

## ランニングホイール回転行動に対する欲求制御における内側前頭前野の役割

○谷口 遥海<sup>1</sup>、西谷 直也<sup>1,2</sup>、金田 勝幸<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>金沢大・院薬・薬理、<sup>2</sup>金沢大・薬・薬理

【背景・目的】行動嗜癖は、社会生活に悪影響を及ぼすにも関わらずゲームやギャンブルなどの特定の行動を繰り返す状態のことであり、適切な実験動物モデルが存在しないことからその病態メカニズムの解明は進んでいない。そこで我々は、げっ歯類のランニングホイール (RW) 回転行動に着目し、行動嗜癖のモデルとして新たなオペラント条件付け課題を構築した。本研究では、側坐核や腹側被蓋野と報酬系神経回路を形成し、欲求制御への関与が示唆される内側前頭前野 (mPFC) に着目し、神経活動の操作と観察を行うことで、行動嗜癖におけるmPFCの役割の解明を試みた。

【方法】雄性C57BL/6Jマウス (6週齢以上) を用い、一定回数 (fixed ratio; FR) 穴に鼻先挿入 (nose poke; NP) を行うと1分間ホイールブレーキが解除され、RWを回転させられるようになるオペラント条件付け課題を実施した。課題中のNP数をRW回転行動への欲求の大きさとして評価した。また、アデノ随伴ウイルスベクターAAVdj-CaMKII-hM4Di-mCherryあるいはAAV2/1-CaMKII-jGCaMP8mをmPFCに注入し、mPFC興奮性神経細胞特異的に抑制性人工受容体hM4Diあるいは蛍光カルシウムセンサーであるjGCaMP8mを発現させた。

【結果・考察】FR10条件下において、GABA<sub>A</sub>受容体作動薬 (muscimol; 5 ng/side) をmPFCに局所投与し神経活動を抑制したところNP数は減少した。また、化学遺伝学的手法によるmPFC興奮性神経細胞選択的な活動抑制もNP数を減少させた。さらに、mPFC内へのドパミンD<sub>1</sub>受容体拮抗薬 (SCH23390; 0.15 µg/side) 局所投与はNP数を減少させた一方で、D<sub>2</sub>受容体拮抗薬 (raclopride; 1 µg/side) 局所投与はNP数に有意な影響を及ぼさなかった。続いて、FR10課題実施中におけるファイバーフォトメトリー記録から、mPFC興奮性神経細胞活動は1回目のNP前後で減少し、10回目のNP直後に増加することが明らかになった。また、FR1、3、5、10課題における最後のNP前後、すなわち、ホイールブレーキ解除前後の曲線下面積の差 (ΔAUC) を比較したところ、FR数の増加に伴いΔAUCは増加した。以上の結果から、D<sub>1</sub>受容体を介したmPFC興奮性神経細胞の活動変化がRW回転行動に対する欲求制御に重要であること、さらに、報酬獲得認識時の神経活動上昇は獲得に必要な労力の大きさを反映している可能性が示唆された。

## ヒト人工多能性幹細胞由来大脳皮質オルガノイドを用いた脳発達ならびにアルツハイマー病脳病態における原始マクロファージ/ミクログリアの機能解析

○原田 考輝<sup>1</sup>、山田 志歩<sup>1</sup>、西村 周泰<sup>2</sup>、高田 和幸<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都薬科大・院薬・シナジーラボ、<sup>2</sup>同志社大・院脳科学・脳回路機能創出部門

【目的】脳の免疫担当細胞ミクログリアは、胎生期の卵黄嚢で発生した原始マクロファージを起源としている。胎生期の脳において、原始マクロファージ/ミクログリアは脳の発生・発達に関わり、大脳皮質の神経細胞層構造の形成にも寄与するとされている。また、加齢を最大の発症リスクとするアルツハイマー病 (AD) の脳内では、アミロイド $\beta$  (A $\beta$ ) が脳内で蓄積し、神経細胞死や脳の萎縮が引き起こされる。ミクログリアはA $\beta$ の貪食や脳炎症の惹起により、AD病態の形成にも深くかかわることが示唆されている。しかし、脳の発生・発達や病態脳におけるミクログリアの役割について、特にヒト脳を用いた解析は困難であり、その詳細は不明である。本研究では脳発生・発達や病態脳における原始マクロファージ/ミクログリアの機能解析を可能とする *in vitro* ヒト脳モデルの作製について検討した。

【方法】ヒト脳発達モデルとしてヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 由来大脳皮質オルガノイドを作製し、同じく hiPSC由来の原始マクロファージ (hiMacs) と三次元で共培養した。AD病態脳モデルとして、hiMacsを含有するhiPSC由来大脳皮質オルガノイドにA $\beta$ を処置した。一方、*in vivo*における発生・発達脳の解析には、妊娠マウスにcolony-stimulating factor-1受容体阻害薬を摂取させ、ミクログリアを除去したマウス胎仔脳を用いた。大脳皮質オルガノイドやマウス胎仔脳を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

【結果・考察】大脳皮質オルガノイドやマウス胎仔脳において、原始マクロファージ/ミクログリアが共存すると、層構造内の神経前駆細胞 (SOX2 $^+$ 細胞) の数が増加し、神経中間前駆細胞および未熟神経細胞 (TBR1 $^+$ 細胞) は貪食されて数が減少した。一方、大脳皮質オルガノイドをA $\beta$ で処置すると神経細胞死が引き起こされたが、hiMacsの共培養によりA $\beta$ は貪食され神経細胞死は抑制された。また、A $\beta$  プラーク表面の鋸刃状構造は、hiMacsに貪食されて滑らかなものとなった。以上より、hiMacs含有大脳皮質オルガノイドは、*in vivo*脳でみられる神経細胞や原始マクロファージの反応を高い精度で再現しており、ヒトの脳発生・発達やAD病態脳モデルとして幅広くさらなる解析に応用できることが示唆された。

## Activation of KCNQ2 channels in D1-MSNs attenuates cocaine-seeking behavior in mice during withdrawal.

○周 昕竹<sup>1</sup>、張 心健<sup>1</sup>、船橋 靖弘<sup>2</sup>、坪井 大輔<sup>2</sup>、窪田 悠力<sup>1</sup>、貝淵 弘三<sup>2</sup>、永井 拓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大・精神神経病態セ・神経行動薬理、<sup>2</sup>藤田医科大・精神神経病態セ・細胞生物

The activation of dopaminergic neurons projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens (NAc) is a common early neuropsychopharmacological effect of addictive drugs, resulting in a state of euphoria. In the NAc, approximately 95% of the neurons are medium spiny neurons (MSNs), which can be further classified into two distinct types: D1R-MSNs expressing dopamine D1 receptors, and D2R-MSNs expressing dopamine D2 receptors, are two distinct types of medium spiny neurons (MSNs) in the NAc. Our previous findings indicate that dopamine plays a role in regulating neuronal excitability through phosphorylated KCNQ subunit of potassium channel in D1R-MSNs, which may contribute to the promotion of rewarding behaviors. The objective of this study is to evaluate the influence of KCNQ2 potassium channel activation on cocaine-induced reward memory in mice during withdrawal. The impact of KCNQ2 potassium channel openers on cocaine-induced reward memory was assessed using the conditioned place preference (CPP) paradigm. By employing a variant of KCNQ2 subunit that is constantly active mutant (KCNQ2-CA), we examined the role of KCNQ2 channel activity in D1R-MSNs on cocaine-induced reward memory. The dendritic spine morphology of D1R-MSNs in the NAc was evaluated at various time course during the CPP experiment. Additionally, the impact of KCNQ2 potassium channel openers on the AMPA receptor response and neuronal activity in these mice was evaluated. Consequently, KCNQ2 potassium channel openers were found to significantly attenuate cocaine-induced reward memory in cocaine-treated mice. KCNQ2-CA expression in D1R-MSN also significantly reduced cocaine-induced reward memory. Furthermore, KCNQ2 potassium channel openers significantly inhibited cocaine-induced dendritic spine morphology and neuronal activity in D1R-MSN. These findings suggest that KCNQ2 potassium channel channels may serve as potential targets for the treatment of cocaine addiction.

## CNOT4 and Translational Regulation: Unveiling Mechanisms of Skeletal Muscle Repair in a Sarcopenia Mouse Model

○Khin Kyaemon Thwin、Yasuha Kinugasa、Yumiko Imai

Medical Infection System Department, Research Institute, Nozaki Tokushukai Hospital

Sarcopenia, a leading cause of frailty in the elderly, results in a progressive loss of skeletal muscle mass and function. In Japan's aging society, effective prevention and treatment of sarcopenia are critical for improving quality of life and reducing healthcare burdens. Skeletal muscle repair and regeneration are central to mitigating sarcopenia progression, but the underlying molecular mechanisms remain poorly understood.

Recent research highlights the CCR4-NOT complex, particularly its CNOT4 subunit, as a potential regulator in muscle repair. CNOT4, an E3 ubiquitin ligase, plays a key role in mRNA translation and protein turnover. Our preliminary findings suggest that CNOT4 is involved in ubiquitination and translational regulation, both critical for muscle repair. Through controlling protein synthesis and mRNA stability, CNOT4 may regulate key processes such as satellite cell activation and differentiation, facilitating muscle regeneration.

This study aims to elucidate the specific ubiquitination targets of CNOT4 and its broader role in translational regulation during muscle repair. Understanding these mechanisms could lead to novel therapeutic strategies for sarcopenia, enhancing muscle regeneration and functional recovery in aging populations.

## β<sub>2</sub>アドレナリン受容体の光遺伝学的阻害法の開発

○大谷 鈴華<sup>1</sup>、萩原 雅子<sup>1</sup>、白川 久志<sup>1</sup>、永安 一樹<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都大・院薬・生体機能解析学、<sup>2</sup>大阪大・院薬・神経薬理

【背景】光遺伝学は細胞種特異性・高時間分解能・可逆性を兼ね備えた手法として広く活用されており、神経発火・神経伝達物質の放出・セカンドメッセンジャーの産生といった神経伝達の各段階を制御可能な光遺伝学的ツールが開発されている。一方で、受容体活性化の段階を制御可能な光遺伝学的ツールはほとんど報告されていない。本研究では、細胞内に発現させることで受容体活性の抑制が可能な細胞内抗体である抗β<sub>2</sub>アドレナリン受容体（以下β<sub>2</sub>受容体）ナノボディ（Nb60）を用いて、β<sub>2</sub>受容体の光遺伝学的阻害法の開発を試みた。

【方法・結果・考察】光感受性化機構として、青色光感受性核輸出シグナル（LEXY: Light-inducible nuclear EXport sYstem）を用いた。Nb60にLEXYおよび核局在化シグナル配列NLSを融合させた2xNLS-Nb60-mCherry-LEXYおよびβ<sub>2</sub>受容体をHEK293T細胞に発現させ、mCherryを指標にNb60の細胞内局在を観察した。その結果、青色光照射前からβ<sub>2</sub>受容体が分布する細胞膜に局在することが明らかになった。この結果はNb60のβ<sub>2</sub>受容体への高い親和性に起因と考え、Nb60に対しアラニンスキャニングおよび部位特異的飽和変異導入を実施し、光感受性化に適した標的親和性を有する変異Nb60の同定を行った。その結果、光感受性Nb60のN32S, MおよびC変異体が、青色光依存的に細胞膜に局在することを見出した。これらの光感受性Nb60変異体がβ<sub>2</sub>受容体活性に及ぼす影響をcAMP感受性ルシフェラーゼGlosensorを用いて評価した。β<sub>2</sub>受容体および光感受性Nb60変異体を発現させたHEK293T細胞においてノルアドレナリンへの応答性を測定した結果、すべての変異体において10分間の青色光照射後にEC<sub>50</sub>値が増加した。一方で青色光非照射時あるいは青色光照射後20分間遮光時には対照群と同程度の応答を示した。これらの結果は、2xNLS-Nb60-mCherry-LEXYのN32S, MおよびC変異体が青色光依存的にβ<sub>2</sub>受容体シグナルを阻害する光遺伝学的ツールとして有用であることを示唆する。

## 肥満時の歯周病はミクログリアの活性化を介して認知機能障害を引き起こす

○吾郷 由希夫<sup>1</sup>、山脇 洋輔<sup>2</sup>、駿河 拓矢<sup>3</sup>、田村 哲也<sup>4</sup>、應原 一久<sup>4</sup>、森岡 徳光<sup>5</sup>、花本 博<sup>6,7</sup>、大植 香菜<sup>7</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医（歯）・細胞分子薬理学、<sup>2</sup>第一薬科大・薬・薬物治療学、<sup>3</sup>広島大・歯、<sup>4</sup>広島大・院医（歯）・歯周病態学、<sup>5</sup>広島大・院医（薬）・薬効解析科学、<sup>6</sup>広島大・院医（歯）・歯科麻酔学、<sup>7</sup>広島大病院・歯科麻酔科

【緒言】認知症は世界で最も罹患者数の多い神経疾患である。認知機能障害の発症メカニズムには脳内炎症の関与が指摘されているものの、有効な予防法や治療法は未だ確立されていない。このようななかで近年、肥満病態下での歯性感染症が、糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎を増悪するなど、末梢組織での炎症応答を増幅させるという報告がなされている。本研究では、肥満における歯周病が認知機能に及ぼす影響を、脳内ミクログリアの役割に着目して検討した。【方法】C57BL/6J雄マウスに12週齢から18週間高脂肪食を与え、食餌誘発性肥満モデルを作製した。その後、歯周病菌（*Porphyromonas gingivalis* Pg）を週2回、6週間臼歯部に塗布した。歯周炎の進行は、歯槽骨頂とセメントーエナメル境間の距離により評価した。認知機能は新奇物体認識試験により解析した。

【結果】肥満マウスは、通常食を摂取したマウス（正常マウス）に比べて、Pg塗布による歯周炎が進行していた。正常マウスでは、本研究でのPg処置期間において認知機能への影響はみられなかったが、肥満マウスにPgを処置することで認知機能の低下がみられた。この時、Pg処置肥満マウスの海馬において、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現増加が認められた。免疫組織化学的解析から、Pgを処置した肥満マウスの海馬ならびに前頭前皮質ではミクログリアの細胞体が肥大化しており、ミクログリアの活性化が示唆された。さらに、コロニー刺激因子1受容体阻害薬PLX3397によってミクログリアを枯渇させると、Pg処置肥満マウスの認知機能障害が改善した。【結論】本研究では、肥満あるいは歯周病単独では影響がない条件下、両者をともに発症することで、認知機能が障害されることを、動物モデルを用いて明らかにした。また、この認知機能障害には脳内のミクログリアの活性化が関与していることを見いたした。今回の結果は、歯周病の予防あるいは治療が、認知機能の維持に重要であることを示すもので、認知症の理解と克服に向けた新たな提言につながることが期待される。

## A-2-1

### アミロイド $\beta$ オリゴマー誘発性神経細胞毒性に対するエルゴチオネインの抑制効果

○石田 敦士<sup>1,2,3</sup>、小口 達敬<sup>1,2</sup>、辻 まゆみ<sup>2</sup>、中西 達彌<sup>1,2,3</sup>、片岡 和之<sup>1,2,3</sup>、木内 祐二<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>昭和大学大学院医学研究科医科薬理学分野、<sup>2</sup>昭和大学薬理科学研究センター、<sup>3</sup>昭和大学大学院医学研究科脳神経内科学分野

【背景】近年、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease: AD)の患者数が増加しており社会的に問題となっている。その発症機序はアミロイド $\beta$ 仮説が有力とされ、特に線維形成の過程で現れるアミロイド $\beta$ オリゴマー (Amyloid  $\beta$  oligomer: A $\beta$ o)は神経毒性が強いとされる。最近ではA $\beta$ oを対象とする新薬も登場しているがその適応は限定的であり、食生活や運動習慣を始めとしたADの発症予防は引き続き重要な位置づけにある。今回、我々はキノコ類に含まれる抗酸化物質であるエルゴチオネイン (Ergothioneine: EGT)に着目した。EGTはヒトおよびマウスへの投与により認知機能を改善したとする報告があり、ADの発症および進行予防への応用が期待されている。本研究では、マウス海馬神経由来のグルタミン作動性ニューロンであるHT-22細胞を用い、A $\beta$ o誘発性の神経細胞毒性に対するEGTの保護作用を検討した。

【方法】A $\beta$ <sub>1-42</sub>を10 mMのNaOHに溶解し、フィルタリングした後にphosphate bufferを添加した。37°Cで1時間のインキュベーション後、遠心分離した上清をA $\beta$ oとして採取した。HT-22細胞にA $\beta$ o (5  $\mu$ M)とEGT (100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M)を併用処置し、A $\beta$ oにより誘発された細胞への影響を観察した。細胞生存率の測定にはMTTアッセイを用い、酸化ストレスレベルについてはReactive Oxygen Species (ROS)およびミトコンドリアROSの生成、さらに、細胞膜リン脂質過酸化を測定し評価した。

【結果および考察】A $\beta$ oに暴露した細胞は、無処置細胞と比べ、著しい細胞生存率の低下と酸化ストレスレベルの増加がみられた。一方、A $\beta$ oにEGTを添加した細胞は、A $\beta$ o暴露細胞と比較し、細胞生存率と酸化ストレスレベルの双方において有意な改善を認めた。EGTは、A $\beta$ o誘発性の酸化ストレスを低減し、ADの発症予防および進行抑制に寄与する可能性が考えられる。

## A-2-2

### マウスのノルアドレナリン神経系に及ぼすアルビノの影響

○居場 嘉教、川西 咲弥、西川 真由、山下 葉平

摂南大・理・病態薬理

【背景・目的】ノルアドレナリンなどのカテコールアミンと皮膚や髪の毛に存在するメラニン色素は、共にL-チロシンから生合成される。メラニン色素のないアルビノの魚では、カテコールアミンのレベルが増加し、睡眠障害が生じることが報告されている。しかし、マウスを含む哺乳類において、そのような報告はない。本研究では、各種薬物によるイソフルラン麻酔の延長作用を指標として、マウスのノルアドレナリン神経系に及ぼすアルビノの影響について検討した。

【方法】実験には、8-16週齢の雄性C57BL/6N (B6N)マウスおよび同系統でチロシナーゼ変異を有するB6-albinoマウスを用い、12時間の明暗サイクル下で飼育した。自発運動量はビームセンサー式自発運動装置を用いて測定した。イソフルラン麻酔の実験は、明期 (ZT6) と暗期 (ZT12) を行い、プロチゾラム、メデトミジン ( $\alpha$ 2アドレナリン受容体作動薬)、アチバメゾール ( $\alpha$ 2アドレナリン受容体拮抗薬)によるイソフルラン麻酔の延長効果を正向反射が回復するまでの時間を麻酔時間として評価した。

【結果】B6NマウスとB6-albinoマウスの自発運動量に違いは認められなかった。プロチゾラムは、両マウスにおいて、明期と暗期の両方でイソフルランによる麻酔時間を有意に延長した。メデトミジンによるイソフルラン麻酔の延長効果は、明期・暗期共にB6-albinoマウスの方がB6Nマウスより強い傾向を示した。アチバメゾールは、両マウスにおいて、イソフルランによる麻酔時間に有意な変化を及ぼさなかった。しかし、プロチゾラムとアチバメゾールを併用したところ、両マウス共に、プロチゾラム単独の場合と比較して、イソフルラン麻酔の有意な延長作用が観察された。この延長効果は、暗期では両マウスで同程度であったが、明期ではB6NマウスよりB6-albinoマウスで顕著であった。

【考察】マウスの自発運動にアルビノの影響は認められなかった。マウスでは、ノルアドレナリン神経系の活性化による影響は、GABA神経系によって代償的に抑制されている可能性が考えられた。

## A-2-3

### CGRP欠損が引き起こすHSP90減少とパーキンソン病様症状の関連性

○橋川 成美、石川 晴貴、江田 康耀、小野 杏花、橋川 直也

岡山理科大 理

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は37個のアミノ酸からなる神経伝達物質であり、血管拡張作用、痛覚調節、炎症応答、神経保護作用など重要な生理機能を有する。これまでに、CGRP欠損マウスは脳黒質における $\alpha$ シヌクレインの著明な増加と、それに伴うドパミン神経の減少および運動機能障害を示すことを報告してきた。しかし、CGRP欠損がどのようにしてドパミン神経の減少を引き起こすのか、その分子メカニズムは未だ不明である。本研究ではCGRP欠損マウスにおける $\alpha$ シヌクレインの蓄積に、分子シャペロンの機能異常が関与している可能性を考え、脳黒質におけるHSPsのmRNA発現量を解析した。その結果、CGRP欠損では、HSP72, HSP105の発現が増加していた一方、HSP90の発現は顕著に減少していた。次にHSP誘導剤であるゲラニルゲラニルアセトン (GGA) をCGRP欠損マウスに5週間、500 mg/kg/dayの用量で自由経口投与し、HSP90発現の回復を試みた。その結果、脳黒質におけるHSP90発現の回復とともに、ロタロッド試験およびadhesive removal testにおける運動機能の改善傾向が見られた。しかし、tyrosine hydroxylaseの発現量低下やalpha synuclein発現量増加には影響を与えたなかった。我々はさらに、HSP90阻害薬17-DMAGをC57BL6Jマウスに10 mg/kg/weekで5週間投与し、HSP90阻害が脳黒質および運動機能に与える影響を評価した。その結果、脳黒質における $\alpha$ シヌクレイン発現量に変化は見られなかったが、tyrosine hydroxylase 発現量は有意に減少し、カタレプシー様行動の延長が見られた。これらの結果より、CGRP欠損マウスにおけるパーキンソン病様運動機能障害はHSP90の低下が関与している可能性が示唆された。

## A-2-4

### 臨界期マウス視覚野におけるプロテオーム解析

○及川 弘崇

鈴鹿医療科学大・薬

**【目的】**著者らは以前、バルプロ酸 (VPA) がmiR-124を誘導し、GNAI1を抑制する新たな分子メカニズムを同定し、VPA治療におけるmiR-124/GNAI1/BDNF経路の関与が、バルプロ酸の難治性神経変性疾患に対する再利用の可能性を示唆するものであることを報告した。本経路に関する研究において、エピジェネティックなアプローチにより脳内で擬似的な臨界期が誘発されると仮定してきたが、実際の臨界期とVPA誘発性の擬似臨界期を比較する研究は行われていなかった。そこで、本研究では、実際の臨界期において擬似臨界期で得られた候補タンパク質の変化を検証することを目的とする。

**【方法】**マウス一次視覚野 (V1) の臨界期は、生後14日齢に開眼し、視覚情報が入力され始める時点から始まり、28日齢でピークを迎え、35日齢で安定化する。この短期間で臨界期の各フェーズを捉えられるため、マウスのV1を用いて実験を行った。生後13日齢 (開眼直前) および臨界期ピークである28日齢のC57BL/6マウスを麻酔下で屠殺し、V1を摘出した (n=3)。摘出したV1からタンパク質を抽出し、固定化pH勾配法により等電点でタンパク質を分離し、その後SDS-PAGEによる分離を行った。電気泳動後に蛍光画像を撮影し、ImageMaster 2D Platinum 7.0を用いて画像解析を行った。

**【結果】**画像解析の結果、タンパク質量が2倍以上変動した中で、開眼後に有意に発現が増加した38スポットと、発現が有意に減少した33スポットが検出された。これらの有意な変化を示したスポットからタンパク質を抽出し、MALDI-TOF-MSにより同定を行った。その結果、擬似臨界期で変動していたタンパク質と相同するものは確認されなかったが、臨界期においては $\gamma$ -エノラーゼを含む解糖系に関与する3種類の酵素が検出された。

**【考察】**本研究では、臨界期において解糖系酵素である $\gamma$ -エノラーゼが高発現することを確認した。この酵素は、神経成長および神経障害の両方のマーカーとして知られている。また、他の2種類の解糖系酵素も検出されたことから、臨界期における解糖系の関与が重要な要因であることが示唆される。今後は、臨界期における解糖系の変化に関する詳細な検討を進める必要がある。

## 多発性硬化症に対するウルソデオキシコール酸投与の影響

○ 薗田 悠平<sup>1,2</sup>、相澤 風花<sup>1,2</sup>、西橋 彩香<sup>1</sup>、八木 健太<sup>1,3</sup>、新村 貴博<sup>1,3</sup>、合田 光寛<sup>1,2</sup>、川田 敬<sup>1,4</sup>、石澤 有紀<sup>1,5</sup>、石澤 啓介<sup>1,2,3</sup>

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

【背景・目的】多発性硬化症(MS)は中枢神経系に炎症や脱髓を生じる自己免疫疾患である。病態メカニズムは完全には解明されておらず、治療薬開発の妨げとなっている。我々は、胆汁酸製剤ウルソデオキシコール酸(UDCA)がMSの抑制効果を有する可能性を見出している。近年、胆汁酸は脂質代謝にくわえ、胆汁酸受容体TGR5を介した生理活性物質としての機能が明らかとなってきた。MS患者では胆汁酸代謝変化が生じており、MS病態下における胆汁酸機能の低下がMS増悪に関与する可能性がある。本研究では治療的創出を見据えた病態形成機序解明を目指しMSモデルマウスを用いてUDCAによるMS抑制作用を検討した。

【方法】C57BL/6雌性マウス(8週齢)にミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白を用いて免疫誘導を行い、MSモデルを作製した。神経損傷評価には6段階の臨床スコア、病理組織染色評価を用いた。UDCA(150, 500 mg/kg)およびTGR5阻害剤トリアムテレンは免疫誘導14日目から1日1回反復経口投与した。ミクログリア細胞株(MG6)にUDCAおよびトリアムテレンを共処置し、プロテオーム解析を用いてタンパク質の網羅的発現解析をおこなった。

【結果】高用量UDCAの反復投与群は、vehicle群と比較して神経損傷スコアを有意に改善した。免疫誘導によって生じた脊髄および小脳における白質の脱髓はUDCAの投与によって減少した。MG6細胞におけるLPS誘発性炎症性サイトカインの発現増加はUDCAの共処置によって有意に低下した。さらに、トリアムテレンを共処置することで、Lrp4、FetuinA、ApoAなど炎症反応抑制を担うタンパク質の発現が有意に低下した。

【結論】高用量のUDCAはMS抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに、本作用はTGR5を介したミクログリアの活性調節が関与することが示唆された。末梢性の胆汁酸変化による炎症応答促進機構の解明がMSの病態解明の新たな糸口になると考えられる。

## PERIOD2(PER2)P988L変異による睡眠相前進症候群発症機序の解明

○白藤 俊彦<sup>1</sup>、玉田 紘太<sup>1</sup>、山本 真里奈<sup>1</sup>、黒澤 信幸<sup>2</sup>、内匠 透<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大・院医・生理、<sup>2</sup>富山大・院工

### 背景

時計蛋白質のリン酸化は概日リズム調節に重要である。ヒトで初の家族性睡眠相前進症候群(ASPS)はPERIOD2 (PER2) S662G変異であり、Casein kinaseによるhPER2のFASP部位(Ser662)とb-TrCP部位(Ser479)の2つのリン酸化によりPER2蛋白量が制御され、結果的に概日リズムが調整される。一方、PER2変異によるASPSはこの他にも存在し、未知の調節機構が想定され、総合的なPER2による概日リズム調節機構は未解明である。

今回注目したPER2 P988L変異ではASPSの表現型を呈するが、機序は不明だった。PER2 Pro988に隣接して、Ser987が存在し、proline directed kinaseのモチーフである。そこで、P988L変異ではSer987リン酸化が欠損して、ASPSになるという仮説を考えた。PER2 P982L、S981A変異マウス(ヒトPER2 Pro988, Ser987に相当)を作製して表現型解析を行った。同時にヒトSer987リン酸化の責任キナーゼの同定、リン酸化変異体の蛋白安定性、局在変化の解析も行った。

### 方法

CRISPR/Cas9を用いたiGONAD法でPER2変異マウスを作製し、アクトグラムで行動量を測定し、概日リズムの周期と位相を測定した。Ser987リン酸化の責任キナーゼはPhosphoSitePlusで予測した。妥当性の確認のために、hPER2を発現したCOS7細胞にキナーゼ阻害剤を処置し、独自作製したpS987特異的抗体を用いてWestern blotを行った。

### 結果

PER2 P982L、S981A変異マウスとともに、4-6時間程度の位相前進を認めた。また、恒暗条件では概日リズム周期が短縮した。Proline directed kinaseであるDYRK, CLK, CDKがhPER2 Ser987をリン酸化することを同定した。

### 考察

すでに確立しているFASP部位、b-TrCP部位以外の概日リズム調節に重要な新たなリン酸化部位を同定した。hPER2 P988L変異によるASPSはSer987リン酸化欠損によることが示唆された。

## HMGB1は線維筋痛症の発症・維持に関与する

○三井 鈴華<sup>1</sup>、岸本 彩野<sup>1</sup>、坪田 真帆<sup>1</sup>、友野 靖子<sup>2</sup>、西堀 正洋<sup>2</sup>、川畠 篤史<sup>1</sup>

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

線維筋痛症 (FM) は、3カ月以上にわたって身体の広範囲に原因不明の疼痛が出現する疾患で、痛覚変調性疼痛の一種とされている。我々は、細胞死や種々の刺激によって細胞外に放出される核内タンパク high mobility group box1 (HMGB1) が、炎症性疼痛や神経障害性疼痛の発症に関与することを明らかにしてきた。そこで本研究では、代表的なFMモデルとして知られる反復寒冷 (RC) ストレス負荷マウスと酸性生理食塩水筋注マウスにおける痛みの発症・維持におけるHMGB1の役割を検討した。RCストレス負荷マウスは、24°Cと4°Cに温度を維持した飼育室にケージを用意し、マウスを初日午後4時半から翌日午前10時まで4°C側ケージに保持した後、午前10時から午後4時半まで30分毎に2つのケージ間で交互に移し替える操作を3日間繰り返す計4日間のプロトコールで作製した。酸性生理食塩水筋注マウスは、イソフルラン吸入麻酔下、マウスの右腓腹筋へpH 4に調整した生理食塩水 20 µLを5日間隔で2回筋肉内投与することで作製した。足底部の侵害受容閾値はvon Frey試験により測定した。RCストレス負荷開始3日後より10日以上持続するアロディニアが出現し、このアロディニアの発症は抗HMGB1中和抗体 1 mg/kgあるいはHMGB1不活化作用を有する遺伝子組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン (TM  $\alpha$ ) 3 mg/kgをストレス負荷開始日と反復寒冷暴露を行う3日間、反復腹腔内投与することで阻止された。また、4日間のストレス負荷によってアロディニアが発症した後、上記用量の抗HMGB1中和抗体またはTM  $\alpha$ を2日の休薬を挟んだ前後3日間、反復腹腔内投与したところ、初回投与翌日にはアロディニアが完全に消失し、非ストレスマウスと同レベルの閾値が維持された。次に、右腓腹筋へ酸性生理食塩水を2回投与したマウスでは、2回目投与後に両側性のアロディニアが認められ、この持続的なアロディニアの発症は酸性生理食塩水投与開始13日後より、上記と同じ条件で、抗HMGB1中和抗体またはTM  $\alpha$ を反復投与することでほぼ完全に消失した。以上より、RCストレスおよび酸性生理食塩水筋注によって作製されるFMモデルのアロディニアにHMGB1が関与する可能性が示唆された。

## スタチン類によるオキサリプラチン誘発性末梢神経障害の抑制メカニズムの解明

○宮崎 大夢<sup>1</sup>、濱野 裕章<sup>1</sup>、武田 達明<sup>2</sup>、飯田 緑<sup>3</sup>、山西 芳裕<sup>4</sup>、座間味 義人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大・院医歯薬・臨床薬剤学、<sup>2</sup>岡山大・薬・臨床薬学教育研究センター、<sup>3</sup>九州工業大・院情報工学・物理情報工学、<sup>4</sup>名古屋大・院情報学・生命情報論

【背景・目的】末梢神経障害は、オキサリプラチン(L-OHP)などの抗がん剤治療によって引き起こされ、手足のしびれや感覚障害を伴い、患者の生活の質に大きな影響を与える。現在、治療薬としてデュロキセチンなどが使用されているが、その効果は限定的であり、新たな治療法の開発が望まれている。これまでの研究において、ヒトの診療情報を用いた臨床情報データベースの解析から、L-OHPによる末梢神経障害に対してスタチンが有効であることが示唆されている。そこで本研究では、L-OHPによる末梢神経障害の予防の候補薬としてスタチンに注目し、有効性を基礎薬理学的に確認し、その作用機序を解明することを目的とした。

【方法】痛み・しびれの有効性評価として、L-OHPを処置した末梢神経障害モデルラットにvon Frey testを実施して、スタチンによる影響を確認した。また、トルイジンブルー染色を用いて、坐骨神経の軸索変性に対するスタチンの保護効果を評価した。次に作用機序を明らかにするため、ヒトタンパク質間相互作用やタンパク質の翻訳後修飾、遺伝子経路など、7種類のデータベース (HuRI/CORUM/ Instruct/ KEGG repair/ PhosphositePlus/ InnateDB/ Signalink) から取得した18,570個のタンパク質情報と437,922個の相互作用を基に、生体ネットワークを構築した。生体ネットワークに、文献検索で特定した末梢神経障害の発症因子となる遺伝子群と、遺伝子公共データGEOから抽出したL-OHPによる遺伝子変動と、創薬ツールLINCSから抽出したスタチン類の遺伝子変動をマッピングすることで、生体内における薬剤と疾患間の生体反応を予測した。

【結果・考察】モデルラットでは、痛み・しびれの閾値が低下し、神経軸索の円形度が有意に低下した。対照的に、スタチンはL-OHP誘発の痛み・しびれの閾値を改善し、神経軸索の変性を抑制した。生体ネットワーク解析の結果、スタチンによるL-OHP誘発末梢神経障害の保護作用には、MAP2K3, APP, CDK5, CSNK1Eなどの遺伝子が関与することが示唆された。これらの遺伝子に影響を与えるパスウェイを調べるためにエンリッチメント解析を実施し、神経変性のパスウェイに影響を与えることが示唆された(オッズ比=10.4, 調整後p値=0.017)。これにより、スタチンのL-OHPによる末梢神経障害の予防効果に、挙げられた遺伝子変動が関わっていることが示唆された。

## Ca<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネル活性のサルファイドによる上昇とポリサルファイドによる低下: 亜鉛と酸素の影響

○森田 華帆、大城 こころ、南郷 優希、増田 寛志、笠波 嘉人、関口 富美子、川畠 篤史  
近畿大・薬・病態薬理

サルファイド類は知覚神経に発現するCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性を亢進させることで痛みを誘起する。生体内では、Ca<sub>v</sub>3.2の活性はその細胞外ドメインに存在する191番目のHis残基に結合したZn<sup>2+</sup>により抑制されており、我々はサルファイド類がこのZn<sup>2+</sup>抑制を解除することでCa<sub>v</sub>3.2活性を増大させる可能性を示唆している。一方、ポリサルファイド類のCa<sub>v</sub>3.2チャネル活性に対する効果はよく分かっていない。本研究では、サルファイドとポリサルファイドのCa<sub>v</sub>3.2活性に対する効果を比較検討し、それらにおよぼすZn<sup>2+</sup>添加とO<sub>2</sub>通気の影響を解析した。N<sub>2</sub>通気細胞外液灌流下、Ca<sub>v</sub>3.2発現HEK293細胞を用いてwhole-cell patch clamp法によりT型Ca<sup>2+</sup>チャネル電流（T-current）を経時的に測定した。T-currentは、サルファイドのNa<sub>2</sub>S 30 μM添加直後から著しく持続的に増大したが、ポリサルファイドのNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 30 μMを添加した場合は直後に微増した後、徐々に減少した。細胞外液に生体内濃度と同じ15 μM Zn<sup>2+</sup>が存在するとT-currentは著しく減少した。この条件下では、Na<sub>2</sub>SはT-currentをさらに大きく増大させ、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>はT-currentを緩徐に増加させた。Zn<sup>2+</sup> 15 μM添加後、Zn<sup>2+</sup>を含まない外液に戻すと、低下したT-currentはZn<sup>2+</sup>添加前の7~8割ほどまで回復した。この条件下でもNa<sub>2</sub>SはT-currentを顕著に増大させたが、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>はT-currentを添加直後に僅かに増加させた後、徐々に減少させた。最後に、N<sub>2</sub>の代わりにO<sub>2</sub>で通気した細胞外液灌流下ではNa<sub>2</sub>SのT-current増大効果は減弱した。以上より、サルファイド類は細胞外Zn<sup>2+</sup>存在下でCa<sub>v</sub>3.2活性をより顕著に亢進させるのに対し、ポリサルファイド類は細胞外Zn<sup>2+</sup>濃度が比較的低い時にはCa<sub>v</sub>3.2活性を軽度抑制し、Zn<sup>2+</sup>濃度が高い時には恐らく一部がサルファイドに変化してCa<sub>v</sub>3.2活性を緩徐に上昇させることが判明した。また、細胞外液中の溶存酸素濃度が高い場合、サルファイドは酸化されて恐らく硫黄酸化物やポリサルファイドに変化するため、サルファイドのCa<sub>v</sub>3.2活性亢進効果が減弱することが示唆された。

## A-3-4

## 徐放性H<sub>2</sub>S供与体GYY4137および硫化剤Lawesson's reagentはNa<sub>2</sub>SによるCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネル機能亢進効果を再現できない

○関口 富美子<sup>1</sup>、坂本 結菜<sup>1</sup>、南郷 優希<sup>1</sup>、笠波<sup>1</sup>、田邊 元三<sup>2</sup>、川畠 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>近畿大・薬・有機薬化

一次知覚神経に発現するCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルは、その細胞外ドメインに存在する191番目のHis残基に結合したZn<sup>2+</sup>により機能が抑制された状態にあり、Na<sub>2</sub>Sなどのsulfide類はこの亜鉛抑制を解除することでチャネル活性を亢進させて痛みを誘発することを我々は明らかにしている。また最近、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>などのpolysulfide類が、Ca<sub>v</sub>3.2の活性を逆に低下させるとの知見を得ている。一方、徐放性H<sub>2</sub>S放出薬であるGYY4137 (GYY) や硫化剤であるLawesson's reagent (LR) のCa<sub>v</sub>3.2活性への影響は未だ研究されていない。本研究では、Ca<sub>v</sub>3.2発現HEK293 (Ca<sub>v</sub>3.2-HEK) 細胞のT型 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流 (T-current) に及ぼすNa<sub>2</sub>S、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>、GYYおよびLRの効果と、それらに及ぼすZn<sup>2+</sup>の影響を検討した。Ca<sub>v</sub>3.2-HEK細胞におけるT-currentは、細胞外液を3 mL/minの速度で灌流する条件下、whole-cell patch clamp法により保持電位-80 mVから-20 mV、200 msの刺激電位を12 s間隔で繰返し与えて経時的に測定した。通常の外液中でのT-currentはNa<sub>2</sub>S 30 μMで増大し、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 30 μMで減少したが、緩和なZn<sup>2+</sup> chelatorであるtricine存在下では、Na<sub>2</sub>SとNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>の効果は消失または減弱した。一方、tricine存在下でZnCl<sub>2</sub> 30 μMを添加すると、Na<sub>2</sub>SとNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>の効果はいずれも回復した。通常の外液灌流下、GYYとLRはいずれも100 μMでT-currentを徐々に減少させた。生体内のZn<sup>2+</sup>濃度に相当する15 μMのZnCl<sub>2</sub>を添加するとT-currentは劇的に減少し、この状態でNa<sub>2</sub>S 30 μMを添加するとZnCl<sub>2</sub>を添加しなかった場合より遙かに著明なT-current増大がみられたが、GYYとLRはこの条件下でもT-currentを徐々に減少させた。以上より、Ca<sub>v</sub>3.2チャネル機能のsulfideによる亢進およびpolysulfideによる抑制はいずれもZn<sup>2+</sup>依存性であることが検証され、GYYとLRはZn<sup>2+</sup>の有無に関係なく、それら自身がCa<sub>v</sub>3.2に結合してチャネル活性を抑制する可能性が示唆された。

## 2型糖尿病に伴う有痛性末梢神経障害の発症におけるHMGB1の役割と起源：血小板の関与と白血球-血小板複合体形成の意義について

○坪田 真帆<sup>1</sup>、大東 麻哉<sup>1</sup>、圓尾 賢悟<sup>1</sup>、中野 遥<sup>1</sup>、佐久間 海地<sup>1</sup>、岩根 詩織<sup>1,2</sup>、関口 富美子<sup>1</sup>、友野 靖子<sup>3</sup>、西堀 正洋<sup>3</sup>、川畑 篤史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大・薬・病態薬理、<sup>2</sup>摂南大・薬・臨床薬学、<sup>3</sup>岡山大院・医歯薬・創薬研究推進

我々は、マクロファージ (Mφ) や血小板 (Plt) から細胞外に放出される核内タンパク high mobility group box 1 (HMGB1) が化学療法誘発性末梢神経障害の発症に関与することを明らかにしている。本研究では、高脂肪食摂取と低用量streptozotocin (STZ) 反復投与を組合せた2型糖尿病 (DM) マウスにおける有痛性末梢神経障害 (DPN) へのMφまたはPlt由来HMGB1の関与を検証し、単球(Mon) /Mφ、好中球 (Neu)などの白血球とPltの複合体形成の有無と意義を検討した。20日以上高脂肪食を摂取させたマウスに低用量 (50 mg/kg) streptozocin (STZ) を2回腹腔内投与することで2型DMモデルを作製した。侵害受容閾値はvon Frey法で測定し、細胞複合体の形成はF4/80 (Mφ)、CD115 (Mon)、Ly6G (Neu)、CD41 (Plt)、CD62P/P-selectin (activated Plt; aPlt) などに対する抗体を用いてflow cytometryにより解析した。2型DMマウスのDPN発症は、抗HMGB1中和抗体 (HAb)の反復投与により阻止され、liposomal clodronate によるMφ枯渇または作用機序の異なる抗血小板薬の反復投与によっても抑制された。高脂肪食摂取マウスにおいて、低用量STZ初回投与4日後に採取した血液ではPlt数減少、aPlt/Plt比の増加が認められたが、Mon-Plt、Neu-Pltなどの複合体数に変化は見られなかった。一方、同時期に採取した坐骨神経ではNeu数、Neu-PltおよびNeu-aPltの複合体数の有意な増加、Mφ数、Mφ-aPlt複合体数の増加傾向が認められた。ELISA法でHMGB1量を測定したところ、血小板中HMGB1量の減少傾向と血漿中HMGB1濃度の増加傾向が認められた。以上より、今回用いた2型DMマウスでは、DPN発症にMφや活性化されたPlt由来のHMGB1が関与することが示唆され、さらに、Pltと複合体を形成したMφやNeuが知覚神経周囲に遊走・浸潤していることが明らかとなった。

## 筋線維芽細胞の代謝に着目した新規線維化促進メカニズムの解明

○渡邊 風人<sup>1</sup>、瀧澤 宣郎<sup>1</sup>、末次 春菜<sup>1</sup>、吉岡 啓佑<sup>1</sup>、仲矢 道雄<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>九州大・院薬・疾患制御学、<sup>2</sup>名古屋大・環研・疾患制御学

線維化とは、コラーゲン等の細胞外マトリックスが過剰に産生され、組織に蓄積した状態である。この線維化は組織が正常な時には存在せず、線維化時にのみに出現する筋線維芽細胞という細胞群がコラーゲン等を過剰に産生することにより誘導される。心臓においては、常在する線維芽細胞が炎症をきっかけに筋線維芽細胞へと分化することが知られている。線維化は先進国の死因の約45%に関与すると報告されており、線維化に対する有効な治療薬の開発が望まれている。

種々のコラーゲン蛋白質を構成する全アミノ酸の約20%はプロリンである。従って筋線維芽細胞においてはプロリンの産生、翻訳機構が発達していると考えられる。しかしながら、筋線維芽細胞におけるプロリンの産生、翻訳機構発達メカニズムは不明な点が多い。

我々は、常在性の線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に関わる代謝酵素を網羅的に探索する中で、正常のマウス心臓にはほとんど存在せず、線維化したマウス心臓の筋線維芽細胞において特異的に発現が増加する分子として、分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ1 (BCAT1)を同定した。そしてさらに、BCAT1が心臓の筋線維芽細胞においてプロリンの産生、翻訳を促進する酵素、ALDH18A1、PYCR1、EPRSの発現を制御し、コラーゲン蛋白質の産生を促進することを見出した。実際、BCAT1欠損マウスに心筋梗塞モデル処置を施すと、野生型マウスの場合に比べ、梗塞処置後の心臓の線維化部におけるALDH18A1、PYCR1、EPRSの発現増加が有意に減弱した。その結果、BCAT1欠損マウスにおいては梗塞後心臓の線維化（コラーゲン蛋白質の産生）が抑制され、心機能の改善が見られた。以上の結果から、心臓の筋線維芽細胞においてBCAT1がプロリンの合成・翻訳を促進することでコラーゲン蛋白質の産生を促進することが明らかとなった。

## 心筋梗塞病態におけるミエロイド細胞由来TGF $\beta$ 3の病態生理学的意義解明

○梶浦 僚太、藤尾 慈

大阪大・薬・臨床薬効解析学

### 【背景・目的】

心筋梗塞(MI)は心不全の主要な発症原因の1つである。梗塞後に発症する心不全は治療抵抗性を示すことから新規治療法の開発は喫緊の課題である。MI後心不全発症過程では、ミエロイド細胞による炎症/抗炎症反応が大きな寄与を果たす。しかし、その理解は未だ不十分であり炎症制御機構の解明が求められている。Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )は心筋リモデリングにおいて多様な機能を有することが報告されているが、多くの研究は、TGF $\beta$  1に着目したものである。本研究では梗塞後心筋リモデリングにおけるミエロイド細胞のTGF $\beta$  3の機能を追求した。

### 【方法・結果】

C57BL/6J雄性マウスの左前下行枝を結紮することでMIモデルマウスを作製した。梗塞心に存在するミエロイド細胞におけるTGF $\beta$  3発現を蛍光免疫染色にて検討した。その結果、CD11b陽性ミエロイド細胞においてTGF $\beta$  3発現が確認された。そこで、ミエロイド細胞由来のTGF $\beta$  3の機能解明を目指し、ミエロイド細胞特異的なTGF $\beta$  3ノックアウトマウス (CKOマウス)を作製した。心エコー解析により心機能を評価したところ、CKOマウスではMI後の心機能低下が亢進することを見出した (MI-14日目における左室内径短縮率: WT  $30.9 \pm 5.6\%$ , CKO  $23.3 \pm 5.1\%$ ,  $P < 0.05$ )。また、組織学的検討の結果、CKOマウスにおいてMI後の左心室壁の菲薄化・線維化の亢進が確認された (左心室における線維化面積割合: WT  $21.1 \pm 6.7\%$ , CKO  $31.8 \pm 8.9\%$ ,  $P < 0.05$ )。MI後の心臓組織における血管形成への影響を検討した。MI-14日目の野生型及びCKOマウスを用いてCD31陽性細胞数を評価したところ、CKOマウスにおいて血管密度が減少することを見出した (左心室における血管密度: WT  $1.68 \pm 0.123 \times 10^3/\text{mm}^2$ , CKO  $1.46 \pm 0.0569 \times 10^3/\text{mm}^2$ ,  $P < 0.05$ )。

### 【結論】

ミエロイド細胞由来TGF $\beta$  3欠損は梗塞心における血管密度の減少、心機能の悪化と線維化の亢進を誘導することが明らかとした。これにより、ミエロイド細胞由来TGF $\beta$  3はMI後リモデリングにおいて心保護的な機能を有することが示唆された。

## B-1-3

### Cardioprotective effects of finerenone associated with the suppression of myocardial sodium buildup in salt/aldosterone-loaded rats

○ラフマン アサドウール<sup>1</sup>、達哉 澤野<sup>2</sup>、北田 研人<sup>1</sup>、武史 今村<sup>2</sup>、西山 成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>香川大学医学部薬理学、<sup>2</sup>鳥取大学医学部薬理学

Finerenone, a nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist, has demonstrated considerable cardioprotective benefit in clinical trials. However, its precise mechanism remains unknown. Here, we examined the impact of finerenone (10 mg/kg body weight by oral gavage) on myocardial injury and sodium accumulation in uninephrectomized (UNx) Sprague-Dawley rats with chronic aldosterone infusion and salt-loading through drinking water (1% NaCl) for 4 weeks.

Echocardiography and gene expression analyses revealed an adverse cardiac remodeling as well as diastolic dysfunction with preserved ejection fraction, while finerenone treatment completely prevented the cardiac dysfunction in these rats. Furthermore, sodium content in left ventricular tissues were markedly elevated in salt-loaded and aldosterone-infused UNx rats, but significantly reduced in rats with concomitant finerenone treatment. Moreover, finerenone treatment prevented the migration as well as polarization of macrophages in cardiac tissue and in an in vitro assay utilizing RAW264.7 cells. These data indicate that finerenone has the potential to mitigate cardiac dysfunction in salt-loaded and aldosterone-infused rats by suppressing sodium accumulation in left ventricular tissues. These effects of finerenone may attenuate the subsequent inflammation by macrophages and adverse cardiovascular remodeling.

## B-1-4

### hERG 電位依存性カリウムチャネル活性化のアロステリック制御機構

○古谷 和春<sup>1</sup>、和田 友睦<sup>1</sup>、コルテス アイアナ<sup>2</sup>、ボロビヨーフ イゴール<sup>2</sup>、ヨロフヨロボイ ヴラディーミル<sup>2</sup>、

喜多 紗斗美<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島文理大・薬・薬理、<sup>2</sup>カリフォルニア大デービス・生理

human *Ether-à-go-go-Related Gene* (hERG) チャネルは、心室筋細胞の活動電位再分極を担う電位依存性カリウムチャネルである。多様な薬物がこのチャネルを阻害し不整脈を引き起こすことが、創薬や臨床で問題となっている。そのため、薬物によるhERGチャネル遮断の構造基盤が盛んに研究されている。興味深いことに、ニフェカラントやアミオダロンなど臨床で用いられる多くのhERG遮断薬は、チャネルの電位依存的活性化曲線を左方に20~30 mVシフトさせる。これにより、通常の活性化閾値付近では逆説的に電流を増加させる効果を示す。今回我々は、この薬理作用に着目し、hERGチャネルの活性化に伴うポアドメインの構造変化とその制御機構について新しい仮説を提案する。まず、電気生理学的実験を行い、チャネルの開閉状態の変化に伴う薬物—チャネル相互作用の遷移を詳細に解析した。その結果、膜電位依存的な以下の過程が示唆された:

- 1) 遮断薬（ニフェカラント）は、脱分極時にチャネルの活性化ゲートが開くと細孔内の受容部位に到達し、イオン透過を遮断する。
- 2) 再分極時に活性化ゲートが閉じると、遮断薬はチャネルの細孔内に閉じ込められる。
- 3) 閉じ込められた遮断薬は、活性化ゲートの開閉平衡を開状態に偏らせる。
- 4) hERG電流が増加する膜電位では、薬物の解離速度がチャネルの閉鎖速度より速く、再開口後に薬物が遊離することで脱遮断が起こり、活性化チャネルが出現する。

さらに、電気生理学的実験から得られた速度論的パラメータを用いて、ニフェカラント—hERG相互作用のマルコフモデルの構築およびシミュレーションによる解析を行ったところ、電気生理学的実験で観察される薬物存在下のhERG電流特性が再現された。この機能的モデルは、チャネル細孔内の薬物がチャネルの電位依存的活性化をアロステリックに制御することを仮定している。最後に構造的な解析を行い、hERGチャネルの細孔内には開口時のみ存在する疎水性ポケットがあり、電位依存性を促進する遮断薬がそのポケット内で安定にチャネルと相互作用した。以上の結果より、ある種のhERG遮断薬は、細孔内でチャネルの閉口を妨げる楔（くさび）のように作用し、電位依存的な開口を促すと考えられる。

## B-1-5

### 心筋細胞の伸展誘発性張力増加反応の制御機構におけるTRPC6チャネルの役割

○山口 陽平<sup>1</sup>、金子 智之<sup>2</sup>、梶栗 潤子<sup>1</sup>、鬼頭 宏彰<sup>1</sup>、大矢 進<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大・院・医、<sup>2</sup>旭川医科大・医

心筋に発現する機械感受性チャネルであるTRPC6は、数分間にわたる伸展により活性化される緩徐な収縮力増大反応を制御していることが報告されている。しかし、数秒間の急激な伸展により生じるFrank-Starling機構に伴う心筋の急激な収縮力増大反応におけるTRPC6の役割は、未だ明らかでない。そこで、本研究では、TRPC6がFrank-Starling機構に伴う伸展誘発性収縮力増大反応にどのように関与しているかを調べた。野生型 (WT) とTRPC6ノックアウト (*Trpc6*<sup>-/-</sup>) マウスの心臓から酵素単離した心室筋細胞を用いて、その細胞を電気刺激して拍動させ、カーボンファイバーを用いて伸展を加え、収縮末期張力-長さ関係曲線 (ESFLR) を得た。Frank-Starling機構による心筋細胞の収縮力変化の指標であるESFLRの傾きは、*Trpc6*<sup>-/-</sup>マウスの心筋細胞ではWTマウスよりも有意に増大していた。WTと*Trpc6*<sup>-/-</sup>マウス心筋のトランスクリプトーム解析から、TRPC6の遺伝子欠損は細胞内Zn<sup>2+</sup>濃度 ( $[Zn^{2+}]_i$ ) の増大に伴い変化すると言われるMetallothionein 1と2のmRNAを増加させていた。さらに、Zn<sup>2+</sup>イメージングにより、*Trpc6*<sup>-/-</sup>マウス心筋細胞では、WTマウスに比べて $[Zn^{2+}]_i$ が増加していることが明らかになった。また、5  $\mu$ MのZn<sup>2+</sup>を含むTyrode溶液の灌流により心筋細胞の収縮力は顕著に増加したが、TRPC6活性化薬とZn<sup>2+</sup>トランスポーターの一種であるZIPの阻害薬はその増大を完全に抑制した。その一方、ZIPのmRNAとタンパク質の発現レベルは、WTと*Trpc6*<sup>-/-</sup>マウスの心筋細胞で変化していなかった。これらの結果から、TRPC6はZn<sup>2+</sup>トランスポーターの一種であるZIPの活性を制御して $[Zn^{2+}]_i$ を制御することで、伸展誘発性収縮力増大反応を調節していることが示唆された。

## B-1-6

### 高血圧モデルラットにおけるトウキ葉の降圧効果について

○糸山 健斗、小原 幸、鳥羽 裕恵、中田 徹男

京都薬大 臨床薬理

**[背景・目的]** 漢方薬の成分である”当帰”はセリ科の多年草植物である*Angelica acutiloba*の根から抽出され、更年期障害等に用いられている。当帰に含まれるリグスチリドには血管拡張作用、鎮静作用が報告されている。*Angelica acutiloba*の葉(トウキ葉)は、健康食品として利用されており、リグスチリドを含有しているが、血圧に対する作用は報告されていない。そこで、今回私たちはトウキ葉乾燥粉末の降圧効果とその作用機序を検討した。**[方法]** Wistar STラットを2群に分け、コントロール群(HT群)とトウキ葉投与群(HT+ANGL群)とした。両群ラットの右腎を麻酔下に摘出し、1週間の回復期の後、1.5%食塩水を2週間投与した。HT+ANGL群には食塩負荷に加え、トウキ葉含有食(トウキ葉 150 mg/kg/day)を投与した。週ごとに血圧をテールカフ法で測定し、飲水量・尿量を測定した。食塩負荷2週間後、大腿動脈にカニューレを留置し、自由行動下血圧、心拍数を測定するとともに、心拍変動解析にて自律神経活性の評価を行った。また、飼育期間終了後、血漿中クレアチニン値、血中・腎組織中ACE活性を酵素法で測定した。**[結果]** HT群、HT+ANGL群の飲水量に差はなく、両群に同等の食塩を負荷できた。一方、テールカフによる収縮期血圧はHT群で経時的に高値となり、HT+ANGL群では血圧上昇が有意に抑えられた。また、自由行動下観血的血圧測定による平均動脈圧の上昇もHT群に比しHT+ANGL群では抑制された。自律神経活性測定では、交感神経活性に群間差はなく、副交感神経活性はHT+ANGL群で活性化される傾向が認められた。血漿クレアチニン値に群間差はなく、両群ともに腎機能は保たれていた。血漿中ACE活性は群間差を認めないものの、腎組織中ACE活性はHT群に比し、HT+ANGL群で有意に低値であった。**[結語]** トウキ葉は、高血圧モデルとラットにおいて降圧作用を有することが示された。トウキ葉による降圧作用の機序に腎組織レニン・アンジオテンシン系の関与が示唆された。

## ミクログリアにおける細胞質mitochondrial DNA は LPS 誘導性IFN $\beta$ 産生を増強する

○中野 雅凪矢、中村 康輝、中島 一恵、森岡 徳光

広島大学・大学院医系科学研究所・薬効解析科学

【目的】 ミクログリアは脳内の免疫細胞であり、神経回路の編成や異物の貪食など脳内環境の恒常性維持に寄与する。一方、その過剰な活性化が神経炎症を惹起し、神経変性疾患病態の形成・増悪に関与することも知られている。近年、神経変性疾患患者や高齢者の脳内において、ミクログリアのミトコンドリア機能障害が観察され、その細胞機能の変調に関与する可能性が報告されている。しかしながら、ミクログリアの主要な細胞機能である炎症応答に対し、ミトコンドリア機能障害が及ぼす影響は不明である。第143回本会にて、電子伝達系複合体 I 阻害薬である rotenone によりミトコンドリア機能を抑制・障害したミクログリアにおいて、細胞質に漏出した mitochondrial DNA (mtDNA) が炎症刺激 (リボ多糖: LPS) による interferon (IFN)  $\beta$  の産生を増強することを報告した。一方、本増強反応における細胞質 mtDNA の直接的な関与の詳細については不明である。そこで、細胞質への mtDNA の漏出を模倣する目的で調製した mtDNA をトランスフェクションし、LPS誘導性 IFN  $\beta$  産生に与える影響を評価した。

【方法】 マウスミクログリア細胞株である BV2 細胞を使用した。mtDNA は BV2 細胞からミトコンドリア画分を単離・抽出することで調製した。IFN  $\beta$  の mRNA およびタンパク質の発現量は real-time PCR 法、ELISA 法によりそれぞれ解析した。Toll-like receptor 4 (TLR4) の阻害薬である TAK-242 は mtDNA 処置 30 分前に処置した。

【結果】 調製した mtDNA を単独処置した結果、濃度依存的に IFN  $\beta$  mRNA 発現量が有意に増加した。次に、mtDNA を前処置後に LPS を処置した結果、それぞれの単独処置群と比較し IFN  $\beta$  mRNA およびタンパク質発現量の有意な増加が観察され、両薬物処置によって相乗的な効果が示された。さらに、これらの相乗効果は TAK-242 の前処置により抑制された。

【考察】 本研究の結果、ミクログリアのミトコンドリア機能障害時に細胞質へ漏出した mtDNA は TLR4 受容体が駆動する細胞内シグナルを増強し、IFN  $\beta$  産生の亢進に関与することが明らかとなった。

## リゾホスファチジン酸受容体1は実験的自己免疫性脳脊髄炎における炎症および病態増悪に寄与する

○植村 凪<sup>1</sup>、松尾 凪紗<sup>1</sup>、谷山 一修<sup>1</sup>、中島 弘貴<sup>1</sup>、永安 一樹<sup>1</sup>、金子 周司<sup>1</sup>、植田 弘師<sup>2</sup>、白川 久志<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大・院薬・生体機能解析、<sup>2</sup>生産開発研・疼痛科学

【背景】 多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は中枢神経系の慢性炎症性疾患であり、脱髓と軸索変性を特徴とする。リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は、オートタキシンによって酵素的に产生される生理活性脂質であり、オートタキシンの抑制は MS モデルマウスの病態を改善することが知られているが、LPA の関与については不明な点が多い。LPA 受容体サブタイプの 1 種である LPA<sub>1</sub> は、中枢神経系に高発現することや炎症性サイトカインの産生に関与すること、末梢神経系における脱髓に関与することが知られている。そこで、本研究では MS モデルマウスにおける LPA<sub>1</sub> の関与について検討した。

【方法】 C57BL/6J 系雌性の野生型または LPA<sub>1</sub> 遺伝子欠損マウス (7-12 週齢) に MOG<sub>35-55</sub> ペプチドおよび免疫賦活剤を含むエマルジョンを背側部に皮下免疫することで、MS モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を惹起した。臨床スコアは病態に応じて 6 段階で評価し、摘出した L3-L5 の脊髄を用いて組織学的評価を行った。

【結果・考察】 LPA<sub>1</sub> 欠損マウスでは野生型と比較して臨床スコアが改善し、脱髓が抑制された。末梢免疫細胞でのみ LPA<sub>1</sub> を欠損する骨髄キメラマウスでは臨床スコアの改善が見られなかった。LPA<sub>1</sub> 欠損マウス脊髄では、Iba1 陽性細胞数および CD3 陽性細胞数の増大抑制が観察された。野生型マウスに対し LPA<sub>1</sub> アンタゴニスト AM095 を投与したところ、発症後の投与では臨床スコアの改善を示さなかった一方で、発症前投与を行うことにより臨床スコアが改善される傾向が認められた。さらに AM095 投与は脊髄において炎症性メディエーター (CCL2, IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , IL17A) および Th17 転写因子である Rorc mRNA 量の増大に対して抑制傾向を示した。これらの結果は、中枢神経系の細胞における LPA<sub>1</sub> の活性化が、ミクログリアの活性化やマクロファージの浸潤、Th17 細胞の浸潤を促進することにより、多発性硬化症モデルにおける炎症および病態の増悪に寄与していることを示している。

## マスト細胞・好塩基球の活性化への小胞体ストレスセンサー阻害薬KIRA6の影響

○松嶋 剛志<sup>1</sup>、岡本 花乃<sup>2</sup>、松井 優里<sup>2</sup>、梅田 渚<sup>2</sup>、吉井 美智子<sup>1</sup>、中川 直<sup>3</sup>、石井 香<sup>4</sup>、田中 曜生<sup>4</sup>、柳瀬 雄輝<sup>1</sup>、細井 徹<sup>3</sup>、小澤 光一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医系科学・治療薬効学、<sup>2</sup>広島大・薬・治療薬効学、<sup>3</sup>山陽小野田市立山口東京理科大・薬・臨床薬理学、<sup>4</sup>広島大・院医系科学・皮膚科学

【背景・目的】I型（即時型）アレルギーを罹患する患者は国内外で年々増加している。しかしながら、抗ヒスタミン薬等の既存の治療薬では効果が不十分である場合が多く、より効果的な治療薬の開発が求められている。I型アレルギーは、抗原-IgE抗体反応によりマスト細胞・好塩基球が活性化され、ヒスタミン等の炎症惹起物質を含む顆粒が放出（脱顆粒）されることで引き起こされる。そのため、マスト細胞・好塩基球の活性化を直接、かつ強力に抑制することができれば、有効なアレルギー治療薬となり得る。我々はこれまでに、ラット好塩基性白血病細胞株（RBL-2H3）は、抗原-IgE抗体刺激によって小胞体ストレス応答経路の1つであるIRE1-XBP1経路が活性化されること、また、IRE1 $\alpha$ 阻害薬であるKIRA6がRBL-2H3細胞の脱顆粒を抑制することを見出した。しかしRBL-2H3細胞はラット腫瘍由来細胞であるため、正常マスト細胞・好塩基球に同様の効果があるか不明であった。そこで本研究では、マウス骨髄由来マスト細胞（BMMC）とヒト由来正常マスト細胞・好塩基球を使用して、それらの細胞に対するKIRA6の影響を検討した。

【方法】初代培養マスト細胞として、マウス大腿骨髄細胞をIL-3存在化で培養した骨髄由来マウスマスト細胞（BMMC）を使用した。ヒト好塩基球、ヒトマスト細胞は、それぞれヒト末梢血と皮膚から分離した。IgE受容体を介したマスト細胞の活性化には、DNP-BSA（抗原）と抗DNP-IgE（IgE抗体）を使用した。ヒト好塩基球はドナー由来のIgE抗体を持つため、抗IgE抗体で刺激した。IRE1-XBP1経路の活性化はXBP1のスプライシングをRT-PCR法で測定した。脱顆粒は、ヒスタミン等と同時に遊離される $\beta$ -hexosaminidaseの酵素活性を指標として測定した。炎症性サイトカインのmRNA発現と放出は、それぞれ定量的PCR法とELISA法で測定した。

【結果・考察】本検討から、抗原-IgE抗体反応により正常マスト細胞においてもXBP1のスプライシングが増加することが示された。また、IRE1 $\alpha$ 阻害薬であるKIRA6は、初代培養細胞やヒト由来細胞の脱顆粒反応も強力に抑制することが示された。さらに、KIRA6は抗原-IgE抗体反応によるマスト細胞の炎症性サイトカインの産生・放出も抑制することが示された。以上の結果から、KIRA6は、マスト細胞・好塩基球に直接作用してアレルギー反応を強力に抑制する可能性が示された。今後、KIRA6のより詳細な抑制メカニズムを解明することで、従来の治療薬よりも強力にアレルギー反応を抑制できる新しい治療薬の開発に繋がると期待される。

## 喘息様症状におけるケモカインCCL28を介したTh2細胞浸潤の役割

○急式 杏樹、原 雄大、花里 文菜、松尾 一彦、中山 隆志

近畿大・薬・化学療法

（目的）CCL28は粘膜免疫において重要なケモカインであり、その受容体であるCCR3を介して好酸球を、CCR10を介してIgA抗体産生細胞を遊走する。これまでに、気管支喘息患者においてCCL28の発現が増加することが報告されているが、その病態への寄与については不明である。当研究室では、気管支喘息におけるCCL28の寄与について検討し、CCL28欠損マウスでは、喘息様症状が軽減すること、また、肺への好酸球及びTh2細胞の浸潤が減少することを明らかにした。さらに興味深いことに、CCL28欠損は、CCR3を発現する好酸球浸潤に影響を与えないことを見出した。これは、CCL28が好酸球浸潤の誘導以外の経路を介して喘息病態に寄与している可能性を示したものである。これまでにマウス脾臓T細胞より分化誘導したTh2細胞でのCCR10の発現が報告されている。そこで本研究では、CCL28-CCR10系の肺へのTh2細胞浸潤における関与の可能性について検討した。

（方法）気管支喘息モデルマウスは、メスのC57BL/6系統の野生型及びCCL28欠損マウスに、ニワトリ卵白アルブミン及び水酸化アルミニウムゲルを投与することで作製した。分子の発現はフローサイトメトリー法、免疫染色法及びreal-time PCR法にて、細胞遊走活性能はケモタキシスアッセイにて解析した。

（結果・考察）フローサイトメトリー法及び免疫染色法にて、喘息モデルマウスの肺に浸潤したTh2細胞の一部にCCR10が発現していることを見出した。さらに、肺に浸潤したTh2細胞は、CCL28により濃度依存的に遊走された。一方、Th2細胞にはCCR3も発現していたが、選択的CCR3阻害薬は、CCL28によるTh2細胞遊走をわずかに阻害したのみであった。また、好酸球の強力な遊走因子であるCCR3リガンドCCL11は、Th2サイトカインにより肺上皮細胞より有意に誘導された。また、CCL28欠損マウスの肺では、CCL11の発現が減少することを見出した。以上より、気管支喘息においてCCL28は、①CCR10によるTh2細胞の肺への直接的な遊走、②CCL11の誘導による好酸球の間接的な遊走の2つの役割を担うことで病態に関与していることが示唆された。

## B-2-5

### Probiotics: FK-23のマクロファージを介したTh17分化抑制

○藤田 隆司<sup>1</sup>、青山 朋子<sup>1</sup>、五藤 健児<sup>2</sup>、吉川 敏一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>立命館大・薬・分子薬効毒性、<sup>2</sup>ニチニチ製薬・中央研

プロバイオティクスは、慢性炎症性皮膚疾患である乾癬の治療に役立つ可能性がある。乾癬は過剰な免疫反応を特徴とし、皮膚細胞の急速なターンオーバーをもたらし、鱗屑、発赤、不快感を引き起す。プロバイオティクスは腸の健康を促進し、免疫機能を調節することが知られており、炎症を抑え、免疫系のバランスを整える役割を果たす可能性が示唆されている。これまでの研究では、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) FK-23株が、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおいて乾癬性皮膚症状を改善することを報告してきた。本研究では、FK-23の消化管に対する効果について調べた結果、Th17の分化が抑制される成績を得たので報告する。

マウスは、コントロール群 (CRL)、毛剃りした背中に7日間イミキモドを塗布した群 (IMQ)、事前に2%FK-23を飲ませIMQを塗布した群 (FK+IMQ) にわけた。マウスから小腸を摘出し、酵素処理により細胞分散させ、さらにPercoll密度勾配遠心により血球を調製した。細胞は、抗体と反応させフローサイトメトリー解析を行った。その結果、Lin<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>のTh17集団はIMQ群において増加し、逆にFK+IMQ群でCRL群レベルまで改善した。骨髄から調製したマクロファージと脾臓から調製したnaive CD4<sup>+</sup>細胞の共培養系において、FK-23はRor $\gamma$ t<sup>+</sup>Il-17<sup>+</sup>のTh17分化を抑制した。小腸と末梢血を用いたRNA-Seq解析では、FK-23がTh17を抑制作用することがわかった。以上のことから、FK-23は小腸-末梢血を介して皮膚へのTh17浸潤を抑制する結果、皮膚病態を改善することが強く示唆された。

## B-2-6

### SERPINファミリータンパクAntithrombin はC-type lectin family 1Aを介し好中球機能を制御する:天然タンパクと組換えタンパクの活性比較

○高橋 陽平<sup>1,2</sup>、Soe Soe Htwe<sup>3</sup>、友信 奈保子<sup>4</sup>、和氣 秀徳<sup>5</sup>、木下 理恵<sup>4</sup>、村田 等<sup>4</sup>、阪口 政清<sup>4</sup>、西堀 正洋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>岡山大・院医歯薬 創薬研究推進室、<sup>2</sup>川崎医療福祉大・医技 臨床検査学科、<sup>3</sup>ヤンゴン第一医科大 薬理学、<sup>4</sup>岡山大・院医歯薬 細胞生物学、<sup>5</sup>近畿大・医 薬理学

【背景】 SERPINファミリータンパクであるAntithrombin (AT) は、セリンプロテアーゼ阻害タンパクであり、血液凝固因子であるトロンビンやIXa、Xa因子活性を抑制する。一方、ATにはプロテアーゼ阻害活性とは独立した抗炎症作用や細胞保護作用があることが示唆されているが、その作用機序や分子メカニズムは不明な点が多い。我々はこれまでに、可溶性リガンドを細胞膜留型として発現させる独自のスクリーニング法により、血漿タンパクHRGの受容体としてC-type lectin family 1A (CLEC1A) を同定することに成功している (iScience, 2020; J Immunol, 2021)。今回、同様のスクリーニング法を用いてATの受容体を探索したところ、HRGと同じCLEC1Aが同定された。本研究では、ATがCLEC1Aのリガンドであることを確認すべく、ヒト好中球に対する制御作用を、ヒト血漿精製品ならびに組換えAT (rAT) を用いて検証した。

【方法】 同意を得た健常人の血液から密度勾配遠心法で好中球を採取し、各被験試薬を添加した後、好中球細胞形状解析、細胞外Reactive Oxygen Species (ROS) 産生測定、生存能解析を実施した。細胞形状解析では、Hoechst33342 (核) およびcalcein-AM (細胞質) で蛍光染色し、撮影・評価 (細胞面積・長径/短径比) を行った。また、走査電子顕微鏡 (SEM) でも観察を行った。ROS産生測定にはイソルミノールおよびHRPを用いて細胞外に放出されるROSを化学発光として検出した。生存能解析は、calcein-AM陽性細胞の比率と、WST-1試薬によるミトコンドリア脱水素酵素活性を指標とした。

【結果と考察】 ヒト血漿精製品ATおよびrATの添加により、濃度依存性のヒト好中球正球化が観察され、SEM像でも同様の結果が確認された。同様に、ATおよびrATの添加で濃度依存性に好中球の細胞外ROS産生が抑制された。生存能解析でも、2種類の解析法で生存能の向上が確認された。ヒト血漿精製品ATおよびrATで活性に差を認めなかった。トロンビン阻害薬アルガトロバンではこれらの作用は認めなかったため、ATのトロンビン阻害作用とは独立した作用であると推測された。上記のAT作用は抗AT抗体、抗CLEC1A抗体の添加で抑制された。以上の結果から、ATはトロンビン阻害作用とは独立した機構でCLEC1A受容体を介して好中球機能を制御していることが示唆された。AT濃縮製剤を投与した敗血症性DIC患者で、AT活性が高く維持された患者の生存率が高いと報告されており、ATの好中球機能制御効果が関与している可能性が示唆される。膜係留型タンパクリガンド発現系を用いた受容体探索法は、広い応用範囲があると期待される。

### B-3-1

## M<sub>2</sub>様マクロファージにおけるLRRC8A Cl<sup>-</sup>チャネル阻害によるNOX2-Nrf2-CEPBシグナル経路を介したIL-10転写・産生の抑制

松井 未来、梶栗 潤子、鬼頭 宏彰、山口 陽平、○大矢 進

名市大・院医・薬理

容積感受性陰イオンチャネルLRRC8Aは、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度を調整することで、様々な細胞機能を調節している。腫瘍微小環境（TME）において、M<sub>2</sub>様の腫瘍随伴マクロファージ（TAM）は、がん細胞免疫監視機構からの逃避を促し、がんの悪性化や予後不良に関与する。TAMは、抗炎症性サイトカインIL-10を産生し、TMEにおける制御性T細胞の腫瘍内への浸潤や活性化に寄与している。我々は、ヒト単球由来THP-1細胞をPMAおよびIL-4/IL-13添加によりM<sub>2</sub>様マクロファージ（M<sub>2</sub>-MAC）に分化させ、M<sub>2</sub>-MACのIL-10発現・産生におけるLRRC8Aの役割を検討した。M<sub>2</sub>-MACにLRRC8A阻害薬を投与すると、細胞内Cl<sup>-</sup>貯留による過分極反応が観察された。LRRC8Aを阻害すると、M<sub>2</sub>-MACにおけるIL-10転写・産生は有意に抑制された。M<sub>2</sub>-MACにおいて、LRRC8A阻害はリン酸化されたNrf2の核内移行を減少させ、Nrf2活性化はLRRC8A阻害によるIL-10転写抑制を逆転させた。次に、M<sub>2</sub>-MACにおけるNrf2シグナルの下流標的として、転写因子CEPBを同定した。また、LRRC8Aと機能連関するNADPHオキシダーゼ2（NOX2）を阻害すると、Nrf2-CEPB転写系が抑制された。以上の結果から、LRRC8A阻害薬は、NOX2-Nrf2-CEPBシグナル経路を介してM<sub>2</sub>-MACにおけるIL-10の転写を抑制し、LRRC8A阻害薬が制御性T細胞の腫瘍内への浸潤や活性化を抑制することで、腫瘍免疫監視の回避を抑制する可能性が示された。

### B-3-2

## IL-19シグナルとCCL2発現制御による肝線維化抑制メカニズムの解明

○東 泰孝<sup>1</sup>、小野 尚重<sup>1</sup>、藤田 隆司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪公大・獣医・薬理、<sup>2</sup>立命館大・薬・分子毒性

【背景と目的】インターロイキン（IL）-19はIL-10との相同性検索により発見されたサイトカインで、マクロファージなどの免疫細胞だけでなく、ケラチノサイトなどの非免疫細胞からも産生される。肝線維化は、慢性的な肝傷害に伴う炎症によって活性化された肝星細胞が、細胞外マトリックスを過剰に産生し蓄積することで生じるが、IL-19の関与は十分に解明されていなかった。本研究では、IL-19の肝線維化における役割とその調節機構を明らかにするため、四塩化炭素誘発肝線維化モデルを用いて、IL-19の免疫学的機能とメカニズムを解析した。【方法】雄性8-11週齢のBALB/c野生型（WT）マウスおよびBALB/cを遺伝的背景に持つIL-19遺伝子欠損（IL-19 KO）マウスを使用した。肝線維化モデルは、四塩化炭素0.5 mL/kgを週2回、8週間に渡って腹腔内投与することで作製した。最終投与から3日後に採血および肝臓組織の採材を行い、血清中の肝酵素（ALT、AST）測定、HE染色による組織学的評価、AzanおよびMasson trichrome染色による線維化評価、定量リアルタイムPCR、および蛍光免疫染色等を実施した。【結果】四塩化炭素誘発肝線維化モデルにおいて、血清分析ではIL-19 KOマウスのALT値がWTマウスに比べて有意に高かいことが確認された。また、AzanおよびMasson trichrome染色での定量評価から、IL-19 KOマウスでは線維化領域が有意に増大していた。さらに、IL-19 KOマウスの肝組織において、WTマウスと比較してalpha-SMAの発現が増加していた。mRNAレベルでは、IL-19 KOマウスの肝臓でTGF-betaおよびalpha-SMAの発現がWTマウスと比べて有意に亢進していた。in vitroアッセイでは、IL-19を高発現させたRAW264.7細胞が、四塩化炭素存在下でCCL2発現を抑制し、NIH3T3細胞の遊走を抑制することが示された。【考察】これらの結果から、IL-19はTGF-betaシグナルおよび肝星状細胞の遊走に影響を与え、肝線維化において重要な役割を果たしていることが示唆された。IL-19シグナルの増強は、肝線維化の新たな治療法として期待できる可能性がある。

### B-3-3

## TNBS誘起マウス大腸炎におけるpeptidylarginine deiminase 2および4の役割

○安田 浩之<sup>1</sup>、斉藤 美知子<sup>2</sup>、林 周作<sup>1</sup>、加藤 伸一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都薬大、<sup>2</sup>京都薬大・バイオサイエンス研セ

【背景・目的】 Peptidylarginine deiminase (PAD) は、タンパク質のアルギニン残基をシトルリン化する酵素であり、特にPAD4は好中球の核内に豊富に存在し、好中球細胞外トラップ (NETs) の誘導に関与していることが知られている。NETsは免疫応答の一種であり、種々炎症性疾患の病態との関連が指摘されている。PAD2はPAD4とは異なり細胞質に存在し、好中球ではなくマクロファージやその他の臓器に存在しているといわれている。興味深いことに、PAD2はマクロファージ細胞外トラップ (METs) の誘導に関与しているという報告もあり、PAD4のみならずPAD2もまた炎症性疾患の病態進展における役割が存在すると考えられる。本研究では、PAD2およびPAD4の炎症性腸疾患の病態における役割を明らかにするため、PAD2およびPAD4遺伝子欠損マウス (KO) を用いて、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘起マウス大腸炎モデルで検討した。【方法】 PAD2およびPAD4KOマウスはCRISPR/Cas9システムにより作製した。TNBS誘起マウス大腸炎は、麻酔下のマウス直腸内に30%エタノール溶液に溶解したTNBSを80 mg/kgの濃度で投与することで作成した。3日後、大腸を摘出しそれぞれ評価した。【結果】 野生型マウスにおけるTNBS誘起大腸炎では、顕著な体重減少、組織学的・肉眼的な潰瘍の発生、ミエロペルオキシダーゼ活性の増大、炎症性サイトカインの発現亢進、さらに細胞外トラップ誘導の亢進がみられたが、PAD2KOおよびPAD4KOマウスでは、いずれも抑制された。マウス腹腔好中球におけるNETs誘導は、PAD4KOマウスでは抑制されたが、PAD2KOマウスでは影響を受けなかった。一方、マウス腹腔マクロファージにおけるMETs誘導はPAD2KOおよびPAD4KOマウスのいずれにおいても影響を受けなかった。さらに、PAD2KOマウス由来マクロファージの炎症性サイトカイン発現は、WTマウスと比較して減少していた。【結論】 以上より、PAD4はNETs誘導を介して、PAD2はマクロファージのサイトカイン発現を介してTNBS誘起大腸炎の病態に関与していることが明らかとなった。

### B-3-4

## 肥満細胞に発現するGPR3は脱顆粒応答とサイトカイン産生を抑制する

○田中 茂<sup>1</sup>、浜川 雄輝<sup>1</sup>、柳瀬 雄輝<sup>2</sup>、白榎 紘子<sup>1</sup>、原田 佳奈<sup>1</sup>、秀 和泉<sup>1</sup>、酒井 規雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大・院医・神経薬理、<sup>2</sup>広島大・院医・治療薬効

【目的】 肥満細胞（マスト細胞）は主に組織の血管周囲に分布する造血幹細胞由来の細胞である。肥満細胞は細胞刺激に伴いヒスタミン、ケモカイン、サイトカインを放出し、血管透過性亢進や白血球・免疫細胞浸潤を促進し、荨麻疹や喘息などのアレルギー疾患増悪に関与する。一方、肥満細胞におけるcAMP上昇は、脱顆粒やサイトカイン産生を抑制し、炎症抑制に寄与することが報告されている。最近、我々はT細胞刺激後早期に、恒常的G $\alpha$ s活性化作用を有するGタンパク共役型受容体G-protein-coupled receptor 3 (GPR3)発現が上昇し、エフェクターT細胞抑制に寄与することを明らかにした (Shiraki et al., JPS 2022)。本研究では肥満細胞に着目し、肥満細胞におけるGPR3発現が脱顆粒に与える影響や、細胞刺激に伴うGPR3発現変化が肥満細胞からのサイトカイン産生に与える影響を検討した。

【方法】 肥満細胞には、マウス骨髄細胞をIL-3存在下に1ヶ月以上培養した骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) と、ラットRBL-2H3細胞株を使用した。脱顆粒には、IgE受容体刺激 (DNP-HSA) (10-100ng/ml)、ATP (10-300  $\mu$ M)刺激を用い、細胞からの $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離を測定することで脱顆粒の程度を評価した。RBL-2H3細胞への遺伝子導入には電気穿孔法 (NEPA21) を使用した。

【結果】 BMMCの脱顆粒は、cAMPアクチベーターPDE4阻害剤により濃度依存的に抑制された。GPR3は非刺激状態でBMMCの形質膜に発現し、GPR3ノックアウトBMMCでは野生型BMMCと比較してDNP-HSA刺激、ATP刺激による有意な脱顆粒亢進を認めた。さらに、RBL細胞へのGPR3遺伝子導入群ではmock遺伝子導入群と比較して、DNP-HSA刺激後の細胞内カルシウム上昇が抑制され、脱顆粒も有意に抑制された。さらに、BMMCをDNP-HSA (10ng/ml)又はATP (300  $\mu$ M)で刺激すると、刺激後1-2時間でGPR3発現上昇を認め、その後発現は急速に低下した。また、GPR3ノックアウトBMMCでは野生型BMMCと比較して、ATP (300  $\mu$ M)刺激後のTNF $\alpha$ , IL-6産生が有意に亢進した。

【結論】 肥満細胞でのcAMP上昇やGPR3発現は、肥満細胞刺激に伴う脱顆粒応答を抑制した。また、GPR3はT細胞と同様に、肥満細胞刺激後急速に発現上昇し、cAMP上昇を介して炎症抑制に寄与する可能性が示唆された。

## 腫瘍内マクロファージの低酸素誘導因子が腫瘍組織環境に及ぼす影響の検討

○松永 慎司、平川 遼、本間 拓二郎、富田 修平

大阪公立大・院医・分子病態薬理

腫瘍組織を栄養する血管は正常組織の血管とは異なり、不規則かつ蛇行している。また、その構造においても血管を構成する血管内皮細胞同士の結合は未熟であるため、血液漏出が生じる。そのため、このような血管が走行する組織では血流が乏しく、低酸素、低栄養の環境となる。これらは腫瘍組織において特徴的な組織環境であることから腫瘍微小環境と呼ばれ、腫瘍細胞の増殖・転移の一助となっている。また、抗がん剤、放射線抵抗性などの治療抵抗性の一因となるため、腫瘍微小環境を正常組織様環境に改変することは創薬標的の一つとなっている。

我々はこれまでに低酸素誘導因子・プロリン水酸化酵素 (HIF-PH) 阻害薬を担癌モデルマウスに投与すると腫瘍組織内に血管新生を促進するとともに血管成熟化を亢進すること。また、これらの現象が腫瘍組織内の低酸素領域を減少させ、治療抵抗性を抑制することを報告してきた。そして、これらの現象には腫瘍内のマクロファージ (MΦ) の関与が示唆されるが、腫瘍組織内MΦは腫瘍進展に寄与するとされるため、HIF-PH阻害薬が腫瘍組織内MΦにどのような影響を与えるか、そして、どのような分子機序によりこれらの現象を生じさせているかについての詳細は不明である。そこで本研究はHIF-PH阻害薬により生じる腫瘍内MΦの腫瘍血管新生機構の詳細を検討するため、MΦ特異的HIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$ ノックアウトマウス (KO) を用いて腫瘍血管形成に与える影響について検討を行った。

本研究では*Hif-1 $\alpha$* <sup>fl/fl</sup>および*Hif-2 $\alpha$* <sup>fl/fl</sup>マウスをLysM-Creマウスと交配し、MΦ特異的HIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$  KOを作製し実験を行った。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。腫瘍の体積は腫瘍径を計測することにより算出した。腫瘍血管の評価は血管内皮細胞マーカーであるCD31の染色により腫瘍内の血管性状について評価を行った。

その結果、MΦ特異的HIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$  KOにおいて腫瘍増大に対する影響は有意差を認めなかった。また、MΦ特異的HIF-1 $\alpha$  KOにおいては腫瘍内血管新生の抑制が認められたが、MΦ特異的HIF-2 $\alpha$  KOでは認められなかった。これらのマウスに対しHIF-PH阻害薬投与したところ、MΦ特異的HIF-2 $\alpha$  KO群では腫瘍増大抑制と腫瘍血管正常様化が認められたが、MΦ特異的HIF-1 $\alpha$  KO群ではこれらの作用は認められなかった。このことからHIF-PH阻害薬による腫瘍増大抑制と腫瘍血管正常様化はMΦ HIF-1 $\alpha$ の機能によることが示唆された。

## 脂質メディエーターの產生調節におけるABCA7の役割

○川野 智代<sup>1</sup>、山崎 杏珠<sup>1</sup>、小野 紗楓<sup>1</sup>、中神 心那<sup>1</sup>、高濱 謙太朗<sup>2</sup>、小川 直也<sup>2</sup>、堂前 純子<sup>3</sup>、淺井 遥<sup>1</sup>、福石 信之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>金城学院大・薬 薬理、<sup>2</sup>名古屋大・全学技術セ、<sup>3</sup>中部大・応用生物 応用生物

【目的】 ABCA7はATP-binding cassette (ABC) transporterファミリーの一つで、HDL粒子の生成とコレステロール逆転送に必要なABCA1と相同性が高いことが知られている。このABCA7は、免疫系の細胞に特に多く発現していることが明らかとなっているほか、脂質輸送に関連する可能性があることが推定されているが、その機能については不明である。本研究では、C57BL/6マウスより得た骨髓由来肥満細胞(WT)とABCA7欠損C57BL/6マウスより得た骨髓由来肥満細胞 (A7KO)の脂肪酸組成を比較すると共に、抗炎症性脂質メディエーター (SPMs) の產生量の違いについて検討した。

【方法】 WT及びA7KOの細胞膜脂肪酸組成を網羅的に調べる為、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いてリピドミクス解析を行った。また、WT及びA7KOにおける抗炎症性脂質メディエーター (SPMs) の產生量の違いについて検討する為、LC-MSを用いて定量分析を行った。

【結果・考察】 A7KOでは、WTと比較して2位の位置にアラキドン酸やドコサヘキサエン酸を持つホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミン含量の増加を認めた。これらのことから、A7KOではWTと比較して抗原抗体反応刺激によりアラキドン酸から產生される炎症性脂質メディエーターならびにSPMsの產生量に違いが見られる可能性が示唆された。そこで、抗原抗体反応刺激時のSPMsの產生量について定量分析したところ、A7KOではWTと比較してリポキシン (LX) B<sub>4</sub>の產生量が有意に増加していると共に、LXA<sub>4</sub>の產生量も増加傾向を示すことが判った。一方、他のSPMsの產生量については、両者の間に有意な差は認められなかつた。LXA<sub>4</sub>やLXB<sub>4</sub>はどちらもアラキドン酸から生成されるSPMsであり、生合成経路には各種リポキシゲナーゼ (LOX)関与している。従って、これらの結果は、ABCA7がアラキドン酸の生合成経路、リポキシゲナーゼの発現や活性化等に影響を与えている可能性を示唆していると思われた。ABCA7はアルツハイマー病 (AD) の発症リスクに関与する遺伝子の一つとして知られることから、脳内における炎症性脂質メディエーターやSPMsの產生量の変化とADの病態との関連についても興味が持たれる。

## PGD<sub>2</sub>代謝物15-keto-PGD<sub>2</sub>のヒトCRTH2受容体へのバイアス作用と役割解明

○篠原 万侑、蓮岡 奈苗、縣 美穂、福島 圭穂、藤野 裕道

徳島大・院薬・生命薬理

生理活性物質プロスタグランジンD<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) やPGD<sub>2</sub>代謝物は、Gタンパク質型受容体 (GPCR)に作用することで細胞内に様々なシグナルを伝達する。PGD<sub>2</sub>が作用する受容体にはDP受容体、Chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells (CRTH2) 受容体の2種のサブタイプが存在しており、その中でもCRTH2受容体にPGD<sub>2</sub>が作用すると、アレルギー疾患悪化に関与するシグナルが強く活性化されることが多数の研究グループより報告されている。また、CRTH2受容体はGiタンパク質に共役されているとされるが、Gqタンパク質と共に作用することも報告されている。ところで、PGD<sub>2</sub>は15-prostaglandin dehydrogenase (15-PDGH) により、13,14-dihydro-15-keto PGD<sub>2</sub> (15-keto-PGD<sub>2</sub>)に代謝されることでその活性が失われると一般的に考えられている。そこで、CRTH2受容体を介したシグナルに焦点を当て、PGD<sub>2</sub>およびその主要代謝物である15-keto-PGD<sub>2</sub>のシグナル伝達の差異を明らかにし、その生理的役割を探求することを目的とした。ヒトCRTH2受容体を安定に発現するHEK293細胞を用いて、15-keto-PGD<sub>2</sub>の結合親和性、cAMP産生抑制作用および細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度におよぼす影響を検討した。その結果、15-keto-PGD<sub>2</sub>はPGD<sub>2</sub>に比べ、やや親和性は低いものの有意な差は見られなかった。しかし、cAMP産生抑制効果はPGD<sub>2</sub>と比較して15-keto-PGD<sub>2</sub>は有意に高いことが確認できた。さらに、15-keto-PGD<sub>2</sub>は、PGD<sub>2</sub>と同程度の細胞内Ca<sup>2+</sup>動員作用を示した。PGD<sub>2</sub>はCRTH2受容体に作用して喘息などのアレルギー性の炎症を悪化させることが報告されている。その代謝産物である15-keto-PGD<sub>2</sub>は、受容体のバイアスリガンドとしてGiタンパク質シグナル伝達系を強く活性化させ、炎症抑制作用のある細胞内cAMP量をPGD<sub>2</sub>よりも減少させることで、アレルギー反応を増強させる可能性が示唆された。

## C-1-3

# 新規抗がん剤候補化合物ACA-28耐性骨肉腫細胞に対してACA-28のがん細胞増殖阻害効果を増強する方法 —新規抗がん剤候補化合物ACA-28耐性機構と抗がん作用増強におけるNRF-2の役割—

○泉 大地、高崎 輝恒、杉浦 麗子

近畿大・薬・分子医療ゲノム創薬

**【目的】**多くのがん細胞では細胞増殖を制御するERK経路が恒常的に活性化している。当研究室では、ERK活性が亢進したがん細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導する新規抗がん剤候補低分子化合物ACA-28を同定した。ACA-28の作用機序の詳細については未だ不明な点が残るもの、細胞内の活性酸素レベルを上昇させることが細胞死の一因と推測されている。一方、ACA-28はメラノーマや膵臓がん、骨肉腫など、さまざまがん種に対して有効であるが、抗酸化転写因子であるNRF-2のタンパク質量が多いがん細胞ほどACA-28に対する耐性を示す傾向があることが先行研究で明らかになっている。ACA-28耐性を示す膵臓がん細胞PANC-1に対して、ACA-28とNRF-2阻害剤を併用することでPANC-1が顕著なACA-28感受性を示す。そこで本研究では、ACA-28に耐性を示す骨肉腫細胞MG63においてNRF-2タンパク質量を検証するとともに、NRF-2の阻害がACA-28の抗がん活性効果にどのような影響をもたらすのか解析を行った。

**【方法】**①メラノーマ細胞SK-MEL-28と骨肉腫細胞MG63を用いて、Western blottingを行い、それぞれのNRF-2/GAPDH量を測定した。②骨肉腫細胞MG63において、NRF-2阻害剤ML385をfinal 10  $\mu$ M、ACA-28をfinal 3, 6, 10, 15, 30  $\mu$ Mを添加し、阻害剤の有無による細胞生存率の差をWST-8 assayによって測定した。

**【結果と考察】**SK-MEL-28とMG63のNRF-2/GAPDHを比較したところ、ACA-28に耐性を示すMG63のNRF-2/GAPDHはSK-MEL-28に比べて高かった。このことからNRF-2発現量が骨肉腫細胞MG63におけるACA-28耐性に寄与している可能性が示唆された。また、MG63において、NRF-2阻害剤であるML385とACA-28を併用した結果、ACA-28単独投与と比較して、MG63の細胞生存率が低下した。このことから、ACA-28に耐性を示すMG63細胞においても、NRF-2阻害剤を併用することでACA-28の抗がん活性効果を高める手段として有効であることが示された。

## C-1-4

# 分裂酵母プロテインキナーゼCのストレス顆粒移行の制御機構とMAPKシグナル経路活性化の関わり

○秦 しほみ、富本 尚史、高崎 輝恒、杉浦 麗子

近畿大・薬・分子医療ゲノム創薬

**【目的】**Protein Kinase C (PKC)は酵母からヒトまで高度に保存された蛋白質リン酸化酵素であり、下流のMAPK経路にシグナルを伝達することにより、遺伝子発現や細胞増殖、ストレス・炎症反応など多彩な生命現象を制御する。我々は、PKCの分裂酵母ホモログであるPck2が、定常時は細胞膜に局在するが、熱ストレス (HS) 条件下ではストレス顆粒 (SG) へと移行することでPck2/MAPKシグナルの過活性化を抑制することを明らかにしている。SGは熱や砒素、低酸素などのストレス環境下で形成される膜を持たない構造体であり、細胞のストレス適応機構として、さらにはがんや神経変性疾患などの治療標的として注目されている。高等生物のPKC $\alpha$ もストレスに応答してSGに移行することからも、PKCのSG移行メカニズムの解明は様々な疾患の病態を理解する上でも重要である。そこで本研究では、SG構成因子の多くが、「低複雑性領域 (LCR)」を介してSGに局在することに着目し、Pck2のSG移行メカニズムならびにMAPKシグナル経路の活性化に与える影響を解析した。

**【結果・考察】**LCR予測ソフトを用いて、Pck2内にLCRを同定するとともに、GFP融合LCR欠損Pck2を作成し、ストレス非存在時およびHS条件下で野生型Pck2との細胞内分布を比較した。その結果、野生型Pck2がストレス非存在下では細胞膜に局在するのに対し、LCR欠損Pck2は成長端に局在せず細胞質に分散した。一方、HS条件下ではLCR欠損Pck2も野生型Pck2と同様に凝集体を形成した。さらに、マイルドなHS条件下でLCR欠損Pck2は、正常Pck2より多くのSGと共に局在する凝集体を形成した。一方、下流のMAPK経路への影響を解析した結果、LCR欠損Pck2変異細胞は、Pck2ノックアウト細胞と同様に、MAPKシグナルが抑制されることを示唆する表現型を示した。以上の結果よりLCRはPck2の細胞膜局在に必要であること、さらにLCRはSG移行に対して抑制的に働くことが示された。以上の結果から、HS条件下においてある一定の閾値を超えない限りPck2をSGに移行させない事により、MAPKシグナルの過剰な活性化を防ぐシステムの存在が考えられる。

## C-1-5

### mTOR阻害剤Rapamycinはパーキンソン病モデル分裂酵母細胞においてヒト $\alpha$ -synucleinの凝集形成を抑制する

○山田 琉雅、杉本 恵崇、高崎 輝恒、杉浦 麗子  
近畿大・薬・分子医療ゲノム創薬

【目的】パーキンソン病（PD）はアルツハイマー病に次いで二番目に多い神経変性疾患であり、脳のドパミン神経の脱落によって発症する。PDの治療はレボドバに代表されるドパミン補充療法が主体であり、根本的治療法はいまだ開発されていない。PDでは中脳黒質の神経細胞において $\alpha$ -synuclein（ $\alpha$ -Syn）を主成分とした凝集体が形成されており、これがPDの神経細胞死に関与していると考えられている。そこで私は $\alpha$ -Synの凝集形成を抑制する薬剤を探索し、その作用機構を探ることで、PDの根本的治療につながるのではないかと考えた。

【方法】分裂酵母にGFPタグを付加したヒト $\alpha$ -Syn遺伝子を過剰発現させることで $\alpha$ -Synの細胞内分布および凝集形成過程を可視化した。さらに、mTOR阻害剤であるRapamycinを添加して蛍光顕微鏡下で $\alpha$ -Syn凝集形成への影響を観察した。オートファジー誘導活性は、オートファジーの基質であるAtg8のプロセシングをウェスタンブロッティング法で検出することにより測定した。

【結果・考察】Rapamycinを添加することで $\alpha$ -Syn凝集体を持つ細胞数は減少した。さらに作用機構が異なるmTOR阻害剤であるTorin 1を添加しても $\alpha$ -Syn凝集体を持つ細胞数は減少した。一方、これらの薬剤は、 $\alpha$ -Syn発現量には影響を与えたかった。このことより $\alpha$ -Synの凝集形成過程はmTORを介して制御されていることが示唆された。次に、オートファジーが $\alpha$ -Synの凝集抑制に関与しているか検証した。Rapamycinはマウス細胞においてmTORを介してオートファジーを誘導することが知られているが、分裂酵母においてはオートファジーを誘導しないことが明らかとなった。さらに、窒素飢餓により分裂酵母においてオートファジーを誘導した細胞においても、 $\alpha$ -Synの凝集体形成は影響を受けなかった。このことより $\alpha$ -Synの凝集抑制にオートファジーは寄与しないことが分かった。以上の結果より、 $\alpha$ -Synの凝集形成にはmTORが重要な役割を果たし、そのプロセスにオートファジーは関与しないことが示唆された。

## C-1-6

### 新規蛍光基質を用いた酸性セラミダーゼのリアルタイム活性測定法

○坪井 一人<sup>1</sup>、青木 太一<sup>1</sup>、五熊 さくら<sup>1</sup>、水田 啓太<sup>1,2</sup>、北風 圭介<sup>1</sup>、竹之内 康広<sup>1</sup>、石丸 浩靖<sup>1</sup>、岡本 安雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>川崎医科大・医・薬理、<sup>2</sup>奈良県立医科大・医

【背景・目的】酸性セラミダーゼ（AC）はセラミドを加水分解してスフィンゴシンを生成するリソソーム酵素である。スフィンゴシンはスフィンゴシン1-リン酸に代謝されて細胞増殖、遊走作用を発揮することから、ACはがん細胞の転移・浸潤に関わると考えられている。ACを豊富に発現するがん細胞では抗がん薬が効きにくいことも知られており、AC活性の簡便な測定法は新規抗がん薬の開発およびがんの悪性度の診断において有用であると考えられる。*N*-アシルエタノールアミン酸性アミダーゼ（NAAA）はACと構造・機能が類似したリソソーム酵素であり、NAAAの活性をリアルタイムに検出可能な蛍光基質としてPAMCAが知られている。本研究では、PAMCAの構造類似体であるLAMCAがACの新規蛍光基質として使用できるかについて、精製酵素と培養細胞を用いて検討した。

【方法】FLAGタグを付加したヒトNAAAおよびACをそれぞれヒト胎児腎臓HEK293およびHEK293T細胞に過剰発現させ、培養上清から精製酵素を調製した。精製酵素もしくはヒト前立腺がんLNCaP細胞のホモジネートを緩衝液（pH 4.5もしくは5.25）中でLAMCAと37°Cで反応させ、蛍光強度（Ex 360 nm/Em 460 nm）を5分毎に90分間測定し、酵素活性を算出した。

【結果・考察】精製ACはLAMCAを加水分解し、時間依存的な蛍光強度の増加が確認された。精製NAAAも精製ACの約半分の活性を示した。次に、NAAAが共存する条件下でのAC活性測定系の確立を目的として、両酵素を発現するLNCaP細胞のホモジネートにおけるLAMCA加水分解活性を測定した。本活性はACおよびNAAAに対するsiRNAで処理すると、それぞれ38%および50%抑制された。さらに、NAAA特異的阻害薬ARN077の存在下では、siRNA未処理細胞の活性の大部分（85%）はAC特異的阻害薬SOCLACの併用により阻害された。従って、LAMCAとARN077を用いることで選択的にAC活性をリアルタイムに測定できると考えられた。

## 一酸化窒素によるエピゲノム制御に基づく新型コロナウイルス後遺症発症機序

○森谷 祐斗<sup>1</sup>、久保田 翔<sup>1</sup>、大塚 勇輝<sup>2</sup>、森本 睦<sup>1</sup>、松下 洋輔<sup>3</sup>、徳増 一樹<sup>2</sup>、高杉 展正<sup>1</sup>、片桐 豊雅<sup>3</sup>、大塚 文男<sup>2</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>岡山大・院医歯薬・総合内科学、<sup>3</sup>医薬基盤研・生体機能分子制御

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 罹患者のおよそ3人に1人が長期間にわたる後遺症 (Long COVID) を発症するが、そのメカニズムはほとんど不明である。SARS-CoV-2感染初期では、サイトカインストームにより誘導型一酸化窒素合成酵素の発現が誘導され、過剰な一酸化窒素 (NO) 産生が惹起されることが報告された。生体内におけるNO産生の制御破綻は、多様な疾患発症と深く関わっており、主要な作用機序としてタンパク質への酸化修飾 (*S*-ニトロシル化) を介した機能／酵素活性調節が提示されている。最近、当研究室は主要なエピゲノム制御酵素であるDNAメチル基転移酵素 (DNMT) の*S*-ニトロシル化が酵素活性阻害と、これに続くエピゲノム変化 (DNA脱メチル化) を引き起こし、遺伝子発現をエピジェネティックに誘導することで細胞形質転換を惹起することを見出した。さらに、DNMT3Bの酵素活性には影響せず、本分子特異的に*S*-ニトロシル化を阻害する化合物 (DBIC) の作出に成功した。本研究では、NOによるエピゲノム制御に基づき、持続的な症状を呈するLong COVIDの発症機序を解析した。

Long COVIDに対するNOの病態生理学的関連性を検討するため、80人の臨床検体を用いて血漿中*S*-ニトロシル化タンパク質レベルの測定を行った結果、興味深いことに健常者と比較してLong COVID患者において*S*-ニトロシル化レベルが有意に高いことが認められた。この結果より、COVID-19罹患後においても依然としてタンパク質*S*-ニトロシル化が持続していることが示唆された。エピゲノム制御との関連性を評価するため、正常ヒト細胞を用いてNO誘発性DNA脱メチル化により誘導される遺伝子を網羅的に探索した。NOは低酸素誘導因子 (HIF) のDNA結合領域を選択的に脱メチル化することで、HIF結合を促進し標的遺伝子を誘導することが明らかになった。さらに、この機構により誘導される遺伝子の中でDBICにより顕著に抑制される遺伝子を同定した。最後に、これら遺伝子の発現をLong COVID臨床検体で評価した結果、健常者と比較して有意に発現上昇していることが認められた。以上より、Long COVID病態形成に対するNOによるエピゲノム制御の関与が示唆された。

## C-2-2

### Regulation of chromatin structure under COVID-19

○衣笠 泰葉、キン キヤエモントワイン、今井 由美子

野崎徳洲会病院附属研・メディカル感染システム

Virus infection affects chromatin structure in host cells along with dynamical changes in gene expression. Host cells activate anti-viral mechanisms to protect themselves while viruses manipulate the host's system to create a more favorable environment for their survival. Coronavirus disease-2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV2), has been spreading all over the world since 2019, leading to a wide range of severe symptoms. However, the specific ways in which SARS-CoV-2 affects host cells and alters chromatin regulation during infection remain unclear. We have investigated changes in chromatin structure in the PBMC of COVID-19 patient with various degrees of severity, using chromatin structure and histone modification analysis such as Hi-C and ChIP analysis. Severe patients tended to show severely affected chromatin patterns especially around genes in signaling pathways associated with virus infection. These results suggest that SARS-CoV2 may affect critical host cell systems, potentially contributing to the development of severe symptoms.

## C-2-3

### マトリセルラータンパク質SMOC1の内耳機能における役割の解析

○小野 和也、太田 岳、日比野 浩

大阪大・医・統合薬理

難聴は認知症にもつながる深刻な疾患である。音は、外耳、中耳を経て内耳蝸牛に達する。難治性難聴の多くは、蝸牛の障害による。ヒト遺伝性疾患に基づき難聴モデル動物を作成し、その病態生理を示すことは、複雑な蝸牛の仕組みと働きの理解のみならず、難聴の予防法や治療法の開発への手段となる。稀なワーデンブルグ無眼球症候群 (WAS) は、指趾・四肢の異常と小（無）眼球症を示す常染色体潜性の遺伝疾患であり、その原因遺伝子は *SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1)* である。SMOC1は、Ca<sup>2+</sup>結合ドメインなどを有するマトリセルラータンパク質の一つである。いくつかの臓器では細胞外環境を調節し、組織形成や創傷治癒などに関わる。WASの患者には難聴が伴うことがあるが (Jamashidi et al., 2017) 、その機序に加えて、SMOC1の蝸牛における役割も不明である。本研究では、WASの指趾や眼球の異常を再現する *SMOC1*欠損マウスの聴覚器を解析した。このマウスは、約8割で難聴を示した。形態学的には、意外にも、蝸牛を伝搬する音のパスウェイの入口と出口の窓を覆う径200 mmの円形状の可動膜が、完全あるいは不完全に骨化していた。他の難聴モデル動物では未検出であるこの表現型の機序解明を進めることにより、蝸牛の成立機構や病態の解明が展開すると考えられた。

## C-2-4

### Protective Role of Muscle-Derived Apelin in a Mouse Model of PICS-Like Syndrome

○今井 由美子<sup>1</sup>、衣笠 泰葉<sup>1</sup>、新谷 勇介<sup>2</sup>、橋本 均<sup>2</sup>

<sup>1</sup>徳洲会病院・研究所・メディカル感染システム、<sup>2</sup>大阪大・薬学・神経薬理

Post-Intensive Care Syndrome (PICS) involves physical, cognitive, and psychological impairments that arise after prolonged ICU treatment, with increased significance after COVID-19. While various factors contribute to PICS, this study focused on ARDS and immobilization to investigate the role of the Apelin-its receptor APJ axis in PICS development. We aimed to explore how the muscle-derived Apelin influences inflammation, muscle atrophy, and neurofunctional impairment in PICS, using mouse model and clinical data from ICU survivors.

A PICS-like mouse model was induced via ARDS and immobilization, assessing hallmark features of PICS, including lung inflammation, muscle atrophy, and depression-like behaviors. Apelin-deficient and muscle-specific Apelin-overexpressing mice were used. Single-cell brain transcriptomics were performed. Clinically, a cohort study of COVID-19 ICU survivors analyzed plasma Apelin, IL-6, and peripheral blood mononuclear cells RNA sequencing.

The PICS-like mouse model demonstrated key characteristics of PICS, with suppressed Apelin-APJ signaling in muscle and circulation. Apelin-deficient mice showed worsened symptoms, while muscle-specific Apelin overexpression alleviated them. Brain single cell transcriptomic analysis revealed the upregulation of pathways related to depression and neurodegeneration, especially in microglia and endothelial cells. These effects were more pronounced in Apelin-deficient mice and reduced in mice with muscle-specific Apelin overexpression. ICU-acquired weakness patients had low plasma Apelin, elevated IL-6, and upregulated depression and Alzheimer's-related pathways.

Taking together, muscle-derived Apelin mediates inter-organ communication driving PICS. While further research is needed to understand the complexity of PICS in humans, targeting the Apelin-APJ axis presents a potential therapeutic strategy for PICS prevention and treatment.

## C-2-5

### ホホバオイルを用いたスポーツマッサージによる運動誘発性炎症軽減の可能性

○松本 裕<sup>1</sup>、鈴木 克彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東海大・院医・看護、<sup>2</sup>早稲田大・スポーツ科学

【目的】激しい運動は筋損傷や炎症を誘発し、筋組織から炎症を引き起こす様々なサイトカインが放出される。欧米では、アスリートの疲労回復等を目的としてホホバオイル (jojoba oil; JO) 等を用いたスポーツマッサージが行われている。ラットのカラゲニン誘発足浮腫に対するJOの抗炎症作用が報告されており、本研究ではJO塗布により筋損傷に伴う運動誘発性炎症を予防できるかを検討した。また、JO塗布後の血中遊離脂肪酸上昇が報告されており (Matsumoto et al, *Medicina*, 2019) 、トレッドミル走行時間が延長するかを検討した。【方法】8週齢の雄性ヘアレスマウスを、28匹用いた。マウスをトレッドミルに馴化させる目的で、すべてのマウスに実験1週間前にトレッドミル走を負荷した。予備飼育最終日にマウスを無作為に、コントロール群 (naïve control; NA群) 、JOを塗布した安静群 (JO群) 、JOを塗布しない運動群 (NA+Ex群) 、JOを塗布した運動群 (JO+Ex群) の4群に分けた (各群7匹) 。運動群のマウスには、トレッドミル走を負荷する30分前に背部に体重1gあたり4 $\mu$ LのJOを塗布した。運動群のマウスはトレッドミルを用いて持久走を行い (分速20m、傾斜7%) 、疲労困憊直後に血液、ヒラメ筋、腓腹筋、心臓、肝臓を採取した。その後、血漿サイトカイン濃度 (IL-1 $\alpha$  /  $\beta$ 、IL-6等) 、生化学的指標 (AST、ALT等) 、各組織における炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6等) の遺伝子発現レベルを解析した。【結果】運動後の血漿ではALT、AST、ALP、BUN、CK、IL-6の上昇がみられたが、NA+Ex群とJO+Ex群の比較では、これらの指標および走行可能時間に有意差はみられなかった。JO+Ex群はNA+Ex群と比較して、ヒラメ筋においてIL-1 $\beta$ およびIL-6の mRNA レベルが有意に低下した他、腓腹筋ではIL-1 $\beta$ の遺伝子発現レベルが有意に低下した。【結論】トレッドミル走30分前のJO塗布は、疲労困憊に至るまでの走行時間や血漿サイトカイン濃度に影響を及ぼさなかった。しかし、活動筋局所における運動誘発性炎症を遺伝子発現レベルで抑制した。以上のことから、JOを用いたスポーツマッサージが、運動によって誘発される筋損傷や炎症の予防に有用である可能性が示唆された。

## C-2-6

### 針状ダイヤモンド電極による抗がん薬動態の皮膚内連続計測および心電図との同時モニタリング

Ahmad Norzahirah Binti<sup>1</sup>、緒方 元気<sup>2</sup>、太田 岳<sup>1</sup>、栄長 泰明<sup>2</sup>、○日比野 浩<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪大・院医・薬理、<sup>2</sup>慶應大・理工・化学

体内の薬物濃度のリアルタイム計測は、基礎薬理学研究のみならず、医療現場でも鍵となる。これまで、我々は、理工系先端素材である「針状ダイヤモンド電極」を用いて、モデル動物の内耳や脳における「局所」の薬物濃度動態を経時にモニタリングするシステムを構築してきた。ダイヤモンド電極は、先端径が10~40  $\mu$ mであり、酸化還元反応を介して電気化学的に体液中の化合物を検出する。本研究では、慢性のみならず急性の心障害を誘引する抗がん薬ドキソルビシンを題材にして、皮膚を対象とした計測プラットフォームを創出した。実験では、麻酔したラットの真皮に針状ダイヤモンド電極を挿入し、ドキソルビシンを静注した。すると、局所の薬物濃度動態は、投与後、数分以内に認められる一時的で鋭いピークと、30分~1時間後に観測される緩徐な上昇の二相性を示した。この針状ダイヤモンド電極を心電図計と組み合わせることで、皮膚の薬物濃度の変化と、副作用であるQT延長の度合いを、同時にリアルタイムで追尾できた。本研究で提案した技術は、局所のpharmacokineticsと全身のpharmacodynamicsの関係を詳しく知る手掛かりになるのみならず、次世代のリアルタイムTDMを実現するウエアラブルデバイスの基礎になる可能性がある。

## ポドサイトにおける転写因子OASISは高リン負荷誘発腎障害に関与する

○長曾我部 恽也、藤尾 慶  
大阪大・薬・臨床薬効解析学

【背景】リンは生体に必須の栄養素であるが、高リン状態は腎障害などを惹起する。特に高リン負荷が尿細管傷害に関わることがよく知られている一方で、血液濾過障壁として働く糸球体上皮細胞ポドサイトに対する作用には不明な点が多い。他方、我々はポドサイトにおける転写因子Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS)の発現上昇が、糖尿病関連腎臓病などの病態形成に関与することを明らかにしてきた。本研究では、高リン負荷誘発腎障害の新たなメカニズム解明を目的に、ポドサイトのOASISに着目して検討を行った。

【方法・結果】まず、リンとOASISとの関連性を検討するため、培養ポドサイトを高リン培地（通常5.6 mMのリン濃度に2 mMを負荷）に暴露させ、OASISのタンパク発現を経時的に評価した。ウェスタンブロッティングの結果、高リン暴露後3時間においてOASISの発現上昇が確認された。次に、リンによるポドサイトのOASISの発現上昇が腎臓に与える影響を検討するため、ポドサイト特異的OASISノックアウト (cKO) マウスを作製した。そのcKOマウスとコントロール群に高リン食 (2%) を16週間与えた。その結果、オスにおいて、腎障害の指標である尿中アルブミンクレアチニン比 (ACR) には差が無かった一方、腎機能マーカーである血清シスタチンc値はcKOマウスで有意に抑制された。また、PAS染色を用い、糸球体障害指標の一つである糸球体硬化について評価したところ、cKOマウスで有意に糸球体硬化が抑制された。糸球体硬化の進展には糸球体内皮細胞の欠落が関与すると言われている。そこで、免疫組織化学染色を用い、内皮細胞マーカーであるCD31の発現について評価したところ、cKOマウスで有意にCD31の発現が維持されていた。他方、メスにおいては、ポドサイトのOASIS欠損は尿中ACRおよび血清シスタチンc値、糸球体硬化指数に影響を及ぼさなかった。

【結論】転写因子OASISはポドサイトにおけるリンシグナルに関与しており、特にオスにおいて高リン負荷誘発腎障害のメカニズムの一つとして考えられる。また、高リン食負荷モデルでは、オスとメスで腎障害誘発機構に違いがあることが示唆された。本研究成果は、ポドサイトのOASISが高リン血症時の腎障害治療標的となりうることを示すものである。

## 腎急性虚血再灌流後に誘導される細胞外マトリックスSPARCの役割

○鳥羽 裕恵<sup>1,2</sup>、金 徳男<sup>2</sup>、高井 真司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都薬科大・薬・臨床薬理、<sup>2</sup>大阪医科薬科大・医・薬理

【背景・目的】細胞外マトリックスsecreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) は正常な腎臓における発現が低いが、高血圧や糖尿病、慢性腎臓病等、慢性疾患のモデル動物の腎臓で誘導されることや、SPARC遺伝子をノックアウトすると腎障害が軽減することが報告されている。我々は以前、SPARCによる線維化の機序に、細胞外マトリックス分解酵素ADAMTS1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-1) 産生が関与していることを報告している。今回、急性腎障害の主要原因である虚血再灌流障害におけるSPARCの役割について検討した。

【方法】7週齢の雄性BALB/cマウスを用い、右腎摘後に左腎動脈を45分間阻血し、再灌流から3日後に採血と腎臓の摘出を行い実験に用いた。血清クレアチニン、血中尿素窒素を測定し、腎臓におけるMCP-1、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1、collagen I、SPARC、ADAMTS1のmRNA発現をRT-PCR法にて検討した。また、ヘマトキシリソエオシン染色、アザン染色と免疫染色によるSPARC、ADAMTS1の検出を行った。

【結果】腎虚血再灌流によって腎/体重量比、血清クレアチニン、血中尿素窒素が上昇し、MCP-1、TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1、collagen I発現が増加した。虚血再灌流群の腎組織では、髓質領域の拡大と尿細管間質の線維化、尿細管管腔の拡大が認められた。SPARCとADAMTS1のmRNA発現も有意に増加し、組織学的評価から、SPARCは線維化や障害尿細管上皮細胞を中心に発現していること、また、ADAMTS1発現部位と重複していることが明らかになった。さらに、SPARC発現量は血清クレアチニン、血中尿素窒素と、MCP-1、TGF $\beta$ 、collagen I、ADAMTS1発現量と有意に正に相関していた。

【結論】虚血再灌流障害時に誘導されるSPARCは、腎機能低下と炎症や線維化に関連した分子と正の相関が認められ、急性腎障害のマーカーや治療ターゲットとしてのSPARCの有用性を示すことができた。また、さらなる検討が必要であるが、SPARCによる線維化の機序にADAMTS1増大が寄与している可能性が示唆された。

## 単離臍島を用いたミトコンドリアタンパク質p13の機能解析

○今岡 伸太朗<sup>1</sup>、野口 雅史<sup>1</sup>、岩田 圭子<sup>1</sup>、新谷 紀人<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>和歌山県立医科大・薬・薬品作用、<sup>2</sup>大阪大・院薬・神経薬理

【目的】ミトコンドリアの機能異常は、糖尿病をはじめとした様々な代謝性疾患と関連する。当研究室ではII型糖尿病モデルマウスの臍ラングルハンス氏島（臍島）で発現減少する因子として分子量約13kDaのミトコンドリア局在タンパク質p13を同定した。また全身体のp13欠損（p13-KO）マウスを用いた検討から、本マウスでは糖負荷後の血中インスリン增加の抑制が見られること、本マウスから調製した臍組織切片では平均臍島面積の低下や小型臍島の増加が見られることを見出し、p13の欠損によるミトコンドリアの機能異常がインスリン分泌や臍島の発達に悪影響を及ぼす可能性を示している。そこで本研究では、これら表現型の分子病態を臍島レベルで理解することを目的とし、p13-KOマウスから単離した臍島を用いて形態学的解析や分子生物学的解析を行なった。

【方法】生後8-12週齢のICRを遺伝的背景に有するp13-KOマウスと、同腹の野生型マウスを実験に用いた。マウスの体重、体長、脛骨長を測定し、body mass index (BMI)、Lee index、相対骨長などの体格指數を算出した。臍島はコラゲナーゼ法により単離した。具体的には、麻酔処理を行ったマウスを開腹し、総胆管の十二指腸接続部を結紮し、総胆管からカニュレーションによりコラゲナーゼ液を臍臓内に充填した。さらに、臍臓を摘出、破碎し、顕微鏡下で臍島を単離した。形態学的解析としては単離臍島のサイズやアスペクト比を評価した。また、インスリンやグルカゴンの内分泌マーカーのほか、内分泌系前駆細胞の分化に関わる*Ngn3*等のマーカーのmRNA発現量をqPCR法で評価した。

【結果】p13-KOマウスは野生型マウスと比較し、BMIやLee indexが低値を示すほか、発育異常の指標として知られる相対骨長は高値を示した。またp13-KOマウスの単離臍島では、平均サイズは野生型と比較して有意に減少していたが、アスペクト比はほぼ同等で野生型と同様の楕円状の形を示すことがわかった。一方qPCR解析からは、グルカゴンの有意な増加が見られる他、臍β細胞系譜の分化マーカーとして知られている*Ngn3*が約260倍と顕著に増加していた。

【結論】p13-KOマウスは野生型と比較して、単に痩せているのではなく発育不全にある可能性が示された。またp13-KO臍島では臍島サイズが減少することが改めて確認された他、グルカゴンや*Ngn3*の増加を併せて考えると、内分泌系の分化に異常があることが示唆された。以上p13は臍島の正常な発生と機能発現に必要な因子であることが示された。

## DNA-encoded libraryを用いたグレリン受容体作動薬の創製

○椎村 祐樹<sup>1,2</sup>、伊藤 幸裕<sup>3</sup>、林 到炫<sup>2</sup>、岡田 咲良<sup>3</sup>、松井 一真<sup>1</sup>、岩田 想<sup>2</sup>、鈴木 孝禎<sup>3</sup>、佐藤 貴弘<sup>1</sup>

<sup>1</sup>久留米大・分生研・遺伝情報、<sup>2</sup>京都大・院医・分子細胞情報、<sup>3</sup>大阪大・産研・複合分子化学

### 緒言

グレリンは、胃から分泌されるペプチドホルモンで、Gタンパク質共役型受容体のひとつであるグレリン受容体に作用して、成長ホルモンの分泌促進、摂食亢進、エネルギー代謝調節といった多彩な生理作用を示す。近年、グレリン受容体作動薬のアナモレリンが、唯一のがん悪液質治療薬として本邦で承認された。一方、グレリン様作用から期待される筋肉増強作用が微弱であるとして欧米では承認されていない。そこで本研究では、がん悪液質治療の選択肢拡大またはアナモレリンの薬効の最大化を目指して新規グレリン受容体標的薬の開発を行った。

### 方法

化合物ライブラリーには、フラグメントDNA-encoded library（フラグメントDEL）を用いた。精製グレリン受容体タンパク質とフラグメントDELの結合実験を行い、20フラグメントペアのグレリン受容体結合化合物を抽出した。さらに、グレリン受容体への結合親和性の上位のものから順にフラグメントペアを連結させた連結化合物を合成した。その後、グレリン受容体発現細胞を用いたシグナルアッセイを行うことで化合物をスクリーニングした。

### 結果

グレリン受容体作動薬（化合物A）を同定した。化合物Aは単独で弱いグレリン受容体活性を持つことに加えて、アナモレリンのpositive allosteric modulatorとして作用した。

### 考察

化合物Aは、ago-PAMと呼ばれるタイプの化合物に分類される。既存のグレリン受容体標的薬にはago-PAM活性を持つものはないため、フラグメントDELを用いた化合物スクリーニングによって、新たな特性を持ったグレリン受容体作動薬を見出すことができた。

### C-3-5

## 蛇毒由来成分ボトロセチンの組み換え体rBot2とその変異体mrBot2がマウス血小板凝集(agglutination)に与える影響

○狩野 泰輝<sup>1</sup>、菅沼 由唯<sup>1</sup>、小川 律妃<sup>1</sup>、大原 玄徳<sup>1</sup>、池本 和久<sup>1</sup>、一瀬 千穂<sup>1</sup>、松井 太衛<sup>2</sup>、近藤 一直<sup>1</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大・医・薬理、<sup>2</sup>藤田医科大・医療・生物

【目的】リストセチン惹起血小板凝集は血小板膜上Glycoprotein Ib (GPIb) とvon Willebrand因子 (VWF) を介した血小板凝集(agglutination)の評価に用いられるが、動物種により効果に差があるため、現在マウスなどを用いた基礎研究では、同様の凝集を引き起こす惹起薬として蛇毒由来タンパク質のボトロセチンが使用されている。しかし、ボトロセチンはワシントン条約で粗毒の入手自体が困難であることから、我々は組換えボトロセチン (rBot2) を作成し、ヒト血小板を用いて構造と機能の検討を行ってきた。今回、マウス血小板においてrBot2惹起性凝集を評価した。さらにGPIb結合部位のアミノ酸を変化させた変異導入ボトロセチン (mrBot2) の効果も検討したので報告する。

【方法】マウス (ICR・6ヶ月齢・雄) から三種混合麻酔下にてクエン酸添加採血を行い、多血小板血漿 (PRP) を得た。血小板数を50万/ $\mu$ Lに調整後、rBot2 (0.5~2.0  $\mu$ g/mL) 及びmrBot2 (0.5~1.5  $\mu$ g/mL) を添加し、血小板凝集能を光透過法にて測定した。

【結果】rBot2は0.5、1.0、1.5、2.0  $\mu$ g/mL添加でそれぞれ最大凝集率47.8±17.4、86.0±3.5、87.0±1.9、62.8±6.9 %、凝集曲線下面積1398±594、4964±496、4929±243、2942±229と凝集が見られた。しかし2.0  $\mu$ g/mL添加では1.5  $\mu$ g/mLよりも凝集は減弱していた。mrBot2は0.5、1.0、1.5  $\mu$ g/mL添加でそれぞれ最大凝集率8.4±4.1、46.8±20.8、81.8±14.2 %、凝集曲線下面積314±263、2566±1263、5222±955と凝集が生じた。

【考察】我々の作成したrBot2を用いてマウス血小板によるGPIbとVWFを介した凝集能を調べることができた。この結果は既に報告したヒト血小板を用いた結果と同様であり、rBot2を種差の影響を受けるagglutinationの評価薬として用いられる可能性が示唆された。一方で、今回mrBot2はマウス血小板を凝集させたが、ヒト血小板では血小板凝集をむしろ抑制することがわかつており、この原因究明も含めてボトロセチンの更なる機能解明を進める必要がある。

### C-3-6



## エリスロポエチンによるインスリン抵抗性改善機序の解明

○岩倉 健斗、鳥羽 裕恵、小原 幸、中田 徹男

京都薬科大・薬

【背景】当研究室は、造血を呈さない低用量のエリスロポエチンが糖尿病や高血圧モデルラットの腎障害や血管障害に対し、phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) /Akt経路活性化を介して抑制効果を発揮することを報告してきた。PI3K/Akt経路はインスリンシグナルの中核であることから、エリスロポエチンがインスリン抵抗性を改善すると仮説をたて、インスリン抵抗性モデルラットを用いて検討している。これまで、経口糖負荷試験やHOMA-IR測定の結果から、エリスロポエチンによる耐糖能改善作用を確認している。

【目的】エリスロポエチンによるインスリン抵抗性改善機序について、スクロース慢性負荷インスリン抵抗性モデルラットを用いて検討した。

【方法】飲料水として12%スクロース水を10週間することでインスリン抵抗性モデルラットを作製し、エリスロポエチンを最後の4週間皮下投与した (75 U/kg、週3回)。投与期間終了時に肝臓と脂肪組織を摘出し、リン酸化Akt (Ser473)、リン酸化signal transducers and activators of transcription (Stat) 3 (Try705) の発現をウェスタンブロッティング法で検討した。また、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )、interleukin-6 (IL6)、interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ )、arginase-1 (Arg1) のmRNA発現をRT-PCR法で検討した。

【結果】肝臓におけるリン酸化Aktの発現は全群間で有意差を認めなかつたが、リン酸化Stat3発現はエリスロポエチン投与により増加した。一方、エリスロポエチン投与は脂肪組織におけるリン酸化Stat3発現に影響を与えたかった。また、エリスロポエチンは肝臓においてマクロファージM1マーカーであるTNF  $\alpha$ 発現を有意に減少し、他のM1マーカーであるIL6、IL1 $\beta$ を減少、M2マーカーのArg1を増加する傾向にあった。脂肪組織ではIL1 $\beta$ のみがエリスロポエチンにより減少した。

【結論】スクロース慢性負荷ラットにおけるエリスロポエチンのインスリン抵抗性改善機序には、肝臓におけるStat3経路活性化を介したM2>M1マクロファージの分化促進が関与している可能性が示唆された。