

日本応用酵素協会誌

No.54

2019

総 説

ゲノム全域をオフターゲットなく自在に編集できる新しい 酵素システム系の創製とその応用	1
植 田 充 美	
Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) の病態と遺伝子変異	9
加 藤 慎 也, 五十川 健太, 渡 邊 実 夢, 竹 森 洋	
Unstructured 領域から始まるプロテアソームによる蛋白質分解 Proteasome-mediated protein degradation initiated from unstructured region	19
伊野部 智由	

2019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	25
成人病の病因・病態の解明に関する研究助成	53
Vascular Biology Innovation に関する研究助成	81
全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成	96
Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成	103

研究調査所 酵素情報

創薬標的としてのN I K	125
マラリア原虫から分泌されるフシギな酵素たち	128
リボヌクレアーゼ H (Ribonuclease H, RNase H)	131

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

総 説

ゲノム全域をオフターゲットなく自在に編集できる 新しい酵素システム系の創製とその応用

植 田 充 美*

微生物を用いた発酵生産は一連の多段階反応を常温常圧で行うことができることや、医薬に特有な立体選択的の反応が可能であり有害な副産物も少ないことから、エネルギー消費量が少なく環境に優しい手法として注目を集めている。しかし、発酵生産は一般に生育に伴うものであり、発酵条件は微生物が生育可能な環境に限られている。例えば、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いたエタノール生産では、発酵熱により酵母の生育や発酵が阻害される。そのため、発酵系の冷却により *S. cerevisiae* が生育できる温度を維持する必要がある。しかし、冷却はエネルギー消費が大きく、製造コスト増大につながる。物質生産能の高い *S. cerevisiae* に熱耐性を付与することで、生産コストの削減が期待できる。さらに高温発酵により、蒸留コストの削減やコンタミネーションリスクの低減も見込まれるため、酵母の熱耐性化は低コストな物質生産に大きな可能性を秘めている。しかし、酵母に熱耐性を付与できる遺伝子変異の知

見や高効率で容易な変異導入法は構築されておらず、高効率なバイオ生産における律速となる¹⁾。

本研究ではこれら問題に対して、まず、非熱耐性株から熱耐性株を育種することで、熱耐性に寄与する変異の同定を目的として、さらに、そのために、ゲノムワイドな新規塩基編集技術である CRISPR/Nickase システムを構築することで、短時間で高効率に変異を酵母に導入できる技術の開発を行った。

1. 熱耐性適応育種細胞の取得

熱耐性に寄与する変異の同定を目的として、至適温度が 30°C の *S. cerevisiae* 株 MT8-1 を親株として 32°C、72 時間の継代培養を繰り返し行った (図 1)。親株 30°C 時よりもより良く生育した時点で 34°C で培養した。同様に親株 30°C よりも生育するまで繰り返し培養して、適応した時点でさらに 2°C 培養温度を上昇させた。同様に繰り返して最終的に 38°C に適応した株 YK60-1 を単

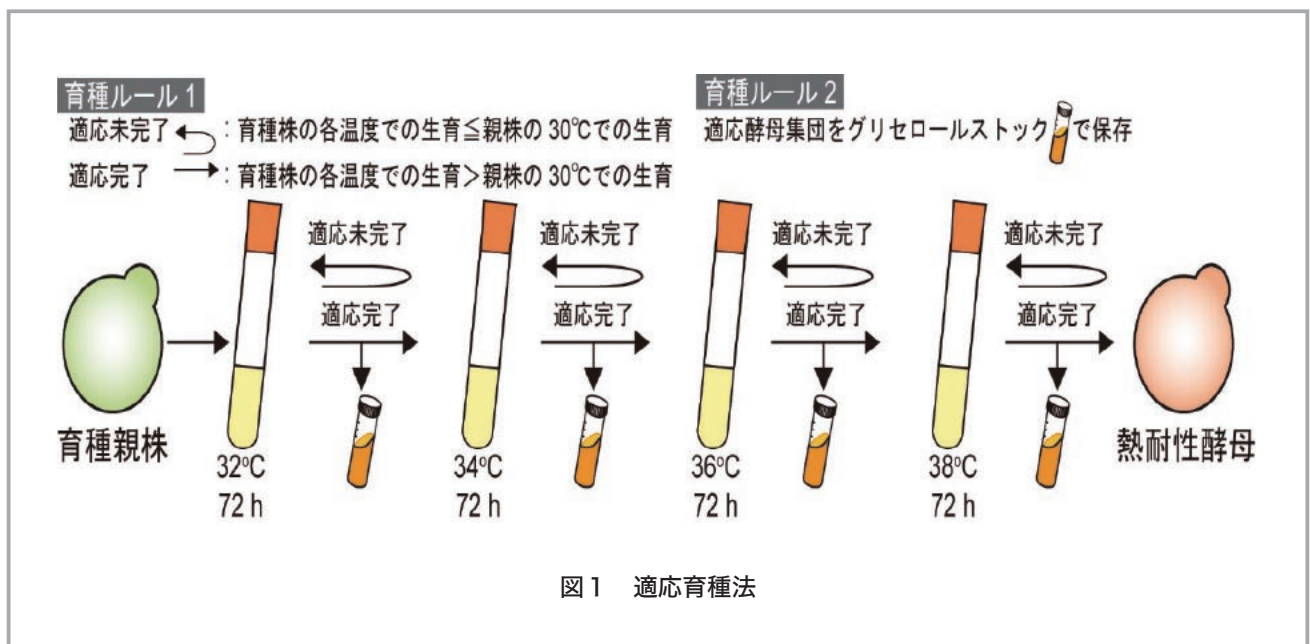


図 1 適応育種法

*京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

離した。また、その過程で各温度に適応した育種途中株を保存した。YK60-1はMT8-1が生育できない40°Cでも良好に生育した²⁾。トランスクリプトーム解析の結果、YK60-1は熱ショックタンパク質などストレス応答性タンパク質を常時30°Cで発現誘導していた。さらに、YK60-1は二糖類の一種であるトレハロースを30°Cで多く蓄積していた(図2)。トレハロースは生体内でタンパク質の変性を緩和する作用があり、酵母は通常熱ストレス下で蓄積する。また、YK60-1のこの形質は非熱ストレス下で長期培養しても失われなかった。これらよりYK60-1は遺伝子変異により、熱ストレス応答が恒常的に「スイッチON」していることが示唆された。

2. 細胞の熱ストレス適応戦略

YK60-1において熱耐性に寄与する変異を同定するために、親株MT8-1との比較ゲノム解析を行った。MT8-1と比べて、YK60-1では40個以上の変異が同定された。これらの中には熱ショックタンパク質をコードする遺伝子など熱耐性への寄与が明確に知られているものはなかった。そこで、育種途中株を解析することで、育種における集団の推移や淘汰を遡って調べることができるため、熱耐性に寄与した変異を効率的に同定していくことを試みた。育種途中株のゲノム解析で同定された変異をもとに、進化系統樹を構築したところ、独立した異なる系統で共通にみられる変異 *CDC25*^{W1416C} を発見した(図3)。この遺伝子にコードされる Cdc25p

育種株のトレハロース合成系

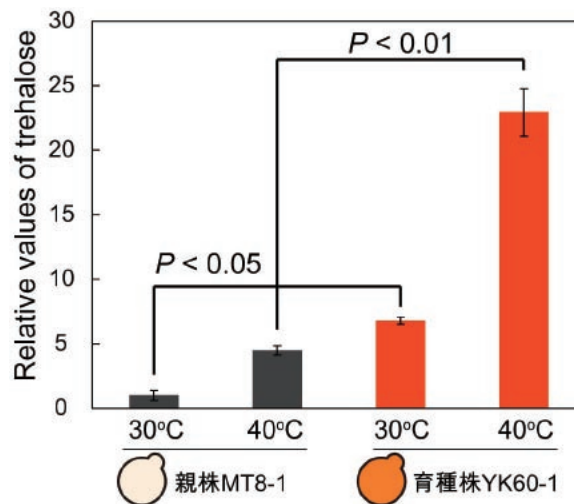


図2 トレハロース合成の比較

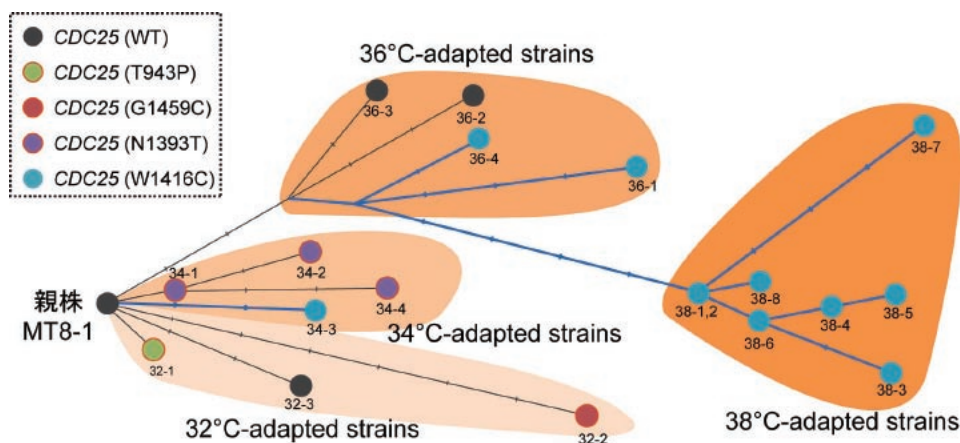


図3 適応進化の系統樹

は 1416 番目の Trp が Cys に置換されている。この変異を有する集団は 38°C で優占的に生育していた。また、*CDC25* の異なる部位に変異を有する *CDC25*^{W1416C} を含む *CDC25* 遺伝子上の変異の熱耐性への寄与が予想された。同定した 4 種類の変異をそれぞれ親株 MT8-1 に再導入したところ、これら 4 種類の再構築株はいずれも熱耐性を示した (図 4)。これより仮説の証明と適応進化の再現に成功した。

Cdc25p はグアニンヌクレオチド交換因子として、細胞内のサイクリック AMP (cAMP) 濃度を間接的に調節する。酵母では cAMP の濃度が低いときに、シグナ

ル伝達系下流のストレス応答性転写因子が活性化されて、ストレス耐性が誘導される。*CDC25* 変異再構築株の細胞内 cAMP 濃度を測定したところ、すべての株で MT8-1 よりも cAMP 濃度が低下していた。さらにトランスクリプトーム解析によると、*CDC25* 変異再構築株で常時発現誘導されている遺伝子のほとんどが cAMP 経路下流の転写因子に制御されていた。これより、変異型 Cdc25p は細胞内 cAMP 濃度低下を誘導して下流の種々の転写因子を活性化することで、ストレス耐性を誘導していることが明らかになった (図 5)。*CDC25* 変異再構築株では、シグナル伝達系上流から包括的に様々

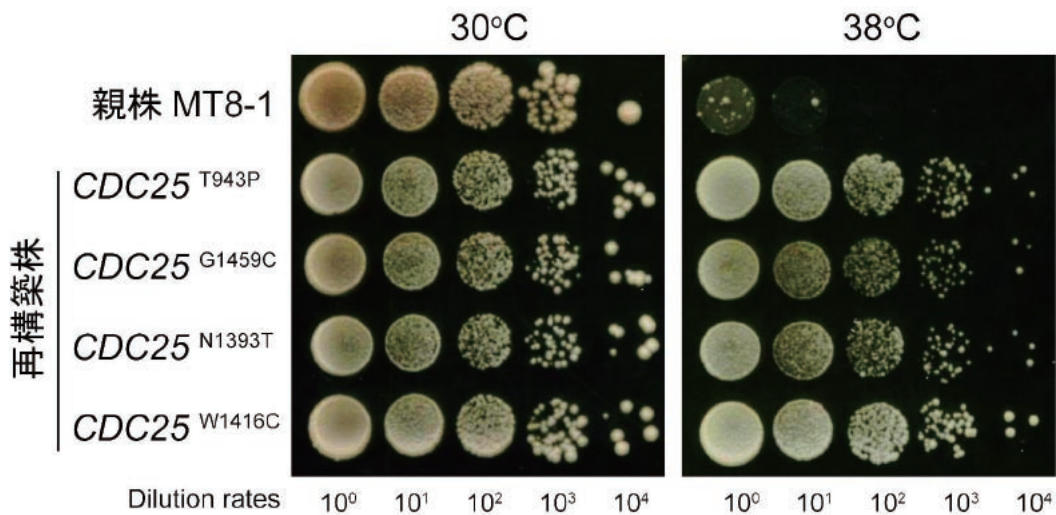


図 4 熱耐性株の比較

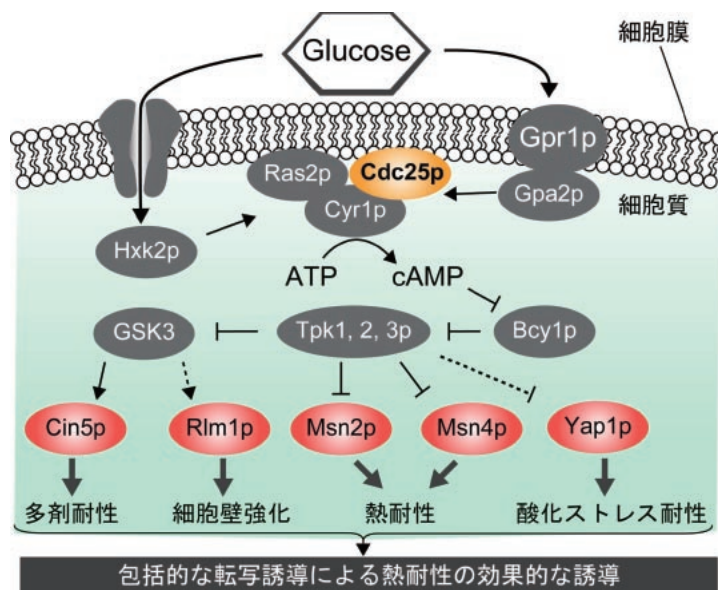


図 5 シグナル伝達経路

なストレス応答性転写因子を活性化することで、熱応答性遺伝子を協調的に制御して熱耐性を効果的に誘導していることが初めて示された。

CDC25 変異再構築株の熱ストレス下における発酵生産能を評価した。グルコースを炭素源としたとき、*CDC25* 変異再構築株は熱ストレス下 (39°C) において親株 MT8-1 の 2 倍以上のエタノールを生産した。また、トランスクリプトーム解析から *CDC25* 変異再構築株は 30°C において、トレハロース合成経路を誘導して

いることが示された。酵母のトレハロース合成経路はガラクトース資化経路と一部オーバーラップしており、*CDC25* 変異株はガラクトース資化能が向上している可能性も示唆された。実際にガラクトースを炭素源としたとき、*CDC25* 変異再構築株は親株 MT8-1 の最大 1.3 倍のエタノールを生産した。さらに 39°C においては、*CDC25* 変異再構築株は親株の最大 5.1 倍のエタノールを生産した (図 6)³⁾。

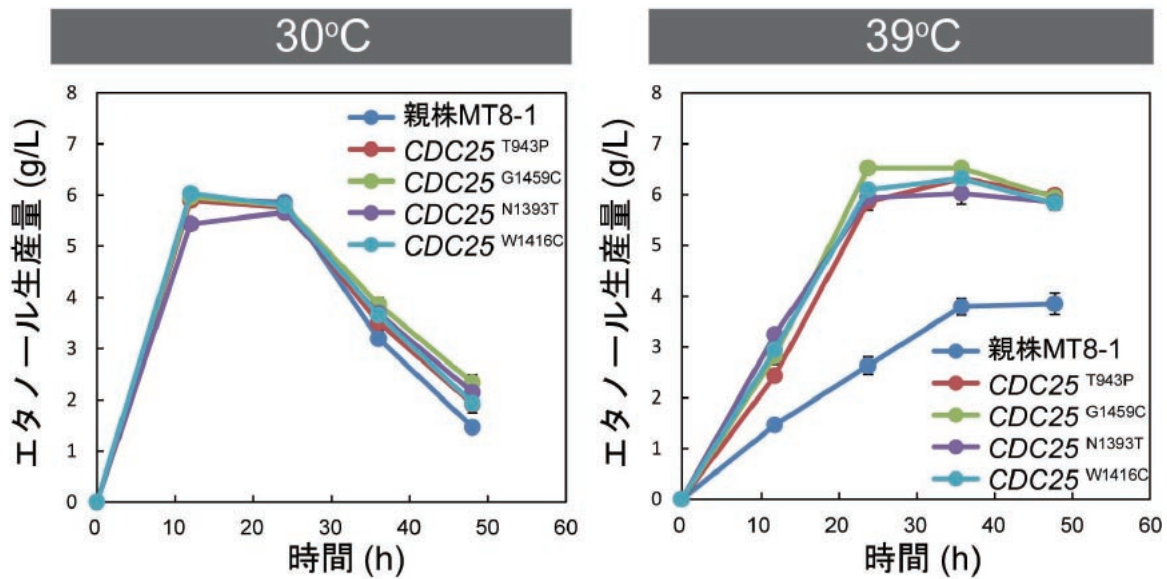


図 6 エタノール生産量の比較

CRISPR/Cas9 system

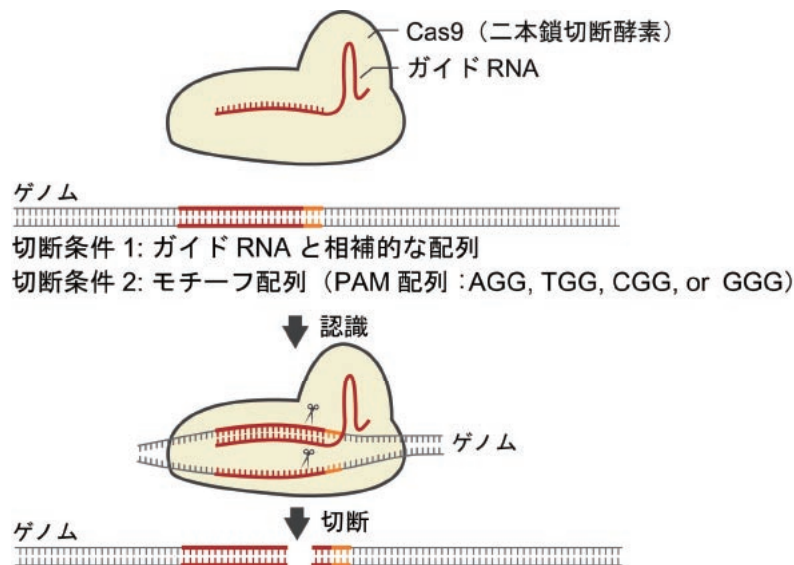


図 7 ゲノム編集 CRISPR/Cas9 システム

3. 新規ゲノム編集法の開発による熱耐性変異株の構築

CDC25 変異は効果的に熱耐性を誘導できるが、一般的な手法による変異導入は約 2 週間の手間がかかるうえ、効率も 50% 以下と非常に低い。より短期間に熱耐性株を構築するためには、熱耐性に関わる変異の同定だけでなく、効率的な変異導入法の開発が求められる。近年、高効率で容易な変異体作製法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めている (図 7)。

このシステムでは、ガイド RNA が PAM 配列 (NGG:

N は任意の塩基) に続く 20 塩基を認識して、Cas9 が DNA を切断する。切断領域に相補的なドナー DNA を加えると相同組換えにより任意の配列をノックインできる。また、非相同末端結合により切断配列をランダムに修復するとノックアウトが可能になる (図 8)。しかし、CRISPR/Cas9 システムは全てのゲノム領域を編集することができないという大きな欠点がある (図 9)。認識配列と PAM 配列以外の部位に変異を導入するように相同組換えを行うと編集後も認識配列が残るため、Cas9

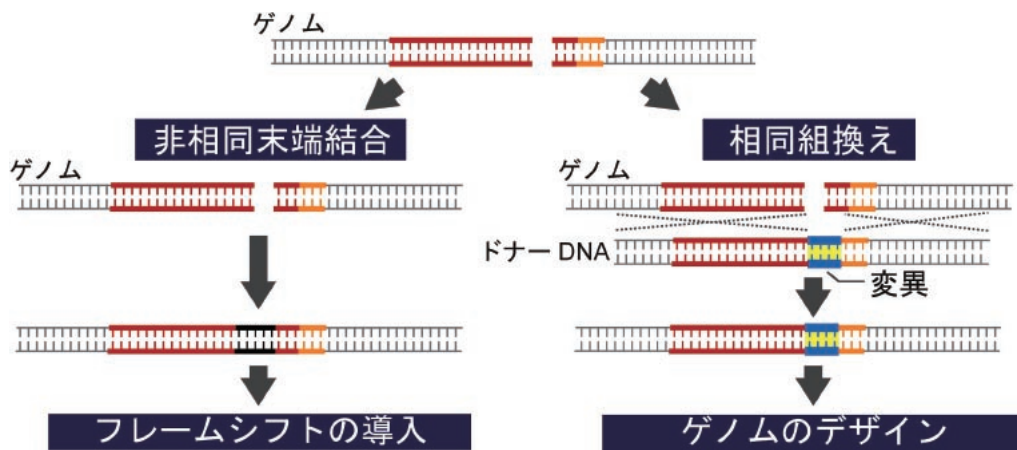


図 8 相同組み換えの比較

CRISPR/Cas9 systemの弱点

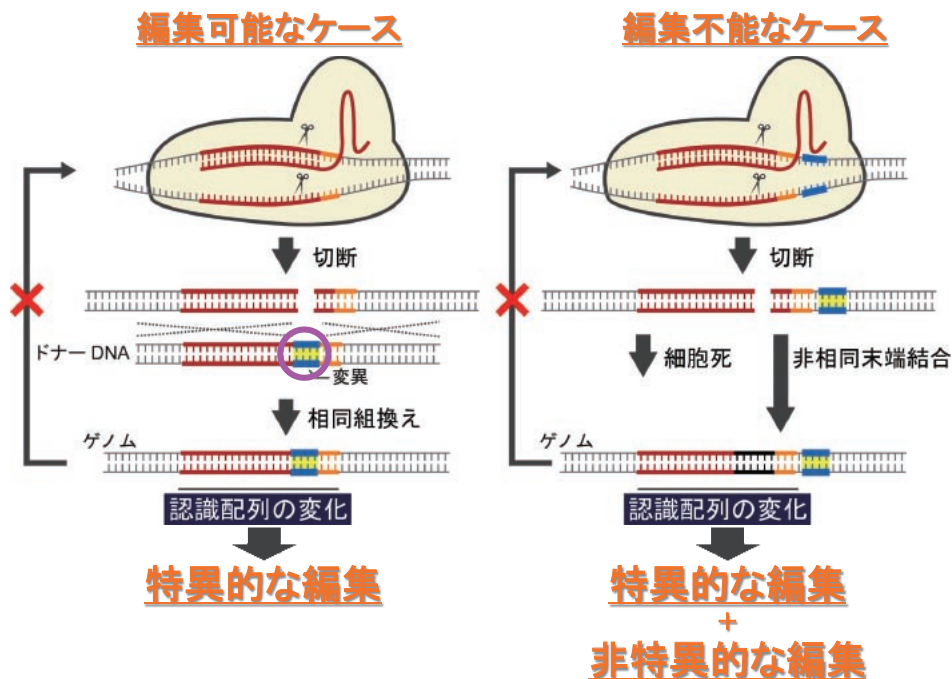


図 9 CRISPR/Cas9 システムの弱点

による再切断が起こってしまう。生じた二本鎖切断は再度鋳型 DNA をもとにした相同組換えや非相同末端結合により修復される。相同組換えにより修復された場合、認識配列が残るためさらに再切断される。そのため、最終的には非相同末端結合により標的配列に望まない塩基の挿入、欠失が生じてしまうという大きな欠陥がある。従って、このシステムが正確に編集できる領域は、Cas9 が認識できる NGG 配列とそれに続く 20 塩基のみであり、これはゲノム中にわずか 60% 程度しか存在しない⁴⁻⁸⁾。

上述の旧来法よりもはるかにゲノムワイドで高効率な編集技術を構築するために、一本鎖切断酵素である

Cas9 Nickase を用いる方法を考案した (図10)。Cas9 Nickase で生じる一本鎖切断 (ニック) は正確に修復される。また旧来の Cas9 により生じる二本鎖切断と異なり、ニックは相同組換えを誘導するが、非相同末端結合は誘導しない。そのため、Nickase による相同組換え後に標的配列が残った時でもニックが再度導入されるだけで、非相同末端結合による余分な配列の挿入や欠損は起こらない。また、本システムはニックから 50 bp 離れた領域でも正確に編集できた。これは、本システムが編集可能塩基に制限がある CRISPR/Cas9 よりも、理論上 40% 以上も広いゲノム領域、すなわち、ほぼゲノム全域を編集できることを示している。

CRISPR Nickase systemの新規開発

変異: 認識配列の外側

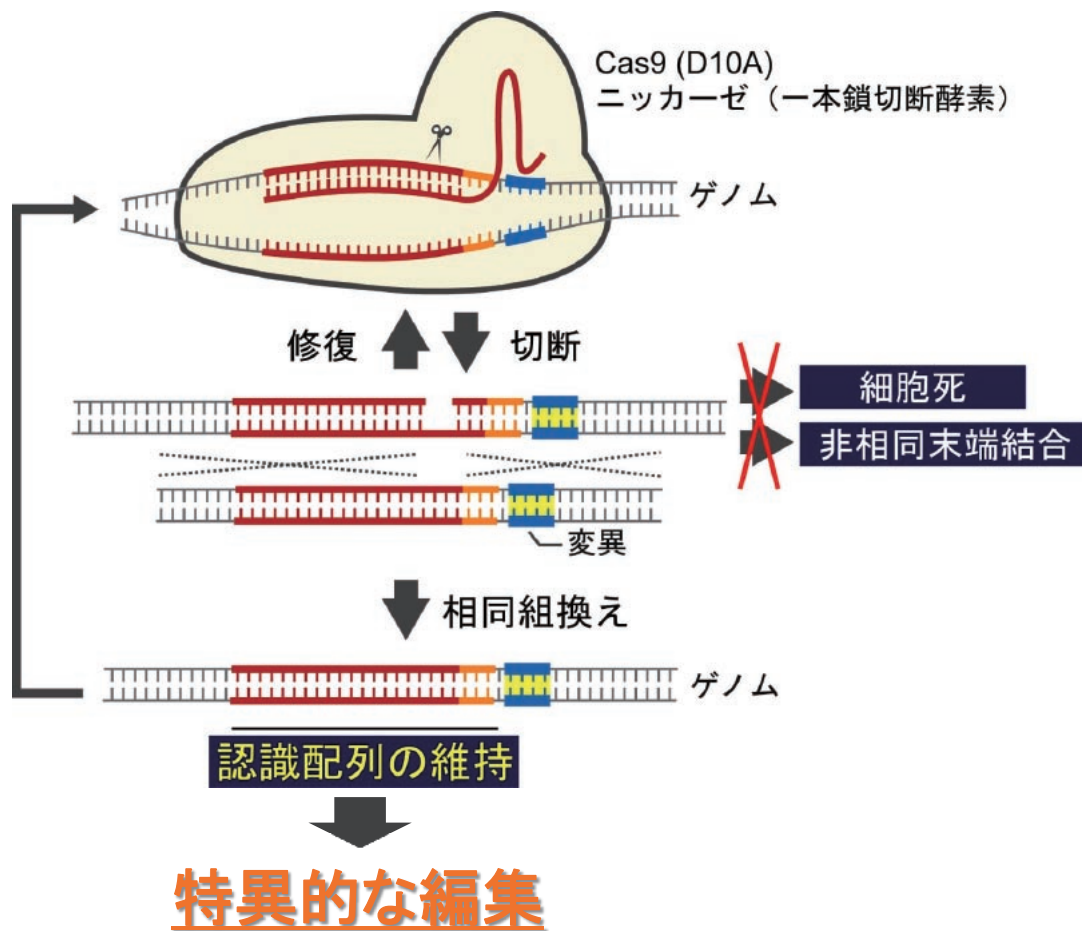


図10 新規開発した CRISPR/Nickase システム

Gap repair cloningを利用した変異体構築

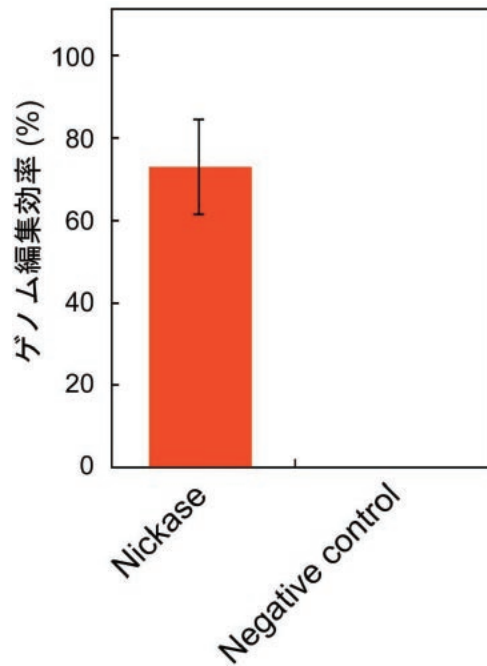


図11 Gap Repair Cloning (GRC) 法

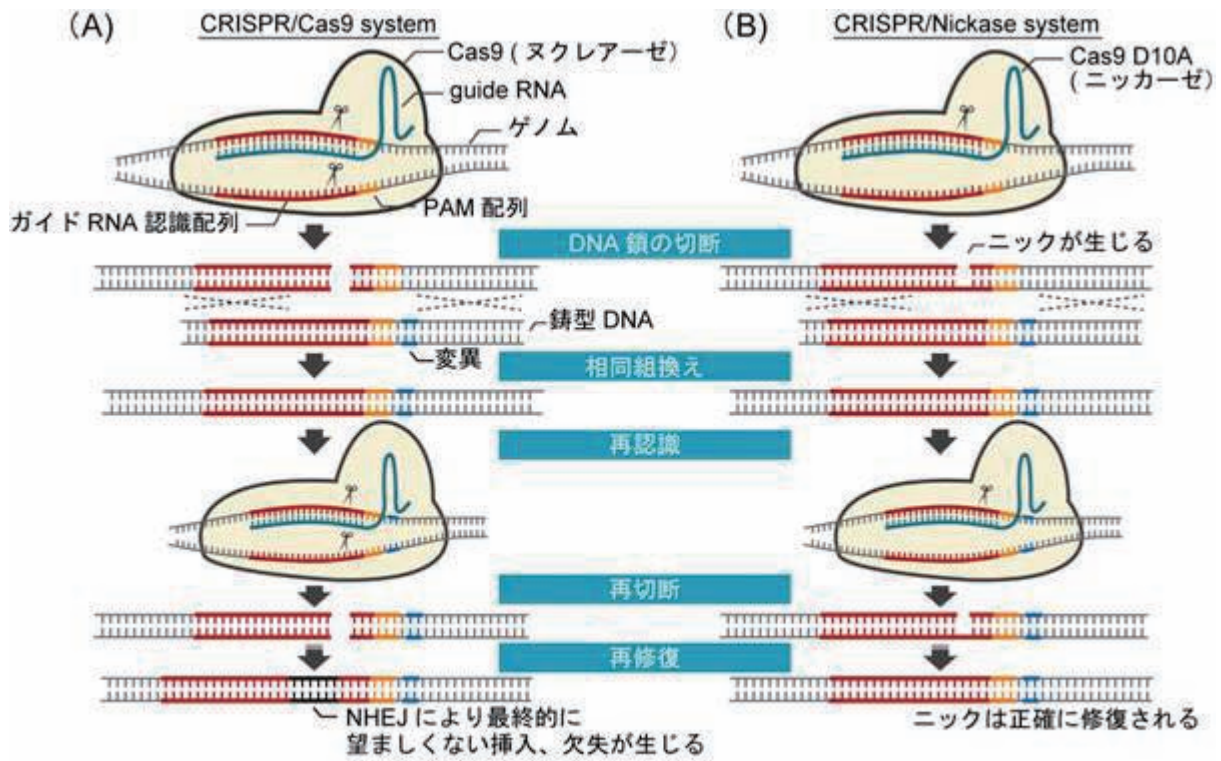


図12 ゲノム編集 CRISPR/Cas9 システムと新規開発 CRISPR/Nickase システムの比較

図 (A) CRISPR/Cas9 システムと (B) CRISPR Nickase システムによるゲノム編集 Cas9 一塩基置換体である Cas9 D10A は一本鎖切断酵素として働く

新規開発した CRISPR/Nickase システムは、ガイド RNA の発現配列と、ドナー DNA 配列をそれぞれベクターに組み込む必要がある。ベクター構築は 1 週間ほどの手間を要するため、本ゲノム編集の律速となっていた。そこで、煩雑なベクター構築作業を省くため、酵母の Gap Repair Cloning (GRC) 法を採用した。相同領域をそれぞれ両端に有する DNA 断片を酵母に導入すると、酵母内で GRC によりプラスミドが自動的に構築された (図11)。GRC を用いてベクター構築段階を省略することで、酵母などの場合は、CRISPR/Nickase による変異体構築法により最短 5 日で *CDC25* 変異株を含む様々な変異酵母を正確で高効率に作製することができた。

開発した CRISPR/Nickase システムでは、CRISPR/Cas9 の欠陥をすべて超越し、より正確に、理論上、ほぼゲノム全域を編集できる。これにより、ゲノム上のほぼすべての SNPs の修復編集が可能になるとともに、逆に、目的通りの SNPs の導入も可能になり、これからのゲノム科学の発展に貢献できると考えられた (図12)⁹⁾。

今後さらに、動物細胞にも展開することにより、ゲノム上のほぼすべての SNPs の修復編集が可能になるとともに、SNPs による遺伝病のゲノム疾患の修復による遺伝子治療の発展にも貢献できると考えられた。

文献

- 1) Satomura, A. *et al.*: Environmental stress tolerance engineering by modification of cell surface and transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Environ. Eng.*, **1**, 149 (2014).
- 2) Satomura, A. *et al.*: Acquisition of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* by breeding via stepwise adaptation, *Biotechnology Progress*, **29**, 1116 (2013).
- 3) Satomura, A. *et al.*: Reconstruction of thermotolerant yeast by one-point mutation identified through whole-genome analyses of adaptively-evolved strains, *Scientific Reports*, **6**, 23157 (2016).
- 4) Gaj, T. *et al.*: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnol.*, **31**, 397 (2013).
- 5) Jinek, M. *et al.*: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816 (2012).
- 6) Ishino, Y. *et al.*: Nucleotide-sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline-phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene-product, *J. Bacteriol.*, **169**, 5429 (1987).
- 7) Barrangou, R. *et al.*: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709 (2007).
- 8) DiCarlo, J.E. *et al.*: Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4336 (2013).
- 9) Satomura, A., *et al.*: Precise genome-wide base editing by novel CRISPR/Nickase system, *Scientific Reports*, **7**, 2095 (2017).

総 説

Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) の病態と遺伝子変異

加藤 慎也*, 五十川 健太*, 渡邊 実夢*, 竹森 洋*

1. はじめに

Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS)は、1959年に初めて報告された常染色体劣性遺伝性疾患群である¹⁾。HPS患者は共通の病態として、眼皮膚白皮症 (Oculocutaneous Albinism, OCA) を発症する²⁾。この病態は全身のメラノサイトにおけるメラニン色素の合成低下によるものであり、メラニン色素合成の場である細胞内小器官メラノソームの成熟異常を認める。メラノソームは起源の一部を伴にするリソソームの関連小胞 (Lysosome-Related Organelles: LRO) に分類され、HPS患者ではLROへのタンパク質輸送系に異常を認める³⁾。このタンパク質輸送系の異常が、HPS患者でのメラニン色素の合成低下の原因である。同様な病態にChediak-Higashi Syndrome (CHS) が挙げられる。

HPS患者でみられるLROへのタンパク質輸送系異常に伴う他の病態としては、血小板濃染顆粒を含む分泌顆粒の機能不全が挙げられる。そのため、HPS患者の多くは、血小板機能低下に起因する出血傾向が観察される。この病態は、セロトニンなどの血小板濃染顆粒内容物の低下による血小板放出異常症 (δ storage pool deficiency: δ SPD) と呼ばれる⁴⁾。一方、リソソームそのものの異常としては、不要な物質の除去不全に伴う、骨髄などの組織の網内系細胞へのセロイド様物質の沈着が挙げられる³⁾。

HPS患者では、OCA及びSPDに加え、水平方向の眼振が共通に認められることも特徴である⁵⁾。本稿では、これまで報告されている各HPSの遺伝子変異及びHPSサブファミリーごとの病態をまとめる⁶⁾。

2. リソソームとLRO

リソソームは真核生物の細胞内小器官の一つであり、

主に細胞外から取り込まれた各種因子の分解機能を担っている^{7,8)}。エンドサイトーシスは細胞外因子を取り囲むように小胞を形成し、その小胞は初期エンドソームを構成する。その後、初期エンドソームは後期エンドソームへと変換され、リソソームと融合することで内包された因子を分解する。リソソーム内での因子分解に機能する酵素は、タンパク翻訳の場である小胞体、ERから一旦ゴルジ体に輸送され、その後、初期及び後期エンドソームへと輸送される。この間、エンドソームは融合と分裂を繰り返すことで、それぞれの因子及び分解酵素を正しく、リソソーム分解系路へと導く。

一方、エンドソームの一部はリソソームとの融合前に一部が分離して、再度、細胞膜表面へと輸送される⁹⁾。細胞表面到達後は、エクソサイトーシスを介して細胞膜タンパク質として局在するか細胞外へ因子を放出する。このように、エンドソームは因子の分解と分泌の双方に関与する細胞内小胞として機能し、エンドソームの形成及び輸送異常は様々な病態に関連する。

LROはゴルジ体-エンドソームから分離され、主に分泌系路へと導かれた小胞である。これら分泌小胞は、細胞特異的な役割を付与され、そのもので機能構成単位を構成することから、細胞内小器官に分類される。メラノサイト以外のLROの例としては、血小板濃染顆粒、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を介した抗原提示機能を有する小胞、免疫系の顆粒球やナチュラルキラー(NK)細胞などの溶菌性顆粒、II型肺胞上皮細胞から分泌されるサーファクタント集合体であるラメラ体の小胞が挙げられる¹⁰⁾。

3. メラノソーム形成とメラニン合成

メラニンメラノソーム内で基質であるチロシンから生合成される。この合成は、チロシナーゼ (Tyrosinase)

*岐阜大学工学部化学・生命工学科

や Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) が触媒に働く¹⁰⁾。メラノソームはトランスゴルジネットワーク (TGN) の一部が分離して形成され、まずは極未成熟 (Stage I) メラノソームを構成する。この過程に Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex (BLOC)-1 と呼ばれるタンパク質複合体が関与し、膜表面上でクラスリン被覆による膜の一部の隔離から始まる。なお、Stage I メラノソームには、Tyrosinase や TRP-1 は含まれていない (図 1)。

続いて、Tyrosinase の触媒活性に必要な Cu^{2+} のトランスポーターである ATP7A, Cl^- チャンネルと示唆される OCA2 や、膜融合に関与する Syntaxin, TRP-1 などを含む初期エンドソームが Stage I メラノソームと融合することで Stage II/III メラノソームへと成熟する。この過程には BLOC-2 及び BLOC-3 が関与す

る¹¹⁻¹³⁾。最後に、Adapter Protein-3 (AP-3) の働きにより Tyrosinase がメラノソームへと輸送され、成熟 (Stage IV) メラノソームでメラニンが合成される¹⁴⁾。なお、Tyrosinase は BLOC-2/3 関与の小胞輸送でもメラノソームへ運ばれるとされている。

成熟メラノソーム内で合成されたメラニンは、メラノソームごとメラノサイトから放出され、隣接するケラチノサイトへと取り込まれる。ケラチノサイトへ取り込まれたメラノソームは核近傍に配置され、紫外線からの DNA 損傷を防ぐ役割を担う。すなわち、メラノソームも細胞内小器官のみならず、分泌小胞として機能している^{15,16)}。

HPS はこれら BLOC1 ~ 3 及び AP-3 を構成する因子に異常があるため、メラニン合成に異常をきたす。また、他の LRO の機能不全に起因する病態を併発する²⁾。

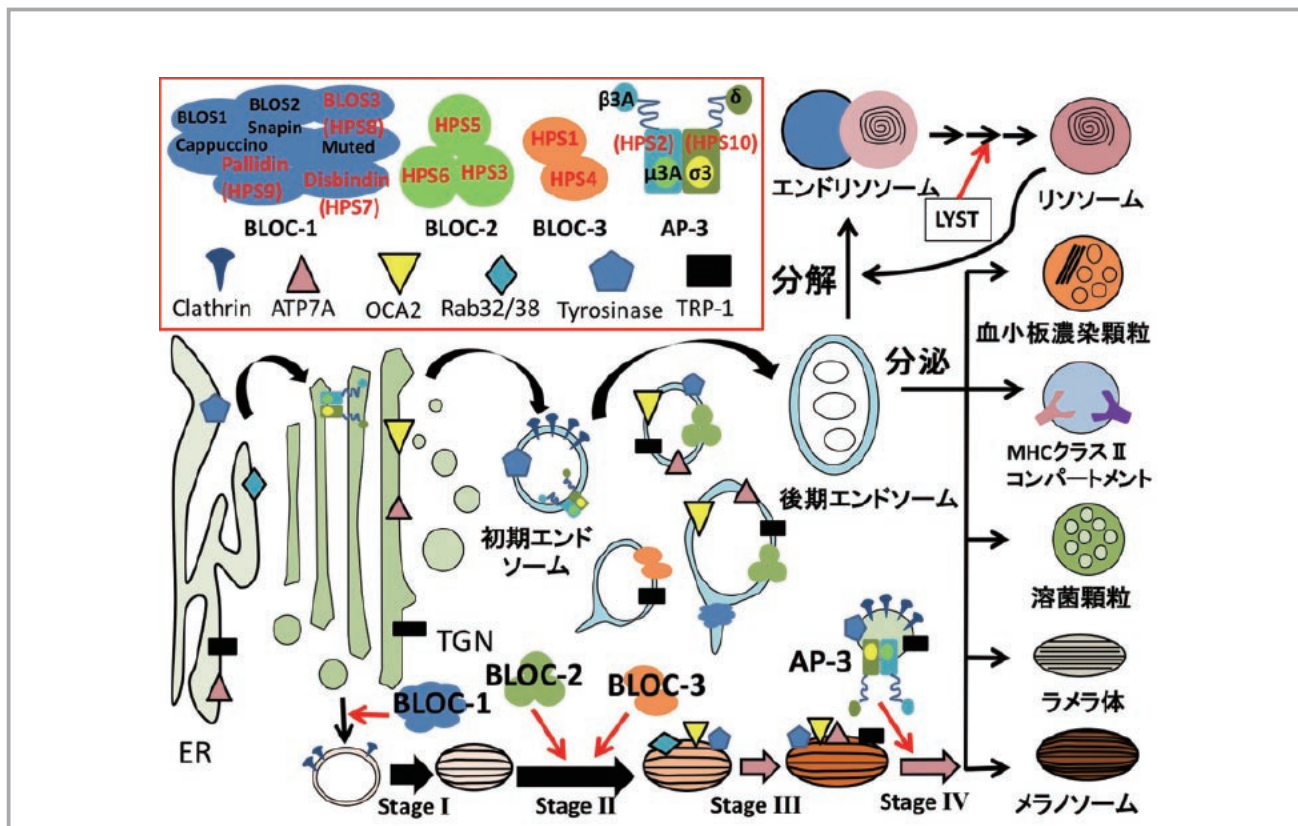


図 1 各 HPS が属するタンパク質複合体と細胞内小胞の形成及び成熟

BLOC: Biogenesis of lysosome-related organelles complex, BLOS: BLOC-1 subunit, TGN: Trans Golgi Network, TRP-1: Tyrosinase-related protein 1, LYST: Lysosomal trafficking regulator, AP-3: Adapter Protein 3 (LAMP-1: Lysosomal Membrane Associated glycoproteins), ATP7A: copper-transporting P-type ATPase (銅輸送タンパクトランスポーター). 以下, Blos1, Blos2, cappuccino, snapin, muted はマウス変異体の名前. OCA2 は Cl^- トランスポーターと示唆されている. Rab32/38 は BLOC3 とともにメラニン合成酵素の輸送に関わる. LYST は、後期エンドソームとリソソームの融合や分裂に関わる Chediak-Higashi Syndrome の責任遺伝子.

4. HPS の全体像

HPS はプエルトリコでの有病率が最も高く、約 1800 人に 1 人の割合で発症する¹⁷⁾。この数字から、異常な遺伝子の保因者は約 21 人に 1 人と計算される。これまでに、HPS は 1 ～ 10 までのサブタイプが報告されており、それぞれの責任遺伝子の産物は、図 1 の 4 つの異なる複合体、BLOC-1 ～ 3 及び AP-3 の構成因子として機能する^{2,18-22)}。

それぞれの複合体を順にまとめると、BLOC-1 は HPS7, 8, 9 が、BLOC-2 は HPS3, 5, 6 が、BLOC-3 は HPS1, 4 で構成されている。また、HPS2, 10 は Adapter protein 3 (AP-3) の構成因子である。これら複合体構成因子はヒトで全ての遺伝子異常が同定されている訳ではなく、マウスのみで変位が同定されている因子もある。これらタンパク質複合体が、メラノソームのみならず、血小板濃染顆粒、アズール顆粒などの LRO 形成・成熟や、それに関わる細胞内小胞輸送に関与する。一方、HPS 遺伝子産物の機能欠損により生じる病態・症状には、属する複合体ごとで共通性が見受けられる。

BLOC-3 機能欠損である HPS1, 4 は HPS の中で最も症状が重篤とされ、特発性間質性肺炎及び肺線維症や肉芽腫性大腸炎などを発症する¹⁷⁾。AP-3 機能欠損の HPS2, 10 もやはり重篤な病態を発症する。一方、BLOC-2 機能欠損である HPS3, 5, 6 は比較的軽微な病態とされる。また、BLOC-1 機能欠損である HPS7, 8, 9 の症例報告は少ないが、軽症に分類される。

HPS の中では HPS1 が最も症例報告が多く、プエルトリコでは HPS の約 25% が HPS1 であることも報告

されている¹⁷⁾。また、HPS 1 はプエルトリコ以外にも世界中で報告がされており、南ヨーロッパやインド、アジアなどの地域で報告確認されている。HPS1 の占める割合は、全 HPS の約 50% とされている。日本においては HPS1, 4, 6, 9 が報告されていたが²³⁾、最近の我々の調査で、新たに HPS5 を同定した²⁴⁾。以下に、現在までに報告されている各 HPS の遺伝子変異部位を病態順に説明する。

5. HPS1/4 (BLOC-3) 変異

HPS1 及び 4 タンパク質は BLOC3 構成因子である。HPS1 患者 (図 2) は、OCA 及び SPD の病態に加え、8 割を超えて肺線維症を発症する²⁵⁾。肺組織においては、リン脂質の沈着と II 型肺胞上皮からのサーファクタント蛋白分泌異常に関連した肥大化ラメラ体が観察される。これらの沈着は、分泌小胞の異常を示唆する。視覚系に関して、光彩及び網膜色素の色素量は必ずしも皮膚との相関は無い。一方、水平方向の眼振が特徴的である^{2,26,27)}。

肺異常の発症及び病態進行は CT 撮影が利用され、30 歳半ばで発症することが多いと報告されている。また、平均死亡年齢は 30 歳後半とされる²⁸⁾。しかし、個々のケースでそれぞれの時期も大きく異なり、喫煙やインフルエンザへの感染などの生活環境の影響も大きい。HPS1 患者の肺疾患に対しては、特発性肺線維症の治療に利用されるピルフェニドン (Pirfenidone) が処方されることもある²⁹⁾。

HPS1 患者の SPD に伴う出血傾向は多くの場合、新

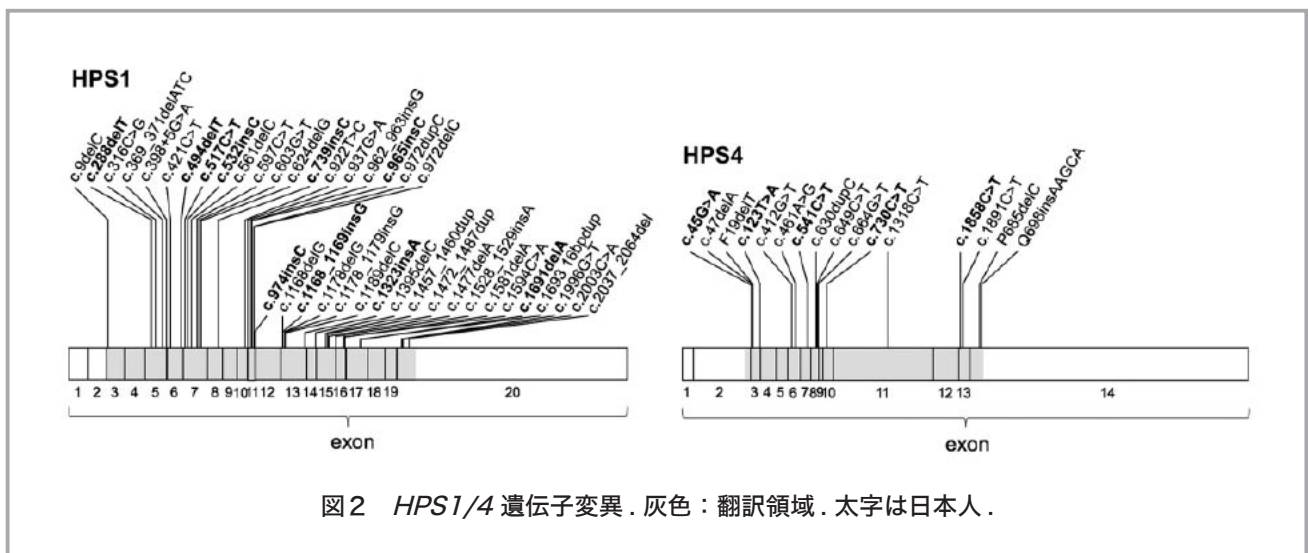


図 2 HPS1/4 遺伝子変異. 灰色：翻訳領域. 太字は日本人.

生児期の歩行開始時期に検出される。止血までにかかる時間は>1時間のこともあり、12時間以上かかるケースもあるとされる。電子顕微鏡像から、血小板濃染顆粒の欠損が観察される。これらのことから、血液凝固抑制作用を有するアスピリンなどの薬剤の利用は避けられる。

これら病態に加え、HPS1患者の約15%では炎症性腸疾患を発症する³⁰⁾。特徴は大腸特異的な肉芽腫様塊を形成する。多くの場合は、外科的治療を必要とする。一方、抗腫瘍壊死因子 α (TNF α) 抗体のインフリキシマブが有効であった例も報告されている³¹⁾。

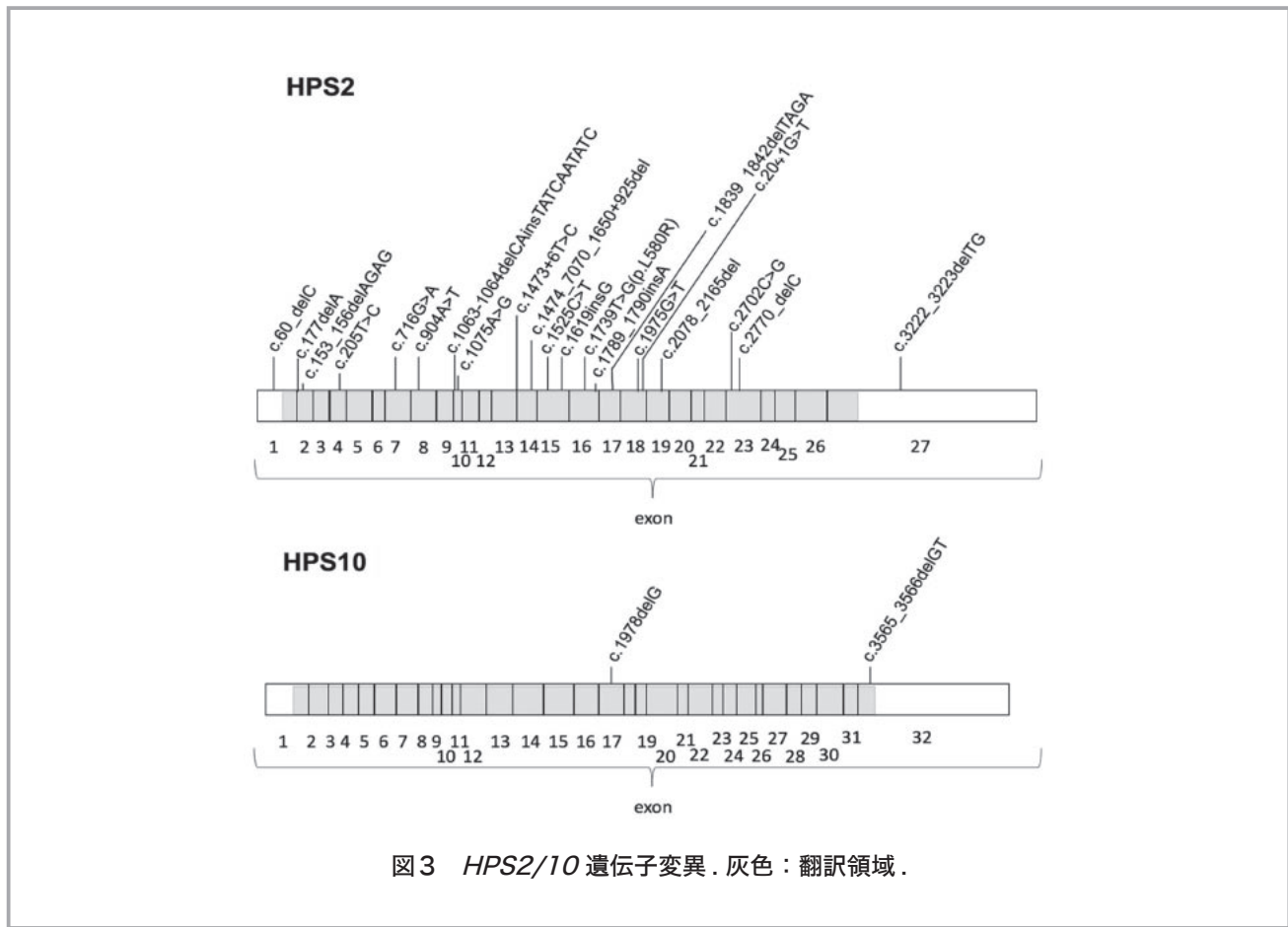
HPS4患者の病態はHPS1患者に近く、OCA, SPD, 眼振, 肺線維症及び炎症性腸疾患を認める³²⁾。また、マクロファージにセルロイド色素が観察されることが特徴である。細胞生物学的検討では、HPS4患者の血小板において、環状ヌクレオシドのATP依存的ポンプであるMRP4 (ABCC4) の細胞内顆粒の局在異常が観察される³³⁾。

6. HPS2/10 (AP-3) 変異

HPS2/10患者の遺伝子変異(図3)は、AP-3複合体

のそれぞれ β 3A因子及び δ をコードするAP3BI及びAP3DIにある^{2,34)}。OCA, SPD及び眼振は他のHPS患者と同様である。他のHPS患者の病態と異なる点は、好中球減少症と再発性感染症が挙げられる。特に呼吸器系への感染症が特徴である。これらの点において、アズール顆粒を欠損することによるNK活性の低下が特徴的なCHSに類似している³⁵⁾。しかし、HPS2患者ではCHSで観察される肥大化細胞内顆粒は見られない。HPS2患者の易感染に対しては、予防的な抗生物質投与やG-CSF投与を行うこともある。

細胞内異常の特徴として、リソソーム系へのタンパク質輸送不全が挙げられる。AP-3複合体が他のHPS因子が担当するタンパク質輸送系とは別の輸送系に関与するため、異常が観察されるタンパク質群に違いが観察される。具体的には、リソソーム輸送系の異常に伴うCD63などの細胞膜表面への局在増加と、メラニン合成酵素Tyrosinaseのメラノソーム局在低下が観察される^{3,36,37)}。一方、TRP1のメラノソーム局在は正常である点が特徴である。しかし、実験動物の生体レベルでの研究では、AP-3複合体欠損でもメラニン合成は正常で



あることも示されており，特殊な培養環境下においてA P-3 機能不全がTyrosinase のメラノソームへの局在不全に繋がる可能性も示唆される³⁸⁾．また他因子への影響としては，トランスフェリン受容体やマンノース6リン酸受容体の細胞膜発現異常も示唆される³⁹⁾．

HPS2 患者の易感染に相関する現象として，細胞障害性T細胞の運動障害を含めた機能低下も挙げられ，血球貪食性リンパ組織症も特徴の1つである．これらは，CHS 及び細胞内輸送に関わる G- タンパク質である *RAB27A* 遺伝子欠損による Griscelli 症候群に類似する．免疫系異常に加えて，神経系の異常も報告されており，バランス感覚や聴覚の異常も見受けられる³⁷⁾．

HPS10 患者は HPS サブタイプとしては最後に同定さ

れた^{21,34)}．症例数が限られていることもあり個別事例となるが，HPS2 と同様な病態を示す．特に，免疫系の異常が共通の特徴であり，NK 細胞の脱顆粒異常も観察される．血中 IgE レベルが高値であることも特徴である．HPS2 患者同様に HPS10 患者も神経系の異常を来とし，発作が見受けられる．

7. HPS3/5/6 (BLOC-2) 変異

HPS3/5/6 タンパク質は BLOC-2 を構成しており(図4)，免疫組織化学染色でもこれらタンパク質の共局在が報告されている．HPS3/5/6 患者の病態は比較的軽症とされ，類似点も多いため，まとめて紹介する^{23,24,40-42)}．患者は北ヨーロッパで同定されることが多く，日本では HPS5

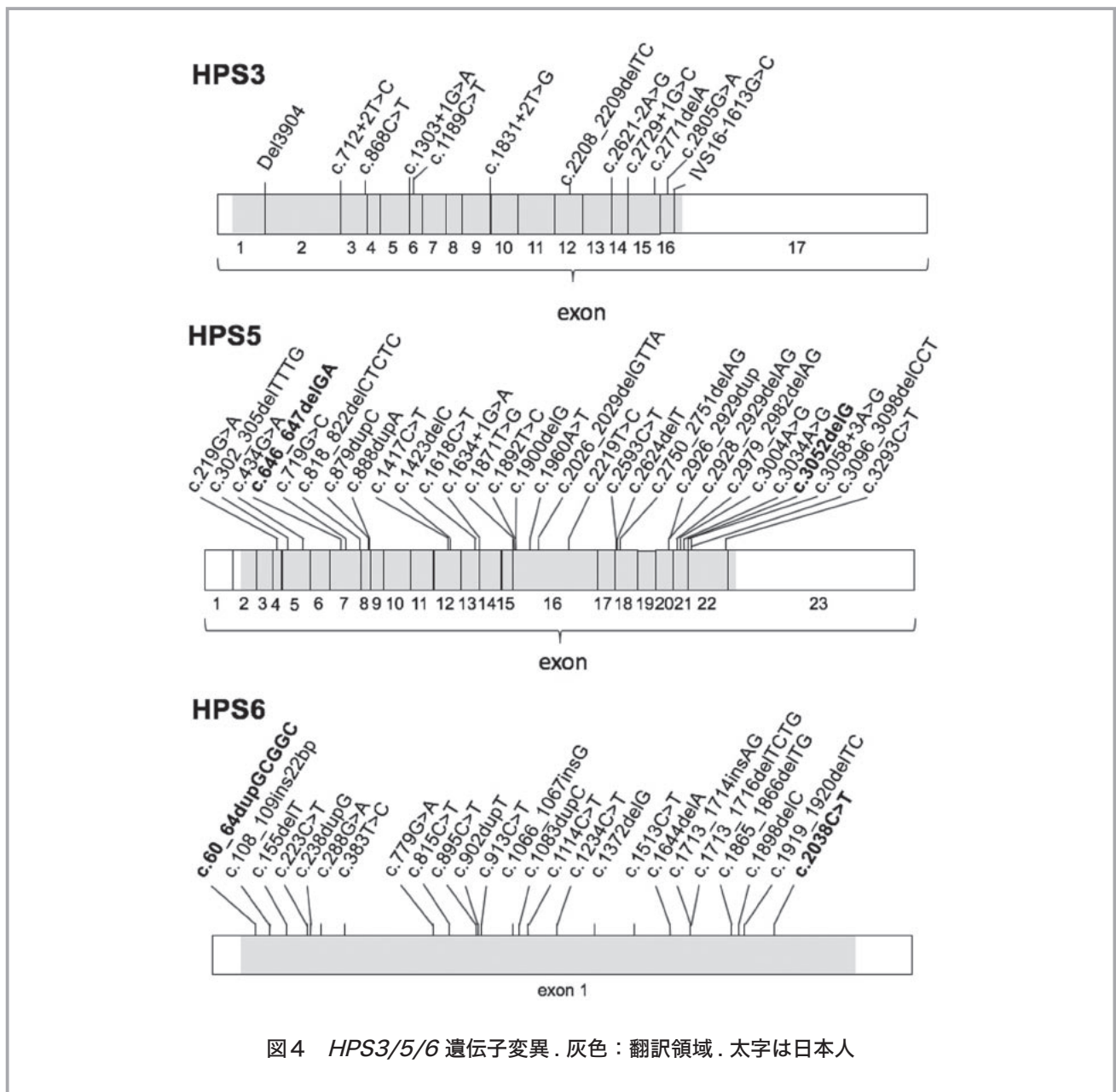


図4 HPS3/5/6 遺伝子変異．灰色：翻訳領域．太字は日本人

と6に各1名が認められている。これらの患者のOCAの度合いもHPS1と比較して軽度である。HPS5/6患者においては眼振がみられる²⁾。

また、これら患者では軽症ではあるが、SPDの特徴である打撲による内出血や鼻血傾向が特徴である。HPS3患者では僅かながらの肺機能低下も観察されるが、HPS5/6患者においては殆ど観察されない。また、HPS3/5/6患者では炎症性腸疾患を発症することもある^{27,43)}。HPS5患者では、血中コレステロール値の上昇や、僅かな中性脂肪値の上昇も観察される。これらが、小胞輸送系の異常によるものか否かは不明である。

8. HPS7/8/9 (BLOC-1) 変異

HPS7/8/9タンパク質はBLOC1複合体の因子である。このBLOC1複合体を構成するタンパク質をコードする遺伝子の変異は、ヒトで全て同定されている訳ではない(図5)。図1に示すように、マウス変異体のみもしくは人為的変異体でのみ表現型解析されている状況にある。また、他のHPSサブタイプ遺伝子と異なり

HPS7/8/9遺伝子には、殆ど変異は同定されていない²⁾。

HPS7/8/9の患者は他のHPS患者同様にOCA、SPD及び眼振の病態を発症する^{19,20,23)}。HPS8の患者のOCAは不完全型と判定されている。SPDに関しては時に輸血を行ったとある。HPS9患者のOCAに関しては、皮膚は白く、髪の毛のコア部分のメラニン色素も低沈着が報告されている。一方で、眼の光彩は茶色とあり極端なメラニン色素欠乏とは言えない。これらHP7/8/9患者の肺の異常は報告されていないが、HPS7患者は呼吸の間隔が短いとされている。また、HPS7患者では大腸に肉芽腫が観察されたとある。

9. ヒトとマウスの共通点・相違点

マウス遺伝学の分野においても、毛色の異常を指標にHPS関連の自然発生突然変異体が数多く分離されている³⁷⁾。マウスはヒトとは異なり、統一した遺伝的背景のもとで個々の遺伝子変異を比較できる。そのため、BLOC-1～3及びAP-3間の相互関係を毛色表現型及び他の病態で詳細に比較できる。

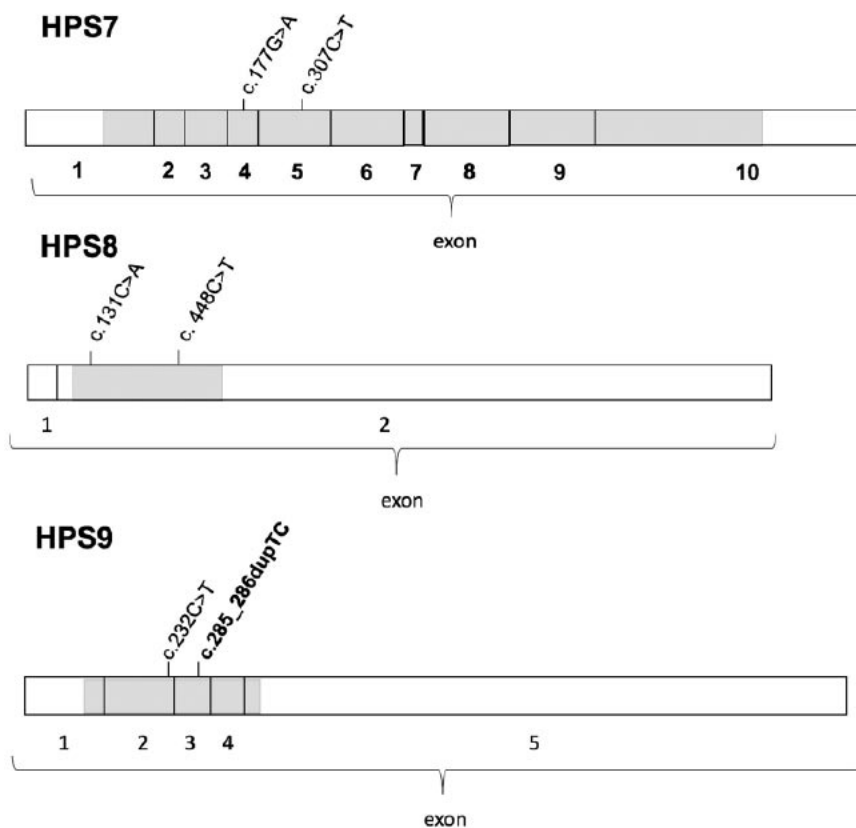


図5 HPS7/8/9 遺伝子変異. 灰色：翻訳領域. 太字は日本人.

マウス系統 C57BL/6 の遺伝背景において、メラニン色素沈着が低下する表現型は、BLOC-1 に異常を有する変異体群が顕著であり、次いで BLOC-2 変異体群が続く³⁸⁾。一方、BLOC-3 異常と AP-3 異常の変異体群は、大きな色素沈着異常は見受けられない。しかし、BLOC-3 変異と AP-3 変異が重なると、BLOC-2 変異に近い低色素沈着を示す。一方、BLOC-3 変異と BLOC-2 変異が重なっても、BLOC-2 単独変異で観察される低色素沈着表現型を大きくは変化させない。このことは、AP-3 と BLOC-3 は全く異なる系路で機能するが、BLOC-2 と BLOC-3 とは作用系路が近いことを示唆する。

ヒト HPS 患者では、全例において OCA が観察される²⁾。また、元々は全てのマウス変異体も、毛色変異体として単離された経緯がある。そのため、茶色個体（野生色：例えば C3H の遺伝的背景）では全ての *Hps* 変異マウスで低色素沈着が観察される⁴⁴⁾。すなわち、C57BL/6 の遺伝背景では *Hps* 変異の表現型が現れにくいと示唆され、ヒト病態の重篤度における遺伝的背景の関与も示唆される。

ヒト HPS 患者における重篤な病態に肺線維症が挙げられる^{45,46)}。しかし、マウスでは肺線維症は単独の *Hps* 変異では発症しない⁴⁷⁾。詳細な検討により、マウス *Hps1* 変異で僅かに肺胞異常が示唆されている。この異常は *Hps1/Hps2* の 2 重変異とすることで、肺胞上皮細胞で肥大化ラメラ体が観察される異常として検出できるようになる⁴⁷⁾。このことは、マウス毛色において BLOC-3 変異と AP-3 変異が重なることで低色素症の表現型が現れる状況に一致する。

加えて、ヒト HPS1 (BLOC-3 変異) 患者でみられる炎症性腸疾患は、マウスでは観察されない²⁷⁾。しかし我々は、飼育マウス集団に、低色素症で仔を保育中に頻繁に下痢をするマウス集団を見出した。マイクロサテライト解析及び遺伝子配列確認の結果、*Hps5* 遺伝子に変異を有することが明らかとなった⁴⁸⁾。しかし、それまでに同定されている複数の *Hps5* 変異マウスでは、下痢の報告はなかった。そこで、飼育環境の違いも考慮して、デキストランサルフェート誘導性の炎症性腸疾患モデルで確認した。その結果、*Hps5* マウスは雌雄を問わず慢性の炎症性腸疾患に移行することが判明した (図 6)。その

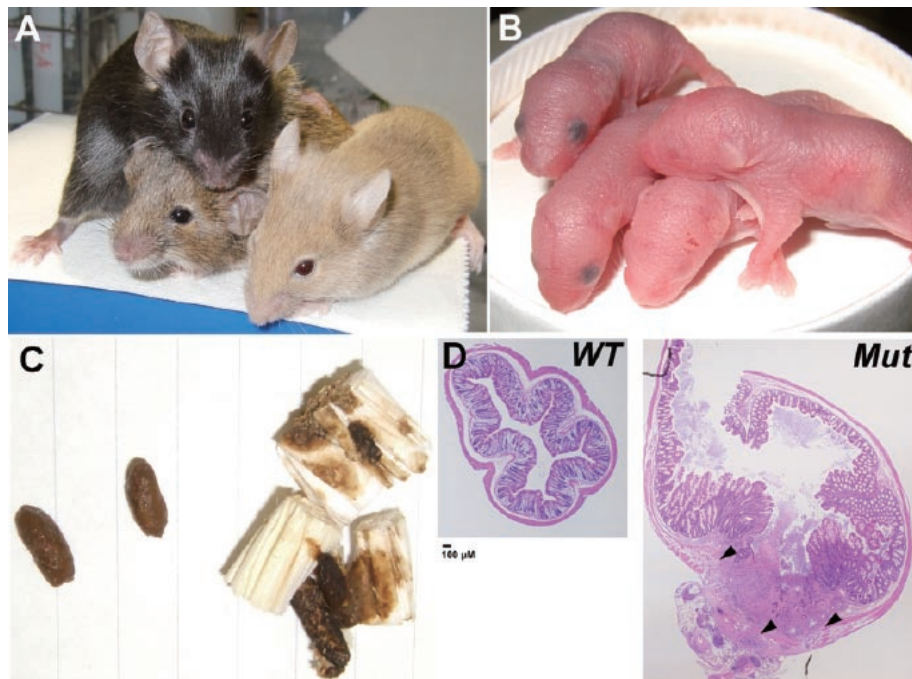


図 6 マウス *Hps5* 変異体で観察される大腸肉芽腫。

A. 左から C57BL/6J (野生型), C3H/HeJ (野生型), C3H/HeJ (*Hps5* 変異体). B. 生後直後の眼の色素異常 (右: *Hps5* 変異体). C. *Hps5* 変異雌の保育中の糞便 (下痢). D. *Hps5* 変異体 (*Mut*) のデキストランサルフェート誘導後に慢性化した炎症性腸疾患 (大腸肉芽腫). 矢印は筋層破壊部分.

病態は、ヒト HPS 患者同様に大腸に肉芽腫を形成するものであった。これらのことは、HPS の病態は遺伝的背景や生活環境に大きく左右されることを示唆するものである。

10. おわりに

HPS は低色素症である OCA を特徴とする症候群である。その原因は、エンドソームのタンパク質輸送異常によるものであり、メラノソームも属する LRO に異常を来すことで、免疫系、呼吸器系、消化器系にも病態が現れる。一方で、ヒトとマウスの HPS 病態の比較から、病態発症には他の遺伝要因や環境因子が左右することも明らかである。

このことを逆にとらえると、HPS 患者の病態は外的要因で制御可能であることを示唆する。そこで我々は、低分子化合物で HPS 患者病態を軽減もしくは治療できるのではないかと考え、メラニン合成を修飾し抗炎症作用を発揮する化合物をスクリーニングした。これまでに、HPS と同様に Tyrosinase や CD63 を低下させる化合物及び、小胞輸送系を促進し炎症性腸疾患を緩和させる興味深い化合物群の取得に成功している。今後は、これら化合物の HPS 特異的な細胞内輸送への影響を検討し、ケミカルバイオロジー的視点から、細胞内小胞輸送系の新たな機構の解明とそれら異常による病態を改善する方法の開発に取り組む予定である。

11. 参考文献

- 1) Hermansky, F. & Pudlak, P.: Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies, *Blood.*, **14**, 162 (1959).
- 2) Wei, ML.: Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function, *Pigment Cell Res.*, **19**, 19 (2006).
- 3) Marks, MS. *et al.*: Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream, *Curr Opin Cell Biol.*, **25**, 495 (2013).
- 4) Rivera-Concepcion, J. *et al.*: Bleeding assessment in female patients with the Hermansky-Pudlak syndrome-A case series, *Eur J Haematol.*, **102**, 432 (2019).
- 5) Summers, CG. *et al.*: Hermansky-Pudlak syndrome. Ophthalmic findings, *Ophthalmology.*, **95**, 545 (1988).
- 6) Nakamura, M. *et al.*: Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: an update, *J Dermatol Sci.*, **69**, 6 (2013).
- 7) Raposo, G. *et al.*: Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation, *Cell Struct Funct.*, **27**, 443 (2002).
- 8) Yordanov, TE. *et al.*: Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BORC) regulates late endosomal/lysosomal size through PIKfyve-dependent phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate, *Traffic.*, **20**, 674 (2019).
- 9) Cullen, PJ. & Steinberg, F.: To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **19**, 679 (2018).
- 10) Delevoye, C. *et al.*: Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system, *Curr Opin Cell Biol.*, **59**, 147 (2019).
- 11) Gerondopoulos, A. *et al.*: BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor, *Curr Biol.*, **22**, 2135 (2012).
- 12) Dennis, MKm *et al.*: BLOC-2 targets recycling endosomal tubules to melanosomes for cargo delivery, *J Cell Biol.*, **209**, 563 (2015).
- 13) Aguilar, A. *et al.*: Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis, *Blood Adv.*, **3**, 2368 (2019).
- 14) Huizing, M. *et al.*: AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes, *Mol Biol Cell.*, **12**, 2075 (2001).
- 15) Matama, T. *et al.*: Hair Coloration by Gene Regulation: Fact or Fiction?, *Trends Biotechnol.*

- 33, 707 (2015).
- 16) Ripoll, L. *et al.*: Myosin VI and branched actin filaments mediate membrane constriction and fission of melanosomal tubule carriers, *J Cell Biol.*, **217**, 2709 (2018).
 - 17) Witkop, C.J. *et al.*: Albinism and Hermansky-Pudlak syndrome in Puerto Rico, *Bol Asoc Med P R.*, **82**, 333 (1990).
 - 18) Wei, A.H. & Li, W.: Hermansky-Pudlak syndrome: pigmentary and non-pigmentary defects and their pathogenesis., *Pigment Cell Melanoma Res.*, **26**, 176 (2013).
 - 19) Morgan, N.V. *et al.*: A germline mutation in BLOC1S3/reduced pigmentation causes a novel variant of Hermansky-Pudlak syndrome (HPS8), *Am J Hum Genet.*, **78**, 160 (2006).
 - 20) Bryan, M.M. *et al.*: Clinical and molecular phenotyping of a child with Hermansky-Pudlak syndrome-7, an uncommon genetic type of HPS, *Mol Genet Metab.*, **120**, 378 (2017).
 - 21) Mohammed, M. *et al.*: Biallelic mutations in AP3D1 cause Hermansky-Pudlak syndrome type 10 associated with immunodeficiency and seizure disorder, *Eur J Med Genet.*, **62**, 103583 (2019).
 - 22) Doubkova, M. *et al.*: Novel genetic variant of HPS1 gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis: a case report, *BMC Pulm Med.*, **19**, 178 (2019).
 - 23) Okamura, K. *et al.*: Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **31**, 267 (2018).
 - 24) Kato, S. *et al.*: New Deletions in the Hermansky-Pudlak Syndrome Type 5 Gene in a Japanese Patient, *reports.*, **2**, 15 (2019).
 - 25) Nazarian, R. *et al.*: Biogenesis of lysosome-related organelles complex 3 (BLOC-3): a complex containing the Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) proteins HPS1 and HPS4, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**, 8770 (2003).
 - 26) Ito, S. *et al.*: High frequency of Hermansky-Pudlak syndrome type 1 (HPS1) among Japanese albinism patients and functional analysis of HPS1 mutant protein, *J Invest Dermatol.*, **125**, 715 (2005).
 - 27) Ishihara, J. *et al.*: Infantile-onset inflammatory bowel disease in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome: a case report, *BMC Gastroenterol.*, **19**, 9 (2019).
 - 28) Gochuico, B.R. *et al.*: Interstitial lung disease and pulmonary fibrosis in Hermansky-Pudlak syndrome type 2, an adaptor protein-3 complex disease, *Mol Med.*, **18**, 56 (2012).
 - 29) Gahl, W.A. *et al.*: Effect of pirfenidone on the pulmonary fibrosis of Hermansky-Pudlak syndrome, *Mol Genet Metab.*, **76**, 234 (2002).
 - 30) Giroit, P. *et al.*: Crohn's-like acute severe colitis associated with Hermansky-Pudlak syndrome: A case report, *World J Gastroenterol.*, **25**, 1031 (2019).
 - 31) Kouklakis, G. *et al.*: Complicated Crohn's-like colitis, associated with Hermansky-Pudlak syndrome, treated with Infliximab: a case report and brief review of the literature, *J Med Case Rep.*, **1**, 176 (2007).
 - 32) Wu, W. *et al.*: A novel mutation causes Hermansky-Pudlak syndrome type 4 with pulmonary fibrosis in 2 siblings from China, *Medicine (Baltimore)*, **98**, e16899 (2019).
 - 33) Masliah-Planchon, J. *et al.*: Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update, *Br J Haematol.*, **160**, 5 (2013).
 - 34) Ammann, S. *et al.*: Mutations in AP3D1 associated with immunodeficiency and seizures define a new type of Hermansky-Pudlak syndrome, *Blood.*, **127**, 997 (2016).
 - 35) de Boer, M. *et al.*: Hermansky-Pudlak syndrome type 2: Aberrant pre-mRNA splicing and mislocalization of granule proteins in neutrophils,

- Hum Mutat.*, **38**, 1402 (2017).
- 36) Peden, AA. *et al.*: Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins, *J Cell Biol.*, **164**, 1065 (2004).
- 37) Bowman, SL. *et al.*: The road to lysosome-related organelles: Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases, *Traffic.*, **20**, 404 (2019).
- 38) Gautam, R. *et al.*: Interaction of Hermansky-Pudlak Syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles, *Traffic.*, **7**, 779 (2006).
- 39) Storch, S. & Braulke, T.: Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3, *J Biol Chem.*, **276**, 4298 (2001).
- 40) Wei, A. *et al.*: NGS-based 100-gene panel of hypopigmentation identifies mutations in Chinese Hermansky-Pudlak syndrome patients, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **29**, 702 (2016).
- 41) Michaud, V. *et al.*: Clinico-molecular analysis of eleven patients with Hermansky-Pudlak type 5 syndrome, a mild form of HPS, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **30**, 563 (2017).
- 42) Sandrock-Lang, K. *et al.*: Novel mutation in two brothers with Hermansky Pudlak syndrome type 3, *Blood Cells Mol Dis.*, **67**, 75 (2017).
- 43) Hussain, N. *et al.*: Intestinal disease in Hermansky-Pudlak syndrome: occurrence of colitis and relation to genotype, *Clin Gastroenterol Hepatol.*, **4**, 73 (2006).
- 44) Nguyen, T. *et al.*: Melanosome morphologies in murine models of hermansky-pudlak syndrome reflect blocks in organelle development, *J Invest Dermatol.*, **119**, 1156 (2002).
- 45) Kelil, T. *et al.*: Hermansky-pudlak syndrome complicated by pulmonary fibrosis: radiologic-pathologic correlation and review of pulmonary complications, *J Clin Imaging Sci.*, **4**, 59 (2014).
- 46) Sanchez-Guiu, I. *et al.*: Hermansky-Pudlak syndrome. Overview of clinical and molecular features and case report of a new HPS-1 variant, *Hamostaseologie.*, **34**, 301 (2014).
- 47) Lyerla, TA. *et al.*: Aberrant lung structure, composition, and function in a murine model of Hermansky-Pudlak syndrome, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, **285**, L643 (2003).
- 48) Itoh, Y. *et al.*: Simple chronic colitis model using hypopigmented mice with a Hermansky-Pudlak syndrome 5 gene mutation, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **29**, 578 (2016).

総 説

Unstructured領域から始まるプロテアソームによる蛋白質分解 Proteasome-mediated protein degradation initiated from unstructured region

伊野部 智由*

1. はじめに

細胞内の蛋白質濃度は、合成だけでなく分解によっても制御される。真核細胞のサイトゾルや核では、このような分解の多くはユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)によって行われる。UPSのコアとなるプロテアソームは巨大蛋白質複合体の分解装置であり、単にミスフォールドしたりダメージを受けた蛋白質を分解するだけでなく、数百にも上る細胞機能の調節蛋白質の濃度を制御している。したがって、プロテアソームは分解すべき蛋白質と、分解すべきでない蛋白質を厳密に見分けている。本稿では、プロテアソームの厳密な基質認識のメカニズムについて、最近の研究進捗状況を概説する。さらに新規基質認識メカニズムを利用した、人工的な分解制御方法についても概況を述べる。

プロテアソーム基質選択の基本メカニズムが、ここ十年ほどで明らかとなってきた。33個の異なるサブユニットよりなるプロテアソームは、3つの異なるアミノ酸配列特異性を持った分解活性部位を内包し、様々な蛋白質を分解することができる。分解活性部位は外部から隔離された内腔にあることから、プロテアソームは基質の分解活性部位へのアクセスを制御することにより、その分解機能を制御している。プロテアソームの標的となるほとんどの蛋白質は、ユビキチン分子により標識されている。プロテアソームはユビキチンシグナルを認識し、蛋白質の非構造領域(Unstructured領域)から分解を開始する。基質蛋白質はUnstructured領域から順次アンフォールドされ、分解活性部位まで送られる。このようなプロテアソームの基質認識メカニズムが明らかになってきたが、依然として多くの疑問が残っている。例えば、プロテアソームはどのようにして蛋白質複合体の一つのサブユニットだけ分解することができるのか？ユ

ビキチン鎖に非依存的に分解される蛋白質はどのように分解されるのか？Unstructured領域のない蛋白質はどのように分解されるのか？これらの疑問に対する答えが、最近の構造学的、生化学的研究により明らかになってきている。さらにこのような新たな知見に基づいた、蛋白質分解の制御方法も次々と考案されている。

2. プロテアソーム

プロテアソームは20Sコア粒子(CP)と制御粒子(RP)に分けられる。20S CPは7量体リングが4つ積み重なった円筒形をしており、内側の2つのβリングは大きな内部空洞を形成し、各リングの3つのβサブユニットは蛋白質分解活性を持つ。αリングはβリングを挟み込むように配置され、αリングの上部の孔を介して、βリングの形成する蛋白質分解内腔につながっている。αリングからβリングにつながるチャネルは狭く、折りたたまれた蛋白質は通過できない。遊離20S CPでは、さらにαサブユニットのN末端がチャネル入口をゲートのように入ふさぐため、小さなペプチドでさえも分解が阻害される。

αサブユニットN末端のゲートを開放させるRPによって、20S CPは活性化される。4種のRPが知られているが、その中で最もよく理解され分解に関わっているのは19S RPである。19S RPは19個のサブユニットから構成され、約900 kDaの分子量をもつ。20S CPに1個あるいは2個19S RPが結合した複合体は26Sプロテアソームとよばれ、細胞内プロテアソームの一般的な形態となる。19S RPが基質蛋白質を認識し、それをアンフォールドしてCPに送り込むことにより、蛋白質の分解・断片化が起こる。

高解像度の26Sプロテアソームの構造は長らく不明

*富山大学学術研究部工学系

であったが、最近の電子顕微鏡技術の発展により、20S CPに結合した19S RPの高解像度立体構造が明らかとなり、プロテアソーム研究に大きなブレイクスルーが起きている¹⁾。

19S RPの心臓部は、基質をアンフォールドし20S CPに送り込むモーターとして働く6つのATPaseサブユニット(Rpt1-Rpt6)のリングである。ATPaseサブユニットリングの中心のATPaseチャンネルは20S CPのチャンネルに続き、基質蛋白質の通り道となる。ATPaseサブユニットのC末端部は20S CPにドッキングし、20S CPのゲートを開かせる。19S RPには、ATPaseサブユニットリングを基盤として、3つのユビキチン受容体(Rpn1, Rpn10, Rpn13)や、脱ユビキチン化活性をもつサブユニットが集合している。3つのユビキチン受容体は連携してユビキチン化蛋白質を認識する。認識されたユビキチン化蛋白質がATPaseサブユニットの作用によりATPaseチャンネルに引き込まれると、チャンネル上部に位置する脱ユビキチン化活性をもつRpn11によってユビキチン鎖が除去される。このように蛋白質分解に必要な活性は、プロテアソームの長軸チャンネルに沿って順番に並べられている。19S RPの残りの部分は7量体を形成し、ATPaseリングを側面から覆うように、Rpn2およびユビキチン受容体Rpn10と、20S CPの α リングと相互作用してクランプのように働いている。このクランプは19S RPと20S CPの結合を安定化させるとともに、19S RPと20S CPの間のアロステリックな機能調整に関わっていると考えられる。電子顕微鏡像や生化学的実験により、ATPの結合や加水分解が26Sプロテアソームの大きな立体構造変化をもたらし、基質認識から分解に至るまでの各ステップを制御していることが分かっている¹⁾。

プロテアソーム構成サブユニットに加えて、プロテアソームに一時的に結合する、脱ユビキチン化酵素Ubp6(哺乳類ではUSP14)およびUCH37や、シャトル因子Rad23(HR23A/B)、Dsk2(UBQLNs)、Ddi1(DDI1/2)が、分解において補助的な役割を果たす。さらにプロテアソームは、Cdc48(p97/VCP)などの上流因子とも協力している。

3. ユビキチン化

プロテアソームにより分解される蛋白質のほとんどは、ユビキチン標識によってプロテアソームにターゲティングされる。ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の連続的な働きにより、ユビキチンが標的蛋白質に取り付けられる。ほとんどの場合、ユビキチンC末端カルボキシル基はリジン残基の ϵ アミノ基とイソペプチド結合を形成するが、基質N末端アミノ基やシステイン残基に結合することもある。最初に結合したユビキチンのリジン残基に2番目のユビキチンが結合し、さらに3番目4番目のユビキチンが同様に前のユビキチンに結合してポリユビキチン鎖を形成することが多い。また標的蛋白質の複数箇所にユビキチンが結合することもある。細胞内にはユビキチン鎖を除去する脱ユビキチン化酵素(DUB)も多数存在し、ポリユビキチン鎖の形成と同時にユビキチン鎖の除去も行われている。

酵母細胞内では数千もの蛋白質がユビキチン化されるものの、その半分ほどはプロテアソームにより分解されるわけではない。48番目のLys残基を介して4つ以上のユビキチンが結合したポリユビキチン鎖が、プロテアソームによる分解のシグナルであると長らく信じられてきた。一つのユビキチンが結合するモノユビキチン化やユビキチンの63番目のLysを介して連結したポリユビキチン鎖は膜輸送に関係している。またユビキチンのN末端とC末端が連結した直鎖状ポリユビキチン鎖はシグナル伝達に関わっている。分岐したユビキチン鎖も見つかっており、Lys63連結鎖とLys11連結鎖の分岐ポリユビキチン鎖は細胞周期の制御に関与している。しかしながらユビキチン鎖の区別は厳密ではなく、Lys63連結ポリユビキチン鎖や複数のモノユビキチン修飾は、特定の条件でプロテアソームによる分解のシグナルとなる。最近の研究によって、細胞内のプロテアソームは直接ポリユビキチン化蛋白質を捕捉して分解するのではなく、多くが上流因子やシャトル蛋白質を介してプロテアソームに受け渡され分解されることが分かった。上流因子Cdc48のコファクターであるNpl4がプロテアソームのLys48連結ユビキチン鎖の選択性を決定しているらしい²⁾。

4. 第二のプロテアソーム分解シグナル

4-1. Unstructured 分解開始領域

プロテアソームは、ポリユビキチン鎖を介して基質を認識し結合するが、分解は基質にあるフラフラと特定構造をとらない Unstructured 領域から開始する。基質蛋白質は、ユビキチン鎖を介して 19S RP に認識されると、ATPase チャンネルに引き込まれ、アンフォールドされる。その後、アンフォールドされた基質は 20S CP に送り込まれ分解される。ATPase チャンネルは小さな蛋白質でも入り込めないほど狭いため、最初に入り込むことができるのは Unstructured 領域だけであり、Unstructured 領域がアンフォールディング反応の開始起点となる³⁾。Unstructured 領域は、古細菌や細菌のプロテアソームホモログの基質にある分解シグナルと同じ働きをすると考えられる。プロテアソームでは ATPase チャンネル入口から約 30～40 Å のところにある、リング内側に並んだ可動ループにより Unstructured 領域が認識される。可動ループに到達するには、少なくとも 20～30 アミノ酸残基の長さの Unstructured 領域が必要となる。この必要な長さは、モデル基質を用いた *in vitro* 分解実験の結果と一致する⁴⁾。このように Unstructured 領域が ATPase 可動ループに認識されると、そこを起点にポリペプチド鎖に沿って引張り力が加えられ、蛋白質は順次アンフォールドされ、20S CP に送り込まれて分解される。

4-2. Unstructured 分解開始領域の特徴

効率的な分解には Unstructured 領域が必要であるが、十分な長さの Unstructured 領域とプロテアソーム結合ドメイン（ポリユビキチン鎖など）の両方を持つにもかかわらず、プロテアソームにより分解されない蛋白質がいくつかある。分解されない蛋白質と分解される蛋白質の Unstructured 領域のアミノ酸配列には、何らかの違いがあると予測される。そこで我々は Unstructured 領域のアミノ酸配列について、その分解誘導効果を調べた。まず十数個のアミノ酸配列を調べたところ、配列の複雑度と分解の受けやすさの間に相関があることを見いだした。つまり複雑なアミノ酸配列から構成される Unstructured 領域をもつ蛋白質だけがプロテアソームによって分解される⁵⁾。さらに数百に及ぶアミノ酸配列を調べたところ、配列の複雑度に加えて、

Unstructured 領域の疎水性と電荷、柔らかさが分解と関係があることが分かった。即ち疎水的で非極性で堅い Unstructured 領域は効率的な分解を誘導し、親水的で酸性でゆらぎの大きな柔らかい Unstructured 領域は分解を誘導しない⁶⁾。

実際プロテアソームによる分解をまぬがれることが出来る蛋白質の Unstructured 領域のアミノ酸配列には偏りがある。例えば E2 酵素である Cdc34 は、ポリユビキチン化され、C 末端に長い Unstructured 領域を持つにもかかわらず、分解を免れる。その Unstructured 領域は酸性アミノ酸残基に偏った配列になっているため、Unstructured 領域からの分解開始が阻害されたのであろう。Cdc34 や、同じく偏った配列の Unstructured 領域をもつ Rad23 に、偏りのない複雑な組成の Unstructured 領域を取り付けると、効率的に分解されるようになったことから、分解を誘導するためには複雑なアミノ酸組成を持つ Unstructured 領域が必須であるといえる⁵⁾。

さらなる確証を得るために、マウス蛋白質約 6000 種類において、その寿命（半減期）と Unstructured 領域のアミノ酸配列の関心のバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、蛋白質末端に複雑なアミノ酸配列の Unstructured 領域をもつ蛋白質の寿命は、末端に Unstructured 領域を持たない蛋白質より 4～8 時間ほど短いことがわかった。一方末端に偏りのあるアミノ酸配列の Unstructured 領域を持つ蛋白質は、持たない蛋白質に比べ、ほとんど寿命の差は無い。このことから細胞内蛋白質のプロテアソームによる分解の受けやすさも、Unstructured 領域のアミノ酸配列の複雑さから説明することができる⁵⁾。

このようなプロテアソームの Unstructured 領域配列の嗜好性は、ATPase チャンネルの特性に由来すると考えられる。疎水的な配列は疎水的な可動ループに認識されやすい。酸性アミノ酸残基は負に帯電した ATPase チャンネルの内壁と反発するだろう。また堅い Unstructured 領域はフラフラと逸れることなくチャンネルをくぐり抜け、ATPase 可動ループに到達することができるだろう。認識に適した多様な特徴を持ち合わせた配列は、自然と複雑度の高い配列になるのであろう。

プロテアソームは、基質蛋白質のポリユビキチン鎖

と Unstructured 領域の両方を認識して初めて効率的に基質蛋白質を分解する。そのため基質蛋白質上でのポリユビキチン鎖のようなプロテアソーム結合ドメインと Unstructured 領域の立体的な配置が重要で、プロテアソーム上のそれぞれの受容体の配置と一致する必要がある。この関係は、プロテアソーム結合ドメインと Unstructured 領域の間に様々な長さのスペーサーを挿入したモデル蛋白質を用いて実験的に示された⁴⁾。プロテアソーム結合ドメインと Unstructured 領域の間の距離が短すぎても、離れすぎていても分解されることはなく、ちょうどそれぞれの受容体の距離に相当するスペーサーを入れたときにだけ効率的な分解が観測された。

4-3. 蛋白質複合体の分解

これらの Unstructured 領域に関する知見に基づき、細胞内の蛋白質複合体の分解を説明することができる。蛋白質複合体のサブユニット特異的な分解において、Unstructured 領域の性質は分解の決定要因になる。サイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (Cdk)-Cdk 阻害因子複合体の周期的な構成サブユニットの分解は、Unstructured 領域のアミノ酸配列と位置を考慮することにより説明できる。この三者複合体のうち、一つのサブユニットだけ分解されるのは、そのサブユニットの Unstructured 領域だけが、分解に適切なアミノ酸配列をもち、適切な位置に配置されているからだろう。またターゲット蛋白質をプロテアソームに運び込む Rad23 などのシャトルアダプター蛋白質の安定性も説明できる。アダプター蛋白質にも Unstructured 領域があるが、その位置や長さ、アミノ酸配列のいずれかが、上記の効率的分解のための条件を満たしていない。そのためアダプター蛋白質は分解を免れ、ターゲット蛋白質のみ分解されるのだろう。

4-4. ユビキチン非依存的分解基質

ユビキチン非依存的に 26S プロテアソームにより分解される蛋白質 (ODC や Rpn4, APOBEC3G など) も、分解を引き起こす条件を備えた Unstructured 領域を持ち、実際この Unstructured 領域が分解シグナルとなる。おそらくユビキチン非依存的分解基質の Unstructured 領域は非常に強く ATPase チャンネル可動ループに結合するため、ポリユビキチン鎖が不要なのであろう。このことから、プロテアソームによる蛋白質分解において、

Unstructured 領域の性質はユビキチン鎖以上に重要であることがうかがい知れる。

5. プロテアソーム上流因子 Cdc48 によるアンフォールディング

一部の蛋白質のプロテアソームによる分解には、Cdc48 (p97/VCP) の補助が必要となる。Cdc48 は、ユビキチン受容体として働く調節因子 Ufd1 (UFD1L) や Npl4 (NPLOC4) などと協調して働く⁷⁾。分解に Cdc48 の助けが必要な蛋白質のほとんどは、膜蛋白質や蛋白質複合体のサブユニットである。実際、Cdc48 は小胞体関連蛋白質分解 (ERAD) に関わる蛋白質として知られている。他にも膜結合性前駆体として合成される転写因子 Spt23 および Mga2 は、Cdc48 依存的にプロテアソームにより部分的な分解を受け、膜から遊離し活性化される⁸⁾。

Cdc48 は、Unstructured 領域を元々含まない強固な蛋白質をアンフォールドすることができる^{9,10)}。Rapoport らは Cdc48 がポリユビキチン鎖に直接働きかけ、ユビキチンからアンフォールドを開始することを示した。高解像度の電子顕微鏡による研究で、Lys48 連結ポリユビキチン鎖の一つのユビキチンが、N 末端側から Cdc48 に引き込まれアンフォールドしている様子が観察されている¹⁰⁾。このアンフォールディングを起点に、イソペプチド結合を介してつながったユビキチンや基質蛋白質が、連鎖的に Cdc48 によりアンフォールドされると思われる。

上記のようなアンフォールディングにより、Cdc48 はプロテアソームが認識することのできる Unstructured 領域を作っているのであろう⁹⁾。そのためプロテアソームは、より多くの蛋白質を分解できるようになる。例えば、細胞内においてはユビキチン融合分解経路で分解される緑色蛍光蛋白質の N 末端にユビキチンが結合したキメラ蛋白質は、*in vitro* の系では精製プロテアソームによっては分解されない。しかしながら細胞内では、Cdc48 の作用によりアンフォールドされることによりできた Unstructured 領域を起点にしてプロテアソームにより分解されるのだろう。一部の古細菌の Cdc48 は 20S CP と直接複合体を形成し、基質蛋白質の分解に関わっている¹¹⁾。進化的には元々 Cdc48 は、

19S RP とは異なる蛋白質群をアンフォールドするための代替 RP として働き、分解に直接関与していたのだろう。

6. 分解の人工制御

UPS による蛋白質分解の人工制御方法が、基礎研究だけでなく臨床においても注目されている。実際最も単純な分解制御方法となる、ボルテゾミブやカルフィルゾミブなどのプロテアソーム阻害剤は、有効なガン治療薬として承認されている。しかしながらそのようなプロテアソーム阻害剤は、本来分解されるべき蛋白質の分解まで止めてしまい、細胞機能に対する影響は大きく、医薬品としての副作用は無視できない。そのため特定の蛋白質を標的にした分解制御方法の開発が求められている。プロテアソームによる分解のターゲティングは、上述のようにポリユビキチン鎖と Unstructured 領域により決定される。そのためポリユビキチン化と Unstructured 領域の制御による、蛋白質特異的な分解制御方法が注目され、現在盛んに研究されている。

蛋白質特異的なユビキチン化を誘導する proteolysis-targeting chimeras (PROTAC) をはじめ、さまざまな誘導性分解システムが開発されており、臨床での利用が期待されている。PROTAC の場合、標的蛋白質とユビキチンリガーゼとの相互作用を仲介するアダプター小分子により、標的蛋白質のポリユビキチン化を誘導し分解に導く¹²⁾。しかしながら、基質蛋白質のどこで、どのようなユビキチン化が起こるのか正確に理解されておらず、また取り付けられたポリユビキチン鎖がプロテアソームにのみターゲティングできるかも分からない。実際、ターゲット蛋白質に結合しているにもかかわらず、ターゲットの分解を引き起こさない PROTAC もある。1つの可能性として、ユビキチン化はされるが、有効な Unstructured 領域を持たないならば、標的蛋白質の分解誘導は期待できない。したがって、Unstructured 領域による分解開始を考慮に入れた分解制御システムの設計が必要となる。

我々は、Unstructured 領域に着目した分解の人工制御方法の開発を行っている。分解の最終決定因子である Unstructured 領域のプロテアソームへのアクセスを加速させたり、阻害したりすることによって、標的蛋白質の特異的な分解制御（分解誘導と分解抑制）が可能になる

と考えられる。

我々の研究で、ユビキチン化されていない蛋白質でも、人工アダプター蛋白質を介してプロテアソームに運び込まれ、分解されることがわかった¹³⁾。標的蛋白質と特異的に結合する蛋白質と、プロテアソーム結合ドメインを融合したアダプター蛋白質は、標的蛋白質をプロテアソームに運び込み、その分解を促進した。Unstructured 領域を除くなどすれば、アダプター蛋白質自身は分解されず、繰り返しターゲット蛋白質をプロテアソームに運びこみ、分解を誘導する。

有効な Unstructured 領域を標的蛋白質へ取り付ければ、標的蛋白質の分解を誘導することができる。実際、ユビキチン非依存的に分解される蛋白質（ODC など）の Unstructured 領域を遺伝的にターゲット蛋白質に融合した蛋白質は、Unstructured 領域依存的にプロテアソームにより分解されるようになる。我々は、遺伝子改変なしでも、特定蛋白質の分解誘導するために、Unstructured 領域ペプチドの標的蛋白質への付加反応を試みている。まずは Unstructured 領域の付加のために、ポリユビキチン化反応を利用した。Unstructured 領域をユビキチンの N 末端に取り付けた Unstructured 領域融合ユビキチンが、ユビキチン化反応により標的蛋白質に結合し、その蛋白質の分解を促進することを確認している¹⁴⁾。ケミカルバイオロジー的な手法により Unstructured 領域を任意の蛋白質に取り付けることができるようになれば、臨床応用も期待できる。

分解を引き起こす Unstructured 領域の性質を、リガンドの結合や修飾により変化させれば、特定蛋白質の分解を抑制できる¹⁵⁾。我々は Unstructured 領域に結合する小分子や抗体、リガンドにより、特定蛋白質の分解を阻害することができることを示した。分解を誘導する Unstructured 領域は基質蛋白質毎に異なっていることから、Unstructured 領域を狙った分解阻害方法は、既存のプロテアソーム阻害剤等に比べて、遙かに蛋白質特異性は高く、今後の応用活用が期待される。

7. おわりに

最近の UPS の分子メカニズムの研究の結果、UPS による蛋白質の分解が、これまで考えられていた以上に複雑で多層的に制御されていることが明らかとなっ

た、ユビキチン標識は蛋白質をプロテアソームに運び込むことができるが、プロテアソームが分解を開始するために Unstructured 領域も認識される必要がある。Unstructured 領域認識による分解開始のステップは、プロテアソームがどの蛋白質を分解するかを基質選択の最終段階を担っている。プロテアソームが認識する Unstructured 領域の特徴も次第に明らかとなっており、その特徴は細胞内の蛋白質の安定性に大きな影響を与えているらしい。Unstructured 領域をターゲットにした人工的な分解制御法の開発も精力的に行われており、今後の臨床応用が期待される。しかしながら Unstructured 領域が細胞内の複雑な環境下でどのように機能するかを理解する上では、さらなる研究が必要である。Unstructured 分解開始領域の研究は、主にモデル蛋白質を使用して行われており、これまでの知見が細胞内の蛋白質の分解安定性にもあてはまるか、今後システムワイドな研究を行い、注意深く検証する必要がある。今後のさらなる Unstructured 分解開始領域の研究は、細胞機能における Unstructured 領域の役割を明らかにし、より深い UPS の蛋白質分解メカニズムの理解と分解制御法の開発につながるだろう。

References

- 1) J.A.M, Bard. *et al.*: Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem.*, **87**, 697-724 (2018).
- 2) H, Tsuchiya. *et al.*: In Vivo Ubiquitin Linkage-type Analysis Reveals that the Cdc48-Rad23/Dsk2 Axis Contributes to K48-Linked Chain Specificity of the Proteasome. *Mol Cell.*, **66**, 488-502 e487 (2017).
- 3) T, Inobe. & A, Matouschek.: Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr Opin Struct Biol.*, **24**, 156-164 (2014).
- 4) T, Inobe., S, Fishbain., S, Prakash. & A, Matouschek.: Defining the geometry of the two-component proteasome degron. *Nat Chem Biol.*, **7**, 161-167 (2011).
- 5) S, Fishbain. *et al.*: Sequence composition of disordered regions fine-tunes protein half-life. *Nat Struct Mol Biol.*, **22**, 214-221 (2015).
- 6) H, Yu. *et al.*: Conserved Sequence Preferences Contribute to Substrate Recognition by the Proteasome. *J Biol Chem.*, **291**, 14526-14539 (2016).
- 7) N.O, Bodnar. *et al.*: Structure of the Cdc48 ATPase with its ubiquitin-binding cofactor Ufd1-Npl4. *Nat Struct Mol Biol.*, **25**, 616-622 (2018).
- 8) D, Xia., W.K, Tang. & Y, Ye.: Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. *Gene.*, **583**, 64-77 (2016).
- 9) N.O, Bodnar. & T.A, Rapoport.: Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell.*, **169**, 722-735 e729 (2017).
- 10) E.C, Twomey. *et al.*: Substrate processing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin unfolding. *Science.*, **365**, eaax1033 (2019).
- 11) D, Barthelme. & R.T, Sauer.: Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science (New York, NY).*, **337**, 843-846 (2012).
- 12) K.M, Sakamoto. *et al.*: Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 8554-8559 (2001).
- 13) S, Prakash., T, Inobe., A.J, Hatch. & A, Matouschek.: Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat Chem Biol.*, **5**, 29-36 (2009).
- 14) T, Inobe., M, Tsukamoto. & M, Nozaki.: Proteasome-mediated protein degradation is enhanced by fusion ubiquitin with unstructured degron. *Biochem Biophys Res Commun.*, **501**, 948-954 (2018).
- 15) K, Takahashi., A, Matouschek. & T, Inobe.: Regulation of Proteasomal Degradation by Modulating Proteasomal Initiation Regions. *ACS Chem Biol.*, **10**, 2537-2543 (2015).

酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究

細胞透過性人工リコンビナーゼタンパクによる高効率で安全なゲノム編集法の開発

飯島 健太

(名古屋大学大学院医学系研究科)

【目的】

近年、後天性免疫不全症候群の完治を目的として、ゲノム編集技術を用いたプロウイルス DNA の除去や HIV エントリーコレセプターである CCR5 遺伝子破壊が試みられている。従来のゲノム編集で利用されるヌクレアーゼは、DNA 鎖切断を生じるが DNA 損傷修復経路により速やかに修復されるため、遺伝子破壊効率が低いのみならず、染色体異常を誘発するリスクを伴う。またウイルスベクターによる核酸導入は染色体 DNA への挿入リスクなどから臨床での利用には不安が残っている。

本研究では HIV 感染において重要な CCR5 遺伝子を破壊するために CCR5 特異的人工リコンビナーゼを開発する。人工リコンビナーゼは自身の酵素活性のみで組換え反応が完結するため、遺伝子破壊効率が優れるとともに、切断 DNA 末端を露出しないため安全性が高い。さらに本研究では当研究部で開発した優れた細胞透過性を示す核指向性ペプチド NTP を人工リコンビナーゼに付与することで、核酸を導入しない安全性の高い技術開発を目指す¹⁾。

【方法】

Cre, および HIV-LTR を標的とした人工リコンビナーゼである Brec1 の NTP 付加型組換えタンパク質を精製し、*in vitro*, および細胞培養系での活性を評価する。また CCR5 遺伝子を標的とした人工リコンビナーゼを獲得するために、試験管内分子進化法により Cre リコンビナーゼの標的配列特異性を修飾する²⁾。

【結果】

NTP を付加した Cre, Brec1 を高純度にて精製し、*in vitro* での基質 DNA, および、細胞培養系への添加時に

おける機能性を明らかにした。CCR5 遺伝子を標的とした人工リコンビナーゼの開発は、当初の想定よりも配列特異性の修飾が困難であり、目的とする人工リコンビナーゼの獲得には至らなかった。

【考察】

遺伝子治療において、従来のヌクレアーゼよりもリコンビナーゼは優れた特長を持つことから、さらに大規模に人工リコンビナーゼ開発を展開することで、より安全で有用な遺伝子治療法を導出することが可能であると考えられる。

【文献】

- 1) Takashina, T. *et al.*: Identification of a cell-penetrating peptide applicable to a protein-based transcription activator-like effector expression system for cell engineering, *Biomaterials.*, **173**, 11-21 (2018).
- 2) Karpinski, J. *et al.*: Directed evolution of a recombinase that excises the provirus of most HIV-1 primary isolates with high specificity, *Nat Biotechnol.*, **34**, 401-409 (2016).

膵β細胞のインスリン分泌シグナル形成障害およびβ細胞消失の過程におけるmetabolic reprogrammingを担う糖代謝関連代謝酵素の役割の解析

石原 寿光

(日本大学医学部)

【目的】

グルコースによる膵β細胞からのインスリン分泌には、グルコースの代謝が必要であり、その大まかな枠組みについては、コンセンサスが得られている。しかし、グルコース代謝の過程の詳細およびその2型糖尿病発症過程の障害・変化の詳細は、未だ不明である。

【方法】

そこで、グルコース代謝に重要な遺伝子発現をインスリン分泌細胞で修飾し、2型糖尿病におけるインスリン分泌障害と同様な変化が認められるかを検討した。そして、インスリン分泌への影響を裏打ちする代謝の変化としてのメタボロームの変容を解析した。具体的には、開発中のインスリン分泌 MIN6 細胞の改変体で、遺伝子発現修飾を効率良くできるようにした細胞において、解糖系の酵素である glucokinase (Gck), phosphoglycerate kinase (Pgk1), 解糖系産物 pyruvate を TCA サイクルに繋げる pyruvate dehydrogenase の触媒サブユニット Pdha1 の発現抑制細胞を、tetracycline 誘導性の遺伝子発現修飾システムを用いて作製した。これらの細胞においてインスリン分泌およびインスリン含有量の変化を検討するとともに、グルコース刺激時のメタボロームをヒューマンメタボロームテクノロジー社の受託解析を用いて、解析した。

【結果】

Gck, Pgk1, Pdha1 に対する doxycycline 誘導的 shRNA の発現は、対応するタンパクの発現を 10% -30% に低下させた。Gck の発現抑制は、1 時間の 20mM グルコース刺激によるインスリン分泌を約 50% に低下させ、インスリン含有量には影響を与えなかった。Pdha1 の発現抑制では、インスリン含有量が約 2 倍に増加し、細胞含有量に対するインスリン分泌は、有意に低下した。また、Pgk1 の発現抑制では、インスリン含有量が約 1.5 倍に増加し、細胞含有量に対する分泌量としては、変化を認めなかった。20mM グルコースで 1 時間刺激した際の細胞抽出液のメタボロームの解析では、いずれの場合も、TCA サイクル中間体の低下と ATP/ADP 比の低下が認められたが、Gck の発現抑制では、解糖系中間体の低下が認められたのに対し、Pgk1 および Pdha1 の発現抑制では、解糖系中間体の増加が認められた。

【考察】

2型糖尿病発症初期の膵β細胞の特徴として、インスリン含有量の増加とそれに伴う基礎分泌の増加、および高グルコースに応答するインスリン分泌の低下が知られている。前者は、グルコースに対する応答能の低下を部分的に補償する可能性が推定されている。Pgk1 あるいは

は Pdha1 の発現抑制細胞で観察された結果は、糖尿病初期のβ細胞の挙動と類似している。また、これらの細胞での解糖系中間体の蓄積が、インスリン合成能を促進する可能性も示唆される。

マウス嗅覚系臨界期における刷り込み記憶形成機構

井上 展子

(福井大学医学部)

【目的】

出生直後の外界感覚入力に対する刷り込み現象とは外的環境への適応である。マウスの場合、新生仔期の刷り込み記憶が正常に起こらない場合、その後の成育に影響が出るだけでなく、成長後の社会性の欠如によって、生存率の低下をも引き起こす。従って、新生仔期における刷り込み記憶の形成機構を解明することは、ヒトの精神発達障害を理解する上でも非常に重要である。マウス嗅覚系における刷り込み現象の記述と、それを可能にする分子機構の解析を試みた。

【方法】

マウス幼少期における匂い刷り込みの様子を行動解析により記述し、シナプス形成解析による臨界期の定義を行った。そして、外界の刺激依存的に匂いを「刷り込む」ため、神経活動依存的に機能するシナプス形成因子を探索し、分子遺伝学的手法により刷り込み現象への寄与を調べた。刷り込み記憶には常に誘引的価値が付加されることが判明し、その価値付けのために必要な因子として、ペプチドホルモンであるオキシトシンに着目し、同時にオキシトシンを分泌する ADP-リボシルシクラーゼ (CD38) の刷り込み記憶への価値付けへの寄与を各分子の欠損マウスや、機能回復実験を通じて検証した。

【結果】

幼少期の匂い曝露により、忌避性の匂いを用いても生後一週間の臨界期に経験した匂いに対してマウスは安心感を覚え、誘引的に振る舞うことを見出した。

また、外界の刺激依存的に、嗅球における嗅覚一次神経と二次神経のシナプス形成を強固にする機能のある分子ペアとしてセマフォリン 7A (Sema7A) とその受容体、プレキシシン C1 (PlxnC1) を見出した。これらの分子に

よって生後に嗅いだ匂いを嗅球レベルで刷り込むことができることが変異マウス解析などを通じ明らかになった。臨界期は PlxnC1 の発現様式で定義されることも明らかになった。

刷り込み記憶の発露のための回路を同定するため、匂い条件付けたマウスの高次領域の神経活性の様子を調べると、刷り込み記憶は、愛情行動などの誘引的な出力決定に関与する内側扁桃体を活性化し、ストレスホルモンの分泌に関与する扁桃体梨状皮質移行領域を抑制して発露することが判明した。

臨界期に刷り込まれた匂いは質感に関係なく、上記のような誘引性の回路を形成する。幼少期の誘引回路形成を可能にする因子として、他者との絆を深めるなどの機能を有し、生後の時期に脳内で多量に、広い範囲で分泌されているオキシトシンに着目した。オキシトシン欠損、受容異常マウスに加え、オキシトシンの分泌に必要な酵素、CD38 に関して、その欠損マウス（オキシトシン分泌異常マウス）では刷り込み記憶における誘引行動が起らなくなることが判明した。オキシトシンとその分泌経路に関して刷り込み記憶における寄与は同等であろう結果となった。

【考察】

マウスは出生直後の環境に対して誘引的な回路を形成することで、その後の社会生活を正常なものとしているようである。刷り込み記憶とは嗅球レベルで特定の匂いに対する応答性をシナプス形成の強化により上昇させることと、その入力に対して誘引性回路を形成するという二つの現象が組み合わさって引き起こされるということが本研究の結果から考察できた。

【文献】

Inoue, N., Nishizumi, H., Naritsuka, H., Kiyonari, H. & Sakano, H.: Sema7A/PlxnC1 signaling triggers activity-dependent olfactory synapse formation, *Nat. Commun.*, **9**, 1842 (2018).

Inoue, N. & Sakano, H.: Sema7A Signaling is Essential for Activity-Dependent Synapse Formation in the Mouse Olfactory Bulb, *J. Neurol. Neuromed.*, **3**, 33-38 (2018).

酵母 TOR 複合体 2 シグナル経路の活性化における細胞膜脂質成分の役割

井上 善晴

(京都大学農学研究科)

【目的】

TOR (Target Of Rapamycin) は真核生物において進化的に保存された Ser/Thr キナーゼであり、細胞の成長や代謝などを司るシグナル伝達経路を構成する。TOR は機能的に異なる 2 種類の TOR 複合体 (TORC1 と TORC2) を形成する。TORC1 の活性化機構については詳細な研究が進んでいるのに対し、TORC2 のそれについては未解明の部分が多い。出芽酵母の TORC2 は、細胞膜の MCT (Membrane Compartment containing TORC2) と呼ばれる脂質マイクロドメインに局在することが知られている。しかしながら、MCT を形成する脂質成分、TORC2 の MCT 局在機構、MCT 局在と TORC2 の機能発現との相関性などの基本的なことはまだ解明されていない。そこで本研究では、TORC2 シグナルに関与する因子を、脂質成分に注目して探索することを目的とした。

【方法】

出芽酵母の非必須遺伝子破壊株コレクション (約 4800 株) を、メチルグリオキサール (MG) 含有プレートにスポットし、感受性株のスクリーニングを行った。

【結果・考察】

われわれは以前、解糖系から派生する MG が酵母ならびに哺乳類細胞において TORC2 シグナルを活性化することを発見した¹⁾。TORC2 は生育に必須な機能を持ち、その破壊は致死となることから、MG による TORC2 シグナルの活性化は、生存に必要な応答であると考えられる。従って、MG 感受性を示す変異株は、TORC2 シグナルの活性化に関与する因子が欠損している可能性が期待される。スクリーニングの結果、MG に対して感受性を示す 31 株の変異株を得た。それらの中に、細胞膜脂質成分であるエルゴステロール (動物細胞におけるコレステロールに相当) の合成系酵素 (Erg2 および Erg3) の欠損株が含まれていた。そこで、ステロールに結合する薬剤 (フィリピン、ナイスタチン、ア

ムホテリシンB)で前処理した後に、MGならびに、酵母 TORC2 の活性化剤オーレオバシジン A (AbA) による TORC2 シグナルの活性化を検討した。その結果、これらの薬剤による前処理は、TORC2 シグナルの活性化を阻害した。

ホスファチジルコリンのリゾ体アナログであるエデルフォシンはステロールと親和性があり、脂質マイクロドメインに影響を与えることが報告されている²⁾。そこで、エデルフォシンで前処理した細胞の TORC2 シグナルを検討した結果、MG や AbA による TORC2 シグナルの活性化が阻害された。これらの結果から、酵母 TORC2 の活性化において、エルゴステロールが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Nomura, W. & Inoue, Y.: Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1269-1280 (2015).
- 2) Castro, B.M., Fedorov, A., Hornillos, V., Delgado, J., Acuña, A. U., Mollinedo, F. & Prieto, M.: Edelfosine and miltefosine effects on lipid raft properties: membrane biophysics in cell death by antitumor lipids. *J. Phys. Chem. B.* **117**, 7929-7940 (2013).

細胞内における選択的タンパク質分解制御方法の開発とその応用

伊野部 智由

(富山大学工学部)

【目的】

多くの疾患の発症には、特定蛋白質の分解異常が関わっている。この特定蛋白質の分解を人工的に制御することができれば、新しい治療法の開発につながるはずである。我々は、細胞内の蛋白質分解を担うユビキチン-プロテアソーム分解系において、効率的な分解には、標的蛋白質のポリユビキチン化だけでは不十分で、標的蛋白質自身にフラフラとした Unstructured 領域が必要で

あることを明らかにした。このことは Unstructured 領域のプロテアソームへのアクセスを制御すれば、分解を制御できることを示している。そこで我々は有機化学的手法や小型抗体などを利用して、細胞内夾雑系においても、特定の標的蛋白質の特異的分解制御（分解誘導と分解抑制）を可能とする技術の開発を目指した。

【結果】

まず Unstructured 領域の認識阻害による新規分解抑制方法の開発を試みた。既に確立している細胞内でも働くことができる小型抗体を用い、Unstructured 領域に抗原配列をもつモデル蛋白質の分解を阻害できることを確かめた。そこで実際のガンで分解が亢進する NKX3.1 を対象に、その C 末端の分解誘導性 Unstructured 領域に対する小型抗体を、無細胞ディスプレイ技術を用いて還元的環境で取得した。取得した抗体は細胞内において確かに NKX3.1 の分解誘導性 Unstructured 領域をもつ蛋白質の分解を抑えた。

次に分解誘導性 Unstructured 領域ペプチドの標的蛋白質への選択的ケミカルラベリングにより、分解を誘導できるか検証を行った。まずは Unstructured 領域をもつユビキチンによるポリユビキチン化が、基質蛋白質の分解を促進することを確認した¹⁾。次に Unstructured 領域を直接標的蛋白質に取り付けるために、Spy-tag/Spy-catcher システムを導入した。このシステムでは夾雑環境でもモデル蛋白質 (Spy-catcher) に、Spy-tag を融合した Unstructured 領域ペプチドを付加できた。さらにこの Unstructured 領域が付加された Spy-catcher は、精製プロテアソームにより分解されることを確認している。

【考察】

以上で開発した蛋白質分解制御方法を利用することにより、蛋白質分解異常が原因となる病気の治療が可能になると見込まれる。

【文献】

- 1) Inobe, T., Tsukamoto, M., & Nozaki, M.: Proteasome-mediated protein degradation is enhanced by fusion ubiquitin with unstructured degron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **501**, 948-954 (2018).

**ゲノム全域をオフターゲットなく自在に編集できる
新しい酵素システム系の創製**

植田 充美

(京都大学大学院農学研究科)

【目的】

近年、ゲノム編集法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。しかし、このシステムが正確に編集できる領域は、Cas9 が認識できる NGG 配列とそれに続く 20 塩基のみであり、これはゲノム中にわずか 60% 程度しか存在しません。また、ガイド RNA 認識配列外の塩基を編集する場合、相同組換え後もガイド RNA 認識配列が残るため、Cas9 ヌクレアーゼにより、ゲノムが繰り返し切断・修復された結果、最終的には非同末端結合により望まない塩基の挿入、欠失が生じてしまうという大きな欠陥が目立ってきています。遺伝病にも関係します多様で多種の SNPs が存在することが判明してきましたゲノムにおきまして、ゲノムの全域にわたって、正確に、自在に編集できるゲノム編集技術の発展が望まれています。

【方法と結果】

近年、高効率で容易な変異体作製法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。このシステムでは、ガイド RNA が PAM 配列 (NGG: N は任意の塩基) に続く 20 塩基を認識して、Cas9 が DNA を切断します。切断領域に相補的なドナー DNA を加えると相同組

換えにより任意の配列をノックインできます。また、非同末端結合により切断配列をランダムに修復するとノックアウトが可能になります。しかし、CRISPR/Cas9 システムは全てのゲノム領域を編集することができないという大きな欠点があります (図 A)。このシステムが正確に編集できる領域は、Cas9 が認識できる NGG 配列とそれに続く 20 塩基のみであり、これはゲノム中にわずか 60% 程度しか存在しません。

我々は、上述の旧来法よりもはるかにゲノムワイドで高効率な編集技術を構築するために、一本鎖切断酵素である Cas9 Nickase を用いました (図 B)。Cas9 Nickase で生じる一本鎖切断 (ニック) は正確に修復されます。また旧来の Cas9 により生じる二本鎖切断と異なり、ニックは相同組換えを誘導するが、非同末端結合は誘導しません。そのため、Nickase による相同組換え後に標的配列が残った時でもニックが再度導入されるだけで、非同末端結合による余分な配列の挿入や欠損は起こりません。また、本システムはニックから 50 bp 離れた領域でも正確に編集できました。

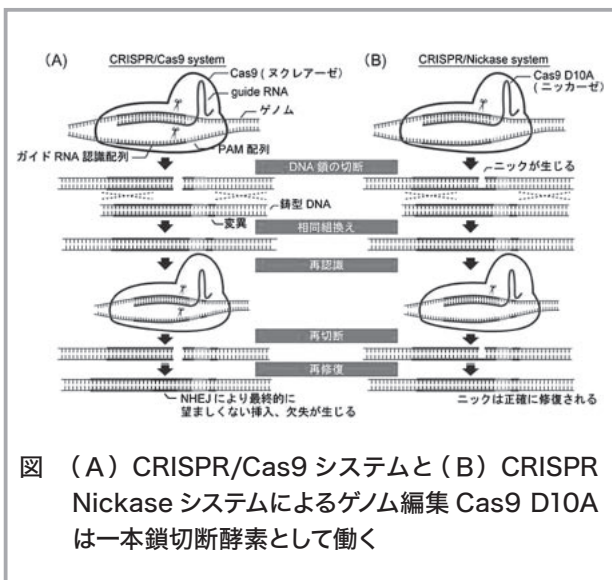
これは、本システムが編集可能塩基に制限がある CRISPR/Cas9 よりも、理論上 40% 以上も広いゲノム領域、すなわち、ほぼゲノム全域を編集できることを示しています。

【考察】

本研究では、ゲノムワイドで高効率な編集技術を構築するために、一本鎖切断酵素である Cas9 Nickase を用いた CRISPR/Nickase システムを確立しました。

近年、ゲノム編集法として CRISPR/Cas9 システムが注目を集めています。しかし、全てのゲノム領域を編集することができないという大きな欠点があります。

我々の開発した CRISPR/Nickase システムでは、CRISPR/Cas9 の欠陥をすべて超越し、より正確に、理論上、ほぼゲノム全域を編集できます。これにより、ゲノム上のほぼすべての SNPs の修復編集が可能になるとともに、逆に、目的通りの SNPs の導入も可能になり、これからのゲノム科学の発展に貢献できると考えております。



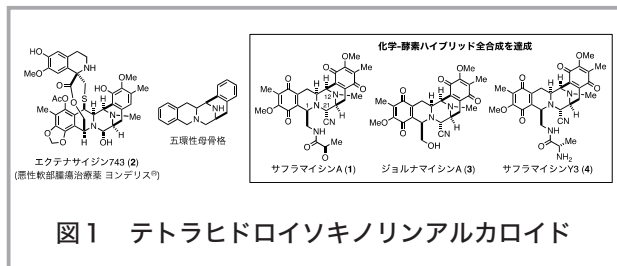
化学合成と *in vitro* 酵素変換の融合による多環性アルカロイドの迅速合成

大栗博毅

(東京農工大学大学院工学研究院)

【背景】

サフラマイシン A (1) に代表されるテトラヒドロイソキノリン (THIQ) アルカロイドは、強力な抗腫瘍活性を示す (図 1)。1 と同様の五環性母骨格を共有するエクテナサイジン 743 (2) は悪性軟部腫瘍の治療薬 (ヨンデリス, 大鵬薬品) として認可されている。また、側鎖構造が異なるジョルナマイシン A (3), サフラマイシン Y3 (4) 等の類縁体も数多く存在する。



当研究グループでは 1 の生合成研究を展開し、ユニークな骨格構築機構を明らかにした¹⁾。非リボソーム依存型ペプチド合成酵素 (NRPS) のモジュールの一つである SfmC が 7 段階の反応を触媒し、単純な 2 つの基質から五環性骨格を一挙に組み上げる。

【目的】

本研究では、生合成酵素 SfmC を活用した THIQ アルカロイド群の化学-酵素ハイブリッド迅速合成法を確立する。合成基質の酵素変換により得た多官能性の五環性骨格に数段階の化学変換を施し、1 位の側鎖や芳香環/キノン環を自在に改変できる迅速合成法を開発する。

【方法】

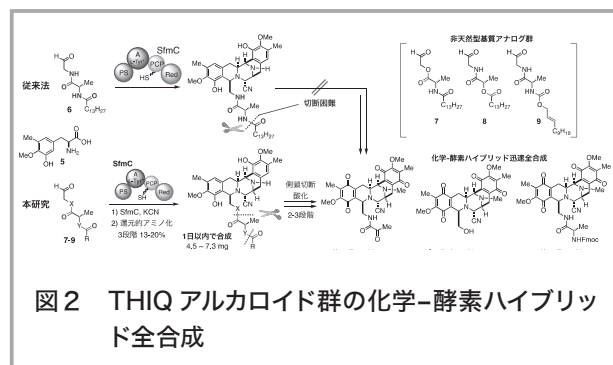
SfmC は、チロシン誘導体 5 と N 末端に長鎖脂肪酸側鎖を有する 6 を基質として認識する。この脂肪酸側鎖は本生合成経路で生じる 1 には存在しないが、SfmC による骨格構築には必須である。そのため、五環性骨格を構築した後に脂肪酸側鎖を除去する必要がある。しかし、多数の官能基を持つ中間体に対するアミド結合加水分解による脂肪酸側鎖の除去は極めて困難である。そこで、

6 の 2 つのアミド結合をそれぞれ容易に切断可能な官能基 (エステル/アリルカルバメート基) へと置き換えた非天然型基質アナログ群 (7-9) を設計・合成した (図 2)。

【結果】

設計・合成した非天然型基質 7-9 の酵素 SfmC による変換は、いずれも高い効率で進行し、所望の五環性骨格群を得ることができた。プロセスを更に簡略化するため、酵素変換と化学変換の融合を検討した。反応溶液にシアン化カリウムを添加し、ワンポットでシアノ化した。酵素を除いた後、還元のアミノ化を施すことで、適切に官能基化された五環性骨格を単純な合成基質 (5, 7-9) からわずか 1 日で合成する化学-酵素ハイブリッドプロセスの開発に成功した。

前述のリンカー (エステル/アリルカルバメート基) を合成化学的に切断し、長鎖脂肪酸側鎖を除去した。続く酸化反応により、3 つの天然物 1, 3, 4 の化学-酵素ハイブリッド迅速合成 (5~6 段階) を達成した (図 2)²⁾。更に、本研究で創出したフェノール型の類縁体が、天然物シアノサフラシン B よりも強力な DNA アルキル化能を示すことを見出した³⁾。



【文献】

- 1) Koketsu, K., Watanabe, K., Suda, H., Oguri, H. & Oikawa, H.: Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms, *Nat. Chem. Biol.* **6**, 408 (2010).
- 2) Tanifuji, R., Koketsu, K., Takakura, M., Asano, R., Minami, A., Oikawa, H. & Oguri, H.: Chemo-enzymatic Total Syntheses of Jorunnamycin A, Saframycin A, and N-Fmoc Saframycin Y3, *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 10705 (2018).
- 3) Tanifuji, R., Tsukakoshi, K., Ikebukuro, K.,

Oikawa, H., & Oguri, H.: Generation of C5-desoxy analogs of tetrahydroisoquinoline alkaloids exhibiting potent DNA alkylating ability, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 1807 (2019).

糖転移酵素 EOGT による Notch シグナルと血管形成の制御機構の解明

岡 島 徹 也

(名古屋大学大学院医学系研究科)

【目的】

細胞表面に集積する糖鎖は、細胞機能の制御に中心的な役割を果たすと考えられている。しかしながら分子メカニズムの多くは未解明のままである。その中で、細胞間の主要なシグナル伝達である Notch シグナル制御における糖鎖機能の理解が進んできた。本研究では、Notch 受容体の EGF リピート上に存在する O-型糖鎖修飾である O-GlcNAc 修飾について、分子機能と生物学的な役割について解析を行った。

【方法】

EGF ドメインの構造安定性における O-GlcNAc 修飾の役割には、還元剤を用いた unfolding assay を実施した。O-GlcNAc 糖鎖の検出には、CTD110.6 抗体による検出と、LC-MS/MS と糖鎖解析ソフト Byonic を用いた半定量解析を実施した。分子機能と生物学的な役割については、O-GlcNAc 修飾に関わる糖転移酵素 EOGT の遺伝子変異マウスや、それから単離した血管内皮細胞などを用いた。

【結果】

単一ドメインの O-GlcNAc 糖付加により、還元剤存在下での構造安定性が増強された。この効果は、O-フコースや O-グルコースと類似していた。一方で、Notch 受容体への分子機能への作用として、Delta-リガンドに対する物理的な相互作用と Notch シグナルの増強が観察された。O-GlcNAc 糖鎖の修飾部位は、Notch1 の EGF リピートの 10 箇所以上に同定され、その一部は、2 糖 (O-GlcNAc-Gal) もしくは 3 糖 (O-GlcNAc-Gal-Sia) へと伸長された。3 糖へ伸長され

る複数の修飾部位をアラニン置換した結果、Notch1 の Delta-like4 リガンドに対する結合能が低下した。

マウスにおける *Eogt* の mRNA 発現を検証したところ、血管内皮において高発現が認められた。そして、血管内皮特異的な *Eogt* 遺伝子欠損により、血漿成分の漏出が認められ、Notch シグナル構成因子の haploinsufficiency の表現型と一致した。また、*Notch1* や *Rbpj* のヘテロ接合体のバックグラウンドでは、これらの表現型の増強が認められた。

【考察】

以上の解析結果より、EOGT による Notch 受容体の O-GlcNAc 修飾は、血管 integrity において重要な役割を果たすことが見出された。背後の分子機構として、Notch 受容体の O-GlcNAc 単糖もしくはその伸長構造が、DLL リガンドとの相互作用を直接的に制御する仕組みが考えられた。一方で、独立した O-GlcNAc 修飾の分子機能として、Notch 受容体を構成する EGF ドメインの安定化作用も見出した。この効果は、O-フコースや O-グルコースと同様であり、*Eogt* 変異細胞においては、Notch1 受容体の表面発現レベルに大きな異常を伴わないことから、複数の糖鎖が互いに補完関係にあると考えられた。このように、O-GlcNAc 修飾には、O-型糖鎖としての一般的な構造安定化機能と O-GlcNAc 特有のリガンド結合制御機能を併せ持つと考えられた。

【文献】

- 1) Sawaguchi, S. *et al.*: O-GlcNAc on NOTCH1 EGF Repeats Regulates Ligand-Induced Notch Signaling and Vascular Development in Mammals. *eLife.*, **6**, e24419 (2017).
- 2) Ogawa M, *et al.*: Structural Divergence in O-GlcNAc Glycans Displayed on Epidermal Growth Factor-like Repeats of Mammalian Notch1. *Molecules.*, **23**, E1745 (2018).

過酸化水素分解酵素カタラーゼの細胞内局在制御による酸化ストレス応答の分子機構の解明

奥本 寛治

(九州大学大学院理学研究院)

【目的】

活性酸素種 (ROS) の 1 種である過酸化水素は酸化還元反応に基づく生体反応に付随して産生される酸化ストレス因子であり、多くの生物種が過酸化水素を代謝 (消去) する酵素としてカタラーゼを有する。哺乳類では細胞内小器官ペルオキシソーム内腔に主に局在しているが、我々は最近、ミトコンドリア外膜でアポトーシス促進因子として機能する BAK がペルオキシソームにも一部局在化し、カタラーゼのペルオキシソームからサイトゾルへの放出を介して細胞の酸化ストレス抵抗性を高めることを見出した (Hosoi *et al.*, *J. Cell Biol.* 2017, Fujiki *et al.*, *Mol. Cell. Oncol.* 2017)。この発見は、カタラーゼのサイトゾル局在化が抗酸化ストレス反応として作用することを示すものである。さらに我々は、ペルオキシソーム内腔タンパク質 (酵素) の輸送因子である Pex5p のペルオキシソーム膜上受容体 Pex14p が過酸化水素依存的にリン酸化修飾され、カタラーゼの輸送を負に制御する結果を得ている。本研究では、酸化ストレスに応答したカタラーゼのサイトゾル局在化の制御と細胞の酸化ストレス抵抗性における Pex14p のリン酸化の役割について詳細な解析を行った。

【方法】

点変異導入および質量分析により Pex14p の過酸化水素依存的なリン酸化部位を解析した。得られた知見から非リン酸化型および恒常的リン酸化型 Pex14p 変異体を作製、PEX14 欠損性 CHO 細胞へ導入し、イムノブロットや免疫染色等によりカタラーゼのペルオキシソームへの輸送に対する影響を解析した。また、過酸化水素処理に対する細胞の生存率における Pex14p リン酸化の役割を MTT アッセイにより検討した。

【結果と考察】

マウス各臓器抽出液の Phos-tag PAGE およびイムノブロットによる解析により Pex14p のリン酸化修飾を初めて見出した。通常培養時のラット肝臓由来 Fao 細胞

や CHO 細胞では Pex14p のリン酸化割合は非常に低いものの、過酸化水素などの酸化ストレス処理により高度にリン酸化された。点変異導入および質量分析により、過酸化水素処理により誘導される Pex14p のリン酸化部位として 3 つのセリン残基を同定した。非リン酸化型 (Ala) および恒常的リン酸化型 (Asp) Pex14p 変異体を用いた解析等から、過酸化水素依存的な Pex14p のリン酸化はとくにカタラーゼのペルオキシソームへの輸送を抑制し、サイトゾル局在性カタラーゼの増加を介して細胞の酸化ストレス耐性を亢進させることが明らかとなった。これらの結果は、リン酸化を介したペルオキシソームタンパク質輸送の制御機構という世界初の発見であるとともに、カタラーゼの細胞内局在の調節により酸化ストレスに応答するという細胞の新たな生存戦略を示すものである。

局所的 *in vivo* ゲノム編集技術を用いたフィードバック並列視覚情報処理の解明

小坂田 文隆

(名古屋大学創薬科学研究科)

【目的】

視覚情報は、網膜にて電気信号に変換され、外側膝状体 (LGN) を経由し、大脳皮質一次視覚野 (V1) に送られる。その後、高次視覚野を含む他の領野に送られ、知覚・認知に至る。形・動き・色などを含む視覚情報は、網膜内で視覚属性毎に分けられ、異なる網膜神経節細胞を起源とし並列情報処理され、LGN を経て V1 に至る (Nassi and Callaway, *Nat Rev Neurosci*, 2009)。この情報処理過程のいずれかに異常が起ると、視覚障害を引き起こす。

これまでに我々は、マウス視覚系において、方向選択性応答を示す網膜神経節細胞が LGN の shell (浅層) へ入力し、その後 shell の神経細胞は V1 の第 1 層へ入力することを明らかにしてきた (Cruz-Martín *et al.*, *Nature*, 2014)。これにより、マウスでは LGN の core (深層) から V1 の第 4 層へ伝達される経路と、LGN の shell から V1 の第 1 層へ伝達される経路との 2 つの並列回路が存在することが示された (恩田および小坂田、

日本薬理学雑誌, 2017). しかし, これら並列回路がどのように制御されるかは不明である. 網膜→LGN→V1のフィードフォワード経路に加えて, V1からLGNへのフィードバック結合が知られている. 本研究では, V1からLGNへのフィードバック結合に着目し, その役割を明らかにすることを目的とした.

【方法】

1) CRISPR/Cas9 システムを搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の作製

Cas9 を搭載する AAV, 各遺伝子座に特異的な guide RNA 配列およびノックインカセットを搭載する AAV を HEK293t 細胞にて産生した.

2) 成体マウス脳へのウイルスベクターの微量注入

脳定位固定装置に成体マウスを固定し, 空気圧を用いてウイルス溶液を微量注入した.

3) 2光子イメージングを用いた覚醒下マウスの視覚応答特性の評価

カルシウム感受性蛍光タンパク質の GCaMP6m を発現させたマウスを頭部固定し 2光子顕微鏡下で視覚応答を蛍光強度変化として計測した. 視覚刺激として様々な角度の正弦波格子刺激を呈示した.

【結果】

マウス大脳皮質の 6 層細胞は異なる細胞種から構成される. 各細胞種を分離する目的で, Allen Brain Institute の *in situ* hybridization および single cell transcriptome データからマウス大脳皮質の 6 層細胞の 3 種類のサブタイプに特異的なマーカーを各々同定した. 次に, これら細胞を *in vivo* で可視化するために, 成体脳にて大脳皮質 V1 に局所的に AAV を微量注入し, 各マーカーの遺伝子座に GFP をノックインした. 大脳皮質の第 6 層に GFP 陽性細胞が認められた.

次に, 第 6 層細胞の機能を明らかにする目的で, 覚醒下のマウスから視覚応答を計測した. マウスを 2光子顕微鏡下で頭部固定し, 正弦波格子刺激に対する応答を記録した. 視覚刺激に反応して GCaMP6 の蛍光強度変化が観察され, 視覚野に特徴的な方位選択性応答および方向選択性応答が認められた.

【考察】

CRISPR/Cas9 を用いて成体脳での局所的なノックイン法の確立に成功し, 成体マウスの大脳皮質から LGN

にフィードバック入力する第 6 層細胞に対して GFP をノックインすることで, サブタイプ毎に細胞を可視化することができた. さらに, 2光子顕微鏡を用いて, 大脳皮質の最深部でカルシウムイメージングが困難であった第 6 層細胞から視覚応答を記録した. 本研究では, これまで極めて困難であった技術の壁を突破することができた. 今後は, これらの手法を組み合わせることで, V1 第 6 層細胞の細胞タイプ毎の機能を明らかにし, 並列回路における役割を明らかにする予定である.

【文献】

- 1) Nassi, J.J. & Callaway, E.M.: Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci.*, **10**, 360-72 (2009).
- 2) Cruz-Martín, A., El-Danaf, R.N., Osakada, F., Sri-ram, B., Dhande, O.S., Nguyen, P.L., Callaway, E.M., Ghosh, A. & Huberman, A.D.: A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex. *Nature.*, **507**, 358-61 (2014).
- 3) 恩田将成, 小坂田文隆: 視覚情報処理を担う神経回路の構造と機能. *日本薬理学雑誌.*, **149**, 274-280 (2017).

二本鎖 DNA による新規の遺伝子ノックダウン現象を駆動する核酸-酵素複合体の解明

小 沼 健

(大阪大学大学院理学研究科)

【目的】

我々は 2015 年に「二本鎖 DNA (dsDNA) を注入すると, 配列特異的に遺伝子機能が阻害される現象」を発見し, DNA 干渉 (DNAi) と命名した¹⁾. これは脊索動物のオタマボヤで偶然に見出した現象である. PCR 産物を注入するだけでノックダウンができるため, 遺伝子スクリーニング²⁾ など応用性に富む生物現象である. この DNAi のしくみの解明を目的とした.

DNAi では, 標的 mRNA 分解がみられる²⁾. そこで RNA 干渉 (RNAi) と似たしくみであるという仮説のもと研究を開始した. 2016 年度に当財団の助成のもと研

究を開始し、DNAi では RNAi と同様、(1) 小分子 RNA (exo siRNA) の合成や、(2) 核酸分解酵素アルゴノート (AGO) がかわる可能性を示した。2018 年度はこれらを進展させ、以下の知見を得た。

【方法・結果】

(1) DNAi を行った未受精卵を作成し、small RNA の RNA-seq 解析を行った。その結果、注入した dsDNA 断片に対応した exo siRNA に対応するリード配列が検出された。未注入卵ではこれらのリード配列は検出されなかった。

(2) FLAG タグ標識した AGO を哺乳類細胞に発現させ、FLAG の免疫沈降を行ったのち qPCR によって小分子 RNA (miRNA) を定量した。免疫沈降の前後で小分子 RNA のコピー数を比較することで、AGO と miRNA の結合の有無を検討できる。オタマボヤには 7 種類の AGO ホモログが存在するが、そのうち 3 つに結合活性があることが示唆された。

【考察・展望】

本研究を通じて、DNAi には (1) dsDNA からの exo siRNA 合成という新しいしくみがあることが実証できた。現在、内在の miRNA との共通点や違いを解析している (大阪大学 元岡博士との共同研究)。また RNAi 同様に、二本鎖 RNA の段階を経て一本鎖の exo siRNA へと変換されるのかについても検討する予定である。

(2)についても、小分子 RNA と結合する AGO を同定するための実験系が完成し、DNAi にかかわる AGO を同定できる見通しがついた。

以上が揃い次第、投稿論文を作成する予定である。このように本助成を通じて、この研究テーマを一から育て、結実できる目前まで辿りついた。心より御礼を申し上げます。

【文献】

- 1) Omotezako, T. *et al.*: DNA interference: DNA-induced gene silencing in the appendicularian *Oikopleura dioica*. *Proceedings of the Royal Society B.*, **282** (1807): 20150435 (2015).
- 2) 小沼ら：二本鎖 DNA による新規の遺伝子ノックダウン現象 (DNAi): ガイド鎖と核酸分解酵素 Argonaute からそのしくみに迫る. *日本応用酵素協会誌.*, **52**, 11-18 (2018).

癌抑制タンパク質 p53 誘導性ホスファターゼによる脂肪細胞分化・脂肪滴形成制御機構の解明

坂口 和 靖

(北海道大学大学院理学研究院)

【目的】

肥満は白色脂肪細胞における脂肪滴形成が過剰に行われ、脂肪細胞の肥大と増殖によって引き起こされる。また、脂肪細胞のみならず、好中球やマクロファージなどの免疫細胞や、精巣支持細胞であるライディッヒ細胞において脂肪滴がそれら細胞の機能に関与していることが報告されているが、詳細な脂肪滴形成機構、特に機能制御機構については依然として多くの部分が不明である。PPM1D (Wip1) は DNA 損傷などの細胞ストレスにより癌抑制タンパク質 p53 依存的に発現誘導される Ser/Thr ホスファターゼとして発見された。近年、PPM1D ノックアウトマウスにおいて、PPM1D がインスリン感受性を制御し、グルコース恒常性維持に関与していることが報告されている。このため、PPM1D が代謝調節においても重要な役割を果たしていると考えられる。本研究の目的は、『脂肪細胞の脂肪滴形成および脂肪滴を介した脂肪細胞の機能制御における PPM1D の新規機能を解明すること』である。

【方法】

我々はこれまでに、PPM1D の機能解析において非常に有用なツールとなる PPM1D に対する強力かつ特異的な阻害剤 SL-176 の開発に成功し、好中球の細胞分化や免疫応答能、さらには精原細胞の細胞分化に PPM1D が関与していることを明らかにしている¹⁻³⁾。本研究では、PPM1D ホスファターゼによる脂肪細胞分化・脂肪滴形成の分子制御機構を解明することを目的とする。今回、脂肪細胞分化の研究に広く用いられている脂肪前駆細胞 3T3-L1 をモデル系として選択し、脂肪細胞分化における PPM1D の機能を解析した。

【結果・考察】

脂肪前駆細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導にともない、PPM1D の発現量が増加することを見出した。特異的な PPM1D 阻害剤 SL-176 を用いた解析により、PPM1D 阻害が脂肪細胞分化を顕著に抑制することが示

された。また、脂肪滴の定量および脂肪滴のイメージング解析により、PPM1D 阻害が脂肪滴の量およびサイズを著しく減少させることが明らかとなった。以上より、PPM1D が脂肪細胞分化と脂肪滴形成の制御に関与することが示された⁴⁾。さらに我々は、脂肪滴形成における PPM1D の標的分子および経路についても明らかとしている。今後、脂肪細胞分化および脂肪滴形成の両方に効果を示す PPM1D を標的とした、阻害剤 SL-176 による脂肪滴形成の抑制は、新たな肥満治療への発展が期待される。

【文献】

- 1) Ogasawara, S., Kiyota, Y., Chuman, Y., Kowata, A., Yoshimura, F., Tanino, K., Kamada, R., & Sakaguchi, K.: Novel inhibitors targeting PPM1D phosphatase potently suppress cancer cell proliferation, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 6246 (2015).
- 2) Kamada, R., Kudoh, F., Yoshimura, F., Tanino, K., & Sakaguchi, K.: Inhibition of Ser/Thr phosphatase PPM1D induces neutrophil differentiation in HL60 cells, *J. Biochem.*, **162**, 303 (2017).
- 3) Ogasawara, S., Chuman, Y., Michiba, T., Kamada, R., Imagawa, T., & Sakaguchi, K.: Inhibition of protein phosphatase PPM1D enhances retinoic acid-induced differentiation in human embryonic carcinoma cell line, *J. Biochem.*, **165**, 471 (2019).
- 4) Kamada, R., Kimura, N., Yoshimura, F., Tanino, K., & Sakaguchi, K.: Inhibition of lipid droplet formation by Ser/Thr protein phosphatase PPM1D inhibitor, SL-176, *PLoS One*, **14**, e0212682 (2019).

糖脂質フリッパーゼの基質輸送機構の解析

申 惠 媛

(京都大学薬学研究科)

【目的】

脂質二重層からなる生体膜の外葉と内葉では、脂質組成が非対称に保たれている。膜 10 貫通タンパク質の

P4-ATPase は、P-type ATPase のサブファミリーであり、リン脂質を外葉から内葉へとフリップすることにより非対称性の調節を行う。私は種々の P4-ATPase が特異的なリン脂質をフリップすることを明らかにしてきた¹⁾。その中、ATP10A はホスファチジルコリン(PC)をフリップするが、ATP10D はリン脂質ではなく、糖脂質のグルコシルセラミド (GlcCer) をフリップすることを発見した。本研究では ATP10D の GlcCer の輸送機構とその生理機能を理解することを目的とした。

【方法】

他の P-type ATPase 結晶構造を元に、ATP10D の立体構造を予測した。モデル構造を基盤に ATP10A と ATP10D の基質輸送に関わる可能性のあるアミノ酸に点変異を導入し、各変異体を安定発現する細胞株を用いて PC と GlcCer に対するフリップ活性を測定した²⁾。

【結果】

ATP10A や ATP10D に保存されている TM4 の Gln は ATP10D の GlcCer のフリップ活性に必須であることがわかった。Gln 残基と近い位置にある TM6 の Leu と Ile および TM1 の Asn と Trp が GlcCer のフリップ活性に必須であることがわかった²⁾。

【考察】

GlcCer は、ATP10D の TM1, 4, 6 の間を介して輸送されることが示唆された。ATP10A の TM4, 6 の同様の変異は PC のフリップ活性に影響がないことから、これらの残基は基質選択性と基質輸送に関わることが考えられた。一方、ATP10A の TM1 の変異は PC フリップ活性も一部阻害することから、これらの残基は基質輸送に関わることが考えられた。ATP10D の遺伝子多型は、動脈硬化や心筋梗塞に関連があり、血中 GlcCer の濃度上昇に関わることから、ATP10D の機能を解明していくことは、このような疾患の発症メカニズムの解明に貢献すると期待している。

【文献】

- 1) *Shin, H.-W. & Takatsu, H.: Substrates of P4-ATPases: beyond aminophospholipids (phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine). *FASEB J.*, **33**, 3087 (2019).
- 2) §Roland, B.P., §Naito, T., Best, J.T., Arinaiz-Yepepe, C., Takatsu, H., Yu, R.J., Shin, H.-W.,

& Graham, T.R.: Yeast and human P4-ATPases transport glycosphingolipids using conserved structural motifs. *J. Biol. Chem.*, **294**, 1794 (2019).

視床下部の機能維持に果たすペルオキシソームの機能と作用機構

杉浦 歩

(神戸大学大学院医学研究科)

【目的】

ペルオキシソームは真核生物のほぼ全ての細胞に存在する脂質二重膜に囲まれたオルガネラである。細胞内代謝の中心的な役割を担い、細胞内・外の環境に応じて数や形、局在を変化させながら細胞内を動的に動き回る。機能と動態は相互に制御されており、代謝装置としての正常な機能を発揮するためにはその動態が重要である¹⁾。

視床下部は食事や睡眠、性行動など個体の恒常性調節の中枢である。視床下部の第三脳室に面した側壁は、上衣細胞やタニサイトなどのグリア様の細胞で構成されている。タニサイトは栄養素の感知に加え、神経幹細胞様の機能を持ち、視床下部の機能維持や調節において重要な役割を担っている²⁾。しかし、糖や脂質の実際の代謝の場であるオルガネラの応答については未知な部分が多く残されている。

本研究課題では高脂肪食摂餌マウスを視床下部ストレスモデルとし、タニサイトを中心にペルオキシソームを解析することにより視床下部の機能維持に果たすペルオキシソームの機能と作用機構を解明することを試みた。

【方法】

1. 実験マウス

8週齢のオスマウス (C57BL/6) に高脂肪食とそのコントロール食を16週間給餌した。高脂肪食給餌後のマウスより、脳凍結切片を作製し、免疫蛍光法により視床下部におけるペルオキシソームを解析した。同マウスより視床下部を摘出し、ウェスタンブロッティング法によりペルオキシソームタンパク質量を解析した。

2. 初代培養タニサイト

10日齢のマウス視床下部より初代培養タニサイトを単離・培養し³⁾、免疫蛍光法やウェスタンブロッティング法などによりペルオキシソームを解析した。

【結果と考察】

高脂肪食を摂餌したマウスの視床下部においてペルオキシソームの数や形態に顕著な変化は観察されなかったが、タニサイトにおいて一部のペルオキシソームがペルオキシソーム特異的オートファジー (ペキソファジー) 制御因子の一つである p62⁴⁾ と共局在を示した。一方、p62 やペルオキシソームタンパク質量の変化は視床下部全域のウェスタンブロッティング解析では観察されなかった。

高脂肪食摂餌により脳脊髄液中のパルミチン酸の濃度が上昇し、細胞毒性を発揮することが報告されているが⁵⁾、タニサイトに対する作用は不明である。上記のマウスの結果がパルミチン酸のタニサイトへの影響かを調べるために、パルミチン酸添加培地で培養した初代培養タニサイトを解析した。細胞体において p62 陽性構造の増加が観察され、一部のペルオキシソームと共局在を示した。また、生化学的な解析により p62 の蓄積が観察された。これらの結果は高脂肪食摂餌下において脳脊髄液中のパルミチン酸濃度が上昇した結果、タニサイトでのペキソファジーが抑制されたことを示唆している。今後は電子顕微鏡などによる詳細な形態学的解析に加え、脂質酸化などのペルオキシソームの機能解析を行い、視床下部機能維持に果たすペルオキシソームの役割の解明を目指す。

【文献】

- 1) Honsho, M., Yamashita, S. & Fujiki, Y.: Peroxisome homeostasis: Mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals, *Biochim Biophys Acta.*, **863**, 984-91 (2016).
- 2) Prevot V., Dehouck B., Sharif A., Ciofi P., Giacobini P. & Clasadonte J.: The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism, *Endocr Rev.*, **39**, 333-368 (2018).
- 3) De Francesco, PN., Castrogiovanni, D., Uriarte,

M., Frassa, V., Agosti, F., Raino, J. & Perello, M.: A simple strategy for culturing morphologically-conserved rat hypothalamic tanycytes, *Cell Tissue Res.*, **369**, 369-380 (2017).

- 4) Deosaran, E., Larsen, KB., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., Brech, A., Johansen, T. & Kim, PK.: NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes, *J Cell Sci.*, **126**, 939-52 (2013).
- 5) Posey, KA., Clegg, DJ., Printz, RL., Byun, J., Morton, GJ., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, DG., Heinecke, JW., Woods, SC., Schwartz, MW. & Niswender, KD.: Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **296**, (2009).

Wet&Dry 実験を融合させた新しい酵素分子進化法による高比活性 L-グルタミン酸オキシダーゼの耐熱性向上

杉 森 大 助

(福島大学共生システム理工学類)

【研究背景】

L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は食品や生体試料中の L-グルタミン酸 (Glu) 濃度の定量に利用されている産業用酵素である。現在、既存 (上市) LGOX については耐熱性と比活性の向上が望まれている。酵素の耐熱性向上については、世界中で多くの研究者が取り組んでいる課題であり、従来の進化分子工学的手法では比活性や基質特異性を維持したまま耐熱化させることは難しいのが現状である。

【目的】

そこで研究代表者らは、スクリーニングにより取得した *Streptomyces* sp. NT-1 株 LGOX (LGOX_{NT1}) の比活性、基質特異性を一切低下させずに、その耐熱性を 55°C から 70°C まで向上させることを目的とした。

【方法】

温度因子解析によるホットスポット予測および配列データベースの情報を用いた最新の人工タンパク質設計法により耐熱性向上を目指した。前者は予測した部位に aa 置換を導入することにより点変異体を作成した。後者は、まず BLAST サーチによる LGOX_{NT1} のホモログ配列約 5,000 を取得後、MSA により LGOX_{NT1} と非相同な aa を同定した。次に、非相同 aa のうち耐熱化が予想される aa を精選し、相同性が高い aa に置換 (690 aa からなる LGOX_{NT1} の 104 aa を置換) することで、コンセンサス配列を有するフルコンセンサス型酵素 (Fc_LGOX) を設計した。設計した遺伝子配列を全合成し、宿主大腸菌体内に可溶性発現させ、カラムクロマトグラフィー精製した。精製酵素について耐熱性等の諸特性を解析した。

【結果】

温度因子解析による点変異体については耐熱性が 5°C 向上した。一方、精製 Fc_LGOX (比活性 30.3 U/mg-protein) の耐熱性は親型酵素 (rWT) に比べ 15°C 向上し、70°C、30 min インキュベート後でも 100% 活性を維持していた (図 1)。比活性、基質特異性の低下は認められず、耐熱性を向上させることに成功した。Fc_LGOX の aa 配列について分子系統解析を行った結果、rWT と Fc_LGOX 間の aa 配列相同性は 86% と比較的高かったが、分子系統的には独立した末端節を形成した (図 2)。

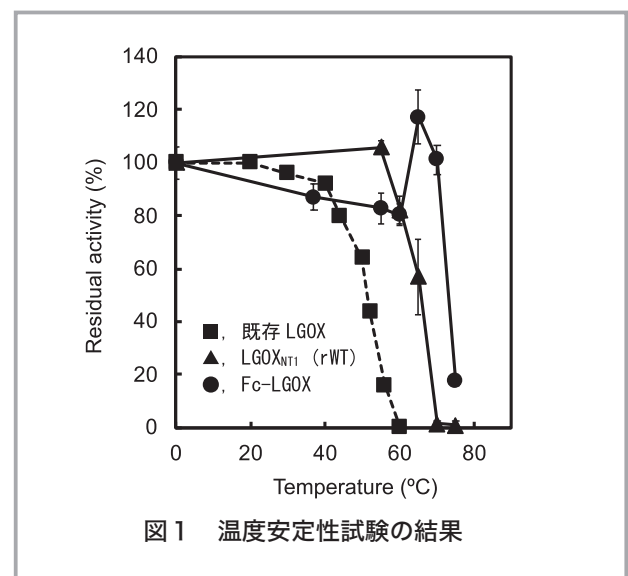


図 1 温度安定性試験の結果

【考察】

WT と Fc_LGOX の立体構造予測モデルを比較すると、

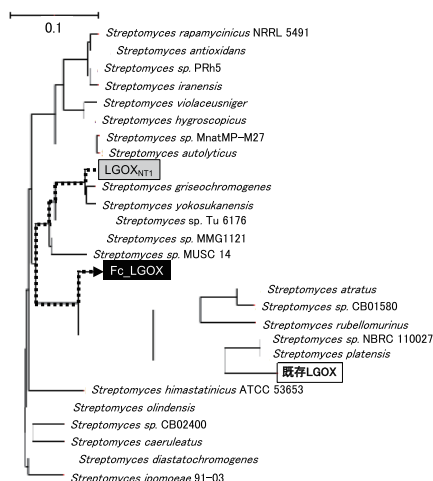


図2 LGOX_{NT1} のアミノ酸配列と類縁関係を持つホモログと Fc_LGOX の分子系統樹

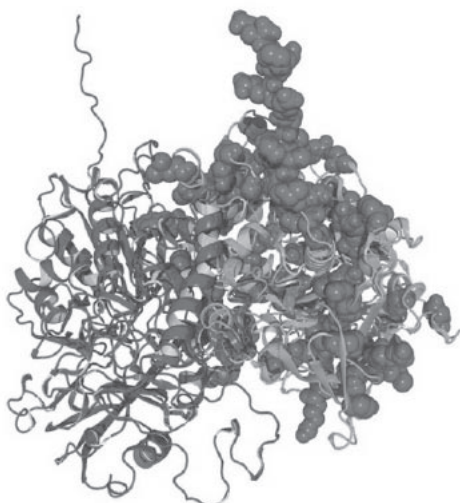


図3 LGOX_{NT1} の立体構造予測モデル(ホモ2量体)と104カ所のアミノ酸置換点(青ボール:一方のサブユニットのみ置換点を表示)

ランダムコイルとサブユニット界面を含む溶媒露出表面に aa 置換が集中していることがわかった (図3)。また、モデル構造比較から WT と比べて Fc_LGOX ではランダムコイルが減少するとともに、酵素分子全体がコンパクトにフォールディングすることによって変性しにくい構造をとり耐熱化したと考えられる。以上のように、タンパク質の溶媒露出表面への aa 置換がタンパク質の機能向上につながるという結果は、これまでの定説とは真逆の結果である点で興味深いといえる。今後、さらに Wet-Dry 実験から得られるデータと、その知見の積み

重ねによって、より普遍性の高い人工タンパク質設計法の確立につながることを期待できる。

澱粉枝作り酵素の特性制御への挑戦

鈴木 龍一郎

(秋田県立大学生物資源科学部)

【目的】

澱粉は人類の主食として重要であり、食品・食品添加物および各種工業分野に利用されている。澱粉は規則正しい分岐を伴ったアミロペクチン分子を主成分としており、アミロペクチンの構造(分岐の長さや数)は物性と相関があることが知られている。アミロペクチンは複数の酵素群の共同作業によって生合成され(図1)、枝作り酵素(BE)はアミロペクチンの分岐構造を決める鍵

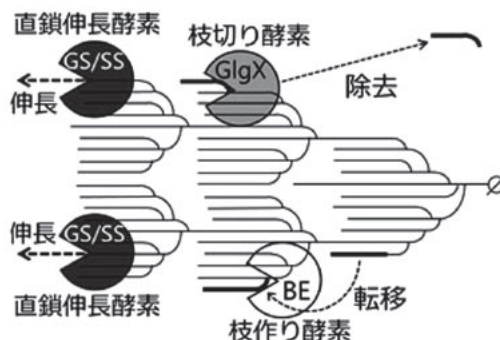


図1 枝作り酵素 (BE) の役割

新しい枝(太い部分)を転移することで、分岐構造の制御に関わっている。

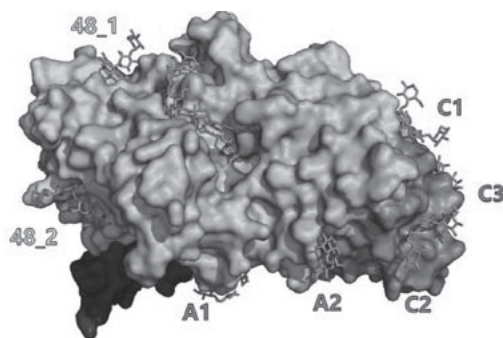


図2 枝作り酵素の結晶構造

中央(活性中心)に結合している糖鎖が酵素特性に関与している。酵素表面の糖鎖結合部位(SBS)は、ラベルした。

酵素である。しかし、構造を制御するメカニズムは不明である。そこで本研究提案では、アミロペクチン構造の制御を目的として、BEの機能改変に挑戦する。

【方法】

これまでに筆者らは、シアノバクテリア *Cyanothece* sp. ATCC 51142 株由来 BE1 が糖鎖と結合した状態の結晶構造を明らかにしている (Hayashi *et al.* 2017)。筆者らは、酵素の活性中心に結合している糖鎖の非還元末端側の構造が反応産物の構造制御に関わっていると予想している (図2)。非還元末端側付近に位置しているアミノ酸残基 (W285, N286, N608, V609) を選び、部位特異的変異導入法によって変異体を構築した。

野生型 BE1 および変異体について、大腸菌内での発現系を用いて組換え酵素を大量調製した。これら組換え酵素の比活性は、ヨウ素染色法によって測定した。さらに、キャピラリー電気泳動法によって、反応産物の構造 (鎖長分布) を解析した。

【結果と考察】

各変異体の比活性は野生型 BE1 と比べて低下していたが、半分程度の値を維持していた。また、反応産物の鎖長分布パターンは、野生型 BE1 と比べて大きな変化は見られなかったが、重合度 (DP) 6-10 のグルカン鎖の生産割合がわずかに変化していた (図3)。このことから、特性を大きく変化させるためには点変異だけでな

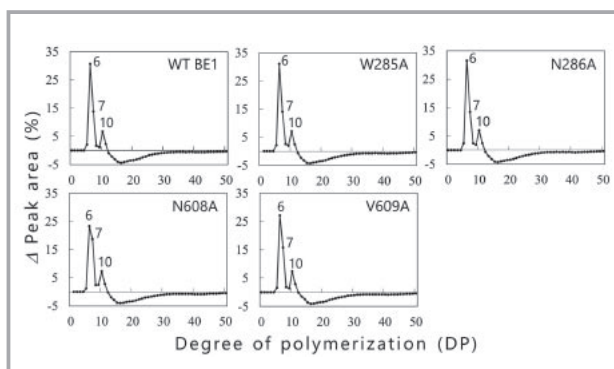


図3 野生型 BE1 と変異体の反応産物の鎖長分布 (差分グラフ)

縦軸は反応産物から基質の割合を引いた差分 (%) を示す。
横軸はグルコースの重合度 (DP) を示す。

く、複数の変異導入が必要であると考えられた。

今後は BE に複数の変異を導入することで、反応産物の構造の大幅な改変を試みたい。さらに、その他関連酵

素についても構造機能相関を解明し、澱粉の酵素合成法の確立を目指して研究を続けていきたい。研究成果が食品産業・各種工業分野への応用につながれば幸いである。

【文献】

Hayashi, M., Suzuki, R., Colleoni, C., Ball, S., Fujita, N. & Suzuki, E.: Bound substrate in the structure of cyanobacterial branching enzyme supports a new mechanistic model, *J. Biol. Chem.*, **292**, 5465 (2017).

メラニン合成酵素の細胞内輸送異常に関連した炎症性腸疾患の制御法開発

竹 森 洋

(岐阜大学工学部)

【目的】

炎症性腸疾患は、腸内細菌に対する過剰な免疫応答により引き起こされる難病である。申請者は自然発生の突然変異マウスの解析で、メラニン合成異常を伴うヘルマンスキー・パドラック症候群5型 (HPS5) 遺伝子変異を同定した。HPS5 変異マウスは炎症性腸疾患 (慢性の炎症性大腸炎) を発症しやすいことを明らかにした。本研究で、日本人患者にも HPS5 遺伝子変異が存在することが示された。平行して、植物成分の 11 α OH-カウレン酸が好中球を介する過剰な免疫反応を抑制することを新たに見出した。さらに、絶滅危惧種植物ヌマダイコンが 11 α OH-カウレン酸を多量に含有することも明らかにできた。ヌマダイコンは中国・台湾で抗炎症を目的とした生薬として利用されている。本研究では、11 α OH-カウレン酸が有する抗炎症作用の炎症性腸疾患治療への応用の可能性を検証した。

【方法】

ヒト HPS5 変異同定は mRNA の配列決定を利用した。炎症性腸疾患モデルには、デキストランサルフェート (DSS) 誘導性のマウスモデル (C57BL/6J) を利用した。11 α OH-カウレン酸の調整には、ヌマダイコンの栽培法を確立し抽出方法を確立した。11 α OH-カウレン酸のメラニン合成抑制効果を生体レベルでの薬効発現マーカー

として利用し、ヌマダイコン抽出液の投与量を決定した。DSS 誘導性大腸炎への効果は、マウスの体重、生存率、解剖、血液マーカーで検証を行った。

【結果】

国内で初めてのヒト HPS5 変異を同定できた。変異はコンパウンドヘテロで存在し、これまで報告の無いものであった。11 α OH-カウレン酸の体内動態検討の結果、経口投与の場合は 100 mg/kg (マウス) が必要と計算された。一方、ヌマダイコン抽出液の経口自由摂取では、乾燥ヌマダイコン重に対して 100 倍量の熱水抽出が投与限界量であった。この投与量では血中 11 α OH-カウレン酸濃度を維持できる量ではないが、毛色で評価されるメラニン合成抑制活性は検出されたため、DSS 試験でも 100 倍量の熱水抽出を採用した。その結果、ヌマダイコン抽出液は DSS 誘導性大腸炎 (急性) の病態を緩和した。

【考察】

今回、ヌマダイコン抽出液が急性の炎症性大腸炎の病態を改善する結果を得た。当初計画では、HPS5 マウスにおける慢性の大腸炎に対する効果も検証する予定であった。しかし、申請者の異動に伴い HPS5 変異マウスをクリーンアップしたことで、腸内細菌叢が変化したためか慢性炎症性大腸炎を発症しなかった。最近、本マウスも慢性病態を発症するようになり、ケージ交換の際に床敷きの一部を残すことで、再現良く病態を発症している。今後、HPS5 マウスの慢性病態に対してもヌマダイコン抽出液と精製 11 α OH-カウレン酸の効果を検討する。また、ヌマダイコンは絶滅危惧種であるが、今回人工栽培法を確立できたため、今後は台湾での使用に習い新規生薬として開発する予定である。

【文献】

Kato, S., Aoe, T., Hamamoto, A., Takemori, H. & Nishikubo, T.: New Deletions in the Hermansky-Pudlak Syndrome Type 5 Gene in a Japanese Patient, Reports 2, 5 (2019).

肝障害に伴い架橋されるサイトケラチンの同定と機能解析

辰 川 英 樹

(名古屋大学大学院創薬科学研究科)

【目的】

本研究は、組織線維化の増悪に係るタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) を対象として、病態進展に伴い架橋される標的基質タンパク質の理解を深め、線維化の病態形成の分子機構の解明および同疾患の治療・予防法の開発に繋げることを目的とする。これまでに肝線維化に伴い架橋される基質タンパク質の網羅的同定を行った結果、肝臓の機能保持および肝障害に密接に関連するサイトケラチン 18 (K18) およびこれとヘテロ二量体を形成するサイトケラチン (K8) が同定された。これらの *in vivo* で得られた知見についてさらなる詳細な検討を行うため、肝障害刺激を与えた肝実質細胞モデルでの再現および TGase の架橋修飾が及ぼす機能変換について解析を行った。

【方法】

8 週齢の雄マウスに胆管結紮を行い、肝線維化を誘導した。胆管結紮により誘導される肝実質細胞障害について細胞レベルで模倣するため、胆汁の主成分であるグリコケノデオキシコール酸 (GCDCA) を肝細胞株に処理して実験を行った。細胞障害の程度は WST-8 やアポトーシスの程度により評価した。細胞中の TGase の活性については、細胞抽出液を作製した後、TGase アイソザイム特異的に反応するビオチン標識基質ペプチドや一級アミンと反応させ、標的基質タンパク質に架橋されて取り込まれるビオチン量を指標として評価した。

【結果】

胆管結紮後の肝臓では TGase の発現増加が見られるのに対し、GCDCA 処理した肝細胞では有意な発現上昇は見られなかった。しかしながら、基質ペプチドやアミンの取り込みによる TGase 架橋活性については、GCDCA 処理により上昇が見られた。興味深いことに、一部のタンパク質の取り込み量において顕著な増加が認められた。また、TGase の siRNA や競合阻害剤を処理したところ、GCDCA による肝細胞障害は有意に抑制さ

れた。

次に、GCDCA 処理により基質ペプチドや一級アミンが特異的に取り込まれるタンパク質について、モノアビジンゲルを用いて精製し、増加したバンドの領域に含まれるタンパク質を質量分析により検証したところ、K18 および K8 が同定された。これらの抗体を用いた検討においても同様に、基質ペプチドやアミンを取り込んだタンパク質中の K18 および K8 量の増加が確認された。

【考察】

これらの結果により、胆管結紮後の肝組織および胆汁酸刺激した肝細胞において、TGase が K18 および K8 を選択的に架橋し、肝細胞の障害性に関わることが示唆された。

【文献】

- 1) Tatsukawa, H., Tani, Y., Otsu, R., Nakagawa, H. & Hitomi, K.: Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates cross-linked by transglutaminases using substrate peptides in mouse liver fibrosis, *Sci. Rep.*, **7**, 45049 (2017).
- 2) 辰川英樹, 人見清隆: 組織の線維化に伴い架橋される基質タンパク質群の網羅的同定・解析, *日本応用酵素協会誌*, **52**, 1 (2017).

アミロイドの生成・脱凝集制御機構の解明

田中元雅

(理化学研究所脳科学総合研究センター)

【目的】

アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病など神経変性疾患では、原因となるタンパク質が凝集し、βシート構造に富んだ線維状のタンパク質凝集体、アミロイドを脳内に生成する。最近の研究では、生成したアミロイドの構造によって、細胞毒性や脳内伝播性が変わることが指摘されているが、モノマーのタンパク質からアミロイドの構造多型が生じるメカニズムには不明な点が多い。また、アミロイドは生成し続ける一方向の現象ではなく、細胞内因子によってオリゴマーやモノマーにま

で脱凝集されることも示唆されている。しかし、その脱凝集のメカニズムの理解はまだまだ十分ではない。本研究では、これまでに我々が様々な実験系を開発しアミロイド研究に適した酵母プリオンタンパク質 Sup35NM の系を用いて、アミロイドの生成・代謝のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

Sup35NM モノマータンパク質の動的な構造揺らぎが、モノマーが凝集して最終的に生じるアミロイドの構造へ与える影響やアミロイドの代謝過程に関して、核磁気共鳴法や一分子蛍光法などを含む各種分光法や質量解析を用いた測定を行った。また、Sup35NM アミロイドの構造多型が細胞の機能や同種・異種間におけるプリオン感染性に与える影響については、出芽酵母を用いた遺伝学的解析などから検討を行った。

【結果】

弱いプリオン株の表現型を示す Sup35NM S17R 変異体のアミロイドの構造が野生型 Sup35NM のものとは大きく異なり、プリオンドメインのカルボキシル末端にアミロイドのコアが存在することを見出した。また、Sup35NM のモノマーは天然変性であるものの、野生型および S17R 変異体のモノマーには局所構造が存在し、その構造揺らぎが互いに異なることを明らかにした。さらには、S17R 変異体アミロイドの伝播性が弱いことを見出し、アミロイド構造が決定するその脱凝集性および伝播性が複数の細胞内因子によって精密に制御されていることを明らかにした。加えて、Sup35NM モノマーの構造揺らぎは、異種間プリオン感染性や、アミロイド構造を介して脱凝集効率にも大きな影響を与えうることを見出した。

【考察】

タンパク質のモノマー状態における動的な構造が、モノマーが凝集して最終的に生じるアミロイドの構造やその伝播性、共凝集効率を制御する要因になることを明らかにした。このことは、モノマータンパク質の揺らぎの制御が神経変性疾患の新たな治療戦略になる可能性を示唆するものである。

【文献】

- 1) Ohhashi, Y., Yamaguchi, Y., Kurahashi, H., Kamatari, Y.O., Sugiyama, S., Uluca, B., Pie-

chatzek, T., Komi, Y., Shida, T., Müller, H., Hanashima, S., Heise, H., Kuwata, K. & Tanaka, M.: Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 2389 (2018).

2) Tanaka, M. & Komi, Y.: Layers of structure and function in protein aggregation. *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 373 (2015).

3) Ohhashi, Y., Ito, K., Toyama, B.H., Weissman, J.S. & Tanaka, M.: Differences in prion strain conformations result from non-native interactions in a nucleus. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 225 (2010).

【謝辞】

公益財団法人日本応用酵素協会の酵素研究助成に深謝いたします。

DNA 酸化酵素による全能性獲得機構の解明

東 田 裕 一

(九州大学稲盛フロンティア研究センター)

【目的】

生殖は生物個体が自己と同じ種に属する個体をつくり出すという、全ての生物に見られる本質的な生命現象である。その生殖において、細胞の全能性 [totipotency] (単独の細胞が自律的に発生を開始し個体を作り出す能力) は、極めて重要な役割を果たしている。しかし、「全能性細胞とはどのような細胞であるか?」という学術的な問いに対し、全能性の分子基盤は未解明である。本研究では、これまでに報告例のない体細胞核移植胚特異的再プログラム化因子として、申請者らが同定した DNA 酸化酵素 TET3 に着目し、体細胞核移植胚の全能性獲得機構解明を目指す。

【方法】

申請者のこれまでの研究により、母性 TET3 の欠損は体細胞核移植胚の胚盤胞期胚 (胎 3.5 日) までの発生には顕著な影響を与えないが、その後の胚発生異常により出生しないことを明らかにしている。そこで本研究では、

母性 TET3 が体細胞核移植胚の発生に果たす役割を明らかにするために、まず胚に異常が生じる発生ステージの同定を体細胞核移植胚の *in vitro* 培養および仮親マウスへの輸卵管移植後の形態観察により行った。次に、母性 TET3 が体細胞核移植胚の遺伝子発現制御において果たす役割を明らかにするために、胚発生に異常が生じる前後の発生ステージの胚におけるトランスクリプトームの RNA-seq 解析を行い、母性 TET3 欠損により生じる遺伝子発現変化を調べた。

【結果】

TET3 欠損による体細胞核移植胚の表現型は、①着床前の胎生 3.5 日までは形態および発生率に顕著な影響がないが、②全く着床せず、③胚が着床する胎生 4.5 日において壁栄養外胚葉形成に異常を生じた。TET3 欠損による遺伝子発現への影響は、④着床前の胎生 3.5 日では顕著な変化はないが、⑤胚が着床する胎生 4.5 日では栄養膜細胞の分化に関連する遺伝子群の発現が顕著に低下した。

【考察】

本研究により、母性 TET3 は体細胞核移植胚において壁栄養外胚葉形成に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、母性 TET3 の欠損が胚の着床不全を引き起こす分子メカニズムに関して、栄養膜細胞への分化に関連する遺伝子群の発現が低下することが明らかになった。しかし、栄養膜細胞への分化に関連する遺伝子群の発現低下が、壁栄養外胚葉形成異常の原因と結果のどちらであるかは不明である。TET3 は DNA 酸化酵素であることから、TET3 欠損の表現型は DNA のメチル化の効力消去や脱メチル化の阻害による遺伝子発現抑制が原因と推測される。そこで現在、母性 TET3 欠損による体細胞核移植胚のメチロームへの影響を PBAT (post-bisulfite adaptor-tagging) 法を用いた DNA メチローム解析により明らかにすることを試みている。

ユビキチン転移酵素を利用した細胞内タンパク質の人工寿命制御

出水庸介

(国立医薬品食品衛生研究所)

【目的】

Crews 教授 (Yale 大), 内藤部長 (国立衛研) らにより開発されたプロテインノックダウン (PROTAC, SNIPER) 法は, ユビキチン転移酵素 (E3) に結合する小分子 (L) と標的タンパク質に結合するリガンド (X) をコンジュゲートした分子 (L-X) を用いることで両タンパク質を架橋し, 標的タンパク質を特異的にポリユビキチン化することでプロテアソームによる分解を誘導する手法である (図1)^{1,2)}. プロテインノックダウンは, タンパク質機構解明の有用な手法のひとつであるが, 現在の手法では標的タンパク質に合わせたリガンドを用いなければならず広い範囲に適用が困難, リガンドが不明なタンパク質には適用不可であるなどの問題点が挙げられる. また UPS を介したタンパク質分解の適用可能範囲は未解明であり, これを網羅的に解析する手法は確立されていない. そこで本研究では, 標的タンパク質に融合

させた His タグをターゲットとすることで標的タンパク質のリガンドを用いない手法を開発³⁾することを目指した.

【方法】

His タグと相互作用するリガンド (NiNTA) と E3 リガンド (BS, MV1), および, これらの分子を細胞内へ導入するための膜透過ペプチド (CPPs) をコンジュゲートしたハイブリッド分子 (BS-NiNTA-CPPs, MV1-NiNTA-CPPs) を合成した. プロテインノックダウンの検討は, His タグ融合 CRABP2 (10xHis-CRABP2-T7) を安定発現させた HT1080 細胞に対して化合物処理を行いウェスタンブロット法によって細胞内タンパク質を定量的に確認することで評価した (図2).

【結果】

化合物 (BS-NiNTA-CPPs, MV1-NiNTA-CPPs) は 10xHis-CRABP2-T7 を分解した. E3 リガンドとしては BS よりも MV1 を導入した化合物がより高い活性を示した. また, プロテアソーム阻害剤である MG132 共存下では化合物の活性が低下したことから, 本分解はプロテアソームにより行われていることが示唆された.

【考察】

開発したハイブリッド分子により His タグタンパク質の分解誘導を達成できた. E3 を利用することで細胞内タンパク質の寿命を人工的にコントロールできる系の構築は, タンパク質の機能解析だけでなく, 新規医薬品の開発を助ける強力なツールとなることが期待できる.

本研究を遂行するにあたり, 多大なご支援を賜りました, 公益財団法人日本応用酵素協会に深く感謝申し上げます.

【文献】

- 1) Paiva, S.L. & Crews, C.M.: Targeted protein degradation: elements of PROTAC design, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **50**, 111 (2019).
- 2) Naito, M., Ohoka, N. & Shibata, N.: SNIPERs-Hijacking IAP activity to induce protein degradation, *Drug Discovery Today: Technologies*, **31**, 35 (2019).
- 3) Okitsu, K., Hattori, T., Misawa, T., Shoda, T., Kurihara, M., Naito, M.* & Demizu Y.*: Development of a small hybrid molecule that mediates degradation of His tag-fused proteins, *J. Med. Chem.*, **61**, 576 (2018).

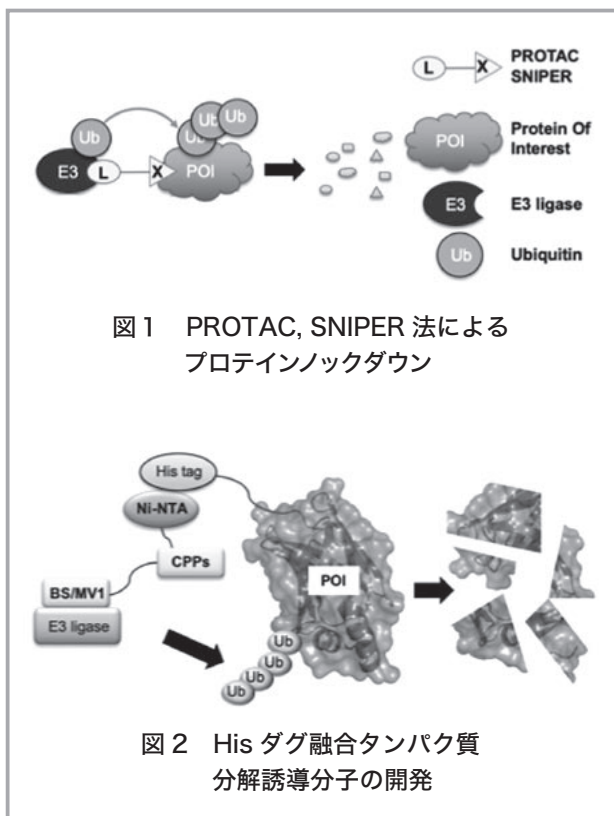


図1 PROTAC, SNIPER 法によるプロテインノックダウン

図2 His タグ融合タンパク質分解誘導分子の開発

蛋白質リン酸化酵素 CaMKII 機能のパラダイムシフト

林 康 紀

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

Ca²⁺/カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ II (CaMKII) は、興奮性シナプス伝達の調節に重要な役割を果たしていると考えられてきた。特に一旦活性化されると、自己リン酸化によって常時活性型になる性質から、長期増強現象を始めとするシナプス可塑性や記憶への関与が示唆されてきた。しかし CaMKII には未だ大きな謎がある。一つは、シナプス後部での量、もう一つは回転対称型 12 量体構造である。これらに対し、明快な説明はなかった。我々は、CaMKII の真の機能は同様な結合により他のタンパク質と複合体を形成することにより、液-液相分離を起こし、それにより、活動依存的なシナプス局所へのタンパク質の移行と濃縮を起こすという仮説を立てた。

【方法】

CaMKII が液-液相分離を起こすかを検討するため、CaMKII、代表的な PSD タンパク質である、PSD-95、CaMKII と結合することが知られている NMDA 受容体細胞内カルボキシル末端、AMPA 受容体補助サブユニット Stargazin 細胞内カルボキシル末端をそれぞれ大腸菌で発現し、精製した。NMDA 受容体細胞内 C 末端、AMPA 受容体補助サブユニット Stargazin 細胞内 C 末端は蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質とし、また PSD-95、CaMKII は蛍光色素を、クロスリンカーで結合させた。それぞれのタンパク質を Ca²⁺/CaM の存在下、非存在下で混合、静置し、蛍光顕微鏡で観察した。

【結果・考察】

CaMKII、PSD-95、NR2B は Ca²⁺ の非存在下では殆ど液-液相分離を起こさなかった。しかし、そこに Ca²⁺/CaM を添加すると、液-液相分離を起こした。位相差顕微鏡観察下では、油滴状の濃縮相が多数観察され、また蛍光顕微鏡下でも 3 つのタンパク質が取り込まれている様子が観察された。次に Stargazin を加えた場合、PSD-95、NR2B、Stargazin の 3 つが、均一な、液-液相

分離を起こしたが、CaMKII は取り込まれなかった。しかし、Ca²⁺/CaM を添加すると CaMKII が取り込まれるのと同時に、液相内分離を起こし、CaMKII-NR2B が外側、Stargazin-PSD-95 が内側の 2 つに分離した。

これらの結果は、CaMKII がシナプスタンパク質と共に液-液相分離を起こすことに依り、シナプス内部でのタンパク質の局在分布の調節に関与していることが示唆された。AMPA 受容体はグルタミン酸に対する親和性が低く、神経伝達放出部位の直下に存在しないと機能しない。CaMKII は、神経伝達放出部位の直下に AMPA 受容体を集積することに依って、シナプス伝達効率を調節している可能性がある。

スフィンゴミエリン合成酵素とグルコシルセラミド合成酵素のヘテロ複合体の解析

林 康 広

(帝京大学薬学部)

【目的】

スフィンゴミエリン (SM) とスフィンゴ糖脂質は、共通の基質であるセラミドにホスホコリンか糖のいずれかが結合することによってゴルジ体で産生される。400 種以上に及ぶ多種多様な糖鎖構造を示す脊椎動物のスフィンゴ糖脂質の大部分は、セラミドに D-グルコースがβ結合したグルコシルセラミド (GlcCer) を基本骨格とする。SM 合成酵素はアミノ酸配列の異なる SMS1 および SMS2 の二つのアイソフォームからなるが、哺乳類の GlcCer 合成に関わる酵素は現在までに GlcCer 合成酵素 (GlcT) の 1 種しか見つかっていない。つまり、SM 合成酵素と GlcT はゴルジ体におけるセラミド代謝の鍵酵素といえる。SM とスフィンゴ糖脂質が形成する脂質マイクロドメインは空間および機能的にも異なることが考えられており、ゴルジ体でセラミドが SM または GlcCer のどちらに合成されるかは、脂質マイクロドメインを介した細胞間・細胞内のさまざまなイベントに影響すると思われる。

我々は SM 合成酵素のホモ二量体の解析で、蛍光タンパク質再構成法を用いてアミノ末端の近接を調べた。その解析過程で異なるゴルジ槽に局在すると考えられてい

る SMS1 と GlcT の組み合わせをネガティブコントロールとして用いたが、予想に反してゴルジ体で蛍光タンパク質の再構成が観察され、SMS1 と GlcT は近接することが示唆された。Halter らはタグを付加した SMS1 と GlcT を安定発現する HeLa 細胞において電子顕微鏡で細胞内局在を調べたところ、二つのタンパク質はゴルジ体で実質的には異なる分布を示すが部分的に共局在することを報告している。しかしながら、ゴルジ体で共局在する SMS1 と GlcT の役割については不明な点が多い。そこで、SMS1 と GlcT のヘテロ複合体の形成に重要なアミノ酸領域、および、その機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

【方法・結果・考察】

(A) GlcT は、SMS2 よりも SMS1 に親和性が高い

レトロウィルスの発現系を用いて、C末端に V5-tag を付加した SMS1 および SMS2 を安定に発現する COS-7 細胞を作製した。これらの細胞に C末端に HA-tag を付加した GlcT を発現させ、1% CHAPS で可溶化し、抗 HA ビーズを用いて免疫共沈を行った。その結果、GlcT は SMS2 よりも SMS1 と親和性が高いことが分かった。コンフォーカル顕微鏡で細胞内局在を調べると、SMS1 はゴルジ体で GlcT と完全に共局在するが、SMS2 はゴルジ体および形質膜に局在するため、部分的にゴルジ体で GlcT と共局在した。これらの結果より、SMS1 と GlcT はゴルジ体でヘテロ複合体を形成することが示唆された。

(B) SMS1-GlcT ヘテロ複合体における近傍領域の同定

SMS1 と GlcT のアミノ末端が近接するのかを蛍光タンパク質再構成法で調べた。蛍光タンパク質 Venus の N末端側 (VN) あるいは C末端側 (VC) を SMS1 の N末端あるいは C末端に付加したキメラ蛋白質、そして VC を GlcT の N末端あるいは C末端に付加したキメラ蛋白質の発現ベクターを構築した。これらを COS-7 細胞に発現させ、コンフォーカル顕微鏡およびフローサイトを用いて細胞内局在および蛍光強度を解析した。コンフォーカル顕微鏡より、各キメラ蛋白質はゴルジ体に局在することが分かった。フローサイトの解析より、SMS1-GlcT ヘテロ複合体において、GlcT の C末端は SMS1 の N末端と最も近接することが分かった。N, C末端にタグを付けた SMS1, GlcT を細胞に発現させ、

digitonin 処理後に細胞を免疫染色し、SMS1 と GlcT の N, C末端配向を調べた。その結果、SMS1 の N, C末端はゴルジ体において細胞質に配向するが、GlcT は N末端がゴルジ体のルーメン側、C末端を細胞質側に配向することが明らかになり、蛍光タンパク質再構成法の結果を支持するものであった。これらの結果より、SMS1 の N末端と GlcT の C末端はゴルジ体の細胞質側で近接することが分かった。

(C) SMS1 の N末端の SAM 領域は GlcT との親和性に重要である

SMS1 の N末端 (4-68 a.a.) には、sterile alpha motif (SAM) 領域が存在する。SAM 領域はタンパク質相互作用を媒介すると考えられているが、SMS1 の SAM 領域の機能は解明されていない。SMS1 の N末端は GlcT の近傍に存在することから、SMS1 の SAM 領域が SMS1-GlcT ヘテロ複合体の形成に関与するのかを免疫共沈で調べた。興味深いことに、SMS1-ΔN68 は野生型 SMS1 と比較して GlcT との親和性が低下することが明らかとなった。コンフォーカル顕微鏡より、SMS1-ΔN68 はゴルジ体に局在し、細胞内局在に変化はなかった。以上のことから SMS1 の SAM 領域は、細胞内局在に影響せずに、SMS1-GlcT ヘテロ複合体間の親和性に関与することが分かった。

(D) SMS1-GlcT ヘテロ複合体は SM 合成を正に制御する

SMS1 と GlcT のヘテロ複合体の形成が、SM 合成に与える影響を調べた。内在性の SMS1, GlcT による影響を防ぐために、CRISPR/Cas9 システムを用いて HEK293T 細胞より SMS1-GlcT ダブルノックアウト (DKO) 細胞を作製した。FKBP (FK506-binding protein)-SMS1 キメラタンパク質と FRB (FKBP-rapamycin binding protein)-GlcT キメラタンパク質を発現する SMS1-GlcT DKO 細胞に対し、ラパマイシン処理でヘテロ複合体の形成を誘導すると、ラパマイシン未処理と比べて、¹⁴C-ステアリン酸代謝ラベルによる SM 合成速度が約 30% 増加した。また、グリシンとセリンの繰り返し配列である GS リンカーでつなげた SMS1 と GlcT のキメラタンパク質でも、野生型 SMS1 よりも SM 合成速度が増加したことから、SMS1-GlcT 複合体は SM 合成を正に制御することが明らかになった。

以上の研究成果を【文献】に記すように Hayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2018) で報告しました。日本応用酵素協会の研究助成金は、研究を円滑に進めて頂けただけではなく、研究者として大きな励みになりました。貴財団の助成金採択者として、今後も研究に努力していきます。

【文献】

- 1) Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Matsumoto, N., Hama, K., Tanikawa, T., Oka, S., Saeki, T., Kumasaka, T., Koizumi, T., Arai, S., Wada, I., Yokoyama, K., Sugiura, T., & Yamashita, A.: Complex formation of sphingomyelin synthase 1 with glucosylceramide synthase increases sphingomyelin and decreases glucosylceramide levels, *J. Biol. Chem.*, **293**, 45 (2018).

環境条件に応じた組織破壊を伴わないグルコシノレートの分解機構

丸山明子

(九州大学農学研究院)

【目的】

グルコシノレート (GSL) は、アブラナ科植物が生合成する含硫化合物であり、病虫害への忌避に働く他、発ガンを抑制する効果も知られる。GSL とその分解酵素 β -グルコシダーゼ (BGLU) は別の細胞に存在し、食害などの組織破砕に伴って分解が起きると考えられてきた。一方で硫黄の貯蔵物質としての GSL の役割も提唱されてきた。アブラナ科植物では総硫黄量の 30% にものぼることがあり、特に種子には多く蓄積する。植物が暗条件や硫黄欠乏 (-S) にさらされると GSL 量が急速に減少する^{1,2)}。これにより、一次代謝へと硫黄が回収され、貧栄養下で植物の生存が維持されると考えられる。しかし、これらの環境変化に応じた GSL の分解機構についてはほとんど知見がない。BGLU28, BGLU30 の発現が -S で、BGLU30 の発現が暗所で著しく上昇することから、これらが GSL の分解に働くと予測される。本研究では、BGLU28, BGLU30 に着目する事で環境変

化に応じた組織破壊を伴わない GSL の分解機構を解明することを目的とした。

【方法】

植物材料としてシロイヌナズナの野生型株 (WT), 硫酸イオン輸送体 SULTR1; 2 の欠損株 (*sultr1;2*), BGLU28, BGLU30 の欠損株 (*bglu28*, *bglu30*, *bglu28/bglu30*) を用いた。植物体各部位の採取にはバーミキュライト上で MGRL 水耕液を用いて栽培した植物を用いた。GM 培地上で 3 週間育成した植物をアルミで覆うことで暗処理とした。硫黄十分 (+S), -S の処理は MGRL 寒天培地中の硫酸イオン濃度を 1500 μ M (S1500), 15 μ M (S15), 0 μ M (S0) に調整して行った。

育成後の植物を抽出し、GSL (LC-MS), 硫酸イオン (イオンクロマト), システイン, グルタチオン (HPLC) 量を測定した (括弧内は測定機器)。総硫黄は試料を硝酸分解後、ICP-MS で測定した。転写産物量は各植物試料から抽出した RNA から cDNA を作成し、定量 PCR により測定した。

【結果】

① 植物体各部位の GSL の量と組成に及ぼす -S の影響を WT と *sultr1;2* (植物体内の硫酸イオン量が少なく -S と似た表現型を示す植物³⁾) を用いて解析した。葉や茎では *sultr1;2* で GSL 量が減少したのに対し、さやや種子では *sultr1;2* でも mGSL 量が維持されていた。GSL 以外の含硫代謝物量は全ての部位で *sultr1;2* で減少した⁴⁾。

② 暗処理では BGLU30 の発現が著しく上昇した。暗処理による GSL 蓄積への影響を WT と *bglu30* で比較した。WT では 3 日間の暗処理で GSL が著しく減少したのに対し、*bglu30* ではこの減少が認められなかった。GSL 以外の含硫代謝物量は植物間で変化しなかった。

③ -S が GSL の蓄積に及ぼす影響を WT と *bglu28*, *bglu30*, *bglu28/bglu30* で比較した。WT と *bglu28*, *bglu30* では S15, S0 で著しく GSL 量が減少した。*bglu28/bglu30* は S1500 では WT と同程度に GSL を蓄積したが、S15, S0 では他の植物と比べて極多量の GSL を蓄積し、S0 では生育が抑制された。

【考察】

①より、-S 下でも GSL が種子に優先的に蓄えられる

と結論した⁴⁾。GSLの貯蔵物質としての役割が強く示唆された。②より、BGLU30が暗所におけるGSLの分解を担う事を示した。暗所では光合成も抑えられるため、GSL分解で生じるグルコースが回収され、植物の生育を支えると考えられる。③より、BGLU28, BGLU30が-S下でGSLの分解を担う事を示した。各単一欠損株ではWTと違いがなく、二つの酵素が協調して働く可能性が示唆された。S0での生育抑制は、GSL分解が-Sでの植物の生育に大きく寄与する事を示している。

【文献】

- 1) Huseby. *et al.*: *J. Exp. Bot.*, **64**, 1039-1048 (2013).
- 2) Maruyama-Nakashita. *et al.*: *Plant Cell.*, **18**, 3235-3251 (2006).
- 3) Maruyama-Nakashita, *et al.*: *Plant Physiol.*, **132**, 597-605 (2003).
- 4) Morikawa-Ichinose, *et al.*: *Plants.*, **8**, 95 (2019).

DNA切断酵素による血中DNA生成のメカニズムの解明と臨床応用の可能性

水田 龍 信

(東京理科大学生命医学研究所)

【目的】

血液中には、微量ながら分解を免れた cell-free DNA (cfDNA) といわれる DNA が存在する。この cfDNA の生成メカニズムに関しては不明な点が多いが、その応用に関しては近年臨床分野で大きな注目を集めている。例えば、妊婦の血流中には胎児由来の cfDNA が存在し、これは胎児の出生前診断に用いられている。また cfDNA の中には、がん細胞由来のものもあり、がんの診断に応用できることから、その解析はゲノム医療の基盤技術として大きな位置を占めつつある。本研究では、cfDNA の生成メカニズムの解明を目的とし、特に、その生成に関与すると予想された二つの DNA 切断酵素に注目して解析を行った。

【方法】

cfDNA はモノヌクレオソーム単位の DNA 断片が多

いことから、その生成には細胞死の際の DNA 断片化酵素が関与することが予想された。細胞死はその形態学的な違いからアポトーシス、ネクローシスに大別され、それぞれの代表的な DNA 切断酵素として CAD, DNase γ (別名 DNase1L3) があり、いずれも DNA 断片化を起こすことが明らかになっている。そこで、野生型マウス (WT)、それぞれの遺伝子欠損マウス (CADKO, DNase γ KO)、その両遺伝子を欠損したマウス (DKO) に肝細胞ネクローシス、あるいは肝細胞アポトーシスを誘導し、血中 cfDNA の検出を試みた。

【結果】

WT, CADKO では、アポトーシス、ネクローシスのいずれにおいても同程度の cfDNA が認められたが、DNase γ KO では、アポトーシスにおいてはその生成が部分的に抑制され、ネクローシスにおいてはさらに抑制が顕著であった。また DKO ではいずれの誘導の際にも、cfDNA は全く検出されなかった。このことは、ネクローシスの場合は DNase γ が、またアポトーシスの場合は CAD と DNase γ の両方が cfDNA の生成に必要であることが明らかになった。

【考察】

血液中には DNase γ のほかに DNase I が存在し、これまで cfDNA の生成には DNase I が主たる役割を担っていると考えられていたが、今回の結果より、DNase I はむしろ cfDNA の分解に寄与することが示唆された。本研究により cfDNA の生成メカニズムが解明されたが、この発見は、酵素の特異性をふまえた cfDNA の評価ならびに精製プロトコルの作製に寄与するものと期待される。

【文献】

- 1) Watanabe, T., Takada, S., & Mizuta, R.: Cell-free DNA in blood circulation is generated by DNase1L3 and caspase-activated DNase, *BIOCHEM. BIOPH. RES. CO.*, **516**, 790 (2019).
- 2) 水田龍信: 細胞死における DNase γ の役割, *臨床免疫・アレルギー科*, **71**, 114 (2019).

慢性ストレス応答に関連する脳内 PI3K シグナルの重要性

宮田 信吾

(近畿大学東洋医学研究所)

【目的】

研究代表者はこれまでに Adult マウスへの慢性ストレス負荷による脳内変化として、神経細胞ではなくグリア細胞のひとつである成熟オリゴデンドロサイトでの特異的な PI3K シグナルに関与するセリンスレオニンキナーゼである SGK1 (Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1) の発現上昇およびリン酸化による活性化が引き起こされること、さらにはこの SGK1 活性化によりカドヘリン等の接着因子群につながるシグナル伝達機序を明らかにしてきた¹⁾。また、オリゴデンドロサイトの形態変化の有無等についても検討したところ、SGK1 カスケードの活性化により成熟オリゴデンドロサイト特異的に突起の異常分岐と細胞質部分の増大が引き起こされる可能性についても明らかにしてきた¹⁾。そこで、本研究助成では、慢性ストレス負荷時の成熟オリゴデンドロサイト特異的 SGK1 活性化経路の重要性の解明を目指して線維束での髄鞘/ランビエ絞輪部における詳細な検討を行った。

【方法および結果、考察】

我々は複数の慢性的ストレス負荷マウスでのうつ様症状や不安症状の解析を試みているが、これまでの検討からは髄鞘/ランビエ絞輪部での脱髄様の所見は観察されていない。そこでより詳細に髄鞘の構造的・機能的な変化の有無について検討を行った。免疫染色法等による検討からは、ランビエ絞輪部のノード領域幅は縮小しているもののノード-パラノード間の境界は明瞭であった。しかし、パラノード領域の縮小像とは異なり、パラノード局在タンパク質の一つ Caspr とジャクスタパラノードに局在する Kv1.1 の局在が境界領域で広がっており、結果的にパラノード-ジャクスタパラノード間の境界が不明瞭で共局在している様な画像を得た。次に、このような髄鞘/ランビエ絞輪部の構造変化が軸索活動レベルに影響し得るか否かについて検討したところ、跳躍伝導活性に関連する Na/K ATPase 活性の低下やオリゴデ

ンドロサイトの脱分極レベルの調整に重要な cAMP レベルが低下することを見出した。

以上の結果より、慢性ストレス負荷による成熟オリゴデンドロサイト特異的 SGK1 による PI3K シグナル経路活性化により、cAMP 量調節を介した髄鞘 Na/K ATPase 活性調節が行われる可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Miyata, S. & Tohyama, M. *et al.* Plasma corticosterone activates SGK1 and induces morphological changes in oligodendrocytes in corpus callosum. *PLoS One.*, **6**, e19859 (2011).

光応答性キナーゼ酵素の開発と神経シナプスへの応用

村越 秀治

(自然科学研究機構生理学研究所)

【目的】

本研究では、プロテインキナーゼである CaMKII を 2 光子励起で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で直接制御できるように遺伝子改変する。さらにこれらを、神経細胞シナプス内で活性化させることにより、光照射によってシナプスの可塑的变化(長期増強)を惹起できるような光遺伝学的ツールを開発することを目的としている。

【方法】

プロテインキナーゼを遺伝子改変により、光応答性分子である LOV2 ドメインと融合することにより、2 光子励起によって活性化させることができる光応答性分子を遺伝子工学的に開発する。さらに光応答性 CaMKII を海馬神経細胞に遺伝子銃を用いて導入し、シナプス内で、2 光子励起により直接活性化することによって、CaMKII の機能を直接調べ、シナプス長期増強が惹起できるかどうかを調べる。具体的には、光応答性 CaMKII を 1 個のシナプス (スパイン) 内で活性化し、スパインの体積変化を 2 光子顕微鏡で観察する。また、シナプス長期増強が惹起できるかどうかを電気生理学的に調べる。

【結果】

Phototropin1 は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、青色光照射によって、自身の持つ LOV2 ドメ

ンに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。我々はLOV2ドメインを用いて、現在までにpaCaMKIIのプロトタイプの開発に成功した。海馬スライスに遺伝子銃を用いてpaCaMKIIを導入し、900 nmの2光子励起でpaCaMKIIを単一スパイン内で活性化させたところ、体積増大（シナプス形態的可塑性）が見られた。また、化学伝達物質であるグルタミン酸の受容体であるAMPA受容体の局在が、paCaMKIIを活性化させたスパイン内で増加していることを蛍光イメージングと電気生理実験の両面から確認することができた（Shibata *et al.* in preparation）。さらに、海馬のみならず、大脳皮質スライスにおいても単一スパインに可塑的形態変化を惹起することに成功した。

【今後】

現在までに海馬・大脳スライスでシナプスの可塑的変化を惹起することに成功しているため、今後は個体マウスで照射によりスパインの体積変化が惹起出来るかどうかを確認する。そのために、光応答性CaMKIIをコードするアデノ随伴ウイルスを作製し、マウス大脳皮質の神経細胞にプローブを発現させ、光応答性キナーゼを光活性化できるかどうかを個体マウスのレベルで確認する予定である。このようにして、個体動物にも応用可能な光応答性分子を開発し、シナプスと記憶の関係を調べるためのツール開発を進める。

昆虫細胞によるインフルエンザウイルス様粒子の分泌生産

山 地 秀 樹

(神戸大学大学院工学研究科)

【目的】

治療薬とは異なり、健常者を対象とするワクチンは大量生産が必須であり、安全で安価なワクチンを迅速に製造する技術が必要とされる。ウイルスの表面タンパク質の遺伝子を哺乳動物細胞で発現させると、ウイルス感染細胞と同様の生合成過程を経てウイルス様の空の粒子が形成、分泌される。ウイルス様粒子はゲノムをもたず感染性がないため安全性が高く、本来のウイルス抗原と同等の抗原性や免疫原性を示すことから、安全かつ有効な

次世代ワクチンとして注目されている。ところが、ウイルスタンパク質が動物細胞に毒性を示すため、生産性が低いことが実用化を妨げていた。昆虫細胞は本来の構造や機能を保持した組換えタンパク質を大量に生産可能であり、動物ウイルスのタンパク質を発現させても細胞毒性が低いことから、ウイルス様粒子を生産するための強力なプラットフォームになると考えられる。本研究では、組換え昆虫細胞によりA型のインフルエンザウイルス様粒子を高分泌生産するための基盤技術を開発する。

【方法】

インフルエンザAウイルスの構造タンパク質のうち、主要感染防御抗原であるヘマグルチニン（HA）とエンベロープを裏打ちしているマトリックスタンパク質M1の遺伝子を高発現型のプラスミドベクターを用いて昆虫細胞に導入し、両遺伝子を共発現する組換え細胞を作製する。分泌タンパク質や一部の膜内在性タンパク質のN末端に存在するシグナルペプチドは、シグナル認識粒子の作用により小胞体膜へと誘導された後、酵素シグナルペプチダーゼによって切断される。本研究では、HAやM1のN末端に付加するシグナルペプチドがウイルス様粒子の分泌生産に及ぼす影響について検討する。

【結果と考察】

*Drosophila*由来のBiPシグナルのN末端領域、中央部領域、およびC末端領域に特徴的なアミノ酸の種類・数を変化させ、昆虫細胞High Fiveによる抗体の分泌生産を比較検討した。その結果、分泌生産量は顕著に増減し、シグナル配列の改変は組換えタンパク質の生産性を向上させる有効な手段となることがわかった¹⁾。

次に、BiPシグナルまたはバキュロウイルス由来のgp64シグナルを付加したHAおよびM1の遺伝子をHigh Fiveで発現させると、BiPシグナルを用いた場合にM1の分泌発現量が増大した。BiPシグナルを付加したHAおよびM1の遺伝子をHigh Fiveに導入して作製した安定発現細胞は、HAとM1から構成されるウイルス様粒子を高分泌生産することがわかった²⁾。

【文献】

- 1) Ohmuro-Matsuyama, Y. & Yamaji, H.: Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells, *Cytotechnology.*, **70**, 891-898 (2018).

2) Matsuda, T., Tanijima, T., Masumi-Koizumi, K., Katsuda, T., & Yamaji, H.: Production of influenza virus proteins using recombinant insect cells, *APCCHE 2019 Proceedings*, 6 pages (2019).

マルチカラー生物発光共鳴エネルギー移動法を用いたゲノム DNA メチル化レベル定量法の開発

吉田 亘

(東京工科大学応用生物学部)

【目的】

DNA メチル化とは CpG 配列中のシトシンがメチル化される反応であり、遺伝子発現制御に関連している。正常細胞と比較してがん細胞ではゲノム全体の DNA メチル化レベルが低下しているため、ゲノム DNA のメチル化レベルはがんのバイオマーカーとなる。これまでに本研究室ではメチル化 CpG 結合蛋白質 (Methyl-CpG-binding domain: MBD) と Firefly luciferase (Fluc) の融合蛋白質 (MBD-Fluc) を用いた、メチル化 CpG 定量法を開発している¹⁾。本手法はゲノム DNA に結合させたインターカーター (BOBO-3) と Fluc 間で起こる生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を利用した定量法である。さらに、非メチル化 CpG 結合蛋白質 CXXC と Fluc の融合蛋白質 (CXXC-Fluc) を用いて、非メチル化 CpG を定量できることを示している²⁾。そこで本研究では、Fluc より最大発光波長が短い *Oplophorus luciferase* (Oluc) を CXXC に融合させた蛋白質 (CXXC-Oluc) を開発し、MBD-Fluc と同時に用いれば、メチル化と非メチル化 CpG を同時に定量できると考えた (Fig. 1)。つまり、本手法を用いればゲノム DNA のメチル化レベルを簡便に定量できると考えた。

【方法】

CXXC-Oluc 発現ベクターを構築し、BL21 (DE3) を用いて CXXC-Oluc を発現させ、strep-tag システムを用いて精製した。精製した CXXC-Oluc とインターカーター BOBO-1 を HeLa ゲノム DNA に混合し、BRET シグナルがゲノム DNA の濃度に依存するか検討

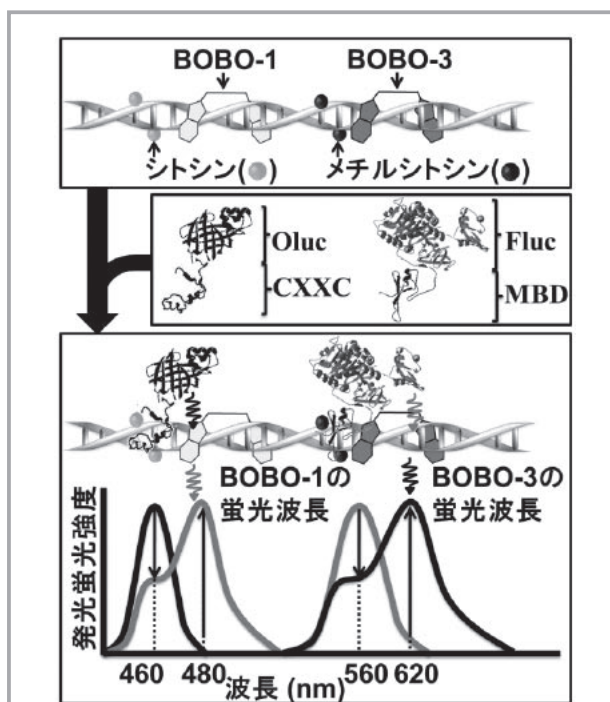


Fig.1 CXXC-Oluc と MBD-Fluc を用いた DNA メチル化レベル定量法の原理

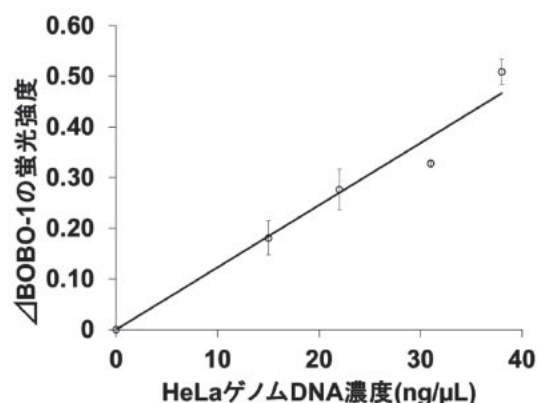


Fig.2 CXXC-Oluc と BOBO-1 を用いたゲノム DNA 定量結果

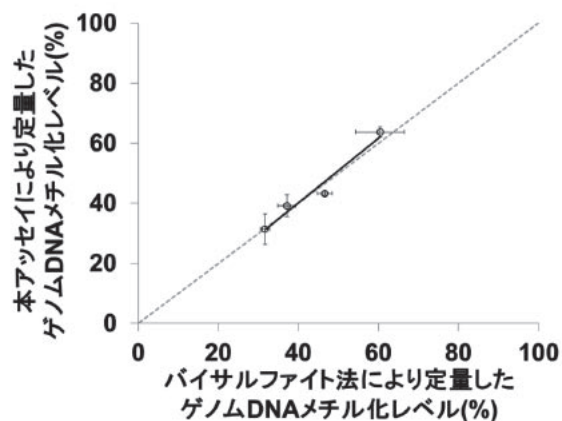


Fig.3 CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 を用いたゲノム DNA メチル化レベル定量結果

した。最後に、CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 を HeLa ゲノム DNA に混合し、それぞれの BRET シグナルからゲノム DNA のメチル化レベルを定量できるか検討した。

【結果および考察】

SDS-PAGE 解析の結果、溶出画分で目的の位置 (27 kDa) 付近にシングルバンドが確認できたことから、CXXC-Oluc を組換え生産できたことが示された。ゲノム DNA に CXXC-Oluc と BOBO-1 を加え、BRET シグナルを測定した結果、ゲノム DNA の濃度依存的に BRET シグナルが観察された (Fig. 2)。つまり、ゲノム DNA 上で CXXC-Oluc と BOBO-1 間で BRET が生じていることが示された。最後に、CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 をゲノム DNA に混合し、それぞれの BRET シグナルを測定した。その結果、CXXC-Oluc と BOBO-1 間の BRET シグナルは非メチル化 CpG 量に、MBD-Fluc と BOBO-3 間の BRET シグナルはメチル化 CpG 量に依存することが示された。これら BRET シグナルから、ゲノム DNA のメチル化レベルを算出した結果、既存法で定量したメチル化レベルと一致した (Fig. 3)。以上の結果より、CXXC-Oluc, MBD-Fluc, BOBO-1 および BOBO-3 を用いたマルチカラー BRET 法によりゲノム DNA のメチル化レベルを簡便に定量できることが示された³⁾。

【文献】

- 1) Yoshida, W., Baba, Y. & Karube, I.: Global DNA methylation detection system using MBD-fused luciferase based on bioluminescence resonance energy transfer assay, *Anal. Chem.*, **88**, 9264 (2016).
- 2) Yoshida, W., Baba, Y., Banzawa, K. & Karube, I.: A quantitative homogeneous assay for global DNA methylation levels using CpG-binding domain- and methyl-CpG-binding domain-fused luciferase, *Anal. Chim. Acta.*, **990**, 168 (2017).
- 3) Baba, Y., Yamamoto, K. & Yoshida, W.: Multicolor bioluminescence resonance energy transfer assay for quantification of global DNA methylation, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (2019).

鉄硫黄クラスター生成複合体に存在する分子内トンネルによる硫黄輸送メカニズムの解明

和田 啓

(宮崎大学医学部)

【目的】

鉄硫黄 (Fe-S) クラスターは、タンパク質内部に存在する金属補因子であり、一般に [4Fe-4S] や [2Fe-2S] の形が知られている。これら Fe-S クラスターは生物界に普遍的に分布しており、呼吸、光合成、アミノ酸やビタミン合成、遺伝子制御に至るまで生命活動の根幹に関わる反応の活性/触媒中心となっている。Fe-S クラスターは単純な構造だが、細胞内では多成分で構成される複雑なマシンリーが生成を担う。その代表である SUF マシンリーは、オペロンにコードされる六種のタンパク質 (SufABCDSE) から構成される。この心臓部であるコア複合体 (SufBCD 複合体) は、新規な構造 (長鎖βヘリックス構造) をもち、かつ新規なオリゴマー形成様式をもつ^{1,2)}。本研究では、構造変化により緻密に制御された Fe-S クラスター合成反応機構の全容を解き明かすことを目指し、コア複合体内部の「トンネル構造」の生理機能を可視化することを目的とした。

【方法】

ランダム変異導入をコア複合体 (SufB 領域) に導入し、複合体内の機能残基を大腸菌の生育能で評価する *in vivo* 相補実験系を進めた。機能必須残基への変異が与える影響を複合体の生化学解析により精査した。さらに、立体構造に基づくコンピューターシミュレーションによって、コア複合体内部のトンネル構造の機能性を推定した。

【結果および考察】

コア複合体の機能に必須な残基を探索したところ、SufB サブユニット Cys405 および SufB サブユニット Cys254 が機能に必須であることを明らかにした。分子全体の形として細長いβヘリックス構造をもつ SufB において、これらの残基はそれぞれ分子の両端に位置していた。Cys405 は分子内部の Fe-S クラスター合成サイト付近、Cys254 は分子表面に存在し硫黄原子の受け取りに機能することを明らかにした。コア複合体の立体構

造の詳細を分析したところ、これらの残基間を繋ぐように、分子内部を貫通するトンネルが存在していることが分かった。コンピューターシミュレーション (MD 法) によって、このトンネルは硫黄原子が通過できるサイズを持つことが推定された。これらを踏まえ、SufBCD 複合体における Fe-S クラスター生合成機構を提唱した。

【文献】

- 1) Hirabayashi, K. *et. al.*: *J. Biol. Chem.*, **290**, 29717–29731 (2015).
- 2) Yuda, E., *et. al.*: *Sci Rep.*, **7**, 9387 (2017).

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、*K. pneumoniae* の Th1 誘導に関与する因子の同定のため、*K. pneumoniae* のゲノム比較、*K. pneumoniae* の遺伝子改変を行った。

【方法、結果】

K. pneumoniae の内、腸内に定着し Th1 細胞を強く活性化する株である 40B3 株と Th1 細胞の活性化にはほとんど影響を与えない KCTC2242 株から DNA を精製しゲノムシーケンスを行った。その結果、40B3 株特異的に保有している遺伝子として 229 個の遺伝子を同定した。しかしながら、その多くが機能未知の遺伝子であり、遺伝子名から Th1 誘導に関与する遺伝子の探索は難しいことが判明した。そこで 1 遺伝子ではなく、複数の遺伝子が含まれる 8kb 以上の領域に違いがないかを解析した。その結果、40B3 株が保有し KCTC2242 株が保有していない領域として、3 つの領域 (A, B, C) が見つかった。その一つ領域 A は 8,631bp が KCTC2242 株で欠損しており、D-alanyl-D-alanine-carboxypeptidase や D-alanine--D-alanine ligase A など細胞壁ペプチドグリカンの構成に必要なタンパク質をコードしている遺伝子が含まれていた。このことから、

ペプチドグリカンの構成が 40B3 株と KCTC2242 株で異なっている可能性が示唆された。実際にこれまでの解析において *Klebsiella* による Th1 細胞の活性化は Toll-like receptor (TLR) 依存的であるという結果が得られているため、ペプチドグリカンの違いが Th1 誘導の違いにつながっている可能性が高いと考えられた。そこで、領域 A を 40B3 株から欠損した変異株 (40B3 欠損株) と KCTC2242 株へ挿入した変異株 (KCTC2242 挿入株) の作製を行った。KCTC2242 株から領域 A 外側それぞれ 1.5kbp をクローニングし、カナマイシン耐性遺伝子をその間に組み込んだプラスミドを作成した。そのプラスミドを 40B3 株へエレクトロポレーションで導入し相同組換えにより変異株を作成した。また、同様の方法により KCTC2242 株へ 40B3 株由来の領域 A を挿入した変異株を作成した。これらの変異株を無菌マウスに経口投与し、それぞれの単独定着マウスを作成した。投与 3 週間後に大腸の Th1 細胞の活性化を解析したところ、40B3 欠損株は 40B3 野生株と比較して少し弱い程度であった。KCTC2242 挿入株に関しては KCTC2242 野生株と比較して有意に Th1 細胞が活性化されていたが、40B3 野生株と比較すると半分程度の強度であった。

【考察】

以上のことから *Klebsiella* の Th1 細胞活性化に関与する候補領域として 8,631bp の領域 A を同定したが、変異株を用いた解析から Th1 細胞活性化に関与はするがそこまで大きな寄与はないと考えられた。そのため、さらに詳細にゲノム比較を行うことにより候補領域・遺伝子を探索する必要があると考えられる。

新生児期におけるケトン体合成能の意義

有馬 勇一郎

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

ケトン体は主に肝臓において産生され、心臓などの肝外臓器で消費されている (Arima Y. et. al., *JACC* 2019). 空腹時のエネルギー源として知られているが、新生児期においては満腹であるにも関わらずケトン体濃度が高い。我々は、周産期におけるケトン体合成の意義を明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

【方法】

CRISPR/Cas9法を用いてケトン体合成の律速段階酵素であるミトコンドリア型 HMG-CoA 合成酵素 (*Hmgcs2*) の deletion mutant を樹立し、表現型を検討した。

【結果】

Hmgcs2 KO マウスでは有意にケトン体濃度が低下していることが確認され (Liver tissue; WT1564±60.1mmol/g, n=5, KO179±21.5mmol/g, n=5, p<0.0001), ケトン体合成不全マウスモデルを作成することに成功した。

Hmgcs2 KO マウスの出生率に差は認めず、胎性期に致命的な影響をもたらさないことが確認された。一方で、肝臓は授乳開始後より急速に腫大し、顕著な異所性脂肪沈着を呈した。電子顕微鏡にて Hepatocyte の形状を確認すると、*Hmgcs2* KO マウスの Hepatocyte では小滴性の脂肪沈着を認め、ミトコンドリアの変性所見も確認された。

生後3日目の肝臓サンプルを用いてメタボローム解析を実施した結果、KO マウスにおいて解糖系は抑制されている一方で、アセチル CoA は有意に上昇していた。しかしながら、TCA サイクル内の代謝産物は *Hmgcs2* KO マウスで有意に低下しており、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。

続いて代謝関連タンパクについて定量比較をした結果、当初の予想に反して、ミトコンドリアタンパク量は野生型マウスより *Hmgcs2* KO マウスの方が多いことが確認された。そのため、機能低下の原因として翻訳後修

飾の関与を検討した結果、*Hmgcs2* KO マウスで有意にミトコンドリアタンパクのアセチル化が亢進していることが確認された。

【考察】

新生児期におけるケトン体合成能の生理的意義として、ミトコンドリアタンパクの過度のアセチル化を緩和し、ミトコンドリア機能を保護する働きがあることを確認した。生後環境の変化の中で、胎盤栄養から母乳由来の脂肪酸を多く含んだ栄養環境へと変化する。

ケトン体合成はこの過程で、急激に増加する脂肪酸の一部をケトン体へと変換することで、ミトコンドリア内でのアセチル CoA の蓄積を回避し、細胞保護的に作用する可能性が示唆された。

【文献】

Arima, Y.*, Izumiya, Y., Ishida, T., Takashio, S., Ishii, M., Sueta, D., Sakamoto, K., Fujisue, K., Kaikita, K. & Tsujita, K.: Myocardial ischemia suppresses ketone body utilization. *J Am Coll Cardiol.* **73**(2): 246-247, (2019).

(*corresponding author)

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

(東京大学医学部附属病院)

【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要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健常人 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、それらの値には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。

②5 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、各薬剤に対する iPS-CM の反応性は個体における薬理反応と同様であったが、その反応度合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使用する 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が、それでも薬理反応には個体間差を認めた。

【考察】

iPS-CM には由来クローンおよび個体による特性差が反映されており、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。我々の手法で使用する心筋細胞の選別を行えば、薬理反応はある程度均質化されるが、それでも由来個体による差が残ることが判明した。

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、健常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。

脂肪肝再生過程で生じる細胞死様式選択メカニズムの解明

稲葉有香

(金沢大学新学術創成研究機構)

【目的】

脂肪肝における再生障害は、肝障害の遷延化・重症化を惹起するという危険性が知られる一方で、その病因・治療法の詳細は、解明されていない。我々は、脂肪肝再生障害誘導メカニズムの解明を進める過程で、肝再生過程の統合的ストレス応答に伴う細胞死の増加が、肝再生障害に重要であることを見出している。統合的ストレス応答は、脂肪肝の重症化に伴い増強する。今回、高度脂肪肝の再生過程では、統合的ストレス応答が増強し、ストレス応答性転写因子 ATF3 発現が誘導され、細胞死(アポトーシス・ネクロプトーシス)が発症し、重篤な再生障害を惹起することを見出した。本研究では、重篤な肝再生障害の誘因となる細胞死誘導における ATF3 の役割を解明することを目的とした。

【方法】

高度脂肪肝モデルは、肝臓特異的 ATF3 欠損マウス及び対照マウスに対する 16 週間の高脂肪食負荷により作成した。脂肪肝再生障害の検討は、高度脂肪肝に対する 70% 肝切除モデルを用いて行った。肝再生過程の血漿 ALT 値、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により評価した。細胞死様式の評価は、TUNEL・活性型カスパーゼ 3 の蛍光二重染色により行った。

【結果】

16 週間の高脂肪食負荷後の肝トリグリセリド量は、ATF3 欠損と対照群で同程度であった。これらマウスの切除後再生過程では、肝障害の指標である血漿 ALT 値が、ATF3 欠損群で有意に低下した。実際、高度脂肪肝の再生過程で生じる壊死を伴う広汎細胞死が、ATF3 欠損群では消失した。一方で、孤発性細胞死は残存することが、TUNEL 染色により明らかとなった。次に、細胞死関連因子の検討を行った。ネクロプトーシス関連因子 RIPK3 の発現・リン酸化が、ATF3 欠損群で減少した。一方で、アポトーシス関連因子の発現・活性型カスパー

ゼ3は対照と同等であった。そこで、細胞死様式を検討したところ、高度脂肪肝再生過程で認められる TUNEL 陽性・活性型カスパーゼ3陰性の細胞（ネクロプトーシス）が、ATF3 欠損群では、有意に減少した。

【考察】

本研究により、脂肪肝再生過程のネクロプトーシスの誘導に関与し、重篤な再生障害を引き起す因子として、ATF3 が重要な役割を担うことを明らかにした。現在、ATF3 によるネクロプトーシス誘導メカニズムに関して、解析を進めている。

解糖系酵素に焦点をあてた脳アミロイドアンギオパチーの病態解析および治療開発

井上 泰輝

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の 90% にみられ、アミロイドペータ (Aβ) が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が進み CAA 患者が増加する一方で、CAA の予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。アミロイドーシス研究において、共存タンパク質が疾患解明の鍵として認識されるようになってきている。ところが、CAA における共存タンパク質はこれまで検討されておらず、代表研究者は CAA の共存タンパク質の研究が CAA の病態生理の解明、ひいては治療法開発に結びつく可能性があると考え、プロテオミクス解析により CAA に罹患した脳血管における共存タンパク質を複数同定した (Inoue et al. *Acta Neuropathol.* 2017; 134: 605-17)。次に、Aβに次いで2番目に多く CAA 罹患血管に発現している α-エノラーゼに着目した。α-エノラーゼは、生命現象に深く関与する解糖系酵素として広く研究されている生理活性物質であるが、それ以外の機能については長らく不明であり、*in vitro* において Aβの毒性発現にいかなる影響を及ぼすか検討を行うことを目的とした。

【方法】

チオフラビンT蛍光色素を用いた Aβ線維形成過程の

評価、透過型電子顕微鏡による Aβの形態学的評価、脳血管平滑筋培養細胞を用いたカスパーゼ 3/7 を指標とした Aβ細胞毒性評価を行った。

【結果】

Aβは、単量体が時間経過と共に次第に凝集し Aβ線維形成に至るが、その過程で形成される Aβ重合体（オリゴマー）、Aβ線維が細胞毒性を示す。今回、我々は α-エノラーゼが ①Aβオリゴマー形成、および Aβ線維形成を抑制すること ②一旦形成された Aβ線維を分解することを明らかにした。さらに、③α-エノラーゼを Aβと共に添加すると Aβによる細胞毒性が軽減されるというこれまでに報告のない新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。

【考察】

α-エノラーゼが Aβの重合過程の阻害、さらに Aβ線維分解を介して、細胞毒性を軽減することを明らかにした。これらのメカニズムについて、我々は α-エノラーゼが Aβを断片化する可能性、α-エノラーゼが Aβと結合し、Aβの重合を阻害する 2つの仮説を立て、検討を進めている。

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】

従来の疾患研究は、少数の器官や組織に限定されてきました。しかし、生体はより複雑な多臓器連関ネットワークで成り立っており、多くの疾患は一つの器官だけではなく、複数の器官に影響を及ぼすことがわかってきています。そこで本プロジェクトではこの多臓器連関ネットワークの成り立ちと作動性を理解し、Disease science に役立てることを最終目的として研究を行っています。現在までに、すでにクロストークが行われていることが知られている臓器間での多臓器連関ネットワークについては良く解析されていますが、我々は、各種疾患において従来考えられていたよりも、生体内において広範囲に

変化が起きているのではないかと考え、全身での遺伝子発現パターンレベルの変化を解析することを1つ目の目的としました。2つ目の目的として、各種疾患における全身での遺伝子発現パターンの data set を構築することで、ある臓器の遺伝子発現パターンから他の臓器の遺伝子の発現パターンが推測できるのではないかと考え、解析を行っています。

【方法】

本研究では、ヒト疾患モデルマウス（心筋梗塞，糖尿病，がん，老化促進，腎障害）における病態発生初期から後期の異なるタイムポイントで13-23臓器を回収しました。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）を構築しました。

【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りました。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を明らかにし、さらに骨で産生されるホルモン Fgf23 を介した骨と皮膚の新たな臓器関連ネットワークを解明しました。本データベースは論文として発表し「i-organs.atr.jp」にて公開しています。現在、本データベースを活用することで、新たな臓器関連ネットワークの解明を行っており、KO マウスの解析や臨床検体を用いた研究も行っています。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ます。

【文献】

Kozawa, S.*, Ueda, R.*, Urayama, K.*, Sagawa, F., Endo, S., Shiizaki, K., Kurosu, 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

短眠を作る神経メカニズムの研究

大石 陽

（筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構）

【目的】

哺乳類において睡眠制御に重要とされる遺伝子やシステムは数多く提案されているが、多くの場合、それらを欠損させたとしても顕著な行動変化は起きない。我々は最近、モチベーションによる睡眠覚醒制御の解析過程で、ある神経群の欠損によって生じる、数か月以上の長期間にわたって短眠状態を維持可能なマウスを見出した。本研究ではその神経メカニズム解明を目的とした。

【方法・結果】

まず、報酬刺激に応じて活性化する腹側被蓋野 (VTA) に着目した。VTA のドーパミン神経の化学遺伝学的活性化は強力な覚醒維持作用をもたらす。そこでジフテリア毒素の発現により VTA の細胞をマウスにおいて欠損させたところ、予想に反して顕著な睡眠量の低下（覚醒の増加）が見られた。このメカニズムを解析するため、VTA 神経の60%を占めるドーパミン神経を選択的に欠損させたが、睡眠量に変化はなかった。次に残りの大部分を占める GABA 作動性神経を選択的に欠損させたところ、通常の半分以下となる著しい睡眠量の低下が観察された。従って、この GABA 作動性神経が正常な睡眠量を維持するために必須の神経群であることが判明した。欠損部位が橋の一部を含んでいたため、同部位の名称を腹側内側中脳橋 (ventral medial midbrain/pons; VMP) とした。

化学遺伝学的な VMP GABA 神経の抑制も睡眠を低下させたため、一過的な神経活動の抑制も睡眠変化に十分であることが示された。また、この神経活動抑制及び神経欠損による睡眠量低下は、ドーパミン受容体拮抗薬により消失もしくは軽減されたため、ドーパミン依存的に起こった行動変化であることが示唆された。

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) Takata, Y., Oishi, Y.*, Zhou, XZ., Hasegawa,

E., Takahashi, K., Cherasse, Y., Sakurai, T. & Lazarus, M.*: Sleep and Wakefulness Are Controlled by Ventral Medial Mid-brain/Pons GABAergic Neurons in Mice., *J. Neurosci.* **38**(47): 10080-10092 (2018). *Co-corresponding authors

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

(名古屋大学大学院理学研究科)

【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】

我々はこれまでに、リガンドー受容体システム 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、研究代表者が在籍していた研究室 (京都大学生命科学研究科・井垣達吏教授) では、神経系で反発作用を引き起こすリガンドー受容体システム 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)。我々は、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、Slit-Robo システムを破綻させた極性崩壊細胞が排除を免れて上皮組織にとどまる現象と類似しているものである。さらに、そのような排除されずに組織にとどまった死細胞が分泌性の増殖因子を発現していることが分かってきた。これらの結果は、排除すべき細胞を速やかに組織から排除することが、創傷治癒を行う上で重要な役割を果たしていることを示唆している。

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。

これまでに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調べてきた。その結果、キヌレン酸は過剰な Trp を分解した結果で生じた排泄物の一種であることが示唆された。すなわち、キヌレン酸増加の一因は、Trp の蓄積であると考えられる。したがって、過剰な Trp による細胞毒性の解析が、病態の理解につながる期待される。実際、高 Trp 血症という遺伝病も知られており、高濃度の Trp は有害であると考えられている。しかし、その原因は不明であ

り、高濃度の Trp が細胞にどのような影響を及ぼすかもよく分かっていない。本研究では高濃度 Trp による細胞毒性の原因特定のために、高濃度 Trp への耐性機構を解析する。

【方法と結果】

出芽酵母の非必須遺伝子変異株ライブラリ（約 5,000 遺伝子の欠損株）を用いて、高濃度 Trp への耐性に必要な遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、いくつかのオートファジー関連遺伝子が過剰な Trp への耐性に必要であることを見出した。しかし、過剰な Trp によるオートファジーの活性化はほとんど認められなかったことから、恒常的なオートファジーが過剰な Trp への耐性に必要であることが示唆された。また、RNA シーケンス解析によって、高濃度 Trp に応答する遺伝子を探索したところ、いくつかのアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現が変動していることも確認できた。これらの実験から得られた結果を統合的に解析し、高濃度 Trp への応答に重要なプロテインキナーゼの特定に成功した。

【考察】

オートファジー関連遺伝子やアミノ酸代謝酵素遺伝子が過剰な Trp への耐性に必要であることが分かった。オートファジーはタンパク質を分解し、アミノ酸を再利用する機構であるため、過剰な Trp への耐性にはアミノ酸代謝が重要と考えられる。また、特定した高濃度 Trp への応答に重要なプロテインキナーゼはアミノ酸代謝の制御に重要なシグナル伝達を担うと予想された。

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)

【背景および目的】

病的な心筋において、限られたエネルギー基質をいかに有効に利用できるかは重要な課題となり得る。虚血を含めた様々な心疾患の特に急性期治療において、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。今回我々は、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。

さらに、重症虚血性心疾患においては、不要代謝産物として蓄積した乳酸が重要なエネルギー基質として利用されることが報告されている。今回我々は、自施設の臨床データベースを用いることにより、急性心筋梗塞 (AMI) 症例における乳酸の血中濃度に影響を与える因子、さらにはエネルギー基質としての乳酸利用を促進する因子を検討した。

【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¹⁾。

次に、AMI の虚血再灌流後急性期において乳酸値の動態に影響を与える因子について検討を行った。虚血再灌流療法後の乳酸値は心不全の重症度である Killip 分類に比例すること、また、発症前に梗塞前狭心症が存在する AMI 症例ではエネルギー基質として乳酸利用が促進されていることが確認された。

【結論】

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。また臨床データの検討から、発症前から虚血に晒されている AMI 症例ではエネルギー基質として乳酸利用が促進されていることが確認された。

【文献】

- 1) Kashiwagi, Y., Nagoshi, T., Yoshino, T., Tanaka, T., Ito, K., Harada, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Anzawa, R. & Yoshimura, M.: Expression

of SGLT1 in Human Hearts and Impairment of Cardiac Glucose Uptake by Phlorizin during Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *PLoS One*. 2015 Jun 29; **10**(6): e0130605.

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 賢太朗

(神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター)

【背景】

肥満では、摂食抑制ホルモンであるインスリンやレプチンの視床下部における感受性異常（抵抗性）が惹起され、エネルギー・糖代謝恒常性の破綻を来し肥満や糖尿病が発症するが、その分子メカニズムは未解明である。

我々は最近、レプチン抵抗性の発症に関わる細胞内シグナル分子の探索を行い、低分子量Gタンパク質 Rap1 が視床下部に高発現を示すこと、肥満マウスの視床下部で Rap1 の活性化型が増加すること、を見出した。そこで視床下部の Rap1 活性化が肥満や糖代謝異常の発症に寄与すると想定し、視床下部を含む前脳特異的 Rap1 欠損マウスを作製することにより、視床下部 Rap1 の活性化がホルモン感受性異常を惹起することを証明した (Kaneko. *Cell Reports*, 2016)。

【目的】

肥満において視床下部レプチン抵抗性を誘発する液性因子は不明である。そこで本研究では、Rap1 が GPCR/Gs/cAMP 経路により活性化され得ることに着目し、GPCR リガンドによる Rap1 活性化機序の解明を目的とした。

【方法】

外因性薬剤に応答する視床下部ニューロン網を維持した『*in vitro* 視床下部器官培養系』を用いて Rap1 活性化刺激および細胞内レプチン抵抗性誘発因子を探索した。

【結果】

脳スライス系において、腸管ホルモン GIP が視床下部 Rap1 の活性化を誘導することを見出した。そこで GIP によるレプチン感受性における役割を検討したとこ

ろ、レプチンによる STAT3 リン酸化を阻害し、視床下部レプチン抵抗性を誘導することを明らかにした。

次に GIP をマウスに腹腔内および脳室内投与したところ、レプチンによる抗肥満作用を減弱させることを明らかにした。さらに、GIP がレプチンによる視床下部 POMC ニューロンの活性化を阻害すること、GIP によるレプチン抵抗性の誘導が脳 Rap1 欠損マウスでは消失すること、GIP 受容体阻害薬の肥満マウスへ脳室内投与により体重減少作用を示すことを見出した。

以上より、GIP が視床下部 Rap1 を活性化することによりホルモン感受性異常を惹起することを明らかにし、“腸管ホルモン—視床下部 GPCR — Rap1 活性化”という腸—脳連関に基づく新しいレプチン感受性の制御メカニズムを解明した (Kaneko. *Journal of Clinical Investigation*, 2019, in press)。

PSMA のグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ活性を標的とした前立腺がん蛍光イメージングプローブの開発

神谷 真子

(東京大学大学院医学系研究科)

PSMA (prostate specific membrane antigen) は、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ活性を有する膜タンパク質であり、前立腺がんなどのがん組織での発現亢進が報告されている。現在までに、PSMA を標的とした診断薬や治療薬の開発が盛んに行われきたが、その多くは PSMA に対する抗体やリガンドを用いた always-on 型のプローブであった。そこで我々は、PSMA を標的とした新たな術中イメージングツールを開発するべく、PSMA のカルボキシペプチダーゼ活性を標的とした世界初の activatable 型蛍光プローブの開発を目指した。

まず初めに、PSMA の基質となり、反応前後で電子密度が大きく変化するグルタミン酸誘導体を探索したところ、アゾホルミル基を介してグルタミン酸をベンゼン環に導入した誘導体が PSMA の基質となることを見出した。さらに、この加水分解反応に伴う電子密度の変化を利用することで、PSMA のカルボキシペプチダーゼ活性を検出可能な蛍光プローブを開発した。本ブ

プローブは、PSMA との反応前は d-PeT (donor-excited photoinduced electron transfer) により消光しているが、PSMA との反応に伴いグルタミン酸が切断されると、アゾホルミル基が脱離して強蛍光性の生成物が産生し、100 倍以上の蛍光強度上昇を示すことが明らかになった。次に、PSMA 高発現前立腺がん細胞 LNCaP および低発現前立腺がん細胞 PC3 に適用したところ、LNCaP 細胞においてのみ蛍光上昇が観察され、またその蛍光上昇は PSMA 特異的阻害剤 2-PMPA で抑制されることが示された。これらの結果から、開発したプローブにより生きた培養細胞における PSMA 活性を検出できることが示された。さらに、前立腺がん患者由来の臨床検体にプローブを添加し、蛍光イメージング及び病理組織染色を行ったところ、蛍光上昇を示す部位と PSMA を発現するがん部位とが概ね一致することも示された。

胸腺における負の選択に寄与するゲノミックエンハンサーに関する研究

河岡 慎平

(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

胸腺における負の選択の現行モデルでは、T細胞受容体 (T cell receptor; TCR) と自己抗原の結合強度が定量的にアポトーシス遺伝子の発現量(アポトーシス強度)へと変換され、自己抗原を強く認識する TCR を持つ胸腺細胞が、自己反応性 T細胞としてアポトーシスにより除去される。このモデルを支持する因子の一つが、アポトーシス促進遺伝子 *Bim* である。*Bim* の発現量は TCR シグナル依存的に増加し、*Bim* を欠失させたマウスでは負の選択が不全となる。本モデルは広く認知されているものの、TCR シグナルと *Bim* 依存的なアポトーシスを定量的につなぐメカニズムに関する我々の理解は限定的であった (Strasser et al. *Immuno. Cell Biol.* 2008)。

演者は、ゲノミックエンハンサーを欠失させるアプローチによって、この問題に取り組んだ。まず、エピゲノム解析によって、*Bim* 遺伝子の近傍に胸腺細胞に特異的なエンハンサーを発見した。本エンハンサーを欠失させたマウスを作製したところ、胸腺に、自己反応性 T細胞の特徴を持つ細胞が蓄積した。特定の TCR を発現

する複数のトランスジェニックマウス、初代培養系もちいた実験の結果、本エンハンサーを欠失したマウスでは、負の選択が不全となることがわかった。さらに、本エンハンサーが、TCR シグナル依存的な *Bim* の発現に必要であることも判明した。以上のことから、本エンハンサーが、TCR シグナル依存的な *Bim* の発現制御を介して負の選択に貢献するエンハンサーであると結論した。一方で、本エンハンサーを欠失したマウスの末梢 T細胞には異常が認められず、また、当該マウスは自己免疫疾患を発症しなかった。本マウスを実験的自己反応性脳脊髄炎 (EAE) 実験に供したところ、野生型と全く同じ症状を示した。つまり、本エンハンサーの欠失は、EAE による自己免疫の症状を悪化させなかった。したがって、本エンハンサーは、胸腺における自己反応性 T細胞の除去には必要であるが、末梢 T細胞の恒常性・自己免疫には必要ではない、と結論した。

本研究により、胸腺における負の選択に特化した機能を持つゲノミックエンハンサーを同定した。現在、エンハンサーを欠失させるアプローチを、がんが個体に悪影響を与えるメカニズムを調べる研究にも応用している。

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)

自閉症の原因は未だ多くは解明されていない。これまで同定されている自閉症リスク遺伝子も 1-2% 程度の患者を説明するに過ぎず、その症状を広範に説明する異常は明らかになっていない。最近、数割にのぼる多くの自閉症児について脳の局所 (前頭前野など) における肥大が起こることが示された。前頭前野は言語機能や社会的行動の調節などを担う領域であり、前頭前野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前頭前野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、前頭前野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前頭前野を含む大脳前方領域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。現在、胎生期の早い段階においてFgfシグナルの下流でどのような因子が前頭前皮質形成に関与するのかを調べている。

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。

て食欲・筋肉量・体重を増加させる報告があり (Bai Y et al. *Support Care Center*, 2017), 本邦でも昨年11月に製造販売承認申請された。

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、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。

筆者は魚油に多く含まれるEPA/DHAの抗サルコペニア効果に着目し、骨格筋量が低下したサルコペニアモデルマウス (SAMP1マウス (Haramizu S et al, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011)) へのEPA/DHA慢性給餌実験を行った。結果、対照群 (コーン油投与群) と比較して体重に変化は認めなかったが、上肢の握力が増加していることを新規に突き止めた (図1)。また、空腹時血糖や血清脂質 (総コレステロール) といった代謝パラメータの改善も認めた (図2)。こうした知見から、EPA/DHA投与によるインスリン抵抗性や炎症などの全身性の変化が骨格筋の筋肉内シグナルを変化させ、筋力改善がもたらされた可能性が示唆され、今後さらなる解析をすすめ、メカニズムの解明やサルコペニア治療標的の探索を目指す。

また、臨床面においてはサルコペニア外来を開設し (症例報告など論文化²⁾)、血糖コントロール不良のサルコペニア高齢2型糖尿病患者に対し、入院管理下で血糖コントロール・(比較的)高タンパク (1~1.2g/日) の食事療法・リハビリテーション科と協働した運動療法、の集学的治療を行い、骨格筋の質・量におよぼす影響を検討する臨床試験を計画している (名古屋市立大学病院IRBに申請中)。

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)

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⁾。グレリンは成長ホルモン (GH)-IGF-1分泌を介した骨や骨格筋の成長促進作用だけでなく摂食増進、心機能改善、抗炎症作用を有する。グレリンの経口アナログ製剤であるアナモレリンを悪液質患者に投与するとGH分泌を介し

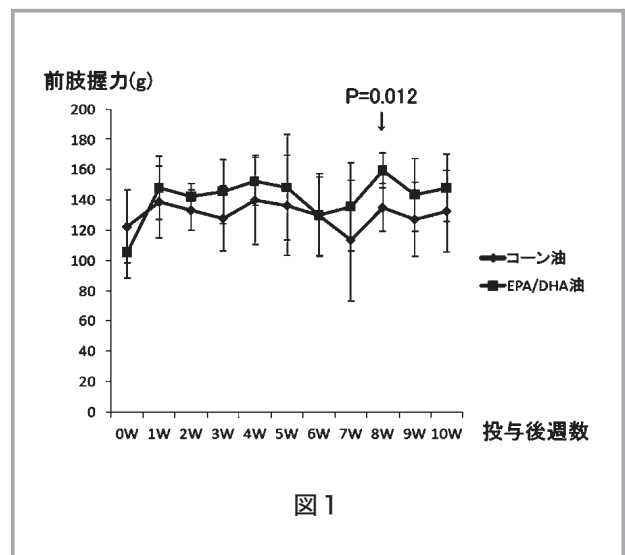


図1

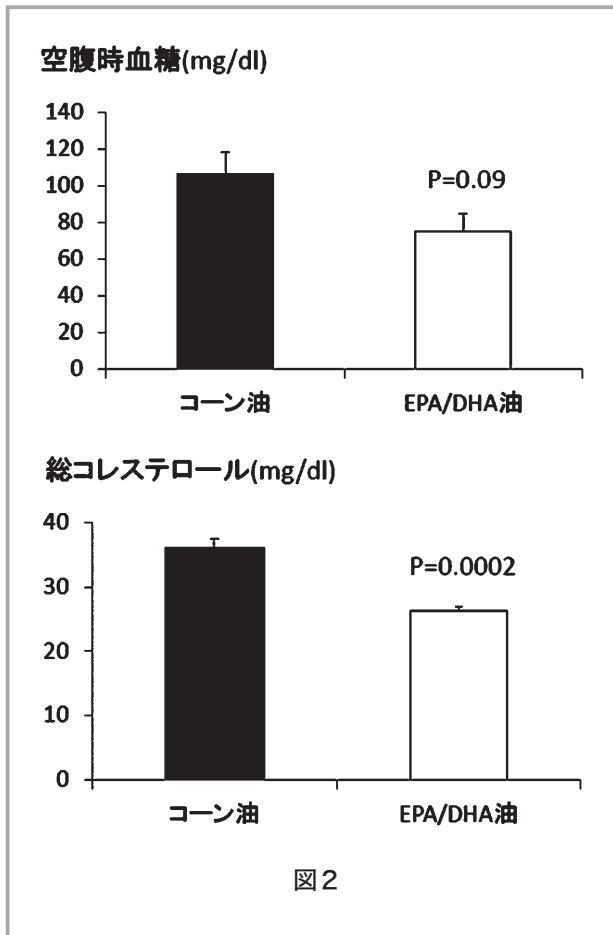


図2

【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.*: 'The first adult Japanese case of hypophosphatasia successfully treated with enzyme replacement therapy' *Internal Medicine*, (2019). (under review)

オレキシン受容体アゴニストの創製と薬理作用の解明

斉藤 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神経ペプチドオレキシンは、2つのオレキシン受容体 (OX1R, OX2R) に結合することで覚醒や摂食を制御する¹⁾。オレキシン産生ニューロンの変性により脳内オレキシン量が減少すると、深刻な睡眠障害であるナルコレプシーを発症す

る。そのため、オレキシンの機能を補完する薬物はナルコレプシー治療薬として期待される²⁾。これまでに我々は、オレキシン受容体を標的とした創薬研究を実施し、OX2R 選択的作動薬 YNT-185 を見出してきた³⁾。YNT-185 はナルコレプシーモデルマウスに対する末梢投与 (40mg/kg) で顕著なカタプレキシー抑制作用を示し、ナルコレプシーの随伴症状である肥満傾向を有意に抑制した⁴⁾。このように OX2R 作動薬はナルコレプシー治療薬として期待される一方で、内因性オレキシンは OX2R のみならず OX1R にも作用する。ナルコレプシーにおける OX1R の機能は未だ明らかとなっていないため、本研究では OX1R の薬理効果の解明に向け OX1R にも作動活性を有するリガンドの開発に着手した。

【方法】

YNT-185 の構造より誘導した化合物群は、いずれも高い OX2R 選択性を有していたことから新たに OX1R に親和性のある異なる構造を設計することができれば OX1R 作動活性が発現すると考えた。我々のグループでは、これまでの一連のオレキシン受容体リガンドの探索過程で、モルヒネ構造を有する κ オピオイド受容体作動薬が OX1R 拮抗活性を有するを見出しており、構造最適化をすることでオピオイド受容体には親和性を示さず高い OX1R 選択的拮抗活性を有する YNT-707 を見出している⁵⁾。そのため、YNT-707 の構造のうち OX1R 結合に必要な構造を同定することができれば、OX1R 作動薬の分子設計に有用な情報が得られると考えた。以上を踏まえ、本年度は YNT-707 の構造のうち OX1R 選択的結合に寄与する構造の同定を行った。

【結果】

YNT-707 の OX1R 拮抗活性はモルヒネ構造に起因しているおり、ファーマコフォアとして機能するスルホンアミド構造とアミド側鎖構造を適切に配置していると考えられる。YNT-707 のこれら 2 つの構造を保持し、それらの配向に關与するモルヒナン骨格上 D 環と E 環を除去した誘導体 3 種を合成し、その活性を評価した。その結果、それぞれ環を除去した誘導体は、環を除去しても十分な活性を有することがわかり、また両方の環を除去した誘導体では活性は減弱するものの、 $1.3 \mu\text{M}$ の活性が保持されることを明らかにした。この結果を考察する

ために誘導体の配座解析を行ったところ、YNT-707 より環を除去することでそれぞれのファーマコフォアの自由度が向上し、特にスルホンアミド部位の配座固定が OX1R 拮抗作用に重要な役割を果たしていることがわかった。以上の結果を踏まえ、今後 YNT-185 の構造中に、YNT-707 のスルホンアミド部位の配座を再現できる構造を導入することで OX1R 作動薬の開発を行っていく予定である。

【文献】

- 1) T, Sakurai. *et al.*: *Cell*. **92**, 573-585 (1998).
- 2) T, Nagahara. *et al.*: *J. Med. Chem.* **58**, 7931 – 7937 (2015).
- 3) M, Mieda. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4649-4654 (2004).
- 4) Y, Irukayama-Tomobe. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 5731-5736 (2017).
- 5) H, Nagase. *et al.*: *J. Med. Chem.* **60**, 1018 – 1040 (2017).

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・方法】

全臓器・全身スケールでの遺伝子発現解析のために、高度な組織透明化技術とライトシート顕微鏡による高速な 3次元観察方法を組み合わせ、個体レベルのシステム生物学を実現させることを目指した。

【結果・考察】

新規の透明化試薬スクリーニング系を立ち上げ、40種類の水溶性化合物からアミノアルコールが高度な組織透明化活性を持つことを発見した (Cell 2014-1)。またアミノアルコールがヘムを脱色する作用を有することを発見し、マウス全身の高度な透明化に世界で初めて成功した (Cell 2014-2)。ライトシート顕微鏡による透明化された全脳・全身画像取得と画像解析により、細胞回路の解析をオミクス的に多サンプルで解析するパイプラインの構築に成功した (Cell 2014-1, -2, Nat Protoc.

2015)。本パイプラインと Arc 遺伝子レポーターを用いて、MK-801 投与下のマウスの全脳神経活動解析を全 20 脳的全脳イメージングデータから解析し、特徴的な反応を示す細胞群を抽出することに成功した。さらに、*in situ* hybridization によりこれらの活動細胞の細胞種同定に成功した (Neuron 2016)。組織透明化試薬のさらなる高度化と透明化原理の解明のため、1600 種類以上の化合物からなるスクリーニングを実施し、第二世代 CUBIC 試薬を開発して成体マーマセット全脳の透明化と 3次元観察に成功した (Cell Rep. 2018)。細胞ラベリング法の拡張のため、高速な「交配なし」マウス遺伝学 (次世代マウス遺伝学) の構築を行い、新規レポーターマウスの作出 (Cell 2014-1, -2)、概日時計遺伝子のレスキュー実験等での実証 (Mol. Cell 2017) に成功した。さらに、免疫組織学的なラベリング法への適応も進め、マウス膀胱、腎臓、トリ胚などでのアプリケーション例を報告 (Nat. Commun. 2017, Kidney Intl. 2019, Dev. Biol. 2018) するとともに、3次元病理学の実現に向けたパイロットスタディも行なった (Sci. Rep. 2017)。これらの個体レベルのシステム生物学実現を目指すスキームをまとめ、英文総説として発表した (Cell Chem Biol 2016, npj Syst. Biol. App 2017)。

【文献】 (主要なもの 5 報)

- 1) Tainaka, K.*, Murakami, TC.*, Susaki, EA., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K., Hayashi-Takagi, A., Sekiya, H., Arima, Y., Nojima, S., Ikemura, M., Ushiku, T., Shimizu, Y., Murakami, M., Tanaka, KF., Iino, M., Kasai, H., Sasaoka, T., Kobayashi, K., Miyazono, K., Morii, E., Isa, T., Fukayama, M., Kakita, A. & Ueda, HR. (*co-first): Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep.*, **24**, 2196-2210.e9 (2018).
- 2) Ode, KL.*, Ukaim H.*, Susaki, EA.*, Narumi, R., Matsumoto, K., Hara, J., Koide, N., Abe, T., Kanemaki, MT., Kiyonari, H. & Ueda HR. (*co-first): Knockout-Rescue Embryonic Stem Cell-Derived Mouse Reveals Circadian-Period Control by Quality and Quantity of CRY1. *Mol. Cell*, **65**, 176-190 (2017).

- 3) Tatsuki, F.*, Sunagawa, GA.*, Shi, S.*, Susaki, EA.*, Yukinaga, H.*, Perrin, D.*, Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Ohno, RI., Tone, D., Ode, KL., Matsumoto, K. & Ueda, HR. (*co-first): Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron*, **90**, 70-85 (2016).
- 4) Susaki, EA. & Ueda, HR.: Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. *Cell Chem. Biol.* **23**, 137-157 (2016).
- 5) Susaki, EA.*, Tainaka, K.*, Perrin, D.*, Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, TM., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H. & Ueda, HR. (*co-first): Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*, **157**, 726-739 (2014).

むことで分析が可能であった。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かを検討する際、これを単一の回帰モデルで取り扱うことは難しく、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。しかし回帰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で、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検出できる可能性を見出した。アウトカム間での影響の差異を単一のモデルで取りあつかえるようになり、種々のモデル分析に応用できるものと期待される。

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（説明変数）がアウトカム（従属変数）に及ぼす影響を検討する際、回帰モデルは大変有用な統計学的解析手法である。これまでも種々の性質を持つアウトカムに対して、様々な回帰モデルが考案され、臨床医学を含め、生命科学分野でも広く用いられてきた。ある事象に関連する作業仮説について、1つの回帰モデルで分析できれば、複数の因子を投入したとしても、それらを同じ土俵、同じ尺度で評価・比較することが可能となる。臨床で観察される事象は種々の因子が互いに影響を及ぼしあった結果として観察されることが多く、多数の因子を同時に1つのモデルに組み込める回帰分析は魅力的である。これまで、医学研究分野においても、回帰モデルを用いて、交絡因子の調整、交互作用効果の検出等が試みられてきたが、いずれも1つのモデルに組み込

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、ハイコンテンツイメージング技術を導入することで従来の *in vitro* タウ伝播アッセイを数百倍の高い効率にまでハイスループット化することに成功し、これ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継続している。

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。本件に関して1件の特許申請を行い、さらに1件の特許申請準備を進めている。

【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きた。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.*: *Neuroscience Research.*, **141**: 36-42 (2019).

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).

社会ストレスによる脳組織の超微細な細胞生物学的変化とその機序・役割の解明

永井裕崇

(神戸大学大学院医学研究科)

【目的】

社会や環境より受けるストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を誘発し、精神疾患のリスクとなる。マウスの社会挫折ストレスモデルにおいては、脳内免疫細胞であるミクログリア活性化に代表される脳内炎症や前頭前皮質神経細胞の樹状突起萎縮や樹状突起スパインの喪失などの神経形態変化が情動変容に重要であることが示唆されてきているが、ミクログリアと神経細胞の相互作用並びに神経形態変化の微細形態学的基盤は殆ど確立されていない。従って本研究では、連続する超高解像度画像の取得により、あらゆる細胞と細胞内小器官の三次元的組織再構築を可能とする三次元電子顕微鏡を用いて社会挫折ストレス後脳組織における神経形態変化と神経グリア相互作用の実態を明らかにすることを目的とする。

【方法】

マウス社会挫折ストレスモデルを用い、ストレスに供したマウスの内側前頭前皮質第II/III層をシリアルブロックフェイス走査電子顕微鏡 (SBEM) により観察した。真空内の筐体にサンプルブロックを静置しサンプル表面の撮像と切削を繰り返す技術であるSBEMを用いて1ピクセルあたり約5nmの平面解像度を持つ撮像と50nmの表面切削を繰り返すことで、連続電子顕微鏡画像を取得した。取得した画像はImageJを用いてアライメント補正をかけた後に、手動で神経細胞やグリア細胞を分画し、立体再構成を行った。

【結果】

社会ストレスに供したマウスにおいては軸索ブトンの一部がミクログリアに覆われる頻度が増加することが明らかとなった。完全に貪食された軸索ブトンについての

頻度、並びにミトコンドリアやリソソームなどの細胞内小器官の大きさや頻度については変化が無かった。また、シナプスがそのまま貪食されたような構造は殆ど存在せず、ミクログリアが軸索に選択性をもって貪食する可能性が示唆された。

【考察】

社会ストレスがミクログリアと軸索の形態的相互作用を増強することが示唆された。今後はその機能的意義並びに分子機序について検討する必要がある。

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 マウス) 及び GC-B ノックアウトマウス (C-GC-B-KO マウス) 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、C-CNP-KO マウスと C-GC-B-KO マウスの顎顔面形態計測を行った。

【方法・結果】

C-CNP-KO マウスおよび C-GC-B-KO マウスの吻殿長は、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 マウス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、C-CNP-KO および C-GC-B-KO の顎顔面表現系解析を行ったところ、C-CNP-KO マウスおよび C-GC-B-KO マウスはともに上下顎の劣成長を認めた。上顎の成長には、頭蓋底の軟骨組織である蝶後頭軟骨結部の内軟骨性骨化による成長が重要とされているが、C-CNP-KO マウスおよび C-GC-B-KO マウスの蝶後頭軟骨結合部の成長抑制が認められた。また、下顎骨の形態も劣成長を呈していた。これについては下顎頭軟骨の成長抑制に加え、上顎の劣成長が咬合関係を介し、下顎の前方への成長に抑制的に作用したことが考えられた。

また、C-CNP-KO マウスおよび C-GC-B-KO マウスの大後頭孔が狭窄しており、組織学的解析の結果、大後頭孔を構成する軟骨組織の内軟骨性骨化の抑制を認めた。

【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。さらに CNP/GC-B 系は局所因子として、顎顔面形態に対し強く影響をおよぼすことが明らかとなった。

心臓リモデリングに対する心臓局所のネプリライシンの役割についての検討

中 川 仁

(奈良県立医科大学医学部)

【背景・目的】

ナトリウム利尿ペプチド (NP) は心房・心室から分泌され、それぞれ ANP・BNP と呼ばれており、ナトリウム利尿作用や心臓リモデリングに対する抑制効果を持ち、心不全における保護的ホルモンとして作用している。近年、NP をはじめとするペプチドを分解するネプリライシン (NEP) が注目され、NEP 阻害薬と

Angiotensin II 受容体拮抗薬との合剤が、心不全の予後を改善する事が大規模臨床試験で報告された。なぜ NEP 阻害薬が心不全の予後をこれほど改善したかについては、ホルモンとしての ANP・BNP の作用を亢進させた事によると考えられているが、心臓局所における ANP・BNP の局所組織濃度が血中よりもはるかに高い事を考えると、autocrine としての NP の作用を増強させた可能性がある。本研究の目的は、NEP 遺伝子改変マウスを用いて心筋細胞における NEP の作用を検討し、心臓リモデリングに対する心臓局所での NP と NEP の相互作用を明らかにする事である。

【方法・結果】

野生型マウス (WT)、心筋特異的ネプリライシン過剰発現マウス (aMHC-NEP Tg) と全身のネプリライシン欠損マウス (NEP KO) の baseline での血漿・心臓組織での cGMP 濃度は aMHC-NEP Tg では WT に比べて有意に低く、NEP KO では WT に比べて有意に高かった。大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷を加えたところ、aMHC-NEP Tg では WT に比べて有意に心重量、肺重量、心臓間質の線維化が増悪し、心エコーでは心収縮能の低下を認めた。蛋白電気泳動では Serca2a の発現が TAC 後の aMHC-NEP Tg で著明に低下していた。次に、血漿の cGMP 低下を補正するため hANP 0.66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ を皮下ポンプで投与し TAC を施行したところ、同様に aMHC-NEP Tg は WT に比べて有意な心臓組織の cGMP 低下を伴う心臓リモデリングと心機能低下を認めた。興味深い事に、肺重量は aMHC-NEP Tg と WT では差を認めなかった。一方、WT と NEP KO に 6% 高食塩餌の条件で Angiotensin II (1.4 mg/kg/day) の皮下ポンプ投与を 4 週間投与したところ、WT では心臓間質の有意な線維化を認め、NEP KO ではやや抑制された。線維化のマーカーである CTGF は NEP KO で有意に抑制された。

【結論】

aMHC-NEP Tg において、TAC 後に心臓組織の cGMP 低下を伴う心臓リモデリングと心機能低下を認め、血漿 cGMP の低下を補正しても同様の結果であった。心臓局所におけるネプリライシンが、心臓リモデリングにおいて重要な役割を認めることを確認できた。

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)

【目的】

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、血管の形成や恒常性をどのように制御するのかを理解することを目指している。

【方法】

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た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たまま特異的にイメージングできる TG や、Hippo 経路の標的因子である YAP の転写活性化を生きたまま可視化できる TG システムの樹立などを行ってきた。

【結果】

上記の TG システムを用いて、血流に反応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、血流に反応した YAP が、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。さらに、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い、大動脈弓や脳底動脈において血流によるメカニカルストレスに依存した血管新生が起こること、さらにそれらが従来の (血流非依存的な) 血管新生とは全く異なる様態で起こっていることを新たに見出した。

【考察】

一連の研究から我々は、血流によるメカニカルストレスを介した血管制御機構の一端を明らかにすることができた。血流は、このような機構を介して最適な血管ネットワークの形成に必須の役割を果たしている。現在、我々はゼブラフィッシュの脳血管の観察を通じて、血管ネットワークの最適化に関する研究に着手しており、イメージング解析と血流によるメカニカルファクターのシミュレーション解析を組み合わせることで、どのように血管ネットワークの最適化が起こるのかを調べている。

【文献】

- 1) Nakajima, H., Yamamoto, K., Agarwala, S., Terai, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Ando, K., Miyazaki, T., Yokota, Y., Schmelzer, E., Belting, H.G., Affolter, M., Lecaudey, V. & Mochizuki, N.: Flow-dependent endothelial YAP regulation contributes to vessel maintenance, *Dev. Cell.*, **40**, 523 (2017).
- 2) Nakajima, H., & Mochizuki, N.: Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation, *Cell Cycle.*, **16**, 18931 (2017).
- 3) ◆Yokota, Y., ◆Nakajima, H.(equal first authors), Wakayama, Y., Muto, A., Kawakami, K., Fukuhara, S. & Mochizuki, N.: Endothelial Ca²⁺ oscillations reflects VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity *in vivo*. *eLife.*, **4**, e08817 (2015).

心腎連関に関わる PIGF と sFlt-1 の意義およびその機序の解明

中田 康紀

(奈良県立医科大学医学部)

【目的】

以前の疫学的研究により、慢性腎臓病 (CKD) の患者では心血管系の罹患率と死亡率のリスクが著しく高いことが明らかにされている^{1,2)}。しかしながら、腎機能障害とアテローム性動脈硬化症の進行および心血管疾患

の発症とを結び付ける分子メカニズムは完全には解明されていない。我々は、胎盤増殖因子 (PIGF) とその受容体である Flt-1 の可溶性アイソフォームで、PIGF の内因性拮抗因子である可溶性 Flt-1 (sFlt-1) の発現不均衡が心血管疾患の発症あるいは進展に寄与することを示してきた^{3,4)}。また、腎機能低下患者では sFlt-1 の発現が低下し、PIGF/Flt-1 系が優位になっていることを報告した³⁾。sFlt-1 発現を調節する因子は明確には解明されておらず、我々は尿毒症毒素が CKD 患者における sFlt-1 の減少に関与していると仮定した。そこで今回、経口吸着炭である AST-120 による sFlt-1 発現レベルおよびアテローム性動脈硬化進展に対する効果を検討した。

【方法】

まず、ヒト臍帯動脈内皮細胞 (HUAEC) に尿毒素物質であるインドキシル硫酸と p-クレゾールを添加し、sFlt-1 の発現変化についても検討を行った。また、動脈硬化モデルマウスである ApoE^{-/-}マウスを用いて、8 週齢で偽手術群 (sham) と 5/6 腎摘群 (5/6NR) の 2 群に無作為割り付けした。その後、さらに 12 週齢よりそれぞれを AST-120 治療群、AST-120 非治療群に分け、計 4 群で 22 週齢において比較検討を行った (sham; n = 7, 5/6NR; n = 10, sham + AST-120; n = 8, 5/6NR + AST-120; n = 8)。

【結果】

尿毒素物質が添加された HUAEC では sFlt-1 の有意な発現低下を認めた。また動物モデルにおいては、5/6NR 群では sham 群に比べ、腎組織での sFlt-1 の発現が有意に低下しており、5/6NR + AST-120 群では 5/6NR 群に比べ、sFlt-1 の発現低下が抑制されていた。同様に、胸腹部大動脈の動脈硬化プラーク面積は 5/6NR 群で sham 群に比べ有意に大きく、5/6NR + AST-120 群では 5/6NR 群に比し、その範囲が有意に縮小していた。動脈硬化プラーク面積は、血中インドキシル硫酸、血中 p-クレシル硫酸、また sFlt-1 の発現レベルと有意な相関関係を認めた。

【考察】

CKD 患者における動脈硬化進展に、尿毒素による sFlt-1 発現低下が寄与している可能性が示唆された。引き続き CKD 患者における動脈硬化進行の分子メカニ

ムを検討する。

【文献】

- 1) Go, A.S., Chertow, G.M., Fan, D., McCulloch, C.E. & Hsu, C.Y.: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1296-1305 (2004).
- 2) Ninomiya, T. *et al.*: Chronic kidney disease and cardiovascular disease in a general Japanese population: The Hisayama study. *Kidney Int.*, **68**, 228-236 (2005).
- 3) 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**, 2470-2477 (2009).
- 4) Matsui, M. *et al.*: Suppressed soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, **85**, 393-403 (2014).

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)

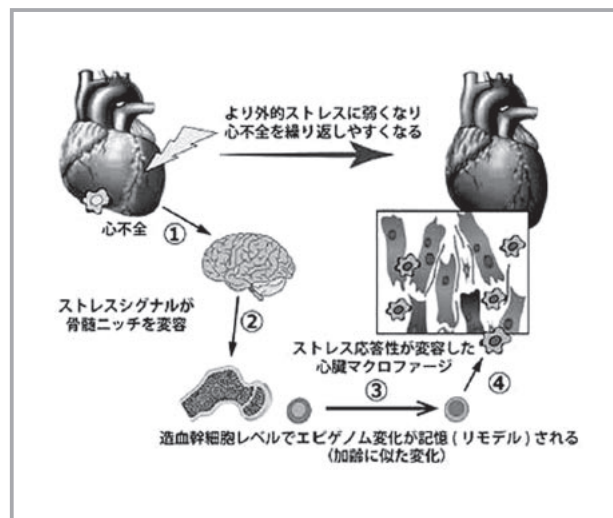
【目的】

高齢心不全症例の増加が顕著になっているが、従来の心不全治療では、健康寿命の延伸は得られていない。心臓の加齢変化の病態生理を解明し、繰り返す心不全を予防する新たな治療戦略を創出することは喫緊の課題である。我々は、心臓間質に存在する組織マクロファージが、心保護的蛋白アンフィレギュリン (Areg) の分泌を介して恒常性維持に重要な役割を担っていることを解明した。近年の報告では、心臓マクロファージの細胞起源は、心不全や加齢に伴って胎児肝単球由来のマクロファージから骨髄単球由来に変化すると考えられている。一方で、細胞起源の変遷に伴う心臓マクロファージの表現型の変

化が心機能に与える影響は未知である。また、骨髄は老化すると造血幹細胞 (HSC) レベルで質的变化をする。そこで、①骨髄老化に伴う心臓マクロファージのエピゲノムの変化が、心臓の恒常性維持を破綻させ組織リモデリングを引き起こす、②心不全になると骨髄ニッチが変化して HSC 自体が変化する、という仮説に基づき心不全の新たな病態解明を図る。

【研究成果】

骨髄老化が心機能に与える影響を評価するため、老年マウスの骨髄を若年マウスに移植したところ、自然経過で慢性期に心筋線維化が進んで収縮能が低下した。老化に伴って心臓の線維化を進ませるのは血清中蛋白ではなく細胞成分であり、加齢によって表現型が変化した免疫細胞が可塑性を失って心臓実質の恒常性を損動させると考えられた。続いて心不全マウスの骨髄だけを正常マウスに移植すると、同様の線維化と心機能低下が見られた。そこで、心不全が骨髄に与える影響を解析すると、心不全マウスの骨髄 HSC では、老化した骨髄で見られるように、EdU 陽性 HSC が増加した。さらに、末梢循環を共有する parabiosis マウスの片方に心不全モデルを作成すると、患側マウスの骨髄で HSC の EdU 陽性率が上がる一方で、健側マウスの骨髄には同様の所見は認められなかった。つまり、心不全になると循環を介さない、神経を介したストレスシグナルが骨髄に入り (図中①②)、HSC のエピゲノムを変化させると考えられた。骨髄の内皮細胞や間葉系幹細胞の発現や細胞数の解析でも心不全によって変化することが新たに分かった。さらに、老化マウスや心不全マウスの HSC を健常マウスの HSC と competitive に移植すると、若年マウ



ス HSC 由来細胞と比較して、両者は同様に骨髄系細胞に偏向して分化することが分かった (図中③)。そして、老化マウスや心不全マウスの HSC 由来の心臓マクロファージが、より炎症性の表現型を示す (図中④) ことが分かった。

【考察】

心不全を起こすと脳、神経を介して骨髄に、老化した際と同様のリモデリングを起こし、HSC レベルでエピゲノムが変化して骨髄系細胞に分化しやすくなった。一方で心不全マウスの HSC 由来単球は心保護的な心臓マクロファージに分化しにくくなるということが分かった。このことは、老化や心不全を起こした心臓で外的ストレスに対する忍容性を低下させ、さらなる心機能低下を引き起こすと考えられた。心不全を起こすとどのように神経系のリモデリングが起きるのか、心臓圧センサーへの介入による骨髄変化を見たり、HSC の ATAC-seq や骨髄の免疫染色により構造的、機能的変化を解析したりして、心臓・脳・骨髄という新たな臓器連関の解明を図る。心臓マクロファージの表現型の変化が心臓の恒常性維持の破綻を生むという仮説の元、骨髄やその上流の脳神経系を標的とした治療戦略を目指す。

EBV 陽性 NK 腫瘍細胞の産生、分泌するサイトカインは単球様細胞の凝固活性とマクロファージへの分化を亢進させる

西尾 美和子

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

【緒言】

慢性活動性 EBV 感染症や節外性 NK/T 細胞リンパ腫などの EBV 陽性 T, NK 細胞腫瘍は、全身の炎症を伴い、しばしば播種性血管内凝固症候群 (DIC) や血球貪食症候群 (HLH) を発症する。その機序を解明するため、EBV 感染 T, NK 細胞の単球系細胞への直接作用を、細胞株を用いて検討した。

【方法】

EBV 陽性 T 細胞株 (SNT8, SNT15, SNT16) と NK 細胞株 (SNK1, SNK6, SNK10) の培養上清を、単球系

細胞株 THP-1 と共培養し、THP-1 の変化を解析した。凝固能は Ca 再加時間法、細胞表面の TF, CD11b の発現量および蛍光ビーズを用いた貪食能はフローサイトメトリー法で、mRNA の発現は RT-PCR 法で測定した。培養上清中の網羅的サイトカイン濃度解析はサイトカインアレイを用いた。

【結果】

EBV 陽性 NK 細胞株上清との共培養で THP1 細胞表面では組織因子 (TF) の発現と凝固活性が亢進した。凝固活性の亢進は抗 TF 抗体添加により阻害された。また、EBV 陽性 NK 細胞株上清との共培養により THP-1 はマクロファージ様の形態変化を示し、CD11b の発現および貪食能の亢進、さらに IL-6, IL-8, TNF α の mRNA の発現亢進を認めた。これらの結果は EBV 陽性 T 細胞株上清との共培養ではほとんど認められなかった。培養上清では、TNF α , IL-6, IFN γ 濃度が NK 細胞株上清特異的に高値を示した。そこで、これら炎症性サイトカインを THP-1 に添加したところ、凝固活性および TF 発現の亢進を認めた。

【結語】

EBV 陽性 NK 腫瘍細胞が産生、分泌した炎症性サイトカインによって、単球系細胞では TF を介した凝固の活性化および M1 マクロファージの活性化が生じることが示された。今後は原因となる炎症性サイトカインを精査し、病態との関連および抗サイトカイン療法の有用性を検証する。

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

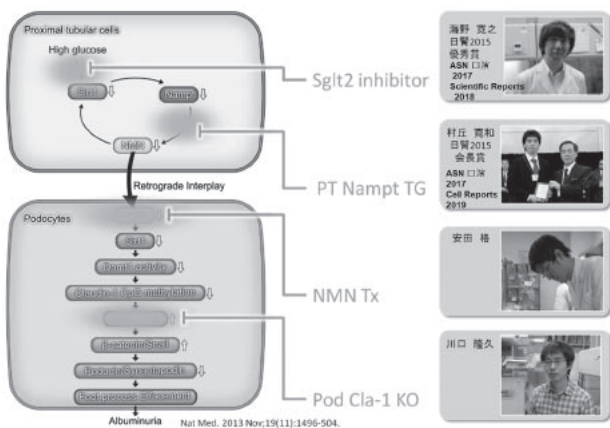
(慶應義塾大学医学部)

【目的】

2013 年 Nature Medicine に発表した糖尿病性腎症における尿細管糸球体連関分子の詳細な機能解析を進めた。

【方法】【結果】

尿細管糸球体連関 研究チーム(指導 長谷川 一宏)



- 1) SglT2 阻害剤が Sirt1 の保持作用があることを明らかにした. Scientific Reports 2018 に報告した.
- 2) Namp1 の尿細管における機能をあきらかにした. Cell Reports 2019 に報告した.
- 3) NMN 投与における尿細管糸球体連関の保持作用を検討している.
- 4) Claudin-1 の遺伝子改変マウスの解析を行なっている.

【考察】

尿細管糸球体連関は糖尿病性腎症の新規の病態発症機序であり、今後も解明を進めていきたい。

【文献】 いずれも筆頭著者（もしくは相当）

- 1) Muraoka, H., Hasegawa, K. & Wakino, S. *et al.*: Role of Namp1-Sirt6 axis in renal proximal tubules in extracellular matrix deposition in diabetic nephropathy. (1st and 2nd authors equally contributed.) *Cell Reports*. 2019 Apr 2; **27** (1): 199-212. e5. (impact factor 8.4)
- 2) Hasegawa, K.: Novel tubular-glomerular interplay in diabetic kidney disease mediated by sirtuin 1, nicotinamide mononucleotide, and nicotinamide adenine dinucleotide Oshima Award Address 2017. *Clin Exp Nephrol*. 2019 Mar 11. (impact factor 2.4) Review.
- 3) Umino, H., Hasegawa, K., Wakino, S. *et al.*: High Basolateral Glucose Increases Sodium-Glucose Cotransporter 2 and Reduces Sirtuin-1 in Renal Tubules through Glucose Transporter-2 Detection. *Sci Rep*. 2018 May 1; **8** (1): 6791. (1st and 2nd authors equally contributed.) (impact factor 4.847)

4) Hasegawa, K., Wakino, S., Sakamaki, Y., Kanda, T., Tokuyama, H., Hayashi, K. & Itoh, H.: Communication from Tubular Epithelial Cells to Podocytes through Sirt1 and Nicotinic Acid Metabolism. *Curr Hypertens Rev*. 2016; **12** (2): 95-104. Review. 査読有り（発刊1年未満で impact factor 現在のところ未算出）

5) Hasegawa, K., Wakino, S., Simic, P., Sakamaki, Y., Hayashi, K., Guarente, L. & Itoh, H.: Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat Med*. 2013. **19** (11): 1496-504. 査読有り (impact factor 30.3)

⇒ 新聞記事掲載 2013年10月22日3面 読売新聞 夕刊

摂食関連 GPCR の活性化・不活性化における分子メカニズム解析

濱本明恵

(岐阜大学工学部)

【目的】

メラニン凝集ホルモン (MCH) の受容体 MCHR1 は Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、摂食調節、エネルギー代謝、情動などを制御する。先行研究において MCHR1 活性化の分子メカニズムがいくつか解明されたが、MCHR1 の不活性化に関する知見は乏しい。GPCR を介した細胞内シグナルの強度と持続時間は、受容体の活性化と不活性化のバランスに依存しているため、MCHR1 がどのように不活性化されるのかを明らかにすることが必要不可欠である。そこで本研究では、受容体不活性化の中心的役割を果たす“受容体インターナリゼーション (細胞内移行)”に着目した。受容体インターナリゼーションとは、リガンド刺激により活性化された受容体がリン酸化され、細胞内へ移行し、分解または再利用される現象である。MCHR1 において受容体インターナリゼーションに関する報告は殆んど無いため、その詳細を解析した。

【方法】

N末端にFlag タグが付加した哺乳類 MCHR1 の細胞内第2, 第3ループ領域に存在する5箇所の予測リン酸化アミノ酸をAlaに順次置換した置換体をinverse PCR法で作製した。ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293細胞) にMCHR1置換体を強制発現させてリガンドMCHを添加し, 細胞免疫染色により受容体局在などを解析した。

【結果・考察】

哺乳類MCHR1において, 細胞内第2ループ領域同時置換体, 細胞内第3ループ領域同時置換体, それらを組み合わせた細胞内第2+第3ループ領域同時置換体では, 同程度の受容体インターナリゼーションの抑制が観察された。従って, MCHR1のインターナリゼーションには, 細胞内第2ループ領域の同時リン酸化, 細胞内第3ループ領域の同時リン酸化が独立に関与し, 第2と第3ループ間には相加・相乗効果はない可能性を示した。また興味深いことに, その置換体は単に受容体インターナリゼーションが抑制されるのみならず, 野生型よりも受容体インターナリゼーションが生じるタイミングが遅延し, エンドサイトーシスの過程も異なることも示唆された。引き続きMCHR1のインターナリゼーション機構を詳細に解析することで, MCHR1における不活性化のメカニズム解明に繋がると考えている。

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】

従来, 心筋細胞の増殖能は, 生後に急激に低下し「成体心筋細胞は増殖しない」と考えられてきたが, 近年, 成体心筋細胞が僅かでも「ターンオーバー」していることが実証された。この成体心筋細胞の増殖能を増幅することは, 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から, 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を行った。さらに, 得られた候補化合物がラット新生児初代心筋細胞の増殖能に与える影響も評価した。最も心筋細胞の増殖能を増幅した化合物TAZ-12を対象に構造改変を行い, その活性中心構造を同定するとともに, 毒性が低く, 心筋細胞での効果選択性が極めて高く, 生体内安定性も考慮したフッ素化合物(TT-10)を創出した。化合物TT-10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TT-10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¹⁾。さらに, この化合物が健常者由来のヒト由来iPS心筋細胞の増殖も促進することを実証した一方で, 遺伝子発現, 心筋細胞の拍動, 細胞毒性を指標とした心筋細胞の機能評価では明らかな有害事象を認めなかった²⁾。

【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化合物を創出し, ヒト由来iPS心筋細胞の増殖効果も実証した。重症心不全・虚血性心疾患患者に対する新たな治療を提供しうるとともに, 心筋細胞の分裂機序解明にも貢献できると考えられる。

【文献】

- 1) Hara, H., Takeda, N. & Komuro, I. *et al.*: Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury, *JACC Basic Transl Sci*, **3**, 639-653 (2018).
- 2) Ito, M.*, Hara, H.* (*equally first contribution), Takeda, N. & Komuro, I. *et al.*: Characterization of a small molecule that promotes cell cycle

activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J Mol Cell Cardiol*, **128**, 90-95 (2019).

劇症1型糖尿病発症メカニズムの解明

細川 吉 弥

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

劇症1型糖尿病は本邦で最初に報告された1型糖尿病のひとつの疾患単位であり、急速に進行するβ細胞破壊にともなうインスリンの完全な枯渇を特徴とする。これまで我々は劇症1型糖尿病 iPS 細胞を用いた研究において、サイトカイン刺激後の劇症1型糖尿病 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞を単離し RNA シークエンスにて発現が著明に低下していた遺伝子として *CH25H* (*Cholesterol 25-Hydroxylase*) を見いだしている。また、近年、PD-1 抗体および PD-L1 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬投与中に劇症1型糖尿病を発症する症例が多数報告されているが、我々は MIN6 への poly (I;C) トランスフェクションにて *PD-L1* 発現が上昇するという知見を得ているとともに、免疫チェックポイント阻害薬投与中に発症した1型糖尿病患者の切除膵を得ている。これらのサンプルを用いて劇症1型糖尿病発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】

① CH25H は Cholesterol から 25HC (25Hydroxycholesterol) を産生する酵素であり、我々はこれまでの MIN6 における 25HC の抗アポトーシス効果の検討に加えて、今回、劇症1型糖尿病 iPS 細胞から分化誘導して得られたインスリン陽性細胞を含む細胞において、サイトカイン投与にて上昇した Caspase3 活性が 25HC を投与することで有意に低下すること、また免疫染色においてインスリン陽性細胞に占める活性型 Caspase3 陽性細胞の割合が 25HC を投与することで有意に低下することを見出し、劇症1型糖尿病 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞における 25HC の抗アポトーシス効果を見出した。また、大阪大学工学部と共同で、血中 25HC 濃度測定系の樹立をすすめており、今回、健常人血漿中の

25HC 濃度を GC-MS/MS を用いた内部標準法で測定することに成功した。②これまでに、劇症1型糖尿病 iPS 細胞3クローン、健常人 iPS 細胞3クローン由来インスリン陽性細胞に poly (I;C) トランスフェクションが終了した (n=3)。今後インスリン陽性細胞のみを FACS にて単離し *PD-L1* 等の遺伝子発現の差異を評価する。③免疫チェックポイント阻害薬投与中に発症した1型糖尿病患者の切除膵を用いた免疫組織学的検討において、T リンパ球の浸潤と PD-L1 発現低下を見出し報告した(下記)。

【文献】

Yoneda, S. & Hosokawa, Y. *et al.*: T lymphocyte infiltration to islets in the pancreas of a patient who developed type 1 diabetes after administration of immune checkpoint inhibitors. *Diabetes Care* (Epub ahead of print).

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】

睡眠・覚醒を通じた大脳皮質神経活動における視床マトリックス細胞の役割を明らかにする。

【背景】

視床は末梢の感覚情報を大脳皮質に伝達する必須の役割を担っている。睡眠時、我々は外部感覚情報を認識しないため、視床の活動が低下する事が睡眠に重要ではないかと考えられてきた。しかし、近年、視床の感覚情報の伝達を担う神経群(コア細胞)は睡眠覚醒制御に関与せず、大脳皮質のほぼ全域に広く、非特異的に投射している神経群(マトリックス細胞)が睡眠覚醒制御を担う事が明らかとなった。

【方法】

自由行動下のマウスの睡眠覚醒サイクルを通じて、大脳皮質の神経活動を測定する。また光遺伝学を用いた視床マトリックス細胞の活性化、および、薬理遺伝学を用いた視床マトリックス細胞の不活性化が大脳皮質活動に

及ぼす影響を検討する。

【結果】

我々は光遺伝学を用い、マウスのマトリックス細胞の活性化を行った。5msの刺激を20秒に一度という低頻度で行うと、VM神経の刺激に大脳皮質神経が反応して発火する事が観察された。興味深い事に、ノンレム睡眠時には大脳皮質の反応はより大きく、ノンレム睡眠特異的脳波である徐波/Slow waveの誘導が観察された。また、予備的な結果ではあるが、薬理遺伝学によりマトリックス細胞の除去を行うと、覚醒時・レム睡眠時脳波のうちガンマ周波数帯域の減少が観察された。

【考察】

我々の結果から、視床と大脳皮質の相互作用は睡眠覚醒を通じダイナミックに変化する事が明らかになった。また、ノンレム睡眠時の徐波、および覚醒時・レム睡眠時のガンマ派というそれぞれの脳状態における特徴的な脳波に視床マトリックス細胞が関与している可能性が示された。

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

松井 勝

(奈良県総合医療センター)

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活性化は血管新生や単球浸潤などの機序を介して動脈硬化巣の形成および進展を促進する。一方、膜型 Flt-1 受容体遺伝子から alternative splicing で産生される細胞外ドメインのみから構成される sFlt-1 は、PIGF と結合し、膜型 Flt-1 受容体へ結合を阻害する、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 sFlt-1 に着目して、その均衡が動脈硬化疾患の発症・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 PIGFmRNA の発現の亢進と sFlt-1 mRNA の発現低下が認められた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 PIGFmRNA 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、大動脈プラーク面積が有意に減少した²⁾。

さらに 1351 名の CKD 症例の血漿で血中 PIGF 濃度を測定し、心血管イベントを追跡したところ、心血管イベントの発症リスクは PIGF \leq 10.1 pg/ml の患者群に対して PIGF 10.2-14.4pg/ml では 1.55 倍、PIGF 14.5-19.5pg/ml では 3.39 倍、PIGF \geq 19.6pg/ml では 8.42 倍であり、CKD 患者における PIGF 濃度と心血管イベント発症の関連性を臨床的に明らかにした³⁾。

一方で、sFlt-1 はヘパリン負荷後に細胞表面から一過性遊離した 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。ヘパリン負荷試験施行したヒト 343 名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。sFlt-1^{-/-}ApoE^{-/-}マウスは sFlt-1^{+/+}ApoE^{-/-}KO に比して有意に大動脈プラーク面積が多くなること、sFlt-1^{-/-}マウスの圧負荷モデルは心筋線維化の進行とともに心不全の増悪に繋がることを示し、CKD 環境でなくとも sFlt-1 が心血管疾患の発症抑制に重要な鍵因子であることを示した⁴⁾。

以上より、われわれは、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関連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).

- 4) Seno, A. *et al.*: Suppressed Production of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Contributes to Myocardial Remodeling and Heart Failure. *Hypertension.*, **68**: 678-87 (2016).

血糖変動と認知機能の関連解明のための前向き観察研究

松原正樹

(国立循環器病研究センター病院)

【背景】

糖尿病患者では、アルツハイマー型認知症、血管性認知症の発症リスクがそれぞれ1.5倍、2.5倍に増大することが知られている。糖尿病患者における認知機能低下や認知症の病態については、高インスリン血症、慢性的な高血糖、低血糖、脳細小血管障害、終末糖化産物の蓄積など多くの要因が示唆されているが未解明な部分が多く、また認知症予防のための血糖管理指標も明らかとなっていない。近年、血糖持続測定 (continuous glucose monitoring:CGM) 機器の登場により糖尿病患者の血糖プロファイルを評価する事が可能となり、これまでの横断研究で血糖変動と認知機能の関連が示唆されている。

【目的】

本研究では、糖尿病患者の血糖変動と認知機能の関連を縦断的に解析することで、糖尿病患者で認知機能低下に至る病態を解明し、また糖尿病患者における認知症予防のための新規血糖管理指標を探索することを目的とする。

【方法】

Mild Cognitive Impairment (MCI) は認知症の前駆段階として知られ、年間約10%が認知症に移行する集団である。本研究では、国立循環器病研究センター通院中のMCIを認める高齢 (65-85歳) 糖尿病患者100名に、CGM (リブレ Pro)、認知機能試験 (Montreal Cogni-

tive Assessment, Alzheimer's Disease Assessment Scale) を登録時、1年後、2年後と縦断的に行い、得られた血糖変動指標と認知機能試験スコアの変化との関連を解析する。

【進捗】

国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得て、2019年3月より患者エントリーを開始している。

Cytochrome P450 基質薬のスクリーニングによるフェロトーシス抑制薬の同定と機序の解明

三島英換

(東北大学病院)

【背景・目的】

フェロトーシス (Ferroptosis) は鉄介在性の脂質酸化依存性プログラム細胞死であり、ROSによる脂質過酸化の蓄積によって誘発されるため酸化ストレス誘導性細胞死とも呼ばれる。フェロトーシスは急性組織障害、神経変性疾患、抗癌剤感受性等への病態の関与が報告されており、脂質酸化を抑制する薬剤介入によって制御可能な細胞死でもあるためフェロトーシスの抑制は関連病態の治療ターゲットとなる。Cytochrome P450 (CYP) は脂溶性薬剤、外的異物やホルモンの代謝を行う酵素群であるが過去の報告からCYPの基質となる化合物の一部が脂質酸化を抑制することが機序が不明確ながら知られていた。これをヒントに今回我々はCYP基質薬をターゲットとしてフェロトーシス抑制薬の探索と同定、機序の解明、さらに組織障害保護効果について検討した。

【方法・結果】

培養細胞とグルタチオン合成酵素阻害薬BSOによるフェロトーシス誘導系においてCYP基質薬のスクリーニングを行った結果、臨床利用可能な複数の薬剤およびホルモンにフェロトーシス抑制効果を見出した。これら薬剤の脂質酸化抑制を介するフェロトーシス抑制機序としてラジカルスカベンジャー能を検討したが代表的なROSであるヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドに対する補足能は乏しかった。一方、脂質ラジカルブロープを用いた解析からこれらの薬剤は脂質酸化の連鎖

反応に関わる脂質ペルオキシラジカルに対して高いスカベンジャー能を有することが分かった。さらにホスファチジルコリン酸化体 (PCOOH) の処理による細胞内脂質ペルオキシラジカルの増加状態ではこれらの薬剤のフェロトシス抑制効果は消失したが、高濃度薬剤投与では PCOOH 処理下でもフェロトシス抑制能を認めため、この脂質ペルオキシラジカルに対するスカベンジャー能がフェロトシス抑制機序であることを明らかにした。これら薬剤のフェロトシス抑制効果はいずれの細胞種 (腎臓, 心筋, 骨格筋, 神経, がん・非がん) でも認め、さらに急性腎障害モデルおよび肝障害モデルマウスにおいて各薬剤投与群では組織障害の軽減, 組織内脂質酸化の抑制, ミトコンドリア形態保持を認めためフェロトシス抑制を介した臓器保護効果が示された。

【結語】

CYP 基質薬等の脂質ペルオキシラジカルスカベンジャー能を有する薬剤はフェロトシス関連病態の治療薬となる可能性が期待される。

白血病を維持する腫瘍エンハンサーの検索

村川 泰裕

(理化学研究所生命医科学研究センター)

【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の解明から、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。

【背景】

エンハンサーは、細胞種特異的に活性化し標的遺伝子の発現を増大させる作用を持つことから、ゲノムネットワークの中心的な役割を担う。申請者の所属機関で独自に開発された CAGE 法は、RNA の 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。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。従って、CAGE 法によりエンハンサー RNA の 5'末端を検出し、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、従来の CAGE 法ではエンハンサーの検出感度は極めて低かった。

【方法】

この問題を解決するために、我々は、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 (NET-CAGE 法) を開発した (Nature genetics in revision)。今回、急性白血病患者の複数患者のサンプルにおいて我々の独自技術を適用して、ゲノムネットワーク解析を行った。

【結果】

ゲノムネットワーク解析の結果、白血病に特異的に活性化しているエンハンサーおよび未知の遺伝子などが網羅的に検出された。さらに TCGA のがんゲノムアトラスのデータとも統合解析を行うことで、新規の診断マーカーや治療標的候補と思われる分子を同定した。今後、これらの機能解析を行い、白血病の病因・病態の解明を目指す。

【文献】

Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T. *et al.*: An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.*, **507**, 455-461. (2014).

Hirabayashi S., Bhagat S., Matsuki Y., Takegami Y., Uehata T., Kanemaru A., Itoh M., Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Takeuchi O., Carninci P., Katayama S., Hayashizaki Y., Kere J., Kawaji H. & Murakawa Y.: Dynamics and Topology of Human Transcribed Cis-regulatory Elements. *Nature Genetics* in revision

がん免疫の成立機構に関する研究

諸石 寿朗

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

がん細胞は自らの免疫原性（＝細胞が液性免疫や細胞性免疫などの免疫応答を誘導する性質）を低下させ、宿主のがんに対する免疫応答から逃れるような腫瘍微小環境に身を隠し増殖するが、細胞の免疫原性がどのような分子機構で制御されているかは大きな謎となっている。本研究では、がん細胞内のシグナル伝達経路に注目してこのメカニズムの解明をめざす。

【方法】

われわれは過去の研究で、細胞内 Hippo シグナルががん細胞において細胞の免疫原性を抑制し、宿主の抗腫瘍免疫応答を抑えていることを報告した [Cell 167, 1525-39 (2016)]。本年度の研究では、この現象が特定のがん種に限ったものであるのか、また、がん免疫を誘導するための要件やそのメカニズムを探索した。

【結果】

がん細胞における Hippo シグナルの阻害によって、幅広い種類のがんにおいて免疫応答の誘導が認められた。また、がん細胞集団の中に Hippo シグナルを阻害した細胞が一部あれば、宿主の免疫応答が誘導されることがわかった。さらに、Hippo シグナルを阻害したがん細胞が誘導するインターフェロン応答が、抗腫瘍免疫応答の成立に重要であることも示唆された。

【考察】

Hippo シグナルの阻害によるがん免疫の誘導は様々ながん種で認められる共通した現象であると考えられる。今後この詳細なメカニズムを明らかにすることによって、多細胞生物における細胞の免疫原性の制御機構に関して理解を深めたい。

オルガネラ量の恒常性を司る仕組みの研究

柳谷 耕太

(九州大学生体防御医学研究所)

【目的】

真核生物において、好気呼吸による ATP の合成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必須な反応は、ミトコンドリアや小胞体、ペルオキシソームなどのオルガネラで分担して遂行される。哺乳類を含む高等動物においては、同じ種類の細胞間では、各オルガネラの量は驚くほど類似している。例えば、小胞体で大量の抗体を合成する形質細胞では、どの細胞も一様に、著しく発達した小胞体を備えている。一方、ATP の消費が著しい心筋細胞では、ミトコンドリアが一様に大量に増殖している。これらの事実は、それぞれの種類の細胞に、オルガネラ量の正常範囲があり、この範囲を逸脱した場合に、そのオルガネラ量を正常範囲に戻す恒常性維持機構が存在することを示唆している。しかし、オルガネラ量の恒常性維持機構は、その存在が示唆されているにも関わらず、十分には研究されていない。本研究では、申請者が、これまでの研究で開発したオルガネラ量を人為的に減少させる技術を活用して、オルガネラ量の恒常性のなかでも、特に、オルガネラ不足に対する細胞応答の解明を目指した。

【結果・考察】

これまでの研究で、申請者は、オートファジーによって狙ったオルガネラを人為的に消化させるシステム（オルガネラ減少法）を開発していた。この方法によって、狙ったオルガネラを減少させた際の細胞応答を記述することを計画したが、トランスフェクションによる一過的な発現によって、一部の細胞にしか、オルガネラ減少を引き起こせていなかった。そこで、刺激によってオルガネラ減少法の発現を誘導できる細胞株の作製を試みた。ウイルスベクターや Flp-In T-Rex などの市販の発現誘導システムの系を用いた試みでは、目的とする細胞株は取得できなかったが、doxycycline で、非常に厳密に発現誘導ができる Tet-3G システムとトランスポゾンを用いたベクターを作製し、それを用いたところ、誘導性オルガネラ減少法をゲノムに組み込んだ細胞株を作製する

ことができた。

【将来の展望】

樹立した誘導性オルガネラ減少法を用いて、オルガネラ不足に対する細胞応答を明らかにする。

甲状腺ホルモン脱ヨード酵素を標的とした脂質・エネルギー代謝促進薬の開発

山内 一郎

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

甲状腺ホルモンは、LDL コレステロール低下作用やエネルギー代謝促進による抗肥満作用を有する。臓器特異的に甲状腺ホルモン作用を調節することで治療への応用を目指している。我々が研究している甲状腺ホルモン脱ヨード酵素には、1型 (D1)、2型 (D2)、3型 (D3) の3種類があり、それぞれ臓器毎に分布が異なっている点が魅力的である。例えば、D1 活性を増強させると肝臓を介して LDL コレステロール低下に繋がり、D2 活性を増強させると褐色脂肪を介してエネルギー代謝促進による抗肥満作用に繋がる。以上より、D1、D2、D3 の調節因子を明らかにすることを目的とした。

【方法】

甲状腺ホルモン脱ヨード酵素は、良好に発現する細胞株に乏しく、酵素活性の測定にラジオアイソトープやカラム処理を要するなど、ハイスループットな検出系を構築する上での困難さがある。そこで、プロモーターアッセイを基盤として、384 ウェルプレートと少ない試薬量で十分に検出できる系を構築した。細胞株は HEK293T を用いた。D1、D3 については HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A、D2 についてはフォルスコリンをポジティブコントロールとして用い、そのシグナルに対する相対比を算出してプレート間の補正を行った。陽性判定とした化合物について、恒常発現プロモーターに対しては反応を示さず、再現、用量依存が見られることを確認した。

【結果・考察】

臨床応用されている薬剤のライブラリー (2560 種類) を用いたスクリーニングを実施した。正に制御するものについて確認実験を進め、D1 について 6 個、D2 につ

いて 34 個、D3 について 5 個のヒット化合物が得られた。D2 は既に知られているアドレナリン受容体作動薬が多数ヒットしており、系の妥当性が支持された。ヒット化合物が生体作用を示すかを検証するにあたり、当院に甲状腺疾患で通院中の患者のコホートを構築し、各ヒット化合物の内服前後での変化をレトロスペクティブに解析するという試みを行っている。

腸管 NAMPT-NAD⁺合成系を標的とした NAD⁺中間代謝産物 NMN によるインスリン抵抗性発症予防法の開発研究

山口 慎太郎

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

近年、哺乳類 NAD⁺合成系の鍵酵素である NAMPT が環境・栄養状態に応答することで NAD⁺量を調節し、NAD⁺消費酵素を介して代謝、老化などの生物学的な多彩な局面において重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。さらに、インスリン抵抗性、2型糖尿病などに代表される代謝疾患において NMN (nicotinamide mononucleotide) などの NAD⁺中間代謝産物が NAD⁺量を増加させ、病態を改善することも報告されている。実際に、申請者らは脂肪細胞特異的 *Nampt* ノックアウトマウスを作成し、脂肪組織の NAMPT-NAD⁺合成系が脂肪局所の炎症およびアディポネクチン分泌をコントロールし、インスリン抵抗性を制御することを報告した (*Cell Rep.* 2016)。

また、我々の研究室では、高脂肪食により生じる腸管の炎症が、脂肪組織の炎症に伴うインスリン抵抗性発症に先行することを見出し (*Cell Metab.* 2016)、2型糖尿病の発症を予防するためには、腸管にアプローチする必要があると考えた。

さらに、これまで経口投与された NAD⁺中間代謝産物 NMN がどのように吸収され、2型糖尿病の病態を改善するか詳細なメカニズムは不明であったが、NMN のトランスポーターが小腸に存在することが報告され (*Nature Metab.* 2019)、2型糖尿病発症における腸管の重要性が認識されている。

そこで、本研究では腸管の NAMPT-NAD⁺ 合成系の 2 型糖尿病発症における意義を検討する。

【方法・結果】

C57BL/6 マウスに高脂肪食を負荷した。白色脂肪組織の NAMPT 低下に先行して、腸管の *NAMPT* が低下した。そこで、肥満による 2 型糖尿病発症過程における腸管 NAMPT-NAD⁺ 合成系の役割を検討するために、腸管特異的 *Nampt* ノックアウトマウスを新規に作成した。具体的には、ワシントン大学医学部内科の吉野純博士より供与していただいた *Nampt*-floxed マウスと、腸管上皮細胞で *Cre* を発現する *Villin-Cre* マウスを用いた。これまでに、ノックアウトマウスの腸管各部位で NAMPT 発現量がコントロールマウスと比較し、有意に低下していることを確認した。

【今後の方針】

腸管の NAMPT-NAD⁺ 合成系が糖代謝を制御しているという仮説のもと、解析を進めていく。

Vascular Biology Innovationに関する研究助成

ミネラルコルチコイド過剰におけるアルカローシス
依存性のPendrin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】

アルドステロン感受性遠位ネフロン（遠位曲尿細管～集合管）は、Na-Cl 共輸送体（NCC）や上皮 Na チャネル（ENaC）を発現し、腎における NaCl 再吸収の最終調節を担う。最近、皮質集合管の β -間在細胞に発現する Pendrin が第 3 の NaCl 再吸収機構として働き、NCC と相補的に血圧調節に寄与することが報告された。

原発性アルドステロン症のような一次性的アルドステロン過剰では、低 K 血症を生じると共に NCC および Pendrin の活性化が起き、食塩感受性高血圧を発症する。前回我々は、この Pendrin 活性化が間在細胞特異的 MR 欠損マウスでは抑制されず、一方で主細胞 MR-ENaC 経路の遮断や K 補充による低 K 血症の是正により抑制されることを報告した。この低 K 血症に関連した Pendrin 活性化機構は、低 K 血症より直接的に起こることが知られる NCC 活性化機構と類似したが、両者の相違点や、前者の血圧調節における意義は不明であり、今回さらなる検討を行った。

【方法と結果】

マウスに高食塩食・アルドステロン投与を行うと、低 K 血症に付随して代謝性アルカローシスを生じ、NCC と Pendrin の活性化が見られた。アルカローシスは Pendrin 制御への関与が示唆されていることから、この点に着目して解析を進めた。同系においてアミロライド（ENaC 阻害薬）投与や K 補充により低 K 血症を是正したところアルカローシスも是正され、NCC・Pendrin の活性化はともに抑制された。一方、アセタゾラミド（炭酸脱水素阻害薬）の投与を行うと、低 K 血症の是正無しにアルカローシスのみが是正され、NCC 活性化の抑

制無しに、Pendrin 活性化のみが抑制された。すなわち Pendrin の制御はアルカローシスを必要とすることが分かった。さらに、NCC 欠損マウスに高食塩・アルドステロン投与を行ったところ、野生型より高度の Pendrin 活性化が起き、依然高血圧が残存した。本系において K 補充によりアルカローシスを是正すると Pendrin 抑制とともに降圧が得られ、アルカローシスに依る Pendrin 制御が NCC 欠損時の高血圧維持に関与することが示唆された。

【結論】

一次性的アルドステロン過剰ではアルカローシスに依る Pendrin 活性化が食塩感受性高血圧発症に関与する。本機構はサイアザイド抵抗性高血圧における治療標的になる可能性がある。

免疫学的介入に基づく循環器病に対する新規治療法の開発

安西 淳

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

急性心筋炎は、特に若年者における突然死、拡張型心筋症の主な原因の一つであり、病態の解明、治療法の確立は医学研究の急務である。急性心筋炎は感染症、自己免疫、薬物などを原因とする、心筋を主座とした炎症性疾患であり、病理学的には心臓へのリンパ球やマクロファージなどの炎症細胞浸潤、心筋壊死、間質の浮腫、線維化を特徴としている。急性期の炎症反応が過剰な症例、あるいは遷延する症例は慢性心筋炎に移行しやすいことが知られている。心機能低下が顕著な症例では心移植が唯一の治療法になるが、日本を含めた多くの国では、心移植に潤滑に対応できないのが現状である。

Interleukin-3 (IL-3) は、数十年前にクローニングされた造血成長因子の一つであるが、その機能については

未だ不明な点が多く、特に循環器病における役割に関する報告はほぼ皆無である。本研究では急性心筋炎マウスモデルを用い、その免疫応答における IL-3 の役割を解明するとともに、急性心筋炎に対する新規治療法を同定することを目的とする。

【方法と結果】

野生型、および IL-3KO マウスに 100 μ g の心臓特異的 α ミオシン重鎖ペプチドを完全フロインドアジュバントとともに、週に 1 回、2 週間皮下投与し、自己免疫性心筋炎モデルを作製した。以下に行った検討とそれに対する結果を示す。

1. 野生型マウスと比較して IL-3KO マウスでは、21 日目における組織学的スコアがより軽度であり、心臓の炎症が抑制されていた。
2. Flow cytometry 法で浸潤細胞を解析すると、IL-3KO マウスで特に単球、マクロファージ、単球由来樹状細胞の浸潤が抑制されていた。
3. CD4 陽性 T 細胞が IL-3 の主な産生源であった。心筋炎患者の心臓組織中の IL-3 の遺伝子発現が正常心と比較して上昇していることも確認した。
4. 末梢血、骨髄の白血球数、分画は両群で有意差を認めなかった。
5. IL-3 受容体は心臓マクロファージに高発現しており、CRISPR-Cas9 の手法を用いて、IL-3 がマクロファージからの CCL2, CCL7, CCL12 (単球の遊走を促すケモカイン) の産生を誘導することを示した。
6. 抗 IL-3 抗体の投与により、野生型マウスにおける急性期の炎症、慢性期における心機能、線維化の改善を認めた。

【考察】

本研究により、IL-3 のマクロファージを介した新規機能が明らかとなった。近年、癌に対する Check-point 阻害薬の使用が普及しているが、その致死的副作用の一つとして自己免疫性心筋炎が知られている。IL-3 は急性心筋炎における新規治療標的となる可能性がある¹⁾。

【文献】

- 1) Anzai, A. *et al.*: Self-reactive CD4+ IL-3+ T cells amplify autoimmune inflammation in myocarditis by inciting monocyte chemotaxis. *J Exp Med*; **216**: 369-383, (2019).

ドキシソルビシン心筋症におけるフェロトーシスの役割解明

池田 昌隆

(九州大学大学院医学研究院)

【背景・目的】

アントラサイクリン系抗癌剤の一種であるドキシソルビシンは、現在でも造血器悪性腫瘍および乳がんを中心に多用される抗がん剤である。一方で、用量依存性に心毒性を示すことが知られ、他の心筋症と比較しても予後不良であることが報告されている。本研究では近年新規に提唱された過剰な過酸化脂質に基づく regulated cell death であるフェロトーシス (ferroptosis) とその主たる制御分子である Glutathione peroxidase 4 (GPX4) に着目し^{1,2)}、ドキシソルビシン心筋症におけるフェロトーシス誘導の分子機序とその役割を解析した。

【方法】

ドキシソルビシン心筋症動物モデルは、6mg/kg/回をモデル作成開始 0, 2, 4 日目に尾静脈より投与して作成した。14 日目に心エコー、臓器重量を測定し、回収したサンプルの生化学的解析を行った。新生仔ラット単離心筋細胞にドキシソルビシン (2 μ M) で 30 時間の刺激を行い、生化学的評価および細胞死の評価を行った。

【結果】

ドキシソルビシン心筋症モデルマウスでは、14 日目に LVEF の低下を認めた。心筋組織においては、GPX4 の遺伝子および蛋白の発現量は低下しており、脂質酸化化合物の一種である MDA が増加していた。さらに GPX4 の過剰発現マウスでは LVEF の低下は改善し、過酸化脂質の蓄積が抑制された。一方で GPX4 ヘテロ KO マウスでは LVEF のさらなる増悪を認め、過酸化脂質の蓄積が増加した。単離心筋細胞にドキシソルビシンで刺激を加えたところ、GPX4 の減少および過酸化脂質の増加とともに著明な細胞死が誘導された。一方で、GPX4、特にミトコンドリア型 GPX4 の過剰発現により過酸化脂質は抑制され、有意に細胞死が抑制された。さらに GPX4 によるフェロトーシス阻害に加え、アポトーシス阻害剤である zVAD-FMK を用いたところ、ドキシソルビシンによる細胞死が完全に抑制された。

【考察】

ドキシソルピシン心筋症において GPX4 の発現低下はフェロトーシス誘導の機転となっており、フェロトーシスはアポトーシスとともにドキシソルピシンによる細胞死において重要な regulated cell death であることが示唆された。

【文献】

- 1) Dixon. *et al.*: Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death, *Cell.*, **149**, 1060 (2012).
- 2) Angeli. *et al.*: Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice, *Nat Cell Biol.*, 1180 (2014).

細胞外分泌タンパク質の分解経路の研究

板倉 英 祐

(千葉大学大学院理学研究院)

【目的】

生体内のタンパク質恒常性の維持は健康を保つために重要である。実際に近年の研究から細胞内タンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソームやオートファジーの多様な生理的重要性は明らかとなっている。一方で細胞外、つまり血液内にもタンパク質は豊富に存在し、細胞内と同様な熱ショックや酸化ストレスだけでなく、細胞外ではさらに細胞外プロテアーゼの攻撃、pH の変化 (アシドーシス)、循環物理的ストレスなどに晒され、タンパク質は厳しい環境を耐え忍ぶ。しかし、細胞外のタンパク質恒常性を維持するメカニズムはよくわかっていない。

【方法】

細胞外ミスフォールドタンパク質がヒト培養細胞に取込まれると赤色蛍光タンパク質が細胞内蓄積する新規取込みアッセイ法を開発した。これにより細胞外ミスフォールドタンパク質の細胞内取込み分解を定量的に測定できるようになった。さらに本アッセイ法と CRISPR による網羅的遺伝子スクリーニングを組み合わせることで、細胞外のミスフォールドタンパク質を認識して分解する細胞膜上受容体の原因遺伝子の同定を探索した。

【結果】

開発した細胞外取込みアッセイ法を用いたところ、細胞外正常タンパク質に比べて、細胞外ミスフォールドタンパク質が積極的に細胞内に取込まれリソソーム分解されていることを見出した。そこで、取込みアッセイ法と全遺伝子を標的として CRISPR による原因遺伝子を探索した。その結果、細胞外ミスフォールドタンパク質の取込みに関わる細胞外クリアランス受容体の同定に成功した。この受容体を欠損すると細胞外ミスフォールドタンパク質の取込み分解が抑制され、細胞外ミスフォールドタンパク質と受容体が直接複合体形成することも発見した。

【考察】

同定した細胞膜上クリアランス受容体はアルツハイマー病の原因となる細胞外アミロイドβの分解に関わることも見出した。つまり細胞外にも、異常タンパク質を選択的に認識して分解するタンパク質分解経路があることを同定した。この経路の詳細な分子機構を解き明かすことで、血液内のタンパク質恒常性を維持するメカニズムの基盤を確立し、神経変性疾患など細胞外タンパク質沈着を伴う疾患の治療に応用できると期待される。

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)

これまで我々は、脳血管障害におけるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の影響について、特にアンジオテンシン II 2 型 (AT₂) 受容体の役割について検討・報告してきた。AT₂ 受容体は古典的な RAS の受容体である 1 型 (AT₁) 受容体に拮抗する作用を持ち、脳障害時に保護的な作用をすることを明らかにしてきた。しかし、認知機能への影響については不明であったことから認知機能低下モデルマウスを用いて AT₂ 受容体の影響を検討した。両頸動脈狭窄術 (BCAS) により血管性認知症モデルを作成し、AT₂ 受容体直接刺激薬、C21 を投与してその影響を検討した。BCAS により認知機能が低下していたが、BCAS 群に C21 を投与することでその低

下が改善していた。脳血流量を測定したところ、BCAS 群で減少していたが、C21 を投与することによりその減少が改善していた。さらに、AT₂ 受容体欠損マウスで BCAS を行うと野生型マウス (WT) の BCAS 群に比べてさらに認知機能が低下しており、脳血流量もより低下する傾向があった。

また以前、この AT₂ 受容体刺激による脳保護作用について、受容体の細胞内 C 末端に結合するタンパク質、ATIP が重要であることを培養神経細胞の検討から明らかにしてきた。しかし、この脳保護作用における ATIP の役割は不明である。そこで ATIP 過剰発現マウス (ATIP-Tg) を用いて脳保護への影響を検討した。このマウスで脳梗塞を誘導すると、WT に比べて ATIP-Tg で梗塞巣の減少傾向が認められた。さらに C21 を投与していると、WT、ATIP-Tg で共に梗塞巣の減少が認められるが、ATIP-Tg でその効果が増強されていた。また、虚血直後の脳血流量が ATIP-Tg において改善傾向を示し、C21 を投与していることで改善していた。

こうした結果から AT₂ 受容体-ATIP シグナルの活性化により効果的に脳血流量低下を軽減することで酸化ストレスや炎症を抑制し、脳障害の予防や neurovascular unit が改善することで認知機能低下抑制に繋がっている可能性がある。

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予防は健康寿命の伸長のために極めて重要であるが、その原因、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。我々は、加齢に伴いヒトおよびマウスの骨格筋で (P)RR の発現が上昇していることを発見しており、サルコペニアにおける (P)RR の意義を明らかにするため、全身に (P)RR を発現させたマウス ((P)RR Tg マウス) を作成し解析を行

なった。

【方法および結果】

(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、生後約一年以内に死亡した。骨格筋では Wnt シグナルが活性化されており、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。AAV ベクターを用いた骨格筋への (P)RR 発現でも筋萎縮は誘導され、筋肉自体の (P)RR の寄与が明らかとなった。

(P)RR Tg マウスの自発的な筋傷害にはオートファジー障害が関与していた。また、傷害後の再生過程では、筋線維数の増加が野生型と有意な差を認めなかったものの、多核化と筋線維の肥大が遅滞し、筋芽細胞融合の障害が示唆された。(P)RR Tg マウスでは傷害早期から、筋分化マーカー Myogenin 陽性再生線維を多数認め、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、Wnt シグナル阻害分子 DKK-1 の投与により改善がみられた。そこで、(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 マウスの筋萎縮および傷害後の骨格筋再生を促進する効果が確認された。

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、加齢マウスおよび (P)RR Tg マウスにおいて活性化が確認され、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】

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。

臓器特異的なペリサイトの機能解析

加藤 勝 洋

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

毛細血管の内腔は一層の血管内皮細胞で覆われており、そのすぐ外側にペリサイトが内皮細胞と基底膜を共有して存在している。肺におけるペリサイトの機能の多くはわかっていなかった。我々は複数の遺伝子改変マウスと肺厚切り切片の三次元的形態観察法を用いることで血管構成細胞の一つであるペリサイトの機能が肺胞形成に必須であること、また特異的な成長因子の分泌を介して制御していることを見出した。そこで本研究は、さらに成体における肺ペリサイトの機能を理解することを目的とする。

【方法】

Hippoシグナル伝達経路は発生、器官のサイズの制御、恒常性の維持、組織再生、がん細胞の増殖・浸潤にとって重要な役割を担うことが示されており、YAP1, TAZは其中で重要分子であることが知られている。ペリサイト特異的かつ誘導的 Yap1, Taz ダブルノックアウトマウスを作製し、新生仔または成体で Yap1 および Taz の遺伝子を誘導的に欠損させ解析を行った。また、ペリサイトに対する Cre を発現誘導可能なマウス系統とレポーターマウスを用いて細胞系譜追跡実験を行い、肺障害において肺ペリサイトの動態を解析した。

【結果】

ペリサイト特異的かつ誘導的に Yap1 および Taz を成体において欠損させ解析したところ、ノックアウトマウスにて肺重量の増加を認めた。このことから成体において肺ペリサイトは血管透過性を制御していることが示唆された。また、ブレオマイシン肺線維症モデルを用いて細胞系譜追跡実験を行ったところ、ペリサイトは筋線維芽細胞には分化しないことを見出した。

【考察】

本研究により成体において肺ペリサイトの機能の1つとして血管透過性を制御していることが考えられた。また、今までの知見から肺ペリサイトが肺線維症の病態において、筋線維芽細胞に分化することを示唆する報告が

されていたが、本研究の結果から別の細胞が筋線維芽細胞に分化することが示唆された。今後さらに臓器特異的なペリサイトの機能について明らかにしていく予定である。

VEGF-A の質に着目した ANCA 関連血管炎の治療効果評価に寄与する評価法構築に向けて

菊地 良 介

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

本研究は、血管内皮細胞成長因子 (VEGF-A) の質に着目した ANCA 関連血管炎の診断に寄与する評価法を構築するために、ANCA 関連血管炎患者での治療前後の VEGF-A 及び抗血管新生因子 (VEGF-A_{165b}) 血中濃度との関連について評価することを目的とする。

【方法】

ANCA 関連血管炎を有する日本人患者の寛解導入療法前向きコホート研究 (RemIT-JAV) に登録された ANCA 関連血管炎 (n=172) と新たに診断された患者検体を用いた。血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度は、ELISA kit を用いて測定した。

【結果】

我々は、種々の腎関連疾患における血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度を測定した。その結果、対照群と比較して血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度は ANCA 関連血管炎を有する患者群において有意に増加していた。そこで、血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度が ANCA 関連血管炎と関連しているかを評価するために、RemIT-JAV 登録検体を用いて治療前後での血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度変化について評価した。その結果、血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度は、ANCA 関連血管炎の治療後に有意に減少していた。ANCA 関連血管炎は、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (GPA)、顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の3疾患に大別することができることが知られている。そのため、どの疾患群において治療後の血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度が変化しているかを評価した。その結果、血中 VEGF-A 濃度は、

MPA の治療後に有意に減少していた。一方で，血中 VEGF-A_{165b} 濃度は EGPA の治療後に有意に減少していた。

【考察】

今回の我々の結果から，血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度は ANCA 関連血管炎の治療効果を評価できる有用なマーカーとなる可能性が示唆される。今後，血中 VEGF-A 及び VEGF-A_{165b} 濃度と各種評価パラメーターとの関連や ANCA 関連血管炎患者の予後との関連について評価していく予定である。

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】

腫瘍組織の隅々にまで張り巡らされた血管ネットワークは，酸素や栄養分を供給することで腫瘍の増大に働いている。腫瘍血管の形成は主に血管新生と呼ばれる過程によって進められるため，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。しかしながら，VEGF 阻害剤を始めとする血管新生阻害剤は，単独で使用した場合にはほとんど抗腫瘍効果を示さず，当初期待されたような効果は得られていない。腫瘍増殖における血管系の重要性は疑いようがなく，効果的でない理由は未解明のまま残されている。本研究では，血管新生阻害剤への治療抵抗性を生み出す未知の腫瘍血管形成機構が存在すると考え，腫瘍血管形成過程の生体内イメージング解析に取り組んだ。

【方法および結果】

腫瘍組織中における血管形成過程を時空間的に明らかにするため，生体内イメージングによる解析系の構築に着手した。まず，腫瘍血管を長期的に安定して観察するための血管イメージングマウスを作成するため，Apelin 遺伝子のプロモーター下で TdTomato 蛍光タンパク質を発現する BAC Tg マウスを作成した。作成した血管イメージングマウス的大脑表層部にグリオーマ細胞を同所移植し，多光子共焦点レーザー顕微鏡にて撮影を行っ

たところ，腫瘍の増大に伴って血管の形成が進む様子が確認できた。そこで，腫瘍血管の伸長方向に規則性がないかを，時空間データのモデリングから解析した。一般的に，腫瘍血管は腫瘍中心部の低酸素領域から産生される VEGF の濃度勾配に従って求心性に伸長すると考えられている。しかしながら，我々の観察から導かれた解析結果はそのような傾向を示さず，むしろ新生血管は，腫瘍の外縁部へ向かって伸長することを示唆していた。

【考察】

動的な現象である血管形成は生体内でしか観察できないため，これまでの組織学的な観察結果を基にして想像にて形成過程を推測しているにすぎなかった。しかしながら，本研究が示した「真の血管形成過程」は，書籍の模式図で表されるような単純ものでは無いことを示している。このような腫瘍血管形成のダイナミクスは，これまでの VEGF 阻害という概念に基づく治療法への抵抗性を生みだしている可能性がある。

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 が腎虚血障害に対して治療効果を示すことが報告されている (Vinas et al. Kid Int 2016) が，その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、10kDa の MWCO 系を用いて超遠心 (4000xg, 45min) 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 (図 1)。上記方法を用いて CD-XXhi および CD-XXlo 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

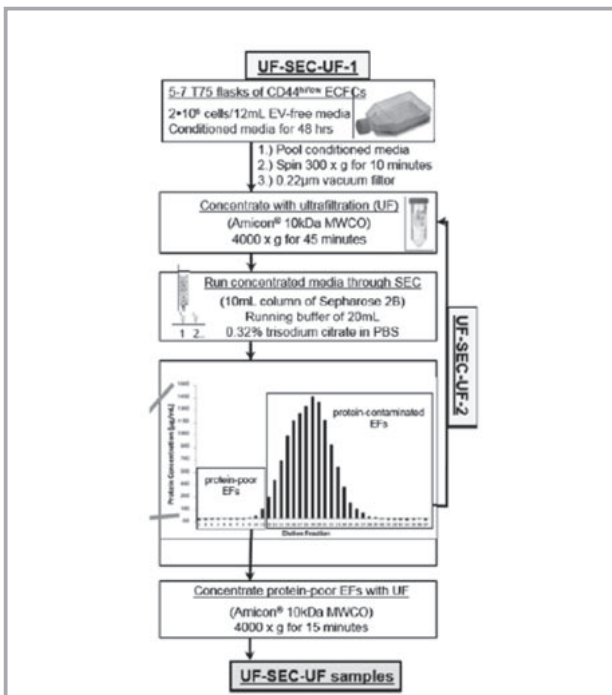


図 1

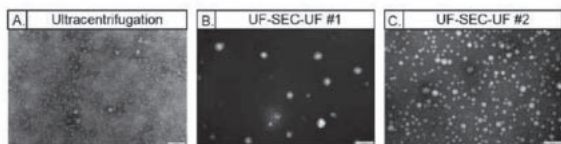


図 2

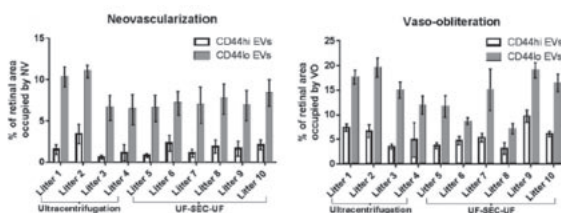


図 3

(Oxygen induced Retinopathy: OIR) モデルおよび網膜視細胞変性モデルマウス (RD10 マウス) に注射し、虚血および新生血管の改善および神経保護効果を検討した。

【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 では巨大タンパクの凝集がみられなかった (図 2 および赤矢印, 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。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-XXhi より分離された EV (CD-XXhi-EV) および CD-XXlo-EV を硝子体注射したところ、CD-XXhi-EV は CD-XXlo-EV に比較して、有意に新生血管 (neovascular-ization) の退縮効果および虚血 (Vaso-obliteration) の改善効果が認められた (図 3)。RD10 マウスにおいても視細胞層の厚みが保たれており、神経保護効果が認められた。

【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しめた。

【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).

代謝制御による不全心筋ミトコンドリア治療の開発

高田 真吾

(北翔大学生涯スポーツ学部)

【目的】

心不全に対する薬物治療や非薬物治療が普及してきたが、死亡率のみならず再入院率の高さが依然として臨床的課題であり、より効果的な治療法の確立が求められて

いる。近年の研究から、心室リモデリングの発症・進展に心筋ミトコンドリアの機能不全が関与すると考えられている。今回、我々は心不全における心筋ミトコンドリア機能低下のメカニズムを明らかにすること、心不全のミトコンドリア機能低下に対する治療法を開発することを目的とした。

【方法および結果】

左冠動脈結紮による心筋梗塞後心不全マウス群の単離心筋ミトコンドリアにおいて、ミトコンドリア機能(Oxygraph-2k)は、コントロール(偽手術)マウスと比較し、有意に低下した。一方で、心不全群のミトコンドリア当たりの電子伝達系のサブユニットや複合体合因子の発現量(WB, RT-PCR)はコントロール群との間に差はなかったが、複合体としての電子伝達系の発現量(BN-PAGE)は心不全群で有意に低下した。

心不全群では心筋組織当たりのスクシニル CoA 量(メタボローム)が減少し、ミトコンドリアタンパク質のスクシニル化(WB)が低下した。心不全群の単離心筋ミトコンドリアにスクシニル CoA を加えるとミトコンドリアタンパクのスクシニル化は増加し、ミトコンドリア機能は改善した。また、心不全群の心機能は改善した。

【結論】

心不全マウスの心筋ミトコンドリア機能低下の一因として、スクシニル CoA およびミトコンドリアタンパク質のスクシニル化の低下が関与する。(国際特許出願中)

アドレノメデュリン-RAMP2 系による血管恒常性 制御機構による腫瘍転移抑制薬の開発

田 中 愛

(信州大学医学系研究科)

【目的】

アドレノメデュリン(AM)は、多彩な作用を有するペプチドである。AM 受容体には、受容体活性調節タンパク RAMP が結合する。我々は RAMP2 が腫瘍血管新生を制御することを報告したが、RAMP3 の腫瘍における役割は未だ不明である。一方、膵癌は、術後肝転移の制御が重要であり、Podoplanin (PDPN) 陽性の癌関連線維芽細胞(CAF)の存在は予後不良であることが報告

されている。我々は成体の血管 RAMP2 欠損誘導マウス(DI-E-RAMP2^{-/-})と RAMP3 欠損マウス(RAMP3^{-/-})を用いて、臓器間転移における AM-RAMP 系の意義を検討した。

【結果】

PAN02 膵癌細胞を脾臓に移植し、肝転移の検討を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-}は Control 群と比べ、転移率が上昇した。転移巣の癌周辺領域では、RAMP3 および PDPN の発現と、転移促進因子 S100A8/A9 の発現が有意に亢進していた。一方で、RAMP3^{-/-}では、DI-E-RAMP2^{-/-}とは逆に、転移が有意に抑制され、転移巣の PDPN 発現が低下していた。そこで、PDPN が AM-RAMP3 シグナル下に存在すると考え、RAMP3 ノックダウン細胞を樹立した。その結果、RAMP3 発現低下に伴って、PDPN 発現低下と p-Src の活性低下が示された。さらに、転移巣から初代培養した RAMP3^{-/-}CAF は、癌細胞と共培養することによって、その増殖を抑制し、悪性度、遊走能も低下させた。

【考察】

以上から、DI-E-RAMP2^{-/-}では、AM-RAMP3 系の亢進と PDPN 発現亢進を生じ、癌の悪性度が増強したと考えられた。一方、RAMP3^{-/-}では PDPN 陽性 CAF が減少し、AM-RAMP2 系の亢進を生じた結果、悪性度が低下したと考えられた。このことから、選択的な RAMP2 の活性化と RAMP3 の阻害が、癌転移抑制の新たな治療法になることが期待される。

多能性幹細胞における代謝機構に基づく細胞作製と 心臓再生医療への応用

遠 山 周 吾

(慶應義塾大学医学部)

ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含む様々な細胞に分化する能力を有するため、心臓再生医療への応用が期待されている。一方で、ヒト多能性幹細胞を用いた心臓再生医療における臨床応用を実現化するためには多くの課題を克服する必要がある。その最も重要な課題の1つは、分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、効率よく心筋細胞のみを作製する技術の確立であった。我々はこれ

らの課題に対して、ヒト多能性幹細胞と分化心筋細胞の代謝プロファイルを詳細に解析することにより、培養環境により分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、分化心筋細胞のみを効率よくかつ大量に純化精製するという画期的手法を構築することにより克服することに成功した (Tohyama, et al. *Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016, *Stem Cell Rep* 2017).

しかしながら、依然として課題が存在する。それは、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療における臨床応用さらには産業化を実現化するためには、大量の細胞を作製する必要があり、それに伴い多くのコストが発生することである。この課題を克服するためには、ヒト多能性幹細胞を安価かつ効率よく作製する必要がある。一方で、ヒト多能性幹細胞における従来の培養液は、未分化維持および増殖において最適な条件ではなかった。そこで、我々はヒト多能性幹細胞の増殖に最適な培養条件を探索し、特定の代謝産物を増強することにより、ヒト多能性幹細胞の増殖が促進されることを見出した。本研究成果は、安価に大量のヒト多能性幹細胞および分化心筋細胞を作製することに繋がるため、再生医療における臨床応用あるいは産業化の推進に貢献することが期待できる。

【文献】

- 1) Tohyama, S. et al.: *Stem Cell Rep.*, **9**, 1406-1414 (2017).
- 2) Tohyama, S. et al.: *Cell Metab.*, **12**, 663-674 (2016).
- 3) Tohyama, S. et al.: *Cell Stem Cell.*, **12**, 127-137 (2013).

iPS 細胞を用いた創薬研究

内 藤 篤 彦

(東邦大学医学部)

【目的】

心臓に対する毒性は医薬品の開発中止理由として最も大きな割合を占めている。医薬品候補化合物の催不整脈性を評価する手法は確立されている一方で、心臓の収縮・弛緩・伝導能を障害するような毒性（心機能毒性）を評価するための手法は確立されていない。本研究の目的は

薬物による心機能毒性を *in vitro* で評価する評価系を確立し、近年その心毒性がトピックとなっている代表的な抗がん薬の毒性を評価することである。

【方法】

日本人健康成人由来の iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞 (iPS 心筋) を 96 well プレート上でパターン状に培養し、モーションベクトルイメージングで解析する評価系を用いて複数の分子標的抗がん薬 (スニチニブ、ソラフェニブ、バンデタニブ、レゴラフェニブ、イマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ、ラパチニブ) およびドキシソルビシンの短期的 (作用 2 時間後) および長期的 (作用 48 時間後) な作用を評価した。

【結果】

強い心機能毒性が広く知られているドキシソルビシンは、短期的には iPS 心筋の動きを変化させなかったが、長期的には iPS 心筋の収縮、弛緩および同期性を強く低下させており、ドキシソルビシンの晩期毒性を反映しているものと考えられた。分子標的抗がん薬の中でも VEGF 受容体阻害薬であるスニチニブ、ソラフェニブ、バンデタニブ、レゴラフェニブは iPS 心筋の収縮速度を濃度依存性に低下させた。一方、この作用は一過性であり、長期的にはほぼ消失した。また、スニチニブ、バンデタニブ、ラパチニブは収縮の同期性を低下させる作用を示した。これら 3 つの分子標的抗がん薬は心機能毒性が規制当局から警告されている薬物であり、収縮の同期性を指標として心機能毒性を予測できる可能性が示唆された。これらの結果から、パターン培養した iPS 心筋のモーションベクトルイメージングによる解析で抗がん薬の心機能毒性が予測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、A384T Treg 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・割合が野生型マウスに比べて非常に少ないことが分かった。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、体重に有意な差は認められなかった。また、通常食で飼育させた WT と A384T マウスの糖代謝（インスリン抵抗性試験、グルコース負荷試験）を比較したが、糖代謝にも有意な差は認められなかった。

【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ものの、糖代謝や高脂肪食負荷に伴う体重増加については、野生型マウスと比べ大きな差は認められなかった。肥満と脂肪組織の Th1 型炎症亢進には正の相関があることが良く知られているものの、A384T マウスで見られているような脂肪組織

の Th2 型炎症亢進が全身の代謝にどのように寄与しているかは現在のところ不明である。今後は脂肪組織が Th2 型に亢進している生物学的意義(褐色化の亢進など)を明らかにし、脂肪組織における Treg の役割を解明したいと考えている。

生理活性ペプチドの臨床応用に向けた研究

永田 さやか

(宮崎大学医学部)

我々は、これまで本講座で発見されたビッグアンジオテンシン-25 (Bang-25) やアドレノメデュリン (AM) の臨床応用に向けての研究を行ってきた。そこで最終研究報告として Bang-25 と AM の研究成果について報告する。

① Bang-25 の診断薬開発に向けた研究：レニン・アンジオテンシン系 (RA 系) は循環器疾患や腎臓疾患に重要な役割を果たしている。また組織中には組織 RA 系が血中 RA 系とは独立して存在していると考えられるが、その生成機構や役割に関しては不明な点が多い。そこで組織 RA 系の機序や役割を明確にするためにアンジオテンシンペプチドの系統的探索を行った。その結果、ヒトの尿中に 25 個のアミノ酸からなり 14 番目の Asn が糖鎖修飾を受けたペプチドを発見し、Bang-25 と命名した。Bang-25 は、心臓や副腎髄質、膵臓ではラ氏島のβ細胞、腎臓のポドサイトをはじめ生体内に広く分布していた。また、様々な疾患の尿中 Bang-25 を比較したところポドサイト障害の進行した疾患で上昇傾向にあり、糖尿病では健常人に比べて有意に高い事が明らかとなった。以上より Bang-25 は循環器・腎臓疾患の病態に関与している可能性が高いと考えられ、生成酵素の探索を行う事で阻害薬などの開発を目指すと共に尿中 Bang-25 の測定意義を明らかにする事で診断薬開発を目指している。

② 治療薬としての AM 誘導体の開発：AM は、ヒト褐色細胞腫の組織抽出液より発見され、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いる生理活性ペプチドである。そのため、これまで高血圧、心筋梗塞、炎症性腸疾患 (IBD) といった様々な疾患でその有用性が示されてきた。しかし、AM は生理活性ペプチ

ドであるために血中半減期が短く、治療に用いる際は、長期的な入院下での経静脈持続投与が必要である。そこで独自に開発した方法論を用いて AM の N 末端にポリエチレングリコール (PEG) を結合させた PEG-AM やヒト IgG の Fc 領域を N 末端に融合した Fc-AM を開発した。PEG-AM, Fc-AM 共に AM 受容体を発現した細胞株において AM と同程度の cAMP の産生能を有し、血中半減期を著明に延長させた。また、両誘導体は、皮下の単回投与によって IBD や脳血管性認知症、高血圧に対して効果を示した事から AM 誘導体の治療薬としての臨床応用を目指している。

骨格筋におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割

中津 祐介

(広島大学大学院医歯薬保健学総合研究院)

【目的】

サルコペニア等の骨格筋異常症は、糖取り込みの低下等による代謝障害に関与する。一方で、代謝障害は、蛋白合成阻害等を引き起こし、サルコペニアを誘発することが知られている。このように、代謝異常症とサルコペニアは、密接に関係しており、骨格筋機能の維持は、高齢化社会の日本において重要な課題である。

プロリン異性化酵素は、様々な標的蛋白に結合し、プロリンのシストランズ異性化を行うことにより、その機能を調節している酵素である。Pin1 は、癌とアルツハイマー病の発症に関与することが従来知られていたが、我々のグループでは、Pin1 が代謝調節に重要であることを見出した。

今回、骨格筋での Pin1 の役割を明らかにする目的で研究に着手した。

【方法及び結果】

骨格筋特異的 Pin1 KO マウス (以下 KO マウス) を作成し、筋肉の所見を観察したところ、筋重量や筋線維タイプの割合、ミトコンドリア蛋白量等には、WT と KO で差が認められなかった。また、普通食時の体重や耐糖能には、両群で差は認められなかったが、高脂肪食負荷時には、KO マウスで有意な体重増加が認められた。この体重増加と一致して、各脂肪重量、肝重量も KO マ

ウスの方が高値であった。また、インスリン投与時の肝・筋・脂肪の Akt リン酸化も KO マウスで障害が認められた。そこで、次に運動能力への影響を検討するために、トレッドミルを用いて走行時間・距離を検討した。その結果、Pin1 KO マウスは、走行距離・時間ともに WT と比べて低値であった。

骨格筋での Pin1 結合蛋白を同定するために、Pull down assay からの銀染色・LC-MS/MS を行ったところ、SERCA1 を同定した。SERCA1 は、細胞質から筋小胞体へカルシウムを取り込む蛋白であるが、サルコリピンと結合すると熱産生を行うことが知られている。そこで、SERCA1 とサルコリピンの結合に Pin1 が影響するかを検討したところ、KO マウスの骨格筋で両者の結合が減少していた。また、KO マウスの骨格筋では、SERCA の ATPase 活性も低下していた。

【考察】

以上の結果より、Pin1 は SERCA1 の機能を亢進し、カルシウム取り込みや熱産生を行うことで運動機能や代謝を調節していると考えられた。

妊娠時ストレスによる食塩感受性高血圧発症機序の解明

西本 光宏

(東京大学先端科学技術研究センター)

【目的】

高血圧を含む種々の疾患発症の要因として胎児期/新生児期におかれた環境因子の寄与が示唆される事象が報告され、DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が提唱されている。機序としてエピジェネティックな調節機構、特に比較的長期に変化の持続する DNA メチル化調節の関与が想定される。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 11 β 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。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、食塩再吸収調節を担う腎尿細管に着目し、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負荷ラットからの産仔（LP産仔）及び11 β HSD2によって不活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（Dex産仔）について成長後の血圧および室傍核での renin-angiotensin 系（RA系）構成分子の遺伝子発現、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での機序の検討を行った。

【結果】

LP産仔、Dex産仔とも成体での食塩感受性高血圧を呈した。これら産仔の室傍核では、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。培養室傍核神経細胞では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、この反応はDNMT3aのノックダウンによってDex非依存性に再現された。Dex産仔マウスの腎尿細管ではNa再吸収に関わる蛋白の発現変化を認め、出生後の薬物治療によって改善した。

【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脳内でのエピジェネティック調節異常が関与することが示された。

心臓疾患における個体レベルの細胞・分子挙動の網羅的理解

野村 征太郎

(東京大学大学院医学系研究科)

生体組織の適応・修復は、個体レベルで多臓器が連関した細胞・分子の相互作用・挙動、そしてそれに伴った細胞のリモデリングといった四次元ダイナミクス機構であり、その機構の破綻は疾患発症に直結している。我々は心臓のストレスに対する適応・修復過程をシングルセルレベルで解析することにより、心不全発症過程におけ

る(1)心筋リモデリングの分子ダイナミクスの同定¹⁾、(2)遺伝子発現の空間的不均一性²⁾、(3)同定された分子機序による疾患層別化³⁾、を明らかにしてきた。しかし、個体内の細胞・分子の挙動およびその機能を正確に理解するためには、①詳細な系譜追跡とそれと同時に細胞表現型を解析できるシステム、②細胞・分子の相互作用を網羅的に解析するシステム、③遺伝子・分子機能を網羅的かつ相互関連的に解析するシステム、④シングルセルオミックス間のデータを連結するシステム、を確立することが必須である。我々は、DNAバーコードによる系譜追跡システムとゲノム・トランスクリプトーム同時解析を組み合わせ、心臓に対するストレス応答の多臓器連関性をシングルセル解析することで、臓器間・臓器内のどの細胞・分子の相互作用・挙動が適応修復に貢献するか？各臓器においてどの細胞がどのような系譜を辿ってどのような機能を発揮するか？といった問題を解明するとともに、心不全患者の心臓組織検体を用いて、適応修復機構における細胞・分子応答の臨床応用について検証している。本研究報告会では、これら次世代型シングルセル解析研究の一端を紹介する。

【文献】

- 1) Nomura, S., Satoh, M., Fujita, T., Higo, T., Sumida, T., Ko, T., Yamaguchi, T., Tobita, T., Naito, A.T., Ito, M., Fujita, K., Harada, M., Toko, H., Kobayashi, Y., Ito, K., Takimoto, E., Akazawa, H., Morita, H., Aburatani, H. & Komuro, I.: Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun.*, **9**(1): 4435, 2018.
- 2) Satoh, M.*, Nomura, S.*, Harada, M., Yamaguchi, T., Ko, T., Sumida, T., Toko, H., Naito, A.T., Takeda, N., Tobita, T., Fujita, T., Ito, M., Fujita, K., Ishizuka, M., Kariya, T., Akazawa, H., Kobayashi, Y., Morita, H., Takimoto, E., Aburatani, H. & Komuro, I.: High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals heterogeneous responses of cardio-myocytes to hemodynamic overload. *J Mol Cell Cardiol.*, **128**: 77-89, 2019. *co-first authors

3) Ko, T.*, Fujita, K.*, Nomura, S.*, Uemura, Y., Yamada, S., Tobita, T., Katoh, M., Satoh, M., Ito, M., Domoto, Y., Hosoya, Y., Amiya, E., Hatano, M., Morita, H., Fukayama, M., Aburatani, H. & Komuro, I.: Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.*, in press.*co-first authors

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バイオマーカーとしての尿中ポドサイト mRNA 排泄量の有用性の検討

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、また、尿中ポドサイト関連分子がバイオマーカーとして有用となる可能性が示唆され、動物モデルと臨床症例で検討した。

【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。6 週齢、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、臨床研究では糖尿病と診断された 145 例 (正常アルブミン尿 83 例、微量アルブミン尿 31 例、顕性蛋白尿 31 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尿中ポドサイト mRNA 排泄量の早期診断マーカーとしての有

用性を検討するとともに、follow up 可能であった 114 例を対象とし前向きコホート研究 (2 年間) を行い進展予測因子としての検討も行った。

【結果】

ZDF-fatty ラット群では、高血糖やアルブミン尿を認めない 6 週齢の段階ですでに尿中 IGF1, IGF2 は高値であり、有意な糸球体肥大、mTOR pathway 下流の Phospho-S6 のポドサイトでの発現の上昇、尿中ポドサイト mRNA 排泄量の上昇を認め、早期の段階でポドサイトにストレスが生じていることが示唆された。また、6, 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 (ポドサイト density の低下) がより顕著となり、アルブミン尿と非常に強い相関を認めた ($R^2 = 0.86$)。上記ポドサイトへのストレスは 40% カロリー制限により抑制できた。

さらに、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、正常アルブミン尿群でもコントロール群と比較して有意な上昇を認めた。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。

また、2 年間のコホート研究において、単変量解析では、尿中ポドサイト mRNA/クレアチニン比 (10-fold increase) [(OR, 2.95 (95% CI, 1.18–7.34)] と尿中アルブミン・クレアチニン比 (10-fold increase) ((OR, 2.70 (95% CI, 1.67–4.36)) が有意に e-GFR の年間 4% 以上低下と関連し、多変量解析でも同様の結果であった [OR, 2.97 (95% CI, 1.07–8.27), OR, 3.98 (95% CI, 1.94–8.15)]。

【結論】

糖尿病性腎症において Growth factor (IGF1, IGF2) の上昇による mTOR1 シグナルの活性化に伴う糸球体肥大が病態進展の一因を担っており、それらは高血糖やアルブミン尿出現前の早期よりすでに認められる可能性が示唆された。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のみならず糖尿病性腎症進展のリスク予測因子として有用となる可能性が示唆された。

ドパミンシグナルを介した心不全の新規病態生理の 解明と治療法の開発

山口 敏 弘

(東京大学医学部附属病院)

【背景】

心不全の従来の基礎研究では「モデル動物とヒトの種差・心不全の病態の差異」が臨床応用を妨げる重要な課題となってきた。我々は、ヒト心不全及び圧負荷モデルマウスのいずれの心臓においても発現が著増する共通の遺伝子としてドパミン受容体 D1 (D1R) を同定した。

【目的】

本研究の目的は、種を超えた心不全の本質的な病態形成に心臓 D1R が寄与するという仮説のもと、心不全の病態生理におけるドパミンシグナルの役割を解明するとともに、D1R を介した心不全の新規治療法の開発を目指すことである。

【方法・結果】

心不全時に増加する D1R を *in situ* hybridization 法で評価したところ、D1R は心筋細胞で増加していた。そこで心筋特異的に D1R を欠失するマウスを作成したところ、圧負荷心不全時の心室性不整脈が抑制され、生存率も改善した。他方、心筋特異的に D1R を過剰発現したマウスでは心室性不整脈が増加した。以上より、心不全時に増加する心筋 D1R は致死的心室性不整脈の発症に寄与すると考えられた。不整脈発症の機序として心筋細胞内の Ca²⁺ handling 異常が知られているため、アデノウイルスを用いて培養心筋細胞に D1R を強制発現させたところ D1R は細胞内 Ca²⁺ handling に異常をきたすことが明らかとなった。また、心不全時の D1R の転写制御メカニズムを明らかにするために、D1R プロモーター領域のモチーフ解析及び培養心筋細胞を用いた検証実験を行ったところ、D1R の制御 pathway として NF-κB pathway が関与していることが示唆された。さらに当院の心筋症患者より採取した心筋細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、持続性心室頻拍の既往あるいは植込み型除細動器を持つ患者群で心筋 D1R の発現が増加しており、同様の結果が共同研究グループであるコロラド大学のヒト心臓サンプルでも再現された。

【考察】

本研究の結果、心筋 D1R は慢性心不全治療薬の新たなターゲットとして期待されるものと考えられる。今後、D1R による Ca²⁺ handling 異常をきたす機序を明らかにし、さらなる解明を試みていく。

ヒト iPS 心筋細胞を用いた心毒性評価

山 崎 大 樹

(国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

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開発の可能性が示唆され、心臓安全性評価の予測精度を向上させうる新たなツールとして注目されている。同時に多点電極システムや膜電位感受性色素を用いた催不整脈リスク評価系についても発展してきた。我々は、これまでヒト iPS 心筋細胞と多点電極システムを組み合わせた医薬品の催不整脈リスク予測法の開発を行ってきており、2種類の iPS 心筋細胞株 (iCell cardiomyocyte, CDI 社および Cor.4U, Ncardia 社) において、ISI (inter-spike interval)-FPD (field potential duration) 関係はヒト心筋の心電図における RR-QT 関係と非常に似た性質を有していること、hERG 阻害剤である E-4031 による逆頻度依存性がヒト心筋と同様に観察されることを見出した。さらには、ヒトの QT 間隔が 500 ms を超えると不整脈が発生しやすくなるとの報告から、ヒト iPS 心筋細胞にて検証したところ、FPD 値が 500 ms を超えると EAD が発生しやすくなることも見出した。このことはヒト iPS 心筋がヒトの催不整脈リスク予測評価に有用なモデルとなり得ることを示している。そこで、多点電極システムによる細胞外電位間隔の変化の程度と致死的不整脈である torsade de pointes (TdP) につながるということが知られている early afterdepolarization (EAD) の発生の有無を指標にして、TdP リスクの異なる化合物 (iCell cardiomyocyte) および 27 化合物 (Cor.4U) の催不整脈リスクを評価し、3種類のリスク (高リスク, 中リスク, 低リスク) に分類した。次いで、3つのリスクに分類された薬剤のうち、高リスクと低リスクに分類され

た薬剤について、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ダンス解析を行ったところ、高い相関性が得られた。以上より、ヒトiPS心筋細胞と多点電極システムを組み合わせた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非常に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】

血管壁は絶えずメカニカルストレス（血圧、シェアストレスなど）に晒されており、その制御機構の破綻が大動脈瘤などの血管病態を引き起こす事が提唱され始めているが、血管壁におけるメカノセンシング機構の詳細は明らかになっていない。我々は、大動脈瘤マウスモデルを用いて、コフィリンを介した細胞骨格のリモデリングが大動脈瘤形成に重要である知見と、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)が発現亢進する事を報告してきた (Yamashiro. *Sci. Signal.*, 2015)。さらに、大動脈瘤血管壁ではThbs1が過剰に亢進している事、Thbs1の抑制が大動脈瘤発症の抑制に効果的である事を報告してきた (Yamashiro. *Circ. Res.*, 2018)。しかしながら、Thbs1を介したメカノセンシング機構の詳細は、未だ不明のままである。

【方法・結果】

はじめに、血管平滑筋細胞を周期的伸展刺激下で培養し、分泌されるタンパク質を網羅的に解析した結果、Thbs1が過剰に分泌されている事を明らかにした。次に、分泌されたThbs1は、インテグリン $\alpha v \beta 1$ と結合し、細胞接着斑を形成する事を見出した。Thbs1欠損細胞では、接着斑がうまく形成されず、細胞硬度も柔らかくなる事が明らかになった。加えて、RNA-seqを用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、メカニカルストレス応答性の転写因子YAP関連遺伝子の発現がThbs1欠損

細胞の伸展刺激条件下では、発現低下していることが示唆された。実際に、Thbs1によって誘導されるYAPの核内移行は、small GTPase Rap2やHippo経路を介している事を明らかにした。さらに、Thbs1欠損マウスは、横行大動脈縮窄術（TAC）による圧負荷の増大に伴って血管壁の乖離を引き起こす事、頸動脈結紮術における新生内膜の形成に、Thbs1を介したYAPの活性化が重要な働きをしている知見を見出した。

【考察】

これらの結果は、Thbs1が血管壁内のメカニカルストレス応答に重要な役割を担う可能性を示唆しており、Thbs1を介した血管リモデリングにおける新しい役割を提起するものである。

【文献】

- 1) Yamashiro, Y., Thang, BQ., Shin, 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. *Circ. Res.*, **123** (6): 660-672, (2018).
- 2) Yamashiro, Y. & Yanagisawa, H.: Crossing bridges between Extra- and Intra-cellular events in thoracic aortic aneurysms. *J. Atheroscler. Thromb.*, **25**(2): 99-110, (2017).
- 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) 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): 183ra58, (2013).

全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

低分子量 GTP 蛋白質 Ral とインフラマソームとの
関連から見た炎症性大腸発癌機序の解明

飯田 智哉

(札幌医科大学医学部)

【背景・目的】

炎症性大腸発癌 (Colitis-associated cancer: CAC) は、慢性持続性炎症性粘膜から発症する大腸癌であり、通常型大腸癌の発癌機序とは異なる機序が想定されているが、未だ明らかとなっていない点が多い。CAC は早期から深部に浸潤しやすいという臨床的特徴を有しており、その予後は不良である。したがって、CAC の機序解明は、臨床上重要な課題である。近年、Ras family の一つである低分子量 GTP 蛋白質 Ral の活性化が、複数の炎症性疾患や癌において重要な役割を担うことが報告されている。また、Ral の抑制性活性制御因子である Ral に対する GTPase-activating protein (RalGAP) $\alpha 1$, $\alpha 2$, β が同定されており、我々の予備実験において、大腸では RalGAP $\alpha 2$ が強発現していることが明らかとなっている。しかしながら、Ral と CAC との関連についての報告はない。本研究では、CAC の深部浸潤機序における Ral の役割を解明することを目的とした。

【方法】

(1) ヒト大腸上皮、通常型大腸癌、CAC における RalGAP $\alpha 2$ の発現について、免疫染色を行い比較検討した。(2) Ral が活性化している RalGAP $\alpha 2$ knockout (KO) マウスを用いて CAC モデルを作製し、Ral の活性化が CAC の病態に与える影響について検討した。(3) RalGAP $\alpha 2$ を knockdown (KD) した大腸癌細胞株 Colon26 を用いて、Ral の活性化が細胞の遊走能、浸潤能に与える影響について検討した。(4) 野生型 (WT) マウスと RalGAP $\alpha 2$ KO から大腸上皮細胞を単離して microarray 解析を行い、腫瘍の深部浸潤に関わる因子について検討した。この因子について immunoblotting,

RT-PCR, 免疫染色などを行い検討した。(5) RalGAP $\alpha 2$ KD Colon26 及び RalGAP $\alpha 2$ KO 由来 CAC とインフラマソームとの関連について、immunoblotting を行い検討した。

【結果】

(1) 免疫染色では、RalGAP $\alpha 2$ はヒト大腸上皮及び通常型大腸癌では強発現していたが、CAC では有意に低発現であった。(2) RalGAP $\alpha 2$ KO マウスでは WT マウスと比較して、腫瘍数、腫瘍径、粘膜下層浸潤癌が有意に増加した。(3) RalGAP $\alpha 2$ KD Colon26 では non-KD Colon26 と比較して、遊走能、浸潤能が有意に亢進していた。(4) Microarray 解析では、WT マウスと比較して RalGAP $\alpha 2$ KO マウスの大腸上皮細胞で、matrix metalloproteinase (MMP)-9, MMP-13 の発現が亢進していた。また、RalGAP $\alpha 2$ KO マウス由来 CAC では、WT マウス由来 CAC と比較して immunoblotting, RT-PCR で MMP-9, MMP-13 の発現が亢進しており、免疫染色では腫瘍先進部において MMP-9, MMP-13 が高発現していた。(5) RalGAP $\alpha 2$ KD 大腸癌細胞株及び RalGAP $\alpha 2$ KO マウス由来 CAC では、コントロール群と比較して IL-1 β , NLRP3, ASC, Caspase-1 の発現が亢進していた。また、NLRP3 阻害薬を加えて Colon26 における cell invasion assay を行ったところ、有意に浸潤が抑制された。さらに、NLRP3 阻害薬を投与した RalGAP $\alpha 2$ KO マウスでは、WT マウスと比較して粘膜下層浸潤癌が有意に減少した。

【結論】

Ral の活性化が、MMP-9, MMP-13 の発現亢進及び NLRP3 インフラマソームの活性化を介して、CAC の深部浸潤機序に関与していることを明らかにした。本研究が CAC の早期発見や治療標的の開発につながることを期待される。

ベーチェット病の HLA リスク因子を対象としたゲノムワイド遺伝子間相互作用解析

石戸 みづほ

(横浜市立大学医学部)

【目的】

ベーチェット病は口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とする再発性の難治性炎症性疾患である。ベーチェット病は多因子疾患であり、HLA-B*51 アリルと HLA-A*26 アリルが疾患の発症リスクと顕著に相関することが報告されている。近年、複数の HLA 関連免疫疾患において、HLA リスク因子が他の遺伝的要因と相互作用を示し、疾患の発症リスクに対して相乗効果をもたらすことが報告されている。ベーチェット病では、小胞体アミノペプチダーゼをコードする ERAP1 遺伝子が HLA-B*51 と遺伝子間相互作用を示すことが報告されているものの¹⁾、他の遺伝子領域と HLA リスク因子の遺伝子間相互作用についてはこれまでに詳細な検討は行われていない。したがって本研究では、ベーチェット病の HLA リスク因子である HLA-B*51 または HLA-A*26 と遺伝子間相互作用を示す遺伝的要因をゲノム全域に渡って検討した。

【方法】

日本人集団（ベーチェット病患者 611 例、健常者 737 例）を対象としたベーチェット病のゲノムワイド関連解析²⁾ で取得した SNPs データを対象に、PLINK の Epistasis 機能を用いて、HLA リスク因子（HLA-B*51, HLA-A*26）と SNP 間の相互作用をゲノム全域に渡って解析した。

【結果】

ベーチェット病の発症リスクに対して HLA-A*26 と統計学的有意に遺伝子間相互作用を示す遺伝子領域を 1 領域同定した ($P=8.9 \times 10^{-9}$)。また、統計学的有意に達しないものの、HLA-B*51 または HLA-A*26 と遺伝子間相互作用の可能性を示唆する遺伝子領域を複数同定した ($P < 1.0 \times 10^{-4}$)。

【考察】

ベーチェット病の発症において、HLA リスク因子と複数の遺伝子領域の相互作用が重要であることが示唆さ

れた。今後、新たな日本人集団および海外人種集団を対象に同様の解析を実行し、ベーチェット病の HLA リスク因子と遺伝子間相互作用を示す遺伝子領域を明確にする。

【文献】

- 1) Kirino, Y., Bertias, G., Ishigatsubo, Y., Mizuki, N. & Tugal-Tutkun, I. *et al.*: Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1, *Nat. Genet.*, **45**(2), 202-207 (2013).
- 2) Mizuki, N., Meguro, A., Ota, M., Ohno, S. & Shiota, T. *et al.*: Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci, *Nat. Genet.*, **42**(8), 703-706 (2010).

yRNA の強皮症の病態への関与の解明

稲葉 豊

(和歌山県立医科大学医学部)

【目的】

全身性強皮症は皮膚など多臓器に線維化を生じる系統的疾患であるが、線維化の原因としてのコラーゲン異常発現の機序は未だ不明で、線維化は一般に不可逆的であり早期診断が必要だが有用な血液マーカーは同定されておらず、有効な治療法にも乏しい。

膠原病には一般に遺伝素因と環境素因が発症に関与すると考えられているが、研究代表者らはその環境因子として non-coding RNA に注目してきた。本研究は non-coding RNA の一つである yRNA の強皮症の病態への関与の解明により、上記の課題を解決することを目的とした。

【結果】

最初に、それぞれ 3 例の正常および強皮症皮膚由来の培養皮膚線維芽細胞における yRNA1, 3, 4, および 5 の発現をリアルタイム PCR を用いて調べた。yRNA4 の mRNA 発現は正常および強皮症皮膚線維芽細胞間で変化なかった。一方、yRNA1, 3 および 5 の発現は強皮

症の線維芽細胞で増加していたが、yRNA3 の増加のみが統計学的に有意であった。

次に、3 例の正常皮膚組織と 5 例の強皮症病変部皮膚から抽出した RNA において同様に yRNA1, 3, 4, および 5 の発現を調べた。しかし、これらの mRNA 発現量において有意な差はみられなかった。

【考察】

yRNA は約 100 塩基の non-coding RNA で Ro RNP の構成因子として見出された。長らくその働きは明らかになっていなかったが、近年 DNA 複製を制御していることが判明し、ヒト疾患において環境因子となりうることが示唆されている。本研究では強皮症皮膚由来培養線維芽細胞において yRNA3 発現が上昇していた。今後、コラーゲン異常発現との関わりや臨床的意義を検討していく予定である。

自己免疫性ぶどう膜炎における転写因子 PU.1 を介した抑制制御メカニズムの解析

馬 詰 朗 比 古

(東京医科大学医学部)

【目的】

ベーチェット病に代表される難治性ぶどう膜炎は何らかの自己免疫機序で発症すると考えられ、失明に至ることもある疾患である。これらのぶどう膜炎の治療にはステロイドの点眼や内服療法や炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤などが用いられている。しかし、視力予後不良となることも少なくなく、治療の選択肢も少ない。本研究では難治性ぶどう膜炎の動物モデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis: EAU) を用いて、従来の治療法に代わる免疫細胞療法としての遺伝子治療の可能性を模索し、難治性ぶどう膜炎への臨床応用の実現を目的とする。

【方法】

C57BL6 マウスを hIRBP1-20 ペプチド含有 CFA で免疫した群 (EAU 群) と、CFA のみによる免疫群、非免疫群の 3 群に分け、免疫 14, 21, 28, 42 日目に眼底を観察、炎症の程度を記録し、その後、眼球を摘出して

網膜内の PU.1, CD11c, F4/80 の total mRNA を Real-time PCR で定量し、3 群間で比較した。次に網膜炎極期の網膜内に浸潤した細胞を、FACS を用いて解析した。また、ELISA および Cell beads assay (CBA) を用いて、EAU の発症に関わる主要サイトカインである IFN- γ , IL-2, IL-17 および IL-10 の頸部リンパ節内における産生と PU.1 の関係を検討した。

【結果】

EAU 群の眼炎症所見は免疫後 21 日目に極期に至り、PU.1, CD11c, F4/80 の mRNA は免疫後 21 および 28 日目で他の 2 群よりも有意に増加し、EAU の重症度とも比例していた。FACS では CD3, CD11c, F4/80 の発現が PCR で得られた結果に矛盾しない結果が得られた。リンパ節におけるサイトカインの産生は、PU.1 をノックダウンすることによって IFN- γ と IL-2 の産生が抑制された。

【考察】

今回の結果からは、ぶどう膜炎の炎症極期における網膜内に浸潤した樹状細胞、及びマクロファージに PU.1 が発現していることを示し、さらに、*in vitro* ではあるが、ぶどう膜炎に関連する炎症サイトカインである IFN- γ と IL-2 の産生が抑制されたことは、PU.1 発現レベルがぶどう膜炎の炎症レベルに関与することを示唆している

全身性強皮症の線維化における IL-22 の microRNA を介した関与

澤 村 創 一 郎

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

全身性強皮症は皮膚を主体として、多臓器に線維化を生じ得る疾患であり、病変部では線維芽細胞から過剰な I 型コラーゲン産生が生じている。炎症、免疫異常、血管障害などが誘因となり、transforming growth factor- β 1 などのサイトカインを介して線維芽細胞が活性化されると考えられている。本研究では、強皮症の皮膚組織において過剰に発現していることが既知の、インターロイキン 22 (IL-22) に着目し、IL-22 が microRNA を介して線維芽細胞に与える影響や患者検

体における IL-22 の発現について検討した。

【方法】

In vitro にて正常線維芽細胞または強皮症由来線維芽細胞の培養を行い、IL-22 の影響下における細胞外マトリックス発現量の変化を、PCR array, real-time PCR, ウェスタンブロッティングを用いて測定した。microRNA 発現量の測定は real-time PCR を用いて行った。ヒト皮膚における IL-22 の発現量は免疫染色法、血清においては enzyme-linked immunosorbent assay を用いて行った。

【結果】

正常皮膚由来の線維芽細胞に IL-22 を作用させると、mRNA レベルでの変化を伴わず、I 型コラーゲン蛋白の発現が有意に増加した。I 型コラーゲン以外の細胞外マトリックス発現に関しては、mRNA、蛋白レベルいずれも変化を認めなかった。また、IL-22 を作用させた正常線維芽細胞では、I 型コラーゲンの発現抑制作用を持つ microRNA である、let-7a の発現量が有意に低下していることが確認された。強皮症患者の血清 IL-22 濃度は、コントロール群と比較し有意差は認めなかったが、免疫染色法により、強皮症患者の皮膚組織では、真皮層に浸潤するリンパ球において IL-22 が発現していることがわかった。

【考察】

IL-22 は、microRNA let-7a を介して I 型コラーゲン蛋白の過剰産生に寄与している可能性が考えられた。これらのサイトカインや 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につながる可能性がある。

5-ASA 製剤と 6-TGN の相互作用の検討および TPMT 活性の検討

森久保 拓

(北里大学北里研究所病院)

【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) 治療薬であるチオプリン製剤 (アザチオプリン, 6-メルカプトプリン) はその代謝産物 6TGN が免疫調節および骨髄抑制作用に、6-MMP が肝

障害に関与する。5ASA 製剤との相互作用で 6TGN 濃度が上昇することが知られており、これは 5ASA 製剤ごとの薬物送達の違いによると考えられる。今回我々は新規 5ASA 製剤のリアルダ®を含めた 5ASA 製剤間でのスイッチが併用チオプリンの代謝に及ぼす影響を比較検討した。また 5ASA 製剤毎の血中 5ASA 濃度や TPMT 活性に与える影響も検討を行った。

【方法】

① 2017年11月 - 2018年7月にチオプリン製剤併用下に、臨床的判断または患者希望で pH 依存性 (アサコール®) もしくは時間依存性 (ペンタサ®) メサラジン製剤から pH 依存性 MMX 製剤 (リアルダ®) へ変更した UC 患者 31 例を対象とし、変更前と変更後 8 週での 6TGN と 6-MMP を比較検討した。② 5ASA 製剤単独で使用している UC 患者 41 例を対象として 5ASA 製剤毎の血中 5ASA 濃度、血中 N-Ac-5ASA 濃度と TPMT 活性の低下率を検討した。

【結果】

① 対象患者は男性 21 例、女性 10 例。患者年齢は 23 ~ 77 歳。pH 依存性製剤から pH 依存性 MMX 製剤では変更前後で 6TGN, 6-MMP ともに変化がなかったが、時間依存性製剤から pH 依存性 MMX 製剤への変更の前/後では、6TGN の有意な低下 ($p=0.02$) と 6-MMP ($p=0.04$) の有意な増加を認めた。変更後 24 週目での再燃はペンタサからの変更群で有意に多かった。② 5ASA 濃度と TPMT 時間依存性製剤を内服中の患者で血中 5ASA 濃度は有意に高く、TPMT 活性の低下率が高い傾向にあった (血中 5-ASA 濃度: $p=0.002$) (TPMT 低下率: $p=0.06$)。

【考察】

時間依存性製剤から pH 依存性 MMX 製剤への変更は、血中 5ASA 濃度低下に伴いチオプリン製剤の有効性に影響を与える可能性がある。

IL-22 binding protein による慢性腸炎病態シフトの検討

矢野 有紗

(久留米大学医学部)

【目的】

上皮細胞特異的に作用する IL-22 は、腸炎に対して正と負の相異なる役割が報告されている。この機序として、IL-22 の阻害分子として働く内因性の IL-22 binding protein (IL-22BP) の役割に着目した。IL-22BP 減少に伴う過剰な IL-22 の活性化は上皮バリアの修復よりむしろ破綻を誘導して腸内細菌依存性の肉芽腫性腸炎発症を誘導するという仮説の証明を目的として研究を行った。

【方法・結果】

上皮機能の解析のために、30mM EDTA perfusion 法により陰窩単位で抽出した上皮細胞より蛋白を抽出して、様々な転写因子についてのリン酸化をマルチプレックス法にて解析した。サンプルとして野生型マウス (6 例)、潰瘍性大腸炎モデル T cell receptor- α (TCR α)-/マウス (24 例)、IL-22BP-/マウスを作成し、潰瘍性大腸炎モデルである TCR α -/マウスと交配した IL-22BP-/ x TCR α -/マウスについて肉芽腫陽性群 (13 例) と肉芽腫陰性群 (10 例)、上皮特異的に STAT3 が欠失し IL-22BP および TCR α も欠失した Triple knockout マウス (13 例) を使用し、比較検討を行った。野生型以外は、腸炎による影響を最小限に抑えるために中等度以上の腸炎のモデルマウスを使用した。解析は、STAT3 (Tyrosine, Serine), STAT1, STAT2, STAT5, STAT6, CREB, JNK, NF κ B, MAP-p38, ERK1/2, AKT, p70S6K の転写因子についての活性化 (リン酸化) を検討した。

結果として肉芽腫陽性群では上皮の STAT3 の過剰活性化が認められた。委細のデータは論文投稿準備中のために公表は避ける。上皮の STAT3 が過剰に活性化したことで粘膜固有層において肉芽腫を形成した組織においては、上皮を剥離し付着細菌を除去した後に、16SrRNA の増幅を次世代シーケンズ法にて解析を行っている。また上記方法で上皮細胞より RNA を抽出して DNA マイクロアレイ法で解析した結果、肉芽腫陽性群の場合はケモセンサー機能の亢進が疑われる所見が認められた。

【考察】

今回の検討により IL-22BP が欠損することにより上皮の過剰な STAT3 活性化が誘導され、それによる上皮のバリア機構の破綻により肉芽腫の発症を誘導する可能性が考えられた。

【文献】

- ・ Mizoguchi, A., Yano, A., Himuro, H., Ezaki, Y., Sadanaga, T. & Mizoguchi E.: Clinical importance of IL-22 cascade in IBD, *J Gastroenterol.*, 465-474, **53** (2018).
- ・ 溝口 恵美子, 氷室 秀知, 矢野 有紗, 【IBD 免疫の更なる理解をめざして!】IBD 病態理解に役立つ上皮免疫の基礎 (解説/特集), *IBD Research*, 32-37 (2018).

全身性強皮症における resident memory T 細胞と代謝

吉岡 華子

(筑波大学医学医療系)

【目的】

近年、循環血中から動員された後、末梢組織に留まり続ける resident memory T 細胞 (T_{RM}) についての研究が進んでおり、皮膚疾患との関連が報告されている。また、T_{RM} は長期生存に脂肪酸を必要とするため、T 細胞と代謝との関連についても注目されている。例えば、T_{RM} は血中と末梢組織を行き来する central memory T 細胞よりも酸素消費量が亢進していること、また、全身性エリテマトーデスにおいては CD4T 細胞の酸素消費量や解糖能が亢進していることなどが報告されている。今回、全身性強皮症における T_{RM}、また自己免疫性炎症性皮膚疾患における T 細胞と代謝との関連について検討したため報告する。

【方法】

全身性強皮症皮膚、健常皮膚中 T 細胞の量的質的相違を免疫組織学的に、また flow cytometry にて検討した。また強皮症血中細胞の T_{RM} 分化能を調べるため、健常人血中 T 細胞、強皮症血中 T 細胞と健常皮膚由来

線維芽細胞とを共培養し、 T_{RM} の発現する割合を flow cytometry にて検討した。また、健常人血中T細胞と皮膚疾患患者の血中T細胞について、細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費量、解糖能を測定した。

【結果】

強皮症皮膚には組織学的にT細胞が少なく、flow cytometry で検討すると特にCD4⁺ T_{RM} の分画が減少していた。一方で、強皮症血中T細胞は、健常血中T細胞と同等の T_{RM} への分化能を有していた。強皮症で末梢血T細胞が T_{RM} に分化する能力を保持していることが判明したため、 T_{RM} で亢進する酸素消費量など代謝の変化が末梢血T細胞で測定できる可能性を考えた。健常人血中T細胞と皮膚疾患患者の血中T細胞について酸素消費量や解糖能を比較したところ、乾癬患者の血中T細胞では、酸素消費量が有意に増加していた。

【考察】

強皮症皮膚では T_{RM} が構築されておらず、骨髓炎などの局所感染症の罹患率が高くなっている一因と考えられた。一方で、強皮症血中T細胞の T_{RM} への分化能は保たれていたため、強皮症の皮膚環境により皮膚T細胞の構築が抑制される可能性を推察した。乾癬患者のT細胞では、酸素消費量、つまりミトコンドリア代謝が亢進していたが、今後全身性強皮症など他の自己免疫性・炎症性疾患においても解析を進めていきたい。

IKKキナーゼ (IKK) β 阻害薬によるマウス実験的 自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) 軽症化の検討

劉 野

(北海道大学大学院医学研究院)

【目的】

マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) に対するIKK β 阻害薬による抗炎症効果について検討する。

【方法】

B10.BR (H-2^k) マウスにK2ペプチドと結核死菌を含む完全フロイドアジュバントエマルジョンを皮下に投与し、追加免疫として百日咳毒素を腹腔内投与して、EAU

を惹起した。免疫後、治療群には3日おきにIKK β 阻害薬であるIMD-0354を、対照群にはPBSを腹腔内投与した。IMD-0354はコンピュータ分子設計技術を用いて作成されたIKK β 特異的阻害化合物である。免疫後7日目から、3日おきに眼底検査によって網膜の炎症の程度を評価した (臨床的重症度)。21日目に眼球を摘出し、切片を作製後にHE染色を行い、組織学的に網膜の炎症の程度を評価した (組織学的重症度)。さらに、免疫組織化学により、炎症で生じる網膜での転写因子NF- κ B p65の核内移行を検討した。また、免疫したマウスから抽出したCD4陽性T細胞とK2ペプチドを共培養し、T細胞の増殖反応について検討し、同時に培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。

【結果】

臨床的重症度でも組織学的重症度でも、IMD-0354を投与した治療群では対照群に比較して、マウスEAUの炎症の程度は軽症化した。免疫組織化学では、IMD-0354投与によってEAUマウスの網膜へのNF- κ B p65サブユニットの核内移行が抑制された。さらに、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した結果、IMD-0354添加群ではTh1サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ とTh17サイトカインであるIL-17Aの産生が抑制された。

【考察】

ぶどう膜炎の病態には、転写因子NF- κ B経路が重要である。しかしNF- κ Bは感染防御に重要であり、非特異的に抑制することは生理的に望ましくない。我々は炎症反応時にのみ活性化される分子であるIKKを特異的に阻害する、コンピュータ分子設計技術を用いて合成された化合物に注目した。この分子標的薬剤は炎症時にのみNF- κ Bの核内移行を抑制し、Th1とTh17サイトカインの産生を抑制することによって、眼内の炎症を軽症化していることが示された。

【結論】

IKK β 特異的分子阻害薬は、内因性ぶどう膜炎に対する安全かつ有効な薬剤となる可能性がある。

IBD モデルにおける腸管二次リンパ組織の機能解析

渡部 太郎

(東京医科歯科大学医学部)

【目的】

潰瘍性大腸炎と虫垂切除には負の相関がみられるように、腸管二次リンパ組織は炎症性腸疾患（IBD）の病態に深く関与すると推測されるが、その機能の詳細は明らかでない。本研究は IBD モデルの発症病態における腸管二次リンパ組織の機能解析を目的とする。

【方法】

8-12 週齢の野生型 C57BL/6 マウス（WT）にオキサゾロン腸炎を誘導し、臨床・病理学的評価とともに大腸粘膜固有層リンパ球（LPL）の炎症性サイトカイン産生を測定した。また WT に対して虫垂切除術を施し 2 週間の回復期間の後、腸炎を誘導して同様の解析を行った。さらに成熟 B 細胞を欠損する μ MT マウスや YC3.60 トランスジェニック（Tg）マウスに腸炎を誘導し、同様の解析や生体イメージング観察を行った。

【結果】

WT に腸炎を誘導すると、臨床症状に相関し腸管短縮、粘膜固有層へのリンパ球・顆粒球浸潤や潰瘍形成とともに、組織内リンパ濾胞の腫大や濾胞関連上皮の傷害が観察され、LPL からは IFN- γ 、IL-4、IL-17 の産生亢進が測定された。腸炎誘導における二次リンパ組織の腫大や上皮傷害に着目し、虫垂切除術後のマウスに同様の腸炎を誘導すると、腸管短縮の軽減、粘膜固有層への細胞浸潤減弱とともに LPL の IFN- γ 、IL-4、IL-17 産生が減少した。さらにこうした二次リンパ組織の B 細胞の機能に着目し μ MT マウスに腸炎を誘導すると、腸管短縮の軽減、病理学スコアの減弱に相関し、LPL の IL-4、IL-17 産生が抑制された。YC3.60 Tg マウスに腸炎を誘導すると、発症早期から B 細胞の活性化が確認された。

【考察】

一般に二次リンパ組織は T 細胞と B 細胞で主に構成されるが、T 細胞については獲得免疫応答に重要であることは周知であることから、今回我々は B 細胞に着目した。本研究では μ MT マウスで IBD モデルが減弱することが示され、虫垂切除の解析結果と併せ、腸管二次リンパ組

織の B 細胞が病態に深く関与することが推察された。B 細胞の機能としては一般に形質細胞への分化とそれに伴う免疫グロブリン産生が広く知られているが、その他の機能でも免疫応答に寄与している可能性が推測される。今後これらの機能をより詳細に解析することで、IBD の病態解明がさらに深まるものと期待する。

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

GLP-1 の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対する臓器保護効果の機序の解明

井上 智 彰

(九州大学病院)

【目的】

急激な糖尿病患者の増加により、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) を有した糖尿病患者が増加している。糖尿病合併 NAFLD では肝線維化が進展し、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進展するリスクが高く、有効な治療戦略の確立が喫緊の課題である。新規糖尿病治療薬である GLP-1 受容体アナログが発売され、現在多くの糖尿病患者の治療に使用されている。近年の、NASH 患者を対象とした臨床研究 (LEAN 試験) において、GLP-1 受容体アナログが肝の線維化進行を抑制することで、NASH の有用な治療法となる可能性が報告されている。しかしながら、肝細胞には GLP-1 受容体が存在しないなど、組織分布とそれに対応する臓器保護効果には解離があり、機序の詳細は明らかではない。そこで本研究では GLP-1 受容体組織特異的欠損マウスを用いて詳細な機序の検討を行い、GLP-1 が持ち合わせる臓器保護効果のメカニズムの解明を目指す。

【方法】

申請者が最近独自に作出した loxP 配列で gpl1r 遺伝子のエクソン 4, 5 を挟む、floxed マウス (GLP-1r floxed mice) と、単球系細胞特異的に発現する LysM (lysozyme M)-Cre マウスとの交配によって、単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを作出する。コントロールマウスと比較検討することで、単球 GLP-1 受容体と肝臓との関連を検討する。

【結果】

GLP-1R floxed/floxed LysM-Cre マウスの GLP-1 受容体の発現を RT-PCR 法で確認を行った。GLP-1R floxed/floxed LysM-Cre マウスでは単球特異的に GLP-1 受容体が欠

損していることを確認した。コントロールマウス及び組織特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを 18 週齢まで飼育し、血糖値、食事摂取量、体重の変化について評価を行ったが、両群に差を認めなかった。また、肝逸脱酵素 ALT についても両群に有意な変化は認めなかった。

【考察】

今年度は、単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスの作出に成功し表現型の解析を開始できた。しかしながら単球 GLP-1 受容体の欠損のみでは、肝機能を含めた表現系に変化を認めなかった。脂肪肝の状態での評価も必要と考えられ、単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスに高脂肪負荷を行い検討する予定としている。

血管内皮における O-GlcNAc 修飾による糖尿病合併症進展機構の解明

大橋 夏子

(滋賀医科大学)

【目的】

糖尿病治療において、糖尿病症状の改善はもとより、種々の合併症の発症及び進展の予防が非常に重要である。我々は、血管障害による糖尿病合併症の病態解明を目指し、血管内皮における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割及び病態における役割に関して検討を行う。

【方法】

タモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウス (VEcad-BAC-CreERT2 マウス) と OGT-floxed マウスとの交配を行い、10 週齢にてタモキシフェンを腹腔内投与することで血管内皮細胞特異的 OGT 欠損 (OGT-VEKO) マウスを作製し、通常食・高脂肪食を摂取している状態において表現型を解析した。

【結果】

通常食を摂取している状態では、OGT-VEKO マウス

は対照群と比較し、耐糖能や血圧、尿糖や尿中アルブミンをはじめとする尿所見、心臓や大動脈、腎臓における組織学的変化に関して明らかな差を認めなかった。一方、高脂肪食を摂取している状態では、OGT-VEKO マウスでは対照群に比して有意な肥満抵抗性と耐糖能改善を認め、その原因としてOGT-VEKO マウスにおける皮下脂肪量と肝重量の減少が考えられた。

【考察】

O-GlcNAc 修飾は、解糖系側副路の一つであるヘキサミン生合成経路を介して最終的に産生される UDP-GlcNAc を基質とし、O-GlcNAc 転移酵素により蛋白の Ser, Thr 残基に付加され、O-GlcNAc 分解酵素により除去される修飾である。高血糖状態では、細胞内へのグルコース流入量の増加に伴ってヘキサミン生合成経路が活性化されることから、O-GlcNAc 修飾は糖尿病合併症の成因進展機構の一つとして着目されてきた。現時点までの我々の検討では、OGT-VEKO マウスの通常食摂取モデルでは表現型に関して特に有意な変化を認めず、高脂肪食摂取モデルでは有意な肥満抵抗性と耐糖能改善を認めたことから、血管内皮における O-GlcNAc 修飾の欠損による影響は正常血糖状態では見られず、高血糖状態において肥満及び耐糖能を改善させることが明らかとなった。今後、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルでの検討、さらには現在明らかとなっている高脂肪食摂取モデルの表現型をもとに詳細なメカニズムの検討を行う。

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、増加マウスの解析

皮下脂肪特異的 Fat ROS 低減マウス (aP2-Cat/Sod1 ダブルトランスジェニックマウス) は、皮下脂肪組織の健康的肥大を呈し、腸間膜脂肪組織や肝臓への脂肪蓄積を減少させ、インスリン抵抗性が改善した。また、Fat ROS 増加マウス (脂肪細胞特異的グルタチオン合成酵素欠損マウス) は、これらと対照的な表現型を呈した。これらのマウスで認められた健康的脂肪肥大は、脂質合成の亢進や線維化の抑制を伴った (Okuno Y et al., Diabetes, 2018)。

脂肪細胞特異的グルココルチコイド受容体欠損マウスの解析

脂肪細胞特異的グルココルチコイド受容体欠損マウスは、クッシング症候群モデルにおいて、脂肪組織の健康的肥大を呈し、肝臓への脂肪蓄積を減少させ、インスリン抵抗性が改善した。本マウスで認められた健康的脂肪肥大は、脂質分解の抑制や線維化のターンオーバー促進を伴った (Hayashi R, Okuno Y et al., Endocrinology, 2019)。

脂肪細胞における新規核内 SREBP1 結合因子の同定

健康的脂肪肥大において重要な役割を持つと考えられる nSREBP1 の新規結合因子を探索した。3T3-L1 脂肪細胞において、FLAG-nSREBP1 を bait とした生化学的精製の結果、機能未知因子 X を同定した。nSREBP1 は因子 X のドメイン A に結合すると考えられた。因子 X が nSREBP1 の転写活性を抑制すること、因子 X が内分泌代謝疾患 B の原因遺伝子であることから、疾患 B は SREBP1 活性化により発症する可能性が考えられた。

【考察】

脂肪組織の健康的肥大は、原発性肥満における脂肪組織酸化ストレスや、二次性肥満における脂肪細胞グルココルチコイド受容体と関連する事が明らかになった。また、因子 X を制御することにより、健康的肥満を制御できる可能性が示唆された。

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。細胞外基質における弾性線維形成に必須の分子である Fibulin-5 (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負荷を行った。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 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。グルコースクランプによる解析により、Fbln5KO では全身におけるインスリン感受性の改善が示唆された。Fbln5KO では皮脂腺の萎縮を認め、高脂肪食負荷時の皮膚における各種脂肪酸代謝関連分子の発現誘導が消失しており、WT に比較し寒冷刺激に対する体温低下が顕著であった。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。Fbln5-floxed マウスを入手し各臓器特異的 Fbln5KO を作成したところ、肝細胞特異的 Fbln5KO および脂肪細胞特異的 Fbln5KO は体重変化やインスリン感受性の変化を呈さなかった。さらに、野生型マウスの肝組織および初代培養肝細胞における Fbln5 の発現を比較したところ、肝臓において Fbln5 は主に肝細胞外に発現していた。Fbln5KO は血管の脆弱性を呈することから、標識インスリンをマウス下大静脈より投与し直後の肝臓におけるインスリン取り込みを評価したところ、Fbln5KO では野生型に比較し取り込みの亢進を認めた。

【考察】

Fbln5KO において全身におけるインスリン感受性の亢進と体重増加の抑制を認めた。この機構として、肝

細胞特異的 Fbln5KO や脂肪細胞特異的 Fbln5KO はインスリン感受性の改善や体重変化を呈さなかったことから、Fbln5 欠損による代謝表現型の変化は臓器連関や間接作用を介した作用であると考えられ、皮膚を介したエネルギー代謝の変化や、血管におけるインスリン透過性の亢進の寄与が示唆された。

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。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。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。

【結果】

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違いがないものの、インスリン値は有意に低値であった。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。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。単離膵島ではインスリン遺伝子やその転写因子など膵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 KO マウスで有意に Pimonidazole 陽性β細胞が増加してい

た。単離膵島において、ER stress, 炎症性サイトカインの遺伝子発現も亢進していた。さらには、膵島内の血管構造を電子顕微鏡で評価したところ、KO マウスで血管内皮の減少、基底膜の肥厚を認めた。

【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、ER stress や炎症の軽減を介して膵β細胞の機能・量の維持に極めて重要な役割を果たす。

上記内容は下記論文として accept された。

Obata, A., Kimura, T., Obata, Y., Shimoda, M., Kinoshita, T., Kohara, K., Okauchi, S., Hirukawa, H., Kamei, S., Nakanishi, S., Mune, T., Kaku, K., Kaneto, H.: Vascular endothelial PDK1 plays a pivotal role in the maintenance of pancreatic beta cell mass and function in adult male mice. *Diabetologia*. 2019 May 4. doi:10. 1007/s00125-019-4878-1. [Epub ahead of print]

肥満時の癌発症・進展における M2 マクロファージの役割

角 朝 信

(富山大学医学部附属病院)

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。しかしながら、肥満がどのように癌発症に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。免疫抑制因子、血管新生因子、炎症性サイトカインなどを介してマクロファージ、制御性T細胞 (Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) を始めとする免疫細胞が癌微小環境を調節し癌細胞を支持していることが知られている。癌抑制的な機能をもつマクロファージが存在する一方で、一部のタイプのマクロファージは免疫抑制や血管新生を介して癌の進展・転移を促進することが報告されている。様々な種類の癌においてマクロファージは表面マーカーを用いて M1 マクロファージ, M2 マクロファージに大別して解析されてきた。しかしながら、それぞれ

のマクロファージが癌の発症・進展にどのような役割を果たしているか、*in vivo* モデルでの検討は充分に行われておらず分子機構についても未だ明確ではない。様々な組織における M2 マクロファージの役割を解析するため、我々は人為的に M2 マクロファージの数を減らすことが可能な CD206-DTR マウスを作製した (Am J Pathol. 185(1): 162-171, 2015.)。

本研究では独自に作製したマウスモデルを用いて M2 マクロファージが癌の発症・進展に与える影響及びその分子機構について調べている。これまでの実験で M2 マクロファージの減少により癌の発症・進展が抑制されることがわかり、そのメカニズムを追及している。また、肥満によって癌微小環境におけるマクロファージの subtype が変化し、非肥満時より癌発症が促進される可能性があると考え、肥満のマウスの癌におけるマクロファージの subtype を解析している。さらには肥満時において M2 マクロファージが癌発症・進展に与える影響は現時点で不明であり、独自に作製したマウスモデルに高脂肪食を負荷し、その際に M2 マクロファージの数を減らすと癌発生が抑制あるいは促進されるのかを今後評価する予定である。肥満と癌発症をつなぐ機序に M2 マクロファージが如何に関わるかを分子機構レベルで明らかにしたい。

イソプレノイド生合成経路が脂肪組織発達に及ぼす影響の検討

後 藤 剛

(京都大学大学院農学研究科)

【目的】

イソプレノイド合成経路はコレステロールをはじめとする様々な生体内代謝物生産を担っている経路である。脂肪組織は生体内最大のコレステロール貯蔵組織として知られているが、脂肪細胞におけるイソプレノイド生合成経路の生理的意義は未解明である。そこで本研究では、脂肪細胞におけるイソプレノイド生合成経路の生理的意義について明らかにすることを目的とし、種々の検討を行った。

【方法】

イソプレノイド合成経路の律速酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR) の flox マウスを作成し、脂肪細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスと交配させることにより、脂肪細胞特異的に HMGCR を欠損させたマウス (aKO マウス) を作成し種々の検討を行った。

【結果・考察】

通常食飼育下において、aKO マウスは雌雄を問わず摂餌量・飲水量が増加し、耐糖能異常、インスリン感受性の低下が認められた。aKO マウスでは脂肪組織が白色脂肪組織・褐色脂肪組織ともにほぼ完全に消失しており、アディポネクチンやレプチンに代表されるアディポカインの血中レベルの顕著な低下が認められた。肝臓では顕著な脂肪蓄積亢進が認められ、その一因として脂肪合成関連遺伝子の発現亢進が寄与しているものと考えられた。aKO マウスに認められた上記のような種々の代謝異常は、白色脂肪組織移植によってほぼ完全に回復が認められた。これらの結果から aKO マウスでは顕著な脂肪萎縮に伴う代謝異常が起きていることが示唆された。HMGCR flox マウスより単離した前駆脂肪細胞に対しタモキシフェン活性化型 Cre recombinase を導入し、脂肪細胞分化誘導後タモキシフェンにより HMGCR を欠損させた細胞では、アポトーシスが誘導され、細胞生存率の低下が観察された。本現象はイソプレノイド化合物、ゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) の添加によって回復が認められた。これより、脂肪細胞においてイソプレノイド合成経路は GGPP 産生を介して脂肪細胞の生存に必須の役割を担っていることが示唆された。

【結論】

脂肪細胞のイソプレノイド合成経路は脂肪細胞の生存に必須の役割を担っていることが明らかになった。

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】

糖尿病と肥満や動脈硬化症に関わる新規因子候補として、我々は 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 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²⁾。Favine のさらなる機能解析を目的に本研究を行った。

【方法】

血管内皮培養細胞 HUVEC と Favine 欠損マウスを用いた機能解析

【結果】

HUVEC において、Favine 添加または Favine 遺伝子発現抑制により、TNF α 誘導性の炎症関連因子の発現が変動した。Favine/ApoE 欠損マウスは重篤な動脈硬化症の病態を呈した。現在は Favine の血管に対する作用機序を探索している。

【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、動脈硬化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).

FGF21 発現誘導に寄与しており、また Activin B の強制発現では FGF21 発現誘導を介して全身の代謝改善作用を及ぼすものと考えられた。

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 が絶食やケトジェニック食摂取などの代謝ストレス時に肝臓において発現が強く誘導されたことから、Activin B の代謝制御における役割について明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法および結果】

Activin B の強制発現によってインスリン感受性・インスリン分泌の改善を伴って糖尿病モデルマウスの耐糖能異常が著明に改善された。Activin B による効果の作用機序について検討したところ、絶食時に誘導され代謝調節に関与することが知られている FGF21 が、Activin B によって誘導され、逆に Activin B のノックダウンより絶食時の FGF21 発現は障害されていた。実際に、Activin B 強制発現で認められるインスリン感受性亢進作用は、FGF21 のノックダウンにより消失したことから、Activin B による代謝改善作用の少なくとも一部に FGF21 誘導の寄与が考えられた。Activin B による FGF21 発現制御メカニズムについて検討したところ、Activin B は確かに FGF21 のプロモーター活性を活性化したが、Activin B による FGF21 の発現誘導は PPAR α 活性に非依存적であった。さらに Activin B による細胞内シグナル伝達について検討した結果、Activin B は肝臓においては ALK4 (Acvr1b) 経路に加えて ALK2 (Acvr1) 経路により、それぞれ Smad2/3 および Smad1/5/8 を活性化することが明らかとなった。このうち Activin B による FGF21 の発現誘導は ALK4 に依存적であり、絶食時の肝臓における FGF21 の発現は Smad2 ノックダウンにより障害された。

【考察】

Activin B とその下流シグナル伝達経路は絶食時の

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が、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、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) マウスを作出した。これまでに TM 投与後 2 週間の膵島において AP 不全が確認され、TM 投与後 6 週間に Atg7KO マウスの有意な耐糖能の悪化が認められた。そこで AP 不全から膵 β 細胞機能障害に至る分子機構を明らかとするためにトランスクリプトーム解析を行った。

【方法】

TM 投与後 2 週間と TM 投与後 6 週間の Atg7KO マウスより膵島を単離し、トランスクリプトーム解析を行った。

【結果】

TM 投与後 6 週間の膵島ではインスリン合成や分泌に関わる遺伝子発現の低下が認められたが、TM 投与後 2 週間の膵島では低下が認められなかった。一方で TM 投与後 2 週間と 6 週間に共通して発現の増加または低下している遺伝子も見出された。

【考察】

インスリン合成や分泌に関わる遺伝子発現に TM 投与後 2 週間と 6 週間で差が見出されたのは耐糖能の表現型に矛盾しない結果であった。更に今回共通に変化が認められた遺伝子はオートファジーによる膵 β 細胞調節に

関与している可能性がある。2型糖尿病における膵β細胞機能不全のメカニズムの一端を見出せる可能性があり、さらなる検討が必要である。

【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).

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ゴールド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20名(38.5%),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2143 kcal/day,非糖尿病群で2222 kcal/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)。また、標準体重1kg当たりの平均総エネルギー消費量は糖尿病群で36.5 kcal/kg/day,非糖尿病群で37.6 kcal/kg/dayであり、2群間の差は認めなかった (Mean difference: 1.1 kcal/kg/day, 95% CI: -1.6 to 3.9 kcal/kg/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)。糖尿病群における治療法別の比較を行ったところ、インスリン治療群において、総エネルギー消費量および身体活動レベルは低値を、基礎代謝量は高値を示したが、統計学的有意差は認めなかった。

【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、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。このような Sdf2l1 の生理的な役割について、遺伝子改変動物を用いた検討を加えた。

【方法】

我々は既に Sdf2l1-floxed マウスを樹立していたが、その成獣にアデノウイルス Ad-Cre を投与し、肝臓特異的 Sdf2l1 欠損マウスを作製した。その表現型を観察し、従来の Sdf2l1 ノックダウンモデルとの比較を行なった。

【結果】

アデノウイルス Ad-Sdf2l1 RNAi を用いたノックダウンモデルでは、投与 10 日後までの表現型しか観察できなかったが、上記ノックアウトモデルでは、投与 6 週間後においても、肝臓の Sdf2l1 の発現は対照群の半分以下に低下していた。また他の組織においては、明らかな Sdf2l1 の欠損は示唆されず、肝臓特異的にノックアウトができたものと考えられた。このマウスはノックダウンモデルと同様に小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現亢進、インスリン抵抗性、耐糖能障害、肝中性脂肪含量増加を呈した。加えてピルビン酸負荷試験にて、糖新生亢進も認められた。

【考察】

より長期的なノックアウトによる表現型は、短期的なノックダウンによる表現型と同様であり、Sdf2l1 の小胞体ストレスと糖脂質代謝に及ぼす作用を、更に裏づける結果であった。この知見も含め、以下の通り論文発表を行なった：

Sasako, T., Ohsugi, M., Kubota, N., Itoh, S., Okazaki, Y., Terai, A., Kubota, T., Yamashita, S., Nakatsukasa,

K., Kamura, T., Iwayama, K., Tokuyama, K., Kiyonari, H., Furuta, Y., Shibahara, J., Fukayama, M., Enooku, K., Okushin, K., Tsutsumi, T., Tateishi, R., Tobe, K., Asahara, H., Koike, K., Kadowaki, T. & Ueki, .K: Hepatic Sdf2l1 controls feeding-induced ER stress and regulates metabolism, *Nat Commun.*, **10**, 947 (2019).

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)

【目的】

現在、糖尿病の治療薬として、血中の GLP-1 濃度を高める薬剤が広く使われている。GLP-1 は、食事に伴い小腸から分泌され、膵β細胞に発現する受容体に作用することでインスリン分泌を促進するが、GLP-1 受容体は膵島細胞以外にも様々な部位に発現しており、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ほとんどわかっていない。この中で肺はヒトやマウスで GLP-1 受容体が量も強く発現する組織の一つである。我々は、一見つながりがわからない、腸管と肺の関係性を両者に共通する、バリア機能の観点から考えてきた。我々の研究の目的は、肺における GLP-1 の役割を GLP-1 は生体防御を調節する因子であるという仮説の元に検証することである。

【方法】

肺の無菌性炎症モデルマウスと感染性炎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。また、GLP-1 受容体欠損マウスにおける感染症モデルにおいても同様に検討を行った。

【結果】

肺の無菌性炎症モデルマウスでは GLP-1 は、サイトカインの産生を高め、無菌性の炎症を増強することが示唆された。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。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】

肺や腸管は外界と接するという点で共通している。GLP-1 は、状況では炎症を増強し、病原体の侵入を防ぐための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。

ヒト iPS 細胞とマイクロ流体デバイスを用いた小腸組織及び腸管内分泌細胞の成熟化機序の解明

三小田 亜希子

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

ヒト iPS 細胞を用いて生体腸管を模した立体組織を作成し、ヒト腸管内分泌細胞の機能を *in vitro* で解析できる新たな実験系を開発する。成体腸管の恒常性維持機構を、マイクロ流体デバイスを用いた腸管チップ上で再現し、これを用いて、食事や薬剤による腸管内分泌細胞の機能変化を *in vitro* で捉え、糖尿病や肥満など代謝性疾患における消化管ホルモンの意義を包括的に理解することが本研究の目的である。

【背景】

腸管からは 10 種類以上の消化管ホルモンが分泌される。腸管は、外部環境（食事内容）の変化を感知して全身の代謝制御、恒常性維持に寄与する巨大な内分泌臓器である。高脂肪食や高炭水化物といった食習慣の変化は、インクレチン (GIP, GLP-1) や、CCK, NTS の分泌を変化させ、糖尿病発症やインスリン抵抗性、肥満形成の直接の原因となる (Inagaki N, et al. Diabetes 2014. Li J, et al. Nature 2016.)。また腸管内分泌細胞は、複数の消化管ホルモンを同時に含有するパラホルモナルな細胞であること、腸管の部位によって発現するホルモンのパターンが異なることが知られる。

協調して働くべき複数の消化管ホルモンの異常が、複合的に代謝異常を引き起こす可能性が示唆されるが、複

数の消化管ホルモンの変化、病態への関与を統合して捉えた報告は乏しい。レポーターマウス等を用いた既存の実験手法は、各ホルモン分泌細胞の同定、分布解析に大きく寄与したが、腸管内分泌細胞を *in vitro* で培養する技術が存在しないという限界があり、機能の解析は困難であった。

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いて、十二指腸から回腸に至る小腸組織を部位ごとに分化誘導し、部位特異的なパラホルモナル腸管内分泌細胞を含む小腸チップを作成する。さらに、マイクロ流体デバイスの隔膜上で、極性を有する腸管細胞を培養することで、上層（消化管内腔側）と下層（血管側）を区別して内分泌細胞を刺激し、分泌ホルモン解析することが可能である。外部環境の変化（食事内容）によって生じる消化管ホルモンの変化を直接解析できる新たな *in vitro* 実験系の構築を目指す。

【結果】

成体小腸は陰窩底部に存在する幹細胞からの持続的細胞供給によって組織恒常性を維持する。パネート細胞が陰窩における幹細胞ニッチ形成に重要な機能を果たすことが知られる。幹細胞から分化した内分泌細胞を含む腸管粘膜上皮細胞は絨毛を構成するが、その寿命は 4-7 日と短い。したがって、成体の組織恒常性を維持した腸管チップの作成には、陰窩・絨毛構造の形成が不可欠である。

ヒト iPS 細胞から、領域化された陰窩-絨毛構造を備えた 3 次元小腸オルガノイドの作成に成功した。このオルガノイドは、マウスの陰窩を単離、初代培養した陰窩培養オルガノイドと酷似した構造を有し、細胞分裂が盛んな陰窩領域と、Villin 陽性粘膜上皮細胞、ChgA 陽性内分泌細胞が存在する絨毛領域をそれぞれ有する。ただし陰窩の成熟度は新生児期マウス小腸に相当するものであった。今後はこのヒト iPS 細胞由来小腸オルガノイドを、マイクロ流体デバイスに搭載し、2 次元的に培養、種々の刺激を負荷し、成体小腸への成熟を促進する。

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 (WS) 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糖尿病を発症する。我々は本モデルにおけるβ細胞消失の一因としてβ細胞が脱分化することを明らかにしたが、ヒトについては不明である。一方、脱分化誘導機構には、WFS1 の機能障害により引き起こされる小胞体及び酸化ストレス亢進との関わりが推察されるが、そのメカニズムは明らかではない。そこで、*Wfs1* 欠損マウスにおける細胞内ストレスによる細胞可塑性制御機構を解明するとともに、WS 患者におけるβ細胞不全とβ細胞脱分化の関わりを明らかにする。

【方法】

Wfs1 欠損マウス単離膵島を用いて、遺伝子発現定量解析、メタボローム解析、細胞内代謝動態解析を行った。マウス膵切片及び WS 患者の剖検膵について免疫組織染色により解析した。

【結果】

10-12 週齢の *Wfs1* 欠損マウスでは空腹時及び随時血糖値は野生型と同等であるものの大部分のβ細胞が Neurogenin3 を発現する膵内分泌前駆様細胞に脱分化する。同時に、*Wfs1* 欠損膵島ではグルコース異化障害に基づく ATP 産生障害を認めた。さらに、*Wfs1* 欠損膵島ではグルコース負荷時の解糖速度、酸素消費速度が著しく低下していた。これらの代謝障害は、*Wfs1* 欠損膵島において顕著な発現増強を示すストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) を欠損させることにより有意に回復し、脱分化の抑制とともにβ細胞量が維持された。50 週齢までの観察において *Wfs1*:*Txnip* 二重欠損マウス全観察個体で糖尿病の発症が抑制された。一方、WS 患者の膵組織では、インスリン陽性細胞の著明な減少を認め、膵ホルモン陰性内分泌細胞が増加していたことから、β細胞が脱分化していることが推察された。さらには、膵島細胞がピメンチンまたは

アミラーゼ陽性細胞に変容していることが明らかになった。

【結論】

Wolfram 症候群ではβ細胞脱分化が中心病態となり糖尿病を発症する。*Wfs1* 欠損マウスにおいて、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性が示唆される。

脂肪組織マクロファージにおける GIP シグナルの働き

清水 辰徳

(秋田大学大学院医学系研究科)

【目的】

脂肪組織には、脂肪細胞のみならずマクロファージにも GIP 受容体が発現している。脂肪組織マクロファージにおける GIP シグナルの働きと、肥満・インスリン抵抗性との関りを明らかにすることを目的とする。

【方法】

(1) 脂肪組織間マクロファージの単離

マウスから得た脂肪組織をコラゲナーゼで処理・遠心・浮遊している脂肪細胞と沈殿している SVF を分取した。SVF 分画を CD45 抗体付きマグネットビーズによって CD45(+) と CD45(-) へ分けた。これらの分画を用いて RT-PCR を行い、遺伝子発現を解析した。

(2) 骨髄移植による脂肪組織間マクロファージの置換

骨髄移植マウスは、GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植したもの (KO → WT) と、コントロールとして野生型マウスの骨髄を野生型マウスに移植したもの (WT → WT) を作成。移植後 8 週で採血を行い、骨髄の置換状況を確認した。移植 8 週間後より高脂肪食の投与を開始とし、高脂肪食開始前に OGTT・ITT、高脂肪食開始後 4 週間で再度 OGTT・ITT を行った。

【結果】

(1) 脂肪組織間マクロファージは GIP 受容体を発現している

SVF の CD45(+) 分画に GIP 受容体が強く発現しており、脂肪組織間マクロファージに GIP 受容体は発現しているものと考えられた。この分画にはアディポネク

チンの発現は認められず、脂肪細胞の混入によるものではないと考えられる。

(2) KO→WT マウスは高脂肪食に対する肥満耐性がある
移植8週後に末梢血を用いて置換状況を確認したところ、KO → WT マウスはおよそ7割がGIP 受容体欠損マウス由来に置換されていた。KO → WT マウスとWT → WT マウスは移植後、通常食摂取下において体重差はなかったが、高脂肪食に変更したところKO → WT マウスはWT → WT マウスと比べて有意な肥満耐性を示した。高脂肪食開始前に行ったOGTTでは、15分・30分でKO → WT マウスが良好な耐糖能を示していた。ITTでは、120分でのみKO → WT マウスのインスリン感受性が優れていた。しかしながら、高脂肪食負荷後4週間後に行ったOGTT・ITTでは両マウス間に有意差は認められなかった。

【考察】

KO → WT マウスに認められた肥満耐性は、GIP 受容体欠損マウスの表現型として知られており、脂肪細胞への中性脂肪の取り込みを行うGIPの働きが抑制されることによって生じるものと考えられているが、今回の結果は脂肪組織間マクロファージも脂肪の取り込みに関与することを示唆するものである。現在、マクロファージ特異的GIP受容体欠損マウスの作成を行っており、更に検討を進めていく。

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)

膵β細胞において解糖系の律速段階酵素であるグルコキナーゼを介したグルコースシグナルは、インスリン分泌、細胞増殖、およびアポトーシスを誘導し、糖尿病の病態に深く関与することが知られている。申請者は、既知の経路とは異なる、グルコースシグナルを介した膵β細胞機能の新規制御機構を明らかにしてきた。膵β細胞でのグルコキナーゼの活性低下は、小胞体ストレスに対して脆弱となり (*J Biol Chem.* 2011, *Diabetes* 2011), GLP-1 受容体シグナルがグルコースシグナルの低下を

回復させることを示した (*Endocrinology* 2012)。また、グルコースシグナルの活性化は、IRS-2 を介したアポトーシス抑制分子の誘導と小胞体ストレス分子の直接発現制御の2つの異なる経路により、小胞体ストレス誘導性膵β細胞アポトーシスを抑制することを明らかにした (*Diabetes* 2013)。さらに、インスリン受容体とIGF-1受容体の特異的阻害により、グルコースシグナルによる新規膵β細胞増殖経路を見出した (*Endocrinology* 2014)。2型糖尿病ドナー由来のヒト膵島を用いた解析から、グルコースシグナル活性化による代償性の膵β細胞増殖は、FoxM1/PLK1/CENP-A 経路を介していることを明らかにし、この経路が2型糖尿病における膵β細胞量低下の原因の1つである可能性を示した (*Cell Metabolism* 2017)。また、膵β細胞におけるグルコキナーゼの標的分子として、細胞外マトリックス分子であるFibulin-5と炎症性タンパクであるS100A8を同定し、Fibulin-5は、グルコキナーゼ活性化によりカルシニューリン/NFAT 経路を介して誘導されインスリン分泌を制御することを見出し (*Sci Rep.* 2017), 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、新規グルコキナーゼ標的分子の膵β細胞特異的ノックアウトマウスおよびヒト膵島を用いて、さらなる解析を進めている。これまで、手厚い助成を頂きました日本応用酵素協会および関係者の先生方へ心より御礼申し上げます。

single-cell RNA sequencing を用いたβ細胞新生経路の解明

鈴木 路可

(順天堂大学大学院医学部)

【背景】

我々はこれまで、胎生期および成体におけるβ細胞新生に焦点を当てて研究を行ってきた。具体的には、“*Ins1-Timer* マウス”を用いて新生β細胞数を定量し、新生β細胞の遺伝子発現プロファイル、および細胞周期の特性を明らかにした (Miyatsuka T et al. *Diabetes*, 3388-3393, 2014)。このマウスでは、FACSによる新

生β細胞単離および、その遺伝子プロファイル解析に成功したものの、新生β細胞の位置情報を得ることが困難であった。このような背景を踏まえ、昨年度の申請において、新生β細胞の位置情報を得るため、*Ins1-eGFP; Timer* double transgenic mouse (*new Ins1-Timer*) を作製した。本マウスでは、蛍光顕微鏡下で新生β細胞＝緑色蛍光細胞として観察可能となった。実際に新生β細胞の位置情報を得ることに成功し、更に、新生β細胞は膵管近傍に観察されるだけでなく、膵管から離れた血管周囲にも認められた。この観察結果は胎生期膵臓には起源の異なる2種類の新生β細胞、即ち膵管近傍にある内分泌前駆細胞がその場でβ細胞へと分化した“膵管近接型”新生β細胞 (*new β^{duct}* 細胞) と、膵管近傍の内分泌前駆細胞が血管周囲に移動した後に分化する“血管近接型”新生β細胞 (*new β^{vessel}* 細胞) が存在することが示唆された。さらに、免疫組織学的染色の結果から、それぞれの細胞集団の間では遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示唆された。

【目的・方法】

前年度の結果を踏まえ、2つの異なるβ細胞新生経路を規定する分子メカニズムを解明するため、FACSを用いて新生β細胞を単離し、single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) を行った。

【結果・考察】

新生β細胞は遺伝子発現プロファイルの差異により、5つのクラスターに分類され、そのうちの2つが *new β^{duct}* 細胞および *new β^{vessel}* 細胞に相当すると考えられた。さらに、pseudotime 解析の結果から、*new β^{duct}* 細胞と *new β^{vessel}* 細胞は共通の前駆細胞から別れて分化したものと考えられた。以上のように、蛍光顕微鏡による位置情報を得るための解析と、scRNA-seqによる1細胞レベルでの unbiased な解析により、2つの異なるβ細胞新生経路が存在することが示された。

【今後の展望】

蛍光顕微鏡での観察結果から、位置情報として2つの新生β細胞の存在が示唆され、さらに scRNA-seq から得られた unbiased な解析結果からも、同様に2つのβ細胞新生経路があることが示唆された。今後は、scRNA-seq から得られた *new β^{duct}* 細胞および *new β^{vessel}* 細胞を特徴づける遺伝子に関し、免疫組織学的染

色を行い、両者の整合性を確認する。

メタボローム解析を活用した糖・脂質代謝を制御する内因性代謝物の解明

高橋 春 弥

(京都大学大学院農学研究科)

【研究背景・目的】

肥満等から誘導される種々の生活習慣病の予防・改善を図るうえで、脂肪組織は重要な組織である。なぜなら、脂肪細胞は単にエネルギー（脂肪）を貯蔵するだけでなく、条件によってはエネルギー消費にも寄与するからである。通常の脂肪細胞（白色脂肪細胞）は主にエネルギーを蓄積するが、寒冷環境下や特定の薬剤・食品成分による刺激時には、エネルギーを積極的に消費する褐色様脂肪細胞に変換する。この現象は動物実験用マウスだけでなくヒトでも生じることが知られているが、どのようなメカニズムで白色脂肪細胞から褐色様脂肪細胞に変換するのか、いまだに明らかになっていない部分が多く残されている。そこで、本研究では、メタボローム解析技術を応用し、褐色様脂肪細胞への変換を制御する内因性低分子代謝物の探索・同定を目的とした。

【方法】

C57BL/6J マウスにβ3アドレナリン受容体のアゴニストである CL316243 (CL) を投与し、血中各種指標及び UCP-1 遺伝子発現量等を解析した。また、血中及び褐色脂肪組織 (BAT)、鼠径部脂肪組織 (IWAT)、精巣周囲脂肪組織 (EWAT) の代謝物を LC-MS を用いて分析し、得られた超精密質量データを活用したメタボローム解析により、CL 投与・非投与群間の差分解析を実施し、代謝変動の全体像を解析した。メタボローム解析から得られた、褐色様脂肪細胞への変換を制御する候補代謝物を培養脂肪細胞に添加し、UCP-1 遺伝子発現量等を解析した。

【結果・考察】

CL 投与により、IWAT を中心に UCP-1 の発現が顕著に増加し、白色脂肪細胞の褐色化が生じていることを確認した。この条件下で血中及び各種脂肪組織中代謝物のメタボローム解析を行い、BAT、IWAT、EWAT 及び血中

で検出された代謝物ピークに対し、CL 投与・非投与間の差分解析を実施した。その結果、CL を投与することで変化した代謝物ピーク数は、IWAT で最も多いことが判明した。また、差分解析において、有意差があり、かつ、IWAT において CL 投与により 10 倍以上変動した代謝物ピークは 28 種存在し、代謝物名が推定できた代謝物が 14 種類特定された。また、推定された当該代謝物の一種である低分子代謝物 A については、培養脂肪細胞に添加することで、UCP-1 発現量が増加することから、当該代謝物は、褐色様脂肪細胞への変換に重要な役割を担うことが推察された。

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】

単一遺伝子糖尿病の可能性が考えられる若年発症者を対象とし、ゲノム DNA の次世代シーケンス解析を行い、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) では同定困難であった、一般人口において低頻度だが疾患発症に与える影響の大きい変異 (mutation) を同定し、糖尿病遺伝素因の全容解明に貢献する。

【方法】

35 歳未満での若年発症糖尿病患者で隣島関連自己抗体陰性である 54 名およびその血縁者のゲノム DNA につき全エクソンシーケンスを行う。そして、一般人口において稀であり (ゲノムデータベースおよび、共同研究中有る計 10,000 人以上のゲノムコホートに属する糖尿病非罹患患者において対立遺伝子頻度 < 1%)、タンパク機能に重大な影響を及ぼす可能性が高いと予測される変異を抽出する。罹患血縁者が存在する場合は共通する変異を絞り込み、発症原因変異候補とする。

【結果】

[1] インスリン分泌不全の顕著な非肥満糖尿病患者 4 名 (空腹時血清 C-ペプチド < 0.3ng/ml) を有する家系 (家系 1) にて、罹患患者 4 名と家系内非罹患患者 2 名を全エクソンシーケンスの対象とし、罹患者に共通

する発症原因変異候補を 16 個に絞り込んだ。

このうち、ADAMTSL3 遺伝子 A137T 変異 (rs181914721) は、複数のゲノムコホートの糖尿病患者非罹患者に比して協力医療機関の糖尿病患者 119 名において高頻度であり、さらに、同変異がみられた糖尿病患者 3 名のうち 1 名の家系 (家系 2) において、罹患血縁者 9 名中 6 名が同変異を有していたことから、糖尿病発症感受性変異である可能性が高いと考えた¹⁾。

[2] 30 歳以下で肥満歴を有さず糖尿病を発症した 12 名を対象とした全エクソンシーケンス解析では、HNF1A 遺伝子 V246fs 変異が 1 名に検出され MODY3 と診断した。さらに別の 1 名において、新生児糖尿病の原因遺伝子である PTF1A 遺伝子に S18F 変異がヘテロ接合にて検出され、35 歳未満発症の罹患血縁者に変異が共有されていたことから、若年発症糖尿病の原因変異である可能性が示唆された。

【考察】

若年発症糖尿病患者における網羅的次世代シーケンスが、糖尿病発症の遺伝的背景解明につながることを示唆された。

【文献】

1) Jambaljav, B., Tanaka, D. & Nagashima, K. *et al.*: Whole-exome sequencing in a Japanese family with highly aggregated diabetes identifies a candidate susceptibility mutation in ADAMTSL3. *Diabetes Res Clin Pract.*, **135**: 143-149 (2018).

グレリンの抗炎症機序の検討

坪 内 拡 伸

(宮崎大学医学部)

【背景・目的】

グレリンは抗炎症と上皮保護効果を有し、肥満では発現が低下する。グレリンの持つ抗炎症作用は、グレリン受容体を介した直接的作用と神経系を介する機構が考えられている。本研究では、高脂肪食負荷または迷走神経

切断処置を行ったマウスに対して、グレリンの抗炎症作用の効果を検討した。

【方法】

- ① C57BL6 マウスに、HFD 負荷 (60 Kcal%fat) を 10 週間行い、ブレオマイシン (BLM) の気管内投与による肥満急性肺損傷モデルを作成した。HFD コントロール群、HFD-PBS 投与群、HFD-グレリン群の 3 群で、摂餌量、体重変化、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数、各種の炎症性サイトカインとケモカインの発現を検討した。
- ② 通常食の C57BL6 マウスに、迷走神経切断手術または sham 手術を行い、手術後 3 日に LPS を気管内投与し、急性肺損傷モデルを作成した。コントロール群、LPS-PBS 投与群、LPS-グレリン群の 3 群で、摂餌量、体重変化、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数、各種の炎症性サイトカインとケモカインの発現を検討した。

【結果】

肥満急性肺損傷モデルにおいて、グレリン群は摂餌量の低下が抑制されていた。BALF 中の総細胞数と蛋白質濃度、肺組織中の IL-6、IL-1 β の発現は、グレリン投与により増加が抑制された。迷走神経切断手術群および sham 手術群において、グレリン投与は肺組織中の炎症性サイトカインの発現の亢進が抑制された。迷走神経切断処置により、グレリン投与による摂餌量の改善は認められなかった。

【考察】

肥満条件下でグレリン投与は抗炎症効果を認めた。また、迷走神経切断後でグレリンの抗炎症効果を認めたことから、薬理量のグレリン投与は直接的な抗炎症作用を有することが示唆された。

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】

栄養シグナルにおいて中心的な役割を果たしているタンパク質リン酸化酵素 TOR (target of rapamycin) は、

酵母 (Tor1 および Tor2) から哺乳類 (mTOR) に至るまで進化的に高度に保存されている。TOR は、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与する (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。

メチルグリオキサールは解糖系から派生する代謝物であり、古くから糖尿病との関連が指摘されている。しかしながら、これまでにメチルグリオキサールと糖尿病病態との因果関係については良くわかっていない。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を明らかにした (Mol. Cell. Biol. 35: 1269-1280, 2015)。また、出芽酵母をモデル生物とした解析で、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ている。さらに、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ている (J. Biol. Chem. 292: 15039-15048, 2017)。そこで、TOR シグナル制御機構の解明を目的とし、出芽酵母での知見を利用してメチルグリオキサールによる TOR シグナルの制御因子の同定を試みた。

【方法・結果】

メチルグリオキサール感受性株に、酵母コレステロールであるエルゴステロールの生合成に関わる遺伝子欠損株 (erg2 Δ および erg3 Δ) が含まれていたこと、ならびに TOR の局在が細胞膜直下に観察されることから、細胞膜脂質に着目して解析を進めた。その結果、エルゴステロール動態に影響を及ぼす Amphotericin B が TOR シグナルの活性化を阻害することを見出した。

【考察】

これらのことは、細胞膜のステロール動態が TOR シグナルの活性制御機構に関与する可能性を示唆しているものと考えられた。

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】

我々はマウス BAT と WAT に対する FAIRE-seq 解析と BAT 特異的オープンクロマチン領域のモチーフ解析から、BAT の分化を正に制御する因子として転写因子 NFIA (nuclear factor I-A) を同定した。NFIA は脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) と BAT 特異的遺伝子エンハンサーにおいて高頻度に共局在 (co-localize) していた。NFIA のエンハンサーへの結合は PPAR γ を含む主要転写因子群の結合に先行し、かつ NFIA の結合は PPAR γ の結合を促進した。また NFIA が結合した時点でその領域は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 の導入により筋芽細胞や白色脂肪細胞は褐色脂肪細胞へ分化した。NFIA ノックアウトマウスの BAT では BAT 特異的な遺伝子プログラムの全体が障害されていた一方、骨格筋の遺伝子プログラムは逆に活性化された。またヒト BAT においても WAT と比較して NFIA は高発現しており、かつその発現は UCP1 を含む BAT 特異的な遺伝子群の発現と正に相関していた。

以上から NFIA は BAT 特異的遺伝子エンハンサーを活性化し、PPAR γ のエンハンサーへの結合を促進することで BAT の遺伝子プログラムを正に制御すると考えられた (Hiraike Y. et al. *Nature Cell Biology*. 2017).

また最近、我々は NFIA の最も C 末端側に位置する 17 アミノ酸残基がその転写活性に必須であることを見出した。ヒト NFIC においては、C 末端側に位置する proline rich domain がその転写活性に重要であるとの報告があり、また NFIA と NFIC の C 末端側の配列は非常によく類似していた。ルシフェラーゼレポーター解析から、proline rich domain の中でも最も C 末端側に位置する 17 アミノ酸残基 (pro #3 domain) が転写活性に必須であると考えられた。実際、pro #3 domain を欠損させた変異体 (Δ pro#3 mutant) は C2C12 筋芽細胞へ導入した際、PPAR γ の発現誘導作用および脂肪細胞分化の促進作用を完全に失っていた。にも関わらず、この変異体は骨格筋分化を抑制する作用は保持していた。従来、脂肪細胞と骨格筋細胞それぞれのマスター転写因子である PPAR γ と MyoD はお互いにその発現を抑制することで、運命決定の一意性を担保することが知られていたが、今回の結果により、NFIA が PPAR γ 依存的な経路と PPAR γ 非依存的な経路の双方を用いて骨格筋分化を抑制することによって、脂肪細胞分化を担保する機能を有していることが判明した。RNA-seq, FAIRE-seq, ChIP-seq を統合した網羅的解析により、PPAR γ 非依存的経路において NFIA は *Myod1* エンハンサー領域に直接結合して *Myod1* およびその近傍から転写され *Myog* の発現を正に制御する non-coding RNA である *DRR_eRNA* の発現を抑制し、骨格筋分化のプログラム全体を抑制することが判明した (Hiraike Y. et al. Submitted).

【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出が完了し実験に着手しており、また NFIA 蛋白複合体の質量分析にも取り組んでいる。NFIA の発現や活性を高めることを介して BAT を活性化し、肥満症や肥満 2 型糖尿病の新しい治療法の開発に結実させ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.

2) Hiraike, Y., Waki, H., Miyake, K., Wada, T., Oguchi, M., Saito, K., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: NFIA differentially controls adipogenic and myogenic gene program through distinct pathways to ensure adipocyte differentiation. **Submitted**.

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】

亜鉛シグナルの健康と病気への関与に注目が集まっているが、「亜鉛シグナルがどのように標的分子の発現・活性を制御するのか」という生命現象の重大な命題が解明できていない。本研究では、ベージュ脂肪細胞分化系を用いることで、ZIP13の直接の標的分子を同定し、ZIP13の脂肪細胞褐色化における役割を明らかにすることを目的とし、肥満糖尿病の理解に貢献することを目標とする。

【結果】

ベージュ脂肪細胞分化系を用いると、*Zip13*欠損細胞にZIP13を過剰発現させると、脂肪細胞褐色化は抑制できるが、亜鉛輸送能を失ったZIP13の変異体では脂肪細胞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す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、脂肪細胞褐色化は抑制できない。ZIP13による亜鉛シグ

ナルには特異性が存在し、脂肪細胞褐色化抑制を調節していると考えられる。そこで亜鉛シグナルの特異性が生じる機構を解明するために、ZIP13の褐色化抑制に必要な領域を同定した。さらに、この領域と結合する分子が特異性を決定しているのではないかと仮定し、ZIP13の褐色化抑制に必要な領域を用いて、yeast two hybrid (Y2H)を行い、結合する分子(結合分子)を3種類選定した。これらの分子をノックダウンや過剰発現することにより、ZIP13と同じ挙動を示す分子を同定した。

【考察】

我々は、自身が開発したベージュ脂肪細胞分化系を用いて、ZIP13の直接の標的分子を同定することができたが、ZIP13の標的分子がどのように脂肪細胞褐色化を制御するかは今後の課題である。*Zip13*-KOマウスでは結合組織の脆弱性を示し、結合組織形成においてはZIP13が必須の役割を果たすことから、ZIP13による肥満糖尿病治療法確立において、脂肪細胞特異的にZIP13の機能を阻害することが重要である。ZIP13-標的分子の制御機構がベージュ脂肪細胞以外の細胞で保存された機構かを明らかにすることで、ZIP13のどのような機能を制御すればエーラス・ダンロス症候群を発症せず肥満糖尿病のみを防げるかが判明する。これらの解明により、ZIP13を利用した新しいコンセプトの抗肥満糖尿病治療法の開発に繋がることを期待できる。

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 (T-cad) 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明らかとした (FASEB J 2017)。また、その想定されるメカニズムとして、APNがT-cad依存的に血管内皮細胞のエクソソームの産生・分泌を増加させることを報告した (JCI Insight 2018)。心血管イベント発症の背景として、慢性腎臓病 (CKD) の存在が重要視されている。APN欠損マウスは5/6腎

摘出モデルで腎線維化が増悪することを過去に報告しているが、その詳細な作用機序は明らかでなかった。このような APN の腎保護作用に関しても、その結合蛋白 T-cad が重要な役割を担っている可能性がある。

【方法・結果】

心血管組織に比して腎臓の T-cad 発現量は少ないものの、野生型マウスの腎臓においても T-cad および APN 蛋白が検出された。動脈血管において APN/T-cad はほぼ血管内皮に限局して存在しているが、興味深いことに糸球体の血管内皮には T-cad は発現しておらず、APN も検出されなかった。蛍光免疫染色の結果、皮質尿細管周囲の微小血管に APN の集積が確認され、血管周皮細胞 (pericyte) マーカーである PDGFR β と共局在していた。

腎虚血再灌流後の急性期では、毛細血管のバリア機能が破綻し permeability が亢進することで、炎症や尿細管壊死、線維化が惹起されることが知られている。T-cad 欠損マウスでは、野生型マウスに比して、虚血再灌流 24 時間後の尿細管壊死所見が増悪しており、エバンズブルー静注により定量した腎血管透過性も有意に亢進していた。

【考察】

Pericyte は毛細血管の支持細胞であり、脳や肺など全身に広く分布しているが、特に腎臓においては内皮細胞と協調した腎血流の調整や、血管内皮バリア機能の維持など、重要な生理学的役割を担っている。Pericyte における腎 APN/T-cad システムとして、①虚血時の血管新生の促進を介する組織血流の維持、②内皮バリア機能の維持、③エクソソーム産生亢進を介した組織修復などを想定し、検討を進めている。

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】

膵臓手術により得られるヒト膵臓組織と周術期の糖代謝の臨床像の詳細な解析により、膵臓手術後の糖尿病の

発症機序の解明を目的とする。内分泌学的検査により得られた術前耐糖能と β 細胞脱分化を含めた膵組織学的所見と術後耐糖能の変化の関連を検討し、耐糖能障害の評価としての β 細胞脱分化の有用性を確立する。また、膵切除術前後で腸内細菌叢の解析、胆汁酸および短鎖脂肪酸解析を実施し、膵切除後糖尿病発症との関連について検討する。

【方法】

①膵臓手術(膵頭十二指腸切除;PD および膵体尾部切除;DP) 予定の症例をリクルートし、文書による同意を取得する。

②術前の内分泌学的検査: 外来受診時の血糖, HbA1c, 病歴聴取から糖尿病の有無を確認する。非糖尿病患者には 75g ブドウ糖負荷試験 (OGTT), 24 時間蓄尿における C-peptide 測定, 糖尿病患者にはグルカゴン負荷試験, 24 時間蓄尿における C-peptide 測定を行い、内因性インスリン分泌能, インスリン抵抗性, インクレチン分泌を評価する。

③摘出膵を用いた免疫組織学的検査: 手術で摘出した膵臓の正常部位から免疫染色用の組織ブロックを作成する。作成したブロックは直ちに包埋し、 -80 度にて保存する。保存ブロックから凍結切片を作成し、蛍光免疫染色により単位面積あたりの膵島面積, 膵島面積あたりのインスリンおよびグルカゴン陽性細胞数, 脱分化した β 細胞や他の内分泌細胞への形質転換を起こした β 細胞の割合を評価する。

④術後の糖尿病発症率の評価: 非糖尿病患者においては、術後の糖尿病発症率を評価する目的で、75g OGTT を術直後および退院後 6 か月毎に実施する。

⑤周術期の内分泌学的検査および膵臓組織検査と術後耐糖能の変化との関連についての検討を行う。

⑥膵切除前および退院直前、6 ヶ月後の糞便を採取、腸内細菌叢解析, 胆汁酸および短鎖脂肪酸解析を実施する。

【結果】

研究期間中に 123 名の膵臓切除術予定者が登録され、8 名が除外基準に該当、最終的に 115 名が解析対象となった。術前に糖尿病を認めたものが 26 名、非糖尿病が 86 名であった。非糖尿病例に 75gOGTT を実施したところ正常型 38 例、境界型 39 例、糖尿病型 9 例であった。追跡可能であった非糖尿病 61 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。75gOGTTでの血糖曲線下面積(AUC)は術後6ヶ月で2群間に有意差を認めた(PD<DP)。インスリンのAUCはPD群で有意に高かった。PDは術後にOGTT後にGLP-1分泌が急激に増加, PDとDPにおけるGLP-1のAUCに有意差を認めた。一方, GIP分泌は両群とも術前後で有意な変化を認めなかった。

膵組織学的解析において, DP患者は β 細胞面積, α 細胞面積がPD患者より有意に大きく, α/β 比が高い傾向を認めた。DP患者における糖尿病発症の予測因子を検討したところ, β 細胞面積および α 細胞面積は有意な予測因子であった。術前NGTであったDP症例のうち術後糖尿病発症群と非発症群から年齢, 性別, BMIをマッチさせた6例ずつを抽出し, β 細胞脱分化マーカーであるAldh1a3陽性細胞の割合を比較したところ, 術後糖尿病発症群は非発症群よりAldh1a3陽性細胞の割合が高かった。

膵切除後の糖尿病発症リスクがPDおよびDPで大きく異なる原因の解明を目的とし, 各術式の術前および術直後, 6ヶ月, 1年後の糞便を採取, 腸内細菌叢解析を実施した。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(Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria)の中では, Proteobacteriaの割合がPD術後に劇的に増加していた。また, 術後の腸内細菌の多様性が保たれる症例ほど, インスリン抵抗性が改善することを見いだした。さらに, 糞便中の短鎖脂肪酸解析においては, PDにおいて術後にいくつかの短鎖脂肪酸レベルが上昇することを明らかにした。便中胆汁酸濃度については解析中である。

【考察】

膵切除後の糖尿病発症率は術式により大きな違いがあり(PD<DP), PDでの発症率の低さには, ①腸管インクレチン(GLP1)分泌の変化, ②腸内細菌叢の変化, ③短鎖脂肪酸増加などが関与している可能性が示唆された。加えて β 細胞の脱分化はNGTの段階でも一部の症例に認められ, β 細胞脱分化をすでに起こしている症例

は膵切除後の糖尿病発症リスクが高かった。膵切除という糖尿病発症リスクが高い集団においては, インスリン分泌能や抵抗性の評価に加え, β 細胞脱分化や腸内環境の変化を考慮した糖尿病発症予測モデルの確立が有用と考えられた。

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が発現し, 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】

- ・ミトコンドリア機能解析
- ・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 は、ミトコンドリアのカルシウムの取り込み及びミトコンドリアの膜電位を阻害しており、細胞内 ATP の産生も抑制した。また、NMU はミトコンドリアの呼吸商 OCR を優位に抑制しており、ROS 産生を亢進した。よって、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* 発現を増加した。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)。

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。

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.

Se 含有タンパク質セレノプロテイン P を標的とした糖尿病治療法の開発

三田 雄一郎

(宮崎大学医学部)

【目的】

血漿セレン (Se) 含有タンパク質である Selenoprotein P (SeP) は糖尿病患者で血中濃度が増加し、ヒト由来 SeP を投与したマウスでは耐糖能異常、インスリン分泌不全が引き起こされる。この SeP によって引き起こされる糖尿病態は SeP の組織への取り込みを阻害する中和抗体を投与することで改善できることから、SeP が糖尿病を悪化させる因子であり、糖尿病の新たな治療標的になると考えられている。

Se はシステインの硫黄が Se に置き換わったセレノシステイン (Sec) という形でタンパク質中に存在している。Sec は通常では UGA コドンにコードされており、3'UTR に Sec 挿入配列 (SECIS) と呼ばれる配列が存在したときのみ UGA コドンへ Sec を挿入することが可能になるという特殊な翻訳メカニズムを有している。SECIS 配列を持つ mRNA はこれまでに 25 種類しか発見されていないことに加え、SECIS 配列は mRNA ごとに異なることが分かっており、SECIS を標的にする治療法を確立することで SeP に対する特異的な治療法を確立することができるのではないかと考えられる。

【方法】

上記の仮説のもと、SeP mRNA の SECIS 及び 3'UTR 配列を標的に *in silico* で解析を行い SECIS 制御因子の探索を行った。見つかった新規遺伝子を SeP が発現している HepG2 細胞に過剰発現させ、SeP の mRNA、タンパク質量への影響を検証した。

【結果】

in silico の解析の結果、SECIS に影響を与える可能性のある新規の noncoding RNA である SeP-ncRNA が同定された。そこで、SeP-ncRNA の機能解析を行った。はじめに、SeP を発現している HepG2 細胞に SeP-ncRNA を過剰発現させた。その結果、SeP mRNA 量に変化は見られなかったが、SeP タンパク質量が減少した。他の Sec 含有タンパク質の mRNA 量・タンパク質量は

変化しなかったため、*SeP-ncRNA* は *SeP* 特異的に作用すると考えられた。次に、*SeP* タンパク質の減少メカニズムを解析するため、*SeP* mRNA の転写から翻訳のどの段階が *SeP-ncRNA* によって阻害されているかを検討した。*SeP* mRNA の核外移行には *SeP-ncRNA* の有無によって差が見られなかったが、*SeP* mRNA に結合するリボソーム量及び SECIS に結合する SBP2 の減少が確認され、翻訳段階が阻害されていることが示唆された。

【結語】

今回新たに見つかった *SeP-ncRNA* は SBP2 と *SeP* mRNA の SECIS の結合を阻害する事によって *SeP* の翻訳を抑制する新規の noncoding RNA である。*SeP-ncRNA* *SeP* 高値の患者に対する糖尿病の新たな治療標的になる可能性が高い。

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

(マンチェスター大学コンピューターサイエンス学科)

【目的】

本研究の目的は以下の4つである。

- 1) 重要な臨床議案に関し質の高いネットワークメタアナリシスを行い、臨床ガイドライン構築に貢献する。
- 2) システマティックレビューの自動化を実現させる。
- 3) 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化を行う。世界のビックデータを、人工知能やテキストマイニングの技術を用い解析する。これはプレジジョンメディシンの実現に寄与する。
- 4) AI を用い、現場の医療者の作業の省力化や効率化、日本の医療システムの維持と改善を目指す。

この4つの研究は最終的に目の前の患者にメリットをもたらす。かつ、現場の医療者にもメリットがある。

人間はより生産的かつ AI により代替不可能な作業に多くの時間を割くことが出来るようになるだろう。

【成果】

- 1) 重要な臨床議案に関し質の高いネットワークメタアナリシスを行い、臨床ガイドライン構築に貢献する。

いくつかの臨床議案に関し系統的レビューを行い Diabetes Care などの医学雑誌に報告した¹⁰⁻¹²⁾。また、国際メタアナリストの一員として GBD の解析に協力しコラボレーターとして活動した¹⁻⁹⁾。

- 2) システマティックレビューの自動化を実現させる。

PICORON-EBM (PICO and Risk Of bias Navigator for Evidence Based Medicine) の開発を行った¹³⁾。PICORON はシステマティックレビューの Risk of Bias, PICO を評価する際に頻用される単語を簡単に素早く自動ハイライトし、レビュー省力化を目的としたソフトである。研究者の興味に合わせた単語の自由な追加や削除も可能である。詳細はホームページを参照されたい。<http://www.picoron.com/index.html>

- 3) 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化を行う。世界のビックデータを、人工知能やテキストマイニングの技術を用い解析する。これはプレジジョンメディシンの実現に寄与する。

T-Library の開発を行った¹⁴⁾。T-Library は病歴要約などから自動でデータを分割抽出し臨床研究の解析の際のデータ抽出省力化を目的としたソフトである。詳細はホームページを参照されたい。

<http://www.picoron.com/tlibrary/index.html>

- 4) AI を用い、現場の医療者の作業の省力化や効率化、日本の医療システムの維持と改善を目指す。

現在、国内外の人工知能やテキストマイニングを専門とする企業と提携し、現在の医療の抱える問題点の解決に向けた多くの研究開発を進めている。

【Publications】

- 1) GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 May; 18(5): 459-480.
- 2) GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 May; 18(5): 439-458.
- 3) GBD 2017 SDG Collaborators. Measuring

- progress from 1990 to 2017 and projecting attainment to 2030 of the health-related Sustainable Development Goals for 195 countries and territories: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 2091-2138.
- 4) GBD 2017 Population and Fertility Collaborators. Population and fertility by age and sex for 195 countries and territories, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 1995-2051.
 - 5) GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 1923-1994.
 - 6) GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 1789-1858.
 - 7) GBD 2017 Mortality Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality and life expectancy, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 1684-1735.
 - 8) GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10; 392(10159): 1859-1922.
 - 9) GBD 2016 Alcohol Collaborators. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2018 Sep 22; 392(10152): 1015-1035. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31310-2.
 - 10) Yamada, T., Kamata, R., Ishinohachi, K., Shojima, N., Ananiadou, S., Nom, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: Biosimilar vs originator insulins: Systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2018; **20**(7): 1787-1792.
 - 11) Yamada, T., Shojima, N., Noma, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors as add-on therapy to insulin for type 1 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Obes Metab*. 2018 Jul; **20**(7): 1755-1761.
 - 12) Yamada, T., Shojima, N., Noma, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: Weekly Versus Daily Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Therapy for Type 2 Diabetes: Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2018 Apr; **41**(4): e52-e55.
 - 13) Yamada, T., Kondo, Y. & Momosaki R.: 2019. PICO and Risk Of bias Navigator for Evidence Based Medicine. *PeerJ Preprints* 7: e27684v1
 - 14) Yamada, T., Kondo, Y. & Momosaki, R.: 2019. Automated data extraction software for medical summary using text mining (T-Library). *PeerJ Preprints* 7: e27685v1

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

Allah Nawaz

(富山大学医学部)

Previous reports suggested that adipose tissue macrophages are involved in maintaining insulin sensitivity in adipocytes along with improvement in metabolic genes. Nonetheless, it is largely unknown how depletion of M2-like macrophages regulates insulin sensitivity and adipocyte progenitor (AP) proliferation. To understand the role of M2-like macrophages in white adipose tissue (WAT), we generated CD206DTR mice based on transgenic expression of diphtheria toxin receptor under the control of the CD206(+) promoter to specifically deplete CD206 M2-like macrophages. Partial depletion of CD206 M2-like macrophages resulted in the generation of smaller adipocytes, upregulated expression of metabolically favorable genes and enhanced insulin sensitivity in both chow and high-fat diet-fed CD206-reduced mice. In vivo and in vitro studies revealed that $Tgf\beta 1$, abundantly expressed in CD206 M2-like macrophages, regulate AP differentiation and proliferation. Flow cytometry analysis revealed that the number of APs was increased and cyclin gene expression levels in the AP fraction were up-regulated. To validate this hypothesis, we generated genetically engineered mice in which CD206 specific $Tgf\beta 1$ was knocked out after tamoxifen treatment. Increased number of APs and smaller adipocytes were observed in the CD206 specific $Tgf\beta 1$ knockout mice, suggesting that CD206 cell-specific deletion of $Tgf\beta 1$ resulted in the enhanced proliferation of AP. Previous studies had shown that type 2 cytokines and M2 macrophages induce cold-induced browning in inguinal WAT (ingWAT) by producing catecholamines. Exactly how

the conditional and partial depletion of CD206 M2-like macrophages regulates the cold-induced browning of ingWAT, however, remains unknown. We also examined the role of CD206 M2-like macrophages in the cold-induced browning of WAT and found that partial depletion of CD206 M2-like macrophages caused an increase in the number of beige progenitors and also enhanced their proliferation in ingWAT in response to cold. Thus, we concluded that CD206 M2-like macrophages inhibit the proliferation of white and beige progenitors. (ref 1 and 2)

【Reference】

- 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., Okaza-ki, 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. *Nature Communications*. 2017 Aug 18; **8**(1): 286.
- 2) Igarashi, Y., Nawaz, A., Kado, T., Bilal, M., Kuwano, T., Yamamoto, S., Sasahara, M., Jiuxiang, X., Inujima, A., Koizumi, K., Imura, J., Shibahara, N., Usui, I., Fujisaka, S. & Tobe, K.: Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. *Scientific Reports*. 2018 Oct 1; **8**(1): 14567.

創薬標的としてのNIK

【序】

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、広範な組織・細胞に発現する転写因子であり、炎症、免疫応答、細胞増殖およびアポトーシスといった多様な生物学的応答において重要な役割を担っている^{1,2)}。NF- κ B が寄与するシグナルには、古典的経路および非古典的経路が存在する。古典的経路は、tumor necrosis factor (TNF) α や interleukin- 1β といった炎症性サイトカインや、グラム陰性桿菌の内毒素リポポリサッカライドに代表される病原体関連分子パターン (PAMPs) の刺激によって活性化され、NF- κ B p50 と p65 から成るヘテロダイマーを介して転写調節に寄与する。一方で、非古典的経路は、B cell activating factor belonging to the TNF family (BAFF)、CD40 リガンド、TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) あるいは receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) などの TNF superfamily (TNFSF) 分子の刺激によって活性化され、NF- κ B p52 と Rel B から成るヘテロダイマーを介して標的遺伝子の転写を調節すること

で多彩な生理機能に寄与している。

本稿では、免疫応答に重要な役割を果たしている非古典的 NF- κ B 経路に着目し、その中心を担う分子の一つである NF- κ B-inducing kinase (NIK) に焦点をあてた。以下、NIK の機能、疾患との関連および創薬標的としての可能性について概説する。

【NIK の機能】

NIK は、MAP kinase kinase kinase (MAP3K) ファミリーに属するセリンスレオニンキナーゼであり、TNF receptor を介して NF- κ B 活性化に関与するタンパクとして同定された³⁾。その構造は、N 末端に TNF receptor-associated factor (TRAF) 3 結合部位、中央部にキナーゼドメイン、そして C 末端に下流分子である inhibitory- κ B kinase (IKK) α との結合部位を有している¹⁾。NIK を介した非古典的 NF- κ B 経路のシグナル伝達の概略を図 1 に示す。定常状態において、NIK は TRAF2/3 と cellular inhibitor of apoptosis proteins

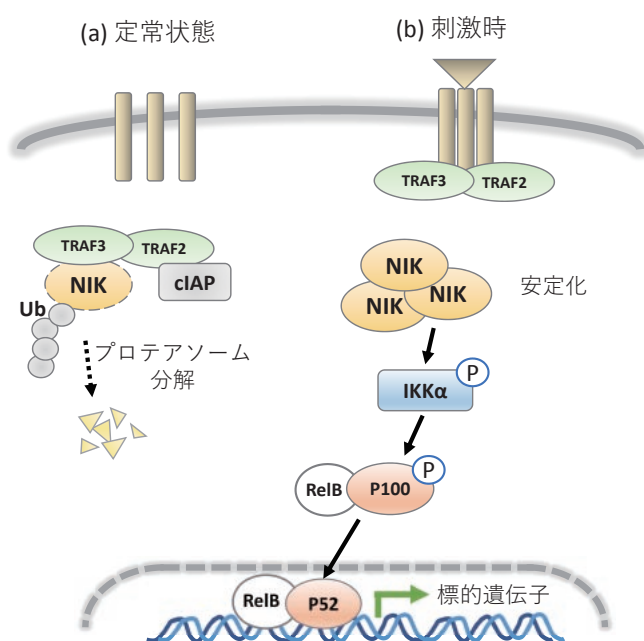


図 1 非古典的 NF- κ B 経路 シグナル概略図

(cIAP)の複合体に結合し、ユビキチンプロテアソーム系の分解を受けることで、その発現レベルが低く維持されている(図1a)。一方で、TNFSF分子の刺激が入った場合には、NIKとTRAF3が乖離することでプロテアソーム分解が解除され、NIKが安定化する(図1b)。その結果、NIK下流のIKK α のリン酸化と、それに続くp100のプロセッシングが誘導され、最終的にはNF- κ B p52とRelBのヘテロダイマーが標的遺伝子の転写を調節する^{1,2)}。

免疫応答におけるNIKの役割については、NIK遺伝子欠損マウスや変異患者の解析から明らかになってきた。NIK遺伝子変異あるいは欠損マウスでは、胸腺および脾臓の構造異常や二次リンパ組織の形成不全が認められ、末梢血のB細胞数低下とそれに伴う免疫応答の低下が起こる。また、NIK遺伝子変異患者においても、末梢血のB細胞数、濾胞性ヘルパーT細胞数およびNK細胞数の低下や、低ガンマグロブリン血症を認め、その結果、免疫不全や易感染状態となることが知られている⁴⁾。これらの解析からNIKは免疫応答に必須の因子であり、自己免疫疾患を中心とした様々な疾患の病態形成に寄与していると考えられている。

【疾患との関連】

代表的な自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE)では、BAFFやTWEAKが非古典的NF- κ B経路を活性化し、自己抗体の産生や腎炎の発症を惹起することが示唆されている。また関節リウマチでは、RANKLが非古典的NF- κ B経路を活性化し、破骨細胞形成を促進する²⁾。さらに多発性骨髄腫をはじめとしたB細胞系の血液腫瘍では、NIKの過剰発現による非古典的NF- κ B経路の異常な活性化が生じていることも知られている¹⁾。このような背景から、非古典的NF- κ B経路は従来から創薬標的として着目され、TNFSF分子やその受容体を標的とした治療薬の開発が進められてきた。すでに抗BAFF抗体ベリムマブはSLEを適応として上市され、現在も血管炎、シェーグレン症候群および筋炎等で臨床試験が進行中である。またPEG化抗CD40リガンド抗体ダピロリズマブもSLEを適応として第II相臨床試験の段階にある。

【NIKの創薬標的としての可能性】

非古典的NF- κ B経路の中心を担うNIKもまた、創薬標的分子としての可能性が示唆されてきたが、NIK阻害剤の創製や開発に関する報告はこれまでほとんど例がなかった。その理由の一つとして、他のキナーゼに対する選択性の担保が困難であったためであると考えられる。しかしながら、最近、Genentech社から選択的なNIK阻害活性を有する低分子化合物SMI1が報告された⁵⁾。SMI1はNIKに対するKi値が0.23 nMと強力であり、222種類の他のキナーゼに対して高い選択性を示した。B細胞やT細胞を用いた実験で非古典的NF- κ B経路の活性化を抑制することに加え、ループス腎炎の動物モデルであるNZB/WF1マウスにおいて腎症状および生存率の改善が認められている。

現時点ではNIK阻害剤による病態改善報告は非臨床情報にとどまっているが、NIKを標的とするアプローチは、従来の単一リガンドや単一受容体を標的とした場合と比べ、より強力な病態改善効果を発揮する可能性があると考えられる。近い将来、NIK阻害剤のヒトでの有効性が確認され、自己免疫疾患や慢性炎症疾患、あるいは血液腫瘍等の新たな治療薬となることが期待される。

【参考文献】

- 1) Paul, A. *et al.*: Inhibitory- κ B Kinase (IKK) α and Nuclear Factor- κ B (NF κ B)-Inducing Kinase (NIK) as Anti-Cancer Drug Targets. *Cells.*, **7**, 176 (2018).
- 2) Sun, S.C.: The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 545 (2017).
- 3) Malinin, N.L. *et al.*: MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature.*, **385**, 540 (1997).
- 4) Willmann, K.L. *et al.*: Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat Commun.*, **5**, 5360 (2014).
- 5) Brightbill, H.D. *et al.*: NF- κ B inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythe-

matosus. *Nat. Commun.*, **9**, 179 (2018).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット 河野佑子)

(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)

マラリア原虫から分泌されるフシギな酵素たち

【はじめに】

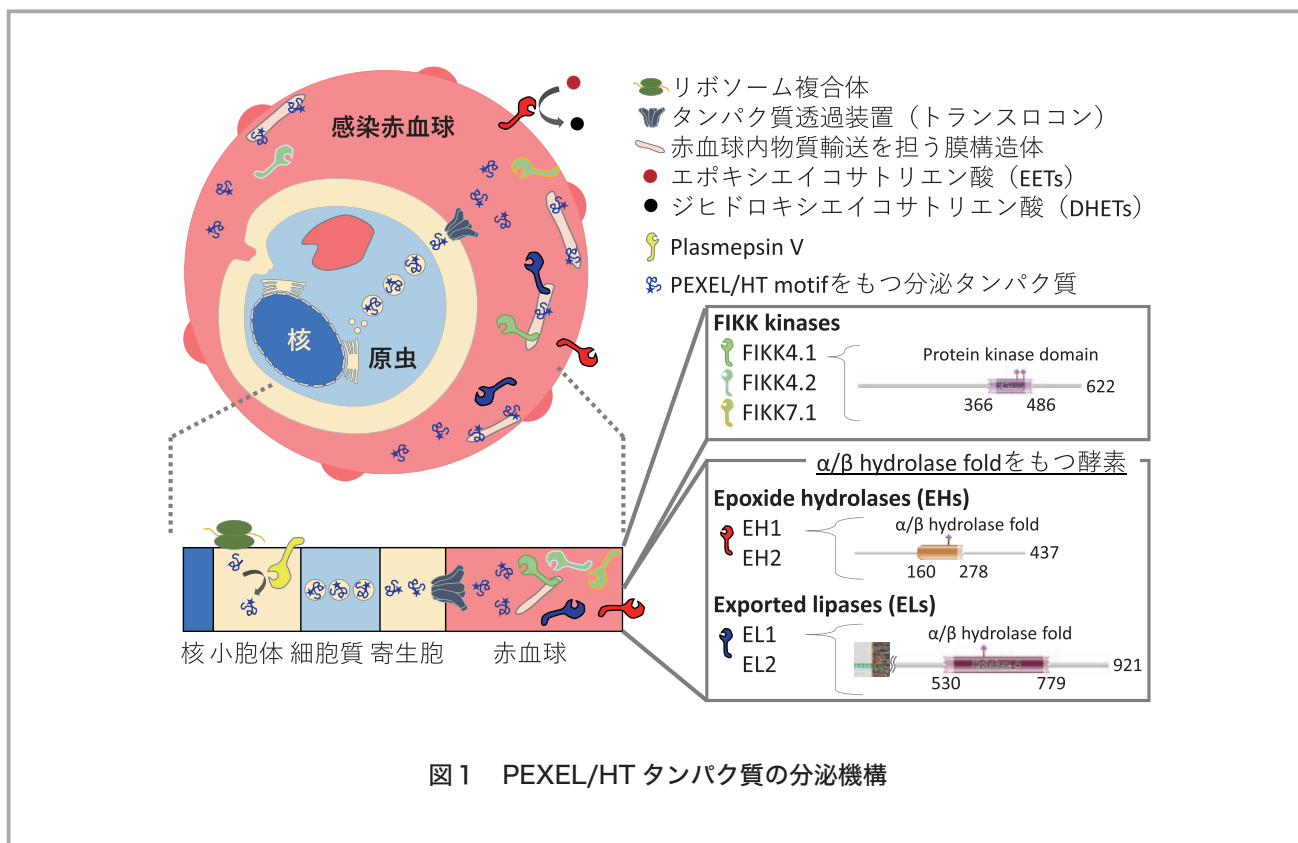
結核、HIV と並んで世界三大感染症に数えられるマラリアは、アピコンプレックス門の *Plasmodium* に属するマラリア原虫により引き起こされる。世界保健機構 (WHO) の報告によれば、本原虫による感染は世界 87 개국以上で認められ、本感染症に毎年 2 億人以上が罹患し、約 44 万人が死亡していると推計されている¹⁾。

ヒトに感染するマラリア原虫のうち、公衆衛生上最も危険な病原体の一つが、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) である。本原虫には、寄生した赤血球内に様々なタンパク質を送り込むことで、血球の構造や性質を内部から作り替える独自の機構 (宿主リモデリング機構) が存在する²⁾。本稿では、意外と知られていない熱帯熱マラリア原虫による宿主リモデリング機構を題材に、この機構に関わる酵素について、最新の知見に触れながら概説したい。

【宿主改変のカギとなる酵素 Plasmepsin V】

ハマダラカの吸血により生体に侵入したマラリア原虫は、肝臓を経由した後、赤血球へ寄生する。赤血球での増殖は、血球への侵入と破壊が繰り返される為、ヒトに発熱や貧血といった症状を引き起こす。酸素運搬に特化した赤血球には、核はもとより、小胞体やゴルジ体などのタンパク質輸送経路が存在しない。このような過酷な環境で生き抜くため、原虫は赤血球内へと様々なタンパク質を分泌し、独自のタンパク質輸送系を構築することで、あたかも有核細胞のように赤血球を作り替え、必要な栄養素の取り込みなどを行う (図 1)。

原虫が赤血球へ送り込むタンパク質の多くは、その N 末端に、PEXEL/HT (*Plasmodium* Export Elements/Host Targeting) モチーフと呼ばれる 5 残基からなる特徴的なアミノ配列 (RxLx(D/E/Q)) をもつ。この配列をもつタンパク質は、原虫の小胞体に存在する Plasmepsin V とよばれる酵素により開裂され、N 末端がアセチル化



された後、タンパク質透過装置（トランスロコン）を介して赤血球へ分泌される³⁾。Plasmepsin は、マラリア原虫にのみ存在すると考えられているアスパラギン酸プロテアーゼであり、現在迄に少なくとも 10 種類が同定されている。なかでも、Plasmepsin V は、宿主リモデリング機構のカギを担う分子であり、赤血球内での原虫増殖に必須であることが示されている⁴⁾。また、Plasmepsin V の酵素活性を阻害する特異的薬剤を用いた研究により、本酵素のプロテアーゼ活性が分泌タンパク質の輸送に不可欠であることも示されている⁵⁾。Plasmepsin V は哺乳類には存在せず、マラリア原虫にのみ存在する酵素であることから、有望な創薬ターゲットであると考えられている。

【赤血球へと送り込まれる酵素たち】

上述の機構により赤血球へと分泌されるタンパク質は、300～400 種類にも上るとされているが、赤血球を用いた研究の技術的な難しさや、ゲノム特性 (*Plasmodium falciparum* は約 80% ともいわれる AT リッチなゲノムをもつ) による研究障壁も相まって、これら分泌タンパク質の生理活性に関する研究はほとんど行われていない。ここでは、酵素活性をもつと報告された代表的な分泌タンパク質について紹介する。

● FIKK kinase (FIKK キナーゼ)

FIKK キナーゼは、アピコンプレクサにのみ存在するタンパク質リン酸化酵素 (Ser/Thr キナーゼ) であり、2004 年に初めて発見された。その名前は、特徴的なアミノ酸モチーフ (Phe-Ile-Lys-Lys(FIKK)) に由来し、その酵素活性や基質は、2013 年に初めて生化学的に証明されるまで不明であった。

熱帯熱マラリア原虫には、FIKK キナーゼが約 20 種確認されており、そのうち 15 種以上が赤血球へと分泌されることが知られている。組み換えタンパク質を用いた研究により、初めて酵素活性をもつことが証明された FIKK4.1 は、赤血球骨格の一因子である dematin をリン酸化することで、赤血球膜の機械的安定性を変えると考えられている⁶⁾。その後、FIKK4.2, FIKK7.1, FIKK12 をコードする遺伝子を欠損した組換え原虫を用いた研究からも、これらの酵素が、宿主リモデリング機

構に関与することが示唆された⁷⁾。FIKK キナーゼの多くは、赤血球での増殖に必ずしも必要ではないが、特定の FIKK キナーゼは、原虫のベクター内増殖 (ハマダラカ体内での増殖ステージ) に必須であるという報告もあり⁸⁾、創薬ターゲットとしての FIKK キナーゼの是非は、まだ議論の余地がある。

● Epoxide hydrolase (エポキシド加水分解酵素)

エポキシエイコサトリエン酸 (EETs) は、主に血管内皮細胞により産生され、血管拡張作用や抗炎症作用を有する生理活性物質であり、エポキシド加水分解酵素 (EHs) により分解されることで活性を失う。マラリア原虫感染において、EETs がどのような役割を担っているかは定かではないが、原虫から赤血球へ分泌されるタンパク質の中には、赤血球表面に提示され、血液中の EETs を分解する EHs が存在することが、近年報告されている⁹⁾。これらの EHs は、感染局所の炎症により誘導される EETs を分解し、血管拡張を抑えることで、正常な血流を遮断し、熱帯熱マラリアの重症化に寄与していることが示唆されている。

これらの EHs には、プロテアーゼやリパーゼなどに共通してみられる α/β hydrolase (α/β 加水分解酵素) ドメインが存在する。分泌タンパク質の網羅的同定を試みた最新の研究により、このドメインを有し、赤血球膜表面へは輸送されない分泌タンパク質も新たに同定されている¹⁰⁾。このタンパク質の酵素活性については未だ確認されていないものの、赤血球内で脂質の加水分解を担う分泌型リパーゼだと考えられている^{9,10)}。いずれの分泌タンパク質も、宿主リモデリング機構への関与が示唆されているが、赤血球内における原虫増殖には必須でないことから、創薬ターゲットとしては不向きであると考えられる。

【おわりに】

本稿では、熱帯熱マラリア原虫による宿主リモデリング機構に焦点をあて、この機構に関わる幾つかの代表的な酵素について紹介した。しかし、元来、マラリア原虫はハマダラカとヒトの間を行き来する非常に複雑な生活環をもっており、創薬の視点に立ち戻れば、赤血球内増殖のみならず、蚊体内での発育や、肝臓での増殖に関わ

る酵素も非常に魅力的な創薬ターゲットといえる。これらいずれの増殖ステージにも必須な酵素が、創薬ターゲットとしては理想であり、その点で、フェノタイプドレッジディスカバリー (PDD) による創薬アプローチが最も合理的な創薬手法であるといえる。

マラリアは、依然アフリカにおける幼児の死亡主要因の一つである。本感染症の治療は、アルテミシニン誘導体多剤併用療法 (Artemisinin-based Combination Therapy: ACT) が最も効果的とされているが、薬剤耐性株の蔓延も各地で報告されており、未だマラリア撲滅への道筋は見えない。一方、近年のグローバルヘルスの発展により、多くの企業が、マラリアや顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases) といった感染症に対する薬剤開発に着手している。このような異なる化合物ライブラリーを基に、独立してスクリーニングを行う取り組みは、作用機序の異なる薬剤の発見、開発へとつながり、現行の多剤併用療法の選択肢を広げ、耐性原虫の出現を最小限に抑えることを可能にする。複数の治療薬の選択肢をもつことが、マラリア制圧の第一歩であり、今後の薬剤開発の取り組みに期待したい。

【参考文献】

- 1) World Health Organization: World malaria report 2018: <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>. Accessed at Nov. 4th, 2019.
- 2) Maier, A.G. *et al.*: Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol.*, **7**, 341-354 (2009).
- 3) Russo, I. *et al.*: Plasmepsin V licenses Plasmodium proteins for export into the host erythrocyte. *Nature.*, **463**, 632-636 (2010).
- 4) Boonyalai, N. *et al.*: Essentiality of *Plasmodium falciparum* plasmepsin V. *PLoS One.*, **13**, e0207621 (2018).
- 5) Sleebs, B.E. *et al.*: Inhibition of plasmepsin V activity demonstrates its essential role in protein export, PfEMP1 display, and survival of malaria parasites. *PLoS Biol.*, **12**, e1001897 (2014).
- 6) Brandt, G.T. & Bailey, S.: Dematin, a human

erythrocyte cytoskeletal protein, is a substrate for a recombinant FIKK kinase from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **191**, 20-23 (2013).

- 7) Osman, K.T. *et al.*: Biochemical characterization of FIKK8 – A unique protein kinase from the malaria parasite *Plasmodium falciparum* and other apicomplexans. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **201**, 85-89 (2015).
- 8) Jaijyan, D.K. *et al.*: A novel FIKK kinase regulates the development of mosquito and liver stages of the malaria. *Sci Rep.*, **6**, 39285 (2016).
- 9) Spillman, N.J. *et al.*: Exported epoxide hydrolases modulate erythrocyte vasoactive lipids during *Plasmodium falciparum* infection. *mBio.*, **7**, e01538-16 (2016).
- 10) Takano, R. *et al.*: A high-resolution map of SBP1 interactomes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *iScience*, **19**, 703-714 (2019).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 創薬基盤研究所 高野量)

(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)

リボヌクレアーゼH (Ribonuclease H, RNase H)

はじめに

Ribonuclease H (RNase H) は、RNA を分解するリボヌクレアーゼスーパーファミリーの中でも RNA を内側から分解するエンドリボヌクレアーゼファミリーに分類される酵素である。RNase H は、DNA と RNA がハイブリッド二本鎖を形成している箇所において、RNA 鎖のホスホジエステル結合部分を加水分解により切断する。RNase H は、古細菌からウイルス、原核生物、真核生物に至るまで普遍的に認められる酵素の一つである。これまでに知られている RNase H の生理機能としては、DNA 複製の際にラギング鎖上に合成されるプライマー RNA の除去に働くほか、RNA 転写に伴って形成される R-loop (DNA に相補的な RNA がハイブリッドを形成し、非相補的な DNA が 1 本鎖となった状態) の分解除去に関わることでゲノム安定性に寄与することなどが知られている。ほかに、RNA ウイルスのなかでも HIV に代表されるレトロウイルスは、宿主ゲノムへの自らの組み込みを成立させるために逆転写酵素をコードしており、この一部が RNase H 活性を持つことが分かっている。また、近年医薬品の新しいモダリティとして注目されているアンチセンス核酸医薬は、標的 RNA とそれに相補的なアンチセンスのハイブリッドに対して RNase H が作用することにより標的 RNA の切断・分解を誘導するものである。これらのことから、RNase H の生理機能や分解機構をより深く理解することが、より効果的で副作用の少ない医薬品のデザインをはじめとした創薬研究に極めて重要であると考えられる。

RNase H の構造と基質認識

真核生物における RNase H は、そのアミノ酸配列の特徴により大きく RNase H1 と RNase H2 の 2 つに分類される。RNase H1 は、主として N 末端側のハイブリッド結合ドメインと C 末端側のエンドヌクレアーゼドメインから構成され、このエンドヌクレアーゼドメインで

RNA のリボース部分と相互作用している。両ドメインは結合ドメインと呼ばれるドメインにより連結されており、さらに N 末端にはミトコンドリア移行シグナルが付加されている。ヒト RNase H1 は保存された 3 アミノ酸残基 (N151, N182, Q183) を介して RNA/DNA ハイブリッドの副溝 (マイナーグループ) と相互作用する。活性中心は DEDD モチーフと呼ばれるよく保存された 4 つのアミノ酸 (D145, E186, D210, D274) からなり、ここで RNA 鎖のリン酸基と相互作用している。RNase H1 はこの DEDD モチーフに 2 個の Mg^{2+} が配位することで活性を示す。

RNase H2 は、活性中心を有する RNase H2A と、2B, 2C の各サブユニットからなるヘテロ三量体として機能する。酵素の全体構造としては、3 つのサブユニットが連続して並ぶ形をとっており、2A と 2B の間に 2C が挟まれた構造となっている。2A サブユニットの C 末端側の約 50 アミノ酸残基は β スtrand 構造をとっており、これが 2B および 2C サブユニットに巻き付くように相互作用している。RNase H2 と H1 のアミノ酸配列の相同性はそれほど高くないが、活性中心の構造は非常に似通っている。すなわち、2A サブユニットの DEDD モチーフを形成する 4 個の酸性アミノ酸残基 (D34, E35, D142, D170) が位置的に高度に保存されており、ここで RNA 鎖のリン酸基と相互作用するとともに、RNase H1 のケースと同様に 2 個の Mg^{2+} が配位する。

RNase H の触媒機構

RNase H1 は、細胞内において DNA1 本鎖結合タンパク質である複製タンパク質 A と直接相互作用することによって DNA/RNA ハイブリッドに結合し、その後 RNA 鎖の切断が起こると考えられている。RNase H による RNA の切断機構としては、 S_N2 型リン酸転移反応と呼ばれる反応機構が関与している。まず、脱プロトン化した水分子が RNA 鎖のリン酸塩に求核攻撃するこ

とで5価の反応中間体が形成され、これにより立体配置が逆転したリン酸基が形成される。その後、もう一つの水分子により3'の脱離基が再プロトン化されると5'リン酸基と3'-OH基が生成し、生成物が切断部位から遊離する。この触媒反応には2価の金属イオンが必要であり、これには Mg^{2+} または Mn^{2+} が可能であるが Mg^{2+} が好まれる。2つの金属イオンは非対称的に配位し、一方の金属イオンは求核分子の配置および活性化に必要であり、もう一方の金属イオンは酵素基質複合体を不安定化することにより開裂反応を促進すると考えられている。

RNase H とアンチセンス核酸による標的 RNA の分解

上述のような生体内での本来の反応を利用して、標的 RNA に相補的な塩基配列をもった数十塩基程度の長さのオリゴ核酸 (=アンチセンス核酸) を合成し細胞に取り込ませることで、RNase H による標的 RNA の特異的な切断・分解を引き起こすことができる。アンチセンス核酸はその生体内安定性や標的に対する結合力を向上させるために、通常リン酸基や塩基部分への化学修飾が施される。アンチセンス核酸はまずエンドサイトーシス経路を介して細胞に取り込まれ、その後エンドソームを経てリソソームへと移行するが、一部のアンチセンス核酸はエンドソームから逃れ、やがて核と細胞質の両方に分布する。アンチセンス核酸はここで標的 RNA と相補的に結合し、そこへ RNase H が引き寄せられる。上述のように、真核生物の RNase H には RNase H1 と H2 が存在するが、RNase H1 は主に核およびミトコンドリアに、RNase H2 は主に核に局在する。哺乳類細胞では通常 RNase H1 より RNase H2 の方が高発現しているが、アンチセンス核酸による標的 RNA の切断は、主として RNase H1 によるところが大きいことが分かっている。

RNase H と疾患の関わり

RNASE H1 遺伝子の変異により、常染色体劣性の進行性外眼筋麻痺が引き起こされることが知られている。進行性外眼筋麻痺はミトコンドリア病の一つとされ、眼瞼下垂で見られるような外眼筋の進行性の筋力低下と眼麻痺を認める。これに加えて、心伝導障害と網膜色素

変性を伴う重症型は、Kearns-Sayre 症候群と呼ばれる。進行性外眼筋麻痺の患者由来線維芽細胞では、RNase H1 の転写及びタンパク質レベルの低下に加え、ミトコンドリア DNA の複製欠損が認められる。RNase H1 欠損マウスでは 8.5 日胚で発生が停止することが知られている。これは、主に核内およびミトコンドリアに存在する RNase H1 活性の減少により、ミトコンドリア DNA の複製が十分に行われなくなり、細胞のアポトーシスが引き起こされるためと考えられている。このことは、ミトコンドリア DNA 複製に RNase H1 活性が必要であることを示すとともに、ミトコンドリア機能障害の病態メカニズム解明とその治療薬の創薬に重要な意味を持つと考えられる。

一方、RNASE H2 遺伝子の変異は Aicardi-Goutieres 症候群 (AGS) の原因となることが知られている。Aicardi-Goutieres 症候群は原因遺伝子別に5つのサブグループ (AGS1-AGS5) に分類されているが、このうち AGS2 は RNASE H2B 遺伝子、AGS3 は RNASE H2C 遺伝子、AGS4 は RNASE H2A 遺伝子の変異にそれぞれ起因する。Aicardi-Goutieres 症候群は胎生期ウイルス感染症と類似した経過をたどることが知られている。すなわち、乳児期に重篤な神経症状を示し、小頭症や精神発達遅滞がみられ、小児期に死亡に至る。病理解析では、脳萎縮や白質ジストロフィーおよび石灰化を認め、髄液中にはリンパ球やインターフェロンの増加がみられる。

おわりに

これまでの研究により、生物界に普遍的な酵素である RNase H が、DNA 複製やゲノム安定性に寄与していることが解明され、その構造や反応機構についても解析が進められてきた。一方で、RNase H が生体内で実際どのような基質を認識し、どのような細胞機能に関わっているかの全容については、いまだ明らかになっていない。上述のように、RNase H は疾患の原因遺伝子であることや、アンチセンス核酸の例のように創薬応用のうえでも重要な酵素の一つである。今後の研究の進展によって、生物の核酸代謝機構とその生理機能がより深く理解されるとともに、新しい医薬品開発の礎となることが期待される。

参考文献

- Cerritelli, S.M. & Crouch, R. J.: Ribonuclease H: the enzymes in Eukaryotes, *FEBS J.* **276**, 6, (2009).
- Crooke, S.T.: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides, *Nucleic Acid Ther.*, **27**, 2, (2017).
- Hyjeka, M., Figielb, M. *et al.*: RNases H: Structure and mechanism, *DNA Repair*, in press (2019).

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所 佐々木隆史)

(田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所, 日本応用酵素協会 小寺淳)

