

A1-1

ミクログリアにおけるカテプシンBの増大と細胞内の分布変化は、酸化ストレスならびに炎症反応を介して認知障害をもたらす

○Ni Junjun¹、武 洲^{1,2}、林 良憲¹、中西 博³(¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学、²九州大学大学院歯学研究院OBT研究センター、³安田女子大学薬学部薬理)

Purpose: It is widely believed that oxidative stress and inflammation are major causative factors for the progressive decline in motor and cognitive functions that occur during normal aging in humans and animals. The activation of microglia is the main cellular source of oxidation products and proinflammatory mediators in the brain. However, how oxidative stress and chronic neuroinflammation arise during aging remains unclear. In this study, we intended to demonstrate the novel function of Cathepsin B (CatB) in the age related oxidative stress and chronic neuroinflammation. **Methods:** 2 month-old and 20 month-old wild-type and CatB^{-/-} mice were used for learning and memory tests by step through passive avoidance tests. The cumulative potentiation of the field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) slope and dendritic spine density were also examined. Inflammation were examined by immunoblotting of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and oxidative stress were examined by checking the level of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) in the hippocampal lysate of 2 month-old and 20 month-old wild-type and CatB^{-/-} mice. Intra-lateral ventricle transplantation of CatB over-expressed microglia in middle-aged mice, learning and memory were examined by Y-maze and novel objective tests. **Results:** In this study, we found that genetic ablation of cathepsin B (CatB) in mice significantly reduced the generation of reactive oxygen species (ROS) and neuroinflammation and improved cognitive impairment during aging. In cultured microglia, pharmacological inhibition of CatB significantly reduced the generation of mitochondria-derived ROS and proinflammatory mediators induced by L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe), a lysosome-destabilizing agent. In the CatB over-expressing microglia after treatment with LLOMe, which mimicked the aged microglia, CatB leaked in the cytosol is responsible for the degradation of the mitochondrial transcription factor A (TFAM), resulting in the increased generation of mitochondria-derived ROS and proinflammatory mediators through impaired mtDNA biosynthesis. Furthermore, intra-lateral ventricle injection of LLOMe-treated CatB over-expressing microglia induced cognitive impairment in middle-aged mice. **Conclusion:** These results suggest that the increase and leakage of CatB in microglia during aging are responsible for the increased generation of mitochondria-derived ROS and proinflammatory mediators, culminating in memory impairment.

A1-2

チベット薬Ratanasampil は、低酸素によるミクログリアにおける酸化ストレスならびにNF- κ B活性化に依存した炎症反応を抑制する○孟 ジエイ¹、朱 愛琴³、倪 軍軍¹、林 良憲¹、中西 博⁴、武 洲^{1,2}(九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学、²九州大学大学院歯学研究院OBT研究センター、³Qinghai Provincial Hospital/Institution of Geriatric、⁴安田女子大学薬学部薬理)

YIA

[Background] We have found that Ratanasampil (RNSP), a traditional Tibetan medicine, improves the cognitive function of mild-to moderate Alzheimer's disease (AD) patients living at high altitude as well learning and memory in an AD mouse model (Tg2576). However, mechanism underlying the effects of RNSP is unknown. We hypothesized that the effects of RNSP dependent on regulating microglia-related neuroinflammation, the key hallmark of AD. We have verified our hypothesis using the hypoxia-reoxygenation-induced inflammation in MG6 microglia. Cells exposed to hypoxia (1% O₂) for 6h, then returning to normoxia (20% O₂) for various time points with cell viabilities were determined using cell counting kit-8. We next examined the production of inflammatory cytokines by MG6 cells during exposed to hypoxia/reoxygenation. The mRNA level of iNOS, IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β and Arginase-1 were measured by real-time PCR. Immunofluorescence images of Mit SOX Red, 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG, the oxidative DNA damage marker) and p65 with Hoechst-stained nuclei in MG6 cells exposed to normoxia (20% O₂) or H/R in the presence or absence of RNSP (10 μ mL). To elucidate the novel mechanism of RNSP on the anti-inflammation in MG6 cells, the activation of nuclear factor κ B (NF κ B) was examined by western blotting. **[Results]** we found that hypoxia significantly reduced the viability of MG6 cells From 6h. Pretreatment with RNSP significantly ameliorated the hypoxia-reoxygenation (1% O₂ for 6h, normoxia for 12h, H6/R12) induced cytotoxicity of MG6 cells at 10 μ g/mL. Pretreatment with RNSP significantly suppressed the H6/R24-induced pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF- α , and iNOS and increased the anti-inflammatory factors, including TGF- β 1 and Arginase-1. In addition, H/R-induced oxidative stress was significantly suppressed by RNSP pretreatment. The expressions of p-I κ B α were significantly inhibited by pretreated with RNSP in the MG6 cells, the nuclear localizations of p65 were significantly inhibited by RNSP, respectively. **[Conclusion]** These observations suggest that RNSP suppressed the H/R-induced inflammatory responses through inhibition of oxidative stress and the activation of NF κ B in MG6 cells. Therefore, RNSP may be beneficial in preventing H/R-induced neuroinflammation of AD. **[Acknowledgement]** This work was supported by funding from the National Natural Science Foundation of China (No. 81560711), Qinghai Province Natural Science Foundation (No.2012-Z913).

A1-3 線条体における領域別ドパミンシグナル解析

YIA

○杉山 慶太¹、黒岩 真帆美¹、首藤 隆秀¹、福田 孝一²、西 昭徳¹
(¹久留米大学医学部薬理学講座、²熊本大学大学院生命科学研究部(医学教育)形態構築学分野)

線条体は運動、情動、報酬などの重要な機能に関与している。これらの機能には神経伝達物質のドパミンが深く関連することが知られている。線条体において、ドパミンは直接路のドパミンD1受容体を介してcAMP/PKAシグナルを活性化し、間接路のドパミンD2受容体を介してcAMP/PKAシグナルを抑制する。近年、プロジェクトーム解析やストリオソーム・マトリックス構造解析により、線条体へ投射する神経線維や受容体の詳細な分布領域が解明されてきている。しかしながら、線条体における領域別のドパミンシグナル制御については未だ不明である。このことから本研究では線条体を①吻側部、②中間部内側、③中間部外側、④中間部最外側、⑤尾側部、⑥最尾側部の6領域に分類して検討を行った。

C57BL/6マウスの線条体スライスを前述の6領域に分割し、D1受容体アゴニスト(SKF81297)、D2受容体アゴニスト(quinpirole)付加によるcAMP/PKAシグナルの伝達効率を評価した。評価指標として、cAMP/PKAシグナル下流に存在するDARPP-32、AMPA受容体GluA1サブユニットおよびERK2のタンパク発現量とリン酸化レベルを解析した。

D1受容体アゴニスト付加によるDARPP-32(Thr34)、GluA1(Ser845)、ERK2(Thr202/Tyr204)のリン酸化反応は、②中間部内側で強く、⑤尾側部では弱いことが明らかとなった。さらに中間部領域(②、③、④)の比較で反応性にそれぞれ違いがみられることも判明した。これらの反応性の差異はホスホジエステラーゼ(PDE)10A阻害薬の併用により消失した。また、⑤尾側部ではアセチルコリン合成酵素の発現量が多く、ムスカリン受容体アンタゴニスト(atropine)の併用により⑤尾側部のD1受容体アゴニストによる反応性が増強した。D1受容体の発現量は⑥最尾側部で少ないが他の領域では差が認められなかった。D2受容体アゴニストによるリン酸化反応については領域毎の顕著な差異は認められなかった。

以上の結果より、線条体におけるドパミンシグナル制御の領域特異性は直接路ドパミンD1受容体発現ニューロンに認められ、その反応性の差異はPDEやアセチルコリンシグナルによってもたらされていることが明らかとなった。

A1-4 血液脳関門への加熱式タバコ抽出物の影響の検討

YIA

○木村 郁哉、道具 伸也、高田 芙友子、松本 純一、力武 真衣、縄田 理永、江口 夏海、
山内 淳史、片岡 泰文
(福岡大学薬学部薬学疾患管理)

【目的】血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)は脳血管内皮細胞および細胞間隙に存在するタイトジャンクション(TJ)により形成される脳微小血管特異的な障壁機構である。脳内の恒常性維持に関与するこのBBBの機能は喫煙により障害される。近年普及しつつある加熱式タバコは燃焼を必要としないため、従来の紙巻きたばこ喫煙で生じる燃焼由来物質摂取による有害事象のリスク低下が期待される。しかし加熱式タバコ喫煙による有害事象が報告されつつある。そこで加熱式タバコであるPloom TECHの抽出物を用いて、加熱式タバコ含有成分のBBB機能に対する影響を明らかにすることを企てた。

【方法】Ploom TECHは水、グリセロール、プロピレングリコールからなる液体を気化させタバコカプセル中のタバコ葉からニコチンなどの成分を抽出し、吸引するデバイスである。各溶媒で抽出したPloom TECHのタバコ葉抽出物(Ploom TECH Extract: PTE)を培地で希釈して使用した。3週齢Wistarラットから単離培養した脳血管内皮細胞(RBEC)を用いたin vitro BBBモデルに各PTEを処理し、24 hr後の経内皮電気抵抗値(TEER)およびNa-F透過係数を測定した。各PTEのRBEC傷害作用はWST assayにより、RBECに発現するTJ関連タンパク質(ZO-1、occludin、claudin-5)量はWestern blot法により測定した。

【結果・考察】in vitro BBBモデルへの各PTEの処理により有意なTEER値の減少及びNa-F透過係数の増加が生じた。このとき各PTEによるRBECの生存率への影響は認められなかったことから、各PTEは細胞傷害を起こすことなくBBB機能を低下させると考えられる。また、各PTEのうち水抽出物はZO-1、occludin、claudin-5の発現量を、グリセロールおよびプロピレングリコール抽出物はclaudin-5の発現量を減少させた。従って、PTEはTJ関連タンパク質を減少させてBBB機能を障害すると推測される。各PTEにはニコチンが含まれるが、ニコチン単独処理はTEER値およびNa-F透過係数に影響を与えなかった。以上、BBB機能は加熱式たばこ含有成分によって障害され、その過程におけるニコチンの寄与は低いことが示唆された。

A1-5

メタンフェタミン反復投与後の退薬時に発現する認知機能障害におけるカンナビノイドCB₁受容体の関与

○福森 良、山本 経之、山口 拓
(長崎国際大学薬学部薬理)

目的: 覚せい剤メタンフェタミン (MAP) の反復投与は、マウスやラットにおいて行動感作による再燃現象や感覚情報処理機能の障害を引き起こし、覚せい剤精神病のモデルとして知られている。また、これらの現象は投与時だけでなく、退薬後も長期間にわたって影響が持続することが臨床上重要視されている。しかしながら、これまでの報告は投与直後の急性作用に対するものがほとんどであり、反復投与された後の退薬時における長期的な影響については十分に検討されていない。そこで本研究では、MAP長期反復投与後の退薬時における認知機能について、カンナビノイドCB₁受容体の観点から行動薬理学的に検討した。

実験方法: 実験動物は、CB₁受容体遺伝子欠損 (CB₁KO) 雄性マウスまたは遺伝的対照群としてのICR系雄性マウス (野生型) を用いた。MAP (1.8mg/kg) は1日おきに30日間皮下投与した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。MAP投与30分後に自発運動量を測定し、自発運動量亢進作用 (行動感作) を検討した。また、30日間のMAP投与終了後から退薬し、退薬10および30日後に新奇物体認識試験を用いて認知機能を評価した。

実験結果: MAP反復投与によって、野生型マウスの自発運動量は投与回数に依存して有意に増加した。さらに退薬後の再投与によっても、自発運動量は著しく亢進し、行動感作が認められた。この行動感作が認められたマウスは、退薬10および30日後に新奇物体認識試験における認知機能が障害されていた。一方、CB₁KOマウスの自発運動量は、MAP投与時では投与回数に依存した増加が認められなかったが、退薬後の再投与時によって野生型マウスと同様に増加した。一方、MAP退薬後に発現した認知機能障害は、CB₁KOマウスでは認められなかった。

結論: 以上の結果から、MAP反復投与による行動感作の形成およびMAP反復投与後の退薬時に認められる認知機能障害には、CB₁受容体が促進的に関与していることが示唆された。

A1-6

アクチン細胞骨格による樹状突起スパインの形態制御

○根本 隆行、Hikmawan Wahyu Sulistomo、武谷 立
(宮崎大学医学部機能制御学講座薬理学分野)

大脳皮質神経細胞は互いの連絡部位である多数のシナプスによって伝達を行い、経験・学習・記憶など様々な刺激条件の下でそれらシナプスの数を増減あるいは形態を変化させている。シナプスは神経軸索上のシナプス前部と樹状突起上のスパインと呼ばれるシナプス後部から構成されている。樹状突起スパインは、脳機能の発達・成熟に伴って細長い形からより神経伝達物質を受容しやすいキノコ型および切り株型へと形態を変化させる。スパインの構造的な基盤としての役割を担っているのはスパイン内部のアクチン細胞骨格である。スパインのアクチン細胞骨格は、直線状および分枝状アクチン線維の重合と脱重合がアクチン結合タンパク質により調節されることで、スパインの形態変化を巧みに制御している。近年、アクチン細胞骨格を制御するアクチン結合蛋白質の遺伝子変異や機能低下を認める精神発達遅滞患者の存在が報告された。それらの患者のスパインは異常な形態を呈しており、その形態の異常程度と高次脳機能の障害程度に強い相関があった。このことはアクチン細胞骨格制御に伴うスパインの形態変化が高次脳機能と密接に関わっていることを示唆させるものであるが、そのスパイン内部のアクチン細胞骨格制御機構については未だ不明な点が多い。私たちは以前、アクチン細胞骨格制御因子の一つであるFhod3フォルミン蛋白質を同定し、Fhod3がマウス胎生期の神経発達に必要不可欠であることを報告した。しかしながら、成獣マウス脳におけるFhod3の発現および機能については明らかでない。私たちはまず、成獣マウス脳におけるFhod3の発現解析を行なった。解析の結果、Fhod3蛋白質は大脳皮質の特定領域の神経細胞に発現していた。さらに、初代培養大脳皮質神経細胞を用いてFhod3の神経細胞内の局在解析を行なった結果、Fhod3は樹状突起スパイン内部において高い集積率を示していた。これらの結果は、Fhod3が特定の神経細胞のスパイン内部でアクチン細胞骨格を制御していることを示唆させるものであった。大脳皮質神経細胞におけるFhod3の機能を明らかにするために、脳組織Fhod3欠損マウスを作成し、*in vivo*および*in vitro*による解析を進めている。本会では、神経細胞のアクチン細胞骨格制御に関する最新の知見をふまえて、Fhod3の成獣マウス脳における機能解析結果について紹介したい。

A2-1

オキサリプラチン誘発性末梢神経障害疼痛モデルマウスにおけるPACAP/PAC1受容体シグナリングの関与

○栗原 崇¹、上田 隆拓²、長島 涼太²、豊岡 尚樹³、高崎 一郎²、宮田 篤郎¹(¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理、²富山大学工学部生命工学科生体情報薬理、³富山大学工学部生命工学科生体機能性分子工学)

【目的】オキサリプラチン(OXA)は進行性・転移性大腸がんによく用いられている抗がん剤であるが、手足のしびれ、疼痛、異常冷感などの末梢神経障害が用量制限有害作用として問題視されている。しかし、これら末梢神経障害に対する有効な予防法の確立は未だなされていない。我々はこれまでに、PACAP(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)特異的受容体(PAC1受容体)が脊髄アストロサイトの活性化を介して疼痛慢性化に寄与することを見出し、またイン・シリコスクリーニング法を用いることで、世界初の有機小分子PAC1受容体拮抗薬PA-8等を選別してきた。本研究では、脊髄アストロサイトの活性化が、その病態形成に重要な関与をしていることが近年示唆されているOXA誘発末梢神経障害疼痛モデルマウスを用い、PACAP/PAC1受容体シグナリングの関与の可能性について検討した。

【方法】雄性ddYマウス(6~9週齢)を使用した。OXA誘発末梢神経障害モデルは、OXA(2 mg/kg)を腹腔内に単回投与することで作製した。機械的アロディニアはvon Frey刺激毛を用いた後肢の逃避閾値測定で、冷的アロディニアは後肢足蹠へのアセトン(10 µL)適用後1分間における疼痛関連行動を評価した。

【結果】OXA投与により機械的アロディニア(投与後3~5時間をピークに2週間程度持続)、および冷的アロディニア(投与後4日をピークに10日間程度持続)が誘発された。ペプチド性PACAP受容体拮抗薬(PACAP6-38)およびPA-8の脊髄くも膜下腔前投与は、OXA誘発機械的・冷的アロディニア両者を抑制した。PA-8は腹腔内前投与でも両アロディニアを抑制した。また、PACAP(100 pmol)の脊髄くも膜下腔単回投与は、2週間程度持続する冷的アロディニアを誘発したが、VIP(100 pmol)の投与は無効であった。

【考察】脊髄PACAP-PAC1受容体シグナルは、OXA誘発機械的・冷的アロディニア発症に関与することが示唆された。また、PA-8はOXA誘発末梢神経障害に対して有効な鎮痛薬となる可能性が示唆された。

A2-2

学習・記憶過程におけるグリコーゲン合成の生理学的意義の検討

○神戸 悠輝、中島 優、栗原 崇、宮田 篤郎

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理)

貯蔵型の糖であるグリコーゲンは、中枢神経系においてアストロサイト特異的に存在していることが知られており、エネルギー需要の高まりに応じて神経細胞を栄養することで神経可塑性に寄与することが報告されている。我々は培養アストロサイトへのPACAP、VIPおよびノルアドレナリンの曝露や、受動回避学習試験の後に恐怖記憶の学習に関わる脳領域においてグリコーゲン合成が活性化されることを見出しているが、この生理学的な意義は明らかではない。そこで、本研究ではグリコーゲン合成を活性化するシグナルメカニズムの検討を行った。前脳由来の培養アストロサイトにPACAP、VIPおよびノルアドレナリンを曝露すると、その6時間後に有意なグリコーゲン量の増加が観察された。このPACAPによるグリコーゲン量の増加はPKA阻害剤である、H89およびRp-8-Br-cAMPSでは限定的に、Akt阻害剤であるWortmanninおよびLY294002で完全に抑制されることから、Aktシグナルを介して引き起こされる可能性が示唆された。さらに、マウスを受動回避学習試験に供し、記憶獲得6時間後の内側前頭前皮質(mPFC)、扁桃体および海馬に含まれるグリコーゲン量を測定すると、海馬特異的なグリコーゲン量の増加が観察された。これらのグリコーゲン合成の活性化メカニズムを解析するために、グリコーゲンの合成および分解に関係する遺伝子の発現をqPCR法で解析すると、PACAPを曝露した培養アストロサイトにおいて、グリコーゲン合成に関わるグリコーゲン結合タンパク質であるProtein targeting to glycogen(PTG)遺伝子が有意に増加し、グリコーゲン分解に関わるグリコーゲンホスホリラーゼ(PYGB遺伝子)およびグリコーゲン脱ブランチ酵素(Agl遺伝子)が有意に減少した。さらに、記憶獲得後の海馬に加えて、記憶想起後のmPFCにおいてもPTG遺伝子の有意な増加が観察された。以上の結果から、in vivoとin vitroの両条件下において、PACAPおよびノルアドレナリンのシグナルによってグリコーゲン合成が活性化されることが観察されるとともに、グリコーゲン量の増加の背景にはグリコーゲン合成系の活性化と、グリコーゲン分解系の抑制が協奏的に重要である可能性が示された。

A2-3

The PACAP in the VMH increases food intake by modulating the expression of neuropeptides in the mouse hypothalamus

YIA

○Nguyen Thanh Trung¹, Yuki Kambe¹, Takashi Kurihara¹, Norihito Shintani²,
Hitoshi Hashimoto², Atsuro Miyata¹
(¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体情報薬理、²大阪大学大学院薬学研究科神経薬理)

PACAP is a pleiotropic neuropeptide and it is well-established that PACAP regulates appetite. However, the mechanism how PACAP regulates appetite remains unknown. Here, we attempted to elucidate whether PACAP is involved in the regulation of appetite. Intracerebroventricular injection of PACAP antagonist, PACAP₆₋₃₈ reduced food intake in WT mice. PACAP-deficient mice showed a decrease in food intake in the fasting/refeeding paradigm. PACAP mRNA level was increased significantly by fasting in the whole hypothalamus. The deficiency of PACAP led to a decrease in the expression level of an orexigenic neuropeptide, *AgRP*, however, that of an anorexigenic neuropeptide, *POMC*, increased after refeeding. By fasting, the PACAP mRNA was increased in the VMH region but not in the PVH region of hypothalamus. The infection of PACAP-expressing adeno-associated virus in the VMH region resulted in an increment of the food intake after 8 hours of the refeeding. These results suggested that appetite in mice was enhanced by increment of PACAP expression in the VMH via the modulation of expression level *AgRP* and/or *POMC*, indicating that blockade of PACAP signaling might be a potential strategy for developing of novel anti-obesity drugs.

A2-4

感覚情報伝達における脊髄後角アストロサイト亜集団の役割

○高露 雄太¹, 松田 烈士¹, 吉原 康平¹, 桂木 龍一¹, 岡 嵩晃¹, 田島 諒一¹, 棟田 翔¹,
山根 拓也¹, 齊藤 秀俊¹, 御子柴 克彦², Taylor Verdon³, 井上 和秀⁴, 津田 誠¹
(¹九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野、²(独) 理化学研究所脳神経科学研究センター発生神経生物研究チーム、
³University of Basel Department of Biomedicine、⁴九州大学大学院薬学研究院薬理)

発達期から成体にかけてアストロサイトは分子あるいは機能的に多様な集団であることが示唆されているが、感覚情報伝達の情報処理を行う場である脊髄後角におけるアストロサイトの多様性については未だ不明である。そこで本研究では、成体脊髄におけるアストロサイト亜集団の同定および感覚情報伝達における役割解明を目的として検討を行った。まず始めにアストロサイト関連遺伝子について脊髄後角と脊髄前角における発現比較解析を行い、脊髄後角に発現が有意な因子を同定した。同因子陽性細胞は脊髄後角表層選択的に存在するアストロサイトであった。脊髄後角表層は主に侵害受容線維の入力を受容する領域であるため、マウス足裏へのカプサイシン刺激に対する脊髄後角表層アストロサイトの活動性変化について *in vivo* カルシウムイメージングを行った。その結果、カプサイシン投与により脊髄後角表層アストロサイトにおいて細胞内カルシウム濃度の増加が観察された。アストロサイトのカルシウム濃度変化による感覚情報伝達に対する役割について検討を行うため、アデノ随伴ウイルスを用いて脊髄後角表層アストロサイト特異的に hM3Dq を発現するマウスを作製した。CNO 投与によるアストロサイト刺激により一過性の機械刺激に対する過敏応答が惹起された。この過敏応答は NMDA 受容体に対する D-セリンシグナルの阻害剤である 5,7-dichlorokynurenic acid (DCK) により抑制された。脊髄後角表層アストロサイトの生理的役割を検討するために、マウス足裏へのカプサイシン投与後の即時的な侵害防御行動および遅延して生じる機械刺激に対する過敏応答を解析した。その結果、IP3R2 ノックアウトマウスおよび DCK 前処置マウスにおいて機械刺激に対する過敏応答は抑制された。一方で、侵害防御行動には影響は見られなかった。以上の結果から、脊髄後角表層アストロサイトの活動変化は、末梢への侵害刺激後に惹起される機械刺激に対する過敏応答に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

A2-5

海洋渦鞭毛藻由来化合物(ペリジニン)は亜鉛イオンによるミクログリアのM1極性誘導増悪化を抑制する

○東 洋一郎¹、上羽 佑亮¹、新武 享朗¹、小野寺 健一²、中村 里菜¹、秋澤 俊史¹、清水 孝洋¹、清水 翔吾¹、濱田 朋弥¹、Zou Suo¹、山本 雅樹¹、長尾 佳樹¹、齋藤 源顕¹
(¹高知大学医学部薬理、²高知大学農林海洋科学部)

【目的】活性化ミクログリアは炎症性のM1と抗炎症性のM2のいずれかに極性誘導される。以前、我々は、脳虚血時の海馬神経細胞から放出される亜鉛イオン(Zn^{2+})がミクログリア細胞内の活性酸素産生を介してM1極性誘導の増大化と過度な炎症応答を惹起し、空間記憶の低下に関与することを報告している。そこで本研究は、我々が単離抽出した海洋渦鞭毛藻由来化合物(ペリジニン)が Zn^{2+} による活性酸素産生を介したM1極性誘導の増大化と過度な炎症応答ならびに空間記憶の低下を阻止するか否かを検討した。

【方法】新生仔C57BL/6マウス由来初代培養ミクログリアにペリジニン(30-300 ng/mL)存在下で $ZnCl_2$ (60 μ M)を前処置し、その後、lipopolysaccharide (LPS, 1 ng/mL)を添加することでM1へ誘導した。LPS添加後のIL-1b、IL-6、TNFa量はELISA法で検討した。 $ZnCl_2$ 処置後の細胞内活性酸素レベルを検討するため、活性酸素プローブ(DHE)を細胞に取り込ませ、ペリジニン存在下で $ZnCl_2$ 処置を行った。ペリジニンが直接 Zn^{2+} と反応するか否かはUV-Visスペクトル法により検討した。さらに、ペリジニンの有効性を確認するため、同系統の雄性マウス(12週齢)脳室内にペリジニン(20-200 ng/mL)を前投与し、両側総頸動脈を20分間閉塞した。再灌流3日後の海馬のIL-1b、IL-6、TNFa発現レベルをリアルタイムPCR法で、M1マーカー分子(CD16/32)の発現を免疫組織化学染色で検討した。再灌流5日後のマウスの空間記憶はY字迷路試験を用いて解析した。

【結果】ペリジニンは、 $ZnCl_2$ により惹起されるM1ミクログリアのIL-1b、IL-6、TNFa産生の増大化、ならびに細胞内DHE陽性シグナルの増加を有意に抑制したが、ペリジニンと Zn^{2+} の直接的な反応は認められなかった。また、ペリジニンの脳室内前投与は再灌流後のIL-1b、IL-6、TNFaならびにCD16/32の発現誘導、さらには空間記憶の低下を阻止した。

【考察】以上、我々は、ペリジニンが Zn^{2+} による細胞内活性酸素の増加を抑制することでM1極性誘導の増大化と過度な炎症応答を阻止し、マウスの空間記憶を保護する作用を有することを示唆する新しい知見を得ることが出来た。

A2-6

脳虚血後の細胞外亜鉛放出と発症時刻との関連

YIA

○新武 享朗、東 洋一郎、清水 孝洋、清水 翔吾、上羽 佑亮、濱田 朋弥、Zou Suo、山本 雅樹、長尾 佳樹、齋藤 源顕
(高知大学医学部薬理)

【目的】脳梗塞はその発症に概日リズムが認められ早朝に発症することが多く、致死率の高さや後遺症の重篤化が指摘されている。近年、げっ歯類を用いた検討により、一過性脳虚血後の神経細胞死や炎症応答の増悪化が処置時刻により異なることが報告されているが、その機序はほとんど理解されていない。一方、脳内亜鉛(Zn^{2+})の一部は大脳辺縁系、特に海馬の神経細胞内に貯蔵されており、脳虚血時に細胞外へ大量放出される。この放出 Zn^{2+} は神経細胞や脳内免疫担当細胞であるミクログリアに取り込まれ、神経細胞死や炎症性(M1)ミクログリアへの極性誘導の増大化を惹起する。また、興奮性アミノ酸輸送体(EAAC1)は、 Zn^{2+} の神経毒性を抑制し、中脳における発現に日内変動が存在することが報告されている。そこで本研究は、一過性脳虚血後の海馬神経細胞内への Zn^{2+} 集積ならびに神経細胞死、ミクログリアのM1極性誘導が処置時刻により変化するか否かを解明し、さらには、海馬におけるEAAC1の日内変動を明らかにすることを目的とした。

【方法】明期開始4-6時間後(明期群)または暗期開始4-6時間後(暗期群)の雄性C57BL/6マウス(12-14週齢)の総頸動脈を40分間閉塞し一過性脳虚血を誘導した。再灌流72時間後の海馬における神経細胞内 Zn^{2+} 集積について Zn^{2+} プローブ(TSQ)を用いて検討した。また、神経細胞死並びにM1極性誘導は抗NeuN抗体(神経細胞)並びに抗CD16/32抗体(M1ミクログリア)を用いた免疫組織化学染色法により検討した。さらに、ウェスタンブロット法により明期及び暗期の海馬EAAC1発現を検討した。

【結果】一過性脳虚血処置による海馬のTSQ陽性細胞は明期群並びに暗期群の両群で観察された。しかし、明期群のTSQ陽性細胞数は暗期群のそれと比べて有意に多かった。また、暗期群と比べて明期群は、海馬のNeuN陽性細胞が減少しCD16/32陽性細胞が増加していた。海馬のEAAC1発現は暗期に比べて明期で低下していた。

【考察】以上、我々は、明期の一過性脳虚血処置による神経細胞死並びに炎症応答の増大化に神経細胞内 Zn^{2+} 集積並びにM1極性誘導の増大化と、EAAC1の明期における発現低下が関与している可能性を示唆する新しい知見を得ることが出来た。

A3-1 複合性局所疼痛症候群モデルマウスに対する TNF- α 中和抗体局所投与の治療効果

○柴田 志保^{1,2}、田頭 秀章¹、鈴木 沙理¹、喜多 知¹、喜多 紗斗美^{1,3}、山浦 健²、岩本 隆宏¹
 (1 福岡大学医学部薬理、2 福岡大学医学部麻酔科学、3 徳島文理大学薬学部薬理)

【目的】複合性局所疼痛症候群 (CRPS) は難治性の慢性疼痛である。痛み以外にも浮腫、血流障害、運動障害などの様々な症状を伴うために、患者の日常生活は大きく障害される。未だ病態機序が解明されておらず、効果的な新規治療法の開発が望まれている。近年、外傷後に放出された TNF- α が末梢性感作や中枢性感作を引き起こし、治療困難な痛みを進行させる可能性が示唆されている。本研究では、CRPS モデル動物を独自に作製し、その病態機序を解析するとともに、TNF- α 中和抗体局所投与の有効性について検討した。

【方法】雄性 ddY マウスを用い、坐骨神経部分結紮 (PSNL) による一般的な神経障害性疼痛モデルマウスと、PSNL 処置後に患肢を 2 週間ギプスで固定する CRPS モデルマウスを作製した。PSNL 処置 2 週間後から、TNF- α 中和抗体 (1 μ g) を患肢の坐骨神経周囲に隔週で 3 回局所投与し、痛み閾値を von Frey test で測定した。PSNL モデルマウスの坐骨神経周囲には隔週で 3 回 recombinant TNF- α (0.01 μ g) を局所投与し、痛み閾値を von Frey test で測定した。また、坐骨神経結紮部と脊髄組織を適時採取し、免疫組織染色を実施した。

【結果】CRPS 群では、患肢に腫脹と色調変化が出現し、痛み閾値の顕著な低下 (0.12 ± 0.04 g) が PSNL 処置 6 週間後まで観察された。TNF- α 中和抗体を投与後は痛み閾値が徐々に上昇し、6 週間後には対照群レベル (1.50 ± 0.18 g) まで有意に回復した。PSNL 群に recombinant TNF- α を投与すると、痛みの回復が遅れる傾向がみられた。CRPS 群の坐骨神経および脊髄の免疫組織染色では、TNF- α および S100 β のシグナルが増強していたが、TNF- α 中和抗体を投与した CRPS 群ではそのような炎症反応が抑えられていた。

【結論・考察】今回作製した CRPS モデルマウスは、CRPS 患者に類似した諸症状を呈し、重篤な慢性疼痛を発症した。本モデルでは、ギプス固定により、坐骨神経への物理的圧迫や強制的な不動状態が引き起こされ、神経障害性疼痛が増悪した可能性が考えられた。また、TNF- α 中和抗体が本モデルの CRPS 様症状を寛解したことから、TNF- α を介する炎症性シグナルの重要性が示唆された。

A3-2 脊髄後角 GRPR 陽性神経活動と慢性掻痒におけるアストロサイトの役割

○山方 涼、古賀 啓祐、白鳥 美穂、津田 誠
 (九州大学大学院薬学研究院ライフィノバージョン分野)

YIA

慢性的な痒みは睡眠障害、過度の肉体疲労、精神的ストレスをもたらす QOL を著しく低下させることから、その制御は極めて重要な課題である。従来の慢性掻痒研究は皮膚に着目したものが主流であったが、当研究室ではその視点を感覚情報伝達制御の場である脊髄後角に移し、脊髄後角アストロサイトの活性化が慢性掻痒の増悪に関与することを世界で初めて明らかにした。しかし、アストロサイトによる慢性掻痒増悪の神経メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、慢性掻痒時の活性化アストロサイトが脊髄後角痒み伝達神経である gastrin-releasing peptide 受容体 (GRPR) 陽性神経に与える影響について検討した。

Grpr-EGFP マウスを用いて、アセトンに溶解したジフェニルシクロプロペノン (DCP) を 7 日間隔で 2 回、剃毛した背部皮膚に塗布し接触性皮膚炎モデルを作製した。同マウスを用いて頸部脊髄急性スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法により脊髄後角第 II 層の GRPR 陽性神経から膜電位応答を記録したところ GRP による脱分極応答がモデルマウスで増強されていた。この応答増強に対する活性化アストロサイトの関与を検討するために、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、アストロサイトの活性化に重要な STAT3 の機能を抑制するドミナントネガティブ STAT3 (dnSTAT3) をマウスの頸部脊髄後角アストロサイト選択的に発現させ、接触性皮膚炎モデルの作製を行った。その結果、慢性掻痒時のアストロサイトの活性化及び痒み行動の抑制が認められた。さらに、dnSTAT3 発現マウスの GRPR 陽性神経から膜電位応答を記録したところ、慢性掻痒時に認められる GRP 応答の増強が減弱していた。また、活性化アストロサイトから産生されるリポカリン 2 (LCN2) を GRP と共処置すると、無処置マウスにおける GRP 応答が増強された。

以上の結果から、慢性掻痒モデルにおける活性化アストロサイトが LCN2 を介して GRPR 陽性神経の GRP に対する応答性の増強と慢性掻痒の増悪に関与することが示唆された。

A3-3

Imaging MS (質量顕微鏡) を用いた中枢性脳卒中後疼痛モデルにおけるLPA産生の可視化

YIA

○岩元 隆征¹、根山 広行¹、見山 知穂¹、杉浦 悠毅²、植田 弘師¹
(¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科創薬薬理、²慶應義塾大学)

我々は、これまでに脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)が末梢性神経障害性疼痛の初発因子であり、その受容体であるLPA1およびLPA3を介したシグナルが同時に疼痛維持にも関与する事を明らかにしてきた。これらはLPA受容体を介する脊髄レベルでのフィードフォワード性疼痛増幅機構と密接に関連する事を見出してきた。その延長として、中枢性の神経障害性疼痛におけるLPA受容体機構が関与することを検証するために脳卒中後疼痛モデルマウスの開発を行った。当初は、塞栓子を用いた一過性中大脳動脈梗塞モデルや光誘発性脳血栓モデル(PIT)を作成して慢性疼痛の評価を試み、ニューロメーターを用いた疼痛試験法では長期の疼痛過敏を見いだせたが、広く利用されているThermal Paw Withdrawal試験(TPW)やMechanical Paw Withdrawal試験(MPW)では顕著な疼痛過敏を見いだす事ができなかった。しかし、PIT処置後6時間に血栓溶解剤tPAを投与し再灌流するcentral post-stroke pain(CPSP)モデルでは安定したTPWとMPWにおける疼痛過敏が観察された。このCPSPはLPA 1ならびにLPA3遺伝子欠損マウスで完全に消失した。しかも疼痛が確立した後にLPA1/3拮抗薬Ki-16425を連続投与したときにも、顕著なCPSP治療効果が見いだされた。さらに興味ある知見は左中大脳動脈梗塞にも関わらず両側性CPSPが観察されたことである。本研究ではさらにLC-MS/MSやImaging MS解析を用いてLPAの定量、可視化技術の観点からこの両側性のCPSP産生のメカニズム解明を試み、そのメカニズムに視床背内側核領域のLPAの産生や島皮質の関与があげられることを見いだした。こうした脳領域の関与はLPAのマイクロインジェクションによる疼痛誘発においても確認している。

A3-4

ACSA2抗体を用いた脊髄アストロサイト単離法の確立

YIA

○山根 拓也、高露 雄太、津田 誠
(九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野)

中枢神経系には神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞など多様な細胞が存在し、それぞれが特定の遺伝子発現、機能を有することで脳や脊髄の複雑な高次機能を構築している。中でも、グリア細胞の一種であるアストロサイトは様々な中枢神経系疾患において重要な役割を果たすことが知られており、また近年の研究により遺伝子発現の異なるアストロサイト亜集団の存在も示唆されている。即ち、アストロサイトを単離し遺伝子発現解析を行うことは、その機能解明や亜集団の同定および特徴付けを行う上で非常に重要である。脳アストロサイトの遺伝子発現解析を目的として、フローサイトメトリーやイムノパンニング法、免疫磁気ビーズ分離法などを用いたアストロサイト単離法が報告されている一方で、成体脊髄のアストロサイトを単離し、遺伝子発現を解析した報告は少ない。そこで本研究では、アストロサイト特異的マーカーとして近年見出されたastrocyte cell surface antigen-2(ACSA2)に着目し、ACSA2抗体を用いた免疫磁気ビーズ分離法による脊髄アストロサイト単離法の確立に取り組んだ。脊髄におけるACSA2の発現を免疫組織染色法により確認したところ、脊髄前角および後角いずれにおいてもその発現が確認された。また、各種細胞マーカーを用いた二重染色から、その発現細胞はアストロサイトであることが明らかとなった。そこで、ACSA2抗体を用いた成体脊髄アストロサイトの単離を目的として、①パパイニン処理による細胞分散、②CD11b抗体、O4抗体、ミエリン除去ビーズを用いたミクログリア、成熟および未成熟オリゴデンドロサイトの除去、③ACSA2抗体によるアストロサイトの捕捉という3つのステップにより分取したACSA2陽性分画における各種細胞マーカー分子のmRNA量をリアルタイムPCR法にて評価した。その結果、脊髄抽出サンプルと比較してACSA2陽性分画ではアストロサイトマーカーであるSox9のmRNA量の増加、一方でItgam(ミクログリア)、Sox10(オリゴデンドロサイト)、Mog(成熟オリゴデンドロサイト)、Rbfox3(ニューロン)、Cldn5(血管内皮細胞)のmRNA量低下が確認された。以上の結果から、本手法により高純度の脊髄アストロサイトを単離可能であることが示唆された。

A3-5 カテコールアミン動態に及ぼす柑橘類機能成分の影響

○豊平 由美子¹、坂巻 路可²、石兼 真¹、高橋 富美¹
 (¹産業医科大学医学部薬理、²西南女学院大学保健福祉学部栄養科)

【目的】柑橘類にはフラボノイド・カロテノイド・クマリン・テルペン・リモノイドの5種類の代表的な機能成分が含まれており、抗炎症作用、抗腫瘍作用をはじめとする様々な作用を持つことが報告されている。現代社会において、ストレスが要因となるメンタルヘルス不調は生活習慣病増加の一因とされているが、柑橘類機能成分の神経系への作用についての報告は少ない。そこで本研究では、ストレス負荷によりカテコールアミン (CA) 分泌が増加することが知られている副腎髄質細胞を用いて、CA 生合成・分泌に及ぼす柑橘類機能成分 Nomilin、Limonin (柑橘系リモノイド)、Auraptene (クマリン類) の影響について検討した。

【方法】培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、CA 分泌は細胞を刺激して遊離された CA を水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法にて蛍光定量した。CA 生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) のリン酸化はウエスタンブロッティング法により測定した。また、Fura-2 を用いて細胞内 Ca イオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動を測定した。

【結果】Nomilin、Auraptene、Limonin はニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体刺激による CA 分泌を抑制した。抑制作用は Nomilin > Auraptene \geq Limonin であった。Nomilin は nACh 受容体刺激による CA 分泌と細胞内への Ca イオン流入を濃度依存性 (10-100 μ M) に抑制し、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動も抑制したが、電位依存性 Ca チャネル活性化による $[Ca^{2+}]_i$ 変動は抑制されなかった。Auraptene は nACh 受容体を介する CA 分泌を抑制し、TH のセリン 40 のリン酸化を促進した。

【考察】柑橘系リモノイドである Nomilin とクマリンである Auraptene は、nACh 受容体のイオンチャネルを阻害することにより、カテコールアミン分泌を抑制することが示唆された。また、Auraptene は TH の活性に影響を及ぼしている可能性が示された。

A4-1 GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応と ProHB-EGF の切断反応への Pyk2 の関与

YIA

○澳津 志帆¹、仲嶺 三代美¹、鳥原 英嗣¹、東山 繁樹²、山本 秀幸¹
 (¹琉球大学大学院医学研究科生化学、²愛媛大学プロテオサイエンスセンター細胞増殖・腫瘍制御部門)

ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属している。GnRH 受容体刺激により Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) が活性化され、続いて ErbB ファミリーの活性化が起こることが報告されている。ErbB ファミリーの活性化は、細胞膜上のヘパリン結合型 EGF の前駆体 (ProHB-EGF) の切断により細胞外に遊離された HB-EGF により引き起こされることが示唆されているが、Pyk2 の活性化から ProHB-EGF の切断に至る分子機構については明らかにされていない。Pyk2 は非受容体型チロシンキナーゼであり、中枢神経系ではシナプス機能に関与している。私達は、昨年の本学会で、培養視床下部神経細胞 (GT1-7 細胞) での GnRH 受容体刺激による Pyk2 の活性化に CaM キナーゼ II が重要であることを報告した。今回、GnRH 受容体刺激による extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化と ProHB-EGF の切断反応への Pyk2 の関与について検討した。

GnRH の添加により ERK が活性化され、その活性化は Pyk2 の阻害薬 (PF431396) の添加により抑制された。また、Pyk2 の 402 番目のチロシン残基 (Y402) のリン酸化も抑制された。次に、GnRH 受容体刺激による ProHB-EGF 切断反応への CaM キナーゼ II と Pyk2 の関与について検討した。ProHB-EGF の切断反応を検出するために、アルカリフォスファターゼ (AP) と融合させた ProHB-EGF を発現する GT1-7 細胞を樹立した。GnRH の添加により培養液中の AP 活性が増加し、GnRH 受容体刺激により ProHB-EGF の切断反応が起こることが示唆された。この AP 活性の増加は CaM キナーゼ II 阻害薬 (KN93) と PF431396 の添加により抑制された。

以上の結果より、GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応と ProHB-EGF の切断反応には、CaM キナーゼ II を介した Pyk2 の活性化が重要であることが示唆された。

A4-2 培養視床下部神経細胞におけるGnRH受容体刺激後のPyk2とFynの相互作用

○仲嶺 三代美、澳津 志帆、山本 秀幸
(琉球大学大学院医学研究科生化学)

Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) は非受容体型チロシンキナーゼであり、主に神経細胞で発現している。Pyk2の402番目と579/580番目のチロシン残基(Y402とY579/580)は、それぞれ、Srcファミリーとの結合と酵素の活性化に関与することが報告されている。マウス視床下部の培養神経細胞であるGT1-7細胞を用いた実験で、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)受容体刺激によってERK(extracellular signal-regulated kinase)が活性化される過程に、Pyk2が関与することが報告されていた。私たちは、このPyk2の活性化にSrcファミリーのFynとプロテインキナーゼD1(PKD1)が関与することを見出した。今回、Pyk2とFynの過剰発現系を用いて、Pyk2の活性化機構を検討した。

GT1-7細胞にPyk2を過剰発現させると、GnRH無添加でY402とY579がリン酸化された。Srcファミリーの阻害剤(ダサチニブ)の添加では、Y402のリン酸化が部分的に、Y579のリン酸化がほぼ完全に抑制された。Pyk2の阻害剤(PF431396)の添加では、Y402のリン酸化がほぼ完全に、Y579のリン酸化が部分的に抑制された。免疫沈降実験によって、ダサチニブは、Pyk2とFynとの結合を増強させることが明らかになった。PF431396の存在下では、ダサチニブによるPyk2とFynとの結合の増強は見られなかった。また、Pyk2とFynの変異体を用いた実験から、ダサチニブは、Pyk2のリン酸化されたY402とFynのSH2ドメインとの結合を増強させることが示唆された。今回の研究から、Pyk2はY402が自己リン酸化された後、FynのSH2ドメインと結合し、続いてFynによるY579/580のリン酸化によって活性化されることが示唆された。さらに、ダサチニブの作用から、Fynによる未知のチロシン残基のリン酸化がFynとPyk2との結合を抑制する可能性が考えられる。

A4-3 グアニン四重鎖を標的とした神経疾患の病態解明と治療薬開発

○塩田 倫史
(熊本大学発生医学研究所ゲノム神経学分野)

DNAは、右巻き二重らせんであることがWatson博士とCrick博士によって1953年に発見された。このDNAの基本的な構造は「B型DNA」と呼ばれる。実は、一般的に知られているこの右巻き二重らせん構造以外にも、左巻きDNA、三重鎖DNA、四重鎖DNA等「非B型DNA」と呼ばれる構造が発見されており、DNAはその配列の特徴や溶媒の環境により、試験管の中では右巻き二重らせん構造以外の構造を取り得ることが報告されている。これらは興味深い結果ではあったが、実際に細胞内で非B型DNA構造ができるか、という疑問は長らく明らかにされていなかった。しかしながら近年、非B型DNA及びRNA構造のひとつである「グアニン四重鎖」が実際に細胞内に存在することが報告された。さらに、グアニン四重鎖は神経疾患の原因となる可能性も示唆されてきている。グアニン四重鎖構造は、グアニンが豊富な配列領域で、1本鎖DNAもしくはRNAが形成する特殊な高次構造の1つである。グアニン残基を豊富に含むDNAやRNAの一本鎖配列において4分子のグアニン残基がGカルテットとよばれる平面構造を形成する。これが層状に重なることで、グアニン四重鎖構造が形成される。グアニン四重鎖構造を形成するDNA配列はこれまでに、テロメア領域をはじめとして、がん関連遺伝子のDNAプロモーター領域に存在し、抗がん作用の標的として知られている。バイオインフォマティクス解析では、ヒトゲノム中に376,000個のDNAグアニン四重鎖構造形成配列が存在することが予測され、テロメア、遺伝子プロモーター、リボソームDNAおよび組換えホットスポットに特に多く見られる。また、mRNA合成、発現および機能において重要な役割を果たす第1イントロンの5'末端、および5'、3'末端非翻訳領域に多く位置することも示されており、がん関連遺伝子以外の遺伝子における転写・翻訳にも関与すると考えられている。本発表においては、グアニン四重鎖と神経疾患との関与について、グアニン四重鎖の異常によって発症する遺伝性神経疾患「ATR-X症候群」における知的障害の病態解明と治療薬開発について報告する。

A4-4 視床下部ニューロン活動の制御における内因性一酸化窒素の役割の解析

YIA

○山川 貴生¹、倉内 祐樹²、久恒 昭哲^{3,4}、関 貴弘²、香月 博志²(¹熊本大学薬学部薬物活性、²熊本大学大学院生命科学研究部(薬学教育)薬物活性、³熊本大学大学院先端機構、⁴熊本大学リーディング大学院HIGOプログラム)

【背景・目的】視床下部外側野に局在するオレキシンニューロンは、睡眠・覚醒の調節をはじめとして種々の生理機能を担っている。オレキシンニューロンの近傍には神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 含有ニューロンが分布しており、我々は以前、長期間の断眠負荷がNOの過剰産生を介してオレキシンニューロンの変性を招く可能性を見出した (J Neurosci 2013)。しかし、視床下部 nNOS ニューロンおよびそれらによる内因性 NO 産生の生理的な役割は不明である。本研究では、睡眠・覚醒に影響を及ぼす薬物や短時間の断眠負荷がマウス視床下部のオレキシンニューロンと nNOS ニューロンの活動レベルならびにマウスの覚醒レベルにもたらす変化と、それらに対する nNOS 阻害薬 7-nitroindazole (7-NI) の作用を検討した。

【方法】8～10週齢雄性 C57BL/6J マウスにカフェイン (30 mg/kg)、ジフェンヒドラミン塩酸塩 (10 mg/kg) あるいは 7-NI (25 mg/kg) を腹腔内投与した。また、5分間のハンドリングを1時間おきに8回繰り返すことでマウスに断眠負荷をかけた。各処置後にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔に達するまでの時間を計測した。さらに、オレキシン-A および c-Fos の免疫組織化学、ならびに NADPH ジアホラーゼ活性染色によりオレキシンニューロンと nNOS ニューロンの活動レベルを調べた。

【結果】オレキシンニューロンと nNOS ニューロンの活動レベルは明期よりも暗期に高く、またカフェイン投与や断眠負荷はオレキシンニューロンと nNOS ニューロンの活動レベルを増大させた。一方、ジフェンヒドラミンはオレキシンニューロンの活動レベルとマウスの覚醒レベルを低下させた。7-NI は単独でオレキシンニューロンの活動レベルを増大させ、マウスの覚醒レベルも増大させる傾向を示した。オレキシンニューロンの活動レベルに対するカフェインや断眠負荷の効果と 7-NI の効果は非相加的であった。また 7-NI は、単独で nNOS ニューロンの活動を抑制し、カフェインによる nNOS ニューロン活性化も著明に抑制した。

【考察】nNOS ニューロンによる視床下部局所の NO 産生は、オレキシンニューロンの活性化を定常的に抑制しているものと考えられた。一方、カフェイン投与や断眠負荷は nNOS ニューロンの活動を亢進させるものの、これらの刺激によるオレキシンニューロンの活性化は内因性の NO の影響を受けないことも示唆された。

A4-5 大腸炎モデルラットにおける大腸動脈血管機能の変化

○村上 聡¹、高取 真吾²、田坂 祐一³、飛鷹 範明¹、田中 亮裕¹、川崎 博己²(¹愛媛大学病院薬剤部、²松山大学大学院医療薬学研究科臨床薬学、³就実大学薬学部臨床薬学研究室)

【背景・目的】潰瘍性大腸炎の患者数は年々増加しているが、発症の原因および根本的治療法は未だ確立されていない。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS, dextran sulfate sodium) 誘発大腸炎モデルにおける大腸動脈血管床の血管機能変化について検討した。

【方法】大腸炎モデルラットは、7週齢の Wistar 系雄性ラットに3% DSS 溶液を5日間自由飲水させて作製した。摘出ラット大腸動脈血管床の灌流標本を作成し、37℃に加温した Krebs 液を一定流量で灌流し、経壁電気刺激 (PNS, periarterial nerve stimulation) および noradrenaline (NAd) の血管内注入による血管収縮反応を観察した。Methoxamine 含有 Krebs 液にて灌流圧を一定レベルまで上昇・安定後、PNS および acetylcholine (ACh), calcitonin gene-related peptide (CGRP), sodium nitroprusside (SNP) の血管内注入による血管拡張反応も評価した。いずれの場合においても、灌流圧の変化を血管緊張度変化として測定した。

【結果・考察】PNS (8 and 12 Hz) および NAd (1 and 10 nmol) は、それぞれ刺激頻度依存のおよび濃度依存の血管収縮反応を生じた。また、PNS (2 and 4 Hz) および ACh (0.01 and 1 nmol), CGRP (10 and 50 pmol), SNP (0.5 and 5 pmol) は、それぞれ刺激頻度依存のおよび濃度依存の血管拡張反応を生じた。大腸炎モデルにおける PNS (8 Hz) 誘発血管収縮および CGRP (50 pmol) による血管拡張は、コントロール群と比べてそれぞれ有意に増大および減少した。しかし、その他の血管反応は、コントロール群と比べて変化が認められなかった。上記の結果より、DSS 誘発大腸炎モデルラットの大腸動脈血管床において、交感神経性血管収縮の増大と CGRP 注入による血管拡張の低下が惹起されており、大腸組織における血流調節機構の変化に寄与している可能性が示唆された。

B1-1

ジンジバリス菌由来LPSの全身曝露による中年のマウスにおける炎症性骨喪失と認知機能低下

YIA

○顧 也博¹、倪 軍軍²、武 洲^{2,3}、高橋 一郎¹¹九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座歯科矯正学分野、²九州大学大学院歯学研究院口腔機能分子科学、³九州大学大学院歯学研究院OBT研究センター

【Background】 Periodontitis is suspected to positively link to cognitive decline with Alzheimer's disease (AD). It is also known to be related to osteoporosis with aging. We have found that chronic systemic exposure to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* (PgLPS) could induce AD-like phenotype in middle-aged mice. However, the evidence and mechanism bridging memory decline and bone loss during periodontitis is still unknown. The present study aimed to explore the kinetic changes of bone and memory decline in middle-aged mice after chronic systemic exposure to PgLPS.

【Methods & Results】 Middle-aged female mice (DBA/2, 12-13months old) were exposed to PgLPS daily (1mg/kg, intraperitoneally, i.p.) for 3 consecutive weeks. Age-matched female mice were exposed to Double-Distilled Water (DDW) daily at the same time course as the control. Trabecular bones of proximal tibia were assessed by micro-CT imaging. Abilities of memory were assessed by passive avoidance test. The mRNA expressions of TNF-a and IL-6 were analyzed by Quantitative Real-time PCR and the localizations of TNF-a and IL-6 were evaluated by immunohistochemistry in the cortex of brain. In comparison with the control mice, significant decrease of bone volume/tissue volume ratios as well as trabecular numbers, however, significant increase of structure model indexes in the proximal tibia were determined in middle-aged mice at week 3 after chronic systemic exposure to PgLPS. Moreover, significant memory decline and significant upregulation in expression of TNF-a and IL-6 in microglia was detected at week 3 after systemic exposure to PgLPS. These findings demonstrated that chronic systemic exposure to PgLPS induces bone loss, microglia-mediated neuroinflammation and memory decline in the middle-aged mice.

【Conclusion】 We provide the evidence that bone losses were paralleled to memory decline in the middle-aged mice during chronic systemic exposure to PgLPS. We are elucidating the link of bone loss and memory decline.

B1-2

マウス脛骨骨組織において S1PR シグナル伝達経路が骨形成および骨芽細胞分化マーカーに及ぼす影響

○松崎 英津子¹、高橋 富美²、平田 雅人³、阿南 壽¹¹福岡歯科大学口腔歯学部歯科保存学、²産業医科大学医学部薬理、³福岡歯科大学口腔歯学部

【目的】 スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、S1PR1-R5 の5つの G タンパク質共役受容体を介して細胞分化・増殖・遊走に関する脂質メディエーターである。これまでに演者らは、S1P/S1PR1 シグナルの活性化による骨芽細胞分化促進作用および S1PR1 シグナル非依存性の S1P/S1PR2 シグナルの活性化による骨芽細胞分化促進作用を明らかにした。In vivo においても、S1PR1 および S1PR2 作動薬による骨形成促進作用が示された。また、S1PR2 作動薬による海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数の増加には、S1PR2/RhoA/ROCK シグナル伝達経路の一部が関与し、骨形成を促進することが示唆された。そこで、本研究では in vivo における S1PR シグナルが骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現に及ぼす影響について、さらに検討を行った。

【方法】 8週齢の雄性 C57BL/6N の腹腔内に S1PR2 作動薬・阻害薬及び ROCK 阻害薬を 1日1回、28日間投与し、屠殺後、左脚脛骨を採取して、リアルタイム RT-PCR 法を用いて骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現の解析を行った。同様に S1PR1 作動薬、阻害薬についても実験を行った。(福岡歯科大学動物実験承認番号：15022)

【結果・考察】 投与28日後のマウス脛骨骨組織では、S1PR2 作動薬により ALP、OCN、OPN、BSP の遺伝子発現が増加した。とりわけ、後期の分化マーカーや骨基質形成に関与する遺伝子発現が著明に増加した。また ALP、OPN、BSP の遺伝子発現増加には、S1PR2/ROCK 経路が関与した。一方、S1PR1 作動薬により、ALP、OCN、OPN、BSP の遺伝子発現は増加した。S1PR1 阻害薬により BSP 遺伝子が有意に抑制された。

【結論】 S1PR2、S1PR1 経路活性化による骨形成促進作用は、臨床的に骨欠損部における骨再生などの新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

B1-3

微弱パルス電流と温熱の同時印可は imiquimod 誘導性乾癬マウスモデルの炎症病態を改善する

YIA

○連川 雄、森田 光咲、森内 将貴、中野 義雄、Piruzyan Mariam、深見 紗奈子、
Suico Mary Ann、首藤 剛、甲斐 広文
(熊本大学大学院生命科学研究部(薬学教育)遺伝子機能応用)

乾癬は難治性の炎症性皮膚疾患である。活性化した免疫細胞やケラチノサイトが形成する炎症が恒常的なケラチノサイト増殖異常に関わっている。現行の治療薬である生物学的製剤や免疫抑制剤は、強力な抗炎症効果を発揮するものの副作用のリスクや病態改善効果の個人差が課題として残されており、長期にわたり安全性と有効性を発揮する新規治療法の開発が急務である。本研究室では、生物活性を指標に最適条件を見出した微弱パルス電流 (MES-55 pps) と 42℃ の温熱 (heat shock: HS) の併用処置 (MES+HS) が II 型糖尿病や慢性腎臓病マウスモデルの病態を改善することを見出してきた。さらに、肥満、II 型糖尿病患者を対象にした臨床試験において MES+HS 処置は高い安全性と病態改善効果を発揮した。一方、近年のマイクロアレイ解析により、MES+HS 処置がマウス皮膚の遺伝子群の発現パターンを変動させることが示されたことから、本研究では、乾癬に対する MES+HS の作用の解明を目的にした。

まず、toll-like receptor 7, 8 のリガンドである imiquimod 含有クリーム (15 mg) をマウスの耳に塗布し、乾癬モデルを作成した。imiquimod 塗布により、皮膚の肥厚化や、乾癬関連分子の発現増大、免疫細胞の浸潤等が認められた。興味深いことに、毎日 10 分間の MES+HS 処置は、耳の肥厚化を処置後 2 日目より有意に抑制し、さらにその効果は MES, HS 単独処置群より優れていた。また、MES+HS 処置群の病変皮膚では、増殖マーカーの PCNA, KRT6A 発現の減少、炎症性サイトカイン *Il1β*, *Il17A*, *Il22* の mRNA 発現及び IL-17A のタンパク質発現の減少、CD3 陽性 T 細胞の浸潤の抑制、さらに、乾癬の炎症増悪因子である抗菌タンパク質 (*Reg3γ*, *S100A8*) の mRNA 発現の抑制が認められた。最後に、MES+HS 処置は、リコンビナント IL-17A を添加したヒトケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞における抗菌タンパク質の mRNA 発現も有意に抑制した。

以上、MES+HS 処置は imiquimod 誘導性乾癬様皮膚炎を抑制することが明らかとなり¹、乾癬治療における有用な物理療法となり得ることが示唆された。

1) Tsurekawa Y. *et al. Exp Dermatol.* 2018

B1-4

PDZRN3 蛋白質による筋芽細胞のアポトーシス制御

○本田 健、品川 右京、水野 優、横須賀 由季、乾 誠
(山口大学大学院医学系研究科薬理学講座)

[諸言] PDZRN3 (PDZ domain containing RING finger 3) は PDZ ドメインおよび PDZ 結合モチーフを併せ持つ、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼである。主に心臓や骨格筋に分布し、特に間葉系前駆細胞には高く発現している。これまで我々は、その前駆細胞分化において、PDZRN3 が脂肪および骨芽細胞分化を抑制する一方、筋分化では必須因子であることを明らかにしてきた。様々な筋損傷からの再生過程では、衛星細胞 (骨格筋幹細胞) が MyoD を発現し、筋芽細胞 (前駆細胞) に分化し増殖期に入る。これまでのマウス骨格筋の損傷-再生モデルを用いた実験で、筋再生時の MyoD 発現誘導に伴って PDZRN3 の発現も誘導されることを明らかにしている。本研究では、増殖期にある筋芽細胞での PDZRN3 の役割を明らかにすることを目的とした。

[方法・結果] PDZRN3 発現を抑制した筋芽細胞株 C2C12 の培養では顕著な細胞数の減少が認められた。この際、PDZRN3 発現を抑制した細胞では、生存 (抗アポトーシス) シグナル経路の要である Akt の活性化 (リン酸化) が対照細胞に比べて減弱していた。また、ストレスを与えた際のアポトーシスマーカーは顕著に増大しており、PDZRN3 のアポトーシス制御への関与が示された。Akt の直接的な活性化因子の中で cyclin A2 を調べた結果、PDZRN3 発現抑制によってその mRNA 発現が減弱していることが明らかとなった。また、cyclin A2 は DNA 修復因子 Mre11 の翻訳を直接活性化してゲノム保護作用を示すことが報告されている。本研究においても、PDZRN3 発現抑制細胞における cyclin A2 発現の減少に応じて Mre11 の発現が減弱していること、DNA 損傷蓄積に応答した p53 活性化レベルが増大していることが明らかになった。

[結論] 以上の結果から、PDZRN3 は、筋損傷からの再生において筋芽細胞への分化や増殖期に発現が誘導され、cyclin A2 を介した Akt シグナル経路の調節やゲノム安定性の保持に寄与する可能性が示された。

B1-5

過酸化水素処理における ρ^0 細胞の膜状態変化とアクアポリン 3, 8, 9 の発現

YIA

○高 裕子^{1,2}、富田 和男¹、桑原 義和^{1,3}、五十嵐 健人¹、長澤 大成¹、並河 英紀⁴、
田中 康一⁵、西谷 佳浩²、西山 信好⁵、佐藤 友昭¹¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理、²鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存、³東北医科薬科大学医学部放射線基礎、⁴山形大学理学部物質生命科学、⁵兵庫医療大学薬学部薬理)

【目的】放射線治療や一部の化学療法は、細胞内の活性酸素種 (ROS) を増大させ、細胞膜の脂質の過酸化を引き起こし細胞死に至るという機序が知られている。そのため、がん細胞における ROS の細胞応答を明らかにすることはがん克服への第一歩となる。ROS に感受性である細胞として ρ^0 細胞が知られており、この細胞はミトコンドリア DNA が欠失している。我々はこれまで 1) カタラーゼ酵素活性の上昇、2) ATP 量の減少、3) 膜電位の低下を報告してきた。本研究ではヒト子宮頸部がん (HeLa) 及びヒト舌がん (SAS) 細胞由来の ρ^0 細胞を用い、過酸化水素の細胞内への取り込みと細胞膜における脂質の過酸化について検討した。

【方法】HeLa 及び SAS の ρ^0 細胞と親株細胞に対し過酸化水素処理を行い、内在性過酸化水素量を HYDROP[®]、過酸化水素の細胞内取り込みを安定同位元素、脂質の過酸化を代表的な脂質酸化マーカー 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) の免疫染色にて解析した。またリポソーム膜を用い、脂質の酸化度と過酸化水素取り込み量の関係を調べた。過酸化水素処理前に酸化脂質の一種 POVPC を添加し、処理後の細胞生存率を WST アッセイにて解析した。過酸化水素の透過性に関与するアクアポリン (AQP) 3, 8, 9 の遺伝子発現量解析を行った。

【結果】過酸化水素処理後の内在性過酸化水素量上昇のタイミングは ρ^0 細胞で早まり、安定同位元素を用いた過酸化水素の細胞内取り込みは、 ρ^0 細胞において処理後 1 時間で取り込み量増加が認められた。HNE 量は ρ^0 細胞で増加していた。リポソーム膜を用いた実験では、酸化脂質添加数%までは脂質の酸化度が高いほど過酸化水素取り込み量増加が認められた。過酸化水素処理前に POVPC を添加したところ、過酸化水素処理による細胞死が増加した。AQP 3, 8, 9 の遺伝子発現量は、 ρ^0 細胞で増加傾向にあった。

【考察】 ρ^0 細胞では、脂質の過酸化と AQP の発現量の増加により、過酸化水素の膜透過性が亢進し、過酸化水素処理後の細胞内過酸化水素量の増加タイミングが早まると考えられ、これが ρ^0 細胞の過酸化水素に対する高感受性の要因であると考えられた。また、酸化脂質の添加実験の結果より、がん細胞に脂質の過酸化を誘導する薬物を投与することにより、抗がん作用を高める可能性が示唆された。

B1-6

細胞膜酸化状態はがんの治療耐性を制御する

○富田 和男¹、桑原 義和^{1,2}、高 裕子^{1,3}、五十嵐 健人¹、長澤 大成¹、並河 英紀⁴、
田中 康一⁵、北中 純一⁶、北中 順恵⁶、栗政 明弘²、西谷 佳浩³、西山 信好⁵、竹村 基彦⁶、
福本 学⁷、佐藤 友昭¹¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理、²東北医科薬科大学医学部放射線基礎医学、³鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存、⁴山形大学理学部物質生命科学、⁵兵庫医療大学薬学部薬理、⁶兵庫医科大学医学部薬理、⁷東京医科大学医学部病理)

【背景・目的】放射線治療は悪性腫瘍治療の柱のひとつであるが、放射線耐性細胞の存在はその治療の障害として大きな問題となっている。我々は 2 Gy/day の照射を繰り返しても増殖する臨床的治療耐性がん細胞 (CRR 細胞) を樹立し、その性質と耐性メカニズムの研究を進めている。現在までに、CRR 細胞は放射線以外にも抗がん剤である Docetaxel や過酸化水素にも耐性を示すこと、ミトコンドリア DNA のコピー数、ATP 量、ミトコンドリアおよび細胞膜の膜電位が減少していることなどを明らかとしている。本研究では、CRR 細胞の過酸化水素に対する耐性と膜状態の関係について検討した。

【方法】HeLa および SAS の親株及び CRR 細胞に対し過酸化水素処理を行い、内在性過酸化水素量を HYDROP、脂質の過酸化を代表的な脂質酸化マーカーである HNE の免疫染色にて経時的に観察した。また、代表的な酸化脂質である POVPC を細胞培養液中に添加後、過酸化水素処理を行い、その細胞生存率を WST アッセイにて解析した。さらに、膜脂質の酸化に関与する細胞内ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) の量を Hydroxyphenyl Fluorescein、脂質の酸化酵素であるリポキシゲナーゼの遺伝子発現量を定量 PCR にて調べた。

【結果・考察】過酸化水素処理後の内在性過酸化水素量と HNE 量は、親株でその増加が見られる処理後 2 時間であっても CRR 細胞において有意な変化は見られなかった。また、過酸化水素処理にて、内在性過酸化水素量の増大に先立ち HNE 量の増大が起きることも明らかとなった。これらのことより、過酸化水素処理を行うとまず脂質の過酸化が起き、その膜状態変化が内在性過酸化水素量増大を引き起こし、細胞死が惹起されと考えられた。実際、CRR 細胞に POVPC を添加した後に過酸化水素処理を行うと、細胞生存率は有意に減少した。また、細胞内で脂質の過酸化を引き起こし、細胞死を誘導することが報告されている $\cdot\text{OH}$ の量は、親株に比べ CRR 細胞で有意に低く、リポキシゲナーゼの遺伝子発現量も減少していた。

以上より、CRR 細胞では、親株細胞に比べ細胞膜の脂質過酸化が起きにくい状態となっているため、過酸化水素処理による内在性過酸化水素量が親株ほどは増加せず、細胞膜における脂質の過酸化とそれに引き続いて起こる細胞死が抑制されていると考えられた。

B2-1

セレコキシブ誘導体ジメチルセレコキシブはGSK-3の活性化を介してイソプレナリン誘導心筋肥大・線維化を抑制する

○森重 翔二^{1,2,3}、高橋 富美³、石兼 真³、塩瀬 明²、笹栗 俊之¹(¹九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野、²九州大学大学院医学研究院循環器外科学分野、³産業医科大学医学部薬理学講座)

【背景】グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3) は、心肥大を抑制的に調節する分子である。我々はこれまでに、セレコキシブ誘導体のジメチルセレコキシブ (DMC) が、圧負荷モデルマウス等において、GSK-3活性化を介して心臓リモデリングを抑制することを見出したが、心筋細胞および心臓線維芽細胞に対するDMCの直接的作用は未解明であった。

【目的】 β 受容体作動薬イソプレナリンが惹起する心肥大・線維化に対するDMCの効果とその機序を、*in vivo*および*in vitro*実験により、心筋細胞および心臓線維芽細胞に対する直接的作用を含めて解明することを目的とした。

【方法】*In vivo*実験：C57BL/6マウスに対し、浸透圧ポンプによるイソプレナリン (20mg/kg/day) の持続投与およびDMC (1000ppm) の経口投与を行い、2週間後に摘出心を評価した。*In vitro*実験：新生仔ラット由来初代心筋細胞及び成獣ラット由来初代心臓線維芽細胞に対して、1時間のDMC (3-20 mM) 前処置の後にイソプレナリン (5 mM) 刺激を24時間行い、それぞれ細胞面積・細胞増殖の変化を評価した。*In vivo*、*in vitro*実験共にウエスタンブロット法で蛋白発現・リン酸化を評価した。

【結果と考察】*In vivo*実験にて、DMCはイソプレナリンが惹起した心筋肥大・左室線維化を有意に抑制した。*In vitro*実験において、DMCはGSK-3の活性化を介して下流の心肥大促進因子 β -cateninおよびmammalian target of rapamycinを抑制し、心筋細胞面積の増大を抑制していた。また、心臓由来線維芽細胞においても、DMCはGSK-3を活性化し、細胞周期促進因子cyclin D1の発現を低下させることで、増殖を抑制していた。

【結語】DMCは心筋細胞および線維芽細胞に直接作用し、GSK-3活性化による下流因子の制御を介して心筋肥大・線維化を抑制することが明らかとなり、心臓リモデリングの新たな治療薬となりうることが示唆された。

B2-2

心筋梗塞時におけるプロトン感知性GPCR (GPR4) の役割解析

YIA

○伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等

(九州大学大学院薬学研究院薬効安全性学)

心筋梗塞は、心臓に血液を供給する冠動脈が閉塞することで引き起こされる虚血性心疾患である。心筋梗塞が起こると梗塞部位への酸素供給が途絶え、嫌氣的解糖系が亢進する。その結果、副産物である乳酸が蓄積しpHが低下することが知られている。しかし、pH低下が心筋梗塞後の心臓にどのような影響を及ぼしているかについては不明な点が多い。そこで、pHの低下によって活性化するプロトン感知性Gタンパク質共役型受容体 (プロトン感知性GPCR) に着目した。これまでプロトン感知性GPCRは4種類が報告されている。その中でも、マウス心臓において発現量が最も高いGPR4に着目し、心筋梗塞時におけるpH低下の生理的意義を解析した。

GPR4が心筋梗塞後の病態に与える影響を調べるため、マウス心臓におけるGPR4発現細胞を検証したところ、血管内皮細胞に高発現していることが明らかになった。血管内皮細胞は細胞接着分子を発現することで、炎症の発端となる白血球の浸潤を促し、炎症を増悪させることが知られている。そこで、野生型 (WT) マウスとGPR4欠損 (KO) マウスに心筋梗塞処置を施し、細胞接着分子の発現量を比較したところ、GPR4KOマウスでは発現が顕著に抑制されていた。実際に、心筋梗塞後初期に浸潤することが知られている好中球について、その浸潤量を比較したところ、GPR4KOマウスでは浸潤が有意に減少していた。さらに、GPR4KOマウスではサイトカイン発現量が顕著に減少しており、心筋梗塞後の炎症応答が減弱していることが明らかになった。続いて、GPR4による細胞接着分子の発現制御がpH低下によるものであるかを検証するため、WTマウスおよびGPR4KOマウスの心臓から血管内皮細胞を単離し、酸性培地を用いて低pH刺激を行った。その結果、GPR4はpHの低下を感知することで細胞接着分子の発現を増加させることを見出した。GPR4KOマウスでは心筋梗塞時の炎症応答が減弱していたことから、GPR4に起因する炎症応答の違いが、実際に心筋梗塞後の病態に与える影響を検証した。その結果、GPR4KOマウスでは心機能が有意に改善しており、さらに心筋梗塞後の予後を悪化させる要因となる線維化についても有意に抑制されていることを見出した。

本研究により、心筋梗塞時に低下するpHはGPR4を活性化させ、細胞接着分子の発現を増加させることで、炎症応答の発端となることを見出した。その結果、好中球の浸潤をはじめとする炎症応答が引き起こされ、心機能の低下などの病態悪化につながるということが明らかになった。

B2-3 遺伝子改変マウスを駆使したMg²⁺輸送体候補遺伝子の*in vivo*機能解析

○田頭 秀章¹、喜多 紗斗美^{1,2}、喜多 知¹、鈴木 沙里¹、岩本 隆宏¹
(¹福岡大学医学部薬理学、²徳島文理大学薬学部薬理学)

マグネシウムイオン (Mg²⁺) は生体機能の調節や維持に必須の2価カチオンであり、細胞内Mg²⁺濃度は多様なMg²⁺輸送体によって巧みに制御されている。それゆえ、Mg²⁺輸送体の機能破綻は様々な疾患につながると考えられ、実際に、Mg²⁺代謝異常は、心血管疾患(虚血性心疾患、不整脈、高血圧)、神経筋疾患、電解質異常症の併発などに関係することが知られている。我々は、近年同定された各種Mg²⁺輸送体候補遺伝子の*in vivo*機能解析を目的として、これらを標的とした遺伝子改変マウスを作製している。これまでの薬理学会で一部報告しているが、SLC41A2ホモ欠損マウスを用いた解析では、血中Mg²⁺濃度および尿中Mg²⁺排泄量の調節異常が認められ、摘出大動脈標本におけるアゴニスト誘発血管収縮反応の減弱が観察された。また、Mg²⁺透過チャネルであるTRPM7は腎尿細管のMg²⁺再吸収に関与すると考えられているが、腎尿細管特異的TRPM7機能抑制マウス(ドミナントネガティブ変異体導入マウス)では、尿中Mg²⁺排泄量の増加および血中Mg²⁺濃度の低下が認められ、SLC41A2ホモ欠損マウスと同様に、摘出大動脈標本におけるアゴニスト誘発血管収縮反応の減弱が観察された。これら両方の遺伝子改変マウスに高マグネシウム食を4週間摂取させると、アゴニスト誘発血管収縮反応の減弱はいずれも正常化された。さらに最近、CNNM2ホモ欠損マウスを作製したところ、血中Mg²⁺濃度の低下および尿中Mg²⁺排泄量の増加が認められた。興味深いことに、CNNM2ホモ欠損マウスの心電図をテレメトリー解析した結果、エピネフリン/カフェイン投与による不整脈が顕著に誘発されることを見出した。これまでに得られた結果は、SLC41A2、TRPM7およびCNNM2が生理的に重要なMg²⁺輸送体であることを示唆している。我々が作製した3種の遺伝子改変マウスは、Mg²⁺代謝異常症モデル動物として、Mg²⁺代謝異常に基づく心血管病態機序の*in vivo*解析に有用な研究ツールと考えられる。

B2-4 2型リアノジン受容体の機能低下型変異は細胞内Ca²⁺動態にどのような影響をおよぼすか?**YIA**

○哲翁 直之、呉林 なごみ、村山 尚、櫻井 隆
(順天堂大学医学部薬理)

背景と目的：2型リアノジン受容体(RyR2)は心筋の興奮収縮連関において中心的な役割を果たす小胞体のホモ4量体Ca²⁺遊離チャネルである。最近の次世代シーケンサーの発達により、RyR2の変異がカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)、特発性心室細動(IVF)、QT延長症候群(LQTS)、単連結性トルサードポアン(scTdP)など様々な不整脈性疾患に関与する症例が数多く報告されるようになった。これまでに我々は、³H]リアノジン結合実験からCPVT変異はすべて活性促進型(GOF)であるが、IVF、LQTS、scTdPに関連付けられる変異には活性低下型(LOF)が含まれることを明らかにしてきた。CPVT変異RyR2は異常な自発的Ca²⁺遊離を引き起こし易く、Na-Ca交換反応の活性化から不整脈を誘発すると考えられるが、LOF変異がどのように不整脈を起こすかよく分かっていない。今回我々はIVF、LQTS、scTdPに関連付けられているLOF型変異体が細胞のCa²⁺動態にどのような影響をおよぼすかについて、内在性RyR2がほとんどないHEK293細胞と内在性RyR2を発現するマウス心房筋由来HL-1細胞を用いて検討した。

方法：野生型(WT)および変異体ホモ4量体RyR2チャネルを発現するHEK293細胞の細胞質と小胞体Ca²⁺シグナルをG-GECO1.1とR-CEPIA1erを用いて測定した。またHL-1細胞にはバキュロウイルス発現系を用いRyR2とmCherryを同時に発現させ、細胞内Ca²⁺シグナルをCal520により測定した。

結果と考察：野生型RyR2をHEK細胞に発現すると周期的な細胞内Ca²⁺の振動を起こすが、LOF変異RyR2を発現させても全くCa²⁺振動を起こさなかった。一方、LOF変異RyR2をHL-1細胞に発現させたところ、5種類のうち3種類は活動電位誘発性Ca²⁺トランジエントの大きさを減少させたがCa²⁺waveは起こさなかった。一方、他の2種類の変異は頻回のCa²⁺waveを発生させた。このことは、野生型と変異型から成るヘテロ4量体RyR2チャネルの性質は、それぞれのホモ4量体の中間の性質とは異なる可能性が示唆された。これらの結果を合わせて、LOF変異体による不整脈発生機構について考察する。

B2-5 慢性心筋梗塞モデルにおける卵膜由来間葉系幹細胞シートの他家移植による心機能改善効果

○石兼 真^{1,2}、細田 洋司³、山原 研一³、秋武 義治³、池田 智明³、豊平 由美子¹、高橋 富美¹
 (1産業医科大学医学部薬理、2国立循環器病研究センター研究所生化学部、3国立循環器病研究センター研究所再生医療部)

【背景・目的】難治性心疾患に対する間葉系幹細胞 (MSC) 移植療法において、骨髄由来 MSC (BM-MSC) が広く用いられているが、臨床応用するためには課題がある。我々は、新たな移植細胞のソースとして、出産時に廃棄されている胎児付属物である卵膜に着目した。本研究では、慢性心筋梗塞 (MI) に対する他家卵膜由来 MSC (FM-MSC) シート移植と自己 BM-MSC シート移植の治療効果について比較検討を行った。

【方法】Lewis ラットの左冠状動脈前下行枝 (LAD) を結紮することにより、MI モデルを作製した。妊娠 GFP-SD ラットから得た FM-MSC、または GFP-Lewis ラットから得た BM-MSC を温度応答性培養皿に播種して細胞シートを作製した。MI 作製 4 週間後、心機能低下が認められたラットに対し、他家 FM-MSC シート、または自己 BM-MSC シートを梗塞部位に移植した。移植 4 週間後に心機能評価、心臓の免疫組織染色による移植細胞の生着性、血管新生作用や線維化抑制作用等を評価した。また、NIBS 系ミニブタの LAD の狭窄による MI モデルを作製した。MI 作製 4 週間後に NIBS 系ミニブタ由来 FM-MSC シートを他家移植し、移植 12 週間後に心機能評価を行った。

【結果】MI ラットにおいて、移植した他家 FM-MSC シートは時間経過と共に減少傾向が確認されたが 4 週間生着しており、移植部位での免疫反応は自己 BM-MSC 移植群と同様であった。移植 2-4 週間後に生着細胞において血管内皮や平滑筋細胞へのわずかな分化を認めた。他家 FM-MSC シート移植により、非治療群と比較して有意な血管新生、線維化抑制、心機能改善効果が得られた。これらの治療効果は、自己 BM-MSC シート移植群と同等であった。しかし、ラットと異なり MI ミニブタにおいては、他家 FM-MSC シート移植で非治療群と比較して有意な心機能改善効果は得られなかった。

【考察】小動物を用いた検討では、他家 FM-MSC シート移植は、自己 BM-MSC シート移植と同等の生着性、心機能改善効果を示した。しかし、大動物を用いた検討では心機能改善効果は得られず、MI に対する治療法として発展させるためには治療効果の改善が必要であり、現在効果改善に関する検討を行っている。

B2-6 炎症時における血管内皮細胞の硬さ変化と単球接着における細胞の硬さの役割

○岡本 貴行、白田 春樹、田中 徹也、和田 孝一郎
 (島根大学医学部薬理)

【目的】動脈硬化病変や血管壁硬化でみられる血管組織の線維化や石灰化によって血管硬化 (弾性率の増加) が生じる。血管硬化は血管内皮機能の減退や心血管イベント発生リスクと相関を示すことが報告されており、これらは血管の力学的性質の変化が血管機能に及ぼす可能性を示唆している。組織レベルでの血管の硬さ変化と機能の相関が示されつつある一方で、細胞レベルでの硬さ変化と機能の連携については不明な点が多い。本研究で我々は、血液凝固、炎症、白血球の接着を制御する血管内皮細胞に着目し、炎症時における血管内皮細胞の硬さ変化とその機構を解析した。

【方法と結果】細胞の硬さは Atomic force microscopy (AFM) を用いて測定した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を腫瘍壊死因子 (TNF- α) で刺激し、刺激 4 時間後、24 時間後に硬さを測定した。その結果、4 時間後に細胞の硬さは著しく硬化し、24 時間後には未刺激時と同程度まで軟化した。細胞の硬さは細胞骨格と細胞間相互作用の影響を受けることが知られている。次に細胞の硬化部位でのアクチンの重合を観察し、硬化部位でアクチンの重合が亢進することを示す結果を得た。さらに単一細胞はコンフルエントな状態の細胞より硬く、細胞間ギャップ結合を阻害した際には細胞の硬さは著しく増加することを明らかにした。また、硬化した血管内皮細胞上への単球の接着を評価した結果、硬さ依存的な細胞接着の亢進がみられた。

【結論と考察】炎症時に血管内皮細胞の表面は硬化し、硬化した血管内皮細胞には単球の接着が亢進することで血管病変形成が誘導されると考えられた。他方、ギャップ結合の異常は動脈硬化、高血圧など病態形成を促進することがすでに知られており、炎症時におけるギャップ結合の機能低下が細胞硬化を介して血管病変形成を促進する可能性が示唆された。

B3-1

急性腎障害－慢性腎臓病 transition モデルラットにおける尿中細胞外小胞アクアポリン1および2タンパク質放出パターンについての検討

○園田 紘子、Asvapromtada Siree、押川 さやか、星野 雄也、Sinlapadeelerdkul Titaporn、池田 正浩
(宮崎大学農学部獣医薬理)

近年の疫学調査の結果などから、急性腎障害 (acute kidney injury, AKI) から慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) への遷移過程 (AKI-CKD transition) に注目が集まっている。一方で、AKIやCKDでは腎において尿濃縮障害が生じることが知られている。尿や血液などの体液中には、様々な細胞から放出される細胞外小胞 (extracellular vesicles, EVs) が存在し、EVsには由来細胞の機能タンパク質や核酸が含まれている。EVsは細胞の状態を反映して放出されるため、近年バイオマーカーソースとして注目されている。腎の尿濃縮機能に重要な水チャネル、aquaporin-1 (AQP1) および AQP2は尿中EVsに存在することが明らかになっている (uEV-AQP1, uEV-AQP2)。そこで今回、AKI-CKD transition モデルラットを用いて uEV-AQP1 および uEV-AQP2 の放出パターンについて検討を行った。

実験にはSDラットを用いた。右腎を摘出した1週間後、左腎を35分間虚血にし、その後血液を再灌流させた (I/R群)。I/R群および偽手術群 (sham群) から任意の時点で採材を行い、各種パラメータを測定した。尿中EVは超遠心法により分離した。sham群と比べてI/R群では血中クレアチニン値が術後3日で9倍に上昇したがその後漸減し、35日ではsham群との間で有意な差は認められなかった。術後7日、35日において尿量は有意に増加し、尿浸透圧は低下した。組織解析では、I/R群において術後7日には著明な尿細管拡張、上皮細胞壊死が見られ、35日では尿細管障害は回復したものの、間質は著しく線維化していた。線維化の細胞マーカーである α -SMAを免疫染色したところ、術後7日の腎間質において多数の陽性細胞が観察されたが、35日にはその数の減少が見られた。uEV-AQP1およびAQP2はともに、術後7日のI/R群で著しく減少した。術後35日においては、uEV-AQP1はsham群レベルに回復したが、uEV-AQP2は減少したままであった。

以上の結果から、AKI-CKD transitionの時期 (α -SMA 陽性細胞数の増加期) には、uEV-AQP1およびAQP2ともにその放出が減少すること、一方で、AKI回復後の腎の線維化が重篤な時期では、uEV-AQP2のみ減少することが明らかとなった。これらの結果から、uEV-AQP1とuEV-AQP2とを組み合わせることで評価することにより、AKI-CKD transitionの状態を推測できる可能性が考えられた。

B3-2

Adriamycin誘導性ネフローゼ症候群モデルに対する微弱パルス電流及び温熱同時印加の効果

YIA

○寺本 啓祐^{1,2}、連川 雄^{1,2}、嘉村 美里^{1,2}、加世田 将大^{1,2}、小嶋 遥¹、桑水流 淳¹、大町 紘平^{1,2}、横田 翼¹、Mary Ann Suico¹、首藤 剛¹、甲斐 広文¹

(¹熊本大学大学院生命科学研究部(薬学教育)遺伝子機能応用、²熊本大学リーディング大学院HIGOプログラム)

物理刺激を応用した治療法であるPhysical medicineは、低侵襲性かつ処置条件の調節が容易であり、長期間の治療を要する難治性疾患の新規治療法として注目されている。これまで、本研究室では、生体が応答しうる最適化された低周波微弱パルス電流 (MES) と温熱 (HS) の併用処置 (MES+HS) が、2型糖尿病患者や種々の疾患モデルにおいて病態改善作用を有することを明らかにした。本研究では、未だ臨床的に有効な治療法が存在しない腎疾患、難治性ネフローゼ症候群に対するMES+HSの効果を検討した。

8週齢のBALB/cマウスに抗がん薬であるAdriamycin (ADR; 10 mg/kg) を単回尾静脈投与し、難治性ネフローゼ症候群の一つである巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) を誘導した。MES+HS処置は、ADR投与の前日から開始し、1回10分間、週に2回の頻度で行った。また、尿を4週間経時的に採取した。腎機能パラメーターや腎組織学的解析、各種分子の発現量を測定することで、MES+HSの効果の評価した。

まず、MES+HS処置群では、ネフローゼ症候群の主な特徴である尿中へのアルブミン漏出が、MES+HS未処置群と比較して有意に抑制された。このとき、ADRにより誘導される尿中タンパク質量の増加、および、腎病態に伴い増加する腎機能パラメーター血中尿素窒素 (BUN) の減少も認められた。また、MES+HS処置は、ADR誘導性の糸球体の硬化病変およびタンパク円柱などの尿細管障害を抑制した。さらに、活性化caspase3のタンパク質発現量およびアポトーシス・炎症・線維化関連遺伝子の発現量に関する検討から、MES+HS処置は、FSGSの発症に関わる糸球体上皮細胞のアポトーシスを抑制するのみならず、腎病態の進行に関わる炎症・線維化関連遺伝子の発現抑制作用をも有することが明らかになった。

以上、本研究では、ADR誘導性FSGSモデルマウスにおいて、MES+HS処置が、腎病態初期の発症規定因子である糸球体上皮細胞のアポトーシスを抑制するとともに、病態進行過程の炎症・線維化を抑制し、結果として、腎病態保護的に作用することを明らかにした。本知見は、Physical medicineとして注目されるMES+HSが、難治性ネフローゼ症候群に対する有用な治療法となることを示唆するものである。

B3-3 低酸素応答メカニズムを標的とした各種疾患治療法の開発

○南嶋 洋司
(九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門分子医科学分野)

我々の身体には、利用出来る酸素が限られた**低酸素環境 (hypoxia)** に対する生体防御反応 (低酸素応答) がプログラムされていますが、この低酸素応答は主に転写因子 **HIF** (hypoxia-inducible factor) によって制御されています。

正常酸素濃度環境 (normoxia) においては、HIFの α -サブユニット (HIF α) がプロリン水酸化酵素 **PHD** による水酸化を指標にユビキチン化されてプロテアソームにおける蛋白分解へと導かれるため、HIF 依存的低酸素応答はOFFになります。

逆に、低酸素環境下では、その酵素活性に酸素分子を必要とするPHDの活性が低下するため、PHDによるプロリン水酸化依存的な蛋白分解を免れたHIF α の発現量が急上昇し、転写因子HIFが活性化し、低酸素応答がONになります。

すなわち、PHDは酸素濃度センサーとしてHIF 依存的な低酸素応答を制御していると解釈することが出来ます。このことは、PHDの酵素活性を薬剤で阻害すれば、正常酸素濃度環境下においても低酸素応答を自由に活性化させることが出来ることを意味しています。

本発表では、現在腎性貧血の治療薬として臨床治験中の**PHD阻害剤**を、虚血再灌流障害、乳酸アシドーシスなど、さまざまな疾患の治療薬としてリポジショニングする試みについてディスカッションさせて戴ければと考えております。

B3-4 ミラベグロンによる β_3 アドレナリン受容体を介さない膀胱平滑筋の弛緩メカニズムの解明

YIA

○牧 知子¹、Kareman Eljamal²、梶岡 俊一²、笹栗 俊之²、江藤 正俊¹
(¹九州大学大学院医学研究院泌尿器科、²九州大学大学院医学研究院臨床薬理)

【緒言】過活動膀胱 (OAB: Overactive bladder) は尿意切迫感を必須とした症状症候群であり、患者のQOLを低下させる慢性疾患である。OABの標準治療薬はムスカリン受容体拮抗薬が用いられているが、口内乾燥や便秘などの副作用があり服薬を継続できない場合がある。2011年に新たに承認された選択的 β_3 (アドレナリン) 受容体作動薬 (ミラベグロン) はムスカリン受容体拮抗薬とは異なる作用機序を有している。私たちは膀胱平滑筋において、 β_3 受容体遮断薬 (SR58894A) 存在下においても、ミラベグロンが弛緩作用を有することを認め、ミラベグロンが β_3 受容体以外にも作用している可能性が示唆されたため、膜脱膜化標本を用いて検討を行った。

【目的】膀胱平滑筋のミラベグロンによる β_3 受容体を介さない弛緩メカニズムの解明を目的とした。

【対象と方法】ヒト、ブタ膀胱平滑筋 (新鮮標本、 α トキシン・ β エスチン処理膜脱膜化標本) に、当尺性収縮張力測定法を適用した。

【結果】ヒト膀胱平滑筋の新鮮標本でカルバコール累積投与による誘発性収縮をミラベグロン (30 μ M) は有意に抑制した。 α トキシン処理によるブタ膜脱膜化標本では、1 μ Mカルシウムによる収縮を100 μ M cAMPは59.3 \pm 11.8% (n=8)、100 μ Mミラベグロンは43.2 \pm 8.0% (n=22) 抑制した。選択的rho kinase (ROK) 阻害薬のY-27632 (10 μ M) および選択的protein kinase C (PKC) 阻害薬のGF-109203X 10 μ M存在下ではミラベグロンの弛緩作用は各々77.4 \pm 7.3% (n=4)、43.4 \pm 1.8% (n=4) であった。アデニル酸シクラーゼ阻害剤SQ22536 またはPKA阻害剤H-89存在下で1 μ Mカルシウムによる収縮に対してミラベグロンの弛緩作用はそれぞれ26.0 \pm 3.0%、35.8 \pm 1.5%と完全に抑制されなかった。一方、 β エスチン膜脱膜化標本では、100 μ M cAMPはほとんど弛緩効果を示さないのに対し、100 μ Mミラベグロンは42.3 \pm 2.0% (n=5) の弛緩効果を認めた。

【結語】ミラベグロンによる膀胱平滑筋に対する弛緩作用は β_3 受容体を介したcAMP依存性の弛緩作用と非依存性の弛緩作用があることを認めた。

B3-5

Comparison of the hydrogen sulfide-induced relaxation effect on the bladder between hypertensive and normotensive rats

YIA

○ZOU SUO¹、清水 孝洋¹、清水 翔吾¹、尾野 秀彬^{1,2}、清水 陽平¹、山本 雅樹¹、
新武 享朗¹、長尾 佳樹¹、濱田 朋弥¹、上羽 佑亮¹、東 洋一郎¹、齊藤 源顕¹
(¹高知大学医学部薬理、²高知大学)

Aim of study: Our recent report showed that hydrogen sulfide (H₂S) has a possible role as an endogenous relaxation factor in the rat bladder. Because we have shown that bladder dysfunctions develop in spontaneously hypertensive rats (SHRs), we compared effects of NaHS and GYY4137 (H₂S donors) on contractility of the bladder and on micturition reflex between SHRs and normotensive control rats (Wistar rats).

Methods: Eighteen-week-old male SHRs and Wistar rats were used. Effects of NaHS (1 × 10⁻⁸ to 3 × 10⁻⁴ M) were evaluated on carbachol (10⁻⁵ M)-induced pre-contracted rat bladder strips. Under urethane-anesthesia (0.8 g/kg, ip), a catheter was inserted into the rat bladder to instill reagents at 2.4 ml/h (vehicle or GYY4137 at 10⁻⁸, 10⁻⁷ and 10⁻⁶ M) and to measure intravesical pressure.

Results: NaHS induced maximal relaxation rate was significantly higher in the bladder strips from Wistar rats than those from SHRs. Intravesically instilled GYY4137 significantly prolonged intercontraction intervals in Wistar rats, but not in SHRs.

Conclusions: H₂S-induced bladder relaxation in SHRs is impaired. It might be a cause of hypertension-mediated development of bladder dysfunctions.

B4-1

DIF-1 は STAT3 シグナルの阻害により悪性黒色腫細胞の遊走・浸潤を抑制する

YIA

○久保 桃子、有岡 将基、哲翁 ふみ、笹栗 俊之
(九州大学大学院医学研究院臨床薬理)

【目的】 Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* において、柄細胞への分化を誘導する物質として同定された低分子化合物であるが、DIF-1 の作用は細胞性粘菌にとどまらず、哺乳類の細胞に対しても強力な増殖抑制・分化誘導作用を示す。これまでに、新規抗がん薬の開発が強く求められている悪性黒色腫に対する DIF-1 の効果を検討したところ、DIF-1 は悪性黒色腫細胞の増殖、遊走、浸潤、肺コロニー形成を顕著に抑制した (Arioka et al. *Biochem Pharmacol* 138: 31-48, 2017)。しかし、DIF-1 による細胞遊走・浸潤抑制の機序は不明のままであったため、今回検討することにした。

【方法】 悪性黒色腫細胞は、ヒト由来 A2058 細胞株を用いた。細胞遊走能は wound healing assay で、細胞浸潤能は cell invasion assay で評価した。タンパク質の発現量とリン酸化は、Western blotting 法と定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。

【結果・考察】 DIF-1 は、A2058 細胞の遊走、浸潤を有意に抑制し、細胞遊走に關与する matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、twist、vimentin、N-cadherin の発現を減少させた。これらの上流に位置すると想定され、がんの進行において重要な役割を果たすことが知られている STAT3 について調べたところ、DIF-1 は STAT 3 のリン酸化を有意に抑制した。さらに、DIF-1 は Src のタンパク質発現レベルを減少させたため、これにより STAT 3 シグナルを抑制すると考えられた。また、STAT3 阻害薬は、MMP-2、twist、vimentin、N-cadherin の発現を減少させ、細胞遊走・浸潤を有意に抑制した。これらの結果から、DIF-1 は、STAT 3 シグナル伝達経路を阻害することにより、悪性黒色腫細胞の遊走・浸潤を抑制することが明らかとなり、DIF-1 が悪性黒色腫に対する新規治療薬となり得ることが示唆された。

B4-2 新規 TRPC3-Nox2 複合体阻害剤の探索および効果の検証

○西山 和宏¹、赤司 壮一郎¹、富田 拓郎^{2,3}、藤本 泰之^{2,4}、田中 智弘²、西村 明幸¹、
東 泰孝⁴、西田 基宏^{1,2,3}

¹九州大学大学院薬学研究院創薬育薬研究施設統括室、

²自然科学研究機構生命創成探究センター心循環ダイナミズム創発研究グループ、³総合研究大学院大学、

⁴大阪府立大学大学院生命環境科学研究所統合バイオ機能(応用薬理)

当研究グループはこれまで、アントラサイクリン系抗がん剤の一種であるドキソルビシンが transient receptor potential canonical (TRPC) 3タンパク質の発現量を増加させることで活性酸素生成酵素 (NADPH oxidase2: Nox2) のタンパク質分解を抑制し、結果的に活性酸素の増大を介した心筋毒性を誘発することを個体レベルで見出した。抗がん剤を用いた化学療法は、全身性のがんに対して有効な治療法であるものの、長期的には正常組織機能も低下させるため、その使用が制限されている。特に、ドキソルビシンは多くのがんに有効であるものの、心筋・骨格筋の萎縮や腎障害、免疫機能低下といった強い副作用があるため、がん治療のために高用量を用いることが難しい。そこで、本研究では、既承認薬の中から TRPC3-Nox2 複合体を阻害する化合物を探索し、ドキソルビシンの毒性に対する有効性の検証を行った。

RAW264.7細胞を用いた独自のスクリーニング系により1280種類の既承認薬ライブラリーから17種類のヒット化合物を得た。さらにそのうち、TRPC3-Nox2複合体を阻害しROSの産生を減少させる既承認薬Xを同定した。また、既承認薬Xは心筋細胞だけでなく骨格筋細胞、免疫細胞におけるドキソルビシン毒性も軽減できることが明らかとなった。さらに、既承認薬Xはドキソルビシンによるがん細胞死に対しては全く影響を与えず、別の抗がん剤であるシスプラチンによる細胞毒性も有意に抑制することを見出した。

以上の結果より、既承認薬XがTRPC3-Nox2複合体を阻害し、ROS産生を抑制することで抗がん剤の副作用を軽減する可能性が示された。

B4-3 がん悪液質誘発性心機能障害に対する自発的運動の効果

○野中 美希¹、柿木 亮²、呉林 なごみ³、村山 尚³、寺脇 潔⁴、櫻井 隆³、上園 保仁^{1,5}、
上野 晋⁶

¹国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野、²順天堂大学医学部生理学第二講座、³順天堂大学医学部薬理、

⁴株式会社ツムラ漢方研究開発本部ツムラ漢方研究所漢方研究三部基礎研究G、

⁵国立がん研究センター研究所先端医療開発センター支持療法開発分野、⁶産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学)

【目的】がん自体の進行や抗がん剤の副作用に伴う全身性の機能低下は、がんと就労とを両立させる上で大きな障害となる。特に抗がん剤やがん悪液質によって起こる心機能障害は、がんと就労の両立を含め、患者のQOLや治療予後という点において極めて重要な課題でありその対策は急務である。ヒトのがん悪液質では心機能障害が起こることが報告されているものの、ヒトの臨床症状に類似した適切なモデルがほとんどなかったことから、がん悪液質と心機能との関係については不明な点が多く残されていた。我々はヒト胃がん細胞株を移植することにより、ヒト患者で観察されるものと同様の食欲不振や体重減少を示す新規がん悪液質モデルマウスを確立した。本研究では、このがん悪液質モデルマウスを用いて心機能を評価するとともに、自発的運動の効果について検討した。

【方法】ヒト胃がん細胞由来である85As2細胞を8週齢の雄のBALB/c nu/nuマウスの両側皮下(1×10⁶ cells/site)に1回接種すると、移植後2週目以降から悪液質の指標となる体重、骨格筋重量、ならびに食餌摂取量等の減少を示す。本研究では前悪液質群(移植後2週目)および悪液質群(移植後8週目)の2群に分けて、それぞれの群に対する同週齢の対照群と比較することにより、心機能を中心とした悪液質症状、ならびにこれに対する回し車による自発的運動の効果を検討した。

【結果】同週齢の対照群と比較して、前悪液質群ならびに悪液質群では心臓重量が有意に減少し、特に悪液質群における減少が顕著であった。さらに左室駆出率(LVEF)についても前悪液質群、悪液質群でいずれも有意に減少しており、心電図では悪液質群においてQT時間の有意な延長も認められた。回し車による自発的運動により、悪液質群では心臓重量の減少の抑制とともにLVEFの改善も認められた。

【結語】以上の結果より、85As2細胞を移植したマウスは心機能障害を伴うがん悪液質を再現する新たなモデルマウスとして有用であり、また自発的運動は悪液質誘発性心機能障害の改善効果があることが判明した。一般的な心不全の症状改善に運動療法が用いられていることは知られているが、本研究によりがん悪液質によって誘発される心機能障害に対しても運動療法が治療効果を発揮する可能性が示唆された。

B4-4

4本鎖DNA結合性新規化合物の癌細胞増殖抑制効果について

YIA

○福田 晃^{1,3}、佐藤 しのぶ²、東 泉³、大住 伴子³、竹中 繁織²、富永 和宏¹、竹内 弘³
¹九州歯科大学歯学部顎顔面外科学分野、
²九州工業大学工学研究院物質工学研究系応用化学部門バイオマイクロセンシング技術研究センター、
³九州歯科大学歯学部口腔応用薬理)

【目的】テロメア配列を染色体末端に伸長させる酵素テロメラーゼは、癌細胞型の80%以上で過剰発現を認めるため、抗癌剤開発の新たな標的として期待される。本研究では、テロメア反復配列が生細胞内で4本鎖構造を形成することに着目し、4本鎖DNA構造への特異性向上を期待して新たに開発された化合物の抗腫瘍効果について各種細胞株を用いて検討した。

【材料および方法】環状ナフタレンジイミド(cNDI)誘導体及び環状アントラキノン(cAQ)誘導体は、九州工業大学・竹中研究室にて合成した。細胞はヒト口腔癌由来細胞株Ca9-22、SAS、HSC-2、KBおよび不死化ヒト細胞株HEK293、マウス大腿骨より採取した骨髓細胞、およびヒト正常角化細胞を用いた。細胞増殖試験はWST-8法により行った。遺伝子の発現は各細胞から調製した全RNAを逆転写し、PCRおよびリアルタイムPCR法にて解析した。各細胞のテロメラーゼ活性はTelomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) アッセイで比較した。本実験内容について九州歯科大学動物実験倫理委員会の承認(16-013)を得ている。

【結果と考察】検討した全ての化合物は用量依存的に細胞増殖を抑制した。なかでもcAQ-mBenによる細胞増殖抑制効果では、各細胞株におけるTERT遺伝子のmRNA発現レベルと相関傾向を認めた。細胞増殖抑制効果について、マウス骨髓細胞及びヒト正常表皮角化細胞を対象として比較したところ、既存の抗癌剤シスプラチンは癌細胞株と対象の正常細胞に対し同程度の効果を示した。一方、cNDI及びcAQ-mBenは正常細胞よりも癌細胞株に対して高い細胞増殖抑制効果を示した。本研究では4本鎖DNAへの結合特異性の向上を図った化合物はいずれも癌細胞増殖を抑制し、その効果は癌細胞に対して高い特異性を示した。

P-1

インターロイキン-27による感覚感度の調節

○八坂 敏一¹、笹栗 智子²、田口 徹³、村田 祐造⁴、小林 希実子⁵、飯笹 さやか⁶、
 飯笹 英一¹、津田 誠⁷、平川 奈緒美²、原 博満¹、吉田 裕樹⁸
¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科免疫学、²佐賀大学医学部麻酔・蘇生学、
³新潟医療福祉大学リハビリテーション学部運動機能医科学研究科、⁴佐賀大学医学部生体構造機能学、
⁵兵庫医科大学医学部解剖学、⁶鹿児島大学大学院連合農学研究科先端応用生命科学連合、
⁷九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野、⁸佐賀大学医学部免疫学)

近年免疫分子が慢性疼痛に関与することが多数報告されている。これらには、炎症性サイトカイン(インターロイキン(IL)-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17等)が痛みを誘発するという報告や、抗炎症性サイトカイン(IL-10等)が痛みを抑制するという報告も含まれている。IL-27は、免疫刺激等により抗原提示細胞等から分泌されT細胞の分化を介してIL-17産生を抑制し、IL-10産生を促進することが知られている。我々は、IL-27が痛みの調節に関与することを期待して遺伝子欠損マウスの行動解析を行った。本研究では、予想外に発見されたIL-27の新たな機能について報告する。IL-27はEBI3とp28からなり、その受容体は特異的受容体WSX-1とgp130からなる。実験にはEBI3, p28, WSX-1欠損マウスを用いた。これらの欠損マウスは、未処置の状態では熱刺激、機械刺激において疼痛関連行動の増強を示した。IL-27は免疫刺激等によって誘導されるため、我々は、何かの処置後に表現型が現れると予想していたため、予期せぬ結果であった。IL-27欠損マウスにIL-27を補うことで、この表現型は速やかに正常化された。また、野生型マウスのIL-27を中和抗体で阻害すると欠損マウスと同様の表現型が速やかに誘導された。これらの実験において効果が速やかに現れたことから、T細胞の分化は関与していないことが示唆された。また、皮膚-神経標本による検討を行った結果、行動実験で見られたような機械刺激に対する反応の増強が観察された。この結果により、IL-27の作用部位は皮膚あるいは末梢神経であることが示唆された。これらの欠損マウスに従来の慢性疼痛モデルを適用したところ、さらなる閾値の低下が観察された。この結果は、IL-27シグナル欠損により閾値が低下する機序は、従来の慢性疼痛モデルのそれらとは異なることを示唆している。以上の結果から、IL-27は新規な機序により基底の感覚感度を調節している可能性が示唆された。

P-2

TRPV4に対するアセトアミノフェンの作用

YIA

○中川 文雄^{1,2}、東 泉²、大住 伴子²、渡邊 誠之¹、竹内 弘²
 (¹九州歯科大学歯学部歯科侵襲制御、²九州歯科大学歯学部口腔応用薬理)

【目的】アセトアミノフェン (APAP) は、非ステロイド性抗炎症薬と比較してシクロオキシゲナーゼ阻害作用が弱く、解熱鎮痛薬として広く用いられている。APAPはその代謝産物である N-arachidonoyl-phenolamine (AM404) が transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) や TRP ankyrin 1 (TRPA1)、カンナビノイド受容体1などの活性化を介して作用を発揮すると報告されている。最近我々は APAP が TRPV4 を介して細胞遊走能を修飾することを見出したので、本研究では APAP が TRPV4 のカルシウム (Ca^{2+}) チャンネル機能に及ぼす作用を検討した。

【方法】細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は、Fura 2-AM で標識した細胞の蛍光画像を 2 波長励起蛍光顕微鏡で取得し、F340/F380 比として測定した。

【結果と考察】RT-PCR 法にて TRPV4 の強い発現と TRPV1 の弱い発現を認めたラット副腎褐色細胞腫由来細胞株 PC12 において、APAP 及び AM404 はいずれも単独で細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を起こさなかったが、TRPV4 選択的作動薬 GSK1016790A による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制した。また、TRPV4 を発現しないヒト口腔癌由来細胞株 KB にマウス TRPV4 を遺伝子導入し、同様に細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、遺伝子導入した細胞でのみ、GSK1016790A による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と APAP によるその抑制効果を認めた。以上の結果は、APAP と AM404 が TRPV4 に対して抑制的に作用することを示唆しており、TRPV4 が APAP の新たな分子標的であることを示唆するものである。

P-3

神経障害性疼痛寛解期の社会的敗北ストレス負荷は痛覚閾値の再低下を引き起こす

○齊藤 秀俊¹、八田 拓弥¹、井上 和秀²、津田 誠¹
 (¹九州大学大学院薬学研究院ライフイノベーション分野、²九州大学大学院薬学研究院薬理)

実社会において数多くの人が慢性の痛み苦しんでいる。痛みは主観的な訴えでしか計ることができないが、日常生活への障害を伴い様々なストレス負荷状態を引き起こす。また、ストレス応答は体の様々な器官に影響を及ぼすが、痛みの感受性変化にも十分影響していると考えられる。本研究課題ではストレス応答によって引き起こされる末梢炎症応答と、神経障害性疼痛モデルを用いた慢性疼痛病態の解析を組み合わせ、慢性疼痛に対するストレスの影響・炎症応答への影響について行動解析を行った。

腰髄から後肢に投射する末梢神経束を切断する神経障害性疼痛モデルマウスの疼痛病態は4週間後程度で回復を示す。この時、LPSを腹腔に投与し全身性に弱い炎症応答を惹起させることによって、一度は回復した疼痛病態が再発することを見出した。また、他のマウスから攻撃を受けることによる社会的敗北ストレスを負荷されたマウスにおいても同様の再発が見られたが、末梢神経傷害を経験していないマウスにおいては痛み閾値の変化は見られなかった。全身性の炎症応答によって惹起される痛みと心理社会的なストレスによって引き起こされる痛みの2つの相関をつなぐメカニズムを解析するために、LPSによって惹起されることが知られているサイトカイン類を静脈投与し、インターロイキン1 β の静脈内投与によって痛みの再発を再現することを見出した。脊髄組織中のミクログリアの活性化レベルをIba1タンパク発現レベルの発現で解析したところ、ストレス負荷後やLPS投与後の脊髄組織においてミクログリア活性化レベルの再増加を見出した。これらの結果は、ストレスや末梢炎症応答等が一度痛みに関連したミクログリアを再活性化させることによって、疼痛病態の再燃を引き起こすことを示唆している。

P-4

社会的長期隔離飼育マウスの攻撃行動増加に対する抑肝散と抑肝散加陳皮半夏の効果

YIA

○才宮 万季¹、射場 日佳里¹、松澤 香奈絵¹、藤田 柁平¹、森山 博史¹、窪田 香織^{1,2}、
桂林 秀太郎¹、渡辺 拓也^{1,2}、岩崎 克典^{1,2}
(¹福岡大学薬学部臨床疾患薬理、²福岡大学加齢脳科学研究所)

抑肝散は中国で作られた漢方薬であり、抑肝散に陳皮と半夏を加えた抑肝散加陳皮半夏は日本において経験的に開発されたものである。両漢方薬は、子供の夜泣き・痲癩や不眠症ならびに神経症に対して処方されているが、その両漢方薬の使い分けに関する科学的根拠は乏しい。そこで、本研究では若週齢マウスの攻撃行動に対する抑肝散と抑肝散加陳皮半夏の効果について比較検討を行った。

5週齢雄性マウスを1ケージに1匹の条件で6週間飼育した(単独隔離飼育マウス)。その後、他マウスに対する攻撃行動回数を10分間評価した。抑肝散(1000 mg/kg)と抑肝散加陳皮半夏(1000 mg/kg)は、攻撃行動解析実験の2週間前から1日1回経口投与した。正常対照マウスには、1ケージに3~6匹で飼育したもの(群飼育マウス)を用いた。攻撃行動解析実験後、採血と扁桃体摘出を行い、ELISAと定量PCRを行った。

単独隔離飼育マウスは、群飼育マウスに比べて攻撃行動回数の増加を示した。また、単独隔離飼育マウスへの抑肝散の投与は、攻撃行動回数の増加を有意に抑制した。一方、抑肝散加陳皮半夏の投与は、攻撃行動回数増加に対して有意な抑制効果を示さなかった。単独隔離飼育マウスの血漿中corticosterone量は、群飼育マウスのものと比べて有意に増加した。抑肝散ならびに抑肝散加陳皮半夏投与は、その増加に対して抑制効果を示さなかった。単独隔離飼育マウスの扁桃体では、群飼育マウスと比較して、5-HT_{2A}受容体mRNA発現量の有意な増加が認められた。抑肝散加陳皮半夏投与マウスにおいても5-HT_{2A}受容体mRNA発現量の有意な増加が認められたが、抑肝散投与マウスでは、その有意な増加は認められなかった。

本結果から、攻撃行動に対して抑肝散は有効であり、抑肝散加陳皮半夏は有効ではないことが明らかとなった。また、その攻撃行動の抑制効果には、扁桃体の5-HT_{2A}受容体が寄与することが示唆された。

P-5

X線照射後の初代培養神経細胞におけるCl⁻トランスポーター発現解析

○五十嵐 健人、富田 和男、佐藤 友昭
(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科応用薬理)

γ -アミノ酪酸(GABA)は中枢神経における主要な抑制性神経伝達物質の一つである。リガンドを受容したGABA受容体は細胞内外の濃度勾配に従って細胞内にCl⁻イオンを流入させる。細胞内のCl⁻イオンが増え過分極を起こすため、活動電位を生成しにくくなる。K⁺/Cl⁻ co-transporterであるKCC2は細胞内のCl⁻イオンを排出して細胞内Cl⁻を低濃度に維持する上で重要な役割を果たしている。成熟した神経細胞ではKCC2が十分に機能しているのに対して、未成熟な細胞や病的な細胞ではKCC2の機能が不十分であるため細胞内外のCl⁻イオン濃度勾配が逆転して脱分極しやすい状態にある。先行研究から強制飲水ストレスを負荷した雌性マウスでは海馬におけるKCC2の減少や新奇物体探索時間の減少が明らかになっており、ストレス負荷によるKCC2の機能低下は認知機能とも関わる可能性が考えられる(Tsukahara et al., 2015)。

X線などの低LET電離放射線を用いた脳腫瘍治療では腫瘍細胞だけでなく正常な神経細胞にもダメージを与える。知能低下など悪影響を及ぼす分子機構に関わる知見は、その分子機構を標的とした防護薬物の探索に有用である。低LET電離放射線を照射された生体内では水分子との反応により過酸化水素(H₂O₂)を含む活性酸素種を生成する。先行研究ではH₂O₂により初代培養神経細胞におけるKCC2の機能低下が明らかになっている(Wake et al., 2007)。従って我々はX線照射によりKCC2の機能低下が惹起され、放射線治療後の高次脳機能の低下を引き起こしているものと推察している。

この仮説を検証するため我々はラット胎児脳由来の初代培養細胞を用いて解析している。抗KCC2抗体を用いた免疫蛍光染色の結果ではH₂O₂添加培地で培養した細胞はH₂O₂非添加培地の細胞と比べ細胞表面のシグナルが低下しており、KCC2が減少していることが示唆された。次にX線1.5Gy照射した細胞についても調べたところ、非照射細胞と比べて細胞表面のシグナルが低下していた。H₂O₂添加培地での処理後にオキシトシン添加培地に交換した細胞ではシグナルの回復がみられた。今後初代培養実験系を用いた解析により投与する薬物の選択や方法について検討し、実験動物を用いた検証を計画している。

P-6

認知症で認められる血液脳関門破綻に対する microRNA に着目した新規治療戦略開発の可能性

○茂木 正樹¹、外山 研介¹、Josh Spin²、Tsao Philip²(¹愛媛大学大学院医学系研究科薬理学、²Stanford University School of Medicine Division of Cardiovascular Medicine)

マウスの両側総頸動脈を狭窄して慢性脳低灌流状態とした認知症モデル、及び初代脳血管内皮細胞を用いた実験等から、血管内皮細胞間のタイトジャンクション崩壊によるBBB破綻にTNF α が重要な役割を担っていることを我々は報告してきた。今回、TNF α がタイトジャンクションを修飾して血液脳関門(BBB)の破綻を引き起こす現象の下流を調べることにより、Key-microRNAを同定し、そのmicroRNAが新たな治療戦略に結びつく可能性を模索した。

トランスレーショナルリサーチの観点から、ヒトとマウスのタイトジャンクション(Claudin-5、ZO-1、Occludin)をそれぞれ共通制御しえる8つのmicroRNAがin silicoの解析によりリストアップされた。このうちmiR-497-3pと501-3pのみが、脳血管内皮細胞を用いたin vitroの実験系でTNF α に反応して発現が増加した。マウスの両側総頸動脈にマイクロコイルを巻きつけて慢性脳低灌流状態(BCAS術)にすると、脳梁部の白質病変化とともに作業記憶能が低下する。このマウスの脳白質ではTNF α の発現の増加と、Claudin-5・ZO-1の発現の減少が認められる。興味深いことに、この脳白質部から単離された血管内皮細胞でのmiR-501-3p発現は増加した(miR-497-3pは不変)。野生型マウスへTNF α を投与すると脳梁白質部のmiR-501-3pは増加し、初代マウス脳血管内皮細胞(mPBMEC)でもTNF α 刺激でmiR-501-3pの発現が増加した。ZO-1の3'-UTRを挿入したLuciferase reporter vectorとpre-miR-501-3pをヒト脳血管内皮細胞へco-transfectすると、Luciferaseの発光が対照と比べて減少し、miR-501-3pをmPBMECで過剰発現させるとZO-1の発現と細胞間の電気抵抗値が減少したことから、miR-501-3pはZO-1を制御することで細胞間の結合に関わっている可能性が考えられた。最終的に、BCASマウスへmiR-501-3pのアンチセンスを投与すると、脳白質部でのZO-1減少、BBB破綻、作業記憶障害や白質病変が軽減したことから、miR-501-3pが認知症における新たな治療戦略の開発に結びつく可能性が期待された。

P-7

脳ペリサイトによる α -シヌクレインの細胞内取り込み機構

○矢野 瑞紀、道具 伸也、横谷 みき、高田 芙友子、松本 純一、木村 郁哉、山内 淳史、片岡 泰文

(福岡大学薬学部薬学疾患管理)

【背景・目的】パーキンソン病は黒質線条体のドパミン神経の変性・脱落およびレビー小体の蓄積を特徴とする神経変性疾患である。パーキンソン病患者では血中および脳内での α -シヌクレイン(α -Syn)増加が認められ、 α -Synの凝集体を主成分とするレビー小体の増加および伝播が病態進展に相関する。病変の拡大には、神経細胞間および神経細胞-グリア細胞間での α -Synの伝播が関与するとされるが、この細胞間伝播の過程における血液脳関門構成細胞(脳血管内皮細胞、脳ペリサイト)の関与は不明である。我々は、グリア細胞と同様に、脳ペリサイトは α -Synに応答して、炎症性サイトカインおよびmatrix metalloproteinase-9を産生する α -Syn感受性細胞であることを明らかにした。そこで、本研究では脳ペリサイトによる α -Synの細胞内取り込み機構について、脳血管内皮細胞およびアストロサイトと比較検討した。

【方法】3週齢および生後1日齢のWistarラットから脳血管内皮細胞、脳ペリサイトおよびアストロサイトを単離培養した。これら細胞にHylite 488標識ヒト α -Syn(5 μ g/mL)および非標識ヒト α -Syn(10 μ g/mL)を処理し、一定時間後の細胞内取り込み量を蛍光プレートリーダーおよびwestern blot法にて測定した。

【結果・考察】 α -Synの120分までの細胞内取り込み量は脳血管内皮細胞が最も多く、脳ペリサイトとアストロサイトは同程度であった。脳ペリサイトの α -Syn取り込みは過剰量の α -Syn(50 μ g/mL)存在下および4°C下で有意に減少したことから、脳ペリサイト内への α -Syn取り込みには飽和性およびエネルギー依存的な輸送機構の関与が示唆された。さらに、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤であるsertralineは α -Syn取り込みを阻害しなかった。また、24 hr後の細胞内取り込み量はオートファジー阻害剤であるbafilomycin A1によって増加し、この作用は脳ペリサイトでのみ認められた。以上の結果から、脳ペリサイトには α -Synを細胞内へ取り込む輸送担体および取り込まれた α -Synをオートファジー依存的に分解する特異的機構が存在することが示唆された。

P-8

Flavonolignan である Silybin のカテコールアミン分泌とインスリン分泌に及ぼす影響

○坂巻 路可¹、豊平 由美子²、石兼 真²、高橋 富美²
(¹西南女学院大学保健福祉学部栄養学科、²産業医科大学医学部薬理学)

【目的】医用植物として知られるマリアアザミ (*Silybum marianum*) の種子は古くから肝疾患治療薬として民間療法に使用されてきた。Silymarin は種子から抽出された flavonolignan の混合物で、主な活性成分は、silybin (または silibinin), silychristin, silydianin 等である。この中で Silybin が最も生物活性が高い flavonolignan であり、肝臓保護物質としてだけでなく、糖尿病患者のインスリン抵抗性を低下させることも報告されている。現代社会において、生活習慣病は増加の一途を辿っており、ストレス負荷は増悪要因となっている。本研究では、生活習慣病への Silybin の影響を検討する目的で、ストレス負荷により増加するカテコールアミン (CA) 生合成・分泌への影響についてウシ副腎髄質細胞を用いて、また同じくストレス負荷により上昇する血糖値への影響を膵β細胞由来細胞株 MIN6 細胞でのインスリン分泌を測定することで検討した。

【方法】培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、CA 分泌は細胞を刺激して遊離された CA を水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法にて蛍光定量した。CA 生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の活性は ¹⁴C-tyrosine 基質として、リン酸化はウエスタンブロッティング法により測定した。マウス膵β細胞 MIN6 を用いたグルコース刺激によるインスリン分泌は ELISA 法を用いて吸光度 (450 nm) にて定量した。

【結果】Silymarin はニコチン性アセチルコリン受容体刺激による CA 分泌を抑制したが、High K 刺激による CA 分泌には影響しなかった。Silybin, silychristin, silydianin はアセチルコリン受容体刺激による CA 分泌を抑制し、silybin が最も強い抑制作用を示した。Silymarin, silybin は TH 活性を抑制した。Silymarin と silybin はグルコース刺激によるインスリン分泌を濃度依存性に抑制した。

【考察】Silybin は、イオンチャンネル機能を阻害して CA 分泌を抑制し、グルコース刺激によるインスリン分泌を抑制する効果が示唆された。作用機序の解明は今後の検討課題である。

P-9

心筋サルコメアにおける心筋ミオシン結合蛋白質 C とフォルミン蛋白質 Fhod3 との相互作用

○鹿毛 陽子¹、松山 翔^{1,2}、住本 英樹²、武谷 立¹
(¹宮崎大学医学部機能制御学講座薬理学分野、²九州大学大学院医学研究院生化学分野)

心筋ミオシン結合蛋白質 C (cMyBP-C) は、心筋βミオシン重鎖とならび家族性肥大型心筋症の主要な原因遺伝子の一つである。cMyBP-C は、心筋の収縮装置サルコメアにおいて、A 帯 (暗帯) と呼ばれるミオシン存在部位の中でも中心に近い C ゾーンに局在しており、アクチンやミオシンと直接結合することでアクトミオシンのクロスブリッジ形成の制御に関わっていると想定されているが、その分子メカニズムについては依然不明な点が多い。今回我々は新規の cMyBP-C 結合蛋白質として、アクチン調節因子であるフォルミン Fhod3 を同定した。Fhod3 は、アクチン線維のプラス端に直接結合してアクチン重合を制御することで、心筋サルコメア内のアクチン線維の形成を促進し、心臓の発生や発達、心機能の維持に必須の役割を果たしている。In vitro タンパク質間相互作用解析により、心筋型 Fhod3 に特異的な N 末領域が心筋型 cMyBP-C に特異的な N 末端 Ig 様ドメインと直接相互作用することを明らかにした。心筋型 Fhod3 は心筋サルコメア内の C ゾーンで cMyBP-C と共局在しているが、cMyBP-C 結合領域を欠いた Fhod3 非心筋バリエーションは C ゾーンに局在できなかったことから、この相互作用が心筋型 Fhod3 の C ゾーンへの局在を規定していると考えられた。さらに興味深いことに、この Fhod3 と cMyBP-C との相互作用は、ミオシンによって濃度依存的に阻害されたことから、cMyBP-C によるアクトミオシンのクロスブリッジ制御に Fhod3 が関与している可能性が示唆された。以上より、cMyBP-C と Fhod3 との直接的な相互作用は、心臓の収縮能の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

P-10

アンジオテンシンⅡ及びアンジオテンシンⅡ+食塩負荷高血圧モデルマウスにおけるジメチルセレコキシブの心・腎保護効果

○山本 美佐紀¹、高橋 富美²、笹栗 俊之¹
 (¹九州大学大学院医学研究院臨床薬理、²産業医科大学医学部薬理)

【背景】我々は、ジメチルセレコキシブ (DMC) が、GSK-3の活性化による Wnt/ β カテニン系の抑制により、拡張型心筋症と圧負荷心不全における心臓リモデリングを抑制することを報告した。レニン-アンジオテンシン系の活性化は心血管病や慢性腎臓病の進展に中心的な役割を果たす。そこで今回、アンジオテンシンⅡ (Ang Ⅱ) 負荷による高血圧モデルマウス及び Ang Ⅱ + 食塩負荷モデルマウスにおけるジメチルセレコキシブ (DMC) の心臓・腎臓への効果について検討した。

【方法】実験には、C57BL/6J マウス (8 ~ 10 週齢雄) を用いた。

プロトコール1 (P1) :

Ang Ⅱ は、浸透圧式ポンプを用いて6週間持続注入 (2.0 mg/kg/min) した。DMC は固形飼料へ添加した。① vehicle 投与群、② Ang Ⅱ 投与群、③ Ang Ⅱ + DMC 投与群の3群に分け、tail cuff法にて毎週血圧を測定し、投与前と6週間後に心エコー検査を行い、24時間蓄尿にて尿中アルブミン値を測定した。また、6週間後に心臓・腎臓を摘出して組織学的に評価した。

プロトコール2 (P2) :

P1の処置に加え、4%NaClを固形飼料へ添加した。① control群: vehicle 投与 + 無添加飼料、② DMC群: vehicle 投与 + DMC 飼料、③ AS群: Ang Ⅱ + 4%NaCl 飼料、④ AS DMC群: Ang Ⅱ + 4%NaCl + DMC 飼料の4群に分け、P1と同様に評価した。尿中アルブミン値は2週間毎に測定した。

【結果】Ang Ⅱ 投与により血清アルドステロン値と血圧の有意な上昇がみられたが、DMC 投与はこれらには影響しなかった。P1・P2とも心臓の肥大・線維化が有意に増強したが、DMC 投与によりP1では減弱傾向を示し、P2では有意に抑制された。腎臓では、P1・P2とも尿中アルブミン値が増加し、DMCはこれを有意に減少させた。P2ではP1より尿中アルブミン値はさらに増加し、マウスの死亡率が増加したが、DMCは死亡率を改善する傾向を示した。

【考察】DMCは、血圧に影響を与えずに、Ang Ⅱや食塩による心肥大や腎障害に対して有効であることが示唆された。今後は、DMCの心・腎保護効果の機序について明らかにしたい。

P-11

消化器領域で用いられる漢方薬のグレリン受容体に対する薬理学的作用の解析 ~六君子湯を中心として~

YIA

○木本 千尋^{1,2}、蜂谷 理佳^{2,3}、宮野 加奈子²、今井 康太^{2,4}、吉田 有輝^{2,5}、永淵 かおり^{1,2}、宇津 美秋²、野中 美希²、和田 浩志³、藤井 秀明¹、大宮 雄司⁶、上園 保仁²
 (¹北里大学薬学部生命薬化学、²国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野、³東京理科大学薬学部資源植物化学、⁴東京理科大学薬学部疾患薬理、⁵東京理科大学薬学部分子病理・代謝学、⁶榊ツムラ漢方研究開発本部ツムラ漢方研究所)

【目的】終末期のがん患者の約8割は、がん悪液質と呼ばれる進行性症候群となり、食欲不振、体重減少、脂肪・筋肉組織の消耗、全身衰弱、倦怠感などを惹起する。がん悪液質は患者自身の生活の質を低下させるのみならず、それ自身が原因で死亡する患者が20%に及ぶ。六君子湯は8種の生薬 (陳皮・大棗・半夏・人參・蒼朮・甘草・茯苓・生姜) で構成されている漢方製剤であり、当研究室ではこれまでに、六君子湯がグレリン受容体 (GHS-R) のシグナルを促進し、がん悪液質による体重減少および食欲不振を改善することを明らかにした。さらに、六君子湯の生薬のひとつ、蒼朮に含まれているアトラクチロジンがGHS-Rへのグレリン結合性を高めることでグレリンシグナルを増強させることを見出した。しかしながら、蒼朮を含む他の漢方薬に六君子湯同様の効果があるのかについては不明である。そこで本研究では、六君子湯と同様に消化器領域で用いられている補中益気湯、平胃散、二陳湯、茯苓飲が六君子湯と類似の生薬で構成されていることに注目し、各漢方薬のGHS-R活性に対する効果について比較解析した。

【方法】本実験には、GHS-Rを安定発現させたHEK293A細胞を用いた。GHS-R活性は、カルシウム蛍光指示薬Fluo-4を用いたカルシウムイメージングアッセイを行い、グレリンによる細胞内カルシウム濃度上昇作用に対する各漢方薬の効果をそれぞれ評価した。

【結果・考察】六君子湯、補中益気湯、平胃散、茯苓飲はグレリンシグナル増強効果を示したが、二陳湯にその効果が認められなかった。その理由は、二陳湯に蒼朮 (アトラクチロジン) が含まれていなかったためであると考えられる。また、グレリンシグナル増強作用の順位は六君子湯 > 補中益気湯 > 平胃散 > 茯苓飲であったが、各漢方薬における蒼朮の含有量は4.0gと変わらない。そのため、蒼朮以外の生薬が恐らく蒼朮と何らかの相互作用を示してグレリンシグナルを促進している可能性が考えられる。

P-12

5-aza-2-deoxycytidine (5-AZ) による 5-fluorouracil (5-FU) の抗腫瘍効果増強作用の機序解明

○西澤 由紀彦¹、池田 龍二²、南 謙太郎³、新田 美奈¹、寺園 英之^{1,4}、古川 龍彦³、
武田 泰生^{1,4}
(¹鹿児島大学病院薬剤部、²宮崎大学医学部附属病院薬剤部、³鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍、
⁴鹿児島大学大学院医歯学総合研究科薬物動態制御)

【目的】5-fluorouracil (5-FU) は、ピリミジン代謝拮抗薬であり、他の抗がん剤と併用で広範な腫瘍に対して用いられる。近年の研究により、5-FUに5-aza-2-deoxycytidine (5-AZ) を併用させることで、5-FUの細胞増殖抑制効果が増強することが明らかになっているが、その詳細な機序については不明である。本研究では、5-FUの活性代謝酵素の1つである thymidine phosphorylase (TP) に着目し、5-AZによる5-FUの細胞増殖抑制効果増強の機序解明を目的とし、検討を行った。

【方法】5-FUの感受性をMTT assay法により、タンパク質発現をWestern blotting法により、mRNAはRT-PCR法により、TP promoter領域のメチル化修飾はbisulfate sequence法により評価した。

【結果】ヒト咽頭がん細胞 (KB-3-1) に、5-FU・5-AZを併用することにより、5-FUの感受性が亢進し、その効果はTP阻害剤を細胞に添加することによって抑制された。さらに、KB-3-1細胞に5-AZを処理するとTP mRNAならびにタンパク質発現が亢進した。また、TP promoter領域に結合サイトが存在する転写因子Sp-1のsiRNAの処理により5-AZによるTPの亢進は抑制された。さらに、5-AZによりSp-1結合サイトのメチル化修飾が解除されることが明らかになった。また、複数のTP promoter領域のSp-1結合サイトにpoint mutationを行い、TP発現に重要となるSp-1結合サイトの検討を行った。

【結論】5-AZによる5-FUの細胞増殖抑制効果の増強作用はTP promoter領域のSp-1結合サイトの脱メチル化によるTPの発現の亢進に起因していることが示唆された。今回得られた知見は、5-AZによる5-FUの抗腫瘍効果増強の機序を明らかにし、がん化学療法の新規治療戦略として5-FU・5-AZ併用の有用性を示すものである。

P-13

Differentiation-inducing factor-1のトリプルネガティブ乳癌に対する抗腫瘍効果

YIA

○哲翁 ふみ^{1,2}、有岡 将基¹、久保 桃子¹、高橋 富美³、西村 英紀²、笹栗 俊之¹
(¹九州大学大学院医学研究院臨床薬理、²九州大学大学院歯学研究院歯周病学、³産業医科大学医学部薬理)

【目的】Differentiation-inducing factor (DIF) は、細胞性粘菌 *Dictyostereum discoideum* が分泌し、柄細胞への分化を誘導する物質として単離・精製された低分子化合物である。我々の研究室は、これまでに、DIF (DIF-1 および DIF-3) の作用は細胞性粘菌にとどまらず、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK-3) の活性化を介する Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の抑制により、哺乳類の細胞に対して増殖抑制作用を示すことを報告してきた。しかし、DIFのターゲット解明には至っていない。現在、悪性度が高く、高転移性のトリプルネガティブ (エストロゲン受容体陰性・プロゲステロン受容体陰性・HER2過剰発現なし) 乳癌 (TNBC) における良好な化学療法や遠隔転移を阻害する治療薬はなく、新規抗がん薬の開発が強く求められている。そこで本研究では、TNBCに対するDIF-1の抗腫瘍効果の検討および機序の探索を行った。

【方法】マウス由来TNBC細胞株4T1/lucを用い、*in vivo* および *in vitro* 実験系で以下の検討を行った。*In vivo* 実験で、10週齢の雌Balb/cマウスの左側第4乳房乳腺に 1.0×10^5 個の4T1/luc細胞を打ち込み、増殖モデルマウス、肺転移モデルマウスを作製した。コントロール群には大豆油を、DIF-1投与群には大豆油で溶解したDIF-1溶液 (300mg/kg/day) を、増殖モデルマウスには打ち込みと同時に、転移モデルマウスには打ち込みから1週間経過後、経口投与を開始した。経口投与は週5日行い、2週間後に安楽死させ、乳癌組織を摘出し重さを測定、肺を摘出しシフェラーゼ活性を測定した。*In vitro* 実験で、シグナル分子の発現はWestern blotting法とリアルタイムPCR法、細胞遊走能はwound healing assay、細胞浸潤能はinvasion assayを用いて検討を行った。

【結果と考察】*In vivo* 実験で、経口投与したDIF-1は体重減少や骨髄抑制の有害反応なしに、腫瘍増殖と肺転移を有意に抑制した。*In vitro* 実験で、DIF-1はcyclin D1とc-Mycの発現を抑えることで細胞増殖を強力に抑制し、MMP-2とvimentinの発現を減少させることで細胞遊走・浸潤を抑制した。DIF-1がSTAT3のタンパク質発現を抑制したこと、STAT3阻害薬はcyclin D1、c-Myc、MMP-2、vimentinいずれのタンパク質の発現も抑制したことから、DIF-1はSTAT3シグナルを介して細胞増殖・遊走・浸潤を阻害していることが明らかとなり、DIF-1のターゲットがSTAT3経路に存在する可能性が示唆された。

【結論】DIF-1は、TNBCの増殖・遊走・浸潤・転移を抑制したことから、TNBCに対する新規抗腫瘍薬となりうる可能性が示唆された。

P-14

DEC2は肺癌においてオートファジー細胞死を誘導しユビキチン・プロテアソーム経路によって分解される

YIA

○渡邊 いく子¹、南 謙太郎¹、永田 俊行²、山本 雅達¹、新里 能成¹、河原 康一¹、関原 和正¹、佐藤 雅美²、古川 龍彦¹
 (¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍、²鹿児島大学大学院医歯学総合研究科呼吸器外科分野)

肺癌は我が国において、がんの死亡原因の第一位である。我々はTCGAの肺癌のデータベースを用いて、発現が低いことで肺癌の予後不良と関連する遺伝子を探索した。その結果、数種類の候補遺伝子の中から発現低下が予後に関わることがわかったDEC2に注目し、肺癌にどのように関わっているかを検討した。

まず肺癌におけるDEC2の作用を調べるため、DEC2の発現が低い肺腺癌細胞株A549細胞を用いて検討を行った。テトラサイクリン誘導細胞株A549/DEC2tetを樹立し、これらの細胞株を用いて細胞増殖アッセイを行った。ドキシサイクリン存在下でA549/DEC2tet細胞は、MTTアッセイ及び軟寒天増殖アッセイともに細胞増殖が抑制された。以上の結果から、DEC2は細胞増殖抑制効果を持つことを示した。

DEC2の発現によって細胞増殖が抑制される詳しい機序を調べるため、A549/DEC2tet細胞を48時間ドキシサイクリンで処理してDEC2を発現誘導後、アポトーシス関連タンパク質の発現量をウエスタンブロットで検討した。その結果、p53、p21の発現量は上昇し、Bcl-2の発現量は減少した。しかし、Baxの発現量も減少しており、DEC2発現による細胞死はアポトーシスによるものではないと考えられた。また、DEC2が発現すると解糖系に関わるGAPDHの発現量が低下していることから栄養飢餓状態になると示唆されたので、オートファジーによる細胞死に注目した。DEC2タンパク質の発現に伴ってオートファジーマーカーであるLC3-IIの発現量が増加していたことから、DEC2発現による細胞死はオートファジー細胞死によるものと考えられた。

また、肺癌におけるDEC2の発現低下機構についても解析した。A549細胞にDEC2を安定的に発現させた複数の細胞株で、DEC2のmRNA量とタンパク質発現量が相関していない結果が得られ、DEC2タンパク質発現に翻訳後修飾が関わっている可能性が考えられた。そこで、DEC2のタンパク質分解にユビキチン修飾が関わっているかを検討した。HEK293FT細胞にDEC2とユビキチンの遺伝子を導入し、ユビキチンで免疫沈降後検出すると、ラダー状のバンドが確認され、MG132を処理するとバンドが増強した。この結果から、DEC2がユビキチン化されてプロテアソームにより分解されることが示唆された。

本研究では、DEC2は肺癌においてオートファジー細胞死を誘導すること、及びDEC2の発現低下機構の一つにユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解が関わっていることを明らかにした。

P-15

卵巣癌患者に着目したTC療法施行時のパクリタキセル過敏症に対する支持療法の影響と発症要因の検討

○新田 美奈¹、池田 龍二^{2,3}、寺園 英之^{1,2}、佐藤 洸¹、眞子 あつき¹、武田 泰生^{1,2}
 (¹鹿児島大学医学部歯学部附属病院薬剤部、²鹿児島大学大学院医歯学総合研究科薬物動態制御、³宮崎大学医学部附属病院薬剤部)

【目的】卵巣癌では、パクリタキセル+カルボプラチン療法(以下、TC療法)が汎用される。パクリタキセル(以下、PTX)は過敏症を発現する頻度が高いため、PTX投与の30分前までに支持療法として過敏症の予防薬であるH₁ブロッカー、H₂ブロッカーおよびデキサメタゾンを投与することが定められている。当院では過敏症の予防薬と制吐剤を同時にPTX投与の30分前に投与するスケジュールとなっていたが、30分の間隔を空けずにPTXを投与する可能性があるため、過敏症予防薬の後に30分かけて制吐剤を投与し、過敏症予防薬からPTXを開始するまでの時間を厳密に30分確保できる投与スケジュールに変更した。本研究では卵巣癌患者において過敏症予防薬の治療スケジュール変更前後でのPTX過敏症の発現頻度の違い、およびリスクファクターを明らかとし、より安全な治療の提供を可能にすることを目的とした。

【方法】2012年1月～2016年11月に当院産婦人科で卵巣癌の治療としてTC療法を受けた患者69人を対象とし、電子カルテ情報をもとに後方視的調査を行った。過敏症により治療継続が不可能となり、レジメン変更となった症例を過敏症が発現した症例とした。調査項目として、年齢、ECOG Performance Status(PS)、病期、食物アレルギー歴、薬物アレルギー歴、喘息、アトピー性皮膚炎の既往、アプレピタントの併用、PTXの投与量を調査した。統計解析として、p値を0.05%未満において有意差ありと判定した。

【結果】支持療法の投与スケジュール変更前は33人中4人(12.1%)、変更後は34人中2人(5.9%)にPTX過敏症が発現した。また、投与スケジュール変更前の33人中7人(21.2%)に食物アレルギーの既往があり、この7人中3人(42.9%)でPTX過敏症が発現した。一方、投与スケジュール変更後は34人中5人(14.7%)に食物アレルギーの既往があったが、この5人の中でPTX過敏症を発現した患者はおらず、支持療法の変更により食物アレルギーの既往のある患者のPTX過敏症の発現率が低下する傾向が認められた。

【考察】本研究では、統計学的な差を明らかにすることはできなかったが、PTX過敏症に対する支持療法の投与スケジュールの変更により、卵巣癌患者で食物アレルギーの既往のある患者のPTX過敏症の発現率が低下する傾向が認められ、変更後の投与スケジュールは安全な治療の提供に繋がると考えられる。

P-16

Yumoto 子宮頸癌細胞の cancer stem-like cells における S100A16 の役割

○富山 成章^{1,4}、池田 龍二³、西澤 由紀彦²、益田 将吾²、田實 裕介⁴、寺蘭 英之^{1,2}、
武田 泰生^{1,2}

(¹鹿児島大学大学院医歯学総合研究科薬物動態制御学分野、²鹿児島大学病院薬剤部、³宮崎大学医学部附属病院薬剤部、
⁴出水総合医療センター薬剤科)

【目的】 S100A16 はがん細胞において発現が亢進し、がん抑制遺伝子 p53 の機能に影響を与えると考えられているが、その役割は十分には理解されていない。また、cancer stem-like cells (CSCs) における S100A16 の役割は不明である。そこで CSCs における S100A16 の役割について検討した。

【方法】 細胞はヒト子宮頸癌細胞 Yumoto を用いた。細胞を epidermal growth factor (EGF) および basic fibroblast growth factor (bFGF) 含有無血清培地、低接着容器にて培養し、spheroid を形成させた (sphere formation)。siRNA 導入実験では、siRNA 処理 24 時間後、得られた細胞を sphere formation に用いた。Sphere 形成細胞を光学顕微鏡で測定し、この 100 個の平均を平均直径とした。Proteasome 阻害実験では sphere formation 3 日目に lactacystin (10 μ M) を 24 時間処理した。mRNA 発現は RT-PCR 法、タンパク質発現を western blotting 法により評価した。

【結果】 ヒト子宮頸癌細胞 Yumoto の sphere formation により、Oct4、Nanog および S100A16 の発現が亢進した。S100A16 siRNA 導入により Oct4 および Nanog の発現は抑制され、sphere 形成細胞の平均直径は有意に減少した。Proteasome 阻害作用を有する lactacystin の暴露により、sphere formation による Oct4 および Nanog の発現は抑制されたが、S100A16 の発現は変わらなかった。

【考察】 Yumoto 子宮頸癌細胞の CSCs において、S100A16 は ubiquitin-proteasome 系による p53 の分解を亢進させることにより、p53 の発現を抑制し、Oct4 および Nanog の発現を亢進させていると考えられた。このことから、S100A16 は CSCs の形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

P-17

脳内一酸化窒素は頻尿誘発に関与する

YIA

○尾野 秀彬^{1,2,3}、清水 孝洋¹、清水 陽平^{1,4}、Zou Suo¹、山本 雅樹¹、清水 翔吾¹、
東 洋一郎¹、新武 享朗¹、濱田 朋弥¹、長尾 佳樹¹、上羽 佑亮¹、齋藤 源顕¹

(¹高知大学医学部薬理学講座、²高知大学医学部先端医療学コース、³高知大学医学部医学科 3 年生、
⁴高知大学医学部医学科 2 年生)

【目的】 我々はこれまで一酸化窒素 (NO) 供与薬 SIN-1 のラット脳室内投与が血漿カテコラミン (CA、ノルアドレナリンおよびアドレナリン) 量を増加させる事を報告した。CA は膀胱排尿筋弛緩・内尿道括約筋の収縮を誘発する事から、脳内 NO が排尿機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究では SIN-1 脳室内投与が排尿反射に与える影響を検討した。

【方法】 ①ウレタン麻酔下 (0.8 g/kg, ip) にて、Wistar 系雄性ラットの膀胱および大腿動脈へ膀胱内圧測定 (CMG) 及び採血用のカテーテルを挿入した後、vehicle または SIN-1 (100 or 250 μ g/rat) を脳室内投与し、連続 CMG を行った (生食注入速度、12 ml/h)。また SIN-1 投与直前および投与 5 分後に採血した動脈血から調製した血漿より CA を抽出し、HPLC を用いてその濃度を測定した。一部のラットは予め急性両側副腎摘除術 (ADX) を施した後、同様の施術・実験を行った。②膀胱・大腿動脈に加えて大腿静脈へカテーテルを挿入し、静脈カテーテルを介して SIN-1 を静脈内投与 (250 μ g/rat) 後、①と同様の実験を行った。③予め Carboxy-PTIO (PTIO, NO 消去薬、750 μ g/rat) を脳室内前処置し、その 30 分後に SIN-1 を脳室内投与 (250 μ g/rat) し、①と同様の実験を行った。④ SIN-1 脳室内投与 (250 μ g/rat) 後、single CMG により 1 回排尿量 (Vv) 及び残尿量 (Rv) を測定した。

【結果】 ①脳室内投与 SIN-1 は用量依存的に排尿間隔 (ICI) の短縮及び血漿アドレナリンの増加を誘発した。ADX は SIN-1 によるアドレナリン増加を消失させた一方、ICI 短縮には影響を与えなかった。②脳室内投与と同用量の SIN-1 を静脈内投与しても ICI 短縮は認められなかった。③ PTIO 前処置は SIN-1 による ICI 短縮を抑制した。④ SIN-1 は Vv を有意に減少させた一方、Rv には有意な影響を与えなかった。

【結論】 脳室内投与された SIN-1 は NO 産生を介して頻尿を誘発し、その誘発作用は血中 CA 増加非依存的である事が示唆された。

P-18

脳内ニコチン受容体刺激が排尿反射に及ぼす影響の薬理的検討

○清水 孝洋¹、清水 陽平^{1,2}、尾野 秀彬^{1,3,4}、Zou Suo¹、山本 雅樹¹、清水 翔吾¹、
東 洋一郎¹、新武 享朗¹、濱田 朋弥¹、長尾 佳樹¹、上羽 佑亮¹、齋藤 源顕¹
(¹高知大学医学部薬理、²高知大学医学部医学科2年生、³高知大学医学部医学科3年生、⁴高知大学医学部先端医療学コース)

【目的】我々はこれまでニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 刺激薬エピパチジン (Epi) のラット脳室内投与が副腎髄質からのカテコラミン (CA、ノルアドレナリン及びアドレナリン) 遊離を惹起する事を明らかにした。CAは膀胱排尿筋弛緩・内尿道括約筋の収縮を誘発する事から、脳内nAChR刺激が排尿機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究ではEpi脳室内投与が排尿反射へ与える影響を検討した。

【方法】①ウレタン麻酔下 (0.8 g/kg, ip) にて、Wistar系雄性ラットの膀胱および大腿動脈へ膀胱内圧測定 (CMG) および採血用のカテーテルを挿入した後、vehicleまたはEpi (0.3 or 1 nmol/rat) を脳室内投与し、CMGを行った (生食注入速度、12 ml/h)。またEpi投与直前および投与5分後に採血した動脈血から調製した血漿よりCAを抽出し、HPLCを用いてその濃度を測定した。一部のラットは予め急性両側副腎摘除術 (ADX) を施した後、同様の施術・実験を行った。②膀胱・大腿動脈に加えて大腿静脈へカテーテルを挿入し、静脈カテーテルを介してEpiを静脈内投与 (1 nmol/rat) 後、①と同様の実験を行った。③予めmecamylamine (nAChR遮断薬、100 or 300 nmol/rat) を脳室内前処置し、その30分後にEpiを脳室内投与 (1 nmol/rat) し、①と同様の実験を行った。

【結果】①脳室内投与Epiは用量依存的に排尿間隔 (ICI) の延長及び血漿CAの増加を誘発した。ADXはEpiによるCA増加を消失させた一方、ICI延長には影響を与えなかった。②脳室内投与と同用量のEpiを静脈内投与してもICIの延長は認められなかった。③mecamylamine前処置はEpiによるICI延長を抑制した。

【結論】脳室内投与されたEpiは脳内nAChRを介して中枢性に排尿反射を抑制し、その抑制作用は血中CA増加非依存的である事が示唆された。

P-19

ストレス反応性脳内神経伝達物質アンジオテンシンIIによる排尿筋過活動誘発の分子機構解明・脳内アンジオテンシンIIタイプ1受容体を標的とした排尿筋過活動抑制効果

○清水 翔吾¹、清水 孝洋¹、中村 久美子¹、長尾 佳樹¹、片岡 環^{1,2,3}、鎌田 栞穂^{1,2,3}、
新武 享朗¹、Zou Suo¹、濱田 朋弥¹、上羽 佑亮¹、山本 雅樹¹、東 洋一郎¹、齋藤 源顕¹
(¹高知大学医学部薬理学講座、²高知大学医学部先端医療学コース、³高知大学医学部医学科2年生)

【目的】心理ストレス曝露が頻尿 (排尿筋過活動) を惹起することが知られているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。我々は、ストレス反応性脳内神経伝達物質であるアンジオテンシンII (Ang II) が脳内Ang IIタイプ1 (AT1) 受容体を介し排尿間隔の短縮、つまり排尿筋過活動を誘発することを動物実験にて報告した。今回、その分子機構の解明をAng IIがAT1受容体を介し作用するcorticotropin-releasing factor (CRF) 神経系に着目し検討した。さらに、中枢移行性のあるAT1受容体遮断薬telmisartanが脳内AT1受容体を標的として脳内Ang IIに起因する排尿筋過活動を抑制しうるか検討した。

【方法】①ウレタン麻酔下の雄性Wistar系ラット (330-400 g) に対し、Ang II (30 pmol) 脳室内投与30分前にAT1受容体遮断薬 [telmisartan (3 or 10 nmol) or valsartan (10 nmol)]、CRF1受容体遮断薬 [CP154526 (3 or 10 nmol)] またはCRF2受容体遮断薬 [K41498 (10 nmol)] をそれぞれ脳室内投与すると同時に膀胱内圧測定を行った。②Telmisartan (1 or 10 mg/kg) または中枢移行性の弱いvalsartan (10 mg/kg) を同ラットに8日間慢性経口投与後、血圧測定を行った。そして、同ラットに対しAng II脳室内投与前後にて膀胱内圧測定を行った。

【結果】①Telmisartan、valsartanまたはCP154526脳室内前投与は、Ang II脳室内投与による排尿間隔の短縮を抑制した一方、K41498脳室内前投与の影響は見られなかった。②今回用いた用量の薬物投与は、同ラットの血圧には影響を与えなかった。一方、高用量のtelmisartan経口前投与はAng II脳室内投与による排尿間隔の短縮を抑制した一方、valsartan経口前投与の影響は見られなかった。

【結語】脳内Ang IIは脳内CRF1受容体を介し、排尿筋過活動を誘発することが考えられた。中枢移行性のあるAT1受容体遮断薬telmisartanは脳内Ang IIに起因する排尿筋過活動を抑制する可能性が示唆された。

P-20

ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いたリボソームタンパク質S19のリン酸化および赤血球造血制御の解析

○鳥原 英嗣¹、仲嶺 三代美¹、前田 紀子¹、上地 珠代²、吉浜 麻生²、中島 由香里²、
剣持 直哉²、山本 秀幸¹
(¹琉球大学大学院医学研究科生化学、²宮崎大学フロンティア科学実験総合センター)

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) は、主に乳幼児期に発症し、特に赤血球分化が障害される先天性の造血不全症である。患者の半数以上においてリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子の変異が確認されている。中でも *RPS19* 遺伝子の変異は全患者の 25% と最も多く、52 番目から 62 番目のアミノ酸配列領域に高頻度の変異が報告されている。以前我々は、*in vitro* で、*RPS19* の 59 番目のセリン残基 (Ser59) が、PIM-1 によりリン酸化を受けることを見いだした。そこで本研究では、ゼブラフィッシュを用い、*RPS19* のリン酸化と赤血球造血について検討を行った。

まず、モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) をゼブラフィッシュの受精卵に微量注入し、*rps19* 発現抑制モデルを作製した。この時、*rps19* の mRNA およびタンパク質レベルでの発現量低下を確認した。また、受精後 24 時間 (24 hpf) までに頭部や尾部に異常な表現型を示し、48 hpf までに赤血球が著しく減少した。そこで、MO と同時に *in vitro* 合成した *rps19* mRNA を注入したところ、発現量は回復し、形態異常および赤血球減少もほぼ正常に回復した。これに対し、Ser59 をアラニン残基あるいはアスパラギン酸残基に置換した合成 *rps19* mRNA を注入した胚では回復は見られなかった。以上より、*RPS19* の機能に Ser59 の可逆的なリン酸化反応と脱リン酸化反応が重要であることが示唆された。

次に *pim-1* が赤血球造血におよぼす影響について検討した。ゼブラフィッシュ受精卵に *pim-1* を標的配列とする MO を微量注入し、*pim-1* mRNA の発現量低下を確認した。24 hpf までに頭部や尾部に異常な表現型を示し、48 hpf までに *rps19* 発現抑制胚と同様に赤血球数が著しく減少した。*in vitro* 合成した *pim-1* mRNA によるレスキュー実験により、脳構造および赤血球数の回復を確認し、*pim-1* が赤血球造血に関与していることが示唆された。

現在、CRISPR/Cas9 法による *pim-1* 変異体の作成を試みており、今後は *pim-1* 変異体での *rps19* のリン酸化と赤血球造血の変化について検討する予定である。

P-21

嚢胞性線維症気道上皮細胞における SIGIRR スプライスアイソフォームの発現上昇とその炎症調節における役割

○首藤 恵子¹、亀井 竣輔^{2,3}、内田 友二¹、甲斐 広文²、徳富 直史¹、首藤 剛²
(¹崇城大学薬学部薬理、²熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学教育) 遺伝子機能応用、
³熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学教育) 博士課程教育リーディングプログラム [HIGO])

SIGIRR は I 型膜貫通タンパク質であり、Toll-like receptor (TLR) シグナル抑制分子として機能する。近年、抗炎症性サイトカインの IL-37b が SIGIRR のリガンドとして報告されたが、IL-37b-SIGIRR 経路の病態生理的役割は不明である。これまで、本研究室では、過剰な呼吸器炎症が病態の基盤をなす嚢胞性線維症 (CF) に着目し、正常または CF 由来気道上皮細胞における SIGIRR 発現と IL-37b の抗炎症作用に関して検討を行ってきた。その結果、CF 気道上皮細胞において SIGIRR タンパク質の細胞膜上発現が低下していること、それに伴い TLR3 リガンド Poly (I:C) 誘導性 IL-8 産生に対する IL-37b 依存的な炎症抑制作用が消失していることを証明し、CF 病態の一部に炎症抑制性 IL-37b-SIGIRR 経路の破綻 (減弱) が関与することを示した。本研究では、CF 特異的な SIGIRR 細胞膜上発現低下のメカニズムとその意義の解明を目的とし、種々の検討を行った。

まず、正常および CF 気道上皮細胞における SIGIRR タンパク質発現の詳細解析を行なったところ、CF 細胞では、糖鎖修飾を受けていない正常型 SIGIRR タンパク質よりも約 10 kDa 分子量が低い SIGIRR タンパク質 (low-SIGIRR) が多く発現していた。そこで、SIGIRR mRNA の発現パターン解析を行なったところ、CF 細胞では SIGIRR 遺伝子の exon 8 領域が脱落したスプライスアイソフォーム ($\Delta 8$ SIGIRR) の発現量が高いことが明らかとなった。興味深いことに、1) $\Delta 8$ SIGIRR タンパク質は、CF 細胞に多く存在する low-SIGIRR タンパク質と同程度の分子量であること、2) $\Delta 8$ SIGIRR は、それ自身、細胞膜上に発現せず細胞内にとどまること、3) $\Delta 8$ SIGIRR の過剰発現は、正常型 SIGIRR の細胞膜上の発現量を低下させ、IL-37b 依存的な炎症抑制作用を阻害することが明らかになった。

以上の結果より、CF 特異的な SIGIRR 細胞膜上発現の低下とそれに伴う炎症抑制性 IL-37b-SIGIRR 経路の破綻 (減弱) に、 $\Delta 8$ SIGIRR によるドミナントネガティブ作用が関与することが明らかになった。本知見は、SIGIRR のスプライススイッチが CF 呼吸器炎症を増悪化することを示唆する初めての報告である。

P-22 細胞外糖濃度によるマクロファージ極性化の調節

○工藤 崇裕^{1,2}、臼井 通彦¹、東 泉²、大住 伴子²、中島 啓介¹、竹内 弘²
(¹九州歯科大学歯学部歯周病、²九州歯科大学歯学部口腔応用薬理)

【目的】糖尿病では、炎症の遷延や創傷治癒の遅延を認めるが、その発症や病態形成にはマクロファージの関与が注目されている。マクロファージは M1 や M2 と呼ばれる状態に極性化し、それぞれ組織障害やインスリン抵抗性の誘導、障害組織の修復や代謝恒常性の維持に関わる。マクロファージの極性決定機構の解明は、メタボリックシンドロームに起因する病態の理解と新たな治療法の開発につながると考えられる。今回我々はマクロファージの M1/M2 極性化に細胞外グルコース濃度が及ぼす影響を調べた。

【方法】マウス由来マクロファージ様細胞株 Raw 264.7 細胞を、高および低グルコース培地として、4.5 g/L および 1 g/L グルコースを含む培地中で培養した。M1/M2 への分化は IL-4 および LPS によって誘導し、RT-PCR 法にて Arg1, NOS2 遺伝子の発現上昇を指標として検討した。マウス骨髄由来マクロファージは、8～10 週齢の雄マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、溶血緩衝液で処理後、細胞を洗浄し、M-CSF 添加培地中で 5 日間培養したものを、上記 Raw 264.7 細胞と同様の実験に供した。本実験内容について九州歯科大学動物実験倫理委員会の承認 (16-013) を得ている。

【結果】Raw 264.7 細胞において、低グルコース環境下では高グルコース環境下と比べて IL-4 刺激後の Arg-1 発現量が上昇し、LPS 刺激後の NOS2 発現量が低下しており、M2 分化への誘導が促進されていた。また低グルコース環境下で活性化する AMPK を、Metformin によって直接活性化すると M2 分化への誘導を促進した。マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験についても Raw 264.7 細胞と同様の結果を得た。すなわち骨髄由来マクロファージも Metformin で処理すると AMPK の活性化を介して M2 分化への誘導が促進されていた。

【考察】本結果は、組織局所のグルコース濃度は AMPK を介してマクロファージの極性に影響することを示唆し、糖尿病患者の歯周病治療に AMPK を標的とする薬物応用の可能性を期待させる。

P-23 誤嚥性肺炎予防のための口腔ケア洗浄液の比較

○小林 裕太¹、佐藤 歩美²
(¹島根大学医学部基礎看護、²島根大学医学部看護学科)

高齢者では誤嚥性肺炎が増加するが、その原因の1つは口内細菌と考えられ、日常的な口腔ケアが誤嚥性肺炎の予防に重要であるとされている。今回、患者にとって負担が少なく日常的に実施が可能で、口腔内を清潔に保つことのできる洗浄法を比較検討した。

文書で同意の得られた、女子大学生4人に対してイソジン(30倍希釈)、市販の緑茶、市販の口腔ケアティッシュ、水道水の4種類の洗浄液を用い、スポンジブラシで口腔ケアを行った。口腔ケア前後および1時間後の口腔内細菌密度を計測するため、直径3cm大の口腔粘膜をスワブで拭って懸濁標本とし、粘膜細胞をろ過後DAPI色素で細菌を蛍光染色し蛍光顕微鏡を用いカウントした。一方、洗浄液に対する感想をアンケート調査した。

口腔ケア前の菌数を100%とすると、口腔ケア直後はイソジンでは菌数は41 ± 6%に、緑茶では45 ± 16%に有意に減少した。ケア1時間後ではケア直後に比べてやや菌数の増加傾向がみられたが、ケア前に比べるとイソジンでは59 ± 10%、緑茶では47 ± 10%と有意な減少が認められた。口腔ケアティッシュではケア直後には菌数が53 ± 10%と有意に減少したが、ケア1時間後にはケア前の88 ± 12%にまで菌数が戻っていた。水道水では、口腔ケア直後も菌数の減少があまりみられず、1時間後も有意差はなかった。洗浄液を使用した時の感想では、イソジンはすぐうがいしたくなると答えていた。

緑茶はイソジンと異なり細胞障害性もなく、日々のケアに取り入れやすい。よって緑茶を口腔ケアに日常的に取り入れることは患者にとって有用性が高いと考えられ、今後実際に患者や施設入居者の方で有用性を確かめる必要がある。

P-24

舌画像解析システムを用いた瘀血診断客観化の有用性の検討

YIA

○松村 千晶¹、貝沼 茂三郎²、小林 大介¹、川尻 雄大¹、村上 綾¹、島添 隆雄¹
(¹九州大学大学院薬学研究院臨床育薬、²九州大学大学院医学研究院地域医療教育ユニット)

【目的】漢方医学的病態の1つである瘀血は、その診断に舌診が重要であり、舌の暗赤化が関連すると考えられている。しかしながら、瘀血と舌色との関連を裏付ける報告は十分ではない。さらに、舌診は医師の経験や知識などの主観的要因と、光源や室温などの環境要因に影響を受けることが指摘されている。そこで近年、一定の条件下で舌を撮影し、色調をコンピュータで定量化する、舌撮影解析システム (Tongue Image Analyzing System: TIAS) が開発された。本研究では、TIASを用いて得られた舌色値と瘀血の関連について評価し、診断支援におけるTIASの有用性の検討を行った。

【方法】2013年8月1日から2018年2月28日までの期間に九州大学病院漢方外来を受診した初診患者515名を対象に後ろ向き調査を行った。初診時に患者の舌をTIASで撮影し、取得された画像群をRGBからCIE (国際照明委員会)が定める表色系のCIE XYZの色空間データへ変換し、その後CIE1976の色空間データであるL* (明るさの成分) a* (赤色の成分) b* (青色の成分) に変換して分析に用いた。測定箇所は舌の両端 (1)・舌根部 (2)・中央部 (3)・舌の先端 (4) の4ヶ所とした。また電子カルテから患者の基本情報および漢方医学的所見を収集し、瘀血の診断基準として広く用いられる瘀血スコアを算出した。瘀血スコアが20点以下を非瘀血群、20.5点～39.5点を瘀血群、40点以上を重症瘀血群と分類し、各群における舌色値の比較を行った。2群間の比較には χ^2 乗検定、Wilcoxon順位和検定およびロジスティック回帰分析を用いた。

【結果】漢方薬をすでに服用していた患者など除外症例を除いた227名を解析対象とした (非瘀血群39名、瘀血群139名、重症瘀血群49名)。非瘀血群と重症瘀血群を比較すると、重症瘀血群で有意に女性が多く ($P < 0.0002$) (非瘀血群: 20名、重症瘀血群: 43名)、年齢が若かった ($P < 0.0001$) (非瘀血群: 64.7歳、重症瘀血群: 47.6歳)。また舌色では重症瘀血群は非瘀血群と比較すると、L1・4およびa1～4で有意差が認められた ($P < 0.05$)。

【考察】瘀血と舌の両端・先端部のL*成分および舌全体のa*成分の関連が認められ、これらの部位の暗さと赤みが瘀血と相関することが明らかになった。したがって、瘀血の舌の評価にTIASによる舌色の定量化が有用である可能性が示唆された。

P-25

患者の良好な服薬アドヒアランスに対する薬剤師と看護師の認識の比較

YIA

○坂根 可奈子、宮本 まゆみ、福岡 美紀、津本 優子、小林 裕太、内田 宏美
(島根大学医学部基礎看護学講座)

【研究目的】服薬自己管理を継続する患者のうち、およそ半数に飲み残しや飲み間違いが生じている。とくに入院時は処方内容や量の変更が多く、退院後に患者が戸惑うこともある。そのため、多職種が協働して服薬支援を行うことが重要である。本研究は、服薬支援において中心的役割を担う看護師と薬剤師が、どのような患者の服薬自己管理行動や態度を良好な服薬アドヒアランスと捉えているか明らかにすることを目的とした。

【研究方法】研究デザインは質的帰納的研究である。研究対象者は、山陰地方の急性期病院で勤務し、5年以上の臨床経験を有する看護師と薬剤師とした。半構成的面接を実施し、患者のどのような服薬自己管理行動や態度を良好な服薬アドヒアランスと捉えたか具体的に語ってもらった。面接内容を逐語録とし、分析データとした。分析データの中から良好な服薬アドヒアランスの認識に関する記述を抽出し、コード化した。コードの意味内容の類似性に基づきカテゴリ化した。

【倫理的配慮】島根大学医学部看護研究倫理委員会承認後、研究参加者に研究協力の任意性、研究協力同意後の撤回の自由、個人情報への守秘、公表等を説明し、同意を得て実施した。

【結果】研究対象者は、看護師3名、薬剤師2名であった。職種ごとに分析した結果、薬剤師は17コード、看護師は41コードが抽出され、どちらも<医療者の指示する処方の理解>、<医療者との協働性>、<服薬自己管理の自律性>、<服薬と生活との調和>の4カテゴリに分類された。抽出したコードのうち、“残数と処方日数が大体あっている”、“家族の服薬サポートがある”等は両職種で共通していた。一方、病棟薬剤師特有のコードは、患者が“飲み忘れた時の対応がわかる”、“医療者に分包サポートをされている”等であった。また、病棟看護師特有のコードは、患者の“生活と服薬のタイミングが合っている”、“医療者とのコミュニケーションに支障がない”等であった。

【考察】薬剤師と看護師が捉える良好な患者の服薬アドヒアランスに対する認識は、カテゴリでは共通していたが、抽出されたコードでは内容に違いがみられた。病棟薬剤師は、飲み間違いのリスクが減るような自己管理行動や調剤方法に着目していた。一方看護師は、服薬行動に関連する患者の生活や認知機能に着目していた。職種による認識の違いを互いに理解したうえで、情報共有や支援を行う必要があると考えられた。