

第 38 回 薬物活性シンポジウム 第 20 回 日本循環薬理学会

－ 循環機能制御の多様性と創薬 －

口演要旨集

会期：2010 年 11 月 11 日(木)～2010 年 11 月 12 日(金)

会場：札幌市教育文化会館(札幌市中央区北 1 条西 13 丁目)

第 38 回 薬物活性シンポジウム 会長

第 20 回 日本循環薬理学会 当番幹事

三輪 聡一

(北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野・教授)

主催：社団法人日本薬理学会・社団法人日本薬学会・日本循環薬理学会

組織委員(五十音順)：

井関 健(北海道大学大学院 薬学研究院 臨床薬剤学分野・教授)

筒井裕之(北海道大学大学院 医学研究科 循環病態内科学分野・教授)

寶金清博(北海道大学大学院 医学研究科 脳神経外科学分野・教授)

南 雅文(北海道大学大学院 薬学研究院 薬理学分野・教授)

吉岡充弘(北海道大学大学院 医学研究科 神経薬理学分野・教授)

第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会 事務局：

〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目

北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野

TEL: 011-706-6921、FAX: 011-706-7824

E-mail: sympo.njy2010@gmail.com

URL: <http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/njy2010.html>

担当：西屋禎、堀之内孝広、西本新、西山朋美

薬物活性シンポジウム開催記録

回	開催年	開催地	会 長	所 属	主 催	メインテーマ
1	昭和 47	徳 島	石田 行雄	徳島大・薬	日本薬学会	
2	昭和 48	名古屋	福田 英臣	名古屋市大・薬	〃	
3	昭和 49	岐 阜	藤村 一	岐阜大・医	〃	
4	昭和 50	長 崎	金戸 洋	長崎大・薬	〃	
5	昭和 51	広 島	瀬川 富朗	広島大・医	〃	
6	昭和 52	金 沢	五味 保男	金沢大・薬	〃	
7	昭和 53	東 京	柳浦 才三	星薬大	〃	
8	昭和 54	熊 本	加瀬 佳年	熊本大・薬	日本薬学会・ 日本薬理学会	
9	昭和 55	大 阪	岩田平太郎	大阪大・薬	〃	
10	昭和 56	前 橋	田所作太郎	群馬大・医	〃	
11	昭和 57	仙 台	鶴藤 丞	東北大・薬	〃	
12	昭和 58	福 岡	古川 達雄	福岡大・医	〃	
13	昭和 59	京 都	富田 謙吉	京都大・薬	〃	
14	昭和 60	名古屋	亀山 勉	名城大・薬	〃	
15	昭和 61	鳥 取	君島健次郎	鳥取大・薬	〃	
16	昭和 63	富 山	木村 正康	富山医薬大・薬	〃	
17	平成元	船 橋	高柳 一成	東邦大・薬	〃	薬物受容体と医薬品
18	平成 2	旭 川	安孫子 保	旭川医大	〃	薬物作用のメカニズム
19	平成 3	京 都	大幡 勝也	京都薬大	〃	生体内活性物質と医薬品
20	平成 4	鹿児島	福田 健夫	鹿児島大・医	〃	薬物と受容体
21	平成 5	横 浜	三須 良寛	横浜市大・医	〃	レセプターと病態モデル
22	平成 6	札 幌	野村 靖幸	北海道大・薬	〃	薬物標的分子と創薬
23	平成 7	山 形	遠藤 政夫	山形大・医	〃	シグナルトランスダクションから創薬へ
24	平成 8	京 都	佐藤 公道	京都大・薬	〃	分子特異性と創薬
25	平成 9	東 京	唐木 英明	東京大・農	〃	天然物の薬理活性
26	平成 10	福 岡	神谷 大雄	福岡大・薬	〃	生体維持へのシグナル系から創薬へ
27	平成 11	福 井	村松 郁延	福井医大	〃	新しい薬・新しい標的分子
28	平成 12	山 梨	橋本敬太郎	山梨医大	〃	21 世紀の薬理学の領域を探る
29	平成 13	仙 台	大泉 康	東北大・薬	〃	成人病とゲノムの解明から創薬へ
30	平成 14	福 岡	桂木 猛	福岡大・医	〃	細胞メカニズムの解明から創薬へ
31	平成 15	東 京	内田 幸宏	明治薬大	〃	薬物感受性の発現制御と創薬
32	平成 16	大 阪	馬場 明道	大阪大院・薬	〃	生活習慣病の克服への創薬アプローチ
33	平成 17	新 潟	長友 孝文	新潟薬大・薬	〃	分子標的治療薬の開発とその戦略
34	平成 18	前 橋	小濱 一弘	群馬大院・医	〃	薬物活性とその制御
35	平成 19	広 島	土肥 敏博	広島大院・ 医歯薬学	〃	口是疾禍之門
36	平成 20	徳 島	福井 裕行	徳島大院・ ヘルスバイオサイエンス	〃	
37	平成 21	仙 台	谷内 一彦	東北大院・医	〃	産学連携と社会貢献を目指して
38	平成 22	札 幌	三輪 聡一	北海道大院・医	〃	循環機能制御の多様性と創薬
39	平成 23	福 岡	藤原 道弘	福岡大・薬	〃	(予定)

第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会の開催にあたって

第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会をお世話させて頂くにあたり、一言ご挨拶申し上げます。

薬物活性シンポジウムは、1972 年に日本薬学会の主催で第 1 回大会が開催され、1979 年の第 8 回大会からは日本薬学会と日本薬理学会の共催として、毎年 1 回開催されてまいりました。学術集会を重ねて、今年で 38 回に至ります。本シンポジウムの特徴は、毎回メインテーマを決め、大学、企業、研究所などの第一線で活躍している研究者が一堂に会し、2 日間にわたって、自由な雰囲気下で有意義な討議を行う点にあります。

一方、日本循環薬理学会は、1991 年に設立された循環薬理研究会が発展し、1999 年に学会となりました。毎年 1 回、定期的に開催され、今年で 20 回目の開催を迎えます。本学会は、我が国における循環薬理学の学術交流の場として、重要な役割を果たしてきてだけでなく、若手研究者の口頭発表を対象にした「Young Investigator's Award」の贈呈を行うなど、医学・歯学・薬学・獣医学・農学・医工学系などの学生や若手研究者にとって、研鑽を積む貴重な機会を提供してまいりました。

さて、超高齢化社会を迎えた現代において、循環器疾患や痴呆症などの成人病の克服が急務となっています。近年、ゲノムサイエンスの発展によって、様々な新規生体分子が同定され、さらに、その多彩な機能も解明されつつあります。そこで、今年度は「循環機能制御の多様性と創薬」をテーマに定め、循環器の機能制御の解明や創薬・治療に資する基礎研究及び臨床研究の最先端の話題を第一線で活躍している多くの先生に提供して頂くことにしました。さらに、循環器だけではなく、成人病と密接に関りあう中枢神経系・免疫系・消化器系をはじめとする幅広い分野の最新の知見もご紹介して頂きます。

今回は、第 38 回薬物活性シンポジウムと第 20 回日本循環薬理学会を同時に開催するため、様々な分野の研究者と知り合いになることが出来る絶好の機会です。実験の方法論や研究上の疑問点、研究者としての資質や生き方について、有意義な示唆を多く得ることも出来ると思います。本学会が、最先端の研究成果に触れる場としてだけでなく、この様な研究者の交流の場としても、先生方のお役に立てることを期待しています。

初日の学会後は、札幌の観光名所の一つであるサッポロビール園で懇親会を開催します。学会でサイエンスを満喫した後は、懇親会で是非、北海道の味覚を満喫していただければ幸いです。

末筆になりますが、本学会を有意義なものとするため、多数の先生方のご参加と活発なご討論をお願い申し上げます。

第 38 回 薬物活性シンポジウム 会長

第 20 回 日本循環薬理学会 当番幹事

三輪聡一

(北海道大学大学院 医学研究科 細胞薬理学分野)

学会会場・懇親会会場のアクセスマップ



学会会場：札幌市教育文化会館

〒060-0001

札幌市中央区北1条西13丁目

TEL：011-271-5821

FAX：011-271-1916

**新千歳空港から JR 札幌駅まで、
快速エアポート利用でおよそ 36 分。**

● JR 札幌駅からお越しの場合

地下鉄南北線さっぽろ駅より乗車、
大通駅にて東西線に乗り換え、
西 11 丁目駅下車、
1 番出口から徒歩 5 分

● 地下鉄でお越しの場合

東西線西 11 丁目駅下車、
1 番出口から徒歩 5 分

● 市電でお越しの場合

西 15 丁目前から徒歩 10 分

● JR バス・中央バスでお越しの場合

「北 1 条西 12 丁目」から徒歩 1 分

懇親会会場：

サッポロビール園スターホール

〒065-0007

札幌市東区北 7 条東 9 丁目 2-10

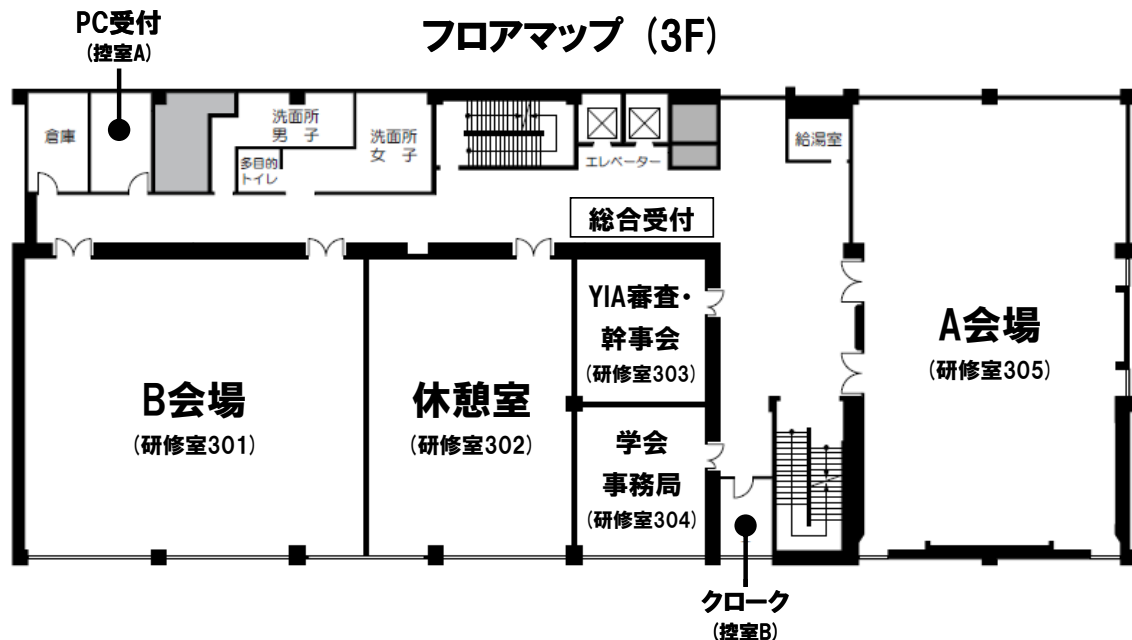
電話 0120-150-550 (サッポロビール園
総合予約センター)

**初日の全てのプログラム終了後、
学会会場から懇親会会場までの
無料送迎バスをご用意致します。
是非、ご利用下さい。**

(左図は路線バスによるアクセスのご案内です)

会場案内図

学会会場は、札幌市教育文化会館 3 階です。



A 会場：研修室 305

B 会場：研修室 301

休憩室：研修室 302

クローク：控室 B

PC 受付：控室 A

YIA 審査・幹事会：研修室 303

学会事務局：研修室 304

- 館内は、全て禁煙となっております。館外(正面、東口)に設置されているスモーキングスタンドをご利用下さい。皆様のご理解とご協力をお願いいたします。
- 休憩室(研修室 302)を設けています。ドリンクをご用意しておりますので、ご利用下さい。
- クローク(控室 B)を設けています。なお、貴重品・壊れ物・傘は、お預かり出来ませんので、予めご了承下さい。その他、1 階ロビー・4 階・地下に設置されている無料コインロッカーもご利用いただけます。

お知らせとお願い

● 参加される方へ

1. 受付場所 札幌市教育文化会館 3F 総合受付（エレベーター前）
会場には午前9時からご入場いただけます。
2. 受付時間 11月11日(木) 9:00～17:30
11月12日(金) 9:00～14:00
※事前登録をされている方は受付の必要はありません。会場では必ず参加証をご着用下さい。なお、参加証の再発行はできませんのでご注意下さい。紛失・お忘れの場合は当日登録が必要となります。
3. 当日参加費 会 員 5,000 円
非会員 6,000 円
学 生 無料 ※当日受付で学生証を提示して下さい。
4. 懇親会 11月11日(木) 18:30～20:30
サッポロビール園スターホール
※初日の全てのプログラム終了後、学会会場から懇親会会場までの無料送迎バスを運行いたしますのでご利用下さい。また、懇親会に出席される方は、懇親会参加証をつけて下さい。当日、懇親会に参加される方は、総合受付にてお申し込み下さい。懇親会参加費(当日)は、次の通りです。
会 員 6,000 円
非会員 6,000 円
学 生 4,000 円
5. 休憩 研修室 302 に休憩室を設けています。休憩室には飲み物をご用意していますので、ご利用下さい。また、喫煙される方は、館外(正面、東口)に設置されているスモーキングスタンドをご利用下さい。皆様のご理解とご協力をお願い致します。
6. お食事 会場内及び周辺のレストランをご利用下さい。
7. 駐車場 会場には駐車場のご用意がございません。お近くの民間駐車場(有料)をご利用下さい。
8. クローク 11月11日(木) 9:00～17:30
11月12日(金) 9:00～16:00
※貴重品・壊れ物・傘は、お預かり出来ませんので、予めご了承下さい。
この他、1階ロビー・4階・地下に設置されている無料コインロッカーもご利用いただけます。
9. 会場撮影 会場内でのカメラ、ビデオカメラ、カメラ付携帯電話、その他の機器による撮影や録音は固くお断りします。なお、開催記録のため、スタッフが会場内の様子を撮影する場合がございますので、ご了承下さい。

● 発表される方へ

1. PC と液晶プロジェクターを用いた発表に限らせていただきます。各自、ノートパソコンをご用意下さい。
2. Microsoft Windows または Apple MacOS が動作し、外部モニター出力端子(ミニ D-sub 15 ピン対応)を備えた PC を使用してください。一部のノートパソコンでは本体付属のコネクターが必要な場合がありますので、その場合は必ずお持ち下さい。
3. 発表予定時間の 60～30 分前までに「PC 受付」へお越し下さい。
4. PC 受付のプロジェクターにてケーブルの接続を確認して下さい。
5. 以下を忘れずにご持参下さい。
 - ① AC アダプター
 - ② 外部出力コネクター(ミニ D-sub 15 ピン以外の機種の場合)
6. 予め、スクリーンセーバー、省電力設定を解除して下さい。また、起動時にパスワード等を設定している場合は、解除しておいて下さい。
7. 試写後、ご発表予定時間の 30 分前位(発表中でもかまいません)に会場内の左手前方演台付近の PC デスクまでお越しの上、スタッフに起動した状態で PC をお渡し下さい。スタッフが、ケーブルを接続し、外部出力の確認を行います。
8. ご発表時には、PC を演台に移動いたします。ご発表データの 1 枚目をスライドショー状態でスクリーンに映写しますので、ご自身でデータの送り戻しの操作を行って下さい。
9. 発表終了後は速やかに PC デスクにお越し下さい(発表中でもかまいません)。お預かりしたパソコンをご返却いたします。



【データ作成時の注意点】

- ・ ノートパソコンからプロジェクターに正しく出力されるか確認して下さい。
- ・ 個々のパソコンや OS により設定方法が異なりますので、事前にご確認下さい。
- ・ デスクトップ上の分かりやすい場所に発表データを「演題番号 演者名」として保存して下さい(例：演題番号が Y-01 の場合、Y-01 北大太郎)。
- ・ 念のため、バックアップデータを必ずお持ち下さい。

【発表時間】

- ・ 日本循環薬理学会の YIA 候補者演題及び一般演題の発表時間は 9 分、質疑応答時間 3 分を厳守していただきます様、お願いいたします。
(発表開始後、7 分(1 回)、9 分(2 回)、12 分(3 回)でベルが鳴ります)
- ・ 薬物活性シンポジウムの発表時間は 20 分、質疑応答時間 5 分を厳守していただきます様、お願いいたします(一部の演題では、発表時間 17 分・質疑応答時間 3 分)。
(発表開始後、17 分(1 回)、20 分(2 回)、25 分(3 回)でベルが鳴ります)
- ・ 発表の 10 分前までには次演者席にお着き下さい。

● YIA 候補者の方へ

- ・ YIA 受賞者の発表及び授賞式は、学会初日の特別講演後、A 会場(研修室 305)で行います。YIA 候補者の方は全員ご参加下さい。

● YIA 審査員の方へ

- ・ セッション開始 15 分前には、総合受付へ到着の旨をお伝え下さい。審査用紙をお渡しいたします。
- ・ YIA 候補者演題の発表が全て終了いたしましたら、総合受付へ審査用紙をご提出下さい。

● 座長の方へ

- ・ 受付の必要はありません。セッション開始 15 分前には、会場右手前方の次座長席にお着き下さい。
- ・ 進行は全て座長の先生にお任せいたしますので、活発な討論が行われる様にご配慮下さい。発表時間及び討論時間は次の通りです。

日本循環薬理学会 : 口演発表 9 分・討論 3 分

薬物活性シンポジウム : 口演発表 20 分・討論 5 分(一部、口演発表 17 分・討論 3 分)

- ・ タイムキーパーが発表開始後の時間経過をベルでお知らせいたしますので、プログラムの時間を厳守いただきます様、お願いいたします。

日本循環薬理学会 : 発表開始後、7 分(1 回)、9 分(2 回)、12 分(3 回)

薬物活性シンポジウム : 発表開始後、17 分(1 回)、20 分(2 回)、25 分(3 回)

● 日本循環薬理学会幹事の方へ

- ・ 総合受付にお立ち寄りいただき、幹事会に関するご案内をお受け取り下さい。

プログラム・座長一覧（1 日目）

11 月 11 日 (木)	A 会場 (研修室 305)	B 会場 (研修室 301)
9:00	開場 受付開始	
9:15 (A 会場)	開会の辞 会長・当番幹事：三輪聡一	
9:25-10:40	第 20 回 日本循環薬理学会 一般演題発表(1) A-01～A-06 <small>座長：笹栗俊之（九大院・医・臨床薬理） 沢村達也（国立循環器病研究センター・血管生理）</small>	第 20 回 日本循環薬理学会 一般演題発表(2) A-07～A-11 <small>座長：西尾真友（金沢医大・医・薬理） 服部裕一（富山大・院・分子医科薬理）</small>
10:40-10:50	休 憩	
10:50-12:10	第 20 回 日本循環薬理学会 YIA 候補者演題発表(1) Y-01～Y-06 <small>座長：川崎博已（岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学） 谷村明彦（北海道医療大・歯・薬理）</small>	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(1) S-01～S-03 <small>座長：岡村富夫（滋賀医大・医・薬理） 大場雄介（北大院・医・病態医科）</small>
12:10-13:10	昼 食・日本循環薬理学会幹事会	
13:10-14:30	第 20 回 日本循環薬理学会 YIA 候補者演題発表(2) Y-07～Y-12 <small>座長：東城庸介（北海道医療大・歯・薬理） 平藤雅彦（北海道医療大・薬・薬理）</small>	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(2) S-04～S-06 <small>座長：谷口隆之（京都薬大・病態生理） 谷内一彦（東北大院・医・機能薬理）</small>
14:30-14:40	休 憩	
14:40-16:20	第 20 回 日本循環薬理学会 YIA 候補者演題発表(3) Y-13～Y-17 <small>座長：田中利男（三重大院・医・薬理ゲノミクス） 西山 成（香川大・医・薬理）</small>	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(3) S-07～S-10 <small>座長：伊藤茂男（北大院・獣医・薬理） 福永浩司（東北大院・薬・薬理）</small>
16:20-16:30	休 憩	
16:30-17:30 (A 会場)	第 20 回 日本循環薬理学会 特別講演 寶金清博 教授 座長：三輪聡一 <small>（北大院・医・細胞薬理）</small>	
17:30-17:50 (A 会場)	① YIA 優秀賞発表授賞式 ② 日本循環薬理学会 会長挨拶 会長：岡村富夫（滋賀医大・医・薬理） ③ 第 21 回日本循環薬理学会 当番幹事挨拶 川崎博已（岡山大院・医歯薬学総合・先端薬物療法開発学・臨床薬学） ④ 第 20 回日本循環薬理学会 閉会挨拶 当番幹事：三輪聡一	
17:50-18:30	サッポロビール園へ貸し切りバスで移動	
18:30-20:30	懇親会（サッポロビール園スターホール）	

プログラム・座長一覧（2 日目）

11 月 12 日 (金)	A 会場 (研修室 305)	B 会場 (研修室 301)
9:00	開場 受付開始	
9:10-10:50	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(4) S-11~S-14 座長：堀尾嘉幸（札幌医大・医・薬理） 柳澤輝行（東北大院・医・分子薬理）	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(5) S-15~S-18 座長：今泉祐治（名市大院・薬・細胞分子薬効解析） 谷口隆信（旭川医大・生化学・細胞制御科学）
10:50-11:00	休 憩	
11:00-12:00 (A 会場)	第 38 回薬物活性シンポジウム 特別講演 村松郁延 教授 座長：三輪聡一 （北大院・医・細胞薬理）	
12:00-13:00	昼 食	
13:00-15:20	第 38 回薬物活性シンポジウム シンポジウム(6) S-19~S-23 座長：牛首文隆（旭川医大・医・薬理） 西宗敦史（福井大・医・薬理）	第 38 回薬物活性シンポジウム 薬物活性シンポジウム(7) S-24~S-29 座長：倉石 泰（富山大院・医薬・応用薬理） 横谷邦彦（高知大・医・薬理）
15:20-15:30 (A 会場)	第 38 回 薬物活性シンポジウム 閉会挨拶 会長：三輪聡一	

プログラム・演題一覧 (1 日目)

A 会場(研修室 305)

B 会場(研修室 301)

9:15

開会の辞 (A 会場)
会長・当番幹事：三輪聡一

第 20 回 日本循環薬理学会

一般演題発表(1) A-01~A-06

座長：笹栗俊之 (九大院・医・臨床薬理)

沢村達也 (国立循環器病研究センター・血管生理)

9:25 拡張型心筋症モデルマウスにおける自発的運動の効果
A-01 果と電気的リモデリングへの関与
○杉原匡美^{1,2}, 鈴木剛^{1,2}, 小田切史徳^{1,2}, 中里祐二²,
代田浩之², 櫻井隆¹, 森本幸生³, 呉林なごみ¹
(順天堂大・医・¹薬理, ²循環器内科, ³九州大院・医・
臨床薬理)

9:37 S-Nitrosothiol による細胞間情報伝達系の制御
A-02 ○松本明郎, 立花知子, 小谷野友里, 遠藤愛実, 中
谷晴昭
(千葉大院・医・薬理)

9:49 ALDH2 の遺伝子多型がニトログリセリンの薬効に及
A-03 ぼす影響
○笹栗俊之¹, 坂田智子², 吉原達也¹, 白石富美恵¹,
松村潔²
(九大院・医・¹臨床薬理, ²病態機能内科)

10:01 プロシアニジンは酸化 LDL 受容体 LOX-1 のアンタゴニ
A-04 ストであり、ラット血管壁への脂質沈着を抑制する
西塚太一¹, 藤田佳子², 佐藤優子², 中野厚史², 垣
野明美², 大嶋俊二¹, 神田智正¹, ○善本亮², 沢村
達也²
(¹アサヒビール株式会社食の基盤技術研究所, ²国立
循環器病研究センター・血管生理)

10:13 虚血性疾患に対する炭酸ガスの血流および代謝機能
A-05 改善効果
○泉康雄, 山下直人, 田中昌子, 南野優子, 文沙
郎, 塩田正之, 中尾隆文, 岩尾洋
(大阪市大院・医・分子病態薬理)

10:25 プロスタグランジン E1 の血管新生促進作用における
A-06 NCX1 輸送体の役割について
松井雪子^{1,2}, 喜多紗斗美¹, ○伊豫田拓也¹, 小室一成³,
大慈弥裕之², 岩本隆宏¹
(福岡大・医・¹薬理, ²形成外科, ³阪大院・医・循環
器内科)

第 20 回 日本循環薬理学会

一般演題発表(2) A-07~A-11

座長：西尾真友 (金沢医大・医・薬理)

服部裕一 (富山大・院・分子医科薬理)

9:25 ラット門脈縦走筋標本に対する硫化水素の作用
A-07 ○木村真一, 野呂奈々江, 大橋敦子, 島村佳一
(北海道医療大・薬・薬理学・臨床薬理毒理)

9:37 アンジオテンシン II タイプ 1 受容体を介したアルド
A-08 ステロンの血管収縮反応: AT1 受容体 2 量体形成の可
能性
○山田雅大, 瀬谷和彦, 古川賢一, 元村成
(弘前大院・医・病態薬理)

9:49 TNF- α 誘導性 IRS-1 セリンリン酸化とインスリン抵
A-09 抗性
○柴田倫人, 佐藤久美, 加納誠一朗, 金田繁, 市原
和夫
(北海道薬大・薬・薬理)

10:01 GTN と ISDN の作用に対する ALDH2 阻害薬, cyanamide
A-10 の効果: 摘出血管と丸ごとの動物での差異
○石橋隆治^{1,2}, 中本美保子², 安倍房江², 劉鶴², 吉
田純子², 西尾真友²
(¹金沢医大・看護・薬理, ²金沢医大・医・薬理)

10:13 ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応における
A-11 BKCa チャネルの役割
○森麻美, 鈴木佐知, 坂本謙司, 中原努, 石井邦雄
(北里大・薬・分子薬理)

休憩 (10:40-10:50)

第 20 回 日本循環薬理学会

YIA 候補者演題発表(1) Y-01~Y-06

座長：川崎博巳（岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学）

谷村明彦（北海道医療大・歯・薬理）

10:50 巢状分節性糸球体硬化症の原因遺伝子となる TRPC6
Y-01 チャネル変異体の機能解析とアクチン骨格の関連
○市川純，井上隆司
（福岡大・医・生理）

11:02 SSRI による心筋保護作用とそのメカニズム
Y-02 ○田頭秀章，Bhuiyan Md Shenuarin，塩田倫史，福
永浩司
（東北大院・薬・薬理）

11:14 ゲノムワイド RNAi スクリーニングによる心機能調節
Y-03 因子 NOT3 の同定
○久場敬司¹，鈴木享¹，森田正行¹，Greg Neely²，Josef
Penninger²，福田恵一³，磯部光章⁴，木村樟芳⁵，今井由美子¹
（¹秋田大院・医・情報制御・実験治療，²IMBA-Institute
of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy
of Sciences，³慶應大・医・循環器内科，東医歯大・⁴
循環制御，⁵難治疾患研究所・分子病態）

11:26 心筋トロポニン T の定量的ノックダウンにおける心
Y-04 機能イメージング解析
○梅本紀子¹，西村有平^{1,2,3,4}，山中裕貴子¹，岸誠也¹，
伊藤早紀¹，岡森加奈¹，島田康人^{1,2,3,4}，黒柳淳哉¹，
張孜¹，田中利男^{1,2,3,4}（¹三重大院・医・薬理ゲノミ
クス，²三重大メディカルゼブラフィッシュ研究セン
ター，³三重大・バイオインフォマティクス，⁴三重大
大・メディカルケモゲノミクス）

11:38 抗不整脈薬による hERG チャネルの活性化ゲート機能
Y-05 制御
○古谷和春^{1,2}，山川祐子³，稲野辺厚^{1,2}，岩田美紀¹，
倉智嘉久^{1,2}
（¹阪大院・医・分子・細胞薬理，²阪大・臨床医工学
融合研究教育センター，³阪大院・医・数理保険）

11:50 ラット肺静脈心筋細胞のノルエピネフリン誘発自動能
Y-06 ○岡本洋介¹，鷹野誠²，大場貴喜¹，尾野恭一¹
（¹秋田大院・医・細胞生理，²自治医科大・生理）

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム(1) S-01~S-03

「レニン・アンジオテンシン系の最前線」

座長：岡村富夫（滋賀医大・医・薬理）

大場雄介（北大院・医・病態医科）

10:50 IgA 腎症患者で発症する食塩感受性高血圧と腎内レ
S-01 ニン・アンジオテンシン系
○西山成¹，小西啓夫²，今西政仁²
（¹香川大・医・薬理，²大阪市総合医療センター腎高
血圧内科）

11:15 心腎連関における交感神経と腎内 RAS の役割
S-02 ラフィー カジ¹，野間貴久²，人見浩文¹，中野大介¹，
○西山成¹
（¹香川大・医・薬理，²循環器内科）

11:40 受容体サブタイプ間相互作用による AngII シグナル
S-03 制御機構
○大場雄介，犬塚(鈴木)貴之，津田真寿美，川口秀明
（北大院・医・病態医科）

昼食・日本循環薬理学会幹事会（12:10-13:10）

第 20 回 日本循環薬理学会

YIA 候補者演題発表 (2) Y-07~Y-12

座長：東城庸介（北海道医療大・歯・薬理）

平藤雅彦（北海道医療大・薬・薬理）

13:10 神経-血管ガイダンス分子 Semaphorin を標的とした
Y-07 次世代の血管再生治療および代謝性疾患治療の開発
○森谷純治，南野徹
（千葉大院・医・循環病態医科学）

13:22 アルドステロンによる IGF-1 受容体とハイブリッド
Y-08 受容体を介したインスリン抵抗性と血管リモデリング
に与える影響
○人見浩史¹，藤田昌子²，Shamshad Sherajee¹，Kazi Rafiq¹，中野大介¹，清元秀泰²，河野雅和²，西山成¹
（香川大・医・¹薬理，²循環器腎臓脳卒中内科）

13:34 鉄キレート剤 deferoxamine は内皮細胞活性化により
Y-09 血管新生を促進する
○田島壮一郎¹，池田康将¹，堀ノ内裕也¹，木平孝高¹，
富田修平¹，山野範子¹，石澤啓介²，土屋浩一郎²，
玉置俊晃¹
（徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部・¹薬理，
²医薬品機能生化学）

13:46 血管内皮細胞を用いた endothelial microparticles
Y-10 (EMP) の効率的な産生系の確立およびバイオマーカー
としての可能性の検討
○山本誠士¹，東英梨月^{1, 2}，村松昌³，柳橋努⁴，生
谷尚士⁴，長井良憲⁴，高津聖志⁴，宮崎賢治¹，佐竹
美芽¹，堂本光子²，新飯田俊平³，服部裕一¹
（¹富山大・院・分子医科薬理，²金沢工大・ゲノム生
物工学，³国立長寿医療研究センター・遺伝子蛋白質
研，⁴富山大・院・免疫バイオ）

13:58 血管平滑筋細胞における BK チャネル-VGCC 複合体の
Y-11 解析
○鈴木良明，山村寿男，大矢進，今泉祐治
（名市大院・薬・細胞分子薬効解析）

14:10 血管病態を制御する新規カルモジュリン関連蛋白質
Y-12 の探索と機能解析
○臼井達哉，山脇英之，岡田宗善，原幸男
（北里大・獣医畜産・獣医薬理）

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム (2) S-04~S-06

「アルツハイマー病研究の最近の進歩」

座長：谷口隆之（京都薬大・病態生理）

谷内一彦（東北大院・医・機能薬理）

13:10 アルツハイマー病における神経原線維変化の成熟化
S-04 におけるアクチン重合調節破綻の関与
○高田和幸，北村佳久，谷口隆之
（京都薬大・病態生理）

13:35 [¹¹C]BF-227 PET による脳内ミスフォールディング蛋白
S-05 白の計測
岡村信行，古本祥三，○谷内一彦
（東北大院・医・機能薬理）

14:00 アストロサイトにおける Ca²⁺シグナル依存的な N-カ
S-06 ドヘリン発現制御を担う因子の同定
○金丸和典¹，大久保洋平¹，廣瀬謙造²，飯野正光¹
（東大院・医・¹細胞分子薬理，²神経生物）

休憩 (14:30-14:40)

第 20 回 日本循環薬理学会

YIA 候補者演題発表 (3) Y-13~Y-18

座長：田中利男（三重大院・医・薬理ゲノミクス）

西山 成（香川大・医・薬理）

14:40 圧力負荷環境での培養血管平滑筋細胞におけるドコサ
Y-13 ヘキサエン酸による iNOS, COX-2 発現誘導改善作用
○町田拓自, 篠原耕作, 飯塚健治, 平藤雅彦
(北海道医療大・薬・薬理)

14:52 プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP4 の抗血
Y-14 小板療法ターゲットとしての可能性
○柏木仁¹, 栗山周子¹, 結城幸一¹, 小島史章¹, 成
宮周², 牛首文隆¹
(¹旭川医大・医・薬理, ²京大院・医・薬理)

15:04 マウス腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応機序
Y-15 の解析
○和家祥大¹, 牧野堅人¹, 藤原弘喜¹, 橋川成美²,
橋川直也³, 高取真吾¹, 川崎博巳¹
(¹岡山大院・医歯薬学総合・臨床薬学, 岡山理大・
理(臨床生命科学)・²薬理, ³臨床分子遺伝学)

15:16 糖代謝物質メチルグリオキサル慢性処置のラット血
Y-16 管反応性に及ぼす影響とメカニズム
○向田昌司, 山脇英之, 岡田宗善, 原幸男
(北里大・獣医畜産・獣医薬理)

15:28 ポストコンディショニングによる心保護メカニズ
Y-17 ム：プレコンディショニングとの比較
○田和正志^{1,2}, 福本大起², 山下直人², 大喜多守²,
今村武史¹, 松村靖夫², 岡村富夫¹
(¹滋賀医大・薬理, ²大阪薬大・病態分子薬理)

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム (3) S-07~S-09

「虚血傷害の病態と治療」

座長：伊藤茂男（北大院・獣医・薬理）

福永浩司（東北大院・薬・薬理）

14:40 脊髄反射電位に対するアデノシンの作用と低酸素惹
S-07 起シナプス伝達抑制への関与
○乙黒兼一, 山地良彦, 伴昌明, 和田昌子, 高橋
巧, 太田利男, 伊藤茂男
(北大院・獣医・薬理)

15:05 ドネペジルのラット網膜虚血・再灌流傷害抑制メカ
S-08 ニズムの解析
○坂本謙司, 大木かよ, 森麻美, 斉藤麻希, 中原
努, 石井邦雄
(北里大・薬・分子薬理)

15:30 一過性脳虚血モデルラットの異常行動と人工酸素運
S-09 搬体
○山口拓¹, 濱舘直文¹, 掛端仁¹, 富樫廣子^{1,2}, 泉
剛¹, 吉田隆行¹, 吉岡充弘¹
(¹北大院・医・神経薬理, ²北海道医療大・薬・薬理・
病態生理)

15:55 薬剤誘導による脳虚血耐性機構
S-10 ○福永浩司, 塩田倫史
(東北大院・薬・薬理)

休憩 (16 : 20-16:30)

16:30

第 20 回 日本循環薬理学会 特別講演 (A 会場)

座長：三輪聡一(北大院・医・細胞薬理)

虚血脳の循環代謝研究のフロンティア

宝金清博 教授

(北大院・医・脳神経外科)

17:30

第 20 回 日本循環薬理学会
YIA 授賞式・会長挨拶・次期当番幹事挨拶・閉会挨拶 (A 会場)

- ① YIA 優秀賞発表授賞式
- ② 日本循環薬理学会 会長挨拶
会長：岡村富夫(滋賀医大・医・薬理)
- ③ 第 21 回日本循環薬理学会 当番幹事挨拶
次期当番幹事：川崎博巳(岡山大院・医歯薬総合・先端薬物療法開発学・臨床薬学)
- ④ 第 20 回日本循環薬理学会 閉会挨拶
当番幹事：三輪聡一

17:50

サッポロビール園へ貸し切りバスで移動

18:30

|

20:30

懇親会(サッポロビール園スターホール)

プログラム・演題一覧（2日目）

A 会場（研修室 305）

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム(4) S-11～S-14

「心血管リモデリングの病態と治療・予防」

座長：堀尾嘉幸（札幌医大・医・薬理）

柳澤輝行（東北大院・医・分子薬理）

9:10 アルドステロン誘発心臓リモデリングにおける NCX1
S-11 輸送体の役割

○伊豫田拓也¹，喜多紗斗美¹，山本信太郎¹，小室一成²，西山成³，岩本隆宏¹

(¹福岡大・医・薬理，²阪大院・医・循環器内科，³香川大・医・薬理)

9:35 AZT/Tmpk を用いた心筋症モデル：細胞運命制御遺伝
S-12 子治療法の応用

○柳澤輝行，助川淳，佐藤岳哉
(東北大院・医・分子薬理)

10:00 レスベラトロールによる筋ジストロフィーの治療
S-13 堀佑輔，久野篤史，細田隆介，丹野雅也，○堀尾嘉幸
(札幌医大・医・薬理)

10:25 キマーゼ阻害薬による腹部大動脈瘤進展予防の可能性
S-14 ○高井真司，金徳男，宮崎瑞夫
(大阪医大・薬理)

B 会場（研修室 301）

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム(5) S-15～S-18

「イオン輸送体と免疫系」

座長：今泉祐治（名市大院・薬・細胞分子薬効解析）

谷口隆信（旭川医大・生化学・細胞制御科学）

9:10 B-SOC：BCR 刺激とストア枯渇により活性化される
S-15 Stim1 依存性の新たな Ca²⁺流入経路

○森田貴雄¹，谷村明彦¹，馬場義裕²，黒崎知博²，東城庸介¹

(¹北海道医療大・歯・薬理，²阪大・免疫学フロンティア研究センター・分化制御)

9:35 免疫系における中コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャ
S-16 ネルの役割

○大矢進，仲村恵梨奈，山村寿男，今泉祐治
(名市大院・薬・細胞分子薬効解析)

10:00 Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体のタンパク質発現に必須なアミ
S-17 ノ酸配列の同定

○根津顕弘^{1,2}，Most. Nahid Parvin²，R. James Turner²

(¹北海道医療大・歯・薬理，²Molecular Physiology and Therapeutics Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health)

10:25 オキサゾロン誘導マウス腸炎モデルの腸上皮における
S-18 focal adhesion kinase (FAK) の発現亢進

馬艶菊¹，仙葉慎吾¹，前本篤男²，竹内昌之¹，亀下勇³，石田敦彦⁴，加藤早苗¹，加藤剛志¹，劉雲鵬⁵，○谷口隆信¹

(¹旭川医大・生化学・細胞制御科学，²内科学・消化器・血液腫瘍制御内科，³香川大・農・応用生命科学，⁴広島大院・総合科学・分子脳科学，⁵中国医大付属第一病院・腫瘍内科)

休憩（10:50-11:00）

11:00

第 38 回 薬物活性シンポジウム 特別講演（A 会場）

座長：三輪聡一（北大院・医・細胞薬理）

多様化する受容体の機能・表現型-Phenotype Pharmacology への展開

村松郁延 教授

(福井大・医・薬理)

昼食（12:00-13:00）

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム(6) S-19～S-23

「薬物受容体研究の最前線」

座長：牛首文隆（旭川医大・医・薬理）

西宗敦史（福井大・医・薬理）

13:00 脂肪酸受容体 GPR120 の新規リガンド探索と構造活性
S-19 関連

○原貴史¹，孫崎²，平澤明²，木村郁夫²，足達哲也³，
淡路健雄⁴，石黒正路⁵，鈴木孝禎⁶，宮田直樹⁶，辻
本豪三²

（京都大院・薬・¹最先端創薬研究センター，²ゲノム
創薬科学分野，³京都府立医大・細胞分子機能病理，
⁴埼玉医大・薬理，⁵新潟薬大・生物機能化学，⁶名市
大・薬化学）

13:25 多剤耐性細胞 KB-C2 における薬剤耐性克服の取り組み
S-20 - チロシンキナーゼ阻害薬とマイクロ RNA の応用 -

○柴山良彦¹，田口美雪²，池田龍二²，長田貴之¹，
武田泰生²，菅原満¹，井関健¹，山田勝士²

（¹北大院・薬・臨床薬学教育研究センター，²鹿児島
大院・医歯学総合・薬物動態制御）

13:50 エネルギー代謝指標としての MCT4 の有用性について
S-21 の基礎的検討

○飯塚健治¹，森田憲輝²，町田拓自¹，平藤雅彦¹

（¹北海道医療大・薬・薬理，²北海道教育大岩見沢校
健康・スポーツ科学）

14:15 大脳皮質に特異的なムスカリン受容体の生体内表現
S-22 型

○西宗敦史，A. S. M. Anisuzzaman，吉木はつみ，宇
和田淳介，村松郁延

（福井大・医・薬理）

14:40 プロスタグランジン I₂ の非アルコール性脂肪性肝炎
S-23 の発症・進展における役割解明

○糸井志麻^{1,2}，結城幸一¹，小島史章¹，柏木仁¹，奥
村利勝²，牛首文隆¹

¹旭川医大・医・薬理，²旭川医大病院・総合診療部

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム(7) S-24～S-26

「中枢神経系とストレス応答」

座長：倉石 泰（富山大院・医薬・応用薬理）

横谷邦彦（高知大・医・薬理）

13:00 Toll-like receptor 4 および細胞外 ATP によるミク
S-24 ログリアの細胞死/生存調節

○原田佳奈¹，秀和泉¹，藤原俊輔¹，関貴弘¹，田中
茂¹，仲田義啓²，酒井規雄¹

（広島大院・医歯薬総合・¹神経薬理，²薬効解析）

13:20 脳内エンドカンナビノイドの中枢性交感神経-副腎
S-25 髄質系賦活における抑制性制御

○清水孝洋，横谷邦彦

（高知大・医・薬理）

13:45 脳神経細胞におけるインスリンシグナル：恒常性維
S-26 持のためのシグナル変動

○横尾宏毅¹，根本隆行²，柳田俊彦²，山本誠二¹，
富田賢吾¹，高野健一¹，服部裕一¹

（¹富山大院・医薬・分子医科薬理，²宮崎大・医・薬理）

14:10 帯状疱疹痛マウスモデルでの自発痛様行動の評価と
S-27 その発生における一酸化窒素の役割

○佐々木淳，金山翔治，倉石泰

（富山大院・医薬・応用薬理）

14:35 ノルアドレナリンによる樹状細胞の機能制御
S-28

○柳川芳毅，松本真知子，富樫廣子

（北海道医療大・薬・薬理・病態生理）

14:55 痛みによる不快情動生成における分界条床核内コル
S-29 チコトロピン放出因子—protein kinase A (PKA) 情
報伝達系の関与

○玉野竜太¹，中誠則¹，近藤直人¹，大野篤志¹，井
手聡一郎¹，山口拓²，吉岡充弘²，南雅文¹

（¹北大院・薬・薬理，²北大院・医・神経薬理）

15:20

第 38 回 薬物活性シンポジウム 閉会挨拶（A 会場）

会長：三輪聡一

— *MEMO* —

第 38 回 薬物活性シンポジウム

特別講演

多様化する受容体の機能・表現型 — pharmacome pharmacology への展開

村松 郁延、宇和田 淳介、吉木 はつみ、ASMD Anisuzzaman、西宗 敦史
福井大学医学部生命情報医科学講座薬理学領域

1992 年の地球サミットで、biodiversity という概念が提唱された。ここで biodiversity とは、「すべての生物間の変異性をいうものとし、種内の多様性、種間の多様性および生態系の多様性を含む」と定義されている。つまり、さまざまな種が存在し、同じ種でも遺伝子レベルに差があり、さらに環境によって構成する生態系も様々に異なるということである。これを受容体に当てはめると、動物間だけでなく、遺伝子レベルでもサブタイプやヴァリエーションなどの多様性が考えられる。さらに最近では、たとえ遺伝子が同じでアミノ酸配列が相同であっても、タンパク質の構造や機能は決して同じでないことが明らかになってきた。言い換えれば、タンパク質は生体の周りの環境に応じて、非常にフレキシブルに構造を変化することができ、異なった機能を持つことができる。アミノ酸配列が相同であっても、タンパクがさまざまな表現型を取りえるということは、これまでの遺伝子とタンパクが 1 : 1 に対応するというプロテオミクスにおける基本的了解を覆すものである。実際に、アミノ酸が相同なタンパクであっても、薬物感受性の違う多数の表現型が存在することが、次々に明らかになってきている。私たちは、生体に存在するタンパク質の全ての表現型をまとめて、ファルマコーム (pharmacome) と呼ぶことを提唱している (図 1)。

生体レベルでの受容体の多様性としては、リガンド結合部位の多様化、シグナル系の多様化、シグナルのバイアス化、リガンド特異性の変化、臓器および細胞間での分布の相違、さらには細胞内における機能・表現型の多様化などが上げられる。ここでは、我々の研究室で最近明らかになってきた α_1 -アドレナリン受容体受容体とムスカリン受容体の多様性を一部紹介する。

1. α_1 -アドレナリン受容体の多様性

α_1 -アドレナリン受容体には、遺伝子およびタンパク質のレベルで 3 つのサブタイプ (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) が存在する。これらはいずれも prazosin 高親和性であるが、ヒト前立腺や尿道の α_1 -アドレナリン受容体は prazosin に対し著しく低い親和性を示す。この異なった薬理学的特性のため、上記 3 サブタイプとは異なる新しいサブタイプが想定され、 α_{1L} -サブタイプと命名された。しかし、その遺伝子は同定されず、 α_{1L} -サブタイプはいわゆる putative receptor として約 15 年が経過した。最近になり、この α_{1L} -サブタイプは α_{1A} 遺伝子をノックアウトすると消失すること、さらに、 α_{1L} -サブタイプの特性は組織をホモジナイズすると α_{1A} -サブタイプに変化することが示された。これら一連の研究から、 α_{1L} -サブタイプは α_{1A} 遺伝子由来ではあるが、 α_{1A} -サブタイプとは異なる表現型であることが明らかになった。

以上のように、 α_{1L} -サブタイプのファルマコーム解析 pharmacome analysis の結果、「1 遺伝子には 1 受容体に対応する」というこれまでの考えは普遍的でないことが明らかになってきた。このことはまた、受容体の取る表現型によって薬の効果が異なることを意味する。「何故、一遺伝子から異なった表現型が発現するのか？」 私たちは、受容体と相互作用するタンパク質が表現型を変化させていると考え、yeast two-hybrid screening にて CRELD1 α を同定した。そして、 α_{1A} と共発現することで α_{1L} -サブタイプを特異的に発現する細胞を樹立することに成功した。さらに、この細胞系を用いた薬理学的検討の結果、失禁治療薬としてこれまで開発が試みられた多くの化合物は α_{1A} 選択的であり、 α_{1L} -サブタイプには無効であることも明らかにした。本研究結果は、受容体を遺伝子だけで分類するのではなく

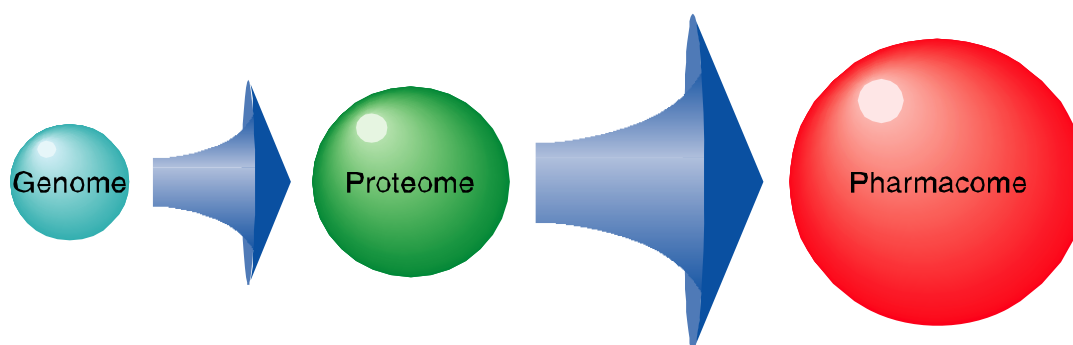
表現型も含めて分類し、それぞれの表現型における薬物感受性の違いを治療に応用する薬理学“pharmacome pharmacology”を提唱するきっかけともなった。

2. ムスカリン受容体の多様性

M₁ ムスカリン受容体(M₁ サブタイプ)は中枢神経系に主に存在し、記憶や学習など高次脳機能などに関与している。事実、M₁ サブタイプ欠損マウスでは学習能力は著しく低下する。また、海馬の長期増強 LTP は M₁ サブタイプ刺激でさらに増強されることが知られている。我々は、組織をホモジナイズせず切片をそのまま用いる tissue segment binding method を開発し、ラットのムスカリン受容体を定量解析した。そして、M₁ サブタイプが脳皮質や海馬においては、細胞膜だけでなく、細胞内にも大量に分布することを明らかにした。同様な結果は、神経芽細胞 NIE cell や脳皮質初代培養細胞でも得られた。さらに、両部位の受容体機能を比較したところ、細胞膜 M₁ サブタイプは IP₃-Ca イオン系を活性化させるのに対し、細胞内 M₁ サブタイプ刺激は MAP kinase 系を活性化させるという結果を得た。

ムスカリン受容体は、細胞膜に存在する代表的な膜受容体と考えられてきた。本研究は、ムスカリン受容体が細胞内にも存在し、しかも機能しているという、今までの膜受容体説に当てはまらない表現型の存在を明らかにしたものである。今後は、ムスカリン受容体だけでなく他の受容体の細胞内分布や機能も詳しく研究され、pharmacome analysis が高次脳機能解明に繋がることを期待したい。

図 1。生体における多様性（遺伝子からファルマコムへ）



— *MEMO* —

第 38 回 薬物活性シンポジウム

シンポジウム

IgA 腎症患者で発症する食塩感受性高血圧と

腎内レニン・アンジオテンシン系

¹西山 成、²小西啓夫、²今西政仁香川大学医学部薬理学¹、大阪市総合医療センター腎高血圧内科²

要約：

腎臓におけるアンジオテンシン II 産生は、主に腎内局所のアンジオテンシノーゲンの発現量によって調節されている。最近、尿中アンジオテンシノーゲンが腎内レニン・アンジオテンシン系の活性を反映することが臨床的にも証明されていることから、本研究では IgA 腎症患者の食塩感受性高血圧と尿中アンジオテンシノーゲンの関係について検討を行った。その結果、尿中アンジオテンシノーゲンは増塩期で減塩期に比して有意に高値を示した。さらに、血圧に対する食塩感受性指数は糸球体硬化スコア・尿中アンジオテンシノーゲンの変化と有意な相関を示した。一方、このような相関は、腎機能が正常なメニエル氏病患者では観察されなかった。以上、IgA 腎症患者においては食塩摂取により腎内局所でのアンジオテンシノーゲン産生が増加し、それに伴って生じる腎内レニン・アンジオテンシン系の活性化が食塩感受性亢進に関与している可能性が示唆された

キーワード：アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン II、IgA 腎症、食塩感受性高血圧

1. はじめに

腎臓におけるアンジオテンシン II 産生は、腎傍糸球体細胞に豊富に存在しているレニンではなく、主に腎内局所のアンジオテンシノーゲンの発現量によって調節されている。一方、これまでに我々は、臨床的にレニン・アンジオテンシン系阻害薬が慢性腎臓病患者の食塩感受性高血圧を改善することを認めている。また、ダール食塩感受性高血圧ラットにおいて、高食塩投与によりレニン活性は減少するものの、逆に腎組織中アンジオテンシノーゲン発現と尿中アンジオテンシノーゲン排泄量が著明に増加し、それに伴って腎内レニン・アンジオテンシン系の亢進が生じて腎臓が障害されることを証明した。さらに最近、尿中アンジオテンシノーゲンが腎内レニン・アンジオテンシン系活性を反映することを臨床的にも証明し、実際に慢性腎臓病患者では腎内レニン・アンジオテンシン系が亢進していることなどを証明してきた。そこで本研究では、IgA 腎症患者の食塩感受性高血圧と尿中アンジオテンシノーゲンの関係について検討することを目的とした。

2. 方法と結果

IgA 腎症患者 40 例 (Cre 0.7 ± 0.2 mg/dL) を対象とした。食塩 15g、5g を摂取する増塩期と減塩期を各 1 週間行い、各期の尿中アンジオテンシノーゲンを我々の開発した ELISA 法にて測定した。食塩感受性指数は各期の 1 日 Na 排泄量変化あたりの 24 時間血圧の変化で計算した。尿中アンジオテンシノーゲンは増塩期 $34.1 \pm 53.5 \mu\text{g/g} \cdot \text{Cre}$ で、減塩期 $12.5 \pm 19.7 \mu\text{g/g} \cdot \text{Cre}$ に比し、有意に高値を示した。また、血圧に対する食塩感受性指数は糸球体硬化スコア ($r=0.43$)、尿中アンジオテンシノーゲンの変化 ($r=0.36$) と有意な相関を示した。一方、このような相関は、腎機能正常なメニエル氏病患者では観察されなかった ($n=11$)。

3. 結論

IgA 腎症患者においては食塩摂取により腎内局所でのアンジオテンシノーゲン産生が増加し、それに伴って生じる腎内レニン・アンジオテンシン系の亢進が食塩感受性亢進に関与している可能性が示唆された。

4. おわりに

過去の動物実験の結果によって、レニン・アンジオテンシン系阻害薬は血圧に対する食塩感受性をむしろ悪化させると考えられてきた。しかし、臨床的にはレニン・アンジオテンシン系阻害薬は慢性腎臓病患者の食塩感受性高血圧を改善することが観察される。本研究では、慢性腎臓病患者においては、食塩摂取によって腎内局所レニン・アンジオテンシン系が異常に活性化されることを証明した。今後、詳細なメカニズムについてさらなる検討を進め、新しい治療戦略が開発されることが期待される。

文 献

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007; 59: 251-287.

Nishiyama A, Nakagawa T, Kobori H, Nagai Y, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Okumura M, Meda I, Kiyomoto H, Hosomi N, Mori T, Ito S, Imanishi M. Strict angiotensin blockade prevents the augmentation of intrarenal angiotensin II and podocyte abnormalities in type 2 diabetic rats with microalbuminuria. *J Hypertens.* 2008; 26: 1849-185.

Nishiyama A, Konishi Y, Ohashi N, Morikawa T, Urushihara M, Maeda I, Hamada M, Kishida M, Hitomi H, Shirahashi N, Kobori H, Imanishi M. Urinary angiotensinogen reflects the activity of intrarenal renin-angiotensin system in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Jul 7. [Epub ahead of print]

心腎連関における交感神経と腎内 RAS の役割

¹ラフィー カジ、²野間貴久、¹人見浩文、¹中野大介、

¹西山 成

香川大学医学部薬理学¹、循環器内科²

要約：アルブミン尿を呈する慢性腎臓病 (CKD) 患者における心血管イベント発症率が高いことなどから、心腎連関の存在が強く示唆されている。一方、心機能障害患者では高率に蛋白尿・アルブミン尿が観察される。本研究では、大動脈弁閉鎖不全モデルラットに伴う腎障害における交感神経と腎内局所レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の役割、ならびにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の効果について検討を行った。実験はカテーテルによって大動脈を一部破壊して作成した大動脈弁閉鎖不全モデルラットに対し、ビークル、ARB (オルメサルタン)、あるいはヒドララジンを 6 か月間投与して行った。偽手術ラットと比較して大動脈弁閉鎖不全モデルラットでは左室の肥大・拡大を生じたが、収縮期血圧・心拍出量に差はなかった。しかし、大動脈弁閉鎖不全モデルラットでは、腎組織アンジオテンシン II・ノルエピネフリンレベルの上昇と、糸球体内酸化ストレス (DHE 染色にて評価) を伴った糸球体上皮細胞障害 (desmin 染色により評価) とアルブミン尿を生じた。ARB の投与は血圧を低下させ、大動脈弁閉鎖不全モデルラットで生じる腎組織アンジオテンシン II 上昇と糸球体内酸化ストレスを抑制し、左室の肥大・拡大、糸球体上皮細胞障害、アルブミン尿を改善した。同様の腎臓に対する保護効果が腎神経切除によっても観察された。一方、同程度降圧作用を持つヒドララジンではこのような作用は全く観察されなかった。以上の実験結果より、慢性心機能障害は交感神経を介して腎臓局所の RAS を活性化し、糸球体上皮細胞障害とアルブミン尿を生じている可能性が示唆された。

キーワード：心腎連関、交感神経、レニン・アンジオテンシン系、大動脈不全、オルメサルタン

1. はじめに

アルブミン尿を呈する慢性腎臓病 (CKD) 患者における心血管イベント発症率が高いことなどから、心腎連関の存在が強く示唆されている。特に我々は、心機能障害患者では高率に蛋白尿・アルブミン尿が観察されることに着目し、慢性心機能低下が交感神経を介して腎内レニン・アンジオテンシン系 (RAS) を活性化し、腎機能障害のトリガーとなりうるのではないかと仮説を立てた。本研究ではその仮説を検証するため、腎血行動態に変化を生じない大動脈弁閉鎖不全モデルラットを作成し、腎障害、腎内局所 RAS、ノルエピネフリンの変化、ならびにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) と腎神経の除神経の効果について検討を行った。

2. 方法と結果

実験は、カテーテルによって大動脈を一部破壊して作成した大動脈弁閉鎖不全モデルラットに対し、ビークル、ARB (オルメサルタン 15 mg/kg/day, p. o.)、あるいはヒドララジン (50 mg/kg/day, p. o.) を 6 か月間投与して行った。偽手術ラットと比較して大動脈弁閉鎖不全モデルラットでは左室の肥大・拡大を生じたが、血圧・心拍出量・血中アンジオテンシン II レベルに差はなかった。しかし、大動脈弁閉鎖不全モデルラットでは、腎組織アンジオテンシン II・ノルエピネフリンレベルの上昇と、糸球体内酸化ストレス (DHE 染色にて評価) を伴った糸球体上皮細胞障害 (desmin 染

色により評価)とアルブミン尿を生じた。ARB の投与は血圧を低下させ、大動脈弁閉鎖不全モデルラットで生じる腎組織アンジオテンシン II・ノルエピネフリン上昇と糸球体内酸化ストレスを抑制し、左室の肥大・拡大、糸球体上皮細胞障害、アルブミン尿を改善した。同様に、腎神経の除神経もこれらの腎臓の変化を抑制した。特に、腎神経の除神経は、腎内アンジオテンシノーゼンの発現を抑制し、腎組織アンジオテンシン II レベルを減少させることが明らかとなった。一方、同程度降圧作用を持つヒドララジンではこのような作用は全く観察されなかった。

3. 結論

以上の実験結果より、慢性心機能障害が交感神経を介して腎臓局所の RAS を活性化し、糸球体上皮細胞障害とアルブミン尿を生じている可能性が示唆された。

4. おわりに

慢性心機能障害患者では CKD を発症することが臨床的に示唆されているが、本研究結果はその心腎連関が生じるメカニズムの一部明らかにしたものである。現在、詳細なメカニズムについてさらなる検討を進めているが、今後、心腎連関患者に対する新しい治療戦略の発見が期待される。

文 献

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007; 59: 251-287.

Nishiyama A, Kobori H, Konishi Y, Morikawa T, Maeda I, Okumura M, Kishida M, Hamada M, Nagai Y, Nakagawa T, Ohashi N, Nakano D, Hitomi H, Imanishi M. Mineralocorticoid receptor blockade enhances the antiproteinuric effect of an angiotensin II blocker through inhibiting podocyte injury in type 2 diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332: 1072-1080.

Ihara G, Kiyomoto H, Kobori H, Nakai Y, Ohashi N, Hitomi H, Nakano D, Pelisch N, Hara T, Mori T, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Regression of superficial glomerular podocyte injury in type 2 diabetic rats with overt albuminuria : effect of angiotensin II blockade. *J Hypertens.* 2010, In-press.

受容体サブタイプ間相互作用による AngII シグナル制御機構

大場雄介、犬塚（鈴木）貴之、津田真寿美、川口秀明
北海道大学大学院医学研究科病態医科学分野

要約：

アンジオテンシン II (angiotensin II、AngII) は、1 型受容体 (AT1) および 2 型受容体 (AT2) を介して細胞内にシグナルを伝え、AT2 の活性化は AT1 シグナリングと拮抗的に作用することが知られている。しかしながら、この AT2 による AT1 抑制の正確な分子機構の詳細は未だ不明のままである。我々は、蛍光バイオイメージング手法を用いて、AT1-AT2 間の細胞内における時空間的および機能的な相互作用について検討したので報告する。AT2 は AngII 非存在下においても AT1 受容体と結合しているが、AngII 刺激によって両者の相互作用が増強されることが、免疫共沈法と蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer、FRET) で明らかになった。特に FRET による画像化により、AT1 と AT2 が結合しエンドゾームに蓄積することが可視化でき、AngII シグナル伝達経路の新たな調節機構として、受容体レベルのダイナミクスが関与することが示唆された。

キーワード： アンジオテンシン 受容体 蛍光共鳴エネルギー移動 二量体化

1. はじめに

アンジオテンシン II (angiotensin II、AngII) は高血圧、アテローム性動脈硬化症、心不全等の心血管疾患の発症に極めて重要な役割を担う多能性のペプチド・ホルモンである^{1,2)}。これまで、ヒトでは 4 つのサブタイプの AngII 受容体が同定されている^{1,2)}。このうち、AngII による血管収縮作用の大部分は 1 型受容体 (AT1) を介した作用である。一方、他の受容体の情報伝達機構と病理生理学的な役割に関する報告は少なく、2 型受容体 (AT2) の活性化が AT1 と競合的に機能するという報告がある程度である¹⁻⁴⁾。最近、AT1 への AT2 の直接結合がリガンド結合非依存的に生じ、この結合が AT1 シグナル伝達を抑制する新たな機構として報告されている⁵⁾。しかし、この研究においては化学架橋方法を使用しているため、細胞内での生理的な状態における AT2 による AT1 シグナルの正確な調節機構はまだ解明されていない。

我々は、AT1 と AT2 との機能連関をより生理的条件で解析するために、蛍光タンパク質を付加した AT1 と AT2 を用いて生きた細胞でのイメージングを行った。その結果、AT2 と AT1 の間の受容体レベルでの時空間的な相互作用の存在が明らかになり、AT2 による AT1 抑制の新たな分子機構の一端を解明したので報告する。

2. 結果

先ず我々は、AT2 受容体が AT1 及び他の受容体シグナル依存的な ERK のリン酸化を抑制するかどうかを検討した。HEK293T 細胞では AT1 を発現することにより、AngII 刺激依存的な ERK のリン酸化が認められる。そして、この ERK のリン酸化は AT2 の発現量依存的に抑制された。AT2 選択的抑制薬である PD123319 により、AT2 が発現しているにも関わらず、ERK リン酸化が認められたため、AT2 の抑制効果にはリガンドの結合が必要であると考えられた。

以前の報告で、化学架橋方法を用いた AT1 と AT2 の直接結合が G タンパク質と結合した AT1 シグナル伝達経路を抑制すると示されている⁵⁾。我々は、この相互作用をより生理的状态に近い状態で検討するため、架橋をしない条件で免疫沈降を行い、両者の結合を検討した。AT2 は、報告どおり AngII がなくても AT1 と結合しているが、AngII 処理はさらに両者の結合を増強した。この結果は、AT2 が受容体レベルの相互作用で AT1 シグナルに影響を与える可能性を示唆する。

蛍光顕微鏡を用いて両受容体の局在を可視化したところ、免疫沈降法の結果に一致して、AngII 刺激前にも AT2 の局在パターンは AT1 の局在に一致していた。また AngII 処理の後、タイムラプス蛍光顕微鏡で AT1 と AT2 受容体の細胞内局在性を調べたところ、AT2 は AT1 と共局在しながらエンドサイトーシスされた (図 1)。さらに、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の検出により、両分子の会合を検討した結果、AngII 刺激前には弱い FRET が検出されたが、両者の間の FRET 効率は AngII 刺激によって時間依存的に増加し (図 2)、主として両者を取り込まれた顆粒状構造上で観察された。

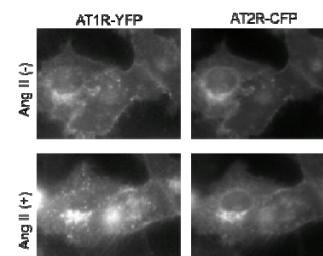


図 1 AT1 と AT2 の局在 上段が AngII 刺激前、下段が刺激後。

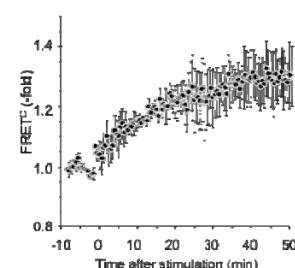


図 2 時間依存的な AT1-AT2 間 FRET 効率の変化。タイムラプス蛍光顕微鏡で取得した画像データから、ゴードン法で算出した FRET 効率をプロットした。

3. 考察

今回の我々の研究で、AT1 と AT2 が AngII によりダイナミックにその局在を変化し、ヘテロ多量体化しながら細胞内に取り込まれる様子が明らかになった。その後の研究の結果、AT1 と AT2 の相互作用には両者へのリガンドの結合が必要であり、また PKC に依存していることが明らかになった。PKC は AT1 依存的 ERK 活性化の重要な介在分子であるため、PKC による AT2 のリン酸化、それに続く受容体レベルの会合に伴う AT1 シグナルの抑制は、細胞自身が持つ AngII シグナルにおける負のフィードバック機構と考えられ、今後この機構をターゲットとした治療法の開発も期待される。

4. おわりに

蛍光タンパク質 CFP と YFP の cDNA を分与頂いた理化学研究所宮脇敦史博士に深謝する。

文 献

1. Kim, S. & Iwao, H.: Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*, **52**: 11-34, 2000.
2. Mehta, P.K. & Griendling, K.K.: Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**: C82-97, 2007.
3. Munzenmaier, D.H. & Greene, A.S.: Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*, **27**: 760-5, 1996.
4. Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A.D. & Nahmias, C.: Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J*, **325** (Pt 2): 449-54, 1997.
5. Abdalla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A.M. & Quitterer, U.: The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, **276**: 39721-6, 2001.

アルツハイマー病における神経原線維変化の成熟化における

アクチン重合調節破綻の関与

高田 和幸、北村 佳久、谷口 隆之
京都薬科大学病態生理学分野

要約：アルツハイマー病 (AD) 脳では、アミロイド β タンパク質 (A β) の蓄積により形成される老人斑、異常リン酸化タウタンパク質 (タウ) が神経細胞内に蓄積して形成される神経原線維変化 (NFT)、シナプス構造の破綻や神経細胞死などの病理学的変化が引き起こされる。これら病理学的変化の相互関係は不明であるが、時間的・遺伝的要因の解析から A β の蓄積は AD 発症において上流に位置し、かつ中心的役割を担うことが示唆されている。¹⁾ 一方、神経細胞におけるシナプス構造の形成とその機能は、細胞骨格タンパク質であるアクチンの正確な重合により調節されていることが知られている。そこで我々は、アクチン重合制御因子である Wiskott-Aldrich syndrome protein-family verprolin-homologous protein (WAVE) について、AD 剖検脳を用いて解析をおこなった。その結果、WAVE は、正常老化脳と比べて AD 脳ではその発現量が有意に増加しており、NFT において異常蓄積していることがわかった。さらに、この WAVE 病変に対する A β やタウの影響を解析するため、A β プラークを形成する Tg2576 マウス、NFT 様構造物を形成する JNPL3 マウスおよびその両方を形成する 3xTg-AD マウスを用いて解析した。その結果、3xTg-AD マウスにおいてのみ、WAVE が NFT 様構造物において蓄積することがわかった。以上の結果は、A β 病変が神経原線維変化に影響し、WAVE の蓄積を誘導することでシナプス構造の破綻を招く可能性を示唆している。このように、A β は NFT の成熟化を促進する因子として働くことが予想され、脳内 A β の早期除去の重要性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、神経原線維変化、アクチン骨格、アミロイド β 、タウ

1. はじめに

老化を最大の危険因子とする進行性の神経変性疾患である AD は、超高齢化社会を迎えた日本において介護への労働力不足や医療経済上の問題からもより効果的治療法の開発が必要である。AD 脳においてシナプス構造の破綻は、AD における認知機能の低下と高い相関性を示す重要な病理学的変化の一つとして検出される。シナプス構造は、細胞骨格タンパク質であるアクチンが線維状に重合することにより厳密に制御されていることから、AD で認められるシナプス構造の破綻にはアクチン重合の制御異常が関与していることが予想される。しかしながら、その具体的な制御異常を示す報告はほとんどなく、他の病理学的変化との関連性も不明である。そこで我々は、アクチン重合制御因子に着目し、シナプス破綻を中心とした AD における病理学的変化の相互作用について解析した。

2. アクチン重合制御因子

近年、アクチン重合における重要な制御因子として WAVE が同定された。¹⁾ WAVE は、タウと同じく微小管結合タンパク質の一つである collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) と複合体を形成するが、CRMP2 は過剰にリン酸化され NFT において蓄積していることが報告されている。^{2,3)} つまり、CRMP2 の異常蓄積は WAVE に影響し、さらにはアクチン重合の制御異常につながることも推測される。そこで、われわれは AD 脳における WAVE の変動について解析した。^{4,5)}

3. AD 脳における WAVE の発現量と局在

ウェスタンブロッティング法により WAVE の発現量について解析した結果、対照群である正常老化脳と比較して、細胞質分画および膜分画において AD 脳ではその発現量が有意に増加していた。さらにサルコシル不溶性分画を用いた解析では、AD 脳から調製した検体でのみ WAVE の免疫反応性が検出された。免疫組織化学的解析では対照群において WAVE は脳実質全体での微弱な拡散性の免疫反応性を示し、一方の AD 脳では、過剰リン酸化タウやリン酸化 CRMP2 と同じように、NFT において強い免疫反応性が検出された。また、免疫沈降法では AD 脳の細胞質分画において WAVE ならびに過剰リン酸化タウが CRMP2 と結合していることがわかった。以上より、WAVE は AD で形成される NFT において、CRMP2 との結合性を介して過剰リン酸化タウやリン酸化 CRMP2 とともに沈着していることが示唆された。

4. トランスジェニック AD モデルマウスにおける WAVE の解析

さらに A β やタウの病理学的変化と WAVE 蓄積との関連性を解析するために、トランスジェニックマウスを用いた免疫組織学的解析をおこなった。家族性 AD の原因遺伝子として同定されたヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質 (APP_{swe}) 遺伝子を導入した Tg2576 マウス脳では、大量の A β プラークが形成されていたが過剰リン酸化タウ、リン酸化 CRMP2 および WAVE の神経細胞内蓄積は検出されなかった。ヒト変異型タウ (tauP301L) 遺伝子を導入した JNPL3 マウス脳では、神経細胞内における過剰リン酸化タウの蓄積に加え、リン酸化 CRMP2 の蓄積が認められたが WAVE の蓄積には至らなかった。一方、前述の二つの変異遺伝子に加えて A β 産生を促進するために、さらにヒト変異型プレセニリン 1 タンパク質 (PS1_{M146V}) 遺伝子を導入した 3xTg-AD マウス脳では、神経細胞内外における A β や APP の蓄積、過剰リン酸化タウやリン酸化 CRMP2 の神経細胞内蓄積、さらに興味深いことには WAVE の神経細胞内蓄積が再現された。以上の結果を考察すると、JNPL3 マウスの解析から CRMP2 の蓄積は過剰リン酸化タウの蓄積により誘導されるが、それだけでは WAVE の蓄積には至らないこと、その蓄積には 3xTg-AD マウスのように過剰リン酸化タウの蓄積に加え、A β や APP の細胞内外での蓄積という二つの病理学的変化が深く関与することが示唆される。このようにアクチン重合の調節因子を取り巻く要因として A β ・APP やタウさらにはシナプス構造の破綻を捉えた時、AD 脳で誘導されるそれぞれの病理学的変化の新たな相関性が浮かび上がるが、ここでもやはりできるだけ早い段階での脳内 A β の除去が AD の治療戦略と成り得ることが示唆される。

5. おわりに

本解析では、アクチン重合の上流に位置する制御因子をターゲットとして捉え、A β やタウの影響を考察することでシナプス構造の破綻に関与する可能性のある一連のカスケードが一部解明できた。このカスケードにおいても A β は神経変性を促進してシナプス構造の破綻を導く「脳の老化促進因子」として AD 病態発症の中核を担うことが推定され、より早い段階での脳内 A β の除去の重要性が示唆された。このように、AD で引き起こされる A β 依存性の病理学的変化のさらなる解析が、新規の AD 発症メカニズムや新規治療法の開発に繋がることが期待される。

文 献

- 1) Hardy J., Selkoe D. J., *Science*, **297**, 353-356 (2002).
- 2) Miki H., Suetsugu S., Takenawa T., *EMBO. J.*, **17**, 6932-6941 (1998).
- 3) Yoshida H., Watanabe A., Ihara Y., *J. Biol. Chem.*, **273**, 9761-9768 (1998).
- 4) Gu Y., Hamajima N., Ihara Y., *Biochemistry*, **39**, 4267-4275 (2000).
- 5) Kitamura Y., Tsuchiya D., Takata K., Shibagaki K., Taniguchi T., Smith M. A., Perry G., Miki H., Takenawa T., Shimohama S., *Neurosci. Lett.*, **346**, 149-152 (2003).
- 6) Takata K., Kitamura Y., Nakata Y., Matsuoka Y., Tomimoto H., Taniguchi T., Shimohama S., *Am. J. Pathol.*, **175**, 17-24 (2009).

[¹¹C]BF-227 PET による脳内ミスフォールディング蛋白の計測

岡村信行、古本祥三、谷内一彦
東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野

要約：アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される蛋白質ミスフォールディング病では、βアミロイドやタウ、αシヌクレインなどの蛋白の脳内濃度が発症前から高まり、これらが重合して毒性を獲得することによって神経変性がもたらされる。したがって、脳内に蓄積した重合蛋白濃度の計測は、疾患の早期診断や治療モニタリングにおける有力な手段となる。βシート結合プローブを用いた PET 分子イメージングは、ミスフォールディング蛋白の非侵襲的検出法として強く期待されている。ミスフォールディング病の原因蛋白は複数存在するが、βシート構造を形成した fibril の多くはその立体構造が近似しており、1 種類のプローブで複数の蛋白コンフォメーションを認識することが可能である。そこで我々は、βアミロイド検出用プローブとして開発した [¹¹C]BF-227 を用いて、アルツハイマー病変以外の重合蛋白の検出を試みた。その結果、[¹¹C]BF-227 が βアミロイドのみならず、αシヌクレインやプリオン蛋白の線維化病変の検出にも応用できることが判明した。今後、蛋白特異性を高めたプローブを新たに開発することで、ミスフォールディング蛋白を標的とした新規治療薬開発が促進されるであろう。

キーワード： Positron emission tomography、βアミロイド、αシヌクレイン、プリオン

1. はじめに

蛋白質はその構造によって特異的な機能を獲得して生命現象を維持している。だが遺伝的変異や後天的異常により構造を形成する折り畳みに失敗すると（ミスフォールディング）、重合して凝集体を形成する。アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病に代表される蛋白質ミスフォールディング病では、βアミロイドやタウ、αシヌクレイン、プリオンなどの蛋白の脳内濃度が発症前から高まり、これが重合して毒性を獲得することによって神経変性がもたらされる。したがって、ミスフォールディング蛋白を非侵襲的に検出する PET プローブは、蛋白質ミスフォールディング病の超早期診断をサポートし、また各蛋白を標的とした新規治療薬の薬効モニタリングにも応用可能である。我々は、線維化βアミロイドを検出する Positron emission tomography (PET) 用プローブ ([¹¹C]BF-227) を独自に開発した。

2. 軽度認知障害における脳内βアミロイド蓄積量の計測

我々は[¹¹C]BF-227 のアルツハイマー病初期病変検出能力を評価する目的で、アルツハイマー病の前駆段階とされる軽度認知障害 (MCI) の患者を対象として脳内βアミロイド蓄積量を計測した。[¹¹C]BF-227 投与後 40-60 分後の大脳皮質におけるプローブ集積量を検討した結果、MCI はアルツハイマー病患者に匹敵するプローブ高集積を示す症例 (約 60%) と正常集積を示す症例 (約 40%) に二分された。さらに MCI の進行予後と[¹¹C]BF-227 集積量との関係を調べたところ、AD への進行例の多くが プローブ高集積を示し、非進行例と明瞭に区別することができた。この結果から、βアミロイドの蓄積はアルツハイマー病の発症前から高度に進行しているものと考えられ、βアミロイドの PET 計測は AD 発症を予測する有力な指標となる¹⁾。

3. [¹¹C]BF-227 による脳内 α シヌクレインの検出

ミスフォールディング病の原因となる蛋白は複数存在するが、 β シート構造を形成した fibril の多くはその立体構造が近似していることから、1 種類のプローブで複数の蛋白コンフォメーションを認識することができる²⁾。BF-227 は β アミロイドのみならず、 α シヌクレイン線維とも高い結合親和性 ($K_d = 9.63$ nM) を有する³⁾。そこで、 α シヌクレイン蛋白がグリア細胞質封入体として脳内に高度に蓄積する多系統萎縮症の患者を対象として、[¹¹C]BF-227 PET による α シヌクレイン蛋白の非侵襲的計測を試みた。その結果、グリア細胞質封入体の好発部位である被殻、淡蒼球、黒質、皮質下白質においてプローブの集積上昇が観察され、BF-227 の α シヌクレイン線維との in vivo での結合が示唆された⁴⁾。

4. [¹¹C]BF-227 によるプリオン蛋白の検出

BF-227 およびその誘導体は、異常プリオン蛋白によって形成されたアミロイド斑とも結合性を有することが知られている。そこで我々は、[¹¹C]BF-227 PET をプリオン病にも応用し、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病およびクロイツフェルト・ヤコブ病患者を対象として[¹¹C]BF-227 PET 検査を実施した。プリオン蛋白がアミロイド斑を形成しやすいゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病の患者では、その好発部位である小脳、視床、側頭葉において[¹¹C]BF-227 の集積が上昇していた。一方、プリオン蛋白がアミロイドを形成せず、シナプスにびまん性に沈着しやすいクロイツフェルト・ヤコブ病患者では、[¹¹C]BF-227 の集積上昇がみられなかった。これらの結果を総合すると、ミスフォールディング蛋白の線維形成度がプローブの結合性を大きく左右する因子になると考えられた⁵⁾。

5. おわりに

PET 分子イメージングの進歩によって、これまで不可能とされてきた脳内ミスフォールディング蛋白の非侵襲的計測が実現した。今後、蛋白特異的なプローブを用いた画像バイオマーカーを新たに開発することができれば、ミスフォールディング蛋白を標的とした治療薬開発に役立てることができるとであろう。

文 献

1. Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 285: 100-108. 2009
2. Okamura N, Fodero-Tavoletti MT, Kudo Y, Rowe CC, Furumoto S, Arai H, Masters CL, Yanai K, Villemagne VL. Advances in molecular imaging for the diagnosis of dementia. *Expert Opinion Med Diag.* 3: 705-716. 2009
3. Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, Kudo Y, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. In vitro characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. *Eur J Pharmacol.* 617: 54-58. 2009
4. Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. In vivo visualization of α -synuclein deposition by [¹¹C]-BF-227 PET in multiple system atrophy. *Brain*, 133: 1772-1778. 2010
5. Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [¹¹C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 37: 934-941. 2010

アストロサイトにおけるCa²⁺シグナル依存的なN-カドヘリン発現制御を担う因子の同定

金丸和典¹、大久保洋平¹、廣瀬謙造²、飯野正光¹
 東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学¹／神経生物学²

要約：アストロサイトは神経伝達物質、ホルモン、サイトカイン、物理刺激など様々な刺激に応答してダイナミックな細胞内Ca²⁺濃度変化（Ca²⁺シグナル）を示す。近年、このCa²⁺シグナルが種々の細胞内シグナル伝達経路の制御を介し、脳構築や脳機能発現に貢献することが解明されつつあるが、その詳細については不明な点が多く残されている。これまでに我々はCa²⁺シグナルの長期抑制法を確立し、これを用いることにより、アストロサイトCa²⁺シグナルがN-カドヘリン発現量の維持を介して神経成長に貢献することを示した（文献1）。今回この経路の仲介因子を同定したので報告する。DNAマイクロアレイ解析から、Ca²⁺シグナルを抑制した培養アストロサイトにおいて翻訳抑制因子 *pumilio-2* (Pum2) が発現増大することを見出した。興味深いことに、N-カドヘリンmRNAの3'非翻訳領域にはPum2結合配列が存在することから、Pum2がN-カドヘリン制御因子であることが期待された。実際にPum2を過剰発現させるとアストロサイトのN-カドヘリン発現量は低下した。また、アストロサイトCa²⁺シグナルを抑制するとPum2発現量が増加することを確認した。逆に、反応性アストロサイト分化誘導因子の処理によりCa²⁺シグナルを活性化させた培養アストロサイトでは、Pum2発現量の低下が観察された。さらに、マウス大脳皮質損傷モデルを用いた実験により、生体内の反応性アストロサイトにおいてもPum2発現量が低下することを確認した。これらの結果は、Pum2がアストロサイトCa²⁺シグナルにより負の制御を受けるN-カドヘリン発現抑制因子であることを示し、アストロサイトCa²⁺シグナルはPum2-N-カドヘリン経路を介して脳機能に重要な役割を果たすことが示唆される。

キーワード：

1. ニューロンーグリア機能連関
2. アストロサイト
3. Ca²⁺シグナル
4. Pum2
5. N-カドヘリン

文 献

1. Kanemaru K., Okubo Y., Hirose K. and Iino M., 2007, Regulation of neurite growth by spontaneous Ca²⁺ oscillations in astrocytes., *J. Neurosci*

— *MEMO* —

脊髄反射電位に対するアデノシンの作用と

低酸素惹起シナプス伝達抑制への関与

乙黒兼一、山地良彦、伴昌明、和田昌子、高橋巧、太田利男、伊藤茂男
北海道大学 大学院獣医学研究科 薬理学教室

要約：細胞外アデノシンは伝達物質として作用し、様々な細胞がアデノシン受容体を発現していることが分かってきている。中枢神経系では、主に A_1 受容体を介して神経活動に対する抑制性の調節因子として働いていることが報告されている。本研究では、ラット摘出脊髄標本を用い、脊髄反射電位に対する外因性・内因性アデノシンの作用を検討した。アデノシンを適用すると、単シナプス反射電位 (MSR) と侵害受容経路の反応を反映していると考えられる遅発性前根電位 (sVRP) は抑制され、この反応は A_1 受容体拮抗薬で遮断された。sVRPの方がアデノシンに対する感受性が高く、アデノシンが痛覚をより選択的に抑制する可能性が示唆された。脊髄標本を低酸素に曝露すると、細胞外アデノシン濃度が上昇し、脊髄反射電位が速やかに抑制された。このアデノシン濃度の上昇は、細胞内のアデノシンが直接放出された結果と考えられる。しかしながら A_1 受容体拮抗薬によって、低酸素による MSR 抑制は消失したが、sVRP 抑制はほとんど減弱しなかった。低酸素によるアデノシン放出は動物の日齢や外液 Ca^{2+} 濃度に強く影響され、低酸素による MSR 抑制もそれに伴い変化した。sVRP の抑制はそのような条件においても比較的安定して出現した。以上の結果から、急性の低酸素によるシナプス伝達抑制において、アデノシンの関与は神経経路によって大きく異なることが示唆された。

キーワード： アデノシン、脊髄、シナプス伝達、侵害受容経路、低酸素

1. はじめに

近年、伝達物質としてのアデノシンの役割が明らかにされるにつれて、様々な病態の解明や治療法開発においてアデノシンが注目されるようになった。アデノシンは中枢神経系では、抑制性調節因子としてシナプス伝達を抑制することが良く知られており、髄内投与すると鎮痛作用が得られることが動物実験で報告されている。そのため、アデノシン受容体をターゲットとした新規鎮痛薬の可能性も期待されているが、脊髄などの中枢神経系は多様な神経ネットワークで構成されており、多くのニューロンがアデノシン受容体を発現していることが予想されるため、はたしてアデノシンが脊髄の侵害受容経路だけを選択的に抑制しうるのかについては不明瞭な点が多い。また、アデノシンは虚血や低酸素条件下で中枢神経系組織に蓄積することが知られている。低酸素は中枢神経系における神経活動を速やかに抑制し、この抑制にアデノシンが関与しているとの報告がなされているが、その関与の度合いについては一致しておらず、アデノシンの作用が神経経路によって異なることも示唆される。

2. 外因性アデノシンによる脊髄侵害受容経路の抑制

我々は脊髄における異なる神経経路の活動を評価するために、新生ラットから摘出した脊髄標本から、単シナプス反射電位 (MSR) と遅発性前根電位 (sVRP) を測定した。MSR は脊髄反射運動に、sVRP は侵害受容にそれぞれ関与する神経経路の反応と考えられている。アデノシンをこの標本に適用すると、どちらの反射電位も濃度依存性に抑制されたが、とくに sVRP が抑制されやすいことが明

らかとなった。アデノシンキナーゼ阻害剤を適用すると内因性アデノシンが放出されるが、これによっても sVRP がより強く抑制されることが示され、アデノシンは脊髄の侵害受容経路を他の経路と比べてより選択的に抑制する可能性が示唆された。また、ATP の適用によってもアデノシン A₁ 受容体を介した抑制効果がみられたことから、ATP は速やかにアデノシンへ代謝されていると考えられる。

3. 低酸素によるアデノシン放出とシナプス伝達抑制との関係

生後 5-8 日の新生ラットから摘出した脊髄標本を低酸素に 10 分間曝露すると、細胞外アデノシン濃度の上昇が観察された。この時イノシン濃度も上昇したが、ATP や他のアデニンヌクレオチドの濃度に変化は見られず、またアデノシン上昇は細胞外 ATP 代謝酵素の影響も受けなかったため、低酸素によってアデノシンが直接放出されていると考えられる。低酸素によるアデノシン放出は、細胞外 Ca²⁺ 濃度を上昇させると著しく抑制され、また 0-3 日齢のラットから摘出した脊髄ではほとんど観察されなかった。低酸素下では、脊髄反射電位が速やかに抑制され、MSR の抑制は A₁ 受容体拮抗薬でほぼ消失したことから、放出されたアデノシンが A₁ 受容体を介してシナプス伝達を抑制した結果と考えられる。一方、sVRP の抑制は A₁ 受容体拮抗薬でわずかに減弱したのみで、この抑制反応にはアデノシンの関与が低いことが示唆された。これを裏付けるように、低酸素による MSR 抑制はアデノシン放出が見られない条件では生じないにも関わらず、sVRP 抑制は常に観察された。

5. おわりに

複雑な神経ネットワークから構築される中枢神経系では、アデノシンの抑制効果は神経経路によって異なると考えられる。また低酸素による脊髄シナプス伝達抑制には、アデノシン依存性と非依存性のメカニズムが混在し、アデノシン関与の度合いが神経経路によって異なることが、様々な条件下における低酸素の影響が異なる原因の一つとなっている可能性が示唆される。

文 献

1. Takahashi T, Otsuguro K, Ohta T & Ito S (2010) Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats. *Br J Pharmacol*, *in press*.
2. Otsuguro K, Ban M, Ohta T & Ito S (2009) Roles of purines in synaptic modulation evoked by hypercapnia in isolated spinal cord of neonatal rat *in vitro*. *Br J Pharmacol*, **156**, 1167-1177.
3. Otsuguro K, Yamaji Y, Ban M, Ohta T & Ito S (2006) Involvement of adenosine in depression of synaptic transmission during hypercapnia in isolated spinal cord of neonatal rats. *J Physiol*, **574**, 835-847.

ドネペジルのラット網膜虚血・再灌流傷害抑制機序の解析

坂本 謙司, 大木 かよ, 森 麻美, 斉藤 麻希, 中原 努, 石井 邦雄
北里大学薬学部分子薬理学教室

要約: わが国では、高齢化の進行に伴い、緑内障、加齢黄斑変性症、あるいは糖尿病網膜症などの眼疾患に罹患することにより視力障害を来す患者の数が増加しており、大きな社会的問題となりつつある。その中でも緑内障は網膜視神経節細胞が何らかの原因により死滅し、視野の欠落や失明を引き起こす疾患であり、現在、後天性失明原因の第一位である。その原因の1つとしてグルタミン酸神経毒性による視神経細胞死が考えられている。我々は、ラットの神経網膜に対してグルタミン酸神経毒性を引き起こすことができる高眼圧負荷網膜虚血・再灌流モデルなどを用いて、神経保護作用を有する薬物の探索や、視神経細胞死のメカニズムを解明するための研究を行っている。その中で、我々は、アルツハイマー病の治療薬として用いられている中枢性コリンエステラーゼ阻害薬のドネペジルが、網膜虚血・再灌流により惹起される視神経細胞死を抑制することを明らかにした。古典的コリンエステラーゼであるネオスチグミン、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬であるメカミラミン、およびムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬であるスコポラミンを用いた検討により、ドネペジルの神経保護効果の機序は網膜の部位によって異なっており、視神経節細胞においては主にアセチルコリンエステラーゼ阻害以外の作用が、また、内網状層においてはムスカリン性アセチルコリン受容体刺激作用が寄与している可能性が示唆された。本研究の結果はドネペジルが緑内障により惹起される視神経細胞死を抑制する薬物のリードとなる可能性を示している。また、網膜虚血・再灌流傷害の機序が脳虚血・再灌流傷害の機序と類似していることから、ドネペジルは虚血性脳神経障害に対する治療薬のリードともなる可能性がある。これらの知見は高齢化に伴って増加する緑内障や虚血性脳神経障害に対する新たな予防・治療戦略の開発に資するところと大きいと考えられる。

キーワード：網膜、緑内障、神経細胞死、ドネペジル、アセチルコリンエステラーゼ

1. はじめに

通常、高齢者とは65歳以上の人間を指し、全人口に対する高齢者の割合が14%を越える場合を高齢化社会と定義している。わが国では、1980年代後半から少子高齢化が進んでおり、総務省統計局のデータによると、平成22年9月現在で、全人口の23.1%が65歳以上の高齢者である。社会の高齢化に伴い、視力障害を有する中高年者の数が増加しており、大きな社会的問題となりつつある。人間が外界から受け取るさまざまな感覚情報のうち、80~90%は視覚を通じて得ているといわれており、高齢者がquality of lifeを維持し、豊かな老いを迎えるためには、視機能を正常に保つことが重要である。成人の失明の原因となる疾患として、緑内障、糖尿病網膜症、あるいは加齢黄斑変性症などがあるが、これらはいずれも高齢者が罹患することが多い網膜疾患である。近年、我々の研究室では、これらの疾患の新たな予防・治療戦略の探索を大きなテーマとして、研究に取り組んできた。

緑内障は、眼圧の上昇をはじめとする何らかの原因で網膜に存在する視神経細胞が死滅し、視野が欠損していく病気である。現在のところ、一旦死滅した視神経細胞を再生させる方法はなく、緑内障はわが国における後天性失明原因の第1位となっている。緑内障による視神経細胞死にはグルタミン酸神経毒性が関与していると考えられているため、我々はラットの網膜に対してグルタミン酸神経毒性を引き起こすことが知られている網膜虚血・再灌流モデルやNMDA硝子体内投与モデルを用い、神経保護作用を持つ薬物の探索や、視神経細胞死のメカニズムを解明するための研究を行っている。

本シンポジウムでは、最近の我々の成果の一部として、アルツハイマー病の治療薬として用いられている中枢性コリンエステラーゼ阻害薬のドネペジルが、網膜虚血・再灌流により惹起される視神経細胞死を抑制すること、ならびにその機序について検討した結果を紹介する。

2. ドネペジルの網膜虚血・再灌流傷害抑制効果

SD系雄性ラット（7～9週齢）をペントバルビタール（50 mg/kg, i.p.）で麻酔し、片眼に130 mmHgの高眼圧を負荷して60分間の網膜虚血を負荷した。7日後に両眼を摘出して固定し、組織学的評価のために、視神経を通る厚さ5 μ mの網膜の水平切片を作成し、HE染色を行った。視神経節細胞層では500 μ m当たりの細胞の数を、内網状層、内顆粒層および外顆粒層では層の厚さを、同一個体の無処置眼との百分率比で算出した。薬物は網膜虚血の15分前に静脈内投与した。

網膜虚血・再灌流により視神経節細胞数は約20%、内網状層厚は約30%、内顆粒層厚は約70%に減少したが、外網状層厚ならびに外顆粒層厚は変化しなかった。1 mg/kg ドネペジル投与群においては、保護作用は認められなかったが、3 mg/kg ドネペジル投与群においては、視神経節細胞数や内網状層厚ならびに内顆粒層厚の減少が有意に抑制された。

従って、ドネペジルは、網膜虚血・再灌流により惹起される視神経細胞死を抑制することが示された。

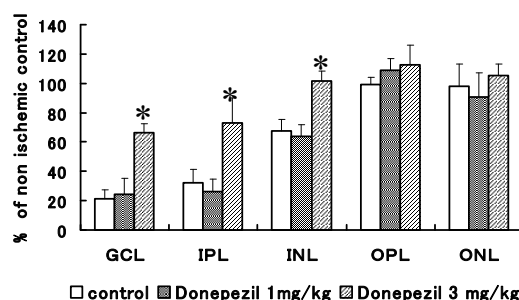


Fig. 1 Effect of Donepezil (1 and 3 mg/kg) on ischemia-reperfusion injury in the rat retina. The number of the cells in the GCL and the thickness of the IPL, INL, OPL and ONL after ischemia-reperfusion are shown as a percentage of that of the non-ischemic eye. Each datum represents as mean \pm SEM of three or four independent experiments. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer. (* P < 0.05 vs. control)

3. ドネペジルの網膜虚血・再灌流傷害抑制機序の解析

上項で明らかとなったドネペジルの網膜虚血・再灌流傷害抑制機序を検討するため、ドネペジル（1および100 μ M）とネオスチグミン（10および100 μ M）の網膜虚血・再灌流傷害に対する影響を検討した。また、スコポラミン（1および3 μ M）およびメカミラミン（10および100 μ M）がドネペジルやネオスチグミンの作用に与える影響についても検討した。薬物処置は薬液を5 μ L硝子体内に投与することにより行い、2種類の薬物を処置する場合は薬物の混液を用いた。薬物の硝子体内投与15分後に上項と同様の方法で網膜虚血・再灌流を負荷した。

10 μ M donepezil投与群においては、視神経節細胞数、内網状層厚ならびに内顆粒層厚の減少が抑制されたが、100 μ M neostigmine投与群においては、視神経節細胞数の減少は抑制されず、内網状層厚ならびに内顆粒層厚の減少のみが認められた。また、メカミラミンの同時投与はドネペジルの保護効果を抑制しなかったが、スコポラミンの同時投与はドネペジルの内網状層における保護効果を抑制した。ネオスチグミンの内網状層における保護効果もスコポラミンの同時投与によって消失した。

従って、ドネペジルの神経保護効果の機序は網膜の部位によって異なっており、視神経節細胞や内顆粒層においては主にアセチルコリンエステラーゼ阻害以外の作用が、内網状層においてはムスカリン性アセチルコリン受容体刺激作用が寄与している可能性が示唆された。

4. おわりに

高齢者のquality of lifeを保つためには、視機能の保持が重要である。我々は、現在も実験系に改良を加えながら、視機能に影響する眼疾患の予防・治療をテーマとして研究を続けている。本シンポジウムで紹介した我々の研究成果が、緑内障の新規発症予防ならびに治療法の開発につながることを期待する。その結果、将来的に緑内障患者の視機能がより長い期間良好に保つことができるようになれば幸いである。

文 献

1. Sakamoto K, Ohki K, Saito M, Nakahara T, Ishii K. Histological protection by donepezil against neurodegeneration induced by ischemia-reperfusion in the rat retina. J Pharmacol Sci. 112(3): 327-335, 2010.

一過性脳虚血モデルラットの異常行動と人工酸素運搬体

山口 拓¹⁾、濱舘直文¹⁾、掛端 仁¹⁾、富樫廣子^{1,2)}、泉 剛¹⁾、吉田隆行¹⁾、吉岡充弘¹⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科神経薬理学分野

2) 北海道医療大学薬学部薬理学講座病態生理

要約：本研究は一過性脳虚血モデルラットにおける脳機能障害としての行動変容を探索し、その脳機能障害に対するナノカプセル型人工酸素運搬体(LEH)の効果を検討した。一過性脳虚血(脳虚血再灌流)モデルラットには、両側総頸動脈を閉塞した 2-血管閉塞(2VO)ならびに 2VO の処置に加えて両側椎骨動脈を永久閉塞した 4-血管閉塞 (4VO)モデルを用いて評価した。2VO モデルラットは高架式十字迷路試験において不安惹起行動が認められ、この行動変容は脳虚血中に投与した LEH によって改善された。また、2VO によって海馬内組織酸素分圧(PtO₂)は低下したが、LEH によってその PtO₂の低下は抑制された。これらのことから、2VO による不安惹起行動に対する LEH の改善機序のひとつとして、2VO による脳血流の低下状態に LEH の投与による側副血行路を介した酸素供給が図られたことが推察される。一方、4VO モデルラットは文脈的恐怖条件付け試験において長期記憶障害が認められ、この行動変容も LEH によって改善された。さらに文脈的恐怖条件付け試験後の海馬 CA1 領域におけるリン酸化 cAMP response element binding protein (CREB)の発現は減少しており、この変化は LEH の投与によって有意に改善作用が認められた。また、海馬内 PtO₂において LEH は脳虚血中の著明な PtO₂の低下に対して変化を示さなかったが、脳虚血後に観察された過酸素状態に対して有意な抑制効果が認められた。これらのことから、4VO による長期記憶障害ならびに海馬におけるリン酸化 CREB の発現減少に対する LEH の改善作用は、LEH が脳虚血直後に認められる海馬内の過酸素状態を正常化することによって発現することが示唆された。以上の研究成果から、2VO による不安惹起行動および 4VO による長期記憶障害に対する LEH の脳保護効果が明らかとなった。さらに、LEH は脳虚血性疾患に対する酸素治療という臨床応用ならびに急性脳梗塞の治療薬としての可能性が期待された。

キーワード： 一過性脳虚血、脳機能障害、不安惹起行動、長期記憶障害、人工酸素運搬体

1. はじめに

脳には海馬 CA1 領域や大脳皮質の錐体細胞など、虚血に対して脆弱な神経細胞群が存在することが知られている。脳虚血障害やその修復機構に関する多くの研究は、これら海馬 CA1 領域における遅発性神経細胞死を指標として行われてきた。しかしながら、脳血流の低下が軽度で神経細胞死がみられない場合でも、神経細胞の機能障害が認められることが知られている。一方、医療の高度化に伴い輸血医療の重要性が増す一方、急速な少子化・高齢化を背景とする献血人口の減少により、輸血用血液製剤の需給バランスの悪化が懸念されている。また、輸血時のウィルス感染の回避や大規模災害時等、緊急時の輸血対応を目的として、クロスマッチの必要がなく、長期保存が可能な輸血用血液製剤が求められている。このような社会的要求を背景として、人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin: LEH)の開発が進められてきた¹⁾。我々は、一過性脳虚血モデルラットに認められる脳機能障害である情動機能障害ならびに認知機能障害に対して改善作用が認められることを報告した²⁻³⁾。このように、LEH の可能性は、単なる輸血代替物にとどまらず、虚血性疾患における“酸素治療”といった新たな臨床応用へと展開されつつある。本研究では、上述した一過性脳虚血モデルラットに認められる脳機能障害に対する LEH の効果について検討した研究成果を概説する。

2. 人工酸素運搬体

人工酸素運搬体 (LEH, TRM-645, テルモ株式会社)はリポソーム化ヘモグロビン(p50 = 35.9 mmHg、製剤中ヘモグロビン濃度:6%)であるナノカプセル型 LEH である。径は 200nm で赤血球の

1/30～1/40であるため、赤血球が通過できない箇所においても酸素供給が可能となる。さらに抗原性を排除しているため、血液型に依存しない有用性が確認されている。

3. 2-血管閉塞モデルラットが示す情動機能障害に対する人工酸素運搬体の効果

本研究では一過性脳虚血モデルとして両側総頸動脈を 10 分間閉塞後に再灌流した 2-血管閉塞 (2VO)モデルラットを用いて評価した。両側総頸動脈閉塞直後に LEH あるいは生理食塩水 (対照群) を経尾静脈的に投与した。脳虚血 4 日後に実施した暗条件下の高架式十字迷路試験において、不安惹起行動 (オープンアーム滞在時間の減少) と考えられる行動変容が観察された。この 2VO 群に認められた不安惹起行動は、LEH によって改善効果が認められた。一方、2VO 群における脳血行動態を検討したところ、前頭皮質血流量は、両側頸動脈の閉塞によって低下したが、閉塞解除後は一時的な過灌流状態を示した。この虚血中の血流低下あるいは再開通後の過灌流状態に対して LEH は影響がなかった。さらに、海馬内組織酸素分圧を検討したところ、2VO によって海馬における酸素分圧は低下したが、LEH によってその酸素分圧の低下は抑制された。これらのことから、2VO による不安惹起行動に対する LEH の改善機序のひとつとして、2VO による脳血流の低下状態に LEH を投与したことによる側副血行路を介した酸素供給が図られたことが推察される。

4. 4-血管閉塞モデルラットが示す認知機能障害に対する人工酸素運搬体の効果

本研究では一過性脳虚血モデルとして上述の 2VO の処置に加えて両側椎骨動脈を永久焼灼によって閉塞した 4-血管閉塞 (4-vessel occlusion: 4VO)モデルラットを用いて評価した。両側総頸動脈閉塞直後に LEH あるいは生理食塩水 (対照群) を経尾静脈的に投与し、30 分後に再灌流した。脳虚血 11 日後に実施した文脈の恐怖条件付け (CFC) 試験において長期記憶障害 (すくみ行動の発現低下) と考えられる行動変容が観察された。この 4VO 群に認められた記憶障害は、LEH によって改善効果が認められた。一方、免疫組織科学的検討において CFC 試験後の海馬 CA1 領域におけるリン酸化 cAMP response element binding protein (CREB) の発現は偽手術投与群と比較して有意に減少しており、この変化は LEH の投与によって有意に改善作用が認められた。以上の結果から、4VO によって生じた長期記憶障害に対する LEH の改善作用は、脳虚血による海馬 CA1 領域におけるリン酸化 CREB の発現減少に対する LEH の抑制効果と密接な関連性があることが考えられた。また、海馬血流量において虚血中の著明な低下に対して LEH による変化はなかった。しかしながら海馬内組織酸素分圧において LEH は虚血中の著明な酸素分圧の低下に対して変化を示さなかったが、虚血後に観察された過酸素状態に対して有意な抑制効果が認められた。これらのことから、4VO による長期記憶障害に対する LEH の改善作用は、LEH が虚血直後に認められる海馬内の過酸素状態を正常化することによって発現することが示唆された。

5. おわりに

以上の研究成果から、2VO による不安惹起行動および 4VO による記憶障害に対する LEH の改善効果 (脳保護効果) が明らかとなった。また、LEH は代替輸血用 LEH の有望な候補としてのみならず、LEH の脳虚血性疾患に対する酸素治療という臨床応用ならびに急性脳梗塞の治療薬としての可能性が期待された。

文 献

- 1) Kaneda S, Ishizuka T, Goto H, et al.. Liposome-Encapsulated Hemoglobin, TRM-645: Current status of the development and important issues for clinical application. *Artif. Organs.*, 33: 146-152 (2009)
- 2) Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, et al.: Therapeutic potentials of an artificial oxygen-carrier, liposome-encapsulated hemoglobin, for ischemia/reperfusion-induced cerebral dysfunction in rats., *J Pharmacol Sci.*, in press
- 3) Hamadate N, Yamaguchi T, Sugawara A, et al.: Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates impairment of fear memory and hippocampal dysfunction after cerebral ischemia in rats., *J. Pharmacol Sci.*, in press

薬剤誘導による脳虚血耐性機構

福永浩司、塩田倫史

東北大学大学院薬学研究科 薬理学分野

要約：脳梗塞急性期治療においては、ラジカルスカベンジャーと血栓溶解剤の適応により脳梗塞は致死的な脳疾患ではなくなった。しかし、運動麻痺、言語障害、認知機能低下など高次脳機能障害が残るために、脳梗塞の予後は極めて悪い。短時間・繰返しの軽度な脳梗塞が、重度の脳梗塞に伴う遅発性神経細胞死を抑制することは虚血耐性現象として知られているが、臨床応用は不可能である。私達は虚血耐性を誘導する短時間脳虚血後に神経細胞においてプロテインキナーゼ B (Akt) が活性化されることを見出した。Akt の活性化反応は hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) の誘導を介して虚血耐性遺伝子を誘導することが知られている。私達は Akt の活性化剤である VO(OPT):bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) の末梢投与が、虚血耐性を誘導することを見出した。同時に HIF-1 α によって誘導される VEGF などの血管再生因子が上昇することを確認した。さらに、脳虚血により低下する海馬血流量を部分的に改善することも確認した。本研究では VO(OPT) の脳虚血に伴う神経血管ユニットの再生と虚血耐性メカニズムについて考察する。

キーワード： 脳梗塞、遅発性神経細胞死、虚血耐性、 Akt、 VEGF

1. はじめに

砂ネズミの両総頸動脈閉塞モデルにおいて 2 分間の短時間虚血 (preconditioning) を施した 3 日後に 10 分間の致死的な脳虚血を与えても海馬では遅発性神経細胞死は見られない。Preconditioning の 3 日目から Akt 活性が上昇して少なくとも 1 週間活性化が持続することを見いだした(1)。PI3K/Akt の阻害剤である wortmannin を脳室内に前投与して preconditioning を行ったところ、Akt の活性化反応は抑制され、同時に虚血耐性も消失した。さらに、砂ネズミの preconditioning の条件で内皮細胞型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が血管で誘導されることが解った。Wortmannin を用いた実験から eNOS の誘導にも PI3K/Akt 経路に関わることが示された(2)。

一方、VO(OPT) はチロシンホスファターゼ 2B を阻害することにより、インスリン受容体などチロシンキナーゼ型受容体を活性化する (図 1A)。血糖降下作用が強く、糖尿病治療薬としての応用が期待されている。私達は VO(OPT) がチロシンキナーゼ系を活性化して PI3K/Akt を活性化することに注目した。

2. VO(OPT) の脳虚血における神経保護と脳血管再生作用

既報の方法に従い C57BL/6N マウスの中大脳動脈閉塞モデルを作製した(3)。虚血 90 分間施行し、再灌流した。再灌流 20 分前と 30 分後に 2 回に分けて、VO(OPT) (1, 2.5, 5.0 mg/kg) を腹腔内投与した。用量依存性に脳梗塞領域の縮小効果が認められた(3) (図 1B)。再灌流後 30 分、90 分の 2 回投与においても有意な脳梗塞領域縮小効果認められた。私達は以前、砂ねずみ両総頸動脈閉塞において、神経細胞内 Akt 活性が低下することを報告した。本実験の中大脳動脈閉塞マウスのペナンプラ領域においても Akt の活性化に必須の Ser-473 のリン酸化が虚血群で低下した (図 3C)。VO(OPT) の投与は Akt の不活性化を完全に抑制し、Akt の基質である 3 種類のフォークヘッド転

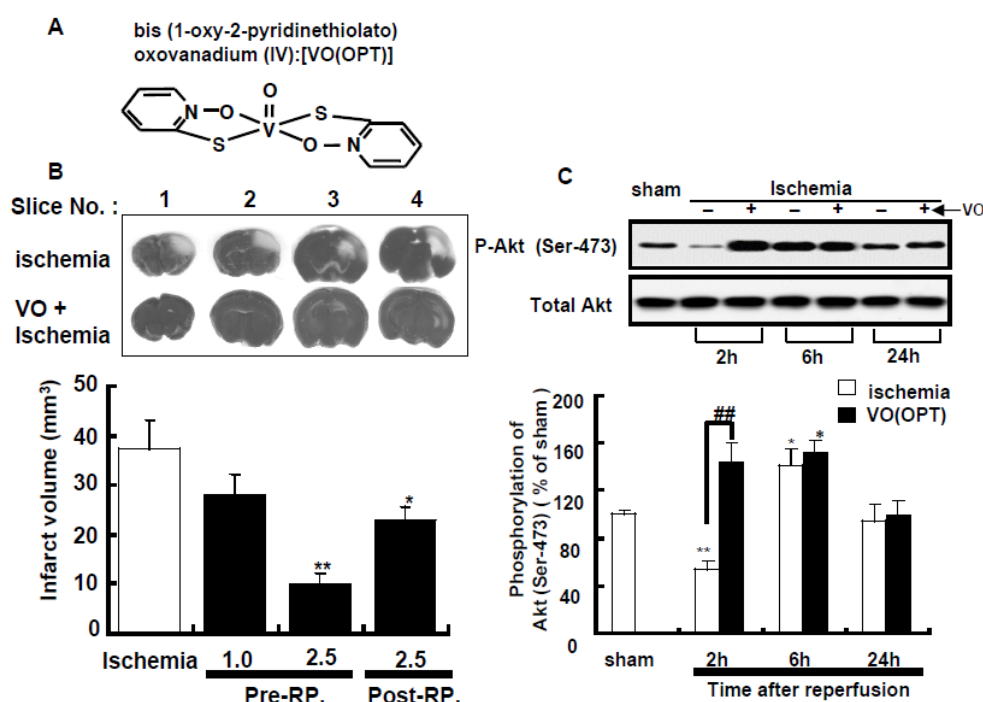


図1. VO(OPT) 投与による脳梗塞領域縮小効果と Akt(Ser-473) の脱リン酸化反応の抑制

写因子 (FKHR, FKHL1, AFX) の脱リン酸化反応を完全に阻害した。フォークヘッド転写因子は脱リン酸化されると核内移行して、アポトーシス因子である Bim と Fas-ligand を誘導する。実際に、本実験においても VO(OPT) は Akt を活性化してフォークヘッド転写因子の脱リン酸化反応を阻害して、Bim と Fas-ligand の誘導を抑制した。

次に、PI3K/Akt の活性化剤である VO(OPT) の前投与により、虚血耐性が誘導できるのか、ラット4血管閉塞モデルで検討した。VO(OPT) 0.5-5 mg/kg を腹腔内投与して3日後に10分間の両総頸動脈閉塞を行った。虚血後7日目に還流固定して、海馬CA1領域の遅発性細胞死を評価すると、用量依存性に神経細胞死は有意に抑制された。レーザー血流計で海馬の血流量を測定すると2-7日目において低下する海馬血流量がVO(OPT)投与で部分的に改善した。

3. おわりに

本研究ではげっ歯類を用いて虚血耐性機構にPI3K/Aktの活性化が重要であること、そのメカニズムとしてeNOSの誘導が関わることを明らかにした。私達はVO(OPT)投与により形成される虚血耐性では海馬微小血管の再生が関与することも確認した。しかし、eNOSの誘導が血管再生に関与するか不明である。脳梗塞慢性期では血管や神経細胞の再生を促進する薬剤が有効であると考えられる。VO(OPT)は血管のみならず海馬神経新生を促進すること(4)を考えると脳梗塞慢性期治療薬のシーズとして期待できる。

文 献

1. Yano S et al (2001) *J Cereb Blood Flow Metab* 21:351-360.
2. Hashiguchi A et al (2004) *J Cereb Blood Flow Metab* 24:271-279.
3. Shioda N et al (2007) *Neuroscience* 148:221-229.
4. Shioda N et al (2008) *Neuroscience* 155:876-887.

アルドステロン誘発心臓リモデリングにおける NCX1 輸送体の役割

伊豫田 拓也¹、喜多 紗斗美¹、山本 信太郎¹、小室 一成²、西山 成³、岩本 隆宏¹

¹ 福岡大学・医学部・薬理学

² 大阪大学・院・医学系研究科・循環器内科学

³ 香川大学・医学部・薬理学

要約：近年アルドステロンの心臓に対する作用が注目されている。その分子機序については、これまでにレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)の活性化や活性酸素産生の関与が報告されているものの、未だに不明な点が多い。今回、我々は1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)遺伝子改変マウスおよびNCX阻害薬を用い、アルドステロンの長期投与により誘導される心肥大、心筋線維化および心機能障害において、心筋NCX1が重要な役割を果たしていることを明らかにした。この心臓リモデリングの機序には、冠血管周囲の活性酸素産生およびRAAS系の賦活化が関与しているものと考えられ、その上流にNCX1を介した Ca^{2+} シグナルが位置すると考えられた。既にNCXについては特異的な阻害薬が開発されており、この薬剤には新しい心疾患治療薬となる可能性が期待される。

キーワード：アルドステロン、心臓リモデリング、NCX、 Ca^{2+} シグナル、活性酸素

1. はじめに

アルドステロンはレニン・アンジオテンシン系の下流に位置する電解質調節ホルモンであり、その過剰産生は低カリウム血症を伴う高血圧症(原発性アルドステロン症)を引き起こす。これまで、アルドステロンの主たる作用は、腎臓尿細管上皮における Na^+ 再吸収を介した循環血漿量の増加による血圧上昇であると考えられてきた。しかし近年、慢性心不全患者における抗アルドステロン薬の有効性が報告されて以来¹⁾、アルドステロンの心臓や血管に対する治療効果に関心がもたれている。さらに、原発性アルドステロン症の患者に心血管系の合併症が多く報告されることや²⁾、単にレニン・アンジオテンシン系の最終産物であると考えられてきたアルドステロンがアンジオテンシン変換酵素やアンジオテンシン受容体の発現を制御することなどが報告されたことから³⁾、現在では心臓リモデリング、心臓線維化、心臓・血管機能障害、血管肥厚など種々の心血管病におけるアルドステロンの役割が注目されている。これらアルドステロンの心血管障害作用は、アルドステロンの腎臓上皮組織への作用を介さない、心血管系への直接作用によるものであると考えられているが⁴⁾、詳細な分子機序については未だ不明な点が数多く残されており、その解明が期待されている。

2. 心臓に対するアルドステロンの作用と NCX1

我々はこれまでに、NCX1遺伝子改変マウスや特異的NCX阻害薬を用いた研究から、NCX1が心臓や腎臓の虚血再灌流障害および食塩感受性高血圧の発症に密接に関与することを報告してきた^{5, 6)}。そこで今回はアルドステロンを長期投与した際に誘導される心臓リモデリングに着目し、この病態におけるNCX1輸送体の役割について検討した。

4週間にわたるアルドステロンの投与($0.3\mu\text{g/hr}$, + 1% NaCl 飲水)は、野生型及び心臓特異的NCX1.1高発現マウスにおいて心肥大を誘導し、同時に心機能の低下も認めた。しかしNCX1ヘテロノックアウトマウスにおいてはこれらの症状は誘導されなかった。この結果は、アルドステロン誘導性の心肥大および心機能障害にNCX1が深く関与することを示唆している。アルドステロン処置に伴う血圧上昇や腎肥大はいずれのマウス群においても同程度に認められることから、今回観察された心肥大および心機能障害は、血圧上昇や腎障害に付随した二次的な影響ではないと考えられた。

アルドステロンの心臓に対する直接作用は、未だ議論の中にある。心筋にはアルドステロン受容体として働く MR が発現しているが、MR はアルドステロンだけでなくコルチゾールとも結合することが知られ、通常生理的な条件下では、アルドステロンよりも圧倒的に高濃度で存在するコルチゾールが心筋の MR に結合していると考えられている。ところが種々の臨床研究において、アルドステロンブロッカーが心臓リモデリングを改善する結果が報告され、病的状態にある心臓においては、何らかの機構によりアルドステロンシグナルが保持されている可能性がある。今回我々は、アルドステロンの長期投与により、心臓における MR 遺伝子発現が (NCX1 依存的に) 増大することを観察した。これは上記の仮説を支持する機序の一つと考えられる。またこの MR 発現と同様、アルドステロン長期投与は ACE や NHE1、gp91^{phox} の発現を、ともに NCX1 機能に依存する形で誘導することが、今回明らかとなった。これまでに、gp91^{phox} の遺伝子欠損がアルドステロン誘導性の心臓線維化を軽減することが報告されている。また、培養腎糸球体メサンギウム細胞においても、アルドステロンが NADPH オキシダーゼ (p47^{phox}、p67^{phox}) の活性化を介して、活性酸素産生を引き起こすことが報告されている。一方、アンジオテンシン II が酸化ストレスを誘導し、心不全の発症に密接に関わることは広く知られている。今回我々は、アルドステロンが誘導する心活性酸素酸性が NCX1 依存的であり、さらに心臓への炎症細胞の浸潤も同様に NCX1 依存的であることを見出した。これらの結果より、アルドステロンは NCX1 を介して RAAS 系を賦活化し、その結果として活性酸素産生や炎症応答を亢進させるものと推測される。また NHE1 についてもこれまでに、心肥大への関与を示唆する報告がいくつもされている。アルドステロン刺激に伴う NHE1 の発現上昇は、細胞内 Na⁺ の上昇を引き起こすと考えられる。この Na⁺ を駆動力として、NCX1 を介した Na⁺排出・Ca²⁺流入が誘導されることでさらなる心肥大シグナルの誘導をきたし、病態の悪化に寄与している可能性がある。

4. おわりに

近年、エプレレノンやスピロラクトンなどの MR アンタゴニストが示す心保護効果に注目が集まっている。しかしながら、これらの薬剤は血中カリウム濃度を上昇させることも広く知られている。心不全患者において高カリウム血症は大きなリスクとなることから、MR アンタゴニストの臨床応用は適用患者が制限される (中等度以上の腎機能障害のある患者には禁忌)。本研究において、我々は、アルドステロンによって誘導される心臓リモデリングの機序に、心筋 NCX1 を介するシグナルが深く関与することを明らかにした。実際、NCX 阻害薬の投与がアルドステロン誘導性の心障害に対して保護的に作用する結果も得ている (論文未発表)。このように NCX1 輸送体は、心臓リモデリングを抑制する新しい創薬標的になる可能性があると考えられる。

文献

- 1) Pitt B *et al.* Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 348:1309-1321, 2003.
- 2) Tanabe A *et al.* Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res.* 20:85-90, 1997.
- 3) Azuma Y *et al.* Aldosterone augments angiotensin converting enzyme gene expression in cultured cardiac fibroblasts. *慈恵医大誌.* 121:133-140, 2006.
- 4) Brilla CG *et al.* Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 67:1355-1364, 1990.
- 5) Iwamoto T *et al.* Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca²⁺ entry via Na⁺/Ca²⁺ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med.* 10:1193-1199, 2004.
- 6) Iwamoto T *et al.* Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 7:188-198, 2007.

AZT/Tmpk を用いた心筋症モデル：細胞運命制御遺伝子治療法の応用

柳澤輝行、助川 淳、佐藤岳哉

東北大学大学院 医学系研究科 分子薬理学分野

要約:細胞運命制御遺伝子治療法の研究過程で得られた tmpk の酵素活性亢進変異体を用いて研究し、AZT 誘発性ニューロパシーやミオパシーの機序にアポトーシスがあることを報告してきた。アポトーシスの機序には AZT 三リン酸の蓄積、ミトコンドリア内膜呼吸鎖複合体障害、活性酸素分子種産生亢進、カスパーゼ 3 活性化誘導の一連の分子機序が存在することが明らかになった。我々の AZT/Tmpk 系を用いることにより AZT 誘発性ミトコンドリオパシーの機構をスピードアップして発生させることが可能で、本細胞モデルは心筋症のよい中間体モデルとなると考える。

キーワード: 細胞運命制御遺伝子治療法（自殺遺伝子治療法）、チミジル酸キナーゼ活性亢進変異体、アジドチミジン、ミトコンドリオパシー、ミオパシー

1. はじめに

遺伝子治療や iPS 細胞などによる再生医療は多くの疾患に対する新規かつ有効な治療法として注目されているが、遺伝子導入細胞の異常増殖が常に問題となる。遺伝子導入細胞の増殖を制御する安全装置としての細胞運命制御遺伝子治療法: cell fate control gene therapy（自殺遺伝子治療法: suicide gene therapy）が重要である（図 1）。

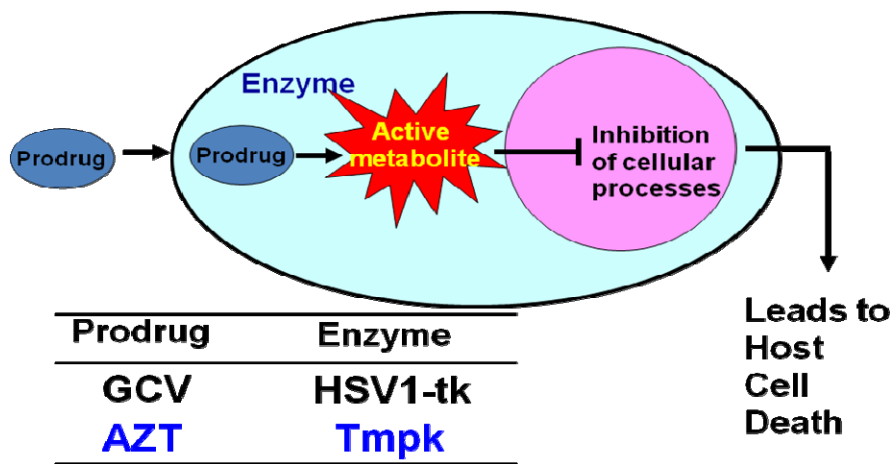
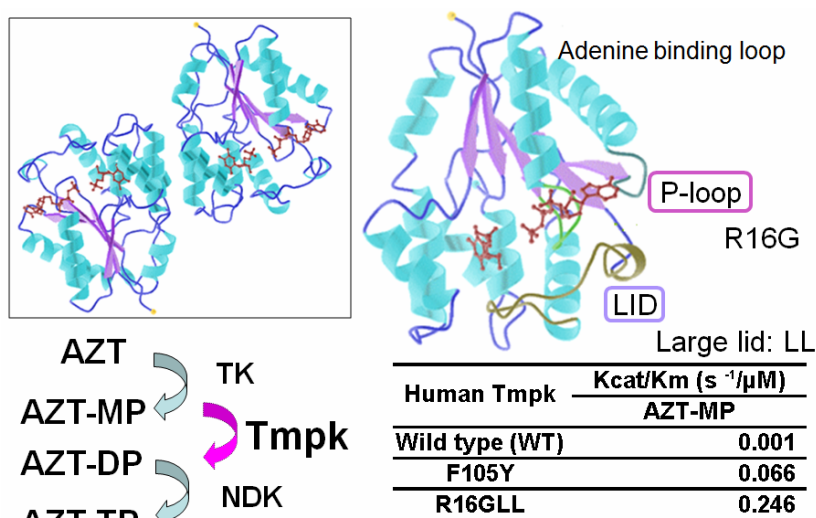


図 1. Cell fate control gene therapy. The combination of prodrug and enzyme.

細胞運命制御遺伝子治療法は、不活性なプロドラッグとそれを活性化する代謝酵素を組み合わせる方法であり、この酵素により活性化された薬物は遺伝子導入細胞に対してのみ細胞毒性を示すため、遺伝子導入細胞の異常増殖が起きた際には、プロドラッグを患者に投与することでこの細胞を選択的に患者体内から除去するものである。抗ヒト免疫不全ウイルス（HIV）薬であるアジドチミジン（AZT）とヒト由来の代謝酵素遺伝子であるチミジル酸キナーゼ（thymidylate monophosphate kinase: Tmpk）の組み合わせによる新規遺伝子治療法を確立してきた（図 2）。

2. AZT による細胞死のメカニズムの追究と心筋症モデルへの応用

AZT の使用は一方で重篤なミトコンドリオパシーによるニューロパチーやミオパチーを誘発する



R. Brundiers et al. *J. Biol. Chem.* 1999 ;274:35289-92.

図 2. Crystal structure of human tmpk (dimer) and the activities of its mutants.

ことが知られおり、その分子機構にアポトーシス誘導が関与していることを報告した。さらに、tmpk の酵素活性を亢進させた変異体を用いてAZTTPが中間代謝物のAZT一リン酸(AZTMP)よりもカスパーゼ3の活性化を強く誘導することを既に報告し、Tmpkの酵素活性を亢進させた変異体をレンチウィルスベクターを用いて心筋細胞に発現させて心筋症のモデルとすること考えて研究してきた。なお、AZTは、3段階のリン酸化カスケード反応により活性化体であるAZT三リン酸(AZTTP)となる。この反応の2段階目に関与する酵素、Tmpkがこの反応の律速であるため、通常の細胞系ではAZTTPの蓄積は僅かであり、AZTTPの細胞に対する影響はこれまで十分に研究されていなかった。

3. AZTTP 蓄積によるアポトーシス誘導の分子機構

Tmpk 変異体を発現する細胞では AZT 処理により ATP が時間依存的に減少したが、対照群ではそれは見られなかった。ATP 産生は、ミトコンドリア内膜を介する電気化学的プロトンイオン濃度勾配形成に依存する。AZT 処理後に ATP 減少が観察された理由として AZT 代謝物蓄積によりミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体(ETC)が障害され、その結果として ETC からの活性酸素分子種(ROS)産生が亢進したと考えた。AZT 代謝物蓄積による ROS 産生亢進について DCFDA を用いて確認したところ、Tmpk 変異体を発現する細胞においてのみ、AZT 処理による ROS 産生亢進が認められた。これらの結果は、AZT によるミトコンドリア機能障害の原因として AZTTP がミトコンドリア内膜の ETC を障害し、その結果として ROS 産生亢進をもたらし、ミトコンドリア機能障害を誘発していることを示すものである。

4. おわりに

我々の AZT/Tmpk の実験系は野生型に比べて 250 倍もの活性をもち、これまで AZT 慢性使用の副作用としてしか認識されてこなかったニューロパシーやミオパシーの基となるミトコンドリオパシーの分子機序を明らかにした。AZT/Tmpk 系を用いることにより AZT 誘発性ミトコンドリオパシーの機構をスピードアップして発生させることが可能で、種々の薬物によるミトコンドリオパシーの予防・治療効果を検証できることから、本細胞モデルは心筋症のよい中間体モデルとなると考える。

文 献

Sato T *et al.*: Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. *Mol. Ther.* 2007;15:962-70.

Sato T *et al.*: Vascular endothelial growth factor broadens lentivector distribution in the heart after neonatal injection. *J. Cardiol.*2009;54:245-54.

レスベラトロールによる筋ジストロフィーの治療

堀 佑輔、久野 篤史、細田 隆介、丹野 雅也、堀尾 嘉幸

札幌医科大学医学部薬理学講座

要約: SIRT1 を活性化するレスベラトロールは遺伝性心不全を起こす TO-2 ハムスターの心肥大や心機能の低下を抑制し、寿命を有意に延長する(Tanno *et al*, JBC 2010)。TO-2 ハムスターの心不全は δ サルコグリカンの遺伝子変異が原因であり、サルコグリカンはジストロフィンと複合体を形成する。レスベラトロールがジストロフィンの異常によって起きる Duchenne 型筋ジストロフィーに対して治療効果を持つか検討した。Duchenne 型筋ジストロフィーモデルの mdx マウスにレスベラトロールを飼料に混合し生後 9 週から 32 週間経口投与したところ、骨格筋および心筋の線維化が有意に抑制され、phalloidin の染色により定量した骨格筋量の低下は有意に抑制された。Duchenne 型筋ジストロフィーでは心筋の異常も出現しその死因として心不全が重要であるが、心エコーで測定した心機能はレスベラトロール投与により改善し、心肥大も抑制された。一方、筋の崩壊をあらわす血中のクレアチンキナーゼの量はレスベラトロール投与によっても低下せず、筋の変性や壊死はレスベラトロールによって抑制されない可能性が考えられた。ヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと異なり mdx マウスの寿命は正常でより詳細な検討が必要であるが、レスベラトロールは Duchenne 型筋ジストロフィーに対してある程度の治療効果を持つことが判明した。

キーワード: レスベラトロール、サーチュイン、筋ジストロフィー、線維化、心不全

1. はじめに

レスベラトロールは、ブドウの果皮や赤ワインに含まれるポリフェノールの一種であり、赤ワインの消費量が多いほど虚血性心疾患の発生が減少するという現象（フレンチパラドックス）をおこす原因物質ではないかと言われている。レスベラトロールは NAD⁺依存性蛋白質脱アセチル化酵素の 1 つ SIRT1 を活性化する。SIRT1 は酵母などで過剰発現をおこなうと寿命を延ばす作用を持つ Sir2（いわゆる長寿遺伝子）のホモログの 1 つで、ヒストン H3, H4 の N 末端部分の脱アセチル化をおこないクロマチンの構造変化に関与する他、いろいろな転写因子や転写のコファクターなどを脱アセチル化して細胞の増殖や分化、細胞死、糖質や脂質の代謝、炎症、血管形成など様々な生理的機能に関与し、各種の病態にも関連することが我々の研究を含めて明らかとなりつつある(1-7)。

筋ジストロフィーは主にジストロフィンやジストロフィンに結合する蛋白質の変異により起きる遺伝性の筋肉変性疾患であり、筋肉は変性、壊死と再生を繰り返しながら、次第に萎縮と筋力低下が進行していく。様々な病型が存在するが、現在のところ根本的治療法がなく、病型によっては生命予後が良好ではないものも存在する。我々は SIRT1 活性化薬のレスベラトロールが遺伝的心不全をおこす TO-2 ハムスターの寿命を有意に伸ばすことを明らかとした(5)。TO-2 ハムスターは δ サルコグリカンの遺伝子異常が原因で心筋の炎症、壊死がおき、次第に心肥大と心不全を起こす。サルコグリカンはジストロフィンと複合体を形成することから、レスベラトロールがジストロフィンの変異を持つ Duchenne 型筋ジストロフィーモデルマウス mdx に対して有効かその効果を調べた。

2. 方法

アンチマイシン A（ミトコンドリア呼吸鎖 complexIII の阻害薬）を筋芽細胞の C2C12 細胞に作用さ

せておきる酸化ストレスによる細胞死を核の凝集もしくは TUNEL 染色法で測定した。レスベラトロールはマウスに生後 9 週から 32 週間連続で経口投与 (4g/kg 飼料) した。酸化ストレスレベルは 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) 蛍光もしくはニトロチロシンおよび 8-hydroxy guanine 量で測定した。組織の線維化は抗体および定量 RT-PCR 法を用いてフィブロネクチン、コラーゲンの発現量で測定した。アクチンは蛍光ラベルした phalloidin を用いて染色した。心臓機能はエコーで測定した。

3. 結果

C2C12 細胞において SIRT1 の発現は酸化ストレスによる細胞死を抑制した。レスベラトロールは SIRT1 依存性に酸化ストレス量を減少させ、MnSOD の発現量を増加させ有意に細胞死を抑制した。MnSOD-siRNA によりレスベラトロールによる酸化ストレス低下作用と細胞死抑制作用は消失した。

mdx マウス骨格筋ではニトロチロシンおよび 8-hydroxy guanine 量で測定した酸化ストレスが上昇しており、レスベラトロールを投与するとこれらの上昇は抑制された。また、レスベラトロールは骨格筋の減少を抑制し、フィブロネクチンやコラーゲンの発現も有意に抑制した。mdx マウスでは心肥大が出現し、心筋においても線維化が進行する。レスベラトロールの投与により心肥大は抑制され、心室拡張障害が有意に抑制された。また、レスベラトロールは心筋においても線維化を抑制した。組織の線維化を促進する因子として転写コアクチベータで蛋白質アセチル化酵素 p300 がある。心筋において p300 の発現量は未治療 mdx マウスで増加し、レスベラトロール投与により減少した。骨格筋においてはレスベラトロールを投与しても MnSOD の発現量には変化がなく、さらに、血清中のクレアチンキナーゼの量はレスベラトロールによる治療によっても低下しなかった。

4. 考察

レスベラトロールには Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウス mdx の骨格筋の筋量を保存し、筋の線維化を有意に抑制し、心筋機能の低下を抑制する作用があった。この作用の一部には p300 のレスベラトロールによる抑制が関与することが考えられた。しかし、筋細胞においては MnSOD 誘導は見られず、筋の崩壊と壊死には変化をもたらさないことから、心筋と骨格筋ではレスベラトロールの作用が異なることが判明した。mdx マウスはヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと異なり、同じジストロフィン遺伝子の変異を持つにも関わらず生命予後は良好であり、本研究結果をそのままヒト筋ジストロフィーの治療に応用することはできないが、今後、治療への応用についてさらに検討していきたい。

5. 文献

1. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460, 587-591, 2009.
2. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y: NAD-dependent histone deacetylase SIRT1 (Sir2α). *J. Pharmacol. Sci.* 98, 200-204, 2005
3. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleo-cytoplasmic shuttling of NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 282, 6823-6832, 2007
4. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, Sato M, Horio Y. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15999-15604, 2008.
5. Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K and Horio Y. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J. Biol. Chem.* 285: 8375-8382, 2010.
6. Iwahara N, Hisahara S, Hayashi T and Horio Y. Transcriptional activation of NAD⁺-dependent protein deacetylase SIRT1 by nuclear receptor TLX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386: 671-675, 2009.
7. Sugino T, Maruyama M, Tanno M, Kuno A, Houkin K, Horio Y. Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett.* 584: 2821-2826, 2010.

キマーゼ阻害薬による腹部大動脈瘤進展予防の可能性

高井真司、金徳男、宮崎瑞夫
大阪医科大学・薬理学教室

要約：腹部大動脈瘤の発症および進展の機序は不明であり、有効な治療薬はない。一方、ヒト腹部大動脈瘤組織では、キマーゼ、アンジオテンシン (Ang) II、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 が著明に増加している。キマーゼは、Ang II を産生する酵素であるが、ヒト腹部大動脈瘤組織では proMMP-9 から MMP-9 へ活性化する酵素としても機能している。MMP-9 は、腹部大動脈瘤の中膜破壊とその被薄化に重要な役割を担っている酵素であり、Ang II は ProMMP-9 の遺伝子発現を誘導する。つまり、キマーゼは、AngII 産生および ProMMP-9 の活性化を介してヒト腹部大動脈瘤の進展に深く関与している可能性がある。腹部大動脈にエラスターゼを処置して作製する腹部大動脈瘤ハムスターモデルでは、血管組織中のキマーゼ活性の増加を認め、キマーゼ阻害薬は腹部大動脈瘤の進展を強く抑制した。エラスターゼ誘導腹部大動脈瘤イヌモデルにおいても、キマーゼ阻害薬は血管組織中のキマーゼ活性、Ang II 産生、MMP-9 活性を低下させ、腹部大動脈瘤の進展を強力に抑制した。これらの結果は、エラスターゼ誘導腹部大動脈瘤の進展機序におけるキマーゼの関与を示唆する。近年、ヒトの腹部大動脈瘤に近いモデルとして繁用されている ApoE ノックアウトマウスに Ang II を持続投与する腹部大動脈瘤モデルでは、Ang II 持続投与後に血管組織中の MMP-9 活性が亢進する。本モデルの腹部大動脈瘤組織においても、ProMMP-9 の活性化にキマーゼが深く関与し、キマーゼ阻害薬は血管組織中の MMP-9 活性を低下させ、腹部大動脈瘤の発症を抑制した。キマーゼは、腹部大動脈瘤組織において Ang II 産生に加えて ProMMP-9 を活性化させることにより、その進展に深く関与している可能性が高く、その阻害薬は腹部大動脈瘤の進展抑制薬として有用と考える。

キーワード：キマーゼ阻害薬、腹部大動脈瘤、肥満細胞、アンジオテンシン II、マトリックスメタロプロテアーゼ-9

1. はじめに

腹部大動脈瘤は、動脈硬化や高血圧との関連性が指摘されているが、その病態機序は不明であり、有効な進展抑制薬がないのが現状である。腹部大動脈瘤では、血管炎症を伴う中膜破壊と被薄化が認められる。この中膜破壊および被薄化にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 が重要な役割を果たすことが示唆されている。事実、MMP-9 の遺伝子欠損マウスでは大動脈瘤の進展が有意に抑制される (1)。キマーゼは、肥満細胞顆粒中に存在するキモトリプシン様セリンプロテアーゼであり、ヒト血管でアンジオテンシン II を産生する酵素として機能する (2)。アンジオテンシン (Ang) II 産生酵素としては、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) が知られているが、キマーゼの産生する Ang II は、炎症や傷害された組織でのみ機能している、つまり、炎症誘導性の局所 Ang II 産生酵素と考えられている (3)。一方、キマーゼは、Ang II 産生だけではなく、MMP-9 の前駆物質である ProMMP-9 を MMP-9 へ活性化することが *in vitro* の実験により確認されている (4)。Ang II は、ProMMP-9 の遺伝子発現を誘導することより、キマーゼは、ヒト腹部大動脈瘤の発症および進展に関与する血管組織中の MMP-9 活性の上昇に深く関連する可能性が高い。

2. ヒト腹部大動脈瘤の組織解析

ヒト腹部大動脈瘤患者から採取した大動脈瘤形成部位のキマーゼ活性および Ang II 産生活性は、正常の大動脈部位に比して有意に増加していた (5)。また、大動脈瘤の外膜部分において、キマーゼ活性および Ang II 産生活性が著明に増加しており、MMP-9 も強く発現していた (5)。

ヒト腹部大動脈瘤の組織抽出液を 37℃ でインキュベートすると経時的に MMP-9 活性が増加した。この組織抽出液中にキマーゼ阻害薬を添加すると ProMMP-9 から MMP-9 への変換が抑制され、精製したヒトキマーゼを添加すると MMP-9 への変換は促進した (4)。これらのことは、キマーゼがヒト腹部大動脈瘤組織中で、MMP-9 への活性化に重要な役割を果たしていることを示唆する (4)。

3. エラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデル

ハムスターの腹部大動脈にエラスターゼを処置することにより腹部大動脈瘤を作製した (6)。エラスターゼ処置後、血管組織中ではキマーゼ活性および Ang II 産生活性が亢進し、大動脈径が拡大した (6)。キマーゼ阻害薬は、エラスターゼによる惹起される大動脈径の拡大には影響しなかったが、エラスターゼ処置後に経時的に拡大する大動脈径を有意に抑制した (6)。

イヌのエラスターゼ誘導腹部大動脈瘤モデルにおいてもキマーゼ阻害薬は、エラスターゼ処置後に亢進するキマーゼ活性、Ang II 産生活性、MMP-9 活性を有意に抑制し、中膜の破壊および大動脈径の拡大を著明に抑制した (7)。これらの結果は、キマーゼ阻害薬が Ang II 産生および MMP-9 活性を低下させ、腹部大動脈瘤の進展を抑制したことを強く示唆する。

4. ApoE ノックアウトマウスを用いた Ang II 誘導腹部大動脈瘤モデル

ApoE ノックアウトマウスに Ang II を持続投与することにより発症する腹部大動脈瘤モデルの血管組織において、キマーゼ活性および MMP-9 活性が有意に増加した (8)。キマーゼ阻害薬は、Ang II の持続投与による昇圧反応や ApoE ノックアウトマウスで見られる高脂血症には影響を与えなかったが、中膜破壊を強く抑制し、腹部大動脈径の拡大を有意に抑制した。本モデルの組織抽出液においても ProMMP-9 から MMP-9 への変換は、ヒト腹部大動脈瘤組織抽出液を用いた場合と同様に、キマーゼ阻害薬により強く抑制された。これらの結果は、Ang II により誘導された ProMMP-9 の MMP-9 への活性化をキマーゼ阻害薬が抑制し、中膜破壊の軽減および大動脈径の拡大が抑制したことを示唆する。

5. おわりに

キマーゼは、ヒト腹部大動脈瘤形成部位で著増しており、局所での Ang II 産生および MMP-9 活性の亢進と深い関連性があった。また、腹部大動脈瘤モデルにおいても、大動脈瘤形成部位でキマーゼ活性、Ang II 産生、MMP-9 活性が亢進しており、キマーゼ阻害薬は、キマーゼを抑制することで Ang II 産生および MMP-9 活性を抑制し、大動脈瘤の発症および進展を強力に抑制した。これらのことより、キマーゼ阻害薬は、腹部大動脈瘤の進展予防に有用な薬剤になると考える。

文 献

1. Pyo R. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **105**, 1641-1649 (2000)
2. Takai S. *et al.*, *Circulation*, **100**, 654-658 (1999)
3. Miyazaki M. *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, **112**, 668-676 (2006)
4. Furubayashi K. *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, **388**, 214-216 (2008)
5. Nishimoto M. *et al.*, *Life Sci.* **71**, 2195-2205 (2001)
6. Tsunemi K. *et al.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 879-883 (2004)
7. Furubayashi K. *et al.* *Hypertens. Res.*, **30**, 349-357 (2007)
8. Inoue N. *et al.* *Atherosclerosis*, **204**, 359-364 (2009)

B-SOC : BCR刺激とストア枯渇により活性化されるStim1依存性の新たなCa²⁺流入経路

森田貴雄¹、谷村明彦¹、馬場義裕²、黒崎知博²、東城庸介¹

¹北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野、

²大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・分化制御

要約: 非興奮性細胞では、Ca²⁺ストアの枯渇により引き起こされる容量性Ca²⁺流入(Capacitative Ca²⁺ entry, CCE)が重要なCa²⁺流入経路である。最近、CCEに関与する分子として、Stim1とOrai1が同定されたが、Stim1のチャネル活性化機構などまだ不明な点が多い。我々はストア枯渇とB cell receptor (BCR)刺激の相互作用により活性化されるCa²⁺流入経路の存在を発見し、このCCEとは異なる新しいCa²⁺流入機構をBCR-mediated store-operated Ca²⁺ entry (B-SOC)と名付けた。阻害剤を使った実験により、B-SOCはチロシンキナーゼの活性化を必要とすることが示唆された。また、Stim1ノックアウト細胞およびOrai1/2 siRNAを使った実験から、B-SOCにStim1が関与し、Orai1/2は関与しないことがわかった。B-SOCは比較的弱い刺激に応じたストア内のCa²⁺低下により誘導されることから、生理的条件下でのCa²⁺流入に働いていると考えられる。

キーワード: Stim1、容量性Ca²⁺流入、Ca²⁺ストア、B cell receptor、チロシンキナーゼ

1. はじめに

Ca²⁺は様々な生体機能を調節する最も普遍的な細胞内メッセンジャーである。受容体刺激により、PLCの活性化を介してIP₃が産生され、IP₃を介して細胞内ストアからのCa²⁺放出とこれに続くCa²⁺流入が起こる。このCa²⁺流入はCa²⁺ストアの枯渇に応じて起こることから、容量性Ca²⁺流入(Capacitative Ca²⁺ entry, CCE)と呼ばれ、非興奮性細胞の重要なCa²⁺流入経路である。最近CCEに関与する分子として、Stim1とOrai1が同定された(1)。Stim1は小胞体内のCa²⁺濃度を感知するCa²⁺センサーとして機能し、Orai1は細胞膜上の容量性Ca²⁺チャネル本体であると考えられている。受容体活性化などによりCa²⁺ストアが枯渇すると、Ca²⁺センサーのStim1が細胞膜近傍の小胞体上で凝集し、細胞膜上のOrai1と相互作用することにより、Ca²⁺チャネルであるOrai1を通してCa²⁺流入が起きる(1)。我々はニワトリB細胞由来のDT40細胞を使ってCa²⁺流入の研究を行ってきたが(2)、最近、CCEとは異なるStim1依存性の新たなCa²⁺流入機構を発見したので報告する(3)。

2. BCR刺激とストア枯渇により引き起こされる新しいCa²⁺流入経路

DT40野生型(WT)細胞のB cell receptor (BCR)を比較的低濃度(1-3 µg/ml)の抗IgM抗体で刺激すると、細胞内ストアからのCa²⁺放出と細胞外からのCa²⁺流入が起こった。このCa²⁺流入はCCEを阻害する0.3 µM La³⁺存在下でも抑制されなかった。対して、小胞体Ca²⁺ポンプ阻害剤のThapsigargin(ThG)でストアを枯渇させることにより誘導されるCa²⁺流入は0.3 µM La³⁺でほとんど完全に抑制された。これらの結果から、BCR刺激により起こる流入はCCEとは異なる経路によると考えられる。

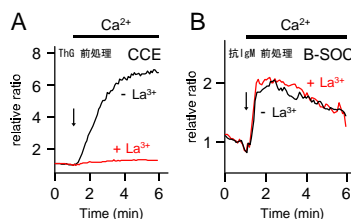


図1 B-SOCの特徴
A) 容量性Ca²⁺流入(CCE)はLa³⁺で抑制される。
B) BCR刺激によるB-SOCはLa³⁺で抑制されない。

IP₃R ノックアウト細胞では、BCR 刺激による Ca²⁺放出や Ca²⁺流入は起こらなかった。しかし、ThG でストアを枯渇させ、その後に BCR 刺激を行うと、WT と同様の La³⁺で抑制されない Ca²⁺流入が観察された。この結果から、La³⁺抵抗性 Ca²⁺流入は BCR 刺激とストアの枯渇の両方を必要とすることが示された。我々はこの流入を BCR-mediated store-operated Ca²⁺ entry (B-SOC)と名付けた。

3. B-SOC の薬理的性質

B-SOC はチロシンキナーゼ阻害剤の genistein によって有意に抑制された。しかし、PLC 阻害剤の U73122 および PKC 阻害剤の staurosporine では抑制されなかった。このことから、B-SOC はチロシンキナーゼの活性化を必要とすることが明らかになった。

4. B-SOC における Stim1 および Orai1 の関与の検討

B-SOC における Stim1 の関与の可能性を、Stim1 ノックアウト(Stim1-KO)細胞を使って検討した。Stim1-KO 細胞では、B-SOC はほぼ完全に消失していた。この細胞に YFP-Stim1 を強制発現させると、B-SOC の回復が見られた。また、YFP-Stim1 を発現させた細胞を TIRF 顕微鏡で観察したところ、BCR 刺激により蛍光強度の上昇が観察され、YFP-Stim1 の膜近傍への移行が示唆された。これらのことにより、B-SOC は Stim1 に依存的であり、Stim1 の膜近傍への移行を介して誘導されることがわかった。

さらに Orai1 についても検討を行った。WT 細胞に Orai1 および Orai2 siRNA を導入すると、CCE が有意に抑制された。しかし、これらのノックダウンは B-SOC に影響を与えなかった。このことから、B-SOC は Orai1, 2 に非依存的であることが明らかになった。

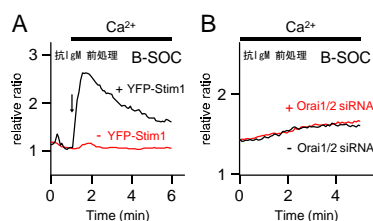


図2 B-SOC への Stim1 および Orai1/2 の関与
A) Stim1-KO 細胞に YFP-Stim1 を発現させると (+YFP-Stim1, 灰丸)、B-SOC が回復する。
B) Orai1/2 siRNA を導入しても B-SOC は抑制されない。

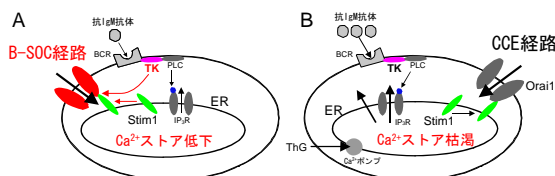


図3 B-SOC と CCE のモデル

A) B-SOC: 比較的弱い BCR 刺激により、ストア内の Ca²⁺が低下する。それに伴う Stim1 の細胞膜近傍への部分的移行とチロシンキナーゼ活性化との相互作用により、B-SOC が起こる。
B) CCE: 比較的強い BCR 刺激やタブシガージン(ThG)刺激により Ca²⁺ストアが枯渇し、Stim1 の細胞膜近傍への移行とそれに伴う Orai1 活性化が起こる。この Orai1 を介して CCE が起こる。

5. おわりに

最近、Stim1 は本研究の B-SOC を含めた Orai1 以外の Ca²⁺流入経路に関与することが報告されている。Stim1 を介する Ca²⁺流入機構については未知の部分が多く残されており、B-SOC チャネルの実体解明も含めて今後の研究で明らかにされることが期待される。

文 献

- Putney JW Jr, New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. J Cell Sci 120 : 1959-1965 (2007)
- Morita T, Tanimura A, Nezu A, Kurosaki T, Tojyo Y. Functional analysis of the green fluorescent protein-tagged inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in Ca²⁺ release and entry in DT40 B lymphocytes. Biochem J 382 : 793-801 (2004)
- Morita T, Tanimura A, Baba Y, Kurosaki T, Tojyo Y. A Stim1-dependent, noncapacitative Ca²⁺-entry pathway is activated by B-cell-receptor stimulation and depletion of Ca²⁺. J Cell Sci 122: 1220-1228 (2009)

免疫系における中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルの役割

大矢 進, 仲村恵梨奈, 山村寿男, 今泉祐治

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学分野

要約: T 細胞や癌細胞のような非興奮性細胞では、 K^+ チャネル活性化による細胞膜の過分極は、興奮性細胞の場合とは逆に、細胞内への Ca^{2+} 流入を増大させ、細胞増殖、分化を促進する。したがって、 K^+ チャネル阻害薬は、自己免疫疾患や癌の治療薬として期待されている。

本研究では、オキサゾロン (Ox) 誘発性接触過敏症 (遅延型過敏症: DTH) モデルを用いて、炎症誘発部位である耳介リンパ節における中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (IK_{Ca}) チャネル活性及びそれをコードする $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ の発現変化について解析した。また、局所皮膚 (耳介) における、 IK_{Ca} チャネル阻害薬の炎症抑制効果について検討した。

Ox 感作、惹起による耳介リンパ節重量変化を測定したところ、非感作・非惹起群 (Ox -/- 群) と比較して、感作・惹起群 (Ox +/+ 群) 及び感作・非惹起群 (Ox +/- 群) において、有意に湿重量が増大しており、T 細胞増殖が促進していることが示唆された。そこで、各群の耳介リンパ節から T 細胞を単離し、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を用いて IK_{Ca} チャネル阻害薬による膜電位変化を測定したところ、Ox -/- 群と比較して Ox +/- 群及び Ox +/+ 群において有意に大きな脱分極反応が観察され、同様に、Ox +/-、Ox +/+ 群において、 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ 発現が有意に増大していた。さらに、接触過敏症を惹起する際に耳介近傍に IK_{Ca} チャネル阻害薬 TRAM-34 (10 mg/kg) を皮下注射により投与したところ、耳介肥厚と耳介リンパ節における T 細胞増殖は有意に抑制された。以上より、 IK_{Ca} チャネル阻害薬は、接触過敏症やアレルギー疾患の治療薬として有効である可能性が示された。

キーワード: Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル, T 細胞, 細胞増殖, 接触性過敏症, 転写調節因子

1. はじめに

免疫系細胞に機能発現する主な K^+ チャネルは、電位依存性 K^+ チャネル (K_{V} チャネル) と中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル (IK_{Ca} チャネル) であり、それぞれ $\text{K}_{\text{V}1.3}$ と $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ によりコードされる。カリフォルニア大学 Irvine 校の Chandy らの研究グループは、エフェクターメモリー T (T_{EM}) 細胞では、 $\text{K}_{\text{V}1.3}$ が、ナイーブ T (T_{N}) 細胞やセントラルメモリー T (T_{CM}) 細胞では、 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ が優位に発現することを報告した¹⁾。現在のところ、 T_{EM} 細胞の増殖や炎症組織への浸潤を抑制する $\text{K}_{\text{V}1.3}$ 阻害薬が、免疫抑制薬や自己免疫疾患、アレルギー疾患治療薬として期待され、疾患モデル動物においてその有効性が証明されている¹⁾。

本研究では、オキサゾロン (Ox) 誘発接触過敏症 (DTH) モデルを用いて、炎症誘発部位である耳介リンパ節における IK_{Ca} チャネル活性及び $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ 発現変化について、膜電位感受性色素を利用した蛍光イメージング解析と分子生物学的手法を用いて検討するとともに、 IK_{Ca} チャネル阻害薬による耳介における炎症抑制効果について薬理学的に検討した。

2. 実験方法

1) オキサゾロン誘発性接触過敏症モデルマウスの作成

雄性 Balb/c マウス (6 週齢) の腹部を剃毛し、0.5 % 4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one - アセトン (Ox) 溶液 100 μL を塗布することにより、「感作」した。7 日後、マウスの耳介とその周辺

に Ox 溶液を 100 μ L を塗布し、炎症反応を「惹起」した。IK_{Ca} チャネル阻害薬 TRAM-34 の炎症抑制効果は、局所皮膚（耳介）への皮下注射により検討した。

2) mRNA、タンパク質発現量の解析

mRNA 発現量は、real-time PCR 法（Syber Green 法）により、Prism 7000 システム（ABI）を用いて、また、タンパク質発現量は、Western ブロット法により、LAS1000（富士フイルム）を用いて解析した²⁾。

3) 膜電位感受性色素を用いた膜電位変化の測定

単離した耳介リンパ節細胞にオキシノール系膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) (100 nM) を取り込ませ（37°C、30 分間）、高速 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCA（浜松フォトニクス）を用いて膜電位変化を測定した（励起波長：488 nm）³⁾。

3. 実験結果・考察

Ox 感作、惹起による耳介リンパ節重量変化を測定したところ、非感作・非惹起群（Ox -/- 群）と比較して、感作・惹起群（Ox +/+ 群）だけでなく、感作・非惹起群（Ox +/- 群）、において有意な湿重量の増加が観察された。そこで、各群の耳介リンパ節から T 細胞を単離し、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を用いて IK_{Ca} チャネル阻害薬による膜電位変化を測定したところ、Ox +/- 群及び Ox +/+ 群において、Ox -/- 群よりも有意に大きな脱分極反応が観察された。最近我々がクローニングした N 末端欠損変異体 K_{Ca}3.1b は、機能型 K_{Ca}3.1 (K_{Ca}3.1a) のドミナントネガティブとして機能する。したがって、IK_{Ca} チャネル活性の増大の機構として、①K_{Ca}3.1a 発現の増大、②K_{Ca}3.1b 発現の減少、または、その両方が考えられる。耳介リンパ節における K_{Ca}3.1 発現について検討したところ、Ox +/- 群及び Ox +/+ 群において、K_{Ca}3.1a 発現のみが有意に増大し、K_{Ca}3.1b 発現はほとんど変化しなかった。我々は、Jurkat T 細胞において、Ca²⁺活性化 K⁺チャネルが、細胞周期の進行に重要な役割を果たすことを報告しており⁴⁾、接触過敏症モデルの耳介リンパ節 T_N 細胞における K_{Ca}3.1a 発現増大は、細胞周期の進行を促進することにより、クローン増殖を増大させている可能性が考えられる。

また、DTH を惹起する際、耳介近傍に IK_{Ca} チャネル阻害薬 TRAM-34 (10 mg/kg, s.c.) を投与したところ、耳介肥厚が有意に抑制されるとともに、耳介リンパ節の重量増加も顕著に抑制された。これは、IK_{Ca} チャネル阻害薬が、耳介リンパ節における T_N 細胞のクローン増殖・T_{EM} 細胞への分化を抑制することを示唆している。すなわち、IK_{Ca} チャネル阻害薬が炎症反応抑制を示す機構として、炎症反応惹起時のサイトカイン産生や細胞遊走につながる T 細胞活性化を抑制するだけでなく、その前段階である T 細胞のクローン増殖・分化を抑制することが挙げられる。以上より、IK_{Ca} チャネル阻害薬が、接触過敏症やアレルギー疾患の治療薬として有効である可能性が示された。

4. おわりに

IV 型アレルギーの遅延型過敏症の代表的な疾患として、接触性皮膚炎の他に、ツベルクリン反応、移植免疫、腫瘍免疫、シェーグレン症候群、感染アレルギー、薬剤性肺炎、ギラン・バレー症候群などが挙げられる。本研究により得られた実験結果は、病態時における T 細胞の異常増殖・分化における K_{Ca}3.1 発現調節の病態生理学的意義を明らかにするとともに、IK_{Ca} チャネル阻害薬が、上記疾患をはじめとする各種免疫疾患の治療薬として有用である可能性を示している。

文 献

- 1) Cahalan M.D. & Chandy K.G., *Immunol. Rev.*, 231, 59-87 (2009)
- 2) Ohya S. *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 289, H1635-H1642 (2005).
- 3) Imaizumi Y. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 62, 836-846 (2002)
- 4) Morimoto T. *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 94-98 (2007)

Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体のタンパク質発現に必須なアミノ酸配列の同定

根津 顕弘^{1,2}、Most. Nahid Parvin²、R. James Turner²

¹北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野

²Molecular Physiology and Therapeutics Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health

要約：Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体(NKCC1、NKCC2)は、イオンと水の輸送を制御する膜タンパク質で、腎臓において利尿薬の重要なターゲット分子である。近年、様々な膜タンパク質で細胞膜への輸送に重要なアミノ酸配列の存在が報告されてきた。本研究では、NKCC1のC末端に存在する4つの疎水性アミノ酸配列(ILLV)が、NKCC1タンパク質発現を制御する重要な配列であることを明らかにした。野生型およびC末端のアミノ酸配列の変異体発現プラスミドをHEK-293細胞に一過性に発現させ、NKCC1タンパク質の発現量や糖鎖修飾の状態、さらにタンパク質の凝集に対する影響を調べた。4つの疎水性アミノ酸のうち、いずれか2つのアミノ酸をアラニン(A)に置換すると、複合体糖鎖修飾されたタンパク質量が減少し、変異体タンパク質の凝集が認められた。ILLV配列をすべてアラニンに置換した変異体(AAAA変異体)では、複合体糖鎖修飾されたタンパク質が90%減少し、変異体タンパク質発現量も50%以上の減少が認められた。さらに、変異体タンパク質の著しい凝集が観察された。AAAA変異体の細胞内分布を細胞表面のビオチン標識法および免疫組織化学染色法により調べたところ、AAAA変異体は細胞膜へ輸送されないことが確かめられた。これらの結果は、このアミノ酸配列が共輸送体のタンパク質発現のプロセスに必須であることを示唆する。

キーワード： Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体, 疎水性アミノ酸, タンパク質発現量, 糖鎖修飾, 細胞膜輸送

1. はじめに

Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体(NKCC1、NKCC2)は、陽イオン/Cl⁻共輸送体に共通の12回膜貫通型タンパク質で、Na、KおよびClイオンの取り込みと水の輸送に関与する。赤血球、心筋、神経細胞、唾液腺および腎臓に発現し、腎臓において利尿薬の重要なターゲット分子である。膜タンパク質がその機能を発揮するためには、発現したタンパク質が正しく膜へ移行する事が重要である。近年、膜タンパク質の細胞膜への輸送に、タンパク質自身が持つ短いアミノ酸配列が必須であることが明らかにされてきた。例えば dileucine 配列(LL配列)や酸性アミノ酸配列など2から6個のアミノ酸配列が、受容体、糖タンパク質やCl⁻チャネルの膜への輸送に関わることが報告されている(1)。NKCC1では、このようなアミノ酸配列の有無やその役割について全く調べられていない。本研究では、NKCC1のC末端に疎水性アミノ酸配列(ILLV)が、NKCC1の小胞体からゴルジ装置への輸送に必須であることを明らかにした(2)。

2. NKCC1のC末端アミノ酸配列変異体のタンパク質発現と糖鎖修飾量の解析

野生型NKCC1および変異体発現プラスミドをHEK-293細胞に導入し、野生型および変異体タンパク質の発現をNKCC1の特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。野生型NKCC1は～170 kDaと～130 kDaのタンパク質の発現が認められ、170 kDaのタンパク質の発現は130 kDaと比べ4倍高い発現量を示した。これらの170および130 kDaのタンパク質は、PNGase Fを用いた実験から、それぞれ複合体糖鎖修飾とコア糖鎖修飾されたものであることが確かめられた。NKCC1のC末端に存在するLL配列を含む4つの疎水性アミノ酸(ILLV)のうち、いずれか2つをアラニン(A)に置換すると、

複合体糖鎖修飾されたタンパク質量が 60%減少した。これらの変異体では、野生型では見られないタンパク質の凝集が認められた。さらに、すべてをアラニンに置換した変異体(AAAA 変異体)では、複合体糖鎖修飾されたタンパク質量は 90%減少し、変異体タンパク質の発現量は野生型と比べ 50%以上低下していた。また AAAA 変異体は、そのほとんどが凝集していた。共輸送体ファミリーでよく保存されているアミノ酸を変異させても、その発現パターンに有意な差は認められなかった。以上の結果は、ILLV 配列が NKCC1 の複合体糖鎖修飾とタンパク質発現量に重要であることを示唆する。

3. NKCC1 変異体の細胞膜発現量の解析

野生型および AAAA 変異体の細胞膜での発現量を調べるため、細胞膜表面のタンパク質をビオチンで標識し、ビオチン化されたタンパク質をストレプトアビジンビーズで結合することにより解析した。野生型では HEK-293 細胞に発現した NKCC1 のうち約 75%がビーズと結合し、野生型が細胞表面でビオチン化されたことを示す。一方、AAAA 変異体では有意なビーズとの結合は認められず、変異体が細胞膜表面へ発現していないことが示された。さらに免疫組織化学染色法により細胞内の分布を調べた。野生型はそのほとんどが細胞膜に発現していたのに対し、AAAA 変異体は細胞膜の分布が認められず、小胞体の分布と一致した。以上の結果は、AAAA 変異体が細胞膜へ輸送されずに小胞体に留まっている事を示唆する。

4. NKCC1 変異体の共輸送体機能の解析

野生型と変異体タンパク質の共輸送体機能を ^{86}Rb 取り込み実験により解析した。野生型発現細胞では、空ベクター導入細胞と比べ有意な ^{86}Rb の取り込みが観察されたが、AAAA 変異体では有意な ^{86}Rb の取り込みは認められなかった。

5. おわりに

本研究により、NKCC1 の正しいタンパク質発現のプロセスに必須のアミノ酸配列の存在が明らかになった。この配列は、NKCC1 の小胞体からゴルジ装置への輸送に重要な役割を果たしていることが示唆された。NKCC1 の C 末端に存在する疎水性アミノ酸配列は、様々な動物種で保存されている。また、この配列は NKCC2 や $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ 共輸送体にも存在し、この変異が同様の現象を引き起こすことが報告されており (3)、この疎水性アミノ酸配列は、共輸送体に共通する重要な配列であると考えられた。わずかなアミノ酸変異によって起こるタンパク質の発現異常は、様々な疾患の原因となる可能性があり、特異的な機能をもつアミノ酸配列は新しい疾患治療のターゲットとして注目されている。

文 献

1. Dong C, Filipeanu CM, Duvernay MT, Wu G. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 853-870.
2. Nezu A, Parvin MN, Turner RJ. A conserved hydrophobic tetrad near the C terminus of the secretory $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter (NKCC1) is required for its correct intracellular processing. *J Biol Chem* 2009; 284: 6869-6876.
3. Zaarour N, Demarets S, Defontaine N, Mordasini D, Laghmani K. A highly conserved motif at the COOH terminus dictates endoplasmic reticulum exit and cell surface expression of NKCC2. *J Biol Chem* 2009; 284: 21752-21764.

オキサゾロン誘導マウス腸炎モデルの腸上皮におけるfocal adhesion kinaseの発現亢進

谷口 隆信

旭川医科大学 生化学講座 細胞制御科学分野

要約：オキサゾロンによって誘導されるマウス腸炎モデルにおいて、チロシンキナーゼの関与を検討した。チロシンキナーゼファミリーにおいて保存されたペプチド配列に対して作成したモノクローナル抗体、YK34，を用い、マウスの摘出腸管から採取した腸上皮におけるチロシンキナーゼの発現を、網羅的に解析した。腸上皮抽出試料を2次元電気泳動で展開してウェスタンブロットを行った所、複数のスポットが認められた。腸炎誘導によって増強するスポットに着目し、その分子量や等電点データに基づいてデータベース解析を行い、focal adhesion kinase (FAK)を同定した。FAK特異的な抗体を用いて検討した所、腸上皮におけるFAKの発現は、腸炎の誘導によって増加し、発現量は炎症の程度と正の相関を示した。また、免疫組織学的検討において、FAKの発現は腸上皮に局限したものであり、浮腫を起こした粘膜下組織に遊走してくる炎症細胞群にもほとんど認められなかった。これらの結果から、腸炎の誘導から成立過程、あるいは、治癒過程において、腸上皮に存在するFAKの関与が示唆された。

キーワード：炎症性腸疾患，潰瘍性大腸炎，クローン病，チロシンキナーゼ，focal adhesion kinase

1. はじめに

慢性炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎とクローン病を代表とする消化器疾患であり、粘膜防御機構の破綻、炎症細胞による過剰なサイトカイン産生に引き続く、慢性の腸炎を主症状とする。腸管粘膜免疫系の変調については、クローン病ではTh1系のサイトカイン、interferon- γ やTNF- α ，とTh17系のサイトカインであるinterleukin-17の増加が、潰瘍性大腸炎においてはTh2系とTh17サイトカインの増加が認められている。その他、病因については、遺伝因子や環境因子などの関与などが言われているが、不明の部分が多く特異的な治療法も存在しない (1-4)。

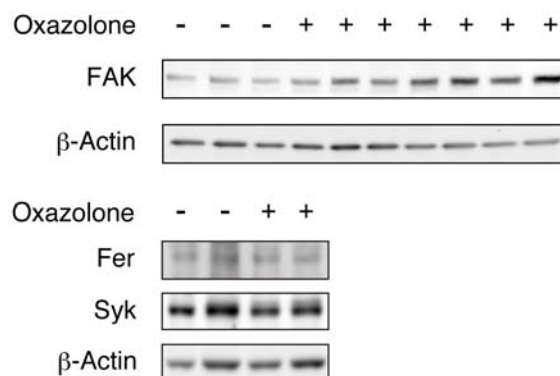
2. 材料と方法

BALB/c雄性マウスに10 mg/mlのオキサゾロン液0.1 mlを注腸投与し、24時間後に腸管を摘出して実験に供した。摘出腸管の肉眼的観察に基づき、炎症の程度を7段階に分類してスコア化した (0/炎症なし～6/重度の壊死)。全ての動物実験は旭川医科大学の規定に基づき、旭川医科大学動物実験委員会の審査を経て実施したものである。

3. 結果

摘出腸管から採取した腸上皮のタンパク質抽出液を、二次元電気泳動で展開し、チロシンキナーゼ群特異的な抗体、YK34 (5)，を用いてウェスタンブロットを行った所、複数のスポットが認められ腸炎誘導前後でシグナルが増減しているものも認められた。最も増加が顕著であったスポットにつき、そのタンパク質の生化学的情報に基づいて、UniProtKB/Swiss-Protデータベースを検索し、focal adhesion kinase (FAK)を同定した。

図は、FAK特異的な抗体を用いて、腸上皮におけるFAKの発現を腸炎誘導前後で比較したウェスタンブロットの結果であるが、誘導後において、FAKの発現が増加している。他の非受容体型チロシンキナーゼ、FerとSykではこのような増加は認められず、発現の上昇はFAKに特異的な現象であった。 β アクトチンのシグナルに対する比として定量化した所、腸炎誘導によりFAKの発現は約1.7倍増加していた。また、炎症スコアとの比較でも、有為な正の相関が認められ ($r=0.68$)、腸炎の病態とFAKの関連が推察された。



腸炎誘導前後の大腸組織切片をFAKに対する抗体で免疫染色した結果では、FAKの発現は、腸上皮に限局して認められ、浮腫を生じた粘膜下組織に遊走してきた炎症細胞群にもほとんど認められなかった。また、上皮細胞が欠損した潰瘍部あるいはその周辺において、最も強い発現が認められ、先の結果とも合致するものであった。

4. 考察

オキサゾロンによって誘導されるマウス腸炎モデルにおいて、腸上皮に限局してFAKの発現が上昇していた。この現象が腸炎発症から炎症治癒過程のどの段階で関わっているかは更なる検討によらなければならないが、FAKの発現が上昇するメカニズムとして、1) 炎症性サイトカインによる誘導、2) 自然免疫系による誘導、3) 潰瘍形成によるものなどが考えられる。今後はこれらの点をふまえた研究を通して、炎症性腸疾患の病態解明につなげていきたい。

5. おわりに

この研究の一部は、以下の助成の援助を受けてなされた。
知的クラスタ創成事業（札幌バイオクラスタ）、科学研究費補助金（若手B）、旭川医科大学プロジェクト（独創性のある生命科学研究）。

文 献

1. Bouma, G., and Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521-533
2. Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70
3. Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K., and Hibi, T. (2008). IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682-1689
4. Fuss, I., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R., Mannon, P., and Strober, W. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113, 1490-1497
5. Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., Ishida, A., Taniguchi, T., and Kameshita, I. (2005). Generation and application of a monoclonal antibody that detects a wide variety of protein tyrosine kinases. *Anal Biochem* 347, 112-120

脂肪酸受容体GPR120の新規リガンド探索と構造活性相関

原 貴史

京都大学大学院薬学研究科 最先端創薬研究センター

要約：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞内外の様々な刺激に応答しシグナル伝達を行う生理学的に重要な分子であり、各種疾患との関連も数多く報告されていることから治療標的としても注目されている。GPCR に対して高い活性を示す化合物を効率的に探索することは生理学的な機能解析、更には創薬の観点からも重要である。これまで我々は、長鎖脂肪酸によって活性化される GPCR である GPR120 が、腸管、脂肪組織、肺に高発現していることを報告し、腸管において脂肪酸による GPR120 の刺激がグルカゴン様ペプチド(GLP-1)の分泌を促進することから、インスリン分泌への関与を示唆している。一方、これまで GPR120 に特異的な化合物に関する報告は僅かであり、さらなる機能解析を行う上でより特異的な化合物を探索することが必要不可欠である。今回我々は、新規 GPR120 リガンドの探索を目的として、天然物由来の化合物および新規の合成化合物をリガンド候補化合物とし、GPR120 強制発現細胞株を用いて細胞内シグナルを指標に活性評価を行うことでスクリーニングを行った。その結果、GPR120 に対して活性を示す一連の化合物群を探索することに成功した。さらに、GPR120 ホモロジーモデルを構築し、これらの化合物についてドッキングシミュレーションを行った結果からは、GPR120 とリガンドとの構造活性相関に関する知見が得られている。さらに、活性が認められた化合物について、*in vivo*での活性評価を行い生物学的な有用性を検討した。今回得られた新規化合物は脂肪酸に代わる特異的なプローブとして、今後の脂肪酸受容体の生理学および薬理学的研究に有用であると考えられる。

キーワード： Gタンパク質共役型受容体、GPR120、遊離脂肪酸、構造活性相関、ドッキングシミュレーション

1. はじめに

近年のゲノム情報に基づいた、リガンドが未知のオーファン GPCR 研究の進展により、これまで栄養源として考えられていた遊離脂肪酸をリガンドとする脂肪酸受容体ファミリーの存在が明らかとなった。脂肪酸受容体は、生体内で特異的な組織分布を示し、それぞれが異なる炭素鎖長の脂肪酸によって活性化される。また、生理学的な機能解析から、代謝疾患との密接な関係が明らかとなりつつあり、より詳細な機能解析が期待されている^{1,2)}。脂肪酸受容体に対する特異的な化合物については、*in silico*および *in vitro*両面からのリガンドデザインとスクリーニングによるアプローチによって、脂肪酸リガンドよりも高い活性を示す合成化合物が報告されている^{3,4)}。またこれに伴って、いくつかの脂肪酸受容体では、リガンド結合部位に関する情報についても研究が行われ、リガンドと受容体との構造活性相関に関する知見も得られている³⁾。

我々はこれまでに、脂肪酸受容体のうち長鎖脂肪酸で活性化される GPR120 が、腸管、脂肪組織、肺に高発現していることを明らかにした^{5,6)}。また、遊離脂肪酸の経口投与と大腸への直接投与により血中 GLP-1 とインスリン濃度の上昇を起こしたこと、GLP-1 と GPR120 が大腸組織で共発現していたことから、*in vivo*でも脂肪酸をリガンドとして生理学的機能を発揮していることを示唆している。他方、GPR120 については特異的なリガンドに関する報告は僅かであり、既知リガンドについても結合様式に関する情報が殆どないこと等から生理学的な機能解析が必ずしも十分に進んでいないのが現状である。

2. GPR120 の新規化合物の探索

そこで我々は、天然物化合物および合成化合物群から新規 GPR120 リガンドの探索を行い、その結合様式について検討を行った^{7,8)}。まず、GPR120 受容体の強制発現細胞株を用いて、80 種以上の天然物化合物とその類縁体から、細胞内 Ca^{2+} 濃度および ERK 活性化を指標としてスクリーニングを行い、新規 GPR120 リガンドを探索した。その結果、grifolin 類縁体のうち、grifolic acid と grifolic acid methyl ether の 2 種の化合物に活性が認められた。また、grifolic acid はアゴニスト存在時に GPR120 に対して選択的に阻害作用を示す部分アゴニストであることが確認できた。さらに、内在性に GPR120 を発現する腸管内分泌細胞株による検討から、これらの化合物がいずれも GLP-1 の分泌を促進することが明らかとなった。また、より活性の高い化合物の探索を目的として、PPAR γ リガンドを基に一連の化合物群 (NCG 化合物) を合成し、活性化能を評価したところ α -LA よりも高い活性を示す化合物 NCG21 を見出し、マウス腸管への投与においても血中 GLP-1 の上昇作用を示すことを確認した。

3. GPR120 の構造活性相関

さらに、構造活性相関を検討するために GPR120 ホモロジーモデルを構築し、NCG 化合物群についてドッキングシミュレーションを行い水素結合エネルギーの評価を行った。その結果、ERK 活性化能と水素結合エネルギーとの間に相関が認められた ($R^2 = 0.73$)。特に、NCG 化合物の中で NCG21 が最も高い ERK 活性能を示し、かつ最も低い水素結合エネルギーを示したことは、本評価手法が新規リガンドの評価系として非常に有用であることを示唆している。変異受容体株による検討からは、99 番目の Arg 残基が、 α -LA 及び NCG21 が有するカルボキシル基との相互作用に関与し、GPR120 の活性化を引き起こしていることが明らかとなった。本結果はドッキングシミュレーションから予測されるリガンドの結合様式とも一致していたことから、今回構築した GPR120 受容体ホモロジーモデルが化合物の活性予測だけでなく、相互作用の理解にも非常に有用であることが示唆された。

4. おわりに

今回の報告で、脂肪酸受容体 GPR120 について、新規リガンドの探索とリガンド結合様式を検討することにより、リガンドデザインに有益な構造情報とその評価手法を得ることに初めて成功した。今回得られた新規化合物は脂肪酸に変わる特異的なプローブとして、今後の脂肪酸受容体の生理学および薬理学的研究に有用であると考えられる。これらの結果は GPR120 のみならず脂肪酸受容体研究全般の更なる進展に寄与するものであり非常に重要な知見となると考えられる。

文 献

- 1) Hirasawa A et al., *Biol Pharm Bull.*, 31:1847-51, 2008.
- 2) Oh da Y et al., *Cell.*, 142:687-98, 2010.
- 3) Sum CS et al., *J Biol Chem.*, 282:29248-55, 2007.
- 4) Suzuki T et al., *J Med Chem.*, 51:7640-4, 2008.
- 5) Hirasawa A et al., *Nat Med.* 11:90-4, 2005.
- 6) Miyauchi S et al., *J Pharmacol Sci.*, 112:19-24, 2010.
- 7) Hara et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 380:247-55, 2009.
- 8) Sun Q et al., *Mol Pharmacol.*, 2010 [Epub ahead of print].

多剤耐性細胞 KB-C2 における薬剤耐性克服の取り組み - チロシンキナーゼ阻害薬とマイクロ RNA の応用 -

柴山良彦¹、田口美雪³、池田龍二³、長田貴之¹、武田泰生³、菅原満¹、井関健²、山田勝士³

北海道大学大学院薬学研究院臨床薬学教育研究センター¹

北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学²

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科薬物動態制御学³

要約：薬剤耐性克服の新たな方法を見出すため、チロシンキナーゼ阻害薬であるソラフェニブ、スニチニブを併用した時の殺細胞性抗がん薬の感受性と、がんの悪性化と関係が示唆されているマイクロ RNA の発現変化について多剤耐性細胞である KB-C2 細胞を用いて検討した。KB-C2 はパクリタキセルに耐性を示すが、ソラフェニブ、スニチニブを併用すると親株である KB-3-1 細胞と同レベルにパクリタキセルへの感受性が回復することが確認された。また、KB-C2 においてマイクロ RNA126 と 210 の発現が減少し、98 は KB-3-1 より上昇していることが認められた。KB-C2 にマイクロ RNA126 と 210 の阻害剤を加えると、それぞれドキシソルビシンとパクリタキセルへの感受性が低下することが認められた。以上の結果から、チロシンキナーゼの併用やマイクロ RNA126 と 210 の抑制は薬剤耐性克服に有効である可能性が示唆された。

キーワード：チロシンキナーゼ阻害薬、マイクロ RNA126、マイクロ RNA210、マイクロ RNA98

1. 目的

がん治療において化学療法は、特に進行がんにおいてなくてはならない治療法である。抗がん薬の薬剤耐性は、がん化学療法における重要な問題であり薬剤耐性を克服するため、様々な取り組みがなされてきたが、いまだ多くの問題を抱えている。近年、様々な分子標的薬が臨床でも使用されるようになり、その効果が期待されている。チロシンキナーゼ阻害薬であるソラフェニブ、スニチニブは、腎細胞癌と肝細胞癌あるいは消化管間質腫瘍の標準治療薬の一つとなっている。現在、これらの薬剤は単一で使用されており、他の抗がん薬との併用による臨床効果は不明である。

薬剤耐性を生じる機序として抗がん薬の細胞外への排出促進など、様々な分子機構が存在し、それらの薬剤耐性を克服するため様々な取り組みがなされてきたが、いまだ多くの問題をかかえている。近年、遺伝子をコードしない RNA の機能が明らかになりつつあり、約 20 塩基の低分子 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) が存在することが報告された。miRNA は相補的な複数のメッセンジャー RNA とハイブリダイズすることにより、遺伝子の蛋白質への翻訳を制御すると考えられている。miRNA はがんの発生や悪性化との関係が示唆されているが、抗がん薬耐性における機能は不明な点が多い。

本研究では薬剤耐性克服への応用を目的とし、ソラフェニブ、スニチニブを併用した時の抗がん薬の感受性の変化と、miRNA を細胞内に導入した時の抗がん薬感受性の変化について分析した。

2. 方法

ヒト咽頭癌由来 KB-3-1 細胞、KB-3-1 をコルヒチン処理により選別した多剤耐性細胞であり、P 糖蛋白質 (P-gp) が高発現している KB-C2 細胞⁽¹⁾、そして KB-3-1 に *MDR1* 遺伝子 (ABCB1) を導入した KB-G2 細胞、さらに K562 細胞および *MDR1* 遺伝子を導入した K562-MDR1 細胞を用いた。本研究ではソラフェニブ、スニチニブを併用した時の 50%増殖阻害濃度 (IC50) を MTT アッセイ法により測定した。

がん細胞における悪性化との関連が示唆されている miRNA30b, 93, 98, 126, 210 の発現の変化を TaqMan® MicroRNA Assay により分析した。また、KB-3-1 および KB-C2 において miRNA 126, 210 の前駆体あるいは阻害ヌクレオチドを導入した時の抗がん薬感受性について検討した。

3. 結果

ソラフェニブ、スニチニブを 4 μ M の濃度で添加した時の 50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) を測定した (表 1)。KB-C2 はパクリタキセルに対して約 14 倍の耐性を示したが、ソラフェニブ、スニチニブを加えることで KB-3-1 と同レベルに IC₅₀ が低下した。

多剤耐性細胞である KB-C2 細胞では、対照群の細胞を 1 としたとき miRNA126 と 210 の発現が有意に低下 (それぞれ 0.20 ± 0.06 , 0.10 ± 0.02 、平均値 \pm 標準誤差) しており、miRNA98 の発現は上昇 (2.44 ± 0.53 、平均値 \pm 標準誤差) していた。一方、miRNA30b および 93 の発現に変化は認められなかった。一方、MDR1 遺伝子を導入した細胞である KB-G2、K562-MDR1 細胞では、分析したマイクロ RNA の発現に有意な変化は認められなかった。さらに KB-3-1 細胞において miRNA126 の機能を阻害することにより、ドキソルビシンへの 50%成長阻害濃度が 2.2 倍に、miRNA210 の機能を阻害することにより、パクリタキセルへの 50%成長阻害濃度が 1.7 倍に上昇した。miRNA126、210 とともに前駆体導入による薬剤感受性への影響は認められなかった (表 2)。

表 1 ソラフェニブ、スニチニブを併用した時の各抗がん薬の IC₅₀

		KB-3-1			KB-C2	
		+ Sunitinib	+ Sorafenib		+ Sunitinib	+ Sorafenib
PTX	12 ± 2	$2.03 \pm 0.35^{\#}$	$0.84 \pm 0.06^{\#}$	$166 \pm 15^*$	$2.35 \pm 0.61^{##}$	$0.66 \pm 0.07^{##}$
MTX	213 ± 5	171 ± 27	201 ± 11	209 ± 18	158 ± 19	195 ± 12
CDDP	2133 ± 129	1845 ± 86	$1162 \pm 83^{##}$	$2575 \pm 28^*$	$2048 \pm 50^{##}$	$1238 \pm 24^{##}$
SN-38	326 ± 12	311 ± 58	311 ± 26	$885 \pm 131^*$	938 ± 27	1016 ± 28

*: $p < 0.01$, compared with KB-3-1 group; #: $p < 0.01$, ##: $p < 0.001$, compared with vehicle treatment; Data are mean \pm SEM.

表 2 マイクロ RNA の前駆体あるいは阻害剤を導入した時の IC₅₀ の変化

	Control	Pre-126	Anti-126	Control	Pre-210	Anti-210
KB-3-1	151 ± 36	143 ± 31	$328 \pm 50^*$	3.11 ± 0.26	4.48 ± 1.28	$5.24 \pm 1.15^*$
KB-C2	1418 ± 286	1088 ± 219	1415 ± 220	107.9 ± 9.4	111.8 ± 5.3	123.3 ± 6.2

*: $p < 0.05$, compared with vehicle group. The group of miRNA 126 was treated doxorubicin. The group of miRNA 210 was treated paclitaxel. Data are mean \pm SEM.

4. まとめ

P-gp が高発現している KB-C2 細胞においてソラフェニブ、スニチニブを併用することによりパクリタキセル、シスプラチンの感受性が上昇することが示唆された。

また KB-C2 細胞において miRNA126 と 210 の発現が低下すること、KB-3-1 細胞においてそれらの miRNA を阻害すると薬剤抵抗性が上昇することから、miRNA126 と 210 の抑制は薬剤耐性克服に有効である可能性が示唆された。

文 献

Ichikawa et al., J. Biol. Chem. 266, 903-8, (1991).

エネルギー代謝指標としての MCT4 の有用性についての基礎的検討

飯塚健治¹、森田憲輝²、町田拓自¹、平藤雅彦¹

¹北海道医療大学 薬学部 薬理学講座

²北海道教育大学岩見沢校 健康・スポーツ科学専攻

要約：2 型糖尿病の発症には骨格筋の糖・脂質代謝機能異常が深く関わっていると考えられており、骨格筋の代謝状態を簡便にモニター出来る診断法の確立はメタボリックシンドロームの治療、予防の観点からも重要である。近年、乳酸の細胞内外の移送には乳酸輸送担体である monocarboxylate transporter (MCT) が関与していることが明らかにされたが、運動や代謝異常等の因子が骨格筋 MCT にどのような影響を及ぼすかについてはよく明らかにされていない。本研究では培養骨格筋細胞を用いて、運動を疑似的に再現することができる圧力負荷装置を用いたメカニカルストレスの存在下において、MCT4 が高グルコースや高インスリン環境下でどのような変化を示すかについて検討するとともに、モデル動物を用いて MCT4 が骨格筋の代謝を反映するバイオマーカーとして有用であるか否かについても検討を行った。その結果、骨格筋細胞の MCT4 は、細胞外のグルコース、インスリン濃度並びにメカニカルストレスによって変動する可能性が明らかとなった。また細胞培養液の検討から、細胞膜に存在する MCT4 が細胞外にも存在する可能性が明らかになった。さらに 2 型糖尿病モデルマウスでの検討から、MCT4 が骨格筋で増加するとともに、血液中の MCT4 も増加傾向を示したことから、骨格筋の MCT4 が循環系へ遊離しているのではないかと考えた。MCT4 が骨格筋の糖代謝環境を反映する新たなバイオマーカーとして利用可能か否について、今後さらなる検討を加える価値があると考えられた。

キーワード：圧力負荷、骨格筋細胞、乳酸輸送担体、乳酸、バイオマーカー

1. はじめに

ライフスタイルの欧米化に伴って肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症、動脈硬化性疾患等の生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿り、これらの克服は国民医療の観点からも極めて重要な課題となっている。特に、動脈硬化症を初めとする様々な全身疾患の前駆状態と位置づけられているメタボリックシンドロームの発症メカニズムの解明と新しい治療法の確立は、予防医学の観点からも極めて重要な課題であり、これまでに例のない高齢化社会を迎えつつある我が国において国民の健康、医療、福祉の向上の観点からその対策は急務である。

糖質は食事などで摂取した総量の多くが骨格筋で処理されるとされており、糖尿病（2 型）は骨格筋の糖、脂質代謝機能異常が発症に深く関わっていると考えられている。骨格筋は生体最大の臓器であり、運動、エネルギー消費、糖脂質代謝に重要な役割を果たす。骨格筋量とその構成成分は、骨格筋の機能発現に重要であるが、これは身体の活動量や環境、種々の病態により変化するとともに、骨格筋の代謝機能を高める運動療法は、糖尿病の予防および治療に効果的である。

一方、細胞内に存在する乳酸は、エネルギー代謝（解糖）の課程で生成され、細胞内 pH に大きな影響を与えることから、嫌気性代謝においては細胞外へ移送される一方、様々な環境下において乳酸はエネルギー源として細胞間で積極的に移送され、エネルギー源として取り込まれていることが明らかにされている¹。これら乳酸の細胞内外の移送には MCT が重要な役割を果たしており、これまでに骨格筋において、MCT のアイソフォームの一つである MCT4（MCT3-M）が乳酸の細胞内外の移送に中心的な機能を果たしていることが明らかにされるとともに²、動脈硬化病変においてこの MCT の発現が局所で増加することが報告され³、その生体内での機能が注目されている。

2. MCT1 の生体内での挙動

これまでの検討から、我々は MCT のアイソフォームの一つである MCT1 が血液中に存在する事を見い

出した⁴。この結果から、MCT4 も同様に血液中に存在する可能性があるのではないかとこのMCT4 の変化が、末梢組織におけるエネルギー代謝の一部を反映する可能性があるのではないかと考えた。

3. 圧力負荷が細胞に与える影響

機械的ストレスの一種である圧力負荷が細胞に対してどのような影響を及ぼすかについてこれまでに様々な観点から検討した結果、ヒト大動脈平滑筋細胞では、160 mmHg、3 時間の加圧ストレスによって [³H] -TdR の取り込みや tetrazolium 塩の代謝が亢進し、これらの細胞が圧力負荷に応答を示す事が明らかになった⁵。また、ERK、JNK の発現や c-Src⁶ などの情報伝達カスケードに変化が認められ、これらの蛋白が圧力ストレス情報を細胞内へ伝達する経路の一部を形成していると考えられた。そして圧力負荷が、MCT に対してもその発現に影響を与える事が明らかになったことから⁷、圧力負荷装置を用いて運動中に発生する筋内圧の上昇を再現し、この環境下で MCT の発現と運動の間にどのような関係があるかについて検討を行うことにした。

4. MCT4 の変化

筋管細胞へ分化誘導した骨格筋細胞の培養液中の乳酸濃度は高グルコース (400 mg/dl) 環境および圧力負荷により増加したが、インスリン (20 ng/ml) の添加により抑制された。高グルコース並びに高インスリン環境下で、MCT4 mRNA と蛋白質発現は増加したが、圧力負荷は MCT4 mRNA 発現を抑制した。圧力負荷ならびに高インスリン環境下では、細胞培養液中に MCT4 蛋白質の遊離が認められた。さらに糖尿病モデル動物である KK-Ay の骨格筋では、MCT4 蛋白質が C57BL/6J と比較してより多く存在しており、このモデル動物の血清中の MCT4 蛋白質は、血清インスリン濃度との間で正の相関を示した。

5. おわりに

MCT4 が骨格筋のエネルギー代謝環境を反映する新たなバイオマーカーとして利用可能であるか否について、さらなる検討を加える価値があると考えられた。今後は発現に関わる調節因子や循環中に遊離するメカニズム、並びに血清中の MCT4 の役割などについてさらなる検討が必要であると考えられる。

文 献

1. George A. Brooks, Hervé Dubouchaud, Marcia Brown, James P. Sicurello, and C. Eric Butz. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96, 1129–1134.
2. Wilson MC, Jackson VN, Heddl C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF, Halestrap AP. Lactic Acid Efflux from White Skeletal Muscle Is Catalyzed by the Monocarboxylate Transporter Isoform MCT3. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 15920–15926.
3. Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Inactivation of Monocarboxylate Transporter MCT3 by DNA Methylation in Atherosclerosis. *Circulation.* 2005; 112, 1353–1361.
4. Kenji Iizuka, Noriteru Morita, Tatsuya Nagai, Akiko Hanada, Koichi Okita, Kazuya Yonezawa, Takeshi Murakami, Akira Kitabatake, Hideaki Kawaguchi. A 44-kDa of protein identical to the N-terminal amino acid sequence of MCT1 in human circulation. *Mol Cell Biochem.* 2003; 248, 217–23.
5. Ozaki T, Iizuka K, Suzuki M, Murakami T, Kitabatake A, Kawaguchi H. Threshold-dependent DNA synthesis by pure pressure in human aortic smooth muscle cells: Gialpha-dependent and -independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256, 212–7.
6. Morita N, Iizuka K, Murakami T, Kawaguchi H. N-terminal kinase, and c-Src are activated in human aortic smooth muscle cells by pressure stress. *Mol Cell Biochem.* 2004; 262, 71–8.
7. Oikawa K, Iizuka K, Murakami T, Nagai T, Okita K, Yonezawa K, Kitabatake A, Kawaguchi H. Pure pressure stress increased monocarboxylate transporter in human aortic smooth muscle cell membrane. *Mol Cell Biochem.* 2004; 259, 151–6.

大脳皮質に特異的なムスカリン受容体の生体内表現型

西宗敦史、A.S.M. Anisuzzaman、吉木はつみ、宇和田淳介、村松郁延
福井大学医学部薬理学領域

要約：哺乳動物細胞株に薬物受容体 cDNA を発現させることによって、受容体の薬理学的表現型の多くを再構成することができる。これによって受容体の表現型解析や、薬物スクリーニングは大きく進展した。しかしながら、生体内で見られる全ての表現型が忠実に再構成されているわけではない。受容体の表現型を解析する上で、結合実験は非常に有用な研究手段の一つであるが結合実験には、試料として通常ホモジナイズした膜画分を用いるため、その適用は膜画分の調製操作で損なわれない表現型に限定される。我々は、インタクトな組織切片を試料として用いる『組織片結合実験法』を開発し、膜画分の調製操作に感受性を示す生体内表現型を発見しようと試みている。今回はムスカリン受容体の未知の生体内表現型の研究を目的として、 $[^3\text{H}]\text{-N-methylscopolamine}$ ($[^3\text{H}]\text{-NMS}$) を用いて組織片結合実験を行った。

組織片結合実験法による解析でも、 $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ の特異的結合が観察できた。受容体密度は変化しなかったが、解離定数には膜標品との間で差が見られた。大脳皮質には M1, M2, M3, M4 サブタイプの結合がみられたがこのうち M3 は大脳皮質特異的に、組織切片で高親和性 M3 拮抗薬(darifenacin, solifenacin)に対して低親和性を示した。生体環境下での M3 の膜標品や組換え受容体標品では再構成されないことが明らかとなった。中枢性の M3 は摂食調節等を初めとして薬物標的として魅力的な生体機能を有しており、今回の知見は向中枢性のムスカリン受容体標的薬の開発に有用な知見を提供していると考えられた。

キーワード：M3 ムスカリン受容体、ソリフェナシン、 $[^3\text{H}]\text{-N}$ -メチルスコポラミン、組織片結合実験法、M1 ムスカリン受容体

1. はじめに

近年の受容体研究の進展により、受容体の細胞内領域には多くのタンパク質が結合し、タンパク質複合体を形成していることが明らかとなってきた。この複合体により受容体の細胞内局在や代謝回転の速度、シグナル伝達経路の選択など、受容体機能発現に重要な性質が調節を受けていることが解明されつつある。これらに対し、薬物の結合部位については、同一の受容体サブタイプから組織依存的に多様性を示す現象については十分な検討がなされているとは云いがたい。つまり組織特異的な受容体の表現型解析は今後の課題として残されたままであると考えられる。今回は $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ を用いて組織片結合実験を行い、ムスカリン受容体の生体内表現型の解析を行った。

2. まず、 $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ を用いた組織片結合実験が生体内ムスカリン受容体の研究に利用可能であるかどうかを検討するため、 $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ の結合と解離の時間発展を解析した。その結果、少なくとも 12 時間以内に、結合反応と解離反応の両者が十分な平衡に到達していることが確認できた。次に組織片と膜ホモジネートそれぞれで $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ の結合実験を行った結果、両者で同程度の受容体量が得られた。従って、ムスカリン受容体はどちらの方法で解析しても、本研究に用いた実験条件下で比較的安定な形態で存在していることが示唆された。

3. 次に、ムスカリン受容体各サブタイプに特異性の高い各種アンタゴニストを用いて、アフィニティーの測定を行った。Pirenzepine 結合部位については、組織片で見られる低親和性の結合部位がホモジネートで消失していたが、これは先に報告した(Lee et al., 2010)M1 サブタイプの細胞内受容体を観

察しているものと考えられる(Figure 1 A)。

これに加えて、M3 受容体について膜ホモジネートで観察された高親和性の結合部位が、大脳皮質の組織片では特異的に消失していることが明らかとなった(Figure 1 C)。大脳皮質には、M1、M2、M3、M4 の各サブタイプに特異的な結合が観察されるが、M3 選択的アンタゴニストである darifenacin または solifenacin で競合される M3 結合部位は組織片では pKi が 6.4(darifenacin)或いは 6.7(solifenacin)の単一の結合部位が見られた。これに対して膜ホモジネートではこれらと同様の低親和性の結合部位に加えて pKi が 8.5(darifenacin)或いは 8.2(solifenacin)の高親和性結合部位が見られるようになった。

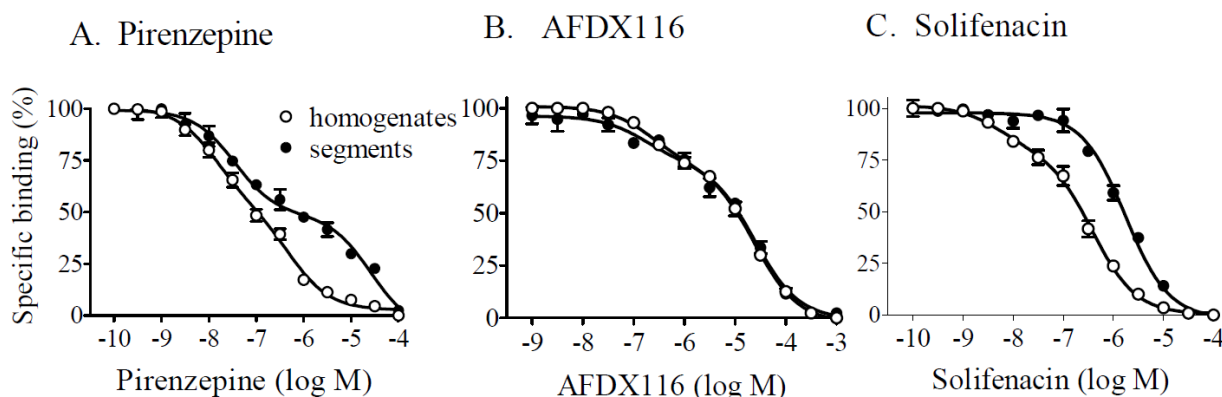


Figure 1. Muscarinic receptor subtypes in the rat cerebral cortex

4. ラット大脳皮質の組織片で M3 受容体の anomaly が観察されたため、脳の他の部位も剖出して検討を行った。比較対照としては海馬、線条体、中脳、橋を用い、膀胱平滑筋、胃壁平滑筋及び顎下腺を末梢組織の対照として用いた。Darifenacin と solifenacin の両者で同様な結果が得られたが、大脳皮質以外の脳部位では対照の末梢組織と同様に高親和性と低親和性の二相の pKi が観察され、上記の anomaly は大脳皮質に特異的であることが明らかとなった。

5. おわりに

生体環境下での M3 の膜標品や組換え受容体標品では再構成されない大脳皮質特異的な M3 の新たな性質が明らかとなった。上記の M3 アンタゴニストは過活動膀胱の治療薬として末梢 M3 拮抗薬として臨床応用されているが、これらの薬物は特に中枢性の（副）作用は持たない。一方、中枢の M3 は摂食調節に関与することが示されており、本結果は中枢 M3 に作用する拮抗薬の開発上有用な知見を与えていると考えられた。我々はアドレナリン α 1A 受容体の生体内表現型である α 1L 受容体の in vitro 再構成を報告(Nishimune et al., 2010)したが、M1 の細胞内受容体、M3 の大脳皮質特異的低親和性受容体についても同様な再構成が可能であれば、中枢のムスカリン受容体を標的とする薬物開発に有益な知見を提供できる可能性があると考えられた。

文 献

- Nishimune A., Suzuki F., Yoshiki H., Morishima S. & Muramatsu I. α 1-Adrenoceptor pharmacome: α 1L-Adrenoceptor and α 1A-adrenoceptor in the lower urinary tract. *Int. J. Urol.* **17**: 31-37. 2010.
- Yoshiki H., Nishimune A., Suzuki F., Morishima S., Ikeda T., Sasaki M., Audigane L.M., Gauthier C. & Muramatsu I. Evaluation of β 1L-adrenoceptors in rabbit heart by tissue segment binding assay. *J. Pharmacol. Sci.* **110**: 389-396. 2009.
- Lee K-S., Nishimune A., Anisuzzaman A.S.M., Yoshiki H., Suzuki F., Wang M-H., Cheng J-T. & Muramatsu I. Assessment of novel muscarinic acetylcholine receptors in rat cerebral cortex by tissue segment binding method. *J. Pharmacol. Sci.* **112**:444-451,2010
- Nishimune A., Suzuki F., Yoshiki H., Morishima S. & Muramatsu I. Identification of CRELD1 α as a novel α 1A-adrenoceptor-down-regulating protein and establishment of an α 1L-adrenoceptor expressing cell line. *J. Pharmacol. Sci.* **113**:169-181,2010

プロスタグランジン I₂ の非アルコール性脂肪性肝炎の

発症・進展における役割解明

桑井志麻^{1,2}、結城幸一¹、小島史章¹、柏木 仁¹、奥村利勝²、牛首文隆¹

¹旭川医科大学・医学部・薬理学講座 ²旭川医科大学病院・総合診療部

要約：脂肪肝が起因となり発症する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の患者数は、現在少なくとも 100 万人と推定されている。NASH 患者は高頻度で肝硬変や肝がんを発症することから、NASH の病態解明と治療法の確立が急務となっている。一方、プロスタグランジン (PG)I₂ は、アラキドン酸に由来する生理活性脂質であり、血管内皮細胞やマクロファージから産生され、PGI₂ 受容体 (IP) を介して多彩な作用を発揮する。IP は、肝臓を構成する多種類の細胞においてその発現が認められ、PGI₂ の慢性肝疾患における肝線維化や門脈圧調節への関与が示唆されている。また、NASH 患者の肝臓で、PGI₂ を含めたプロスタノイド合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 の発現亢進を示す報告があり、NASH 病態形成にプロスタノイドが関与する可能性が示されている。しかし、PGI₂ を含めたプロスタノイドと NASH との関連は不明である。そこで、野生型 (WT) マウスと PGI₂ 受容体 (IP) 欠損マウスに、メチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) を 10 週間与え、NASH 病態モデルを作成した。その結果、MCD 食負荷では、WT マウスは点状赤色紋理を伴う軽度の肝炎を呈したのに対し、IP 欠損マウスは網状赤色紋理及び著しい肝表の凹凸を呈した。血清学的解析では、IP 欠損マウスに AST/ALT 比の逆転、血清アルブミン値の低下、血清フェリチン値の著しい上昇を認めた。これらの結果、IP 欠損マウスでは NASH 病態の進展が有意に加速することが示された。以上より、PGI₂-IP 系は、NASH 病態形成において重要な役割を果たすことが示唆された。

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎、プロスタグランジン I₂、メチオニン・コリン欠乏食、酸化ストレス、鉄

1. はじめに

日本では戦後の食生活の欧米化と、自動車普及率の上昇に伴う運動量の減少により、現在 BMI が 25 以上の肥満成人は 2300 万人にも達する。肥満者では脂肪肝の合併率が高い。近年脂肪肝は、脂肪性肝炎を経て最終的には肝硬変へも進展しうる進行性の病気であることが認識されはじめている。脂肪肝の中で、特に肝硬変への移行率の高い組織学的な特徴（脂肪肝に炎症性細胞浸潤と粗面小胞体の水腫性変化を認める）を示すものが、NASH と定義される (1)。現在、日本の NASH 患者は少なくとも 100 万人と推定されているが、今後患者数は日本のみでなく欧米諸国でもさらに増加することが予測される。したがって、NASH は世界的にもその病態解明と治療法の確立が急務とされる疾患に位置付けられる。ところで NASH の発症機構では、脂肪肝の形成 (first hit) 後に、何らかの肝細胞障害因子 (second hit) が加わり発症するという 2 hit theory が広く受け入れられている (2)。Second hit には、肝での過剰な脂肪酸負荷に伴う脂質代謝の促進から生じる酸化ストレスの亢進や、腸内細菌由来の lipopolysaccharide による Kupffer 細胞の過剰な活性化等が考えられている。

2. MCD 食負荷による NASH 病態モデル

メチオニンまたはコリンは、リン脂質であるフォスファチジルコリン (PC) の合成に必須である。PC は、肝細胞内の中性脂肪等の脂質を血中に分泌する VLDL を構成する主要なリン脂質である。PC の欠乏は VLDL の分泌を障害し、脂肪肝を形成する (3)。PC の不足による VLDL 分泌不全は、肝細胞内の脂質合成を抑制するが、同時に細胞外の脂質の取り込みと β 酸化を亢進させるため、酸化ストレスを惹起する (4)。一方、メチオニンは抗酸化作用のあるグルタチオンの合成に必要な S-アデノシルメチオニンに必須であり、メチオニンの欠乏は酸化ストレスを助長する。我々は、野生型マウスへの 10 週間の MCD 食負荷で全例が NASH を発症することを確認した。

3. MCD 食負荷の IP 欠損マウスでは NASH の病態が進行する

10 週間の MCD 食負荷の IP 欠損マウスでは、肝表に網目状の紋理と著しい凹凸が出現し、野生型マウスに比べ門脈の拡張と脾臓の腫大傾向を示した。さらに MCD 食負荷の IP 欠損マウスは、野生型マウスに比べ血清アルブミン値は有意に低下し、血清 AST/ALT 比が高値を示した。以上より MCD 食負荷の IP 欠損マウスでは、組織学的・血清学的に肝機能障害の悪化を認め、NASH の病態が進行したと考えられた。

4. MCD 食負荷の IP 欠損マウスでは肝に鉄が過剰に蓄積する

肝細胞中の鉄は、血清フェリチン (Fer) 濃度に正の相関を示し、血清 Fer 濃度は正常肝、単純性脂肪肝、NASH 患者の順に上昇する (5)。NASH 発症の主要な second hit は、酸化ストレスである。肝での鉄の過剰蓄積が、フェントン反応を介して活性酸素を生成し、NASH の発症・進展に関与する。また瀉血により NASH 患者の肝機能が改善することが知られている。そこで我々は、MCD 食負荷のマウスにおける鉄の蓄積の解析を行った。その結果、MCD 食負荷の IP 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、血清 Fer 値が有意に上昇していた。また IP 欠損マウスでは、肝組織のベルリンブルー染色により肝細胞における鉄の蓄積が著明に亢進することが明らかとなった。以上より、IP 欠損マウスでは肝臓に鉄が過剰に蓄積することで MCD 食負荷に伴う酸化ストレスが増強し、NASH の病態が進行したと考えられた。

5. おわりに

PGI₂-IP 系が、NASH の病態の進行を抑制することが明らかとなった。また、IP 選択的アゴニストの NASH 治療薬としての可能性が期待される。

文 献

- (1) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:434–438.
- (2) Day CP, James OF. Steatohepatitis; a tale of two “hit”? *Gastroenterology* 1998;114:842–845.
- (3) Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1988;263:2998–3004.
- (4) Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res.* 2006;47:2280–2290.
- (5) Yoneda M, Nozaki Y, Endo H, Mawatari H, Iida H, Fujita K, Yoneda K, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Maeyama S, Hotta K, Nakajima A. Serum ferritin is a clinical biomarker in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis independent of HFE gene mutation. *Dig Dis Sci.* 2010;55:808–814.

Toll-like receptor 4 および細胞外 ATP による

ミクログリアの細胞死/生存調節

原田 佳奈¹、秀 和泉¹、藤原 俊輔¹、関 貴弘¹、田中 茂¹、仲田 義啓²、酒井 規雄¹
 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・¹神経薬理学、²薬効解析科学

要約：脳内のマクロファージ様細胞であるミクログリアは脳内炎症において中心的役割を果たすが、炎症時のミクログリアの生存がどのように制御されるのか不明な点が多い。我々は、脳障害時に損傷組織から放出されることが示唆されている炎症誘導物質 Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドと ATP が協調してミクログリアの生存を調節することを見出した。単離培養ミクログリアは徐々に自発的細胞死を起こすが、TLR4 の過剰な活性化を受けると速やかに細胞死に至った。しかし、穏やかな（適度な）TLR4 活性化を受けた場合、ミクログリアは長期間生存することが明らかとなった。さらに、細胞外 ATP は TLR4 の過剰な活性化を受けたミクログリアの細胞死を促進する一方、穏やかな活性化を受けたミクログリアの生存をさらに強く維持した。また、ATP の細胞死促進作用および生存促進作用は異なる機序を介して発揮され、それぞれ、①アデノシン、②P2X₇ 受容体が関与することが示唆された。以上の結果から、TLR4 と細胞外 ATP はミクログリアの細胞死および生存調節を介して、脳内炎症の制御に役割を果たす可能性が示された。

キーワード：ミクログリア、細胞死/生存、Toll 様受容体、ATP、アデノシン

1. はじめに

脳内のマクロファージ様細胞であるミクログリアは、細胞体から長い突起を伸ばして脳内環境を監視しており、ひとたび異常を感知すると脳障害部位へ遊走し、死細胞の貪食や神経栄養因子の産生を行う。一方、種々の神経疾患において、ミクログリアは過剰な炎症反応を誘発し、病態の増悪に関与することが示唆されている¹⁾。したがって、適切な炎症の維持、終結が行われることが、脳障害後の組織修復に重要であると考えられる。炎症は、炎症細胞の生存維持や細胞死誘導などによる細胞数の調節によっても制御される。脳内炎症においてもミクログリアの生存および細胞死誘導は、組織修復・病態形成に深く結びつくと推測されるが、その調節機構には不明な点が多い。最近、脳障害時には、損傷組織から放出される細胞外シグナル分子がミクログリアの活性化を引き起こすことが明らかにされつつある。このようなシグナル分子のうち、炎症誘導物質である Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドと細胞外 ATP が協調してミクログリアの生存調節に関わることを我々は見出し、その調節機構について検討を行った。

2. TLR 4 の活性化の強さに依存したミクログリアの細胞死および生存調節

TLR4 の活性化を受けたミクログリアは脳内炎症を誘発し、脳虚血や神経疾患の病態形成に関与することが示唆されている²⁾。本研究では、TLR4 リガンドであるリポポリサッカライド (LPS) を用いて、炎症時のミクログリアの生存調節における TLR4 の役割を検討した。単離したラット初代培養ミクログリアは長期間生存できず、2 日後にはすべて死滅した。この単離ミクログリアに LPS を処置すると、LPS は濃度依存的 (5-100 ng/mL) にミクログリアの細胞死を促進した。しかし、このとき細胞死を起こさなかった一部のミクログリアは、その後長期間 (3-7 日間) 生存し続けることが明らかとなった。一方、より低濃度の 1 ng/mL LPS は細胞死を誘導することなく、生存促進作用のみを発揮した。また、この時用いた濃度の LPS によるミクログリアの活性化の程度を、炎症メディエーターであ

一酸化窒素 (NO) の放出量を指標として検討した。LPS による NO 放出は、LPS 1 ng/mL 以上で認められ、5 ng/mL から 10 ng/mL で最大に達した。したがって、TLR4 の過剰な活性化を受けた高傷害性ミクログリアは速やかに細胞死に至る一方、穏やかな (適度な) 活性化を受けた低傷害性ミクログリアは長期間生存する能力を獲得すると推察された。

3. 細胞外 ATP 刺激による TLR4 活性化ミクログリアの細胞死および生存の促進

細胞内に高濃度存在する ATP は、脳障害時には損傷を受けた組織から多量に放出され、多彩な作用を発揮する³⁾。ATP (1 mM) は単独ではミクログリアの生存には影響を及ぼさなかったが、高濃度 LPS (10 ng/mL) で刺激したミクログリアの細胞死を促進した。一方、低濃度 LPS (1 ng/mL) で活性化したミクログリアにおいては、ATP は細胞死を促進することなく、その生存をさらに強く促進した。したがって、細胞外 ATP は、過剰に活性化したミクログリアの細胞死を促進するとともに、穏やかな活性化を受けたミクログリアの生存を維持すると考えられた。

4. 細胞外 ATP による細胞死促進作用と生存促進作用の発現メカニズムの違い

ATP 非水解性アナログである ATP γ S は ATP とは異なり、高濃度 LPS (10 ng/mL) により誘導されるミクログリアの細胞死に影響を与えなかった。さらに、ATP の分解産物であるアデノシンは、ATP と同程度の細胞死促進作用を示したことから、ATP による細胞死促進には、ATP から生成されたアデノシンが関与すると考えられた。一方、低濃度 LPS (1 ng/mL) によるミクログリアの生存維持に対しては、ATP γ S は ATP よりも強い促進作用を示すことが明らかとなり、ATP による生存促進には ATP 自体が関与すると考えられた。さらに、薬理的検討により、生存促進には ATP 受容体である P2X₇ 受容体が関与することが示唆された。

5. おわりに

ミクログリアは脳内の恒常性維持において重要な役割を果たすが、時として過剰な炎症反応を誘導し、周辺組織に傷害を与える。したがって、ミクログリアの活性は厳密に制御される必要がある。本研究により、TLR4 を介した炎症誘発時のミクログリアの生死は、ミクログリアの傷害性の高さに応じて決定されることが示唆された。さらに、細胞外 ATP は、高傷害性ミクログリアの細胞死誘導および低傷害性ミクログリアの生存を促進することにより、傷害を抑え、より保護的な方向へと脳内炎症の制御を行う可能性が示された。

文 献

- 1) Glass C. K., Saijo K., Winner B., Marchetto M. C. and Gage F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918-934.
- 2) Lehnardt S. (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* **58**, 253-263.
- 3) Di Virgilio F., Ceruti S., Bramanti P. and Abbracchio M. P. (2009) Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci.* **32**, 79-87.

脳内エンドカンナビノイドの中枢性交感神経—副腎髄質系賦活における抑制性制御

清水孝洋、横谷邦彦

高知大学医学部薬理学講座

要約：私達は交感神経-副腎髄質系(SA系)の中枢性賦活機構を解析する過程で、①SA系賦活に脳内アラキドン酸(AA)カスケードが関与する事、及び②その賦活の際、AA前駆体として脳内2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)が関与する事、を明らかにしてきている。近年、この2-AGがマリファナ中に含まれているカンナビノイド(CB)に対する受容体(CB受容体)の内因性リガンド、つまりエンドカンナビノイド(eCB)であることが報告され、脳内で神経調節機能を有する事が示されている。すなわち、神経刺激により後シナプスで産生された2-AGが前シナプスのCB₁受容体を賦活し、逆行性に神経伝達物質の放出を抑制する、という機構である。そこで私達は、中枢性SA系賦活制御に対する脳内eCBの役割について薬理的に検討した。結果、脳内eCBがCB₁受容体を介して中枢性SA系賦活を抑制的に制御する事が明らかとなった。以上から、脳内eCBシステムを賦活する薬物が中枢性SA系賦活抑制薬として臨床応用される事が期待される。

キーワード：脳、交感神経—副腎髄質系、2-アラキドノイルグリセロール、エンドカンナビノイド、カンナビノイドCB₁受容体

1. はじめに

ストレスに対する生体反応にはSA系が重要な役割を担っているが、この系の過剰な活性化は高血圧症、消化性潰瘍、免疫機能低下による発癌などを引き起こす[1-2]。したがって、これらストレス性疾患の治療及び発症予防には、SA系の中枢性制御機構の解明が不可欠である。私達はこれまで、種々のストレス関連物質[コルチコトロピン放出因子(CRF)、アルギニン・バソプレシン(AVP)、ボンベシン(BB)など]のラット脳室内投与による血中カテコールアミン(CA) (ノルアドレナリン及びアドレナリン)増加がシクロオキシゲナーゼ阻害薬により著しく抑制されたことから、中枢性SA系賦活機構における脳内AAカスケードの関与を明らかにしてきた[3-5]。

2. 脳内ホスホリパーゼCを介した脳内AA産生経路—脳内2-AGの関与—

そこで、CRF、AVP及びBBにより惹起される中枢性SA系賦活時の脳内AA産生経路を解析した所、代表的なAA産生酵素であるホスホリパーゼA₂ではなく、脳内ホスホリパーゼC(PLC)が関与する事を両酵素の阻害薬を用いた実験から明らかにした[6-8]。さらに、脳内PLCにより細胞膜リン脂質から生成されたジアシルグリセロール(DAG)がDAGリパーゼ(DGL)により加水分解されて2-AGが生じ、2-AGがさらにモノアシルグリセロールリパーゼ(MGL)により加水分解されてAAが産生される、という脳内PLC/DAG/2-AG/AA経路(図1)が中枢性SA系賦活に

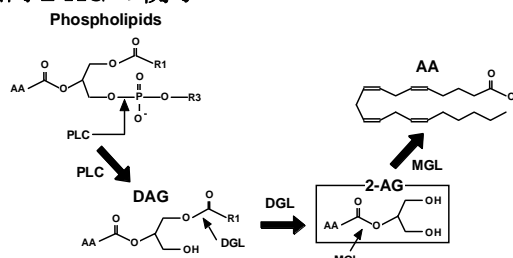
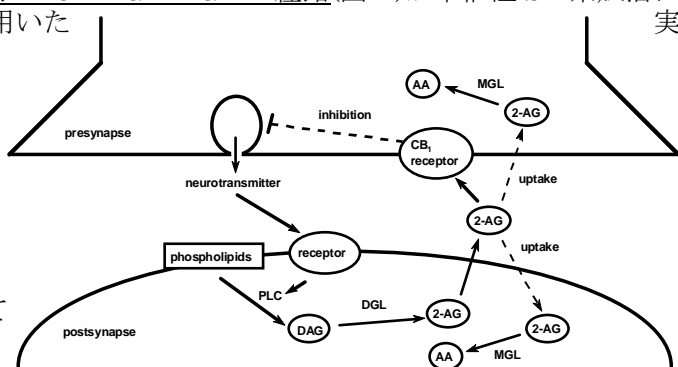


図1. 脳内PLC/DAG/2-AG/AA経路(図1)が中枢性SA系賦活に

3. 脳内eCBの神経系における機能

興味深いことに、このAA前駆体である2-AGはCB受容体に対する内因性リガンド、つまりeCBである事が報告されている[11-12]。2-AGは神経活動に対してネガティブ・フィードバック様の神経興奮抑制作用を有する事が示されている。すなわち、興奮した神経の後シナプスにおいて細胞膜リン脂質からPLC及びDGLを介して産生された2-AGはシナプス間隙に遊離され、



前シナプスに存在するCB₁受容体に逆行性に作用して神経伝達物質の遊離を抑制する(図2)[12-14]。さらにシナプス間隙に遊離された2-AGは細胞内へ取り込まれてAAとグリセロールに速やかに分解されて不活性化される(図2)[14-15]。この逆

行性の抑制シグナルがシナプスの長期抑圧、摂食促進作用などの eCB が有する中枢作用に関与する事が示唆されている[16-17]。CB と中枢性 SA 系賦活との関連についてはいくつか報告が散見される[18-19]ものの、その多くは外来性に投与した CB の影響を検討したものであり、中枢性 SA 系制御における脳内「エンド」カンナビノイドの役割は不明である。

4. 中枢性 SA 系賦活に対する脳内 eCB の抑制性制御

そこで、CRF、AVP 及び BB により惹起される中枢性 SA 系賦活に対する脳内 eCB の役割について CB₁ 受容体レベルで検討した。AM 251 (CB₁ 受容体遮断薬)の脳室内前処置は CRF、AVP 及び BB による血中 CA 増加作用を著しく増強させた[9-10]。さらに、WIN 55212-2 (非選択的 CB 受容体刺激薬)の脳室内前処置は、AVP による血中 CA の増加作用を著しく抑制し[9]、ACEA (CB₁ 受容体刺激薬)の脳室内前処置も CRF 及び BB による血中 CA の増加作用を著しく抑制した[10]。これらの成績から、中枢性 SA 系賦活時に生成された内因性 2-AG により、脳内 CB₁ 受容体を介して本系の賦活が抑制的に制御されている事が示唆される。

内因性に生成された 2-AG は、取り込み機構によりシナプス外において不活化される(図 2)。そこで、CB 取り込み阻害薬 AM 404 の影響を解析した。AM 404 の脳室内前処置は CRF 及び BB による血中 CA の増加作用を著しく抑制した[10]事から、取り込み機構の抑制により増加した内因性の 2-AG は、さらなる抑制作用を示す事が推測される。

以上の実験成績から、脳内 eCB (おそらく 2-AG)は CB₁ 受容体を介して中枢性 SA 系賦活に対し抑制性に関与するものと考えられる。

5. おわりに

図 3 にこれまでの私達の成績をまとめた。これら成績から、中枢性 SA 系賦活に対する抑制薬としては CB₁ 受容体刺激薬が効果的と考えられる。しかしながら、CB₁ 受容体は脳内の広範に分布しているため[20]、その受容体刺激薬も脳内の広範な部位に作用し、マリファナが有する多彩な生理作用(幻覚、陶酔感、自発運動量低下など)を引き起こす可能性がある[21]。一方、CB 取り込み阻害薬は eCB の

代謝回転が亢進している部位に局限して作用し、eCB の不活性化を抑制するため、中枢性 SA 系賦活時に活性化される部位を選択的に抑制する利点がある。今後、精神的副作用の少ない中枢性 SA 系賦活抑制薬として「CB 取り込み阻害薬」が臨床応用される事が期待される。

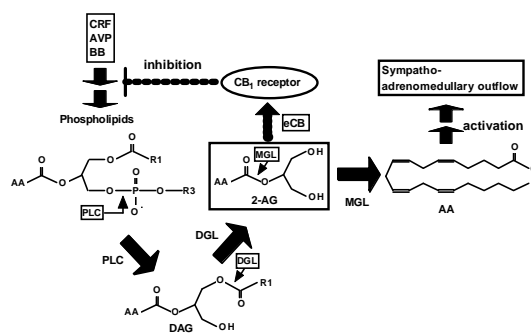


図 3. 私達の実験成績のまとめ

文 献

- [1] Vanitallie TB. Metabolism 2002; 51: 40-45. [2] McDougall SJ, et al. Auton. Neurosci. 2005; 123: 1-11. [3] Yokotani K, et al. Eur. J. Pharmacol. 2001; 419: 183-189. [4] Okada S, et al. Eur. J. Pharmacol. 2002; 457: 29-35. [5] Lu L, et al. Eur. J. Pharmacol. 2008; 590: 177-184. [6] Okada S, et al. Eur. J. Pharmacol. 2003; 475: 49-54. [7] Shimizu T, et al. Eur. J. Pharmacol. 2004; 499: 99-105. [8] Shimizu T, et al. Eur J Pharmacol 2005; 514: 151-158. [9] Shimizu T and Yokotani K. Eur. J. Pharmacol. 2008; 582: 62-69. [10] Shimizu T, et al. Eur. J. Pharmacol. 2010; 641: 54-60. [11] Sugiura T, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995; 215: 89-97. [12] Sugiura T, et al. Prog. Lipid Res. 2006; 45: 405-446. [13] Freund TF, et al. Physiol. Rev. 2003; 83: 1017-1066. [14] Di Marzo V. Trends. Pharmacol. Sci. 2006; 27: 134-140. [15] Bisogno T. J. Neuroendocrinol. 2008; 20: 1-9. [16] Di Marzo V, et al. Int. J. Obes. 2009; 33: S18-S24. [17] Heifets BD and Castillo PE. Annu. Rev. Physiol. 2009; 71: 283-306. [18] Padley JR, et al. Br. J. Pharmacol. 2003; 140: 384-394. [19] Pfitzer T, et al. Br. J. Pharmacol. 2004; 142: 943-952. [20] Howlett AC, et al. Pharmacol. Rev. 2002; 54: 161-202. [21] Kalant H. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2004; 28: 849-863.

脳神経細胞におけるインスリンシグナル：恒常性維持のためのシグナル変動

横尾宏毅¹⁾、根本隆行²⁾、柳田俊彦²⁾、山本誠二¹⁾、富田賢吾¹⁾、高野健一¹⁾、服部裕一¹⁾

¹⁾富山大院・医薬・分子医科薬理学、²⁾宮崎大・医・薬理学

要約：神経細胞のインスリンシグナルは、末梢組織における糖代謝シグナルとしてよりも、神経細胞の成熟、細胞相互のネットワーク形成、細胞修復に必須のシグナルと考えられている。培養副腎髄質クロマフィン細胞にインスリンを処置すると、電位依存性 Nav1.7 チャネルの細胞膜発現が増加、細胞における電氣的刺激増加が示唆された。またインスリンシグナル分子の glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 活性を躁病治療薬でもあるリチウムの処置により低下させると、それに応じてインスリン受容体発現、insulin receptor substrate (IRS)-1、IRS-2 の蛋白発現が減少した。一方、敗血症モデルマウスにおける脳神経細胞の解析では、心臓のような末梢臓器でのインスリンシグナル減少とは異なり、インスリンシグナル分子の Akt および GSK-3 β のリン酸化量は増加、インスリン受容体シグナルは増加していた。以上のことから、脳神経細胞にはその生育環境に応じた適度なインスリンシグナルを保つために様々なシグナル調節機構が存在し、生命の核ともいえる神経活動を支えているものと考えられた。

キーワード： インスリン、シグナル変動、神経変性疾患、GSK-3 β 、酸化ストレス

1. はじめに

インスリン抵抗性の病態は、糖代謝異常を背景として種々の臓器組織に機能障害を引き起こす。さらに、インスリンシグナルの糖代謝以外の生理作用として、細胞の増殖・分化・成熟過程への関与、蛋白合成促進作用、細胞死抑制効果、抗炎症作用などが、近年注目されてきている。特に脳神経組織では、いくつかの神経変性疾患発症に、インスリンシグナル減少が関与していることがこれまで次々と明らかになってきた¹⁾。ここでは、脳神経細胞におけるインスリンシグナルの変化を、培養神経系細胞を用いた *in vitro* の検討、および炎症を惹起した全身性傷害モデルマウスを用いた *in vivo* での解析結果を交えて紹介する。

2. 脳神経細胞におけるインスリンシグナル

インスリンをはじめとした成長因子は、総じて神経細胞体からの神経突起伸長に関与し、細胞相互のネットワーク形成に関与している。培養副腎髄質クロマフィン細胞にインスリンを処置すると、インスリンシグナル伝達分子の、Akt、GSK-3 β 、ERK1/2 等にリン酸化が生じてシグナル経路が活性化されるとともに、電位依存性 Nav1.7 チャネルの細胞膜発現が増加した²⁾。Nav1.7 は、神経細胞においては特に成長円錐部に発現し、神経細胞分化の際には、その発現量が増加することが知られている。インスリンは、発現が増加した Na チャネル活性化による電氣的興奮を介して、加えて分泌されるカテコラミンをはじめとした神経伝達物資のそれぞれの受容体への作用増加を介して、神経細胞相互のネットワーク形成を密にし、神経活動を活性化しているものと考えられる。

3. 躁病治療薬によるインスリンシグナル変動

インスリンシグナルを伝達する分の中でも GSK-3 β については、リチウム、バルプロ酸ナトリウムといった躁病治療薬が、その活性を阻害することが知られている³⁾。GSK-3 β は、そもそも細胞外からの刺激を受けていない状態において構成的活性を有しており、下流の基質蛋白質（転写調節因子 β カテニン、細胞骨格蛋白質タウなど）の多くをリン酸化/不活性化している。培養副腎髄質クロマフ

イン細胞にリチウムを処置すると、GSK-3 β Ser⁹リン酸化量は増加した。すなわち GSK-3 β 下流の基質蛋白質活性は増加したが、一方上流のインスリンシグナルはどう変化するか、細胞膜インスリン受容体発現について ¹²⁵I-insulin 結合により検討した。リチウム処置によりインスリン受容体細胞膜発現は減少した。さらに、リチウム処置細胞におけるインスリン受容体チロシンキナーゼ活性を検討すると、対照細胞に比較し、受容体チロシンリン酸化量が減少、細胞のインスリンシグナルは減弱することが明らかとなった⁴⁾。加えてリチウム処置は、IRS-1、IRS-2 の蛋白発現も減少させた⁵⁾。一方、リチウム処置細胞の培養液を通常培養液に置換しリチウムの作用をなくすと GSK-3 β Ser⁹ のリン酸化量は減少、GSK-3 β の構成的活性が回復した。加えて、それに伴い、リチウム処置で減少していたインスリンシグナル分子発現は、それぞれ増加に転じた^{4,5)}。一方、ERK1/2 活性阻害薬、PD98059 の処置は、シグナル分子発現に影響しなかった。感情障害に対するリチウムの効果については未だ多くの仮説が提唱されているが、少なくとも GSK-3 β 活性を介して、神経細胞におけるインスリンシグナルに対し何らかの影響を与えていることが示唆された。

4. 脳神経傷害とインスリンシグナル

多臓器不全を呈するような全身性炎症時には、重症化すると意識障害をはじめとした神経症状が現れるが、その分子基盤については未解明な部分が多い。盲腸結紮穿孔 (CLP) による敗血症誘発マウスによるインスリンシグナルを検討した。まず、CLP マウス脳組織では、脳血管透過性の亢進、酸化ストレスの増加、サイトカイン発現が増加していた。このとき、末梢血液中のインスリン濃度は上昇していたが、糖負荷試験を行うと血糖値増加がみられたことから、末梢ではインスリン作用不全の状態を呈していた。このとき脳神経細胞における Akt、GSK-3 β リン酸化量は、心臓、血管等の末梢組織とは異なり増加していた (図 1)。また、細胞レベルの解析では、ケトン体増加時及び前述のインスリンシグナル増強時にはインスリン受容体発現は減少するが、CLP マウス脳組織においては増加していた⁴⁻⁶⁾ (図 2)。以上のことは、敗血症病態での脳神経傷害時にはインスリンシグナルを動員してでも神経細胞を保護しようとする機構が備わっているものと推測される。

5. おわりに

これまでインスリンといえば糖代謝といわれるぐらい、代謝シグナルの代表に位置づけられてきた。しかし、脳神経細胞に目も向けてみると、細胞機能、傷害細胞の修復、細胞の寿命等に大きく関わっていたことが、近年次々と明らかになってきた。加えて、細胞にはその生育環境に応じた適度なインスリンシグナルを保つために、様々なシグナル調節機構が存在していた。特に神経細胞領域における恒常性維持のためのインスリンシグナル変動を明らかにしていくことは、末梢組織に比べ治療薬が少なかった神経領域疾患に、新しい角度からの研究視点が加わるものと期待される。

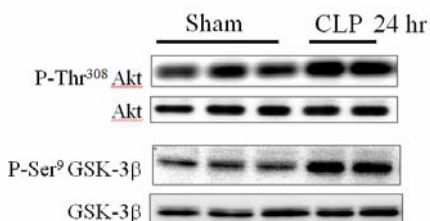


図 1. 炎症マウス脳でのインスリンシグナル増加

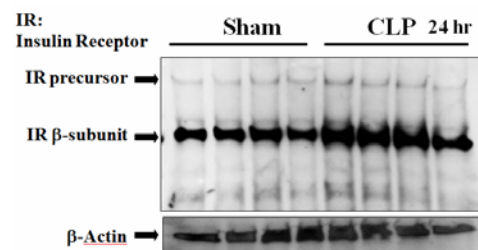


図 2. 炎症マウス脳でのインスリン受容体増加

文 献

- 1) Wada A., Yokoo H., et al. J Pharmacol Sci. 2005;99:128-143.
- 2) Yamamoto R., Yokoo H., et al. J Neurochem. 1996;67:1401-1408.
- 3) Wada A., Yokoo H., et al. J Pharmacol Sci. 2005;99:307-321.
- 4) Yokoo H., et al. J Neurochem. 2007;103:1883-1896.
- 5) Nemoto T., Yokoo H., et al. Brain Res. 2006;1110:1-12
- 6) Yokoo H., et al. J Pharmacol. Exp Ther. 2003;304:994-1002.

帯状疱疹痛マウスモデルでの自発痛様行動の評価と

その発生における一酸化窒素の役割

佐々木淳、金山翔治、倉石泰

富山大学大学院 医学薬学研究部 応用薬理学

要約：帯状疱疹は初感染後感覚神経節内に潜伏感染していた水痘・帯状疱疹ウイルスが再活性化して生じる有痛性の皮膚疾患である。激しい自発痛が生じるが、既存の鎮痛薬でのコントロールは困難である。マウスに単純ヘルペスウイルス I 型を経皮接種すると、帯状疱疹様の皮疹を生じ、その皮疹部位をしきりに舐める行動が観察される。このマウスは、帯状疱疹による自発痛のマウスモデルとして有用であると考えられる。この自発痛様行動の発生には、感覚神経節と皮膚における一酸化窒素合成酵素 2 の発現誘導と一酸化窒素の産生が関与する。また、一酸化窒素はそれ自身での発痛作用は弱いが、P2X₃ 受容体を介した ATP の発痛作用を増強する。この経路には、グアニル酸シクラーゼ-サイクリック GMP-プロテインキナーゼ G 経路が関与する。

キーワード：帯状疱疹、自発痛、一酸化窒素、一酸化窒素合成酵素、P2X₃ 受容体

1. はじめに

水痘は、水痘・帯状疱疹ウイルス感染により引き起こされる発熱と発疹を主症状とする良性の疾患であるが、ウイルスは水痘治癒後も感覚神経節に潜伏感染する。何らかの誘因により、この潜伏感染していたウイルスが再度活性化することで生じるのが、帯状疱疹である。感覚神経節で増殖したウイルスは神経軸索を伝わり皮膚に達し、その神経支配領域に一致して疱疹が带状に配列する。帯状疱疹患者の 7 割以上が睡眠あるいは日常業務に影響するほどの強い痛み（触刺激により痛みが生じるアロディニアや持続痛・突発痛といった自発痛）を経験するといわれるが、既存の鎮痛薬では十分に痛みをコントロールすることは困難である。また、帯状疱疹は加齢とともに発症頻度が高くなるので、高齢者の増加が著しいわが国を含めた先進諸国では帯状疱疹による痛みの治療は重要な課題となっている。

我々は単純ヘルペスウイルス I 型を経皮接種により作製する帯状疱疹痛マウスモデル(1, 2)を作出し、アロディニアの発生機序の解析を行ってきたが、最近、このマウスにおいて自発痛様行動の評価も可能であることを見出した。本シンポジウムでは、帯状疱疹痛マウスモデルでの自発痛様行動の評価とその発生機序に関する一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の役割についての研究成果を紹介する。

2. 帯状疱疹痛マウスモデルでの自発痛様行動の評価と薬物感受性

単純ヘルペスウイルス I 型をマウス大腿部に経皮接種すると、5 日後に接種部位と同じ皮膚節内の背部に皮疹が生じ、その後皮疹は皮膚節内に多発し、7 日後には皮膚節内全体に带状に分布する。このマウスではウイルス接種後 5 日目以降、皮疹部をしきりに舐める行動が観察された。無人環境下でビデオ撮影し、一定時間 (10 分間) の総舐め行動時間の経日変化を調べると、舐め行動時間は 6~7 日後に最大となり、皮膚病変治癒とともに消失することがわかった。次に、この舐め行動に対する各種、鎮痛薬、鎮痛補助薬の効果を調べた。鎮痛薬としては、オピオイド鎮痛薬モルヒネ、非ステロイド性消炎鎮痛薬ジクロフェナク、鎮痛補助薬としては、メキシレチン (抗不整脈薬) とギャバペンチン (抗痙攣薬) を用いた。皮疹部への舐め行動はモルヒネ、ギャバペンチンにより強力に抑制され、

メキシレチンによっても部分的に抑制された。しかし、ジクロフェナクは無効であった。以上から、帯状疱疹痛マウスモデルで生じる皮疹部への舐め行動は自発痛様行動の評価に有用であると考えられる。また、非ステロイド性消炎鎮痛薬が無効な重症例の自発痛モデルとして期待できる。

3. 自発痛様行動の発生における NO の関与とその役割

一般に、細菌やウイルス感染局所では NO 合成酵素 2 (NO synthase 2, NOS2) が発現誘導され NO が産生されることが知られている。NO には殺菌・抗ウイルス作用による生体防御としての役割だけでなく、病態によってはその悪化要因となることも報告されており(3), その役割には不明な部分が多い。本研究では、帯状疱疹痛マウスモデルを用いて、NOS2 による NO 産生が帯状疱疹による自発痛の発生に関与している可能性を検証した。

NO 消去薬 CPTIO および選択的 NOS2 阻害薬 AMT の全身性投与は、自発痛様行動を有意に抑制した。感覚神経節および皮膚においてウイルス増殖後に NOS2 の発現誘導が生じ、NOS2 の主な発現細胞はマクロファージであった。以上から、ウイルス増殖により感覚神経節と皮膚に浸潤したマクロファージで NOS2 発現誘導され、産生された NO が自発痛様行動の発生に関与すると考えられる。しかし、健常マウスに NO 供与体 NOR3 を単独で局所注射しても有意な自発痛様行動(注射部位への舐め行動)は生じなかったことから、NO は発痛物質でなく、発痛増強物質として働くと考えられた。近年、疼痛発生における ATP の役割が注目されており、様々な ATP 受容体が痛みの発生に関与することが明らかとされている(4)。中でもイオンチャネル型の $P2X_3$ は痛覚神経に特異的に発現しており、その活性化により自発痛様行動が生じる。帯状疱疹痛マウスの自発痛様行動においても、選択的 $P2X_3$ 受容体拮抗薬 A317491 の検討から $P2X_3$ 受容体の関与が示唆された。そこで、NO が $P2X_3$ 受容体シグナルを増強する可能性を考え、検討を行なった。その結果、NO 供与体 NOR3 は $P2X$ 受容体作動薬 α,β -meATP の発痛作用を有意に増強し、この増強は NO 消去薬 CPTIO、選択的 $P2X_3$ 受容体拮抗薬 A317491, グアニル酸シクラーゼ(GC)阻害薬 ODQ およびプロテインキナーゼ G(PKG)阻害薬 KT5823 の前処置により消失した。したがって、NO による自発痛発生機序には、GC-cGMP-PKG 経路を介した $P2X_3$ 受容体シグナルの増強が関与する可能性が考えられる。

3. おわりに

単純ヘルペスウイルス I 型の経皮接種により作製する帯状疱疹痛マウスモデルは、帯状疱疹によるアロディニアのみならず自発痛の発生機序と治療に関する実験的解析にも有用であると考えられる。近年、NO による蛋白質のニトロシル化が新たなシグナル伝達経路として注目されており、疾患への関与も報告されている(5)。今後は、PKG によるリン酸化の経路だけでなく、ニトロシル化経路を含めて NO の発痛増強作用機序を明らかにしていく必要があると考えている。

文 献

1. Takasaki I, et al., Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. *Pain* 86:95-101, 2000.
2. Sasaki A, et al., Pharmacological differences between static and dynamic allodynia in mice with herpetic or postherpetic pain. *J Pharmacol Sci* 108:266-73, 2008.
3. Zaki MH, et al., Nitric oxide-induced nitritative stress involved in microbial pathogenesis. *J Pharmacol Sci* 98:117-129, 2005.
4. Donnelly-Roberts D, et al., Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 324:409-415, 2008.
5. Foster MW, et al., Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 15:391-404, 2009.

薬物名の略語: AMT, 2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine; CPTIO, 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide; α,β -meATP, α,β -methylene adenosine-5'-triphosphate; NOR3, (\pm)-(E)-4-ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamide; ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one.

ノルアドレナリンによる樹状細胞の機能制御

柳川芳毅, 松本真知子, 富樫廣子

北海道医療大学・薬学部・薬理学講座・病態生理学

要約: 樹状細胞 (dendritic cell, DC) は強力な抗原提示細胞であり, 免疫反応の始動において重要な役割を果たしている. 本研究では, DC の抗原取り込み (エンドサイトーシス) およびサイトカイン産生に対するノルアドレナリン (noradrenaline, NA) の作用を調べた. NA は α_2 受容体-PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路を介し, DC の抗原取り込みを短時間で著しく上昇させた. 一方, NA は β 受容体-PKA (protein kinase A) 経路を介し, 免疫賦活性サイトカインである IL-12 の産生を抑制し, 免疫抑制性サイトカインである IL-10 の産生を増強した. こういった NA の DC に対する作用は, 「短期ストレスは免疫系を賦活し, 長期ストレスは免疫系を抑制する」ことを説明するメカニズムの一つであると考えられる.

キーワード: ノルアドレナリン, 樹状細胞, 抗原取り込み, サイトカイン

1. はじめに

現代社会におけるストレスが感染症やアレルギー性疾患などの病態に関係していることが示唆されている. 一般的に, 短期ストレスは免疫系を賦活し, 長期 (慢性) ストレスは免疫系を抑制すると考えられている. 慢性ストレスによる免疫力の低下については比較的広く認識されているが, 短期ストレスによる免疫賦活に関する報告は少なく, そのメカニズムについても不明な点が多い. 生体がストレスを受けると交感神経系からノルアドレナリン (noradrenaline, NA) が分泌され, 緊急事態に対する様々な生理反応が誘導される. 一方, ストレスによる免疫系の変化には, 少なくとも部分的に, 交感神経系が関与していると考えられている.

樹状細胞 (dendritic cell, DC) は強力な抗原提示細胞であり, 免疫反応の誘導および調節に重要な役割を果たしている. DC は病原体に対する監視役として全身に分布し, 病原体が生体内へ侵入すると, いち早くそれを認識し, 病原体抗原を取り込み, 活性化される. 活性化された DC は, 支配リンパ節の T 細胞領域へ移行し T 細胞に抗原を提示する. これにより, 病原体に対する獲得免疫が誘導される. 一方, 交感神経線維は全身に分布しており, NA の分泌は創傷によるストレスによっても誘導される. したがって, DC 機能が交感神経系によって調節されている可能性がある.

そこで本研究では, DC の抗原取り込みおよびサイトカイン産生に対する NA の作用について解析した¹⁾.

2. 方法

マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 6 日間培養することにより DC を分化させ実験に用いた. 抗原取り込み (エンドサイトーシス) の実験には, 蛍光ラベルしたデキストランまたは卵白アルブミンを用いた. 抗原取り込み量はフローサイトメトリーによって測定した. また, 抗原取り込み像は共焦点顕微鏡によって解析した. 細胞内情報伝達系はウエスタンブロット法により解析した. サイトカインの発現量は ELISA 法により測定した.

3. 結果

蛍光標識した抗原を用いて, DC の抗原取り込みに対する NA の作用を調べた. DC による抗原取り込みは, NA (1 μ M) 処理の 3 分後から著しく上昇し, 20 分後においてもその作用は持続した. NA による抗原取り込みの上昇は, α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビンの処理によりほぼ完全に抑制されたが, α_1 受容体拮抗薬であるプラゾシンや β 受容体拮抗薬であるプロプラノロールの処理によって影響を受けなかった. また, DC の抗原取り込みは, α_2 受容体選択的作動薬である azepexole (B-HT 933) の処理によって著しく上昇した.

次に DC の細胞内情報伝達系に対する NA の作用を解析した. NA の処理によって, DC における PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) および ERK (extracellular signal-regulated kinase) が強く活性化された. これ

らの活性化は、ヨヒンビンの処理によって完全に抑制された。一方、NA による抗原取り込み誘導は、PI3K 経路の阻害によって著明に減弱したが、ERK 経路の阻害によって影響を受けなかった。したがって、NA は α_2 受容体-PI3K 経路を介して DC の抗原取り込みを促進すると考えられる。

DC は TLR (Toll-like receptor) を介して病原体構造を認識し各種サイトカインを産生する²⁻⁴⁾。DC に TLR リガンドを 24 時間処理することにより、IL-12 および IL-10 の著しい産生誘導が認められた。NA は、この TLR 刺激による IL-12 産生を抑制し、IL-10 産生を促進した。これらの作用は、プロプラノロールの処理によって完全に抑制されたが、ヨヒンビンやプラゾシンの処理によって影響を受けなかった。また、NA のサイトカイン産生に対する作用は、PKA (protein kinase A) 阻害剤である H89 の処理によって顕著に抑制された。したがって、NA は β 受容体-PKA 経路を介して、DC のサイトカイン産生バランスを制御していると考えられる。

4. 考察

α_1 , α_2 , β アドレナリン受容体は、それぞれ Gq, Gi, Gs に結合し、多彩な生理活性を発現する。免疫系において NA は、 β 受容体を介して IL-12 (免疫賦活性サイトカイン) の産生を抑制し IL-10 (免疫抑制性サイトカイン) の産生を促進すると報告されており、慢性ストレスによる免疫抑制との関連性が示唆されている。今回の結果から、DC における NA によるサイトカイン産生バランスの制御には、 β 受容体-Gs-PKA 経路が関与していると考えられる (図 1)。

一方、 α_2 受容体を介した免疫系への作用についてはこれまで不明であった。今回我々は、NA が α_2 受容体を介し DC の抗原取り込みを速やかに促進することを見出した。DC による抗原取り込みは、獲得免疫の誘導において必須のプロセスであることから、この作用は獲得免疫の増強につながると考えられる。さらに細胞内情報伝達系について解析した結果、NA は α_2 受容体-Gi-PI3K 経路を介して DC の抗原取り込みを促進すると考えられる (図 1)。

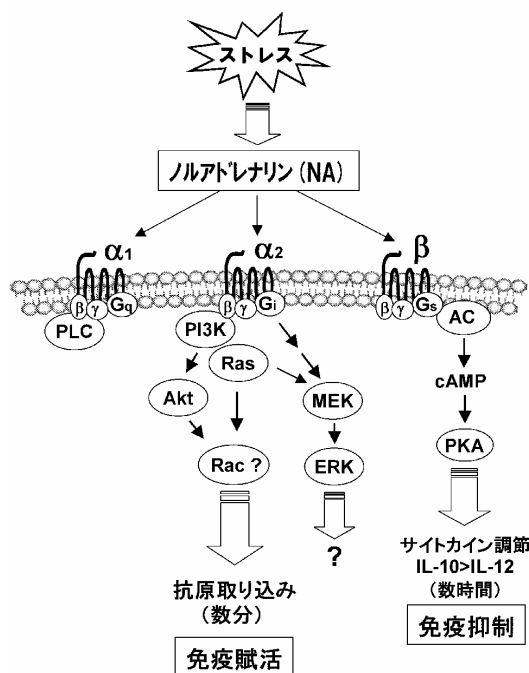


図1. ストレスによる樹状細胞 (DC) の機能制御

5. おわりに

NA が α_2 受容体を介し、短時間で DC の抗原取り込みを促進することは、短期ストレスが免疫反応を賦活することを説明する分子機構の一つであると考えられる。NA による免疫制御機構のさらなる解析は、新たな免疫制御法の開発につながると考えられる。

文 献

1. Yanagawa Y, Matsumoto M, Togashi H. Enhanced dendritic cell antigen-uptake via α_2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline. *J. Immunol.* in press.
2. Yanagawa Y, Iwabuchi K, and Onoé K. Cooperative action of IL-10 and IFN- γ to regulate dendritic cell functions. *Immunology* 127:345-353, 2009.
3. Yanagawa Y and Onoé K. Enhanced IL-10 production by TLR4 and TLR2 primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J. Immunol.* 178: 6173-80, 2007.
4. Yanagawa Y and Onoé K. Distinct regulation of CD40-mediated IL-6 and IL-12 production via MAPK and nuclear factor κ B inducing kinase (NIK) in mature dendritic cells. *Immunology* 117: 526-535, 2006.

痛みによる不快情動生成における分界条床核内コルチコトロピン

放出因子—protein kinase A 情報伝達系の関与

玉野竜太¹、中誠則¹、近藤直人¹、大野篤志¹、井手聡一郎¹、山口拓²、吉岡充弘²、南雅文¹

1.北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室

2.北海道大学大学院医学研究科神経薬理学分野

要約：「痛み」は感覚的成分と情動的成分からなるが、情動的成分に関わる神経機構については、未だ不明な点が多い。一方、脳内の分界条床核 (BNST) は、不安、恐怖、嫌悪といった不快情動に関与し、また、コルチコトロピン放出因子 (CRF) は、ストレス応答において重要な役割を担う神経伝達物質として機能することが明らかとされてきている。そこで我々は、CRF 神経が背外側 BNST (dlBNST) に多く投射していることに注目し、dlBNST 内 CRF 神経情報伝達が痛みによる不快情動生成に関与しているか否かを検討した。痛み刺激により惹起される不快情動反応は、条件付け場所嫌悪性 (CPA) 試験を用いて評価した。CRF 受容体アンタゴニストである α -helical CRF の dlBNST 内投与により、痛み刺激により惹起される CPA が用量依存的に減弱した。一方、痛みの感覚的成分に対しては有意な効果はみられなかった。さらに、CRF 受容体のサブタイプ CRFR1 および CRFR2 に関しても検討を行ったところ、いずれの受容体選択的アンタゴニスト投与の場合も痛み刺激により惹起される CPA を有意に減弱した。また、CRF 受容体は G_s 共役型であることから、痛みによる不快情動生成への protein kinase A (PKA) を介した細胞内情報伝達の関与を検討したところ、PKA 阻害剤の Rp-cAMPS の投与で不快情動生成が抑制されることが明らかとなった。さらに dlBNST 内 CRF 局所投与による条件付けを行った結果、痛み刺激がない状態においても、CPA が用量依存的に惹起された。以上の結果から、dlBNST 内 CRF 神経情報伝達の亢進、さらには CRF 受容体を介した PKA の活性化が、痛みによる不快情動生成に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、dlBNST において、PKA 基質タンパク質の痛み刺激によるリン酸化亢進を検討し、GluR1 ならびに細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) のリン酸化が亢進することを明らかとした。

キーワード：痛み、不快情動、分界条床核、コルチコトロピン放出因子 (CRF)、protein kinase A (PKA)

1. はじめに

「痛み」は感覚的成分と情動的成分により構成され、「痛い」という感覚と同時に、情動的側面として不安、恐怖、嫌悪といった負の情動反応が惹起される。こうした痛みによる不快な情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割にとって非常に重要であると考えられるが、感覚的側面に比べ、情動的側面を担う神経機構に関する研究は十分には進んでいないのが現状である。

BNST は、扁桃体中心核とともに extended amygdala と呼ばれる脳領域を形成し、ストレス応答や不快情動反応に関与していることが知られている¹⁻³⁾。当研究室においても、CPA 試験などの行動薬理学的手法を用いて、痛みにより惹起される不快情動の生成に BNST、特にその腹側領域 (vBNST) における β アドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達が重要な役割を果たしていること⁴⁾を明らかにしてきた。一方、dlBNST にはノルアドレナリン神経入力は少なく、かわりに CRF の密な神経入力が存在する⁵⁾。CRF はストレスホルモンとも呼ばれる神経ペプチドであり、ストレス応答に対し内分泌系を調節するほか、情動反応においてもノルアドレナリンとともに重要な役割を果たしていることが知られており、痛みにより惹起される不快情動においても CRF が関与しているこ

とが考えられる。そこで本研究では、痛みによる不快情動生成における dlBNST 内 CRF 神経情報伝達の果たす役割について検討を行った。

2. 痛みによる不快情動生成に対する dlBNST 内 CRF 受容体アンタゴニスト局所投与の効果

雄性 SD 系ラットに、薬物局所投与のためのガイドカニューレ埋め込み手術を行い、約 1 週間後 CPA 試験を行った。本研究では、場所嫌悪反応 (CPA) を指標として痛みによる不快情動を評価した。その結果、vehicle 投与群と比較して、CRF 受容体アンタゴニスト投与群において CPA score が用量依存的に、かつ有意に減少し、痛みによる不快情動生成における dlBNST 内 CRF 神経情報伝達の関与が示唆された。また、CRF 受容体サブタイプ選択的アンタゴニストを用いた検討より、CRFR₁ ならびに CRFR₂ のいずれのサブタイプも痛みによる不快情動生成に関与することが示唆された。

3. 痛みによる不快情動生成に対する dlBNST 内 PKA inhibitor 局所投与の効果

次に、CRF 受容体-アデニル酸シクラーゼ-cAMP を介した細胞内情報伝達系の下流に位置する protein kinase A (PKA) の関与について、CPA 試験を用いて検討を行った。dlBNST 内 Rp-cAMPS (選択的 PKA 阻害薬) 局所投与によって用量依存的に CPA score が減少し、高用量では有意に減少した。このことから、痛みによる不快情動生成における dlBNST 内 PKA 活性化の関与が示唆された。

4. dlBNST 内 CRF 局所投与による不快情動の生成

痛み刺激が存在しない場合でも直接 dlBNST 内 CRF 受容体を活性化することにより不快情動が惹起されるか否かを検討した。痛み刺激非存在下において、dlBNST 内 CRF 局所投与により用量依存的に CPA が惹起され、高用量では CPA score が有意に増大した。さらに、CRF により惹起されたこの CPA は、Rp-cAMPS の同時投与により有意に抑制された。

5. 痛みによる dlBNST 内タンパク質リン酸化の解析

PKA によるタンパク質リン酸化に着目し、痛み刺激による基質候補タンパク質のリン酸化への影響についてウエスタンブロッティング法を用いて検討した。2%酢酸腹腔内投与後 30 分で、リン酸化 GluR1、ERK1/2 の量が saline 投与群と比較して有意に増加しており、dlBNST において、CRF 受容体を介した PKA 活性化が、直接的もしくは間接的に GluR1 および ERK1/2 のリン酸化を亢進させ、それが痛みによる不快情動生成において、重要な役割を担っている可能性が考えられる。

6. おわりに

痛みによる不快情動生成において dlBNST 内 CRF 神経情報伝達亢進、さらには CRF 受容体を介した PKA 活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、痛みにより dlBNST において GluR1 がリン酸化されることでグルタミン酸神経情報伝達が亢進するとともに、ERK が遺伝子発現または神経情報伝達を促進的に調節することで、不快情動が惹起される可能性が考えられるため、今後、これらのタンパク質の不快情動生成への関与を、より詳細に検討していく必要がある。

文 献

- 1) Sullivan GM et al., *Neurosci.*, **128**, 7-14 (2004).
- 2) Walker DL et al., *J. Neurosci.*, **17**, 9375-9383 (1997).
- 3) Fendt M et al., *J. Neurosci.*, **23**, 23-28 (2003).
- 4) Deyama S et al., *J. Neurosci.*, **28**, 7728-7736 (2008).
- 5) Santibañez M et al., *J. Neurosci. Res.*, **81**, 140-152 (2005).

— *MEMO* —

第 20 回 日本循環薬理学会

特別講演

虚血脳の循環代謝研究のフロンタイン

寶金 清博

(北海道大学大学院 医学研究科 脳神経外科学分野・教授)

急性期の脳虚血における循環代謝では、虚血 Core とそれを取り囲む ischemic penumbrae の概念が重要である。虚血 Core が基本的に治療対象にならないのに対して、ischemic penumbrae は、治療による救済可能な領域として、臨床上、重要な治療対象と考えられてきた。しかし、これを臨床的に画像として捉えることは必ずしも容易ではなかった。しかし、最近、MR I や PET などの脳循環画像が広く普及し、実用的な方法で、この ischemic penumbrae の画像化が可能となってきた。これは、t-P A による治療の対象でもあり、臨床上、極めて重要であり、今後さらに改良が期待される。

一方、慢性期の脳虚血では、血行再建術の治療適応を決める上で、極めて重要な stage 分類がなされてきた。PET では酸素、グルコースの代謝を観察することで、血行再建術の適応が、より厳密に行われている。特に、以前は概念的なものであった misery perfusion が、具体的に明確に捉えられるようになってきた。加えて、いわゆる hyperperfusion (過灌流) を画像的に捉えることも可能となり、合併症の予測と予防が可能である。

今後は、さらに、MR I などを用いたより簡便な画像により脳循環代謝異常が捉えられることが期待される。

第 20 回 日本循環薬理学会

一般演題

<div style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">A-01</div>	拡張型心筋症モデルマウスにおける自発的運動の効果と電気的リモデリングへの関与
	<p>○杉原 匡美^{1,2}, 鈴木 剛^{1,2}, 小田切 史徳^{1,2}, 中里 祐二², 代田 浩之², 櫻井 隆¹, 森本 幸生³, 呉林 なごみ¹</p> <p>¹順天堂大・医・薬理学, ²順天堂大・医・循環器内科学, ³九州大院・医・臨床薬理学</p>

【背景】慢性心不全の患者において、適度な運動は症状の改善、再入院率の低下等の効果をもたらすことが報告されている。拡張型心筋症(DCM)は左心室の拡大と収縮能の低下により特徴づけられる。慢性心不全を引き起こす一方、30～40%で致死性不整脈による突然死がみられる。DCM 患者に対する運動療法の有効性は未だ確立されていない。我々は、ヒトの家族性 DCM であるトロポニン T の遺伝子変異に基づいて作製され、心筋収縮の Ca^{2+} 感受性が低下するモデルマウスを用い、致死性不整脈の発生機構について調べてきた。この DCM モデルマウスは生後 70 日で約半数が死亡する。我々はこれまでに、 K^{+} イオンチャネルのリモデリングが致死性不整脈を惹起することを報告した。今回、自発的運動が DCM マウスにもたらす効果を検討した。

【方法】マウスケージに回し車を設置し、回転数により耐運動能を測定した。食餌等の刺激はなく、自発的運動といえる。様々な日齢のマウスで測定した。また、マウス心筋を摘出し、遺伝子発現解析や光学的活動電位測定を行った。

【結果】2 ヶ月齢の DCM マウスでは野生型と同等の運動量を示した。3 カ月齢以降で運動量が低下し、肺水腫を伴う個体がみられた。生後 1 カ月以内に運動を開始した DCM マウスでは、運動しない DCM マウスに比べ有意に余命が延長していた。また、耐運動能の高いマウスでは一部の K^{+} チャネルのリモデリングが抑制されていた。

【考察】回し車による運動量の測定は心不全の有無を判断するのに有用であった。また、自発的運動が DCM モデルマウスにおいて余命を延長させるのには易不整脈性の変化が関与すると考えられた。

<div style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">A-02</div>	S-Nitrosothiol による細胞間情報伝達系の制御
	○松本明郎, 立花知子, 小谷野友里, 遠藤愛実, 中谷晴昭 千葉大学大学院医学研究院薬理学

一酸化窒素（NO）は、血管内皮由来弛緩因子として cGMP を介した血管弛緩を引き起こす NO-cGMP 経路と、タンパク質等のシステイン SH 基のニトロシル化を介した SNO 経路により、細胞間をつなぐ情報伝達系を形成している。血管内皮細胞から産生された NO は、拡散により細胞間を伝達すると考えられてきたが、SNO シグナルがどのように細胞間を伝播するのかについては明らかではなかった。

今回、Cu⁺/Cys-化学発光法を用いた高感度な SNO 測定方法により、細胞外から細胞内へ伝達される SNO シグナルの時空間的变化を検討した。細胞外に加えた SNO ドナー物質は経時的に細胞内へ取り込まれ、細胞内 SNO 濃度ならびに NO 濃度を上昇させた。しかし、純粋な NO を放出するドナーを細胞外に加えた場合には、細胞内での NO 産生は認められるものの、SNO 濃度の上昇は認められなかった。また、SNO ドナーのうち Cysteine-SNO（CysNO）は容易に細胞内へ取り込まれるのに対して、Glutathione-SNO（GSNO）は細胞内へ GSNO として取り込まれるのではなく、SNO 転移反応（Trans-nitrosylation）により CysNO に変換され、細胞内へと SNO シグナルを伝達することが示された。細胞種により SNO の取り込みや細胞内での蓄積が異なることも明らかとなり、SNO シグナルに特異的な伝達制御系が存在していることも示唆された。

NO は容易に酸化されシグナル分子としての機能を失うのに対して、SNO 化されると比較的安定に存在することができる様になり、シグナル伝達物質としての機能も安定化すると考えられている。本研究により NO が拡散により細胞間を伝わる一般的な NO 経路とは別に、SNO シグナルを直接的に伝達する経路とその制御系が存在していることが明らかになりつつあり、とりわけ循環器系における NO の薬理学的作用をより有機的に理解するために役立つものと考えられる。

A-03

ALDH2 の遺伝子多型がニトログリセリンの薬効に及ぼす影響

○笹栗俊之¹⁾、坂田智子²⁾、吉原達也¹⁾、白石富美恵¹⁾、松村 潔²⁾

¹⁾九州大学大学院 医学研究院 臨床薬理学分野

²⁾九州大学大学院 医学研究院 病態機能内科学分野

【目的】ニトログリセリン (GTN) は抗狭心症薬として頻用されているが、その薬効には個人差が大きい。GTN はプロドラッグであり、体内で還元されて一酸化窒素 (NO) を生成し、NO が血管平滑筋を弛緩させる。最近、2 型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) が NO 生成に関与する酵素として注目されている。しかし、ALDH2 の活性は、日本人では遺伝子多型 (Glu487Lys) による個人差が著しく、高活性型 (*1/*1) は 60~70% に過ぎず、30~40% が低活性型 (*1/*2)、2~4% が無活性型 (*2/*2) である。したがって、ALDH2 の多型が GTN の薬効の個人差を生んでいる可能性が考えられる。そこで本研究では、ALDH2 遺伝子多型が GTN の血管拡張反応に及ぼす影響を調べた。

【方法】ALDH2 遺伝子型を解析した 117 名の健常成人 (平均年齢 26.7 歳、男性 83 人・女性 34 人) を対象として臨床試験を行った。遺伝子型は、制限酵素 TspRI を用いた RFLP 法により決定した。無作為割付クロスオーバーデザインにより、1 週間以上の間隔において GTN (0.3 mg) または二硝酸イソソルビド (ISDN、1.25 mg) を口腔内噴霧にて投与し、被験者の遺伝子型を知らされていない測定者が、上腕動脈血管径を超音波断層法で連続的に計測した。

【結果】被験者の遺伝子型は、高活性型 47 名、低活性型 48 名、無活性型 22 名であった。GTN 投与後の最大血管拡張率には遺伝子型による差はなかった (全体 $18.7 \pm 5.7\%$ 、高活性型 $17.6 \pm 4.9\%$ 、低活性型 $19.5 \pm 6.4\%$ 、無活性型 $19.6 \pm 5.3\%$)。しかし、最大径に到達するのに要した時間は、高活性型に比べ無活性型では有意に延長した (全体 272.6 ± 62.9 秒、高活性型 254.7 ± 59.2 秒、低活性型 277.4 ± 59.0 秒、無活性型 299.7 ± 69.3 秒)。また、最大径の 90% に到達するのに要した時間は、高活性型に比べて低活性型と無活性型では有意に延長した (全体 198.3 ± 50.7 秒、高活性型 174.9 ± 46.5 秒、低活性型 206.1 ± 49.3 秒、無活性型 231.4 ± 38.4 秒)。一方、ISDN による血管拡張では、いずれのパラメーターにも遺伝子型による差は認めなかった。

【結論】GTN の血管拡張反応に ALDH2 遺伝子多型が影響を及ぼすことが明らかとなった。狭心痛除去という使用目的からみて、この拡張遅延は臨床的な意味を有すると思われる。ただし、最大血管拡張率には多型による差がなかったことから、NO の生成には ALDH2 に依らない機序も存在すると考えられた。

<div style="font-size: 2em; font-weight: bold; text-align: center;">A-04</div>	<p>プロシアニジン は酸化 LDL 受容体 LOX-1 のアンタゴニストであり、ラット血管壁への脂質沈着を抑制する</p>
	<p>西塚太一¹、藤田佳子²、佐藤優子²、中野厚史²、垣野明美²、大嶋俊二¹、神田智正¹、○善本亮²、沢村達也²</p> <p>¹アサヒビール株式会社食の基盤技術研究所 ²国立循環器病研究センター血管生理学部</p>

【背景・目的】Lectin like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) は血管内皮細胞などに発現する酸化 LDL 受容体であり、心血管病の進展・発症に寄与する。本研究では様々な食品より抽出した素材ライブラリーを利用し、酸化 LDL と LOX-1 の結合を阻害する素材の探索、物質の同定を行った。

【方法・結果】約 400 種類の食品素材のうち、約 50 の素材が LOX-1 と酸化 LDL の結合を 70% 以上抑制した (cell free 系)。次に、human LOX-1 安定発現細胞株 (hLOX-CHO 細胞) における DiI 標識酸化 LDL (DiI 酸化 LDL) の取り込みを評価したところ(10 µg/mL)、そのうち約半数が 70% 以上の強い抑制を示した。抑制の特に強かった素材の多くは、ブドウ種子エキス、リンゴポリフェノールなどプロシアニジンを多く含むことが知られた食品素材であった。実際、リンゴから調整したカテキン含有プロシアニジンは、DiI 酸化 LDL と LOX-1 の結合を抑制し、それ以外の成分に LOX-1 阻害能は認められなかった。更にプロシアニジンを重合度別に分けて活性を測定したところ、3~8 量体プロシアニジンにおいて強い LOX-1 阻害が観察された (IC₅₀: 0.13~0.44 µg/mL)。一方、2 量体の LOX-1 阻害能はやや弱く (IC₅₀: 1.1 µg/mL)、単量体であるカテキンおよびエピカテキンは 1 µg/mL まで阻害活性を示さなかった。分子間相互作用解析装置 (BIAcore) を用いた検証においても、3 量体以上のプロシアニジンにおいてのみ LOX-1 との強い結合が観察された (K_d=1.3~5.2 µM)。最後に、高脂肪食で飼育した脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP) にプロシアニジンを 2 週間与えたところ、抗 LOX-1 抗体を処置した時と同様、摂餌量・血圧に影響を与えることなく血管壁への脂質沈着が有意に抑制された。

【結語】プロシアニジンには LOX-1 antagonist 活性があり、in vivo においては抗 LOX-1 抗体と同様に血管壁の脂質沈着を抑制した。プロシアニジンは赤ワインの主要ポリフェノールであり、フレンチパラドクスを説明する要因の 1 つとして LOX-1 を阻害している可能性が示唆された。

A-05

虚血性疾患に対する炭酸ガスの血流および代謝機能改善効果

○泉 康雄、山下 直人、田中 昌子、南野 優子、文 沙郎、塩田 正之、
中尾 隆文、岩尾 洋

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態薬理学

【目的】炭酸ガスは血管拡張作用を有することが知られている。本研究では、下肢虚血モデルを作製し、炭酸ガスを局所投与することにより、虚血後の血流改善効果や代謝機能に及ぼす影響について検討した。

【方法】野生型 (C57BL/6J) マウスの左大腿動静脈を切除し、片側下肢虚血モデルを作製した。(1) 炭酸ガス非処置群、混合空気 (O₂: 20%, N₂: 80%) 処置群、炭酸ガス (100% CO₂) 処置群に分けた。各ガスの投与は、霧状にした混合ガスあるいは炭酸ガスを充満させた袋内にマウス下半身を毎日 10 分間入れることで行った。(2) 炭酸ガス処置群に対して、NO 合成酵素阻害薬 N^G-Nitro-L-arginine (L-NAME) の飲水投与 (1 mg/ml)を行った。虚血作製後の血流をレーザードップラー血流計により経時的に 4 週後まで測定し、健常足側に対する虚血足側の血流比 (I/N 比) を算出して比較検討した。また、虚血領域の骨格筋を抗 CD31 抗体で免疫染色し、血管密度について評価した。さらに、血管新生に關与する増殖因子や代謝機能に關する遺伝子の発現についても調べた。

【結果】虚血作製直後には、虚血側の血流はほとんど認められないが、非処置群においても次第に血流は改善し、4 週後の I/N 比は 約 0.6 まで回復した。非処置群と比較して、混合ガス群では非処置群と明らかな差がみられなかった。炭酸ガス処置群では、虚血 1 週後において非処置群よりも有意な血流改善効果が見られ、この効果は虚血 4 週後まで持続した (I/N 比 約 0.75)。この炭酸ガス群の血流改善促進効果は、L-NAME の投与により消失した。虚血作製 4 週後の血管密度も、非処置群と比較して炭酸ガス処置群でのみ増加しており、L-NAME 投与によってこの増加は抑制された。炭酸ガス処置により、血管内皮増殖因子・線維芽細胞増殖因子の遺伝子発現は亢進し、糖代謝に關与する遺伝子発現も増加した。L-NAME 投与によってその効果は消失した。

【結論】炭酸ガスは血管新生や代謝機能に關与する遺伝子発現を亢進させることで、虚血後の血流改善を促進することが示唆された。炭酸ガスは虚血性疾患に対する新たな治療法として応用できるかもしれない。

<div style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">A-06</div>	プロスタグランジン E1 の血管新生促進作用における NCX1 輸送体の役割について
	<p>松井 雪子^{1,2}、喜多 紗斗美¹、○伊豫田 拓也¹、小室 一成³、大慈弥 裕之²、岩本 隆宏¹</p> <p>¹福岡大学・医・薬理学、²福岡大学・医・形成外科学、 ³大阪大学・院・医学系研究科・循環器内科学</p>

【背景】近年、末梢循環障害に対する治療法の1つとして血管新生療法が注目されている。血管新生を誘導する薬剤としてプロスタグランジン E1 (PGE1) が良く知られており、これを用いた PGE1 製剤が広く用いられているが、その作用機序は不明である。一方で血管新生の分子機序については、これまでに各種成長因子やその受容体の関与が報告されているが、Ca²⁺ の関与については未だ不明な点が多い。そこで今回、微細脂肪粒子に PGE1 を封入した Lipo-PGE1 と NCX1 遺伝子改変マウスを用い、PGE1 製剤が誘導する血管新生と Ca²⁺ シグナリングに注目した検討を行った。

【方法】マウス左大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製した。Lipo-PGE1 は3もしくは10 μg/kg を虚血日より1週間、尾静脈より投与した。下肢血流量は虚血前および虚血後1週間毎に、レーザードップラー画像血流計を用いて計測した。虚血4週間後に腓腹筋を摘出し、van Gieson 染色による虚血下肢血管数の算定、および western blotting による VEGF、pAkt、eNOS 発現解析を行った。

【結果】今回用いた下肢虚血モデルにおいては、薬剤投与がなくとも自発的な血流回復が生じるが、Lipo-PGE1 の投与は、虚血後の下肢血流量および虚血下肢血管数を優位に増加させ、同時に VEGF、eNOS の発現および Akt のリン酸化を亢進させた。これらの結果は、Lipo-PGE1 により誘導される血管新生促進作用には、VEGF-Akt-eNOS のシグナル経路が関与することを示唆している。また自発的な血流回復応答は NCX1 ヘテロノックアウトマウス (N1KO) において促進され、同マウスへの Lipo-PGE1 の投与は、更なる血流回復効果を示した。eNOS 阻害剤 L-NAME の投与は Lipo-PGE1 投与群および N1KO 群の双方において下肢血流回復効果を顕著に抑制した。この事実から NCX1 は Lipo-PGE1 が活性化するシグナル経路とは独立して、eNOS の活性化に寄与していると考えられた。以上の結果より Lipo-PGE1 と同様に NCX 阻害薬にも、将来的に末梢動脈閉塞性疾患に対する治療薬としての可能性が期待される。

A-07	ラット門脈縦走筋標本に対する硫化水素の作用
	○木村真一、野呂奈々江、大橋敦子、島村佳一 北海道医療大学 薬学部 薬理学講座 臨床薬理毒理

〔緒言〕近年、硫化水素の生理的役割が示唆されている。門脈においては輪走筋標本での収縮抑制の報告はあるが縦走筋標本については不明である。本研究では、ラット門脈の縦走筋方向の収縮に対する硫化水素の作用を調べた。

〔方法〕ラット門脈から縦走筋方向の短冊形標本を作成し、37℃のタイロッド液中で等尺性収縮力を記録した。硫化水素ナトリウム (NaHS) 水溶液を用いて硫化水素を作用させた。

〔結果および考察〕門脈縦走筋の自発収縮に対し、NaHS は、100 μ M で収縮促進作用を、1 mM で収縮抑制作用を示した。テトロドトキシン存在下において、自発収縮は、NaHS 100 μ M により促進されず、むしろ抑制された。したがって硫化水素の収縮促進作用は神経に依存すると考えられた。ムスカリン受容体遮断薬と α_1 受容体遮断薬存在下において、NaHS 100 μ M は自発収縮を促進させた。カプサイシンを作用させたところ、NaHS 100 μ M による、自発収縮は一過性に促進し、その後、促進作用が消失した。したがって低濃度の硫化水素の収縮促進作用は、副交感神経や交感神経は関与せず、カプサイシン感受性の感覚神経に依存することが示された。

〔まとめ〕ラット門脈縦走筋において、100 μ M の硫化水素は感覚神経を刺激して自発性収縮を促進することが明らかとなった。

A-08	アンジオテンシンⅡタイプ1受容体を介したアルドステロンの血管収縮反応：AT1受容体2量体形成の可能性
	○山田 雅大、瀬谷 和彦、古川 賢一、元村 成 弘前大学大学院医学研究科 病態薬理学講座

【目的】以前我々はアルドステロン（Aldo）の非ゲノムの血管収縮作用がアンジオテンシンⅡ（AⅡ）タイプ1（AT1）受容体拮抗薬にて抑制されることを報告した。今回我々はAldoのAT1受容体を介した微小血管収縮反応をAT1aノックアウトマウスを用いて再検討し、その機序にAT1受容体の二量体形成の可能性について検討した。

【方法】C57BL/6J（野生型）マウス、及びAT1aノックアウト（AT1aKO）マウスの腸間膜細小動脈（60-160 μ m）を採取し、内圧60cmH₂Oにてカニューレーションし、CCDカメラにて血管径を測定した。 10^{-13} Mから 10^{-6} MのAldoを投与し反応を観察後、バルサルタン（ 10^{-4} M）、カンデサルタン（ 10^{-7} M）、スピノロラクトン（ 10^{-6} M）、AT1受容体のホモダイマーを誘導するトランスグルタミナーゼ（TG）の阻害剤であるシスタミン（ 5×10^{-4} M）、カダベリン（ 10^{-4} M）の投与下にて同様にAldoの血管反応を観察した。受容体ダイマーの評価として野生型マウス腸間膜動脈にAldo 10^{-7} Mを10分間作用させ蛋白を抽出、特異的AT1抗体でWestern blotを行った。また、野生型マウス由来の大動脈血管平滑筋培養細胞を用い、Aldo 10^{-7} M刺激による細胞内TG活性の変化を測定した。

【結果】野生型マウスの腸間膜細小動脈ではAldoは濃度依存的に血管収縮反応を示した（最大収縮率は $8.6 \pm 0.3\%$ ）。バルサルタン、カンデサルタンはAldoによる血管収縮反応をほぼ完全に抑制したが、スピノロラクトンは収縮反応を抑制しなかった。AT1a KOマウスではAldoによる血管収縮反応は観察されなかった。TG阻害剤であるシスタミンとカダベリンは共にAldoの収縮反応をほぼ完全に抑制したがAⅡの収縮反応には影響しなかった。Aldoを作用させたマウス腸間膜動脈ではAT1受容体のモノマーとダイマーと思われる高分子のバンドが観察され、ダイマーのバンドはTG阻害剤作用下では観察されなかった。また、Aldoはマウス血管平滑筋細胞内TG活性を上昇させた。

【考察】マウス腸間膜細小動脈におけるアルドステロンの血管収縮反応はAT1受容体を介した非ゲノム作用と考えられ、AT1受容体活性化の機序として細胞内TGを介したダイマー形成の関与が示唆された。

A-09

TNF- α 誘導性 IRS-1 セリンリン酸化とインスリン抵抗性

○柴田倫人、佐藤久美、加納誠一郎、金田繁、市原和夫
北海道薬科大学大学院薬学研究科・薬理学分野

【背景・目的】インスリンがインスリン受容体(IR)を刺激すると IR のチロシン残基(Tyr)のリン酸化に伴いインスリン受容体基質(IRS)-1 の Tyr がリン酸化される。一方、IRS-1 のセリン残基(Ser)がリン酸化されるとインスリン刺激による IRS-1 Tyr リン酸化が抑制される。つまり、細胞は IRS-1 の Tyr および Ser のリン酸化レベルによってインスリンシグナルのバランスを保っている。インスリン抵抗性は糖尿病の重要な病態の一つであるが、その原因として炎症組織などから分泌される Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)のような炎症性サイトカインによる IRS-1 の Ser リン酸化が挙げられる。また、近年、AMP-activated protein kinase (AMPK)活性化によるインスリン抵抗性改善作用が注目されているが詳細は不明である。そこで我々は、脂肪細胞における IRS-1 Ser リン酸化のメカニズムおよびその IRS-1 Ser リン酸化に対する AMPK 活性化の影響を検討した。【方法】①3T3-L1 線維芽細胞を 3T3-L1 脂肪細胞へと分化させ、TNF- α 刺激後に IRS-1 Ser、JNK、ERK リン酸化を、インスリン及び TNF- α 刺激後に細胞膜画分における GLUT4 発現量を検出した。②AMPK 活性化剤 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR)及び TNF- α 刺激後に IRS-1 Ser リン酸化を、同条件で AMPK 抗体により共免疫沈降を行った後に JNK、ERK リン酸化を検出した。③糖尿病モデルマウス+Lepr^{db}/+Lepr^{db} より脂肪組織を摘出し in vitro 実験と同様にリン酸化蛋白質を検出し、非糖尿病モデルマウス m+/+Lepr^{db} と比較した。検出にはいずれも Western blotting 法を用いた。【結果】3T3-L1 脂肪細胞において TNF- α 刺激により JNK2、ERK1/2、IRS-1 Ser 307、IRS-1 Ser 636/639 のリン酸化が増加した。IRS-1 Ser リン酸化の増加は JNK および ERK の阻害によって抑制された。TNF- α はインスリンによる GLUT4 の細胞膜発現の増加を抑制した。AICAR 存在下で培養した細胞においては、TNF- α 刺激による IRS-1 Ser リン酸化は観察されなかった。この時、AMPK 抗体による共免疫沈降物における JNK1 および ERK1/2 のリン酸化は抑制された。また、AICAR により AMPK α のリン酸化は増加した。+Lepr^{db}/+Lepr^{db} では m+/+Lepr^{db} と比較し JNK1/2、ERK1/2、IRS-1 Ser 636/639 リン酸化はいずれも増加していた。【考察】TNF- α は Ser/Thr kinase である JNK、ERK のリン酸化を介して IRS-1 Ser をリン酸化することが明らかになった。さらに TNF- α は IRS-1 の Ser リン酸化を介してインスリン抵抗性を誘導することが示唆された。一方、AICAR 処理は IRS-1 Ser リン酸化の抑制を起こしインスリン抵抗性を改善することを見出した。+Lepr^{db}/+Lepr^{db} の JNK1/2、ERK1/2 および IRS-1 Ser リン酸化がいずれも増加しているので、AICAR が in vivo においても同様のメカニズムによりインスリン抵抗性を改善する可能性がある。

<div style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">A-10</div>	GTN と ISDN の作用に対する ALDH2 阻害薬, cyanamide の効果： 摘出血管と丸ごとの動物での差異
	○石橋隆治 ^{a, b)} 、中本美保子 ^{b)} 、安倍房江 ^{b)} 、劉鶴 ^{b)} 、吉田純子 ^{b)} 、西尾眞友 ^{b)} 金沢医科大学看護学部薬理学 ^{a)} ・医学部薬理学 ^{b)}

Glyceryl trinitrate (GTN)の活性化に Aldehyde dehydrogenase type2 (ALDH2)が関与し、その度合いは Isosorbide dinitrate (ISDN)の活性化に於けるものよりも大きいとされている。しかし、摘出血管と丸ごとの動物の両方において、それぞれの薬物の作用に対する ALDH2 の阻害効果を比較検討した報告は見当たらない。そこで我々はウサギを用いて摘出血管と丸ごとの動物における GTN および ISDN の作用と、これに対する ALDH2 阻害薬、cyanamide、の効果を比較検討した。

フェニレフリン($3 \times 10^{-7} \text{M}$)で収縮させたウサギ大動脈リング標本に対する各々の薬物の弛緩作用は cyanamide($3 \times 10^{-4} \text{M}$)によって阻害された。その阻害効果を阻害薬存在下と非存在下の弛緩薬の ED_{50} の比で比較したところ、GTN に対する阻害効果は ISDN に対するものの約 2 倍であった。

ペントバルビタール(30mg/kg , i.v.)で麻酔したウサギにおいて、GTN($1-100 \mu \text{g/kg}$, i.v.)および ISDN($10-1000 \mu \text{g/kg}$, i.v.)は用量依存性に血圧を低下させるとともに、血中 NO_2^- 濃度を増加させた。各々の薬物による血中 NO_2^- 濃度の変化と降圧の程度は薬物ごとに良く相関し、GTN の降圧時に見られる NO_2^- 濃度の増加は ISDN によるものより少なかった。

Cyanamide (100mg/kg 胃内投与) はそれぞれの薬物による降圧作用と血中 NO_2^- 濃度の増加を抑制した。阻害薬存在下と非存在下の AUC($50 \text{mmHg} \cdot \text{min}$)の比率で比較すると、GTN の降圧作用に対する阻害効果は ISDN に対するものの約 1/3 であった。また、GTN による NO_2^- 増加に対する抑制効果も ISDN に対するものの約 1/3 であった。

これらの結果は、ISDN の活性化にも ALDH2 が大きく関与している可能性を示唆するとともに、丸ごとの動物における反応は摘出血管で得られた結果から単純に類推することが困難であることを示している。また、生体に於ける GTN と ISDN の薬理作用および NO_2^- 増加に対する cyanamide の阻害効果の違いは、それぞれの弛緩薬の生体内での複雑な活性化機序の違いの積み重なりから生じるものであることを示唆している。

A-11	ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応における BK_{Ca} チャネルの役割
	○森 麻美、鈴木佐知、坂本謙司、中原 努、石井邦雄 北里大・薬・分子薬理

【背景及び目的】当教室では、acetylcholine (ACh) 誘発ラット網膜血管拡張反応に内皮由来過分極因子 (EDHF) を介する機序が関与していることを示唆してきた。EDHF は、脳血管において Ca^{2+} 活性化 K^+ (K_{Ca}) チャネルを介して作用を示すという報告があるものの、網膜血管における拡張機序は明らかではない。そこで、ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応に K_{Ca} チャネルが関与しているか否かについて検討した。

【方法】Pentobarbital 麻酔下、Wistar 系雄性ラットの硝子体内に、高コンダクタンス K_{Ca} (BK_{Ca}) チャネル遮断薬である iberiotoxin (IbTX, 20 pmol/eye)、 BK_{Ca} チャネル・中間コンダクタンス K_{Ca} (IK_{Ca}) チャネル遮断薬である charybdotoxin (ChTX, 20 pmol/eye)、低コンダクタンス K_{Ca} (SK_{Ca}) チャネル遮断薬である apamin (APA, 20 pmol/eye)、または IK_{Ca} チャネル遮断薬である TRAM-34 (6 nmol/eye) を投与した。これらの薬物投与後、自律神経反射と眼球運動を抑制するため、人工呼吸下に tetrodotoxin (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) 処置を行った。低下した全身血圧と心拍数を正常レベルまで回復させるため、静脈内に adrenaline : noradrenaline (9:1) 混合溶液を持続投与した。また、ACh 誘発 EDHF 様網膜血管拡張反応は、一酸化窒素合成酵素阻害薬である N_ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 30 mg/kg, i.v.) 及びシクロオキシゲナーゼ阻害薬である indomethacin (5 mg/kg, i.v.) 存在下で観察し、網膜血管の反応は、当教室で開発したラット *in vivo* 網膜血管径計測システムを用いて評価した。

【結果及び考察】ACh (0.3-30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) の静脈内投与は、用量依存的な網膜細動脈径増大及び血圧低下反応を誘発した。IbTX 及び ChTX は、ACh 誘発網膜細動脈径増大反応を有意に減弱させたが、降圧反応には影響を及ぼさなかった。一方、APA 及び TRAM-34 は、両反応に有意な影響を与えなかった。L-NAME 及び indomethacin 存在下においても、ACh は用量依存的に網膜血管径を増大させ、血圧を低下させた。IbTX は、ACh の EDHF 様網膜血管拡張反応を有意に減弱させたが、降圧反応には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応には、 K_{Ca} チャネルのうち、 BK_{Ca} チャネルが関与することが示唆された。

第 20 回 日本循環薬理学会

YIA 候補者演題

<p><i>Y-1</i></p>	<p>巣状分節性糸球体硬化症の原因遺伝子となる TRPC6 チャネル変異体の機能解析とアクチン骨格の関連</p>
	<p>○市川 純、井上隆司 福岡大学・医学部・生理学</p>

巣状分節性糸球体硬化症 focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)は糸球体における蛋白濾過機能不全により重度の蛋白尿を呈する疾患である。足細胞、基底膜、有窓型内皮細胞の複合体により形成される拡散障壁の構造破綻により濾過機能が損なわれ、その遺伝的要因としては足細胞に発現する複数種類の蛋白質遺伝子 (nephrin, podocin, phospholipase C α , α -actinin-4, laminin- β_2 , TRPC6) の変異が報告されている。ヒト TRPC6 においては P112Q, M132T, N143S, S270T, K874X, Q889K, R895C, E897K といった変異が原因と考えられているが、これらの TRPC6 変異体が細胞及び濾過機能の破綻を導くメカニズムは不明である。我々は TRPC6 変異がそのチャネル機能に及ぼす影響を調べるため、HEK 細胞にマウス TRPC6 変異体 (P111Q, M131T, N142S; それぞれヒトの P112Q, M132T, N143S 変異に相当) を発現させ、細胞内 Ca^{2+} イメージングおよびパッチクランプにより検討した。M131T は野生型あるいは他の変異体に比べ高い自発活性を示した。また carbachol 等による TRPC6 チャネル活性化時には非常に強い応答が観察され、機械刺激応答にも増強が見られた。さらに cytochalasin D 処理によってアクチン骨格を破壊するとこれらの応答には有意な変化が見られた。以上の結果より、M131T 変異は細胞骨格との相互作用を介して細胞内への Ca^{2+} の過剰流入を引き起こすことが示唆された。

Y-02	SSRI による心筋保護作用とそのメカニズム
	○田頭秀章、Bhuiyan Md Shenuarin、塩田倫史、福永浩司 東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野

【目的】 Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) を服用しているうつ病患者では、心疾患による死亡率や心疾患発症リスクが有意に減少する。しかし、どのようなメカニズムで SSRI が心疾患発症リスクを低下させるのか不明である。私達は SSRI の一つである fluvoxamine が sigma-1 受容体高親和性アゴニストであることに注目した。本研究では、マウス大動脈狭窄 (TAC) モデルを用いて SSRI である fluvoxamine の sigma-1 受容体を介した心筋保護作用とそのメカニズムを追究した (1)。

【実験方法】 10 週齢雄性 ICR マウスに TAC 処置を行った。Fluvoxamine の投与量はヒトでの臨床用量である、1mg/kg あるいはその半分量の 0.5mg/kg とし、TAC 処置後 2 日目から一日一回 4 週間連続投与し、心エコーによる心機能解析と形態学的解析を行った。また、sigma-1 受容体の関与を確認するために、sigma-1 受容体アンタゴニストである NE-100 を前投与し、fluvoxamine の効果を調べた。さらに、SSRI の中で sigma-1 受容体への結合がほとんど認められない paroxetine を用いて同様の実験を行った。最後に、培養心筋細胞を用いて、アンジギオテンシン II (Ang-II) 誘導心筋細胞肥大に対する fluvoxamine、paroxetine、NE-100 の効果を検討した。

【結果】 心エコーによる心機能パラメータ解析の結果、4 週間の TAC 処置群において左室内径短縮率 (fractional shortening: FS) が有意に減少した。形態学的解析では、体重に対する左室重量の有意な上昇が見られた。TAC 処置後 4 週間 fluvoxamine 慢性投与した群において、左心室肥大は有意に抑制され、FS も有意に改善した。一方、paroxetine 慢性投与においては左心室肥大、FSともに改善作用は認められなかった。次に、培養心筋細胞を用いて Ang-II による心筋肥大に対する fluvoxamine、paroxetine の効果を検討した。TAC モデルマウスでの結果に一致して、fluvoxamine 処理により Ang-II による心筋細胞肥大は有意に抑制された。しかし、paroxetine 処理では抑制されなかった。また、NE-100 は fluvoxamine の心筋肥大抑制効果を完全に消失させた。

【考察】 Sigma-1 受容体に結合する fluvoxamine は、TAC および Ang-II による心筋肥大を抑制することが明らかとなった。同時に、fluvoxamine は TAC による心機能障害も改善することが解った。本研究は SSRI 慢性投与がうつ病患者の心疾患発症リスクを低下させる医学的根拠を示す初めての報告である。さらに、sigma-1 受容体が心肥大から心不全への移行を抑制する新たな治療薬のターゲットとなることを示唆している。

Tagashira et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. doi:10.1152/ajpheart.00198.2010

Y-03	ゲノムワイド RNAi スクリーニングによる心機能調節因子 NOT3 の同定
	<p>○久場 敬司¹、鈴木 享¹、森田 正行¹、Greg Neely²、Josef Penninger²、 福田 恵一³、磯部 光章⁴、木村 彰方⁵、今井 由美子¹</p> <p>¹ 秋田大院・医・情報制御・実験治療、²IMBA-Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences、³慶應大・医・ 循環器内科、⁴東医歯大・循環制御、⁵難治疾患研究所・分子病態</p>

虚血性心疾患や心筋症といった循環器疾患は未だに死因の第1位であり、疾患メカニズムの理解ならびに新しい治療法の開発が求められている。モデル生物による疾患関連因子の探索は、心疾患の病態解明のために有効な戦略のひとつであるが、私達はショウジョウバエのゲノムワイド RNAi トランスジェニックライブラリー (Dietzl G, et al. *Nature* 2007) を用いた心筋特異的 RNAi 心不全スクリーニングを行った。8417 個のショウジョウバエ遺伝子の中から 498 個の心不全遺伝子を同定し、バイオインフォマティクス解析により、心機能調節遺伝子ネットワークのシステムマップを作製したところ、CCR4-NOT 複合体が心機能調節因子として初めて単離された。CCR4-NOT 複合体は、酵母の遺伝学的スクリーニングにより見出された転写調節因子として知られ、遺伝子発現調節において転写調節と RNA 分解の 2 つの活性を発揮するユニークな分子複合体である。私達は、CCR4-NOT の構成因子である NOT3 の遺伝子欠損マウスの作製、解析を行ったところ、NOT3 ホモ欠損は胎生致死で幹細胞の増殖に不可欠である一方、NOT3 ヘテロ欠損にて心機能の低下を示した。また、HDAC 阻害剤の投与は NOT3 ヘテロ欠損の心収縮力の低下を認めた。さらに、網羅的なヒトゲノム遺伝子関連解析 (GWAS) から、ヒト NOT1 ならびに NOT3 の遺伝子座の SNP が、心電図 QT 時間の長さを規定することが分かった (*Cell* 2010)。したがって、CCR4-NOT 複合体は、ショウジョウバエからヒトまで保存された心臓の機能調節因子であることが分かった。

Y-04	心筋トロポニンTの定量的ノックダウンにおける心機能イメージング解析
	○梅本紀子 ¹ 、西村有平 ^{1, 2, 3, 4} 、山中裕貴子 ¹ 、岸誠也 ¹ 、伊藤早紀 ¹ 、岡森加奈 ¹ 、島田康人 ^{1, 2, 3, 4} 、黒柳淳哉 ¹ 、張孜 ¹ 、田中利男 ^{1, 2, 3, 4} ¹ 三重大・院医・薬理ゲノミクス、 ² 三重大メディカルゼブラフィッシュ研究センター、 ³ 三重大・バイオインフォマティクス、 ⁴ 三重大・メディカルケモゲノミクス

心疾患は様々な遺伝子発現変化によりその病態機構が形成されている。しかしながら、病態遺伝子の発現変化と心機能との関係は十分に明らかではない。我々は遺伝子介入が容易であるゼブラフィッシュを適用することにより、遺伝子発現レベルと心機能との関係を解析した。一般的なゼブラフィッシュの遺伝子ノックダウン法にはモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)を用いる。遺伝子発現抑制レベルは受精卵の MO 導入量に依存しているが、従来は、過剰に MO を導入することにより、ノックダウン効率は極めて高くなり、臨床病態から解離した病態モデルを構築しているにすぎなかった。そこで我々は、蛍光標識したノンターゲット MO の共導入によりゼブラフィッシュの定量的遺伝子ノックダウン法を確立した。さらに、遺伝子発現変化がもたらす心機能への影響を検討するため、心機能イメージング解析を開発した。これらの方法により、心筋トロポニン T(cTnT)を定量的にノックダウンし、cTnT 発現変化と心不全病態との相関を明らかにした。

ゼブラフィッシュの受精卵に cTnT-MO をマイクロインジェクションすると、心不全重症度の異なる複数の表現型が出現する。そこで我々は、cTnT-MO と蛍光標識したノンターゲット MO をゼブラフィッシュ受精卵へ共導入し、蛍光強度と cTnT の発現量の関係を調べた。その結果、蛍光強度と心不全重症度は有意に相関し、蛍光強度と cTnT 発現量は逆相関した。すなわち、2 種類の MO を共導入し、蛍光強度を測定することより、ノックダウン効率の定量化が実現した。さらに我々は、蛍光色素 Bodipy-ceramide が血漿を染めるが心筋壁は染めないという性質を利用して、心室内腔の可視化に成功した。この新しい心機能イメージング法を用いて心室内径、心室容量、心室壁運動速度等を測定することにより、高速かつ高精度に心機能を評価することが可能となった。この方法を用いて、定量的ノックダウン法を適用した cTnT ノックダウンモデルにおける心機能解析を行った。その結果、極微量な cTnT 発現量の低下が誘導する心機能障害を検出した。すなわち、この方法を用いることにより、病態レベルの cTnT 発現低下が及ぼす選択的な心機能障害を明らかにした。

心疾患における病態遺伝子の発現制御と、バイオイメージングによる心機能解析法は、その分子機能を解明する上で極めて重要である。我々が開発したゼブラフィッシュの定量的ノックダウン法及び心臓イメージングによる心機能解析法は、あらゆるヒト心疾患の病態メカニズムの解明及び治療標的分子の探索研究に適用可能であることが示唆される。

Y-05	抗不整脈薬による hERG チャンルの活性化ゲート機能制御
	○古谷和春 ^{1, 2} 、山川祐子 ³ 、稲野辺厚 ^{1, 2} 、岩田美紀 ¹ 、倉智嘉久 ^{1, 2} ¹ 大阪大学大学院医学系研究科 分子・細胞薬理学 ² 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター ³ 大阪大学大学院医学系研究科 数理保健学

膜電位の変化に応答したイオンチャネルの開閉は活動電位の形成や細胞の電氣的興奮性制御のための必須の分子機能である。この機能（電位依存的ゲート機能）に作用する薬物や毒素が知られ、これらはイオンチャネル機能研究のツールとして用いられてきた。第三群抗不整脈薬に分類されるアミオダロンやニフェカランは、hERGチャネルを含む電位依存性K⁺チャネルに対して阻害作用を持つことが以前から知られるが、近年我々は、hERGチャネルの活性化ゲート機能にも作用を持つことが明らかにした。この薬物作用をファシリテーションと呼んでいる。これまでの研究から、抗不整脈薬はポア領域との相互作用によりファシリテーション作用を発揮すると見られた。これは、これまで比較的良好に調べられてきたイオンチャネルの電位センサー領域に作用するゲート機能制御薬と作用部位が明らかに異なる。薬物のhERGチャネルファシリテーション作用の理解からチャネルゲート機能制御の理解が進む可能性がある。そこで今回、ファシリテーション作用に関してさらに電気生理学的解析を行った。薬物のファシリテーション作用の特徴として電位依存性がある。薬物存在下でも、脱分極のプレコンディショニングを行わないとファシリテーション作用はほとんど観察されない。薬物濃度を系統的に変えながら実験を行ったところ、アミオダロンなどでは阻害のおこらない低濃度から脱分極のプレコンディショニングによってファシリテーション作用は観察されることが分かった。また、いずれの実験条件においても、阻害されたチャネル成分はファシリテーション作用に見かけ上関与しない。ファシリテーションと阻害がポア内でおこる異なる相互作用様式に基づくとの我々の以前の結論とも併せて考えると、一連の結果はチャネル機能を阻害せず、潜在的にファシリテーションに移行できる薬物相互作用の状態が存在することを示唆している。また今回、カルベジロールやキニジンなど他のhERGチャネル阻害薬もファシリテーション作用を有していること、薬物毎にチャネルの活性化ゲート機能に対する作用の強さは異なることが分かった。作用が顕著なアミオダロンでは活性化曲線のシフトは-30 mVに達する。hERGチャネルに限らず、イオンチャネル阻害薬がゲート機能に影響を及ぼす実験データは論文中に散見する。チャネルのポア領域は薬物によるゲート機能制御の重要な標的かも知れない。

Y-06	ラット肺静脈心筋細胞のノルエピネフリン誘発自動能
	○岡本 洋介 ¹ , 鷹野 誠 ² , 大場 貴喜 ¹ , 尾野 恭一 ¹ ¹ 秋田大学大学院医学系研究科細胞生理学講座, ² 自治医科大学生理学

【背景】臨床において最も頻度の高い不整脈である心房細動は、その起源は主に肺静脈であることが知られており、心房細動の発症あるいは維持に自律神経系の関与が示唆されている。本研究では、ラット肺静脈心筋細胞におけるノルエピネフリン（NE）誘発性自動能の細胞内メカニズムを、電気生理学的、薬理学的、分子生物学的及び組織学的手法を用いて解析した。

【方法、結果】単離した肺静脈心筋において穿孔パッチクランプ下に膜電位を測定し、NE 10 μ M を投与した。約 25% の細胞で自動能が誘発され、自動能の出現前後で膜抵抗にほとんど変化を認めず、電圧固定条件では、固定電圧によらず、常に内向きの振動性内向き電流を生じた。Na-Ca 交換体（NCX）の選択的阻害薬である SEA0400 1 μ M により、この誘発自動能は停止した。細胞内 Ca イメージングと膜電位・膜電流の同時記録では、自動能は Ca 貯蔵部位からの Ca 放出に伴って起きていることがわかった。これらのことから、NCX がこの自動能の主な責任担体であると考えられた。NE 誘発自動能は α_1 アドレナリン受容体遮断薬、 β_1 遮断薬により停止した。 α_1 受容体のシグナル伝達経路に着目し、伝達経路の下流の拮抗薬を投与したところ、フォスホオリパーゼ C、イノシトール 3 リン酸受容体（InsP3R）の拮抗薬はこの自動能を阻害した。一方、C キナーゼ（PKC）の阻害薬はこの自動能を停止させなかった。免疫染色では、NCX と InsP3R が共局在していることがわかった。

【考察】以上により、NE 誘発自動能には α_1 、 β_1 いずれの受容体も必須であり、 α_1 刺激は InsP3R を活性化、 β_1 受容体刺激は細胞内 Ca 貯蔵部位への Ca 取り込みを促進していることが推測された。InsP3R を介する細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 放出が近接する NCX の順向性輸送を促進することにより内向き電流を生じ、催不整脈性の自動能が誘発されることが示唆された。

Y-07	神経-血管ガイダンス分子 Semaphorin を標的とした次世代の血管再生治療および代謝性疾患治療の開発
	○森谷純治、南野徹 千葉大学大学院医学研究院 循環病態医科学

Semaphorin3E (Sema3E)は胎生期における神経-血管ガイダンス分子であることが知られているが、生後の血管新生における役割はよく知られていない。その役割を調べるため、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)を用いて検討したところ、Sema3E は HUVEC において血管内皮増殖因子 (VEGF) の受容体である VEGFR2 のリン酸化を抑制し、濃度依存性に VEGF の血管新生促進作用を抑制することがわかった。

またマウス虚血肢において Sema3E の発現は著明に上昇しており、Sema3E の阻害剤として働く PlexinD1-Fc 融合蛋白 (PlexinD1-Fc) により Sema3E を抑制すると、有意な血流の改善を認めた。さらに Sema3E ノックアウトマウスでは下肢虚血後の血管新生が野生型に比して改善していた。

老化分子である p53 も血管新生に対して抑制的に働くことが知られているが、HUVEC においては、低酸素刺激によって p53 が活性化し Sema3E の発現が誘導された。マウス虚血下肢においても p53 依存性に Sema3E の発現の増加が認められたが、これらの上昇は糖尿病マウスの虚血下肢においてさらに増強されていた。そして糖尿病マウスの虚血肢に VEGF と PlexinD1-Fc の発現ベクターを同時に投与すると、VEGF 単独投与群と比較して著明な血流改善が得られた。

骨格筋や脂肪組織といったエネルギー代謝の標的臓器では、その機能に関して血管の形成が重要な役割を担っている。我々はこれらの臓器における Sema3E の発現が糖尿病モデルにおいて上昇していること、さらに Sema3E のヘテロノックアウトマウスにおいて糖負荷試験を行うと、野生型に比して血糖値の上昇が抑制されていることを確認した。さらに高脂肪高ショ糖負荷をした野生型マウスに PlexinD1-Fc の発現ベクターを筋注すると、コントロールに比べて空腹時血糖および糖負荷試験による血糖値の上昇が抑制されていた。

これらの結果から、Sema3E を抑制することは、特に VEGF 等の治療のみでは効果のない症例に対する新たな治療的血管新生の標的となり得ると考えられた。さらに Sema3E は、血管新生の抑制作用のみならず、糖尿病をはじめとする代謝性疾患の病態生理に関わっていることが示唆された。

Y-08

アルドステロンによる IGF-1 受容体とハイブリッド受容体を介したインスリン抵抗性と血管リモデリングに与える影響

○人見 浩史、藤田 昌子、Shamshad Sherajee、Kazi Rafiq、
中野 大介、清元 秀泰、河野 雅和、西山 成
香川大学医学部 薬理学 循環器腎臓脳卒中内科

(目的) 我々は、アルドステロンが血管平滑筋におけるインスリンシグナルに、深く影響を与えることを報告してきた。最近インスリンシグナルにおいて、Insulin-like growth factor (IGF)-1 の関与が報告されているが、アルドステロンと IGF-1、およびその受容体の関係は明らかとなっていない。そこで本研究では、アルドステロンの IGF-1 受容体を介したインスリンシグナルに与える影響を、細胞実験と動物実験で検討した。(方法) インスリン受容体と IGF-1 受容体の発現、Mitogen-activated protein (MAP)キナーゼのリン酸化は Western blot 法で評価した。IGF-1 受容体 mRNA は RT-PCR 法で評価した。ハイブリッド受容体は免疫沈降法を用いて評価した。細胞肥大は ^3H 標識ロイシンの取り込みで測定した。 α -smooth muscle actin (SMA)発現は免疫蛍光法で測定した。ラットにアルドステロンを投与し、大動脈を Azan 染色で評価した。酸化ストレスはジヒドロエチジウム染色で、耐糖能は Glucose Tolerance Test (OGTT)で評価した。(結果) アルドステロン (10nmol/L) は IGF-1 受容体とハイブリッド (インスリン-IGF-1) 受容体の発現を有意に増加させた。しかしながら、インスリン受容体発現に変化は認められなかった。IGF-1 受容体 mRNA 発現もアルドステロンにより増加した。選択的なミネラルコルチコイド受容体 (MR) 阻害剤であるエプレレノン、これらの発現を抑制した。増殖性シグナルである MAP キナーゼについても調べたところ、アルドステロンは、インスリンによる MAP キナーゼのリン酸化をさらに増強した。ロイシンの取り込みや SMA の発現もアルドステロンにより増強されたが、エプレレノンや MR siRNA はこれらすべてを抑制した。一方動物実験では、アルドステロン投与ラットの血圧は上昇し、スピロノラクトンや抗酸化剤はこれを抑制した。アルドステロン投与により、酸化ストレスの増加を認め、抗酸化剤やエプレレノンはこれを抑制した。OGTT で評価した耐糖能では、アルドステロン投与ラットで耐糖能の悪化を認めた。アルドステロンは Azan 染色陽性部位を増加させ、スピロノラクトンはこれを減少させた。また、アルドステロンは大動脈組織のハイブリッド受容体の増加を認め、スピロノラクトンや抗酸化剤はこれを抑制した。これらの変化は、細胞実験で見られた変化と矛盾しない結果であった。(結論) アルドステロンは、IGF-1 受容体とハイブリッド受容体の発現増加により、インスリンによる血管平滑筋細胞を肥大させた。ラットモデルにおいても細胞実験で認めた同様の変化を確認した。以上の結果より、アルドステロンによる IGF-1 受容体とハイブリッド受容体の発現増加が、高血圧を伴う糖尿病における動脈硬化の機序の一部である可能性が示唆された。

Y-09	鉄キレート剤 deferoxamine は内皮細胞活性化により血管新生を促進する
	○田島壮一郎 ¹ 、池田康将 ¹ 、堀ノ内裕也 ¹ 、木平孝高 ¹ 、富田修平 ¹ 、 山野範子 ¹ 、石澤啓介 ² 、土屋浩一郎 ² 、玉置俊晃 ¹ 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 ¹ 薬理学, ² 医薬品機能生化学

【背景】 鉄は生体恒常性維持に必須の因子である。しかし、過剰の鉄は Fenton 反応を介して細胞障害性の強いヒドロキシラジカルを生成して酸化ストレスを誘導する。近年、鉄蓄積と末梢動脈疾患の関連が報告されている。鉄過剰症治療薬である deferoxamine (DFO : 鉄キレート剤) は vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を増加させることが知られている。したがって DFO は血管新生促進して末梢動脈疾患に有効であることが示唆される。本研究ではマウス下肢虚血モデルを用いて DFO の血管新生作用について検討した。

【方法・結果】《in vitro study》培養ヒト大動脈内皮細胞を用いて解析を行った。DFO 添加により endothelial nitric oxide synthase (eNOS) リン酸化ならびに Akt リン酸化は亢進した。DFO の eNOS リン酸化亢進作用は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害剤である LY294002 にて抑制された。DFO は内皮細胞の増殖・遊走・管腔形成を促進して、DFO によるこれらの内皮機能活性化は LY294002 にて抑制された。《in vivo study》8 週齢 C57BL/6J マウスの下肢虚血モデルを用いて DFO の血管新生作用について解析を行った。マウスは DFO 投与群ならびに vehicle 投与群の 2 群に分け比較・検討した。レーザードップラーによる虚血後微小循環についての検討では、vehicle 投与群と比較して DFO 投与群では虚血肢における血流回復の促進を認めた。虚血肢骨格筋における CD31 免疫染色による毛細血管密度の検討においても同様に DFO 群において毛細血管密度は増加していた。また虚血肢における Akt ならびに eNOS のリン酸化は DFO 投与群で亢進していた。DFO による虚血後血流回復促進効果は eNOS 欠損マウスでは認められなかった。

【結論】 DFO は NOS 依存性に内皮機能を活性化することによって虚血後血管新生を促進することが示唆された。

血管内皮細胞を用いた endothelial microparticles (EMP) の効率的な産生系の確立およびバイオマーカーとしての可能性の検討

○山本誠士¹, 東英梨月^{1, 2}, 村松昌³, 柳橋 努⁴, 生谷尚士⁴, 長井良憲⁴, 高津聖志⁴, 宮崎賢治¹, 佐竹美芽¹, 堂本光子², 新飯田俊平³, 服部裕一¹

¹富山大・院・分子医科薬理, ²金沢工大・ゲノム生物工学, ³国立長寿医療研究センター・遺伝子蛋白質研, ⁴富山大・院・免疫バイオ

【はじめに】近年、血中に存在する endothelial microparticles (EMP)がメタボリックシンドローム、子癇前症、敗血症などの疾患に伴い増加することが報告されている。EMP は上記疾患を含む炎症性病態で血中に増加するとされるが、どの部位の血管から産生されるのか、どのようなメカニズムによって血管内皮細胞から出芽し放出されるのか、それ自身がどのような生物活性を有するのか未解明な部分が多い。我々は、EMP の *in vitro* での効率的な産生系と測定系を確立し、さらに *in vivo* 病態モデルとの比較検討を行い、EMP の疾患バイオマーカーとしての可能性の検討することを目的に研究を行った。

【方法】脳血管内皮細胞由来細胞株である b.End5 を用い、3 種類の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , IFN- γ)および lipopolysaccharide (LPS)を作用させ、EMP の産生量を flow cytometry によって解析した。サイトカインおよび LPS を作用させたときの細胞の炎症状態は、各種炎症マーカーを指標にして評価した。さらに time lapse 解析によって、EMP が放出される際の細胞表面の詳細な観察を行った。また、*in vivo* の検討では、急性炎症マウスモデル、慢性炎症マウスモデルを作成し、血中 EMP を flow cytometry によって解析した。さらに EMP の構成蛋白質について、SDS-PAGE サンプルに銀染色を施し評価した。

【結果】b.End5 を用いた *in vitro* の系において、最も炎症マーカーの発現が高かったサイトカイン+LPS を作用させた際に、EMP の産生が開始されることを time lapse 解析で明らかにした。また、細胞膜特異的染色法を用いた結果、EMP の産生を効率的に flow cytometry で測定できることを確認した。さらに、共焦点顕微鏡を用いて、EMP を可視化することに成功した。一方、*in vivo* の系では、LPS 投与による急性炎症マウスモデル、肥満による慢性炎症マウスモデルでの検討を行い、両モデルで血中 EMP 量の増加が観察された。銀染色による EMP 構成蛋白質の解析では、*in vitro*、*in vivo* で約 60 kD 蛋白質の著明な増加が観察された。

【考察】EMP の効率的な *in vitro* 産生系および測定系の確立に成功した。さらに、*in vitro* の炎症マウスモデルでは、急性炎症、慢性炎症いずれの場合においても血中 EMP の増加が確認された。また、銀染色の結果から、炎症によって誘導される EMP の主要な構成蛋白質は、*in vitro*、*in vivo* で関連性がみられることが示唆された。以上の結果から、血中 EMP 量を flow cytometry など注意深くモニターすることによって、炎症性疾患の有無、さらには重症度を診断できる可能性が示唆された。

Y-11	血管平滑筋細胞における BK チャネル-VGCC 複合体の解析
	○鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉祐治 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学

血管平滑筋細胞において、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VGCC) と大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル (BK チャネル) は筋小胞体膜上のリアノジン受容体 (RyR) と共に、 Ca^{2+} 動態が厳密に制御された Ca^{2+} マイクロドメイン内で機能すると想定される。このマイクロドメイン内で BK チャネルは主に RyR から遊離された Ca^{2+} によって活性化されるが、一部の神経細胞においては、BK チャネルが VGCC から流入した Ca^{2+} によって直接活性化されるとの報告も為されている。このような分子複合体を安定化させる足場として、カベオリン 1 (Cav1) 等によって形成される細胞膜上の窪み構造 (カベオラ) が知られている。本研究では、BK チャネルと VGCC の分子間相互作用と、これに対するカベオラの機能的意義の解明を目的として、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡による細胞膜上のイオンチャネル動態の 1 分子可視化とパッチクランプ法による機能解析を行った。BK チャネルおよび VGCC の細胞内 C 末端に YFP あるいは CFP を融合させ、マウス大動脈平滑筋細胞に一過性に共発現させると、これらのイオンチャネルは共局在して蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を起こした。更に脱分極により VGCC から流入した Ca^{2+} は共局在する BK チャネルを直接活性化することが明らかとなった。よって、BK チャネルと VGCC の一部は機能的分子複合体を形成することが示唆された。更に、カベオリン 1 ノックアウトマウス (Cav1-KO) を用いた実験から、カベオラが BK チャネルと VGCC の分子間相互作用を促進させることが示唆された。これまで BK チャネルは主に loose coupling した RyR からの Ca^{2+} 遊離により活性化されると考えられてきたが、本研究により tight coupling した VGCC からの Ca^{2+} 流入によっても活性化され、この機能連関にはカベオラが重要であるという新たな知見が得られた。BK チャネル活性による過分極は過度の Ca^{2+} 流入を防いで血管平滑筋の興奮性を制御するが、この制御機構にカベオラを場とする上記の tight coupling が寄与すると考えられる。

Y-12	血管病態を制御する新規カルモジュリン関連蛋白質の探索と機能解析
	○臼井 達哉、山脇 英之、岡田 宗善、原 幸男 北里大学 獣医畜産学研究科 獣医薬理学研究室

【背景と目的】カルモジュリンは炎症、代謝、アポトーシス、筋収縮、細胞内情報伝達、記憶、神経成長、免疫応答などに関与すると言われている。近年、虚血性心疾患や脳梗塞の原因とみられるカルモジュリン関連蛋白質や遺伝子がいくつか発見されている。そこで本研究では、in vivo 病態モデルの血管組織及び、in vitro 培養血管平滑筋細胞におけるカルモジュリン関連蛋白質の遺伝子レベルでの発現変化を検討することを目的とした。

【方法】自然発症高血圧ラット(SHR)及びウィスターKyoto (WKY)ラット胸部大動脈組織から RNA を抽出し、RT-PCR 法により 11 種のカルモジュリン関連蛋白質の mRNA 発現を解析した。また、ラット腸間膜動脈平滑筋細胞(rmaSMC)に各種炎症性サイトカインを処置後、同様に mRNA 発現を解析した。さらに rmaSMC に TNF を処置した後、ウェスタンブロット法を用いて蛋白質発現及びリン酸化解析を行った。

【結果】SHR 大動脈組織及び rmaSMC において brain-derived neurotrophic factor (BDNF)及び転写調節因子 histone deacetylases (HDAC)4 発現が亢進した。rmaSMC において非選択的 HDAC 阻害薬 TSA は TNF による VCAM-1 発現誘導及び NF- κ B のリン酸化を抑制したが JNK、p38、ERK 及び Akt のリン酸化は抑制しなかった。また、siRNA による HDAC4 ノックダウンは TNF による VCAM-1 発現誘導及び NF- κ B のリン酸化を抑制した。一方、BDNF 阻害薬 K252a は TNF による VCAM-1 発現誘導を抑制した。さらに、BDNF 単独処置により VCAM-1 発現が誘導され、NF- κ B 及び Akt のリン酸化が亢進した。

【考察】以上の結果から、HDAC4 及び BDNF が高血圧症の病態に何らかの関与を示す可能性が示された。また、rmaSMC において HDAC4 が TNF による VCAM-1 発現誘導を NF- κ B のリン酸化を介して制御し、BDNF は NF- κ B 及び Akt のリン酸化亢進を介して VCAM-1 発現を誘導することが明らかとなった。

【背景および目的】血管内皮細胞や平滑筋細胞機能は、神経や化学・液性因子による刺激の他に、絶えず血圧・血流によって生じる血行力学的因子によっても調節されている。この力学的作用は、大きく伸展張力、圧力負荷、ずり応力に大別され、血管の恒常性の維持や、病態の進展に影響を及ぼす。一方、当研究室では先にドコサヘキサエン酸（DHA）がラット培養血管平滑筋細胞において、インターロイキン-1 β （IL-1 β ）刺激により誘導される誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）及びシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）発現を増強することを明らかにしている。本研究では、収縮期高血圧を想定した圧力負荷が培養血管平滑筋細胞の iNOS、COX-2 発現に与える影響と、圧力負荷環境下における DHA の iNOS、COX-2 発現に与える影響を検討した。

【方法】血管平滑筋細胞は、雄性ウィスター系ラットの胸部大動脈中膜から酵素法により単離し、培養したものを実験に使用した。細胞への波動圧力負荷は、37°C 条件下、5%の二酸化炭素を含む大気を注入しながら内圧を 160～80 mmHg までくり返し変動させることができる加圧タンクを用いて行った。蛋白質発現はウェスタンブロット法、mRNA 発現は RT-PCR 法により検討した。

【結果】IL-1 β （3 ng/ml）刺激により 24 時間までに時間依存的に誘導された iNOS 及び COX-2 発現は、圧力負荷により有意に抑制された。一方、圧力負荷は COX-1 発現には影響を与えなかった。DHA（30 μ M）は、圧力負荷環境下においても IL-1 β 刺激による iNOS、COX-2 発現を有意に増強した。また、圧力負荷環境下における DHA の COX-2 発現増強作用は、圧力負荷を行っていない群と比較して、有意に増強された。

【考察】収縮期高血圧を想定した圧力負荷環境において血管平滑筋細胞の iNOS、COX-2 発現誘導能が抑制されることが明らかとなり、このことが病態の進展に関連していることが示唆された。また、圧力負荷環境下での DHA の iNOS、COX-2 発現増強作用が、DHA の循環器疾患に対する有用性に関連している可能性が考えられた。

Y-14	プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP4 の抗血小板療法ターゲットとしての可能性
	<p>○ 柏木 仁¹、栗山周子¹、結城幸一¹、小島史章¹、成宮 周²、牛首文隆¹</p> <p>¹ 旭川医科大学・医・薬理</p> <p>² 京都大学・医・薬理</p>

【背景】従来、プロスタノイドは血小板の機能調節に中心的な役割を果たすことが知られている。なかでも、強い血小板活性化作用を示すトロンボキサン (TX) A₂ と、その活性化抑制作用を示すプロスタグランジン (PG) I₂ が重要と考えられている。一方、PGE₂ には低濃度では血小板凝集を促進させ、高濃度では逆に抑制する二相性の作用が知られていた。この PGE₂ の血小板凝集促進作用が PGE₂ 受容体サブタイプである EP₃ を介することを、我々は報告している。しかし、PGE₂ の血小板凝集抑制作用に関する詳細は不明である。

【方法】マウスとヒトの血小板から total RNA を調製し、RT-PCR 法により PGE₂ 受容体各サブタイプと PGI₂ 受容体 IP の発現を解析した。また、EP₂ と EP₄ を欠損するマウスの血液から多血小板血漿 (PRP) を調製し、PGE₂ や各受容体アゴニストが血小板凝集に及ぼす作用を血小板凝集計を用いて解析した。さらに、EP₂ と EP₄ のアゴニスト・アンタゴニストがヒト血小板凝集に及ぼす作用についても解析した。

【結果】マウスおよびヒト血小板において EP₂、EP₃、EP₄ と IP の発現が確認された。また、PGE₂ が低濃度では EP₃ を介した血小板凝集促進作用を示し、高濃度では IP、EP₂ と EP₄ など複数の受容体に作用して凝集抑制作用を示すことを明らかにした。一方、EP₂ と EP₄ の特異的アゴニストは血小板凝集を濃度依存的に抑制したが、この抑制作用は EP₂ と EP₄ を各々欠損するマウスにおいて有意に減弱した。また、マウス同様、EP₂ と EP₄ の特異的アゴニストはヒト血小板の凝集を濃度依存的に抑制した。興味深いことに、EP₄ アゴニストの血小板凝集抑制作用はマウスに比しヒトでは非常に強く、この抑制作用は EP₄ アンタゴニストにより完全に拮抗された。

【結論】ヒト血小板に対する強い凝集抑制作用から、EP₄ アゴニストの新規抗血小板薬としての可能性が示唆された。

Y-15	マウス腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応機序の解析
	<p>○和家 祥大¹、牧野 堅人¹、藤原 弘喜¹、橋川 成美²、 橋川 直也³、高取 真吾¹、川崎 博己¹</p> <p>¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 臨床薬学 ²岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科 薬理学 ³岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科 臨床分子遺伝学</p>

【目的】これまでに我々は、ラット腸間膜動脈血管床において血管緊張度調節に関与する種々の因子について検討を行ってきた。さらに我々は、遺伝子改変が可能であり、多くの病態モデルが作成されているマウスの腸間膜動脈血管床における血管反応性評価系を新たに確立し、血管周囲神経を介した血管緊張度調節が、ラット血管床と類似したメカニズムを有することを明らかにしている。そこで今回、種々の血管調節液性因子を産生し、血管緊張度調節に関与している血管内皮機能に着目し、マウス腸間膜動脈血管床におけるより詳細な血管緊張度調節機構について検討を行った。

【方法】C57BL/6 系雄性マウスの腸間膜動脈血管床を摘出して、灌流標本作製した。一定流量で Krebs 液を灌流し、その灌流圧変化を血管緊張度変化として測定した。静止緊張下において、経壁電気刺激(PNS, periarterial nerve stimulation)および noradrenaline による血管収縮反応を、また methoxamine 誘発昇圧条件下において、acetylcholine(ACh)、calcium ionophore(A23187)による血管弛緩反応を観察した。さらに、これら血管収縮および弛緩反応に対する NO 合成酵素阻害薬(L-NAME, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester)、cyclooxygenase(COX) 阻害薬 indomethacin、K⁺チャネル阻害薬(TEA, tetraethyl ammonium)および gap-junction 阻害薬(18α-GA, 18α-glycyrrhetic acid)の影響も検討した。

【結果・考察】静止緊張下標本において PNS 誘発血管収縮反応は、L-NAME、indomethacin および TEA 存在下により有意に増大したが、18α-GA 存在下では変化が見られなかった。昇圧緊張下標本では、ACh および A23187 により惹起された血管弛緩反応は、いずれも L-NAME および 18α-GA 存在下により抑制されなかった。一方、Indomethacin 存在下では、主に A23187 誘発弛緩反応が減弱し、TEA 存在下では ACh 誘発弛緩反応のみが著明に減弱した。以上の結果から、マウス腸間膜動脈内皮細胞において、A23187 は主に COX を介した弛緩反応を誘発し、ACh は主に endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF)を介した弛緩反応を誘発すると考えられる。マウス腸間膜動脈血管床においても血管周囲神経のほか血管内皮細胞由来弛緩因子を介した血管緊張度調節機構の存在が示唆される。

Y-16	糖代謝物質メチルグリオキサル慢性処置のラット血管反応性に及ぼす影響とメカニズム
	○向田 昌司、山脇 英之、岡田 宗善、原 幸男 北里大学 獣医畜産学研究科 獣医薬理学研究室

【背景と目的】糖尿病合併症患者において糖代謝物質 methylglyoxal (MGO)の血中濃度が上昇していることから、MGO が糖尿病性血管障害に関与すると考えられている。加えて近年、自然発症高血圧モデルラットや老化動物の血管組織においてMGOの蓄積が上昇し、高血圧症の進展に寄与する可能性も報告されている。我々はこれまでに MGO 急性処置はラット摘出大動脈・腸間膜動脈標本において平滑筋の BK_{Ca} チャネルを活性化して noradrenaline (NA)による収縮を抑制することと、ラット頸動脈標本において内皮細胞に作用し、活性酸素種産生を上昇させ、angiotensin II による収縮を増強すること明らかにしている。本研究では器官培養法を用いて MGO を慢性処置した摘出腸間膜動脈の収縮反応性の変化とそのメカニズムの検討を行った。

【方法と結果】ウイスターラットから腸間膜動脈を摘出し、内皮を剥離後、器官培養法を用いて MGO を 3 日間処置した。MGO (4-42 μ M) は、NA (0.1 nM-3 μ M) による収縮反応を濃度依存的に抑制した。抗酸化薬 NAC (1 mM)は MGO による NA 収縮抑制を有意に改善した。また、選択的 NADPH oxidase 阻害薬 gp91ds-tat (0.1 μ M)は、MGO による NA 収縮抑制を有意に改善した。さらに、lucigenin を用いて NADPH oxidase の活性を測定したところ、MGO により有意に上昇した。形態学的検索から MGO (42 μ M, 3 days)処置により平滑筋の粗鬆化が観察され、NAC の併用処置により改善が見られた。MGO (42 μ M, 3 days)は、NADPH oxidase サブユニットの gp91^{phox} (NOX2)、p22^{phox}、p67^{phox}、p47^{phox} の発現に影響を与えなかったが、NADPH oxidase (NOX) 1 の発現を上昇させた。MGO は superoxide dismutase (SOD)-1 及び SOD-2、Heme Oxygenase 1、inducible NOS の発現には影響を与えなかった。

【考察】以上の結果から、MGO 慢性処置は血管平滑筋に作用し、NA 収縮抑制作用を有することが明らかとなった。このメカニズムは NOX1 発現上昇により産生増強された活性酸素種が血管平滑筋を形態的に障害することによると考えられる。

Y-17	ポストコンディショニングによる心保護メカニズム：プレコンディショニングとの比較
	○田和 正志 ^{1,2} 、福本 大起 ² 、山下 直人 ² 、大喜多 守 ² 、今村武史 ¹ 、松村 靖夫 ² 、岡村 富夫 ¹ ¹ 滋賀医科大学薬理学講座 ² 大阪薬科大学病態分子薬理学研究室

【背景・目的】プレコンディショニング (preC) ならびにポストコンディショニング (postC) は、心臓の虚血再灌流障害を軽減することが知られている。以前の研究において、preC による心保護効果には、虚血再灌流障害の原因の一つであるノルエピネフリン (NE) 過剰放出の抑制が関与していることが明らかにされている。本研究では、postC による心保護効果にも、preC と同様に NE 過剰放出の抑制が関与しているのかについて検討した。

【方法】SD 系雄性ラットから心臓を摘出し、心灌流標本を Langendorff 法に準じて作製した。安定放置後、虚血処置として灌流を 40 分間停止し、再灌流を 30 分間施した群を対照群とし、虚血前に 5 分間虚血、5 分間再灌流を 3 サイクル行った群を preC 群、再灌流直後に 30 秒再灌流、30 秒虚血を 3 サイクル行った群を postC 群とした。心機能の指標として、最大左心室圧 (LVDP)、左心室圧一次微分値 (dp/dt_{max})、左心室拡張末期圧 (LVEDP) の各パラメーターをモニターした。また、再灌流開始 5 分後までの灌流液中の NE 濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

【結果】対照群では、心虚血再灌流により LVDP、 dp/dt_{max} の低下並びに LVEDP の上昇といった機能低下が観察された。虚血再灌流によるこれら心機能パラメーターの悪化は、preC あるいは postC 処置により有意に改善したが、その改善程度は postC 群に比べ preC 群でより強力であった。また、対照群でみられた虚血再灌流後の NE 過剰放出は、preC 処置により顕著に抑制されたものの、postC 処置による影響はなかった。なお、非選択的な一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬である N^G -nitro-L-arginine (NOARG) を前処置することにより、postC による心保護効果は完全に消失した。一方、NE 過剰放出抑制作用を含めた虚血再灌流障害に対する preC の心保護効果は、NOARG 処置下においても完全には消失せず、部分的に認められた。

【結語】postC による心保護効果は、preC とは異なり、虚血再灌流後の NE 過剰放出抑制を伴わず、内因性 NO を介する機序によることが明らかとなった。

日本循環薬理学会会則
役員名簿
名誉会員名簿
永年会員名簿

日本循環薬理学会会則

第1章 総則

第1条 本会は日本循環薬理学会 (Japanese Association of Cardiovascular Pharmacology) と称する。

第2条 本会の事務局を〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町 滋賀医科大学薬理学教室内 (TEL:077(548)2184 FAX:077(548)2183) に置く。

第2章 目的および事業

第3条 本会は、循環薬理学の研究の発展を図るとともに、会員の相互の連携および関連機関との連絡を保ち、広く知識の交流に努めることを目的とする。

第4条 本会は前条の目的を達成するために次の事業を行う。

1. 学術集会、講演会などの開催
2. 関係学術団体との連絡および調整
3. 循環薬理学に関する国際交流
4. その他本会の目的達成のために必要な事業

第3章 会 員

第5条 本会会員は本会の目的に協力するもので次の通りとする。

1. 一般会員：医学、薬学、歯学、農学、獣医学、理学、工学その他関連領域の研究者で本会の目的に賛同する者
2. 賛助会員：本会の事業を援助する個人又は法人
3. 永年会員：循環薬理学の分野で貢献した者で、幹事会の承認を得た者
4. 名誉会員：本会の発展に特に功績のあった者で、幹事会の承認を得た者

第6条 会費は附則に定める。

名誉会員及び永年会員は会費を納めることを要しない。

第7条 本会に入会を希望するものは、所在地、所属、氏名を明記し、会費を添えて本

会事務局に申し込むこととする。原則として 2 年間会費を滞納したものは退会したものとみなす。

第 4 章 役 員

第 8 条 本会に次の役員を置く。

1. 会長 1 名
2. 当番幹事 1 名
3. 幹事 20 名程度
4. 監事 2 名
5. 事務担当委員 若干名

第 9 条 会長は幹事の互選によって選出され、会務を統括し、幹事会の議長となる。

第 10 条 幹事は幹事会の推薦によって選出され、会長が任命する。

第 11 条 幹事は幹事会を構成し、会の運営、庶務その他の業務を分担する。

第 12 条 当番幹事は幹事会において推薦・選出され、学術集会を主宰する。

第 13 条 監事は幹事の互選によって選出され、会務および会計の監査をおこなう。

第 14 条 事務担当委員は幹事会によって選出され、幹事の業務を補佐する。

第 15 条 役員は、その任期は 2 年とし、就任時に年齢満 65 歳未満でなければならない。

第 16 条 本会に幹事の中から選出した会計を 1 名おく。

第 17 条 学術集会および幹事会は毎年 1 回以上開催する。

第 5 章 会 計

第 18 条 本会の事業年度は毎年 1 月 1 日より始まり、12 月 31 日に終わる。

第 19 条 本会の会計は会費、各種補助金および寄付金をもって充てる。

第 6 章 附 則

- 1) 本会則の変更は幹事会の議を経ておこなう。
- 2) 一般会員の会費は年額 3,000 円とし、賛助会員の会費は年額 100,000 円とする。
- 3) 本会則は、平成 10 年 11 月 27 日から施行する。
- 4) 本会則の改正は、平成 15 年 12 月 5 日から施行する。
- 5) 本会則の改正は、平成 18 年 12 月 1 日から施行する。

日本循環薬理学会 役員名簿

(平成 22 年 10 月 1 日現在)

氏名(役職)	所属あるいは連絡先
岡村 富夫(会長)(事務局担当)(第 12 回)	滋賀医科大学 薬理学教室
岩尾 洋 (監事)(第 13 回)	大阪市立大学大学院 医学研究科 分子病態薬理学教室
飯野 正光 (幹事)(第 16 回)	東京大学大学院 医学系研究科 細胞分子薬理学教室
倉智 嘉久 (幹事)(第 17 回)	大阪大学大学院 医学系研究科 病態制御医学 薬理学講座 分子細胞薬理
玉置 俊晃 (監事)(第 15 回)	徳島大学大学院 ヘルス・バイオサイエンス研究部 神経情報医学部門 病態情報医学講座 情報伝達薬理学分野
辻本 豪三 (幹事)(第 19 回)	京都大学大学院 薬学研究科 ゲノム創薬科学分野
水流 弘通 (幹事)	
中谷 晴昭 (幹事)(第 18 回)	千葉大学大学院 医学研究院 薬理学講座
尾崎 博 (幹事)(HP 担当)	東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医薬理学教室
三輪 聡一 (幹事)(第 20 回)	北海道大学大学院 医学研究科 生理系 薬理学講座 細胞薬理学分野
光山 勝慶 (幹事)	熊本大学大学院 生命科学研究部 総合医薬科学部門 薬物治療設計学講座 生体機能薬理学分野
石井 邦明 (幹事)	山形大学 医学部 器官病態統御学講座 循環薬理学分野
川崎 博已 (幹事)(第 21 回予定)	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 先端薬物療法開発学講座 臨床薬学分野
元村 成 (幹事)	弘前大学大学院 医学研究科 病態薬理学講座
吉栖 正典 (幹事)	奈良県立医科大学 薬理学講座
服部 裕一 (幹事)	富山大学大学院 医学薬学研究部(医学系) 分子医科薬理学講座
山田 充彦 (幹事)	信州大学 医学部 分子薬理学講座
井上 隆司 (幹事)	福岡大学大学院 医学研究科 人間生物系 細胞分子制御学
田中 利男 (幹事)	三重大学大学院 医学系研究科 薬理ゲノミクス分野

日本循環薬理学会 名誉会員名簿

(平成 22 年 10 月 1 日現在)

氏名	所属あるいは連絡先
戸田 昇 (第 1 回)	滋賀医科大学(名誉教授)/トヤマ循環器病治療薬研究所
安孫子 保 (第 2 回)	旭川医科大学(名誉教授)/老人保健施設 愛善ハイツ
三須 良寛	横浜市立大学(名誉教授)
菅野 盛夫 (第 6 回)	北海道大学(名誉教授)
斎藤 秀哉 (第 3 回)	北海道大学(名誉教授)/医療法人新仁会 千歳桂病院
橋本 敬太郎 (第 4 回)	山梨大学大学院(名誉教授)/横浜薬科大学 臨床薬学科 臨床薬理研究室
宮崎 瑞夫 (第 5 回)	大阪医科大学(名誉教授)/清恵会医療専門学院
安部 陽一 (第 7 回)	香川大学(名誉教授)/医療法人 錦秀会
唐木 英明 (第 8 回)	東京大学(名誉教授)/日本学会議会員/オフィス 301
遠藤 政夫 (第 9 回)	山形大学(名誉教授)
竹尾 聰 (第 10 回)	東京薬科大学(名誉教授)
中山 貢一 (第 14 回)	岩手医科大学 薬学部 分子細胞薬理学講座
後藤 勝年 (第 11 回)	独立行政法人 科学技術振興機構 J S T サテライト茨城
長尾 拓	内閣府 食品安全委員会 委員

日本循環薬理学会 永年会員名簿

(平成 22 年 10 月 1 日現在)

氏名	所属あるいは連絡先
藤野 澄子	札幌筋科学研究所
重井 達朗	名古屋大学(名誉教授)
山本 研二郎	大阪市立大学(名誉教授)

謝 辞

本学会の開催にあたり、下記の団体及び企業からご協力を頂きました。
ここに深甚なる感謝の意を表します。

(平成 22 年 10 月 20 日現在)

【協賛】

イムノサイエンス株式会社
財団法人 喫煙科学研究財団
日本ケミファ株式会社
日本たばこ産業株式会社
ファイザー株式会社
株式会社フロンティア・サイエンス

【広告】

アステラス製薬株式会社
MSD 株式会社
大塚製薬株式会社
株式会社金芳堂
サノフィ・アベンティス株式会社
シグマ アルドリッチジャパン株式会社
第一三共株式会社
田辺三菱製薬株式会社
ノバルティスファーマ株式会社
バイエル薬品株式会社
柏陽印刷株式会社
北海道和光純薬株式会社
株式会社ムトウ

(五十音順、敬称略)

第 38 回薬物活性シンポジウム 会長
第 20 回日本循環薬理学会 当番幹事
三輪 聡一