

一般演題要旨

C 会場

C-1-1 左心性疾患に伴う肺高血圧症モデルマウスにおけるカルシウムシグナルの亢進



○松本 和幸¹、近藤 るびい¹、鈴木 良明¹、山村 彩²、山村 寿男¹

¹名古屋市立大・院薬・細胞分子薬効解析、²愛知医科大・医・生理

【背景】肺高血圧症(PH)は、慢性的に肺動脈圧が上昇する予後不良の難治性疾患である。PHの臨床分類第1群は、肺動脈性肺高血圧症(PAH)で難病に指定されている。PAHの主な病因は、肺動脈平滑筋細胞(PASMCs)の過剰な増殖による肺血管リモデリングである。PASMCsの増殖は、細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_{cyt})の上昇により誘発される。PAHのPASMCsでは、Ca²⁺透過性チャネルの発現や機能変化により、Ca²⁺シグナルが亢進する。第2群は、左心性疾患に伴う肺高血圧症(PH-LHD)でPHの中で最も患者数が多い。PH-LHDのPASMCsにおけるイオンチャネルの発現や機能変化、Ca²⁺シグナルとの関連は明らかになっていない。本研究では、PH-LHDモデルマウスを作製し、イオンチャネルを介した細胞内Ca²⁺シグナルとの関連を検討した。

【結果】PH-LHDモデルマウスは横行大動脈縮窄術(TAC)により作製した。TACマウスでは、PHの特徴である肺血管の中膜肥厚(肺血管リモデリング)および右室収縮期圧の上昇が認められた。次に、PAHにおいて発現亢進するストア作動性Ca²⁺(SOC)チャネルの発現解析を行った。リアルタイムPCRの結果、TACマウス肺動脈平滑筋において、Orai1/2、STIM1/2、TRPC6のmRNA発現が上昇していた。また、ウエスタンブロットの結果、Orai1タンパク質の発現上昇が認められた。そこで、TACマウスからPASMCsを急性単離して、[Ca²⁺]_{cyt}変化を可視化解析した。その結果、静止時[Ca²⁺]_{cyt}の上昇とストア作動性Ca²⁺流入(SOCE)の増大が認められた。最後に、SOCEが細胞増殖に与える影響を明らかにするため、TACマウス初代培養PASMCsを用いて、細胞増殖アッセイを行った。その結果、PASMCsの増殖は、Orai1阻害薬CM4620、TRPC6阻害薬 SAR7334、SOCE阻害薬 YM58483により抑制された。

【結論】PH-LHDモデルマウスであるTACマウスのPASMCsでは、SOCチャネルを介したSOCEがCa²⁺シグナルを亢進させ、細胞増殖に寄与することが示唆された。本研究成果は、PH-LHDの病態機構の解明やイオンチャネルを標的とした新規PH-LHD治療薬の創製に繋がることが期待される。

C-1-2 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬が虚血性急性腎障害に及ぼす影響



○村本 聡史、中川 恵輔、杉山 美羽、井上 悠、佐々木 里真、北條 賢太郎、田和 正志、大喜多 守

大阪医科薬科大・薬・病態分子薬理

【背景・目的】急性腎障害(AKI)における腎機能低下は一過性であり、完治可能な病態であるとも考えられてきたが、AKIの20~30%が慢性腎臓病へ移行し、透析導入されるケースが極めて多いため、AKIに対する治療薬の開発が喫緊の課題である。可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)は一酸化窒素の受容体として働き、cGMPを産生することで血管拡張作用や抗炎症作用など多彩な生理作用を発揮する。AKIの中でも虚血性AKIは、過剰な活性酸素種の産生や再灌流時のCa²⁺過負荷に伴う腎動脈の血管収縮が病態形成の一因であると考えられている。そのため、血管拡張作用を有するsGC刺激薬は虚血性AKIに対し保護効果を示す可能性が考えられる。そこで本研究では、虚血性AKIに対するsGC刺激薬BAY 41-2272虚血前投与の影響を検討した。

【方法】8週齢の雄性SDラットを実験に供した。右腎摘出より2週間の回復期間を設け、その後左腎動静脈をクレンメにより45分間阻血し、次いで再灌流(クレンメを除去)することで虚血性AKIモデルを作製した。BAY 41-2272(100, 300および500 μg/kg)は虚血5分前に頸静脈より投与した。一部の試験では、BAY 41-2272投与の影響がsGCに依存しているか否かを調べるために、sGC阻害薬ODQ(5 mg/kg)をBAY 41-2272投与30分前に同様の方法で投与した。再灌流24時間後から5時間の採尿を行い、その後の剖検において血液および左腎を摘出し各種評価に供した。

【結果】虚血再灌流(IR)処置は腎機能マーカーである血漿クレアチニンの増加およびクレアチニンクリアランスの低下を引き起こし、BAY 41-2272 100 μg/kg投与は大きな影響を与えなかったが、300および500 μg/kg投与は明らかな改善効果を示した。またIR処置により生じた腎組織障害(蛋白円柱、鬱血・出血および尿細管壊死)は、腎機能障害と同様に、BAY 41-2272投与により用量依存的に抑制された。加えて、ODQ前投与は上述したBAY 41-2272の腎保護効果を部分的にキャンセルした。

【考察】sGC刺激薬BAY 41-2272の虚血前投与は、腎IRに伴う腎機能障害ならびに腎組織障害に対して、顕著な病態改善効果を発揮した。加えてその改善効果はODQ前投与により一部抑制されたことから、BAY 41-2272投与による腎保護効果はsGCに依存していることも明らかとなった。

C-1-3 Roxadustatがラット胸部大動脈の血管緊張調節に及ぼす影響

○中川 恵輔、大柴 依子、田和 正志、大喜多 守

大阪医科薬科大・薬・病態分子薬理

新たな腎性貧血治療薬として、低酸素誘導因子 (HIF) -プロリン水酸化酵素 (PH) 阻害薬が開発され、臨床で広く使用されている。数年前に実施された臨床試験では、HIF-PH阻害薬roxadustat (Rox) は造血作用だけではなく、軽度な降圧作用を有することも示された。しかしながら、Roxが血管緊張調節に与える影響については明らかになっていないため、本研究ではこの点についてラット胸部大動脈を用いてマグヌス法により検討した。その結果、Rox (1-100 μM) 曝露は血管内皮の有無に関わらず濃度依存的な弛緩作用を引き起こしたが、この作用は内皮除去により明らかに減弱した。加えて、一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬L-NAME (100 μM)、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 阻害薬ODQ (10 μM) およびブラジキニンB2受容体阻害薬icatibant (1 μM) の前処置によっても、Rox誘発血管弛緩反応は有意に抑制された。すなわち、Roxは血管内皮に発現するブラジキニンB2受容体を介することで内皮型NO合成酵素を刺激し、次いでNO/sGC経路が活性化される可能性が示唆された。またRoxの血管平滑筋に対する影響を検討したところ、内皮除去標本に対する非選択的カリウムチャンネル阻害薬tetraethylammonium (10 mM) の前処置は、Rox誘発血管弛緩反応をほぼ完全に消失させた。このことから、Roxは血管平滑筋のカリウムチャンネルを開きさせて血管弛緩を引き起こすことも明らかとなった。さらに血管収縮に対するRoxの影響を評価したところ、Rox前処置はphenylephrine (1 nM-1 μM) およびangiotensin II (内皮存在下: 0.1 μM 、内皮除去標本: 0.01 μM) 誘発血管収縮を血管内皮の有無に関わらず有意に抑制した。なお、他のHIF-PH阻害薬 (daprodustat, enarodustatおよびvadadustat) とRoxの血管弛緩効力を比較すると、Rox > vadadustat > enarodustat > daprodustat (ほぼ弛緩せず) の順で強かった。

以上の結果から、Roxは造血作用だけではなく、血管系においては血管内皮および血管平滑筋の両方に作用することで血管緊張調節に影響を与えることが明らかとなった。ただし、他のHIF-PH阻害薬ではRoxと同程度の血管弛緩は得られなかったことやRoxの反応が極めてacuteであることを考慮すると、RoxはHIF安定化と無関係のオフターゲットを有していることが考えられるため、この点に関しては今後詳細な検討が必要である。

C-1-4 タバコ煙抽出物(CSE)は、ラットおよびヒトiPSC由来心筋細胞において細胞内Ca²⁺動態異常とミトコンドリア機能障害を介して、収縮・拍動障害および細胞死を誘導する

○安田 純平、松村 早季子、納富 拓也、陳 以珊、西谷 (中村) 友重

和歌山県立医科大・医・薬理学講座

【背景】喫煙は動脈硬化や虚血性心疾患などの循環器疾患の主要な危険因子である。その原因の1つとして血管内皮障害などの間接的影響が指摘されている。しかし、喫煙物質が心筋細胞に及ぼす直接的な影響やその細胞内機序については不明な点が多い。本研究では、CSEが心筋細胞の収縮機能や細胞内Ca²⁺動態、ミトコンドリア機能に及ぼす影響を、ラット由来の培養または急性単離心室筋細胞およびヒトiPSC由来心筋細胞を用いて検討した。

【方法】CSEは市販タバコ (hi-lite) より調整したものを使用した。培養心筋細胞は生後1日齢のSprague-Dawleyラット心室筋より単離し、3日後に自動拍動することを確認した。急性単離心室筋細胞は7-9週齢オスラットより単離した。培養心筋細胞の生存率はMTSアッセイおよびカルセイン蛍光観察により測定した。また培養心筋細胞の自動拍動数および急性単離心筋細胞の収縮率、細胞内Ca²⁺動態はCell Motion Imaging Systemによって解析した。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ミトコンドリア由来活性酸素種 (ROS) 産生、ミトコンドリア膜電位とミトコンドリア膜遷移孔の開口、シトクロムc局在を蛍光観察した。

【結果】0.1%以上のCSEは濃度・時間依存的にラット培養心筋細胞の自発拍動速度および生存率を低下させた。また、1% CSEは単離心筋細胞の収縮率を低下させた。同様の収縮不全・拍動不全はヒトiPSC由来心筋細胞でも観察された。一方、1% CSEは細胞内Ca²⁺トランジェントを増大させ、不規則なCa²⁺トランジェント発生頻度を増加させた。動態解析の結果から、CSEは筋小胞体 (SR) へのCa²⁺取り込みを促進させ、SRにおけるCa²⁺の異常な流入/放出を促す可能性が示唆された。またCSEは、細胞内Ca²⁺動態異常に続発するミトコンドリア障害イベントである、ミトコンドリア由来ROS産生、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア膜遷移孔の開口を誘導した。さらにCSEは、細胞死誘導シグナルである、ミトコンドリアからのシトクロムc放出を惹起した。

【考察】以上の結果から、CSEは心筋細胞において細胞内Ca²⁺動態異常を引き起こし、それに伴うミトコンドリア機能異常を介して心筋細胞の収縮機能障害および細胞死をもたらすことが明らかとなった。

C-1-5 希少糖アリトールは生体内で浸透圧活性を有する



○大藪 公平、Hossain Akram、藤澤 良秀、Rahman Asadur、北田 研人、西山 成

香川大・医・薬理学

【目的】希少糖とは自然界に微量しか存在しない単糖とその誘導体である。糖質の中には、グルコース、マンニトール、ソルビトールなど生体内で浸透圧活性を有するものがあることが知られているが、希少糖については不明である。本研究では、希少糖アリトールの浸透圧活性をin vitroおよびin vivoで検討した。

【方法】培養ヒト肝細胞癌細胞（HepG2）において、浸透圧ストレス応答因子である浸透圧感受性エンハンサー結合蛋白質（TonEBP）の浸透圧特異的活性を、ルシフェラーゼによるレポーターシステムで測定した。また、9-11週齢の雄性Sprague-Dawleyラットに対して5%（274 mM）及び20%（1096 mM）アリトール溶液の静脈内投与を、6週齢の雄性C57BL6Jマウスに対して7日間3%アリトール溶液の飲水投与を行い、尿量・尿濃縮能、体内電解質・水分バランスなどを評価した。

【結果】HepG2細胞において、100 mMアリトールは同濃度のグルコースやマンニトールに比して、浸透圧応答依存性TonEBPルシフェラーゼ活性を有意に増強した。麻酔下ラットに対してアリトールを静脈内投与すると、尿量の増加、尿浸透圧の低下が生じ、浸透圧利尿の特徴が認められた。一方、マウスにアリトールを継続的に飲水投与すると軟便を認め、代償的に尿量は減少傾向を示し、結果的に、全身の水分、ナトリウム、カリウム含量には影響を与えなかった。

【考察】以上の結果より、アリトールは生体内で浸透圧活性を有しており、静脈内投与の場合は浸透圧利尿が、経口投与の場合は腸からの水排泄増加が誘導されることが示唆され、体液過剰や便秘などに有効である可能性が考えられた。

C-1-6 慢性血栓塞栓性肺高血圧症におけるhistidine-rich glycoproteinおよびsoluble receptor for advanced glycation end-productsの量的変動

○出石 恭久^{1,2}、木山 和子²、小川 愛子²、北村 佳久¹、松原 広己^{2,3}

¹就実大・薬・薬物治療学、²岡山医療セ・臨研、³岡山医療セ・循内

【背景】慢性血栓塞栓性肺高血圧症（chronic thromboembolic pulmonary hypertension : CTEPH）は肺動脈特異的な閉塞病変により、右心不全に至る難治性疾患である。CTEPHは早期診断による早期治療が生命予後を改善する。しかしながら、本疾患は特異的な自覚症状が存在せず、早期診断が難しいため治療まで時間を要する事も少なくない。そのため、新たな視点に基づく病態の指標が必要とされている。近年、CTEPHの病態形成に炎症が関与している事が示唆されていることから、本研究ではCTEPH症例の血漿を用いて様々な凝固線溶系や免疫、炎症時の生体反応調節を行っているhistidine-rich glycoprotein（HRG）および健康な肺に高発現して炎症を惹起する受容体の可溶性分子種であるsoluble receptor for advanced glycation end-products（sRAGE）について、CTEPHの治療前後の量的変動について検討した。

【方法】岡山医療センター循環器内科で2011年1月以降にバルーン肺動脈形成術が行われたCTEPH患者のうち、平均肺動脈圧（mean pulmonary arterial pressure : mPAP）が40mmHg以上の重症例で治療後のmPAPが25mmHg未満と顕著に改善した33症例を対象とし、治療前後の血漿中のHRGとsRAGEをELISA法により測定した。さらに、対照として健康者33例についても同様にHRGとsRAGEを測定した。健康者ではHRGは年齢と有意な正の相関を示したことから、HRGにおける健康者とCTEPH症例の解析では全例解析に加えて傾向スコアマッチング法を用いて年齢によるバイアスを調整した解析を行った。一方、sRAGEは年齢および性別と統計学的に有意な関係性が認められなかったため全例で解析を行った。

【結果】健康者に対しCTEPH症例ではHRGが有意に低値を示したが、sRAGEは健康者と比較してCTEPH症例で有意に高値を示した。さらに、治療前と比較して治療後のHRGは有意に上昇し、健康者と同等のレベルとなった。一方、sRAGEも有意に低下し、健康者と同等のレベルとなった。

【考察】重症度の高いCTEPH患者は、健康者と比較してHRGは低値を示しsRAGEは高値を示すこと、さらに治療後の顕著なmPAPの改善により両因子とも健康者と同じレベルになることが明らかとなった。本研究結果より、HRGとsRAGEは重症度の高いCTEPHの治療により変動する血漿中の分子である可能性が示唆された。

C-1-7 一酸化窒素がアデニン腎障害ラットのインドキシル硫酸産生増加におよぼす影響

○小淵 修平、鄭 慶実、林 優成、山崎 怜奈、上田 晴康

兵庫医科大・薬・薬理

【背景・目的】

血管内皮障害は慢性腎臓病（CKD）における心腎症候群の主要な悪化因子であることが知られている。我々は、CKDモデルであるアデニン腎障害ラットの血管機能障害には尿毒素であるインドキシル硫酸（IS）の血中濃度増加が密接に関与することを報告した。ISによる血管機能障害メカニズムを解析する目的で、同ラットに抗酸化薬を処置したところ、血管機能障害の改善がみられたが、IS濃度上昇も抑制された。このことから酸化ストレスがIS産生に関与している可能性が考えられた。さらにIS産生に対する酸化ストレスの関与を、S9mixを用いて検討する中で、一酸化窒素（NO）がIS産生を強く抑制することを発見した。そこで本研究では、NOがアデニン腎障害ラットのIS産生および血管機能におよぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】

アデニン腎障害ラットはSDラットに0.75%アデニン食を4週間摂餌させることにより作製した。アデニン摂餌2週間後にNO供与体として亜硝酸塩を30 mg, 100 mg/Lとなるよう飲水投与した。アデニン摂餌4週後に麻酔下で右大腿動静脈にカテーテルをそれぞれ挿入し、血圧の測定および薬物の投与を行った。無処置および各種処置薬存在下におけるアデニン食群と亜硝酸塩処置群のアセチルコリン（ACh）およびニトロプルシドナトリウム（SNP）による血圧下降を比較することで血管内皮および平滑筋機能について解析した。また2週間ごとに採血採尿を行い、得られた血液・尿より各種腎機能パラメータを測定した。

【結果】

亜硝酸塩100 mg/L処置によりアデニン腎障害ラットにおける血中インドキシル硫酸濃度の増加は抑制された。アデニン食群および亜硝酸塩群においてNO合成阻害薬であるニトロアルギニン（L-NA）処置によりAChの血圧下降は変化しなかった。COX阻害薬とL-NA処置下におけるAChによる血圧下降はアデニン食と比較して亜硝酸塩処置群では増加する傾向がみられた。アデニン食と比較して亜硝酸塩100 mg/L処置群ではSNPによる血圧下降は有意に増大した。

【結論】

亜硝酸塩はアデニン腎障害ラットでみられたIS産生増加を抑制することで、障害された血管内皮由来過分極（EDH）ならびに血管平滑筋機能を改善すると考えられた。

C-2-1 抗がん剤vincristine誘起末梢神経障害の発現におけるマクロファージおよびSchwann細胞由来HMGB1と局所血液凝固系の相反する役割



○迫 桃子¹、青木葉 優衣¹、谷津 健太¹、関口 富美子¹、坪田 真帆¹、友野 靖子²、西堀 正洋²、川畑 篤史¹

¹近畿大・薬・病態薬理、²岡山大・院医歯薬・創薬研究推進

我々は、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）の発症に、核内タンパク質high mobility group box 1（HMGB1）の細胞外放出が関与すること、またHMGB1を放出する細胞は、抗がん薬の種類によって異なることを明らかにしている。一方、thrombin（TB）は、内皮thrombomodulin（TM）依存性にHMGB1を分解しCIPN発症に対して抑制的に働くほか、TB受容体PAR1を活性化することで炎症性疼痛を抑制することを報告している。また、外科的な傷害を受けた坐骨神経（SN）では、その周辺局所においてthrombin産生亢進が起こることが他のグループから報告されている。今回は、vincristine（VCR）によるCIPN発症におけるマクロファージ（Mφ）およびSchwann細胞（SC）由来HMGB1の役割とthrombinの影響、さらにSN由来SCにおける凝固因子発現・遊離に及ぼすVCRの効果を検討した。マウスにおいてVCR 0.2 mg/kgを1～2週間反復腹腔内投与することでCIPNが発症し、これは抗HMGB1中和抗体、可溶性TM（TMα）、MφからのHMGB1遊離を抑制するethyl pyruvateあるいはMφ枯渴薬liposomal clodronateにより抑制された。TB受容体PAR1遮断薬vorapaxarはVCRによるCIPN発症に全く影響しなかった。マウスMφ由来RAW264.7細胞および成熟分化させた新生ラットSN由来SCにおいて、VCRはそれぞれ100 nMおよび10 nM以上でHMGB1の細胞外放出を誘起した。VCR刺激SC細胞では、成熟SCマーカーであるmyelin basic protein（MBP）のmRNA発現低下とtissue factor（TF）のmRNA発現増加および細胞外放出が認められたが、第II、VIIおよびX因子のmRNA発現量は変化しなかった。VCR刺激したMφおよびSC細胞の培養上清に放出されたHMGB1は、TB 10-20 U/mLを添加することで4時間後にはほとんど分解された。以上より、VCRによるCIPNの発症には、MφとSCに由来するHMGB1が関与し、VCRに暴露されたSCでは脱分化とともにTFの発現誘導と細胞外放出がおこり、神経周囲で局所的に産生されたTBがHMGB1を分解することでCIPN発症に対して抑制的に働いているのではないかと考えられる。

C-2-2 HMG-CoA還元酵素阻害剤はGSTを介して抗がん剤誘発性機械的刺激応答閾値低下を改善する

○相澤 風花^{1,2}、岡林 亜美²、森山 大嗣²、八木 健太^{2,3}、新村 貴博^{2,3}、合田 光寛^{1,2}、石澤 有紀^{2,4}、川田 敬^{2,5}、石澤 啓介^{1,2,3}

¹徳島大学病院・薬剤部、²徳島大・院医歯薬・臨床薬理学分野、³徳島大学病院・総合臨床研究センター、⁴医療法人 倚山会・田岡病院・総合臨床科、⁵徳島大・院医歯薬・臨床薬学実務教育学分野

【背景】抗がん剤使用で生じる末梢神経障害(PN)は有効な支持療法薬に乏しく、抗がん剤治療を中断させる要因の1つである。重度のPNは抗がん剤治療再開が困難であり、患者の生命予後に悪影響を及ぼすことが指摘されている。我々は、HMG-CoA還元酵素阻害剤(HRI)に神経障害抑制作用があることを見出している。HRIは本来の脂質異常是正作用以外に多様な薬理作用を有するが、抗がん剤誘発性PN抑制のメカニズムについては不明である。Glutathione-*s*-transpherase(GST)は酸化還元反応に関与するほか、中枢神経系における神経の発生や保護に寄与している。本研究ではHRIのPN抑制機構におけるGSTの関与について検討した。

【方法】C57BL6/J系統マウス(雄性、8週齢)に抗がん剤としてoxaliplatinまたはpaclitaxelを投与しPNモデルマウスを作製した。各HRI(simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin)は1日1回経口投与した。抗がん剤投与後の冷刺激応答・機械刺激応答変化はacetone testおよびvon Frey testによって評価した。機械的刺激応答におけるGSTの関与はGST阻害剤であるethacrynic acidをHRI投与同日から1日1回7日間反復腹腔内投与し、von Frey testにて評価した。また、Cascade Eyeを用いたパスウェイ解析により、PN発現メカニズムにおけるGST関連因子を網羅的に探索した。

【結果】Oxaliplatinまたはpaclitaxel投与後の冷刺激応答閾値は、各HRIの投与による影響は認められなかった。一方で、抗がん剤投与後の機械的応答閾値はvehicle群と比較して、抗がん剤の累積投与量依存的かつ有意に低下した。さらに、抗がん剤投与と同時にまたは抗がん剤投与7日目からの各HRI反復経口投与は、抗がん剤単独群の機械的刺激応答閾値の低下を有意に改善した。HRI投与による機械的刺激応答閾値改善作用は、7日間のethacrynic acid併用によってoxaliplatinおよびpaclitaxel群いずれにおいても消失した。また、パスウェイ解析によって109のPN原因性遺伝子が抽出され、GSTの下流因子としてIL1βおよびIL13が抽出された。

【考察】HRIによる抗がん剤誘発性PN抑制はGSTを介していることが明らかになった。また、このGSTシグナルには炎症応答に関連するIL1β及びIL13の関与が示唆された。

C-2-3 マクロファージ・ミクログリアの性差と神経障害性疼痛形成機構

○雑賀 史浩^{1,2}、木口 倫一²

¹宝塚医療大学・和歌山保健医療学部・リハビリ、²和歌山県立医科大・薬・生体機能解析学

神経障害性疼痛の分子基盤には傷害末梢神経や脊髄後角における慢性炎症が重要な役割を担うが、中でも特にマクロファージ・ミクログリアの関与が注目されている。そして近年では、痛みの調節におけるマクロファージ・ミクログリアの役割には性差があることを示す報告が増加している。本研究では、マクロファージ・ミクログリア阻害薬であるPLX3397を用い、神経障害性疼痛に及ぼすその影響と性差の有無について検討した。

坐骨神経部分結紮モデルマウスでは雌雄共に機械的アロディニアが惹起され、傷害坐骨神経および脊髄後角においてマクロファージ・ミクログリアの集積が認められた。PLX3397含有飼料を坐骨神経部分結紮モデルマウスに摂取させると、雄マウスでの機械的アロディニアは抑制されたが、雌マウスではそのような抑制効果が認められなかった。

PLX3397が脊髄後角のミクログリア数に及ぼす影響を評価したところ、雌マウスでは雄マウスと比較してミクログリアが多く残存していた。そこでPLX3397の効果の性差に及ぼすアンドロゲンの関与を明らかにするため、精巣を全摘出した雄マウスを用いて同様の実験を行った。精巣摘出から4週間後における血清テストステロン濃度は検出限界以下に低下しており、そのような条件下では雌マウスと同様にPLX3397による抗アロディニア効果が消失した。また精巣全摘出マウスのミクログリア数に及ぼすPLX3397の影響を評価すると、雌マウスと同様に、対照の雄マウスよりも多く残存していた。

その一方で、傷害坐骨神経のマクロファージに及ぼすPLX3397の影響を評価したところ、マクロファージの残存率はミクログリアと比較して雌雄共に大きく、性差やアンドロゲン依存性も観察されなかった。さらにマクロファージが産生する炎症性因子の阻害薬を傷害坐骨神経周囲に局所投与すると、雌雄共に機械的アロディニアが抑制された。以上の結果より、脊髄ミクログリアにはアンドロゲン依存的な性差が形成されるが、末梢マクロファージには性差が認められず、雌雄共に痛みの増悪に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

C-2-4 変形性膝関節症での疼痛遷延化に対する海馬ミクログリアの活性変化の関与



○山本 健太、中島 一恵、中村 庸輝、森岡 徳光

広島大・院医系・薬効解析

【背景・目的】変形性膝関節症（OA）は関節の炎症と軟骨基質の分解を示す慢性変性疾患である。根治療法として、人工膝関節置換術が行われるが、施術を受けた約30%の患者において疼痛が遷延化することが示されている。それ故、OAにより疼痛が遷延化する原因の解明が求められている。

ミクログリアは脳内の恒常性維持を担い、活性化により炎症反応を惹起する細胞である。また、様々な慢性疼痛モデルにおいて、ミクログリアが痛みの遷延化に関与することが報告されている。当研究室の過去の報告において、OAモデルマウスでは疼痛と膝関節軟骨の損傷が病態発症の初期から持続的に生じている一方で、海馬ミクログリアの活性化は遅発的に認められることから、疼痛の遷延化に海馬ミクログリアが関連する可能性を示した。そこで本研究では、OAでの疼痛発症に対する海馬ミクログリアの役割について、さらに検討を行った。

【方法】 ddY 系雄性マウス（7週齢）の左膝関節腔内にmonoiodoacetate (MIA) (1.0 mg) を投与することでOAモデルを作製した。MIA投与5週後において、ミクログリアを除去するコロニー刺激因子-1受容体阻害薬PLX3397の配合飼料、または通常飼料をそれぞれ7日間自由に摂食させた。また同様に、ミクログリア枯渇剤のclodronate liposome、またはcontrol liposomeをそれぞれ右側海馬へ単回局所投与した。疼痛評価はvon Frey Testを用いて機械的刺激に対する逃避閾値を測定した。ミクログリア活性は各種検診の後に脳凍結切片を作製し、ionized calcium binding molecular 1及びtransmembrane protein 119に対する抗体を用いた免疫組織化学染色法により解析した。

【結果・考察】疼痛に対するミクログリアの関与を検討するためにPLX3397を全身的に処置した結果、海馬ミクログリアが減少し、疼痛も有意に改善された。そこで、海馬ミクログリアの関与を検討するためにclodronate liposomeを海馬局所的に投与した結果、投与5日後において海馬ミクログリアが減少し、疼痛も有意に改善された。以上の結果から、海馬ミクログリアの活性化が疼痛の遷延化に重要な役割を果たすことが示唆された。

C-2-5 ジンジバリス菌由来リポ多糖類(LPS)刺激によるミクログリアにおけるIL-1b産生に対するb-ディフェンシン3の抑制メカニズムの解析



○井上 瑛里加¹、湊崎 紫陽¹、小田 康祐²、野中 さおり²、中西 博²

¹安田女子大・薬、²安田女子大・薬・薬理学分野

【目的】 IL-1bは、他の炎症性メディエーターの産生誘発にも関与する重要な炎症性サイトカインである。以前の研究で、唾液抗菌ペプチドの一種であるb-ディフェンシン3がジンジバリス菌LPSにより活性化したミクログリアにおいて遅発性に誘導されるIL-6ならびに一酸化窒素の産生を有意に抑制することを報告した (Inoue et al., In J Mol Sci. 23, 15099, 2022)。そこで本研究では、b-ディフェンシン3のジンジバリス菌LPS刺激によるミクログリアにおけるIL-1b産生に及ぼす作用を解析した。

【方法・結果】 (1) NanoLucルシフェラーゼ遺伝子とCL1-PEST分解シグナル配列をIL-1bプロペプチド領域を介して結合した融合遺伝子をIL-1b遺伝子プロモーター下流に連結したBV-2ミクログリアを用い、成熟型IL-1bのレポーターアッセイを行なった。その結果、ジンジバリス菌LPS刺激によるIL-1b産生は、Toll様受容体2 (TLR2) 阻害薬C29ならびにIkBキナーゼ阻害薬wedelolactoneにより有意に抑制された。一方、NLRP3インフラマソーム阻害薬MCC950の影響は受けなかった。(2) b-ディフェンシン3ならびにCA-074Meは、ジンジバリス菌LPS刺激によるIL-1b産生を有意に抑制した。一方、カテプシンB特異的阻害薬ZLLRならびにレンチウイルスshRNA導入によるカテプシンBノックダウンは、影響を及ぼさなかった。(3) b-ディフェンシン3ならびにCA-074Meは、ジンジバリス菌LPS刺激に伴うNF- κ B p65核移行ならびにIkBa分解を有意に抑制した。(4) タンパク質構造解析ソフトAlphaFold2を用い、b-ディフェンシン3とカテプシンBならびにLとの結合様式を解析した。その結果、b-ディフェンシン3はカテプシンBの活性部位と強固に結合することが予測されたが、カテプシンLの活性部位との結合は比較的弱いことが予測された。

【考察】 カテプシンBならびにLは、ジンジバリス菌LPS刺激によるミクログリアにおけるプロ型IL-1b産生に関与することが示唆された。b-ディフェンシン3は、カテプシンBならびにLの酵素活性を阻害することでジンジバリス菌LPSにより誘導されるIL-1b産生を抑制することが明らかになった。今後、プロ型IL-1bの成熟型へのプロセッシングにおけるカテプシンBならびにLの関与、さらにb-ディフェンシン3の抑制作用について検討したい。

C-2-6 代表的な歯周病菌「ジンジバリス菌」が分泌する外膜ベシクル(OMV)による脳ならびに腸バリア機能の破綻メカニズムの解明

○野中 さおり、中西 博

安田女子大・薬

代表的な歯周病菌であるジンジバリス菌の感染は、アルツハイマー病の増悪因子であることが近年の臨床研究から明らかとなっており、私たちは、アルツハイマー病の原因は、感染症を発端とした脳炎症であると仮説を立て検証している。そのメカニズムとしては、(1)歯周組織から全身循環系に入ったジンジバリス菌やその病原性因子が脳実質に侵入して脳炎症を惹起することや、(2)唾液と共に飲み込まれたジンジバリス菌やその病原性因子が腸内細菌叢を攪乱させ、さらに腸のバリア機能が破綻した結果、漏れ出した腸内細菌やその代謝産物によって脳炎症が惹起されることが想定されている。このためには、ジンジバリス菌または、その病原性因子が血液脳関門や腸上皮バリアを破綻させる可能性が考えられる。私たちはその解明に取り組んだ。まず、ジンジバリス菌の培養上清をヒト脳血管内皮細胞株(hCMEC/D3細胞)に添加すると、密着結合構成タンパク質であるZO-1及びオクルディンの減少を伴った細胞層の透過性の上昇が起こり、その効果はジンジバリス菌が産生分泌するプロテアーゼの「ジンジパイン」に依存することがわかった。さらに、ジンジパインが直接ZO-1やオクルディンの細胞内領域を分解することがわかった。そこで、ジンジパインが細胞内に入ってこれらの分子を分解すると予想し、ジンジバリス菌が分泌するouter membrane vesicles (OMVs)に着目した。OMVはグラム陰性細菌が外膜から切り出して分泌する小胞であり、脂溶性が高く、ジンジバリス菌のOMVにはジンジパインも結合していることから、そのキャリアとして働いていると考えられる。免疫組織学的解析から、ジンジパインの結合したOMVが脳血管内皮細胞内に侵入できることが明らかとなり、ジンジパインはOMVと共に脳血管内皮細胞内に入り込み、細胞質側からZO-1やオクルディンを分解することで血液脳関門を破壊すると考えられた。さらなる解析により、ヒト腸上皮細胞株(Caco-2細胞)に対してもジンジパインはOMVを介した同様の仕組みで腸上皮バリアも破綻させることが明らかになった。以上のジンジバリス菌OMVによる脳及び腸バリア破綻の仕組みは、ジンジバリス菌がもたらすアルツハイマー病の増悪に深く関与していると考えられる。

C-3-1 ランソプラゾールはイソニアジドによる肝障害を軽減する



○大瀧 翔太¹、若井 恵里¹、白水 崇¹、小岩 純子¹、田丸 智巳²、西村 有平¹

¹三重大・医・統合薬理学、²三重大学医学部附属病院・臨床研究開発センター

イソニアジドは結核治療の第一選択薬である。しかし、イソニアジドは重篤な肝細胞障害や急性肝不全を引き起こしうる。現状ではイソニアジド誘発性肝障害を予防できる、レベルの高いエビデンスの得られた治療法は確立されていない。本研究では、さまざまなマウス系統におけるイソニアジド感受性の違いを解析した公共トランスクリプトームデータを起点として、イソニアジド誘発性肝障害を軽減する併用薬の探索を試みた。まず、イソニアジド誘発性肝障害を起こしやすい3系統のマウスに共通する発現変動遺伝子(イソニアジド誘発性肝障害の遺伝子発現シグネチャー)を同定した。この遺伝子発現シグネチャーを逆向きに变化させる薬物をConnectivity Mapを用いて同定した。また、ヒト有害事象自発報告データベースを用いて、イソニアジド服用患者における肝障害の報告オッズ比を低下させる併用薬を同定した。13種類の薬物が共通して同定され、その中にランソプラゾールが含まれていた。ゼブラフィッシュを用いて、イソニアジドによる肝細胞アポトーシスをランソプラゾールが抑制すること、イソニアジドによる小胞体ストレスや炎症をランソプラゾールが軽減する可能性を明らかにした。さらに、三重大学病院の電子カルテ情報を用いて、イソニアジドを投与された患者における肝機能をランソプラゾール内服群と非内服群で比較したところ、ランソプラゾール内服群の肝障害マーカー(AST, ALT)が非内服群に比べて有意に低いことを見出した。これらの結果は、ランソプラゾールがイソニアジド誘発性肝障害を軽減することを示唆している。本研究手法は、他の薬物性肝障害に対する治療薬の探索にも活用できると考えられる。

C-3-2 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルに対するD-cysteineの効果

○関 貴弘^{1,2}、那須 健斗²、前田 仁志³、今野 歩⁴、人羅 菜津子²、倉内 祐樹²、平井 宏和⁴、渡邊 博志⁵、丸山 徹³、香月 博志²

¹姫路獨協大・薬・薬理、²熊本大院・生命・薬物活性、³熊本大院・生命・薬剤、⁴群馬大院・医・脳神経再生、⁵熊本大院・生命・医療情報

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、アルコールの消費量に関係なく、肝臓に脂質が蓄積する肝疾患である。約25%と高い有病率を示し、肝硬変・肝癌のリスクを高めるが、根本的な治療法は未だ確立されていない。近年、NAFLDに対して、硫化水素が保護効果を示すことが報告された。硫化水素は有毒物質であるが、生体内でも微量に産生され、組織保護効果を示す。D体アミノ酸であるD-cysteineはD-amino acid oxidase (DAO)で代謝され、硫化水素が産生される。DAOは小脳・肝臓・腎臓に選択的に発現し、D-cysteineはこれら臓器選択的な硫化水素ドナーとして働くと思定される。我々は最近、D-cysteineが脊髄小脳失調症発症を抑制することを解明した。以上の背景から、D-cysteineが肝臓での硫化水素産生を介してNAFLDへの保護的効果を示すと想定し、本研究ではNAFLDモデル細胞及びマウスに対するD-cysteineの効果を解析した。

NAFLDモデル細胞として、ヒト肝癌細胞株であるHepG2細胞へのパルミチン酸処置を用いた。NAFLDモデル細胞では活性酸素種 (ROS) の増大が観察され、D-CysteineはこのROS増大を有意に抑制した。この抑制効果はDAO阻害薬の共処置により減弱したことから、D-cysteineはDAOを介した硫化水素産生により、NAFLDモデル細胞におけるROS産生を抑制することが示唆された。

続いて、NAFLDモデルマウスでの解析を行った。マウスはヒトと異なり肝臓でDAOが発現していないため、ウイルスベクターを用いた肝臓選択的遺伝子導入により、肝臓DAO発現マウスを作製した。このマウスにメチオニン減量コリン欠乏高脂肪食 (HFLMCD) を摂取させることでNAFLDモデルマウスとした。HFLMCD摂取開始と同時に生理食塩水もしくはD-cysteineを連日経口投与した。生理食塩水投与NAFLDモデルマウスでは肝障害マーカーである血中AST、ALTの上昇が観察されたが、D-cysteine慢投与はその上昇を有意に抑制した。肝臓の組織学的解析の結果、NAFLDモデルマウスにおける脂肪滴蓄積がD-cysteine投与により有意に軽減した。以上の結果から、D-cysteineはNAFLDの病状進行を抑制する効果を示すことが明らかとなった。

C-3-3 シトリン欠損症患者由来iPS細胞を用いた尿素サイクル異常症の病態肝モデル作製

○人見 浩史¹、岡野 舞^{1,2}、下村 優衣¹、金子 一成²

¹関西医科大・医・iPS再生医学、²関西医科大・医・小児科

【背景】シトリン欠損症 (CD) はSLC25A13遺伝子の異常であり、常染色体潜性遺伝である。シトリンは、主に肝臓のミトコンドリア膜のアスパラギン酸・グルタミン酸の輸送体タンパク質である。シトリンが欠損することで、尿素サイクルだけでなく、細胞質内のNADH/NAD⁺が過剰となり、解糖系、糖新生、エネルギー産生の障害も生じる。症状は病期により2つに分かれ、新生児から乳児の病型であるNICCD期は肝内胆汁うっ滞、肝障害、多種アミノ酸血症などを呈し、成人期の成人発症II型シトルリン血症 (CTLN2) は、意識障害、急性脳症様症状、精神症状で発症し、高アンモニア血症、高シトルリン血症、脂肪肝を呈し、一旦発症すると重篤な経過をたどり、肝移植が必要となる場合があり、根治療法が渴望されている。

【目的】CD患者から樹立したiPS細胞が、先天性尿素サイクル異常症の病態肝モデルとして使用できるか、ヒトiPS細胞由来肝細胞 (HLC) に分化し評価し、さらに治療について検討した。

【方法】CD患者からiPS細胞を樹立し、HLCへ分化誘導を行う。それらのHLCを用いて、CTLN2の発症を予防する薬剤、ピルビン酸の負荷を行い、培地のアンモニア値で評価した。

【結果】2名のCD患者からiPS細胞を樹立し、G-Bandの異常がないこと、未分化・多能性マーカー、シーケンスでそれぞれの患者の遺伝子異常を確認した。健常者由来iPS細胞とCD-iPS細胞からHLCへの分化誘導を行い、PCR・免疫染色・Western blottingでAlb、AFP、ASGR、HNF4 α などの発現を確認しHLCに分化出来ていることを確認した。HLCの段階で、培養液中にNH₄Clを加え、培養液を回収し、代謝されたアンモニア値を測定した。健常者HLCは経時的にアンモニア濃度が低下するが、CD-HLCでは低下を認めなかった。また、ピルビン酸を10mM、100mMの濃度で負荷しNH₄Clを加えると、CD-HLCではピルビン酸の濃度依存性にアンモニア濃度の低下を認めたが、健常者HLCでは有意な低下は認められなかった。

【考察】CD-iPS細胞を用いて、HLCへの分化を誘導することにより、尿素サイクル障害の病態を検討した。CD-HLCは、健常者HLCと比較してアンモニア代謝が不十分であった。ピルビン酸はCD-HLCでのみアンモニアを有意に低下させた。これらの所見は、ピルビン酸がCD患者に対する効率的な治療法である可能性を示唆している。ヒトiPS細胞から得られたこれらの尿素サイクル欠損症モデルは、尿素サイクル欠損症患者の病態研究や新規治療法の開発に有用なツールである。

C-3-4 ケモカイン受容体CCR6はIL-17A産生細胞の遊走を介して劇症肝炎病態を制御する



○坂東 政充、原 雄大、竹中 美貴、松尾 一彦、中山 隆志

近畿大・薬・化学療法学研究室

【背景・目的】CCR6は、制御性T細胞（Treg）、Th17細胞および γ δ T細胞に選択的に発現しているケモカイン受容体である。CCL20をリガンドとし、これらの細胞の遊走を介して、種々の病態の制御に寄与する。劇症肝炎は、急速かつ大規模な肝細胞の壊死が生じ、極めて死亡率が高い疾患である。これまでに、慢性肝炎患者の急性増悪時や劇症肝炎モデルマウスにおいて、CCR6やCCL20の発現が増加することが報告されている。しかしながら、CCR6-CCL20系の病態学的な意義は未だ明らかとなっていない。当研究室では、劇症肝炎におけるCCR6-CCL20系の役割を研究しており、劇症肝炎モデルマウスの肝臓においてCCL20が増加すること、CCR6欠損マウスでは、野生型マウスと比べ、血清ALT値および死亡率が減少することをこれまでに見出している。しかしながら、CCR6欠損マウスでみられた病態の変化の詳細については不明である。本研究では、CCR6-CCL20系を介した肝臓への免疫細胞の遊走制御機構の解明を行った。

【方法】実験には、オスのC57BL/6Nマウスを用いた。劇症肝炎病態は、D-galactosamine (300 mg/kg) およびLPS (1 μ g/kg) を腹腔内投与することで誘導した。投与6時間後にサンプルを回収し、免疫細胞の浸潤はフローサイトメトリー法にて、サイトカインの発現はELISA法にて解析した。

【結果・考察】CCR6欠損マウス肝臓では、Tregの浸潤に変化はなかった。一方、Th17細胞および γ δ T細胞の浸潤がCCR6欠損マウスで減少した。また特に、 γ δ T細胞は、IL-17Aを産生するサブセットの浸潤が減少していた。さらに、これらの細胞より産生される主要なサイトカインであるIL-17Aの発現量が、CCR6欠損マウス肝臓において顕著に減少した。最後に、抗IL-17A抗体の投与は、劇症肝炎モデルマウスの死亡率を減少させた。以上の結果は、CCR6がIL-17A産生細胞の肝臓への遊走を制御し、劇症肝炎病態を制御する可能性を示すものである。また、CCR6は劇症肝炎の有望な新規治療標的分子となることが示唆される。

C-3-5 低重力下における消化管と骨髄における鉄動態の検討

○池田 康将¹、船本 雅文¹、安田 英紀¹、今西 正樹²、土屋 浩一郎²

¹徳島大・院医歯薬・薬理学、²徳島大・院医歯薬・医薬品機能生化学

【目的】来るべき宇宙時代へ向けて、長期の宇宙滞在により引き起こされる生体恒常性変化についての研究がすすめられている。宇宙環境では筋量・骨量減少に加えて、貧血が生じることも知られており、生体内鉄分布に影響すると考えられる。そのため、宇宙における鉄の至適摂取量は重要課題であるが、そのエビデンスは乏しく、消化管鉄吸収機構の解明が望まれる。しかし、消化管鉄吸収機構については未解明である。本研究では低重力下で飼育されたマウスを用いて消化管と骨髄における鉄動態を検討した。

【方法】JAXA「きぼう」利用マウスサンプルシェアで提供されたマウス消化管と胸骨を使用した。C57BL/6雄マウスを、宇宙で小型遠心機を用いた人工重力1/6Gで飼育した群と、対照として地球重力1Gで飼育した群を比較・検討した。

【結果】十二指腸におけるPerls/DAB染色では、1G飼育群と比較して1/6G飼育群での染色性は減弱していた。FTH、DMT1の免疫組織化学でも1/6G飼育群での染色性が減弱していた。加えて、F4/80によるマクロファージ評価では1/6G飼育群で絨毛内マクロファージ数は減少し、一方、杯細胞数は増加していた。胸骨骨髄の検討では、Perls/DAB染色とFTH免疫組織化学とともに1/6G飼育群で染色性の減弱を認めた。

【結論】低重力下では十二指腸・骨髄の鉄量が減少していることが示唆された。

C-3-6 塩酸誘発性急性肺障害におけるインターロイキン-19の新規的役割について

○東 泰孝

大阪公大・獣医・薬理

【目的】 インターロイキン-19(IL-19)はIL-10ファミリーに分類されるサイトカインであり、主としてマクロファージから産生され各種炎症性病態において抗炎症作用を示す。これまでに、肺炎など肺疾患におけるIL-19の役割は明らかにされてこなかったことから、肺疾患におけるIL-19の役割を解明することとした。本研究では急性肺障害におけるIL-19の役割を解明する目的で、IL-19遺伝子欠損マウス(IL-19KO)を用いて塩酸誘発肺障害における肺病態を解析した。

【方法】 雄性C57BL/6(8-10週齢)の野生型マウス(WT)およびIL-19KOを用いて、露出させた気管内に塩酸(0.1M)を2 μ L/g投与した。塩酸投与から4時間後に肺を採材した。HE染色を用いて組織学的評価を実施し、定量リアルタイムPCRにより各因子のmRNA発現量を測定した。好中球浸潤およびアポトーシスの検出には免疫組織染色および免疫蛍光染色を各々用いて評価した。

【結果】 塩酸投与に伴い、肺胞壁の肥厚ならびに肺胞面積の減少を伴う肺障害が見られた。IL-19KOではWTよりも有意に肺胞面積の減少がみられたことから肺障害は悪化することが明らかとなった。また、IL-19KOではWTよりも有意に肺水腫の悪化および出血の増悪もみられた。MPO陽性割合により好中球浸潤を評価したところ、IL-19KOではWTよりも有意にMPO陽性面積の割合が増加した。定量リアルタイムPCRにより関連する因子のmRNA量を定量したところ、IL-19KOではWTよりも有意に好中球遊走因子であるCXCL1およびIL-6が増加していた。一方、マクロファージのマーカであるF4/80 mRNA発現量はWTとIL-19KOの間で有意な変化は認められなかった。続いて、肺障害により細胞死が起っているかどうか、さらには、アポトーシスが検出されるかどうかを、カスパーゼ3抗体を用いて評価した。WTではカスパーゼ3抗体陽性細胞はほとんど検出されなかったのに対して、IL-19KOではカスパーゼ3抗体陽性細胞が認められ。

【考察】 以上の結果より、IL-19KOでは塩酸誘発肺障害による肺障害が増悪することが明らかとなった。また、この増悪には好中球浸潤が主として関わることから、IL-19は好中球が介在する急性炎症に関与する可能性が示唆された。