

## 1 1 . がんの全身性転移におけるレクチン様酸化 LDL 受容体-1 の役割

瀧田守親、出口敦子、丸義朗  
(薬理学)

〔目的〕 レクチン様酸化 LDL 受容体 (lectin-like oxidized LDL receptor-1; LOX-1)は酸化 LDL を認識する C 型レクチン受容体の一つであり、血管内皮細胞やマクロファージなどに発現して、動脈硬化の増悪化に関与することが知られている<sup>1)</sup>。近年、LOX-1 はがんの病態にもその関与が示唆されているが、がんの全身性転移における宿主 LOX-1 の役割は未だ不明である。そこで、我々は LOX-1 遺伝子欠損 (LOX-1-KO)マウスにマウス悪性黒色腫 B16 メラノーマ細胞を移入して、がんの全身性転移モデルを作製し、がんの全身性転移における宿主 LOX-1 の役割を調べた。

〔方法〕 がんの全身性転移モデルはマウス B16 メラノーマ (B16-BM)細胞を LOX-1-KO マウスの尾静脈に移入して作製した。がん細胞の移入から 18 日後に肺、肝臓、腎臓、大腿骨及び脛骨を摘出し、臓器表面における黒色の転移結節を計数して転移を定量化した。

〔結果〕 野生型マウスでは B16 細胞の移入により、肺、肝臓、腎臓、大腿骨遠位部、脛骨近位部に著しい黒色の転移巣の形成が認められた。一方、LOX-1-KO マウスでは野生型マウスに比べ肝臓及び腎臓における転移結節数が増加していたが、肺及び大腿骨・脛骨の転移結節数は変わらなかった。

〔考察〕 LOX-1-KO マウスではがんの肝臓及び腎臓への転移が野生型マウスに比べ亢進していることから、宿主の LOX-1 ががんの肝臓及び腎臓への転移を抑制していることが示唆された。

〔結論〕 宿主の LOX-1 はがんの肝臓・腎臓への転移を抑制する。

〔文献〕

1) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. (1997) Nature 386(6620): 73-77

## 1 2. 神経障害性疼痛の基盤となる中枢神経可塑性機構

植田禎史、宮田麻理子

(生理学 (神経生理学分野))

〔目的〕 末梢神経が損傷すると、神経障害性疼痛と呼ばれる難治性の疼痛が引き起こされる。この疼痛発症には末梢神経の損傷で誘起される中枢神経回路構造と機能の可塑的变化が関与すると考えられてきた。体性感覚の伝導路では、末梢からの感覚情報が脳皮質へ伝わる際には必ず視床という構造を経由する。しかし、これまでの研究では末梢神経損傷が視床脳皮質投射回路にどのような可塑的变化を引き起こすかについてはよくわかっていなかった。今回、脳皮質に痛みを伝える視床脳皮質投射回路に着目し、末梢神経損傷に伴う回路形成や視床脳皮質投射ニューロンの発火活動性変化を調べた。

〔方法〕 実験はマウスのヒゲ体性感覚伝導路を対象にした。ヒゲの触圧覚は三叉神経節ニューロンから末梢側に伸びる軸索である眼窩下神経を伝わり、中枢側へ伸びる軸索を介して脳幹の三叉神経主知覚核へ入力される。脳幹からは対側の視床後内側腹側核 (VPM 核) に投射 (内側毛帯線維) が起こり、VPM 核の視床皮質投射ニューロンの軸索は脳皮質一次体性感覚野へ送られる。末梢神経損傷モデルとして、眼窩下神経を切断すると、神経切断後 1 週間で VPM 核の視床皮質投射ニューロンに入力する内側毛帯線維のシナプス改編が生じる<sup>1)</sup>。また、同じタイミングで神経障害性疼痛であるアロディニア様の疼痛が生じるようになり、マウスは通常は痛みを覚えない程度の弱い皮膚の機械刺激に対しても痛みの指標となる逃避行動を示すようになる<sup>2)</sup>。この神経障害性疼痛モデルマウスの VPM 核において、視床皮質投射ニューロンの発火活動性がどのように変化するかについて、電気生理学的手法を用いて詳細に調べた。

〔結果〕 視床皮質投射ニューロンの発火活動性はシナプス後部である脳皮質の興奮性を左右する。視床皮質投射ニューロンは持続的な発火と高頻度な活動電位の連発とそれに続く不応期が特徴的なバースト発火の二つの発火モードを示す。視床の急性スライス標本で、単一の視床皮質投射ニューロンからのホールセル・パッチクランプ記録で膜電位変動を調べたところ、眼窩下神経切断後の VPM 核視床皮質投射ニューロンではバースト発火が増強されていることがわかった。ニューロンの膜特性をさらに詳細に調べた結果、膜電位は過分極し、過分極で開くカチオンチャンネル (HCN チャンネル) の電流は減少していた。一方、視床皮質投射ニューロンのバースト発火に寄与することが知られている低閾値活性型の電位依存性カルシウムチャンネルの電流には変化がなかった。

〔考察〕 末梢神経損傷マウスの VPM 核では低閾値型の電位依存性カルシウムチャンネルの電位依存性には大きな変化はなかったが、ニューロンの膜電位は過分極化するため、チャンネルの駆動力自体は増強され、脱分極が加速されると考えられる。また、HCN チャンネルは過分極で開いて細胞内に陽イオンを流入させることで活動電位の再分極を促進し、リズムに繰り返される活動電位の発生に寄与する。このチャンネル電流が減少することは、脱分極状態にあっても活動電位が徐々に発生しにくくなると予想される。これらの膜特性を担うチャンネル活動の変化が、視床皮質投射ニューロンのバースト発火増強に貢献する可能性が示唆された。

〔結論〕 末梢神経損傷は視床の脳皮質投射ニューロン（視床皮質投射ニューロン）におけるイオンチャンネルの働きを変化させることで膜特性を変え、バースト発火を増強させることがわかった。

〔文献〕

- 1) Takeuchi Y., Yamasaki M., Nagumo Y., et al. (2012) *J. Neurosci.* 32(20) : 6917-6930
- 2) Takeuchi Y., Osaki H., Yagasaki Y., et al. (2017) *eNeuro.* 4(2) : ENEURO.0345-16.2017

〔発表論文〕

- 1) Osaki H., Kanaya M., Ueta Y., and Miyata M. (2022) Distinct nociception processing in the dysgranular and barrel regions of the mouse somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 13(1): 3622

〔学会発表〕

- 1) Ueta Y. and Miyata M. Peripheral nerve injury facilitates burst firing of thalamocortical neurons via GABAergic tonic inhibition dependent on microglial activity. *Neuro2022*（第45回日本神経科学大会／第65回日本神経化学会大会／第32回日本神経回路学会大会）、宜野湾、2022/7
- 2) Ueta Y. Peripheral nerve injury induces synaptic and intrinsic plasticity in the somatosensory thalamus underlying ectopic mechanical hypersensitivity. *Development and Plasticity of the Brain Shima*, 2022/10
- 3) Ueta Y. and Miyata M. Synaptic and intrinsic plasticity mechanisms for peripheral nerve injury-induced reorganization of input and output functions in the somatosensory thalamus. *IRCN-iPlasticity International Symposium*, Tokyo, 2023/1
- 4) Ueta Y. and Miyata M. Synaptic and intrinsic plasticity mechanisms for peripheral nerve injury-induced reorganization of input and output functions in the somatosensory thalamus. 第100回日本生理学会大会、京都、2023/3

### 1.3. 線虫における全身性 RNA 干渉の解析

出嶋克史、吉田慶太、末廣勇司、吉名佐和子、三谷昌平  
(生理学 (分子細胞生理学分野))

〔目的〕 1998年に線虫で初めて RNA 干渉が記載された時に、既に RNA 干渉は組織細胞を超えて全身に拡散する現象が記載されている<sup>1)</sup>。この現象に関与する分子は *sid-1* 遺伝子が細胞外の dsRNA を取り込むために必要であることなど、重要な発見はなされたが<sup>2)</sup>最近の進捗は捗々しくない。我々は、核酸医薬の DDS などに有用な情報が得られる可能性を考え、線虫の全身性 RNA 干渉に関わる分子とその仕組みを解析してきた。

〔方法〕 我々は既に発表している全身性 RNA 干渉に関わる *rsd-3* 変異体 (dsRNA の取り込み効率の低下を示す) を用いて、そのサプレッサーをスクリーニングした。*rsd-3* 変異体では RNA 干渉は効果が低下しているが、完全になくなる訳ではなく、全身性 RNA 干渉に必須分子ではないため、RSD-3 と拮抗する分子の変異体によって全身性 RNA 干渉が増強する可能性を想定した。*rsd-3* 変異体バックグラウンドに GFP と RFP をトランスジェニック発現する個体を作成した。このストレインに EMS で変異導入を行い、その子孫に GFP に対する RNA 干渉を行い、GFP 蛍光が消失するが、RFP 蛍光は消失しない (トランスジーンは機能している) 個体をスクリーニングした。得られた変異体は戻し交配後に全ゲノム配列解読を行い、変異部位の決定を行なった。

我々は、RNA 干渉に関わる全く新しい分子のスクリーニングも行なった。上記のように、全身性 RNA 干渉に関わる分子の解析が遅れている理由は遺伝子機能の冗長性によって表現型が中間的になっているためである。我々は、全身性 RNA 干渉の表現型が中間的な変異体を分離した。*bli-3* に対する RNA 干渉 (強度が半定量的に視認可能) を行なってスクリーニングを行なった。分離した変異体は戻し交配後に全ゲノム配列解読を行い、変異部位の決定を行なった。

〔結果〕 前者のスクリーニングで *zipt-9* 遺伝子その他の候補遺伝子を得た。ZIPT-9 分子はエンドソームで発現している亜鉛トランスポーターであり、細胞質の亜鉛濃度の増加を起こす。*zipt-9* 変異体では、*rsd-3* 変異体との二重変異体で全身性 RNA 干渉の効果が向上した。また、*zipt-9* 単独変異体では全身性 RNA 干渉が野生型に比べて増強していた。ZIPT-9 は全身性 RNA 干渉に負の効果を持っており、この分子の機能低下が全身性 RNA 干渉の効果の増強として表現型を示した。*zipt-9* 変異体と拮抗する表現型を呈する既知の変異体を探索することで、効果の弱い *sid-3* や *sid-5* が見つかった。これらは *rsd-3* 変異体と二重変異体にすることで、全身性 RNA 干渉がほぼ消失したことから、RSD-3 分子は SID-3 や SID-5 分子と冗長的に作用していたことが分かった。これらの変異体から細胞間での dsRNA 伝播に関わる主要経路が解明できた。

後者のスクリーニングで、新規に *rexd-1* 遺伝子、*tbc-3* 遺伝子が見つかった。これらの変異体は単独では表現型が不完全であるが、既知の変異体 *sid-5* との三重変異体では、ほぼ全身性 RNA 干渉が起らなくなる。これらの変異体では、dsRNA の腸管細胞からの分泌が低下していることが分かった。dsRNA の分泌には主として3種の経路があると考えられる。

〔考察〕 我々は順遺伝学的手法により全身性RNA干渉に影響する分子の発見を行なった。全身性RNA干渉に関わる分子群は冗長的に働いており、従来の研究でその全貌が解明されていないかったのは、中間的な表現型を呈する変異体をスクリーニングすることは技術的に難易度が高いためであると思われる。これら以外にも同様の表現型解析により多くの全身性 RNA 干渉の効果を減弱させる分子あるいは増強する分子が見つかっており、分子機序の解析中である。

〔結論〕 全身性 RNA 干渉に関わる分子の多くが我々の方法で解明可能である。

〔文献〕

- 1) Fire A, Xu S, Montgomery MK et al.(1998) Nature 391(6669):806-11.
- 2) Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. (2002) Science. 295(5564):2456-9.  
doi: 10.1126/science.1068836. Epub 2002 Feb 7. PMID: 11834782.

〔発表論文〕

- 1) Yoshina S, Mitani S. (2022) MicroPubl Biol. 2022: 10.17912/micropub.biology.000571.
- 2) Yoshina S, Izuhara L, Kamatani N et al. (2022) J Physiol Sci. 72(1):28.
- 3) Hori S, Mitani S. (2023) MicroPubl Biol. 2023: 10.17912/micropub.biology.000754.
- 4) Tabara H, Mitani S, Mochizuki M et al. (2023) EMBO J. 42(11):e105002.
- 5) Dejima K, Imae R, Suehiro Y et al. (2023) iScience. 26(6):106930.
- 6) Zhang H, Zhu Y, Suehiro Y et al. (2023) Proc Natl Acad Sci U S A. 120(36):e2302490120.
- 7) Higuchi S, Suehiro Y, Izuhara L et al. (2023) BMC Cancer. 30;23(1):811.
- 8) Yoshida K, Suehiro Y, Dejima K et al. (2023) iScience. 2023 26(10):108067.
- 9) Yoshina S, Izuhara L, Mashima R et al. (2023) J Physiol Sci. 73(1):28.
- 10) Gengyo-Ando K, Tateyama M, Mitani S et al. (2023) MicroPubl Biol. 2023: 10.17912/micropub.biology 001052.

#### 1 4. ヒト肺胞上皮腺がん細胞 A549 を用いた銀ナノ粒子とサルブリナル同時処理による小胞体ストレス応答の増大とオートファジーの破綻

宮山貴光、松岡雅人

(衛生学公衆衛生学 (環境・産業医学分野))

〔目的〕 銀ナノ粒子の医療応用が期待されていることから、有効性と安全性の確保のため、細胞死誘導メカニズムの全容解明が待たれている。これまで、ヒト、マウス、ラット由来の肺がん細胞を用いて、銀ナノ粒子の細胞死を評価した結果、リソソームに蓄積した銀ナノ粒子は、内腔の pH を上昇してオートファジーの破綻を引き起こし、細胞死を誘導することを明らかにした。本研究では、肺胞上皮腺がん細胞 A549 を用いて、銀ナノ粒子による ER ストレス/オートファジーの分子基盤を解析した。

〔方法〕 肺胞上皮腺がん細胞 A549 に、銀ナノ粒子(0 - 200  $\mu\text{g Ag/mL}$ )と eIF2 $\alpha$  の持続的リン酸化を誘導するサルブリナル 20  $\mu\text{M}$  を 24 時間処理した。細胞死は MTT assay で評価した。リソソームとオートファゴソームを LysoTracker と DAPI を用いてそれぞれ蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡とライブセルイメージャーでそれぞれ観察した。小胞体ストレス/オートファジー関連因子の定量は western blotting および q-PCR で評価した。

〔結果〕 銀ナノ粒子処理濃度依存的に細胞死は増大した。無毒性用量として銀ナノ粒子の終濃度 50  $\mu\text{g Ag/mL}$  およびサルブリナルの終濃度 20  $\mu\text{M}$  の併用条件において細胞死は有意に増大した。このとき、PERK 経路に関わる小胞体ストレス応答の因子、すなわちリン酸化 eIF2 $\alpha$ 、GRP78、CHOP の発現レベルもそれぞれ増大した。共焦点レーザー顕微鏡とライブセルイメージャーの観察により、細胞内のオートファゴソームの蓄積を認めるとともに、オートファジーの関連因子である p62 と LC3B-II の発現レベルも銀ナノ粒子とサルブリナルの併用下で銀ナノ粒子単独処理よりも増大した。

〔考察〕 銀ナノ粒子とサルブリナルの併用により、それぞれの単独処理と比較して、小胞体ストレス応答の PERK 経路の増大とオートファジーの破綻を誘導し、細胞死を増大させるものと考えられた。

〔結論〕 本研究は、小胞体ストレス/オートファジー機構を介した銀ナノ粒子の細胞死決定メカニズム解明の一助となる。

〔学会発表〕

- 1) Miyayama, T., Matsuoka, M., Combined use of AgNPs and salubrinal promotes cell death by modulating endoplasmic reticulum stress/autophagy in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASITOX-X), Taipei, 2023/7
- 2) 宮山貴光、松岡雅人、銀ナノ粒子による細胞死の誘導メカニズム、第 93 回日本衛生学会学術総会、東京、2023/3



## 15. カドミウムのヒト近位尿細管細胞における毒性発現機構

藤木恒太<sup>1</sup>、田邊賢司<sup>2</sup>、菅谷健<sup>3</sup>、松岡雅人<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>衛生学公衆衛生学 (環境・産業医学分野)、<sup>2</sup>総合医科学研究所、<sup>3</sup>聖マリアンナ医科大学医学部腎臓・高血圧内科)

〔目的〕 カドミウム曝露により、腎近位尿細管細胞において細胞死が誘導されるが、その分子機構は未だ解明されていない。我々はその分子基盤を明らかにすべく解析を行っており、現在、不死化ヒト近位尿細管由来上皮細胞 (HK-2 細胞) を用いてカドミウム曝露依存的尿細管細胞死における接着斑の役割について解析を行っている。

接着斑は、細胞が細胞外基質との接着を認識し、応答するために形成される構造体である。細胞外基質と接着分子インテグリンが結合すると、チロシンキナーゼ FAK (focal adhesion kinase) は Y397 を自己リン酸化 (P-FAK Y397) し、活性化する。また、FAK はチロシンキナーゼ Src などによって Y576、Y861、Y925 がリン酸化され (P-FAK Y576、P-FAK Y861、P-FAK Y925)、完全な活性化に至る。活性化した FAK はアダプター因子 Paxillin の Y31 および Y118 をリン酸化する (P-Paxillin Y31、P-Paxillin Y118)。リン酸化された Paxillin は様々な細胞骨格制御因子と結合することが可能となり、アクチン骨格系などを介して細胞の遊走・形態を調整する。一方、FAK は Akt や MAPK の活性を調整することも知られている。我々は近年カドミウムに曝露された尿細管細胞では、Akt および MAPK が活性し、カドミウム曝露依存的な尿細管細胞死を制御することを見出したが、未だにカドミウム曝露下においてこの経路に関わる分子がどのようにして活性化するのかを明らかにしきれていない。我々は、接着斑がカドミウム曝露下の Akt および MAPK の活性化の制御に関わるのではないかと考え、その可能性について現在検討している。

〔方法〕 HK-2 細胞に塩化カドミウム (CdCl<sub>2</sub>) を 1~30 時間曝露し、細胞内シグナル伝達因子の挙動変化を解析した。細胞内の蛋白量は、回収した細胞抽出液を用いたウエスタンブロットにより検出した。また、接着斑およびアクチン繊維を可視化するために、抗 Paxillin 抗体、抗 P-Paxillin 抗体、抗 FAK 抗体、抗 P-FAK 抗体、抗 Integrin 抗体および Phalloidine-FITC、Phalloidine-Alexa647 を用いて染色し、蛍光顕微鏡 (総研機器: Ti2E) を用いて解析した。

〔結果および考察〕 カドミウム毒性に対する接着斑の役割を調べるため、まずカドミウム曝露下における FAK の活性および Paxillin のリン酸化状態の動態を検討した。その結果、カドミウム曝露後 6 時間をピークに P-FAK Y397 が上昇し、その後減衰することを確認した。また、P-Paxillin Y31 および Y118 もカドミウム曝露後 6 時間をピークに上昇し、その後減衰することを確認した。このことから、FAK はカドミウム曝露下において一過性に活性化し、それに伴い Paxillin のリン酸化も上昇したと考えられる。一方、P-FAK Y576、Y861、Y925 は、カドミウム曝露後 3-18 時間までコントロール細胞と比較し、常に増加している状態が維持されており、Paxillin のリン酸化の動態と一致しないことが分かった。このことから、カドミウム曝露下において、FAK は自身の活性に依存せず Src などによるリン酸化を受けていると考えられる。次に、カドミウム曝露下の細胞において、アクチン繊維および接着斑の局在変化を観察するため、Phalloidine および Paxillin、P-Paxillin (Y31、Y118)、FAK、P-FAK (Y397、

Y861、Y925)、Integrin 抗体で染色し、可視化した。その結果、アクチン繊維および Paxillin、P-Paxillin、FAK、P-FAK、Integrin 抗体で染色されるドットは、コントロール細胞では細胞内に多数存在するが、カドミウム曝露後 6 時間で細胞周囲に配置されるようになり、その後カドミウム曝露後 12 時間以降に出現する丸く収縮したような細胞では、概ね消失することがわかった。このことから、カドミウム曝露依存的に細胞内のアクチン骨格系および接着斑が局在変化すること、またカドミウム曝露が長時間持続するとアクチン繊維および接着斑形成が不良になることが明らかとなった。

〔結論〕 カドミウム曝露後 12 時間以降に出現する丸く収縮した細胞は、カドミウム曝露下において細胞が死ぬ過程に出現するものであり、その細胞ではアクチン骨格系および接着斑形成が不良であることが明らかとなった。このことから、接着斑およびアクチン骨格系は、カドミウムが細胞毒性を発揮するための標的構造体の一つであると考えられ、今後さらにその詳細を明らかにする必要がある。また、通常 Src および FAK は接着斑において相互に活性化しあうため、Src による FAK のリン酸化 (P-FAK Y576、P-FAK Y861、P-FAK Y925) は、FAK の活性化 (P-FAK Y397) 状態と相関性をもつ場合が多いが、カドミウム曝露下では、両者の間に明らかな相関性が見られなかった。一方、カドミウム曝露下の局在については、P-FAK Y397、P-FAK Y861、P-FAK Y925 はほぼ同様の動態を示した。今後、カドミウム曝露下において Src による FAK のリン酸化がどのように起きているのか、また、どのような意味をもつのかについても明らかにする必要がある。

〔学会発表〕

1) 令和 5 年度環境省「重金属などによる健康影響に関する総合的研究」研究発表会

## 16. 新機抗マラリア薬として期待される化合物 X の作用機序に関する研究

### 本間一

(衛生学公衆衛生学 (公衆衛生学分野グローバルヘルス部門))

〔目的〕 マラリアによる死者数は 2000–2019 年にかけて着実に減少してきていたが、COVID-19 に起因する医療サービスの崩壊に伴い、2019 年以降は上昇に転じた<sup>1)</sup>。マラリアは流行地において公衆衛生上の脅威であり続けている。抗マラリア薬による化学療法はマラリア治療の柱であるが、最も重篤な症状を引き起こす熱帯熱マラリア原虫において薬剤耐性株が出現することがマラリア制圧を困難にしている<sup>2)</sup>。既存の抗マラリア薬のほぼ全てについて耐性株が報告されており、耐性株にも効果を示す新規薬剤の開発が求められる。化合物 X は熱帯熱マラリア原虫に対して抗マラリア活性を示すことが見出されており、新規抗マラリア薬の候補として誘導体の開発が進められている。化合物 X は熱帯熱マラリア原虫が持つタンパク質 A やタンパク質 B への結合性が示唆されているが、作用機序はよくわかっていない。本研究では、CRISPR/Cas9 で作製したタンパク質 A と B のノックダウン株を用いて化合物 X の感受性試験を行った。

〔方法〕 glmS 配列はグルコサミン (GlcN) 存在下で自身を切断するリボザイムとして働く。glmS 配列を標的遺伝子の末端に挿入することで、培養液への GlcN の添加の有無により標的遺伝子の発現を RNA レベルで調節できるコンディショナルノックダウン (KD) の系が構築される。本研究では、CRISPR/Cas9 を用いて、タンパク質 A と B をコードする遺伝子の末端に glmS 配列を挿入した株をそれぞれ作製した。これらの株を 0–2.5 mM の GlcN を含む培地で 48 時間培養した後に化合物 X に曝露した。濃度を振った化合物 X を含む培地で KD 株を 72 時間培養した後に培養液を凍結・融解して細胞を溶解し、溶解液に含まれる DNA 量を SYBR Green I で染色してマルチプレートリーダー MD SpectraMax i3 で定量することで増殖を評価し、化合物 X に対する IC<sub>50</sub> 値を求めた。

〔結果〕 CRISPR/Cas9 で作製したタンパク質 A と B のそれぞれの KD 株と、それらの親株である野生株について、化合物 X に対する IC<sub>50</sub> 値を求めた。野生株では、培地に含まれる GlcN の濃度に関係なく、IC<sub>50</sub> 値は一定の値を示した。タンパク質 A と B の KD 株では、培地に含まれる GlcN の濃度が高い場合に GlcN を含まない場合と比べて IC<sub>50</sub> 値が統計学的に有意に上昇した。

〔考察〕 KD 株で IC<sub>50</sub> 値が上昇したことから、タンパク質 A と B は化合物 X が作用する標的であることが示唆される。しかし、IC<sub>50</sub> 値の上昇は限定的であったことから、化合物 X がもつ抗マラリア活性には他の作用も複合的に関わっていることが考えられた。

〔結論〕 化合物 X が持つ熱帯熱マラリア原虫への抗マラリア活性の一因として、タンパク質 A と B への作用が示唆された。

[文献]

- 1) World Health Organization. (2021) World Malaria Report 2021
- 2) Menard D and Dondorp A (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 7(7): 1-24

## 17. 浴槽内の水に存在するヒト DNA を用いた入浴時間の推定

町田光世、木林和彦  
(法医学)

〔目的〕 法医学では事件・事故の発生場所や死体が置かれていた場所の特定は重要な鑑定事項である。浴槽、プール、河川、海水浴場等の水中は溺水事故の発生場所であり、稀には死体投棄の場所にもなる。溺水患者が水中から救出され病院に搬送された場合等では溺水の発生場所の特定が必要である。水中と臓器中のプランクトンの種類から溺水場所を調べることがあるが、浴槽やプールの水にプランクトンは通常含まれていない。水中から死亡者や他者の DNA を検出すれば死亡場所や死亡状況の特定につながると予想される。本研究では入浴中に変化する 11 因子を経時的に調べ、入浴時間に関係する因子を多変量解析により検討した。

〔方法〕 11 名のボランティアが各自浴槽内に入浴し、入浴前、入浴 1 分、2 分、5 分、10 分後に採取した浴槽内の水 2 リットルをガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ過後のろ紙を細断後 QIAamp DNA Investigator kit で DNA を抽出した。ヒト DNA 量は Kapa hgDNA Quantification kit の 41 bp の DNA 濃度を基にして算出した後、DNA 分解度は 129 bp と 41 bp の DNA を定量し、129 bp:41 bp の比を計算した。抽出した DNA は AmpFISTR Identifiler Plus kit で増幅し STR 解析を行った。本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て実施した (2021-0007)。

〔結果〕 入浴時間とヒト DNA 量の関係は相関係数  $r=0.27$  で相関はなかったが、入浴時間と DNA 分解度との関係は相関係数  $r=0.69$  であり、入浴時間が長いほど分解されていない DNA が増加する傾向を示した。入浴時間と正しく検出された STR ローカス数の関係は相関係数  $r=0.56$  であり、入浴時間が長いほど正しく検出された STR ローカス数が増加する傾向を示した。特に入浴 5 分と 10 分では D19S433、D3S1358、D8S1179、D5S818 の 4 ローカスが増幅されやすく、D7S820、D18S51、CSF1PO、D2S1338 の 4 ローカスは増幅されにくい傾向がみられた。また、入浴時間とアレルピーク高の関係は相関係数  $r=0.691$  であり、入浴時間が長いほどアレルピーク高が高まる傾向を認めた。

〔考察〕 浴槽内の水に存在するヒト DNA の解析では、入浴時間が長いと各 STR ローカスの増幅傾向に差が生じるが、DNA 分解度や正しく検出された STR ローカス数、アレルピーク高からヒトが水中に浸かっていた時間の推定が可能と考えられた。

〔発表論文〕

- 1) 町田光世、木林和彦 (2023) 浴槽内の水に存在するヒト DNA を用いた入浴時間の推定、DNA 多型 vol. 31 (1): 89-91.

〔学会発表〕

- 1) 町田光世、木林和彦. 浴槽内の水に存在するヒト DNA を用いた入浴時間の推定、第 31 回日本 DNA 多型学会、金沢、2022/11.

## 18. LC-QTOF/MS による大麻由来のカンナビジオール オイルの高感度分析と毒性評価

中尾賢一朗、木林和彦  
(法医学)

〔目的〕 「カンナビジオール(CBD)オイル」は美容や健康補助食品として、あるいは電子タバコのリキッドとして輸入販売され、誰でも簡単に入手できる。CBD は大麻草の茎や種子に含まれるが、向精神成分であるテトラヒドロカンナビノール(THC)と違い、向精神作用がなく法規制されない成分である。しかし本研究者は実務において、CBD オイルから THC を検出した<sup>1)</sup>。現在流通している CBD オイルには様々な比率で THC と CBD が含まれているとみられ、その消費量は増加している<sup>2)</sup>。しかしながら THC の有害性の一つである潜在的な DNA 損傷作用に関する研究は遅れており、特に THC と CBD の含有比が 1 対 1 以外における脳への影響を調べた研究は少ない<sup>3)</sup>。そこでこの研究では、脳内薬物濃度(THC、CBD、THC の代謝物である THC-OH と THC-COOH)と脳細胞の DNA 損傷の有無を調べ、測定した薬物濃度と DNA 損傷度の関係を探る。今年度はコントロールマウスを作製した。

〔方法〕 6 週齢 ddY 系オスマウス (n=3) に、エタノール : Tween80 (界面活性剤) : 生理食塩水 = 1 : 1 : 18 の割合で混和したコントロール溶液を 1 日 1 回、5 日間連日腹腔内投与した。最後の薬物投与 120 分後にイソフルラン吸入による深麻酔下で開胸し、右心房切損による放血で安楽死後すぐに脳を採取した。脳は -80℃ で冷凍保存した。

〔今後の予定〕 マウスに THC 単独、CBD 単独及び任意の混合比で THC と CBD を混和させたものを投与し、液体クロマトグラム四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF/MS)を用いて脳内の THC、CBD、THC、THC-OH 及び THC-COOH を定量する。

〔文献〕

- 1) Ken-ichiro Nakao K., Tatara Y., and Kibayashi K. (2022) Res. Pract. Forens. Med. 65: 155-160
- 2) Madras BK. (2019) Neuropsychopharmacology. 44: 215-216
- 3) Withey SL., Bergman J., Huestis MA., et al. (2020) Drug Alcohol Depend. 213: 108129.

## 19. マウス外傷性脳損傷後の脳の遺伝子発現解析

島田亮、木林和彦  
(法医学)

〔目的〕 髄膜リンパ管は、脳脊髄液と脳の組織液を、頸部深リンパ管を經由し、深前頸リンパ節に輸送している。外傷性脳損傷は、髄膜リンパ管の障害を引き起こすことを報告した。髄膜リンパ管障害は脳に影響を及ぼすと考えられる。本研究では、マウスの外傷性脳損傷モデル及び頸部深リンパ管の結紮モデルを用い、両モデルの海馬に共通で遺伝子とタンパクの発現変化を解析した。

〔方法〕 マウス(約 10 週齢)の頭部に硬膜の上から打撃を加えて大脳皮質に損傷を形成した。大脳皮質損傷を形成しない群を Sham 群とした。マウス髄膜リンパ管障害はマウス(約 1.5 年齢)頸部深リンパ管を結紮した。脳損傷群及び Sham 群は受傷後 1.5 年及び頸部深リンパ管結紮群は結紮後 1 カ月の脳海馬を採取した。次世代シーケンサーの RNA-seq を用い、網羅的遺伝子発現解析を行った。

〔結果〕 RNA-seq の Sequencing Error Rate は 0.03%以下。塩基の Clean Reads は 98.55%以上。Clean Bases は 10.6G 以上。既知転写産物との Mapping 率は 85.18%以上。Percentage of genome region は Exon が 90.4%以上、Intron が 6.77%以下、Intergenic が 2.83%以下。グループ間差やグループ内サンプルの重複を評価する主成分分析(PCA)では、グループ内のサンプルは密接にクラスタリングされたが、グループ自体は別々にクラスタリングされた。

〔考察〕 動物実験や次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析の実験は順調に行い、よい結果が得られた。

〔結論〕 本研究は、約 1.5 年齢のマウス脳損傷モデル及び髄膜リンパ管障害モデルを作成でき、脳海馬の網羅的遺伝子発現解析実験が順調に進んだと確認できた。今後、両群が Sham 群に対し遺伝子発現の変化を特定したいと考える。

〔文献〕

- 1) Maloveska, M. (2018) *Neurol. Res.* 40: 372-380.
- 2) Shimada R, Nakao K, Kibayashi K, et al. (2012) *J.Clin.Neurosci.* 19(3): 447-451.
- 3) Da Mesquita, S. (2018) *Nature* 560: 185-191.
- 4) Shimada R, Abe K, Kibayashi K, et al. (2014) *Neurol.Res.* 36(3): 239-246

## 20. 抗血栓薬が外傷性脳損傷の重症度に与える影響

多々良有紀、木林和彦

(法医学)

〔目的〕 高齢者は転倒等の外傷性脳損傷のリスクに加え、様々な基礎疾患を有している。脳疾患や心疾患の治療のため、抗凝固薬や抗血小板薬等の抗血栓薬を服用している患者も多い。抗血栓薬服用者の頭部外傷では外傷性脳損傷が増悪することがある。本研究では、ワルファリンを投与したマウスに外傷性脳損傷を形成し、プロトロンビン時間と脳出血量の測定に加え、ワルファリンとワルファリン代謝物の血中濃度を定量することで、外傷性脳損傷の増悪機序を解析した。

〔方法〕 ビタミン K 欠乏飼料で飼養したマウス (C57BL/6J・8~10 週齢) にワルファリン (低投与量 0.35mg/kg/24h・高投与量 0.70mg/kg/24h) を経口投与し、脳挫傷作成装置 (Impact One, Leica) を用いて大脳皮質に局所性脳損傷を作製した。ワルファリン未投与と未受傷のマウスと比較した。受傷 2 時間、1 日及び 3 日後にプロトロンビン時間と脳出血量を測定し、また、LC-MS/MS を用いてワルファリンと 7-水酸化ワルファリンの血中濃度を定量した (各群各時間 n=5~8)。

〔結果〕 ワルファリン高投与量において損傷群は未受傷群に比べ、受傷後 1 日目にプロトロンビン時間が有意に延長し、脳出血量は有意に増加し、また、ワルファリンと 7-水酸化ワルファリンの血中濃度は高値となる傾向が観察された。

〔考察〕 ワルファリン服用時には受傷後 1 日目に脳挫傷に伴う脳出血が増大することが示された。外傷性脳損傷が増悪する機序に受傷後の血液凝固能障害と血中ワルファリン濃度高値の関与が示唆された。

〔学会発表〕

- 1) 多々良有紀、中尾賢一朗、木林和彦. 外傷性脳損傷モデルマウスを用いたワルファリン服用時に外傷性脳損傷が増悪する機序の解析. 第 46 回日本脳神経外傷学会、岡山、2023/2