

# 第1回三学部合同研究発表会 プログラム

平成30年3月16日(金) 9:30~17:00

於：有瀬キャンパス 大学会館 マナビーホール

主催：神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター

## プログラム

- 9:30~9:35 開会の挨拶 総合リハビリテーション学部長 中川昭夫
- 9:35~9:55 《口頭発表》 (座長:津田裕子)  
O-1 リムーバブル阻害剤の分子設計と病態プロテアーゼの活性制御  
Molecular design of removable inhibitors and activity control of pathological proteases  
○日高興士, 北條恵子, 津田裕子  
神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室
- 9:55~10:15 RXFP 3 Peptide Antagonists の設計と合成  
O-2 Design and Synthesis of Hydrocarbon Stapled Peptide Antagonist for Relaxin Family Peptide Receptor 3  
○北條恵子, 日高興士, 津田裕子  
神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室
- 10:15~10:35 Duchenne 型筋ジストロフィーに対するカルパイン 1  
O-3 阻害治療法の開発  
Calpain 1 inhibitor therapy for Duchenne muscular dystrophy  
○松尾雅文<sup>1</sup>, 白川 卓<sup>1</sup>, 鍋島陽一<sup>2</sup>, 福島昭二<sup>3</sup>, 栗野宏之<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 総合リハビリテーション学部  
<sup>2</sup>(公財)先端医療振興財団先端医療センター  
<sup>3</sup>神戸学院大学 薬学部 <sup>4</sup>神戸大学 小児科
- 10:35~10:45 休 憩  
座長:(李 英培)
- 10:45~11:05 自閉症モデルラット由来ミクログリアの M1/M2 極性変化  
O-4 Changes of microglia M1/M2 polarization in rat model of autism spectrum  
○榎本理世, トラン ゴックミン, 山本理瑚, 成田有紀, 原 祐希,  
吹留 舞, 李 英培  
神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
- 11:05~11:25 高食塩摂取後の随時尿における尿中食塩排泄量と推定食塩摂取量の  
O-5 検討  
Diurnal change of sodium urine excretion and estimation of total salt-intake after high salt-diet in healthy young men  
○筒井輪央, 友藤 楓, 山下恵祐, 眞本利絵, 藤岡由夫  
神戸学院大学 栄養学部 臨床栄養学部門

- 11:25～11:45  
O-6 酪酸ナトリウムのマクロファージ、脂肪細胞の共培養下における PGE2 増加と lipolysis 抑制への影響について  
**Butyrate attenuates lipolysis in adipocytes co-cultured with macrophages through up-regulation of prostaglandin E2**  
○大平英夫, 筒井輪央, 眞本利絵, 藤岡由夫  
神戸学院大学 栄養学部 臨床栄養学部門
- 11:45～12:45 昼休憩  
座長：(水谷健一, 平岡義範)
- 12:45～13:05  
O-7 ナルディライジンによる PER2 の機能調節を介した概日リズム制御機構  
**Nardilysin regulates the mammalian circadian clock via modulating PER2 function**  
○平岡義範<sup>1</sup>, 吉種 光<sup>2</sup>, 大野美紀子<sup>3</sup>, 森田雄介<sup>4</sup>, 布川莉奈<sup>2</sup>, 西 清人<sup>4</sup>, 久米典昭<sup>1</sup>, 木村 剛<sup>4</sup>, 深田吉孝<sup>2</sup>, 西 英一郎<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学部門  
<sup>2</sup>東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻  
<sup>3</sup>滋賀医科大学 医学部医学科 薬理学講座  
<sup>4</sup>京都大学大学院 医学研究科 循環器内科学
- 13:05～13:25  
O-8 大脳皮質の神経分化を調節する分子機構  
**Molecular mechanisms to regulate neural differentiation of the developing neocortex**  
○水谷健一<sup>1,4</sup>, 井上真悠子<sup>1,5</sup>, 鈴木真理子<sup>1</sup>, 岩井亮太<sup>1</sup>, 田端秀典<sup>2</sup>, 岡本正志<sup>3</sup>, 今野大治郎<sup>4</sup>, 竹本経緯子<sup>5</sup>, 眞貝洋一<sup>5</sup>, 松崎文雄<sup>4</sup>, 永田浩一<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> 神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室  
<sup>2</sup> 愛知県コロニー発達障害研究所  
<sup>3</sup> 神戸学院大学 薬学部 生化学研究室  
<sup>4</sup> 理化学研究所 CDB <sup>5</sup> 京都大学ウイルス・再生医科学研究所
- 13:25～13:35 休憩  
座長：(市川秀喜)
- 13:35～13:55  
O-9 ホウ素中性子捕捉療法用 L-BPA ナノサスペンションの製剤設計  
**Pharmaceutical design of nanoparticulate L-BPA formulations for boron neutron-capture therapy**  
○安藤 徹<sup>1</sup>, 鈴木 実<sup>2</sup>, 櫻井良憲<sup>2</sup>, 高田卓志<sup>2</sup>, 藤本卓也<sup>3</sup>, 市川秀喜<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室  
<sup>2</sup>京都大学 原子炉実験所  
<sup>3</sup>兵庫県立がんセンター 整形外科

- 13:55～14:15  
O-10 新規小型高圧乳化機の開発と機能性エマルジョンの開発  
Development of new type high pressure emulsifier for small production and study of functional emulsions  
○福島昭二, 岸本修一  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬剤学研究室
- 14:15～14:35  
O-11 2017年度 研究活動の総括  
-基礎研究からの発信を臨床に還元するには?-  
Generalization of the research activities 2017- From basic research to clinical application -  
○徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- 14:35～14:45 休憩
- 14:45～15:45  
P-1 《ポスター発表》  
医薬品微粒子のドライコーティングプロセスの開発：  
DEM シミュレーションを利用した物理モデルの構築  
Development of dry coating process for microparticulate pharmaceuticals:  
Physical modelling using DEM simulation  
○安永峻也<sup>1</sup>, 川元 匠<sup>2</sup>, 荒井彩花<sup>2</sup>, 安藤 徹<sup>2</sup>, 福森義信<sup>2</sup>,  
市川秀喜<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> 神戸学院大学大学院 薬学研究科  
<sup>2</sup> 神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-2 再分散性向上による溶解性改善を目的とした難水溶性薬物のナノ結晶被覆粒子の開発  
Development of nanocrystal-coated particles for improving dissolution of poorly water-soluble drug based on the increased redispersibility  
○福島滉祐, 福山 愛, 安藤 徹, 福森義信, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-3 感温性ナノゲル粒子の膨潤収縮挙動に基づく薬物の温度応答性パルス放出型マイクロカプセルの設計  
Design of microcapsules with pulsatile drug-release in response to temperature changes based on swelling-deswelling behavior of thermosensitive nano-gel particles  
○重村彩佳, 安藤 徹, 市川秀喜, 福森義信  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

- P-4 乳癌細胞株を用いた骨転移に対するホウ素中性子捕捉療法 (BNCT)  
Preclinical study on boron neutron capture therapy for bone metastasis of breast cancer  
○佐谷諒一<sup>1</sup>, 安藤 徹<sup>1</sup>, 藤本卓也<sup>2</sup>, 須藤 保<sup>3</sup>, 福森義信<sup>1</sup>, 市川秀喜<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室  
<sup>2</sup>兵庫県立がんセンター 整形外科  
<sup>3</sup>兵庫県立がんセンター 研究部
- P-5 多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型コーティング製剤の処方設計  
Formulation studies on coated dosage forms with controlled-release of drugs by using porous fine core-particles  
○中川貴登, 古田智美, 安藤 徹, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-6 タンパク性薬物の徐放化を目的とした生分解性微粒子製剤の開発  
Development of biodegradable microparticles for prolonged-release of protein-based drugs:  
○西田綾花, 姫野智子, 安藤 徹, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-7 新規 P1 残基及び P2' 残基を有するプラスミン阻害剤の設計と評価  
Design and evaluation of plasmin inhibitor with a new P1/P1' residue  
○近藤めぐみ<sup>1</sup>, 杉浦成香<sup>1</sup>, 日高興士<sup>1,2</sup>, 北條恵子<sup>1,2</sup>, 合田圭吾<sup>3</sup>, 手納直規<sup>4</sup>, 和中敬子<sup>5</sup>, 津田裕子<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 <sup>2</sup>神戸学院大学 LSC <sup>3</sup>関西分子設計研究会  
<sup>4</sup>広島国際大学 医療栄養学部 <sup>5</sup>血栓止血研究プロジェクト
- P-8 皮膚組織における血管の規則的な構築  
Regular patterning of the blood vessels in the skin tissue  
○高島さつき<sup>1,2</sup>, 鈴木真理子<sup>1</sup>, 森山麻里子<sup>3</sup>, 森山博由<sup>3</sup>, 岡本正志<sup>2</sup>, 市橋正光<sup>2</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室  
<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 生化学研究室 <sup>3</sup>近畿大学薬学総合研究所
- P-9 神経分化過程における転写因子 Prdm8 の役割  
Prdm8 regulates the morphological transition during neural differentiation  
○友田亮太<sup>1,2</sup>, 田畑秀典<sup>3</sup>, 岩井亮太<sup>1</sup>, 岡本正志<sup>2</sup>, 市橋正光<sup>2</sup>, 永田浩一<sup>3</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室  
<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 生化学研究室 <sup>3</sup>愛知県コロンニー発達障害研究所

- P-10 Prdm8 の下流分子である Ebf3 は神経分化を調節する  
A Prdm8 target gene Ebf3 regulates neural differentiation  
○岩井亮太<sup>1,2</sup>, 井上真悠子<sup>1</sup>, 田畑秀典<sup>2</sup>, 岡本正志<sup>3</sup>, 市橋正光<sup>3</sup>,  
永田浩一<sup>2</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室  
<sup>2</sup>愛知県コロニー発達障害研究所 <sup>3</sup>神戸学院大学薬学部 生化学研究室
- P-11 LC-MS/MS を用いた薬物血中濃度測定と動態解析  
Study of Drug disposition using LC-MS/MS  
○福島昭二, 岸本修一  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬剤学研究室
- P-12 コエンザイム Q10 の培養皮膚線維芽細胞へのアンチエイジング作用  
Antiaging Effect of Coenzyme Q10 against Cultured Skin Fibroblasts  
○峯 幸稔, 高橋隆幸, 市橋正光, 岡本正志  
神戸学院大学 薬学部 生化学研究室
- P-13 Orexin-A による脳虚血誘導性糖代謝異常の抑制作用に対する Foxa2 の  
関与  
Involvement of Foxa2 on the suppressive effect of orexin-A for cerebral  
ischemia-induced hyperglycemia  
○原田慎一, 上野彩歌, 徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- P-14 脳虚血ストレス負荷後の脳内 sodium-glucose transporter type 1  
および hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  の発現変化  
Involvement of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cerebral ischemic stress-induced  
up-regulation of cerebral sodium-glucose transporter type 1  
○兵庫梨紗, 川本有香, 原田慎一, 徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- P-15 脊髄 HMGB1 シグナル系を介する脳卒中後疼痛の発現機序の解明  
Involvement of spinal high mobility group box-1 signaling on the central  
post-stroke pain  
○松浦 渉<sup>1</sup>, 原田慎一<sup>1</sup>, 劉 克約<sup>2</sup>, 西堀正洋<sup>2</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>岡山大学大学院 医歯薬学部 薬理学
- P-16 全脳虚血誘導性機械的アロディニアに対する orexin-A の効果  
Effect of orexin-A on the global ischemia-induced mechanical  
allodynia  
○喜多山紗希, 堀内雅由紀, 松浦 渉, 原田慎一, 徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

- P-17 疼痛制御機構における脳内長鎖脂肪酸 GPR40/FFAR1 の役割  
The role of brain GPR40/FFAR1 on an endogenous pain control system  
○中本賀寿夫<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 山下琢矢<sup>2</sup>, 平澤 明<sup>3</sup>, 栗原 崇<sup>4</sup>,  
糟谷史代<sup>2</sup>, 宮田篤郎<sup>4</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室  
<sup>3</sup>京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野  
<sup>4</sup>鹿児島大学 医歯学総合研究科 生体情報薬理学
- P-18 疼痛時における脳内遊離脂肪酸および脂質関連因子の解析  
Analysis of brain free fatty acid and lipid-related factor during pain  
○橘 男<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 山下琢矢<sup>2</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>3</sup>,  
栗原 崇<sup>4</sup>, 糟谷史代<sup>2</sup>, 宮田篤郎<sup>4</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室  
<sup>3</sup>京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野  
<sup>4</sup>鹿児島大学 医歯学総合研究科 生体情報薬理学
- P-19 脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの破綻が反復ストレスによる痛みの慢性化  
に關与する  
The dysfunction of the brain GPR40/FFAR1 signaling relate to the  
development of chronic pain induced by repeated stress  
○相澤風花<sup>1</sup>, 山下琢矢<sup>2</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 糟谷史代<sup>2</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室
- P-20 反復ストレス暴露後の慢性疼痛発症における脳内関連因子の解明  
Brain mechanisms of chronic pain induced by repeated social defeat stress  
○大垣 望, 中村有香, 相澤風花, 中本賀寿夫, 徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- P-21 幼少期ストレス負荷マウスの脳内各種オピオイド受容体の発現変化  
The changes of each opioid receptors expression in the brain of an early life  
stress mice  
○今西朝美, 京谷奈月, 春日政挙, 中本賀寿夫, 徳山尚吾  
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- P-22 幼少期ストレスによる神経障害性疼痛増悪機構における青斑核アストロ  
サイトの関与  
Astrocyte activation in locus coeruleus is involved in neuropathic pain  
exacerbation mediated by early life stress  
○喜多 豊<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 小山 豊<sup>2</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, <sup>2</sup>神戸薬科大学 薬理学

- P-23 母性行動における脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの関与  
**The involvement of brain GPR40/FFAR1 signaling in maternal behavior**  
 ○新里征史郎<sup>1</sup>, 中尾一誠<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>2</sup>,  
 栗原 崇<sup>3</sup>, 宮田篤朗<sup>3</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>京都大学大学院 薬学研究室 薬理ゲノミクス分野  
<sup>3</sup>鹿児島大学 医歯学総合研究科 生体情報薬理学
- P-24 GPR120/FFAR4 の欠損は非アルコール性脂肪性肝炎を悪化させる  
**The deletion of GPR120/FFAR4 exacerbates the non-alcoholic steatohepatitis**  
 ○檜崎祐実<sup>1</sup>, 長橋明香<sup>1</sup>, 原田慎一<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>2</sup>,  
 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室  
<sup>2</sup>京都大学大学院 薬学研究室 薬理ゲノミクス分野
- 15:45～15:55 休 憩
- 15:55～16:55 特別講演 (座長：徳山尚吾)  
 痛みによる負情動生成の神経機構  
 北海道大学大学院 薬学研究院  
 南 雅文先生
- 16:55～17:00 閉会の挨拶 センター長 津田裕子

【特別講演】

痛みによる負情動生成の神経機構  
Neuronal mechanisms for pain-induced negative emotion

南 雅文 (Masabumi Minami)

北海道大学 大学院薬学研究院 薬理学研究室

Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Hokkaido University

痛みは、侵害刺激が加わった場所とその強さの認知に関わる感覚的側面 (sensory component) と、侵害刺激の受容に伴う不安、嫌悪、抑うつ、恐怖などの負情動の生起に関わる情動的側面 (emotional component) よりなる複雑な体験である。これまでに痛みの感覚的側面に関しては精力的に研究がなされその神経機構もかなり明らかにされているが、情動的側面に関する研究は未だ緒についたばかりである。痛みによる負情動の生起は、生体警告系としての痛みの生理的役割に重要である。しかしながら、癌性疼痛や神経障害性疼痛などの慢性的な痛みでは、痛みにより引き起こされる不安や抑うつなどの負情動は、生活の質 (QOL) を著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環をも生じさせる。痛みの感覚的側面だけでなく情動的側面をも考慮した慢性疼痛治療法の開発、加えて、その基盤となる基礎的知見の集積が望まれる。

我々は、行動薬理的解析や電気生理学的解析により、腹側分界条床核におけるノルアドレナリン神経情報伝達亢進 (J Neurosci 28 (2008) 7728-7736) および背外側分界条床核における CRF 神経情報伝達亢進 (J Neurosci 33 (2013) 5881-5894) が、痛みによる負情動生成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。背外側分界条床核における CRF 神経情報伝達と NPY 神経情報伝達が、負情動生成において相反的な役割を果たしていることも見出している。さらに、組織化学的解析により、CRF による分界条床核 2 型神経細胞活性化が、3本の GABA 神経を介して腹側被蓋野ドパミン神経を抑制的に調節する可能性を示した (J Neurosci 32 (2012) 18035-18046)。うつ病モデル動物では腹側被蓋野ドパミン神経の活動変調が認められることが報告されており、腹側被蓋野ドパミン神経活動を調節する神経回路が、痛みの情動的側面とうつ病に共通する神経基盤として重要である可能性が考えられる。講演では、痛みによる負情動生成に関わる神経回路・神経情報伝達について我々の研究成果を紹介するとともに、うつ病モデルとして知られる慢性軽度ストレスモデル動物と慢性疼痛モデルとして知られる神経障害性疼痛モデル動物における脳内報酬系の機能変化についても最新のデータを示し、慢性疼痛とうつ病の接点となる神経機構について論じたい。

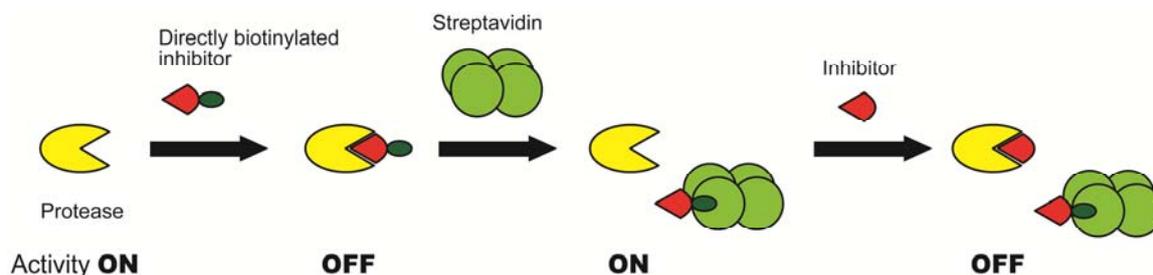
## リムーバブル阻害剤の分子設計と病態プロテアーゼの活性制御

○日高興士、北條恵子、津田裕子  
神戸学院大学薬学部 薬品化学研究室

酵素活性中心を標的とする阻害剤は研究ツールや治療薬として広く用いられる。しかし、一旦結合した阻害剤を取り除くには希釈やタンパク質変性などの手間がかかるのが問題である。我々の研究グループは、プロテアーゼ阻害剤を直接的にビオチン化することにより、標的プロテアーゼとの結合後にストレプトアビジン (SA) の強力な親和性を競合させて阻害剤を容易に取り除くことができる「リムーバブル阻害剤」へと変換することに成功している。本発表では、HIV プロテアーゼおよびヒトカテプシン D を標的にリムーバブル阻害剤による制御を検討したので報告する。

標的プロテアーゼとの X 線共結晶構造を基にビオチン化部位を決定し、HIV プロテアーゼ阻害剤のアミノ基へ直接的にビオチンを結合させた bPI-11 を合成した。比較として、ペプスタチン A のカルボキシ基末端にヒドラジドを介してビオチンを結合させた bPI-12 を合成した。ビオチン誘導体と標的プロテアーゼを結合させ、SA 存在下、非存在下での FRET 基質の切断を測定した。HIV プロテアーゼ含有ヒト血清または HCT116 細胞成分と阻害剤を担持した磁気ビーズを振とうし、洗浄後、ビーズに結合したタンパク質をビオチン誘導体により溶出した。溶出液に SA および FRET 基質を添加し、基質断片の蛍光量を検出した。

bPI-11 は HIV プロテアーゼおよびヒトカテプシン D に対してそれぞれ 0.16 nM、16 nM の  $K_i$  値を示し、阻害状態へ SA を添加すると阻害できなくなり酵素活性がほぼ回復した。一方で、bPI-12 ではヒトカテプシン D に 41 pM の  $K_i$  値を示したが、SA を添加しても 30%程度の回復に留まった。bPI-11 を結合させた HIV プロテアーゼは室温で放置しても 4 ヶ月後に十分な酵素活性が検出され、カテプシン D の場合でも 3 日後まで活性が検出されたことから、bPI-11 はプロテアーゼの安定化にも役立つことが分かった。これらの結果を踏まえ、血清中の HIV プロテアーゼおよび癌細胞成分のカテプシン D について、室温でのアフィニティ精製後に酵素活性を検出し、阻害剤を評価した。本結果より、プロテアーゼ阻害薬の治療前における感受性試験や薬剤耐性試験へのリムーバブル阻害剤の応用が期待される。

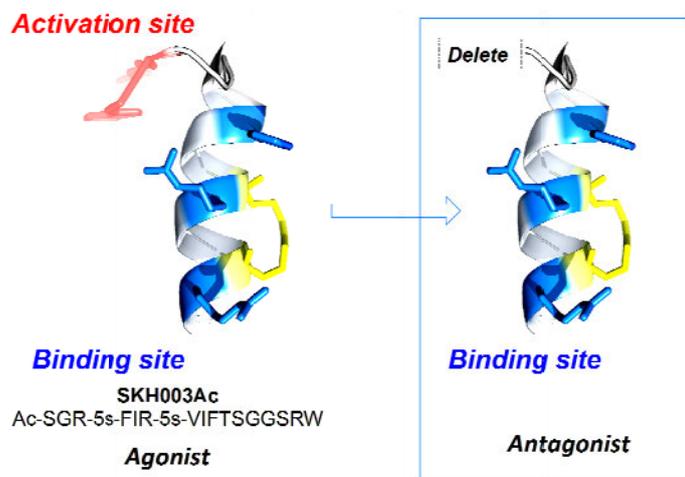


## RXFP 3 Peptide Antagonists の設計と合成

○北條 恵子<sup>1,2</sup>、日高 興士<sup>1,2</sup>、山本大河<sup>1</sup>、楠原右崇<sup>1</sup>、津田 裕子<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大学薬学部, <sup>2</sup>神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター

リラキシン-3 (インスリン様ペプチド-7) とその受容体 (RXFP3) は、摂食、情動、認知行動など神経活動に関わるとされており、うつ、認知障害などに対する創薬標的として脚光を浴びている。しかし、リラキシン-3 は、インスリンスーパーファミリーに属し、インスリンと同様の二本鎖 (A、B 鎖) からなる複雑な立体構造を有している。そのため構造改変が困難で低分子リードの開発は極めて難しい。最近我々は、リラキシン-3B 鎖のバイオアクティブな立体構造を再現した B 鎖一本鎖からなるステープルペプチドアナログが RXFP3 の強力な選択的アゴニスト (Peptide 5A) となることを報告した [1]。今回、この Peptide 5A の立体構造を参照し、受容体活性化に必要な残基を除去したステープルペプチドを設計合成し、その活性について検討を行った。

活性発現に必須な残基を除去しかつ、親和性に重要な受容体結合領域の立体構造を分子内架橋によって保持したステープルペプチドのアナログ群をデザインした。分子内架橋はオレフィンメタセシス反応 (RCM) によって行い、また、その架橋位置は、Peptide 5A と同じ位置 (Glu13 及び Ala17) とした。各アナログについて RXFP3 に対する結合親和性及び cAMP 活性を測定した。デザイン、合成したアナログ群は、期待通り、RXFP3 に対する選択的なアンタゴニスト活性を示した。その詳細について報告する。



[1] Hojo, K., *et al.*, *J. Med. Chem.*, 59, 7445-7456 (2016).

## Duchenne 型筋ジストロフィーに対するカルパイン 1 阻害治療法の開発

○松尾雅文<sup>1</sup>、白川卓<sup>1</sup>、鍋島陽一<sup>2</sup>、福島昭二<sup>3</sup>、栗野宏之<sup>4</sup>  
神戸学院大学総合リハビリテーション学部<sup>1</sup>（公財）先端医療  
振興財団先端医療センター<sup>2</sup> 神戸学院大学薬学部<sup>3</sup> 神戸大学  
小児科<sup>4</sup>

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、最も頻度の高い遺伝性筋疾患で、致死性の進行性筋萎縮症で、未だ有効な治療法はない。DMD は、*DMD* 遺伝子の異常により筋細胞膜を裏打ちするジストロフィンが欠損するため発症する。DMD では、ジストロフィン欠損により筋細胞内へのカルシウムの流入が生じ、カルシウム依存性タンパク分解酵素が活性化され、筋タンパクが分解され筋萎縮となる。本研究では、「カルシウム依存性カルパイン 1 が筋萎縮に関与するタンパク分解酵素で、その阻害は DMD の新しい治療標的である」との着想のもと、カルパイン 1 阻害剤による DMD 治療法を開発するものである。その結果、治療効果の判定に有用なバイオマーカーの開発を行い、骨格筋に大量に存在するタイチンの分解産物の ELISA 法による定量法を確立した。そして、DMD 患者尿中には極めて高濃度にタイチンが存在することを明らかにし、尿中タイチンが新しいバイオマーカーになることを示した。さらに、DMD モデルマウスにカルパイン 1 阻害剤を投与し、その投与により運動能力の改善を示すデータを得た。

本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 難治性疾患実用化研究事業により実施した。

## 自閉症モデルラット由来マイクログリアの M1/M2 極性変化

○榎本理世、トラン ゴック ミン、山本理瑚、成田有紀、原祐希、吹留舞、李 英培  
神戸学院大学薬学部薬理学研究室

自閉症は、①社会性の異常、②言語の異常、③常同行動・興味の限定を三大徴候とする神経発生発達障害で、重い症状から軽い症状まで幅が広いことから、正式には自閉症スペクトラム障害と呼ばれる精神疾患である。しかしながら、一番程度の軽い症状の自閉症と健常者の間に明確な境界線はなく、連続性があると考えられている。自閉症の大部分は原因や背景は不明であるが、一部の遺伝子疾患との関連性や、母体環境や父親の加齢が自閉症リスクを高めることが知られている。妊娠時のある種のウイルス感染や抗てんかん薬バルプロ酸の曝露と自閉症発症の関連性が示唆されており、これらを背景にしたモデル動物を用いた研究が行われている。自閉症は、発生発達段階での神経のネットワーク構築の不具合が原因と考えられており、シナプス形成の異常や不要なシナプスの刈り込み不良による神経伝達効率の異常、興奮性神経と抑制性神経のアンバランスなどが示唆されている。マイクログリアはシナプスの刈り込みにおいて重要な役割を担っており、本研究では、自閉症モデル動物由来のマイクログリアについて、*in vitro*で基礎的評価を行った。

既報に従って、妊娠ラットにウイルス感染を模した Poly:IC 投与またはバルプロ酸投与を行い、生まれた新生仔を自閉症モデルラットとした。生後 8 日の新生仔大脳から MACS 磁気分離によってマイクログリアを分離して培養し、M1 および M2 マーカーに対する免疫染色を行い、マイクログリアの M1/M2 極性を調べた。また、マイクログリアを M1 型または M2 型に誘導する刺激を与え、刺激に対する極性変化についても観察した。なお、生理食塩水を投与した母親から生まれた新生仔由来のマイクログリアをコントロールマイクログリアとした。

Poly:IC 投与母から生まれた新生仔由来のマイクログリアでは、M1 型マイクログリアマーカーである iNOS がコントロールマイクログリアに比べて多く発現していた。また、M2 型マイクログリアマーカーも、コントロールマイクログリアより強く発現していた。Poly:IC マイクログリアは、LPS による M1 型への誘導刺激および IL-4 による M2 型への誘導刺激に対してコントロールマイクログリアより強く反応する傾向があり、刺激に対する応答変化の経時変化もはやかった。一方、バルプロ酸投与母から生まれた新生仔由来のマイクログリアでは、LPS や IL-4 の刺激に対する応答性がコントロールマイクログリアより低下していた。

Poly:IC やバルプロ酸を投与した母親から生まれた新生仔は、いずれも自閉症モデル動物として汎用されているが、脳内でのマイクログリアの機能変化が異なる可能性が示唆された。

## 高食塩摂取後の随時尿における

### 尿中食塩排泄量と推定食塩摂取量の検討

○筒井輪央、友藤楓、山下恵祐、眞本利絵、藤岡由夫  
神戸学院大学栄養学部

#### 【目的】

夕食時の高食塩食摂取によってナトリウム(Na)が尿中に排泄される時期を、随時尿のNa排泄量の解析を行って求める。

#### 【方法】

対象は、大学生および大学院生の男性23名、そのうち研究が遂行できた者は21名(年齢 $20.6 \pm 0.84$ 歳、身長 $169.5 \pm 4.4$ cm、体重 $64.4 \pm 10.3$ kg、BMI $22.6 \pm 3.0$ kg/m<sup>2</sup>、収縮期血圧 $113.1 \pm 11.8$ mmHg、拡張期血圧 $71.0 \pm 12.0$ mmHg)であった(遂行率95.5%)。参加試験期間を4日間とし、1日目の夕食から食塩含有量2gの低塩食を3食摂取した後、食塩含有量10gの高食塩食を2日目の夕食のみ摂取(2日目は食塩摂取合計14g)、その後、再び2gの低塩食を4食摂取した。参加試験期間中には、すべての随時尿を採取した。あわせて、高食塩食摂取後から24時間蓄尿し、随時尿および24時間蓄尿の尿中Na(g)、カリウム(K)、クレアチニン(Cr)を測定した。また、食前には血圧、1日目～3日目夕食前および4日目朝には体組成を測定した。

#### 【結果】

経時的に2時間毎の尿中Na排泄量を観察すると、高食塩食夕摂取後、約4～8時間後に増加し、約12～14時間後(翌日6:30～8:30)にピークに達した。約18～22時間後(翌日12:30～16:30)においても、再び尿中Na排泄量が増加した。Na/Cr比は、高食塩摂取後、約20～22時間後にピークに達した。なお、24時間蓄尿から推定される1日平均食塩摂取量は13.65gであり、Tanaka's methodから推定した食塩摂取量は、約18～20時間後にあたる翌日の昼頃に最も近い値をとった。血圧および体組成分析は、有意な経時的変化はなかった。

#### 【結論】

高食塩食夕摂取後の尿中Na排泄量のピークは、12～14時間後であったが、Na/Cr比は20～22時間後であった。Tanaka's methodから推定した食塩摂取量は、18～20時間後で実際の摂取量に最も近くなった。

## 【0-6】

### 酪酸ナトリウムのマクロファージ、脂肪細胞の共培養下における prostaglandin E2 増加と lipolysis 抑制への影響について

○大平英夫、筒井輪央、眞本利絵、藤岡由夫

#### [目的]

脂肪細胞とマクロファージ間の相互作用が代謝性疾患に影響を持つことが報告されている。以前、我々は共培養時に炎症性メディエーターと遊離脂肪酸放出を増加させ、酪酸ナトリウム（酪酸 Na）が有意に低下させる効果をもつことを報告した。酪酸 Na は免疫細胞での prostaglandin E2 (PGE2) 産生を増加させる効果を持つことが知られている。我々は、酪酸 Na の lipolysis 抑制効果と PGE2 との関連性の有無について調べた。

#### [方法]

細胞は分化 3T3-L1 と RAW264.7 を用い、共培養は直接もしくは間接法を用いた。PGE2 産生と lipolysis 機序に関わる項目について測定、検出を行った。

#### [結果]

共培養は、各細胞単独時に比べ有意な PGE2 産生増加を示し、酪酸 Na 添加は、さらに産生増加を認めた。共培養は両細胞共に cyclooxygenase-2 発現量を増加し、酪酸 Na は、より発現量の増加を認めた。共培養では、マクロファージにおいて cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) 活性増加を示し、一方、脂肪細胞において、adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA2) 発現増加を認めた。酪酸 Na 添加はマクロファージ cPLA2 活性増加を示したが、脂肪細胞 AdPLA2 発現に変化は見られなかった。共培養時において、培養液中への遊離脂肪酸放出は増加を示し、酪酸 Na もしくは PGE2 添加は抑制を認めた。PGE 受容体 3 の拮抗薬は、PGE2 処理への遊離脂肪酸放出を基礎レベルまで低下させ、酪酸 Na 処理では遊離脂肪酸の放出は部分的に抑制するのみであった。

[結論] マクロファージ、脂肪細胞の共培養下において、酪酸 Na による lipolysis 抑制効果は、PGE2 増加が一部関与している可能性が示唆された。

## ナルディライジンによる PER2 の機能調節を介した概日リズム制御機構

○平岡義範<sup>1</sup>、吉種光<sup>2</sup>、大野美紀子<sup>3</sup>、森田雄介<sup>4</sup>、布川莉奈<sup>2</sup>、  
西清人<sup>4</sup>、久米典昭<sup>1</sup>、木村剛<sup>4</sup>、深田吉孝<sup>2</sup>、西英一郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 臨床薬学部門

<sup>2</sup>東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻

<sup>3</sup>滋賀医科大学 医学部医学科 薬理学講座

<sup>4</sup>京都大学大学院 医学研究科 循環器内科学

ナルディライジン (NRDC) は M16 ファミリーに属するメタロプロテアーゼで、細胞局在に依存した多機能性 (細胞表面: シェディング活性化、核: 転写調節) を有することを明らかにしてきた。NRDC 欠損マウス (*Nrdc*<sup>-/-</sup>) は成長遅延、軸索・髄鞘形成不全、低体温など多彩な表現型を呈し、NRDC は様々な恒常性の維持に必須な因子であることを報告している。今回、*Nrdc*<sup>-/-</sup> の行動リズムを解析したところ、野生型マウス (*Nrdc*<sup>+/+</sup>) と比べて有意に短周期であったことから、NRDC が概日リズム制御に関わっている可能性が示唆された。したがって、本研究では概日リズム制御における NRDC の役割について検討を行った。*Nrdc*<sup>+/+</sup> と *Nrdc*<sup>-/-</sup> の肝臓を経時的に採取し、時計遺伝子の発現リズムを検討したところ、*Per2*、*Cry1* などの mRNA およびタンパク質レベルでの発現上昇が見られた。次に、作製した抗 NRDC 抗体を用いて肝臓のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) 解析を行ったところ、*Per2*、*Cry1* を含む多くの時計遺伝子の転写開始点付近に NRDC の結合ピークを認め、網羅的な NRDC 結合モチーフ解析の結果、USF1 (E-box) が上位に検出された。また、細胞強発現系の実験で、免疫沈降法により NRDC と時計タンパク質 (CLOCK、BMAL1、PER2 など) との複合体形成を検討したところ、NRDC は PER2 と共沈降することが分かった。最後に E-box Luc を用いたレポーターアッセイにより、NRDC による PER2 の機能調節を検討したところ、NRDC は PER2 の転写抑制因子としての働きを阻害することが分かった。以上の結果から、NRDC は PER2 の機能調節を介して、概日リズムを制御していることが示唆された。

## 大脳皮質の神経分化を調節する分子機構

○水谷健一<sup>1,4</sup>, 井上真悠子<sup>1,5</sup>, 鈴木真理子<sup>1</sup>, 岩井亮太<sup>1</sup>, 田端秀典<sup>2</sup>, 岡本正志<sup>3</sup>, 今野大治郎<sup>4</sup>,  
竹本経緯子<sup>5</sup>, 眞貝洋一<sup>5</sup>, 松崎文雄<sup>4</sup>, 永田浩一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室

<sup>2</sup> 愛知県コロニー発達障害研究所 <sup>3</sup> 神戸学院大学 薬学部 生化学研究室

<sup>4</sup> 理化学研究所 CDB <sup>5</sup> 京都大学ウイルス・再生医科学研究所

大脳皮質の形態形成が如何にして可能になるのかという問いは、私たちがどのように高次な脳機能を獲得したのかを知る上で重要である。大脳皮質を構成する全ての細胞は、胎生期の神経幹細胞から生み出されるが、生み出されて直ぐに神経細胞として分化を完了する訳ではなく、未成熟な細胞（多極性細胞；Multipolar cell）へと形態変化することが知られている。多極性細胞は、やがて双極性細胞へと再び形態変化を行うことで、大脳皮質を構成する神経細胞へと最終分化する。私たちはこれまで、マウス大脳皮質における多極性細胞を制御する分子機構に着目し、①多極性細胞へと変化する際にはミトコンドリアが顕著に減少し、これはPRドメインタンパク質の一種Prdm16とプロニューラル遺伝子NeuroD1の発現切り替えによって生じる(Inoue et al., *Development* 2017)ことを明らかにすると共に、②多極性細胞が双極性細胞へと形態変化する際には、Prdm8が重要な役割を果たすと共に(Inoue et al., *PLoS ONE* 2014; Inoue et al., *Genes Cells* 2015)、Prdm8の下流分子bHLH型転写因子Ebf3が双極性細胞における先導突起の形成に寄与(Iwai et al., *BBRC* 2018)することで、神経分化に決定的な役割を果たすことを見出している。

このような複雑な形態変化は哺乳類特有の現象で、形態変化の異常は様々な神経疾患と密接に関連することから、脳を構築する上で極めて重要な現象であると考えられている(Mizutani., *Genes Cells* 2018 (review))。本発表では、私たちの研究室が見出した神経分化に関する最近の研究成果をご紹介します。

## ホウ素中性子捕捉療法用 L-BPA ナノサスペンションの製剤設計

○安藤 徹<sup>1</sup>, 鈴木 実<sup>2</sup>, 櫻井良憲<sup>2</sup>, 高田卓志<sup>2</sup>, 藤本卓也<sup>3</sup>, 市川秀喜<sup>1</sup><sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室 <sup>2</sup>京都大学原子炉実験所<sup>3</sup>兵庫県立がんセンター 整形外科

【目的】ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は,  $^{10}\text{B}$  による熱中性子捕捉反応で生ずる  $\alpha$  線を利用して腫瘍を殺傷するがん治療法である. BNCT では腫瘍内の  $^{10}\text{B}$  濃度が治療効果の発現に重要であり,  $^{10}\text{B}$  の場合, 20  $\mu\text{g/g}$  wet tissue (ppm) 以上が必要とされ, 腫瘍内で  $^{10}\text{B}$  をより高濃度かつ長時間, 蓄積・保持可能な製剤が望まれている. 我々の研究室では,  $^{10}\text{B}$  化合物として臨床で使用されている *p*-borono-L-phenylalanine (L-BPA) のナノサスペンション (NS) 製剤化を試みてきた. この製剤は, L-BPA 自体がアミノ酸類自体であるがゆえに有する腫瘍選択的な蓄積性に加えて, その NS 化により腫瘍内に蓄積し, 長時間の滞留を意図したものである. これまでに界面活性剤である Solutol<sup>®</sup> HS 15 (SO) と Soybean lecithin (SL) を用いた湿式混合粉碎により BPA-NS が調製可能であることを明らかにしてきた. 本検討では, BPA-NS の粒子径を変化させることによって, 腫瘍内滞留の濃度・時間・抗腫瘍効果を制御できるのではと考え, BPA-NS の調製とならびに BNCT による抗腫瘍効果を評価した.

【方法】異なる粒子径を持つ BPA-NS は, 回転速度や粉碎媒体を変えた遊星ボールミルによる湿式混合粉碎法で調製した. 調製した BPA-NS の粒子径分布は動的光散乱式粒径分布測定装置 (LB-500) によって室温で測定した. B16F10 細胞をマウスの右臀部に皮下移植した担がんモデルを作成した. BPA-NS ならびに BPA-Fr (L-BPA のフルクトース錯体水溶液) を腫瘍の端部へ直接投与した. 所定時間後に腫瘍を腫瘍上部, 中部, 下部の 3 部位に分けて採取した. 各サンプル中の  $^{10}\text{B}$  濃度を ICP-AES 法により測定した. BNCT による抗腫瘍効果の評価はそれぞれの製剤を同様に投与して熱中性子の照射を行い, 照射後の腫瘍体積を測定した.

【結果・考察】BPA-NS の平均粒子径はそれぞれ 183 nm (NS-S), 358 nm (NS-L) であった. BPA-NS の腫瘍内直接投与後の動態は 3 製剤ともに投与 5 分後には腫瘍全体の  $^{10}\text{B}$  濃度が 55 ppm 以上と高度な滞留を示した. その後, 溶液製剤である BPA-Fr は投与 3 時間後に 3 部位での蓄積が 15.1-20.4 ppm と均一ではあるものの, 投与 5 分後の 30% 程度の保持であったのに対して, NS-S は 39.6-46.4 ppm と均一かつ 70% 以上の保持, NS-L は 21.6-83.0 ppm でばらつきはあるものの 80% 以上の保持と BPA-Fr より長時間, 高度に腫瘍内で滞留し, 腫瘍組織内での固体粒子としての動態特性が反映した結果が得られた. また, BPA-NS 間での動態の違いについては粒子径や溶解速度が関係していると考えられる. 次に, 熱中性子の照射により,  $^{10}\text{B}$  の拡散にばらつきが見られた NS-L では腫瘍成長が早かったのに対して, NS-L と腫瘍内  $^{10}\text{B}$  濃度を同等に調整した BPA-Fr においては, ほぼ同様かつ NS-L と比較して高度な腫瘍成長抑制効果が見られた. これらの結果より, 粒子径の違いによる同投与量当たりの粒子数, 血管壁間隙からの漏出性, 溶解速度などの違いが腫瘍内の粒子挙動の違いに関わり, 抗腫瘍効果にも影響を与えられられる. これらの結果は, 製剤の粒子径が腫瘍内直接投与後の腫瘍内における挙動, 抗腫瘍効果をコントロールできる可能性を示唆した.

## 新規小型高压乳化機の開発と機能性エマルジョンの開発

○福島昭二、岸本修一  
神戸学院大学薬学部 臨床薬剤学研究室

高压乳化機は O/W 型エマルジョンや懸濁剤などの分散製剤を調製するのに必須の装置である。しかし、これまでの装置は、高価であったり、製造量が数100ml以上必要であったり、乳化過程の制御が不十分であったりし、研究室レベルでの製剤検討には制約が大きかった。そこで容易に入手可能な機材・部品を用い、数 10 ml のエマルジョンを調製可能な小型高压乳化機を制作し、様々なエマルジョン製剤や分散製剤に適用した。新規小型高压乳化機の紹介と、それを用いて製造した機能性エマルジョンの研究について発表する。

新規小型高压乳化機のポンプとして、1次圧力を256倍増圧する高压ポンプ、および512倍増圧する高压ポンプを採用した。そのため、1次圧の動力源として、通常のコンプレッサーやガスボンベを使用して、最大約 2,500 kg/cm<sup>2</sup>、あるいは 5,000 kg/cm<sup>2</sup> の運転圧力で乳化をすることが可能となった。乳化部は直径を任意に設定できる細孔の空いたオリフィスと、種々の口径・長さ・形状のステンレス管で構成し、製剤の処方に応じて最適な組合せが設定可能である。また、乳化部に冷却機能も併せ持たせたため、最低必要量をより少量にすることができた。標準的な脂肪乳剤の処方

で同等以上の性能を示した。また、製造に必要な最低量は 30 ml 弱であり、貴重な薬物・試薬などでもエマルジョン製剤化が可能である。

乳化機のコストは従来の高压乳化機と比較し、格段に低く抑えられた。



従来の高压乳化機、あるいは今回開発した小型高压乳化機を用いて、薬物キャリアーとしての血中滞留性ビタミン E エマルジョン製剤の研究や、人工酸素運搬体としてのパーフルオロカーボンエマルジョンの研究や、抗腫瘍性プロスタグランジン含有脂肪乳剤の研究を行ってきたが、それらの結果について発表する。

## 2017 年度 研究活動の総括

### － 基礎研究からの発信を臨床に還元するには？ －

徳山 尚吾

神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

我々は種々の疾患の発症メカニズムを解明するために、研究活動を行っている。ここでは本年度に実施した研究内容の一部について紹介する。

#### ・長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 を介する疼痛制御機構の解明

GPR40/FFAR1 欠損マウスは、ワイルドタイプと比較して術後痛の回復が遅延することや疼痛時に脳内遊離脂肪酸が増加することを見いだした。(Nakamoto, Tokuyama *et al.*, PLoS One, 2017)。さらに、同受容体欠損雌マウスにおいて、母性・養育行動が著しく低下することを発見した(Aizawa, Tokuyama *et al.*, Biol. Pharm. Bull., 2017)。

#### ・耐糖能障害による脳血管障害増悪機序の解明

脳虚血後の高血糖発現の制御に対する視床下部における orexin-A の重要性を示した(Harada, Tokuyama *et al.*, Brain Res., 2017)。その高血糖による神経障害の増悪機序に脳内 sodium-glucose transporter type 1 (SGLT1) を介した細胞内 Na<sup>+</sup>濃度の増加が関与することを報告した(Yamazaki, Tokuyama *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 2017; J. Pharmacol., Sci., *in press*)。

#### ・脳卒中後疼痛の発現機序の解明および治療戦略の確立

脳卒中後疼痛を模倣する全脳虚血モデル動物を用いて、脳卒中後疼痛に対する脊髄 HMGB1 およびその関連受容体の関与について検討を加えた(Matsuura, Tokuyama *et al.*, Brain Res., 2018)。

#### ・幼少期ストレスによる成熟期の疼痛への影響とその発症機序の解明

幼少期ストレス負荷後の青班核におけるアストロサイトの活性化が神経障害性疼痛の増悪を引き起こすことを明らかにした(Nakamoto, Tokuyama *et al.*, Front. Pharm., 2017)。

#### ・非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症機序の解明

NASH の発症機序における長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の役割(Nakamoto, Tokuyama *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 2018) および高血糖状態は NASH の病態を悪化させることを見いだした(Harada, Tokuyama *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 2017)。

以上、我々は常に臨床現場を意識した基礎研究を行っている。本学に着任してから、早 15 年以上も経過したが、臨床への還元については、未だ何らの達成感も得られていない。今後も日々の研究が一方向的な発信に留まらず、臨床との接点を見据えながら遂行していける様、精進して参りたい。

医薬品微粒子のドライコーティングプロセスの開発:

DEM シミュレーションを利用した物理モデルの構築

○安永峻也<sup>1</sup>, 川元 匠<sup>2</sup>, 荒井彩花<sup>2</sup>, 安藤 徹<sup>2</sup>, 福森義信<sup>2</sup>, 市川秀喜<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 神戸学院大学 大学院 薬学研究科

<sup>2</sup> 神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

近年、高齢社会の進行に伴って、水なしで服用可能な口腔内崩壊錠（OD 錠）が盛んに上市されている。OD 錠は口腔内で錠剤を構成する個々の微粒子に崩壊するが、粒子径が 200  $\mu\text{m}$  を超えると砂を嚙んだような不快な服用感を与えることが知られている。コーティングが必要な原薬を OD 錠とする場合、コーティング剤の溶液や分散液を微粒子にスプレーする微粒子コーティング技術が利用されるが、微粒子は付着性が高く、粒子同士の凝集防止にスプレー速度を低下させるために長時間プロセスとなり、製造コストの高騰が課題の一つとなっている。従って、溶媒を使用せずに固体粒子を混合するだけでコーティングが可能なドライプロセスが求められている。ドライプロセスは、医薬品含有母粒子周囲にコーティング剤粒子を配向させた後に機械的な負荷をかけて母粒子表面に子粒子をコーティングする方法として古くから提案されているが、固体粒子の付着力の制御が困難であるため、医薬品の放出制御に必要な子粒子の多層構造の形成が実現の障壁となっている。先行研究では、低融点物質を溶融させて結合剤とすることで多層構造を実現しているが、保存安定性や精密な放出制御に難がある。装置についても回転パドルとの衝突を利用したものが多く、高速回転では母粒子の粉碎が生じるリスクがあり、低速では装置内のパドルの届かない領域に微粒子が滞留するなど実用化のための材料と装置の最適化がなされていない。これまでに我々は新規の高分子材料を合成し、振動場とビーズ媒体を利用した新たな装置を開発することで上述の課題の解決に一応の成功をみている。

本研究では、プロセスの効率化を図るべく、ビーズの衝突回数が子粒子の付着量（被覆効率）に与える影響に着目し、これを表現する物理モデルを構築した。衝突回数は実験では得られないため、離散要素法（Discrete Element Method, DEM）に基づくシミュレーションを用いて推定し、種々の実験で得られるパラメータをモデル式に組み込んだ（Fig. 1）。モデル式は実験における被覆効率の経時推移と一致し、ドライプロセスにおける機械的負荷の回数がコーティングの進行に与える影響の一部を明らかにした。

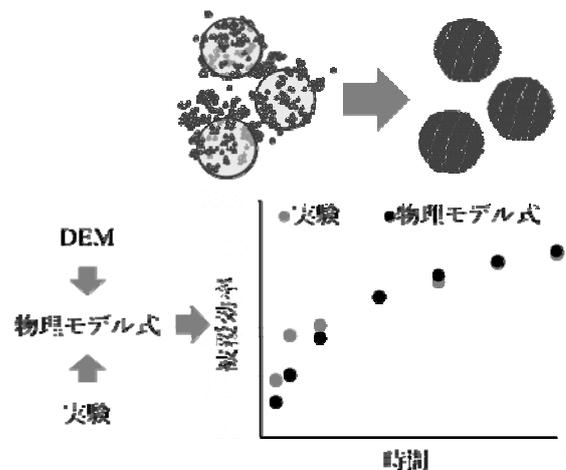


Fig. 1. Physical modelling of coating behavior in dry coating process

## 再分散性向上による溶解性改善を目的とした難水溶性薬物の ナノ結晶被覆粒子の開発

○福島滉祐, 福山 愛, 安藤 徹, 福森義信, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】薬物の溶解性は、生体内への吸収性に影響を及ぼす重要な物性である。難水溶性薬物の経口投与では、消化管液への溶解が吸収の律速過程になることから、薬物のバイオアベイラビリティの低下をもたらす。比表面積の増大による薬物の溶解速度の増加を期待して、湿式混合粉碎等による薬物結晶のナノ粒子化が試みられているが、得られる Nanosuspension (NS) は液状製剤であり、分散安定性や服薬利便性などに注意を払う必要がある。これらのことから当研究室では、Nanosuspension Spray Coating System (NSCS) と称する NS を被覆した固形微粒子製剤 (MPs) 化の評価を行ってきた。本法に基づく製剤化では、Hydroxypropyl cellulose (HPC) を NS の分散剤かつ被覆時の結合剤として添加するが、作製した MPs は再分散性が悪く溶解性の改善が不十分であった。そこで、本研究では HPC に加え、Mannitol を添加した固形微粒子製剤の処方設計および *in vitro* における薬物溶出に関する検討を行った。

【方法】モデル薬物のグリベンクラミド (GLI, 水への溶解度 3.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、HPC、蒸留水を加え、遊星ボールミルで湿式混合粉碎し NS を得た。その後、NS に 8 g の Mannitol を加え、スターラーで 1 時間攪拌することで溶解させたものをスプレー液とし、ドラフトチューブ付噴流層コーティング装置によって核粒子である乳糖粒子 (75-106  $\mu\text{m}$ ) 表面に被覆し MPs (HPC + Mannitol) を得た。得られた MPs の再分散性および薬物溶出性の評価は、別途作製した HPC 単独処方 MPs (HPC) と比較することで行った。

【結果・考察】NS に Mannitol を添加することで GLI の凝集が危惧されたが、添加後の NS の平均粒子径は約 40 nm の増加に留まり、添加による GLI の過度の凝集は確認されなかった。MPs (HPC) と MPs (HPC + Mannitol) の収率は 81.5, 82.6%, 薬物含有率は 6.4, 6.2% と Mannitol 量に反比例してやや減少した。MPs (HPC + Mannitol) の含有率は理論値を超えているが、これは NS のスプレードライ物の混入や Mannitol の飛散ロス等が原因と考えられる。次に局方第 2 液中の再分散試験では、30 秒のボルテックス処理において MPs (HPC) は全く再分散した粒子が見られなかったのに対し、MPs (HPC + Mannitol) は約 400 nm とサブミクロンサイズにまで再分散した。さらに超音波処理において、MPs (HPC) は 60 分間の積算超音波処理により最小で 333 nm まで粒子径が減少したのに対し、MPs (HPC + Mannitol) は 5 分間で 129 nm となり、速やかな再分散性を示した。これは Mannitol 粒子が薬物被覆層において薬物ナノ粒子間に存在することで、被覆時の薬物ナノ粒子同士の接触に伴う凝集を抑制し、MPs からの良好な再分散をもたらしたものと推察される。局方第 2 液中での溶出試験において、MPs (HPC) と MPs (HPC + Mannitol) の溶出濃度は各々 16.1, 37.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となった。これは、再分散試験で示された局方第 2 液中での良好な分散特性による NS への復元に起因しているものと考えられる。以上の結果から、Mannitol の添加はナノ結晶被覆製剤の溶解性改善に有効であることが分かった。今後は、錠剤化へ向けた製剤設計の検討を進めたい。

## 感温性ナノゲル粒子の膨潤収縮挙動に基づく 薬物の温度応答性パルス放出型マイクロカプセルの設計

○重村彩佳, 安藤 徹, 市川秀喜, 福森義信  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】 温度応答性の薬物放出制御型マイクロカプセル (MC) の人体への適用を考慮する際, 平熱体温付近では薬物放出抑制され, 数°Cの温度上昇で薬物放出生起される人体に低侵襲なシステムが望ましい。これまでに, 温度応答性ナノゲル粒子 (T-NPs) を用いた MC (Fig. 1) で人体の体温付近の微小温度幅での温度応答性放出制御が可能であることを示してきたが, 薬物放出制御のメカニズムは未明である。そこで, 本検討では T-NPs の膨潤収縮特性に着目し,

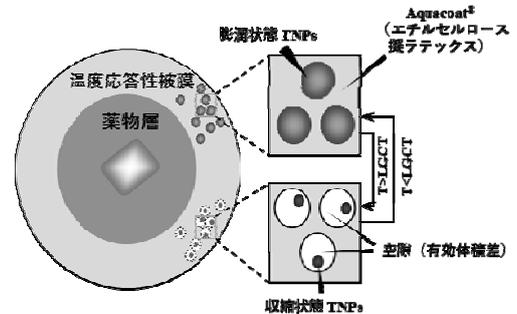


Fig. 1. MCs with T-NPs-dispersing ethyl cellulose film for thermally-modulated pulsatile drug

この特性が異なる T-NPs をそれぞれ組み込んだ MC の薬物放出挙動の感温性を評価した。

【方法】 T-NPs の構成モノマーとして *N*-isopropylacrylamide と *N,N*-dimethylacrylamide を用い, Sodium dodecyl sulfate (SDS) 共存下, SDS の添加量を 0.4, 1.5, 3.0 mM と変化させ, 3 種類の T-NPs (以下, 0.4-T-MCs, 1.5-T-MCs, 3.0-T-MCs と略記) を水系分散重合法により合成した。温度変化に伴う膨潤・収縮挙動を動的な光散乱法による粒子径測定にて評価した。薬物放出の感温性は, MC 膜中で T-NPs の収縮によって生じる空隙体積  $V_0$  に依存すると仮定し, T-NPs 一個粒子の 35.0 と 41.0°Cにおける体積差に完全収縮時から求めた T-NPs の粒子個数を乗じて  $V_0$  を推算した。MC はドラフトチューブ付き噴流層コーティング装置で調製した。63-75  $\mu\text{m}$  に分級した 20 g の  $\text{CaCO}_3$  に 4 g のモデル薬物 (carbazochrome sodium sulfonate) を含む 2.5 wt% 結合剤水溶液をスプレーした後, 温度応答性放出制御膜として 50 g の固形成分が Aquacoat® (AQ) : T-NPs = 46.76 : 3.34 となるように混合した分散液をスプレーした。薬物放出挙動はカラム法放出試験で評価し, 35-41°Cの周期的温度変化に伴う薬物の放出速度変化をフローセル型分光光度計でモニターした。

【結果と考察】 合成した各 T-NPs の粒子径は 10-60°Cの範囲での昇温/冷却過程において同一の軌跡を描いて変化したため, 水中では温度変化に応じて可逆的に膨潤・収縮することが示唆された。また, 0.4- > 1.5- > 3.0-T-NPs の順で室温および完全収縮時の粒子径がともに小さくなった。従って, MC 膜中の単位質量あたりの T-NPs 粒子数はその逆順で多くなると考えられる。次に薬物放出試験において, 0.4 T-MCs, 3.0 T-MCs では初期の低温側 (35°C) の段階でバーストを起こしたのに対して, 1.5 T-MCs では薬物放出速度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ ) の平均値が低温側 (35°C) では 4.6, 高温側 (41°C) では 9.2 と低温での放出抑止は完全ではないものの, 比較的明瞭な周期的なパルス型温度応答性を示した。0.4-, 1.5-, 3.0-T-MCs の  $V_0$  ( $\times 10^{12} \mu\text{m}^3$ ) はそれぞれ 15.1, 4.91, 17.3 と算出され, 過大な  $V_0$  は初期バーストを促すが, その 3分の1程度の  $V_0$  であれば感温性の放出抑制が可能になることが分かった。

## 乳癌細胞株を用いた骨転移に対するホウ素中性子捕捉療法 (BNCT)

○佐谷諒一<sup>1</sup>, 安藤 徹<sup>1</sup>, 藤本卓也<sup>2</sup>, 須藤 保<sup>3</sup>, 市川秀喜<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室 <sup>2</sup>兵庫県立がんセンター 整形外科

<sup>3</sup>兵庫県立がんセンター 研究部

【目的】これまで演者らは、明細胞肉腫 (CCS) などの整形外科領域の難治性悪性肉腫を標的として、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) の適応に関する前臨床研究<sup>1)</sup>を行ってきた。本研究では、乳癌の腋窩リンパ節転移の臨床例に BNCT が著効したことから<sup>2)</sup>、整形外科領域で最も多い悪性骨腫瘍である癌の骨転移に対して、同様に BNCT による制御が可能であるか検討する。癌種には臨床現場で骨転移を来しやすい例が多くみられる<sup>4)</sup>乳癌を選択し、ヒト由来の乳癌細胞株を用いて骨転移動物モデルの作成、ホウ素薬剤の体内動態および BNCT による抗腫瘍効果を検討した。

【実験】乳癌骨転移モデルでは、ヒト由来の乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入した MDA-MB-231-luc を用いた。in vitro 試験では、培地に <sup>10</sup>B 濃度が 10, 20, 30 ppm になるようにホウ素薬剤 (*p*-Borono-L-phenylalanine-fructose 錯体, BPA-Fr) を添加し、2 時間暴露させた後に細胞を回収し、ICP-AES 法で <sup>10</sup>B 濃度を測定した。骨転移モデルは、Campbell らの方法<sup>3)</sup>を参考にして作成した。骨転移部の確認は、病理組織検査と共に X 線 CT 装置による X 線撮影および IVIS Imaging System による発光イメージングと X 線撮影にて行った。動態試験では BPA-Fr を大腿静脈投与後に血液、正常組織および腫瘍を採取し、<sup>10</sup>B 濃度を ICP-AES 法で測定した。骨転移動物モデルを 1 : BNCT 群 (BPA-Fr + 熱中性子線照射), 2 : HOT 群 (熱中性子線のみ照射) 3 : Cold 群 (対象群) の 3 群に分け、1, 2 群は骨転移部に熱中性子線を照射した。その後、画像検査にて評価した。

【結果・考察】BPA-Fr 取込試験は 10, 20, 30 ppm で MDA-MB-231-luc 細胞の <sup>10</sup>B 取込濃度はそれぞれ 9.9, 14.3, 20.1 ppm となった。これは CCS と比較して取込量は低い濃度依存的な取込を示しており、CCS と同様に BNCT の適応が期待できると考えられる。骨転移モデルの作成では、発光イメージングにて移植部位の発光を認め、脛骨内で腫瘍の形成が示唆された。さらに移植後 5 週間の X 線撮影にて骨透亮像が観察され、発光イメージングにおいて同部位に発光強度および発光面積の増大を認めた。また、移植後 8 週間の腫瘍組織切片を用いた HE 染色において、脛骨髄腔内に骨破壊を伴う腫瘍の形成を認めた。これらの結果は乳癌骨転移部の浸潤・増大を発光イメージングにより捉えられることを示す。骨転移モデルを用いた動態試験では、BPA-Fr 投与 1.5 時間後に腫瘍選択的に <sup>10</sup>B の取込を認めた。熱中性子線照射実験は、同時刻より 1 時間照射を行い、腫瘍細胞 5 Gy, 正常骨約 2 Gy の照射線量を認めた。照射後の発光イメージング評価では、BNCT 群のみ発光強度が低下し、抗腫瘍効果を認めた。本研究より、BNCT による骨転移巣の制御の可能性が確認された。

【参考文献】1) Andoh T et al., *Appl. Rad Isot.*, **88**, 59-63 (2014). 2) Fujimoto T et al., *KURRI Prog. Rep.*, PR8-2 (2015). 3) Campbell JP et al., *J. Vis. Exp.*, 4(67), e4260 (2012).

4) 骨転移診療ガイドライン 日本臨床腫瘍学会 (2015)

## 多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型コーティング製剤の処方設計

○中川貴登, 古田智美, 安藤 徹, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】近年、服薬の利便性を追求した製剤の開発が盛んに行われている中、粒子径が 100  $\mu\text{m}$  以下の微粒子へのコーティング技術の開発に対するニーズが高まっている。当研究室では、粒子径が小さく効率の良い製造を企図して、多孔性微粒子を核粒子に用いた放出制御型コーティング製剤の開発を試みている(図 1)。提案型の製剤は、細孔を塞ぐことが可能なコーティング量で放出制御効果が期待できる。また、従来型より少量のコーティングで済めば、製品粒子径を小さく抑えられる可能性を持つ。

本検討では、薬物放出制御製剤への一応用例として、アクリル酸エチル(EA)、メタクリル酸メチル(MMA)、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル(HEMA)を用いて共重合ナノ粒子(EA/MMA/HEMA)を調製し、これをコーティング剤とした湿式スプレーコーティングによる苦味マスキングを検討した。

【方法】モデル薬物に、苦味を持つプロメタジン塩酸塩、核粒子には、75-106  $\mu\text{m}$  の多孔性微粒子であるフジカリンを用い、薬物封入を行ったものを核粒子とした。コーティング剤として用いる共重合ナノ粒子(EA/MMA/HEMA)は、モル比の異なる 2 種類のラテックスタイプのもを乳化重合法により合成した。EA:MMA:HEMA のモル比を 9:9:10 とし、コーティング率 10, 20% のものをそれぞれ Run 1, 2, モル比を 6:12:5 に変更したコーティング剤をコーティング率 20% のものを Run 3 とする。コーティング剤の平均粒子径は、Run 1, 2 で 35 nm, Run 3 で 33 nm と、核粒子の平均細孔径 110 nm より小さいものである。これをドラフトチューブ付き噴流層コーティング装置で薬物封入粒子に被覆した。この後、加熱処理を施した被覆粒子について粒子径分布と日局パドル法溶出試験で薬物溶出挙動を評価した。

【結果・考察】口内で苦みを感じずに服用が可能で、かつ薬効を損なわない苦味マスキングには、1 分後の薬物放出が 10% 以下、30 分後の薬物放出が 100% となる短時間遅延放出制御が理想である。本検討で調製した製剤では、被覆後に加熱処理を行った粒子からの薬物放出率が 30 秒, 1, 30 分後において、Run 1 では 1.4, 18.0, 87.3%, Run 2 では 0.67, 5.5, 76.3%, Run 3 では 1.8, 6.3, 96.1% となった。Run 1 では、コーティング率が低く、細孔を塞ぎきれずに短時間遅延放出制御が達成できなかったと考えられる。これに対して、コーティング率を増した Run 2 では、1 分後の薬物放出率が 5.5% と放出が抑制されたが、30 分後の薬物放出率が 76.3% と抑制傾向にあった。次に、EA:MMA:HEMA の割合を変更した Run 3 では、1, 30 分後の薬物放出率がそれぞれ 6.3, 96.1% と理想とする放出パターンに近づけることができた。Run 3 に用いたコーティング剤は、Run 2 と比較して親水性モノマーの割合が少ないにもかかわらず薬物放出率が増加した。これはコーティング剤の軟化温度が加熱処理温度よりも 20°C 近く高いため、完全な被膜形成に至らず、空隙が残存したためと推察される。

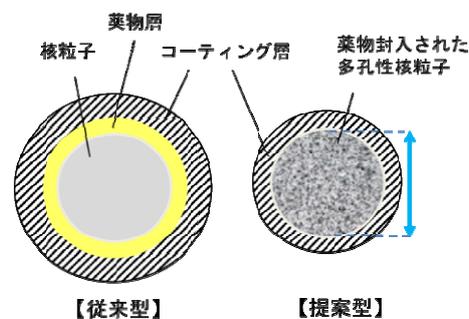


図 1. 多孔性微粒子を核粒子に用いた放出制御型コーティング製剤

## タンパク性薬物の徐放化を目的とした生分解性微粒子製剤の開発

○西田綾花, 姫野智子, 安藤 徹, 市川秀喜  
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】ペプチドやタンパク性のバイオ医薬品の有効性を増大させるための注射型徐放性微粒子の開発には根強いニーズがある。当研究室ではキトサンナノ粒子 (CNP) からなる水系分散タイプの生分解性徐放性コーティング剤を用いたバイオ医薬品の皮下埋込型徐放性微粒子製剤を開発してきた。これまでヒドロキシアパタイト (HAp) 多孔性粒子を核粒子とし、細孔内にモデルタンパク薬物を吸着させた後に少量の CNPs でその細孔を閉塞した構造を持つ微

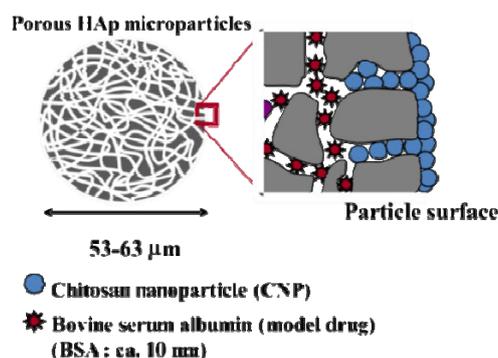


図 1. 微粒子製剤(CNPs-MPs)イメージ

粒子製剤 (CNPs-MPs, 図 1) の開発を進め、その結果, *in vitro*, *in vivo* において薬物の 2 週間にわたる徐放化が可能であることを示してきた。また, トリポリリン酸 (TPP) による CNPs 表面の架橋は, 徐放化能を損なわずにコーティングの良操作性を付与できることを見出しているが, *in vivo* での薬物放出への効果は明らかではない。本研究では, TPP-CNPs コーティングのラット皮下への埋め込み時における *in vivo* での放出特性に関する評価を行った。

【方法】牛血清アルブミン (BSA) および蛍光標識 BSA (FITC-BSA) をモデル薬物とし, インキュベート法によって薬物封入 HAp 粒子を得た。CNPs はクレアミックスを用いて中和析出法で調製した。また, Hasanovic らの検討<sup>1)</sup>を参考に所定の比率で TPP を CNPs に添加し, 超音波照射下で反応させ TPP 処理化 CNPs (TPP-CNPs) を調製した。薬物封入 HAp 粒子 (53-63 μm) に対して 5 wt% の TPP-CNPs をドラフトチューブ付噴流層コーティング装置によりコーティングし, 53-63 μm の画分を CNPs-MPs として回収した。*In vivo* の放出特性は, CNPs-MPs の水性分散液を 8 週齢の Wistar 系雄性ラットに皮下投与し, 所定期間後に皮下から回収した CNPs-MPs 中の FITC-BSA 残存量を蛍光光度計で測定して評価した。

【結果・考察】14 日後における FITC-BSA の放出率は, *in vitro* において Non coating で 45.0%, CNPs coating で 20.9%, CNPs-TPP coating で 23.0% となり, TPP 処理の有無にかかわらずコーティングすることで FITC-BSA 放出が抑制されたことが示された。次に *in vivo* においては CNPs coating で 59±4.9%, CNPs-TPP coating で 45±11.7% と, CNPs-TPP coating は CNPs coating と比較してやや放出を抑制する傾向にあった。*In vitro* と異なり *in vivo* において放出率に差が認められたことは, CNPs の TPP 処理が生体内でのキトサンの分解速度に影響を及ぼすことを示唆するが, この点については今後, リゾチームなどの分解酵素の関与を含めて詳細な検討が必要である。

1) Hasanovic A., Zehl M., Reznicek G., Valenta C., J. Pharm. Pharmacol., 61(12), 1609–1616 (2009).

## 新規 P1 残基及び P2'残基を有するプラスミン阻害剤の設計と評価

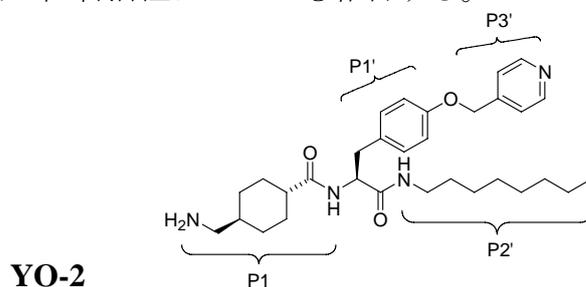
○近藤 めぐみ<sup>1</sup>、杉浦 成香<sup>1</sup>、日高 興士<sup>1,2</sup> 北條 恵子<sup>1,2</sup>、合田 圭吾<sup>3</sup>、  
手納 直規<sup>4</sup>、和中 敬子<sup>5</sup>、津田 裕子<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学薬学部, <sup>2</sup>神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター,  
<sup>3</sup>関西分子設計研究会, <sup>4</sup>広島国際大学医療栄養学部, <sup>5</sup>血栓止血研究プロジェクト

【目的】プラスミン(Plm)はセリンプロテアーゼの一種であり、血栓の溶解に関わる主要因子である。Plm は線溶系の他に、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の活性化による癌の浸潤・転移、サイトカインの活性化による炎症に関与することが知られている。従って、Plm 阻害剤により Plm の作用を抑制することで、抗炎症・抗癌作用が期待される。また、Plm阻害剤はこれらの病態における Plm の役割の解明にも有効であると考えられる。我々は活性中心指向型 Plm 阻害剤の YO-2 (IC<sub>50</sub>=0.53 μM for Plm) [1]を基盤とした Plm 阻害剤の分子設計を行い、阻害活性を評価した。

【分子設計】YO-2 はトラネキサム酸 (Tra: P1 残基)、Tyr(OPic)(P1'および P3'残基)、およびオクチルアミン (OA: P2'残基)から構成されている [2]。蛇毒由来の Plm 阻害剤である Textilinin の Arg19 は Plm の S2'ポケット(Glu687)と相互作用していると報告されている [3]。この報告を基に P2'残基に塩基性アミノ酸を導入し、さらにカルボキシ末端にアルキル鎖を配置した誘導体の設計を行った。P1 残基の変換として、Tra と Tyr 間のペプチド結合を変換した。

【結果および考察】Arg 誘導体において、アルキル鎖を伸長するほど阻害活性は増強する傾向を示した (IC<sub>50</sub>=4.9 μM、炭素数 9)。Tra と Tyr 間のペプチド結合を変換した化合物の阻害活性についても報告する。



[1] Okada, Y., Tsuda, Y., *et al.* (2000) *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1964-1972.

[2] Law, R.H.P., Wu, G., *et al.* (2017) *Blood Advances*, **1**, 766-770.

[3] Millers, E-K.I., Johnson, L.A., *et al.* (2013) *Plos one*, **8**, e54104.

## 皮膚組織における血管の規則的な構築

○高島さつき<sup>1,2</sup>, 鈴木真理子<sup>1</sup>, 森山麻里子<sup>3</sup>, 森山博由<sup>3</sup>, 岡本正志<sup>2</sup>, 市橋正光<sup>2</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室

<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 生化学研究室 <sup>3</sup>近畿大学薬学総合研究所

血管系は、皮膚組織を構成する細胞に酸素・栄養を供給すると共に、代謝老廃物を排出する機能を担っており、皮膚の恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている。近年の研究で、組織幹細胞の維持には血管由来の微小環境が密接に関与することが指摘されている。そこで、本研究では、皮膚組織における血管走行の規則性を見出すと共に、その生理的意義を明らかにすることを研究の目的とした。これまで私たちの研究室では、血管リポーターマウス(VEGFR1-EGFP および VEGFR2-DsRed BACtg)を用いて、脳血管を立体的に観察することで、組織内における血管の密度および血管の形態学的な特徴、神経発生における生理的な意義を明らかにしてきた。そこで、本研究では、脳血管の解析で確立した実験系を応用することで、胎児期および生後の皮膚組織における血管の特徴を、免疫組織学実験によって詳細に観察した。また、同様の実験を老齢マウスにおいても行なうことで、加齢に伴う皮膚血管系の変化を評価した。

## 神経分化過程における転写因子 Prdm8 の役割

○友田亮太<sup>1,2</sup>, 田畑秀典<sup>3</sup>, 岩井亮太<sup>1</sup>, 岡本正志<sup>2</sup>, 市橋正光<sup>2</sup>, 永田浩一<sup>3</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室

<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 生化学研究室 <sup>3</sup>愛知県コロニー発達障害研究所

哺乳類の発生期大脳皮質では、神経幹細胞(前駆細胞)から生み出された細胞が、多極性細胞と呼ばれる特殊な細胞へと形態変化した後、双極性細胞へと再び変化することで成熟な神経細胞へと最終分化する。このような複雑な分化様式は、正常な大脳皮質の構築に重要な役割を果たすと考えられていることから、この分子機構や生理的な意義を明確化することを本研究の目的とした。

これまで私たちの研究室では、転写因子 Prdm (PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing)-8 が多極性細胞から双極性細胞への形態変化に重要な役割を果たすことを見出している。そこで、本研究では、Prdm8 過剰発現細胞における発現遺伝子の変動、移動細胞の挙動をタイムラプス観察することで、Prdm8 を介した神経分化制御機構の分子機構を追求した。

## Prdm8 の下流分子である Ebf3 は神経分化を調節する

○岩井亮太<sup>1</sup>, 井上真悠子<sup>1</sup>, 田畑秀典<sup>2</sup>, 岡本正志<sup>3</sup>, 市橋正光<sup>3</sup>, 永田浩一<sup>2</sup>, 水谷健一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室

<sup>2</sup>神戸学院大学 薬学部 生化学研究室 <sup>3</sup>愛知県コロニー発達障害研究所

発生過程の脳皮質では、脳室帯に存在する神経幹細胞が生み出した細胞は、多極性形態へと変化し、やがてサブプレート直下の双極性形態へと変化させ、皮質板へと侵入していく。この多極性から双極性への形態変化のタイミングを調節する分子機構は、脳皮質の形成に決定的な影響を及ぼすことが知られているが、その詳細は不明である。私たちは、子宮内エレクトロポレーション法を用いた実験から、Prdm8 の過剰発現細胞は、適切に双極性へと分化できないことを明らかにしている。そこで、本研究では、Prdm8 の下流因子が多極性細胞から双極性細胞への推移を制御すると考え、ChIP-シーケンス解析とDNAマイクロアレイ解析でPrdm8 の下流候補遺伝子を探索し、転写因子 Early B-cell factor3 (Ebf3)を候補分子の一つとして見出した。このEbf3は、双極性細胞の先導突起の形成に重要な役割を果たし、正常な脳皮質の構築に寄与することが示唆された。

## LC-MS/MSを用いた薬物血中濃度測定と動態解析

○福島昭二、岸本修一  
神戸学院大学薬学部 臨床薬剤学研究室

薬物血中濃度や生体成分濃度の測定は、医薬品創製や臨床研究に欠くべからざる技術であり、近年は特に高速液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)を用いた測定が主流となっている。近年のLC-MS/MSの感度の上昇は著しく、10数年前と比較すると数百倍から数千倍以上に向上している。このような超高感度定量は、従来では感度不足による制限によって現実的に不可能であった分析を可能なものとし、また、多種の薬物の濃度測定を可能とし、探索的基礎研究から臨床研究、さらには臨床現場でのルーチンワークまで幅広く使用可能である。最新のLC-MS/MSが本学に導入されてから3年目になるが、神戸市立医療センター中央市民病院や西市民病院、先端医療センター病院、国立病院機構神戸医療センターなどとの医療連携研究において、血中濃度測定をLC-MS/MSで行ってきた。本発表では、それらの結果について紹介する。

## コエンザイム Q10 の培養皮膚線維芽細胞へのアンチエイジング作用

○峯 幸稔, 高橋 隆幸, 市橋 正光, 岡本 正志  
神戸学院大学薬学部・社会薬学部門・生化学研究室

【目的】Coenzyme Q10(以下 CoQ10と略す)は、ミトコンドリア電子伝達系の必須構成成分であり、エネルギー産生系で重要な役割を担っている。また、還元型 CoQ10は生体内の種々の酸化ストレスに対して強い抗酸化作用を発揮する。このような二つの重要な生理作用を有する CoQ10は、加齢とともに生体内含量が減少することが知られている<sup>1)</sup>。そのため、CoQ10は加齢性疾患への適応が期待されている。

そこで今回、CoQ10の加齢性疾患への適応性を検討するため、継代培養を繰り返し複製老化(Replicative Senescence:RS)<sup>2)</sup>を誘導した老化様モデル細胞の作成と抗酸化力の強い長期間安定な還元型 CoQ10の作製を試みた。

【方法】新生児ヒト皮膚線維芽細胞を約300日間培養し、RSを誘発したものを老化様モデル細胞とした。その際、老化様モデル細胞の評価は形態変化の観察とSA-βgalの陽性染色により行った。次に、安定な還元型 CoQ10の作製のため、酸化型 CoQ10とVit.Cを水溶液中に溶解し、一定時間後その還元型 CoQ10への変換量をHPLC-ECD法にて測定した。なお、酸化型 CoQ10(水溶化 CoQ10(アクア Q10 P40))は、日清ファルマ株式会社健康科学研究所から恵与を受けた。

【結果と考察】RSにより作成した老化様モデル細胞では、SA-βgalの陽性染色率が増加した。また、この老化様モデル細胞では、分裂回数を重ねる毎に細胞の扁平化が顕著となった。さらに、老化様モデル細胞は、ROSの産生増大やp21のmRNA量増加など、細胞老化に一般的な特徴を示した。このモデル細胞を用いた際、培養液への1 μM CoQ10の添加はSA-βgalの陽性染色を抑制し、細胞の扁平化も改善した。さらに、CoQ10は細胞老化により発現が上昇するp21やIL-6のmRNA発現量を低下させ、ROSの産生も抑制した。

一方、25℃遮光下、水溶液中で酸化型 CoQ10をVit.Cと共存させると、Vit.Cの濃度依存的に水溶液中の酸化型 CoQ10の還元型への変換量は顕著に上昇した。また、水溶液中での酸化型 CoQ10とVit.Cとの含量比が1:100の際には、その酸化型 CoQ10の還元型への変換量は共存30日後に約90%まで上昇し、これは180日後でも安定していた。さらに、酸化型 CoQ10の還元型への変換量は、温度、水溶液組成によっても変化することが確認された。

これらの結果は、CoQ10のアンチエイジング作用を基盤とした加齢性疾患への研究に応用できること、さらには、水系でも化学的に安定な還元型CoQ10の作製は、新しい還元型CoQ10含有ドリンク剤への開発に展開できる可能性を示唆した。

### 【参考文献】

- 1) Kalén A., *et al.*, *Lipids*, **24**(7): 579-84 (1989)
- 2) Hayflick, L., *Exp Cell Res.*, **25**: 585-621 (1961)

## Orexin-A による脳虚血誘導性糖代謝異常の抑制作用に対する

### Foxa2 の関与

○原田慎一, 上野彩歌, 徳山尚吾  
神戸学院大薬・臨床薬学

【背景】脳虚血ストレス負荷後早期に惹起される高血糖状態は、脳虚血性神経障害を増悪させる。その増悪は、神経ペプチドのひとつである orexin-A によって抑制される。さらに、脳虚血ストレス負荷によって、視床下部における orexin-A の発現量は減少するが、その機序は未だ不明である。Forkhead ファミリーに属する Forkhead box a2 (Foxa2) は、転写因子の一つであり、近年 orexin-A の発現調節に関与することが報告された。そこで本研究では、脳虚血ストレス負荷後の視床下部における orexin-A の発現変化と Foxa2 の関連について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、局所脳虚血モデルは、中大脳動脈閉塞法 (middle cerebral artery occlusion : MCAO) によって作成した。Foxa2 adeno-associated virus (AAV) は、MCAO 7 日前に、視床下部内に局所投与した。MCAO 1 日後の空腹時血糖値を測定し、神経障害の評価として MCAO 3 日後の梗塞巣形成および行動異常の評価を行った。各種 mRNA およびタンパク質発現は、qRT-PCR および蛍光免疫染色法によって解析した。

【結果】Foxa2 mRNA および prepro-orexin mRNA の発現は、MCAO 6、12 時間および 1 日後において sham 群に比較して有意に減少した。Foxa2-AAV 投与群において、視床下部における Foxa2 および prepro-orexin の発現が増加した。また、Foxa2-AAV 投与によって、MCAO 後の空腹時血糖値の増加、梗塞巣の形成および行動異常の発現が有意に抑制された。

【考察】視床下部における orexin-A および Foxa2 は、連動した発現変化を示し、Foxa2 は、orexin-A の作用発現調節の一部に関与することが示唆された。

## 脳虚血ストレス負荷後の脳内 sodium-glucose transporter type 1

### および hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ の発現変化

○兵庫梨紗, 川本有香, 原田慎一, 徳山尚吾  
神戸学院大薬・臨床薬学

【背景】我々は、脳内 sodium-glucose transporter type 1 (SGLT-1) のタンパク質発現増加は、脳虚血後高血糖誘導性の神経障害を増悪させることを報告している。しかしながら、その発現上昇機序は不明である。Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  は、様々な因子の転写調節に関与する因子であり、脳虚血負荷によってその発現は上昇する。さらに、末梢組織においては、HIF-1 $\alpha$  が SGLT-1 の発現調節を担っていることも知られている。そこで本研究では、脳虚血後の脳内 SGLT-1 および HIF-1 $\alpha$  の発現変化について検討した。

【方法】胎生 17 日齢の ddY 系マウスの大脳皮質神経初代培養を用いた。細胞播種後 5 日目に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/glucose (8.75 mM) を添加し、24 時間後に細胞生存活性の評価を行った。YC-1 (HIF-1 $\alpha$  阻害剤、10  $\mu$ M) は、薬物処置 1 hr 前に添加した。一過性局所脳虚血モデルマウスは、5 週齢の ddY 系雄性マウスに中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO, 2 hr) を施すことによって作成し、1 日後に各種 mRNA 量を qRT-PCR で測定した。

【結果】H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独処置によって誘導される細胞死は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/glucose の共処置によって、さらに増悪した。この細胞死は、YC-1 の処置によって有意に抑制された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/glucose の共処置条件下において、SGLT-1 mRNA 量の増加が認められたが、HIF-1 $\alpha$  mRNA 量は変化が認められなかった。MCAO 1 日後の大脳皮質において、HIF-1 $\alpha$  mRNA 量の増加が認められたものの、SGLT-1 mRNA 量は変化しなかった。

【考察】以上の結果から、脳虚血ストレス負荷による神経障害の発現に対し、HIF-1 $\alpha$  が関与する可能性が示唆された。さらに、脳虚血後において、HIF-1 $\alpha$  の発現変動に SGLT-1 が関与する可能性が考えられるが、今後より詳細に検討していく必要がある。

## 脊髄 HMGB1 シグナル系を介する脳卒中後疼痛の発現機序の解明

○松浦渉<sup>1</sup>, 原田慎一<sup>1</sup>, 劉克約<sup>2</sup>, 西堀正洋<sup>2</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸学院大薬・臨床薬学 <sup>2</sup>岡山大院医歯薬・薬理学

【背景】我々は、脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) の発症機序に脊髄の high mobility group box-1 (HMGB1) が関与する可能性を提唱してきた。近年、HMGB1 がその受容体である receptor for advanced end products (RAGE)、toll-like receptor 4 (TLR4) を介し、疼痛に関与するグリア細胞の活性化および nitric oxide synthetase (NOS) を調節することが示唆されている。そこで、本研究では、CPSP の発現に対する脊髄の HMGB1/HMGB1 関連受容体/グリア細胞/NOS シグナルの関与について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、CPSP モデルは 30 分の両側総頸動脈閉塞法 (bilateral carotid arteries occlusion: BCAO) によって作成した。BCAO 3 日後に、マウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数の変化を von Frey test を用いて行った。さらに、BCAO 3 日後に抗 HMGB1 抗体 (2, 20  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME: NOS 阻害剤; 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、lipopolysaccharides from *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS: TLR4 アンタゴニスト; 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) および low-molecular-weight heparin (LMWH: RAGE アンタゴニスト; 20, 40, 70  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を脊髄腔内投与し、疼痛評価を行った。また、BCAO 3 日後におけるグリア細胞の活性化および NOS 活性はそれぞれ免疫染色法および比色定量法を用いて測定した。

【結果】BCAO 3 日後における有意な逃避行動回数の増加は、抗 HMGB1 抗体 (20  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、L-NAME (300  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、LPS-RS (5, 10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) および LMWH (70  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の投与によって有意に抑制された。さらに、BCAO 後に脊髄グリア細胞の活性化および NOS 活性の上昇が確認され、それらは抗 HMGB1 抗体 (20  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) および LPS-RS (10  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を投与することによって、有意に抑制された。一方、LMWH (70  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の投与は、グリア細胞の活性化に影響せず、NOS 活性を有意に抑制した。

【考察】CPSP の発現機序に、脊髄における HMGB1/TLR4/グリア細胞/NOS および HMGB1/RAGE/NOS シグナルの変動が関与している可能性が考えられた。

## 全脳虚血誘導性機械的アロディニアに対する orexin-A の効果

○喜多山紗希, 堀内雅由紀, 松浦渉, 原田慎一, 徳山尚吾  
神戸学院大薬・臨床薬学

【背景】脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) は脳卒中後に生じる難治性の合併症として知られている。しかしながら、現行の治療法を用いても CPSP を根治されることが困難であるため、有効な治療戦略の開発が急務である。近年、摂食や睡眠に関係した機能を有している神経ペプチドの orexin-A が、痛みの制御に関わっていることが報告されてきている。そこで我々は、全脳虚血モデルマウスを用いて、CPSP に対する orexin-A の関与について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いて、全脳虚血モデル (bilateral carotid arteries occlusion: BCAAO、30 分間) を作製した。BCAAO 3 日後のマウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数の変化を von Frey test を用い、orexin-A (50, 150 pmol/mouse) の脳室内投与後、疼痛評価を行った。さらに、SB334867 (orexin-1 受容体アンタゴニスト; 1.5 nmol/mouse, i.c.v.)、naloxone (オピオイド受容体アンタゴニスト, 1 mg/kg, i.p.) を orexin-A を投与する 30 分前、また、yohimbine ( $\alpha_2$  受容体アンタゴニスト; 16  $\mu$ g/mouse, i.t.) および WAY1000635 (5-HT<sub>1A</sub> 受容体アンタゴニスト; 40  $\mu$ g/mouse, i.t.) を 15 分前に投与し、疼痛評価を行った。

【結果】BCAAO 3 日後の後肢において認められた機械的刺激に対する機械的アロディニアは、orexin-A (50, 150 pmol/mouse) の投与によって有意に抑制された。さらに、orexin-A の投与によって認められた抑制効果は、SB334867 (1.5 nmol/mouse)、yohimbine (16  $\mu$ g/mouse)、WAY1000635 (40  $\mu$ g/mouse)、naloxone (1 mg/kg) によって拮抗された。

【考察】Orexin-A が脳において、CPSP の抑制に関与している可能性が示唆された。また、疼痛制御に関わっている下降性疼痛制御系のノルアドレナリン神経の起始核である青斑核およびセロトニン神経の起始核である縫線核には orexin-1 受容体が発現していると報告されている。CPSP に対する orexin-A の抑制作用は、orexin-A/orexin-1 受容体シグナルを介した下降性疼痛制御系の活性化が関与している可能性が示唆された。

## 疼痛制御機構における脳内長鎖脂肪酸 GPR40/FFAR1 の役割

○中本賀寿夫<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 山下琢矢<sup>2</sup> 平澤 明<sup>3</sup>, 栗原 崇<sup>4</sup>, 糟谷史代<sup>2</sup>,  
宮田篤郎<sup>4</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>

1 神戸学院大薬・臨床薬学, 2 神戸学院大薬・毒性学, 3 京都大・院・薬・薬理ゲ  
ノミクス, 4 鹿児島大・医歯学総合 生体情報薬理

【背景】我々は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖脂肪酸によって活性化される長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 が、内因性の疼痛制御機構に関与していることを報告している。しかしながら、これらシグナル機構の欠損が、疼痛行動に与える影響については明らかにされていない。そこで本研究では、GPR40/FFAR1 欠損マウスを用いて各種疼痛モデルマウスを作製し、GPR40/FFAR1 シグナル欠損が疼痛行動に与える影響について検討した。

【方法】動物は、7 週齢の ddY 系雄性マウス、8-10 週齢の C57BL6J (WT) および GPR40/FFAR1 KO (KO) マウスを使用した。術後痛モデルは Brenann らの方法を用いて作製した。疼痛の評価には、tail flick、ホルマリン試験、von Frey 試験および plantar 試験を用いた。GPR40/FFAR1 アンタゴニストの GW1100 (10 µg) は 1 日 1 回 5 日間脳室内へ反復投与した。蛋白質の発現変化は、ウエスタンブロット法または免疫組織染色によって確認した。mRNA 発現はリアルタイム PCR 法によって解析した。

【結果・考察】術後痛マウスは、術後 1 日目から機械的アロディニアが認められ、3 日間持続した後、4 日目にはコントロールレベルまで消失した。GW1100 の反復処置によって、コントロール群と比較して術後痛は 5 日目まで増悪された。同様に、KO マウスにおいても術後 1 日目より機械的アロディニアが認められ、これは 7 日目まで持続した。一方、非疼痛刺激下においては、各種疼痛刺激に対して WT と KO マウス間の差異は認められなかった。以上、GPR40/FFAR1 シグナルの欠損は、疼痛刺激を増悪させることから、痛みの慢性化にこれらシグナル機構の破綻が関係していると示唆される。

## 疼痛時における脳内遊離脂肪酸および脂質関連因子の解析

○橋 男<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 山下琢矢<sup>2</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>3</sup>, 栗原 崇<sup>4</sup>,  
糟谷史代<sup>2</sup>, 宮田篤郎<sup>4</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>

1 神戸学院大薬・臨床薬学, 2 神戸学院大薬・毒性学,

3 京都大・院・薬・薬理ゲノミクス, 4 鹿児島大・医歯学総合 生体情報薬理

【背景】 これまでに私達は、長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 シグナルが内因性の疼痛制御機構の調節を担っていることを提唱してきた。またこれらアゴニストである長鎖脂肪酸が、無処置マウスと比較して疼痛時の脳内、特に視床下部や中脳の領域において増加していることを見出している。この増加は、痛みが回復した段階では消失していることから、痛み刺激に応答して遊離が増強されていることが示唆される。しかし、どのような因子を介して遊離脂肪酸が増加するかについては解明されていない。本研究では、疼痛モデルマウスを用いて、疼痛時における脳内の遊離脂肪酸の挙動に変化を与える脂質関連因子の解析を行った。

【方法】 動物は、7 週齢の ddY 系雄性マウスを使用した。術後痛モデルは Brenann らの方法を用いて作製した。疼痛の評価には、von Frey 試験を用いた。各々の脳領域における遊離脂肪酸は、LC-MS/MS により解析した。脂質関連因子は、リアルタイム PCR 法により解析した。

【結果・考察】 術後痛マウスにおいて、術後 1 日目から機械的アロディニアが認められ、3 日間持続した後、4 日目にはコントロール群のレベルまで消失した。術後 2 日目のマウス視床下部では、オレイン酸およびドコサヘキサエン酸 (DHA) がコントロール群と比較して有意に増加した。この条件下において、脂肪酸結合蛋白質の FABP7 mRNA の発現はコントロール群と比較して有意に低下した。生体膜の主要成分であるグリセロリン脂質を加水分解し、遊離脂肪酸を産生する酵素であるホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) は有意に増加した。一方、術後 4 日目の疼痛が回復した時点では、いずれの脳領域においても遊離脂肪酸含量の変化は認められなかった。以上、疼痛刺激に伴い、脳内の DHA を含む遊離脂肪酸が変化する可能性が示された。これら遊離脂肪酸の変化は、GPR40/FFAR1 シグナルを調節することで疼痛を制御している可能性が考えられる。

## 脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの破綻が 反復ストレスによる痛みの慢性化に関与する

○相澤風花<sup>1</sup>、山下琢矢<sup>2</sup>、中本賀寿夫<sup>1</sup>、糟谷史代<sup>2</sup>、徳山尚吾<sup>1</sup>

1. 神戸学院大・薬・臨床薬学, 2. 神戸学院大・薬・毒性学

【目的】慢性疼痛およびうつ病や不安障害などの情動機能異常の患者においては共通して n-3 系脂肪酸が減少しているとの報告があり、さらに慢性疼痛の発症には情動機能異常が密接に関与することも示唆されている。我々は、n-3 系脂肪酸が脳内の長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の活性化を介して、痛み・情動機能の制御に関与することを示している。しかしながら情動機能異常による慢性疼痛発症機構における脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの関与は不明である。本研究では、慢性疼痛下における脳内リン脂質の変化および脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの低下が、反復ストレス暴露後の痛みの慢性化に関与するかどうか検討した。

【方法】C57BL/6J 雄性マウス (8 週齢) を使用した。10 日間連続の社会的敗北ストレス (SDS) を暴露した後、術後痛を惹起させ慢性疼痛モデルを作製した。SDS マウスを用いた疼痛惹起 7 日目における whole-brain phosphatidylcholine (PC) の解析には、マトリックスレーザー支援型イメージング MS を用いた。SDS 中の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナル抑制のため、浸透圧ポンプを用いて GPR40/FFAR1 アンタゴニストである GW1100 (1.0 $\mu$ g/12 $\mu$ L/day/mouse, 0.5  $\mu$ L/h) をカニューレ存在下、側脳室内へ持続投与した。機械的痛覚過敏は von Frey 試験を用いて、フィラメント 10 回の刺激に対する反応回数を評価した。

【結果】疼痛惹起 7 日目において、SDS—sham 群および SDS—ope 群は non SDS-sham 群と比較して、前頭部では 16:0/16:0、16:0/18:0、18:1/20:4 の PC が減少した。中脳・延髄領域では、18:0/18:0、18:0/20:4、18:0/18:1、18:0/22:6、18:1/22:6 の PC が減少した。SDS 暴露マウスは、非 SDS マウスと比較して機械的痛覚過敏性が有意に増加し、この持続は術後痛惹起 28 日目に消失した。SDS 暴露中の GW1100 の持続投与群は、vehicle 群と比較し術後痛惹起 28 日目以降も機械的痛覚過敏性が持続し、これは 63 日目に消失した。

【考察】以上の結果から、情動機能異常に伴う脳内の脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの破綻は、反復ストレス暴露後の慢性疼痛発症に関与することが示された。

## 反復ストレス暴露後の慢性疼痛発症における脳内関連因子の解明

○大垣 望、中村有香、相澤風花、中本賀寿夫、徳山尚吾  
神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室

【目的】これまで我々は、マウスに 10 日間連続の反復ストレスを暴露することで、術後痛の回復が遅延するという知見を得ている。さらに、この遅延には、脳内の長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 シグナルの破綻が関与することも見出している。しかしながら、その詳細な機序は不明である。そこで、慢性疼痛発症メカニズムを明らかにするために、反復ストレス暴露後に術後痛を惹起した慢性疼痛モデルマウスを作製し、脳内疼痛関連因子の発現変化を検討した。また、神経細胞における BDNF の発現変化に対する GPR40/FFAR1 の関与を検討するために、大脳皮質初代培養神経細胞を用いて *in vitro* ストレス暴露モデルを作製した。

【方法】C57BL/6J (9 週齢) 雄性マウスに、10 日間連続の社会的敗北 (SD) ストレスを暴露した。次に術後痛を惹起し、ストレス暴露後慢性疼痛モデルマウスを作製した。C57BL/6J (胎生 17 日目) マウス大脳皮質より播種した初代培養神経細胞に corticosterone (CORT) を 0.05  $\mu\text{M}$  で 24 時間処置し、*in vitro* ストレス暴露モデルを作製した。これらモデルにおける fatty acid binding protein 7 (FABP7)、calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) および brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現解析には、リアルタイム PCR 法を用いた。

【結果】慢性疼痛モデルマウスにおいて、FABP7 は疼痛惹起 7 日目の海馬および視床下部において、SD-ope 群は non SD-ope 群と比較して有意に減少した。なお、疼痛惹起 1 日目においては何ら変化を示さなかった。iPLA<sub>2</sub> および BDNF は、疼痛惹起 1 日目および 7 日目の海馬および視床下部においていずれも変化を示さなかった。一方、*in vitro* ストレス暴露モデルにおいて、CORT 処置群は vehicle 群と比較して、BDNF の発現は有意に減少した。

【考察】海馬および視床下部における FABP7 の発現減少が、反復ストレス暴露後の術後痛遅延メカニズムに重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、ストレス暴露による大脳皮質神経細胞における BDNF の発現減少が、情動機能異常の発症に関与する可能性が示唆された。

## 幼少期ストレス負荷マウスの脳内各種オピオイド受容体の発現変化

○今西朝美, 京谷奈月, 春日政挙, 中本賀寿夫, 徳山尚吾  
神戸学院大薬・臨床薬学

【背景・目的】幼少期における虐待や育児放棄といったストレスは、成熟後に慢性疼痛を発症する要因となることが知られているが、そのメカニズムについては不明である。我々はこれまでに、幼少期ストレスとして母子分離・隔離飼育(MSSI)ストレスを負荷したマウスに対して、坐骨神経を部分結紮させると、対照群と比べて雌雄マウスとも神経障害性疼痛が増悪することを明らかにしてきた。しかしながら、幼少期ストレス負荷後になぜ痛みが増悪するかメカニズムは不明である。そこで、我々は MSSI ストレスによってオピオイド受容体を介したシグナル機構の低下が生じているとの仮説を立て、MSSI モデルマウスの各種脳領域におけるオピオイド受容体の変化について検討した。

【方法】動物は、ddY 系の雄性マウスを使用した。幼少期ストレスとして、母子分離と隔離飼育ストレスを組み合わせたモデルを用いた。生後 2 週目から 3 週目の間に、1 日 6 時間仔マウスを別々のケージに移し母子分離を行い、生後 3 週目以降は単独で飼育した。不安様行動の評価には、高架式十字迷路試験 (EPM) を使用した。神経障害性疼痛モデルは坐骨神経を1/3～1/2部分結紮 (PSL) することで作製した。疼痛行動の評価には von Frey 試験を用いた。各種脳領域におけるオピオイド受容体の発現変化は、リアルタイムPCR (RT-PCR) を用いて解析した。

【結果・考察】生後 7 週目において、MSSI ストレスマウスは社会性行動の低下およびうつ様行動が認められた。さらに生後 9 週目において、PSL 処置によって痛みを惹起させたところ、ストレス負荷群は対照群と比べて、機械的刺激に対する反応性の有意な亢進が認められた。この条件下における MSSI ストレス負荷マウスの中脳水道周囲灰白質 (PAG) 領域の  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ -オピオイド受容体は、コントロール群と比較して有意に低下した。扁桃体領域の  $\kappa$ -オピオイド受容体は、コントロールと比較してストレス群で有意に増加した。その他の前頭前皮質、側坐核、青班核および視床下部領域においては、何ら変化は認められなかった。以上の結果から、MSSI ストレスにより惹起される成熟期における神経障害性疼痛の増悪機構には、PAG 領域の各種オピオイド受容体の発現低下が関与している可能性が示された。

## 幼少期ストレスによる神経障害性疼痛増悪機構における

### 青斑核アストロサイトの関与

○喜多 豊<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 小山 豊<sup>2</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>

1 神戸学院大・薬・臨床薬学, 2 神戸薬科大学・薬理学

【背景】長期間におよぶ痛みは、不安や抑うつなどの情動機能障害を引き起こし、また、これらの障害によって、さらなる痛みの増悪が引き起こされることが知られている。このように、痛みは感覚的および情動的な要因が互いに影響し合い制御されているが、その関係性についてはいまだ不明な点が多い。グリア細胞の一つであるアストロサイトは、形態、分布および機能などを変化させることで、うつ病などの精神疾患の発症や維持、さらには慢性疼痛の形成と密接に関与している。本研究では、情動機能障害による疼痛増悪のメカニズム解明を目的として、アストロサイトに着目し検討を行った。

【方法】実験には ddY 系雌性マウスを使用し、母子分離・隔離飼育 (MSSI) ストレスを負荷した。不安様行動の評価には、高架式十字迷路試験 (EPM) を使用した。神経障害性疼痛モデルは坐骨神経を 1/3~1/2 部分結紮 (PSL) することで作製した。疼痛行動の評価には von Frey 試験を用いた。アストロサイトのマーカータンパク質の glial fibrillary acidic protein (GFAP) 発現変化は、ウェスタンブロット法および免疫組織染色法で検討した。生理食塩水またはリポポリサッカライド (LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をラット大脳皮質由来培養アストロサイトへ添加した 24 時間後の培養上清は、両側の青斑核領域へ 0.2  $\mu\text{L}$  の容量で局所投与した。

【結果・考察】MSSI ストレス負荷は Sham 群と比較して不安様行動および疼痛行動の指標である機械的刺激に対する反応回数を増加させた。同条件下、青斑核領域において GFAP の発現増加が認められた。この増加は PSL 処置による疼痛を惹起させることで、ストレス負荷 + 偽手術群に比較して、有意に低下した。さらに、LPS 処置によって活性化した培養アストロサイト上清の青斑核領域への局所投与は、対照群に比較して、不安様行動を増加させ、機械的刺激に対する反応回数も増加させた。以上の成績から、MSSI ストレス負荷による青斑核領域のアストロサイトの活性化は、情動機能障害に関与し、PSL 処置後の機械的アロディニアの増悪に影響を与える可能性が示された。

## 母性行動における脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの関与

○新里征史郎<sup>1</sup>, 中尾一誠<sup>1</sup>, 相澤風花<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>2</sup>,  
栗原 崇<sup>3</sup>, 宮田篤朗<sup>3</sup>, 徳山尚吾<sup>1</sup>

1 神戸学院大・薬・臨床薬学,

2 京都大院・薬学研究院・薬理ゲノミクス分野,

3 鹿児島大医歯学総合・生体情報薬理学

【背景】うつ病や統合失調症などの精神疾患の病態形成機構には、脳内の脂肪酸組成変化やこれらを介したシグナル伝達機構の破綻が密接に関係しているとされている。さらに、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の摂取が、産後うつ病などの精神疾患の緩和やその発症率を低下させる可能性も知られている。しかしながら、これらのメカニズムについては不明である。近年、G-蛋白質共役型受容体の一つで、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの PUFA によって活性化される長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 が同定された。これら受容体は脳に豊富に存在しているが、その役割は不明な点が多い。そこで、本研究においては、GPR40/FFAR1 欠損マウスを使用し、PUFA-GPR40/FFAR1 シグナルが母性行動や情動に与える影響について検討を行った。

【方法】動物は 8-10 週齢の雌雄の C57BL6J (WT) および GPR40/FFAR1 欠損マウス (KO) を使用した。情動行動の評価には、オープンフィールド、高架式十字迷路、新規環境下摂食抑制試験、社会性行動試験およびスクロース嗜好性試験を行った。母性行動の評価には、出産から離乳までの期間における育児放棄や喰殺などの飼育状況を詳細に観察した。さらに、養育行動の指標として、母親が仔を巣へ運ぶまでにかかるレトリービング行動の時間を観察した。

【結果・考察】高架式十字迷路試験において、KO マウスではオープンアームの滞在時間および侵入回数が WT と比較して有意に増加した。社会性行動試験では、KO マウスはターゲットマウスの存在の有無に関わらず、インターアクション領域への滞在時間が低下した。その他の行動は、両群間に顕著な変化は認められなかった。一方、KO マウスでは育児放棄および喰殺行動の個体数が WT と比較して上昇した。さらに KO マウスのレトリービング時間は、WT と比較して有意に延長した。以上の成績から、脳内の脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナル機構が、母性および情動行動に関与している可能性が示された。

## GPR120/FFAR4 の欠損は非アルコール性脂肪性肝炎を悪化させる

○檜崎祐実<sup>1</sup>, 長橋明香<sup>1</sup>, 原田慎一<sup>1</sup>, 中本賀寿夫<sup>1</sup>, 平澤 明<sup>2</sup> 徳山尚吾<sup>1</sup>

1 神戸学院大薬・臨床薬学, 2 京都大・薬 薬理ゲノミクス分野

【背景】長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 は、中鎖—長鎖脂肪酸によって活性化される脂肪酸受容体である。近年、GPR120 欠損マウスは肥満、炎症系の亢進、インスリン抵抗性や肝機能障害を呈するとの報告があり、メタボリックシンドロームとの関連が示唆されている。我々はこれまでに、GPR120/FFAR4 アゴニストのドコサヘキサエン酸 (DHA) が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルマウスの病態進行を予防することを報告し、NAFLD の進行に GPR120/FFAR4 が関与している可能性を提唱している。そこで本研究では、GPR120/FFAR4 欠損マウスが NAFLD の進行を増悪させるかどうか検討を行った。

【方法】動物は C57BL/6J (WT) および GPR120/FFAR4 (KO) マウスを使用した。マウスは、普通食 (SD) または超高脂肪コリン欠乏メチオニン低減飼料 (CDAHFD ; メチオニン 0.1%、60 Kcal% 脂肪) を 2 週間摂取させた。炎症および線維化マーカーは、免疫組織染色およびリアルタイム PCR にて解析した。血清中の AST および ALT の測定は比色法を用いた。肝臓の形態学的変化は各種染色法によって評価した。

【結果・考察】肝障害マーカーの AST 値、ALT 値および肝湿重量は、CDAHFD の 2 週間摂取によって、SD 食を摂取させたマウスと比較して、有意に高い値を示した。しかしながら、KO および WT マウスの両群間による差は認められなかった。さらに、マクロファージマーカーの F4/80 によって染色された王冠様構造 (CLS) 数、肝臓 F4/80、TNF- $\alpha$ 、collagen-type 1  $\alpha$  および TGF- $\beta$  mRNA の発現は、SD 食を摂取させたマウスと比較して、CDAHFD 食を摂取させたマウスで有意に増加した。同条件下、CDAHFD を摂取させた KO マウスの肝臓では、CDAHFD 食を摂取させた WT マウスの肝臓と比較して、CLS 数および TNF- $\alpha$  mRNA の発現が有意に増加した。しかし、肝線維化マーカーについては何らの影響も認められなかった。以上の結果から、GPR120/FFAR4 は NAFLD にともなう肝臓の炎症制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。