

福 岡 大 学

# 薬学集報

Vol. 24 (No. 48)

2024年3月

**PHARMACEUTICAL BULLETIN  
OF  
FUKUOKA UNIVERSITY**

福 岡 大 学 研 究 推 進 部

福岡大薬集

## [原著論文]

脳神経センターでの6日間の実習における薬学生による患者への貢献に関する意識調査 .....	安高 勇気, 緒方憲太郎, 神村 英利 ...	1
---	-------------------------	---

## [総 説]

フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症増悪の有害作用 .....	稲田 紘舜 ...	9
加齢性血液脳関門機能障害における脳ペリサイトの関与 .....	岩尾 卓朗 ...	15
てんかん治療薬開発を目指した <i>Scn1a</i> 変異マウスの病態解析並びに新規シナプス薬効標本の確立 .....	内野 鉦也 ...	31
ミトコンドリア阻害剤誘発性の細胞死に対する活性型ビタミンK <sub>2</sub> 誘導体の効果 .....	土岐衣梨奈 ...	39
老化促進マウス SAMP8 の嗅覚反応障害と認知機能障害への人参養栄湯の治療効果研究 .....	平田茉莉花 ...	47

## ○ 原著論文

**Survey on the contributions of pharmacy students towards patients during a six-day clinical practicum at the cranial nerve center****Yuki YASUTAKA<sup>\*1,2</sup>, Kentaro OGATA<sup>1,2</sup>, Hidetoshi KAMIMURA<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical and Health Care Management, Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan<sup>2</sup>Department of Hospital Pharmacy, Fukuoka University Hospital, 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*Received, July 8, 2023**Revised, July 26, 2023**Accepted, July 28, 2023***Abstract**

The Department of Pharmacy at Fukuoka University Hospital is implementing a six-day clinical practicum at the cranial nerve center with the presence of one clinical pharmacist faculty member, with the aim of providing education to students with a patient-focused perspective. However, it remains unclear what the students thought they would be able to contribute to their patients. Therefore, we conducted a survey using the outcome records that the students in 2022 freely described at the end of the practical training. The contributions to patients and the combination of actions leading to those contributions were classified into 14 categories. Among them, most students felt that they were able to contribute to the improvement of their understanding of drugs through guidance to patients. Some of the devised methods of guidance included “explanations tailored to the patients’ level of understanding” and “explanation by modifying the medication instruction manual.” Furthermore, although the number was small, there were students who felt that their suggestions for prescription proposals to physicians contributed to the avoidance of side effects and improved therapeutic effects through the appropriate use of medications. The continued improvement of teaching methods, mainly by clinical pharmacist faculty members, is needed in order to increase the awareness of students regarding their contribution to patients through practice.

**Keywords** : Long-term practical training, Patient contribution, Ward training, Cranial nerve, Pharmacist faculty**脳神経センターでの6日間の実習における  
薬学生による患者への貢献に関する意識調査**安高 勇気<sup>\*1,2</sup>, 緒方 憲太郎<sup>1,2</sup>, 神村 英利<sup>1,2</sup><sup>1</sup>福岡大学薬学部病院薬学 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1<sup>2</sup>福岡大学病院薬剤部 〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1**要旨**

福岡大学病院薬剤部では、脳神経センターに臨床系教員1名を配置した6日間の病棟実習を構築し、実

習生の視点を患者に向ける教育を実施している。しかし、実習終了時に実習生が担当患者に対してどのような貢献ができたと感じたかは不明である。そこで、2022年度の実習生が自由記述した成果記録を用いて調査した。患者への貢献内容と貢献に至るまでの行動の組み合わせは14通りに分類された。その中で、患者への指導によって薬に対する理解度の向上に貢献できたと感じた実習生が最も多かった。指導方法の工夫としては、「患者の理解度に応じた説明」や「お薬説明書を加工して説明」などが挙げられた。さらに、少数ではあるが、医師への処方提案を実施した場合には、副作用回避や薬の適正使用による薬効の向上に繋がったと感じた実習生も認められた。多くの実習生が実践を通じて患者への貢献を意識できるようにするために、今後も臨床系教員が主導となって指導方法を改善していく必要がある。

**キーワード：**長期実務実習、患者貢献、病棟実習、脳神経、臨床系教員

\*E-mail: yasutaka@fukuoka-u.ac.jp (安高 勇気)

## 【緒言】

長期実務実習は薬学教育において重要な役割を果たしており、薬学生が実際の医療現場で経験を積むことによって、薬剤師としての倫理的責任や臨床判断力、コミュニケーション能力などの実践的なスキルを習得する場となっている。そのため、薬学教育モデル・コアカリキュラム（以下、コアカリ）の目標である「薬剤師として求められる基本的な資質」を実習生が習得するために、各実習施設において、試行錯誤しながら実習体制が構築されている<sup>1-3)</sup>。また、コアカリでは、がん、高血圧症、糖尿病、心疾患、脳血管障害、精神神経疾患、免疫・アレルギー疾患、感染症といった代表的な8つの疾患が挙げられており、これらの疾患を持つ患者の薬物治療に実習生が継続的に関わることで奨励されている。

福岡大学病院（以下、当院）では、これまでにコアカリに準拠した実践型の病棟実習プログラムを構築してきた<sup>4-9)</sup>。2018年度には脳神経センターにおいて薬学部の臨床系教員を1名配置し、6日間の実習プログラムを導入した。また、著者らは、実習生が患者を継続的に担当し、患者状態の把握、薬に関する確認、服薬指導、薬物療法の評価といった一連の流れを実践することで多くの実習生の視点を患者に向けることに成功した<sup>4)</sup>。さらに、2019年度には脳神経センターにおいて、実習生が患者に継続的に関わることで、患者の状態をより把握できるようになり、その結果、医師に対して薬学的な情報提供をする機会が増えることを報告した<sup>6)</sup>。しかし、病棟実習を通じて実習生が担当患者に対してどのような貢献ができたかについては不明である。また、実習生の患者貢献に関する他施設からの報告もない。

そこで、本研究では当院の実習生が脳神経センターでの実習中に担当した患者のために行動し、どのような貢献ができたと感じたかを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

### 1. 対象

本研究は、2022年度に当院の脳神経センターで実習を受けた薬学部5年生88名を対象に実施した。なお、実習期間中に体調不良などの理由による欠席や担当患者の入院日数の影響によって、1人の患者に対する実践日数が4日未満となった実習生は解析から除外した。

### 2. 実習スケジュール

脳神経センターにおける実習の概要は、2018年度と同様にした<sup>4)</sup>。しかし、実習スケジュールについては、新型コロナウイルス感染症の影響を考慮して、1日あたりの実務実習時間を3時間、自宅での課題学習時間を3時間とし、実習生1人あたり6日間実施した。原則として、午前には病院で実習・午後に自宅で学習した場合、翌日は午前には自宅で学習・午後には病院で実習することとし、実習生間で不公平が生じ

ないように配慮した。また、実務実習3時間あたりの実習生数は2名とした(図1)。課題学習の時間は、主に担当患者について診療ガイドラインなどの情報源を用いて「病因・病態」、「疾患のリスクファクター」、「非薬物療法は必要か?」、「薬物療法は必要か?」、「選択されている薬物は適切か?」、「選択されなかった薬物について」、「薬物の用法用量について」、「注意すべき副作用の把握・評価」、「注意すべき相互作用の把握・評価」、「服薬アドヒアランスの評価」の項目<sup>10)</sup>を評価した。指導者は、1年間を通して臨床系教員1名のみとし、年間合計786時間(休講1日あり)、44回にわたって指導した。なお、脳神経センターでの6日間の実習において、指導者は実習生に対して初日に診療録からの患者情報の把握の仕方を説明し、2日目以降に患者の問題点の立案方法や薬物療法の評価の際に活用する診療ガイドラインなどの情報源の使用方法について指導した。また、日々の患者面談前および面談中にはフォローアップを行い、面談後にはフィードバックを提供した。さらに、実習生が作成した薬剤管理指導記録および課題学習の内容について指導した。実習最終日(6日目)には、指導者と実習生で担当患者に関する成果発表会を行った。

1日目の午前に病院での実務実習を開始した場合(実習生2名)

	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
9:00~12:00		■		■		■
13:00~16:00	■		■		■	

1日目の午後に病院での実務実習を開始した場合(実習生2名)

	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
9:00~12:00	■		■		■	
13:00~16:00		■		■		■

□ : 病院での実務実習      ■ : 自宅での課題学習

図1. 脳神経センターにおける実習のタイムスケジュール

### 3. 調査項目

#### 1) 実践状況の調査

脳神経センターでの実習において、実践日数や実践した疾患数(主疾患および合併症)、疾患名を実習期間中に実習生が作成した成果記録および指導者の記録より調査した。さらに、実践内容を10項目(1. 患者情報の把握, 2. 患者の問題点の抽出, 3. 薬の用法用量の確認, 4. 薬効のモニタリング, 5. 副作用モニタリング, 6. 服薬アドヒアランスの確認, 7. 患者あるいは家族への服薬指導, 8. 薬物治療の評価, 9. 他の医療従事者への薬の情報提供, 10. 医師への処方提案)に分類し、実習開始前の技能については、5段階リッカート尺度を用いて実習生に自己評価させ、実習終了後には10項目の実践状況を調査した。

#### 2) 患者に対する実習生の貢献内容に関する調査

脳神経センターの実習最終日(6日目)に、実習生に対して特に患者のためになったと思う自分自身の行動について自由記述させた。その中から患者への貢献に関する内容を「不安軽減」、「理解向上」、「服薬アドヒアランス向上」、「副作用回避」、「薬効向上」の5つのカテゴリーに分類した。また、患者への貢

献に至るまでの実習生の行動を「共感」、「確認」、「指導」、「提案」の4つのカテゴリーに分類した。さらに、実習生が記載した「指導」に関する内容について、患者への説明方法の工夫が読み取れる内容を「患者の理解度に応じた説明」、「お薬説明書を加工して説明」、「患者の状態（症状）を考慮した説明」、「同種同効薬の特徴（違い）を説明」、「繰り返し説明」の5つのカテゴリーに分類した。

#### 4. 倫理的配慮

本研究は、福岡大学の研究倫理審査の承認を得て実施した（承認番号：22-05-02）。本研究の実施にあたり、実習生には研究目的や研究への協力は自由であり、不参加でも不利益を受けないこと、また、個人情報などのプライバシー保護に十分な配慮が行われることについて、説明文書を用いて口頭で説明し、全ての実習生から文書にて同意を得た。

### 【結果】

#### 1. 実践状況

解析対象者は77名であり、1人の患者に対する実践日数の内訳は、4日が8名、5日が13名、6日が56名であった。実習生が実践した疾患数の平均（範囲）は、3.6（2－6）疾患であった。代表的な8疾患の実践状況を表1に示す。実習生が担当した患者の主疾患は、脳血管障害（脳梗塞、内頸動脈狭窄症、大動脈解離）が22名、神経変性疾患（パーキンソン病）が16名、筋疾患（重症筋無力症）が14名、脱髄性疾患（多発性硬化症、視神経脊髄炎）が6名、末梢神経障害（多発ニューロパチー）が6名、神経障害（顔面神経麻痺、トロサハント症候群）が6名、血管炎が5名、脳腫瘍が2名であった。実習開始前の技能について、10項目の実践内容ができるかという問いに対して、「そう思う」あるいは「ややそう思う」と回答した割合は、「薬の用法用量の確認ができる（46.8%）」や「服薬アドヒアランスの確認ができる（40.3%）」といった項目で比較的高かった。また、「他の医療従事者への薬の情報提供ができる（7.8%）」と「医師への処方提案ができる（10.4%）」を除く8項目については、90%以上の実習生が6日間の実習期間中に実践した（表2）。

表1. 代表的な8疾患の実践状況

疾患名	主疾患	主疾患＋合併症
がん	2 (2.6)	2 (2.6)
高血圧症	0 (0)	49 (63.6)
糖尿病	0 (0)	27 (35.1)
心疾患	0 (0)	22 (28.6)
脳血管障害	22 (28.6)	30 (39.0)
精神神経疾患	16 (20.8)	51 (66.2)
免疫・アレルギー疾患	37 (48.1)	53 (68.8)
感染症	0 (0)	45 (58.4)
上記以外の疾患	0 (0)	77 (100)

数値は、実習生数(%)。n = 77.

表2. 病棟実習の実践項目に対する実習開始前の自己評価と実践状況

実践項目	実践開始前の技能(実習生の自己評価)						実践状況	
	そう思わない	あまり そう思わない	どちらとも 言えない	ややそう思う	そう思う	実施できた		
患者情報の把握ができる	2 (2.6)	18 (23.4)	32 (41.6)	25 (32.5)	0 (0)	77 (100)		
患者の問題点抽出ができる	7 (9.1)	29 (37.7)	30 (39.0)	11 (14.3)	0 (0)	77 (100)		
薬の用法用量の確認ができる	4 (5.2)	18 (23.4)	19 (24.7)	30 (39.0)	6 (7.8)	77 (100)		
薬効モニタリングができる	10 (13.0)	33 (42.9)	20 (26.0)	14 (18.2)	0 (0)	76 (98.7)		
副作用モニタリングができる	5 (6.5)	27 (35.1)	28 (36.4)	17 (22.1)	0 (0)	77 (100)		
服薬アドヒアランスの確認ができる	3 (3.9)	15 (19.5)	28 (36.4)	28 (36.4)	3 (3.9)	73 (94.8)		
患者あるいは家族への服薬指導ができる	3 (3.9)	21 (27.3)	31 (40.3)	22 (28.6)	0 (0)	73 (94.8)		
薬物療法の評価ができる	16 (20.8)	37 (48.1)	23 (29.9)	1 (1.3)	0 (0)	77 (100)		
他の医療従事者への薬の情報提供ができる	24 (31.2)	39 (50.6)	12 (15.6)	2 (2.6)	0 (0)	6 (7.8)		
医師への処方提案ができる	47 (61.0)	27 (35.1)	3 (3.9)	0 (0)	0 (0)	8 (10.4)		

数値は、実習生数(%)。n = 77.

## 2. 実習生が感じた患者への貢献内容に関する調査

本調査において、実習生が特に患者のためになったと思う自分自身の行動に関する自由記述の総文字数は、平均137字（標準偏差72字）であった。患者に対する貢献内容が5つのカテゴリーに該当する実習生は55名であり、その内訳は、「不安軽減」が9名、「理解向上」が45名、「服薬アドヒアランス向上」が11名、「副作用回避」が3名、「薬効向上」が4名（実習生の重複回答を含む）であった。また、貢献に至るまでの行動の内訳は、「共感」が2名、「確認」が9名、「指導」が50名（重複2名あり）、「提案」が4名であった。

実習生が感じた患者に対する貢献内容と貢献に至るまでの実習生の行動の組み合わせは14通りに分類された（図2）。貢献内容については、指導によって薬に対する理解度が向上したと感じた実習生の割合が最も高く（81.8%、45/55名）、指導による理解向上からアドヒアランス向上に繋がったと感じた実習生も認められた（12.7%、7/55名）。実習前に「患者あるいは家族への服薬指導ができる」と回答した実習生の割合は28.6%であったが、本実習においては94.8%の実習生が実践することができた（表2）。一方で、患者への貢献内容として「副作用が発現していないことの確認」といった間接的な内容を挙げる実習生も認められた。患者貢献に至るまでの行動として「指導」を挙げた実習生50名の中で、患者への説明方法に工夫が読み取れる回答をした実習生は33名であった。説明内容の工夫として、「患者の理解度に応じた説明（32.0%、16/50名）」や「お薬説明書を加工して説明（20.0%、10/50名）」に関する記載の割合が高かった（図3）。

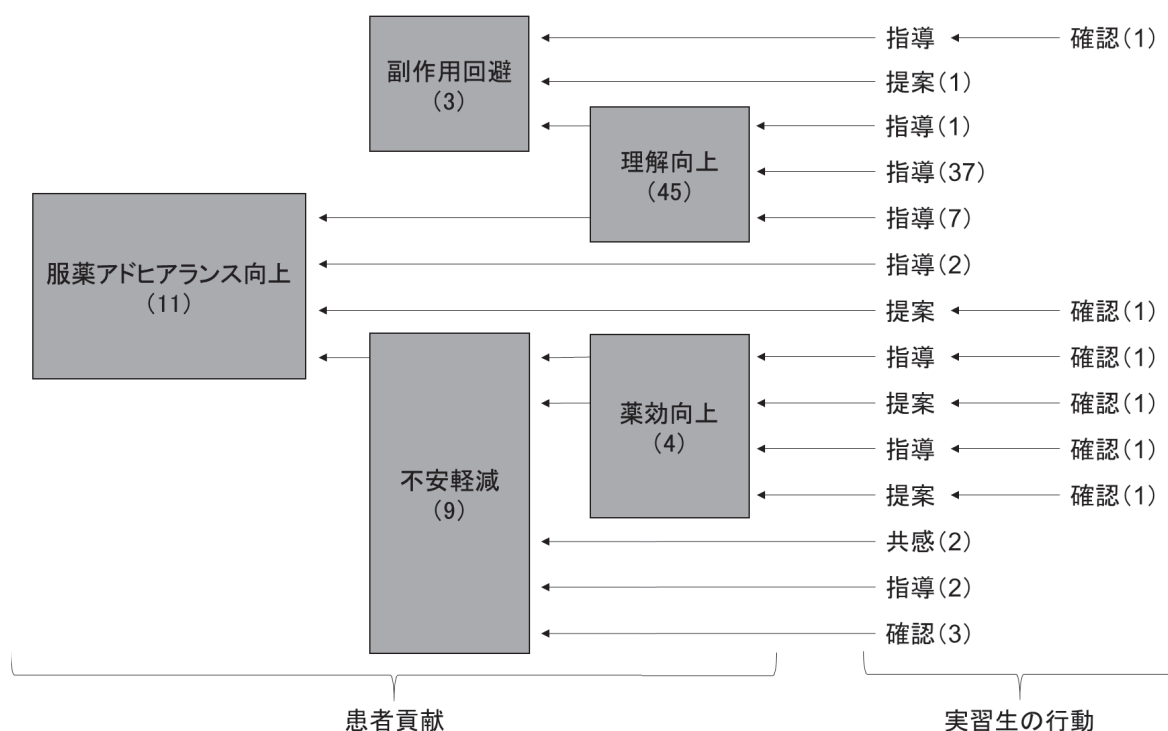


図2. 患者に対する実習生の貢献内容と貢献に至るまでの行動

( )内の数値は実習生数を示す。「指導」に実習生2名の重複あり。n = 55.

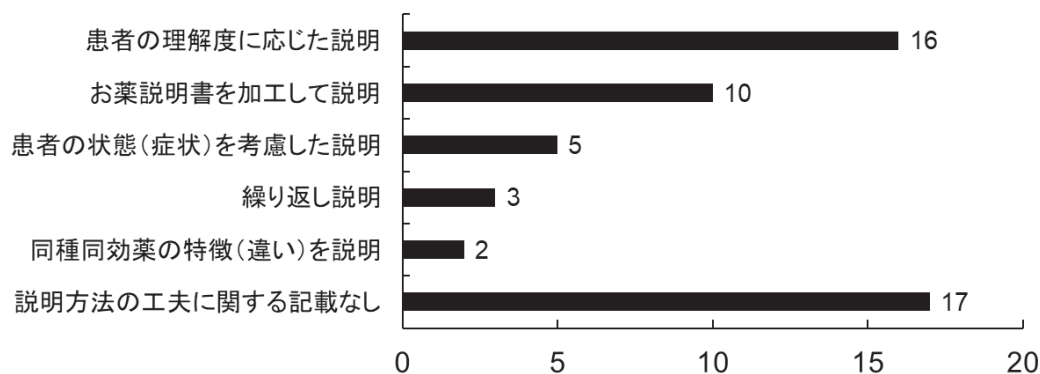


図3. 実習生による患者への説明方法の工夫  
実習生3名の重複あり. n = 50.

### 【考察】

本研究によって、脳神経センターでの6日間の実習において、実習生が指導を行うことで薬に対する患者の理解度が向上し、さらに、服薬アドヒアランスの向上に繋がることが示唆された。また、実習生は患者の理解度に応じた説明やお薬説明書を加工して説明するなど、多様なアプローチを用いて情報を提供していた。これらの結果から、少なくとも4割の実習生は患者の個別のニーズや特徴を考慮して情報を提供する重要性を認識していたと考えられる。さらに、実習生が医師へ処方提案を行った場合には、副作用の回避や薬の適正使用による薬効の向上に貢献したと実感することも明らかとなった。

実習生が患者の立場に立ち、患者のニーズや安全を最優先に考えることは、質の高い医療サービスの提供に不可欠である。そのため、指導者は実習生に対して患者のために何ができるかを意識させることが非常に重要であると考えられる。また、実習生が自らの行動が患者にどのような影響を与えるかを理解し、適切な指導や情報提供を行うことで、薬剤師としての役割を遂行する能力が向上すると考えられる。大学や臨床現場では、実習生に対して患者中心のアプローチを教え、実践的な経験を積ませることで将来の薬剤師としての能力を向上させる役割を果たしている。特に、病院実務実習プログラムの作成において、病院での実務実習と臨床業務に従事している臨床系教員の役割は重要である<sup>2,3)</sup>。当院では、臨床系教員2名が脳神経センターと腫瘍血液感染症内科における実習プログラムを構築し、各々が患者と向き合いながら実習生を指導してきた<sup>4,7)</sup>。2021年度の病棟実習では、薬剤部の薬剤師の指導と比較し、臨床系教員の指導による実施率が「服薬アドヒアランスの確認」と「薬物療法の評価」で有意に高く、「医師への処方提案」と「患者の問題点の抽出」で高い傾向を示した<sup>9)</sup>。これら4項目は、実習生の患者貢献において重要な要素と考えられる。近年、病院薬剤師の業務が拡大する中で、薬剤師が教育に十分な時間を割くことが困難になっている。このような状況において、臨床業務と実臨床での教育業務を担ってきた臨床系教員がプログラム作成に積極的に関与し、教育の質を確保する必要があると考えられる。これまでに臨床系教員のワークバランスについては様々な議論がなされているが、医療現場を完全に離れずに、実務、教育、研究、次世代の教員の育成に従事することが求められる<sup>11)</sup>。

脳神経センターの実習では、患者との面談時に服薬指導の機会を設けており、実際に指導を行ったと回答した実習生は94.8%を占めた。しかし、本調査では、特に患者のためになったと思う自分自身の行動について自由記述させた結果、「副作用が発現していないことの確認」といった間接的な内容を挙げる実習生も認められた。この背景には、実習生の中には自身のパフォーマンスが不十分であり、患者のために貢献できていないと感じる者もいることや、実際の臨床現場では、実習生の介入内容が実習期間中



の患者の状況に影響を受ける可能性が考えられる。したがって、病棟実習における教育では、患者や実習生の多様性を考慮し、個々の実習生に対して指導者のフォローアップが重要であると考えられる。

本研究にはいくつかの限界がある。まず、実習生の自己評価や自由記述は主観的なものであり、客観的な評価指標も導入することが望ましい。また、本研究では実習生の実践内容に焦点を当てているが、患者の治療結果やアウトカムに関するデータは収集していない。将来的には、実習生の実践が患者の症状にどのような影響を与えるかを明確にするために、長期的な追跡や評価が必要である。なお、本研究では、指導者1名が全ての実習生を指導したため、指導者による教育の差は生じていないと考えられる。

当院の脳神経センターにおける病棟実習プログラムは、主疾患だけでなく合併症に対する評価も行うことから、幅広い疾患に対する経験を提供し、実習生の臨床能力の向上に寄与している。また、実習生は患者との関わりを深めることで、患者の状態やニーズに敏感になり、医薬品の適切な使用や副作用の回避、服薬アドヒアランスの向上などに貢献している。指導者の存在と適切な教育は、実習生の理解度や患者への貢献に大きく影響を与えられられるため、今後も臨床系教員が主導となって指導方法を改善し、多くの実習生が実践を通じて患者への貢献を意識できるようにする必要がある。

#### 【利益相反】

開示すべき著者の利益相反はない。

#### 【参考文献】

- 1) 大久保正人, 増田和司, 小林由佳, 中村貴子, 鈴木貴明, 石井伊都子: 病院実務実習について薬学部生に実施したポストアンケート調査 —長期実務実習開始から8年間の変遷—. YAKUGAKU ZASSHI 141: 731-742, 2021.
- 2) 塩見めぐみ, 田中庸一, 尾鳥勝也: 薬学実務実習ガイドラインを基に考案した病院実習プログラムの評価. 薬学教育5: 349-356, 2021.
- 3) 菊池正史, 佐藤裕, 佐藤紀宏, 前川正充, 眞野成康: 新型コロナウイルス感染症に対応した病院実務実習プログラムの評価. 日本病院薬剤師会雑誌57: 1256-1261, 2021.
- 4) 安高勇氣, 緒方憲太郎, 神村英利: 実践的な病棟実習による薬学部5年生に生じる意識変化 —脳神経センターにおける6日間の実習を通して—. 薬学教育3: 149-154, 2019.
- 5) 安高勇氣, 緒方憲太郎, 神村英利: 薬学部5年生における実践型病棟実習の教育効果, 九州薬学会雑誌74: 13-17, 2020.
- 6) 安高勇氣, 神村英利: 病棟実習における薬学部5年生による処方提案の実態調査. 福岡大学教育開発支援機構紀要3: 63-72, 2021.
- 7) 緒方憲太郎, 安高勇氣, 知念祥太郎, 中島勇太, 佐々木秀法, 吉川千鶴子, 高松泰, 神村英利: がん化学療法を受ける患者に対する薬学実習生の着眼点の把握 —テキストマイニング法を用いた解析—. 薬学教育5: 311-318, 2021.
- 8) 安高勇氣, 緒方憲太郎, 神村英利: コロナ禍における薬学部5年生の実務実習 —顧客満足度分析を応用した実習生の自己評価に基づく病棟実習の課題—. 福岡大学教育開発支援機構紀要4: 65-76, 2022.
- 9) 安高勇氣, 緒方憲太郎, 神村英利: 病院実務実習の満足度調査 —薬学生の進路希望による比較—. 福岡大学教育開発支援機構紀要5: 49-62, 2023.
- 10) 大村友博, 松原和夫: パーキンソン病. 一般社団法人 日本医療薬学会(編): 病態を理解して組み立てる 薬剤師のための疾患別薬物療法II 改訂第2版, pp.44-46, 南江堂(東京), 2018.

- 11) 野田幸裕, 矢野育子, 青山隆夫, 渡邊美智留, 今田愛也, 中村均, 松下良, 森田邦彦, 三宅勝志, 瀬尾量, 上村直樹, 富岡佳久, 木津純子, 望月眞弓: 薬学臨床系教員の現状に関するアンケート調査: 第2報. 医療薬学41: 223-235, 2015.

## ○ 総 説

## フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症増悪の有害作用

稲田 紘舜

福岡大学薬学部生物薬剤学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

**Adverse effects of fluoroquinolone antibiotics on onset and exacerbation  
of aortic aneurysm and dissection****Koshun INADA**Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Fluoroquinolone antibiotics are among the most commonly prescribed. However, the use of fluoroquinolones increases the risk of aortic aneurysm and dissection (AAD). In this study, we attempted to elucidate the pathogenesis of AAD induced by fluoroquinolone antibiotics.

We examined effects of the fluoroquinolone moxifloxacin (MFLX) on the occurrence of AAD in a moderate-severity mouse model. MFLX ( $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ) induced AAD in mice with moderate-severity AAD. In addition, aortic dilatation, destruction, and elastic fiber fragmentation were observed in abdominal aorta in MFLX ( $30$  and  $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ )-treated moderate AAD model mice. Also, MFLX significantly increased OPN expression in aortic tissues in mice with AAD. Next, we examined effects of MFLX on the expression of OPN protein in RAW 264.7 cells. MFLX significantly increased expression of OPN protein through phosphorylation of ERK 1/2 and JNK in RAW 264.7 cells.

Phenotype switching is involved in the onset and exacerbation of AAD. Therefore, we examined effects of three fluoroquinolone antibiotics, MFLX, ciprofloxacin (CPFX), and levofloxacin (LVFX), on the expression of the vascular smooth muscle cell contractile phenotype markers in RASMCs. CPFX and MFLX significantly decreased the expression of SM22 $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA, SMMHC, and caldesmon proteins in RASMCs compared with vehicle. On the other hand, LVFX significantly decreased the expression of SM22 $\alpha$ , SMMHC, and caldesmon proteins in RASMCs compared with vehicle, but did not significantly decrease the expression of  $\alpha$ -SMA protein. Furthermore, CPFX and MFLX significantly decreased the expression of SM22 $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA, SMMHC, and caldesmon in mRNA levels in RASMCs compared with vehicle, but LVFX did not significantly decrease those of mRNA expression levels. Therefore, among the three drugs, MFLX and CPFX had a higher risk of developing and exacerbating AAD than LVFX.

In conclusion, fluoroquinolone antibiotics may cause on onset and exacerbation of AAD through upregulation of OPN expression and phenotype switching.

**Keywords** : Fluoroquinolone antibiotics, Aortic aneurysm and dissection, Osteopontin, phenotype switching

## 【緒言】

フルオロキノロン系抗菌薬は、最も一般的に処方されている抗菌薬であり、DNA ジャイレースの阻害やDNA トポイソメラーゼIVを阻害することで殺菌的に作用する。抗菌スペクトルが広域であるため、尿路感染症や呼吸器感染症をはじめとした多くの感染症に頻用されている。また、フルオロキノロン系抗菌薬の使用は心血管死亡リスクの増加と関連しており、モキシフロキサシン (moxifloxacin; MFLX) はそのリスクが最も高く、2～3倍に増加することが報告されている [1]。さらに、臨床研究やメタアナリシス研究においてフルオロキノロン系抗菌薬の服用により大動脈瘤・大動脈解離 (aortic aneurysm and dissection; AAD) のリスクが増大することが報告されている [2, 3]。なかでも MFLX, シプロフロキサシン (ciprofloxacin; CPFX) およびレボフロキサシン (levofloxacin; LVFX) の3剤はAADの有害作用と強く関連している [4]。さらに2019年1月10日に厚生労働省は全てのフルオロキノロン系抗菌薬の重大な副作用に「大動脈瘤、大動脈解離を引き起こすことがある」と追記するように製薬会社に添付文書の改訂を指示しており、大動脈瘤および大動脈解離を合併している患者を「慎重投与」の対象とした。

AAOは一般的に無症状で病状が進行し、破裂した場合の死亡率は非常に高い疾患であるため、早期発見が非常に重要である。また、腹部大動脈瘤 (abdominal aortic aneurysm; AAA) は平均大動脈直径の50%を超える局所拡張した病態であり、血管径の拡大、血管中膜の脆弱化 (血管平滑筋細胞の減少、アポトーシスなど)、エラスチン分解及び中膜・外膜への炎症性細胞の浸潤が病理学的特徴である。さらに血管平滑筋細胞の収縮型から合成型への表現型スイッチはAAAの発症と増悪に重要であり [5]、この表現型スイッチは、血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー ( $\alpha$ -smooth muscle actin;  $\alpha$ -SMA, smooth muscle protein 22 $\alpha$ ; SM22 $\alpha$ , smooth muscle myosin heavy chain; SMMHC, and caldesmon など) の喪失で特徴づけられる。

オステオポンチン (osteopontin; OPN) はマクロファージ、血管平滑筋細胞などから分泌され、炎症に関与する糖リン酸化タンパク質である。また、AAAモデル動物のAAA病変において、増加したOPNはmatrix metalloproteinases発現を増加させ、細胞外基質を分解させることにより、AAAを発症・増悪させる [6]。

このように幅広い感染症に有効とされるフルオロキノロン系抗菌薬が頻用されているにも関わらず、重篤な有害作用である大動脈瘤・解離のリスクを上昇させることは、極めて問題である。しかし、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序は不明である。そこで本研究では、フルオロキノロン系抗菌薬による大動脈瘤・解離の発症機序を解明し、フルオロキノロン系抗菌薬間でのリスクの相違を検討した。

## 第1章 第1節

### 中等度AADモデルマウスのAAD形成に対するMFLXの影響

#### 【目的】

フルオロキノロン系抗菌薬の中でもMFLXはAADの有害作用 [4] および心血管死のリスク増大 [1] と強く関連していることが報告されている。しかし、その発症機序は不明である。そこで本研究では、中等度AADモデルマウスにおいてMFLX誘発のAAD形成におけるOPN発現を評価した。

#### 【実験方法】

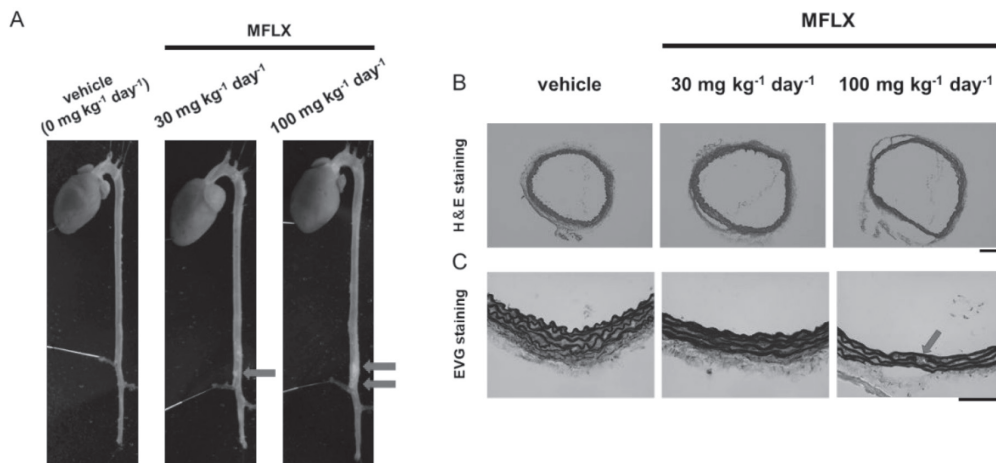
4週齢の雄性C57BL/6Jマウス (Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan) を使用した。4週齢時から高脂肪食 (1.25% cholesterol, 15% cacao butter, and 0.5% sodium cholate; F2HFD1; Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) の負荷を開始し、8週齢時に浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2004; Durect, CA, USA) を皮下移植し、angiotensin IIを4週間持続注入することで中等度AADモデルマウスを作製した [7]。9週齢時よ

り水に溶解したMFLX (30 and 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) を3週間連続で経口投与し、12週齢時に腹部大動脈を評価した。また、中等度AADモデルマウスの大動脈組織をHematoxylin and Eosin (H&E), elastica-van Gieson (EVG) 染色, 免疫組織化学染色およびwestern blot法により評価した。

### 【結果・考察】

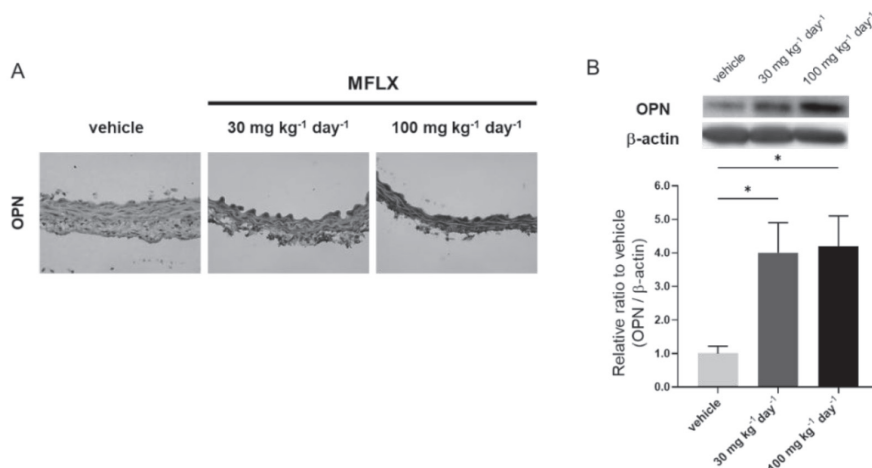
中等度AADモデルマウスにおいてMFLX投与群 (100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) は、腹部大動脈にAADを誘発させた (Fig. 1A)。次にH&E染色およびEVG染色により組織学的に評価を行った。その結果、MFLXによる血管径の拡大 (Fig. 2B), 破壊及びエラスチンの分解が観察された (Fig. 2C)。

また、免疫化学組織染色およびウエスタンブロット法において、MFLX投与群 (30 and 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) はvehicle群と比較して、大動脈組織中のOPN発現増加が免疫化学組織染色によって観察された (Fig.



**Fig. 1** Impact of MFLX on AAD occurrence in mice with moderate severity AAD.

Representative images of the aorta showing different features following administration of vehicle or MFLX (30 and 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>). The red arrow indicates AAD features (A). Representative images of Hematoxylin and eosin (H&E) stained-tissues shows aortic dilatation and destruction in treated-mice vs. control (B). Representative images of elastica van Gieson (EVG) staining showing differences in fragmentation of elastic fibers between treated- and control groups. The red arrow indicates fragmentation of elastic fibers in the aortic vessel wall (C). Scale bar: 100 μm.



**Fig. 2** Effects of MFLX on the expression of OPN in aorta.

Immunohistochemical staining shows the expression of OPN (A). Scale bar: 100 μm. Immunoblot analysis shows the levels of protein expression for OPN (B). Bars represent mean ± SD; \*P < 0.05.

2A)。さらに、MFLX投与群 (30 and 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) は vehicle 群と比較して大動脈組織における OPN タンパク発現を顕著に増加させた (Fig. 2B)。したがって、MFLXは大動脈組織における OPN 発現を増加させ、AADの発症を誘発する可能性が示唆された。

## 第1章 第2節

### マクロファージにおける MFLX による OPN 発現変化とメカニズムの解明

#### 【目的】

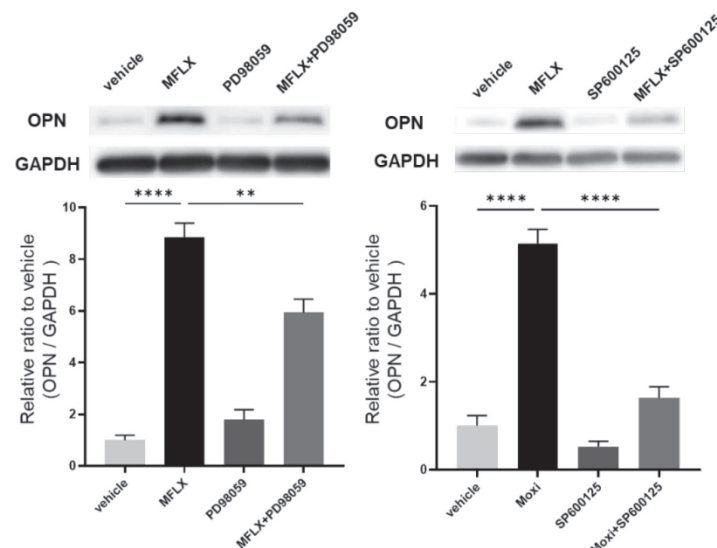
第1章 第1節より、MFLXが中等度AADモデルマウスの大動脈組織において OPN タンパク発現を増加させることによりAAD増悪を誘発させることが示唆された。しかし、MFLXによる OPN タンパク発現増加に関する機序は不明である。そこで、AADの誘発および増悪に重要な役割を果たしているマクロファージに着目し、マウスマクロファージ様細胞RAW 264.7における OPN 発現に対する MFLX の影響を検討した。

#### 【実験方法】

マウスマクロファージ様細胞RAW 264.7を使用し、MFLXを300 μMで24時間処理し、western blot法により OPN のタンパク質量を測定した。

#### 【結果・考察】

RAW 264.7細胞において MFLX は用量 (0 ~ 300 μM) および時間 (0 ~ 24 hours) 依存的に OPN タンパク発現を増加させ、300 μM, 24時間で最も増加させた。次に OPN 発現を調節する ERK 1/2 および JNK シグナルのリン酸化を評価した。その結果、MFLX は ERK 1/2 および JNK シグナルを1時間および8時間で顕著に活性化させた。さらに、MFLX と ERK 1/2 阻害剤である PD98059 (Fig. 3A) および JNK 阻害剤であ



**Fig. 3** Effect of ERK 1/2 inhibitor (PD98059) and JNK inhibitor (SP600125) on MFLX-increased expression of OPN protein levels in RAW 264.7 cells.

Representative immunoblots showing protein levels of OPN (upper panels). Quantitative analyses of band intensities showing expression of OPN protein (bottom panel). Cells were treated with vehicle or MFLX (300 μM) for 24 h in the absence or presence of the ERK 1/2 inhibitor (PD98059) (A) or the JNK inhibitor (SP600125) (B). PD98059 and SP600125 were added to cells for 30 min before treatment with vehicle or MFLX. Each bar represent mean ± SEM (n=4). \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001.

る SP600125 (Fig. 3B) の併用により, MFLX による OPN タンパク発現増加を抑制させた。したがって, MFLX はマクロファージにおいて ERK 1/2 および JNK シグナル経路を介して OPN タンパク発現を増加させることが示唆された。

## 第2章

### フルオロキノロン系抗菌薬間における AAD リスクの相違

#### 【目的】

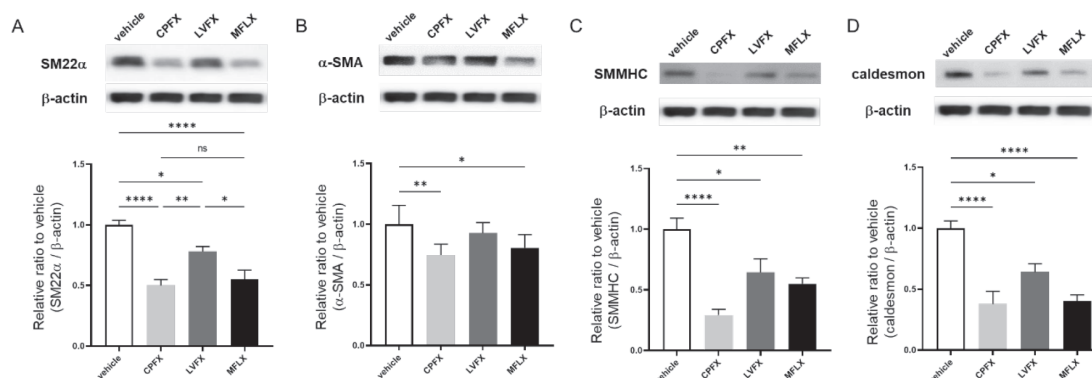
CPFV, LVFX および MFLX の3剤間で AAD の発症および増悪のリスクの相違を評価するため, 血管平滑筋細胞における血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー ( $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , SMMHC, および caldesmon) の発現を比較・検討した。

#### 【実験方法】

ラット大動脈血管平滑筋細胞 (rat aortic smooth muscle cells; RASMCs) を使用し, CPFV, LVFX および MFLX を 300  $\mu$ M で 96 時間処理し, RT-PCR 法および western blot 法により  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , SMMHC および caldesmon の mRNA 量およびタンパク質量を測定した。

#### 【結果・考察】

RASMCs において CPFV, LVFX および MFLX は 300  $\mu$ M, 96 時間処理により SM22 $\alpha$ , SMMHC および caldesmon のタンパク発現を顕著に減少させた。一方, CPFV および MFLX は vehicle と比較して  $\alpha$ -SMA のタンパク発現を減少させたが, LVFX は減少させなかった (Fig. 4)。また, RASMCs において CPFV および MFLX (300  $\mu$ M, 96 時間) は vehicle と比較して SM22 $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA, SMMHC および caldesmon の mRNA 発現を減少させた。しかし, LVFX は, これらの mRNA 発現を減少させなかった。したがって, RASMCs において CPFV, LVFX および MFLX は血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させたことから, 血管中膜を脆弱化させることにより, AAD を誘発および増悪させる可能性が示唆された。さらに LVFX は CPFV および MFLX と同程度に血管平滑筋細胞の収縮表現型マーカー発現を減少させなかったため, 3剤



**Fig. 4** Effect of treatment with CPFV, LVFX, and MFLX (300  $\mu$ M) for 96 h on the expression of marker of the VSMCs contractile phenotype protein in RASMCs.

Representative bands of SM22 $\alpha$  (A),  $\alpha$ -SMA (B), SMMHC (C) and caldesmon (D) in CPFV, LVFX and MFLX treated RASMCs (upper panel). Quantitative analysis of band intensities showing expression of SM22 $\alpha$  (A),  $\alpha$ -SMA (B), SMMHC (C) and caldesmon (D) proteins (bottom panel). Cells were treated with CPFV, LVFX and MFLX (300  $\mu$ M) for 96 h. Each bar represent mean  $\pm$  SEM (n=7-9). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001.

の中ではLVFXがAADを誘発および増悪させるリスクが低い可能性が示唆された。

### 【総括】

本研究により、フルオロキノロン系抗菌薬はOPN発現増加および表現型スイッチを介してAADを発症・誘発させる可能性が示唆された。さらに3剤の中ではLVFXがAADを発症・増悪のリスクが低い可能性が示唆された。

本研究の成果より、フルオロキノロン系抗菌薬の有害作用に関する予測・軽減・回避対策の構築が可能となり、本薬物の安全性と有効性のさらなる向上が期待できる。さらにはAAD患者及びAAD発症リスクの高い患者において、フルオロキノロン系抗菌薬の使用を避け、その他の抗菌薬の使用を選択することが可能となる。フルオロキノロン系抗菌薬を使用しなければいけない場合は、治療上の有益性を考慮した上でリスクの低いLVFXを選択するなど、患者背景に沿って慎重に選択すべきである。

### 【参考文献】

- [1] E. Gorelik, R. Masarwa, A. Perlman, V. Rotshild, M. Abbasi, M. Muszkat, I. Matok, Fluoroquinolones and Cardiovascular Risk: A Systematic Review, Meta-analysis and Network Meta-analysis, *Drug Saf* 42 (2019) 529-538.
- [2] C.C. Lee, M.T. Lee, Y.S. Chen, S.H. Lee, Y.S. Chen, S.C. Chen, S.C. Chang, Risk of Aortic Dissection and Aortic Aneurysm in Patients Taking Oral Fluoroquinolone, *JAMA Intern Med* 175 (2015) 1839-1847.
- [3] S. Singh, A. Nautiyal, Aortic Dissection and Aortic Aneurysms Associated with Fluoroquinolones: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Am J Med* 130 (2017) 1449-1457.e1449.
- [4] A.C. Bennett, C.L. Bennett, B.J. Witherspoon, K.B. Knopf, An evaluation of reports of ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin-association neuropsychiatric toxicities, long-term disability, and aortic aneurysms/dissections disseminated by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency, *Expert Opin Drug Saf* 18 (2019) 1055-1063.
- [5] H. Peng, K. Zhang, Z. Liu, Q. Xu, B. You, C. Li, J. Cao, H. Zhou, X. Li, J. Chen, G. Cheng, R. Shi, G. Zhang, VPO1 Modulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch by Activating Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK 1/2) in Abdominal Aortic Aneurysms, *J Am Heart Assoc* 7 (2018) e010069.
- [6] J. Li, X. Bao, Y. Li, Y. Wang, Z. Zhao, X. Jin, Study of the functional mechanisms of osteopontin and chemokine-like factor 1 in the development and progression of abdominal aortic aneurysms in rats, *Exp Ther Med* 12 (2016) 4007-4011.
- [7] S.A. LeMaire, L. Zhang, W. Luo, P. Ren, A.R. Azares, Y. Wang, C. Zhang, J.S. Coselli, Y.H. Shen, Effect of Ciprofloxacin on Susceptibility to Aortic Dissection and Rupture in Mice, *JAMA Surg* 153 (2018) e181804.



## 加齢性血液脳関門機能障害における脳ペリサイトの関与

岩尾 卓朗

福岡大学薬学部応用薬剤学 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

### Involvement of brain pericytes in age-related impairment of the blood–brain barrier

Takuro IWAO

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

#### Abstract

Aging increases the risk of developing neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease (AD) and Parkinson's disease (PD), which are closely associated with blood–brain barrier (BBB) dysfunction [1]. BBB disruption precedes the onset of AD and is an early biomarker of human cognitive dysfunction [2-3]. Furthermore, neurodegenerative diseases are implicated in age-related BBB impairment [4-7]. However, how BBB integrity alters with aging is unclear.

BBB is formed by brain microvessel endothelial cells (BMECs), astrocytes, and pericytes. It restricts transport of substances in the blood for maintaining homeostasis of the central nervous system (CNS) [8]. BMECs, which are the basic component of BBB, mainly control the entry of various substances from blood to the brain. Tight junction-associated proteins (TJs) spanning intracellular BMECs contribute to regulating paracellular permeability, and their disruption and loss result in the disruption of BBB integrity [8-9]. In addition, adherens junction-associated proteins (Ajs), such as cadherins, contribute to holding the cells together, providing the tissue structural support, and are essential for formation of tight junctions [10]. Major facilitator superfamily domain-containing protein-2a (MFSD2A), which is exclusively expressed in BMEC, is a docosahexaenoic acid (DHA) transporter and can inhibit transcellular permeability by regulating endocytosis [11-14].

Pericytes are present at intervals along the walls of brain capillaries and play a key role in maintaining BBB integrity [15-18]. They induce formation of TJs in BMECs and regulate BBB permeability [15, 19]. Furthermore, their presence is required for the MFSD2A expression in BMECs [12].

The aim of the present study was to explore the characteristic changes in pericytes with aging and to ascertain whether pericytes are involved in age-related impairment of BBB. In the first chapter, we reported age-related changes in DHA transport across BBB and the expression of DHA carrier proteins in young-adult, middle-aged, and aged mice. In the second chapter, we reported the relationship between dynamic changes in BBB integrity with aging and cellular senescence in pericytes. Furthermore, we showed the relationship between BBB integrity and the inflammatory activation of microglia, which contributes to neuroinflammation. In the third chapter, we reported the effect of senescence pericytes on the barrier function of BBB evaluated using an in vitro BBB model. In the fourth chapter, we reported how pericytes regulate the MFSD2A expression and whether pericytes affect the localization of MFSD2A in BMEC. In the fifth chapter, we reported the effect of long-term dietary DHA supplementation on

age-related BBB disruption and subsequent activation of microglia. Finally, we explore whether DHA regulated the barrier function of BBB in physiological condition in vitro.

The present study would provide new insights into the age-related impairment of BBB. Repairing age-related dysfunction of BBB can be a novel strategy for preventing neurological diseases.

**Keywords** : Blood-Brain Barrier, Aging, Pericytes, MFSD2A, Docosahexaenoic acids

## 【緒言/目的】

加齢はアルツハイマー型認知症やパーキンソン病といった神経変性疾患の病態進展の主要な危険因子である。そして、これらの疾患は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier; BBB) の破綻と密接に関連している。BBBの破綻と関連した神経変性疾患の病態形成機構として、末梢血から流入した血中タンパク質による神経障害や神経炎症が考えられている。また、BBB機能障害はアルツハイマー型認知症の発症に先行して出現し、認知機能低下のバイオマーカーとしての有用性が報告されている。更に、加齢に伴うBBBの破綻が神経変性疾患の病態形成に寄与するとの証拠が増えつつある。そのため、加齢に伴うBBB破綻の進行抑制は神経変性疾患の新規予防戦略となりうる可能性がある。しかし、加齢に伴うBBBの破綻がどのようにして生じるかは明らかにされていない。

BBBは脳微小血管内皮細胞、アストロサイト及びペリサイトによって構成され、循環血中から脳への物質移行を制限することで中枢神経系の恒常性を維持している。中でも、脳微小血管内皮細胞間に発現する密着結合関連タンパク質 (Tight junction-associated proteins; Tjs) は、細胞間隙経路を介した物質移行を制限する上で主要な役割を担い、このTjsの変性や消失はBBBバリア機能の破綻に寄与する。また、微小血管内皮細胞間に発現し組織構造の維持に必要な接着結合関連タンパク質 (Adherens junction-associated proteins; Ajs) は、Tjs形成にも寄与している。更に、MFSD2A (Major facilitator superfamily domain-containing protein-2a) は脳微小血管内皮細胞の細胞膜に発現するドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid; DHA) のトランスポーターとして機能するほか、エンドサイトーシスを制御することで経細胞経路を介した脳内への物質移行を抑制し、BBBバリア機能維持にも寄与している。

DHAは脳のリン脂質に豊富に存在するn-3系不飽和脂肪酸であり、脳神経機能の発達・維持において重要な役割を担う。更に、DHAは脳神経機能のみならず、脳血管内皮細胞の脂質恒常性やBBBバリアに対して保護的に作用することが報告されている。しかし、脳内においてDHAはほとんど合成されないため、脳内のDHAレベルを維持するためにはBBBを介して脳内に輸送される必要がある。加齢に伴う脳内DHAレベルの低下は認知機能の低下と関連しているが、なぜ加齢に伴い脳内DHAレベルが低下するのかは不明である。また、加齢に伴いBBBバリア機能は脆弱化するが、DHA輸送機能がどのように変化するかは明らかにされていない。

ペリサイトは脳毛細血管壁に沿って脳微小血管内皮細胞を取り囲むように存在する。ペリサイトは脳血管内皮細胞のTjs発現を誘導し、BBBバリア機能維持に寄与している。更に、ペリサイト非存在下では脳微小血管内皮細胞においてMFSD2Aが発現しないことが報告されており、ペリサイトは脳血管内皮細胞におけるエンドサイトーシスの制御及びDHA輸送機能維持にとっても重要な役割を担う。BBB構成細胞の細胞老化が加齢に伴うBBBバリア機能の破綻に寄与していることが示唆されているが、ペリサイトが細胞老化によりどのように変化するかは不明である。

本研究では、加齢における老化ペリサイトの特徴的な変化に着目し、加齢に伴うBBB機能障害におけるペリサイトの関与について検証した。

## **【実験方法】**

### **1. 老齢マウスでのBBB輸送能および脳組織学的変化**

2, 8, 12, 24カ月齢の雄性C57BL/6Jマウスを使用し、経心臓脳灌流法を用いてRIラベル化されたDHA ( $[^{14}\text{C}]$  DHA) の脳移行について評価することで、DHA脳移行の加齢に伴う変化について検証した。また、2, 8, 12, 24カ月齢の雄性C57BL/6Jマウスから脳微小血管を単離し、ウエスタンブロット法を用いてTjsであるZO-1, Ajsであるcadherin, ペリサイトマーカであるPDGFR $\beta$ 及び $\alpha$ SMA, 老化細胞のマーカであるp16, p21, p53発現量を評価した。更に、2, 12, 24カ月齢の雄性C57BL/6Jマウスから全脳を採取し脳切片を作製後、蛍光免疫染色法を用いて、BBBバリア破綻のマーカであるFibrinogen, 脳内免疫担当細胞であり脳内炎症形成に寄与するミクログリアのマーカであるIba1, ペリサイトマーカであるPDGFR $\beta$ 発現について評価した。

### **2. 老化ペリサイトがBBB機能へ与える影響**

ペリサイトの細胞老化がBBBバリア機能に与える影響を検証するため、3週齢(若年)及び18カ月齢(老齢)のWistar ratからペリサイトを単離し、脳血管内皮細胞のバリア機能に与える影響をin vitroにおいて検証した。併せて、一般的に老化細胞を作製する手段として用いられる長期継代培養による複製老化と(2, 4, 7, 10代目を作製)、老齢ラットから単離したペリサイト(老齢ペリサイト)との差異についても評価した。バリア機能は経内皮電気抵抗値(TEER)及びNa-F透過性により評価した。

### **3. ペリサイトによるMFSD2A発現制御機構**

ペリサイトによるMFSD2A発現の制御機構について検証するため、3週齢のWistar ratから単離した脳血管内皮細胞及びペリサイトを用いて共培養モデルを作製し、脳血管内皮細胞におけるMFSD2A発現量について検証した。更に、脳血管内皮細胞とペリサイトとのPDGFB/PDGFR $\beta$ シグナリングがMFSD2A発現に及ぼす影響を検証するため、Pdgfrbノックダウンペリサイトを作製した。

### **4. DHA含有食摂取の加齢性BBB機能変化に対する作用**

最後に、加齢に伴うBBBバリア機能の脆弱化とDHAとの関係を検証するため、19カ月齢のC57BL/6JマウスにDHA非含有食(Control群)もしくはDHA高含有食(DHA群)を13週間摂食させ、脳微小血管におけるTjs, Ajs, MFSD2A発現量を評価した。更に、Fibrinogenの脳内漏出及びミクログリア活性化についても評価した。

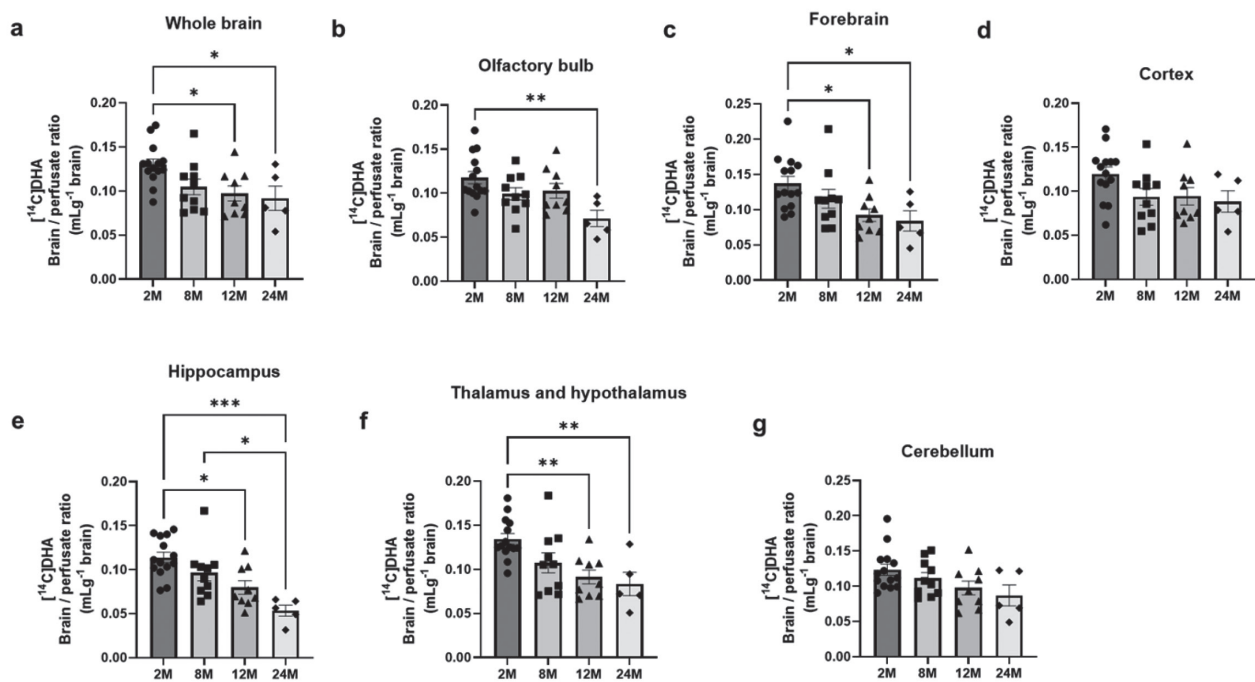
## **【結果】**

### **1. DHA脳移行は12, 24カ月齢マウスにおいて減少する**

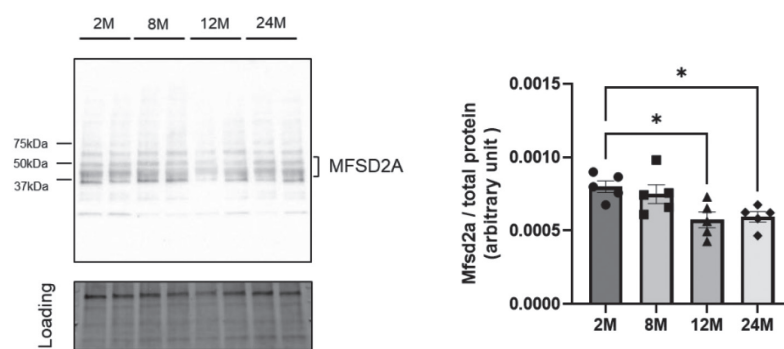
12, 24カ月齢マウスにおいて $[^{14}\text{C}]$  DHAの脳/灌流液割合は、2カ月齢マウスと比べ0.03275 mL/g (2カ月齢 vs 12カ月齢,  $P = 0.0284$ ) と0.03827 mL/g (2カ月齢 vs 24カ月齢,  $P = 0.0380$ ) の有意な減少が認められた(Fig. 1a)。各脳領域におけるDHA脳移行については、嗅球で0.04626 mL/g (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0042$ ) (Fig. 1b), 脳前方で0.04489 mL/g (2 vs. 12カ月齢,  $P = 0.0299$ ), 0.05294 mL/g (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0375$ ) (Fig. 1c), 海馬で0.03402 mL/g (2 vs. 12カ月齢,  $P = 0.0101$ ), 0.06034 mL/g (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0001$ ) (Fig. 1e), 視床・視床下部で0.05106 mL/g (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0067$ ) (Fig. 1f) の有意な減少が認められた。

### **2. 脳微小血管におけるMFSD2A発現量は12, 24カ月齢マウスにおいて減少する**

2カ月齢マウスと比べ12, 24カ月齢マウスではそれぞれ29% ( $P = 0.0242$ ), 26% ( $P = 0.0432$ ) の有意な減少が認められた(Fig. 2)。



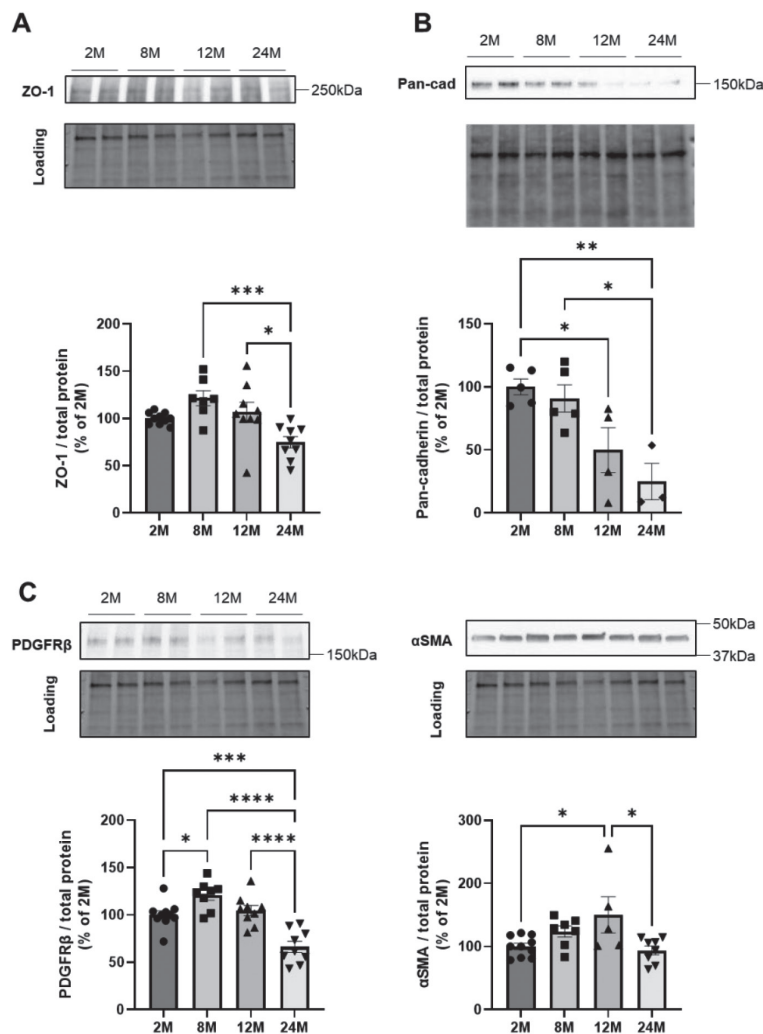
**Fig. 1** Brain uptake of [<sup>14</sup>C] docosahexaenoic acid (DHA) in 2-, 8-, 12-, and 24-month-old mice. Brain/perfusate ratio of [<sup>14</sup>C] DHA as NE-DHA in the whole brain (a), olfactory bulb (b), forebrain (c), cortex (d), hippocampus (e), thalamus and hypothalamus (f), and cerebellum (g) of 2- (2M), 8- (8M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice following in situ transcardiac brain perfusion for 1 min at 2 mL/min. Data are shown as the mean ± standard error of the mean (n = 4 - 15). Each closed symbol represents an individual value. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, significantly different from 2-month-old group.



**Fig. 2** MFSD2A expression levels in brain microvessels from 2-, 8-, 12-, and 24-month-old mice. Representative Western blot images and band intensities quantified by densitometry in 2- (2M), 8- (8M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice. Total protein levels measured by Stain-free technology were used as the loading controls for total protein normalization. Bars indicate the mean ± standard error of the mean (n = 5 - 6). Each closed symbol represents an individual value. \*P < 0.05, significantly different from 2-month-old group.

### 3. 脳微小血管における Tj, Ajs 及びペリサイトマーカ発現量の加齢に伴う変化

24カ月齢マウスの脳微小血管におけるZO-1発現量は、8、12カ月齢マウスと比べ46.57% (8 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0005$ ) と31.85% (12 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0131$ ) の有意な減少を示した (Fig. 3A)。12、24カ月齢マウスの脳微小血管におけるcadherin発現量は、2カ月齢マウスと比べ50.22% (2 vs. 12カ月齢,  $P = 0.0448$ ) と75.15% (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0058$ ) の有意な減少が認められた (Fig. 3B)。PDGFR $\beta$ 発現量は8カ月齢マウスでピークに達し (2カ月齢マウスに対して120.8%の発現,  $P < 0.05$ ), 12、24カ月齢マウスでは2カ月齢マウスに対して104.6%及び66.20% ( $P = 0.0003$  24 vs. 2カ月齢;  $P < 0.0001$  vs. 8カ月齢;  $P < 0.0001$  vs. 12カ月齢) の発現レベルであり, 加齢に伴い徐々に発現量が減少した (Fig. 3C)。 $\alpha$ SMA発現量は12カ月齢マウスで150.1%の発現レベルを示し (2 vs. 12カ月齢,  $P < 0.05$ ), 24カ月齢マウスは12カ月齢マウスと比べ56.27% ( $P = 0.0179$ ) の減少を示した (Fig. 3D)。

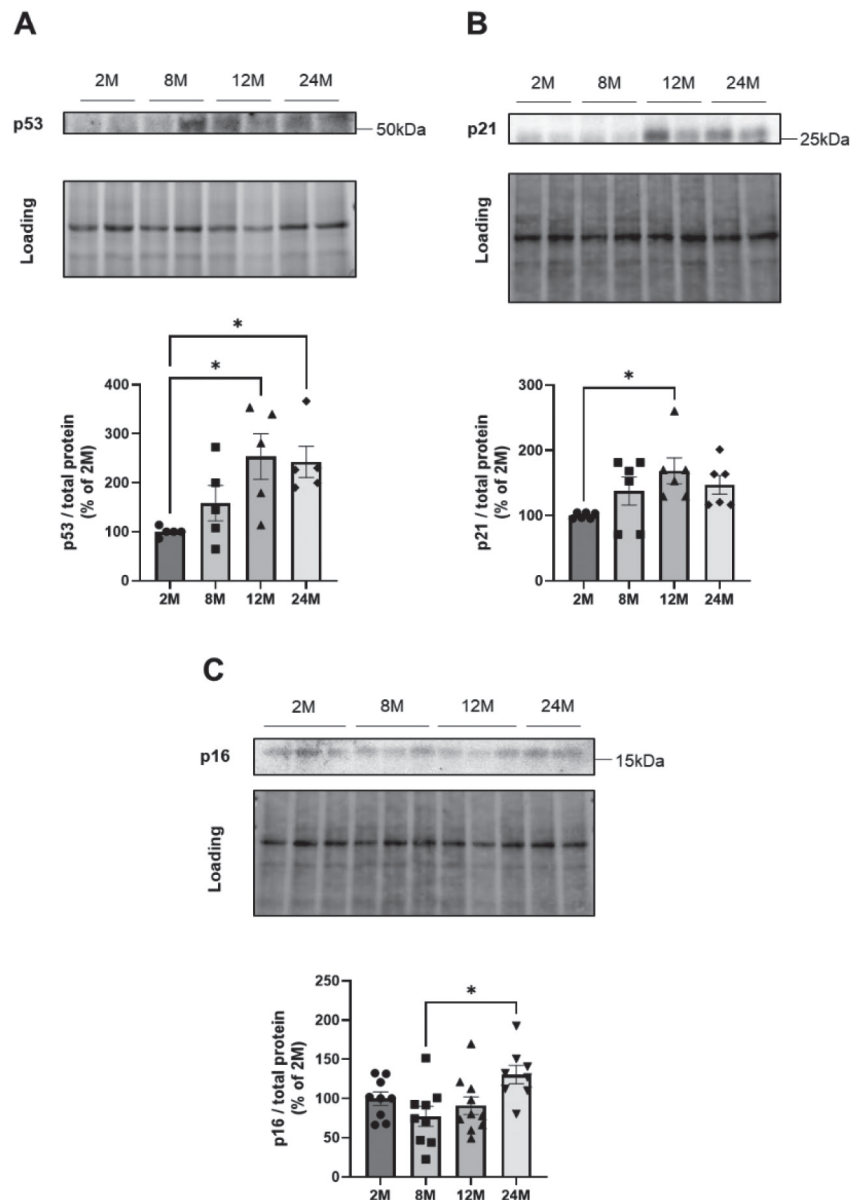


**Fig. 3** ZO-1, occludin, pan-cadherin, PDGFR $\beta$  and  $\alpha$ SMA expression levels in brain microvessels of 2-, 8-, 12-, and 24-month-old mice.

Representative western blotting images of ZO-1 (A), Pan-cadherin (B), PDGFR $\beta$  (C) and  $\alpha$ SMA (D) in 2- (2M), 8- (8M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice. Band intensities quantified by densitometry. Total protein levels measured by stain-free technology used as loading controls for total protein normalization. Data are expressed as percentages of the 2-month-old group's protein level. Bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 3-11$ ). Each closed symbol represents an individual value. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ , significantly different between groups.

#### 4. 脳微小血管における p16, p21 及び p53 発現量の加齢に伴う変化

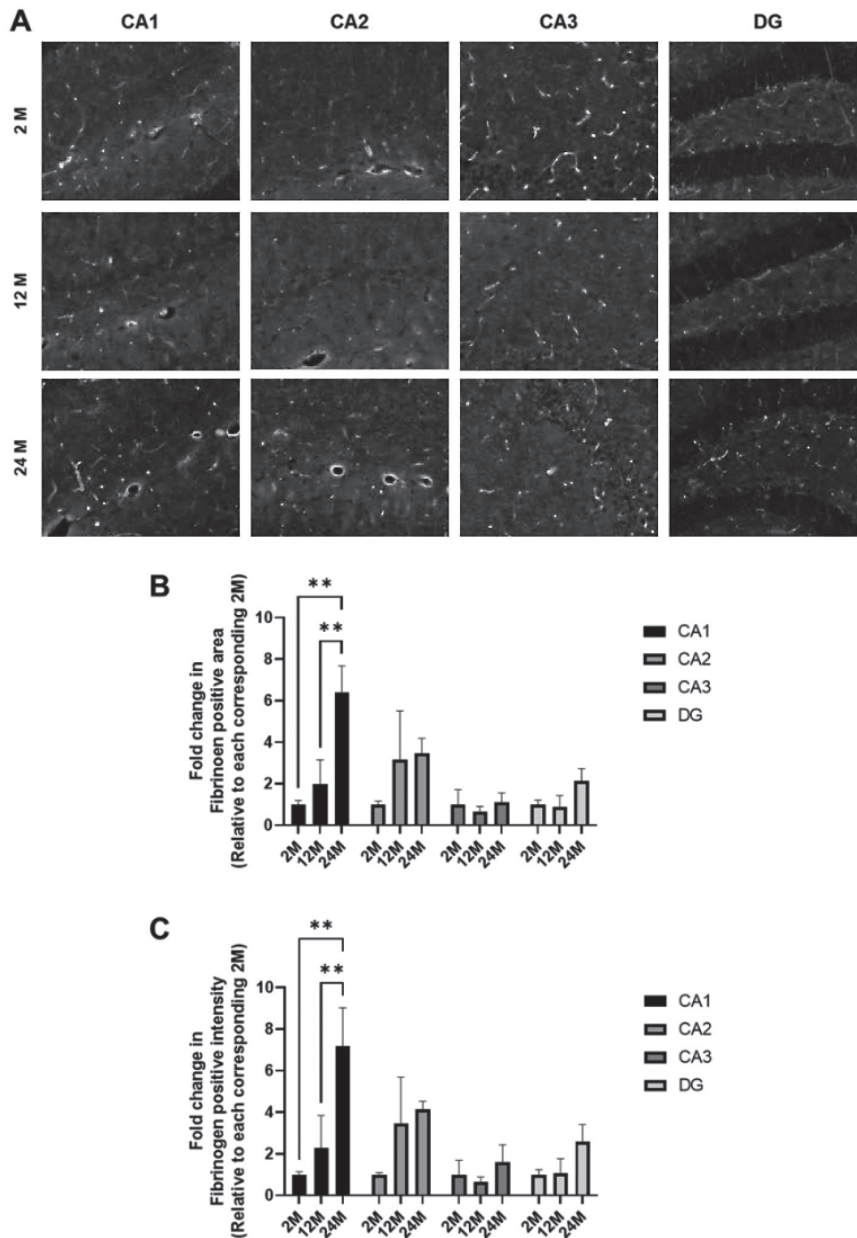
2カ月齢マウスと比べ、12、24カ月齢マウスにおける p53 発現量は 153.6% (2 vs. 12カ月齢,  $P=0.0244$ ) と 142.5% (2 vs. 24カ月齢,  $P=0.0385$ ) 有意に増加した (Fig. 4A)。更に、12カ月齢マウスにおける p21 発現量は2カ月齢マウスと比べ68.75% 増加した (Fig. 4B)。24カ月齢マウスにおける p16 発現量は8カ月齢と比べ有意に増加したが ( $P=0.0127$ )、2カ月齢マウスとの差異は認められなかった (Fig. 4C)。



**Fig. 4** p53, p21, and p16 expression levels in brain microvessels of 2-, 8-, 12-, and 24-month-old mice. Representative western blotting images of p53 (A), p21 (B), and p16 (C) in 2- (2M), 8- (8M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice. Band intensities quantified by densitometry. Total protein levels measured by the stain-free technology used as the loading controls for total protein normalization. Data are expressed as percentages of the 2-month-old group's protein level. Bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 5-10$ ). Each closed symbol represents an individual value. \* $P < 0.05$ , significantly different between each group.

## 5. 海馬における Fibrinogen 脳内漏出に対する加齢の影響

24カ月齢マウスの海馬CA1領域における Fibrinogen 陽性面積及び陽性強度は2カ月齢マウスと比べ6.4倍 ( $P=0.0013$ ) 及び7.2倍 ( $P=0.0011$ ) 有意に増加し, 12カ月齢マウスと比べ陽性面積, 陽性強度共に3.2倍 ( $P=0.0081$ ,  $P=0.0087$ ) の有意な増加を示した (Fig. 5)。

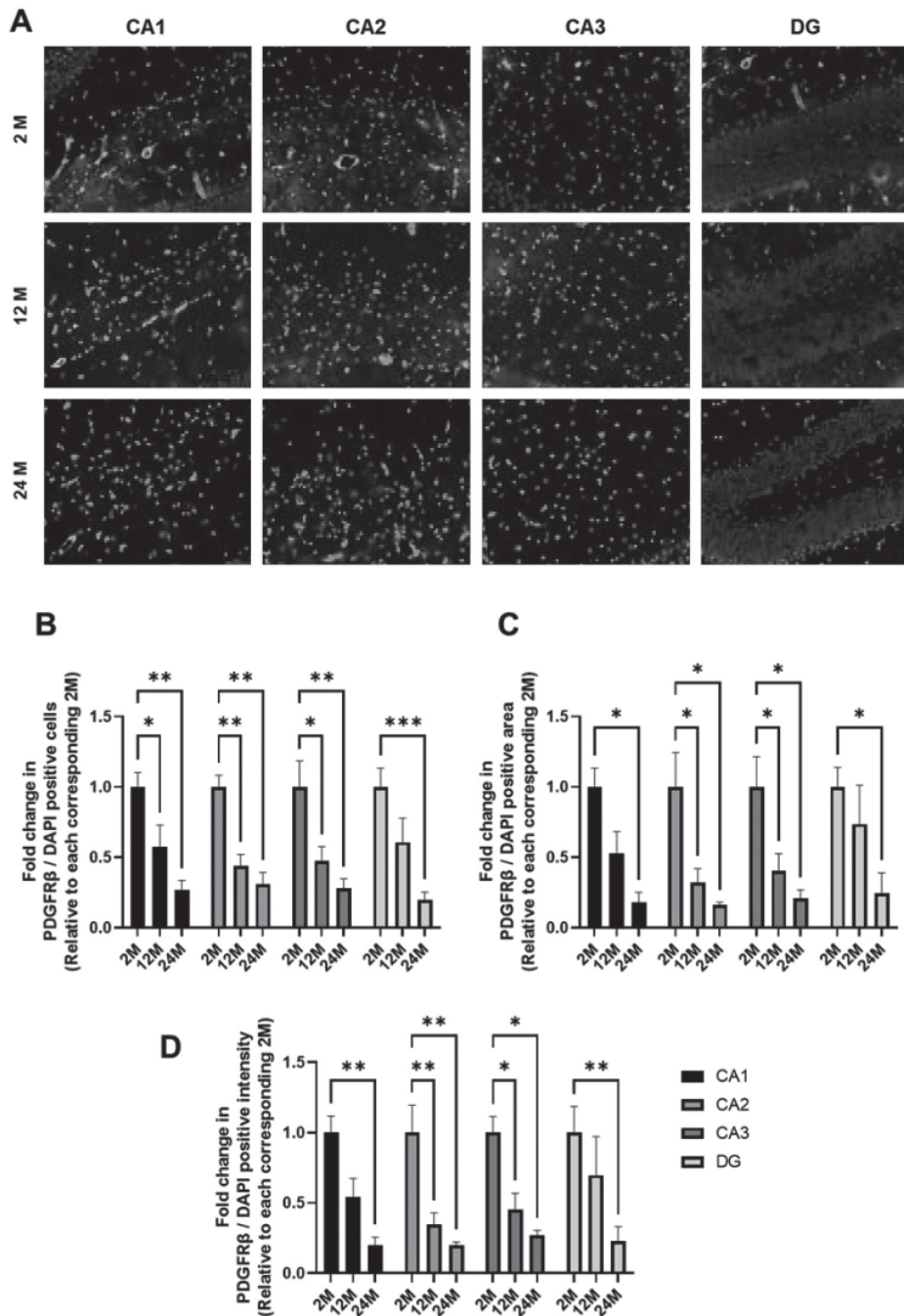


**Fig. 5** Fibrinogen extravasation in the hippocampus of 2-, 12-, and 24-month-old mice.

Representative fluorescence images of fibrinogen (red) and lectin (green) in CA1, CA2, CA3, and DG of the hippocampus in 2- (2M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice (A). Fibrinogen-positive areas (B) and intensity (C) detected and quantified by fluorescence microscopy. Data are expressed as fold changes in each corresponding 2M ( $n=3$ ). Bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean.  $**P < 0.01$ , significantly different from each corresponding 2M.

## 6. 12, 24カ月齢マウスの海馬におけるペリサイトの消失

12, 24カ月齢マウスの海馬におけるPDGFR $\beta$ 陽性細胞数, 陽性面積, 陽性強度は2カ月齢マウスと比べて有意に減少した (Fig. 6)。



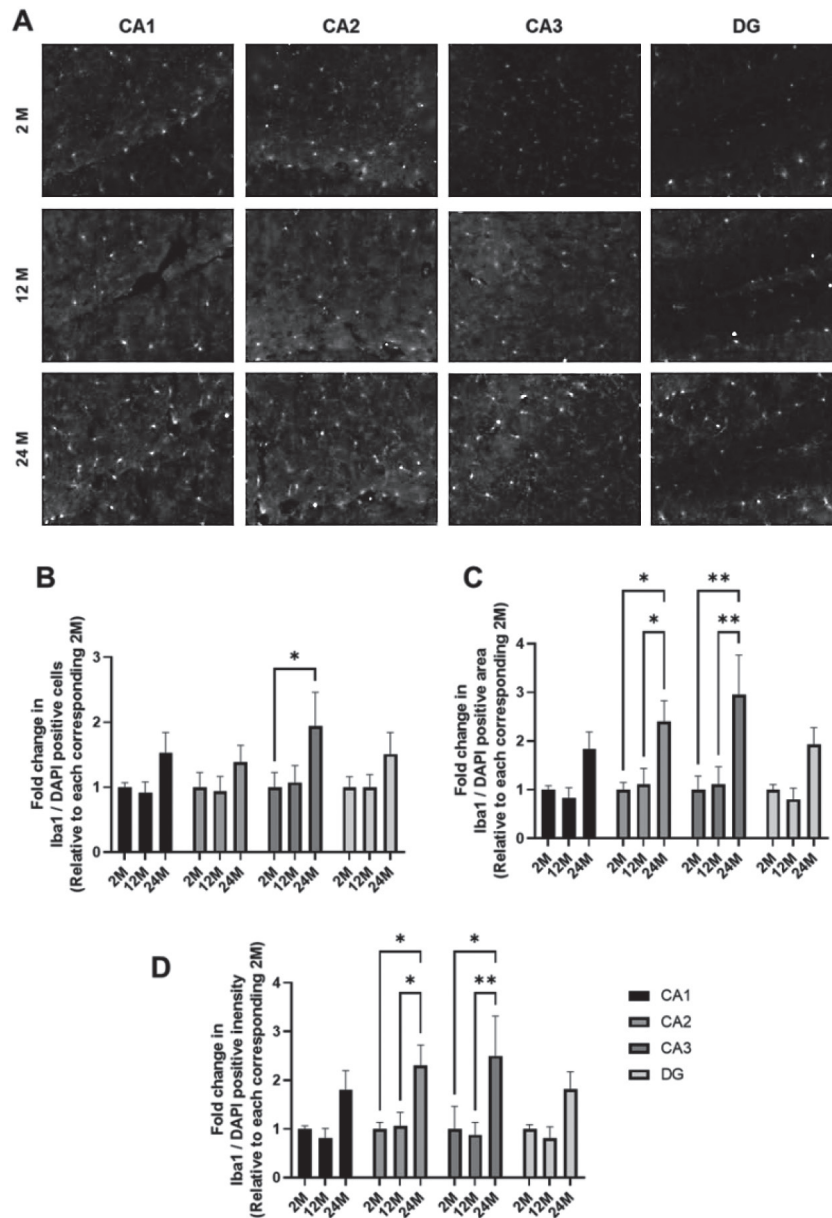
**Fig. 6** PDGFR $\beta$  expression levels in the hippocampus of 2-, 12-, and 24-month-old mice.

Representative fluorescence images of PDGFR $\beta$  (red) and DAPI (blue) in CA 1, CA 2, CA 3, and DG of the hippocampus of 2- (2M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice (A). (B, C, D) PDGFR $\beta$ -positive cells (B), areas (C), and intensity (D) detected and quantified by fluorescence microscopy. Data are expressed as fold changes in each corresponding 2M ( $n = 3-5$ ). Bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from each corresponding 2M.



## 7. 24カ月齢マウスの海馬におけるミクログリア活性化

24カ月齢マウスの海馬CA3領域においてIba1陽性細胞数 (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0487$ ), 陽性面積 (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0013$ , 12 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0014$ ), 陽性強度 (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0163$ , 12 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0057$ ) が有意に増加した。CA2領域においてもIba1陽性面積 (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0240$ , 12 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0288$ ), 陽性強度 (2 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0426$ , 12 vs. 24カ月齢,  $P = 0.0423$ ) が有意に増加した。

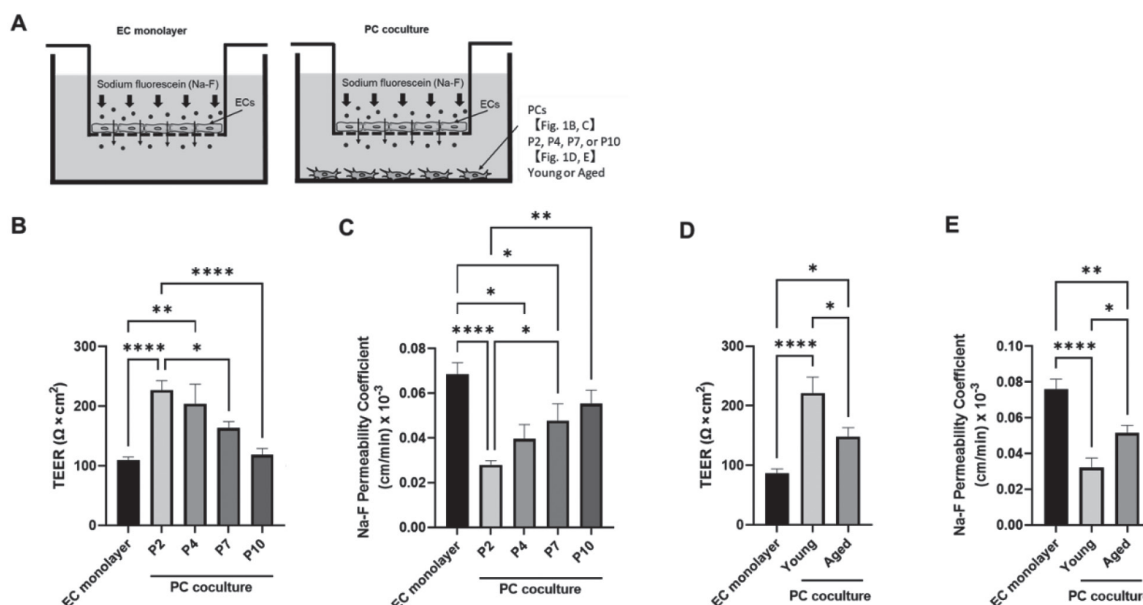


**Fig. 7** Iba1 expression levels in the hippocampus of 2-, 12-, and 24-month-old mice.

Representative fluorescence images of Iba1 (green) and DAPI (blue) in CA1, CA2, CA3, and DG of the hippocampus of 2- (2M), 12- (12M), and 24-month-old (24M) mice (A). Iba1-positive cells (B), areas (C), and intensity (D) detected and quantified by fluorescence microscopy. Data are expressed as fold changes in each corresponding 2M ( $n = 4-5$ ). Bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different from each corresponding 2M.

## 8. 複製老化及び自然老化によるペリサイトのBBBバリア機能向上作用の減弱

脳血管内皮細胞単独群と比べ、2, 4代目ペリサイト共培養群はTEERが2.1倍 ( $P < 0.0001$ ) と1.9倍 ( $P = 0.0017$ ) 有意に増加した。しかし、7, 10代目ペリサイト共培養群のTEERは2代目ペリサイト共培養群よりも有意に低かった (Fig. 8B)。2, 4, 7代目ペリサイト共培養群は脳血管内皮細胞単独群と比べNa-F透過性が59.15% ( $P < 0.0001$ ), 42.32% ( $P = 0.0131$ ), 及び30.54% ( $P = 0.0261$ ) 有意に低値であった。しかし、10代目ペリサイト共培養群ではNa-F透過性の有意な減少は認められなかった (Fig. 8C)。複製老化と同様に、老齢ペリサイトはTEERの増加及びNa-F透過性の減少を若年ペリサイトほど示すことはできなかった (Fig. 8D, E)。

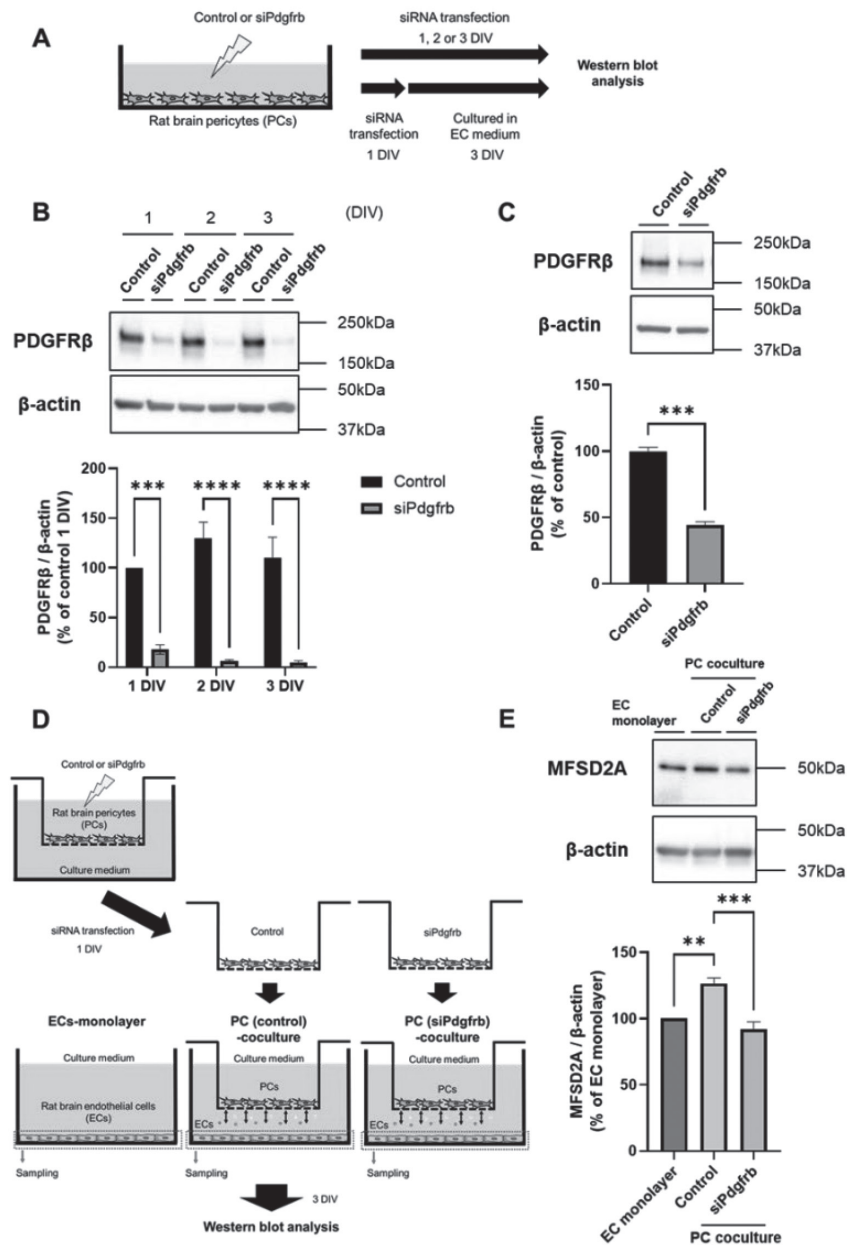


**Fig. 8** Influence of brain pericytes, which were serially passaged or isolated from 18-month-old rats, on the endothelial barrier function of BBB.

(A) Schematic showing the *in vitro* BBB models using rat brain endothelial cells (ECs) co-cultured with or without rat brain pericytes (PCs), which were serially passaged or isolated from 18-month-old rats. (B, D) TEER values and (C, E) permeability coefficients of sodium fluorescein (Na-F) for the EC monolayer were measured after culturing for 3 days. Bar graph represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7-24$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## 9. 脳血管内皮細胞とペリサイトとのPDGFRβ/PDGFRβシグナリングはMFSD2A発現を制御する

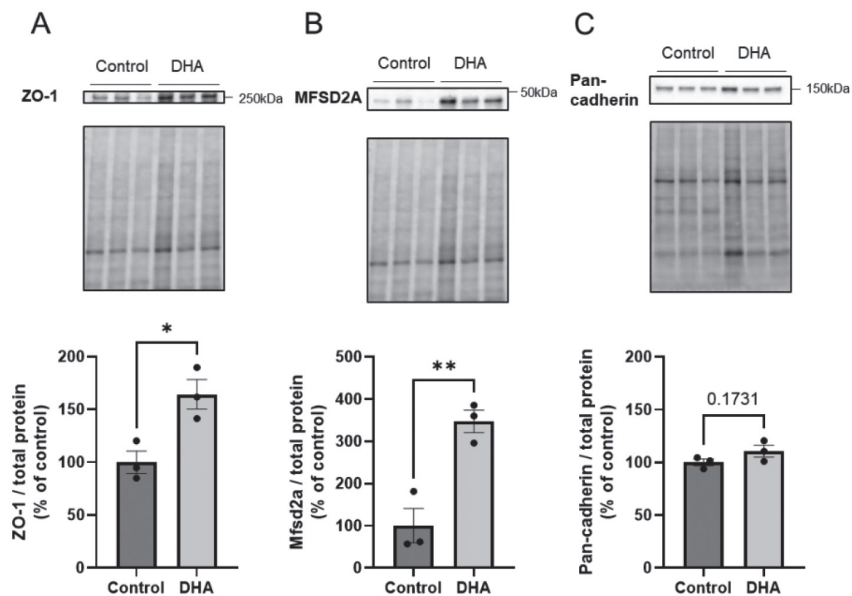
ペリサイトにおけるPDGFRβノックダウン効果を検証したところ、siPdgfrb導入1日後よりPDGFRβ発現量がNegative control導入と比べ82.26% ( $P = 0.0006$ ) 有意に低下した (Fig. 9B)。また、このPDGFRβノックダウン効果は3日間持続することを確認した (56%の減少,  $P = 0.0001$ ) (Fig. 9C)。このPDGFRβノックダウンペリサイトと内皮細胞を3日間共培養した後MFSD2A発現量を評価したところ、Negative control導入ペリサイトと共培養した内皮細胞はMFSD2A発現量が26.6% ( $P = 0.0050$ ) 増加し、この発現量の増加はPDGFRβノックダウンによって阻害された ( $P = 0.0004$ ) (Fig. 9E)。



**Fig. 9** Effect of PDGFR $\beta$ -knockdown pericytes on the MFSD2A expression in brain endothelial cells (ECs). (A) A schematic diagram of experimental procedures for siRNA transfection to rat brain pericytes. (B) The top panel shows representative western blotting images of PDGFR $\beta$  and corresponding  $\beta$ -actin in pericytes transfected with siPdgrfb or negative-control siRNA (control) for 1–3 days in vitro. The bottom panel shows the quantified band intensities corrected by  $\beta$ -actin as the loading control ( $n = 3$ ). (C) The top panel shows representative western blotting images of PDGFR $\beta$  and corresponding  $\beta$ -actin in pericytes transfected with siPdgrfb or a negative control (control). After a 24-h transfection, cells were cultured by replacing with the EC medium for 3 days in vitro. The bottom panel shows the quantified band intensities corrected by  $\beta$ -actin as the loading control ( $n = 3$ ). (D) A schematic diagram of experimental procedures for evaluating the effect of Pdgrfb-knockdown pericytes on the MFSD2A protein expression in ECs. (E) The top panel shows representative western blotting images of MFSD2A and corresponding  $\beta$ -actin in ECs cultured with or without siPdgrfb- or negative control (control)-transfected pericytes. The bottom panel shows the quantified band intensities corrected by  $\beta$ -actin as the loading control ( $n = 4-5$ ). Data are expressed as percentages of control in pericytes or the EC monolayer. The bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and \*\*\*\* $P < 0.0001$ , significantly different from control pericytes or the EC monolayer.

## 10. 老齢マウスの脳微小血管におけるZO-1及びMFSD2A発現量はDHA補給によって増加する

DHA群はControl群と比較し、ZO-1発現量が1.64倍 ( $P = 0.0213$ )、MFSD2A発現量が3.47倍 ( $P = 0.0071$ )増加した (Fig. 10)。



**Fig. 10** ZO-1, MFSD2A and pan-cadherin expression levels in brain microvessels isolated from CO-fed and DHA-fed aged mice.

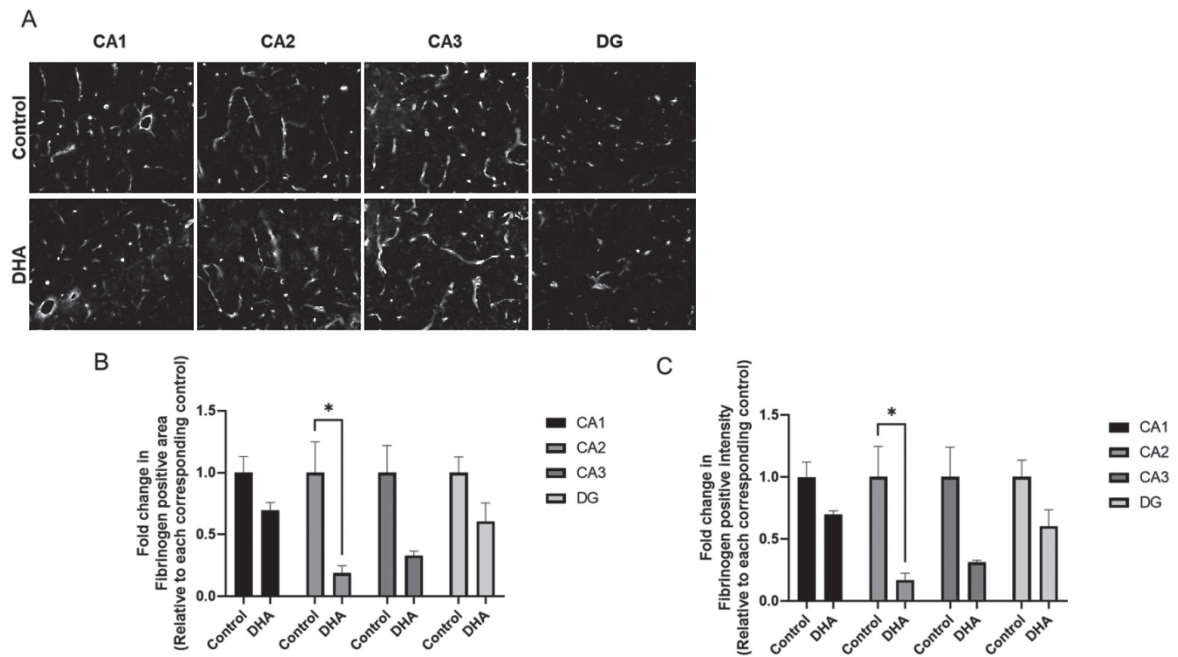
Representative western blotting images of ZO-1 (A), MFSD2A (B) and pan-cadherin (C) in CO-fed (control group) and DHA-fed (DHA group) aged mice. Band intensities quantified by densitometry. Total protein levels measured by Stain-free technology used as the loading controls for total protein normalization. Data are expressed as percentages of the control group's protein level. The bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean ( $n = 3$ ). Each closed symbol represents an individual value. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , significantly different compared to the control group.

## 11. 老齢マウスのBBBを介したFibrinogen脳内漏出に対するDHA補給の効果

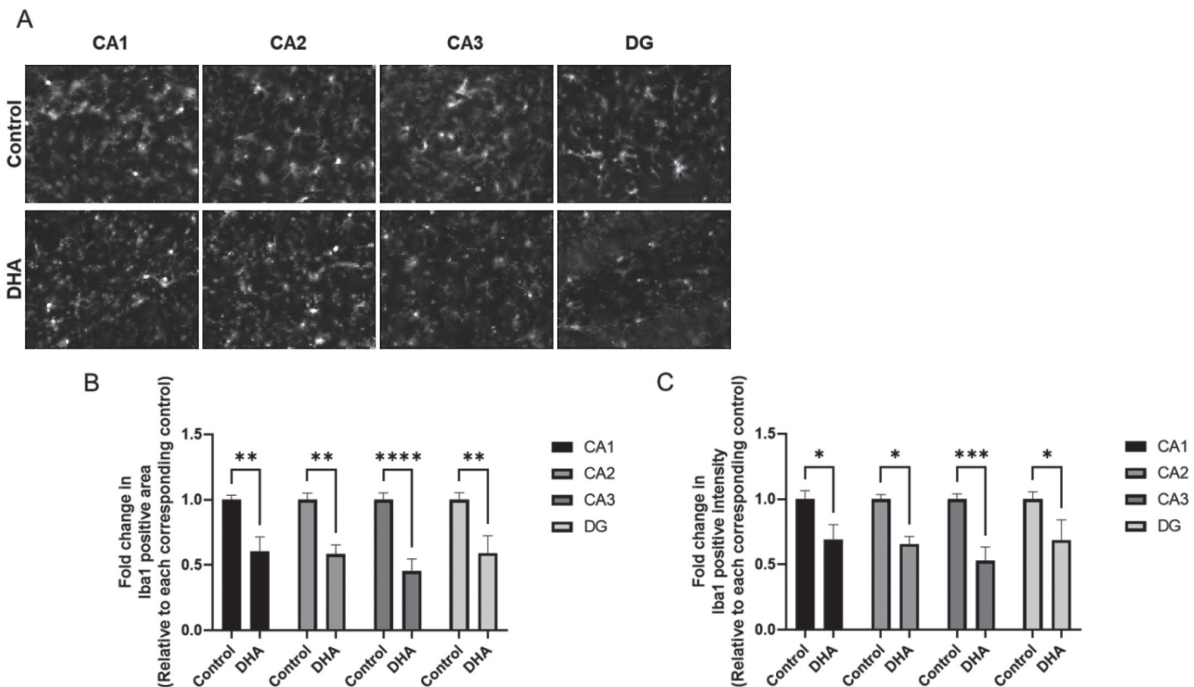
DHA群はControl群と比べ、海馬CA2におけるFibrinogen陽性面積、陽性強度が81.19% ( $P = 0.0181$ )及び83.10% ( $P = 0.0171$ )低下し、CA3においてもFibrinogen陽性面積、陽性強度が67.02% ( $P = 0.0638$ )及び68.90% ( $P = 0.0595$ )低下した (Fig. 11)。

## 12. 老齢マウスのミクログリア活性化に対するDHA補給の効果

DHA群はControl群と比べ、海馬におけるIba1陽性面積及び陽性強度を有意に低下させた。Control群に対するDHA群の陽性面積の比率はCA1で0.3952 ( $P = 0.0022$ )、CA2で0.4156 ( $P = 0.0013$ )、CA3で0.5453 ( $P < 0.0001$ )、DGで0.4080 ( $P = 0.0016$ )であった。陽性強度はCA1で0.3119 ( $P = 0.0299$ )、CA2で0.3447 ( $P = 0.0144$ )、CA3で0.4701 ( $P = 0.0008$ )、DGで0.3148 ( $P = 0.0281$ )と有意な変化を示した。



**Fig. 11** Fibrinogen expression levels in the hippocampus of CO- and DHA-fed aged mice. Representative fluorescence images of fibrinogen (red) and lectin (green) in CA 1, CA 2, CA 3, and DG of the hippocampus of CO- (control group) and DHA-fed (DHA group) aged mice (A). Fibrinogen-positive areas (B) and intensity (C) detected and quantified by fluorescence microscopy. Data are expressed as fold changes in each corresponding control (n = 3). The bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean.



**Fig. 12** Iba1 expression levels in the hippocampus of CO- and DHA-fed aged mice. Representative fluorescence images of Iba1 (green) and DAPI (blue) in CA 1, CA 2, CA 3, and DG of the hippocampus of CO-fed (control group) and DHA-fed (DHA group) aged mice (A). Iba1-positive areas (B) and intensity (C) detected and quantified by fluorescence microscopy. Data are expressed as fold changes in each corresponding control (n = 3–6). The bars indicate mean  $\pm$  standard error of mean.

## 【考察】

各月齢マウスの [ $^{14}\text{C}$ ] DHA 脳移行に関する実験より、DHA 脳移行は加齢に伴い減少することが示された (Fig.1)。そして、12、24カ月齢マウスにおける [ $^{14}\text{C}$ ] DHA 脳移行の低下と一致して、脳微小血管における MFSD2A 発現量の減少が認められたことから (Fig.2)、加齢に伴う MFSD2A 発現量の減少が DHA 脳移行の低下に寄与していることが示唆される。加齢に伴い脳内 DHA レベルは低下することが報告されているが、これは MFSD2A 機能低下による DHA 脳移行の低下に起因する可能性がある。また、加齢に伴う脳内 DHA レベルの低下は認知機能の低下と関連していることから、加齢に伴う認知機能の低下を予防する上でも MFSD2A が治療ターゲットになりうる可能性がある。

脳微小血管における Tjs 構成タンパク質である ZO-1, Ajs である cadherin 及びペリサイトマーカである PDGFR $\beta$  は加齢に伴い減少が認められた (Fig.3)。更に、細胞老化を特徴づける p53, p21, p16 発現量の加齢に伴う増加も認められた (Fig.4)。BBB 破綻マーカである血漿タンパク質の Fibrinogen 脳内漏出は、24カ月齢マウスにおいて確認された (Fig.5)。加齢に伴う BBB バリア機能の破綻は、PDGFR $\beta$  及び ZO-1 発現量が最も低レベルにあり、p16 発現量が最も高レベルにある状態で生じており、脳微小血管における細胞老化の進行が BBB バリア機能にとって致命的な影響を与えることを示唆している。また、ペリサイト細胞数は2カ月齢マウスと比較し12カ月齢マウスから大幅に減少しており (Fig.6)、MFSD2A 発現量の減少が加齢に伴うペリサイトの減少によるものであることが示唆される。更に、神経変性疾患の病態形成に寄与するミクログリアの活性化は24カ月齢マウスで確認された (Fig.7)。フィブリノーゲンはミクログリア活性化を惹き起こすことが報告されており、加齢に伴い脳内に流入した Fibrinogen によってミクログリア活性化が生じたことが示唆される。健全な加齢においてもミクログリア活性化が生じており、ミクログリアの更なる活性化が神経変性疾患の病態形成に寄与している可能性がある。

ペリサイトの細胞老化が BBB バリア機能に与える影響を検証したところ、老齢ラット由来ペリサイト、及び複製老化によって細胞老化を誘発したペリサイトは BBB バリア機能強化作用が減弱することから (Fig.8)、加齢に伴う BBB バリア機能の破綻にペリサイトの細胞老化が寄与している可能性が示された。

脳血管内皮細胞の MFSD2A 発現制御に、脳血管内皮細胞とペリサイトとの PDGFB/PDGFR $\beta$  シグナルが関与することが示された (Fig.9)。このことは、加齢に伴う MFSD2A の機能的発現減少にペリサイトが寄与していることを示唆している。

DHA 群はコントロール群と比較し ZO-1 及び MFSD2A 発現量が増加し (Fig.10)、フィブリノーゲンの脳内漏出を抑制した (Fig.11)。更に、DHA 摂取はミクログリア活性化も抑制した (Fig.12)。以上のことから、DHA は脳血管内皮細胞に作用することで加齢性 BBB バリア機能障害を改善し、フィブリノーゲンの脳内漏出を抑制することで、ミクログリア活性化を抑制する可能性がある。これは、加齢に伴う脳血管内皮細胞内の DHA レベルの低下が、BBB バリア機能の脆弱化、及びそれに付随するミクログリア活性化に寄与していることを示唆するものである。

本研究を総括すると、ペリサイトは若年、成人期において BBB バリア機能の強化及び脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現を制御することで、BBB 機能維持に寄与している。しかし、中高齢期においてペリサイトが消失することで、脳血管内皮細胞における MFSD2A 発現量が減少し、DHA 脳移行が低下する可能性がある。脳内 DHA の半減期は長いため、この DHA 脳移行の低下は脳内 DHA レベルの低下に長期的に寄与すると考えられる。更に、脳ペリサイトの減少は ZO-1 発現量にも影響を及ぼすが、中高齢期においては BBB バリアが破綻するほどの影響はない可能性がある。老齢期において、ペリサイトの細胞老化及び脳血管内皮細胞内の DHA レベルの低下が BBB バリアの破綻を招き、血中から脳内へフィブリノーゲンが流入することで、二次的にミクログリアを活性化させることが示唆される。そして、ミクログリ

ア活性化による脳内炎症は神経細胞を障害する。この障害の蓄積が加齢性神経変性疾患の病態進展に寄与する可能性がある。

以上、本研究結果は、老化したペリサイトの機能変化が、加齢性BBB機能障害を惹き起こすことを示唆する新たな知見を提供し、加齢性BBB機能障害の修復を指向した中枢神経変性疾患の新規予防戦略の構築に資するものである。

#### 【参考文献】

1. Erickson MA, Banks WA. Age-Associated Changes in the Immune System and Blood-Brain Barrier Functions. *Int J Mol Sci.* 2019;20 (7).
2. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018;14 (3) :133-50.
3. Nation DA, Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, D'Orazio LM, Pachicano M, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med.* 2019;25 (2) :270-6.
4. Verheggen ICM, de Jong JJA, van Boxtel MPJ, Gronenschild E, Palm WM, Postma AA, et al. Increase in blood-brain barrier leakage in healthy, older adults. *Geroscience.* 2020;42 (4) :1183-93.
5. Erdő F, Denes L, de Lange E. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37 (1) :4-24.
6. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015;85 (2) :296-302.
7. Mooradian AD, Haas MJ, Chehade JM. Age-related changes in rat cerebral occludin and zonula occludens-1 (ZO-1). *Mech Ageing Dev.* 2003;124 (2) :143-6.
8. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37 (1) :13-25.
9. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* 2007;40 (2) :148-60.
10. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002;38 (6) :323-37.
11. Angers M, Uldry M, Kong D, Gimble JM, Jetten AM. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *Biochem J.* 2008;416 (3) :347-55.
12. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, et al. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature.* 2014;509 (7501) :507-11.
13. Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, et al. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature.* 2014;509 (7501) :503-6.
14. Eser Ocak P, Ocak U, Sherchan P, Zhang JH, Tang J. Insights into major facilitator superfamily domain-containing protein-2a (Mfsd2a) in physiology and pathophysiology. What do we know so far? *J Neurosci Res.* 2020;98 (1) :29-41.
15. Dalkara T, Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M. Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2011;122 (1) :1-9.
16. Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36 (2) :451-5.

17. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009;54 (3-4) :253-63 .
18. Dohgu S, Takata F, Kataoka Y. [Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function] . *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2015 ;146 (1) :63-5 .
19. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468 (7323) :562-6 .



## てんかん治療薬開発を目指した*Scn1a*変異マウスの病態解析 並びに新規シナプス薬効標本の確立

内野 鉦也

臨床疾患薬理学研究室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

### Pathophysiological analysis of *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and the establishment of a novel synaptic culture system for the development of therapeutic drugs for epilepsy

Kouya UCHINO

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

#### Abstract

Epilepsy is a pervasive and severe neurological disorder that affects 0.5–1% of the population, predominantly in childhood. Epilepsy patients are generally treated with antiepileptic drugs, but about 30% have refractory epilepsy that does not respond to such drug therapy. With this background, the molecular mechanisms underlying the onset of refractory epilepsy remain mostly unknown. Therefore, epilepsy is one of the most challenging diseases for developing fundamental therapies and drugs. In this study, we investigated the mechanisms of Dravet syndrome that is refractory epilepsy, and developed a novel synaptic culture system for the treatment of the disease. In Chapter 1, we found that inhibitory synaptic transmission is impaired at higher extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in the *Scn1a*<sup>+/-</sup> mouse model of Dravet syndrome. In Chapter 2, we found that astrocyte Ca<sup>2+</sup> signaling is facilitated in an *Scn1a*<sup>+/-</sup> mouse model. In Chapter 3, we established an autaptic culture with human-induced pluripotent stem cell-derived astrocytes. The establishment of this culture allows a detailed analysis of synaptic modification by patient-derived astrocytes. Therefore, our methodology would facilitate studies on the pathological analysis of many central nervous system diseases, including epilepsy, as well as the development of medicines.

**Keywords** : Epilepsy, Synapse, Astrocyte, Induced pluripotent stem cell

#### 【緒言】

てんかんは、神経細胞の過剰な電氣的興奮に伴って、意識障害やけいれんなどを発作的に起こす慢性的な神経疾患である。熱性けいれんを含めると全人口の1%に及ぶ非常に高頻度な疾患であり、多くは小児期に発症する。一般的には抗てんかん薬による治療が行われるが、約3割の患者では抗てんかん薬が無効なてんかんを有している。また、難治性てんかん発症の分子メカニズムはほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が困難な疾病の一つである。加えて、難治性の小児てんかん患者は発達障害や精神遅滞などの合併症も生ずることがあり、成人になっても社会生活に対する不安を伴う場合もある(Hirose et al., 2000, 2002)。そこで本研究では、難治性てんかんであるDravet症候群モデルマウスのシナプス機能及びアストロサイトの活性を評価するとともに、ヒトiPS細胞の活用を検討した。第1章ではDravet症候群モデルマウスである*Scn1a*キックインマウスの興奮性および抑制性ニューロンのシナプス

病態について解析した。第2章では*Scn1a*キックインマウスにおけるアストロサイトの活性を評価した。さらにヒトのアストロサイトに着目したシナプス薬効評価モデルの確立を目的として、第3章ではヒトiPS細胞由来アストロサイトを有した新規シナプス薬効標本を確立した。

## 第1章 *Scn1a*キックインマウスニューロンのシナプス機能解析

(Uchino K et al., *Scientific Reports*, 2021 .May. 20.)

### 【目的】

Dravet症候群は、乳児期に発症して頻回性のてんかん発作により重篤な脳症や発達障害をきたす難治性てんかんである。発症の原因には、患者の約80%以上に電位依存性ナトリウムチャネルであるNav1.1をエンコードしている*SCN1A*のヘテロ変異が認められている。近年、*SCN1A*遺伝子のヘテロ変異を有するマウスが、Dravet症候群のモデルマウスとして報告された(Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007; Cheah et al., 2012; Han et al., 2012)。これらのモデル動物では*SCN1A*遺伝子の変異により抑制性神経機能の低下あるいは興奮性神経機能の亢進が生じており、脳内の興奮性と抑制性のバランスが崩壊し非常にてんかんを発症しやすい状態になっている。正常な脳では、多数のニューロンがお互いに結合することで神経ネットワークを形成し、情報をバランス良く伝導・伝達することで中枢恒常性を維持している。ニューロンの架け橋である『シナプス』では、化学伝達物質を介して効率的に情報が伝達されている。すなわち、てんかん発生時には、神経ネットワークの興奮性と抑制性のバランス(E/Iバランス)が一過性もしくは持続的に破綻し、シナプス活動が過剰に興奮すると考えられる。よって、てんかんを「シナプス病態」として捉え、シナプス機能の病態を解明することは、根本的なてんかん治療および創薬への一助となる可能性がある。そこで*Scn1a*ヘテロ変異を有する*Scn1a*キックインマウスを用いて興奮性及び抑制性シナプス機能を解析した。

### 【実験方法】

実験動物には、*Scn1a*キックイン(Het)マウスを用いた。このマウスは*Scn1a*遺伝子をコードする領域のうちexon 8-12がネオマイシン耐性遺伝子に置換されたキックインマウスであり、Nav1.1がノックアウトされたマウスと同じ表現型を示す。Het及び野生型(WT)マウスの海馬または線条体より単離したニューロンを用いて単一ニューロン培養標本であるオータプス培養標本を作製し、ニューロン培養13~17日目に、シナプス伝達をパッチクランプ法により解析した。また、神経細胞のシナプス数を免疫染色法により定量した。

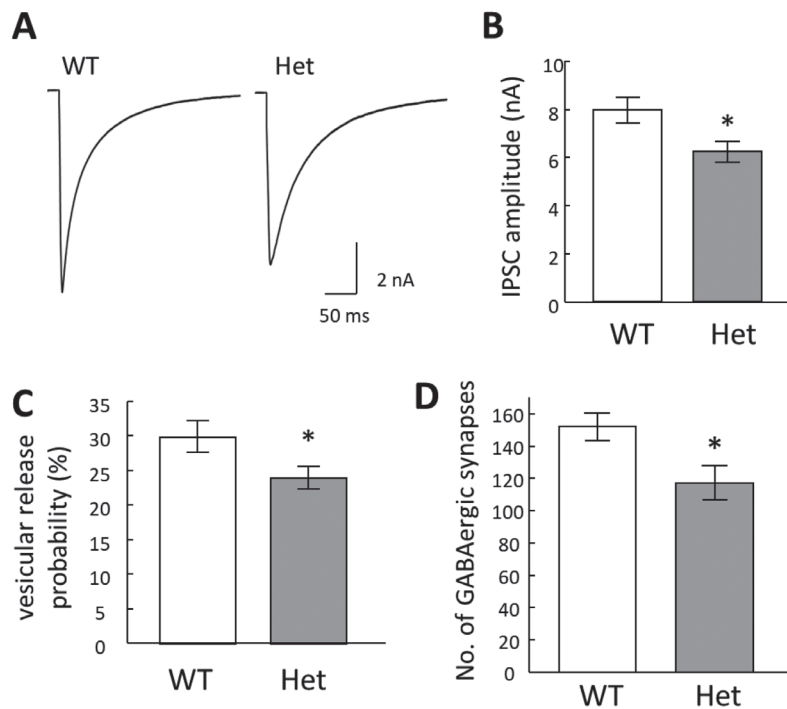
### 【結果】

HetニューロンとWTニューロンにおいて、興奮性シナプス後電流(Excitatory postsynaptic current, EPSC)の振幅は同程度であったが、抑制性シナプス後電流(Inhibitory postsynaptic current, IPSC)の振幅はHetニューロンで有意に低下した(Fig. 1. A, B)。さらに、抑制性シナプス小胞の開口放出確率とシナプスの数は、WTニューロンと比較してHetニューロンでは有意に低下していた(Fig. 1. C, D)。加えて、Hetニューロンにおいて細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴いEPSCの振幅は比例的に増加したのに対して、IPSCの振幅は増加しなかった(Fig. 2, A, B)。

### 【考察】

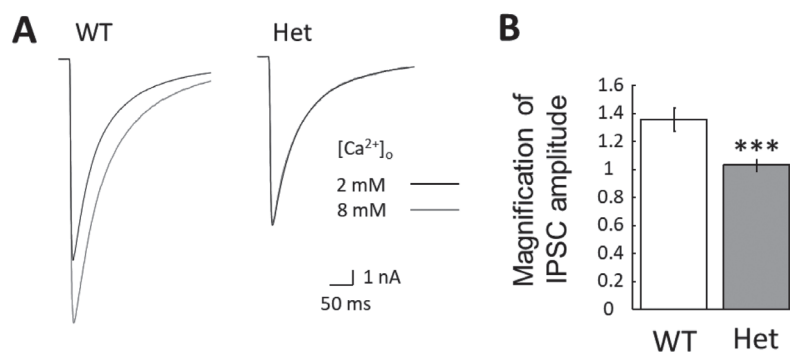
*Scn1a*キックインマウスのニューロンにおいて、興奮性シナプス伝達の亢進作用は観察できなかった。一方で、抑制性ニューロンではシナプス数の低下、および開口放出確率の低下によって抑制性シナプス伝達が有意に低下していた。加えて、てんかん発作時を近似した細胞外Ca<sup>2+</sup>高濃度条件では、より一層E/Iバランスが崩壊していた。以上のことから、本研究によって*Scn1a*キックインマウスでは抑制性シナ

プス機能低下によってE/Iバランスが破綻していることが明らかとなった。



**Fig. 1** Changes in the inhibitory synaptic transmission of *Scn1a*<sup>+/-</sup> (Het) neurons.

(A) Representative traces of evoked inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) recorded from a single autaptic neuron of either wild-type (WT) or Het mice. Depolarization artifacts caused by the generated action currents have been removed for clarity of presentation. (B) Average amplitudes of the evoked IPSCs in neurons of WT or Het mice (WT:  $7.94 \pm 0.55$  nA,  $n=96$ ; Het:  $6.18 \pm 0.42$  nA,  $n=98/N=5$  cultures,  $*p < 0.05$ ). (C) Vesicular release probability ( $P_{vr}$ ) in single autaptic neurons of either WT or Het mice (WT:  $29.99 \pm 2.31\%$ ,  $n=91$ ; Het:  $24.01 \pm 1.66\%$ ,  $n=92/N=5$  cultures,  $*p < 0.05$ ). (D) The number of VGAT-positive synaptic puncta in autaptic neurons of either WT or Het mice (WT:  $152.23 \pm 7.91$ ,  $n=70$ , Het:  $117 \pm 10.61$ ,  $n=74/N=8$  cultures,  $*p < 0.05$ ).



**Fig. 2** Changes in extracellular  $Ca^{2+}$  concentration sensitivity of inhibitory synapses in Het neurons.

(A) Representative traces of evoked IPSCs recorded at 2 mM  $[Ca^{2+}]_o$  (black line) and 8 mM  $[Ca^{2+}]_o$  (red line) from neurons of either WT or Het mice. Depolarization artifacts caused by the generated action currents have been removed for clarity of presentation. (B) Average magnification of the evoked IPSCs at 8 mM  $[Ca^{2+}]_o$  based on IPSC amplitudes at 2 mM  $[Ca^{2+}]_o$  in neurons of WT or Het mice (WT:  $1.36 \pm 0.09$  mM,  $n=35$ , Het:  $1.02 \pm 0.04$  mM,  $n=36/N=9$  cultures,  $***p < 0.001$ ).

## 第2章 *Scn1a*キックインマウスアストロサイトのCa<sup>2+</sup>発火解析

(Uchino K et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2023 . Jan. 1.)

### 【目的】

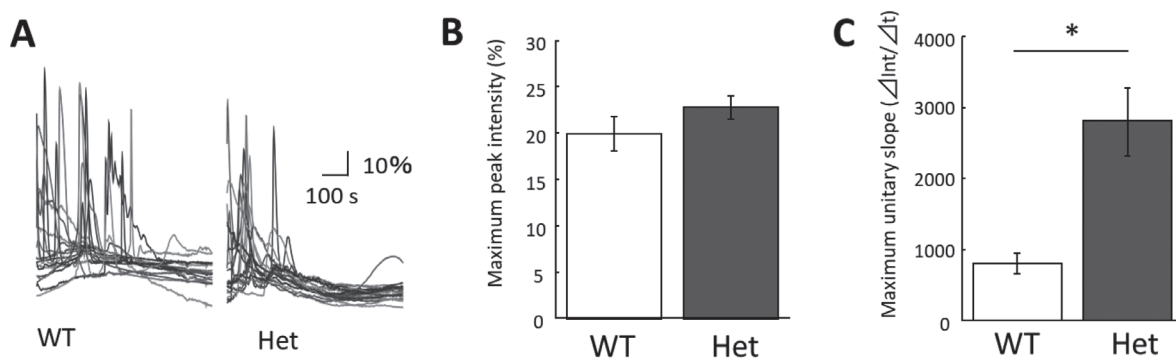
アストロサイトは中枢神経系全般に存在し、ニューロン間のシナプス伝達やシナプスの形成、成熟に関わっている (Allen and Barres, 2009)。活動電位を発生させることにより情報伝達を行うニューロンと異なり、アストロサイトは活動電位を発生しないため、非興奮性の細胞であると考えられてきた。しかしながら、カルシウムイメージング法の確立により、アストロサイトが細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度変化 (Ca<sup>2+</sup>発火)を示す興奮性の細胞であることがわかった。アストロサイトはこのCa<sup>2+</sup>発火を伴いながら、グルタミン酸やATP, D-serineなどのグリア伝達物質や神経伝達物質を放出することでニューロンの活動を調節している (Aguilhon et al., 2008)。近年アストロサイトのCa<sup>2+</sup>発火がニューロンを介して、てんかん発作に関与していることが明らかとなった (Fellin et al., 2006; Tian et al., 2005)。しかしながらDravet症候群においては、神経細胞のみの研究にとどまっており、アストロサイトに変化が生じているかどうかは不明である。よってDravet症候群のアストロサイトのCa<sup>2+</sup>発火を解析することは、新たな病態機序解明につながることを考え、*Scn1a*キックインマウスのアストロサイトのCa<sup>2+</sup>活性をカルシウムイメージング法にて評価した。

### 【実験方法】

実験動物は第1章と同じ*Scn1a*キックイン (Het) マウスを用いた。野生型 (WT) 及びHetマウスの大脳皮質よりアストロサイトを単離、培養し標本を作製した。実験にはOregon Green BAPTA-1, AM (OGB1) とFluo4-AMを使用した。OGB1ではアストロサイトの自発的なCa<sup>2+</sup>発火を記録し、Fluo4-AMではATPにて誘発したCa<sup>2+</sup>発火を記録した。記録したCa<sup>2+</sup>発火の波形の最大値、傾き、面積をWT及びHetマウスのアストロサイトで比較した。

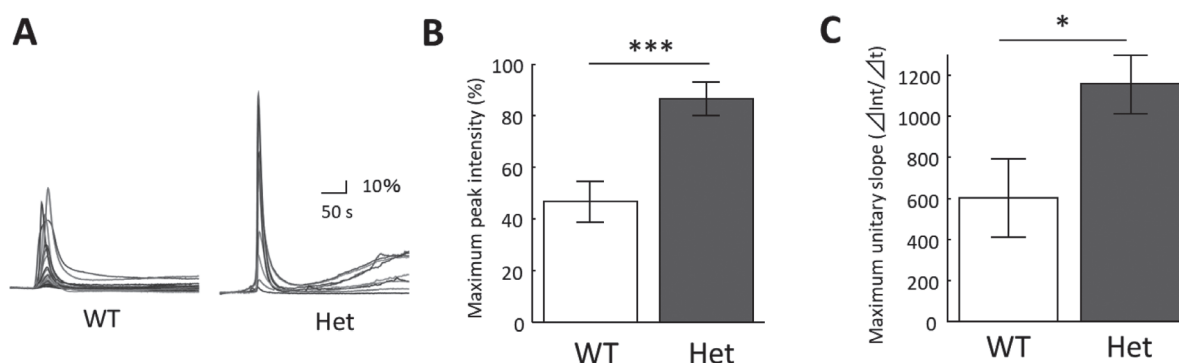
### 【結果】

Hetマウスのアストロサイトにおいて、自発的なCa<sup>2+</sup>発火では波形の傾きが増大し (Fig. 3. A, B, C), 誘発刺激によるCa<sup>2+</sup>発火では蛍光強度の最大値と傾きが増加していた (Fig. 4. A, B, C)。このことから、Hetマウスのアストロサイトでは、Ca<sup>2+</sup>発火が亢進することが明らかとなった。



**Fig. 3** Spontaneous Ca<sup>2+</sup> signaling in *Scn1a*<sup>+/-</sup> (Het) astrocytes.

(A) Representative waveforms of spontaneous Ca<sup>2+</sup> signaling in wild-type (WT) and *Scn1a*<sup>+/-</sup> astrocytes. The different colored lines indicate the relative changes in Ca<sup>2+</sup> intensity using Oregon-Green BAPTA-1 AM at individual ROIs. Waveforms are shown relative to the baseline. (B) Mean of maximum relative intensity of spontaneous Ca<sup>2+</sup> signaling in WT and Het astrocytes (WT: 19.9 ± 1.8%, n = 123; Het: 22.8 ± 1.3%, n = 179 from N = 5 cultures). (C) Mean of the maximum differential intensity of spontaneous Ca<sup>2+</sup> signaling in WT and Het astrocytes (WT: 797.5 ± 143.2 ΔInt/Δt, n = 98; Het: 2796 ± 481.3 ΔInt/Δt, n = 179 from N = 4 cultures, \*p < 0.05).



**Fig. 4** ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in *Scn1a*<sup>+/-</sup> (Het) astrocytes.

(A) Representative waveforms of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in WT and Het astrocytes. The different colored lines indicate the relative changes in Ca<sup>2+</sup> intensity using Fluo4-AM at individual ROIs. (B) Mean of maximum relative peak intensity of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in WT and Het astrocytes (WT: 46.5 ± 7.8%, n = 64; Het: 86.4 ± 6.5%, n = 114 from N = 4 cultures, \*\*\**p* < 0.001). (C) Mean values of the maximum differential intensity of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in WT and Het astrocytes (WT: 601.1 ± 190.2 ΔInt/Δt, n = 63; Het: 1154.5 ± 140.7 ΔInt/Δt, n = 114 from N = 4 cultures, \**p* < 0.05).

### 【考察】

アストロサイトのCa<sup>2+</sup>発火の増強がてんかん発作を増悪させているのか、それとも発作を抑制しているのか現時点では分からない。しかしながら、本研究によってDravet症候群の病態にはニューロンだけでなくアストロサイトも関与している可能性が示唆された。今後はヒトにおける臨床的背景を模範しつつ、アストロサイトとニューロンの相互作用について検討を行うことが重要である。

## 第3章 ヒトiPS細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本の確立

(Uchino K et al., *iScience*. 2022 Jul 16.)

### 【目的】

てんかんを含む多くの中枢神経疾患ではアストロサイトの機能異常がみられる (Cai et al., 2017, Booth et al., 2017, Petrelli et al., 2016, Patel et al., 2019)。そして、アストロサイトの機能異常は神経回路を取り巻く液性因子の異常へとつながり、結果的に神経回路の過活動や異常反応を引き起こす。よって、近年創薬の治療標的としてアストロサイトに注目が集まっている。しかしながら、ヒトの病態アストロサイトによるシナプス異常を同定できる神経回路モデルが存在しないことや、動物モデルではヒトの病態を忠実に再現できないため、創薬に至っていない。

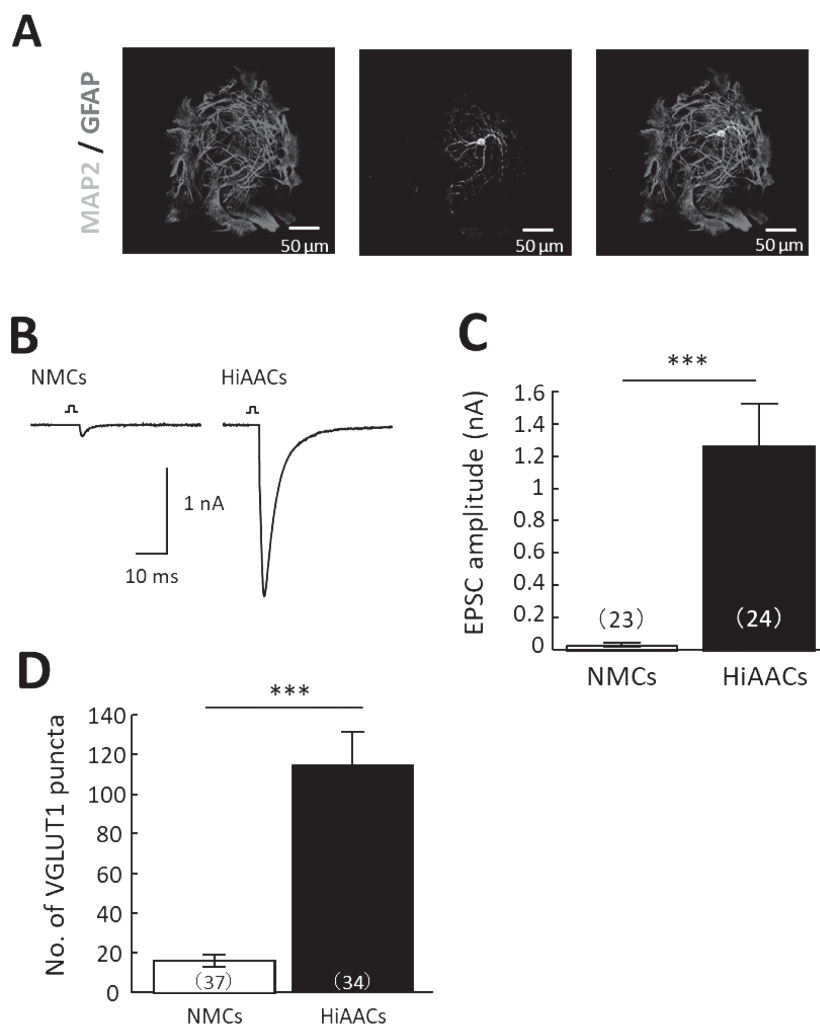
一方で、iPS細胞が開発されたことにより、患者の病態を維持したまま、様々な細胞に分化が可能となった。よって、現在は従来のモデル動物に代わって患者iPS細胞由来モデルが創薬に活用されていく潮流である。近年、複数の中枢神経疾患患者のiPS細胞からアストロサイトへと分化誘導されており、その機能解析が進んでいる。さらには、病態アストロサイトと共培養したニューロンの形態評価やシナプスの発現量、自発的に発生するシナプス電流などについて研究されている (Russo et al., 2017, Williams et al., 2014)。しかしながら、従来の培養方法では神経ネットワークが複雑であるため、単一ニューロンレベルの形態解析やシナプス定量に至っていない。また、シナプス伝達に関する研究は自発的なシナプス放出に依存しており、誘発刺激により発生するシナプス電流などの解析に至っていない。そこで、ヒトiPS細胞由来アストロサイトを有したオータプス培養標本を確立した。

### 【実験方法】

ヒト iPS 細胞から神経幹細胞を経由しアストロサイトへと分化させた。作製したアストロサイトをドット状に培養し、その上にICRマウスの海馬ニューロンを共培養してオートプス培養標本を作製した (Fig. 5. A)。作製した標本において、シナプス伝達をパッチクランプ法により解析し、神経細胞のシナプス数を免疫染色法により定量した。

### 【結果】

作製した標本は、ニューロン単独培養と比較して、シナプス数が有意に増大し、興奮性シナプス後電流を示す機能的なシナプスを有していた (Fig. 5. B, C, D)。さらに本標本はニューロン培養後2週間から4週間で成熟し、培養6週間まで実験に使用することができた。



**Fig. 5** Establishment of an autaptic culture with human iPSC-derived astrocytes (HiAACs).

(A) Representative images of HiAACs immunostained for GFAP and microtubule-associated protein 2 (MAP2). Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . (B) Representative traces of evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) recorded from single neurons in neuron monoculture (NMC) or HiAAC. Depolarization artifacts caused by the generated action currents were removed for clarity. (C) Mean amplitudes of evoked EPSCs in single neurons in NMC or HiAAC (n = number of neurons: NMCs, n = 23; HiAACs, n = 24; three cultures). (D) Mean number of VGLUT1-positive synaptic puncta in single neurons in NMC or HiAAC. n = number of neurons: NMCs, n = 37; HiAACs, n = 34; two cultures. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 【考察】

本研究によって、ヒトiPS細胞由来アストロサイトと共培養したニューロンのシナプス数や樹状突起形態の解析が単一ニューロンレベルで可能となり、誘発刺激によるシナプス伝達の記録も可能となった。本研究では健康な人のiPS細胞由来アストロサイトを使用してオータプス培養標本を作製したが、本標本は患者iPS細胞由来のアストロサイトを使用することで、様々な病態アストロサイトのフェノタイプをシナプスを通して解析できる。よって、本標本の確立により、ヒトアストロサイトに特化した3者間シナプスの研究が前進すると期待される。

## 【参考文献】

- 1) Hirose S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. Are some idiopathic epilepsies disorders of ion channels?: A working hypothesis. *Epilepsy Res.* 2000 Oct;41 (3) :191-204. doi: 10.1016/s0920-1211(00)00141-8.
- 2) Hirose S, Okada M, Yamakawa K, Sugawara T, Fukuma G, Ito M, Kaneko S, Mitsudome A. Genetic abnormalities underlying familial epilepsy syndromes. *Brain Dev.* 2002 Jun;24 (4) :211-22. doi: 10.1016/s0387-7604(02)00056-6.
- 3) Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci.* 2006 Sep;9 (9) :1142-9. doi: 10.1038/nn1754. Epub 2006 Aug 20.
- 4) Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itoharu S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci.* 2007 May 30;27 (22) :5903-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007.
- 5) Cheah CS, Yu FH, Westenbroek RE, Kalume FK, Oakley JC, Potter GB, Rubenstein JL, Catterall WA. Specific deletion of Nav1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 4;109 (36) :14646-51. doi: 10.1073/pnas.1211591109.
- 6) Han S, Tai C, Westenbroek RE, Yu FH, Cheah CS, Potter GB, Rubenstein JL, Scheuer T, de la Iglesia HO, Catterall WA. Autistic-like behaviour in Scn1a<sup>+/-</sup> mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature.* 2012 Sep 20;489 (7416) :385-90. doi: 10.1038/nature11356. Epub 2012 Aug 22.
- 7) Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature.* 2009 Feb 5;457 (7230) :675-7. doi: 10.1038/457675a.
- 8) Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron.* 2008 Sep 25;59 (6) :932-46. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.004.
- 9) Fellin T, Gomez-Gonzalo M, Gobbo S, Carmignoto G, Haydon PG. Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J Neurosci.* 2006 Sep 6;26 (36) :9312-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2836-06.2006.
- 10) Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 2005 Sep;11 (9) :973-81. doi: 10.1038/nm1277.
- 11) Cai Z, Wan CQ, Liu Z. Astrocyte and Alzheimer's disease. *J Neurol.* 2017 Oct;264 (10) :2068-2074. doi: 10.1007/s00415-017-8593-x.

- 12) Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci.* 2017 Jun;40 (6) :358-370. doi: 10.1016/j.tins.2017.04.001. Epub 2017 May 17.
- 13) Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2016 Feb 12;10:21. doi: 10.3389/fncel.2016.00021.
- 14) Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci.* 2019 May;20 (5) :282-297. doi: 10.1038/s41583-019-0126-4.
- 15) Russo FB, Freitas BC, Pignatari GC, Fernandes IR, Sebat J, Muotri AR, Beltrão-Braga PCB. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biol Psychiatry.* 2018 Apr 1;83 (7) :569-578. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.09.021.
- 16) Williams EC, Zhong X, Mohamed A, Li R, Liu Y, Dong Q, Ananiev GE, Mok JC, Lin BR, Lu J, Chiao C, Cherney R, Li H, Zhang SC, Chang Q. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 1;23 (11) :2968-80. doi: 10.1093/hmg/ddu008.



## ミトコンドリア阻害剤誘発性の細胞死に対する活性型ビタミン K<sub>2</sub> 誘導体の効果

土岐 衣梨奈

福岡大学薬学部創剤学研究室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

### Suppressive effect of active form of vitamin K<sub>2</sub> derivatives on mitochondrial inhibitor-induced cell death

Erina TOKI

Department of Formulation Design, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

#### Abstract

Mitochondria, which synthesize ATP, are particularly concentrated in highly energy-dependent tissues such as the brain and muscle, and their dysfunction is involved in the development of Alzheimer's and Parkinson's disease. Menaquinone-4 (MK-4), a vitamin K<sub>2</sub> homolog, is involved in the mitochondrial electron transport chain. In our previous study, we synthesized the menahydroquinone-4 (MKH) ester derivative and reported that it exhibits better intracellular delivery than MK-4. In this study, we investigated the effects of MKH derivatives on mitochondrial inhibitor-induced cell death. Both MK-4 and MKH derivatives suppressed cell death induced by rotenone (ROT, complex I inhibitor) and decreased mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) overproduction, and intracellular CoQ<sub>9</sub> levels. In addition, MKH derivatives functioned as MKH prodrugs in NIH/3T3 cells. Furthermore, MK-4 and MKH derivatives attenuated the cytotoxicity induced by 3-nitropropionic acid (3-NP, complex II inhibitor) and carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP, uncoupler). In conclusion, MK-4 and MKH derivatives protect NIH/3T3 cells by suppressing mitochondrial dysfunction, using delivered MKH.

**Keywords** : Mitochondria, NIH/3T3 cells, Rotenone, Vitamin K<sub>2</sub>, Menaquinone-4, Menahydroquinone-4, Prodrug

#### 【緒言/目的】

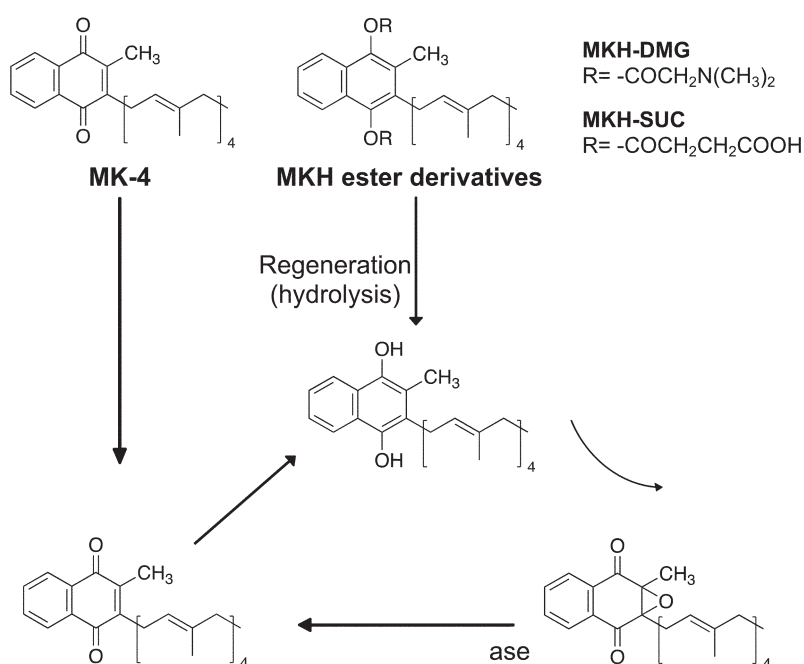
ミトコンドリアは生命維持に不可欠な細胞内小器官であり、電子伝達系の働きにより脂質二重膜の膜間腔に形成されるミトコンドリア膜電位 (MMP) を駆動力に ATP 合成を行う。脳や筋肉などのエネルギー依存度の高い組織にミトコンドリアは特に集中しており、その機能不全はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの発症に関与していると考えられている<sup>1-3</sup>。したがって、ミトコンドリアに焦点を当てることは、不治の病への効果的な治療薬の開発に繋がるのが期待できる。

ビタミン K<sub>2</sub> の一種であるメナキノン-4 (MK-4) は、2電子還元されてメナヒドロキノン-4 (MKH) となり、血液凝固や骨形成に関与する  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として機能し<sup>4</sup>、MK-4 エポキシド (MKO) に変換される (Fig. 1)。この機能により、MK-4 は骨粗鬆症治療薬や血液凝固薬として臨床使用されている。最近の研究では、MK-4 がミトコンドリア電子伝達系に関与し得ることが報告されているが<sup>5,6</sup>、一方で、MK-4 はミトコンドリア電子伝達系でコエンザイム Q (CoQ) の機能を代替

できないことが報告されている<sup>7</sup>。依然として、ミトコンドリア機能不全に対するMK-4の有効性には議論の余地がある。

MK-4は骨粗鬆症患者への長期投与による安全性が確認されている<sup>8</sup>。よって、ミトコンドリア機能不全に対する有効性を証明できれば、それらが要因となる疾患をターゲットとした安全かつ有効な治療・予防薬開発に貢献できることが期待される。しかしMK-4の活性体は還元型のMKHであり、従来のMK-4の投与では、効果が不十分であることが予測される。

これまでに我々は、MKHのエステル誘導体、MKH-1,4-bis-N,N-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG) およびMKH-1,4-bis-hemi-succinate (MKH-SUC) を合成し、培養細胞と動物においてMKHプロドラッグとして機能し、MK-4より優れた細胞内送達性を示すことを報告している<sup>9-12</sup>。本研究では、ミトコンドリア阻害剤誘発性細胞死に対するMKH誘導体の効果を検討した。



**Fig. 1** Schematic illustration of the vitamin K cycle.

VK, vitamin K; MK-4, menaquinone-4; MKH, menahydroquinone-4; MKO, menaquinone-4 epoxide; VKDP, vitamin K-dependent protein; GGCX,  $\gamma$ -glutamyl carboxylase.

## 【実験方法】

### 細胞生存試験

マウス線維芽細胞NIH/3T3を $1.0 \times 10^4$ /wellの密度で96-well black plateに播種し24時間培養した。次にロテノン (ROT, 10  $\mu$ M), 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP, 2.5 mM), カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP, 10  $\mu$ M) をそれぞれ0.03–3  $\mu$ MのMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCと24時間併用処理した。細胞生存率は、CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (CTB) を使用して測定した。

### ミトコンドリア膜電位 (MMP) の測定

NIH/3T3細胞をcollagen- I coated glass dish (IWAKI, AGC TECHNO GLASS株式会社) に $2.5 \times 10^5$  cell/wellの密度で播種し24時間接着させ、10  $\mu$ M ROT存在下で3  $\mu$ MのMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUC

を6時間処理した。MMPの測定はJC-1 MitoMP Detection Kitを使用して評価した。

#### 細胞内活性酸素種 (ROS) 量の測定

NIH/3T3細胞をcollagen- I coated 96-well black plateに $1.0 \times 10^4$  cell/wellの密度で播種し24時間培養した。その後、ROTの存在下で $3 \mu\text{M}$ のMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCを6時間処理した。細胞内ROS量は2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)を使用して測定し、CTB試薬により算出した細胞生存率で標準化した。

#### 細胞内MKH量およびCoQ<sub>9</sub>/CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>量の測定

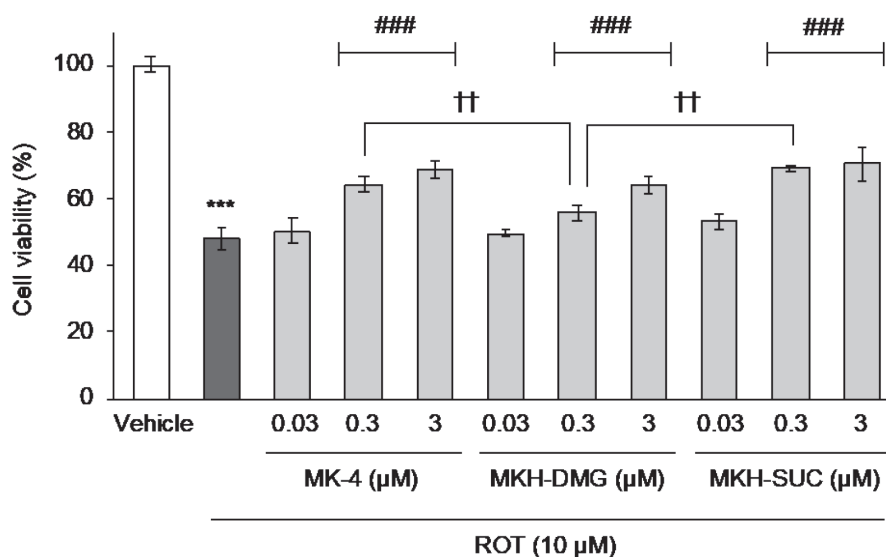
NIH/3T3細胞を6-well plate (TPP)に $3.0 \times 10^5$  cells/dishの密度で播種し24時間培養した。次に、 $10 \mu\text{M}$ のROTと $3 \mu\text{M}$ のMK-4, MKH-DMGまたはMKH-SUCを6時間併用処理した。培地を除去しPBSで2回洗浄後、細胞をPBS中1 mLに集めて氷上で超音波処理を行った。細胞懸濁液を等量のエタノールおよび3倍量のn-ヘキサンと混合して2分間ボルテックスし、 $1750 \times g$ で10分間遠心分離した。窒素ガスで濃縮後、残留物をエタノールで再溶解し、LC-MS/MSにより分析した。

### 【結果】

#### ROT誘発性NIH/3T3細胞死に対するMK-4およびMKH誘導体の抑制効果

ROTはミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害剤であり、ラットに慢性投与するとドーパミン作動性ニューロンの変性を引き起こし、パーキンソン病の病理学的特徴を再現する<sup>13</sup>。したがって、ROTはミトコンドリア機能障害治療薬を探索するための実験モデル作製に広く用いられている。

MK-4およびMKH誘導体のミトコンドリア機能障害に対する有効性を検証するため、ROT誘発性細胞死に与える影響を評価した。その結果、ROT単独添加群では細胞生存率の有意な減少がみられ、MK-4およびMKH誘導体併用群では $0.3 \mu\text{M}$ の濃度でROT誘発性の細胞生存率減少が抑制された (Fig. 2)。

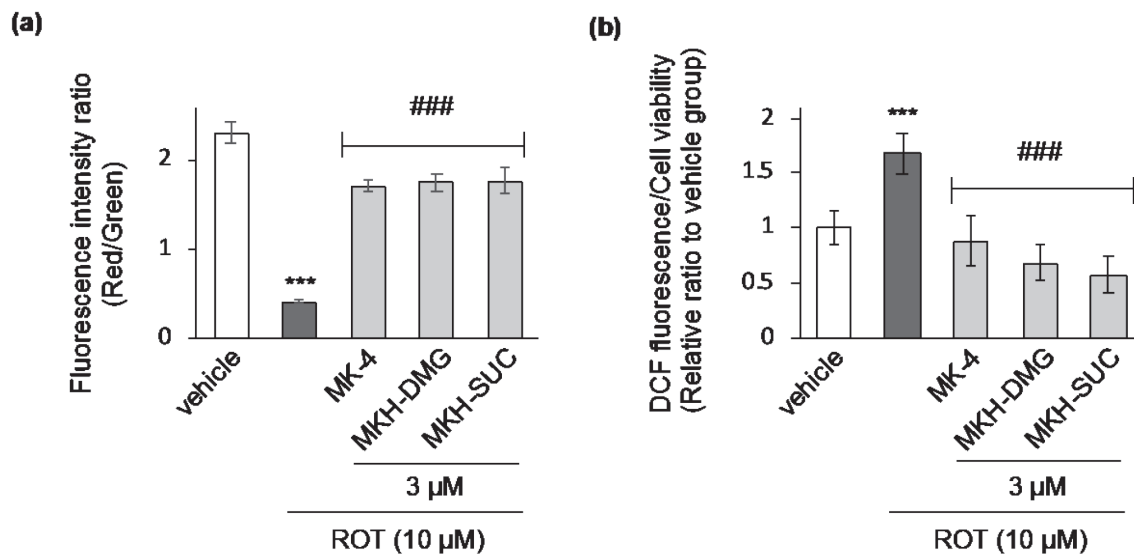


**Fig. 2** Suppressive effect of MK-4 and MKH derivatives on ROT-induced cell death.

NIH/3T3 cells were treated with 0.03-3  $\mu\text{M}$  MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 24 h in the presence of 10  $\mu\text{M}$  ROT. \*\*\*  $p < 0.001$  vs vehicle; ###  $p < 0.001$  vs ROT; ††  $p < 0.01$  vs 0.3  $\mu\text{M}$  MKH-DMG (Tukey's test). Mean  $\pm$  SD (n=3).

### ミトコンドリア機能障害と酸化ストレスに対するMK-4およびMKH誘導体の影響

正常なミトコンドリアでは、内膜を境に形成される高いMMPを駆動力にATPが産生されている。また、ATP産生過程では、常時ROSが発生しており、細胞に備わる抗酸化機能により恒常的に調整されている。ROTは呼吸鎖複合体Iの阻害により、ミトコンドリア機能に障害を与え、MMP低下やROSの過剰産生による酸化ストレスを引き起こす<sup>14</sup>。そこで、MK-4およびMKH誘導体がMMPやROSに対して及ぼす影響を評価した。ROT単独添加によりMMPの低下とROS量の増加が認められたが、MK-4およびMKH誘導体はMMP低下とROS量の増加を抑制した (Fig 3 a, 3b)。

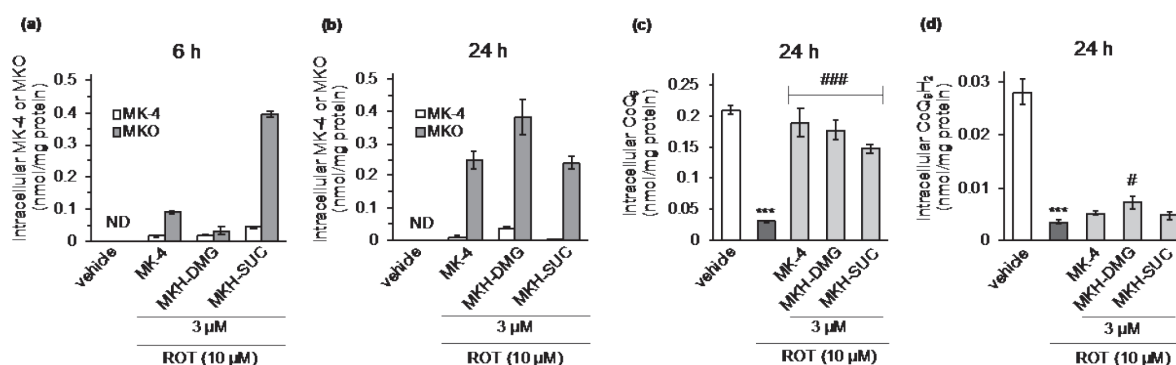


**Fig. 3** Influence of MK-4 and MKH derivatives on ROT-induced MMP depression and ROS overproduction. NIH/3T3 cells were treated with 3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 6 h in the presence of 10 μM ROT. MMP was evaluated by JC-1 staining (a), intracellular ROS levels were determined by DCFH-DA staining (b). \*\*\* p < 0.001 vs vehicle; ### p < 0.001 vs ROT (Tukey's test). Mean ± SD (n=3).

### MKHの細胞内送達性と内因性CoQ<sub>9</sub>/CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>量の変化

MK-4の活性型はMKHであり、細胞内に送達されたMKHがミトコンドリアに対して効果を発揮していると考えられる。NIH/3T3細胞に対するMKH細胞内送達性を評価するために、細胞内MKH量をLC-MS/MSにて測定した。ただし、MKHは酸化されやすく直接測定するのは困難であるため、MKO量を細胞内に送達されたMKH量として評価した。MK-4およびMKH誘導体によるMKHの細胞内送達は、薬物処理6時間後にMKH-SUC > MK-4 > MKH-DMGの順で高かったのに対し (Fig. 4a), 24時間後はMKH-DMG > MK-4 ≒ MKH-SUCであった (Fig. 4b)。NIH/3T3細胞内で、MKH-SUCのエステル加水分解が速く、MKH-DMGは緩徐であることが影響していると考えられた。

また、ROTは呼吸鎖複合体IにおいてNADHデヒドロゲナーゼと結合し、CoQからCoQH<sub>2</sub>への還元を阻害する<sup>15</sup>。CoQH<sub>2</sub>は生体にとって重要な抗酸化物質である<sup>16,17</sup>。そこで、マウスの内因性CoQ<sub>9</sub>に与えるROTとMK-4およびMKH誘導体の影響を評価するために、細胞内CoQ<sub>9</sub>量とCoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>量をLC-MS/MSで測定した。ROT単独添加群の細胞内CoQ<sub>9</sub>量およびCoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>量はROT非添加群と比較して著しく低下した (Fig. 4c, 4d)。MK-4およびMKH誘導体は、細胞内CoQ<sub>9</sub>量の減少を有意に抑制したが (Fig. 4c), 一方でCoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>量にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 4d)。この結果から、MK-4およびMKH誘導体はCoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>の抗酸化作用とは無関係に、ミトコンドリア機能を正常な状態に維持することが示唆された。

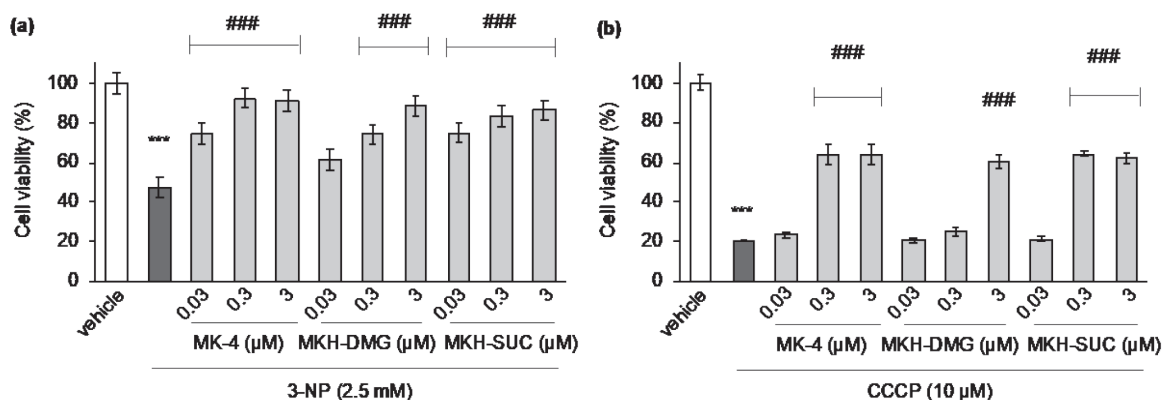


**Fig. 4** Intracellular MK-4, MKO, and native CoQ<sub>9</sub>/CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> levels.

NIH/3T3 cells were treated with 3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 6 h or 24 h in the presence of 10 μM ROT. Intracellular MK-4 or MKO levels at 6 h (a) and 24 h (b), CoQ<sub>9</sub> levels (c) and CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub> levels (d) at 24 h.\*\*\* p < 0.001 vs vehicle; ### p < 0.001 vs ROT; # p < 0.05 vs ROT (Tukey's test). Mean ± SD (n = 3).

#### 呼吸鎖複合体II阻害剤および脱共役剤誘発性細胞死に対するMK-4およびMKH誘導体の抑制効果

ROT以外のミトコンドリア阻害剤として、3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) およびカルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) を用いて検討を行った。3-NPは呼吸鎖複合体IIのコハク酸脱水素酵素を不可逆的に阻害し、ラットへの投与で選択的な線条体病変が生じることから、ハンチントン病のモデル作製に用いられる<sup>18</sup>。CCCPは脱共役剤であり、ミトコンドリア膜間腔のH<sup>+</sup>をマトリックスへ流入させることでMMPを消失させ、電子伝達系とATP合成酵素の共役を阻害する。各阻害剤とMK-4およびMKH誘導体 (0.03-3 μM) を併用処理し、24時間後の細胞生存率を測定したところ、3-NP (2.5 mM) およびCCCP (10 μM) の細胞毒性をMK-4およびMKH誘導体は有意に軽減した (図5a,5b)。



**Fig. 5** Suppressive effect of MK-4 and MKH derivatives on cell death induced by complex-II inhibitors and uncoupler. NIH/3T3 cells were treated with 0.03-3 μM MK-4, MKH-DMG, or MKH-SUC for 24 h in the presence of 2.5 mM 3-NP (a), 10 μM CCCP (b).\*\*\* p < 0.001 vs vehicle; ### p < 0.001 vs 3-NP or CCCP (Tukey's test). Mean ± SD (n = 3).

## 【考察】

MK-4およびMKH誘導体は、呼吸鎖複合体 I 阻害剤 ROT によって誘導される細胞死に対して部分的な抑制効果を示した。ROTはCoQ<sub>9</sub>の絶対量低下に伴うROSの過剰産生によりMMP低下を誘発することでミトコンドリア機能障害を与え、MK-4およびMKH誘導体はその一連の反応を抑制することによりROT毒性から細胞を保護したと推測される。呼吸鎖複合体 II 阻害剤 3-NP および脱共役剤 CCCP によって誘導される細胞死に対しても、MK-4 および MKH 誘導体は部分的な抑制効果を示すが、これらに対する効果がROSレベルの正常化に起因するかさらなる検証が必要である。

本研究により、NIH/3T3細胞を用いてMKH誘導体のミトコンドリア機能不全に対する効果を評価し、その詳細なメカニズムを解明したことで、様々な臓器由来の細胞を用いた、より発展的な開発研究の基盤を構築できたと考える。

## 【参考文献】

- 1 Henchcliffe, C. & Beal, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology* **4**, 600-609, doi: 10.1038/ncpneuro0924 (2008).
- 2 Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N. & Brouillet, E. Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1802**, 52-61, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.012 (2010).
- 3 Yan, M. H., Wang, X. L. & Zhu, X. W. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* **62**, 90-101, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014 (2013).
- 4 Tie, J. K. & Stafford, D. W. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**, 236-247, doi: 10.1111/jth.13217 (2016).
- 5 Vos, M. *et al.* Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science* **336**, 1306-1310, doi: 10.1126/science.1218632 (2012).
- 6 Bhalerao, S. & Clandinin, T. R. Vitamin K-2 Takes Charge. *Science* **336**, 1241-1242, doi: 10.1126/science.1223812 (2012).
- 7 Cerqua, C. *et al.* Vitamin K2 cannot substitute Coenzyme Q (10) as electron carrier in the mitochondrial respiratory chain of mammalian cells. *Scientific Reports* **9**, doi: 10.1038/s41598-019-43014-y (2019).
- 8 Orimo, H. *et al.* Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **16**, 106-112, doi: 10.1007/s007740050034 (1998).
- 9 Setoguchi, S. *et al.* Enhanced Antitumor Effects of Novel Intracellular Delivery of an Active Form of Menaquinone-4, Menahydroquinone-4, into Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Prevention Research* **8**, 129-138, doi: 10.1158/1940-6207.capr-14-0292 (2015).
- 10 Setoguchi, S. *et al.* Antitumor Effects and Delivery Profiles of Menahydroquinone-4 Prodrugs with Ionic or Nonionic Promoiety to Hepatocellular Carcinoma Cells. *Molecules* **23**, doi: 10.3390/molecules23071738 (2018).
- 11 Goto, S. *et al.* Prodrugs for Skin Delivery of Menahydroquinone-4, an Active Form of Vitamin K-2 (20), Could Overcome the Photoinstability and Phototoxicity of Vitamin K-2 (20). *International Journal of Molecular Sciences* **20**, doi: 10.3390/ijms20102548 (2019).
- 12 Yamakawa, H. *et al.* Growth Inhibitory Effects of Ester Derivatives of Menahydroquinone-4, the Reduced Form of Vitamin K-2 (20), on All-Trans Retinoic Acid-Resistant HL60 Cell Line. *Pharmaceutics* **13**,

- doi: 10.3390/pharmaceutics13050758 (2021).
- 13 Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* **3**, 1301-1306, doi: 10.1038/81834 (2000).
  - 14 Condello, S. *et al.* Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappa B activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. *Journal of Neurochemistry* **116**, 67-75, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07085.x (2011).
  - 15 Singer, T. P. & Ramsay, R. R. THE REACTION SITES OF ROTENONE AND UBIQUINONE WITH MITOCHONDRIAL NADH DEHYDROGENASE. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1187**, 198-202, doi: 10.1016/0005-2728(94)90110-4 (1994).
  - 16 Takayanagi, R., Takeshige, K. & Minakami, S. NADH-DEPENDENT AND NADPH-DEPENDENT LIPID-PEROXIDATION IN BOVINE HEART SUB-MITOCHONDRIAL PARTICLES - DEPENDENCE ON THE RATE OF ELECTRON FLOW IN THE RESPIRATORY-CHAIN AND AN ANTIOXIDANT ROLE OF UBIQUINOL. *Biochemical Journal* **192**, 853-860, doi: 10.1042/bj1920853 (1980).
  - 17 Quinn, P. J., Fabisiak, J. P. & Kagan, V. E. Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q. *Biofactors* **9**, 149-154, doi: 10.1002/biof.5520090209 (1999).
  - 18 Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K. & Sanberg, P. R. 3-nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**, 289-293, doi: 10.1016/s0149-7634(96)00027-9 (1997).

## 老化促進マウス SAMP8 の嗅覚反応障害と認知機能障害への人参養栄湯の 治療効果研究

平田 茉莉花

福岡大学大学院薬学研究科臨床疾患薬理学研究室 〒814-0181 福岡市城南区七隈8-19-1

### Study of the therapeutic effect of Ninjinyoeito on olfactory response impairment and cognitive dysfunction in senescence-accelerated mouse SAMP8

Marika HIRATA

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

#### Abstract

Olfactory dysfunction is observed at early stage of alzheimer's disease (AD), but a therapy for the olfactory dysfunction has not been established. Ninjinyoeito (NYT) is a Kampo medicine and is used for treatment of decline in physical strength, fatigue and anorexia. This study investigated whether SAMP8 mouse, which is one of AD models, shows alternations of olfactory responses to odorants and whether NYT affects the olfactory responses. SAMP8 mice reduced avoidance behaviors towards pentanal and hexanal, which are aldehydes, in comparison with SAMR1 mice. SAMP8 mice also showed decrease in neuronal activity in hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and amygdala when presented with hexanal. NYT improved poor olfactory performance and suppressed the decrease in neuronal activity in PVN. Therefore, it was suggested that the amelioration of abnormal olfactory nerve pathways to PVN contributes to the improvement of the decline in odor avoidance behavior by NYT. Furthermore, NYT improved spatial memory impairment and apathy-like behavior in SAMP8 mice, suggesting that NYT was effective against not only olfactory impairment but also memory impairment and psychiatric symptoms. It was reported that AD patients demonstrate reduced olfactory responses to wood and rose. Considering that wood and rose have aldehydes, AD patients may demonstrate deficit of olfactory response to aldehydes. Furthermore, it was shown the possibility that treatment of olfactory dysfunction may lead to prevention and therapy for core symptoms and peripheral symptoms such as memory impairment and lethargy-like behavior. This study suggests clinical application of NYT from early stage is useful to prevention of olfactory dysfunction and suppressing the progression of AD.

**Keywords** : AD, ninjinyoeito, SAMP8, olfaction

#### 【緒言】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、認知症患者の約7割を占めており、世界中で5000万人が罹患している進行性の神経変性疾患である。AD患者では認知機能障害が緩徐に増悪していき、AD脳ではアミロイドβの蓄積やリン酸化タウによる神経原繊維変化が年月をかけて増加している。また、認知機能低下が発症するより早い段階から嗅覚障害が認められることが報告されているが<sup>(1)</sup>、その病態の



全貌は明らかではない。この段階から医療介入を開始することでADへの進行抑制が期待される。

人參養榮湯は、12種の生薬から構成されており、気と血を補う漢方薬として使用されている。人參養榮湯は主に病後の体力低下や疲労倦怠、そしてそれに付随する、抑うつや無気力状態などの精神症状に対して処方されており、最近では高齢者の虚弱（フレイル）や認知症の予防効果も期待されている。2014年に日本老年医学会はフレイルとは介護前段階を意味する用語として提唱し、体重減少や筋力の衰えなどの身体的要素だけでなく、孤独、閉じこもりなどの社会的要素と、うつや無気力、認知機能障害などの精神・心理要素を含んでいる。身体的機能低下による歩行障害や転倒と認知機能の低下は双方に影響を及ぼし、身体的にフレイルであることは、後の認知機能低下のリスクであり<sup>(3)</sup>、認知症発症の危険因子であることが報告されている<sup>(4)</sup>。このような背景から、近年では人參養榮湯はADを含む認知症予防に関しても有効性が期待されている。しかし、その科学的根拠は乏しい。

老化促進マウスである senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) マウスは、記憶障害や神経細胞数減少、さらにアミロイドβとリン酸化タウの増加を示し、その他にもADと類似の病態変化が現れることから、ADモデルマウスとして提案されている<sup>(5)</sup>。しかし、SAMP8マウスがAD早期の嗅覚障害の病態を呈しているかは検討されておらず、それに対する人參養榮湯の治療効果も未検討である。このSAMP8マウスを用いた早期嗅覚障害の検討は、ADの早期嗅覚障害の病態解明に繋がると考えられる。さらに人參養榮湯の治療効果の評価は、ADの嗅覚障害治療法の確立に繋がると期待される。

そこで本稿第1章では、SAMP8マウスの悪臭回避行動と嗅覚神経経路の神経細胞活性を解析し、AD早期の嗅覚障害との類似性とその病態メカニズムを検討した。続く第2章ではSAMP8マウスの嗅覚障害に対する人參養榮湯の治療効果を解析し、人參養榮湯の嗅覚障害治療薬としての有用性を検討した。また、第3章ではSAMP8マウスの記憶障害や精神症状に対する人參養榮湯の治療効果を解析し、ADの中核症状である認知機能障害と周辺症状である無気力や不安症状に対する人參養榮湯の効果を検討した。

## 第1章 老化促進マウス (SAMP8 マウス) の嗅覚反応障害の検討

### 【目的】

ADは認知機能障害が緩徐に進行していく疾患であり、認知機能障害が認められる以前から脳内では病理変化が現れていると提案されている。また、認知機能障害が発症するより早期から嗅覚障害も認められており、早期のバイオマーカーとして提案されているが、その病態の全貌は明らかではない。

SAMP8マウスは、学習記憶障害を示し、アミロイドβやリン酸化タウの脳蓄積が認められることから、ADモデルマウスの一つとして提案されている。従って、ADやMCIで認められる嗅覚障害の病態解明の手段の一つとして、SAMP8マウスの病態解析は有効であると考えられる。しかし、SAMP8マウスの嗅覚変化に関する報告は皆無である。

本章では、SAMP8マウスが嗅覚障害の病態モデルとなるか否かの検討を目的として、様々な匂い物質に対するSAMP8マウスの反応行動を解析した。さらに、嗅覚神経経路における神経活動の変化を検討した。

## 【実験方法】

### 実験動物

10週齢のSAMP8マウスと senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) マウス (正常老化) を日本エスエルシー株式会社から購入した。

### 嗅覚嗜好テスト (olfactory preference test)

嗅覚の評価は、中型プラスチックケージ (25 × 35 × 17 cm) の端にろ紙を設置した装置を用いた。匂いを発する液体をろ紙に添加した後、装置内にマウスを入れ、上部からカメラでマウスの行動を3分間撮影した。撮影した動画の解析は、ビデオ・トラッキング・ソフトウェア ANY-maze を用いて、探索エリア (ろ紙を中心として半径10cm以内の範囲) と回避エリア (ろ紙を設置した壁の反対の壁から5cmの範囲) の2つのエリア内での滞在時間を解析した。

### 使用した匂いを発する液体

Eugenol, 2-MB, pentanal, hexanal, heptanal, n-octanalを使用した。ろ紙に各液体を10 $\mu$ L染み込ませた。

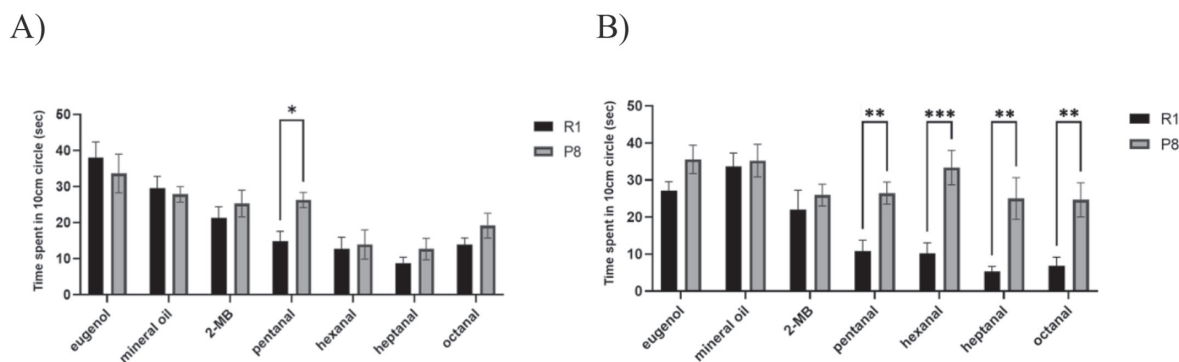
### 嗅覚神経経路の解析方法

eugenolまたはhexanalを暴露したマウス (11ヶ月齢) の凍結冠状切片作成し、c-fos抗体を用いて免疫染色を行った後、mouse brain atlasを参考にして<sup>(6)</sup>、顕微鏡 (KEYENCE, 倍率4倍) 下で撮影した。撮影画像上で測定対象部位を0.1 mm<sup>2</sup>の正方形にて囲い込み、盲検下でその範囲内におけるc-fos陽性細胞数を測定した。

## 【結果・考察】

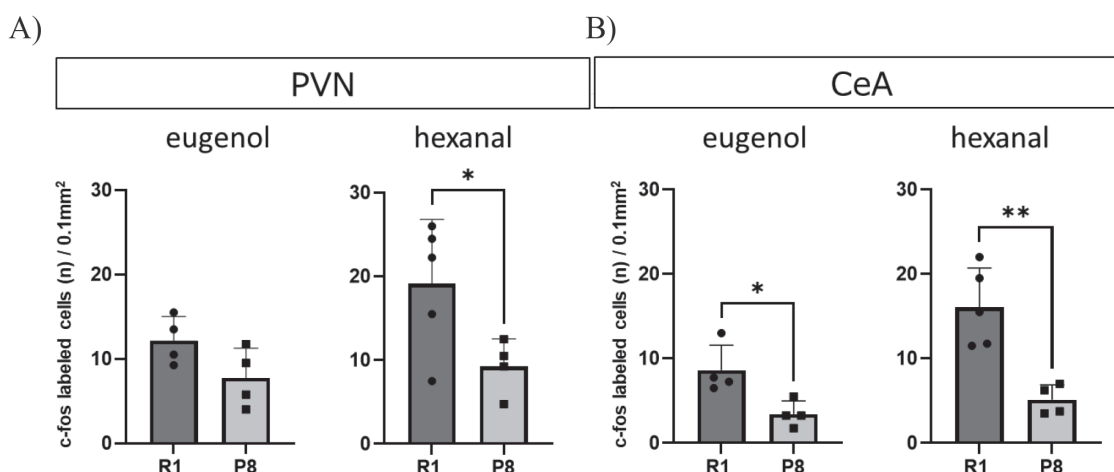
SAMP8マウスはSAMR1マウスと比較してアルデヒド臭 (pentanal, hexanal, heptanal, n-octanal) に対する回避行動の低下が認められた (Fig.1)。また、hexanal暴露時の視床下部室傍核と扁桃体におけるc-fos陽性細胞数がSAMP8マウスで減少していることが認められた (Fig.2)。

これらの結果から、SAMP8マウスでは嗅覚反応における視床下部室傍核と扁桃体での神経細胞活動低下が回避行動低下に関与することが示唆された。



**Fig. 1** Time spent in search area in olfactory preference test in SAMP8 mouse.

A) 3 months old B) 5 months old. unpaired t-test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  
R1: SAMR1, P8: SAMP8



**Fig. 2** Number of c-fos positive cells exposed to eugenol or hexanal for 1 hour  
 A) Hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), B) Amygdala central nucleus (CeA). unpaired t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , unpaired t-test. R1: SAMR1, P8: SAMP8.

## 第2章 SAMP8マウスの嗅覚反応障害に対する人参養栄湯の検討

### 【目的】

人参養栄湯は12種の生薬から構成される漢方薬であり、気と血を補う漢方薬として使用されている。前章でSAMP8マウスが嗅覚障害を示すことが明らかとなった。そこで、本章ではSAMP8マウスの嗅覚障害に対する人参養栄湯の効果を検討するため、人参養栄湯のエキス剤をSAMP8マウスに投与し、嗅覚反応の評価を行った。

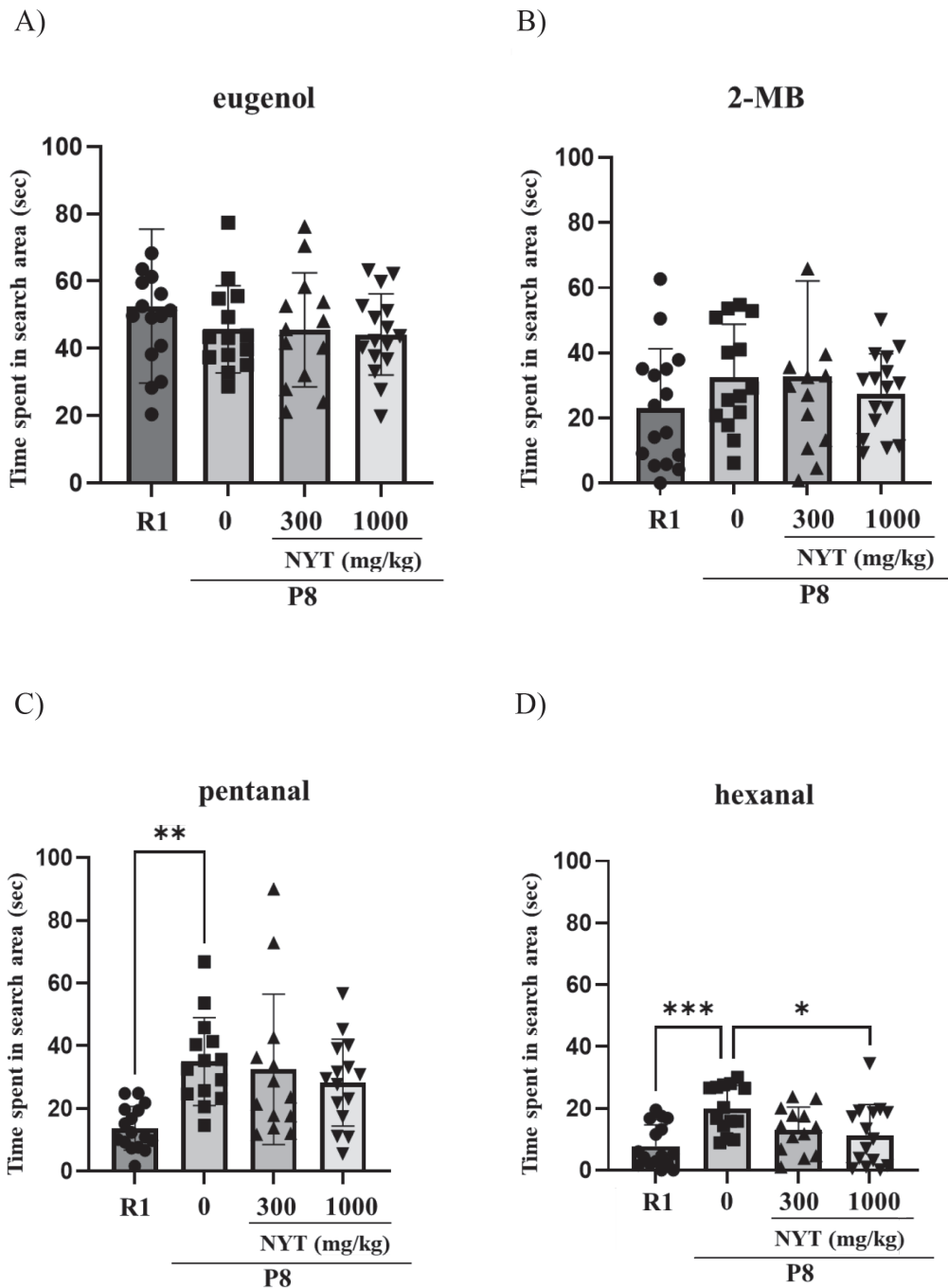
### 【実験方法】

人参養栄湯エキスを飲水ボトルに添加し、3ヶ月齢から11ヶ月齢の期間で飲水投与を行い、嗅覚嗜好テストおよび嗅覚識別テストを用いて嗅覚反応の評価を行った。

### 【結果・考察】

嗅覚嗜好テストにおいて、SAMP8マウスのhexanal回避行動低下を人参養栄湯は有意に抑制した (Fig. 3)。さらに、hexanal暴露時の視床下部室傍核におけるc-fos陽性細胞数減少を人参養栄湯が抑制する結果が認められた (Fig. 4)。このことから、人参養栄湯による悪臭回避行動低下改善には、視床下部室傍核への嗅覚神経経路異常の改善が寄与することが示唆された。また、嗅覚識別テストでは、SAMP8マウスの嗅覚識別障害に対する人参養栄湯の改善効果も認められた (Fig. 5)。MCIやAD患者では、嗅覚識別能の障害が報告されていることから<sup>7)</sup>、本評価項目に関しても早期のAD患者の嗅覚障害病態を反映していることが考えられ、人参養栄湯が治療薬として有効であることが示唆された。

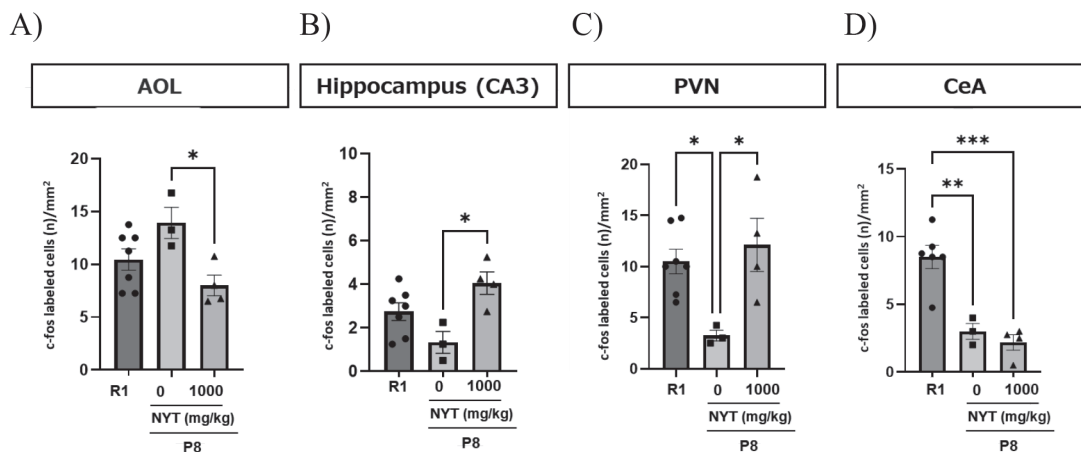
hexanalの暴露は、SAMR1マウスと比較してSAMP8マウスでは、大脳辺縁系である視床下部室傍核および扁桃体中心核のc-fos陽性細胞数を有意に減少し、神経細胞活動の低下が示唆された。さらに、人参養栄湯1000 mg/kg投与は、視床下部室傍核におけるc-fos陽性細胞数の有意な増加を示した。一方、扁桃体中心核において増加は認められなかった。また、人参養栄湯投与は、前嗅核のc-fos陽性細胞数を減少させ、海馬CA3のc-fos陽性細胞数を増加させた (Fig. 4)。前嗅核での減少は、回避行動の増加による嗅覚刺激



**Fig. 3** Time spent in search area in olfactory preference test in SAMP8 mouse (8 months old). Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . R1: SAMR1, P8: SAMP8, NYT: Ninjinyoeito

の減少によることが考えられた。

嗅覚識別テストでは、hexanalまたはeugenolの臭いと砂糖粒を関連付ける訓練を行ったSAMP8マウスおよびSAMR1マウスを用いた。SAMP8マウスではhexanalが置かれたアームとpentanalが置かれたアームに滞在した時間に差は認められなかった。一方、人參養榮湯 1000 mg/kgの投与によりhexanalが置かれたアームに滞在する時間が有意に増加した (Fig.5)。このことから、SAMP8マウスはhexanalとpentanalの臭いの識別能の低下が考えられ、人參養榮湯はその低下を改善することが示唆された。

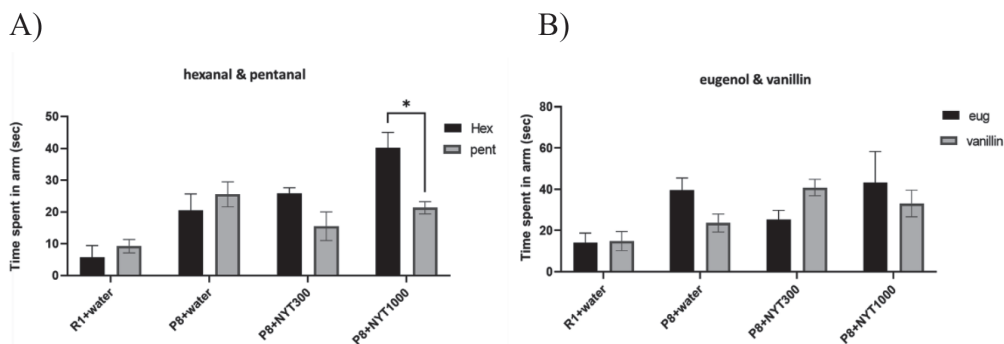


**Fig. 4** The number of c-fos-positive cells in each brain region of the olfactory nerve pathway in 11-month-old SAMP8 mice exposed to hexanal for 1 hour.

A) Anterior olfactory nucleus, B) Hippocampus (CA3), C) PVN, D) CeA.

Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . R1: SAMR1, P8: SAMP8, NYT: Ninjinjyoito



**Fig. 5** Arm dwell time of SAMP8 mice in olfactory discrimination test.

A) hexanal (sugar +) & pentanal, B) eugenol (sugar +) & vanillin. Unpaired t-test.

\* $p < 0.05$ . Hex: hexanal, pent: pentanal, eug: eugenol

### 第3章 SAMP8マウスの記憶障害・精神様症状に対する人参養栄湯の効果検討

#### 【目的】

AD患者は認知機能障害や遂行機能障害などの中核症状と、Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) と呼ばれる周辺症状を示し、嗅覚障害発症以降に中核症状と周辺症状が認められる。SAMP8マウスのアルデヒド臭回避行動低下に対する人参養栄湯の予防効果を第2章で提示したが、ADの嗅覚障害発症後に現れる中核症状や周辺症状に対する人参養栄湯の効果は不明である。そこで本章では、人参養栄湯の予防的な長期摂取がSAMP8マウスの記憶障害や精神症状様行動に対しても有効であるか検討を行った。

#### 【実験方法】

第2章と同様に、NYTを3ヶ月齢から12ヶ月齢まで長期飲水摂取させたSAMP8マウスおよびSAMR1マウスを使用した。

##### モリス水迷路課題を用いた学習記憶障害の評価方法 (12ヶ月齢)

水を入れたプール (直径150cm, 高さ45cm, 水深32cm) に直径12cmの透明なプラットフォームをプールの壁面から中心側へ30cmの位置に設置した。出発点からマウスがプラットフォームに遊泳して、到達するまでの行動を解析した。1日3試行 (各試行で各出発地点: A, B, C) し、毎日出発地点の順序を変えて5日間連続で課題を行い、その獲得過程を評価した。

##### Open-fieldテストを用いた不安様行動の評価 (5ヶ月齢, 8.5ヶ月齢)

open-field装置 (底面直径60cm, 壁の高さ50cm, 壁の上縁の直径80cmのバケツ状のもの) の中央に静かにマウスを入れ、その動きを10分間ビデオカメラにて撮影した。撮影した動画は、ビデオ・トラッキング・ソフトウェア ANY-mazeを用いて、10分間における総移動距離と内側エリア (Inner zone) 滞在時間を測定した。総移動距離からマウスの運動量を、内側エリア滞在時間から不安症状を評価した。

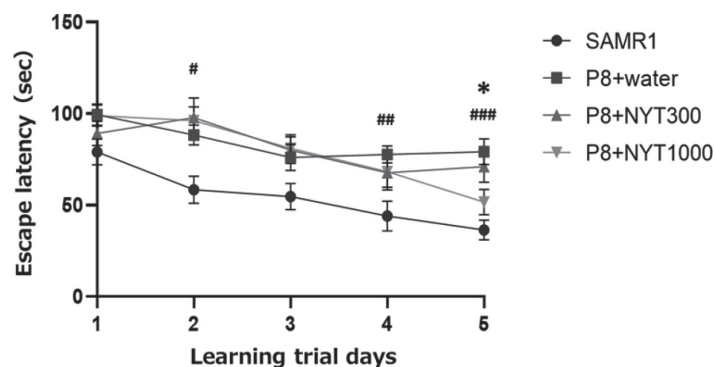
##### Sucrose splashテストによる無気力様行動の評価 (5ヶ月齢)

マウスをホームケージに入れた状態で、ホームケージを30～50 luxの照明に設定した部屋に置いた。食紅で着色した10%スクロース溶液をマウスの背部に一回噴霧し、300秒間の行動をビデオカメラにて動画撮影した。撮影した動画は、Event Recソフトウェアを用いて、300秒間における身繕いした時間を計測した。

#### 【結果・考察】

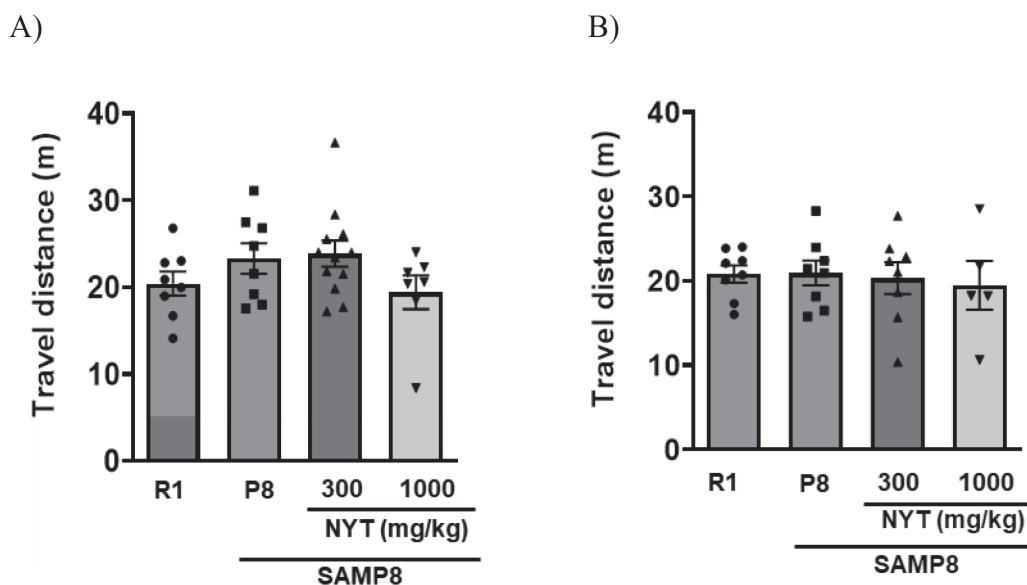
5日間にわたる空間記憶獲得過程でのプラットフォーム到達時間の推移をFig. 6に示した。P8 + waterのプラットフォーム到達時間は、R1+waterと比較し、2日目および4日目、5日目では有意に延長した。(2日目:  $P=0.020$ , 4日目:  $P=0.006$ , 5日目:  $P=0.0002$ )。更に、5日目のP8+NYT1000のプラットフォーム到達時間は、P8 + waterと比較して有意に短縮したことから (5日目:  $P=0.038$ )、人参養栄湯の投与により、学習記憶の獲得障害は予防される可能性があることが示唆された。

Open-field testにおけるSAMP8マウスの総移動距離をFig. 7に示した。5ヶ月齢のSAMP8マウスにおいては、R1+waterならびにP8+water, P8+NYT300, P8+NYT1000のどのグループ間においても、差は認められなかった。また、8.5ヶ月齢においても同様の結果となった (Fig.7)。また、Open-field testにおけるSAMP8マウスの内側エリア滞在時間において、5ヶ月齢のSAMP8マウスでは、R1+waterならびにP8+water, P8+NYT300, P8+NYT1000のどのグループ間においても、内側エリア滞在時間に差は認められなかった。また、老化が進行した8.5ヶ月齢においては、R1+water群と比較してP8 + water群では、



**Fig. 6** Platform arrival time by 5-day water maze test.

We evaluated learning and memory using the Morris water maze task. Three trials per day were analyzed for five days, and the data represent the average of the three trials. Data were subjected to Tukey's multiple comparison tests after one-way ANOVA. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs R1+water, \* $P < 0.05$  vs P8+water

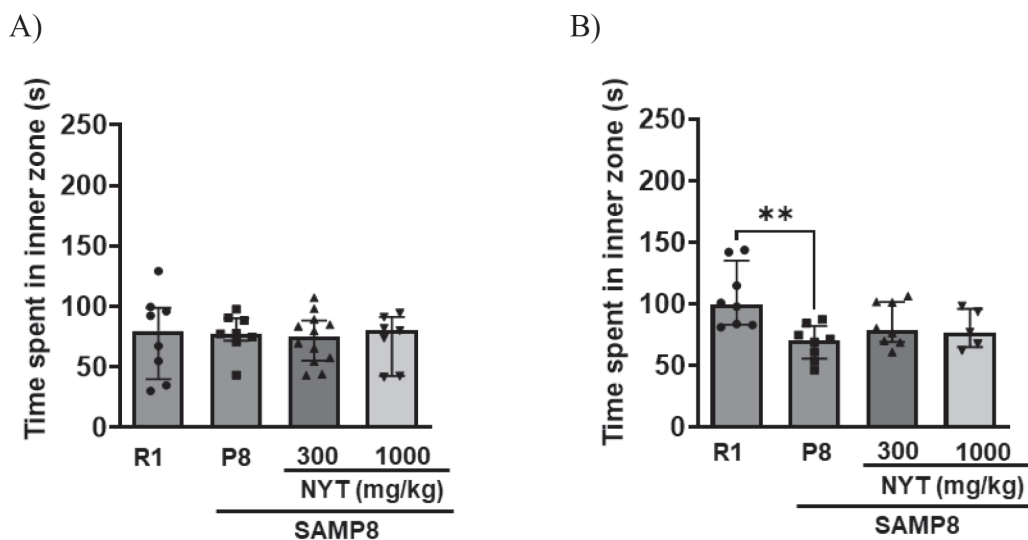


**Fig. 7** Total distance of SAMP8 mice open-field test.

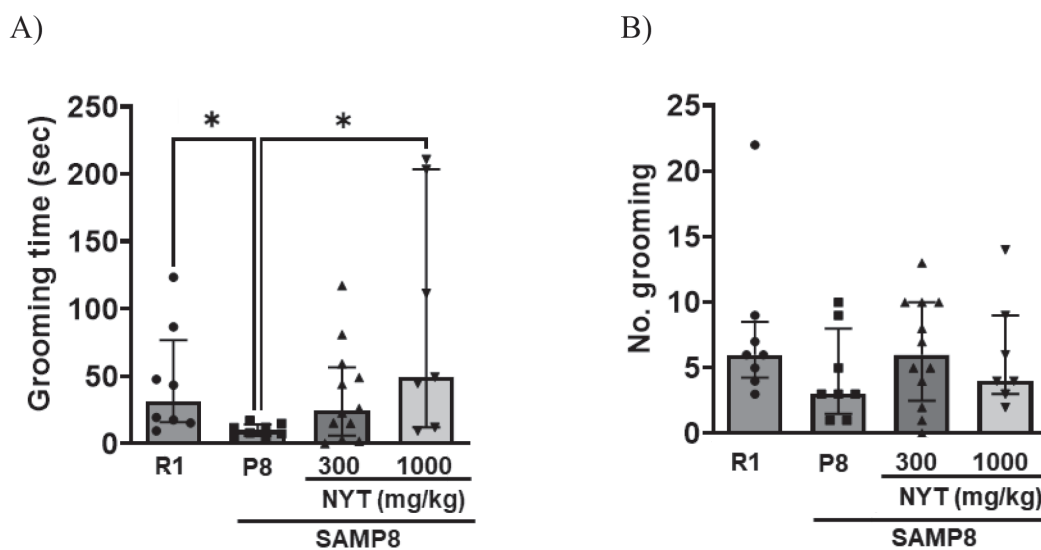
We measured the moving distance for 10 minutes in the open-field. A) 5 months old, B) 8.5 months old

内側エリア滞在時間が有意に減少し、不安様行動の発現が認められた (Fig. 8)。しかし、この変化に対して人參養榮湯の300および1000 mg/kg用量は共に影響を示さなかった。

Sucrose splashテストにおけるSAMP8マウスの身繕い時間および身繕い回数をFig. 9に示した。R1+waterと比較してP8+waterでは、身づくろい時間が有意に減少し、無気力様行動の発現が認められた。また、この減少は人參養榮湯1000 mg/kgの投与により、有意に改善された (Fig. 9)。このことから、無気力様症状に対して人參養榮湯は治療効果を有することが示唆された。一方、身繕い回数は、4群間で有意な差は認められなかった。



**Fig. 8** Time spent in the inner zone of SAMP8 mice in open-field test. We measured the time spent in the inner zone of the open-field device and analyzed anxiety-like behavior. A) 5 months old, B) 8.5 months old.  $**p < 0.01$ . Data were subjected to Dunn's multiple comparison tests after one-way ANOVA. R1: SAMR1, P8: SAMP8



**Fig. 9** Grooming time and number of SAMP8 mice in the sucrose splash test. A) grooming time, B) grooming number  $*p < 0.05$ . one-way ANOVA. Dunn's multiple comparisons test R1: SAMR1, P8: SAMP8.

本章では、SAMP8マウスの空間記憶障害と精神症状様行動に対する人参養栄湯の効果を検討した。SAMP8マウスは空間記憶障害と無気力様行動、不安様行動を示し、人参養栄湯は空間記憶障害と無気力様行動を軽減した。一方、不安様行動に対して人参養栄湯は改善効果を示さなかった。このことから、人参養栄湯は、嗅覚障害だけでなく、記憶障害や精神症状の一部に有効であることが示唆された。



## 【総括】

ADの早期からの嗅覚障害発現と、嗅覚障害と認知機能障害の関連性は以前から報告されていたが<sup>(8)(9)</sup>、その病態の全貌は不明なままであり、予防・治療法も確立されていない。本研究では、ADモデルマウスであるSAMP8マウスの嗅覚障害の発現が明らかとなったことで、AD早期の嗅覚障害の病態を解明する糸口となる可能性が期待できた。更に、ADの嗅覚障害に対して人參養栄湯が有効であることが提案され、早期段階からの投与により記憶障害や無気力様行動などの中核症状や周辺症状の進行を予防する可能性も示された。本研究成果はADの嗅覚障害の病態解明に関する数少ない知見であり、人參養栄湯の治療効果に関する新たな科学的根拠となりえる。そして、AD患者の嗅覚障害の治療やADの進行抑制を目的として、人參養栄湯が臨床適応される可能性を示した。人參養栄湯はAD早期の嗅覚障害に対して、より安全性の高い新たな治療薬になり得る可能性が示された。

## 【参考文献】

- (1) Dan, Xiuli et al. "Olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative diseases." *Ageing research reviews* vol. 70 (2021) : 101416.
- (2) Rokot, Natasya Trivena et al. "A Role of Ginseng and Its Constituents in the Treatment of Central Nervous System Disorders." *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* vol. 2016 (2016) : 2614742.
- (3) Samper-Ternent, Rafael et al. "Relationship between frailty and cognitive decline in older Mexican Americans." *Journal of the American Geriatrics Society* vol. 56,10 (2008) : 1845-52.
- (4) Kojima, Gotaro et al. "Frailty as a Predictor of Alzheimer Disease, Vascular Dementia, and All Dementia Among Community-Dwelling Older People: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of the American Medical Directors Association* vol. 17,10 (2016) : 881-8.
- (5) Morley, John E et al. "The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1822,5 (2012) : 650-6.
- (6) Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2007
- (7) Kouzuki, Minoru et al. "Comparison of olfactory and gustatory disorders in Alzheimer's disease." *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* vol. 39,2 (2018) : 321-328.
- (8) Djordjevic, Jelena et al. "Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Neurobiology of aging* vol. 29,5 (2008) : 693-706.
- (9) Roberts, Rosebud O et al. "Association Between Olfactory Dysfunction and Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia." *JAMA neurology* vol. 73,1 (2016) : 93-101.

**[Articles]**

Survey on the contributions of pharmacy students towards patients during a six-day clinical  
practicum at the cranial nerve center ... Yuki YASUTAKA, Kentaro OGATA, Hidetoshi KAMIMURA ... 1

**[Reviews]**

Adverse effects of fluoroquinolone antibiotics on onset and exacerbation of aortic  
aneurysm and dissection .....Koshun INADA ... 9

Involvement of brain pericytes in age-related impairment of the blood–brain barrier ..... Takuro IWAO ... 15

Pathophysiological analysis of *Scn1a*<sup>+/-</sup> mice and the establishment of a novel synaptic  
culture system for the development of therapeutic drugs for epilepsy .....Kouya UCHINO ... 31

Suppressive effect of active form of vitamin K<sub>2</sub> derivatives on mitochondrial inhibitor-  
induced cell death .....Erina TOKI ... 39

Study of the therapeutic effect of Ninjinyoeito on olfactory response impairment and  
cognitive dysfunction in senescence-accelerated mouse SAMP8 .....Marika HIRATA ... 47

## 福岡大学論叢寄稿取扱要領

〔制定 昭和60年6月19日〕  
〔改正 令和3年4月1日〕

- 1 福岡大学研究推進部規程第3条第1号に基づき、各分野における研究の成果等を発表するため、各学部は論文集（以下「論叢」という。）を発行することができる。
- 2 論叢の編集は、各学部に設置する編集委員会が行う。
- 3 各学部の編集委員会の委員長は、研究推進部委員とし、委員会の構成員は3人以上とする。
- 4 論叢の各巻における原著論文及び資料（以下「論文等」という。）を発行できる総頁数の上限は、次のとおりとする。

(1) 人文論叢	3,500頁	(A5判)
(2) 法学論叢	1,500頁	(A5判)
(3) 経済学論叢	500頁	(A5判)
(4) 商学論叢	1,300頁	(A5判)
(5) 理学集報	200頁	(A4判)
(6) 工学集報	600頁	(A4判)
(7) 医学紀要	350頁	(A4判)
(8) 薬学集報	200頁	(A4判)
(9) スポーツ科学研究	150頁	(A4判)
- 5 論叢の発行は、研究推進部長が行う。
- 6 論叢の発行に関する事項は、研究推進部委員会において協議する。
- 7 論叢に論文等を寄稿することができる者は、本学の教育職員（特任教育職員、病院客員教授及び病院臨床教授・准教授を含む。以下同じ。）とする。ただし、連名で寄稿し、本学の教育職員が寄稿筆頭者となる場合は、その連名者については制限をしない。
- 8 前項本文の規定にかかわらず、次の各号のいずれかに該当する場合は、寄稿することができる。なお、第4号から第7号までに該当する場合は、当該学部教授会の承認が必要である。
  - (1) 本学の専任職員（教育職員を除く。）、非常勤講師、臨床研修医、大学院学生・研究生又は外国人研究員が寄稿筆頭者となり、本学の教育職員と連名で寄稿する場合
  - (2) 本学の非常勤講師又は外国人研究員が単独で寄稿する場合
  - (3) 本学の大学院学生・研究生が博士学位論文を単独で寄稿する場合
  - (4) 本学の教育職員であった者が、在職中に行った研究の成果を退職後6月以内に寄稿する場合
  - (5) 学外の者に特に原稿を依頼する場合
  - (6) 本学の名誉教授が寄稿する場合
  - (7) 前各号に該当しない者で編集委員会が推薦する場合
- 9 前2項により本学の教育職員以外の者が寄稿する場合は、その所属・職氏名を論文等の巻頭に記載しなければならない。
- 10 掲載された論文等の著作権は、著者に属し、その内容についての責任は著者が負うものとする。

- 11 掲載された論文等は，原則として電子化しインターネット等を介し公開する。
- 12 論文等一編の原稿枚数は，原則として，A4サイズ20枚(30,000字程度，図表，写真及び余白等を含む。)以内でなければならない。
- 13 この要領は，令和3年4月1日から実施する。

# 福岡大学薬学集報 投稿規定

## 1. 投稿の取り決め事項

- 1) 投稿区分には，原著論文，症例報告，総説がある。  
【原著論文】薬学（薬学教育を含む）およびその関連領域に関する論文。  
【症例報告】臨床症例で新しい薬学的知見を含む報告。  
【総 説】著者の専門分野における研究成果や知見をまとめたもの。編集委員長が，新たに博士の学位を授与された者に執筆を依頼するものも含む。
- 2) 投稿論文は未発表のものに限る。依頼原稿はこの限りではない。
- 3) 投稿論文は，原則として研究室または所属部局の責任者が校閲したものとする。
- 4) 投稿論文は和文，英文いずれでも良い。ただし，和文原稿には英文抄録をつける。
- 5) 原稿には表題，要旨，本文，文献，図表を含める。
- 6) 投稿原稿は編集委員長（研究推進部委員）宛てに送付する。
- 7) 投稿に際しては，和文および英文とも原稿（図，表も含む）の電子ファイル（Microsoft WordおよびPDFファイル）を提出する。
- 8) 投稿された原稿（依頼原稿を除く）は，編集委員長（会）が依頼した査読者による査読を経て掲載する。編集委員長は一定期間内に査読の結果を投稿者に提示する。投稿者は査読コメント毎に紙面で適切に回答し，論文を校正する。
- 9) 校正後の再投稿に際しては，査読コメント毎の回答，校正履歴を明示した修正原稿の電子ファイルを締め切りまでに提出する。
- 10) 論文の根拠となる研究に関して，国及び福岡大学が倫理審査を求めている場合（人を対象とする医学研究等），当該研究に関する倫理審査委員会の承認番号を本文中に記載する。医療従事者や学生を対象とした研究，情報（処方箋，薬歴など）を取り扱う研究においても対象者への倫理的配慮を十分に行い，個人情報保護に十分注意する。
- 11) 投稿者は論文の末尾に利益相反に関する事項を開示しなければならない。

## 2. 投稿原稿執筆要領

原稿はMicrosoft Wordで作成する。原則としてA4判で（行間1行），上下左右の余白は標準設定（上：35mm，下：30mm，左：30mm，右：30mm）を使用し，和文は明朝体（横書き），英文はTimes系で12ポイントフォントを使用する。原稿は表紙から本文，参考文献そして図脚注（Figure Legends）まで通しページ番号をつける。表と図はそれぞれ別に一括する。

### A・和文原稿 表紙

- 1) 論文の第1ページ（表紙）には，表題，著者名，所属を書く。責任著者名の後ろに「\*」を付す。
- 2) 第2ページには，英文表題（Title），著者名（Author），所属（Affiliation），要旨（Abstract），キーワード（Keywords）（5個まで）を記載した英文抄録をおく。
  - ① 著者名は著者慣用のものを用い，姓はすべて大文字にしてフルネーム（例：Taro FUKUOKA）を記入する。責任著者名の後ろに「\*」を付す。

② キーワード (Keywords) は、最後に行をかえて記載する。

3) 2) の次に改ページ後、和文の要旨及びキーワード (5個まで) を記載する。

4) 3) の次に責任著者のEメールアドレスおよび氏名を記載する。

例：\*E-mail: xxxx@fukuoka-u.ac.jp (福岡 太郎)

## B・英文原稿 表紙

1) 論文の第1ページには、Title (表題)、Author (著者名)、Affiliation (所属) を書く。タイトルは前置詞、冠詞、接続詞以外は大文字で書く。所属機関名は正式の欧文呼称で、著者名は慣用のものを用い、姓は全て大文字にしてフルネーム (例：Taro FUKUOKA) を記載する。責任著者名の後ろに「\*」を付す。

2) 第2ページにはAbstract (要旨) をおく。Keywords (キーワード) は、最後に行をかえて5個以内で記載する。

3) 2) の次に責任著者のEメールアドレスおよび氏名を記載する。

例：\*E-mail: xxxx@fukuoka-u.ac.jp (Taro FUKUOKA)

## C・本文

1) 以降は、緒言 (Introduction)、方法 (Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、謝辞 (Acknowledgments)、利益相反 (Conflict of Interest)、参考文献 (References)、図脚注 (Figure Legends) の順に記載する (症例報告、総説は適宜変更可)。これらの見出しはボールドとし、番号を付けない。

2) 各項目中に付ける小見出しの記号は、1, 1), (1) の順にする。

3) 参考文献は引用順に番号を付し、本文中では片かっこを付けて、上付き肩書とする。通常句読点の前に配置する。(例：「…と報告している<sup>1)</sup>。」)

## D・謝辞

研究費に関する事項など、感謝の辞を付記したい場合はこの項に記載する。

## E・利益相反

開示すべき利益相反がある場合、その内容を記載する。利益相反の開示事項がない場合は、末尾に「開示すべき著者の利益相反はない。(和文原稿) / The authors declare no conflict of interest. (英文原稿)」と記載する。

## F・参考文献

1) 文献欄の配列は引用順とする。

2) 著者名はすべて連記する。

3) 配列の順序は、著者氏名 (英文の場合、名はイニシャルのみ、例：Fukuoka T) : 題名. 雑誌名 巻 : 最初のページ-終わりのページ, 年号 (西暦). とする。

4) 欧文雑誌名の省略法は、PubMedの記載に準ずる。

5) 通常の雑誌の場合の記載例：

- 1) 土肥 真, 鈴木修二: 遅発型アレルギー反応とT細胞. 臨床免疫 22: 1884-1890, 1990.
  - 2) Straus FG, Maxwell MH: Withdrawal of antihypertensive therapy. J Am Me Ass 238: 1734-1737, 1988.
- 6) 単行本の場合の記載例:
- 1) 杉浦光雄: 食道動脈癌の治療 第2版, 医学教育出版社(東京), 1985.
  - 2) Dunhill MS: Pathological Basis of Renal Disease 2nd ed. Saunders (Philadelphia), 1989.
- 但し, 特定のページを引用したときにはed. の次にpp. 50-80といった数字を入れる.
- 7) 編著のいる単行本の1章を引用したときの記載例:
- 1) 福田 健: 構造・表面レセプター. 牧野莊平・石川 孝(編): 好酸球 第2版, pp. 91-129, 国際医学出版社(東京), 1991.
  - 2) Kaehny WD: Disorders of potassium metabolism. In: Schrier RW (ed.), Renal and Electrolyte Disorders 3rd ed. pp. 85-98, Little-Brown (Boston), 1986.
- 8) 未発表の研究成果引用は, 本文中に人名を掲げて(未発表, 英文ではunpublished data)とカッコでいれ, 文献欄には載せない.

## G・表

- 1) Microsoft Wordで作成する. 表ごとに別のページに書く(白黒).
- 2) 表には番号(表1, 英文ではTable 1)を付け, 表のタイトルは上におく. 説明は表の下におく.

## H・図

- 1) 図はA4判1ページに1点ずつ作成する. 図または写真は鮮明なものでなければならない(カラー可). Microsoft PowerPointで作成しても良い(スライドサイズはA4縦とすること).
- 2) 図には番号を付ける(図1, 英文ではFig. 1). ページの左上部に図と区別して, 図の番号を記載する.
- 3) 各図のタイトルと説明は, 図脚注(英文ではFigure Legends)にまとめて記載する.

## I・その他

本文中, 反復する語句には略語を用いても差し支えないが, 初出のときは省略せず, フルスペルで記述し, その直後に略語を括弧内に記す. (例: smooth muscle actin (SMA))

福岡大学薬学集報に論文を投稿する場合の提出リスト

	提出物
投稿時	原稿(図脚注(Figure Legends), 図表を含む)の電子ファイル
査読後	提示された査読コメントとコメント毎の回答の電子ファイル
	校正履歴*のある原稿の電子ファイル

\*: 修正した部分がわかるように文字色を変えたり, 下線を引く.

福岡大学薬学集報 第24巻 (通巻48号)

2024年3月8日発行  
(非売品・無断転載を禁ず)

編集 福岡大学薬学集報編集委員会

編集委員長 石橋大輔  
(研究推進部委員)

発行人 鹿志毛信広  
(福岡大学研究推進部長)

発行所 福岡大学研究推進部  
福岡市城南区七隈八丁目19番1号

印刷所 有限会社新幸印刷  
久留米市小頭町10-1