

公 益 財 団 法 人

薬 理 研 究 会

助 成 研 究 報 告

第 56 集

平成 30 年度

序

本財団では、平成 11 年度から、「薬物治療に関する基礎的研究並びに実地応用上の研究」をテーマに研究助成者を公募してきました。

平成 30 年度には 60 件の応募をいただき、本財団の選考委員会において厳正に審査を行った結果、次の 7 名の研究者に研究助成金を支給しました。

北海道大学大学院薬学研究院	天 野 大 樹	講 師
日本大学医学部	金 丸 和 典	准教授
京都大学大学院医学研究科	實 吉 岳 郎	准教授
山口大学共同獣医学部	島 田 緑	教 授
法政大学生命科学部	曾 和 義 幸	准教授
金沢大学医薬保健研究域薬学系	出 山 諭 司	助 教
東京大学医学部附属病院	早 河 翼	助 教

ここに、上記平成 30 年度に研究助成を受けられた方々による研究成果を、助成研究報告第 56 集として刊行するものです。

本財団の研究助成によって、薬理学、薬学に係わる基礎的研究が着実に進められていることは、誠に悦ばしいことであります。

研究助成を受けられた方々におかれては、本財団の設立の趣旨を体し一層のご精進を期待しております。

令和元年（2019）年 12 月

公益財団法人 薬 理 研 究 会
理事長 大 塚 正 徳

なお、平成 29 年度研究助成を受けられた、名古屋大学医学部附属病院の永井 拓准教授の研究成果は、研究期間延長のため、本第 56 集に併せて掲載します。

目 次

1	社会行動変化におけるプライミング効果をもたらす内側視索前野細胞内シグナル伝達系の解明	天野 大樹	北海道大学大学院 薬学研究院 薬理学	1
2	脳損傷時アストロサイトのカルシウム活動依存的な神経保護因子の探索	金丸 和典	日本大学医学部 細胞分子薬理学	4
3	記憶を司るCaMK2と基質による自己活性化型シグナル複合体の解析	實吉 岳郎	京都大学大学院 医学研究科 システム神経薬理学	6
4	プロリン異性化酵素を標的とした新規抗がん剤の開発	島 田 緑	山口大学共同獣医学部 獣医生化学	9
5	1分子可視化技術による薬剤排出ポンプの機能解析	曾和 義幸	法政大学 生命科学部 生命機能学科	12
6	即効性抗うつ薬の創薬標的としてのTRPCチャンネル	出山 諭司	金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 薬理学	14
7	エキソソームを標的とした統合失調症治療薬の新戦略	永 井 拓	名古屋大学 医学部附属病院 薬剤部	17
8	アドレナリン依存性内皮細胞Immunogenic reprogrammingを利用した抗腫瘍免疫療法の開発	早 河 翼	東京大学 医学部附属病院 消化器内科	20

1. 社会行動変化におけるプライミング効果をもたらす内側視索前野細胞内シグナル伝達系の解明

天野 大樹

(北海道大学大学院 薬学研究院 薬理学研究室)

[背景と目的]

養育は子供の生存に必要不可欠である。また不適切養育は成長後の精神疾患罹患率を上昇させることが知られる¹。一方で特に交尾未経験の雄の哺乳類動物が子供に対する忌避行動や攻撃行動を取ることが知られている²。しかし交尾や妊娠雌との同居といった社会経験を経て養育行動を開始する種が多く見られる。このように雄マウスの脳内では社会経験に応じて攻撃または養育行動を選択させる何らかの脳機能変化が起こっていることが予想されるが、その分子機構は不明な点が多い。

視床下部の吻側に位置する内側視索前野 (medial preoptic area; MPOA) の特に中心部 cMPOA は子供の受容や養育における中心的役割を果たす脳領域と考えられている³。これまでの研究から扁桃体の垂核のうち内側扁桃体 (Medial amygdala; Me) から cMPOA への抑制性入力シナプス機能が父親になることで低下していることを見出した (図1)。これは cMPOA が脱分極によって興奮しやすい状態になっていることを示す。またこのシナプス機能変化が行動選択に寄与することについても in vivo 光遺伝学的手法を用いた行動試験において確認している (改訂投稿中)。本研究ではさらにその詳細な分子メカニズムを明らかにするべく薬理的・分子生物学的な手法を用いた検討を行った。

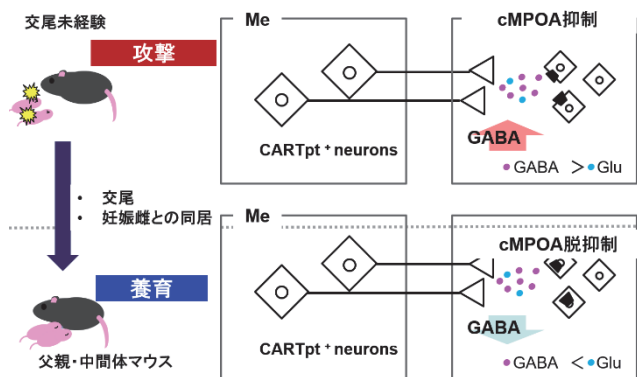


図1 内側扁桃体⇒内側視索前野経路における脱抑制は仔マウスに対する行動選択に寄与する

[方法]

雄性 C57BL/6J マウスを雌と一対一の状態で雌が妊娠するまで飼育した father in gestation experience (FGE) の状態とした。また出産後 3 日間子どもおよび雌と同居したものを父親とした。これらのマウスから脳を摘出し 230 μ m のスライスを作成した。赤外線カメラ下で cMPOA 細胞を観察し、ホールセルパッチクランプ記録または単一細胞記録摘出を行った。摘出した細胞サンプルから cDNA を合成し、次世代シーケンサーによる RNA シークエンス解析を行った。

[結果]

(1) RNA シークエンス解析

交尾未経験群・FGE 群・父親群の cMPOA 神経細胞から抽出した mRNA サンプルについて、各遺伝子発現量を比較したところ GABA_A 受容体のサブユニットの一つである GABAR β 3 が FGE において有意に増加していた。また GABAR β 2 およびドパミン D₂ 受容体の増加傾向が FGE で認められた。

(2) 電気生理学実験

これまで G タンパク質シグナル阻害薬 GDP β S を用いた実験から、cMPOA 細胞

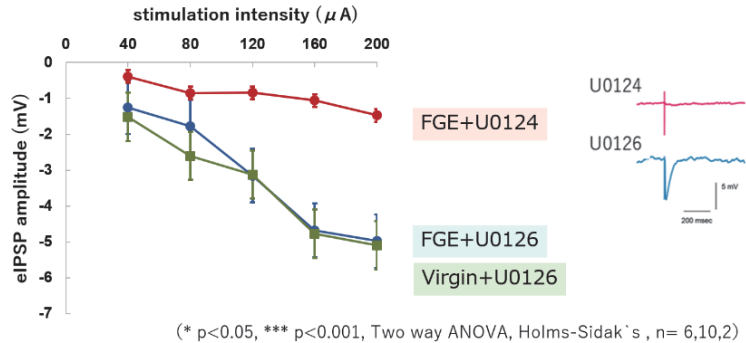


図2 U0126によってFGEのcMPOAのeIPSPのamplitudeが増大した

内のポストシナプス側の因子によって GABA_A 受容体活性が低下していることが示唆されていた。そこで cMPOA への GABA 作動性入力に FGE または父親で抑制される機構について調べるために、GABA_A 受容体の機能を調節することが報告されている MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase; MAP キナーゼ; 分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ) 阻害薬である U0126⁴ を記録用ガラス電極内液に加えたところ、抑制性シナプス伝達効率が元のレベルへと戻った。また U0126 のコントロールアナログである U0124 を用いて同様の実験を行ったが、抑制性シナプス伝達効率に変化が見られないことを確認している (図2)。

(3) 行動薬理学実験

FGE 群マウスの cMPOA に対して U0126 および U0124 の脳内微小注入を行い、約 20 分の回復期間後に P1~P6 の仔マウスをケージに入れた時の行動様式を観察した。その結果、U0126 投与群では U0124 投与群に比べて有意に仔マウスを攻撃するマウスの割合が有意に上昇した (図3)。

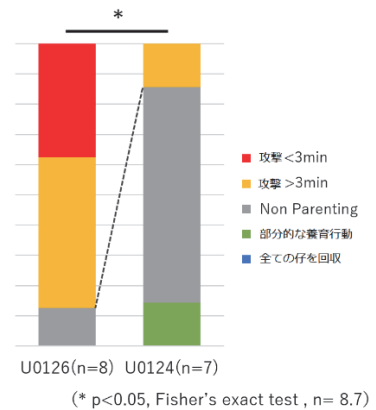


図3 U0126投与群で攻撃行動を示す個体の割合が有意に増加した

[考察]

cMPOA 細胞内において父性発現に関わる社会経験、特に雌との交尾や妊娠後期までの同居に依存して GABA_A 受容体機能を調節する MAPK を介した細胞内シグナル伝達経路が存在する可能性が考えられた。また MAPK が活性化するメカニズムについては今後更なる検討が必要である。本研究で雌との社会経験によって増加傾向が認められたドパミン D₂ 受容体は交尾後の cMPOA で発現増加することが報告されており⁵、また MAPK/ERK 系との関係も指摘されている。父性発現を分子レベルで理解することは不適切養育や虐待を防止す

る手段を開発することにつなげるための足掛かりとなるものであり、更なる展開が期待される。

[謝辞]

本研究を遂行するにあたり微量 RNA サンプルの調整についてご指導・ご助言をしてくださった鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生化学・分子生物学分野・奥野浩行教授に心より感謝いたします。また本研究をご支援頂いた公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

1. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*. 2001, Jun 15;49(12):1023-39
2. Amano T, Shindo S, Yoshihara C, Tsuneoka Y, Uki H, Minami M, Kuroda KO. Development-dependent behavioral change toward pups and synaptic transmission in the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Behav Brain Res*. 2017 May 15;325(Pt B):131-137. doi: 10.1016/j.bbr.2016.10.029.
3. Tsuneoka Y, Tokita K, Yoshihara C, Amano T, Esposito G, Huang AJ, Yu LM, Odaka Y, Shinozuka K, McHugh TJ, Kuroda KO. Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J*. 2015 Nov 3;34(21):2652-70.doi: 10.15252/emboj.201591942. Epub 2015 Sep 30.
4. Bell-Horner CL, Dohi A, Nguyen Q, Dillon GH, Singh M. ERK/MAPK pathway regulates GABAA receptors. *J Neurobiol*. 2006 Nov;66(13):1467-74.
5. Nutsch VL, Will RG, Robison CL, Martz JR, Tobiansky DJ, Dominguez JM. Colocalization of Mating-Induced Fos and D2-Like Dopamine Receptors in the Medial Preoptic Area: Influence of Sexual Experience. *Front Behav Neurosci*. 2016 Apr 18;10:75. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00075. eCollection 2016

2. 脳損傷時アストロサイトのカルシウム活動依存的な神経保護因子の探索

金丸 和典

(日本大学医学部 細胞分子薬理学部門)

背景と目的

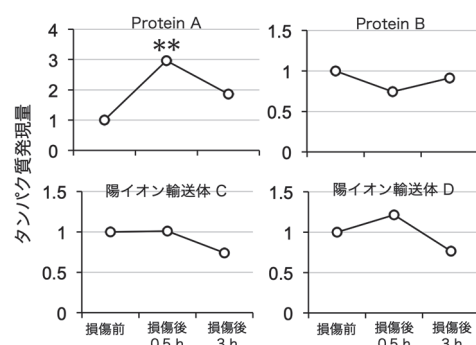
てんかんや脳挫傷、神経変性疾患などの脳病態では、神経細胞死による不可逆的な脳機能低下が問題となる。脳病態に伴いアストロサイトやミクログリア等のグリア細胞が起こす「反応性グリオシス」と呼ばれる細胞分化過程を人為的に制御できれば、グリア性軸索再生因子の発現亢進による神経回路再形成、あるいは神経保護因子の発現亢進による細胞死抑制などといった治療戦略に可能性を拓ける。しかし反応性グリオシスの分子基盤や神経相互作用メカニズムの多くは未解明である。

グリア細胞内のカルシウム濃度変動 (Ca^{2+} シグナル) は、検出困難なグリア細胞活動の良い指標であり、タンパク質発現・活性変動のスイッチ、さらに病変発生部位・時間の情報を伝えるメッセンジャーとして機能するため、この謎を解く鍵になり得る。そこで本研究では、申請者らが開発してきた遺伝子改変マウスおよびこれを用いたイメージング解析と網羅的定量プロテオミクス解析、さらに候補因子絞り込みと各種実験系での検証により、反応性グリオシス誘発時のアストロサイト Ca^{2+} シグナルにより駆動される神経細胞死制御因子の新規同定および機能解析を目指す。

結果と考察

レシオ型 Ca^{2+} センサータンパク質 yellow-cameleon Nano50 (YC-Nano50) をアストロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウス (文献 1) を用い、広視野で大脳皮質をイメージングしながら損傷刺激を適用した。損傷誘発 Ca^{2+} シグナルが大脳皮質の広い領域に伝搬することを見出し、その領域と持続時間を明らかにした。アストロサイト特異的 Ca^{2+} シグナル抑制マウス (イノシトール三リン酸加水分解酵素 IP_3 5-phosphatase 発現マウス) では損傷誘発 Ca^{2+} シグナルの伝搬は見られなかった。 Ca^{2+} シグナル伝搬領域を採取してプロテオミクス解析用の試料とした。このとき、グリア・血管ユニットを精製することで、ミクログリアとニューロンを排除し、細胞間相互作用の場であるアストロサイト突起先端に解析対象を絞った。QTOF 型高分解能質量分析装置を用いた網羅的定量プロテオミクス (SWATH 法) 解析を行った。アストロサイト特異的 Ca^{2+} シグナル抑制マウスでも同様の解析を行い、比較することで損傷誘発 Ca^{2+} シグナルにより発現変動するタンパク質を探索している。例えば、アストロサイト特異的なマーカータンパク質 2 種およびトランスポーター 2 種の発現量を

比較すると、損傷後 30 分で発現上昇した後
に 3 時間後では発現低下するタンパク質が見
られる（右図）など、興味深い結果を得てい
る。この発現変動にはリン酸化状態などのア
ミノ酸修飾による影響が含まれる可能性も
ある。このような早い時間経過での変動を検
出できたことは、我々を含め（文献 2）多く



の研究者がこれまでに研究してきたトランスクリプトーム解析では検出が難しい因
子を探るとい、まさに本研究の狙いの一つであり、本研究は順調に進行して
いると言える。このタンパク質についてさらに研究を深めるとともに、他のタンパ
ク質についても同様の解析を進めている。

今後の課題と展望

今後のさらなる解析で着目すべきタンパク質を複数個ピックアップし、過剰発現
やノックダウンなどの遺伝学的摂動と阻害剤などによる薬理的摂動を加えて詳細
な検証実験を行い、Ca²⁺依存性の機能・発現変動機構の解明や脳機能・病態への関与
を解明して神経保護因子を同定したい。この成果は脳疾患の基礎過程に対する理解
を深めるだけでなく、新規創薬標的や治療戦略につながる可能性が期待できる。

謝辞

共同研究者である徳島大学大学院医歯薬学研究部の立川正憲教授とご支援を賜り
ました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

文献

1. Kazunori Kanemaru, Hiroshi Sekiya, Ming Xu, Kaname Satoh, Nami Kitajima, Keitaro Yoshida, Yohei Okubo, Takuya Sasaki, Satoru Moritoh, Hidetoshi Hasuwa, Masaru Mimura, Kazuki Horikawa, Ko Matsui, Takeharu Nagai, Masamitsu Iino, Kenji F Tanaka: In vivo visualization of subtle, transient and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca²⁺ indicator. *Cell Reports* 8(1):311-318, 2014.
2. Kazunori Kanemaru, Jun Kubota, Hiroshi Sekiya, Kenzo Hirose, Yohei Okubo, Masamitsu Iino: Calcium-dependent N-cadherin upregulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11612-11617, 2013.

3. 記憶を司る CaMK2 と基質による自己活性化型シグナル複合体の解析

實吉 岳郎

(京都大学大学院医学研究科 システム神経薬理学)

研究背景・目的

脳には過去の記憶を何らかの形で貯蔵する仕組みが備わっている。記憶される出来事に反応して神経細胞間の連絡が変化し、神経細胞同士の繋がり方、すなわち神経回路網に記憶が貯蔵される。この神経細胞回路の接続部であるシナプスは、刺激の大きさや頻度によって性質や形が変化し、それが持続する（シナプス可塑性）。個々のシナプスの性質の変化は、神経回路網に保存される記憶の素子であり、その集積によって情報として蓄えられていると考えられている。

シナプス可塑性の中でも細胞レベルでの記憶の基礎である長期増強現象（LTP）は、グルタミン酸受容体からシナプスへ Ca^{2+} が流入し、CaMKII の活性化をへて長期にわたりシナプス伝達強度を増強する。LTP 刺激を受けると、シナプスでは Ca^{2+} 濃度がミリ秒単位で上昇し、続く CaMKII は 1 分間程度活性化する。これに対してシナプスの形を支えるスパイン（樹状突起上に形成される小突起）内のアクチン細胞骨格の活性化は 30 分間以上持続する。しかし、非常に短い Ca^{2+} 濃度の上昇がどのように長期間持続するシナプス伝達強度へと変換するのか、全く解っていなかった。

本研究では、CaMKII とアクチン細胞骨格に着目して、長らく未解明だった、シナプス可塑性における一過的なカルシウムシグナルを持続する生化学反応へ変換するメカニズムの解明を試みた。

研究手法・成果・考察

本研究は、ラット海馬興奮性神経細胞をモデルに LTP 刺激により起こる生化学的な変化をライブイメージング、生化学、分子生物学的手法を組み合わせで行った。

これまでの研究からアクチン重合へ至るコフィリン（アクチン線維の脱重合を促進するタンパク質）を介した情報伝達経路、特に Rho 経路（Rho は細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質ファミリーのひとつ）が重要であることが分かっていた（Bosch *et al.*, 2014）。そこで、LTP 発現時に Rho 経路の一つである Rac1 の活性化様式を詳細に調べると、刺激をうけたスパインでは Rac1 の活性化は、LTP 刺激がなくても続いていることがわかった。また、Rac1 を活性化するタンパク質の中で CaMKII と結合するものを調べたところ、Tiam1 が安定して結合することがわかった。さらに、結合様式を生化学的に検討したところ、Tiam1 と CaMKII の結合には、1) カルシウムが必要なこと、2) 一度結合が成立するとカルシウムは必要なくなること、3) CaMKII の酵素活性は必要ないこと、4) CaMKII は Tiam1 のアミノ酸 1543-1557 に結合すること、5) Tiam1 は、CaMKII の T-site に結合すること、がわかった。さらにこの複合体では、Tiam1 は CaMKII によってリン酸化され、活性化すること、CaMKII は Tiam1 との結合によって自己リン酸化とは独立したカルシウム非依存的酵素活性を獲得することがわかった。つ

まり、Tiam1 と CaMKII は互いを活性化し合う酵素と基質のシグナル複合体であることが明らかにできた。我々は、このような相互活性化型シグナル複合体を RAKEC (reciprocally activating kinase-effector complex)と名付けた。

LTP 誘導に際して、スパイン内での RAKEC の挙動を FRET ライブイメージングの手法で検討すると、神経伝達物質であるグルタミン酸刺激により急速に Tiam1/CaMKII 複合体が形成され、30 分間以上持続していた。また、分子置換法による検討で、Tiam1/CaMKII 複合体は Rac1 活性化およびシナプス構造可塑性に必須である事がわかった。

以上のことから、シナプス可塑性においてシナプス単位の記憶が、Tiam1 と CaMKII からなる RAKEC として形成、維持されるメカニズムを明らかにできた。本研究成果は、これまで特定の分子のリン酸化や発現量などでは説明つかなかった分子記憶が、タンパク質間相互作用として存在するという新しいコンセプトを提案するものである (Saneyoshi *et al.*, 2019)。

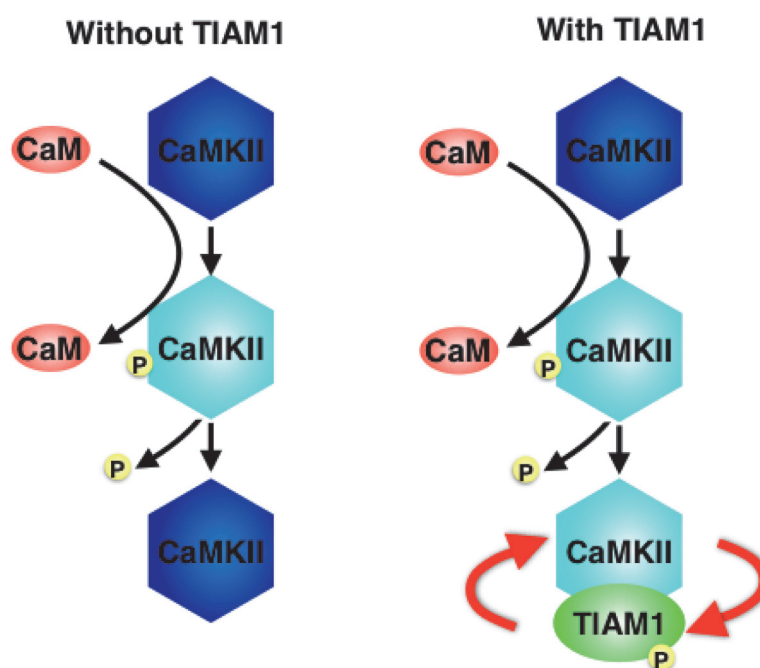


図1 RAKEC のモデル

カルシウム・カルモデュリン (CaM) が CaMKII に結合すると酵素活性が上昇し、T286 の自己リン酸化が起こる。これが自己抑制状態を解除し、活性化を促進する。しかし、細胞内では活性化状態は 1 分以内に消失する (左)。一方、活性化した CaMKII と Tiam1 との結合により、CaMKII の自己阻害は解除され酵素として活性化状態が維持される。この酵素活性は Tiam1 のリン酸化による活性も維持する。つまり、CaMKII と Tiam1 は、相互活性化型酵素基質複合体 (RAKEC) を形成する (右)。

さらに、RAKEC 形成不全変異を Tiam1 に導入したノックインマウスを作成し、記憶試験の新規物体認識試験を行うと記憶に障害が見られた (Kojima *et al.*, 2019)。すなわち、Tiam1/CaMKII で構成される RAKEC は LTP ならびに個体レベルでの記憶に重要な役割を果たしていることが明らかにできた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. ***Saneyoshi T.**, Matsuno H., Suzuki A., Murakoshi H., Hedrick N.G., Agnello E., O'Connell R., Stratton M.M., Yasuda R., *Hayashi Y. Reciprocal Activation within a Kinase-Effector Complex Underlying Persistence of Structural LTP. **Neuron**. 102(6):1199-1210. **2019**. *, co-corresponding authors.
2. Kojima H., Rosendale M., Sugiyama Y., Hayashi M., Horiguchi Y., Yoshihara T., Ikegaya Y., ***Saneyoshi T.**, *Hayashi Y. The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory. **Neurobiol. Learn. Mem.** In press. Aug 21:107070. doi: 10.1016/j.nlm.2019.107070. **2019**. *, co-corresponding authors.
3. Mizuta K., ***Saneyoshi T.** Amyloid- β -Dependent Neuronal Circuit Rearrangement in Presymptomatic Alzheimer's Disease. **Biol. Psychiatry**. 86(3):167-168. **2019**. *, corresponding author.
4. Bosch M., ¹Castro J., ¹**Saneyoshi T.**, Matsuno H., Sur M., Hayashi Y. Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. **Neuron**. 82(2):444-59. **2014**. ¹, Equal contribution.

4. プロリン異性化酵素を標的とした新規抗がん剤の開発

島 田 緑

(山口大学 共同獣医学部 獣医生化学教室)

研究背景・目的

前立腺がんは欧米の男性で最も発症率が高く、日本においても人口の高齢化および食生活の欧米化により、その罹患数および死亡数は急激に増加している。アンドロゲン受容体(AR: Androgen receptor)経路の活性化は前立腺がんの悪性化に中心的な作用を持つため、AR経路の理解およびAR阻害薬の開発が必須である。前立腺がんの治療としてARの作用を抑制するホルモン療法が一般的に用いられているが、一定期間を経過するとホルモン療法に抵抗性を示す去勢抵抗性前立腺がん(CRPC: Castration-Resistant Prostate Cancer)となり、その予後は極めて不良となるため、有効な治療法の確立が緊急課題となっている。

DNA損傷応答機構は乳がんなどのがん治療で注目されている化学療法の標的である。Chk1(Checkpoint kinase 1)はDNA複製、DNA損傷チェックポイント、転写調節など多くの生命現象に関わる必須な機能を持つ(1)。Chk1は変異により発がんの原因となる染色体不安定化を引き起こすが、一方で特定のがんでは高活性化しており、抗がん剤耐性に寄与していると考えられる(2)。これらの知見と一致して、Chk1阻害薬(AZD7762)は前立腺がんの増殖を顕著に抑制する(3)。最近、KRas変異を持つ膵がんなどに対して、Chk1阻害剤とMK2(MAPK-activated protein kinase-2)阻害剤を併用することで抗腫瘍効果を発揮したため、一層Chk1を標的とした阻害薬が注目されている(4)。しかしながらChk1阻害薬は正常細胞の生存にも影響を与えてしまうため、有効な治療法とは言えない。そこで申請者はがんで高活性化されているChk1の下流、制御因子を標的とした、新たな分子標的薬の創出を目指すことを目的に研究を行った。

研究成果

1. 標的因子の発現、阻害による効果

Chk1と相互作用する因子やリン酸化標的因子を網羅的スクリーニングにより取得し、その中でICP1(Interaction partner of Chk1 Protein 1)の機能解明を行った。ICP1はプロリン異性化酵素であり、前立腺がん細胞をはじめ様々ながん細胞で高発現していた。レンチウイルスを用いた発現抑制実験により、ICP1はAR陽性前立腺がん細胞の増殖に必要であることが分かった(図1)。理化学研究所IMS免疫器官形成グループ・Sharif Jafar専任研究員との共同研究によるRNA-seq解析の結果から、ICP1はARの

標的遺伝子の発現に関与することが明らかとなった（図2）。さらに特定の転写関連因子との相互作用を介して転写制御、ゲノム安定性維持に関与することも見出した。様々な機能の中で現在、がん細胞の増殖に必須な機能を特定し、機能ドメインを同定中である。

2. 標的因子に対する阻害薬の合成および増殖に対する影響

名古屋市立大学薬学研究科・中川秀彦教授、川口充康助教との共同研究で、標的因子の酵素活性阻害薬の合成に成功したため、この阻害薬を用いてがん細胞の増殖に与える影響を検討した。その結果、前立腺がん細胞の増殖を顕著に抑制することがわかり、少なくとも酵素活性ががん細胞の増殖に必要であると考えられた。

図1 ICP1は前立腺癌細胞の増殖に必要である

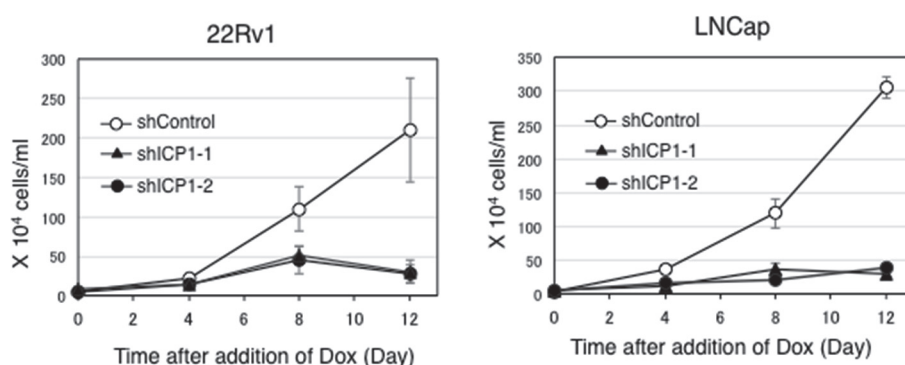
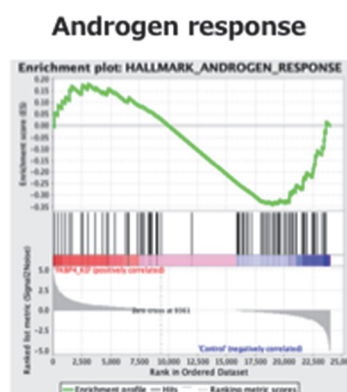


図2 AR標的遺伝子の転写活性化に必要である



考察

プロリンの異性化はタンパク質の構造変化を促すことで、タンパク質の機能を調節する。PPIaseにはPin1, FKBPおよびシクロフィリンの3つのファミリーが存在する。PPIaseは重要な生命現象に関与することが知られているが、詳細な機能は十分には理解されておらず、臨床において阻害剤の開発は成功に至っていない。その原因として基質同定および酵素活性測定の難しさ、さらにscaffoldとして機能するモードも存在するこ

とが挙げられる。今後は、異性化される基質タンパク質を同定し、異性化の意義を詳細に検討する必要があると考えられる。さらに酵素活性阻害薬の最適化・抗腫瘍効果の検討を行い、より特異性の高い阻害薬の開発・実用化によりがん治療への臨床応用を目指したい。またChk1の他の標的因子についても解析を行っており、前立腺がんおよび乳がんの増殖に必須な因子について創薬ターゲットとなりうる可能性について検証中である。

謝辞

本研究に多大なご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に心より感謝申し上げます。また山口大学共同獣医学部獣医生化学の川崎直子様、大浜三紗子様には研究室の立ち上げから実験の補助など様々なことをサポートしていただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H and Nakanishi M
Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell*. 132: 221-232, 2008
- 2) M M Al-kaabi, A T Alshareeda, D A Jerjees, A A Muftah, A R Green, N H Alsubhi, C C Nolan, S Chan, E Cornford, S Madhusudan, I O Ellis, E A Rakha
Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response. *Br J Cancer*. 112: 901-911, 2015
- 3) Karanika S, Karantanos T, Li L, Wang J, Park S, Yang G, Zuo X, Song JH, Maity SN, Manyam GC, Broom B, Aparicio AM, Gallick GE, Troncoso P, Corn PG, Navone N, Zhang W, Li S, Thompson TC
Targeting DNA Damage Response in Prostate Cancer by Inhibiting Androgen Receptor-CDC6-ATR-Chk1 Signaling. *Cell Rep*. 18: 1970-1981, 2017
- 4) Dietlein F, Kalb B, Jokic M, Noll EM, Strong A, Tharun L, Ozretić L, Künstlinger H, Kambartel K, Randerath WJ, Jüngst C, Schmitt A, Torgovnick A, Richters A, Rauh D, Siedek F, Persigehl T, Mauch C, Bartkova J, Bradley A, Sprick MR, Trumpp A, Rad R, Saur D, Bartek J, Wolf J, Büttner R, Thomas RK, Reinhardt HC
A Synergistic Interaction between Chk1- and MK2 Inhibitors in KRAS-Mutant Cancer. *Cell*. 162:146-159, 2015

5.1 分子可視化技術による薬剤排出ポンプの機能解析

曾和 義幸

(法政大学 生命科学部 生命機能学科)

【背景と目的】

近年、多数の薬剤に耐性をもつ多剤耐性病原菌の出現が深刻な社会問題となっている。この多剤耐性能の要因の一つは薬剤排出ポンプの発現にある。大腸菌は RND 型薬剤排出ポンプを 5 種、それ以外のタイプの薬剤排出ポンプを 15 種もつ(文献 1, 図 1)。そのうち構成的に発現し、機能しているのは AcrB (内膜トランスポーター) – AcrA (膜融合タンパク質) – TolC (外膜チャネル) 複合体のみである。このうち、外膜チャネル TolC は環境刺激によって発現が誘導された多くのトランスポーターに共有される。したがって、環境条件が変化すると、大腸菌にとって最適な薬剤排出ポンプ複合体が新たに形成される。

本研究では、大腸菌が最適な薬剤排出ポンプ複合体を新たに形成する過程を 1 分子レベルで可視化することを目的とした。今回、我々は TolC と複合体を形成して機能する内膜トランスポーターに MdtB/MdtC に着目した。このトランスポーターは非常に興味深いことに、MdtB:MdtC=2:1 でヘテロ三量体を形成したときに最も活性が高いことが知られている。これは、様々な構成比率で人工的にタンデム化した MdtB と MdtC の複合体の活性から得られた結果である(文献 2)。では、実際の生細胞内における機能的 MdtB/MdtC の構成比率はどうなっているのか? この問いに答えるために、本研究では我々が進めてきた 1 分子蛍光可視化技術をさらに発展させて、MdtB/MdtC の動態解析を目指した。

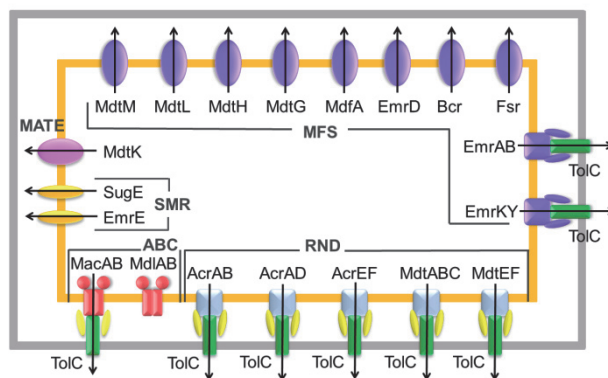


図 1. 大腸菌薬剤排出ポンプ

【結果と考察】

本研究では、MdtB と MdtC に蛍光タンパク質を融合させ、1 分子レベルで多剤排出ポンプの観察をおこなった。まず、 $\Delta mdtABC$ 株および、MdtB と MdtC のそれぞれに GFP と tagRFP を融合したタンパク質の発現系を構築した。これらの融合体の薬剤排出能を定量的に調べるために、MdtB/C トランスポーターが特異的に排出する薬剤に対する最小発育阻止濃度を決定した。つぎに、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて生細胞内でのトランスポーターの動態を観察した。大腸菌をカバーガラスにポリリジンを用いて接着させて、473 nm または 561 nm のレーザーで全反射照明すると、カバーガラスに接する膜表面に存在する蛍光分子のみを高 S/N 比で検察することができる。まず、MdtB-GFP または MdtC-tagRFP をそれぞれ単独で $\Delta mdtABC$ 株に発現させて蛍光観察をおこなった。その結果、MdtB-GFP 株では膜上に固定されて動かない輝点が多く

観察されたのに対して、MdtC-tagRFP 株では輝度の弱い輝点が膜上を動き回る様子が観察された(図 2)．また、輝点の強度の分布をみると、MdtB-GFP では GFP 1 分子の 2 倍または 3 倍に相当するものが多く見られた．一方、MdtC-tagRFP では tagRFP 1 分子と同程度または 2 倍に相当するものが多く見られた．我々は最近、構成的に発現する AcrB に GFP を融合した AcrB-GFP を観察することで、TolC と結合した AcrB-GFP の動きは制限されており、その輝度は GFP3 分子に相当することを報告した(文献 3)．以上の結果を考慮すると、MdtB はホモ三量体を形成して、MdtA とともに TolC と複合体を形成して膜上に固定されうるのに対して、MdtC は三量体を形成することではなく単量体または二量体で存在し、TolC とも複合体を形成しないため細胞膜上を拡散していると考えることができる．現在、2 光路分岐光学系を組み込んだ全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、MdtB-GFP と MdtC-tagRFP が同時に発現する条件で、2 波長の蛍光を同時に観察することを進めている．まだプレリミナリーであり今後検討する必要があるが、GFP と tagRFP の輝点が共局在して膜上に固定されているデータが得られている．すなわち、生細胞内においても MdtB/MdtC のヘテロ複合体形成を示唆している．

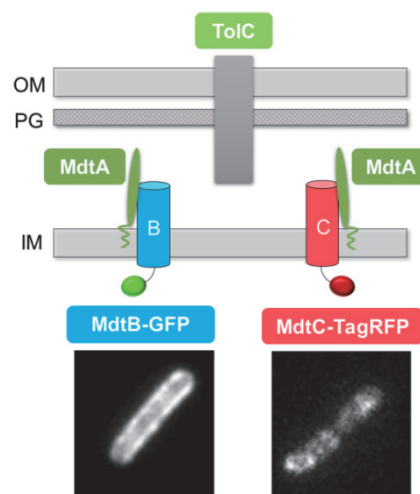


図 2. MdtB と MdtC の可視化

【結論】

以上のように、MdtB-GFP と MdtC-tagRFP を観察することで、ポンプ複体内に含まれる機能的構成素子数を解析することが可能になってきた．今後は、さまざまな薬剤存在下における構成素子比率を定量的に解析することで、大腸菌の薬剤耐性獲得の戦略について明らかにしたい．

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く御礼申し上げます．また、本研究は法政大学生命科学部生命機能学科の川岸郁朗教授およびラボメンバーの協力のもと実施されました．この場をお借りして感謝申し上げます．

【参考文献】

1. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:672-93 (2000)
2. Kim HS, Nagore D, Nikaido H. Multidrug efflux pump MdtBC of *Escherichia coli* is active only as a B2C heterotrimer. *J Bacteriol.* 192:1377-86 (2010)
3. Yamamoto K, Tamai R, Yamazaki M, Inaba T, Sowa Y, Kawagishi I. Substrate-dependent dynamics of the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 6: 21909 (2016)

6. 即効性抗うつ薬の創薬標的としての TRPC チャネル

出山 諭司

(金沢大学医薬保健研究域薬学系 薬理学研究室)

【背景・目的】

選択的セロトニン再取り込み阻害薬などの既存の抗うつ薬は、治療効果発現までに数週間以上を要し、約 3 割の患者には奏功しないため（治療抵抗性うつ病）、新たな抗うつ薬の開発は喫緊の課題である。近年の臨床研究により、NMDA 受容体拮抗薬ケタミンの単回静脈内投与が、治療抵抗性うつ病患者に即効性（数時間以内）かつ持続性（1 週間程度）の抗うつ作用を示すことが明らかになり、大きな注目を集めている。ケタミン自体の抗うつ薬としての使用には、依存性や統合失調症様症状の惹起などの重大な副作用のため大きな制約があるが、ケタミンのユニークな即効性抗うつ作用を担う神経メカニズムの解明は、より安全性の高い新規即効性抗うつ薬の開発と、うつ病の病態機序の解明に極めて重要である。

ケタミンの抗うつ作用には、内側前頭前野 (mPFC) での脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遊離と、これに続く mTORC1 活性化を介した錐体細胞の可塑的变化が関与することが知られているが¹⁻³、その作用メカニズムには不明な点が多く残されている。我々は最近、mPFC 錐体細胞からの血管内皮増殖因子 (VEGF) 遊離が、ケタミンの抗うつ作用と mPFC 錐体細胞の可塑的变化に重要であることを見出している⁴。一方で、BDNF はその受容体 TrkB の下流で非選択的のカチオンチャネル TRPC3 および TRPC6 を活性化し、TRPC3・TRPC6 の活性化は BDNF によるニューロンの可塑的变化に重要であることが報告されている^{5,6}。また、血管内皮細胞を用いた報告ではあるが、VEGF も VEGF 受容体 2 を介して TRPC3 および TRPC6 を活性化することが知られている⁷。しかしながら、BDNF や VEGF の下流における TRPC3・TRPC6 活性化が、ケタミンの即効性抗うつ作用に関与するか否かは不明である。そこで本研究では、ケタミンの抗うつ作用における mPFC 内 TRPC3・TRPC6 活性化の役割を明らかにすることを目的とした。また、選択的 TRPC3・TRPC6 活性化薬が抗うつ作用を示すか否かを検討した。

【方法】

実験には、雄性 C57BL/6J マウス (7-11 週齢) を用い、リポポリサッカライド (LPS) 誘発うつ病モデル⁸を作製した。LPS (0.8 mg/kg) を腹腔内投与し、その 24 時間後に運動量測定 (LMA)、26 時間後に尾懸垂試験 (TST)、28 時間後に強制水泳試験 (FST) を行った。ケタミンおよび選択的 TRPC3・TRPC6 活性化薬は、LMA の 75 分前に腹腔内投与した。mPFC 内薬物投与用ガイドカニューレ埋込手術を施した場合は、術後 7 日以上の回復期間をおいてから、LPS 投与を行った。mPFC への TRPC3 阻害薬または TRPC6 阻害薬の投与は、ケタミン腹腔内投与の 15 分前に行った。行動実験終了後、投与部位の確認を行い、両側 mPFC 内への薬物投与が成功した個体のみ解析に用いた。

【結果と考察】

まず LPS 誘発うつ病モデルマウスにおいて、ケタミン腹腔内投与 (10 mg/kg) によって抗うつ作用が認められるかどうかを確認した (図 1A)。その結果、ケタミンは運動量に有意な影響を及ぼすことなく (図 1B)、LPS 投与による TST および FST での無動時間の増加を有意に抑制した (図 1C, D)。これらの結果から、ケタミンが LPS 誘発うつ病モデルマウスにおいて抗うつ作用を示すことが確認された。このケタミンの抗うつ作用は、mPFC への TRPC3 阻害薬または TRPC6 阻害薬の局所投与により有意に抑制された。また、ケタミンの代わりに、選択的 TRPC3・TRPC6 活性化薬を腹腔内投与したところ、LPS 投与による TST および FST での無動時間の増加が用量依存的に抑制された。すなわち、選択的 TRPC3・TRPC6 活性化薬が抗うつ作用を示すことが明らかとなった。

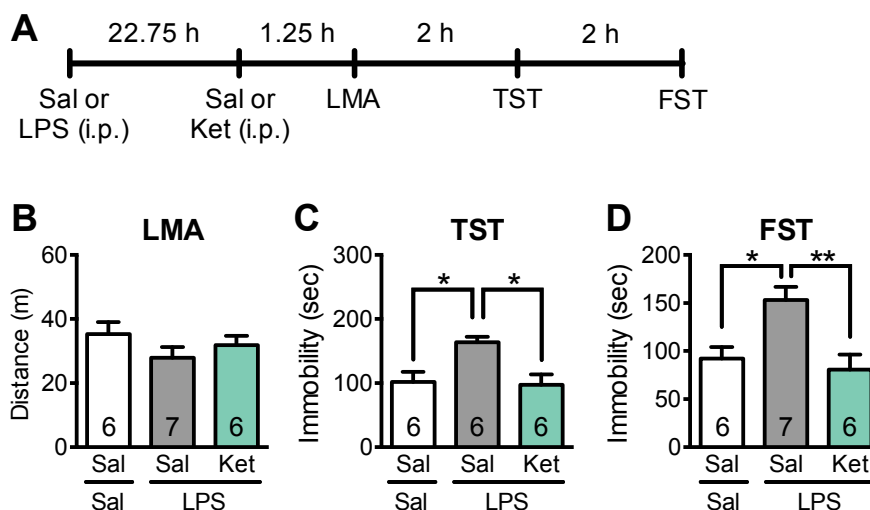


図 1 LPS 誘発うつ病様行動 (TST および FST における無動時間増加) は、ケタミン (Ket) 腹腔内投与により有意に抑制された。Sal = saline, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

以上の結果から、ケタミンの抗うつ作用には mPFC 内の TRPC3 および TRPC6 活性化が必要であること、並びに、TRPC3・TRPC6 の活性化が抗うつ作用の発現に十分であることが明らかとなり、TRPC3・TRPC6 活性化作用を有する薬物が新たな即効性抗うつ薬となる可能性を見出すことができた。

【参考文献】

1. Li N, et al. (2010): mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*. 329: 959-964.
2. Liu RJ, et al. (2012): Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 71: 996-1005.
3. Lepack AE, et al. (2014): BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 18: pyu033.

4. Deyama S, et al. (2019): Role of neuronal VEGF signaling in the prefrontal cortex in the rapid antidepressant effects of ketamine. *Am J Psychiatry*. 176:388-400.
5. Li Y, et al. (2005): Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 434:894-898.
6. Amaral M and Pozzo-Miller L. (2007): TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *J Neurosci*. 27:5179-5189.
7. Cheng HW, et al. (2006): VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1768-1776.
8. Deyama et al. (2017): Resolvin D1 and D2 reverse lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors through the mTORC1 signaling pathway. *Int J Neuropsychopharmacol*. 20: 575-584.

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

7. エキソソームを標的とした統合失調症治療薬の新戦略

永井 拓

(名古屋大学医学部附属病院薬剤部)

目的

統合失調症は、陽性症状（幻覚・妄想など）、陰性症状（情動反応の平板化など）および認知障害を特徴とする重篤な精神疾患である。生涯有病率は約 1% と高く、再発・再燃により症状が悪化すると難治化に至る。抗精神病薬を用いた薬物治療や心理社会的治療が導入されているが、全体の 30% は未だに十分な治療効果が得られていない治療抵抗性の患者で占められている。疫学的調査により統合失調症は、遺伝・環境要因により神経発達障害を基盤とする脆弱性が生じ、心理社会的ストレスが引き金となって症状が顕在化すると考えられるが¹⁾、統合失調症に関わる分子基盤については解明されていない。現状では神経伝達物質受容体を標的とした既存の治療薬では対症療法の域に留まっており、病態メカニズムに即した治療法の開発が望まれている。これまでの連鎖解析、関連解析およびゲノムワイド関連解析により、主要組織適合抗原複合体 I 型 (MHCI) 遺伝領域が統合失調症に関連することが強く示唆されているが²⁾、高次脳機能への影響について詳細は不明である。一方、我々は、周産期におけるアストロサイトの異常活性化が神経発達を障害し、統合失調症様行動を惹起することを示してきた³⁻⁶⁾。本研究では、末梢免疫活性化による中枢神経系における MHCI の発現変化、ならびに前頭前皮質のアストロサイトにおける膜貫通型 MHCI/H-2D あるいは分泌型 MHCI/sH-2D の発現が周囲の細胞と高次脳機能に及ぼす影響について調べた。

結果および考察

実験には C57BL/6J 系マウスを使用した。合成 2 本鎖 RNA アナログで Toll 様受容体アゴニストある polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (polyI:C、3 mg/kg、腹腔内投与) またはインターフェロン- γ (IFN- γ) を処置したマウスから大脳皮質を摘出して MHCI および炎症性サイトカインの mRNA 量を測定した。生理食塩水投与群に比べて polyI:C 投与群では投与 6 および 24 時間後の前頭前皮質における H-2D および H-2K mRNA の発現が顕著に増加した。また、polyI:C 投与群では前頭前皮質において投与 6 時間後における IFN- β および TNF- α mRNA 発現の一時的な増加が観察され、IL-6

mRNA については持続的な発現増加が認められた (表 1)。コントロールマウスと比較して、IFN- γ を処置したマウスでは、皮質における IFN- γ mRNA における有意な発現変化は認められないが、MHCI/H-2D および H-2K mRNA の発現はコントロールに比べて有意な発現増加が認められた。PolyI:C 処置による H-2D mRNA の発現は神経細胞以外にもアストロサイトで認められ、このアストロサイトにおける MHCI/H-2D の発現割合は継時的に上昇することを確認した (図 1)。したがって、脳内での MHCI の発現には末梢で発現上昇した炎症性サイトカイン、特に IFN- γ がその機構に寄与する可能性が示唆された。

培養アストロサイトおよびアストロサイトーマとして知られる C8-D1A に H-2D あるいは sH-2D をコードするプラスミドを導入し、各細胞小器官との共局在を解析した結果、物質の細胞間輸送に関わるエキソソーム (CD63) と強く共局在がみとめられた。培養上清から調製したエキソソームの画分に H-2D および sH-2D が含有されていることも確認した。また、培養上清中の H-2D および sH-2D はエキソソームの膜合成阻害薬 GW4869 を処置すると減少したことからアストロサイトにおける MHCI はエキソソームを介して分泌されると考えられる。

H-2D および sH-2D のアストロサイトにおける過剰発現が脳機能に及ぼす影響を調べるため、GFAP プロモーターで機能するアデノ随伴ウイルスベクターを用いて前頭前皮質のアストロサイト特異的に MHCI を過剰発現させたマウスを作製した。一連の行動バッテリーを実施した結果、アストロサイト特異的 MHCI 過剰発現マウスでは社会性行動および物体認知記憶に障害が観察された (表 2)。前頭前皮質のアストロサイト特異的に H-2D あるいは sH-2D を過剰発現するマウスを用いてミクログリアの活性化、パルブアルブミン陽性の抑制性神経および錐体神経細胞におけるスパイン密度を解析した。sH-2D 過剰発

表1. PolyI:C処置マウスの内側前頭前皮質におけるMHCIおよび炎症性サイトカイン mRNAの発現変化

	6時間後	24時間後
MHCI/H2D	増加	増加
MHCI/H2K	増加	増加
MHCI/ β 2m	増加	増加
IFN- β	増加	変化なし
TFN- α	増加	変化なし
IL-6	増加	増加

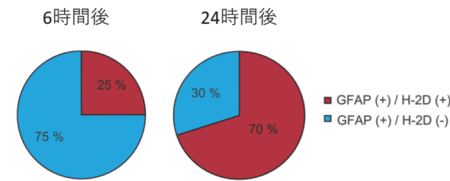


図1. PolyI:C処置マウスの内側前頭前皮質に存在するアストロサイトにおけるMHCI/H-2Dの発現割合

表2. アストロサイト特異的MHCI過剰発現マウスの行動変化とエキソソームの膜合成阻害薬GW4869の効果

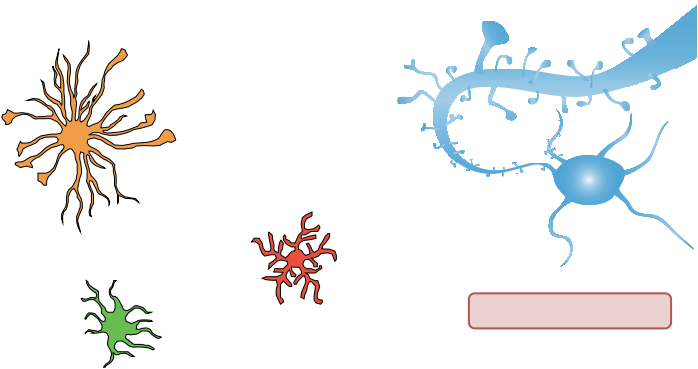
試験項目	行動指標	結果	GW4869の効果
Locomotor activity試験	運動機能	変化なし	未実施
オープンフィールド試験	運動機能・不安	変化なし	未実施
Y字迷路試験	学習・記憶	変化なし	未実施
新規物体探索試験	学習・記憶	低下	改善
社会性行動試験	社会性行動	低下	改善
メタンフェタミン誘発性運動過多	薬物感受性	変化なし	未実施

現マウスの前頭前皮質では Iba1 陽性のミクログリアの細胞数および細胞の大きさが上昇した（表 3）。パルプアルブミン陽性の抑制性神経細胞数は低下し、H-2D 過

表3.アストロサイト特異的MHCⅠ過剰発現マウスの神経病理変化とエキソソームの膜合成阻害薬GW4869の効果

神経病理変化	結果	GW4869 の効果
ミクログリア活性化	上昇	改善
パルプアルブミン陽性細胞	低下	改善
スパイン密度	低下	未実施

剰発現マウスにおいても同様の結果が得られた。また、H-2D 過剰発現マウスあるいは sH-2D 過剰発現マウスでは、錐体神経細胞におけるスパイン密度も低下した（表 3）。sH-2D 発現マウスで認められたこれらの障害はエキソソームの膜合成阻害薬 GW4869 の投与により改善した（表 2 および表 3）。このことからアストロサイトにおける MHCⅠの発現はエキソソームを介して近傍のミクログリアあるいは神経細胞に直接影響し、社会性行動の低下や物体認知記憶の低下を惹起することが示唆された（図 2）。また、本研究によりアストロサイト由来 MHCⅠが新規創薬標的となる可能性を示すことができた。



謝辞

本研究を実施するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 薬理研究会に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. Am J Psychiatry. 2010; 167 (3): 261-280.
- 2) Mokhtari R, Lachman HM. The Major Histocompatibility Complex (MHC) in Schizophrenia: A Review. J Clin Cell Immunol. 2016; 7(6): pii: 479.
- 3) Yamada S, Itoh N, Nagai T, Nakai T, Ibi D, Nakajima A, Nabeshima T, Yamada K. Innate immune activation of astrocytes impairs neurodevelopment via upregulation of follistatin-like 1 and interferon-induced transmembrane protein 3. J Neuroinflammation. 2018; 15(1): 295.

8. アドレナリン依存性内皮細胞 Immunogenic reprogramming を利用した抗腫瘍免疫療法の開発

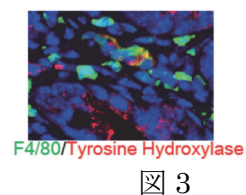
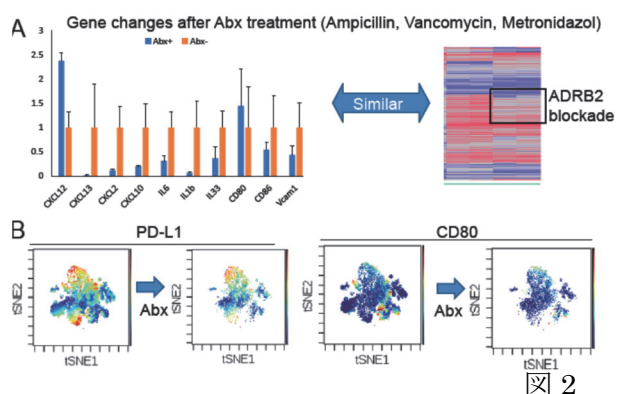
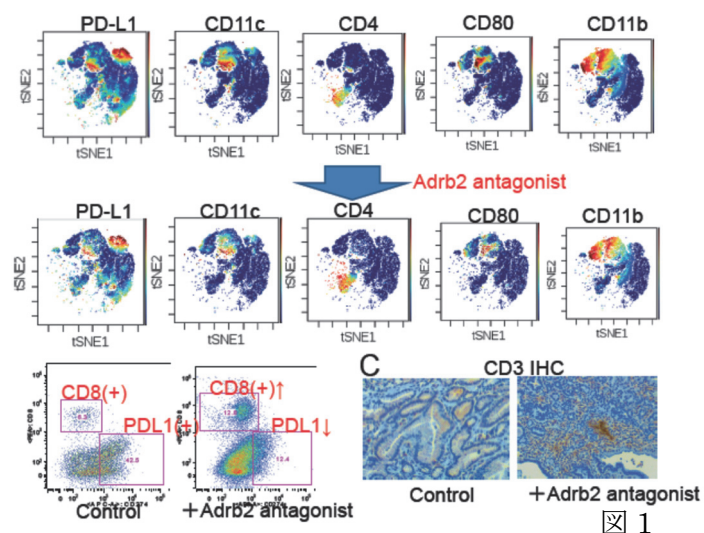
早 河 翼

(東京大学 医学部附属病院 消化器内科)

マウス胃腫瘍内の血管内皮細胞の中には、CXCL12 を発現する一分画が存在する¹。この CXCL12 陽性内皮細胞の遺伝子発現解析の結果、CXCL12 陽性内皮細胞は Adrb2 を特異的に高発現し、また腫瘍内ではより多彩なサイトカイン・ケモカインを発現し、PD-L1 陽性免疫細胞を誘導して腫瘍免疫を制御していることを発見した。このアドレナリン依存性 Immunogenic reprogramming のメカニズムを解析することを目的として以下の解析を行った。

Apc 欠損胃腫瘍、IL1b過剰発現胃腫瘍組織を用いて、CyTOF 解析による免疫プロファイリングを施行した。Apc 欠損型腫瘍ではマクロファージ・好中球を含む骨髄球系細胞の増加、IL1b 過剰発現腫瘍では骨髄球系細胞に加え T/B リンパ球の増加を認めた。ADRB2 阻害剤を投与もしくは Adrb2 ノックアウトマウスとの交配をしたマウスと対照群との比較により、ADRB2 を介したカテコラミンが腫瘍内の PDL1 陽性 F4/80 陽性マクロファージ分画と CD80 陽性 CD11b陽性骨髄球分画を誘導している可能性が示唆された(図 1)。逆に、NGF 過剰発現マウスではアドレナリン依存性神経の増生とマクロファージ・好中球を含む骨髄球系細胞の増加が認められた。この誘導過程において、抗生剤投与により消化管殺菌を行うと、腫瘍内の PDL1 陽性 F4/80 陽性マクロファージ分画と CD80 陽性 CD11b陽性骨髄球分画が減少し、また内皮細胞内のケモカイン・サイトカインの産生が抑制されたことから、胃内 Dysbiosis によって誘導された同炎症細胞群がカテコラミンを産生し、内皮細胞内遺伝子発現変化を促進していることがわかった(図 2)。

カテコラミンの産生をモニターしうる TH(Tyrosine hydroxylase)の発現を腫瘍内で解析したところ、神経細胞のみならず一部の血球細胞とくに CXCR4 陽性骨髄球分画での発現が認められ、抗生剤投与によってこの細胞群が減少していることが分かった(図 3)。胃炎・胃癌組織中の dysbiosis によって誘導された骨髄球分画がカテコラミンを産生し、内皮細胞中 immunogenic reprogramming を促進している可能性がある。



最後に、胃癌サブタイプを模倣し B6 バックグラウンドマウスに移植可能なオルガノイドの樹立をすすめた。Kras/Apc/Tgfr2/p53 (KPAT) の変異をもつ CIN 型のオルガノイドは B6 マウスの皮下で増殖し、形成した腫瘍内には PD-L1・CTLA-4 の発現を認めた。GS 型 (signet-ring cell) のオルガノイドとして Kras/p53/Tgfr2/Cdh1 (KPTC) の変異を持つオルガノイドを作製した。こちらも B6 マウスへの皮下移植可能であった。KPAT、KPTC オルガノイドを移植したマウスに Adrb2 阻害剤を投与したところ腫瘍内骨髄球分画の減少、特に PD-L1 を発現する分画の減少を認めた (図 4)。一方で腫瘍内 T 細胞の増加を認めた。Adrb2 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用投与を行ったところ、コントロールおよび Adrb2 阻害剤/免疫チェックポイント阻害剤単剤群に比べより効果的な腫瘍サイズ縮小効果が認められた。以上の結果は、Adrb2 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用を含めた CIN・GS 型胃癌に対する新規治療法の可能性を提示することができた。また in vivo のモデルとして TFF1Cre/Tgfr2FF/Cdh1FF マウスは粘膜下浸潤を呈する印環細胞癌を発症することを見出したが、これらのモデルは GS 型胃癌を模倣するモデルとして今後 in vivo の解析に有用であると考えられる。さらに、p16, Arid1a, Mlh1, Pik3Ca などの遺伝子改変マウスを入手し交配させ、MSI 型・EBV 型の腫瘍オルガノイドを作製した。

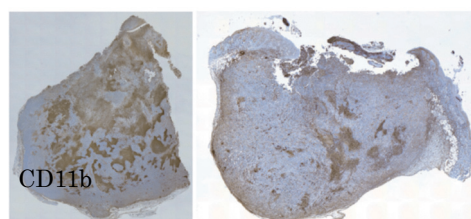
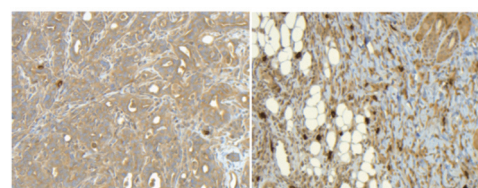


図 6

以上より、Adrb2 阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用は特に CIN・GS 型胃癌に対する新規治療法として有効である可能性を提示することができた。また、作製したオルガノイドおよびマウスモデルは、ヒト胃癌サブタイプを模倣するツールとして今後の胃癌研究の進展に資するものであると考える。



+Adrb2 antagonist

図 4

神経ストレスと悪性腫瘍の相互作用については以前から注目されている研究分野の一つであり、最近の解析手法の進化に伴いその関連性がより科学的に証明されてきている^{2, 3}。本研究では Adrb2 を選択的に阻害する薬剤・ノックアウトマウスを用いてその有効性を証明したが、実臨床においてはすでに広く使われている β ブロッカーと各種抗癌剤の併用によって患者の予後延長に資する可能性があり、前向き・後ろ向きの臨床研究の展開が期待できる。また一般的に言えば、古くから伝わる「病は気から」という格言の信ぴょう性についてある程度の解を与える研究成果であり、広く人々の興味を引き新たなイノベーションの開発につながる可能性がある。

文献

1. Hayakawa Y, Ariyama H, Stancikova J, et al. Mist1 Expressing Gastric Stem Cells Maintain the Normal and Neoplastic Gastric Epithelium and Are Supported by a Perivascular Stem Cell Niche. Cancer Cell 2015;28:800-14.

2. Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, et al. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. *Cancer Cell* 2017;31:21-34.
3. Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Sci Transl Med* 2014;6:250ra115.