

# 一般演題要旨

## D 会場

## D-1-1 Pyruvate dehydrogenase kinase 1は骨肉腫幹細胞の細胞特性を制御する



○田中 優妃、徳村 和也、檜井 栄一

岐阜薬科大・薬・薬理学研究室

目的：骨肉腫は、骨組織を原発巣とする希少がんであり、外科手術や化学療法を組み合わせた治療が行われている。しかし、約40年間治療成績の顕著な改善が認められていない。その原因の1つとして骨肉腫幹細胞（Osteosarcoma stem cell: OSC）の存在が挙げられる。OSCは、幹細胞性と治療抵抗性を有し、治療後も残存したOSCが自己複製や多系統分化を行うことで骨肉腫が再び産生され、再発・転移が引き起こされると考えられている。したがって、骨肉腫根治のためOSCを標的とした新規治療法の開発が希求されている。Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) は解糖系関連因子であり、乳がん幹細胞において高発現し、幹細胞性を制御するという報告がある。しかし、OSCにおけるPDK1の機能については明らかではない。本研究では、*in vitro*実験により、OSCにおけるPDK1の機能的解析を行った。

方法：ヒト骨肉腫細胞株143B及びMG63の2種類の細胞株を用いた。各々の細胞にshort hairpin RNAを用い、*PDK1*をノックダウンさせた143B細胞及びMG63細胞を作製した。*PDK1*がOSCに及ぼす影響を検討するために、自己複製能を評価するSphere formation assay、増殖能を評価するMTT assay、細胞死を評価するApoptosis assayを行った。

結果：143B細胞とMG63細胞の両方において、*PDK1*ノックダウン群では、コントロール群と比較して、Sphere数の減少、増殖能の低下、Apoptosisの上昇が認められた。

考察：*PDK1*はOSCにおいて、自己複製能、増殖能、細胞死を制御している可能性が示唆された。骨肉腫の根治を目的とした治療法の開発を目指す上で、*PDK1*が新規治療標的因子となりうる事が期待される。

## D-1-2 軟骨無形成症モデルマウスに対するCDK8阻害剤の治療効果の検討



○久保 拓也<sup>1</sup>、貞盛 耕生<sup>1</sup>、山本 めぐみ<sup>2</sup>、北尾 達哉<sup>2</sup>、白波瀬 弘明<sup>2</sup>、檜井 栄一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大・薬・薬理学研究室、<sup>2</sup>京都薬品工業

### 【目的】

軟骨無形成症(Achondroplasia: ACH)は、四肢短縮型低身長症を呈する難治性骨系統疾患である。ACHは線維芽細胞増殖因子受容体3 (FGFR3: fibroblast growth factor receptor 3) の変異によってFGFR3シグナル伝達が亢進している。FGFR3シグナルの下流には、signal transducer and activator of transcription (STAT) シグナル伝達経路などが存在する。転写関連CDKファミリーに属するサイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8) は、生存、分化および増殖を含む基本的な細胞プロセスの制御に重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、ACHの進行におけるCDK8の機能的役割とそのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、*in vitro*及び*in vivo*実験により、ACHに対するCDK8阻害剤KY-065の有効性を検討した。

### 【方法】

*Col2a1*プロモーター下流に*Fgfr3<sup>G380R</sup>*変異をもつ遺伝子改変マウスをACHモデルとして使用した。ACHモデルマウス由来の軟骨細胞をKY-065存在下で培養した。軟骨細胞分化能を評価するため、アルシアンブルー染色、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色、リアルタイムqPCRおよびウェスタンブロッティングを行った。KY-065をACHモデルマウスに生後3日目から28日間連続で皮下投与した。その後、 $\mu$ CT解析と組織学的解析を行った。

### 【結果】

KY-065処理したACHモデルマウスの軟骨細胞では、アルシアンブルー染色とALP染色の染色性が増強し、軟骨細胞分化マーカーのmRNA発現レベルが有意に増加した。また、KY-065添加は、Erk1/2のリン酸化には影響を与えなかったが、STAT1<sup>Ser727</sup>のリン酸化を選択的に低下させた。KY-065の連日投与はACHモデルマウスの大腿骨長を有意に伸長させ、大腿骨遠位部の成長板軟骨の厚さと肥大化面積の両方を有意に増加させた。

### 【考察】

本研究により、CDK8阻害剤KY-065がACHモデルマウスの軟骨細胞の機能を亢進させるとともに長管骨を伸長させることが示された。軟骨細胞におけるCDK8-STAT1<sup>Ser727</sup>軸がACHの潜在的治療標的であり、CDK8阻害剤がACHの有望な治療候補となる可能性が明らかになった。

## D-1-3 糖尿病合併心不全に対する漢方薬五苓散の抑制効果



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

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

【背景】糖尿病に伴う様々な臓器合併症は患者のQOLを悪化させ予後不良となる。糖尿病合併心不全は糖尿病性心筋症とも呼ばれ、心臓リモデリングに伴う心不全と定義され、特異的治療法はないのが現状である。五苓散は、体液恒常性調節障害の改善に加え、糖尿病が適応症として認められている漢方薬であるが、糖尿病臓器合併症への効果は未知である。本研究では、短期間で作成できる糖尿病合併心不全モデルマウスを確立し、糖尿病合併心不全に対する五苓散の効果について検討した。

【方法】C57BL6/N系統マウス（8週齢，雄性）に、高脂肪食とL-NAME（0.1%）を9週間与え、5週目にSTZ（50mg/kg/day）を5日間連続腹腔内投与することで糖尿病合併心不全モデルを作成した。非糖尿病群、糖尿病合併心不全（D-HF）群、糖尿病（DM）群、L-NAME群の4群で比較検討した。五苓散（Go）は初週から1g/kg/dayを連日経口投与し、他群には等量の滅菌水を投与した。非糖尿病群、糖尿病合併心不全（D-HF）群、糖尿病合併心不全（D-HF）+Go 群の3群で比較検討した。

【結果】D-HF群は、DM群、L-NAME群と比べて、心筋細胞肥大、線維化がみられたことより、モデルとして適当であると確認した。空腹時血糖は、非糖尿病群と比較してD-HF群とD-HF+Go群で高値であったが、両者に差はみられなかった。心エコーでは、D-HF群における左室内径短縮率の低下は、D-HF+Go群では抑制された。D-HF群でみられた心体重比の増加も、D-HF+Go群では抑制された。D-HF群における病理組織での心筋細胞肥大と心肥大関連遺伝子（*Nppa*, *Nppb*）発現増加は、D-HF+Go群で抑制された。D-HF群におけるアポトーシス関連タンパク質（Cleaved Caspase-3）発現の亢進とAktリン酸化の減少は、D-HF+Go群で抑制された。D-HF群におけるPSR染色での間質線維化亢進と線維化関連遺伝子（*Col1*）発現上昇、線維芽細胞活性化指標タンパク質（ $\alpha$ SMA）と脂質過酸化（4-HNE）の増加は、D-HF+Go群で抑制された。一方で、炎症関連遺伝子（*Tnfa*, *Il1b*）の発現はD-HF群とD-HF+Go群で増加したが、差は認めなかった。

【結論】五苓散は糖尿病合併心不全に対する新たな治療薬となることが示唆された。

## D-1-4 Single-cell RNA-seq データセットを用いた変形性関節症における細胞老化と糖鎖修飾の関連性の検討



○吉本 誠、徳村 和也、檜井 栄一

岐阜薬科大・薬・薬学科

【目的】変形性関節症（Osteoarthritis: OA）は関節全体に退行性変性が生じる疾患である。これまでに、OAの発症・病態進展には細胞老化および糖鎖修飾がそれぞれ関与していることが報告されているが、両者の相互関係は明らかになっていない。本研究では、OAの発症・進展における細胞老化と糖鎖修飾の関連を明らかにするため、OA患者のsingle-cell RNA-seq データセットを用いたバイオインフォマティクス解析を実施した。

【方法】異なる2種類のOA患者のsingle-cell RNA-seq データセットを用いて解析を行った。患者の軟骨細胞におけるgene set enrichment analysisにより、OAの重症度とOA病態関連シグナルの相関を検証した。また、細胞老化と糖鎖修飾の相関を検討した。次に、軟骨細胞における糖鎖関連遺伝子の発現解析を行った。さらに、発現解析で同定されたPolypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase（*GALNT*）遺伝子の発現量とOA病態関連シグナルおよび細胞老化との相関を検討した。

【結果】Osteoarthritis Research Society Internationalスコアにおける重症度が高いOA患者の軟骨細胞では、OA病態関連シグナルが亢進していた。さらに、細胞老化と糖鎖修飾には正の相関があり、特にO結合型糖鎖修飾との相関が強いことが示された。2種類のデータセットの軟骨細胞では、共通して7種類のO結合型糖鎖関連遺伝子が発現上昇し、そのうち5種類は*GALNT*遺伝子であった。さらに、*GALNT*遺伝子が高発現している軟骨細胞では、OA病態関連シグナル及び細胞老化が亢進していることが示された。

【考察】本研究により、OA病態下の軟骨細胞において、細胞老化と糖鎖修飾は関連している可能性が示唆された。O結合型糖鎖修飾を担う*GALNT*遺伝子がOAの新規治療標的となることが期待される。

## D-1-5 抗PD-L1抗体による炎症性関節炎の滑膜線維芽細胞における病態解明

○細沼 雅弘<sup>1</sup>、中野 僚太<sup>2</sup>、豊田 仁志<sup>1</sup>、篠内 良介<sup>3</sup>、船山 英治<sup>3</sup>、磯部 晃<sup>1</sup>、木内 祐二<sup>1</sup>、吉村 清<sup>4</sup>

<sup>1</sup>昭和大・医・薬理学講座 医科薬理学部門、<sup>2</sup>昭和大・薬・基礎医療薬学講座生理学部門、<sup>3</sup>昭和大・薬・基礎医療薬学講座薬理学部門、<sup>4</sup>昭和大・臨床薬理研究所・臨床免疫腫瘍学部門

がん治療において免疫チェックポイント阻害薬は革新的な治療となったが、免疫関連有害事象の炎症性関節炎や関節リウマチ(RA)患者の関節炎増悪によるQOL低下が課題である。抗PD-1抗体がPD-1/PD-L1シグナル阻害によるT細胞の活性化を誘導するに対し、抗PD-L1抗体はさらにPD-L1への結合による細胞内シグナル伝達が報告されている。しかし関節炎病態に関与する滑膜線維芽細胞に着目した抗PD-L1抗体の関節炎への作用は報告がない。そこで本研究ではSKGマウスに抗PD-L1抗体を投与することで炎症性関節炎モデルを作成し、その表現型を解析した。Mannanで関節炎を誘導したSKGマウスに抗PD-L1抗体250 µgを週3回投与すると、対照群と比較し関節炎スコアの増悪を認めた。一方で抗PD-L1抗体投与を週1回に減量すると、関節炎スコアの増悪を認めずにvon frey testによる疼痛閾値の低下を認めた。in vitro系でRA滑膜線維芽細胞(RA-FLS)におけるPD-L1発現を検討すると、PD-L1発現はmRNA・タンパクレベルで共にTNF $\alpha$ 刺激により上昇した。さらに2例のRA患者由来のRA-FLSを抗PD-L1抗体で処理しbulkRNA-seqで発現変動遺伝子を検討すると、CXCL8/IL-8およびFGF9の発現上昇を認めた。BALB/cマウスの足背へのrmFGF9皮下注射はvon frey testによる疼痛閾値の低下を認めた。以上より、抗PD-L1抗体は、滑膜線維芽細胞の発現するPD-L1に結合し、CXCL8/IL-8産生促進による関節炎増悪およびFGF9産生促進による関節炎疼痛の増悪を誘導する可能性が示唆された。

## D-1-6 可溶性グアニル酸シクラーゼ活性化薬のブタ冠動脈および冠静脈に対する弛緩作用の比較

○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

虚血性心疾患の治療薬として頻用されている一酸化窒素(NO) 供与薬は生体内でNOを発生させ、還元型(ヘム鉄がFe<sup>2+</sup>)可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の酵素活性を上昇させる。一方、近年開発が進められているsGC活性化薬はNO非依存的に酸化型(ヘム鉄がFe<sup>3+</sup>) /アポ(ヘムが脱離)のsGCを活性化するという特徴を有している。NO供与薬の血管弛緩作用は静脈系で強いことが知られているが、sGC活性化薬の作用に動静脈差が存在するのかわか不明である。本研究では、摘出ブタ冠動脈および冠静脈を用いて、この点について検証した。sGC活性化薬であるBAY 60-2770 (1 pM-0.1 µM)は冠動脈および冠静脈のいずれにおいても濃度依存的な弛緩を誘発したが、その作用は冠静脈よりも冠動脈で強かった。一方、NO供与薬であるsodium nitroprusside (SNP、1 nM-0.1 mM)も濃度依存的な弛緩を誘発したが、その作用は冠動脈よりも冠静脈で強かった。なお、プロテインキナーゼG活性化薬である8-Br-cGMP (1 µM-0.3 mM)の反応性には冠動脈と冠静脈間で差はなかった。BAY 60-2770による弛緩作用はヘム鉄酸化薬であるODQ (10 µM)存在下では増強し、冠動脈と冠静脈間で認められた反応性の差は消失した。また、SNPによる弛緩作用は冠動脈および冠静脈のいずれにおいてもODQ存在下では減弱し、両者間の反応性の差はなくなった。NO合成酵素阻害薬であるN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME、0.1 mM)は冠動脈と冠静脈間におけるBAY 60-2770およびSNPによる弛緩反応の不均一性を解消しなかった。以上の結果から、sGC活性化薬の血管弛緩作用はNO供与薬とは対照的に動脈系で強いことが明らかとなった。これは動脈系が静脈系よりも酸化型/アポsGCを多く発現することに起因するのかもしれない。なお、NOにはsGCのヘム鉄を酸化する作用があり、また、血管内皮から恒常的に分泌されるNO量は静脈系よりも動脈系で多いことが知られているが、この分泌量の違いが動脈系で酸化型/アポsGCの発現が多いことの一因とはならないようである。

## D-1-7 フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈疾患リスクに関する2つの矛盾

○石澤 有紀<sup>1,2</sup>、宮田 晃志<sup>2</sup>、辻中 海斗<sup>2,3</sup>、糸数 柊人<sup>2</sup>、宮田 辰巳<sup>2</sup>、近藤 正輝<sup>2,3</sup>、新村 貴博<sup>2,4</sup>、吉岡 俊彦<sup>2,3</sup>、相澤 風花<sup>2,3</sup>、八木 健太<sup>2,4</sup>、川田 敬<sup>5</sup>、合田 光寛<sup>2,3</sup>、石澤 啓介<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup>(医)倚山会 田岡病院・総合診療科、<sup>2</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬理学分野、<sup>3</sup>徳島大学病院・薬剤部、<sup>4</sup>徳島大学病院・総合臨床研究センター、<sup>5</sup>徳島大・院医歯薬・臨床薬学実務教育学分野

フルオロキノロン系抗菌薬は広く使用されている抗菌薬であるが、大動脈瘤や解離といった致死的な血管疾患との関連が指摘され、2018年アメリカ食品医薬品局による警告が出され、本邦でも添付文書中で重大な副作用リスクとして警鐘されている。一方でここ2-3年、相反する知見が散見されはじめ、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈疾患の危険性に関する議論が激化している。そこで本研究の目的は、フルオロキノロン系抗菌薬が真に大動脈疾患のリスクを増加させ得るか否か、基礎薬理的手法および大規模医療情報データベースを用いた検討から明らかにすることである。

基礎薬理学的検討として、培養細胞および大動脈解離易発症モデルマウス (LABマウス) を用いて検討を行った。フルオロキノロンの一種であるレボフロキサシン (LVFX) は、*in vitro*において内皮細胞傷害を引き起こし、matrix metalloproteinaseを増加させた。しかし、*in vivo*試験ではエラスチン分解や大動脈解離発生率に有意な影響は認められなかった。さらにLABマウスにおける内皮障害マーカー、ICAM-1、VCAM-1の遺伝子発現に及ぼすLVFXの作用は、大動脈解離発症前後で変化し、発症前はLABマウスで見られるmRNA発現上昇を増悪させたが、発症後のマウス大動脈においてはむしろ抑制傾向を示した。

さらに、実臨床におけるリスクを評価するため有害事象自発報告データベースVigiBaseおよびレセプトデータベースJMDCを用いて解析を行った。VigiBase解析において、フルオロキノロンの使用により、既報と同様大動脈瘤についてリスクシグナルが検出されたが、大動脈解離に限定して解析した場合にはリスクシグナルが検出されなかった。レセプトデータベースJMDCを用いた後ろ向きコホート解析においても、フルオロキノロンの使用は呼吸器感染症患者において有意に大動脈瘤および解離の発症を増加させなかった。

本研究により、フルオロキノロンの血管系への作用に関する2つの矛盾を浮き彫りにした。第一に、LVFXの相反する作用が*in vitro*と*in vivo*の試験で、また解離発症の前後で観察された。第二に、データベース解析により、大動脈解離と動脈瘤に対する作用が異なることが明らかになった。フルオロキノロン系抗菌薬による細胞毒性はみられるものの、大動脈解離に限定して検討した場合、生体内、すなわち実臨床における副作用発生リスクの有意な増加は示唆されず、大動脈解離に対する懸念がフルオロキノロンの使用中止を正当化するものではないことが示唆された。

## D-2-1 Protein kinase Aが制御するEP4受容体シグナル伝達メカニズムの解明



○柳川 瞬矢<sup>1</sup>、東山 晃子<sup>1</sup>、福島 圭穰<sup>1</sup>、Regan John W<sup>2</sup>、藤野 裕道<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院薬・生命薬理学分野、<sup>2</sup>Dept. Pharmacol. & Toxicol., Coll. of Pharm., The Univ. of Arizona

### 【背景・目的】

Gs、Gi型タンパク質に共役するEタイププロスタノイド4 (EP4) 受容体は、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 刺激による活性化により過剰発現し、大腸がん増悪につながるシグナル伝達系を亢進させることが報告されている。また、細胞内第3ループ領域 (ICL3) のセリン残基はGsシグナルを介したprotein kinase A (PKA) の活性化によりリン酸化されることも報告されている。そのためEP4受容体シグナル伝達系においてPKAは重要な役割を担うと考え、PKA阻害が細胞に与える影響に着目して研究を行った。

### 【方法】

ヒトEP4受容体遺伝子を安定的に発現させたHEK293細胞 (HEK-EP4細胞) に対しPKA阻害薬を前処置し、PGE<sub>2</sub>処置後の細胞が引き起こす変化を検討した。細胞内アクチン動態の変化についてはファロイジン染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。

### 【結果・考察】

HEK-EP4細胞にPKA阻害を行いPGE<sub>2</sub>刺激を行うと細胞形態の変化が認められた。細胞形態変化を引き起こしているHEK-EP4細胞の細胞内アクチン動態を検討したところ、アクチンストレスファイバーの形成が認められた。そこで、ICL3領域のセリン残基をアラニンに変異させPGE<sub>2</sub>刺激を行うと、変異導入前と比較してより顕著な細胞形態変化、アクチンストレスファイバーの形成が認められた。

以上の結果より、PKAによるICL3領域のセリン残基のリン酸化がアクチンストレスファイバーの形成、それに伴う細胞形態の変化を制御していることが考えられた。また、今回見られた細胞形態の変化は間葉上皮転換様であり、EP4受容体により活性化したPKAによるICL3のセリン残基のリン酸化の変化が、がんの転移に関わる可能性が考えられた。以上の結果から、EP4受容体シグナル系が惹起するPKAによる詳細な制御メカニズムを解明することで、大腸がんの悪性化のメカニズムのみならず新たな治療ターゲットを提案することができると考えている。

## D-2-2 EP4プロスタノイド受容体下流の大腸がん原因因子の同定と誘導メカニズムの解明



○小西 勇夢<sup>1</sup>、福島 圭穰<sup>2</sup>、Regan John W<sup>3</sup>、藤野 裕道<sup>4</sup>

<sup>1</sup>徳島大・院薬・生命薬理学分野、<sup>2</sup>徳島大・院薬・生命薬理学分野、<sup>3</sup>The University of Arizona・College of Pharmacy・Department of Pharmacology and Toxicology、<sup>4</sup>徳島大・院薬・生命薬理学分野

【背景・目的】大腸がんは日本における年間死亡数が2番目に多いがん疾患であり、高齢化の進行に伴いその罹患者数および死亡者数の増加が予想される。そのため、大腸がんの予防や治療を見据えたがん発生・悪性化メカニズムの解明は重要であると考えられる。大腸がん組織では、炎症性メディエーターであるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)の生産が亢進している。PGE<sub>2</sub>は初期大腸がんを高発現しているEP4受容体に作用し、その下流の細胞内シグナルが大腸がんの発生や悪性化を促進していると考えられている。しかし、具体的な因子については十分に明らかになっていない。本研究では、大腸がん細胞における遺伝子応答の網羅的解析とリアルワールドデータ解析を組み合わせることで、治療標的となり得る大腸がん原因因子の探索とその誘導メカニズムの解明を試みた。

【方法】ヒト大腸がんHCA-7細胞をPGE<sub>2</sub>で刺激した際の遺伝子応答を、RNAシーケンスを用いて網羅的に解析した。さらに、がんゲノム・ビッグデータを用い、実際のヒト大腸がんにおいて発現が亢進している因子を抽出した。HCA-7細胞のEP4プロスタノイド受容体をPGE<sub>2</sub>で刺激し、同定された遺伝子のタンパク質発現量を評価した。さらに、細胞内シグナルの阻害薬を用いることで、EP4受容体下流の誘導メカニズムの解明を試みた。

【結果・考察】PGE<sub>2</sub>で刺激したEP4受容体の応答因子のうち、実際のヒト大腸がんでも発現が亢進している因子として補体抑制因子であるCD55を同定した。HCA-7細胞をPGE<sub>2</sub>で刺激すると、濃度依存的・時間依存的にCD55のタンパク質発現量が増加した。このPGE<sub>2</sub>刺激によるCD55の発現はEP4受容体のアンタゴニストによって阻害され、また、Gsタンパク質の阻害薬では抑制されなかった一方で、Giタンパク質の阻害薬で抑制された。以上の結果より、CD55の発現はEP4受容体下流のがん促進因子であり、Giタンパク質を介したシグナルによって制御されている可能性が考えられた。

## D-2-3 ヒト前立腺がんLNCaPスフェロイドモデルにおけるCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル阻害によるユビキチンリガーゼFBXW7の活性化

○大矢 進、鬼頭 宏彰、梶栗 潤子、山口 陽平、松井 未来

名古屋市立大・院医

がん抑制遺伝子F-box and WD repeat domain-containing 7 (FBXW7)は、がん幹細胞マーカーのタンパク質分解を促進することにより、がん幹細胞能を低下させる。我々は最近、いくつかのがん細胞の三次元(3D)スフェロイド形成により、FBXW7転写が抑制されることを明らかにした。本研究では、ヒト前立腺がんLNCaP細胞の3次元スフェロイドモデルにおいて、Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネルK<sub>Ca</sub>1.1阻害により、Akt-Nrf2シグナル伝達経路を介してFBXW7転写が活性化されることを見出した。また、K<sub>Ca</sub>1.1阻害によるFBXW7転写の活性化は、C/EBP $\delta$  (CEBPD)の阻害、およびmiR223 mimicの移入により低下した。以上の結果により、LNCaPスフェロイドモデルにおいて、K<sub>Ca</sub>1.1阻害によるFBXW7転写の活性化は、Akt-Nrf2-CEBPD-miR223系を介して制御されている可能性が示唆された。さらに、K<sub>Ca</sub>1.1阻害によるFBXW7活性化は、1) K<sub>Ca</sub>1.1活性の増大と2) がん幹細胞マーカーc-Mycのタンパク質発現低下を惹起した。したがって、K<sub>Ca</sub>1.1阻害によるFBXW7の転写活性化は、K<sub>Ca</sub>1.1陽性発現がん細胞におけるがん幹細胞への転換抑制に少なくとも一部関与する可能性が示唆された。

## D-2-4 がん細胞におけるアミノ酸トランスポーターLAT1 の阻害はp38 MAPK 活性化を介したサイクリン D1 の下方制御により G0/G1期からS期への移行を抑制する



○Zhou Xinyu<sup>1</sup>、大垣 隆一<sup>1,2</sup>、Jin Chunhuan<sup>1</sup>、Xu Minhui<sup>1</sup>、岡西 広樹<sup>1</sup>、遠藤 仁<sup>3</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>ジェイファーマ株式会社

大型中性アミノ酸を主な輸送基質とするアミノ酸トランスポーターLAT1 (SLC7A5) は、さまざまな腫瘍組織において発現が亢進している。LAT1選択的阻害剤 nanvuranlat (Nanv; JPH203) は、アミノ酸取り込みの遮断によってがん細胞の成長と増殖を抑制する、新規作用機序の抗悪性腫瘍薬として開発が進められてきた。先行研究では、がん細胞をNanv で処理した際に G0/G1 期の細胞が増加することが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで本研究では、Nanvが細胞周期に与える影響と、その背景にある分子機構の解明を試みた。膵臓がんMIA PaCa-2細胞を低血清培地中に培養し、G0/G1期の細胞周期チェックポイントであるRestriction pointで同期させた。その後、通常濃度の血清存在下で培養を開始し、細胞周期の進行を誘導したところ、NanvがG0/G1期からS期への移行を著明に抑制することを見出した。Nanv存在下ではp38 MAPKが持続的に活性化しており、サイクリン D1 のリン酸化依存的プロテアソーム分解経路の亢進によって、S期への移行に重要なサイクリンD1の蓄積が抑制されていた。プロテアソーム阻害薬はサイクリンD1の量を回復させ、Nanvによる細胞周期の停止を解除した。p38 MAPK の4種類のアイソフォームについて特異的ノックダウンを実施したところ、主に $\alpha$ アイソフォームがサイクリンD1の下方制御に寄与していることが明らかになった。NanvによるG0/G1期からS期への移行の阻害、p38 MAPK  $\alpha$  アイソフォームの活性化とサイクリンD1の下方制御は、他の膵臓がん細胞株であるAsPC-1やPANC-1においても確認された。また、免疫不全マウスで作製したMIA PaCa-2細胞ゼノグラフト腫瘍モデルにNanvを投与したところ、p38 MAPK のリン酸化が増加し、サイクリン D1 の量が減少した。以上より、NanvがG0/G1 期からS期への移行における細胞周期停止作用を有することが示された。本研究の成果は、Nanvの抗腫瘍効果の基盤となる薬理作用の解明に貢献するとともに、Restriction point下流に位置するアミノ酸依存的細胞周期チェックポイントの分子機構についても重要な知見を与えるものである。

## D-2-5 マクロファージの低酸素誘導因子発現が腫瘍組織環境へ与える影響についての検討



○平川 遼、松永 慎司、徳留 健太郎、本間 拓二郎、富田 修平

大阪公立大・医・分子病態薬理学

腫瘍組織内の血管は正常組織の血管性状と異なり、不規則な分枝かつ血管内皮細胞間の密着結合が未熟であるため、血液易漏出性および血流に乏しく、腫瘍組織内では低酸素環境が形成される。細胞の低酸素応答機序の1つとしてプロリン水酸化酵素 (PHD)、低酸素誘導因子 (HIFs)、VHLを介する系がある。免疫細胞におけるHIFの活性化は腫瘍免疫の活性化や腫瘍組織環境形成など腫瘍組織において重要な役割を果たしている。そこで本研究では抗原提示細胞であるマクロファージ (M $\phi$ ) に着目し、M $\phi$  特異的HIF-2 $\alpha$  過剰発現が腫瘍増大および腫瘍内血管形成およびM $\phi$  組織浸潤に対し、どのような影響を与えるか検討を行った。

本研究では*Hif-1<sup>lox/lox</sup>*、*Hif-2<sup>lox/lox</sup>*、*Vhl<sup>lox/lox</sup>*、および*LysM-Cre*マウスを用いて実験を行った。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ルイス肺癌細胞株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および細胞間密着結合分子マーカーであるZO1の染色により腫瘍内の血管性状について評価を行った。また、遺伝子改変マウスから採取したBMDMを用いたTranswell Assayにより、M $\phi$  の遊走能を評価した。

M $\phi$  特異的HIF-1 $\alpha$  欠損HIF-2 $\alpha$  過剰発現マウスにおいて腫瘍増大抑制が認められたが、M $\phi$  特異的HIF-1 $\alpha$  欠損マウスでは腫瘍増大抑制は認められなかった。M $\phi$  特異的HIF-1 $\alpha$  欠損HIF-2 $\alpha$  過剰発現マウス、M $\phi$  特異的HIF1欠損マウスの両方で血管面積および血管1本あたりの占める面積の低下が認められた。M $\phi$  特異的HIF-1 $\alpha$  欠損HIF-2 $\alpha$  過剰発現マウスでは血管の成熟度の低下が認められたが、M $\phi$  特異的HIF1欠損マウスでは認められなかった。またM $\phi$  特異的HIF-1 $\alpha$  欠損HIF-2 $\alpha$  過剰発現マウスにおいてはM $\phi$  の遊走能の低下が認められたが、M $\phi$  特異的HIF-1欠損マウスでは有意な差は見られなかった。以上のことより、腫瘍内M $\phi$  においてHIF-2 $\alpha$  過剰発現は腫瘍の増大抑制およびM $\phi$  の遊走能に寄与することが示唆された。また、腫瘍内M $\phi$  のHIF-1 $\alpha$  は腫瘍内血管形成に寄与することが示唆された。

## D-2-6 Bcr-Abl阻害剤に対する慢性骨髄性白血病細胞の耐性獲得メカニズムの探索

○八木 健太<sup>1</sup>、今若 清香<sup>2</sup>、高岡 麻佑<sup>2</sup>、岡本 尚大<sup>2,3</sup>、相澤 風花<sup>2,3</sup>、新村 貴博<sup>1,2</sup>、合田 光寛<sup>2,3</sup>、川田 敬<sup>2,4</sup>、石澤 有紀<sup>2,5</sup>、石澤 啓介<sup>1,2,3</sup>

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

【目的】慢性骨髄性白血病（CML）はBcr-Abl遺伝子が発症の主たる原因であり、imatinibをはじめとするBcr-Abl阻害剤が劇的な効果を発揮する。しかし一部の症例では耐性を獲得し、Bcr-Abl阻害剤による治療継続が困難となる。Bcr-Abl阻害剤の有効性を維持するためには、がん細胞の耐性獲得機構の解明が必須である。耐性獲得の機序の一つとして、Bcr-Abl遺伝子の点突然変異による、Bcr-Abl阻害剤の標的蛋白への結合阻害が知られている。しかし、点突然変異以外にも耐性の原因は存在する。近年上市したasciminibは、従来のBcr-Abl阻害剤と異なるBcr-Abl阻害機序を有し耐性克服に有用な薬剤として期待されている。しかしながら、薬剤耐性機構は多岐にわたるため、とくに点突然変異以外の耐性化に対するasciminib有効性には不明な点が多い。そこで本研究では、Bcr-Abl阻害剤に耐性をもつCML細胞株を樹立しasciminibの有効性および薬剤耐性機序について検討した。

【方法】ヒトCML細胞株であるK562細胞にimatinibを長期間曝露し、imatinib耐性K562細胞（K562-IR ①, ②, ③）を作製した。K562-IRを用いてasciminib単独およびimatinib併用時の細胞生存率の変化をWST-8 assayを用いて検討した。フローサイトメトリーを用いてAnnexin VおよびPIを用いたアポトーシスや細胞周期の解析を行なった。各耐性株における点突然変異はRNAシーケンシング法を用いて確認し、RNAseqおよびリアルタイムPCRを用いて薬剤耐性に関連する遺伝子変異を網羅的に解析した。

【結果】Imatinib非耐性株であるK562において、asciminib曝露により濃度依存的に細胞生存率が低下した。Imatinibとasciminib併用は、imatinib耐性の有無にかかわらず相乗効果が認められた。しかし、いずれのK562-IRにおいても非耐性株と比較して、asciminibのIC<sub>50</sub>は上昇した。点突然変異のないK562-IR③では薬剤排出トランスポーターABCB1, ABCG2の遺伝子発現の上昇がみられたが、imatinibおよびasciminibの曝露時の細胞生存率の低下は各トランスポーター阻害剤に影響されなかった。そこで、RNA seqによる網羅的解析によって、耐性化に関与する可能性のある3遺伝子を見出した。3遺伝子のうち、細胞の分化に関与する遺伝子であるGRRP1の発現は、K562-IR③において有意に減少した。

【考察】Asciminibは、imatinibと併用する事で抗がん作用が高まることを見出した。一方で、imatinibに薬剤耐性を獲得した細胞に対しては、asciminibでも有効性が低下する可能性が示唆された。その耐性化メカニズムには、GRRP1が関与している可能性がある。

## D-3-1 S-ニトロシル化修飾によるG3BP1のストレス顆粒形成制御と細胞保護作用



○伊藤 和、久保田 翔、高杉 展正、上原 孝

岡山大学・院医歯薬・薬効解析学

【背景・目的】一酸化窒素（NO）は生体内のシグナル伝達物質として働き、生理的・ストレス条件下において様々な機能調節を担っている。NOの作用機序の一つとして、タンパク質システインチオール基をS-ニトロシル化（SNO化）し、様々なタンパク質の機能を制御することが報告されている。当研究室では、タンパク質がSNO化を受け、酵素活性や機能が変化することを明らかにしてきた。また、酸化ストレスや熱ショックなどのストレスにตอบสนองして、液-液相分離により細胞質で一過性に形成するストレス顆粒（SG）は、細胞保護作用を示すことが知られている。その一方で、分解されない異常なSGを介した凝集体形成が神経変性疾患の発症に関与することが示唆されており、病態下のSG動態に関する多くは未解明である。そこで、本研究ではG3BP1のSNO化を介したSG動態の変化及び、NO誘発性SGの細胞死への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞、HeLa細胞にNO供与体を処理した。G3BP1のSNO化形成はBiotin-switch assayにより評価した。また、SGはG3BP1の蛍光免疫染色により解析した。位相差観察による形態変化とHoechst染色での核凝縮により細胞死を評価した。

【結果・考察】G3BP1のSNO化の有無を検証したところ、NO処理濃度依存的にSNO化が認められ、時間とともにそのレベルが低下することがわかった。また、SNO化が観察された条件下で、NO処理濃度依存的にSG形成が誘導され、G3BP1のCys73がNOの標的であることがわかった。次にG3BP1 C73S過剰発現細胞にNOを処理したところ、G3BP1 WTと比較してSG形成が抑制された。続いて、TDP-43の発現により誘導される細胞死に、NO誘発性のSGが影響を与えるか否かを検証した。その結果、比較的低濃度のNO処理により、G3BP1 WTとTDP-43を共発現させた細胞において、TDP-43のSG内局在が増加し、細胞死が抑制されることが明らかとなった。以上より、G3BP1はSNO化修飾を介してSG形成を促進し、SG内にTDP-43を取り込むことで、細胞毒性を軽減していることが示唆された。



## D-3-2 IRE1 $\alpha$ 特異的酸化修飾阻害薬の開発とその抗細胞死効果



○黒木 春那<sup>1</sup>、Zhang Kam<sup>2</sup>、Kumar Ashutosh<sup>2</sup>、阿部 匠<sup>3</sup>、澤田 大介<sup>3</sup>、上原 孝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大・院医歯薬・薬効解析学、<sup>2</sup>理研・生命機能科学研究セ・構造バイオインフォマティクス、<sup>3</sup>岡山大・院医歯薬・精密有機合成化学

【背景・目的】神経変性疾患の発症メカニズムが種々提唱される中、その実行因子として、加齢や炎症によって産生が増大する一酸化窒素 (NO) が注目されてきた。NOは、システインチオール基への酸化修飾 (S-ニトロシル化) を介して様々なタンパク質の機能を調節することが知られている。当研究室では新規NO標的分子として小胞体ストレスセンサーIRE1 $\alpha$ を同定し、IRE1 $\alpha$ のRNase活性がS-ニトロシル化によって低下することで、細胞死が誘発されることを明らかにした。さらに、パーキンソン病様症状を引き起こすMPP<sup>+</sup>処理によっても、IRE1 $\alpha$  RNase活性は阻害されることを見出している。MPP<sup>+</sup>は、NOの産生を介して神経細胞死を惹起することが報告されている。したがって、NOによるIRE1 $\alpha$ 活性低下をコントロールすることが細胞死回避に重要であると推定された。本研究では、IRE1 $\alpha$ のS-ニトロシル化を特異的に抑制する阻害薬を開発し、その抗細胞死効果を検証した。

【方法】IRE1 $\alpha$ のS-ニトロシル化部位を標的とする化合物は、化合物ライブラリーから*in silico*ドッキングシミュレーションによって探索した。IRE1 $\alpha$ のS-ニトロシル化は、ビオチンスイッチ法によって評価した。IRE1 $\alpha$ のRNase活性は、基質である*Xbp1*の切断型mRNA (*Xbp1s*) 量をRT-PCR法で検出し、評価した。細胞死は、全細胞に対するヨウ化プロピジウム (PI) 陽性細胞の割合を細胞死亡率として算出し、評価した。

【結果】二回のスクリーニングを経て、IRE1 $\alpha$ 選択的なS-ニトロシル化を阻害する化合物Xを単離した。IRE1 $\alpha$ のRNase活性依存的に産生される*Xbp1s*は、細胞生存に重要である。化合物Xは、NOドナーによる*Xbp1s*発現低下を有意に抑制する一方で、NOドナー未処理時の*Xbp1s*の増減には影響しなかった。以上より、化合物XはIRE1 $\alpha$ のRNase活性そのものに影響をすることなく、S-ニトロシル化に伴う活性低下を阻止することが示唆された。さらに、NOドナーやMPP<sup>+</sup>によって誘導した細胞死に対する化合物Xの効果を検証したところ、濃度依存的に細胞死が減少することがわかった。本研究から、IRE1 $\alpha$ のS-ニトロシル化阻害薬として単離した化合物Xは、NO依存的な細胞死に対して保護的に働くことが明らかになった。

## D-3-3 パルミトイル化修飾酵素DHHCタンパク質の新規活性測定法の開発と機能解析

○足立 直子<sup>1</sup>、Hess Douglas T.<sup>2</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・分子薬理分野、<sup>2</sup>Case Western Reserve University・ITMM

脂質修飾の一つであるパルミトイル化修飾は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、修飾を受けたタンパク質は疎水性が上昇し、細胞膜や細胞内小器官膜への親和性が上がる。これまでに2000以上のタンパク質がこの修飾を受けることが知られており、この修飾機構の破綻は神経疾患や免疫疾患、加えて、様々ながんに関連することが報告されている。パルミトイル化修飾の責任酵素であるDHHCタンパク質は、ヒトでは23種同定されている。DHHCタンパク質群は、細胞内でパルミトイル-CoAを用いて、活性中心部位に存在するシステイン残基を自己パルミトイル化し、続いて基質タンパク質のシステイン残基にパルミトイル基を転移する。DHHC酵素の活性状態は、自己パルミトイル化されたDHHC酵素を検出することでモニターできるが、これまでの手法では膜貫通タンパク質であるDHHC酵素を多量に精製する必要があったことから、DHHC酵素の大半で未解析のままであった。

今回我々は、自己パルミトイル化DHHC酵素を簡便に短時間で、更に、低コストに検出する手法を開発した。本研究によりDHHC酵素の活性は様々な翻訳後修飾により制御され、活性状態には酵素間で大きな違いがあることが判明した。加えて、がん患者より同定されたDHHC酵素の変異をスクリーニングしたところ、自己パルミトイル化能が大きく低下し、不活性化された変異DHHC酵素を発見した。本手法により、パルミトイル化修飾酵素DHHCタンパク質の機能解析が大きく前進し、パルミトイル化修飾が関与する様々な病因の解明が期待できる。

## D-3-4 トリコプレインによる一次線毛形成制御の組織損傷再生における役割について

○白水 崇、稲垣 昌樹、西村 有平

三重大・院医

細胞膜上に存在する小さな不動性の突起である一次線毛 (Primary cilia) は細胞内外のシグナル伝達に働き、その構造形成やシグナル伝達の機能に関する遺伝子の異常は線毛病と呼ばれる一連の疾患を引き起こすことが知られている。一次線毛の形成制御に関わる遺伝子の一つであるトリコプレイン (TCHP) は一次線毛基部の基底小体に局在し、オーロラAキナーゼの活性化を介して一次線毛形成の抑制因子として機能する。このTCHPを介した一次線毛の形成制御については、細胞周期進行や間葉系幹細胞の分化に関わるものが明らかになっているが、その詳細な分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究ではTCHPノックアウトゼブラフィッシュを作成し、組織レベルにおけるTCHPの機能を調べるとともに、プロテオーム解析による網羅的な一次線毛シグナル伝達関連因子の同定を試みた。作成したTCHPノックアウトゼブラフィッシュは、ヒレ組織の損傷再生実験において、野生型よりも高い再生能力を示した。また、再生中のヒレ組織を用いた定量的プロテオーム解析では8756のタンパク質が同定され、ノックアウトと野生型の間で発現変動があるものとして、186タンパク質が同定された。また、これらプロテオームデータを用いたオントロジー解析では、細胞増殖や分化に関わる遺伝子とともに、新たなシグナル分子の関与も示唆された。本発表では、同定された新規一次線毛シグナル関連分子のゼブラフィッシュを用いた機能解析について報告する。

## D-3-5 高速スキャン型スペckルノイズ変調OCTによるイメージ像の鮮明化

○太田 岳<sup>1</sup>、小野 和也<sup>1</sup>、日比野 浩<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・薬理学講座統合薬理学、<sup>2</sup>AMED・AMED-CREST

空気の振動である音は、哺乳類の鼓膜・耳小骨を介して、渦巻き型の末梢受容器「内耳蝸牛」に機械的刺激として入力される。この臓器内部のシート様組織である「感覚上皮帯」は、渦の底から頂上にかけてその厚さ・幅・硬さが単調に変化し、この物理的な性質の差を利用して場所ごとに周波数を選び分け、ナノ振動する。この微小な動きは、上皮上に分布するセンサー細胞の動作によって、小さな音ほどよりよく増幅される。内耳は、多種多様な細胞が絡み合って複雑な構造体を形成しており、この増幅機構の詳細はまだ十分に理解されていない。しかしながら、わずかな侵襲であっても臓器機能が損なわれてしまうため、分析が困難であった。そこで2006年から、光断層撮像法を応用した *in vivo* 形態解析、さらに同手法による感覚上皮帯のナノ振動計測が実施されてきた。しかしながら、麻酔下の生きた動物における計測においては、光エコーのスキャン中に拍動や自発呼吸による動きノイズが混入しやすく、積算して得られる断層画像にはしばしばそれらに由来した解像度の低下が確認される。そこで本研究では、サンプル上における単位時間あたりの反射光量を高め、1回あたり10 ms未満の高速スキャンによる撮像を実施した。さらに連続した2枚のイメージペアを複数用意し、それらを画像鮮明化に特化した機械学習モデルに適用したところ、シングルショット画像から背景ノイズが除去された。本手法の活用により、動きノイズの影響を受けにくい鮮明な形態的解析が今後可能となると考えられる。

## D-3-6 **ダイヤモンド電極による薬物モニタリングシステムの構築とその臨床応用への展望**

○日比野 浩<sup>1</sup>、Ahmad Norzahirah Binti<sup>1</sup>、柴山 礼寛<sup>1</sup>、緒方 元気<sup>2</sup>、齋木 琢郎<sup>3</sup>、西條 康夫<sup>3</sup>、栄長 泰明<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・統合薬理、<sup>2</sup>慶應義塾大・理工・化学科、<sup>3</sup>新潟大・院医歯・腫瘍内科

体内の薬物濃度のリアルタイム計測は、基礎的な薬理学研究のみならず、臨床の現場でも鍵となる。我々は、理工系先端素材である「ダイヤモンド電極」を用いて、体液中の薬物動態を経時的に追尾するプラットフォームを構築してきた。この電極は、酸化還元反応を介して電気化学的に化合物を検出する。ダイヤモンド電極には、二つの形状がある。第一は、先端径が10~40 μmの針状センサであり、生体内の局所に挿入することができる。このセンサに、電気現象を捉える従来の微小ガラス電極を組み合わせることで、薬物の濃度とその主作用・副作用を同時に捉える計測系を創出した。このシステムを使い、動物の内耳や脳を題材として、利尿薬や抗てんかん薬を解析した。第二は、平板状センサであり、これを1 cm四方のチップ状に加工して、血中の薬物濃度を短時間で定量する系を試作した。このシステムにより、経口投与した抗がん薬の血清濃度を、動物および患者のサンプルから短時間で決定した。ダイヤモンド電極を駆使した薬物モニタリングシステムを最適化し活用することで、新たな視点から薬理作用の理解や薬物治療の発展が進展すると期待される。