

## 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素を阻害しないD-carbidopaはH<sub>2</sub>S産生酵素cystathionine-β-synthaseを阻害することでTNBS誘起結腸痛を抑制する

○井場 祐里子<sup>1</sup>、本郷 泉侑<sup>1</sup>、坪田 真帆<sup>1</sup>、川瀬 篤史<sup>2</sup>、岡田 卓哉<sup>3</sup>、豊岡 尚樹<sup>3</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>近畿大・薬・生物薬剤、<sup>3</sup>富山大・工・生命工学

気体メディエーターのH<sub>2</sub>Sはcystathionine-γ-lyase (CSE)、cystathionine-β-synthase (CBS) または3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) によってL-cysteineから生成される。我々は、H<sub>2</sub>SがCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルの機能亢進を介して疼痛または痛覚過敏を誘起することを明らかにしている。また、結腸内腔H<sub>2</sub>SがCa<sub>v</sub>3.2依存性の結腸痛を誘起すること、butyrate誘起結腸過敏にCa<sub>v</sub>3.2の機能亢進が関与することを報告している。一方、2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 処置ラットの腸組織ではCBSによるH<sub>2</sub>S産生が亢進することが報告されている。現在、CSEと3-MSTの選択的阻害薬は利用可能であるが、選択的CBS阻害薬はなく、GABA transaminase阻害薬のaminooxyacetic acid (AOAA) などがCBS阻害薬として研究に使用されている。今回は、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) 阻害薬のbenserazideがCBSを阻害するとの報告に注目して類似薬のCBS阻害活性を評価し、AADCを阻害しないD-carbidopaがCBSを阻害することを見出だした。さらに、TNBS誘起マウス結腸痛へのCBSとCa<sub>v</sub>3.2の関与を解析し、D-carbidopaと我々が開発した新規T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬の結腸痛抑制効果を評価した。ラット腎ホモジネート中のCBS活性をH<sub>2</sub>Sの蛍光プローブ7-azido-4-methylcoumarinを用いて測定し、catecholamine関連化合物のCBS阻害活性を調べたところ、L-carbidopa = D-carbidopa > L-dopa > droxidopaであった。次に、ラット線条体ホモジネートを用いてL-dopaからのdopamine産生をLC-MS/MSにより測定してAADC活性を調べたところ、L-carbidopaはAADCを阻害したがD-carbidopaに阻害活性は見られなかった。マウス結腸内にTNBS 2 mgを投与すると、6日後、結腸伸展過敏および下腹部へのvon Frey filament刺激に対する関連痛覚過敏が認められた。このTNBS誘起結腸痛は、Ca<sub>v</sub>3.2遺伝子欠損マウスでは全く認められず、T型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬KTtp-5 10 mg/kg、AOAA 20 mg/kg、L-またはD-carbidopa 25 mg/kgの腹腔内投与により抑制された。さらに、TNBS処置マウスの結腸組織ではCBS発現量が著しく増加していた。以上より、AADC阻害活性のないD-carbidopaが選択的CBS阻害薬の開発シーズになりうるということが明らかとなった。また、TNBS誘起結腸痛にはCBS由来H<sub>2</sub>S/Ca<sub>v</sub>3.2系が関与し、D-carbidopaを含むCBS阻害薬やKTtp-5を含むT型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬が治療効果を示すことが示唆された。

## 睡眠薬によるイソフルラン麻酔の延長作用に及ぼすアルビノの影響

○山田 幸佳<sup>1</sup>、遠 正太<sup>1</sup>、佐和田 真一<sup>1</sup>、児島 菜月<sup>2</sup>、小網 真夢<sup>2</sup>、山本 凜紗<sup>2</sup>、細川 友希<sup>2</sup>、居場 嘉教<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>摂南大・院理工・生命、<sup>2</sup>摂南大・理工・生命

**【背景・目的】** これまでに、錐体・桿体を失ったマウスを用いた検討により、睡眠薬によるイソフルラン麻酔の延長作用が明暗サイクルの影響を受けることを報告している (Sugano et al., 2021)。アルビノは、先天的にメラニンを欠乏している個体であり、視覚障害を示すことが知られているが、覚醒・睡眠に及ぼすアルビノの影響はほとんど明らかにされていない。本実験では、C57BL/6Nマウスとそのアルビノ変異体であるB6-albinoマウスを用いて、睡眠薬によるイソフルラン麻酔の延長作用を比較し、別の垂系統であるC57BL/6Jマウスの結果とも比較した。

**【方法】** マウスの自発運動量は、7-8週齢時にビームセンサー式自発運動量測定装置を用いて測定した。また、9-17週齢時の明期 (ZT6) および暗期 (ZT12) に、マウスにプロチゾラム(0.75 mg/kg)またはスボレキサント(40 mg/kg)を経口投与し、投与1時間後に4%イソフルランを2分間吸入させ、麻酔ボックスから取り出して正向反射が回復するまでの時間を麻酔時間として計測した。

**【結果】** B6-albinoマウスの自発運動量は、典型的な夜行性パターンを示し、C57BL/6NマウスおよびC57BL/6Jマウスとの間に違いは認められなかった。プロチゾラムは、C57BL/6NおよびC57BL/6Jマウスでは明期と暗期の両方で、イソフルラン麻酔を有意に延長し、延長効果は暗期より明期で顕著であった。一方B6-albinoマウスでは、プロチゾラムは明期において有意な麻酔の延長作用を示さなかった。また、スボレキサントは、C57BL/6Jマウスでは明期と暗期の両方でイソフルラン麻酔を有意に延長したのに対して、C57BL/6NマウスおよびB6-albinoマウスでは明期と暗期のいずれにおいてもイソフルラン麻酔に影響を及ぼさなかった。

**【考察】** B6-albinoマウスでは、プロチゾラムによるイソフルラン麻酔の延長作用が明期で減弱しており、明暗刺激を十分に感知できていない可能性が示唆された。一方、スボレキサントによるイソフルラン麻酔の延長効果は、C57BL/6NマウスとB6-albinoマウスの両方で認められず、スボレキサントによる延長作用の有無は、C57BL/6マウスの垂系統差に起因するものと考えられた。

## 新生仔期プロスタグランジンE<sub>2</sub>投与による若年・成体期の情動性・情報処理機能と遺伝子発現に及ぼす影響

○肥田 裕丈<sup>1,2</sup>、吉田 樹生<sup>2</sup>、吉見 陽<sup>2,3</sup>、堀田 彰悟<sup>1,2</sup>、山田 清文<sup>1</sup>、尾崎 紀夫<sup>4</sup>、野田 幸裕<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・附属病院・薬剤、<sup>2</sup>名城大・薬・病態解析学 I、<sup>3</sup>名城大・総合研究所・OMICs & TRセ、<sup>4</sup>名古屋大・院医・精神疾患病態解明学

【背景】精神疾患の発症には、発達段階における周産期のウイルス感染や、出産時の低酸素脳症、周産期や幼若期の育児放棄などの環境的要因が関与していることが報告されている。我々は、発達段階における環境的要因の曝露による情動や認知行動の障害には、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) やPGE<sub>2</sub>-EP1受容体情報伝達系が関与していることを見出している。本研究では、新生仔期マウスへのPGE<sub>2</sub>の直接投与が若年期や成体期の情動性・情報処理機能と遺伝子発現に与える影響について行動学的、神経化学的および分子遺伝学的に検討した。

【方法】新生仔期（生後2～6日）にPGE<sub>2</sub>（10 mg/kg）を投与したマウスの若年期（生後35日）と成体期（生後70日）において社会行動試験（情動性）およびプレパルス抑制試験（情報処理機能）を行った。また、新生仔期PGE<sub>2</sub>投与による若年期と成体期のマウスにおける神経細胞形態とその関連タンパク質発現、および網羅的遺伝子発現の解析を行った。

【結果】新生仔期にPGE<sub>2</sub>を投与し、若年期と成体期において社会行動試験とプレパルス抑制試験を行ったところ、若年期ではなく、成体期において社会性と情報処理機能の障害が認められた。これらの行動障害は、PGE<sub>2</sub>-EP1受容体拮抗薬により緩解された。新生仔期にPGE<sub>2</sub>を投与すると、成体期において前頭前皮質のスパイン数やグルタミン酸トランスポーター発現が低下していた。一方、網羅的遺伝子発現解析において若年期の前頭前皮質では細胞骨格、成体期では恐怖反応に関連する遺伝子の発現が変化していた。

【結論】新生仔期のPGE<sub>2</sub>投与は、PGE<sub>2</sub>-EP1受容体情報伝達系を介して、成体期におけるグルタミン酸神経系の関連タンパク質の発現変化を伴う神経形態と情動性・情報処理機能を障害させることが示唆された。

統合失調症治療におけるムスカリンM<sub>4</sub>受容体の機能解析

○石崎 悠斗<sup>1</sup>、清水 佐紀<sup>1</sup>、豊嶋 友未香<sup>1,2</sup>、住吉 孝明<sup>2</sup>、三塩 沙羅<sup>1</sup>、服部 達矢<sup>1</sup>、小垂 祐貴<sup>1</sup>、大野 行弘<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪医科薬科大・薬・薬品作用解析学、<sup>2</sup>関西大院・理工・医薬品工学

【背景および目的】 アセチルコリン神経系の機能低下は、統合失調症の発症に一部関連することが報告されており、特に、ムスカリンM<sub>4</sub>受容体の精神疾患治療における役割が注目されている (Aust. N. Z. J. Psychiatry, 53, 1059-1069, 2019)。本研究では、統合失調症治療におけるM<sub>4</sub>受容体の機能を明らかにする目的で、選択的M<sub>4</sub>受容体作動薬 N-sulfonyl-7-azaindoline derivatives compound 1 (NSAD-C1, Bioorg. Med. Chem. Lett., 24, 2909-2912, 2014) の抗精神病作用、認知機能へ及ぼす影響および錐体外路系副作用について評価するとともに、臨床開発中のM<sub>1</sub>/M<sub>4</sub>受容体作動薬xanomelineの作用と比較した。

【方法】 実験にはddY系雄性マウスを用い、各種M<sub>4</sub>受容体作動薬の作用を評価した。抗精神病作用については、open-field 装置を用いてapomorphine (APO) 誘発運動亢進に対する作用を評価した。認知機能の評価は新奇物体認識試験を行い、さらに錐体外路障害であるブラジキネジア誘発作用の評価はpole-testにより評価した。

【結果】 抗精神病作用の評価では、APO誘発運動亢進に対してNSAD-C1 (0.3-3 mg/kg, s.c.) は用量依存的な抑制作用を示し、そのED<sub>50</sub>値はxanomelineの約2.3倍であった。新奇物体認識試験においては、両薬物ともに単独投与では認知機能を障害せず、scopolamineおよびMK-801誘発健忘に対して有意な改善効果を示した。さらに、副作用評価において、NSAD-C1は単独投与でブラジキネジアを誘発せず、3 mg/kg (s.c.)ではむしろhaloperidolよるブラジキネジア発現を改善した。一方、xanomelineは単独投与でブラジキネジアを誘発し、さらに高用量では筋弛緩作用を示した。

【考察】 NSAD-C1およびxanomelineはいずれも顕著な抗精神病作用に加え、認知機能障害に対する有意な改善作用を示した。さらに、NSAD-C1はxanomelineにより認められたブラジキネジアの発現や筋弛緩などの副作用を示さなかった。以上の結果より、選択的なM<sub>4</sub>受容体の活性化は統合失調症治療の新たな治療法として期待される。

## 悪性神経膠腫移植マウスとレベチラセタム投与マウスにおけるGABA<sub>A</sub>受容体抑制誘発けいれん発作感受性の検討

○富好 真沙也<sup>1</sup>、松尾 平<sup>1</sup>、小森 理絵<sup>1</sup>、中居 永一<sup>2</sup>、上羽 哲也<sup>2</sup>、伊藤 康一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大・香川薬・薬物治療、<sup>2</sup>高知大・医・脳神経外科

【目的】脳腫瘍関連てんかんにおいては脳腫瘍の治療が優先され、てんかん治療に焦点が当たる機会は世界的に見ても少ない。患者のQOLを維持し重積状態を防ぐため、てんかん発症をできる限り抑えることが望まれるが、既存のAEDでは顕著な有効性は認められていない。脳腫瘍てんかんモデル動物は、発作誘発が難しいなど実験上の問題点も多く研究が進んでいない。本研究では、脳腫瘍細胞移植後マウスとレベチラセタム投与マウスにおいてGABA<sub>A</sub>受容体抑制誘発けいれん発作発症感受性を指標に検討し比較した。

【方法】C3H/HeN雄性マウス（8～10週齢、クレア）にRSV-M mouse glioma cells (RSV-M-TS、100,000 cells/2μl)を脳定位手術で大脳皮質(左頭頂葉、)内に移植を行った。脳腫瘍移植後3～5週間後にMRI撮像し脳腫瘍移植状態を観察した。その後、前頭葉/頭頂葉に慢性脳波ビス電極を留置した。脳腫瘍移植後けいれん後のGABA<sub>A</sub>受容体抑制誘発けいれん発症閾値(感受性)を検討するため、GABA<sub>A</sub>受容体遮断薬ペンチレンテトラゾール (PTZ) の低用量(30 mg)投与後ビデオ脳波測定を行い脳波と行動の計測・観察した。また、PTZ誘発発作に対するレベチラセタム (LEV) の効果も検討した。LEVは給水瓶に5 mg/mLの濃度で溶解し14日間自由飲水後、PTZ誘発発作を検討した。

【結果・考察】未処置群、偽移植群のマウスでは、PTZ 30 mg/kg投与ではけいれん発作は出現しない。しかし、脳腫瘍マウスではミオクローヌス、間代性けいれん発作が出現した。つまり、脳腫瘍マウスでは脳内けいれん発作閾値の低下 (PTZ感受性上昇) が認められた。この結果より、脳腫瘍移植後脳腫瘍細胞増殖に伴いGABA<sub>A</sub>受容体関連発作準備状態が形成されている可能性が示唆された。またLEV投与では、脳波におけるPTZ誘発波は抑制されなかったが、実際のけいれん発作は抑制された。この結果よりLEVによって行動におけるGABA<sub>A</sub>受容体抑制誘発けいれん発作閾値が上昇したと言える。現在、LEVを脳腫瘍によりGABA<sub>A</sub>受容体抑制誘発けいれん発作閾値が低下したマウスに長期投与しその効果を検討中である。

## けいれん発現調節因子Phf24欠損による扁桃核グルタミン酸およびGABA遊離の変化

○加藤 将貴、國澤 直史、清水 佐紀、芹川 忠夫、大野 行弘

大阪医科薬科大・薬・薬品作用解析学

【背景および目的】 PHD finger protein 24 (Phf24) はG $\alpha$ i-interacting protein (GINIP) と呼ばれ、3量体Gタンパク質のG $\alpha$ iサブユニットと相互作用することで、Gi/o共役型受容体の機能を促進的に調節することが示唆されている。我々はこれまでに、自然発症性てんかんモデルNoda epileptic ratの脳内においてPhf24発現が著しく低下していること (Behav. Genet., 47, 609, 2017)、さらに、Phf24欠損ラットでは、けいれん発現の感受性が亢進していることを見出した (Behav. Brain Res., 369, 111922, 2019)。そこで本研究では、Phf24のけいれん発現調節メカニズムを明らかにするため、Phf24欠損ラットの扁桃核における神経伝達物質 (グルタミン酸およびGABA) の遊離機能変化を *in vivo* microdialysis法により評価した。

【方法】 実験には雄性Phf24欠損ラットまたはF344ラット (対照動物) を用い、麻酔下で扁桃核にガイドカニューレを留置した。回復期間の後、透析プローブを介して人工脳脊髄液を灌流し、無麻酔、無拘束下にて扁桃核の細胞外液を回収した。また、脱分極性のシナプス遊離機能を評価する目的で、高K<sup>+</sup>刺激 (50, 100 mMにて各60分間灌流) を与えた。回収したサンプル内に含まれるグルタミン酸およびGABA含量はHPLC法を用いて解析した。

【結果および考察】 Phf24欠損ラットと対照動物であるF344ラットの扁桃核において、グルタミン酸およびGABAの基礎遊離に変化は認められなかった。一方、高K<sup>+</sup>液灌流による脱分極刺激に対するグルタミン酸およびGABA遊離は、Phf24欠損によりいずれも有意に亢進された。この際、Phf24欠損による遊離亢進は、GABAに比べてグルタミン酸において顕著であり、GABA/グルタミン酸比を比較した場合、Phf24欠損ラットでは扁桃核神経の興奮-抑制バランスが興奮側に傾いていることが示唆された。以上より、Phf24は扁桃核においてグルタミン酸およびGABAの遊離を抑制的に制御しており、Phf24欠損ラットでは、扁桃核神経活動のバランスが興奮側に傾くために、けいれん感受性が亢進されると推察された。

## 尿毒素インドキシル硫酸の飲水投与が血管機能に及ぼす影響

○中川 恵輔<sup>1</sup>、戸田 成美<sup>1</sup>、小淵 修平<sup>2</sup>、田和 正志<sup>1</sup>、大喜多 守<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪医薬大・薬・病態分子薬理、<sup>2</sup>兵庫医科大・薬・薬理学分野

## 【背景・目的】

慢性腎臓病（CKD）などの腎疾患において、尿毒素インドキシル硫酸（IS）の血中濃度は腎機能低下だけでなく、血管内皮機能障害と強い相関関係を示す。また我々は、正常ラットから摘出した胸部大動脈に対するIS急性曝露が、活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオン（ $O_2^-$ ）産生を亢進し、一酸化窒素（NO）依存性血管弛緩反応を顕著に減弱させることを報告している。しかしながら、ISの長期曝露が血管内皮機能に及ぼす影響は不明であるため、IS飲水投与の影響を検討した。

## 【方法】

0%（蒸留水）および0.1%（w/v）IS水溶液を雄性Sprague-Dawleyラットに4週間自由飲水させた。0週（IS飲水開始前）、2週および4週目に24時間採尿と採血を行い、血漿および尿中IS濃度の測定並びに腎機能マーカー（クレアチニン、尿蛋白）の測定を行った。飲水開始4週後に剖検を実施し、得られた腎臓は病理組織学的検討に供し、摘出した胸部大動脈はマグヌス法（等尺性張力変化）によりacetylcholine（ACh）およびNO供与体sodium nitroprusside（SNP）に対する血管反応性を評価した。また、胸部大動脈の一部は、ルシゲニン法による $O_2^-$ 産生量の測定にも使用した。

## 【結果】

IS飲水投与後の血漿IS濃度は経時的に上昇し、特に飲水開始4週後はCKD患者やCKDモデル動物と同程度の濃度を示した。しかしながら、各時点における血漿クレアチニンおよび尿蛋白排泄量は2群間で大きな差はみられず、ISを与えたラットにおいて腎組織障害（尿細管障害や腎線維化）も認められなかった。一方、胸部大動脈のAChに対する血管反応性は、IS投与により有意に悪化し、SNP誘発血管弛緩反応も減弱傾向を示した。またIS投与群の胸部大動脈における $O_2^-$ 産生量は増大傾向を示した。

## 【考察】

IS飲水投与は、腎機能および腎組織変化に対しては影響を及ぼさず、NOを介する血管弛緩反応を減弱させることが示された。すなわち、ISは生体内において直接的な血管毒性を有する可能性が示唆された。

## フルオロキノロン系抗菌薬による血管毒性の病態解明

○宮田 晃志<sup>1</sup>、石澤 有紀<sup>2</sup>、近藤 正輝<sup>1,3</sup>、辻中 海斗<sup>1,3</sup>、大峯 航平<sup>1</sup>、西 穂香<sup>1</sup>、糸数 柗人<sup>1</sup>、新村 貴博<sup>4</sup>、相澤 風花<sup>1,3</sup>、濱野 裕章<sup>4,5</sup>、八木 健太<sup>4</sup>、座間味 義人<sup>1,5</sup>、合田 光寛<sup>1,3</sup>、石澤 啓介<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理学分野、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学分野、<sup>3</sup>徳島大学病院・薬剤部、<sup>4</sup>徳島大・総合臨床研究センター、<sup>5</sup>岡山大学病院・薬剤部

【背景】フルオロキノロン系抗菌薬は臨床で最も使用される抗菌薬の1つであり、尿路感染症や肺炎、腸管感染症など幅広い疾患に対して使用されている。その使用に伴い、時として偽膜性大腸炎やQT延長、腱断裂など特徴的な有害事象が現れることがある。発症率はまれであるものの、重篤な有害事象として大動脈瘤、大動脈解離などの血管毒性が報告されている。しかしながらフルオロキノロン系抗菌薬による血管疾患の病態形成機序や疫学的知見は現在まで不明である。薬物有害事象の病態形成機序やリスク因子を解明することは、抗菌薬による有害事象の発症予防において重要な知見であり、原疾患である感染症に対する治療効果の最大化、抗菌薬適正使用の点などから不可欠である。そこで本研究ではフルオロキノロン系抗菌薬に由来する大動脈瘤・解離等の血管毒性病態機序の検討および、大規模医療情報データベースを活用した疫学的解析を行った。

【方法】薬物有害事象報告を収集したWHOグローバル症例安全性報告データベースであるVigiBaseを用い、実臨床におけるフルオロキノロン系抗菌薬と各種血管疾患との関連を検証した。さらに血管毒性におけるフルオロキノロン系抗菌薬の主たる標的を明らかにするため細胞実験を行った。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト大動脈平滑筋細胞 (HASMC) を用いて、フルオロキノロン系抗菌薬の一種であるレボフロキサシン刺激による血管毒性に関連する遺伝子の発現変動を検討した。また、保険組合から収集した診療情報で構成された1000万人以上のデータ数を誇るJMDC Claims Databaseを活用し、フルオロキノロン系抗菌薬に関連する大動脈瘤・解離発症のリスクとなる背景因子を解析した。

【結果・考察】VigiBase解析から、フルオロキノロン系抗菌薬の使用に関連した血管毒性として大動脈瘤・解離の副作用シグナルが検出された。細胞実験では、レボフロキサシン刺激により、HUVECにおける炎症細胞を誘発するICAM、VCAMの遺伝子発現増加、およびHASMCにおける細胞外基質分解酵素MMP2、MMP3の遺伝子発現上昇が確認された。このことからフルオロキノロン系抗菌薬による血管毒性には血管内皮障害と血管平滑筋障害が協同して生じる可能性が示された。JMDC Claims Databaseの解析から、フルオロキノロン系抗菌薬使用者のうち年齢・性別・既往歴などの背景因子が血管毒性の薬物有害事象に与える影響が明らかになった。



## ドキシソルビシン誘導性心毒性に対するオウゴン成分オウゴニンの効果検討

○船本 雅文<sup>1</sup>、今西 正樹<sup>2</sup>、土屋 浩一郎<sup>2</sup>、池田 康将<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学分野、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・医薬品機能生化学分野

【目的】ドキシソルビシンは、広範囲の腫瘍に対して効果的であるアントラサイクリン系薬である。このドキシソルビシンは、用量依存的に心毒性を示し、心不全を発症させる。この心毒性による心不全は、がん患者における治療継続の制限だけでなく生命予後やQOLを左右する大きな要因である。近年、癌など様々な疾患に対して漢方薬の臨床応用が進められている。この漢方薬は複数の生薬を組み合わせたものであり、生薬のほとんどが植物由来である。これら生薬は、ポリフェノールやフラボノイドなどの生薬由来の化合物を含有している。この生薬由来の化合物には、抗酸化作用、抗炎症作用などの生理作用を示すものが数多くあり、アポトーシスを抑制する天然化合物についても幾つか報告がある。そこで本研究の目的は、ドキシソルビシンによる心毒性を抑制する漢方薬などを探索することである。

【方法&結果】ラット心臓由来H9c2細胞に漢方薬ライブラリーを用いて、漢方薬・生薬を100  $\mu$ g/ml、生薬由来化合物をそれぞれ10  $\mu$ Mで処理した。2h後に0.5  $\mu$ Mのドキシソルビシンで処理した。24時間培養後、MTS assayにより細胞生存率を評価した。MTS assayの結果、生薬オウゴンに含まれるバイカリン並びにオウゴニンはドキシソルビシン処理による細胞生存率を改善した。次に、ドキシソルビシンによる細胞死の改善を示した化合物を用いてウエスタンブロッティング法によりアポトーシス関連タンパク質について検討した。ウエスタンブロッティング法の結果、バイカリン並びにオウゴニンはドキシソルビシンによるCleaved Caspase-3の増加を抑制した。また、ドキシソルビシンによるp38、ERK1/2、JNKのリン酸化もバイカリン並びにオウゴニンは抑制した。最後に、細胞死の改善を示した化合物を含む生薬を用いてMTS assayによりドキシソルビシンによる細胞死への影響を評価した。MTS assayを行った結果、生薬オウゴンはドキシソルビシンによる細胞死が抑制された。

【考察】本研究より、オウゴニンがドキシソルビシン誘導性の細胞傷害を抑制することが示された。オウゴニンがアポトーシスに関連する複数の経路に対して影響を与えたことから、ドキシソルビシンによる心毒性を抑制する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

## 免疫チェックポイント阻害剤関連心筋炎の解析に適した実験的病態モデルの開発

○運天 拓人<sup>1</sup>、濱野 裕章<sup>2,3</sup>、新村 貴博<sup>2</sup>、内田 和志<sup>1</sup>、友近 七海<sup>1</sup>、宮田 晃志<sup>1</sup>、石田 俊介<sup>4</sup>、合田 光寛<sup>1,4</sup>、八木 健太<sup>2</sup>、相澤 風花<sup>4</sup>、石澤 有紀<sup>5</sup>、座間味 義人<sup>1,3</sup>、石澤 啓介<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理学分野、<sup>2</sup>徳島大学総合臨床研究センター、<sup>3</sup>岡山大学病院薬剤部、<sup>4</sup>徳島大学病院薬剤部、<sup>5</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学分野

【背景】免疫チェックポイント阻害剤（Immune Checkpoint Inhibitor: ICI）を使用した患者の約1割は治療中断を伴う重度の免疫関連有害事象を引き起こす。その中でも心筋炎は非常に高い死亡率を示すため、予防・治療薬の開発が急務である。新薬の開発には、動物モデルが不可欠であるが、既存のICI関連心筋炎モデルPD-1-KO-N10は短命の自然発症モデルであるため、解析可能な期間が短く、予防薬・治療薬の投与及び有効性の評価をする時期の決定が困難であった。一方、PD-1-KO-N12は同様のモデルでありながら、生存期間が長いといった特徴があるが、心筋炎の発症率が低いという問題点があった。本研究ではPD-1-KO-N12に心筋炎誘発剤を用いて実験的心筋炎発症モデルを作成し、ヒトにおけるICI関連心筋炎の病態を模倣できているか評価した。

【方法】BALB/cの野生型およびPD-1KOマウス（PD-1-KO-N12、雄性、8週齢）に心筋ミオシンペプチドと百日咳毒素を投与し、投与21日後に解剖して心筋炎の発症の有無を評価した。心筋組織中の免疫細胞浸潤をHE染色により評価し、心筋繊維化はマッソントリクローム染色により評価した。また、ヒトにおける浸潤リンパ球のサブセットとして確認されているCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>細胞の関与を蛍光免疫染色により検討した。さらに炎症、繊維化、心筋炎マーカーに関連する遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。

【結果】ミオシンを投与したPD-1KOマウスにおいて、ミオシン非投与PD-1KOマウスと比較して、心筋組織への免疫細胞浸潤の増加及び心筋繊維化の進行が確認された。蛍光免疫染色では、心筋組織内へのCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>細胞の浸潤が確認された。さらにミオシン投与により、心臓における炎症性サイトカインや線維化マーカーが増加する傾向が見られた。

【考察】PD-1-KO-N12に心筋炎誘発剤ミオシンを投与することで、ICI関連心筋炎の実験モデルとして、簡便かつ再現性のある心筋炎を発症させることができるモデルを作製することができた。今後、本モデルを用いたICI関連心筋炎の新規予防薬・治療薬の開発が期待される。

## Histamine induced high mobility group box-1 release from vascular endothelial cells through H<sub>1</sub> receptor

○Gao Shangze、劉克約、王登莉、和氣秀徳、西堀正洋

岡山大・院医歯薬・薬理学

[Background] Systemic allergic reaction is characterized by vasodilation and vascular leakage, which causes a rapid, precipitous and sustained decrease in arterial blood pressure with a concomitant decrease of cardiac output. Histamine is a major mediator released by mast cells in allergic inflammation and response. It causes a cascade of inflammation and strongly increases vascular permeability within minutes through its four G-protein-coupled receptors (GPCRs) on endothelial cells. High mobility group box-1 (HMGB1), a nonhistone chromatin-binding nuclear protein, can be actively secreted into the extracellular space by endothelial cells. HMGB1 has been reported to exert pro-inflammatory effects on endothelial cells and to increase vascular endothelial permeability. However, the relationship between histamine and HMGB1-mediated signaling in vascular endothelial cells and the role of HMGB1 in anaphylactic-induced hypotension have never been studied.

[Methods & Results] EA.hy 926 cells were treated with different concentrations of histamine for the indicated periods. The results showed that histamine induced HMGB1 translocation and release from the endothelial cells in a concentration- and time-dependent manner. These effects of histamine were concentration-dependently inhibited by  $\alpha$ -chlorpheniramine, a specific H<sub>1</sub> receptor antagonist, but not by H<sub>2</sub> or H<sub>3/4</sub> receptor antagonists. Moreover, an H<sub>1</sub>-specific agonist, 2-pyridylethylamine, mimicked the effects of histamine, whereas an H<sub>2</sub>-receptor agonist, 4-methylhistamine, did not. Adrenaline and noradrenaline, which are commonly used in the clinical treatment of anaphylactic shock, also inhibited the histamine-induced HMGB1 translocation in endothelial cells. We therefore established a rat model of allergic shock by i.v. injection of compound 48/80, a potent histamine-releasing agent. The plasma HMGB1 levels in compound 48/80-injected rats were higher than those in controls. Moreover, the treatment with anti-HMGB1 antibody successfully facilitated the recovery from compound 48/80-induced hypotension.

[Conclusion] Histamine induces HMGB1 release from vascular endothelial cells solely through H<sub>1</sub> receptor stimulation. Anti-HMGB1 therapy may provide a novel treatment for life-threatening systemic anaphylaxis.

## ミノサイクリンは腫瘍切除マウスで認められるうつ様行動および海馬ミクログリアの形態変化を改善する

○尾中 勇祐<sup>1</sup>、山口 太郎<sup>1</sup>、新谷 紀人<sup>2,3</sup>、橋本 均<sup>3,4,5,6,7</sup>、米山 雅紀<sup>1</sup>

<sup>1</sup>摂南大・薬、<sup>2</sup>和歌山県立医科大・薬・薬品作用学、<sup>3</sup>大阪大・院薬・神経薬理学、<sup>4</sup>大阪大・院連合小児発達、<sup>5</sup>大阪大・データビリティフロンティア機構、<sup>6</sup>大阪大・先導的学際研究機構、<sup>7</sup>大阪大・院医・分子医薬

【背景・目的】がん患者で認められる抑うつ症状などの情動機能障害は、治療後も長期間持続することがあり、生活の質の低下につながることで問題となっている。これまでに、我々は、がん細胞の接種後に形成される腫瘍を切除したマウスにおいて、血中サイトカインの上昇が正常レベルまで戻るものの、社会性の低下が持続して認められることから、がん治療後の精神機能障害のモデル動物として、腫瘍切除マウスが有用である可能性を見出してきた。また、腫瘍切除マウスの海馬において、ミクログリアの突起が退縮することを明らかにしている。一方で、腫瘍切除マウスで認められる海馬ミクログリアの形態変化が社会性の低下に関与するかどうかは不明である。そこで、本研究では、ミクログリアの活性化抑制薬であるミノサイクリンが、腫瘍切除マウスの海馬ミクログリアの形態変化および社会性の低下に与える影響を評価した。

【方法】8週齢のBALB/c系雄性マウスの腹部に、大腸がん細胞であるcolon 26 ( $1 \times 10^7$  cells/mL)を皮下投与した。Colon 26接種後3日目に形成された腫瘍を麻酔下にて外科的に切除した。ミノサイクリンは、70 ug/mLの濃度で水道水に溶解し、腫瘍切除後から14日間自由摂取させた。情動機能の評価として、腫瘍切除後4、あるいは14日目に社会性行動試験を行った。行動試験後は灌流固定を行い、ミクログリアマーカーであるIba1の免疫染色により、海馬ミクログリアの形態を評価した。

【結果と考察】薬物非投与のマウスでは、腫瘍切除後4、あるいは14日目に、社会性の低下と海馬ミクログリアの突起退縮が認められた。一方で、腫瘍切除マウスの海馬ミクログリアの数や細胞体面積の変化は認められなかった。また、ミノサイクリンは、腫瘍切除マウスで認められる社会性の低下、および海馬ミクログリアの突起退縮を有意に抑制した。以上の結果から、腫瘍切除マウスの海馬ミクログリアの形態変化には、ミクログリアの何らかの機能変化が伴う可能性、および腫瘍切除マウスにおける海馬ミクログリアの機能変化がうつ様行動の発現に関与する可能性が示唆された。

## 反復社会敗北ストレス負荷後の海馬におけるグリア細胞の発現変化

○中本 賀寿夫、徳山 尚吾

神戸学院大・薬・臨床薬学

【目的】反復社会敗北 (SD) ストレスを負荷したマウスは、社会性行動試験において、ストレス脆弱性群とストレス抵抗性群の異なる 2 つの社会性行動パターンを示すことが報告されている。これはストレスに対する個体間の感受性の違いが、社会性行動パターンを変化させる要因となることが示唆されているが、その詳細は不明である。

海馬はストレス応答の調節を担う重要な領域として知られているが、一方ストレスに対して脆弱性を示す領域でもある。事実、うつ病や心的外傷ストレス症候群患者の海馬容積は減少しているとの報告がある。そこで、本研究では SD ストレスマウスを用いて、ストレスに対する感受性の変化によって生じる社会性行動の変化が、海馬グリア細胞の発現様式に与える影響について検討を行った。

【方法】社会敗北ストレスは、C57BL/6J 雄性マウス (8 週齢) に攻撃性の強い ICR マウスを 1 日 10 分間暴露させ、直接攻撃を与えた。その後、同ゲージに透明のアクリル板を設置し、お互いが見える状況下で間接的なストレスを翌日まで与え、これを 10 日間繰り返して行った。社会性行動の評価には、社会性相互作用 (SI) 試験を用いた。SI ratio は、target 存在下のインターアクション滞在時間を non target 時のインターアクション滞在時間で除した値で表した。SI $\leq$ 1.0 をストレス脆弱性群 (SD-S) と SI $>$ 1.0 をストレス抵抗性群 (SD-R) として示した。Real time PCR 解析を用いて海馬領域におけるグリア細胞関連遺伝子の発現変化を解析した。

【結果・考察】海馬における GFAP mRNA の発現量は、いずれの群においても何ら変化は認められなかった。一方、CD68 mRNA および P2ry12 mRNA の発現量は Control 群と比較して SD-S 群で有意に減少した。Cx3cr1 mRNA の発現量は、Control 群と比較して SD-S 群および SD-R 群いずれも有意に減少した。

【まとめ】本研究結果は、ストレス脆弱性群およびストレス抵抗性群間においてミクログリア関連遺伝子の発現パターンに差が認められることを明らかにした。このミクログリアの発現様式の違いが社会性行動に影響を与えている可能性が考えられる。

## 妊娠期の低酸素曝露が胎仔脳に与える影響について

○徳留 健太郎<sup>1</sup>、植木 正明<sup>1,2</sup>、中村 敦輝<sup>1</sup>、本間 拓二郎<sup>1</sup>、松永 慎司<sup>1</sup>、富田 修平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪公立大学・院医・分子病態薬理、<sup>2</sup>西脇市立西脇病院・麻酔科

**【背景・目的】**母胎環境の異常は、出生児の将来罹患しうる疾患を運命づける。例えば、妊娠期における胎児の低酸素状態は、精神発達障害の発症要因の1つとして考えられている。我々は、妊娠動物への低酸素負荷が生まれてきた仔の社会性障害や学習機能障害を引き起こすことを以前より報告している。そこで、本研究では、妊娠期の低酸素負荷が胎仔脳に与える影響について評価を加えた。

**【方法】**実験には、妊娠したF344ラットを使用した。妊娠ラットを低酸素チャンバー内で24時間飼育した。その後、妊娠動物より胎仔を摘出し、これらの胎仔脳より得られた冠状切片を用いた免疫染色法により、細胞増殖能および分化能について評価した。加えて、胎仔脳における神経およびアストログリア新生に関連する遺伝子発現パターンをqPCRにより評価した。

**【結果】**始めに、胎仔脳を用いた免疫染色では、神経幹細胞および一部の神経前駆細胞に発現するとされているSox2<sup>+</sup>細胞の増殖能について評価した結果、胎仔新皮質ではSox2<sup>+</sup>細胞と細胞増殖能のマーカーであるKi67との共局在率は妊娠期低酸素負荷により有意な上昇を示した。また、神経幹細胞分化の指標である非等分裂について、Sox2および神経前駆細胞マーカーであるTbr2との蛍光二重免疫染色により評価した。その結果、神経幹細胞の割合は対照群と比較して有意な上昇を示した。さらに、遺伝子発現解析では、低酸素曝露直後の胎仔脳ではアストログリア関連遺伝子および興奮性神経への運命づけに関わる遺伝子の有意な発現低下を示した。

**【結語】**妊娠期の低酸素曝露は胎仔脳内において神経幹細胞の増殖を促進し、神経幹細胞の神経あるいはアストロサイトへの分化に影響を与えることが示唆された。

非ステロイド性抗炎症薬Flurbiprofenは、ケミカルシャペロン、分子シャペロン誘導剤として働き、セロトニントランスポーターおよびそのミスフォールド変異体の機能を制御する

○酒井 規雄、平川 明樹、田口 慧、村川 青矢、浅野 昌也、野口 颯真、吉川 慧、原田 佳奈、秀 和泉、田中 茂

広島大・大学院医系科学研究科・神経薬理学

【背景と目的】 セロトニントランスポーター (SERT) の機能は膜輸送によって調節される。我々は、小胞体 (ER) ストレスの緩和剤候補としてSERTの膜輸送を促進する薬物を検索し、その中でもケミカルシャペロン活性を持つ薬物に注目してきた。非ステロイド性抗炎症薬であるFlurbiprofenは、ケミカルシャペロン活性を示すことが報告されている。そこで、Flurbiprofenが膜輸送を介したSERTの機能調節に果たす役割について検討した。

【方法】 野生型 (WT) SERT、またはミスフォールドタンパク質であるSERTのC末端欠失変異体 (SERT $\Delta$ CT) を一過性に発現させたCOS-7細胞を使用した。SERTのセロトニン取り込み活性、タンパク発現、糖鎖修飾に対するFlurbiprofenの効果を、蛍光基質とトリチウムセロトニンの取り込み測定、western blotting法により検討した。

【結果と考察】 WT SERT発現細胞をFlurbiprofen(>0.5 mM)24時間処置すると、不完全糖鎖修飾SERTの発現が減少し、完全糖鎖修飾SERTの発現が増加した。さらに、セロトニンの取り込みも亢進した。これらの結果から、Flurbiprofenは、SERT膜輸送を促進することにより、その機能を調節することが示唆された。Flurbiprofenの鏡像異性体を用いた検討により、FlurbiprofenのSERTに対するこれらの効果は、シクロオキシゲナーゼ阻害を介するものではないことが示された。SERT $\Delta$ CT 発現細胞に対して、Flurbiprofenは SERT $\Delta$ CT のタンパク質発現と取り込み活性を低下させ、SERT $\Delta$ CT 凝集体の形成を阻害した。ERストレスマーカーである分子シャペロンGRP78/BiP のレベル指標にして、Flurbiprofenが SERT $\Delta$ CT 誘発性ERストレスを改善できるかどうかを検討した。興味深いことに、Flurbiprofenは ER ストレス条件下でのみ GRP78/BiP の発現を誘導し、定常条件下では誘導しないことがわかった。これらの結果から、フルルビプロフェンは、ケミカルシャペロンとしての機能に加えて、分子シャペロンの誘導剤としても機能している可能性が示唆された。

## 脊髄ミクログリアの性差に及ぼすアンドロゲンの影響

○木口 倫一<sup>1</sup>、波多野 裕<sup>2</sup>、雑賀 史浩<sup>1</sup>、日野 信次朗<sup>3</sup>、鈴木 堅太郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>和歌山県医大・薬・生体機能解析、<sup>2</sup>山梨大・生命環境・器官形成ダイナミクス、<sup>3</sup>熊本大・発生医研・細胞医

病的な痛みの分子基盤は脊髄グリア細胞と密接な関わりがあると考えられている。特に活性化ミクログリアは痛みを増悪させると考えられているが、その役割には性差があることを示す報告が近年増加している。本研究では神経障害性疼痛モデルマウスを用い、ミクログリアの性差に及ぼす男性ホルモン（アンドロゲン）の影響を検討した。

坐骨神経傷害モデルマウスの脊髄後角において、雌雄ともにミクログリアの形態的活性化が認められ、またミクログリアマーカーや炎症性因子の発現も顕著に増加していた。ミクログリア枯渇薬であるPLX3397を含む特殊飼料を坐骨神経傷害モデルマウスに与えると、雄では機械的アロディニアが抑制されたが、雌ではそのような抑制効果が認められなかった。またPLX3397によるミクログリアの減少の程度には性差があり、雄と比較して雌では弱いことが示された。このようなミクログリアの性差に及ぼすアンドロゲンの関与を検討するため、精巣を摘出した雄マウスを用いて同様の検討を行ったところ、PLX3397による抗アロディニア効果が消失した。健常マウスにコロニー刺激因子1（CSF1）を脊髄くも膜下腔内投与すると、雄特異的に機械的アロディニアが惹起されるが、精巣摘出マウスではCSF1のアロディニア誘発効果が認められなかった。

上記の結果より、アロディニアに関与するミクログリアの性質は雌雄で異なっており、その差異が痛みの調節機構に大きく関わっていると考えられた。またそれらの性差は、アンドロゲンシグナルによって形成されている可能性が示唆された。現在、アンドロゲンの標的細胞ならびにその下流因子の同定を行っている。



てんかん原性初期のマウス海馬におけるレベチラセタム新規ターゲット*Fos/1*の挙動

○小森 理絵<sup>1</sup>、松尾 平<sup>1</sup>、石原 康宏<sup>2</sup>、伊藤 康一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大・香川薬・薬物治療、<sup>2</sup>広島大・院統合生命科学・生体機能化学

我々は、脳損傷（脳卒中、頭部外傷、アルツハイマー型認知症等）をきっかけに発症する慢性脳疾患の一つ「症候性てんかん」の発症予防の可能性を探っている。これまでの研究から、脳損傷後の潜伏期（てんかん原性）において脳内炎症、血液脳関門透過性亢進、脳浮腫等の脳内変化が進行すること、新規抗てんかん薬レベチラセタム（LEV）投与によりこれら変化が抑制されることを明らかにした。また、マウスミクログリアBV-2細胞を用いた実験より、LEVの新規ターゲットの一つとしてAP-1転写因子*Fos/1* (*Fra1*) を同定し、LEVがLPS刺激後に起こる*Fos/1*発現誘導を阻害することで、ミクログリアの活性化、及び炎症反応を抑制することを示した。

本研究では、ピロカルピン誘発重積けいれん（PILO-SE）モデルマウスを作製し、*in vivo*におけるLEVと*Fos/1*の関係について解析した。まず、PILO-SEマウスの脳内変化を把握するため、Cap Analysis of Gene Expression（CAGE）を用いて海馬における遺伝子発現変化を非SE誘発群とSE誘発群（SE 6時間、2日後）で比較した。SE誘発群の海馬では、炎症反応に関わるサイトカイン/ケモカイン、血管新生関連遺伝子等の発現上昇がみられ、これらが盛大に変化することで脳内炎症や脳浮腫の進行が起こることが示された。同時に、*Fos/1*発現も誘導されること、及びこれらの誘導がLEV投与により抑制されることを示した。次に、*Fos/1*発現細胞を同定するため、FACSAria IIを用いて海馬ミクログリア、アストロサイト、神経細胞、血管内皮細胞を分取し、それぞれの細胞集団における*Fos/1*発現を解析した。SE 2日後に発現誘導される海馬*Fos/1*は、ミクログリアにはほとんど認められず、大部分がアストロサイトに局在していた。また、有意差はなかったものの、LEV投与によるアストロサイト*Fos/1*の抑制傾向がみられたことから、海馬*Fos/1*はアストロサイト活性化を介して炎症反応を制御している可能性が示唆された。

症候性てんかん予防は、超高齢社会における大きな課題の一つである。効果的な予防法確立を目指し、LEVの*Fos/1*誘導阻害と炎症抑制の関連性を解析していく予定である。

## 時計遺伝子発現量変化に着目した抗がん剤投与による不眠発症メカニズムの解明

○白水 翔也<sup>1</sup>、牛尾 聡一郎<sup>1</sup>、江角 悟<sup>1</sup>、濱野 裕章<sup>1</sup>、北村 佳久<sup>2</sup>、座間味 義人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大学病院・薬剤部、<sup>2</sup>就実大・薬・薬物治療学

【背景・目的】不眠をはじめとする睡眠障害は、がん患者の2人に1人が経験する合併症である。睡眠不足は免疫機能低下による感染症のリスクが高く、抗がん剤治療継続が困難になるケースも存在することから臨床上大きな問題となっている。がん患者が経験する不眠は、主にがんによる痛みや予後に対する不安などが原因であり、睡眠薬の服用により改善すると考えられてきた。しかし、睡眠薬服用によっても十分な睡眠改善効果を認めない症例も多く存在することから、痛みによる物理的要因や不安による心理的要因とは異なる不眠発症メカニズムが存在することが示唆されている。睡眠は、日内変動を司る「時計遺伝子」と呼ばれる遺伝子群によって制御されており、一部の抗がん剤が「時計遺伝子」の発現を変調させることが報告されている。しかしながら、抗がん剤投与により不眠が引き起こされる詳細な「時計遺伝子」変調メカニズムは不明である。そこで、本研究では抗がん剤投与による「時計遺伝子」発現量変化に着目し、不眠発症に寄与する「時計遺伝子」の同定を目的とした。

【方法・結果】神経細胞のモデル細胞であるPC12細胞に対して、Serum shock法を用いて「時計遺伝子」の発現を同調させ、以下の実験に使用した。様々ながん種の化学療法で使用される抗がん剤パクリタキセルをPC12細胞に曝露し、「時計遺伝子」として知られている *Clock*等のmRNA量をreal-time RT-PCR法により測定した。その結果、*Clock*mRNAの発現変容が確認された。次に、ICR系雄性マウスの尾静脈内にパクリタキセルを反復投与（6mg/kg, i.v.）して不眠モデルマウスを作製し、以下の実験に使用した。不眠モデルマウスより大脳皮質等をサンプリングし、*Clock*等のmRNA量をreal-time RT-PCR法により測定した。その結果、正常マウスと比較して不眠モデルマウスにおいて有意に*Clock*mRNA発現量の変化が認められた。

【考察】パクリタキセルによる不眠発症のメカニズムには*Clock*が関与していることが示唆された。

## A Prototype of the Microsensing System for Real-time Drug Monitoring in the Skin of Live Animal with Diamond Electrode

○Ahmad Norzahirah Binti<sup>1</sup>、澤村 晴志朗<sup>1</sup>、緒方 元気<sup>2</sup>、栄長 泰明<sup>2</sup>、日比野 浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・統合薬理学、<sup>2</sup>慶應義塾大・理工・化学

Monitoring of plasma drug concentrations is necessary for the efficacy and safety of therapeutic medicines. Nonetheless, repetitive collection of whole blood followed by analysis of plasma samples with standard methods delays representation of crucial results to clinicians and timely control of drug administration to patients. Skin is an easily accessible organ; a portion of systemically circulating drug molecules is diffused to the dermal interstitial fluid through capillaries. Therefore, the compound's concentrations in the fluid could likely reflect the plasma pharmacokinetics. To approach such local and narrow dermal space in situ, in this study we constructed a microsensing system for real-time drug detection with a needle-type boron-doped diamond (BDD) electrode, a state-of-the-art electrochemical material that detects chemical compounds by redox reaction. The sensor with a small diameter of 20  $\mu\text{m}$ , is minimally invasive and allows passage into the otherwise inaccessible interface. As a test drug we selected doxorubicin, which is widely used for oncotherapy but can induce cardiotoxicity. In an in vitro experiment with a BDD microsensor, doxorubicin elicited a prominent reductive current in response to applied negative potential. The current was minimally disturbed by addition of glucose, uric acid, ascorbic acid, or fatty acids, each of which is abundantly present in the dermal interstitial fluids. Calibration curve showed a linear relation in the therapeutic window and determined the limit of detection as  $\sim\text{nM}$ . Finally, the BDD microsensor was embedded in the skin and the tip was placed within the dermis layer in anesthetized live hairless rats; after doxorubicin was intravenously administered, the local pharmacokinetics was continuously tracked for  $>1$  hour with the  $C_{\text{max}}$  and  $T_{\text{max}}$   $3.06 \pm 1.40$  nM and  $33.57 \pm 20.56$  mins, respectively ( $n = 7$ ). By combining a suitable formula that can link the local measurements to plasma data, this advanced microsensing system subjected to the skin may be applicable to the development of a real-time monitoring method for systemic drug concentrations.

## ヒト微小血管内皮細胞の組織因子発現と血液凝固反応活性化機構の解明

○國枝 拓真<sup>1</sup>、柳瀬 雄輝<sup>1</sup>、松原 大樹<sup>2</sup>、秀 道広<sup>2,3</sup>、小澤 光一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医・治療薬効学、<sup>2</sup>広島大・院医・皮膚科学、<sup>3</sup>広島市民病院

(背景・目的)

慢性特発性蕁麻疹 (CSU) は明らかな誘因が無く、6週間以上ほぼ毎日膨疹の出現と消失を繰り返す疾患である。膨疹形成機序として、皮膚肥満細胞や好塩基球から放出されるヒスタミンが直接的な原因になっていると考えられているが、その発症機構には不明な点が多く残されている。これまで我々は、外因系血液凝固反応と慢性蕁麻疹の病態に深い関係があることを示してきた。例えば、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は、CSUの増悪因子であるヒスタミン、VEGF、TNF $\alpha$ やLPS等で同時に刺激すると、細胞膜上の組織因子 (TF) が高発現し、外因系血液凝固反応を活性化すること、また、産生された活性化血液凝固因子 (FXa、FIIaなど) は血管内皮細胞上のプロテアーゼ受容体、PAR-1、を介して血管透過性を亢進し、膨疹形成に寄与する可能性を示してきた。しかし実際の膨疹形成は真皮内の微小血管で起こると考えられる。そこで本研究では、CSU増悪因子であるヒスタミンやLPSがヒト微小血管内皮細胞のTF発現と、その後の外因系血液凝固反応の活性化を引き起こすか検討した。

(方法)

ヒト正常微小血管内皮細胞として、Human Microvascular Endothelial Cells (HMVEC) を使用した。TFのmRNA、細胞内タンパクと細胞膜タンパク発現は、それぞれqPCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリで検出した。また、TF発現細胞の外因系凝固反応駆動能はACTICHROME® TF kitで測定した。

(結果)

HMVECをヒスタミンとLPS等のCSU増悪因子で同時に刺激すると、HUVECと同様に、相乗的なTF発現がmRNA、タンパクレベルで検出された。さらに相乗的に発現したTFは外因系凝固反応を亢進して、少なくとも活性化凝固因子であるFXaを産生することが明らかとなった。

(考察)

本研究では、正常ヒト微小血管においても、刺激によりTFの相乗的な発現と外因系凝固反応の活性化が起こることを示した。そのため外因系凝固反応により産生された活性化凝固因子は微小血管に作用して、局所的な血管透過性亢進と膨疹形成に寄与していると考えられる。本研究成果は、未だほとんど解明されていない複雑なCSU病態の一端を解明し新しい治療法の開発につながると考えられる。

## Prader-Willi syndrome 患者由来のiPS 細胞を用いた脂肪分化

○岸村 うらら、原田 真希、添田 修平、谷浦 秀夫

立命館大・薬・薬学科 神経化学研究室

**【目的】**

Prader-Willi syndrome(PWS)は小児の先天性の稀少疾患であり、第15番染色体のPWS責任領域(15q11-q13)の父性発現遺伝子の欠損によって、低身長、肥満、知的障害、筋緊張低下等の様々な症状を呈する。PWS患者では過食による肥満がみられるが、脂肪細胞単位の異常の有無は不明である。そこで、本研究ではPWS患者由来のiPS (iPWS)細胞を用いて脂肪細胞への分化過程、脂肪滴蓄積に着目し、健常者iPS (Nips) 細胞由来の脂肪細胞との相違点を明らかにすることを目的とした。

**【方法】**

Nips細胞及びiPWS細胞をembryoid body(EB:胚様体)経由で脂肪細胞に分化させた。その際、光学顕微鏡を用いて各分化過程における細胞の分化の度合いを観察した。その後分化中の細胞を経時的に採取し(EB接着後、脂肪分化を開始した15、21、27日目の各点)、RT-リアルタイムPCRを用いて定量した。さらにOil Red Oで染色し脂肪滴を観察した。

**【結果】**

RT-リアルタイムPCRで脂肪細胞マーカーPPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、ADIPOQ、aP2、その他脂肪細胞の機能に関連する遺伝子の発現を解析した。脂肪細胞の成熟初期に発現が上昇するC/EBP $\alpha$ 及びPPAR $\gamma$ のmRNA量は、Nips、iPWS細胞両者由来の脂肪細胞(NipsAdipocytes、 iPWSAdipocytes)で、分化21日目にピークが見られ、27日目には発現が若干低下した。また、iPWSAdipocytesでは、ADIPOQ(善玉サイトカイン)の発現がiPS細胞の状態からほとんど上昇しなかった。一方、iPWSAdipocytesにおいてTNF- $\alpha$ (悪玉サイトカイン)の発現は、NipsAdipocytesと比較し、21日目に顕著に上昇していた。さらに、iPWSAdipocytesのaP2、PGC1 $\alpha$ の発現量の上昇は見られなかった。脂肪分化の過程を光学顕微鏡下で観察した際には、Nips、iPWS両者に分化の成熟スピードの差は無かった。また、Oil Red O染色の結果、脂肪滴を蓄えた細胞がiPWS由来細胞で顕著に確認された。

**【考察】**

本研究では、PWS患者と健常者で脂肪細胞に違いがあることを明らかにした。iPWSAdipocytesにおいて、善玉サイトカインの発現が極端に低く、悪玉サイトカインの発現が高いことから、PWS患者ではインスリン抵抗性が増大する可能性が示唆された。またaP2の機能の1つに脂肪滴分解酵素HSLを助ける働きがあることから、脂肪滴の分解にも影響することを見出した。よって脂肪滴蓄積がiPWSAdipocytesで増えていると考えている。今後、PWS患者のインスリン抵抗性の増大について解明するために、分化した脂肪細胞内へのグルコース取り込み量を比較する予定である。

## L-Carnitine supplementation attenuates lenvatinib-induced muscle impairment without affecting its anti-angiogenesis effect

○靖 崚<sup>1</sup>、射場 智大<sup>2</sup>、内藤 尚道<sup>2</sup>、許 平平<sup>1</sup>、盛重 純一<sup>1</sup>、長田 直人<sup>1</sup>、大久保 裕直<sup>3</sup>、安藤 仁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>金沢大・院医薬保健・細胞分子機能学、<sup>2</sup>金沢大・院医薬保健・血管分子生理学、<sup>3</sup>順天堂大学医学部附属練馬病院・消化器内科

[Aim] Lenvatinib (LEN), an oral tyrosine kinase inhibitor, is widely used to treat several types of advanced cancers but often causes muscular adverse reactions. Our previous study revealed that LEN reduces L-carnitine content, expression of carnitine-related genes, and mitochondrial function in the skeletal muscle. Therefore, the present study aimed to investigate whether L-carnitine supplementation can prevent LEN-induced muscle impairment in rats.

[Methods] Male Wistar rats were divided into four groups and administrated orally once daily for 2 weeks with vehicle, LEN (2 mg/kg/day), LEN + L-carnitine (150 mg/kg/day), or LEN + L-carnitine (300 mg/kg/day). For in vitro studies, differentiated C2C12 myocytes were treated with or without 1  $\mu$  M LEN and different concentrations of L-carnitine (1.6, 6.4, and 25.6 mM).

[Results] L-Carnitine supplementation significantly attenuated LEN-induced deleterious effects on L-carnitine content, expression of carnitine-related (OCTN2, CPT1, CACT, and CPT2) and OXPHOS genes in the skeletal muscle of rats. In addition, L-carnitine prevented LEN-induced reductions in mitochondrial function (ATP content and membrane potential) in C2C12 myocytes. Furthermore, in HUVECs, L-carnitine did not affect the anti-angiogenesis action of LEN assessed by the tube formation and ring assays.

[Conclusion] These results suggest that L-carnitine supplementation can alleviate the adverse reactions of LEN in the skeletal muscle without reducing its anti-angiogenesis effect.

## グルコシルセラミド合成酵素はマウス骨芽細胞増殖促進に関与する

○三島 好貴、濱村 和紀

愛知学院大・歯・薬理学講座

【目的】骨代謝制御機構の解明は重要な研究課題となっており、様々な研究が報告されている。グルコシルセラミド合成酵素（GCS）はスフィンゴ糖脂質であるガングリオ系およびグロボ系糖脂質の発現に必須である。スフィンゴ糖脂質が骨代謝に関与していることは報告されているが、GCSの骨芽細胞増殖における役割についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、GCSを阻害することで、その骨芽細胞増殖への関与について検討した。【試料および方法】マウス骨芽細胞株（MC3T3-E1）にGCS阻害剤（Miglustat、D-PDMP、D-PPMP）を添加し、フローサイトメトリーを用いてGD1aおよびGb4の発現レベルを検討した。また、スフィンゴ糖脂質により制御される分子を同定するため、GCS阻害剤処理群と未処理群の細胞よりRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その後、マイクロアレイで予測された遺伝子をリアルタイムPCRにて確認した。【結果および考察】GCS阻害剤によりGD1aおよびGb4の発現が低下し、細胞増殖も有意に抑制された。また、マイクロアレイ解析によりGCS阻害剤（スフィンゴ糖脂質の低下を引き起こす）で、発現が上昇する10遺伝子および低下する9遺伝子が候補として絞られた。また、それらの遺伝子をリアルタイムPCRにて確認した結果、GCS阻害剤で抑制されると予測された9つの遺伝子のうち、*Fndc1*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angptl6*のmRNA発現量は、3種類すべての阻害剤によって抑制された。また、*Fndc1*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angptl6*のmRNAの発現量は、成熟な骨芽細胞への分化誘導に伴い抑制された。今後は、骨芽細胞の増殖における*Angptl6*、*Cox6a2*、*Cth*、*Fndc1*の関与を検討するために、siRNAによるノックダウン実験を行いたいと考えている。【結論】本研究により、GCSはマウス骨芽細胞増殖の促進に関与することが明らかになった。

電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルKv1.6による膜電位制御と変形性膝関節症の関係

○倉田 朋<sup>1</sup>、鈴木 良明<sup>1</sup>、楯野 真也<sup>1</sup>、味八木 茂<sup>2</sup>、Eiva Bernotiene<sup>3</sup>、Wayne Giles<sup>4</sup>、山村 寿男<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大・院薬・細胞分子薬効解析学、<sup>2</sup>広島大・院医・整形外科学、<sup>3</sup>Innovative Medicine Center・Head of Department of Regenerative Medicine、<sup>4</sup>University of Calgary・Cumming School of Medicine・Department of Physiology & Pharmacology

【背景・目的】関節軟骨は、軟骨細胞から合成・分泌されるコラーゲンなどの軟骨基質により形成され、スムーズな関節の動きを可能にする。ところが、関節内の慢性的炎症や力学的な過負荷、加齢など複合的な要因により変形性膝関節症（Osteoarthritis；OA）を発症すると、軟骨基質が消失して激しい痛みと運動障害が生じる。これまでに、OAモデル動物由来の軟骨細胞において細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）上昇とOAの進行が関連することが報告されているが、どのようにして[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇するかは不明である。本研究では、マウス初代培養軟骨細胞を用いて、OA時に[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇するメカニズムの解明を目指した。

【方法・結果】C57BL/6マウスより単離した初代培養軟骨細胞において、OA時の滑液中に分泌される主要な炎症性サイトカインであるIL-1β（Interleukin-1β, 10 ng/mL）を処置してOA時の軟骨細胞を模倣した。IL-1β処置した軟骨細胞では、静止時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が有意に上昇していた。さらに、電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルの一種であるKv1.6の発現および膜電流が減少し、膜電位が脱分極することが明らかになった。L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル（Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel；VDCC）の阻害薬であるニフェジピンにより、静止時の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が有意に低下した。また、IL-1βによって誘導される細胞死は、ニフェジピンにより抑制された。

【結論】OA時に観察される[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は、Kv1.6活性の減弱による脱分極とそれによるL型VDCCを介した[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>流入によって生じると考えられる。持続的な[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は軟骨細胞の細胞死を誘導して、OAの進行に寄与すると推測される。



## Oxaliplatin誘起末梢神経障害には血小板由来HMGB1が関与する

○岸本 彩野<sup>1</sup>、堂本 莉紗<sup>1</sup>、松永 浩明<sup>1</sup>、松本 亜紗菜<sup>1</sup>、坪田 真帆<sup>1</sup>、関口 富美子<sup>1</sup>、王 登莉<sup>2</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>岡山大・院医歯薬・創薬研究推進、<sup>3</sup>岡山大・院医歯薬・薬理

核内タンパクhigh mobility group box 1 (HMGB1) は、マクロファージ (MΦ) などの細胞から分泌され、炎症や痛みを促進する。我々は、種々の抗がん剤により生じる化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) にHMGB1が関与することを明らかにしているが、paclitaxelとbortezomibによるCIPNに関与するHMGB1はMΦ由来であるのに対し、oxaliplatin (OHP)によるCIPN (OIPN) に関与するHMGB1の主たる由来細胞はMΦではないことを報告している。興味深いことに、血小板は無核であるにも関わらず、細胞内にHMGB1を含有しており、血小板由来HMGB1が血栓症の発症に関与することが報告されている。そこで本研究では、OIPNの発現に血小板由来HMGB1が関与する可能性を検証した。はじめに、ラット血小板多血漿および洗浄血小板をトロンビンで2時間刺激したところ、HMGB1の遊離が認められた。次に、OHPをマウスに5 mg/kgの用量で単回腹腔内投与すると3時間後より1週間以上持続するOIPNが発症したが、1 mg/kg単回投与ではOIPNは発症しなかった。OHP 5 mg/kgの単回腹腔内投与によるOIPNは、抗血小板薬のCOX阻害薬aspirin (ASA) 50 mg/kg とP2Y<sub>12</sub>阻害薬clopidogrel (CLP) 10 mg/kg の反復併用経口投与により完全に阻止された。マウスに抗血小板抗体 (抗CD42b抗体) 2 mg/kgを静脈内投与すると、24時間後に血小板数が1/3程度にまで減少し、血漿中HMGB1濃度が2倍近くに増加した。このマウスに単独無効量 (1 mg/kg) のOHPを単回投与するとOIPNが誘発された。次に、OHP反復投与によるマウスCIPNモデルを作製するため、OHP 1 mg/kg/2 daysを3回反復腹腔内投与したところ、投与開始5日後からOIPNが認められ、これは抗HMGB1中和抗体 (HAb) 1 mg/kgの反復腹腔内投与の他、抗血小板薬のASA 50 mg/kg、CLP 10 mg/kg、PDE III阻害薬cilostazol 100 mg/kgまたはトロンボキサン合成酵素阻害薬ozagrel 100 mg/kgの反復経口投与によって阻止された。摘脾によりマウスの血小板数は偽手術マウスに比べて倍増することを確認し、OHP 1 mg/kg/2 daysを反復腹腔内投与したところ、偽手術マウスでは投与開始5日後から、摘脾マウスでは初回投与翌日より明らかなOIPNが発症し、これも抗HMGB1中和抗体の反復投与で阻止された。最後に、ラットにおいてOHP 5 mg/kgの反復腹腔内投与により誘発されるOIPNもCLPの反復投与で阻止されることを確認した。以上より、OIPNの発症に血小板由来HMGB1が関与する可能性が示唆された。

## 神経細胞のリン輸送調節機構におけるPDGF-BBの関与

○大内 一輝、高瀬 奈央子、三島 彩音、村山 祐斗、栗田 尚佳、保住 功、位田 雅俊

岐阜薬科大・薬・薬物治療学研究室

**【背景】** 特発性基底核石灰化症 (Idiopathic Basal Ganglia Calcification; IBGC) は大脳基底核や小脳歯状核などに石灰化を呈する進行性の神経変性疾患である。IBGCの原因遺伝子として、リン酸輸送に関する *SLC20A2* や *PDGF* をはじめ、いくつか報告されており、複数細胞種のリン恒常性破綻が病態形成に関与することが推測される。当研究室では、*PDGF* 変異を有するIBGC患者iPS細胞から誘導した内皮細胞でPDGF-BB分泌能が低下することを報告している。他の研究チームからは、PDGF-BBはPiT1 (*SLC20A1* がコードするリン酸輸送体) を介して血管平滑筋細胞のリン酸輸送を活性化することを報告している。一方で、IBGC病態形成に重要な役割を担う神経細胞においては、PDGF-BBとリン酸輸送の関係性はまだ明らかでない。

**【目的】** 神経細胞におけるPDGF-BBのリン酸輸送調節機構における役割を解明する。

**【方法】** まず、IBGCの原因遺伝子である *SLC20A2* を一過性または安定的にノックダウンさせたヒト神経芽細胞種SH-SY5Y細胞 (以下、*SLC20A2*-KD細胞) を用いて、PDGF-BBの細胞生存・増殖・遊走に対する影響を評価した。このPDGF-BBの作用に関連するシグナル同定のため、諸種シグナル阻害剤を処置、評価した。次に、*SLC20A2*-KD細胞におけるPDGF-BB処置がリン酸輸送活性に及ぼす影響を検討した。PDGF-BBのリン酸輸送活性に及ぼす影響がPiT1及びPiT2 (*SLC20A2* がコードするリン酸輸送体) どちらを介する作用なのかを各々ノックダウン法を用いて検討した。最後に、神経細胞におけるPDGF-BBのリン酸輸送調節機構を調べるために、PDGF-BBのリン酸輸送体の発現および膜移行活性に与える影響を評価した。

**【結果】** *SLC20A2*-KD細胞において低下した生存活性、増殖・遊走活性をPDGF-BB処置は回復させた。さらにこのPDGF-BBの作用はAkt阻害剤によってキャンセルされた。PDGF-BBは濃度依存的にリン酸輸送能を増強した。この作用は *SLC20A2* ではなく、*SLC20A1* をノックダウンしたときにキャンセルされた。興味深いことに、PDGF-BBのリン酸輸送活性化はリン酸輸送体の発現増加によるものではなく、膜移行の活性化によるものであった。

**【結語】** PDGF-BBはAktシグナルの活性化によるリン酸輸送活性の増加を介して神経細胞死を抑制した。また、PDGF-BBのリン酸輸送活性増加にはAktシグナル活性化を介したPiT1の膜移行促進が関与することが明らかとなった。

## 炎症性刺激を受けたアストロサイトにおけるOrai2チャンネルの機能解明

○中島 弘貴<sup>1</sup>、藤田 沙也香<sup>1</sup>、抱 将史<sup>1</sup>、永安 一樹<sup>1</sup>、大洞 将嗣<sup>2</sup>、白川 久志<sup>1</sup>、金子 周司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大・院薬・生体機能解析学、<sup>2</sup>順天堂大・院医・生化学第一

**【序論】** アストロサイトは中枢神経系 (CNS) において最も豊富に存在するグリア細胞であり、神経伝達物質の回収やイオン濃度の調節、血液脳関門の形成などCNSの恒常性維持に寄与している。近年、アストロサイトは病態時の様々な刺激に応答して病態の増悪あるいは抑制に寄与することが明らかになってきた。代表的な炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ とIL1 $\alpha$ がアストロサイトを炎症促進性のフェノタイプへと変化させることが報告されたが、それらの刺激を同時に受けた際のサイトカイン変化や制御分子に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、これら炎症性サイトカインに対するアストロサイトの応答について、Ca<sup>2+</sup>シグナリングとの関連に着目して解析した。

**【方法】** 生後0-2日齢のC57BL/6Jマウス新生仔から大脳皮質を摘出し、フラスコに播種してグリア混合培養とした。培養2~4週間後、振とう法によりアストロサイトを単離して再播種し、TNF $\alpha$  (10 ng / mL) または/および IL1 $\alpha$  (3 ng / mL) の処置24時間後に遺伝子発現変化、タンパク質産生量変化、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。

**【結果・考察】** TNF $\alpha$  やIL1 $\alpha$  を処置したマウス初代培養アストロサイトにおいて、様々な炎症性サイトカインの遺伝子発現量が増加したが、中でもIL6、CXCL1、CXCL2は両サイトカインの共処置により相乗的な増加を示した。また、このときストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入 (SOCE) を担うチャンネルであるOrai2の遺伝子発現が相乗的に増加したため、Orai2をノックダウン (KD) してDNAマイクロアレイによる解析を行ったところ、TNF $\alpha$  と IL1 $\alpha$  の共処置を受けた際に、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生経路がKD群において亢進していることが示された。リアルタイムPCRおよびELISAによる検討から、KD群ではPGE<sub>2</sub>合成酵素のひとつであるmPGES1の遺伝子発現およびPGE<sub>2</sub>産生量が増加していることが明らかとなった。またOrai2遺伝子欠損マウス由来のアストロサイトにおいては、TNF $\alpha$  とIL1 $\alpha$  の共処置を受けた際にOrai1の遺伝子発現量、SOCEによるCa<sup>2+</sup>流入が増加し、COX2およびmPGES1の遺伝子発現量、PGE<sub>2</sub>産生量も増加していた。以上の結果から、TNF $\alpha$  とIL1 $\alpha$  の共刺激によるアストロサイトPGE<sub>2</sub>産生亢進は、Orai2が関与するメカニズムによって部分的に抑制されていることが示された。

## CGRPによるMAObの転写調節機序の解明

○藤原 享志朗<sup>1</sup>、渡邊 杏香<sup>2</sup>、橋川 直也<sup>1,2</sup>、橋川 成美<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>岡山理科大・大学院理学研究科・臨床生命科学専攻、<sup>2</sup>岡山理科大・理・臨床生命科学科

## [目的・背景]

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は37個のアミノ酸からなる神経ペプチドの1種で中枢・末梢神経に広く分布している。また、CGRPを脳室内に投与すると不安様行動が誘発されることが知られているが、その機序はいまだ不明である。これまで我々は不安様行動と密接に関与していると考えられている海馬のドーパミンに着目して、CGRP脳室内投与を行い、ドーパミンの代謝酵素であるモノアミン酸化酵素 b (MAOb) の増加とそれによるドーパミンの減少が不安様行動に関わることを報告してきた。そこで本研究はCGRP投与によるMAObのエピジェネティックな転写調節機序について解析した。

## [方法]

8週齢のC57BL/6J 雄性マウスにSalineまたはCGRP (0.5 nmol) を脳室内投与した。投与24時間後に脳海馬を摘出し、MAObの転写調節因子であるKrüppel-like factor 11 (KLF11) のタンパク質量をWestern blottingにて解析を行った。また、ヒストンH3をメチル化することで遺伝子サイレンシングに関与することが知られているヘテロクロマチンタンパク質 (HP1 $\gamma$ ) のリン酸化量をWestern blottingにて解析を行った。さらに、CGRP脳室内投与24時間後のマウス脳海馬のDNAを断片化し、KLF11プロモーター領域あるいはエンハンサー領域のHP1 $\gamma$ 及びメチル化H3の結合量をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。

## [結果・考察]

CGRP投与によりKLF11及びリン酸化HP1 $\gamma$ が有意に増加した。HP1 $\gamma$ はPKAによりリン酸化され、ヒストンH3との結合が外れることで、転写を促進していることが報告されている。そこで、CGRPにより増加したリン酸化HP1 $\gamma$ がKLF11の発現調節に関与しているか検討するためChIPアッセイを行った。KLF11のプロモーター領域あるいはエンハンサー領域のHP1 $\gamma$ リクルート量を解析したところ-700 bp付近で有意な減少が見られた。さらに、メチル化ヒストンH3のリクルート量を解析したところ-1000 bp付近で有意に減少していた。以上のことからCGRPは、リン酸化HP1 $\gamma$ 量を増加させ、KLF11エンハンサーのヒストンH3メチル化を抑制することにより、KLF11の転写を活性化させ発現量を増やし、MAObを増加させる可能性が示唆された。

## 慢性社会ストレスによる内側前頭前皮質の解剖学的結合の変化の解析

○奥田 裕己<sup>1</sup>、篠原 亮太<sup>1</sup>、山口 真広<sup>2</sup>、小坂田 文隆<sup>2</sup>、古屋敷 智之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大・院医・薬理、<sup>2</sup>名古屋大・院創薬科学・細胞薬効解析

社会や環境から受ける慢性ストレスは、抑うつや不安亢進、認知機能低下を誘導し、うつ病など精神疾患のリスク因子ともなる。我々はマウスの慢性社会ストレスを用いて、慢性社会ストレスにより行動変化が誘導されたマウスでのみ、内側前頭前皮質の錐体細胞の樹状突起退縮が誘導されること、急性社会ストレスが樹状突起増生を誘導しつつ、行動変化を抑制することを示してきた。しかし、社会ストレスによる内側前頭前皮質の錐体細胞の樹状突起の形態的变化が神経回路に与える影響は不明である。本研究では逆行性感染G欠損型狂犬病ウイルスベクターを用い、慢性社会ストレスにより解剖学的に変化する内側前頭前皮質への神経投射の同定を行った。慢性社会ストレスを受けた成体オスマウスでは、社会忌避行動、報酬指向行動、認知機能の低下といった複数の行動変化が観察された。これらのマウスの片側の内側前頭前皮質に蛍光タンパク質を発現する逆行性感染G欠損型狂犬病ウイルスベクターを注入し、内側前頭前皮質に入力する神経細胞を可視化した。脳冠状切片を作製した後、全脳における陽性細胞数を定量し、各脳領域における陽性細胞数の分布を系統的に調べた。その結果、蛍光タンパク質発現細胞は90以上の脳領域で確認されたが、慢性社会ストレスに暴露したマウスでは、対照群と比較し、特異的な脳領域で陽性細胞数の変化を認めた。以上の結果は、慢性社会ストレスにより内側前頭前皮質への神経投射が解剖学的に変化することを示唆している。

## Connexin43発現が低下したアストロサイトにおけるリゾホスファチジン酸受容体を介したアミトリプチリンによる脳由来神経栄養因子の発現亢進機序の解明

○徳永 希、中村 庸輝、中島 一恵、森岡 徳光

広島大・院医系科学・薬効解析

【背景】 Connexin43 (Cx43) は脳内ではグリア細胞であるアストロサイトに高発現する膜タンパク質であり、従来知られている細胞間分子輸送だけではなく、細胞内情報伝達系にも寄与していることが知られている。うつ病患者の死後脳解析により前頭前皮質や海馬におけるCx43の発現低下が認められており、うつ病態とCx43との関連性が示唆されている。一般的に、抗うつ薬はシナプス間隙でのモノアミン濃度を増加させることで、抗うつ効果を発揮している。しかし、これらの効果は抗うつ薬の投与直後に認められる一方で、治療効果が発現するまでには投与開始時から数週間要することが知られており、モノアミンを介さない作用機序が存在する可能性が考えられている。これまでに当研究室では、うつ病モデルマウスにおいて、海馬Cx43発現量と抗うつ薬アミトリプチリン (AMI) の抗うつ効果には逆相関が認められることを明らかにしている。また培養アストロサイトにAMIを処置すると、リゾホスファチジン酸 (LPA) 受容体1 (LPA<sub>1</sub>) を介して脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現が増加し、この反応がCx43発現を低下させた培養アストロサイトではさらに亢進することを示し、第140回本会において報告した。今回は、これらの反応に関与するメカニズムについてさらなる解析を行った。

【方法】 Wistar系ラット新生仔の脳皮質より、定法に従って培養アストロサイトを作製した。RNA干渉法により培養アストロサイトにおけるCx43発現を低下させた。BDNF mRNA発現及びタンパク質の発現変化はreal-time PCR及びWestern blottingにてそれぞれ解析した。

【結果】 Cx43発現を低下させた培養アストロサイトにおけるAMI誘導性BDNF発現の亢進作用は、G<sub>i/o</sub>及びG<sub>q</sub>タンパク質と共役するLPA<sub>1</sub>及びLPA<sub>3</sub>の阻害によって抑制された。また、このBDNF発現亢進作用にはprotein kinase C (PKC) が関与していることを明らかにした。

【考察】 本研究により、Cx43発現低下アストロサイトにおけるAMI誘導性BDNF発現の亢進作用は、G<sub>i/o</sub>及びG<sub>q</sub>と共役するLPA<sub>1</sub>及びLPA<sub>3</sub>を介することが示された。また、正常アストロサイトにおけるAMIによるBDNF発現増加作用に対してPKCは関与しないことから、Cx43発現低下を介したAMI誘導性BDNF発現亢進メカニズムに対するPKCの重要性が示唆された。本研究結果は、うつ病患者において認められるCx43発現低下はうつ病の病態形成だけではなく、抗うつ薬の治療効果にも影響を及ぼしている可能性を示唆している。

## 塩化鉄傷害法に基づく血栓モデル動物を用いた、in-vivo血栓閉塞時間の評価と麻酔薬の影響

○近藤 一直<sup>1</sup>、狩野 泰輝<sup>1</sup>、菅沼 由唯<sup>1</sup>、池本 和久<sup>1</sup>、一瀬 千穂<sup>1</sup>、望月 利昭<sup>2</sup>

<sup>1</sup>藤田保健衛生大・医、<sup>2</sup>藤田医科大・医・岡崎医療センター 麻酔科

【背景】薬効評価におけるin-vitro実験データとin-vivo評価との関連付けは、最終目的である臨床適用の成否につながる重要なステップと考える。我々は血小板凝集実験においてin-vitro（あるいはex-vivo）薬効評価を報告してきたが、より実践的検討として血栓動物モデルを用いた閉塞時間を測定した。評価対象としては古典的ペントバルビタール麻酔と、三種混合麻酔とを比較した。【方法】ICR系マウス6ヶ月齢オスを用い、ペントバルビタール麻酔は80mg/kg-i.p. [PENT群]、3種混合麻酔はメドトミジン0.75mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+ブトルファノール5mg/kg [i.p.、MMB群]にて行った。鼠径部を切開して大腿動脈を露出し、超音波血流計DVM-4500（Hadeco社製）を用いて血流をモニタしつつ、濾紙ディスクに浸み込ませた塩化鉄10%溶液を乗せて血管外から5分間作用させ、血流変化を記録した。反応開始から血流完全停止までに要した時間を閉塞時間として測定、30分以上閉塞が無い場合は上限の30分を測定値とした。【結果】PENT麻酔動物においては閉塞時間平均値が $13.6 \pm 1.3$ 分であり、アスピリン100mg/kg-p.o.投与はこれを $25.1 \pm 4.9$ 分と延長した（ $n=3$ 、 $P=0.06$ ；positive control）。次いで麻酔薬を変更して比較したところ、PENT群 $22.8 \pm 4.0$ 分であったのに対しMMB群 $13.6 \pm 0.8$ 分と短縮傾向を示した（ $n=5$ 、 $P=0.08$ ）。【考察】我々が以前報告したデータでは、ペントバルビタール麻酔下で $37.2 \pm 7.7\%$ であったin-vitro凝集率がMMB麻酔により $86.6 \pm 2.9\%$ と有意に増強しており（第93回年会、2020年3月横浜→web開催； $n=5$ 、コラーゲン $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$ 刺激）、今回の閉塞時間短縮はこの血小板凝集亢進を反映した可能性が考えられた。

## マウス動脈硬化におけるCGRPの役割

○井上 翔太<sup>1</sup>、川島 心<sup>2</sup>、橋川 直也<sup>1</sup>、橋川 成美<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山理科大・大学院理学研究科、<sup>2</sup>岡山理科大・理

## 【目的・背景】

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は37個のアミノ酸からなるペプチドであり、カプサイシン感受性の知覚神経に含まれている。CGRPの生理作用として、強力な血管拡張作用、細胞保護効果、マクロファージ浸潤抑制作用など様々な作用が報告されている。しかし、動脈硬化におけるCGRPの役割は未だ不明なままであった。我々は、これまでアポリポプロテインE (ApoE)欠損マウスとCGRP欠損マウスをかけあわせ、ApoE/CGRPダブルノックアウト(DKO)マウスを作製し血清コレステロール値、大動脈の脂質沈着の増加、腹腔内マクロファージの機能亢進と炎症性サイトカインTNF $\alpha$ の増加を報告してきた。そこで本研究ではTNF $\alpha$ 阻害薬によりダブルノックアウトマウスの動脈硬化が改善されるかどうか検討をおこなった。また、マウスマクロファージ細胞株であるRaw264.7を用いCGRPがTNF $\alpha$ の発現に影響を及ぼすか検討した。

## 【方法】

8週齢の雄性ApoE欠損マウスあるいはDKOマウスを用いた。また、TNF $\alpha$ 阻害薬として完全ヒト型可溶性TNF $\alpha$ /LT $\alpha$ レセプター製剤のエタネルセプトを週に1回(5 mg/kg)腹腔内投与を行った。心臓はクリオスタットを用いて薄切片を作り、大動脈起始部の脂質沈着をoil red Oを用いて染色した。また、マウスの大動脈展開標本を作製し同様にoil red Oで染色し脂質沈着を測定した。Raw264.7細胞にCGRP(100 nmol)を添加した。60分後に細胞を回収し、RNAを抽出後、Real time PCRにてTNF $\alpha$ およびIL-6 mRNA発現量を定量化した。

## 【結果・考察】

ApoE/CGRP DKOマウスに2週間高脂肪食を与えながらエタネルセプトを週に1回投与した結果、大動脈展開標本において脂質沈着が抑制されていることが確認された。Raw264.7細胞を用いてCGRP投与による炎症性サイトカイン発現量を解析した。その結果、IL-6 mRNA発現量は、有意な変化は見られなかったが、TNF $\alpha$  mRNA発現量がCGRP投与によって有意に減少していた。以上の結果よりCGRPにはTNF $\alpha$ の発現を抑制する作用があり、CGRP欠損による動脈硬化の増悪にはTNF $\alpha$ 阻害薬が効果を示すことが示唆された。



## 可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化薬BAY 60-2770の抗冠攣縮作用

○田和 正志、中川 恵輔、大喜多 守

大阪医科薬科大学・薬・病態分子薬理

冠攣縮性狭心症では発作的に冠動脈が過収縮を起こし、心筋への血液供給が減少することによって胸痛が生じる。狭心症発作の寛解、予防には硝酸薬やカルシウム拮抗薬が使用されるが、これらの薬物では十分に発作を抑制できない場合があり、新たな治療薬の開発が求められている。本研究では、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 活性化薬 (酸化型/アポsGCを優先的に活性化する) が冠攣縮性狭心症の治療薬となり得るのか否かについて検討した。イヌおよびブタの心臓から単離した冠動脈より標本を製作し、マグヌス法に準じて等尺性張力変化を観察した。sGC活性化薬であるBAY 60-2770 ( $10^{-10}$  to  $10^{-8}$  M) の存在下 (20 min曝露) では、endothelin-1 ( $3 \times 10^{-11}$  to  $3 \times 10^{-8}$  M)、prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $10^{-8}$  to  $10^{-5}$ )、5-hydroxytryptamine ( $10^{-9}$  to  $10^{-6}$  M) によるイヌ冠動脈収縮反応が濃度依存的に抑制された。また、KCl (30 mM) の脱分極性刺激による冠動脈収縮もBAY 60-2770の前処置によって抑制された。BAY 60-2770の作用時間は長いことが知られているため、ウォッシュアウトの影響をみたが ( $10^{-9}$  MのBAY 60-2770に1 hr曝露後、30 minおきに4 hr洗浄)、BAY 60-2770による冠動脈収縮抑制作用はウォッシュアウト後も持続していた。次に、in vitroの冠攣縮モデルとして知られている3, 4-diaminopyridine誘発周期性収縮に対する効果を検証したところ、BAY 60-2770 ( $10^{-10}$  to  $10^{-8}$  M) は濃度依存的に3,4-diaminopyridine (10 mM) によるブタ冠動脈の最大発生張力を減弱し、その収縮周期も延長した。硝酸薬やカルシウム拮抗薬の冠動脈拡張作用は太い血管で強いことが知られているため、sGC活性化薬の弛緩作用にも太い冠動脈 (左冠動脈前下行枝: AHA分類 #6) と細い冠動脈 (左冠動脈第一対角枝: AHA分類 #9) で差があるのか否かを検証した。Endothelin-1 ( $3 \times 10^{-9}$  M) で前収縮させた冠動脈に対するBAY 60-2770 ( $10^{-12}$  to  $10^{-7}$  M) の弛緩作用は太い冠動脈より細い冠動脈で強かった。以上の結果から、sGC活性化薬は抗冠攣縮作用を有しており、冠攣縮性狭心症の治療薬として有用であることが示された。また、細い冠動脈に対しての作用が強いことから、微小血管狭心症にも適応が期待できるかもしれない。

## 抗結核薬における薬物併用効果予測ツールとしてのCRISPR干渉の利用

○寒川 訓明<sup>1</sup>、山口 雄大<sup>2</sup>、尾関 百合子<sup>3</sup>、松本 壮吉<sup>3</sup>、徳留 健太郎<sup>1</sup>、松永 慎司<sup>1</sup>、本間 拓二郎<sup>1</sup>、富田 修平<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪市立大・医・分子病態薬理学教室、<sup>2</sup>(国研) 国立感染症研究所・細菌第一部、<sup>3</sup>新潟大・医・細菌学教室

結核は、世界中で年間約1000万人が罹患し、約140万人が死亡する感染症である。結核の治療は、多剤併用化学療法が基本であり、その治療期間は最短でも6ヶ月を要する。長期間に及ぶ治療によって生じる抗結核薬の不適切な服用や治療の中断は、年々増加する薬剤耐性結核菌発生の温床となっている。そこで、既存の抗結核薬と相加的もしくは相乗的な併用効果を示し、治療期間を短縮できる新規抗結核薬の開発が望まれている。近年、Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) 干渉の開発によって、新規抗結核薬の標的探索が容易となり、創薬の加速が期待されている。しかしながら、現状ではリード化合物の開発に先立って、既存の抗結核薬との併用効果を明らかにする方法は存在しない。本研究では、複数の抗結核薬による併用効果の予測がCRISPR干渉により可能かを検証した。検証には、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) の近縁で、非病原性かつ速育性を有する *Mycobacterium smegmatis* を用いて、既存の抗結核薬 (イソニアジド [INH]、リファンピシン [RFP]、エタンブトール [EMB]、ストレプトマイシン [SM]) の2剤間の併用効果を checkerboard assay により検討した。相乗効果が認められたのはINHとRFP、RFPとEMBとの併用、相加効果が認められたのはINHとEMBとの併用であった。一方で、INHとSMおよびRFPとSMの間では併用による効果増大は認められなかった。次に、INHの標的分子である *inhA* の誘導発現抑制 (KD) 株をCRISPR干渉で作成し、上記薬剤への感受性を検討した。結果は、対照株に比べ、*inhA* のKD株ではRFPとEMBの最小発育阻止濃度 (MIC) が低下し、SMのMICは変化しなかった。一方、RFPの標的分子である *rpoB* のKD株では、INHとEMBのMICは低下し、SMのMICは変化しなかった。これらの結果より、checkerboard assayでの2剤の抗結核薬の併用効果は、一方の薬剤の標的分子をCRISPR干渉でKDすることで再現が可能であった。さらに、結核菌の遺伝子配列と99%相同である *Mycobacterium bovis* BCGを用いての併用効果の検証を行い、CRISPR干渉の有用性を確認した。本研究より、CRISPR干渉は新規結核薬の標的分子の探索に加え、その阻害薬が治療期間短縮につながる、既存薬の効果増大をもたらすか否かを予測しうることを示唆された。

## 肺線維症における脂質メディエーター分解酵素の役割

○岡本 安雄<sup>1</sup>、竹之内 康広<sup>1</sup>、北風 圭介<sup>1</sup>、松井 玲那<sup>2</sup>、石丸 浩靖<sup>1</sup>、杉本 理栄<sup>1</sup>、坪井 一人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>川崎医科大・医、<sup>2</sup>川崎医療福祉大学・医療技術学部・臨床検査学科

特発性肺線維症は不可逆的に肺の線維化が進行し、予測できない多様な臨床経過をたどる予後不良の疾患で、新たな治療法の開発は急務である。脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) とリゾホスファチジン酸 (LPA) が増加すると、これらの受容体を介して肺線維化を促進することが明らかになってきた。しかしながら、S1PやLPAレベルを上昇させる分子メカニズムは不明である。本研究では、肺線維化促進因子であるS1PおよびLPAが増加する分子メカニズムについて検討した。抗がん薬ブレオマイシン反復投与肺線維症モデルマウスの肺を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、S1PおよびLPAの受容体や代謝酵素の遺伝子変動を検討した。生理食塩水投与群と比較して、ブレオマイシン投与群の肺で両脂質メディエーターの分解活性を持つ脂質リン酸ホスファターゼ 3 (LPP3) の遺伝子発現の低下を認め、そのタンパク質発現もブレオマイシン投与群の肺で低下していた。他の脂質リン酸ホスファターゼLPP1やLPP2の肺組織におけるmRNA発現はLPP3と比べて低く、生理食塩水投与群とブレオマイシン投与群の肺で変化は見られなかった。以上の結果から、線維化肺ではS1PとLPAの分解酵素LPP3の肺胞上皮細胞における発現低下がS1PとLPAの蓄積を引き起こし、線維化を促進していることが示唆された。次に、肺を構成するどの細胞でLPP3の発現が低下しているかを検討した。生理食塩水投与群と比較して、ブレオマイシン投与群の肺から単離した肺胞上皮細胞で、LPP3のmRNA発現が低下していた。複数のマイクロRNAがLPP3の発現抑制に働いていることが報告されているが、mir-184の発現がブレオマイシン投与群の肺および肺胞上皮細胞で増加していた。実際にA549細胞をmiR-184で処理したところ、LPP3の発現が抑制された。以上の結果から、ブレオマイシン投与により肺胞上皮細胞でmir-184発現が増加し、LPP3発現が低下したことによりLPAおよびS1Pが増加し、肺線維症の発症・進行に関与することが示唆された。

## 母乳由来プロバイオティクスによる炎症性大腸発癌の抑制効果

○倉原(海) 琳<sup>1</sup>、李 小東<sup>1</sup>、平石 敬三<sup>2</sup>、平野 勝也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>香川大・医、<sup>2</sup>福岡大・医・生理学

## 背景と目的

炎症性腸疾患(IBD)は難病に指定され、遺伝や免疫的因子の他に食事や腸内細菌などの多因子が発症や増悪に関与し、また、高い発癌リスクを伴う。IBDは母乳で育てられた時期が長い人ほど発症リスクが顕著に低いことが知られている。乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスがIBD治療へ臨床応用されているが、母乳由来プロバイオティクスの応用の報告はない。本研究では、母乳由来プロバイオティクス*Probio*-M9によるIBD予防・治療効果とそのメカニズムを明らかにする。

## 方法

雌マウスにazoxymethane (AOM : 12 mg/kg BW i.p.)を前処置後、dextran sulphate sodium (DSS7日間2%DSS 自由飲水+7日間通常飲水)の投与を3セット行い、炎症性大腸癌モデルを作製した。母乳由来プロバイオティクス*Probio*-M9(菌量は $2 \times 10^9$ 個/1日/匹)投与を3セット行った。便中腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い、多様性解析・主座標分析(PCoA)、腸内細菌属・種分析を行った。AOM投与後20週に大腸腫瘍数解析、大腸病理組織学解析を行った。

## 結果

Vehicle群と比較して、AOM+DSS群では有意な脾臓重量、糞便スコア・病理スコア・腫瘍数・線維化・非腫瘍領域漿膜下層CD68陽性マクロファージの増加、腸内細菌の構造変化が観察された。

*Probio*-M9投与により、これらの指標は改善し、さらに細菌叢の多様性の増加、腸炎を増悪する細菌の減少が観察された。

## 結論

母乳由来*Probio*-M9投与は腸内細菌叢の多様性や構造を改善し、炎症性大腸発癌に対し抑制的に働くことが示唆された。

## GLP-1受容体作動薬の高血糖誘導性糸球体足細胞障害に対する影響

○長井 皓平、小原 幸、赤倉 章仁、清水 美乃莉、鳥羽 裕恵、中田 徹男

京都薬科大・薬・臨床薬理学分野

**【背景・目的】**糖尿病性腎臓病は新規透析導入の最大原疾患であり、現在行われているレニン・アンジオテンシン系阻害薬による治療下でも、未だ満足な効果が得られていない。Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)受容体作動薬は2型糖尿病患者に対して血糖値を下げる目的で用いられるが、近年、糖尿病性腎臓病モデル動物において腎保護効果を示すことが報告されている。そこで今回我々は、糸球体濾過において重要な役割を担っている糸球体足細胞(ポドサイト)に焦点を当て、GLP-1受容体作動薬がポドサイトに対してどのような効果を示すかについて検討した。

**【方法】**培養不死化温度感受性マウス糸球体上皮細胞の細胞分裂を停止し、ポドサイトに分化させた。通常血糖群(5 mM glucose)と高血糖負荷(25 mM glucose)した群とをそれぞれNG群、HG群とした。治療薬投与群としてGLP-1受容体作動薬であるExendin-4 (10 nM)を通常血糖に投与した群、高血糖に投与した群を各々NE群、HE群とし各群7日間培養を行った。さらにAkt経路を阻害するPI3K阻害剤Wortmannin(100 nM)をExendin-4と共投与する(HE+Wort)群を設定した。細胞障害は培養上清のLDH活性で測定し、アポトーシスは核の形態変化とカスパーゼ3活性で検討した。ポドサイト構成因子であるWilms' tumor-1(WT-1)、synaptopodin のmRNA発現はreal time PCR法で測定した。細胞骨格に対する影響は蛍光ファイロジンによるF-actin染色で検討した。Exendin-4による細胞保護機序を検討するため、Aktのリン酸化及びbcl2、baxタンパク発現をWestern blotで検討した。

**【結果】**NG群に比しHG群では、核の凝集・断片化を認め、カスパーゼ3活性の増加も伴っており、アポトーシスの誘導が認められた。さらに、HG群ではポドサイトの構成因子であるWT-1およびsynaptopodin発現の減少が認められ、細胞骨格であるF-actinの形態に損傷が認められた。HE群ではこれらのポドサイト障害が抑制されており、抗アポトーシスに働くことが知られているAktのリン酸化とbcl2タンパクの保持を伴っていた。また、アポトーシス誘導に働くbaxタンパクは抑制傾向であった。さらにExendin-4による足細胞アポトーシス抑制効果はHE+Wort群で消失した。

**【結語】**GLP-1受容体作動薬は高血糖由来ポドサイト障害を軽減し、その作用機序にAktのリン酸化保持やbcl-2ファミリータンパクの調整が関与し、apoptosisを抑制する可能性が示唆された。

## COVID-19の医療情報を用いた長期・短期の重症化予測AIアルゴリズムの開発

○今井 由美子<sup>1</sup>、衣笠 泰葉<sup>1</sup>、コバルビアス マーラ<sup>1</sup>、谷内江 綾子<sup>2</sup>、西野 泰子<sup>2</sup>、北野 宏明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>医薬基盤・健康・栄養研・ワクチン・アジュバント研究センター、<sup>2</sup>システムバイオロジー研究機構

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が重症化するとICUで人工呼吸やECMOを含む集中治療が行われる。重症COVID-19に対して、日本では諸外国と比べて高い救命率を維持できたものの、一時期、医療崩壊と呼ばれる現象が生じた。感染患者のICUにおける長期予後(生・死)に加え、短期予後、すなわち、入院中のある時点からn日後に、悪化するか、回復するかといった重症度の変遷の予測は、重症化の予防、さらに重症者向け医療提供体制の整備に有用であると思われる。今回われわれは、ICUに入院したCOVID-19患者、1,794例の複数時点の診療情報をもとに、長期予測モデルとして、入院時の診療情報から退院時の生死を予測、短期予測モデルとして、入院中のある時点での診療情報から、3,5,7日後の重症度の変遷を予測する機械学習モデルを作成した。入力情報として、患者基本情報(年齢、性別、基礎疾患など)、投与薬物、呼吸管理法(酸素投与、人工呼吸、ECMOなど)、血液検査値、血液ガス値、生化学的検査値(電解質、腎機能、肝機能、凝固機能、炎症マーカー)、臓器不全スコア、重症度スコアなどの診療情報を用いて、入力データの生成、データ分割、GridSearchによるパラメータ探索、RF, XGBoost, SVCの3種類の推定器によるモデリング、次いで、ROC curve, PR curveなどによる検証を行った。その結果、長期予測については、クラスバランスを考慮したランダムフォレストモデルによって高い精度で生命予後を予測するモデルを構築することができた。短期予測については、悪化の可能性について、5日後に人工呼吸あるいはECMOが必要になるほどに悪化することを予測するモデルを、回復の可能性について、5日後、7日後に、酸素投与が不要となる、人工呼吸やECMOから離脱できるほどに回復することを予測するモデルを構築することができた。今後、開発したAIモデルのICU診療現場での実装を目指したいと考えている。

## アミノ酸トランスポーターLAT1阻害薬が腫瘍細胞の大型中性アミノ酸輸送とタンパク質合成に与える影響

○西窪 航<sup>1</sup>、大垣 隆一<sup>1,2</sup>、岡西 広樹<sup>1</sup>、奥田 傑<sup>3</sup>、徐 旻愷<sup>1</sup>、遠藤 仁<sup>4</sup>、金井 好克<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・生体システム薬理、<sup>2</sup>大阪大・先導的学際研究機構・生命医科学融合フロンティア研究部門、<sup>3</sup>東京大・院農学生命科学・食品生物構造、<sup>4</sup>ジェイファーマ株式会社

L-type amino acid transporter 1 (LAT1; SLC7A5) は、様々な臓器由来の悪性腫瘍の細胞膜上で高発現し、7種の必須アミノ酸を含む8種の大型中性アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン)の取り込みを担う。アミノ酸は、栄養素としてタンパク質合成をはじめとする様々な生化学反応の基質となると同時に、それ自身がシグナル分子として多様な代謝・合成制御に関与し、腫瘍細胞の生存、成長、増殖に寄与している。実際に、LAT1阻害薬によるアミノ酸取り込み阻害は、*in vitro*での腫瘍細胞増殖抑制作用および*in vivo*での腫瘍増大抑制作用をもたらすことが報告されている。代表的な阻害薬であるJPH203については、抗悪性腫瘍薬としての臨床試験が実施されている。一方で従来の研究では、腫瘍細胞に対するLAT1阻害薬のアミノ酸輸送阻害効果は、輸送基質の一つであるロイシンのみを用いて評価されてきた。また、LAT1阻害薬のタンパク質合成への影響についての検証は、翻訳制御に関与するアミノ酸シグナル経路上の因子のリン酸化変動を指標とした間接的なものであった。そこで本研究は、腫瘍細胞においてLAT1阻害薬の阻害効果をLAT1全基質について検討するとともに、LAT1阻害によるタンパク質合成低下を実証することを目的とした。複数の膵臓癌細胞株におけるアミノ酸輸送測定により、JPH203がLAT1の基質である8種全ての大型中性アミノ酸の取り込みを強く阻害することが示された。また、競合するアミノ酸が高濃度で存在する培地中においても、JPH203は大型中性アミノ酸の取り込みを強く阻害することを明らかにした。さらに、ピューロマイシンの新規合成タンパク質への取り込み解析(SUnSET法)と、mRNAとリボソームの結合状態に基づく翻訳活性解析(ポリソーム解析)により、腫瘍細胞においてJPH203によるLAT1阻害が全般的な翻訳低下をもたらすことを明らかにした。本研究は、LAT1阻害薬の腫瘍細胞増殖抑制の背景にある、大型中性アミノ酸取り込みへのLAT1の主要な寄与と、LAT1阻害薬によるタンパク質合成抑制を実証した。本研究の成果は、LAT1の悪性腫瘍治療の標的としての意義をさらに支持するものである。

## パーキンソン病モデル酵母を用いた $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Syn)のアミノ酸変異が凝集体形成や細胞毒性に及ぼす影響の解析

○杉本 恵崇、高崎 輝恒、黒崎 亮、巽 祐司、山田 南、佐藤 亮介、杉浦 麗子

近畿大・薬

パーキンソン病やLewy小体型認知症に代表されるLewy小体病は $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) の細胞内凝集を特徴とする。従って $\alpha$ -シヌクレインの凝集メカニズムを明らかにすることはこれらの疾患の病態を理解し、治療法を開発するうえで重要な課題である。我々は、強力な遺伝学を駆使することのできる分裂酵母モデル生物を用いることにより、 $\alpha$ -Synの細胞内凝集機構を解析してきた。 $\alpha$ -SynをGFP融合タンパク質として、細胞内で発現、可視化した結果、 $\alpha$ -Synは低発現時には主に細胞の成長端（細胞膜）および中隔に局在するのに対して、高発現時には凝集体を形成し、その凝集体は膜脂質成分を染色するFM4-64で標識されることを明らかにした。さらに、 $\alpha$ -Synが細胞機能に与える影響を解析した結果、 $\alpha$ -Synの過剰発現はエキソサイトーシスや液胞融合などの細胞内輸送のプロセスに障害をもたらし、細胞毒性を示すことを明らかにした。次に $\alpha$ -Synの凝集メカニズムを解析する目的で、 $\alpha$ -Synの140アミノ酸のうち、家族性パーキンソン病の症例において点突然変異の報告のある30番目のアラニンをプロリンに置換した $\alpha$ -SynA30Pを作成した。この変異を導入した $\alpha$ -SynA30Pで細胞膜に局在せず、細胞毒性を示さないが、高発現時にわずかに凝集体を形成することが分かった。さらに、この変異に加えてタンパク質の高次構造解析において、エネルギー的に安定な領域に存在する56番目、76番目のアラニンをプロリンに置換した3重変異体 ( $\alpha$ -SynPPP)を作成した。興味深いことにこれらの点変異を導入した $\alpha$ -SynPPPは細胞膜への局在がほとんど消失しただけでなく、高発現状態においても細胞内凝集体の形成が顕著に阻害され、かつ細胞増殖抑制効果が失われていることが明らかになった。この結果から $\alpha$ -Synの凝集体形成には、56番目や76番目のアミノ酸が必要である可能性が考えられた。さらに、細胞膜に結合することにより凝集体形成が増強され細胞毒性を示すようになることが示唆された。



## 相分離を介したPKC/MAPKシグナル制御におけるストレス顆粒制御因子RNA helicase Ded1の役割

○富本 尚史、高崎 輝恒、佐藤 亮介、蔡 淳安、梅田 茉美、杉浦 麗子

近畿大・薬・分子医療・ゲノム創薬学研究室

PKC/MAPKシグナル伝達経路は高度に保存されたシグナル伝達経路であり、その過剰な活性化は発がんや密接に関わる。我々はPKC/Pck2過剰発現 (OP) がMAPKの活性化と細胞増殖抑制を誘導することを利用した遺伝学的解析により、膜をもたないオルガネラであるストレス顆粒 (SG) がPKC/Pck2を取り込むことによりMAPKシグナルの活性化を抑制することを見出した。SGは翻訳抑制の制御だけでなく、シグナル伝達制御の場としても注目される他、がんや神経変性疾患と密接に関わることから、新たな創薬標的としての可能性が秘められている。さらに、我々はストレス顆粒の制御因子であるヒトDDX3の分裂酵母ホモログDed1がPKC/Pck2過剰発現 (OP) に伴う細胞増殖抑制効果を回復することを見出した。そこで本学会では、PKC/MAPKを介する細胞増殖とDed1を介したSG形成/相分離制御がいかに関わるのかを解析した。

初めに、Pck2 OPがSG形成を誘導するのかを調べるため、SGマーカーであるPabpやDed1を用いて検証した。Pck2 OPによってPck2やPabpはそれぞれ凝集体を形成し共局在を示したが、興味深いことに、Ded1の凝集体形成は認められなかった。この結果は、Pck2 OPによって誘導されるSGは「不完全なSG」である可能性を示唆する。さらに、Pck2 OP細胞にさらにDed1を過剰発現することで、Pck2のSG移行が促進されたことから、Ded1 OPはPck2のSG移行を促進することにより、Pck2 OP依存的な細胞増殖抑制から回復する可能性を示唆した。次に、SG形成に必要なDed1の領域や機能を同定するため、SG形成に重要な低複雑性領域 (LCR) を欠損させたDed1<sup>ΔLCR</sup>やRNAヘリカーゼ活性を低下させたDed1<sup>DAAD</sup>を用いてSG形成を検証した。Ded1<sup>WT</sup> OP細胞と比較して、Ded1<sup>ΔLCR</sup>やDed1<sup>DAAD</sup>のOP細胞では、Ded1あるいはPabpの凝集が形成されず、Pck2のSG移行が顕著に低下したことから、Ded1のLCR、およびRNAヘリカーゼ活性がSG形成やPck2のSG移行に重要な役割を担っていることが示唆された。本発表では、PKC/MAPKシグナルの過剰な活性化に対するDed1やSGを介した抑制メカニズムについて議論する。

## 新規ERK活性調節シースACA-28による細胞死とNRF2経路の関わり

○濱邊 庸之、高崎 輝恒、當内 健太、上山 紗依、佐藤 亮介、杉浦 麗子

近畿大・薬・分子医療・ゲノム創薬学研究

ERK MAPK経路は細胞増殖制御に重要であり、この経路の異常な活性亢進は発がんを招くことが知られている。当研究室では、分裂酵母の遺伝学を駆使した化合物スクリーニングにより、新規抗がん剤リード化合物となるMAPKシグナル調節薬を複数単離している。その一つであるAcetoxy Chavicol Acetateの誘導体ACA-28は、特定のメラノーマおよび膵臓がん由来の細胞において、活性化状態にあるERK MAPK経路をさらに亢進することで細胞死を誘導するというユニークな性質を持つ。本研究では、ACA-28の適応拡大を視野に、ACA-28の細胞死誘導機構の解明、さらには、細胞種によりACA-28感受性が異なる分子的背景の解明を目指して解析を行なった。

メラノーマ細胞 (SK-MEL-28) にACA-28を添加した際の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析した。その結果、ACA-28処理により、酸化ストレス応答転写因子Nrf2により誘導される遺伝子群の発現が顕著に上昇した。さらに、ACA-28はNRF2タンパク質量も上昇させた。NRF2は生体が活性酸素種 (ROS) に曝露されると、抗酸化関連遺伝子群の転写活性化を介して細胞保護や抗炎症効果を発揮する。そこで、抗酸化剤NACの効果を検証したところ、ACA-28依存的なNRF2タンパク質量の増加が抑制されるとともに、ACA-28により誘導される細胞死が抑制された。これらの結果は、ACA-28がROSを介してNRF2量の上昇と、細胞死誘導効果を発揮していると推測される。そこで、細胞内のNRF2量やACA-28添加時のNRF2の増加が、ACA-28の細胞死誘導効果に影響を及ぼすのではないかと仮説を立て、NRF2の発現上昇と細胞死誘導効果の関係を解析した。6種類のがん細胞由来株を用いて、NRF2タンパク質量とACA-28感受性 (IC<sub>50</sub>) の関係を検証した結果、この2つには相関関係があり、NRF2タンパク質量が多い細胞ほど、ACA-28に耐性を示すことを発見した。さらに、HeLa細胞に対するACA-28の細胞死誘導効果が、NRF-2をノックダウンすることで有意に増強された。以上の結果から、NRF-2による酸化ストレス耐性機構が頑強ながん細胞では、ACA-28によるROSを介した細胞死誘導効果が発揮されにくい可能性が示唆された。

## ミトコンドリア蛋白質p13の遺伝子欠損マウスにおける呼吸器組織の異常

○野口 雅史<sup>1</sup>、原 さとみ<sup>2</sup>、岩田 圭子<sup>1</sup>、橋本 均<sup>2,3,4</sup>、新谷 紀人<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>和歌山県立医科大・薬・薬品作用学、<sup>2</sup>大阪大・薬・神経薬理学、<sup>3</sup>大阪大学院・連合小児発達・子どものこころセンター、<sup>4</sup>大阪大学院・データビリティフロンティア機構

[目的] ミトコンドリア呼吸鎖複合体I (複合体I) のアクセサリー分子であるp13は、II型糖尿病やパーキンソン病との関連が示唆されているが、内因性のp13の生理学的、病理学的意義については未だ十分に明らかになっていない。当研究室では、CRISPR/Cas9システムにより作製したp13の全身欠損性マウスについて、本マウスの多くが生後早期に致死性を示すこと、脂肪や精巣などの形成が抑制されることを見出している。本研究では同マウスの呼吸器組織に注目した解析を行った。[方法] 7週齢のp13のホモ欠損マウス(p13<sup>-/-</sup>)と同腹の野生型マウス(p13<sup>+/+</sup>)から左肺葉を摘出し、パラフィン切片を作製したあと、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色等による解析を行った。またpulmoDBやGEO Profilesを用いた*in silico*解析を行い、肺組織においてp13の発現量変化が生ずる条件を検索した。[結果] p13<sup>-/-</sup>肺では、肺胞腔の拡大が認められるとともに、その構造が単純化している傾向が認められた。そこでこれらを定量的に解析したところ、p13<sup>-/-</sup>肺はp13<sup>+/+</sup>肺と比較して、平均肺胞壁間距離が有意に増加しており、定量的にも肺胞腔が拡大していることが示された。一方でp13のmRNA発現は、発生期の肺胞形成時に重要な役割を果たす肺胞II型上皮細胞とその前駆細胞との比較において前者で増加すること、人工呼吸器誘発性の肺障害モデルにおいて著しく減少をすること、が示された。[考察] p13は肺胞の正常な形成に不可欠であることが示された。肺胞腔の拡大や肺胞構造の単純化といった構造変化は、肺気腫などの慢性肺疾患において高頻度に認められる。よってp13 mRNAの発現変化の知見も併せ、今回、呼吸器の発生や病態形成におけるp13の重要性が示されたと考える。

## ERK MAPKシグナル調節剤ACA-28は骨肉腫由来細胞株においてオートファジー依存的アポトーシスを誘導する

○上山 紗依<sup>1</sup>、高崎 輝恒<sup>2</sup>、上野 七海<sup>2</sup>、佐藤 亮介<sup>2</sup>、秋末 敏宏<sup>3</sup>、河本 旭哉<sup>3</sup>、宮本 智弘<sup>3</sup>、杉浦 麗子<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>近畿大・院薬・分子医療・ゲノム創薬、<sup>2</sup>近畿大・薬・分子医療・ゲノム創薬、<sup>3</sup>神戸大・医・整形外科

骨肉腫は骨にできるがんの中で最も代表的なものである。全体の5年生存率は、近年の技術の進歩により70-80%まで改善したものの、転移した場合の予後は極めて悪い。現在、骨肉腫の治療に用いられている化学療法には耐性や毒性などの問題があるため、より効果的な治療法が求められている。ACA-28は当研究室独自のスクリーニング法により得られたERK MAPKシグナル調節剤であり、ERK活性が亢進しているメラノーマ細胞や膵臓がん細胞において、ERKのさらなる活性化により細胞死の一種であるアポトーシスを誘導することが報告されている。そこで、本研究では、ERKの恒常的な活性化が報告されている骨肉腫由来細胞株に対しても、ACA-28がメラノーマ細胞や膵臓がん細胞と同様の細胞死誘導や細胞内シグナル変化を引き起こすかを検証した。

まず初めに3種類の骨肉腫由来細胞株(LM8、KTHOS、MG63)に対してACA-28を添加し、細胞増殖抑制効果を検証した。その結果、ACA-28はLM8細胞とKTHOS細胞に対して、メラノーマ細胞と比較して、より強い細胞増殖阻害活性を示した。次に、これらの骨肉腫細胞においてACA-28による細胞内シグナルへの影響を検証したところ、ACA-28はLM8細胞とKTHOS細胞においてアポトーシスを誘導することが確認できた。そこで、ACA-28によりLM8細胞とKTHOS細胞で誘導されたアポトーシスがERK活性依存的なものであるかを調べるためにACA-28とMEK阻害剤を併用して検証した。その結果、ACA-28は、LM8細胞においてERK依存的アポトーシスを誘導するのに対して、KTHOS細胞においてはERK非依存的な経路を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。そこで、KTHOSにおけるACA-28のアポトーシス誘導機構を調べた結果、オートファジー依存的アポトーシスを発見した。興味深いことに、ACA-28により誘導されるオートファジーはLM8細胞では確認できなかったため、KTHOS細胞特有のアポトーシス誘導機構であることが明らかとなった。今回、ACA-28が細胞株によって異なる経路で細胞死を誘導するという興味深い結果が得られたため、ACA-28添加時の各種シグナル伝達経路の変化の違いを細胞株間で比較した結果について報告する。

慢性腎臓病に対するSPPARM $\alpha$ ペマフィブラートの腎保護効果

○山田 佑人<sup>1</sup>、堀ノ内 裕也<sup>1</sup>、吉岡 駿<sup>1</sup>、村嶋 優香<sup>1</sup>、久禮 匠<sup>1</sup>、佐々木 尚史<sup>1</sup>、今西 正樹<sup>2</sup>、土屋 浩一郎<sup>2</sup>、  
四宮 一昭<sup>1</sup>、池田 康将<sup>3</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大・薬・医療薬学、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・医薬品機能生化学、<sup>3</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学

【背景】現在、世界で8億4,000万人以上が罹患していると推定されている慢性腎臓病 (CKD)は進行すれば日常生活が妨げられる腎性貧血に、さらに血液透析、腹膜透析や腎移植が必要な末期腎不全に至る。また、心血管疾患による死亡リスクも増加する。しかしながら現時点ではCKDに対する治療法は存在しないため、CKDを惹起・進展させないことが重要であり、予防法の開発は喫緊の課題である。核内受容体であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )は、脂質代謝において中心的役割を担うが、その欠損は腎線維化を悪化させることが報告されている。PPAR $\alpha$ アゴニストであるフィブラート系薬剤は脂質異常症治療薬であるが、CKD患者への使用の際は腎機能低下に伴う有害事象リスクの増大に注意が必要である。一方、選択的PPAR $\alpha$ モジュレーター (SPPARM $\alpha$ )であるペマフィブラートは従来のフィブラート系薬剤と異なり、PPAR $\alpha$ に対して高い選択性をもち低用量から活性化する胆汁排泄型の薬剤であるため、CKDにおいて効果が期待できる。そこで、本研究ではCKDにおけるペマフィブラートの腎保護効果を動物実験で検討した。

【方法】片側尿管結紮誘導腎線維化モデルマウス (UUOマウス)とアデニン誘導CKDモデルマウス (CKDマウス)にペマフィブラートを連日経口投与し、腎保護効果を検討した。

【結果】まず、UUOマウスにおいてペマフィブラートの腎保護効果を検討した。ペマフィブラート投与は、UUOマウス腎臓において増加した炎症性サイトカイン、細胞外マトリックス関連遺伝子発現の増加を抑制した。UUOマウスにおいてペマフィブラートによる腎保護効果が確認されたため、次にCKDマウスを用いて検討を行った。ペマフィブラート投与によりCKDマウスにおけるクレアチニンの増加や貧血は抑制され、腎線維化も抑制された。さらに、ペマフィブラート投与によりCKDマウス腎臓における炎症性サイトカイン遺伝子発現の増加も抑制された。

【結論】ペマフィブラート投与によりCKDマウスにおける腎機能低下、貧血、腎線維化、腎臓における炎症の抑制などが認められたことから、ペマフィブラートのCKDに対する腎保護効果が示唆された。

## 急性腎障害におけるマクロファージ鉄ストレスの役割の検討

○伊藤 達紀<sup>1,2,3</sup>、船本 雅文<sup>2</sup>、今西 正樹<sup>4</sup>、土屋 浩一郎<sup>4</sup>、池田 康将<sup>2</sup>

<sup>1</sup>徳島大・医・医学科、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・薬理学分野、<sup>3</sup>徳島大・医・Student Lab、<sup>4</sup>徳島大・院医歯薬・医薬品機能生化学

【背景】現在、急性腎障害（AKI）に対する効果的な治療法はなく、AKIの病態機序の解明が精力的に行われている。鉄は必須微量元素であるが、一方で鉄過剰は酸化ストレスの原因となる。我々の研究グループでは、各種の腎障害モデルを用いて鉄除去による腎障害抑制効果を報告してきた。しかし、従来の鉄キレート薬、鉄摂取制限による非特異的な鉄除去は貧血が生じる。以前の報告で鉄由来の炎症と酸化ストレスの中心がマクロファージであることを報告した（＝マクロファージ鉄ストレス）。本研究では、マウスの急性腎障害モデルを用いてマクロファージ鉄ストレスの役割を検討した。

【方法】LysM-CreマウスとFth floxedマウスを交配し、マクロファージ特異的Fth欠損マウス（FthKO）を作製した。FthKOマウスと野生型マウス（WT）を用いて、AKIモデルとして葉酸誘発性AKIモデルを用いた。葉酸誘発性AKI群（FA-AKI群）と対照群について、48時間後に血液、組織をサンプリングして解析・比較した。

【結果】WTのFA-AKI群におけるBUNと血清クレアチニンの増加はFthKOマウスで抑制された。病理組織での葉酸誘発性腎障害の程度ならびに腎障害マーカーKIM-1、LCN-2の遺伝子発現の増加はKOマウスで軽度だった。炎症性サイトカインマーカーTNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-6の遺伝子発現の増加はKOマウスで抑制された。マクロファージマーカーCD68の遺伝子発現の増加はKOマウスで抑制された。酸化ストレスマーカー4-HNEのタンパク発現の増加はKOマウスで軽減された。

【結論】マクロファージ鉄ストレスは葉酸誘発性AKIに関与することが示唆された。

## 高血圧自然発症ラットは、腎尿濃縮能低下に伴う体液喪失が引き金となり、皮膚の体液保持機構活性化と血圧上昇が生じる

○小倉 卓浩、北田 研人、中野 大介、西山 成

香川大・医・薬理学

近年、降圧剤によって血圧のコントロールは可能になったが、未だ治療抵抗性高血圧も存在し、本態性高血圧はその発症機序さえ不明である。我々は、5/6腎摘ラットの腎障害早期において、腎尿濃縮能低下による尿量増加が惹起され、その体液喪失を代償するために皮膚血管収縮に起因する経皮水分蒸散の抑制が生じ、腎性高血圧の一因になることを報告した。本研究では、本態性高血圧モデルの血圧上昇においても腎尿濃縮能低下や皮膚の体液保持機構が関与する可能性を検討した。まず、高血圧自然発症ラット(SHR)と対照のWistar Kyoto(WKY)を用いて代謝ケージでの測定を行ったところ、SHRではWKYに比して有意な尿量の増加と尿浸透圧の低下が認められ、飲水量は増加傾向を示した。一方、尿中浸透圧物質排泄量は両群間に有意差はみられなかった。よって、SHRでは腎尿濃縮能低下に伴う尿量増加により、体液喪失が生じていることが示唆された。また、SHRではWKYに比して有意な経皮水分蒸散量の減少と血圧上昇が認められた。故に、SHRの皮膚は血管収縮により皮膚の血管面積を減少させることで皮膚からの体液喪失を抑制している可能性が考えられた。また、皮膚の体液成分を測定したところSHRでは皮膚にナトリウムとカリウムの有意な蓄積が認められた。このことから、SHRでは腎尿濃縮能低下に対する代償機構として皮膚血管を収縮させると同時に皮膚に浸透圧物質を蓄積させることで経皮水分蒸散を抑制し、結果として血圧上昇が生じる可能性が考えられた。皮膚機能や腎尿濃縮能の改善が本態性高血圧の新たな治療標的になりうることが考えられた。

## Phosphorylation of twinfilin-1 involved in the reelin signaling plays a crucial role in spine development

○Dong Geyao<sup>1</sup>、伊藤 教道<sup>1</sup>、溝口 博之<sup>1</sup>、松崎 哲郎<sup>1</sup>、森 大輔<sup>2</sup>、永井 拓<sup>3</sup>、鍋島 俊隆<sup>3</sup>、尾崎 紀夫<sup>2</sup>、山田 清文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大・院医・医療薬学・病院薬剤部、<sup>2</sup>名古屋大・医・精神医学、<sup>3</sup>藤田医科大・医

Reelin, an extracellular glycoprotein, is involved in various of mammalian brain functions including neuronal migration, spine development and synaptic plasticity. Reelin binds to its cell surface receptors, and activates the downstream signaling through Src/Fyn kinases and adaptor protein Dab1.

Human genetic studies suggest that *RELN* is associated with schizophrenia and autism spectrum disorder. Previously, we reported that Orleans reeler (*Reln<sup>rl-Orl</sup>*) mice showed behavioral alteration with deficits in sociability, motor coordination, and anxiety. However, the molecular mechanism underlying these phenotypes remains unknown.

We have screened molecules in the brains of *Reln<sup>rl-Orl</sup>* mice which have an altered phosphorylation level compared to those in wild-type mice, and identified twinfilin1 (TWF1), an actin-monomer-binding protein, as a candidate protein. TWF1 plays an important role in the regulation of actin dynamics. Our studies have discovered that tyrosine phosphorylation level of TWF1 was decreased in *Reln<sup>rl-Orl</sup>* mice. Besides, we also found that TWF1 was phosphorylated by Src mainly at the position of tyrosine 309. Therefore, we have hypothesized that tyrosine phosphorylation of TWF1 may be involved in the reelin-dependent processes for spine development and synaptic plasticity. To test this working hypothesis, we have generated a mouse model in the C57BL/6J strain with *TWF1* gene mutation (TWF1-Y309F), and found that they exhibit abnormal spine morphology in prefrontal cortex of brain. Our results indicate that phosphorylation of TWF1 induced balanced dynamics of the neuronal cytoskeleton, which may be an important component of Reelin's function in spine development and synaptic plasticity.



## ALK5阻害剤SB431542の眼圧下降作用

○青島 弘汰<sup>1</sup>、稲垣 賢<sup>1</sup>、中村 信介<sup>1</sup>、原 英彰<sup>1,2</sup>、嶋澤 雅光<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬・薬効解析学研究室、<sup>2</sup>岐阜薬科大・薬・創薬イノベーション

【背景と目的】 緑内障は本邦の中途失明原因の第1位を占め、眼圧下降により病態の進行を部分的に抑制できる疾患として知られている。眼圧は眼房水量で調節されており、毛様体からの産生と、線維柱帯・シュレム管経路／ぶどう膜強膜経路を介した排出により制御される。現在、原発解放隅角緑内障の発症に関して有力な仮説の一つとして、線維柱帯への細胞外マトリックスの蓄積による眼房水の流出阻害が提唱されている。線維柱帯を標的とした治療薬として、唯一 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) 阻害剤が上市されているが、結膜炎、充血などの副作用が報告されており、新たな機序を有する治療薬の開発が望まれている。そこで本研究では、新規眼圧下降薬の探索を目的として、Activin receptor-like kinase 5 (ALK5) 阻害剤の眼圧制御並びに線維柱帯における細胞外マトリックスへの作用に関して検討を行った。

【方法】 初代培養ヒト線維柱帯細胞を用いてスクリーニングを行い、ウェスタンブロッティング法を用いて細胞外マトリックスの発現変動の評価を行った。初代ヒト線維柱帯細胞にALK5阻害作用を有するSB431542 (終濃度: 0.1~10  $\mu$ M) を添加し、48時間及び72時間培養後、ウェスタンブロッティング法およびRT-PCR法による細胞外マトリックスマーカー、線維芽細胞活性化マーカーの発現量変化の評価を行った。

8週齢雄性C57BL/6Jマウスに対して、SB431542 (1.0 %, 5  $\mu$ L) 及びROCK阻害剤であるY-27632 (1.0 %, 5  $\mu$ L) の点眼処置を行い、非侵襲的眼圧測定器TonoLabを用いて麻酔下において眼圧を測定した。

【結果】 培養ヒト線維柱帯細胞の検討では、SB431542は、fibronectin、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) タンパク質の発現を減少させ、fibronectin、collagen1のmRNAの発現を抑制した。正常マウスにおいて、SB431542 の点眼は投与後6、12、24時間後に眼圧下降作用 ( $-1.704 \pm 0.466$  mmHg,  $-1.167 \pm 0.383$  mmHg,  $-1.044 \pm 0.331$  mmHg) を示した。トラフ値を測定した検討においても眼圧下降を認めた。

【結論】 ALK5阻害剤は、点眼により眼圧下降作用を示し、その作用機序の一部に線維柱帯における細胞外マトリックスの産生抑制作用が関与する可能性が示唆された。以上より、ALK5は眼圧制御に対する新規治療標的因子として期待される。

## アスコルビン酸による活性酸素消去はSOD1欠損マウスの生命維持に必須である

○本間 拓二郎<sup>1,2</sup>、武田 裕司<sup>3</sup>、尾崎 司<sup>1</sup>、藤井 順逸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山形大・院医・生化学・分子生物学、<sup>2</sup>大阪市立大・院医・分子病態薬理学、<sup>3</sup>山形大・院医・免疫学

Superoxide dismutase 1 (SOD1)は活性酸素として最初に生じるスーパーオキシドの消去を担う抗酸化酵素である。SOD1遺伝子を欠損したマウスは一見すると正常で、貧血や皮膚の炎症・創傷遅延、脂質代謝異常を引き起こすものの、いずれの表現型も比較的緩徐である。ところが、このSOD1欠損マウスの胎児から線維芽細胞を採取すると、通常培養環境下（約21%酸素）においてp53依存的な増殖抑制および細胞死が生じる。この時、抗酸化物質アスコルビン酸（ビタミンC）を培地中に添加することによってSOD1欠損線維芽細胞の細胞死が顕著に抑制されることが分かった。マウスをはじめとする多くの実験動物はグルコースを出発材料としてアスコルビン酸を合成することができる。Aldo-keto reductase 1a (Akr1a) はアスコルビン酸合成反応を触媒する重要な酵素であり、Akr1a遺伝子を欠損したマウスはアスコルビン酸合成能が著しく低下する。Akr1a単独欠損マウスはアスコルビン酸を投与しなくとも1年程度は生存し、酸化ストレスが直接的な原因と考えられる障害は顕著ではない。そこで本研究では、SOD1とAkr1aを両方とも欠損したマウスを樹立し、生体内でのスーパーオキシドの毒性軽減におけるアスコルビン酸の役割について検証を試みた。樹立したSOD1・Akr1a二重欠損マウスは非常に病的な症状を示し、その多くが生後間もなく死亡したが、アスコルビン酸水(1.5 g/L)を自由摂取させることにより、一部のマウスは約1年程度延命した。一方、成獣でもアスコルビン酸の投与を休止すると、週齢や性別に関わらず、約2週間程度で死亡した。そこで、この死因を明らかにするために臓器の病理組織学的解析を行ったところ、投与休止マウスでは肺の気管支粘膜上皮の細胞の著明な腫大、リンパ球の浸潤が認められた。また、肺胞洗浄液中には炎症細胞数の増加や炎症性サイトカインの産生増加が認められた。以上の結果から、SOD1・Akr1a二重欠損マウスではアスコルビン酸量の減少によりスーパーオキシドの肺毒性が顕在化したことが明らかになった。各臓器の中でもとりわけ肺の酸化障害からの保護におけるアスコルビン酸の重要性が示され、アスコルビン酸によるスーパーオキシドの消去がSOD1欠損マウスの生命維持に必須であることが示唆された。

## チロシナーゼのパルミトイル化修飾によるメラニン合成制御機構

仁木 洋子<sup>1</sup>、○足立 直子<sup>1</sup>、深田 正紀<sup>2</sup>、深田 優子<sup>2</sup>、錦織 千佳子<sup>3</sup>、齋藤 尚亮<sup>1</sup>、上山 健彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大・バイオシグナル総合研究センター、<sup>2</sup>生理学研・生体膜研究部門、<sup>3</sup>神戸大・院医・皮膚科学

パルミトイル化修飾は脂質であるパルミチン酸がタンパク質のシステイン残基のチオール基に付加される可逆的な翻訳後修飾で、細胞内で様々なタンパク質の動態を変化させる。我々は、パルミトイル化修飾阻害薬である2-bromopalmitate (2-BP) が色素合成細胞であるメラノサイトを含む三次元培養皮膚モデルにて、メラニン色素産生を促進し、肌を黒化する現象を見出した。2-BP処置したメラノサイトでは、色素合成酵素であるチロシナーゼの発現量が有意に増加し、これはメラニン量増加の一因であると考えた。そこで、チロシナーゼにおけるパルミトイル化修飾を検討した結果、Cys<sup>500</sup>がパルミトイル化修飾を受けることを見出した。チロシナーゼは2-BP処置によるパルミトイル化修飾阻害、または、非パルミトイル化修飾変異(C500A)の導入により、タンパク質分解が低下し、安定性が増加した。そこで、チロシナーゼのパルミトイル化修飾に関わるパルミトイル化修飾酵素DHHCタンパク質をスクリーニングし、DHHC 2, 3, 15の関与が判明した。メラノサイトにおいて、これらのDHHCタンパク質のノックダウンは、2-BP処置と同様にメラニン産生を増加させ、逆にこれらDHHCタンパク質の恒常的発現細胞では、メラニン色素の産生は減少した。チロシナーゼは、メラノサイトにおいてDHHC 3とは小胞体とゴルジ体で、DHHC 15とは主にゴルジ体にて共局在した。また、DHHC 2とはメラニン色素を合成するメラノソーム上での共局在が観察された。これらの結果から、DHHCタンパク質、特に、DHHC2によるCys<sup>500</sup>のパルミトイル化修飾がチロシナーゼのメラニン合成酵素の機能を制御し、メラニン合成量の調節を行うことが明らかとなった。

## グルココルチコイド受容体拮抗薬(RU486)単独処理による脂肪細胞分化に伴う遺伝子発現特性

○橋本 剛、平野 勝也

香川大・医

【目的】脂肪細胞分化の研究では、マウス由来線維芽細胞(3T3-L1細胞)にイソブチルメチルキサンチン、インスリン、デキサメタゾンの3剤処理(MIX処理)を行い成熟脂肪細胞へ分化誘導するモデルが汎用されている。脂肪細胞分化におけるグルココルチコイド受容体の役割を明らかにするために行った予備的実験において、グルココルチコイド受容体拮抗薬RU486が、MIX処理よりも小さな脂肪滴を有する脂肪細胞への分化を誘導することを見出した。本研究は、DNAマイクロアレイ解析によりRU486誘導脂肪細胞の遺伝子発現特性を明らかにする。

【方法】MIX処理またはRU486処理を行い5日目の3T3-L1細胞(MIX群およびRU群)、および無処理の3T3-L1細胞(未処理群)からRNAを抽出し、Affymetrix社製Clariom\_S\_Mouse DNAチップを用いてマイクロアレイ解析を行った。マウス精巣上体および鼠径部脂肪組織のマイクロアレイデータを米国国立衛生研究所のGEO Data Setから入手し、Transcriptome Analysis Console 4.0.2(Thermo Fischer Scientific)とMetascape(NIH)を用いて解析した。

【結果】未処理群、MIX群、RU群のいずれも精巣上体または鼠径部脂肪組織と第一主成分は乖離していた。一方、RU群は、精巣上体脂肪組織と第二主成分で、鼠径部脂肪組織と第三主成分で近似していた。未処理群およびMIX群は、いずれの主成分において精巣上体とも鼠径部脂肪組織とも乖離していた。精巣上体脂肪組織の異なる3つのデータセットとRU群との発現パターン解析から得られた62種類の共通遺伝子についてGene Ontology解析を行った。その結果、DNAの複製に関与する生物学的プロセスがもっとも高いEnrichment scoreとして検出された。

【結論】RU処理による誘導された3T3-L1細胞由来脂肪細胞は、MIX処理による分化誘導に比べて生体の脂肪組織と類似した遺伝子発現特性を示した。RU486単独処理は、従来のMIX処理と比較して、より生体の脂肪細胞に近似する脂肪細胞を誘導する新しい方法であることが示唆された。

## 歯槽骨再生治療薬としての骨形成因子遺伝子発現プラスミドの可能性について

○山本 (河井) まりこ<sup>1</sup>、大浦 清<sup>2</sup>

<sup>1</sup>関西女子短期大学、<sup>2</sup>太成学院大・看護

背景と目的: 遺伝子治療はこれまでアデノウイルスやレトロウイルスなどウイルス性遺伝子発現プラスミドベクターを用いた治療が行われてきた。しかし、アデノウイルスベクターの大量投与による過剰免疫反応での死亡事故などウイルス性遺伝子発現プラスミドベクターを用いた遺伝子治療にはリスクが大きいといえる。一方、非ウイルス性遺伝子発現プラスミドベクターはウイルス性ベクターと比較し、より安全性が高いが、遺伝子導入効率が低いという欠点もある。われわれはこれまで非ウイルス性遺伝子発現プラスミドベクターを用いた骨再生治療法の開発を試みてきた。今回、骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein-2: BMP-2)遺伝子発現プラスミドベクターとelectroporationを用いた歯槽骨再生をラットにて試みた。材料と方法: Wistarラット雄の上顎第一大臼歯歯周組織へ非ウイルス性**bmp-2**発現プラスミドベクターを注入、直ちに50V., 50msec., 32pulseのelectroporationを実施した。3週間後に試料採取、非脱灰標本ならびに脱灰標本作成し、組織学的解析さらに骨形態計測学的解析を実施した。結果: ラット上顎歯周組織への遺伝子導入前と導入後の石灰化速度(Mineral Apposition Rate: MAR)を比較したところ、遺伝子導入3日から6日のMARが有意に増加した。また、一次パラメーターの比較においてもコントロール群と比較し、遺伝子導入群において骨形成方向への指標が増加した。結論: ラット歯周組織への非ウイルス性BMP-2遺伝子発現プラスミドベクター導入によって、遺伝子導入部位での歯槽骨の再生が認められた。今回の結果から、歯槽骨再生治療薬として、非ウイルス性骨形成因子遺伝子発現プラスミドが有効である可能性が示唆された。

## 放射線障害に対する葉酸の保護作用機構解析

○西村 有平<sup>1</sup>、八十島 左京<sup>1</sup>、樋口 愛菜<sup>1</sup>、鹿島 誠<sup>2</sup>、小岩 純子<sup>1</sup>、白水 崇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>三重大・院医、<sup>2</sup>青学大・理工・化学・生命

放射線を用いた診断・治療の発展により、医療被ばくの機会が増加している。胎児の器官形成期における被ばくは、先天異常の発生と密接に関係するため特に注意が必要である。放射線防護薬の開発は、医療における安全な放射線利用に向けた重要なアプローチの一つであると考えられる。本研究では、ゼブラフィッシュの放射線障害に対する葉酸の保護作用機構解析を試みた。ゼブラフィッシュ仔魚へのX線照射による下顎形成への影響をアルシアンブルー染色で解析したところ、受精36時間後に8GyのX線を照射することで著明に下顎形成が傷害されることを見出した。また、葉酸（200 microM）をX線照射の1時間前から投与することにより、X線照射による下顎形成障害が有意に抑制されることを見出した。この放射線障害に対する葉酸の保護作用機構の解明を目的としてRNA-Seqを実施し、X線照射により障害され、葉酸投与により回復する遺伝子発現変化を同定した。現在、これらの遺伝子発現変化が関与するシグナル経路と、放射線障害に対する葉酸の保護作用機構との関連性について解析を進めている。

## 腫瘍内マクロファージに対する低酸素誘導因子機能とその影響

○松永 慎司、平川 遼、寒川 訓明、徳留 健太郎、本間 拓二郎、富田 修平

大阪公大・院医・分子病態薬理

腫瘍組織内には癌細胞のみならず血球系細胞や血管系の細胞など種々の細胞が存在している。腫瘍組織内を走向する血管は正常組織の血管と異なり、不規則かつ蛇行している。微小血管を構成する血管内皮細胞同士の結合は未熟であるため、血液漏出が生じる。また、これらの事象は組織間質圧の上昇、低酸素、低栄養の要因となり、腫瘍組織特異的な環境、つまり腫瘍微小環境形成に関与する。我々はこれまでに、プロリン水酸化酵素（PHD）阻害薬を担癌モデルマウスに投与することにより腫瘍組織内に血管新生を促進するとともに血管成熟化を亢進すること。ならびに、これらの現象が腫瘍組織内の血流、および低酸素の改善に繋がり、腫瘍微小環境が改善され、治療抵抗性が改善することを報告してきた。また同時に、腫瘍増大抑制も生じ、これらの現象にマクロファージの関与が示唆された。しかしながら、腫瘍組織内マクロファージは腫瘍進展に寄与するとされる。そこで本研究ではPHD阻害薬の作用点である低酸素誘導因子（HIF）の組織内マクロファージの機能に与える影響について検討するため、マクロファージ特異的HIF-1およびHIF-2ノックアウトマウスを用いて腫瘍に対する影響について検討を行った。

マウス腫瘍皮下移植モデルはマウス側腹部にマウス肺癌細胞株であるlewis lung carcinoma (LLC) を皮下に移植することにより作製した。腫瘍の体積は腫瘍を計測することにより算出した。腫瘍血管の評価は血管内皮細胞マーカーであるCD31の染色により腫瘍内の血管性状について評価を行った。

マクロファージ特異的HIF-2ノックアウトマウスではPHD阻害薬投与による腫瘍増大の抑制を認めたが、マクロファージ特異的HIF-1ノックアウトマウスではPHD阻害薬を投与しても腫瘍増大の抑制は認められなかった。また、マクロファージ特異的HIF-2ノックアウトマウスではPHD阻害薬投与により腫瘍血管の正常化を認めたのに対し、マクロファージ特異的HIF-1ノックアウトマウスではPHD阻害薬を投与しても腫瘍血管の正常化は認められなかった。また、腫瘍内マクロファージが血管形成および成熟化に寄与している可能性が示唆された。

## 抑制性DAMPsとしてのリボソーム構成分子RPL9の同定

○渡邊 政博<sup>1</sup>、豊村 隆男<sup>1</sup>、和氣 秀徳<sup>2</sup>、西中 崇<sup>2</sup>、ハティポール オメル ファルク<sup>2</sup>、高橋 英夫<sup>2</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、森 秀治<sup>1</sup>

<sup>1</sup>就実大・薬、<sup>2</sup>近畿大・医、<sup>3</sup>岡山大・院医歯薬

【背景と目的】過去に我々は、還元糖とアミノ基を有する分子が非酵素的に結合することによって生じる分子群である終末糖化産物（AGEs）の作用を解析するなかで、AGEsと結合する新規分子としてリボソーム構成分子のひとつであるRPL9を見出した。これまでにAGEsは、細胞の損傷に伴い細胞外に放出され、炎症反応を引き起こすダメージ関連分子パターン（DAMPs）と総称される分子のひとつであるHMGB1との相互作用を介して相乗的に炎症反応を促進することを見出している。このことから、新たに見出したAGEs結合分子であるRPL9もまた、DAMPsとして作用する可能性が考えられた。そこで本研究において我々は、RPL9が新規DAMPsである可能性を検討することを目的に以下の解析を行った。

【方法】LPSの投与により作製した炎症病態マウスと非投与マウスにおける血清中のRPL9のタンパク質量の変化をHMGB1と比較した。タグ配列を付加したリコンビナントRPL9とHigh mobility group box-1（HMGB1）の発現系を構築し、タグ配列を用いたアフィニティー精製によりリコンビナント分子を調製した。これらのリコンビナント分子をRAW264.7細胞に与え、細胞応答の変化を検討した。

【結果と考察】HMGB1は炎症病態下において細胞から放出され、血清中に分布することが知られている。本研究において作製した炎症病態マウスの血清中において、RPL9はHMGB1と同様に増加することが示された。この結果は、生体内においてRPL9がDAMPsと同様の挙動を示すことを示唆している。一方で、RPL9は、HMGB1とは異なり、細胞に炎症反応を誘導する作用をもたないことが示された。さらに、RPL9をHMGB1と同時に細胞に与えると、HMGB1により誘導される炎症反応が有意に抑制されることが示された。これらの結果は、RPL9がDAMPsと同様の挙動を示しながら、DAMPsの作用を抑制する作用を持った抑制性DAMPsである可能性を示唆している。



## 肥満細胞の抗原抗体反応におけるABCA7タンパク質の役割

○浅井 遥<sup>1</sup>、川口 万緒<sup>1</sup>、村井 ひなの<sup>1</sup>、磯村 玲奈<sup>1</sup>、佐藤 光<sup>1</sup>、小野 紗楓<sup>1</sup>、山崎 杏珠<sup>1</sup>、堂前 純子<sup>2</sup>、福石 信之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>金城学院大・薬、<sup>2</sup>中部大学・応用生物学部・管理栄養

【背景・目的】 ABCA7タンパク質は脳及び免疫系の組織で特異的に発現しており、アルツハイマー病の原因遺伝子の一つであると報告されている。また、脳の神経細胞やミクログリアの細胞内情報伝達系タンパク質のリン酸化を制御し、アミロイドβタンパク質蓄積に関連しているとの報告もある。一方で、免疫系の組織での生理学的役割は未だ明らかとなっていない。今回、免疫系細胞の一つである肥満細胞における細胞内情報伝達系へのABCA7の影響を検討し、肥満細胞でのABCA7の役割を明らかにすることとした。

【方法】 野生型C57BL/6マウス及びABCA7遺伝子欠損C57BL/6マウスから得た骨髓細胞をIL-3存在下で培養し、各骨髓由来肥満細胞(WT、A7KO)を作成した。これら各肥満細胞をIgE抗体で24 h感作後、抗原抗体反応を惹起し、0.5, 3, 10分後に反応を停止させ、細胞内情報伝達に関わるSyk, Gab2, Akt, p38, PLCγ2のリン酸化をWestern blot法を用いて検出した。また、各肥満細胞におけるFcεRI及びc-kitの発現量をフローサイトメトリー法で検討した。さらに、各肥満細胞をIgE抗体で24 h感作し、抗原抗体反応を惹起30分後の上清と細胞内のβ-hexosaminidase活性を測定し、脱顆粒率を測定した。

【結果・考察】 肥満細胞の抗原抗体反応は、FcεRIに結合したIgEと抗原との架橋により始まり、SykやPLCγ2, Gab2, Akt, p38のリン酸化を経て脱顆粒やサイトカイン産生を引き起こす。WTのSyk, PLCγ2, Gab2は0.5, 3分でリン酸化を認めた。さらに、WTのAkt, p38は3, 10分でリン酸化を認めた。一方、A7KOのSyk, PLCγ2はWTと同様の経時的なリン酸化を認めたが、Gab2, Akt, p38は経時的なリン酸化を認めなかった。また、A7KOにおけるFcεRIの発現量はWTと同程度であった。A7KOの抗原抗体反応による脱顆粒率はWTと比較して半分程度に低下した。したがって、ABCA7は肥満細胞の抗原抗体反応による脱顆粒の細胞内情報伝達系を制御する役割を担っている可能性が示唆された。また、抗原抗体反応により惹起されるサイトカイン産生におけるWTとA7KOの相違についても報告する予定である。

ATP透過性ヘミチャネルによる骨芽細胞分化調節におけるKir2.1 K<sup>+</sup>チャネルの役割

○鬼頭 宏彰、劉 澤成、雑賀 紀明、遠藤 京子、梶栗 潤子、大矢 進

名古屋市立大・院医

【背景・目的】骨組織は、骨形成と骨吸収のバランスにより恒常性が維持されている。前骨芽細胞の細胞増殖・分化は骨芽細胞の成熟において重要な役割を果たしており、骨芽細胞分化障害は骨代謝性疾患の原因となると考えられている。内向き整流性K<sup>+</sup>チャネル (Kir2.1) は、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を調節することにより、骨芽細胞の分化に関与することが報告されている。さらに、Panx3やCx43などのヘミチャネルから放出されたATPは、パラクライン/オートクラインに作用することで骨芽細胞分化を促進する。本研究の目的はKir2.1を介した膜電位制御によるヘミチャネルからのATP放出制御と骨芽細胞に機能発現するP2X受容体との機能連関を解明することで、骨芽細胞分化におけるKir2.1を介したATPシグナルの重要性を明らかにすることである。

【結果・考察】骨芽細胞分化を誘導したマウス前骨芽細胞株MC3T3-E1において、Kir2.1阻害薬 (ML133) およびヘミチャネル阻害薬 (Carbenoxolone) は骨芽細胞分化マーカーの発現を抑制した。骨芽細胞分化に伴うATP放出に対するKir2.1阻害の作用を検討したところ、ML133投与群によりATP放出量が有意に減少した。また、MC3T3-E1細胞におけるATP誘導性[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は、Kir2.1阻害薬により減弱した。ATP刺激による骨芽細胞分化への影響を検討したところ、ATP刺激により発現亢進した骨芽細胞分化マーカーは、P2X4阻害薬 (5-BDBD) の処置により有意に発現が抑制された。さらに、マウス胎児中足骨を用いた軟骨内骨化モデルにおいて、Kir2.1阻害薬、ヘミチャネル阻害薬、P2X4阻害薬は、いずれも軟骨内骨化を有意に抑制した。以上の結果より、Kir2.1は骨芽細胞からのATP放出を亢進してP2X4受容体を介したCa<sup>2+</sup>流入を促進することで骨芽細胞分化を誘導する可能性が示された。