

Machinery”. 伊豆の国, 12月.

- 15) 大城戸真喜子, 松藤千弥. アンチザイム1ノックアウトマウスにおける高濃度ポリアミンによる造血障害. 日本ポリアミン研究会第21回研究発表会. 西東京, 1月. [講演要旨集 2007; 27]
- 16) 村井法之, 松藤千弥. 傍腫瘍性小脳変性疾患関連タンパク質 CDR2 と AZ2 の相互作用の解析. 日本ポリアミン研究会第21回研究発表会. 西東京, 1月. [講演要旨集 2007; 29]

薬理学講座第1

教授: 川村 将弘 内分泌薬理学
 教授: 堀 誠治 感染化学療法学, 神経薬理学
 講師: 中道 昇 内分泌薬理学, 臨床薬理学
 講師: 大野 裕治 内分泌薬理学
 (DNA 研究所)

研究概要

I. ウシ副腎皮質細胞における ACTH 受容体と ATP 受容体との相互作用に関する研究

細胞外の ATP および UTP は, 細胞膜に局在する P2 受容体に作用し, 種々細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。P2 受容体は, イオンチャネル内臓型の P2X と G タンパク共役型の P2Y に大別される。P2Y は少なくとも 7 つのサブタイプを持っている。我々はウシ副腎皮質束状層細胞 (bovine adrenocortical fasciculate cell: BAFC) において, 糖質コルチコイド産生を促進する, Gq と共役した P2Y2 の存在を認めたので, その糖質コルチコイド産生機構における生理的役割について検討を行っている。そして, ATP が副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の糖質コルチコイド産生および cAMP 産生促進作用を増強することを見出した。ATP は P2Y2 以外に cAMP 産生を促進する Gs と共役した未知の P2Y 受容体とも結合し cAMP 産生を促進するので, Gq と共役している P2Y2 のみと結合する UTP の ACTH による cAMP 産生に対する影響を検討したところ, UTP もまた ATP と同様に増強的に作用した。P2Y2 は Gq を介して IP3 産生を刺激し, 細胞内小胞体の Ca²⁺ の枯渇を引き起こし, その結果細胞外からの Ca²⁺ 流入を促進する。したがって, UTP の ACTH 誘発 cAMP 産生増強作用の一つとしては, 細胞内への Ca²⁺ 流入の増加が考えられるが, 細胞外に比較的低濃度の Ca²⁺ の存在があれば, 十分な増強効果がみられるので, この仮説は可能性が少ない。一方, 近年, Gq の $\beta\gamma$ サブユニットのアデニル酸シクラーゼ活性調節への関与が報告され始めている。したがって, P2Y2 に共役した Gq から遊離した $\beta\gamma$ サブユニットが移動し Gs と相互作用を起こしている可能性がある。 $\beta\gamma$ サブユニットの移動にはアクチン細胞骨格の関与が考えられるので, アクチン細胞骨格の正常構造を乱すサイトカラシン D 等の, この UTP の増強作用への影響を検討したところ, これらの薬物は何ら影響を与えなかつ

た。すなわち、細胞骨格は関与していないことが示された。この結果から、 $\beta\gamma$ サブユニットの関与が否定されるわけではなく、今後抗体直接このサブユニットを阻害する方法等を用いて検討する必要がある。

II. 細胞内 Ca^{2+} 動態に関する研究

Ca^{2+} が種々の細胞・臓器における機能調節に重要な細胞内情報伝達物質として作用していることは良く知られている。我々は、数種の細胞および臓器における、 Ca^{2+} 動態に関与する因子およびその生理的意義について、主として蛍光性 Ca^{2+} 指示薬を細胞内に導入し、カルシウムイメージング装置を用いて研究を行っている。

1. BAFC における容量依存性 Ca^{2+} 流入 (store-operated calcium entry: SOCE) 機構に関する研究

細胞内への Ca^{2+} 流入機構の一つに、小胞体内の Ca^{2+} が枯渇することにより活性化される SOCE がある。我々は、BAFC には ATP および UTP により活性化される SOCE が存在し、それが糖質コルチコイド産生と連関していることを報告した。SOCE 機構の詳細は未だ明らかではないが、SOCE チャネルの候補として、幾つかの細胞種において transient receptor potential protein (TRP) が報告されている。そして、BAFC には TRP のサブタイプの内、TRPC が存在することが報告されているので、BAFC における SOCE への TRP の関与の有無について検討を行い、少なくとも BAFC において TRPC は SOCE チャネルではないことを明らかにした。

2. 3T3-L1 前駆脂肪細胞 (3T3-L1) における SOCE に関する研究

3T3-L1 は脂肪細胞への分化の機序の研究に良く用いられている。3T3-L1 の脂肪細胞への分化に影響を与える因子の一つに Ca^{2+} がある。 Ca^{2+} は分化開始初期には抑制的に、分化の後期には促進的に作用するといわれている。我々はこの細胞株における Ca^{2+} 動態を検討することは、脂肪細胞への分化機構を解明する上で重要であると考え研究を行っている。その結果、未分化 3T3-L1 には $\text{PGF}2\alpha$ により惹起される SOCE が存在することが判明したが、SOCE 機構については不明であった。そこで、アクチン細胞骨格の正常構造を乱す、サイトカラシン D 等の影響を検討したところ何ら影響を与えなかった。昨年度 BAFC においては、これらの薬物が SOCE を抑制することを報告したが、未分化 3T3

-L1 においては、BAFC とは異なった機序により SOCE が活性化することが示された。

3. イヌ正常遠位尿細管細胞 (MDCK 細胞) における細胞内 Ca^{2+} 動態に関する研究

腎尿細管上皮細胞では Ca^{2+} は管腔側から基底膜側へ輸送されると共に、細胞内情報伝達物質として重要な役割を果たしている。したがって、膵臓の発症機序等の解明には本細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態について検討することは重要であるが、知見は少ない。そこで、モデル細胞として MDCK 細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態を観察したところ、細胞外 Ca^{2+} の有無にかかわらず自発的カルシウムオシレーションがみられた。このオシレーションは IP3/リアノジン受容体を介する小胞体からの Ca^{2+} の放出機構が関与していることを明らかにした。また、プロベネシドによりこの自発的カルシウムオシレーションが抑制されることを見出し、その機序の検討を行っている。

4. 細胞外 ATP による海馬アストロサイトのカルシウムオシレーション調節機構の解析

中枢神経系の非興奮性細胞であるグリア細胞のアストロサイトが、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伝播していくカルシウムウェーブを引き起こすことは良く知られている。しかしながら、その生理的役割については未解明である。そこで、我々はラット海馬スライス培養標本を用いてカルシウムイメージングを行うことにより、海馬アストロサイトの自発的カルシウムオシレーションに対する細胞外 ATP の作用について検討した。ATP はアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度を一過性に上昇させた後、自発的カルシウムオシレーション頻度を有意に増加した。自発的カルシウムオシレーション頻度増加は ATP がアデノシンに加水分解後活性化されるアデノシン A2B 受容体により引き起こされていた。すなわち、細胞外 ATP が ATP 受容体およびアデノシン受容体の二つの異なる受容体を活性化することにより、アストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度およびアストロサイトの自発的カルシウムオシレーションの頻度調節を行っていることが示唆された。

III. キノロン系抗菌薬 (キノロン薬) の非抗菌作用に関する研究

1. キノロン薬の痙攣誘発作用と非ステロイド薬との薬物相互作用に関する研究

これまでキノロン薬が痙攣誘発作用を持ち、かつある種のキノロン薬は非ステロイド薬との併用で痙攣誘発作用が増強されることを明らかにしてきた。

今回は、呼吸器感染症原因菌に強い抗菌活性を有する、5種類のレピラトリーキノロン (RQ) の痙攣誘発作用について、マウス脳室内投与により検討した。その結果、各 RQ 薬の痙攣誘発作用の強さには薬物間で差があるが、非ステロイド薬との相互作用は認められなかった。

2. キノロン薬の腸管吸収に関する研究 (共立薬科大学実務薬学講座との共同研究)

キノロン薬の腸管からの吸収における薬物相互作用、特に金属イオンとの相互作用が問題となっている。今回、その評価を *in vitro* で行う事のできるラット反転腸管を用いた実験系を確立した。この系を用いて、吸収の態度が、各キノロン薬により異なり、かつ金属イオンによる吸収阻害の強さにも差のあることをみいだした。

IV. テオフィリンの副作用および抗炎症作用に関する研究

1. テオフィリン誘発痙攣に関する研究

テオフィリンの重大な副作用の一つに痙攣誘発があることは良く知られているが、その発現機序については不明である。マウス皮下にテオフィリンを大量投与すると、投与量依存的に痙攣が誘発された。痙攣誘発に関与する化合物を検討する目的で、テオフィリンおよびその代謝産物をマウス脳室内に投与し痙攣誘発活性を検討した。その結果、代謝産物である1-メチルキサンチンが、テオフィリン自身よりも非常に強い痙攣誘発作用を持つことが判明した。すなわち、テオフィリン投与による痙攣誘発には、その代謝産物が強く関与している可能性が示唆された。

2. テオフィリンの抗炎症作用に関する研究 (共立薬科大学実務薬学講座との共同研究)

テオフィリンの抗炎症作用機序を、ラット足蹠カラゲニン誘発浮腫を指標として検討した。テオフィリンは投与量依存的にカラゲニン浮腫を抑制したが、その代謝産物ではその効果は認められなかった。テオフィリンの浮腫抑制効果はグルココルチコイド受容体拮抗薬投与により抑制された。したがって、テオフィリンには抗炎症作用があり、その作用発現にはグルココルチコイド受容体が関与している可能性が示された。

V. 心血管作動物質に関する研究

これまで、ラット新生仔より得た初代培養心筋細胞を用いて、ウロコルチンをはじめとする、各種心血管作動物質の作用およびその機序を検討してき

た。一方、臨床における検討においては有意な作用が認められるにもかかわらず、単独培養心筋細胞を用いて検討すると、軽微な作用しか認められない物質も存在する。したがって、*in vivo* の状態に近似した環境を模した心筋細胞・非心筋細胞共培養計を構築して検討した。その結果、心臓から分泌される心房性ナトリウム利尿ペプチドの分泌様式が一部変化する可能性を示唆する結果を得た。また、マウス心房細胞由来の細胞株である HL-1 細胞を用いて、ウロコルチンおよびその関連物質受容体についての検討を開始した。

VI. 落針式血液専用粘度計の臨床試験

虚血性心疾患の発症と血液粘度との間には密接な関係があるといわれているが、血液粘度を迅速かつ簡便に測定できる機器はこれまで市販されていなかった。しかしながら、関西大学環境都市工学部、独協医大法医学教室との共同研究により開発された針の落下により血液粘度を短時間・高精度で測定できる血液専用粘度計が開発された。そこで、この粘度計が実用化できるかどうかについて、成人ボランティア血液を対象とした性能試験を行っている。その結果、抗凝固処理の有無により、明確に粘度の差異が認められた。現在、血液凝固能の充進を含めて、血液流動性に影響を与える要因を検索している。

「点検・評価」

1. 教育

講師以上は全員、講義・薬理学実習および症候学演習に参加している。また、助手および大学院生は薬理学実習に参加している。川村は教学委員長、教育センター長、医学総論および基礎医科学 II コース責任者、同コースのユニット、生体と薬物、生殖器系、内分泌系の責任者をつとめた。堀はカリキュラム委員、臨床基礎医学 II コース責任者、コース基礎医科学 II・機能系実習、コース臨床基礎医学 II のユニット、細菌・真菌と感染、感染・免疫テュートリアル責任者をつとめた。また、基礎医科学 II 総合試験委員、基礎医科学 II 口頭試験委員長、臨床基礎医学 II 総合試験委員、臨床基礎医学 II 口頭試験委員をつとめた。薬理学実習に関しては長年の積み重ねにより *in vitro*, *in vivo* 共に充実した実習になっていると思っている。

2. 研究

薬理学講座は内分泌薬理学を中心に研究を行っている。特に、副腎皮質細胞の機能調節において Ca^{2+} が cAMP と共に重要な役割を果たしているこ

とを証明してきた。近年は副腎皮質細胞における Ca^{2+} 動態について研究を行っており、糖質コルチコイド産生を刺激する ATP 受容体とそれを介する容量依存性 Ca^{2+} 流入の存在を見つけその機構について研究を行っている。また、ATP 受容体と ACTH 受容体との相互作用機序に関する研究については、BES 発生のため今年も屠畜当日に副腎組織がもらえず、やむを得ず、冷蔵庫に一晩保存した組織を用いて副腎皮質細胞を採取しているため良質の細胞がなかなか採れなかったが、その解決策を見出し現在は比較的順調に研究が行われている。また、研究対象に 3T3-L1 脂肪前駆細胞を加え、1名の大学院生がその細胞内 Ca^{2+} 動態の研究を行っている。その結果、本細胞に容量依存性 Ca^{2+} 流入機構が存在することを見つけ、脂肪細胞への分化と Ca^{2+} 流入との関係についての研究をはじめた。そして、腎臓・高血圧内科との共同研究として、膿胞腎の発症機序解明のため、腎尿細管上皮細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態の研究を1名の大学院生が行っている。また、1名の助手には、脳アストロサイトにおける、細胞内 Ca^{2+} 動態の研究を進めてもらっている。以上のように、最近では種々細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態の研究を中心に行っている Ca^{2+} 動態に関する研究は、先年購入してもらったカルシウムイメージング装置を中心に行っている。

また、最近注目されている、キノロン系抗菌薬の非抗菌作用について、共立薬科大学実務薬理学講座との共同研究を行っているが、興味ある結果を得ている。

研究に関係した委員会関係では、川村は、東京慈恵会医科大学雑誌編集委員長、J.M.J 編集委員、堀が学術情報センター図書館委員、実験廃棄物処理委員、全学放射線安全委員をつとめ、大野は遺伝子組換え実験安全対策委員を、池田助手は動物実験委員、アイソトープ研究運営委員をつとめた。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Hori S, Kizu J (Kyoritsu Univ of Pharmacy), Kawamura M. Effect of fluoroquinolones on plasma glucose levels in fasted and glucose-loaded mice. *J Infect Chemother* 2006; 12(2): 109-11.
- 2) 池田恵一, 東條克能, 田嶋尚子, Claycomb WC (LSU), 川村将弘. 炎症刺激と HL-1 心筋細胞からの Urocortin 分泌についての検討. *ACTH RELATED PEPTIDES* 2006; 17: 47-50.

II. 総説

- 1) 堀 誠治. 適応外使用のエビデンス 承認用法・用量とその問題点—抗菌薬. *EBM ジャーナル* 2006; 7(3): 436-9.
- 2) 堀 誠治. 適応外使用のエビデンス 抗菌薬の新しい作用—マクロライド薬を中心に. *EBM ジャーナル* 2006; 7(3): 460-5.
- 3) 堀 誠治. ニューマクロライド系抗菌薬の現状における安全性評価. *新薬と臨* 2006; 55(12): 1860-6.
- 4) 堀 誠治. レスピラトリーキノロンの安全性—痙攣, 低血糖, QT 延長を中心に—. *化療の領域* 2007; 23(1): 133-40.

III. 学会発表

- 1) 堀 誠治. モンテカルロ・シミュレーションからみた腎機能低下時の抗菌薬投与法の検討. 第54回日本化学療法学会総会. 京都, 5月. [日化療会誌 2006; 54(Suppl A): 156]
- 2) 堀 誠治. (シンポジウム)PK/PD 理論シンポジウム 抗菌薬開発における PK/PD 臨床ガイダンスの役割. 第54回日本化学療法学会総会. 京都, 5月.
- 3) Ikeda K, Tojo K, Tokudome G, Ishikawa M, Hosoya T, Tajima N, Nakao K (Kyoto Univ), Kawamura M. Change in secretory pattern of natriuretic peptides from cultured rat cardiac myocytes (MCs) in MCs/cardiac non-myocyte (NMCs) co-culture system in the number of NMCs-dependent manner. The 88th annual meeting of the Endocrine Society. Boston, June.
- 4) 川村将仁, 川村将弘. 細胞外 ATP による海馬アストロサイトにおけるカルシウム波伝播の調節. 第29回日本神経科学大会. 京都, 7月.
- 5) 池田恵一, 大坪主税, 宇田川崇, 川村将弘. サイトカインによるマウス心筋細胞株 HL-1 からの urocortin 分泌. 第115回日本薬理学会関東部会. 高崎, 9月.
- 6) 川村将仁, 川村将弘. 細胞外 ATP による海馬アストロサイト自発的カルシウム・オシレーションの頻度調節. 平成18年度生理学研究所研究会 Neuro-glio-vascular interaction におけるプリン作動性シグナリングの病態生理的機能. 岡崎, 9月.
- 7) 宇田川崇, 花岡一成, 大坪主税, 細谷龍男, 川村将弘. MDCK 細胞における自発的 calcium oscillation の観察. 第14回膿胞性腎疾患研究会. 東京, 9月.
- 8) 堀 誠治, 川村将弘. Respiratory Quinolones の痙攣誘発作用と薬物相互作用に関する研究 Tosufloxacin を中心に. 第53回日本化学療法学会東日本支部総会. 東京, 10月.
- 9) 堀 誠治. (教育セミナー)PK/PD からみた注射用カルバペネム薬の有効性と安全性. 第53回日本化学療

法学会東日本支部総会。東京，10月。

- 10) 川村将仁, 大坪主税, 宇田川崇, 池田恵一, 中道 昇, 堀 誠治, 川村将弘. 細胞外 ATP による海馬アストロサイト自発的カルシウム・オシレーションの調節機構. 第123回成医会総会。東京，10月。
- 11) 池田恵一, 東條克能, 石川匡洋, 徳留悟朗, 細谷龍男, 田嶋尚子, 中尾一和 (京大), 川村将弘. 心筋細胞・非心筋細胞共培養下におけるナトリウム利尿ペプチドの分泌様式の変化について. 第10回日本心血管内分泌代謝学会。福井，11月。
- 12) Udagawa T, Hanaoka K, Otsubo C, Hosoya T, Kawamura M. Probenecid inhibits spontaneous calcium oscillations in MDCK cells. The American Society of Nephrology, Renal Week 2006. San Diego, Nov.
- 13) Matsumoto M¹⁾, Kurihara Y¹⁾, Ogino H¹⁾, Yamakami J¹⁾, Kizu J¹⁾ (Kyoritsu Univ of Pharmacy), Hori S, Kawamura M. *In vitro* evaluation in intestinal absorption of fluoroquinolones. 10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases. Fukuoka, Dec.
- 14) Hori S, Kurihara Y¹⁾, Kizu J¹⁾ (Kyoritsu Univ of Pharmacy), Kawamura M. Convulsant activity of respiratory quinolones and their drug interaction with anti-inflammatory drugs. 10th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases. Fukuoka, Dec.
- 15) 堀 誠治, 木津純子(共立薬大), 川村将弘. テオフィリンおよびその代謝産物の痙攣誘発作用に関する研究. 第127年会日本薬学会。富山，3月。
- 15) 渡辺茂和¹⁾, 土田沙織¹⁾, 安江麻美¹⁾, 山上 潤¹⁾, 土屋雅勇¹⁾, 木津純子¹⁾ (共立薬大), 堀 誠治. テオフィリンおよびテオフィリン代謝産物の抗炎症作用に関する研究. 第127年会日本薬学会。富山，3月。
- 16) 川村将仁, 大坪主税, 宇田川崇, 川村将弘. 海馬アストロサイトにおけるアデノシン受容体の活性化を介した自発的カルシウム・オシレーションの頻度増加. 第80回日本薬理学会年会。名古屋，3月。[J Pharmacol Sci 2007; 103(Suppl I) : 138]

IV. 著 書

- 1) 堀 誠治. 第18章 抗菌薬の体内動態・臓器移行性. 河野 茂, 平瀨洋一編. ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド. 東京: 文光堂, 2006. p. 590-8.
- 2) 堀 誠治. 感染症学総論 VII. 抗菌薬 副作用, 安全性 神経障害. 日本臨床 (65巻増刊2: 新感染症学 上 新時代の基礎・臨床研究). 大阪: 日本臨床社, 2007. p. 587-95.

V. その他

- 1) 木津純子(共立薬大), 堀 誠治. 子どもの薬安心マニュアル 体の中での薬の働き 大人と子どもの違い. チャイルドヘルス 2006; 9(6) : 388-92.
- 2) 堀 誠治, 戸塚恭一, 斎藤 篤, 相沢一雅, 岩田 敏, 小野 真, 鍛冶善夫, 古賀哲文, 佐々木一尋, 佐々木 繁, 佐藤淳子, 谷川原祐介, 千葉俊博, 二木芳人, 野澤健二, 拝郷久満, 平岡聖樹, 宮崎修一(日本化学療法学会 PK/PD 検討委員会). 臨床 PK/PD ガイダンス (案). 日化療誌 2007; 55(1) : 24-8.