

日本応用酵素協会誌

No.53
2018

総 説

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| コンドロイチン硫酸の発現調節酵素による骨格筋分化・再生制御 | 1 |
| 三上雅久, 北川裕之 | |
| 神経傷害特異的に応答発現するエンドペプチダーゼ | |
| Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE) | 11 |
| 木山博資, 桐生寿美子 | |
| 超偏極 ¹³ C MRIによる非侵襲的酵素活性イメージング | 19 |
| 松元慎吾 | |
| 低酸素応答による末梢神経の髄鞘形成制御 | 27 |
| 氏家悠佳, 若月修二, 荒木敏之 | |

2018年度 研究報告

| | |
|---------------------------------------------------------|-----|
| 酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究 | 33 |
| 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 | 58 |
| Vascular Biology Innovation に関する研究助成 | 87 |
| 全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成 | 103 |
| Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成 | 109 |

研究調査所 酵素情報

| | |
|--------------------------------------|-----|
| ファージディスプレイによる進化分子工学的手法を用いた酵素改変 | 127 |
| 免疫疾患領域における創薬標的としての RIPK1 | 130 |
| Bruton's tyrosine kinase (Btk) | 133 |

公益財団法人 日本応用酵素協会
Japan Foundation for Applied Enzymology

総 説

コンドロイチン硫酸の発現調節酵素による骨格筋分化・再生制御

三 上 雅 久*, 北 川 裕 之*

1. はじめに

骨格筋は、ヒトの体重の約40%を占める最大の臓器であり、身体を支え、自立的な活動を可能にする“運動器”の構成基盤であるとともに、個体レベルでのエネルギー代謝調節の中心的な役割を果たす臓器として、肝臓や脂肪組織と肩を並べる。骨格筋は、環境の変化に応じて、量的かつ質的な可塑性を示す特徴があり、適正な栄養摂取と運動トレーニングにより肥大するが、運動不足などによるメカニカルストレスの減少や加齢などによって萎縮する。特に、加齢性の筋萎縮はサルコペニアと呼ばれ、寝たきり状態や、肥満などの代謝異常を誘発し、ADL (activity of daily living) や QOL (quality of life) の低下を招く要因となっている。したがって、サルコペニアの克服は、超高齢化社会に突入した本邦においても重要な課題である。骨格筋は、生来比較的再生能が高く、ダメージを受けても速やかに筋線維を再生する。しかしながら、この再生能も加齢に伴い低下し、サルコペニアの発症に繋がる。骨格筋再生能の低下の要因として、筋組織内の微小環境変化が想定されているが、その実体はよくわかっていない。

筆者らはこれまでに、あらゆる組織の主要な細胞外マトリックス構成分子であるコンドロイチン硫酸 (CS) 多糖鎖の発現量調節が、骨格筋分化と再生過程の推進に重要であることを見出し、CS鎖により形づくられる微小環境と骨格筋の正常なリモデリングとの密接な関連性を紐解く解析を続けている。本総説では、CS鎖の機能発現を調節する生合成・分解システムについて概説するとともに、骨格筋分化・再生過程におけるCS鎖の発現変動と作用基盤に関する知見を紹介し、CS鎖の発現調節酵素によるサルコペニアをはじめとする筋疾患治療応用

への展望を述べる。

2. CS鎖の構造と生合成システム

CS鎖は、代表的な硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 多糖の一つであり、コアとなるタンパク質の特定のセリン残基に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として、あらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に存在している¹⁻⁴⁾。近年の研究により、CSPGは、形態形成・骨格形成や神経可塑性をはじめとする様々な生命現象に関与することがわかってきた¹⁻¹⁴⁾。このようなCSPGの機能の多くは、糖鎖部分であるCS鎖によって担われている。実際、数多くの生合成酵素の働きにより産み出されるCS鎖の構造多様性は、CS鎖が広範な生理機能を発揮する所以でもある。

CS鎖は、グルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖が繰返し重合した直鎖状の糖鎖構造を基本骨格にもつ (図1b)。CS鎖の生合成は、まずコアタンパク質の特定のセリン (Ser) 残基に、結合領域と呼ばれる四糖構造 (GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-Ser: Xyl, Galはそれぞれキシロース, ガラクトースを表す) が合成されることにより始まる^{1,15)} (図1a)。この四糖構造は、それぞれ固有の糖転移酵素の働きにより、単糖単位で段階的に合成される。組み上がった四糖構造は、CS生合成のプライマーとなり、非還元末端のGlcA残基に、GalNAcとGlcAが交互に付加されることで、CS鎖特有の二糖繰返し領域が合成される (図1b)。二糖繰返し領域の生合成には、コンドロイチン合成酵素 (ChSy) に代表される6種類の糖転移酵素が参画する¹⁶⁻²⁶⁾。この際、協働する糖転移酵素の組合せや硫酸基転移酵素との相互作用などにより、CS鎖の重合レベルや一本のコアタンパク質上に載るCS鎖の本数が厳密

*神戸薬科大学学生化学研究室

に制御される^{27, 28)} (図1b).

CS鎖の糖鎖骨格は、基質特異性の異なる複数の硫酸基転移酵素により、主に GlcA 残基の2位や GalNAc 残基の4位または6位で硫酸化修飾を受ける^{3, 29)}. したがって、生合成されたCS鎖は、特徴的な二糖単位 (O,

A, C, D, E ユニット) の組み合わせから構成されるポリマーと捉えることができ、多様な構造を示すようになる (図1b). これらの修飾反応は、各硫酸基転移酵素の競合的あるいは協調的作用によって厳密に制御され、最初の基質となるOユニット (硫酸化されていない二糖

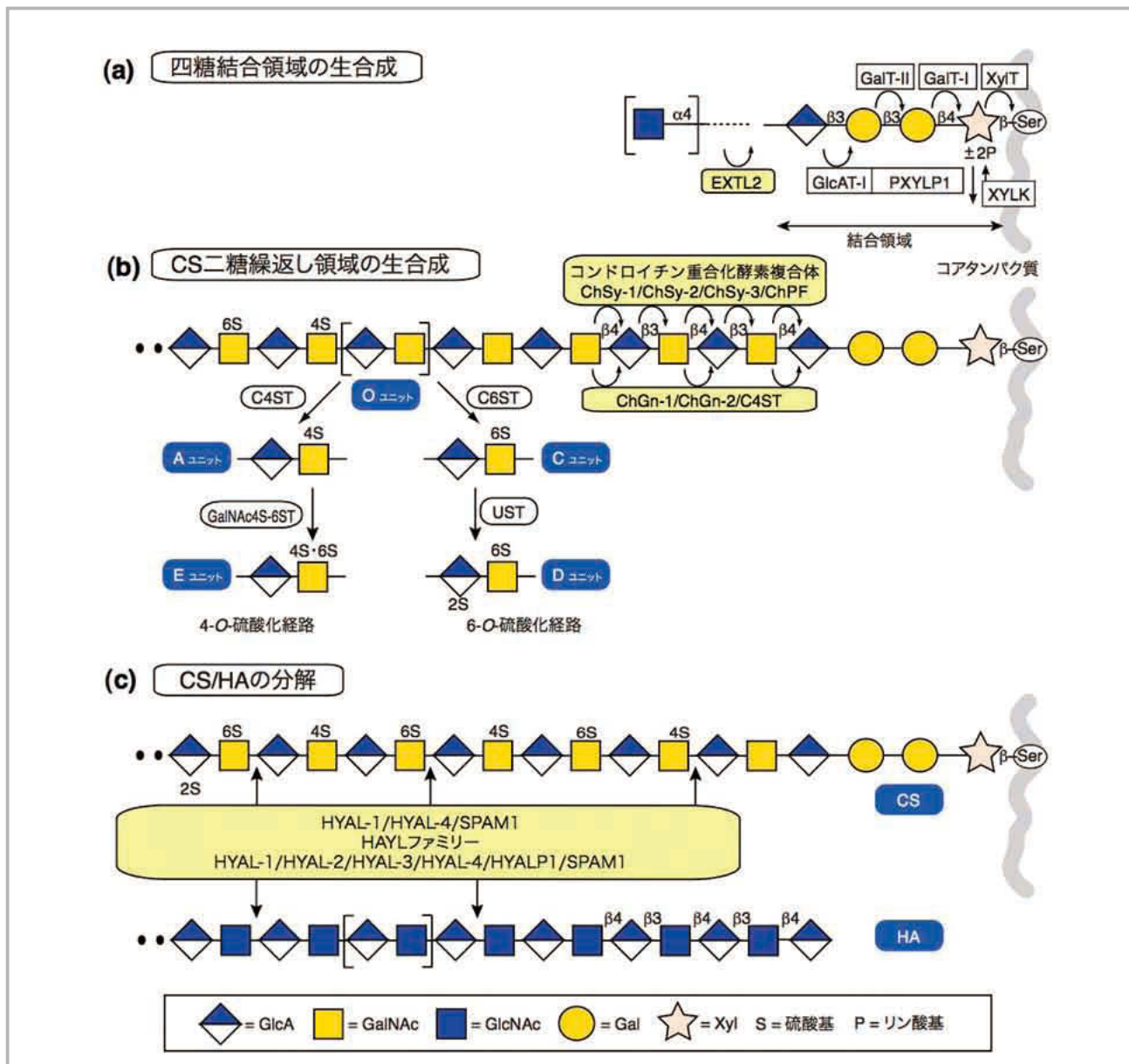


図1 CS鎖の生合成・分解システム

数多くの糖転移酵素や硫酸基転移酵素、特異的なリン酸化酵素/脱リン酸化酵素が、CS生合成のプライマーとなる四糖結合領域 (a) やCS鎖の二糖繰返し領域 (b) の生合成に関与する。CS鎖の分解に寄与するエンド型の加水分解酵素 (c) は、ヒアルロン酸 (HA) の代謝にも関わるHA分解酵素HYALによって担われる。図中の (2P) は、一時的な2位のリン酸化を表し、2S, 4S, 6Sは、それぞれ2位, 4位, 6位のヒドロキシ基が硫酸基に置換された構造を示す。(a) XylT: キシロース転移酵素, XYLK: キシロース2-O-キナーゼ (別名FAM20B), PXYLP1: 2-O-ホスホキシロースホスファターゼ, GalT-I: ガラクトース転移酵素-I, GalT-II: ガラクトース転移酵素-II, GlcAT-I: グルクロン酸転移酵素-I. (b) ChSy: コンドロイチン合成酵素, ChPF: コンドロイチン重合化因子, ChGn: コンドロイチンN-アセチルガラクトサミン転移酵素, C4ST: コンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素, C6ST: コンドロイチン6-O-硫酸基転移酵素, UST: ウロシル2-O-硫酸基転移酵素, GalNAc4S6ST: N-アセチルガラクトサミン4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素. (c) HYAL: ヒアルロン酸分解酵素

単位)が、4-*O*-硫酸化されるか、あるいは6-*O*-硫酸化されるかによって、生成される二糖単位も異なってくる^{3, 29)}。

興味深いことに、CS鎖の合成量は、結合領域のXyl残基の一過的なリン酸化によっても制御される。なぜなら、Xyl残基のリン酸化は、その後の連続したGalの転移とGlcAの転移を担う酵素活性に影響するためである³⁰⁻³²⁾。最近、このリン酸化と脱リン酸化を触媒する責任酵素として、それぞれXyl 2-*O*-キナーゼ (XYLK, 別名FAM20B)と2-*O*-ホスホキシロースホスファターゼ (PXYP1)が著者らにより同定され、結合領域のXyl残基の一過的なリン酸化による結合領域四糖構造の成熟とCS鎖の合成量制御が、生理的にも重要なイベントであることが判明した³³⁻³⁵⁾。また、EXTL2という糖転移酵素は、このリン酸化四糖構造の非還元末端に、 α 1-4結合で*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)を転移する活性をもつ³⁶⁾。このリン酸化五糖構造は、CS生合成のプライマーとして利用できない³⁶⁾ことから、EXTL2は、CSPGの品質管理に寄与しているかもしれない。

3. CS鎖の分解システム

CS鎖の分解は、主にリソソームで行われ、エンド型の加水分解酵素により、大まかに断片化された後、生じたオリゴ糖が、エキソ型のグリコシダーゼやスルファターゼにより、非還元末端側から段階的に分解されると考えられている³⁷⁾。しかしながら、CS鎖の生合成系とは対照的に、哺乳類のCS鎖の分解系についてはあまりよくわかっていない。その最大の要因は、CS分解系の最初のステップで働く特異的なエンドグリコシダーゼが不明瞭であったためである。

以前より、硫酸化されていないCS鎖であるコンドロイチン (Chn)鎖が、非硫酸化GAG多糖であるヒアルロン酸 (HA, 図1c参照)と構造的に類似していることから、HA加水分解酵素 (ヒアルロニダーゼ)がCS鎖の分解にも関与することが想定されていた。実際、哺乳類ヒアルロニダーゼであるHYALファミリーに属する6つのメンバーのうち、HYAL-1, HYAL-4およびSPAM1 (精巣由来ヒアルロニダーゼ, PH-20)にCS分解活性があることが報告されている^{38, 39)}。

近年、HAを産生しない線虫 *Caenorhabditis elegans*

(*C. elegans*)のゲノム中で同定されたHYALホモログ分子が、Chnに特異的な加水分解酵素であることが判明した⁴⁰⁾。この結果を受け、哺乳類HYALの酵素学的特性が再検討され、HYAL-1やSPAM1は、HA分解活性と同等の強いCS分解活性をもつことが確認された⁴¹⁾。一方、HYAL-4は、HA分解活性を示さず、CS特異的なエンド β -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼであることが報告された⁴²⁾。しかしながら、ヒトHYAL-4は、胎盤、骨格筋、精巣など限られた組織にしか発現しておらず、全身性のCS分解は、広範な組織発現様式を示すHYAL-1であるとする見方が現在のところ有力である。

4. CS鎖の発現レベルと骨格筋分化との接点

CS鎖の個体レベルでの生理学的重要性は、モデル生物である線虫を用いた解析により初めて証明された。線虫は、硫酸化されていないCS鎖であるChn鎖を多く含む^{43, 44)}。Chnの生合成に関わる線虫のChSyファミリー分子の機能不全は、初期胚において細胞質分裂不全を呈し、一度分裂した細胞が再度融合し、多核となって死に至る^{5, 45)}。同様の逆行現象による多核胚 (合胞体)の異常形成は、著者らが作製したCS鎖の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素-I (GlcAT-I)が欠損したマウスの初期胚においても観察される (図2a)⁶⁾。これらの知見は、CS鎖の発現が初期胚の細胞質分裂を正常に進行させる上で必須不可欠であることを意味する。さらに穿った見方をすると、細胞融合・多核化を伴う正常な体細胞の分化過程が、CS鎖の積極的な発現低下によって担保されている可能性も想定された。こうした背景の下、筆者らは、多核の合胞体を形成する骨格筋分化過程に着目し、仮説の検証を試みた¹⁰⁾。

骨格筋分化過程では、未分化な筋芽細胞が互いに融合して多核の筋管細胞 (myotube)となる劇的な変化を遂げる。筆者らは、*in vitro*で骨格筋分化過程を再現できる筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いて、分化に伴うCS鎖の発現変動を解析した¹⁰⁾ (図2b)。C2C12細胞は、低血清条件下で培養することで一定の割合の細胞が分化を開始し、やがて多核の筋管細胞を形成する⁴⁶⁾。CS鎖の発現レベルは、分化誘導後の初期段階では増加するが、細胞融合・多核化が活発に起こる筋管形成期を

境に減少に転じた (図2b). 興味深いことに, 分化途上の C2C12 細胞における CS 鎖の発現は, myogenin (Myog) 陽性細胞の周囲で相対的に低下した. Myog は, 筋管細胞への分化誘導に関わる筋特異的転写因子であることから, CS 鎖の発現レベルの減少は, Myog 制御下の細胞融合・多核化を伴う筋管形成において, プログラムされた重要なイベントであることが示唆された.

そこで, 筋管形成における CS 鎖の重要性を確かめるため, C2C12 細胞の分化誘導系に発現する CS 鎖を強制的に排除することによっても, 筋分化が亢進するかを調べた¹⁰. 細菌由来の CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC (ChABC) を筋管形成期の培養系に添加すると, 24 時間後には, CS 鎖の発現レベルは 50% 程度にまで低下し, 多核の筋管細胞の割合が有意に増加した. さらに筆者らは, コンドロイチン 4-O-硫酸基転移

酵素-1 (C4ST-1) の発現をノックダウンした C2C12 細胞を樹立した. なぜなら, C4ST-1 は, 硫酸化酵素でありながら, CS 鎖の合成量の制御にも関与し (図1b), その欠損によって, CS 鎖の発現レベルが劇的に減少するからである^{27, 47-49}. 期待通り, C2C12 細胞における C4ST-1 のノックダウンは, CS 鎖の発現レベルの有意な減少と, 筋分化の顕著な亢進を再現した. これらの結果を裏付けるように, 遊離の CS 多糖鎖を添加処理すると, C2C12 細胞の筋幹形成が抑制されることも報告されている⁵⁰.

5. 骨格筋分化を制御する CS 鎖の発現調節酵素と細胞内シグナル伝達

C4ST-1 のノックダウンは, CS 鎖の発現レベルを強制的に減少させる上で効果的であったが, C2C12 細胞

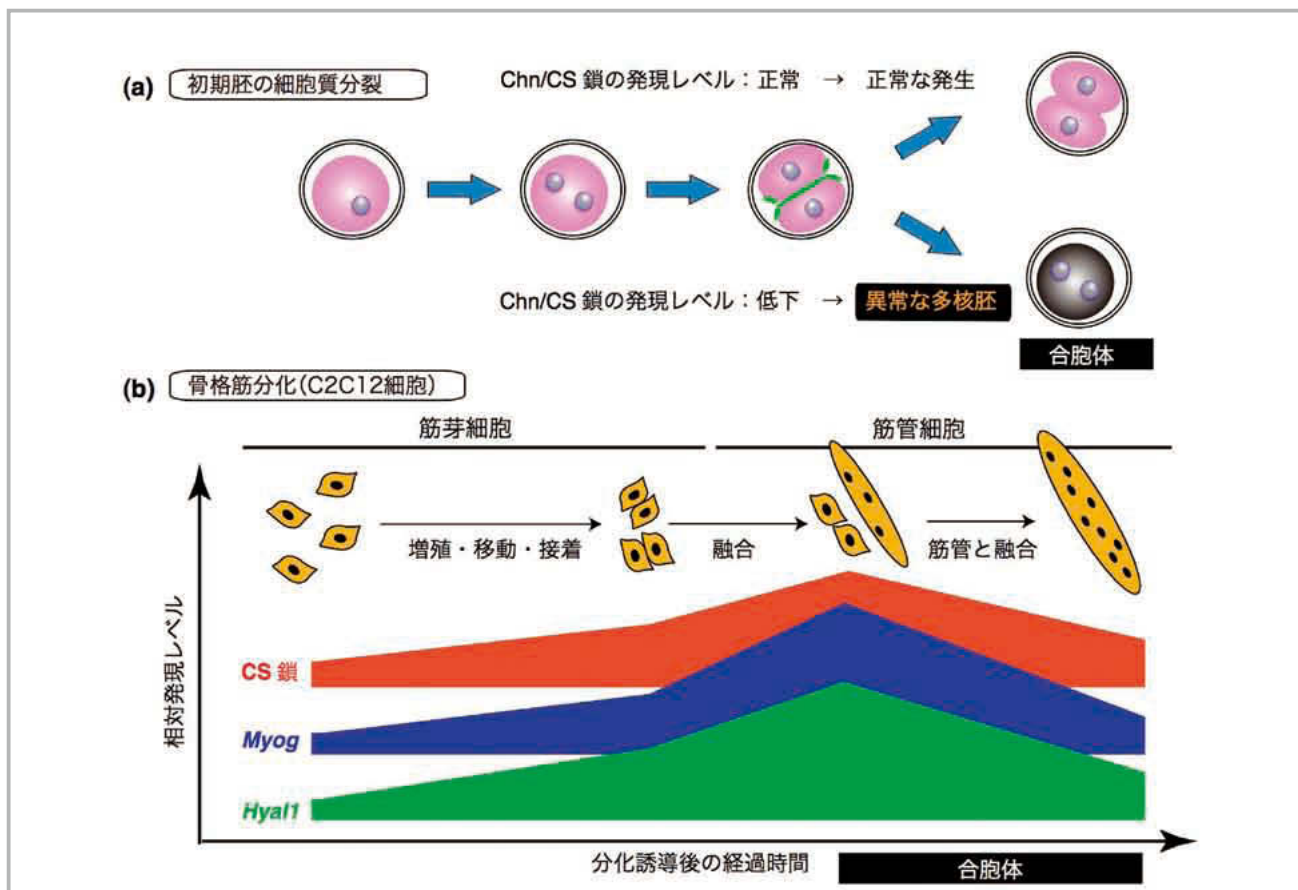


図2 初期胚の細胞質分裂異常ならびに骨格筋分化過程における CS 鎖の発現

(a) 通常の初期胚では, 1 → 2 → 4 細胞へと細胞分裂を繰り返していくが, Chn/CS 鎖の発現が減少した初期胚では, 細胞質分裂が正常に進行せず, 分裂と融合を繰り返し, 多核の合胞体となって致死となる. (b) C2C12 細胞の筋芽細胞から多核の筋管細胞への骨格筋分化過程 (上段) における CS 鎖の発現変動 (下段赤). CS 鎖の発現レベルは, 筋管細胞への分化誘導に関わる転写因子 Myog (下段青) や CS 鎖の分解に関わる Hyal1 (下段緑) の発現と同調した変動を示し, 筋管形成期に低下する.

の筋分化過程における内在性の C4ST-1 の発現パターンは、CS 鎖の発現変動と必ずしも一致しなかった。同様に、CS 鎖の生合成に関与する糖転移酵素群についても、筋幹形成期における CS 鎖の時期特異的な減少を説明しうる発現変動を示すものは見出せなかった¹⁰⁾。

これらの結果から、骨格筋分化の過程では、むしろ CS 鎖の分解系が賦活化している可能性が考えられた。そこで筆者らは、CS 鎖に対する分解活性が見出されている HYAL ファミリーメンバー^{38, 39)} の発現に注目した。当初、ヒトにおいて、胎盤や骨格筋といった合体体形成の盛んな組織に局限した発現様式を示す HYAL-4 に期待を寄せたが、マウス由来の C2C12 細胞では、調べたいずれの分化段階でも *Hyal4* の発現は検出できなかった。一方で、*Hyal1* は *Myog* と同調した発現変動を示し (図2b)、*Myog* 陽性細胞の多くで、*Hyal1* の発現が観察された。また、*Hyal1* の発現レベルが高い細胞周囲

では、抗 CS 抗体によって認識される CS 鎖の染色性が減弱していた。HYAL1 を過剰発現する C2C12 細胞を樹立したところ、CS 鎖の発現は常に低いレベルに抑えられ、親株細胞に比べ、多核の筋管細胞の割合が有意に増加した。対照的に、HYAL1 のノックダウンでは、CS 鎖の蓄積と分化遅延が助長された。これらのことから、骨格筋分化過程における一過的な CS 鎖の発現レベルの減少は、HYAL1 を介して細胞自律的に制御されていると考えられた。

さらに筆者らは、C2C12 細胞の筋分化過程において、少なくともホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K)/Akt 経路が、CS 鎖の発現レベルの減少により活性化されることを見出した (図3a)。PI3K/Akt シグナルは、筋形成過程のみならず、筋肥大や再生にも関与^{51, 52)}、いわば筋組織で起こる現象すべてを一手に担う万能シグナルである。このことから、CS 鎖の発現レ

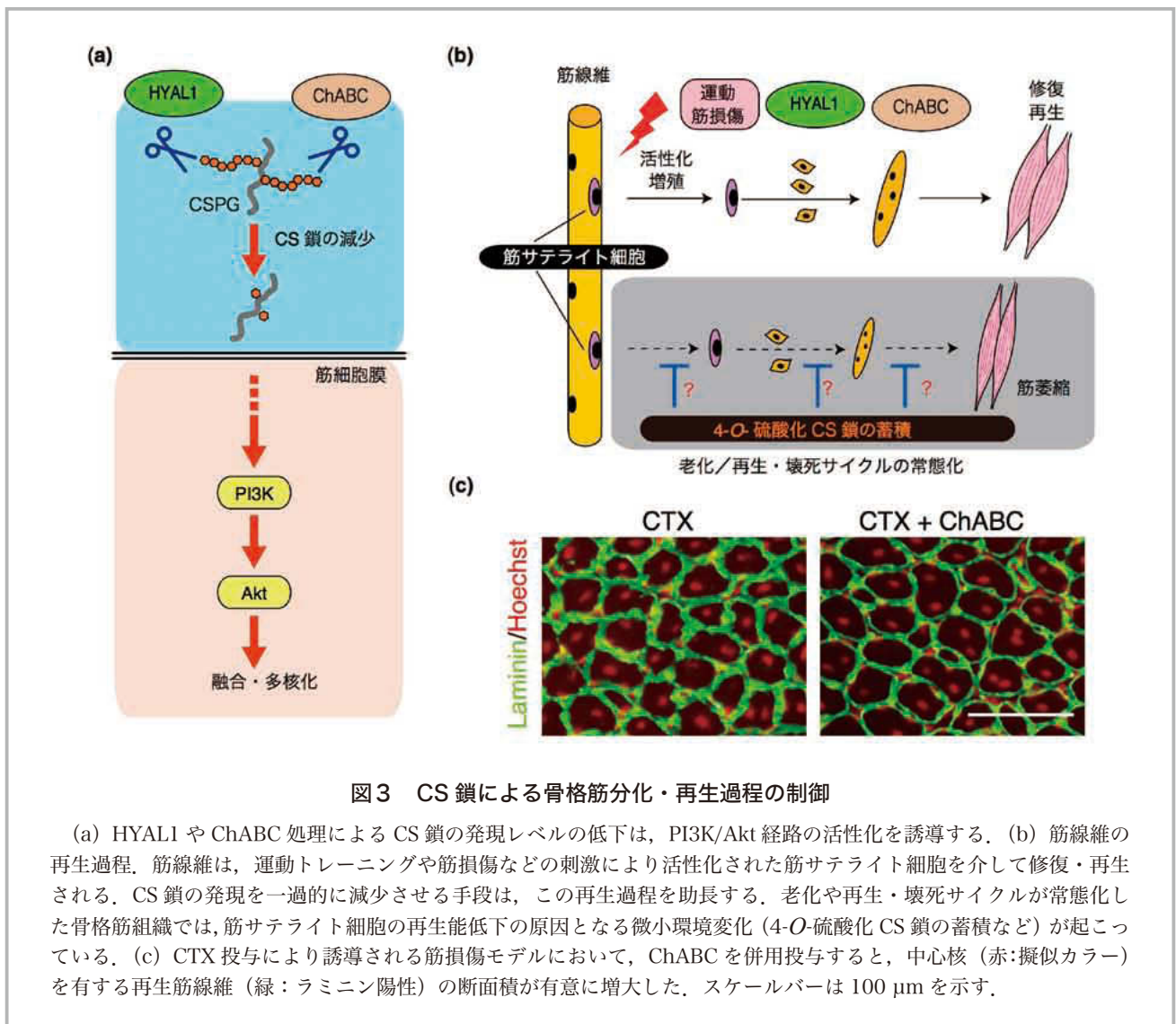


図3 CS鎖による骨格筋分化・再生過程の制御

(a) HYAL1 や ChABC 処理による CS 鎖の発現レベルの低下は、PI3K/Akt 経路の活性化を誘導する。(b) 筋線維の再生過程。筋線維は、運動トレーニングや筋損傷などの刺激により活性化された筋サテライト細胞を介して修復・再生される。CS 鎖の発現を一過的に減少させる手段は、この再生過程を助長する。老化や再生・壊死サイクルが常態化した骨格筋組織では、筋サテライト細胞の再生能低下の原因となる微小環境変化 (4-O-硫酸化 CS 鎖の蓄積など) が起こっている。(c) CTX 投与により誘導される筋損傷モデルにおいて、ChABC を併用投与すると、中心核 (赤:擬似カラー) を有する再生筋線維 (緑: ラミニン陽性) の断面積が有意に増大した。スケールバーは 100 μm を示す。

ベルの減少は、骨格筋分化を正常に進行させる上で、重要なイベントであるといえよう。しかしながら、CS鎖の減少がどのような形でPI3K/Akt経路の活性化を惹起するかなど、詳細な分子メカニズムは不明であり、さらなる解析が待たれる。興味深いことに、筋芽細胞同士の融合が、CSPGの一つであるパーシカンの断片化により促進されることが報告された⁵³⁾。パーシカンの断片化が、筆者らが見出した筋芽細胞周囲のCS鎖の減少を模擬しているかは議論の余地があるが、CSPGがCS鎖ならびにコアタンパク質レベルで代謝調節されることが、骨格筋分化の促進に奏効することは確からしい。

6. CS鎖を標的とした骨格筋再生へのアプローチ

骨格筋は、比較的再生能力の高い組織であり、ダメージを受けても速やかに再生する。再生に大きく貢献するのは、筋線維の基底膜と形質膜（筋内膜）の間に局在する筋サテライト細胞であり、成体の筋組織内では静止状態にある。筋サテライト細胞は、運動や損傷による刺激を受けると活性化し、細胞分裂を繰返して筋芽細胞へと分化した後、互いに融合したり、既存の筋線維と融合したりして筋線維を再生する（図3b）。したがって、筋芽細胞の融合・多核化を含む骨格筋分化過程は、損傷筋の再生過程を担保する基本原理でもある。そこで筆者らは、CS鎖の発現調節が、サルコペニアや遺伝性筋疾患の治療戦略として有用であるかを検証するために、CS鎖の発現を低下させることによって、骨格筋の再生過程が促進されるかを調べた¹⁰⁾。

筋線維は、多核の合胞体であり、成熟した筋線維の筋核は筋線維の周囲に分布しているが、再生途上にある筋線維はその中心部に筋核をもつ。成熟した筋組織においてCS鎖は、個々の筋線維を取り囲むように、ラミニン陽性の基底膜や筋内膜に強く発現している。マウス後肢の前脛骨筋にChABCを直接投与したところ、筋線維周囲のCS鎖の発現は、ChABC投与後7日目の時点でも顕著に減少していたが、ChABCの浸透領域において、明確な筋線維の変性・壊死像などは認められなかった。このことから、ChABCの単回投与で、筋組織内のCS鎖を少なくとも7日間持続的に減少させることが可能であること、また、炎症や筋線維の変性を誘発するような毒性がないことがわかった。

そこで次に、コブラ毒であるカルジオトキシン（CTX）を投与した筋損傷モデルにChABCを投与することにより、その筋再生過程を促進させることができるかを調べた¹⁰⁾。CTXは、筋線維を壊死させるが、筋サテライト細胞などには傷害を与えないため、速やかな筋再生を促すことができる。興味深いことに、CTX単回投与群に比べて、ChABCを併用投与した場合には、中心核をもつ再生筋線維の断面積が有意に増大していることがわかった（図3c）。再生筋線維の断面積の増加は、筋芽細胞の融合がより活発に起こった結果であると考えられ、CS鎖の発現レベルを低下させる手段が、CTX処理などにより内在性の筋再生プログラムが賦活化した筋組織において有効であることがわかった。

7. mdxマウスにおけるChABCの効果

代表的な筋原性疾患である筋ジストロフィーでは、筋線維の崩壊と再生が絶え間なく起こっているが、次第に筋の萎縮が進行する。筋ジストロフィーモデルマウスであるmdxマウス（ジストロフィン遺伝子に変異をもつ）では、生後3週齢以降に筋線維の壊死が起こり始めるが、壊死後の再生も活発化していることが知られている。実際、生後5～6週齢のmdxマウスでは、正常マウスではほとんど見られない中心核をもつ再生途上筋が、筋線維の60～70%を占めた。ChABCをmdxマウスの前脛骨筋に単回投与したところ、投与後7日目に一過的な再生途上筋の割合の有意な低下（病態改善の指標）が観察され、その割合は、投与後14日目で定常レベルにまで戻ることが判明した。これらのことから、ChABC処理による筋再生過程の促進作用は、mdxマウスの病態改善にも有効であることが示唆された。

CSPGの一つであるビグリカンのコアタンパク質を投与することで、mdxマウスの症状が同様に改善されることが報告されている⁵⁴⁾。ビグリカンは、ジストロフィン・糖タンパク質複合体の構成分子でもあることから、そのmdxマウスにおける病態緩解作用は、ジストロフィンの機能を代償するユートロフィンの筋細胞膜へのリクルートを仲介するなどして、筋細胞膜の安定性向上に貢献した結果であると考えられている。この点を考慮すると、ChABC投与によるmdxマウスの一過的病態の改善は、CS鎖をもたないビグリカンコアタンパク質の割合

を増加させ、筋細胞膜を相対的に安定化させたことも一要因であるかもしれない。

8. 骨格筋組織中の微小環境制御分子としてのCS鎖

特筆すべきことに、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者の筋生検では、健常者と比較して、C4ST-1 (CHST11) の有意な発現増加とHYAL-4の発現低下が見られ、4-O-硫酸化CS鎖の蓄積が顕著であることが報告された⁵⁵⁾。これらDMD患者の生検では、筋線維の脱落に加え、筋組織の脂肪化と線維化が観察される。DMDと同様に、サルコペニアにおいても、筋サテライト細胞の筋分化能の低下に伴って脂肪化と線維化が生じることが知られている。したがって、筋組織内における4-O-硫酸化CS鎖の蓄積は、骨格筋再生能の低下を導く微小環境変化そのものであるかもしれない(図3b)。筋組織における4-O-硫酸化CS鎖の蓄積の生理的かつ病理学的意義については、今後検討すべき重要な課題であるが、C4ST-1やHYAL-4の発現正常化が骨格筋の脂肪化や線維化の抑制に寄与するかなど、多面的な解析が必要となろう。いずれにせよ、正常な可塑性を失った環境を一度破壊し、骨格筋の再生に適した微小環境を再整備するという意味でも、CS鎖の発現コントロールの重要性が改めて強く示唆される。

9. おわりに

本総説では、CS鎖の発現レベルが、骨格筋の分化や再生過程を制御するという、CS鎖の新たな機能的側面について紹介した。ChABC投与のように、骨格筋組織内のCS鎖の発現レベルを減少させる手段は、骨格筋自身のもつ再生能力を賦活化し、サルコペニアや筋ジストロフィーの進行遅延や改善を図る有効な治療戦略として、その応用が期待される。しかしながら、ChABCは、CS鎖のみならずHAの分解にも寄与すること、さらに、脱離酵素であるため、ChABC処理により生じるCS鎖の分解産物は、強い抗原性を有することが知られている。そのため、ChABCの長期的利用により、免疫応答などを介した望まない有害作用を誘発する可能性が懸念される。将来的に、より安全性の高いCS鎖の発現調節酵素の活用が望まれるが、HYAL-1はその有望な候補分子であるかもしれない。実際、筆者らが明らかにし

たHYAL-1による細胞自律的なCS鎖の発現制御機構は、C2C12細胞の骨格筋分化過程のみならず、筋サテライト細胞による筋再生過程でも機能しているようである。今後、骨格筋の再生能のみならず、骨格筋への運動神経支配や、脂肪化・線維化などにおけるCS鎖の役割を網羅的に解析していくことにより、骨格筋を機能的な面からも支える理想的な治療戦略が確立されることを期待している。

文献

- 1) Sugahara, K. & Kitagawa, H.: Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 518 (2000).
- 2) Sugahara, K. *et al.*: (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 612 (2003).
- 3) Mikami, T. & Kitagawa, H.: Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4719 (2013).
- 4) Kitagawa, H.: Using sugar remodeling to study chondroitin sulfate function. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1705 (2014).
- 5) Mizuguchi, S. *et al.*: Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **423**, 443 (2003).
- 6) Izumikawa, T. *et al.*: Impairment of embryonic cell division and glycosaminoglycan biosynthesis in glucuronyltransferase-I-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 12190 (2010).
- 7) Mikami, T. *et al.*: Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J. Biol. Chem.* **284**, 4494 (2009).
- 8) Miyata, S. *et al.*: Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat. Neurosci.* **15**, 414 (2012).
- 9) Koike, T. *et al.*: Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to

- N-cadherin and cadherin-11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 523 (2012).
- 10) Mikami, T. *et al.*: Chondroitin sulfate is a crucial determinant for skeletal muscle development/regeneration and improvement of muscular dystrophies. *J. Biol. Chem.* **287**, 38531 (2012).
 - 11) Izumikawa, T. *et al.*: Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **4**, 3701 (2014).
 - 12) Takeuchi, K. *et al.*: Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat. Commun.* **4**, 2740 (2013).
 - 13) Koike, T. *et al.*: Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. *Sci. Rep.* **5**, 8994 (2014).
 - 14) Nadanaka, S. *et al.*: Chondroitin sulfate-mediated N-cadherin/ β -catenin signaling is associated with basal-like breast cancer cell invasion. *J. Biol. Chem.* **293**, 444 (2018).
 - 15) Silbert, J.E. & Sugumaran, G.: Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* **54**, 177 (2002).
 - 16) Kitagawa, H. *et al.*: Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 38721 (2001).
 - 17) Gotoh, M. *et al.*: Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to N-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* **277**, 38179 (2002).
 - 18) Kitagawa, H. *et al.*: Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 23666 (2003).
 - 19) Yada, T. *et al.*: Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities. *J. Biol. Chem.* **278**, 30235 (2003).
 - 20) Yada, T. *et al.*: Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **278**, 39711 (2003).
 - 21) Izumikawa, T. *et al.*: Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor. *Biochem. J.* **403**, 545 (2007).
 - 22) Izumikawa, T. *et al.*: Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *J. Biol. Chem.* **283**, 11396 (2008).
 - 23) Uyama, T. *et al.*: Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **277**, 8841 (2002).
 - 24) Gotoh, M. *et al.*: Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 38189 (2002).
 - 25) Sato, T. *et al.*: Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **278**, 3063 (2003).
 - 26) Uyama, T. *et al.*: Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate. *J.*

- Biol. Chem.* **278**, 3072 (2003).
- 27) Izumikawa, T. *et al.*: Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates the chain length of chondroitin sulfate in co-operation with chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Biochem. J.* **434**, 321 (2011).
- 28) Izumikawa, T. *et al.*: Chondroitin 4-O-sulfotransferase-2 regulates the number of chondroitin sulfate chains initiated by chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Biochem. J.* **441**, 697 (2012).
- 29) Kusche-Gullberg, M. & Kjellén, L.: Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 605 (2003).
- 30) Gulberti, S. *et al.*: Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **280**, 1417 (2005).
- 31) Tone, Y. *et al.*: 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 16801 (2008).
- 32) Wen, J. *et al.*: Xylose phosphorylation functions as a molecular switch to regulate proteoglycan biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 15723 (2014).
- 33) Koike, T. *et al.*: FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem. J.* **421**, 157 (2009).
- 34) Koike, T. *et al.*: Identification of phosphatase that dephosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **289**, 6695 (2014).
- 35) Izumikawa, T. *et al.*: GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl(2-O-phosphate) is the preferred substrate for chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *J. Biol. Chem.* **290**, 5438 (2015).
- 36) Nadanaka, S. *et al.*: EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **288**, 9321 (2013).
- 37) Prabhakar, V. & Sasisekharan, R.: The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans. *Adv. Pharmacol.* **53**, 69 (2006).
- 38) Csoka, A.B. *et al.*: The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* **20**, 499 (2001).
- 39) Stern, R. & Jedrzejewski M.J.: Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem. Rev.* **106**, 818 (2006).
- 40) Kaneiwa, T. *et al.*: Identification of a novel chondroitin hydrolase in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **283**, 14971 (2008).
- 41) Honda, T. *et al.*: Hyaluronidases have strong hydrolytic activity toward chondroitin 4-sulfate comparable to that for hyaluronan. *Biomolecules* **2**, 549 (2012).
- 42) Kaneiwa, T. *et al.*: Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology* **20**, 300 (2010).
- 43) Yamada, S. *et al.*: Demonstration of glycosaminoglycans in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **459**, 327 (1999).
- 44) Toyoda, H. *et al.*: Structural analysis of glycosaminoglycans in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and demonstration that tout-velu, a *Drosophila* gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 2269 (2000).
- 45) Izumikawa, T. *et al.*: Nematode chondroitin

- polymerizing factor showing cell-/organ-specific expression is indispensable for chondroitin synthesis and embryonic cell division. *J. Biol. Chem.* **279**, 53755 (2004).
- 46) Yaffe, D. & Saxel, O.: Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* **270**, 725 (1997)
- 47) Klüppel, M. *et al.*: Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Development* **132**, 3989 (2005).
- 48) Uyama, T. *et al.*: Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity. *J. Biol. Chem.* **281**, 38668 (2006).
- 49) Mizumoto, S. *et al.*: Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 is required for somitic muscle development and motor axon guidance in zebrafish. *Biochem. J.* **419**, 387 (2009).
- 50) Warita, K. *et al.*: Degree of suppression of mouse myoblast cell line C2C12 differentiation varies according to chondroitin sulfate subtype. *Mar. Drugs* **14**, 193 (2016).
- 51) Roffe, S. *et al.*: Halofuginone inhibits Smad3 phosphorylation via the PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways in muscle cells: effect on myotube fusion. *Exp. Cell Res.* **316**, 1061 (2010).
- 52) Kim, M.H. *et al.*: Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1324 (2011).
- 53) Stupka, N. *et al.*: Versican processing by a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats proteinases-5 and -15 facilitates myoblast fusion. *J. Biol. Chem.* **288**, 1907 (2013).
- 54) Amenta, A.R. *et al.*: Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 762 (2011).
- 55) Negroni, E. *et al.*: Glycosaminoglycan modifications in Duchenne muscular dystrophy: specific remodeling of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**, 789 (2014).

総 説

神経傷害特異的に応答発現するエンドペプチデース Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE)

木 山 博 資*, 桐 生 寿 美 子*

1. はじめに

私たちは舌下神経損傷モデルを用いて、運動ニューロンの軸索が損傷した時に発現する分子探索を行ってきた¹⁾。その過程で損傷側の舌下神経核と健常側の舌下神経核での mRNA 発現の違いを Differential display 法を用いて検討した時に、メタロエンドペプチデース様構造を有する膜 1 回貫通型の膜蛋白質が同定された。この分子を我々は Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE) と命名し 2000 年に発表した²⁾。ほぼ同時期に Endothelin Converting Enzyme (ECE)

のファミリー分子を探索していたロッシュのグループは、ヒトで DINE オルソログ遺伝子を同定しこの分子を ECE-like 1 (ECE1) と命名した³⁾。DINE は酵素活性部位を細胞外あるいは小胞体の内腔側に有しており、アミノ酸配列からその構造が Nephilysin (enkephalinase) や ECE に大変類似しており、これらのメタロプロテアーゼと並んで重要なペプチドのプロセッシングに関わると考えられた。しかし、 β アミロイドやエンドセリンの前駆蛋白を基質とはせず、その基質の同定は難渋し未だ基質の同定に至っていない。ただ、その遺伝子発現応答が

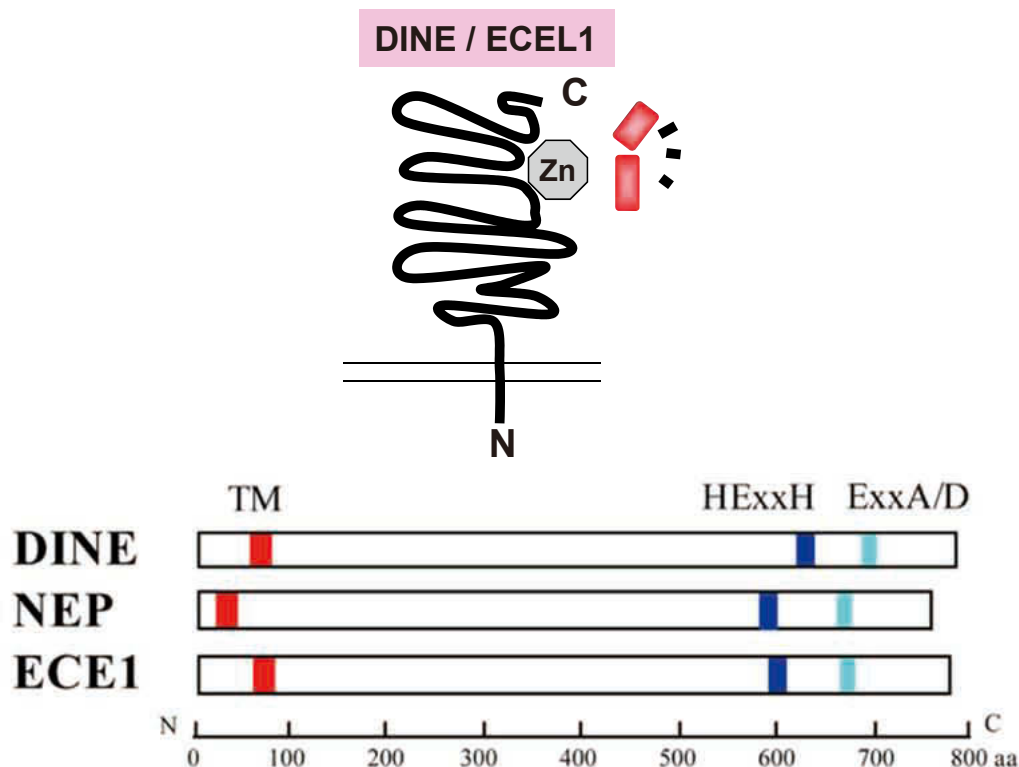


図1 DINE の構造と近縁ファミリーメンバー

DINE は酵素活性部位を細胞外側に有する膜 1 回貫通型のメタロプロテアーゼの構造を有している。アミノ酸構造の類似性から、DINE はネプリライシン (NEP) やエンドセリン転換酵素 (ECE1) とファミリーを形成している。

神経損傷に深く関わっていることや、ノックアウトでは顕著な表現型が見られることから、この分子が生体で重要な機能を果たしていることが容易に予想できる。さらにヒトでの遺伝子変異の家系が発見され、先天性の運動機能障害の原因遺伝子であることが明らかになった。本総説では、我々が独自に同定したメタロプロテアーゼである DINE の特徴と機能的意義について紹介する。

2. DINE の構造と脳内局在

DINE 遺伝子は 18 個のエクソンからなり 775 個のアミノ酸からなるメタロプロテアーゼ様構造をとる。膜を

1 回貫通するドメインを有し細胞外に位置する C 末側に酵素活性部位と想定されるドメインが存在する²⁾。構造的には NEP や ECE と最も近くこれらの酵素とファミリーを形成する (図 1)。DINE の発現は神経系が主であり、他の組織での発現はほとんど見られない^{2,4)}。脳では、神経細胞に発現しておりグリア細胞には発現しておらず、ニューロン特異的に発現している分子であると考えられる。神経細胞において DINE は小胞体の膜上と細胞膜上に存在すると考えられている²⁾。

DINE mRNA は、胎生期の E12 頃より一部の神経細胞に特異的に発現する。特に神経管の腹側 (基板) に強

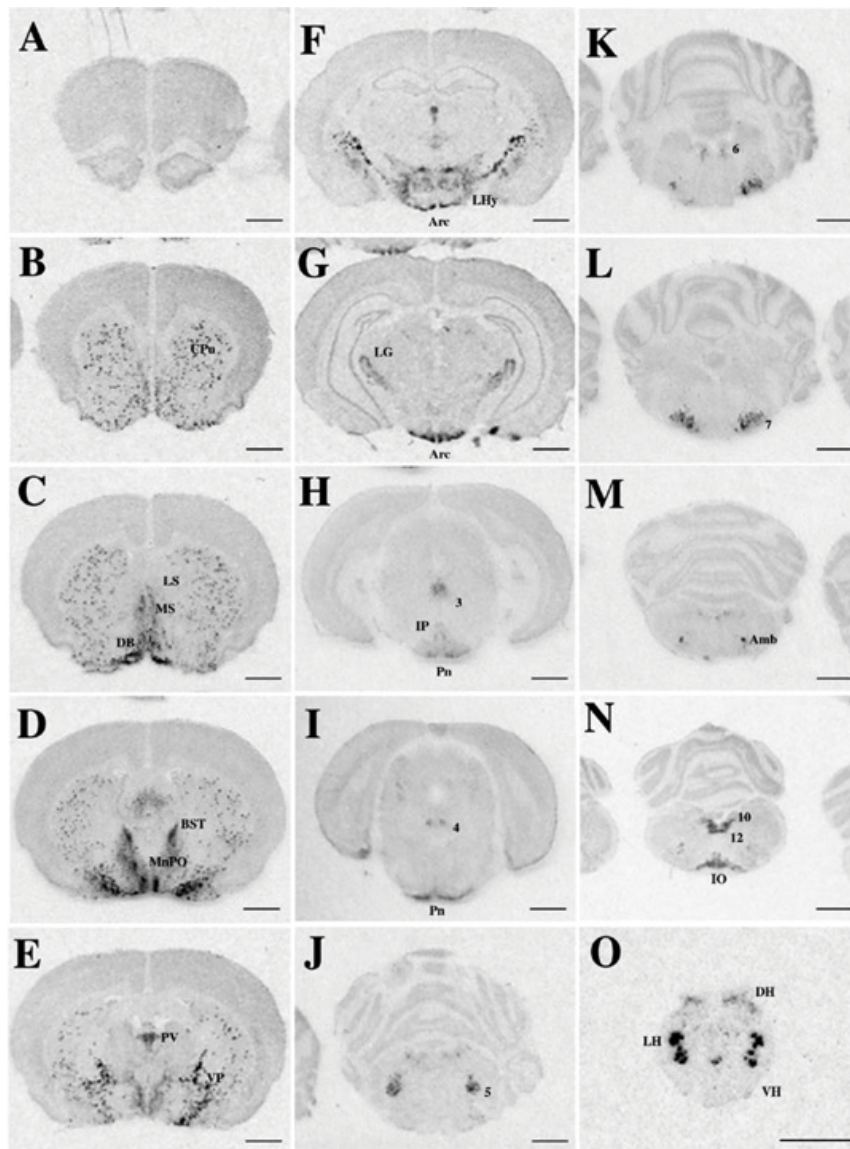


図2 脳内の DINE mRNA 局在分布

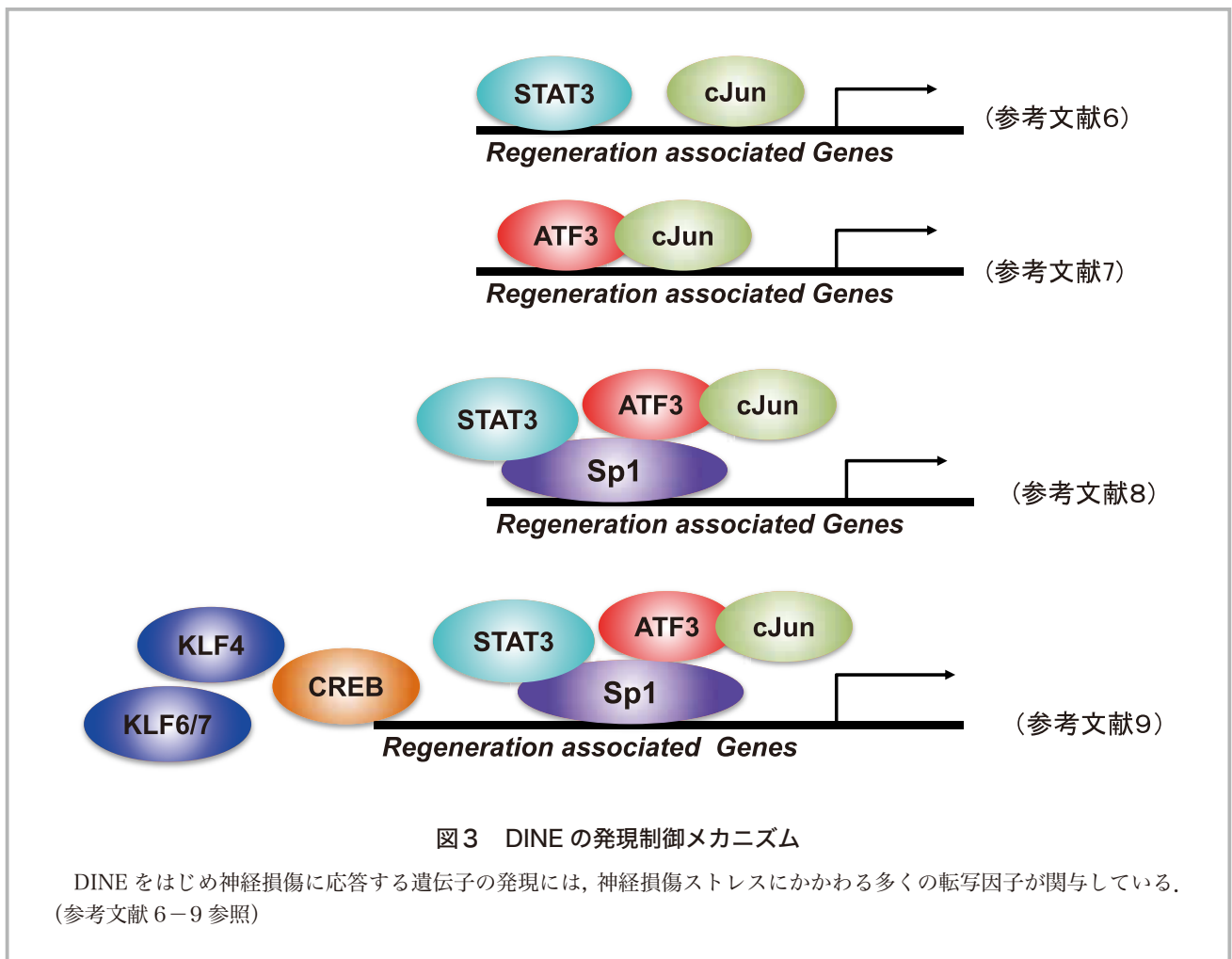
詳細は参考文献 4 参照

く発現する。成熟した脳内では視床下部広域（腹内側核を除く）と脳幹・脊髄の運動ニューロンに最も多くの mRNA が発現し、大脳皮質や海馬、小脳には発現していない⁴⁾。この他特徴的に強い mRNA 発現がみられる領域としては、線条体の大型のコリナージックニューロンや対角帯核、さらに分界上床核などにも局在する。下位脳幹では、橋核や下オリーブ核に陽性細胞が存在する。脊髄では前角の運動ニューロンの他、側角の交感神経節前細胞に mRNA が局在している（図2）。末梢においては、特に胎生期の消化管壁の神経細胞や交感神経節などに強い mRNA シグナルが見られる⁴⁾。

3. DINE の遺伝子発現応答の特徴

DINE の最も大きな特徴は、中枢末梢を問わず神経傷害に応答して、その発現が上昇することにある^{2,5)}。末梢の運動神経や知覚神経傷害、中枢の脳外傷、脳梗塞、視神経傷害など神経損傷に応答して、神経細胞特異的にその発現が見られる。このような神経特異的・損傷特異

的に発現誘導される転写制御のメカニズムは大変興味深く、我々はこの転写制御について DINE のプロモーター領域を用いて検討した（図3）。当初、軸索損傷ストレスにより cJun シグナルが誘導されること、運動ニューロンで神経損傷後に LIF の受容体 gp130 が強く誘導され、その下流にある STAT3 の発現と核移行が生じることが明らかになった。そこで、培養神経細胞に cJun と STAT3 のシグナルを入れると DINE の mRNA 発現が上昇することが明らかになった⁶⁾。ただ、これらの転写因子は神経細胞以外にも発現しているので、神経特異性を出す転写因子の必要性が考えられた。そこで、損傷特異的に神経細胞で発現する別の転写因子 ATF3 に着目して解析したところ、ATF3 と cJun がヘテロダイマーを形成して DINE の発現を誘導することが明らかになった⁷⁾。さらに解析を進めていくと、STAT3、ATF3/cJun が Sp1 というハウスキーピング転写遺伝子に結合して大きな複合体を形成していることが明らかになった⁸⁾。このことから、少なくとも DINE の発現誘導には、



2013年, 先天性多発性関節拘縮症 (AMC) Type 5D (DA5) の家系で DINE 遺伝子に変異が生じていることが初めて報告され¹²⁾. その後, 次々とこの疾患で DINE/ECEL1 遺伝子に変異が発見された (図5)¹³⁾. AMC は多くが筋に発現するミオシン重鎖などの遺伝子に変異があることにより発症し, 筋原性の疾患であると考えられていたが, DINE は神経のみに発現するため, AMC の DA5 は神経原性であることが示唆された. そこでこの遺伝子変異が本当に原因であるかどうかを検討するために, 患者家系で見られる遺伝子変異配列をマウスにノック

インしたところ, DINE ノックアウトマウスで見られた表現型と同様の表現型が観察できた. 特に四肢遠位の神経分岐異常が顕著であり, 疾患の病態と類似していた. さらに, この疾患に見られた1塩基変異型をノックインしたマウスでも同様に NMJ の形成不全が生じることを我々は確認した^{14,15)}. 以上のマウスを用いた実験の結果から, DA5 は神経原性の疾患であり, その原因遺伝子の一つは DINE/ECEL1 であることが明らかになった^{14,15)}.

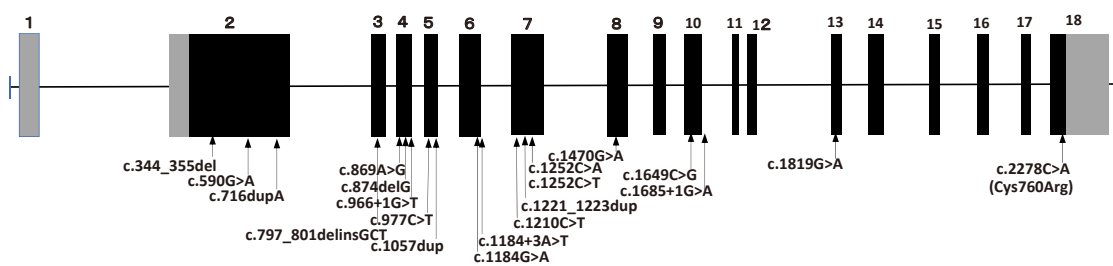


図5 先天性多発性関節拘縮症 (AMC) Type 5(DA5) の家系に見られる遺伝子変異

AMC のうち, 遠位に関節拘縮がみられる DA5 の複数の家系において, DINE/ECEL1 の遺伝子に多くの変異が存在することが, 2013年以降次々と報告されている. (参考文献 12,13 参照)

Optic nerve injury (Flat-mount)

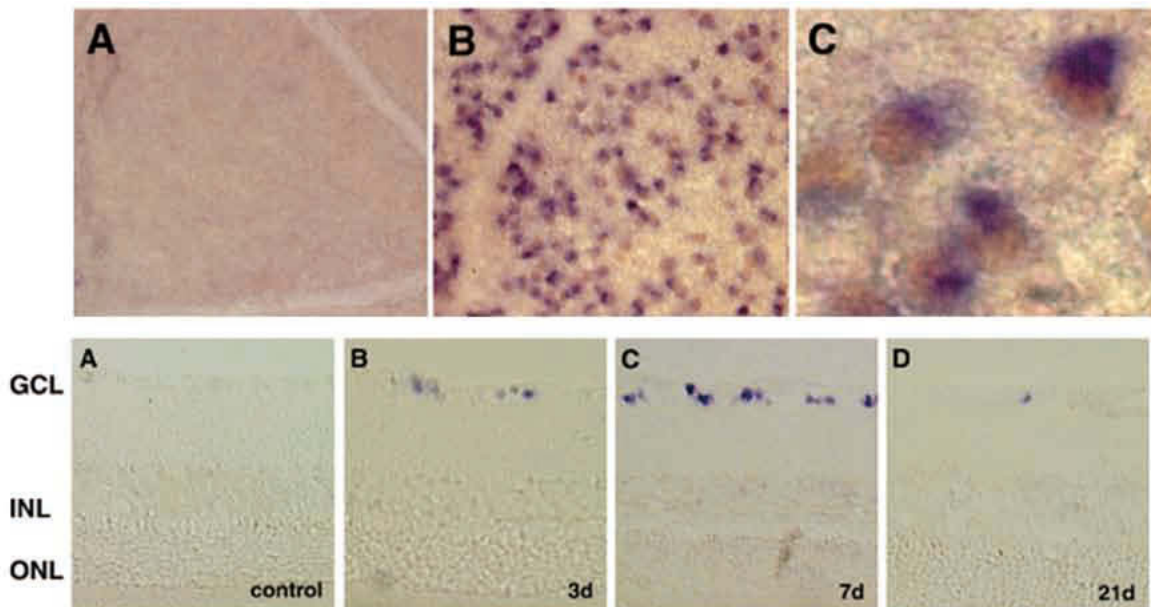


図6 視神経損傷時に見られる網膜視神経節細胞の DINE mRNA 発現

上段は網膜の伸展標本, 下段は網膜の断面を示す. 上段では健常時 (A) にほとんど発現の見られなかった DINE mRNA は, 視神経損傷後 3 日 (B) には多くの視神経節細胞に観察される. (C) は強拡大. 下段でも同様に DINE mRNA 陽性細胞は神経損傷後 3 日より 7 日にかけて視神経節細胞層 (GCL) に限局してみられる. このことから DINE は中枢神経系においても神経損傷に応答することがわかる.

5. DINE の中枢神経系の再生における機能

生直後の致死性を回避させ成長した DINE ノックアウトマウスを用いて、中枢神経系の再生における DINE の機能解明を行なった。中枢神経再生における DINE の機能解析には、視神経の損傷モデルを用いた。中枢神経系である視神経の損傷においても、DINE 発現は軸索損傷に応答する。通常視神経節細胞には DINE mRNA の発現は見られないが、視神経損傷後には著しい DINE mRNA の発現が観察される (図 6)。野生型マウスでは損傷視神経は通常再生しないが、Zymosan 等で炎症応答を惹起すると一部視神経の再生がみられる。この現象を利用して視神経再生条件下で DINE ノックアウトの影響を観察した。その結果、DINE が欠損したマウスでは炎症による視神経再生は著しく阻害された。この結果から DINE は中枢神経軸索再生においても何らかの役割を担っていると考えられる¹⁶⁾。

6. おわりに

本稿では、我々が、長年研究を続けているメタロプロテアーゼ DINE 研究の端緒から現在に至るまでの経過

を紹介した¹⁷⁾。DINE は今の所、発生過程での NMJ の形成や、成熟動物での神経再生に関わっていることは明らかであるが、その局在分布を考えると、知覚神経や自律神経の損傷や再生に関与していることが予想される。また、視床下部の多くの神経細胞が発現していることから、代謝内分泌にも関わる事が予想される。さらに、脳梗塞や脳の外傷においても損傷部位周辺の神経細胞に DINE は発現するので、これらの疾患において、損傷部位の神経細胞死防御、脳の回路修復や代償回路構築の促進にも大きく関わっている可能性がある。残された一番の問題は、基質ペプチドの同定である。過去に様々な手法を用いて同定を試みているが未だそのペプチドはみつかっていない。中枢や末梢神経の部位により基質が異なり、それが DINE の多彩な機能に繋がっていると考えられ、今後も基質同定に取り組んでいきたいと考えている。

参考文献

- 1) Kiryu, S. *et al.*: Nerve injury enhances rat neuronal glutamate transporter expression: identification by differential display PCR, *J Neurosci*, **15**,

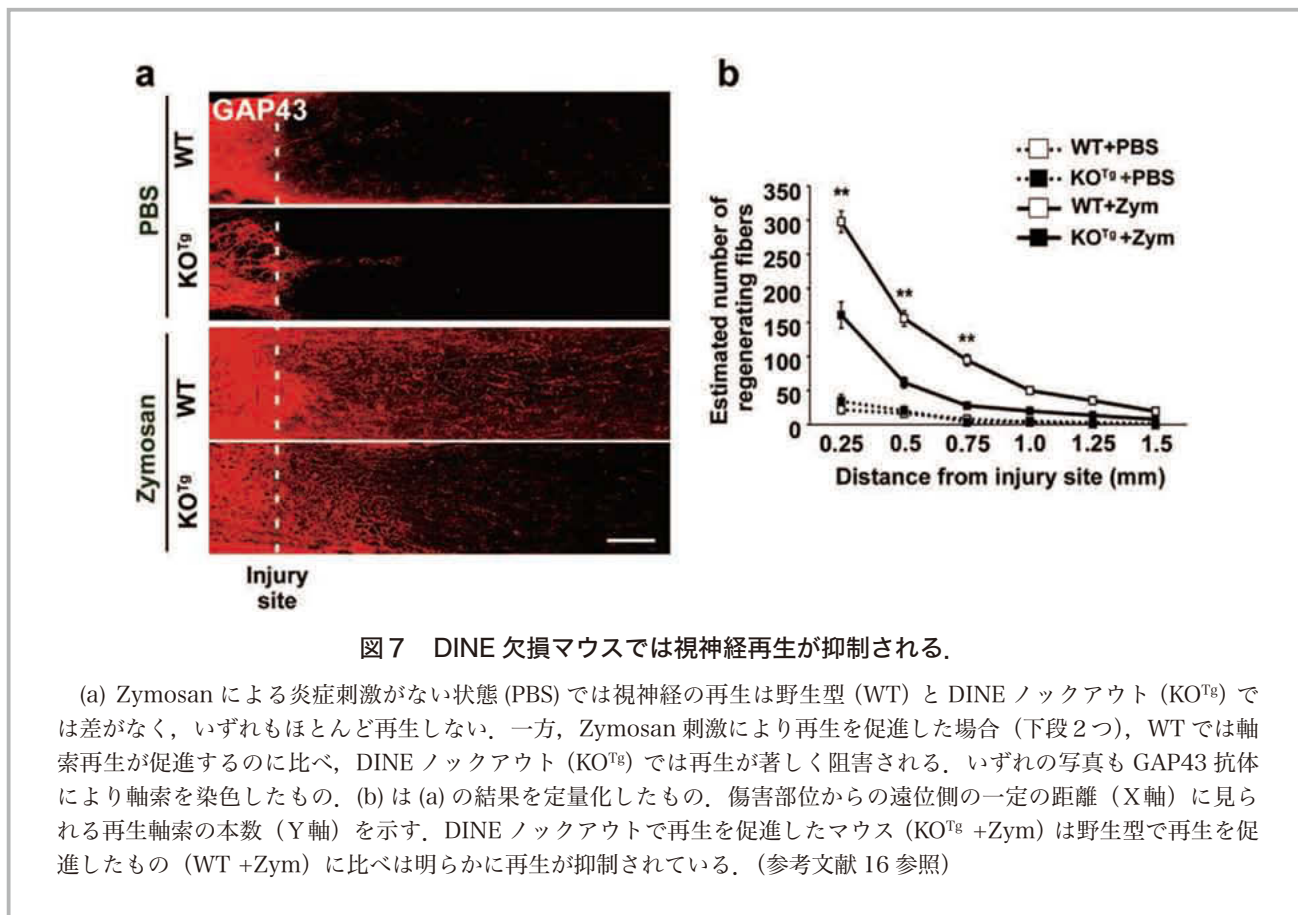


図 7 DINE 欠損マウスでは視神経再生が抑制される。

(a) Zymosan による炎症刺激がない状態 (PBS) では視神経の再生は野生型 (WT) と DINE ノックアウト (KO^{Tg}) では差がなく、いずれもほとんど再生しない。一方、Zymosan 刺激により再生を促進した場合 (下段 2 つ)、WT では軸索再生が促進するのに比べ、DINE ノックアウト (KO^{Tg}) では再生が著しく阻害される。いずれの写真も GAP43 抗体により軸索を染色したもの。 (b) は (a) の結果を定量化したもの。傷害部位からの遠位側の一定の距離 (X 軸) に見られる再生軸索の本数 (Y 軸) を示す。DINE ノックアウトで再生を促進したマウス (KO^{Tg} + Zym) は野生型で再生を促進したもの (WT + Zym) に比して明らかに再生が抑制されている。(参考文献 16 参照)

- 7872 (1995).
- 2) Kiryu-Seo, S. *et al.*: Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 4345 (2000).
 - 3) Valdenaire, O. *et al.*: Organization and chromosomal localization of the human ECEL1 (XCE) gene encoding a zinc metallopeptidase involved in the nervous control of respiration, *Biochem J*, **346**, Pt 3:611, (2000).
 - 4) Nagata, K. *et al.*: Localization and ontogeny of damage-induced neuronal endopeptidase mRNA-expressing neurons in the rat nervous system, *Neuroscience*, **141**, 299 (2006).
 - 5) Ohba, N. *et al.*: Expression of damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) mRNA in perinfarct cortical and thalamic neurons following middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem.*, **91**, 956 (2004).
 - 6) Kato, R. *et al.*: Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE/ECEL) expression is regulated by leukemia inhibitory factor and deprivation of nerve growth factor in rat sensory ganglia after nerve injury. *J Neurosci.*, **22**, 9410 (2002).
 - 7) Nakagomi, S. *et al.*: Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation, *J Neurosci*, **23**, 5187 (2003).
 - 8) Kiryu-Seo S. *et al.*: Neuronal injury-inducible gene is synergistically regulated by ATF3, c-Jun, and STAT3 through the interaction with Sp1 in damaged neurons. *J Biol Chem*, **283**, 6988 (2008).
 - 9) Kiryu-Seo S, Kiyama H.: The nuclear events guiding successful nerve regeneration. *Front Mol Neurosci*, **4**, 53 (2011).
 - 10) Nagata K, *et al.*: Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions, *J Neurosci*, **30**, 6954 (2010).
 - 11) Matsumoto S, *et al.*: Motor nerve arborization requires proteolytic domain of damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) during development, *J Neurosci.*, **36**, 4744 (2016).
 - 12) Dieterich, K. *et al.*: The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with a distinct form of recessive distal arthrogryposis, *Hum Mol Genet*, **22**, 1483 (2013).
 - 13) Shaaban, S. *et al.*: Expanding the phenotypic spectrum of ECEL1-related congenital contracture syndromes, *Clin Genet*, **85**, 562 (2014).
 - 14) Nagata, K. *et al.*: ECEL1 mutation implicates impaired axonal arborization of motor nerves in the pathogenesis of distal arthrogryposis. *Acta Neuropathol*, **132**, 111 (2016).
 - 15) Nagata K. *et al.*: Distinct functional consequences of ECEL1/DINE missense mutations in the pathogenesis of congenital contracture disorders. *Acta Neuropathol Commun*, **5**, 83 (2017).
 - 16) Kaneko, A. *et al.*: Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) enhances axonal regeneration potential of retinal ganglion cells after optic nerve injury, *Cell Death & Disease*, **8(6)**, e2847,(2017).
 - 17) Kiryu-Seo, S. *et al.*: New Insights of a Neuronal Peptidase DINE/ECEL1: Nerve Development, Nerve Regeneration and Neurogenic Pathogenesis, *Neurochem Res.*, <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2665-x> (2018).

総 説

超偏極¹³C MRIによる非侵襲的酵素活性イメージング

松 元 慎 吾*

1. はじめに

健康寿命の延長と国民医療費の抑制という時に相反するベクトルの両立が喫緊の課題となっている現代において、疾患の早期発見や個別医療の最適化に資する診断技術への期待が高まっている。疾患の早期発見のため、定期的な健康診断等で繰り返し検査を行おうとする場合、その検査手法は血液や尿など比較的容易に得られる生検体の分析か、非侵襲的な画像診断法に限局される。前者においては、質量分析メタボローム技術の進歩により、1グラム以下の生検体中に含まれる数百種類の代謝物の網羅的解析が可能となり、有用な疾患マーカーの発見へと繋がっている。同時に、メタボローム解析が明らかにしたのは、あらゆる疾患は何らかの代謝変化を伴うという事実である。一方、後者の画像診断では、組織や臓器

の形態像から得られる情報は技術的に飽和しつつあり、特定疾患の特異的マーカーを検出する分子イメージング技術あるいは、それに資する新たな分子センシング技術の開発が重要となる。理想的な分子センシング技術に求められる要件として、1) 高感度である、2) 陽電子断層撮影PETのような放射線被曝の問題がない、3) 光学系イメージングでしばしば問題となる体深部の計測が容易である、4) 蛍光標識のような生体にとっての異物構造を含まず安全である、などが挙げられる。

核磁気共鳴画像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) による形態像は軟組織のコントラストが高く、疾患の正確な診断や治療効果の評価において臨床に不可欠なものとなっている。反面、核磁気共鳴はその本質的な検出感度の低さから分子イメージングへの応用は限ら

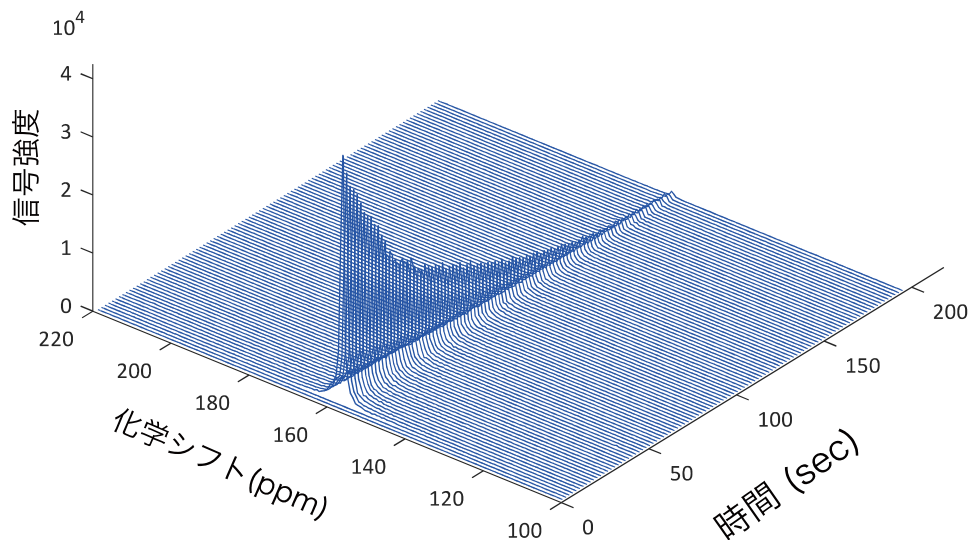


図1 [1-¹³C] ピルビン酸アリルの超偏極¹³C NMR スペクトル

パラ水素誘起偏極 (PHIP) 法により¹³C NMR/MRI の測定感度を数万倍に増幅。励起した¹³C核スピンの分極は、縦緩和時間 T₁ を時定数に元の熱平衡状態へと減衰する。

*北海道大学大学院情報科学研究科磁気共鳴工学研究室

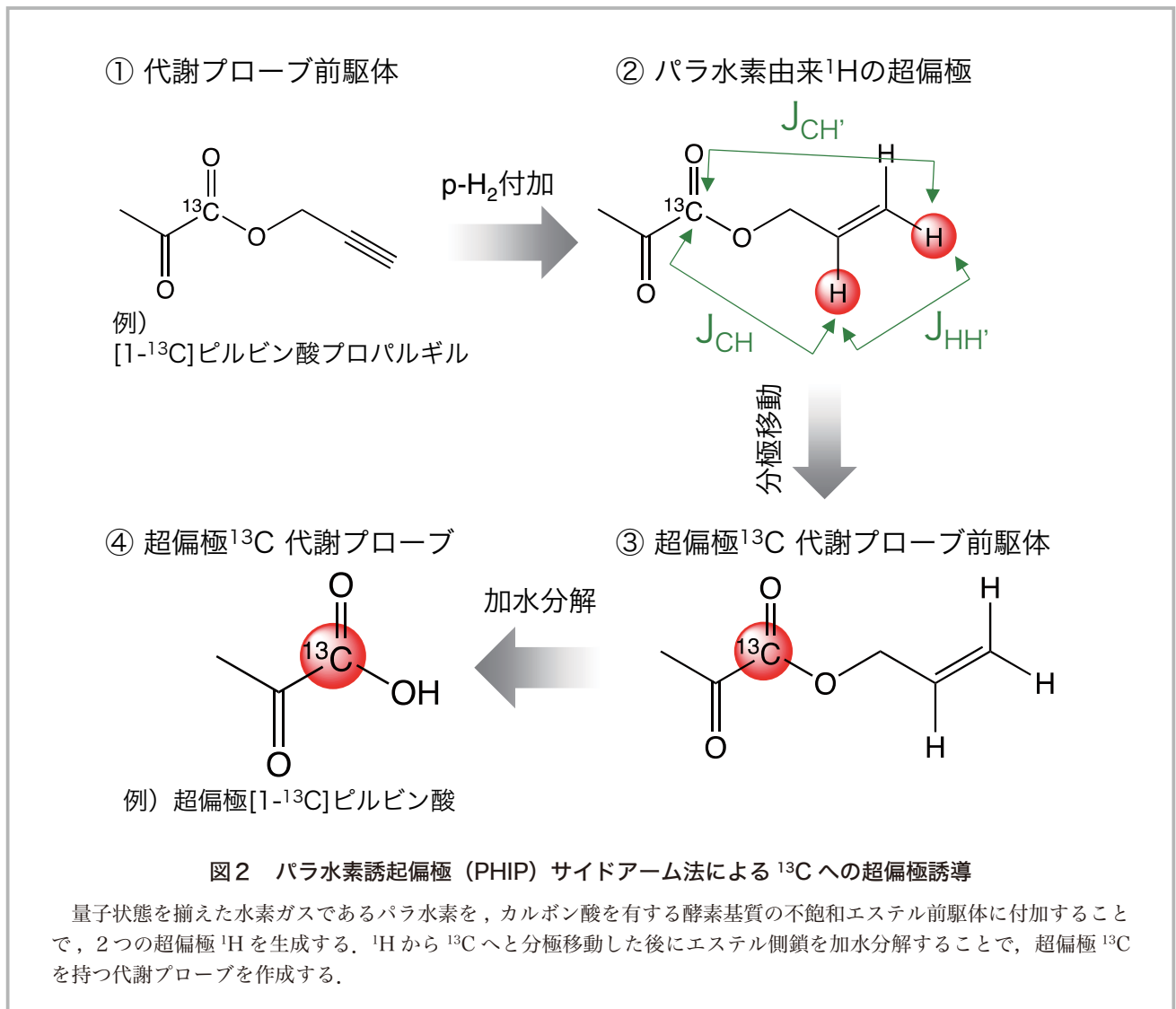
れていた。近年、分子内の特定の核スピんに熱平衡状態の数万倍に及ぶ分極 (MRI 感度に比例) を誘導する“超偏極”技術を用いた様々な分子イメージング技術が開発され、その一部は既に臨床応用も始まっている¹⁾。Overhauser 型 MRI では測定対象となるフリーラジカル分子中の不対電子から周囲の水分子のプロトン核へと動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) により分極を移すことで、MRI を用いて、まるで電子常磁性共鳴画像法のような生体内フリーラジカルの分布画像が得られる。ルビジウム Rb 原子の光ポンピングを用いた ^3He や ^{129}Xe など希ガスの超偏極 MRI は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や喘息など肺疾患の診断に極めて有用であり、欧米では既に臨床応用が始まっている。

一方、2003 年に J.H.Ardenkjaer-Larsen や K. Golman 等によって溶液の ^{13}C NMR 感度を数万倍に増幅する dissolution DNP (dDNP) 技術が報告されたの

を皮切りに、 ^{13}C 標識した基質の生体内における代謝反応、つまりは特定の組織・臓器における“代謝酵素の活性”を非侵襲的に計測し可視化する超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングの研究開発が世界中で進められている²⁻⁴⁾。2012 年には米国 University of San Francisco California (UCSF) が、前立腺癌患者におけるピルビン酸代謝イメージングで、世界初の臨床試験を実施し、現在は世界 10 カ所ほどの施設で前立腺癌診断に加え、脳腫瘍や癌の肝転移、心機能を目的に臨床試験が行われている^{5, 6)}。本稿では、筆者らの研究成果を中心に、この超偏極現象を用いた、ヒトにも応用可能な新しい酵素活性イメージング技術を紹介する。

2. 炭素 ^{13}C 核と核偏極

核磁気共鳴 NMR の測定対象は大きな磁気モーメントを有し、質量数が奇数の原子核である。炭素の同位体の

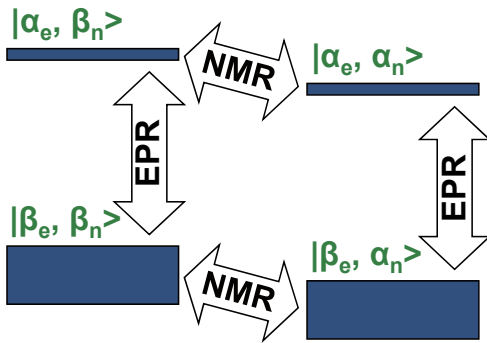


中では、スピン量子数 $1/2$ の炭素 13 のみが NMR 信号を与える。天然存在比が 1.1%，磁気回転比（NMR 測定感度は磁気回転比の 3 乗に比例）が ^1H の 4 分の 1 の 10.7 MHz/T であるため、内因性の生体内分子に含まれる ^{13}C 核スピンは通常の MRI 測定では検出されない。代謝基質内の特定の炭素原子を ^{13}C 標識し、超偏極により数万倍に NMR 感度を増幅することで、一時的に ^1H MRI と同等の測定感度が得られる（図 1）。超偏極によって増幅した ^{13}C NMR/MRI 信号は励起直後からその縦緩和時間 T_1 に従って急速に減衰するため、比較的 T_1 の長いカルボニル炭素や 4 級炭素を選択的に標識することでより高感度な画像が得られる。炭素 13 核に隣接する

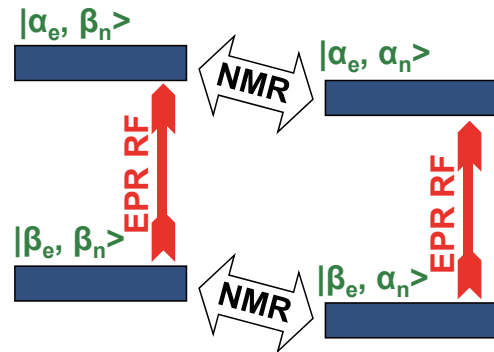
^1H 核は大きな磁気モーメントを持ち、炭素 13 核の磁気緩和を早めるため、これらを重水置換することで、化学的に更に高感度化することも有効である。

上述の Overhauser 型 MRI では、測定対象となるプローブがニトロキシラジカル等の生体内で比較的安定かつ毒性の少ないフリーラジカル種に限られ、光ポンピングによる肺のイメージングでは ^3He と ^{129}Xe 等の希ガス分子に限られるため、得られる生体内情報の制約が厳しい。それに対し ^{13}C 標識では、比較的 low molecular weight で、かつ高感度に検出できるカルボニル炭素や 4 級炭素を持つ生体内物質は糖や脂質代謝物だけでも軽く数百種類に及び、その代謝イメージングにより得られる情報の自由度

① 熱平衡状態



② EPR励起後



③ 核スピンの超偏極

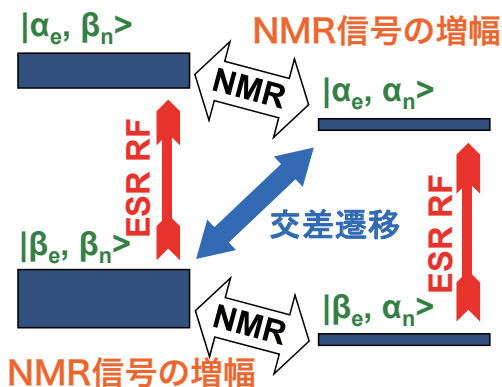


図 3 動的核偏極（DNP）による超偏極の誘導原理と臨床用 ^{13}C 核励起装置

3-5T の超電導磁石の中で、約 1 K の極低温条件下、約 0.1% の濃度でドーブした常磁性分子の電子スピン共鳴をマイクロ波照射により飽和させる。動的核偏極により不対電子の電子スピンから周囲の ^{13}C 核スピンへと分極が移動し、超偏極が ^{13}C に誘導される。

は極めて大きい。また、元来、体内に多く存在する代謝物の ^{13}C 標識体を分子プローブとして用いるため、外来生の新規化合物を分子プローブとして用いる場合に比べ毒性の懸念も少ない。

炭素 13 核に超偏極を誘導する主な手法として、1) 強制励起法 (Brute Force)、2) パラ水素誘起偏極法 (ParaHydrogen Induced Polarization, PHIP)、3) 動的核偏極法、の 3 つが用いられている。強制励起法では、14T 以上の高磁場、100 mK 以下の超低温条件に検体を長時間置くことでボルツマン分布に従い高い分極率を得られる。溶液・粉末を問わずあらゆる化合物を励起できる反面、1 検体の励起に数日掛かることから、代謝イメージングの用途には適していない。2 番目のパラ水素誘起偏極法は、水素分子の付加反応を用いて化学的に核スピン偏極を誘導する手法である (図 2)。通常の水素ガスは 4 つのエネルギー状態が均等に混ざった状態として存在するが、これを触媒存在下で 30K 以下に冷却することにより、最も低いエネルギーを持つパラ型の水素分子に量子状態を揃えることができる。高純度のパラ水素を炭素多重結合を持つ代謝プローブ前駆体に付加すると、パラ水素由来の 2 つの ^1H 核スピンは超偏極の状態となる。続いて、超偏極 ^1H から周囲の標識した ^{13}C 核へと分極移動することで、超偏極した ^{13}C 核スピンを持つ分子プローブを作成する⁷⁻⁹⁾。低磁場 (~2mT)、室温下で比較的安価に超偏極実験が行えるため、1980 年代より化学反応の研究に広く用いられて来た。しかしながら、投与する代謝プローブを直接励起できず、炭素多重結合を持つ前駆体が必要であることによる化学構造上の制限、水素付加反応に用いる白金触媒を瞬時に除去することが困難であること、の 2 つの理由により代謝イメージングへの応用はほとんど成されていない。従って、現在、多くの超偏極 ^{13}C MRI による代謝イメージングの研究では、3 番目の動的核偏極法 (Dynamic Nuclear Polarization, DNP) が採用されている。

動的核偏極法は、電子スピンと核スピンの二重共鳴に基づく核偏極の誘導法である。 ^{13}C 標識した高濃度の代謝プローブと、EPA と呼ばれる安定な常磁性分子を約 1000 : 1 の割合で混合し、3-5T の高磁場、超低温下 (~1 K) において、EPA 中の不対電子の電子スピン共鳴を励起する。電子スピンの分極は交差遷移により周囲

の ^{13}C 核へと移り、高温に熱したバッファーで急速溶解することにより、 ^{13}C 核スピンの超偏極した代謝プローブ溶液が得られる (図 3)。臨床で広く用いられている通常の ^1H MRI では MRI 装置自体の磁場強度に依存して核スピンの分極、即ち測定感度が決まるが、超偏極 ^{13}C MRI における核スピンの分極は励起装置側の磁場強度で決まり、MRI 装置自体の磁場強度には依存しない。ボルツマン分布から、より高磁場かつ低温の励起装置を用いることで分極率、つまりは最終的な MRI 測定感度が著しく高まる。代謝プローブの観点から生体イメージングに十分な分極率を得るには、水もしくは DMSO やグリセロール等の毒性の低い有機溶媒に 1M 以上の溶解性があり、凍結時にガラス状の結晶構造を取る必要がある等の一定条件はあるが、DNP 法により励起できる代謝プローブの汎用性は高く、2014 年の時点で 60 種類以上もの ^{13}C 標識分子プローブが報告されている¹⁰⁾。

3. 酵素活性イメージングの画像診断への応用

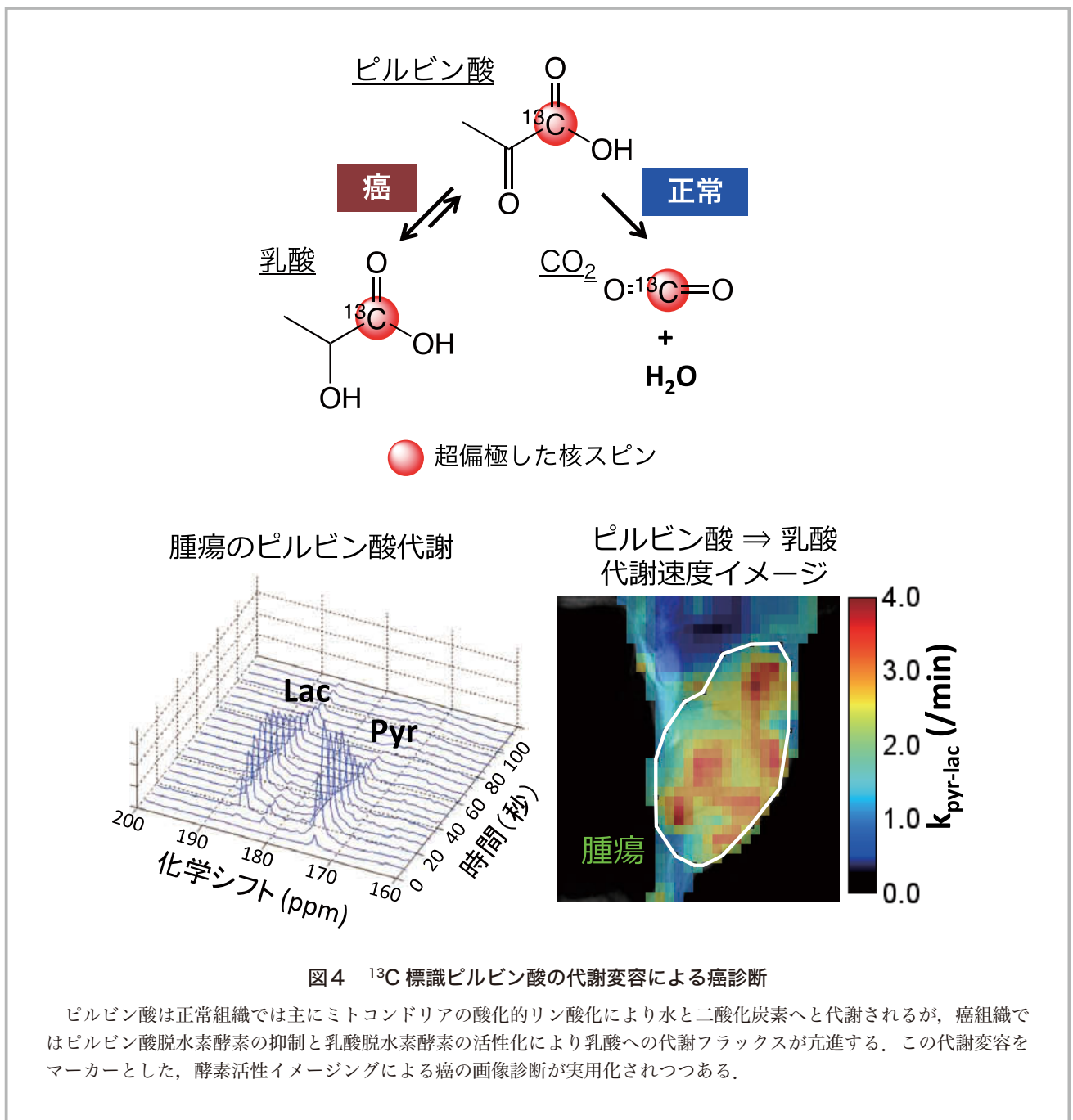
世界初の超偏極 ^{13}C MRI 酵素活性イメージングの臨床応用はピルビン酸代謝の違いによる前立腺癌の診断で行われた⁵⁾。 ^1H MRI による形態像からは腫瘍の位置や形状、大きさの情報が得られ、治療に対する腫瘍サイズの変化から抗癌治療の効果が評価される。しかしながら、特定の治療の有効性が腫瘍サイズの変化として現れるには数週間から数ヶ月掛かることが多く、より早い段階で治療効果を評価する、或いは逆に、治療を始める前にその治療法の有効性を判断できる画像診断法の確立が望まれている。ピルビン酸は正常組織ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化により主に水と二酸化炭素に代謝されるのに対し、癌組織ではピルビン酸脱水素酵素の活性抑制と乳酸脱水素酵素 (LDH) の発現増加を伴う解糖系の亢進により、主に乳酸へと代謝される代謝変容が起こる。172.5 ppm にあるピルビン酸の 1 位の炭素核の化学シフトは、乳酸に代謝されることで 185 ppm に大きく変化し、化学シフトイメージングにより容易に区別して可視化できる。このピルビン酸代謝の違いを超偏極 ^{13}C MRI によりリアルタイムに可視化することにより、わずか 3 分の撮像で腫瘍の正確な診断が可能となる (図 4)^{3,4)}。TRAMP モデルを用いた前立腺癌の前臨床試験では、代謝イメージングから得た乳酸/ピルビン酸

比と、組織化学から得た腫瘍の悪性度との間に高い相関が見られている¹¹⁾。

炎症性疾患や抗癌治療効果の評価においては、“細胞がどれだけ死んでいるのか”が重要な判断材料となる。現在、フマラーゼ酵素活性を標的にした細胞死イメージング法の研究開発が進められている¹²⁾。フマラーゼの基質であるフマル酸を外来的に投与しても細胞内移行性が低いため、細胞死が起きていない健康体ではほとんど何も代謝物は検出されない。炎症性疾患や抗癌治療によって癌細胞にネクロシス（壊死）が起これると、障害された細胞からフマラーゼが細胞外へと放出される。フマ

ラーゼが触媒する酵素反応は補酵素を必要とせず、酵素基質さえあれば細胞外でも酵素活性は維持されている。従って、超偏極 ^{13}C フマル酸からリンゴ酸への代謝が観察されれば、そこで細胞膜の破壊が起きていることを意味する。フマル酸とリンゴ酸の化学シフトが近いため、高いスペクトル分解能が必要とされるが、細胞死のイメージングは幅広い応用が期待される。

疾患には遺伝的要因に依るものも多く、遺伝的な違いはそのコードする酵素反応の変化として現れ、治療効果や予後に大きく影響する場合がある。例えば、脳腫瘍においては膠芽腫では p53 経路の遺伝子異常が 50% 近く



に認められ、星細胞腫および乏突起細胞腫ではイソクエン酸デヒドロゲナーゼ IDH1 突然変異が 50-80% の高頻度で見られる。IDH1 変異は癌化の原因ではあるが、この遺伝子変異による脳腫瘍は他の遺伝子変異に起因する場合と比べ予後が良く、生存年数も有意に長い。正常な IDH1 はミトコンドリア内のクエン酸回路においてイソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換するが、変異体の多くは α -ケトグルタル酸を 2-ヒドロキシグルタル酸に変換する異常な代謝を示す。従って、 ^{13}C 標識した α -ケトグルタル酸の代謝イメージを行うことにより脳内の IDH1 遺伝子変異を非侵襲的に検出できる¹³⁾。また、コハク酸の代謝イメージングからは癌抑制遺伝子であるコハク酸デヒドロゲナーゼやフマラーゼの活性異常を計測

することができる。ジカルボニル構造を持つコハク酸は細胞内移行性が悪いが、エステル化することにより移行性を改善できることが報告されている¹⁴⁾。このように超偏極 ^{13}C MRI による酵素活性イメージングは、遺伝子変異の検出にも有用であり、他の遺伝子変異を検出する様々な酵素基質プローブの開発も重要な研究分野となってきた。

4. 腫瘍における LDH 酵素活性と抗癌治療効果

画像診断技術の進歩により、癌の全身スクリーニングが可能となっている現在、見つかった腫瘍の悪性度の評価や、個別の抗癌治療戦略の最適化に資する画像診断技術の開発が求められている。図5はマウス後肢に移植し

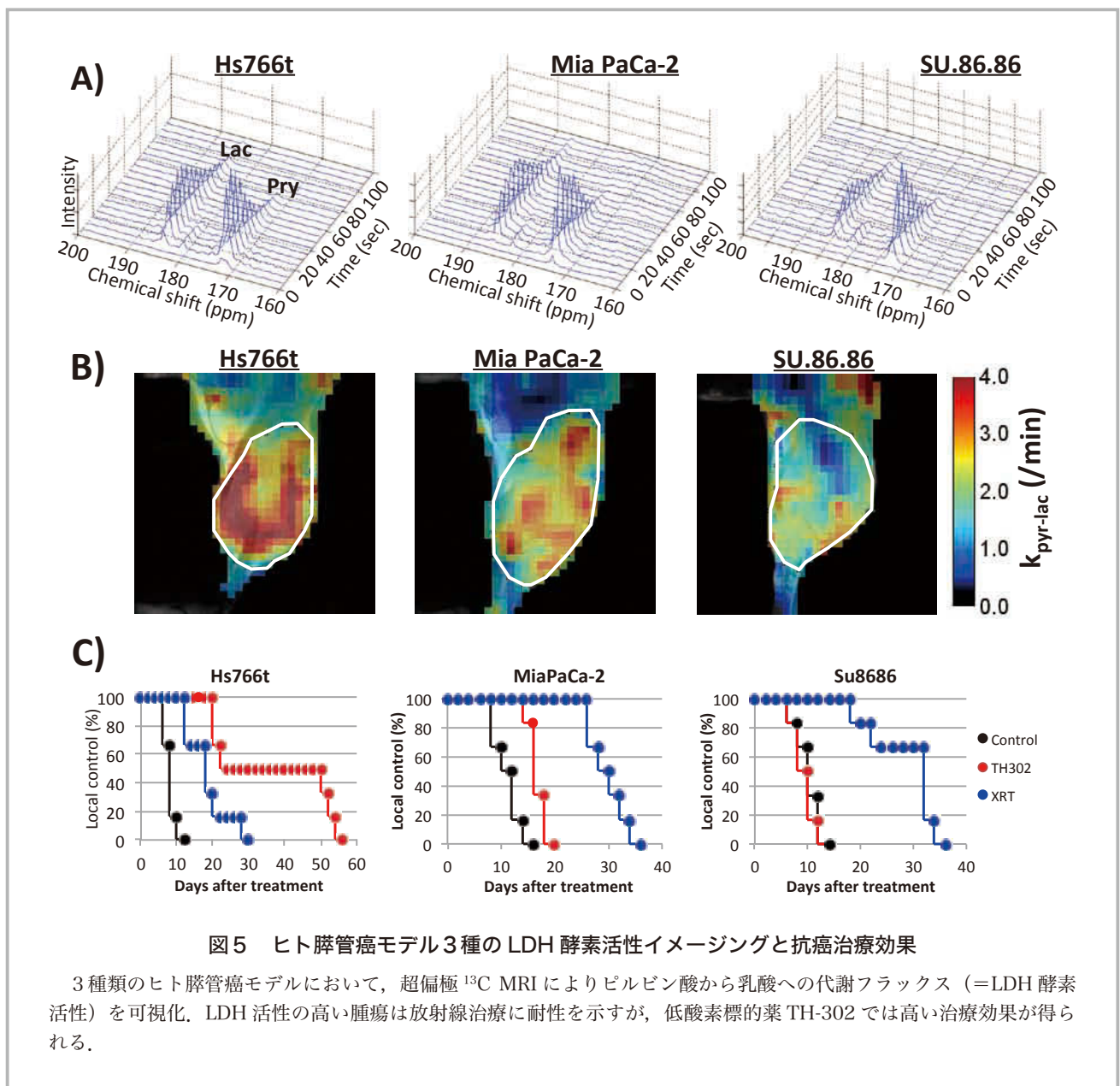


図5 ヒト膵管癌モデル3種の LDH 酵素活性イメージングと抗癌治療効果

3種類のヒト膵管癌モデルにおいて、超偏極 ^{13}C MRI によりピルビン酸から乳酸への代謝フラックス (=LDH 酵素活性) を可視化。LDH 活性の高い腫瘍は放射線治療に耐性を示すが、低酸素標的薬 TH-302 では高い治療効果が得られる。

た3種類のヒト膵管癌モデルにおいて、超偏極 ^{13}C ピルビン酸代謝イメージングから得たLDH酵素活性画像と、それらの腫瘍を放射線治療、膵臓癌の第一選択薬であるジェムシタビン、および低酸素標的薬であるTH-302で治療した際の生存曲線を示している¹⁵⁾。同じ膵管癌の腫瘍であってもその背景にある遺伝子変異の違いにより、腫瘍のLDH酵素活性は大きく異なる。LDH発現量は転写因子である低酸素誘導因子HIFの制御を受けており、低酸素腫瘍ではその発現は上昇する。従って、LDH活性が高い腫瘍は酸素濃度が低い可能性が示唆され、実際に放射線治療に耐性を示した。その一方で、低酸素下において活性化され抗癌作用を示す低酸素標的薬TH-302は、そのようなLDH活性の高い腫瘍に対して高い治療効果を示し、LDH活性の低い腫瘍においてはほとんど治療効果が観察されなかった。これらの結果は、LDH酵素活性が腫瘍の酸素状態を良く反映しており、超偏極 ^{13}C MRIが個別の癌患者に対する最適な治療方針の決定に有用な知見を与え得ることを示唆している。

5. 今後の展望

超偏極 ^{13}C MRIによる代謝イメージングは、この10年ほどで立ち上がった新しい分野である。代謝プローブの候補となる生体内分子は数百種類に及ぶ。現在までに報告されている代謝プローブはそのほんの一部に過ぎない¹⁰⁾。将来、超偏極 ^{13}C MRIを意図したハード&ソフトウェアの開発・改良と合わせ、革新的な代謝プローブが開発されていけば、医療の発展に大きく貢献できる可能性を秘めている。

近年の代謝研究では質量分析技術の発展により、組織中に含まれる数百種類もの代謝物を一度に定量することが可能となり、疾患を包括的な代謝変化として捉える、所謂メタボロームが疾患メカニズムの解明に重要な役割を果たしている。これまでの超偏極 ^{13}C MRI研究は、1つの代謝プローブを用いて、1つの代謝経路を選択的に検出することを目的としていた。最近の国際会議では灌流プローブと代謝プローブを同時に励起し、画像化するなど、複数の異なる性質を持つ、もしくは、複数の代謝プローブを同時に用いて異なる代謝経路を検出するマルチプレックス代謝イメージングの試みも報告され始めている¹⁶⁾。より多くの代謝プローブを同時に投与し、そ

れらから派生する何十種類もの代謝物を区別してイメージングすることが出来れば、メタボロームのような包括的代謝情報を非侵襲的に得ることも可能になり、様々な疾患を1度のMRI測定で検出・診断することも可能になると考えられる。

上述のように、既に前立腺癌や脳腫瘍診断、心機能評価において臨床試験が始まり、世界10カ所ほどで様々な代謝プローブを用いた超偏極 ^{13}C MRIの新たな臨床試験が計画されている。その一方で、世界有数の6000台ものMRI台数を誇るMRI大国であるはずの日本では、筆者の知る限り、前臨床レベルでさえも超偏極 ^{13}C MRIによる代謝イメージの撮像が可能なのは筆者・松元の研究チームのみである。超偏極 ^{13}C MRIの国内普及が進まない主因は数億円に及ぶ現行DNP型の ^{13}C 励起装置の導入初期コストにある。近年の臨床試験の成功を受け、より低価格な励起装置の実現に繋がるPHIP法の報告数も著しく増えてきており、今後の国内普及の拡大へと繋がるのが期待される。

参考文献

- 1) Ross, B.D. *et al.*: Hyperpolarized MR imaging: neurologic applications of hyperpolarized metabolism. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 24 (2010).
- 2) Ardenkjaer-Larsen, J.H. *et al.*: Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 10158 (2003).
- 3) Golman, K. *et al.*: Metabolic imaging by hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging for in vivo tumor diagnosis. *Cancer Res.* 66, 10855 (2006).
- 4) Matsumoto, S. *et al.*: EPR oxygen imaging and hyperpolarized ^{13}C MRI of pyruvate metabolism as noninvasive biomarkers of tumor treatment response to a glycolysis inhibitor 3-bromopyruvate. *Magn. Reson. Med.* 69, 1443 (2013).
- 5) Nelson, S.J. *et al.*: Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [^{13}C] pyruvate. *Sci. Transl. Med.* 5, 198 (2013).

- 6) Charles, H. *et al.*: Hyperpolarized ¹³C metabolic MRI of the human heart initial experience. *Circ. Res.* 119, 1177 (2016).
- 7) Golman, K. *et al.*: Parahydrogen-induced polarization in imaging: Subsecond ¹³C angiography. *Magn. Reson. Med.* 46, 1 (2001).
- 8) Chekmenev, E. *et al.*: ASADENA hyperpolarization of succinic acid for MRI and NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4212 (2009).
- 9) Reineri, F. *et al.*: ParaHydrogen Induced Polarization of carboxylate resonance in acetate and pyruvate. *Nat. Commun.* 6, 1 (2015).
- 10) Keshari, K.R. and Wilson, D.M. Chemistry and biochemistry of ¹³C hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. *Chem. Soc. Rev.* 43, 1627 (2014).
- 11) Albers, M.J. *et al.*: Hyperpolarized ¹³C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading. *Cancer Res.* 68, 8607 (2008).
- 12) Gallagher, F. *et al.*: Production of hyperpolarized [1,4-¹³C₂] malate from [1,4-¹³C₂] fumarate is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 19801 (2009).
- 13) Chaumeil, M.M. *et al.*: Non-invasive in vivo assessment of IDH1 mutational status in glioma. *Nat. Commun.* 4, 2429 (2013).
- 14) Zacharias, N.M. *et al.*: Real-time molecular imaging of tricarboxylic acid cycle metabolism in vivo by hyperpolarized 1-(¹³C) diethyl succinate. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 934 (2012).
- 15) Matsumoto, S. *et al.*: Metabolic and Physiologic Imaging Biomarkers of the Tumor Microenvironment Predict Treatment Outcome with Radiation or a Hypoxia-Activated Prodrug in Mice. *Cancer Res.* 78, 3783 (2018).
- 16) von Morze, C. *et al.*: Simultaneous multiagent hyperpolarized (¹³C) perfusion imaging. *Magn. Reson. Med.* 72, 1599 (2014).

総 説

低酸素応答による末梢神経の髄鞘形成制御

氏家悠佳*, 若月修二*, 荒木敏之*

1. はじめに

ヒトを含むほぼすべての多細胞生物は、大気中の酸素を利用してエネルギーを産生する。そのため、多細胞生物を構成する細胞にとってその生存には酸素が不可欠であるが、生体局所の酸素分圧は常に変動しており、個々の細胞が生存するためにはこの変動に適応する必要がある。低酸素誘導因子 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF1) は、細胞への酸素供給が不足したときに誘導されるタンパク質として発見され、酸素濃度の変動への適応応答において中心的な役割を果たす。哺乳類の胚発生は 1%~5% と成体よりも低い酸素濃度で生じるため、胚発生における HIF 依存的な遺伝子発現調節の重要性が示されている。その一方で、低酸素への適応機構の異常や破綻は多くの疾患の症状形成や病態の進展と密接に関わることが明らかになりつつあり、HIF を介する低酸素応答機構を理解することは、病態生理学的な面からも極めて重要である。

神経細胞において情報の出力を担う軸索は、標的となる細胞と連絡して情報を伝達する。ほとんどの軸索を覆う髄鞘 (ミエリン) は導線を包む絶縁体のような役割を果たし、このはたらきによって、情報伝達に必要な電気信号が神経細胞から標的となる細胞へ迅速かつ正確に伝えられる。末梢神経系において、ミエリンはシュワン細胞によって形成される。哺乳類ではシュワン細胞は神経堤細胞から生じ、胎生中期以降に軸索へと遊走し、出生前後に活発にミエリン形成を開始する。出生によって胎児を取り巻く酸素環境は大きく変化することから、酸素環境の変化がミエリン形成を誘導する可能性がある。著者らは神経損傷などによる末梢神経障害後の再生機構に関わる責任分子の探索するなかで、シュワン細胞の分化、すなわちミエリン形成と正に相関する発現変動を示す分

子として HIF1 を見出した。本総説では、シュワン細胞における HIF1 を介する低酸素応答の分子機構に関する著者らの研究を紹介し、ミエリン形成における低酸素応答の生理的意義について考察する。

2. 末梢神経ミエリン化におけるシュワン細胞の分化

前述のように、シュワン細胞は神経堤細胞から発生し、シュワン細胞前駆細胞、幼若シュワン細胞を経て、最終的にミエリン形成細胞へと分化する。幼若シュワン細胞はニューレグリンやラミニンなどを介した軸索とのクロストークにより、細胞増殖や軸索への遊走が促進されて軸索に寄り添うようになる。こうして幼若シュワン細胞はミエリン形成細胞へと分化し、1本の軸索に対して何十層ものミエリンを形成する。ミエリン形成に至るまでの各ステージにおいて機能する転写因子が同定され、それに準ずる遺伝子発現調節が明らかにされている^{1,2)}。代表的なものとして、主に幼若シュワン細胞に発現する Oct6 はミエリン形成細胞への分化を促す Krox20 の転写を活性化し、Krox20 は MBP (myelin basic protein) などのミエリン構成蛋白遺伝子のプロモーター領域に結合して発現を促進することが知られている。Oct6 および Krox20 は、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いた検討によりミエリン形成の遅延や形成異常が起こることが報告され、ミエリン形成の主要な転写因子であると考えられている³⁻⁵⁾(**図 1**)。しかしながら、これらの報告は各ステージに限定した断片的な結果を示すものであり、ミエリン形成に至るまでのシュワン細胞の分化制御メカニズムの全貌は未だ明らかにされていない。

*国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第五部

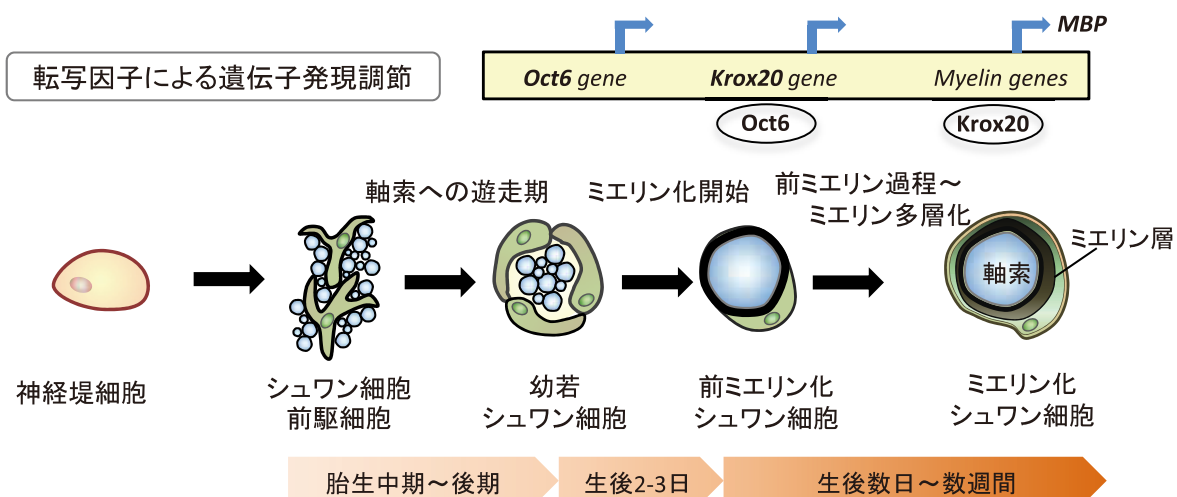


図1 シュワン細胞の分化過程

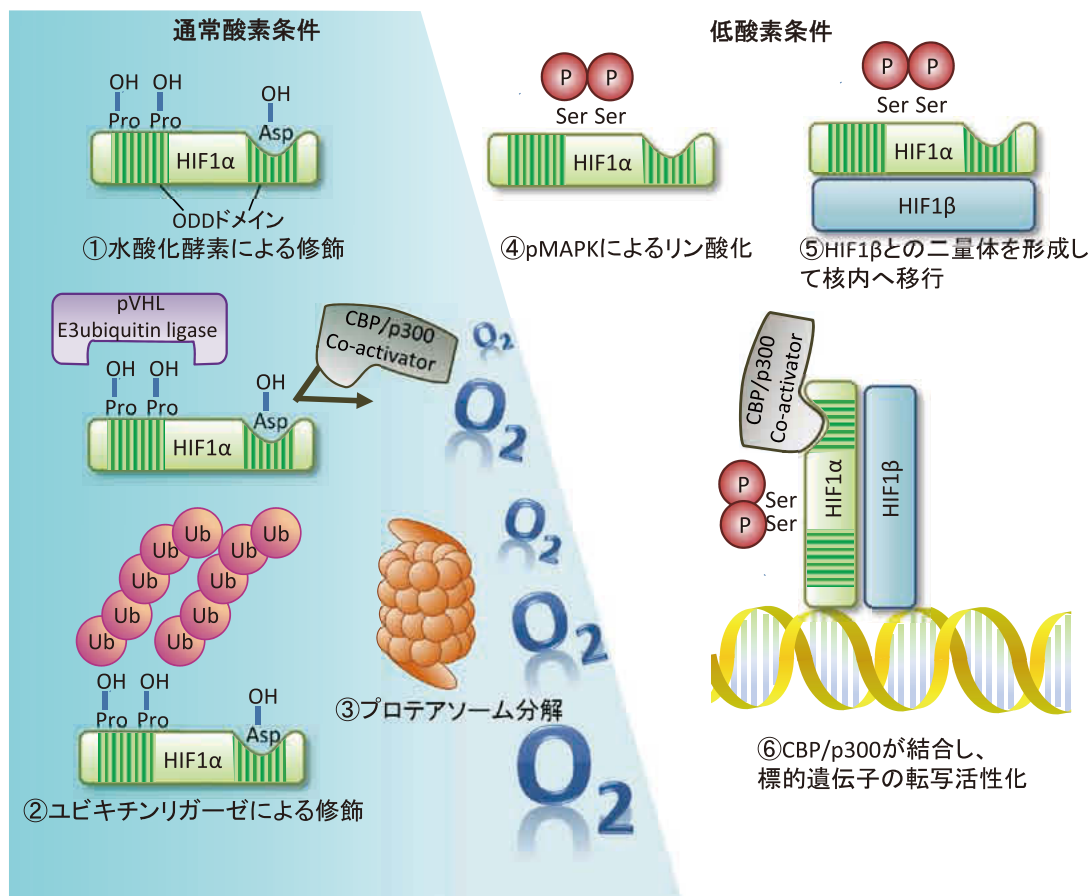


図2 HIF の発現制御

3. HIF1 による遺伝子発現制御

HIF1 は元来、肝がん細胞株において低酸素依存的にエリスロポエチン産生を誘導する転写因子として発見された⁶⁾。HIF1 はすべての後生動物に存在し、HIF1 α および HIF1 β のふたつのサブユニットから構成される。HIF1 α サブユニットには ODD (oxygen-dependent degradation) ドメインと呼ばれる蛋白質の安定性制御を担う領域が存在する。この領域に含まれる二つのプロリン残基はプロリン水酸化酵素により酸素依存的に水酸化され、von Hippel-Lindau 蛋白 (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されてプロテアソーム依存的に分解される。一方、アスパラギン残基の水酸化は転写共役因子 CBP/p300 との結合を阻害し、転写活性が抑制される。低酸素状態では、これらの水酸化酵素が機能しないために HIF1 α は分解されず、細胞質内に安定化する。その後 HIF1 α は HIF1 β と二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子のプロモーター領域内の ACGTG/GCGTG で構成される低酸素応答性領域に結合することで転写を開始することができる^{7,8)}(図2)。これまでに HIF1 α は ERK (extracellular signal related kinase) によって 641, 643 番のセリン残基がリン酸化されると核内移行が促進され転写活性が上昇することが報告されている^{9,10)}。このように、様々な翻訳後修飾を受けて HIF1 α が安定化されることによって、低酸素に応答した遺伝子発現が制御される。これまでに、HIF1 α が発現制御する遺伝子として、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) や血管内皮増殖因子 (VEGF) などが報告されている⁷⁾。

4. シュワン細胞における HIF1 α 安定発現とミエリン関連遺伝子発現変化

生後2日目のラットから坐骨神経を採取し、シュワン細胞を調製した。得られた初代培養シュワン細胞はホルスコリンおよびグリア増殖因子 (GGF) を含む培地で継代することができる。シュワン細胞を低酸素環境(酸素濃度1%)にて培養し、免疫染色により HIF1 α の局在を観察したところ、低酸素暴露4時間後および24時間後では HIF1 α がシュワン細胞の細胞質および核内に局在し、内因性の HIF1 α の安定化と核内移行が観察された。24時間後ではおよそ80%以上のシュワン細胞

で HIF1 α が核内移行した。低酸素暴露後のシュワン細胞を回収し、定量的 PCR にてミエリン関連遺伝子の発現変化を解析すると、Oct6, Krox20 および MBP 遺伝子の発現レベルが通常酸素環境(酸素濃度20%)と比較して有意に上昇した。プロリン残基をアラニン残基に置換し、水酸化による分解を免れて安定的に発現する HIF1 α 変異体を導入したシュワン細胞は、対照群と比較して Krox20 および MBP 遺伝子の発現レベルが増加した。これらのことから、HIF1 α の発現はシュワン細胞の分化、すなわちミエリン形成と正に相関することがわかった。

5. ミエリン形成期のシュワン細胞における HIF1 α の発現

次に、生体内における HIF1 α の機能を調べるため、マウスを用いて発達期の末梢神経における HIF1 α の発現と局在を調べた。マウスの坐骨神経では、ミエリン形成は生後2~3日に開始し、生後1週でシュワン細胞が軸索に沿って突起を伸展する。生後3週間後には軸索に多重層構造のミエリンを形成し始め、ミエリン完成までに約2か月を要する。生後2日、10日、3週齢および成獣マウスの坐骨神経を採取し、HIF1 α の mRNA および蛋白質の発現変化を解析したところ、成獣マウスと比較して HIF1 α 蛋白質は生後2日齢において豊富に存在した。意外なことに、HIF1 α mRNA は成獣マウスにおいてわずかに発現増加が認められるのみであった。したがって、HIF1 α mRNA の発現レベルは発達期を通してほぼ一定であるのに対し、HIF1 α 蛋白質はミエリン形成開始期では安定的に発現し、ミエリンが完成する成獣では分解されると考えられた。HIF1 α 蛋白質を発現する細胞を免疫組織化学により同定したところ、生後10日齢のマウス坐骨神経では、核およびシュワン細胞の核内に局在した。これらの結果は、ミエリン形成初期に HIF1 α 蛋白質が安定発現することがシュワン細胞の分化誘導、すなわちミエリン形成の制御に関与する可能性を示唆した。

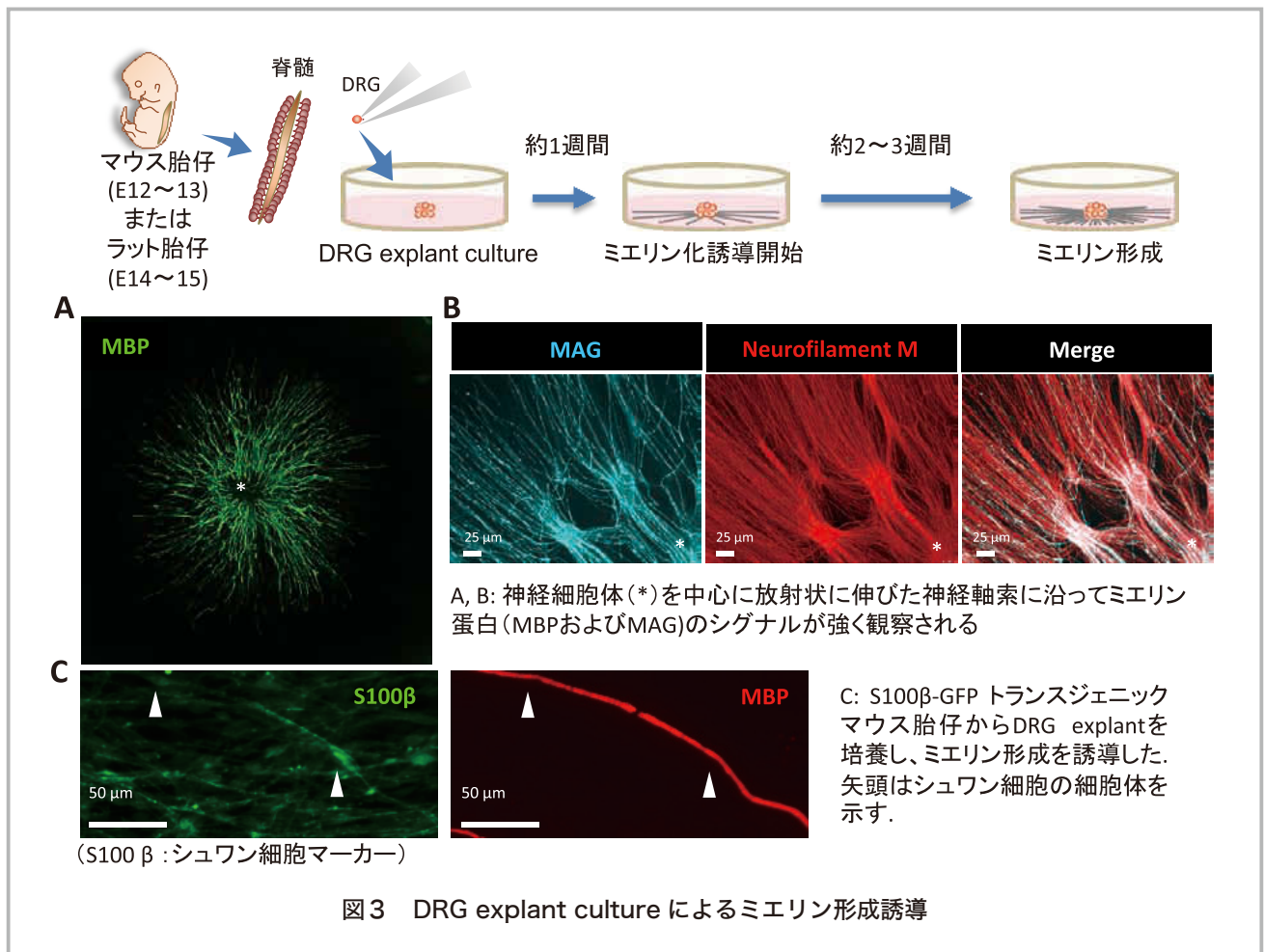
6. *in vitro* myelination の確立

筆者らは、マウスおよびラット胎仔から採取した脊髄後根神経節 (DRG) を用いた組織培養 (explant culture) によるミエリン形成の評価系 (explant 法) を

確立した。胎生期 12～13 日の DRG にはシュワン細胞の前駆細胞（サテライト細胞とも呼ばれる）が存在するため、explant 法は神経細胞とシュワン前駆細胞の共培養系となる。採取した DRG explant を NGF などの栄養因子を含む培地で培養すると、約 1 週間で軸索が外側へ向けて放射状に伸長する。シュワン細胞前駆細胞は神経細胞の細胞体近傍に密集しているが、培養経日的に増殖し、軸索に沿って遊走していく。その後、アスコルビン酸を添加してミエリン形成を誘導すると、誘導開始から約 2～3 週間後にはミエリンが形成される（図 3）。中枢神経系ではミエリン形成を担うオリゴデンドロサイトは複数の軸索に対してミエリン化するが、シュワン細胞は 1 本の軸索にミエリンを構築する。したがって、観察される 1 つのミエリンセグメントが 1 つのミエリン形成細胞を意味し、ミエリンセグメントの蛍光強度や個数を定量することでミエリン形成を評価できる。

これまで、*in vitro* myelination では、生後 2～4 日のラット由来のシュワン細胞とラット胎仔またはマウス胎仔由来の神経細胞の培養を別々に採取し、後に混合す

る共培養系が用いられた¹¹⁻¹⁴⁾。この場合、神経細胞の培養は採取してきた DRG を酵素処理で分散し、増殖性細胞を薬剤処理により除去した後に共培養を開始する。シュワン細胞と神経細胞の間で細胞の由来が異種または別個体になるため、遺伝的に変異のある動物から採取したシュワン細胞または神経細胞を共培養に用いることが可能である。また、共培養前に人工的に特定の遺伝子をノックダウンしたり、過剰発現させたりすることができ、共培養後のミエリン形成で細胞特異的な *loss of function* および *gain of function* 解析が可能であるが、シュワン細胞、神経細胞ともに大量の細胞を確保する必要となる。一方、explant 法では採取した 1 つの DRG から共培養系を確立できるため、簡便性・量産性に優れている点で、薬剤スクリーニングに有用なツールとなる。また、同一個体に由来したシュワン細胞と神経細胞による共培養系となるため、生体内における発達期のミエリン形成を一部模倣した *in vitro* モデルとなると考えている。例えば、Charcot-Marie-Tooth 病モデルである Tremble-J マウス（ミエリン構成蛋白 *PMP22* の変異により末梢神経に



脱髄を認める) から作製した explant culture では野生型と比較してミエリン形成が低下しており^{15,16)}, 病態時のミエリン形成異常を一部再現している。

7. HIF1 α 安定化によるミエリン形成の促進

これまでの結果から, HIF1 α 蛋白の安定発現はシュワン細胞の分化, すなわちミエリン形成を促進する可能性がある。この仮説を裏付けるため, 低酸素暴露によるミエリン形成への影響を explant 法により検討した。低酸素環境で6時間培養した後, 通常酸素環境に戻し, ミエリン形成誘導培地で3週間培養を継続した。その結果, 軸索の密度や伸長には変化がみられないが, 通常酸素環境のみの培養と比較してミエリンセグメント数が有意に増加することがわかった。次に, プロリン水酸化酵素を阻害することでHIF1 α 蛋白を安定化する薬剤 (HIF1 α 安定化剤) を添加してミエリン形成への影響を検討した。HIF1 α 安定化剤を添加すると, HIF1 α 蛋白はほぼすべてのシュワン細胞の核に局在した。ミエリン形成誘導開始時にこの濃度でHIF1 α 安定化剤を添加して培養した後, ミエリン形成誘導培地でさらに12日間培養してミエリン形成を評価したところ, ミエリンセグメントの数が増加することがわかった。これらのことから, 低酸素および薬剤によりHIF1 α 蛋白が一過性に安定して発現することでミエリン形成を促進する可能性が強く示唆された。

8. おわりに

本総説では, 末梢神経系の髄鞘 (ミエリン) 形成におけるHIFの機能に関する著者らの研究を紹介した。HIF1 α は転写因子としてミエリン形成を促進する遺伝子の発現調節に関与すると考えられるため, 現在, クロマチン免疫沈降法による網羅的解析 (ChIP-seq 解析) を進めている。また, シュワン細胞においてHIF1 α がどのように活性化し, ミエリン形成に関与するのかを動物個体レベルで理解するために, 今後はシュワン細胞特異的にHIF1 α 遺伝子を欠損するモデル動物を用いて, 生理学的あるいは病態生理学的環境下におけるHIF1 α の機能解析を行う必要があると考えている。

HIF1 α 蛋白の安定化はIL1 β , TNF α およびTGF β などのサイトカインにより低酸素非依存的に制御されるこ

とが知られている¹⁷⁾。著者らの観察では, HIF1 α 蛋白は発達初期の坐骨神経に安定して存在していた。発達初期のマウス坐骨神経にはマクロファージなどの免疫細胞が存在している。これらの免疫細胞が産生するサイトカインを介したマクロファージ-シュワン細胞間のクロストークが, HIF1 α 蛋白の安定化に寄与する可能性がある。これらの可能性についてもさらに検討する計画である。

一方, 脱髄疾患では視力障害や手足の麻痺, 感覚障害, 高次機能障害などの重篤な神経障害を生じる。脱髄疾患で最多は多発性硬化症であり世界で250万人が罹患する。また, アルツハイマー病や脳卒中, 炎症, 代謝異常, ビタミンB12欠乏症などの栄養素の欠乏においても髄鞘 (ミエリン) が障害されることが報告されており, 近年では統合失調症などの精神疾患においてもミエリン形成の異常が仮説として提唱されている。このように, 世界中には数千万人にも及ぶ多数の方がミエリンに障害を持ち, そのことが原因となる神経障害に苦しんでいる。脱髄の抑制や髄鞘の再生を促進する方法の開発はこれらの神経障害の進行の緩和に繋がるが, 国内外での髄鞘 (ミエリン) を標的とした研究は少なく, 脱髄疾患の発症・進行機構の解明と有効な治療戦略の提示は重要な課題であると考ええる。近年, 血中酸素濃度の変化に伴い, 中枢神経系のミエリン形成が活発化することが報告されている¹⁸⁾。ミエリン形成の分子機構は, 少なくとも部分的には中枢神経系と末梢神経系で共通するが, 軸索からのシグナルに強く依存する末梢神経系と比べ, 中枢神経系はよりシステム的な影響を受ける。今後は, 中枢神経系のミエリン形成と酸素ダイナミクスの関連性を明らかにし, 脱髄疾患の発症・進行機構の解明と有効な治療戦略の提示に繋げたい。

参考文献

- 1) Jessen, K.R. & Mirsky, R.: The origin and development of glial cells in peripheral nerves, *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(9), 671 (2005).
- 2) Pereira, J.A. *et al.*: Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system, *Trends. Neurosci.*, 35(2), 123 (2012).
- 3) Topilko, P. *et al.*: Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system, *Nature.*, 371,

- 796 (1994).
- 4) Bermingham, J.R. Jr. *et al.*: Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration, *Genes Dev.*, 10(14), 1751 (1996).
 - 5) Jaegle, M. *et al.*: The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation, *Science.*, 273, 507 (1996).
 - 6) Semenza, G.L. & Wang, G.L.: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, 12(12), 5447 (1992).
 - 7) Sharp, F.R. & Bernaudin, M.: HIF1 and oxygen sensing in the brain, *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(6), 437 (2004).
 - 8) Lisy, K. & Peet, D.J.: Turn me on: regulating HIF transcriptional activity, *Cell. Death. Differ.*, 15(4), 642, (2008).
 - 9) Richard, D.E. *et al.*: p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1, *J. Biol. Chem.*, 274(46), 32631 (1999).
 - 10) Mylonis, I., *et al.*: Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha, *J. Biol. Chem.*, 281(44), 33095 (2006).
 - 11) Eldridge, C.F. *et al.*: Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation, *J. Cell. Biol.*, 105(2), 1023 (1987).
 - 12) Einheber, S. *et al.*: Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination, *J. Cell. Biol.*, 123(5), 1223 (1993).
 - 13) Saitoh, F. & Araki, T.: Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates schwann cell differentiation, *J. Neurosci.*, 30(4), 1204 (2010).
 - 14) Saitoh, F. *et al.*: Glutamate signals through mGluR2 to control Schwann cell differentiation and proliferation, *Sci. Rep.*, 6, 29856 (2016).
 - 15) Liu, N., *et al.*: Enhancement of Schwann cell myelin formation by K252a in the Trembler-J mouse dorsal root ganglion explant culture, *J. Neurosci. Res.*, 79(3), 310 (2005).
 - 16) Rangaraju, S. *et al.*: Rapamycin activates autophagy and improves myelination in explant cultures from neuropathic mice, *J. Neurosci.*, 30(34), 11388 (2010).
 - 17) Frede, S. *et al.*: Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation, *Methods Enzymol.* 435, 405 (2007).
 - 18) Yuen, T.J. *et al.*: Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell.*, 158(2), 383 (2014).

酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究

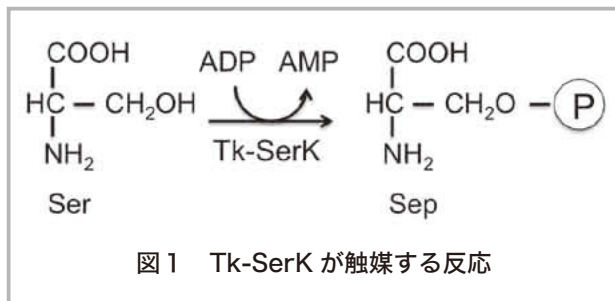
新規 serine kinase ホモログの機能解析と SerK kinase family の提唱

跡見 晴 幸

(京都大学工学研究科)

【目的】

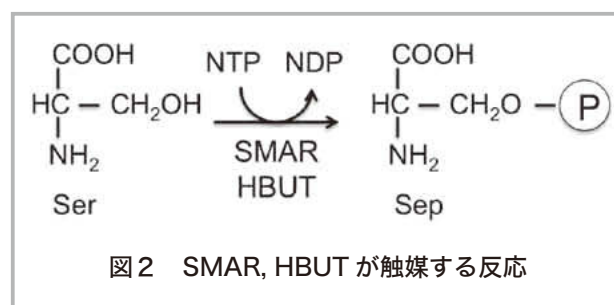
我々はいままでに、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の cysteine 合成機構を解明し、TK0378 遺伝子にコードされる新規 ADP-dependent serine kinase (Tk-SerK) を同定した¹⁾。いままでタンパク質中の serine 残基をリン酸化する酵素は多数知られていたが、SerK は遊離の serine をリン酸化する酵素としては初めての例であった (図1)。Tk-SerK は ADP をリン酸基供与体とし、serine に高い特異性を示し、threonine や homoserine、ペプチド中の serine 残基には活性を示さなかった。SerK は既存の kinase family とは異なる一次構造を示すことから、Tk-SerK は新しい kinase family の一員である可能性が示唆された。そこで本研究ではアーキアの中では *Thermococcus* 属と比較的遠縁の Crenarchaeota が保有する Tk-SerK ホモログの機能解析を進め、新しい kinase family の提唱・確立を目指す。



【方法】

Crenarchaeota に属する数種のアーキアから Tk-SerK ホモログ遺伝子を増幅し、*Escherichia coli* 内で大量発現して翻訳産物の取得 (MSED, SMAR, HBUT) を目指した。Tk-SerK, MSED, SMAR, HBUT はそれぞ

れ 242, 268, 252, 142 個のアミノ酸からなるタンパク質であった。発現の結果、MSED については不溶性のタンパク質が得られたが、SMAR, HBUT の 2 種について可溶性の組換え型タンパク質が得られた。SMAR は nuclease と機能推定され Tk-SerK と 45% の相同性を示した。HBUT は transcriptional regulator と推定され、Tk-SerK と 18% の相同性を示した。SMAR は 85°C, 10 分間の熱処理、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。HBUT は陽イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。得られた精製タンパク質を用いて O-phosphoserine (Sep) の生成やリン酸基供与体の消費等を測定することにより serine kinase 活性の有無を検討した。



【結果】

SMAR および HBUT について、まず ADP-dependent serine kinase 活性の有無を検討した。いずれのタンパク質も本活性を示さないことが判明した。そこで、リン酸基供与体を変更し、ATP を用いて活性を評価した。その結果、いずれも活性を示すことがわかった。

そこで SMAR が利用できるリン酸基供与体を調べた。ATP, UTP, GTP, CTP, pyrophosphate, triphosphate の利用を検討した結果、SMAR が ATP, UTP, GTP, CTP, triphosphate を用いて L-serine のリン酸化反応を触媒できることがわかった。Tk-SerK と同様、反応の生成物は Sep であった。また L-serine に対する活性よりは低いものの、SMAR は D-serine に対しても活性を示した。類似の構造をもつ threonine や homoserine は認識さ

れなかった。HBUTについてもリン酸基供与体の解析を進めた結果、本酵素はATP, UTP, GTP, CTPを利用できることが明らかとなったが、UTPを用いた場合の活性が特に高いことがわかった。

【考察】

本研究により Euryarchaeota の *Thermococcus* 属以外の archaea においても serine kinase が存在することがわかった。これらはADPではなく種々のNTPをリン酸基供与体として利用することが明らかとなった。上記のSMAR, HBUT以外にもCrenarchaeota由来Tk-SerKホモログの中にATP-dependent serine kinase活性を有するものの存在が明らかとなっており、今後新しいserine kinase familyの提唱が可能であると期待している。

【文献】

- 1) Makino, Y., Sato, T., Kawamura, H., Hachisuka, S.-I., Takeno, R., Imanaka, T. & Atomi, H.: An archaeal ADP-dependent serine kinase involved in cysteine biosynthesis and serine metabolism. *Nature Commun.* 7, 13446, (2016).

ATP 受容体 P2X4 に対する抗体と ATP 加水分解酵素を利用した「痛み」抑制分子の開発

阿部 義人

(九州大学薬学研究院)

【目的】

世界にはモルヒネも効かない痛み「神経障害性疼痛」等に罹患する患者が2000万人以上も存在し、救われ難い痛みを苦しんでいる。九州大学薬学研究院の井上らは「脊髄内ミクログリアの異常な活性化と、そこに発現するATP受容体サブタイプP2X4の刺激により神経障害性疼痛が発症する」ことを報告した¹⁾。この結果はP2X4が神経障害性疼痛における「痛み」のターゲット分子であることを示した。近年、X線結晶解析によって、P2X4の三量体構造が解析され、ATP結合と関連した細胞外ドメインの構造変化など、その構造的な基盤も

確立されつつある²⁾。そのような中で申請者は、ラットP2X4の細胞外ドメインの一部を、立体構造を持ったまま発現、精製に成功し³⁾、この部位のモノクローナル抗体を作成した。本抗体は、ラットミクログリア細胞上のラットP2X4を立体構造特異的に認識する。今回の申請では本抗体を用いて、抗体とATP加水分解酵素をつなげたコンジュゲート抗体の作成を試み、細胞外に存在するATPを分解し、P2X4へのATP結合、さらにミクログリアの活性化を抑制することが可能ではないかと考えた。

【方法】

Cys残基とLys残基を修飾できる二架橋性試薬を用いて、ATP加水分解酵素であるApyrase上のLys残基と抗P2X4抗体をペプシンにより処理し調製した(Fab)'上のCysを架橋し、コンジュゲート抗体の作成を行った。

【結果】

Apyraseと抗ラットP2X4抗体のコンジュゲート抗体の作成を行い、ATP分解活性を持ち、ラットP2X4に結合するコンジュゲート抗体を得ることができた。

【考察】

今後作成したコンジュゲート抗体を用いて、実際にP2X4のカルシウム流入が抑制されるかどうかをP2X4発現培養細胞を用いて確認する予定である。

【文献】

- 1) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W. & Inoue, K.: P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury, *Nature*, 424, 778 (2003).
- 2) Hattori, M. & Gouaux, E.: Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors, *Nature*, 485, 207 (2012).
- 3) Igawa, T., Abe, Y., Tsuda, M., Inoue, K. & Ueda, T.: Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding, *FEBS Lett.*, 589, 680 (2015).

多種類の酵素を精密に整列配置して効率的に物質変換反応を行う反応場の開発

飯 嶋 益 巳

(東京農業大学応用生物科学部)

【目的】

バイオセンサーやバイオリアクター等の固相表面に酵素を固定化し、効率的に反応、触媒、エネルギー変換、物質生産等を行うためには、酵素と基質が効率よく反応できるように酵素の配向性を揃えて精密に整列配置することが重要である。これまでに我々は、IgG-Fc 結合 ZZ タグを整列提示するバイオナノ粒子 (ZZ タグ提示型バイオナノカプセル: ZZ-BNC)¹⁾ が、バイオセンシング表面において IgG の配向性を精密に制御し「クラスター化と整列提示化」を同時に達成できる耐久性の高い足場分子であることを高速原子間力顕微鏡により可視化し²⁾、各種バイオセンシングの高感度化により示してきた^{3,4)}。そこで本研究では ZZ-BNC を発展させ、多種類の酵素を精密に整列提示する足場分子の開発を目指した。まず第一段階として、BNC 表層に特異的 DNA 配列結合領域を提示した BNC を作製し、DNA 配列を介して酵素を精密に整列提示する足場分子の開発を行った。

【方法と結果】

ZZ-BNC と同様に出芽酵母を用いて DNA 結合型 BNC を発現・精製し、透過型電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) 及び動的光散乱法 (DLS) を用いて性状解析を行った結果、DNA 結合型 BNC は直径約 30 nm のナノ粒子であることが判明した。そこで、水晶発振子微量天秤法 (QCM) のセンサー表面に、血液凝固に関与する酵素と特異的に結合する DNA を直接または DNA 結合型 BNC を介して固定し、酵素結合能を測定した結果、DNA 結合型 BNC を介すると酵素結合量が約 2 倍に上昇し、DNA 1 分子に結合する酵素分子数が約 3 倍増加したことから、DNA 結合型 BNC は DNA を介して酵素をクラスター化及び精密整列化できる足場分子としての有望性が示された。今後、様々な酵素の精密整列提示化に応用することで、物質変換反応を高効率に行う反応場の創製を図っていきたい。

【文献】

- 1) Iijima, M. & Kuroda, S.: Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins. *Biosens. Bioelectron.*, 89, 810-821, (2017).
- 2) Iijima, M., Somiya, M., Yoshimoto, N., Niimi, T. & Kuroda, S.: Nano-visualization of oriented-immobilized IgGs on immunosensors by high-speed atomic force microscopy. *Sci. Rep.*, 2, 790, (2012).
- 3) Iijima, M., Kadoya, H., Hatahira, S., Hiramatsu, S., Jung, G., Martin, A., Quinn, J., Jeong, S.Y., Choi, E.K., Arakawa, T., Hinako, F., Kusunoki, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Tanizawa T. & Kuroda, S.: Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein-A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials*, 32, 1455-1464, (2011).
- 4) Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., Maturana, A.D. & Kuroda, S.: Bio-nanocapsule-based scaffold improves the sensitivity and ligand-binding capacity of mammalian receptors on the sensor chip. *Biotechnol. J.*, 11, 805-813 (2016).

高頻度変異感染症に対応できる新規経口ワクチンの創製

植 田 充 美

(京都大学大学院農学研究科)

我々が世界に先駆けて開発し、2010年に日本バイオインダストリー賞ならびに、2015年日本農芸化学会賞を授与された、タンパク質のもつ機能発現する場へ輸送されるためのシグナル配列を応用した「タンパク質の細胞表層分子ディスプレイ」の手法は、自然界からだけでなく、人工的に作製された大規模 DNA 情報分子プールから変異タンパク質、人工抗体やペプチドなど医薬としての機能タンパク質ライブラリーを構築することを可能にした。さらに、我々がナノテクを使って開発した一細

胞スクリーニングに使えるマイクロチャンバーチップなどの新しいセルチップや細胞セルソーターを用いたシステムティックな選択システムにより、種々のカラム操作なしに、ディスプレイされた細胞などを一つの支持体として、提示されたタンパク質の網羅的改変による機能解析ができる。また、PCR法なども併用すれば、導入されたDNAの配列から提示されたタンパク質のアミノ酸配列が即座に決定できる。こういった分子ディスプレイは、DNA情報と機能分子の解析の距離を短縮させるモレキュラーツールとして注目されてきている。

この手法を駆使すれば、多くの感染症の高頻度変異抗原タンパク質を網羅的でハイスループットな高速タンパク質作製システムの構築により感染症出現に際して即応して調製が可能で、さらに、その変異に対合するペプチドなどのリガンドを探索する新しい研究領域の創設も同時にめざせる。申請では、世界的なパンデミック危機をはらんでいるインフルエンザウイルスの強毒性の源になるウイルス H5N1 の 1 次感染源であるヘマグルチニンと 2 次感染源であるノイラミニダーゼとさらに、それぞれの変異体について分子ディスプレイ法によるハイスループットな作製とそれをベースにした経口抗原の作製をめざすものである。本発表では、そのモデルケースとして、高齢化社会で、現在問題になっている真菌感染症カンジダ症に対する、この新しい戦略にもとづく抗体の作成とその経口ワクチンへの取り組みについて、現況をまとめて報告するとともに、インフルエンザウイルス H5N1 のヘマグルチニンとノイラミニダーゼの分子ディスプレイ法による作製を完了したので報告する。

【方法と結果】

我々の開発したモノリスキャピラリーカラムによるナノ LC/MS/MS 定量プロテオーム解析により、カンジダ真菌のマクロファージ破壊脱出機構を調べるために、カンジダ真菌とマクロファージを相互作用させた後、分離せずにナノ LC-MS/MS で測定可能なゲノム情報を基にしたミックスドプロテオーム解析の系を新しく構築した。その結果、カンジダ真菌は、マクロファージに貪食されたのち、封鎖された解糖系からエネルギー生産系をグリオキシル酸回路系にシフトさせ、ストレス耐性タンパク質や病原性タンパク質も生産していることが推測された。そこで、グリオキシル酸回路の主要タンパク質

を細胞表層に配置した分子ディスプレイ経口ワクチンを作成し、その効能を評価したところ、これまでの抗真菌薬を凌駕する効能が示された。また、インフルエンザウイルスの強毒性の源になるウイルス H5N1 の 1 次感染源であるヘマグルチニンと 2 次感染源であるノイラミニダーゼとさらに、それぞれの変異体について分子ディスプレイ法によるハイスループットな作製を完了し、国立感染研での評価を行っている。

脂質メディエーター *N*-アシルエタノールアミンによる摂食制御機構の生理機能解析

宇山 徹

(香川大学医学部)

【目的】

N-アシルエタノールアミンは長鎖脂肪酸とエタノールアミンが縮合した脂溶性バイオフィクターの一種で、脂肪酸の鎖長や不飽和度に応じて異なる受容体に結合し、抗炎症や抗肥満作用などの多様な生物活性を示す。哺乳動物において *N*-アシルエタノールアミンは、生体膜リン脂質から主として二段階の酵素反応によって生成される。まず、*N*-アシル転移酵素によってホスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基に他のリン脂質分子の *sn*-1 位から脂肪酸鎖が転移され、*N*-アシル-PE と呼ばれる特殊なリン脂質が合成される。次に、ホスホリパーゼ D 型酵素によって *N*-アシル-PE から *N*-アシルエタノールアミンが生成される。*N*-アシル転移酵素には Ca^{2+} 依存性の有無で区別される 2 つのグループが存在するが、最近、マウスの脳を用いたプロテオーム解析から Ca^{2+} 依存性の *N*-アシル転移酵素 (Ca-NAT) が既報の細胞質型ホスホリパーゼ A₂ の ϵ 型であることが報告された。しかしながら、その詳細な機能解析は行われておらず、特にヒトにおける同酵素の性状などは明らかになっていない。そこで本研究では、ヒトおよびマウス Ca-NAT の精製組換えタンパク質を用い、同酵素の性状および機能解析を行った。

【方法】

FLAG タグを付加したヒトおよびマウス Ca-NAT を COS-7 細胞または HEK293 細胞で過剰発現させ、組換え

えタンパク質を抗FLAG抗体が結合したアフィニティークラムで精製することで不純物を除き、高度精製組換えタンパク質を調製した。本組換えタンパク質を酵素源として、性状解析を行った。

【結果】

ヒトのオルソログにはデータベース上で2種類のアイソフォームが存在したが、そのいずれもがマウス酵素と同様の活性を示すことが明らかになった。次に、2価カチオンの選択性を検討した結果、活性発現にはCa²⁺が必須であり、他の2価カチオンは無効であるか、ごく弱い作用を示した。Ca-NATの一次構造には、Ca²⁺依存的なリン脂質への結合に関わるとされるC2ドメインがN末端側に存在する。種々のリン脂質による酵素活性への影響を検討したところ、Ca²⁺存在下でホスファチジルセリンによって強く活性化され、その効果は濃度依存性であった。

【考察】

以上の結果から、ヒトおよびマウスのCa-NATのN-アシル転移酵素活性は、細胞内でホスファチジルセリンの存在下でCa²⁺によって制御されることが示唆された。現在、Ca-NAT欠損マウスの生化学的解析を行っているので、これと並行してN-アシルエタノールアミンの摂食制御機構の解析に着手する予定である。

【文献】

Hussain, Z., Uyama, T., Kawai, K., Mustafiz, SSB., Tsuboi, K., Araki, N. & Ueda N.: Phosphatidylserine-stimulated production of N-acylphosphatidylethanolamines by Ca²⁺-dependent N-acyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 493-502 (2018).

ピリミジン生合成系酵素を標的としたピロリ菌治療薬の開発

大石 智一

(微生物化学研究会微生物化学研究所)

【目的】

世界中の約50%のヒトが感染していると言われるヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の感染は、胃粘

膜の炎症を惹起し、胃がんを含む様々な胃関連疾患を引き起こす。これらのことから、同疾患の予防にピロリ菌の除菌が有用であると考えられている。しかしながら、現行の除菌治療に使われている抗生物質に耐性を示すピロリ菌の出現や、抗生物質による副作用の発生が、治療成功率の低下につながっており、近年特に問題視されている。我々はピロリ菌に選択性を有し、高い除菌効果を示す治療薬の開発を目指した。

【方法】

我々のグループは放線菌の培養液に含まれるIntervenolin (ITV) が試験管内の系で高い抗ピロリ菌活性を有することを見出し、ITVをリード化合物とした合成展開により多くの類縁体を作製した¹⁾。ここで得られたITV類縁体において、強い抗ピロリ菌活性を有し、かつマウスを用いた毒性試験で副作用の弱いものを抽出した(AS-1664, AS-1934)。ITVおよび同類縁体の作用機序を試験管内の系を用いて解析し、さらにマウスピロリ菌感染モデルを用いて抗ピロリ菌活性を評価した。

【結果】

ITVおよび同類縁体は抗生物質耐性菌を含むピロリ菌に抗菌活性を示すのに対し、腸内細菌を含むほとんどの一般細菌に対して抗菌活性を示さなかった。このピロリ菌選択的抗菌活性に関与する標的分子として、ピロリ菌のピリミジン生合成系酵素DHODHを同定した。さらにITV類縁体AS-1934単剤経口投与は、マウスモデルにおいて既存の3剤併用療法(clarithromycin, amoxicillin, omeprazole)に比べて有意に強い抗菌活性を示した^{2,3)}。

【考察】

以上の結果は、ITV類縁体AS-1934の臨床応用の可能性を示唆するものである。

【文献】

- 1) Kawada, M. *et al.*: Intervenolin, a new antitumor compound with anti-Helicobacter pylori activity, from *Nocardia* sp. ML96-86F2. *J. Antibiot.*, **66**, 543-548, (2013).
- 2) Ohishi, T. *et al.*: Monotherapy with a novel intervenolin derivative, AS-1934, is an effective treatment for Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, **23**, e12470, (2018).

- 3) Ohishi, T. *et al.*: Dihydroorotate Dehydrogenase as a Target for the Development of Novel Helicobacter pylori-Specific Antimicrobials. *Chem. Pharm. Bull.*, 66, 239-242, (2018).

遺伝子発現の正確性を担保するスプライシング チェックポイント機構の解析

甲斐田 大輔

(富山大学大学院医学薬学研究部(医学))

【目的】

真核細胞においては、転写されたばかりの mRNA (pre-mRNA) はスプライシングにより成熟型 mRNA となる。スプライシングを行うのは、スプライソソームと呼ばれる巨大酵素複合体である。

私たちはスプライシング阻害が転写伸長を抑制することを見出した。しかしながら、細胞がスプライシング異常を感知する機構や、スプライシング異常の情報を Pol II へと伝達する機構は明らかになっていない。そこで、本研究では、スプライシング阻害時における、転写関連因子やスプライソソームの挙動を解析することにより、スプライシングチェックポイント機構の存在を証明し、その詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

- (1) スプライシング異常が転写伸長抑制を引き起こすメカニズムの解析

スプライシング異常が転写伸長に与える影響を解析するために、スプライシング阻害剤スプライソスタチン A で細胞を処理し、その際の転写関連因子の発現量に変化があるかどうかをウェスタンブロッティングで確認した。

- (2) RNA 結合タンパク質の関与の検討

種々の RNA 結合タンパク質が、スプライシング異常による転写伸長抑制を回復させる可能性を検討するために、RNA 結合タンパク質を細胞内で過剰発現させ、その後、スプライシング阻害剤で細胞を処理し、その際の転写活性に変化があるかどうかを確かめた。

【結果と考察】

(1) 細胞をスプライシング阻害剤で処理し、その際の転写関連因子をウェスタンブロッティングで検出したが、顕著なタンパク量の変化は観察されなかった。しかしながら、これらの因子が RNA ポリメラーゼ II へと正常にリクルートされているかどうかは明らかになっていない。今後は、クロマチン免疫沈降実験などにより、転写関連因子のリクルートを調べることでメカニズムを明らかにできるかもしれない。

(2) 種々の RNA 結合タンパク質を細胞で過剰発現させ、それらの細胞をスプライシング阻害剤で処理したところ、いくつかの RNA 結合タンパク質を発現させた細胞では、転写活性が回復していた。また、スプライシング活性には影響を与えなかった。これらのことから、RNA 結合タンパク質は、スプライシング活性を上昇させることで結果的に転写を回復させるわけではなく、直接転写因子に働きかけている可能性が高い。しかしながら、これらの RNA 結合タンパク質の過剰発現によっても、転写関連因子のタンパク量には影響がなかったことから、転写関連因子のリクルートに影響を及ぼしている可能性がある。また、そのうちの一つの RNA 結合タンパク質は mRNA の安定性にも影響を与えていることが明らかとなった。この点についても、将来的に明らかにしていきたい。

コンドロイチン硫酸の発現調節酵素による骨格筋分化・再生制御

北川 裕之

(神戸薬科大学薬学部)

【目的】

超高齢化社会を迎えた本邦において、自立性喪失の要因の一つである筋萎縮症(サルコペニア)は、健康寿命の延伸のみならず、要介護状態への移行を防ぐ上で克服すべき重要な課題である。これまでに我々は、硫酸化多糖の代表格で、主要な細胞外マトリックス(ECM)成分であるコンドロイチン硫酸(CS)鎖の一過的な発現低下が骨格筋分化の進行促進に必要なこ

と、また、細菌由来の CS 分解酵素（コンドロイチナーゼ ABC: ChABC）を筋損傷部位に単回投与することによって、筋損傷モデルマウスの再生促進や、筋ジストロフィーモデルマウスの症状改善に著効を示すことを見出した^{1,2)}。したがって、ChABC 投与のように、筋組織内の CS 鎖の発現を一過的に減少させる手段は、骨格筋自身のもつ再生能力を賦活化し、サルコペニアの進行遅延や改善を図る有効な治療戦略として、その応用が期待される。しかしながら、ChABC は、CS 鎖のみならず、CS 鎖に並ぶ ECM 成分であるヒアルロン酸の分解にも寄与すること、また、ChABC 処理により生じる CS 鎖の分解産物は、哺乳類組織中には通常存在し得ないものであり、強い抗原性を有することが知られている。そのため、ChABC に代わるより安全性の高い酵素、すなわち、「骨格筋分化・再生過程の進行を正に制御する哺乳類由来の CS 鎖の発現調節酵素」の同定が望まれている。そこで本研究では、個体レベルでの骨格筋分化・再生に寄与する CS 鎖の発現調節酵素の同定を目的とした。

【方法】

骨格筋再生過程において、CS 鎖の発現量低下に貢献する調節酵素を同定するため、実験的筋損傷モデルマウスの再生途上筋や筋衛星細胞の休止・活性化状態における CS 鎖の生合成／分解系に関与する酵素群の発現動態を調べた。また、当該調節酵素の発現プラスミドを電気穿孔法によりマウス後肢の筋肉内へ局所導入した筋線維上における CS 鎖の発現変化の有無を評価した。

【結果・考察】

哺乳類において CS 鎖の分解に寄与するとされる HYAL ファミリーメンバーに着目したところ、特定の HYAL タンパク質のみが筋損傷に同調した発現変動を示すことが分かった。本酵素の発現シグナルは、損傷部位における浸潤細胞や再生途上筋周囲の筋衛星細胞と思われる細胞で強く観察された。単一筋線維培養系を用いた解析から、当該 HYAL タンパク質の発現は、活性化した筋衛星細胞で特異的に誘導されることがわかった。本酵素の発現プラスミドを導入した筋線維で CS 鎖の発現低下が観察された。

これらのことから、特定の HYAL タンパク質が、局所的な CS 鎖の発現低下に寄与し、骨格筋再生を助長する細胞自律的な調節酵素である可能性が示唆された。本

酵素を利用したサルコペニア克服のための新たな治療法の確立に繋がることが大いに期待される。

【文献】

- 1) Mikami, T., Koyama, S., Yabuta, Y., & Kitagawa, H.: Chondroitin sulfate is a crucial determinant for muscle development/regeneration and improvement of muscular dystrophies, *J. Biol. Chem.*, **287**, 38531 (2012).
- 2) Mikami, T. & Kitagawa, H.: Biosynthesis and function of chondroitin sulfate, (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 4719 (2013).

神経特異的メタロプロテアーゼ DINE の新たな機能解析

木 山 博 資

(名古屋大学医学系研究科)

【目的】

運動ニューロンの軸索損傷時に発現が促進する分子の探索過程で、膜一回貫通型の新規メタロプロテアーゼを我々は 2000 年に同定し、Damage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE) と名付けた (Kiryu-Seo *et al*, PNAS 2000). DINE (ECEL1) は、エンドセリンを切り出す ECE や A β を分解するネプリライシン (NEP) と極めて構造が類似しているが、基質は共有しない。DINE は成熟神経系では、末梢や中枢を問わず神経軸索障害に鋭敏に応答して強力な発現誘導がかかる。このことは、神経・精神疾患をはじめ神経細胞の障害において、DINE が何らかの重要な役割を担っていることを予想させる。DINE ノックアウトマウスは生直後に横隔膜の機能不全により呼吸できず死に至る。この原因は運動神経が標的の骨格筋に至ってから、神経の分岐がうまくいかず、結果として神経筋接合部 (NMJ) の形成が著しく低下することによる。DINE の機能の解明には基質の同定が必要であるが、現在 DINE の基質探索は難渋している。一方で、DINE ノックアウトの生直後の致死性をレスキューすることにより、ノックアウトした成熟動物を用いてさまざまな表現型の解析が可能になった。本研究では、

これらの動物を用いて DINE の機能解明をめざした。

【方法・結果】

胎生期の NMJ 形成を可能にするため、胎生期の運動ニューロンに一過性に発現する Hb9 のプロモーターを用い、その下流で DINE を発現するトランスジェニックマウスを作成し、ヘテロマウスと交配した。これにより、胎生期から生直後の一時期にのみ運動ニューロンで DINE が発現し、致死性を回避できた。このマウスを用いて中枢神経系の再生における DINE の機能解明を行った。DINE の中枢神経再生に関する機能解析には、視神経損傷モデルを用いた。損傷視神経は通常再生しないがザイモザン等で炎症応答を惹起すると一部再生する。DINE ノックアウトでは、これによる視神経再生が著しく阻害された。この結果から DINE は神経軸索再生にとって何らかの役割を担っていると考えられる。

【考察】

DINE は末梢運動神経や知覚神経の軸索再生に加えて、中枢神経系の軸索再生にとって重要な酵素であることが明らかとなった。今後の基質探索によりさらに詳細な機能解明がなされ、神経再生医療に貢献することが期待される。

【文献】

- 1) Kaneko, A., Kiryu-Seo, S., Matsumoto, S. & Kiyama, H.: Damage-induced neuronal endopeptidase (DINE) enhances axonal regeneration potential of retinal ganglion cells after optic nerve injury, *Cell Death & Disease* **8(6)**, e2847,(2017).

放線菌のメロテルペノイド生合成における普遍的脱アミノ化反応に関する研究

葛山 智久

(東京大学生物生産工学研究センター)

【目的】

本研究では、放線菌が生産し抗酸化活性と抗腫瘍活性を示す二次代謝産物、Naphterpin と Furaquinocin (1) の生合成を研究対象とする。これらの天然化合物は、テルペノイド骨格とポリケタイド骨格とが融合

したメロテルペノイドである。Naphterpin や 1 と共通のポリケタイド骨格を持つ Napyradiomycin, Furanonaphthoquinone などのメロテルペノイドも他の放線菌によって生産されることが報告されている。これらメロテルペノイドに共通のポリケタイド骨格は、Naphterpin の生合成遺伝子群 (*nph*) にコードされる NphC-E や、そのホモログである Furaquinocin の生合成遺伝子群 (*fur*) の Fur1-3 によって、5 分子の malonyl-CoA と L-グルタミン酸から 8-amino-flaviolin (8-AF, 2) を経由して形成される。しかしながら、いずれの最終産物のメロテルペノイドにおいても 8-AF にあるアミノ基が存在しない。したがって、8-AF 以降の生合成の過程で芳香環からの脱アミノ化が起こると推定される。しかしながら、その脱アミノ化の詳細な反応機構や触媒する酵素の実体については不明なままである。本研究課題では、この未知の脱アミノ化機構の全容解明を目的としている。

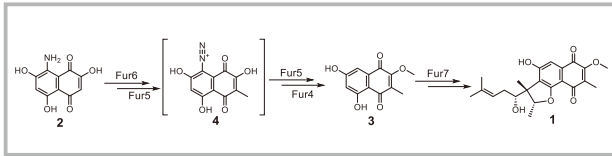
【方法】

1 の生合成においては、ゲラニル基転移酵素 (Fur7) の基質である生合成中間体、2-methoxy-3-methylflaviolin (3) も同定されている。3 には既にアミノ基が存在しないことから、2 から 3 への過程で未知の脱アミノ化が起こると考えられる。Fur4 と Fur6 はいずれも methyltransferase であり、Fur5 は他のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスター間でも高度に保存された機能未知タンパク質である。そこで Fur5 が脱アミノ化反応に直接関与すると推定し、これら Fur4, 5, 6 の各組換え酵素の *in vitro* 解析を実施した。なお、Fur5 は可溶性の組換えタンパク質として取得できなかったため、Naphterpin 生合成クラスター中に存在する Fur5 ホモログ、NphH を代わりに用いた。

【結果・考察】

2 から 3 への変換が、亜硝酸塩と ATP と SAM の存在下で Fur4, Fur6, NphH の 3 つの酵素依存的に起こることを見出した。また、脱アミノ化反応が NphH 依存的に進行することを明らかにした。さらに、この脱アミノ化の過程は、ジアゾ基を持つ化合物 4 を経由すること、亜硝酸塩の窒素原子と 2 のアミノ基に由来する窒素原子とのハイブリッドな窒素ガスが放出されることを明らかにした。このようなジアゾ化合物を経由する脱アミノ

化反応を担う酵素の前例はなく、NphH (Fur5) は新たな反応機構を持つユニークな酵素と考えられる。



シアリダーゼ活性イメージングによる薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出法開発

紅林 佑希

(静岡県立大学薬学部)

【目的】

申請者らは最近インフルエンザウイルスが持つシアリダーゼ酵素活性を高感度、迅速、簡便に蛍光イメージング可能な試薬 BTP3-Neu5Ac を開発し、ウイルスや感染細胞の蛍光イメージングを可能にする技術を確立させた。BTP3-Neu5Ac によるウイルス検出法はウイルスのライブイメージングや蛍光単離法、薬剤耐性の検出に利用可能である。本研究では、BTP3-Neu5Ac を用いて、抗インフルエンザ薬であるシアリダーゼ阻害剤に対する薬剤耐性獲得ウイルスのスクリーニングに利用可能な高感度検出法の確立を試みた。

【方法】

高感度な薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出法を確立するため、BTP3-Neu5Ac によるウイルスシアリダーゼ検出時の酵素反応条件の最適化を行った。ウイルスシアリダーゼの活性に重要な Ca 濃度や反応温度、pH について最適条件を求めた。さらに高感度化を行うためウイルスの遠心フィルタートラップによる簡易濃縮法を検討した。ウイルスをフィルター上に遠心ろ過で濃縮し、フィルター上で BTP3-Neu5Ac と反応させることで検出感度の向上を行った。確立した検出法において、反応時にシアリダーゼ阻害剤を添加することで、シアリダーゼ活性に耐性を示すウイルスのみ酵素反応が起こり蛍光イメージングされる薬剤耐性ウイルス検出法を検討した。

【結果】

反応条件の最適化により既報の BTP3-Neu5Ac によ

るウイルス検出実験に比べ、約 8 倍の高感度化に成功した。興味深いことにウイルスシアリダーゼの活性は 37 度よりも高温条件にした方が高まることが分かり、およそ 50 ~ 60°C 付近が短時間の反応では高い活性を示すことがわかった。さらにフィルターを用いた簡易濃縮法を行い、最適化した反応条件で酵素反応を行うことで最終的に既報の検出実験と比較して 200 倍以上の高感度化に成功した。このウイルス検出法にシアリダーゼ阻害剤を併用することで、薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出を行うことが出来た。

【考察】

ウイルスシアリダーゼの酵素反応条件の最適化と遠心ろ過を利用したウイルス濃縮法を組み合わせることで 200 倍以上の高感度化に成功した。ウイルスシアリダーゼの活性は変異の激しいインフルエンザウイルスにおいてウイルス間で高いレベルで維持された活性であり、本研究においても A 型や B 型の違い、亜型の違いに関わらずウイルス検出および薬剤耐性の判定が可能であった。現在は、衛生検査機関の検体や臨床検体における本法の有用性について検討を行っている。

【文献】

- 1) Kurebayashi, Y. *et al.*: High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity. PLoS ONE1(5): e0156400 (2016).
- 2) Kato, D., Kurebayashi, Y. *et al.*: An easy, rapid, and sensitive method for detection of drug-resistant influenza virus by using a sialidase fluorescent imaging probe, BTP3-Neu5Ac. PLOS ONE 13(7), e0200761 (2018).

細胞内シグナルのアナログ・デジタル変換の鍵となる ERK 核内移行のメカニズム解明

小迫 英尊

(徳島大学先端酵素学研究所)

【目的】

ERK/MAP キナーゼは真核生物に普遍的に存在し、細胞の増殖・生存・分化・がん化などの運命決定に深く関

与している。このような細胞運命決定はデジタルな現象であり、ERK の応答もデジタルなスイッチのように制御されると推測される。我々は最近、ERK のリン酸化応答ではなく、ERK の核内移行のステップでアナログな情報からデジタルな情報に変換されることを明らかにした。このデジタルな核移行応答には ERK 自身のキナーゼ活性が必要であることを示したものの、ERK の核内移行の仕組みについては不明な点が多い。そこで本研究では、最先端プロテオミクス技術を含む様々な方法によって、アナログ・デジタル変換を生み出す ERK の核内移行の分子メカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法と結果】

1) ERK 活性化前後の HeLa 細胞から抽出液を調製し、トリプシン消化後に IMAC (immobilized metal affinity chromatography) によってリン酸化ペプチドを精製した。LC-MS/MS を用いたラベルフリー定量および PRM (parallel reaction monitoring) によるターゲット定量の結果、様々な核膜孔複合体構成因子 (ヌクレオポリン) の多数の部位が ERK 依存的にリン酸化されることが判明した。さらにこれらのヌクレオポリンが ERK によって細胞内で stoichiometric にリン酸化されることを Phos-tag ウェスタンブロット法で明らかにした。

2) リン酸化または非リン酸化ヌクレオポリンをビーズに固相化し、GFP 融合タンパク質と混合して顕微鏡観察することで相互作用を検出する方法 (Bead Halo アッセイ) により、一部のヌクレオポリンは ERK によってリン酸化されるとリン酸化型 ERK との結合が強まることを見出した。

3) 核内移行に伴って ERK と弱く一過的に相互作用する因子を大規模に同定するため、ERK にビオチンリガーゼを融合させて細胞内に発現させ、BioID (近位依存性ビオチン標識) による相互作用因子の大規模同定を行った。その結果、様々なヌクレオポリンや核輸送運搬体を含む多数のタンパク質が同定された。

【考察】

本研究により、細胞外刺激によってリン酸化されて活性化した ERK は様々なヌクレオポリンをリン酸化し、リン酸化型ヌクレオポリンはリン酸化型 ERK との相互作用が増強することで ERK の核内移行を促進するというモデルが考えられた。数理モデルを用いた解析や一部

のヌクレオポリンのノックダウン実験から、ERK はヌクレオポリンのリン酸化を介して自身の核内移行をデジタルな応答となるように制御していることが示唆された。このような ERK の核内移行のデジタルな応答特性が、様々な細胞運命決定において生理的に重要かどうかを明らかにすることは今後の課題であると考えられる。

【文献】

- 1) Shindo, Y., Iwamoto, K., Mouri, K., Hibino, K., Tomita, M., Kosako, H., Sako, Y. & Takahashi, K.: Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling, *Nature Commun.*, 7, 10485 (2016).
- 2) Motani, K. & Kosako, H.: Phosphoproteomic identification and functional characterization of protein kinase substrates by 2D-DIGE and Phos-tag PAGE, *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbapap. 2018. 06. 002 (2018).

レプチンシグナルを制御する新規機構の解明

新 谷 隆 史

(自然科学研究機構基礎生物学研究所)

【目的】

脂肪細胞から分泌されるレプチンは、摂食中枢である視床下部内の弓状核に働いて摂食を強力に抑制するホルモンである。肥満症患者の多くは血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず、レプチンによる摂食量や体重の減少が認められない。すなわち、視床下部において「レプチン抵抗性」と呼ばれるレプチンの作用不全が生じることが知られている。しかしながら、レプチン抵抗性の発症機序は十分に明らかになっておらず、その治療法も見つかっていない。

本研究においては、受容体型プロテインチロシンホスファターゼである PTPRJ によるレプチンシグナルの制御について解析を行った。さらに、PTPRJ のレプチン抵抗性発症における役割について解析した。

【方法と結果】

Ptprj 遺伝子欠損マウスを用いて PTPRJ によるレプチンシグナルの制御機構を解析した。 *Ptprj* 欠損マウスは野生型マウスに比べて摂食量が少なく、脂肪量が少ないため低体重であった。また、 *Ptprj* 欠損マウスの脳室内にレプチンを投与すると、野生型マウスに比べてレプチンシグナルの情報伝達分子である STAT3 の活性化が顕著に亢進するとともに摂食量及び体重が有意に減少することが観察された。生化学的解析から、PTPRJ はレプチンシグナル伝達に必須の役割を果たしているプロテインチロシンキナーゼの JAK2 を脱リン酸化することでレプチン受容体の活性化を抑制していることが判明した。実際に、PTPRJ に対する阻害剤を作用させると、JAK2 及びレプチン受容体のリン酸化が亢進した。一方、PTPRJ のレプチン抵抗性の獲得における役割について検討したところ、高脂肪食摂取により視床下部において PTPRJ の発現が上昇することが明らかになった。さらに、 *Ptprj* 欠損マウスを高脂肪食で長期間飼育しても野生型マウスのようにレプチン抵抗性は発症しなかった。また、ウイルスを用いて弓状核で PTPRJ を高発現させるとレプチン抵抗性が生じた。

【考察】

本研究から、PTPRJ が視床下部におけるレプチンシグナルの制御において重要な役割を果たしているとともに、肥満時に視床下部において PTPRJ の発現が上昇することがレプチン抵抗性の要因であることが示唆された。一方、我々は、PTPRJ がインスリン受容体を基質とすることでインスリンシグナルを抑制していることを既に明らかにしている。このため、PTPRJ の活性阻害剤は、肥満症及び糖尿病の新規の治療薬となることが期待される。

【文献】

Shintani, T., Higashi, S., Suzuki, R., Takeuchi, Y., Ikaga, R., Yamazaki, T., Kobayashi, K. & Noda, M.: PTPRJ inhibits leptin signaling, and induction of PTPRJ in the hypothalamus is a cause of the development of leptin resistance. *Sci. Rep.*, 7, 11627 (2017).

in-cell NMR による細胞中のライソゾーム病関連酵素の構造解析

菅 瀬 謙 治

(京都大学大学院工学研究科)

【目的】

ライソゾームは、細胞中で不要となった生体分子を分解するオルガネラである。ライソゾームの加水分解酵素に異常があると分解されるべき物質が老廃物として体内に蓄積してしまう。異常がある酵素に応じて様々な症状を示し、多くの場合、若くして死に至る。これらの疾患は総じてライソゾーム病と呼ばれる。これまでに、正常な酵素を外部からエンドサイトーシスを介してライソゾームに取り込ませる酵素補充療法と呼ばれる治療法が開発されている。しかし、酵素補充療法で導入した全ての酵素がプロセッシングにより成熟してライソゾームに移行しているか否かが判断できていない。この問題は必要な投与量や投与方法を最適化する上で重要である。本研究では、当研究室が開発した in-cell NMR を用いて、酵素補充療法を模倣して外部から導入した酵素のライソゾーム内構造を解析するための方法論開発を行った。解析対象としては、まずはライソゾームタンパク質の約 10% を占めるヒトカタレプシン D (hCTSD) を選定した。

【方法】

hCTSD は、細胞内でマンノース 6 リン酸 (M6P) 修飾されてライソゾームに運ばれる。しかし、M6P 修飾 hCTSD を大量調製するのは極めて困難である。そこで、本研究ではライソゾーム移行を誘導する GILT と呼ばれるペプチド性タグを用いた。また、導入する hCTSD の NMR シグナルを感度良く観測するためにリジン残基の ¹³Cジメチル化を施した。従来の in-cell NMR では ¹⁵N アミド基を測定するが、¹³Cジメチル化リジンでは、同じ位置に 6 つの ¹Hシグナルが現れるため感度が 6 倍に向上する。

【結果】

hCTSD が大腸菌発現系で封入体として発現されたため、まずはリフォールディング条件を検討した。その結果、8M 尿素と 0.4M アルギニン溶液で封入体を可溶化し、ゆっくりと尿素とアルギニンを抜くことでリフォー

ルディングに成功した。C末端に GILT タグを融合した hCTSD-GILT の場合でも、同様にリフォールディングし、活性も有していた。さらに、hCTSD-GILT を HeLa 細胞に添加したところ、ライソゾームに移行することが確認された。また、hCTSD-GILT を ¹³Cホルムアルデヒドとジメチルアミンボランを用いてリジン残基のジメチル化することに成功した。

【考察】

現在までに、ライソゾーム内の hCTSD を in-cell NMR で解析するための試料が調製できた。しかし、これまでのところ、感度が足りないためかライソゾーム内の hCTSD のシグナルを in-cell NMR で検出するに至っていない。そこで、今後は、HeLa 細胞に添加する hCTSD-GILT の量の最適化や、NMR 管内の培地を循環し細胞の寿命を延長させるバイオリアクターを使用して、hCTSD のシグナルの検出を試みる。

真核生物における糖鎖へのピルビン酸転移酵素の特性解析と酸性糖鎖の生理的役割の解明

竹川 薫

(九州大学農学研究院)

【目的】

生物の細胞表層糖鎖は、多くの場合細胞表面を負電荷にすることに貢献している。細胞表層が酸性化している理由としては、細胞への物質の流入や排出、細胞同士の接着や病原体の宿主への接着などに重要な役割を担っている。数多くの酸性糖類、例えばウロン酸、ムラミン酸やリン酸化・硫酸化糖、さらにシアル酸などがこれまでに報告されているが、糖にピルビン酸が付加したピルビン酸化 (Pv化) 糖も存在する。糖鎖への Pv の付加は、原核細胞において普遍的な酸性糖鎖の構成成分として広く存在しているが、真核生物において糖鎖への Pv の付加に関する報告は大変少ない。真核微生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の糖鎖末端にはガラクトースの 4 位と 6 位に Pv がケタール結合している。我々はこれまでに糖鎖への Pv の付加を触媒する転移酵素が Pvg1 であることを証明した¹⁾。さらに Pvg1 の立体構造解析を明らかにして Pv 付加の反応機構についても明

らかにした²⁾。そこで本研究では、本酵素の生物界における分布や糖鎖への Pv 付加の生物学的役割について解析することを目的とした。

【方法・結果】

これまでに真核微生物において糖鎖へのピルビン酸の付加が報告された例は分裂酵母以外はない。そこでデータベースにより分裂酵母の Pv 転移酵素と相同性の高いタンパク質を検索したところ、*Fusarium* や *Trichoderma* などの糸状菌にもホモログが存在することがわかった。そこで、これらの遺伝子を各種糸状菌ゲノムおよび cDNA ライブラリーから増幅し、大腸菌を用いてタンパク質を生産した。組換えタンパクと基質としてホスホエノールピルビン酸と 4-ニトロフェニル糖を添加して反応を行ったが、酵素生産物を得ることができなかった。また、分裂酵母の *pvg1* 破壊株に糸状菌のホモログ遺伝子を発現させても、糖鎖への Pv の付加は確認できなかった。これらの結果は、糸状菌と分裂酵母の転移酵素の基質特異性が異なっていることが示唆された。

【考察】

本研究では、分裂酵母 Pvg1 と相同性の高い遺伝子が数種の糸状菌ゲノムに存在することがわかったが、これらのホモログ遺伝子が実際に転移活性を有していることは明らかにできていない。そこで現在は各種糸状菌より細胞表層多糖を調製して、NMR 解析により糖鎖へ Pv が実際に付加しているか解析を行っている。また最近、我々は 3 つの分裂酵母 (*S. japonicus*, *S. octosporus*, *S. cryophilus*) ゲノムに *pvg* ホモログ遺伝子が存在することを見出し、実際にこれらの遺伝子は細胞内で発現していることも確認している。しかしながら、これらの株の糖鎖中への Pv 付加量には差があることもわかった。今後は糸状菌類の糖鎖への Pv 付加について構造解析を網羅的に行うことにより、転移酵素の基質特異性と機能を明らかにしていきたい。

【文献】

- 1) Yoritsune, K., Matsuzawa, T., Ohashi, T. & Takegawa, K.: The fission yeast Pvg1p shows galactose-specific pyruvyltransferase activity, FEBS Lett., 587, 917-921 (2013).
- 2) Higuchi, Y., Yoshinaga, S., Yoritsune, K., Tate-

no, H., Hirabayashi, J., Nakakita, S., Kanekiyo, M., Kakuta, Y. & Takegawa, K.: A rationally engineered yeast pyruvyltransferase Pvg1p introduces sialylation-like properties in neo-human-type complex oligosaccharide, *Sci. Rep.*, **6**, 26349 (2016).

カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素による扁桃体機能修飾と情動制御

竹本 さやか

(名古屋大学環境医学研究所)

【目的】

情動（怖い、嬉しい、悲しいなど）は、環境や遺伝的背景に応じて変化し、過度なストレスなどによる情動異常が、現代における社会問題ともなっている。我々は、モデル動物を用い情動変化を引き起こす分子メカニズムの解明を目指している。本研究では、神経細胞の可塑的变化に重要な役割を果たすカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMK)¹⁻³⁾のうち、自らが同定・クローニングを行った CaMKI γ に焦点を当て、新たな情動制御因子であることを明らかとすることを目的とした。

【方法・結果】

CaMKI γ のノックアウトマウスの行動学的評価を推進し、ノックアウトマウスにおける情動行動の異常を見出した。また、特に本酵素の発現の多い、扁桃体における機能を明らかにするため、アデノ随伴ウイルスを用いてマウス扁桃体において本酵素を過剰発現させた際の行動学的評価を実施し、一部の行動学的評価において対照的な結果を得た。更に、脳内および神経細胞内局在を明らかにするために組織学的な検討を推進し、本酵素は不快情動中枢を構成する扁桃体の特定細胞種において多く発現し、特に樹状突起スパインに局在することを見出した。

【考察】

細胞内 Ca²⁺上昇によって活性化されるカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素は、神経 Ca²⁺上昇を細胞内生化学的变化、即ちリン酸化に変換し、神経可

塑性を誘導する主要な酵素であることが分かっている。CaMKI γ の遺伝改変マウスを用いた本研究により、本酵素は“扁桃体中心核シナプスにおいて可塑的变化を担う主要な Ca²⁺エフェクター酵素である可能性が高い”ことが支持された。今後、その上流・下流のシグナリングネットワークを解明することで、情動制御に寄与する新規カルシウム依存性シグナリング経路の全貌解明を目指したい。

【文献】

- 1) Takemoto-Kimura, S. et al.: Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J. Neurochem.* 141 (6): 808-18, 2017.
- 2) Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S. et al.: Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29 (43): 13720-9, 2009.
- 3) Takemoto-Kimura, S. et al.: Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ . *Neuron* 54 (5): 755-70, 2007.

MAP キナーゼの刺激特異性維持に働く二段階活性化機構の解析

館 林 和 夫

(東京大学医科学研究所)

【目的】

酵母は細胞外の高浸透圧環境に適応するために細胞内グリセロール濃度を上昇させるが、ここで働くのが高浸透圧に応答して活性化する Hog1 MAP キナーゼ (MAPK) 経路である。我々は高浸透圧を感知し Hog1 MAPK の活性化に働くセンサーとして複数の膜タンパク質を同定してきた^{1,2)}が、Hog1 の活性化には上流の膜センサーからの活性化シグナルに加え、Hog1 自身の高浸透圧感知と応答が必要であることを示唆する新たな知見を得た。Hog1 MAPK が高浸透圧に直接応答し活性化する分子機構を解明し、その生物学的意義をシグナ

ル伝達の面から理解することを目的として本研究を行った。

【方法、結果と考察】

酵母 *S. cerevisiae* の高浸透圧応答に働く Hog1 MAPK 経路では、複数の膜センサーが高浸透圧を感知すると、下流のキナーゼが順次リン酸化されて、最終的に Hog1 MAPK がリン酸化・活性化される。上流の膜センサー欠変異体や、MAPK カスケードの各種活性型変異体を用いた遺伝学的解析により、Pbs2 MAPKK が Hog1 をリン酸化するステップが、高浸透圧により正に制御されることを見出した。さらに、変異体スクリーニングにより高浸透圧刺激なしでも上流からのリン酸化を受けやすくなった恒常活性型 Hog1 変異体の単離に成功し、これを利用して Hog1 活性化の分子機構を解析した。その結果、酵母の Hog1 活性化には、センサー膜タンパク質を介した上流からの活性化シグナルと同時に、Hog1 自身が刺激を感知しリン酸化を受けやすい構造に変化する必要がある、という Hog1 の 2 段階活性化モデルが導出された。

「高浸透圧刺激が MAPK の上流因子と MAPK 自身の両者に作用して初めて Hog1 が活性化する」という Hog1 の 2 段階活性化機構は、上記活性型 Hog1 を用いた解析により、非刺激時における Hog1 の誤った活性化の抑制に働くことがわかった。さらに、高浸透圧以外の刺激によって活性化された別の MAPK 経路から Hog1 への不適切な活性化 (=シグナルの混線) を防ぐためにもこの機構は働いており、MAPK の 2 段階活性化機構がシグナル特異性の維持に貢献していることが示された。

【文献】

- 1) Tatebayashi K, *et al.*: Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nature Communications*, **6**: 6975 (2015)
- 2) Tatebayashi K, *et al.*: Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* **26**: 3521-3533. (2007).

脳梗塞後の初期に大脳皮質ニューロンで発現する転写因子 Npas4 の解析

坪井 昭夫

(大阪大学大学院生命機能研究科)

【目的】

脳血管障害は、本邦の死因の 4 位となる極めて発生頻度の高い疾患である。しかしながら、虚血により脳組織が一度損傷を受けると、失われたニューロンを再生させる効果的な治療法は、未だ確立されていない。脳梗塞により血流が阻害されると、梗塞巣の内部では、酸素や栄養の不足により大多数のニューロンは死滅する。一方、梗塞巣の境界には、血流が低下しながらも細胞死を免れている領域 (penumbra) が存在し、ここでのニューロンの細胞死を防ぐことが、臨床医学上の重要課題となっている¹⁾。

【方法と結果】

1. 中大脳動脈閉塞 (MCAO: middle cerebral artery occclusion) の手術を行い、梗塞 (0.5 時間)・再灌流モデルマウスを作製した。
2. 梗塞 2 時間後の大脳皮質において、梗塞巣との境界領域 (penumbra) で発現が変化する遺伝子を、RNA シークエンシング法によりスクリーニングして、発現の変化する遺伝子をリストアップした。
3. そのリストの中から、梗塞側の penumbra での発現が反対側と比べて増加する遺伝子を、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて 27 個に絞り込んだ (申請者ら、未発表)。これらの中でも、転写因子 Npas4 遺伝子は大脳皮質の興奮性ニューロンで顕著に発現誘導され、梗塞巣の境界に沿うような発現パターンを示すことが分かった (申請者ら、未発表)。
4. Npas4 欠損マウスでは野生型と比べて、梗塞後の大脳皮質ニューロンの生存率が減少し、梗塞巣のサイズが拡大することが分かった (申請者ら、未発表)。
5. Npas4 欠損マウスの梗塞後の運動機能について、行動実験を用いて解析したところ、顕著に悪化することが分かった (申請者ら、未発表)。

また最近, 申請者らは, 健常脳における嗅球介在ニューロンの神経活動依存的なスパイン形成に, Npas4 が必須の役割を果たすことを見出した²⁻⁴⁾. これらの知見から, 転写因子 Npas4 は, 健常時のみならず障害時においても, ニューロンの発達や生存を促進することで, 神経回路の再編に関与していることが示唆された (申請者ら, 未発表).

【考察と展望】

脳梗塞により損傷した神経細胞や神経回路を再構築する有効な方法の開発は, これからの超高齢化社会において喫緊の課題の一つである. しかしながら, 現在の脳梗塞の治療法は, プラスミノゲンアクチベーターを用いた血栓溶解療法など, 「血流を速やかに回復させることで, 既存の神経細胞や神経回路を守る」ことに重点をおいたもので, 発症から治療までに有効な期間が制限されている. 本研究は, 申請者らが見出した「健常脳における神経回路の再編機構」を, 「損傷脳における神経回路の修復機構」と比較検討することにより, これらの相違を明らかにするのみならず, 脳梗塞に対する新規治療法の開発にもつなげるという点で独創的であり, 期待される.

【文献】

- 1) Lo, E. H.: A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke, *Nat. Med.*, **14**, 497-500 (2008).
- 2) Yoshihara, S., Takahashi, H., Nishimura, N., Kinoshita, M., Asahina, R., Kitsuki, M., Tatsumi, K., Furukawa-Hibi, Y., Hirai, H., Nagai, T., Yamada, K. & Tsuboi, A.: Npas4 regulates Mdm2 and thus Dcx in experience-dependent dendritic spine development of newborn olfactory bulb interneurons, *Cell Rep.*, **8**, 843-857 (2014).
- 3) Yoshihara, S., Takahashi, H. & Tsuboi, A.: Molecular mechanisms regulating the dendritic development of newborn olfactory bulb interneurons in a sensory experience-dependent manner, *Front. Neurosci.*, **9**, Article 514 (2016).
- 4) 吉原誠一, 坪井昭夫: 転写因子 Npas4 による神経活動依存的なシナプス形成の制御機構, 生化学 (日

本生化学会誌), **88**, 220-224 (2016).

直鎖状ユビキチン鎖生成酵素 (LUBAC) を標的とした炎症シグナル制御

徳 永 文 稔

(大阪市立大学大学院医学研究科)

【目的】

NF- κ B は, 炎症や自然・獲得免疫応答に関連する遺伝子発現制御を司る重要な因子である. 我々は複合体型ユビキチンリガーゼ (LUBAC) を発見し, LUBAC がユビキチンのN末端 Met1 を介する「直鎖状ユビキチン鎖」という新規ユビキチン鎖を生成し, NF- κ B 活性化を導くことを見出した¹⁾. また, LUBAC 活性制御の不全は, 多様な疾患発症に関わることを示した^{2,3)}. そこで本研究で我々は, LUBAC による直鎖状ユビキチン鎖生成を足場とした NF- κ B 活性化経路を特異的に制御する化合物を探索・開発する目的で, LUBAC の酵素活性阻害剤などを探索し, 細胞・個体レベルで評価することを目的とした.

【方法】

細胞レベルでの解析として, 各種炎症性サイトカインや病原体分子パターンなどによって惹起される炎症・免疫シグナル伝達の活性化をルシフェラーゼアッセイ, 定量PCR, ELISA, イムノブロットによって解析した. また, B細胞リンパ腫など癌細胞に対する選択的な細胞毒性や細胞死への影響をMTTアッセイ, カスパーゼ活性化により調べた. さらに, 標的分子に対する阻害剤の作用機序を酵素・生化学的に解明するとともに, 乾癬など疾患モデルマウスを用いて薬効の解析を行った.

【結果】

まず我々は, 25万個の化合物ライブラリーからLUBACの直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制する化合物の探索を行い, 新規化合物 (HOIPIN-1; HOIP inhibitor-1) を同定した⁴⁾. HOIPIN-1の酵素阻害機構として, 活性中心サブユニットであるHOIPのRING2ドメイン内に位置するCys930残基に結合し, E2から活性中心であるCys885残基へのユビキチン転移を阻害することでRBR型E3に特有なRING-HECT-hybrid反

応を阻害し、直鎖状ユビキチン鎖生成を抑制することを突き止めた。また、HOIPIN-1がLUBACの基質であるNEMOの細胞内直鎖状ユビキチン化を抑制し、TNF- α 、IL-1 β 、CD40L、T細胞受容体(TCR)、LPS、CpGなど広範な刺激によって引き起こされるNF- κ B活性化を顕著に抑制した。さらに、LUBACの活性亢進が報告されている活性化B細胞様びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(ABC-DLBCL)細胞株に対して、顕著にNF- κ B活性抑制やアポトーシスの亢進を介して増殖抑制能を示すと共に、イミキモド誘発性乾癬モデルマウスに対しても表皮肥厚やサイトカイン発現など病態の抑制効果を示した(論文投稿中)。

【考察】

本研究から、HOIPIN-1はユビキチン修飾系やNF- κ Bシグナル研究の重要なツールになるのみならず、NF- κ B活性亢進が関与する疾患治療を見据えた新たな創薬シーズとなる可能性が示された。

【文献】

- 1) Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K. & Iwai, K.: Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation, *Nat. Cell Biol.* 11,123 (2009).
- 2) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakanano, H. & Iwai, K.: SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex, *Nature* 471, 633 (2011).
- 3) Tokunaga, F.: Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J. Biochem.* 154, 313 (2013).
- 4) Katsuya, K., Hori, Y., Oikawa, D., Yamamoto, T., Umetani, K., Urashima, T., Kinoshita, T., Ayukawa, K., Tokunaga, F. & Tamaru, M.: High-throughput screening for linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) selective inhibitors using homogenous time-resolved fluorescence (HTRF)-based assay system, *SLAS Discov.* (in press).

転移 RNA の修飾と癌転移の分子基盤研究

富田 耕造

(東京大学大学院新領域創成科学研究科)

【目的】

BCDIN3D蛋白質はメチル基転移ドメインを有する蛋白質であり、乳癌細胞において発現が向上しており、癌転移にも関与していることが報告されてきた。また、BCDIN3Dの発現向上と乳癌予後不良との関連性も報告されてきている。我々は、最近、BCDIN3Dが細胞質tRNA^{His}の5'リン酸基を特異的にメチル化する酵素であることを見出している。本研究では、BCDIN3D蛋白質によるtRNA^{His}の特異的認識機構、RNAメチル化の制御機構を明らかにすることを目指した。

【方法】

BCDIN3DによるtRNA^{His}の特異的認識機構の解明のため、1) tRNA^{His}変異体を用いた生化学的解析、2) tRNA結合モデルによるBCDIN3D変異体の生学的解析、そして3) 構造生物学的手法を用いた解析することを試みた。

【結果】

細胞質tRNA^{His}は他のtRNA種と比較した時に、ユニークな特徴を有している。tRNA^{His}は前駆体tRNAからプロセスされた後、その5'末端にtRNA^{His}特異的なグアニン転移酵素(tRNA^{His} Guanyltransferase)によって、3'から5'の方向にグアノシンが付加される(G-1)。結果、通常のtRNAはアクセプターステムの長さが7ヌクレオチド(nt)であるが、tRNA^{His}のみ8ntの長さをもつ。また、アクセプターステムの上部はG-1: A73とミスペアが存在する。変異tRNA^{His}を用いた生化学的な解析から、BCDIN3DはこれらのtRNA^{His}のみにみられる特異的な特徴を認識していることが明らかになった。また、BCDIN3Dのモデル構造、およびtRNAとの複合体モデルを作成したところ、BCDIN3DはtRNA^{His}のアクセプターステムの長さを測ることによってtRNA^{His}に対する特異性を獲得していることが示唆された。また、RNA認識に関わると考えられるアミノ酸の変異BCDIN3Dではメチル化活性が低下していた。

【考察】

tRNAの変異体, BCDIN3Dの変異体をもちいた生化学的な解析, および tRNA^{His} と BCDIN3D の複合体モデルからも, BCDIN3D が tRNA^{His} 特異的なメチル化酵素であることが強く示唆された。現在, BCDIN3D 単体, および BCDIN3D-tRNA^{His} 複合体の結晶化を進めており, BCDIN3D の tRNA^{His} に対する特異性について原子レベルでの解析を行う予定である。

【文献】

- 1) Tomita, K. & Liu, Y.: Human BCDIN3D is a cytoplasmic tRNA^{His}-specific 5'-monophosphate methyltransferase. *Front. Genet.* doi: 10. 3389/fgene. 2018. 00305, (2018).
- 2) Tomita, K.: A possible link between specific transfer RNA methylation and tumorigenic phenotype of breast cancer. *RNA & DISEASE*, 4: e1530; doi: 10.14800/rd. 1530, (2017).
- 3) Martinez, A., Yamashita, S., Nagaike, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. & *Tomita, K.: Human BCDIN3D Monomethylates Cytoplasmic Histidine Transfer RNA. *Nucleic Acids Res.* 45, 5423-5436., (2017).

れの代謝酵素の分解に関わるユビキチンリガーゼを同定し, 分解の仕組みを明らかにすることで, 代謝の新しい制御機構を明らかにしようとしている。

脂肪滴は脂質一重膜からなるオルガネラで, トリアシルグリセロールを貯蔵, 供給する役割をもつ。本研究では, リポリシス (脂肪分解) の制御について, 脂肪滴タンパク質の安定性を切り口に解析を進めた。

【方法】

データベースから半減期の短いタンパク質を抽出した。脂肪滴に局在するものについて, エピトープタグを融合したタンパク質を発現させ, シクロヘキシミドチェイス実験によって半減期を徹底的に調べた。短寿命であることが確認されたタンパク質について, ウサギポリクローナル抗体を作製した。これを使って, ユビキチンリガーゼの変異株ライブラリーでシクロヘキシミドチェイス実験を行い, 分解に関わるユビキチンリガーゼの候補を探索した。

E1 (ユビキチン活性化酵素) と E2 (ユビキチン連結酵素) を大腸菌で発現させ, 精製した。E3 (ユビキチンリガーゼ) を昆虫細胞から精製した。酵母から脂肪滴を精製するスキームを検討した。さらに, ユビキチンも大腸菌で発現, 精製した。これらを混合して, 試験管内ユビキチン化反応を行った。

【結果】

ユビキチン化反応のメカニズムを調べるには, 試験管内での再構成実験がカギとなる。すでに我々は, 試験管内ユビキチン化反応について, 一定レベルの経験があった (たとえば, 酵母ライセートを用いた *in vitro* 翻訳系, 酵母ライセートとミクロソーム画分を用いた ERAD の再構成, 代謝酵素のユビキチン化反応など)。技術の幅をさらに広げるために, イギリス MRC の研究室に約 2 週間滞在し, ウサギ網状赤血球を使ったタンパク質の翻訳, ユビキチン化反応などについて, 具体的な実験手法を習得した。諸々の技術を結集させ, 脂肪滴タンパク質のユビキチン化反応を行った結果, ユビキチン化と思われるバンドの検出に成功した。また, 我々が着目している脂肪滴タンパク質の分解が, 熱ストレスによって促進される可能性も見出した。

【考察】

これまでに, 試験管内ユビキチン化反応に必要なタン

ユビキチン・プロテアソーム系によるリポリシスの制御機構の解明

中 務 邦 雄

(名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科)

【目的】

近年, 様々な代謝酵素の安定性がユビキチン・プロテアソーム系によって制御されていることが分かってきた (*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2015; *Mol. Cell* 2015 ほか)。しかし, タンパク質の半減期と翻訳後修飾について, 質量分析を用いた網羅的な解析が進むにつれ, 分解の意義が明らかでない代謝酵素が想像以上に多いことが分かってきた。我々は, 半減期の短い代謝酵素をデータベースから抽出し, 特異的な抗体を作製して, 安定性を実験的に確認する作業を進めている。さらに, それぞ

パク質の精製標品を得ることができた。また、脂肪滴画分の単離に成功した。さらに、ユビキチン化と思われるバンドの検出にも成功した。現在はデータの質を上げる工夫を行っている。熱ストレスとの関連については、基質の翻訳後修飾の変化などにも着目する必要がある。今後は、脂肪滴上のタンパク質の分解を制御するメカニズムをさらに明らかにすることで、脂肪滴の生成、およびリポリシスの制御機構の解明につなげたい。

【文献】

結果の一部は、日本生化学会などで発表した。

プロテオミクスによるアミノ酸膜輸送体集合体の同定とその下流シグナル全体像の解明

永 森 收 志

(奈良県立医科大学)

【目的】

膜輸送体は、膜を隔てた物質の不均衡を作り出すことで様々な生体機能に関わっているが、その研究は可溶性タンパク質に比べると進んでいない。例えば、アミノ酸輸送を司るアミノ酸トランスポーターは、ヒトでは約60分子が報告されているが、分子の検出ですら容易でないため、発現プロファイルの把握は困難である。我々は、古典的な生化学的手法による生体膜調整法と最新の質量分析器によるプロテオミクスを組み合わせることで、アミノ酸トランスポーターを含む膜タンパク質を網羅的に同定・定量する測定系を構築した。

がん細胞では、急速な細胞増殖を保障するため、アミノ酸トランスポーターの発現が亢進している。前述の網羅的定量プロテオミクスにより、30種類以上のがん細胞株におけるアミノ酸トランスポーター発現プロファイルを取得し、がん細胞におけるアミノ酸トランスポーター発現の特徴を明らかにし、さらに網羅的リン酸化プロテオミクスによって細胞内に輸送されたアミノ酸により起因される生体反応をリン酸化シグナルの変動として捉え、その全体像を解析することを目的とした。

【方法】

網羅的定量プロテオミクスによるアミノ酸トランス

ポーター発現プロファイル取得：30種類以上のがん細胞株から、細胞膜画分を精製し、定量型質量分析 nano LC-MS/MS システムを用いてプロテオーム解析を行った。また、網羅的プロテオミクス予備検討の結果を基に、がん細胞で発現が上昇しているアミノ酸トランスポーターに対する抗体を使用し、スクリーニングにより選択した界面活性剤を用いて免疫沈降を行い、共免疫沈降物を質量分析計で解析し、アミノ酸トランスポーター複合体を同定した。

網羅的リン酸化プロテオミクスによるアミノ酸により起因されるシグナル解析：細胞を任意のアミノ酸やトランスポーター阻害薬存在下・非存在下で培養する。培養細胞破碎液をプロテアーゼ処理後、リン酸化ペプチドを精製して iTRAQ 試薬で標識し、イオン交換カラムで分画した後に LC-MS/MS 解析を行った。得られた結果を基にパスウェイ解析を行い、代謝経路、シグナル経路を解析した。

【結果】

30種類以上のがん細胞株の膜タンパク質発現プロファイルを取得した。アミノ酸トランスポーターとして報告のある分子についてデータ解析を行い、がん細胞に典型的なアミノ酸トランスポータープロファイルを明らかにした。多くの必須中性アミノ酸を輸送する LAT1/SCL7A5 および CD98hc/SLC3A2 は、ほとんどの細胞株で発現が上昇していた。さらにリン酸化プロテオミクスにより、LAT1 により取り込まれたロイシンが様々な生体応答に関与していることが示された。

【考察】

多様ながん細胞株のアミノ酸トランスポーター発現プロファイルを得ることで、がん細胞特異的なアミノ酸取り込み機構の存在が示された。中心となる LAT1/SCL7A5 の基質であるロイシンが多くの生体反応に関わっていることから、LAT1 のトランスポーター機能を阻害することにより、これらの生体反応が進まなくなり、がん細胞の増殖抑制が引き起こされることが示唆される。

【文献】

1) Kongpracha, P., Nagamori, S., Wiriyasermkul, P., Tanaka, Y., Kaneda, K., Okuda, S., Ohgaki, R. & Kanai, Y.: Structure-activity relationship of a

novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1). *J Pharmacol Sci.* 133(2): 96-102. (2017).

ユビキチン化酵素の基質タンパク質同定法の確立

島山 鎮次

(北海道大学大学院医学研究院)

【目的】

「ユビキチン化」はタンパク質分解を制御する翻訳後修飾（酵素反応）であり、多くの生命現象を支える極めて重要な翻訳後修飾の一つである。その反応系は、ユビキチンリガーゼ (E3) が選択的に基質タンパク質を認識することによって進む反応である。ヒト遺伝子には 600 種以上のユビキチンリガーゼ (E3) が存在する。したがって個々の E3 に特異的な基質を同定し、基質タンパク質のユビキチン化部位を決定することは、それらが関連する生命現象を理解する上で重要である。本申請では、最近実用化したさまざまな新しい手法を効果的に組み合わせることにより、これまでの問題点を原理的に解消した、これまでとは全く異なった新しい基質同定法を開発する。

【方法】

本申請研究では、TUBE¹⁾とユビキチンレムナント抗体 /K-εGG 抗体（基質タンパク質とユビキチンのイソペプチド結合部分のトリプシン消化断片のペプチドである K-εGG 配列を認識する）²⁾を用いた新規のテクノロジーにより、さまざまなタイプのユビキチンリガーゼ (E3) へ網羅的に適用し、E3-基質関係を網羅的に解析する。

【結果】

RBR 型 E3 である Parkin と TRIM 型 E3 である TRIM28 を用いて、本技術の開発を進めたところ、複数の基質タンパク質候補が同定された。さらに細胞レベルでの解析を進めたところ、実際にそれぞれの E3 で安定性が制御されるタンパク質の存在も明らかになった。

【考察】

本研究により、以下の 4 つの研究上の応用可能性が示された。一つめは、ユビキチン化基質の網羅的解析の実

現可能性である。二つめは、ユビキチン化が関与する疾患の関連解析の可能性である。三つめは、細胞内部位に依存的なユビキチン化の解析の可能性である。四つめは、分解シグナル以外のユビキチン化修飾解析の可能性である。すなわち、「プロテアソームを介した分解」に依存しない手法であるため、分解シグナル以外のユビキチン化修飾の機能解明にも有効である。

【文献】

- 1) Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P. & Rodriguez, M.S.: Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep.* 10, 1250 (2009).
- 2) Xu, G., Paige, J.S. & Jaffrey, S.R.: Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat. Biotechnol.* 28, 868 (2010).

高立体選択的 C-C 結合反応を触媒する人工金属酵素の創製

藤枝 伸宇

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

【目的】

有機合成化学では様々な配位子が反応系に添加され、反応の促進、選択性の向上などに寄与している。シルクタンパク質や血清タンパク質をこれら配位子の代わりに、反応系中に添加することで、小分子では困難な高立体選択的な反応を達成した例が報告されてきた。しかしながら、添加剤としてのタンパク質の有用性は示されているものの、利用するタンパク質の分子量が大きいため、反応点の精密制御が難しく、汎用性に乏しい。一方、金属酵素におけるタンパク質骨格の有用性と白金族元素の反応性を巧みに組み合わせた人工金属酵素の構築が盛んに行われている。つまり、生体がいまだ利用したことのない金属元素を人工的にタンパク質内部に導入することで、種々の触媒活性を示す新規な生体触媒の開発が可能であることが期待されている。我々はタンパク質を機能

性配位子として金属錯体を合成することで、タンパク質を精密制御反応場として利用した錯体触媒として展開することが可能であると考えた。本研究では小型で安定なキュピタンパク質を配位子として用い、高立体選択的 C-C 結合反応の開発を行なった。

【結果と考察】

タンパク質骨格として好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来のキュピタンパク質 (TM1459) に注目した。TM1459 タンパク質は、高い熱的安定性が期待されることに加え、*cis* 位に空いた配位座を提供可能な 4 つのヒスチジンから成る金属結合サイトをもつ。この金属結合サイトのヒスチジン残基に金属イオンを結合させることで、タンパク質骨格がさらに安定化され、非常に安定な生体触媒の構築が期待出来る。一方で、非ヘム金属酵素のモデル化合物として、tris (2-pyridylmethyl) amine (TPA) を配位子として用いた金属錯体が合成され、詳細な特性評価や触媒活性が調べられてきた。当研究室では、TPA-Os 錯体が酸化剤として過酸化水素を用いたアルケンの *cis* ジオール化反応に対して高い触媒活性を示すことを既に報告している¹⁾。本研究ではこのタンパク質の金属結合部位である 4-His モチーフのヒスチジンにアラニンを変異導入し、多様化させた第一配位圏を持つ変異体ライブラリーを構築した (Figure)。これらを用い、2-azacalcone を基質、nitropropane を求核剤としたマイケル付加反応の結果、H52A 変異体でジアステレオ選択性が 1:9 かつ 99% ee(-)、H54A/H58A 変異体でジアステレオ選択性が 1:10 かつ 95% ee(+) となった。さらに立体構造に基づいて、H54A/H58A 変

異体に F104W 変異を導入することでジアステレオ選択性が 1:12 に向上した。また、H52A 変異体では C106N 変異を導入することでジアステレオ選択性が反転した。このように、作製したタンパク質配位子のライブラリーの中から、高い選択性を示す変異体を選択し、さらなる変異導入を行うことで簡便に高選択的の反応系が構築できることを示した。

【文献】

- 1) Fujieda, N., Nakano, T., Taniguchi, Y., Ichihashi, H., Sugimoto, H., Morimoto, Y., Nishikawa, Y., Kurisu, G., & Itoh, S.: A well-defined osmium-cupin complex: hyperstable artificial osmium peroxygenase, *J. Am. Chem. Soc.*, 139, 5149 (2017).

網膜視細胞におけるユビキチン化酵素による光受容制御機構の解析

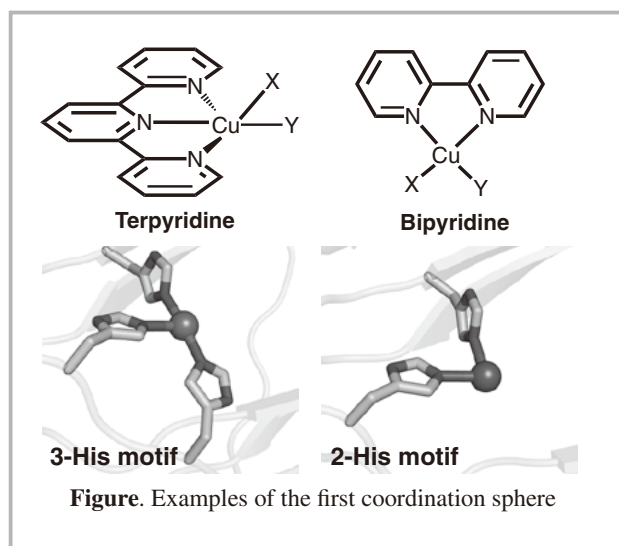
古川 貴久

(大阪大学蛋白質研究所)

【目的】

生物にとって外部環境からの情報を適切な感度で受け取ることは生存や恒常性維持に重要な役割を果たす。網膜は外界からの光情報を受容する中枢神経組織であり、ヒトでは外界から得る情報の 8 割以上を視覚から得ると言われている。網膜には、光センサーとなる視細胞 (桿体視細胞ならびに錐体視細胞) が存在し、この視細胞が受け取った光の刺激は、網膜神経細胞のネットワークを通じて脳に伝えられる。網膜視細胞は繊毛が発達した構造である外節において外界からの光シグナルを受容する。桿体外節はディスクと呼ばれる脂質二重膜が重なった構造を、錐体外節は形質膜が折りたたまれたラメラ状構造をとっており、これら桿体のディスク膜と錐体のラメラ状膜にそれぞれロドプシンや錐体オプシンなどの光受容たんぱく質が存在し、光を受容する。

視細胞は暗所では光受容感度を上昇させて高感度の視覚を得られるようにする一方、明所では感度を低下させることによって応答の飽和を抑制するだけでなく細胞へ



のダメージを防いでいる。しかしながら、視細胞が周囲の光強度に応じて光受容感を調節するメカニズムは不明な点が多い。本研究では、我々が同定した網膜視細胞に強く発現するユビキチン化酵素の機能メカニズムの解析を通じて視細胞の光受容感度の制御機構を明らかにすることを目指す。

【方法】

網膜ユビキチン化酵素の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションや作製した抗体による免疫染色によって観察した。網膜ユビキチン化酵素と標的たんぱく質の生化学的解析を行った。さらに、網膜ユビキチン化酵素遺伝子のノックアウトマウスを作製し、網膜組織の免疫染色解析や網膜電図 (ERG) 測定による生理学的解析などの生体機能解析を行った。網膜ユビキチン化酵素の標的たんぱく質の過剰発現実験を、マウス網膜への生体エレクトロポレーション法を用いて行った。

【結果】

我々は、網膜に強く発現する網膜ユビキチン化酵素の生化学的解析を行い、標的たんぱく質の同定に成功した。網膜ユビキチン化酵素のノックアウトマウスを作製したところ、網膜組織の発生には異常が観察されなかった。次に、網膜ユビキチン化酵素のノックアウトマウスの網膜電図解析を行ったところ、成体マウスにおいて、光受容感度制御に異常が認められた。光受容に関わるオプシンやトランスデューシンなどの変異マウスでは、網膜視細胞の変性が認められるが、興味深いことに網膜ユビキチン化酵素ノックアウトマウスでは網膜組織の変性は認められなかった。さらに、視細胞の光受容による網膜ユビキチン化酵素ならびに標的たんぱく質の分子レベルでの制御メカニズムの解析を行っている。

【考察】

網膜視細胞の光感度調節においては、光の明暗によって視細胞の外節内の Ca^{2+} 濃度の変化が起こることに関連していることは知られてきたが、詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究において、網膜ユビキチン化酵素が標的蛋白質の分解によって、視細胞の光受容感を制御するという予想されていたメカニズムが明らかになった。網膜視細胞は周辺環境の光強度に応じて光に対する感度を調節する明暗順応機構を備えている。視細胞において、暗いところでは光感度を上げることに

よって弱い光を感知することが可能となり (暗順応)、明るいところでは光感度を下げることによって飽和せずに物を見ることができるよう (明順応)。また、明順応は光による視細胞のダメージを軽減する役割を担うと考えられている。我々は、光の明るさが 10 万ルクス以上の晴天下の外界から、0.01 ルクス以下の暗い場所まで、シームレスに物を見ることができると、これは目の光受容感度制御を介した明暗順応の機能によるものである。今回の我々の研究成果によって、今までよく分かっていなかった視細胞の明暗順応の仕組みが明らかになりつつある。

神経新生における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割

松 坂 賢

(筑波大学医学医療系)

【目的】

Elovl6 は炭素数 (C) 12 ~ 16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とし、C18 以上の長鎖脂肪酸を合成する脂肪酸伸長酵素である。我々は、Elovl6 欠損マウスおよび脳特異的 Elovl6 欠損マウスには、脳重量の増加、神経新生の減少、樹状突起スパインの形態異常、空間記憶学習の障害が認められることを見出した (未発表データ)。そこで、本研究では、脳特異的 Elovl6 欠損マウスを用いて、Elovl6 の神経新生と高次脳機能における役割を解明することを目的とした。

【方法】

① *in vivo* 解析：脳特異的 Elovl6 欠損マウスの脳の組織学的解析、神経新生解析、行動解析を行い、脳における Elovl6 の役割を明らかにする。また、Elovl6 欠損マウスおよび脳特異的 Elovl6 欠損マウスの胎生期から各種脂肪酸や動物性脂肪、植物性脂肪、魚油を添加した餌を給餌し、神経新生および行動テストを指標にフェノタイプを改善する条件を探索した。② *in vitro* 解析：脳特異的 Elovl6 欠損マウスおよびコントロールマウスの胎児由来の神経幹細胞からニューロスフェアを形成し、神経幹細胞の自己複製能への Elovl6 欠損の影響を解析した。また、これらサンプルに対してトランスクリプター

ム解析を行い、Elovl6 により制御され、神経幹細胞の増殖および分化におよぼす因子を抽出した。

【結果】

脳特異的 Elovl6 欠損マウスの脳では、C16 脂肪酸の増加および C18 脂肪酸の減少と、脳重量の増加、神経新生の減少が認められた。脳特異的 Elovl6 欠損マウスの胎児大脳から調整した神経幹細胞の培養でもニューロスフェア形成能の低下が認められ、RNA-seq 解析から、神経幹細胞の自己複製に重要な受容体およびそのシグナル伝達に関わる因子の発現が Elovl6 の欠損により低下することを明らかにした。また、マウスおよびニューロスフェアにおいて、Elovl6 の欠損により低下する神経幹細胞の増殖を回復させる脂質を見出した。

【考察】

本研究の結果から、Elovl6 は神経幹細胞の自己複製に重要であり、その異常が脳の形成と機能に影響をおよぼす可能性が示唆された。今後、Elovl6 を介して産生され、神経幹細胞の機能を制御する脂質を特定し、その制御機構を分子レベルで解明することが、脳における脂質の新しい機能の解明や、神経・精神疾患の病態解明および新規治療法の開発などの応用研究に役立つと期待される。

MRI) により、標的とする任意の酵素活性の生体内分布を非侵襲的かつリアルタイムに可視化する基盤技術を開発する。

【方法】

“超偏極” ^{13}C MRI は ^{13}C 標識した化合物の NMR 信号を一時的に数万倍に増幅することで、その生体内における代謝反応をリアルタイムに可視化する最先端技術である。超偏極 $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸を治療応答性の異なる 3 種のヒト膵管癌モデルに投与し、 ^{13}C MRI 撮像により乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性をイメージングした。

【結果】

超偏極 ^{13}C MRI により非侵襲的に計測した LDH 酵素活性は低酸素な腫瘍ほど高く、免疫プロットにて測定したタンパク発現量と相関していた (図 1)。LDH 活性の高い腫瘍は放射線治療に耐性を示す一方で、低酸素標的薬である TH-302 では高い治療効果が得られた。

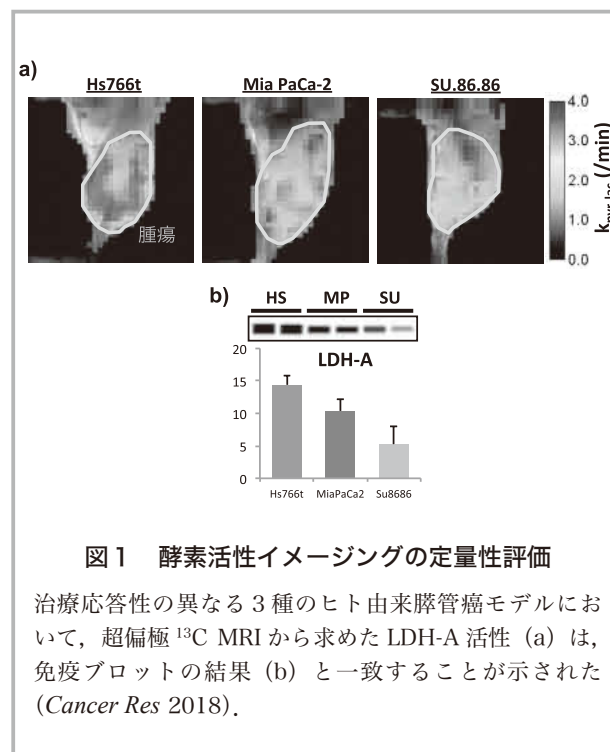
【考察】

非侵襲的に特定の酵素活性を計測可能な超偏極 ^{13}C MRI は癌診断や抗癌治療の最適化において、今後重要な役割を果たすものと期待される。

超偏極 ^{13}C MRI による酵素活性イメージング
松元 慎吾
(北海道大学情報科学研究科)

【目的】

近年、微量組織中に含まれる数百種類に及ぶ代謝物の網羅的定量が可能となっている。それらメタボローム研究が明らかにしたのは、あらゆる疾患は何らかの酵素活性変化を伴うという事実である。疾患に伴う特定酵素の絶対量や活性の増減は診断マーカーとして臨床で広く用いられているが、血液や尿など比較的容易に得られる検体から診断できる疾患は限られており、体内奥深く特定の臓器・組織のみで起きている酵素活性の変動を非侵襲的に計測する診断技術の開発が望まれている。本研究では、超偏極 ^{13}C 核磁気共鳴画像 (Hyperpolarized ^{13}C



【発表論文】

1) Matsumoto, S., Kishimoto, S., Saito, K. et al.: Metabolic and Physiologic Imaging Biomarkers of the Tumor Microenvironment Predict Treat-

ment Outcome with Radiation or a Hypoxia-Activated Prodrug in Mice. *Cancer Res.* e-pub ahead of print. (2018).

- 2) Stewart, N.J., Kumeta, H., Tomohiro, M., Hashimoto T., Hatae, N. & Matsumoto, S.: Long-range Heteronuclear J-coupling constants in Esters: Implications for ¹³C Metabolic MRI by Side-Arm Parahydrogen-Induced Polarization. *J. Magn. Reson.* e-pub ahead of print. (2018).

ROR1 キナーゼによる生体膜ダイナミクス制御機構の解明

山口 知也

(熊本大学大学院先導機構

(併任) 大学院生命科学研究部)

【目的】

これまでに私たちは、リネジ生存癌遺伝子である TTF-1 によって転写活性化される ROR1 が EGFR からの肺腺癌の生存シグナルの維持に必要な受容体型チロシンキナーゼ (RTK) であることを見出し^{1,2)}、また近年、ROR1 がカベオラ形成を安定化させ、カベオラに集積する様々な RTK の活性化の維持に寄与することで、肺腺癌にとっての重要な生存シグナルを担うことを明らかにした³⁾。そこで本研究では、受容体としての ROR1 キナーゼの新たな機能に着目し、重要なカベオラ機能の1つであるカベオラ依存的なエンドサイトーシス制御機構における ROR1 キナーゼによる詳細な分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

肺腺癌細胞では、カベオラからのエンドソームの小胞移動に関わる CAVIN3 と ROR1 が直接結合し、細胞膜からのエンドサイトーシスを制御し、ROR1 は CAVIN3 を介して MYO1C と相互作用することでアクチンフィラメント上を移動することが判明した。また、ROR1 と CAVIN3 の結合は CAVIN3 の適切な細胞内局在に必須であるが、カベオラ形成そのものには影響を与えないことが分かった。さらに、肺腺癌細胞において、ROR1 と

CAVIN3 の相互作用は EGF や IGF-I などのリガンド刺激による PI3K-AKT シグナルをカベオラ依存的なエンドサイトーシスによって生じた初期エンドソームにおいて厳密に制御していることが明らかとなった (論文投稿中)。

【考察】

本研究により、これまで ROR1 は細胞膜上のカベオラにおいて生存シグナルを担っていると考えられてきたが、エンドサイトーシスによって生じたシグナリングエンドソームにおいて様々なアダプター蛋白質をリクルートし、肺腺癌細胞の生存シグナルを経時的及び空間的に制御していることが判明した。また、本研究の成果は、ROR1 とエンドサイトーシスに関わる CAVIN3 との相互作用を標的とした、これまでにない肺腺癌の生存シグナルを特異的に抑える独自性の高い革新的な阻害剤の開発につながると期待される。

【文献】

- 1) Yamaguchi, T., Yanagisawa, K., Sugiyama, R., Hosono, Y., Shimada, Y., Arima, C., Kato, S., Tomida, S., Suzuki, M., Osada, H. & Takahashi, T.: NKX2-1/TITF1/TTF-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma, *Cancer Cell* 21; 348-361 (2012).
- 2) Yamaguchi, T., Hosono, Y., Yanagisawa, K. & Takahashi, T.: NKX2-1/TTF-1: An enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression, *Cancer Cell* 23; 718-723 (2013).
- 3) Yamaguchi, T., Lu, C., Ida, L., Yanagisawa, K., Usukura, J., Cheng, J., Hotta, N., Shimada, Y., Isomura, H., Suzuki, M., Fujimoto, T. & Takahashi, T.: ROR1 sustains caveolae and survival signaling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1, *Nat Commun* 7; 10060 (2016).

好熱性放線菌ホスホリパーゼDを利用した表皮肥厚性疾患の分子メカニズムの解明

山本 圭

(徳島大学大学院社会産業理工学研究部)

【目的】

リン脂質はホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) などの極性基の違いだけではなく、グリセロール骨格の *sn-1* 位の炭化水素鎖がエステル (アシル型) 結合したものの他にアルケニル結合 (ビニルエーテル型) したサブクラスも存在する。これに加えて、*sn-1* 位と *sn-2* 位に結合する脂肪酸の違いにより、リン脂質は膨大な数の分子種を構成する。我々は、リン脂質代謝酵素の一つである IIF 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ (PLA2G2F) が、表皮角質細胞から分泌されるプラズマローゲンを加水分解し、この時に生じるプラズマローゲン型リゾホスファチジルエタノールアミン (P-LPE) が乾癬や皮膚癌などの表皮肥厚性疾患に関わることを報告した¹⁾。一方、プラズマローゲン定量用診断酵素の開発を目的として好熱性放線菌から単離されたホスホリパーゼ D (LyPlsPLD) は、1) プラズマローゲン型リゾリン脂質を優先的な基質としアシル型リゾリン脂質やリン脂質は基質としない、2) 幅広い至適 pH をもつ。そこで本研究では LyPlsPLD が乾癬を緩和する効果をもつのではないかと予想し、検討をおこなった。

【方法と結果】

マウス乾癬モデルを用いてリビドミクス²⁾をおこなったところ、マウス角質における P-LPE が、テープストリッピングにより検出可能であること、さらに乾癬の悪性度に応じて増加することを見出し、P-LPE が乾癬のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。皮膚から抽出したリゾリン脂質を基質とし LyPls-PLD の基質特異性を調べたところ、LyPlsPLD は P-LPE を優先的な基質とし、プラズマローゲン型リゾホスファチジン酸 (P-LPA) を産生することが明らかになった。乾癬を惹起させたマウスの耳介に LyPls-PLD を外用塗布すると、耳介中の P-LPE 量が低下するとともに P-LPA の増加が認められ、表皮の肥厚が緩和された。さらにマウスアトピー性皮膚炎モデルを用いて検討すると、乾癬モデルと同様に、

LyPls-PLD を外用塗布により惹起された表皮の肥厚が緩和された³⁾。

【考察】

以上の結果より、PLA2G2F により産生される P-LPE は表皮肥厚性疾患を制御する新規生理活性脂質であり、創薬の対象となることが示唆された。

【文献】

- 1) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Nishito, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M.H., & Murakami, M.: The role of group IIF secreted phospholipase A2 in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901-1919 (2015).
- 2) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., & Murakami, M.: Secreted phospholipase A2 specificity on natural membrane phospholipids. *Methods in Enzymol.* 583, 101-117 (2017).
- 3) 山本圭, 村上誠, 酒瀬川信一.: 表皮肥厚性疾患及び/又は表皮肥厚性症状に対する予防, 改善, 又は治療剤, PCT/JP2018/19345, 2018年5月18日.

【知的財産権】

髄鞘形成における低酸素誘導因子 HIF の機能解析

若月 修二

(国立精神・神経医療研究センター神経研究所)

【目的】

髄鞘は電線を包む絶縁体のような役割を果たし、このはたらきにより情報伝達に必要な電気信号が神経ネットワークにおいて迅速かつ正確に伝えられる。髄鞘が破壊される病気は脱髄疾患と呼ばれ、視力障害や手足の麻痺、感覚障害、高次機能障害などの重篤な神経障害が生じる。申請者のグループは末梢神経系の髄鞘化・脱髄機構を対象にした研究を行い、さまざまな成果を挙げ報告してきた。神経損傷などによる末梢神経傷害後の再生に関わる責任分子を探索するなかで、低酸素誘導因子 HIF がシュ

ワン細胞による髄鞘化に関与する可能性が示唆された。本研究では、髄鞘形成における HIF の機能を明らかにするとともに、HIF を標的とした髄鞘形成促進剤を探索し、同定することを目的とした。

【方法】

1. HIF1 α による髄鞘形成促進効果の検証

培養シュワン細胞に対して HIF1 α 遺伝子を過剰発現・発現抑制し、髄鞘形成に関連する遺伝子の mRNA レベルの変化を定量的 PCR 法などにより検討した。

2. 動物モデルを用いた検討

HIF1 α による髄鞘形成促進効果を脱髄疾患病態モデル、再髄鞘化モデルを用いて検討した。HIF1 α は分子内プロリン残基が水酸化酵素によりヒドロキシル化されて不安定化するため、水酸化酵素阻害剤は HIF1 α を安定化する。脱髄疾患モデルとして Trembler 系統、再髄鞘化モデルとして坐骨神経傷害モデルを用い、水酸化酵素阻害剤の髄鞘形成への効果を電子顕微鏡観察により判定した。

3. 新規髄鞘形成促進剤の探索

水酸化酵素阻害剤は HIF1 α 以外のさまざまな水酸化反応を阻害する。特異性の高い「HIF1 α 安定化剤」など、より実効性の高い髄鞘形成促進剤を探索するために従来法と比べ簡便な培養髄鞘形成モデルを構築した。

【結果】

シュワン細胞への低酸素暴露により HIF1 α 蛋白量が増加し、同時に髄鞘形成を促進する転写因子群や髄鞘構成蛋白など、髄鞘形成に関連する遺伝子の mRNA レベルが増加、反対に RNA 干渉により HIF1 α 遺伝子発現を抑制するところの効果が打ち消された。動物モデルでは水酸化酵素阻害剤が髄鞘形成を促進する予備的な結果を得た。また、髄鞘形成促進剤の探索に向け、従来法と比べ簡便な培養髄鞘形成モデルを構築した。

【考察】

本研究では、髄鞘形成と酸素ダイナミクスに関連性を明らかにし、脱髄疾患の発症・進行機構の解明と有効な治療戦略を提示することを目的とした。予備的ではあるが、動物モデルにおいて HIF の安定化により髄鞘形成が促進される可能性が示唆された。今後は、細胞特異的な HIF 遺伝子改変・欠損動物を利用したり、髄鞘形成細胞での HIF の安定化によってどのような遺伝子群が

発現制御されるのかを網羅的に調査したりすることで、HIF による髄鞘促進効果の全貌が明らかになると考え、現在その解析を進めている。

【文献】

- 1) Saitoh, F., Hagiwara, H., Wakatsuki, S., & Araki T.: Carboxymethylation of CRMP2 is associated with decreased Schwann cell myelination efficiency. *Neurosci. Res.* (2018) *in press*.
- 2) Imai, S., Koyanagi, M., Azimi, Z., Nakazato, Y., Matsumoto, M., Ogihara, T., Yonezawa, A., Omura, T., Nakagawa, S., Wakatsuki, S., Araki, T., Kaneko, S., Nakagawa, T., & Matsubara K.: Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells prior to induction of neurotoxicity via distinct mechanisms. *Sci. Rep.* 7, 5947 (2017).
- 3) Saitoh, F., Wakatsuki, S., Tokunaga, S., Fujieda, H., & Araki T.: Glutamate signals through mGluR2 to control Schwann cell differentiation and proliferation. *Sci. Rep.* 6, 29856 (2016).

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成

腸内細菌異常による疾患発症メカニズムの解明

新 幸 二

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

ヒトの腸管内腔に存在する腸内細菌は宿主の生理機能に大きな影響を与えており、そのため腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が様々な疾患の発症につながる可能性が示唆されている。しかし、どのような原因で dysbiosis が起こるのか、どのような細菌種が疾患発症に直接関与しているかについては明らかになっていない。これまでの研究から、クローン病患者の唾液中に存在していた *Klebsiella pneumoniae* 2H7 株が腸管に定着すると大腸で強い Th1 細胞の誘導を引き起こすことが明らかになった。そこで本年度は、どのようなメカニズムで Th1 誘導が引き起こされるかを解析した。

【方法・結果】

2H7 株の Th1 誘導メカニズムの解析のため、Batf3 欠損マウス・MyD88/Trif 欠損マウス・Il18 欠損マウス・Il1r1 欠損マウスを無菌化し、2H7 株を定着させた後大腸 Th1 の誘導をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、Il1r1 欠損マウスのみ野生型マウスと同等の Th1 の誘導が見られたが、他のマウスはほぼ誘導が見られないか有意に誘導が弱いことが明らかになった。

また、Th1 の誘導能が弱い *K. pneumoniae* 2552 株と今回単離した Th1 誘導能が強い 2H7 株を無菌マウスに定着させ、1 週間後に大腸の上皮細胞と粘膜固有層の樹状細胞を採取し、遺伝子発現の違いを RNA-seq により網羅的に解析した。その結果、2H7 株定着マウスの上皮細胞と樹状細胞ともに GBP や Cxcl9 などの IFN γ 誘導遺伝子や H2-Ab1, Duox2 などが著明に上昇していた。

【考察】

Batf3 欠損マウスの解析から *K. pneumoniae* の Th1

誘導に CD103 陽性の樹状細胞が重要であることが明らかになり、さらに TLRs を介した刺激が IL-18 の産生を増強し Th1 誘導を促進していると考えられた。また、RNA-seq の解析から多くの IFN γ 誘導遺伝子の発現に違いがあったが、Th1 誘導の原因か結果かを注意深く調べる必要がある。In vitro の解析から IFN-g 非依存的に誘導され IFN γ の positive feedback loop に関与していることが示唆されるデータが取れているため、少なくとも一部の IFN γ 誘導遺伝子は Th1 細胞の誘導に関与している可能性が高いと考えられた。

【文献】

Atarashi, K., Suda, W., Luo, C., Kawaguchi, T., Motoo, I., Narushima, S., Kiguchi, Y., Yasuma, K., Watanabe, E., Tanoue, T., Thaiss, C. A., Sato, M., Toyooka, K., Said, H. S., Yamagami, H., Rice, S. A., Gevers, D., Johnson, R. C., Segre, J. A., Chen, K., Kolls, J. K., Elinav, E., Morita, H., Xavier, R.J., Hattori, M. & Honda, K.: Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives T(H)1 cell induction and inflammation, *Science*, 358, 359-365 (2017).

生活習慣病胎児発症起源説の実験的検証

—ケトン体合成不全と脂肪肝素因形成との関連—

有馬 勇一郎

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【背景】

生活習慣病胎児発症起源説 (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD) は、周産期の環境ストレスがさまざまな成人後の生活習慣病リスク上昇に繋がるといふ、疫学的に確立された概念である。現在世界では 15%、日本では約 10% の出生児が低出生体重児として生まれており、今後出生時低体重が抱える成人後リスクは看過できない問題となるが、疫学研究の結果を説

明する生活習慣病素因の獲得機序についてはほとんど解明されておらず、病態メカニズムに基づいた対応策を講じることができていない。申請者は発生学的考察に基づいて成人疾患を考えることで、病態の新たな側面を明らかにすることを目指した研究を進めている。

【目的】

マウスモデルを用いて、生活習慣病胎児発祥起源説のメカニズムを明らかにする。

【方法】

胎生期に50%のカロリー制限を施すことで出生児低体重マウス（低体重マウス）を作成した。得られた産仔について肝臓における表現型を検討した。

【結果】

50%カロリー制限により、有意差を持って低体重胎仔の作出に成功した（出生児体重；カロリー制限群 $n=56$ $1.27 \pm 0.16g$, 対照群 $n=58$ 1.51 ± 0.14 , $p<0.001$ ）。生後3日目の肝臓を評価すると、低体重マウスで有意な脂肪沈着を認めた。また、出生時の血中ケトン体濃度およびケトン体合成酵素の発現が低体重マウス群で低下しており、ケトン体合成不全が示唆された。続いて我々は、CRISPR/Cas9システムを用いてケトン体合成の律速酵素であるHMGCS2のノックアウトマウスを作成し、新生仔期の表現型を評価した。ケトン体の一種である β ヒドロキシ酪酸（3OHB）の血中濃度を測定した結果、ノックアウトマウスで有意に低下していることが確認できた（3OHB: wild-type (WT) 1.35 ± 0.14 mmol/L, KO 0.24 ± 0.05 mmol/L, $p<0.0001$ ）。加えて、肝臓重量を比較した結果、新生仔期のHMGCS2ノックアウトマウスにおいて肝臓重量が有意に増加していることも確認した（Liver weight: wild-type (WT) 87.6 ± 3.4 mg, KO 123.9 ± 10.1 mg, $p<0.05$ ）。腫大した肝臓をオイルレッド染色にて評価した結果、脂肪沈着が増加していることが明らかとなり、新生仔期においてもケトン体の利用障害が脂肪酸合成を誘導することが示唆された。

【文献】

Arima, Y*. & Hokimoto, S. *et al.*: Evaluation of Collateral Source Characteristics With 3-Dimensional Analysis Using Micro-X-Ray Computed Tomography. *J Am Heart Assoc.* 2018 Mar 23; 7(6).

軟骨細胞における Ca^{2+} 動態の分子機構及び生理機能の解明

市村 敦彦

(京都大学大学院薬学研究科)

【目的】

本研究は、細胞内 Ca^{2+} 動態と制御機構、及びその生理機能を軟骨細胞を用いて解明することを目的とした。

【方法】

Ca^{2+} は、主要な生理機構に必須と言えるほど極めて重要なシグナル分子であり、受精、筋収縮、神経伝達物質やホルモン分泌、シナプス可塑性といった広範かつ重要な生理機能の制御を担っている。一方で、 Ca^{2+} シグナルが制御している生理機能は、未知のまま多数残されている。そのため、様々な細胞種における Ca^{2+} 動態やその制御機構を明らかにすることは、それぞれの細胞における特徴的な生理機能を理解する上で非常に重要である。本研究では、軟骨細胞における Ca^{2+} 動態とその制御機構や生理機能に着目した。生体内における軟骨細胞が細胞外マトリクス中に埋め込まれるように存在しており、直接観察することも、培養細胞系で再構築することも極めて困難であるため、軟骨細胞における Ca^{2+} 動態やその生理機能の多くは不明であった。そこで、胎生期マウス大腿骨のスライス培養サンプルを用いて生体内における状態に近いコンディションを保ったまま Ca^{2+} 動態を観察可能な新しい実験系を構築した。この実験系により、これまでは不可能であった、形態や生体内における位置といった情報を保ったまま、細胞内 Ca^{2+} 動態をリアルタイムに観察することを可能とした。本実験系を用い、様々な薬理的阻害及び活性化実験と網羅的遺伝子発現解析を組み合わせ、軟骨における Ca^{2+} 動態を解析するとともに、その制御分子機構の一端を明らかとした。

【結果】

軟骨細胞において、自発的に細胞内 Ca^{2+} が振幅していることを発見した。また、薬理的スクリーニングマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、自発的 Ca^{2+} 振幅は主として細胞膜に存在する二価陽イオンチャンネル TRPM7 により媒介されていることを見出し

た。更に、TRPM7 阻害薬や遺伝子欠損動物由来の骨組織を解析した結果、TRPM7 の阻害や欠損により初代培養中指骨の伸長が阻害されることを明らかとした。

【考察】

一連の結果から、軟骨細胞においては TRPM7 を介して自発的に流入する Ca^{2+} が軟骨細胞の増殖や正常な分化に必要であることが示唆された。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験手法の開発と薬理反応個体間差の検討

伊藤 正道

(東京大学大学院医学系研究科)

【背景】

薬物開発過程においてその催不整脈作用を的確に予測することは、予期せぬ突然死を軽減すると共に、本来なら安全な化合物の不適切な開発中止を回避することに繋がるため、適切な薬剤安全性評価手法の確立が期待されている。

iPS 細胞およびそこから分化誘導した細胞は由来となる体細胞と同一のゲノムを有しているため、ヒト個体の臓器の生理的特性を反映していると考えられる。このため、iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を用いることで、薬剤による催不整脈性を既存手法よりも精度高く、個体ごとに予測することが可能になるのではないかと期待されている。

しかし iPS-CM の由来ドナー、由来クローンの違いが iPS-CM の薬剤反応に与える影響は明らかになっておらず、ある 1 個体・1 クローン由来の iPS-CM による試験結果が、集団の催不整脈性を反映しうるか、また個体ごとの薬理反応の差が誘導した iPS-CM に反映されているのかについては明らかにされていない。

【目的】

iPS-CM の電気的特性を評価し、薬剤反応にどの程度由来クローンによる差や個体による差が存在するか検証する。またそれらの差を克服する実験・解析手法を開発する。

【方法・結果】

- ① 健康人 5 名から計 10 クローンの iPS 細胞および iPS-CM を作製し、未投薬時における iPS-CM の拍動数や活動電位持続時間を評価した。その結果、それらに由来クローンによる差があることが判明した。由来クローンが同一であればそれらのばらつきは小さかった。
- ② 5 種類のイオンチャネル阻害作用を有する薬剤、臨床的に催不整脈作用を有することが知られている薬剤を投与し、活動電位時間変化や EAD (早期後脱分極) などの異常電気活動の有無を比較した。その結果、iPS-CM の薬理反応には由来個体による差が存在することが判明した。
- ③ 投薬前のデータによって薬理反応を検証する iPS-CM を選別することによって、薬理反応の個体間差は軽減されることが判明した。

【考察】

iPS-CM には由来クローンおよび個体による特性差が存在しており、心毒性評価のためのツールとして使用する際には、実験・解析手法のみならず細胞ソースを標準化することが必要である。

今後は、iPS-CM の個体間差が被験者の遺伝的背景の差に由来するものかを検証するため、薬剤反応性に影響を与える SNP (*KCNH2* rs36210421 など) との関連を評価することや、実際に薬剤性不整脈を発症した患者から iPS 細胞を樹立し、健康者間の差を超える反応性の差が確認されるかを検証することを予定している。

脂肪肝再生過程に生じる肝細胞死様式誘導メカニズム

稲葉 有香

(金沢大学新学術創成研究機構)

【目的】

肝細胞死の増加は、脂肪肝における肝再生障害を引き起こし、術後合併症の誘因となるだけでなく、非アルコール性脂肪性肝疾患の進行に関与する。マウス脂肪肝再生過程では、脂肪肝の進行と共に増加する細胞死が、重篤な再生障害を引き起こす。我々は、重篤な再生障害を誘

導する重度脂肪肝の再生過程で、ストレス応答性転写因子 ATF3 の発現が亢進することを見出した。本研究では、重度脂肪肝の再生過程で生じる細胞死様式の選択メカニズムの解明を目的とした。

【方法】

肝臓特異的 ATF3 ノックアウト (A-KO) マウス及び対照マウスに対する高脂肪食負荷により、軽度脂肪肝または重度脂肪肝を作成し、70%肝切除後の脂肪肝再生過程を検討した。具体的には、肝再生過程の TUNEL 陽性細胞数 (肝細胞死数)、細胞死関連因子の遺伝子発現及びタンパク発現を評価した。TUNEL 法はアポトーシス細胞以外の細胞死も検出することから、TUNEL 法と活性化型カスパーゼ 3 の免疫染色法を組み合わせた蛍光二重染色法を行い、細胞死様式の検討を行った。

【結果】

重度脂肪肝の再生過程では、軽度脂肪肝と比較し、ATF3 発現・ネクロプトーシス誘導因子 RIPK3 発現・カスパーゼ 3 活性化が亢進し、壊死を伴う広汎な細胞死が誘導され、重篤な肝再生障害を引き起こした。また、TUNEL・活性化型カスパーゼ 3 の蛍光二重染色の結果、軽度脂肪肝では、TUNEL(+)[・]活性化型カスパーゼ 3 (+) のアポトーシス細胞のみであったのに対し、重度脂肪肝では、TUNEL(+)[・]活性化型カスパーゼ 3 (-) のアポトーシス非依存的な細胞死が増加した。RIPK3 欠損による検討では、このようなアポトーシス非依存的な細胞死が消失しており、この細胞死様式がネクロプトーシスであることが示唆された。A-KO 高度脂肪肝の再生過程では、広汎な細胞死の誘導が阻害され、肝再生障害が改善した。A-KO 群では、カスパーゼ 3 活性化は対照群と同等であったが、RIPK3 発現は有意に減少した。そこで、細胞死様式を検討したところ、TUNEL(+)[・]活性化型カスパーゼ 3 (-) の細胞が有意に減少した。

【考察】

重度脂肪肝の肝再生過程では、アポトーシス・ネクロプトーシスという異なる様式の細胞死が誘導され、脂肪肝再生障害を誘導すること、これら細胞様式の選択メカニズムとして ATF3 が重要な役割を担うことを明らかにした。

Bodywide transcriptome landscape in mouse models and human

浦山 恭次

(国際電気通信基礎技術研究所佐藤匠徳特別研究所)

【目的】

生体は複雑な多臓器連関ネットワークで成り立っており、これらネットワークの異常や崩壊は様々な疾患の原因となっている事が知られている。近年、臓器間のクロストークに関わるメディエーターの発見、およびメカニズムの解明に関する研究は目覚ましく発展している。しかし、多くの研究がすでにクロストークを行っていることが知られている臓器間の解析に限定されている。そこで、我々は、各種疾患において従来考えられていたよりも広範囲で多臓器連関ネットワークの変化が起きており、それらは個体レベルでの生理学的機能や疾患の発症において重要な役割を担っていると仮定した。本仮説を検証し、個体レベルでの多臓器連関ネットワークの全体像を明らかにする最初のステップとして、我々は、生体内における臓器間のクロストークを網羅的にあぶり出すことを目的に本研究を行った。

【方法】

本研究では、5つの異なる疾患モデルマウス (心筋梗塞、糖尿病、がん、老化促進、腎障害) における病態発生から異なるタイムポイントで 13-23 臓器を回収し RNAseq 解析を行い、各モデルの各臓器の異なるタイムポイントでの遺伝子発現変動を網羅的に解析し、全身レベルでのトランスクリプトームデータベース (全身網羅的多器官遺伝子発現地図, iOrgans Atlas) を構築した。

【結果&考察】

本データベースをデータマイニングする事で、先行研究から遺伝子発現の変化が想定される臓器以外の多臓器においても遺伝子発現の変化が広範囲で起きていることが明らかになった。また、本研究から皮膚が疾患のセンサーとして働いている事が明らかになった。本データベースは論文として発表し「i-organs.atr.jp」にて公開した。今後、本データベースを活用・発展させることで新規疾患マーカーや治療ターゲットの発見につながるのではないかと考えている。

【文献】

Kozawa, S.*, Ueda, R.*, Urayama, K.*, Sagawa, F., Endo, S., Shiizaki, K., urosu, H., de Almeida, G. M., Hasan, S. M., Nakazato, K., Ozaki, S., Yamashita, Y., Kuro-o, M. & Sato, T.N.: The body-wide transcriptome landscape of disease models, *iScience.*, **2**, 238-268 (2018). *These authors contributed equally

発生現象の再構成研究

戎 家 美 紀

(理化学研究所生命機能科学研究センター)

私達は、発生現象を培養細胞上に再構成している。実際に作ってみることで、現在の理解がどれほど正しいか検証し、さらには予想外の発見をしたい、という動機である。

現在は、細胞のパターン形成、同調振動機構、組織の変形の3つのプロジェクトを行っている。いずれも多細胞生物の発生機構の基礎的なメカニズムである。哺乳類培養細胞に複数の遺伝子パーツを導入して人工遺伝子回路を作製し、目的とするような振る舞い（例えば細胞のパターン）が起こるか観察する。イメージングで生化学パラメーターを測定し、数理モデルと比較することで、作製の指針や動作原理の理解が得られることもある。ただし、培養細胞と人工遺伝子回路だけでは起こりえない高次現象もやはり存在するので、最近では幹細胞やオルガノイドを使った再構成も進めている。

細胞のパターン形成と同調振動機構についてははだいたいできつつあるので、近いうちに研究発表させていただきたい。

報酬系による睡眠覚醒制御

大 石 陽

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

我々の睡眠覚醒はホメオスタシスやサーカディアンリズムなど様々な要因に制御される。経験的に明らかなよ

うに、モチベーションも睡眠覚醒に影響を与えるが、その脳内メカニズムはほぼ不明である。本研究では、腹側被蓋野や側坐核がモチベーション行動において重要な役割を果たす点、側坐核に睡眠物質アデノシンの受容体が発現する点に注目し、両脳領域の睡眠覚醒制御における機能解析を目的とした。

【方法・結果】

まず、報酬刺激に応じて活性化する腹側被蓋野のドーパミン神経に着目し、同神経の化学遺伝学的活性化による強力な覚醒維持作用をマウスにおいて見出した。この作用は、拮抗薬を用いた薬理実験により、ドーパミン D2/D3 受容体依存的であることが示された。

次に、腹側被蓋野ドーパミン神経が投射を送る側坐核に注目し、D2 受容体およびアデノシン A2A 受容体を発現する間接路神経を光遺伝学的に活性化した結果、睡眠の大部分を占めるステージであるノンレム睡眠が顕著に増加した。また、側坐核から腹側淡蒼球への投射経路を光遺伝学的に活性化したところ、同様にノンレム睡眠が増加した。

化学遺伝学的な側坐核間接路神経活性の抑制は、リガンド用量依存的に睡眠量を減少させた。このため、同神経活性は正常な睡眠量の維持に必須であることが判明した。また、この抑制は断眠後のリバウンド睡眠に影響せず、さらに断眠操作自体も同神経活性を変化させなかったため、同神経活性は睡眠のホメオスタシス制御とは独立すると示唆された。最後に、モチベーション刺激をマウスに与えたところ、側坐核-腹側淡蒼球経路の活性が低下し、それに伴って睡眠量が低下した。従って、側坐核はモチベーション刺激を感知し、さらに睡眠覚醒を制御する興味深い領域であることが明らかになった。

今回明らかにした神経群は過去に報告のない新しい睡眠制御システムであるため、詳細な解析により新たな不眠症治療薬の開発につながる可能性がある。

【文献】

- 1) Oishi, Y., *et al.*: Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. *Nat Commun.* 8(1): 734, (2017).
- 2) Oishi, Y*, et al., Activation of ventral tegmental area dopamine neurons produces wakefulness through dopamine D2-like receptors in mice.

Brain Struct Funct. 222 (6): 2907-2915, (2017).

*corresponding authors

- 3) Oishim, Y*. & Lazarus, M.: The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems. *Neurosci Res.* 118: 66-73, (2017). *corresponding author

細胞競合を介した上皮の内在性がん抑制機構の解明

大澤 志津江

(京都大学大学院生命科学研究所)

【目的】

ヒトのがんのほとんどは上皮由来であり、上皮がんの発生・進展には上皮細胞の頂底極性 (apico-basal 極性) の崩壊が深く関与している。一方で興味深いことに、apico-basal 極性を崩壊した細胞が正常な上皮組織に生じると、それら極性崩壊細胞は正常細胞との生存競合“細胞競合”に敗れて組織から排除されることが近年分かってきた。しかしながら、上皮組織において正常細胞と極性崩壊細胞が競合する際に、正常細胞がいかにして極性崩壊細胞を認識し、細胞排除を駆動するのか、そのメカニズムはほとんど分かっていない。また、細胞排除システムの生理機能に関しても不明である。本研究では、上皮組織であるショウジョウバエ成虫原基をモデル系として用い、正常細胞が極性崩壊細胞を認識し、排除を駆動するメカニズムの同定とその生理的意義の解明を目指す。

【結果】

我々は前年度までに、リガンド受容体システム Sas-PTP10D が上皮組織に生じたがん原性の極性崩壊細胞を認識する上で重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Yamamoto#, Ohsawa# (# equal contribution) *et al.*, *Nature*, 2017)。一方で、研究代表者が所属する研究室 (京都大学・井垣達史教授) では、神経系で反発作用を引き起こすリガンド受容体システム Slit-Robo が、極性崩壊細胞の排除を促進する上で重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (Vaughen & Igaki, *Dev Cell*, 2017)。本年度は細胞排除システムの生理機能を明らかにすることを目的とし、

Sas-PTP10D および Slit-Robo システムが機能する組織・時期を探索した。その過程で、Sas-PTP10D および Slit-Robo システムが創傷治癒に関わる可能性を見いだした。具体的には、Sas-PTP10D あるいは Slit-Robo システムを遺伝学的に破綻させた翅成虫原基 (将来、翅のブレード領域を形成する幼虫期の組織) に対してタングスタンニードルにより物理的損傷を与えた際、その修復に異常をきたすことが分かった。興味深いことに、Slit-Robo システムを遺伝学的に破綻させると、創傷治癒の過程で生じる死細胞が組織から排除されずに成虫原基の上皮層にとどまる様子が観察された。この観察結果は、排除すべき死細胞を組織から除去することが創傷治癒を行う上で重要な役割を果たす可能性を示唆している。

抗酸化物質キヌレン酸増加の分子機構とその意義

大橋 一登

(群馬大学生体調節研究所)

【背景および目的】

キヌレン酸はトリプトファン (Trp) から合成されたキヌレニンがキヌレニンアミノトランスフェラーゼ (KAT) により脱アミノ化されることで生成する。キヌレン酸の増加は二型糖尿病やうつ病で認められているが、キヌレン酸の増加の原因や意義はよく分かっていない。これらの病態を理解するためには、キヌレン酸の機能について知見が不足していると考えられる。本研究では、真核生物のモデル細胞である出芽酵母を用いて細胞内におけるキヌレン酸の機能を明らかにする。

【方法と結果】

出芽酵母では、KAT 活性は検出されているが、KAT 遺伝子は特定されていない。キヌレン酸の細胞内での機能を調べるために、KAT 遺伝子の同定とその破壊によるキヌレン酸欠乏株の構築を試みた。ヒトの KAT と相同性を示す酵素を選出し、それらの遺伝子多重欠損株の細胞抽出液に含まれるキヌレン酸とキヌレニンを LC/MS で測定した。その結果、Aro9 と Aro8 の遺伝子二重欠損株 (*aro8Δ aro9Δ*) では細胞抽出液中のキヌレン酸が顕著に減少していることが確認できた。そこでキヌレン酸欠乏の影響を明らかにするために、*aro8Δ*

*aro9Δ*の表現型を探索したところ、この株は過剰な Trp に感受性を示した。*aro8Δ aro9Δ*の Trp への感受性は、キヌレン酸を添加しても回復しなかった一方で、プラスミドで Aro9 の遺伝子を再導入することで、部分的に回復した。以上の結果から、Aro8 と Aro9 が過剰な Trp の無毒化に必要であることが示された。

【考察】

本研究により、Aro8 と Aro9 は出芽酵母の KAT であることが分かった。また、KAT は過剰な Trp をキヌレン酸へと変換することで、その毒性を軽減すると考えられた。キヌレン酸は、ヒトや動物の尿に多く含まれていることを考慮すると、過剰な Trp を無毒化した結果で生じる、排泄物である可能性が考えられた。

【文献】

Kazuto Ohashi, Romanas Chaleckis, Masak Takaine, Craig E. Wheelock, and Satoshi Yoshida
Kynurenine aminotransferase activity of Aro8/Aro9 engage tryptophan degradation by producing kynurenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*
Scientific Reports, 7, 12180 (2017)

ナトリウム/グルコース共輸送体 (SGLT1) を介した心臓エネルギー代謝制御機構と病態への関与

柏木 雄介

(東京慈恵会医科大学医学部)

【目的】

病的な心筋において主要なエネルギー基質となる糖の取り込み能と利用効率の最適化は、虚血を含めた様々な心疾患の特に急性期治療において重要である。心筋細胞における糖輸送体は、濃度勾配依存性促進拡散型糖輸送体の GLUT と、ナトリウム勾配を駆動力として糖を能動輸送する SGLT に大別される。GLUT に関してはその制御・作用機構はすでに広く検討されている一方で、SGLT の病態生理作用は未知な部分が多い。我々は、虚血再灌流障害における心臓 SGLT1 の役割をエネルギー代謝制御の観点から検討した。

【方法および結果】

最初に、SGLT1 が左右心房心室全体に相当量発

現していることがヒト剖検心の免疫染色及びマウス Langendorff 摘出灌流心の膜分画蛋白レベルで確認された。また、マウス心筋において、SGLT2 の発現は確認できなかった。一方、phlorizin による短期的な心臓 SGLT 阻害により虚血再灌流障害は助長され、心機能回復が低下することが確認された。さらに、虚血再灌流中の SGLT 阻害が心筋細胞内への糖取り込みと解糖系活性を抑制し、ATP 供給を低下させることが証明された。

加えて我々は最近、自施設の臨床データベースを用い、急性冠症候群 (ACS) の虚血発作極期に血清カリウム (K) 値が一過性に低下する現象を報告した。この一過性 K 値低下度合いは、HbA1c や HOMA-IR とは無関係に、一貫して発作時の血糖値と正の相関を示しており、ACS 虚血発作極期にインスリン抵抗性を凌駕して内因性 glucose-insulin-potassium (GIK) 系が代償的に活性化されている可能性が考えられた。

【考察】

心臓 SGLT1 の活性化は、虚血再灌流中の心筋への糖取り込み能の亢進と、これに伴う ATP 供給を介して、心保護的に働くことが示された。さらに SGLT 発現/活性が、虚血や高糖濃度環境で亢進するということが、及び Na^+/K^+ ATPase 活性化 (= K の細胞内への取り込み亢進) が駆動力であることが、を考慮すると、ACS 急性期病態に SGLT- Na^+/K^+ ATPase 連関が深く関与していることが示唆された。

いずれにしても、心臓エネルギー代謝研究において、SGLT は重症虚血時の短期的糖代謝活性化機構の一つとして注目すべき存在である。

食品由来シグナルによる視床下部の摂食調節ホルモンの感受性変容

金子 賢太郎

(神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター)

【背景】

過栄養状態では、視床下部におけるホルモンシグナル応答性障害 (レプチン抵抗性やインスリン抵抗性) が惹起されることにより、過食とエネルギー代謝活性の低下を来し、更なる肥満の増悪と糖尿病などの代謝異常症候

群の合併が惹起される。脂質を多く含む食品の摂取がレプチン・インスリン抵抗性を誘導することは古くから知られているが、食餌に由来するどの成分が如何なる分子機序によりホルモン応答性を障害するのかは未解明である。

我々は最近、レプチン抵抗性の発症に関わる新しい細胞内シグナル分子、Rap1 を同定した。脳 Rap1 欠損マウスの作製により高脂肪食摂取による脳の Rap1 活性化がレプチン・インスリン抵抗性を惹起し肥満や糖代謝異常の原因となることを証明した (*Cell Reports*, 2016) 。 Rap1 は GPCR 経路によって活性化されることから、視床下部ホルモン感受性が内因性・外因性の GPCR リガンドの制御下にあることを初めて示した。

食品成分や代謝・消化産物が GPCR リガンドとして作用することが報告されていることから、食品成分がシグナル分子あるいは代謝産物を介して脳に作用し代謝を制御していることが考えられるが、どのような分子機序により肥満発症に関与するかは不明である。

【目的】

本研究では、視床下部における食品（食餌）由来シグナルとレプチン・インスリンなどのホルモンシグナルのクロストークの実態の解明と、肥満発症における視床下部病態の分子基盤の解明を目的とした。

【方法】

脳組織に近い条件で視床下部のホルモンシグナルの感受性評価が可能な独自の視床下部器官培養系、視床下部系培養細胞株、BV-2 マイクログリア細胞株をホルモン感受性試験に用いた。

【結果】

視床下部器官培養系において、エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸がレプチン感受性を増大させる一方、高脂肪食の主要成分であるパルミチン酸ではレプチン抵抗性を惹起することを見出した。また BV-2 細胞において、エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸がマイクログリア炎症を抑制する一方、パルミチン酸では炎症反応を増強することを明らかにした。さらに、ビタミン類や生理的代謝産物の中からレプチン感受性に関わる数種の食品由来成分の同定に成功し、また、高脂肪食によって発現増加する新しい分子を発見した。現在、更なる探索とメカニズム解析を実施している。

がんが個体に悪影響をあたえるしくみに関する研究

河 岡 慎 平

(国際電気通信基礎技術研究所佐藤匠徳特別研究所)

がんは個体に様々な悪影響を与え、最終的には個体を死に至らしめる。このことは広く知られた事実であるものの、がんが個体に悪影響をあたえるメカニズムに関する理解は立ち遅れている。このことが一因となり、がんによる個体への悪影響を有効に緩和できる方法は、現時点では存在しない。

この問題を解決する一助とするために、がんによる個体への悪影響を調べるという目的に適した、新しいゼブラフィッシュ腫瘍モデルの作成に取りくんだ。ゼブラフィッシュの稚魚は数 mm と小さく、また、透明であるため、稚魚期に腫瘍を発生させることができれば、がんと個体の関係を全身的に調べることが可能となる。まず、UAS の制御下に変異型 *kras* (*kras*^{G12D}) を発現するトランスジェニック系統を作製した。次に、得られたトランスジェニック系統を Gal4 系統と掛け合わせ、稚魚期に腫瘍を発生するような組み合わせを探索した。その結果、後腸 (posterior intestine) 特異的に発現する Gal4 系統 (pInt-Gal4) と UAS-*kras*^{G12D} 系統の掛け合わせにより、受精後 5 日という早い時期に後腸に腫瘍を発生させることに成功した。

腫瘍個体の全身的な解析をおこなったところ、本腫瘍が、個体に様々な悪影響をおよぼすことが判明した。例えば、腫瘍個体の肝臓が肥大することや、肝臓に炎症が起ることがわかった。また、腫瘍個体は野生型個体に比べて成長が遅く、致死率も高かった。

続いて、本モデルの特性を活かして、全身的なトランスクリプトーム解析や代謝解析をおこなった。解析の結果、腫瘍個体の肝臓では、コレステロール代謝酵素である *cyp7a1* を介した胆汁合成が不全となることが明らかとなった。興味深いことに、肝臓特異的に *cyp7a1* を過剰発現させ、胆汁合成を回復させると、腫瘍依存的な肝臓の炎症が緩和された。一方、肝臓の肥大や成長阻害、個体の死といった悪影響は、本介入では緩和されなかった。以上の研究から、*cyp7a1* を介した腫瘍-肝臓連関の存在が明らかとなり、本モデルの有用性の一端が示さ

れた。

Sora Enya, Koichi Kawakami, Yutaka Suzuki, and Shinpei Kawaoka.

A novel zebrafish intestinal tumor model reveals a role for *cyp7a1-dependent* tumor-liver crosstalk in causing adverse effects on the host. *Disease Models & Mechanisms* in press

成体における社会的行動異常に関与する大脳形成不全の原因の解明

川口大地

(東京大学大学院薬学系研究科)

自閉症は発症率が子供の1~2%と高く、成人においても社会的行動異常を示すことから社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症の原因は殆ど分かっておらず治療法も確立していない。自閉症児に見られる解剖学的な異常として、大脳の前方領域が肥大することが知られている。前方領域は言語機能や社会的行動の調節などを担う領域であり、大脳前方肥大化が自閉症発症に関与する可能性が十分に考えられるが、その関連は明らかになっていない。近年、自閉症患者者に特徴的な遺伝子変異を網羅的に探索する試みが活発に行われており、複数のFgfシグナル関連因子が自閉症原因候補遺伝子として挙げられている。Fgfシグナルは発生過程において細胞増殖を制御して組織のサイズ決定に関与することが知られており、申請者はこのシグナルの異常が自閉症児に見られる大脳前方肥大化に関与する可能性を考えた。

そこで本研究では、Fgfシグナル関連因子の変異マウスを作製し、大脳前方肥大化とそのメカニズムの解析、さらには行動解析を行った。生後において大脳のサイズを調べた結果、Fgfシグナル関連因子の変異マウスにおいて大脳前方が肥大することが明らかとなった。そこで、Fgfシグナルがいかなる発生時期において機能することで大脳前方形成に関与するのかを調べた。その結果、胎生期の非常に早い時期こそが大脳前方肥大に関与する重要な時期であることが示唆された。この結果から、疾患において見られる大脳形成の異常は胎生期の早い段階におけるFgfシグナルの異常に起因している可能性が考え

られる。

また、Fgfシグナル関連因子の変異マウスが自閉症様行動を示すのかを調べた結果、Fgfシグナル関連因子の変異マウスでは有意に反復行動が増大すること、社会性行動が低下することが明らかとなった。以上の結果から、Fgfシグナルの異常により自閉症が発症する可能性が示唆された。

高脂肪食インスリン抵抗性発症における腸管樹状細胞・腸管CD4陽性T細胞の病態生理学的役割

川野義長

(慶應義塾大学医学部)

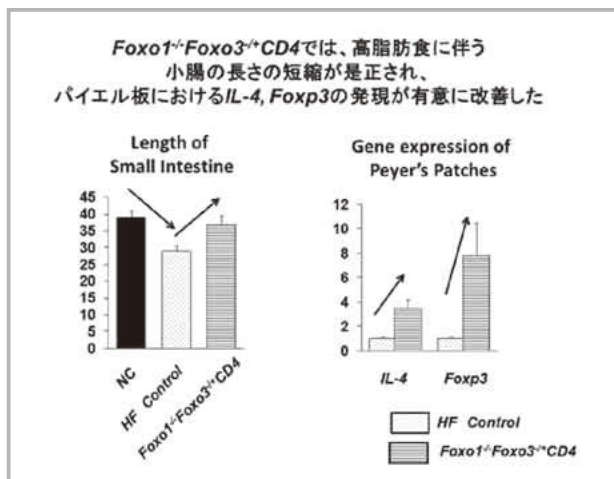
Nlrp10は、腸管樹状細胞が外的刺激を受けてT細胞の活性化、B細胞による抗体産生能に重要な役割を果たすNLRファミリーの1つである。樹状細胞マーカーCD11cCreを使用し、CD11c細胞特異的Nlrp10欠損マウスを作製したところ、高脂肪食負荷下において大腸でFoxp3およびIL-17発現が有意に低下し、腸管の炎症が悪化し耐糖能が悪化した(下図参照)。これらのデータから樹状細胞Nlrp10がTreg, Th17細胞およびILC3細胞などの分化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。既報では、Th17細胞とILC3細胞の分化に重要な転写因子Ror γ tを欠損させたマウスが、肥満を呈する事から、腸管Th17細胞やILC3細胞が全身の糖・エネルギー代謝を制御している可能性が示唆されており、腸管樹状細胞Nlrp10もこれらの分化に影響を与えることで、糖・エネルギー代謝をリモートコントロールする可能性があり、今後解析を進めていく。

Tリンパ球特異的Foxo1ノックアウトFoxo3ヘテロノックアウトマウス(*T-QuarterKO*; 以下*T-QKO*と称する)は高脂肪食負荷において負荷10週移行コントロールと比較して有意に体重増加が抑制され、耐糖能およびインスリン抵抗性が有意に改善した。

*T-QKO*では、コントロールで認める高脂肪食負荷に伴う小腸の長さの短縮およびパイエル板の萎縮が有意に改善する。*T-QKO*における小腸の所属リンパ節であるパイエル板の炎症関連遺伝子の発現量をReal Time PCRを用いて検討した。その結果、*T-QKO*のパイエル

板において、Th2 サイトカインの1つである IL-4 および Treg マーカー Foxp3 の遺伝子発現がコントロールと比較して有意に増加していた。T-QKO では、酸素消費量の増加による抗肥満の表現型を呈し、寒冷刺激下において Pgc1a 遺伝子発現の有意の増加が褐色脂肪組織および皮下脂肪組織において認められた。また褐色脂肪組織では小腸パイエル板同様、Th2 サイトカインである IL4 および IL13 遺伝子発現の有意の増加が認められた。

以上から、T リンパ球における Foxo ファミリーは、Th2 リンパ球への分化または変換を抑制する作用があると考えられ、脂肪組織において Th2 サイトカインの発現を抑制することにより、Beige 化を抑制し、最終的にエネルギー消費を抑制する作用があると考えられた。T-QKO の「小腸の慢性炎症の抑制」と「脂肪組織における Beige 化の抑制」をつなぐメカニズムに関しては、今後のさらなる検討が必要と考えられた。



グレリン分泌細胞における GPCR 発現解析および新規調節因子の探索

小山 博之

(名古屋市立大学大学院医学研究科)

【目的】

申請者はこれまで胃グレリン分泌細胞株の RNA シーケンシングによる網羅的遺伝子発現解析を行い、高発現する GPCR のリガンドの添加実験によりトリプトファンやパルミチン酸、長鎖脂肪酸など栄養素がグレリン分泌を制御することを明らかとしてきた¹⁾。

本研究助成を得た 2016 年 6 月より現在の名古屋市立

大学に拠点を移し、臨床面での貢献もいっそう求められる立場になり、1st author として臨床にて経験した 2 症例を論文報告し^{2, 3)}、過去の基礎研究と今後の臨床活動をつなぐ疾患としてサルコペニアに注視するようになった。

サルコペニアは筋力低下を主徴とする老年症候群であり、成因として運動不足や低栄養にくわえ慢性炎症や内分泌異常（インスリン抵抗性、性ホルモンや成長ホルモンの分泌・作用不全）が想定されているが未だ不明な点が多くエビデンスの確立した治療法は存在しないのが実情であり、超高齢社会を迎える我が国においてサルコペニアの病態解明および予防・治療法の確立は喫緊の課題である。グレリンもサルコペニア治療のターゲットとして現在臨床試験が進んでいる。

そこで筆者は、臨床面においては 2018 年よりサルコペニア外来を立ち上げ治療に従事するかたわら、EPA や DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のサルコペニア治療の可能性に思い至り、前向き臨床研究へ橋渡しするための研究を新規に開始した。EPA/DHA 製剤は抗炎症作用・抗動脈硬化作用を有し脂質異常症や閉塞性動脈硬化症の治療薬として実臨床にて使用されている。

本研究では、2 種類のサルコペニアモデルマウス（老齢 C57BL/6J マウスおよび、SAM (Senescence-Accelerated Mouse)-P10 マウス) に n-3 系 PUFA 慢性投与実験を行い、サルコペニアの主病態である筋肉量およびその機能（筋タンパク合成・分解・ミトコンドリア機能など）に与える影響およびその作用機序の解明に迫る。

【文献】

- 1) Koyama, H. et al.: 'Comprehensive Profiling of GPCR Expression in Ghrelin-producing Cells' *Endocrinology*. 157(2):692-704, 2016
- 2) Koyama, H. et al.: 'Nocturnal reactive hypoglycemia well-treated subjectively and objectively with voglibose' *BMJ Case Reports* 2017; doi:10.1136/bcr-2017-220295
- 3) Koyama, H. et al.: 'Suspected case of lipoedema in a Japanese woman with a characteristic histology in skin biopsy' *BMJ Case Reports* 2017; doi:10.1136/bcr-2017-221049

オレキシン受容体アゴニストの創製と薬理作用の解明

齊藤 毅

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

視床下部外側野で産生されるオレキシン (OX) は、オレキシン 1 受容体 (OX₁R) およびオレキシン 2 受容体 (OX₂R) に結合することで覚醒や摂食を誘導する^{1,2)}。これまでに我々は、オレキシン受容体を標的とした低分子作動薬の創薬研究を実施し、OX₂R 選択的作動薬 YNT-185 (EC₅₀ = 28 nM (OX₂R), OX₁R/OX₂R = 100)³⁾や OX_{1/2}R dual 作動薬を見出してきた。特に、OX₂R 作動薬はナルコレプシー治療薬として期待⁴⁾され、YNT-185 はナルコレプシーモデルマウスに対する末梢投与 (40 mg/kg) で顕著なカタプレキシー抑制作用を示した。また、ナルコレプシーの随伴症状である肥満について YNT-185 の影響を検討したところ、有意に体重増加を抑制することを見出した⁵⁾。一方で、オレキシンを過剰発現するマウスでは、高脂肪食により誘導される肥満や、耐糖能異常を示さないことが報告されている⁶⁾。そこで、野生型マウスにおいても YNT-185 が抗肥満効果を示すのではないかと考え、検証を行うこととした。

【方法・結果】

ナルコレプシーモデルマウスでの体重増加は、YNT-185 を 1 日 1 回、14 日間連日投与することで抑制されていた。そのため、高脂肪食を負荷した野生型マウスに、1 日 1 回活動期前に YNT-185 を 40 mg/kg 腹腔内に投与し、体重変化を 8 日間計測した。その結果、YNT-185 投与群では、高脂肪食負荷による体重増加が有意に抑制された。また、8 日後のマウス血漿中の中性脂肪値を調べたところ、YNT-185 投与群では高脂肪食負荷による中性脂肪値の上昇が有意に抑制されていた。

【考察】

オレキシンは食事性のリズム構築に重要であり⁷⁾、また血糖値の日内変動が緩慢である糖尿病マウスに、オレキシン受容体非選択的拮抗薬 suvorexant を 1 日 1 回、明期前に投与すると、睡眠および耐糖能異常が改善する⁸⁾ことが報告されている。これらの事実から、活動期前に

オレキシン受容体作動薬を定期的に投与すると、交感神経の活性化を介して生体リズムのバランスが調節され、抗肥満作用が発現しているのではないかと考えられる。今後、高脂肪食負荷マウスに対して YNT-185 を異なる時間帯で投与し、時間依存的な効果の違いを検討する。また、生化学的肥満マーカー、食欲に及ぼす効果の検証、YNT-185 の本作用における標的部位の解析を行っていく予定である。

【文献】

- 1) Sakurai, T. *et al.*: *Cell* **92**, 573-585 (1998).
- 2) Chemelli, R.M. *et al.*: *Cell* **98**, 437-451 (1999).
- 3) T. Nagahara *et al.*: *J. Med. Chem.* **58**, 7931-7937 (2015).
- 4) M. Mieda *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4649-4654 (2004).
- 5) Irukayama-Tomobe, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 5731-5736 (2017).
- 6) Funato, H. *et al.*: *Cell Metab.* **9**, 64-76 (2009).
- 7) Mieda, M. *et al.*: *J. Neurosci.* **24**, 10493-10501 (2004).
- 8) Tsuneki, H. *et al.*: *Endocrinol.* **157**, 4146-4157 (2016).

睡眠の記憶における機能

坂口 昌徳

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

睡眠中の脳は、覚醒時に学習した新たな情報を記憶として固定化する。それに携わる脳領域やそのタイミングは学習および睡眠それぞれの種類によって異なる。我々は独自の研究成果^{1,3,5)}を元に、特に海馬歯状回の新生ニューロンが睡眠中の記憶固定化メカニズムに果たす役割を検討した。ほ乳類の成体脳では、ニューロンの新生は基本的には起こらないが、稀な例外として海馬歯状回ではニューロン新生が生涯続く。今回、光遺伝学的手法を用い、マウス脳内の新生ニューロンの興奮を睡眠ステージ選択的に抑制し、その記憶固定化へのメカニズム

を検討した。

【方法】

pNestin-CreERT2 マウス (Nestin マウス) に CAG-loxP-stop-loxP (LSL)-eNpH3.0 マウス (Halo マウス) を交配し, NestinHalo マウスを作成した。成獣となった時点で Tamoxifen を投与し Cre 酵素が神経前駆細胞のゲノムの LSL 配列を除去する。これにより, Tamoxifen 投与期間に生まれた新生ニューロンに選択的に Halorhodopsin 光受容体 (Halo) を発現させる。Halo はオレンジ色の光に反応し神経細胞内に Cl⁻イオンを流入されるため神経の興奮を抑制できる。

【結果】

Nestin/Halo マウスの歯状回において, スライスパッチクランプ法を用いて照射期間に限定した新生ニューロンの興奮抑制を確認した。リアルタイムで睡眠を分析しながら特定の睡眠ステージに選択的に照射し, 新生ニューロンの興奮を制御するシステムを構築した。この方法を使って睡眠中に音で恐怖記憶を減弱させることを示した²⁾。この恐怖記憶学習直後の時間帯に, 大脳皮質と海馬間で起こると考えられる記憶処理システムのスイッチング現象を見出した。この現象は睡眠依存的であり海馬依存的な機構であることを示すデータを得た。

【考察】

我々は成体脳で新生するニューロンが, 睡眠中の記憶固定化に果たす役割を明らかにしつつ有る。実際に, 新生ニューロンが睡眠中に記憶を固定化する際に, 学習依存的にどのような活動パターンを示すかの解析を進めている。今後本研究を継続することで, 哺乳類だけが持つ記憶学習メカニズムの一端を明らかにすることが可能と考えられる。

【助成期間中の発表論文】

- 1) Akers, KG., Fujita, Y., Chérasse, Y., Srinivasan, S., Sakurai, T. & Sakaguchi, M*.: Role of adult hippocampal neurogenesis in memory processing and regulation by sleep and epigenetics, Stem Cells, 2018 Feb, DOI: 10.1002/stem. 2815, *corresponding
- 2) Purple, R*, Sakurai, T. & Sakaguchi, M*.: Auditory conditioned stimulus presentation during NREM sleep impairs fear memory in mice, Sci.

Rep., 7:46247, 2017, *corresponding authors, NHK 報道等

- 3) Fujinaka, A[¥], Li, R[¥], Hayashi, M., Kumar, D., Changarathil, G., Naito, K., Miki, K., Nishiyama, T., Lazarus, M., Sakurai, S., Kee, N., Nakajima, S., Wang, SH. & Sakaguchi, M*.: Effect of context exposure after fear learning on memory generalization in mice, Mol. Brain, 2016 Jan, 9:2, *corresponding author, [¥]=equally contributed, 朝日新聞掲載, 筑波大学学長賞受賞等
- 4) Sakaguchi, M*, Kim, K., Yu, LMY., Hashikawa, Y., Sekine, Y., Okumura, Y., Kawano, M., Hayashi, M., Kumar, D., Boyden, ES., McHugh, TJ. & Hayashi, Y*.: Inhibiting the activity of CA1 hippocampal neurons prevents the recall of contextual fear memory in inducible ArchT transgenic mice, Plos ONE, 2015 Jun 15;10(6) *=corresponding authors
- 5) Arruda-Carvalho, M., Akers, KG., Guskjolen, AJ., Sakaguchi, M. & Josselyn, S.: Frankland PW, Post-training ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories, J.Neurosci., 2014 Nov 19;34(47): 15793-803.

骨髄単核球、脂肪組織由来間葉系肝細胞などを用いた再生医療（血管新生療法、リンパ管新生療法など）

清水 優 樹

（名古屋大学医学部附属病院）

血管およびリンパ管は全身に広く存在し, 生体においては生命活動維持の為に必須の存在といえる (ノックアウトマウスではいずれも胎生致死となる)。また, 生後において, これら脈管の機能不全が生じると, 血液循環あるいはリンパ循環が障害され, 臓器障害, 組織ホメオスターシスの破綻などに至る。

循環器疾患においても血管やリンパ管は, その病態に密接に関連し, 重症度およびその後の機能的予後, 生命予後もこれらが規定している。心筋梗塞をはじめとした,

虚血性心疾患に関しては世界の死因第1位を占め、さらなる病態の解明とその対策は急務である。

リンパ管研究においては、血管新生研究と比して、脆弱な脈管であることや同定する特異的マーカーなどがなかったことから基礎研究レベルから遅れをとっている。また臨床においては、我が国でも乳がんをはじめとした術後のリンパ浮腫で悩まされる患者の存在は多く、手術による根治療法の拡大と共に、今後もさらに多くの方が発症することが予想される。これらリンパ浮腫に対する対策は現在のところリンパマッサージや弾性ストッキングなどの理学療法が中心であり、根本的治療が存在しなかった。よって、難治性リンパ浮腫に対する治療法の開発も求められている。

従って心筋梗塞や組織障害、リンパ浮腫をターゲットに、本研究を進めていく事により、これまで有効な治療法が存在しなかった、難治性心血管病に対する病態の解明と新規治療法の開発につながる事が期待できる。

本研究助成による成果として、心臓リンパ管研究の一部を解明でき、また、リンパ浮腫に対しては新規治療ターゲットとなりうる“治療的リンパ管新生”の可能性を示すことができた。今後もリンパ管・血管新生研究を中心とした難治性疾患の病態の解明とトランスレーショナルリサーチを継続し、さらなる研究の発展に努めていく次第である。

【文献】

- 1) Shimizu, Y., Polavarapu, R., Eskla, KL., Nicholson, CK., Koczor, CA., Wang, R., Lewis, W., Shiva, S., Lefter, DJ. & Calvert, JW.: Hydrogen sulfide regulates cardiac mitochondrial biogenesis via the activation of AMPK. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Jan 29;116:29-40.
- 2) Barr, LA., Lambert, JP., Shimizu, Y., Barouch, LA., Naqvi, N. & Calvert, JW.: Exercise training provides cardioprotection by activating and coupling endothelial nitric oxide synthase via a β 3-adrenergic receptor-AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Med Gas Res.* 2017 Mar 30;7(1):1-8.
- 3) Hayashida, R., Kondo, K., Morita, S., Unno, K., Shintani, S., Shimizu, Y., Calvert, JW., Shibata,

R. & Murohara, T.: Diallyl Trisulfide Augments Ischemia-Induced Angiogenesis via an Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism. *Circ J.* 2017 May 25;81(6):870-878.

全組織レベルの高速な遺伝子発現解析を目指す組織透明化技術の開発

洲 崎 悦 生

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

オミクス的アプローチにより得られる網羅的情報を個体機能と関連づけるには、神経細胞・回路レベルでの構造や機能のバリエーションを検出することが重要である。このような観点から、研究代表者らは、遺伝子機能の時空間的な発現ダイナミクスや神経回路の解剖学的情報を全脳スケールで捉える技術として CUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and Computational analysis) を報告した [Susaki et al. Cell 2014; Tainaka et al. Cell 2014 他]。本技術は、高度な組織透明化とシート照明顕微鏡を組み合わせた高速な組織全体のイメージングを実現し、画像解析によるサンプル間の定量的な比較を可能とした。本年度は、CUBIC によるヒト病理の3次元展開や肥満研究への応用例を蓄積した。また、セルオミクス解析に必須となる、遺伝学的細胞ラベリングの高速化のため開発した「次世代マウス遺伝学」(交配なしマウス遺伝学) についての英文総説を発表した。

【結果】

CUBIC による3次元観察によって、膵臓 β 細胞への神経支配が検出され、肥満時に β 細胞の増殖が制御されるメカニズムの一端が明らかとなった¹⁾。ヒト臨床病理学を3次元へ拡張するコンセプトスタディを行い、パラフィンブロック標本への適応や、3次元観察による微小癌転移の検出感度の大幅上昇などの実例を示した²⁾。実験目的に応じて観察対象となる細胞や解剖学的構造を遺伝学的にラベルする手法を高速化するために、ES細胞でゲノム改変後の第1世代(F0世代)で全身のゲノム改変が完了した解析個体(ESマウス)を作製するスキー

ム「次世代マウス遺伝学」について、研究代表者らの成果 [Ode et al. Mol Cell 2017] 等を含む関連研究をまとめ、英文総説を発表した³⁾。

【文献】

- 1) Neuronal signals regulate obesity induced β -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. Yamamoto, J., Imai, J., Izumi, T., Takahashi, H., Kawana, Y., Takahashi, K., Kodama, S., Kaneko, K., Gao, J., Uno, K., Sawada, S., Asano, T., Kalinichenko, VV., Susaki, EA., Kanzaki, M., Ueda, HR., Ishigaki, Y., Yamada, T. & Katagiri H.: Nature communications 8(1) 1930 2017.
- 2) CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. Nojima, S., Susaki, EA., Yoshida, K., Takemoto, H., Tsujimura, N., Iijima, S., Takachi, K., Nakahara, Y., Tahara, S., Ohshima, K., Kurashige, M., Hori, Y., Wada, N., Ikeda, JI., Kumanogoh, A., Morii, E. & Ueda, HR.: Scientific reports 7(1) 9269 2017.
- 3) Next-generation mammalian genetics toward organism-level systems biology. Susaki, EA., Ukai, H. & Ueda, HR.: npj Systems Biology and Applications 3 15 2017.

生活習慣病に関連した腎障害において、慢性炎症に 対抗するオートファジー

高橋 篤史

(大阪大学大学院医学系研究科)

糖尿病、高脂血症、高尿酸血症などの生活習慣病は、様々な機序で腎障害に関与している。近年、様々な病態において慢性炎症の関与が示唆されているが、これらの生活習慣と関連した代謝疾患による腎障害も例外ではないと考えられる。そして、細胞レベルで機序を検討してみると、細胞内恒常性維持機構であるオートファジーが、ミトコンドリアやリソソームの機能維持を介して慢性炎症を抑制する可能性がある。

我々は、近位尿管特異的オートファジー不全マウスならびに対照マウスに対して、(1) 高血糖（ストレプト

ゾトシンを投与）、(2) 高脂血症（高脂肪食：HFD-60 を負荷）、(3) 高尿酸血症（尿酸ならびにウリカーゼ阻害剤を投与）を誘発する実験によって、オートファジーがこれらの疾患モデルにおいて、炎症を抑制し、腎障害を軽減することを見出した。

これらの結果から、オートファジーを亢進させることが、疾患の治療につながる事が期待されるが、単純にオートファジーを亢進させることが病態の改善につながるとは限らない。我々はオートファジーと生活習慣病の研究において、オートファジーの終着点であるリソソームに着目し、「リソソームの機能低下が、オートファジーの停滞を引き起こし、病態の悪化につながる事」を見出した²⁾。すなわち、リソソームの機能が十分でないオートファジーという機構が十分に機能しないと考えられるわけである。

一方、我々は、オートファジー抑制因子である Rubicon (Matsunaga et al. Nat Cell Biol. 2009 Apr;11(4):385-96) にも着目してきた。理論上、Rubicon をノックアウトすることによりオートファジーの活性化が得られるわけであるが、近位尿管特異的 Rubicon ノックアウトマウスでは前述の生活習慣病モデルにおいて病態の改善が得られず、むしろ、通常の飼育下で肥満を呈することが判明した。これはオートファジーを適度に抑制しないと肥満につながることを示唆しており、その機序を現在検討中である。オートファジーは飢餓に対抗するメカニズムでもあるため、栄養が十分な状態もしくは過栄養の状態では適度に抑制されることも必要なかもしれない。

将来的には、活性化させるか抑制するかは別として、オートファジーを調整する薬剤が開発され、生活習慣病に応用されることを期待したい。

【文献】

- 1) Takahashi, A., Takabatake, Y., Kimura, T., Maejima, E., Namba, T., Matsuda, J., Minami, S., Kaimori, J., Matsui, I., Matsusaka, T., Niimura, F., Yoshimori, T. & Isaka, Y.: Autophagy Inhibits the Accumulation of Advanced Glycation End Products by Promoting Lysosomal Biogenesis and Function in the Kidney Proximal Tubules. *Diabetes.*, 66 (5): 1359-1372, (2017).

- 2) Yamamoto, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kimura, T., Namba, T., Matsuda, J., Minami, S., Kaimori, J., Matsui, I., Matsusaka, T., Niimura, F., Yanagita, M. & Isaka, Y.: High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol.*, 28(5): 1534-1551, (2017).
- 3) Isaka, Y., Takabatake, Y., Takahashi, A., Saitoh, T. & Yoshimori, T.: Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.*, 31(6): 890-6, (2016).

リスク因子が各アウトカムに及ぼす影響の差異の検出

高原 充 佳

(大阪大学大学院医学系研究科)

リスク因子がアウトカムに及ぼす影響を検討するうえで、回帰モデルは有用であり、これまでも種々の性質を持つアウトカムに対して種々の回帰モデルが考案され広く利用されてきた。回帰モデルが活用できる領域は実に広く、例えばリスク因子のアウトカムに及ぼす影響が対象集団によって異なる場合（すなわち他の因子によって修飾を受ける場合）であっても、それを交互作用効果として回帰モデルに組み込むことにより、1つの回帰モデル上で分析することが可能である。1つの回帰モデルで分析できるということは、説明変数と従属変数の関連性を評価するのと同じ土俵、同じ尺度で評価が可能であることを意味する。これはモデルを用いた分析を行ううえで大変な長所となる。一方、リスク因子がアウトカムに及ぼす影響がアウトカムの属性によって異なる場合については、これを単一の回帰モデルで取り扱うことは難しく、結果としてアウトカムごとに回帰モデルを構築し、別々にモデルの解釈が行われることが多かった。しかしモデルを別々に構築してしまうと、モデル間で、説明変数と従属変数との関連性を比較することは難しく、結果として、アウトカム間でのリスク因子の及ぼす影響の差異を統計学的に検出することの障害となっていた。こうした事象を単一の回帰モデルで表すことができれば、説

明変数と従属変数の関連性を評価するのと同じ尺度でアウトカム間の差異を表現することが可能となり、リスク因子とアウトカムとの関連性の理解の促進につながるものと期待される。我々は混合モデルの性質に着目し、線形混合モデルもしくは一般化線形混合モデルを拡張することにより、こうしたアウトカム間でのリスク因子がアウトカムに及ぼす影響の差異を単一の回帰モデル上で取り扱える可能性を見出した。

アルツハイマー型認知症の病態解明と新規治療・診断法の確立に向けた研究

武 田 朱 公

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

アルツハイマー病の病態解明とその診断・治療法開発へ向けた基盤的研究を行う。アルツハイマー病の特徴的病理所見である神経原線維変化（タウ凝集体）は神経細胞死と直接的に関連しており、診断・治療法開発の有力な標的と考えられている。申請者等はこれまでにタウ病理の進展に関与する特殊なタウを同定しており¹⁻³⁾、これを標的とした治療法開発を進める。またタウを標的とした髄液マーカー探索のためのプレクリニカルモデルの構築や、ヒト髄液検体を用いた病態マーカーの開発を行う。さらに、認知症の超早期診断に向けた試みとして、高精度視線検出技術を用いた定量的認知機能評価法の開発を行う。

【方法・結果】

1：タウ伝播を標的とした治療シーズの探索

タウを標的とした免疫療法の開発をマウスモデルを用いて行った。伝播に関与するタウを中和する抗体の選定を行い、またペプチドワクチンの作製手法を用いてタウ伝播を阻害するために最も重要なリン酸化部位のスクリーニングを開始した。さらに、*in vitro* タウ伝播アッセイを用いて化合物ライブラリーからタウ伝播阻害因子の探索を開始した。

2：タウ関連脳脊髄液バイオマーカーの探索

マウス脳脊髄液を覚醒自由行動下で持続的に回収するための手法を開発した（論文投稿中）。これを利用して

髄液中に存在するタウ分子種の解析を行った。また、認知症患者髄液中に存在する高分子量リン酸化タウの測定を行い、その病態における意義を解析した。

3：高精度視線検出技術を用いた認知機能評価システムの開発

視線検出技術と認知機能評価映像を組み合わせ、注視点データを基に被験者の認知機能を短時間で定量的にスコアリングするシステムを構築した。これを用いて認知症の早期診断を行い、超早期から変化する髄液マーカーの探索を開始した。

【考察】

アルツハイマー病タウ病理を標的とした治療法と診断マーカーの探索を進めている。また認知症の超早期診断を目指したデバイスの開発を行い、これを利用して超早期認知症患者を対象とした髄液バンク構築を行っている。これらはアルツハイマー病の早期診断・治療法開発の基盤となることが期待される。

【文献】

- 1) Takeda, S. *et al.*: *Nature Communications* 6:8490, (2015).
- 2) Takeda, S. *et al.*: *Annals of Neurology* 80(3): 355-67, (2016).
- 3) Takeda, S. *et al.*: *American Journal of Pathology* 187(6): 1399-1412, (2017).
- 4) Takeda, S. *et al.*: *PNAS* 107(15) (2010).
- 5) 武田朱公: 認知症バイオマーカーとしての CSF タウ, 『実験医学』 Vol.35 No.12 p210 (2017)
- 6) 武田朱公: タウ伝播仮説の可能性と限界について, 『実験医学』 Vol.35 No.12 p152 (2017)

細胞接着・接触を介した肝臓の糖代謝制御機構

土屋 恭一郎

(山梨大学医学部)

【背景・目的】

肥満に伴う脂肪肝や糖脂質代謝異常において、肝実質への CCR-2 陽性骨髄系細胞の浸潤が促進的役割を果たしている。肥満に伴い骨髄系細胞が肝実質へ浸潤する機構、及び肝細胞との相互作用について、細胞接着・接触

の視点から検討した。

【方法・結果】

肥満マウス由来の肝類洞内皮細胞 (LSEC) では、ケモカイン MCP-1 の受容体 CCR-2、及び接着因子 (VCAM-1, Selectins) の発現が増加していた。肥満マウス肝臓の電子顕微鏡による解析では、単球・マクロファージが LSEC と接着する像や、肝実質細胞間に浸潤している像が多数観察された。生体イメージングでは、*ob/ob* マウスの肝臓において類洞壁の接着する Lysozyme M 陽性細胞が野生型マウスと比較して有意に増加していた。還流装置による細胞接着実験では、肥満マウス由来 LSEC において単球の接着が著明に増加しており、接着因子 VCAM-1 のリガンド VLA-4 に対する中和抗体の前処置により接着が抑制された。同様に、*ob/ob* マウスにおいて VLA-4 中和抗体を投与すると類洞壁に接着する細胞が有意に減少した。肝細胞とマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の接触共培養では、糖新生関連遺伝子 (*Pck1*, *G6pc*) の発現誘導と糖産生の増加が認められ、Notch 阻害剤により *Pck1*, *G6pc* の発現誘導は抑制された。さらに、高脂肪食負荷マウスへの抗 VLA-4 抗体投与により、肝臓への Gr-1 および CCR-2 陽性細胞の浸潤が抑制され、MCP-1, CCR-2, TNF- α の遺伝子発現の減少とインスリン抵抗性の改善が認められた。

【考察】

肥満では、LSEC において MCP-1 の発現が亢進しており、肝臓への骨髄系細胞の誘導に促進的役割を果たすことが示唆された。また、骨髄系細胞は LSEC との細胞接着亢進を介して肝実質に浸潤し、肝細胞との細胞接触を介して代謝異常を惹起する機構が推察された。

【文献】

Miyachi, Y., Tsuchiya, K., Komiya, C., Shiba, K., Shimazu, N., Yamaguchi, S., Deushi, M., Osaka, M., Inoue, K., Sato, Y., Matsumoto, S., Kikuta, J., Wake, K., Yoshida, M., Ishii, M. & Ogawa, Y.: Roles for Cell-Cell Adhesion and Contact in Obesity-Induced Hepatic Myeloid Cell Accumulation and Glucose Intolerance. *Cell Rep.* 2017;18(11):2766-2779.

C型利尿ペプチドの心血管系における生理および病態生理的意義の検討

中尾 一 泰

(国立循環器病研究センター病院)

【目的】

C型利尿ペプチド (CNP) は3番目のナトリウム利尿ペプチドとして、ブタの脳から発見され、主にオートクリン、パラクリン作用により局所での生理および病態生理機能に関係していることが示唆されてきた。その後、ノックアウトマウスが作製されたが、軟骨における高度の内軟骨骨化障害による著しい吻殿長の短縮により、心血管系での CNP の生理的意義を解明することは困難であった。組織特異的 CNP ノックアウトマウスを用いて心血管系での CNP/GC-B 系の意義を明らかにすること。

【方法、結果】

CNP^{flox/flox} マウスおよび CNP の特異的なレセプターと考えられている膜型グアニル酸シクラーゼである GC-B^{flox/flox} マウスを作製した。CNP^{flox/flox} マウスと Tie2-Cre マウスを交配し、血管内皮細胞特異的 CNPKO マウス (ecKO) を作製した。このマウスは対照マウスと比較し吻殿長に差を認めず、血管系の解析が可能となった。頸動脈に挿入したテレメトリー血圧計で24時間自由行動下の血圧を測定したところ、対照マウスと比較し、ecKO では収縮期血圧が有意に上昇していた。心拍数には有意差は認められなかった。更に、腸間膜動脈を用いて、内皮依存性血管拡張反応を測定すると、ecKO 群は対照群と比較し、有意な減弱を認めた。次に、内皮由来 CNP が血管平滑筋の GC-B を介して作用しているという仮説のもとに、GC-B^{flox/flox} マウスを SM22-Cre マウスと交配し、血管平滑筋特異的 GC-BKO マウス (smKO) を作製した。ecKO と対照的に、smKO は対照群と比較し、血圧および内皮依存性血管拡張反応に有意差を認めなかった。これらの結果から、内皮由来 CNP は血管平滑筋の GC-B を介さず作用していることが示唆された。平滑筋のほかに考える作用部位として内皮のレセプターを介している可能性があると考え、内皮の変化を評価するために ecKO マウスの肺から単離した血管内皮細胞の遺伝子発現を検討した。CNP の発現は ecKO マウ

スと比較し 1/10 以下に低下している一方、エンドセリン遺伝子や、ACE 遺伝子の有意な上昇をみとめた。同マウスの、血漿エンドセリン濃度およびアンジオテンシン II 濃度を測定したところ、ecKO でエンドセリン濃度の有意な上昇を認めた。さらに、同マウスにエンドセリン受容体拮抗薬を投与したところ、対照マウスと比較して ecKO マウスで血圧の低下が大きかった。以上より、ecKO の血圧上昇へのエンドセリン系の関与が示唆された。以上を論文発表した。

さらに、心臓における CNP 系の意義を明らかにするために、Potin-Cre マウスと CNP^{flox/flox} マウスを交配し、心臓特異的 CNPKO マウスを作製した。同マウスに、大動脈結紮にて心肥大モデルを作製したところ、KO マウスはコントロールと比較し有意に心重量が重かった。今後、機序など、更なる検討を行う。

【考察】

C型利尿ペプチド (CNP) は心血管系において、オートクリン、パラクリン作用により局所での病態生理機能に関係していることが示唆される。今回の検討では、CNP の主な受容体と考えられる GC-B の KO では表現型が一致しておらず、更なる検討を要すると考えられる。

【文献】

Nakao, K. & Kuwahara, K., *et al.*: Endothelium-Derived C-Type Natriuretic Peptide Contributes to Blood Pressure Regulation by Maintaining Endothelial Integrity. *Hypertension*. 2017 Feb; 69 (2): 286-296.

内軟骨骨化における CNP/GC-B 系の生理的意義

中尾 一 祐

(京都大学大学院医学研究科)

【背景・目的】

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は、グアニル酸シクラーゼ B (GC-B) を介して生物作用を発揮する。我々はこれまでに CNP あるいは GC-B の全身ノックアウトマウスが著明な骨伸長障害を示すことを報告し、CNP/GC-B 系が内軟骨性骨化により形成される骨伸長に対する強力な促進系であることを証明してきた。

CNP/GC-B系は、脳、血管、骨など全身に幅広く分布する paracrine/autocrine 系調節因子であるが、今回成長板軟骨における意義を検討するために、Cre-loxP システムを用いて軟骨特異的 CNP ノックアウトマウス (C-CNP-KO) 及び GC-B ノックアウトマウス (C-GC-B-KO) を作製し、解析した。更に CNP/GC-B 系の顎顔面形態形成に与える影響を検討し、顎変形症に対する新たな治療法となる可能性を検討するために、CNP トランスジェニックマウス (CNP-Tg マウス) および軟骨無形成症モデルマウス (Ach マウス) 用いて検討した。

【方法・結果】

C-CNP-KO および C-GC-B-KO の吻殿長は、10 週齢ではそれぞれの対照マウスの吻殿長の 78.6% および 72.5% であり、ともに椎骨と四肢長管骨は著明な短縮が認められ、全身性 KO の表現系をほぼ再現していた。2 週齢の C-CNP-KO および C-GC-B-KO の脛骨骨端成長板軟骨組織像は、肥大化軟骨細胞層の厚さと細胞数の著明な減少を認めた。生後 1 日目の C-CNP-KO 及び C-GC-B-KO から脛骨を採取し器官培養を行ったところ、共に脛骨成長板の著しい成長抑制を認めた。C-CNP-KO から採取した脛骨成長板は CNP 添加により、成長板軟骨の厚みが改善したが、C-GC-B-KO から採取した脛骨成長板は CNP 添加により全く改善しなかった。

また、CNPTg マウスおよび Ach マウスの顎顔面表現系解析を行ったところ、CNP-Tg マウスは内軟骨性骨化の促進により上顎過成長を、一方、Ach マウスは頭蓋底軟骨結合部の早期骨化により上顎の劣成長と大後頭孔の狭窄を呈していた。Ach マウスに認められた上顎の劣成長は CNP-Tg マウスとの交配により有意に改善した。さらに大後頭孔の狭窄についても改善した。組織学的検討の結果、軟骨結合部の早期骨化については改善できなかったが、軟骨結合部の骨化が生じるまでに、軟骨結合部の成長が促進することにより顎顔面形態異常の改善できたことが明らかとなった。

【考察】

成長板に発現する CNP は局所因子として、成長板軟骨に発現する GC-B を介して、骨伸長作用を示すことを証明した。また、CNP 投与は軟骨無形成症患者などに生じる顎変形症に対する新たな治療法となりうる可能性が示唆された。

食塩による心筋リモデリングに対するナトリウム利尿ペプチドの及ぼす効果の研究

中川 仁

(奈良県立医科大学医学部)

【背景】

過剰なナトリウムは高血圧だけでなく、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) を活性化させ心筋肥大や心不全を引き起こす。ナトリウム利尿ペプチドは利尿によりナトリウムを調節するホルモンであるが、RAAS を抑制し心筋リモデリングに対して保護的に作用する事も知られている。しかし、ナトリウム利尿ペプチドがナトリウムによる心筋リモデリング増悪作用を抑制するかどうかは明らかにされていない。そこで、ナトリウム利尿ペプチドの作用不全を認めるマウスにおいて、過剰なナトリウムが心筋リモデリングを増悪させるか否かについて検討をおこなった。

【方法・結果】

ナトリウム利尿ペプチドの受容体が欠損 (GC-A KO) するマウスと野生型マウスに対して、血圧を上昇させない量の aldosterone (100 ng/kg/min) または vehicle を浸透圧ポンプで 4 週間投与し、それぞれに低食塩 (0.001%)、通常食塩 (0.6%)、高食塩 (6.0%) を与えた。野生型マウスにおいては、食塩負荷は vehicle 群、aldosterone 群のいずれにおいても心筋肥大・線維化を認めなかった。一方、GC-A KO マウスでは、高食塩と aldosterone 投与群において著明な心筋肥大と心臓間質の線維化を認め、心肥大・線維化と酸化ストレスに関連する遺伝子の発現が亢進しており、さらにミネラルコルチコイド受容体 (MR) の下流遺伝子である Sgk1 の遺伝子発現も亢進していた。これらの変化は野生型マウスでは認められなかった。さらに、高食塩のみでも GC-A KO マウスにおいては、心肥大と線維化のマーカーである BNP と CTGF が有意に増加した。

【結論】

本研究では、GC-A 受容体欠損マウスの aldosterone 投与下において、過剰な食塩が Sgk1 の上昇を伴う心筋リモデリングを引き起こす事が明らかになった。この事は、ナトリウム利尿ペプチド/GC-A 受容体のシグナル

が、アルドステロン/MR系による心筋リモデリングに対する食塩の増悪作用を抑制する事を示唆している。さらにGC-A KO マウスにおいて、食塩負荷のみでも心肥大と線維化のマーカーの上昇を認めていたことから、GC-A シグナルが食塩のMRを介さない心臓リモデリング作用も抑制している可能性が示唆された。

【文献】

Nakagawa, H., & Saito, Y. *et al.*: Salt accelerates aldosterone-induced cardiac remodeling in the absence of guanylyl cyclase-A signaling. *Life Sci.* Nov 15; 165: 9-15. (2016).

**血流による機械的刺激に対する血管内皮細胞応答の
in vivo イメージング解析**

中 嶋 洋 行

(国立循環器病研究センター研究所)

血管は血液が通る管であるため、血管の内側を覆う血管内皮細胞は常に血流に曝された状態にある。血流は、分泌性因子を介して血管機能を調節する一方、流れ自体がメカニカルストレスとして血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に作用する。血流が生み出すメカニカルストレスは、動脈硬化や脳動脈瘤などの病態の発症機序にも関与することから、血流に対する血管の応答性を理解することは、成人病などの血管が関与する種々の疾病の発症機序の理解にも繋がる医学的に重要な研究課題である。我々は、血流に対する内皮細胞の応答を *in vivo* イメージングによって細胞レベルで可視化することで、血流によるメカニカルストレスが、血管の形態や恒常性をどのように制御するのかを研究している。

ゼブラフィッシュは、胚が透明で遺伝子操作が容易なため、イメージングに適した脊椎動物モデルである。我々は、ゼブラフィッシュの血管内で種々の細胞応答を生きのまま可視化するトランスジェニックゼブラフィッシュ (TG) システムの作製を行っており、これまでに内皮細胞のカルシウム応答を生きのまま特異的にイメージングできる TG システムや、Hippo 経路の標的因子である YAP の核内移行 (転写活性化) を生きのまま可視化できる TG システムの樹立などを行ってきた。このような

系を用いることで、血流に応答した内皮細胞がカルシウム応答を起こす様子や、YAP が流れ依存的に核内に移行して転写活性化する様子を捉えている。このような観察を基に、血流に応答した YAP が、ある種の血管の管腔構造の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした (Nakajima et al., *Dev. Cell* (2017)).

血管の恒常性維持における血流の役割はよく研究されている一方、血管新生に関してはこれまで良い解析モデルが見つかっておらず、どのように流れが血管新生を制御するのかはほとんどわかっていなかった。今回我々は、発生過程のゼブラフィッシュでイメージングによる網羅的解析を行ったところ、血流依存的に血管形成が起こる部位を複数箇所同定した。これを詳細に解析したところ、血流によるメカニカルストレスに依存して起こる血管新生が、従来の (血流非依存的な) 血管新生とは全く異なる状態で起こっていることを新たに見出したので、本研究発表ではこれらの観察結果を詳しく紹介する。

**新たな心機能制御要素としての心臓マクロファージ
の機能解析**

中 山 幸 輝

(東京大学医学部)

【目的】

生活習慣病を原因とする心血管病は近年ますます増加しており、心不全は依然として罹患率と死亡率が高い。また高齢者心不全や繰り返す心不全の予後は不良であり、その病態生理の解明は急務である。我々はこれまでにマウスの心臓マクロファージが心臓恒常性維持に必須であることを示した。そこで、心臓マクロファージの新たな発現制御機構の解明が新たな治療戦略になり得ると考えた。

【方法】

若年マウスと老化マウスの心臓マクロファージの ATAC-seq を行うことで心臓マクロファージ特異的に発現する遺伝子の転写調節領域が、老化によりどのように変化するのかを捉えることができる。心臓の老化は心臓マクロファージと心筋細胞との相互作用の破綻が引き起こすという視点のもと、老化を転写制御領域の変化とし

でゲノム上で可視化し、これらのエピゲノム変化が心機能低下の表現型に与える影響を解析する。

【結果】

我々は心臓マクロファージ由来の心筋細胞保護的制御因子として分泌タンパクのアンフィレギュリン (Areg) を同定した¹⁾。Areg は心臓においてマクロファージでのみ発現しており、またその他の組織マクロファージでは発現しておらず細胞特異的な発現を示す。Areg のプロモーター領域は心臓マクロファージが老化するとエピゲノムが変化することが分かった。さらに心臓マクロファージの網羅的発現解析により、細胞起源によって異なることが分かった。

【考察】

心臓マクロファージの細胞起源が胎仔肝由来から骨髄単球由来のものに変わり、さらに骨髄の老化により心臓マクロファージが質的に変化すると考えられた。これらのエピゲノムの変化による心臓実質へ与える影響を解析することで、老化や心不全の新たな病態解明を図る。

【文献】

- 1) Katsuhito Fujiu, Munehiko Shibata, Yukiteru Nakayama, Fusa Ogata, Sahohime Matsumoto, Issei Komuro, Ryozi Nagai, & Ichiro Manabe.: A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation and cellular communication. *Nat Med.* 2017; 23(5): 611-622

GATA2 変異による遺伝性 MDS 由来 iPS 細胞を用いた分子発症機序の解明

西尾 美和子

(文京学院大学保健医療技術学部/
国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

多段階の遺伝子異常蓄積を経て発症すると考えられる骨髄異形成症候群 (MDS) では、これまでに様々な遺伝子異常が同定されてきた。GATA2 変異は、常染色体優性遺伝を呈する家族性 MDS の原因遺伝子異常であり、MDS 発症の中心的役割を担うマスター遺伝子異常

である。GATA2 変異にどのような多段階の分子異常の蓄積がおこって MDS の発症に至るのか、未発症家族性 MDS 患者の末梢血リンパ球から樹立したヒト iPS 細胞を用いて、「GATA2 変異による遺伝性 MDS 由来 iPS 細胞を用いた分子発症機序の解明」を目指すことを目的とする。

【方法】

家族性に MDS や白血病発症を認める家系において、遺伝子異常を解析し、GATA2 変異による家族性 MDS 家系を検出した。GATA2 変異を有する 2 家系の家族性 MDS の MDS 患者から末梢血リンパ球を無菌的に単離し、確立されている方法により 2 種類の GATA2 変異 iPS 細胞 (R396W と P250A) を樹立した。GATA2 変異 iPS 細胞を iPS-SAC 法で造血前駆細胞まで分化誘導した。長期的に培養を行い、形態、表面抗原、増殖能などの変化を、正常 iPS 分化細胞と比較し、MDS 幹細胞としての生物学的性状を解析した。また、骨髄移植モデルマウスを作製し、GATA2 変異をマウス造血幹細胞に過剰発現させた。

【結果】

GATA2 変異 iPS 細胞由来の造血前駆細胞は、正常 iPS 細胞と比較して有意に CD34 陽性細胞が減少していた。また、骨髄移植モデルマウスを作製し、GATA2 変異をマウス造血幹細胞に過剰発現させたところ、分化した顆粒球系細胞が著減していた。このことから GATA2 変異単独ですでに造血幹細胞の分化障害が生じていることが明らかとなった。

【考察】

家族性免疫不全/骨髄異形成症候群の原因遺伝子である GATA2 変異が、「MDS 幹細胞」を規定する遺伝子異常であることが明らかとなった。今回作製した遺伝性 MDS 由来 iPS 細胞を用いて MDS 発症に至る過程を明らかにし、MDS 発症メカニズムの解明につながることを期待している。今後、様々な協調遺伝子を同定することで世界初のヒト化 MDS モデルマウスを作製し、MDS の治療開発に役立てることを目指している。

ANPの病的血管を標的とした新たなトランスレーショナルリサーチへの展開

野尻 崇

(国立循環器病研究センター研究所)

【背景】

これまでに我々は、肺癌手術周術期に心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) を投与することにより、急性期合併症だけでなく術後早期再発を抑制することを報告した。本メカニズムとして、ANPの血管保護作用により、癌細胞の血管への接着を抑制し、様々な癌腫の転移を防ぐことができることを明らかにしており、ANPの血管制御作用に注目している。

【目的】

様々な病態モデルに対して ANP 単独又は薬剤併用による安全性及び有用性について検討し、前向き臨床研究へ橋渡しすること。

【方法及び結果】

①リポポリサッカライド誘発急性肺障害マウスに対して、ANP 前投与を行うと、対照群と比較して、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数増加を軽減し、病理組織学的にも炎症細胞浸潤を抑制することを確認した。②シスプラチン (CDDP) 誘発急性腎障害マウスに対して、ANP 前投与を行うと、対照群と比較して、腎障害マーカーの増加を抑制し、病理組織学的にも腎臓へのダメージを軽減することを確認した。③ブレオマイシン肺線維症マウスに対して、ANP 投与により線維化が有意に抑制されること、また、血管内皮特異的 GC-A 過剰発現マウス (EC GC-A Tg) では対照マウスと比較して肺線維化が有意に軽減されたことから、ANPの血管保護による線維化抑制作用である可能性が示唆された。④低酸素誘発肺高血圧モデルマウスに対して、ANP 投与群では対照群と比較して、収縮期肺動脈圧は有意に低値であり、同様の条件下において EC GC-A Tg では、対照マウスと比較して、収縮期肺動脈圧が有意に改善されたことから、ANPは主に血管内皮を介した肺高血圧改善効果を有する可能性が示唆された。⑤4T1 乳癌及び Colon26 大腸癌同所移植マウスに対して、ANP 単独投与を行うと、対照群と比較して腫瘍サイズは有意差を認めなかつ

たが、肺転移は有意に減少した。本メカニズムとして、癌が転移する前に転移予定先臓器において炎症を惹起するいわゆる“転移前ニッチ”形成に対して、ANPが抑制的に働くことを確認した。⑥4T1 乳癌及びブルイス肺癌マウスに対して、ANP+CDDP 併用投与を行ったところ、vehicle+CDDP 群と比較して、腫瘍縮小作用の増強効果が認められた。本メカニズムとして、ANPの腫瘍血管透過性制御により、腫瘍内へ効率良く抗癌剤を到達させることができることを確認した。

【まとめ】

ANPは血管制御により様々な病態モデルに対して有効であり、今後臨床応用に向けた新たなトランスレーショナルリサーチを展開したいと考えている。

抗加齢遺伝子サーチュイン (Sirt1) を介した糖尿病性腎症の新規発症メカニズムの解析—尿細管・糸球体連関—

長谷川 一宏

(慶應義塾大学医学部)

慢性腎臓病：CKD (Chronic Kidney Disease) の最多要因の糖尿病性腎症 (Diabetic Nephropathy, DN) の克服の為、DN時に顕著に低下する抗加齢遺伝子 Sirt1の低下機構についてその詳細を解明したいと考え、解析を進め、SGLT2を介したメカニズムを同定した (長谷川ら Scientific Reports 2018) ので今回ここに報告する。我々は、近位尿細管 (Proximal Tubules, PT) 抗加齢遺伝子サーチュイン：Sirt1のDNにおける意義を明らかにした (長谷川, 脇野, 伊藤裕, Nat Med 2013, 日本腎臓学会大島賞 2017, 日本心血管内分泌学会 高峰譲吉研究奨励賞 2017)。糖尿病性腎症ではまずPTのSirt1が低下し、細胞内エネルギー代謝でミトコンドリアの酸化的リン酸化のATP産生に重要な補酵素であるNADとその前駆体NMNのPTからの分泌が減少する事で糸球体Sirt1も続けて低下し、その結果、アルブミン尿を生じる新規病態機構：尿細管-糸球体連関 (図1) を発見した。しかしSirt1とNMNがDN時にPTで顕著に低下する機序は不明であり、今回、特にこのうちSirt1低下にSGLT2が関与することを見出したので、こ

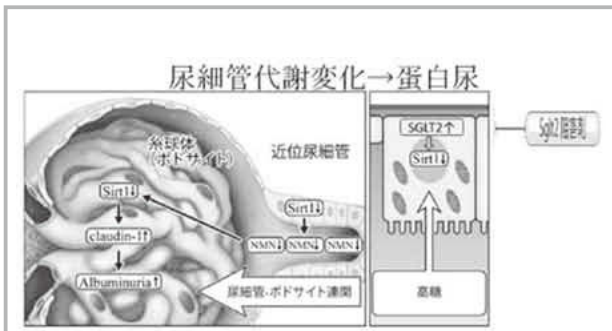


図1 尿細管系球体連関

申請者は、糖尿病性腎症の新規の病態機構を同定した (Nat Med 2013). アルブミン尿や蛋白尿といったポドサイトや糸球体の機能・形態異常に先んじて、尿細管の代謝変化が生じる事を明らかにし、尿細管系球体連関と名付けた (Current Hypertension Review 2016) 更に、その後の解析で、SGLT2 による Sirt1 低下が関与し、SGLT2 阻害剤による Sirt1 維持を明らかにした (Sci Reports 2018).

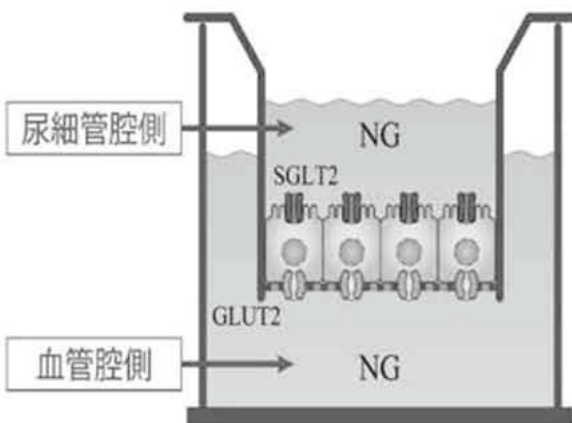


図2 SGLT2 上昇の機序の同定
SGLT2 上昇の Polarity を同定した

こに報告する。

前述した近位尿細管 Sirt1 低下の刺激となる高糖負荷が、近位尿細管の SGLT2 を介する尿細管腔由来の高糖か、GLUT2 を介して血中に再吸収される血管腔由来の高糖かは不明であった。まず db/db マウス、8 週齢オスに混餌で SGLT2 阻害剤 (Canagliflozin) を投与し、解析を行なった。まず、SGLT2 阻害剤にて、血糖、HbA1c が低下し、Canagliflozin は有効に作用していた。次に、SGLT2 阻害薬の作用部位である SGLT2 の発現量が、糖尿病性腎症でどのように変わるかを検討した。16 週時点 (投与 8 週間後) で、db/db 群で、control (db/m) に比して SGLT2 発現が上昇し、SGLT2 阻害薬

により、発現抑制がみられた。次に、Sirt1 発現について検討したところ、db/db マウスでは Sirt1 発現低下を認め、SGLT2 阻害薬投与で、Sirt1 発現は保持された。以上から、糖尿病性腎症において SGLT2 発現上昇がおそらく細胞内高糖を介して、Sirt1 発現を低下させる事がマウスで認められ、同様の傾向はヒト糖尿病性腎症の生検検体でも、相関が認められ、その重要性が示唆された。

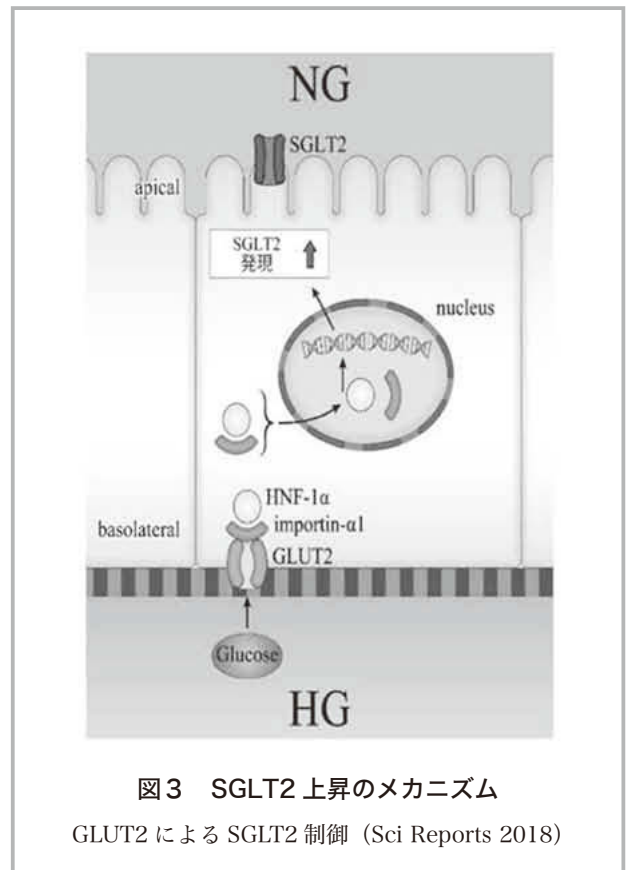


図3 SGLT2 上昇のメカニズム
GLUT2 による SGLT2 制御 (Sci Reports 2018)

次に、*in vitro* の解析で Cell Insert を装着し、細胞の頂側・基底側の両方から糖の刺激が入る実験系を構築した。上層を尿細管細胞の尿管腔側、下層を血管腔側とみなし、Normal Glucose・High Glucose の medium を $2 \times 2 = 4$ 通りで組み合わせて LLCPK-1 細胞 (ブタ由来の近位尿細管細胞) を培養し、SGLT2 発現がどちらからの高糖負荷に依存しているのかを検討した。上層を NG, HG, 下層を NG, HG とした 4 通りでは、下層が HG の際に SGLT2 上昇と Sirt1 低下を顕著に認め、血管腔側 HG (*In vivo* の血糖上昇に相当) が重要と分かった。更に、重要なことに GLUT2 がこの系にかかわることが分かった。紙面スペースの関係等で詳細は割愛させていただくが、その後の細胞シグナル解析で GLUT2

が Glucose を sensor し、GLUT2 と結合している importin- α 1 と HNF-1 α が、高糖刺激で乖離し、これらが核内へ移行し、SGLT2 の発現を上昇させることを同定した (長谷川, 脇野, 伊藤裕ら Scientific Reports 2018). GLUT2 の関与については、一時的に尿管腔側で高糖になる状況) とは、糖尿病性腎症における超早期に高尿糖を生じ、インスリン代償分泌等により高血糖までは持続していない早期の病期に起こり得る状況と相当し、発症早期には GLUT2 が受動輸送トランスポーターのため一時的な糖逆流が生じうる可能性をも想起されるが、これが生じているのかそれとも sensing しているのみであるかは今後の検討が必要と考えている。

更に、SGLT2 発現上昇が、どのように Sirt1 発現低下を来すのかその詳細を同定していきたい。加えて、SGLT2 発現上昇が、Sirt1 低下の下流でどのような Tubulopathy を来すのか、続いて尿細管糸球体連関の破綻をきたすか検討し、逆に SGLT2 阻害が抑止できるかを検討したい。

一次繊毛における中枢性摂食受容体の機能解析

濱本明恵

(岐阜大学工学部)

【目的】

メラニン凝集ホルモン (MCH) は、MCHR1 を介して摂食に関与する。一次繊毛は、繊毛膜に発現する受容体を介して微小環境を検知するセンサーとして働き、その攪乱は肥満など様々な疾患と結びつく。繊毛膜は細胞膜から連続する構造ではなく、繊毛膜へ輸送されるのは MCHR1 を含む限られた分子のみである。先行研究において我々は、MCHR1 陽性一次繊毛が MCH 濃度依存的に一次繊毛長が短くなる「縮退現象」を見出した。これまで生命現象の根幹を担う細胞内シグナルは、MCHR1 を含めて細胞膜上に受容体を発現させた実験系を中心に研究が進められてきた。そこで申請者は、MCHR1 を含む一次繊毛局在型受容体の生理機能を解明するブレイクスルーとして「一次繊毛という特異なオルガネラに局在する受容体の特徴的なシグナル系」の重要性を提唱すると共に詳細な解明を試みた。

【方法】

一次繊毛を有するヒト網膜色素上皮細胞 (hRPE1 細胞) に MCHR1 を強制発現させた安定発現株を作製した。当該株を用いて MCH を添加した際の一次繊毛の形態観察および縮退に伴う細胞内シグナルの解析を実施した。また、マウス脳切片における一次繊毛の観察条件も検討した。

【結果・考察】

MCHR1 が安定高発現した hRPE1 細胞 (#7) を作製した。#7 は MCHR1 を一過性発現させた細胞より鋭敏かつ安定して一次繊毛の縮退が生じ、縮退現象解明のための有用な特徴を有していた。#7 を用いて解析を行ったところ、一過性発現系で示された「縮退現象が Gi/o 特異的であり、Akt \rightarrow GSK3 β を介して生じる」ことを明確に支持する結果を得た。さらに、縮退現象の終点にあたる細胞骨格系の形成および崩壊現象を各種阻害剤により解析した結果、微小管の脱重合およびアクチンの重合が繊毛縮退に重要なことを明らかにした。さらに、#7 を用いたタイムラプス解析から、同一細胞におけるリアルタイムな繊毛縮退を捉えることに成功し、縮退現象にエクソソームは関与しないことも判明した。また、マウス脳の各脳領域 (海馬, 線条体等) において、一次繊毛を簡便かつ高感度に検出する免疫染色条件を確立し、生体内において検出可能な基礎的条件が整いつつある。本研究は一次繊毛という「場」における GPCR のダイナミックな機能および肥満の分子メカニズム解明に新規知見を与える物である。

レム睡眠を制御する神経基盤および分子基盤の解明と神経疾患の治療への応用

林 悠

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

本研究では、睡眠障害を頻繁に伴う疾患として認知症に着目した。アルツハイマー型認知症 (AD) ではレム睡眠 (いわゆる夢を見る睡眠) の減少が見られ、レビー小体型認知症 (DLB) ではさらにレム睡眠行動障害 (夢のおりに体を動かして暴力を振るう障害) が見られる。

本研究では、マウスモデルを用いてこうした睡眠異常の発症機構を解明することで、治療法の糸口を得るとともに、睡眠そのものの制御機構に関する知見を得ることを目的とした。

【方法】

まずはADの動物モデルを用いて、どのような睡眠の症状が見られるかについて解析を行った。西道隆臣博士、斉藤貴志博士（理化学研究所 脳科学総合研究センター）らのグループによりADを最も忠実に再現したモデルマウスが開発されたが、林グループは、同グループとの共同研究の下、このモデルマウスが示す睡眠構築の特徴を詳細に明らかにした。また、DLBに関しては、ヒト変異型シヌクレイン発現ウイルスベクターを構築し、脳に局所注入することで、レム睡眠行動障害やレム睡眠減少の責任候補領域の特定を試みた。

【結果】

ADモデルマウスでは、若い時期から睡眠構築に異常が生じること、加齢とともに一層重症化すること、さらに、睡眠構築の制御に重要な脳幹の領域に β アミロイドが蓄積していることが判明した。また、DLBに関しては、シヌクレインを脳幹橋に導入したマウスでDLB患者のレム睡眠関連症状とよく似た表現型が観察された。

【考察】

代表的な認知症であるADとDLBそれぞれの睡眠関連症状の原因解明に関して、本研究から、マウスモデルを用いたアプローチが有効であること、そして、DLBに伴うレム睡眠関連症状のメカニズムの一端を明らかにすることができた。この結果は、睡眠制御そのものの神経基盤を解明する上でも有用な成果である。今後、有効な治療法の探索と、睡眠構築の異常が、認知症の進行そのものに寄与する可能性の検証が重要である。

成体心筋細胞の分裂機序の解明と心筋再生治療への応用を目指して

原 弘 典

（東京大学大学院医学系研究科）

【背景・目的】

近年、成人の心筋細胞も、既存の心筋細胞が分裂することで僅かながらターンオーバー（自己再生）していることが実証された。この成体心筋細胞の増殖能（内因性心筋再生）を増幅することは、本邦で増加しつつある心不全・虚血性心疾患の新たな治療戦略として期待できる。本課題では、心臓を含む臓器の「適切な大きさ（増殖）」を制御しているHippo-YAP経路に着目し、心筋細胞増殖を促進する薬剤を、高速大量スクリーニング手法により同定・改変し、心筋梗塞モデルマウスでの有効性と安全性を検証することで、心筋細胞増殖と心筋再生（修復）を促進する薬剤の創出を試みた。

【方法・結果】

約18,600種類の機能未知化合物ライブラリーを用いて、上皮細胞（2種類の細胞アッセイ系）でのYAP-TEADs転写活性を指標とした候補化合物の選出作業を行い、その後ラット新生児初代心筋細胞の増殖能も促進する化合物を選出した。最も有効であった化合物について30種類以上の構造改変を行い、その活性中心構造を同定し、さらに毒性が低く、心筋細胞での効果選択性が極めて高く、生体内安定性にも考慮したフッ素化合物（TAZ-K）を創出した。この候補化合物TAZ-Kは、心筋細胞でもYAP-TEADs転写活性を促進し、さらにWnt/ β -catenin経路を活性化させることで、強力な増殖促進作用を発揮すると考えられた。また、RNA-seqによる網羅的な発現解析により、細胞周期の進行とサルコメア蛋白分解などの効果の他、酸化ストレス応答転写因子NRF2の効果（抗酸化・抗アポトーシス作用）も増強させていることを見出した。マウス心筋梗塞モデルにTAZ-Kを腹腔内投与したところ、梗塞境界域での心筋細胞の細胞周期の促進とクローン性増殖が誘導され、線維化軽減と心機能の改善にも効果的であった。

【考察】

Hippo-YAP経路を標的とした細胞アッセイ系を用い

て、心筋細胞増殖作用と心筋障害に対する保護作用を併せ持つ新規フッ素化誘導体 (TAZ-K) を創出した。重症心不全患者に対して、効果的な心筋再生効果を期待できるとともに、心筋細胞の分裂機序解明にも大きく貢献することが予想される。

ノンレム睡眠特異的脳波パターンを作り出す神経回路の解析

本城 咲季子

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

大脳皮質の活性化および睡眠から覚醒への遷移における視床の役割を明らかにする。

【方法】

自由行動下のマウスの睡眠覚醒サイクルを通じて、大脳皮質と視床の神経活動を測定する。また光遺伝学を用い睡眠時に視床を活性化し、覚醒への遷移が起きるかどうか検討する。また、薬理遺伝学を用い、視床の不活性化の影響についても検討を行う。

【結果】

大脳皮質神経群 (一次運動野, 二次運動野) は覚醒時とレム睡眠において発火頻度が高く、ノンレム睡眠時には覚醒時の約 80% 程度へ発火頻度が低下する事が観察された。それに対し、視床内側腹側核 (Ventromedial nucleus, 以下 VM) の神経群は、ノンレム睡眠時に覚醒時と比べ 20% 程度まで発火頻度が低下する事が明らかになった。また、発火頻度の変化を解析した結果、ノンレム睡眠から覚醒への過程において、まず VM 神経の発火頻度が上昇し、それに続いて大脳皮質神経が発火頻度を上昇させ、最後にマウスが動き出す事が分かった。これらの結果は VM 神経群が大脳皮質の活性化を通じ覚醒への遷移を駆動する可能性を示唆する。

そこで我々は光遺伝学を用い、ノンレム睡眠中のマウスの VM 神経群の活性化を行った。その結果、VM 神経の刺激により大脳皮質が活性化し、マウスが覚醒行動を示す事がわかった。また薬理遺伝学を用い VM の活動を阻害すると、マウスの覚醒状態が減り、より長い時

間眠り続けるという結果が得られた。

【考察】

VM の神経群は大脳皮質のほぼ全域に広く、非特異的に投射している事が知られている。また、主に皮質第一層外側に投射し、第一層に存在する抑制性神経と、興奮性神経の樹状突起の両方を標的としている (二三層, 五層の錐体細胞)。これらの解剖学的知見と我々の実験結果から、VM の神経は大脳皮質の多様な神経細胞の活性化を通じ、個体の覚醒状態への遷移・および維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

慢性腎臓病における PIGF・可溶性 Flt-1 による動脈硬化症発症機序に関する検討

松井 勝

(奈良県立医科大学医学部)

慢性腎臓病 (CKD) は糖尿病, 高血圧などの生活習慣病と並んで心血管疾患を発症させる独立した危険因子であるが、その発症・増悪の機序はまだ十分に解明されていない。VEGF family の一つである胎盤増殖因子 (PIGF) は血管内皮細胞の Flt-1 受容体に結合し、その慢性的なシグナルの活性化は血管新生, 単球の浸潤などの機序を介して動脈硬化巣の形成および進展に促進性に働く。一方、膜型 Flt-1 受容体遺伝子からの alternative splicing によって産生される細胞外ドメインのみより構成される sFlt-1 は、PIGF と結合し、膜型 Flt-1 受容体へ結合することを阻害することにより、Flt-1 活性化に対する内因性の拮抗物質として働く。われわれは動脈硬化進展作用を有する PIGF とその防御因子である可溶性 Flt-1 (sFlt-1) に着目して、その均衡が動脈硬化疾患の発症あるいは進展の予防に重要であると考えた。

腎不全モデルマウスでは血中 PIGF 濃度の上昇と肺や腎組織における PIGF mRNA の発現の亢進と sFlt-1 mRNA の発現の低下が認められた¹⁾。また、培養細胞実験系において CKD 患者の血清を添加したヒト血管内皮細胞においても PIGF mRNA の増加と sFlt-1 mRNA の低下が確認された。さらに sFlt-1 蛋白を腎不全モデルマウスに投与すると、大動脈内プラーク面積が有意

に減少した²⁾。

さらに 1351 名の CKD 症例を対象に、血中 PIGF 濃度が心血管イベントの予測因子となり得るかどうか検討した。心血管イベントに対する調整ハザード比 [95% 信頼区間] は 1st quartile (PIGF \leq 10.1 pg/ml) に対して 2nd quartile (PIGF 10.2-14.4 pg/ml) では 1.55 [0.92-2.66], 3rd quartile (PIGF 14.5-19.5 pg/ml) では 3.39 [2.20-5.41], 4th quartile (PIGF \geq 19.6 pg/ml) では 8.42 [5.54-13.3] であり、血清 PIGF 濃度は CKD 患者において心血管イベント発症の独立した危険因子であった³⁾。また、この関連性は透析患者に限定したサブグループ解析でも同等であった。

一方で、sFlt-1 はヘパリン負荷後に細胞表面から一過性に遊離した sFlt-1 濃度を測定することが全身の sFlt-1 を反映していることを見出した。ヘパリン負荷試験を施行した 343 名の患者では腎機能低下とヘパリン負荷後 sFlt-1 濃度は正の相関を認めており、sFlt-1 減少群で有意に心血管イベント発症率が高かった。

以上より、われわれは動脈硬化促進作用を有する PIGF とそのアンタゴニストである sFlt-1 の不均衡が CKD 患者における心血管疾患発症の機序に一助していることを証明した。

【文献】

- 1) Matsui, M. *et al.*: Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 85, 393-403 (2014).
- 2) Onoue, K. *et al.*: Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation.*, 120, 2470-7 (2009).
- 3) Matsui, M. *et al.*: Placental Growth Factor as a Predictor of Cardiovascular Events in Patients with CKD from the NARA-CKD Study. *J Am Soc Nephrol.* 26: 2871-81 (2015).

腸管および腸内環境をターゲットした慢性腎臓病の治療薬の開発

三島英換

(東北大学病院)

【背景・目的】

腸管と腎臓の間の臓器連関である「腸腎連関」が近年明らかになりつつある。腸内細菌叢は CKD の病態に尿毒素蓄積等を介して正負両面から関与するため腸管への介入が慢性腎臓病 (CKD) の治療法となる可能性がある。糖尿病治療薬である sodium glucose cotransporter (SGLT) 阻害薬の中でも、カナグリフロジンは血糖降下作用を示す SGLT2 阻害能に加えて腸管に発現する SGLT1 の阻害能も有する薬剤である。SGLT1 阻害による小腸でのグルコース吸収遅延は、大腸へのグルコースエスケープを引き起こすことで腸内細菌叢を含む腸内環境を変化させる。今回我々は、カナグリフロジンが CKD 病態に与える影響を腸内細菌叢を含め検討した。

【目的・方法】

CKD モデルマウス (アデニン誘発腎不全) に対してカナグリフロジン (10 mg/kg/day) を 2 週間経口投与し、CKD 時に体内に蓄積する各種尿毒素物質および腸管内短鎖脂肪酸、腸内細菌叢に与える影響を検討した。

【結果】

カナグリフロジン投与は p クレシル硫酸、インドキシル硫酸といった腸内細菌叢によって産生される悪玉尿毒素の血中蓄積をそれぞれ -75%、-26% 減少させた (vs control 群)。一方、尿中への各尿毒素の排泄量に有意な変化を認めなかったことからこの減少効果は腸管での尿毒素産生抑制が機序と考えられた。また同時に、カナグリフロジンは CKD 時に減少する腸管内短鎖脂肪酸の増加作用を示した。さらに回盲部内容物を用いたメタゲノム解析からは、カナグリフロジンは CKD 時の腸内細菌叢の有意な変化を引き起こしていることを認めた。

【考察】

カナグリフロジンは CKD 時における腸内細菌叢を変化させることで、腸内細菌由来尿毒素を減少させるとともに、腸管内短鎖脂肪酸を増加させる作用があることを明らかにした¹⁾。このように他疾患での既承認薬の腎保

護効果を見出すことは CKD 治療薬へのドラッグリポジショニングが期待される。

【文献】

- 1) Mishima, E. *et al.*: Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018 [Epub ahead of print]

白血病を維持する腫瘍エンハンサーの検索

村川 泰裕

(理化学研究所予防医療・診断技術開発プログラム)

【目的】

成人病の柱の一つに悪性疾患が含まれる。とりわけ白血病は、他の悪性疾患に比べて発症年齢が若く、社会的にも重大な疾病である。本研究課題では、白血病細胞を維持しているゲノム転写ネットワーク、特にこのネットワークで中心的役割を担うエンハンサーを同定し、病態に基づいた新たな分子標的薬や予後予測バイオマーカーを目指す。

【方法】

エンハンサーは、遺伝子の遠位に存在し、転写因子が結合することで、標的遺伝子の発現を増大させる数百塩基長のシスエレメントである。しかし、遺伝子の遠位に存在し、同定が困難なため十分に研究が進んでこなかった。申請者の所属機関で開発された CAGE 法は、RNA の 5' キャップ構造を利用して、5' 末端を次世代シーケンサーにより網羅的に解析する技術である。遺伝子から転写される RNA の 5' 末端を解読することでプロモーター解析に応用されてきた (FANTOM Consortium, *Nature* 2014)。近年、驚くことに、エンハンサーにも RNA ポリメラーゼがリクルートされ、エンハンサー自体からも両方向性に RNA (エンハンサー RNA) が合成されることが示された。従って、CAGE 法によりエンハンサー RNA の 5' 末端を検出することで、高塩基解像度でエンハンサーが同定できる (Andersson *et al.* *Nature* 2014)。しかし、エンハンサー RNA は合成さ

れた直後に活発に分解され、細胞内のトータル RNA 中には極僅かしか存在しない。従って、単一のサンプルのみに対して通常の CAGE 法を行っても、エンハンサーは極僅かしか同定できない。この問題を解決するために、本課題では、特殊な工夫を加えることでエンハンサーを 1 つのサンプルのみからでも高感度に同定できる改良版 CAGE 法 (NT-CAGE 法) を開発する。

【結果】

申請者は、nascent RNA を簡単な生化学的作業のみにより精製するウェット実験手法を確立し、エンハンサーを超高感度に同定および活性定量できる NET-CAGE 法の実験手技を立ち上げた。そして、ヒト慢性骨髄性白血病細胞 K562 やリンパ芽球細胞 GM12878 を含む ENCODE の主な腫瘍細胞株 4 種類に対して NETCAGE 法を既に行った。そして、ENCODE プロジェクトで蓄積されたエンハンサー、オープンクロマチン領域や様々な転写因子の結合部位といったゲノムワイドなアノテーション情報を用いて、NET-CAGE のバイオインフォマティクス解析のプログラムも最適化された。このように NET-CAGE 法の技術開発、および白血病を含む数種類の腫瘍への適用は既に完了した。大規模の臨床検体に対してエピゲノム解析、トランスクリプトーム解析、ゲノムネットワーク解析を行うための基盤を形成することに成功した。

【考察】

今後この独自に開発した NT-CAGE 法を数百の急性白血病の患者のサンプルに適用し、白血病細胞に特異的なエンハンサーを検索し、白血病細胞を維持している遺伝子発現ネットワークを詳細に解析し、白血病の病因・病態の解明を目指す。グローバルな遺伝子発現異常が白血病に一般的に認められるが、そのメカニズムは不明である。とりわけ、急性白血病ではエピジェネティクスの異常が示唆されており興味深い。

In vivo・一細胞レベルでオルガネラの役割を研究するための方法の開発

柳 谷 耕 太

(奈良先端科学技術大学院大学研究推進機構)

【目的】

真核生物において、好気呼吸によるエネルギーの産生や細胞外へのタンパク質分泌、脂質の代謝などの細胞の生命機能に重要な反応は、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソームなどの脂質膜で覆われた細胞内小器官(オルガネラ)で分担して遂行される。高等動物の細胞においては、これらのオルガネラの量は、オルガネラを有する細胞がどの程度、そのオルガネラの機能容量を必要とするのかに依存すると考えられる。例えば、筋収縮によってATPを大量に消費する心筋細胞や、細胞膜を越えたイオンの流入・流出にATPを消費する神経細胞では、ミトコンドリアが発達している。また、超長鎖脂肪酸のβ酸化や胆汁酸の合成が盛んな肝臓においてはペルオキシソームが増殖している。これは、それぞれの細胞において、その生理的機能を維持するために必要な量のオルガネラが存在することを示唆しているが、そのオルガネラ量と細胞の生理的機能の因果関係は十分に理解されていない。本研究課題では、生体内において、特定の種類の細胞の機能におけるオルガネラの役割を調べるための方法の開発を目指した。

【方法、結果】

生体内において、特定の種類の細胞におけるオルガネラの役割を調べるための方法として、オルガネラ量を減少させる方法(オルガネラ減少法)の開発に取り組んだ。現在までに、培養細胞を用いた研究で、ミトコンドリアやペルオキシソーム、小胞体の量を減少させることが可能になった。さらに、ゼブラフィッシュを用いた研究で、動物個体にも、このオルガネラ減少法を適用できることが明らかになった。また、一細胞レベルで、オルガネラ減少を引き起こすことができるように、光照射によって活性を調節できる光活性化型オルガネラ減少法の開発を行った。その結果、培養細胞レベルで、光を照射した細胞のみで、ミトコンドリアやペルオキシソームの量を減少させることが可能になった。しかしながら、個体にお

ける一細胞レベルでのオルガネラ減少は樹立できていない。

【将来の展望】

今後は、オルガネラ減少法を活用して、オルガネラ量の恒常性を司るシステムの解明を目指す。

MR 結合新規転写共役因子の探索とその機能解析

横 田 健 一

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

近年、糖尿病や肥満、CKDなどに合併する治療抵抗性高血圧の患者の一部で、高アルドステロン血症を呈さないにも関わらずMR拮抗薬の併用により血圧のコントロールが得られる症例が存在することから、何等かのMRの病的活性化機構の存在が示唆され、我々はこのような病態を「MR関連高血圧」という新規概念で提唱し、これまでその分子メカニズムの一部を解析してきたが^{1,2)}、いまだMR活性化メカニズムには未知の部分が多い。我々は、MRの新規転写共役因子の網羅的同定を質量分析計を用いて試み、さらには同定された因子についてエピゲノムを介したMRの転写調節機構の解析を切り口として、これまで殆ど未知であった高血圧の遺伝因子からの発症メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

MR安定発現腎由来細胞を樹立し、核抽出液から抗体精製にてMR相互作用因子を取得し、LC-MS/MSを用いて網羅的に同定を試みた。そして得られた因子の中から、高血圧発症関連因子CASZ1に着目し、*in vitro*およびヒトのサンプル、尿細管特異的ノックアウトマウスの表現型解析を行い、高血圧発症に対する重要性を解析した。

【結果】

スクリーニングにより同定した蛋白の中で、GWAS研究により高血圧との関連が示唆されていたCASZ1に注目し機能解析を進めたところ、CASZ1は尿細管細胞でMRと共発現し、Mi-2/NURD複合体とMRとのリガンド依存性のアダプターとして機能し、ヒストン

脱アセチル化を促進してMR 標的遺伝子発現を抑制することで血圧調節に関わることを明らかにした。さらに、CASZ 1 遺伝子内に報告された高血圧関連 SNP は、CASZ1 の発現量を変動させることで、高血圧発症に関与していることが示唆された。また CASZ1 の尿細管特異的ノックアウトマウスは DOCA/salt 負荷 2 週間後、尿中 K 排泄および血圧が有意に高く、この作用はスピロノラクトン投与によりキャンセルされた。

【考察】

本研究により MR 転写共役因子を介したエピゲノム制御による、高血圧発症メカニズムの一因が明らかにされた。今後、高血圧治療のターゲットとして MR の重要性が再認識され、今後臨床においても、高血圧患者の CASZ1 の SNP タイプの解析により、早期からの MR 拮抗薬の投与を考慮するといった、オーダーメイド治療にもつながる可能性がある。

Vascular Biology Innovationに関する研究助成

RAAS 活性化における間在細胞 MR 依存性および非依存性の Pedrin 制御機構

鮎澤 信宏

(東京大学先端科学技術研究センター)

【目的】

腎接合尿管・皮質集合管の β 間在細胞に発現するPendrin(PDS)は、遠位尿管に発現するNCCと相補的にNaCl再吸収に働き、体液量維持や食塩感受性高血圧の形成に関与する。

PendrinはNCCと同様にアンジオテンシンII(AII)刺激や、アルドステロン(Aldo)過剰により活性化することが知られる。これらの状況において、間在細胞では特異的脱リン酸化によるMR活性化が起こり、このMR活性化がPDS制御と相関することが最近示された。しかし、この間在細胞MR活性化とPDS制御との因果関係や、その意義は不明である。そこで本研究では、腎間在細胞特異的MR欠損マウスを作成し、AII刺激やAldo過剰によるPendrin制御において間在細胞MRが果たす役割や、その意義につき検討した。

【方法と結果】

MR-floxおよびAtp6v1b1-creマウスを交配し腎間在細胞MR欠損マウス(MR-B1KO)を作成した。これらマウスにAII投与を行うと、野生型ではNCC活性化とともにPDS発現の増加が見られたが、MR-B1KOではPDS増加のみが有意に抑制された。生理学的にはAIIによるPDS活性化は体液量減少時に起こり、同じく活性化したNCCとともにNaCl再吸収・体液量保持に働くと考えられる。実際、野生型マウスに低食塩食を投与すると腎PDS発現量の増加が見られ、さらにNCC阻害薬であるhydrochlorothiazide(HCTZ)を追加すると、さらなるRAAS活性化とともにPDS発現量もさらに増加した。一方でMR-B1KOでは、これらの状況においてもPDS増加が抑制され、体重減少・血圧低下を

呈した。以上から、AIIによるPDS制御は間在細胞MR依存的に起こり、体液量減少時に体液量・血圧維持に働く生理学的意義を有することが示された。

一方、野生型マウスに高食塩食・Aldo投与を行うと、NCC活性化やPDS発現増加・管腔側膜集積が見られ、食塩感受性高血圧を生じた。MR-B1KOマウスではこのPDS発現増加は部分的に抑制されるに留まり、膜移行は抑制されず、食塩感受性高血圧を含めて表現型に明らかな変化は見られなかった。すなわち、Aldo過剰時には間在細胞MR非依存的なPDS制御機構が存在することが示唆された。

昨今、Aldo過剰に伴うNCC活性化は、遠位尿管のMRを介さず、集合管主細胞のMR-ENaC経路活性化に伴う低K血症によって起こることが証明された。そこで我々は、PDS制御においても同様に主細胞のMR-ENaC経路活性化に伴う素因による制御機構があると想定し、解析を行っている。これまでに間在細胞MR欠損マウスに加え、全ネフロンMR欠損マウスや、ENaC阻害薬を用いた実験等を行い、想定通り、Aldo過剰に伴うPDS制御も主細胞のMR-ENaCの活性化に伴う素因により起こることが明らかとなった。

【考察】

本研究では、AII刺激時における間在細胞MR依存性のPDS制御と、Aldo過剰時における主細胞MR-ENaC経路の活性化に伴う素因によるPDS制御、2つの対照的な経路を明らかとした。これらPDS制御機構は既存の利尿薬抵抗性の高血圧などにおいて新たな治療標的となる可能性がある。

分泌顆粒分解に着目した内分泌調節機構の解析

板倉 英 祐

(千葉大学大学院理学研究院)

【目的】

超高齢化社会を迎え、生活習慣病や神経変性疾患数は増加する一方であり、ホルモンの分泌や血管内を健全に保つことが重要である。しかし分泌タンパク質に関わる研究はその合成や分泌調節機構について解明されてきたが、合成後の品質管理機構は全く知られていない。私は細胞内タンパク質分解システムに関わる研究から得た知見を応用して、分泌顆粒内もしくは細胞外（血液内）タンパク質の品質管理機構に焦点をあてることで、糖尿病などの生活習慣病や神経変性疾患の新しい予防・治療法に応用できると考えている。

本研究ではこれまで継続してきた Crinophagy による分泌顆粒分解系と、その延長課題として細胞外（血液内）タンパク質品質管理システムの研究を進展している。

細胞内の分泌顆粒とリソソームが直接融合し、分泌前のホルモンが分解されることを Crinophagy (Crin はギリシャ語で分泌, phagy は食べるの意) と呼ぶ。Crinophagy は細胞内過剰・不良分泌顆粒を除去するために働いていると考えられている。しかし、Crinophagy の分子機構も生理機能も不明のままである。これまで開発した Crinophagy アッセイ法を用いて、Crinophagy の誘導機構や分子機構の解明を進めている。

細胞外、つまり血中内の不良タンパク質がどのように除去されるのかわかっていない。そこで細胞外シャペロンに着目した。細胞外シャペロンと基質の分解経路を調べることで、血管内のゴミを取り除き、健康な血管を保つ仕組みの解明を目指す。本発表では現在進めている細胞外品質管理システムについて主に報告する。

【方法】

細胞外タンパク質品質管理経路が存在するかどうか調べるため、細胞外不良タンパク質分解をモニターできるアッセイ法の開発に取り組んだ。まず哺乳類培養細胞のゲノム組換えシステムを利用することで、蛍光タンパク質を付加した細胞外シャペロンタンパク質の大量発現と精製に成功した。精製した細胞外シャペロンと不良タン

パク質を組み合わせ、不良タンパク質がエンドサイトーシスを介して細胞によって除去されるか調べた

【結果】

細胞外シャペロン自体だけでは細胞内に顕著な取り込みを受けない一方で、細胞外シャペロンと不良タンパク質複合体はすみやかに細胞内に取り込まれ、リソソーム依存的に分解されることがわかった。不良タンパク質と代替した正常タンパク質の添加では取り込み促進はみられなかったことから不良タンパク質特異的な認識があることがわかった。またこの分解機構は様々な細胞で見られるため、組織特異的な現象ではないと考えられる。

【考察】

これらの結果は細胞膜上に血中内の不良タンパク質を取り除く品質管理受容体があることを強く示唆している。したがって、CRISPR を応用した網羅的遺伝子欠損スクリーニングを用いて血液内の不良タンパク質を取り除くためにはたらく品質管理受容体のスクリーニングを進めている。品質管理受容体の分子機構を解くことで、血管内を健康に保つ新しい概念の提唱が期待される。

AT2 受容体相互作用タンパク質の脳保護作用への影響についての検討

岩波 純

(愛媛大学大学院医学系研究科)

【目的】

これまで我々はアンジオテンシン II タイプ 2 (AT2) 受容体刺激が脳保護効果を持つこと、さらに培養神経細胞を用いた検討から、AT2 受容体の C-末端に結合している AT2 受容体相互作用タンパク質 (ATIP) がその保護効果に重要であることを報告してきた。血管障害モデルにおいても ATIP が AT2 受容体刺激に重要であることを報告してきたが、脳傷害時における ATIP の作用については明らかにされていない。そこで ATIP 過剰発現マウス (ATIP-Tg) を用い、脳傷害時における ATIP の影響および AT2 受容体刺激薬の効果について検討した。

【方法】

10 週齢雄性 ATIP-Tg と同腹子 (WT) に中大脳動脈

閉塞術 (MCAO) を施行し、脳梗塞モデルを作成した。AT2 受容体刺激薬 (C21; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) は 8 週齢から 2 週間腹腔内投与し、MCAO を施行した。MCAO の 24 時間後、神経学的症状、梗塞サイズ、mRNA 発現、MCAO 前後の脳表層血流量の変化を検討した。MCAO 前の脳表層血管の発達を墨汁灌流により検討した。

【結果】

神経学的症状および脳梗塞サイズは、ATIP-Tg で WT に比べて改善傾向があったが有意差は認められなかった。C21 を投与することにより神経学的症状、脳梗塞サイズは無投与群に比べて両マウスとも有意に改善しており、さらにこの改善効果は WT に比べて ATIP-Tg で増強していた。MCAO 後の脳血流量の減少は、中大脳動脈中心部では全ての群で有意差は認められなかった。周辺部では WT-C21 投与群では MCAO の 24 時間後に血流量の増加が認められた。一方、ATIP-Tg-C21 群では MCAO 直後から脳血流量の減少が軽減していたことから脳表層血管形成を検討した。MCAO 前の脳表層の Collateral Circulation およびリン酸化 eNOS は ATIP-Tg-C21 群で増加傾向が認められた。また、MCAO 24 時間後、神経保護因子である MMS2 mRNA の発現は ATIP-Tg、ATIP-Tg-C21 群で非梗塞側に比べ梗塞側で増加していた。

【結論】

以上の結果から、AT2 受容体刺激は ATIP を介して脳血流量に影響し、脳保護効果を増強していることが示唆された。

ストレスホルモン制御機構である腎臓とその破綻の解析

上田 浩平

(東京大学先端科学技術研究センター)

申請者らは作出した腎臓特異的 *Hsd11b2* 遺伝子欠損マウス (*Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウス) の解析から、

1. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスは野生型に比べ、24 時間 telemetry 計測にて収縮期・拡張期血圧ともに有意に上昇を認めた。

2. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスの高血圧は減塩食により野生型と同等レベルにまで低下した。

3. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスは低カリウム血症をきたした。(AME 症候群の一症状)

これらの結果から、腎臓の 11 β -HSD2 活性喪失は単独で食塩依存性に高血圧発症機序となることが示され、腎臓説を強く支持された。申請者らは昨年発表時からさらに解析を進め、

1. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスは低レニン活性・低アルドステロン血症・高コルチコステロン 1 日排泄量を示した。また野生型マウスのコルチコステロン血中濃度は「活動期に高く非活動期に低い」という正常な日内変動が見られた一方で、*Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスでは両活動相を通じて高値を示し、日内変動の破綻が観察された。

2. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスの腎臓では、リン酸化 Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC)、上皮性ナトリウムチャネル α サブユニットの細胞膜発現量が増加しており、これらの活性化が示唆された。一方で NKCC2 は増加していなかった。

3. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスに高カリウム食や K 保持性利尿薬 amiloride を投与して低カリウム血症を補正したところ、高血圧は同処置下野生型マウスと同等レベルに改善したことから、このモデルの高血圧発症に低カリウム血症が重要であることが示された。

4. *Hsd11b2*^{Ksp-/-}マウスに MR 拮抗薬または GR 拮抗薬を皮下徐放ペレットにより投与したところ、それらの降圧効果はマウスの活動相に応じて差異が見られた。

以上の結果を踏まえ現在は、この現象が腎臓の *Hsd11b2* 遺伝子を欠損した状態に特異的なものなのか、それとも高コルチコステロン血症に普遍的な現象なのか、更なる解析を進めている。

加齢性骨格筋萎縮の新規分子機構の解明

遠藤 仁

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

加齢性骨格筋萎縮の原因、分子機序については不明な点が多い。近年、老化と関連の深い Wnt シグナルを活性化する分子の一つとして、組織 RAS の鍵分子であるプロレニン受容体 ((P)RR) が同定された。本研究は、(P)RR-Wnt シグナルを中心とした新たな加齢性骨格筋萎縮の分子機構の解明および新規治療法開発を目的とする。

【方法・結果】

加齢に伴いヒトおよびマウスの骨格筋では (P)RR の発現が増加していた。そこで我々は、全身に (P)RR を高発現させた (P)RR Tg マウスを作製し解析をおこなった。(P)RR Tg マウスは生後約一年以内に死亡した。(P)RR Tg マウスは、体重減少を呈し、全身の著明な骨格筋萎縮 (速筋優位) を認めた。(P)RR Tg マウスの骨格筋では Wnt シグナルが活性化されており、組織所見では、円形線維、筋線維の大小不同、中心核、間質の線維化がみられ、MHC2B 陽性線維 (速筋) の数が著明に減少していた。また、老化マーカーの上昇がみられ、前述の組織所見とともに、(P)RR Tg マウスは加齢性骨格筋萎縮の表現型を呈していると考えられた。

筋傷害後の骨格筋再生能を (P)RR Tg マウスで評価した。筋線維数の増加は野生型と有意な差は認めなかったが、多核化と筋線維の肥大が遅滞し、筋管形成 (筋芽細胞融合) の障害が示唆された。筋分化マーカー Myogenin 陽性再生線維も (P)RR Tg マウスでは傷害早期から多数認められ、筋線維の早熟分化が示唆された。

(P)RR を安定発現させた C2C12 筋芽細胞株においても、Wnt シグナルの活性化が確認され、筋成熟・筋管形成能の低下を認めた。この表現型は Wnt シグナル阻害分子 DKK-1 の投与により改善がみられた。

(P)RR Tg マウスに DKK-1 を投与したところ、炎症、線維化、老化マーカーが抑制され、骨格筋萎縮の改善がみられた。次に、(P)RR と Wnt の結合をブロックする中和抗体を投与したところ、同様に (P)RR Tg マウスの

筋萎縮の改善がみられ、傷害後の骨格筋再生を促進する効果も確認できた。

さらに、Wnt シグナルと協調的に働く YAP シグナルについても解析を行なった。加齢マウスおよび (P)RR Tg マウスにおいて YAP の亢進が確認され、YAP 阻害薬 Verteporfin の投与により筋芽細胞融合の回復を介して筋萎縮が改善することが示された。

【考察】

(P)RR Tg マウスは、稀有なサルコペニアモデル動物と考えられる。サルコペニアの発症機構に (P)RR-Wnt-YAP シグナルの活性化が重要であり、筋芽細胞融合の障害・早熟化を介して骨格筋萎縮が進展する。これらのシグナル経路を阻害する薬剤が今後サルコペニアの新たな治療薬になることが期待される。

VEGF-A_{165b} と心血管病の関連から病態評価へ

菊地 良介

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

生体内で血管新生を調節する主要な因子の一つに血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) がある。165 個のアミノ酸からなる VEGF-A₁₆₅ はこれまで血管新生を正にコントロールする因子として研究され、これを抑制する抗体医薬が現在癌に対して臨床応用されている。ところが近年、血管新生を抑制するという全く逆の機能を有する VEGF-A_{165b} が発見された。しかし、VEGF-A_{165b} と心血管病との関連、さらには病態評価への応用については不明な点が多い。

そこで、本研究では VEGF-A_{165b} と心血管病との関連を明らかにし、さらには病態評価への応用が可能かについて評価することを目的とした。

【結果】

血管病の一つである末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) は、主幹動脈の閉塞と不十分な側副血管形成に起因する組織虚血から生じる。PAD 患者では、VEGF-A 血中濃度が健常人と比較して有意に上昇しているにも関わらず、下肢虚血が改善されないという矛盾点が知られていた。そこで私たちは、PAD 患者の上昇している VEGF-A 血中

濃度に VEGF-A_{165b} が含まれている可能性について検証した。その結果、PAD 患者において VEGF-A_{165b} 濃度が上昇していることを発見し、VEGF-A_{165b} による PAD の血管新生不全機序を解明した¹⁾。VEGF-A 血中濃度の上昇と病態進行との矛盾点は、他にも指摘されており、その中には PAD の発症リスクとして知られている肥満症、心疾患や慢性腎臓病がある。私たちは、肥満症患者の胃縮小術前後で血中 VEGF-A_{165b} 濃度に有意な差が認められ、微小血管障害の改善指標として有用であること²⁾、急性心筋梗塞 (AMI) を発症した患者では、AMI 発症後の予後評価指標となりうること³⁾ (特願: 2017-247153)。さらに、慢性腎臓病患者の尿中 VEGF-A_{165b} 濃度が腎機能障害の重症度を反映しており、透析導入直前の患者では血中 VEGF-A_{165b} 濃度が上昇していることを明らかにした⁴⁾ (特願: PCT/JP2016/65325)。また、私たちは、汎用されている VEGF-A ELISA の測定原理を再発想し、新規に VEGF-A_{165b} の測定系を樹立した (特願: PCT/JP2016/65325)。この技術を応用し自動分析機用 VEGF-A_{165b} 測定試薬の開発に取り掛かり、現在までにプロトタイプの試薬開発に成功した。

【考察】

我々のこれまでの研究成果から、VEGF-A_{165b} と心血管病との関連が明らかになり、さらには病態評価への応用についての可能性が示唆された。今後、VEGF-A_{165b} による心血管病への病態評価として臨床検査法を確立できるよう研究を進めていきたい。

【文献】

- 1) Kikuchi, R. *et al.*: An anti-angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat. Med.* 20(12): pp1464-1471 (2014).
- 2) Doan, T.M., Farb, M. & Kikuchi, R. *et al.*: Anti-angiogenic actions of VEGF-A_{165b}, a novel isoform of VEGF-A, in human obesity. *Circulation.* 130: pp1072-1080 (2014).
- 3) Harada, K. & Kikuchi, R. *et al.*: Association between the ratio of anti-angiogenic isoform of VEGF-A to total VEGF-A and adverse clinical outcomes in patients after acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol. Heart. Vasc.* 19: 3-7

(2018).

- 4) Kikuchi, R. *et al.*: Urinary and circulating levels of the anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor-A in patients with chronic kidney disease. *Clin. Chim. Acta.* 475:102-108 (2017).

新規単球サブセットによる高次血管ネットワークの編成機構の解明

木戸屋 浩康

(大阪大学微生物病研究所)

【目的】

固形腫瘍が増殖するためには、酸素や栄養の供給路として血管を腫瘍組織内へ引き込む必要があるため、血管新生の抑制による「兵糧攻め」のコンセプトに基づく癌治療法の開発が進められてきた。これまでに VEGF をはじめとする多数の血管新生誘導因子が発見され、それらに対する阻害薬が開発されているが、予想に反して血管新生抑制剤の治療効果は限定的であった。このことは、血管新生に依存しない未知の腫瘍血管形成機構の存在を示唆している。

我々の血管発生に関する研究により、血管リモデリング過程において血管が管腔構造を保ったままスライドすることが明らかになっている。また、この「血管束移動」と名付けた血管リモデリング過程には、特殊なミエロイド系細胞群が関与していることを明らかにしている。本研究では、腫瘍血管形成における血管束移動の役割の解明と、血管新生抑制剤に対する治療抵抗性との関連性を明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】

腫瘍組織中における血管束移動の有無を検討するため、多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた生体イメージングによる経時的な解析を行った。我々が作成した血管イメージングマウスを用いて撮影を行ったところ、腫瘍組織内で血管束移動が起きている様子が確認できた。また、腫瘍血管組織内の血管束移動においても、血管近傍にミエロイド系細胞群が蓄積していることを組織学的な解析から明らかにした。このミエロイド系細

胞は MMP9 を高発現しており、血管周囲の細胞外基質を分解することで血管束移動を誘導していると考えられる。腫瘍組織中のミエロイド系細胞には多様なサブセットが存在しており、血管束移動に関与する細胞群を「血管関連ミエロイド」として同定するために、MMP9 の高発現を指標として探索したところ、CXCR2 陽性かつ CD195 陰性のサブセットが同定された。さらに、VEGF 阻害剤にて血管新生を抑制した場合には、血管関連ミエロイドの数と割合が増加していることが明らかとなった。

【考察】

本研究の成果から、血管束移動が腫瘍血管の構築に寄与している可能性が示唆され、腫瘍組織にて血管束移動を制御と思われる特殊な血管関連ミエロイドが同定された。血管束移動は血管新生阻害剤に対する治療抵抗性に関与していると考え、今後はさらなるメカニズムの解明と血管関連ミエロイドを標的とした癌治療法の開発を進めていきたい。

ヒト血管内皮コロニー形成細胞の細胞小胞を介した網膜神経血管保護作用

崎 元 晋

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

血管内皮コロニー形成細胞 (Endothelial colony-forming cells: ECFCs) は、血管内皮前駆細胞 (EPC) の分画のひとつで、臨床での細胞治療に用いる自家血管内皮細胞のソースとして注目を集めている (Nature Biotechnology 2014, Cell Stem Cell 2014)。ECFC のパラクライン作用による血管再生メカニズムに関しては、ほとんど報告がされていなかった。申請者らの目的は、ECFC による虚血性網膜症による ECFC のパラクライン作用を明らかにすることである。特に近年、細胞間伝達の重要な因子としてエクソソームやマイクロベジクルに代表される細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) が注目されている。ECFC に関しては、細胞由来の EV 中の miRNA に腎虚血障害に対する治療効果があることが報告されている (Vinas et al. Kid Int 2016) が、そ

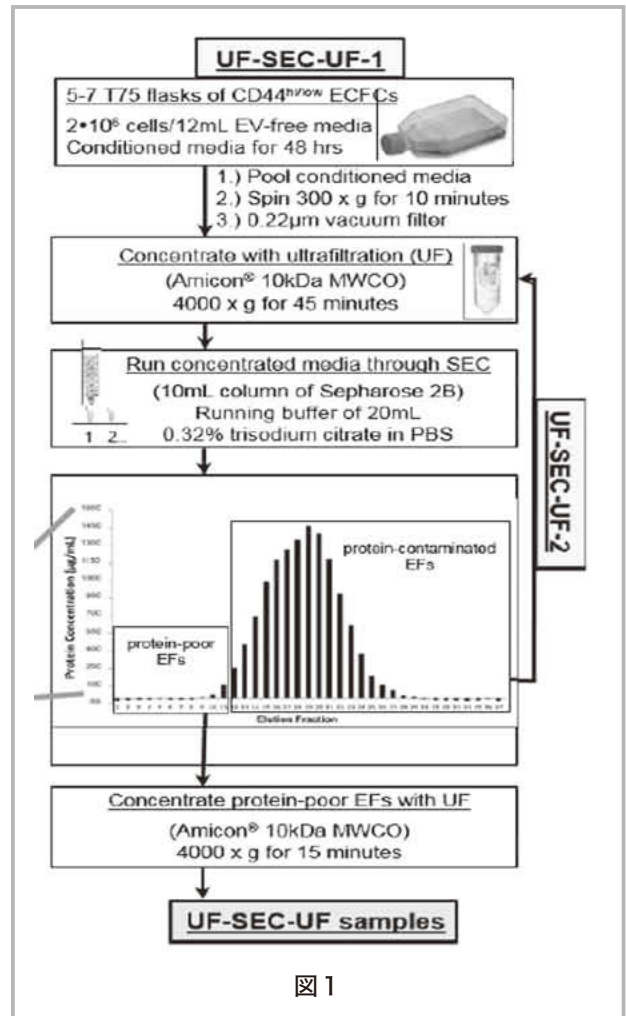


図 1

他のメカニズムについてはほとんどわかっていない。

【方法】

EV は 48 時間培養し 0.22 μm のフィルターを通したのち、10 kDa の MWCO 系を用いて超遠心 (4000 x g, 45 min) を行ったのち、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。BCA タンパク質アッセイを用い、可溶性タンパクの少ない EV の濃縮に適した溶出分画を決定し、それらの EV サンプルを UF-SEC-UF-1-EV (Serial ultrafiltration (UF), size exclusion chromatography (SEC) extracellular vesicle) サンプルとし、残りの分画に再度同様に超遠心、アッセイを行い、得られた EV サンプルを UF-SEC-UF-2-EV とした。上記方法を用いて CD-XX^{hi} および CD-XX^{lo} の ECFC から EV を単離し、虚血性網膜症モデルである酸素誘導性網膜症 (Oxygen induced Retinopathy: OIR) モデルに注射し、虚血および新生血管の改善効果を検討した。

【結果】

EV に対する透過型電子顕微鏡所見では、UC-EV に比較し、UF-SEC-UF-1-EV および UF-SEC-UF-2-EV では



図2

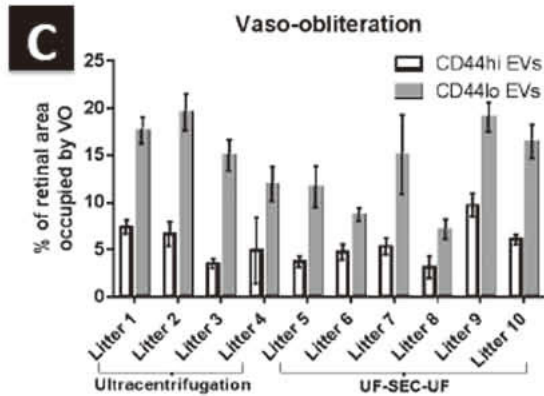
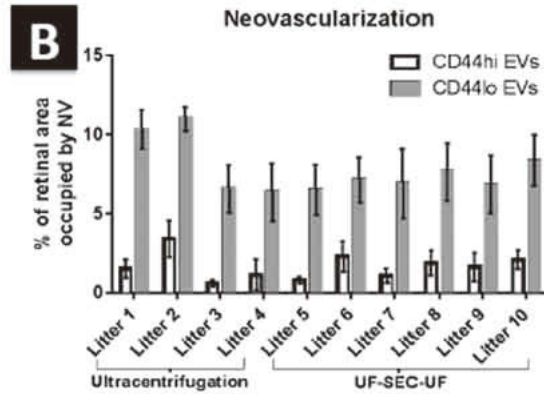


図3

巨大タンパクの凝集がみられなかった(図2および白矢印, バーは0.2 μm). また, NTA計測においてもUF-SEC-UFはUCに比較して有意に多くのEVが認められた(図3). 生後(P)7日からマウス仔を75%酸素チャンバーで5日間飼育するOIRモデルにおいて, P12にCD-XX^{hi}より分離されたEV(CD-XX^{hi}-EV)およびCD-XX^{lo}-EVを硝子体注射したところ, CD-XX^{hi}-EVはCD-XX^{lo}-EVに比較して, 有意に新生血管(neovascularization)の退縮効果および虚血(Vaso-obliteration)の改善効果が認められた.

【考察】

UF-SEC-UFを用いたEVの単離は有効であり, ECFC由来のEVは虚血の改善効果を示し, 今後のサブグループの解析が可能であることを示した.

【文献】

- 1) Sakimoto, S. *et al.*: CD44 expression in endothelial colony-forming cells regulates neurovascular trophic effect. *JCI Insight* 2(2), e89906 (2017).
- 2) Dellett, M. *et al.*: MicroRNA-containing extracellular vesicles released from ECFCs modulate angiogenesis during ischaemic retinopathy. *J. Cell. Mol. Med.* 21(12), 3405-3419 (2017).

ヒト心筋細胞移植療法実現に向けた患者移植用 iPS 細胞株の樹立および選抜法の最適化

関 倫 久

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

末期重症心不全は内科的治療に抵抗性であり, 心臓移植が唯一の根治的治療となるが, 我が国ではドナー不足により移植申請数に対する移植施行件数は大きく下回る現状が続いている. このような状況に対して, 近年 iPS 細胞が末期心不全に対する心筋細胞移植療法の細胞ソースとして期待されている. 既に動物実験レベルでは iPS 細胞由来心筋細胞の移植により心機能が改善することが報告されており, 医療者および患者双方から早急な重症心不全に対する再生治療の実現が求められている. 将来的な移植治療に向けて, GMP レベルの培養条件内で完結可能な心筋細胞分化用 iPS 細胞樹立プロトコルを確立すること, さらに iPS 細胞樹立後の各種の未分化性と安全性の評価プロトコルを最適化し, 移植用としてふさわしくない細胞株を排除し, 移植に適する iPS 細胞株を短期間で選抜する体制を確立すべく, 研究を行った.

【方法と結果】

具体的には, まず GMP レベルへ移行可能な培養系を確立するため, 動物由来成分の含有が最小限であり, かつ生物由来原料基準をクリアできる培養系の確立を試みた. また, iPS 細胞の品質管理に用いる遺伝子マーカーを同定するため, 公開データを含めた多数の発現データから核型を推定し統計的に解析を行うことで, 臨床用に適さない iPS 細胞株を迅速に見分ける方法の確立を試みた. センダイウイルスベクターによる山中因子導入, 及

び StemFitAK02 培地, 培養基剤として iMatrix-511 を用いることにより, 従来の培養条件よりも高効率な樹立方法の確立に成功した. 当該方法は GMP 基準へ移行可能な試薬のみを用いており, ヒトへの移植ができる培養条件内で完結可能である. さらに, 樹立後の選抜マーカーとして, 700 個のヒト多能性幹細胞のマイクロアレイデータの解析から, ヒト iPS 細胞の最頻度の核型異常である 12 トリソミーを簡便に見分けるマーカーとして GTSF1 を同定した. 当該マーカーを用いることで, iPS 細胞培養において最頻度の核型異常である 12 トリソミーを有する細胞株を遺伝子発現の確認のみで排除することが可能となった.

【考察】

単一の遺伝子の発現で異常細胞のスクリーニングが可能となる本法は再生医療の実現化にとって非常に有用である. 今後さらに複数の遺伝子の検討を重ね, より判別精度の高い方法を検討する.

心不全における骨格筋治療

高田 真吾

(北海道大学大学院医学研究院)

【背景・目的】

慢性心不全患者は運動耐容能が低下していることが知られており, それは独立した予後規定因子である. 我々は運動耐容能の主規定因子が骨格筋ミトコンドリアであることを報告してきたが (*Int Heart J 2015; Cardiovasc Res 2016*), その治療は運動療法しか存在しない. しかしながら, 重症患者においてはしばしば運動療法を施行出来ないことがある. 本研究は運動を模倣した骨格筋の収縮で分泌されるホルモン(マイオカイン)に着目し, その探索およびその効果を検討することを目的とした.

【方法および結果】

マイオカインを探索するため, マウス骨格筋培養細胞 (C2C12 筋管細胞) を用いて, カフェイン添加により骨格筋収縮を起こした. その際のメディアムを質量分析により解析すると, 筋収縮群に脳由来神経栄養因子 (BDNF) が検出された. 我々は BDNF が心不全患

者において低下しており, BDNF レベルは運動耐容能と負の相関をすることを報告した (*Int J Cardiol 2013; J Card Fail 2015*). そこで, 骨格筋の BDNF を検討したところ, 速筋線維に比較し, 遅筋線維に豊富に局在し, 超解像度顕微鏡画像によりミトコンドリアと共局在することが明らかになり, 骨格筋ミトコンドリア機能および全身の運動能力を制御する可能性が示された. そこで, BDNF が心不全における骨格筋異常および運動耐容能低下に及ぼす役割を検討した. 心筋梗塞 2 週後の骨格筋 BDNF レベルは心不全マウスでタンパク発現が有意に低下した.

心筋梗塞 2 週後から心不全マウスにリコンビナントヒト BDNF (rhBDNF) を 2 週間投与した (皮下注, 1 回/日, 5 mg/kg/day). 心不全マウスにおける rhBDNF の投与は骨格筋ミトコンドリア機能・量の増加に伴い, 低下した運動耐容能も有意に改善した.

【結論】

rhBDNF の投与は心不全における骨格筋ミトコンドリア機能・量を亢進することで運動耐容能の低下を改善する.

ヒト iPS 細胞由来心筋スフェロイドの大量作製と移植システムの確立

遠山 周吾

(慶應義塾大学医学部)

ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞や iPS 細胞) は再生医療における魅力的な細胞源であるが, 分化後に腫瘍化の原因となる未分化幹細胞が混入することが大きな問題になっている. そこで, 我々はヒト多能性幹細胞および分化心筋細胞におけるグルコース, グルタミンおよび乳酸の代謝プロファイルの差異を明らかにし, その性質を利用することにより, FACS を用いることなく, 特殊な培養環境により残存未分化幹細胞を除去し, 分化心筋細胞のみを選別する技術を開発してきた (*Tohyama, Cell Stem Cell 2013, Cell Metab. 2016, Circ. Res. 2017*). また, ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を大量生産するために, 我々は強制換気システムと多層培養プレートを用いた 2 次元大量培養系を確立することに成功した (*Stem*

Cell Rep. 2017). さらに、我々は純化心筋細胞から心筋スフェロイドを効率よく作製する手法を構築した。その結果、ヒトへの移植細胞数に相当するヒト iPS 細胞由来の純化心筋スフェロイドの作製が可能となった。現在、免疫不全マウス・ラットあるいはマイクロミニブタへの細胞移植を行い、安全性・有効性の評価を行っている。本研究成果によりヒト iPS 細胞から純化心筋細胞およびスフェロイドの大量作製および移植システムが確立され、今後の再生医療の実現化に貢献することが期待される。

【文献】

- 1) Tohyama, S. et al.: *Stem Cell Rep.* 9,1406-1414 (2017).
- 2) Tohyama, S. & Fukuda K.: *Circ. Res.* 120, 1558-1560 (2017).
- 3) Tohyama, S. et al.: *Cell Metab.* 12, 663-674 (2016).
- 4) Tohyama, S. et al.: *Cell Stem Cell* 12, 127-137 (2013).

ヒト iPS 細胞を用いた創薬研究

内藤篤彦

(東邦大学医学部)

近年、過去にがん治療を受けた患者で心不全を含む心疾患の罹患率が高いことが報告されており、抗がん薬による心毒性、特に心臓の左室機能を障害するような毒性(左室機能毒性)に関心が集まっている。ドキソルビシンを代表とする殺細胞性抗がん薬だけでなく、本来副作用が少ないはずの分子標的抗がん薬の一部にもメカニズムの明らかでない左室機能毒性を示すものが存在することが報告されている。新規抗がん薬が次々に開発される中、左室機能毒性を正確に、簡便に、再現性高く評価する手法の開発が求められている。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞 (iPS 心筋) を用いて薬物の催不整脈性リスクを評価できる可能性が示されている。一方、既存の iPS 心筋を用いた評価系では、人間の左室機能に関する特徴が再現できないなどの問題点がある。

本研究で我々は、日本人健康成人由来の iPS 心筋を 96 穴プレート上でパターン培養し、モーションベクトルイメージングで解析する評価系を構築した。パターン培養することで iPS 心筋は収縮・弛緩速度および総動き量が収縮頻度と正の相関を示す性質を獲得した。心臓に対する作用が明らかな複数の薬物に対して、パターン培養した iPS 心筋は薬物の作用機序に基づいた反応を示した。パターン培養した iPS 心筋で複数の分子標的抗がん薬およびドキソルビシンの短期的および長期的影響を評価したところ、心筋細胞の収縮、弛緩、同期性に対する影響が同じクラスに属する分子標的抗がん薬であっても異なるパターンで出現することが明らかになった。分子標的薬による影響の多くは軽度かつ一時的なものであったが、ドキソルビシンによる影響は時間経過とともに増悪していた。パターン培養した iPS 心筋をモーションベクトルイメージングで評価することで、薬物の左室機能毒性を *in vitro* で評価できる可能性が示された。

制御性 T 細胞による脂肪組織恒常性維持機構および脂肪細胞分化機構の解明

中島 啓

(東京大学大学院薬学系研究科)

【目的】

制御性 T 細胞 (Treg) は、様々な組織環境、炎症環境に適応する事で機能し、この適応性が炎症制御と組織の恒常性維持に重要である。我々はこれまでに、ヒト自己免疫疾患 IPEX で同定されている Foxp3 遺伝子変異 A384T を導入したマウスの解析から、A384TTreg が、AP-1 転写因子 BATF や GATA3, ST2 の発現制御異常を引き起こし、結果的に非リンパ組織に局在する Treg の恒常性を特異的に破綻させる事を見出した。本研究は、この発見を手がかりとして、BATF, GATA3, ST2 の発現がその機能性維持に重要とされている脂肪組織中の Treg に着目し、A384T 変異マウスの解析から脂肪組織における Treg の適応性を制御するメカニズムを明らかとし、Foxp3⁺Treg を介した脂肪組織恒常性維持機構および脂肪細胞分化機構を解明する事を目的とする。

【方法】

Foxp3 遺伝子変異 A384T 変異マウス, R397W 変異マウス, Treg 特異的 BATF 欠損マウスおよび野生型マウスの白色・褐色脂肪組織について, 組織形態, 免疫応答 (Th1/Th2/Th17 etc.), 免疫細胞集団を病理学的, 免疫学的に解析し, Foxp3 依存的な *Batf* 発現制御が脂肪組織の恒常性維持および脂肪細胞分化にいかにか寄与しているのか検証する。また, A384T 変異マウスと野生型マウスをそれぞれ通常食, または高脂肪食を摂取させ, エネルギー代謝変化を比較解析する。

【結果】

A384T マウスの脂肪組織を解析した結果, 予想通り, 脂肪組織中の Treg の数・割合が非常に少ない事が分かった。さらに Th1/Th2/Th17 応答を解析したところ, A384T マウスの脂肪組織では Th2 応答が過剰に起こっており, 脂肪組織重量も野生型マウスと比較して低い傾向にあった。一方で通常食・高脂肪食を摂取させ, 体重をモニタリングしたが, 今の所, 体重に有意な差は認められていない。

【考察】

A384T マウスの脂肪組織は Treg の数が少なく, 過剰な Th2 応答が起こっている事が分かった。現在のところ, WT マウスと A384T マウスでは体重に差がないものの, 糖代謝など全身の代謝が変化している可能性が考えられるため, 今後はこれらのパラメーターについて詳細に解析して行く予定である。

学習・記憶障害に対する持続性アドレノメデュリン誘導体の効果

永田 さやか

(宮崎大学医学部)

【背景と目的】

アドレノメデュリン (AM) は, ヒト褐色細胞腫の組織抽出液より発見された生理活性ペプチドである。AM は, 強力な血管拡張や血管新生, 抗炎症作用など多彩な作用を有しており, これまで消化器や循環器疾患の予防や治療における有用性が研究されてきた。しかしながら生理活性ペプチドである AM は血中半減期が短く, 治

療に用いる際は, 長期的な持続投与が必須である。この問題を解決すべく我々は 60 kDa のポリエチレングリコールを AM に結合する事で血中半減期を延長させる AM 誘導体の合成に成功した。そこで本研究では, AM 誘導体の学習・記憶障害に対する効果を確認する事とした。

【方法】

学習・記憶障害モデルとして 4 血管閉塞モデルラットを用いた。はじめに AM 誘導体を皮下投与し, 電気メスを用いて両側椎骨動脈閉塞手術を行った。翌日, 縫合糸を用いて麻酔下で両側総頸動脈を 30 分間閉塞し, その後, 縫合糸を取り除き, 血流を再開通した。モリスの水迷路は, モデル作製から 9 日後に 1 試行遊泳させ, モデル作製から 10 日目より, 1 日 4 試行で 5 日間 Hidden platform test を行い, 5 日目の最終試行の 1 時間後に Probe test を行った。AM 誘導体の投与量は 1 および 10 nmol/kg の 2 用量とした。

【結果と考察】

AM 誘導体は, 1, 10 nmol/kg の両群で Hidden platform test のプラットフォームへの到達時間が短縮した。また Probe test においても AM 誘導体投与の 1, 10 nmol/kg の両群で滞在率が有意に高かった。両側総頸動脈閉塞手術時の死亡率には差が認められなかった。つまり本試験条件下における AM 誘導体の皮下投与では, 4 血管閉塞モデルによる記憶・学習障害に対する軽減作用が示唆された。

以上より, AM 誘導体は, 学習・記憶障害を軽減できる可能性が明らかとなり, 脳虚血による認知症や脳卒中の新規治療薬の候補物質となると考えられた。

プロリン異性化酵素 Pin1 による adipose triglyceride lipase (ATGL) 制御機構

中津 祐介

(広島大学大学院医歯薬保健学総合研究院)

【目的】

心臓での中性脂肪の蓄積は, 心不全や狭心症などの原因となることが知られている。心臓での中性脂肪の分解は, adipose triglyceride lipase (ATGL) が中心となっ

で行っており、ATGL 欠損は、過剰な中性脂肪の蓄積を誘発することが報告されている。

我々が着目しているプロリン異性化酵素 Pin1 は、様々な標的蛋白に結合し、プロリンのシス-トランス異性化を行うことで標的蛋白の機能を調節している酵素である。

今回、Pin1 が ATGL と結合することを見出し、Pin1 を介した ATGL 機能制御と心臓での中性脂肪蓄積との関係を明らかにすることを目的とする。

【方法及び結果】

Pin1 と中性脂肪分解との関係を明らかにするために、代表的な脂肪分解酵素である ATGL と hormone sensitive lipase (HSL) との結合を検討した。その結果、Pin1 と両蛋白の結合が確認された。また、Pin1 は N 末側の WW domain を介して ATGL と結合しており、一方 ATGL は S185 が Pin1 との結合に必要であった。さらに、ATGL を CIAP で処理すると Pin1 との結合が消去された。

次に、Pin1 による ATGL 機能制御について検討したところ、Pin1 過剰発現により ATGL の発現は低下し、逆に Pin1 ノックダウンにより ATGL の発現は増加した。一方、ATGL mRNA 発現は、Pin1 過剰発現により影響を受けなかった。Pin1 過剰発現による ATGL の発現低下は、プロテアソーム阻害剤処理により抑制されたことから、Pin1 は ATGL の発現分解を促進してると考えられた。

さらに脂肪分解活性に対する Pin1 の影響を検討したところ、Pin1 欠損により脂肪分解活性は上昇した。

【考察】

Pin1 は、ATGL と結合し、その分解を促進することで脂肪分解を負に制御していると考えられた。Pin1 の発現変動や機能異常が心臓の過剰な脂肪蓄積につながる可能性が示唆された。

妊娠時低栄養による食塩感受性高血圧発症の中枢神経機序の解明

西本光宏

(東京大学先端科学技術研究センター)

【目的】

高血圧を含む生活習慣病の発症要因として遺伝因子と環境因子が知られている。第二次世界大戦前後に飢饉に晒された母体から出生した子が成長後に生活習慣病を合併する頻度が高いことが報告され、環境因子への適応が長い年月を経て発病に至る原因になった例として注目された。このような胎児期/乳児期のプログラミングの機序としてエピジェネティック機構が想定されるが、中でも DNA メチル化は持続的な遺伝子発現の変化をきたすことから、胎児/新生児期低栄養による成人期高血圧発症への関与が考えられる。一方、低栄養母体の胎盤ではコルチゾールを不活性化する 11β -HSD2 活性が低下しており、過剰なコルチゾール暴露が子の成長後の生活習慣病発症に影響するとされている。しかし胎児期のコルチゾール過剰が成人後に高血圧を発症させる機序は未解明である。我々は、血圧調節を司る視床下部の室傍核 (PVN) に着目し、胎児期コルチゾール過剰とエピゲノム変化および食塩再吸収を担う腎尿細管での Na 輸送体の変化を検討した。

【方法】

妊娠時低栄養、胎児コルチゾール過剰暴露のモデルとして妊娠時低タンパク食 (LP) 負荷ラット及び 11β HSD2 によって不活性化されない合成糖質コルチコイド (Dexamethasone) を妊娠中に投与したラット/マウスからの産仔について成長後に食塩負荷を行い、血圧および PVN での renin-angiotensin 系 (RA 系) 構成分子の遺伝子発現および DNA メチル化、腎での Na 輸送体発現を検討した。またマウス培養細胞系も用いて機序の検討を行った。

【結果】

妊娠時 Dex 負荷母体ラット産仔では、妊娠時 LP ラット由来産仔と同様に、成体での食塩感受性高血圧を呈した。これら産仔の PVN では、アンジオテンシン受容体 (AT1a) 遺伝子の DNA 脱メチル化と AT1a mRNA 発

現増加を認め、さらに DNA メチル化酵素 DNMT3a の発現と *AT1a* プロモータへの結合が低下していた。また、培養 PVN 神経細胞でも Dex 添加により、DNMT3a の発現低下と DNA 脱メチル化による *AT1a* 発現増加を認めた。また DNMT3a のノックダウンによって Dexa 非依存性の *AT1a* 発現増加を認めた。さらに PVN 特異的 DNMT3a-KO マウスでは *AT1a* 発現増加を認め、食塩負荷により血圧が上昇した。一方、*AT1a*-KO では妊娠時 Dex 投与による食塩感受性高血圧発症に抵抗性であった。Dexa 投与マウスからの産仔の腎尿管では Na 再吸収に関わる蛋白の発現変化を認めた。

【結論】

妊娠時低栄養による食塩感受性高血圧発症機序として、脳内糖質コルチコイド過剰による DNA メチル化異常が *AT1a* 発現を増加させ、その結果食塩負荷時の血圧上昇を生じる可能性が考えられた。食塩感受性高血圧の発症過程におけるエピゲノム異常とその成立メカニズムを解き明かし、新たな診断・治療法への手がかりを得ることが出来た。一方、胎児期の低栄養/糖質コルチコイド過剰負荷が実際に腎での Na 再吸収関与分子の発現変化を来す可能性が示唆された。

マルチオミックス連関による心不全分子病態の層別化

野村 征太郎

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

心不全はゲノム要因と環境要因が絡み合い複雑な心臓分子病理を呈しているが、個々の患者においてこれらの要素を詳細に解析する手法は確立されていない。本研究はこれらの統合により心不全ゲノム分子病理を解析する技術を確認することを目指す。

【背景】

我々は遺伝性心不全の主要な原因である心筋症の包括的ゲノム解析により、臨床的予後や治療応答性と関連する遺伝子変異を複数同定し、心不全ゲノム要因の不均一性の存在を明らかにしている。また心不全モデルマウスを用いて心臓組織の 1 細胞トランスクリプトームを心臓機能・細胞形態・エピゲノムと統合して解析する技術を

確立し、心不全に至る心筋リモデリング過程・心筋/非心筋の相互作用を詳細に解明してきた。

【方法】

本研究では、心不全患者のゲノム・心臓シングルセルトランスクリプトーム情報を治療応答性などの臨床情報と連結して心不全病態と強く関係する分子機構を明らかにし、これを用いた心不全病態層別化の臨床応用性について検討する。

【結果】

心不全患者の心筋 1 細胞解析により、健常者と比較して心不全患者の心筋細胞の遺伝子発現パターンは極めて不均一であり、この不均一性はいくつかの協調的に発現する遺伝子グループの発現パターンにより説明できることがわかった。またこれらの結果を臨床情報と連結することで、心筋細胞の可逆性を評価する遺伝子発現パターンを明らかにした。またこれらの特徴的な遺伝子の大半は圧負荷心不全モデルマウスの病態とも強く関連することを明らかにし、種を超えた心筋ストレス応答の保存性を見出した。さらに、同定した心不全病態と関連する分子機構を標的とした心臓組織解析により、簡便に心不全患者の臨床的予後・治療応答性を予測できることを明らかにした。

【考察】

個々の心筋細胞の転写プログラムは細胞の機能的情報を含んでおり、心臓疾患の分子病態の解明だけでなく精密医療の実現において極めて重要である。

心臓線維芽細胞老化の心臓線維化保護効果に関する検討

肥後 友彰

(The Institute of Cancer Research, Dynamic Cell Systems Laboratory)

【目的】

DNA 損傷応答 (DDR) は核 DNA 損傷に対し、細胞周期を停止させ DNA 修復を促進する一方で、DNA 損傷が深刻な際にはアポトーシスや、不可逆的な細胞周期の停止である細胞老化を誘導する。これまでに我々は

心筋細胞における DNA 損傷と DDR 活性化が心不全進展を促進することを明らかにしてきた¹⁾。一方で、組織線維芽細胞における DDR 活性化が創傷治癒や肝臓線維化の過程において組織保護的に働くことが報告されており、今回我々は心臓線維芽細胞 (Cardiac Fibroblast: CF) DDR 活性化の役割に着目した。

【方法および結果】

心筋梗塞 (MI) モデルマウスを作製し、CF における DDR 活性化を経時的に観察したところ、MI 後 4 日目以降に梗塞領域・境界領域で観察され、DDR 活性化マーカー陽性 CF の数は 7 日目で最も増加していた。またこれら DDR 陽性 CF は細胞増殖マーカーヒストン H3 リン酸化陰性や p21 発現上昇、SA-βgal 染色陽性、アポトーシスマーカー陰性など細胞老化に特徴的な所見を認めた。CF 老化が周囲の CF へ及ぼす影響を検討するため、我々は次に放射線照射による *in vitro* 老化 CF モデル作製を行い、周囲の CF に対する増殖抑制効果を検討した。老化 CF と正常 CF の共培養を行ったところ、老化 CF は傍分泌的ではなく接合分泌的に周囲の CF 増殖を抑制していることが明らかになった。

【現在の進捗状況】

上記の結果は CF における DDR 活性化が線維化形成に抑制的に働いている可能性を示唆している。現在は DDR エフェクター分子 ATM ヘテロノックアウトマウスを作製し、MI 後の CF 老化が心臓線維化、また心不全進展に抑制的に働いているのかどうかを検討中である。

【文献】

- 1) Higo, T., Naito, AT., Sumida, T., Shibamoto, M., Okada, K., Nomura, S., Nakagawa, A., Yamaguchi, T., Sakai, T., Hashimoto, A., Kuramoto, Y., Ito, M., Hikoso, S., Akazawa, H., Lee, JK., Shiojima, I., McKinnon, PJ., Sakata, Y. & Komuro, I.: DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun.* 2017 Apr 24; 8: 15104.

ポドサイト傷害による糖尿病性腎症の進展機序の解明と早期診断マーカーとしての尿中ポドサイト mRNA 排泄量の検討

福田 顕 弘

(大分大学医学部)

【背景・目的】

糖尿病性腎症の進展機序の解明と早期診断法の開発は透析患者を減らす上で極めて重要である。近年では糖尿病性腎症の比較的早期から、また病勢の進行とともにポドサイト傷害が認められることが報告されている。このことからポドサイト傷害の持続が糖尿病性腎症進展の主体であり、早期診断マーカーとして尿中ポドサイト関連分子が有用となる可能性が示唆される。糖尿病性腎症の早期診断法として用いられる微量アルブミン尿は陰性であっても糸球体傷害が進行している症例が存在し、微量アルブミン尿より精度の高い早期診断法の開発が求められる。

【方法】

II 型糖尿病性腎症モデルとして、レプチン受容体欠損ラットである Zucker Diabetic Fatty ラット (ZDF-fatty) を使用し、レプチン受容体変異をヘテロで有するラット (ZDF-lean) を非糖尿病モデルコントロールとした。15 週齢、30 週齢、45 週齢においてアルブミン尿、尿中ポドサイト mRNA 排泄量、糸球体容積、ポドサイト容積、ポドサイト density (体積あたりのポドサイト数) などを測定し比較した。

また、上記ラットモデルにおいて 6～14 週齢の早期糖尿病期の検討を行うとともに、糖尿病と診断された 174 例 (正常アルブミン尿 99 例、微量アルブミン尿 38 例、顕性蛋白尿 37 例) を対象とし、人間ドックで糖尿病及び高血圧を認めない 41 症例を対象コントロールとした。

【結果】

ZDF-fatty ラット群では、15、30、45 週と経過に伴い、糸球体とポドサイト容積のミスマッチ (glomerular volume/ポドサイト数) がより顕著であった。さらに、mTOR pathway 下流の Phospho-S6 のポドサイトでの発現は、ZDF-fatty ラット群で有意に上昇し、これらは 40% カロリー制限により抑制できた。

ZDF-fatty ラット群では、10 週齢よりアルブミン尿の増加を認めたが、尿中ポドサイト (podocin) mRNA 排泄量はそれ以前の 8 週齢より増加し始めた。また、臨床症例の検討では、アルブミン尿の増加とともに尿中ポドサイト mRNA 排泄量の増加を認めた (vs control: 正常アルブミン尿群: 4.3 倍, 微量アルブミン尿群: 4.2 倍, 顕性蛋白尿群: 16.7 倍)。さらに、正常コントロール群の四分位範囲でアルブミン尿値を揃えても尿中ポドサイト mRNA 排泄量は正常アルブミン尿群で有意に増加していた (vs control: 6.7 倍, $P < 0.01$)。

【結論】

糖尿病性腎症において mTOR1 シグナルの活性化による糸球体とポドサイトの容量ミスマッチが病態進展の一因を担っている可能性が考えられた。また、尿中ポドサイト mRNA 排泄量は糖尿病性腎症における早期診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

心筋直接リプログラミングを促進する低分子化合物

村岡直人

(慶應義塾大学医学部)

終末分化細胞である心筋細胞は再生能力が限られていることから、一度障害を受けると失われ、線維芽細胞に置換されることで、心機能は低下していく。多能性幹細胞は心筋再生の細胞源として期待されるが、その使用には分化誘導効率、腫瘍形成の可能性、移植細胞の生着率などの問題がある。心臓に内在する線維芽細胞を直接その場で高率に心筋に転換できればこれらの問題を解決できる。これまでの研究により心筋特異的転写因子である Gata4/Mef2c/Tbx5 (GMT) または GMT/Msep1/Myocd を導入することでマウスの *in vitro*, *in vivo*, さらにヒト細胞で線維芽細胞からの心筋直接リプログラミングを可能とした (Ieda M et al, Cell, 2010, Inagawa K et al, Circ Res, 2012, Wada R et al, PNAS, 2013)。また、筋特異的マイクロ RNA である miR-133 により心筋誘導効率が改善すること、そのメカニズムとして上皮間葉移行のマスター因子である Snail を直接抑制することで線維芽細胞の特性が消去され、心筋誘導が促進することを明らかとした (Muraoka N et al, EMBO J, 2014)。

これらによりジェネティックな障壁の一部が明らかとなったが、エピジェネティクスを含めた分子基盤に関しては未だ不明な点が多く、リプログラミング効率も依然十分とは言えない。

そこで、注目したのが低分子化合物である。低分子化合物はコスト、安全面、簡便さから臨床応用に向け優れた選択肢といえる。本研究ではエピジェネティック制御因子も含めた化合物ライブラリーの中から心筋誘導を促進するものを探索することとした。心筋特異的蛋白である α -Myosin Heavy Chain (α MHC) を蛍光標識した α MHC-Cre/Loxp-tdTbmato (tdT) 遺伝子改変マウスの尾部線維芽細胞を用いて、GMT に加えて各種低分子化合物を導入することで誘導される tdT 陽性細胞数及び割合を cell image analyzer により評価し、high-throughput screening を行い、tdT 陽性細胞の誘導を促進する化合物の絞り込みに成功した。その中で、心筋直接リプログラミングを強く促進する新規低分子化合物として、化合物 A を同定した。化合物 A は心筋リプログラミング因子 GMT/Hand2 (GHMT) に加えることで cTnT 陽性細胞を強く促進することを flow cytometer で確認した。また、遺伝子発現の変化を microarray 及び qRT-PCR で確認したところ、化合物 A を加えることで、多くの心筋関連遺伝子の発現が顕著に上昇していた。今後は化合物 A による心筋直接リプログラミング促進のメカニズムを解明していく。

ヒト iPS 心筋細胞による催不整脈リスク予測

山崎大樹

(国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

【目的】

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (ヒト iPS 心筋細胞) は、ヒト心筋に発現する複数のイオンチャネルを有しているため、複合的な催不整脈リスク評価法への応用の可能性が示唆されており、心臓安全性評価の予測精度を向上させる新たなツールとして非常に注目されている。これまで我々は 1 種類の iPS 心筋細胞株 (iCell cardiomyocyte, CDI 社) を用いて、多点電極システムにより催不整脈リスクを高精度に予測できることを明ら

かにしてきた。現在、複数種類のヒト iPS 心筋細胞が市販されているが、株によって性質が異なっているため、これらが医薬品の催不整脈リスク予測に応用できるかは不明である。そこで、我々は新たなヒト iPS 心筋細胞株として Cor.4U (Ncardia 社) を選択し、催不整脈リスク予測精度について評価した。

【方法】

ヒト iPS 心筋細胞株は Cor.4U を用いた。細胞外電位波形の記録は、多点電極システムを用いた。プローブにヒト iPS 心筋細胞を高密度培養し、播種 1 週間後から計測を開始した。Field potential duration (FPD) の変化の程度および異常波形である EAD の有無を指標としてスコア化 (TdP risk score) した。また、EAD などのイベントが起こった化合物のフリー体濃度と臨床有効血中濃度との比を求めて、化合物ごとにプロットした。

【結果】

iCell cardiomyocytes と同様に、Cor.4U においても細胞外電位波形から得られる inter-spike interval (ISI) と FPD の相関関係がヒト心筋の RR-QT 相関関係に近いこと、hERG 阻害剤である E-4031 による逆頻度依存性が観察されること、さらには、FPD の値が 500ms を超えると EAD が発生しやすくなることが明らかとなった。このことは Cor.4U がヒトの催不整脈リスク予測評価に有用なヒト iPS 心筋細胞であることを示している。次に本評価系により、TdP リスクの異なる 27 化合物を用いて多点電極システムによりデータを取得した。化合物ごとに TdP リスクスコアおよび臨床血中濃度との比を算出してプロットし、パラメーターごとに TdP リスクの境界を定めることで、高リスクとして 9 薬剤、中リスクとして 8 薬剤、低リスクとして 10 薬剤に分類することができた。さらに高リスク薬剤と低リスク薬剤について、臨床において TdP の発生を記録した CredibleMeds データベースとのコンコルダンス解析を行ったところ、高い相関性が得られた。

【考察】

iCell cardiomyocytes の結果も併せて考察すると、複数のヒト iPS 心筋細胞株において、多点電極システムを組み合わせたりリスクカテゴリーシステムは、医薬品の催不整脈リスク予測を行う上で有用なツールであることが示された。

血管壁の機械刺激応答と病態形成を誘導するシグナル分子の解析

山城 義人

(筑波大学生存ダイナミクス研究センター)

【目的】

大動脈瘤は血管壁が異常に拡張し、破裂、やがて死に至る疾患であり、破裂を未然に防ぐ治療法も未だ確立されていない¹⁾。我々は、独自に開発した上行大動脈瘤マウスモデル²⁾を用いて、コフィリンを介した細胞骨格のリモデリングが瘤形成に重要である知見を報告してきた³⁾。また、横行大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷の増大に伴って、細胞-基質間の相互作用を触媒する細胞外マトリクス Thrombospondin-1 (*Thbs1*) が上行大動脈で発現亢進する事、大動脈瘤病変で *Thbs1* が過剰に亢進している事を見出したが³⁾、圧負荷応答における *Thbs1* の役割と大動脈瘤形成へどのように関与するかの詳細は未だ不明である。よって、血管壁内の機械刺激応答における *Thbs1* の役割を明らかにすることが大動脈瘤の形成メカニズムを理解する上で重要である。

【方法・結果】

はじめに、生後 30 日目の大動脈瘤血管壁を *Thbs1* 抗体で免疫染色し、その局在を精査した。野生型の大動脈瘤では *Thbs1* の発現はほとんど認められないのに対し、大動脈瘤では内皮細胞と内皮細胞近傍の平滑筋細胞に高発現していた。次に、血管平滑筋細胞を周期的伸展刺激下で培養すると、*Thbs1* が細胞接着斑と共局在することから、*Thbs1* が細胞接着斑の形成あるいは分解に関与している可能性が示唆された。さらに、*Thbs1* のノックアウトマウスと *SMKO* マウスとの掛け合わせで得られるダブルノックアウトマウス (*DKO*) は、細胞骨格調整因子コフィリンの不活性化を伴って大動脈瘤の形成が抑止された (論文投稿中⁴⁾)。透過型電子顕微鏡を用いた解析によって、*DKO* マウスでは、血管弾性線維が太くなる傾向が観察され、*SMKO* マウスで見られた平滑筋細胞と弾性線維の接着点喪失異常も見られなくなる事がわかった。

【考察】

これらの結果より、*Thbs1* が血管壁のメカニカルスト

レス応答に重要な役割を担い、大動脈瘤形成に関与する細胞骨格調整因子コフィリンの上流シグナルであることが明らかになった。今後、*Thbs1* の新しい役割、接着斑形成や弾性線維形成、または *Thbs1* の発現を標的とした新しい大動脈瘤の治療薬の開発が期待される。

【文献】

- 1) Yamashiro, Y. & Yanagisawa, H.: Crossing bridges between Extra- and Intra-cellular events in thoracic aortic aneurysms. *J. Athroscler. Thromb.* 25(2): 99-110. (2017).
- 2) Huang, J., Yamashiro, Y., Papke, CL., Ikeda, Y., Lin, Y., Patel, M., Inagami, T., Le, VP., Wagenseil, JE. & Yanagisawa, H.: Angiotensin-converting enzyme (ACE)-induced activation of local angiotensin signaling is required for ascending aortic aneurysms in fibulin-4-deficient mice. *Sci. Transl. Med.* 5(183):1 83ra58, (2013).
- 3) Yamashiro, Y., Papke, CL., Kim, J., Ringuette, LJ., Zhang, QJ., Liu, ZP., Mirzaei, H., Wagenseil, JE., Davis, EC. & Yanagisawa, H.: Abnormal mechanosensing and cofilin activation promote the progression of ascending aortic aneurysms in mice. *Sci. Signal.* 8(399): ra105, (2015).
- 4) Yamashiro, Y., Thangm BQ., Shinm SJ., Lino, CA., Nakamura, T., Kim, J., Sugiyama, K., Tokunaga, C., Sakamoto, H., Osaka, M., Davis, EC., Wagenseil, JE., Hiramatsu, Y. & Yanagisawa, H.: Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. *In revision.*

全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

潰瘍性大腸炎における抗 TNF- α 抗体製剤使用前後の血小板・赤血球沈降速度・IL-6 の検討

秋田 義博

(東京慈恵会医科大学医学部)

【目的】

重症の潰瘍性大腸炎に対して抗 TNF- α 抗体製剤を導入した前後の血小板, 赤血球沈降抗体 (以下 ESR), IL-6 を比較検討する。

【方法】

I) 血小板, ESR の検討

反応例 (10 例), 抵抗例 (7 例) にわけ使用前後の血小板, ESR を解析する。

II) 組織中 IL-6 の検討

抗 TNF- α 抗体製剤使用前後に施行した大腸内視鏡検査で採取した生検検体に関して, IL-6 抗体を用いて特殊免疫染色を施行した。抗 TNF- α 抗体製剤に対して反応例, 抵抗例別に IL-6 に対する陽性細胞数を層別化 (陽性細胞数の割合: +(30%未満), 2+(30-60%), 3+(60%以上)) し評価する。※陽性細胞数の評価は病理医による判断を採用

【結果】

I) 使用前後での検討では, 使用後 ESR は反応例の方が抵抗例と比較し有意に低かった ($p = 0.012$)。治療反応性別での検討では反応例の血小板は使用前と比較して使用後は有意に低かった ($p = 0.013$)。その他の項目に関しては有意な差を認めなかった。

II) 現在解析中のため, 一例の結果を報告する。反応例に関しては Matts 分類が 3 \rightarrow 2, IL-6 が 1 \rightarrow 1 だったが, 抵抗例に関しては Matts 分類が 2 \rightarrow 3, IL-6 が 0 \rightarrow 1 だった。

【考察】

炎症性腸疾患における CRP, ESR, 血小板等のバイオマーカーと疾患活動性との比較は多数報告されているが

一定の見解が得られていない。本研究でも治療反応性を予測する結果は認めなかった。活動性のある UC は非活動性の UC と比べ大腸上皮細胞内に多くの IL-6 が発現しているとも報告されている¹⁾。Matts 分類と組織中 IL-6 の相関性に関しては症例に蓄積が望まれる。

【文献】

- 1) Yi Li., Colin de Haar. & Min Chen.: Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. Gut, 59, 227-235

遺伝要因を用いたベーチェット病の臨床症状形成機序の解明および臨床症状分類の構築

石戸 岳仁

(横浜市立大学医学部)

【目的】

ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。口腔内アフタ性潰瘍, 皮膚症状, 眼症状, 外陰部潰瘍の 4 症状を主症状とし, しばしば関節炎, 副睾丸炎, 消化器症状, 血管病変, 中枢神経病変などの副症状を伴う。

ベーチェット病は多因子遺伝疾患であり, 人種を超えて HLA-B 遺伝子の HLA-B*51 アリルと顕著に相関することが知られている。また, 近年のゲノム全域を対象とした遺伝子解析により, ベーチェット病の新規の遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) が多数報告されている。一方, ベーチェット病の多様な症状の形成を規定する要因は未だ明確に決定されておらず, ベーチェット病の病態の全容解明には依然として至っていない。したがって本研究では, ベーチェット病の主症状および副症状の形成に影響を与える遺伝要因の解明を行った。

【方法】

現在までに報告されているベーチェット病の18個の有力な遺伝要因 (HLA-B*51, HLA-A*26, IL10, IL23R-IL12RB2, CCR1, STAT4, KLRC4, ERAP1, TNFAIP3, MEFV, FUT2, IL12A, IL1A-IL1B, RIPK2, ADO-EGR2, LACC1, IRF8, CEBPB-PTPN1) について, 日本人患者608例を対象に, 各遺伝子のリスクアレルの保有の有無で患者を層別化し, 各臨床症状の形成に影響を与える遺伝要因の特定を行った。

【結果】

層別化解析により, 「HLA-A*26」は眼症状, 外陰部潰瘍および中枢神経病変, 「IL23R-IL12RB2」は関節炎, 「IL10」は口腔内アフタ性潰瘍, 皮膚症状, 眼症状および中枢神経病変, 「STAT4」は外陰部潰瘍, 「CCR1」は血管病変, 「KLRC4」は副睾丸炎, 「IRF8」は眼症状と副睾丸炎の形成に影響を与えるリスク因子であることが示唆された。また, 「HLA-A*26とIL10」の組み合わせは中枢神経病変, 「HLA-A*26, IL10およびIRF8」の組み合わせは眼症状, 「HLA-A*26とSTAT4」の組み合わせは外陰部潰瘍, 「KLRC4とIRF8」の組み合わせは副睾丸炎の発生率を大きく上昇させた。

【考察】

本研究により, ベーチェット病の臨床症状の形成に影響を与える遺伝要因が網羅的に見出された。今後, 遺伝要因を用いたベーチェット病の臨床症状分類を構築することで, ベーチェット病の初期段階における遺伝子検査で, 今後形成する可能性の高い臨床症状の予測が可能になり, 患者への早期の適切な治療に繋がることが期待される。

ぶどう膜炎の病態に関連する網膜血管因子の解明

小野 久子

(東京大学大学院医学系研究科)

未発表データが含まれるため, 掲載していません。

慢性移植片対宿主病様皮膚硬化モデルマウスにおけるB細胞の役割

齊藤 明允

(筑波大学人間総合科学研究科)

【目的】

造血細胞移植後の合併症である慢性移植片対宿主病の一症状として, 強皮症様皮膚硬化が知られている。実際, 我々の用いる移植片対宿主病様皮膚苔癬反応モデルマウスは, 急性移植片対宿主病様の皮膚粘膜病変が生じた後, 皮膚硬化を認めた。近年, 慢性移植片対宿主病の病態生理における病原性B細胞の役割が注目され, 同モデルにおけるB細胞の役割を解明し, 新規分子標的治療薬の開発に結びつけることを期待する。

【方法】

皮膚粘膜表皮角化細胞特異的にKeratin 14プロモーター下に卵白アルブミン (OVA) をトランスジェニックした遺伝子改変マウス (K14-mOVA Tg マウス) をレシピエントとし, OVA 特異的T細胞受容体を発現したCD8 T細胞であるOT-I細胞を持つOT-Iマウスのリンパ節細胞をドナー細胞として養子移入¹⁾した後, 28日観察すると全身の皮膚硬化を認めた。そこで, B細胞機能欠損するCD19^{cre/cre}/K14-mOVA double Tg マウスまたはB細胞そのものが欠損する μ MT/K14-mOVA Tg マウスを作成し, 皮膚硬化の程度を比較検討した。

【結果】

本モデルマウスにおいて, OT-I細胞移入後は移入前と比べて, 14日までの急性の間, 皮膚所属リンパ節のB220陽性IL-6およびIL-10産生細胞の割合がともにいったん増加し, 以降は移入前と同程度まで減少する。OT-I細胞移入後, CD19^{cre/cre}/K14-mOVA double Tg マウスはK14-mOVA Tg マウスと比べて, 14日までの急性期では有意に死亡率が高かった。また, この間, 皮膚所属リンパ節を解析すると, 両群ではB220陽性IL-6陽性細胞の割合に有意差はなかったが, CD19^{cre/cre}/K14-mOVA double Tg マウスではB220陽性IL-10産生細胞はほぼみられなかった。次に, OT-I細胞移入後, μ MT/K14-mOVA Tg マウスはK14-mOVA Tg マウスと比べて, 28日における皮膚硬化が軽度で, 真皮厚,

皮膚ハイドロキシプロリン含量、真皮 α SMA 陽性筋線維芽細胞数が有意に減少していた。

【考察】

本慢性移植片対宿主病様皮膚硬化モデルマウスにおいて、急性期に増加する B220 陽性 IL-10 産生細胞は主に急性期のサイトカインストームによる死亡の抑制に寄与し、B220 陽性 IL-6 産生細胞は病原細胞として慢性期の皮膚硬化を誘導している可能性が示唆された。

【文献】

1) Shibaki, A., Sato, A. & Katz, SI.: Induction of GVHD-like skin disease by passively transferred CD8(+) T-cell receptor transgenic T cells into keratin 14-ovalbumin transgenic mice. *J Invest Dermatol*, 123, 109 (2004).

腸管マクロファージにおける NLRP3 を介した IL-10 発現機序の解明

佐上 晋太郎

(北里大学北里研究所病院)

【研究の背景と目的】

炎症性腸疾患 (IBD) は再燃寛解を繰り返す難治性の炎症性腸疾患である。腸管マクロファージ (以下 腸管 M ϕ) は健常者において、腸内抗原に対して過剰な反応を示さずに抗炎症性サイトカイン IL-10 を恒常的に産生する事によって腸内抗原に対する寛容性を保っているが、IBD でその機構が破綻していることが病態の key event と考えられている。本研究では、この腸管 M ϕ における恒常的 IL-10 発現機序を解明することを目的とする。

【方法】

1) SPF 或いは GF の野生型 (WT) マウス、および *Myd88*^{-/-}、*Nlrp3*^{-/-} マウスの大腸より CD11b⁺ 腸管 M ϕ を単離し、*Il10* の発現を qPCR により比較した。2) WT マウスの骨髄より Bone Marrow-derived macrophage (BMDM) を作成し、lentivirus system によるインフラマソーム関連遺伝子 (*Nlrp3*, *ASC*, *Caspase-1*) の knock down (KD) を行った。LPS 10 ng/ml による priming 後に ATP 5 nM による刺激を加え、経時的な *Il10* の発現を qPCR により評価した。3) WT

マウスの大腸、脾臓、腹腔より M ϕ を採取し、*Il1r1* の発現を qPCR により比較した。4) WT, *Myd88*^{-/-} 及び *Nlrp3*^{-/-} マウスの腸管 M ϕ を IL-1 β 10 ng/ml により刺激し、経時的な *Il10* の発現を qPCR により評価した。

【結果および考察】

1) SPF と無菌環境下で飼育した WT マウスにおいて、腸管 M ϕ の *Il10* 発現に差は見られなかったが、*Myd88*^{-/-} および *Nlrp3*^{-/-} マウスの腸管 M ϕ では、WT と比較して *Il10* の発現が有意に低下していた。*Myd88*^{-/-} 腸管 M ϕ では、WT と比較して *Nlrp3* の発現も有意に低下していた。2) *Nlrp3* KD-BMDM では LPS + ATP 刺激後の *Il10* 発現が 0.5, 1, 3 時間で WT よりも有意に低下していたが、*ASC*-, *Caspase-1* KD-BMDM では差は見られなかった。3) 腸管 M ϕ では脾臓、腹腔内 M ϕ と比較して、*Il1r1* 発現が亢進していた。4) IL-1 β による腸管 M ϕ の刺激では 2, 4 時間後で有意に *Il10* の発現が亢進していた。本検討により、腸管マクロファージにおける IL-10 発現には NLRP3 が関与し、インフラマソームの活性化とは別に、MyD88 依存的な IL-1 受容体刺激伝達経路を介して NALP 分子や IL-10 の発現に関与している可能性が示唆された。現在腸管 M ϕ において NLRP3 が IL-10 産生のための転写因子として作用しているか否かを証明するために実験を進めている。

酸化ストレスによる全身的な炎症と加齢黄斑変性 (AMD) の発症・悪化の関与を含めて更なる機序を解明

高山 圭

(防衛医科大学校医学部)

【目的】

滲出型加齢黄斑変性 (nAMD) の発症と悪化に眼内の炎症性サイトカインが関与するかどうか調べた。

【方法】

未治療の nAMD 症例 22 名 22 眼を対象とし、白内障症例 17 名 21 眼を対照群とした。nAMD 症例は初回と 3 回目の抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 抗体硝子体投与の直前に、対照群は白内障手術執刀時に前房水を採取した。採取した前房水の 26 種類のサイトカイン (PDGF,

IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A, eotaxin, basic fibroblast growth factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α , VEGF) を測定し, nAMD と対照群との間の差と, nAMD 眼の抗 VEGF 抗体投与による変化を調べた。

【結果】

nAMD 眼は VEGF および IP-10 が上昇し IL-6 が低下していた。また, 抗 VEGF 抗体投与により VEGF が減少し IL-6 と IP-10 が増加し, VEGF と IP-10 の間に負の相関関係があった。nAMD 発症時において視力と相関する中心窩網膜厚と IP-10 濃度に正の相関があること, 抗 VEGF 抗体であるアフリベルセプトの硝子体内投与の3回目直前の IL-6 濃度と視力には負の相関があった。

【考察】

IP-10 は白血球および内皮細胞や平滑筋細胞などの非白血球から分泌され, IP-10 は抗血管新生作用および抗線維形成作用を有する。また, IL-6 は VEGF を含む多数の血管新生および炎症促進性サイトカインを誘導する。抗 VEGF 抗体投与によって, IP-10 産生を誘発し発症における脈絡膜新生血管の産生を予防する可能性と, IP-10 と IL-6 が相互作用して過剰な血管新生応答および抗血管新生応答を相殺する可能性が示唆された。

ヒト IBD 体外モデル構築による難治化病態解明

日比谷 秀爾

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

【目的】

発表者の所属する教室で構築したマウス大腸オルガノイド培養技術¹⁾を用いて, マウス大腸初代培養細胞に炎症刺激を長期間行い, 慢性炎症の病態を模倣した体外擬似モデルの構築に成功した²⁾。

ヒト大腸オルガノイドでも同様の手法を用いて長期間の炎症刺激を行い, 炎症性腸疾患 (IBD) 体外モデルを確立させるとともに, 上皮細胞機能評価システムを構築することにより, 新規治療候補薬の評価系の確立を目的

とした。

【方法】

所属施設の倫理審査委員会承認のもと, クローン病非病変部の大腸より内視鏡的に生検を行い, 生検検体からヒト大腸オルガノイドを樹立した。ヒト大腸オルガノイドの炎症応答関連レセプター発現を RT-PCR 法にて解析した。炎症刺激による上皮応答を RT-PCR 法で調べることによって解析した。また, マイクロアレイ法及び GSEA 法を用いて, 網羅的な上皮炎症応答を評価した。酸化ストレスは CellROX (R) を用いて蛍光強度を測定した。

【結果】

ヒト大腸オルガノイドの炎症応答関連レセプター発現を RT-PCR にて同定した。発現を認めたレセプターのリガンドにて刺激を行うと, IL-8 の発現上昇を認めた。さらに, 1 週間の持続刺激にて酸化ストレス関連遺伝子である DUOX2 の発現上昇を認めた。応答を認めたリガンドを混合して刺激を行った所, リガンド単剤での刺激と比較して最も大きい炎症応答を認めた。そこで, リガンド混合による持続刺激を5週間行い, マイクロアレイ法にて解析したところ, 炎症関連遺伝子群の上昇及び粘液形質の減少を認めた。CellROX (R) を用いた酸化ストレス解析では蛍光強度の増加を認め, 炎症刺激による酸化ストレス上昇を認めた。さらに, 新規治療候補薬の添加により, 炎症環境においても炎症関連遺伝子の低下・粘液形質の上昇を認め, 酸化ストレスの低下を認めた。新規治療候補薬による抗炎症作用, 粘膜再生作用の効果を確認し得た。

【結論】

ヒト大腸オルガノイドにおいて, 炎症刺激の持続により, IBD の炎症環境を模倣していることが示唆された。IBD 体外モデルの構築及び評価系の確立により, 新規候補薬物のスクリーニングに有用となることが示唆された。

【文献】

- 1) Yui, S., Nakamura, T. *et al.*: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18: 618-23, (2012).
- 2) Hibiya, S., Tsuchiya, K. *et al.*: Long-term inflammation transforms intestinal epithelial

cells of colonic organoids. *J Crohns Colitis*. 11: 621-630, (2017).

腸管小胞体ストレスに対する免疫応答と腸炎発症メカニズム解明

細見 周平

(大阪市立大学大学院医学研究科)

【背景・目的】

クローン病に特徴的な全層性慢性炎症に対する組織修復過程が、肥満細胞の集簇を伴う平滑筋細胞増生やコラーゲン産生・線維化に関与し、線維性狭窄を来すと考えられている。炎症性腸疾患患者の腸管においては、小胞体ストレスの亢進が報告されているが、肥満細胞における小胞体ストレス応答に関する報告は少ない。そこで、小胞体ストレス下の肥満細胞株の網羅的遺伝子発現解析結果から、上皮成長因子受容体のリガンドである Amphiregulin に注目し、小胞体ストレス応答によるその発現誘導機構の解明と、クローン病におけるその発現の検討を目的とした。

【方法】

コントロールとクローン病患者の手術切除標本を用いて、Amphiregulin 発現の比較検討を行った。ヒト肥満細胞株である LUVA cell line を用いて、小胞体ストレス誘導剤である Thapsigargin (Tg) 刺激条件下における Amphiregulin の mRNA (*AREG*) 発現を定量 PCR 法で、培養上清中の蛋白発現を ELISA 法で測定した。また、siRNA を用いたノックダウン実験・クロマチン免疫沈降 (ChIP)・Luciferase assay で、小胞体ストレス応答による Amphiregulin 誘導機構を検討した。

【結果】

蛍光免疫染色では、Amphiregulin 陽性の粘膜固有層細胞数が、コントロールに比較してクローン病患者では有意に高値を示した ($p = 0.029$)。Tg 刺激により、Amphiregulin の mRNA 発現及び培養上清中の蛋白発現が誘導された。siATF4 によるノックダウンで、その発現誘導は抑制されたことから、小胞体ストレス応答性転写因子である ATF4 が発現誘導に関与している可能性が示唆された。ChIP・Luciferase assay の結果か

ら、小胞体ストレス下では、*AREG* の開始コドン 0 ~ -374 bp の領域に存在する ATF motif に ATF4 が直接結合し、*AREG* の mRNA が誘導されている可能性が示唆された。

【結語】

組織修復や線維芽細胞の増殖などに関与する Amphiregulin のクローン病における発現亢進は、肥満細胞における小胞体ストレス亢進に伴う ATF4 を介した誘導であることが示唆され、クローン病の線維化病態の理解の一助となることが期待される結果であった。

全身性強皮症の皮膚硬化における microRNA let-7a の関与の検討

牧野 雄成

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

全身性強皮症とは皮膚硬化を主症状とし、皮膚だけでなく多臓器にも線維化を生じうる自己免疫疾患である。全身性強皮症の硬化皮膚では、活性化された線維芽細胞による、I 型コラーゲンを主体とした過剰な細胞外マトリックス産生が生じているとされている。本研究では、microRNA let-7a が線維芽細胞における過剰な I 型コラーゲン産生に関与しているか検討を行った。

【方法/結果】

全身性強皮症と健常人の皮膚組織より microRNA を抽出し、microRNA アレイを行い発現に変化のある microRNA を検索した。アレイ結果から、I 型コラーゲンの mRNA に結合することが予想される microRNA の中で、microRNA let-7a は硬化皮膚において健常人皮膚より減少していた。この let-7a は全身性強皮症の皮膚線維芽細胞や患者血清において健常人と比較して低下していた。次に let-7a が皮膚線維芽細胞において実際 I 型コラーゲン蛋白量を変化させるのか検討を行った。合成した let-7a を線維芽細胞に導入すると I 型コラーゲン量は減少し、逆に let-7a の阻害剤を導入すると I 型コラーゲン量は増加していた。これらの結果より、let-7a を増加させることで皮膚硬化が改善するのではと推測し、ブレオマイシン誘導マウス皮膚硬化モデルで検

討を行った。ブレオマイシン誘導皮膚硬化マウスに let-7a 腹腔内注射を行うと、ブレオマイシン投与による皮膚厚の増加は let-7a 投与により減少していた。

【考察】

microRNA による I 型コラーゲン調節のメカニズムを解明することは、強皮症の新しい治療や疾患マーカーにつながる可能性がある。

炎症性腸疾患発症に関与する新たな因子の検討

松 本 佳 則

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

未発表データが含まれるため、掲載しておりません。

Front Runner of Future Diabetes Researchに関する研究助成

肥満脂肪細胞における酸化還元状態の病態学的意義
解明

奥野陽亮

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

我々は、肥満状態の脂肪組織では酸化ストレス (Fat ROS) が亢進する事をマウス及びヒトにおいて報告してきた (Furukawa et al., J Clin Invest., 2004, Hirata et al., BBRC, 2012). しかし、メタボリック症候群における Fat ROS の病態学的意義は不明であった。

【方法・結果】

Fat ROS 低減マウスの解析

Fat ROS 低減マウスにおける酸化ストレス状態を詳細に検討した。皮下脂肪組織、性腺周囲脂肪組織では 8-isoprostane, 過酸化水素の低下を認めたが、腸間膜脂肪組織、褐色脂肪組織、肝臓では差が認められなかった。本マウスの皮下脂肪組織では、M2 マクロファージ優位の変化を示し、炎症が改善していると考えられた。また、PicroSirius 染色にて線維化の抑制を認めた。

Fat ROS 増加マウスの解析

Fat ROS 増加マウスの脂肪組織における酸化ストレス状態を詳細に検討した。性腺周囲脂肪組織においては、8-isoprostane, 過酸化水素, カルボニル化蛋白の増加を認めた。

本マウスは高脂肪食負荷下において、Fat ROS 低減マウスとは対照的に、白色脂肪重量の減少、肝臓・褐色脂肪組織への脂質蓄積、インスリン抵抗性の増悪を認めた。白色脂肪組織においては、脂質合成系遺伝子の発現抑制、炎症マーカーの亢進を認めた。また、M1 マクロファージ優位の変化を認め、炎症が増悪していると考えられた。また、PicroSirius 染色にて線維化の亢進を認めた。

【考察】

肥満脂肪組織において増加した Fat ROS は、脂質合

成抑制、脂肪組織炎症の増加、脂肪組織線維化の増悪を介し、異所性脂肪蓄積・インスリン抵抗性を誘導する可能性が考えられた。

【文献】

Okuno, Y., Fukuhara, A., Hashimoto, E., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Otsuki, M. & Shimomura I.: Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway. Diabetes 2018; 67(6):1113-1127

弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 によるインスリン抵抗性制御機構の解明

奥山朋子

(横浜市立大学医学部)

【目的】

細胞外基質の糖代謝制御への関与は不明である。我々は、膝島におけるグルコキナーゼの標的分子として、細胞外基質における弾性線維形成に必須の分泌タンパクである Fibulin-5 (Fbln5) を同定しており、本研究では Fbln5 の糖代謝への影響の解明を目的とし検討を行った。

【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) および野生型マウス (WT) に生後 8 週齢より通常食あるいは高脂肪食を負荷し代謝表現型の解析を行った。生後 8 週齢において、Fbln5KO と WT の体重および耐糖能に差は認めなかったものの、Fbln5KO ではインスリン感受性の亢進および肝糖新生の抑制を認めた。両群の摂餌量は同等であったが、いずれの食餌群でも週齢とともに Fbln5KO では体重増加が抑制され、高脂肪食誘導性の肥満・肝脂肪蓄積・脂肪細胞肥大化が抑制された。グルコスクランプによる解析を行ったところ、Fbln5KO では全身の糖利

用率の上昇および肝糖産生率の低下、骨格筋での糖取り込みの亢進を認め、全身におけるインスリン感受性の改善が示唆された。また、Fbln5KO では WT に比較し寒冷刺激に対する体温低下が顕著であったが、この際脂肪組織における熱産生・脂肪酸燃焼に関連する遺伝子群の発現は上昇していた。これらの Fbln5KO の表現型は、肥満抑制や耐糖能改善が報告されている皮膚特異的 SCD1 欠損マウスの表現型と酷似していることに着目した。Fbln5KO では高脂肪食負荷による皮膚における SCD1 発現誘導が抑制されており、皮膚特異的 SCD1 欠損マウスと同様、皮脂腺の萎縮を認めた。

【考察】

細胞外基質分子である Fbln5 は全身のインスリン感受性・エネルギー代謝制御に関与しており、弾性線維に富む皮膚などの組織がインスリン感受性の形成に寄与している可能性が示唆された。今後 Fbln5 欠損マウスを用いて弾性線維に富む血管におけるインスリン透過性の検討や、臓器特異的 Fbln5 欠損マウスを用いた検討を追加する。

血管内皮 PDK1 の病態生理学的役割の解明

小畑 淳 史

(川崎医科大学医学部)

【背景】

Phosphoinositide dependent protein kinase1 (PDK1) は PI3K の下流にあり、インスリンシグナルにおいて重要な役割を果たす事が知られている。我々は世界に先駆けて、血管内皮特異的 PDK1 欠損マウス (VEPDK1KO マウス) を作製した (Tawaramoto et al. Mol Endocrinol. 2012)。一方で通常食 3 ヶ月飼育で、随時インスリン値が有意に低値であったことに着目し、「血管内皮 PDK1 は膵β細胞機能に重要な役割を果たす」という仮説を立てた。

【目的】

血管内皮 PDK1 の膵β細胞に及ぼす役割を解明する。

【方法】

通常食 3 ヶ月飼育した VEPDK1KO マウスとコント

ロール (flox/flox) マウスを比較検討した。まず、①腹腔内糖負荷試験及び経口糖負荷試験を行い、耐糖能、インスリン値について検討を行い、②血圧測定およびレーザードップラー法により膵血流量を評価し、③単離膵島を用いたグルコース応答性インスリン分泌能評価、及び膵β機能に関わる遺伝子群の発現を評価し、④免疫染色により膵β細胞量、α細胞量および、CD31 染色・Pimonida-zole 染色により膵β細胞における血管内皮面積及び虚血を評価した。

【結果】

通常食 3 ヶ月飼育下では VEPDK1KO マウスは腹腔内糖負荷試験でコントロールと比較して血糖値に全く違いがないものの、インスリン値は有意に低値であった。大変興味深いことに経口糖負荷試験では KO マウスで 15 分値血糖は有意に上昇していた。Ex-4 で前処置したところ、腹腔内糖負荷試験では KO マウスで有意に血糖は高値であった。免疫染色では、膵β細胞量、α細胞量は KO マウスで有意に低下していた。膵血流量は KO マウスで有意に低下しており、膵島における CD31 陽性面積は有意に KO マウスで低下していた。また、グルコース応答性インスリン分泌は KO マウスで減弱しており、Ex-4 添加によりその差はより明瞭化した。単離膵島では mRNA レベルでインスリン遺伝子やその転写因子 (ins1, ins2, mafa, pdx-1, neurod), glp-1r, irs2, gck, glut2, ccnd1 など膵β細胞機能において重要な遺伝子発現が KO マウスで有意に低下しており、hif1α 及びその下流遺伝子は KO マウスで有意に上昇していた。さらには、KO マウスで有意に Pimonidazole 陽性β細胞が増加しており、KO マウスの膵島は相対的虚血状態にあった。単離膵島において、ER stress に関わる bip, s-xbp1, chop 等の遺伝子発現は有意に KO マウスで増加しており、炎症性サイトカインの遺伝子発現も亢進していた。

【結語】

血管内皮 PDK1 は、膵島における血流維持にとっても重要で、膵島を虚血から保護している。さらに ER stress や炎症の軽減を介して膵β細胞の機能および量の維持に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

肥満・糖尿病におけるメタロプロテアーゼの制御および役割

川崎 修二

(山鹿市民医療センター)

【目的】

報告者らは、TNF α 分泌に不可欠なメタロプロテアーゼ (MP) である ADAM17 の発現・活性が、肥満・糖尿病状態の脂肪組織 (WAT) で増強、カロリー制限 (CR) により抑制されることを証明した。本研究では、幅広く各種 MP の制御・役割を検討する。

【方法】

ADAMs (ADAM9, 10, 12, 17) および、ある MP (MP-X) の mRNA 発現を検討した。1) 高脂肪・高ショ糖食を与えた C57BL/6 マウス (B6-HF/HS) について、また、肥満・糖尿病モデル KK-Ay マウスについては、2) 自由摂食群 (Ay-AL)、3) CR 群 (Ay-CR) に分けて検討した。さらに、4) C57BL/6 マウスにゴールドチオグルコースを投与した過食・肥満モデルマウス (B6-GTG)、5) 培養細胞 (脂肪細胞、腹腔由来マクロファージ) においても検討した。

【結果】

1) B6-HF/HS の WAT にて、ADAM10 は 2.0 倍、ADAM17 は 2.3 倍、MP-X は 6.8 倍に上昇、2) Ay-AL の WAT にて、ADAM10 は 1.2 倍、ADAM17 は 2.4 倍、MP-X は 15.6 倍に上昇、3) CR により ADAM10 は 18.5%、ADAM17 は 36.6%、MP-X は 89.5% 減少した。4) B6-GTG の週齢に従って (肥満が進行するに従って)、脂肪組織での MP-X の発現が上昇した。5) 培養細胞への LPS 添加実験では MP-X 発現の変化は無かったが、パルミチン酸の添加により発現上昇することが確認された。

【考察】

ADAM10, 17 は、TNF α 産生に関わる酵素であり、肥満・糖尿病状態の脂肪組織における炎症やインスリン抵抗性の惹起に関与することが示唆された。一方、今回の検討で特に大きな変動を示した MP-X については、脂肪組織における報告はなく、免疫や腫瘍細胞における炎症惹起応答への関与が報告されているが、逆に、TNF

受容体切断といった炎症抑制への関与も示唆されている。各種 MP の制御、役割、相互作用や発現バランスについて検討することで、炎症やインスリン抵抗性の制御につながる可能性がある。

腸内細菌産生脂肪酸がマクロファージ極性変化に与える影響の解析

後藤 剛

(京都大学大学院農学研究科)

【背景・目的】

腸内細菌と宿主エネルギー代謝との深い関連性が示されているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。我々は腸内細菌の脂質代謝解析を通じて、食餌由来の多価不飽和脂肪酸が腸内細菌によって多彩な修飾脂肪酸へと変換されることを報告してきた。昨年までの研究において、リノール酸由来の腸内細菌産生脂肪酸、10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid が陽イオンチャネル、transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) 依存的に褐色脂肪組織 (BAT) 機能を亢進し、高脂肪食誘導性の体重増加を抑制することを報告してきた。本研究では、腸内細菌産生脂肪酸と宿主代謝調節機構の接点について明らかにすることを目的とし、n-3 系多価不飽和脂肪酸である α -リノレン酸 (ALA) と ALA 由来の腸内細菌産生脂肪酸を対象に、マクロファージの極性変化に着目し、検討を行った。

【方法・結果】

複数の食餌脂肪酸および食餌脂肪酸由来腸内細菌産生脂肪酸について、骨髄由来細胞から M2 マクロファージへの分化に与える影響について検討したところ、ALA および ALA 由来の腸内細菌産生脂肪酸、13-hydroxy-9(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (13-OH), 13-oxo-9(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (13-oxo) が IL-4 (interleukin-4) または IL-13 存在下で M2 マクロファージのマーカー遺伝子 (CD206 および arginase-1) の発現上昇を誘導することが示唆された。これらの脂肪酸の効果は、脂肪酸受容体 G protein-coupled receptor 40 (GPCR40) および GPCR40 下流に存在する phospholipase C- β や MAPK/ ERK kinase

の各阻害剤存在下で減弱が認められた。ALA, 13-OH, 13-oxo は IL-4 存在下で, M2 マクロファージ分化に重要な転写因子 signal transducers and activator of transcription 6 (STAT6) と peroxisome proliferator-activated receptor γ の相互作用を亢進させることが明らかとなった。さらに, これら脂肪酸を3日間投与 (1g/kg/day) したマウスの消化管粘膜固有層において, M2 マクロファージの集積が認められた。

【考察】

食餌由来の ALA および ALA から腸内細菌によって産生される 13-OH, 13-oxo は, GPCR40 の活性化を介して M2 マクロファージ分化を促進し, 生体のマクロファージ極性に影響を与えることが示唆された。

血管および脂肪組織由来新規分泌因子 Favine の機能解析

小林 祥子

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

肥満や糖尿病において動脈硬化症が発症, 進展するが, その機序には依然不明な点が多い。我々は, 血管から分泌される, 糖尿病と肥満や動脈硬化症に関わると推定される新規因子として, Fat/vessel-derived secretory protein (Favine)/Coiled-coil domain containing 3 (CCDC3) を同定した。Favine は, 血管と脂肪で高く発現する分泌因子であり, 糖脂質代謝異常や炎症に関連する刺激により, その遺伝子発現量が変動する¹⁾。Favine の機能解析を目的に本研究を行った。

【方法】

Favine 遺伝子改変 3T3-L1 脂肪培養細胞および血管内皮細胞の解析と Favine 欠損マウスにおける機能解析。

【結果】

Favine 過剰発現 3T3-L1 細胞は分化が亢進し, また脂肪合成が促進した。Favine 欠損マウス (以下, KO マウス) の脂肪組織では脂肪細胞サイズが小さく, 脂肪合成関連遺伝子発現の低下が認められた。KO マウスは加齢に伴う体重増加および脂肪肝の進展が抑制され, 1 年齢では野生型に比してインスリン抵抗性の軽減を認め

た。Favine は脂肪組織に作用し, 脂肪細胞分化と脂肪合成促進作用を有することが明らかになった²⁾。血管内皮細胞 HUVEC において, Favine 過剰発現/発現抑制により, TNF α 誘導性の炎症関連因子の発現が変動することが明らかとなった。現在は動脈硬化性疾患との関連を解析している。

【考察】

Favine は, 脂肪蓄積促進作用を有し, インスリン抵抗性, 血管の炎症に関与する分泌因子であることが示唆された。

【文献】

- 1) Sachiko Kobayashi, Atsunori Fukuhara, Takashi Taguchi, Morihiro Matsuda, Yoshihiro Tochino, Michio Otsuki, & Iichiro Shimomura.: Identification of a new secretory factor, CCDC3/Favine, in adipocytes and endothelial cells *Biochem Biophys Res Commun.* 392, 29-35 (2010).
- 2) Sachiko Kobayashi, Atsunori Fukuhara, Michio Otsuki, Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa, Eiichi Morii, & Iichiro Shimomura.: Fat/Vessel-derived Secretory Protein (Favine)/CCDC3 Is Involved in Lipid Accumulation. *J. Biol. Chem.* 290, 7443-7451 (2015).

Activin B による糖・エネルギー代謝制御機構の解明

小林 直樹

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

TGF β スーパーファミリーリガンドのひとつである Activin B が, 肝臓において食餌摂取により発現がコントロールされていることを見出し, Activin B による糖・エネルギー代謝における役割を検討している。これまでの検討から, 肝臓における Activin B シグナルが, ①インスリン非依存的な肝糖新生抑制, ② FGF21 の産生・分泌の増大によるインスリン感受性亢進, ③グルコース応答性インスリン分泌反応亢進, などの作用を有しており, その結果として糖尿病における耐糖能異常を改善する可能性が示唆された。Activin B による上記のよう

な特徴的な薬理作用と糖尿病の病態との関連を明らかにする目的に下記の検討を行った。

【方法および結果】

肥満モデルおよびヒトの肝臓における *Inhbb* (Activin B を構成するサブユニットをコードする) の発現を検討したところ、いずれにおいても発現に変動を認めなかった。しかしながら、Activin ファミリーは内因性アンタゴニストである Follistatin (FST) あるいはその関連分子 FSTL3 が存在し、これらの分子は Activin と結合し、Activin と受容体の結合が阻害することが知られている。興味深いことに、肥満モデルマウスおよびヒトの脂肪組織において、FST の発現は変化を認めなかったが、FSTL3 は肥満において強く発現していた。実際に、正常マウスにおける FSTL3 の強制発現により耐糖能異常を誘導し、また肥満マウスにおける FSTL3 のノックダウンにより耐糖能異常の改善を認めた。また、肝臓において Activin B により誘導される細胞内シグナル伝達および FGF21 発現誘導は、いずれも FSTL3 の共発現により阻害された。さらに、*in vivo* における Activin B と FSTL3 の関連について、肥満マウスにおいてそれぞれの分子を強制発現させることにより検討した結果、Activin B 強制発現によって認められたインスリン抵抗性改善・インスリン分泌亢進・耐糖能異常改善は FSTL3 の共発現により阻害された。

【考察】

肥満時に脂肪組織において強発現する FSTL3 が Activin B と拮抗作用することにより、Activin B によるインスリン感受性亢進およびインスリン分泌亢進作用が阻害されることが示唆された。

糖尿病発症におけるオートファジーによる膵β細胞調整メカニズムの解明

小宮 幸次

(順天堂大学大学院医学研究科)

【目的】

2型糖尿病の膵β細胞維持にオートファジー (AP) が必須であることを見出し¹⁾、そのメカニズムの探求を行ってきた^{2,3)}。これまでは膵β細胞特異的に AP 実行

分子である Atg7 を胎生期よりノックダウンさせたマウスを用いてきた。しかし糖尿病モデル動物の検討において、インスリン抵抗性状態では AP の促進が認められ、膵β細胞の代償機構が破綻した糖尿病状態では AP 不全を呈することを明らかとした²⁾。これはインスリン抵抗性の継続が AP 不全をもたらす、糖代謝異常を惹起すると考えられ、胎生期からではなく出生以降に AP 不全がもたらされるシステムがより病態を反映すると考えられた。心臓においては胎生期と出生以降に AP 不全を惹起させた場合には表現型が異なる事が報告されている³⁾。そこで本研究では任意の時期に膵β細胞特異的に Atg7 をノックアウトすることで、成体における AP 不全が膵β細胞機能に与える影響を明らかとする。

【方法】

MIP (mouse insulin promoter)-CreERTM マウスに floxed Atg7 マウスを交配し、タモキシフェン (TM) 誘導性膵β細胞特異的 Atg7 ノックアウト (Atg7KO) マウスを作出し、耐糖能の評価を行った。

【結果】

TM 6 mg Atg7KO マウスと対照マウスに隔日 3 回、計 18 mg の投与を行った。投与後 2 週間に膵島を単離し、Western blotting による解析を行った。オートファゴソーム形成マーカーである LC3-II は対照マウスと比較して Atg7KO マウスの膵島において有意な低下を認め、AP による蛋白分解の基質の一つである p62 の異常集積を認めたことから、TM 投与後 2 週間の膵島において AP 不全が確認された。TM 投与後 2 週間に行った腹腔内ブドウ糖負荷試験において、Atg7KO マウスと対照マウス間に有意な差は認められなかった。TM 投与後 6 週間の検討では、Atg7KO マウスにおいて血糖の有意な上昇と、血中インスリン値の有意な低下が認められた。

【考察】

これまでに膵β細胞において AP 不全から膵β細胞機能障害に至るまでにはタイムラグがあることが明らかとなった。今後、Atg7KO 膵島を用いたトランスクリプトーム解析を行うことにより、AP 不全から膵β細胞機能障害に至る分子機構の一端を明らかにしたい。

【文献】

- 1) Ebato, C. *et al.*: Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of

beta cell mass in response to high-fat diet, *Cell Metab.*, 8(4), 325 (2008).

- 2) Shigihara, N. *et al.*, Human IAPP-induced pancreatic beta cell toxicity and its regulation by autophagy, *J. Clin. Invest.*, 124, 3634 (2014).
- 3) Honda, A. *et al.*, Normal pancreatic beta-cell function in mice with RIP-Cre-mediated inactivation of p62/SQSTM1, *Endocr. J.*, 65, 83 (2018).
- 4) Abe, H. *et al.*: Exendin-4 improves beta-cell function in autophagy-deficient beta-cells. *Endocrinology*, 154, 4512 (2013).
- 5) Nakai, A. *et al.*, The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress, *Nat. Med.*, 13, 619 (2007).

2型糖尿病患者における二重標識水法を用いた総エネルギー消費量の検討

近藤慶子

(滋賀医科大学)

【目的】

糖尿病患者において、エネルギー摂取量の管理は治療上重要である。糖尿病学会ガイドラインでは、身体活動レベルにより、エネルギー必要量を設定することが推奨されているが、正確に測定された糖尿病患者の総エネルギー消費量を検討した報告はほとんどない。そこで、我々は、総エネルギー消費量測定のためのゴールデンスタンダードな方法である二重標識水法を用い、2型糖尿病患者におけるエネルギー消費量の実態を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】

滋賀医科大学医学部附属病院糖尿病内分泌内科に外来通院中の60~79歳の糖尿病患者および非糖尿病患者を対象とした。二重標識水法を用いた総エネルギー消費量を測定し、間接熱量測定により基礎代謝量を評価した。さらに、総エネルギー消費量を基礎代謝量で除して、身体活動レベル (Physical activity level) を算出した。また、活動量計を14日間装着し、期間中の平均 METs

(Metabolic equivalents) を算出した。共分散分析を用い、糖尿病群と非糖尿病群の比較を行った。

【結果】

糖尿病群52名(平均年齢70.2歳,男性28名[53.8%])のうちインスリン治療18名(34.6%),経口薬治療18名(34.6%),食事療法14名(26.9%)であった。非糖尿病群15名の平均年齢は67.1歳,男性は6名(40.0%)であった。平均HbA1cは,糖尿病群6.9%,非糖尿病群5.5%であった($p<0.001$)。平均BMIは,糖尿病群23.3,非糖尿病群22.7であった($p=0.490$)。性,年齢,脂肪量,除脂肪量および平均METsで調整した平均総エネルギー消費量は,糖尿病群で2143kcal/day,非糖尿病群で2222kcal/dayと糖尿病群で若干低値を示したが,2群間に有意な差は認めなかった(Mean difference: 79 kcal/day, 95% confidential interval [CI]: -78 to 235 kcal/day)。基礎代謝量は糖尿病群で低値を示したが,2群間に統計学的有意差はなかった(Mean difference: -33 kcal/day, 95% CI: -80 to 15 kcal/day)。一方,身体活動レベルは糖尿病群(1.71)で非糖尿病群(1.81)より低い傾向を示した(Mean difference: -0.01, 95% CI: -0.01 to 0.21)。

【考察】

正確に測定した日本人2型糖尿病患者の総エネルギー消費量は非糖尿病患者と同等であった。身体活動レベルは糖尿病患者群で低い傾向を示したが,差は小さかった。研究限界として,単一病院の結果であること,症例数が少なく,選択バイアスの可能性があることが挙げられる。本研究結果は,糖尿病食事療法のエネルギー必要量の設定に役立つ可能性がある。今後は,糖尿病治療別あるいは血糖コントロールとの関連を検討する予定である。

新規小胞体ストレス調節因子 Sdf2l1 による肝臓での糖脂質代謝調節作用の検討

笹子敬洋

(東京大学大学院医学系研究科)

【背景・目的】

我々は肝臓における摂食状態に応じた代謝調節機構に着目し,摂食が一過性に生理的な小胞体ストレスを惹起

すること、コシャペロンと考えられる Sdf2l1 が摂食時に小胞体ストレスを介して糖脂質代謝を調節する一方、その発現低下が肥満・糖尿病の病態形成に関与している可能性を示してきた。培養細胞系における検討を端緒に、Sdf2l1 と膜輸送関連蛋白 TMED10 との相互作用が示唆され、両者の関連について更に検討を加えた。

【方法】

初代肝細胞において、Sdf2l1 と共に TMED10 をノックダウンし、その際の小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現を解析した。また中心的なシャペロンである BiP をノックダウンし、その影響を比較した。また肝臓の膜画分において、Sdf2l1 と TMED10 の相互作用が認められた条件で、Sdf2l1 と BiP の相互作用についても検討した。

【結果】

Sdf2l1 と TMED10 の一方のノックダウンにより、小胞体ストレスマーカーである sXbp1 や CHOP の発現は同程度に上昇し、両者をノックダウンしても更なる変化は見られなかった。また Sdf2l1 と BiP の一方のノックダウンによっても、マーカー遺伝子の発現は同様に上昇したが、両者のノックダウンによって更なる上昇が認められた。一方、肝臓の膜画分において、Sdf2l1 と TMED10 同様、Sdf2l1 と BiP の相互作用も認められたものの、Sdf2l1 と結合している BiP は、膜画分における発現量のごく一部であった。

【考察】

これまで Sdf2l1 と BiP はシャペロン複合体を形成していると報告されてきたが、今回の我々の検討では、Sdf2l1 にとって BiP よりも TMED10 の方が主なパートナーであると考えられた。加えて機能的にも、Sdf2l1 と BiP が独立に作用するのに対して、Sdf2l1 と TMED10 は協調的に小胞体ストレスに対して保護的に作用していることが示唆された。

生体防御調節因子としての GLP-1 の役割

佐藤 雄大

(秋田大学大学院医学系研究科)

【背景】

現在、糖尿病の治療薬としてインクレチン関連薬が広く使用されている。インクレチン関連薬は、血中の活性型 GLP-1 レベルを高めることにより、インスリン分泌促進作用を発揮する。GLP-1 受容体は膵島細胞以外にも様々な部位に発現しているが、GLP-1 の膵外作用についてはその全貌ならびに生理的な意義については今だ未解明な部分がある。我々は、ある種の肺傷害モデルでは GLP-1 受容体作動薬の投与により急性期におけるサイトカインの発現が亢進することを見出した。また逆に GLP-1 受容体欠損マウスではこうしたサイトカインの発現が減弱していた。これらのことから、ある条件下では GLP-1 がサイトカインの発現を増強していると考えられたが、我々はこのことの生体への意義として GLP-1 が病原体などからの防御的役割を一部担っているという仮説を立てている。この研究の目的は、生体防御調節因子としての GLP-1 の役割を検討することである。

【方法】

肺の肺障害ならびに感染症モデルマウスを作成し、GLP-1 受容体作動薬を投与し、生存や体重推移、遺伝子発現等を検討した。

【結果】

肺の感染症モデルマウスでは、GLP-1 受容体作動薬を投与することでその生存率が改善した。また逆に GLP-1 受容体欠損マウスでは生存率が低下する傾向にあった。GLP-1 受容体作動薬の投与により病原体の減少が認められ、肺の炎症が改善した。GLP-1 受容体作動薬の投与によりある種のサイトカインシグナルの増強が認められ、このことが病原体の減少に寄与することが示唆された。

【考察】

これらのことより、GLP-1 が生体防御調節因子として働いている可能性が示唆された。

腸管内分泌K細胞およびI細胞を介した高脂肪食誘導性肥満の機序解明

三小田 亜希子

(京都大学大学院医学研究科)

【背景】

2型糖尿病の基礎病態は、①インスリン分泌能低下、②インスリン抵抗性増大の2つである。日本人は欧米人と比較して膵β細胞のインスリン分泌能が低いため、高脂肪食を特徴とする食の欧米化を背景に、軽微な肥満であっても糖尿病を発症する患者が急増している。「脂肪摂取による肥満促進・インスリン抵抗性増大」の機序解明が喫緊の課題である。

腸管は食事の消化・吸収を担う消化管としての働きをもつが、同時に糖質や脂質の代謝を制御する多様なホルモンを分泌する生体内で最大の内分泌器官でもある。Gastric inhibitory polypeptide (GIP) を分泌する腸管内分泌K細胞と、cholecystokinin (CCK) を分泌するI細胞は、ともに上部小腸に多く存在し、脂質の摂取によって脂肪酸受容体 GPR120 や GPR40 を介した強い分泌刺激を受ける。高脂肪食条件下では GIP・CCK ともに分泌が亢進し、各々の欠損マウスでは高脂肪食誘導性肥満がみられない。GIP と CCK には多くの共通点があり、両腸管ホルモンは協調的に相互に作用しながら、高脂肪食誘導性肥満に寄与する可能性があるがその詳細は不明である。

【目的と方法】

高脂肪食誘導性肥満のキーホルモンである GIP および CCK の分泌亢進の機序解明を目的とし、まずは K 細胞、I 細胞の解析を行い、各々の分布や特性を明らかにする。GIP 遺伝子に GFP 遺伝子を挿入し K 細胞を可視化したマウス (GIP-GFP マウス) と、CCK-Cre マウスと Rosa-TdTomato マウスを交配し I 細胞を可視化したマウス (CCK-TdTomato マウス) をかけ合わせ、ダブルレポーターマウス (GIP-GFP×CCK-TdTomato マウス) を作製する。フローサイトメーターを用いて、GFP 単独陽性細胞 (K 細胞)、TdTomato 単独陽性細胞 (I 細胞)、GFP-TdTomato 共陽性細胞 (K/I 細胞) を単離回収し、各細胞の数、分布、遺伝子発現様式を検証する。

数、分布に関しては免疫組織学的評価も併せて行う。

【結果】

免疫染色で、K 細胞、I 細胞、K/I 細胞の比率は、上部小腸で 19%、51%、30%、下部小腸で 8%、68%、24% であった。引き続きこれらの各細胞群の特徴を明らかにし、特に高脂肪食摂取下での機能面での相違の有無を検証する。

Wfs1 欠損によるβ細胞機能障害とインクレチンの効果に関する研究

椎木 幾久子

(山口大学医学部)

【目的】

Wolfram 症候群モデル動物 *Wfs1* 欠損マウスでは、膵β細胞が進行性に減少し、高血糖を来す。我々はこれまでに *Wfs1* 欠損β細胞は脱分化することを明らかにしてきた。*Wfs1* 欠損膵島では高血糖を呈する以前より小胞体ストレス及び酸化ストレスが増大しており、脱分化誘導との関連が推測されるが、詳細は明らかではない。ストレス病態における細胞内エネルギー代謝に着目し脱分化との関わりを検討した。

【方法】

高血糖発症前 10-12 週齢 *Wfs1* 欠損マウスの単離膵島を用いて、mRNA・蛋白質発現及びメタボローム解析、グルコース負荷時の酸素消費速度及び ATP 濃度を測定した。

【結果】

Wfs1 欠損マウスの膵島では、解糖系中間代謝物及びピルビン酸が増加する一方、アセチル CoA 及びクエン酸の低下、すなわち TCA 回路が減弱しており、その結果 ATP 含量が低下した。このエネルギー代謝経路の乖離について、Pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性を抑制するリン酸化 (pPDH) が増加し、このことよりピルビン酸からアセチル CoA 生成の抑制がその要因として推察された。*Wfs1* 欠損β細胞ではストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) の発現亢進をきたしており、Txnip が PDH および PDH kinase1

への結合を介して PDH のリン酸化を促進することが示唆された。 *Wfs1: Txnip* 二重欠損マウスでは、 *Wfs1* 欠損マウスに比して睪島での pPDH が低下し、グルコース負荷時の酸素消費速度及び ATP 濃度上昇が回復した。さらに、組織学的には脱分化の抑制とともに β 細胞量が維持されており、50 週齢までの観察において *Wfs1: Txnip* 二重欠損マウス全個体において糖尿病の発症が抑制された。

【結論】

ストレス病態での細胞内エネルギー代謝障害と脱分化誘導との関連における *Txnip* の役割とその制御による脱分化抑制の可能性が示唆された。

摂食と生殖能を繋ぐ分子メカニズムの解明と肥満症・糖尿病における男性不妊治療への応用

清水 辰 徳

(秋田大学大学院医学系研究科)

【背景】

肥満症・糖尿病は多くの疾病・合併症を引き起こす危険因子であることが明らかにされている。一方、世界には 4850 万組に及ぶ夫婦が不妊症を抱えており、その中で肥満・糖尿病は、女性側においてよく知られた不妊の一因である。インスリン抵抗によって惹起される多嚢胞性卵巣症候群などがその一つであり、メトホルミンのようなインスリン抵抗性改善薬は妊娠率を改善させることが報告されている。不妊症の原因の半数は男性側に原因があるとされ、近年の報告では肥満症・糖尿病は、男性側においても不妊の一因であることが疫学的に示されている。しかしながら、肥満症・糖尿病と男性不妊の機構についてはほとんど解明されておらず、これらを繋ぐ因子については全く分かっていなかった。そのために、男性不妊に対する治療は生殖補助医療にほぼ限られている。肥満症男性の精子は体外受精による妊娠の成立率が低下するものの、卵細胞質内精子注入法を用いた場合は非肥満男性と同等であることが報告されており、肥満症男性の精子は卵との結合ステージにおいて何らかの障害を有している可能性がある。

【目的】

GIP 受容体が精巣に発現し、GIP シグナルが精子細胞における *Psg17* の遺伝子発現を調節することで受精に影響を与えること、また肥満症・糖尿病における男性不妊は、このシグナルが低下することが一因であることを明らかにする。

【方法】

- ① 精巣における GIP 受容体の発現を RT-PCR 法・*in situ* hybridization を用いて検討した。
- ② 受精能の違いを野生型マウス、GIP 受容体欠損マウスの精子を用いた *in vitro* fertilization assay にて検討した。
- ③ 野生型・GIP 受容体欠損マウスの精巣組織、精子運動能、受精能に影響を与えうるテストステロン・レプチンの血中濃度、レプチン受容体の発現量を検討した。
- ④ 受精能の低下原因検索目的に野生型マウス・GIP 受容体欠損マウスの精巣を用いたマイクロアレイ解析を行った。
- ⑤ フローサイトメトリーを用いた 1 倍体精子細胞の遺伝子発現の検討、精子細胞を欠如する 17 日齢マウス精巣の遺伝子発現を検討した。
- ⑥ 上記より得られた *Psg17* の発現をインスリン抵抗性モデルマウスで検討した。

【結果】

- ① GIP 受容体は精巣の精子細胞に発現していた。
- ② 卵の透明帯有無に関わらず、野生型マウス精子と比べ、GIP 受容体欠損マウスの精子において有意に受精率が低下した。
- ③ GIP 受容体欠損マウスの精巣組織に異常は認めず、血中テストステロン・レプチンの血中濃度、レプチン受容体の発現量は野生型マウスと同等であった。
- ④ 有意な変動を示す遺伝子を抽出し、その中から *Psg17* に着目した。
- ⑤ *Psg17* ならびに *GIPR* が精子細胞に強く発現していることを確認した。
- ⑥ *ob/ob* マウス・*DIO* マウスの精巣では GIP 受容体の発現は有意に低下しており、同様に *Psg17* の発現低下も認めた。

【結語】

肥満症・糖尿病に生じる GIP 抵抗性を改善する治療が Psg17 の発現を回復させ、男性不妊の新たな治療法となることが期待される。

グルコースシグナルを介した膵β細胞の小胞体ストレス制御メカニズムの解明

白川 純

(横浜市立大学大学院医学研究科)

【目的・方法】

グルコースシグナルを介した膵β細胞のストレス制御機構を明らかにするため、グルコキナーゼ活性化薬 (GKA) により膵β細胞で発現変化する分子群の機能を解析する。

【結果】

これまで、膵β細胞においてグルコキナーゼを介したグルコースシグナルの活性化は、IRS-2 を介した抗アポトーシス効果と IRS-2 に非依存的な小胞体ストレス分子の発現制御の 2 つの異なる経路により、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することを示した (*Diabetes* 2013)。また、小胞体ストレスは膵β細胞増殖の制御にも関与するが、GKA によるグルコースシグナル活性化を含む代償性の膵β細胞増殖・生存は、FoxM1/PLK1/CENP-A 経路を介していることを明らかにした (*Cell Metabolism* 2017)。

今回、膵β細胞でグルコキナーゼの活性化により発現上昇する分子として Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) である S100 calcium-binding protein A8 (S100A8) に着目した。膵島における S100A8 の発現はグルコースシグナル依存的に増加し、db/db マウスや ob/ob マウスの膵島における発現上昇を認めた。マクロファージとの共培養、およびパルミチン酸の存在下では、膵島における S100A8 の発現は相乗的に上昇し、これらは TLR4 に非依存的であった。膵島由来の S100A8 は、TLR4 を介してマクロファージを刺激し、マクロファージからの炎症性サイトカインの発現を誘導した。組み換え S100A8 タンパクにより、

マクロファージの炎症および遊走が惹起され、それらは S100A8 中和抗体にて抑制された。グルコース刺激、マクロファージ、およびパルミチン酸の組み合わせにより誘導された膵β細胞アポトーシスは、S100A8 依存的であった。ヒト膵島においても、グルコース刺激およびマクロファージとの共培養により S100A8 の発現は上昇し、S100A8 中和抗体により膵β細胞アポトーシスは抑制された。

【考察】

グルコースシグナルの標的分子である S100A8 は、TLR4 を介したマクロファージとの相互作用により膵β細胞アポトーシスを制御していることを明らかにした (*J Biol Chem.* 2018)。現在、独自に膵β細胞特異的 S100A8 欠損マウスを作製し (MIP-Cre/ERT2; S100A8-floxed mice)、解析を進めている。

【文献】

- 1) **Shirakawa, J.**, Togashi, Y., Sakamoto, E., Kaji, M., Tajima, K., Orime, K., Inoue, H., Kubota, N., Kadowaki, T. & Terauchi, Y.: Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β cells. *Diabetes*. **62** (10): 3448-58, (2013).
- 2) **Shirakawa, J.**, Fernandez, M., Takatani, T., El Ouaamari, A., Jungtrakoon, P., Okawa, ER., Zhang, W., Yi, P., Doria, A. & Kulkarni, RN.: Insulin signaling regulates the FoxM1/PLK1/CENP-A pathway to promote adaptive β -cell proliferation. *Cell Metab.* **25** (4): 868-882, (2017).
- 3) Inoue, H., ***Shirakawa, J.** (*: corresponding author), Togashi, Y., Tajima, K., Okuyama, T., Kyohara, M., Tanaka, Y., Orime, K., Saisho, Y., Yamada, T., Shibue, K., Kulkarni, RN. & Terauchi, Y.: Signaling between pancreatic β -cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. *J Biol Chem.* **293** (16) 5934–5946, (2018).

時計遺伝子 E4BP4/DBP の膵β細胞における役割の解明

田口 昭彦

(山口大学大学院医学系研究科)

【目的】

Wolfram 症候群は、若年発症、インスリン依存性の糖尿病と視神経萎縮を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である¹⁾。我々は Wolfram 症候群のモデルマウスである *Wfs1* 欠損 Ay/a マウス (*Wfs1*^{-/-}Ay/a マウス) のランゲルハンス氏島 (ラ氏島) のマイクロアレイ解析をしたところ、時計遺伝子である E4BP4 の発現が亢進し、DBP の発現の低下を認めた^{2,4)}。E4BP4 および DBP は逆位相で発現される出力系の時計遺伝子で、同じ標的遺伝子に結合し、それぞれ、転写抑制、及び活性化に働く。コア時計遺伝子である *Bmal1* の膵特異的欠失マウスが顕著なインスリン分泌不全をきたす³⁾。また、*Wfs1* 欠損マウスのβ細胞機能不全には小胞体 (ER) ストレスが関与する。そこで今回、それらの点を念頭に、膵β細胞における E4BP4 や DBP の役割について解析した。

【方法】

マウスインスリンプロモーター (MIP) 下に E4BP4 を強発現する MIP-E4BP4-TG マウスを発現量の異なる 2 ライン (TG-C, TG-D) 樹立した。これらのマウスを用いて、12 週齢での経口糖負荷試験を実施し全身の耐糖能を評価した。8 週から 12 週齢のマウスからラ氏島を単離し、グルコース応答性のインスリン分泌能、ATP/ADP 比、細胞内 Ca 濃度を測定した。また転写因子 E4BP4 が制御する遺伝子を解析するために、WT および TG-C マウスラ氏島の RNA シーケンスおよび ChIP シーケンスを行った。

【結果】

E4BP4, DBP の発現は、小胞体ストレスによりそれぞれ亢進、抑制された。MIP-E4BP4-TG マウスでは顕著なグルコース応答性のインスリン分泌低下を認めた。またこのマウスのラ氏島において、グルコース刺激前後で ATP/ADP 比の上昇が認められず、グルコース刺激後の Ca の上昇も抑制されていた。RNA シーケンス解析によると E4BP4-TG マウスラ氏島では、インスリンの分

泌や蛋白合成に関わる遺伝子群に顕著な変動を認めた。ChIP シーケンスでは E4BP4 がβ細胞機能に重要な遺伝子を直接制御している知見を得た。

【考察】

膵臓における転写因子 E4BP4 および DBP の役割を解析した。*Wfs1*^{-/-}Ay/a マウスなどストレス存在下にあるラ氏島において E4BP4・DBP の発現は変化し、全体としての DBP 転写活性の低下はβ細胞機能不全をもたらすことが明らかとなった。E4BP4・DBP は *Bmal1*/*Clock* などのコア時計遺伝子によっても制御を受ける遺伝子であり、β細胞ストレスだけでなく時計遺伝子の異常によって引き起こされるインスリン分泌不全にも介在している可能性が考えられる。さらに今回の知見は、E4BP4・DBP のシグナル経路に介入することで Wolfram 症候群や 2 型糖尿病などによる糖代謝異常を制御できる可能性が示唆された^{4,5)}。

【参考文献】

- 1) Inoue, H., Tanizawa, Y., Oka, Y. & Permutt, MA. *et al.*: A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet.* 1998 Oct; 20(2): 143-8.
- 2) Nakabayashi, H., Ohta, Y., Taguchi, A. & Tanizawa, Y. *et al.*: Clock-controlled output gene *Dbp* is a regulator of *Arnt/Hif-1β* gene expression in pancreatic islet β-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 May 3; 434(2): 370-5.
- 3) Ohta, Y., Taguchi, A., Yanai, A., Shinoda, K. & Tanizawa, Y. *et al.*: Clock Gene Dysregulation Induced by Chronic ER Stress Disrupts β-cell Function. *EBioMedicine.* 2017 Apr; 18: 146-156.
- 4) Perelis, M., Marcheiva, B., Taguchi, A. & Bass, J. *et al.*: Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science.* 2015 Nov 6; 350 (6261): aac4250.
- 5) Taguchi, A., Ohta, Y. & Tanizawa, Y. : Molecular clock as a regulator of β-cell function. *J Diabetes Investig.* 2018 Mar 15.

日本人の若年発症非肥満糖尿病患者における網羅的次世代シーケンスの試み

田中大祐

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

日本人の若年発症非肥満糖尿病患者につき、全エクソンシーケンスを行い、発症の遺伝的背景を検討する。

【方法】

30歳以下で糖尿病を発症し、肥満歴を有さずGAD抗体陰性であった11名(男7名,女4名)のゲノムDNAを、書面による承諾を得て採取した。得られたゲノムDNAにつき、Illumina HiSeqおよびAgilent SureSelectXT Human All Exon V6を使用し全エクソンシーケンスを行った。検出された塩基配列変化のうち、アミノ酸配列変化を伴うものを抽出し、dbSNPもしくは日本人SNPデータベース(Human Genetic Variation Database)において一般人口におけるアレル頻度が0.01以上のものを除外し、希少変異候補とした。変異候補をCombined Annotation Dependent Depletion (CADD)を用いて分析し、タンパク機能に変化をもたらす疾患発症原因となる可能性の高いものを抽出した。

【結果】

11名の平均発症年齢は21.8歳で、平均BMIは20.8 kg/m²であった。薬物療法は6名がインスリン、4名がSU薬もしくはグリニド薬、1名が無投薬であった。全エクソンシーケンスの結果から既知単一遺伝子糖尿病原因遺伝子(新生児糖尿病およびMODYの原因となる35遺伝子¹⁾)の希少変異を検討することとし、疾患発症への影響が強く示唆されるCADD score (PHRED)が20以上の変異を抽出した。HNF1A遺伝子については、V246fs変異が1名(患者1)に検出されMODY3と診断したほか、遺伝子産物機能低下が報告されているG191D変異が1名(患者2)に検出された。患者2にはさらにGLIS3遺伝子Q450H変異が検出され、疾患発症を修飾した可能性があると考えられた。さらに、1名(患者3)にWFS1遺伝子K190del変異が検出され、発症への影響が示唆された。すべての変異は

ヘテロ接合であり、8名に関しては抽出基準に当てはまる変異を検出しなかった。

【考察】

網羅的次世代シーケンスを若年発症非肥満糖尿病患者に行うことで、複雑な遺伝的背景の解明が可能であることが示唆された。

【文献】

- 1) Jason Flannick., Stefan Johansson. & Pål R. Njølstad.: Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. Nature Reviews Endocrinology, 12, 394-406 (2016).

Depletion of CD206 M2 macrophages induces proliferation of adipocyte progenitors and improves insulin sensitivity

Nawaz Allah

(富山大学医学部)

Adipose tissue-resident macrophages have important roles in the maintenance of tissue homeostasis and regulate insulin sensitivity, for example by secreting pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines. Here, we show that depletion of CD206 M2-like macrophages resulted in the generation of smaller adipocytes, upregulated expression of metabolically favourable genes and enhanced insulin sensitivity in both chow and high fat diet-fed CD206-reduced mice. *In vivo* and *in vitro* studies revealed that Tgf β , abundantly expressed in CD206 M2-like macrophages, regulate adipocyte progenitors (APs) differentiation and proliferation. To validate this hypothesis, we generated genetically engineered mice in which CD206 specific Tgf β 1 was knocked out after tamoxifen treatment. Increased number of APs and smaller adipocytes were observed in the CD206 specific Tgf β 1 knockout mice. Collectively, we show that CD206 M2-like macrophages in adipose tissues constitute an important microenvironment in which

they regulate APs growth/differentiation via Tgf β signaling pathway and thereby control adiposity and systemic insulin sensitivity¹⁾.

References

- 1) Nawaz, A., Aminuddin, A., Kado, T., Takikawa, A., Yamamoto, S., Tsuneyama, K., Igarashi, Y., Ikutani, M., Nishida, Y., Nagai, Y., Takatsu, K., Imura, J., Sasahara, M., Okazaki, Y., Ueki, K., Okamura, T., Tokuyama, K., Ando, A., Matsumoto, M., Mori, H., Nakagawa, T., Kobayashi, N., Saeki, K., Usui, I., Fujisaka, S. & Tobe, K.: CD206⁺ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat Commun.*, 8(1):286 (2017).

解糖系代謝物による TOR シグナルの活性化

野村 亘

(京都大学大学院農学研究科)

【背景・目的】

TOR (target of rapamycin) はセリン・スレオニンキナーゼであり、栄養シグナルにおいて重要な役割を果たしている。TOR は酵母 (Tor1 および Tor2) から哺乳類 (mTOR) に至るまで進化的に保存されており、異なる2つの複合体である (m)TORC1 および (m)TORC2 を形成することで機能し、TOR シグナルを構成している。また、TOR シグナルは糖尿病に関連する病態との関わりが指摘されており、糖代謝や脂質代謝の制御にも関わる事が知られている (*Cell* 168:960-976, 2017)。しかしながら、その詳細な制御機構および糖尿病病態への作用機序については不明な部分も多く残っている。

解糖系から産生される代謝物であるメチルグリオキサールは、古くから糖尿病との関連が指摘されている。我々は、メチルグリオキサールが、TOR シグナルを活性化すること、ならびに酵母 TOR シグナルの不全株がメチルグリオキサールに対して高い感受性を示すことを見出した (*Mol. Cell. Biol.* 35:1269-1280, 2015)。そこで、TOR シグナル制御機構の解明を目的として、出

芽酵母を用いてメチルグリオキサール感受性を指標とした TOR シグナルの制御因子の同定を試みた。

【方法・結果】

遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、メチルグリオキサール感受性株として31の遺伝子破壊株を所得した (*J. Biol. Chem.* 292:15039-15048, 2017)。スクリーニング結果に基づきメチルグリオキサール感受性についての精査を行ったところ、ホスファチジルイノシトール 3,5-二リン酸 (PtdIns(3,5) P_2) の合成不全株がメチルグリオキサールに対して高い感受性を示すことを見出した。また、PtdIns(3,5) P_2 合成不全株において、メチルグリオキサールによる TOR シグナルの活性化に不全が認められた。

【考察】

リン脂質である PtdIns (3,5) P_2 がメチルグリオキサールによる TOR シグナルの活性化機構に関与する可能性が示唆された。

NFIA が褐色脂肪細胞分化を制御するメカニズム及び全身代謝への影響の解明

平池 勇雄

(東京大学大学院医学系研究科)

【背景】

褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) はミトコンドリアにおける uncoupling protein-1 (UCP1) の機能を介して熱を産生しエネルギーを消費する点において、主にエネルギーの貯蔵を担う白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) とは対照的な組織である。リニエージトレーシングの結果から、BAT と WAT は発生学的な由来が異なる一方、BAT と骨格筋は共に Myf5 陽性の前駆細胞から分化すると報告されている。また近年になって、ヒト成人においても機能的な BAT が存在すること、BAT の活性と BMI は負に相関することが示されており、BAT は肥満症、メタボリックシンドローム、肥満2型糖尿病の新しい治療標的になり得るとして注目されている。

【結果】

我々はまずマウス BAT 及び WAT の FAIRE-seq

(formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements coupled with high-throughput sequencing) によってゲノム上のオープンクロマチン領域を網羅的に同定し、BAT 特異的なオープンクロマチン領域には転写因子 Nuclear factor-I (NFI) の結合モチーフが最も強く濃縮していることを見出した。NFI ファミリーには4種類 (NFIA, B, C, X) のアイソフォームが存在するが、うち NFIA は BAT において WAT や骨格筋と比較して高発現しており、かつ褐色脂肪細胞の分化に伴ってその発現が上昇した。C2C12 筋芽細胞に NFIA を導入すると脂肪滴の蓄積や *Ucp1* を含む褐色脂肪遺伝子の発現誘導を認めた一方、骨格筋遺伝子の発現は抑制された。褐色脂肪細胞において NFIA をノックダウンすると、脂肪細胞分化は保たれていたものの *Ucp1* を含む褐色脂肪遺伝子の発現が強く抑制された。褐色脂肪細胞において ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing) を行い NFI のゲノムへの結合を網羅的に解析したところ、BAT 特異的遺伝子の転写開始点においては WAT 特異的遺伝子の転写開始点と比較して1) より近傍に NFI の結合領域が存在し2) 転写開始点 \pm 50 kb における NFI の結合領域の数が多く3) 転写開始点 \pm 50 kb における NFI の結合強度の総和も大きかった。また NFI の結合領域は脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR γ の結合領域と高頻度に共局在 (co-localize) した。分化後に NFI と PPAR γ が共局在する領域のうち、分化前から共局在が認められる領域は2割程度に留まり、半数以上の領域において分化前の時点では NFI のみが結合していた。またこの時点で C/EBP α , C/EBP β , EBF2 など褐色脂肪細胞分化における既知の主要転写因子群はいずれも結合していなかった。にも関わらず、これら領域は分化前の時点でオープンクロマチン構造やヒストン K27 のアセチル化といった活性型エンハンサーの特徴を呈していた。NFIA 全身欠損マウスは生後すぐに死亡するが、新生児の BAT を解析したところホモ欠損マウスでは野生型に比べて UCP1 の遺伝子発現、蛋白発現が有意に低下しており、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析でも褐色脂肪遺伝子群の発現低下と骨格筋遺伝子群の発現上昇が確認された。最後に、ヒト腎周囲の褐色脂肪組織において NFIA の発現と UCP1 を含む褐色脂肪遺伝

子の発現は有意かつ正に相関していた。以上より NFIA は BAT の新規主要制御因子であり、褐色脂肪遺伝子エンハンサーを分化前から活性化し、マスター転写因子 PPAR γ をリクルートすることでその作用を発揮すると考えられた。

【今後の展望】

組織特異的 NFIA 欠損マウス、組織特異的 NFIA トランスジェニックマウスの作成及び NFIA 蛋白複合体の質量分析に着手している。成体の BAT における NFIA の重要性、とりわけ耐糖能やインスリン感受性、酸素消費量など全身代謝に及ぼす影響を解明すること、また NFIA と結合・協調して作用する因子を同定し褐色脂肪細胞の運命決定におけるクロマチンリモデリングの全貌を明らかにすることを目指している。

【文献】

- 1) Hiraike, Y., Waki, H., Yu, J., Nakamura, M., Miyake, K., Nagano, G., Nakaki, R., Suzuki, K., Kobayashi, H., Yamamoto, S., Sun, W., Aoyama, T., Hirota, Y., Ohno, H., Oki, K., Yoneda, M., White, AP., Tseng, YH, Cypess, AM., Larsen, TJ., Jespersen, NZ., Scheele, C., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Yamauchi, T. & Kadowaki T.: NFIA co-localizes with PPAR γ and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nature Cell Biology*. 2017; 19 (9): 1081-92.

亜鉛トランスポーター ZIP13 による脂肪細胞褐色化制御機構の解明

福中彩子

(群馬大学生体調節研究所)

【目的】

本研究では、亜鉛トランスポーター ZIP13 を介した亜鉛シグナル (ZIP13-亜鉛シグナル) による脂肪細胞の褐色化制御機構の分子メカニズムを解明することを目的とし、肥満や糖尿病の理解に貢献することを目標とする。

【方法】

亜鉛トランスポーター *Zip13* のノックアウトマウス (*Zip13*-KO マウス) や ZIP13 の機能喪失型変異を保持

するエーラス・ダンロス症候群患者では脂肪萎縮が見られることから、申請者は脂肪組織における ZIP13 の役割の解析を進めた。その結果、*Zip13*-KO マウスでは、白色脂肪組織でベージュ脂肪細胞の顕著な増加・エネルギー消費量の亢進・高脂肪食誘導性の肥満に抵抗性を示す・インスリン感受性が良くなること、さらに ZIP13 はベージュ脂肪細胞の分化を抑制することを見出した。これらの結果は ZIP13 が白色脂肪細胞の運命を制御することによって、全身の代謝を調節する分子である可能性を示しており、下記の論文を公表した (Fukunaka A, et al., *PLoS Genet.* (2017), Fukunaka A (corresponding author), Fujitani Y, *Int. J Mol Sci.* (2018)). 我々はこの知見を元に、ZIP13 による褐色化抑制の分子メカニズムを明らかにするために、ベージュ脂肪細胞分化誘導系を用いて、ZIP13 の脂肪細胞褐色化抑制に必要な領域の同定を目指した。

【結果】

これまでに我々が開発したベージュ脂肪細胞分化系を用いると、*Zip13*-KO 細胞に ZIP13 を過剰発現させると、褐色化は抑制できるが、亜鉛輸送能を失った ZIP13 の変異体では褐色化抑制ができない。また、培地中に過剰量の亜鉛を添加した場合や、同じゴルジ体に局在し、ZIP13 と最も高い相同性を示し亜鉛トランスポーターを発現した場合には、細胞質内の亜鉛量は増加するにも関わらず、褐色化は抑制できないことが判明した。ZIP13 による亜鉛シグナルは、その量と共に質 (特異性) も非常に厳密に制御し、脂肪細胞褐色化の抑制を調節していると考えられる。

一方で、鳥類には、ベージュ脂肪細胞が存在しないことが知られているが、ZIP13 は鳥類にも保存されている。マウスのベージュ脂肪細胞分化系を適用すると、ニワトリ ZIP13 は亜鉛輸送能があるにも関わらず、マウス ZIP13 のように脂肪細胞褐色化を抑制する機能は保存されていないことから、マウス ZIP13 にはニワトリ ZIP13 には保存されていない領域で脂肪細胞褐色化を抑制する可能性が考えられた。そこで、その領域を同定するため、ニワトリとマウスのキメラ ZIP13 を作成することにより、脂肪細胞褐色化抑制に必要なマウス ZIP13 の領域を同定した。

【考察】

我々は、ZIP13 の脂肪細胞褐色化抑制に必要な領域を同定した。今後この領域がどのようにして脂肪細胞褐色化を制御するのか明らかにする。

アディポネクチンの組織修復機構の解明

藤 島 裕 也

(大阪大学大学院医学系研究科)

【背景】

脂肪細胞特異的分泌蛋白アディポネクチン (APN) は、GPI アンカー型蛋白である T-カドヘリン (Tcad) への特異的な結合を介して心血管組織に集積し、抗動脈硬化作用を発揮することをこれまでに明らかとした。GPI 特異的切断酵素 GPI-PLD は、糖尿病患者や NAFLD 患者で血中濃度が上昇していることが報告されており、APN により血中濃度が低下する結果を得ているが、その生体内における生理・病態学的役割は明らかとなっていない。

【方法・結果】

GPI-PLD 遺伝子発現は肝臓において圧倒的に高発現しており、db/db マウスおよび streptozotocin 投与マウスでは、肝臓での GPI-PLD の mRNA が上昇し、血中濃度の増加を伴っていた。

続いて、GPI-PLD 欠損マウス (GP-KO) を樹立し解析を行った。GP-KO における Tcad 蛋白は、GPI-PLD の主な産生臓器である肝臓において約 2.5 倍と有意に上昇しており、少なくとも肝臓の GPI アンカー蛋白の発現制御に関与していると考えられた。高脂肪高蔗糖食 (HF/HS) を負荷した GP-KO マウスでは、WT に比して、体重の推移には差がない一方で、血中 TG 値が有意に低値であり、OGTT にて良好な耐糖能を示した。さらに、GP-KO では、HF/HS 負荷に伴う肝臓の脂肪変性の程度が軽度にとどまっており、肝ジアシルグリセロール (DAG) 含量の増加が顕著に抑制されていた。また GP-KO マウスでは、肝臓での PKC ϵ 活性化の抑制と、インスリンによる AKT リン酸化の改善を認めた。

ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* の検討では、siRNA による GPI-PLD のノックダウンにより細胞内

DGA 量は有意に減少した。一方でアデノウイルスによる過剰発現では、特に GPI の前駆体を構成する脂肪酸鎖であるアラキドン酸添加時に著明な DAG 量の増加を認めた。

最後に、当院外来通院中の男性患者 86 名 (68 名は 2 型糖尿病を合併) を対象として、ELISA により血中 GPI-PLD 濃度を測定したところ、血中 TG 値および血中 ALT 値が血中 GPI-PLD の独立した規定因子となっていた (共に正に相関)。

【考察】

GPI-PLD はそれ自体が生合成された小胞体において GPI を切断することで、ホスファチジン酸を生成、これが速やかに脱リン酸化されることにより、DAG 産生を促すことが報告されている。小胞体には蛋白質が付加する前の前駆体を含む GPI のプールが存在し、GPI-PLD により肝 DAG 産生が調節され、肝インスリン感受性や脂質蓄積に関わっていることが示唆された。

β細胞の脱分化・形質転換と膵切除後糖尿病発症に関する研究

坊内 良太郎

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

膵臓切除術施行患者の耐糖能の推移と膵組織学的所見・内分泌学的所見・腸内細菌叢との関連について検討する。

【方法】

東京医科歯科大学医学部附属病院にて膵臓切除術 (膵頭十二指腸切除; PD または膵体尾部切除; DP) を受けた症例のうち、術前、術後、術後 6 ヶ月ごとに 75g ブドウ糖負荷試験 (OGTT)、切除膵の正常部を用いた免疫組織学的解析 (膵 β 細胞面積、α 細胞面積、α/β 細胞面積比) を実施した 86 名を対象とした。また術前、術後、術後 6 ヶ月に 16S rRNA 遺伝子配列解析による腸内細菌解析、胆汁酸および短鎖脂肪酸解析を施行した。膵切除前および術後 6 ヶ月の糞便を 10 週齢の無菌マウスに移植し、高脂肪食で 4 週間飼育、経口ブドウ糖負荷

試験、インスリン負荷試験、肝臓・精巣周囲脂肪重量、腸管長、肝臓組織学的検査、炎症関連遺伝子発現の評価を実施した。

【結果】

術前に行った 75g OGTT において非糖尿病型であり、膵臓切除術後の経過を追跡し得た非糖尿病 6 例 (PD29 例、DP32 例) の糖尿病の 2 年累積発症率は PD4.0%、DP48.1% と顕著な違いを認めた。PD 症例は DP 症例に比較し、有意に高齢であったが、性別や原疾患が癌である割合に差はなかった。また糖・脂質代謝、肝・腎機能等に 2 群間で有意差は認めなかった。年齢、性別、HOMA-IR 等にて調整した多変量モデルにおいて、DP は PD に比して糖尿病発症のリスクが高いことが明らかとなった。術後の 75gOGTT における活性型 GLP1 分泌レベルは、両術式共に上昇を認めたが、PD 症例は DP 症例と比してより有意に上昇していた。GIP については両群とも術前後で有意な変化は認めなかった。DP にて切除された膵組織の α 細胞、β 細胞の膵実質全体に占める割合は、PD にて切除された膵組織より有意に高値であった。OGTT における NGT と IG 症例の比較検討では、α/β 比は IGT 群でより高い傾向が得られた。

DP 症例では術前後で腸内細菌叢の大きな変化は認めなかったものの、PD 症例では術直後 (2 週から 4 週後) から腸内細菌叢の劇的な変化を認め、その変化は 6 ヶ月後まで維持された。4 大門の中では、Proteobacteria の割合が PD 術後に有意に増加した。また、術後の腸内細菌の多様性が保たれる症例でインスリン抵抗性の改善を認めた。75gOGTT における各ポイントの胆汁酸および短鎖脂肪酸の血中濃度には有意な変化は認めなかった。PD 術前および 6 ヶ月後の糞便の無菌マウスへの移植実験で PD による腸内細菌叢の変化と膵内分泌予後の関連を検証中である。

【結論】

膵切除後の糖尿病発症の術式による違いは、腸管インクレチン (GLP1) 分泌の変化および腸内細菌叢の変化が関与している可能性が示唆された。β 細胞の脱分化の膵切除後の糖尿病発症の病態における役割についてはさらに詳細な検討が必要である。

糖代謝調節に関与するニューロメジン U (NMU) の機能解析

三浦綾子

(宮崎大学医学部)

【背景】

ニューロメジン U (NMU) は、子宮筋収縮アッセイを用いて脊髄より発見された 25 アミノ酸残基からなる神経ペプチドである (Minamino N, 1985)。ラット中枢への NMU 投与は、摂食を抑制し、エネルギー代謝を亢進する (Nakazato M, 2000)。NMU KO マウスは、過食を伴う肥満を呈するとともに、エネルギー代謝が低下している (Hanada R, 2004)。ヒトでは、チェコの家系で不活性な NMU を生産する Arg165Trp 変異が発見されており、小児肥満及び高トリグリセリド血症と関連する。NMU 受容体 (NMUR) は G タンパク質共役型受容体であり、主に腸管などの末梢組織に NMUR1、中枢神経系に NMUR2 が発現している。NMUR はタンパク質サブクラスのうち Gq と Gi の両方に共役するが、NMUR1 は Gq を、NMUR2 は Gi を主として選択する。ヒト膵β細胞に NMUR1 は発現し、NMU は高グルコース刺激時のインスリン分泌 (GSIS) を抑制する可能性が示唆されている。

【目的】

NMU のインスリン分泌調節作用を *in vivo* および *in vitro* にて検討し、肥満や糖尿病の病態との関連を解析する。

【方法】

- ・マウス膵島と MIN6 細胞を用いた GSIS, Ca^{2+} イメージング, ミトコンドリア機能解析
- ・マウス IPGTT における NMU の効果
- ・ラットへの NMU 末梢投与後の電気活動の測定

【結果】

NMU と NMUR1 は膵β細胞にも発現し、NMU と NMUR1 アゴニストは *in vivo* (マウス) と *in vitro* (単離膵島とβ細胞由来 MIN6 細胞) のいずれでもグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制した。NMU の作用は、siNmU と NMU 中和抗体で消失した。細胞内 Ca^{2+} イメージング解析から、NMU はβ細胞への Ca^{2+} 流入

を減少させ、インスリン分泌を抑制することを立証した。さらに、NMU のβ細胞への暴露はミトコンドリア機能を低下させることが示唆された。また、空腹時に、NMU の発現は腸管と迷走神経節で増加し、NMUR1 発現は迷走神経節で増加した。NMU のラットへの末梢投与は、迷走神経求心線維の電気活動を亢進し、視床下部室傍核の *c-fos* 発現を増加する。NMU は、空腹時に自律神経求心路を活性化してインスリン分泌を抑制するデクレチン作用を示すペプチドの可能性が示唆された。

【考察】

NMU と NMUR1 は膵β細胞に発現し、オートクライン・パラクライン作用により、インスリン分泌を抑制していることを報告した (BBRC, 2017)。さらに、NMU は、ミトコンドリア機能を低下させ、インスリン分泌を抑制する可能性が示唆された。また、空腹時には神経を介するデクレチン作用の両者の機序を介して、インスリン分泌を制御し、糖代謝調節に機能していると考えられる。

【文献】

Weidong Zhang., Hideyuki Sakoda., Ayako Miura., Koichiro Shimizu., Kenji Mori., Mikiya Miyazato., Kentaro Takayama., Yoshio Hayashi., & Masamitsu Nakazato.: Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Nov 4; 493 (1): 677-683.
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.132.

ネットワーク・メタアナリシスによる糖尿病の最良の治療選択エビデンスの確立

山田朋英

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

ネットワーク・メタアナリシスにより糖尿病の最良の治療選択エビデンスを確立する。

【方法・結果・考察】

1. 集中治療における最適な血糖管理目標値

重症成人患者に対するインスリンによる種々の異なる血糖管理目標が患者の予後に与える影響について

での系統的レビューとネットワーク・メタアナリシスを行い、その成果を報告した (ICM 2017ab, Resuscitation 2017)。36 のランダム化比較試験が解析対象となった。厳格な血糖コントロール (管理目標 80-110 mg/dl) 群では、かなり穏やかなコントロール (管理目標 180-220mg/dl) 群とやや穏やかなコントロール (管理目標 140-180mg/dl) と比べ約5倍の低血糖、重症低血糖のリスク増加を認めた。一方、厳格な血糖管理は死亡を改善しなかった。本結果は重症患者に対する厳格な血糖管理は支持せず、より穏やかな血糖管理目標を支持する結果となった。本論文は、アメリカ静脈経腸栄養学会 (ASPEN) 2017 の診療ガイドラインに引用された。

2. 新規糖尿病薬の薬効の評価 (週一回 DPP-IV阻害薬)

Weekly DPP-IV阻害薬 (週一回内服型製剤) と Daily DPP-IV阻害薬の薬効比較を行い、効果有害事象ともに有意差がないことを示した (Diabetes Care 2018)。

3. 1型糖尿病に対する追加治療法に関する評価

1型糖尿病に対する SGLT2 阻害薬の薬効と有害事象検討を行った。1型糖尿病への SGLT2 阻害薬の投与は、重症低血糖を増やすことなく、血糖コントロール、体重が低下した。しかし生殖器感染症、糖尿病性ケトアシドーシスのリスクを約3倍増加させた。1型糖尿病への SGLT2 阻害薬使用は、慎重に検討すべきと考えられた (DOM 2018)。本成果は ACP journal club に採択された。

【今後の展望】

人工知能を用い、システマティックレビュー・メタアナリシスの自動化を目的とした国際共同研究を開始した。従来では人間が手作業で行なっている医学文献の評価を、機械処理することにより論文数が膨大であっても高速に行なうことができる。煩雑な作業を、専門家の暗黙知を学んだ人工知能が代行することで、人間はより生産的な仕事に従事することが可能となる。

ファージディスプレイによる 進化分子工学的手法を用いた酵素改変

はじめに

生物が持つ酵素は様々な機能を持ち、複雑な反応を触媒することが出来る。それは永い進化の過程で変異と淘汰が繰り返されてその機能を獲得したためと考えられる。多くの酵素が研究・工業用途に用いられており、酵素を改変し、望んだ機能を向上・付与することは重要な意味を持つ。では、酵素を人工的に進化させて改変することは可能だろうか。人工的に進化を行うための研究として「進化分子工学」がある。進化分子工学では、実験者が望んだ機能を持つ分子を取得することを目的として、実験室内で適切な淘汰圧をかけることによって自然界で発生するよりも遥かに早い時間で人工的に進化を行う。それでは、具体的にどのような手法を使えば人工的な進化を効率的に実施することが出来るのだろうか。

2018年のノーベル化学賞は Frances H. Arnold 氏、George P. Smith 氏、Sir Gregory P. Winter 氏に贈られた。酵素の進化分子工学への貢献が評価された Frances H. Arnold 氏は、プロテアーゼの一種である subtilisin E に無作為に変異を導入した多種類の変異体からなるライブラリを構築し、ジメチルホルムアミド (DMF) 存在下でプロテアーゼ活性を保持する変異体を探索した。淘汰圧に相当する DMF 存在下でプロテアーゼ活性を有した subtilisin E 変異体に対して、さらに変異導入と淘汰 (スクリーニング) を繰り返すことにより、60%(v/v) DMF 存在下での酵素活性が 256 倍向上した subtilisin E 変異体 (10 か所の変異が含まれていた) の作製に成功した¹⁾。この例のように、変異と淘汰により望んだ機能を持つ酵素を探索する進化分子工学では、多種類の変異体からなるライブラリを迅速にスクリーニングする技術が必要とされる。George P. Smith 氏により考案されたファージディスプレイは大規模な変異体ライブラリをスクリーニングするために有効な手法である²⁾。ファージディスプレイとは、大腸菌に感染する M13 ファージなどのコート蛋白質をコードする遺伝子に外来遺伝子を連結することによって、1つのファージ表面上に1種類

の外来蛋白質を提示する技術である。ファージディスプレイでは $10^9 \sim 10^{10}$ にも達する多種類の遺伝子を含むファージライブラリを構築することが出来る。そのファージライブラリに対して実験者が望んだ機能を持つ外来蛋白質が選択出来るような淘汰圧をかけてスクリーニングすることによって、目的の機能を有する外来蛋白質を持ったファージを選別する。ファージ表面上に提示された外来蛋白質はそのファージが有する DNA を解析することによって容易に特定することが出来る。Sir Gregory P. Winter 氏はファージディスプレイを抗体に応用し、抗体創薬に大きなインパクトを与えた³⁾。本稿では、ファージディスプレイを進化分子工学的に酵素改変に用いた報告を紹介する。

・酵素活性の向上

Bacillus cereus 株 569/H/9 由来メタロ β ラクタマーゼは亜鉛イオンを活性中心に持ち、 β ラクタム系抗生物質を加水分解する酵素である。このような金属要求性酵素について進化分子工学的に活性向上が可能かどうかを検証するために、ファージディスプレイによるスクリーニングが実施された⁴⁾。まず、無作為な変異をメタロ β ラクタマーゼに導入し、fd ファージの g3p コート蛋白質と連結することによって、メタロ β ラクタマーゼ変異体をファージ表面上に提示したファージライブラリが構築された。このライブラリの多様性 (変異体数) は 5×10^6 規模として設計された。次に、 β ラクタム系抗生物質であるペニシリンを固定化した担体に、エチレンジアミン四酢酸で亜鉛イオンをキレート除去してメタロ β ラクタマーゼ変異体の加水分解活性を不活化したファージライブラリを混合した。その後、亜鉛イオンを添加することによりメタロ β ラクタマーゼ変異体を活性化し、酵素活性を保持するファージはペニシリンが分解されることによって担体から溶出された。この手法での淘汰圧は、メタロ β ラクタマーゼ変異体がペニシリンに結合し、加水分解活性を保持することであり、このよう

にして得られたメタロβラクタマーゼ変異体は野生型と比較して酵素活性 (k_{cat}/K_m) が1.7倍に向上した。

・低pH下でも活性を保持するα-アミラーゼの獲得

α-アミラーゼは澱粉を加水分解しオリゴ糖を産生する酵素である。このα-アミラーゼが低pH下で活性を維持することは工業的に好ましい。低pH下でも活性を持つα-アミラーゼを取得するため、ファージディスプレイによるスクリーニングが実施された⁵⁾。まず、α-アミラーゼの変異体をfdファージのg3pコート蛋白質と連結することによって、α-アミラーゼ変異体をファージ表面上に提示したファージライブラリが構築された。変異箇所はα-アミラーゼの立体構造を参考に決定され、ライブラリの理論多様性は 5×10^4 規模として設計された。次に、澱粉とファージライブラリを混合し、澱粉と結合したファージは加熱処理することにより回収した。この手法での淘汰圧は、澱粉とファージライブラリを混合する際のpHを4.5～5.5とすることである。スクリーニングはpH 4.5では4ラウンド、pH 5.0では5ラウンド、pH 5.5では7ラウンドが行われ、ライブラリ中に含まれる低pH下で澱粉との結合が維持されているα-アミラーゼ変異体を選択された。このようにして得られたα-アミラーゼ変異体についてpH 4.5と7.5における澱粉の加水分解活性の比率が算出され、野生型では0.05であった比率が0.13に向上した。

・耐熱性の向上

酵素の熱安定性を高めることは様々な用途で酵素の実用性を広げることに繋がる。酵素の熱安定性を高めるため、ファージが大腸菌へ感染するシステムを応用し、ファージディスプレイによるスクリーニングが実施された⁶⁾。fdファージのg3p蛋白質はN1, N2, CTという3個のドメインからなり、N1とN2が大腸菌への感染に必要とされる。そこで、熱安定性を向上させたい蛋白質変異体をN2とCTの間に挿入し、挿入した蛋白質変異体がプロテアーゼにより切断されるとCTからN1-N2が切断されるために大腸菌への感染能が失われることを利用する。プロテアーゼ耐性が熱安定性と関連性があることを検証するため、リボヌクレアーゼT1 (RNase T1) の4個のシステイン残基をアラニ

ン残基に置換した安定性の低いRNase T1 (4A) の安定性を向上させることが試みられた。RNase T1 (4A) 変異体をfdファージのg3p蛋白質のN2とCTの間に挿入して、RNase T1 (4A) 変異体をファージ表面上に提示したファージライブラリが構築された。変異箇所はRNaseT1での熱安定性を向上させることが知られている3か所とし、ライブラリの理論多様性は 7×10^3 規模として設計された。この手法での淘汰圧は、ファージライブラリとプロテアーゼが反応することである。つまり、RNase T1 (4A) 変異体がプロテアーゼにより切断された場合、g3p蛋白質のCTからN1-N2が切断されるためファージが感染能を失い、プロテアーゼ耐性を獲得したRNase T1 (4A) 変異体を提示するファージのみが大腸菌への感染能を維持し、大腸菌への感染・増幅が可能となる。プロテアーゼによる切断、大腸菌への感染、ファージの増幅という工程を4ラウンド繰り返し、プロテアーゼ耐性を持つRNase T1 (4A) 変異体を選択された。このようにして得られた変異体を持つ変異箇所をRNase T1に導入したところ、野生型のRNase T1では50.9°Cであった熱変性中点温度 (T_m) が変異体では58.7°Cまで向上した。この結果から、プロテアーゼ耐性と熱安定性の関連性が推察された。さらに、この技術が他の蛋白質にも適用出来るかどうか検証するため、*Bacillus subtilis* のコールドショック蛋白質であるBs-CspBに適用し、プロテアーゼ耐性を持つBs-CspB変異体がスクリーニングされた結果、熱変性中点温度が28°C向上したBs-CspB変異体を取得された⁷⁾。

おわりに

多様性の高い酵素変異体ライブラリをスクリーニングすることが出来るファージディスプレイを用いて「適切な淘汰圧」をかけることにより、実験者が求める機能を向上させるように効率的に酵素を進化させることが出来る。「適切な淘汰圧」をどのように計画するかによって、酵素の進化の方向性は決定されるが、ここで紹介したようなスクリーニング手法以外にも着想次第で酵素を人工進化させることが可能である。2018年のノーベル化学賞は、「人工進化」に注目したと思われるが、今後、これまでにない新しい機能を持つ酵素が進化分子工学により創出され、様々な分野に影響を与えることが期待される。

参考文献

- 1) Chen, K. & Arnold FH.: Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **90**, 5618 (1993).
- 2) Smith, GP.: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315 (1985).
- 3) McCafferty, J., Griffiths, AD., Winter, G. & Chiswell, DJ.: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**, 552 (1990).
- 4) Ponsard, Il., Galleni, M., Soumillion, P. & Fastrez, J.: Selection of metalloenzymes by catalytic activity using phage display and catalytic elution. *Chembiochem.*, **2**, 253 (2001).
- 5) Verhaert, RM., Beekwilder, J., Olsthoorn, R., van Duin, J. & Quax, WJ.: Phage display selects for amylases with improved low pH starch-binding. *J. Biotechnol.*, **96**, 103 (2002).
- 6) Sieber, V., Plückthun, A. & Schmid, FX.: Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 955 (1998).
- 7) Martin, A., Sieber, V. & Schmid, FX.: In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J. Mol. Biol.*, **309**, 717 (2001).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所
長野 哲也, 創薬本部 フロンティア創薬ユニット 山内
理夏子)

免疫疾患領域における創薬標的としてのRIPK1

【序】

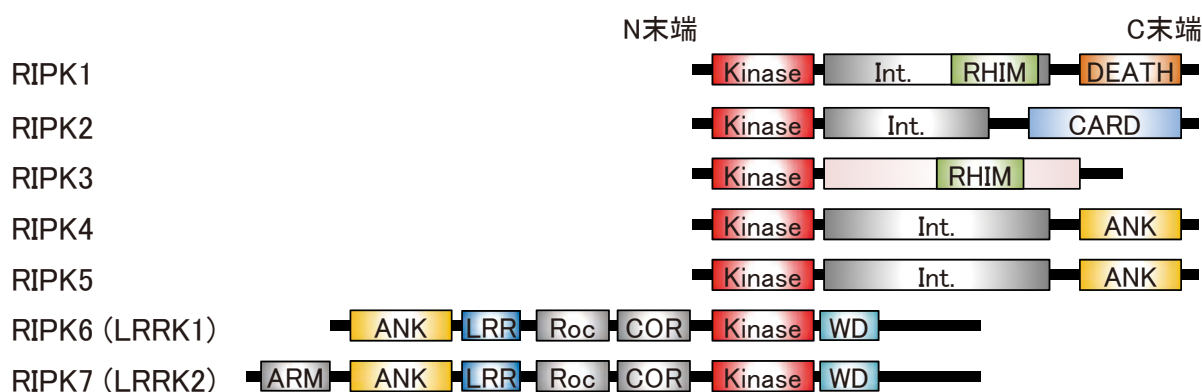
生命機能を維持していく中で、「細胞死」が様々な場面で重要な働きをしている。細胞死の中でも、プログラムされた細胞死であるアポトーシスと共に、近年アポトーシス以外の細胞死として知られるネクロトーシスの研究が進んでいる。細胞死を調節するシグナル経路の中で、receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) がアポトーシスとネクロトーシスの両方を調節するキナーゼ分子として注目されている。RIPK1 によるネクロトーシス研究の進展により、RIPK1 を介したシグナル調節によって種々の動物モデルの病態改善報告が示されていることから、本キナーゼを標的とした薬剤開発が盛んに行われている。本稿では、近年特に創薬が難しいとされる免疫・炎症分野における RIPK1 と疾患の関連、及びその臨床応用についての概要を述べる。

【RIPK1 とその働き】

RIPK1 は、幅広い組織に発現しており、タンパク質 1 次構造の N 末端側にキナーゼドメインを有する RIP キナーゼ (RIPK) ファミリーに属し (図 1)、ストレス/炎症シグナル伝達時における受容体共役型のタンパク質キナーゼとして働く分子である。RIPK ファミリーの中でも RIPK1 は唯一、C 末端側に「DEATH ドメイン」を有するのが特徴で、元来細胞死を誘導する分子として同定された¹⁾ 経緯もあることから、長年にわたり細胞死メカニズムの研究が盛んに進められてきた。

生体機能の恒常性維持における様々な場面で細胞死が重要な働きを担っている。発生や分化が正常に進行するため、また生体内で役目を終えた細胞が排除されるなどには、プログラムされた細胞死として知られるアポトーシスが適切に働くことが必要である。

一方で、アポトーシス以外にネクロトーシスなどの



(略語) LRRK: Leu-rich repeat kinase, ARM: Armadillo, ANK: ankyrin, LRR: Leu-rich repeat, Roc: Ras of complex, COR: C-terminal of Roc, Int.: intermediate, RHIM: RIP homotypic interaction motif, CARD: caspase activation and recruitment domain, WD: WD40 repeat

図1 ヒト RIPK ファミリーとタンパク質ドメイン構造

細胞死も存在し、炎症の惹起や慢性炎症の原因となっており、そこで働く RIPK1 の役割が長年の研究から明らかとなってきた^{2,3)}。その中の典型的なシグナル伝達の概略を以下に記す (図 2)。

RIPK1 は、アポトーシスとネクロトーシスの両方の細胞死を制御するシグナル調節のキー分子として働くことが現在までの研究から明らかとなってきた。ストレス/炎症シグナル分子の一つである腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor α (TNF α) のシグナル下流において、RIPK1 が caspase8 を活性化することでアポトーシスを誘導することが古くから示されていた。その後の細胞死研究から、RIPK1 がアポトーシスとは別経路のネクロトーシスを引き起こすメカニズムが明らかとなってきた。RIPK1 が下流の RIPK3 をリン酸化することで、RIPK3 と mixed lineage kinase-like (MLKL) の相互作用が強まり、さらに MLKL の重合化が進み、最終的にネクロトーシスが起る。ネクロトーシスにより細胞内物質が細胞外に流出することで、構成成分である damage-associated molecular patterns (DAMPs) や炎

症性サイトカインが細胞外で働く環境が生まれることとなる。

さらに、RIPK1 はネクロトーシスやアポトーシスの細胞死誘導シグナルとは別に、下流にある転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B) にシグナルを伝えることで炎症関連分子や生存因子(抗アポトーシス因子等)の転写を活性化する働きも併せ持っている。

ネクロトーシスの結果生じた分子や NF- κ B の活性化によって産生された分子などが再び細胞に炎症性シグナルを入れ、これらの結果、RIPK1 によりネクロトーシスや NF- κ B 活性化が起こるといったシグナル伝達のポジティブループが廻ることによって炎症が維持されると考えられている (=慢性炎症) (図 2)。そのため、RIPK1 は慢性炎症において重要な分子として近年着目されている。

【疾患における RIPK1 と臨床応用】

ネクロトーシスなどの細胞死研究が進められる中で、ネクロトーシス関連分子である RIPK1, RIPK3,

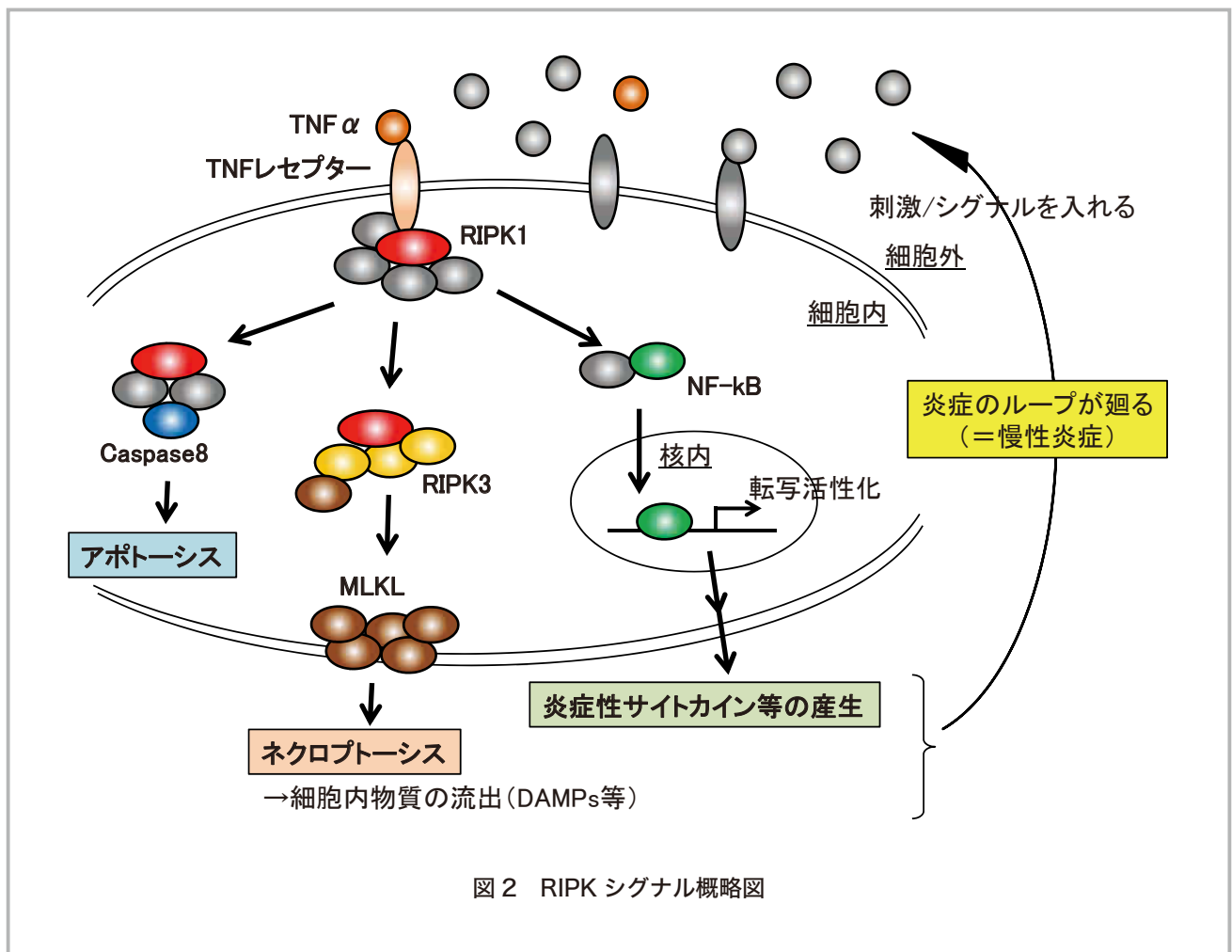


図 2 RIPK1 シグナル概略図

MLKL の遺伝子改変マウスや RIPK1 阻害剤を用いた実験により、ネクロプトーシスと病態との関係を示す報告が蓄積されてきている。RIPK1 遺伝子改変マウスや、RIPK1 阻害剤 (=ネクロプトーシス阻害剤) であるネクロスタチン 1 を用いた実験報告、また RIPK3 や MLKL の遺伝子欠損マウスを用いた解析により、様々な動物病態モデル (肝炎、腎炎、膵炎、脳梗塞、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデル) での病態症状が改善することが現在までに示されている⁴⁾。

当初は細胞死研究から注目された RIPK1 は、前項に述べたように炎症関連の重要な分子として、免疫・炎症領域の疾患においても近年注目が集まり国内外の製薬各社が RIPK1 を標的とした創薬を進めている。中でも創薬の難易度が高い自己免疫疾患領域において、GlaxoSmithKline 社が RIPK1 を標的とした阻害化合物 GSK2982772⁵⁾ の潰瘍性大腸炎、関節リウマチ、乾癬を適応とした第 II 相臨床治験を進めている。また、中枢神経と免疫疾患領域において、Denali 社と Sanofi 社が DNL747 でアルツハイマーや ALS、多発性硬化症 (MS) において、また DNL758 で自己免疫疾患の適応を目指して第 II 相臨床治験を共同で行うことが決定している。

RIPK1 による細胞死研究が進んではいるものの、アポトーシスとネクロプトーシスが切り替わるメカニズムなどの重要なポイントはいまだ解明されていない。今後の RIPK1 をはじめとするネクロプトーシス研究と共に RIPK1 阻害薬の臨床応用 (創薬) の更なる発展が期待される。

【参考文献】

- 1) Stanger B.Z. *et al.*: RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.*, **81**, 513 (1995).
- 2) He, S. & Wang, X.: RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nat. Immunol.*, **19**, 912 (2018).
- 3) Humphries, F. *et al.*: RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ.*, **22**, 225 (2015).

- 4) Zhou, W. & Yuan, J.: Necroptosis in health and diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **35**, 14 (2014).
- 5) Harris, P.A. *et al.*: Discovery of a First-in-Class Receptor Interacting Protein 1 (RIP1) Kinase Specific Clinical Candidate (GSK2982772) for the Treatment of Inflammatory Diseases. *J. Med. Chem.*, **60**, 1247 (2017).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット 四方田純一郎)

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット 柳田哲哉)

Bruton's tyrosine kinase (Btk)

【はじめに】

近年、核酸治療、遺伝子治療、iPS 治療など様々な新しいモダリティを用いた治療の開発が急速に進んできている。一方で、低分子薬は、経口投与可能であること、数はそれほど多くないが、JAK 阻害剤など抗体に劣らない薬効を示す薬剤も存在すること、新しいモダリティに比べて廉価であること、などから依然として医薬品開発のスタンダードなアプローチ法の一つであり、現在でも一定の割合で開発が進められている。低分子薬の中でもキナーゼ阻害薬については、従来、標的のキナーゼのみを選択的に阻害する化合物を創製することは困難であったが、近年はキナーゼの構造解析やキナーゼと阻害薬の結合様式の解析などによって、高選択型キナーゼ阻害薬の開発が可能となっており、主にかん疾患を中心に多くの薬剤開発が進められている。

Bruton's tyrosine kinase (Btk) は、先天性免疫異常症である X連鎖無γグロブリン血漿の責任遺伝子として同定された非受容体型チロシンキナーゼであり、この疾患を最初に記載した小児科医であるオグデン・ブルトンの名を冠して名付けられた¹⁾。本稿では Btk の役割について概説する。

【Btk の構造と役割】

Btk は Tec ファミリーに属するチロシンキナーゼであり、659 個のアミノ酸からなる約 77kDa のタンパクである。その構造は N 末端より PH (pleckstrin homology), TH (Tec homology), SH3 (Src homology 3), SH2 (Src homology 2), SH1/TK (Src homology 1/Tyrosine

kinase) の 5 つのドメインから構成されている^{1,2)}。

Btk は、形質細胞を除く B 細胞、血小板、顆粒球、単球など T 細胞以外の血球系細胞の全般に発現している^{3,4)}。中でも、B 細胞の初期分化において選択的に発現するプレ B 細胞受容体の機能において重要な役割を果たしていることが知られている。Btk は spleen tyrosine kinase (Syk) の下流にあり、B 細胞受容体からのシグナルが Syk, Btk と伝達され、最終的には NFκB 経路を活性化させる。

Btk が欠損するとプロ B 細胞からプレ B 細胞への分化障害が生じ、結果として、末梢血の成熟 B 細胞欠損となる。そのため、抗体産生がなくなり、脳、肺、副鼻腔、および皮膚において重篤な細菌感染が頻繁に生じる^{5,6)}。

【Btk が関係する疾患と治療薬】

マンツル細胞リンパ腫は、リンパ節内のマンツルという部分にあるリンパ球の中の B 細胞がかん化し、リンパ節の中で増殖する疾患である。Btk を阻害することで、このかん化 B 細胞に細胞死をもたらし、細胞の移動や接着を低下させるというコンセプトで Btk 阻害剤の開発が進められてきた。

日本では、イブルチニブが 2016 年に Btk 阻害剤として初めて承認され (米国では 2013 年に承認)、再発又は難治性のマンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病 (小リンパ球性リンパ腫を含む) の治療に使用されている。イブルチニブは最初に開発された経口の Btk 阻害剤であり、Btk の 481 番目のシステイン残基に不可逆



図1 Btk の構造

的に共有結合することにより、その機能を阻害する。

Btk 阻害剤は慢性リンパ性白血病や難治性のマントル細胞リンパ腫以外の疾患への適応拡大として、SLE や関節リウマチといった自己免疫疾患への適応が考えられており、自己免疫疾患の動物モデルである MRL/lpr モデルにおいて抗体産生を抑制し、腎症の程度が軽減したとの報告や⁷⁾、複数の関節炎モデルにおいて関節炎スコアや炎症性サイトカインを抑制したとの報告もなされている⁸⁾。また自己免疫以外の疾患に関しても、一過性脳虚血モデルにおいて脳梗塞領域の拡大抑制や、神経症状の改善を示す報告がなされており⁹⁾、脳梗塞への適応可能性が示されている。

日本ではまだ上市されていないが、イブルチニブより Btk への選択性を高めたアカラブルチニブも 2017 年に米国で難治性のマントル細胞リンパ腫を適応症として承認を受けている。アカラブルチニブはイブルチニブ同様、様々ながんで臨床試験を実施中であるが、Btk への高い選択性からオフターゲットによる副作用を軽減できる可能性があるため、がん以外の疾患である関節リウマチでも臨床試験が行われており、今後の開発が期待される。

様々な薬が開発されて患者の QOL が格段に向上した疾患領域もある一方で、まだまだ十分ではない疾患領域も多く残されており、世界中で今なお多くの多くの患者さんが苦しんでいる。Btk 阻害薬をはじめとした新たな薬剤がさらに開発され、患者さんのアンメットニーズが解決されることを期待したい。

【参考文献】

- 1) Hendriks, RW *et al.*: Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer.*, **14**, 219 (2014).
- 2) Akinleye, A *et al.*: Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.*, **6**, 59 (2013).
- 3) de Weers, M. *et al.*: The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 3109 (1993).

- 4) Smith, C. I. *et al.*: Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J. Immunol.*, **152**, 557 (1994).
- 5) Mohamed, A. J. *et al.*: Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol. Rev.*, **228**, 58 (2009).
- 6) Doyle, S. L. *et al.*: Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, **282**, 36953 (2007).
- 7) Honigberg LA *et al.*: The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 13705 (2010).
- 8) Chang BY *et al.*: The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis. Res. Ther.*, **13**, R115 (2011).
- 9) Ito M *et al.*: Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat. Commun.*, **6**, 7360 (2015).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 創薬基盤研究所 三由 文彦)

