

第 131 回例会 要旨

特別講演

抗ウイルス薬の研究と薬剤耐性ウイルスの遺伝子解析

北陸大学 薬学部 大黒 徹

私は、1989年に名古屋大学医学部病態制御研究分野ウイルス感染研究部門で西山幸廣博士の下、ヘルペスウイルスの研究を始めた。当時は、アシクロビル (ACV) やその他の薬剤の開発で Elion 博士のノーベル賞受賞が話題となっていた。ACV は単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) がコードする thymidine kinase (TK) で一リン酸化され、その後、宿主のリン酸化酵素で二リン酸、三リン酸化され、HSV の DNA polymerase によって HSV の DNA に取り込まれて伸長を阻害 (chain termination) する。ところが、HSV-1 には非常に有効だが、HSV-2 ではやや効果が下がり、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) に対する効果は限定的であった。そこで当初は、HSV-2 や HCMV に対して有効な化合物の研究を行っていたが、ガンシクロビル (GCV) が抗 HCMV 薬として承認された。しかしながら、これらのことが様々な抗ウイルス剤の研究を行うきっかけとなり、2006年より富山大学の白木公康博士の下で、ファビピラビル (T-705、アビガン®) やアメナメビル (ASP2151、アメナリーフ®) の研究に携ることができた。ファビピラビルは、ウイルス RNA 依存性 RNA 合成酵素を阻害し、当初インフルエンザウイルス薬として研究を行っていたが、他の RNA ウイルスの増殖も抑えるという非常にユニークな薬剤である。さらに、薬剤耐性ウイルスを分離し、標的ウイルスタンパク質の詳細な解析を試みようとしたが、耐性ウイルスを分離することは極めて困難であった。アメナメビルは、ヘルペスウイルスの helicase / primase を阻害する全く新しい抗ヘルペスウイルス薬で 2017年に帯状疱疹薬として承認されることとなった。

一方で、ACV のウイルス感染細胞特異性を発揮する TK による一リン酸化であるが、TK 遺伝子は HSV の増殖には必須ではないため、TK 遺伝子の変異による薬剤耐性ウイルスの出現という新たな問題が生じてきた。また、HCMV は TK 遺伝子を保有しておらず、GCV の活性化に関わる機序が謎であったが、GCV 耐性 HCMV が分離されはじめ、その遺伝子解析により HCMV の UL97 遺伝子にコードされるプロテインキナーゼが GCV のリン酸化に関与していることが明らかになった。近年の臓器移植の普及により、HCMV の再活性化による日和見感染に対して、GCV やバルガンシクロビル (VGC) が広く用いられるようになり、米国を始め日本国内でも GCV 耐性ウイルスの出現が大変問題となっており、国内の病院から GCV 耐性遺伝子変異の検出の依頼を受ける事となった。

2016年に北陸大学に赴任して、村山次哉博士によるトリシン (Tricin) の抗ウイルス効果の研究に感銘を受けた。トリシンは、イネ科植物に含まれるフラボノイドの一種でクマザサに含まれる抗ウイルス成分として同定された。サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルスに対して抗ウイルス活性を示すが、その効果は DNA ウイルスだけにとどまらず、RNA ウイルスにも効果を示す非常に興味深い物質といえる。現在は、ファビピラビルやフラボノイド誘導体等の広域スペクトルを有する抗ウイルス剤の研究を行っている。

大黒 徹（だいこく とおる）

学歴

1987年 北海道大学 水産学科 卒業

1989年 北海道大学大学院 水産食品学研究科 修士課程修了

1994年 名古屋大学大学院 医学研究科 博士課程修了

職歴

1993年 日本学術振興会 特別研究員

1997年 名古屋大学大学院 医学研究科 ウイルス感染学 助手

2002年 愛知県がんセンター研究所 腫瘍ウイルス学 主任研究員

2006年 富山大学大学院 医学薬学研究部（医学） 准教授

2016年 北陸大学 薬学部 教授

獎勵賞受賞講演

難治性中枢神経系疾患の治療法確立に向けた 脳・網膜関門における生体膜輸送体およびその制御機構の特定

富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 薬剤学研究室 赤沼 伸乙

脳・網膜は生体における“サンクチュアリ”であり、外的障害に曝されても大きな変化が示されない。一方、先天的遺伝子変異や加齢が発症・進行の要因となる難治性中枢神経系疾患に対して薬物治療や治療薬創出を行う際、この性質がボトルネックとなる。この特殊性の実体は循環血液とこれら組織を隔てる関門組織である。脳に存在する代表的な関門組織は血液脳関門 (BBB) と血液脳脊髄液関門 (BCSFB) であり、網膜に存在する関門組織は内側血液網膜関門 (inner BRB) と外側血液網膜関門 (outer BRB) である。これら関門組織に発現する生体膜輸送体は末梢血液と中枢神経系組織との薬や神経伝達物質及びその関連物質のやり取りを制御する。そのため、これら関門組織における生体膜輸送体の本物質交換に対する役割を解明することは、難治性てんかんやアルツハイマー病、そして緑内障などの難治性中枢神経系疾患の克服に繋がる。

エイコサノイドである prostaglandin E₂ (PGE₂) は脳に豊富に存在し、てんかんやアルツハイマー病などの難治性脳疾患時において脳内レベルが上昇する。In vivo BBB を介した [³H]PGE₂ 排出を精査したところ、その排出への生体膜輸送体 Oat3 および Mrp4 の関与が示唆された。また、興奮性神経伝達物質である L-グルタミン酸の脳内投与にて、この [³H]PGE₂ 排出は減弱し、そのプロセスには N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が関与することが示唆された。PGE₂ 排出を減弱させる L-グルタミン酸の脳外排出に対し BCSFB に発現する生体膜輸送体 EAAT3 が役割を果たすことを並べて我々は解明しており、難治性脳疾患に対し「脳内環境の正常化によるこれら疾患の治療」を実現するための脳関門に発現する生体膜輸送体とその制御機構が明らかとなった。

この L-グルタミン酸を介したシグナル伝達が過剰となることで誘導される細胞死は、網膜疾患である緑内障においても認められる。我々は inner BRB の網膜側膜においてグルタミン酸輸送体の一つである EAAT1 が発現・局在することを免疫組織化学的解析にて明らかにし、機能的解析を通じ EAAT1 が L-グルタミン酸輸送に関与することを実証した。Inner BRB 輸送系について、糖尿病網膜症の発症・進行に関与することが報告されている尿酸の前駆体、hypoxanthine が一部 ENT2 を介し網膜から循環血液中に排出輸送されていることを見出した。さらに、L-グルタミン酸刺激や炎症時に機能が変動する生体膜輸送機構へミチャネルが outer BRB において機能し、その実体が connexin 43 であることを見出した。これら正常時・病態時における BRB 物質輸送理解に繋がる知見は、内科的治療法開発が停滞している網膜疾患の新規治療法確立に繋がると期待される。

現在、これら制御の実現性に加え、中枢神経系疾患に対する治療薬の分布を制御する新たな生体膜輸送機構の一部について特定を成功させている。将来的にこれら知見を統合し、バリア生体膜輸送体を起点とした新たな脳・網膜疾患の診断・治療法確立を目指していきたいと考えている。

赤沼 伸乙 (あかぬま しんいち)

学歴

2000年4月-2004年3月 東北大学薬学部 総合薬学科
2004年4月-2006年3月 東北大学大学院薬学研究科 医療薬科学専攻 博士課程前期2年の課程
2006年4月-2007年9月 東北大学大学院薬学研究科 医療薬科学専攻 博士課程後期3年の課程
(2007年9月30日中途退学)

2012年3月 東北大学 論文博士にて博士(薬学)取得

学位論文題目:

「血液脳関門におけるPGE₂排出輸送へのMRP4の役割及びAβ排出輸送へのABCA1の寄与の解明」

職歴

2007年10月-2019年9月 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学) 助教

2019年10月-現在 富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 助教

2015年5月-2016年3月 米国 University of Kentucky, Department of Pharmaceutical Sciences
Visiting Scholar

受賞歴

2004年3月 東北大学総長賞(東北大学)

2017年9月 Global Education Seminar Presentation Award 2017
(公益社団法人 日本薬剤学会)

若手シンポジウム

**「日本人の食事摂取基準と疾病治療に
おける栄養素の役割」**

リソソームから細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送機構

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学） 分子細胞機能学研究室

川口 甲介

ビタミン B₁₂ は必須の栄養素で、奇数鎖脂肪酸やアミノ酸の代謝に関与するメチルマロニル CoA ムターゼおよびメチオニンの生合成に関与するメチオニン合成酵素の補酵素として機能する。厚生労働省の策定した「日本人の食事摂取基準」（2015 年版）によると、ビタミン B₁₂ の推奨量は 2.4 μg/日と微量ではあるが、その欠乏により巨赤芽球性貧血、脊髄および脳の白質障害、末梢神経障害が起きる。

摂取されたビタミン B₁₂ は、胃で分泌される内因子と複合体を形成し、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、細胞質中に輸送される。その後、数段階の反応を経て補酵素型へと変換される。先天的な遺伝子異常によるビタミン B₁₂ の細胞内代謝異常は、生化学的表現型としてはホモシステインやメチルマロン酸の異常蓄積を示し、重篤な疾患の原因となる。これまでに、ビタミン B₁₂ の細胞内代謝異常の原因として報告されている遺伝子変異のうち、ABC トランスポーター ABCD4 およびリソソーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子の変異は、リソソームへのビタミン B₁₂ の蓄積を表現型とするビタミン B₁₂ 代謝異常の原因となる。今回、我々が明らかにした LMBD1 と協調した ABCD4 のリソソームへの局在化機構、ABCD4 によるビタミン B₁₂ の輸送機構を紹介し、ビタミン B₁₂ 輸送障害とその治療戦略について触れる。

哺乳動物細胞に単独で過剰発現させた ABCD4、LMBD1 はそれぞれ小胞体、リソソームに局在し、両者を共発現させると ABCD4 は LMBD1 と複合体を形成しリソソームへ局在化した。LMBD1 のリソソーム移行シグナルをアラニンに置換すると、複合体は細胞膜へ局在化した。さらに内在性の LMBD1 を欠損させると内在性 ABCD4 のリソソーム局在化が顕著に低下した。これらの結果は、リソソーム移行シグナルを持たない ABCD4 が LMBD1 依存的にリソソームへと移行することを強く示唆している。一方、ABCD4 の機能解析は、His-ABCD4 を酵母 *Pichia pastoris* 発現させ可溶化・精製後、プロテオリポソームを用いて解析した。ABCD4 が ATPase 活性を持つことを確認し、リポソーム内にビタミン B₁₂ を封入した。ATP を添加すると、内部のビタミン B₁₂ 量が時間依存的に減少した。ATPase 活性を失った変異型 ABCD4 はビタミン B₁₂ 輸送活性を持たなかった。精製した LMBD1-GST を用いて同様の実験を行ったが、ビタミン B₁₂ の輸送は観察されなかった。すなわち、ABCD4 がリソソーム内から細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送を担う輸送体であることが示唆された。

今後は、リソソーム内へのビタミン B₁₂ 蓄積の原因となることが報告されている変異型 ABCD4 および LMBD1 を用いた解析を行い、リソソーム内からのビタミン B₁₂ 輸送障害の分子機構を明らかにするとともに、ビタミン B₁₂ 輸送障害を回復させる化合物の探索を行う予定である。

川口 甲介 (かわぐち こうすけ)

学歴

2003年 3月 京都大学 農学部 生物機能科学科 卒業
2005年 3月 京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 博士前期課程修了
2011年 3月 京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 博士後期課程単位取得
退学

職歴

2011年 4月－9月 京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 教務補佐員
2011年 10月－ 富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 分子細胞機能学研究室 助教

経腸栄養剤が薬物体内動態におよぼす影響

金沢大学附属病院 薬剤部

嶋田 努

安心安全な薬物療法を実施するためには、患者1人1人の個体差要因を十分に配慮することが必要である。個体差の要因としては、薬物間相互作用や遺伝子多型など様々な要因が報告されているが、現状での理解では説明できない個体差の存在を疑うべき症例を多く経験しており、さらに複雑な要因を考慮する必要がある。発表者はその個体差要因の1つとして、栄養による影響について検討している。

一般的に、ヒトは生体機能を維持するために生体外由来の物質を食事として口から摂取し、胃や小腸などの消化器内で消化・分解された形で栄養素として吸収している。また、食事由来の生体にとって悪影響を及ぼす化合物や病原体に対しては、腸管免疫機構と腸内細菌叢による免疫応答反応や代謝酵素・トランスポータによる生体防御により守られている。一方、一般食を摂取できない状態、例えばクローン病などの消化吸収能が低下している場合、疾患によって食道の通過障害がある場合、さらには高齢による嚥下機能低下に伴う誤嚥を防ぐために、これら患者に対しては経腸栄養法が用いられる事がある。経腸栄養剤療法は、アミノ酸やデキストリンまたは大豆タンパクや乳カゼインの消化栄養素を胃や消化管上部に直接投与されることから、高カロリー輸液療法と比較すると生理状態に近い形が取られているが、長期投与に及ぶと本来の腸機能を使用しないことから消化管粘膜の機能低下やバクテリアトランスロケーションが発症することがある。また経腸栄養剤は生態にとっての異物含量は少なくまた十分に消化された栄養成分で構成されていることから、生体防御や消化機能として必要とされる腸内環境が大きく影響を受け生体外物質の排泄機構である薬物代謝酵素やトランスポータの発現機構や腸内細菌叢の変動を受けることが考えられる。本シンポジウムでは、これまで得られている経腸栄養剤や他の栄養成分による薬物の体内動態に与える影響やそのメカニズムとして代謝酵素やトランスポータさらには腸内細菌叢に与える影響について、途中成果ではあるが報告する予定である。

嶋田 努 (しまだ つとむ)

学歴

- 2000年 金沢大学薬学部製薬科学科 卒業
- 2002年 金沢大学大学院自然科学研究科 博士前期課程修了
- 2005年 金沢大学大学院自然科学研究科 博士後期課程修了

職歴

- 2005年 武蔵野大学薬学部 助手
- 2007年 武蔵野大学薬学部 助教
- 2010年 武蔵野大学薬学部 講師
- 2012年 Nemours Alfred I. duPont Hospital for Children, Research fellow
- 2014年 金沢大学附属病院 准教授

受賞歴

- 2011年 日本生薬学会 論文賞 (共著)
- 2013年 和漢医薬学会 学会奨励賞
- 2016年 医療薬学フォーラム 2016 優秀ポスター賞

骨形成促進による骨粗鬆症の予防と治療に向けたチャレンジ

北陸大学薬学部薬学臨床系薬理学分野

北陸大学健康長寿総合研究グループ

高橋達雄

骨粗鬆症とは「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大する骨格疾患」と定義され、日本における骨粗鬆症の患者数は1,200万人を超えると推定されている。骨強度の低下は骨量の減少と骨質の劣化によってもたらされるが、生体では骨強度の維持のため骨組織はダイナミックに骨破壊（骨吸収）と骨形成を繰り返し、骨の再構築を営むことによって形態と機能を維持している。骨の再構築には、骨吸収を行う破骨細胞と、骨形成を行う骨芽細胞が大きく関わっている。

一般に、原発性骨粗鬆症は男女ともに50歳以降の加齢に伴う骨量減少が亢進して発症し、遺伝的素因や生活習慣によって修飾される。カルシウム、ビタミンD、ビタミンKの欠乏状態はいずれも骨脆弱性の危険因子となり、特に高齢者で不足状態になりやすいため注意が必要である。十分な量のこれらの栄養素を食品から摂取することは、骨粗鬆症の予防と治療の観点からも推奨される。実際に活性型ビタミンD₃薬とビタミンK₂薬はいずれも骨粗鬆症治療薬として用いられており、骨密度上昇作用と骨折抑制効果が認められている。

骨粗鬆症治療薬は、その効果が発現するまで長期にわたり薬物を服用する必要があるため、安全性の高さが要求される。そのため、我々は天然物もしくは天然物由来成分が骨粗鬆症の予防・治療に適していると考えた。金沢の手取川に自生する「カワラケツメイ (*Chamaecrista nomame*)」にいくつかのフラバノン配糖体が含まれることを見出し、Butin-7-O-β-D-glucopyranosideの単離に成功した。Butin-7-O-β-D-glucopyranoside及びそのアグリコンであるButinはいずれも骨芽細胞と破骨細胞の分化を促進した。骨粗鬆症に対する治療効果を検証するためモデルとして卵巣切除(OVX)マウスを用い、Butinを4週間にわたり連日経口投与した。その結果、Butinの投与によって卵巣切除マウスで認められた骨量の減少が有意に抑制され、さらに骨表面における骨芽細胞数と破骨細胞数の増加が認められた。このようにButinは骨形成と骨吸収を促進するデュアルエフェクトを有し、骨粗鬆症に対して予防・治療効果を有することが示唆された。

また、我々はButin以外にも骨芽細胞の機能を亢進する骨粗鬆症治療薬を探索しており、その候補としてEphrinB2に着目している。EphrinB2は破骨細胞の細胞膜上に発現し、骨芽細胞と破骨細胞のカップリング因子として機能するが、我々はEphrinB2の投与によってOVX誘導性の骨量減少が有意に抑制され、骨表面の骨芽細胞数の増加と破骨細胞数の減少がもたらされることを見出している。

近年、骨芽細胞の機能亢進作用を有する骨粗鬆症治療薬が注目されており、Butinを含有するカワラケツメイやEphrinB2の骨粗鬆症予防もしくは新規骨粗鬆症治療薬としての応用が期待される。

高橋 達雄 (たかはし たつお)

学歴

2001年 北陸大学 薬学部薬学科 卒業

2003年 金沢大学大学院 自然科学研究科 博士前期課程修了

2006年 金沢大学大学院 自然科学研究科 博士後期課程修了

職歴

2003年 St. Louis University, Department of Pediatrics, Research Scholar

2006年 北陸大学薬学部 助手

2007年 北陸大学薬学部 助教

2011年 北陸大学薬学部 講師

2015年 北陸大学薬学部 准教授

受賞歴

2015年 日本薬学会北陸支部 学術奨励賞

**学生優秀発表賞選考対象
学士課程部門（領域1）**

1-学-1

免疫チェックポイント阻害薬の効果及び免疫関連有害事象の発現に関わる予測因子の後方視的探索

○隅屋暦¹、高橋喜統²、岡本晃典¹、元雄良治³、石川和宏¹、政氏藤玄²

(北陸大学薬学部¹、金沢医科大学病院薬剤部²、金沢医科大学病院腫瘍内科³)

【目的】免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) は、従来のがん治療薬とは異なる作用機序を持ち、分子標的薬に続くがん治療の第4の柱として注目を浴びている。また、悪性黒色腫に始まり様々ながん種に適応が拡大され、ICIによる治療を受ける患者が増え続けている。一方で、ICIに効果を示す患者はある程度限定されることや、従来のがん薬の有害事象とは異なる irAE (immune related adverse event) が全身に発現することで管理が困難といった課題が指摘されている。そこで、本研究では、ICIによる過剰な治療を防ぎ、irAEの発現を最小限に抑えることを目的に、ICIの効果を正確に予測するための効果予測及びirAEの発現リスクにかかわる因子を同定すべく、後方視的な探索研究に着手した。

【方法】金沢医科大学病院にて2016年2月1日から2019年1月31日の期間内にペムブロリズマブを使用した、非小細胞肺癌、尿路上皮癌、悪性黒色腫、ホジキンリンパ腫の患者48例を対象とした。ICIの効果予測因子については、OS (overall survival)を主要アウトカムとし、PS (performance status) や年齢などについてKaplan-Meier法を用いて解析を行い、交絡因子についてCox回帰分析により調整した。irAEの発現リスク因子の探索では、irAE未発現期間を副次的アウトカムとし、性別、ライン数、甲状腺の異常などについてCox回帰分析を用いて解析を行った。

【結果・考察】PS2群のOSは、PS0/1群のOSと比較し有意に短かった (PS0/1 vs. PS2 : 中央値251日 vs.173日、 $P=0.001$)。コックス回帰分析による単変量解析/多変量解析からも、PSがOSへ与える影響が最も大きい独立因子であることがわかった ($HR=4.63$ 、 $95\%CI: 1.67-12.82$ 、 $P=0.003$)。irAEの発現リスク因子については、各因子群について単変量解析としてコックス回帰分析を用いて行ったが、有意な結果を示すには至らなかった。今回の研究では、ベースラインでのPS2は、ペムブロリズマブによる治療を受けている患者に対するOSの独立した予測因子であり、その他の因子 (年齢、皮膚障害発現の有無、irAE発現の有無、抗核抗体の陽性、 $KL-6 \geq 500$) はOSに影響を与えないことが示された。一方で、PS0とPS1の間でOSに与える影響に差はなく、先行研究ではPS以外の因子もOSとの関係を示している。以上より、ペムブロリズマブの投与を選択する際は、PS2の患者では、PS以外の因子も踏まえて慎重に判断する必要があるといえる。今回の調査では、irAEの発現リスク因子となるものを同定することができなかったが、irAEの発現リスク因子に関する研究はまだ少なく、irAEを最小限に抑えるためにも今後の更なる検討が重要であると思われた。

1-学-2

非小細胞肺癌患者における免疫チェックポイント阻害薬の効果及び免疫関連有害事象の発現に関わる予測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、もとおりようじ元雄良治³、いしかわかずひろ石川和宏¹、まさうじろうげん政氏藤玄²

(北陸大学薬学部¹、金沢医科大学病院薬剤部²、金沢医科大学病院腫瘍内科³)

【目的】第4のがん治療の選択肢として、自らの免疫能力を賦活化することによりがん細胞に作用する免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が使用され始めている。しかし ICI を投与された患者すべてが効果を発揮する訳ではなく、実際に効果が発現している患者は全体の 2~3 割である。そのために、効果発現の指標となる因子を見つけるための研究は世界中で行われている。ICI の投与においては、従来型の殺細胞性の抗がん薬では発現が認められてない副作用が発現している。ICI による特異的な副作用は irAE (免疫関連有害事象) と呼ばれ免疫系が関係していると考えられている。そこで、臨床上有用と思われる ICI の効果や副作用を予測するため因子を同定することを目的として後方視的調査研究に着手した。

【方法】2016年2月1日から金沢医科大学病院倫理審査委員会承認日(2018年11月26日)までの期間において、金沢医科大学病院でペムブロリズマブを投与された36例の非小細胞肺癌の患者を対象とした。患者のデータは電子カルテより患者 OS 及び irAE の発現に関与している因子について後方視的に調査解析を実施した。本研究の実施に当たっては、臨床研究に関する倫理指針に従い、金沢医科大学病院及び本学の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

【結果】ICI の効果は、PS (Performance Status) が生存期間 (OS) に大きく影響を与えることが示された($P=0.007$)。PS が OS に大きく影響を与えているため、PS を除いた臨床検査項目でも同様の多変量解析を行った。その結果、irAE と皮膚障害のハザード値 (HR) の値がそれぞれ 1.383 (95%CI : 0.413-4.075) と 0.509 (95%CI : 0.156-1.659) となり皮膚障害の発現が危険因子である傾向が見られたが有意な差は認められなかった (皮膚障害の発現 $P=0.580$ 、irAE 発現 $P=0.262$)。

【考察】従来の報告通り、患者の状態を示す PS が OS に大きく影響を与えることが示唆された。その他にもハザード比が 1 を下回る項目が複数認められたが、統計学的には証明されず、確証を得るには至らなかった。今後の検討課題として、本研究における規模の問題は否めないことから、規模の拡大も含めた各種因子の関連性がより明確に探ることができる研究デザインを再度構築することが求められると思われた。

1-学-3

覚醒剤メタンフェタミンによる細胞死に対する膜貫通蛋白質 TMEM168 の関与

○^{やながわたつき}築川 樹¹、^{みやもとよしあき}宮本嘉明^{1,2}、^{さとうなおき}佐藤直輝¹、^{おおたけかずや}大竹和弥¹、^{ふかぜん}傅 柯荃²、^{むらまつしんいち}村松慎一³、^{にったあつみ}新田淳美^{1,2}

(富山大薬¹、富山大院薬²、自治医大³)

【目的】覚醒剤であるメタンフェタミン (METH) は我が国で最も検挙者の多い乱用薬物であり、特に再犯率の高さが大きな問題となっている。そのため薬物依存症に対する治療法の開発が喫緊の課題となっているが、ほとんど進んでいないのが現状である。そこで我々の研究室では METH をマウスに連続投与することにより発現が上昇する蛋白質として、transmembrane protein 168 (TMEM168) を同定した。TMEM168 をマウスの側坐核において過剰発現したところ METH による行動量の上昇、場所嗜好性の過多、細胞外ドパミン量の上昇が抑制され、また骨基質に存在するオステオポンチン (OPN) と共局在していることも分かった。これらの研究成果より、TMEM168 が薬物依存の形成に関与する可能性が示唆されている。一方、高用量 METH の長期にわたる使用は、神経細胞死を誘導する。そこで我々は TMEM168-OPN 経路が METH による神経細胞死に関与すると考え、そのメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

【方法】ベクターの導入によって COS-7 細胞で TMEM168 を過剰発現し、細胞内・細胞外の OPN の変化を ELISA 法で定量した。また TMEM168 と初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームとの共局在について免疫染色法で検討した。加えて METH の長期乱用は神経の細胞死を誘導することから、SH-SY5Y 細胞を用いて細胞死の制御に関与する Akt 及び Erk 経路の活性化についてウエスタンブロット法で定量した。加えて METH によって誘導される細胞死に対し、TMEM168 が関与するかについて、MTT アッセイ法により細胞生存率の定量を行った。

【結果・考察】TMEM168 の培養細胞での過剰発現により、細胞外の OPN 量が有意に増加した。また TMEM168 は初期・後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームと共局在していた。これらより、TMEM168 は OPN の細胞外への輸送に関与する可能性が示唆された。さらに SH-SY5Y 細胞で TMEM168 を過剰発現したところ、Akt のリン酸化が有意に増加した。また TMEM168 の過剰発現は METH による細胞死を抑制した。以上の結果より、TMEM168 は細胞外における OPN の発現を上昇させ、分泌された OPN が Akt を活性化させ、METH による細胞死を抑制している可能性が考えられる。薬物依存関連蛋白質である TMEM168 の機能解析は、薬物依存症のメカニズムの解明及び治療法の開発につながることを期待される。

1-学-4

コラゲナーゼ投与マウス脳出血モデルでの脳炎症・行動障害における膜結合型 PGE₂ 合成酵素の役割

○宮原伸卓¹、與澤智佳²、川野早紀²、水口愛香²、植松智³、審良静男⁴、田辺光男²、高橋達雄¹、
松尾由理^{1,2} (北陸大薬¹、北里大薬²、大阪市大院医³、阪大免疫フロンティア研セ⁴)

【目的】 脳出血は重い後遺症が残ることや、脳幹圧迫により死に至ることもある深刻な病気である。我々はこれまでに PGE₂ の誘導型最終合成酵素である膜結合型 PGE₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) が脳虚血後の障害増悪因子であることを見出してきた。本研究では mPGES-1 の脳出血後の発現変化と脳炎症や行動障害での役割の解明を試みた。

【方法】 C57BL/6 系雄性 mPGES-1 欠損型 (KO) 或いは野生型 (WT) マウスを使用した。右線条体に 0.025 U/μl コラゲナーゼ (タイプ VII-S) を 1 μl 投与し、反対側は対照として溶媒を投与した。脳を採取し、western blot 法、qPCR (SYBR Green) 法、TUNEL 染色法、Nissl 染色法にて解析し、PGE₂ 量を ELISA 法にて測定した。四肢の運動障害や行動障害は Rotarod 法、踏み外し試験、尾懸垂法、無動や回転歩行も含めた神経学的行動障害スコアにて解析した。

【結果】 WT の線条体では、コラゲナーゼ投与 1 日後に mPGES-1 と COX-2 の mRNA が有意に発現誘導した。また、mPGES-1 タンパク質も脳出血 1~7 日後に顕著に発現誘導した。そこで、脳出血後に誘導する mPGES-1 の役割を調べるため、mPGES-1 KO マウスを用いて WT マウスと比較検討した。コラゲナーゼ投与 1 日後の脳出血や脳浮腫の大きさは、WT と mPGES-1 KO で大きな違いは見られなかった。WT では投与後 3 日以内に 3 割程度の死亡が見られたが、mPGES-1 KO では死亡するマウスはいなかった。また、WT では脳出血 1 日後をピークに PGE₂ 量が増加したが、mPGES-1 KO ではほとんど変化しなかった。WT で多数みられた線条体の DAPI 陽性核凝縮と TUNEL 陽性細胞は、mPGES-1 KO では低値だった。さらに、脳出血直後の四肢の運動障害について検討した。Rotarod 法では、出血 1 日後には回転バーからの落下が顕著に早まり WT と mPGES-1 KO に違いは無かったが、出血 7 日後までに mPGES-1 KO は WT よりも有意に回復した。踏み外し試験においても、両遺伝子型共に 1 日後が最も多く、その後 14 日後まで回復したが、mPGES-1 KO では WT に比べ、1, 3 日後で有意に低値であり、3 日後には正常レベルまで回復した。尾懸垂試験によるひねり行動については、WT では右にひねる割合が出血 1, 3 日後に有意に高かったが、mPGES-1 KO では WT より有意に低値であった。さらに、踏み外し、片麻痺、回転歩行、無動をスコア化により総合的に評価したところ、1 日後は両遺伝子型間で違いはなかったが、7, 14 日後には、mPGES-1 KO では WT に比べ有意に回復し、ほぼ正常レベルとなった。

【考察】 以上の結果より、mPGES-1 は脳出血後に発現誘導し、脳出血部位の PGE₂ 産生に寄与すること、また、出血部位での神経アポトーシスを促進し、脳出血後の運動異常に寄与することが示唆された。mPGES-1 は脳出血治療において有効なターゲットとなる可能性が期待される。

1-学-5

Nicotine による mPFC V層錐体細胞における発火増大作用のメカニズム

○ いずみしょうま 泉翔馬¹、どうもとまさき 堂本将輝²、ささせひとき 笹瀬人暉²、えさきひろひと 江崎博仁¹、でやまさとし 出山諭司²、かねだかつゆき 金田勝幸²

(金沢大学薬¹、金沢大院薬²)

【目的】 Nicotine は、注意力、学習・記憶力、情報処理能力などの向上作用を持つことが知られている。過去の研究から、これらの向上作用には nicotine による内側前頭前野 (medial prefrontal cortex, mPFC) の数十分にわたる活動上昇が関与することが示唆されている。一方、nicotine は mPFC 錐体細胞においてシナプス伝達を増強するが、この作用はニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の脱感作により数分で消失することが報告されている。したがって、nicotine による認知・記憶・注意力の持続的な向上作用には、一過性のシナプス伝達増強作用とは異なる、より持続的な神経活動上昇作用が関与していると考えられるが、その詳細は不明であった。そこで本研究では、この神経機構を明らかにするために、mPFC V層錐体細胞の発火活動に対する nicotine の作用とそのメカニズムについて検討した。

【方法・結果・考察】 雌雄 C57BL/6J マウス (4~6 週齢) から脳スライス標本を作製し、mPFC V層錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。GABA_A 受容体アンタゴニスト picrotoxin (Picro; 50 or 100 μ M) による抑制性神経伝達ブロック下で nicotine (1 μ M) をバス適用すると、適用の約 30 s 後から自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の頻度が増加し、約 110 s 後にはこの増加作用は消失した。一方、sEPSC の振幅には影響を与えなかった。次に、Picro と kynurenic acid (1 or 2 mM) による抑制性及び興奮性神経伝達ブロック下で nicotine (1 μ M) をバス適用した際の脱分極性電流注入による発火応答を記録したところ、nAChR の脱感作が生じていると考えられる nicotine 適用 300 s 後において発火数の有意な増加が観察された。この作用は非選択的 nAChR アンタゴニストの mecamylamine (10 μ M)、 α 4 β 2、および、 α 7 nAChR のそれぞれのアンタゴニストの dihydro- β -erythroidine (1 μ M)、および、methyllycaconitine (100 nM)、非選択的電位依存性カリウムチャネルブロッカーである 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) の前適用で阻害され、また、電極内液に Ca²⁺のキレート剤である BAPTA (10 mM) を添加することでも阻害された。一方、Ca²⁺依存性カリウムチャネルの SK、あるいは、BK チャネルのそれぞれのブロッカーである apamin (100 nM)、あるいは、tetraethylammonium (1 mM) の前適用によっては阻害されなかった。

次に、脱分極性電流注入による発火閾値について解析したところ、nicotine 適用によりコントロールと比較して発火閾値潜時の有意な短縮が認められた。また、4-AP の適用によっても発火閾値潜時は有意に短縮し、その後に nicotine を適用しても、さらなる潜時の短縮は見られなかった。

以上より、nicotine は nAChR の脱感作以降も持続的に mPFC V層錐体細胞の活動を上昇させる作用を持つことが明らかになった。また、この作用は α 4 β 2、および、 α 7 nAChR 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇を介した電位依存性カリウムチャネルの抑制によって誘導されることが示唆された。

1-学-6

Poly(I:C)による妊娠中母体免疫の活性化方法の差による仔の行動異常の相違

○矢口立真、石林朋子、二井谷和平、向井沙和子、江崎博仁、出山諭司、金田勝幸（金沢大・薬）

【目的】妊娠中の母体免疫活性化（MIA）は胎児の脳の発達に影響を与え、自閉症スペクトラム障害（ASD）などの発達障害を引き起こすことが知られている。げっ歯類においては MIA を惹起する方法やタイミングにより行動異常に差異が認められることが報告されているが、系統的な比較についての報告は限られている。そこで本研究では、MIA による自閉症様症状発症メカニズムを調べるにあたり、2種類の異なる方法で MIA を惹起したマウスから生まれた仔について、青年期、および、成体期においてどのような行動異常の違いが認められるのかを検討した。

【方法】実験には C57BL/6J マウスを用い、ウイルス感染を模倣する Poly(I:C)を妊娠 9.5 日目（G 9.5）に 5 mg/kg を尾静脈内（i.v.）投与、または、12.5 日目と 15.5 日目（G 12.5 & 15.5）に腹腔内（i.p.）投与することで MIA を惹起した。コントロール群には saline を投与した。行動試験には雄のみを使用し、青年期（4-5 週齢）では self grooming test（SG：常同行動を評価）、social approach test（SA：社会性を評価）、elevated plus maze test（EPM：不安を評価）を、成体期（8-12 週齢）では SG、SA、open field test（OF：自発運動量・不安を評価）を行った。また、Poly(I:C) i.p.群ではこれらに加えて成体期で novel object recognition test（NOR：認知記憶を評価）も行った。

【結果・考察】青年期の各試験について、Poly(I:C) i.p.群において SG の自己身づくろい時間の有意な増加、および、SA の新奇マウスの入ったかごへの sniffing 時間の有意な減少が見られた。EPM では i.v.、および、i.p.のどちらの群でもオープンアーム滞在時間に変化は見られなかった。成体期の各試験について、SG での自己身づくろい時間、SA での sniffing 時間、OF での中央エリア滞在時間に変化は見られなかったが、成体期の Poly(I:C) i.v.群でのみ OF での行動量の有意な減少が見られた。また、成体期の Poly(I:C) i.p.群でのみ行った NOR では、訓練試行において物体の総探索時間の極度な減少が観察され、認知記憶の評価を行うことができなかった。このことから、成体期の Poly(I:C) i.p.群では新奇物体への興味の減少、あるいは、警戒心の亢進が生じている可能性が考えられた。

以上より、Poly(I:C)の G 9.5 i.v.投与では成体期の自発運動量の減少が、また、G12.5 & 15.5 i.p.投与では青年期の常同行動の増加、および、社会性の低下が確認され、新奇物体に対する興味の減少あるいは警戒心の亢進が示唆された。よって、ASD の中核症状である常同行動の増加、社会性の低下という行動異常発現の神経メカニズムの解明には、Poly(I:C)の単回 i.v.投与よりも複数回の i.p.投与による MIA モデルを用いるほうがより適していると考えられる。

1-学-7

悪性黒色腫における SOX10 を介した PD-L1 の発現制御機構

○^{さとうひろき}佐藤弘樹、^{たかはしあつし}高橋篤司、^{さくらいひろあき}櫻井宏明、^{よこやまさとる}横山 悟（富山大・薬・がん細胞生物学）

【目的】抗 PD-1/PD-L1 抗体製剤は、活性化 T 細胞の膜表面に発現する受容体の PD-1 と、がん細胞の膜表面に発現する PD-L1 の結合を阻害することで、T 細胞応答性の腫瘍免疫の抑制を阻害する。抗 PD-1 抗体製剤ニボルマブは、約 3 割の悪性黒色腫患者に対して高い腫瘍抑制効果を示す一方で、治療が奏功しない患者も多い。その要因の 1 つとして腫瘍細胞の PD-L1 発現量が低いことが報告されている。我々は悪性黒色腫の PD-L1 の発現を制御する遺伝子を探索するため、悪性黒色腫のマイクロアレイデータの再解析を行った結果、メラノサイトの分化に必須である転写因子 SOX10 と PD-L1 の発現が負に相関することを明らかとした。そこで本研究では、PD-L1 発現量の増加による抗 PD-1/PD-L1 抗体製剤の治療効果改善を目指し、転写因子 SOX10 による PD-L1 の発現制御機構について検討した。

【方法】悪性黒色腫細胞株 A2058、UACC257、SK-MEL-28、Malme3M 細胞を、SOX10 siRNA や HDAC 阻害剤で処理し、細胞表面の PD-L1 の発現と、その遺伝子転写制御についてフローサイトメトリーやウエスタンブロット法、クロマチン免疫沈降法で解析した。

【結果・考察】A2058、UACC257 細胞において、SOX10 ノックダウンを行った結果、細胞表面上の PD-L1 発現量が低下した。しかし、SK-MEL-28、Malme3M 細胞では PD-L1 発現量の変化は観察されなかった。また、いずれの細胞においても SOX10 ノックダウンによって、PD-L1 発現制御転写因子である IRF1 の発現量が増加した。このことから、SOX10 が IRF1 発現を抑制し PD-L1 発現を抑制していること、さらには SOX10 による IRF1 の発現抑制以外の PD-L1 発現制御機構も存在することが示唆された。一方、SOX10 の発現を低下させることが報告されている HDAC 阻害剤処理では、いずれの細胞においても PD-L1 と IRF1 の発現量が増加した。この結果より、一部の悪性黒色腫ではヒストンがアセチル化されておらず、PD-L1 の発現が抑制されている可能性が示唆された。

本研究により、悪性黒色腫において、SOX10 による IRF1 を介した PD-L1 の発現抑制機構が明らかとなった。一方、ヒストンのアセチル化修飾が PD-L1 発現制御に関与することも示唆された。HDAC 阻害剤が悪性黒色腫における PD-L1 発現抑制を解除する薬剤になりうると考えられたことから、HDAC 阻害剤と抗 PD-1/PD-L1 抗体製剤の併用療法の有効性について、in vivo 実験にて検討していく予定である。

1-学-8

ErbB2/3 ヘテロダイマーにおける新たな非定型的リン酸化部位の同定

○^{じしあかり}地子愛佳理¹、^{いけがやしんご}池ヶ谷真吾¹、^{ばんばあやこ}馬場絢子¹、^{かわさきゆうき}河崎優希²、^{しゅうえつ}周越¹、^{さくらひろあき}櫻井宏明¹

(富山大・薬・がん細胞生物学¹、高崎健康福祉大学・薬・衛生科学²)

【目的】ErbB 受容体は 1 回膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体で、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の 4 つのメンバーからなり、細胞の増殖や生存を制御している。ErbB2 と ErbB3 は乳がんや胃がんなどで過剰発現や活性化変異が見られ、ErbB2 を標的とした治療が行われている。ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーは ErbB 受容体ダイマーの中でシグナル伝達強度が最も強く、細胞増殖に関わる MEK/ERK 経路などを活性化する。一般的な ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーのシグナルにおいて、リガンド刺激による定型的なチロシン残基のリン酸化については広く研究が行われている。一方、我々の研究室では、ErbB 受容体のリガンド非依存的にセリン・スレオニンがリン酸化される非定型的なリン酸化機構について着目している。これまでに、ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーにおいて、活性化 ERK による ErbB2-Thr-677 のリン酸化がチロシン残基の自己リン酸化を抑制するフィードバック阻害機構を明らかにしている。しかし、Thr-677 以外にも ErbB2 のリン酸化部位が存在することが示唆されているため、フィードバック阻害機構についてさらなる解析が必要である。そこで、本研究では ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーにおいて ERK を介した ErbB2 の新規リン酸化部位の同定を行うこと、またその機能を解析することを目的とした。

【方法】ErbB2/ErbB3 を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて、ErbB3 のリガンドである HRG や MEK/ERK 経路を活性化する TPA を作用させた際の ErbB2 と ErbB3 のリン酸化状態をウエスタンブロット法とリン酸化を検出する Phos-tag ウエスタンブロット法により検討した。また、新たなリン酸化部位を同定するため ErbB2 の変異体を作製し、HEK293 細胞に過剰発現させて実験を行った。

【結果・考察】ErbB2 の新規リン酸化部位を同定するために deletion mutant を作製したところ、ERK が制御する ErbB2 のセリン・スレオニンのリン酸化領域は、主に C 末端側の自己リン酸化ドメインの 1131 番目から 1200 番目の間であることが明らかになった。この領域内にセリン・スレオニン残基は合計 7 個あり、それに注目して Phos-tag ウエスタンブロット法を用いて検証した。その結果、ErbB2 の Ser-1151 と Thr-1172 が ERK による新たなリン酸化部位として同定された。また、Ser-1151 と Thr-1172 をアラニンに置換した 2A 変異体を用いた Phos-tag ウエスタンブロット法において、TPA によってバンドシフトがわずかに残っていたことから、他にも ERK が制御するリン酸化部位が存在すると考えられる。今後はその機能の解析を進めていく予定である。ErbB2/ErbB3 ヘテロダイマーの活性化制御機構の解明は、将来的にがん分子標的薬の開発や獲得耐性の克服など、がん治療の進展に貢献することが期待される。

1-学-9

cdk 阻害剤の抗ヘルペスウイルス効果

○梅田実希¹、佐藤好隆²、木村 宏²、大黒 徹¹ (北陸大薬・感染防御¹、名古屋大院医・ウイルス学²)

【目的】 ヘルペスウイルスが感染すると、前初期 → 初期 → 後期の順で遺伝子発現を行ったのち、宿主に生涯潜伏感染し続ける。ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は幼小児期に感染 (通常は不顕性感染) し、潜伏感染後、臓器移植患者やエイズ患者等の免疫抑制状態下で再活性化して、間質性肺炎や網膜炎等の種々の病態を引き起こす。一方、Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、主に B リンパ球に潜伏感染し、伝染性単核症やバーキットリンパ腫を引き起こすことが知られている。HCMV と EBV には、ガンシクロビル等が有効であるが、遺伝子変異により薬剤耐性ウイルスの出現が問題となってきた。

北陸大学ではこれまで、イネ科の植物に含まれるフラボノイドの一種であるトリシンが、HCMV の増殖を阻害すること、そしてその標的が宿主のサイクリン依存性キナーゼ (cdk) 9 であることを報告してきた。また、共同研究者らは、cdk の阻害剤が EBV の後期遺伝子の転写を抑制することを見つけ、その作用機序としてウイルス転写開始前複合体が関わっていることを明らかにした。そこで今回、EBV の後期遺伝子の転写を抑制する cdk 阻害剤の HCMV の転写に及ぼす影響と、抗 HCMV 活性について検討を行った。

【方法】 細胞はヒト胎児肺線維芽 (HEL) 細胞を、ウイルスは HCMV Towne 株を用いた。cdk 阻害剤は Cdk1/2 inhibitor III (CDK1/2i)、Cdk2/9 inhibitor (CDK2/9i) と Alsterpaullone, 2-Cyanoethyl (A2CE) の 3 種類を使用した。cdk 阻害剤による HCMV の増殖抑制効果は、プラーク減少法により確認した。単層培養した HEL 細胞に HCMV を感染させ、1 時間の吸着後、cdk 阻害剤を添加した 2% ウシ胎児血清 (FBS) を含む最少必須培地 (MEM) を加えた。5 日間培養の後、ホルマリンで固定し、メチレンブルーで染色後プラーク数を計測した。また、後期遺伝子の発現は以下の手順で検討した。単層培養した HEL 細胞に HCMV を multiplicity of infection (MOI) > 1 で感染し、1 時間の吸着後、2% FBS 含 MEM を加え 5 時間培養し、cdk 阻害剤添加 2% FBS 含 MEM に培地交換を行った。感染 4 日後に細胞中の total RNA を抽出し、逆転写反応後にリアルタイム PCR 法により HCMV の後期遺伝子である UL75 と UL99 の転写産物の定量を行った。

【結果・考察】 3 種類の cdk 阻害剤は、全て濃度依存的に HCMV のプラーク形成を抑制した。そのうち、CDK1/2i と CDK2/9i が A2CE に比べて抗 HCMV 活性が高かった。また、リアルタイム RT-PCR の結果から、cdk 阻害剤 3 種類の中で CDK1/2i と CDK2/9i は、HCMV の後期遺伝子である UL75 と UL99 の転写を 0.03 ~ 0.1 μM で濃度依存的に抑制した。(特許コード: P180014949, 公開番号: 特開 2019-116429)

以上のことより、cdk 阻害剤は、HCMV の後期遺伝子の発現を抑制し、ウイルスの増殖を阻害することから、ヘルペスウイルスに対する効果的な阻害物質となり得ると予想される。既存の抗ヘルペスウイルス薬は、ウイルスゲノム複製を標的にしており、薬剤耐性ウイルスの出現が治療を困難にしている。cdk 阻害剤は既存薬と作用機序が異なるため、薬剤耐性ウイルスに有効で、既存薬との相乗効果も期待でき、広い抗ウイルススペクトルを有する可能性がある。今後、cdk を標的とした抗ウイルス薬の研究開発に携わっていきたい。

**学生優秀発表賞選考対象
大学院課程部門（領域1）**

1-院-1

環境化学物質によるインフラマソームを介した炎症誘導メカニズムの研究

○河野里沙¹、鈴木 亮^{1,2} (¹金沢大院・医薬保、²CREST)

【目的】外因性微粒子（PM2.5 等）は、様々な環境化学物質を構成成分として有しており、多様な生体影響を及ぼすと考えられている。特に、肺をはじめとする呼吸器系組織への生体影響が強く懸念されており、外因性微粒子による肺細胞への炎症誘導メカニズムの解明が不可欠となっている。本研究では、実大気粒子（PM2.5）及びその構成成分の一つとして生体影響が懸念されているベンゾ[a]ピレン（BaP）を用いて、ヒト肺胞上皮細胞での炎症誘導メカニズム、特にインフラマソームをはじめとするシグナル伝達機構について追究した。

【方法】細胞には、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞（A549 細胞）を使用した。PM2.5 は、実大気中より採取し超音波抽出したものを用いた。BaP（0～2,000 nM）で刺激した際の A549 細胞における mRNA（ASC、pro-Caspase-1、NLRP3、NLRP1）発現量の解析は、定量的 PCR により行った。また、刺激応答に伴う IL-1 β の分泌は ELISA 法を用いて定量した。また、ウェスタンブロッティング法によりタンパク質の発現量や活性化の解析を行った。

【結果・考察】外因性微粒子による炎症誘導メカニズムを追究するため、実大気から採取した PM2.5 を用いて、ヒト肺胞上皮細胞を刺激した際に誘導される炎症性メディエータの mRNA 発現解析を行った。その結果、炎症性サイトカイン IL-1 β の前駆体である pro-IL-1 β の発現上昇が観察された。ここで観察された pro-IL-1 β の有意な上昇は、BaP 刺激においても同様に認められ、IL-1 β の分泌についても亢進していた。この IL-1 β の分泌の亢進には、pro-IL-1 β の産生とインフラマソームによるプロセシングの過程が関与していると推察される。はじめに、pro-IL-1 β の産生過程に関与するシグナル分子（Src キナーゼ、MAP キナーゼ等）の活性化状態について検討した。その結果、BaP 刺激によって Src キナーゼや MAP キナーゼのリン酸化が亢進しており、これにより pro-IL-1 β の産生が促進されている可能性が示唆された。次に、インフラマソームによるプロセシング過程について追究した。インフラマソームは、Caspase-1 や ASC、NLR ファミリータンパク質（NLRP3、NLRP1）によるタンパク質複合体であり、インフラマソームが形成されると Caspase-1 が活性化し、IL-1 β のプロセシングが行われる。そこで、BaP 刺激によるインフラマソーム形成タンパク質の発現変化について解析したところ、ASC と NLRP1 で顕著な発現上昇が観られた。一方、NLRP3 の発現上昇については観察されなかった。このことから、BaP は NLRP1 によるインフラマソーム形成を促進していると推察された。さらに Caspase-1 の活性化の指標である p20 の解析から、Caspase-1 が刺激時間依存的に活性化していることが明らかになった。

以上のことから、BaP は A549 細胞において、pro-IL-1 β 産生およびインフラマソームを介した IL-1 β のプロセシングを促進することにより、IL-1 β の分泌を亢進していることが示唆された。

1-院-2

マスト細胞-好中球相互作用によるアレルギー反応調節の可能性

○中村 萌里¹、鈴木 亮¹ (1金沢大院・医薬保)

【目的】花粉症をはじめとするアレルギー疾患の発症には、マスト細胞が重要な役割を担っている。アレルゲンによって活性化されたマスト細胞は、ヒスタミンをはじめとする様々な炎症性メディエータを分泌し炎症反応を誘導している。また、マスト細胞は炎症組織に浸潤してくる様々な免疫細胞と相互作用することによって、複雑なアレルギー反応を調節していると考えられている。アレルギー疾患モデルマウスを用いた我々の研究から、アレルギー炎症組織において、活性化したマスト細胞と外来異物に対する貪食作用を有する好中球が、近傍に存在し相互作用している様子が観察された。本研究では、マスト細胞と好中球の細胞間相互作用と相互作用を介したアレルギー反応調節の可能性について検討した。

【方法】マスト細胞はマウス骨髄細胞を IL-3 及び SCF の存在下で 1 ヶ月間培養し分化させた骨髄由来マスト細胞を用いた。好中球はマウス骨髄細胞から Neutrophil Isolation Kit により単離したものをを用いた。これらの細胞をマトリゲルコートしたディッシュ上で培養し、マスト細胞の刺激応答に伴う細胞間相互作用を生細胞イメージングや免疫染色法を用いて追究した。マスト細胞の特異的な刺激は、抗 DNP-IgE 抗体を感作させたマスト細胞に対して、特異抗原 (DNP-HSA) を用いて行なった。また、*in vivo* 疾患モデルには受動皮膚アナフィラキシー (PCA) を用いた。

【結果・考察】はじめに、マウス骨髄細胞から分化または単離したマスト細胞や好中球について分化・単離状態の確認を行なった。フローサイトメータを用いたマーカータンパク質の解析から、両細胞とも 90%以上の純度で分化・単離できていることが分かった。そこで、得られたマスト細胞と好中球をマトリゲルコートしたディッシュ上で共存培養し、マスト細胞の抗原刺激応答に伴う両者の相互作用を生細胞イメージングを用いて追究した。その結果、マスト細胞の活性化に伴って好中球がマスト細胞方向に向かって移動し、両者が相互作用している様子が観察された。さらに、免疫染色法を用いて相互作用を追究したところ、好中球の細胞膜タンパク質がマスト細胞へ移動しており、マスト細胞へ取り込まれている様子も観察された。次に、ここで観察された好中球膜タンパク質のマスト細胞への移動について解析した。共存培養下でマスト細胞を特異的に活性化し、培養液中に存在する好中球由来膜タンパク質を定量した。その結果、抗原刺激 1 時間後の培養液において、好中球由来膜タンパク質量が増加していることが明らかになった。さらに、アナフィラキシーモデルを用いた *in vivo* 疾患モデルを用いて解析したところ、*in vitro* で観察されたのと同様に好中球で発現する膜タンパク質のマスト細胞への取り込みが観察された。これらのことから、マスト細胞と好中球は抗原刺激応答に伴って相互作用しており、好中球由来膜タンパク質を介してアレルギー応答を調節している可能性が示唆された。

1-院-3

Tumor secreting proliferin inhibits adipogenesis and causes cachexia.

○ Nguyen Duc Tuan¹, 宮竹佑治¹, 吉田孟史², 華山力成^{1,2}

1. 金沢大・医・免疫学、2. 金沢大・WPI NanoLSI

【目的】

Cachexia is a wasting disorder accompanied by malignant diseases and multiple chronic non-malignant diseases. In malignant diseases, tumor-derived factors induce cancer-associated cachexia (CAC), which impairs quality of life in the patients, limits the cancer therapies and decreases the survival time. CAC results from disorders of different processes and one of them is a disorder in adipogenesis. Adipogenesis is a process of differentiation from pre-adipocytes into mature adipocytes, and accumulation of lipid in the mature adipocytes. However, mechanisms by which cancer inhibits the adipogenesis have been poorly understood. In this study, we attempted to identify adipogenesis inhibiting factors released from cancer and clarify their effects on CAC.

【方法】

Firstly, we tried to evaluate effects of several cancer cell lines on adipogenesis by stimulating pre-adipocytes with each conditioned medium. To identify inhibitory molecules released from tumor cells, we performed a mass spectrometry analysis and identified 19 secreting proteins as candidates. For further identification, we generated the recombinant proteins and tumor cells knocking out (KO) the genes. To determine a key factor, the recombinant proteins or conditioned media of the KO tumor cells were treated to pre-adipocytes, and evaluated maturation of adipocytes and accumulation of lipid droplet by Oil red O staining. To explore the mechanism, expression of genes involved in adipogenesis was analyzed by RTqPCR. In order to confirm the phenomenon in *in vivo* model, we performed intraperitoneal injection of the recombinant protein into mice and followed adipose tissue weight. Furthermore, to clarify roles of the factors *in vivo* CAC model, we transplanted wild type or KO tumor cells into the mice. Amounts of food intake or water consumption were followed in the alimantation. Finally, the mice were sacrificed, and measured body weight, tumor weight and adipose tissue weight.

【結果・考察】

The conditioned media of FM3A or Ehrlich cells strongly inhibited adipogenesis. Based on the protein analysis by mass spectrometry, we found that proliferin (PLF) is a promising inhibitory molecule secreted from the tumor cells. The *in vitro* adipogenesis model showed that PLF recombinant protein dramatically inhibited adipogenesis. PLF recombinant protein suppressed the expression of important genes involved in differentiation of pre-adipocytes or accumulation of lipid droplet, including *Ppar-g*, *C/ebp-a*, *Acc*, *Fasn*, *Scd1* and *Srebf1c*. Furthermore, the adipogenesis inhibition was impaired by the conditioned media of *Plf*-KO tumor cell lines. In the injection of recombinant protein study, gonadal adipose tissues decreased about 20% in the mice treated with PLF recombinant protein compared with control mice. In *in vivo* CAC model of Ehrlich cells, wild type cells decreased 50% of gonadal adipose tissue, on the other hand *Plf*-KO tumor decreased only 15%. These results revealed PLF plays an important role in the loss of fat in CAC.

1-院-4

副腎白質ジストロフィーの発症機構：*Abcd1* 欠損ミクログリアの免疫応答の異常

○^よ ^だ ^{だい} ^き 依田大輝、^{かい} ^ざ ^{わた} ^{ろう} 螺澤太郎、^{もり} ^{たま} ^{さし} 守田雅志、^{そう} ^{たか} ^{のり} 宗孝紀（富山大院薬）

【目的】

副腎白質ジストロフィー (Adrenoleukodystrophy, ALD) はペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能欠損を原因とする炎症性の脱髄疾患であり、組織における極長鎖脂肪酸の異常蓄積を特徴とする。本疾患の発症機序として、脳に蓄積した飽和極長鎖脂肪酸がミトコンドリアの機能障害などを引き起こし、これにより活性化されたミクログリアやアストロサイト、及び脳内に浸潤したリンパ球による炎症反応が脱髄反応を引き起こすことが想定されている。しかし、その詳細な発症機序は未だ明らかになっていない。本研究では、その発症機序を解明する目的で、特に ABCD1 を多く発現しているミクログリアに着目し、この分子の欠損が特に自然免疫応答にどのような影響を及ぼすかについて解析した。

【方法】

生後 1~2 日の野生型及び *Abcd1* 欠損のマウス的大脑を用いて、混合グリア細胞を培養し、ディッシュへの接着能の違いを利用してミクログリアを得た。このミクログリアにリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を一定時間作用させ、リアルタイム定量 PCR により遺伝子の発現量を解析した。また、LPS 及びニゲリシン (Nigericin) の共刺激でインフラマソームを活性化させることで、培地中に分泌される IL-1 β の産生量を ELISA により定量した。

【結果】

未刺激時において、*Abcd1* 欠損ミクログリアでは野生型に比べ、極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の低下が認められた。また、ミクログリアの活性化マーカーである *Mrc1* や *Cd83* 遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子である *iNos* や *Sod2* 遺伝子の発現量が、*Abcd1* の欠損により有意に上昇することが判明した。一方、LPS 存在下では *Ch25h* 及び *Aim2*、*Nlrp3* 遺伝子の発現量が、*Abcd1* の欠損により有意に上昇することがわかった。さらに、脳内炎症に關与する IL-1 β の産生量を解析した結果、LPS 単独処理では IL-1 β の産生は認められなかったが、LPS とニゲリシンの共刺激により、*Abcd1* 欠損ミクログリアで IL-1 β の分泌量が増加する傾向が認められた。

【考察】

本疾患の発症機序として、ABCD1 を欠損するミクログリアが IL-1 β を過剰に産生することでアストロサイトが異常に活性化され、これにより分泌されるケモカインがリンパ球の脳内への遊走を促進する可能性が考えられる。本研究から、*Abcd1* 欠損ミクログリアが弱く活性化された状態であり、外部刺激に対して NLRP3 インフラマソームの異常活性化が起こり、IL-1 β が過剰に分泌されることが推察された。したがって、*Abcd1* 欠損ミクログリアの自然免疫応答の異常と本疾患の発症と間に何らかの因果関係が存在することが示唆された。

1-院-5

単純ヘルペスウイルス I 型感染マウスにおける帯状疱疹痛へのマクロファージ系細胞の関与

○^{たんぼ}丹保宗一郎¹、^{うただいすけ}歌大介¹、^{くめとしあき}久米利明¹、^{あんどうつぐのぶ}安東嗣修¹ (富山大学大学院 医学薬学研究部 応用薬理学研究室)

【目的】帯状疱疹は、後根神経節に潜伏感染していた水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)が再活性化することで発症する。帯状疱疹患者には激しい疼痛が現れるが、その中でもアロディニア(異痛症)は患者の生活の質に影響を及ぼす。さらに、皮膚病変発症時の疼痛が強い患者は皮膚病変治癒後も疼痛が残存する帯状疱疹後神経痛に移行するため、皮膚病変発症時の疼痛コントロールが重要である。帯状疱疹性疼痛は神経の炎症・障害によって引き起こされるが、古くから神経の炎症・障害には脊髄免疫系細胞が重要な役割を担っていると言われてきた。その中でもマクロファージ系細胞はこれまでに神経障害性疼痛の発生に関与していることが示唆されている。そこで本研究は、帯状疱疹性疼痛の発生におけるマクロファージ系細胞の関与を検討した。

【方法】帯状疱疹を発症させる VZV は種特異性が高いため、VZV と同じ α -ヘルペスウイルス亜科に属する単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1)を用いることで帯状疱疹性疼痛モデルを作製した。雌性 C57BL/6j マウスの右後肢を除毛し、右後肢大腿部の表皮を乱切した後、 1×10^6 PFU の HSV-1 を経皮接種した。疼痛の評価に際しては、画用絵筆による撫で刺激を後肢足蹠に加え、次のように3段階にスコア化した。0 点= 反応なし、または後肢をずらす動作、1 点 = 腹部方向への後肢の引き上げ動作、2 点= 後肢の振り動作、舐め動作、または持続的な後肢の引き上げ動作。撫で刺激は6回加え、その合計をスコアの最大値で割ることで疼痛関連スコアを算出した。脊髄後角における各種抗体(HSV-1, CD68 及び CCR2)の発現は蛍光免疫染色により検出し、MCP-1 mRNA の発現レベルは real time-PCR 法で数値化した。

【結果・考察】HSV-1 感染マウスの疼痛は接種後3日目から、皮膚病変は5日目から発生し、どちらも7日目に最大となった。皮膚病変はその後治癒したが、疼痛に関しては皮膚病変治癒後も持続した。HSV-1 感染マウスの脊髄において、HSV-1 の増加が接種後3日目から生じ、5日目に最大となった。マクロファージ系細胞マーカーである CD68 の陽性細胞数は接種後5日目から増加し、7日目で最大となった。また、マクロファージの遊走因子である MCP-1 の mRNA 発現は HSV-1 感染マウスの脊髄において接種後5日目に増加していた。さらに、脊髄内で増加した CD68 陽性細胞の多くが MCP-1 の受容体である CCR2 を発現していた。従って、骨髄由来マクロファージが MCP-1 によって脊髄内へ浸潤したと考えられる。以上より、脊髄内での HSV-1 の増加による MCP-1 の産生・遊離に続き遊走された CCR2 発現陽性マクロファージが帯状疱疹性疼痛の発生に寄与している可能性が示唆される。

1-院-6

ヒト肝がん細胞における Thyroid Adenoma Associated (THADA) の病態生理機能の解明

○^{かとうみずき}加藤瑞希¹、^{ふじいたくと}藤井拓人¹、^{しみずたかひろ}清水貴浩¹、^{たぶちよしあき}田渕圭章²、^{さかいひでき}酒井秀紀¹ (富山大院薬¹、富山大生命科学研セ²)

【目的】

ナトリウムポンプ (Na⁺,K⁺-ATPase) の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、その抗がん作用が注目されている。我々は、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に強心配糖体 ouabain を処理し、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、顕著に発現が低下する遺伝子として Thyroid Adenoma Associated (THADA) を見出した。THADA は、ヒトの進化において重要な遺伝子であり、ゲノムワイド関連解析において 2 型糖尿病のリスク遺伝子のひとつとして報告されているが、タンパク質レベルでの機能解析は進んでいない。本研究では、ヒト肝がん細胞における THADA の病態生理機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

強心配糖体として ouabain および digoxin を用いた。HepG2 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析および RT-PCR により THADA mRNA の発現検討を行った。また、ヒト大腸がん由来 HT-29 細胞よりクローニングした THADA 発現ベクターを、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞にトランスフェクションした強制発現系において抗 THADA 抗体の特異性を確認した。THADA タンパク質の発現検討は、HepG2 細胞から調製した total lysate をサンプルとしたウェスタンブロットおよび免疫細胞染色により行った。

【結果・考察】

HepG2 細胞に ouabain (1 μM) を処理しマイクロアレイ解析および RT-PCR を行ったところ、THADA mRNA の顕著な発現低下が観察された。抗 THADA 抗体を用いたウェスタンブロットにおいても、ouabain 処理 (300 nM、1 μM) による THADA タンパク質 (約 190 kDa) の発現低下が観察された。HepG2 細胞において、THADA は細胞質内に発現しており、ouabain 処理により THADA の蛍光シグナルが減少した。Digoxin 処理も同様に、THADA タンパク質の発現を低下させた。また、ヒト肝細胞がん (HCC) 組織とその近傍の非がん組織において THADA の発現を比較したところ、HCC 組織において THADA mRNA およびタンパク質が高発現していた。

がん細胞における THADA タンパク質の発現制御メカニズムを明らかにするため、各種阻害剤を用いて検討を行った。興味深いことに、がん細胞の増殖や血管新生に関連する分子をターゲット遺伝子に多く含む転写因子である hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) の阻害剤 YC-1 を HepG2 細胞に処理したところ、HIF-1αの発現を低下させる濃度 (5 μM、10 μM) と相関して THADA タンパク質の発現低下が観察された。また、ouabain 処理 (300 nM、1 μM) により HIF-1αの発現が低下した。

以上の結果より、ヒト肝がん細胞において高発現する THADA は HIF-1 のターゲット遺伝子であり、強心配糖体による抗がん作用に HIF-1αの発現低下を介した THADA の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

1-院-7

容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャンネルの機能調節因子の解明

○^{たかはしりゅうた}高橋 隆大¹、^{しみずたかひろ}清水 貴浩²、^{おおのちえ}大野 智恵¹、^{まつだなつほ}松田 夏穂²、^{ふじいたくと}藤井 拓人²、^{さかいひでき}酒井 秀紀²

(¹ 富山大院薬、² 富山大薬)

【背景・目的】容積感受性外向き整流性 (volume-sensitive outwardly rectifying : VSOR) Cl⁻チャンネルは、ほぼすべての動物細胞においてユビキタスに発現し、細胞容積の恒常性維持に必須の分子として知られている。近年、このチャンネルの分子実体として LRRC8A (leucine-rich repeat containing protein 8 family, member A) が報告されたが、その全貌は未だ明らかになっていない。当研究室ではこれまでに、VSOR Cl⁻チャンネル活性を示すヒト口腔類表皮ガン KB 細胞と KB 細胞由来であるが、VSOR Cl⁻チャンネル活性を示さないシスプラチン耐性株 KCP-4 細胞を用いたプロテオミクス解析により、VSOR Cl⁻チャンネル関連分子として swelling-sensitive molecule-A (SSM-A) を見出している。

SSM ファミリーには、A の他に B、C のアイソフォームが属することから、本研究では、各 SSM の VSOR Cl⁻チャンネル機能に対する影響をパッチクランプホールセル記録法により検討した。また、SSM-A のキメラ変異体を作製し、SSM-A の VSOR Cl⁻チャンネル機能調節部位の同定を試みた。

【方法】本研究では、ヒト SSM-A、ヒト SSM-B およびヒト SSM-C を組み込んだ pIRES2-AcGFP ベクターをトランスフェクションしたヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞を用いた。GFP 蛍光により各 SSM が発現している細胞を選別し、パッチクランプホールセル記録法によりチャンネル機能を測定した。また、SSM-A の N 末端領域と SSM-B および SSM-C の N 末端領域を PCR によって組み替えたキメラ変異体を作製した。このキメラ変異体を発現させた HEK293T 細胞にもパッチクランプホールセル記録法を適用した。さらに、ヒト SSM-A を組み込んだ pcDNA6/V5-His A ベクターを用いて外因的に発現させた SSM-A と内在的に発現している LRRC8A の相互作用について検討するため、抗 V5 抗体と抗 LRRC8A 抗体を用いた近接ライゲーション法 (PLA) を行った。

【結果・考察】パッチクランプホールセル記録法において、ベクターのみをトランスフェクションした mock 細胞に低浸透圧刺激を負荷したところ、細胞膨張に伴い、外向き整流性 Cl⁻電流が観測された。この電流は脱分極位で時間依存的な不活性化を示したことから、VSOR Cl⁻チャンネル電流であることが示唆された。この VSOR Cl⁻チャンネル活性は、野生型 SSM-A を強制発現させることで有意に増大した。一方、SSM-B および SSM-C を強制発現させても、VSOR Cl⁻チャンネル活性の有意な亢進は見られなかった。SSM ファミリーでは N 末端領域に差異があることから、SSM-A の N 末端領域と SSM-B および SSM-C の N 末端領域を組み換えたキメラ変異体を作製した。これらのキメラ変異体において、SSM-A の強制発現によって観測された VSOR Cl⁻チャンネル活性の亢進が有意に減弱した。これらの結果は SSM-A の N 末端が VSOR Cl⁻チャンネル活性の制御に重要であることを示唆している。次に、SSM-A を強制発現させた細胞で PLA を行ったところ、ドット状のシグナルが検出されたことから、内在性 LRRC8A と SSM-A が相互作用している可能性が示唆された。

以上の結果から、SSM-B や SSM-C ではなく、SSM-A が VSOR Cl⁻チャンネルの調節因子であることが示唆された。VSOR Cl⁻チャンネルの SSM-A による制御は、SSM-A の N 末端領域が LRRC8A と直接相互作用してチャンネル機能の調節を行っている可能性が考えられた。

1-院-8

消化管間質腫瘍細胞における RSK 阻害剤 BI-D1870 の KIT 発現抑制による細胞増殖抑制効果

○石田勝也^{いしだ かつや}、福司弥生^{ふくしやよい}、周越^{しゅうえつ}、横山 悟^{よこやまさとる}、櫻井宏明^{さくらいひろあき}（富山大学・薬・がん細胞生物学）

【目的】KIT は細胞膜上に発現するチロシンキナーゼ型受容体の一つで、リガンドの結合により活性化し、下流にシグナルを送ることで細胞の増殖を制御している。消化管間質腫瘍（GIST）は、主に KIT に活性化変異が生じることによって、異常な細胞増殖が起こっている。治療には、KIT のチロシンキナーゼ活性を阻害する Imatinib が使用されているが、長期投与による二次変異の発生で耐性化することが問題となっている。今回、我々は、RSK 阻害剤である BI-D1870 が濃度依存的に GIST 細胞の細胞増殖を抑制する可能性を見出した。また、GIST 細胞において BI-D1870 が KIT の発現を抑制するメカニズムの解明を試みた。

【方法】ヒト消化管間質腫瘍細胞 GIST-T1 に対して阻害剤を処理後、KIT の発現や MAPK 経路の活性化をウエスタンブロット法で解析した。細胞増殖は WST-8 を用いて測定した。RT-PCR によって KIT の mRNA 発現を解析した。また、siRNA による RSK1、RSK2 ノックダウンを行い KIT の発現変化を解析した。

【結果・考察】GIST-T1 細胞に対して Imatinib を処理すると、KIT の活性化が抑制された。次に、RSK 阻害剤である BI-D1870 を処理したところ、KIT の活性化ではなく発現が抑制された。BI-D1870 処理時の KIT の発現が mRNA レベルで抑制されていた。そこで、両者を併用したところ KIT の発現減少と活性化減少がともに認められた。また、細胞増殖を測定すると、BI-D1870 と Imatinib ともに細胞増殖が抑制され、両者併用時にはさらなる細胞増殖抑制効果が認められた。次に、siRNA を用いて RSK1、RSK2 をノックダウンしたところ、KIT の発現に変化はなかったことから、BI-D1870 の KIT 発現抑制は RSK1、RSK2 を介した経路ではなく、別の経路に作用して KIT の発現を抑制していると考えられた。

BI-D1870 は KIT の発現を mRNA レベルで抑制し、細胞増殖を抑制することがわかった。また、Imatinib と併用することで、さらなる細胞増殖抑制を示すことがわかった。今後は、さらに作用機序を解明するとともに、BI-D1870 に作用が、二次変異を獲得した細胞に対しても KIT 発現抑制効果を示すのかを検討する予定である。

1-院-9

認知症発症を加速する骨格筋分泌性因子

○^{ながせつかき}長瀬 綾沙、^{とうだちひろ}東田 千尋（富山大和漢研）

【目的】

アルツハイマー病（AD）は不可逆的進行性の神経変性疾患であり、その治療の難しさから現在はADの早期発見や予防に関心が高まっている。ADの予防に運動の有効性が示唆され、骨格筋から分泌される myokine が認知機能の維持に関与しているのではないかと考えられている。逆に、骨格筋の萎縮と認知機能低下の因果関係とその分子機序を明確に示した研究はほとんどない。そこで本研究は、筋萎縮によりADの認知機能低下が早まる現象の検証とそのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

ADモデルとして5XFADマウス、対照として野生型マウスを用いた。5XFADマウスは5種類の家族性変異遺伝子を神経細胞特異的に過剰発現させたADモデルであり、およそ生後6週目からAβ沈着、生後16週目から認知障害が認められる。11-14週齢のマウスの後肢をcastにより14日間固定して廃用性筋萎縮を誘導し、物体認知記憶試験および場所認知記憶試験を行った。後肢骨格筋を萎縮させた5XFADマウスにおいて認知障害が発症した。脳内のAβ沈着の程度の変化を調べるため、脳切片のチオフラビンT染色によりAβ数を定量した結果、前帯状皮質、脳梁膨大後部皮質、嗅周皮質の3部位においてはcast装着した5XFADと非装着5XFADの間で差は見られなかった。

筋萎縮によるAD発症加速のメカニズム解明のため、骨格筋の萎縮により分泌が増加するタンパク質の同定を行った。Cast装着群及び非装着群から、それぞれ前脛骨筋と腓腹筋を摘出してこれをorgan cultureした後、培養上清を回収し2D-PAGEによりタンパク質の発現量を比較した。MALDI-TOF/MS解析により、cast装着群の培養上清中でhemopexinが増加することがわかった。Cast装着5XFADおよび非装着5XFADから得られた血漿、および腓腹筋lysateをウェスタンブロット法により解析した結果、cast装着群においてhemopexin発現量が増加している傾向がみられた。

【考察】

以上、骨格筋の萎縮によりADモデルマウスの認知障害発症が早まることが明らかとなった。萎縮した骨格筋からの分泌が促進する因子としてhemopexinを同定した。骨格筋萎縮に伴い、hemopexinは血中でも増加したことから、骨格筋から分泌されたhemopexinが血中に移行する可能性が考えられる。Hemopexinが脳内に移行して認知障害発症に関わると想定し、現在それを検討中である。

1-院-10

レゾルビン E1 の抗うつ作用における内側前頭前野内 BDNF、VEGF 遊離と mTORC1 活性化の関与

○^{あおきしゅん}青木 駿¹、^{でやまさとし}出山 諭司¹、^{いしむらこうへい}石村 航平²、^{ふくだはやと}福田 隼^{2,3}、^{しゅうとうざとし}周 東 智²、^{みなみまさぶみ}南 雅 文²、^{かねだかつゆき}金田 勝幸¹ (金沢大院薬¹、北海道大院薬²、長崎大院医歯薬³)

【目的】近年、NMDA 受容体拮抗薬ケタミンが、単回投与で即効性の抗うつ作用を示し、治療抵抗性うつ病患者にも有効であることから大きな注目を集めている。しかし、ケタミン自体の抗うつ薬としての使用は、依存性や幻覚・妄想などの副作用のため大きな制約がある。そこで、ケタミン様の副作用は示さないが、ケタミンと類似の機序で抗うつ作用を示す化合物を見出すことが、新たな治療抵抗性うつ病治療薬開発の近道であると考えられる。我々は、その候補としてエイコサペンタエン酸の活性代謝物レゾルビン E1 (RvE1) に着目し、リポポリサッカライド (LPS) 誘発うつ病モデルマウスにおいて、RvE1 側脳室内投与が抗うつ作用を示すこと、その抗うつ作用が mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 阻害薬ラパマイシン腹腔内投与により抑制されること、並びに、内側前頭前野 (mPFC) への RvE1 局所投与によっても抗うつ作用が発現することを明らかにしてきた。しかしながら、RvE1 の抗うつ作用メカニズムについては不明な点が多く残されており、その臨床応用のためには、代謝・分解を受けやすい RvE1 を非侵襲・効率的に脳内に送達する手法の確立が必要である。そこで本研究では、LPS 誘発うつ病モデルマウスを用いて、RvE1 経鼻投与が抗うつ作用を示すか否か、並びに、その抗うつ作用における AMPA 受容体と電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) の活性化、mPFC 内脳由来神経栄養因子 (BDNF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) 遊離および mTORC1 活性化の役割について検討した。

【方法】雄性 C57BL/6J マウスに LPS を腹腔内投与し、その 23 時間後に RvE1 を経鼻または mPFC 内投与した。RvE1 投与 1 時間後に 10 分間の運動量を測定した。また、抗うつ作用の評価のために、RvE1 投与 3 時間後に尾懸垂試験、5 時間後に強制水泳試験を行った。尾懸垂試験では、マウスの尾をフックに固定して逆さ吊りにし、6 分間の無動時間を計測した。強制水泳試験では、水を入れたビーカー (24 ± 1 °C、水深 15 cm) にマウスを入れ、6 分間強制的に水泳させ、2-6 分間の無動時間を計測した。

【結果・考察】尾懸垂試験および強制水泳試験において、RvE1 経鼻投与により、LPS 投与による無動時間延長が抑制されたことから、RvE1 経鼻投与が抗うつ作用を示すことが明らかとなった。この抗うつ作用は、AMPA 受容体拮抗薬 NBQX または VDCC 阻害薬 verapamil の腹腔内投与により有意に抑制された。また、RvE1 経鼻および mPFC 内投与による抗うつ作用は、BDNF 中和抗体 (nAb)、VEGF nAb またはラパマイシンの mPFC 内投与によって完全に抑制された。なお、いずれの処置も運動量には影響を与えなかった。以上の結果より、RvE1 はケタミンと同様に、mPFC における AMPA 受容体および VDCC の活性化に続く BDNF と VEGF の遊離と、その下流の mTORC1 の活性化を介して抗うつ作用を示すことが示唆された。

1-院-11

2型糖尿病防止に関わる中枢性代謝調節機構における嗅覚系の役割の解析

○^{まつだひろき}松田大樹、^{つねきひろし}恒枝宏史、^{おおにしけんご}大西兼悟、^{まつおかゆきな}松岡幸奈、^{ゆぶねこはる}湯舟香春、^{わだ}和田 ^{つとむ} 努、^{ささおかとしやす}笹岡利安（富山大院薬）

【目的】糖・脂質代謝の恒常性を維持するために末梢のホルモン作用に加え、脳を中心とした臓器連関が重要な役割を果たしている。特に脳は食前に末梢臓器の代謝恒常性を変化させ、代謝機能を向上させるため、糖尿病などの代謝疾患の重要な治療標的と考えられている。しかし、この中枢機構を制御する薬物治療法は未確立である。そこで我々は、代謝に関わる脳機能を調節する介入法として嗅覚機能に着目した。食餌の匂いなどの知覚情報が脳神経系を介して代謝を調節することが古くから知られている。この機構の賦活化が食前の代謝様式の調節を介して代謝機能を最適化し、代謝異常の防止に寄与する可能性が考えられるが、これまで嗅覚系と代謝系の連携機序や意義はほとんど検討されていない。そこで本研究ではマウスを用いて、1) 空腹時の食餌の匂い刺激が糖・脂質代謝機能を向上させること、また2) 嗅球摘除による嗅覚系の破壊が代謝機能を破綻させることを仮定し、代謝調節における嗅覚系の意義を検証した。

【方法】マウスに対する食餌性嗅覚刺激法として、多数の小孔を有する遮光瓶内に餌を充填し、視覚情報を与えることなく絶食マウスに食餌の匂いを受容させた。嗅覚刺激後の糖・脂質代謝の急性的変化を解析するため、経口糖負荷試験(OGTT)、ELISA によるインスリンおよび血清遊離脂肪酸測定、および小動物用代謝測定システムによる呼吸商解析を行った。また、嗅覚刺激後の糖・脂質代謝に対する長期的影響を検証するため、高脂肪食負荷による肥満マウスに週2回、食餌性嗅覚刺激を16週間行い、OGTTで耐糖能の変化を解析した。さらに、嗅球摘除(OBX)したマウスに高脂肪食を負荷し、糖負荷試験やGeneChip法による遺伝子発現解析を行い、嗅覚消失の影響を検証した。

【結果・考察】嗅覚系と代謝系の連関を実証するため、まず1)、正常 C57BL/6J マウスに対し、空腹時に食餌性嗅覚刺激を行い、糖脂質代謝の急性的変化を解析した結果、刺激後1時間において血糖値は不変であったが、血中の遊離脂肪酸の増加を認め、エネルギー源として脂質の動員が認められた。しかも、再摂食後において呼吸商を指標に糖・脂質代謝様式を解析した結果、非刺激群が糖代謝型を呈するのに対し、嗅覚刺激群は脂質代謝型を示すことを見出した。レプチン抵抗性を示す食餌性肥満マウスおよび遺伝性肥満 db/db マウスでは嗅覚刺激後の再摂食時における呼吸商の変化は認められなかった。このように、食直前の食餌性嗅覚刺激はレプチン依存的に代謝適応を惹起し、再摂食後に脂質の燃焼を促進することが示された。次に、長期的に嗅覚刺激を高脂肪食負荷マウスに与え、糖・脂質代謝に及ぼす影響を検証した結果、体重変化を伴うことなく、随時血糖値の低下を認めた。OGTTにおいても、嗅覚刺激群では耐糖能異常の改善を認めた。また、インスリン抵抗性指標のHOMA-IRも嗅覚刺激群で低下した。したがって、長期的な食餌性嗅覚刺激は肥満に伴う耐糖能異常とインスリン抵抗性を防止することが示された。一方、2) 嗅覚消失が糖・脂質代謝に及ぼす影響を高脂肪食負荷した OBX マウスを用いて検証した結果、偽手術群と比べ、OBX マウスは糖負荷試験において耐糖能異常を呈した。肝臓における遺伝子発現の網羅的解析の結果、糖尿病、非アルコール性脂肪肝、炎症、および肝線維化との関連が認められ、嗅覚系の存在意義が示された。以上、嗅覚系は糖・脂質代謝の調節や代謝異常の防止に不可欠であり、現在の末梢臓器を標的とした糖尿病治療を補完する新しい介入法となる可能性が示された。

1-院-12

2型糖尿病マウスにおける不眠症治療薬レンボレキサントの糖代謝改善効果

○^{さとうきよふみ}佐藤清史、^{つねきひろし}恒枝宏史、^{こん かんた}今 寛太、^{わだ つとむ}和田 努、^{さきおかとしやす}笹岡利安（富山大院薬 病態制御薬理学）

【目的】

血糖値はインスリンなどのホルモンによる末梢作用だけでなく脳神経機能によっても制御されている。睡眠障害は脳機能に悪影響を与え、2型糖尿病の発症リスクを増加させる。本知見に合致して、2型糖尿病モデルマウスは睡眠障害を呈するが、不眠症治療薬が2型糖尿病病態に及ぼす影響は不明である。最近、当研究室では2型糖尿病 *db/db* マウスにおいて不眠症治療薬のスボレキサント（オレキシン受容体拮抗薬）が睡眠障害と耐糖能異常を改善することを報告したが、両改善作用の関連は不明である。そこで本研究では、睡眠と糖代謝が連関することを実証するため、1) スボレキサントと化学構造の異なるオレキシン受容体拮抗薬レンボレキサントも睡眠障害と耐糖能異常を改善する、2) 睡眠障害を呈さない非糖尿病 *db/m+* マウスではレンボレキサントが糖代謝に影響しない、および3) 生理的な睡眠とは異なる鎮静的睡眠を誘発するベンゾジアゼピン系睡眠薬ジアゼパムは2型糖尿病病態を改善しないとの仮説を検証した。

【方法】

2型糖尿病モデルマウスとして高脂肪食を負荷した食餌性肥満 C57BL/6J マウスおよび遺伝性肥満 *db/db* マウスを、対照群として非糖尿病 *db/m+* マウスを用いた。不眠症治療薬レンボレキサントまたはジアゼパムは休息期開始時（7:00 a.m.）に3~9週間連日投与した。耐糖能、インスリン感受性、およびインスリン分泌能はそれぞれグルコース負荷試験（GTT）、インスリン負荷試験（ITT）、およびグルコース誘発性インスリン分泌試験（GSIS）で解析した。エネルギー消費量および自発運動量は小動物代謝測定装置で解析した。行動量の変化と脳高次機能の関連を検証するため、記憶学習、不安、およびうつ様行動をY字迷路試験、高架式十字路試験、および強制水泳試験で解析した。

【結果・考察】

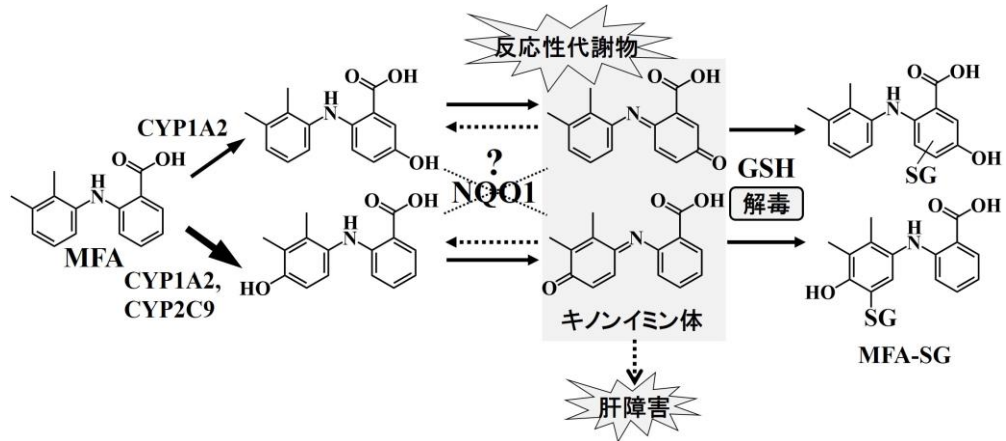
睡眠を誘発する用量のレンボレキサントを休息期開始時に3週間以上連日投与し、GTTを行った結果、食餌性肥満マウスの耐糖能が改善した。同様に、*db/db* マウスにおいてもレンボレキサントによる耐糖能の改善効果を認めた。なお、ITT および GSIS では変化を認めなかった。また、体重およびエネルギー消費量は変化しなかった。このように、レンボレキサントはインスリン感受性、インスリン分泌、およびエネルギーバランスの変化を介さずに、耐糖能を改善することが示された。さらに、レンボレキサントは活動期の自発運動量を増加させた。しかし、記憶学習、不安およびうつ様行動に変化は認められなかった。したがって、レンボレキサントはこれらの脳機能に影響せず、むしろ睡眠の質と共に覚醒の質を向上させることが示唆された。非糖尿病 *db/m+* マウスでは、レンボレキサントによる耐糖能の変化が認められず、本薬物による代謝改善作用が睡眠依存的であることが示された。一方、ジアゼパムを休息期開始時に3週間連日投与し、GTTを行った場合、*db/db* マウスの耐糖能異常は改善せず、生理的な睡眠の促進が耐糖能の改善に不可欠であることが示された。以上より本研究は、オレキシン系を標的とした睡眠の改善が不眠を伴う2型糖尿病の病態改善に有用であることを明らかにし、糖尿病の新規時間治療の概念を提示した。

1-院-13

メフェナム酸の代謝物キノニンミン体の解毒を担うヒト肝臓中酵素の同定

○^{おぎそたくお}小木曾巧朗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}、^{なかじまみき}中島美紀^{1,2}(金沢大院薬¹、金沢大 WPI ナノ生命科学研究²)

【目的】医薬品化合物の代謝反応は一般に解毒反応であるが、時に、不安定で生体の高分子に結合する反応性代謝物を生成し、様々



な毒性を引き起こすことがある。頭痛や関節炎等の治療に用いられているメフェナム酸 (MFA) の副作用として肝障害が報告されており、反応性代謝物キノニンミン体が原因と考えられている (上図)。キノニンミン体はグルタチオン(GSH) 抱合を受けて解毒されるが、細胞内の GSH が枯渇すると生体高分子と結合して細胞機能を低下させる。キノニンミン体は NADPH-キノノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1) によって還元され得るが、ヒト肝臓に NQO1 は発現していない。本研究では MFA による肝障害に対して、NQO1 に代わる解毒酵素が存在するか明らかにすることを目的とした。

【方法】CYP1A2 および CYP2C9 発現系と MFA をインキュベートして生成したキノニンミン体を GSH 抱合体 (MFA-SG) として検出し、キノニンミン体の解毒酵素が存在する場合に GSH 抱合体の生成量が減少することを想定し、ヒト肝臓サイトゾル (HLC) またはミクロソーム (HLM) を添加した際の GSH 抱合体生成量の変化を評価した。GSH 抱合体生成量の減少が認められた HLC から責任酵素を精製し、単離・同定した。MFA の他に、フルフェナム酸 (FFA)、トルフェナム酸 (TFA)、アセトアミノフェン、アモジアキン、ジクロフェナク、ラパチニブのキノニンミン体を GSH 抱合体として LC-MS/MS で検出し、HLC またはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)1 を添加して GSH 抱合体の生成減少量を評価した。

【結果・考察】CYP1A2 もしくは CYP2C9 による MFA-SG 生成量は、HLM よりも HLC を添加することにより有意に減少した。HLC よりキノニンミン体解毒酵素を精製したところ、SOD1 が単離・同定された。SOD1 が MFA のキノニンミン体生成を抑制する酵素であることは、CYP1A2 発現系に SOD1 を添加すると MFA-SG 生成量が減少したこと、ヒト個人肝臓 19 検体における SOD1 発現量と HLC 存在下での CYP1A2 発現系による MFA-SG 生成量との間に有意な負の相関関係が認められたことから支持された。キノニンミン体を生成する医薬品の中で MFA と構造が類似している FFA および TFA の GSH 抱合体生成量も HLC または SOD1 の添加によって有意に減少した。したがって、フェナム酸系 NSAIDs から生成するキノニンミン体を SOD1 が減少させることが示された。SOD1 は活性酸素種の 1 つスーパーオキシドを分解する酵素として知られているが、本研究では SOD1 がキノニンミン体の解毒酵素としても働くことを明らかにした。

1-院-14

ヒト肝臓における UGT2B7 の RNA メチル化による転写後調節

○音頭今日子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】 *N*⁶-Methyladenosine (*m*⁶A) 修飾は真核生物の mRNA に広く認められる RNA メチル化修飾の一つである。*m*⁶A 修飾は writer と呼ばれる methyltransferase-like 3 (METTL3)-METTL14 複合体により触媒される一方、*m*⁶A は eraser と呼ばれる fat mass and obesity-associated protein (FTO) または alkB homolog 5, RNA demethylase (ALKBH5) により脱メチル化される。*m*⁶A 修飾は、mRNA 上のコンセンサス配列 5'-DRACH-3' (D = A/G/U; R = A/G; H = A/C/U) で認められ、mRNA の安定性や立体構造、翻訳に影響を与える。本研究では、種々の医薬品に加えビリルビンなどの内因性化合物のグルクロン酸抱合を担う UDP-glucuronosyltransferase (UGT) に着目し、RNA メチル化がヒト肝臓における UGT の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 分化させたヒト肝癌由来 HepaRG 細胞に RNA メチル化阻害剤である 3-deazaadenosine (DAA) を処置し、UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A9、2B7、2B10 および 2B15 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により評価した。ヒト肝癌由来 Huh7 細胞に siRNAs (siControl, siMETTL3, siMETTL14, siFTO, or siALKBH5) を導入し、UGT2B7 または hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) の mRNA またはタンパク質発現量をリアルタイム RT-PCR またはウェスタンブロッティングにより評価した。HepaRG 細胞またはヒト肝臓組織より調製した total RNA を用いて *m*⁶A 抗体で免疫沈降し、UGT2B7 mRNA 量を評価した。

【結果・考察】 HepaRG 細胞の DAA 処置により UGT1A6 を除く全ての UGT 分子種の mRNA 発現量が 1.3-2.6 倍に有意に増加し、RNA メチル化が複数の UGT 分子種の発現を負に制御する可能性が示された。医薬品および内因性化合物の代謝への寄与が大きい分子種として UGT2B7 に着目し、以降の検討を行った。培養細胞として頻用されている Huh7 細胞において、UGT2B7 の mRNA およびタンパク質発現量は、METTL3 と METTL14 のダブルノックダウンにより約 1.5 倍増加した一方、FTO または ALKBH5 のノックダウンにより 30% 程度減少した。通常、*m*⁶A 修飾は mRNA 上の終止コドン周辺を含む 3'-UTR に頻見されるのに対し、UGT2B7 は 5'-UTR において *m*⁶A 修飾を受けやすいことが、HepaRG 細胞またはヒト肝臓組織の total RNA に対する *m*⁶A 抗体を用いた免疫沈降により示された。RNA メチル化関連酵素のノックダウンによる UGT2B7 mRNA の発現変動の要因の一つとして転写活性の変化が考えられたため、UGT2B7 の発現を正に制御することが報告されている HNF4 α に着目した。Huh7 細胞における METTL3 と METTL14 のダブルノックダウンまたは ALKBH5 のノックダウンにより HNF4 α の mRNA およびタンパク質は変動しなかった一方、FTO のノックダウンにより 37-58% 減少した。したがって、UGT2B7 の発現は自身の RNA メチル化により負に制御されることに加え、HNF4 α の発現変動を介して間接的にも影響を受けている可能性が示された。

以上、本研究では RNA メチル化がヒト肝臓において UGT2B7 およびその上流因子である HNF4 α の転写後調節を担うことを示し、薬物動態の変動要因としての RNA メチル化の重要性を明らかにした。

1-院-15

NSAIDs のアシル CoA 抱合を触媒するヒト acyl-CoA synthetase 分子種の基質選択性

○^{はしづめひろき}橋爪洋樹¹、^{ふかみだつき}深見達基^{1,2}、^{みしまかんぢ}三島観知¹、^{あらかわひろし}荒川大¹、^{ちやんよんじょ}張永傑²、^{なかのまさたか}中野正隆^{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)

【目的】カルボン酸含有薬物 (Drug containing carboxylic acid: DCCA) は稀にアナフィラキシーや肝障害、スティーブン・ジョンソン症候群などの副作用を引き起こすことが報告されている。これらの副作用は DCCA のグルクロン酸抱合体が生体内高分子に結合することで惹起されると考えられている。しかし、DCCA はグルクロン酸抱合体よりも生体内高分子への結合能が高いアシル CoA 抱合体に代謝されることも知られている。アシル CoA 抱合反応を触媒する acyl-CoA synthetase (ACS) はヒトにおいて 26 分子種存在し、基質となる脂肪酸の炭素鎖長をもとに 5 つのファミリー (ACSS、ACSM、ACSL、ACSVL、others) に分類されるが、薬物代謝におけるヒト ACS の役割は不明である。本研究は薬物代謝の主要臓器であるヒト肝臓における各 ACS 分子種の発現量を評価しつつ、カルボン酸含有 NSAIDs に対するヒト ACS 分子種の基質選択性を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト個人肝臓 3 検体を用いてヒト ACS 26 分子種の mRNA を real-time RT-PCR により定量し、ヒト個人肝臓 28 検体における ACSL1 タンパク質発現量を Western blotting により評価した。バキュロウイルス感染能を利用し Sf-21 細胞を宿主として、ヒト ACSL1 と ACSM2B 発現系を作製した。基質対象のカルボン酸含有 NSAIDs として、プロピオン酸系 (アルミノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ロキソプロフェン、ケトプロフェン、(S)-ナプロキセン)、アントラニル酸系 (メフェナム酸)、フェニル酢酸系 (ジクロフェナク)、インドール酢酸系 (インドメタシン、スリンダク)、サリチル酸の 11 種類を選択し、ヒト肝臓ホモジネート、ヒト ACSL1 または ACSM2B 発現系におけるアシル CoA 抱合体生成量を LC-MS/MS により測定した。

【結果・考察】ヒト ACS 26 分子種のうち 20 分子種の発現がヒト肝臓で認められ、最も高い発現量を示した分子種は ACSL1 (45.9%)、次に高いのが ACSM2B (14.5%) であり、両者の合計がヒト肝臓 ACS mRNA 総発現量の約 60% を占めていた。ヒト肝臓において ACSL1 または ACSM2B が薬物のアシル CoA 抱合反応に高く寄与すると考え、これらの発現系を作製して 11 種類の NSAIDs の CoA 抱合体生成量を測定した結果、アルミノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ロキソプロフェン、ケトプロフェンの 5 種類の NSAIDs のアシル CoA 抱合活性が ACSL1 発現系においてのみ認められた。ヒト個人肝臓 28 検体における ACSL1 タンパク質発現量とこれらの 5 種類の NSAIDs のアシル CoA 抱合活性の間に有意な正の相関が認められた。以上より、プロピオン酸系 NSAIDs がヒト肝臓中でアシル CoA 抱合反応を受け、その責任酵素は ACSL1 であることを明らかにした。プロピオン酸構造を有する DCCA はグルクロン酸抱合反応のほかに CoA 抱合反応を受けるため、グルクロン酸抱合体に加えてアシル CoA 抱合体も副作用の原因代謝物となり得る可能性が考えられた。

1-院-16

In vivo 薬物輸送特性の評価を目的としたラット血液網膜関門スフェロイドモデルの確立

○山本 雄大、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】Inner blood-retinal barrier (BRB) は網膜毛細血管内皮細胞が形成する tight-junction (TJ) によって細胞間の非特異的な物質輸送を制限している一方、efflux pump が異物の排出を行うことで循環血液-網膜間における関門として機能している。従来の inner BRB 単細胞培養モデルは循環血液-網膜間の薬物輸送を評価する上では有用であるが、*in vivo* における薬物輸送特性を完全には再現できていないことが課題である。近年、blood-brain barrier をモデルとした多細胞スフェロイドが *in vivo* に近い系として確立され、TJ および efflux pump の機能を保持していることが報告されている。*In vivo* における inner BRB を再現した新たな系は inner BRB を介した物質輸送メカニズムの解明だけでなく、正常・病態時においてバリア機能を制御する因子の同定に貢献することが期待される。本研究では、inner BRB を構成する 3 種の細胞を用いて多細胞性スフェロイドを構築し、inner BRB バリア機能の *in vitro* による再現を試みた。

【方法】Inner BRB を構成する網膜毛細血管内皮細胞、網膜ペリサイトおよび Müller 細胞それぞれのモデル細胞である TR-iBRB2 細胞、TR-rPCT1 細胞および TR-MUL5 細胞を 1:1:1 の割合で agarose gel コーティングした 96-well プレート上に播種し、33°C にて 48 時間共培養した。タンパク質発現および efflux pump の機能はそれぞれ免疫染色および蛍光基質の取り込みによって解析を行った。

【結果・考察】本培養条件下におけるスフェロイド形成割合は 184/208 (個/well = 88%) であった。スフェロイドにおける免疫染色では、glutamine synthetase (TR-MUL5 細胞由来) 由来のシグナルが中心を占め、NG2 (TR-rPCT1 細胞由来) および GLUT1 (TR-iBRB2 細胞由来) 由来のシグナルが表面を覆うように検出された。この細胞配置から、スフェロイド外部は血液側、その内部は網膜側の構造を反映していると考えられた。3 種の細胞を用いたスフェロイドにおける FITC-dextran および Lucifer Yellow の取り込みは TJ を形成する TR-iBRB2 細胞無しのスフェロイドと比してそれぞれ 60% および 64% 低下した。TJ の崩壊を促す血管内皮増殖因子および最終糖化産物の処理によって FITC-dextran の取り込みはそれぞれ 1.8 倍および 1.6 倍に増加した。また、免疫染色において claudin-5 および zonula occludens (ZO-1) 由来のシグナルはスフェロイド表面に検出された。これらのことから、TJ がスフェロイド表面において形成されることが示唆された。P-glycoprotein (P-gp) 基質である rhodamine123 の取り込み解析の結果、阻害剤である verapamil および quinidine 共存下における蓄積はそれぞれ 5.1 倍および 6.1 倍に増加した。Breast cancer resistant protein 基質である BODIPY FL prazosin の取り込み解析の結果、阻害剤である Ko143 および dipyridamole 共存下における蓄積はそれぞれ 1.4 倍および 1.7 倍に増加した。また、multidrug resistance-associated protein 4 基質である 8-[fluor]-cAMP の取り込み解析の結果、阻害剤である benzylpenicillin および verapamil 共存下における蓄積は共に 1.2 倍に増加した。以上から、作製したスフェロイドにおいて、ABC 輸送担体を実体とする efflux pump が機能することが示唆された。続いて、EverFluor FL verapamil の取り込み解析を行ったところ、verapamil および pyrilamine 共存下における蓄積の変化は過去の TR-iBRB2 細胞単独の輸送解析結果とは異なり、*in vivo* における結果と類似した。以上のことから、スフェロイドにおいて inner BRB 特有のバリア機能が維持され、薬物輸送特性は TR-iBRB2 細胞単独モデルと比して *in vivo* に近いことが示唆された。本研究で得られたスフェロイドは inner BRB を介した薬物輸送の評価に有用であることが期待される。

1-院-17

血液脳関門における抗うつ薬 paroxetine の輸送特性

○むらやま村山 ゆか結香、あかぬま赤沼 しんいち伸乙、くぼ久保 よしゆき義行、ほそや細谷 けんいち健一 (富山大院薬)

【目的】 Paroxetine は SSRI に分類される抗うつ薬の 1 つであり、脳内セロトニン神経シナプスに発現するセロトニントランスポーターの阻害によって、うつ病症状を改善すると考えられている。しかし、paroxetine を含む SSRI を服用する患者のうち、約半数が十分な治療効果を得られていないことが報告されており、治療効果の向上が強く求められている。薬物の脳移行は、血液脳関門 (BBB) によって制御されている。したがって、BBB における paroxetine 輸送機構の理解は、paroxetine の脳への効率的な送達を可能にし、治療効果の向上および適切な薬物療法に繋がると期待される。本研究は、BBB における paroxetine 輸送機構解明を目的とした。

【方法】 BBB を介した循環血液から脳への³H]paroxetine 移行は、integration plot 法によって評価した。BBB における詳細な paroxetine 輸送は、BBB モデル細胞株である条件的不死化ラット脳毛細血管内皮細胞 (TR-BBB13 細胞) を用いて解析した。

【結果・考察】 BBB を介した循環血液から脳への³H]paroxetine 取り込みクリアランスは 313 $\mu\text{L}/(\text{min} \cdot \text{g brain})$ であり、BBB 非透過性化合物である D-mannitol のクリアランスと比較して、530 倍以上の高値であった。このことから、paroxetine は BBB を介して脳へ積極的に移行することが示唆された。TR-BBB13 細胞における³H]paroxetine 取り込みは、時間、温度および濃度依存性 ($K_m = 87.2 \mu\text{M}$) を示し、BBB における paroxetine 輸送は担体介在型であることが示唆された。阻害解析において、細胞への³H]paroxetine 取り込みは、既知の有機カチオン輸送担体の基質によって有意に阻害されなかった。また、BBB において新規 H^+ /有機カチオン対向輸送機構への関与が報告されている、pyrilamine や nicotine によっても、取り込みは有意に阻害されなかった。その一方で、duloxetine や maprotiline といったカチオン性薬物によって、取り込みは有意に阻害された。さらに、³H]paroxetine 取り込みは、イオン依存性および H^+ 共輸送、対向輸送の特性を示さなかった。以上から、BBB における paroxetine 輸送に、既知の有機カチオン輸送担体および新規 H^+ /有機カチオン対向輸送機構の関与は小さいことが示唆された。また、lysosomal trapping 阻害剤である monensin によって、paroxetine 取り込みは有意に阻害されなかったことから、BBB における paroxetine 輸送への lysosomal trapping の関与は小さいことが示唆された。以上の結果から、BBB を介した paroxetine の脳移行には、既知の有機カチオン輸送担体および新規 H^+ /有機カチオン対向輸送機構とは異なる、担体介在型の輸送機構が関与することが示唆された。

リソソーム膜 ABC トランスポーター ABCD4 によるビタミン B₁₂ 輸送機構の解析

きたいかつき かわぐちこうすけ もりたまさし いまなかつねお そうたかのり
 ○北井克樹¹、川口甲介¹、守田雅志¹、今中常雄²、宗孝紀¹（¹富山大院薬、²広島国際大薬）

【目的】

ABC トランスポーター ABCD4 の機能不全は、リソソーム内へのビタミン B₁₂ の蓄積を表現型とする代謝異常症の原因となる。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 の機能不全も同様の表現型を示すことから、ABCD4 と LMBD1 の両分子が協調してビタミン B₁₂ 輸送に関与する事が示唆された。我々はこれまでに、ABCD4 が LMBD1 と複合体を形成することでリソソームへと移行することを明らかにした（図1）。以上から、LMBD1 は ABCD4 のリソソームへの局在化に必須なタンパク質であり、ABCD4 がリソソーム膜上でビタミン B₁₂ の輸送を担っていることが示唆されたが、その詳細は不明であった。本研究では、ABCD4 がビタミン B₁₂ の輸送を担う輸送体であることを実証することを目的に、ABCD4 および LMBD1 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現し、機能解析を行った。

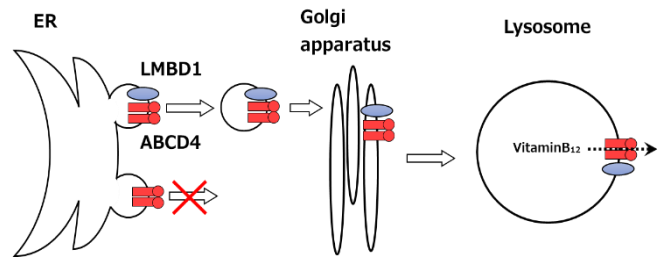


図1. Targeting mechanism of ABCD4 to lysosome

【方法】

タグを付加した融合タンパク質 His-ABCD4 または LMBD1-GST をアルコールオキシダーゼ (AOX1) プロモーター支配下でメタノール資化性酵母 *P. pastoris* に異種発現させた。発現させたタンパク質は、界面活性剤 β-DDM で可溶化し、アフィニティ精製を行った。ATPase 活性はマラカイトグリーン法により測定した。ビタミン B₁₂ は、逆相カラムを用い HPLC で定量した。

【結果・考察】

可溶化、精製した ABCD4 を含むプロテオリポソームを調製し、ATPase 活性を測定したところ、時間および ABCD4 の量依存的に活性が上昇した。このことから ABCD4 が活性型酵素としてリポソームに組み込まれていることを確認した。ABCD4 を含むプロテオリポソーム内にビタミン B₁₂ を封入すると ABCD4 の ATPase 活性が上昇したことから、ビタミン B₁₂ が ABCD4 の基質となることが示唆された。このプロテオリポソーム内のビタミン B₁₂ 量を定量したところ、時間依存的な減少が見られたことから、ABCD4 がビタミン B₁₂ をリポソーム外に輸送することを確認した。しかし、ATPase 活性を失った変異型 ABCD4 ではビタミン B₁₂ 輸送活性を確認できなかった。可溶化、精製した LMBD1 を用いて同様の実験を行ったが、ビタミン B₁₂ の輸送活性は確認できなかった。以上の結果から、ABCD4 が ATPase 活性依存的にビタミン B₁₂ の輸送を行う輸送体であることを初めて明らかにした。LMBD1 単独での輸送活性は見られなかったが、ABCD4 と LMBD1 が複合体を形成することでビタミン B₁₂ の輸送機能が調節されることが示唆された。現在、ABCD4 の LMBD1 との複合体形成時の酵素活性を測定し、ビタミン B₁₂ 輸送における LMBD1 の役割について解析を進めている。

1-院-19

膜タンパク質 TMEM16F のイオン/リン脂質輸送メカニズムの解析

○白井 佳暖¹、清水 貴浩²、藤井 拓人²、鍋島 彰大¹、酒井 秀紀² (¹富山大院薬、²富山大薬)

【背景・目的】血液凝固障害を生じるスコット症候群の原因遺伝子として同定された transmembrane protein 16F (TMEM16F) は、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇によって活性化し、脂質二重膜内のリン脂質を双方向に輸送するスクランブラーゼである。興味深いことに、これまでに TMEM16F はスクランブラーゼとして機能するだけでなく、 Ca^{2+} 活性化型 Cl^- チャネル (CaCC) としても機能することが報告されているが、そのイオンおよびリン脂質の輸送メカニズムは明らかになっていない。本研究では、野生型 TMEM16F および変異体におけるイオンチャネル機能とスクランブラーゼ機能の連関について電気生理学的解析により検討した。

【方法】本研究では、ヒト TMEM16F を組み込んだ pCINeo/IRES-GFP 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 HEK293T 細胞を用いた。TMEM16F 発現細胞は GFP 蛍光により選別した。TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ機能は、GFP 蛍光により TMEM16F を発現している細胞を選別しながら、Annexin V-phycoerythrin (PE) を用いた flow cytometry 解析により観測した。TMEM16F の CaCC 電流は、パッチクランプホールセル記録法により細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を上昇させることで観測した。TMEM16F のチャネルゲーティング速度は、+100 mV の脱分極刺激により TMEM16F チャネルを活性化させた後、-100 mV の電圧で保持したときに観測されるテール電流により評価した。テール電流を指数関数で fitting し、開閉速度の指標とした。

【結果・考察】野生型 TMEM16F を発現させた HEK293T 細胞にパッチクランプ法を適用したところ、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴う Cl^- 電流の増大が観測され、この電流は、 Cl^- チャネル阻害剤によって減少した。また興味深いことに、これらの Cl^- チャネル阻害剤の処理により野生型 TMEM16F のリン脂質転移活性が抑制されたことから、両機能が密接に関連していることが明らかとなった。次に、近年 TMEM16F のスクランブラーゼ機能に重要であると報告されたスクランブル領域内のアミノ酸残基に対して変異を導入したところ、ある変異体においてスクランブラーゼ機能およびチャネル機能が有意に抑制されたことから、このスクランブル領域がイオン輸送にも関与することが示唆された。そこで、野生型 TMEM16F および変異体のテール電流を用いたゲーティング解析を行ったところ、変異体において fitting より算出された時定数は、野生型 TMEM16F における時定数と比べて有意に減少していた。この結果は、TMEM16F のスクランブラーゼ機能の低下がイオンチャネルの開閉機構の変化により生じている可能性を示唆する。それ故、TMEM16F のスクランブラーゼ機能の温度依存性について検討した。25°C条件下で観測されたリン脂質転移活性は、4°C条件下において有意に抑制されたことから、TMEM16F のリン脂質輸送には構造変化が必要であることが分かった。以上の結果から、ヒト TMEM16F におけるイオンチャネル機能とリン脂質スクランブラーゼ機能が相関していること、さらにチャネルゲーティングによる構造変化によりリン脂質輸送が行われていることが示唆された。

**学生優秀発表賞選考対象
学士課程部門（領域2）**

2-学-1

ヒト三次元培養表皮モデルに及ぼすアスコルビン酸の影響

○こうちしんご幸地真吾¹、さとうやすのり佐藤安訓¹、きむらしゆん木村 駿²、たかぎきょうこ高木恭子²、いしいつよし石井 強²、きむらとしゆき木村敏行¹、いしがみあきひと石神昭人³

(北陸大薬¹、ロート製薬・基礎研究開発部²、都健康長寿医療セ・分子老化制御³)

【目的】ヒトの身体を覆う皮膚はヒトの臓器の中で最大の器官であり、成人では皮膚全体の表面積が約 1.5~2.0 m²、重量は体重の約 16%にも及ぶ。外界と直接接触するため、水分の保持、体温の調節、微生物や物理化学的刺激から生体防御、感覚器など様々な役割を担っている。皮膚は生命を維持するために必要不可欠で重要な器官であるといえ、構造や機能を知ることは極めて重要なことである。皮膚は表皮、真皮、皮下組織からなる。表皮は構成する細胞の 95%はケラチノサイト（表皮角化細胞）であり、表皮の最下層にて細胞分裂し成熟するにつれ上方の層へ移行する。これにより基底層、有棘層、顆粒層、角質層の 4 つの層が形成される。これらの皮膚の構造・機能にはアスコルビン酸が関わっており、真皮のコラーゲンの生成やメラニンの生成抑制を担っていることが知られている。これまでの先行研究において、アスコルビン酸含有培地で培養し移植されたマウスの皮膚は基底膜の発達や表皮のバリア機能が高いことが分かっている。このようにアスコルビン酸は皮膚に対して生理的作用に影響していることが知られているが、ヒトのケラチノサイトに対してどのような影響を及ぼすかは分かっていない。そこで本研究はヒト三次元培養表皮モデルをアスコルビン酸含有培地で培養し、ヒト表皮組織に及ぼすアスコルビン酸の影響を明らかにすることとした。

【方法】ヒト三次元培養表皮モデルは CO₂ インキュベーターにて 37°C、5% CO₂ の条件にてインキュベートし、培地は 24 時間ごとに交換した。培地にはアスコルビン酸ナトリウムを最終濃度で 1 mM、10 mM、100 mM になるように調製した。培養 7 日間と 14 日間後に切片を作成後、ヘマトキシリン-エオシン染色し組織学的観察を行った。また本研究を行うにあたってアスコルビン酸とアスコルビン酸ナトリウムの pH 測定、アスコルビン酸ナトリウムの濃度測定についても検討した。

【結果・考察】7 日間培養ではアスコルビン酸 0 mM に比較して 1 mM 添加時に表皮厚の有意な増加が認められた。14 日間培養では、1 mM 添加群の表皮が最も厚くなった。また基底層～顆粒層および角質層に区別して厚さを測定した結果、7 日間培養では基底層～顆粒層において有意差が認められなかった。一方、角質層では他濃度に比べて 1 mM 添加時に約 2 倍角質層が厚くなった。14 日間培養では、アスコルビン酸濃度が高くなるほど基底層～顆粒層が高い値となった。また角質層では 1 mM 添加時が最も厚かった。以上の結果から、ヒト三次元培養表皮モデルにおいてアスコルビン酸は 1 mM 添加時では基底層～顆粒層、角質層ともに促進的に働き、10 mM では基底層～顆粒層に対しては促進的に働くが、角質層には影響を及ぼさない可能性が示唆された。

2-学-2

シグマ-1 受容体イメージングを目的とした放射性リガンドの合成

○中田大貴¹、三代憲司²、柴和弘³、小川数馬² (北陸大薬¹、金沢大新学術²、金沢大学際セ³)

【目的】

シグマ-1 受容体の発現量は癌や種々の神経疾患と関係しており、その治療指針の決定を目的としたシグマ-1 受容体標的分子プローブの開発が望まれている。我々は、これまでに vesamicol (Fig.1 a)を母体化合物とした誘導體群(Fig.1 b)の評価を行ったところ、プロピル鎖を導入した C3NV が、シグマ-1 受容体への最も高い親和性を示した。しかし、C3NV へ放射性ヨウ素を導入した^[125I]pIC3NV を用いた実験の結果、非特異的な集積が多いことが問題となった。そこで、化合物の脂溶性を下げることによる非特異的な集積の低減を期待して、アミド基を導入した **1**、**2** (Fig.1 c)の合成・評価を行った。

【方法】

ピペラジンとベンズアルデヒドを出発原料として、**1**、**2** を合成し、競合阻害実験によりシグマ受容体親和性を評価した。^[125I] **1**、**2** を用いて、DU145 ヒト前立腺癌細胞を用いた細胞取り込み実験、分配係数測定を行った。

【結果・考察】

1、**2** をそれぞれ総収率 9.6%、5.6%で得た。^[125I] **1**、**2** はそれぞれ放射化学的収率 60.9%、74.8%、放射化学的純度 97%以上で得た。期待に反し、^[125I] **1**、**2** の分配係数はそれぞれ 3.00 ± 0.02 、 3.25 ± 0.02 であり、^[125I]pIC3NV (2.54 ± 0.04) に比べて高値を示した。シグマ受容体への親和性は、**1** (sigma-1 $K_i = 39.1 \pm 10.0$ nM、sigma-2 $K_i = 1278.9 \pm 121.7$ nM)、**2** (sigma-1 $K_i = 35.1 \pm 4.9$ nM、sigma-2 $K_i = 769.3 \pm 169.8$ nM) であり、どちらも高いシグマ-1 受容体選択性を示した。細胞取り込み実験の結果、^[125I] **1**、**2** は癌細胞への高い取り込みを示し、シグマ受容体リガンドの過剰量同時曝露により、その取り込みは減少した。その減少割合は、^[125I]pIC3NV と比較して大きかったことから、より特異的に取り込まれたと考えられる。

以上の結果より^[125I] **1**、**2** はシグマ-1 受容体イメージングリガンドとして有用である可能性が示唆された。

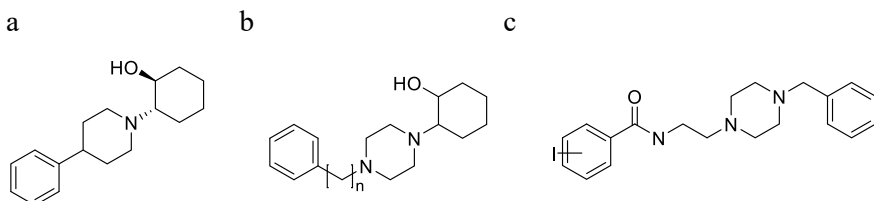


Figure 1. Structures of (a) (+)-vesamicol and (b) CnNV, (c) **1**, **2** (**1**:p-, **2**:m-)

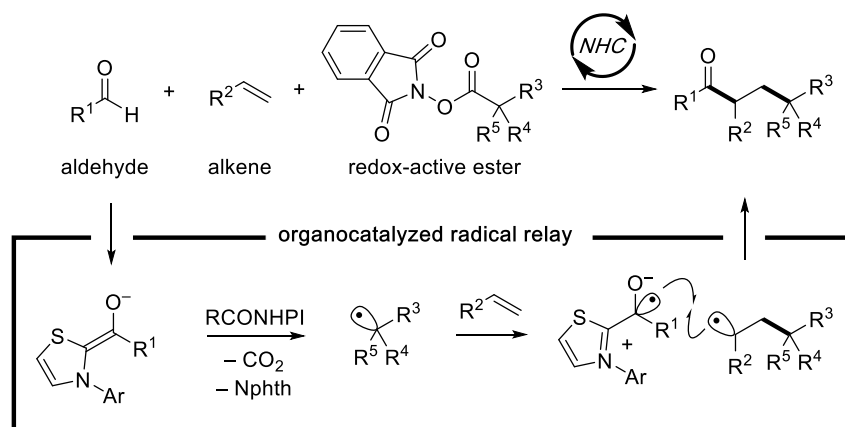
2-学-3

N-ヘテロ環カルベン触媒によるアルケンのビシナルアルキルアシル化反応

○太田健治、石井卓也、長尾一哲、大宮寛久（金沢大院医薬保）

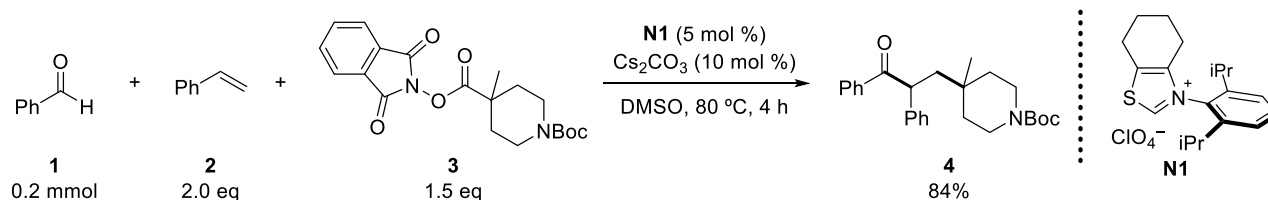
【背景・目的】アルケンに二つの炭素官能基を導入する反応は、豊富に存在するアルケンから複雑な炭素骨格を合成できるため有用である。これまで、遷移金属や光触媒を用いた方法が数多く報告されているが、競合するβ-ヒドリド脱離などの問題からsp³炭素の導入は困難とされていた。最近、我々はN-ヘテロ環カルベン (NHC) 触媒による芳香族アルデヒドとカルボン酸誘導体の脱炭酸型クロスカップリング反応を開発した¹。本反応では、エノラート型 Breslow 中間体からカルボン酸誘導体への一電子移動が起き、生成するラジカル同士のカップリングを経て進行する。速度論的解析から、ラジカル-ラジカルカップリングがアルキルラジカルアルケンへの付加より遅いことが示唆された。これに基づき、我々は、NHC 触媒によるアルケンのアルキルアシル化反応を着想した (Scheme 1)²。本反応は金属や光などを必要とせず、有機分子触媒のみでアルケンへの sp³炭素とアシル基の位置選択的導入が可能である。

Scheme 1. NHC-catalyzed vicinal alkylacylation of alkenes



【方法・結果】触媒量のチアゾリウム塩 (N1)、炭酸セシウム存在下、ベンズアルデヒド (1)、スチレン (2)、カルボン酸誘導体 (3) を DMSO 中 80 °C で 4 時間反応させたところ、アルケンのアルキルアシル化反応が進行し、目的のケトン体 (4) が高収率で得られた (Scheme 2)。

Scheme 2. Vicinal alkylacylation of alkenes



1. Ishii, T.; Kakeno, Y.; Nagao, K.; Ohmiya, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3854–3858.

2. Ishii, T.; Ota, K.; Nagao, K.; Ohmiya, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14073–14077.

2-学-4

アジド導入ペプチドを用いた新規クリック反応の開発

しのぎきゆうき¹、ちばじゅんや²、ともひろたけのり² (富山大薬¹、富山大院薬²)

【背景および目的】

銅触媒アジド-アルキン環化付加反応 (CuAAC) では、1,4-二置換1,2,3-トリアゾール生成物を優れた速度と選択性で与える。Cu配位子には安定な錯形成をするTBTAや水溶性のTHPTAなどが開発され、生体分子の可視化などに汎用されてきた。我々は光アフィニティーラベル法 (PAL) による標的タンパク質同定を推進しているが、プロテオーム解析ではラベルタンパク質の濃縮は必須であり、CuAAC を利用したビオチン化がしばしば利用される。しかし、極めて微量のタンパク質に効率よくビオチン導入するには、反応速度の更なる向上が求められる。Taranらはアジド基を導入した配位子を用いることで反応速度を大幅に向上させることに成功した¹⁾。一方、天然アミノ酸のみを使用した水溶性/生体適合性オリゴペプチド配位子が探索され、THPTAに匹敵する速度を与えるペプチドリガンドが報告された²⁾。今回、反応速度の向上のため、ヒスチジンを含むペプチドのN末端にアジド基を導入した配位子を合成し、反応性を評価した。

【方法】

銅タンパク質では主にヒスチジン側鎖のイミダゾール基が銅と錯形成していることから、既報²⁾を参照しつつ複数ヒスチジンを含む多様なペプチドを作製した。続いて、高い反応性を示したペプチドの N 末端に鎖長の異なるリンカーを介してアジド基を導入した。これらアジド導入ペプチド配位子を用いた CuAAC については、TBTA と比較しながら 7-ethynylcoumarin (無蛍光性) を用いて 406 nm における蛍光強度の増加および HPLC により反応を追跡・評価した。HPLC により 7-ethynylcoumarin の減少とトリアゾール誘導体の生成を確認した後、反応収率を算出し、蛍光強度増加から反応の初速度を算出した。タンパク質を用いた評価系では、エチニル基を有する光反応性 ATP プローブを作製し、PAL によりグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) をクロスリンクした後、標識エチニル基に CuAAC でビオチンを導入し、ラベル GDH を化学発光法により検出した。

【結果および考察】

ペプチドについては優れた CuAAC 反応速度を示した HAAHAAMA 配列を採用し、この N 末端にリンカーを介してアジド基を導入した。アジド導入ペプチドを用いた CuAAC 初速度はリンカー鎖長および Cu 濃度に依存し、TBTA を用いた場合に比べ約 50 倍の速度増加が認められた。また、TBTA とは異なり、いずれの配位子も短時間にほぼ終了した。タンパク質を用いた評価では化学発光による検出のため、ペプチド C 末端に Lys を介してビオチン基を組み込んだペプチド配位子を合成した。まず、光照射で ATP プローブと GDH をクロスリンクさせた後、この溶液にクリック試薬を加え、GDH をビオチン化した。長時間反応では分解や非特異的ラベルが認められたため、活性酸素 (ROS) 捕捉剤を添加したところ、いずれも大幅に減少することが分かった。最適化条件において CuAAC 反応効率を評価したところ、TBTA に比べ優れた CuAAC 反応速度と収率を示し、生体分子への応用が可能であることが示唆された。

参考文献：

- 1) F. Taran, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 5872-5876.
- 2) M. G. Finn, et al., *Bioconjugate Chem.*, **2017**, 28, 1693-1701.

2-学-5

脂肪酸代謝関連酵素プロファイリングを目的とした光ラベル法の開発

○荻原 智¹、森本正大³、千葉 順哉²、友廣岳則² (¹富山大薬, ²富山大院薬, ³鈴鹿医療科学大薬)

【背景および目的】脂肪酸代謝物はメディエーターとして様々な生理機能や炎症に関与しており、その関連酵素や受容体は有力な創薬対象である。リポドミクスにより見出された代謝物の生理機能解明には分子レベルでの検討が必須である。それらの相互作用は一般的に弱いことから、受容体特定には光照射で瞬時に相互作用分子同士を共有結合で結びつける光アフィニティーラベル法 (PAL) が利用されてきた¹⁾。PAL では標識と光反応基を導入した生理活性分子をプローブとして用いるが、脂肪酸代謝物の関連酵素や受容体を同定するためのプローブ作製では、その代謝物が複雑で多岐に渡るため、個々に精密合成するには膨大な時間がかかる。そこで本研究では PAL による関連酵素/受容体プロファイリングを目的として、生合成や代謝プロセスを利用した脂質メディエーターの光プローブ作製を検討したので報告する。

【方法】今回、アラキドン酸 (AA) 代謝を対象に、そのカルボン酸末端に光反応基を導入した AA 光プローブを 2 種類作製した。各プローブを複数の酵素 (COX-1, PGF_{2α} synthase) で処理し、生成物を LC-MS で確認した。酵素の光ラベルはビオチンが導入されたプローブを用いて行い、アビジン-HRP を利用した化学発光法で確認した。

【結果および考察】まず、AA カルボン酸末端にフェニルアラニン型ジアジリン (TmdPhe) 光反応基を導入した光プローブを作製した。これまで同様に作製した光プローブにより、DHA 輸送タンパク質の同定²⁾やパルミチン酸β酸化関連酵素の基質結合部位解析³⁾を行ってきた。反応基にはビオチン基も導入されており嵩高いが、カルボン酸を末端に残す構造となる。この光プローブを COX-1 で処理したところ、LC-MS では、酵素反応は遅いものの AA の減少が確認された。この酵素では 2 つの反応が進行するが、AA 光プローブのプロスタグランジン類 PGG₂ および PGH₂ に相当する MS シグナルが確認され、それは経時的に増加した。また光照射によるラベル化を試みたところ、COX-1 へのクロスリンクが確認された。競合剤であるインドメタシンの添加によりラベル量が減少することから、本プローブは特異的に取り込まれていることが示唆された。一方、光反応基をアルキルジアジリンに変更し、構造を小型化したプローブを作製したところ、先のプローブと同様に酵素に基質として認識され、その酵素反応速度は増加した。さらに続けて、その反応溶液に次段階の酵素の 1 つである PGF_{2α} synthase を添加したところ、PGF_{2α} に相当する生成物が LC-MS で検出され、経時的な増加を確認した。以上のことから、本 AA プローブはアラキドン酸カスケードを担う酵素で順次変換し得る可能性が示唆された。

参考文献 : 1) Y. Xia and L. Peng. *Chem. Rev.* 2013, **113**, 7880 ; 2) M. Tachikawa, et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2018, **41**, 1384; 3) Y. Kashiwayama, et al. *J. Biol. Chem.* 2010, **285**, 26315.

2-学-6

D-マンニトールの粉体物性による分類とそれらの錠剤物性に与える影響

○辻日向子¹、林祥弘²、熊田俊吾²、岡田康太郎¹、大貫義則¹ (富山大薬¹、日医工株式会社²)

【目的】錠剤の調製に使われる賦形剤の1つであるD-マンニトールは、服用性・崩壊性に優れており、口腔内崩壊 (orally disintegrating, OD) 錠に活用されている。現在、粒子径や結晶形など粉体物性の異なる様々なグレードのD-マンニトールが販売されている。製剤設計において粉体物性と錠剤物性の関係を明らかにすることは重要であり、優れた機能を持つD-マンニトールの新規開発や目標とする錠剤の調製に有益となるが、その関係については不明瞭な点が多い。本研究では、直接圧縮法用のグレードとして販売されているD-マンニトールの粉体物性およびその錠剤物性を測定して比較することで、粉体物性によるD-マンニトールの分類および、粉体物性が錠剤物性にどのように影響を与えるか評価することとした。

【方法】粉体物性の評価 : D-マンニトール (8種類) のゆるみかさ密度、タップ密度、圧縮性指数、安息角、粒子径 d_{10} 、粒子径 d_{50} 、粒子径 d_{90} および比表面積を測定した。主成分分析によってそれらの評価を行った。

錠剤の調製 : D-マンニトール、結晶セルロース、クロスポビドンおよびステアリン酸マグネシウムからなる錠剤を直接圧縮法によって調製した (設定硬度 65 N、錠径 8 mm の R 錠)。

錠剤物性の評価 : 摩損度および口腔内崩壊時間の測定を行った。多変量解析によって粉体物性と錠剤物性との関係について評価した。

【結果・考察】測定した粉体物性を主成分分析によって解析した結果、ローディングプロット (Fig. 1) から、第一主成分は粒子径および圧縮性指数の特徴を強く反映した指標であり、かつ、粒子径と圧縮性指数は互いに負の相関を示すことが明らかになった。また、第二主成分はゆるみかさ密度やタップ密度などと強く相関していることが示された。さらに、スコアプロット (Fig. 2) から、D-マンニトールの粉体物性は製法 (スプレードライおよび造粒) および結晶形 (α および α, β 混合) によっても異なることが示された。最後に、粉体物性と錠剤物性 (崩壊時間および摩損度) との関係性を明確化するためにそれらの多変量解析を行った。崩壊時間に対しては粒子径が有意に影響し、粒子径が小さいほど崩壊時間は短縮することが明らかとなった。また、摩損度に対しては、粉体の比表面積が有意に影響していることが示され、比表面積が大きいほど摩損度は低下する傾向にあった。

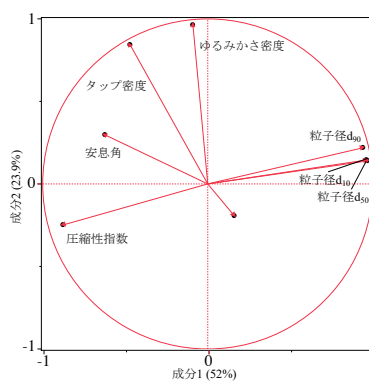


Fig. 1. 粉体物性の主成分分析によるローディングプロット

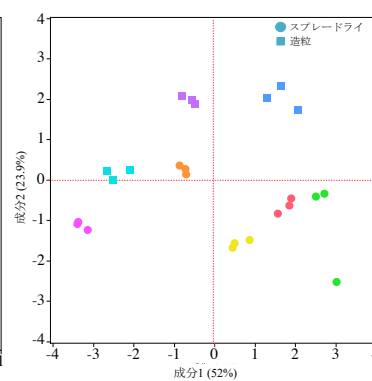


Fig. 2. 粉体物性の主成分分析によるスコアプロット

**学生優秀発表賞選考対象
大学院課程部門（領域2）**

2-院-1

オキサボロールの合成と光物理的性質の探索

なかのみさき すみだゆうと ながおかずのり ふるやまたにゆき いながきふゆひこ おおみやひろひさ
○中野美咲¹、隅田有人¹、長尾一哲¹、古山溪行²、稲垣冬彦³、大宮寛久¹

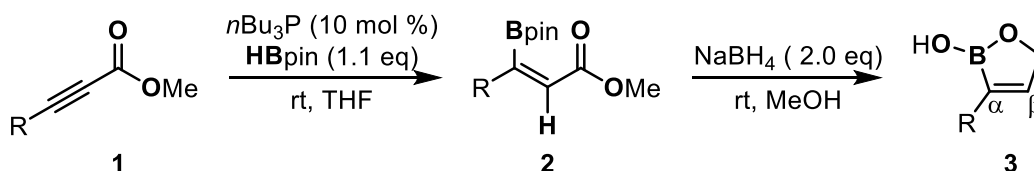
(金沢大院医薬保¹、金沢大院自然科学²、神戸学院大薬³)

【目的】

有機蛍光分子は増白剤やマーカー用色素、環境中の化学物質などの測定用蛍光指示薬、臨床診断用プローブとして広く使用されており、近年では有機 EL、有機太陽電池、色素レーザーとしても注目を集めている。これまで多くの有機蛍光分子が開発されており、新たな光物性や機能性を見いだすため、その研究が活発に行われている。中でも、含ホウ素有機蛍光分子は、そのホウ素の p 軌道に基づく強い電子受容性により生じる高い酸素親和性や、2つの共有結合性の配位状態を形成できる特性をもつことから、機能性分子として期待される。このような背景のもと、今回我々は、五員環ホウ素化合物であるオキサボロール誘導体の光物性・機能性を探索した。

【方法】

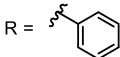
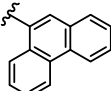
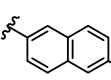
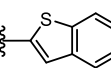
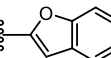
アルキノエート
1 のホスフィン
触媒 *anti*-ヒドロ



ホウ素化¹により、対応するアルケニルホウ素化合物 **2** が得られる。**2** のエステル基の還元、続く環化反応により、オキサボロール **3** に誘導した。この合成経路を用いて、さまざまな α 置換基 (R) をもつオキサボロール誘導体 **3** を合成し、これらの吸収・蛍光測定を行い、蛍光量子収率を求めた。

【結果・考察】

α 位に 2-ナフチル基が置換したボロール **3c-f** において蛍光量子収率が 55–63%と、比較的高い値が得られた。一方、ヘテロ芳香環をもつ **3g, h** では、ストークスシフトが小さくなり、特に **3g** は蛍光量子収率の大幅な低下がみられた。また、ボロール **3c-f** の中でも、電子求引性を有するボロール **3d, f** については pH が高くなるほど、吸収が長波長シフトし、蛍光強度が減少することがわかり、pH センサーとしての可能性を見出した。

		$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Φ^a (%)
R = 	3a	265	322	N.D
	3b	261	379	19
	3c : R ¹ = H	260	361	55
	3d : = COOMe	259	377	61
	3e : = OMe	259	373	63
	3f : = F	258	365	63
	3g	296	336	4
	3h	299	322	43

^aQuantum yields were determined in DMSO solution, using 9,10-diphenylanthracene as reference $\Phi = 0.90$ in cyclohexane.

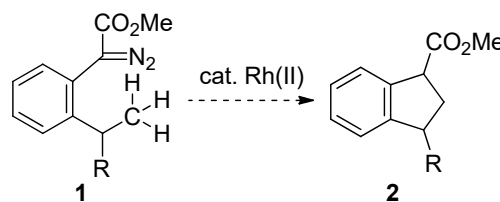
1. Nagao, K.; Yamazaki, A.; Ohmiya, H.; Sawamura, M., *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1861–1865.

2-院-2

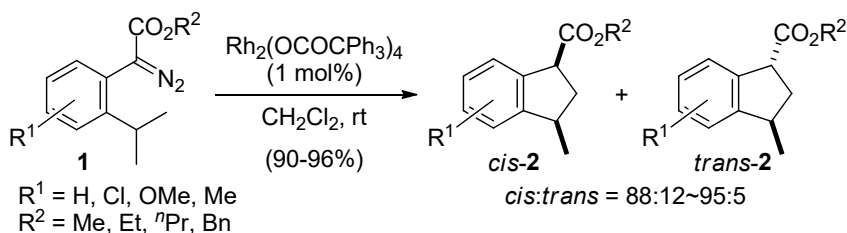
Rh(II)触媒を用いるフェニルジアゾアセタートの化学および立体選択的メチル C-H 挿入反応の開発

あまのりょうや なんぶひさのり やくらたかゆき
○天野良哉, 南部寿則, 矢倉隆之 (富山大院薬)

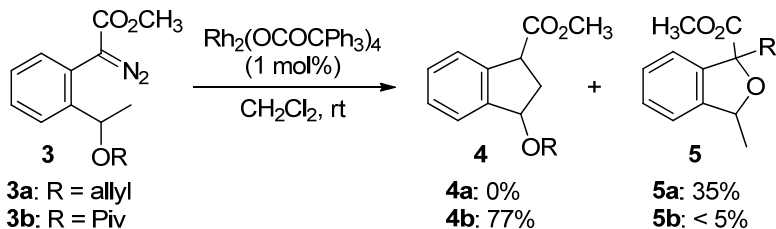
【背景・目的】ロジウム(II)触媒を用いる α -ジアゾカルボニル化合物の C-H 挿入反応は、不活性な C-H 結合を C-C 結合へと変換できるため、有機合成化学における重要な反応の一つである。¹⁾ Taber らは、C-H 挿入反応における C-H 結合の反応性を検討し、その順序が「メチン>メチレン>メチル」であることを報告している。²⁾ 実際、メチル C-H 結合への挿入反応はこれまでほとんど報告されていない。我々はオルト置換フェニルジアゾアセタート **1** の反応でメチル C-H 挿入反応が進行すれば、2 位無置換の 1-インダンカルボン酸エステル **2** が得られ、新規インダン合成法となると考え、メチル C-H 挿入反応の開発を目的として本研究を開始した。



【方法・結果】オルトイソプロピルフェニルジアゾアセタート **1a** ($R^1 = H, R^2 = Me$) の酢酸ロジウム(II)触媒反応を検討した。その結果、驚いたことにメチル C-H 挿入反応が室温下速やかに進行し、インダン誘導体 **2a** が収率 66% で得られた。しかし、**2a** は *cis:trans* = 45:55 の混合物として得られ、立体選択性はほとんど見られなかった。そこで、収率と立体選択性の向上を目指し、様々なロジウム(II)触媒を用いて検討した結果、嵩高い配位子をもつロジウムトリフェニルアセタートを用いると、収率および立体選択性が共に向上し、収率 95%, *cis:trans* = 95:5 で **2a** が得られることが分かった。また、様々な置換基をもつフェニルジアゾアセタート **1** の反応でも、高収率かつ高い *cis* 選択性で **2** が得られることを明らかにした。



次に、本反応の基質一般性の拡張として、オルト位にオキシエチル基をもつ **3** のロジウム(II)触媒反応を検討した。この基質では、ロジウムカルベノイドが酸素原子と反応して 5 員環オキソニウムイリドを形成することが考えられるため、メチル C-H 挿入反応とオキソニウムイリド形成反応の化学選択性に興味をもたれる。アリルエーテル **3a** ($R = \text{allyl}$) では、オキソニウムイリド形成が優先し **5a** のみが収率 35% で得られ、メチル C-H 挿入体 **4a** は全く得られなかった。一方、ピバル酸エステル **3b** の反応では、メチル C-H 挿入反応が高選択的に進行し、インダン誘導体 **4b** が収率 77% で得られることが分かった。**3b** では、電子求引性置換基であるピバロイル基により隣接する酸素原子の電子密度が下がり、オキソニウムイリド形成が抑えられたと考えている。



以上のように、触媒および置換基効果による化学および立体選択的メチル C-H 挿入反応の開発に成功した。

1) Review: Yakura T., Nambu H., *Tetrahedron Lett.*, **59**, 188 (2018).

2) Taber D. F., Ruckle R. E., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7686 (1986).

2-院-3

経口固形製剤の設計技術における決定的スクリーニング計画の有用性評価

○うすだしゆい臼田珠維¹、はやしまさひろ林祥弘²、くまだしゅんご熊田俊吾²、おかだこうたろう岡田康太郎¹、おおめきよしのり大貫義則¹

(富山大院薬¹、日医工株式会社²)

【目的】近年、次世代の製剤開発における概念である Quality by Design (QbD) に基づく製剤の処方設計が重視されている。QbD では、製剤の性能や品質と、製剤を構成する設計因子の因果関係を明らかにすることが目的であり、実験計画法の活用が強く推奨されている。スクリーニング検討における実験計画法として、決定的スクリーニング計画が開発され、注目を集めている。決定的スクリーニング計画は、少ない実験数で特性値に対する設計因子の寄与を明らかにできる。さらに、交互作用や非線形性を持つ設計因子と特性値の関係を応答曲面法などによって可視化することもできる。したがって、製剤の処方設計において有用であるものの、実際の処方設計への適用は限られている。そこで本研究では、湿式顆粒圧縮法によるミニタブレット製剤の製造を事例研究として選択し、設計因子 (処方や造粒工程パラメータ) と特性値 (顆粒物性および錠剤物性) との因果関係を決定的スクリーニング計画によって詳細に評価した。

【方法】主薬としてアセトアミノフェンを用い、決定的スクリーニング計画に従って処方や造粒条件を変えながら流動層造粒法によって打錠用顆粒を調製した。続いて、それぞれの顆粒を用いて直径 3 mm のミニタブレット製剤を調製した。特性値として顆粒物性 (安息角、かさ密度、分散度、粒子径) および錠剤物性 (質量、原薬の含量) を測定し、決定的スクリーニング計画によって設計因子と特性値との因果関係をモデル化した。

【結果・考察】決定的スクリーニング計画によって顆粒物性による設計因子の影響を解析した結果、今回の検討では、顆粒物性に最も影響を与えた因子は結合液濃度であった。続いて、各特性値と設計因子との因果関係を可視化するため、応答曲面を作成した。

決定的スクリーニング計画では、因子間の交互作用や二乗項の評価が可能である。この特徴によって、設計因子と顆粒物性の関係を高精度にモデル化することができた(Fig.1)。一方、ミニタブレット製剤の錠剤物性は、本研究で検討した設計因子 (処方および造粒条件) 以外にも大きく影響する因子の存在が示唆された。以上より、決定的スクリーニング計画は製剤処方設計において極めて有用であることが明らかになり、さらに、ミニタブレット製剤の設計における有益な知見が得られた。

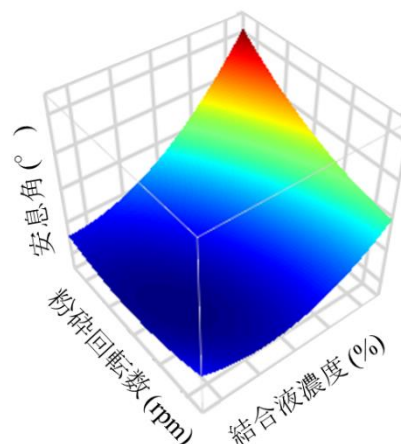


Fig. 1. 決定的スクリーニング計画による応答曲面の予測

2-院-4

ランダムフォレストによる打錠中の荷重-変位曲線とスティッキング性間の定量的評価

Quantitative evaluation of relationship between force-displacement profile during tableting and sticking propensity using random forest

○高橋拓巳¹、林 祥弘²、中野友梨¹、熊田俊吾²、岡田康太郎¹、大貫義則¹ (¹富山大院・薬、²日医工)

【目的】打錠障害の1種であるスティッキングの発生リスクは、錠剤に配合する原薬によって大きく異なる。これまで、スティッキングのメカニズムや発生リスクに関する研究は広く行われてきたが、どのような原薬でスティッキングが発生しやすいかは未だ定量的に予測できない。スティッキング性に大きく影響する原薬物性を明らかにするため、我々はこれまでに 81 種類の原薬を含む大規模なデータベースを構築し網羅的な検討を行ってきた。すなわち、粉体の圧縮特性評価装置(GTP-2, Gamlen Tableting Press)を用いて試料のスティッキング性を評価した後、機械学習の1つであるランダムフォレストを用いて予測モデルを構築した。そして、構築したモデルを基にスティッキング性に対する原薬物性の影響度を定量化できることを報告してきた。本研究では、打錠中の荷重-変位曲線から取得できる物性を新たに追加し、その影響度を明らかにすることを目的とした。

【方法】81種類の各原薬における粒度分布およびかさ密度等の物理的性質を測定し、原薬の分子量および溶解度等の化学的性質を調査した。スティッキング性評価のために、圧縮成型時における各原薬を配合した錠剤と下杵との付着力 (detachment stress, DS) を GTP-2 により測定した。打錠中の荷重-変位曲線から圧縮消費エネルギー、圧縮エネルギーおよび弾性エネルギーを算出した。構築したデータベースにランダムフォレストを適用し、DS と原薬物性間の関係性をモデル化した。

【結果・考察】圧縮消費エネルギーは配合した原薬によって著しく変化し、各試料の圧縮性の違いを明確に評価できた。例えば、クロロキンニン酸は低値 (1.49 J) を示した一方で、ストレプトマイシン硫酸塩は高値 (2.89 J) を示した。その後、ランダムフォレストにより DS と原薬物性間の関係性をモデル化した結果、決定係数は 0.832 を示し良好なモデルを構築できた (Fig. 1a)。原薬物性と DS との関係から影響度を算出した結果、圧縮消費エネルギー、引張強度、分子量およびジヨードメタン接触角が特に大きな影響を及ぼすことが示唆された (Fig. 1b)。

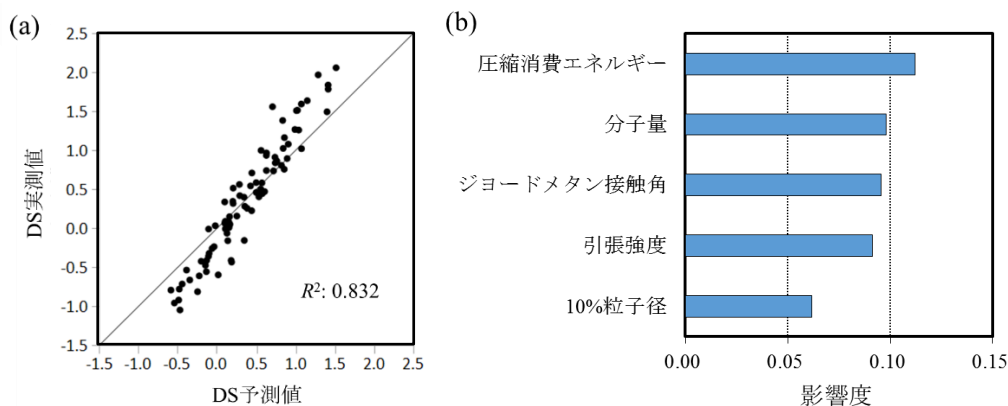


Fig. 1. 構築したランダムフォレストのモデル: (a) 予測値と実測値の散布図, (b) DS への影響度

2-院-5

TNF 受容体の細胞内領域に含まれる TRAF 結合ペプチドモチーフの精密化を目指した研究

○飯田日向子、^{いいた ひなこ} 帯田孝之、^{おびた 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、二次リンパ組織でナイーブ 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 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 など) は、抗原受容体 TCR や CD28 のシグナルを調節し、免疫記憶など 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、重要なシグナル機能を司るアダプター分子群である。哺乳類では 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。我々はこれまでに TRAF2 と各 TNFRSF の解離定数を算出し、TRAF2 は HVEM との結合親和性が最も高いことを明らかにした。しかし、TRAF2 と HVEM の詳細な相互作用様式や、他の TRAF 分子と TNFRSF の相互作用については不明な点が多い。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 TRAF5、および 7 種の TNFRSF 分子 (TNFR2、OX40、CD27、CD30、4-1BB、HVEM、GITR) 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 His タグと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、Ni-NTA アフィニティーおよび陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。TRAF 分子は、C 末端の TRAF ドメインに His タグとリポイルドメイン、さらにビオチン化酵素 (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 TRAF 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】

7 種の TNFRSF 分子の細胞内領域をアナライトとして測定し、TRAF 分子に対しての解離定数を算出した。TRAF2 は HVEM に対する結合親和性が最も高い一方で、TRAF5 は CD30 に対して最も高い結合親和性を示した。本研究から、それぞれの TNFRSF 分子がもつ細胞内領域のペプチド配列の違いにより、TRAF2 と TRAF5 が選択され、それぞれの分子が異なる形でシグナル伝達に関与することが推察された。また、今回の結果と TNFRSF 分子の TRAF 結合アミノ酸配列の比較から、新たな TRAF 結合モチーフの存在が示唆された。今後は、詳細な相互作用様式の解明とさらなる結合モチーフの精密化のために、TNFRSF -TRAF 複合体の X 線結晶構造解析を行う。

2-院-6

Sfh1 のリン脂質輸送能の評価とその脂質組成依存性

よしだうきょう なか おひろゆき いけ だけいすけ なかのみのる
○吉田右京、中尾裕之、池田恵介、中野実（富大院薬）

【目的】酵母のリン脂質輸送タンパク質である Sec14 はホスファチジルイノシトール (PI) とホスファチジルコリン (PC) の二種類のリン脂質輸送活性をもち、トランスゴルジ膜上での PC/PI 交換作用によって、Pik1 による PI から PI4P へのリン酸化を促進している。酵母には Sec14 と相同性の高いタンパク質が 5 種類存在する (Sfh1-Sfh5)。その中でも Sfh1 は Sec14 と最も相同性が高い (64%)。Sfh1 は核に局在するが、その生理的機能は不明である。また、Sfh1 に関しては PI や PC と結合した結晶構造が明らかにされているが、Sec14 とは異なり PI と PC の輸送活性を示さないことが報告されている²⁾。本研究では Sfh1 の PC/PI 輸送能を再検証するとともに、Sec14 との違いを明らかにすることを目的とした。

【方法】蛍光リン脂質として PC もしくは PI の片方のアシル鎖をピレンで標識した py-PC、py-PI を使い、PC、PI、ホスファチジルセリン (PS) と混合したリポソームを作製した。ピレン標識脂質を 16 mol% 含むリポソーム (ドナー) と含まないリポソーム (アクセプター) を調製し、両者を混合後、Sfh1 を加えた (図 1)。ドナー中の蛍光標識脂質がアクセプターへ輸送されることに伴うピレンのエキシマー蛍光の減衰を観測し、Sfh1 の PC、PI 輸送能と輸送の脂質組成依存性を評価した。

【結果・考察】蛍光を用いた脂質輸送評価から、ドナーリポソームとアクセプターリポソームがともに PC のみから構成される場合、Sfh1 は py-PC を輸送しなかった。しかし、ドナーリポソームとアクセプターリポソームのどちらにも PI や PS などの酸性リン脂質が含まれる場合はエキシマー蛍光の減衰が観測され、py-PC が輸送されることが明らかになった (図 2)。この py-PC 脂輸送速度は酸性リン脂質の濃度に依存して増加した。さらに、py-PI についても酸性リン脂質濃度依存的な輸送が観測された。これらの結果から、Sfh1 のリン脂質輸送には酸性リン脂質が関係していると考えられる。これは Sfh1 の脂質ポケットの蓋 (lid) として働く両親媒性ヘリックスには、正電荷を持つアミノ酸残基が存在し、これらと酸性リン脂質との相互作用が、Sfh1 脂質膜へのターゲティング、もしくは脂質膜上での脂質交換に関与していると推測される。このような酸性リン脂質による PC/PI 輸送速度の上昇は Sec14 においても観測されている³⁾。酸性リン脂質量が少ない条件では Sec14 は PC 輸送能を有するが、Sfh1 は PC 輸送能を有さない。これは、Sfh1 の lid は Sec14 に比べて柔軟性が低いためであると考えられる。

【参考文献】

- 1) G Schaaf et al., Mol Cell, **29**, 191-206 (2008).
- 2) X. Li et al., Mol Biol Cell, **11**, 1989-2005 (2000)
- 3) T. Sugiura et al., Biophys. J., **116**, 92-103 (2018).

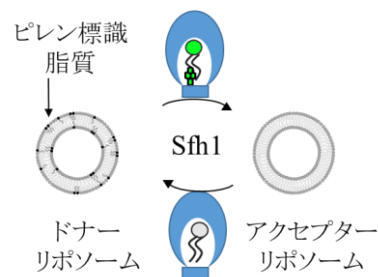


図 1. ピレン標識脂質を用いた Sfh1 の PC、PI 輸送能評価

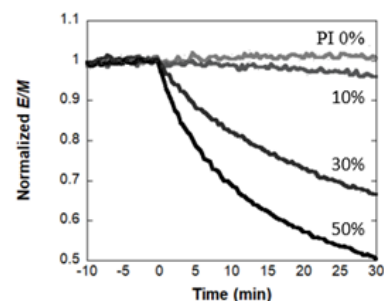


図 2. Sfh1 の py-PC 輸送評価における PI 濃度依存性

一般講演（領域1）

1-般-1

RNA 編集酵素 ADAR1 によるヒト CYP7A1 発現制御

○堀内 陽生¹、片山 浩樹¹、中野 正隆^{1,2}、深見 達基^{1,2}、中島 美紀^{1,2} (金沢大医薬保¹, 金沢大 WPI ナノ生命科学研究²)

【目的】

RNA 上のアデノシンが adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) によってイノシンに置換される A-to-I RNA 編集により、遺伝子の発現等に変化が生じ得る。肝特異的 ADAR1 ノックアウトマウスにおいて肝機能障害が起こることが報告されており、RNA 編集が肝臓において重要な役割を果たすことが示されている。本研究では肝機能の 1 つである胆汁酸合成における ADAR1 の役割に着目し、その律速酵素である CYP7A1 の発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に siRNA を導入することで ADAR1 をノックダウン (KD) し、real-time RT-PCR による CYP7A1 mRNA 発現量の評価ならびに細胞内総胆汁酸量の測定を行った。転写阻害剤 α -amanitin を用いて CYP7A1 mRNA 安定性に対する ADAR1 KD の影響を評価した。CYP7A1 遺伝子のプロモーター領域を含む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により CYP7A1 の転写活性を評価した。CYP7A1 を制御する転写因子 farnesoid X receptor (FXR)、hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)、peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) の発現量が ADAR1 KD により変化するかどうか Western blotting により評価した。CYP7A1 プロモーター領域に対する HNF4 α の結合能を評価するため、クロマチン免疫沈降を行った。

【結果・考察】

HepG2 細胞において、ADAR1 KD により CYP7A1 mRNA 発現量が 6 倍に有意に増加し、細胞内総胆汁酸量が 1.5 倍に有意に増加した。転写阻害条件下において、CYP7A1 mRNA の分解速度は ADAR1 KD により変化しなかったことから ADAR1 は CYP7A1 mRNA 安定化には関与しないと考えられた。CYP7A1 プロモーター領域 (-430 bp ~ +11 bp) を含む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において、ADAR1 KD による活性値の有意な増加が認められたことから、ADAR1 は CYP7A1 の発現を転写レベルで制御することが示唆された。CYP7A1 を制御する各転写因子のタンパク発現量は ADAR1 KD により変化しなかったものの、CYP7A1 プロモーター上の HNF4 α 結合配列に変異を導入することにより、ADAR1 KD によるルシフェラーゼ活性値の増加が認められなくなった。クロマチン免疫沈降により、CYP7A1 プロモーター領域への HNF4 α の結合量が ADAR1 KD により増加することが示されたことから、これが、ADAR1 KD による CYP7A1 の発現増加の原因であることが示唆された。以上、本研究では ADAR1 が CYP7A1 を負に制御することで胆汁酸合成を抑制する役割を有することを明らかにした。

1-般-2

アルド-ケト還元酵素 AKR1C 分子種 (AKR1Cs) が核内受容体 PXR の転写活性化に与える影響

○^{もりた こうき}森田 倅規¹、^{ふかみ たつき}深見 達基^{1,2}、^{なかじま みき}中島 美紀^{1,2}

(金沢大医薬保¹, 金沢大 WPI ナノ生命科学研²)

【目的】

ヒト肝臓に発現するアルド-ケト還元酵素 AKR1C ファミリーには、AKR1C1、1C2、1C3 および 1C4 の 4 分子種が存在し、薬物代謝および性ホルモンの生合成を担っている。これらは細胞質で代謝反応を触媒するが、近年 AKR1C3 が核内にも局在し、核内受容体アンドロゲン受容体 (AR) と相互作用することにより、その転写活性化能を促進することが報告された。AR をはじめとする核内受容体ファミリーは互いにドメイン構造が類似しているため、AKR1Cs は同ファミリーに属するプレグナン X 受容体 (PXR) とも相互作用し、PXR の転写活性化能に影響を及ぼす可能性が考えられた。PXR はリファンピシンなどのリガンドと結合し活性化されることで、CYP3A4 などの薬物代謝酵素の発現を誘導する。本研究では、AKR1Cs が PXR と相互作用する可能性、そして AKR1Cs の発現量の変化もしくは AKR1Cs が基質または阻害剤と結合することによる高次構造の変化が、PXR による CYP3A4 発現誘導を左右する可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ヒト肝臓由来 HepG2 細胞にヒト PXR を安定発現させた Shp51 細胞から核抽出物またはサイトゾル画分を調製し、AKR1Cs と PXR が相互作用しているかどうか共免疫沈降法により検討した。siRNA を導入することで AKR1Cs をノックダウン (KD) した Shp51 細胞にリファンピシンを処置し、real-time RT-PCR により CYP3A4 mRNA 発現量を評価した。また、Shp51 細胞に AKR1Cs の基質または阻害剤と PXR のリガンドであるリファンピシンを処置し CYP3A4 mRNA 発現量の評価を行った。

【結果・考察】

抗 AKR1C1 抗体を用いた免疫沈降物に対し、抗 PXR 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、核抽出物およびサイトゾル画分の両方で PXR のバンドが認められたことから、Shp51 細胞において AKR1Cs と PXR が相互作用していることが明らかになった。AKR1Cs との相互作用が PXR による転写活性化に影響を及ぼすか調べるため、AKR1Cs を KD したところ、リファンピシンによる CYP3A4 mRNA の発現誘導率が有意に抑制された。このことから、AKR1Cs は PXR と相互作用することで PXR による転写活性化能を亢進させる役割を有している可能性が示唆された。AKR1Cs の基質であるナロキソンの処置により、リファンピシンによる CYP3A4 発現誘導率が増加する傾向が認められており、AKR1Cs の基質存在下で PXR の転写活性化能が変動する可能性について併せて報告する。以上、本研究では、還元反応を触媒する代謝酵素として知られる AKR1Cs がコアクチベーターとして機能することで、その他の薬物動態関連因子の発現を変動させ得るという新たな知見を見いだした。

1-般-3

Sertoli 細胞における zidovudine 取り込み機構の解明

○伊藤 武、赤沼 伸乙、久保 義行、細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】 ヒト免疫不全ウイルス (HIV; human immunodeficiency virus) は CD4 陽性の免疫細胞に感染し、免疫機能の低下やそれに関連した日和見感染や神経機能障害などの疾患を誘発することが知られている。HIV の主要な感染媒体の1つとしては精液が挙げられ、HIV 治療中の男性患者においては、HIV が血液中で検出されない場合においても、精巣では検出される場合があり、精巣を標的とする HIV 治療戦略の重要性が示唆されている。HIV は循環血液と精細管内腔を隔てる血液精巣関門 (blood-testis barrier; BTB) を経て精細管内腔に侵入することで、血液中の HIV 治療薬を回避することから、より優れた HIV 治療の実現には、BTB を介した効率的な HIV 治療薬送達法の開発が重要となる。多くの HIV 治療薬に関しては精液への低い移行性が知られる一方、逆転写酵素阻害剤 (NRTI; nucleoside reverse transcriptase inhibitor) である zidovudine に関しては、その積極的な精液中への移行性および zidovudine 治療による精液内 HIV の減少効果が報告されている。このため、BTB の主要な実体細胞である、Sertoli 細胞は zidovudine を循環血液から精細管内腔に輸送していると考えられ、その詳細な輸送機構の解明は、より効果的な新規 HIV 治療薬の開発につながるものと期待される。本研究では、Sertoli 細胞における zidovudine 取り込み機構の解明を目的とした。

【方法】 マウス由来 Sertoli 細胞株(TM4 細胞)を *in vitro* BTB モデル細胞として用いた。TM4 細胞を 24-well plate 上で培養し、 ^3H zidovudine 取り込み解析を実施した。

【結果・考察】 TM4 細胞における ^3H zidovudine 取り込みが、温度依存性および濃度依存性 ($K_m = 20 \mu\text{M}$)を示したことから、BTB における zidovudine 輸送が担体介在型輸送によって担われることが示唆された。また、TM4 細胞による ^3H zidovudine 取り込みが Na^+ 非依存性であったこと、また内因性ヌクレオシドである adenosine や uridine、有機アニオン化合物である PAH や probenecid によって阻害されなかったことから、BTB を介した zidovudine 輸送における Na^+ 依存性ヌクレオシドトランスポーター1, 3 (CNT1,3) や Na^+ 非依存性ヌクレオシドトランスポーター2 (ENT2)、および有機アニオントランスポーター1-4 (OAT1-4) の寄与は低いことが示唆された。また、TM4 細胞による ^3H zidovudine 取り込みは、NRTI である stavudine や lamivudine などによって阻害されなかった一方、内因性ヌクレオシドである thymidine によって顕著に阻害されたことから、Sertoli 細胞において zidovudine および thymidine を基質とする新規トランスポーターの関与が示唆された。さらに、zidovudine および thymidine の化学構造に着目して阻害解析を実施した結果、 ^3H zidovudine 取り込みが deoxycytidine によって顕著に阻害された一方、gemcitabine や deoxyguanosine によって阻害されなかったことから、zidovudine 輸送機構が pyrimidine 塩基の 2'-deoxynucleoside を選択的に認識する可能性が示された。以上から、Sertoli 細胞における zidovudine 輸送機構において、特定の nucleoside を基質とする新規トランスポーター分子の関与が示唆された。

1-般-4

単離網膜毛細血管における ABC トランスポーターの機能評価法

○たじま こうすけ あかぬま しんいち おおいし ゆうき くぼ よしゆき いのうえ まさひこ ほそや けんいち田嶋 孝亮、赤沼 伸乙、大石 雄基、久保 義行、井上 将彦、細谷 健一 (富山大院薬)

【目的】内側血液網膜関門 (inner BRB) および血液脳関門 (BBB) は循環血液と組織を隔てる関門組織であり、非特異的な物質移行を厳密に制限している。これら関門組織を介した物質移行には類似性が知られているが、カチオン性薬物ベラパミルの移行性には差異が報告されている。この組織移行性の差異を説明する分子実体の候補として、新規カチオン性薬物輸送機構と P-糖タンパク質 (P-gp) が挙げられる。この差異に対する P-gp の関与を明らかにする上で、*in vitro* ツールは有用であると考えられるが、モデル細胞では P-gp を含めトランスポーターの機能は完全に維持されていないことが報告されている。一方で、BBB の実体組織である単離脳毛細血管を用いた *ex vivo* 解析では、*in vivo* 環境で観察される特性が示されている。従って、単離毛細血管を用いた薬物輸送解析は、inner BRB および BBB におけるトランスポーターの輸送機能を比較する上で有用なツールと言える。そこで本研究では、inner BRB の実体組織である網膜毛細血管の単離法の確立および inner BRB および BBB における P-gp の機能を比較することを目的とした。

【方法】ラット網膜および脳毛細血管を密度勾配遠心およびナイロンメッシュ連続濾過法によって単離した。単離した血管は明視野もしくは免疫染色後の蛍光観察によって形態を評価した。輸送解析では、蛍光基質を処理後の毛細血管を共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得し、管腔側への蓄積量を測定することで組織から循環血液への排出輸送の指標とした。

【結果・考察】ラット網膜から調製した画分を明視野観察した結果、直径 10 μ m の血管が見られた。また、毛細血管内皮細胞のマーカーである GLUT1 の免疫染色を実施した結果、画分中に見られた血管において GLUT1 由来の蛍光シグナルが検出された。以上から、本手法によって網膜毛細血管が単離されていることが示唆された。単離した網膜毛細血管における P-gp の機能評価に向け、P-gp の選択的基質である cyclosporin A (CsA) に蛍光団を導入し、P-gp の蛍光基質となる NBD-CsA を合成した。この NBD-CsA を用い、単離した網膜毛細血管において NBD-CsA の管腔内蓄積量を解析した結果、P-gp 阻害剤である 100 μ M verapamil および quinidine 共存下において、それぞれ 66% および 28% 有意に低下した。また、BCRP の蛍光基質である BODIPY FL prazosin の管腔内蓄積量を解析した結果、BCRP 阻害剤である 250 nM Ko143 および 20 μ M dipyridamole 共存下において、それぞれ 39% および 29% 有意に低下した。これらの結果から、単離した網膜毛細血管における P-gp および BCRP は機能しており、inner BRB におけるこれらトランスポーターの機能評価が可能であることが示唆された。単離した網膜および脳毛細血管において NBD-CsA の管腔内蓄積量を解析した結果、有意な差はなく、inner BRB および BBB の単離毛細血管における P-gp 機能には差がないことが示唆された。

1-般-5

血液網膜関門カチオン性薬物輸送における lysosomal trapping の影響：リソソーム濃縮画分を用いたアプローチ

○山田未希¹、久保義行^{1,2}、赤沼伸乙^{1,2}、細谷健一^{1,2} (¹富山大薬、²富山大院薬)

【目的】網膜神経変性を伴う緑内障や網膜色素変性症は、わが国で上位を占める失明原因疾患であり、これら疾患治療法の向上は重要な課題として位置付けられている。Clonidine や propranolol などのカチオン性薬物は、神経保護作用を有することが知られており、循環血液から網膜へのカチオン性薬物送達機構解明が新たな網膜疾患治療に有用であると期待されている。循環血液-網膜間を隔てる関門組織である血液網膜関門 (blood-retinal barrier; BRB) は、内側血液網膜関門 (inner BRB) と外側血液網膜関門 (outer BRB) によって構成されており、これまでに、複数のカチオン性薬物輸送機構の存在が示唆されている。一方、脂溶性が高い一部のカチオン性薬物に関しては、担体介在型輸送に加えて、酸性小胞である lysosome 内への蓄積 (lysosomal trapping) が知られており、網膜毛細血管内皮細胞においても同様の機構が存在することが示唆されている。以上から、BRB におけるカチオン性薬物輸送機構の詳細な理解には、担体介在型輸送に加えて lysosomal trapping の影響を解析する必要があると考えられる。本研究では、BRB におけるカチオン性薬物輸送に lysosomal trapping が及ぼす影響を解析するため、lysosome 濃縮画分を用いた薬物取り込み解析を実施した。

【方法】Lysosome 濃縮画分は、条件的不死化ラット網膜毛細血管内皮細胞株 (TR-iBRB2 細胞) および条件的不死化ラット網膜色素上皮細胞株 (RPE-J 細胞) から調製した。各細胞をホモジナイズした後、密度勾配遠心法によって 11 フラクシオンに分離し、lysosome 濃縮画分を分取した。得られた lysosome 濃縮画分を用いて蛍光標識されたカチオン性薬物の取り込み解析を行った。

【結果・考察】Lysosome 濃縮画分を用いた取り込み輸送解析をリソソームマーカーである LysoTracker® Red に関して実施した結果、lysosome 濃縮画分による LysoTracker® Red 取り込みはカチオン性化合物である desipramine や propranolol、verapamil 共存下で 24~30% 有意に低下した一方、アニオン性化合物である *p*-aminohippuric acid (PAH) や有機カチオントランスポーターの基質や阻害剤である tetraethylammonium (TEA) や 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) 共存下においては変化しなかった。また、lysosomal trapping を受ける quinacrine および EverFluor® FL verapamil についても同様の解析を行った結果、lysosome 濃縮画分における quinacrine 取り込みはカチオン性化合物である desipramine や imipramine、propranolol、verapamil、pyrilamine 共存下において 23~58% 有意に低下した。また、EverFluor® FL verapamil では、desipramine、verapamil 共存下において 35~49% 有意に低下した。以上の結果から、lysosomal trapping を受ける性質を持つカチオン性薬物の一部は、BRB を介した輸送過程において細胞形質膜を透過後に、lysosome 内へ移行することが示唆された。

1-般-6

内側血液網膜関門 verapamil 輸送機構の薬物認識特性

○ 森 唯衣香¹、赤沼 伸乙^{1,2}、久保 義行^{1,2}、細谷 健一^{1,2} (富山大薬¹、富山大院薬²)

【目的】視覚を担う神経組織である網膜において、物質の非特異的移行は内側血液網膜関門 (inner BRB) および外側血液網膜関門 (outer BRB) によって制限されている。一方、これら BRB においてトランスポーターを始めとする薬物輸送機構が存在しており、選択的な物質輸送が行われている。そのため、緑内障などの網膜疾患治療薬を開発する上で、これら輸送機構への理解が重要である。これまでに、我々は inner BRB を介した循環血液から網膜への薬物輸送メカニズムの一つとして、塩基性薬物である verapamil を基質とする未知の輸送機構の存在を明らかにしている。本輸送機構の薬物認識性を理解することは、網膜への効率的な薬物送達の実現に繋がると考えられた。本研究では、各種中枢神経系作用薬を対象とし、本 verapamil 輸送機構に認識される薬物の特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】*In vitro* ラット inner BRB モデルとして TR-iBRB2 細胞を用い、本細胞における [³H]verapamil 取り込みに対する薬物共存時の阻害強度を評価した。阻害された薬物の一部について、薬物共存下における濃度依存性解析を実施し、阻害様式の詳細を評価した。

【結果・考察】TR-iBRB2 細胞への [³H]verapamil 取り込みに対し、神経作用薬 100 μM 共存条件下における阻害強度について大小が確認された。そこで、本条件下において verapamil 取り込みを 50% 以上阻害したものを hit 薬物として設定したところ、フェノチアジン骨格やブチロフェノン骨格を有する薬物などが hit し、ベンズアミド骨格や四級アンモニウムを有する薬物などは除外された。本結果は、inner BRB における verapamil 輸送機構の少なくとも一部は化合物の構造を認識する担体介在型輸送であることを示唆している。また、これらの hit 薬物には、興奮性神経伝達を制御する薬物や一部のアルカロイドなど神経保護効果が期待される薬物が含まれており、これらは網膜神経疾患治療薬のシーズとなる可能性が考えられた。そこで、これら hit 薬物について、verapamil 輸送阻害様式を解析した。イソキノリンアルカロイド化合物に属する 1 つの薬物について、薬物非共存条件下と比して Michaelis-Menten 定数 (K_m 値) は変化せず最大取り込み速度 (V_{max}) が約 50% 低下したことから、verapamil 輸送機構の非競合的な阻害剤であることが示唆された。一方、興奮性神経伝達を制御する 2 つの薬物、および麦角アルカロイド化合物である 1 つの薬物について、 K_m 値は薬物非共存条件下と比較し 1.3-2.1 倍高値であり、 V_{max} 値は変化しなかった。本結果から、これらの 3 つの薬物は inner BRB における verapamil 輸送機構を競合的に阻害すること、すなわち本輸送機構の基質である可能性が示唆された。今後、これら 3 つの化合物について、inner BRB を介した循環血液-網膜間の輸送への verapamil 認識型輸送機構の関与を明らかにすることで、網膜疾患治療薬としての応用に繋がると期待される。

1-般-7

モノカルボン酸トランスポーター・MCT14の輸送機能および網膜における発現局在解析

○^{ふくなが としき}福永 飛自¹、^{じょうむら りゅうた}定村 龍太²、^{あかぬま しんいち}赤沼 伸乙^{1,2}、^{くぼ よしゆき}久保 義行^{1,2}、^{ほそや けんいち}細谷 健一^{1,2} (1 富山大薬、2 富山大院薬)

【目的】 Monocarboxylate transporter family (MCTs/Slc16A) は 14 種の isoform が存在することが知られている。MCT1-4 は典型的 MCT とされ、H⁺濃度勾配に従ってモノカルボン酸やケトン体を輸送する。一方で、MCT8 は甲状腺ホルモンを輸送基質とし、MCT10 は甲状腺ホルモンに加え芳香族アミノ酸を輸送する。また、MCT9 はアミノ酸やカチオン性化合物輸送し、その輸送特性は既知の有機カチオントランスポーターと異なることが示された。このように MCTs は必ずしも名称に合致した基質認識性を示すわけではなく、isoform によって異なる低分子を輸送基質とし、その輸送特性も異なる。MCTs の isoform の 1 つである MCT14 (Slc16A14) に関しては脳や腎臓におけるタンパク質発現が報告され、当研究室が実施した解析では網膜毛細血管内皮細胞および網膜色素上皮細胞において mRNA 発現が示唆されたが、生体内における輸送機能は明らかとされていない。本研究では、MCT14 の輸送基質を探索するとともに、そのタンパク質発現・局在を解析し MCT14 の役割を解明することを目的とした。

【方法】MCT14 の輸送基質を探索するため、ラット MCT14 (rMCT14) cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞 (oocyte) に注入して rMCT14 発現 oocyte を作成し、放射標識化合物の取り込み解析を実施した。rMCT14 の発現・局在解析のため、rMCT14 由来のエピトープペプチドをモルモットに免疫して抗 rMCT14 ポリクローナル抗体を作成した。網膜における MCT14 の発現・局在解析はラット眼球凍結切片における免疫組織化学的染色を実施した。

【結果・考察】MCT14 の輸送基質探索では、45 種類の放射標識化合物の取り込み解析を実施した。rMCT14 発現 oocyte による [¹⁴C]glycine、[³H]D-serine、[³H]L-glutamine、[³H]L-arginine、[³H]spermine、[³H]pyridoxine および [³H]histamine 取り込みは、water-injected oocyte と比して有意に減少するとともに、rMCT14 発現 oocyte による [³H]L-proline、[³H]nicotinate、[³H]prostaglandin D₂ および [³H]L-histidine 取り込みは、water-injected oocyte と比して有意に増加したことから、MCT14 がこれら 11 種の化合物を輸送する可能性が示された。抗 rMCT14 抗体は、rMCT14 発現 oocyte から調製した crude membrane の Western blot 解析および腎臓切片を用いた免疫組織化学的解析において rMCT14 タンパク質特異的シグナルが検出された。このことから、作成した抗体が rMCT14 特異性を有することが示された。ラット眼球凍結切片の免疫組織化学的染色では、網膜毛細血管内皮細胞および網膜色素上皮細胞において rMCT14 由来のシグナルが示された。また、そのシグナルは、GLUT1 のシグナルと merge したことから、MCT14 タンパク質は網膜毛細血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞において血液側膜と網膜側膜の両側に局在することが示唆された。

以上から、MCT14 がアミノ酸やアミノ酸代謝産物、水溶性ビタミン、エイコサノイドを含む 11 種の化合物に対し基質認識性を示す可能性が示唆され、網膜毛細血管内皮細胞と網膜色素上皮細胞において MCT14 タンパク質が血液側と網膜側の両側に局在することが示唆された。

1-般-8

ラット網膜色素上皮細胞における chloroquine による細胞死への影響

○^{たけうちとしなり}竹内駿徳、^{まきのれいな}牧野令奈、^{あかぬましんいち}赤沼伸乙、^{くぼよしゆき}久保義行、^{ほそやけんいち}細谷健一 (富山大院薬)

【目的】網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells: RPE 細胞) の lysosome は、視細胞外節の貪食作用によって視覚の維持に貢献している。これまで、lysosome の機能低下による細胞障害が加齢黄斑変性などの網膜疾患につながることを示されている。この機能低下の要因として化合物の lysosome 内への蓄積が知られている。一部のカチオン性化合物は lysosome 内にてプロトン化され留められる (lysosomal trapping)。この機構による lysosome 内への化合物の蓄積が細胞障害を引き起こす要因の 1 つと考えられている。抗マラリア薬 chloroquine は、chloroquine 網膜症と呼ばれる重篤な網膜障害が副作用として報告されている。この chloroquine について、lysosomal trapping を受けて lysosome 内に過剰蓄積され、lysosome 内の空胞化が生じることがヒト RPE 細胞を用いた解析を通じて明らかにされている。一方で、chloroquine によって誘発された空胞形成が RPE 細胞の細胞死、そして網膜障害の発生にどのように関与するか、もしくは他の経路がそれらの発生に関与するか、未だ不明な点が多い。本研究では、RPE 細胞における chloroquine による lysosome 内空胞形成が細胞死を発生させる要因を明らかにすることを目的とした。

【方法】条件的不死化ラット網膜色素上皮細胞 (RPE-J 細胞) を用い、chloroquine の lysosomal trapping および lysosome 内空胞形成を lysosomal trapping のプローブである LysoTracker® Red (LTR) の処理後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。細胞死は alamarBlue® を用いて蛍光強度 (励起波長 560 nm; 蛍光波長 590 nm) を測定することで評価した。さらに、chloroquine による細胞死経路を特定するため、apoptosis 実行タンパク質である caspase-3/-7 の活性化について、Magic Red® を用いて蛍光強度 (励起波長 590 nm; 蛍光波長 620 nm) を測定することで評価した。

【結果・考察】LTR 処理後の RPE-J 細胞を共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察した結果、RPE-J 細胞内にて LTR 由来の点状シグナルが示され、10 μ M chloroquine 共存下にてそのシグナルが消失した。さらに、同濃度 chloroquine 処理によって空胞の形成が観察された。以上の結果から、RPE-J 細胞において chloroquine は lysosomal trapping を受けて lysosome 内に蓄積され、空胞形成に関与することが示唆された。また、RPE-J 細胞の全体数に対し 50% が空胞を形成する chloroquine の 50% effective concentration (EC₅₀) は $1.35 \pm 0.08 \mu$ M、50% が細胞死に至る chloroquine の 50% lethal concentration (LC₅₀) は $82.5 \pm 15.9 \mu$ M と算出された。RPE-J 細胞に対する chloroquine による LTR 取り込み阻害解析について half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) は $3.45 \pm 2.98 \mu$ M であったことから、EC₅₀ と近似した。従って、RPE-J 細胞 lysosome への chloroquine 蓄積は空胞形成の直接的な要因であるものの、細胞死の誘発については空胞形成に加えて別の要因も関与する可能性が示唆された。この別の要因について細胞自体の apoptosis 誘発の可能性を検証するため、chloroquine 処理後の caspase-3/-7 の活性化を評価した。RPE-J 細胞に対し chloroquine を 500 μ M にて処理した結果、caspase-3/-7 活性が未処理細胞と比較し有意に増加し、その上昇度は apoptosis 誘導薬である genistein 処理条件下と同程度であった。以上の結果から、chloroquine による RPE-J 細胞に対する細胞死は空胞形成による細胞障害だけではなく、apoptosis も一部関与する可能性が示された。

1-般-9

神経芽腫細胞を用いたブチンとブテインとの抗腫瘍活性の差に関する検討

○おおもとまさのり 大本まさのり¹、なからいみさこ 半井美紗子¹、やぶしたなお 藪下奈央¹、かさまつかおる 重松薫¹、なかしまみつき 中嶋美月¹、すずきひろかず 鈴木宏一¹、たかはしじゅんこ 高橋純子²、まつおゆり 松尾由理¹、やまざきまつみ 山崎眞津美¹、たけもとまさや 武本眞清¹、たかはしたつお 高橋達雄¹、だいこくとおる 大黒徹¹（北陸大薬¹、北陸大医療保健²）

【目的】ブテインは、フラボノイド化合物の1つで強力な抗酸化作用や抗炎症作用があり、種々の慢性疾患を治療あるいは予防できる可能性が示唆され、特に抗腫瘍作用においては多くの詳細な報告がある。ブテインの基本構造はカルコンであり、フラバノン有するブチンの異性体である。両者の構造の違いは、生物活性の強度に影響する可能性が考えられる。ブチンにも酸化ストレスを抑えたとの知見が示されており、ブテインと同様の薬効が推察されるが、抗腫瘍作用に関する報告がなく、ブテインとの作用強度の差異も検討されていない。本研究では、神経芽腫細胞（Neuro2A 細胞）を用いて、ブチンとブテインとの抗腫瘍活性の差を検討した。

【方法】ブチンおよびブテインは、無血清 E-MEM 培地で 0.5・5・50 μM を調整し、24・48 時間処置における Neuro2A 細胞の細胞生存率および LDH 活性による細胞傷害性の差異を比較した。また、培養細胞に各化合物を 24 時間処置した際の細胞死をトリパンブルー染色で評価し、活性型 caspase-3 の発現量変化をウエスタンブロット法により確認した。細胞内シグナルに及ぼす両化合物の影響は、Akt、ERK および CREB のリン酸化を検討するため、化合物処置後の 1 時間の細胞ライセートを用いてウエスタンブロットで解析した。Neuro2A 細胞は、レチノイン酸を含む低血清培地で培養することで神経突起様構造が形成される。各濃度の両化合物を含むレチノイン酸低血清培地で 24 時間培養した際の突起長を測定し、突起伸長に及ぼす影響を確認した。また、神経突起に見られる MAP-2 mRNA 発現量は、SYBR グリーンを用いたリアルタイム PCR 法で検討した。

【結果・考察】両化合物は、ともに濃度および時間依存的に細胞生存率を減少し、LDH 活性を上昇させる結果が示された。特にブテインの 50 μM では、ブチンと比較して生存抑制および細胞毒性が強くなる傾向があった。化合物処置後 24 時間における検鏡視野中の細胞数は、播種直後の細胞数に比べて高濃度で明らかに少なく、トリパンブルー染色された細胞の陽性率は、両化合物で 0.5・5 μM よりも 50 μM において有意に高かった。活性型 caspase-3 の発現は、両化合物ともに濃度依存的に増加し、特にブテイン 50 μM はコントロールに対して有意に増加しており、高いトリパンブルー陽性率と一致する結果が示された。細胞内分子のリン酸化に及ぼす化合物の影響では、p-Akt の軽微な減少、p-ERK および p-CREB の上昇が化合物濃度依存的に示された。細胞の突起伸長に与える影響では、両化合物で濃度依存的に伸長阻害が見られ、両化合物とも特に 50 μM 以上の濃度で有意であったが、ブテインはブチンよりも低濃度で強い阻害作用が示唆された。MAP-2 mRNA では、ブチンに顕著な変化は見られず、ブテイン 50 μM でコントロールと比較して有意な低下が示され、突起長の測定結果を部分的に反映する結果が示された。ブテインの方がブチンに比べて MAP-2 遺伝子発現を抑える傾向が強くと考えられる。以上のことから、ブチンについてもブテインと同様に抗腫瘍作用があると考えられるが、ブチンの効果はブテインと比較して緩徐であり、低毒性であると推察される。両化合物のアポトーシス誘導には、caspase-3 の活性化が関与していると考えられるが、リン酸化分子の変動との関連については今後の検討が必要である。

1-般-10

がん細胞の温熱誘導細胞障害における BAG3 の役割

○^{とりごえみ さ こ}鳥越美沙子¹、^{ゆのきたつや}柚木達也¹、^{みながわきつき}皆川沙月²、^{ふるさわゆきひろ}古澤之裕³、^{ひらのてつし}平野哲史²、^{はやし あつし}林 篤志¹、^{たぶちよしあき}田淵圭章²

(富山大医¹、富山大研究推進機構²、富山県大教養³)

【目的】

がん温熱療法（ハイパーサーミア）は、様々ながんに適用されその有効性が認められている。一方で、がん治療過程における温熱抵抗性獲得が問題となっている。この獲得には、分子シャペロンである熱ショックタンパク質（HSP）70 が関与することが報告されている。BAG (Bcl-2 associated athanogene) タンパク質ファミリーに属する BAG3 は、HSP70 のコシャペロンであり、熱、重金属等のストレスによって発現が誘導される。また、BAG3 は数多くのがんにおいて発現レベルが上昇し、BAG3 が種々のタンパク質と相互作用することにより、がんの増殖や生存に関与することが示されている。今回、ヒトがん細胞を用いて、温熱誘導細胞障害における BAG3 の役割を調べた。

【方法】

ヒト口腔扁平上皮がん HSC-3 とヒト子宮頸がん HeLa 細胞を用いた。温熱負荷実験では、細胞を 44℃で 90 分間ストレス負荷後、37℃で一定時間培養した。siRNA を用いて、HSC-3 細胞の BAG3 を一過性にノックダウンした。CRISPR/Cas9 法により、BAG3 ノックアウト HeLa 細胞を構築した。また、レンチウイルス発現システムを用いて BAG3 を安定高発現させた。網羅的な遺伝子発現解析には、GeneChip システムを用いた。

【結果・考察】

細胞への温熱負荷により、細胞生存率低下や細胞死増加等の細胞障害が誘導された。BAG3 の機能阻害は、細胞障害を指標とした温熱感受性を有意に上昇させた。一方、BAG3 の高発現はこの感受性上昇を有意に低下させた。以上の成績から、BAG3 は温熱誘導細胞障害に対して細胞保護的に機能することが示された。また、この BAG3 による温熱感受性の上昇には JNK シグナル伝達経路が関与していることが明らかとなった。BAG3 は温熱負荷により速やかに核内に移行することから、その細胞内局在変化が機能発現に重要であると推察された。他方、網羅的な遺伝子発現解析の結果から、BAG3 の温熱感受性の上昇には、DDIT3 や BNIP3 等の細胞死に関連する遺伝子、さらに、HSP ファミリー、HSPA5、HSPB1、HSPD1、HSPH1 等の細胞死を抑制する遺伝子の関与が予測された。

温熱誘導細胞障害に対して保護的に機能する BAG3 の機能阻害は、がん温熱療法における新規の治療戦略になる可能性がある。

1-般-11

マウス脳由来ミクログリア細胞におけるヘモグロビン誘導膜結合型 PGE₂ 合成酵素の役割

○川端悠太¹、柚木紀香¹、加治美乃里¹、植松智²、審良静男³、高橋達雄¹、松尾由理¹

(北陸大薬¹、大阪市大院医²、阪大免疫フロンティア研セ³)

【目的】 脳出血は、グリア細胞の活性化や炎症性メディエーター産生などの炎症反応を伴うことが知られる。我々はこれまでに PGE₂ の誘導型最終合成酵素である膜結合型 PGE₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) が脳虚血後の障害増悪因子であることを報告してきた。また、コラゲナーゼ投与マウス脳出血モデルにおいても、mPGES-1 が誘導し、神経細胞死や行動障害に寄与することを見出している。本研究では、脳出血後に活性化するミクログリアに着目し、培養ミクログリア細胞を用いて mPGES-1 の脳出血における役割の解明を試みた。

【方法】 ミクログリア細胞腫 BV-2 細胞、神経細胞腫 SH-SY5Y 細胞、或いは、マウス脳由来ミクログリア、大脳皮質神経細胞を用いた。初代培養は、胎生 18 日齢或いは生後 1 日齢 C57BL/6 系 mPGES-1 欠損型マウスと野生型マウス脳より、神経細胞とミクログリアを単離培養した。0 - 100 μM ヘモグロビンで刺激し、6 時間後と 24 時間後に PGE₂ 量を ELISA キットにて、各種 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。また、24 時間後の細胞死を Alamar Blue 法で検討した。

【結果】 ヘモグロビン刺激により、SH-SY5Y 細胞では mPGES-1 の誘導は見られなかったが、BV-2 細胞では mPGES-1 の顕著な誘導が見られた。そこで、脳ミクログリアを用い、誘導 mPGES-1 の役割を検討した。野生型ミクログリアではヘモグロビン濃度依存的に有意に PGE₂ が産生したのに対し、mPGES-1 欠損型ミクログリアではヘモグロビンによる PGE₂ が生じなかった。PGE₂ 合成に関わる酵素の発現の違いについて検討したところ、mPGES-2、cPGES、mPGES-1、上流の誘導型酵素 COX-2、いずれもヘモグロビン刺激により増加し、mPGES-1 欠損型ミクログリアでは野生型ミクログリアより高発現した。炎症性サイトカインの TNF-α、IL-1β、神経保護性サイトカイン IL-6 もヘモグロビンにより有意に増加したが、mPGES-1 欠損型ミクログリアでは野生型ミクログリアより TNF-α と IL-1β が有意に低値だったのに対し、IL-6 は有意に高値だった。Iba-1 発現とミクログリア細胞死に遺伝子型による大きな違いは見られなかった。そこで、ミクログリアと神経細胞を共培養したところ、mPGES-1 欠損型ミクログリアとの共培養では、野生型ミクログリアとの共培養に比べ、ヘモグロビンによる神経細胞貪食が多くみられ、神経細胞死が少なかった。

【考察】 以上の結果より、ヘモグロビンにより、ミクログリアにて mPGES-1 が誘導し、PGE₂ 産生を介して、障害性サイトカインと保護性サイトカインの発現を制御することで、神経細胞死を促進することが示唆された。従って、mPGES-1 は脳出血治療において有効なターゲットとなる可能性が期待される。

1-般-12

シナプスに存在する転写活性化因子 MRTFB の神経活動依存的な核移行と遺伝子発現制御機構に関する解析

○伊原 大輔¹、田邊 広樹¹、今西 詩織²、小坂 彩²、佐野 友香里²、阪上 洋行³、加藤 真之佑¹、
田淵 明子¹

(¹富山大院・医薬・分子神経生物、²富山大・薬・分子神経生物、³北里大・医・解剖学)

【背景および目的】

神経細胞は外部刺激に応答してシナプスが活性化し、その情報が核内へ伝わり、転写因子を介して様々な遺伝子が発現する。この一連の情報伝達“シナプスから核へ”のシグナリングは、神経可塑性、高次脳機能発現に重要である。私たちが注目している myocardin-related transcription factor (MRTF)は、アクチン結合性タンパク質であると同時に、転写因子 SRF (serum response factor)のコアキチベーターとして働く。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。最近、私たちは MRTF ファミリーを交差特異的に認識する高品質抗体を作製し、MRTFA および MRTFB がシナプスに存在しており、それらがシナプス成熟に関与することを報告した。また、MRTFB がシナプス活性化による神経可塑性関連遺伝子の 1 つ *Arc* のエンハンサー活性化に関与することも報告した。さらに、その抗体を用いた解析により、MRTFB がシナプス活性化により核内へ移行することを明らかにしている。したがって、シナプスに局在する MRTFB は、シナプスにおいて細胞外刺激の“受け手”となり、自らが核移行し情報を伝達することで、SRF 標的遺伝子の発現を調節することが強く示唆される。そこで本研究では、上記の高品質抗体を活用し、神経細胞における MRTFB の機能をその局在変化と遺伝子発現の観点から解析した。

【方法】

ラット大脳皮質神経細胞初代培養系を用い、MRTFB の局在に関しては蛍光免疫染色により解析した。遺伝子発現に関しては、神経活動依存的に発現が上昇する遺伝子の 1 つである *c-Fos* 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行い転写活性を評価した。

【結果】

長期培養神経細胞に対し、Bicuculline/4-aminopyridine (Bic/4AP)処理を行いシナプス活性化を誘発した。免疫染色の結果、Bic/4AP 処理により MRTFB は一過的に核内へ移行した。またその核移行は、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤 APV、L 型電位依存性 Ca²⁺チャネルの阻害剤 Nicardipine およびカルシニューリン経路の阻害剤 FK506 の前処理により抑制された。遺伝子発現に関しては、予備的な結果ではあるが、Bic/4AP 処理により上昇した *c-Fos* 遺伝子プロモーター活性は APV および FK506 の前処理により減少した。さらに、Bic/4AP 処理により上昇した *c-Fos* 遺伝子プロモーター活性は MRTFA および MRTFB のノックダウンにより減少した。

【考察】

上記の結果から、神経活動依存的に核移行した MRTFB は、引き続き SRF 標的遺伝子の発現を誘導すると考えられる。これまでに、転写因子 CREB のコファクター CRTC1 は、転写因子でありながらポストシナプスにも局在しており神経活動依存的に核へ移行する、さらに CREB-CRTC1 経路が空間認識記憶の形成に重要であるとの報告がある。したがって、上述の経路とよく似た MRTF-SRF 経路を同定することで、“シナプスから核へ”のシグナリング機構を担う、新規の神経可塑性メカニズムの解明につながるものと考えられる。

1-般-13

細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-3 による細胞周期制御因子 Cdc25A の DNA 損傷非依存的な分解誘導機構の解析

○辻口拓也^{つじぐちたくや}、山下克美^{やましたかつみ} (金沢大院薬¹)

【背景および目的】

細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-3 (*Dictyostelium* Differentiation-Inducing Factor-3) は細胞の G1 期停止を誘導することが報告されている。私たちは DIF-3 と細胞周期制御因子との関与に着目して解析を行い、DIF-3 を処置した細胞で細胞周期の進行を正に制御する重要な細胞周期制御因子の 1 つである Cdc25A (Cell division cycle 25A) が分解されていることを見出した。さらに、DIF-3 処置による Cdc25A タンパクの分解が DNA 損傷系とは異なる経路で誘導されることを強く示唆する結果が得られた。本研究はこれらの研究結果に基づき、DIF-3 を処理された細胞で Cdc25A の分解が誘導されるメカニズムの解明を目的とした。

【方法】

ヒト結腸腺癌由来 HCT116 細胞に DIF-3 単独または、DIF-3 と PI3-K および Akt 阻害剤との共処置による Cdc25A タンパクの発現量の変化をウェスタンブロット法により解析した。また、FACS 解析により DIF-3 処置が細胞周期の進行にもたらす影響を評価した。

【結果・考察】

HCT116 細胞に DIF-3 を処置したところ、Cdc25A タンパクの減少が認められた。DIF-3 処置による Cdc25A タンパク質の分解がプロテアソーム阻害剤の MG-132 および Bortezomib (Velcade[®]) との共処置により抑制されたことから、DIF-3 による Cdc25A の分解はユビキチン-プロテアソーム系を介する可能性が示唆された。Cdc25A は DNA 損傷による ATR-Chk1 経路の活性化によって分解が誘導されることが報告されている。しかし、DIF-3 処置群では DNA 損傷依存的な Chk1 のリン酸化や DNA2 本鎖切断のマーカである γ -H2AX シグナルの増強が認められなかった。このことから DIF-3 が既知の DNA 損傷系とは異なる経路で Cdc25A の分解を誘導することが示唆された。DIF-3 は細胞周期促進因子の cyclin D の分解を誘導し、その分解は GSK-3 β 阻害剤により抑制されることが報告されているため、GSK-3 による Cdc25A 分解誘導の可能性について検討した。Cdc25A は DIF-3 と GSK-3 阻害剤との共処置によっても分解されたことから、cyclin D とは異なる経路で分解誘導されることが強く示唆された。さらに、DIF-3 による Cdc25A の分解誘導はリン酸化により GSK-3 を抑制する Akt およびその上流の PI3-K の阻害によっても抑制されなかった。本研究により DIF-3 が DNA 損傷および PI3-K/Akt/GSK-3 系とは異なる、未知の経路で Cdc25A タンパクの分解を誘導することが明らかになった。

1-般-14

麻黄によるアレルギー性炎症抑制機構の研究

○長田夕佳¹、安藤広和²、佐々木陽平²、鈴木 亮¹

(金沢大院医薬保 衛生化学¹、分子生薬²)

【目的】麻黄は麻黄湯や葛根湯など、多くの漢方処方に配合される重要生薬の1つである。特にアレルギー疾患に対する漢方処方には麻黄を含むものが多く、麻黄によるアレルギー炎症抑制効果が示唆されている。その一方で、麻黄の含有成分であるエフェドリンやプソイドエフェドリンなどアルカロイドによる生体影響も懸念されている。このように、麻黄はアレルギー疾患への有効性が期待されているにも関わらず、薬効成分やアルカロイドの影響など、作用機序については不明な点が多い。本研究では、アレルギー疾患に重要な役割を担うマスト細胞を用いて、麻黄によるアレルギー性炎症抑制機構を追究した。

【方法】マスト細胞には、マウス骨髄細胞を IL-3 と SCF の存在下で分化させた骨髄由来培養マスト細胞を用いた。マスト細胞は、抗 DNP (Dinitrophenyl) IgE 抗体で感作後、麻黄エキス (0.1~100 $\mu\text{g/ml}$) 含有培地で処理した。その後、抗原 (DNP-HSA) でマスト細胞を特異的に刺激した際の脱顆粒反応 (ヒスタミンなどの分泌反応) について、顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) 放出量や顆粒膜タンパク質 (CD63) の細胞膜での発現量変化を指標に解析した。また、麻黄エキス処理による高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) の発現量変化の解析にはフローサイトメータを用いた。さらに、麻黄の含有成分の違いによる脱顆粒反応の解析には、アルカロイド含量や組成が異なる麻黄を用いた。

【結果・考察】はじめに、麻黄を含む様々な漢方処方 (小青竜湯、大青竜湯、葛根湯、麻黄湯) 及び麻黄単味の各熱水抽出エキスをそれぞれ処理したマスト細胞において、アレルギー炎症の指標となる脱顆粒反応について観察を行った。その結果、麻黄エキスを処理したマスト細胞では、他の漢方処方エキスと比較して、脱顆粒反応を有意に抑制していた。また、麻黄エキス処理細胞において脱顆粒反応が抑制された原因を追究するため、マスト細胞表面の Fc ϵ RI 発現量について解析したところ、麻黄エキスを処理した細胞では、Fc ϵ RI の発現量が処理時間及び濃度依存的に有意に減少していた。このことから、麻黄はマスト細胞表面の Fc ϵ RI 発現量を減少させることにより、アレルギー応答を抑制することが示唆された。次に、麻黄の含有成分とアレルギー性炎症抑制機構を明らかにするため、総アルカロイド含量などが異なる麻黄を用いて同様の実験を行った。その結果、総アルカロイド含量が低い麻黄から調製した麻黄エキスを処理したマスト細胞においても、これまでと同様にマスト細胞で脱顆粒反応の抑制が観られた。これらのことから、麻黄は、総アルカロイド含量に関わらずマスト細胞の脱顆粒反応を抑制し、アレルギー性炎症反応を調節していることが示唆された。

1-般-15

CD4 陽性 T 細胞の IL-27 受容体シグナルにおける TRAF5 の抑制性機能の解明

○河原永悟¹、藤森由夏¹、大石真結¹、川口甲介¹、守田雅志¹、奥山祐子²、石井直人²、宗孝紀¹（富山大院薬¹、東北大院医²）

【目的】

TRAF (TNF receptor-associated factor) は、リガンドと結合した TNF 受容体及び IL-1/Toll 様受容体と相互作用することでシグナル伝達に関わる細胞内アダプタータンパク質である。TRAF は、C 末端部分に特徴的な TRAF ドメインをもつ TRAF1 から TRAF6 までの 6 種類が存在する。TRAF5 は、NF- κ B の活性化因子として、リンホトキシン β 受容体及び CD40 のシグナル調節因子として当初見出された。IL-27 は、Th1 細胞の分化を誘導に関与すると共に、CD4⁺ T 細胞において IL-10 産生を誘導する。IL-27 受容体は、gp130 (CD130) と WSX-1 (IL-27Ra) から構成される。我々は、TRAF5 が gp130 に相互作用することで IL-6 受容体 (gp130 および IL-6R) のシグナルを抑制することを見出した。したがって、TRAF5 が IL-27 受容体の gp130 に対しても抑制作用を示すことで、IL-27 受容体シグナルを調節する可能性が示唆された。本研究では、TRAF5 の IL-27 受容体シグナルに対する抑制作用を評価するために、野生型および TRAF5 欠損マウスからそれぞれ精製した CD4⁺ T 細胞を用いて、IL-27 刺激による遺伝子発現やシグナル伝達に関して解析した。

【方法】

CD4⁺ T 細胞は、野生型および TRAF5 欠損マウスの脾臓から MACS[®] 磁気ビーズ用いて精製し、RPMI1640 培地に抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体を加えて、IL-27 の存在、非存在下で培養した。その後、細胞を回収し RNA 抽出を行い逆転写反応したのちリアルタイム定量 PCR により遺伝子発現解析を行った。STAT タンパク質のリン酸化は、イムノブロットティングにより評価した。

【結果・考察】

野生型 CD4⁺ T 細胞と比較して、TRAF5 欠損 CD4⁺ T 細胞では抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体存在下で IL-27 刺激による IL-10 および IL-21 の遺伝子発現量の増加がみられた。

CD4⁺ T 細胞の IL-27 受容体シグナルにおいて TRAF5 は抑制性因子として機能し、IL-27 受容体シグナルの過剰応答を制御していると考えられる。現在、IL-27 によって誘導されるその他の遺伝子および STAT タンパク質のリン酸化について評価するとともに、その分子機構について解析を進めている。

1-般-16

サイトカイン受容体 gp130 と TRAF タンパク質の相互作用様式の解明

○^{ふじもり ゆうか}藤森由夏¹、^{かわはら えいご}河原永悟¹、^{かわぐち こうすけ}川口甲介¹、^{もり たまさし}守田雅志¹、^{おび たかゆき}帯田孝之¹、^{おく やまゆうこ}奥山祐子²、^{みずぐち みねゆき}水口峰之¹、^{いし いなおと}石井直人²、^{そう たかのり}宗孝紀¹ (富山大院薬¹、東北大院医²)

【目的】

TRAF [tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor] は、細胞内タンパク質であり、T細胞では OX40 等を含む TNF 受容体型分子の NF- κ B などのシグナル伝達に関わるアダプタータンパク質である。哺乳類の TRAF ファミリータンパク質は、C 末端に特徴的な TRAF ドメインをもつ TRAF1 から TRAF6 までの 6 つの分子から構成される。一方で、インターロイキン 6 (IL-6) は、インターロイキン 6 受容体 (IL-6R) とシグナル伝達受容体 gp130 から構成される受容体に結合することにより gp130 の二量体化を促進し、JAK/STAT シグナル伝達経路を活性化する。我々のこれまでの研究から、従来知られた機能とは異なる形で TRAF ファミリータンパク質の一つである TRAF5 が、gp130 と恒常的に結合することで IL-6 受容体の活性化に依存して起こる JAK/STAT3 シグナル伝達経路を阻害することが判明した。しかし、TRAF5 と gp130 との相互作用がどのように起こり、これが IL-6 受容体のシグナル伝達に対してどのように阻害的に働くかはよくわかっていない。また、TRAF2 や TRAF3 にも IL-6 受容体シグナルを抑制する作用が認められるが、これらの gp130 シグナルの調節に関わる TRAF ファミリー分子の関連性についてもよくわかっていない。そこで本研究では、TRAF5 と gp130 の結合様式、また他の TRAF の関与を明らかにする目的で実験を行った。

【方法】

HEK293T 細胞へのプラスミドベクターのトランスフェクトにより gp130 と各 TRAF タンパク質の両方を発現させ、細胞溶解物から磁気ビーズと抗体を用いて gp130 を免疫沈降し、TRAF の共沈量を評価した。また、gp130 の TRAF2 および TRAF5 結合アミノ酸領域を欠失させた gp130 の変異体 [gp130 (Δ 774-798)] を用いて、上記と同様の方法で gp130 と TRAF の相互作用様式を調べた。

【結果・考察】

gp130 は、TRAF2、TRAF3、および TRAF5 と結合するが、TRAF1 とは結合しないことを見出した。また、TRAF5 の TRAF ドメインと gp130 の TRAF 結合アミノ酸領域を含むそれぞれの精製タンパク質を作成し相互作用を解析したところ、両者の結合を検出できた。しかし、これらの結合はそれほど高くなく、何らかの分子が両者の結合を安定化する可能性が推察された。

また、gp130 (Δ 774-798) と TRAF2 あるいは TRAF5 との結合は認められなかったが、TRAF3 との結合が確認された。以上から、TRAF3 は TRAF2 や TRAF5 とは異なった形で結合しているのではないかと考えられる。

1-般-17

副腎白質ジストロフィー(ALD)：発症における CD4 陽性 T 細胞の関与

○大石真結^{おおいしまゆ}、河原永悟^{かわはらえいご}、守田雅志^{もりたまさし}、宗孝紀^{そうたかのり} (富山大院薬)

【目的】副腎白質ジストロフィー(ALD)は *ABCD1* 遺伝子の変異によって引き起こされる神経変性疾患である。この遺伝子は、極長鎖脂肪酸 CoA を細胞質からペルオキシソームへ輸送するペルオキシソーム膜 *ABCD1* タンパク質をコードしている。本疾患は極長鎖脂肪酸の蓄積を生化学的特徴としており、中枢神経系ではミクログリアやアストロサイトの活性化、及びリンパ球や単球・マクロファージの脳内への浸潤が発症に関与する可能性がある。しかし、その詳細な発症機序は未だ明らかになっていない。本研究では、ALD 発症における CD4 陽性 T 細胞の関与及び役割を解明することを目的とし、野生型マウスと *Abcd1* 欠損マウスから単離した CD4 陽性 T 細胞の性状について解析した。

【方法】野生型マウス及び *Abcd1* 欠損マウスから脾臓を摘出し、溶血処理を行った脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を磁性ビーズを用いて単離した。CD4 陽性 T 細胞を 96well プレートに播種し、抗 CD3 抗体や抗 CD28 抗体で活性化すると共に、ヘルパーT細胞の分化に関与する IL-12 や IL-4 などのサイトカインを培地に添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。一定時間の培養後、培養液上清中のサイトカイン量を ELISA 法により定量し、CD4 陽性 T 細胞における遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR により評価した。

【結果】野生型マウス及び *Abcd1* 欠損マウスの脾臓に含まれる CD4 陽性 T 細胞の亜集団解析を行った結果、脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞におけるナイーブ T 細胞、エフェクターメモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞のそれぞれの割合に関して、両群間で有意な差は認められなかった。次に精製した CD4 陽性 T 細胞を活性化させた後に、細胞増殖能や遺伝子発現量について解析した。その結果、野生型と *Abcd1* 欠損 CD4 陽性 T 細胞の間に増殖能における差は認められなかった。興味深いことに、両 CD4 陽性 T 細胞群において、ペルオキシソーム膜タンパク質をコードする *Abcd3* 遺伝子の発現量が活性化後にも維持されているにもかかわらず、*Abcd2* 遺伝子の発現量が活性化後に著しく減弱することが確認された。IL-12 の未添加及び添加時において、Th1 細胞に関係する *Ifng* 遺伝子の発現量が *Abcd1* 欠損 CD4 陽性 T 細胞で高いことが確認された。一方、IL-4 の添加により Th2 細胞の分化を誘導したところ、*Abcd1* 欠損 CD4 陽性 T 細胞で *Il4* 遺伝子の発現量が低い傾向が認められた。以上の結果から、野生型と比較して *Abcd1* 欠損 CD4 陽性 T 細胞が Th1 細胞に分化しやすいことが示唆された。

【考察】ALD 患者の脳では、炎症部位周辺に CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞の集積が観察される。血液脳関門が破壊されることで、これらのリンパ球が脳内へ浸潤し、炎症反応を増悪させる機序が想定される。CD4 陽性 T 細胞の活性化後に、*Abcd1* と機能的相同性が高い *Abcd2* の発現が消失することから、*Abcd1* 欠損 CD4 陽性 T 細胞内において極長鎖脂肪酸の異常蓄積などが起こり、このような脂質代謝異常が Th1/Th2 の分極に影響を及ぼすことが推察された。以上から、炎症性 T 細胞の脳内での以上応答が ALD 発症と関連する可能性が示唆された。

1-般-18

アラキドン酸による容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネルの制御

○^{すみよししほ}住吉志萌¹、^{しみずたかひろ}清水貴浩¹、^{ふじたきょうすけ}藤田 恭 輔²、^{ふじいたくと}藤井拓人¹、^{わたなべしろう}渡辺志郎²、^{さかいひでき}酒井秀紀¹ (富山大薬¹、富山大和漢研²)

【背景および目的】

容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネルは、低浸透圧性細胞膨張が生じた際に活性化し、細胞容積を調節する。また、この Cl⁻チャネルはアポトーシスや細胞増殖などにも関与することから、細胞の生死を制御する生理的に重要な働きを持つ。このチャネルの電気生理学的性質は詳細に解析されているが、その活性化メカニズムおよび不活化の制御についての全容は明らかとなっていない。これまでに不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は低浸透圧刺激により増加することが報告されていることから、本研究ではアラキドン酸に着目し、その産生が容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネル活性を制御するかについて検討を行った。

【方法】

容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネル電流は、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞にパッチクランプホールセル記録法を適用し、測定した。COX 非選択的阻害剤として indomethacin を、COX-2 選択的阻害剤として celecoxib を、PLA₂ 阻害剤として pyrrophenone を用いた。HEK293T 細胞からのアラキドン酸放出量は、Bligh-dyer 法で脂質を抽出した後に HPLC により定量を行った。

【結果および考察】

HEK293T 細胞を低浸透圧刺激することで容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネル電流が誘発された。この Cl⁻電流は、非選択的な COX 阻害剤である indomethacin および COX-2 の選択的阻害剤である celecoxib により有意に抑制された。一方で、アラキドン酸の産生に関わる PLA₂ を阻害する pyrrophenone を処理したところ、容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネルは阻害されなかった。これらの結果から、細胞膨張により生じるアラキドン酸が Cl⁻チャネルを阻害する可能性が示唆された。そこで Bligh-dyer 法を用いた HPLC により脂肪酸量を定量したところ、低浸透圧性細胞膨張によりステアリン酸、パルミチン酸の量は変化しなかった一方で、アラキドン酸の放出量が増大した。興味深いことに、celecoxib を処理することで、アラキドン酸量がさらに増加した。以上の結果より、COX 阻害剤はアラキドン酸を蓄積することで、容積感受性外向き整流性 Cl⁻チャネルを間接的に阻害することが示唆された。

1-般-19

自閉症に関連するカチオンポンプの病態生理機能の解明

○^{むらやまたすく}村山資¹、^{ふじいたくと}藤井拓人²、^{いはらだいすけ}伊原大輔³、^{しみずたかひろ}清水貴浩²、^{たぶちあきこ}田淵明子³、^{さかいひでき}酒井秀紀² (富山大・薬¹、富山大・院薬・薬物生理²、分子神経生物³)

【目的】

自閉症は広汎性発達障害の一つであるが、発症機序の全容解明には至っていない。自閉症患者において複数の変異が報告されている膜タンパク質 Autism-ATPase (仮称) は、10 回膜貫通構造をとりカチオンポンプとしての機能に重要なドメインを高度に保存している。しかしこれまでに、Autism-ATPase は mRNA レベルで脳に高発現することが報告されているが、その輸送イオン種を含む生理機能は不明である。本研究では、Autism-ATPase の機能解析および自閉症患者において報告されている変異が Autism-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】

マウス Autism-ATPase の全長クローニングを行い、N 末端に Xpress-tag (約 5 kDa) を付加した発現ベクターに組み込んだ。また自閉症患者において報告されている変異アミノ酸残基およびカチオンポンプの機能に重要なリン酸化アスパラギン酸残基の変異体を作製した。Autism-ATPase の野生型 (WT) と各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局在を観察した。この Autism-ATPase 発現細胞の膜画分を用いて ATP 加水分解活性を測定した。また、ラット大脳皮質膜画分およびラット大脳皮質より調製した初代培養神経細胞を使用し、抗 Autism-ATPase 抗体を用いて内在性 Autism-ATPase の発現および局在を観察した。

【結果・考察】

抗 Xpress-tag 抗体を用いた Autism-ATPase 発現細胞でのウェスタンブロットにおいて、目的分子量サイズ (約 130 kDa) にバンドが観察された。また、ラット大脳皮質の膜画分において内在性 Autism-ATPase のバンド (約 125 kDa) が観察された。発現細胞において Autism-ATPase の局在は原形質膜に観察された。Autism-ATPase 発現細胞における ATP 加水分解活性は、空ベクタートランスフェクション (mock) 細胞における活性に比べて有意に上昇し、この活性上昇は、リン酸化アスパラギン酸残基の変異体発現細胞で消失したことから、Autism-ATPase の発現に由来することが示唆された。また、Autism-ATPase 活性は、反応溶液中の Na⁺濃度を減少させることで有意に抑制されたが、K⁺および Ca²⁺濃度を減少させても活性に有意な変化は見られなかった。次に、自閉症患者において報告されている変異体が Autism-ATPase の発現および ATP 加水分解活性に与える影響について検討した。Autism-ATPase の発現レベルは、第 1-2 膜貫通間ループに存在するイソロイシン残基の変異体発現細胞において WT 発現細胞に比べて有意に低下した。他方、第 4-5 膜貫通間ループに存在するグルタミン酸残基の変異体発現細胞では、単位分子当たりの Autism-ATPase 活性が著しく低下した。また、ラット大脳皮質より初代培養神経細胞を調製し、Autism-ATPase の内在的な局在を検討した。細胞体および樹状突起において Autism-ATPase のドット状の発現が観察されたことから、Autism-ATPase がシナプス小胞に局在する可能性が考えられた。

以上の結果より、Autism-ATPase は Na⁺輸送性のカチオンポンプとして機能し、その発現及び機能低下が自閉症に関連している可能性が示唆された。

試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体 Kinase モジュールの機能解析

○海戸優作¹、原子空¹、丹澤円香¹、林裕人¹、藤田智陽¹、飯田智¹、田中亜紀¹、廣瀬豊¹、
大熊芳明²

¹⁾ 富山大院・医学薬学研究部（薬）・遺伝情報制御学、²⁾ ゲノム創薬研究所

【背景・目的】真核生物メディエーター複合体（メディエーター）は、転写因子と転写開始前複合体の両者に結合して転写制御シグナルの伝達を媒介する巨大複合体である。メディエーターは、約30のサブユニットからなり、Head, Middle, Tail と呼ばれる3つのモジュールからなるコアメディエーターと、それに可逆的に会合する Kinase モジュールから構成される。Kinase モジュールは、CDK8, CyclinC, MED12, MED13 の4サブユニットから構成されるキナーゼ複合体で、種々の転写因子やクロマチン制御因子をリン酸化することで、転写の活性化と抑制の両方に関与している。また脊椎動物には、CDK19 という CDK8 のパラログが存在し、CDK8 と相互排他的に Kinase モジュールに含まれている。しかし CDK19 の特異的機能はよく解っていない。また近年、Kinase モジュールサブユニットの遺伝子変異や発現異常が、がんや症候性発育障害などの疾患で多数報告され、さらに CDK8/CDK19 の阻害剤が AML などに対し抗腫瘍活性を持つことが報告されている。したがって、Kinase モジュールの機能解明およびキナーゼ阻害剤の探索がこうした疾患の治療のために必要とされている。一方、Kinase モジュールは、他の一般的な CDK キナーゼと異なり、CDK-Cyclin だけでなく MED12 と MED13 を完全な活性化に必要とし、その合計分子量は約 600kDa と大きく、生化学的な機能解析は遅れている。そこで本研究では、バキュロウイルス-昆虫発現系を用いて組換え Kinase モジュールを再構成・精製し、その生化学的な機能を解析することを目的とした。

【方法】 CDK19 を含む Kinase モジュール4サブユニットをそれぞれ発現する組換えバキュロウイルスを調製し、Sf9 細胞に共感染させることによって、Kinase モジュールを細胞内で形成させた。構造的に複合体の両端に位置するサブユニットにそれぞれ異なるアフィニティータグ（一端の CDK19 に FLAG タグ、他端の MED13 に His タグ）を導入し、連続した二段階のアフィニティー精製を行うことによって、4サブユニットが揃った完全な Kinase モジュールの精製を試みた。次に、モデル基質として組換えマウス RNA ポリメラーゼ II (Pol II) CTD およびヒト STAT1 の 727 番目セリンを含む C 末端部分を大腸菌で発現・精製した。精製 Kinase モジュールとモデル基質をもちい、*in vitro* kinase assay を行い、キナーゼ活性を評価した。リン酸化の検出は部位特異的リン酸化抗体を使用した Western Blotting によって行った。

【結果・考察】 組換えバキュロウイルス共感染 Sf9 細胞から、二段階のアフィニティー精製によって、4サブユニット全てが含まれる複合体を精製した。Pol II CTD を基質とした *in vitro* リン酸化解析の結果、CDK19 Kinase モジュールは、CTD7 アミノ酸リピート配列 YSPTSPS の5番目セリンをリン酸化したが、2番目セリンはリン酸化しなかった。さらに報告されている CDK8 Kinase モジュール同様、CDK19 Kinase モジュールは、STAT1-727 番目セリンをリン酸化した。現在、CDK8 野生型、CDK19 の疾患関連変異体発現バキュロウイルスを用いて Kinase モジュールを精製しており、今後、両 Kinase モジュールの基質特異性の違いや、疾患関連変異がキナーゼ活性や構造に与える影響を評価する予定である。

1-般-21

対面飼育ストレス負荷マウスにおける MPTP ドパミン神経毒性

たかもりさいか きしだかりん みつもとやすひで
○高森採歌, 岸田かりん, 光本泰秀 (北陸大薬)

【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症状の発現に先立って、うつ、不安といった精神症状が認められることが報告されている。また、ストレス性精神障害であるうつ病が本疾患の前駆症状である可能性が疫学研究により示唆されている。そこで本研究では精神的ストレスがパーキンソン病発症の危険因子になるのではないかと考えた。そこでヒトにおける社会心理的ストレスを想定した対面飼育 (Confrontational housing, CH) ストレスを負荷したマウスにドパミン神経毒 MPTP を投与し、CH ストレスの 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。CH ストレスは 2 匹のマウスを、仕切り板を入れたケージで 1 週間単独飼育し、その後仕切りを除いて CH を行うという方法を用いた。Control として群飼育 (3 匹/ケージ) のマウスを用いた。不安様症状の評価は明暗ボックス試験法 (Light dark test, LDT) を用いて行った。ドパミン神経毒 MPTP の処置は、CH 開始から 24 時間後に 20 mg/kg の用量で腹腔内投与した。線条体ドパミン神経変性の程度は、組織ホモジネートを用い、Western blot 法によりドパミントランスポーター (dopamine transporter, DAT), チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) およびグリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 各々のタンパク質レベルを指標に評価した。

【結果・考察】 LDT において CH ストレス負荷マウスは、Control マウスに比べ、暗室から明室へ出てくるまでの時間の有意な延長と明室での滞在時間の短縮傾向が認められた。この結果から CH 法により不安様症状が惹起された可能性が示唆された。

CH ストレス負荷の MPTP 神経毒性に対する影響を検討する目的では、神経毒性が軽度な低用量 (20 mg/kg) の MPTP を用いた。CH ストレス負荷群と比較して CH ストレス負荷 + MPTP 投与群では、DAT 及び TH タンパク質レベル共に有意な低下を示した。また、ドパミン神経変性に伴うアストロサイトの活性化を反映して発現量が増加する GFAP レベルは、有意な増加を示した。一方、Control マウスにおける、これらのタンパク質レベルは MPTP の投与により有意な変化を示さなかった。このことから、CH ストレス負荷により MPTP 神経毒性が増強されたことが示唆された。

以上の結果から、社会心理的ストレスが線条体ドパミン神経の脆弱性を高め、PD 発症の危険因子となる可能性が示唆された。このことは、PD の発症予防を考える上でストレスの緩和が重要なアプローチであると考えられる。

1-般-22

MPTP 処置マウスにおけるフェルラ酸の線条体ドパミン神経保護効果

○谷口正晃¹, 渡辺 (岡部) 未央², 加登康洋², 光本泰秀¹ (北陸大薬¹, 小松ソフィア病院²)

【背景・目的】 孤発性パーキンソン病の発症要因については未だ不明であるが、その病理学的特徴である黒質線条体ドパミン神経の変性脱落にミトコンドリア機能異常や酸化ストレスが関与していると考えられている。しかしながら、この疾患の病勢を阻止するような治療法は確立されていない。本研究では、米ぬかなどに含まれるフェルラ酸 (ferulic acid, FA) に着目した。FA は、抗酸化作用や抗炎症作用を有することから、それらの作用を介して神経保護効果を発揮することが期待できる。そこで 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 処置パーキンソン病モデルマウスにおける FA の線条体ドパミン神経保護効果について検討した。

【方法】 MPTP モデルマウスは、8 週齢 C57BL/6N 雄性マウスに MPTP 30 mg/kg を 1 日 1 回、2 日間腹腔内投与し作製した。実験群として、マウスを Control 群, MPTP 投与群, MPTP+FA (20 mg/kg) 投与群, MPTP+FA (60 mg/kg) 投与群の 4 群に分けた。FA を 1 日 1 回、5 日間連続経口投与し、投与最終 2 日間の FA 投与後に MPTP を腹腔内投与した。MPTP 最終投与から 72~96 時間後に線条体を採取し、組織ホモジネートを調製した。線条体における dopamine transporter (DAT), glial fibrillary acid protein (GFAP) 及び tyrosine hydroxylase (TH) の各タンパク質レベルを Western blot 法により評価した。また、Control 及び FA 投与マウスの前脳から調製した粗シナプトソーム画分を用いて、MPP⁺処置下のミトコンドリア酸化還元活性を Alamar blue 蛍光を指標に測定した。

【結果・考察】 MPTP 投与群では、Control 群と比較して DAT 及び TH タンパク質レベルの減少並びに GFAP レベルの増加が認められた。MPTP による DAT タンパク質レベルの低下に対して FA の 20 及び 60 mg/kg の両用量ともに影響を及ぼさなかったが、TH タンパク質レベルにおいては 60 mg/kg の用量で MPTP による低下を抑制した。この結果から、FA (60 mg/kg) の投与によって MPTP によるドパミン神経の変性・脱落を部分的に遅らせる可能性が示唆された。一方、MPTP による GFAP レベルの増加に対しては、FA (60 mg/kg) でその増加が抑制されたが、FA (20 mg/kg) では抑制効果は認められなかった。ミトコンドリア酸化還元活性においては、粗シナプトソーム画分に MPP⁺処置した際に見られる活性の低下に対して、FA (20 mg/kg) では影響を及ぼさなかったが、FA (60 mg/kg) では、MPP⁺処置による活性の低下を抑制した。

これらのことから、FA によるドパミン神経保護効果が用量依存的で、その保護効果にミトコンドリア機能保護効果が一部関与している可能性が示唆された。

1-般-23

ランニングホイールを用いた行動に対するモチベーションの形成・維持の神経メカニズム

○張形^{ちやうたん}、二見優作^{ふたみゆうさく}、徳村和也^{とくむらかずや}、二井谷和平^{にいたにかずへい}、出山諭司^{でやまさとし}、金田勝幸^{かねだかつゆき}（金沢大院薬）

【目的】

ネット、ゲーム依存などの行動依存が大きな社会問題となっているが、行動依存の神経メカニズム、すなわち、行動に対する異常なモチベーションの形成・維持の神経メカニズムには不明な点が多い。これまでの研究から、脳内報酬系を構成する内側前頭前野(mPFC)、側坐核(NAc)、および、線条体(Str)は麻薬や覚醒剤などに対する異常なモチベーションを示す薬物依存に重要な役割を果たすことが明らかにされている。しかし、これらの脳部位が行動に対するモチベーションにも関与しているか否かは不明である。そこで、本研究ではマウスがランニングホイール(RW)を自発的に回転させることに着目し、これを行動依存のモデルとして用いることで、行動に対するモチベーションの形成・維持における mPFC、NAc、および、Str の関与を検討した。

【方法】

6~13 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを RW に馴化させた後、1 台の RW を設置したケージに 1 匹ずつ入れることで、毎日 1 時間、RW を自発的に回転させた。馴化の翌日を回転 1 日目(D1)とし、D1 から経日的な回転数変化を計測した。各脳部位から切片を作製し、神経活動マーカーの c-Fos の発現を免疫組織化学的に検出することで、RW 回転に伴う各脳部位の神経活動変化を評価した。mPFC は前辺縁皮質(Pl-mPFC)と下辺縁皮質(Il-mPFC)に、NAc はコア(NAc-C)とシェル(NAc-S)に、Str は背内側(DM-Str)と背外側(DL-Str)に分け、それぞれに存在する c-Fos 陽性細胞数を計測した。

【結果・考察】

マウスを毎日 1 時間 RW に接触させることで、回転数は経日的に増加し、約 3 週間後にはそれ以上は増加せずに安定した。すなわち、約 3 週間の間に RW に対するモチベーションが形成され、それ以降は、モチベーションが維持されると考えられた。そこで、モチベーション形成・維持に伴う各脳部位での神経活動変化を解析するために、馴化翌日の D1、安定期の約 80%の回転数を示した D9、および、安定期である D20~23 の 3 つのタイミングで c-Fos 陽性細胞数を計測した。その結果、RW に接触したことのないコントロール群に比較して、Pl-mPFC と Il-mPFC の c-Fos 陽性細胞数は D1 で有意に増加したが、D9 と D20~23 では変化は認められなかった。NAc-C の c-Fos 陽性細胞数は D9 と D20~23 で有意に増加した。NAc-S と DM-Str ではいずれのタイミングでも c-Fos 陽性細胞数は増加したが、DL-Str ではいずれのタイミングでも変化は認められなかった。

以上より、Pl-mPFC と Il-mPFC は RW に対するモチベーションの形成初期に、NAc-C は形成中期と安定期に、さらに、NAc-S と DM-Str はいずれのタイミングにも関与することが明らかになった。したがって、各脳部位は異なるタイミングで行動に対するモチベーションの形成・維持に関与することが示唆された。

1-般-24

嗅周皮質における Piccolo 発現抑制による認知機能障害

○^{おけたにゆうき}桶谷祐貴¹、^{はまたにこうへい}濱谷康平¹、^{みやもとよしあき}宮本嘉明¹、^{むらまつしんいち}村松慎一^{2,3}、^{にったあつみ}新田淳美¹ (富山大院薬¹、自治医大²、東京大医研³)

【目的】統合失調症は罹患率が約 1%とされる重篤な精神疾患の 1 つである。しかし、発症メカニズム及び治療法確立には至っていないのが現状である。統合失調症関連遺伝子として PCLO が見出されている。PCLO はプレシナプスタンパク質 Piccolo を翻訳する遺伝子である。Piccolo は分子量約 530KDa の巨大なマルチドメインタンパク質であり、他のプレシナプスタンパク質と複雑な相互作用を持ち、神経伝達物質放出メカニズムを制御している。我々はマウスの前頭前皮質におけるプレシナプスタンパク質 Piccolo 発現抑制が統合失調症の 3 大症状である陽性症状及び認知機能障害を誘発することを報告している。さらに、本マウスに軽微なストレスを曝露することにより、統合失調症様の陰性症状を誘発することも見出している。そこで、前頭前皮質と相互作用を持つ嗅周皮質に着目し、その領域における Piccolo 発現抑制マウスを作製し行動学的、電気生理学的及び光遺伝学的手法を用いて検討した。

【方法】8 週齢雄性マウスの嗅周皮質に Mock 及び miPiccoloAAV ベクターを局所注入し Mock マウス及び miPiccolo マウスをそれぞれ作製し、4 週間後から行動実験を開始した。行動実験終了後、脳をサンプルとして取り出し、ウェスタンブロッティング法、組織免疫染色及び電気生理学的実験を行った。また、8 週齢雄性マウスの嗅周皮質に Mock 及び miPiccoloAAV ベクターと ChIEF を混合したベクターを局所注入し Mock-ChIEF 及び miPiccolo-ChIEF マウスを作製し、4 週間後からカニューレを挿入し光刺激を与えながら行動実験を行った。

【結果・考察】miPiccolo マウスにおいて短期作業記憶、物体認知記憶及び空間記憶の障害が観察された。しかし、統合失調症様の陽性症状及び陰性症状に相当する行動変化は観察されなかった。AAV ベクター注入部位において、シナプス異常が引き起こされていることが PSD95 及びシナプトフィジンの発現減少から証明された。さらに、嗅周皮質一腹側海馬経路を特異的に活性化すると、Piccolo の発現抑制により誘発された統合失調症様の認知機能障害が回復された。嗅周皮質からの投射先である腹側海馬領域において電気生理学的解析を行った結果、miPiccolo マウスにおいて LTP の低下が観察された。これらの結果から、前頭前皮質からの投射先である嗅周皮質での Piccolo 発現抑制は認知機能障害を引き起こしたが、前頭前皮質における Piccolo の発現抑制した際に誘発された統合失調症様のその他の症状に類似の変化は観察されなかった。以上の研究成果から、嗅周皮質の Piccolo が統合失調症のうち認知機能障害発症メカニズムにおいて中心的な役割を担っていることが示された。

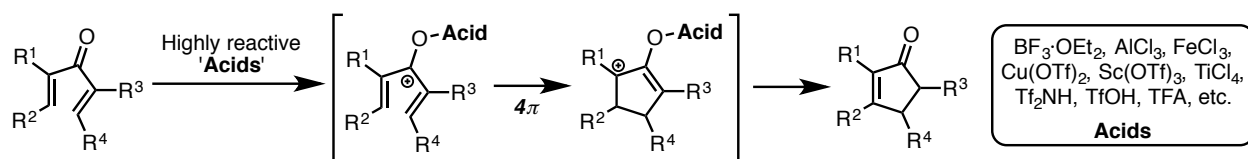
一般講演（領域2）

2-般-1

安全安価なホウ酸を活性化剤として利用するナザロフ環化反応の開発

○^{すぎもとけんじ}杉本健士、^{おおしろみゆ}大城美祐、^{はだりゆうへい}羽田竜平、^{まつやゆうじ}松谷裕二（富山大院薬）

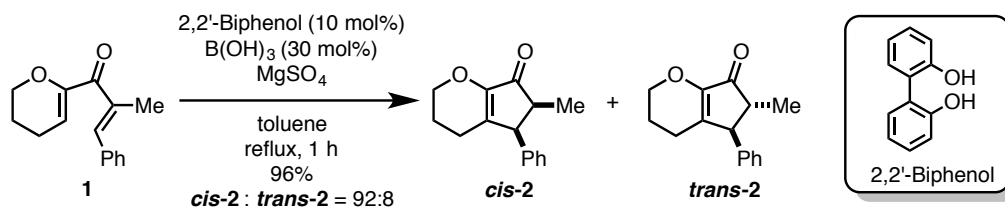
【背景・目的】ナザロフ環化反応は、ジビニルケトンのカルボニル基の活性化を引き金として生じるジビニルカチオンの4 π -電子環状反応によって、シクロペンテノン¹を構築する有用な方法として知られ、不斉反応の開発まで精力的に展開されている¹。しかし、本反応の起点となるカルボニル基の活性化には、高活性な反面、空気中での取り扱いに注意が必要な Brønsted 酸や Lewis 酸を使用する過酷な条件が要求され、その用途が限定されてきた。



そのため、近年では、より温和で取り扱い容易な活性化剤によるナザロフ環化反応の開発が進められている。例えば、Tius²らは、化学量論量のアミンによるイミニウム形成を経る方法²を発展させ、酸塩基複合触媒によるジビニルケトンの多点活性化を経る方法³を報告している。また、Matlin⁴らは、ヒドロキシルアミン触媒によるオキシム形成によるジビニルケトンの活性化が可能であることを報告している⁴。しかし、いずれの方法も、金属フリーの優れた触媒系を開拓しているものの、触媒活性の点で課題が残されていた。

我々は、独自の手法でのナザロフ環化反応の開発を目指し、温和かつ取り扱い容易な活性化剤によるカルボニル基の活性化を探索することとした。

【方法・結果】ジビニルケトン¹を原料として様々なカルボニル基活性化剤を探索したところ、非常に安価なホウ酸(pKa 9.2)と市販の2,2'-ビフェノール(pKa₁ 7.6)の共存下にてナザロフ環化反応が促進されることを見出した。さらに検討を進めた結果、ホウ酸 30 mol%と2,2'-ビフェノール 10 mol%をMgSO₄存在下トルエン中にて加熱還流することで最も良好な結果を与え、**2**を高いcis選択性にて与えることを見出した⁵。本支部例会では本反応の詳細について発表・議論する。



【参考文献】

- (a) Shimada, N.; Stewart, C.; Tius, M. A. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5851–5870. (b) Wenz, D. R.; Read de Alaniz, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 23–37.
- Bow, W. F.; Basak, A. K.; Jolit, A.; Vivic, D. A.; Tius, M. A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 440–443.
- Basak, A. K.; Shimada, N.; Bow, W. F.; Vivic, D. A.; Tius, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8266–8267.
- Hamilton, J. Z.; Kadunce, N. T.; McDonald, M. D.; Rios, L.; Matlin, A. R. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6622–6624.
- Sugimoto, K.; Oshiro, M.; Hada, R.; Matsuya, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *67*, 1019–1022.

2-般-2

円偏光発光を放射する[8]および[7]ロタキサン型蛍光色素の効率的合成法の確立

○大石雄基、宮岡佑太、林滉一朗、菅原颯馬、西沖航平、井上将彦（富山大院薬）

【目的】円偏光発光（CPL）とは、発光分子が放射する光の左円偏光あるいは右円偏光発光成分のどちらかが、もう一方よりも強くなる発光現象のことである。CPLを示す物質はその発光特性から、発光現象自体に対する学術的興味を持たれるだけでなく、新奇なバイオプローブなどの次世代材料への応用が期待されている。

当研究室では最近、アルキニル基を導入したピレンやペリレンが γ -シクロデキストリン (γ -CD) によって封止されたロタキサン型蛍光色素を開発した (Figure 1) ¹⁾。これらのロタキサンは γ -CD の不斉に起因する CPL を放射し、その異方性の尺度を表す g 値は、これまでに報告されている有機蛍光分子の中でも極めて高いものであった。しかし、その合成におけるロタキサン化収率は非常に低く (3~5%)，応用に供するにはさらなる改善が必要とされた。そこで本研究では、Stoddart らが最近報告した高収率なロタキサン合成法 “テンプレート制御クリック法” を利用し、収率の向上を目指すこととした。

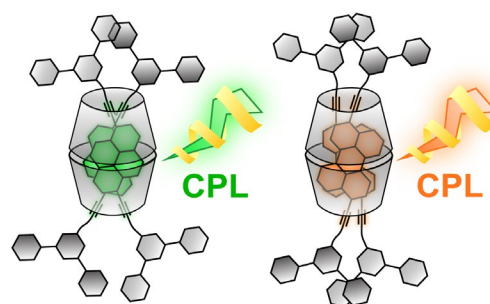
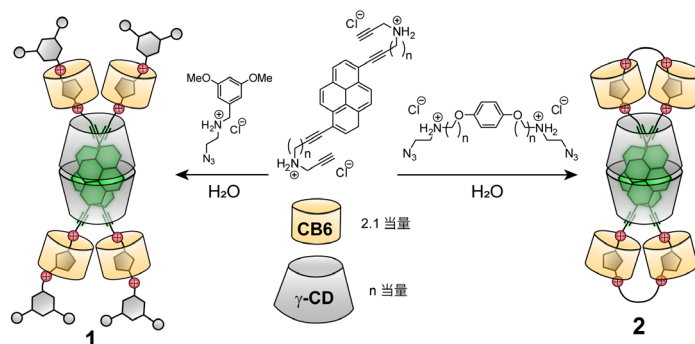


Figure 1. 従来のロタキサン型 CPL 色素

【方法】テンプレート制御クリック法では、CD と cucurbit[6]uril (CB6) および軸成分のアンモニウムカチオンが互いに相互作用し合うことで、自発的にロタキサンが形成される。これを参考に、[8]ロタキサン型 CPL 色素 **1** と [7]ロタキサン型 CPL 色素 **2** を新たに設計した (Scheme 1)。反応温度や γ -CD の当量、スペーサーの長さなどの検討により、収率の向上を図った。



Scheme 1. 新型ロタキサンの合成法

【結果・考察】[8]ロタキサン **1** は、5 °C，シクロデキストリン 1 当量， $n = 6$ のスペーサーの際に最も高い収率でロタキサンを合成することができた (HPLC 収率 85%)。合成した **1** の蛍光スペクトルを測定したところエキシマー発光のみを示し、2 成分のアルキニルピレンが γ -CD 内に抱接されていることが確認された。CPL 測定では、エキシマー発光領域に負の CPL バンドが観測され、その g 値は従来のロタキサン型蛍光色素同様に高い値であった。本発表では、[7]ロタキサン **2** の条件検討の結果についても併せて報告する。

1) Inouye, M. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14392; *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 14613.

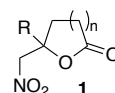
2) Stoddart, J. F. et al. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3766.

2-般-3

ニトロラクトン化反応の開発

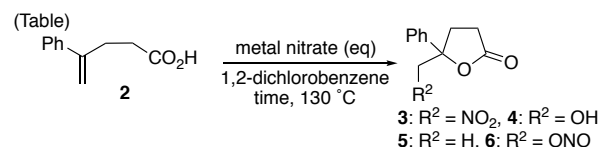
○梅田有紀¹、吉村智之¹ (金沢大院薬¹)

【目的】窒素及び酸素官能基へ変換可能なニトロ基は、合成化学的に大変重要な官能基である。このことから、ニトロ基の導入法が多く報告されている。その中で、オレフィンのニトロ化を伴う環化反応が数例報告されている¹ものの、ニトロラクトン化反応は報告されていない。ニトロラクトン **1** は生理活性天然物にみられる 1,2-アミノアルコール保護体であるとともに、非天然型アミノ酸誘導体の合成に活用できるなど有用な合成素子となり得る。そこで、新規ニトロラクトン化反応の開発を目指し研究に着手した。



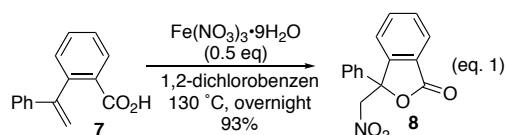
【方法】金属硝酸塩は、加熱によりニトロラジカルを発生することが報告されている。そこで、種々の金属硝酸塩から加熱により発生させたニトロラジカルのアルケンルカルボン酸 **2** に対する付加と、続く分子内環化でラクトン **3** の合成が可能と考え条件検討した。

【結果・考察】カルボン酸 **2** に硝酸鉄を 1,2-ジクロロベンゼン中 130 °C で反応させたところ、所望のニトロラクトン **3** が 58% 収率で得られた (Table, entry 1)。また、副生成物としてヒドロキシラクトン **4** とラクトン **5** がそれぞれ 13%, 5% 得られた。ヒドロキシラクトン **4** は、ニトロラジカルが酸素上で反応が進行して生成する亜硝酸エステル **6** を経由して得られたと考えている。一方、ラクトン **5** は系中に生じた硝酸によるプロトン化で生成していると考えられる。収率の向上を目指し、硝酸銅、硝酸銀、硝酸亜鉛、硝酸ナトリウムを用いて反応を行った (entries 2-5)。しかし、いずれの金属硝酸塩でもニトロラクトン **3** は低収率 (entries 2-4) か、全く得られなかった (entry 5)。プロトン化によるラクトン **5** の生成抑制によるニトロラクトン **3** の収率向上を期待し、炭酸水素カリウムを塩基として用いて反応を行った (entry 6)。しかし **3** の収率向上には至らなかった。そこで、ラジカル中間体をより安定化するカルボン酸 **7** を用いて反応を行った。その結果、所望の環化体 **8** が 93% の高収率で得られた (eq. 1)。



entry	metal nitrate (eq)	time (hr)	yield (%)		
			3	4	5
1	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O (0.5)	1.5	58	13	5
2	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O (0.75)	5	36	12	4
3	AgNO ₃ (1.5)	3	3	4	-
4	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (0.75)	3	8	8	30
5	NaNO ₃ (1.5)	4	0	0	0
6 ^a	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O (0.5)	1.5	54	<10 ^b	13

a: 0.3 equiv. of KHCO₃ was added. b: A small amount of 4-phenyl-4-oxobutanoic acid was contained.



References: 1) Taniguchi, T. *et al. Chem. Commun.* **2013**, 49, 2198; Ishibashi, H. *et al. Org. Lett.* **2010**, 12, 124.

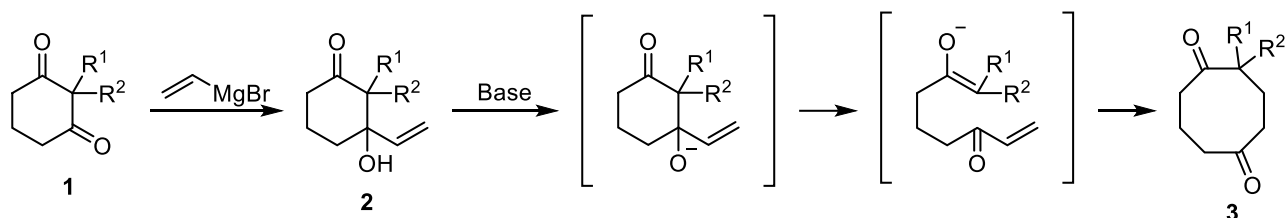
2-般-4

環状 1,3-ジケトンから環状 1,5-ジケトンへの環拡大反応

○^{かなやしゅんべい}金谷 峻平、^{よしむらともゆき}吉村智之、^{まつおじゅんいち}松尾 淳一（金沢大医薬保）

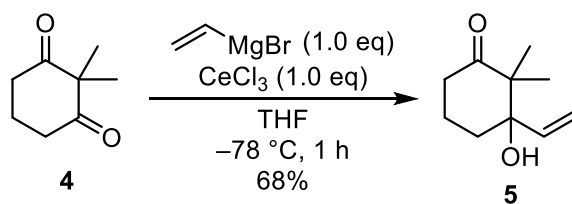
【背景・目的】

有用な薬理活性物質の中には、中員環構造を含むものが数多く存在することから、中員環合成反応の開発は合成化学的に重要である。しかし、容易に入手可能な 5~6 員環化合物から中員環化合物への環拡大反応は、環歪みの増大により熱力学的に困難である。今回我々は、環状 1,3-ジケトン **1** のモノビニル化によって生じた 3-ヒドロキシ-3-ビニルシクロアルカノン **2** に塩基触媒を反応させることによって、retro-aldol 反応と Michael 付加反応が連続的に進行し、環状 1,5-ジケトン **3** へと環拡大し、中員環が生成するのではないかと考えた。

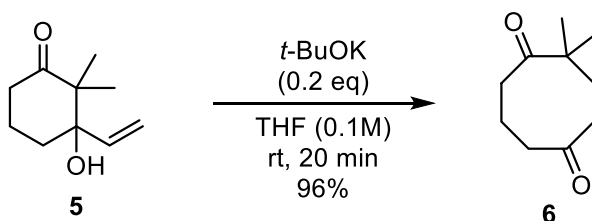


【方法・結果】

種々の検討の結果、CeCl₃ 存在下、シクロヘキサ-1,3-ジオン(**4**)の THF 溶液に対してビニルマグネシウムブロミドを加えて、-78 °C で 1 時間反応させたところ、3-ヒドロキシ-3-ビニルシクロヘキサノン **5** が 68% の収率にて得られた。



THF 溶液中、3-ヒドロキシ-3-ビニルシクロヘキサノン **5** に対して触媒量の *t*-BuOK を加えて、室温で 20 分間反応させた。その結果、環拡大反応が進行し、8 員環生成物 **6** が 96% の収率にて得られた。この際、開環中間体は確認されなかった。塩基の種類と 2 位の置換基が反応に及ぼす影響についても検討を行った。



2-般-5

基本転写因子 TFIIE と二本鎖 DNA の相互作用解析

くぼた あ み おびた たかゆき おおくまよしあき みずぐちみねゆき
○窪田亜未、帯田孝之、大熊芳明、水口峰之（富山大院薬）

【目的】

真核生物の遺伝子は核内で主に RNA ポリメラーゼ II (PolII)によって転写され、複数の基本転写因子 (TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIE, TFIIH)が転写の制御を行っている。転写開始は、転写開始前複合体 (PIC)の組み立てとプロモーターDNA の開裂から始まる。TFIIE は TFIIF とともにこの転写開始段階及び、転写伸長への移行段階において機能する。近年、クライオ電子顕微鏡を用いた研究から、二本鎖 DNA と結合した TFIIE α/β 複合体を含むヒト PIC の構造が明らかとなった。そのモデルでは、TFIIE α の Winged helix (WH)ドメインは PolII クランプドメインと二本鎖 DNA の両方に近接した位置に存在し、TFIIE β の 2 つの WH ドメインはどちらも DNA に近接した位置に存在していた。また、酵母オルソログとして Tfa1/Tfa2 からなる酵母 TFIIE 複合体が存在する。本研究では、ヒト及び酵母の TFIIE と二本鎖 DNA の相互作用を解析することで、相互作用に重要なアミノ酸の同定を目的とした。

【方法】

ヒト TFIIE α/β 複合体を大腸菌を用いて共発現させ、共精製した。ゲルシフトアッセイ (EMSA)により、二本鎖 DNA との相互作用解析を行った。二本鎖 DNA は長さ、配列、GC contents、由来の異なるものを用いた。また、二本鎖 DNA との相互作用に重要と考えられるアミノ酸について、アミノ酸置換点変異体を作成し、変異導入による結合強度の変化を調べた。次に、ヒト TFIIE の場合と同様の変異を導入した酵母 TFIIE 変異体を作成し、EMSA を用いて結合強度の変化を調べた。

【結果・考察】

ヒト TFIIE α/β 複合体と二本鎖 DNA の結合において、①二本鎖 DNA の長さが 21bp 未満では長いほど結合力が強くなり、21bp 以上で十分な結合力を示し、②二本鎖 DNA の配列特異性や GC contents 特異性はなく、③二本鎖 DNA の由来の違いによる結合強度の差異はない、ということが分かった。また、 α サブユニット変異体と比較して β サブユニット変異体は、変異によって二本鎖 DNA との結合強度が著しく低下した。よって、ヒト TFIIE と二本鎖 DNA の相互作用には β サブユニットが重要であることが分かった。酵母 TFIIE 変異体においても、ヒト TFIIE 変異体ほど顕著ではないが、Tfa1 変異体と比較して Tfa2 変異体は、変異によって二本鎖 DNA との結合強度が低下した。これらのことから、ヒト TFIIE β 及び酵母 Tfa2 の WH ドメイン中の正電荷アミノ酸が二本鎖 DNA との相互作用に重要であると考えられた。また、それらのアミノ酸はヒトから酵母まで保存されていることから、TFIIE β /Tfa2 の機能に重要であることが示唆された。

2-般-6

加熱式たばこ煙中多環芳香族炭化水素キノン類の定量と酸化能への寄与

○山崎陸¹, 川井萌¹, 唐寧^{1,2}, 早川和一², 鈴木亮¹, 鳥羽陽¹

(金沢大院医薬保¹, 金沢大・環日本海域環境研究セ²)

【背景・目的】たばこ煙中の発がん物質として多環芳香族炭化水素 (PAH) が広く知られているが, その酸化誘導体である PAH キノン類 (PAHQ) は, 生体内のレドックスサイクルを介して活性酸素種 (ROS) を生成し, 酸化ストレスを誘発することから, 呼吸器疾患や循環器疾患との関連が指摘されている. 演者らは, 紙巻たばこの主流煙と副流煙中に ROS 産生能の高いオルト体を含む PAHQ を同定・定量し, またヒト尿中に PAHQ の代謝物が排泄されていることを発見した^{1,2}. 従って, PAH の発がん性だけでなく, 喫煙に関連した PAHQ 曝露によって誘発される酸化ストレスによる健康影響も重要と考えられる. 現在国内において加熱式たばこが急速に普及し, 各加熱式たばこから発生する有害物質は紙巻たばこと比較して低下したと公表されているが, 限られた物質についてしか報告はなく, 健康影響も未だ不明な点が多い. そこで, 本研究では加熱式たばこの主流煙に含まれる PAHQ を定量すると同時に抽出物の酸化能 (ROS 産生能) を測定し, 紙巻たばこの比較や酸化能に対する PAHQ の寄与評価を行うことを目的とした.

【方法】自動喫煙装置を用い, 3 種類の加熱式タバコ (IQOS, glo, plloomTECH) の主流煙を国際標準化機構 (ISO) の方法を参考にしてガラス繊維フィルターに捕集し, ジクロロメタンで超音波抽出した. また, 比較対象として紙巻たばこ (Kentucky Reference cigarette, 3R4F) を同様に捕集・抽出して試料とした. PAHQ (39 種) の測定はフィルター抽出液を減圧濃縮した後, トルエン/5% 塩酸-飽和食塩水で液-液抽出し, 有機層をアセトニトリルに転溶して亜鉛還元-トリメチルシリル (TMS) 誘導体化を行い, GC-MS/MS で測定した³. ROS 産生能は, dithiothreitol (DTT) の消費速度 ($\mu\text{M}/\text{min}$) を測定する DTT アッセイにより算出した. リン酸緩衝液中で DTT と PAHQ または試料, 及び DTT と溶媒 (ブランク) を 37°C に加温しながら振盪させ, 0, 5, 10, 15 分後に反応液を採取してトリクロロ酢酸により反応を停止させた. 未反応の DTT を十分量の 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) と反応させ, 生成物: 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) の 412 nm における吸光度を測定して TNB を定量し, DTT 量に換算した.

【結果・考察】3 種の加熱式たばこの主流煙から主として 1~3 環の PAHQ が検出され, 5 環の PAHQ は検出されなかった. IQOS 及び glo から 13 種の PAHQ を, plloomTECH から IQOS と glo で検出された 11 種に加えて 5 種 (計 16 種) の PAHQ を定量できた. 加熱式たばこ煙中の PAHQ は, 紙巻たばこの各 PAHQ 濃度の約 20% 以下であり, 総濃度では 0.071~3.3% まで減少していた. これは加熱温度が燃焼温度に比べて低いことに起因すると考えられた. ROS 産生能を紙巻たばこと比較すると, IQOS で 31.9%, glo で 32.8%, plloomTECH で 3.7% まで減少していた. また, 紙巻たばこ煙中 PAHQ の ROS 産生への寄与は 29.6% であったが, 加熱式たばこ煙においては 1% 程度とほとんど寄与を示さなかった. PAHQ のうち, o-PAHQ が主な ROS 産生種であり, 紙巻たばこ煙で寄与度の高い 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) や 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) が, 加熱式たばこ煙では濃度が低い, もしくは含まれていないことが ROS 産生への寄与が低い原因と考えられた.

【文献】

¹⁾ 日本薬学会第 135 年会 (2015), 日本薬学会第 134 年会 (2014), 他, ²⁾ Asahi, M., et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **27**(1), 76-85 (2014), ³⁾ Toriba, A., et al., *J. Chromatogr. A*, **1459**, 89-100 (2016)