

要旨

A 会場

A-1-1 マウスにおける加齢に伴う不安・うつ様行動と海馬ミクログリアの関連性



○横畠 未来¹、中村 庸輝¹、池田 圭佑¹、中島 一恵¹、吾郷 由希夫²、佐藤 綾美³、石神 昭人³、森岡 徳光¹

¹ 広島大・院医系・薬効解析、²広島大・院医系・細胞分子薬理、³都健康長寿研・老化制御

【目的】老年期精神疾患は、配偶者の死別や定年など環境要因に由来するものと考えられているが、加齢に伴う脳内の細胞機能変調などの生体要因との関連性は不明である。中枢神経系の主要な免疫担当細胞であるミクログリアは、成熟した脳内においては自己増殖と細胞死のバランスによりその細胞密度を維持するため、加齢に伴い細胞老化（複製老化）が誘導され細胞機能が変調する可能性が示唆されている。しかしながら、老年期精神疾患とミクログリアの細胞老化の詳細な関連性は不明である。本研究では、様々な情動関連脳領域と結合することから気分調節に重要であるとされる海馬に着目し、マウスにおける加齢に伴う不安・うつ様行動とミクログリアの関連性を解析した。

【方法】雄性 C57BL/6J マウス（3, 12, 24ヶ月齢）を使用し、不安・うつ様行動を各種行動試験により解析した。マウス海馬組織において、細胞老化マーカーとして汎用される p16INK4a や、主要な疾患関連ミクログリアマーカーである TREM2 などの mRNA 発現量を real-time PCR 法により評価した。マウス海馬ミクログリアはミクログリアマーカーである ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) タンパク質に対する抗体を用いて免疫組織染色し、形態変化は細胞突起頂点を結んだ立体の体積（Cell territory）、細胞老化は p16 INK4a タンパク質との共染色によりそれぞれ解析した。

【結果】24ヶ月齢のマウスでは、3ヶ月齢のマウスと比較し、不安・うつ様行動が有意に増加した。さらに、加齢に伴い海馬組織のp16INK4a、TREM2 mRNA 発現量が有意に増加した。また、24ヶ月齢のマウスの海馬ミクログリアでは cell territory が減少するなど細胞形態が変化し、p16INK4a 陽性のミクログリアの増加が認められた。

【考察】マウスにおいても、加齢に伴う不安・うつ様行動の増加が観察された。さらに、海馬組織におけるミクログリア形態変化と細胞老化の誘導が観察されたことから、老年期精神疾患の病態形成に細胞老化ミクログリアが関連する可能性が考えられる。

A-1-2 アルコール離脱誘発性うつ様行動に対する鍼通電療法の効果検証と変動因子の網羅的探索



○山内 博登¹、松崎 伸介^{1,2,3,4}

¹森ノ宮医療大学保健医療学研究科、²森ノ宮医療大学医療技術学部放射線学科、³森ノ宮医療大学MINCL、⁴大阪大学大学院連合小児発達学研究科

COVID-19パンデミック下で、生活習慣の乱れがもたらされたことにより、生活習慣病の罹患者数が世界的に増加したことはよく知られている。また、同時にうつ病罹患者数も増加した。そこで我々は、生活習慣病とうつ病を結びつける、アルコール離脱症候群(AWS)が誘発するうつ症状に着目した。長期の過度な飲酒はAWSを誘発し、抑うつ、快感消失、不安などさまざまな精神症状を引き起こす。これらの心理状態は禁酒の妨げとなり、飲酒の再発リスクを高める。基礎研究においてAWSによるうつ病動物モデルは、うつ病の発症メカニズム解明や創薬の戦略として広く利用されている。アルコール離脱によって誘発されるうつ症状に対しては、いくつかの抗うつ薬が推奨されており、禁酒率を向上させる可能性がある。しかし、これらの薬物の副作用や基礎疾患により有効性と適用が制限されている。補完代替療法である鍼通電療法(EA)は、抑うつ、無気力、不安などの精神症状の治療法のひとつである。また、特に頭部に位置する経穴GV20とEx-HN3へのEAはヒト・動物モデルにおいて有効性が報告されており、具体的には慢性予測不能軽度ストレス、社会的敗北ストレス、リポ多糖投与モデルなど、様々なうつ病動物モデルにおいて有効であることが報告されている。しかし、アルコール離脱により誘発されるうつ病モデルを用いてEAが有効であるかどうかは検証されておらず、EAの効果機序や作用点については未だ不明なことが多い。そこで本研究では、アルコール離脱によって誘発される、うつ様・不安様行動に対するGV20とEx-HN3へのEA処置の効果を検証し、前頭前皮質や海馬等の脳サンプルを回収した後に行動の変容に関与した変動因子をqPCRにて網羅的に調べた。本学会では、行動レベルでの変化、網羅的に調べた遺伝子レベルでの変化の結果について報告する。

(R)-ketamineは前部島皮質の活性化を介して隔離飼育マウスのうつ様行動と認知機能障害を改善する

○横山 玲^{1,2}、吾郷 由希夫¹、五十嵐 久人²、樋口 桃子²、田沼 将人²、島崎 雄人²、
勢力 薫²、林田 美鈴²、山口 瞬³、田中 宏和⁴、中澤 敬信⁵、橋本 謙二⁶、笠井 淳司^{2,7}、
橋本 均^{2,8,9,10,11}

¹広島大・院医(歯)・細胞分子薬理、²大阪大・院薬・神経薬理、³岐阜大・院医・高次神経形態、⁴東京都市大・院理工・システム情報工学、⁵東京農業大・生体科学・動物分子生物、⁶千葉大・社会精神保健教育研究センター・病態解析、⁷名古屋大・環境医学研究所・システム神経薬理、⁸大阪大・院連合小児発達、⁹大阪大・院医・分子医薬、¹⁰大阪大・データビリティフロンティア機構、¹¹大阪大・先導的学際研究機構

【目的】うつ病は、抑うつ気分や無快感症状等の中核症状に加え、認知機能の低下もみられる精神疾患である。近年、解離性麻酔薬ketamineやその光学異性体である(S)-ketamineの治療抵抗性うつ病に対する臨床応用が進んでいる。もう一方の光学異性体である(R)-ketamineは、動物実験において(S)-ketamineと同等以上の強い抗うつ作用を示し、うつ症状の改善に加え、うつ病に伴う認知機能障害にも有効である可能性が示されている。しかしながら、(R)-ketamineと(S)-ketamineの抗うつ作用機序の違いに関する詳細は未だ明らかでない。そこで本研究は、社会的隔離飼育によるうつ様モデルマウスを用いて、ketamine光学異性体間の比較解析により、(R)-ketamineの作用に関与する脳領域を同定することを目的とした。

【方法・結果】まず、隔離飼育マウスにおいても(R)-ketamineが(S)-ketamineよりも低用量で抗うつ作用を示すことを強制水泳試験(FST)により確認した。抗うつ作用に関与する候補脳領域を探索するため、隔離飼育した神経活動レポーター(Arc-dVenus)マウスに両ketamineを投与し、FSTを負荷した際の全脳イメージングと機械学習による判別分析を行った。その結果、(R)-ketamineの抗うつ作用に寄与すると考えられる前部島皮質(aIC)を含むいくつかの脳領域候補を同定した。化学遺伝学的手法を用いてaICの神経活動を抑制したところ、FSTにおける(R)-ketamineの抗うつ作用は阻害された一方で、(S)-ketamineの抗うつ作用に影響はみられなかった。また、ファイバーフォトメトリー法によりketamine投与前後におけるaIC神経活動を記録したところ、(R)-ketamineは隔離飼育により低下した社会的行動に関連するaICの神経活動を回復させることが明らかになった。さらに、5 試行社会的記憶試験において、(R)-ketamineは隔離飼育マウスの社会的記憶の形成を促進させ、aICの活動抑制操作によりこの作用は消失した。以上本研究では、(R)-ketamineがaICの活性化を介して抗うつ作用を発揮するという新たなメカニズムを見いだし、うつ病に伴う認知機能の低下の改善にも寄与する可能性を明らかにした。

SH-SY5Y細胞におけるミトコンドリア障害によるcGAS/STING/ I 型IFN応答性の評価

○中島 明日香¹、藤牧 綾香¹、村上 貴規¹、大内 一輝¹、栗田 尚佳¹、中村 庸輝²、
森岡 徳光²、位田 雅俊¹

¹岐阜薬科大・薬・薬物治療学、²広島大・院医系・薬効解析

DNAセンサーである環状グアノシン-リン酸-アデノシン-リン酸合成酵素(cGAS)は、ウイルスなどの外来DNAを検出し、インターフェロン遺伝子刺激因子(STING)を活性化し、I型インターフェロン(IFN)応答とその後の炎症性サイトカイン発現を誘発する。しかし、細胞質にミトコンドリアDNA(mtDNA)が漏出されると、cGASが感知し、持続的にcGAS/STING経路が活性化される。この活性化は、加齢に伴う慢性炎症や、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、パーキンソン病(PD)などの様々な神経変性疾患の炎症の原因となる。PDは、黒質におけるドパミン神経細胞死を特徴とし、その原因にはミトコンドリア機能不全が関与していると考えられている。過去の研究では、PD患者の剖検脳およびPDモデルマウスでI型IFNの増加が観察された。また、別の研究では、PD患者の黒質におけるSTINGレベルの増加が示され、cGAS/STINGシグナル伝達がPDの発症に関連していることが示唆された。しかし、cGAS/STING経路に関するほとんどの研究は、ミクログリアに注目しており、神経細胞におけるミトコンドリア障害を介したcGAS/STING経路の寄与は依然として不明である。本研究は、神経細胞のミトコンドリア障害におけるcGAS/STING経路の関与を明らかにすることを目的とした。ミトコンドリア電子伝達鎖複合体Iの阻害剤であるロテノンを用いて、SH-SY5Y細胞におけるcGAS/STING活性を評価した。CCK-8で決定した細胞死を引き起こさない濃度のロテノンを用いて、qRT-PCRにより、細胞質内のmtDNAの増加とI型IFNの上昇をmRNAレベルで確認した。また、ウェスタンブロット法によりcGAS/STING経路に関連するタンパク質のリン酸化を確認した。さらに、ロテノンによるI型IFNの上昇は、cGAS/STING経路の阻害剤によって阻止されることを確認した。これらの結果から、神経細胞でのミトコンドリア障害がcGAS/STING/I型IFN経路を介してIFN β が脳内炎症や、神経細胞自体に影響を与えていることが考えられる。以上より、神経細胞におけるミトコンドリア障害を介したcGAS/STING/I型IFN経路は、PDに対する創薬のターゲットとなる可能性があることが示唆された。

神経細胞刺激後急速に発現するGPR3転写調節メカニズムと関連遺伝子に与える影響

○田中 茂、奈良井 浩太、猪川 文朗、白樺 紘子、原田 佳奈、秀 和泉、酒井 規雄

広島大学 医系科学研究科 神経薬理学

G-protein-coupled receptor 3 (GPR3)は神経細胞で恒常的に発現する、リガンド非依存的Gαs活性化型受容体ファミリーの一つで、脊椎動物では種を越えて保存されている。我々はこれまで、神経細胞においてGPR3が様々な細胞ストレス抵抗性や、神経障害後の軸索再生促進に寄与することを解明し、GPR3の神経細胞恒常性や細胞障害に対するレジリエントな役割を見いだしてきた。一方、GPR3は神経細胞やT細胞において分化などの様々な外的刺激に反応し急速に発現上昇するが、この刺激に反応するGPR3発現誘導や転写メカニズムについて不明である。本研究では、神経細胞刺激に応答するGPR3転写調節メカニズムと、GPR3発現変化が下流遺伝子発現に与える影響について検討した。PC12細胞において、GPR3は脱分極、神経成長因子（NGF）、フォルスコリン各刺激1-2時間後に発現が上昇し、以後5時間後まで発現が漸減した。最初にGPR3発現調節部位同定のため、NET-CAGE法を用いた解析を行った。その結果、NGF刺激30分後にGPR3ゲノム5'側翻訳開始点近傍のAP-1結合領域前後でCAGEシグナル上昇を認め、同時相でのAP-1によるGPR3転写調節が示唆された。さらに、ルシフェラーゼを用いたプロモーター解析や転写因子AP-1関連遺伝子（c-fos, c-jun）のノックダウン解析により、AP-1結合領域TPA response element (TRE)や、複数のCREB結合領域cAMP response element (CRE)が、NGF刺激によるGPR3発現上昇に関与することが明らかになった。また、NGFによるGPR3発現上昇は、核内受容体NR4Aファミリー遺伝子発現に影響を与え、特にGPR3によるNR4A1転写調節には、NR4A1遺伝子5'側の複数のCRE領域が関与していた。さらにNGFによるGPR3発現上昇は、NR4A1を介してSynapsin1発現に影響を与えた。したがって、GPR3遺伝子は最初期遺伝子群の一つc-fosにより急速に発現誘導し、細胞内cAMPレベルを上昇させることでcAMP-PKA-CREB経路を刺激し、さらにNR4AなどのCREB転写因子に感受性が高い遺伝子群発現に影響を与えることで、神経細胞恒常性や神経可塑性制御に関与するのかもしれない。

ドパミンD3受容体作動薬による淡蒼球外節の活動亢進はパーキンソン病モデルマウスの意思決定障害に関与する

○窪田 悠力¹、周 昕竹¹、張 心健¹、渡辺 宏久²、永井 拓¹

¹藤田医科大学 精神・神経病態解明センター 神経行動薬理学研究部門、

²藤田医科大学 医学部 脳神経内科学

【目的】意思決定とは、複数の選択肢の中から最適なものを選ぶ行為のことを指す。パーキンソン病（PD）は黒質のドパミン神経細胞の脱落により手の震えや歩行困難などの運動障害を示す神経変性疾患である。PD治療薬のドパミンD3受容体（D3R）作動薬を服用中の患者はハイリスク（罰）を顧みずハイリターン（報酬）を好む病的賭博といった問題行動を呈し、D3R作動薬が意思決定障害を惹起することが示唆されている。しかしながら、D3R作動薬服用中のPD患者に認められる意思決定障害の神経メカニズムについては未だに不明である。本研究では、モデルマウスを用いてD3R作動薬によるPDの意思決定障害に関わる神経回路を探索した。

【方法】ドパミン神経細胞死を誘発する6-ヒドロキシドパミンを両側の背外側線条体に微量注入し、PDモデルマウスを作製した。PDモデルマウスにD3R作動薬であるプラミペキソール（PPX）を投与し、タッチスクリーンを用いたアイオワギャングリング課題を実施した。タッチスクリーン上のP1～P4の4つのパネルのうちP1とP2は「ローリスク・ローリターン」で、P3とP4は「ハイリスク・ハイリターン」で異なる報酬（イチゴミルク）および罰（光刺激）の量と頻度が割り付けられている。各パネルの選択率を算出し、PDモデルマウスの意思決定能力を評価した。神経活動マーカーであるc-Fosの免疫染色により意思決定に関わる脳領域を探索し、候補脳部位に抑制性DREADDを導入した。

【結果】正常なマウスは「ローリスク・ローリターン」であるP1とP2において高い選択率を示したが、PPXを投与したPDモデルマウスは「ハイリスク・ハイリターン」であるP3とP4において高い選択率を示した。PPX投与によりc-Fos陽性細胞は、線条体において減少し、淡蒼球外節と視床において増加した。DREADDによる淡蒼球外節の機能抑制は「ハイリスク・ハイリターン」の選択を抑制した。

【考察】PPXを投与したPDモデルマウスは「ハイリスク・ハイリターン」の不利な選択を好んだことから、本モデルマウスはPD患者に類似した意思決定障害を呈したと考えられる。c-Fos免疫染色の結果より大脳基底核における間接路の異常活動が示唆された。特にDREADDによる改善効果から淡蒼球外節の活動亢進がPDモデルマウスの意思決定障害に関与することが示唆された。

A-2-1

エゾウコギエキスによるラットの学習行動及び海馬BDNFシグナルへの影響

○宮崎 翔平¹、竹腰 英夫²、藤川 隆彦³

¹広島国際大学、²株式会社サン・クロレラ、³鈴鹿医療科学大学

我々はこれまでに、エゾウコギ (*Acanthopanax Senticosus* HARMS: ASH) エキスが高架上での不安行動を減少させ、自律神経活動を安定化させることを報告している。また、ストレスが海馬に依存した学習・記憶を障害することが知られており、ASHエキスはストレス環境下での学習・記憶を向上させる可能性がある。しかし、ASHエキスによる学習行動への影響についてはまだ明らかにされていない。そこで、本研究では抗不安作用を有するASHエキスが学習及び海馬BDNFシグナルに及ぼす影響について検討した。7週齢の雄性SDラットを1週間予備飼育した。その間水及び餌は自由摂取とした。予備飼育後、改良型高架装置による個性判別を行い、不安感受性の低いLタイプと不安感受性の高いSタイプに分類した。2週間の画像プレトレーニングなどを行った後、対照 (Cont) 群及びASH1%、ASH5%混合餌投与群に分け、各飼料の経口投与を1週間行った。その後、二画像弁別課題 (Pair-wise discrimination: PD) を行い、正答率及び正答数、誤答数を解析した。また、Cont群及びASH5%群のPD課題実施中のラットの海馬でのBrain-derived neurotrophic factor (BDNF) シグナルをウエスタンブロット法にて解析した。PDにおいて、ASH5%は両タイプともに正答率を有意に増加させた。また、LタイプにおいてASH1%は正答数及び誤答数を有意に減少させたが、ASH5%は誤答数を有意に減少させた。さらに、Lタイプと比較するとSタイプにおいてASH5%は誤答数を有意に減少させた。海馬のタンパク質発現解析において、SタイプではLタイプと比較してBDNFの発現量が有意に低下していたが、ASH5%はSタイプでのBDNFの発現量を有意に増加させた。また、SタイプではBDNFの受容体であるTrkB及びその下流シグナルのcAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化を有意に増加させた。以上の結果から、ASHエキスは不安感受性の高い個体においてBDNFシグナルを増強し、ストレスによる学習障害を改善する可能性が示唆された。

A-2-2

$\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体を介する海馬アストロサイトの活性化作用

○大野 行弘、國澤 直史、河田 千佳、後藤 光佑、江原 濤、清水 佐紀

大阪医科薬科大学 薬学部 薬品作用解析学

ニコチンは認知機能の促進、抗パーキンソン病作用、依存形成、運動興奮症状 (振戦・けいれん) の誘発など多彩な作用を示すが、その作用機序に関しては不明な点も多い。今回、ニコチンの薬理作用発現におけるアストロサイトの役割を探る目的で、ニコチンのアストロサイト活性化作用を検討した。まず、ddY系雄性マウスにニコチン (0.3~3 mg/kg, i. p.) を投与し、24時間後に脳を摘出して脳内GFAP陽性細胞数の変化を免疫組織化学的に評価した。その結果、ニコチンは梨状葉皮質および海馬 (CA3、歯状回) においてGFAP陽性細胞数を顕著に増加した。また、ニコチンによるGFAP陽性細胞数の増加は $\alpha 4\beta 2$ ニコチン受容体拮抗薬dihydro- β -erythroidineにより影響を受けず、mecamylamineあるいは $\alpha 7$ ニコチン受容体拮抗薬methyllycaconitineによりほぼ完全に抑制された。次に、特異的なアストロサイト不活性化剤であるfluorocitrate (FC) をSD系雄性ラットに脳室内投与してアストロサイト不活性化モデルを作成し、この動物におけるニコチンの運動興奮作用 (振戦、けいれんの発現) を評価した。その結果、ニコチンのけいれん誘発作用がアストロサイトの不活性化によって有意に減弱することが明らかとなった。さらに、Fosタンパク発現を指標とした神経興奮反応の評価から、ニコチンの海馬ニューロン興奮作用がFC処置により部位特異的に抑制されることが確認された。以上の結果から、ニコチンは $\alpha 7$ ニコチン受容体を介して海馬アストロサイトを活性化し、この作用はニコチンの反復投与などによるけいれん発現の増強現象に関与することが示唆された。

A-2-3

Gene expression changes and behavioral abnormalities in rTg4510 mice



○Liu Yue¹、溝口 博之^{1,2}、祖父江 顕³、佐原 成彦⁴、山中 宏二³、山田 清文¹

¹名古屋大学大学院医学系研究科、²名古屋大学 環境医学研究所 附属次世代創薬研究センター、³名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学、⁴国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 脳機能イメージング研究部

Tau hyperphosphorylation has been considered a major contributor to neurodegeneration in Alzheimer 's disease (AD). Glia responses are a key feature of AD and are associated with neuroinflammation. Understanding the specific roles of glial cells in inflammation and their impact on behavior is key to developing new therapeutic strategies. In this study, we investigated changes in gene expression related to neuroinflammation in glial cells of rTg4510 mice. The rTg4510 mice displayed impaired behavior compared with control mice. Gene expression analysis in glial cells from the cortex indicated the activation of glial cells and regression analysis indicated the associations between glial reactivity, inflammation-related genes, and behavioral abnormalities. The findings suggest that specific genetic characteristics of glial cells may contribute to abnormal behaviors in rTg4510 mice, providing new insights into the role of neuroinflammation in neurodegenerative processes.

A-2-4

ミクログリアの炎症性サイトカイン放出におけるERMタンパク質ファミリーの役割



○中野 絢音、大内 一輝、栗田 尚佳、位田 雅俊

岐阜薬科大・薬・薬物治療学

【背景・目的】アルツハイマー型認知症 (Alzheimer 's disease) はアミロイド β の細胞外蓄積による老人斑や、リン酸化タウの神経細胞内蓄積による神経原線維変化を特徴とする神経変性疾患である。細胞骨格関連タンパク質であるEzrin (Ezr)、Radixin (Rdx)、Moesin (Msn)を含むERMタンパク質ファミリーは、細胞の形態変化やシグナル伝達物質に関与する。中でもMsnについては、近年のプロテオーム解析によってアミロイドブラークに有意に多く存在することが明らかになっており、AD患者剖検脳を用いた免疫組織学解析においてはMsnが老人斑、そしてその周りに存在するミクログリアと共局在することも報告されている。しかしながら、アミロイド β に対する活性型ミクログリアの役割についてはまだ不明な点が多く残っている。そこで本研究では、アミロイド β とミクログリアの関連について、ミクログリアにおける炎症応答とERMタンパク質ファミリーの関係に着目し解析を行った。【方法】マウスミクログリア細胞株BV2細胞を用いて検討を行った。siRNAを用いて各ERMタンパク質を一過性にノックダウンした。その後ミクログリアの活性化剤であるLipopolysaccharide (LPS) を処置し、ERM (Ezr、Rdx、Msn)、炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β)、誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現を測定した。【結果・考察】無処置のBV2細胞と比較して、LPS処置したBV2細胞においてEzr、Msnの発現はmRNAレベルで有意に増加し、Rdx mRNAとは異なる変動をした。また、対照群と比較して、MsnをノックダウンしたBV2細胞においてLPS処置した際のTNF α が有意に増加していた。一方で、対照群と比較して、RdxをノックダウンしたBV2細胞においてLPS処置した際のIL-1 β が有意に減少していた。以上のように、LPSにより活性化されたミクログリアにおいてERMタンパク質ファミリーの異なる発現変動が確認された。また、Ezr、Rdx、Msnのそれぞれが炎症性サイトカインの産生に対しても異なる挙動を示すことが示唆された。現状、AD研究においてERMタンパク質ファミリーの内Msnが注目されているが、Ezr、Rdx、Msnそれぞれの相互関係にも着目した研究が必要であると考ええる。

A-2-5 脊髄後角神経細胞に発現するTRPC3は神経障害性疼痛の病態形成に関与する



○戸堀 翔太、植村 風、玉田 晃生、永安 一樹、金子 周司、白川 久志

京都大・院薬・生体機能解析学

神経障害性疼痛は主に末梢神経損傷により生じる慢性疼痛であり、その病態形成には末梢・中枢での体性感覚神経系の病変が重要であることが報告されている。Transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) はホスホリパーゼCと共役して細胞外からのCa²⁺流入を担う受容体活性化型のTRPチャネルであり、中枢神経系や一次感覚神経、末梢免疫細胞等に広く発現している。本研究では末梢神経損傷後の神経障害性疼痛に対するTRPC3の関与について検討した。TRPC3欠損マウスは野生型と同程度の機械・熱刺激感受性を示したが、坐骨神経部分結紮 (pSNL) 処置による機械・熱痛覚過敏の発症はTRPC3欠損により抑制された。また、末梢免疫細胞でのみTRPC3を欠損する骨髄キメラマウスに対しpSNL処置を行ったところ、対照群と同程度の機械痛覚過敏を発症した。TRPC3 mRNAは脊髄後角において主に神経細胞に発現しており、miRNAを用いて脊髄後角神経細胞特異的にTRPC3をノックダウンするとpSNL処置後の機械痛覚過敏が抑制された。一方、一次感覚神経特異的にTRPC3をノックダウンした場合機械痛覚過敏の抑制は認められなかった。続いて、野生型マウスにTRPC3アゴニストGSK1702934A (50 pmol) を髄腔内投与したところ、投与1時間後より機械刺激感受性の亢進が認められた。さらに、神経障害性疼痛との関連が知られているサブスタンスP (1 nmol) の髄腔内投与により誘発される機械痛覚過敏はTRPC3欠損により抑制された。これらの結果より、末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の病態形成に、脊髄後角神経細胞に発現するTRPC3が重要な役割を果たすことが示された。

A-2-6 脳卒中後疼痛モデルマウスにおける脳内ニコチン性アセチルコリン受容体の発現変動

○加藤 将貴、徳山 尚吾

神戸学院大学

【背景・目的】 脳卒中後疼痛 (CPSP) は、疼痛過敏やアロディニアを特徴とする難治性の後遺症であり、既存の疼痛治療薬に対して治療抵抗性を示すケースが多いため、CPSPの病態機序の解明が待ち望まれている。当研究室ではこれまでに、脳内のニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体を刺激することで、両側総頸動脈結紮 (BCAO) によるCPSPモデルマウスにおける機械的アロディニアが改善されることを明らかにしており、CPSP病態では脳内のnACh受容体シグナリングが低下している可能性を示してきた。そこで本研究では、CPSPモデルマウスの脳内におけるnACh受容体の発現変動を解析した。【方法】 本研究では5週齢のddY系雄性マウスを使用した。BCAOによるCPSPモデルは、麻酔下でマウスの両側総頸動脈を露出させ、30分間結紮することで一過性の全脳虚血状態にし、その後再灌流させることで作製した。BCAOから3日後に、0.40 gのvon Freyフィラメントを用いて機械的刺激に対する感受性を評価した。その後、脳を摘出し、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、中脳、橋・延髄を分取した後、total RNAの抽出、逆転写によるcDNAの産生を行った。得られたcDNAサンプルを用いてリアルタイムPCRを行い、nACh受容体遺伝子 (*Chrna4*, *Chrna7*, *Chrn2*) の発現量を測定した。【結果・考察】 機械的刺激感受性評価では、BCAO処置を施したマウスにおいて機械的刺激に対する感受性が亢進していることが確認された。リアルタイムPCRでは、CPSPモデルマウスにおいて、大脳皮質の*Chrna4*遺伝子発現が有意に減少した。視床では*Chrna4*および*Chrna7*、橋・延髄では*Chrna7*および*Chrn2*の有意な減少が認められた。一方、中脳では*Chrna4*および*Chrn2*の有意な増加が確認され、視床下部ではこれら遺伝子の有意な変化は認められなかった。これらの結果から、CPSP病態下では、大脳皮質および視床の $\alpha 4 \beta 2$ nACh受容体、視床および橋・延髄の $\alpha 7$ nACh受容体発現が低下している可能性が示された。一方、中脳では $\alpha 4 \beta 2$ nACh受容体の発現が増加していることが示唆された。以上、CPSPの治療標的として、大脳皮質、視床および橋・延髄におけるnACh受容体シグナリングの制御が有用であることが推察される。

A-3-1 アルコール性運動障害に対するD-cysteineの効果

○関 貴弘^{1,2}、森川 友理²、倉内 祐樹²、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

D-Cysteineは生体内で産生されないD体アミノ酸であるが、生体に投与すると、D-amino acid oxidase (DAO)という酵素で代謝され、硫化水素が産生される。脳内ではDAOは小脳選択的に発現しており、D-cysteineの投与は小脳での硫化水素産生を誘導する。我々は、D-cysteineの慢性投与が脊髄小脳失調 (SCA) モデルマウスの運動障害発症を遅らせ、グリア細胞活性化などの表現型を抑制することを解明した。D-Cysteineは小脳選択的にタンパク質発現変化を誘導するため、この脊髄小脳失調モデルへの発症抑制作用は小脳選択的な硫化水素産生を介していると考えられる。

飲酒が進み酩酊期に到達すると摂取したアルコールが小脳機能を麻痺させる結果、構音障害（ろれつが回らない）、歩行障害（千鳥足）などの小脳失調様の症状が観察される。このアルコール性運動障害に対して、D-cysteineがSCAモデルマウスの運動障害と同様の予防効果を示すかを、エタノール腹腔内投与による一過性の運動失調マウスを用いて検証した。マウス運動機能は細く丸い棒の上をマウスを歩行させるbeam walking testにより観察した。エタノールの慢性腹腔内投与は、投与15分後をピークとする一過性の運動障害を誘導した。SCA発症予防効果を示した100 mg/kgのD-cysteineの腹腔内投与をエタノール投与15分前に行った結果、エタノールによる一過性の運動障害は影響を受けなかった。一方、500 mg/kgとD-cysteineを増量し、さらにエタノール投与10分前と投与間隔を小さくしたところ、D-cysteine投与はエタノールによる運動障害からの回復を有意に遅らせることが明らかとなった。続いて、D-cysteineの経口投与の影響を検討したところ、腹腔内投与の際の結果と同様に、1 g/kgのD-cysteineにより、運動障害からの回復が有意に遅延した。以上の結果はD-cysteineによる小脳での硫化水素産生がアルコール性運動障害からの回復を抑制することを示唆している。本研究結果は、今後D-cysteineがSCA予防薬などとして臨床応用された際には、投与直後に飲酒は避けるべき、という使用上の注意を提示するものである。

A-3-2 嗅覚障害による物体認知記憶障害に対するニコチンの有効性

○西川 佳佑¹、江崎 博仁¹、河崎 伊吹²、今井 寛大¹、西谷 直也^{1,2}、出山 諭司^{1,2}、金田 勝幸^{1,2}

¹金沢大・院薬・薬理、²金沢大・薬・薬理

【背景・目的】認知記憶障害に伴う嗅覚機能低下はよく知られているが、嗅覚障害による認知記憶障害の誘発メカニズムには不明な点が多い。一方、我々を含む多くの研究グループからニコチンが認知記憶を増強することが報告されている。そこで本研究では、嗅覚障害による物体認知記憶障害の誘発メカニズムと、この認知記憶障害に対するニコチンの有効性を検討した。

【方法】雄性C57BL/6Jマウス（7–13週齢）に嗅上皮を損傷させるZnSO₄（5% in saline: 10 μ L/side）を経鼻投与し、嗅覚障害モデルマウスを作製した。床敷きに埋めた餌に接触するまでの潜時を計測するburied food-seeking test (BFT)、および嗅球糸球体面積の組織学的解析により、嗅覚機能を評価した。認知記憶力の評価にはnovel object recognition test (NOR) を用い、trainingの6時間後に行ったtestでのdiscrimination index [DI = (novel object探索時間 - familiar object探索時間) / 合計探索時間] を算出した。また、c-Fos免疫組織化学染色により、NOR後の神経活動変化を評価した。

【結果・考察】経鼻投与1週後のZnSO₄群ではVehicle群と比較して、糸球体面積の減少、およびBFTでの餌接触までの潜時の増大が認められ、嗅覚障害が確認された。ZnSO₄群ではNORでの有意なDIの低下、および内側前頭前野 (mPFC) と海馬 (HPC) におけるc-Fos陽性細胞数の減少が認められた。また、ZnSO₄群でのDIの低下はtraining前のニコチン皮下投与 (0.1 mg/kg) またはmPFC内局所投与 (0.3 μ g/side) により有意に回復した。なお、ニコチン投与は嗅覚機能には影響を与えなかった。以上より、嗅覚障害による物体認知記憶障害の誘発にはmPFCとHPCでの神経活動低下が関与することが示唆された。さらに、ニコチンは認知記憶障害改善作用を示し、その作用の少なくとも一部にはmPFCが関与する可能性が示唆された。

A-3-3

マウスの慢性社会ストレスによる行動変容における嗅皮質－外側中隔核経路の役割



○奥田 裕己¹、篠原 亮太¹、丸山 柚月¹、園部 大和¹、田井中 一貴²、古屋敷 智之

¹神戸大学、²新潟大学

短期的で克服可能なストレスはストレスへの馴化や抵抗性を高めるが、環境要因が持続的に作用することで生じる慢性ストレスは、抑うつ、不安亢進、認知機能障害などの行動変容を促し、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、短期的な急性ストレスは前頭前皮質の興奮性神経細胞の樹状突起を増生させ行動変容を抑制する一方で、長期的な慢性ストレスは前頭前皮質にて樹状突起を退縮させ、行動変容を誘導することを示した。しかし、全脳を対象とした包括的な解析はなされておらず、急性ストレスと慢性ストレスとを区別する神経活動の全容は不明である。本研究では、神経応答のレポーターマウスであるArc-dVenusマウスの脳透明化による全脳イメージングを行い、急性社会ストレスと慢性社会ストレスに伴う神経応答の脳内分布と機能的結合の変化を全脳レベルで比較した。Arc-dVenusマウスにおいて、慢性社会ストレスのみ社会忌避行動、報酬指向行動、認知機能の低下などの行動変容を誘導した。全脳イメージングにより得られたdVenusタンパク質の蛍光強度を223の脳領域で定量し、次元圧縮を行った結果、社会ストレスを受けていない対照群と慢性ストレス群とが明確に分離された。加えて、ネットワーク解析、サポートベクターマシン、LASSOロジスティック回帰など複数の解析の結果、慢性社会ストレスにより複数の脳領域間の相関が減少すること、嗅皮質が慢性社会ストレスによる応答変化のハブとなることが示された。慢性社会ストレス中に嗅皮質興奮性神経細胞の活性化を化学遺伝学的に抑制した結果、社会忌避行動の誘導が消失した。さらに、嗅皮質の投射脳領域と嗅皮質依存的な活性化を全脳で体系的に調べ、外側中隔核を同定した。慢性社会ストレス中に嗅皮質から外側中隔核への投射を化学遺伝学的手法により選択的に阻害した結果、慢性社会ストレスによる報酬指向行動の低下が抑制された。以上の結果は、慢性社会ストレスによる嗅皮質活性化が全脳レベルの神経応答のハブとなり、外側中隔核への投射を介して行動変容を誘導する可能性を示唆する。

A-3-4

瞳孔対光反射および瞳孔サイズに及ぼす加齢の影響



○山下 葉平、長谷川 泰我、居場 嘉教

摂南大学

【背景・目的】瞳孔の拡大・縮小の変化は、脳の覚醒をもたらす神経活動を反映することが知られている。睡眠恒常性維持メカニズムの堅牢性は、加齢に伴って低下すると考えられるが、瞳孔対光反射（PLR）および瞳孔サイズに及ぼす加齢の影響は十分に調べられていない。本実験では、PLRおよび瞳孔サイズを、若年マウスと中年マウスで比較した。

【方法】実験には、若年（2-4か月齢）と中年（12-14か月齢）の雄性C57BL/6Nマウスを使用し、12時間の明暗サイクルで飼育した。PLRの測定は、ZT3-ZT9の間に行った。マウスを1時間暗順応させた後、青色光（470nm）および緑色光（530nm）によるPLRをビデオカメラ（SONY, FDR-AX60）で撮影した。瞳孔サイズは、Image Jを用いて算出し、PLRにおける瞳孔サイズの変化は暗順応時の瞳孔サイズを基準とした百分率（%）で表した。また、瞳孔サイズに及ぼすセロトニン神経系の関与を検討するために、瞳孔サイズ測定の前30分前に5-HT_{1A}受容体の拮抗薬であるWAY-100635 Maleate（1 mg/kg）を腹腔内投与した。

【結果・考察】青色光および緑色光による瞳孔収縮の割合（%）には、若年マウスと中年マウスの間に違いは認められなかった。しかし、明期の暗順応時における瞳孔サイズは、若年マウスと比較して、中年マウスで有意に大きかった。一方、暗期（ZT13）における瞳孔サイズは、若年マウスと中年マウスの両方で、明期の暗順応時と比較して大きく、週齢による違いは認められなかった。明期において、WAY-100635 Maleateの投与は、若年マウスの瞳孔サイズを有意に拡大させたが、中年マウスの瞳孔サイズには有意な変化を及ぼさなかった。以上の結果から、加齢は、瞳孔対光反射には影響を及ぼさないが、明期において瞳孔散大を引き起こすことが明らかとなった。このメカニズムとして、加齢に伴うセロトニン神経系の機能低下が関与している可能性が示唆された。

A-3-5

トロンビン活性・産生能低下による化学療法誘発性末梢神経障害の増悪：臨床データ解析による基礎研究知見の検証

○宮本 朋佳^{1,3}、中村 豪志²、坪田 真帆³、関口 富美子³、木村 健²、桂木 聡子¹、川畑 篤史³

¹兵庫医大・薬・臨床薬学、²兵庫医大病院薬剤部、³近畿大・薬・病態薬理

【目的】我々の研究グループは、実験動物を用いた基礎研究により、化学療法誘発性末梢神経障害（CIPN）の発症に核内蛋白high mobility group box 1（HMGB1）の細胞外放出が関与すること、内因性thrombinが内皮thrombomodulin（TM）依存性にHMGB1を不活性化することでCIPN発症に対して抑制的に働くことを明らかにし、抗凝固薬によってHMGB1濃度が上昇してCIPNが増悪することを証明した。今回は、これらの基礎研究知見をヒトで検証するため、さらに詳細な臨床データ解析を実施した。【方法】兵庫医大病院のpaclitaxel（PCT）投与がん患者327名の診療録と、株式会社JMDCより得たPCT投与がん患者17583名の医療機関データを使用し、血液凝固能検査値あるいは抗凝固薬投与履歴と、CIPN重症化または発症との関係を解析した。【結果】兵庫医大病院において、経口抗凝固薬服用等によりprothrombin time（PT）またはactivated partial thromboplastin time（APTT）が延長している患者では、CIPN重症化率が有意に高かった。しかし、経口抗凝固薬服用とCIPN重症化の間に統計学的に有意な関係を検出できなかった。一方、JMDCデータの解析では、経口抗凝固薬服用とCIPN発症との間に有意な相関が検出され、サブ解析では、CIPN発症率が直接経口抗凝固薬（DOAC）により有意に上昇し、warfarinによっても上昇する傾向が認められた。【考察】基礎研究によって見出した内因性thrombin/TM系の抗CIPN的役割を支持する臨床知見が得られた。本研究により、ヒトにおいて経口抗凝固薬の服用が、殺細胞性抗がん薬によるCIPNを重症化させるリスク因子であることが判明し、臨床的にも極めて重要な示唆が得られた。

A-3-6

五苓散処置によるミクログリアの神経保護的性質発現への影響

○神垣 真由美¹、岡井 寧希¹、土谷 茉瑚¹、兒玉 安史¹、中島 正光²、石原 熊寿¹

¹広島国際大学 薬学部 病態薬理学研究室、²広島国際大学 薬学部 医療薬学研究センター

五苓散は古くから利尿薬として用いられている漢方薬であり、脳浮腫形成時にはアクアポリン4（AQP4）を阻害し、細胞内への水分移動を抑制することで脳浮腫を抑制する。ミクログリアは、脳や脊髄に存在するグリア細胞の一種であり中枢神経系の免疫機能を調節している。正常な脳内では静止型として存在し周辺環境の監視を行うが、病態時には活性型となり神経傷害の性質を有するM1表現型、神経保護的性質を有するM2表現型へと形態が変化する。病変部位に集積するミクログリアにもAQP4が発現しているため、五苓散がラット初代培養ミクログリアに及ぼす影響について形態変化を観察した。さらに細胞傷害で放出されるダメージ関連分子パターンのリガンドであるToll様受容体（TLR4）およびM2ミクログリアのマーカーであるArginase-1の発現についても検討した。

【方法】

ラット初代培養ミクログリアは、新生仔大脳から作成した。初代培養ミクログリアにリポ多糖類（LPS）（30 ng/mL）単独処置、五苓散（0.12 mg/mL）単独処置、五苓散＋LPS併用処置にて6時間あるいは24時間処置したサンプルにてウェスタンブロットを行った。サンプル回収直前に形態を観察し、活性化率を求めた。

【結果】

細胞形態は、6時間あるいは24時間処置の五苓散処置群、LPS処置群ともに類似する活性化形態を示した。処置時間で活性化を比較すると6時間処置では全ての群において有意差は認められなかった。一方24時間処置では、LPS処置群と比較して五苓散処置群の細胞活性化率は有意に増加した。TLR4の発現量は、6時間処置では全群間で発現量に有意な差はみられなかった。一方、24時間処置では無処置群と比較し、処置群の発現量が有意に増加した。またArginase-1の発現量は、6時間処置では全群間において発現量に有意な差はみられなかった。一方、24時間処置では無処置群と比較し、LPS群の発現は増加傾向、五苓散＋LPS併用処置群の発現量は有意に増加した。

【考察】

五苓散はミクログリアの形態変化に関与し、さらに脳浮腫時に集積するミクログリアの神経保護的性質発現に関与する可能性が考えられる。

要旨

B会場

B-1-1 乾癬病態時におけるプロバイオティクスFK-23の効果



○川本 理子¹、青山 朋子¹、五藤 健児²、藤田 隆司¹

¹立命館大学、²ニチニチ製薬株式会社

乾癬は、リンパ球性の炎症性疾患であり、紅斑・鱗屑を伴う皮膚自己免疫疾患の1つである。近年、抗IL-17抗体などの使用により劇的な治療効果が報告されているが、根本的治療法の確立には至っていない。本研究では、プロバイオティクスの1つであるフェカリス菌FK-23を用いて、マウス乾癬モデルにて抗炎症効果を評価した。検討の結果、FK-23は表皮肥厚など皮膚の病態を概ね改善した。次に消化管でFK-23は、小腸上皮細胞ないしはマクロファージに作用すると考えられる。そこでin vivoサンプルを用いてNGS解析を行い、FK-23がミトコンドリア機能を抑制するという結果を得た。また、Seahorse XF analyzerを用いて生体エネルギー分析ならびにフローサイトメトリー解析を行った結果、FK-23はマクロファージ株RAW264.7のミトコンドリアの好氣的代謝を抑制した。これらの結果から乾癬病態における一部のプロバイオティクスの標的は、マクロファージであり好氣的代謝を調節することで炎症を抑制する可能性を示唆した。

B-1-2 アトルバスタチンの副作用にミトコンドリアDNAが関与する可能性について



○斉賀 智子¹、吉井 美智子²、石田 風馬¹、小澤 光一郎²

¹広島大学、²広島大学大学院医系科学研究科

【目的】現在、本邦において心疾患・脳血管疾患の主原因である動脈硬化を引き起こす高コレステロール血症患者は220万人にも及ぶ。その第一選択薬はスタチン系薬剤であるが、重要な副作用として筋障害がある。その発症機序には、HMG-CoA還元酵素阻害によるコレステロール、イソプレノイド、CoQ10の減少に起因する3つの仮説があるが、未だ明らかになっていない。CoQ10の減少は、ミトコンドリア(Mt)不良に繋がり、不良Mtは、マイトファジーによる分解、不良Mtの細胞外への放出、アポトーシスの誘導、mtDNAのMt外放出を起こす。また、スタチンによる筋傷害には免疫反応の関与も疑われており、mtDNA、不良Mt放出はその誘因因子となり得る。本研究では、ラット骨格筋筋芽細胞(L6細胞)を用い、アトルバスタチン(Atorv)によるmRNA、Mtの変化に着目し検討を行った。また副作用危険因子についても併せて検討を行った。

【方法】分化L6細胞をAtorv(20 μ M) + 種々の条件下に処理を行った。メディアウムを回収、浮遊細胞除去、遠心により得たペレットから、translocase of outer membrane複合体を構成するTom20を細胞外放出Mt量として測定した。残った細胞は、各mRNA量の定量に用いた：Dnm1L, Mfn1 (Mtの分裂と融合に関与)、Pink1, Parkin(mitophagyに関与)、Ifn β , IL8(mtDNAに関与)。また、L6細胞をAtorv(20 μ M)で経時的に処理しmtDNA、Mt膜電位を顕微鏡で観察した。

【結果・考察】 Atorv24時間処理によりmRNAの有意な増加が、Ifn β で認められた。Atorv16、20時間処理で、Mt膜電位の低下とmtDNAのMtからの放出、24時間処理ではMt膜電位の回復が観察された。BezまたはOctA共処理では、8時間処理で、IL8のmRNAの有意な増加が認められた。Low Glcでは、Ifn β , IL8のmRNAの増加は認められず、アポトーシスの傾向が観察された。以上の結果から、AtorvはMt不良を起こし、mtDNAをMtから放出、不良Mtの細胞外放出により免疫応答を促すことが考えられる。副作用の危険因子Bez、OctAは、スタチンによる免疫応答をさらに増加させ、細胞障害を増幅する可能性が考えられる。

B-1-3 2型自然リンパ球 (ILC2) のステロイド抵抗性獲得に及ぼすBcl-xL阻害薬の影響



○霜良 勇人、中山 幸子、谷岡 龍之介、前山 紘人、松田 将也、奈邊 健

摂南大・薬・薬効薬理

【背景】喘息患者の5～10%ではステロイド薬に対する感受性が著しく低下し、コントロール不良となる。しかし、その機序は明らかではない。我々は、これまでにステロイド抵抗性を誘導した2型自然リンパ球 (ILC2) において、JAK-STAT経路を介したアポトーシス阻害分子Bcl-xLの発現増強を明らかにした。しかし、ILC2のステロイド抵抗性獲得に及ぼすBcl-xLの役割は明らかではない。本研究の目的は、ステロイド抵抗性ILC2に及ぼすBcl-xL阻害薬の効果を明らかにすることである。

【方法】Ovalbumin (OVA) 感作BALB/cマウス肺からILC2を単離し、各種サイトカインで刺激するとともに、dexamethasone (DEX) ならびにBcl-xL阻害薬navitoclax存在下におけるILC2の増殖を評価した。また、OVA感作マウスにOVAを500 µg/animalの用量で4回気管内投与することで反応惹起し、ステロイド抵抗性喘息モデルを作製した。DEXおよびnavitoclaxは惹起期間中にそれぞれ腹腔内および経口投与した。最終惹起24時間後に肺組織を摘出し、肺内ILC2数および気道リモデリング形成に及ぼす影響を評価した。

【結果】(1) IL-33、TSLPもしくはIL-7のそれぞれ単独刺激によるILC2の増殖は、いずれもDEXを処置すると完全に抑制された。一方、IL-33に加えTSLPおよびIL-7を組み合わせた刺激による顕著なILC2の細胞増殖は、DEXを処置しても抑制されず、ステロイド抵抗性を示した。(2) 本ステロイド抵抗性ILC2増殖は、navitoclax単独処置では抑制されなかったが、navitoclaxとDEXの併用で濃度依存的かつ有意に抑制された。(3) ステロイド抵抗性喘息モデルにnavitoclaxを投与すると、反応惹起に伴うILC2数の増加ならびに気道リモデリング形成が用量依存的かつ有意に抑制された。また、DEXとnavitoclaxを併用投与すると、ILC2の増加ならびに気道リモデリングの形成が相乗的に抑制された。

【考察】ILC2のステロイド抵抗性獲得に、Bcl-xLの発現増強が関与すること、ならびにBcl-xL阻害薬がステロイド抵抗性喘息の改善に有用である可能性が示唆された。

B-1-4 線維化誘導性2型自然リンパ球の増殖に対するcyclin-dependent kinase (CDK) 4/6阻害薬の影響

○松田 将也、石津 愛美、藤原 佑菜、霜良 勇人、奈邊 健

摂南大・薬・薬効薬理

【背景】重症喘息患者の肺においては、気道周囲の線維化が進行し呼吸機能の顕著な低下が認められる。喘息は主に吸入ステロイドによる治療が行われるが、一度進行した組織の線維化に対してステロイドは無効であり新たな治療薬が求められている。2型自然リンパ球 (ILC2) は、線維化誘導因子を大量に産生し、組織の線維化に関与する。最近、我々は肺線維症モデルマウスの肺内ILC2 (F-ILC2) においては、細胞周期関連分子cyclin dependent kinase (CDK) 4/6遺伝子の高発現が認められることを明らかにしてきた。そこで、本研究においては、F-ILC2の増殖に対するCDK4/6阻害薬パルボシクリブの影響を明らかにすることを目的とした。【方法】卵白アルブミン (OVA) 感作BALB/cマウスにOVAを500 µg/animalの用量で4回気管内投与することで反応惹起を行い、肺線維症モデルマウスを作製した。最終反応惹起24時間後、肺組織よりILC2を単離し、その遺伝子およびタンパク発現量をそれぞれRNA-seqおよびflow cytometryにより解析した。さらに、単離したILC2をthymic stromal lymphopoietin (TSLP) およびCDK4/6阻害薬 (パルボシクリブ、10-1000 nM) 存在下にて72時間培養した後、luminescent cell viability assayにより増殖能の評価を行った。【結果】(1) F-ILC2においては、線維化誘導因子IL-13、transforming growth factor (TGF)-b3、activin A、fibroblast growth factor (FGF) 2、ならびにFGF23遺伝子の高発現が認められた。(2) F-ILC2は、TSLPの刺激により顕著に増殖した。(3) TSLP刺激を行ったF-ILC2においては、CDK4/6のアップレギュレーションが認められた。(4) パルボシクリブは、TSLP誘発性ILC2増殖を濃度依存的に抑制した。【考察】TSLPによりアップレギュレーションされたCDK4/6は、F-ILC2の増殖を惹起することが明らかとなった。さらに、パルボシクリブは、F-ILC2の増殖を抑制することで、肺線維化を抑制できる可能性が示唆された。

B-1-5 クロモグリク酸ナトリウムの標的分子としてのGPR35

岡 真純¹、赤木 莊太³、大野 修²、寺崎 真帆¹、田村 裕穂¹、斉藤 美知子¹、加藤 伸一¹、井上 飛鳥⁴、青木 淳賢⁵、松野 研司⁶、古田 和幸³、○田中 智之¹

¹京都薬科大学、²工学院大学、³岡山大学、⁴京都大学、⁵東京大学、⁶安田女子大学

【目的】抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウム(DSCG)は、マスト細胞の脱顆粒応答を抑制する作用を有しており、同様の作用機序をもつ薬物はマスト細胞安定化剤と呼ばれる。マスト細胞安定化剤の標的分子は長らく不明であったが、オーファンGタンパク質共役型受容体であるGPR35のリガンドスクリーニングから、GPR35アゴニストとしての作用を示すことが報告された。本研究ではGPR35のマスト細胞における発現、およびその機能について検討を行った。【結果】ラット腹腔マスト細胞において、DSCGおよび既知のGPR35アゴニストであるザプリナスト、およびキヌレン酸は、IgEを介する抗原刺激による脱顆粒応答を抑制した。5分間の前処理によりDSCGの抑制作用は消失したが、このときザプリナストやキヌレン酸の抑制作用も減弱し、これらがDSCGと共通の標的分子をもつことが示唆された。既知のGPR35アゴニストの多くは別の標的分子をもつことから、新たにアゴニストを設計し、高い親和性を持ち種差の小さい新規アゴニストを見出した。GPR35は皮膚や腹腔の成熟したマスト細胞に発現しており、マスト細胞株や未成熟な骨髓由来培養マスト細胞では発現していなかった。そこで、ラットマスト細胞株RBL-2H3にGPR35を安定発現した細胞株を樹立し、その機能を検討した。GPR35発現株はタプシガージンによる脱顆粒応答は対照株と同等であったが、IgEを介する抗原刺激による脱顆粒応答は低下していた。また、脱顆粒応答の際に認められる一過性のF-アクチン量の減少は、抗原刺激についてはGPR35発現細胞では穏和なレベルに留まった。IgEを介する受身皮膚アナフィラキシー応答(PCA)は野生型マウスとGPR35遺伝子欠損マウスで変化が認められなかったが、DSCGや新規アゴニストによるPCA応答の抑制はGPR35遺伝子欠損マウスでは消失した。【結論】DSCGの標的分子の候補であるGPR35は、成熟したマスト細胞に発現しており、IgEを介する抗原刺激による脱顆粒応答を抑制する作用をもつことが明らかとなった。

B-1-6 終末糖化産物による自然免疫応答シグナルの調節作用

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

¹近畿大学医学部 薬理学教室、²就実大学薬学部 生体情報学教室、³岡山大学学術研究院医歯薬学域 創薬研究推進室

【目的】終末糖化産物(advanced glycation end products: AGEs)は、還元糖のカルボニル基とタンパク質のアミノ基が非酵素的に反応して生成する物質であり、様々な種類のAGEsが見出されている。高血糖状態や加齢に伴いAGEsは生体内に蓄積することから、糖尿病合併症や加齢性疾患の病態形成に関与することが示唆されている。これまでに、glycolaldehyde由来のglycol-AGEが自然免疫システムであるstimulator interferon genes (STING) シグナルの活性化を抑制することを見出した。本研究では、AGEsの調製に使用するカルボニル化合物の種類や濃度、AGEsの化学的性質がSTINGシグナルに及ぼす影響について解析を加えた。

【方法】ヒト血清アルブミンと各種カルボニル化合物を37℃でインキュベートすることでAGEsを調製した。ヒト単球系細胞株THP-1は、ホルボールエステルを処置してマクロファージ様細胞に分化させた。STINGシグナルを活性化させるために、polyethyleneimineを用いてSTINGアゴニストであるcGAMPを細胞内にトランスフェクションした。STINGシグナルを構成するTBK1/IRF3のリン酸化をWestern blot法、シグナルの下流に位置するinterferon- β の発現をreal-time RT-PCR法を用いて解析した。遠心式限外ろ過フィルターユニットを用いて異なる分子サイズのglycol-AGEを分離した。

【結果】glucose由来のAGEはTLR4を介してSTINGシグナルを増強した。一方、glyceraldehyde、methyglyoxalやglyoxal由来のAGEsは、glycol-AGEと同様にSTINGシグナルを抑制した。ヒト血清アルブミンのリジン残基とアルギニン残基の修飾割合とSTING抑制作用は、AGEs調製に使用する各種カルボニル化合物に対して濃度依存性を示した。調製したglycol-AGEには異なる分子サイズの画分が含まれていたが、いずれのglycol-AGEもSTING抑制作用を示した。

【考察】AGEsによるSTINGシグナルの調節作用は、AGEs調製に使用するカルボニル化合物の種類や濃度に依存することが示唆された。

B-2-1

Gpr176/GzシグナルはTGF β 1/Smads/ α SMA経路を介して筋線維芽細胞への分化を正に制御する

○岡本 安雄¹、北風 圭介¹、竹之内 康広¹、石丸 浩靖¹、松井 玲奈²、古賀 大輔¹、
宮島 遼¹、坪井 一人¹

¹川崎医科大学、²川崎医療福祉大学

【背景・目的】GPR 176はリガンド非依存的なcAMP抑制活性を持つGz共役型のGタンパク質共役型受容体（GPCR）である。私たちはGPR176のノックダウンにより、TGF β 1刺激下において筋線維芽細胞の分化マーカーである α SMAタンパク質の発現誘導が抑制されること、およびTGF β 1の下流因子Smad2のリン酸化が減弱することを観察したことから、Gpr176が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を正に制御することを第143回近畿部会において報告した。本研究では、TGF β 1刺激による細胞外マトリックスの発現におけるGPR176の影響および筋線維芽細胞への分化におけるGzの影響について検討した。【方法】ラット線維芽細胞株NRK-49Fあるいはヒト肺線維芽細胞株WI-38において、GPR176あるいはGzの α サブユニットをsiRNAでノックダウンした。TGF β 1刺激後、 α SMAタンパク質の発現誘導、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンタンパク質発現やコラーゲン遺伝子発現をウェスタンブロット法や定量的PCR法で検討した。GPR176とGzの共役については、百日咳毒素（PTX）とcAMP-Glo Assayを用いて検討した。【結果・考察】NRK-49Fにおいて、Gpr176をノックダウンするとTGF β 1刺激によるフィブロネクチンタンパク質発現やコラーゲン遺伝子発現の増加が抑制された。WI-38においてもGPR176のノックダウンにより、TGF β 1刺激による α SMAタンパク質の発現、フィブロネクチンタンパク質発現やコラーゲン遺伝子発現の増加が抑制された。ヒトGPR176過剰発現NRK-49Fにおいて、リガンド非依存的なcAMP抑制活性が観察され、PTXにより影響を受けなかったことから、NRK-49FではGPR176はGzと共役していることが考えられた。NRK-49Fにおいて、Gzの α サブユニットをノックダウンすると、TGF β 1刺激による α SMAタンパク質の発現が抑制された。以上の結果から、Gpr176/GzシグナルはTGF β 1/Smads/ α SMA経路を介して筋線維芽細胞への分化を正に制御すると考えられた。

B-2-2

血管内皮細胞の接着分子発現に対するアデノシンの影響

○甲斐 ゆり乃、柳瀬 雄輝、山脇 遥仁、吉井 美智子、小澤 光一郎



広島大学

【背景・目的】皮膚アレルギー症状の誘発・増悪において、リンパ球、顆粒球（好酸球、好中球、好塩基球）等の免疫細胞の血管外移行（組織移行）は極めて重要なイベントである。免疫細胞の血管外移行には、血管内皮細胞が発現するP-selectin、Intercellular adhesion molecule 1（ICAM-1）、Vascular cell adhesion molecule 1（VCAM-1）等の接着分子が重要であるため、これらの分子の発現を制御する事ができれば、皮膚アレルギーの誘発・増悪を抑制できると考えられる。これまでに我々は、炎症時に細胞外に放出されるATPが代謝されて生じるアデノシンが、好塩基球・マスト細胞の脱顆粒反応や、血管内皮細胞の組織因子発現を抑制することを示してきた。そこで本研究では、感染や炎症性物質による血管内皮細胞のICAM-1、VCAM-1発現に対するアデノシンの影響について検討した。

【方法】血管内皮細胞として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いた。刺激には、感染性物質としてLipopolysaccharide（LPS）、炎症性物質としてTumor necrosis factor α （TNF- α ）を用いた。接着分子のmRNA発現、タンパク発現は、それぞれ定量PCR法、ウェスタンブロット法で検出した。

【結果】HUVECを感染・炎症性物質であるLPSやTNF- α で刺激すると、ICAM-1、VCAM-1のmRNA、タンパク発現が増加した。次に、HUVEC細胞にはアデノシン受容体としてA2a、A2b、A3が発現していることを確認した。また、LPSやTNF- α 刺激によるICAM-1、VCAM-1のmRNA、タンパク発現レベルはアデノシン処理により有意に抑制された。一方、ATP処理による抑制作用は限定的であった。

【考察】以上の結果から、アデノシンは、感染や炎症惹起物質による血管内皮細胞の接着分子発現を抑制し、免疫細胞の組織移行を抑制する作用がある可能性が示された。今後、アデノシンの作用標的や細胞内シグナルの詳細を明らかにすることで、アデノシン受容体、もしくはその下流のシグナルを標的とした新規アレルギー治療薬の開発につながると期待される。

B-2-3 マウスの慢性ストレスにおける末梢代謝変化とその意義の解析



○Qiu Wenran、永井 裕崇、大田 康平、永井 碧、古屋敷 智之

神戸大学大学院医学研究科

社会や環境より受けるストレスは末梢や中枢の代謝を変容し、うつ病や動脈硬化、糖尿病など多様な慢性疾患のリスクとなる。慢性代謝疾患はうつ病の併存疾患であり、ストレスによる末梢代謝変化がうつ病の成因に関わる可能性が考えられるが、その実態や機序は殆ど不明である。本研究ではマウス系統三種（C57BL/6N、C57BL/6J、BALB/c）の成体雄マウスを用いて慢性社会挫折ストレスに供し、ストレスにより生じる末梢血糖変化とうつ関連行動の関連を調べた。その結果、急性ストレスが一過性に血糖を亢進すること、そして、その後の血糖降下速度には個体差があることが明らかとなった。急性ストレス後に速やかに血糖が降下する個体は認知機能が維持される一方で、高い血糖を継続する個体は認知機能が障害されやすいことが分かった。また、慢性ストレス後のベースライン血糖値はうつ関連行動と相関を示し、高血糖を示す個体の方が社会忌避行動や報酬嗜好性低下を示した。そこでストレス曝露前に血糖降下薬を腹腔内投与し、うつ関連行動への影響を調べた。その結果、血糖降下薬の投与はストレスによる認知機能低下と報酬嗜好性低下を抑制した。これらの知見は、ストレス急性期や慢性期における持続的高血糖がうつ関連行動の誘因となる可能性を示唆する。

B-2-4 シクロホスファミドはL-アスパラギナーゼに対する液性免疫と薬剤耐性を増強する

○原（野上） 愛¹、森 映美加¹、茶畑 沙央里¹、嶋田 明²、見尾 光庸¹

¹就実大学 薬学部 薬効解析学分野、²自治医科大学とちぎ子ども医療センター 小児科

【目的】小児急性リンパ性白血病の標準治療薬であるL-アスパラギナーゼ（ASNase）は、投与した患者の約3～7割がアレルギーを生じることが報告されており、食物アレルギーよりも発症率が非常に高い。しかし、当研究室においてASNase単独で感作を行ったマウスの血清中IgE値は、卵白アルブミンを感作したマウスよりもはるかに低値であった。本研究では、ASNaseアレルギーに対する併用薬の影響に着目し、ASNaseにシクロホスファミド（CY）を併用した際のアレルギー反応や薬剤耐性に対する影響を検討した。

【方法】7週齢のBALB/c雄性マウスをASNaseで感作した。CYは全身感作の2日前に、抗IgE抗体はチャレンジ前日に投与し、抗原誘発耳介浮腫、血清中総IgE量、血清中ASNase酵素活性をそれぞれ測定した。同時に、脾臓細胞を回収し、Concanavalin A（Con A）48時間刺激後に培養上清中に遊離されるサイトカインを測定した。

【結果・考察】抗原であるASNaseによって誘発された耳介浮腫ならびに血清中総IgE量は、CY 150 mg/kgの併用によって有意に増加したが、CY 300 mg/kgの併用では、血清中総IgE量は増加したものの、耳介厚は減弱した。CY150mg/kg群の血清は強いRBL-2H3細胞活性化能を示し、CY 300mg/kg群の血清はRBL-2H3細胞活性化能を示さなかったが、CY 300 mg/kg群の血清からIgGを除去すると、RBL-2H3細胞活性化能が回復した。血清中ASNase活性は、CY150mg/kg併用群ではASNase単独投与群と変化がなかったが、CY 300mg/kg併用群では血清中ASNase活性が測定限界以下まで低下していた。マウス脾臓細胞培養上清中のサイトカインのうち、IL-12、IL-4、IL-5、IL-10はCYの濃度に依存して増加し、TNF- α 、IL-2はCYの濃度に依存して低下した。特にCY 300 mg/kgにおけるIL-4とIL-10は顕著であった。

【結論】以上の結果より、CYは低用量からIgE産生を増強して薬物アレルギーを誘発する一方で、高用量では薬物耐性の誘発につながるIgGへのクラススイッチを生じさせる可能性が示唆された。

B-2-5 ミトコンドリアタンパク質 p13 欠損マウス肺の分子病態解析



○山本 朔耶、野口 雅史、今岡 伸太郎、岩田 圭子、新谷 紀人

和歌山県立医科大・薬・薬品作用

〔目的〕 p13はミトコンドリアに局在するタンパク質で、私たちはその遺伝子改変動物を用いた研究から、p13とⅡ型糖尿病やパーキンソン病との関連を明らかにしている。一方で最近、p13の全身性欠損 (p13^{-/-}) マウスの多くが生後1日以内に死亡することや、生存した成体マウスの肺が肺気腫様の構造異常 (肺胞腔の拡大/隔壁構造の単純化) を呈することを見出した。これらの結果から、内因性のp13は発生過程における肺胞の形成や、形成中/形成後の、炎症等による肺胞構造の崩壊に関わる可能性が推察された。そこで本研究では、p13の肺における生理学的、病理学的意義をより明らかにするため、特に生後早期において、p13^{-/-}マウス肺の形態学的・分子生物学的解析を行った。

〔方法〕 生後0, 4, 28日齢の p13^{-/-}マウスと野生型マウスを用いた。摘出肺重量を測定後、肺組織の一部について乾燥前後の重量を計測し、(乾燥前重量-乾燥後重量)/乾燥前重量×100 (%) として肺内水分量を定量した。また左肺葉のパラフィン切片を作製しHE染色を行った後、肺胞の形態を解析した。加えて神経内分泌細胞、粘液細胞、線毛細胞などの肺構成細胞のマーカーやIL-6などの炎症マーカーのmRNA発現量をqPCR法で定量した。qPCR解析は成体マウスでも行った。〔結果〕 各日齢において、p13^{-/-}マウスと野生型マウスの間で、肺重量や肺内水分量には有意な差は見られなかった。一方で組織切片の解析から、p13^{-/-}肺では生後0日の時点ですでに、肺胞腔の拡大/隔壁構造の単純化がみられることが明らかになった。遺伝子発現に関しては、特に成体マウスにおいて、神経内分泌細胞マーカーのmRNA発現量がp13^{-/-}肺では有意に増加することが明らかになった。また神経内分泌細胞のマーカーでありかつ、免疫応答を促進する神経ペプチドCGRPの発現は野生型マウス肺と比べて35倍、IL-6は25倍に増加していた。〔考察〕 以上の結果から、p13^{-/-}肺では肺胞の形態学的異常が生後早期から観察されること、すなわち内因性のp13は肺胞の隔壁形成の極めて初期に関与する可能性が示された。またp13は免疫応答に関与する可能性も示され、発生学的な観点のみならず病因学的な観点からもp13の重要性が明らかになった。

B-2-6

ピロガロールのカルシニューリン/NFATシグナル抑制機構の解明—構造機能相関研究及びピロガロール結合タンパクの探索—

○水口 博之¹、伊藤 智平²、西田 浩平²、湧川 朝治²、中野 友寛²、田邊 彬恵¹、綿野 智一¹、神沼 修³、北村 紀子⁴、石田 達也⁵、木村 勝紀⁶、北村 嘉章⁷、武田 憲昭⁷、福井 裕行^{1,8}

¹大阪大谷大学薬学部薬理学、²徳島大学大学薬学部分子情報薬理学、³広島大学原爆放射線医科学研究所疾患モデル解析研究分野、

⁴東京都医学総合研究所花粉症プロジェクト、⁵東洋大学健康スポーツ科学部栄養科学、⁶株式会社明治研究本部乳酸菌研究所、⁷徳島大学大学院医歯薬学研究部耳鼻咽喉科学分野、⁸医療法人錦秀会

我々は、抗ヒスタミン薬で抑制できるヒスタミンH₁受容体発現シグナルと抑制できないカルシニューリン/NFAT (CN/NFAT) シグナルの両シグナルを同時に抑制することで鼻炎症状を高度に改善できることを明らかにし、ピロガロール (Pyr) の症状改善効果が、CN/NFATシグナルを介したIL-9遺伝子発現亢進抑制によることを明らかにしてきた。本研究では、PyrのIL-9遺伝子発現亢進抑制機構を明らかにするため、まず、Pyrの構造類似体を用いた構造活性相関を明らかにし、また、Pyrの標的分子の探索を行った。Pyr構造類似体としてカテコール (Cat)、レゾルシノール (Rez)、フロログルシノール (Phl)、および没食子酸 (GA) を用い、これらの (i) DPPHを用いた抗酸化活性、(ii) イオノマイシン (IO) 刺激に伴うIL-9遺伝子発現亢進抑制活性、及び (iii) NFATc2の脱リン酸化抑制活性について明らかにした。その結果、Cat、Rez、Phl、及びGAの抗酸化活性はPyrの60.1%、10.4%、18.8%、及び113.5%であった。Cat、Rez、及びPhlはIL-9遺伝子発現亢進を抑制しなかったが、GAはIL-9遺伝子発現亢進を抑制し、そのIC₅₀値は、PyrのIC₅₀値が32.9 μMであるのに対し、82.6 μMであった。さらに、Cat、Rez、及びPhlはNFATc2の脱リン酸化を抑制しなかったが、GAはNFATc2の脱リン酸化を抑制した。没食子酸を固定化したカラムを用いて、Pyr結合タンパク質の探索を行った結果、Poly(U)-binding-splicing factor 60 (PUF60) を同定した。共免疫沈降実験より、IO刺激によりPUF60とNFATc2の結合量は増加し、Pyrはその結合を抑制することが明らかとなった。また、PUF60遺伝子ノックアウト細胞を用いた研究の結果、PUF60欠損によりIO刺激に伴うIL-9遺伝子発現亢進は抑制された。以上の結果から、PyrのIL-9遺伝子発現亢進抑制活性に、1,2,3-Bezenetriol 構造が必要であることが示唆された。また、PUF60はIO刺激に伴うNFATc2を介したIL-9遺伝子発現亢進には必須であり、Pyrは、PUF60とNFATc2の結合を抑制することで遺伝子発現を抑制することが示唆された。

B-3-1 ビートルートジュース摂取が老齢マウスの血管内皮機能障害に及ぼす影響

○田和 正志、中川 恵輔、大喜多 守

大阪医科薬科大学

一酸化窒素 (NO) 産生を主体とする血管内皮機能は加齢に伴い低下し、これが高血圧や動脈硬化の危険要因となるため、高齢期には血管内皮機能を正常に保つことが重要となる。スーパーフードとして注目を集めるビートルート (*Beta vulgaris* L.) はNOの供給源となる硝酸塩を豊富に含む根菜であり、医療への応用が進められている。本研究では、ビートルートジュース (BRJ) 摂取が加齢に伴う血管内皮機能障害に対して保護的に働くのか否かについて検討した。98-100週齢の雄マウスを水道水摂取 (aged群) あるいはBRJ摂取 (BRJ群; 硝酸塩濃度3.5 mM) の2群に分け、各飲料を4週間自由飲水させた。なお、加齢による変化を把握するため、8-11週齢の雄マウスも使用し、水道水を4週間自由飲水させた (young群)。これらのマウスから摘出した胸部大動脈において、100 pM-10 μMの acetylcholine (ACh; muscarinic acetylcholine receptor agonist) は濃度依存的な弛緩作用を示し、この反応は young群と比較してaged群で有意に弱かった。BRJ群においてもAChの反応は減弱していたが、その程度はaged群より小さかった。L-NAME (NO synthase inhibitor, 100 μM) 存在下では、いずれの群においてもAChの弛緩作用は消失した。AChの反応性と同様に、A23187 (Ca²⁺ ionophore, 3 nM-1 μM) による弛緩反応はyoung群>BRJ群>aged群の順に大きかった。一方、sodium nitroprusside (NO donor, 100 pM-10 μM) による弛緩反応は3群間で変わらなかった。Aged群とBRJ群の胸部大動脈には同程度の中膜肥厚が生じていた。BRJ群のNO利用能の指標である血漿NO₃⁻レベルは aged群のレベルと比較して有意に高く、それとは対照的に酸化ストレスの指標である血漿TBARSレベルはaged群よりBRJ群で低かった。これらの結果から、BRJ摂取は加齢に伴うNO依存性血管内皮機能の障害を改善し、この効果はNO利用能の向上や酸化ストレスの軽減に起因する可能性が高いと考えられる。習慣的なビートルートの摂取は加齢に伴う血管内皮機能障害を防止するための有用な方法になり得るであろう。

B-3-2 von Willebrand因子を介した血小板凝集能評価

○近藤 一直、狩野 泰輝、菅沼 由唯、池本 和久、松井 太衛、一瀬 千穂

藤田医科大学

【背景】心筋梗塞や脳梗塞など血栓症の発症機序となる血小板凝集は、結合手である膜糖タンパクGP II b/IIIa (Glyco-Protein II b/IIIa) を介したフィブリノゲン架橋によって細胞同士が連結することから、この現象が評価対象として検討されてきた。いっぽう凝集塊の形成にはもう一つ別の機序も考えられ、異なる結合手GP I b/IXと、血小板が血管壁に粘着する際に糊の役割を果たすvon Willebrand因子 (vWF) との結合を介した細胞同士の凝集もあることが知られている。我々はこの結合機構が新たな治療標的となり得る可能性を考え、vWF介在凝集の実験的評価を試みる。【方法】ICRマウス6ヶ月齢オスを三種混合麻酔下 (メデトミジン0.75mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+ブトルファノール5mg/kg: MMB- i.p.) に開腹し、下大静脈よりクエン酸添加採血を行った。得られた血液サンプルから遠心分離により多血小板血漿Platelet Rich Plasma (PRP: 細胞数25万/μLに調製) を分離した。30分間の静置後に組み替え型ボトロセチン (recombinant botrocetin: r-Bot2) 0.5~1.5μg/mL添加にて血小板凝集を惹起し、光透過法によって凝集反応を測定した (HEMA-TRACER712、MCM社製)。10分間の測定において観察された最大凝集率 (Maximum %) および凝集曲線下面積 (Area Under the Curve: AUC) を評価した。【結果】r-Bot2最終濃度0.5、1.0、1.5μg/mL添加によって惹起された血小板凝集はそれぞれ、最大凝集率45.9±15.4、80.6±13.2、60.6±5.5%、凝集曲線下面積1516±608、4626±454、2905±430と、1.0μg/mL刺激によって最大反応を示し、それより高濃度では却って減弱した。【考察】ヒト血小板を用いた研究ではr-Bot2刺激で血小板凝集が惹起されること、およびその変異型ボトロセチンは逆に凝集反応を抑制することが報告されている (Matsui T et al. J Thromb Hemost 2017)。我々はマウスにおいても同様の結果が得られるかを検討すると共に、in vivo血栓症モデル動物を用いた薬効評価を目指す。

B-3-3**Cardioprotective effects of finerenone by suppressing myocardial sodium buildup in salt/aldosterone-loaded rats**

○ラフマン アサドウル¹、澤野 達哉²、北田 研人¹、今村 武史²、西山 成¹

¹香川大学医学部薬理学、²鳥取大学医学部薬理学

Finerenone, a nonsteroidal mineralocorticoid-receptor blocker, has demonstrated considerable cardioprotective benefits in clinical trials. Nevertheless, its precise mechanism remains unknown. Here, we investigated the cardioprotective effects of finerenone linked to a reduction in salt buildup in heart tissues of Sprague-Dawley rats with chronic aldosterone infusion and salt-loading. Cardiac histology, remodeling gene expression and echocardiography data revealed that these rats exhibited an adverse cardiac remodeling as well as diastolic dysfunction with preserved ejection fraction. Notably, finerenone treatment completely prevented cardiac dysfunction. Furthermore, sodium content in left ventricular tissues was markedly elevated in these rats, but significantly reduced in rats with concomitant finerenone treatment. Moreover, macrophage recruitment as well as M1 and M2 population were markedly increased in these rats, while finerenone treatment completely suppressed it. These data indicate that finerenone has the potential to mitigate cardiac dysfunction by suppressing sodium accumulation in left ventricular tissues.

B-3-4**アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたSLC41ファミリーの電気生理学的特性解析**

○古谷 和春¹、喜多 知²、十川 歩果¹、島崎 碧海¹、篠田 康晴²、根本 隆行²、岩本 隆宏²、喜多 紗斗美^{1,2}

¹徳島文理大学、²福岡大学

Mg²⁺は細胞内ではK⁺に次いで多い金属陽イオンであり、タンパク質や核酸など様々な生体分子に結合し、その機能に関わっている。バクテリアのMg²⁺輸送体MgtEと遠縁の相同性を持つSLC41ファミリー (SLC41A1-A3) は、哺乳類細胞におけるMg²⁺輸送体候補の一つと考えられており、いくつかの研究グループによりSLC41ファミリーの機能的評価が行われているが、未だコンセンサスの得られた理解に至っていない (J Pharmacol Sci. 151:88-92, 2023)。そこで我々は、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、二本電極膜電位固定法によりマウスSLC41ファミリーの電気生理学的特性 (イオン輸送能) を解析した。本発表では、免疫染色によって形質膜への発現が確認されたSLC41A1について得られた結果を報告する。アフリカツメガエル卵母細胞にSLC41A1のcRNAを注入すると、水を注入したコントロール細胞では観察されない膜電流 (SLC41A1電流) が計測された。特に、細胞外液を改変Barth溶液 (96 mM NaCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH7.6) として記録を行うと、大きな電流が計測された。さらに、細胞外液のNaClをNMDG-Clに置換すると内向き電流が消失したことから、この条件で観察された膜電流はNa⁺流入によるものであると考えられた。過去の報告では、細胞外液にMg²⁺を加えることで内向き電流が大きくなることが示されているので、我々の実験系においても同様に細胞外に0.5 mM以上のMg²⁺を加えたが、逆に、SLC41A1電流は直ちに減少する結果となった (>80%減少)。さらに、細胞外にCa²⁺ (>0.5 mM) を加えた場合にも、同じくSLC41A1電流が減少した。これらの結果から、SLC41A1は生理的な条件ではMg²⁺を輸送している可能性は低く、何らかのイオンを細胞内に輸送するが、細胞外Mg²⁺やCa²⁺はこの輸送に対して抑制的に作用すると考えられた。しかしながら、SLC41A1がNa⁺流入に共役してMg²⁺排出を行っている可能性が残されているため、今後、細胞内のイオン組成を変えた検討を行うことで、SLC41ファミリーが哺乳類のMg²⁺輸送を担う輸送体であるのかを明らかにしていきたい。

B-3-5**CNOT4 is responsible for repression of virus replication through histone modification**

○衣笠 泰葉、Llamas Covarrubias Mara Anais、許 迪威、今井 由美子

医療法人徳洲会 野崎徳洲会病院附属研究所

Virus infection can affect host cell epigenetic regulation, including post-translational histone modifications. Ubiquitination of histone H2 has been reported to have several roles including transcription activation. However, it remains unknown the role of histone ubiquitination in the pathology of virus infection (e.g. influenza virus, SARS-CoV2). CNOT4, a component of the CCR4-NOT complex, has a ubiquitin transferase activity at the RING domain. Here we show that CNOT4 is responsible for histone H2BK120 ubiquitination in the host cells, which was linked to H3K4 methylation. CNOT4 ubiquitination activity site mutant showed enhanced viral replication and decreased levels of H2BK120 ubiquitination and H3K4 methylation. Upon influenza virus or SARS-CoV2 virus infection, H3K4 methylation was decreased around interferon-related gene and these gene expression was suppressed in the mutant, which may cause enhanced viral replication. These results suggest that the CNOT4 is involved in the repression of virus replication through histone H2B ubiquitination.

B-3-6**PKC及びDGKに着目したコラーゲン分解酵素の発現抑制機構解明とその応用**

井上 文佳、上田 修司、福田 伊津子、○白井 康仁

神戸大学大学院 農学研究科 応用生命化学講座

紫外線により光老化が引き起こされた皮膚では、深いシワや乾燥がみられ、そのシワ形成にはコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP-1) が大きく関与していることが知られている。また、当研究室では、作製したジアシルグリセロールキナーゼ γ (DGK γ) ノックアウト (KO) マウスが幼若期からシワを呈したことから、DGK γ が MMP-1 の上流因子であるプロテインキナーゼ C δ (PKC δ) の活性を間接的に抑制することによりシワ予防に寄与していることを明らかにしてきた。さらに、DGK γ KO マウスや培養ヒト表皮細胞 (HaCaT 細胞) を用いて、生薬 Y や H の抽出物が MMP-1 の発現を抑制することなども見出した。しかし、これらの生薬抽出物の詳細な作用機序やヒトへの効果は不明であった。そこで本研究では、PKC 及び DGK に着目したコラーゲン分解酵素 MMP-1 の発現抑制機構解明とヒトへの応用を目的とした。

まず、HaCaT 細胞を用いて UVA 誘導性 MMP-1 発現に対する生薬 Y と H の混合物の効果を調べたところ、それぞれ単独よりも、1 : 1 の割合で混合した場合に最も MMP-1 の発現を抑制した。そこで、生薬 Y と H の抽出物を 1 : 1 の割合で含有する化粧水、美容液、クリームを作製し、40代~60代の女性約50人に対し1カ月間のヒト試験を行った。その結果、混合物含有化粧品はヒトのシワ面積率及びシワの最大深さを有意に改善することが分かった。次いで、これらの抽出物の作用機序を解明するために、Y 抽出物の成分である P・Q、抽出物 H の成分である X・N に着目し、その UVA 誘導性 MMP-1 発現に対する効果効果を調べた。その結果、P・Q・N は UVA 誘導性 MMP-1 の発現を抑制したが、X には効果が認められなかった。

以上のことから、Y や H 抽出物は実際にヒトにも効果を示し、P、Q は Y 抽出物の有効成分であり、H 抽出物の有効成分のひとつは P であることが明らかとなった。現在、その詳細な作用機序について調べている。

要旨

C 会場

C-1-1 トホグリフロジンは糖尿病性腎症におけるミトファジー機能を維持する



○尾田 和夢¹、藤井 健志¹、間下 雅士¹、美馬 晶²、野村 篤生¹

¹同志社女子大学、²大阪医科薬科大学

【背景・目的】

糖尿病は血糖が慢性的に高値を示す生活習慣病の代表的な一つであり、血中の糖が様々な細胞に傷害を与え炎症を惹起する。糖尿病合併症の一つとして腎症があり、罹患すると予後が著しく不良となる。糖代謝においてミトコンドリアの機能が重要だが、ミトコンドリアの機能維持にミトファジーが関わっている。トホグリフロジンは近位尿細管においてSGLT-2を選択的に阻害する糖尿病治療薬であるが腎糸球体における作用について不明な点が多いため、腎糸球体細胞におけるトホグリフロジンの効果についてミトファジーに着目して検討を行った。

【方法】マウス腎糸球体細胞 (podocyte) を37℃、5% CO₂条件下1 g/L グルコース (normal Glu) もしくは4.5 g/L グルコース (High Glu) で18~72時間培養し、同時期にSGLT2阻害薬トホグリフロジンを添加した。細胞培養後、RT-PCR、western blot、MT-1 assayによりミトコンドリア機能およびミトファジーについて検討を行った。【結果・考察】High Glu培養podocyteにおいて、ミトコンドリア膜電位がnormal Glu培養と比較して低下した。また、ミトコンドリア機能マーカーPGC-1 α 、ミトファジーマーカーPINK1およびBNIP3が低下し、炎症性サイトカインTNF- α およびIL-1 β が上昇した。一方でトホグリフロジンはHigh Glu培養条件下において変化したミトコンドリア機能およびミトファジーマーカーを回復させ炎症性サイトカインを抑制した。この作用はHigh Glu曝露初期から持続的に効果を示すことが明らかとなった。さらにHigh Glu条件下でミトファジーを誘導するユビキチンリガーゼであるParkinが低下し、PGC-1 α も低下が認められたが、トホグリフロジンによっていずれにおいても回復傾向にあった。このことから、高グルコース条件下におけるミトコンドリア機能およびミトファジーの低下は、トホグリフロジンによって抑制されている可能性が示唆された。

【結論】SGLT-2選択的阻害薬トホグリフロジンはpodocyteにおいて、高血糖下で見られるミトファジー活性低下に伴うミトコンドリア機能低下を抑制することで、炎症を抑制し腎保護に寄与している可能性がある。

C-1-2 シスプラチン誘発腎障害の原因にアプローチする新たな予防戦略の開発

○神田 将哉^{1,2}、合田 光寛^{1,2}、石田 朋奈¹、石田 俊介^{1,2}、櫻田 巧^{1,2}、坂東 貴司^{1,2}、川田 敬^{1,4}、相澤 風花^{1,2}、新村 貴博^{1,3}、八木 健太^{1,3}、石澤 有紀^{1,5}、石澤 啓介^{1,2,3}

¹徳島大学大学院 医歯薬学研究部 臨床薬理学分野、²徳島大学病院 薬剤部、³徳島大学病院 総合臨床研究センター、⁴徳島大学大学院 医歯薬学研究部 臨床薬学実務教育学、⁵医療法人倚山会 田岡病院 総合診療科

【背景】シスプラチン (CDDP) 誘発腎障害は、原疾患に対する治療の妨げになるだけではなく、患者のquality of lifeを著しく低下させるため、臨床上そのコントロールが非常に重要である。しかし現在有効な予防法はなく、新たな予防戦略の開発が求められている。CDDPは腎臓近位尿細管細胞に蓄積することにより腎毒性を発現すること、近位尿細管細胞に発現しているMultidrug and toxin extrusion (MATE) 型輸送体がCDDPの腎排泄に密接に関与していることが知られている。そこで我々はMATE輸送体とともに腎臓近位尿細管に発現しているNHE3及びSGLT2に着目した。これまでの報告を統合し、SGLT2阻害薬によるNHE3の活性化を介して、MATE型輸送体の排泄活性が上昇し、CDDPの排泄量が増えることにより、近位尿細管細胞へのCDDP蓄積量が減少し、腎障害が軽減する可能性を考えた。本研究では、CDDP誘発腎障害モデルを用いて、SGLT2阻害薬のCDDP誘発腎障害に対する影響を明らかにするために検討を行なった。【方法】10週齢のC57BL/6雄性マウスにCDDPを腹腔内投与することによりCDDP誘発腎障害モデルマウスを作製し、CDDP投与8及び72時間後に血清、尿および腎臓を採取した。SGLT2阻害薬などの各種試薬はCDDP投与24時間前から2回もしくは4回経口投与した。SGLT2阻害薬の併用による腎障害の程度を各種腎機能パラメーターにより評価した。CDDP蓄積量はICP質量分析法を用いて定量した。免疫組織染色により、腎臓におけるMATE1, NHE3, SGLT2の局在を確認した。【結果】CDDP投与により、腎機能障害及び腎臓中のCDDP蓄積が認められた。SGLT2阻害薬投与によりCDDP誘発腎機能障害が抑制されることが明らかになった。CDDPの蓄積に関して、MATE阻害剤であるオンダンセトロンの前投与により、腎臓中のCDDP蓄積量が有意に増加した。一方、SGLT2阻害薬投与により腎臓中のCDDP蓄積量は有意に減少した。免疫組織染色により、MATE1, NHE3, SGLT2は腎臓近位尿細管刷子縁膜側で共局在していることが明らかになった。【考察】本研究の結果から、SGLT2阻害薬はCDDPの腎蓄積量を減少させ、CDDP誘発腎障害の増悪を抑制する可能性が示唆される。

C-1-3

Streptozotocin 誘発糖尿病モデルラットの病的変化に及ぼすナットウキナーゼの効果およびその消化管吸収の検討

○山口 萌¹、福山 亮¹、高岡 晋作²、井上 賢一²、藤田 貢¹

¹広島国際大学大学院 薬学研究科、²株式会社 日本生物 科学研究所

目的：ナットウキナーゼ（NK）は納豆由来の線溶酵素として発見され、近年の研究ではNKがTLR4やNOX2等に作用し、マクロファージが誘導する炎症反応を抑制するとの報告もある。2型糖尿病患者では、高血糖状態やマクロファージによる炎症反応が関与して起こる組織障害が合併症を引き起こすことが知られている。そこで、NKの有する抗炎症作用が糖尿病モデルで進行する病的変化に及ぼす効果について検討した。

実験方法：8週齢SD雄性ラットにStreptozotocin（55 mg/kg 体重）を腹腔内単回投与し、その直後よりNK投与群には標準固形飼料1g当りにNKを0.2 mg（NK-L群）また0.6 mg（NK-H群）を含む飼料を14日間自由摂取させた。対照群には、標準固形飼料を14日間自由摂取させた。この間、摂餌量、体重、空腹時血糖値、血漿総タンパク質（TP）、血漿クレアチニン（Cr）、C-反応性タンパク質（CRP）、最終糖化生成物（AGEs）を適時測定した。14日目には左腎を摘出し、病理組織学的評価を行った。さらに、抗NK抗体とAlpaLISA®を用いて確立した定量法にて（定量範囲：1-100ng/mL）、消化管吸収されたNKの定量を試みた。

結果：対照群では投与後7日目より高血糖状態となり、14日目にかけてAGEsおよびCRPの上昇や腎尿細管上皮細胞へのグリコーゲン沈着が認められた。一方、NK投与群では血糖値を除く病的変化の進行が用量依存的に抑制され、特にNK-H群ではその効果が顕著であった。その他パラメーターは各群間で差は認められなかった。本NK定量法では、フィブリノーゲン存在下においてNK検出感度が著しく低下することが影響し、NKを検出するに至らなかった。

考察：糖尿病モデル（対照群）でみられた病的変化に対してNKは用量依存的に抑制効果を示した。AGEsは細胞内の活性酸素種等を誘導する物質であり、糖尿病の病態悪化に関与している。従って、NKはAGEs生成阻害を介して尿細管上皮細胞へのグリコーゲン沈着やCRP産生を抑制したと考えられる。しかし、今回確立した定量法ではNK検出に至らず、NK完全体が消化管吸収されたことを証明することはできなかった。NKによるAGEs生成阻害作用を解明するのにあたり、その完全体および消化されたペプチド断片双方を利用してアプローチする必要がある。

C-1-4

潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける $\alpha 7$ 型アセチルコリン受容体の役割の検討

森脇 友里葉、藤井 健志、間下 雅士、○野村 篤生

同志社女子大学

【背景・目的】潰瘍性大腸炎は、主に大腸内に炎症を起こし連続的なびらんおよび潰瘍を形成する難病指定の消化器疾患である。免疫機構の異常によって炎症が起こるが、喫煙によってその症状が軽度になることから免疫細胞において病状にニコチンの関与が示唆されている。近年、免疫細胞において $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体

（ $\alpha 7$ nAChR）が存在し、免疫および炎症応答に関与することが報告されている。また腸上皮細胞において、オートファジー不全が消化管の炎症を増悪することが報告されていることから、 $\alpha 7$ nAChRとオートファジーの関連性について潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて検討を行った。

【方法】7～9週齢の雄性C57BL/6Jマウスに5% DSSを自由飲水し、潰瘍性大腸炎モデルを作製した。同時期に $\alpha 7$ nAChRアゴニストのGTS21（4 mg/kg）を10日間単回腹腔内投与し体重を経時的に測定した。摘出した大腸はHE染色、sirius Red 染色、real time PCR法により解析した。

【結果・考察】潰瘍性大腸炎モデルにおいて対照群と比較して体重減少が認められたが、GTS21による体重変化の寄与は認められなかった。大腸での粘膜を光学顕微鏡所見を用いて検討したところ、潰瘍性大腸炎モデルマウスは粘膜長の短縮が見られびらん様症状が認められた。GTS21は短縮を抑制し、上皮細胞の変性を抑制した。また、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて線維化の増大が認められた。さらに、炎症性サイトカインであるIL-12が増加し、抗炎症性サイトカインであるIL-10は減少した。GTS21はその変化を抑制した。このことから、 $\alpha 7$ nAChR刺激は、炎症を抑制することで線維化を抑制し、びらん様症状を軽減している可能性が示唆された。大腸において、オートファジーマーカーであるBeclin1とATG5、およびリソソームマーカーであるLAMP1が低下し、GTS21は一部回復傾向を示したことから、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、 $\alpha 7$ nAChR刺激はオートファジーの一部関与を介して炎症を抑制している可能性が示唆された。

【結論】 $\alpha 7$ nAChRはオートファジーの機能保全を介して炎症を抑制することで潰瘍性大腸炎の症状進行の抑制に寄与している可能性が示唆される。

C-1-5 Snijders Blok-Campeau症候群モデルゼブラフィッシュの表現型解析



○八十島 左京¹、榎本 友美²、白水 崇^{1,4}、小岩 純子¹、黒田 由紀子³、村上 博昭³、
鶴崎 美德²、成戸 卓也²、椎谷 静香³、重谷 尚子³、大川 桃果¹、伊藤 弘晃¹、
弓削 瑞葵¹、西村 有平^{1,4}、黒澤 健司^{2,3,4}

¹三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野、²神奈川県立こども医療センター臨床研究所、³神奈川県立こども医療センター遺伝科、⁴三重大学線毛疾患研究センター

【背景と目的】CHDファミリーはクロマチンのリモデリングを介して遺伝子発現調節に密接に関わる。CHD3遺伝子の変異によりSnijders Blok-Campeau症候群が引き起こされるが、その病態メカニズムや治療薬については不明な点が多い。本研究の目的は、Snijders Blok-Campeau症候群モデルゼブラフィッシュ（以下モデルZF）の表現型を解析し、患者表現型との比較と治療薬探索を行うことである。

【方法】CRISPR-Cas9システムを用いてモデルZFを作成した。行動解析を用いてモデルZFの社会性・攻撃性を評価し、神奈川県立こども医療センターのSnijders Blok-Campeau症候群患者の表現型と比較した。モデルZFの脳メタボローム解析を基盤とする治療薬探索を行った。

【結果】行動解析によりモデルZFは高い社会性と低い攻撃性を示した。これらはSnijders Blok-Campeau症候群患者の表現型と類似していた。モデルZFの脳メタボローム解析によってミトコンドリア機能異常が示唆された。モデルZFの行動異常の一部はメトホルミンによって改善された。

【今後の展望】メトホルミンはSnijders Blok-Campeau症候群の治療薬となる可能性が示唆された。モデルZFを用いた解析をさらに進めることにより、Snijders Blok-Campeau症候群の病態解明と治療法確立につながることを期待される。

C-1-6 低フォスファターゼ症モデルマウス同腹仔の表現型の違い

○及川 弘崇¹、藤川 隆彦¹、戸松 俊治²

¹鈴鹿医療科学大学、²Nemours 小児病院

低フォスファターゼ症(HPP)とは常染色体劣性遺伝病であり、その標的分子は組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNSALP)である。TNSALPの失活または欠損が起るため、骨形成時にCa²⁺沈着できずに骨密度低下をきたす。以前Nemours小児病院の戸松教授とともに行ったHPPモデルマウス(Akp2^{-/-})に対する自然型TNSALPの酵素補充療法において、その治療効果の報告を行った。その際我々は、Akp2^{-/-}において同腹児で同一遺伝子変異型なのに表現型に差があることを発見した。そこで本研究では同腹児の重症型と中等型の比較を行った。【方法】野生型(Akp2^{+/+})とヘテロ接合体型(Akp2^{+/-})を対象群とし、HPP中等症型{Akp2^{-/-}(m)}とHPP重症型{Akp2^{-/-}(s)}をHPP患児モデル群とする。Akp2^{-/-}(s)は3週齢まで生存できないため、実験のエンドポイント2週齢とする。出生後1日齢から2週齢までの成長曲線と後肢の観察をする。その後、麻酔下屠殺解体しX-ray解析をする。また、骨検体のAlizarin redとAlcian blueの二重染色を行う【結果】出生時体重はAkp2^{+/+}(1.78±0.073 g) Akp2^{-/-}(m)(1.51±0.050 g)そしてAkp2^{-/-}(s)(1.36±0.023 g)と有意な差としては観察されなかった。しかしながら、2週間経過するとAkp2^{+/+}(9.16±0.411 g) Akp2^{-/-}(m)(7.42±1.043 g)と成長が観察されるが、Akp2^{-/-}(s)では3.27±0.307 gと未熟であった。後肢の観察ではAkp2^{-/-}(s)において後肢の手指が湾曲することが観察された。X-ray解析においてもAkp2^{-/-}(s)において、骨形成不全と骨密度の低下が観察された。Alizarin redとAlcian blueの二重染色ではAkp2^{+/+}と比較してAkp2^{-/-} Akp2^{-/-}に軟骨領域を示す青色領域が多く観察された。【考察】以上の結果より、Akp2^{-/-}(s)における顕著な骨形成不全は内軟骨性骨化が正常に進んでいないことにより惹起されていると推察できる。同腹児で同一遺伝子変異型なのに表現型が違うことより、遺伝子配列によらない染色体機能変化の影響を受けている可能性が示唆される。

C-2-1 NMDA誘発網膜神経節細胞死に対する絶食の影響

○石丸 侑希、米島 大起、西村 美紅、山崎 美渚、吉岡 靖啓

摂南大学薬学部薬物治療学研究室

【背景・目的】緑内障は、網膜神経節細胞の変性・脱落が不可逆的に進行することによって失明をきたす網膜変性疾患である。その多くが正常眼圧緑内障であるが、発症を未然に防ぐ効果的な予防法は、現在のところ存在しない。断続的断食は、1日の中で食事可能な時間を制限する食事法であり、加齢性疾患の進行遅延効果や予防効果を示すことが報告されている。本研究では、緑内障の網膜神経節細胞死に関与すると考えられているNMDA受容体を介したグルタミン酸興奮毒性による網膜神経節細胞死に対する24時間絶食の影響について検討した。【方法】24時間絶食させた8-10週齢の雄性C57BL/6Nマウスの硝子体内にNMDA(10 nmol)を投与した。網膜神経節細胞の脱落は、HE染色した網膜切片の神経節細胞層の細胞数を計測することで評価した。網膜のスペクトリン α IIの分解およびFoxO3aのリン酸化は、Western blottingにより検討した。網膜における抗酸化酵素の遺伝子発現は、リアルタイムRT-PCR法により解析した。【結果・考察】NMDA硝子体内投与24時間後にみられる網膜神経節細胞の脱落は、24時間絶食により軽減された。また、NMDA投与6時間後のマウスの網膜では、細胞内カルシウム流入や酸化ストレスによって活性化されるカルパインの基質であるスペクトリン α IIの分解がみられ、この分解は24時間絶食したマウスにおいて減弱した。24時間絶食したマウスの網膜では、抗酸化酵素の遺伝子発現を誘導する転写因子であるFoxO3aのリン酸化の亢進がみられ、さらに、抗酸化酵素であるGPx3の遺伝子発現上昇がみられた。以上の結果から、絶食は網膜のFoxO3aの活性化を介してGPx3の発現を誘導することによってNMDA誘発網膜神経節細胞死を抑制することが示唆され、断続的断食が緑内障の予防法として有用である可能性が考えられた。

C-2-2 常染色体優性感音難聴1型(DFNA1)における血小板減少症の発症時期解明～モデルマウスとヒト患者から

○河間 史也^{1,2}、倉沢 俊光¹、足立 直子¹、酒井 規雄²、我那覇 章³、上山 健彦¹

¹神戸大・バイオシグナル研・分子薬理研究分野、²広島大・院医・神経薬理学的研究室、³国際医療大・成田病院・耳鼻咽喉科・頭頸部外科

【背景】遺伝性感音難聴（蝸牛有毛細胞から一次聴覚野までの障害）の発症頻度は、500～1000出生あたり1人とされ、先天性の感覚器障害としては最も頻度が高い。常染色体優性（顕性）感音難聴1型（DFNA1）は、直鎖状アクチンの重合促進分子であり、微小管の制御にも関わるフォルミン・ファミリー蛋白の1つであるDIA1/DIAPH1を恒常活性化型にする遺伝子変異が原因で、出生から10歳までに発症し進行性の病態を呈する。DFNA1は非症候群性の感音難聴と信じられて来たが、我々によるDFNA1難聴の発症機序解明と時期を同じくし、細胞骨格の異常に起因する血小板の分化異常（巨大血小板性血小板減少症）を呈することが報告された。

【目的】本研究では、独自開発したDFNA1モデルマウスとヒトDFNA1患者を対象とし、DFNA1の難聴と血小板減少症の発症時期・病態を解明する。更に、現状小児の聴覚評価として行われている聴性脳幹反応検査（ABR）や聴覚心理学的検査に加え、血小板数を指標としたDFNA1難聴の予後予測を、早期の聴覚補償（補聴器装用や人工内耳植込術）へ活用できないかを模索する。

【方法・結果】感音難聴と血小板減少症を呈するDFNA1モデルマウスの作製に成功した。野生型とモデルマウスを用い、ABRと走査電子顕微鏡による聴覚の機能及び形態評価と、血球計算と血液スメアによる血小板の数及び形態評価を、経時的（1, 2, 3, 4, 5, 6, 12ヶ月齢）に行った。モデルマウスでは、難聴が3ヶ月齢から出現し進行性で、アクチン構造物である聴毛に種々の形態異常が出現する一方、血小板減少症は12ヶ月齢で初めて観察された。DFNA1患者を対象とする臨床研究では、8症例中2例で、難聴を発症しているにもかかわらず、血小板減少症を認めなかった。他の6例では、評価時点で既に難聴と血小板減少症の両方を発症していた。

【結語・考察】DFNA1モデルマウスおよびDFNA1患者とも、難聴が血小板減少症の発症に先行した。DFNA1患者では、難聴も血小板減少症も進行性の病態を示した。以上より、血小板減少によりDFNA1難聴の発症を予知・予見することは出来ないが、血小板数の適切な経過観察が、DFNA1難聴の病状進行把握や聴覚補償の時期決定に活用できる可能性が示唆された。

C-2-3 シスプラチンの耳毒性に対するリポ多糖の影響

○山口 太郎、高橋 日向、廣瀬 愛麗、尾中 勇祐、米山 雅紀

摂南大学

【目的】シスプラチン（CDDP）は、多くの固形癌に有効であり広く治療に用いられるが、耳毒性を有することが知られる。CDDPを含む抗悪性腫瘍薬を用いた化学療法中には、易感染状態に伴う微生物感染を引き起こすことがしばしばあり、患者の全身状態を悪化させる要因となる。しかし、この微生物感染によるCDDPの耳毒性への影響は不明であることから、本研究では、リポ多糖（LPS）投与がCDDPの耳毒性に及ぼす影響を解析した。【方法】8週齢ICR雄性マウスにCDDP（10、15 mg/kg）を1日1回、計2回腹腔内投与した。LPS（0.25 mg/kg）は、各CDDP投与4時間前に腹腔内投与した。最終投与3日後に単独投与および併用投与したマウスについて聴性脳幹反応（Auditory brainstem response、ABR）を解析し、聴力を測定した。蝸牛におけるCDDPの蓄積量は、Pt-DNA構造体に対する抗体を用いてELISA法により解析した。また、LPSあるいはCDDP投与後4時間後および3日後でのタイトジャンクションを構成するzonula occludens-1（ZO-1）タンパク質レベルをウエスタンブロット法により解析した。【結果】CDDP（15 mg/kg）単独投与は、8、16および32 kHzの周波数において有意に聴力の低下を引き起こした。これに対し、CDDP（10 mg/kg）あるいはLPS（0.25 mg/kg）単独投与は、全ての周波数において聴力に影響を及ぼさなかった。CDDP単独投与と比較して、LPSおよびCDDPの併用投与では聴力がより低下し、Pt-DNA構造体が増加した。また、LPS単独投与は最終投与4時間後においてZO-1タンパク質レベルを減少させたが、CDDP単独投与はZO-1タンパク質レベルに影響を及ぼさなかった。【考察】以上の結果から、LPSは蝸牛内タイトジャンクションのバリア機能に影響を及ぼすことで、CDDPの蓄積量を増加させ、CDDPの耳毒性を増強することが示唆される。

C-2-4 マウスに対するシスプラチンの内耳毒性による半規管誘発の前庭動眼反射の障害

○今井 貴夫

ベルランド総合病院

はじめに 抗癌剤であるシスプラチンの聴器毒性は広く知られているが、前庭器毒性による前庭機能障害については不明な点が多い。我々は、マウスの回転中に誘発される前庭動眼反射（Vestibulo-ocular reflex、VOR）を240Hzハイスピードカメラにて記録し、解析することでマウスの半規管機能の評価を可能にした。このマウスの半規管機能検査装置を用いてシスプラチンによる半規管機能障害を検討したので報告する。

方法 C57BL/6Jマウス（9～10週齢、20～26g）に、生理食塩水（コントロール群）および8 mg/kgもしくは16mg/kgの濃度のシスプラチンをそれぞれ4日に分割して連日腹腔内投与し（それぞれ10匹ずつ）、マウスの半規管機能検査装置で最終投与翌日の外側半規管の機能を評価した。また、視力および視運動機能の障害の有無を検討するために視運動性眼振（Optokinetic nystagmus、OKN）の評価も行った。マウスの回転時（回転周波数0.5Hz、1.0Hz、2.5Hz）、および8度/秒のOKN刺激時に誘発される水平性眼球運動を240Hzハイスピードカメラにて撮影した。回転台に対する前庭動眼反射の利得（VORgain）、位相（Phase）を測定し、OKN刺激に対して誘発される水平性眼振の利得（OKN gain）を測定した。

結果 0.5Hz、1.0Hzの回転時にはVOR gainの低下は認められなかったが、高周波数（2.5Hz）での回転時にはコントロールに比してVOR gainの低下を認めた。また、その低下は濃度依存性であり16mg/kg投与群でのみ有意な低下が認められた。Phaseはいずれの条件もコントロールと差は認められなかった。OKNの反応はいずれの群、条件でも有意な差は認められなかった。

考察 本研究でシスプラチンの全身投与によってマウスの外側半規管機能が障害される（VOR gainが低下する）ことがわかった。OKNはシスプラチン投与後も明らかな異常を認めず、視力や視運動機能及び、それらに関わる神経回路は保たれていると考えられるため、VOR gainの低下は前庭器官障害によるものであると考えられる。シスプラチンにより外側半規管膨大部の中心部の感覚細胞が主に障害され、その結果として高周波数回転時（2.5Hz）でのみVOR gainの低下が認められたと考えた。

C-2-5 骨芽細胞分化におけるPannexin3とATP受容体P2X7の役割



○丹羽 彩乃、堀場 大紀、鬼頭 宏彰、山口 陽平、梶栗 潤子、大矢 進

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野

【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。骨芽細胞に発現するPannexin3などのヘミチャネルから放出されたATPは、パラクライン/オートクラインを介して作用することで骨芽細胞分化を促進するとの報告がある。本研究の目的は、Pannexin3とATP受容体P2X7に着目し、骨芽細胞分化における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、ヘミチャネル阻害剤Carbenoxoloneは骨芽細胞分化マーカーALPの発現を抑制した。骨芽細胞からのATP放出に対するヘミチャネル阻害の作用を検討したところ、Carbenoxolone投与群においてATP放出量が有意に減少した。また、未分化細胞と比較して、分化誘導MC3T3-E1細胞においてATP受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が有意に亢進した。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、P2X7阻害薬A804598あるいはP2X7 siRNA処置により抑制された。siRNAによるPannexin3及びP2X7受容体発現抑制は、骨芽細胞分化に伴うALP遺伝子発現の上昇及びALP酵素活性の亢進を有意に抑制した。マウス長管骨由来骨髄細胞から分化させた骨芽細胞においても同様に、CarbenoxoloneやA804598投与は骨芽細胞分化に伴うALP酵素活性の亢進をいずれも抑制した。以上の結果から、Pannexin3を介した骨芽細胞からのATP放出はP2X7受容体を介した Ca^{2+} 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。

C-2-6

ラット初代培養軟骨細胞におけるPiezo1活性化による炎症反応に及ぼす影響の検討



○田中 優佳、中村 庸輝、中島 一恵、森岡 徳光

広島大・院医系・薬効解析

【背景】変形性関節症は高齢者に頻発する慢性炎症性疾患であり、関節軟骨の分解と痛みを特徴とする。日本国内での患者数は1,000万人を超え、高齢化を背景に今後も患者数は増加の一途を辿ることが予想されるにも関わらず、病態発症メカニズムが不明であるため、治療手段は外科的や疼痛への対症療法に限定されている。よって、病態メカニズムの解明と新規創薬標的の探索は急務である。本病態の危険因子として機械的過負荷や炎症が挙げられる。過度の負荷は関節軟骨の退行性病変を引き起こすが、変形性関節症の病態発症への関わり、特に炎症反応に及ぼす影響については明らかとなっていない。そこで本研究では、機械的刺激により活性化されるカチオンチャネルであるPiezo1に着目し、初代培養軟骨細胞におけるPiezo1刺激による炎症反応に対する影響を検討した。【方法】Wistar系ラット新生仔の膝関節軟骨から定法に従って初代培養軟骨細胞を作製した。これらに対して、interleukin-1 β (IL-1 β , 10 ng/ml)、あるいはPiezo1アゴニストのYoda1 (3 μ M)を3時間処置することにより炎症、あるいは機械的過負荷をそれぞれ模倣した。薬物処置後のmRNA発現量はreal-time PCR法にて測定した。【結果】初代培養軟骨細胞において、IL-1 β あるいはYoda1の単独処置時と比較して、両者を併用処置することにより、軟骨分解に関与するmatrix metalloproteinase (MMP)3及びMMP13、炎症反応促進に関与するinducible nitric oxide synthaseのmRNA発現量がそれぞれ増強された。またIL-1 β 及びYoda1併用処置時における各因子の発現増強反応は、ethylenediaminetetraacetic acidによる細胞外 Ca^{2+} のキレートや、KN93による Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)の阻害によって抑制された。【結論】以上の結果より、軟骨細胞における機械的過負荷は、炎症に伴って増加する病態進行因子の発現を増強させることが明らかとなった。さらに、これらの発現増強反応には細胞外からの Ca^{2+} 流入を介したCaMK IIによるシグナル経路が重要な役割を果たす可能性が示唆された。