

日本薬学会北陸支部

第130回例会

プログラム&要旨集

2018年11月18日

富山大学杉谷キャンパス
日医工オーデトリウム、講義実習棟

日本薬学会北陸支部 第130回例会

A会場(日医工オーデトリウム)				B会場(302講義室)				C会場(303講義室)			
時間	分類	演題番号	座長	時間	分類	演題番号	座長	時間	分類	演題番号	座長
9:00 ～ 10:30	領域1 大学院 ①	1-院- 1～6	歌 大介	9:00 ～ 10:30	領域1 学士①	1-学- 1～6	藤井 拓人	9:00 ～ 9:45	領域2 学士①	2-学- 1～3	中尾 裕之
								9:50 ～ 10:50	領域2 学士②	2-学- 4～7	大石 雄基
10:40 ～ 12:10	領域1 大学院 ②	1-院- 7～12	横山 悟	10:40 ～ 11:55	領域1 学士②	1-学- 7～11	宇野 恭介	11:00 ～ 12:15	領域2 大学院 ①	2-院- 1～5	高山 亜紀
13:10 ～	総会・学術奨励賞授賞式										
13:40 ～ 14:40	特別講演		矢倉 隆之								
14:50 ～ 15:50	学術奨励賞 受賞講演		東田 千尋、 門脇 真	14:50 ～ 16:20	領域1 大学院 ③	1-院- 13～18	赤沼 伸乙	14:50 ～ 15:40	領域2 一般①	2-般- 1～5	藤原 朋也
16:00 ～ 18:00	若手シンポジウ ム		水口 峰之、 宗 孝紀	16:25 ～ 17:15	領域1 一般①	1-般- 1～5	藤原 博典	15:45 ～ 17:00	領域2 大学院 ②	2-院- 6～10	Wong Chin Piow
				17:15 ～ 18:05	領域1 一般②	1-般- 6～10	岡崎 史泰	17:05 ～ 17:55	領域1 一般③	1-般- 11～15	川口 甲介
18:20 ～	学生優秀発表賞授賞式										

日本病院薬剤師会
第29回北陸ブロック
学術大会(大講義室)

時間	分類
10:10 ～ 11:10	一般講演 午前の部 セッション I
11:10 ～ 12:10	一般講演 午前の部 セッション II
13:00 ～ 14:30	特別講演
14:40 ～ 15:30	一般講演 午後の部

大講義室において「日本病院薬剤師会第29回北陸ブロック学術大会」が開催されます。
19～20ページにそのプログラムを掲載しています。

参加される方へのご案内

発表される方へ：

- ・ 講演時間は、学生優秀発表賞選考対象演題では発表10分ー討論5分(計15分)、一般演題では発表8分ー討論2分(計10分)です。与えられた時間内に終了するようご配慮願います。
- ・ 事前に発表データを事務局宛 (shibu130@inm.u-toyama.ac.jp) に電子送信してください。最終受付を11月15日(木)正午とします。(それ以降に修正が必要になった場合は、事務局までご相談ください。)なお、データは例会終了後、事務局が責任を持って廃棄します。
データの送信は、以下のようにしてください。
 - ✓ データファイル名に演題番号、発表者名、OS名を入れる。例：1-学-1_杉谷太郎_win.pptx
 - ✓ メールタイトルに演題番号と発表者名を入れる。例：発表データ送信(1-学-1_杉谷太郎)
 - ✓ メール本文に発表者の電子メールアドレスを記載する。
 - ✓ 送信ファイルのサイズが大きい場合は、「メモリーサイズの大きい添付ファイルを送信するためのシステム」を使ってください。
- ・ 発表には、液晶プロジェクターを使用します。事務局では、Windows 10 あるいは Windows 7 を搭載した PC を用意し、PowerPoint (Office2013) を使用します。発表の際にその他の PC やソフトウェアをご使用になりたい方は、予め事務局までご相談ください。
- ・ 発表データは画面比率4：3のスライドでご作成ください。
- ・ 当日は、念のためデータを保存した USB メモリーをご持参ください。
- ・ 当日、希望する方は下表の時間帯に発表会場で発表データの最終確認をすることができます。混雑が予想されますので、最終確認を希望される方は時間に余裕をもってお越しください。

会場\発表時刻	午前	午後
A 会場 (日医工オーディトリウム)	8:15 ~ 8:50	12:20 ~ 13:00
B 会場 (302 講義室)	8:15 ~ 8:50	12:30 ~ 13:30
C 会場 (303 講義室)	8:15 ~ 8:50	12:30 ~ 13:30

- ・ 発表時間の30分前までに受付を済ませ、15分前までに発表会場最前列の「次演者席」にご着席ください。

学生優秀発表賞授賞式 (18:20 ~ 18:50) :

- ・ 学生優秀発表賞受賞者は、18:20 から行われる選考結果発表および表彰式に出席する必要があります。不在の場合は受賞が取り消しとなりますのでご注意ください。

座長の方へ：

- ・ 担当するセッション開始の15分前までに会場にお越しください。
- ・ 演題時間は、学生優秀発表賞選考対象演題では発表10分―討論5分(計15分)、一般演題では発表8分―討論2分(計10分)です。交代時間を含め上記の時間内で発表が終了するよう進行をお願いします。

全ての参加者へ：

- ・ 自家用車でお越しの方は、本冊子『富山大学杉谷キャンパスマップ』に示されたゲートから「教職員学生用駐車場」に入構し、ゲートで駐車券をお取りください。マップ中の指定された駐車場に駐車の上、学会の案内看板に従って発表会場までお越しください。
- ・ 受付で駐車券をお見せ頂くと、出庫時に駐車料金を無料にする「教職員等駐車区域特別駐車券」をお渡しします。無料駐車券の発行は終日行っています。例会終了時は混雑しますので、なるべく早めに受付にお越しください。なお、指定外の「外来患者用駐車場」に駐車されますと、上記特別駐車券を利用しても無料になりませんのでご注意ください。
- ・ 会場まで自家用車以外ではバスまたはタクシーとなります。バスで会場に来る場合は、JR 富山駅南口前のバスターミナル3番乗り場から発車する富山大学附属病院循環に乗車し、「富山大学附属病院」で下車します。所要時間は約30分、運賃は450円です。タクシーでは25分程を要し運賃は3,500円程度(小型)です。

昼食について：

- ・ 昼食はお弁当を持参頂くか、附属病院内のレストランあるいはコンビニエンスストア(ローソン)をご利用ください。なお、医薬イノベーションセンター1階に昼食室(兼休憩室)を設けておりますので、昼食スペースとしてこちらもご利用ください。

お問い合わせ先：

〒930-0194 富山市杉谷 2630

第130回例会事務局

富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野

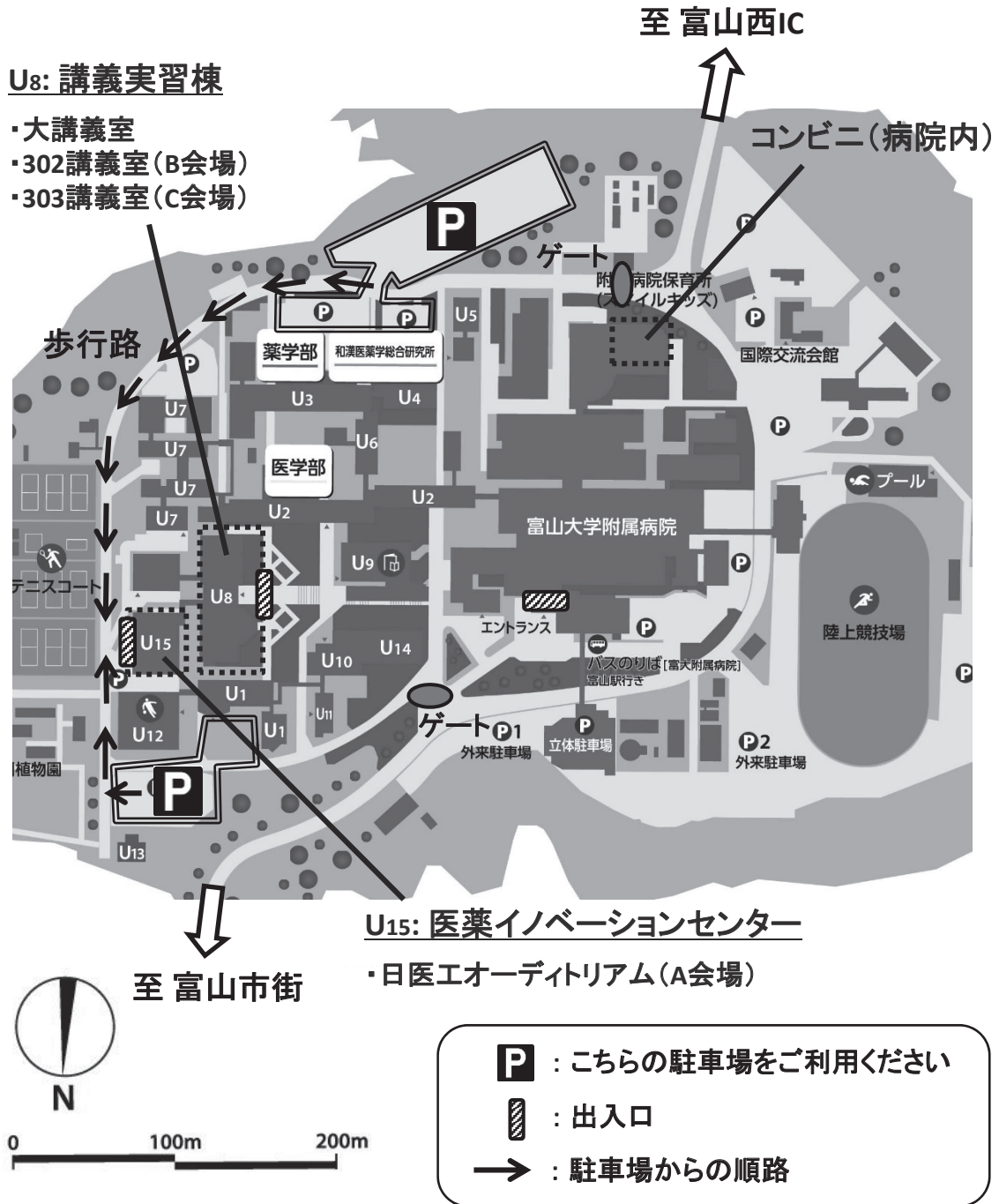
東田 千尋、久保山 友晴、楊 熙蒙

電話：076-434-7670, 076-434-7646

Email：shibu130@inm.u-toyama.ac.jp

- ・ 例会当日に不明な点がございましたら、受付にお申し出ください。

富山大学杉谷キャンパスマップ



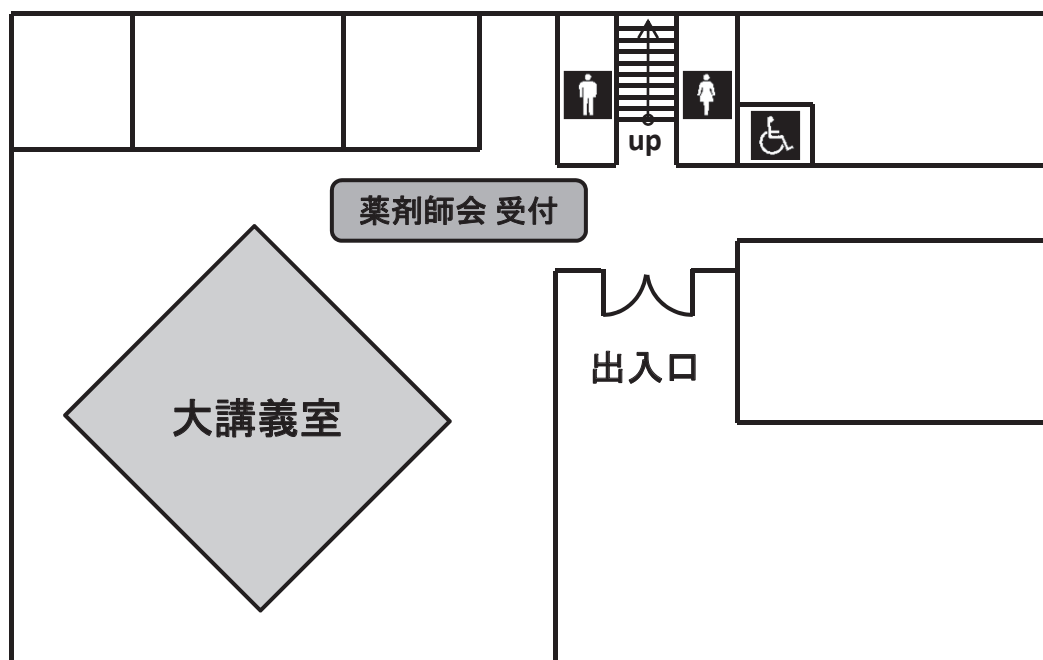
住所: 〒930-0194 富山市杉谷2630番地 (代表電話:076-434-2281)

バス: 富山駅から約30分(3番乗り場/富山大学附属病院循環)

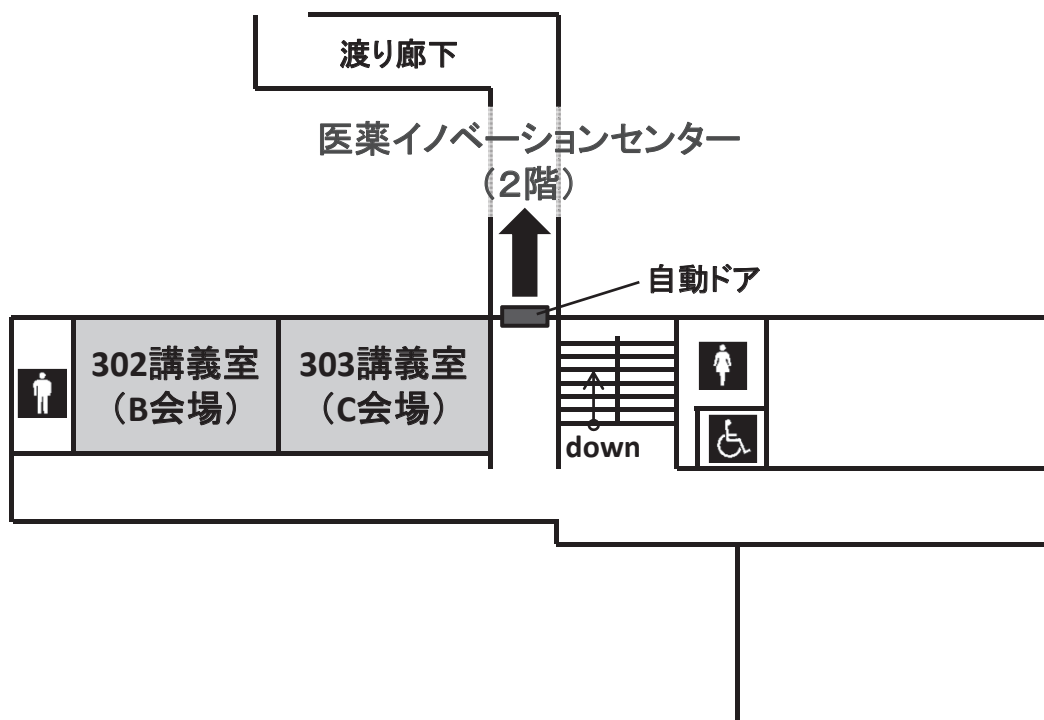
タクシー: 富山駅から約20分, 富山空港から約20分

車: 北陸自動車道「富山西IC」から約4分

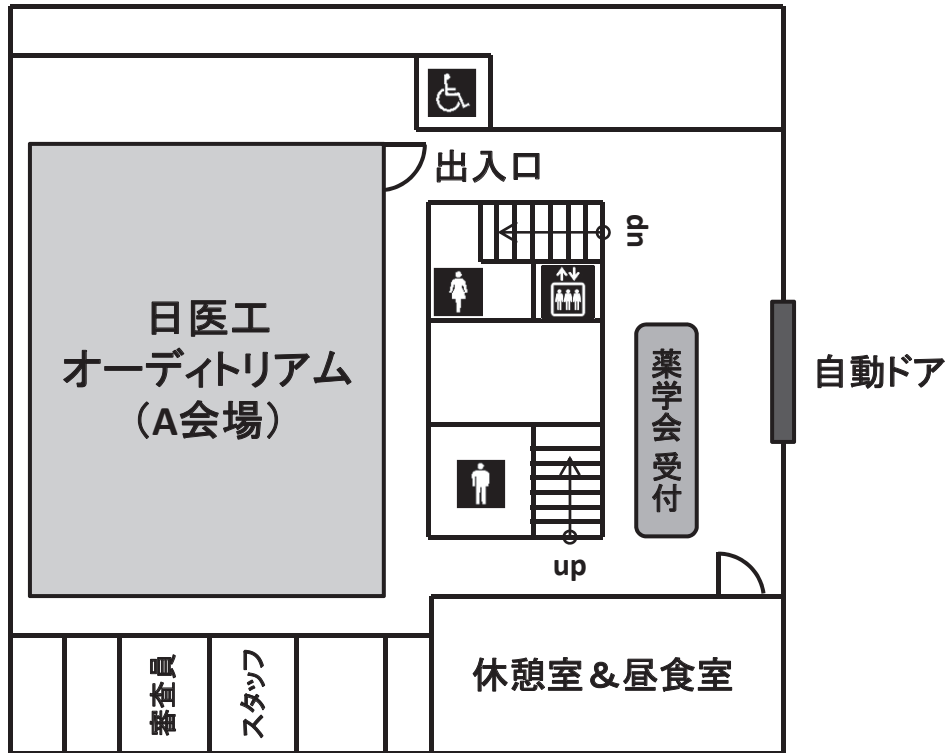
講義実習棟 1階



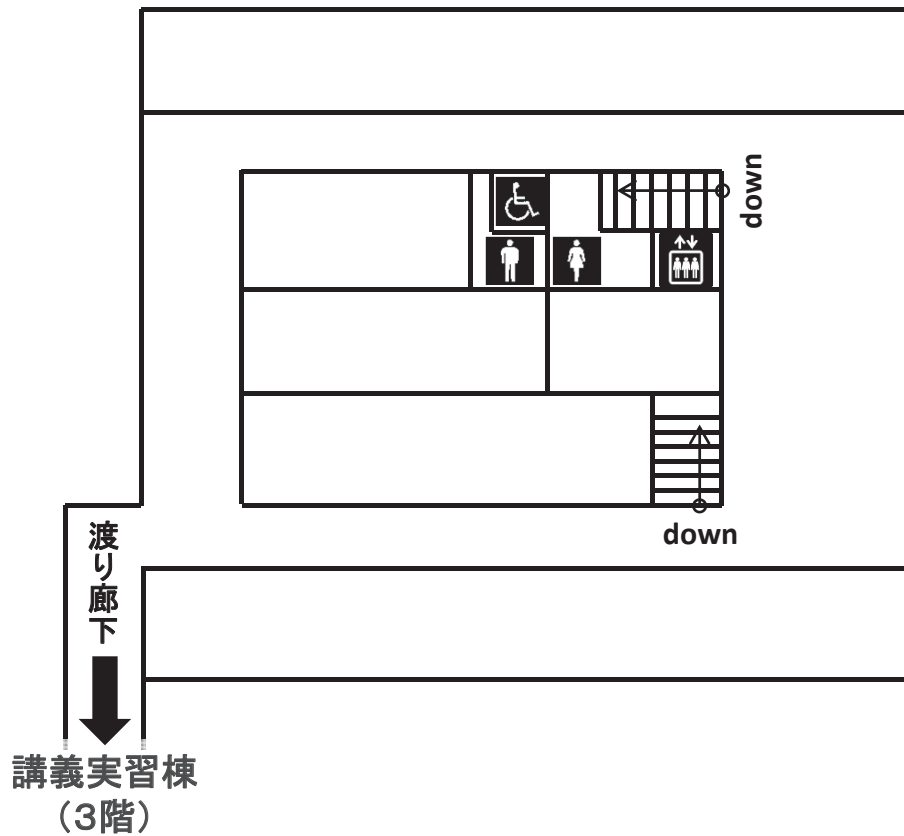
講義実習棟 3階



医薬イノベーションセンター 1階



医薬イノベーションセンター 2階



プログラム

日本薬学会北陸支部 第130回例会 プログラム

13:10 – 13:30 総会・学術奨励賞授賞式 (A会場・日医工オーデトリウム)

13:40 – 14:40 特別講演 (A会場・日医工オーデトリウム)

座長：矢倉 隆之 (富山大院薬)

「アセチレン～遷移金属錯体の研究から始まった超分子化学とケミカルバイオロジー」

井上 将彦 (富山大学 大学院医学薬学研究部(薬学) 教授)

14:50 – 15:50 学術奨励賞受賞講演 (A会場・日医工オーデトリウム)

座長：東田 千尋 (富山大和漢研)・門脇 真 (富山大和漢研)

「軸索伸長を基盤とした神経変性疾患治療法の開発」

久保山 友晴 (富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教)

「炎症性腸疾患の病態解明と新たな治療薬の探索研究」

林 周作 (富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教)

16:00 – 18:00 若手シンポジウム (A会場・日医工オーデトリウム)

「薬学の大きな可能性—多様な領域での最前線研究」

座長：水口 峰之 (富山大院薬)・宗 孝紀 (富山大院薬)

「高精度ドッキングシミュレーション法の開発と抗ウイルス薬のデザイン」

藤本 和宏 (北陸大学 薬学部 講師)

「薬物代謝酵素の医薬品毒性および動態における新規機能解明」

深見 達基 (金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 准教授)

「MRI の製剤物性評価への応用」

大貫 義則 (富山大学 大学院医学薬学研究部(薬学) 教授)

「制御性 T 細胞誘導薬を経口免疫療法に併用した食物アレルギーの新たな治療法の開発」

山本 武 (富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教)

18:20 – 18:50 学生優秀発表賞授賞式 (A会場・日医工オーデトリウム)

学生優秀発表賞選考対象

9:00 – 10:30 学士課程部門（領域 1）①（B 会場・302 講義室）

座長：藤井 拓人（富山大院薬）

- 1-学-1 「肺がん細胞のシスプラチン耐性における ErbB2 および EphA2 の役割」
○馬島洪作¹、泉 結香¹、堀部紗世²、櫻井宏明¹（富山大院薬¹、神戸薬科大²）
- 1-学-2 「CD4⁺ T 細胞のエストロゲン受容体 α を介するエストロゲン作用が妊娠糖尿病病態におよぼす影響」
○宇埜生美恵¹、和田 努¹、田中智子²、荻原沙季¹、叶喬博¹、石川明香里¹、齋藤 滋²、恒 枝宏史¹、笹岡利安¹（富山大学 病態制御薬理学¹、産科婦人科学²）
- 1-学-3 「メタノール資化性酵母を用いたリソソーム膜タンパク質 LMBD1 の発現と機能解析」
○金子直未¹、川口甲介²、守田雅志²、今中常雄³、宗孝紀²
（富山大薬¹、富山大院薬²、広島国際大薬³）
- 1-学-4 「ペルオキシソーム機能と細胞内コレステロール代謝の関連性」
○富田 勇¹、宮澤美優¹、山田祥大朗¹、守田雅志²、宗孝紀²
（富山大薬¹、富山大院薬²）
- 1-学-5 「乳がん患者における顎骨壊死発症リスク因子の後方視的探索」
○杉山雄紀¹、高橋喜統²、岡本晃典¹、石橋浩晃³、石川和宏¹、丹羽 修²
（北陸大薬¹、金沢医科大学病院薬剤部²、金沢医科大学病院歯科口腔科³）
- 1-学-6 「RNA 編集酵素 ADAR による薬物代謝型ヒト P450 分子種の制御」
○野崎香於利¹、中野正隆^{1,2}、深見達基^{1,2}、中島美紀^{1,2}
（金沢大薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研究²）

10:40 – 11:55 学士課程部門（領域 1）②（B 会場・302 講義室）

座長：宇野 恭介（富山大院薬）

- 1-学-7 「ピレン修飾脂肪酸を用いた新規ペルオキシソーム脂肪酸 β 酸化活性及び脂肪酸合成活性の測定法」
○佐藤瑛晶¹、守田雅志²、渡辺志朗³、今中常雄⁴、宗 孝紀²
（富山大薬¹、富山大院薬²、富山大和漢研³、広島国際大薬⁴）

1-学-8 「外側血液網膜関門における putrescine 輸送機構の解明」

○李開理¹, 赤沼伸乙¹, 久保義行¹, 細谷健一¹ (富山大院薬)

1-学-9 「Gabapentin の網膜移行に対する血液網膜関門 L 型アミノ酸トランスポーターの関与」

○山腰敦子¹, 赤沼伸乙¹, 須河内剛志¹, 久保義行¹, Anika M.S. Hartz^{2,3}, Björn Bauer⁴, 細谷健一¹ (富山大院薬¹, Sander-Brown Center on Aging, Univ. of Kentucky, USA², College of Medicine, Univ. of Kentucky, USA³, College of Pharmacy, Univ. of Kentucky, USA⁴)

1-学-10 「REM 断眠ストレス負荷マウスにおける低用量 MPTP のドパミン神経毒性」

○永井結奈¹, 高多瞭治¹, 森厚詞², 光本泰秀¹ (北陸大薬¹, 名古屋大院医²)

1-学-11 「急性拘束ストレス負荷マウスにおける Rubiscolin-6 の抗うつ効果」

○佐藤玲菜¹, 多河典子², 加藤郁夫², 光本泰秀¹ (北陸大薬¹, 神戸薬大²)

9:00 – 10:30 大学院課程部門 (領域 1) ① (A 会場・日医エオーディトリウム)

座長：歌 大介 (富山大院薬)

1-院-1 「ラット血液脳関門における抗てんかん薬 phenytoin の排出輸送機構」

○定村龍太¹, 赤沼伸乙¹, 久保義行¹, 細谷健一¹ (富山大院薬)

1-院-2 「前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスにおける統合失調症モデル動物開発に向けての行動薬理学及び神経化学的解析」

○濱谷康平¹, 稲垣良¹, 宮本嘉明¹, 傳柯荃¹, 佐藤慶治¹, 桶谷祐貴¹, 村松慎一^{2,3}, 宇野恭介¹, 新田淳美¹

(富山大院・薬・薬物治療学¹, 自治医科大学², 東京大学・医科学研究所³)

1-院-3 「脱分極とシナプス活動による転写因子 SRF コアクチベーター MRTFB の核移行制御に関する研究」

○田邊広樹¹, 佐野友香里¹, 加藤真之佑¹, 今西詩織¹, 阪上洋行², 伊原大輔¹, 田淵明子¹

¹ (富山大院・医薬・分子神経生物、² 北里大・医・解剖学)

1-院-4 「5'-リピッドホスファターゼ SHIP2 阻害剤による脳由来神経栄養因子 BDNF 発現の増強効果」

○吉田ひとみ¹, 恒枝宏史¹, 山口実佐子¹, 岡本健太郎¹, 遠藤宏裕¹, 和田努¹, 笹岡利安¹

(富山大院薬)

1-院-5 「Pentylentetrazole 誘発けいれん発作に及ぼす膜輸送体 OCTN1 の関与と内因性基質の探索」
○小森友恵¹、中道範隆¹、増尾友佑¹、西山美沙¹、加藤将夫¹（金沢大院薬¹）

1-院-6 「危険ドラッグ 5F-AMB により誘導されるマウスの行動異常の神経メカニズム」
○伊藤志穂¹、堂本将輝¹、笹瀬人暉¹、矢口立真¹、和田進太郎¹、出山論司¹、檜井栄一¹、金子周司²、金田勝幸¹（金沢大院薬¹、京都大院薬²）

10:40 – 12:10 大学院課程部門（領域 1）②（A 会場・日医工オーディトリウム）

座長：横山 悟（富山大和漢研）

1-院-7 「PKD2L1チャネルの細胞内Ca²⁺上昇を介した苦味受容機構」
○埴田佳佑¹、清水貴浩¹、篠崎稜²、藤井拓人¹、酒井秀紀¹
（富山大院薬¹、富山大薬²）

1-院-8 「小胞体に発現するオーファン P 型 ATPase の生理機能解明」
○矢後亜沙佳、藤井拓人、清水貴浩、酒井秀紀（富山大院薬）

1-院-9 「Depletion of IL-4 Receptor α Attenuates the Severity of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Mice」
○Ai Hertati、林周作、山本武、門脇真（富山大和漢研）

1-院-10 「Extracellular vesicles released from osteosarcoma alter bone microenvironment」
○Nguyen Duc Tuan¹、相羽久輝^{1,2,3}、吉田孟史⁴、土屋弘行²、華山力成^{1,4}
（¹金沢大・医・免疫学、²金沢大・医・整形外科、³名市大・医・整形外科、⁴金沢大・WPI NanoLSI）

1-院-11 「帯状疱疹痛期からの methylcobalamin の連続投与により、難治性の帯状疱疹後神経痛は予防できる」
○菊川孝、歌大介、久米利明、安東嗣修（富山大院薬）

1-院-12 「マクロファージによる血管新生を介した内臓脂肪組織肥大化機構の解明」
○松澤崇俊¹、和田努¹、小野木康弘¹、桶川晃¹、渡邊愛理¹、池田恵介²、中野実²、恒枝宏史¹、笹岡利安¹（富山大院薬 病態制御薬理学¹、生体界面化学²）

14:50 – 16:20 大学院課程部門（領域 1）③（B 会場・302 講義室）

座長：赤沼 伸乙（富山大院薬）

1-院-13 「遺伝子欠損マウス臓器を基質源としたメタボローム解析による膜輸送体 BCRP の生体内基質探索」

○^{しのだきようすけ}笹田京佑¹、^{ますおゆうすけ}増尾友佑¹、^{なかみちのりたか}中道範隆¹、^{かとう ゆきお}加藤将夫¹（金沢大院薬¹）

1-院-14 「カルボニル基の還元反応を触媒する薬物代謝酵素 AKR および SDR ファミリーのヒト肝臓における発現量および機能解析」

○^{あまいけいと}天井圭斗¹、^{ふかみ たつき}深見達基^{1,2}、^{なかの まさたか}中野正隆^{1,2}、^{わたなべ あ き こ}渡邊亜紀子³、^{わたなべ けんご}渡邊健悟³、^{なかじま み き}中島美紀^{1,2}

（金沢大院薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研²、第一三共株式会社³）

1-院-15 「喫煙による RNA 編集酵素 ADAR1 の発現低下が及ぼす酸化ストレス感受性亢進メカニズムの解明」

○^{たきざわ まさし}瀧澤雅¹、^{なかの まさたか}中野正隆^{1,2}、^{ふかみ たつき}深見達基^{1,2}、^{なかじま み き}中島美紀^{1,2}

（金沢大院薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研²）

1-院-16 「グリオーマ幹細胞性およびグリオーマ進展における E3 ユビキチンリガーゼ Smurf2 の役割」

○^{ひらいわま な み}平岩菜奈美¹、^{いえぎ たかし}家崎高志¹、^{ふかさわかずや}深澤和也¹、^{やまだ たかのり}山田孝紀¹、^{かねだかつゆき}金田勝幸¹、^{なかだ みつとし}中田光俊²、^{ひらおあつし}平尾敦³、^{ひの いえいち}檜井栄一¹

（金沢大・薬・薬理¹、金沢大・医・脳神経外科²、金沢大・がん研・遺伝子染色体³）

1-院-17 「ストレス応答シグナルによる p38 を介した RSK-EphA2 経路の活性化」

○^{おおきりょうた}大木良太、^{やまはたいおり}山畑伊織、^{しゅうえつ}周越、^{さくらいひろあき}櫻井宏明（富山大院薬）

1-院-18 「RAS の Ser-39 リン酸化による MAPK 経路の活性化制御機構の解明」

○^{とよだしょういちろう}豊田章一郎¹、^{なかむらし おり}中村施央里¹、^{よこやまさとる}横山悟²、^{さくらいひろあき}櫻井宏明¹

（富山大・院薬¹、富山大・和漢研²）

9:00 – 9:45 学士課程部門（領域 2）①（C 会場・303 講義室）

座長：中尾 裕之（富山大院薬）

2-学-1 「ブースティングツリーによる原薬物性-錠剤崩壊性の相関モデルの構築」

○^{なかの ゆり}中野友梨¹、^{はやしよしひろ}林祥弘¹、^{まるもゆうき}丸茂勇輝¹、^{ひらいだいじろう}平井大二郎²、^{くまだしゆんご}熊田俊吾²、^{こすぎあつし}小杉敦²、^{おおぬきよしのり}大貫義則¹

（¹富山大学 製剤設計学講座、²日医工株式会社）

2-学-2 「新規桂皮酸型ジアジリン光クロスリンカーの開発と機能評価」
○堀川拓¹、千葉順哉²、友廣岳則² (富山大薬¹、富山大院薬²)

2-学-3 「放射性医薬品 MIBG(meta-iodo benzylguanidine)の deltic guanidinium アナログ「deltic MIBG」の合成及び評価」
○福井雅人¹、三代憲司²、小川数馬²、若林大志³、絹谷清剛⁴、小谷明⁴
(金沢大医薬保¹、金沢大新学術²、金沢大附属病院³、金沢大院医薬保⁴)

9:50 – 10:50 学士課程部門 (領域 2) ② (C 会場・303 講義室)

座長：大石 雄基 (富山大院薬)

2-学-4 「環状エーテルからアルキルボロールの合成」
○松原夏¹、長尾一哲²、大宮寛久³ (金沢大院医薬保)

2-学-5 「アルデヒドとイミンを用いた銅触媒還元的カップリング反応」
○三井 惇央¹、竹田 光孝²、長尾 一哲³、大宮寛久⁴ (金沢大院医薬保)

2-学-6 「シクロブタノンとシロキシジエンとの[4+4]型付加環化反応の開発」
○西優奈¹、吉村智之²、松尾淳一³ (金沢大医薬保)

2-学-7 「光増感触媒を用いたイナミンの生成及びそれを利用した光活性化型脱水縮合反応の開発」
○木村武史¹、三代憲司²、国嶋崇隆³ (金沢大院薬)

11:00 – 12:15 大学院課程部門 (領域 2) ① (C 会場・303 講義室)

座長：高山 亜紀 (富山大院薬)

2-院-1 「ヨウ化物イオンの触媒作用によるスピロシクロプロパンの新規位置選択的環開裂一環化反応」
○大貫悠太¹、南部寿則²、矢倉隆之³ (富山大院薬)

2-院-2 「オキチアジナン *N,O*-ケタールの還元によるアミノアルコール類の両立体異性体の選択的合成」
○広澤千晃¹、南部寿則²、藤原朋也³、矢倉隆之⁴ (富山大院薬)

2-院-3 「ヒドロキシエンジン類のカスケード型環化を用いるビシクロ[n.3.0]アルカノン骨格構築法の開発」

○布施哲矢、高橋涼太、内山正彦（金沢大院医薬保）

2-院-4 「アシルスルホンアミド型光反応基による標的タンパク質解析の効率化」

○林龍二、森本正大、千葉順哉、畑中保丸、友廣岳則（富山大院薬）

2-院-5 「時間領域 NMR を応用した各種崩壊剤の吸湿挙動評価と薬物安定性との関連性」

○大城公祐¹、平井大二郎²、熊田俊吾²、小杉敦²、林祥弘^{1,2}、大貫義則¹

（富山大院薬¹、日医工株式会社²）

15:45 – 17:00 大学院課程部門（領域 2）②（C 会場・303 講義室）

座長：Wong Chin Piow（富山大和漢研）

2-院-6 「オオケビラゴケが生産するビベンジルカンナビノイドの生合成研究」

○中川竜一¹、黒崎文也¹、田浦太志¹、保野陽子²、品田哲郎²

（富山大院薬¹、大阪市立大院理²）

2-院-7 「東アジア大陸から長距離輸送される多環芳香族炭化水素類：能登半島と福江島の比較分析」

○楊露¹、張露露¹、周全渝¹、張璇¹、高見昭憲²、佐藤圭²、清水厚²、吉野彩子²、松木篤³、早川和一³、鳥羽陽¹、唐寧^{1,3}（金沢大医薬保¹、国環研²、金沢大学環日セ³）

2-院-8 「Interaction of naphthalene with KOSA particles collected from different Chinese deserts in the aqueous solution」

○Lulu Zhang¹, Lu Yang¹, Quanyu Zhou¹, Xuan Zhang¹, Yongjie Wei², Min Hu³, Lixia Zhao⁴, Jianrong Bi⁵, Kazuichi Hayakawa⁶, Akira Toriba⁷, Ning Tang^{6,7}

（Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University¹, State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environment Sciences², College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University³, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences⁴, College of Atmospheric Sciences, Lanzhou University⁵, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University⁶, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University⁷）

2-院-9 「Amyloid-β と脂質膜の相互作用における膜曲率および酸性リン脂質の影響」

○佐々木哲哉、中尾裕之、池田恵介、中野実 (富山大院・薬)

2-院-10 「示差走査熱量測定を用いたセラミドⅢの結晶性の低下をもたらす物質の探索」

○岩下侑矢、中尾裕之、池田恵介、中野実 (富山大院薬)

一般発表

16:25 – 17:15 一般 (領域 1) ① (B 会場・302 講義室)

座長：藤原 博典 (富山大和漢研)

1-般-1 「ラット中大脳動脈閉塞モデルでの脳梗塞障害におけるブラジキニンの関与」

○松尾由理^{1,2}、池内学²、佐々木泰治² (北陸大薬¹、北里大薬²)

1-般-2 「パーキンソン病に関連するリソソーム局在 P 型 ATPase の病態生理機能の解明」

○鄭 仕州、藤井拓人、清水貴浩、酒井秀紀 (富山大院・薬・薬物生理学)

1-般-3 「血液脳関門における imipramine 輸送特性解明」

○韓 明来、赤沼伸乙、久保義行、細谷健一 (富山大院薬)

1-般-4 「NMDA 受容体による血液脳関門を介したアニオン輸送機構変動解析」

○吉田有紀子、赤沼伸乙、久保義行、細谷健一 (富山大院薬)

1-般-5 「視床下部オレキシン系による肥満と非アルコール性脂肪肝炎の防御効果」

○高田慎治郎¹、恒枝宏史¹、今寛太¹、前田貴大¹、大塚小由希¹、関根崇洋¹、高崎一郎²、和田努¹、笹岡利安¹ (富山大院薬・病態制御薬理学¹、富山大院理工²)

17:15 – 18:05 一般 (領域 1) ② (B 会場・302 講義室)

座長：岡崎 史泰 (富山大院薬)

1-般-6 「強心配糖体によるヒト肝ガン細胞のグルコース輸送体 (GLUT1) のトラフィッキング制御機構」

○大坪愛実¹、藤井拓人²、清水貴浩²、酒井秀紀² (富山大・薬¹、富山大・院薬²)

- 1-般-7 「新規プロトンチャネル Otopetrin 3 の機能解析」
 ○栗栖章¹、藤井拓人²、清水貴浩²、酒井秀紀² (富山大薬¹、富山大院薬²)
- 1-般-8 「PKD2L1 ノックアウトマウスを用いた苦味受容の *in vivo* 解析」
 ○篠崎稜¹、清水貴浩²、藤井拓人²、高村雄策³、西条寿夫³、酒井秀紀²
 (1 富山大・薬、2 富山大・院薬、3 富山大・院医)
- 1-般-9 「雌雄肥満マウスの内臓脂肪組織における制御性 T 細胞局在変化の検討」
 ○石川明香里¹、和田努¹、伊藤哲生¹、田中智子²、宇埜生美恵¹、西村燦志朗¹、齋藤滋²
 2、恒枝宏史¹、笹岡利安¹ (富山大院 病態制御薬理学¹、産科婦人科学²)
- 1-般-10 「腸管炎症病態モデルにおける腸管神経系での神経変性の検討」
 ○宮田佳奈¹、緒方華子¹、門脇真¹ (富山大・和漢研)

17:05 – 17:55 一般 (領域 1) ③ (C 会場・303 講義室)

座長：川口 甲介 (富山大院薬)

- 1-般-11 「自閉症スペクトラム障害で発見された遺伝子変異を導入した SRF コアクチベーター MRTFB は SRF 依存性転写活性化およびニューロン形態を負に制御する」
 ○伊原大輔¹、山崎雄哉¹、佐藤夏美¹、福地守^{1,2}、津田正明¹、田淵明子¹
 (富山大院・医薬・分子神経生物¹、高崎健康福祉大・薬・分子神経科学²)
- 1-般-12 「転写伸長因子 DSIF の Pol II へのリクルートにおける Spt5 酸性領域と TFIIF p62 の関与の検討」
 ○依田ちづる¹、平山翼¹、田中亜紀¹、廣瀬豊¹、大熊芳明^{2,3}
 (富山大院薬¹、長崎大院医歯薬²、ゲノム創薬研究所³)
- 1-般-13 「ユビキチン様ドメインを有する新規脱リン酸化酵素 UBLCP1 によるサイクリン E1 遺伝子の発現制御機構の解析」
 ○車奏一郎¹、和仁翔太郎¹、加藤ありさ¹、加納未由希¹、石黒尋保¹、杉田愛¹、田淵圭章²、大熊芳明^{3,4}、廣瀬豊¹
 (富山大院薬¹、富山大生命科学先端ユニット²、長崎大院医歯薬³、ゲノム創薬研究所⁴)

1-般-14 「薬物加水分解酵素カルボキシエステラーゼおよびアシルアセタミドデアセチラーゼのサルとヒトにおける種差」

○本多^{ほんだしおり} 菜^{ふかみ} 1、深見^{たつき} 達基^{つじぐちたくや} 1,2、辻口^{なかのまさたか} 拓也^{うへはらしょうたろう} 1、中野^{やまざきひろし} 正隆^{なかじまみき} 1,2、上原^{うへはらしょうたろう} 正太郎^{やまざきひろし} 3、山崎^{やまざきひろし} 浩史^{なかじまみき} 4、中島^{なかじまみき} 美紀^{なかじまみき} 1,2
(金沢大薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研²、実中研³、昭和薬大⁴)

1-般-15 「ヒト UGT2A3 タンパク質の発現および機能的役割の解明」

○阿部^{あべ} 貴之^{たかゆき} 1、齋藤^{さいとう} 紗希^{さき} 1、古川^{ふるかわ} 陽一^{よういち} 1、畠山^{はたけやま} 雅彦^{まさひこ} 2、岡崎^{おかざき} 道貴子^{みきこ} 2、Moshe Finel³、
中野^{なかの} 正隆^{まさたか} 1,4、深見^{ふかみ} 達基^{たつき} 1,4、中島^{なかじま} 美紀^{みき} 1,4

(1 金沢大薬、2 日本クレア株式会社、3 ヘルシンキ大薬、4 金沢大 WPI ナノ生命科学研)

14:50 – 15:40 一般（領域 2）①（C 会場・303 講義室）

座長：藤原 朋也（富山大院薬）

2-般-1 「ピリジン-アニン交相互型オリゴマーによる選択的な天然糖の固液抽出」

○大石^{おおいし} 雄基^{ゆうき}、井上^{いのうえ} 将彦^{まさひこ}（富山大院薬）

2-般-2 「イミノホスホラン形成による室温下でのベンゾシクロブテン開裂反応とその応用」

○高山^{こうやま} 亜紀^{あき} 1、是澤^{これさわ} 恵莉^{えり} 1、柘植^{つげ} 清志^{きよし} 2、松谷^{まつや} 裕二^{ゆうじ} 1（富山大院薬¹、富山大院理工²）

2-般-3 「Spithioneine 類の全合成研究」

○上坂^{うえさか} 歌奈^{かな}、松尾^{まつお} 淳一^{じゅんいち}、吉村^{よしむら} 智之^{ともゆき}（金沢大医薬保）

2-般-4 「分散固相抽出法を用いた蛍光検出-HPLC によるニトロ多環芳香族炭化水素類の簡易一斉分析法の開発」

○尾田^{おだ} 知之^{ともゆき} 1、唐寧^{とうねい} 1、2、早川^{はやかわ} 和一^{かずいち} 2、鈴木^{すずき} 亮^{りょう} 1、鳥羽^{とりば} 陽^{あきら} 1

(金沢大院薬¹、金沢大環日本海域環境研究セ²)

2-般-5 「T 細胞のシグナル伝達を制御する TNF 受容体と TRAF の相互作用解析」

○飯田^{いいだ} 日向子^{ひなこ}、帯田^{おびた} 孝之^{たかゆき}、宗孝^{そうたか} 紀^{のり}、水口^{みずぐち} 峰之^{みねゆき}（富山大院薬）

日本病院薬剤師会 第29回 北陸ブロック学術大会

プログラム

特別講演

13:00～14:30

座長 北澤英徳(富山県済生会高岡病院)

「病院薬剤師のこれからを考える」

日本病院薬剤師会 会長 木平健治 先生

一般講演

(午前の部 セッション I)

10:10～11:10

座長：鶴居勝也 (南砺中央病院)

川尻憲行 (富山大学附属病院)

- 1) 「指定抗菌薬管理システムの変更に伴う抗菌薬使用量及び緑膿菌の薬剤感受性の変化」
○村岡美彩¹、旭 美樹¹、細野美幸¹、高畑英信¹、竹村さおり²、永田 肇²、村本由子³、
又野禎也³
(市立砺波総合病院薬剤科¹、臨床検査科²、院内感染対策室³)
- 2) 「院内製剤における電子的な調製工程記録システムの構築」
○大岡由朋、山下慎司、田端志穂、高柳聡子、五十嵐敏明、斎木明子、矢野良一、
塚本 仁、後藤伸之
(福井大学医学部附属病院薬剤部)
- 3) 「調剤室における小児薬用量確認業務の標準化への取り組み」
○河村真由梨、矢野涼子、鬼頭尚子、稲葉裕太、杉浦さくら、室谷理沙、中村彩子、
有原大貴、竹川祐以、斎藤譲一、間瀬広樹、秋山哲平
(国立病院機構金沢医療センター)
- 4) 「金沢大学附属病院における未承認等医薬品の使用の管理に関する取り組み」
○板井進悟、川岸篤史、竹田和喜、原 祐輔、嶋田 努、崔 吉道
(金沢大学附属病院薬剤部)
- 5) 「当院における一般名処方推進に関する取り組み」
○谷山 徹、由雄めぐみ、和泉淳也
(津幡町国民健康保険直営河北中央病院)

(午前の部 セッションⅡ)

11 : 10～12 : 10

座長：藤本直也 (浅ノ川総合病院)

森戸敏志 (済生会金沢病院)

- 6) 「カペシタビンとワルファリンの相互作用ー地域連携推進の観点からー」
○坂井晴香、武内仁美、坂東 翔、池崎友明、北澤英徳
(富山県済生会高岡病院薬剤部)
- 7) 「当院でのダラツムマブ投与患者における infusion reaction の現状」
○小杉綾乃、五十嵐弘幸、上塚朋子、中根論士、高嶋孝次郎
(福井県済生会病院薬剤部)
- 8) 「当院における Nivolumab 投与患者の副作用発現状況について」
○波多野聡子、伊藤幸男、五十嵐弘幸、高嶋孝次郎
(福井県済生会病院薬剤部)
- 9) 「内服および坐剤の使用に反応しない甲状腺機能低下症における LT4 静注を投与した一例」
○六戸部真里、大西優佳里、坂井伸成、宇野 美津江、森 富男
(福井県立病院薬剤部)
- 10) 「小児造血幹細胞移植患者における栄養管理」
○中川有衣¹、橋本美紀恵¹、徳武満里奈²、嶋田 努¹、崔 吉道¹
(金沢大学附属病院薬剤部¹、金沢大学医薬保健学域薬学類²)

(午後の部)

14 : 40～15 : 30

座長：玉田 太志 (敦賀医療センター)

武曾 和明 (春江病院)

- 11) 「入院前からはじまる薬剤師の関わり」
○座光寺成美、富山 徹、蛭谷一彦
(富山赤十字病院薬剤部)
- 12) 「術後疼痛管理における薬剤師の役割」
○奥村直也、佐々木逸美、松岡大晃、田嶋恭典、山本大、矢野良一、塚本 仁、後藤伸之
(福井大学医学部附属病院薬剤部)
- 13) 「金沢医科大学病院における多職種連携教育の試み (第2報)」
○高野克彦^{1,2}、高橋喜統¹、高村昭輝³、石川和宏²、堀 有行³、西条旨子³、丹羽 修¹
(金沢医科大学病院薬剤部¹、北陸大学薬学部²、金沢医科大学医学部³)
- 14) 「病院薬剤師の病院経営に対する貢献～後発医薬品への変更による収益変化に関する考察～」
○脇田真之、岡村吏華、人見智香子、吉井千菊、渡辺恵美、棚田真紀、星野智美、
波能真理恵
(射水市民病院薬剤科)

第130回例会 要旨

特別講演

演者は、有機合成化学ならびに有機金属化学の分野で研究者人生をスタートさせた。大学院博士課程の時期、菌頭反応を筆頭として、アセチレンを用いる遷移金属触媒反応が大きく開花していた。calicheamicin などのエンゲイム系抗生物質の合成や化学修飾が、著名雑誌を賑わせていたことを覚えている。アセチレンは遷移金属と、 π -d ならびに π^* -d 軌道間で仲が良く、触媒サイクルの中間体、もしくはサイクルから外れた不要体のアセチレン-遷移金属錯体の単離や構造決定も盛んであった。演者もこの種の研究にどっぷり浸かり、「新奇」で、しかし何の役にたつかわからない錯体を取っては悦に浸っていた。

博士課程を修了した後、大阪府立大学工学部で助手（今の助教）の職を得た、というより、恩師に行けと言われて行った。全く背景知識を持っていない、光化学・量子化学・材料化学の研究室であった。ところが研究室の教授は政治に忙しく、好きなことをして良いとの放任主義であった（正確には勝手にそう判断した）。これ幸いと演者は、採用していただいた教授の研究分野ではなく、さらには意図的に学生時代の恩師の研究分野でもなく、自身がいつのまにか興味を持っていた分子認識化学・超分子化学の分野に身を投じた。最初は見よう見まねでやっていたが、有機合成化学で身につけた知識と技術が役に立ち、最初から当該分野を専攻してきた者とは一味違う研究を展開することができた。「身につけた知識はその外でスパイスとして使える」と知った。

20世紀が終わりに近づいた2000年12月、不思議な縁で富山医科薬科大学（現富山大学）薬学部に教授として採用された。薬学部のなんたるかも知らず、そして全く予習もせず面接にのぞんだ。少し前に着任されていた故根本英雄教授に「あなたの有機化学は薬学でどのように役に立つのか？」と問われ、「有機化学という狭い世界で考えずサイエンスとしていつか役に立てば良いと思う。」と生意気な返答をしたことを覚えている。

さて、何をしようか。大阪府立大学時代で行っていた研究も、何かしっくりこなくなってきた。生物の機能を模倣して分子認識やら超分子やらといっても、所詮は有機化学の中のお遊びの範疇を出ていなかった。やはり生体分子を直接接触ろう、しかしあくまで化学を基盤として、と決めた。ケミカルバイオロジーという、化学ベースの生命科学が芽を吹き始めていた時期でもあった。最初は何もわからなかったし、何をすれば良いのかもわからなかった。だいたい有機溶媒で抽出できないものをどのようにして精製するのか、そんな基本的なことも知らなかった。しかし人は慣れるもの。そしてやはり、「身につけた知識はその外でスパイスとして使える」だった。大学院生時代の有機合成化学・有機金属化学、さらには大阪府立大学時代は全く興味のなかった光化学・量子化学・材料化学の知識が、門前の小僧よろしくオリジナリティーに貢献してくれた。

講演では、最近の研究のうち、タンパク代用品としての化学矯正ペプチド¹⁾、遺伝情報の拡張を目指した人工DNA²⁾、電気化学と光化学を基盤とする新奇バイオプローブ³⁾を主に報告する。そしてどの分子を見ても、なぜかアセチレンが入っている。

1) *Chem. Commun.* **2017**, 53, 12104. 2) *Chem. Commun.* **2015**, 51, 7043. 3) *Org. Lett.* **2016**, 18, 1960.

略歴

京都大学 大学院工学研究科 博士後期課程 合成化学専攻 単位取得認定退学 (1989)

日本学術振興会 特別研究員 (1989)

大阪府立大学 工学部 助手・講師・助教授 (1989-2000)

JST さきがけ研究員 (1996-1999)

富山医科薬科大学 薬学部 教授 (2000-2005)

JST 戦略的創造研究推進事業 研究代表者 (2002-2006)

富山大学 大学院医学薬学研究部 教授 (2006-)

富山大学 教育研究評議会 評議員 (2009-)

富山大学 学長補佐 (2018-)

受賞

有機合成化学協会 研究企画賞 (1995)

日本化学会 進歩賞 (1995)

獎勵賞受賞講演

軸索伸長を基盤とした神経変性疾患治療法の開発

久保山 友晴（富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野）

アルツハイマー病や脊髄損傷などの中枢変性疾患では、不可逆的な神経回路網の破綻が生じ、軸索再生が阻害されるため、機能不全が永続する。軸索再生不全の原因となる因子を除去・阻害する様々な薬物が臨床で検討されてきたが、いずれの薬物も機能回復をもたらすに至っていない。そこで私は、神経変性疾患の治療には病因の除去だけでは不十分で、軸索伸長を促して神経回路網を再構築させ、失われた機能を回復させることが必要なのではないかと考え、神経細胞やアストロサイト、マイクログリアに着目した研究を行ってきた。

私はまず、*in vitro* のアルツハイマー病モデルを確立した。これは、初代培養神経細胞にアミロイドβを処置して軸索萎縮を誘発させるものである。本培養モデルを用い、軸索伸長活性を有する薬物を探索した結果、伝統薬物やその成分で軸索伸長活性を示すものをいくつか発見し、これら活性のあったものは、そのほとんどがアルツハイマー病モデル動物において軸索正常化作用および記憶改善作用を示した。次に本モデルを応用し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを基質とした *in vitro* の脊髄損傷モデルを確立した。これにおいて軸索伸長活性を示した苦参水エキスを、脊髄損傷マウスに経口投与すると、損傷脊髄内で軸索が伸長し、運動機能が回復した。以上のことから、軸索伸長活性を有する薬物を同定することは、アルツハイマー病や脊髄損傷の治療薬開発に繋がるものであると考えている。

生薬エキス中の活性化合物の同定には、活性を評価しながら分画を進めていく手法がとられているが、同定した活性化合物が本当に脳や脊髄内へ移行し作用しているのかどうかは分からない。そこで私は、薬物投与後に脳や脊髄内へ移行する化合物に着目した。その一例として、骨碎補水エキスを経口投与した際に脳内へ移行して軸索伸長活性及び記憶改善作用を有する代謝物として、*naringenin* を同定した。さらに DARTS 法を用いるなどして、*naringenin* が CRMP2 と結合して脱リン酸化させ、軸索を伸長させることを明らかにした。

次に、アルツハイマー病や脊髄損傷において軸索再生不全となる機序の解明を試みた。その結果、アルツハイマー病において軸索再生不全となる要因は、軸索終末部でアミロイドβにより誘発されるエンドサイトーシスであることを初めて明らかにした。さらに遠志水エキスがエンドサイトーシスを阻害し、アルツハイマー病モデルトランスジェニックマウスの記憶障害誘発を予防することを明らかにした。また、軸索終末部において細胞接着斑のターンオーバーを増加させることにより、損傷した中枢神経組織において軸索再生が誘発されることも初めて示した。この一連の手法は、様々な生薬・方剤の様々な疾患に対する薬理作用の解析に応用が可能であると考えている。

私は神経細胞以外にも、アストロサイトやマイクログリアに着目し、これらを介して軸索伸長を誘発させ、アルツハイマー病モデルマウスや脊髄損傷モデルマウスにおける機能障害を改善させる作用を有する化合物を同定してきた。将来的にはこれまでの研究手法を応用し、脳や脊髄内の様々な細胞、分子に作用して軸索伸長を誘発し、アルツハイマー病や脊髄損傷における機能不全を劇的に回復させるような新規漢方方剤を開発し、臨床への応用を目指したいと考えている。さらに、うつ病のような精神疾患においても軸索伸長により治療することが可能ではないかと考え、これを証明するための研究に取り組んでいる。このように「軸索伸長」の研究を進め、様々な難治性神経疾患の治療に貢献していきたい

久保山 友晴 (くぼやま ともはる)

学歴

1996年4月 - 2000年3月 富山医科薬科大学薬学部薬科学科
2000年4月 - 2002年3月 富山医科薬科大学大学院薬学研究科 薬科学専攻 博士前期課程
2002年4月 - 2005年3月 富山医科薬科大学大学院薬学研究科 薬科学専攻 博士後期課程
2005年3月 学位：博士（薬学）

職歴

2005年4月 - 2010年9月 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター 研究員
2010年10月 - 現在 富山大学和漢医薬学総合研究所 助教
2015年3月 - 2016年2月 マウントサイナイ医科大学（米国） 客員研究員

受賞歴

2003年12月 Excellent Poster Presentation Awards (The Sixth JSPS-NRCT Joint Seminar, Bangkok, Thailand)

炎症性腸疾患の病態解明と新たな治療薬の探索研究

林 周作

富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野

絶えず微生物や食物抗原などの外界と接している腸管粘膜では、腸管粘膜免疫系を中心とした高度な粘膜バリア機構が発達しており、腸管粘膜免疫系の異常による粘膜バリア機構の破綻は、様々な腸管免疫関連疾患の引き金となる。私たちは、近年患者が急増している厚労省の指定難病の炎症性腸疾患（IBD）に着目し、IBDの病態解明ならびに創薬の標的因子の探索研究を行っている。

IBDは再燃と寛解を繰り返す慢性炎症疾患であることから、これまでのほぼ全ての治療薬開発は、過剰な炎症を抑制し寛解を導くことを目的に行われてきた。よって、寛解導入に用いられるIBD治療薬の選択肢は多く、患者の症状に合わせた寛解導入が可能となってきた。しかし、寛解を維持することが出来ず再燃する症例も多く、また寛解導入に用いる生物学的製剤や免疫抑制剤の作用は強力で、感染症のリスクを高めるため長期使用は不可能である。故に現在のIBD治療では、選択肢の少ない長期寛解維持を実現させる有用な新規治療薬の創出が強く求められている。

私たちは、IBDにおいて破綻したバリア機構を回復させることが、長期寛解維持の実現に繋がると考え、腸管粘膜免疫系において中心的な役割を担う腸管マクロファージに着目し研究を行い、IL-10を高産生する腸管マクロファージがIBD病態を改善する可能性を報告してきた。IL-10は腸管の恒常性維持に必須のサイトカインであり、近年、腸管マクロファージがIL-10を介して傷害された腸管粘膜の修復に寄与することが報告されている。また私たちは、腸管マクロファージを除去したマウスでは、炎症によって傷害された腸管粘膜の修復が遅延する知見も得ている。よって、腸管マクロファージのIL-10産生を亢進させる薬物は、単なる抗炎症薬としてではなく、長期寛解維持を実現させる、IBDに対する有用な新規コンセプトをもつ治療薬となると期待される。

そこで私たちは、腸管マクロファージのIL-10産生を亢進させる薬物の探索研究を着想した。これまでに腸管マクロファージのIL-10産生を亢進させる薬物のスクリーニングにより、和漢医薬学総合研究所が所有する和漢薬ライブラリーから2種類の生薬エキスおよび1種類の生薬由来化合物が腸管マクロファージのIL-10産生を亢進することを見出している。このうち*in vivo*での効果が期待できる生薬エキスを候補薬物として、トランスレーショナル・リサーチを目指した製剤化を視野に入れ研究を進めている。

さらに、慢性炎症疾患であるIBDの重大な合併症は慢性炎症を母地とした大腸発がんである。IBDは若年期に好発し、罹病期間に応じて大腸発がんのリスクが顕著に増加するため、今後、非常に大きな問題となることが予想される。私たちはIBDを背景とした大腸発がんについても研究を行い、アセチルコリン性抗炎症機構や漢方薬の大建中湯がIBD関連大腸発がんの発生を抑制することを報告している。

今後さらに、腸管マクロファージのIL-10産生を亢進する薬物を応用した病態薬理研究を推進し、消化管バリア機構ならびにその破綻メカニズムの解明を行い、長期寛解維持を実現させる有用なIBD新規治療薬の創出に繋がりたいと考えている。

林 周作 (はやし しゅうさく)

学歴

2004年3月 京都薬科大学 薬学部 卒業

2006年3月 京都薬科大学大学院 薬学研究科薬学専攻 博士前期課程 修了

2009年3月 京都薬科大学大学院 薬学研究科薬学専攻 博士後期課程 修了

職歴

2009年4月 京都薬科大学 ポストドクター研究員

2010年6月 富山大学 和漢医薬学総合研究所 助教

若手シンポジウム

「薬学の大きな可能性

—多様な領域での最前線研究」

高精度ドッキングシミュレーション法の開発と抗ウイルス薬のデザイン

藤本和宏（北陸大薬）

インフルエンザ特効薬のタミフルに代表されるように、近年の創薬の世界では計算機を活用した「インシリコ創薬」が活躍するようになりつつある。時間的・経済的に莫大なコストのかかる従来の創薬に対し、インシリコ創薬では「合理的」な薬の設計を目指している点が特徴と言える。タンパク質の立体構造情報に基づいて創薬を行う Structure Based Drug Design (SBDD) は、インシリコ創薬の中でも特に注目を集めている。タンパク質の立体構造情報が大量に蓄積されてきたこと、および計算機の演算能力が飛躍的に向上したことに伴い、実際の創薬の現場において SBDD がさかんに行われるようになってきている。SBDD における最重要課題の一つとして、薬剤候補のリガンドと標的タンパク質との「ドッキング（結合様式）予測」が挙げられる。このドッキングを如何に高精度で予測できるかが「合理的」な創薬の鍵となる。そのため、これまでに多くの計算科学者が高精度なドッキング予測を目指した研究に取り組み、その結果、多数のソフトウェアが開発されてきた。しかしながら、こうしたソフトウェアの予測精度は決して高くないのが現状である。

ドッキング予測とは、タンパク質—リガンドにおいて働く分子間相互作用（エネルギー）が最も安定となる構造を探す最適化問題と言える。したがって、この問題の解決には少なくとも①最適化アルゴリズムの開発と②相互作用エネルギーの算出法（目的関数）の開発が必要となる。ここで我々は①の開発に取り組んだ。群知能の一つである Artificial Bee Colony (ABC) アルゴリズム（蜜蜂が花の蜜を効率的に採集する行動をモデル化したもの）に着目し、これをドッキング計算に適用することによって予測精度の向上を試みてきた[1]。その結果、本手法はテストデータセットに対し、遺伝的アルゴリズムを用いた従来法と比べて高い精度でドッキング予測することに成功したのである。また自由度の大きなリガンドの場合、従来法による計算ではドッキング予測の精度が低下するのだが、ABC はリガンドの自由度に関係なく安定した成功率を示すことが分かった。

本手法を用いて抗ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 薬の設計に取り組んだ。HCMV は臓器移植患者や免疫不全患者に対して重篤な日和見感染症を引き起こすウイルスである。抗 HCMV 効果を発揮する有名な薬剤はガンシクロビル (GCV) であるが、近年、GCV 耐性を獲得したウイルスの出現が頻繁に報告されていることから、GCV とは作用機序の異なる新薬の開発が喫緊の課題となっている。これに対し、イネ科植物、特にクマザサに多く含まれるトリシンは GCV とは異なる作用機序で抗 HCMV 効果を発揮するため、新薬の候補として期待されている。しかしながら、トリシンの抗 HCMV 効果は GCV と比較して低いことが分かっているため、トリシンそのものを抗 HCMV 薬として利用することは適切ではないと考えられる。そこで本研究では、トリシンの構造を改変することによって GCV よりも強力な抗 HCMV 薬を作成することを試みた。まずトリシンに対してフッ素を導入することで構造の改変を行った。次にデザインしたトリシン誘導体とサイクリン依存性キナーゼ 9 (CDK9) に対して ABC を用いたドッキングシミュレーションを実施し、CDK9 に対する親和性の評価を行った[2]。計算の結果、本研究で設計したトリシン誘導体の中で 6F-トリシンの親和性が最も高くなることが予測された[3]。この予測に基づいて実際に 6F-トリシンの合成を行い、さらに HCMV 感染細胞を用いた評価実験を行った。その結果、6F-トリシンの 50%効果濃度 (EC₅₀) は 0.126 nM であった。また GCV についても EC₅₀ 測定したところ 27.5 nM であった。したがって、6F-トリシンは GCV より約 200 倍も強力な抗 HCMV 効果を有することが分かった。さらに 6F-トリシンの細胞毒性に関する評価を行ったところ、6F-トリシンの濃度を 10 μM まで上昇させても細胞毒性が現れないことが確認できた。以上の結果から、ABC によるドッキングシミュレーションを用いて設計された 6F-トリシンは強い抗 HCMV 効果を発揮し、且つその細胞毒性は極めて低いことが分かった。

【参考文献】

- [1] S. Uehara, K. J. Fujimoto, S. Tanaka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 16412-16417 (2015).
- [2] H. Sadanari, K. J. Fujimoto, Y. Sugihara, T. Ishida, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *FEBS Open Bio* **8**, 646-654 (2018).
- [3] K. J. Fujimoto, D. Nema, M. Ninomiya, M. Koketsu, H. Sadanari, M. Takemoto, T. Daikoku, T. Murayama, *Antivir. Res.* **154**, 10-16 (2018).

略歴

- 2007年 京都大学大学院工学研究科 博士課程修了 博士（工学）
- 2007年 米国 Duke 大学化学科 博士研究員
- 2008年 京都大学大学院理学研究科 リサーチフェロー
- 2011年 神戸大学大学院システム情報学研究科 講師
- 2015年 北陸大学薬学部 講師

深見達基 (金沢大・薬)

臨床で使用されている医薬品の多くはシトクロム P450 (P450) により代謝されるが、近年では、薬物相互作用を避ける目的で P450 により代謝を受けない医薬品を開発する傾向があり、P450 以外の酵素、non-P450 により代謝を受ける医薬品候補化合物が増えてきている。そのため、non-P450 酵素の機能や個人差の情報が求められている。

臨床で使用されている医薬品の約 10% は加水分解反応を受けることが知られており、本反応を利用して薬理活性体へと変換するプロドラッグの代謝の観点から加水分解酵素の研究が多くなされている。しかし、加水分解酵素はときに反応性代謝物の生成にも関与するため、医薬品毒性学的にも重要である。最も研究が進んでいる加水分解酵素はカルボキシルエステラーゼ (CES) であるが、毒性学的観点から医薬品の加水分解反応を触媒する酵素を解析したところ、医薬品を加水分解する酵素として新たにアリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) を同定した。例えば、抗がん薬フルタミドや真菌症治療薬ケトコナゾールは AADAC により加水分解を受けることで肝障害を引き起こすこと、解熱鎮痛薬フェナセチンは加水分解を受けることでメトヘモグロビン血症を引き起こすことを明らかにした。AADAC は CES よりも、エステル結合およびアミド結合のアシル基側が非常に小さい化合物を基質とする傾向があり、CES とは異なる基質認識性を示すことも明らかにしている。CES もプロドラッグの活性化のみではなく、医薬品毒性に関与するケースがある。例えば、欧州において肝障害が副作用として起こるため問題にされている解熱鎮痛薬フルピルチンは CES の 1 分子種 CES2 により加水分解されたのち、肝障害を引き起こす反応性代謝物に変換されることを明らかにした。

医薬品の副作用には加水分解反応だけではなく、還元反応も関与することがある。ニトロ基を有する医薬品の多くは生体内で還元反応を受けるが、薬物代謝の主要臓器である肝臓においてこの還元反応を触媒する酵素は不明であった。ニトロ基含有薬物の 1 つ、催眠薬ニトラゼパムの還元酵素をヒト肝臓より精製した結果、酸化反応を触媒することで認知されていたアルデヒドオキシダーゼ (AOX) が単離された。ニトロ基が還元されると、生体内高分子に結合する性質のために毒性アラート構造として知られているヒドロキシルアミン体を介してアミノ体が産生される。どのようなニトロ基含有医薬品が AOX により還元されるか調べたところ、そのすべてが筋弛緩薬ダントロレンや解熱鎮痛薬ニメスリドなど副作用として肝障害が報告されているものであったため、AOX による還元反応は医薬品毒性に関与している可能性が考えられた。

上記のように、non-P450 薬物代謝酵素には不明な点が多く残されており、安全な創薬および臨床における医薬品の適正使用のために、さらなる機能解析を行う必要がある。

深見 達基 (ふかみ たつき)

学歴

2004年 金沢大学 薬学部薬学科 卒業

2006年 金沢大学大学院 自然科学研究科博士前期課程 創薬科学専攻 修了

2008年 金沢大学大学院 自然科学研究科博士後期課程 生命科学専攻 修了

職歴

2008年 - 2015年 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 助教

2015年 - 現在 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 准教授

2016年 National Institute of Health, National Cancer Institute, Special Volunteer

専門分野

薬物代謝学、毒性学

所属学会

日本薬物動態学会、日本毒性学会、日本薬学会、International Society for the Study of Xenobiotics

MRI の製剤物性評価への応用

大貫義則

富山大学大学院 医学薬学研究部(薬学) 製剤設計学講座

1. はじめに

磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging, MRI)は、水のプロトンの核磁気共鳴現象(nuclear magnetic resonance, NMR)を利用した分子イメージング技術であり、特に医療分野では、画像診断などに広く使用されている。また、MRI は分子の拡散性やプロトンの回転運動などを表わす MR パラメータを用いて画像化することにより、検体内の水の分子運動性を画像化することも可能である。このような特徴から、医療分野のみならず、科学・産業の様々なシーンで MRI が応用されるようになってきた。薬剤・製剤の分野に目を向けてみると、製剤の機能や性能を特徴づける重要特性の中には、水の分子運動性が深く関与してものも多い。したがって、製剤研究を行う上でも、MRI は有用な分析評価ツールになると考えられる。このような考えから、演者らは、製剤物性評価ツールとしての MRI の有用性について検討している。本講演では、これまでに行った研究事例について紹介させていただく。

2. エマルション製剤の乳化安定性評価

スキンクリームなどのエマルション製剤の品質(外観や主薬均一性など)は、わずかな乳化状態の変化によって著しく損なわれる懸念がある。そこで、MRI を応用してエマルション製剤の乳化状態を非破壊的かつ高感度に評価するための新規手法の構築を試みた。実験の結果、 T_1 および T_2 緩和時間画像(T_1 および T_2 map)や、見かけの拡散係数画像(ADC map)などの水分子運動性可視化技術を応用することで、目視では識別できない微細な乳化状態の変化(クリーミングなど)を高感度で検出できることが明らかになり、エマルション製剤の製剤安定性を評価するための優れた新規手法が構築された。続いて、上記の検討で構築した MRI 手法の有用性を評価するため、臨床現場で使用される実際の外用剤を用いて詳細な評価を行った。なお、測定試料としては、透析患者の掻痒感緩和のために院内製剤として処方されるメントール・ジフェンヒドラミン含有クリームを選択した。この院内製剤は、臨床使用によって製剤安定性の低下が懸念されている。検討の結果、それらの相分離挙動が明らかになり、さらに関心領域の成分分析などから、製剤安定性についての深い知見が得られた。以上より、本 MRI 手法は、実際の製剤安定性を評価する上でも極めて有用であると考えられる。

3. 懸濁剤中の微粒子分散状態の評価

本 MRI 手法の製剤物性評価における更なる有用性を示すため、懸濁剤中の微粒子の分散状態を評価した。試料として、日焼け止めクリームに配合される酸化チタン微粒子の懸濁液を用いた。MRI による分子運動性可視化技術によって観察した結果、試料中の微粒子の分散状態を非破壊的かつ高感度に観察できることが明らかになった。以上より、本手法は微粒子分散液の分散状態を評価する上でも有用であることが示された。

4. 結語

MRI は、試料の内部構造を非破壊的に画像化するだけでなく、試料に含まれる水分子運動性の可視化や、関心領域の成分分析などを行うことも可能である。したがって、製剤物性を評価する上でも、強力な分析評価ツールになる。

大貫 義則 (おおぬき よしのり)

学歴

平成 10 年 3 月 星薬科大学薬学部 卒業

平成 12 年 3 月 星薬科大学大学院薬学研究科 博士前期課程 修了

職歴

平成 12 年 4 月 リンテック株式会社 研究開発本部 研究員

平成 14 年 7 月 星薬科大学 薬剤学教室 助手

平成 19 年 4 月 星薬科大学 薬剤学教室 助教

平成 20 年 コネチカット大学 薬学部 博士研究員

平成 21 年 ジョンズホプキンス大学 医学部 博士研究員

平成 26 年 4 月 星薬科大学 薬剤学教室 講師

平成 27 年 1 月 星薬科大学 薬剤学教室 准教授

平成 27 年 4 月 富山大学 大学院医学薬学研究部(薬学) 製剤設計学講座 客員教授

富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野

山本 武

食物アレルギーは、未だ根本的治癒に至る治療法は確立しておらず、治療は原因食物を除去する除去食療法が行われている。しかし、不慮の原因食物摂取による事故の報告もあり、根本的治癒に至る治療法や治療薬の開発が強く望まれている。

近年、アレルギー患者に対して原因抗原（アレルゲン）をごく微量から増量しつつ投与し続ける免疫療法の有用性が明らかになり、日本ではスギ花粉症やダニアレルギー性鼻炎に対する免疫療法薬が認可されている。しかし、食物アレルギーに対しては、免疫療法が原因抗原の投与により行なわれるため、アナフィラキシー等の重篤な副作用が発現する場合があることや必ずしも耐性獲得が誘導できるわけではないこと、耐性の誘導に数年に渡る長期間の投与が必要であることなど患者への負担が多岐であり、未だ研究段階の治療法とされ一般診療には推奨されていない。けれども、免疫療法は食物アレルギーに対しても一定の成果が報告されており、根本的治癒に繋がる治療法として研究が続けられている。

近年、この免疫療法の治療機序に免疫抑制性の制御性 T 細胞の増加が関与することや、腸管での食物抗原に対する免疫寛容の確立に制御性 T 細胞が重要な役割を担っていることが明らかになり、制御性 T 細胞の重要性が示唆されている。また、我々はこれまでに、食物アレルギー病態モデルを確立し、病態解析を行うとともに治療薬の検討を行い、葛根湯やアシルヒドロカーボン受容体アゴニスト(TCDD)が腸管に Foxp3⁺制御性 T 細胞を誘導し腸管粘膜免疫系の過剰亢進を抑制することにより症状発症抑制作用を示すこと明らかにしている。

そこで、現在食物アレルギーを根本的に治癒する可能性がある治療法として研究が進められているが、安全性の問題や治療効率が十分には高くないことなどの問題から未だ一般診療として推奨されていない経口免疫療法に、制御性 T 細胞を誘導する薬物として葛根湯や TCDD を併用する治療方法を考案し、安全かつ効率的に治療を行えるか検討した。症状を発症した食物アレルギー病態モデルマウスに対して、臨床研究と同様に経口免疫療法を行う経口免疫療法モデルを新たに確立し、葛根湯や TCDD の併用療法を行い、これらの併用療法が腸管に Foxp3⁺制御性 T 細胞を誘導し、経口免疫療法の治療効率を上げることを明らかにした。

以上から、腸管に制御性 T 細胞を誘導する薬物を経口免疫療法と併用療法が、食物アレルギーの治療に有効であることを明らかにし、今後のさらなる研究の発展が、安全でかつ効率の良い食物アレルギーの根本的な治療に繋がる可能性を示した。

略歴

山本 武 (やまもと たけし)

学歴

静岡県立大学 薬学部 卒

静岡県立大学大学院 (博士)食品栄養科学

職歴

1999年4月 県立長崎シーボルト大学 看護栄養学科 助手

2004年9月 富山医科薬科大学 和漢薬研究所 消化管生理学分野 助手

2007年4月 富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野 助教

専門分野

和漢医薬学

消化管生理学

免疫学

薬理学

所属学会

和漢医薬学会

日本アレルギー学会

賞罰

2018年 和漢医薬学会 学術貢献賞

**学生優秀発表賞選考対象
学士課程部門(領域1)**

肺がん細胞のシスプラチン耐性における ErbB2 および EphA2 の役割

○馬島 洪作¹、泉 結香¹、堀部 紗世²、櫻井 宏明¹ (¹富山大院薬、²神戸薬科大)

【背景及び目的】シスプラチンはがん化学療法の中心的薬剤であり、肺がんなどの様々ながんの治療に用いられている。しかしその耐性化が問題となっており、その機構の研究が進められているが耐性化の克服には至っていない。チロシンキナーゼ型受容体 (RTK) は、がん細胞においてしばしば過剰発現や変異が認められ、異常な増殖やアポトーシス抑制につながる事が明らかとなっており、がん細胞の生存において非常に重要な役割を果たしている。RTK の発現増加によりがん細胞が薬剤耐性を獲得することが知られており、シスプラチン耐性化においても同様の機構が働いている可能性が考えられる。そこで、本研究では、肺がん細胞とそのシスプラチン耐性株を用いて、シスプラチン耐性における RTK の発現の役割について検討した。

【方法】A549 細胞とそのシスプラチン耐性株である ACR4 細胞における RTK の発現をウエスタンブロット法により解析した。MEK-ERK-RSK 阻害剤を作用させ、RTK の発現に変化が現れるか検討した。siRNA によって ErbB2 と EphA2 のノックダウン、あるいはシスプラチンと ErbB2 阻害剤ラパチニブを併用し、WST-8 アッセイにて細胞の生存率を評価した。

【結果及び考察】ACR4 細胞では、A549 細胞と比べて ErbB2 や EphA2 の発現が増加していることが明らかになった。また、EphA2 の発現は MEK-ERK 経路を阻害することで減少することがわかった。そこで、A549 細胞と ACR4 細胞に ErbB2 と EphA2 の siRNA を作用させたところ、ACR4 細胞においてのみ細胞の生存率が減少することがわかった。また、ラパチニブとシスプラチンを同時に作用させた際に、ACR4 細胞ではシスプラチン単独と比べて細胞の生存率が減少することが明らかになった。以上の結果から、ACR4 細胞では親株とは異なり細胞生存のためのシグナル伝達に ErbB2 と EphA2 を介した経路も利用することでシスプラチンに対する耐性を獲得していると考えられた。現在、阻害剤を用いた実験により ErbB2 の発現機構を解析し、シスプラチン耐性化機構の詳細なメカニズムの解明を行っている。

1-学-2

CD4⁺T 細胞のエストロゲン受容体 α を介するエストロゲン作用が妊娠糖尿病病態におよぼす影響

○^{うのきみえ}宇植生美恵¹, ^{わだつとむ}和田 努¹, ^{たなかともこ}田中智子², ^{おぎはらさき}荻原沙季¹, ^{いえひろみ}叶喬博¹, ^{いしかわあかり}石川明香里¹, ^{さいとうしげる}齋藤 滋², ^{つねきひろし}恒枝宏史¹,
^{ささおかとしやす}笹岡利安¹

富山大学 病態制御薬理学¹、産科婦人科学²

【背景および目的】妊娠糖尿病は妊娠代謝合併症の1つであり、妊娠期および出産後の母子に代謝異常を引き起こす。妊娠糖尿病患者数は近年増加傾向にあり、詳細な病態の解明が急務とされている。妊娠中に増加するエストロゲンは CD4⁺T 細胞に発現するエストロゲン受容体 α (ER α) を介してナイーブ T 細胞の制御性 T 細胞 (Treg) への分化を促進し、母子免疫系の調節により正常な妊娠維持に寄与する。一方、妊娠糖尿病病態では子宮や末梢血での Treg の減少と慢性炎症の増悪が報告されている。また Treg は内臓脂肪において慢性炎症を抑制し、肥満に伴う糖代謝の悪化を抑制する。そこで本研究では妊娠糖尿病モデルマウスを作製し、CD4⁺T 細胞特異的 ER α 欠損マウスが妊娠糖尿病病態に与える影響を検討した。

【方法】雌性 8~10 週齢の CD4-Cre^{+/+}, ER α ^{flox/flox} (KO) マウス、および ER α ^{flox/flox} (FL) マウスに高脂肪食を 4~5 週間負荷し、雄性の BALB/c マウスと交配した。経時的に体重を測定し、胎生 13.5 日にグルコース負荷試験、胎生 16.5 日にインスリン負荷試験を行い糖代謝の評価を行った。マウスの各組織における Treg の細胞数比を Flow cytometry により解析した。また、内臓脂肪組織における遺伝子発現を Real-time PCR 法により解析した。

【結果】妊娠マウスは非妊娠マウスと比較し、有意な体重増加を認めた。解剖時の組織重量は、妊娠マウスにおいて子宮、肝臓の有意な増加を認めたが、内臓脂肪重量に変化は認めなかった。また FL マウスと KO マウス間で妊娠率、胎児数に差異は認めなかった。妊娠マウスは非妊娠マウスと比較し、有意な耐糖能、インスリン感受性の悪化を示した。さらに妊娠 KO マウスは妊娠 FL マウスと比較し、耐糖能の悪化を示した。Flow cytometry による各組織の解析では、妊娠により胸腺 Treg は FL, KO の両マウスで増加を認めたが、子宮 Treg は FL マウスでのみ増加した。また内臓脂肪組織では、妊娠 FL マウスと比較し妊娠 KO マウスにおいて Treg の減少が認められた。内臓脂肪組織における Real-time PCR 法による遺伝子発現の解析では、妊娠 KO マウスにおいて炎症関連遺伝子の上昇傾向が認められた。また、Th17 の転写因子である ROR γ t および Th1 の転写因子である T-bet の発現は妊娠 KO マウスにおいて上昇傾向を示した。

【考察】妊娠 KO マウスは耐糖能の悪化を示し、その機序として内臓脂肪における Treg の減少と Th17 の増加に伴う慢性炎症の亢進が示唆された。ヒト妊娠糖尿病では、慢性炎症を抑制する Treg の機能および数の低下、ならびに慢性炎症を促進する Th17 の増加が報告されている。以上より、妊娠 KO マウスは妊娠糖尿病病態を反映した良好なモデルマウスであると考えられ、新たな病態解明や治療戦略の立脚に貢献することが期待される。さらに、T 細胞に対する ER α シグナルの障害はヒトでの妊娠糖尿病と類似の病態を示すことから、本機構は妊娠糖尿病を誘導する一病態である可能性が示唆される。

1-学-3

メタノール資化性酵母を用いたリソソーム膜タンパク質 LMBD1 の発現と機能解析

○金子直未¹、川口甲介²、守田雅志²、今中常雄³、宗孝紀²

(¹ 富山大薬、² 富山大院薬、³ 広島国際大薬)

【目的】

必須栄養素であるビタミン B₁₂ は、エンドサイトーシスによりリソソーム内へと取り込まれた後、細胞質へと輸送され、補酵素型へと変換されて機能する。ATP の加水分解エネルギーを駆動力として物質輸送を行う ABC トランスポーターに分類される ABCD4、またはアダプタータンパク質として機能するリソソーム膜タンパク質 LMBD1、それぞれの機能不全は、リソソーム内へのビタミン B₁₂ の異常蓄積を引き起こすことが個別に報告されている。これらの研究結果は、LMBD1 と ABCD4 が協調してリソソームからのビタミン B₁₂ 輸送に関与することを示唆する。我々はこれまでに、LMBD1 が小胞体膜上で ABCD4 と複合体を形成し、ABCD4 のリソソームへの局在化を制御することを明らかにしてきた。以上から我々は、ABCD4 がリソソーム膜上でビタミン B₁₂ 輸送を担う輸送体であると推測している。本研究は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いてヒト LMBD1 およびヒト ABCD4 タンパク質を調製することで、ABCD4 の基質輸送機能への LMBD1 の寄与について検証することを目的とする。

【方法】

C 末端に HA タグまたは GST タグを付加した LMBD1 および N 末端に His タグを付加した ABCD4 を、アルコールオキシダーゼプロモーター支配下で *P. pastoris* に異種発現させた。発現させた融合タンパク質は、界面活性剤で可溶化し、アフィニティレジンで精製した。希釈法により精製したタンパク質を大豆のリン脂質から作製した人工脂質二重膜であるリポソームへ再構成し、プロテオリポソームを調製することでその機能評価を行った。

【結果・考察】

哺乳動物細胞内と同様に LMBD1 と ABCD4 が *P. pastoris* 内でも複合体を形成するかを確認するために、LMBD1-HA と His-ABCD4 の共発現株を作製した。両タンパク質の発現を確認できたので、可溶化後に His タグプルダウンアッセイを行った。しかし、*P. pastoris* 内では LMBD1 と ABCD4 の複合体形成は確認できなかった。そのため、LMBD1 および ABCD4 タンパク質それぞれを精製し、リポソームに組み込むことを試みた。利便性を考慮して、LMBD1 の HA タグを GST タグに置換した発現ベクターを構築した。現在、LMBD1-GST タンパク質の発現を確認できたので、融合タンパク質の可溶化とグルタチオンセファロースを用いたアフィニティ精製を行っている。精製後は、既に精製に成功している His-ABCD4 タンパク質とともにリポソームに組み込むことでプロテオリポソームを作製し、LMBD1 存在、非存在下での ABCD4 の酵素活性および基質輸送活性について検証する予定である。

1-学-4

ペルオキシソーム機能と細胞内コレステロール代謝の関連性

○^{とみだいさむ}富田 勇¹、^{みやざわ み ゆう}宮澤美優¹、^{やまだ よしたろう}山田祥大朗¹、^{もり たまさし}守田雅志²、^{そうたかのり}宗孝紀²

(富山大薬¹、富山大院薬²)

【背景・目的】

ペルオキシソームは、極長鎖脂肪酸 β 酸化やエーテル型リン脂質の生合成など脂質代謝に重要なオルガネラとして機能する。細胞内ではコレステロール代謝の恒常性が厳密に制御されているが、最近、ペルオキシソームがコレステロールの細胞内転送にも関与していることが報告された。しかし、ペルオキシソームの機能と細胞内コレステロール代謝との関連性は明らかになっていない。本研究では、ペルオキシソーム病患者に由来する線維芽細胞を用いて、ペルオキシソーム機能と細胞内コレステロール代謝の関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

本研究では、健常者、ペルオキシソーム膜 ABCD1 タンパク質の機能が欠損した副腎白質ジストロフィー (ALD) 患者、ペルオキシソーム形成異常症 (Zellweger 症候群) 患者に由来する線維芽細胞を用いて実験を行った。培養した各線維芽細胞をカバーガラス上に固定した後に、コレステロールと特異的に結合することで可視化できる filipin 試薬を用いて遊離コレステロールを染色した。リソソーム及びペルオキシソームはそれぞれ LAMP1 抗体及び ABCD3 抗体を用いた蛍光抗体法により、また、ミトコンドリアは MitoTracker 試薬により染色した。その後、蛍光顕微鏡で各オルガネラおよびコレステロールの細胞内局在に関して観察した。各線維芽細胞のコレステロール関連遺伝子の発現量は real-time RT-PCR により定量解析した。

【結果】

各細胞を filipin 染色した結果、健常者に比べて ALD 患者及び Zellweger 患者の線維芽細胞において遊離コレステロールが多くリソソームに蓄積していることが観察された。ペルオキシソームを欠損した Zellweger 患者線維芽細胞では、HMG-CoA レダクターゼや LDL 受容体の遺伝子発現量が健常者に比べ高値を示したことから、小胞体内のコレステロール濃度が低下していることが示唆された。しかし、極長鎖脂肪酸 β 酸化系酵素を欠損しているがペルオキシソーム膜形成は正常な Zellweger 患者に由来する線維芽細胞では、これらの遺伝子の発現量の増加は認められなかった。

【考察】

以上の結果から、リソソームから小胞体への遊離コレステロールの輸送にペルオキシソームが関与することが推察された。一方、ペルオキシソーム欠損により HMG-CoA レダクターゼの発現亢進が認められたことから、ペルオキシソームを介したコレステロールの小胞体への輸送経路は、細胞内のコレステロール代謝調節に重要な役割を担うことが示唆された。また、このペルオキシソームを介したコレステロールの輸送にペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化系は関与していないことが推察された。

1-学-5

乳がん患者における顎骨壊死発症リスク因子の後方視的探索

○すぎやま ひろき杉山 雄紀¹、たかはし よしみつ高橋 喜統²、おかもと こうすけ岡本 晃典¹、いしばし ひろあき石橋 浩晃³、いしかわ かずひろ石川 和宏¹、にわ おさむ丹羽 修²

¹北陸大学薬学部、²金沢医科大学病院薬剤部、³金沢医科大学病院歯科口腔科

【目的】顎骨壊死はビスフォスフォネート（BP）系薬剤の副作用として知られているが、近年 BP 系以外の薬剤でも発症することが報告されている。そこで BP 系薬剤を含む骨吸収抑制薬以外での顎骨壊死の発症に関わるリスク因子について後方視的な調査解析法を用いて検討した。

【方法】金沢医科大学病院においてゾレドロン酸注射液が投与された乳がん患者（89 例）を対象とした。その 89 例について、背景及び使用された抗がん剤の情報を電子カルテより後方視的に調査し、発症群（10 例）と非発症群（79 例）の 2 群間で統計学的な解析を行った。

本研究は、金沢医科大学病院と北陸大学との共同研究として、金沢医科大学病院及び北陸大学の倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。

【結果】両群間で比較解析したところ、以前の報告通り歯科治療歴により顎骨壊死の発症が有意に高まった（ $P=0.008$ ）。また、乳がんの治療として使用された抗がん剤の種類について解析したところ、ドセタキセルを使用した場合においてのみ発症頻度が有意に高まった（ $P=0.05$ ）。次に使用された薬剤の内、2 種の抗がん剤を取り上げて同様に、その組み合わせについて解析したところ、ドセタキセルとシクロfosファミドが併用療法で使用された場合に発症頻度が有意に高まった（ $P=0.011$ ）。

【考察】今回得られた結果から、歯科治療が顎骨壊死発症のリスク因子である可能性が以前の報告通り示されたとともに、抗がん剤においても新たなリスク因子としての可能性が示唆された。抗がん剤の種類としては、タキサン系のドセタキセルであったことから MTDC(最大耐用量療法)をベースとした他剤にはない本剤に特徴的な血管新生阻害作用が関わっている可能性が示唆された。また基礎研究で報告されているドセタキセルの作用機序が臨床事象にも反映された結果が得られたことは、意義深いものと思われる。

【結論】本研究より顎骨壊死の新たなリスク因子として、小規模ながらもドセタキセルが該当するという可能性が示唆されたことから、本剤での治療においてより注意を払う必要があると思われる。その際、顎骨壊死の発症を防止する対策の 1 つとして口腔ケアが考えられる。薬剤師は薬剤に関する専門性を十分に発揮することによって、口腔ケアが顎骨壊死の発症防止に結びつけられるように、医師・歯科医師・看護師・歯科衛生士などの多職種からなるチーム医療をより強化することに寄与することが重要である。

1-学-6

RNA 編集酵素 ADAR による薬物代謝型ヒト P450 分子種の制御

○野崎 香於利¹、中野 正隆^{1,2}、深見 達基^{1,2}、中島 美紀^{1,2} (¹金沢大薬、²金沢大 WPI ナノ生命科学研)

【目的】転写後修飾の一つである RNA 編集は RNA 上の塩基が別の塩基に置換される現象であり、様々なタイプが存在する。中でも哺乳類において最も頻繁に認められるのが、二重鎖 RNA 中のアデノシン (A) がイノシン (I) に置換される A-to-I RNA 編集であり、これによって遺伝子の発現や機能に変化が生じ得る。この塩基置換は adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) という酵素によって触媒される。近年、当研究室ではヒト肝臓における ADAR1 タンパク質発現量に約 220 倍もの個人差があることを明らかにした。肝臓における主要な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (P450) 各分子種の発現量や酵素活性には大きな個人差が認められる。本研究では ADAR の個人差が P450 の発現量や酵素活性の個人差の一因となっている可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】分化させたヒト肝臓由来 HepaRG 細胞に ADAR1 もしくは ADAR2 に対する siRNA を導入し、CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4 および 3A5 の mRNA およびタンパク質発現量を real-time RT-PCR および Western blotting により測定した。また、各 P450 分子種の特異的基質を用いて酵素活性を LC-MS/MS により測定した。ADARs ノックダウン条件下で転写阻害剤 α -アミニチンを処置した後、細胞を経時的に回収し、P450 mRNA の安定性を評価した。CYP2C8 遺伝子の上流 2,500 bp または 500 bp を組み込んだレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、ADARs ノックダウンが CYP2C8 転写活性に与える影響を評価した。

【結果および考察】ADAR1 ノックダウンにより CYP2A6、2B6、2C8、2C9、2C19 および 2E1 mRNA 発現量が 50-70%程度有意に減少した一方、CYP3A4 mRNA 発現量が約 3 倍有意に増加した。また、ADAR2 ノックダウンにより CYP3A5 以外の全ての分子種の mRNA 発現量が約 40-80%有意に減少した。ADAR1 もしくは ADAR2 ノックダウンにより CYP2B6 および 2C8 タンパク質の 50-70%程度の発現減少が、また ADAR1 ノックダウンにより CYP2C8、2C9 および 2D6 酵素活性の約 50%の有意な低下が認められた。したがって、ADARs は P450 の発現量や酵素活性を制御しており、その制御は分子種によって異なることが示された。次に、ADARs ノックダウンにより発現量および酵素活性の低下が認められた CYP2C8 に焦点をあて制御メカニズムに関する検討を行った。転写阻害剤 α -アミニチンを用いた実験において、ADARs ノックダウンにより CYP2C8 mRNA の安定性に変化は認められなかったことから、CYP2C8 の発現制御は転写レベルで生じていることが示唆された。加えて CYP2C8 上流領域を組み込んだレポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、ADAR1 もしくは ADAR2 のノックダウンにより CYP2C8 転写活性の抑制が 50%程度認められたことから、ADARs は CYP2C8 の転写活性に影響を与えることでその発現を制御している可能性が示唆された。

以上、本研究では P450 の発現量や酵素活性が ADARs によって制御されており、中でも CYP2C8 は転写レベルで ADARs によって正に制御され、発現量や酵素活性の変動につながっていることを明らかにした。RNA 編集酵素 ADAR は P450 の制御に関わる新たな因子であることが示された。

1-学-7

ピレン修飾脂肪酸を用いた新規ペルオキシソーム脂肪酸β酸化活性及び脂肪酸合成活性の測定法

○佐藤瑛晶¹、守田雅志²、渡辺志朗³、今中常雄⁴、宗孝紀²

(富山大薬¹、富山大院薬²、富山大和漢研³、広島国際大薬⁴)

【背景・目的】

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、男児約2万人に一人の割合で発症する遺伝子疾患で、現在有効な治療法がない難治性の神経変性疾患である。この疾患では、ペルオキシソームでの脂肪酸β酸化の減少や小胞体における脂肪酸生合成の亢進による飽和極長鎖脂肪酸の蓄積が観察される。従って、脂肪酸β酸化を亢進、もしくは脂肪酸生合成を抑制する化合物は治療薬候補となると考えられる。従来の測定法は放射性同位元素を基質として用いるため、汎用性が低く、多検体の測定は困難であった。本研究では蛍光をもつピレン修飾脂肪酸を基質とした新たな測定法を開発し、治療薬探索のためのスクリーニング系を構築することを目的とした。

【方法】

- 1) ヒト皮膚線維芽細胞: 健常者、ALD患者、ペルオキシソーム形成異常症(Zellweger)患者及びミトコンドリア脂肪酸β酸化欠損(CACT)患者由来皮膚線維芽細胞を10%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で培養したものを実験に用いた。
- 2) ペルオキシソーム脂肪酸β酸化活性: Pyrene-C10:0を各線維芽細胞と3時間インキュベート後、抽出・加水分解して得られた遊離脂肪酸を逆相HPLCで分離し、pyrene-C8:0の蛍光強度を定量することにより測定した。なお活性は細胞タンパク量当りで示した。
- 3) 脂肪酸合成活性: Pyrene-C8:0を各線維芽細胞と3日間インキュベート後、同様に分離したpyrene-C10:0の蛍光強度を定量することにより測定した。

【結果】

Pyrene-C10:0を基質として健常者線維芽細胞とインキュベートすることにより、炭素数の2つ少ないpyrene-C8:0が基質濃度及び時間依存的に検出された。Pyrene-C10:0はCACT患者線維芽細胞ではβ酸化されたが、Zellweger患者線維芽細胞ではβ酸化されなかった。この結果から、Pyrene-C10:0はペルオキシソームでのみβ酸化されることが明らかとなった。一方、pyrene-C8:0を基質としてZellweger患者線維芽細胞とインキュベートすると、基質濃度及び時間依存的に炭素数の2つ多いpyrene-C10:0が検出された。それに対して健常者線維芽細胞ではほとんど検出されなかった。このことから、脂肪酸生合成がペルオキシソーム欠損により亢進していることが確認された。これらの結果は従来の放射性同位元素を基質として用いた測定方法の結果と一致した。

【考察】

以上のことから、pyrene修飾脂肪酸は、ペルオキシソーム脂肪酸β酸化及び脂肪酸生合成活性の測定基質として極めて有用と考えられる。本研究で開発した測定方法は、従来の方法と比べ、汎用性に優れており、多検体の測定にも適用が可能である。今後、この方法を用いたスクリーニング系によりALDに対する治療薬候補化合物が見つかることが期待される。

1-学-8

外側血液網膜関門における putrescine 輸送機構の解明

○李 開理, 赤沼 伸乙, 久保 義行, 細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】網膜は視覚を担う神経組織であり, ポリアミンの一種である putrescine が錐体細胞の発達促進に関与することに加え, 網膜神経節細胞の興奮毒性を増強することなど, 網膜組織の発達および傷害の両者に関与することが報告されている. このため, putrescine 濃度調節は網膜恒常性の維持に必須のものと考えられ, その詳細な機構解明が期待されている. 網膜内 putrescine 濃度調節機構の1つとしては, 血液網膜関門 (blood-retinal barrier; BRB) を介した putrescine 輸送機構が考えられ, これまでに, 網膜毛細血管内皮細胞を実体とする内側血液網膜関門 (inner BRB) において, 未知の putrescine 輸送機構の関与が示唆されている. 一方, 網膜色素上皮 (RPE) 細胞を実体とする外側血液網膜関門 (outer BRB) を介した putrescine 濃度調節の詳細は明らかとされておらず, outer BRB を介した putrescine 輸送機構の解明は BRB 全体を介した putrescine 濃度調節機構の解明に有益な知見をもたらすと考えられた. 本研究では, outer BRB を介した putrescine 輸送機構を, *in vitro* ラット outer BRB モデル細胞株である条件的不活化ラット RPE 細胞 (RPE-J 細胞) を用いて解析した.

【方法】RPE-J 細胞を 24-well plate 上で培養して³H]putrescine 取り込みを解析した. また, ³H]putrescine 取り込みの方向性輸送解析において, RPE-J 細胞を Transwell[®] polyester membrane inserts 上で培養して用いた.

【結果・考察】RPE-J 細胞への³H]putrescine 取り込みは時間および温度依存性を示すとともに, 細胞外 Na⁺, Cl⁻, 膜電位および pH 感受性を示した. さらに, RPE-J 細胞への濃度依存性 putrescine 取り込みは飽和性および非飽和性過程からなり, 飽和性過程の K_m 値は 4.04 μM と算出されたことから, outer BRB を介した putrescine 取り込みは輸送担体介在型であることが示唆された. Outer BRB を介した putrescine 輸送担体の同定に向けて, 各種化合物を用いた阻害解析を実施したところ, RPE-J 細胞における³H]putrescine 取り込みは, 1 mM の putrescine, spermidine, spermine, agmatine, serotonin および 5 mM の choline によって 50%以上阻害され, 1 mM の histamine, MPP⁺, L-carnitine および cimetidine によって 10-30% 程度の有意な阻害効果が示された. 一方, 1 mM の choline, L-ornithine および L-arginine によって³H]putrescine 取り込みは阻害されなかった. このようなカチオン性化合物に対する感受性は, 既知の有機カチオントランスポーター (OCT, OCTN, PMAT および MATE1) のどの輸送特性とも異なることから, outer BRB を介した putrescine 輸送には inner BRB と同様に未知の輸送機構が関与することが示唆された. さらに, 過去のラット *in vivo* 解析から, 循環血液-網膜間を介した putrescine 輸送に関しては網膜から循環血液中への putrescine 排出輸送の優位性が示唆されていることから, RPE-J 細胞による³H]putrescine 取り込みの方向性輸送について解析した. その結果, 頂端膜側から細胞および基底膜側から細胞への³H]putrescine 取り込み量は同程度であったことから, RPE 細胞の putrescine 輸送方向性は *in vivo* 解析によって示された輸送方向性とは異なり, BRB 全体を介した putrescine 輸送に対する寄与は小さいことが示唆された.

Gabapentin の網膜移行に対する血液網膜関門 L 型アミノ酸トランスポーターの関与

○ 山腰 敦子¹, 赤沼 伸乙¹, 須河内 剛志¹, 久保 義行¹, Anika M.S. Hartz^{2,3}, Björn Bauer⁴,
細谷 健一¹(富山大院薬¹, Sander-Brown Center on Aging, Univ. of Kentucky, USA²,

College of Medicine, Univ. of Kentucky, USA³, College of Pharmacy, Univ. of Kentucky, USA⁴)

【目的】Gabapentin は γ -アミノ酪酸のアナログであり、てんかんおよび神経障害性疼痛の治療薬として用いられている。近年、網膜神経節細胞における gabapentin の有益な効果が見出されている。Gabapentin はアミノトランスフェラーゼを阻害することで過剰なグルタミン酸生成を抑制し、興奮神経毒性に対する保護作用を示すほか、酸化ストレスレベルおよび caspase-3 の活性を低下することで異常な神経節細胞死を抑制することが報告されている。緑内障をはじめとした網膜疾患では網膜神経節細胞死が見られることから、網膜神経への gabapentin 移行性解明は網膜疾患への gabapentin 適用につながると期待される。薬物の循環血液から網膜への移行過程は内側血液網膜関門 (inner BRB) および外側血液網膜関門 (outer BRB) によって制御されている。Gabapentin は、BRB に発現するトランスポーターのうち、Na⁺非依存性 L 型アミノ酸トランスポーター-1 (LAT1) および Na⁺依存性有機カチオン/L-carnitine トランスポーター-1 (OCTN1) の輸送基質となることが報告されている。本研究では、ラット *in vivo* および *in vitro* 両解析を通じ、inner BRB および outer BRB を介した循環血液から網膜への gabapentin 移行に寄与する分子実体の解明を目的とした。

【方法】*In vivo* ラット循環血液中から網膜への [³H]gabapentin 輸送は、retinal uptake index (RUI) 法によって解析した。BRB における詳細な [³H]gabapentin 輸送は、*in vitro* inner BRB モデル細胞である TR-iBRB2 細胞および outer BRB モデル細胞株である RPE-J 細胞を用いて解析した。

【結果・考察】ラット循環血液から網膜への [³H]gabapentin 移行は非標識 10 mM gabapentin 共存下において 58%有意に低下したことから、BRB を介した gabapentin 分布への担体介在型輸送が示唆された。また、本 *in vivo* gabapentin 移行は LAT 選択的基質 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid によって阻害されたが、OCTN 基質である tetraethylammonium によって阻害されなかった。TR-iBRB2 細胞および RPE-J 細胞における [³H]gabapentin 取り込みは飽和性 (それぞれ $K_m = 735 \mu\text{M}$ および $507 \mu\text{M}$) を示した。各細胞への [³H]gabapentin 取り込みに対する各種阻害剤の影響を評価したところ、LAT1 の輸送基質である D-leucine および D-phenylalanine などによって、その取り込みはそれぞれ 60%および 40%以上阻害された。LAT の細胞内外基質を交換輸送する特性が各細胞における [³H]gabapentin 輸送において示されるかを検証した結果、非標識 gabapentin および LAT1 基質である D-leucine 含有 medium によってインキュベーションしたところ、細胞内に取り込ませた [³H]gabapentin の細胞外放出が、化合物非存在下に比して、それぞれ 2.1 倍および 1.7 倍以上促進された。さらに、LAT1 に対し特異的な small interfering RNA 処理によって、各細胞における [³H]gabapentin 取り込みは有意に減少し、LAT1 タンパク質発現レベルをもとに算出した取り込み全体に対する LAT1 の寄与率はそれぞれ 60%および 54%と算出された。以上の結果から、inner BRB および outer BRB を介した循環血液から網膜への gabapentin 輸送には主に LAT1 が関与することが示唆された。

1-学-10

REM 断眠ストレス負荷マウスにおける低用量 MPTP のドパミン神経毒性

○^{ながいゆいな}永井結奈¹, ^{たかたりょうじ}高多瞭治¹, ^{もりあつし}森厚詞², ^{みつもとやすひで}光本泰秀¹ (北陸大薬¹, 名古屋大院医²)

【背景・目的】孤発性パーキンソン病の発症要因の詳細は不明であるが、近年パーキンソン病の運動機能障害の発現に先立って、レム睡眠行動異常症が認められることが報告されている。そこで本研究では、レム睡眠障害がパーキンソン病発症の危険因子となる可能性を検証するため、Rapid Eye Movement Sleep Deprivation (REMSD) を負荷したマウスに、ドパミン神経毒 MPTP を投与し、レム睡眠障害の MPTP 神経毒性に対する影響を検討した。

【方法】C57BL/6N マウス (8 週齢, 雄性) は、搬入後 1 週間馴化させた後、実験に使用した。REMSD (1 日 20 時間, 3 日間) は、プラットホーム法 (ケージ中央に $\Phi 3 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ のプラットホームを設置し、水深 4 cm となるように水を張った) を用いて負荷した。50 mg/kg Li_2CO_3 は、初回 REMSD 負荷 4 時間前及び各 REMSD 負荷直後の 4 回腹腔内投与した。ドパミン神経毒 MPTP の処置は、最終 REMSD 負荷直後に 20 mg/kg の用量で腹腔内投与した。ドパミン神経変性の評価は、線条体ホモジネイトを用い、Western blot 法によりドパミントランスポーター (DAT), グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 及びチロシン水酸化酵素 (TH) 各々のタンパク質レベルを測定した。自発運動量 (Locomotor activity, LA) は SCANET MV-20 を用い測定した。線条体ドパミン (DA) 量の測定は、電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて行った。

【結果・考察】REMSD 負荷マウスは、Control マウスに比べ LA の有意な増加を示し、この増加は Li_2CO_3 の処置により抑制された。これらの結果から、プラットホーム法により REM 断眠ストレスに起因した行動異常を引き起こしていることが示唆された。

REMSD 負荷の MPTP 神経毒性に対する影響を検討する目的では、その神経毒性が軽度な低用量 (20 mg/kg) の MPTP を用いた。線条体 DAT タンパク質レベルにおいて、MPTP 投与マウスでは Control マウスと比べ有意な低下は認められなかったが、REMSD 負荷後に MPTP を投与したマウスでは、Control マウスに比べ有意な低下が認められた。また、線条体 TH タンパク質レベルも DAT タンパク質レベルと同様の傾向を示した。線条体 GFAP レベルでは、Control マウスに比べ REMSD 負荷後に MPTP を投与したマウスで有意な増加が認められたが、MPTP 投与のみのマウスでは Control マウスに比べ有意な増加は認められなかった。これらのことから、REMSD 負荷により MPTP 神経毒性が増強される可能性が示唆された。

REMSD 負荷の MPTP 神経毒性に対する作用機序を探る目的で、 Li_2CO_3 の影響について検討した。REMSD 負荷による MPTP 投与マウスにおける線条体 DAT 並びに TH タンパク質レベルの低下および線条体 GFAP レベルは、 Li_2CO_3 の処置により影響を受けなかった。

以上の結果から、REMSD 負荷が MPTP 神経毒性を増強させる可能性が示唆され、その機序は行動異常を引き起こす機序とは異なると考えられた。

1-学-11

急性拘束ストレス負荷マウスにおける Rubiscolin-6 の抗うつ効果

○佐藤玲菜¹, 多河典子², 加藤郁夫², 光本泰秀¹ (北陸大薬¹, 神戸薬大²)

【背景・目的】

うつ病は誰もが罹患する可能性があり、その予防や治療を目指した研究が盛んに進められている。その症状は、憂うつや不安に代表される精神症状及び疲労や頭痛といった身体症状など多様な症状を伴うことが多く、薬物治療ではそれらを改善するために多剤併用となるケースも少なくない。そのため、抗うつ薬における副作用や服薬管理の問題は避けることができない課題である。症状の改善のために補完・代替医療的アプローチを取り入れることは、患者の負担軽減に繋がり有用である。

本研究では、人の健康維持・増進に欠かすことのできない「食」に注目した。Rubiscolin-6 (YPLDLF) は、ほうれん草の葉に含まれる Rubisco (リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) という酵素タンパク質由来の δ オピオイドペプチドである。この Rubiscolin-6 は、摂食促進、学習促進及び、抗不安などの効果を有することが報告されている。本研究では、Rubiscolin-6 が抗うつ効果を有する可能性について尾懸垂試験 (Tail suspension test, TST) を用いて検討した。

【方法】

雄性 ICR マウス (4 週齢) は、搬入後に 1 週間の馴化期間において実験に使用した。マウスの拘束ストレス負荷 (Immobilization stress, IS) は、Restrainer (Mouse DecapiCones, MDC-200) を用い 2 時間行った。合成オピオイドペプチド、Rubiscolin-6 は生理食塩水に溶解し、拘束負荷から解放 30 分後に腹腔内投与した。自発運動量 (Locomotor activity, LA) の測定及び TST は、各々 Rubiscolin-6 投与 30 分及び 60 分後に行った。 δ オピオイド受容体拮抗薬である Naltrindole は、1 mg/kg の用量で Rubiscolin-6 投与直前に腹腔内投与した。

【結果・考察】

IS 処置の有無における Rubiscolin-6 の LA 及び TST の無動時間に及ぼす影響を検討した。IS 処置マウスでは、Rubiscolin-6 により無動時間の有意な短縮が認められたが、IS 未処置マウスでは、Rubiscolin-6 による影響は認められなかった。IS 処置の有無や各々の条件下において Rubiscolin-6 は、LA に影響を及ぼさなかった。これらのことから、Rubiscolin-6 が抗ストレス効果に起因したうつ様症状改善作用を有することが示唆された。

Rubiscolin-6 の抗うつ効果における用量依存性を検討するため、IS 処置マウスにおいて Rubiscolin-6 の 3, 10 及び 30 mg/kg 投与後の LA 及び TST の無動時間を測定した。いずれの用量においても自発運動量に影響を与えず、TST の無動時間は用量依存的な短縮傾向を示した。Naltrindole は、TST の無動時間における Rubiscolin-6 の短縮効果を有意に抑制した。これらのことから、Rubiscolin-6 の抗うつ効果発現に関わる標的分子として δ オピオイド受容体の関与が示唆された。

**学生優秀発表賞選考対象
大学院課程部門(領域1)**

ラット血液脳関門における抗てんかん薬 phenytoin の排出輸送機構

じょうむら りゅうた あかぬま しんいち くぼ よしゆき ほそや けんいち
○定村 龍太, 赤沼 伸乙, 久保 義行, 細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】てんかんは、100 人に 1 人が発症する痙攣や意識障害を伴う脳慢性神経疾患である。てんかん治療は、発作抑制を目的とした抗てんかん薬の服用が行われているものの、約 30%の患者が、抗てんかん薬の十分な服用にもかかわらず発作を抑制することが困難である。この薬剤耐性てんかん患者においては、循環血液と脳内を隔てる関門である血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) におけるトランスポーター分子の発現が変動しており、特に排出トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp) や multidrug resistance-associated protein (MRP) の発現増加が報告されている [1]。抗てんかん薬の 1 つである phenytoin は、P-gp や MRP 阻害剤との併用によって脳内 phenytoin 濃度が上昇することが報告されている [2,3]。一方、BBB を介した phenytoin 排出について詳細な解析は行われておらず、P-gp や MRP 阻害剤による上記の脳内濃度上昇が BBB を介した phenytoin 排出阻害によるものか疑問が残されている。そこで、本研究は BBB を介した phenytoin 排出機構の解明を目的とした。

【方法】BBB を介した脳内から循環血液中への化合物排出を直接的に評価する *in vivo* 実験系である brain efflux index (BEI) 法を用いて¹⁴C]phenytoin 排出を評価した [4]。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系において、トランスポーター分子発現卵母細胞を作製し、¹⁴C]phenytoin 輸送を評価した。

【結果・考察】大脳皮質に投与した¹⁴C]phenytoin は少なくとも 30 分まで経時的に脳内から消失し、その消失半減期 ($t_{1/2}$) は 17 分と算出された。さらに、30 分における¹⁴C]phenytoin 消失は非標識 phenytoin によって阻害されたことから、phenytoin 排出に対する輸送担体の関与が示唆された。各種トランスポーター阻害剤を用いた phenytoin 排出阻害の結果、verapamil などの P-gp 阻害剤および probenecid などの MRP 阻害剤によって¹⁴C]phenytoin 排出は阻害されなかった。このことから、BBB を介した phenytoin 排出に P-gp および MRP の寄与は小さいことが示唆された。一方、bromosulfophthalein (BSP) および desipramine によって、その phenytoin 排出は少なくとも 57%以上有意に阻害された。BSP および desipramine によって阻害を受け、BBB に発現するトランスポーターとして monocarboxylate transporter 8 (MCT8) が報告されている [5]。MCT8 を介した¹⁴C]phenytoin をアフリカツメガエル卵母細胞発現系において評価した結果、MCT8 発現卵母細胞において非発現卵母細胞と比較し、有意に高い¹⁴C]phenytoin 輸送活性が示された。以上から、BBB を介した phenytoin 排出に MCT8 が少なくとも一部関与する可能性が示された。

【参考文献】

- [1] Löscher *et al.* (2005) *Nat Rev Neurosci.* 6: 591-602; [2] Vliet *et al.* (2006) *Epilepsia.* 47: 672-680; [3] Potschka *et al.* (2003) *J Pharmacol Exp Ther.* 306: 124-131; [4] Kakee *et al.* (1996) *J Pharmacol Exp Ther.* 277: 1550-1559; [5] Roth *et al.* (2010) *Neurosci Lett.* 478: 5-8.

1-院-2

前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスにおける統合失調症モデル動物開発に向けての行動薬理学及び神経化学的解析

○濱谷康平¹、稲垣良¹、宮本嘉明¹、傅柯荃¹、佐藤慶治¹、桶谷祐貴¹、村松慎一^{2,3}、宇野恭介¹、
新田淳美¹（富山大院・薬・薬物治療学¹、自治医科大学²、東京大学・医科学研究所³）

【背景・目的】 近年、精神疾患の患者が急増しており、大きな社会的問題となっている。そのなかでも、統合失調症は、陽性症状（幻覚、妄想や多行動）、陰性症状（社会性行動と意欲の低下）および認知機能障害の三つの主症状を示し、これらの症状を十分に寛解する治療法は未だ確立されていない。これまでに、プレシナプスタンパク質 Piccolo をコードする遺伝子 *PCLO* の mRNA 発現量が、統合失調症患者の死後脳において増加していることが報告されている。一方で、我々はマウスへの非定型抗精神病薬の連続投与が、前頭前皮質での Piccolo タンパク質の発現を増加させることを明らかにしている。これらのことから、我々は、統合失調症患者死後脳における *PCLO* mRNA の発現増加は、薬物療法に起因しており、Piccolo の発現あるいは機能変化が統合失調症の病態に関与しているという仮説を立てた。そこで、前頭前皮質における Piccolo 発現を抑制したマウスを製作し、行動解析を行ったところ、統合失調症の陽性症状と認知機能障害に類似の表現型を示した。しかしながら、陰性症状に類似の表現型は示さなかった。本研究では、統合失調症の病因仮説のひとつである 2 Hit 仮説に基づき、遺伝的要因である Piccolo 発現抑制（1st-Hit）に加えて、環境的要因として軽度環境ストレスを暴露（2nd-Hit）したのちに行動的解析を行うことにより、新規治療法開発のための統合失調症モデル動物としての妥当性を検討した。また、統合失調症では前頭前皮質を主として、各脳部位において神経伝達機能の異常が報告されていることから、前頭前皮質における Piccolo の発現抑制が神経回路機能に与える影響を解析し、統合失調症の病態を検討した。

【方法】 8週齢の雄性 C57BL/6J マウスの前頭前皮質に *PCLO* miRNA を組み込んだ AAV-mi*PCLO* ベクターを注入し、12週齢にて軽度社会的敗北ストレスを暴露したのちに行動的解析を行った。また、光活性化タンパク質を組み込んだ AAV-ChIEF および AAV-mi*PCLO* ベクターを同様にマウス前頭前皮質に注入し、その4週間後に線条体において前頭前皮質からの神経終末を光照射によって刺激した。そして、その際の細胞外神経伝達物質濃度をマイクロダイアリシス法にて測定した。

【結果・考察】 前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスは、軽度社会的敗北ストレスの暴露により社会性行動と意欲の低下を示した。このことから、前頭前皮質での Piccolo 発現抑制は、環境ストレスへの脆弱性を誘発し、ストレス暴露により統合失調症の陰性症状様表現型を示したと考えられる。神経化学的解析において、対照マウスでは前頭前皮質-線条体神経経路が活性化されることにより線条体でのグルタミン酸遊離量の増大とドパミン遊離量の低下が観察された。一方、前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスでは、それらの変化が共に有意に抑制されていた。このことから、前頭前皮質での Piccolo 発現抑制は、線条体へのグルタミン酸作動性神経伝達を減弱し、線条体での GABA 介在ニューロンによる抑制機構が減弱された結果、黒質から線条体へ投射しているドパミン神経終末が脱抑制されてドパミン遊離が増加したと考えられる。以上の結果より、統合失調症の病態として、前頭前皮質における Piccolo の発現もしくは機能低下が示唆された。さらに、前頭前皮質 Piccolo 発現抑制マウスは、統合失調症の三大症状に類似の表現型を有する表面的妥当性の高いモデル動物であることが示唆され、新規統合失調症治療薬開発に活用されることが期待される。

1-院-3

脱分極とシナプス活動による転写因子 SRF コアクチベーター MRTFB の核移行制御に関する研究

○たなべ ひろき田邊 広樹¹、さの ゆかり佐野 友香里¹、かとう しんのすけ加藤 真之佑¹、いまにし しおり今西 詩織¹、さかがみ ひろゆき阪上 洋行²、いはら だいすけ伊原 大輔¹、たぶち あきこ田淵 明子¹

(¹富山大院・医薬・分子神経生物、²北里大・医・解剖学)

【背景および目的】

記憶や学習などの高次脳機能の発現には、神経回路網の構築とシナプスの形態および機能変化が重要な役割を果たしている。これらの生理学的プロセスは、アクチンおよび機能性分子などの細胞骨格の動態を変化させる遺伝子発現により制御される。我々は遺伝子発現と形態変化の両方に関与しているとされる myocardin-related transcription factor (MRTF)ファミリーに着目し、脳神経系における機能解明に取り組んでいる。我々はこれまで MRTFA および MRTFB に特異的な抗体を作製し、その細胞内局在と機能を観察した。その結果、MRTFA および MRTFB はポストシナプスに局在しており、スパインの成熟化に関わっていることが明らかとなった。また、MRTFB は転写因子 serum response factor (SRF)のコアクチベーターとして最初期遺伝子 activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)の転写活性化に寄与することも明らかとなった。本研究では、神経活動を活性化させる種々の刺激を行い、MRTFB の核移行のメカニズムについての解析を行った。

【方法】

ラット大脳皮質神経細胞初代培養系を用い、培養 21 日目に KCl および Bicuculline/4AP を添加し神経活動を活性化させたのち、蛍光免疫染色により解析した。また MRTFB 核移行に関わる経路を同定するため、各カルシウムイオンチャネル阻害剤と細胞内伝達経路阻害剤を用い、解析を行った。

【結果】

KCl および Bicuculline/4AP の添加により MRTFB は 15 分から 30 分という比較的短時間で核へ移行し、その後、細胞質へと排出された。また L 型電位依存性カルシウムチャネルと NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害により神経活動の活性化による MRTFB の核移行が妨げられた。さらに予備的データではあるが、カルシニューリン経路の阻害により神経活動による MRTFB の核移行が顕著に減少した。

【考察】

MRTFB は神経活動の活性化により核へ移行し、それには L 型電位依存性カルシウムチャネルと NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化によるカルシウムイオンの流入が必要であることが示唆された。またその核移行にはカルシニューリンを介した経路が関わっていることが示唆された。

5'-リピッドホスファターゼ SHIP2 阻害剤による脳由来神経栄養因子 BDNF 発現の増強効果

○吉田ひとみ、恒枝宏史、山口実佐子、岡本健太郎、遠藤宏佑、和田努、笹岡利安

(富山大学薬・病態制御薬理学)

【背景および目的】

糖尿病は脳機能障害を誘発し、アルツハイマー病などの発症リスクを増大させる。その要因として脳のインスリン抵抗性の増大や脳機能制御に必須な BDNF の発現低下が関与することが知られている。しかも、BDNF の発現増加にはインスリンシグナルが重要な役割を果たしている。したがって、脳のインスリンシグナルを増強する薬物処置は BDNF 機能を改善すると考えられる。5'-リピッドホスファターゼ SH2-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP2)はインスリンシグナルの負の制御因子であるが、SHIP2 の抑制が BDNF 機能に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では培養神経細胞を用い、SHIP2 阻害剤が BDNF の発現調節に与える影響を検証した。さらに、in vivo において SHIP2 阻害剤が記憶学習を改善するか検証した。

【方法】

初代培養ラット大脳皮質細胞を SHIP2 阻害剤 AS1949490 および BDNF で処置し、RT-PCR 法により *Bdnf* mRNA の発現変化を解析した。また、各種シグナル伝達分子の阻害剤を前処置し、その機序を解析した。さらに、2型糖尿病モデルマウスの記憶学習機能をステップスルー型受動回避試験により解析した。

【結果】

BDNF は正のフィードバック機構として *Bdnf* mRNA の発現を増加させ、SHIP2 阻害剤はその効果を増強した。これに対し、3'-リピッドホスファターゼ PTEN の阻害剤は BDNF 誘発性 *Bdnf* mRNA 発現に影響しなかった。BDNF 単独による BDNF mRNA の増加は ERK-MAP キナーゼ (ERK) 阻害剤 U0126 で抑制されたが、PI3 キナーゼ (PI3K) 阻害剤 LY294001、ホスホリパーゼ C γ (PLC γ) 阻害剤 U73122 およびプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤 bisindolylmaleimide Iでは抑制されなかった。一方、AS1949490 存在下では ERK、PI3K、PLC γ および PKC のいずれの阻害剤によっても BDNF 誘発性 *Bdnf* mRNA 発現は抑制された。さらに、転写阻害剤 actinomycin D の存在下において、AS1949490 は *Bdnf* mRNA の安定性を増加させ、PKC 阻害剤はその効果を消失させた。行動試験では AS1949490 の投与により記憶学習機能が改善した。

【考察】

本研究では、SHIP2 阻害剤が *Bdnf* mRNA 発現を増加させることを見出した。その機序は PI3K-PLC γ -PKC 経路を介した BDNF mRNA の安定化の促進と考えられる。また、SHIP2 阻害剤は2型糖尿病マウスの記憶学習機能を改善した。したがって、糖尿病に伴う脳機能障害の改善に向けた新しい治療戦略として、SHIP2 阻害剤が有用であると考えられる。

Pentylentetrazole 誘発けいれん発作に及ぼす膜輸送体 OCTN1 の関与と内因性基質の探索

こもりともえ¹、なかみちのりたか¹、ますおゆうすけ¹、にしやまみさ¹、かとうゆきお¹
 ○小森友恵¹、中道範隆¹、増尾友佑¹、西山美沙¹、加藤将夫¹

(¹金沢大院薬)

【背景・目的】

てんかんは、急速かつ反復性の発作を示す神経学的障害の一つである。てんかん患者の 20~30%は制御不能と言われている。したがって、新規作用機序をもつ標的の明確化が望まれている。OCTN1 はニューロンや神経幹細胞に機能的に発現するが、脳内での役割はほとんど明らかになっていない。本研究の目的は、てんかん治療の標的としての可能性を示す目的で、てんかんの実験モデルであるペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発けいれん発作に及ぼす OCTN1 の病態生理学的役割を明らかにすることである。

【方法】

野生型および *octn1* 遺伝子ノックアウト (*octn1*^{-/-}) マウスに PTZ を反復腹腔内投与した。発作の重篤度は、0-5 段階のスコアとして評価した (Stage 0: 変化なし、Stage 1: 活動低下、無動、Stage 2: 2 回以上の独立したミオクローヌス、Stage 3: 正向反射を保持した全身の間代性けいれん、Stage 4: 正向反射を消失した全身の間代性または強直間代性けいれん、Stage 5: 死亡)。発作を観察した後、海馬を摘出し、発作関連マーカーおよび神経栄養因子の遺伝子発現を real-time PCR によって測定した。神経栄養因子のうち brain-derived neurotrophic factor (BDNF) についてはタンパク質発現を ELISA 法によって測定した。OCTN1 は膜輸送体であるため、PTZ 誘発けいれん発作に及ぼす役割を解明する目的で、脳内に存在する内因性基質の同定を試みた。両マウス海馬をホモジナイズし、除タンパク後、アミノ基選択的誘導体化試薬である 3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (APDS) と反応させたのち、LC-TOF-MS で検出することによりアンターゲットメタボローム解析を行った。

【結果・考察】

PTZ 反復投与後の発作スコアは野生型では上昇した一方、*octn1*^{-/-}ではほとんど変化しなかった。PTZ 投与により、野生型マウス海馬での *c-fos*、*Arc*、および *Egr1* などの発作関連マーカー遺伝子の発現が有意に増加したが、*octn1*^{-/-}では *Egr1* のみの発現が増加した。したがって、*octn1* 遺伝子の欠損は、海馬神経細胞の過剰な興奮を抑制する可能性が示された。PTZ 投与は、野生型マウス海馬における BDNF 遺伝子発現およびタンパク量を増加させたが、*octn1*^{-/-}ではほとんど変化を示さず、*octn1* 遺伝子欠損による海馬 BDNF 誘導の抑制により発作が減弱する可能性が示された。OCTN1 は、食品由来の抗酸化アミノ酸であるエルゴチオネイン (ERGO) を良好な基質としており、脳を含むほとんどの臓器に ERGO が存在する。ERGO は初代培養神経幹細胞の神経新生を促進する。そこで、PTZ 誘発けいれん発作に対する ERGO の効果を明らかにするために、通常餌または ERGO を含まない食餌をマウスに摂取させ、PTZ を反復投与した。しかし、ERGO を含まない食餌を摂取したマウスの発作スコアは、通常餌のマウスとほぼ同等であったことから、ERGO 以外の内因性基質が PTZ 誘導けいれん発作に関与する可能性が考えられた。そこで、ERGO 以外の OCTN1 内因性基質を同定するため、OCTN1 の基質の多くが有するアミノ基の選択的誘導体化を組み合わせたメタボローム解析を実施した。m/z 224.103 および 250.118 の 2 つのピークが、野生型よりも *octn1*^{-/-}で有意に高いシグナル強度を示した。m/z 224.103 の候補化合物は抑制性神経伝達物質 GABA である一方、m/z 250.118 の同定は進行中である。したがって、野生型と比較した *octn1*^{-/-}海馬での高レベルの抑制性神経伝達物質の存在による *octn1*^{-/-}でのフェノタイプが考えられた。

【結論】

octn1 の遺伝子欠損は、BDNF の発現誘導を抑制することによって興奮性シナプス形成を阻害し、PTZ 誘導発作を減弱させる可能性が示された。両マウス間の内因性 OCTN1 基質の海馬中濃度の差が推測された。てんかん発作における OCTN1 の病態生理学的役割のさらなる解明は、てんかん治療における新しい標的分子としての OCTN1 の役割を明らかにするかもしれない。特に、OCTN1 の機能欠損によるてんかん発作の発症抑制機構の解明は標的分子としての役割解明に重要である。

1-院-6

危険ドラッグ 5F-AMB により誘導されるマウスの行動異常の神経メカニズム

○伊藤志穂¹、堂本将輝¹、笹瀬人暉¹、矢口立真¹、和田進太郎¹、出山諭司¹、檜井栄一¹、金子周司²、金田勝幸¹（金沢大院薬¹、京都大院薬²）

【背景および目的】

危険ドラッグ N-[[1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-3-yl]carbonyl]-L-valine methyl ester (5F-AMB) は CB1 受容体到高親和性を示す合成カンナビノイドであり、その摂取は記憶・意識障害を含む精神神経症状を誘発することが知られている。しかし、その神経メカニズムは不明である。本研究では、マウスでの行動薬理的解析および脳スライス標本での電気生理学的解析を用いて、5F-AMB による行動異常の神経メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

行動薬理的解析では、雄性 C57BL/6J マウス（6-8 週齢）を使用した。Open field test (OF) では、新奇フィールド内でのマウスの自発運動量と、中央エリア滞在時間を指標に不安関連行動を評価した。Cliff avoidance test (CA) では、高所からマウスが飛び降りるまでの時間（jumping latency）を指標に衝動性を評価した。Novel object recognition test (NOR) では、マウスに 2 つの同一の物体を置いた装置内で探索させ（訓練試行）、その 60 分後に片方を新奇物体と置換した装置内で探索させた（保持試行）。保持試行での各物体探索時間を測定し、新奇物体探索時間の割合により認知記憶を評価した。5F-AMB は、各試験の 5~15 分前に側脳室内（i.c.v.）あるいは内側前頭前皮質（mPFC）内投与した。

電気生理学的解析では、C57BL/6J の雌雄マウス（4-6 週齢）を使用した。mPFC を含む脳スライスを作成し、人工脳脊髄液を還流させたチャンバー中で、mPFC V 層錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を用い、興奮性（EPSC）および抑制性シナプス後電流（IPSC）を記録した。刺激誘発性シナプス後電流を記録する際は、刺激電極を II/III 層に留置し、連続した 2 回の電気刺激（20 Hz）を行うことで誘発される応答を記録した。なお、各種薬物はバス適用した。

【結果および考察】

5F-AMB（10 nmol）の i.c.v. 投与は、OF において自発運動量には影響を与えずに中央エリア滞在時間を有意に増加させ、CA での jumping latency を有意に減少させた。NOR では、訓練試行前に 5F-AMB を i.c.v. 投与することで、保持試行での新奇物体探索時間は有意に減少した。一方、保持試行前に 5F-AMB を i.c.v. 投与しても、保持試行での新奇物体探索時間に影響を与えなかった。5F-AMB（10 pmol/side）の mPFC 内投与により、CA での jumping latency、NOR での訓練試行前投与による新奇物体探索時間はいずれも有意に減少したが、OF での中央エリア滞在時間には影響が認められなかった。したがって、5F-AMB による衝動性の亢進と認知記憶の低下は mPFC に作用することで惹起されると考えられた。次に、mPFC V 層錐体細胞からホールセル記録を行ったところ、5F-AMB（300 nM）適用により自発性 EPSC（sEPSC）および sIPSC の頻度が有意に減少した。これらの作用は CB1 受容体拮抗薬 AM251（1 μM）の前適用により阻害された。また、微小 EPSC（mEPSC）および mIPSC の頻度も 5F-AMB により減少した。さらに、5F-AMB は刺激誘発性 EPSC（eEPSC）を eIPSC よりも、より顕著に減弱させることがわかった。

以上より、5F-AMB は不安の減少、衝動性の亢進および認知記憶の低下を誘導した。後二者の誘導には、5F-AMB によるプレシナプスに局在する CB1 受容体の活性化を介して引き起こされる、mPFC V 層錐体細胞における興奮性及び抑制性の神経伝達の減弱、また、興奮と抑制のバランス変化に起因する細胞活動の抑制が関与することが示唆された。

PKD2L1 チャネルの細胞内 Ca^{2+} 上昇を介した苦味受容機構

○埴田 佳佑¹、清水 貴浩¹、篠崎 稜²、藤井 拓人¹、酒井 秀紀¹

(¹富山大院薬、²富山大薬)

【背景・目的】 味覚は食物の安全性を評価する生体センサーとして重要な役割を担っており、苦味受容は毒物忌避に重要な生体防御反応として働いている。苦味受容には taste receptor type 2 (T2R) が関していると考えられているが、その受容機構の全容は解明されていない。脳、心臓、舌など広範に発現している Polycystic kidney disease 2-like 1 (PKD2L1) は transient receptor potential polycystin (TRPP) チャネルファミリーに属しており、 Ca^{2+} 透過型非選択性カチオンチャネルとして機能することが知られている。また、舌においてⅢ型味細胞に発現していることから、味覚に関与すると考えられている。これまでに我々は、PKD2L1 の過剰発現系を用いて苦味物質感受性を検討している。PKD2L1 チャネルが苦味標準物質である quinine を除去した際に活性化を示し、denatonium を除去した際には活性化を示さなかったことから、苦味物質を選択的に感受している可能性が示唆されている。本研究では、生体においても PKD2L1 が苦味物質感受に関与している可能性について、PKD2L1 を発現しているⅢ型味細胞を用いて検討した。

【方法】 野生型マウス (WT マウス) および PKD2L1 ノックアウトマウス (KO マウス) から舌を摘出し、舌から酵素的に単離した味細胞に対して Ca^{2+} イメージング法を用い、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度変化を測定することで、quinine および denatonium 感受性を検討した。Ⅲ型味細胞には電位依存性 Ca^{2+} チャネルが発現していることから、細胞外液を高 K^{+} 条件 (50 mM) に曝露した際に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を示した細胞をⅢ型味細胞と同定した。

【結果・考察】 WT マウスおよび KO マウス由来のⅢ型味細胞において quinine 感受性を検討したところ、WT マウス由来Ⅲ型味細胞において quinine 除去時に細胞内 Ca^{2+} 濃度の緩やかな上昇が観測されたが、KO マウス由来Ⅲ型味細胞では観測されなかった。これまでに我々は PKD2L1 がアルカリ刺激時に不活性化状態に移行し、刺激除去時に強い活性化を示すオフ応答チャネルであることを見出している。本研究においても、WT マウス由来Ⅲ型味細胞が quinine 投与時ではなく、除去時に緩やかな細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を示したことから、PKD2L1 の不活性化がこの Ca^{2+} 応答に寄与している可能性がある。一方 denatonium 感受性を検討したところ、WT マウスおよび KO マウス由来Ⅲ型味細胞のいずれにおいても denatonium 除去時に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は観測されなかった。これよりⅢ型味細胞は denatonium 感受性を示さないと考えられる。これらの結果は、PKD2L1 の過剰発現系において苦味物質感受性を検討した結果と一致していることから、Ⅲ型味細胞に発現している PKD2L1 がⅢ型味細胞の quinine 感受性に寄与しているものと考えられる。

苦味物質は多種多様であり、T2R 以外の未知の受容機構の存在が考えられる。また、苦味には味物質が舌に触れた瞬間に生じる先味と、味物質が除かれた後にも持続して生じる後味が存在する。本研究において PKD2L1 を発現しているⅢ型味細胞が quinine 除去時に Ca^{2+} 応答を示したことから、PKD2L1 は新たな苦味受容分子であり、特に後味としての持続的な苦味に関与している可能性が示唆された。

1-院-8

小胞体に発現するオーファン P 型 ATPase の生理機能解明

○^{やごあさか}矢後亜沙佳、^{ふじいたくと}藤井拓人、^{しみずたかひろ}清水貴浩、^{さかいひでき}酒井秀紀（富山大院薬）

【背景および目的】P 型 ATPase は、細胞およびオルガネラ内外のイオンの恒常性の制御に必須な膜輸送タンパク質ファミリーである。セカンドメッセンジャーとして様々な細胞機能に関与する Ca^{2+} の細胞内ストアである小胞体においては、P 型 ATPase の Ca^{2+} -ATPase (SERCA) が小胞体内への Ca^{2+} 取り込みに関与していることが古くから明らかにされているが、他の P 型 ATPase の発現は報告されていない。近年、TRIC チャネルによる K^{+} の小胞体内への取り込み機能が、小胞体からの Ca^{2+} 放出に重要であることが報告されたが、小胞体から K^{+} を排出し小胞体内外の K^{+} 濃度勾配の回復に寄与する膜輸送タンパク質の実体は不明である。本研究では、この K^{+} 排出機能に関与する可能性がある膜輸送タンパク質として ER-ATPase (仮称) を見出した。ER-ATPase は、構造から P 型 ATPase として機能することが推測されているが、輸送イオン種を含めた生理機能については未解明である。

【方法】マウスの各種臓器（脳、胃、小腸、大腸、膵臓、心臓、肝臓、脾臓、肺、腎臓、骨格筋、子宮）、またヒトおよびマウス由来の正常およびがん細胞株から調製した膜画分において、抗 ER-ATPase 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫染色を行い ER-ATPase の発現を検討した。また、ヒト大腸がん由来 HT-29 細胞より ER-ATPase の全長クローニングを行い、N 末端に Xpress-tag を付加することのできる pcDNA4/His ベクターに組み込んだ。この発現ベクターをトランスフェクションしたヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞から膜画分を調製し、抗 Xpress 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫染色を行った。ER-ATPase 過剰発現細胞の膜画分を用いて、120 mM NaCl、30 mM KCl、2 mM MgSO_4 、1 mM NaN_3 の反応溶液中で ATPase 加水分解活性を測定した。

【結果および考察】上記の様々なマウス組織および各種細胞株から調製した膜画分において抗 ER-ATPase 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、全てのサンプルにおいて目的サイズである約 120 kDa にバンドが観察された。ER-ATPase は、細胞内において網目状に局在しており、小胞体マーカーである calnexin の局在パターンと一致していた。クローニングしたヒト ER-ATPase 過剰発現 HEK293 細胞において、ER-ATPase は calnexin と共局在した。また、sucrose と Percoll を用いた不連続密度勾配遠心による細胞分画において、ER-ATPase の分布パターンは、calnexin の分布パターンと一致した。次に、ER-ATPase の ATP 加水分解活性について検討した。ER-ATPase 過剰発現細胞では、空ベクターをトランスフェクションした mock 細胞に比べて、ATP 加水分解活性が有意に上昇した。この ATP 加水分解活性の上昇は、反応溶液中の Na^{+} 濃度を 121 mM から 1 mM まで下げた場合、また K^{+} を除去した場合のどちらの条件においても、mock 細胞における活性と同程度まで減少した。さらに興味深いことに、ER-ATPase を、パーキンソン病において変異が多数報告されている K^{+} 輸送性の P 型 ATPase (Lyso-ATPase) と共発現させることで、Lyso-ATPase の発現が減少し活性が消失した。

以上より、ER-ATPase はユビキタスに存在し、小胞体において K^{+} および Na^{+} を輸送する P 型 ATPase として機能することが示唆された。また ER-ATPase が、パーキンソン病に関連する Lyso-ATPase の負の制御分子として機能する可能性が考えられた。

Depletion of IL-4 Receptor α Attenuates the Severity of Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis in Mice

○Ai Hertati、^{あい へるたてい}林 ^{はやし しゅうさく}周作、^{やまもと たけし}山本 武、^{かどわき まこと}門脇 真 (富山大和漢研)

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is chronic, relapsing inflammation and multifactorial disease with unknown etiology. IBD comprises of two major diseases, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease. UC patients have been reported to show Th2-like immune responses in the colonic mucosa. The major Th2 cytokines, IL-4 and IL-13 exert their function through IL-4 receptor alpha (IL-4R α). However, the precise role of IL-4R α signaling in UC remains unclear. In this study, we investigate whether depletion of IL-4R α gives impact to severity of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis using IL-4R α knockout (KO) mice.

Method

We determined the role of IL-4R α signaling in the pathogenesis of UC by using systemic IL-4R α KO mice (male, 8-10 week old) and their wild-type (WT) littermates with BALB/c genetic background. Experimental acute colitis was induced by 3% DSS (36-50 kDa) in drinking water for 7 days. Severity of colitis was assessed by body weight loss, diarrhea occurrence and rectal bleeding. After 7 days, the colons of mice were excised for macroscopic and histological analysis. Transcriptome analysis was conducted to characterize changes in every gene expression during the development of acute colitis. Quantitative RT-PCR was performed to validate the result of transcriptome analysis. Immunohistochemical analysis was also carried out to examine the infiltration of macrophages in the colonic mucosa due to DSS treatment.

Result

The treatment with 3% DSS for 7 days caused body weight loss, diarrhea occurrence and rectal bleeding as well as colon shortening in mice. These manifestations of DSS-induced colitis were significantly reduced in IL-4R α KO colitis mice compared with WT colitis mice. Histological analysis of colonic mucosa revealed abnormalities such as loss of epithelial integrity and crypt architecture as well as submucosal edema in WT colitis mice. These abnormalities were improved in IL-4R α KO colitis mice. The expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6 mRNA in the colon of WT colitis mice was markedly up-regulated, which was significantly higher than those in the colon of IL-4R α KO colitis mice. Further, transcriptome analysis showed that expressions of 18 genes were down-regulated and 4 genes were significantly up-regulated in the colon of IL-4R α KO colitis mice compared with WT colitis mice. The infiltration of macrophages in the colonic mucosa of WT colitis mice was higher compared to KO colitis mice.

Discussion/Conclusion

These results clearly demonstrate that depletion of IL-4R α attenuates DSS-induced colitis. The present findings suggest that IL-4R α signaling is involved in the pathogenesis of UC.

1-院-10

Extracellular vesicles released from osteosarcoma alter bone microenvironment

○Nguyen Duc Tuan¹, 相羽久輝^{1,2,3}, 吉田孟史⁴, 土屋弘行², 華山力成^{1,4}

1. 金沢大・医・免疫学、2. 金沢大・医・整形外科、3. 名市大・医・整形外科、4. 金沢大・WPI NanoLSI

【背景および目的】 Osteosarcoma (OS) is the most frequent type of primary bone tumor in children and adolescents. It has been reported that extracellular vesicles (EVs) from the tumors have potentials to alter the tumour-microenvironment and enhance metastasis in several tumors, but it is not well understood in OS. Macrophages are thought to be one of the most efficient receiver of EVs in various tissues. We assumed that osteoclasts (OCs), a kind of macrophages in bone, tend to be affected by OS derived EVs (OS-EVs). Here, we attempted to clarify effects of OS-EVs to OCs and relationship between OS-EVs, OCs and tumor malignancy.

【方法】 In order to analyze effects of EVs in OS, we generated EV-depleted mouse OS cell line (LM8 cells) by knocking out Tsg101, which is a key molecule in secretion of EVs. To reveal a function of the OS-EVs in the tumor progression, the LM8 TSG101 KO cells were implanted into distal femurs of mice. When the tumor grew up at an identical size, the tumor growth, angiogenesis, lung metastasis or number of OCs was evaluated. To reveal a mechanism of OS-EVs to reduce OCs, involvement of DC-STAMP, which is a fusion mediator involved in maturation of OCs, was analyzed by RTqPCR or flowcytometry analysis in *in vitro* osteoclastogenesis model. To confirm the phenomena in human, we first analyzed the relationship between amount of EVs and tumor malignancy in two human OS cell lines known to differ in malignancy, and next analyzed the relationship between number of OCs and survival rate in chemotherapy-naïve OS patients. The biopsy specimens were collected at their first time of diagnosis and stained by HE-staining for histological analysis. Their clinical outcomes were followed up for 10 years.

【結果および考察】 The mice bearing LM8 TSG101 KO cells showed low angiogenesis and low metastasis, and abrogated reduce of OCs. The *in vitro* osteoclastogenesis model showed that the LM8-EVs strongly inhibited the differentiation of OCs from precursors by suppressing DC-STAMP (Fig. 1). Comparison of two different human OS cell lines in malignancy showed similar results to the mouse study that low malignant cell (HOS cells) secreted smaller number of EVs than high malignant cell (143B cells). In the patients study, we categorized all patients into OC(-) group and OC(+) patients group by the result of histological analysis. Progression free survivals were prolonged in OC(+) patients (92.9% vs. 58.4%) after 5 years (Fig. 2). These results indicated a possibility that OS-EVs may reduce OCs and alter tumor microenvironment favorable to tumor growth or distant metastasis. Additionally, targeting the OS-EVs will be a promising therapeutic strategy to prevent tumor progression or metastasis in OS.

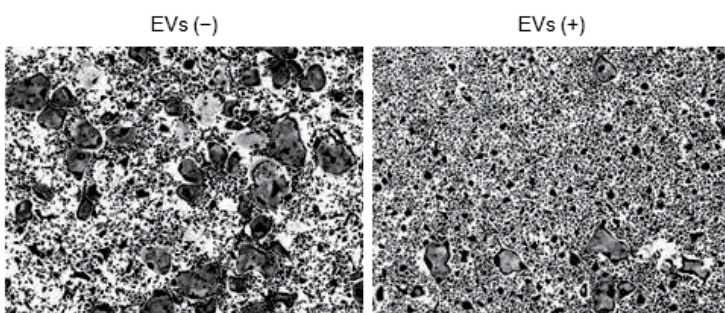


Fig. 1 Suppression of osteoclastogenesis by EVs derived from LM8 cells. OC precursor cells were cultured for 5 days in media with or without 1×10^{10} particles/mL of EVs or RANKL. The cells were stained with the Acidic Phosphatase Leukocyte Kit

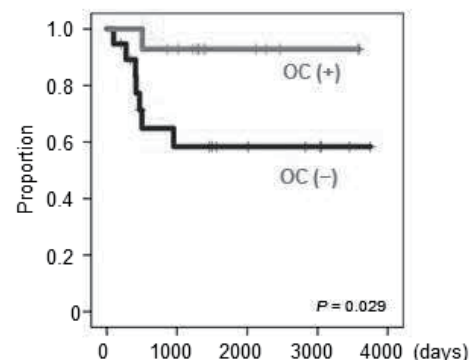


Fig. 2 Relationship between decrease of OCs and poor progression free survival in OS patients. Progression free survival times in the OC (+) group (n = 14) or the OC (-) group (n = 19) were followed up by 10-years. The progression free survival time means a time from surgery to distant metastasis or death.

1-院-11

帯状疱疹痛期からの methylcobalamin の連続投与により、難治性の帯状疱疹後神経痛は予防できる

○菊川 ^{きくかわ} 孝, ^{たかし} 歌 ^{うた} 大介, ^{だいすけ} 久米 ^{くめ} 利明, ^{としあき} 安東 ^{あんどう} 嗣修 ^{つぐのぶ} (富山大院薬)

【背景・目的】

帯状疱疹は水疱瘡と同じ原因ウイルスである水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)により引き起こされ、帯状の皮膚病変と激しい痛み(帯状疱疹痛)を引き起こす。特に、衣服の擦れのような普段は「痛い」と感じない刺激に対して強い痛みを感じるアロディニア(allodynia)が臨床上の問題となっている。また一部の患者において、皮膚病変治癒後も痛みが長期間残存する帯状疱疹後神経痛(PHN)が起こる場合がある。しかし、既存の鎮痛薬は副作用(重度のめまい・便秘など)により患者の生活に支障をきたし、また PHN に対しては効果が低いため、新しい治療法が求められている。

Methylcobalamin (MeCbl) はビタミン B₁₂ の類似体であり、末梢神経障害の痛みなどの症状緩和に処方される。PHN に対しても処方されており、副作用はほとんどないと報告されている。しかし、帯状疱疹痛期から投与した際の効果は不明である。そこで本研究では、MeCbl の帯状疱疹関連痛(帯状疱疹痛, PHN)に対する効果を明らかにし、新しい治療法となる可能性を検討した。

【方法】

実験には雌性 C57BL/6j マウスを用いた。VZV は種特異性が高くマウスに感染しないため、同じヘルペスウイルス科に属する単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)をマウス後肢大腿部に経皮接種することで、ヒト帯状疱疹様の皮膚病変とアロディニアを発症するモデルマウスを作製した。アロディニアは画用絵筆を用いて評価し、疼痛関連スコアを算出した。MeCbl はウイルス接種後 5 日目から 1 日 1 回、吻側背部に皮下投与した。また免疫組織化学染色法により、マウス後肢足蹠における一次求心性線維の組織学的な変化を解析した。

【結果・考察】

マウスに HSV-1 を経皮接種すると、ヒト帯状疱疹様の皮膚病変と帯状疱疹痛, PHN が現れた。皮膚病変はウイルス接種後 5 日目から現れ、20 日目には消失した。疼痛関連スコアはウイルス接種後 3 日目から上昇し始め、7-10 日目でピークとなり(帯状疱疹痛)、皮膚病変消失後も残存した(PHN)。MeCbl をウイルス接種後 5 日目から連続投与すると帯状疱疹痛を減弱し、PHN の発症を抑制した。このことから MeCbl には「鎮痛効果」と「連続投与による PHN 予防効果」の異なる効果が存在することが示唆される。

これまでに PHN を伴ったヒトやマウスにおいて、皮膚における一次求心性線維の組織学的な変化が報告されている。帯状疱疹モデルマウスの後肢足蹠の皮膚では、一次求心性線維である A 線維および C 線維の減少が観察された。帯状疱疹痛期から MeCbl を連続投与することにより、PHN 期において、減少した一次求心性線維の修復が促進された。このことから MeCbl は損傷した一次求心性線維の修復促進をすることで PHN の発症を抑制することが示唆される。

以上から、PHN 発症には一次求心性線維の損傷が重要であることが初めて示された。また MeCbl を帯状疱疹痛期から投与することで鎮痛効果と一次求心性線維の修復促進による PHN の発症抑制効果を得られた。すなわち MeCbl には PHN 予防効果があり、従来の治療薬とは異なる新しい治療法になると考えられる。

1-院-12

マクロファージによる血管新生を介した内臓脂肪組織肥大化機構の解明

まつざわたかとし¹、わだつとむ¹、おのぎやすひろ¹、おけかわあきら¹、わたなべえり¹、いけだけいすけ¹、なかのみのもり²、つねきひろし¹、
○松澤崇俊¹、和田 努¹、小野木康弘¹、桶川 晃¹、渡邊愛理¹、池田恵介²、中野 実²、恒枝宏史¹、

さきおかとしやす¹ 笹岡利安¹ (富山大院薬 病態制御薬理学¹、生体界面化学²)

【目的】 食餌性肥満マウスで認められる内臓脂肪組織の肥大化には、新たな領域を栄養するための血管新生が重要である。我々は、肥満の内臓脂肪では血管新生因子 Platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) が増加すること、PDGF-B は脂肪組織血管を取り巻く周皮細胞 (ペリサイト) を血管から脱離させること、その結果ペリサイトによる内皮細胞の増殖抑制が消失し血管新生が促進され、脂肪組織の肥大化を引き起こすことを明らかとし、新たな肥満進展機構として報告してきた。しかし肥満に伴う脂肪組織肥大化の鍵となる、PDGF-B の増大メカニズムは全く未知である。そこで本研究では食事性肥満マウスの内臓脂肪肥大化に重要な PDGF-B の産生機構につき検討した。

【方法】 肥満脂肪組織での PDGF-B 産生細胞を探索するため、8~9 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し 60%高脂肪食 (HFD) を 3 か月間給餌した内臓脂肪を、成熟脂肪細胞分画 (MAF)、間質血管分画 (SVF) に分離した。SVF は Flow cytometry によりマクロファージ(MΦ)、その他白血球、間質血管分画に分離し *Pdgfb* の発現を検討した。また MΦ は CD11c 陽性 M1-MΦ、CD206 陽性 M2-MΦ に分離し、各分画の *Pdgfb* 発現を検討した。脂肪組織から MΦ を選択的に除去するために、クロドロネートおよび対照として PBS をリポソームに封入した (CL および PBSL)。8~9 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに 60%HFD を給餌し、7 週目より PBSL または CL を週に 2 回腹腔内投与した。2 週間または 6 週間の投与後にマウスを解剖し、内臓脂肪組織のマクロファージを Flow cytometry にて、遺伝子発現を Real-Time PCR 法により解析した。また、同組織の whole mount immuno-staining により血管内皮細胞とペリサイトの免疫染色を行い、血管へのペリサイトの接着と血管面積の定量を行った。

【結果】 肥満マウスの内臓脂肪において、PDGF-B の発現は MAF に比較し SVF で顕著に増加した。SVF をさらに分画した結果、*Pdgfb* は主に MΦ に由来すること、*Pdgfb* 発現は特に肥満の脂肪組織に浸潤する炎症性 M1-MΦ で選択的に発現増加が認められるが、M2-MΦ では発現に変化を認めないことを見出した。MΦ が肥満進展に伴う内臓脂肪の血管新生におよぼす影響を直接検討するため、肥満マウスに対し MΦ 除去薬の CL を投与した。2 週間の CL 投与により、HFD 負荷マウスの内臓脂肪組織の MΦ は有意に減少し、これに一致して *Pdgfb* 発現は低下した。その結果、HFD 負荷に伴う血管からのペリサイトの脱離は CL 投与群で抑制された。6 週間 CL を投与したマウスでは、これらの知見はより顕著であり、内臓脂肪の血管面積の低下と内臓脂肪重量、および体重の有意な減少を伴った。

【結論】 肥満に伴う脂肪組織肥大化には脂肪組織の血管新生が重要である。本研究により、肥満病態進展における MΦ の新規重要性が明らかとなった。血管新生を駆動する PDGF-B の産生源が、肥満に伴い内臓脂肪組織に浸潤する炎症性 M1-MΦ であることが示された。以上より、内臓脂肪組織血管および脂肪組織 MΦ を標的とした新たな肥満治療薬開発が期待される。

遺伝子欠損マウス臓器を基質源としたメタボローム解析による膜輸送体 BCRP の生体内基質探索

○^{しのだ} 笹田 ^{きょうすけ} 京佑¹、^{ますお} 増尾 ^{ゆうすけ} 友佑¹、^{なかみち} 中道 ^{のりたか} 範隆¹、^{かとう} 加藤 ^{ゆきお} 将夫¹ (金沢大院薬¹)

【背景および目的】

膜輸送体 BCRP (breast cancer resistant protein)/ABCG2 は、脳血管内皮細胞、小腸刷子縁膜、肝臓胆管膜、乳腺等に発現し、医薬品を含む基質化合物を細胞外に排出する。薬物等が BCRP の輸送機能を阻害した場合、他の BCRP 基質薬物の血中または組織中濃度を変化させ、薬物相互作用(DDI)が生じる可能性がある。DDI ガイドラインでは、*in vitro* で阻害のポテンシャルが示された場合、プローブ基質薬と併用する *in vivo* 相互作用試験が推奨されるが、その実施には莫大な労力とコストがかかる。一方、ヒトに普遍的に存在する生体内基質の血漿中濃度は、膜輸送体の機能変化を反映し DDI を予測するバイオマーカーとして応用できる可能性があり、新薬開発の効率化につながる。BCRP の生体内基質は pheophorbide A や uric acid 等が報告されているが、網羅的探索の報告は乏しい。本研究では、BCRP を介した DDI 予測に適応できる生体内基質の探索を目的に、アンターゲットメタボローム解析を行った。

【方法】

Mdr1a/1b/Bcrp^{-/-}マウスの肝臓には BCRP の生体内基質が蓄積していると考え、*Mdr1a/1b/Bcrp*^{-/-}マウス由来の肝臓ホモジネート抽出液を、BCRP 基質候補化合物の基質源溶液として実験に供した。BCRP 発現 MDCKII 細胞を transwell に播種後、基質源溶液をドナー側に添加し、アクセプター側のバッファーを LC-TOF-MS の MS スキャンで測定することで、経細胞輸送された BCRP 生体内基質を検出した。BCRP 阻害剤である Ko143 を添加時に、アクセプター側でのシグナル強度が減少したイオンを BCRP 生体内基質の候補として選択した。MS/MS スキャンによる MS スペクトルを、データベースと比較して化合物を推定した。化合物の標品と、候補イオンの MS スペクトルを比較して化合物を同定した。Mock および BCRP 発現 MDCKII 細胞を介した候補化合物の経細胞輸送と、BCRP 発現反転膜ベシクルへの候補化合物の取り込みから、候補化合物の BCRP による輸送を評価した。

【結果・考察】

BCRP 生体内基質の候補となった 9 種類のイオンのうち、経時的な経細胞輸送および、Ko143 による阻害が確認された *m/z* 298.10 に着目した。*m/z* 298.10 は、methylthioadenosine (MTA) のプリカーサイオンと推定され、MTA の標品との比較から、MTA と同定された。Abacavir は、BCRP 基質薬物であり、adenosine と類似した構造を有する。Abacavir と MTA の構造類似性から、BCRP は adenosine 類似化合物を基質として認識する可能性がある。BCRP 発現 MDCKII 細胞において、重水素体標識 MTA (d3-MTA) は、基底膜(B)から頂端膜(A)方向に経細胞輸送された(図-a)。mock-MDCKII 細胞では、d3-MTA の頂端膜への方向性輸送は確認されなかった(図-a)。BCRP 発現 MDCKII 細胞における d3-MTA の方向性輸送は、Ko143 の添加でほぼ完全に阻害された(図-b)。したがって MTA は、BCRP の生体内基質であることが示唆された。MTA は、BCRP の典型的基質である 1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) の経細胞輸送を、阻害しなかったことから、MTA の BCRP に対する親和性は低いことが示唆された。一方で、BCRP 発現膜ベシクルへの d3-MTA の取り込みは、ATP 添加群で、AMP 添加群よりも高くなかった。細胞膜ベシクルにおいて、MTA がベシクル内に取り込まれた後に代謝された可能性や、経細胞輸送において、リン酸体等の MTA 代謝物が経細胞輸送された後に、MTA に変換された可能性が考えられ、さらなる検討が必要である。

【結論】

BCRP の生体内基質として MTA を明らかにした。MTA は BCRP のバイオマーカーとなる可能性もあるが、その有用性の検証が必要である。また、今回確立した遺伝子欠損マウス肝臓抽出物を基質源とした経細胞輸送実験は、BCRP の生体内基質を探索する新たな方法として有用であることも示唆された。

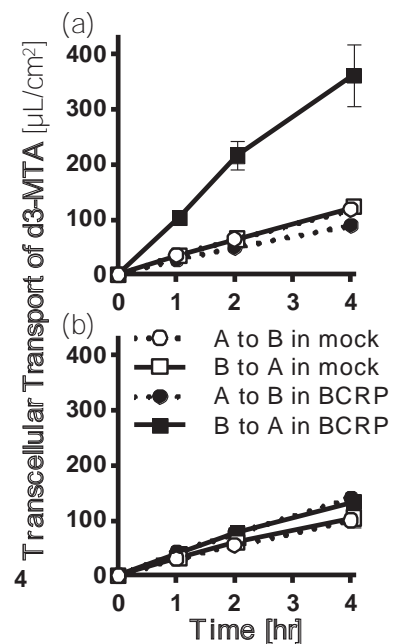


図 2: Transcellular Transport of d3-MTA in MDCKII Cells (a) vehicle (B) Ko143

1-院-14

カルボニル基の還元反応を触媒する薬物代謝酵素 AKR および SDR ファミリーのヒト肝臓における発現量および機能解析

○^{あまいけいと}天井圭斗¹、^{ふかみたつき}深見達基^{1,2}、^{なかのまさたか}中野正隆^{1,2}、^{わたなべあきこ}渡邊亜紀子³、^{わたなべけんご}渡邊健悟³、^{なかじまみき}中島美紀^{1,2} (¹金沢大院薬、²金沢大 WPI ナノ生命科学研、³第一三共株式会社)

[背景および目的] アルドケト還元酵素 (Aldo-keto reductase; AKR) および短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (Short-chain dehydrogenase/reductase; SDR) スーパーファミリーは医薬品化合物のアルデヒド、ケトンおよびキノンのカルボニル基の還元反応を触媒する。近年、製薬企業では薬物間相互作用を避ける目的でシトクロム P450 により代謝されないように創薬する傾向があり、non-P450 酵素で代謝される候補化合物が増加していることから注目されている。ヒトにおいて AKR および SDR スーパーファミリーにはそれぞれ 15 種類および 75 種類の分子種が存在し、そのうち 12 分子種および 6 分子種が還元反応を触媒することが示されている。AKR および SDR スーパーファミリーの各分子種の肝臓における発現量は包括的に調べられておらず、機能面においても、多種多様な還元反応があり得るにもかかわらずカルボニル基の還元反応を触媒することしか知られていない。そこで本研究では、ヒト肝臓における 18 分子種 (12 AKR 分子種および 6 SDR 分子種) の発現量を定量的に評価し、その発現比ならびに個人差を評価すること、また、カルボニル基以外にニトロ基など他の官能基の還元反応を触媒するか明らかにすることを目的にした。

[方法] ヒト肝臓 22 検体 (14 Caucasian, 4 Hispanic, 1 Black, and 3 Asian) の cDNA を用いて、real-time RT-PCR 解析により 18 分子種の mRNA 発現量を測定した。コピー数を算出し、それぞれの分子種の発現量を比較した。ヒト AKR1C1、AKR1C2、AKR1C3、CBR1、および HSD11B1 のバキュロウイルス発現系を作製し、アゾ基、ニトロ基、スルフィニル基およびハロゲン含有薬物の還元酵素活性を LC-MS/MS を用いて測定した。

[結果および考察] ヒト肝臓において AKR1B15 を除いた 17 分子種の mRNA の発現が認められ、最も高い発現を示した分子種は AKR1C2 ($15.8 \pm 8.0\%$) であり、次いで AKR1C3 ($15.0 \pm 5.0\%$)、AKR1C1 ($14.1 \pm 6.5\%$)、CBR1 ($11.5 \pm 4.8\%$)、HSD11B1 ($10.9 \pm 4.8\%$) が高い発現を示した。また、全ての分子種で発現量に個人差が認められ、特に AKR1B10 (956 倍)、AKR1D1 (205 倍)、および AKR7A3 (570 倍) mRNA 発現量には、大きな個人差が認められた。これらの個人差がヒト個人における薬物動態の変動要因となり得る可能性が考えられた。

肝臓に高く発現していた還元酵素の発現系を作製して、還元され得る様々な官能基を有する化合物の還元酵素活性を測定した。その結果、睡眠薬フルニトラゼパムおよびニメタゼパム等のニトロ基を有する化合物の還元反応が AKR1C3 により触媒されることを明らかにした。他の官能基の還元反応について検討した結果も併せて報告する。AKR および SDR スーパーファミリーはカルボニル基のみではなく、多様な還元反応も触媒することを明らかにした。

[結論] 本研究では、ヒト肝臓における AKR および SDR スーパーファミリーの発現量を包括的に評価し、異物代謝を考える上で考慮すべき分子種を明らかにした。また、これらの還元酵素が、カルボニル基以外の官能基の還元反応も触媒することを明らかにした。還元酵素の発現量には個人差が認められたため、生体内における様々な薬物の体内動態の個人差の一因となり得ることが示唆された。

喫煙による RNA 編集酵素 ADAR1 の発現低下が及ぼす酸化ストレス感受性亢進メカニズムの解明

○瀧澤雅¹、中野正隆^{1,2}、深見達基^{1,2}、中島美紀^{1,2} (金沢大院薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研究²)

【目的】 Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) によってアデノシンがイノシンに変換される A-to-I RNA 編集は、生体内の恒常性に必須の転写後修飾として近年注目を集めている。この RNA 編集の異常と様々な疾患との関連性について明らかにされているが、RNA 編集に異常をもたらす外的要因についてほとんど解明され

ていない。本研究では、生体に多様な影響を及ぼす喫煙に着目し、喫煙が RNA 編集に及ぼす影響、および喫煙によって惹起される酸化ストレス応答に対し RNA 編集が及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

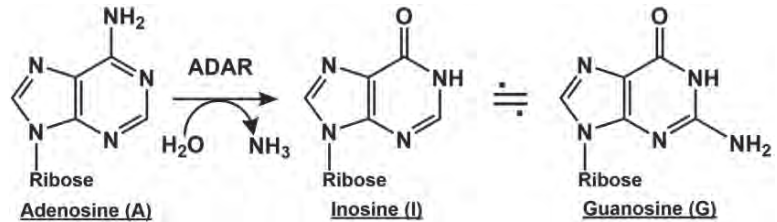


図: A-to-I RNA 編集による塩基置換反応

【結果および考察】 タバコ煙抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) をヒト肺癌由来 A549 細胞に処置したところ、ADAR1 タンパク質発現量が有意に減少した。一方で、ADAR1 mRNA 発現量の変動は認められなかったことから、ADAR1 タンパク質の発現低下は転写後レベルで生じていることが示唆された。CSE とタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの共存下においても、CSE 処置による ADAR1 タンパク質発現低下が認められたことから、CSE は翻訳には影響せず ADAR1 タンパク質の分解を促進している可能性が考えられた。また、クロロキン処置によるオートファジー阻害条件下において CSE 処置による ADAR1 タンパク質の分解が抑制されたため、CSE 処置による ADAR1 タンパク質の分解はオートファジーを介したものであることが明らかになった。タバコ主流煙に曝露させたマウスの肺パラフィン包埋サンプルを用いて免疫組織化学染色による評価を行ったところ、Adar1 タンパク質発現量がコントロールマウスと比較して有意に低かったことより、ADAR1 発現がタバコ煙曝露により低下することが *in vivo* においても示された。また、タバコ煙に含まれる成分の一つであるアクロレインの処置により、A549 細胞中の ADAR1 タンパク質の発現低下が認められたため、CSE による ADAR1 タンパク質の分解にアクロレインが寄与している可能性が示された。ADAR の発現低下が細胞内の酸化ストレスに及ぼす影響を検討するために、siRNA の導入により A549 細胞中の ADAR1 または ADAR2 の発現をノックダウンした結果、酸化ストレスマーカーであるプロテインカルボニル含量の増加が認められた。さらに、ADARs のノックダウンにより抗酸化酵素 superoxide dismutase (SOD) 酵素活性が低下し、特に ADAR1 のノックダウンによって酸化ストレス誘導性の抗酸化遺伝子である heme oxygenase-1 (HO-1) の発現低下が認められた。以上より、ADAR1 は抗酸化遺伝子の機能や発現を正に制御し、酸化ストレスに対し防御的に機能している可能性が考えられた。

【結論】 喫煙により ADAR1 の発現が低下することで喫煙時に惹起される酸化ストレスに対する感受性が亢進する可能性が示された。本研究は、RNA 編集の異常をもたらす外的要因ならびに生体内恒常性に対する RNA 編集の意義に新たな知見を与えた。

1-院-16

グリオーマ幹細胞性およびグリオーマ進展における E3 ユビキチンリガーゼ Smurf2 の役割

ひらいわ まなみ いえざき たかし ふかさわ かずや やまだ たかのり かねだ かつゆき なかだ みつとし ひらお あつし ひのい
o平岩 菜奈美¹、家崎 高志¹、深澤 和也¹、山田 孝紀¹、金田 勝幸¹、中田 光俊²、平尾 敦³、檜井
栄¹ (1. 金沢大・薬・薬理、2. 金沢大・医・脳神経外科、3. 金沢大・がん研・遺伝子染色体)

【背景および目的】

私たちは E3 ユビキチンリガーゼ SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (Smurf2) の新しいリン酸化サイト (Smurf2^{Thr249}) を発見し、そのリン酸化状態が間葉系幹細胞の幹細胞性維持に重要な役割を果たしていることを見出した (Iezaki et al., *Development* 2018)。一方近年、がんの病態とがん幹細胞の幹細胞性維持機構に緊密な関連性があることが明らかになっている。膠芽腫 (glioblastoma=GBM) は、グリオーマの中で最も悪性度が高く予後不良の中枢神経系腫瘍である。集学的治療によってもここ約半世紀もの間、著明な予後の改善は認められていない。GBM の発症・進展においても、グリオーマ幹細胞 (glioma-initiating cell=GIC) の幹細胞性維持機構が重要な役割を担うことが明らかになっている。そこで本研究では GIC における Smurf2 のリン酸化制御機構の解明と、Smurf2 のリン酸化状態 (Smurf2^{Thr249}) が GIC の幹細胞性および GBM の悪性・進展度に与える影響を検討した。

【方法】

ヒト GIC に各種サイトカインを暴露することで、Smurf2 のリン酸化状態 (Smurf2^{Thr249}) を調節する因子の探索を行った。また、ヒト GIC に Smurf2(T249A)変異体 (リン酸化不活性化体)、および Smurf2(T249E)変異体 (リン酸化活性化体) を導入し、スフィア形成能 (in vitro 解析) を測定した。さらに、Smurf2 変異体を導入したヒト GIC を免疫不全マウスへ移植し、腫瘍形成能 (in vivo 解析) に与える影響を解析した。グリオーマ患者 (Grade II (びまん性星細胞腫)、Grade III (退形成性星細胞腫) および Grade IV (GBM)) の腫瘍部位と正常部位の Smurf2^{T249} のリン酸化状態をウエスタンブロット法により解析した。

【結果および考察】

ヒト GIC に TGF-β を暴露すると Smurf2 のリン酸化 (Smurf2^{Thr249}) の低下が認められた。ヒト GIC に Smurf2(T249A)変異体を導入すると、スフィア形成能の上昇が確認された。さらに同細胞を免疫不全マウスの脳に移植すると、腫瘍体積の増加が認められた。一方、Smurf2(T249E)変異体を導入すると、スフィア形成能の低下とともに、腫瘍体積の減少が認められた。さらにヒト病理検体を用いた解析により、グリオーマの進展度に応じて腫瘍部位の Smurf2 のリン酸化 (Smurf2^{Thr249}) 低下が観察された。

以上の結果から、Smurf2 のリン酸化 (Smurf2^{Thr249}) 状態は、GBM の悪性・進展度と関連性がある可能性が示唆された。

ストレス応答シグナルによる p38 を介した RSK-EphA2 経路の活性化

○^{おおきりょうた}大木良太、^{やまはたいおり}山畑伊織、^{しゅうえつ}周越、^{さくらひろあき}櫻井宏明（富山大院薬）

【背景と目的】

EphA2 は、チロシンキナーゼ型受容体の中でも最大のファミリーである Eph 受容体ファミリーに属している。がん細胞においては、EphA2 が過剰発現する一方でリガンドの Ephrin-A1 は発現低下することが知られており、リガンド非依存的な機能が注目されている。我々は、ERK の下流キナーゼである RSK がリガンド非依存的に EphA2 Ser-897 のリン酸化を引き起こし、細胞の遊走や浸潤を誘導することを明らかにした (Zhou et al. Nat Commun, 2015)。本研究では、種々のストレス応答性シグナルにおいて、p38 が RSK-EphA2 経路にどのように関わるかを検討した。

【方法】

ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に対して阻害剤を処理後、各種刺激を行った時の p38、RSK-EphA2 経路の活性化をウェスタンブロット法で解析した。また、siRNA による p38 ノックダウンによる RSK-EphA2 経路の活性化への影響を解析した。

【結果及び考察】

HeLa 細胞に対して炎症性サイトカイン TNF- α で刺激したところ、EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導された。このリン酸化は p38 阻害剤である SB203580 によって減弱することがわかった。また、p38 を強く活性化する Anisomycin による刺激においても Ser-897 リン酸化は誘導されたが、これは SB203580 によってほぼ完全に抑制された。この時、RSK のリン酸化も減弱することがわかった。さらに p38 を強く活性化する浸透圧ストレス、抗がん剤シスプラチンによる刺激においても同様の結果が得られた。一方、EGF、TPA による刺激を加えた時も Ser-897 リン酸化は誘導されたが、p38 阻害による抑制は見られなかった。また、siRNA による p38 ノックダウンを行ったときに Anisomycin で刺激をしたところ、Ser-897 のリン酸化がほぼ完全に抑制された。

p38 は RSK を介して Ser-897 のリン酸化を起こすことが考えられた。また、p38 の RSK-EphA2 経路に対する寄与は p38 が ERK よりも強く活性化した場合に大きいと考えられた。今後は p38-RSK-EphA2 経路が細胞遊走能を制御しているのかを解析する予定である。

RAS の Ser-39 リン酸化による MAPK 経路の活性化制御機構の解明

○^{とよだ} ^{しょういちろう} 章一郎¹、^{なかむら} ^{し お り} 中村 施央里¹、^{よこやま} ^{さとる} 横山 悟²、^{さくらい} ^{ひろあき} 櫻井 宏明¹ (¹ 富山大・院薬、² 富山大・和漢研)

【背景・目的】

RAS は低分子量 G タンパク質の一種で、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。RAS には Switch I (residue 30-38) と Switch II (residue 59-72) と呼ばれる領域が存在し、この領域がヌクレオチドやエフェクター分子との相互作用に重要であることが知られている。チロシンキナーゼ型受容体 EGFR などからの刺激により、この領域の構造が変化し、GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型を切り替えることで細胞の増殖や分化を調節している。活性型 RAS はエフェクター分子 Raf と相互作用し、下流の MAPK 経路を活性化する。がん細胞では頻繁に RAS の変異が認められ、GTP と結合した恒常的活性型となることで異常な増殖シグナル伝達を誘導している。近年、非受容体型チロシンキナーゼ Src により RAS の Switch I 領域内の Tyr-32 がリン酸化され、Raf との結合能低下、GAP との結合能上昇により不活性型 RAS へ移行することが報告された。本研究では、Switch I 領域近傍に位置する Ser-39 のリン酸化に着目し、下流シグナルの活性化、エフェクター分子との結合の解析を行った。

【方法】

HEK293 細胞に Flag-NRAS およびその変異体の発現プラスミドをトランスフェクションし、ウエスタンブロット法により RAS の下流シグナルの活性化を評価した。

【結果・考察】

がん細胞における RAS の活性化変異は、主にコドン 12、13 および 61 にみられる。そこで、NRAS(Q61R)変異体を HEK293 細胞に発現させると ERK の活性化が確認された。この Q61R 変異体にさらに Ser-39 のリン酸化模倣変異(S39D)を加えると、ERK の活性化が著しく低下した。ERK 以外の MAPK の活性化についても解析したところ、p38 や JNK のリン酸化も低下していた。Ser-39 は Switch I 領域近傍に存在することから、Ser-39 のリン酸化がエフェクター分子との相互作用に影響している可能性が考えられた。今後、免疫沈降法などを用いて RAS とエフェクター分子との相互作用を解析していく予定である。また、Ser-39 をリン酸化する責任キナーゼの同定などを行い、RAS 活性化におけるリン酸化制御の役割について検討していく予定である。

**学生優秀発表賞選考対象
学士課程部門(領域2)**

2-学-1

ブースティングツリーによる原薬物性-錠剤崩壊性の相関モデルの構築

○中野 友梨¹、林 祥弘¹、丸茂 勇輝¹、平井 大二郎²、熊田 俊吾²、小杉 敦²、大貫 義則¹
(¹ 富山大学 製剤設計学講座、² 日医工株式会社)

【背景・目的】原薬物性は錠剤崩壊性に大きく影響するため、製剤設計においてこれらの間の関係性を理解することは重要である。しかしながら、両者の関係は複雑であり、原薬物性が錠剤物性に及ぼす影響度を定量的に評価することは困難である。これは多種多様な原薬物性が存在する上、複数の原薬物性が複雑に錠剤崩壊性に影響していることが一因である。

当講座では原薬物性と錠剤物性の関係を明らかにするため、データベースを構築し、機械学習を適用することで因果関係の解明を試みてきた。本研究では、錠剤崩壊性との関連性が多数報告されている接触角をデータベースに新たに追加した。そして、機械学習の1つであるブースティングツリーを適用することで、構築したデータベース内の因果関係をモデル化し、接触角の影響度を明確化した。

【方法】81種類の前薬、結晶セルロースおよびステアリン酸マグネシウムを用いて錠剤を調製し、錠剤崩壊性の指標として崩壊時間を測定した。接触角は錠剤表面に精製水を滴下し、その様子をカメラで記録することで経時的に測定した。接触角の経時変化から錠剤内に水が浸透する速度（導水速度）を算出した。得られたデータを当講座のデータベースに追加し、ブースティングツリーで解析した。ブースティングツリーは決定木にアンサンブル学習を組み合わせた手法である。決定木はデータを場合分けし、樹木状のモデルを作成する手法である。ブースティングツリーでは決定木で当てはまりの悪いサンプルの重要度を上げ、逐次的に決定木を構築することで高精度なモデル化を行う。

【結果・考察】ブースティングツリーの予測精度を評価するためにLeave-some-out cross-validationを行った。その結果、予測値と実測値の決定係数は高値を示し、高精度なモデルを構築できることが示唆された。その一方で、従来手法として適用した重回帰分析では、決定係数が低値を示し、予測精度が低かった。

原薬物性の寄与度を評価した結果、接触角、吸湿量、導水速度の寄与度が高かった(図)。また、決定木のモデル構造を分析することで、原薬物性が錠剤の崩壊時間にどのような影響を及ぼすかを評価した。その結果、接触角が小さく、吸湿量が大きく、導水速度が速い原薬ほど、錠剤の崩壊時間は長くなることが分かった。

【結論】ブースティングツリーを活用することで原薬物性と錠剤崩壊性の関係をモデル化し、錠剤崩壊性における接触角の重要度を定量的に評価できた。今後、新たな原薬物性をデータベースに追加することで、未知の前薬の錠剤崩壊性を予測できるモデルの構築を目指す。

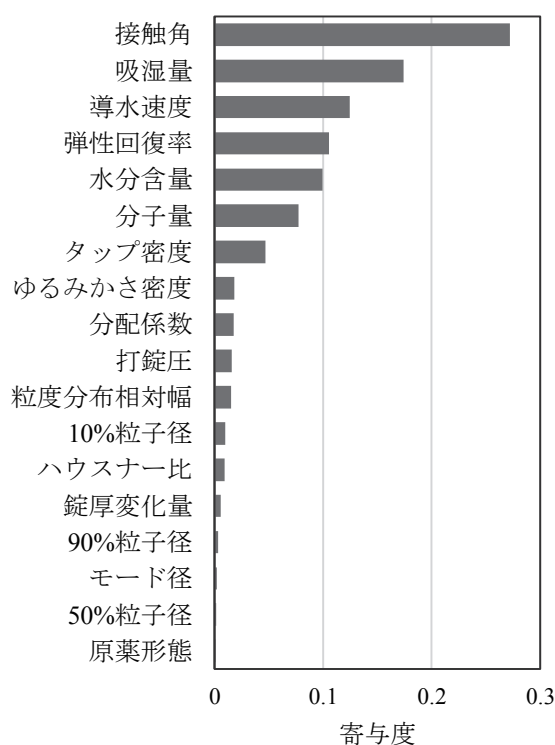


図. 錠剤崩壊性への各原薬物性の寄与度

2-学-2

新規桂皮酸型ジアジリン光クロスリンカーの開発と機能評価

○堀川 拓¹、千葉順哉²、友廣岳則² (富山大薬¹、富山大院薬²)

【背景および目的】

光アフィニティーラベル法 (PAL) は汎用アフィニティー精製法では対応困難な膜受容体や弱い相互作用タンパク質等に応用できるため、未知結合タンパク質探索法として注目されてきた。MS分析機器の高性能化に伴い、PALとMS定量解析法を合わせた方法は化学プロテオミクスの主要なツールとして、近年、応用例が増加している。当研究室では、蛍光基クマリンに変化する桂皮酸型ジアジリン光クロスリンカーを開発し、これまで困難であったラベルペプチドの特定効率を上げ、タンパク質同定と共に機能部位解析を進めてきた¹⁾。しかし、微量発現タンパク質に対応するには、生成するクマリンタグは蛍光強度が弱いという問題があった。そこで今回、従来反応基の有用な機能は残しつつ光反応基を再設計し、機能向上を試みたので報告する。

【方法】

光クロスリンカーは切断機能と発蛍光性を有するオルトヒドロキシ桂皮酸構造を残しつつ、強い蛍光を発する7-ヒドロキシクマリンを形成するように設計した。作製した光クロスリンカーユニットとビオチン基を組み入れたベンゼンスルホンアミドプローブを合成し、炭酸脱水素酵素 (CA II) ラベルによりその機能を評価した。CA II 光ラベルでは、プローブとインキュベートした後、光源に250W超高压水銀灯を用い、バンドパスフィルター (fwhm = 10 nm) を通して365 nm光を照射した。ラベルタンパク質はSDS-PAGE/PVDF膜への転写後、ビオチンタグを利用した化学発光法により検出した。

【結果および考察】

新規光クロスリンカーの桂皮酸型ジアジリン誘導体は、汎用フェニルジアジリン合成法に従い、従来型桂皮酸型クロスリンカーと同様なルートで作製した。新規桂皮酸ユニットに365 nm光を照射したところ、400 nm付近にクマリン由来の蛍光が観測された。これは桂皮酸のE-Z異性化を経て、オルト位ヒドロキシ基による分子内置換反応/環化反応により生成したものと考えられる。蛍光強度は従来型反応基に比べ2桁程度の著しい増強が認められた。光ラベル剤としての機能は炭酸脱水素酵素を用いた評価系で確認した。プローブ化は阻害剤ベンゼンスルホンアミドのパラ位を誘導体化して進めた。この位置の誘導体化による阻害剤合成報告例²⁾は多い。リンカーを介してリシンを導入し、主鎖アミノ基に光クロスリンカーユニットを、側鎖アミノ基にビオチン基を導入した。このプローブを用いて光照射したところ、クロスリンクによるCA IIのビオチン化が確認できた。この光ラベル量はプローブ濃度に依存して増加し、阻害剤ベンゼンスルホンアミドの添加量依存的に減少した。また、従来型反応基を導入したプローブと比較すると、大幅なラベル量の増加が認められた。

参考文献

- 1) T. Tomohiro, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 13502.
- 2) V. Alterio, *et al.*, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4421.

2-学-3

放射性医薬品 MIBG(meta-iodo benzylguanidine)の deltic guanidinium アナログ「deltic MIBG」の合成及び評価

○^{ふくいまさと}福井雅人¹、^{みしろけんじ}三代憲司²、^{おがわかずま}小川数馬²、^{わかばやしひろし}若林大志³、^{きぬやせいご}絹谷清剛⁴、^{おだにあきら}小谷明⁴、
(金沢大医薬保¹、金沢大新学術²、金沢大附属病院³、金沢大院医薬保⁴)

【背景・目的】

生物学的等価体とは薬物の主要な生理活性に影響を与えることなく、他の原子または原子団と代用可能な原子または原子団を意味する。創薬研究において、生物学的等価体の概念は薬物の動態、代謝、毒性の改善を目的とした薬物設計に広く用いられている。guanidinium(Gdm)は生体分子や医薬品をはじめ、数多くの化合物に含まれているため、その生物学的等価体の開発は幅広い意義を持つ。deltic guanidinium(dGdm)は Gdm の中心炭素を三員環に置き換えた骨格を持つ(Figure 1)。dGdm は Gdm と類似した物理学的性質を有することが報告されており¹、Gdm の生物学的等価体としてはたらくことが期待されるが、dGdm の生物学的性質についての評価はこれまで十分に行われていない。本研究では、褐色細胞腫の診断や治療等に用いられている放射性薬剤^{[123/131]I}MIBG の dGdm アナログ「deltic MIBG」を合成し、その生物学的性質の解析、及び MIBG との比較を行った(Figure 2)。

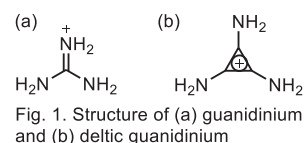


Fig. 1. Structure of (a) guanidinium and (b) deltic guanidinium

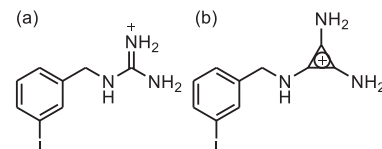
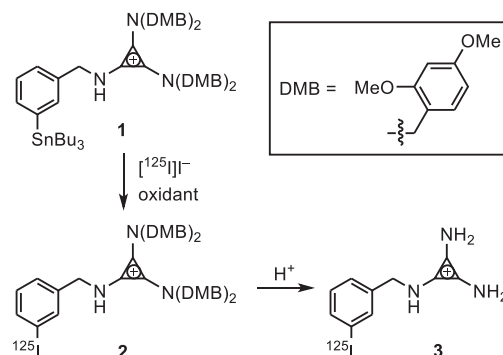


Fig. 2. Structure of (a) MIBG and (b) deltic MIBG

【方法】

dGdm 部分が 2,4-dimethoxybenzyl 基(DMB)で保護されたスズ化合物(1)を標識前駆体として、¹²⁵I 標識、DMB の脱保護により^{[125]I}deltic MIBG(3)を合成した(Scheme 1)。norepinephrine transporter (NET) positive である PC-12 ラット副腎褐色細胞腫細胞を用いた細胞取り込み実験、並びに NET 阻害剤である desipramine 同時投与による blocking 実験を行った。次いで PC-12 ラット副腎褐色細胞腫細胞と NET negative である C6 ラットグリア芽腫細胞担癌マウスを用いた体内放射能分布実験、blocking 実験を行った。上記の実験は^{[125]I}deltic MIBG と^{[123]I}MIBG のダブルトレースで行った。



Scheme 1. Synthesis of ^{[125]I}deltic MIBG

【結果・考察】

PC-12 細胞を用いた取り込み実験では取り込み開始後 3 時間の^{[125]I}deltic MIBG の取り込み量が^{[123]I}MIBG の 1/3 程度だった。一方で desipramine と同時に取り込ませることで^{[125]I}deltic MIBG の取り込みが有意に低下した。この結果から、deltic MIBG は MIBG と同様に NET による取り込みを受けるが、MIBG と比較して NET に認識されにくいと考えられる。次に担癌マウスを用いた体内放射能分布実験を行った。投与後 4 時間での^{[125]I}deltic MIBG の PC-12 腫瘍への取り込みは^{[123]I}MIBG の 1/4 程度であった。blocking 実験では、投与後 1 時間での^{[125]I}deltic MIBG の取り込みは低下する傾向が見られた。今後は尿中排泄される代謝物などの比較をさらに行っていく。

1. K. Mishiro, F. Hu, D. W. Paley, W. Min, T. Lambert, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1655.

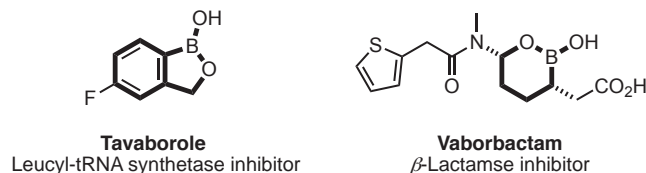
2-学-4

環状エーテルからアルキルボロールの合成

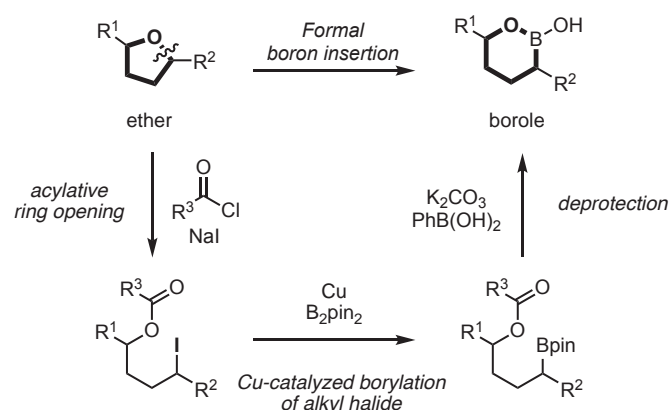
○松原 夏、長尾 一哲、大宮 寛久 (金沢大院医薬保)

【背景・目的】ホウ素医薬品は、最近新たな低分子医薬品の骨格として注目を浴びている。現在まで報告されているホウ素医薬品の骨格形式は、大まかにボロアミノ酸と環状ボロールの2つに分けられる (Figure 1)。中でも Vaborbactam に見られるアルキルボロールは比較的新しい骨格であるため、その合成法は未だ確立されていない¹。したがって、アルキルボロールを効率的かつ直裁的に合成する手法の開発が必要である。今回我々は、天然に豊富に存在する環状エーテルを出発原料としてアルキルボロール骨格を構築する手法を開発した (Scheme 1)。

Figure 1. Pharmaceutical drugs containing a borole scaffold

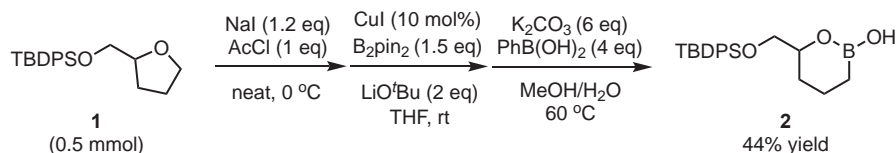


Scheme 1. Synthetic strategy



【方法・結果】5員環エーテル **1** を塩化アセチルおよびヨウ化ナトリウムと反応させることで開環し、ヨウ化アルキルに変換した (Scheme 2)。続いて、銅触媒とビスピナコラトジボロンを用いたホウ素化反応により、アルキルホウ素化合物に導いた。最後に、フェニルボロン酸と炭酸カリウムのメタノール/水混合溶液を作用させることで、アシル基の除去とボロールの構築が一挙に進行し、アルキルボロール **2** が得られた。

Scheme 2. One-pot synthesis of cyclic borole



- Hecker, S. J.; Reddy, K. R.; Totrov, M.; Hirst, G. C.; Lomovskaya, O.; Griffith, D. C.; King, P.; Tsivkovski, R.; Sun, D.; Sabet, M.; Tarazi, Z.; Clifton, M. C.; Atkins, K.; Raymond, A.; Potts, K. T.; Abendroth, J.; Boyer, S. H.; Loutit, J. S.; Morgan, E. E.; Durso, S.; Dudley, M. N. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3682.

アルデヒドとイミンを用いた銅触媒還元的カップリング反応

○三井 惇央、竹田 光孝、長尾 一哲、大宮 寛久 (金沢大院医薬保)

【背景・目的】 β -アミノアルコールは医薬品や生体関連分子に多く見られる重要な骨格群の一つである。したがって、これまで多くの合成法が報告されてきた。その中で最も直接的な合成法はカルボニル化合物とイミンの還元的カップリングである。しかし、これまで報告されている手法は化学量論以上で、かつ強力な還元剤を必要とし、基質適用範囲も限られている。今回我々は、銅触媒とシリルボランを用いることで、アルデヒドとイミンの還元的カップリング反応が進行することを見出した (Scheme 1)。本反応系では、銅触媒がアルデヒドとイ

Scheme 1. Cu-catalyzed reductive coupling between aldehydes and imines

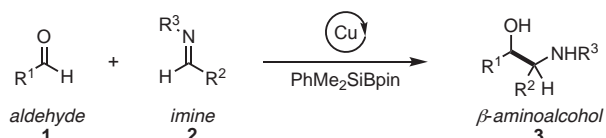
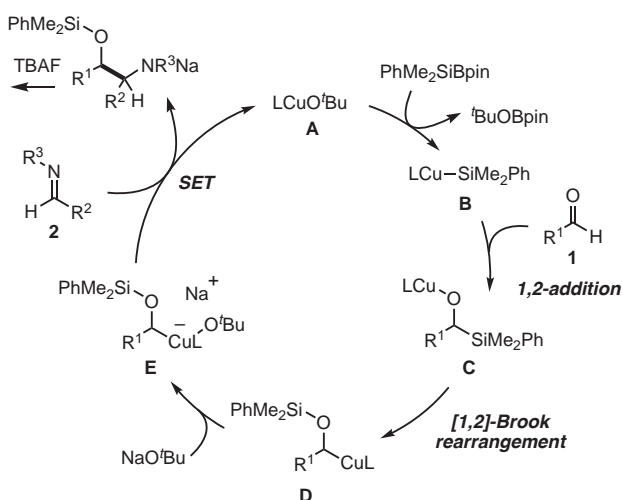


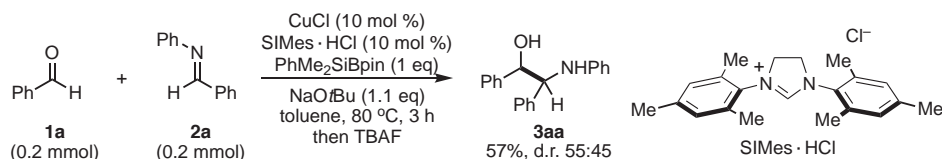
Figure 1. Possible catalytic cycle



ミンの違いを認識し、それぞれを異なる機構で活性化する (Figure 1)。つまり、シリル銅触媒種 (B) がアルデヒド **1** に選択的付加-Brook 転位を起こし、 α -アルコキシアルキル銅 (D) を与える¹。続いて、D が化学量論量のアルコキシド塩基と反応することで、アート型銅錯体 (E) が形成する。最後に、イミン **2** と一電子機構を伴って反応し、生成物を与える。

【方法・結果】 Cu(I)/SIMes 錯体触媒、シリルボラン、アルコキシド塩基存在下、ベンズアルデヒド (**1a**) と *N*-フェニルベンズアルジミン (**2a**) を toluene 中 80 °C で 3 時間反応させたところ、ピナコール型カップリングが進行し、 β -アミノアルコール **3aa** が得られた (Scheme 2)。

Scheme 2. Reductive coupling between aldehyde and imine



1. Takeda, M.; Yabushita, K.; Yasuda, S.; Ohmiya, H. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6776–6779.

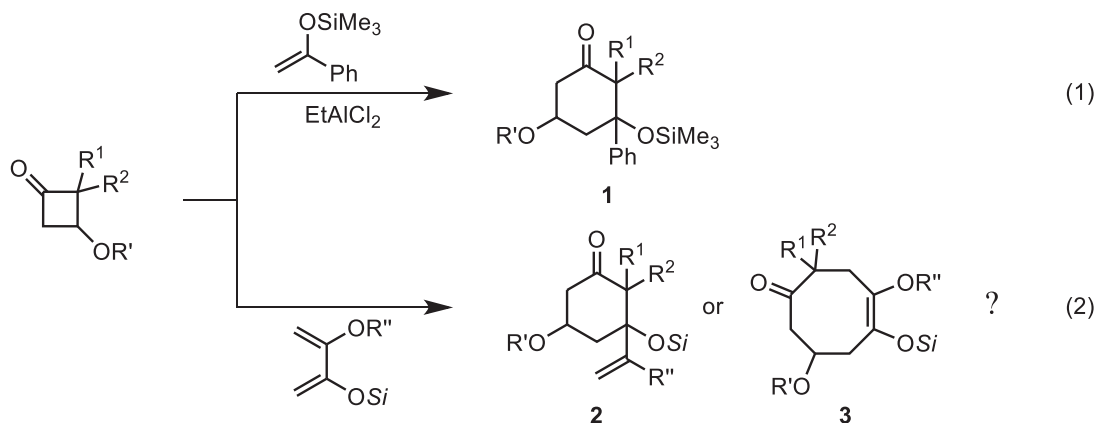
2-学-6

シクロブタノンとシロキシジエンとの[4+4]型付加環化反応の開発

にしゅうな よしむらともゆき まつおじゅんいち
○西優奈、吉村智之、松尾淳一（金沢大医薬保）

【背景・目的】

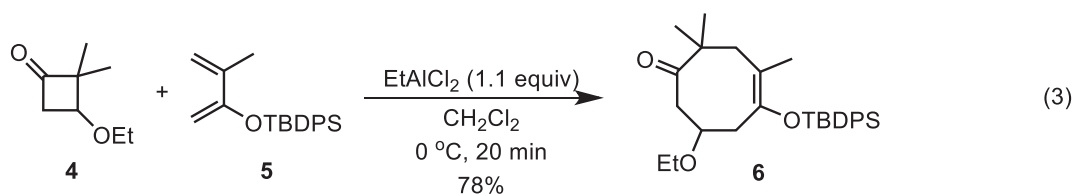
3-アルコキシシクロブタノンは、ルイス酸の活性化によって開裂し、シリルエノールエーテルと反応して形式的[4+2]付加環化成績体 **1** を与える (eq. 1)。今回、シロキシジエンとの反応により、[4+2]もしくは[4+4]型付加環化反応 (**2** または **3**) のどちらが進行するのか明らかにすべく検討を行った (eq. 2)。また、キラルルイス酸触媒を用いた不斉合成についても研究を行った。



【方法・結果】

1. シクロブタノンとシロキシジエンとの[4+4]型付加環化反応の開発

塩化メチレン溶液中、3-エトキシシクロブタノン **4** と共役ジエン **5** の混合液に、0 °Cにて EtAlCl₂ を加えて反応させた。その結果、八員環化合物 **6** が 78%収率にて得られた (eq. 3)。また、この際 [4+2]付加環化成績体である六員環化合物 **2** は全く得られなかった。また、シクロブタノン、共役ジエンの置換基が反応に及ぼす影響についても検討を行った。さらに、合成された八員環化合物に対する炭素-炭素結合形式反応に関しても検討を行ったのであわせて報告する。



2. 触媒的不斉[4+4]型付加環化反応

不斉ルイス酸触媒を種々検討した結果、シクロブタノン **7** と共役ジエン **5** の混合液に、0 °Cにて EtAlCl₂ 及び BINOL (1 : 1) から調製した不斉ルイス酸を触媒量 (10 mol%) 用いた場合、57% ee にて化合物 **8** が得られた (eq. 4)。現在、更なる収率及び選択性の向上を目指し、研究を行っている。



2-学-7

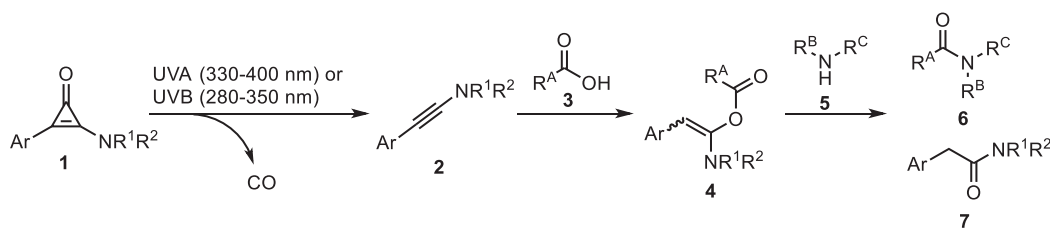
光増感触媒を用いたイナミンの生成及びそれを利用した光活性化型脱水縮合反応の開発

○木村武史、三代憲司、国嶋崇隆 (金沢大院薬)

【背景および目的】

安定な前駆体から光により生成した活性種を用いる光活性化型脱水反応は、単離困難な高反応性の活性種を系中で発生させ簡便に利用できる利点をもつ。最近、我々はアミノシクロプロペノンを利用する光活性化型脱水縮合反応を開発した¹⁾。本反応ではアミノシクロプロペノン(1)のUV照射により系中で発生した高反応性のイナミン(2)がカルボン酸(3)と反応して、アシロキシエナミン(4)を形成し、続くアミン(5)によるアミノリシスによってアミド(6)が生成する(Scheme 1)。本手法ではUVを用いることから、UVに弱い化合物への適用が課題であった。アミノシクロプロペノンは置換基により吸収波長の制御が可能であるため、より長波長の光でイナミンを生成するアミノシクロプロペノンの開発は可能であると考えられるが、可視光で分解するアミノシクロプロペノンは取り扱いが困難であることが懸念される。そこで我々は今回、可視光を吸収する光増感触媒を利用しアミノシクロプロペノンの間接励起による可視光条件での光活性化型脱水縮合反応の開発を試みた。

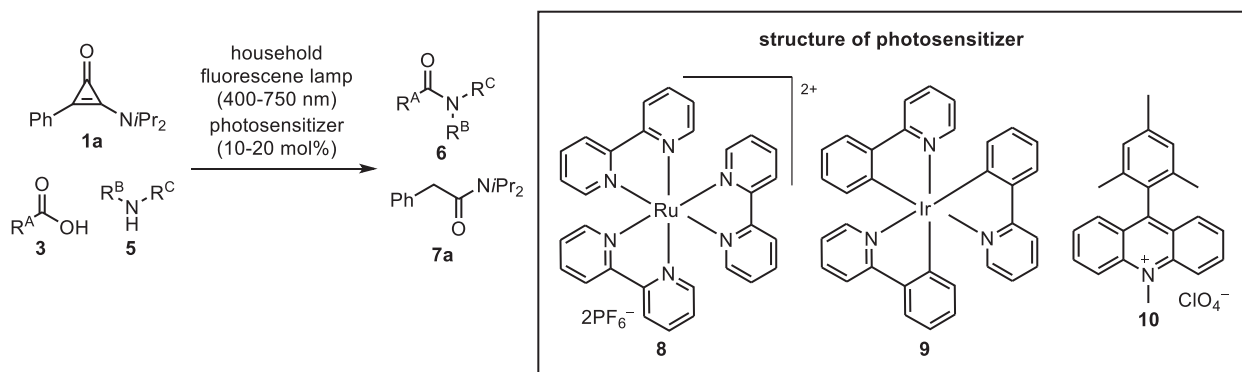
Scheme 1. Phototriggered Dehydration Condensation Using an Aminocyclopropanone



【方法・結果】

可視光領域(>400 nm)に吸収を持つ光増感触媒(8-10)を用いて 400–750 nm の可視光条件下検討を行った結果、目的の光活性化型脱水縮合反応の進行が確認された(Scheme 2)。さらに触媒構造、反応条件の最適化を行い、最高 80%以上の収率で目的のアミド(6)が得られる条件を見出した。アミノシクロプロペノン(1a)は可視光条件下安定であり、本反応は増感剤の共存下でのみ進行した。また、反応の共生成物としてイナミン由来化合物(7a)が得られた。これらのことから、本反応では可視光により励起された光増感触媒の作用によりアミノシクロプロペノン(1a)からイナミンが生じ、Scheme 1 と同様なメカニズムでアミド(6)が生成したと考えられる。

Scheme 2. Photosensitizer Catalyzed Phototriggered Dehydration Condensation (This Work)



1) Mishiro, K. et al., *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4912.

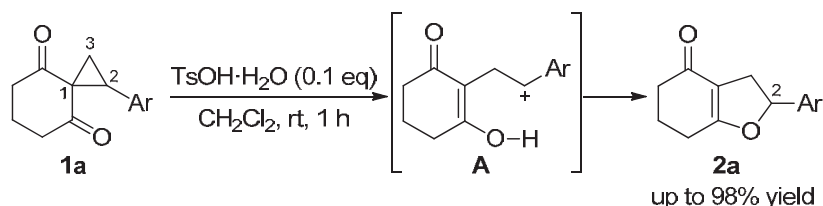
**学生優秀発表賞選考対象
大学院課程部門(領域2)**

2-院-1

ヨウ化物イオンの触媒作用によるスピロシクロプロパンの新規位置選択的環開裂—環化反応

○大貫悠太, 南部寿則, 矢倉隆之 (富山大院薬)

【背景・目的】最近我々は、シクロプロパン上にアール基が置換したスピロシクロプロパン **1a**¹⁾ に活性化剤として触媒量のトシル酸を室温で反応させると、位置選択的なシクロプロパンの開裂に続く環化反応が進行し、2-アールテトラヒドロベンゾフラン-4-オン **2a** が最高 98%の収率で得られることを見出した。²⁾ この反応では、シクロプロパンの C1-C2 結合の位置選択的な開裂により、速やかに安定なベンジルカチオン中間体 **A** を形成し、次いで環化反応が進行して 2 位置換体 **2a** が選択的に得られたと考えている。次に我々は、シクロプロパン上にカチオンの安定化効果をもたない置換基をもつスピロシクロプロパンへの適用を目指す。



【方法・結果】シクロプロパン上が無置換のスピロシクロプロパン **1b**²⁾ の反応では、トシル酸を用いても環化体 **2b** はほとんど得られなかった。

様々な活性化剤を用いて検討した結果、ヨードトリメチルシラン (TMSI) を用いると収率 96% で **2b** を得ることができた。

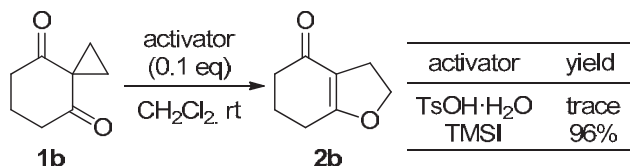
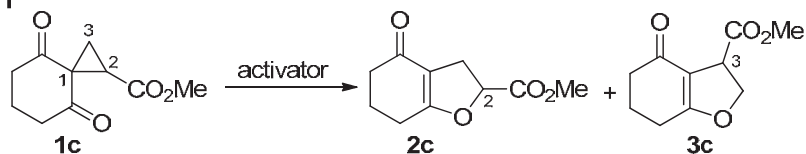


Table 1



entry	activator (eq)	solvent	temp	time (h)	yield (%) ^a	2c:3c
1	TsOH·H ₂ O (1.0)	CH ₂ Cl ₂	rt	24	no reaction	
2	TBAI (0.2) + TfOH (3.0)	CH ₂ Cl ₂	rt	12	87	4:96
3	CaI ₂ (0.1)	THF	0 °C	0.5	95	97:3

^a Combined yield of **2c** and **3c**.

ここで、再び様々な活性化剤を用いて検討した結果、トリフルオロメタンスルホン酸 (TfOH) に触媒量のテトラブチルアンモニウムヨージド (TBAI) を添加すると反応は進行し、2 位置換体 **2c** と 3 位置換体 **3c** が 87%の収率で得られた (entry 2)。2c と 3c の比は 4:96 であり、1a の場合とは異なり C1-C3 結合が開裂して生成する **3c** が優先して得られることが分かった。さらに興味深いことに、ヨウ化カルシウム (CaI₂) を用いると、反応の位置選択性が逆転し、2c:3c = 97:3 と再び C1-C2 結合が開裂して生成する **2c** が優先して得られることが分かった (entry 3)。⁴⁾

【考察】以上の結果から、いずれの反応においてもヨウ化物イオンの触媒作用により反応が進行していること、用いる触媒により位置選択性の逆転がみられることが分かった。

1) Nambu H., Fukumoto M., Hirota W., Ono N., Yakura T., *Tetrahedron Lett.*, **56**, 4312 (2015).

2) Nambu H., Ono N., Yakura T., *Synthesis*, **48**, 1892 (2016).

3) Nambu H., Ono N., Hirota W., Fukumoto M., Yakura T., *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1763 (2016).

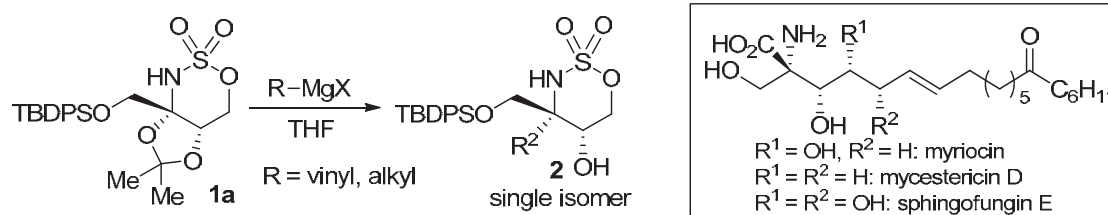
4) Nambu H., Onuki Y., Ono N., Yakura T., *Adv. Synth. Catal.*, **360**, 2938 (2018).

2-院-2

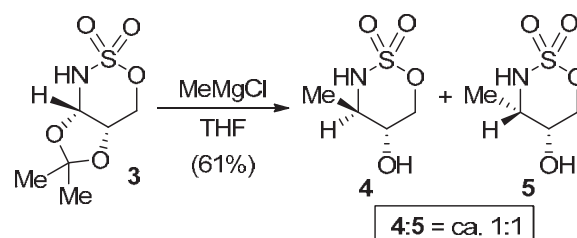
オキサチアジナン *N,O*-ケタールの還元によるアミノアルコール類の両立体異性体の選択的合成

○広澤千晃, 南部寿則, 藤原朋也, 矢倉隆之 (富山大院薬)

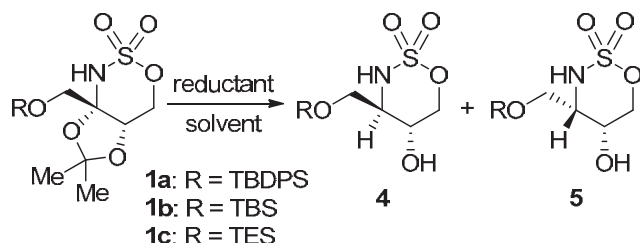
【背景・目的】最近, 我々はオキサチアジナン *N,O*-ケタール **1a** の立体選択的ビニル化による四置換炭素の構築と, それを鍵工程とするスフィンゴシン類縁天然物 myriocin, mycestericin D, sphingofungin E の全合成を達成した。¹⁻³⁾ さらに, **1a** から **2** への立体選択的 sp^3 求核剤の導入 (アルキル化) にも成功した。



一方, 対応する *N,O*-アセタール **3** のエチニル化, ビニル化は Du Bois らにより報告されているが,⁴⁾ アルキル化は未だ報告例がなかった。我々は, ケタール **1a** で有効であった THF 中, Grignard 試薬を用いるアルキル化の反応条件をアセタール **3** に適用して, メチル化によるアミノアルコール **4** および **5** の合成を検討したが, 立体選択性はほとんど見られなかった。そこで我々はアミノアルコール **4, 5** 合成の別法として, ケタール **1** の還元を検討した。



【方法・結果】置換基 R として CH_2OTBDPS をもつオキサチアジナン *N,O*-ケタール **1a** をエーテル中, $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$ で還元すると, アミノアルコール **4a** が高収率および高立体選択的 (90%, **4a:5a** = 85:15) に得られた。一方, DMF 中, NaBH_4 で還元すると, 収率はやや低くなるが立体選択性が逆転し, **5a** が選択的 (52%, **4a:5a** = 16:84) に得られることを見出した。また, TBS や TES で保護した **1b** および **1c** を用いて検討した結果, どちらの保護基でも同様に還元剤を使い分けることによりアミノアルコール **4** および **5** を立体選択的に合成できた。現在, この立体選択的還元反応を用いて, アミノアルコール構造をもつ天然物合成を検討している。



R	reductant	solvent	yield (4:5)
TBDPS	$\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$	Et_2O	90% (4a:5a = 85:15)
	NaBH_4	DMF	52% (4a:5a = 16:84)
TBS	$\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$	Et_2O	87% (4b:5b = 92:8)
	NaBH_4	DMF	76% (4b:5b = 7:93)
TES	$\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$	Et_2O	60% (4c:5c = 90:10)
	NaBH_4	DMF	80% (4c:5c = 8:92)

1) Nambu H., Noda N., Niu W., Fujiwara T., Yakura T., *Asian J. Org. Chem.*, **4**, 1246–1249 (2015).

2) Noda N., Nambu H., Ubukata K., Fujiwara T., Tsuge K., Yakura T., *Tetrahedron*, **73**, 868–878 (2017).

3) Noda N., Nambu H., Fujiwara T., Yakura T., *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 687–696 (2017).

4) (a) C. G. Espino, P. M. Wehn, J. Chow, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 6935–6936. (b) J. J. Fleming, K. W. Fiori, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2028–2029. (c) J. J. Fleming, M. D. McReynolds, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9964–9975.

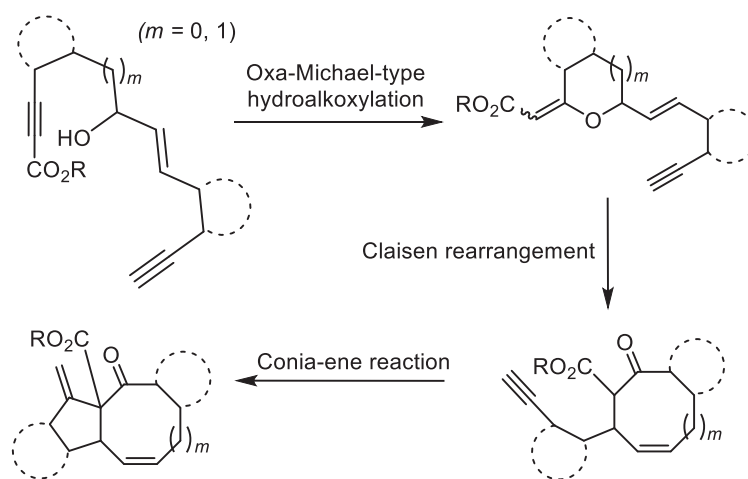
2-院-3

ヒドロキシエンジン類のカスケード型環化を用いるビシクロ[n.3.0]アルカノン骨格構築法の開発

○^ふ ^せ ^つ ^や ^た ^か ^は ^し ^り ^{ょう} ^た ^う ^ち ^や ^ま ^ま ^さ ^ひ ^こ
○布施哲矢、高橋 涼太、内山正彦 (金沢大院医薬保)

【背景および目的】

興味深い薬理活性を有する天然物の中には、中員環を含む縮合多環式化合物が数多く存在することから、中員環形成反応は非常に重要である。しかし、一度の環化反応で中員環を形成することは、エントロピーとエンタルピーの両方の点から不利であり、非常に困難であることが知られている。これまでにオレフィン閉環メタセシスなどの優れた手法が開発されているが、分子間での副反応を抑えるために高度希釈条件を用いなければならないなどの課題もある。このようなことから我々は、環形成が容易な5~6員環の形成と Claisen 転位による環拡大を組み合わせた既知の手法に改めて注目した。この手法は、特に7~8員環形成に効果的な原子効率の高い優れた方法であり、更にもう一つ別の環化反応として5-*exo*型 Conia-ene 反応を組み合わせれば、ビシクロ[n.3.0]アルカノン骨格を一挙に構築できることになる。また、反応基質にあらかじめ環構造をいくつか組み込んでおくことで、中員環を含む縮合多環式骨格の構築も可能である。このような考えのもと、今回我々は、scheme 1 に示すようなカスケード型反応を設計し検討することとした。

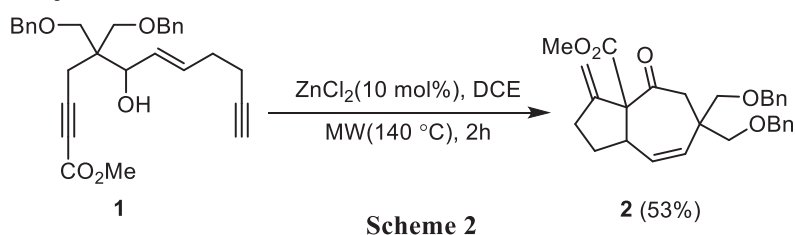


Scheme 1

このようなことから我々は、環形成が容易な5~6員環の形成と Claisen 転位による環拡大を組み合わせた既知の手法に改めて注目した。この手法は、特に7~8員環形成に効果的な原子効率の高い優れた方法であり、更にもう一つ別の環化反応として5-*exo*型 Conia-ene 反応を組み合わせれば、ビシクロ[n.3.0]アルカノン骨格を一挙に構築できることになる。また、反応基質にあらかじめ環構造をいくつか組み込んでおくことで、中員環を含む縮合多環式骨格の構築も可能である。このような考えのもと、今回我々は、scheme 1 に示すようなカスケード型反応を設計し検討することとした。

【方法および結果】

分子内の適切な位置に水酸基やアルケン部、および2つのアルキン部を有するヒドロキシエンジン化合物を反応基質として、 π -酸性と σ -酸性の両方の性質を適度に併せ持つ1種類の金属 Lewis 酸触媒で処理することで、1)アルキン部への分子内ヒドロアルコキシレーションによる5~6員環形成、2)Claisen 転位による環拡大、3)Conia-ene 反応による2つ目の環形成(5員環)が連続的に起こり、ビシクロ[5.3.0]デカノン骨格、あるいはビシクロ[6.3.0]ウンデカノン骨格が一挙に構築できるとの作業仮説をたて、以下の反応について検討した。すなわち、反応基質 **1** をジクロロエタン中、触媒量の塩化亜鉛とともにマイクロウェーブ照射によって140℃で加熱したところ、期待した3つの反応から成るカスケード型反応が進行し、目的とするビシクロ[5.3.0]デカノン誘導体 **2** が53%の収率で得られた。用いる触媒の評価、および本カスケード型反応の基質一般性など、詳細については現在検討中である。



Scheme 2

2-院-4

アシルスルホンアミド型光反応基による標的タンパク質解析の効率化

○林龍二、森本正大、千葉順哉、畑中保丸、友廣岳則（富山大院薬）

【背景および目的】

薬物標的タンパク質同定法の1つである光アフィニティーラベル法（PAL）は、光照射により相互作用物質間に安定な共有結合を形成し、精製／解析タグを導入できることから、弱い相互作用系などの解析に有用である。最近我々は蛍光特性と安定同位体を搭載した高性能小型タグ（IsoFT）を導入可能な多機能性桂皮酸型光クロスリンカーを開発し、ラベルペプチド解析を基本とする高速標的同定法を報告した¹⁾。しかし、一般に光クロスリンカーやタグを生体高分子などに導入してプローブ化するには厳密な合成戦略が必要である。今回、生体直交性カップリング反応の1つであるスルホクリック反応²⁾を利用することで、無保護でのPALプローブ化と、この反応で形成されるアシルスルホンアミドの特性を利用した操作の効率向上を目指した。

【方法】

スルホクリック反応の反応基であるスルホニルアジド基を側鎖に持つアミノ酸を新規に合成し、別途、チオエステル化した桂皮酸型光反応ユニットを調整した。このアミノ酸を、Fmoc 固相合成法を用いてPKC α 阻害ペプチドの特定位置に導入し、さらに光反応基ユニットを加えてPALプローブ化した。アシルスルホンアミドリンカーの切断活性を検討し、PKC α のPAL解析では化学発光及び銀染色により、光ラベル効率と切断精製効率を評価した。ラベルペプチド／アミノ酸はLC-MS/MS解析により決定した。

【結果および考察】

スルホニルアジド基を有する新規アミノ酸は2段階で調整し、桂皮酸チオエステル体は既報³⁾に従って合成した。固相合成法によりこのアミノ酸をペプチドの任意の位置に導入できることを確認した。スルホクリック反応で形成するアシルスルホンアミドリンカーは極めて安定であり、高温においても分子内求核反応による切断は起こらず、従来反応基で確認された精製前のラベルタンパク質の損失を抑えることができると考えられる。このリンカーはN-アルキル化すると容易に加水分解された。ラベルタンパク質での切断反応を確認後、微量のラベルPKC α をアビジン担体に捕捉・濃縮し、この切断特性を利用して選択的に溶出した。従来の光照射による切断は時間を要したが、この化学処理ではMS解析前処理である還元Sアルキル化操作をそのまま利用することが可能であり、有意であった。消化産物のLC-MS/MS解析からATP結合ドメイン近傍へのプローブ結合とその方向が示唆された。また、切断反応後に生成した桂皮酸タグは光照射によりクマリンに変換するため、質量差タグとして利用することで微量MSシグナルの検証に有効であることがわかった。以上、アシルスルホンアミド型分子プローブは簡便に合成でき、操作性やLC-MS/MS解析効率を向上できることから、多くの相互作用系への応用が期待される。

参考文献

- 1) T. Tomohiro, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 13502.
- 2) N. Kumar, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 1526.
- 3) N. Shanguan, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7754–7755

2-院-5

時間領域NMRを応用した各種崩壊剤の吸湿挙動評価と薬物安定性との関連性

○おおぎこうすけ大城公祐¹, ひらいだいじろう平井大二郎², くまだしゅんご熊田俊吾², こすぎあつし小杉敦², はやしよしひろ林祥弘^{1,2}, おおぬきよしのり大貫義則¹

(¹富山大院薬, ²日医工株式会社)

【背景・目的】 市販される錠剤の多くはpress through package (PTP) の個別包装とともに、患者の服用分ごとの一包化調剤を目的としてバラ包装 (ボトル包装) の包装形態でも販売される。バラ包装が可能な錠剤を設計する上で、添加剤の吸湿特性とそれに伴う物性変化の理解は極めて重要な検討項目である。例えば、加水分解を受ける薬物を配合した錠剤の場合、錠剤の吸湿による薬物の加水分解は、配合する添加剤の種類によって大きく変化することが知られている。この主な原因として、添加剤の種類によって吸湿する水分量や、水分子の運動性が異なり、これらの吸湿特性の違いが薬物の安定性に影響していると考えられる。なお、我々はこれまでに様々な崩壊剤の物性を詳細に評価してきており、崩壊剤は、その種類によって水分子との相互作用が著しく変化することを見出している。以上の知見を考え合わせ、本研究では、代表的な15種類の崩壊剤の吸湿挙動を詳細に評価し、さらにアセチルサリチル酸 (acetylsalicylic acid, ASA) をモデル薬物として崩壊剤の吸湿に伴う薬物の加水分解への影響について検討することとした。

【方法】 吸湿挙動の評価 : 各崩壊剤粉末を恒温恒湿条件 (40°C、75%RH) で保存し、サンプリング時間ごとに時間領域核磁気共鳴 (time domain-nuclear magnetic resonance, TD-NMR) によって試料の T_2 緩和挙動の測定を行った。

薬物安定性の評価 : ASAと各崩壊剤の物理混合物およびそれらを配合したASA配合錠を上記の条件で一定期間保存した。そして、ASAの加水分解によって生じるサリチル酸を高速液体クロマトグラフィーによって定量し、ASAの分解率を求めた。

【結果・考察】 恒温恒湿条件で保存した各崩壊剤の T_2 緩和挙動をTD-NMRによって測定したところ、得られたNMR信号には明確な変曲点が観察され、崩壊剤粉末由来および吸湿した水由来の T_2 緩和挙動を分離できることが明らかになった。そこで、水由来の T_2 緩和挙動を求め、試料が吸湿した水分量と、分子運動性を定量的に評価することとした。経時的な試料の吸湿挙動を評価した結果、崩壊剤粉末が吸湿した水分量の増加に伴い、水の T_2 緩和時間も延長し、分子運動性が上昇する傾向が明らかになった。また、各崩壊剤における吸湿特性を比較した結果、クロスロピドンが吸湿した水分子の T_2 緩和時間は他の崩壊剤に比べて著しく長く、運動性が高いことが明らかになった。なお、試料間の吸湿量は T_2 緩和時間ほどの違いは見られなかった。続いて、ASAと各崩壊剤の物理混合物を恒温恒湿条件で一定期間保存し、ASAの分解率を評価した。その結果、クロスロピドン混合物において顕著なASAの加水分解が観察された。さらに、ASA配合錠を用いた検討においても、同様の結果が得られた。以上の結果より、錠剤が吸湿した水分子の運動性が薬物の安定性に寄与する可能性が示された。すなわち、クロスロピドンが吸湿した水分子の運動性は高いため、ASAの加水分解を惹起すると考えられる。

2-院-6

オオケビラゴケが生産するビベンジルカンナビノイドの生合成研究

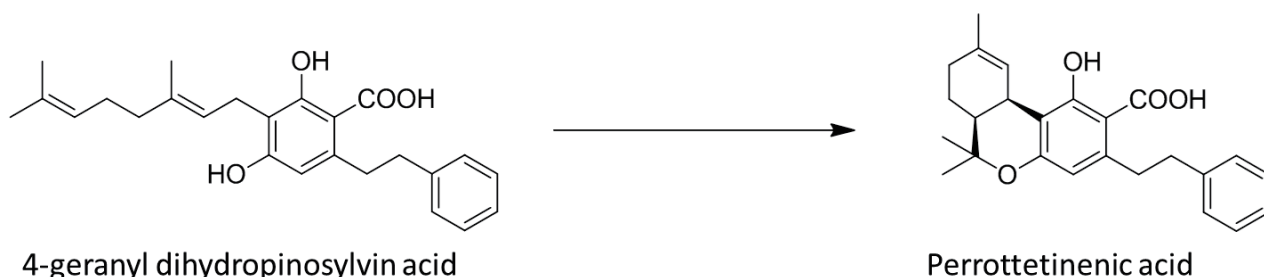
○中川竜¹、黒崎文也¹、田浦太志¹、保野陽子²、品田哲郎² (¹富山大院薬、²大阪市立大院理)

【目的】オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) が生産するビベンジルカンナビノイドの perrottetinene は大麻の幻覚活性成分 tetrahydrocannabinol に類似した興味深い構造を有するが、その生物活性および生合成メカニズムに関しては全く検討されていないのが現状である。本研究ではビベンジルカンナビノイド生合成酵素の遺伝子クローニングおよび構造機能解析を目的とする。

【方法】大麻のカンナビノイドは、FAD oxidase に属するカンナビノイド合成酵素によって基質のゲラニル基が酸化閉環されることにより生成する。本研究では先ず始めにオオケビラゴケ新鮮葉のトランスクリプトームデータを構築し、生合成酵素の候補遺伝子として FAD oxidase のホモログ (RpOx1-3) をコードする配列を同定した。次いで *Pichia pastoris* を宿主として各 RpOx の組み換え酵素を発現し、酵素活性の測定により生合成酵素遺伝子の同定を試みた。

【結果】 RpOx 1-3 遺伝子を *Pichia pastoris* KM71H 株に導入し、得られた組換え体より粗酵素液を調製して、各種の基質を用いアッセイを行った。始めに perrottetinene の生合成前駆体と推定した 4-geranyl dihydropinosylvin を基質とする反応では、いずれの組み換え酵素を用いた場合も生成物は確認されなかった。一方、大麻カンナビノイドの生合成前駆体である cannabigerolic acid を用いて検討したところ、RpOx3 のアッセイにおいて酸化閉環反応により既知カンナビノイドの一種 cannabichromenic acid が生成することが確認された。このため RpOx3 が生合成酵素の候補であると判明し、また基質カルボキシル基の存在が酵素反応に不可欠である可能性が示唆された。そこで 4-geranyl dihydropinosylvin acid を新たに有機合成し、RpOx3 の酵素反応に供したところ、LC-ESI-MS により酸化生成物の明確なピークが確認された。現在ラージスケールの酵素反応による本生成物の単離、構造決定について検討を行っている。また RpOx3 に関してはこれを電気泳動上単一に精製するシステムを既に確立したことから、各種酵素学的性質に関してもあわせて報告する予定である。

【考察】 RpOx3 の性質から、オオケビラゴケのビベンジルカンナビノイドは下図のようにカルボン酸を有する形で生合成された後、脱炭酸により perrottetinene が生じる可能性が考えられる。



【参考文献】 Toyota M, Kinugawa T, Asakawa Y (1994) Bibenzyl cannabinoid and bisbibenzyl derivative from the liverwort *Radula perrottetii*. *Phytochemistry* 37: 859

2-院-7

東アジア大陸から長距離輸送される多環芳香族炭化水素類：能登半島と福江島の比較分析

○楊露¹⁾， 張露露¹⁾， 周全渝¹⁾， 張璇¹⁾， 高見昭憲²⁾， 佐藤圭²⁾， 清水厚²⁾， 吉野彩子²⁾，
まつきあつし³⁾， はやかわかずい³⁾， とりばあきら¹⁾， とうねい^{1,3)}
(金沢大医薬保¹⁾， 国環研²⁾， 金沢大学環日セ³⁾)

【はじめに】多環芳香族炭化水素 (PAHs) 及びそれらのニトロ誘導体 (NPAHs) の多くは、強い発がん性/変異原性/内分泌かく乱作用を有する。大気中 PAHs, NPAHs は、主に石油、石炭等の化石燃料やバイオマスの不完全燃焼や有機物の熱分解によって生じる。これらの PAHs, NPAHs は PM_{2.5} の構成成分であるため、ヒトへの健康リスクが高いとされている。都市域における大気中 PAHs, NPAHs は、自動車や工場など地元で作られたものが多いが、東アジアモンスーンの風下に位置する日本は、初冬から春先にかけて、中国に代表されるアジア大陸で生成した高濃度の PAHs, NPAHs の越境輸送による影響も受けている。特に日本海や東シナ海に面する地域でその影響が顕著であることは既に発表らにより証明されている。本研究では、同じ時期に長距離輸送 PAHs, NPAHs の日本の異なる地域への影響を明らかにするために、日本の典型的なバックグラウンドサイトで同時観測を行った。

【方法】PM_{2.5} は、能登半島の先端に位置する輪島観測局 (WAMS：金沢大学) と福江島観測局 (FAMS：国立環境研究所) で、PM_{2.5} 分級装置付きハイボリウムエアサンプラーを用いて同時に捕集した (Fig. 1)。同時調査は、大陸からの影響が強いとされる春季 (2017 年 4 月 10 日～21 日) に行った。なお、PM_{2.5} の捕集フィルターは毎日交換した (am 10:00 - am 09:00)。捕集したフィルターは所定な方法で恒量・秤量したのち、9 種の PAHs (fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene, indeno[1,2,3-cd]pyrene) 及び 5 種の NPAHs (1,6-, 1,8- dinitropyrenes, 2-nitropyrene, 2-nitrofluoranthene, 1-nitropyrene) をそれぞれ蛍光検出/HPLC 法、化学発光検出/HPLC 法を用いて定量した。



Fig. 1 Sampling sites

【結果及び考察】FAMS の大気中 PM_{2.5} の平均濃度は 23.2 µg/m³ であり、WAMS (8.6 µg/m³) のそれより有意に高かったが、その主原因は 4 月 19 日に FAMS に飛来した黄砂の影響であった。(Fig. 2-A)。一方、両サイトの大気中総 PAHs 及び総 NPAHs の平均濃度は、WAMS では 368 pg/m³ と 3.56 pg/m³ であり、FAMS では 392 pg/m³ と 6.20 pg/m³ であり、いずれも大差がなかった。しかし、Fig. 2-B と Fig. 2-C に示されたように、両サイトの大気中 PAHs, NPAHs 濃度推移にピークの位相がずれていたため、長距離輸送される大気汚染物質の日本への影響は、場所によって必ずしも同じではないことが示唆された。さらに、調査期間中の気象条件及び後方流跡線解析法を合わせて解析した結果、同じ時期においても気圧配置の違いにより、両サイトに到達した空気塊の輸送元と経路が異なることはそれらの違いを引起した主要因と推測した。

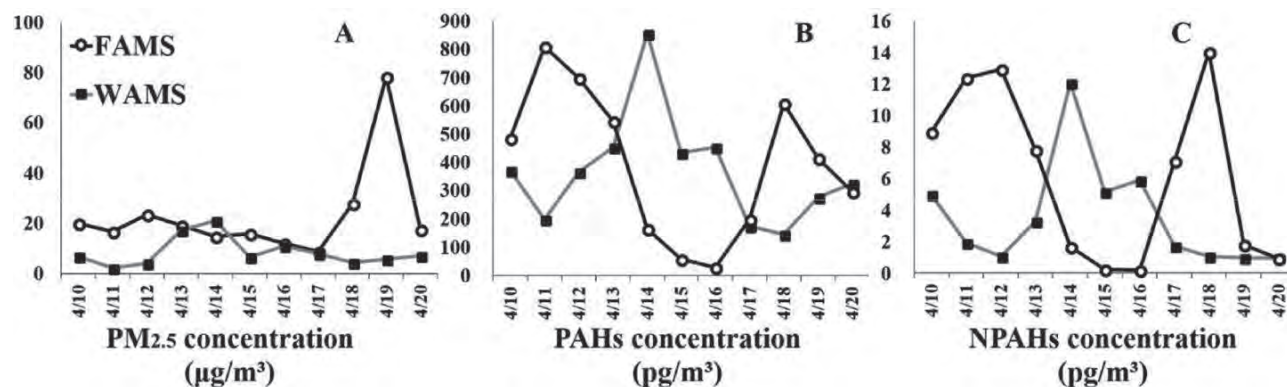


Fig. 2 The concentration trend of PM_{2.5}, PAHs and NPAHs during the sampling periods at two sites

Interaction of naphthalene with KOSA particles collected from different Chinese deserts in the aqueous solution

○Lulu Zhang¹, Lu Yang¹, Quanyu Zhou¹, Xuan Zhang¹, Yongjie Wei², Min Hu³, Lixia Zhao⁴, Jianrong Bi⁵, Kazuichi Hayakawa⁶, Akira Toriba⁷, Ning Tang^{6,7}

Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University¹, State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environment Sciences², College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University³, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences⁴, College of Atmospheric Sciences, Lanzhou University⁵, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University⁶, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University⁷

Introduction

Asian dust (called KOSA in Japanese), the major source of mineral aerosols, can be blown eastward and widely transported to East China, Taiwan, Korea, and Japan. During long-term transportation, KOSA is supposed to mix with anthropogenic pollutants and involve in the heterogenic reactions with acidic species and volatile organic compounds (VOCs). The uptake of atmospheric pollutants on KOSA particles can lead to the degradation of parent compounds and the formation of products, which will greatly affect the composition of the atmosphere. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a group of semi-volatile organic carbons, are widely generated in the incomplete combustion and present a fairly high health risk. The derivatives of PAHs, such as hydroxylated PAHs (OH-PAHs), oxygenated PAHs (OPAHs), and nitrated PAHs (NPAHs), are more toxic than their parent PAHs because of the direct-acting mutagenicity and carcinogenic properties. Since been emitted into the atmosphere, PAHs are rapidly associated with airborne particles and are following involved in atmospheric processes. During sandstorm period, KOSA will pass through several heavily PAH-polluted regions like Shanxi and Hebei along its pathway. As a major component in atmospheric aerosols, suspended KOSA particles might interact with PAH compounds in the local air after deposition. In the current study, the physical properties of different types of KOSA particles were investigated and the basic adsorption behavior of naphthalene, an air pollutant in gas phase, on KOSA particles was observed within the aqueous solution.

Materials and Methods

KOSA samples were collected from 4 different deserts in China, including the Gobi Desert (KOSA 1), Taklamakan Desert (KOSA 2), Horqin Sand Land (KOSA 3), and Loess Plateau (KOSA 4), and they were used as the adsorbent in this study. After pretreatment, KOSA samples were stored in a sealed polytetrafluoroethylene (PTFE) bottle in the dark at room temperature. The particle size distribution of KOSA was determined by laser diffraction method, and the specific surface area was measured by the BET method. Naphthalene (C₁₀H₈), the representative compound of PAHs, was used as the adsorbate. The interaction of naphthalene with different kinds of KOSA samples was investigated separately in the aqueous solution.

Results

The physical properties of KOSA particles differ from desert to desert. KOSA sample collected from Loess Plateau has a finer grain size and a larger specific surface area than those collected from other 3 regions. As no naphthalene had been found in the chromatograms of KOSA samples' methanol extractives before treated and after experiment, the raw KOSA particles have no naphthalene background. And under an experimental condition without interference, there was no chemical reaction between naphthalene and KOSA particles. Based on the adsorption experiments of naphthalene on KOSA particles, we have found that KOSA samples collected from Loess Plateau have shown obvious adsorption of naphthalene in the aqueous solution than other 3 KOSA samples. The adsorption of naphthalene on KOSA 4 was well fitted by Langmuir isotherm, which indicated that naphthalene molecules stick to KOSA 4 particles by a weak physical adsorption with monolayer coverage on the surface.

Amyloid- β と脂質膜の相互作用における膜曲率および酸性リン脂質の影響

○^ささ^き木^{てつ}哲^な哉^{なか}、^お中^{ひろ}尾^{ゆき}裕^い之^け、^い池^{けい}田^{すけ} 恵^{なか}介^の、^み中^の野^の 実^の (富山大院・薬)

【背景・目的】

39-42 残基のタンパク質である Amyloid- β タンパク質(A β)はアルツハイマー病(AD)の病的特徴の一つである老人斑の主要構成成分である。A β の凝集によるアミロイド線維形成と患者脳内での蓄積が AD 発症に大きく影響しているという、アミロイドカスケード仮説が現在広く支持されている。過去の研究で脂質膜が A β の凝集、アミロイド線維の形成を促進することが明らかとなった。さらに、細胞内の後期エンドソームである Multi Vesicular Body (MVB)やそこから放出されたエキソソーム等の膜構造に A β が蓄積していること、それらの A β が線維を形成し膜構造を破壊することなどが報告されている。これまでに当研究室では、大きな膜曲率をもつ脂質膜上で A β の構造変化、線維形成が促進されることを明らかにした。しかし、相互作用のメカニズム、A β の脂質膜上での構造変化の詳細は不明である。そこで本研究ではさらに A β の膜結合における膜曲率や酸性リン脂質の影響、結合した A β の構造変化の熱力学を明らかにすることを目的とした。

【方法】

脂質膜モデルとして膜曲率の大きいリポソームである Small Unilamellar Vesicle (SUV) (粒径：約 30 nm)と膜曲率の小さい Large Unilamellar Vesicle (LUV) (粒径：約 100 nm)を調製した。MVB 小胞の脂質組成を模倣し、L- α -phosphatidylcholine (Egg-PC) : Sphingomyelin (Egg-SM) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) : 1-stearoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Lyso-PC) = 26 : 20 : 26 : 19 : 9 の比率で混合しリポソームを調製した。A β [1-40]の 10 番目のチロシンをトリプトファンに変異させた A β (Y10W)にリポソーム溶液を添加した。リポソーム添加によるトリプトファンの蛍光スペクトルの変化から A β と脂質膜の結合を評価した。また、A β とリポソーム溶液を混合し、37°Cでインキュベーションした後、チオフラビン T を用いてアミロイド線維形成を評価した。

【結果・考察】

膜曲率が大きな MVB 小胞モデルリポソームに対して A β の結合量が増大し、アミロイド線維形成が促進された。このことから、膜曲率が大きくなることでリン脂質頭部間の隙間が広がり、A β が結合しやすくなると示唆される。MVB 小胞モデルから酸性リン脂質である POPS を除去したりリポソームに対して A β の結合量が減少し、線維形成能は低下した。このことから、A β と脂質膜との結合には静電相互作用が大きく寄与することが示唆される。次に、A β に POPS の単一組成のリポソームを添加していくと、蛍光強度が増大した後に減少が見られた。CD スペクトルから Lipid/Peptide 比が小さいと β シート構造、大きいと α ヘリックス構造を多く含むことがわかった。トリプトファン蛍光スペクトルの変化を解析することで、脂質膜存在下における A β の状態変化を三状態モデルで説明することができた。本発表では、脂質膜上での A β の構造変化・分子会合を熱力学的に解析し、報告する。

2-院-10

示差走査熱量測定を用いたセラミドⅢの結晶性の低下をもたらす物質の探索

○岩下侑矢、中尾裕之、池田恵介、中野実 (富山大学院薬)

【背景および目的】

セラミドは角質層の細胞間脂質の主要成分である。加齢やストレスなどにより、またアトピー性皮膚炎患者においてセラミド量が低下することが知られている。塗布によるセラミドの角質層への補給は、皮膚バリア能を維持する有効な手法であるが、セラミドの高い結晶性のため困難である。本研究では、セラミドの外部からの供給の足掛かりとして、セラミドの結晶性を低下させる物質の探索を試みた。

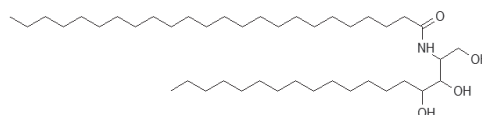


Fig. 1. Chemical structure of ceramide III

【方法】

本研究では、セラミドⅢ (Fig. 1) を用いた。セラミドⅢを種々の物質と混合し、グリセロールで溶媒和させた。示差走査熱量測定 (DSC) によって 3°C/min の昇降温速度で 20→130→20→130°C に加熱および冷却し、熱量変化を観測した。このとき、冷却過程におけるサーモグラムの発熱ピークの立ち上がり温度を相転移温度 (T_f) と定めた。これを束一的性質に基づくセラミドⅢの凝固点降下の理論値 (eq. 1) と比較することで、セラミドⅢの結晶性の低下を評価した。

$$T_f = \left[\frac{1}{T_f^*} - \frac{R}{\Delta_f H} \ln x_{\text{cer}} \right]^{-1} \quad (\text{eq. 1})$$

ここで T_f^* 、 $\Delta_f H$ は純粋なセラミドⅢの凝固点および融解エンタルピー (ただしグリセロール中での値)、 x_{cer} はセラミドⅢのモル分率である。

【結果および考察】

種々の物質と混合したセラミドⅢの T_f のモル分率依存性を Fig. 2 に示す。純粋なセラミドⅢの T_f は 104°C に観察され、種々の物質との混合により低下した。中性リン脂質 (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、1,-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)) との混合によるセラミドⅢの T_f の減少は凝固点降下の理論値とほぼ一致したことから、セラミドⅢはこれらの物質と T_f 以上で混合し、以下では混合しないことが判明した。一方、炭素数 10~18 の脂肪酸や酸性リン脂質 (1,-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (POPA)) との混合では、セラミドⅢの T_f は理論値よりも大きく低下したことから、混合状態がより安定化されることが示唆された。カルボキシ基やリン酸基との相互作用がセラミドⅢとの混合性の向上に寄与したものと考えられる。

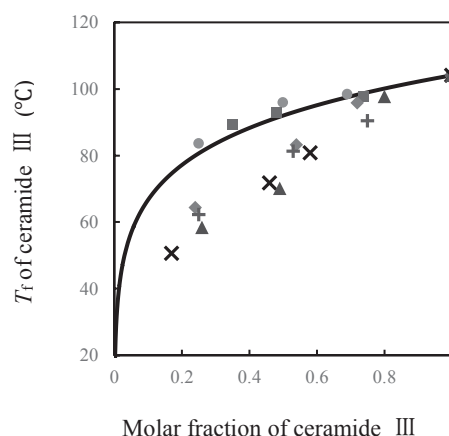


Fig. 2. Ceramide III molar fraction dependence of T_f of ceramide III mixed with various substances (●:DPPC, ■:POPC, ◆:POPA, ▲:Capric acid (10:0), +:Palmitic acid (16:0), ×:oleic acid (18:1)). Solid line represents the theoretical curve derived from eq. 1.

一般演題(領域1)

1-一般-1

ラット中大脳動脈閉塞モデルでの脳梗塞障害におけるブラジキニンの関与

○^{まつお ゆり}松尾由理^{1,2}、^{いけうちまなぶ}池内学²、^{さ さ き やすはる}佐々木泰治² (北陸大薬¹、北里大薬²)

【背景および目的】

我々はこれまでに、脳梗塞障害における炎症反応の関与について検討を行い、炎症性メディエーターであるプロスタグランジン E₂ の重要性を示してきた。同じく炎症性メディエーターとして知られるブラジキニン (BK) は、キニン-カリクレイン系メディエーターとして知られ、末梢炎症反応や痛みに寄与することが知られている。近年中枢での BK の役割も注目され、脳梗塞障害後の梗塞部位に BK が産生することが報告されている。本研究では、脳梗塞後の BK 産生機序とその役割を明らかにするため、BK の前駆体であるキニノーゲン (KNG) の欠損ラットを用いて、脳梗塞障害への KNG、BK の役割について検討を試みた。

【方法】

野生型或いは自然誘発 KNG 欠損型 Brown/Norway rat の中大脳動脈を 1 時間閉塞-24 時間再灌流後に、片麻痺などの行動障害をスコア化により解析した後、脳を摘出した。脳梗塞体積を TTC 染色により、脳浮腫は脳の凍結乾燥による重量変化により検討した。脳内ブラジキニン量は、市販のキットにて測定した。大脳動脈にカニューレを挿入し、血圧を測定した後、血液を採取して生理学的パラメーター (pH, pCO₂, pO₂) を測定した。アポトーシスの検討は、TUNEL 染色、抗 caspase-3 抗体染色により行った。各受容体発現は qRT-PCR 法にて解析した。

【結果および考察】

一過性脳虚血 24 時間後に、野生型ラットでは顕著な脳梗塞が認められたのに対し、KNG 欠損型ラットでは WT に比べ顕著且つ有意に梗塞体積が小さかった。この時の、梗塞側の脳体積および脳水分量の増加も KNG 欠損型ラットでは野生型ラットに比べ有意に低値だった。さらに、脳虚血後の体重減少と片麻痺などの神経学的行動障害についても、KNG 欠損型ラットでは野生型ラットに比べ有意に軽度だった。従って、脳虚血後の脳梗塞と脳浮腫、行動障害に KNG が寄与することが示唆された。また野生型ラット梗塞部位にて多数認められた TUNEL 及び caspase-3 陽性細胞は、KNG 欠損型ラットでは顕著に少なかったことから、梗塞部位の神経アポトーシスにも KNG が寄与すると考えられた。この時、野生型ラットで見られる虚血後の脳内 BK 量増加は、KNG 欠損型ラットでは完全に消失していた。従って、脳梗塞後の BK 産生に、KNG が必須であることが明らかとなった。一方、虚血による脳血流量変化、血圧、血中 pO₂、pCO₂、pH、脳底血管走行については、両遺伝子型間で顕著な差は認められなかった。さらに、脳内の BK 受容体の発現を検討したところ、野生型ラット梗塞部位で B1 受容体、B2 受容体の顕著な発現増加が認められたが、KNG 欠損型ラットでは発現誘導が軽度であった。従って、脳虚血後に産生される BK は、自身の受容体の発現を誘導し、BK シグナルを増強させると考えられた。

以上の結果から、脳梗塞後に KNG より産生される BK は、B1 及び B2 受容体に作用することで、神経アポトーシスを促進させ、脳梗塞障害を悪化させることが示唆された。カリクレイン-キニン系が、脳梗塞治療の新たなターゲットになるものと期待される。

1-般-2

パーキンソン病に関連するリソソーム局在 P 型 ATPase の病態生理機能の解明

○鄭仕州^{ていししゅう}、藤井拓人^{ふじいたくと}、清水貴浩^{しみずたかひろ}、酒井秀紀^{さかいひでき}（富山大院・薬・薬物生理学）

【背景および目的】

パーキンソン病は神経細胞脱落を起因とする神経変性疾患であるが、発症機序の全容解明には至っていない。本研究では、神経細胞のリソソームに局在し、近年国内外のパーキンソン病患者において複数の変異が見つかった新規膜輸送タンパク質 Lyso-ATPase に着目した。Lyso-ATPase は、10 回膜貫通構造をとり、P 型 ATPase としての機能に重要なドメインを全て有していることから P 型 ATPase として機能すると推察されているが、その輸送イオン種を含む生理機能は未解明である。そこで、Lyso-ATPase のイオン輸送機能およびパーキンソン病患者において報告されている変異が Lyso-ATPase の発現および機能に与える効果について検討した。

【方法】

ヒト Lyso-ATPase の全長クローニングを行い、N 末端に Xpress-tag を付加したベクターに組み込んだ。また、パーキンソン病患者において報告されている R449Q、G533R、A746T および R980H 変異体、また P 型 ATPase の機能に重要な自己リン酸化部位の変異体 (D513N) を作製した。Lyso-ATPase の野生型 (WT) と変異体の発現ベクターをヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗 Xpress-tag 抗体を用いて発現および細胞内での局在を観察した。Lyso-ATPase (WT) と変異体をトランスフェクションした HEK293 細胞の膜画分を用いて、ATP 加水分解活性を測定した。

【結果および考察】

Lyso-ATPase 発現細胞の膜画分における抗 Xpress 抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、目的分子量サイズである約 135 kDa にシングルバンドを検出した。また免疫蛍光染色において、Lyso-ATPase の局在は、リソソームマーカーである Lamp1 と大部分が一致した。次に、Lyso-ATPase 発現細胞より調製した膜画分における ATPase 活性について検討した。中性条件 (pH7.4) において様々なイオン存在下で ATPase 活性を測定したが、空ベクター発現 (mock) 細胞より調製した膜画分における ATPase 活性に比べて有意な上昇は観察されなかった。しかし、興味深いことに、弱酸性条件 (pH6.5) において、160 mM の K⁺存在条件下で mock 細胞に比べて有意な ATPase 活性の上昇が観察された。この ATPase 活性の上昇は自己リン酸化部位を変異させた D513N 変異体発現細胞で消失したことから、この ATPase 活性は Lyso-ATPase に由来することが示唆された。Lyso-ATPase 活性は、反応溶液中の K⁺濃度を減少させることで有意に抑制された。また、反応溶液中の K⁺を Na⁺に置換した場合においても Lyso-ATPase 活性は消失した。次に、パーキンソン病患者において報告されている R449Q、G533R、A746T、R980H 変異体の発現および ATPase 活性について検討した。A746T および R449Q 変異体発現細胞における Lyso-ATPase の発現レベルは、WT 発現細胞に比べて有意な差は見られなかったが、G533R および R980H 変異体発現細胞では著しく低下した。A746T および R449Q 変異体発現細胞において Lyso-ATPase の局在は、WT 発現細胞での局在と変化は見られなかった。A746T および R449Q 変異体発現細胞において、Lyso-ATPase 活性を測定したところ、mock 細胞における活性と同程度まで有意に減少した。

以上の結果より、Lyso-ATPase はリソソームにおいて、弱酸性条件下で活性化される K⁺輸送性の P 型 ATPase として機能することが示唆された。また、パーキンソン病関連変異体において、Lyso-ATPase の発現および機能が抑制されたことから、Lyso-ATPase の発現および機能異常がパーキンソン病に関連している可能性が考えられた。

1-般-3

血液脳関門における imipramine 輸送特性解明

○韓 明来, 赤沼伸乙, 久保義行, 細谷健一 (富山大院薬)

【目的】 Imipramine は抗うつ薬であり, その主な抗うつ作用は脳内神経末端の細胞膜タンパク質を阻害することで発現する. Imipramine の適切な使用のため, 脳と循環血液との薬物交換を担う血液脳関門 (BBB) における輸送特性解明が重要である. Imipramine はカチオン性化合物であり, BBB には各種カチオン性化合物を輸送するメカニズムが知られている. 脳から循環血液への薬物排出には, P-糖タンパク質 (MDR1) が関与しており, 循環血液から脳への薬物移行には, 有機カチオントランスポーターである organic cation/carnitine transporters (OCTN1-2) や organic cation transporters (OCT1-3) に加え, pyrilamine や nicotine などを認識する輸送機構が知られている. 本研究では, BBB における imipramine 輸送特性解明を目的とした.

【方法】 *In vivo* ラット循環血液から脳への³H]imipramine 輸送は, brain uptake index (BUI) 法によって解析した. 脳から循環血液への³H]imipramine 排出クリアランスを得るため, brain efflux index 法と brain slice uptake 法を実施した. BBB における ³H]imipramine 輸送特性は, *in vitro* BBB モデル細胞である条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞株 (TR-BBB13 細胞) を用いて解析した.

【結果・考察】 循環血液から脳への³H]imipramine 移行性を表す BUI 値は 92%であり, 本数値から算出される imipramine の BBB を介在 influx clearance 値は 705 $\mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g brain})$ であった. 一方, ³H]imipramine の脳から循環血液への efflux clearance 値は 398 $\mu\text{L}/(\text{min}\cdot\text{g brain})$ であり, influx clearance の約 1/2 倍であった. 本結果から, BBB を介した imipramine の輸送は influx が優位であることが示唆された. TR-BBB13 細胞における³H]imipramine 取り込みは, 時間依存性および飽和性を示し, K_m 値は 38 μM , 最大取り込み速度は 2.7 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg protein})$ であった. さらに, TR-BBB13 細胞における³H]imipramine 取り込みは tetraethylammonium や verapamil, quinidine, pyrilamine, amantadine, clonidine のようなカチオン性化合物共存下において 40%以上阻害された. 一方, カチオン性化合物である propranolol や nicotine, OCT の基質である choline, OCT や plasma membrane monoamine transporter (PMAT) の基質である 1-methyl-4-phenylpyridinium, OCTN2 の基質である L-carnitine によって取り込みは阻害されなかった. この結果から, BBB における imipramine 輸送機構は, ある有機カチオン性化合物に対して認識性を示すことが明らかになった. 以上から, BBB を介した imipramine 輸送には, 既知の輸送機構とは異なるメカニズムの関与が示唆された.

1-一般-4

NMDA 受容体による血液脳関門を介したアニオン輸送機構変動解析

○吉田 有紀子, 赤沼 伸乙, 久保 義行, 細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】 血液脳関門 (BBB) に発現するトランスポーター Oat3 や Mrp4 はドパミン代謝物のホモバニリン酸や炎症物質のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) など, 脳内で産生される有機アニオン性化合物の排出輸送を担うことが示唆されている. 我々は, PGE₂ の BBB 介在排出輸送について, ラット大脳皮質への興奮性神経伝達物質である L-グルタミン酸の処理によって排出輸送能が低下することを見出している. てんかんなどの興奮性神経伝達に関わる疾患時には, 脳内 L-グルタミン酸レベルや PGE₂ 濃度の上昇が報告されていることから, L-グルタミン酸による PGE₂ 排出低下の詳細な分子メカニズム解明は, これら疾患時における脳内環境正常化に繋がると期待される. BBB における排出輸送担体の機能変動メカニズムを明らかにする方法として, BBB の実体である脳毛細血管を単離し, トランスポーター蛍光基質を用いた輸送解析が知られている. Mrp4 介在輸送を評価する蛍光基質として fluo-cAMP が報告されており, 本研究では, fluo-cAMP が Oat3 の基質となるかを明らかにし, 本化合物を用いて BBB における有機アニオン排出輸送機構の変動を解析することを目的とした.

【方法】 Oat3 発現アフリカツメガエル卵母細胞 (oocytes) を調製し, fluo-cAMP 輸送活性を評価した. ラット脳毛細血管をナイロンメッシュ連続濾過法にて単離し, fluo-cAMP 処理後の毛細血管管腔側への fluo-cAMP 蓄積量を測定し, 脳から循環血液への排出輸送の指標とした.

【結果・考察】 Oat3 発現 oocyte において fluo-cAMP の取り込みは有意に増加し, fluo-cAMP が Oat3 の基質であることが示唆された. ラット単離脳毛細血管管腔における fluo-cAMP 蓄積量は, Oat3 および Mrp4 の阻害剤である probenecid や dipyridamole の共存によって 32% 以上低下し, 有機カチオン性薬物である pyrilamine 共存にて変化しなかった. 従って, 単離脳毛細血管管腔側への fluo-cAMP 蓄積量は, BBB における Oat3 及び Mrp4 の輸送機能を反映していることが示唆された. L-グルタミン酸処理による脳毛細血管管腔への fluo-cAMP 蓄積量変化を解析した結果, 本処理によって管腔内 fluo-cAMP 蓄積量は 17% 以上低下した. L-グルタミン酸は各種細胞膜受容体に結合し, 細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることが報告されている. L-グルタミン酸処理時に細胞内 Ca²⁺キレート剤である BAPTA-AM を共存させることで, L-グルタミン酸による管腔内 fluo-cAMP 蓄積の低下は示されなかったことから, L-グルタミン酸による Oat3 および Mrp4 輸送機能低下に細胞膜 L-グルタミン酸受容体の関与が示唆された. さらに, L-グルタミン酸による管腔内 fluo-cAMP 蓄積量の低下は N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体アンタゴニストである MK-801 共存にて消失した. 以上の結果から, 血液脳関門における Oat3 及び Mrp4 介在物質輸送機能は NMDA 受容体活性化によって減弱することが示唆された.

1-一般-5

視床下部オレキシン系による肥満と非アルコール性脂肪肝炎の防御効果

○高田慎治郎¹ 恒枝宏史¹ 今寛太¹ 前田貴大¹ 大塚小由希¹ 関根崇洋¹ 高崎一郎² 和田努¹ 笹岡利安¹ (富山大院薬・病態制御薬理学¹、富山大院理工²)

【背景および目的】

今日、脂肪の過剰摂取などが原因で肥満者人口が激増し、それに伴う非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の罹患者数の増加が社会的問題となっている。肝臓への過剰な脂質蓄積は、炎症や線維化を伴う NASH の発症を誘発し、肝硬変や肝がんなどの重篤な疾患の発症リスクを増加させる。NASH 病態の進展過程では多数の因子が関与するが、その機序は複雑であり、詳細は不明である。肥満防止のためのエネルギーバランス調節機構には中枢神経系が重要な役割を果たしている。特に、視床下部オレキシン系は覚醒を維持し、自発運動やエネルギー代謝を亢進させ、肥満を抑制するので、NAFLD/NASH の発症を防止する新規標的としての可能性が考えられる。しかし、肥満に伴う代謝疾患に対するオレキシンの機能的意義は不明である。そこで本研究では、高脂肪食摂取に伴う肥満病態でのオレキシン欠損が代謝機能に与える影響を解析した。

【方法】

雄性または雌性のオレキシン欠損マウスに 16-24 週間高脂肪食 (HFD) 負荷を行った。また、閉経後肥満モデルとして雌性オレキシン欠損マウスの卵巣を摘出 (OVX) し、HFD 負荷または高脂肪高フルクトース食 (HFFD) 負荷を 20 週間行った。肝臓および脂肪組織の mRNA 発現は RT-qPCR 法で解析した。肝臓の miRNA 発現は GeneChip microarray 法で解析した。肝線維化は Hematoxylin-Eosin 染色および Sirius-red 染色で病理学的に評価した。

【結果】

雄性オレキシン欠損マウスは HFD 負荷により、野生型と比較し、著明な肥満、耐糖能異常およびインスリン抵抗性を示した。肝臓や脂肪組織では炎症マーカーの遺伝子発現が、野生型と比較して、より早期に増加した。肝障害マーカーである血中 AST および ALT の濃度もオレキシン欠損により顕著に増加した。GeneChip による肝臓 miRNA の網羅的解析では、NAFLD や 2 型糖尿病などの代謝疾患に関連する発現プロファイルの変化が認められた。さらに組織学的所見において、肝線維化がオレキシン欠損マウスにおいてのみ生じることを見出した。雌性でも雄性と同様に、HFD 負荷オレキシン欠損マウスにおいて肝臓や脂肪組織の炎症マーカー遺伝子の発現増加および肝線維化が認められた。OVX による閉経後肥満病態では、オレキシン欠損に伴う肝線維化がより顕在化した。特に、HFFD 負荷条件下ではオレキシン欠損マウスの肝臓において重度の線維化が認められた。

【結論】

本研究では、視床下部オレキシン系の破綻が肥満を増大させ、肝臓において線維化を伴う NASH 様病態を誘発することを見出した。以上より、肥満状態においてオレキシン系は脂肪肝から NAFLD/NASH への進展を防止する重要な因子であり、肥満に伴う代謝疾患に対する新規の薬物治療標的であると考えられる。

1-般-6

強心配糖体によるヒト肝ガン細胞のグルコース輸送体 (GLUT1) のトラフィック制御機構

○おおつばまなみ大坪愛実¹、ふじいたくと藤井拓人²、しみずたかひろ清水貴浩²、さかいひでき酒井秀紀² (富山大・薬¹、富山大・院薬²)

【背景および目的】

正常細胞では主にミトコンドリアの電子伝達系で ATP が合成される。しかし、ガン細胞では電子伝達系での ATP 合成が抑制されており、好氣的な条件においても ATP 産生の大部分を解糖系に依存している (Warburg 効果)。解糖系はエネルギー産生効率が悪いが、ガン細胞の原形質膜ではグルコース輸送体 GLUT1 が高発現しており、グルコース取込み能が大きく亢進している。他方、ナトリウムポンプ (Na⁺,K⁺-ATPase) 阻害剤である強心配糖体は、古くから心不全治療薬として用いられているが、近年抗腫瘍効果が注目されている (Fujii et al., BBA-Mol. Basis Dis., in press)。本研究では、強心配糖体がヒト肝ガン細胞における GLUT1 の発現および細胞内分布に及ぼす効果を検討した。

【方法】

原形質膜に GLUT1 が高発現しているヒト肝細胞ガン由来 HepG2 細胞を使用した。強心配糖体として ouabain、oleandrin および digoxin を用いた。GLUT1 の発現および局在は抗 GLUT1 抗体を用いたウェスタンブロット法および免疫細胞染色法により検討した。HepG2 細胞のグルコース取込み能は、³[H⁺]-2-deoxy-d-glucose (³[H⁺]-2-DOG) を用いたトレーサー実験により評価した。細胞増殖能は、強心配糖体処理から 24 時間で増殖した細胞数を計測することで評価した。

【結果および考察】

ヒト肝細胞ガン由来 HepG2 細胞に ouabain、oleandrin および digoxin (20 nM、200 nM、2 μM) を処理すると、原形質膜における GLUT1 発現レベルが濃度依存的に減少した。また GLUT1 の原形質膜での発現レベルの低下に相関して、HepG2 細胞の ³[H⁺]-2-DOG 取込みも抑制された。これら効果の濃度依存性は、強心配糖体が HepG2 細胞の増殖を抑制する濃度依存性と一致したが、Na⁺,K⁺-ATPase のイオン輸送活性を抑制する濃度依存性よりも低かった。強心配糖体による GLUT1 の原形質膜での発現レベルおよび ³[H⁺]-2-DOG 取込みの減少は、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤 dynasore (150 μM) 処理により有意に抑制された。また、強心配糖体処理により HepG2 細胞のトータルライセートにおける GLUT1 の発現量も有意に減少し、この減少は、リソソーム阻害剤 bafilomycin (10 nM) により阻害されたが、プロテアソーム阻害剤 MG-132 (1 μM) では阻害されなかった。次に、強心配糖体が誘導する GLUT1 発現抑制機構に関与する細胞内シグナルを検討した。様々な阻害剤の効果を検討したところ、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) 阻害剤 KN-93 (20 μM) および細胞内 Ca²⁺キレート剤 BAPTA-AM (25 μM) により、強心配糖体による GLUT1 発現抑制効果が阻害されることを見出した。

以上の結果から、強心配糖体は Ca²⁺/CaMK II シグナルの活性化を介して GLUT1 のエンドサイトーシスおよびリソソームでの分解を亢進させることで、肝ガン細胞のグルコース取込み機能を阻害し、細胞増殖能を抑制することが示唆された。

1-一般-7

新規プロトンチャネル Otopetrin 3 の機能解析

○栗栖章紘¹、^{くりすあきひろ} 藤井拓人²、^{ふじいたくと} 清水貴浩²、^{しみずたかひろ} 酒井秀紀² (富山大薬¹、富山大院薬²)

【背景・目的】

真核生物において、プロトン (H⁺) を細胞内から細胞外へ選択的に通すイオンチャネルとして VSOP/Hv1 チャネルが同定されていたが、H⁺を細胞内に取込むイオンチャネルは長年不明であった。しかし最近、味細胞に高発現し、細胞外酸性化により活性化され、H⁺を細胞内へと選択的に輸送する分子として Otopetrin 1 (Otop1) が発見された。Otop1 による H⁺輸送は酸味受容に参与することが示唆されている。他方、Otop1 と同じ Otopetrin ファミリーに属する Otop3 は、マウス組織のマイクロアレイ解析データベースにおいて、胃に高発現することが示唆されている。これまで、マウス Otop3 を oocyte に発現させた実験において、Otop1 と同様に H⁺チャネルとして機能することが報告されているが、Otop1 とは異なり、哺乳類由来細胞を用いた詳細な機能解析は行われていない。本研究では、ヒト胃よりクローニングした Otop3 をヒト腎臓由来 HEK293T 細胞に発現させ、イオンチャネル機能の解析を行った。

【方法】

ヒト胃粘膜より Otop3 をクローニングし、GFP タンパク質を同時に発現させることのできる pIRES2-AcGFP1 ベクターに組み込んだ。ヒト Otop3 をヒト腎臓由来 HEK293T 細胞にトランスフェクションし、GFP の蛍光が観察された細胞に対してパッチクランプホールセル記録を行い、Otop3 由来のチャネル電流を測定した。細胞外 (バス) 溶液として、160 mM NMDG-Cl、2 mM CaCl₂、10 mM HEPES (pH=7.4) または MES (pH=5.0, 4.5, 4.0, 3.5)、細胞内 (ピペット) 溶液として、120 mM Cs-aspartate、15 mM CsCl、2 mM Mg-ATP、5 mM EGTA、2.4 mM CaCl₂、10 mM HEPES (pH=7.3) を用いた。また、ヒト Otop3 を Xpress-tag を付与することのできる pcDNA4/His ベクターに組み込み、HEK293T 細胞にトランスフェクションし、抗 Xpress-tag 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色を行った。

【結果・考察】

抗 Xpress-tag 抗体を用いたウェスタンブロットにおいて、Otop3 の目的サイズである約 65 kDa にシングルバンドが検出された。また、HEK293T 細胞の原形質膜において Otop3 の発現が観察された。ヒト Otop3 発現細胞におけるパッチクランプ解析において、Otop1 が活性化される細胞外 pH 5 および pH 4.5 条件下ではチャネル電流の活性化は観察されなかったが、細胞外を pH 4 以下にすることで大きな内向き (H⁺が細胞内に流入する方向) 電流の活性化が観察された。この内向き電流の活性化は、空ベクターをトランスフェクションした mock 細胞において観察されなかったことから、Otop3 発現細胞で観察された内向き電流は Otop3 由来の電流であることが示唆された。Otop3 由来の内向き電流は、Otop1 のチャネル電流を阻害する Zn²⁺ (10 mM) を細胞外に加えることで有意に抑制された。興味深いことに、Otop3 発現細胞において pH 4 で活性化された内向き電流は、時間依存的に不活性化され弱いチャネル電流を維持したプラトーを形成するが、pH 4 から pH 7.4 に戻した際に、再度一過性の大きな内向き電流が活性化されることを見出した。このようなオフ応答電流は、Otop1 では報告されていない。以上の結果より、ヒト Otop3 は、マウス Otop1 と同様に H⁺チャネルとして機能するが、より強酸性条件下において活性化され、オフ応答特性を有することが示唆された。

1-一般-8

PKD2L1 ノックアウトマウスを用いた苦味受容の *in vivo* 解析

○^{しのざきりょう}篠崎 稜¹、^{しみずたかひろ}清水 貴浩²、^{ふじいたくと}藤井 拓人²、^{たかむらゆうさく}高村 雄策³、^{にしじょうひさお}西 条 寿夫³、^{さかいひでき}酒井 秀紀² (¹富山大・薬、²富山大・院薬、³富山大・院医)

【背景・目的】 Polycystic kidney disease 2 like 1 (以下 PKD2L1) は Transient receptor potential スーパーファミリーに属する非選択性カチオンチャネルであり、脳、心臓、舌など広範に発現している。舌の味細胞に発現していることから、味覚に関与すると報告されており、基本五味のうち酸味に関与する可能性を示唆した報告も存在するが、味覚受容における PKD2L1 の詳細な役割は明らかとなっていない。近年、PKD2L1 がアルカリ化刺激の除去後に活性化することが報告されている。苦味物質の多くがアルカリ性を示すことから、PKD2L1 の苦味受容における寄与に着目した。これまで我々は、PKD2L1 の過剰発現系を用いた *in vitro* 実験により PKD2L1 の寄与を明らかにしている。PKD2L1 を発現させた HEK293T 細胞において、quinine 作用後に大きなチャネル活性化が観測された一方で、denatonium 作用後では、PKD2L1 のチャネル活性化は観測されなかった。この結果から、PKD2L1 が denatonium ではなく quinine を介した苦味応答に関与する可能性が示唆されている。そこで本研究では、マウスを用いた *in vivo* 実験により、苦味物質である quinine および denatonium の苦味受容における PKD2L1 の役割を検討した。

【方法】 実験には、自由摂食飲水、明暗周期 (明期 : 7:00~19:00) で飼育した C57BL/6 系統雄性マウスを使用した。PKD2L1 の C 末端に GFP タグを挿入したマウスを PKD2L1-WT マウスとして用い、PKD2L1 を機能欠損させたマウスを PKD2L1-KO マウスとして用いた。苦味溶液として quinine (30 μ M)、denatonium (500 μ M) を用いた二ビン選択嗜好実験およびリック解析実験により、各種味溶液に対する嗜好性を検討した。二ビン選択嗜好実験では、24 時間左右二ビンとも苦味溶液を摂取させることで順応させた後、15 分間の溶液提示を 2 度行った。左右二ビンの飲水量を測定することで、溶液に対する嗜好性を検討した。リック解析実験においても同様に、苦味溶液に順応させた後、10 秒間の溶液提示を 2 度行った。各 10 秒間におけるリック回数およびリック時間を測定することで、溶液に対する嗜好性を検討した。

【結果・考察】 Quinine を用いた二ビン選択嗜好実験およびリック解析実験において、PKD2L1-WT マウスは quinine 後の水を有意に忌避した一方で、PKD2L1-KO マウスでは quinine 後の水を有意に嗜好した。この結果から、quinine 除去後の苦味応答に PKD2L1 が関与している可能性が示唆された。一方、denatonium を用いた二ビン選択嗜好実験およびリック解析実験では、PKD2L1-WT マウスと PKD2L1-KO マウスの両方において、denatonium の忌避が確認された。この結果から、PKD2L1 は denatonium を介した苦味応答に関与しない可能性が示唆された。以上より、PKD2L1 は苦味物質の種類に依存した選択的な応答に寄与している可能性が示唆された。この結果は、これまでの当研究室における PKD2L1 の過剰発現系を用いた *in vitro* 実験の実験結果と一致している。今回確認された苦味応答は、苦味物質の除去後に起こるオフ応答であると考えられる。オフ応答は、苦味物質の摂取時に起こるオン応答とは異なり、苦味物質が洗い流されることにより起こる特徴的な反応であるため、PKD2L1 が担うオフ応答は苦味の持続性に関与しているものと考えられる。

1-一般-9

雌雄肥満マウスの内臓脂肪組織における制御性 T 細胞局在変化の検討

○石川明香里¹、和田努¹、伊藤哲生¹、田中智子²、宇笠生美恵¹、西村燦志朗¹、齋藤滋²、
恒枝宏史¹、笹岡利安¹（富山大院 病態制御薬理学¹、産科婦人科学²）

【背景・目的】制御性 T 細胞 (Treg) は、過剰な免疫応答を抑制することで生体内恒常性維持に寄与する。雄性マウスでは、内臓脂肪組織 (VAT) に局在する Treg (VAT-Treg) が肥満に伴い減少し、VAT の慢性炎症進展によるインスリン抵抗性の増悪に関与する。一方、雌性マウスでは高脂肪食 (HFD) 負荷による肥満および糖代謝の悪化は雄性マウスに比べ軽度であるが、雌性マウスにおける VAT-Treg の変化は不明である。そこで本研究では、肥満による VAT-Treg 局在の性差を明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】雄性 C57BL/6J マウスに対し、通常食 (ND) 給餌を行う M-ND 群、60%HFD を給餌する M-HFD 群の 2 群を作製した。雌性マウスは ND および 60%HFD 給餌を行う F-ND 群、F-HFD 群に加え、卵巣摘出術 (OVX) を施し 60%HFD を給餌する OVX-HFD 群、および OVX-HFD マウスに 17 β -estradiol (E2) を投与する OVX-HFD + E2 群の計 4 群を設定した。E2 は 1.5 μ g をマウスの性周期を模倣して 4 日に 1 回皮下投与した。12 週間の負荷後、MRI による体組成の測定、小動物用代謝ケージによるエネルギー代謝測定、および糖・インスリン負荷試験による糖代謝の検討を行った。16-18 週後にフローサイトメトリーを用いて脾臓および VAT における Treg (CD45⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD25⁺ Foxp3⁺細胞) の割合を解析した。さらに、sorting により採取した CD25⁻および CD25⁺細胞の遺伝子発現を Real-time PCR 法により検討した。

【結果】M-ND 群と比べ M-HFD 群は著明な脂肪蓄積および糖代謝の悪化を示した。F-ND 群と比べ F-HFD 群は軽度な脂肪蓄積および耐糖能異常を示し、OVX-HFD 群は顕著な増悪を認めたが、OVX-HFD + E2 群ではこれらの代謝障害の明らかな悪化を認めなかった。また、OVX-HFD 群で認められたエネルギー代謝の低下は、OVX-HFD + E2 群では認められなかった。脾臓における Treg の割合は、雌雄とも各群で変化を認めなかった。一方 VAT-Treg の割合は、雄性では既報と一致し HFD 負荷により減少した。これに対し、雌性の VAT-Treg は HFD 負荷により増加傾向を認めたが、OVX-HFD 群では変化を認めなかった。さらに、OVX-HFD + E2 群では F-HFD 群と同程度の VAT-Treg の増加を認めた。

【結論】雌性の肥満マウスにおいて、E2 は Treg の VAT 局在化を促進することで、肥満に伴う慢性炎症を抑制し、糖代謝の悪化を防御する可能性が考えられた。

1-一般-10

腸管炎症病態モデルにおける腸管神経系での神経変性の検討

○^{みやたかな}宮田佳奈、^{おがたはなこ}緒方華子、^{かどわかまこと}門脇真（富山大・和漢研）

【背景および目的】腸管神経系は消化管全域に分布する内在性の自律神経系の1つであり、筋層間神経叢と粘膜下神経叢の2つの神経叢からなる。蠕動運動は筋層間神経叢に存在する知覚ニューロンや介在ニューロン、運動ニューロンにより構成される神経ネットワークによって支配されており、管腔側からの刺激によって放出される抑制性神経伝達物質と興奮性神経伝達物質が平滑筋の弛緩および収縮を引き起こすことで、口側から肛門側へ消化管内容物の輸送を行う。腸管神経系は、食物の通過や炎症、病原性微生物による感染、腸内細菌叢の構成異常などによって生涯ダメージを受け続けており、このダメージにより神経変性や消化管運動不全が起きているが、恒常性を維持するための神経新生も盛んに起こっている。

本研究ではデキストラン硫酸（DSS）誘起大腸炎モデルを用い、腸管炎症による神経変性の病態生理学的役割と、腸管運動性の低下のメカニズムについて検討した。

【方法】C57BL/N マウス（13～14 週齢雄）に 2%DSS を 5 日間自由飲水させることで、DSS 誘起大腸炎を発症させた。8 日目に小腸および遠位結腸を摘出し、縦走筋および筋層間神経叢標本（LMMP）を作製して免疫組織化学染色を行い、腸管神経系の形態的な変化を検討した。そのため、神経線維（tubulin β 3 陽性線維）および神経細胞（HuC/D 陽性細胞）の発現について、1 視野あたりの発現面積および神経節あたりの神経細胞数の検討を行った。また内在性神経ネットワークの機能を検討するため、シナプスマーカーであるシナプス小胞膜タンパク質 synaptophysin1 の発現も検討した。さらにオーガンバスを用いて、DSS 大腸炎マウスの摘出腸管を神経特異的刺激性薬であるナトリウムチャンネル活性化剤 veratridine（1 μ M）で腸管神経を刺激し、それによる腸管の運動を測定し、DSS 大腸炎マウスでの炎症による腸管運動性への影響を評価した。

【結果および考察】DSS 溶液の飲水により、体重減少と下血および下痢などの大腸炎の症状が認められた。Veratridine により腸管神経を活性化すると、腸管平滑筋では収縮運動が惹起される。DSS 大腸炎マウスの小腸では veratridine に対する応答性に変化は認められなかったが（n=6）、遠位結腸では veratridine 惹起腸管収縮運動が認められなかった（n=2）。このとき、小腸および遠位結腸において神経線維の減少が認められたが（小腸：正常 14.4 \pm 2.3%、n=9、大腸炎 10.5 \pm 1.8%、n=3；遠位結腸：正常 22.4 \pm 2.8%、n=2、大腸炎 17.2 \pm 3.3%、n=2）、神経節あたりの神経細胞数は遠位結腸のみで減少が認められた（正常 24.8 \pm 6.6 cells/ganglion、n=2；大腸炎 20.3 \pm 3.5 cells/ganglion、n=2）。また大腸の粘膜では synaptophysin1 の発現亢進が認められ、DSS 大腸炎に伴う粘膜障害に対応して、神経系が粘膜にある防御系細胞を活性化していると考えられた。

以上の結果より、DSS 大腸炎において、小腸および遠位結腸において神経線維の減少を主とする神経変性が起きていることが示唆された。また小腸では神経細胞数の変化が認められなかったことから、小腸における神経変性の程度は神経細胞死にまでは至らないものである一方で、遠位結腸では神経ネットワークの機能不全につながる神経線維の減少および神経細胞死が腸管運動性に影響を与えていることが示唆された。

1-一般-11

自閉症スペクトラム障害で発見された遺伝子変異を導入した SRF コアクチベーターMRTFB は SRF 依存性転写活性化およびニューロン形態を負に制御する

○伊原 大輔¹、山崎 雄哉¹、佐藤 夏美¹、福地 守^{1,2}、津田 正明¹、田淵 明子¹

(¹富山大院・医薬・分子神経生物、²高崎健康福祉大・薬・分子神経科学)

【背景および目的】

Myocardin-related transcription factor (MRTF)は、アクチン結合モチーフを持つと同時に、転写因子 SRF (serum response factor)のコアクチベーターとして働く。MRTF ファミリーには MRTFA と MRTFB が存在するが、非神経細胞において MRTFA は Rho シグナルを介して G-アクチンから解離し、核内に移行して SRF 介在性遺伝子発現を制御するというモデルが提唱されている。当研究室はこれまでに、MRTF が脳に高発現していること、SRF 依存性転写活性を高めること、樹状突起の複雑性を高めることなどを報告している。近年、MRTFB が自閉症スペクトラム障害(ASD)の原因遺伝子候補であることが報告された。ASD で認められる MRTFB 遺伝子の *de novo* 変異の 1 つは、MRTFB の B1 領域におけるシトシンからチミンへの一塩基置換であり、その結果アルギニンからトリプトファンへの 1 アミノ酸置換が生じる。しかし、その遺伝子変異が MRTFB の機能にどのような影響を及ぼすのかについては未解明である。そこで本研究では、野生型および ASD で発見された遺伝子変異を導入した変異型ヒト MRTFB (hMRTFB)遺伝子発現ベクターを構築し、神経細胞におけるその機能解析を行った。

【方法】

ラット大脳皮質神経細胞初代培養系を用い、転写活性に関してはルシフェラーゼアッセイ、神経細胞の形態に関しては蛍光免疫染色により解析した。内在性の SRF 標的遺伝子の発現量に関しては、Neuro2a 細胞に各 hMRTFB 発現ベクターを遺伝子導入した後、定量的 PCR により解析した。

【結果】

SRF 依存性転写活性に関して、野生型および変異型 hMRTFB により転写活性の増加が認められたが、変異型 hMRTFB による転写活性化は野生型の場合と比較して有意に減少した。同様に、神経可塑性関連遺伝子の 1 つ *Arc* (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)のプロモーター活性に関して、変異型 hMRTFB による *Arc* プロモーター活性化は野生型の場合と比較して有意に減少した。また、SRF 標的遺伝子の発現に関して、変異型 MRTFB による *Arc*、*c-fos* 遺伝子発現誘導は野生型の場合と比較して有意に減少した一方、*Egr1* 遺伝子については差が認められなかった。さらに、神経細胞の形態に関して、樹状突起形態の複雑性やその長さは野生型 hMRTFB により有意に増加した一方、変異型 hMRTFB の導入により有意に減少した。

【考察】

ASD で発見された遺伝子変異を hMRTFB に導入することで、神経可塑性や細胞骨格に関与する SRF/MRTF 標的遺伝子群の発現が一部抑制される結果、神経細胞の樹状突起形態が負に制御されると考えられる。以上のような MRTFB の機能障害が、ASD の病態の 1 つであることが示唆される。

1-一般-12

転写伸長因子 DSIF の Pol II へのリクルートにおける Spt5 酸性領域と TFIIH p62 の関与の検討

○^{よだ}依田ちづる¹、^{ひらやまつばさ}平山翼¹、^{たなかあき}田中亜紀¹、^{ひろせゆたか}廣瀬豊¹、^{おおくまよしあき}大熊芳明^{2,3}

富山大院薬¹、長崎大院医歯薬²、ゲノム創薬研究所³

【研究の背景と目的】真核生物 RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写は、開始・伸長・終結の 3 つの過程を経て進行し、開始および伸長段階は転写制御において特に重要である。Pol II は正確な転写を開始するために、遺伝子プロモーター上で 5 種類の基本転写因子 (TFIIB, -D, -E, -F, -H) と転写開始前複合体 (PIC) を形成する。また転写伸長段階では、TFIIF 以外の基本転写因子は Pol II から解離し、転写伸長因子 DSIF が Pol II に結合し転写伸長を制御する。このように Pol II は転写開始段階と伸長段階で、それぞれ異なる因子群により制御されるが、それら因子群が入れ替わる分子機構は不明である。近年の構造解析により、Pol II の同じ二つの領域 (クランプとストーク) に、開始段階では TFIIE が結合し、伸長段階では DSIF が結合することが明らかとなった。すなわち転写開始から伸長への移行段階において、Pol II 上で両者が入れ替ると想定される。TFIIE は α と β の 2 つのサブユニットから構成され、DSIF は Spt4 と Spt5 の 2 つのサブユニットから構成されているが、TFIIE α と Spt5 には共に酸性アミノ酸に富んだ領域 (酸性領域) が存在する。TFIIE α の酸性領域は、TFIIH のサブユニットの一つである p62 と強く結合し、PIC 形成時に TFIIH をプロモーターにリクルートする役割を持つことが知られている。一方、Spt5 酸性領域の機能は不明である。そこで本研究では、p62 が Spt5 の酸性領域と結合することによって、DSIF を Pol II へリクルートする役割を果たしている可能性を検討することを目的とした。

【方法と結果】His タグ融合ヒト DSIF ヘテロダイマー (Spt4/Spt5) と Spt5 単量体、および GST 融合ヒト p62 の大腸菌発現組換えタンパク質を調整し、GST pull-down アッセイにより相互作用解析を行った。また Spt5 と p62 の結合領域を決定するために、それぞれの欠失変異体および p62 のアミノ酸置換点変異体タンパク質を調整し相互作用解析を行った。その結果、DSIF および Spt5 は p62 の PH ドメインと結合した。さらに Spt5 の欠失変異体を用いた p62 PH ドメインとの相互作用解析により、Spt5 の酸性領域だけでなく NGN ドメインが p62 との結合に関わることが示唆された。一方、p62 PH ドメインの点変異体を用いて Spt5 との結合を検討したところ、3 つのリジン残基 (19, 54, 62 番目リジン) が Spt5 との結合に関わることが示唆された。

【考察】本解析により、ヒト Spt5 の N 末端側に存在する酸性領域と NGN ドメインの両者が p62 の PH ドメインと特異的に結合することが新たに明らかとなった。このことは、転写開始から伸長への移行段階において、PIC 内の TFIIH p62 が Pol II 上での TFIIE から DSIF への入れ替りを調節している可能性を示唆している。

1-一般-13

ユビキチン様ドメインを有する新規脱リン酸化酵素 UBLCP1 によるサイクリン E1 遺伝子の発現制御機構の解析

○^{くるまそういちろう}車 奏一郎¹、^{わ にしろうたろう}和 仁翔太郎¹、^{かとう}加 藤ありさ¹、^{かのうみゆき}加 納未由希¹、^{いしぐるひろやす}石 黒尋保¹、^{すぎたあい}杉 田愛¹、^{たぶちよしあき}田 渕圭章²、^{おおくまよしあき}大 熊芳明^{3,4}、^{ひろせゆたか}廣 瀬豊¹

(富山大院薬¹、富山大生命科学先端ユニット²、長崎大院医歯薬³、ゲノム創薬研究所⁴)

【背景・目的】 UBLCP1 (ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1) は、ユビキチン様ドメインと RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の C 末端領域を脱リン酸化する酵素に共通なドメインの両者を有する核タンパク質である。近年、UBLCP1 は、ユビキチン化タンパク質を分解する 26S プロテアソームの活性を抑制する新規の脱リン酸化酵素であることが報告された。一方、細胞核内において、26S プロテアソーム複合体は、タンパク質分解活性に依存的または非依存的に転写制御に関与することが報告されている。そこで本研究では、UBLCP1 が遺伝子発現制御に関与しているかを検討することを目的とした。

【方法】 UBLCP1 ノックダウンによる HeLa 細胞における遺伝子発現への影響を、DNA マイクロアレイによって網羅的に解析した。変化した遺伝子群のパスウェイ解析を行い、UBLCP1 によって調節される可能性の高い生物学的パスウェイ内の候補遺伝子群について、RT-qPCR 解析によって発現変化を確認した。同定した標的候補遺伝子の発現変化が、転写または mRNA 安定性のいずれの段階で調節されるかを、クロマチン免疫沈降解析 (ChIP)、および転写阻害による mRNA 安定性解析により検討した。

【結果・考察】 DNA マイクロアレイ解析の結果、UBLCP1 ノックダウンによって、細胞周期関連遺伝子、特にサイクリン E1 遺伝子 (*CCNE1*) の mRNA 発現量が顕著に低下した。また ChIP 解析と mRNA 安定性解析によって、UBLCP1 抑制によって mRNA の安定性は変化しないが、*CCNE1* 遺伝子の転写開始領域への Pol II 動員が低下することを見出した。さらに ChIP 解析により、UBLCP1 は *CCNE1* の転写開始点近傍に集積することが判明した。これらの結果より、UBLCP1 は転写レベルで *CCNE1* の発現を正に制御していることが示唆された。UBLCP1 は、19S プロテアソームサブユニットである Rpn1 と直接相互作用することがすでにわかっている。そこで、Rpn1 を HeLa 細胞でノックダウンしたところ、*CCNE1* の発現は著しく低下した。以上の結果から、UBLCP1 はプロテアソームとの相互作用を介して、細胞周期関連遺伝子の転写を直接制御することが示唆された。サイクリン E1 は、細胞周期 S 期の進行に必須の因子であり、様々なヒトがん細胞で遺伝子変異や発現上昇が観察されているがん遺伝子である。したがって本研究の結果は、細胞がん化に寄与する遺伝子発現制御の解明に明らかな知見を与えると期待される。

1-般-14

薬物加水分解酵素カルボキシルエステラーゼおよびアリルアセタミドデアセチラーゼのサルとヒトにおける種差

○本多^{ほんだしお}栞^り¹、深見^{ふかみたつき}達基^き^{1,2}、辻口^{つじぐちたくや}拓也^た¹、中野^{なかのまさたか}正隆^{りゅう}^{1,2}、上原^{うえはらしょうたろう}正太郎^{たろう}³、山崎^{やまざきひろし}浩史^し⁴、中島^{なかじまみき}美紀^き^{1,2} (金沢大薬

¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研²、実中研³、昭和薬大⁴)

【背景および目的】カルボキシルエステラーゼ (CES1 および CES2) とアリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) はヒト肝臓および小腸において薬物の加水分解を担う主要な酵素であり、薬物の代謝的活性化や解毒だけでなく、ときに毒性発現にも関与している。ヒト CES1、CES2 および AADAC の基質は化合物の構造によって大別可能であることを当研究室において明らかにしてきた。遺伝学的にヒトに近いカニクイザルや、霊長類で唯一遺伝子改変に成功しているマーモセットは、前臨床試験でも用いられる動物種であるが、加水分解酵素の基質特異性や酵素活性についてほとんど特徴付けがなされていない。本研究では、カニクイザルおよびマーモセットのヒト加水分解酵素活性との違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】カニクイザル肝臓ミクロソーム (CyLM)、マーモセット肝臓 (MaLM) および小腸ミクロソーム (MaIM)、ヒト肝臓 (HLM) および小腸ミクロソーム (HIM) を酵素源として、ヒト CES1、CES2 および AADAC により加水分解される 24 種類の化合物の加水分解酵素活性を HPLC および LC-MS/MS により測定した。なお、基質濃度はヒト各加水分解酵素の K_m 値付近とした。また、両動物種における加水分解酵素の基質特異性を明らかにするために、各種酵素のバキュロウイルス発現系を作製し、加水分解酵素活性を測定した。

【結果および考察】CyLM および MaLM は、ヒト CES1 により特異的に加水分解される化合物の多くに対して HLM より低い酵素活性を示したが、クロピドグレルとリドカインに対して MaLM は HLM より有意に高い活性を示した。この結果より、ヒトとマーモセット CES1 間の基質認識性の差異や、他の酵素の関与が示唆された。また、CyLM および MaLM は、ヒト CES2 により特異的に加水分解されるイリノテカンおよびプロカインに対し HLM よりも高い酵素活性を示したが、ヒト AADAC により特異的に加水分解されるリファンピシンおよびリファペンチンに対し、全く活性を示さなかった。MaLM はヒト AADAC 基質であるリファブチンとフルタミドに対して HLM と同程度の活性および約 50 倍と顕著に高い酵素活性を示した。マーモセット AADAC 発現系により、リファンピシンとリファペンチンは加水分解されず、リファブチンは加水分解され、フルタミドはヒト AADAC 発現系より顕著に加水分解された。したがって、マーモセットでは AADAC 基質の加水分解には他の加水分解酵素は関与しないことが示唆された。最後に、MaIM ではいずれの基質を用いた場合でも MaLM よりも低い酵素活性を示し、これは各酵素の発現量が肝臓より小腸で低いことに起因すると考えられた。

【結論】本研究では、ヒト、カニクイザルおよびマーモセットの加水分解酵素活性の程度を明らかにし、各酵素の基質認識性の差異、異なる酵素の関与などが酵素活性の種差に寄与していることが示唆された。本研究で明らかにした加水分解酵素の種差の情報は、動物で得られたデータをヒトに外挿する際に有用な情報になると考えられる。

1-般-15

ヒト UGT2A3 タンパク質の発現および機能的役割の解明

○阿部 貴之¹、齊藤 紗希¹、古川 陽一¹、畠山 雅彦²、岡崎 道貴子²、Moshe Finel³、中野 正隆^{1,4}、
深見 達基^{1,4}、中島 美紀^{1,4}

(¹金沢大薬、²日本クレア株式会社、³ヘルシンキ大薬、⁴金沢大 WPI ナノ生命科学研究)

【背景・目的】UDP-glucuronosyltransferase (UGT) は、薬物をはじめとする生体外異物およびステロイドホルモンや胆汁酸などの内因性物質のグルクロン酸抱合反応を触媒する小胞体局在性の膜酵素である。UGT はスーパーファミリーを形成しており、ヒトでは 24 種類の分子種が存在し、アミノ酸配列の相同性に基づき UGT1 と UGT2 の 2 つのファミリーに分類されている。ヒト UGT2A サブファミリーに属する UGT2A3 は、肝や小腸に発現していることが mRNA レベルで確認されているが、タンパク質レベルでの発現は確認されていない。発現系タンパク質を用いた検討により、UGT2A3 は chenodeoxycholic acid などの一部の胆汁酸のグルクロン酸抱合活性を示すことが報告されているが、その活性は顕著に低く、UGT2A3 の生理学的・薬物動態的意義について不明な点が多い。本研究ではヒト UGT2A3 に対する特異的抗体を作製してタンパク質レベルでの発現を検討するとともに、生体内における UGT2A3 の機能的役割を解明することを目的とした。

【方法】ヒト UGT2A3 特異的抗体を樹立し、ウェスタンブロッティングによりヒト肝および小腸ミクロソームにおける UGT2A3 タンパク質を検出した。UGT2A3 バキュロウイルス発現系を作製し、フラボノイドである quercetin および kaempferol、内因性ステロイドホルモンである 2-hydroxyestradiol (2OHE2) および 4-hydroxyestradiol (4OHE2)、高血圧症治療薬 carvedilol、ステロイド系抗炎症薬 dexamethasone (DEX) に対し、代謝活性を示すかどうか HPLC または LC-MS/MS によりグルクロン酸抱合体の検出を試みた。UGT は他の分子種とのヘテロダイマー形成により活性が変動することが報告されているため、UGT1A1 安定発現 HEK293 細胞株 (HEK/1A1 細胞) に UGT2A3 を一過性に発現させ、UGT1A1 が触媒する 4-methylumbelliferone (4-MU) グルクロン酸抱合活性に対する UGT2A3 共発現の影響を検討した。

【結果・考察】ウェスタンブロッティングにより、作製した抗体がヒト UGT2A3 に対して特異的に反応することが確認され、UGT2A3 タンパク質は肝臓より小腸に高く発現していることを明らかにした。発現系を用いた酵素活性測定により、UGT2A3 が 2OHE2 および DEX のグルクロン酸抱合活性を有することが示され、UGT2A3 は医薬品代謝にも関わるということが初めて明らかになった。しかし、UGT2A3 の 2OHE2 グルクロン酸抱合活性は UGT1A1 の約 1/6000、DEX グルクロン酸抱合活性は UGT2B7 の約 1/10 と低いことから、UGT2A3 が主に代謝する化合物が他にある可能性も考えられる。UGT2A3 が単独で機能することに加えて、他の UGT 分子種とのヘテロダイマーを形成することでその分子種の機能を調節する可能性を考え、ヒト小腸で発現が高い UGT1A1 と UGT2A3 を共発現させたところ UGT1A1 が触媒する 4-MU グルクロン酸抱合活性が上昇したことから、UGT2A3 は他の分子種の酵素活性を調節する役割を有する可能性が示された。以上、本研究では、UGT2A3 タンパク質がヒト肝および小腸に発現しており、医薬品の代謝にも関与すること、および他の UGT 分子種の活性を調節する作用を有することを明らかにした。

一般演題(領域2)

2-一般-1

ピリジン-アニン交互型オリゴマーによる選択的な天然糖の固液抽出

おいしゅうき いのうえまさひこ
○大石雄基, 井上将彦 (富山大院薬)

【背景・目的】

糖類は生体内の細胞間の情報伝達を担う重要な化合物群である。その誘導体は、医薬品などに利用されており、糖類を誘導化する手法は有用性が高い。しかし、天然の糖類は有機溶媒、特に非極性溶媒への溶解性の低いために、それらを誘導化する方法は制限されている。

当研究室では最近、疎水性溶媒中で糖類と強力に会合する人工受容体“ピリジン-フェノール交互型オリゴマー **1**”を開発した(図 1)¹⁾。この分子は、天然の糖分子と会合体を形成しながら、それらを有機溶媒中へと抽出できる。この抽出を利用すれば、有機溶媒中で糖類を誘導化できるのではないかと考えた。しかしながら、**1** の合成は煩雑であり、塩基に対する安定性も低かったため、誘導化反応に **1** を利用するのは困難であった。そこで今回、新しい人工受容体として“ピリジン-アニン交互型オリゴマー **2**”を開発した。この **2** は、**1** のときと同様に糖分子と効率的に水素結合を形成できるため、糖との高い会合力を有することが期待された。また、**2** は酸性度が高い水素原子を有していないため、塩基性条件でも安定であると推測された。

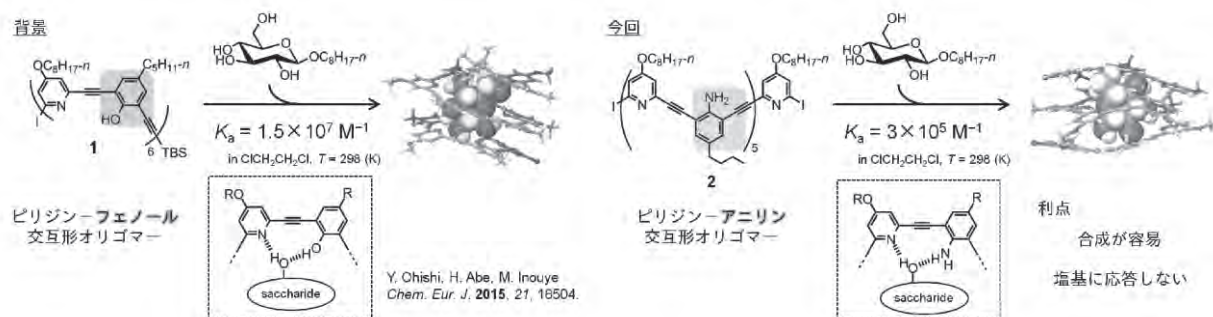


図 1. ピリジン-フェノール交互型オリゴマー **1** とピリジン-アニン交互型オリゴマー **2**

【結果】

オリゴマー **2** は、逐次的な菌頭反応によって合成した。以前のオリゴマー **1** の合成経路では、フェノール性ヒドロキシ基の保護基が必要であったのに対し、**2** はアミノ基を保護せずに合成できた。合成した **2** の糖との会合能は、1,2-ジクロロエタン溶液中でのオクチル β -D-グルコピラノシドとの滴定実験により評価した。その結果、会合定数は約 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と見積もられ、オリゴマー **1** ほどではないものの、**2** は糖と強力に会合することが分かった。続いて、**2** を用いて重クロロホルム溶液中への天然糖の固液抽出実験を行った(図 2)。その結果、グルコース、ガラクトースはほとんど抽出されなかったのに対し、マンノース、フルクトースは抽出されることが明らかとなった。

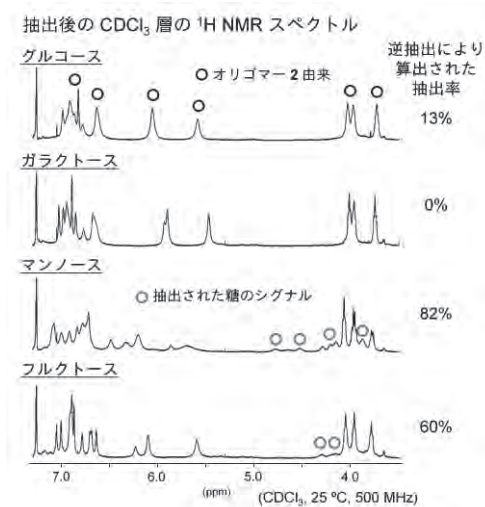


図 2. 天然糖の固液抽出の結果

1) Y. Ohishi, H. Abe, M. Inouye *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16504–16511.

2-般-2

イミノホスホラン形成による室温下でのベンゾシクロブテン開裂反応とその応用

○高山亜紀¹・是澤恵莉¹・柘植清志²・松谷裕二¹

(富山大院薬¹, 富山大院理工²)

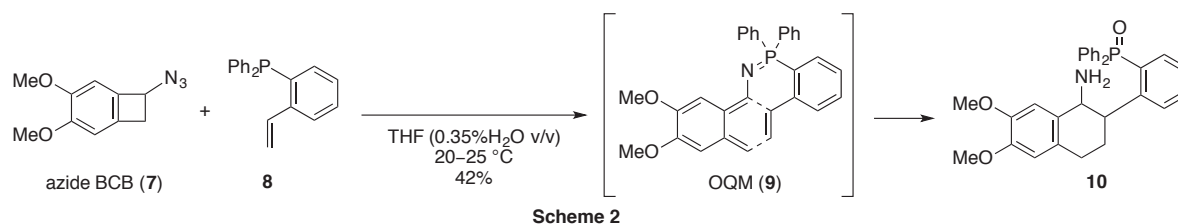
【背景・目的】歪んだ四員環を有するベンゾシクロブテン (BCB) は、熱的四員環開裂によって高反応性ジエンであるオルトキノジメタン (OQM) を生成するため、医薬品候補化合物などの環構築に利用されてきた。その開裂に要する反応温度は、四員環上の置換基によって異なるものの、通常は

100 °C 以上の高温を必要とする (Figure 1)¹。そこで我々は、BCB を基質としたより温和な室温条件下での反応開発を行うべく、“室温付近で四員環開裂を制御し OQM を発生させる新たな方法”を探索することとした。

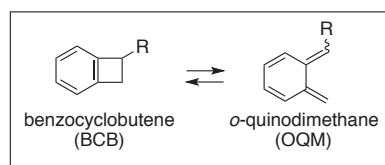
【計画】ベンジル位が電子供与基で置換された場合、四員環開裂の反応性が向上することが報告¹されている。この知見に基づき、我々は、イミノホスホラン BCB (2) が室温以下で四員環を開裂させるのではないかと考え、その反応性を調査した。

【方法・結果】アジド BCB (1) に室温下ホスフィンを作用させたところ、期待通り、Staudinger 反応とつづく四員環開裂が進行しケトン 6 が得られた。そこで、反応機構解析のために、イミノホスホラン BCB (2)、アミノ BCB (4) の熱的四員環開裂に要する反応温度 (T₁, T₂) を比較検討した (Scheme 1)。その結果、T₁=20-25 °C、T₂=70 °C であり、イミノホスホラン BCB はアミン BCB よりも高い反応性を示すことが実験的に証明された。

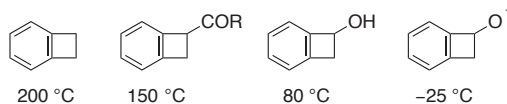
室温下での OQM 発生法が確立できたので、次にこの方法を新規反応開発に応用した。スチリルホスフィン 8 をアジド BCB (7) に作用させると、“Staudinger 反応-四員環開裂-分子内 Diels-Alder 反応”が順次起こることで、2成分が連結し所望の環化体 10 が得られた (Scheme 2)。本反応は、水共存・室温という温和な条件下で進行したことから、生体直交型反応などへの展開が期待される。



¹ W. Oppolzer, *Synthesis*. 1978, 793.



Previous Work



This Work

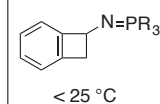
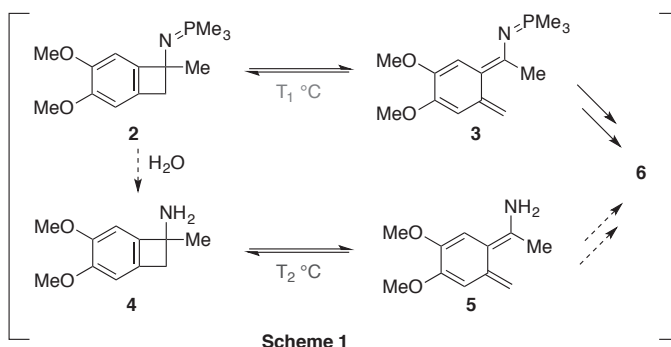
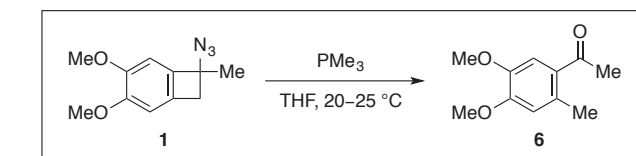


Figure 1. Approximate Reaction Temperature for the Ring Opening



Scheme 2

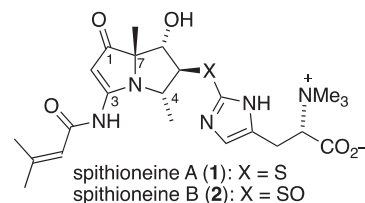
2-般-3

Spithioneine 類の全合成研究

うえさかかな まつおじゅんいち よしむらともゆき
○上坂歌奈, 松尾淳一, 吉村智之 (金沢大医薬保)

【背景・目的】

Spithioneine A (**1**) 及び B (**2**) は 2015 年に MacMillan らによって海産細菌 *Streptomyces spinoverrucosus* より単離されたアルカロイドで, 既知天然物 bohemamine に ergothioneine が結合した化合物である。¹⁾ Ergothioneine は炎症疾患に関連する生体内物質として注目を集めており, このようなアルカロイドとのハイブリッド天然物は今までに例が無く, 生物活性の面から大変興味深いと考えられる。そこで本化合物の全合成を目指し, 研究を行った。

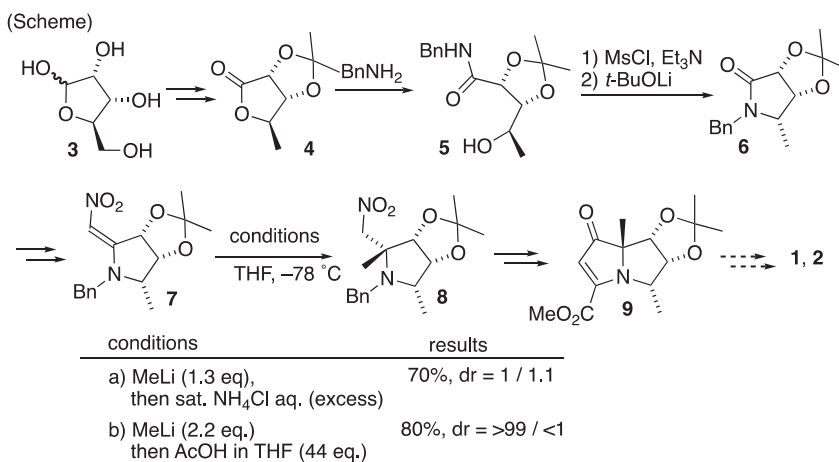


【方法】

全合成の鍵は, ピロリジジン上 C(7) 位四置換炭素を立体選択的に構築することである。そのため, D-ribose (**3**) から合成した二環性のニトロオレフィン **7** に対する立体選択的なメチル基の 1,4-付加反応を行うことを計画した (Scheme)。ニトロオレフィン **7** に対する求核付加は, コンベックス面選択的に進行し, 所望の立体配置を有する **8** が選択的に得られると考えた。その後, **8** からの増炭と環化を経て bohemamine 部分を合成する。最後に ergothioneine と反応させることにより, **1** 及び **2** の全合成を完了する。

【結果】

D-Ribose から 4 工程で二環性ラクトン **4** を合成した。これをアミド **5** へと変換し, メシル化と続く環化により, ピロリジジン **6** を得た (Scheme)。これから 3 工程を経てニトロオレフィン **7** を合成した。これに対し Michael 付加の検討を行った。メチル化剤としてメチルリチウム (MeLi) を用いて THF 中, -78°C で反応を検討した (conditions)。所望の付加体は得られるものの, 反応停止に飽和塩化アンモニウム水溶液を用いると, 立体選択性は低かった (conditions a)。一方, 反応停止に過剰量の酢酸-THF 溶液を用いることで, 所望の立体配置を持つ **8** を高い選択性で収率よく得ることができた (conditions b)。今後は, **8** のニトロ基の α 位を増炭した後に, 分子内環化, Nef 反応を行いピロリジジン **9** へと変換し, エポキシ化と側鎖の導入をすることで bohemamine 部分の合成を目指す。



Reference : 1) MacMillan, J. B. *et al. Org. Lett.* **2015**, *17*, 3046-3049.

分散固相抽出法を用いた蛍光検出-HPLC によるニトロ多環芳香族炭化水素類の簡易一斉分析法の開発

○尾田知之¹, 唐寧^{1,2}, 早川和一², 鈴木亮¹, 鳥羽陽¹
(金沢大院薬¹, 金沢大環日本海域環境研究セ²)

【背景および目的】

大気中の粒子状物質に含まれるニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) は, 主に化石燃料など有機物の不完全燃焼や大気内反応によって生成し, 強い発がん性や変異原性を示すことから, 肺がん等の疾病との関連性が疑われている. 本研究室では NPAH 還元して得られるアミノ体 (APAH) が強い蛍光性を有する特性を利用して高感度に NPAH を検出する二次元 HPLC 法を開発してきた. しかしながら, 前処理が煩雑で HPLC システムが複雑, 測定時間が長い等の欠点があった. そこで本研究では, 分散固相抽出法と単純な蛍光検出-HPLC を用いた簡便且つ迅速な NPAH 分析法の開発を目的とした.

【方法】

開発した HPLC システムでは, 試料を還元カラム (Pt/Rh, 4.0×10mm, JASCO) に移動相であるメタノール:10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) =2:3 (v/v) と共に通液することで還元し, APAH を分離カラム (Eclipse PAH, 4.6×100mm, 1.8μm, Agilent) でアセトニトリルによるグラジエント溶離により分離した. カラムオープン温度は, 分離カラム 20°C, 還元カラム 80°C とした. 検出波長は, 各 APAH の至的励起・蛍光波長とした. 実試料として都市大気標準粉じん (SRM1649b, NIST) を用い, その 3mg にジクロロメタンを加えて超音波処理を行い, 得られた抽出液に固相吸着剤 (シリカゲル, 活性アルミナ, フロリジル) のいずれか 500mg を加えて攪拌した後に遠心分離した. 上清を分取してから再度ジクロロメタンで洗い込んで 1 度目の上清と合わせ, ジメチルスルホキシド (50 μL) を加えてからジクロロメタンを留去した. その残渣にメタノール (250 μL) 加えてから孔径 0.22 μm のフィルターでろ過し, HPLC 検液とした.

【結果および考察】

今回開発した HPLC システムでは, 移動相の初期条件下 2 分間で還元カラム内での NPAH の還元が終了し, APAH が分離カラムに移行した時点でカラムスイッチングにより還元カラムをシステムから切り離すことで高流量での高圧分離が可能となり, 従来約 140 分要していた分析時間が 40 分に短縮された. 2 種類の移動相を使用する単純な HPLC システムで分析できることから, システムの簡略化にも成功した. また, 検出感度も従来法と同程度だった. さらに大気試料の前処理法として, 3 種類の固相吸着剤による分散固相抽出法を検討した結果, 吸着剤による処理をしていない SRM1649b の抽出物と比較して活性アルミナ及びフロリジルにおいて NPAH の検出を妨害する夾雑物質の除去効果が観察された. 分散固相抽出法と単純な HPLC システムにより, 簡便且つ迅速な NPAH 分析法を開発することに成功した.

2-一般-5

T細胞のシグナル伝達を制御する TNF 受容体と TRAF の相互作用解析

○飯田日向子、^{いいた ひなこ} 帯田孝之、^{おび たかゆき} 宗孝紀、^{そうたかのり} 水口峰之、^{みずぐちみねゆき} (富山大・院薬)

[背景・目的]

T細胞による免疫応答は、二次リンパ組織でT細胞が樹状細胞と抗原特異的に相互作用し、活性化されることにより開始する。T細胞に発現する8種のTumor Necrosis Factor (TNF) 受容体スーパーファミリー (TNFRSF) 分子 (TNFR2、OX40、CD27、CD30、4-1BB、DR3、HVEM、GITR) は、抗原受容体 TCR や CD28 のシグナルを増強し、T細胞を介した免疫制御に重要な役割を果たすことが近年の研究から明らかになってきた。TNF receptor-associated factors (TRAFs) は、TNFRSF 分子とT細胞内で相互作用し、シグナル伝達を制御する分子群である。ヒトではC末端に特徴的な TRAF-C ドメインをもつ6種類 (TRAF1-6) のファミリー分子が存在する。TRAF2 が8種の TNFRSF 分子全てと相互作用することや、一つの TNFRSF 分子に複数の TRAF ファミリー分子が結合するなど、その相互作用は重複することが知られている。しかし、それぞれの TNFRSF と TRAF がどのように相互作用するかについての詳細は良く調べられていない。本研究は、TNFRSF と TRAF との相互作用を表面プラズモン共鳴を用いて定量的に解析することで、T細胞の細胞質におけるシグナル伝達機構がどのように制御されているかを明らかにすることを目的とする。

[方法]

TRAF2 と6種 (OX40、GITR、4-1BB、HVEM、CD27、CD30) の TNFRSF 分子の細胞内領域を大腸菌を用いて発現させ、精製した。TNFRSF 分子は、細胞内領域のN末端に可溶性タグであるリポイルドメインを付加して発現させ、陰イオン交換とゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。TRAF2 分子は、C末端の TRAF ドメインにビオチン化酵素 (BirA) 認識配列を付加して発現させたものを精製し、BirA によりビオチン化したタンパク質を調製した。アミンカップリング法でストレプトアビジンを CM5 センサーチップに固定化し、そこにビオチン化した TRAF2 を固定化した。表面プラズモン共鳴実験は、Biacore T200 を用いて pH 7.4, 25°C の条件で行った。

[結果・考察]

6種の TNFRSF の細胞内領域それぞれをアナライトとして測定し、解離定数を算出した。その結果、TNF 受容体と TRAF2 の解離定数は数百 μM 程度であり、相互作用が非常に弱いことが明らかになった。このうち最も強く結合したのは解離定数 92 μM の HVEM であり、OX40 より約2倍高い結合親和性を示した。今後は、HVEM に対する TRAF1-6 の相互作用をはじめとして、他の TNF 受容体と TRAF の相互作用についても解析を行う予定である。さらに、詳細な相互作用様式を解明するために、TNF 受容体-TRAF 複合体の X 線結晶構造解析を行う予定である。