の要因の1つとして拡張機能障害が注目を集めており、糖尿病によって引き起こされる心筋障害に関しても拡張不全が生じている。当研究室では、心筋の弛緩機能に関与する筋小胞体のCa²⁺-ATPase(SERCA)に着目し、抗酸化作用を持つellagic acidおよびgingerolが心筋の弛緩機能を改善することを報告した。そこで本研究では、同じフェノール系物質で抗酸化作用を持つQuercetinのSERCA機能と心筋の弛緩機能に対する影響を検討した。

【方法】

ddY系雄性マウス(4週齢)にstreptozotocin(STZ)を腹腔内投与(200 mg/kg)後、5~7週間飼育し、血糖値が400 mg/dL以上のものを糖尿病マウスとして用いた。また対照群として、STZの溶媒であるcitric acid(pH4.5)を同量投与したものを正常マウスとした。正常および糖尿病マウスから摘出した右心室筋組織標本および単離心室筋細胞を作成し、マグヌス法を用いた弛緩時間の測定および蛍光イメージング法を用いたCa²⁺transient測定を行った。

【結果・考察】

右心室筋組織標本における弛緩時間は、正常心筋に比べ糖尿病心筋において長かった。単離心室筋細胞におけるCa²⁺transientの減衰時間は正常心筋に比べ、糖尿病心筋において長かった。SERCA阻害薬であるcyclopiazonic acid(CPA)処置により、正常および糖尿病心筋のどちらの場合も弛緩時間を延長させ、その作用は正常心筋においてより顕著であった。Quercetin処置により、正常および糖尿病心筋のどちらの場合も弛緩時間を短縮させ、さらにCa²⁺transientの減衰時間を短縮させた。また、その作用は糖尿病心筋においてより顕著であった。さらにQuercetinによる弛緩時間の短縮はCPA処置により消失した。

以上の結果より、STZ誘発糖尿病マウス心筋の弛緩機能障害は、SERCA機能の低下により引き起こされており、QuercetinはSERCA機能を亢進することで弛緩時間を短縮し、STZ誘発糖尿病マウス心筋の拡張不全を改善する可能性が示唆された。

ジャンクトフィリン2変異体の強制発現による心機能低下

○中田 勉¹、川岸 裕幸²、富田 拓郎²、山田 充彦²

¹信州大・基盤研・機器分析、²信州大・医・分子薬理

心筋や骨格筋が正常に収縮するためには、細胞膜と筋小胞体膜が近接する結合膜構造において、L型カルシウムチャンネル (LTCC) とリアノジン受容体が機能的に連関することが必要不可欠である。結合膜構造の維持には、ジャンクトフィリン (JP) が重要な役割を果たすことが知られている。これまでの研究により、骨格筋においてはJP1がLTCCに結合し、その細胞内局在を制御していることを明らかにしている。しかし、心筋のJP2とLTCCの関係には不明な点が多い。

本研究では、JP2のドミナントネガティブ体であるC末端欠失変異体 (JP2 Δ 427) をアデノ随伴ウイルスベクターによってマウス心筋細胞に発現させ、in vivoでの効果を検討した。発現にはトロポニンTプロモータを用いた。ウイルス投与4週間後に免疫染色およびウェスタンブロット法を行ったところ、心筋でのJP2 Δ 427の強い発現が確認できた。また、同時期に心重量を測定したところ、有意な増加が認められた。一方、肺重量、脈拍、血圧については有意な変化は見られなかった。心エコーでの解析を行ったところ、コントロール群の%FSが43%であったのに対し、JP2 Δ 427群では31%に低下していた。単離心筋細胞のカルシウムイメージングを行ったところ、電気刺激によって惹起されるカルシウム上昇が、JP2 Δ 427群では有意に減少していた。また、免疫細胞染色を行った結果、JP2 Δ 427はT管と比べて表面細胞膜に多く分布していることが明らかになった。また同じ細胞でLTCCについて検討を行ったところ、コントロールと比較して表面細胞膜により多く局在していた。これらの結果から、JP2 Δ 427の強制発現は、LTCCの細胞内局在を変化させることで、カルシウム代謝や心機能の低下を誘導することが示唆された。

AT₁アンジオテンシン受容体の生理作用を利用した新規乳幼児心不全治療薬の開発

○川岸 裕幸^{1,2}、富田(沼賀) 拓郎²、中田 勉³、柴 祐司^{1,4}、森本 幸生⁵、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、⁴信州大・医・再生医科、⁵国際医療福祉大・保健医療・理学療法

小児心不全は小児の重要な死因であり、先天性心疾患、心筋症、心筋炎、川崎病などによって起こる。これらの多くは単遺伝子変異を原因としており、かつその変異が各々の患者で異なる場合が多い。その多様性がゆえに大規模臨床治験が困難で、現在世界的にもエビデンスのある治療薬は存在しない。特に乳幼児期に発生する小児心不全は極めて重症で劇的な転機をとり、その治療薬の開発は重要な課題である。これまでに我々は、アンジオテンシンII (AngII) が、新生児・乳児期マウスの心室筋細胞のL型Ca²⁺チャネルを活性化することを報告した。この作用は、AT₁受容体 (AT₁R) /βアレスチン2経路を介したものである。これまでに我々は、AT₁R/β-アレスチン2経路のバイアスアゴニスト (BBA) の心臓への作用について研究を行ってきた。離乳前のマウスにペプチド性BBAであるTRV027を投与すると、有意かつ持続的な強心作用が認められた。一方、TRV027の投与によって、頻脈、不整脈、心筋細胞酸素消費量増加、活性酸素種 (ROS) の増大など、ほかの強心薬に見られる副作用は認められなかった。またTRV027は、胎児期～乳幼児期の表現型を示すヒトiPS細胞由来心筋細胞の単収縮Ca²⁺トランジェントを倍増させた。さらに、ヒト先天性拡張型心筋症モデルの新生児・乳児期マウスを用いた検討から、TRV027は収縮力の低下した病的心においても強心作用を示した。このモデルマウスは離乳期までに約8割の個体が死亡するが、生後1日目からTRV027を継続投与すると、その離乳前生命予後が有意に改善された。したがって、BBAは乳幼児心不全に対し新たな治療法となることが強く示唆された。現在我々は、BBA活性を有する小分子探索を行っており、乳幼児心不全患者にとって負担の少ない治療薬の開発を目指し、研究を進めている。

交感神経除神経が新生児心臓発達に与える影響の解析

○富田 拓郎、川岸 裕幸、中田 勉、山田 充彦

信州大

交感神経は、外環境変化に循環動態を適応させるために必須の自律神経である。交感神経終末から放出されたノルアドレナリンは、心臓の陽性変時変力作用、末梢血管の収縮調整、体液量調整などを介して、全身の循環動態の恒常性維持に重要な役割を果たす。このような成体における循環動態制御に加えて、別の角度からも交感神経の重要性が近年注目されている。その一つが心臓の発達における役割である。マウスやヒトでは交感神経の心室支配は生下後に完了する。これにより、例えば、心筋細胞の成長が細胞増殖から肥大へと変化したり、興奮収縮連関機構が変化したりすることが報告されている。しかしながら、これらの多くの研究は *in vitro* での交感神経と新生児心筋細胞の共培養系等を用いた研究から明らかにされている。そのため、*in vivo* における交感神経支配と、心筋細胞の形質変化がほぼ完了する離乳期（生下後約20日（P20））までの心臓発達との因果関係はほとんど明らかにされていない。本研究では、生下後1日の新生児マウスに6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与することにより交感神経を除神経し、心臓の収縮機能への影響を解析した。心エコー解析から、P21における心室の収縮力が6-OHDA投与により有意に抑制されることが明らかになった。単離心筋細胞を用いた電気生理学的解析から、電位依存性L型カルシウムチャネル活性は、6-OHDA投与による影響が見られなかったが、6-OHDAが投与された細胞においては、有意な細胞膜容量の低下が観察された。そこで、生細胞の蛍光染色により細胞膜構造の解析を行った。その結果、6-OHDAは心筋細胞全体の大きさには影響を与えなかったが、心筋細胞内のT管構造の発達を抑制していた。以上の結果から、交感神経支配は、心臓の離乳期までの発達において、心筋細胞の構造的成熟に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ヒトiPS細胞由来肺胞上皮細胞を用いたCOVID-19治療薬評価

○辻 嘉代子¹、山田 茂^{1,2}、諫田 泰成¹

¹国立衛研・薬理、²PEIJ

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因ウイルスで、ヒトの細胞に発現しているアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）に結合後、transmembrane serine protease 2（TMPRSS2）によってSARS-CoV-2のスパイクタンパク質が切断される事で感染する。SARS-CoV-2は呼吸器症状を呈することから、呼吸器系の細胞を用いた研究は感染メカニズムの解明および治療薬開発に大変重要である。しかしながら、ヒト呼吸器系の初代培養細胞を入手することは困難であり、またロット間差も想定される。

そこで本研究では、ヒトiPS細胞から気道あるいは肺胞上皮細胞へ分化誘導し、SARS-CoV-2治療薬の薬理作用を検討した。ヒトiPS細胞から肺前駆細胞を作製して、分化マーカーであるcarboxypeptidase M（CPM）により濃縮後、さらに肺胞上皮および気道細胞へ分化誘導を行った。qPCRおよび免疫染色により肺胞上皮II型細胞あるいはクラブ細胞であることを明らかにした。また、これらの細胞はACE2及びTMPRSS2を発現しており、SARS-CoV-2により感染することを確認した。レムデシビルにより濃度依存的にウイルス量が抑制された。

以上の結果から、ヒトiPS細胞由来の肺胞上皮II型細胞やクラブ細胞は、COVID-19治療薬評価が可能な*in vitro*モデルであることが示唆された。

PAR拮抗薬はマウスにおけるLPS誘発ステロイド治療抵抗性気道炎症を改善させる

○木村 元気、石川 尚希、伊藤 菜々花、江口 由希子、小泉 優花、齊藤 みなみ、西本 裕樹、木澤 靖夫

日本大・薬

【目的】呼吸器系の基礎疾患を有する患者において、細菌やウイルス感染による急性増悪に伴うステロイド抗炎症薬に対する感受性の低下は、症状の制御を困難にする。したがって、ステロイド抗炎症薬とは異なる作用機序で症候を制御する治療薬の開発が求められている。近年、呼吸器疾患の病態形成の一部に血液凝固・線溶系が関与しており、トロンビンの受容体であるprotease-activated receptor (PAR)を介したシグナル経路が重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで本研究では、マウスにおけるLPS誘発ステロイド治療抵抗性気道炎症に対するPAR拮抗薬の効果について検討した。

【方法】雄性A/Jマウスに、LPSを1日2回3日間経鼻曝露させ、薬物を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中における全細胞数を計測後、flow cytometryにより好中球数を測定した。また、BALF中におけるCXCL1、osteopontin (OPN)及びIFN- γ 量はELISA法により測定した。

【結果及び考察】LPS曝露マウスにおいて増加したBALF中の好中球数は、PAR拮抗薬であるSCH79797及びFSLRY-NH₂によって有意に抑制された。また、BALF中のCXCL1、OPN及びIFN- γ 量の上昇においても、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の誘発において、トロンビン/PAR経路が一部関与していることが示唆された。

肝線維化責任細胞HSCのコラーゲン産生に対するharmineの作用およびその機序の解析

○大岡 央¹、山口 桃生^{1,2}、大林 彩²、山下 日菜子²、本橋 南菜実²、金子 雪子^{1,2}、木村 俊秀^{1,2}、齊藤 真也^{1,3}、石川 智久^{1,2}

¹静岡県立大・院薬、²静岡県立大・薬・薬理、³岡山理科大・獣医

【背景・目的】近年、アルコールやウイルス感染を原因としない非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の患者数が増加している。肝組織の炎症と線維化を伴うNASHが不可逆的に進行すると、最終的には肝硬変や肝癌などの重篤な疾患へと繋がる。よって、肝線維化の責任細胞である肝星細胞（HSC）の活性化機構や活性化されたHSCによるコラーゲン産生の制御機構の解明は、肝線維化治療ターゲットの探索において有益と考えられる。そこで、HSCの活性化やコラーゲン産生に作用する薬物の探索を行ったところ、二重特異性チロシンリン酸化制御キナーゼ（DYRK）阻害薬であるharmineがHSCのコラーゲン産生を抑制する可能性を示す予備検討結果を得た。Harmineは自然界に広く分布する β -カルボリンアルカロイドである。一方、harmineにより阻害されるDYRKは、ダウン症候群や糖尿病の治療ターゲットとして近年注目されているリン酸化酵素である。また、DYRKはNuclear factor of activated T-cells（NFAT）を介した経路によりコラーゲン産生に関わることが知られている。本研究では、HSCにおけるコラーゲン産生に対するharmineの作用とその機序の解明を目的とした。

【方法】実験には、ヒト由来HSC株LX-2を用いた。LX-2細胞の活性化刺激には、肝線維化に関わる代表的なサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子 β 1（TGF- β 1; 5 ng/ml）を用いた。TGF- β 1とharmine（1, 10 μ M）をLX-2細胞に処置し、COL1A1およびNFAT1の発現をwestern blot法にて解析した。さらに、HSCによるコラーゲン産生へのDYRKファミリーの関与を検証するため、DYRK1A、DYRK1B、DYRK2の各アイソフォームをsiRNAにより遺伝子ノックダウンし、real time-qPCR法にてCOL1A1の発現を解析した。

【結果・考察】TGF- β 1刺激により、LX-2細胞におけるCOL1A1発現の増大が誘発され、このCOL1A1の発現増大はharmine（10 μ M）により有意に抑制された。同様にTGF- β 1刺激により増大したNFAT1の発現をharmineは濃度依存的に抑制した。すなわち、TGF- β 1刺激によるHSCのコラーゲン産生にDYRKを介したシグナルが関わっている可能性が示された。そこで、DYRK各アイソフォームをsiRNAによりノックダウンしたLX-2細胞を用いた検討を行った。その結果、DYRK1Bをノックダウンした場合においてのみ、COL1A1発現が有意に抑制された。以上より、harmineはHSCにおけるTGF- β 1誘発コラーゲン産生を抑制する作用を有し、その作用はDYRK1Bの抑制を介することが示唆された。

細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝線維化責任細胞HSCに対する脱活性化作用の解析および肝線維化モデルマウスに対する抗線維化作用の検証

○本橋 南菜実¹、大岡 央¹、山口 桃生¹、齊藤 真也^{1,2}、石川 智久¹

¹静岡県立大・薬、²岡山理科大・獣医

【目的】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が、肝線維化の有効な治療薬はいまだない。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。これまでに当研究室では、細胞性粘菌が産生する低分子化合物である differentiation inducing factor-1(DIF-1)がマウス初代培養細胞HSCの活性化を抑制することを報告している。そこで本研究では、DIF-1による活性型HSCへの脱活性化作用およびその機序の解明、ならびにDIF-1の肝線維化モデルマウスに対する抗線維化作用の検証を目的とした。

【方法】脱活性化作用の検討には、マウス初代培養細胞HSCおよびヒト肝星細胞LX-2細胞を用いた。HSCの脱活性化は活性型の指標である α -SMAおよびI型コラーゲン $\alpha 1$ (COL1A1)の発現を免疫染色法およびwestern blotting法により検討した。C57BL/6J雄性マウスを用いて、thioacetamide(TAA)を投与し脂肪肝を伴わない肝線維化モデルマウスと、コリン欠乏メチオニン減量超高脂肪飼料(CDAHFD)を給餌させ、脂肪肝を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスを作製した。TAAの投与およびCDAHFDの給餌と同時にDIF-1の経口投与を1日2回行った。肝線維化に対するDIF-1の効果は、肝組織におけるヒドロキシプロリン含有量および線維化関連遺伝子のreal-time-PCR法により検討した。

【結果および考察】HSCの活性化により増大した α -SMAおよびCOL1A1の発現をDIF-1は濃度依存的に抑制したことから、DIF-1はHSCの活性化を抑制する作用だけでなく脱活性化させる作用を有することが示唆された。また、DIF-1はHSCの活性化により増大したSMAD3のリン酸化を濃度依存的に減少させたことより、DIF-1の脱活性化作用はSMAD3のリン酸化を介した経路であることが示唆された。さらにTAA投与肝線維化モデルマウスにおいて、DIF-1の投与により*Col1a1*の発現、ならびにヒドロキシプロリン量の減少傾向がみられた。以上のことから、DIF-1はHSCの活性化制御を介して抗線維化作用を有することが示唆された。

肉芽組織形成におけるmPGES-1/PGE₂ axisの役割の検討

○兵頭 徹也¹、天野 英樹¹、伊藤 義也¹、細野 加奈子¹、畑中 公¹、江島 耕二³、林 泉⁴、植松 智⁵、審良 静男⁶、
武田 啓²、馬嶋 正隆⁷

¹北里大・医・薬理学、²北里大・医・形成外科・美容外科学、³北里大・医・免疫学、⁴日本薬大・医療薬、⁵大阪市立大・院
医、⁶大阪大・免疫・フロンティア研セ、⁷大阪大・免疫・フロンティア研セ、⁷神奈工大・健医・臨工・病態治療研

【はじめに】 Prostaglandin E₂(PGE₂) は、膜結合型プロスタグランジン合成酵素(mPGES-1)によって生合成される。我々はスポンジ移植モデルを用いてmPGES-1/PGE₂の肉芽組織形成過程にRegulatory T cells (Tregs)の集積が関与することを報告した。今回その詳細な機序を明らかにしたので報告する。【方法】 6-8週の雄性の野生型(Wild type=WT)及びmPGES-1欠損マウス(mPGES-1KO)でウレタン製滅菌スポンジ (厚さ5mm、直径13mm、重量8.1 ± 0.3mg) を背部皮下に移植することで肉芽組織形成モデルを作成した。移植後7,14日にスポンジを摘出し、スポンジ肉芽組織の湿重量の測定を行なった。またmRNAレベルのCD31、VEGF、Foxp3、TGF-βの発現をreal time PCRまた肉芽組織周囲のFOXP3、TGF-βの蛋白レベルの発現を免疫組織化学で比較検討を行なった。肉芽形成におけるTregsの関与についてはCD25中和抗体を投与することで検討した。【結果】 スポンジ肉芽重量はWTと比較しmPGES-1KOで有意に低下を認めた(P<0.05)。またスポンジ肉芽組織のCD31、VEGF,FOXP3,TGF-βのmRNA発現はmPGES-1KOで有意に低下を認めた(P<0.05)。更にmPGES-1KOで免疫組織化学にてスポンジ肉芽組織周囲のFOXP3及びTGF-βの発現の低下を認めた(P<0.05)。WTでCD25中和抗体投与するとスポンジ肉芽重量及びスポンジ肉芽組織周囲のFOXP3,TGF-βの発現は有意に低下を認めたがmPGES-1KOでは抑制は認められなかった。【考察】 以上の結果よりmPGES-1/PGE₂ axisがTregsを集積することで血管新生及び肉芽組織形成を促進することが考えられた。