

日本応用酵素協会誌

No.58

2023

総 説

- ユビキチン・プロテアソームシステム依存的タンパク質分解の破綻による
神経疾患の発症機序の解明 1
大野 萌馨, 若月 修二, 荒木 敏之
- 質量分析イメージングを用いた酵素組織化学
Enzyme histochemistry using mass spectrometry imaging 9
新聞 秀一
- メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送 17
中津 史

酵素情報

- CD38とBST1 24
夜久 圭介, 中川 崇
- ポリラクトサミン糖鎖生合成を調節する β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 27
米田 敦子

2023年度 研究報告

- 酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成 29
- 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 58
- Vascular Biology Innovationに関する研究助成 110
- 全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成 146
- Front Runner of Future Diabetes Researchに関する研究助成 158

総 説

ユビキチン・プロテアソームシステム依存的タンパク質分解の 破綻による神経疾患の発症機序の解明

大野 萌 馨^{1,2}, 若月 修 二¹, 荒木 敏 之^{1,2}

はじめに

神経発達障害は運動、認知、感情または学習に障害を伴う神経疾患であり、近年、疾患の社会的な認知度の上昇とともに発症率が増加しつつある¹⁾。様々な要因が発症の原因として考えられているが、その一つとして神経細胞内でのシナプス関連タンパク質分解の異常が挙げられる。タンパク質分解経路の一つであるユビキチン・プロテアソーム・システム (UPS) (図 1) のいくつかの関連遺伝子が神経発達障害のリスク遺伝子として同定され、そ

の大部分を E3 ユビキチンリガーゼが占める^{2), 3)}。E3 ユビキチンリガーゼは基質を認識し、E2 からユビキチンへの転移を助ける、または触媒する酵素であり、特定のタンパク質の分解を決める重要である。神経系において、E3 ユビキチンリガーゼは神経細胞の発達、遊走、軸索の伸長や分岐、シナプスの成熟、機能の調節において役割を果たしていることが報告されている⁴⁾。しかし、神経細胞の発達、成熟における UPS の役割についての研究は少なく、UPS 機能と神経発達障害の関連について更なる研究が必要とされている。

UPS の異常は神経変性にも関与することが知られている。ポリユビキチン形成阻害剤を変性軸索に適用すると、軸索変性の進行が有意に抑制されることから、軸索変性には UPS 分解が必要であることが示唆された⁵⁾。完全に発達した神経軸索が壊れる軸索変性は、中枢神経系と末梢神経系の両方において、様々な状況で観察される⁶⁾。軸索変性は、筋萎縮性側索硬化症⁷⁾、パーキンソン病⁸⁾、アルツハイマー病⁹⁾ など、多くの神経変性疾患の初期段階でもしばしば観察される、運動障害を伴うパーキンソン病では、UPS の活性に関与するタンパク質の遺伝子に欠損が報告されている¹⁰⁾。さらに、UPS 機能低下はハンチントン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の進行の促進に関与することが報告されていることから²⁾、UPS は正常な神経細胞の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

神経系の発達過程において、軸索やシナプスは初期に過剰に産生され、その後、過剰な構造は成熟した神経回路を形成するために分解される¹¹⁾。このような軸索の刈り込みは、軸索変性で観察される形態学的特徴と共通しており、軸索変性的一种とみなすこともできる。そこで本稿では、E3 ユビキチンリガーゼのうち、神経変性、神経

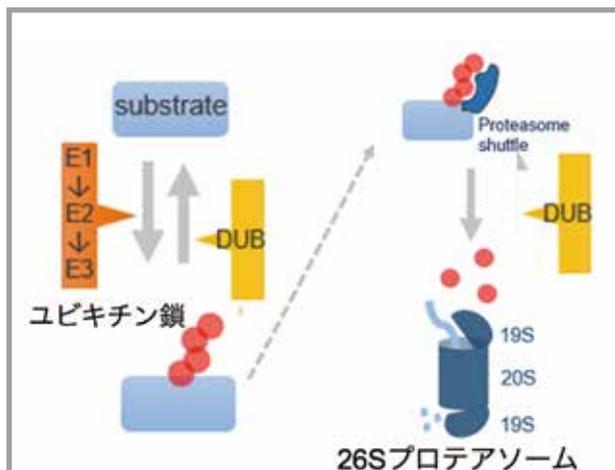


図1 ユビキチンリガーゼ・プロテアソーム・システム (UPS)

UPSはユビキチン分子を標的タンパク質に修飾することでタンパク質の分解、または細胞内シグナルを調節する役割を果たす。標的タンパク質へのユビキチン分子の付加(ユビキチン化)は3つの酵素(E1, E2, E3)によって行われ、さらにユビキチン分子間の縮合反応を繰り返すことでポリユビキチン鎖が形成される。ユビキチン化タンパク質が分解の運命を辿る場合は、26Sプロテアソームによってポリユビキチン鎖が認識され、脱ユビキチン化された後20Sに送り込むことで分解される。

発達の両者に関与する Znrfl と Ube3a について紹介し、脳神経系において一生涯に渡る UPS 機能の関与について現時点の課題を議論する。

1. ZNRF1 による神経変性進行メカニズム

1.1 ZNRF1-AKT-GSK3β-CRMP2 経路

我々はこれまでに、ZNRF1-AKT-GSK3β-CRMP2 経路が軸索変性の進行に関与することを解明した¹²⁾。グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β) の阻害は神経突起変性に対して保護的であることを見出し、リン酸化によって GSK3β 活性を制御する AKT も、軸索保護の役割を果たすことを突き止めた¹²⁾。軸索損傷のような変性刺激によって、AKT 活性は抑制され、GSK3β は神経細胞で活性化される¹³⁾。また我々は、変性軸索における GSK3β の基質として、コラプシン応答メディエータータンパク質 2 (CRMP2) を同定した。GSK3β 依存的リン酸化部位に変異を持つ CRMP2 を軸索変性の培養モデルに過剰発現させたところ、変性の進行が有意に遅延することを見いだした¹²⁾。これらの結果から、変性軸索では GSK3β 依存的な CRMP2 のリン酸化が誘導され、

CRMP2 の分解が起こり、その結果、軸索の微小管構造が破壊されることが示唆された。(図 2 ②-④ a)

我々は以前の研究から、ドミナントネガティブ型の ZNRF1 を過剰発現させると、軸索変性が抑制されることを明らかにしていた。ZNRF1 は神経細胞において実際に AKT と結合し、変性した軸索において AKT を分解する標的となることが判明した¹²⁾。また、ZNRF1 の発現抑制や、AKT-GSK3β カスケードの阻害、リン酸化部位変異型 CRMP2 の過剰発現など、ZNRF1-AKT-GSK3β-CRMP2 経路を任意の段階で阻害すると軸索変性の進行を抑制することから、ZNRF1-AKT-GSK3β-CRMP2 経路が軸索を維持する上で重要であることが示唆された¹²⁾。

1.2 ZNRF1 による細胞アポトーシスの誘導

これまで、酸化ストレスによる神経細胞傷害が、軸索変性だけでなく神経細胞体の死も誘導することが示唆されている。我々は培養神経細胞とマウスモデルを用いて、ZNRF1 の活性化がアポトーシスも誘導することを発見した¹⁴⁾。これまでの研究で、古典的なアポトーシスシグナル伝達経路は、軸索変性を促進するシグナル伝達とは独立

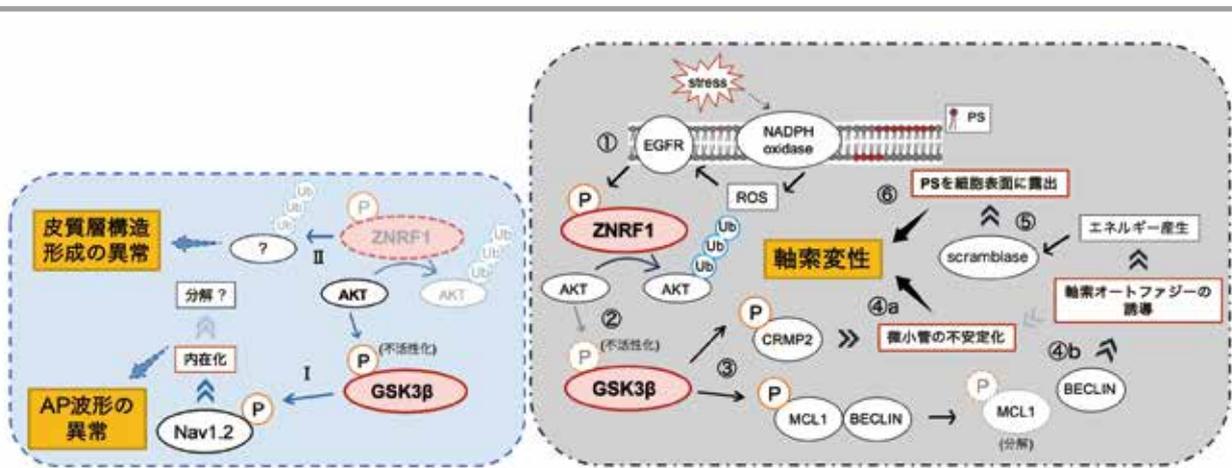


図2 軸索変性時と発達段階で ZNRF1 が担う機能

右: ZNRF1 が制御する神経変性メカニズム ①ストレスによる ROS 産生が、EGFR による ZNRF1 の活性化を起こす。② ZNRF1 による AKT の分解により GSK3β の活性が亢進する。③ GSK3β が CRMP 2, MCL1 をリン酸化する。④ a CRMP 2 のリン酸化により微小管が不安定化し、軸索変性が促進する。④ b リン酸化 MCL1 が分解され、BECLIN は軸索オートファジーを誘導する。⑤ オートファジーによるエネルギー (ATP) 産生がスクランブラーゼの持続的な活性を起こし、PS が細胞膜表面に露出する。⑥ PS の細胞膜表面への露出が貪食を誘発し、軸索変性を促進する。

左: 発達段階における ZNRF1 が担う役割 I ZNRF1 KO では AP の波形に異常が生じる。GSK3β によるリン酸化が Nav1.2 発現レベルの制御によって Nav1.2 の内在化に影響する可能性がある。II ZNRF1 KO では胎児脳の皮質構造に異常を示す。ZNRF1 が未解明な基質の分解を介して、皮質構造の形成に関与すると考えられる。

すると考えられてきた¹⁵⁾。著者らの発見は ZNRF1 がアポトーシスと軸索変性の両方の制御に関与することを示すものであり、ZNRF1 の活性調節機構を詳細に調べることに より、アポトーシスと軸索変性がどのように収束するのかを明らかにできる可能性がある。

1.3 軸索オートファジーの誘導

MCL1 は BCL2 ファミリー分子の抗アポトーシスメンバーであり¹⁷⁾、定常状態の神経細胞ではミトコンドリア外膜上のオートファジー誘導複合体の必須成分である BECLIN1 と相互作用し、オートファジーを制御している¹⁸⁾。我々は MCL1 が軸索変性に対して保護的であり、GSK3 β によってリン酸化される下流分子として同定した¹⁶⁾。軸索変性において GSK3 β が活性化されると、リン酸化された MCL1 は、BECLIN1 やミトコンドリア表面から解離し、F-box 型ユビキチンリガーゼである FBXW7 に依存した UPS 分解を受ける。MCL1 から切り離された BECLIN1 は、変性した軸索においてオートファジーを誘導する¹⁶⁾ (図 2 ④ b)。オートファジーはエネルギーを産生することで、細胞機能に貢献している¹⁹⁾。このことは、軸索の輸送が阻害され、必要なエネルギーを局所的に生産する必要がある軸索変性において特に重要であると考えられる。健康な軸索の細胞膜では、リン脂質は非対称に分布している²⁰⁾。アミンを含む脂質であるフォスファチジルセリン (PS) とホスファチジルエタノールアミン (PE) は細胞膜上で細胞質側を向いて局在する。脂質の移動はフリッパーゼとスクランブラーゼに制御され、フリッパーゼは PS を細胞質側に局在させ、スクランブラーゼは細胞表面に露出させる²¹⁾。変性した軸索やアポトーシス細胞では、スクランブラーゼの活性化とフリッパーゼの抑制により、PS が細胞表面に露出する²²⁾。我々は、スクランブラーゼ活性が、変性した軸索におけるオートファジー由来のエネルギー産生によって維持されることを示した¹⁶⁾ (図 2 ⑤, ⑥)。このことは、オートファジーが、変性部位への食細胞の動員を介して軸索の残骸の吸収し、軸索変性を促進する可能性を示唆している。

2. ZNRF1 の活性化

ZNRF1 はほとんどの神経細胞で発現しているが、定常状態では不活性であり、軸索変性が始まる傷害や刺激

に反応して ZNRF1 は活性化される¹²⁾。ZNRF1 の活性化には、酸化ストレスによって誘導される ZNRF1 の 103 番目のチロシンでのリン酸化が必要である¹⁴⁾。我々はまた、受容体型チロシンキナーゼである上皮成長因子受容体 (EGFR) が ZNRF1 と会合し、リン酸化することを見出した¹⁴⁾ (図 2 ①)。酸化ストレスレベルの上昇がどのようにして EGFR の活性化につながるのか、また、さまざまな種類の刺激がどのようにして神経細胞における酸化ストレスレベルを上昇させるのかは不明である。神経細胞における酸化ストレス産生に関しては、NADPH オキシダーゼが軸索変性の開始に反応した酸化ストレス産生を担っていることが判明している¹⁴⁾。興味深いことに、NADPH オキシダーゼ活性は、培養神経細胞において 6-ヒドロキシドーパミンなどの酸化ストレス誘導物質によって開始される軸索変性に必要であることから、酸化ストレスが細胞内シグナル伝達メディエーターとして作用していることが示唆される²³⁾。酸化ストレスによる NADPH オキシダーゼ活性化のメカニズムは不明であるが、細胞外に与えられた酸化ストレスは、おそらくキナーゼの活性化によって翻訳され、NADPH オキシダーゼを活性化すると考えられる²⁴⁾。

3. 神経発達段階での ZNRF1 の役割

ZNRF1 はマウス胚のほぼ全ての神経細胞で発現が認められ、発達期での神経細胞の成熟に機能を持つ可能性がある²⁵⁾。ZNRF1 を欠損させたマウス (ZNRF1 KO) の行動フェノタイプを明らかにするため、網羅的行動試験を行った結果、精神疾患様の行動異常や多動が確認された (未発表データ)。しかし、ZNRF1 欠損が発達、成熟期においてどのような分子機序を経て神経回路に影響し行動異常を引き起こしているのか、その詳細は不明である。我々は現在、脳・神経系の発達や成熟段階で ZNRF1 が担う機能や分子機序の解明を行っている。

3.1 電位依存性 Na チャネルと ZNRF1

統合失調症様フェノタイプを示す一部の E3 ユビキチンリガーゼ欠損マウスでは、アクションポテンシャル (AP) の波形や発生頻度、興奮性での異常が報告されている²⁶⁾。これまでの検討により、ZNRF1 KO の海馬 CA1 錐体神経細胞では AP のピーク波形に変化が見られ、ZNRF1 KO では電位依存性 Na イオンチャネル (Nav) の発現

増加の傾向があった。サブタイプの一つである Nav1.2 は錐体神経細胞で発現するが、マウスでは2週齢をピークとして発達と共に発現レベルは減少する²⁷⁾。その際、Nav1.2は細胞内へと内在化し、分解されると考えられるが、そのメカニズムは詳細にされていない。培養細胞を用いた検討では GSK3 β が Nav1.2 の内在化を促進することが報告されている²⁸⁾。ZNRF1 KO の海馬では、不活性化型 GSK3 β 発現量が増加していることから、ZNRF1 が AKT-GSK3 β 経路を介して細胞膜上の Nav の発現調節に寄与している可能性が考えられる(未発表)(図② I)。Nav1.2はAPのシナプス可塑性に影響する逆伝搬を担うことから、現在、ZNRF1 KO でシナプス可塑性に異常があるのか検討している。

3.2 皮質層構造と ZNRF1

皮質は I - VI の6つの層からなる構造を持つ。各神経細胞がどの層を構築するかは、いつ誕生したかで決定される²⁹⁾。精神発達障害の一つである統合失調症の患者の脳の厚みを解析した研究では、上層が薄くなっていることが示されている³⁰⁾。また、ヒトの脳オルガノイドを用いて皮質層構造の形成を達成した報告では、統合失調症関連遺伝子である DISC1 に変異を生じさせた場合、層構造の構築が阻害され、統合失調症でも現れる層構造の異常を再現している³¹⁾。我々は妊娠齢14日目で新生する神経細胞に GFP を導入し、出生0日目の皮質において GFP 陽性神経細胞の分布を解析したところ、ZNRF1 KO では脳室面側(腹側側)に分布が偏ることを判明した。また成体 ZNRF1 KO では、皮質が薄いことを発見した(未発表)(図② II)。分布変化を起こす要因を明らかにすることが今後の課題であり、神経細胞への分化と細胞増殖頻度への影響についての検討を考えている。

4. 神経発達障害と神経変性疾患に関与する E3

ユビキチンリガーゼ : Ube3a

E3 リガーゼ Ube3a 欠損は、発達遅延と知的・運動障害を特徴とするアンジェルマン症候群 (AS) の病因である。Ube3a 欠損マウスを用いた研究では複数の基質が特定され、Ube3a による基質のユビキチン化は学習や、シナプスの成熟、形態、さらに神経興奮性に影響することを明らかにしている^{32) -36)}(表1)。また、神経変性疾患モデルにおいて Ube3a を欠損させることで疾患症状の進行が促進されることが示されている^{36) -39)}。これらの結果は Ube3a が一生涯に渡って神経機能に関与する重要なタンパク質であることを示唆している。

4.1 運動障害と Ube3a

Ube3a の基質である phosphotyrosyl phosphatase activator (PTPA) は脱リン酸化することで Protein phosphatase 2A (PP2A) を活性化する³²⁾。PP2A は樹状突起の突起形態やシナプスの成熟過程に必要な刈り込みを促進する分子である³²⁾。Ube3a 欠損マウスは筋力の低下、運動皮質野の神経細胞のシナプスの幼弱化、mEPSC の発生頻度の減少を示す。Ube3a 欠損マウスでは PTPA の発現量と PP2A の活性の増加が確認され、PTPA との共欠損によりシナプスの幼弱化が是正された³³⁾。さらに PP2A 阻害剤の投与により、筋力の低下と mEPSC の発生頻度が改善された³³⁾ ことから、Ube3a 欠損による PTPA の分解の停滞が PP2A 活を亢進することで、シナプスの成熟に影響し、Ube3a 欠損マウスの筋力低下を引き起こしていることを示唆している。

4.2 学習障害と Ube3a

Ephexin5 はアクチン動態に関わる Rho A を活性化することでシナプスの成熟を阻害する働きをもつ。シナプ

基質	基質が担う機能	Ube3a欠損による生理的・形態学的機能	行動フェノタイプ
PTPA	PP2Aのリン酸化	シナプスの幼弱化、mEPSC発生頻度↑	筋力低下
Ephexin5a	RhoAの活性化を介したシナプス成熟制御	シナプス数↑、mEPSC発生頻度↑	学習、記憶障害
Big Kチャンネル	AP発火頻度の制御	興奮性↑、APの発火率↑	No data.

表1 Ube3a の基質と AS に関連するフェノタイプ

ス結合が進行し、Ephexin5 がリン酸化されることで、Ube3a によるユビキチン化が促進され興奮性シナプスは成熟過程を進む。Ube3a 欠損マウスでは Ephexin5 の発現増加が示されている³⁴⁾。Ube3a 欠損マウスでは新規物体を用いた行動実験において記憶や学習に障害を示し、海馬 CA1 錐体細胞のシナプス数や mEPSC 発生頻度の増加が観察された³⁴⁾。これらのフェノタイプは Ube3a と Ephexin5 を欠損させることで改善が見られ³⁴⁾、これらの結果から、Ube3a 欠損による Ephexin5 の発現増加がシナプス数増加を引き起こし、学習に影響すると示唆される。

4.3 神経興奮性と Ube3a

Ube3a は軸索の機能に関与している。Ube3a 欠損マウスではシナプス小胞数の減少が観察され、さらに興奮性シナプスではシナプス小胞リカバリーが遅延している³⁵⁾。この現象は Ube3a 欠損神経細胞の興奮性 - 抑制性バランスの崩れの原因と考えられる。さらに、AS 患者由来 iPSC 細胞から分化させた神経細胞では、アクションポテンシャル (AP) の発火率が増加していることが示された³⁶⁾。これは Ube3a が電位依存性 Big カリウムチャネル (BK) を基質としていることに起因する。BK チャネルはアクションポテンシャルの発火を調節する分子であるが、Ube3a の欠損により BK チャネルが増加し発火が促進され、神経興奮性が增強されていると考えられる。

4.4 神経変性疾患と Ube3a

前述したように Ube3a の発現低下による基質の増加はシナプス成熟や神経興奮性に影響し、神経発達障害の発症に関与する。その一方で、Ube3a の発現低下は神経変性疾患の進行の促進に関与している^{37) - 39)}。

4.4.1 ハンチントン病と Ube3a

ハンチントン病 (HD) はハンチントンタンパク質をコードする遺伝子領域の CAG リピート伸長によって起こる神経変性疾患である。Ube3a を欠損させた HD モデルマウス (HD/Ube3a^{m-/p+}) は同齢の HD モデルマウスと比較して、寿命の短縮、筋力の低下、視床の萎縮、脳内のハンチントンタンパク質の凝集体の増加が観察された³⁷⁾。これらの結果から Ube3a の欠損が HD の進行に影響することが考察される。さらに、Ube3a の発現量を増加さ

せるトポテカン1 (I型トポイソメラーゼ阻害剤) の HD モデルマウスへ投与は寿命の延長、筋力低下の進行遅延、ハンチントンタンパク質凝集体の減少、脳萎縮の抑制が観察された³⁸⁾。この結果は Ube3a 活性が HD 進行を抑制する上で重要であることを示唆し、Ube3a が HD の進行に関与することをサポートするものである。

4.4.2 アルツハイマー病と Ube3a

アルツハイマー病 (AD) は加齢と共に記憶や認知機能の進行的低下を伴う神経変性疾患である。AD の病理学的特徴としてアミロイドβ (Aβ) ペプチドの異常な凝集が挙げられ、アミロイド前駆体 (APP) が切断されることで生成される。AD モデルマウスでは凝集 Aβ の増加と共に不溶画分での Ube3A 存在量は増加する³⁸⁾。さらに、Ube3A を欠損させた AD モデルマウス (AD/Ube3A KO) は寿命が AD モデルマウスよりも有意に短縮する³⁹⁾。通常、齧歯類は新規物体を好む習性は認知機能の評価として用いられるが、8ヶ月齢以降の AD/Ube3A KO マウスは同齢 AD マウスよりも新規物体への嗜好が低下し、認知機能の低下がより進行する³⁹⁾。これらの結果から Ube3a が AD の進行に関与することが示唆される。

5 まとめ

UPS 関連タンパク質、特に E3 ユビキチンリガーゼは脳・神経細胞の発達、神経細胞の遊走、軸索の伸長や分岐、シナプスの成熟、機能の調節において役割を果たしている。また、Ube3a や Znrfl は神経発達、神経変性どちらにも関与し、UPS によるタンパク質のターンオーバーの制御は生涯にわたり正常な神経機能の維持に重要であることが考えられる。神経発達障害のメカニズムの解明には、特定の神経回路に関わる神経間の結合において、どのような分子的、電気生理学的異常が起こることによって行動異常に至るのか明らかにする必要がある。UPS 機能破綻が神経の発達、成熟に影響し、どの、またはどのように神経回路の異常をきたし、行動異常を起こすのか明らかになっていない部分は多く、神経発達障害のメカニズムの解明において、今後重大な課題と言える。

参考文献

- 1) Homberg, J. R. et al. Genetic and environmental modulation of neurodevelopmental disorders: Translational Insights from Labs to beds. *Brain Res. Bul.* 125, 79(2006).
- 2) Upadhyay, A. et al. E3 ubiquitin ligases neurobiological mechanisms: Development to degeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 151(2017).
- 3) Ebstein, F. et al. Neurodevelopmental disorders (NDD) caused by genomic alterations of the Ubiquitin-Proteasome System (UPS): The possible contribution of immune dysregulation to disease pathogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 733012(2021).
- 4) Pinto, M. J. et al. The ubiquitinated axon: Local control of axon development and function by Ubiquitin. *The Journal of Neuroscience*, 41, 2796(2021).
- 5) Watts, R.J. et al. Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis: evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron*, 38, 871(2003).
- 6) Raff, M.C. et al. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296, 868(2002).
- 7) Salvadores, N. et al. Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* 11, 451(2017).
- 8) Tagliaferro, P., Burke, R.E. Retrograde axonal degeneration in Parkinson disease. *J. Parkinsons Dis.* 6, 1(2016).
- 9) Kneynsberg, A. et al. Axonal degeneration in tauopathies: disease relevance and underlying mechanisms. *Front. Neurosci.* 11, 572(2017).
- 10) Lim, K., Tan, J. M. Role of the ubiquitin proteasome system in parkinson's disease. *BMC Biochemistry*, 8, Suppl 1(2007).
- 11) Petanjek, Z. et al. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13281(2011).
- 12) Wakatsuki, S. et al. ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 13, 1415(2011).
- 13) Cosker, K.E., Eickholt, B.J., 2007. Phosphoinositide 3-kinase signaling events controlling axonal morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 207(2007).
- 14) Wakatsuki, S., Furuno, A., Ohshima, M., Araki, T., 2015. Oxidative stress-dependent phosphorylation activates ZNRF1 to induce neuronal/axonal degeneration. *J. Cell Biol.* 211, 881(2015).
- 15) Geden, M.J., Deshmukh, M. Axon degeneration: context defines distinct pathways. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 108(2016).
- 16) Wakatsuki, S. et al. GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration. *J. Cell Biol.* 216, 477(2017).
- 17) Youle, R.J., Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47(2008).
- 18) Germain, M., Slack, R.S. Dining in with BCL-2: new guests at the autophagy table. *Clin. Sci. (Lond)* 118, 173(2009)
- 19) Lum, J.J. et al. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 439(2006).
- 20) Ravichandran, K.S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445(2011).
- 21) Sakuragi, T., Nagata, S. Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24(8), 576(2023)

- 22) Brown, G.C., Neher, J.J. Eaten alive! cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem. Sci.* 37, 325(2012).
- 23) Wakatsuki, S., Araki, T. NADPH oxidases promote apoptosis by activating ZNRF1 ubiquitin ligase in neurons treated with an exogenously applied oxidant. *Commun. Integr. Biol.* 9, e1143575(2016).
- 24) Belambri, S.A., et al. NADPH oxidase activation in neutrophils: role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.*, 48, e12951(2018).
- 25) Araki, T. et al. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel gene discovery. *J. Biol. Chem.* 276, 34131(2001).
- 26) Dong, Z. et al. CUL3 deficiency causes social deficits and anxiety-like behaviors by impairing excitation-inhibition balance through the promotion of Cap-dependent translation. *Neuron*, 105(3), 475(2020).
- 27) Liao, Y. et al. Molecular correlates of age-dependent seizures in an inherited neonatal-infantile epilepsy. *Brain*, 133(5), 1403(2010)
- 28) James, T. F. et al. The Nav1.2 channel is regulated by GSK3. *BBA*, 1850(4), 832 (2015).
- 29) Mukhtar, T., Taylor, V. Untangling cortical complexity during development. *J. Exp. Neurosci.*, 12, 1(2018).
- 30) Wagstyl, K. et al. Multiple markers of cortical morphology reveal evidence of supragranular thinning in schizophrenia. *Transl. Psychiatry*, 6(4), 1 (2016).
- 31) Qian, X. et al. Sliced human cortical organoids for modeling distinct cortical layer formation. *Cell Stem Cell*, 26(5), 766(2020).
- 32) Luo, Y. et al.. PTPA activates protein phosphatase-2a through reducing its phosphorylation at tyrosine-307 with upregulation of protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell Res*, 1833(5), 1235(2013).
- 33) Wang, J. et al. Ube3a-mediated PTPA ubiquitination and degradation regulate PP2A activity and dendritic spine morphology. *PNAS*, 116(25), 12500(2019).
- 34) Sell, G. L. et al. Deleting a UBE3A substrate rescues impaired hippocampal physiology and learning in Angelman Syndrome Mice. *Sci. Rep*, 11, 1(2011).
- 35) Wallace, M. L. et al. Maternal loss of UBE3A produces an excitatory/inhibitory imbalance through neuron type-specific synaptic defects. *Neuron*, 74, 5,(2012).
- 36) Sun, A. X. et al. Potassium channel dysfunction in human neuronal models of Angelman syndrome. *Science*, 366, 6472, 1486(2019).
- 37) Maheshwari, M. et al. 2014. Deficiency of ube3a in Huntington's disease mice brain increases aggregate load and accelerates disease pathology. *Hum. Mol. Genet*, 23(23), 6235(2014).
- 38) Shekhar, S., et a. Topoisomerase 1 inhibitor topotecan delays the disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet*, 26(2), 420(2016).
- 39) Singh, B. K. et al. UBE3A deficiency inhibits amyloid plaque formation in APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet*, 26(20), 4042(2017).

総 説

質量分析イメージングを用いた酵素組織化学

Enzyme histochemistry using mass spectrometry imaging

新聞 秀 — 1, 2, 3 *

要旨

生体組織試料上の酵素反応を可視化する手法として酵素組織化学と呼ばれる方法が1930年代に開発された。この手法で酵素反応を検出するには、一般的に基質と酵素を反応させた後、得られた反応生成物をさらに呈色反応させ顕微鏡観察を行う。すなわち、既存手法では、基質と酵素の一次反応および呈色させる二次反応が必要となる。本稿で取り上げる新しい酵素組織化学では、呈色反応による顕微鏡観察に代わり質量分析計で反応生成物を試料表面から直接検出する。すなわち、組織表面上で直接質量分析を行うことにより、酵素機能の局在を可視化することが可能となる。本総説では、これまで開発した質量分析イメージングによる酵素組織化学手法について解説する。

はじめに

組織内での酵素分布を知る方法として、免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) が一般的に用いられている。IHCでは、酵素の存在は可視化できるがその活性を知ることはできない。IHCでは得られない、酵素活

性分布を可視化する手法として酵素組織化学が1930年代に開発された^{1,2)}。従来の酵素組織化学では、試料表面へ基質を供給し、内在性の酵素反応により産生された物質に対し、呈色反応を行うことで可視化する。既存の酵素組織化学では、この呈色反応のステップに汎用性があるとは言い難く、呈色反応のステップを都度、設計する必要があることから、酵素組織化学自体の汎用性は低かった。また、ここで用いられる呈色反応は定量性が乏しいという問題も挙げられる。

本研究では、これらの課題を解決するために酵素反応で産生された分子を質量分析イメージング (mass spectrometry imaging: MSI) にて可視化する方法を開発した。本総説では、ターゲット酵素としてアセチルコリンエステラーゼ (AChE)、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) ならびにグルタミン酸でカルボキシラーゼ (GAD) とした。具体的には、マウス脳ならびにショウジョウバエにおけるAChE反応の分布を可視化³⁾、マウス脊髄におけるChAT反応の分布を可視化⁴⁾、最後にマメ科植物⁵⁾と大麦⁶⁾におけるGAD反応の可視化について解説したい。

所属：大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

¹ 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻

Graduate School of Engineering, Osaka University

² 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所

Osaka University Shimadzu Analytical Innovation Laboratory

³ 大阪大学先導的学際研究機構

Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives

* 責任著者

e-mail: sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

Phone: +81-6-6879-7418

Running title: Novel enzyme histochemistry

Keywords: 質量分析イメージング；酵素組織化学；コリンエステラーゼ；コリンアセチルトランスフェラーゼ；グルタミン酸脱炭酸酵素；マウス脳；ショウジョウバエ；マウス脊髄；マメ科植物；大麦

MSI を用いた酵素組織化学のワークフロー

MSI を用いた酵素反応の可視化は極めてシンプルな手順で実施可能である。具体的な手順を図1に示すが、観察する試料から凍結切片を回収し、その表面に酵素反応の基質をスプレーにて供給する。反応後、代謝物を質量顕微鏡と呼ばれる iMScope で検出することで、生体内の酵素反応分布を可視化できる。

マウス脳における AChE 反応の分布

ここでは野生型マウス脳を用いて、AChE 反応の分布の可視化を試みた。AChE は、アセチルコリンを基質としコリンと酢酸に分解する酵素である。したがって、ここでは基質としてアセチルコリンを試料表面に供給し、分解産物であるコリンを検出した。MSI を用いた酵素組織化学では、内在性の代謝物(ここではコリン)と区別するために、基質として一般的に重水素ラベル化された基質を用いている。ここでは、アセチルコリン-d9 を基質とし、コリン-d9 を検出した(図2)。

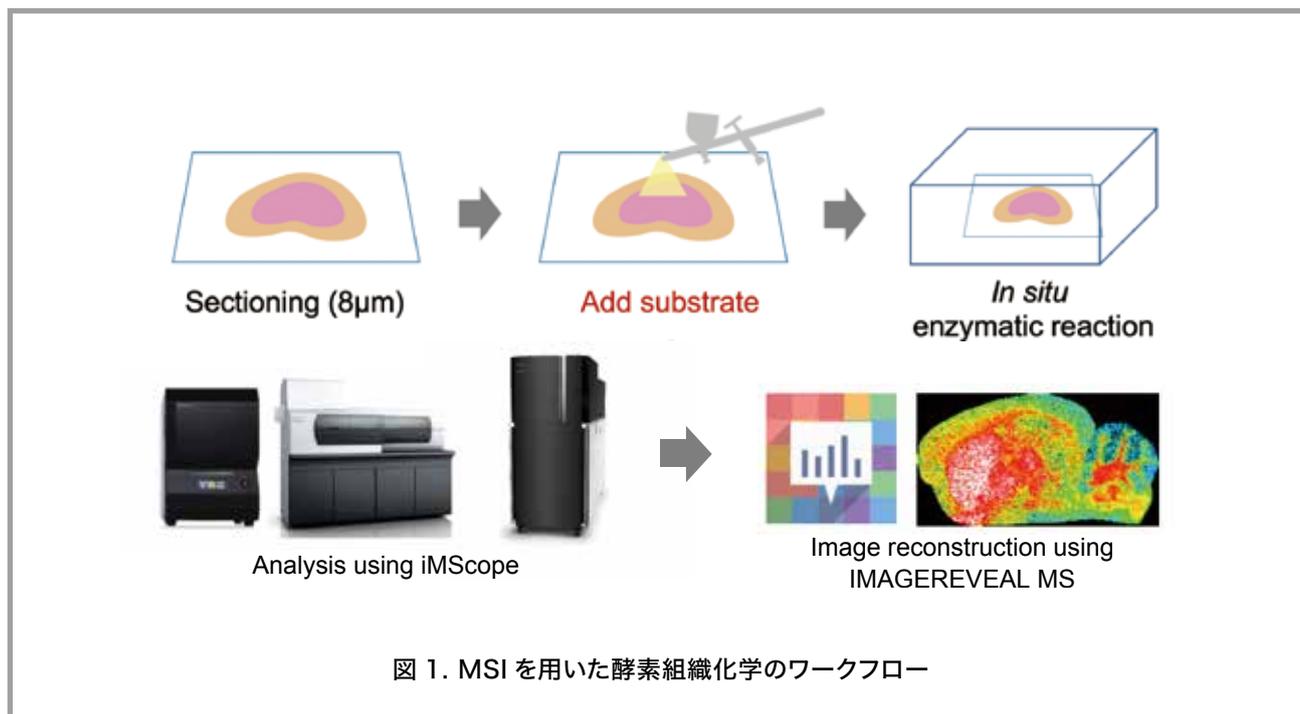


図 1. MSI を用いた酵素組織化学のワークフロー

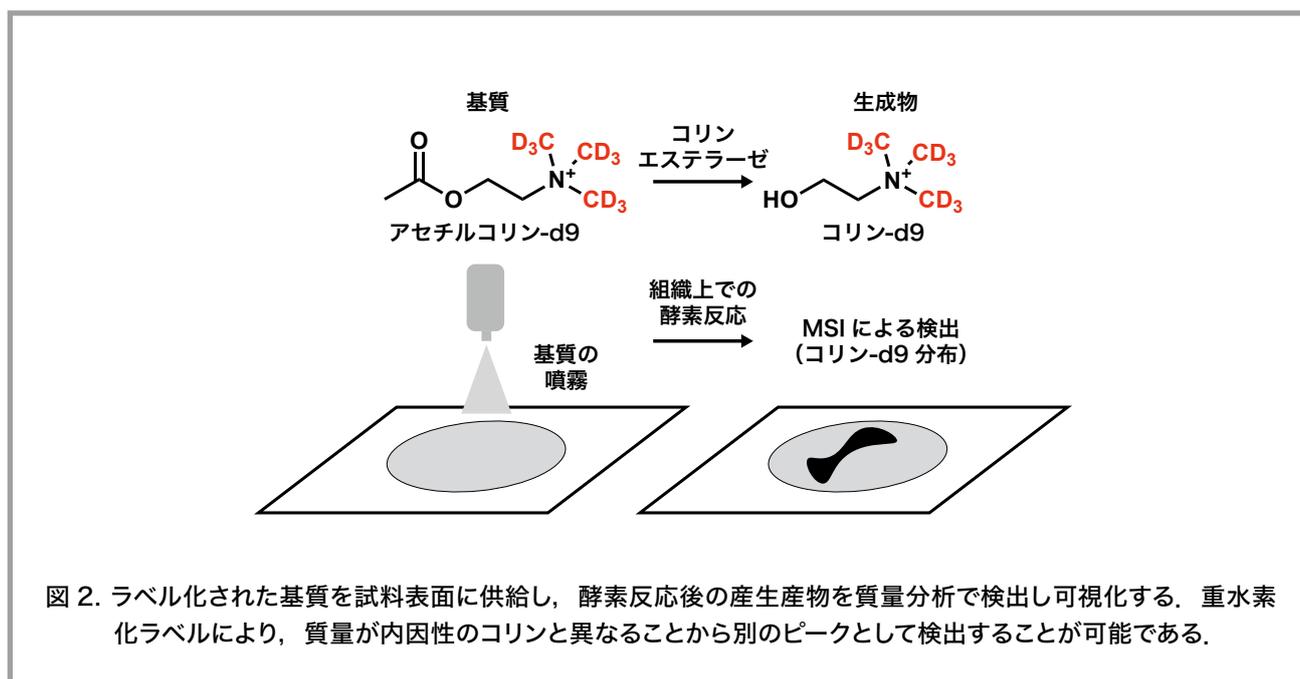


図 2. ラベル化された基質を試料表面に供給し、酵素反応後の産生産物を質量分析で検出し可視化する。重水素化ラベルにより、質量が内因性のコリンと異なることから別のピークとして検出することが可能である。

質量分析で用いるマトリックスは α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α -CHCA, シグマアルドリッチ) を用い、その供給には iMLayer (島津製作所) による蒸着と α -CHCA のスプレー噴霧を組み合わせた⁷⁾。MSI 測定は iMScope TRIO (島津製作所) を用い、解析は IMAGEREVEAL MS (島津製作所) を用いた (図 1)。

基質供給後、アセチルコリン-d9 は試料表面に噴霧後速やかにコリン-d9 に分解することが確認され、反応時間 5 分でプラトーに達しアセチルコリン-d9 が枯渇することが確認された (図 3A)。したがって、酵素反応を可視化するにあたり 5 分以内の反応で十分であることを確認

した。アセチルコリン d-9 分布とコリン d-9 分布像から、IMAGEREVEAL MS で演算を行い最終的な AChE 反応分布を得た。その結果、AChE 反応は線条体 (CPu)、海馬 (HP) ならびに視床下部 (TH) で高くなり、脳梁 (CC) 並びに小脳皮質 (CBX) では低い傾向を示すことがわかった (図 3B)。この結果を、既存の酵素組織化学の結果と比べたところ、非常に良い一致が得られたため本手法の PoC を確認することができた。また、iMScope での高解像度イメージングという特徴を生かし、脳の海馬領域における酵素反応も可視化することが可能となった (図 3C, 3D)。

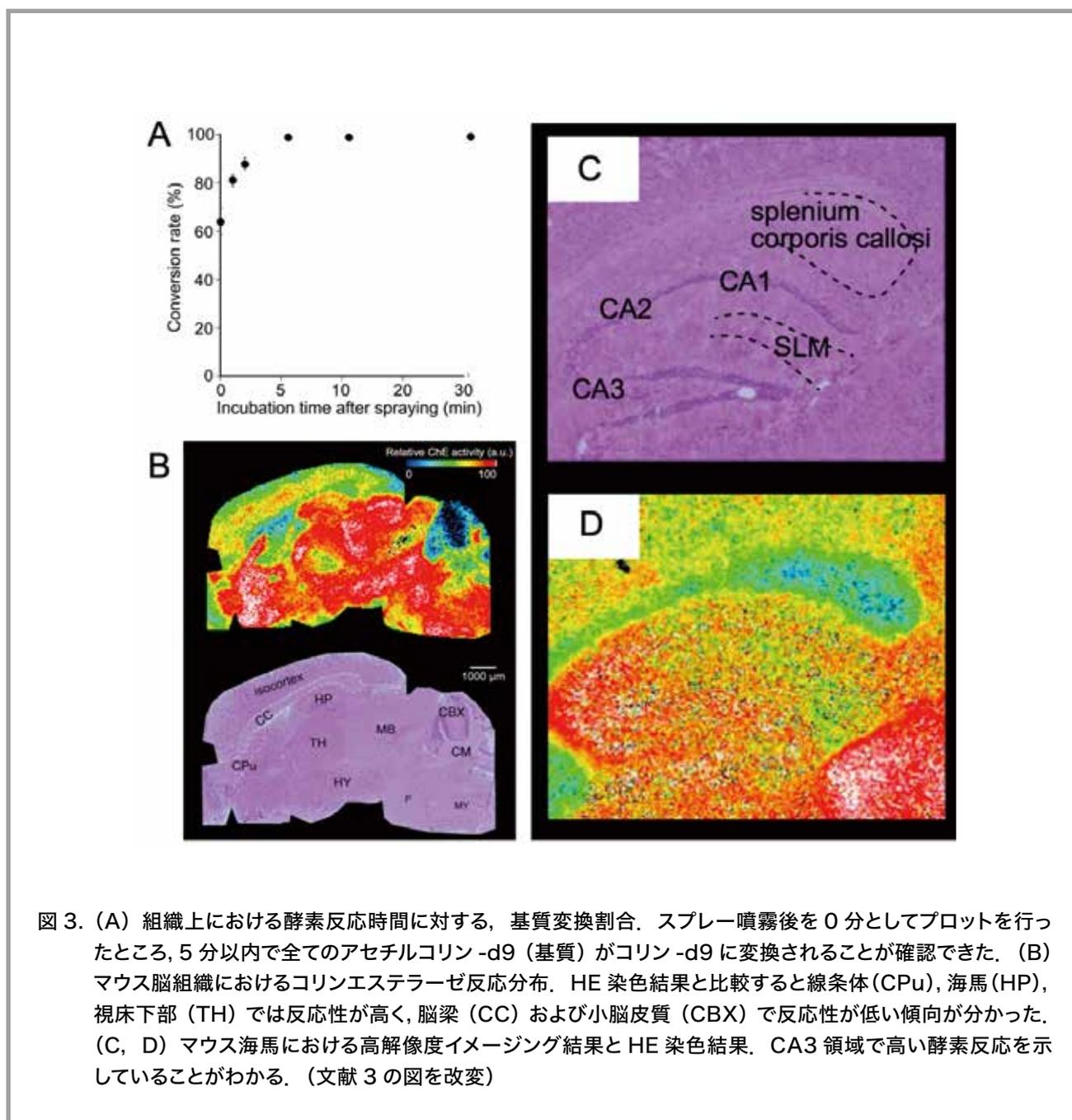


図 3. (A) 組織上における酵素反応時間に対する、基質変換割合。スプレー噴霧後を 0 分としてプロットを行ったところ、5 分以内で全てのアセチルコリン-d9 (基質) がコリン-d9 に変換されることが確認できた。(B) マウス脳組織におけるコリンエステラーゼ反応分布。HE 染色結果と比較すると線条体 (CPu)、海馬 (HP)、視床下部 (TH) では反応性が高く、脳梁 (CC) および小脳皮質 (CBX) で反応性が低い傾向が分かった。(C, D) マウス海馬における高解像度イメージング結果と HE 染色結果。CA3 領域で高い酵素反応を示していることがわかる。(文献 3 の図を改変)

また本手法を異種動物であるショウジョウバエにも適用した。図4に示したように、AChE活性はショウジョウバエ体内中で偏在しており、頭部の大脳部において非常に高い反応性、胸腹部においても高い反応性が確認できた。頭部において特に高い反応性が見られるという結果は先行研究の報告とも一致しており⁸⁾、これは中枢神経系の頭部神経節におけるコリン作動性神経中のAChEによるものであると唆される。一方、腹部におけるChE活性は中枢神経系のAChEによるものではないと考えられる。AChEは神経系以外にも血リンパに存在することが報告されており⁹⁾、さらに、Zador et al.は神経細胞上に存在する膜結合型AChE以外に構造の異なる可溶型AChEが存在すると述べている¹⁰⁾。今回確認された腹部AChE活性の存在はこれらの報告と一致しており、本手法によって得られたChE活性局在の妥当性を示している。

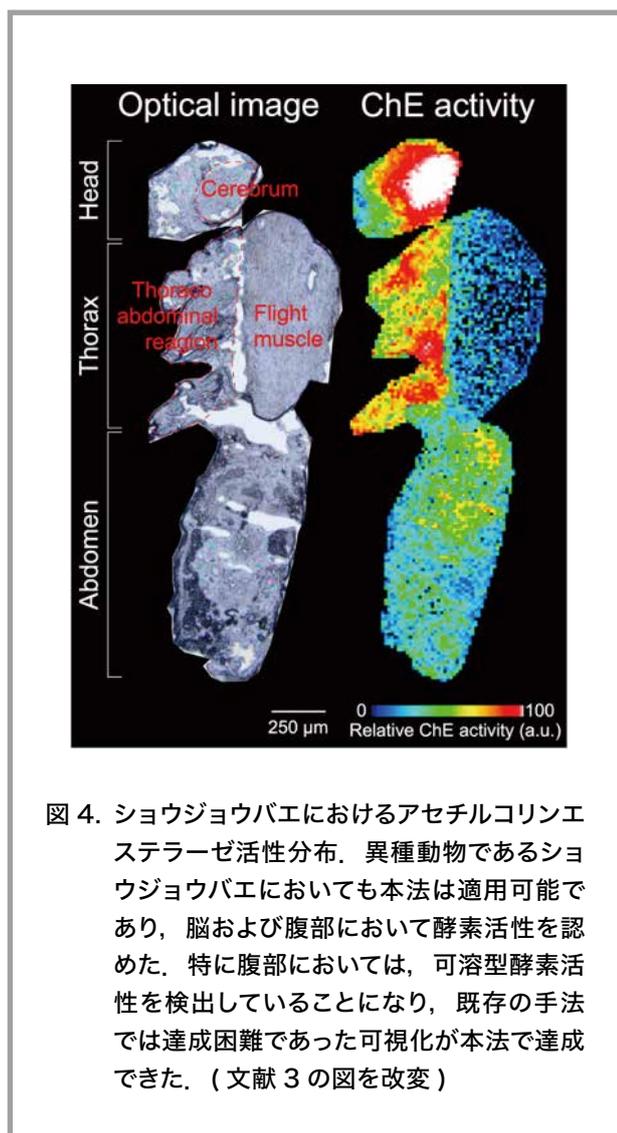


図4. ショウジョウバエにおけるアセチルコリンエステラーゼ活性分布。異種動物であるショウジョウバエにおいても本法は適用可能であり、脳および腹部において酵素活性を認め、特に腹部においては、可溶型酵素活性を検出していることになり、既存の手法では達成困難であった可視化が本法で達成できた。(文献3の図を改変)

マウス脊髄におけるChAT反応の分布

ChATはコリンにアセチル基を転移する酵素であり、その反応には図5に示す通りコリンとアセチルCoAが必要である。また、生成されたアセチルコリンは速やかにAChEで分解されるため、ChAT反応の可視化においてはAChEの阻害剤であるフィソスチグミンを基質溶液に添加する。また、基質としてコリン-d9を用いることで、内因性のアセチルコリンと酵素反応で産生されたアセチルコリンを区別することが可能となる。

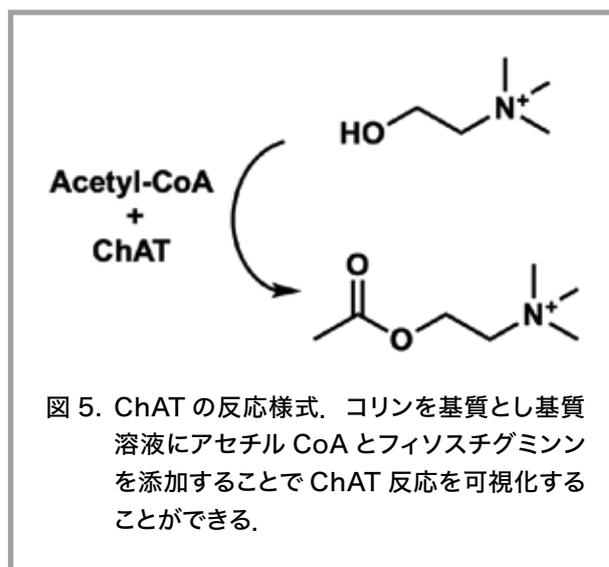


図5. ChATの反応様式。コリンを基質とし基質溶液にアセチルCoAとフィソスチグミンを添加することでChAT反応を可視化することができる。

この実験系をマウス脊髄に適用した結果を図6に示す。図6は髄鞘を青く染めるルクソールファストブルー(LFB)とヘマトキシリンエオシン(HE)の多重染色結果と抗ChAT抗体を用いたIHC結果並びにMSIを用いたChAT反応の分布が示されている。LFB染色とHE染色の結果から脊髄の断面に特徴的なバタフライ様の灰白質が露わになっている。またIHCの結果より前根(ventral root)と前角(anterior horn)でChAT陽性部位が染色されていることがわかる。これらの結果とMSIによるChAT反応の結果を見比べると前根と前角でChAT反応が亢進していることがわかる。また、各部位によるChAT反応を定量化したバーグラフにおいてもanterior hornとventral rootで反応が最大である一方、白質では強度が低いことがわかる。

IHC染色結果とMSIの結果を見比べるとIHCでChATが陽性ではない、前根と前角をつなぐ間でも酵素反応が起きていることがわかる。すなわち、IHCの結果とChAT可視化の結果で矛盾が生じていることになる。これ

について筆者は、IHC では染めることができない可溶性 ChAT の分布が MSI の結果では描出されているものと考えている。実際、ヒトの脊髄では前根と前角をつなぐ間で可溶性 ChAT が存在することが報告されている。

マメ科植物と大麦における GAD 反応の分布

これまで哺乳類や昆虫を中心として酵素反応の分布を示してきたが、本手法は植物に対しても適用可能であるという特徴がある。アミノ酸の一種である γ -aminobutyric acid (GABA) を L-グルタミン酸から脱炭酸反応によって生成する反応を触媒する酵素である GAD 反応の分布について紹介する。GABA はすでによく知られている分子であるが、この分子の生合成の理解は食品化学の分野においても植物生理学の分野においても重要である。特に、植物体内において GABA はシグナル伝達、pH の調整、C/N 比の調整、生物的 / 非生物的なストレスへの応答などの役割を担っている¹¹⁾。またダイズ¹²⁾、イネ¹³⁾、オオムギ¹⁴⁾ などの様々な植物の発芽段階で増加することが報告されており、GABA は種子発芽段階にも重要な役割を

担っていると考えられている。また、GABA 高含有食品が注目されており、大豆などのマメ科植物の発芽種子は GABA 高含有食品として流通している。以上の点から、発芽過程における GABA 生合成に関わる GAD 酵素の局在の分布の理解は、発芽過程における GAD が植物種子の発芽過程にどのように寄与しているかの解明にもつながると考えられる。

GAD 可視化ではグルタミン酸-d3 を基質として、それが酵素反応で変換される GABA-d3 を検出している。GAD の可視化にあたり、反応時間の検討、反応温度の検討及び反応溶媒 pH の検討を行い、それぞれ 3 分、60°C および pH5.8 とした。この最適条件のもとで発芽大豆種子の GAD 反応を可視化した結果を図 7 に示す。図 7A で見られるように GABA-d3 強度は子葉部で極めて低く、胚軸部で高い強度を示した。特に、胚軸部においては子葉部とは反対側の先端部において高い強度を示すという結果が得られた。この結果より発芽種子においては子葉部ではなく主に胚軸部において GAD 活性が高かったと考えられる。

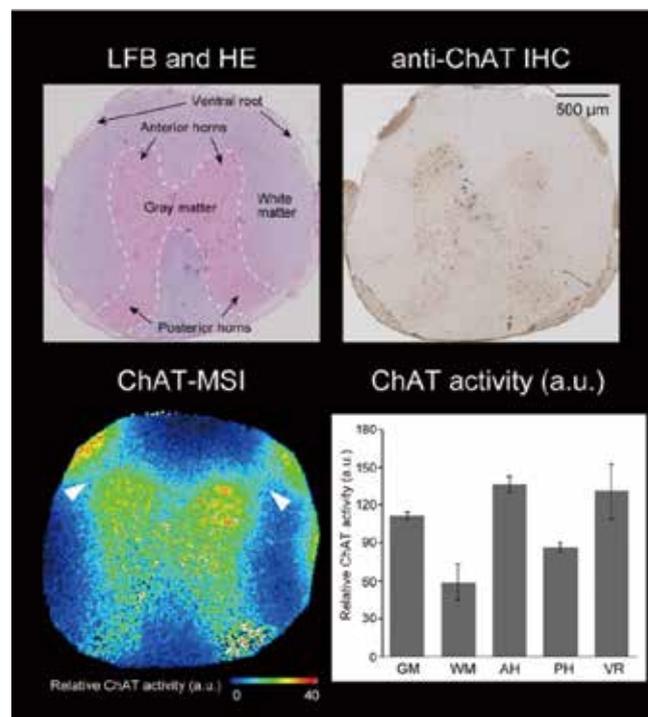


図 6. マウス脊髄における組織染色結果と ChAT 反応分布ならびに反応強度比較結果。MSI による ChAT 反応分布の結果より前根と前角を結ぶ領域 (矢頭) でも酵素反応が起きていることがわかる。IHC の結果で陽性部位でないことから、この反応を担う ChAT は IHC で染めることができない可溶性 ChAT であることが考えられる。スケールバー: 500 μ m。(GM: 灰白質, WM: 白質, AH: 前角, PH: 後角, VR: 前根)

図 7A に示した発芽種子全体の分布の中で、胚軸部において組織学的な構造に由来する分布の偏りが見られた。このことから、胚軸部において高解像度分析を試みた（レーザー照射間 15 μ m）。分析した結果を図 7B に示した。この分布結果から、胚軸内の Vascular system と Root meristem で高い強度で GABA-d3 が分布していることが認められた一方、Root parenchyma ではこれら 2 領域に比べて GABA-d3 の強度が低かった。この結果は、MSI を用いた高解像度測定により初めて明らかになった事実である。

本節の冒頭で、オオムギの発芽段階でも GAD が増加することを述べたが、その反応の強さも可視化することが可能である。以下では最後に、オオムギの発芽において塩分ストレスを与えた場合の有無で GAD 反応がどのように変わるかを調べた結果を示す。オオムギにおいても反応

時間の検討、反応温度の検討及び反応溶媒 pH を検討し、その結果ダイズ種子と同じ条件であることを確認し、測定を進めた。最適条件下での測定結果を図 8 に示す。図 8A は発芽段階における GAD 反応分布変化であり、図 8B はアリューロン層における GAD 反応分布の高解像度測定結果である。図 8A より塩分ストレス条件下では播種後 12 時間で胚における GAD 反応が亢進しており、48 時間まで高い強度が保たれている。また胚乳においても、塩分ストレス下では GAD 反応が亢進する傾向にあることがわかる。さらに 12 時間の時点で特筆すべき点として、塩分ストレスにより最外層のアリューロン層において GAD 反応が亢進していることである。アリューロン層での高解像度測定結果を図 8B に示したが、外層の形状に沿って GAD 反応が亢進していた。

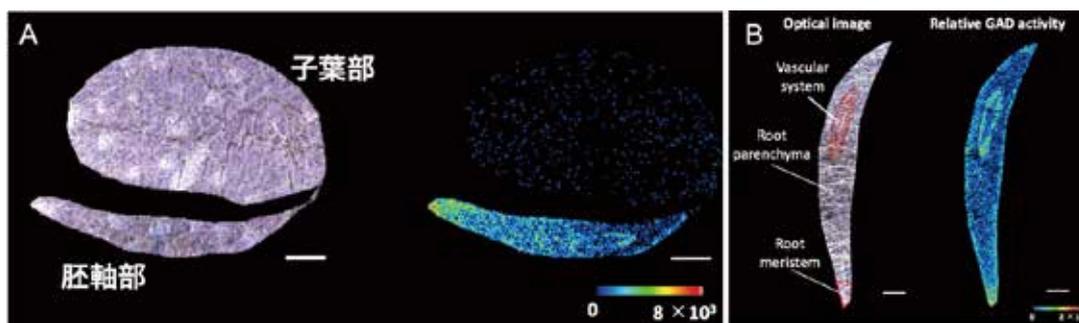


図 7. 発芽大豆における GAD 反応可視化結果。(A) pH 5.8, 60°C, 反応時間 3 分での GABA-d3 分布。最適条件下で MSI を行うことで発芽ダイズ切片において胚軸部でイオンの蓄積が見られた。(B) ダイズ種子胚軸部での高解像度イメージング結果。スケールバー：(A) 3 mm, (B) 1 mm。(文献 5 の図を改変)

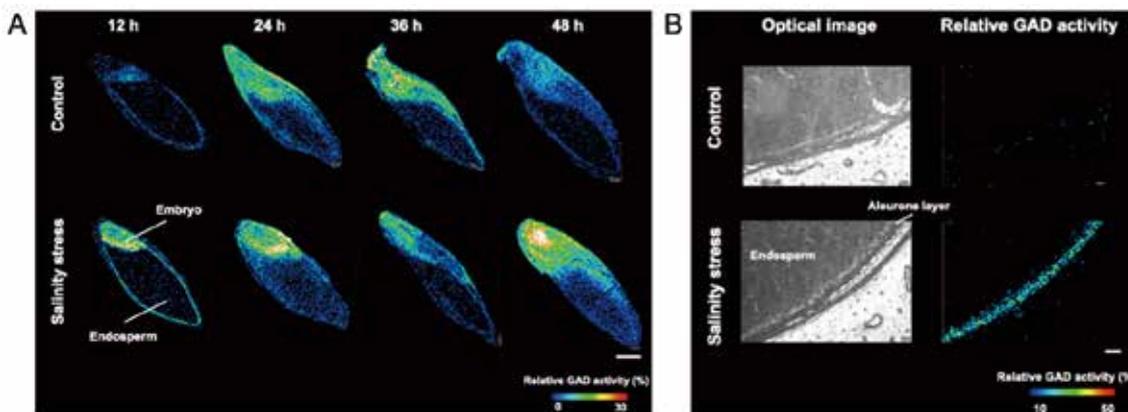


図 8. 塩分ストレス下における発芽オオムギ中の GAD 反応分布可視化結果。(A) 播種後 48 時間までの反応分布の時間経過。(B) アリューロン層における GAD 反応分布。スケールバー：(A) 1 mm, (B) 200 μ m。(文献 6 の図を改変)

まとめ

本研究によって、MSIを応用した酵素組織化学法によって哺乳類、ショウジョウバエ、植物種子におけるAChE、ChATおよびGAD反応の局在を可視化することに初めて成功した。MSIを用いた酵素組織化学により、これまで見る事ができなかった酵素の働きが可視化できるようになり、それが生体内の様々な部位に局在していることが明らかになった。まだまだ解決すべき課題は多いが、現在筆者のグループではストレスマウス脳内におけるGAD反応の可視化や生鮮食品の褐変現象の理解のためのチロシナーゼ反応可視化手法について取り組んでいる。様々な酵素反応が本手法で可視化できるよう、今後も研究開発を継続していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Takamatsu, H. Histochemische Untersuchungen der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Trans. Soc. Path. Japan* 29, 429 (1939)
- 2) Gomori, G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 42, 23 (1939)
- 3) Takeo E, Fukusaki E, Shimma S. A mass spectrometric enzyme histochemistry method developed for visualizing in situ cholinesterase activity in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*. *Anal. Chem.* 92, 12379 (2020)
- 4) Takeo E, Sugiura Y, Ohnishi Y, Kishima H, Fukusaki E, Shimma S. Mass Spectrometric Enzyme Histochemistry for Choline Acetyltransferase Reveals De Novo Acetylcholine Synthesis in Rodent Brain and Spinal Cord. *ACS Chem. Neurosci.* 12, 2079 (2021)
- 5) Ikuta S, Shinohara N, Fukusaki E, Shimma S. Mass spectrometry imaging enables visualization of the localization of glutamate decarboxylase activity in germinating legume seeds. *J Biosci Bioeng.* 134, 356 (2022)
- 6) Ikuta S, Fukusaki E, Shimma S. Visualization of Glutamate Decarboxylase Activity in Barley Seeds under Salinity Stress Using Mass Microscope. *Metabolites.* 12, 1262 (2022)
- 7) Shimma S, Takashima Y, Hashimoto J, Yonemori K, Tamura K, Hamada A. Alternative two-step matrix application method for imaging mass spectrometry to avoid tissue shrinkage and improve ionization efficiency. *J Mass Spectrom.* 48, 1285 (2013)
- 8) Toutant, J. P., Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol.* 32, 423 (1989)
- 9) Chadwick, L. E., Actions on Insects and Other Invertebrates. In *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*, Koelle, G. B., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1963; pp 741-798.
- 10) Zador, E., Tissue specific expression of the acetylcholinesterase gene in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 218, 487 (1989)
- 11) Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C.: The versatile GABA in plants, *Plant Signal Behav.*, 16, e1862565 (2021)
- 12) Matsuyama, A., Yoshimura, K., Shimizu, C., Murano, Y., Takeuchi, H., and Ishimoto, M.: Characterization of glutamate decarboxylase mediating gamma-amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max* [L.] Merr), *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 538 (2009)
- 13) Zhao, G., Xie, M., Wang, Y., and Li J.: Molecular mechanisms underlying γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in giant embryo rice seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 65 4883 (2017)
- 14) AL-Quraan N., AL-Ajlouni Z., and Obedat

D.: The GABA shunt pathway in germinating seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress, *Seed Sci Res.*, 29, 250 (2019)

総 説

メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送

中 津 史

イントロダクション

脂質は、細胞膜やオルガネラ膜などの生体膜の構成要素としてだけでなく、エネルギー産生、シグナル伝達、膜輸送など、様々な重要な役割を担う。真核生物において、多くの脂質は小胞体で合成され、その後細胞内の様々な場所へ輸送されることで正しく機能する¹⁾。ひとたび脂質の輸送や分布に異常をきたすと、細胞機能は滞り、細胞は病に陥る。つまり、多様で複雑な脂質の機能は、その輸送システムに大きく依存している。

細胞内における脂質輸送には、小胞輸送を介した膜輸送による機構と、輸送小胞によらない機構に大別される。近年の研究から、細胞内脂質分布の制御には後者の小胞輸送非依存経路が重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。特に、オルガネラ同士が部分的に接する特殊な領域を介して脂質が輸送小胞非依存的に輸送されている実体も明らかになりつつある。本総説では、細胞内脂質輸送の制御と機能について、特に筆者が着目しているイノシトールリン脂質によるオルガネラ間脂質輸送を中心に概説したい。

細胞機能を支えるイノシトールリン脂質

イノシトールリン脂質はリン脂質の一種であり、細胞内の総リン脂質の10～15%程度を占める²⁾。頭部には細胞質に露出したイノシトール環を持ち、その3位、4位、または5位に可逆的にリン酸化・脱リン酸化修飾を受け、7種の異なるイノシトールリン脂質種が生成される³⁾(図1A)。これらのイノシトールリン脂質は、細胞内の異なるコンパートメントに異なる濃度で分布している⁴⁾(図1B)。例えば、ホスファチジルイノシトール-4,5ビスリン酸(PI(4,5)P₂)は細胞膜に豊富に存在するが、その主要な前駆体であるホスファチジルイノシトール-4リン酸

(PI4P)はより広く分布している。ホスファチジルイノシトール-3,4,5トリスリン酸(PI(3,4,5)P₃)も主に細胞膜に分布しているが、特定の条件下で局所的にそのレベルが一時的に増加する。また、ホスファチジルイノシトール-3リン酸やホスファチジルイノシトール-3,5ビスリン酸(PI(3,5)P₂)は、それぞれエンドソームやリソソームに多く存在する。このような各イノシトールリン脂質種に特異的な細胞内分布は、イノシトールリン脂質キナーゼやホスファターゼなどによる時間・空間的な制御で作られ(図1BおよびC)。そして、これが細胞膜やオルガネラ膜に“個性”を与え、各生体膜で起こる様々な生体反応の時間・空間的な制御を可能にしている⁴⁾。

PI4Pの機能と制御

イノシトール環の4位にリン酸化されたPI4Pは、真核生物において最も豊富なイノシトールリン脂質の一つであ

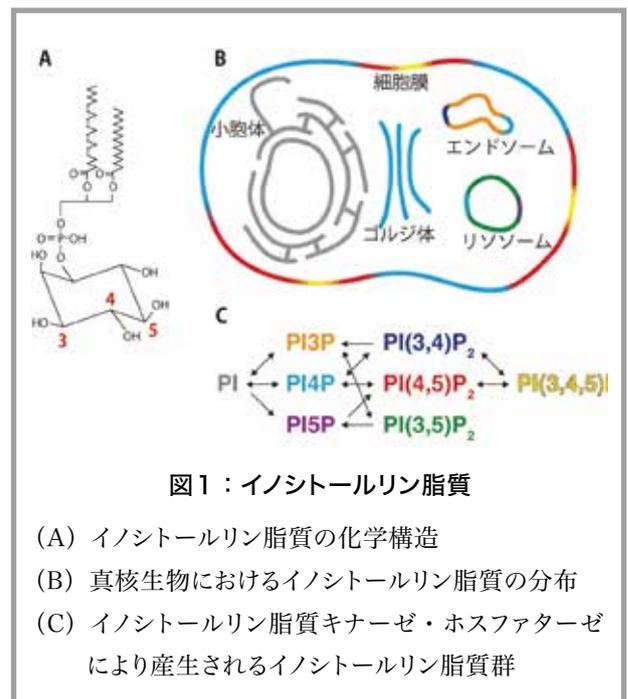


図1：イノシトールリン脂質

- (A) イノシトールリン脂質の化学構造
- (B) 真核生物におけるイノシトールリン脂質の分布
- (C) イノシトールリン脂質キナーゼ・ホスファターゼにより産生されるイノシトールリン脂質群

る。その新規合成は、基質であるホスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環の4位をリン酸化するホスファチジルイノシトール 4 キナーゼ (phosphatidylinositol 4-kinase: PI4K) によって媒介される³⁾。哺乳動物では、2つの III 型 PI4Ks (PI4KIII α と PI4KIII β) および2つの II 型 PI4Ks (PI4KII α と PI4KII β) の計4つの PI4Ks が存在する⁵⁾。I 型 PI4K も以前には存在したが、その後の機能解析から3位をリン酸化する酵素 (つまり PI3K) であることが判明したため、現在は存在しない。PI4P の細胞内分布は、それぞれの PI4Ks の局在および作用部位によって決定される。PI4P は主に細胞膜、ゴルジ体、およびエンドソーム / リソソームに分布しており、これらの PI4P プールはそれぞれ PI4KIII α , PI4KIII β , および PI4KII α または PI4KII β によって合成される。

PI4P の機能や制御については、PI (4,5) P₂ に比べ大きく遅れていた。特に細胞膜においては、その主な機能は PI (4,5) P₂ の前駆体としての役割だと信じられていた。しかし筆者は、豊富に存在することには何か理由があり、PI (4,5) P₂ の前駆体としての機能以外に重要な役割があるはずだと考え、まずは細胞膜における合成メカニズムの解明に着手した。研究開始当時、哺乳動物細胞における細胞膜の PI4P 合成メカニズムはほとんどわかっていなかった。酵母を用いた遺伝学的解析から、酵母では stt4 が細胞膜 PI4P 合成に必須の PI4K であることが知られており、その哺乳類オルソログである PI4KIII α が哺乳動物細胞においては細胞膜 PI4P 合成を担うと予想されていた。ところが実際には、PI4KIII α の細胞膜局在を示す証拠が得られず、代わりに小胞体、ゴルジ体もしくは核に局在する等の諸説が提唱されていたことから、哺乳動物細胞における PI4P 合成機構は大きな謎に包まれていた。筆者はこの重要課題に取り組み、それまで開始コドンであると信じられていたメチオニンをコードする部位が実は開始コドンではなく、それまでの全長 cDNA には N 末端側 59 アミノ酸をコードする配列が欠けていたことを見出した。さらに新たな PI4KIII α 結合分子群 (EFR3A/B および TTC7A/B) を同定し、全長 PI4KIII α は新規結合分子群と複合体を形成することで細胞膜に局在することを示した。機能的には、PI4KIII α 欠損細胞において、細胞膜 PI (4,5) P₂ 欠損に伴う異常 (クラスリン被覆小

胞形成異常やアクチン骨格形成異常等) が見られたことから、PI4KIII α は細胞膜 PI (4,5) P₂ の前駆体である PI4P の合成に必須であることが示された。また、PI4KIII α 欠損細胞では、細胞膜コレステロールの減少や細胞膜局在分子の異所性局在が生じたことから、PI4KIII α により合成される PI4P は、細胞膜のアイデンティティ確立に重要な役割を担っていることが明らかとなった⁶⁾。さらに、酵母 sfk1 のオルソログである TMEM150A も PI4KIII α の機能制御に関与していることが判明した⁷⁾。現在では、PI4KIII α は EFR3A/B, TTC7A/B, TMEM150A および FAM126A/B と複合体を形成することで細胞膜 PI4P 合成を制御していることが明らかになっている (図 3 参照)。

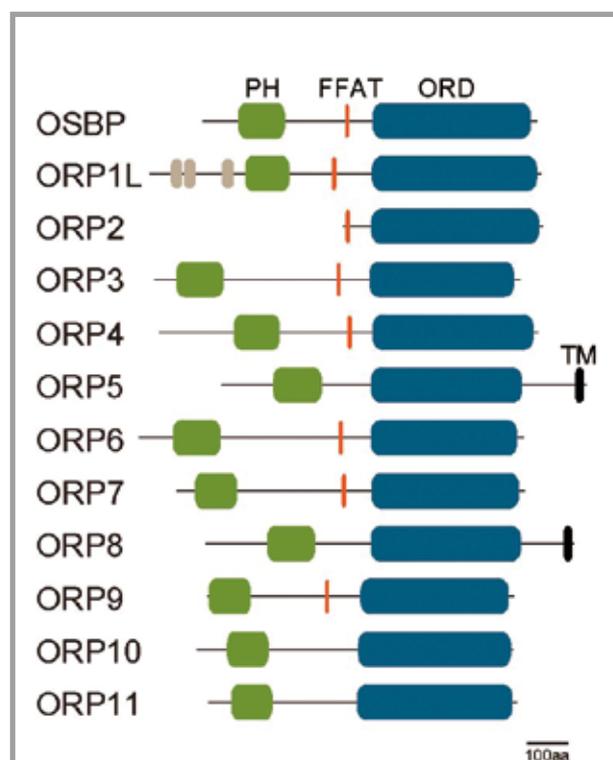


図2：オキシステロール結合タンパク質ファミリー

哺乳類におけるオキシステロール結合タンパク質ファミリーは12分子種から構成され、脂質輸送ドメインである ORD を共通機能ドメインとして有する。その他、膜結合に必要な PH ドメイン、VAP タンパク質との結合に必要な FFAT モチーフや、小胞体膜にアンカーされる膜貫通領域を有する。

PH, pleckstrin homology; FFAT, two phenylalanines (FF) in an acidic tract; ORD, oxysterol-related domain; TM, transmembrane

PI4Pの新機能：メンブレンコンタクトを介した脂質交換輸送

前述の PI4KIII α による細胞膜 PI4P 合成制御機構を調べる過程で、興味深い知見を得た。小胞体の Ca^{2+} レベルが低下すると、小胞体におけるカルシウムセンサーである STIM1/2 がこれを検知してオリゴマー化し、細胞膜カルシウムチャネル Orai1 に結合することで Ca^{2+} 流入を促進して小胞体へ Ca^{2+} を補充する機構 (store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) が存在する。PI4KIII α 欠損細胞では、この SOCE がうまく作動しないことを見出した⁶⁾。SOCE の際には小胞体と細胞膜が近接する“メンブレンコンタクト”が形成されることから、細胞膜 PI4P は小胞体と細胞膜のメンブレンコンタクト形成に何らかの役割があるのではないか、と考えた。

これと並行して、PI4P が関与するもう1つの興味深い知見が報告された。オキシステロール結合タンパク質 (oxysterol-binding protein-related proteins: ORPs) ファミリー (図 2) は、真核生物に高度に保存された脂質転送タンパク質 (Lipid transfer proteins: LTPs) である⁸⁾。酵母には7遺伝子、哺乳動物には12遺伝子が存在する。酵母 osh4 をモデルとした解析から、osh4 はコレステロールと PI4P を *in vitro* で交換輸送する活性があることが示された。それまで osh4 を含む ORP ファミリーはステロールを (一方向に) 輸送する活

性を有することは示されてはいたが、他の脂質がリガンドとなり得ることや、交換輸送する活性があることは知られておらず、この研究は大きな衝撃を与えた⁹⁾。

そこで筆者らは、細胞膜 PI4P が ORP ファミリーによる脂質輸送制御に関与するのではないかと考え、哺乳動物の ORP ファミリーの局在を詳細に検討した。すると、ORP5 および ORP8 が小胞体と細胞膜が近接したメンブレンコンタクト、すなわち小胞体—細胞膜コンタクトに局在することを見出した。ORP5 および ORP8 は ORP ファミリーの IV 群に属し、ドメイン構造の特徴が類似している (図 2)。両タンパク質ともに PH ドメイン、リンカー領域、リガンド結合領域である ORD、および膜貫通ドメインを有する。種々の解析から、ORP5 および ORP8 の膜貫通ドメインは小胞体にアンカーされること、そして PH ドメインが細胞膜の PI4P (および PI (4,5) P₂) を認識して細胞膜と結合することで小胞体と細胞膜を近接させ、メンブレンコンタクトを形成することが判明した。さらなる詳細な解析から、ORP5 および ORP8 は PI4P とホスファチジルセリンの2つの脂質をリガンドとすること、そしてこの2種の脂質を交換輸送する活性を有することを見出した。実際に ORP5 および ORP8 機能欠損細胞では細胞膜 PI4P レベルが上昇するとともにホスファチジルセリンレベルは減少する。また PI4KIII α 欠損細胞においても、ホスファチジル

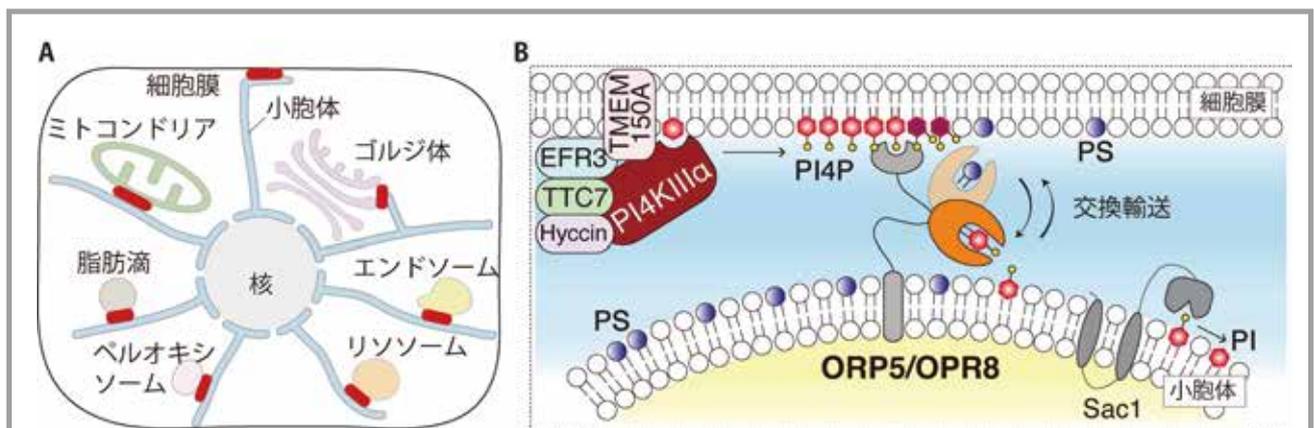


図 3：小胞体—細胞膜コンタクトにおける ORP5 および ORP8 による脂質交換輸送

- (A) メンブレンコンタクト (赤) とは、細胞膜やオルガネラ同士が 10-30nm 程度の距離で近接した領域を指す。小胞体はほとんど全てのオルガネラや細胞膜とメンブレンコンタクトを形成する。
- (B) ORP5 および ORP8 は、細胞膜で合成された PI4P に結合して小胞体—細胞膜コンタクトを形成する。そして細胞膜から PI4P を小胞体へ輸送し、小胞体から細胞膜へホスファチジルセリンを輸送する。これは、細胞膜と小胞体の間に形成された PI4P の濃度勾配により駆動することから PI4P 駆動型脂質交換輸送と呼ばれる。詳細は本文参照。

セリンレベルの減少が脂質分析から明らかになった¹⁰⁾。

これらの結果から、ORP5 および ORP8 は小胞体—細胞膜コンタクトを介して PI4P とホスファチジルセリンを交換輸送していることが判明した (図 3)。ORP5 および ORP8 は、まず PH ドメインによる細胞膜 PI4P との結合を介して小胞体と細胞膜をテザリングすることでメンブレンコンタクトを形成し、PI4KIII α により合成された PI4P を細胞膜から小胞体に輸送する。そして今度は小胞体で合成されたホスファチジルセリンを受け取り、これを細胞膜へと逆輸送する。このように、PI4P が細胞膜から小胞体へと流れることで、ホスファチジルセリンの小胞体から細胞膜への輸送が促進される。つまり、ORP5 および ORP8 によるホスファチジルセリンの輸送は、PI4P が駆動していたのである¹⁰⁾。

では、この脂質の輸送の方向性はどのようなメカニズムで説明されるだろうか？それは PI4P が鍵となっている。PI4P は細胞膜に豊富に存在する。これは、細胞膜に局在する PI4KIII α の作用による。一方で小胞体には PI4P はほとんど存在しない。これは小胞体に局在する PI4P 脱リン酸化酵素 (Sac1) の作用による。つまり、細胞膜と小胞体の間には PI4P の濃度勾配が存在し、PI4P は細胞膜 (= 高濃度 PI4P) から小胞体 (= 低濃度 PI4P) へと一方向に輸送される。これが、ホスファチジルセリンの逆向きの輸送、つまり小胞体から細胞膜への輸送方向を決定する、というモデルである (図 3)。このモデルは、『細胞膜で合成された PI4P を、なぜわざわざ小胞体へ輸送して代謝しているのか』という別の疑問も説明できる。すなわち、小胞体から細胞膜へホスファチジルセリンを輸送する駆動力を生み出すために、小胞体における PI4P レベルを低く保つための戦略と考えられる¹¹⁾。

小胞体—エンドソームコンタクトにおける PI4P/ ホスファチジルセリン交換輸送

前述のとおり、哺乳動物において ORP ファミリーは 12 種存在するが、細胞内における脂質交換輸送活性が証明されているのは OSBP (小胞体—ゴルジ体間コンタクト)¹²⁾、ORP5 および ORP8 (小胞体—細胞膜間コンタクト)¹⁰⁾ のみであった。ORP ファミリーの脂質輸送ドメインの構造予測解析から、全ての ORP ファミリーの脂質輸送ドメインには共通して PI4P が結合する可能性が高いことが報告されており、PI4P は ORP ファミリーに共通したリガンド脂

質である可能性が示唆されていた。このことから、“PI4P 濃度勾配が駆動する脂質交換輸送”メカニズムは、ORP ファミリーに共通した特性である可能性が考えられた。そこでこの仮説を検証するため、PI4P が存在するにもかかわらず脂質交換輸送が証明されていないオルガネラであるエンドソームに着目した。エンドソームに局在する ORP ファミリー分子を様々なエンドソームマーカーを指標に探索したところ、機能未知である ORP10 がエンドソームに局在することが判明した。さらなる細胞内局在解析から、ORP10 は Rab7 陽性エンドソームに強く局在すること、また ORP10 によるエンドソーム局在は、自身の PH ドメインによる PI4P の認識が重要であることも判明した。

ORP10 の局在解析において、ORP10 陽性のエンドソームの多くは小胞体に近接していた。そこで、ORP10 が小胞体—エンドソームコンタクトに局在する可能性とその分子機構の解明を試みた。ORP ファミリー分子の多くは、FFAT モチーフと呼ばれる小胞体タンパク質・VAPA/VAPB 結合モチーフを介して小胞体に局在する。しかし、ORP10 のアミノ酸配列を解析したところ FFAT モチーフ様配列の存在は確認できなかった。そこで、ORP10 は他のタンパク質に結合することでメンブレンコンタクトに局在する可能性を想定し、ORP10 結合タンパク質を生化学的手法により網羅的に探索したところ、その筆頭候補分子として ORP9 を得た。ORP9 は FFAT モチーフを有しており、VAP タンパク質と結合することが知られていたことから、ORP10 は ORP9 に結合することで ORP9 と共に小胞体—エンドソームコンタクトに局在する可能性が示唆された。そこで ORP10、ORP9 および VAPB の局在を調べたところ、これら 3 者は共局在し、小胞体—エンドソームコンタクトを形成した。ORP10 の小胞体—エンドソームコンタクト局在における ORP9 依存性を調べるため、ORP9 欠損細胞を樹立して ORP10 の局在を調べたところ、予想どおり ORP10 の小胞体—エンドソームコンタクトへの局在が消失した。これらの結果から、ORP10 は自身の PH ドメインによる PI4P 認識と、ORP9 への結合に依存して、小胞体—エンドソームコンタクトに局在することが明らかになった。

ORP10 は PI4P とホスファチジルセリンを交換輸送する

ORP10 は、脂質輸送ドメインでホスファチジルセリンに

結合することは報告されていたが、もう一つのリガンド脂質は未同定であった。そこで、まず ORP10 のリガンド脂質の同定を試みた。ORP10 の脂質輸送ドメインを培養細胞から精製し、どのようなリガンド脂質を包含しているかを質量分析により解析したところ、PI4P がリガンド脂質となることを突き止めた。そこで、人工脂質二重膜(リポソーム)を用いた *in vitro* 脂質交換輸送アッセイにより ORP10 の脂質交換輸送活性を検討したところ、ORP10 は PI4P とホスファチジルセリンを交換輸送する活性を有することが確認された。さらに、培養細胞内における脂質交換輸送活性を、ラパマイシンを用いたヘテロ2量体化法によりメンブレンコンタクトを化学ツールにより操作することでイメージング評価したところ、ラパマイシン添加によりエンドソーム膜の PI4P は徐々に減少する一方、ホスファチジルセリンは上昇した。このことから、ORP10 は小胞体とエンドソーム間のメンブレンコンタクトにおいて PI4P とホスファチジルセリンを交換輸送する活性を有することが示唆された。

さらに、ORP10 欠損細胞を用いて ORP10 の脂質交換輸送能を検証した。ORP10 欠損細胞では、エンド

ームのホスファチジルセリン量が顕著に減少していたことから、ORP10 はホスファチジルセリンをエンドソームに正常に供給するのに必須であることが判明した。ところが、エンドソームの PI4P 量は、欠損細胞とコントロール細胞で差が見られなかった。この原因は ORP9 であると考えられた。つまり、ORP9 は PI4P 輸送活性が認められていることから、ORP10 欠損細胞においてエンドソーム PI4P 量に変化がないのは ORP9 による機能補償のためであると予想した。事実、ORP9 欠損細胞におけるエンドソーム PI4P 量は、コントロール細胞に比べて増加していた。したがって、ORP10 は小胞体—エンドソームコンタクトにおいて、エンドソームの PI4P を小胞体へ輸送すると同時に、小胞体からホスファチジルセリンをエンドソームへ交換輸送していることが明らかになった。

ORP10 による脂質交換輸送は、エンドソームにおける逆行輸送を制御する

最後に、ORP10 による PI4P とホスファチジルセリンの交換輸送が担う細胞機能を解析した。ORP10 欠損細胞ではエンドソームのホスファチジルセリン量が減少していたことから、ホスファチジルセリンに依存してエンドソームに局在するエンドソームタンパク質分子の局在異常が予想さ

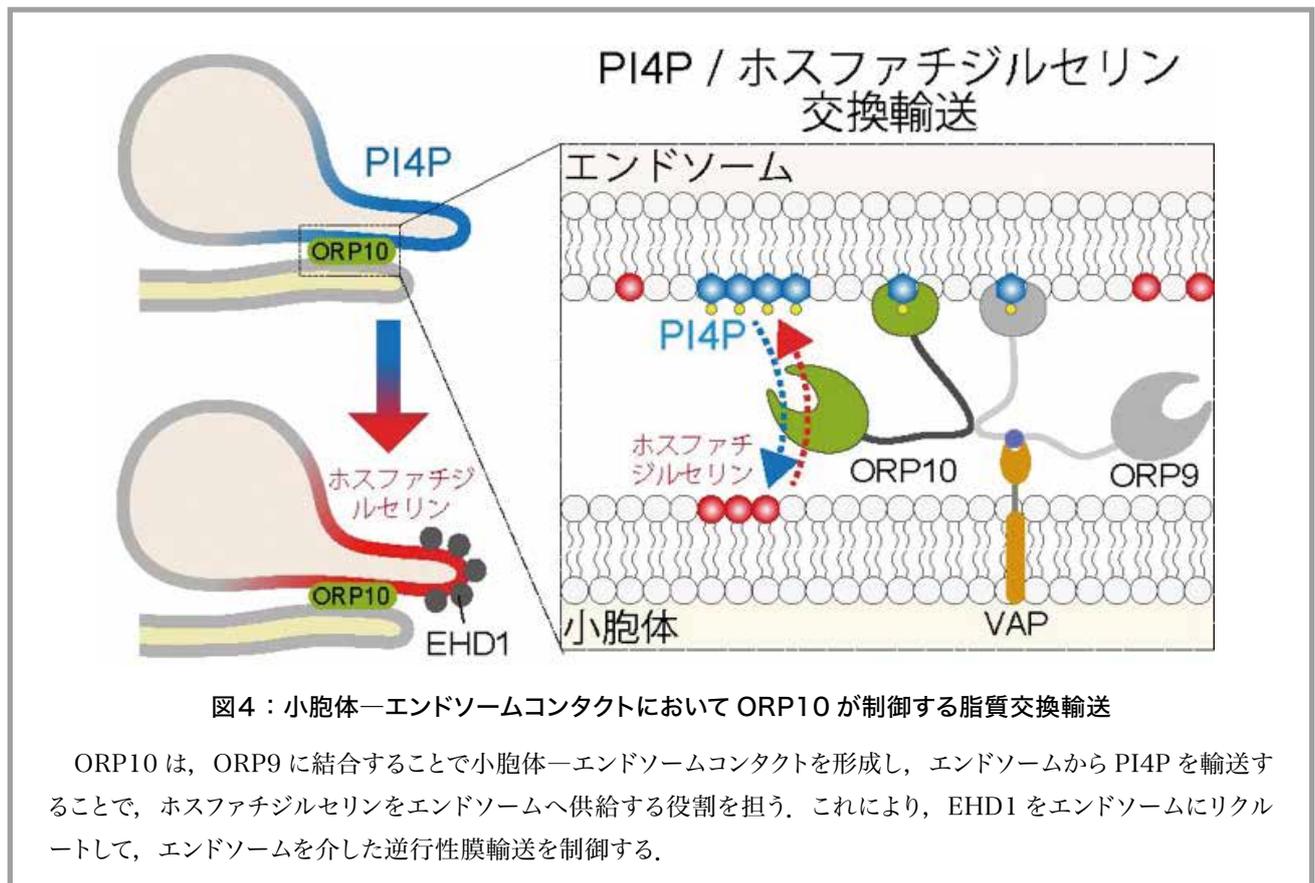


図4：小胞体—エンドソームコンタクトにおいて ORP10 が制御する脂質交換輸送

ORP10 は、ORP9 に結合することで小胞体—エンドソームコンタクトを形成し、エンドソームから PI4P を輸送することで、ホスファチジルセリンをエンドソームへ供給する役割を担う。これにより、EHD1 をエンドソームにリクルートして、エンドソームを介した逆行性膜輸送を制御する。

れた。そこで、EHD1（ホスファチジルセリン依存的にエンドソームに局在する AAA ATPase）に着目してその局在を調べたところ、ORP10 欠損細胞ではそのエンドソーム局在が減少していた。EHD1 は、エンドソームからトランスゴルジ網への逆行輸送の際にエンドソーム膜の分裂を促進する ATPase であることが報告されている。そこで ORP10 欠損細胞におけるエンドソーム膜分裂をライブイメージングにより定量解析したところ、ORP10 欠損細胞ではエンドソーム膜の分裂に要する時間がコントロール細胞に比べて顕著に増大していた。事実、逆行性輸送制御を受けることが知られているカーゴ受容体であるマンノース 6 リン酸受容体の輸送を調べたところ、ORP10 欠損細胞ではトランスゴルジ網への輸送が遅延しており、内在性のマンノース 6 リン酸受容体はエンドソームに異常蓄積していた。

以上の結果から、ORP10 は PI4P の濃度勾配を利用した脂質交換輸送活性によりエンドソームへホスファチジルセリンを供給することで EHD1 をリクルートし、エンドソームからトランスゴルジ網への逆行輸送を制御することが判明した¹³⁾ (図 4)

おわりに

PI4P は細胞膜、ゴルジ体、エンドソーム・リソソームなど広範に分布し、量的にも豊富に存在するが、その意義は十分にわかっていなかった。また、PI4P はこれら細胞膜やオルガネラ膜で合成された後に、小胞体へ輸送されて分解される意義も不明であった。しかし、PI4P が駆動するメンブレンコンタクトを介した ORPs による交換輸送制御の実体が明らかになり、その謎の一部が解けた。つまり、PI4P はメンブレンコンタクトを介して小胞体へ輸送されることで自身の代謝経路が構築されており、これが小胞体で合成された脂質を細胞内各所に分配する駆動力として利用されていたのである¹¹⁾。そしてこの交換輸送システムを作動させるために、PI4P は広範な膜に豊富に存在するのかもしれない。しかし一方で、不明な点は実に多い。メンブレンコンタクトの時空間制御、輸送される脂質種や輸送制御機構、生理機能や疾患との関わりなど、解明しなければならない多くの課題が次々と見えてきた。自分らしいアプローチと視点で、これらの課題に正面から挑んでいきたい。

謝辞

今回紹介した研究は、多くの共同研究者やスタッフの方々のご協力のもとに行われたものです。この場を借りて深く感謝いたします。また、ORP10 に関する研究は（公財）日本応用酵素協会による援助のもとに行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) van Meer G., et al.: Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 112 (2008) .
- 2) Vance J. E.: Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* 16 1 (2014) .
- 3) Balla T.: Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* 93 1019 (2013) .
- 4) Di Paolo G., De Camilli P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443 651 (2006) .
- 5) Balla A., Balla T.: Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol.* 16, 351 (2006) .
- 6) Nakatsu F., et al.: PtdIns4P synthesis by PI4KIII α at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity. *J. Cell Biol.* 199 1003 (2012) .
- 7) Chung J et al.: Plasticity of PI4KIII α interactions at the plasma membrane. *EMBO Rep.* 16 312 (2015) .
- 8) Raychaudhuri S., Prinz W. A.: The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 157 (2010) .
- 9) de Saint-Jean M., et al.: Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J. Cell Biol.* 195 965 (2011) .
- 10) Chung J., et al.: Intracellular transport. PI4P/ phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane

contacts. *Science* 349, 428 (2015b) .

- 11) Nakatsu F, Kawasaki A, Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 9, 664788 (2021) .
- 12) Mesmin B., et al.. A four-step cycle driven by PI (4) P hydrolysis directs sterol/PI (4) P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* 155, 830 (2013) .
- 13) Kawasaki A et al., PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.* 221, e202103141 (2022) .

CD38とBST1

夜久圭介, 中川 崇

【はじめに】

老化制御に関連する分子として、近年補酵素である nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) が注目を集めている。NAD⁺ は補酵素としてさまざまな代謝経路を制御するだけでなく、タンパク質の翻訳後修飾や DNA 修復過程、mRNA の修飾など多様な生理機能を有している。一方で、体内の NAD⁺ 量は加齢に伴って減少することが知られており、NAD⁺ 量の減少は NAD⁺ 依存的な過程の破綻からさらなる老化を引き起こすと考えられている。この NAD⁺ 減少には、NAD⁺ 分解酵素である CD38 の関与が示唆されている。また、CD38 にはパラログである Bone marrow stromal antigen 1 (BST1) が存在し、CD38 と BST1 は加齢や炎症によってその発現が上昇し、NAD⁺ の分解を促進すると考えられている。本稿では、CD38 と BST1 について、その機能や生理的役割、疾患との関わりについて概説する。

【CD38 と BST1 の酵素活性】

哺乳類 CD38 の酵素活性はアメフラシの ADP-ribosyl cyclase とのアミノ酸配列の相同性から見出された。ADP-ribosyl cyclase と同様に、CD38 は NAD⁺ を分解し、cyclic ADP-ribose (cADPR) とニコチンアミドを生成する。また、CD38 は cADPR を加水分解し、ADPR に変換する酵素活性を有している¹⁾。一方で、CD38 は酸性条件下において NAD⁺ phosphate (NADP⁺) の分子内のニコチンアミドをニコチン酸に置換し、nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) を合成する塩基交換反応を触媒する。CD38 によって生じる cADPR と NAADP はいずれも、細胞質へのカルシウムイオンの動員を促進すると考えられている。

BST1 は関節リウマチの骨髄間質細胞に高発現し、前駆 B 細胞の増殖を促進する因子として同定された。BST1 は CD38 のパラログであり、CD38 と同様に BST1 は NAD⁺ から cADPR を合成するとされていたが、CD38 と

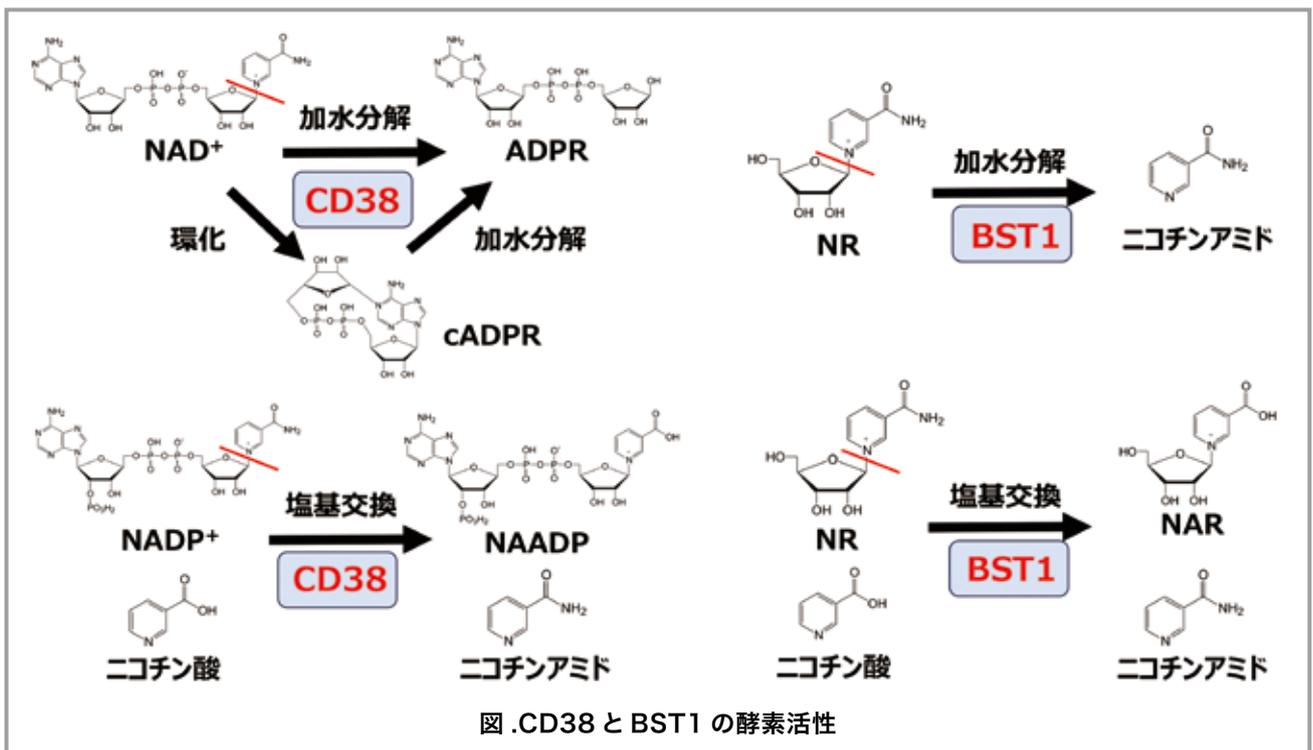


図 .CD38 と BST1 の酵素活性

比較してその活性は非常に低いと考えられていた。近年、筆者らは、CD38はcyclase活性をもつものの、BST1はほとんど活性を示さないことを報告した²⁾。一方で、BST1はNAD⁺代謝の中間代謝物であるnicotinamide riboside (NR)に対する分解活性を示した。また、BST1は単にNRを分解するだけではなく、NRとニコチン酸を用いてnicotinic acid riboside (NAR)を合成する塩基交換反応を触媒する活性を有していた²⁾。CD38は酸性下で塩基交換反応を行うため、生体内で本反応が機能する場所は限られるが、BST1は中性付近で高い塩基交換活性を有しており、生体内の様々な場所で本反応を行うと期待される。

【CD38とBST1の組織局在】

CD38は胸腺やリンパ節、骨髄などの免疫組織に強く発現している。ヒトでは脳や筋肉にも強い発現が認められており、脳ではアストロサイト、筋肉では平滑筋細胞に発現している。CD38はその他の組織にも偏在しており、主に組織中のT細胞やB細胞といった免疫細胞に発現するほか、筋組織や腺組織中の線維芽細胞に存在している。また、マウスでは大腸に強く発現しており、炎症性腸疾患との関与が示唆されている。

一方、BST1はCD38と同様に骨髄に発現するが、ヒトとマウスのいずれにおいても消化管、特に小腸の上皮細胞に強い発現が見られる。さらにヒトでは脳のオリゴデンドロサイトやミクログリア、気管支の繊毛細胞、腎臓の近位尿細管細胞、結腸のゴブレット細胞やパネート細胞、胎盤のホフバウアー細胞、精巣のセルトリ細胞、その他各組織の平滑筋や線維芽細胞、免疫細胞にBST1が発現している。また、BST1は血管内皮幹細胞や胎児期の視床下部への発現が確認されており、組織の分化や発生との関わりが示唆されている。

【CD38とBST1の生理機能】

CD38のcyclase活性は膵臓のインスリン分泌機構に関与していると考えられ、CD38を介したカルシウム動員がインスリン分泌を促進することが報告されている¹⁾。また、近年ではCD38の阻害によるNAD⁺量増加の有効性が注目を集めている。CD38の発現はIL-6やTNF- α といったSenescence Associated Secretory

Phenotype (SASP) 因子によって誘導される³⁾。実際に老化に伴ってCD38の発現は増加し、NAD⁺量の減少を引き起こす。一方でCD38の阻害剤の投与はNAD⁺量を回復させ、老化による耐糖能異常や筋機能の低下を改善することが報告されている⁴⁾。CD38の欠損や阻害の有効性は他の疾患に対しても検討されており、食事誘導性の肥満や、アルツハイマー病、虚血性心疾患、閉塞性腎疾患、関節リウマチなどに対して効果的であることが報告されている。

BST1は小腸に強く発現しており、陰窩における発現はカロリー制限によってさらに誘導される。誘導されたBST1はcADPRの産生を介して腸幹細胞の機能を調節すると考えられている⁵⁾。また、パーキンソン病患者を対象としたゲノムワイド関連解析から、BST1のイントロンにおけるSNPがパーキンソン病発症リスクと関わっていることが見出された⁵⁾。さらに、BST1欠損マウスは不安や抑鬱様行動を取ることが報告されている⁵⁾。これらの知見から、BST1が脳機能に関わっていることが示唆されるが、BST1がどのようにこれらの症状を引き起こすかについては不明である。また、BST1はCD38と同様に免疫細胞に発現し、老化や炎症によってその発現が誘導される。BST1の遺伝子欠損は虚血性腎障害に対して保護的であることが報告されており、BST1が炎症の進行に関わっていると考えられる。

このように、CD38とBST1はいずれも、炎症によって免疫細胞中で誘導される酵素であり、今後、炎症性疾患をはじめとしたさまざまな疾患の治療標的としての開発が期待される。

【参考文献】

- 1) Takasawa, S. CD38-Cyclic ADP-Ribose Signal System in Physiology, Biochemistry, and Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2022; 23
- 2) Yaku, K *et al.*: BST1 regulates nicotinamide riboside metabolism via its glycohydrolase and base-exchange activities. *Nat Commun.* 2021; 12: 6767.
- 3) Chini, CCS *et al.*: CD38 ecto-enzyme in immune cells is induced during aging and regulates NAD (+) and NMN levels. *Nat*

Metab. 2020; 2: 1284-1304.

- 4) Tarragó, MG *et al.*: A Potent and Specific CD38 Inhibitor Ameliorates Age-Related Metabolic Dysfunction by Reversing Tissue NAD (+) Decline. *Cell Metab.* 2018; 27: 1081-1095.e1010.
- 5) Yokoyama, S. Genetic polymorphisms of bone marrow stromal cell antigen-1 (BST-1/CD157) : implications for immune/inflammatory dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Front Immunol.* 2023; 14: 1197265.

【著者】

富山大学学術研究部医学系 分子医科薬理学講座

夜久 圭介, 中川 崇

糖脂質上のポリラクトサミン修飾の消失が期待される。 β 3GnT8は、 β 3GnT2と似て、高分岐N-結合型糖鎖のラクトサミンの非還元末端にGlcNAcを転移する(図1)¹⁾。そのため、GlcNAc転移酵素Vによる β 1-6分岐形成がN-結合型糖鎖上のポリラクトサミン形成に影響する。さらに β 3GnT8は β 3GnT2と複合体を形成すると、 β 3GnT2を活性化する²⁾。このようにポリラクトサミン生成には複雑な機構が存在する。

【疾患との関連】

ポリラクトサミンは、内在性レクチンで炎症に関わるガレクチンのリガンドとして機能し、ある種のポリラクトサミンは免疫細胞や多くの悪性腫瘍細胞に検出される。また、*B3gnt2*ノックアウトマウスではT細胞、B細胞の増殖が亢進し、*B3gnt5*ノックアウトマウスはB細胞の増殖が亢進したことから²⁾、 β 3GnT酵素の機能として炎症との関連が示唆されてきた。ゲノムワイド関連解析などから、*B3GNT2*がバセドウ病、関節リウマチ、強直性脊椎炎、乾癬と関連があることが示唆されている。また、がんとの関連では、*B3GNT2*の高発現膵臓癌は生存率が低い⁴⁾。悪性黒色腫では*BRAF*変異が多いが、*B3GNT2*は*BRAF*変異と関連するとされ、我々も*BRAF*阻害剤耐性細胞でその発現が上昇することを見出している。さらに最近、悪性黒色腫細胞を含む種々のがん細胞が細胞障害性T細胞の攻撃から逃れるための遺伝子として*B3GNT2*が挙げられた⁵⁾。がん細胞とT細胞の相互作用に関わる様々な分子のポリラクトサミン修飾により、2細胞種間の相互作用を阻害して、がん細胞がT細胞からの攻撃に耐性となると提唱している。*B3GNT3*も、肺癌、膵臓癌において高発現の場合生存率が低い⁴⁾。*B3GNT8*高発現の膵臓癌は生存率が高いが、子宮内膜腫では生存率が低い⁴⁾。大腸癌で高発現しており¹⁾、抗がん剤oxaliplatin耐性制御に関わる可能性が示されており⁶⁾、今後の解析が待たれる。

ポリラクトサミン構造は、広く、様々な複合糖質として存在する重要な糖鎖であるにも関わらず、その機能についての解析は多くない。ゲノムワイド解析や様々なデータベースから得られる情報のごく一部を紹介したが、 β 3GnTの様々な疾患への関与は明らかである。最近、 β 3GnT2の触媒ドメインと基質などとの複合体の結晶構造が報告され⁷⁾、その情報をもとに開発された β 3GnT2低分子量阻害剤が

本稿執筆中に報告された⁸⁾。今後臨床応用へ向けた改良や、他のB3GNTファミリー分子に対する阻害剤の開発などが待たれる。また、このような阻害剤により、ポリラクトサミンの生理機能解明が進むことが期待される。

【参考文献】

- 1) Togayachi, A. et al.: Cloning and characterization of β 1,3-glycosyltransferase family with a β 3GT motifs, Trends Glycosci. Glycotechnol., 19, 29 (2007) .
- 2) Togayachi, A. and Narimatsu, H.: Functional analysis of β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases and regulation of immunological function by polylectosamine, Trends Glycosci. Glycotechnol., 24, 95 (2012) .
- 3) Praissman, J.L., et al. :B4GAT1 is the priming enzyme for the LARGE-dependent functional glycosylation of α -dystroglycan, Elife., 3, e03943 (2014) .
- 4) <https://www.proteinatlas.org/>
- 5) Joung, J., et al. : CRISPR activation screen identifies BCL-2 proteins and B3GNT2 as drivers of cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity, Nat. Commun., 13, 1606 (2022) .
- 6) Shen, L., et al. : β 3GnT8 regulates oxaliplatin resistance by altering integrin β 1 glycosylation in colon cancer cells, Oncol. Rep., 39, 2006 (2018) .
- 7) Hao, Y., et al., : Structures and mechanism of human glycosyltransferase β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GNT2) , an important player in immune homeostasis, J. Biol. Chem., 296, 100042 (2021) .
- 8) Jackson, J.J.,et al., : Imidazolone as an amide bioisostere in the development of β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GNT2) Inhibitors, J. Med. Chem., 66, 16120 (2023).

【著者】

東京薬科大学 生命科学部 ゲノム情報医科学研究室
米田 敦子

酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成

原核生物のタンパク質品質管理機構に関与する ClpP を利用した細胞内的人為的分解制御

石川 文 洋

(近畿大学薬学部)

【目的】

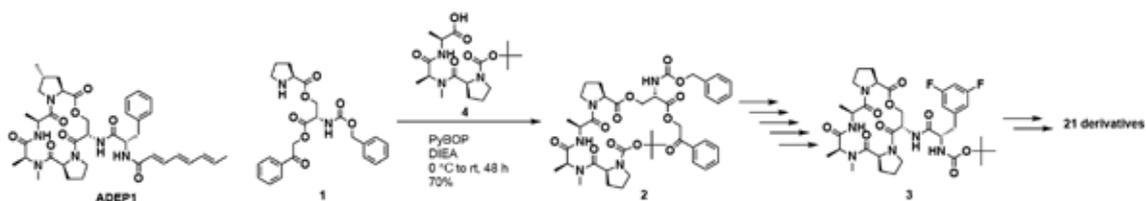
原核生物の細胞内タンパク質分解は、基質タンパク質を認識し、アンフォールディングさせ、迅速かつ不可逆的に標的タンパク質を分解するシステムである¹⁾。細胞内タンパク質分解装置複合体は、ATPase およびタンパク質分解酵素 (ClpP) により形成される。ATPase は基質タンパク質を解きほぐし、ClpP 活性部位への送り込みを、ClpP は基質タンパク質の加水分解を担う。*Streptomyces hawaiiensis* から単離されたアシルデブシペプチド (ADEP1) が、薬剤耐性菌を含むさまざまな病原菌に抗菌活性を示すことが報告された²⁾。ADEP1 の作用機序は、ADEP1-ClpP 複合体による細胞分裂に必須なタンパク質 FtsZ の分解に基づく²⁾。ADEP1 を基盤に、ClpP を自在に操作・制御することができれば、革新的なタンパク質ケミカルノックダウン技術の開発が期待されるだけでなく、次世代型抗生物質開発へ新しい戦略の創出につながる。そこで本研究では、*Bacillus subtilis* をモデルとして ClpP の機能を制御する化合物を開発し、細胞内でのタンパク質分解を人為的に制御することを目的とした。

【方法】

ClpP 活性化剤である ADEP1 (1) 側鎖部は、代謝安定性の低い求電子的な α, β -不飽和カルボニル基を備えたアミド型側鎖を有している。そこで、本研究では、まず ADEP (1) 側鎖部の構造展開を行うことで、代謝安定性およびタンパク質分解活性が向上した ADEP1 (1) 誘導体を創製することから開始した。また、ADEP (1) 誘導体に関して抗菌試験および代謝安定性試験を行った。さらに、化合物および ClpP の濃度を人為的にコントロールできる *in vitro* にてタンパク質分解活性を評価した。*B. subtilis* プロテオーム、大腸菌組換え ClpP、化合物を用いて分解される可能性のあるタンパク質の網羅的同定も行った。

【結果】

まず、化合物 (1) を Z-Ser-OH から 3 段階で合成した。次に、1 のカップリングパートナー (4) を H-Ala-OBzl から 4 段階で合成した。引き続き、1 および 4 を PyBOP を用いて縮合体 (2) を収率 70% で得た。さらに、2 から 5 段階を経て化合物 (3) に導いた。最後に、3 の Boc 基部分の改変により 21 種類の ADEP1 誘導体を合成した。



Scheme 1. Structure of ADEP1 and 21 derivatives.

次に、21種類のADEP(1)誘導体を用いて、*B. subtilis* ATCC 6051に対する最小発育阻止濃度(MIC)の算出を行った。その結果、ADEP1(1)(MIC=2.5 μg/mL)と比べて、強力な抗菌活性をもつ誘導体の創製に成功した(MIC=0.020-0.16 μg/mL)³⁾。また、ADEP1(1)と比べて、タンパク質分解活性の高い誘導体の創製にも成功した(MIC=0.625 μg/mL)。さらに、ラット肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験を行った。その結果、ADEP1($t_{1/2}$ =17min)と比べて、代謝安定性も大きく向上していることが判明した($t_{1/2}$ =98-258min)。定量的プロテオミクス解析により、タンパク質正合成に関わるタンパク質、細胞分裂に関わるタンパク質、脂肪酸生合成に関わるタンパク質など多くの創薬標的タンパク質の分解が誘導されることが示唆された。

Table 1. 最小発育阻止濃度 (MIC) .

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6051	
1	5	13	>20
2	1.3	14	1.3
3	0.078	15	>20
4	0.02	16	1.3
5	0.63	17	>20
6	0.63	18	>20
7	0.63	19	>20
8	2.5	20	2.5
9	0.16	21	>20
10	1.3	Compound 1	0.5
11	1.3	ADEP1	2.5
12	20		

Table 2. 代謝安定性試験 .

	$t_{1/2}$ = min
3	123 ± 9
4	98 ± 8
5	258 ± 2
6	27 ± 7
7	17 ± 1
9	104 ± 4
Compound 1	13 ± 5
ADEP1	17 ± 2

【考察】

ADEP(1)側鎖部へ尿素結合を導入し、構造展開を行うことで、さまざまな特徴をもつClpP活性化剤の創製に成功した。ADEP1と比べて抗菌活性および代謝安定性が大きく向上したADEP1誘導体(4)や抗菌活性をできるだけ抑制し、タンパク質分解活性のみが大きく向上したADEP1誘導体(5)の創製に成功した³⁾。最後になりますが、本研究を支援して頂いた公益財団法人日本応用酵素協会に深謝致します。

【文献】

- 1) Trentini, D. B., Suskiewicz, M. J., Heuck, A. et al.: Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease, *Nature*, 539, 48 (2016).
- 2) Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll H.-P. et al.: Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics, *Nat. Med.*, 11, 1082 (2005).
- 3) 石川文洋, 田邊元三: 環状ペプチド化合物とそれを含む抗菌剤 (特願 2023-083850)

指向性進化による生物発光酵素の機能拡張とその利用

岩野 智

(宮崎大学 テニュアトラック推進室)

【背景・目的】

動物個体で起こる生命現象を可視化する *in vivo* イメージング技術の研究開発が盛んである。様々な原理に基づく手法が存在するが、現状、動物に対しての拘束、切開、細い棒の浸入といったいくつかの侵襲的処置が不可欠である。一方で筆者は動物にやさしい非侵襲的イメージング技術を目指し、生物発光反応に基づく可視化技術を開発している。これまでに、従来技術の検出感度を飛躍的に改善するAkaBLI(人工基質AkaLumine+人工酵素Akaluc)を開発した^{1,2)}。本研究では、AkaBLIを基に非侵襲かつ非拘束な生体分子イメージング技術開発を目的に、生物発光反応の改変によるプローブ技術の開発に取り組んだ。

【方法・結果】

本研究では生物発光反応が持つ環境応答性を活用し、Akalucの発現部位での環境変化に応答し、発光強度を増減させる強度変化型の生物発光プローブの開発を試みた。特に生物発光反応の酸素濃度依存性に注目して研究を進めた。結果、生理的な細胞内酸素濃度変化に鋭敏に応答し発光強度を変調させる変異酵素を取得した。現在、細胞内酸素分圧可視化プローブ技術への応用を進めている。

【考察】

酵素は地球上の生物にとって最も重要で身近な分子であるが、生体内における酵素分子を計測する技術に乏しく、個体内で起こる生命現象と酵素の直接的な関連性はあまり理解されていない。本技術は生体内酵素動態を可視化する強力な技術となる可能性が高く、論文発表に向けてデータを取得中である。

【文献】

- 1) Iwano S, Sugiyama M, Hama H, et al, Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals, *Science*, 359, 935-939, 2018
- 2) Nakashiba T, Ogoh K, Iwano S, et al, Development of two mouse strains conditionally expressing bright luciferases with distinct emission spectra as new tools for in vivo imaging, *Lab Animal*, 2023

膜受容体による加水分解活性と代謝性疾患制御メカニズムの解明

岩部美紀

(東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科)

【目的】

これまでに、当研究室では、肥満に伴って生理活性物質アディポネクチンが低下することが、生活習慣病・メタボリックシンドローム・糖尿病激増の主要な原因になっていることを示し、アディポネクチンの受容体として AdipoR1 および AdipoR2 を同定した¹⁾。非常に重要な点は、AdipoR は、亜鉛イオンが結合しており、G タンパク質共役受容体 (GPCR) とは逆の膜トポロジーを持つ新規の 7 回膜貫通型の受容体であり、G タンパク質とは共役しておらず、構造学的・機能学的にも前例のない受容体であることである²⁾。AdipoR は、Progesterone and AdipoQ Receptor (PAQR) ファミリー分子の一つである。これらの発見を手がかりとして、PAQR ファミリー分子が新規の逆向き 7 回膜貫通型の受容体であるだけでなく、受容体でありながら、亜鉛イオンを結合し、加水分解活性を有する全く新規のユニークな受容体ファミリーで

あることが明らかになりつつある。本課題では、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の新しい機能として、加水分解活性メカニズム、さらにシグナル伝達機構を解明することを目的とする。

【方法】

(1) PAQR ファミリー分子の糖・脂質代謝における細胞内シグナル伝達機構の解明：AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の基質特異性、さらに代謝産物に関して、代謝産物の組成及び変化を網羅的に解析する。さらに、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子における基質特異性および代謝産物の関連性を明らかにし、糖・脂質代謝における新規の細胞内シグナル伝達機構を解明する。

(2) PAQR ファミリー分子の変異体マウスを用いた病態生理的意義の検討：CRISPR/Cas9 システムを用いて、亜鉛イオンが結合できなくなった PAQR ファミリー分子の変異体マウスの作製を既に完了しており、全身の糖・脂質代謝の検討を進める。さらに、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の変異体マウスの各臓器における代謝産物の変化を解析し、臓器特異的な加水分解活性について明らかにする。

【結果】

(1) PAQR ファミリー分子の糖・脂質代謝における細胞内シグナル伝達機構の解明：AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の基質特異性、さらに代謝産物に関して網羅的に解析した³⁾ (未発表)。また、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の活性化により、マウス個体レベルでの糖・脂質代謝が改善することを示した⁴⁾ (未発表)。さらに、PAQR ファミリー分子の活性化によって、代謝に重要な各組織における代謝産物の組成及び変化を解析することにより、PAQR の新規のシグナル伝達機構の一部を明らかにした⁵⁾ (未発表)。

(2) PAQR ファミリー分子の変異体マウスを用いた病態生理的意義の検討：CRISPR/Cas9 システムを用いて、亜鉛イオンが結合できなくなった PAQR ファミリー分子変異体マウスを作製し、個体レベルでの糖・脂質代謝を解析した。さらに、各臓器における代謝産物の変化を解析した (未発表)。

【考察】

本課題の成果により、PAQR ファミリー分子の多様性と普

遍性の理解がより深まり、生物界における未知の受容体活性化メカニズムが存在する可能性も示唆され、学術的貢献・意義も極めて高いと考えられる。

【文献】

- 1) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al.: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, Nature.423,762-769 (2003)
- 2) Tanabe H, Fujii Y, Okada-Iwabu M, et al.: Crystal structures of the human adiponectin receptors, Nature.520,312-326 (2015)
- 3) Tanabe H, Fujii Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Kano K, Kawana H, et al. Human adiponectin receptor AdipoR1 assumes closed and open structures. Commun Biol. 3,446 (2020)
- 4) Iwabu M, Okada-Iwabu M, Tanabe H, et al.: AdipoR agonist increases insulin sensitivity and exercise endurance in AdipoR-humanized mice, Commun Biol. 4, 45 (2021)
- 5) Ohn J, Been KW, Kim JY, et al.: Discovery of a transdermally deliverable pentapeptide for activating AdipoR1 to promote hair growth, EMBO Mol Med.13,e13790 (2021)

緑膿菌の薬剤耐性に関わる糖脂質合成酵素の機能解析

沖野 望

(九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門海洋資源化学分野)

【目的】

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は日和見感染症の原因菌として知られるグラム陰性細菌であり、多剤耐性緑膿菌は世界中で問題になっている。細菌の薬剤耐性機構の一つに細胞膜の修飾が知られている。緑膿菌にはホスファチジルグリセロール (PG) にグルコサミン (GlcN) が結合したグルコサミニルホスファチジルグリセロール (GlcN-PG) が存在し、緑膿菌の薬剤耐性に関与していることが推測されるが、GlcN-PG の合成酵素に関する報告はない。本研究では緑膿菌が持つ GlcN-PG の合成酵

素を同定し、緑膿菌の薬剤耐性と GlcN-PG の関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】

P.aeruginosa PAO1 株のゲノムから PG に GlcN を転移する糖転移酵素を探索したところ、脱アセチル化酵素とオペロンを形成する糖転移酵素を見出した。そこで、GlcN-PG は N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が転移された後に GlcNAc が脱アセチル化されることで生成されると仮定して、糖転移酵素と脱アセチル化酵素の候補配列をそれぞれ、PaGlcNAcT, PaGDAC と名付けてクローン化した。次に、PaGlcNAcT 遺伝子の単独もしくは、PaGlcNAcT と PaGDAC 遺伝子の両方をそれぞれ発現ベクターに組み込んで、大腸菌 BL21 株を用いて発現させた。各遺伝子を発現させた大腸菌の脂質を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) により分析した。さらに、緑膿菌の PaGlcNAc-T 欠損株 (KO 株) を作製して、KO 株と野生株 (WT 株) の脂質組成を薄層クロマトグラフ (TLC) および LC-MS で比較した。加えて、KO 株と WT 株の薬剤耐性試験を微量液体希釈法とディスク法により実施した。

【結果・考察】

PaGlcNAcT を発現させた大腸菌の脂質を LC-MS で解析すると、PG に GlcNAc が転移した GlcNAc-PG が合成されていた。さらに PaGlcNAcT と PaGDAC を同時に発現させると、GlcNAc が GlcN に脱アセチル化された GlcN-PG が合成されていた。また、緑膿菌 PaGlcNAcT の KO 株と WT 株の脂質を TLC と LC-MS で解析したところ、GlcN-PG が完全に消失していた。このことから、PaGlcNAcT と PaGDAC は GlcN-PG の合成責任酵素であり、PaGlcNAcT が PG に GlcNAc を転移し、PaGDAC が転移された GlcNAc を脱アセチル化することが強く示唆された。一方、薬剤耐性試験では PaGlcNAcT の KO 株は WT 株と比較して、特にアミノグリコシド系の抗生物質に対する感受性が高まっていた。このことは、GlcN-PG が緑膿菌のアミノグリコシド系の抗生物質に対する耐性に関与していることを示唆している。

自己免疫性疾患における組織局在リンパ球再活性化の機序

勝山 恵理

(岡山大学学術研究院 保健学域 検査技術科学分野)

【背景】

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) は、若い女性に多い難治性の自己免疫性疾患である。申請者は SLE 患者由来 CD4 陽性 T 細胞に関して、microRNA-200a-3p による制御機構¹⁾、カルシウムシグナルを介した ER ストレスの機序 (申請者筆頭, underreview) について報告した。

SLE を含む自己免疫性疾患の T 細胞機能として、CD4 陽性 T 細胞の機能解析が進む一方、CD8 陽性 T 細胞では感染や癌における細胞障害能以外に、免疫機能としてはいまだ未知である。そこで申請者は、健常者と SLE 患者の T 細胞を比較した RNA-seq の結果、SLE 患者で CD38 の高発現していたという既報に基づき、CD38 高発現 CD8 陽性 T 細胞の病的意義の解明にも着手している。CD38 は活性化マーカーとして知られると同時に、細胞内の nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) を分解する NAD グリコヒドラーゼである。申請者の報告では、CD38 が SLE 患者の CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞で有意に上昇していた。さらに CD8 陽性 T 細胞では CD38 高発現が NAD+ 依存性酵素である Sirtuin1 を介して細胞障害能に重要な RUNX3 などの転写因子を抑制し、SLE 患者における細胞障害能の低下と、実臨床の感染症を増加させることを報告した²⁾。これにより既存の活性化マーカーとしての CD38 の新たな病的意義を見出した。

本研究ではさらなる展開として、CD38 が血中と障害臓器に浸潤した CD8 陽性 T 細胞のフェノタイプの違いに関与するとの仮説を立て、これを解明することを目的とした。この着想は、患者末梢血で増加している CD38 高発現 CD8 陽性 T 細胞は、炎症性サイトカインを産生できないにも関わらず、既報では尿中 CD8 陽性 T 細胞は、非活動性と比較し、活動性ループス腎炎により多く見られるという矛盾から得ている。つまり、血中では CD8 陽性 T 細胞の細胞機能は低下しているが、実際の腎組織では何ら

かの炎症を惹起する CD8 陽性 T 細胞が浸潤しているということになる。

本研究の目的は、

- ①この血中と局所での CD8 陽性 T 細胞のフェノタイプの違いの同定
- ②血中と局所臓器 (特に腎臓) での CD38 高発現 CD8 陽性 T 細胞の遺伝子的・細胞的機能変化の解析を行うこととした。

【方法】

SLE 患者 41 名 vs 健常者 17 名の末梢血由来単核球を比較したシングルセル RNA-seq のデータ³⁾ を再解析した。363,083 細胞の末梢血単核球における CD8 陽性 T 細胞をサブクラスターリングし、CD38 発現状況を検討した。再解析は理化学研究所のヒト免疫遺伝研究チームに委託した。また、岡山大学病院、腎・免疫内分泌代謝内科で施行したループス腎炎患者の腎組織を用い、CD38 の免疫染色を行った。同時に、活動性 SLE 患者の尿沈査のフローサイトメトリーを行い、CD8 陽性 T 細胞の CD38 発現を検討した。

【結果】

末梢血単核球は 37 にサブクラスターリングすることができた。その中で CD8 陽性 T 細胞は 93,097 細胞同定でき、さらにナイーブ分画、セントラルメモリー分画、グランザイム B または K 陽性の細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞分画など、16 にクラスターリングが可能であった。しかしその中で CD38 高発現に代表されるクラスターは同定できなかった。また、シングルセル RNA-seq では CD38 自体を同定することができなかった。そこで健常者 150 人と SLE 患者 372 人の 27 種類の免疫タイプ別の細胞をバルク RNA-seq で解析した結果を確認したところ、CD8 陽性 T 細胞における CD38 発現は健常者と比較しても有意に上昇しており、さらに SLE の活動性が上昇するにつれてその発現も上昇していることが確認できた⁴⁾。

SLE 患者から採取した尿中の CD8 陽性細胞上の CD38 の発現においては、尿で同定できるリンパ球数が少ないため、より活動性の高い腎炎患者の尿検体を回収中である。

【まとめと考察】

CD38 はリンパ球が活性化した際に細胞表面に発現し、形質細胞にも多く発現している一般的な表面分子で

ある。しかし本研究の試みから、予想と異なりシングルセル RNA-seq では CD38 が同定できないと判明した。本結果のように、フローサイトメトリーなどでは容易に検出可能な分子もシングルセル RNA-seq では同定できないといった、解像度の問題ははまだシングルセル RNA-seq の課題である。今後は、十分な細胞数が確保できる場合は、バルク RNA-seq を用いる。あるいはより高精度のシングルセル RNA-seq により CD38 高発現発現集団の機能解析を計画する。

- 1) Katsuyama E, Yan M, Watanabe KS et al., Downregulation of miR-200a-3p, Targeting CtBP2 Complex, Is Involved in the Hypoproduction of IL-2 in Systemic Lupus Erythematosus-Derived T Cells. *J Immunol.* 2017 Jun 1;198(11):4268-4276.
- 2) Eri Katsuyama, Abel Suarez-Fueyo, Sean J Bradley et al. The CD38/NAD/SIRTUIN1/EZH2 Axis Mitigates Cytotoxic CD8 T Cell Function and Identifies Patients with SLE Prone to Infections. *Cell Rep.* 2020 Jan 7;30(1):112-123.e4.
- 3) Nehar-Belaid, D., Hong, S., Marches, R.: Mapping systemic lupus erythematosus heterogeneity at the single-cell level, *Nat Immunol.*,21(9):1094-1106 (2020).
- 4) Masahiro Nakano , Mineto Ota , Yusuke Takeshima et al., Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation., *Cell.* 2022 Sep 1;185(18):3375-3389.e21.

スプライシング因子によるDNA編集酵素の活性調節機構の解明

金山直樹

(岡山大学)

【目的】

抗体遺伝子の体細胞高頻度突然変異には DNA 編集酵素 Activation induced cytidine deaminase (AID) が必須である。我々は、DNA 編集酵素 AID の活性発現およびそれによる高頻度突然変異の誘導に必須な因子の一つとして、スプライシング因子 Serine/arginine-

richsplicing factor 1 (SRSF1) のアイソフォーム SRSF1-3 が必須であることを見出している。SRSF1-3 は抗体遺伝子に集積し、AID と結合して AID の核内への蓄積や AID の活性制御に関与する。本研究は、スプライシング因子 SRSF1-3 による、DNA 編集酵素 AID の DNA 編集活性の調節機構およびその抗体遺伝子特異性を決定する機構を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】

(1) 体細胞高頻度変異における SRSF1-3 の機能部位の同定

SRSF1 転写産物の選択的スプライシングにより生成する SRSF1-3 は、SRSF 1 とは異なる C 末領域を有する。SRSF13 特有の C 末領域の欠失変異体を作製し、抗体遺伝子の高頻度突然変異を誘導可能な B 細胞株に導入した。SRSF1-3 の C 末欠失変異体は変異誘導能力を保持しており AID タンパク質への結合も N 末領域だけで十分であった。SRSF1-3 と共通の N 末領域を有している SRSF1 も同様に変異誘導能力を示し、SRSF1 と AID も結合することが示された。

(2) SRSF1 の C 末 RS ドメインリン酸化状態による体細胞高頻度変異の活性制御

SRSF1-3 とは異なる SRSF1 の C 末領域は、アルギニンとセリンに富み (RS ドメイン)、高度にリン酸化される。高頻度突然変異を誘導する RS ドメインの高リン酸化模倣変異体 (RD 変異体)、脱リン酸化模倣変異体 (RA 変異体) を作製し、B 細胞株に導入した。RA 変異体を導入した細胞では、野生型 SRSF1 と比較してより強い変異誘導能を示した。一方、RD 変異体を導入した細胞では、変異誘導能が全くなかった。どちらの変異体も AID との結合能力に違いはなかった。

【考察】

本研究により、RS ドメインが脱リン酸化された SRSF1 は、SRSF1-3 と同様に AID による高頻度突然変異を誘導する能力を有することが示された。C 末領域を欠損する SRSF1-3 および SRSF1 は共通の N 末領域を有し、ともに変異誘導能力が残存していたことから、変異誘導に必須な機能部位は SRSF1 および SRSF1-3 の N 末領域に存在することが示唆された。一方、C 末 RS ドメインは SRSF1 および SRSF1-3 の変異誘導能を最大化するための調節領域となっていると考えられる。

小胞体膜貫通型転写因子OASISの切断制御による 活性化機構解析

金本 聡 自

(広島大学大学院医系科学研究科)

【背景・目的】

Old Astrocyte Specifically Induced Substance (OASIS, 別名 CREB3L1) は通常状態では小胞体膜上に局在する 1 回膜貫通型の転写因子である。細胞が飢餓状態に陥ったり、細胞内カルシウム濃度が攪乱されるなど、細胞にとって不利益な環境になると OASIS は小胞体からゴルジ体へ輸送され、そこで Site-1 protease および Site-2 protease の 2 種類のプロテアーゼによって段階的に切断を受けた後、アミノ末端側がゴルジ膜から遊離して転写因子として機能するようになる。OASIS は骨形成や、がん細胞の細胞周期停止に関与することが報告されており、OASIS の活性化制御は骨関連疾患やがんの治療標的としての可能性が期待できる。しかし、OASIS が活性化されるに至る詳細な分子機構は完全には明らかとなっていない。本研究では、OASIS 活性化にあたり分子内切断を制御する詳細な分子機構を明らかにする目的で研究を行った。

【方法】

翻訳後修飾による OASIS の切断への影響を検討するため、質量分析を用いて翻訳後修飾サイトを検討する。一方、OASIS の分子内切断を制御する領域を同定するために、変異型 OASIS の発現プラスミドを作成し、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 で強制発現させ、分子内切断への影響をウェスタンブロットングで解析する。また、OASIS に直接作用し切断に関わる分子が存在しないか検討するために、光クロスリンク法を用いて相互作用分子の同定を試みる。

【結果・考察】

質量分析による OASIS の翻訳後修飾サイトの解析では、アセチル化やメチル化の候補サイトが得られたものの、厳密に同定するまでには至らなかった。

種々の変異型 OASIS 発現プラスミドによる強制発現系を用いたウェスタンブロット解析では、OASIS の膜貫通ドメイン直後の領域に存在する 3 か所のアミノ酸残基に変

異があると分子内切断が亢進することが分かった。

OASIS との相互作用分子の同定実験においては光クロスリンクにより OASIS と結合すると思われる結果が得られた。

OASIS の膜貫通ドメイン直後の領域に作用する因子の結合によって分子内切断が制御されることが示唆される。今後、質量分析を用いて相互作用分子の同定を進めていきたい。

プロテオリシスを介した精子成熟メカニズムの解明

浄住 大 慈

(科学技術振興機構さきがけ、名古屋大学環境医学研究所)

【目的】

生物の生殖では、排卵や精子形成、受精などの過程でプロテオリシスが重要な役割を果たしている。哺乳類においても精子の機能的な成熟にプロテアーゼやプロテオリシスが関わるという知見が見出されつつあり、プロテオリシスを理解し制御できれば生殖を人為的に制御できる可能性がある。そこで本研究では、プロテオリシスによって精子の成熟がどのように制御されているかを明らかにする。

【方法】

精子成熟に関わる器官である精巣上体の形成や機能発現に注目しながら、プロテオリシスによる精子成熟に関わる遺伝子や制御メカニズムを検討した。特に応募者が同定した、精巣上体の機能を制御する分泌シグナル伝達である「ルミクリン」に注目しながら、精子成熟を担うプロテオリシスを上位制御するルミクリン機構、ルミクリンによって制御されるプロテオリシス関連因子の同定を試みた。

【結果】

精子成熟を担うプロテアーゼの発現制御因子を探索し、精巣由来分泌タンパク質 NICOL を同定した。Nicol ノックアウトマウスでは精巣上体の上皮組織の分化不全が認められた。これに伴って精子成熟に関わる分泌プロテアーゼである OVCH2 の発現が消失し、精子 ADAM3 のプロセッシングも異常となった。さらに Nicol ノックアウトマウスに認められる雄性不妊の表現型はトランスジーンによって精巣特異的に Nicol を発現させるだけでレスキューされた。これらの結果から NICOL は精巣に由来して経管

性的に精巣上体の分化や遺伝子発現を制御する「ルミクリン因子」であることが明らかとなった。また NICOL は既知のルミクリン因子である NELL2 と強く相互作用することがわかった (以上図 1)。

【考察】

これまでにルミクリン因子として NELL2 を同定したが、NICOL もまた精巣に由来するルミクリン因子であること、NELL2 と相互作用することでリガンド複合体を形成すること、精子成熟に関わるプロテアーゼ OVCH2 の発現や精子 ADAM3 のプロテオリシスを制御していることが明らかとなった。

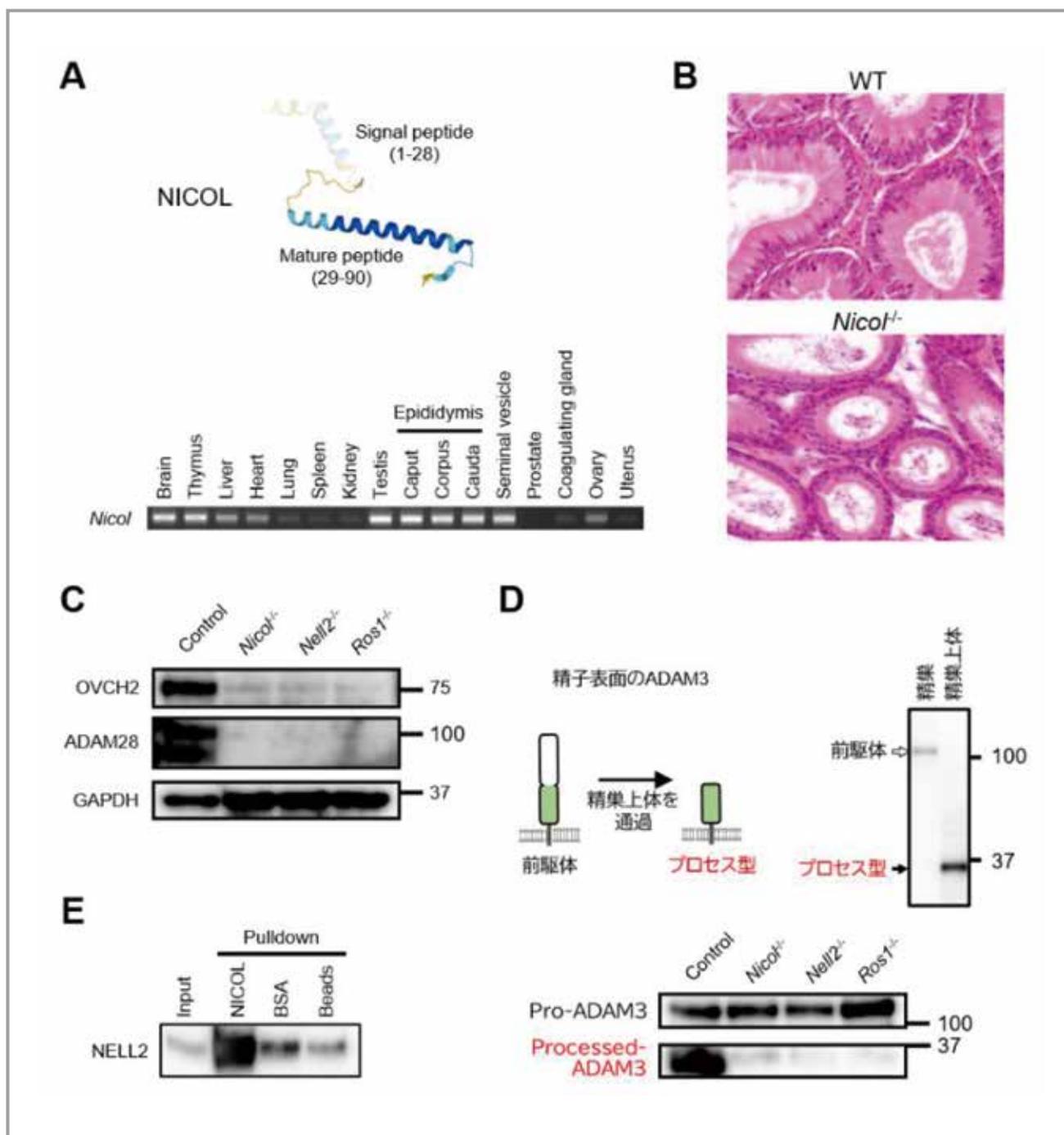


図 1. 精巣に由来する分泌タンパク質 NICOL はルミクリン因子として機能する。A, 新規なルミクリン因子 NICOL の構造と発現。B, *Nicol* ノックアウトマウスで認められる精巣上体上皮の分化不全。C, *Nicol* ノックアウトマウスでは精子成熟に関わるプロテアーゼの発現が低下する。D, *Nicol* ノックアウトマウスの精子では ADAM3 のプロセッシングに異常が生じる。E, NICOL は既知のルミクリン因子である NELL2 と相互作用する。

【文献】

Kiyozumi D. & Ikawa M.: ADGRG2 is dispensable for lumicrine signalling regulating epididymal initial segment differentiation and gene expression, *Biol Reprod.*, **109**, 474-481 (2023).

Kiyozumi D.: Lumicrine signaling: Extracellular regulation of sperm maturation in the male reproductive tract lumen, *Genes Cells.*, **28**, 757-763 (2023).

Kiyozumi D., Shimada K., Chalick M. et al.: A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility, *Nat Commun.*, **14**, 2354. (2023).

Kiyozumi D.: New insights into lumicrine secreted signalling that regulates the function of the mammalian male reproductive tract, *Dev Biol.*, **503**, 111-112. (2023).

Kiyozumi D. & Ikawa M.: Proteolysis in Reproduction: Lessons From Gene-Modified Organism Studies, *Front Endocrinol.*, **13**, 876370 (2022).

呼吸運動の神経性調節における脳内硫化水素合成酵素の機能解析

小金澤 禎史

(筑波大学医学医療系神経生理学)

【目的】

硫化水素は腐った卵や温泉などから発生する特徴的な刺激臭を伴った生体にとって有毒なガスとして有名である。しかしながら、近年、硫化水素は生体内でも合成されており、この生体ガスとしての硫化水素は、細胞保護作用、血管運動調節作用など様々な生理機能を有していることが明らかになってきた。特に、脳ではシナプス伝達調節などを介して、脳機能の調節に役立っているものと考えられている。本研究では、呼吸運動に着目し、脳内の硫化水素が中枢神経系による呼吸運動の形成と調節に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

実験には、ラットの経血管灌流標本を用い、横隔神経と迷走神経より中枢性の呼吸出力を記録した。硫化水素合成酵素である cystathionine β -synthase (CBS), cystathionine γ -lyase (CSE) の抑制薬または活性化薬の全身投与は、灌流液中へ投与することにより実施した。呼吸中枢内の脳領域特異的な硫化水素合成抑制または神経伝達抑制は、脳内に刺入したガラス管を用いた CBS 抑制薬または神経伝達物質受容体遮断薬の脳内微量投与により実施した。

【結果】

脳内にその発現が認められている硫化水素合成酵素である CBS に対する抑制薬の全身投与は、吸息相、後吸息相、呼息相からなる3相性の正常な呼吸運動の出力パターンを吸息相のみからなる単相性の出力パターンへと変化させた。一方、脳以外の臓器にその発現が認められている硫化水素合成酵素である CSE に対する抑制薬や CBS 活性化薬の全身投与は、3相性の正常な呼吸運動の出力パターンに影響を与えなかった。さらに、呼吸中枢を構成する脳領域への局所性の CBS 抑制薬局所投与は、薬物を投与した脳領域に依存した呼吸出力変化をもたらした。一方で、神経伝達物質受容体遮断薬の脳内微量投与は、CBS 抑制薬の脳内微量与による呼吸出力変化を、薬物を投与した脳領域依存的に、増強または抑制した。

【考察】

以上の結果から、脳内の CBS を介して合成された硫化水素は、正常な呼吸運動のパターンを形成する神経回路の機能維持に重要な役割を果たしているものと考えられる。特に、呼吸中枢においては、CBS より合成される硫化水素は、シナプス伝達調節作用を介して、脳領域に依存した呼吸運動の出力調節を行っていることが示唆された。

【文献】

Okazaki, M., Uozu, S., Sato, Y., et al.. Endogenous hydrogen sulfide maintains eupnea in an in situ arterially perfused preparation of rats. *Commun. Biol.*, **3**(1), 58 (2020).

**新奇な阻害機構に基づくプロテインホスファターゼ
阻害剤の創製と低毒性がん転移阻害剤への応用**

茂 里 康

(和歌山県立医科大学)

【目的】

CaMKP (別名 POPX2/PPM1F) は 1998 年にラット脳より, CaM キナーゼ II の自己リン酸化部位を脱リン酸化する酵素として, 申請者らの研究グループによって発見された PPM ファミリーに属するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼである¹⁾. 近年, CaMKP とがん細胞の遊走・浸潤との関連が相次いで報告されるようになった. すなわち CaMKP の遺伝子発現は, がん細胞の悪性度と相関することが報告されており, 本酵素の発現抑制/過剰発現は, がん細胞の遊走・浸潤をそれぞれ抑制・促進する. 従って CaMKP 特異的阻害剤は, がん転移抑制剤として機能することが期待される. これまでの研究では, CaMKP の酵素活性に焦点を当てた報告例が皆無であるので, 本研究ではまず, 乳がん細胞における CaMKP のホスファターゼ活性の測定系を確立し, 遊走能の異なる各種乳がん細胞株で, CaMKP 活性を比較した. ついで, 以前報告したアミノナフトール系 CaMKP 阻害剤, 1-amino-8-naphthol-4-sulfonic acid (ANS) 及び 1-amino-8-naphthol-2,4-disulfonic acid (ANDS)²⁾ を用いて, がん細胞の遊走や形態に与える影響を評価した.

【方法】

乳がん細胞の抽出液を抗ヒト CaMKP 抗体と磁気ビーズを用いて免疫沈降し, 磁気ビーズを十分洗浄した後, リン酸化ペプチド基質とインキュベートし, 基質から放出される無機リン酸を定量することによってホスファターゼ活性を測定した. 乳がん細胞の遊走能は, transwell migration assay により, 血清で誘引されてボイデンチャンバーのインサート膜下面に遊走してくる細胞数をカウントすることによって測定した. 阻害剤による CaMKI のリン酸化レベルの影響は, 一過性に CaMKI を発現させた MDA-MB-231 細胞を阻害剤で処理した後, 細胞を可溶化し, 抗リン酸化 CaMKI 抗体でウエスタンブロットを行うことで評価した³⁾.

【結果】

遊走能の異なる三種の乳がん細胞株 MDA-MB-231, T47D, MCF-7 の遊走能と細胞抽出液の CaMKP 活性は良く相関していたが, 比活性には有意な差が認められなかった. 次に遊走・浸潤活性の高い MDA-MB-231 細胞を, 細胞毒性を示さない 30 μ M の ANS または ANDS で処理すると, 細胞遊走が顕著に阻害されたが, 化学構造が類似しているものの CaMKP 阻害活性のないナフチオン酸では, 遊走阻害は示さなかった. ANS で処理後 MDA-MB-231 細胞の形態観察を行ったところ, 細胞極性の著明な低下が観察された. MDA-MB-231 細胞で高発現している CaMKP の酵素活性が, ANS または ANDS 処理によって阻害されているかどうかを確認するため, CaMKP 基質の 1 つである CaMKI を過剰発現させ, そのリン酸化レベルを評価したところ, ANS または ANDS 処理によって CaMKI のリン酸化レベルが顕著に増加したので, これらの阻害剤が, 実際に細胞内の CaMKP 活性を阻害していることが裏付けられた.

【考察】

遊走能の高いほど, 乳がん細胞株の CaMKP 活性が高かったが, これは主として CaMKP の発現量により調節されていると考えられる. CaMKP 阻害剤により, CaMKP 活性を抑制すると, 乳がん細胞の遊走能が顕著に抑制されたことから, 細胞遊走の過程に CaMKP が重要な役割を果たすと考えられる. CaMKP 阻害剤処理により, 細胞の極性が顕著に低下したことから, CaMKP が細胞の極性形成に重要な役割を果たしており, 酵素活性が阻害されることで極性が低下して細胞遊走が阻害されるという機構が考えられる. ANS や ANDS は, 遊走阻害を示す濃度では, 細胞毒性を全く示さなかったことから, これらの阻害剤は毒性の低い新規がん転移抑制剤創製のためのリーディング化合物となることが期待できる. CaMKP をターゲットとする低毒性の特異的阻害剤は, がん細胞を殺さないが転移浸潤のみを抑制するような新たなタイプの副作用の少ないがん治療薬として, 特に高齢者医療において有用かも知れない³⁾.

【文献】

- 1) Ishida, A., Kameshita, I., Fujisawa, H.: A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent

protein kinase II, *J. Biol. Chem.*, 273, 1904 (1998).

- 2) Sueyoshi, N., Takao, T., Nimura, T., et al.: Inhibitors of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase family (CaMKP and CaMKP-N). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 715 (2007).
- 3) Akizuki, K., Shimoda, N., Ozaki, H., et al.: CaMK phosphatase (CaMKP/POPX2/PPM1F) inhibitors suppress the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells with loss of polarized morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 639, 1 (2023).

老化促進代謝物質産生酵素による加齢同期メカニズムの解明

清水逸平

(国立循環器病研究センター研究所 心血管老化制御部)

【目的】

本研究課題において老化促進代謝物質（セノメタボライト）による加齢同期メカニズムの解明に挑んだ。加齢と共に血液中で上昇し老化形質を促進する分子をセノメタボライト（Senescence+Metabolite）と新しく定義し、心不全やサルコペニアの病態が促進する機序を明らかにすることを目指した。

【方法】

1. セノメタボライトの探索

心不全モデル・老化モデルマウスの血漿や臓器を用いたメタボローム解析に加え、東北メディカル・メガバンクが保有するメタボロームデータを用いた解析を行った。

2. セノメタボライトが増加するメカニズムの探索

加齢と共に血液中で上昇する代謝物質のうち、病的意義を有する可能性が高い代謝物質に特に着目した検討を行った。特にトリメチルアミン-N-オキシド（TMAO）に着目した検討を行った。

3. セノメタボライトが老化形質を促進するメカニズムの探索

心不全モデルマウス、老化モデルマウスにTMAOを投与し心機能や骨格筋機能を評価した。

【結果】

セノメタボライトのうちTMAOに着目し検討した結果、TMAOが心臓のミトコンドリア機能を抑制し心不全の病態を増悪することが明らかとなった。心不全モデルマウスではTMAOが血液中で上昇すること、その機序として褐色脂肪不全が心不全時に生じることが重要であることが明らかになった。TMAO投与マウスで骨格筋におけるミトコンドリアの形態異常が生じ、トレッドミル検査で筋力低下が生じた。

TMAOがミトコンドリア機能不全を惹起する機序としてミトコンドリア複合体IVを構成するシトクロームcオキシダーゼサブユニットIの発現がタンパクレベルで低下することが重要であることもわかった。東北メディカル・メガバンク機構が保有する1000名以上の血液サンプルにおいても、加齢とともにTMAOのレベルが上昇することがわかった。

【考察】

本研究課題によりTMAOが老化及び心不全に伴い血液中で上昇することがわかった。TMAOはアルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）患者の血液及び脊髄液で上昇することが報告されている。これらの疾患は、セノメタボライトにより病態が増悪するセノメタボライト関連疾患（Senometabolite Related Disease (SRD))と包括的に定義できる可能性がある。セノメタボライトによる加齢同期メカニズムの解明及び加齢性疾患に対する次世代の治療法開発を今後も目指してゆく予定である。

【文献】

- 1) Yoshida Y*, Shimizu I*,**, Shimada A, Nakahara K, Yanagisawa S, Kubo M, Fukuda S, Ishii C, Yamamoto H, Ishikawa T, Kano K, Aoki J, Hayashi Y, Ikegami R, Katsuumi G, Suda M, Ozaki K, Kashimura T, Izumi D, Yoshida Y, Okuda S, Ohta S, Okamoto S, Minokoshi Y, Oda K, Sasaoka T, Abe M, Sakimura K, Kubota Y, Yoshimura N, Kajimura S, Zuriaga M, Walsh K, Soga T** and Minamino T**. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2022 Sep 1;12(1):14883. *Co-first author, **Co-corresponding author

質量分析イメージングを用いた神経伝達物質阻害系
殺虫剤によるアセチルコリン合成・分解酵素活性
変化に関する研究

新聞 秀一

(大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻)

【目的】

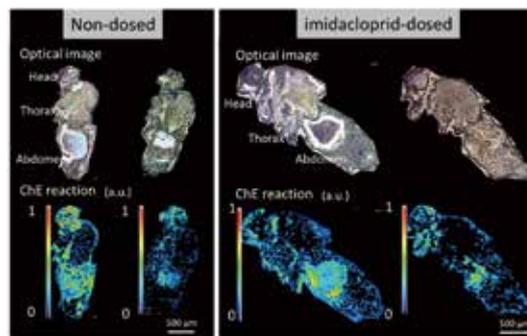
既存農薬の副反応を分子レベルで考察するために、昆虫体内における代謝酵素変動の二次元的解析を行える分析系が強く求められている。したがって、質量分析イメージング (MSI) を用いた新しい酵素活性二次元可視化法で神経伝達物質阻害を作用機序とするネオニコチノイド系農薬がアセチルコリン合成 (ChAT)・分解酵素 (AChE) 活性に与える影響を解明することに資する分析系を構築することを本研究の目的とした。

【方法】

様々なネオニコチノイド系農薬が *D.melanogaster* 体内の酵素反応に与える影響を解析した。本研究では、ネオニコチノイドを摂取させた *D.melanogaster* の切片表面へ基質を供給し、酵素反応で得られた分子を MSI による直接検出で分布情報を得る。基質として重水素ラベル体を用いることで、酵素反応で得られたコリンおよびアセチルコリンとして検出することが可能となる。

【結果】

D.melanogaster 体内における AChE 反応をイミダクロプリド (IMI) の投与の有無で可視化するとともに、得られた強度分布をバーグラフにした結果から、AChE の反応は IMI 未投与サンプルと比較して低下する傾向を示した (図 1)。また、*D.melanogaster* における ChAT の反応の可視化についても世界で初めて成功した (図 2)。図 2 に示す通り頭部において ChAT 反応が起きているが、投与未投与で比較すると頭部では反応が低下する一方、胸部と腹部では亢進する傾向があることがわかった。



The intensity of ChE reaction at each region obtained by MSI

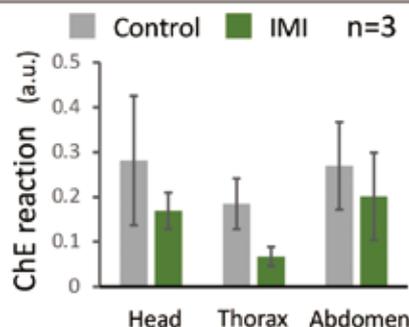
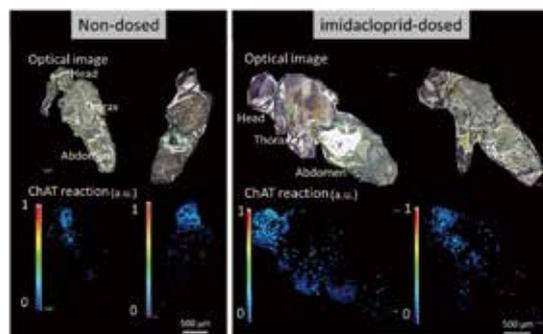


図 1. IMI 投与による AChE 反応の変化。未投与個体と比較して低下する傾向が見られた。特に頭部と胸部での低下が顕著であった。



The intensity of ChAT reaction at each region obtained by MSI

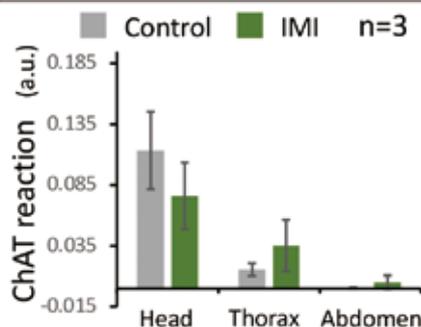


図 2. IMI 投与による ChAT 反応の変化。未投与個体と比較して頭部では低下する傾向が見られ、腹部と胸部では亢進する傾向が見られた。

【考察】

本研究を通して、IMIの摂取の有無におけるAChEおよびChAT反応の可視化への道が拓けた。今回得られた結果より、IMIは全身の酵素について作用するよりは、特定の部位における酵素に対して作用することが示唆された。本研究を今後進めるにあたり、課題も明らかとなった。その課題とは*D.melanogaster*の個体間におけるばらつきの大きさである。この原因は、今回の実験系では餌に農薬を混合し、それを経口で与えている点にあると考えられる。すなわち、餌を食べる量をコントロールすることが非常に困難であることがばらつきの原因であると考えられる。現状、餌を与える前の状況を揃え、餌に暴露する時間もコントロールしていることから、これを解決する方策としては検体数を増やすことが最良ではないかと考えている。

炎症性Caspaseを抑制する新規免疫制御機構の解明

武村直紀

(大阪大学 大学院薬学研究科 生体応答制御学分野)

【目的】

Caspaseは細胞死を誘導するプロセスで中心的な役割を果たすプロテアーゼファミリーであり、免疫応答に深く関わる。病原体感染時に誘導される細胞死の1つであるパイロトーシスは、細胞が膨潤・破裂して死に至る過程で種々の炎症誘発分子を放出することが特徴であり、その引き金を担うCaspase-1, 4, 5は炎症性Caspaseと呼ばれる(ヒトのCaspase-4, 5のマウス相同分子はCaspase-11)。Caspase-4, 5はグラム陰性細菌のリポ多糖(LPS)を認識し、同分類に属する病原性細菌に対する防御応答を担う。一方で、敗血症の際にLPSが原因で起きるショック反応においては、Caspase-4, 5を引き金とする炎症応答が過度に誘導され、組織障害をもたらす。敗血症は高齢化が進む先進国や衛生管理が十分ではない新興国においては、深刻な問題となっている。我々は、生理活性脂質であるProstaglandin (PG) J2類の15d-PGJ2がNon-canonicalインフラマソームを抑制する予備的知見を得ている。マウスマクロファージをLPSで刺激する際に15d-PGJ2で処理すると、活性化

Caspase-11の量が著減する。本研究では、15d-PGJ2はCaspase-11を標的とする抑制性の生体分子として働いていると予想し、その作用機序と影響を解析することで、Caspase-4, 5を中心とする炎症応答の制御について理解し、ひいては敗血症治療に資することを目的とした。

【方法】

15d-PGJ2によるCaspase-11活性化抑制機序を調べるため、15d-PGJ2で標識したビーズとCaspase-11組換えタンパク質を混合し、プルダウンアッセイした。また、15d-PGJ2の存在・非存在下で、LPSで標識したビーズとCaspase-11組換えタンパク質を混合し、プルダウンアッセイした。さらに、15d-PGJ2の抗炎症効果を生体で確認するため、15d-PGJ2 (1mg/kg)を皮下投与したマウスにLPSを投与し、生存率への影響を調べた。

【結果】

プルダウンアッセイの結果、15d-PGJ2はCaspase-11に結合すること、また15d-PGJ2の存在下ではLPSとCaspase-11の結合が抑えられることが分かった(図1)。また、15d-PGJ2を皮下投与したマウスでは、LPSを投与した後の生存率が有意に上がった(図2)。

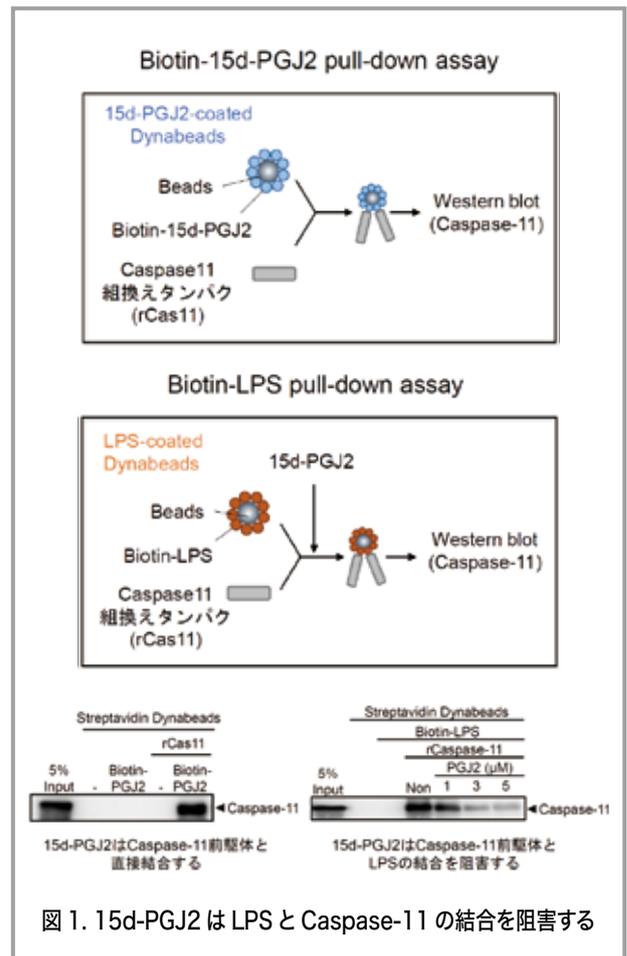
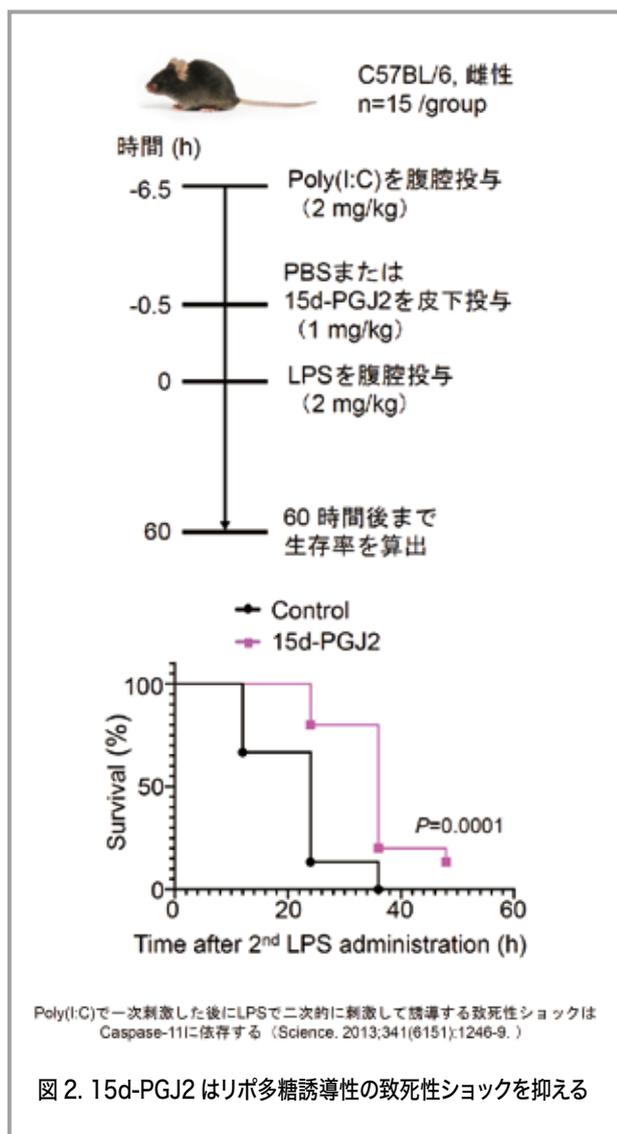


図1. 15d-PGJ2はLPSとCaspase-11の結合を阻害する



【考察】

15d-PGJ2 は Caspase-11 に直接結合し、LPS と Caspase-11 の結合を阻害することで、Caspase-11 の自己活性化を防いでいると予想された。また、LPS を投与したマウスの生存率が 15d-PGJ2 の投与で改善したことから、15d-PGJ2 は生体内でも同様の作用機序で LPS による炎症応答を抑えると予想された。今後、15d-PGJ2 を中心とする炎症抑制機構について、さらに理解を深めていきたい。

架橋酵素反応を検出する新規バイオセンサー開発と 制御剤探索

辰 川 英 樹

(名古屋大学大学院創薬科学研究科)

【目的】

架橋酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) はタンパク質中の特定のグルタミンおよびリジン残基間にイソペプチド結合を形成し、基質の性状や機能変換に関わる。哺乳類では 8 種のアイソザイム (TG1-7,FXIIIa) が存在し、種々の生命現象 (血液凝固や皮膚表皮形成、細胞死、免疫応答、線維化、糖尿病、癌など) に重要な反応を担うが、各 TGase アイソザイム特異的な活性化機構や有用な制御薬剤の開発は不十分である。これを解決するため、申請者はこれまでに主要な TGase アイソザイムである TG1 と TG2 が特異的に認識する基質ペプチド配列 (pepK5, pepT26 配列をそれぞれ同定) を同定し、これを活性検出のための分子プローブとして利用して⁴⁾、TG1 と TG2 の活性を特異的に解析してきた¹⁻³⁾。本研究では、未だコストと感度に問題があるこれまで開発したタンパク質性の分子プローブ⁴⁾を低分子化し、薬剤スクリーニングに有用な簡便かつ高感度に架橋活性を測定できる新規分子プローブを開発することを目的とする。

【方法】

本申請者がこれまでに同定した各 TGase により特異的に架橋されるペプチド配列情報に基づき、グルタミン (Q) およびリジン (K) 残基を含むペプチドを蛍光標識したプローブを合成した。FITC 標識の Q 側配列と Rhodamine 標識の K 側配列が TGase により架橋されると、2 つの蛍光分子の距離が近接して蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こり、蛍光波長が変化する。この波長の変化を捉えることにより各 TGase による架橋反応を簡便に定量できる (図 1)。

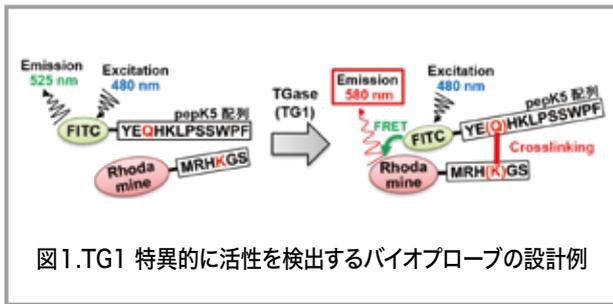


図1.TG1 特異的に活性を検出するバイオプローブの設計例

各ペプチド配列に蛍光分子を標識し、高効率にFRETが起こる分子設計について、基質ペプチドやリンカー長、蛍光分子の標識位置を検討することにより最適化した。プローブ比率や濃度、反応条件、TGase濃度、類似酵素による反応特異性を検証した。さらに培養細胞や組織抽出液による検討、生細胞への導入により生体内TGaseの架橋活性の検出能や感度を評価した。分子プローブの作製後、本学所有の化合物ライブラリーを用いて各TGase特異的な架橋反応を制御する化合物の探索を行った。

【結果】

FITC 標識した Q 残基を含む基質配列と Rhodamine 標識した K 残基を含む基質配列が各 TGase アイソザイムにより架橋されると蛍光分子の距離が接近するため、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こる。480nm の励起による FITC の蛍光が Rhodamine の励起に使われて減弱すると共に、580nm の蛍光強度が増加することを期待した。しかしながら、実際にプローブを作製して測定したところ、期待どおり 480nm の励起による FITC の蛍光強度は減少したものの、580nm の蛍光の増加は観察されなかった。種々の検討結果により、FITC と Rhodamine の近接はクエンチング効果を誘導することを見出し、同プローブの消光作用を利用して、組織や細胞の粗抽出液であっても TG1 と TG2 の各架橋活性を測定できることを示した。さらに、同プローブを用いて化合物ライブラリーから TGase 活性を制御する化合物のスクリーニングに成功した。

【考察】

開発したプローブはこれまで TGase のアイソザイム特異的な活性測定が煩雑であった問題を解決し、プローブを加えるだけで簡便かつ再現性よく架橋活性を測定できる有用なツールとなりうる⁵⁾。

【文献】

1) Tatsukawa H*, Tani Y, Otsu R, et al.: Global

identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using their substrate peptides in mouse liver fibrosis. *Sci Rep.* 7:45049, 2017.

2) Tatsukawa H*, Otsu R, Tani Y, et al.: Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis. *Sci Rep.* 8(1):7306 (16 pages), 2018.

3) Takeuchi T, Tatsukawa H*, Shinoda Y, et al.: Spatially resolved identification of transglutaminase substrates by proteomics in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 65(3):319-330, 2021.

4) Tatsukawa H*, Liu HH, Oba Shota, et al.: FRET-based detection of isozyme-specific activities of transglutaminases. *Amino Acids.* 49(3):615-623, 2017.

5) Tatsukawa H*, Aoyama R, Hitomi K.: Development of peptide-based biosensors for detecting cross-linking and deamidation of transglutaminases. *Amino Acids.* 55(6):807-819, 2023.

癌転移に関わるチオールメチル化酵素標的因子の網羅的同定

谷上 賢 瑞

(東京大学アイソトープ総合センター)

【目的】

メチル化は、核酸・タンパク質・脂質など様々な基質にメチル基が結合・置換することであり、基質の発現量や機能、代謝等に深く関わっている。また、メチル化制御機構の破綻が様々な疾患の原因になるが、破綻が生じる分子機構と生理的意義については十分には明らかになっていない。申請者は癌細胞における DNA/ヒストンメチル化制御が、増殖・腫瘍形成能獲得に寄与し、治療や診断の対象になることを明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。申請者は、

研究をさらに発展させ、膵癌組織で高発現しているメチル化酵素を探索し、膵癌細胞への影響を確認したところ、メチル化酵素 X が膵癌細胞の増殖に重要であることを明らかにした。本課題では、メチル化酵素 X が膵癌で高発現しているメカニズムとメチル化酵素 X のメチル化標的を明らかにし、メチル化酵素 X が膵癌に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

カルチャーインサートによる創傷治癒アッセイやヌードマウスを用いた転移能アッセイを行い、野生型膵癌細胞と比較してメチル化酵素 X ノックアウト膵癌細胞における移動・転移能が低下することが確認された。次に申請者は、メチル化酵素 X が膵癌で高発現している機構の探索を行った。ChIP-seq データ及び膵癌組織における発現データを統合解析し、HNF4 ファミリーがメチル化酵素 X の発現を制御していることを見出した。さらに申請者は、タンパク質や代謝産物などを対象として、メチル化酵素 X のメチル化活性を調べた。既にメチル化酵素 X がチオールをメチル化する機能を有することが報告されていることから、複数のチオール脂質やチオールアミノ酸であるシステイン、グルタチオンなどを基質に用いて、メチル化酵素 X のメチル化活性を調べた。結果、メチル化酵素 X は 18-MOA などのチオール脂質をメチル化することを見出した。

【考察】

本研究では、膵癌組織で発現が亢進し、膵癌細胞の増殖・移動・転移能を制御する因子として、メチル化酵素 X を同定し、当該メチル化酵素がチオール脂質をメチル化することを見出した。今後は、メチル化酵素 X による細胞内でのチオール脂質のメチル化反応を詳細に解明する。本課題で得られた知見が、メチル化酵素 X の阻害剤開発などを通じて、膵癌の治療・診断に応用されることが期待される。

【文献】

- 1) Taniue K, Oda T, Hayashi T, et al.: A member of the ETS family, EHF, and the ATPase RUVBL1 inhibit p53-mediated apoptosis *EMBO rep* 12, 682-689 (2011)
- 2) Taniue K, Kurimoto A, Sugimasa H, et al.: Long noncoding RNA UPAT promotes colon tumorigenesis by inhibiting degradation of

UHRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 1273-8 (2016)

- 3) Taniue K, Hayashi T, Kamoshida Y, et al.: UHRF1-KAT7-mediated regulation of TUSC3 expression via histone methylation/acetylation is critical for the proliferation of colon cancer cells. *Oncogene* 39, 1018-1030 (2020)
- 4) Shimizu D, Taniue K*, Matsui Y, et al.: Pan-cancer methylome analysis for cancer diagnosis and classification of cancer cell of origin. *Cancer Gene Ther* 29, 428-436 (2022)
*correspondence

アラキドン酸リポキシゲナーゼ ALOX15 のフェロトーシス感受性制御機構の解明

鳥居 征司

(群馬大学 食健康科学教育研究センター)

【目的】

フェロトーシスは脂質過酸化を特徴とする新規形態の細胞死で、耐性癌治療戦略の一つとして注目されている。アラキドン酸リポキシゲナーゼは多価不飽和脂肪酸の酸化酵素で、そのうち ALOX15 はヒト癌細胞のフェロトーシス感受性制御に関わることが示された。我々は、ALOX15 の一部が細胞膜に在留することに着目し、ALOX15 のフェロトーシス活性化機能における細胞膜局在化の役割を明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法】

1. 細胞膜局在化 ALOX15 の解析

細胞膜局在の重要性を示すため、ALOX15 に細胞膜ターゲットシグナルを付加したコンストラクト (ALOX15-PM) を作成し、これを癌細胞に発現させてフェロトーシス活性化機能 (野生型を上回るフェロトーシス感受性亢進機能) を確認する。

2. ALOX15 相互作用タンパク質の同定

これまでに ALOX15 と複合体を形成するタンパク質は得られていないため、本研究では、一過性に相互作用して膜局在化を仲介するタンパク質の存在を仮定し、BioID 法 (近位依存性ビオチン標識) による結合分子の探索を行う。

【結果】

1. ALOX15 に細胞膜ターゲットシグナルを連結した2種類のコンストラクトを作成し、HT1080 細胞に発現させたところ、細胞膜への有意な局在が観察された。これらの安定発現株を樹立してフェロトーシスの感受性を解析した結果、いずれの発現株も野生型 ALOX15 発現細胞よりわずかに高い感受性を示した。
2. 野生型 ALOX15 と（細胞膜局在化しない）変異体に AirID を連結したコンストラクトを作成し、それぞれの発現細胞株を作成した。細胞をビオチンで標識した後に、回収したライセートから精製したビオチン化タンパク質のプロテオミクス解析を行った結果、野生型 ALOX15 に結合する膜タンパク質の候補を得た。

【考察】

ALOX15-PM による研究結果から、癌細胞における ALOX15 のフェロトーシス感受性亢進機能は、細胞膜への局在化が必要であることが示唆された。以前に報告された結合タンパク質 PEBP1 は小胞体に局在するが、我々が共免疫沈降実験を行ったところ、ALOX15 との相互作用は確認できなかった。今後は、得られた候補タンパク質と ALOX15 の相互作用を明らかにし、その機能の詳細を調べるつもりである。

BST1 による炎症制御機構の解明

中 川 崇

(富山大学学術研究部医学系分子医科薬理学)

【目的】

BST1 (Bone marrow stromal antigen 1) は、関節リウマチ患者由来の骨髓細胞に高発現するタンパク質として見出された。BST1 は、主に細胞表面に発現するエクストエンザイムであり、GPI アンカータンパク質ファミリーに属することが知られている。BST1 は CD38 の遺伝子重複で生じたパラログであり、CD38 とは高いアミノ酸相同性を示す。しかしながら、BST1 の機能の詳細については良く分かっていなかった。本研究では BST1 の機能について、特に炎症制御機構での役割について明らかにする目的とした。

【方法】

リコンビナント BST1 タンパク質を用いて、その酵素活性について詳細に解析した。また、BST1 欠損細胞、もしくは BST1 ノックアウトマウスを用いて、細胞内、個体での機能を解析した。

【結果】

CD38 は酸化還元反応の補酵素である NAD⁺（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）に対して加水分解活性およびサイクラーゼ活性をもつことが知られている。そのため、BST1 も CD38 と同様の酵素活性を持つと考えられてきたが、実際は、NAD⁺ に対する分解活性およびサイクラーゼ活性はほとんど示さず、BST1 は NAD⁺ ではなく、NAD⁺ の前駆物質である NR（ニコチンアミドリボシド）に対する非常に強い加水分解活性を持つことを明らかにした。また、BST1 の新たな酵素活性として、NR に対する base-exchange 活性（塩基交換活性）を見出した。これは、NR の塩基部分であるニコチンアミドをニコチン酸（NA）と交換し、ニコチン酸リボシド（NAR）と呼ばれる新たな NAD 前駆体を作り出すユニークな酵素活性であった。近年、NAD⁺ やそのシグナルが老化やさまざまな加齢に伴う炎症性疾患に深く関与していることが報告され、注目を集めている。そこで、BST1 と炎症、老化の関係を調べたところ、マクロファージ、特に炎症で誘導される M1 型マクロファージに高発現し、肥満などでは数十倍の発現誘導が見られることを見出した。また、加齢によってもマクロファージで BST1 の発現が上昇することがわかった。

【考察】

肥満や LPS 誘導性の炎症では、NAD⁺ レベルが低下することが知られており、NR のマウスやヒトへの投与は NAD⁺ レベルを上昇させ、肥満などの加齢関連疾患に予防・治療効果を示すことが多数報告されている。つまり、マクロファージなどの炎症性細胞に発現する BST1 は炎症病態において何らかの役割を担っている可能性があるしかしながら、BST1 の酵素活性と炎症がどのように関係しているか今後の検討課題となる。

イノシトールリン脂質キナーゼによる膜接触部位の制御機構

中 津 史

(新潟大学大学院医歯学総合研究科神経生化学)

【目的】

小胞体は、細胞膜やオルガネラと部分的に接することで膜接触部位を形成する。私達は、この膜接触部位が「脂質の交換輸送の場」であることを明らかにしてきた。最近、私達はオキシステロール結合タンパク質・ORP10が小胞体-エンドソーム膜接触部位において脂質交換輸送を制御することを見出した (*JCB*2022)。この脂質交換輸送にはORP10だけでなくORP9も関与し、これがエンドソーム局在型 PI-4 キナーゼ PI4K2a を制御している可能性が示唆された。そこで、本研究では、ORP9 の機能を明らかにすることで、イノシトールリン脂質キナーゼによる膜接触部位の制御機構の解明を目指す。

【方法】

PI4 キナーゼ PI4K2a 及び脂質交換輸送タンパク質 ORPs 等の局在や動態は、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。ORP9 の脂質交換輸送活性は、*in vitro* 脂質交換輸送アッセイ系を用いて検証した。細胞機能解析は、FKBP/FRB を用いたラパマイシン依存的2量体化法による機能獲得法、および CRISPR/Cas9 によるノックアウト機能喪失法により解析した。

【結果】

精製 ORP9 を用いた *in vitro* 脂質交換輸送測定実験から、ORP9 は PI4P を輸送することが判明した。先行研究から示唆されていたコレステロールについて検討したところ、ORP9 はコレステロールに対する輸送活性は示さなかった。一方、ORP9 は PS に対しては強い輸送活性を示したことから、ORP9 は PI4P と PS の脂質交換輸送を制御する可能性が示唆された。そこで ORP9 ノックアウト細胞のエンドソームの PI4P および PS レベルを測定したところ、PI4P の異常蓄積と PS の減少が確認された。しかしながらコレステロールも異常蓄積していることが判明した。

【考察】

ORP9 は予想に反して PI4P と PS を輸送することが判明した。しかし、ORP9 欠損細胞のエンドソームではコレ

ステロールの異常蓄積が確認された。メカニズムは不明だが、ORP9 の脂質交換輸送機能とコレステロール制御が関連する可能性が示唆された。PI4K2a はコレステロールにより活性化されることが知られており、ORP9 は何らかのメカニズムにより PI4K2a 活性制御および膜接触部位の形成制御にも関与する可能性が示唆された。

ニトロ化タンパク質の脱ニトロ化・還元酵素の同定と機能解析

那 須 野 亮

(神戸大学・先端バイオ工学研究センター)

【背景と目的】

シグナル分子である一酸化窒素 (NO) に依存的なタンパク質翻訳後修飾の一つであり、チロシン (Tyr) 残基をニトロチロシン (NT) 残基に変換するニトロ化 (Protein Tyrosine Nitration; PTN) 修飾は、脱修飾に酵素反応が必要と考えられるが、酵素は同定されていない。一方、微生物に広く保存されるニトロレダクターゼ (NR) は、様々なニトロ化合物のニトロ基を還元することが知られている。

本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、PTN シグナルの消去経路として、NT 残基を Tyr 残基へ変換する脱ニトロ化酵素 (DNTase)、アミノチロシン (AT) 残基へ還元する NT 還元酵素 (NTred) を同定することを目的とした。特に、DNTase 候補としては、日本応用酵素協会誌 No.56 (2021) にて NT 結合タンパク質として報告した還元酵素 R に、NTred 候補としては、酵母 NR である Hbn1, Frm2 に着目し、解析を行った。

【方法】

酵母 DNTase 活性の測定：最少培地で培養した酵母 *S.cerevisiae* の抽出液を透析したものを粗酵素液とし、NADPH, NADH, FMN, FAD, ATP, GTP, MgSO₄, CaCl₂ の存在下、1mM 遊離 NT をモデル基質として反応させた後、QTRAP4500 質量分析計 (AB SCIEX) を用いた LC/MS/MS に供し、Tyr および AT を定量した。タンパク質分解に由来する Tyr と区別するため、培養の際の炭素源、窒素源として、¹³C- グルコース (¹³C 培養)、¹⁵N- 硫酸アンモニウム (¹⁵N 培養) を用いた。

酵母 NO 応答の解析：NO ドナーである MAHMA

NONOate, もしくは酸性環境下で亜硝酸塩を添加することにより, 酵母を NO 処理し, スポット試験により NO 毒性に対する耐性を, RT-qPCR により遺伝子発現応答を, 抗 NT 抗体を用いたウェスタンブロットにより細胞内 PTN レベルを, それぞれ解析した.

組換え Hbn1 の酵素活性の測定: 大腸菌を用いた組換え精製酵素として Hbn1 を調製し, FMN を補因子, NADPH を電子供与体とし, モデル基質として遊離 NT に対する活性を測定した. また, Hbn1, FMN, NADPH, 蛍光 NO プロブ DAF-FM を含む反応溶液に, NO ドナー NOC-5 (半減期 25 分) を添加し, 蛍光強度 (Ex: 495nm, Em: 515nm) を経時的に測定することで, NOC-5 由来の NO による経時的な蛍光上昇の阻害の程度から, Hbn1 による NO 消去活性を評価した.

【結果】

これまでに ¹⁵N 培養した酵母抽出液から, 還元酵素 R および NT 依存的な ¹⁴N-Tyr 合成活性を検出し, DNTase 活性の可能性を示した. しかし, ¹³C 培養した酵母抽出液を用いて同様の解析を行ったところ, ¹⁴N-Tyr 合成活性は検出されなかった. このことから, NT 依存的な Tyr 合成は, DNTase 活性ではなく NT を基質としたトランスアミナーゼ活性によると結論付けた.

続いて, 酵母 NR が NTred として機能するか解析した. NO 処理した酵母を RT-qPCR に供したところ, *HBN1*, *FRM2* ともに NO に応答して誘導された. また, NR 遺伝子破壊株は NO ストレスに感受性を示した (図 1). しかし, NO 処理した酵母細胞内の PTN レベルは, NR 遺伝子の有無で変化しなかった. また, 精製 Hbn1 は遊離 NT に対する還元活性を示さなかった. これらのことから, **NR は NTred 以外の機能を発揮し, 酵母の NO 耐性に関与する可能性が考えられた.**

そこで, 精製 Hbn1 が NO そのものを分解するか検証した. その結果, Hbn1 および NADPH 依存的に, NO は明確に消去された (図 2). また, Hbn1 依存的な NO 消去反応は, 系内の溶存酸素濃度を上昇させることで阻害された. 以上のことから, **Hbn1 が NO を還元的に分解すると結論付けた.**

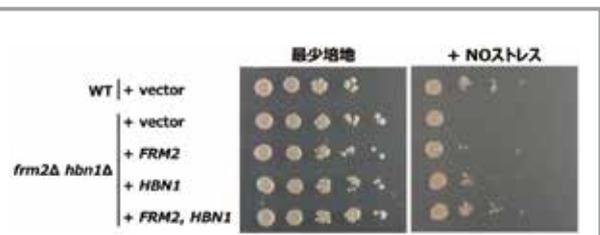


図 1 酵母 NR 依存的な NO 耐性
酵母 NR 遺伝子 (FRM2, HBN1) 破壊株は, 野生株に比べて NO ストレスに感受性を示した.

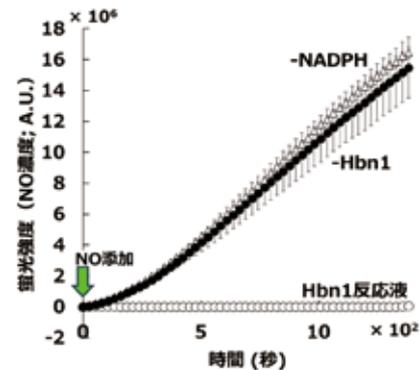


図 2 精製 Hbn1 による消去活性
NO ドナーから放出される NO と蛍光 NO プロブの反応による蛍光上昇は, Hbn1 および NADPH 依存的に阻害された.

【考察】

本研究では, これまでに見出した酵母 DNTase 活性をより詳細に解析した結果, トランスアミナーゼ活性による擬陽性である可能性が示された. これは, サンプル中に存在する微量の α -ケト酸によって引き起こされたと考えられる.

本研究では, 酵母 NR 遺伝子が NO に応答して誘導されること, NO 耐性に寄与することを示し, NR の一つ Hbn1 が還元的に NO を分解することを示唆する結果を得た. アミノ酸配列の類似性 (Identity: 59%) や遺伝子発現の NO に対する応答性などから, Hbn1 と Frm2 は同様の機能を担う可能性が高い. これらのことから, **酵母 NR は NO を還元的に分解することで NO 耐性に寄与すると結論付けた.** 還元反応の生成物は未同定であるが, 既知の NO 還元酵素と同様に亜酸化窒素 (N_2O) を生成すると予想される. 微生物に広く保存される NO 耐性機構であるフラボヘモグロビン (FHb) は, 好気的条件下において NO を硝酸 (NO_3^-) に酸化する. このことから, NR が嫌気的条件下における還元的分解, FHb が

好氣的条件における酸化的分解と、状況に応じて使い分けられている可能性が考えられる。

本研究では、DNTase, NTred の同定はできなかったが、NR による NO 分解という新たな NO 耐性機構を発見した。微生物特異的な NO 耐性機構は抗菌薬標的として注目されており、本研究成果は、基礎微生物学のみならず医薬分野へも波及効果をもたらす。

分泌型メタロプロテアーゼADAMTSによる神経機能制御

服部 光治

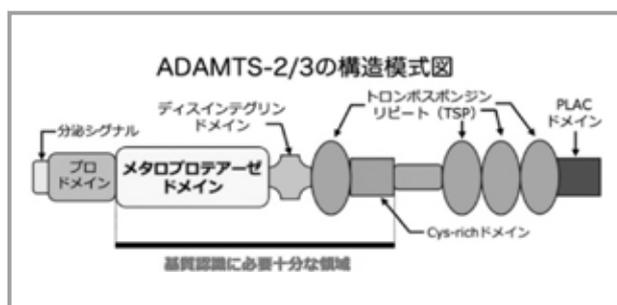
(名古屋市立大学大学院薬学研究科・病態生化学分野)

【研究の背景】

我々は脳の形成と機能発現に必須の分泌タンパク質リーリンが分泌型プロテアーゼ ADAMTS-3 および ADAMTS-2 によって分解・不活化されることを見出した。リーリンの機能低下は様々な疾患に関与するので、これらの酵素の阻害剤はリーリンの機能低下を防ぎ、精神神経疾患の改善に役立つ。本研究では阻害剤創製に向けた ADAMTS-3 の精製及び安定化法の確立と、脳における ADAMTS-3 および 2 のリーリン分解以外の機能の解明を目指した。

【方法】

ADAMTS-3 と ADAMTS-2 はともに下図に示すような構造を持ち、相同性は極めて高いが、発現量と分泌量は ADAMTS-2 のほうが高い。両者のキメラタンパク質を各種作成して分泌量や酵素活性を検討した。さらに、構造解析に供するための安定化方法および精製法について検討した。



【結果】

プロドメインの変換および 550 番目の残基より C 末端側を欠失させることにより、酵素活性を維持したまま発現・

分泌量を増加できることが判明した。また、二量体化により安定化されることが判ったが、酸性条件下では不可逆的に失活することも判った。さらに、東京都臨床医学研究所の丸山千秋博士のグループとの共同研究で、発生期の脳サブプレート直下で発現する ADAMTS-2 が TGF-βシグナルを制御し、これが神経細胞の形態変化（多極性から双極性への移行）に関わる可能性を見出した。

【考察】

従来、ADAMTS ファミリーのプロドメインはフォールディングや局在制御に寄与する例が知られていたが、今回、ADAMTS-2 と ADAMTS-3 のプロドメインは発現と分泌に関与することが明らかとなった。今後の安定化及び大量取得、構造解析に進むための重要な知見であると考えられる。本研究をもとに、ADAMTS-2/3 の基質特異性と生理的意義の全貌の解明が進み、さらには阻害化合物が創製できれば、精神神経疾患の新規治療薬開発につながると期待される。

感染症を重症化させる炎症誘導性タンパク分解酵素の特定

原 英 樹

(旭川医科大学医学部感染症学講座微生物学分野)

【目的】

病原体は特有のリガンドを多く発現しており、感染すると様々な炎症応答を惹起する。多くの炎症応答は感染防御に寄与するなかで、われわれはインフラマソーム応答を介した炎症応答が感染病態を悪化させることを見出した。そこで本研究では、インフラマソーム応答を介した炎症応答に関わるタンパク分解酵素および炎症シグナル関連酵素の特定を試みた。

【方法】

初代マクロファージにリステリアなどの病原菌を感染させ、インフラマソーム応答の指標として培養上清中の IL-1β濃度を測定した。各酵素は特異的な阻害剤で細胞を処理することで炎症応答への関与を調べた。また各酵素の活性化はウエスタンブロット法で活性型タンパクを検出することで評価した。

【結果】

リステリアをマクロファージに感染させると IL-1 β が産生され、カスパーゼ 1 および Gsdmd を阻害することで抑制された。また、リン酸化酵素である Syk およびキナーゼ X を阻害することも抑制された。Syk を阻害した細胞にリステリアを感染させるとキナーゼ X の活性化が低下することから、キナーゼ X は Syk の下流であることが示された。我々は以前に JNK もインフラマソーム応答に関わることを報告しているが、その下流シグナルとしてキナーゼ Y が活性化することも突き止めた。

【考察】

カスパーゼ 1 は IL-1 β 産生を制御しているが、近年の報告からカスパーゼ 1 は pyroptosis だけでなく PANoptosis にも関わることが提唱されている。Pyroptosis 特異的な制御因子として Gsdmd を阻害したところ IL-1 β 産生はほとんど確認されなくなった。このことから、リステリアは PANoptosis ではなく pyroptosis 依存的に IL-1 β の分泌を誘導していることが判明した。また、インフラマソームの活性化にはチロシンおよびセリンキナーゼ経路が関与しており、下流の分子としてキナーゼ X および Y を同定した。これらのキナーゼを阻害することでインフラマソーム応答を抑制できることから、治療手段に限られる感染症治療への応用が期待される。

以上のような研究の進展に大いなる援助をいただいた公益財団法人日本応用酵素協会に心より感謝申し上げます。

ALSを引き起こす抗酸化酵素「SOD1」の凝集機構解明

藤原 範子

(兵庫医科大学・医学部)

【背景と目的】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を含む神経変性疾患では、原因タンパク質のミスフォールディングや凝集・アミロイド化が発症や病態に関与すると考えられているが、その詳細は未だに不明である。ALS は運動ニューロンが特異的に障害されて筋萎縮と筋力低下を来し、最終的には呼吸筋麻痺で死に至る疾患で、発症機構が未解明で治療法も

確立されていない。Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) は生体内で抗酸化酵素として働いているが、点変異や欠失変異は家族性 ALS を引き起こすことが既に明らかになっている。SOD1 はサブユニットあたり 153 個のアミノ酸からなるホモダイマーで、現在までに 200 個以上もの ALS 変異が報告されている。変異 SOD1 は野生型 SOD1 に比べて不安定で凝集しやすい性質があり、ALS 患者の病変部位には SOD1 免疫陽性の凝集体が観察されている。また、SOD1 を欠損させたマウスは ALS を発症しないが、変異 SOD1 を強発現させたマウスは ALS を発症する。従って、変異 SOD1 による ALS 発症は、酵素活性の低下は関係なく、変異 SOD1 タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成が関与する「gain of toxic function」と考えられている¹⁾。そのため、SOD1 の凝集化やアミロイド化の研究が行われ、SOD1 アミロイド形成に重要なコア配列が複数報告されてきた。これらのコア配列を含むペプチドのアミロイド化実験によると、N 末端側の 1-55 と C 末端側の 80-153 はアミロイド化するが、24-79 と 56-118 はアミロイド化しないことが報告された²⁾。この結果は、クライオ電子顕微鏡による SOD1 アミロイドの構造解析で「3-55 と 86-153 がアミロイドを形成し互いに向かい合っていた」という報告³⁾と矛盾しない。しかし、これらの配列が実際に細胞内で凝集体を形成するかどうかの検証はなされておらず、SOD1 の凝集機構は未だ解明されていない。そこで、本研究では、SOD1 の細胞内凝集機構を解明するために、先行研究で得られたアミロイドのコア配列と細胞内凝集に関与する配列が一致するかどうかを検証し、細胞内凝集に重要となる配列を特定することを目的とした。

【方法】

SOD1 の C 末端に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合させた配列を HEK293 細胞に発現させる従来法では、ALS 変異 SOD1 と野生型 SOD1 との違いを見出すことができなかった。一方、protein X を SOD1-EGFP の N 末端側に導入した発現プラスミドを細胞に発現させる方法では、ALS 変異 SOD1 の凝集体形成が著しく促進され、凝集体を容易に観察することができることを見出した。そこで、この protein X 融合法を活用して、既報²⁾でアミロイド化した SOD1 部分配列が細胞内で凝集体を形成するかどうかを検討した。さらに、SOD1 の C 末端

側を順次欠損させた protein X-SOD1 ペプチド (1-120, 1-90, 1-60 など) -EGFP を発現させて凝集体の有無を観察し, SOD1 の細胞内凝集に必要な N 末端配列とアミノ酸残基の決定を行った。

【結果】

アミロイド化する SOD1 部分配列 (1-55 と 80-153) のうち, 1-55 は細胞内でも凝集体を形成したが, 80-153 は凝集体を形成しなかった。一方, アミロイド化しない配列 (24-79 と 56-118) のうち, 24-79 では凝集体をほとんど観察できなかったが, 56-118 は凝集体を形成することがわかった。1-55 が凝集体を形成したこと, また, C 末端側を欠損する家族性 ALS 変異が存在することから, SOD1 の C 末端側を順次欠損させていき, 凝集体形成の有無を検討した。その結果, 1-34 は凝集体を形成しないが, 1-35 よりも長い SOD1 ペプチドを含むと凝集体を形成することが明らかになった。そこで, 1-35 ペプチドにおいて, ヒト SOD1 の 35 番目のアミノ酸である I35 を他のアミノ酸に置換し, 凝集体形成の有無を検討した。I35 を他の分枝鎖アミノ酸に置換した 1-35 ペプチド (I35L と I35V) は凝集体を形成したが, 親水性アミノ酸であるセリン (I35S) やリシン (I35K) に置換すると凝集体を形成しなかった。さらに, 凝集体を形成する ALS 変異 SOD1 (A4V や G93A) に I35S の変異を加えると, 凝集体の形成は著しく低下した。以上の結果より, SOD1 の凝集体形成に必要な N 末端側の最小配列が 1-35 であること, I35 が凝集体形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった (論文投稿中)。

【考察】

I35 は哺乳類の SOD1 では広く保存されているが, I35 に変異をもつ家族性 ALS 患者は未だ報告されていない。つまり, 孤発性 ALS を含め, 全ての ALS 患者が有する SOD1 には凝集体形成に重要な I35 が存在することとなり, SOD1 の凝集体形成が ALS 発症に関与していることが示唆される。従って, I35 を新たなターゲットとして凝集体形成を阻害すれば ALS 発症を抑制できる可能性がある。今後は, 変異 SOD1 の凝集体と共凝集しているタンパク質を明らかにし, 凝集体形成を抑制する方法の開発を進めていく予定である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり, 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謝いたします。

【文献】

- 1) 藤原 範子: 銅・亜鉛 - スーパーオキシドディスムターゼ - 脳科学辞典 DOI: 10.14931/bsd.9795, (2021)
- 2) Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K et al.: Mutation-dependent polymorphism of Cu,Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 285(29):22221 (2010)
- 3) Wang LQ, Ma Y, Yuan HY et al.: Cryo-EM structure of an amyloid fibril formed by full-length human SOD1 reveals its conformational conversion. *Nat Commun.*;13(1), 3491 (2022)

小胞体出芽部位 ER exit site の形成と機能に関する酵素因子群の機能解析

前田 深春

(秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座)

【目的】

インスリンやコラーゲンなど生体分子のおよそ 3 割は細胞外に分泌されて機能する。これらのタンパク質は小胞体で翻訳された後、小胞体上の特殊な領域である ER exit site において形成される COPII 小胞に詰め込まれ、ゴルジ体へ輸送される。ER exit site は通常、細胞あたり数百個存在するが、哺乳細胞では栄養状態や小胞体ストレス等に応じて ER exit site の数や大きさを変化させることで、小胞体からの分泌量を積極的に調節していることが最近明らかになってきた。しかし、ER exit site が小胞体上のどこに、どのような分子メカニズムで形成されるかは不明である。

昨年度我々は、ER exit site における低分子量 G タンパク質 (GTP 加水分解酵素) Sar1 の活性化をライブイメージングで可視化できる細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて構築し、この細胞を用いて、さまざまな状態における Sar1 GTPase の活性を定量的に評価した。

【方法】

我々は split GFP の一部分を Sar1 にノックインするこ

とによって、活性化してはじめて GFP シグナルが検出される細胞株を樹立した。この細胞株に各種 COPII 因子群の発現抑制および薬剤添加等を行い、その際の GFP シグナルの強度および FRAP による回復率を測定することで、Sar1GTPase のターンオーバー率を測定した。

【結果・考察】

Sar1 の活性化因子である Sec12 を発現抑制した細胞においては、Sar1GTPase の輝度が著しく低下した。また、Sar1 の GTPase 活性化因子 (GAP) である Sec23 を発現抑制した細胞においても、Sar1 の活性化が抑制されている。Sec23 は Sar1、積み荷と共に pre-budding complex の形成を担い、この complex が安定化することで、積み荷の濃縮に寄与する。本結果は、Sec23 はそのままでは GAP としての機能よりもむしろエフェクターとして Sar1 GTPase の安定化に寄与することを示唆していると考えられる。

ゲノム編集技術を用いて、Pex19 の N 末端にオーキシンデグロンタグをノックインした酵母株を作製した。オーキシンを添加し、Pex19 を分解させた後に、PMPs を発現させ、PMPs の局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。ミトコンドリアに誤配送された PMPs については、Msp1 依存的な配送のやり直しをタイムラプス観察によって検証した。

【結果および考察】

クライオ電顕解析の結果、Msp1 は各サブユニットが右巻きのらせん階段状に集合したホモ6量体のリング構造を形成していた。Msp1 の各サブユニット間には ATP の結合が確認された。また、Msp1 6量体のリング中心には基質を模倣したペプチドが結合していた。基質との結合に関わる Trp166, Tyr167, そして ATP との結合に関わる Arg247, Arg248 は Pex15 Δ 30 の分解に必須なアミノ酸残基であることを明らかにした。基質ペプチドは、Msp1 のらせん階段構造に沿うように把捉されていたことから、Msp1 が基質を掴んだまま一方方向に移動させることで、誤配送 TA タンパク質を膜から引き抜くモデルが考えられる。

オーキシン添加によって、Ant1, Bna4, Pex11, Pex15 がミトコンドリアに誤配送されることを明らかにした。タイムラプス観察により、Pex15 は Msp1 と Pex19 に依存して、ミトコンドリアからペルオキシソームに移動することを明らかにした。

**膜引き抜きATPアーゼを介した細胞内タンパク質
配送の校正機構の解明**

松本 俊介

(九州大学大学院 農学研究院 生物機能分子化学講座 生物化学分野)

【目的】

本研究は、クライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的解析により、ミトコンドリア外膜に局在する AAA 型 ATP アーゼ Msp1 による誤配送テイルアンカー型 (TA) タンパク質の認識および膜引き抜き機構の解明、出芽酵母を用いてペルオキシソーム膜タンパク質 (PMPs) の Msp1 依存的な配送やり直しの検証とその分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法】

Msp1 は、N 末端に 1 つの膜貫通配列と 1 つの AAA ドメインを持つ膜タンパク質である。Msp1 の膜貫通配列を欠失させ、AAA ドメインの walker B モチーフに変異を導入した可溶性の Msp1 (E193Q) を調製した。得られた電顕画像から、3次元マップを作製し、原子構造モデルを構築した。msp1 欠損出芽酵母株に Msp1 変異体を発現させ、Msp1 のモデル基質 Pex15 Δ 30 の分解活性を分析した。

**変異型RNaseを用いた酵素集合体“META body”
形成に寄与するRNA分子の探索**

三浦 夏子

(大阪公立大学大学院農学研究科)

【背景と目的】

細胞質内でタンパク質が集合することで形成される“膜のないオルガネラ”は、細胞の翻訳コストを抑えながら細胞内で酵素を集積化する巧妙な仕組みとして注目を集めている¹⁾。我々は2013年に発芽酵母において、低酸素条件下で解糖系酵素を含む20以上の代謝酵素が集合し、糖代謝を調節している可能性を初めて示した²⁾。この集合体は2017年に他の酵母株や一部のヒト培養細胞でも形

成されることが報告され、“Glycolytic body (G-body)”あるいは“Glucosome”と名付けられた。近年、低酸素条件下で集合する酵素として新たに purine 合成系の酵素も見出されるなど、低酸素条件下において予想されていた以上にダイナミックな酵素集合体が形成され、細胞の代謝を制御している可能性が示唆されている。申請者らはこうした集合体をまとめて“Metabolic Enzymes Transiently Assembling (META) body”と名づけ、これまでに、集合体の形成に関わるシグナル伝達経路に加え、集合体を形成する酵素のアミノ酸配列から、～30 アミノ酸からなる集合体形成配列を見出した^{2,3)}。しかしながら、META body 形成の直接的なトリガー分子は不明なままである。

細胞内でタンパク質の液-液相分離により形成されるストレス顆粒や P-body 等の集合体では、集合体形成に RNA とタンパク質の相互作用が関与することが知られている。META body でも、2021 年に、解糖系酵素の一つである phosphofructokinase (PFK) と RNase を細胞内で融合発現すると、低酸素条件下で集合体形成を阻害することが示された。一方で、この効果が RNase による RNA の切断によるものか、あるいはサイズ効果による集合体形成阻害であるのかは不明である。また、集合体形成に寄与する RNA 配列は特定されていない。さらに、申請者らの最近の研究により、PFK の集合は他の解糖系酵素に比べて集合が遅いことが明らかになっており⁴⁾ [Akai et al., in preparation], META body 形成のトリガーとなる分子を同定するためには PFK が不適である可能性が示唆された。

本研究では META body 形成酵素群に由来する集合体形成ドメインに、RNase あるいは触媒残基を変異させた RNase 変異体を融合させ、低酸素条件下で META body と共局在させることで、RNA の META body 形成への寄与について検証することを目指した。

【方法と結果】

1. 小スケール低酸素培養系における META body 形成動態の確認

低酸素条件下における META body の形成時期を初期・中期・後期に分割するために、以前に構築した小スケール低酸素培養系⁴⁾を用いて、様々な解糖系酵素群の経時的な動態を追跡した。その結果、以前に報告した

酵素群の動態に加えて、複数の解糖系酵素についてより詳細な動態を得ることができ、META body 形成時期が META body に含まれる酵素の種類によって分割できることが示唆された。

2. RNaseA 変異体の構築と出芽酵母における META body への局在化

ウシ膵臓由来 RNaseA の触媒二残基にアラニン置換を導入した RNaseA 変異体 (RNaseAmut) を設計し、N-末端に META body 局在化シグナルと赤色蛍光タンパク質を付加して、低酸素条件下で出芽酵母内において誘導発現させた。緑色蛍光タンパク質を解糖系酵素に付加することで META body の局在を可視化するレポーター酵母を用いたところ、META body 形成初期の時点で RNaseA, RNaseAmut それぞれが META body と共局在していることが示された。また、このとき RNaseAmut を発現した酵母では、RNaseA 発現酵母に比べて META body を形成している酵母の割合が有意に減少した。すなわち、RNaseA による RNA の切断が META body 形成を阻害することが示唆された。今後、in vitro 系等も併用しながら、さらに検証を進めていく予定である。

【考察】

本研究では、これまで検証されてきた META body 形成後期に加えて、初期段階でも低酸素条件下における集合体の形成・維持に RNA が寄与している可能性を示した。本研究の結果と新たに開発した META body 含有酵母の大量培養法⁵⁾、in vitro 系等を組み合わせ、さらなる解析を進めることで、RNA による酵素集合体形成への寄与について、その詳細を明らかにできると期待できる。

【文献】

- 1) Miura N. Condensate formation by metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 10(2), 232 (2022).
- 2) Miura N, Shinohara M, Tatsukami Y, et al. Spatial Reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* Enolase To Alter Carbon Metabolism under Hypoxia. *Eukaryot. Cell*, 12(8), 1106–1119 (2013).
- 3) Utsumi R, Murata Y, Ito-Harashima S, et al. Foci-forming regions of pyruvate kinase and enolase at the molecular surface incorporate

proteins into yeast cytoplasmic metabolic enzymes transiently assembling (META) bodies, PLOS ONE, 18(4), e0283002 (2023).

- 4) Yoshimura Y, Hirayama R, Miura N, et al. Small-scale hypoxic cultures for monitoring the spatial reorganization of glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell Biol. International, 45(8), 1776–1783 (2021).
- 5) Murata Y, Hirayama R, Miura N, et al. Large-scale preparation of yeast strains expressing condensates derived from a glycolytic enzyme via controlled dissolved oxygen levels under hypoxia. Lett. Appl. Microbiol., in press.

可逆的酵素反応によるユビキチンの細胞内再利用の定量的分析

森本大智

(京都大学大学院工学研究科分子工学専攻)

【目的】

ヒトの体内では、毎日 200 グラムのタンパク質が合成されると同時に、同量の 200 グラムが分解されている。数分から数週間と、合成と分解の頻度はタンパク質によって千差万別であり、各々のターンオーバーは細胞の恒常性維持のため、厳密に管理されている。だが、細胞内タンパク質であるユビキチンのターンオーバーは合成と分解だけではない。

ユビキチンは、基質となるタンパク質に共有結合し、基質の分解や活性を制御する。ユビキチン化酵素群 (E1 酵素, E2 酵素, E3 リガーゼ) の一連の酵素反応により、ユビキチンは基質に共有結合する。一方、基質からユビキチンを脱離させる脱ユビキチン化酵素 (以降 DUB) も細胞内に存在するため、役目を終えたユビキチンは切断され、再び利用される。

細胞内エネルギー源の ATP を使う生合成よりも、ATP を必要としない酵素反応である再利用は圧倒的にコストパフォーマンスが良い (図 1)。しかし、再利用しすぎてもしなすぎても良くない。事実、再利用を担う DUB の異常は、がんや心疾患、神経変性疾患の発症を招く¹⁾。再利用

用の制御は生命維持に重要であるが、未だ再利用の頻度や機構は不明である。なぜなら、化学的にも物理的にも完全に同じ状態に戻る再利用過程は、現在、如何なる手法でも追跡困難であるためである。

このような背景のもと、本研究は、再利用が加水分解反応であることに着目し、酸素の安定同位体を用いた、再利用の直接観測法「¹⁸O 標識法」を考案した²⁾。すでに試験管内において、酸素同位体の取込んだユビキチン分子の量を定量し、再利用に関わる酵素反応を速度論的に求めることで、再利用頻度を定量することに成功している²⁾。本研究では、独自に開発した ¹⁸O 標識法をヒト細胞に適用し、細胞内の再利用頻度を定量することを目的とする。さらに、細胞内環境の変動が再利用にどう影響するのか定量的に解析する。再利用はユビキチン化酵素および DUB の活性に鋭敏に影響される。酵素発現量が異なる細胞種や、酵素活性への影響がある薬剤や刺激を与え、細胞内の再利用が影響されるか調べる (図 1)。

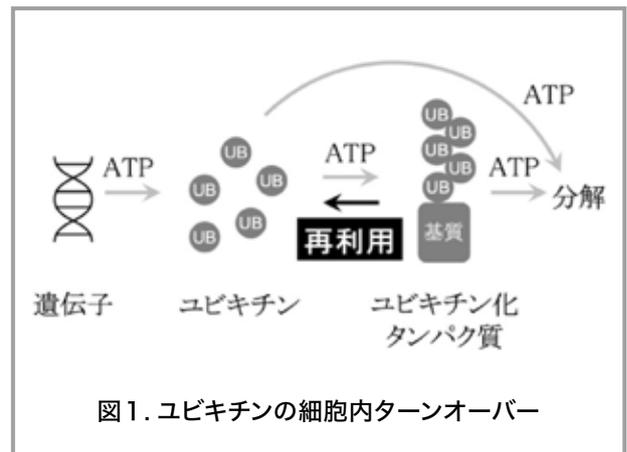


図 1. ユビキチンの細胞内ターンオーバー

【方法】

基質タンパク質からユビキチンを脱離する反応は加水分解反応である。つまり、ユビキチンは再利用される度に溶媒の水由来の酸素原子を分子内に取り込む。したがって、酸素の安定同位体で標識した水を用いれば、再利用によってユビキチン分子内に最大 2 つまで同位体を取り込むことができる (図 2 上)。同位体を取込んだ分子数は、再利用の頻度によって経時的に変化し、理論的には逐次反応式に従う (図 2 下)。同位体を 1 つあるいは 2 つ取込んだ分子は、定量的質量分析によって正確に分離して定量できるため、本研究では本手法を用いてヒト細胞内のユビキチンの再利用の頻度を定量する。

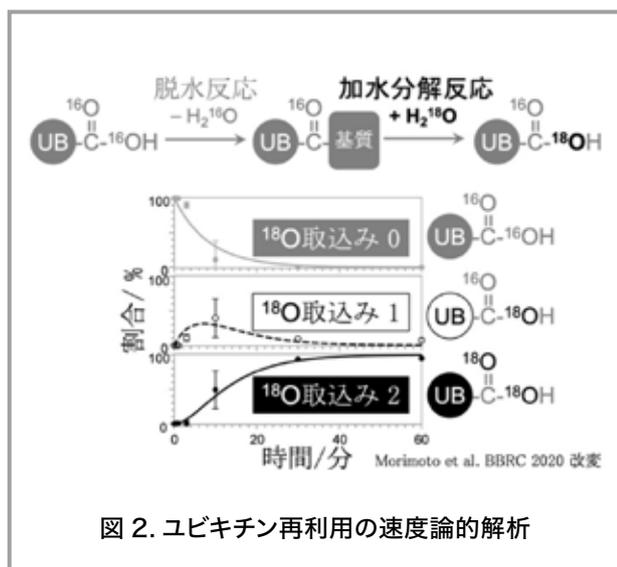


図 2. ユビキチン再利用の速度論的解析

【結果】

¹⁸O 標識した培地で細胞を培養し、¹⁸O 原子を取込んだ細胞内ユビキチンを定量することに成功した。しかし、単に ¹⁸O 標識培地で培養するだけでは生成によっても ¹⁸O 原子を取込んでしまうことがわかった。再利用による取込みと生成による取込みを区別するため、¹³C,¹⁵N 標識培地で細胞を一過的に培養し、その後、¹⁸O 標識培地で培養した。その結果、細胞内ユビキチンの生成と区別して、再利用を ¹⁸O 原子の取込量として定量できた。

再利用を媒介する DUB の発現量により再利用頻度は大きく異なるため、本研究ではモデル細胞であるヒト胎児腎細胞 293 と脱ユビキチン化酵素の発現量が異常な状態にある子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞内のユビキチンの再利用頻度の経時変化を定量した。加えて、ヒト細胞破碎液内のユビキチン再利用頻度も定量した。その結果、細胞種ならびに細胞破碎の有無で優位に再利用頻度が異なることがわかった。さらに、細胞内のユビキチンの再利用量は、生成量や分解量と均衡を保つように調整されていると考えられているため、生成阻害剤 cycloheximide や分解阻害剤（プロテアソーム阻害剤 MG-132）を細胞に添加することによって、生成量や分解量を変化させた細胞内の再利用頻度も調べた。

【考察】

本研究により、試験管内のユビキチン再利用の直接観測法 ¹⁸O 標識法をヒト細胞に適応することができ、実際ヒト細胞内の再利用頻度を定量することに成功した。ユビキチンの再利用は細胞内環境の違いで変動することがわかり、今後、がんや神経変性疾患を模擬した細胞内環境下

でユビキチンの再利用頻度を定量し、再利用の制御不全が招く疾患の発症機構の解明につなげたい。

【文献】

- 1) Park C.W. & Ryu K.Y.,: Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis, BMB Rep., 47(9), 475-482 (2014)
- 2) Tanaka Y., Morimoto D., Walinda E, et al.: Quantitative monitoring of ubiquitination/deubiquitination reaction cycles by ¹⁸O-incorporation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 529(2), 418-424 (2020)

細胞接着・遊走制御機構に関わる細胞膜脂質反転酵素の解析

米田 敦子

(東京薬科大学)

【目的】

脂質 2 重層からなる細胞膜の外側（外葉）と細胞質側（内葉）では脂質組成が異なるが、アポトーシス時のホスファチジルセリンの外葉への露出のように一過的に反転し、重要な機能をなす例が知られている。最近我々は、内葉にのみ存在すると長年考えられてきたホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（PIP2）が細胞膜外葉にも存在し、がん細胞の接着、遊走に働くことを報告した¹⁾。本研究では、がん細胞の接着・遊走を制御する PIP2 反転酵素を同定することで、外葉 PIP2 による新規細胞接着・遊走様式の分子機構解明を目的とした。

【方法】

- 1) 外葉 PIP2 量が異なる細胞株間の遺伝子発現比較から候補となった外葉 PIP2 増加酵素を、外葉 PIP2 量の多い細胞で発現抑制し、当該脂質を減少させる酵素を探索した。当該酵素を外葉 PIP2 量の少ない細胞で過剰発現し、当該脂質が増加するか検討した。
- 2) 外葉 PIP2 近傍タンパク質の同定から、候補酵素の同定を試みた。
- 3) 外葉 PIP2 減少酵素の関与を検討した。各種細胞株での遺伝子発現を解析し、候補となった酵素の発現抑制を行い、外葉 PIP2 量が増加するか検討した。

【結果】

- 1) 酵素 A の発現抑制により外葉 PIP2 量が減少し、過剰発現により当該脂質が増加した。
- 2) 外葉 PIP2 量の多い細胞を用い、外葉 PIP2 近傍タンパク質を同定したが、候補となりうる酵素は検出されなかった。
- 3) 酵素 B を発現抑制したところ、外葉 PIP2 量が増加した。

【考察】

本研究から、酵素 A と B が外葉 PIP2 量を調節でき、当該脂質が高度に調節されていることが示唆された。本研究の成果は外葉 PIP2 による新規細胞接着・遊走の機構解明とその阻害薬開発に繋がる。

【文献】

- 1) Yoneda, A. et al., Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility, *Biochem Biophys Res Commun.* 527, 1050 (2020).

超耐熱性インジゴ還元酵素の「藍染め」への応用利用

米田 一成

(東海大学 農学部 食生命科学科)

【背景・目的】

日本の伝統的な産業である藍染めは、タデ科植物である藍の葉を発酵させた「スクモ」を材料として使用し、常温でかつ高アルカリ条件下で行われる発酵還元過程を経て製造される。古くから微生物によるスクモの還元が行われてきたが、その具体的なメカニズムは不明のままであり、職人たちは経験と勘に頼って作業を行ってきた。本研究では 100°C でも失活しない熱安定性の高いインジゴ還元酵素に着目して酵素の機能解析、熱安定化機構の解明および、藍染めへの応用を行った。

【方法】

Bacillus smithii 由来インジゴ還元酵素を大腸菌を用いて大量発現した。活性測定にはモデル基質である水溶性インジゴのインジゴカルミン、本来の基質であるインジ

ゴと NADH を用いた。藍染め実験にはインジゴ還元顆粒を 0.1% に希釈することで染色液として使用した。酵素の立体構造解析は高エネルギー加速器研究機構で、ドッキングシミュレーションは AutoDock Vina を用いた。

【結果・考察】

インジゴを用いた活性測定では、ツンベルク管付きキューベットを用いアスピレーターで脱気後活性測定を行った。しかし、この方法は溶存酸素の除去が不十分であり、酵素活性を検出することができないことが判明した。アスピレーターで簡単に溶存酸素の除去が可能であれば、酵素を使用した藍染めにも N₂ ガスではなく、脱気という簡便な方法が使用できる可能性がある。藍染めには染色の有無が目視で判断できる 0.1% のインジゴ還元顆粒を使用した。酵素反応による染色を 70°C で 10 分間、N₂ ガス存在下で行った結果、酵素有りの方がより青く染色できることを明らかにした。

本酵素の耐熱化機構を検証した結果、ダイマー形成に重要な役割をする F105 が重要であることを実証した。また、ドッキングシミュレーションによりインジゴカルミンとの結合モデルを明らかにし、基質結合に関わるアミノ酸および、反応機構を推定することができた。

本研究の進展において、公益財団法人日本応用酵素協会からの多大なるご支援に心から感謝申し上げます。

【関連する発表論文】

- 1) 米田 一成, 櫻庭 春彦, 大島 敏久: ジャパン・ブルーとインジゴ還元酵素, *化学と生物*, 61, 9-11 (2023) .
- 2) 米田 一成, 吉岡 観沙, 山下 秀次, 山口 浩, 荒木 朋洋: インジゴ還元酵素を利用した酵素化学実験の教材化, *海大学紀要 農学部* 41, 9-15 (2022) .

非コードRNAによるダイレクトな蛋白キナーゼ活性調節メカニズムとシナプス形成におけるその生理的意義の解明

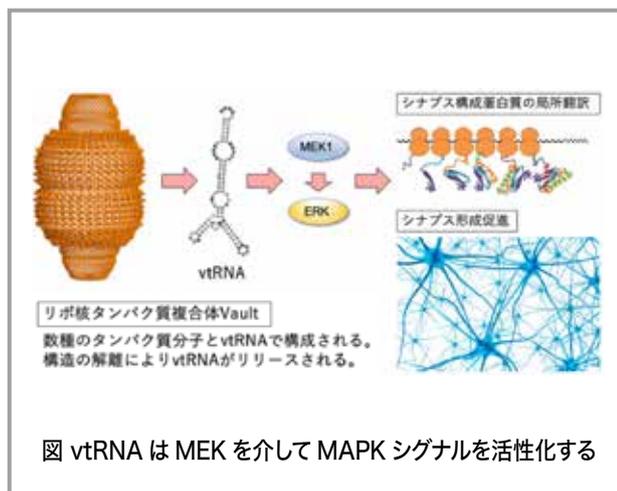
若月 修二

(国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部)

【目的】

機能不明のリボ核蛋白質複合体 Vault とともに神経突起内を輸送される非コードな vtRNA が MEK に直接作用

して MAPK シグナルをダイレクトに調節することで、シナプス形成を促進することを見出した (1)。発達期のシナプス形成では、MAPK シグナルは中心的な役割を担うことが知られる。本研究では非コード RNA による MEK 活性化調節メカニズムとその神経生理学的意義の解明を目指して開始された。



【方法】

1. Aurora-A の活性化と MVP のリン酸化メカニズム

Vault の構造は Aurora-A による MVP のリン酸化をきっかけに解離する。培養シナプス形成モデルを用いて、Aurora-A 活性化ならびに Vault の構造解離につながる MVP リン酸化サイトを調べた。

2. vtRNA による MEK1 の活性調節メカニズム

vtRNA による MEK の活性化を、vtRNA との結合による MEK の構造変化に帰着するため、HITS-CLIP 法などの蛋白質-RNA 相互作用検出法により vtRNA の結合領域を調べた。

【結果】

シナプス領域におけるレドックス反応を介して翻訳後修飾された Aurora-A が自己リン酸化して活性化すること、MVP の 2 つのセリン残基が Aurora-A によりリン酸化されることで Vault の構造が解離すること、などが明らかとなった。また、vtRNA-MEK 複合体の結晶構造解析に着手した。

【考察】

近年、シナプス形成の障害が自閉症などの神経発達障害の発症や病態に大きな影響を与えることが注目されている。本研究で着目した MAPK (ERK) ならびに MVP 遺伝子欠損が神経発達障害の発症と深く関連する可能性が

示唆されている。本研究の成果は、シナプス形成が正しくできないために発症するさまざまな神経発達障害の病態理解に資すると考えられる。

【文献】

1) Wakatsuki, S., Takahashi Y., Shibata M., et al.: Small non-coding vault RNA modulates synapse formation by amplifying MAPK signaling, *J. Cell Biol.*, 220, e201911078, 2021.

環状ペプチド修飾酵素の機能解析と応用展開

脇本 敏幸

(北海道大学大学院薬学研究院)

【目的】

天然物には大環状骨格を有するペプチドが多数存在し、それらは生合成酵素によって効率的に合成されている。従って、これらの天然物の生合成酵素は、中分子ペプチド骨格を効率的に合成する生体触媒として有望である。そこで、本研究では自然界に存在するペプチド修飾酵素の機能解析と応用展開を目指した。

【方法】

我々はこれまで放線菌の非リボソームペプチド生合成経路より、新規ペプチド環化酵素であるペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ (PBP-type TE) を見つけてきた¹⁾。本研究では、surugamide 類の生合成において、ペプチド環化反応を担う PBP-type TE (SurE) の基質選択性を明らかにするために、エチレングリコールを脱離基として用いた鎖状基質ペプチドの効率的な合成方法を開発した (図 1a)²⁾。

【結果】

検討の結果、SurE は、N 末端残基および、側鎖配列、鎖長に対して寛容な選択性を有することが判明した²⁾。一方で C 末端には厳密な選択性を示し、アキラルなグリシンや電荷を有する極性残基を持つ基質を環化できないことが明らかになった。そこでホモログ酵素を検証した結果、WolJ が SurE と相補的な基質選択性を示した。これら環化酵素を利用して複数種の環状ペプチドを高収率で合成した (図 1b)。

【考察】

PBP-type TE は寛容な基質選択性を示すことから、マクロラクタム化生体触媒として有望な酵素ファミリーである。特に、エチレングリコールを脱離基に用いた化学-酵素合成法によって、多様な配列を有する環状ペプチドの並列合成が可能になった。本技術は創薬研究のみならず、様々な機能性を有する新規環状ペプチドの創製研究に有用である。

【文献】

- 1) Kuranaga, T., et al.: Total synthesis of a non-ribosomal peptide surugamide B and identification of a new offloading cyclase family. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57, 9447 (2018).
- 2) Kobayashi, M., et al.: Streamlined chemoenzymatic synthesis of cyclic peptides by non-ribosomal peptide cyclases. *J. Am. Chem. Soc.*, 145, 3270 (2023).

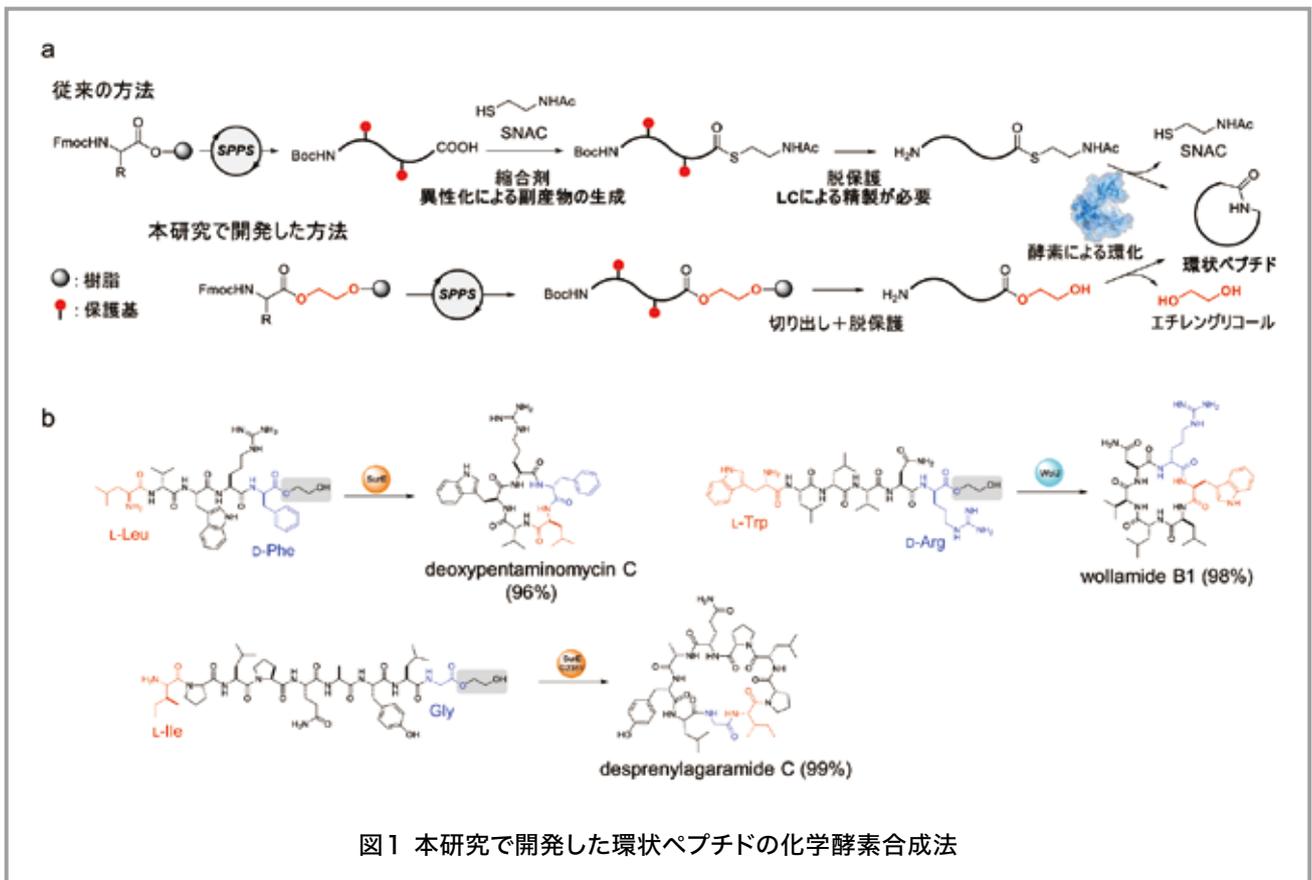


図1 本研究で開発した環状ペプチドの化学酵素合成法

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 (TMFC)

肥満に伴う高インスリン血症における肝臓が及ぼす影響とその機序の探索

浅井 洋一郎

(東北大学大学院医学研究科 糖尿病代謝内科学分野)

【目的】

肥満・脂肪肝、また老化では、肝臓におけるインスリン分解が低下することが報告されている。そのため、高インスリン血症が助長され、肥満がさらに加速する悪循環が考えられる。脂肪肝における肝臓でのインスリン分解低下の機序はこれまで十分に明らかとなっておらず、本研究では肥満・脂肪肝モデルマウス、加齢マウスを用いて、肝臓でのインスリン取り込み/分解が低下する機序の検討を行った。

【方法】

1. 野生型マウスに対し高脂肪食の負荷を行い、肥満と脂肪肝を形成させ、ブドウ糖負荷試験における血中インスリンと血中Cペプチドとのモル比の測定を行うことで肝臓のインスリンクリアランスを評価した。また、同様の検討について、老化マウスを用いても評価した。
2. 肝臓におけるインスリン分解に関与するインスリン分解酵素 (IDE:Insulin degrading enzyme), CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) について遺伝子発現・タンパク発現を評価した。
3. 肥満モデル・老化モデルにおいて、走査型電子顕微鏡を用いて類洞内皮細胞の形態学的評価を行った。
4. MACS (Magnetic-activated cell sorting) を用いて特異的に類洞内皮細胞を単離し、RNA sequence による網羅的遺伝子解析を行った。
5. 血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスを用いて、肥満モデル、老化モデルで肝臓のインスリンクリアランス、走査型電子顕微鏡による類洞内皮の形態学的評価を行った。

6. 加齢マウスに対し、Xの阻害薬を投与し、肝臓のインスリンクリアランスについて評価を行った。

【結果】

1. 高脂肪食群、老化マウスでは、いずれも肝臓のインスリンクリアランスが低下することがわかった。
2. 肝臓におけるIDE,DEACAM1の遺伝子発現・タンパク発現は高脂肪食群で低下していた。一方、加齢マウスにおいてはこれらの遺伝子発現・タンパク発現に変化はなかった。
3. 肥満モデル・老化モデルにおいて、類洞内皮細胞の篩板孔の減少が観察された。
4. 肥満モデル・老化モデルにおいて、類洞内皮細胞では、炎症に関わる遺伝子群が上昇していることがわかった。
5. 血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスでは、肥満モデル・老化モデルで肝臓のインスリンクリアランスの低下が改善していることがわかった。またそれに伴い、類洞内皮細胞の篩板孔の減少についても改善していた。
6. Xの阻害薬により、加齢マウスにおける肝臓のインスリンクリアランスが改善することがわかった。

【考察】

高脂肪食負荷マウス・加齢マウスにおいて肝臓のインスリンクリアランスの低下を認めた。高脂肪食負荷では、インスリン分解に関わる分子の発現が低下していたが、加齢では変化を認めなかった。類洞内皮細胞の篩板孔の減少は肝臓におけるインスリン取り込み低下に関与することが報告されており、両モデルにおける肝臓インスリンクリアランス低下の原因の一つである可能性が考えられた。また、高脂肪食・加齢モデル、いずれの類洞内皮細胞においても炎症に関わる遺伝子群が増加していた。血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスにおける実験では、肥満モデル・老化モデルで観察された肝臓インスリンクリアランス低下や類洞内皮細胞の篩板孔の減少が改善していることがわかり、篩板孔の減少に炎症が寄与していることが推察された。炎症において誘導されるXの阻害薬

を投与したところ、加齢による肝インスリンクリアランス低下が改善することもわかり、同分子の関与が示唆された。今後、肥満や老化に伴う高インスリン血症における肝臓の役割をさらに明らかにすることで、肥満を予防するための治療につながる事が期待される。

免疫学的アプローチによる腎臓病に対する新規治療戦略の開発

畔上 達彦

(慶應義塾大学保健管理センター/慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科)

【背景・目的】

慢性腎臓病（CKD）は末期腎不全や脳心血管疾患の発症・死亡のリスク因子で、患者数は本邦で1330万人、世界で8億5000万人にのぼる。CKD、末期腎不全やその合併症の治療に要する医療費は、医療保険財源を逼迫する一因となるが、CKDに対する根本的な治療法は確立していない。したがって、CKDに対する新たな治療戦略を構築することは、患者個人の生命予後、健康寿命の観点だけでなく、医療経済的な側面からも、喫緊かつ重要な医療課題であると考えられる。

CKDを制御するために、本研究では、原因として最多である糖尿病性腎臓病（DKD）と、進展機序のfinal common pathwayである間質線維化に着目した。特にDKDの発症・進展に深く関与する終末糖化産物受容体（RAGE）と、線維化のkey factorであるconnective tissue growth factor（CTGF）を治療標的に選択した。

CKDは一般に、慢性の経過で進行するため治療が長期間に及ぶ。ワクチン接種により、標的分子の機能を阻害する抗体を誘導することができれば、少ない投薬回数で長期間にわたる治療効果を得ることが可能となり、医療費の軽減や治療アドヒアランスの向上に寄与することができる。

このような背景を踏まえ、本研究では、アンメット・メディカル・ニーズの高いCKDに対して、RAGE、CTGFを標的とした治療ワクチンの開発に取り組み、腎臓領域における新たな治療戦略の構築を目指している。

【方法】

1.RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

1型糖尿病モデルとして、DBA/2Jマウスに膵β細胞毒性を持つストレプトゾトシンを投与する。また、2型糖尿病モデルとして、BKS.Cg+Leprdb/Leprdbマウス（db/dbマウス）を利用する。DKDモデルマウスに、RAGEワクチンを隔週で計3回投与し、尿中アルブミン排泄測定、光学顕微鏡解析（メサンギウム基質面積、糸球体径）、電子顕微鏡解析（糸球体基底膜厚）を行う。

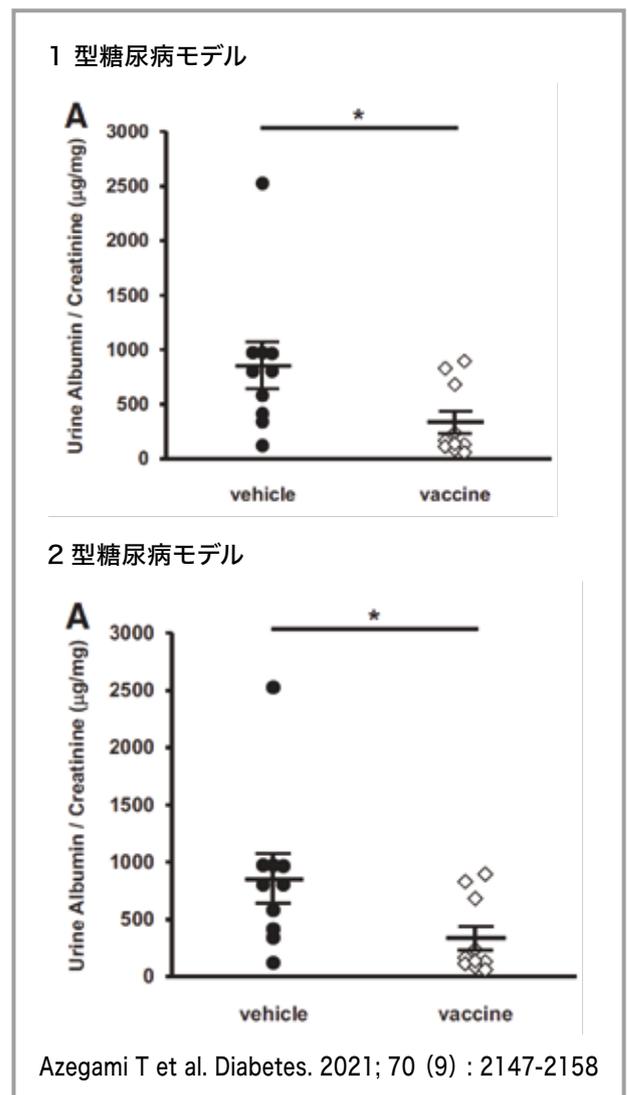
2.CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

腎線維化モデルとして片側尿管結紮（UUO）マウスを、腎不全モデルとしてアデニン負荷マウスを利用する。マウスに、CTGFワクチンを隔週で計3回投与し、両モデルマウスの腎間質線維化を光学顕微鏡で評価し、さらにアデニン負荷マウスの血清クレアチニン、尿中アルブミン排泄を測定する。

【結果】

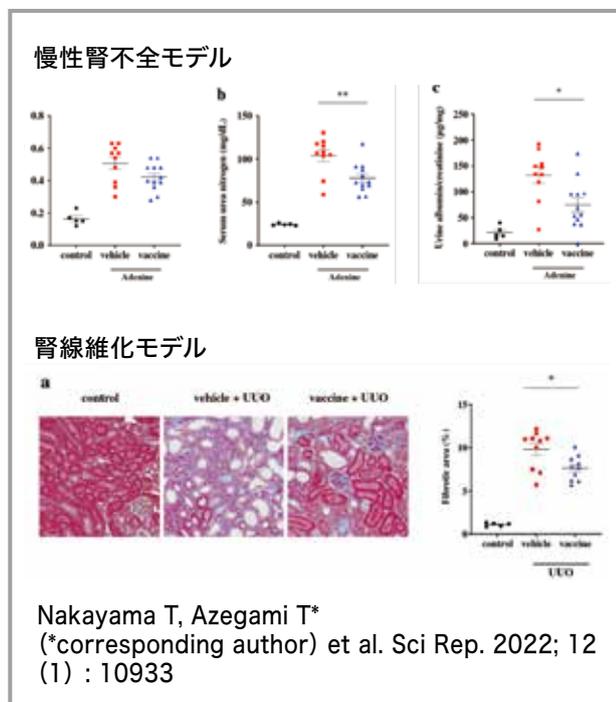
1.RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

RAGE ワクチン接種群で、尿中アルブミン排泄は少なく、



糸球体腫大・メサンギウム基質拡大が軽減され、DKD に対する腎保護効果が示された。また、in vitro 検討で、ワクチン接種後の IgG 抗体が、RAGE 機能を直接的に阻害することが示された。

2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討



CTGF ワクチン接種群で、アデニン負荷マウスの腎機能障害が軽減した。また、アデニン負荷マウス、UUO マウスにて、腎間質線維化が軽減され、CKD に対する腎保護効果が示された。また、in vitro 検討で、ワクチン接種後の IgG 抗体が、CTGF 機能を直接的に阻害することが示された。

【考察・今後の展望】

上記の検討結果にて、抗 RAGE ワクチン、抗 CTGF ワクチンの腎保護効果が確認された。現在、特許を出願し、審査に向けて準備中である。最終的に臨床応用できるように、検討を進めていく方針である。また、今後の展開として「炎症・線維化・過凝固」の制御を目的に、新たに plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を標的とするワクチンを作成し、現在、敗血症モデルでの効果を検討し報告した (Nakayama T, Azegami T*[*:corresponding author] et al. Sci Rep. 2023; 13 (1) : 3103.)。次に、腎臓病を中心に Non-communicable disease での効果を検討する。

百寿者の腸内細菌解析による長寿メカニズムの解明

新 幸 二

(慶應義塾大学 医学部 微生物学・免疫学教室)

【目的】

長寿に関与する腸内細菌の探索のため、健康高齢者の代表である百歳以上の百寿者の便サンプルの解析を行った。百寿者は、年齢と比較して認知機能が維持されている割合が高く、糖尿病の有病率も低く、また activity of daily life (ADL) も高く維持されていること、また百寿者の特徴の一つとしてポジティブシンキングが知られている。そのため、百寿者の百寿者たる所以を明らかにすることで、健康寿命の延伸・健康長寿社会への実現につながると考えられる。そこで、慶應義塾大学百寿総合研究センターと共同で百寿者の便サンプルの採取を行い、百寿者、高齢者 (平均 85 歳)、若者 (平均 30 歳) の腸内細菌叢の比較および腸内細菌由来代謝物の比較を行い、百寿者特異的に存在する腸内細菌種および代謝産物の解析を通して百寿者の長寿の秘訣の一端を明らかにすることを目指した。

【方法】

百寿者、高齢者、若者から提供いただいた便サンプルから DNA 抽出を行い、16S rRNA 解析、メタゲノム解析により腸内細菌叢の比較解析を行った。また同時に便サンプルから代謝物を抽出し質量分析計 (GC-MS, LC-MS/MS) を使用して便中の短鎖脂肪酸・胆汁酸を測定した。その後、百寿者に特徴的に存在していた二次胆汁酸について検討を行うため、便サンプルから細菌株の培養・単離を行い、in vitro における責任細菌の同定・責任遺伝子の同定、および機能解析を行った。

【結果】

細菌叢解析の結果、高齢者・若者と比較して百寿者で有意に多く存在して腸内細菌種として、*Neglecta timonensis*, *Clostridium scindens*, *Parabacteroides merdea* などの細菌種を特定した (図 1)。これらの細菌のうち、*C. scindens* はこれまで二次胆汁酸代謝に関与していることが報告されていたため、便中の二次胆汁酸組成に違いがある可能性が考えられた。そこで、百寿者の便中の胆汁酸定量を行うため、53 種の胆汁酸化

化合物を LC-MS/MS を用いて測定できる系を構築し測定を行ったところ、isoalloLCA や 3-oxoalloLCA などの allo 体 (5 α) 二次胆汁酸が百寿者の便中で有意に増加していた (図 2)。このことから、isoalloLCA や 3-oxoalloLCA が長寿に関与している可能性が考えられた。そこで次に、この isoalloLCA や 3-oxoalloLCA を合成できる細菌種を探索するため百寿者の便から細菌株を単離し、*in vitro* において基質と考えられる一次胆汁酸であるケノデオキシコール酸 (CDCA) やヒト便中に豊富に存在する二次胆汁酸の一種であるリトコール酸 (LCA)、中間産物と考えられる 3-oxo- Δ 4-LCA を加えそれぞれの細菌株を培養し、どのような細菌種が百寿者特異的な二次胆汁酸の変換を行うことができるかを検討した。培養 48 時間後の培養上清を回収し、LC-MS/MS により胆汁酸量を測定したところ、CDCA や LCA からは isoalloLCA, 3-oxoalloLCA ともに検出されなかったが、3-oxo- Δ 4-LCA を培養液に加えた場合には *Parabacteroides merdae* や *Odoribacteraceae* などの細菌株が isoalloLCA を産生できることが明らかになった。そこで、3-oxo- Δ 4-LCA から isoalloLCA への変換にどのような酵素が関与しているかを同定するため、ゲノム配列から胆汁酸代謝に関与すると想定される遺伝子を探索し、*P. merdae* の遺伝子欠損株を作成した。その結果、遺伝子番号 3086 欠損株は 3-oxo- Δ 4-LCA から 3-oxoalloLCA への変換、3805 欠損株は 3-oxoLCA から 3-oxo- Δ 4-LCA への変換、3804 欠損株は 3-oxoalloLCA から isoalloLCA への変換に障害があることが明らかになった (図 3)。以上のことから百寿者で有意に増加していた isoalloLCA の産生を行う腸内細菌の同定とその代謝に関与する酵素の同定を行うことができた。最後に、二次胆汁酸である LCA や isoLCA がグラム陽性の病原性細菌の増殖を抑えることが知られていたため、isoalloLCA も同様の機能を有しているのかを解析した。その結果、LCA や isoLCA と比較して isoalloLCA は約 1/10 程度の低濃度で *Clostridium difficile* や VRE, MRSA などのグラム陽性菌の増殖を抑えることが明らかになった (図 4)。電子顕微鏡写真の結果から、isoalloLCA 処理後の *C. difficile* は細胞壁や細胞膜の萎縮が見られ、isoalloLCA は界面活性作用や膜内外の pH 調整破綻作用などを有していると考えられた。

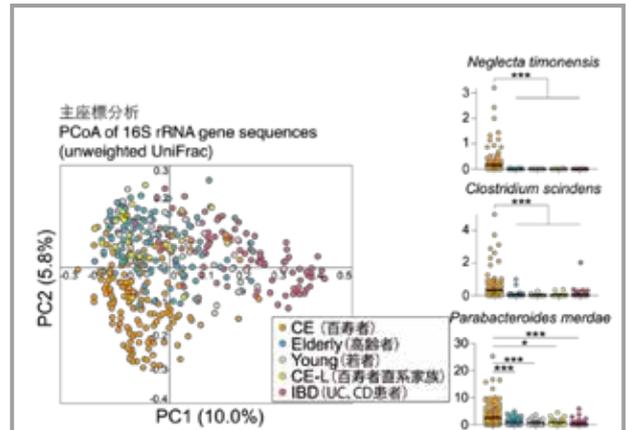


図 1 腸内細菌叢解析

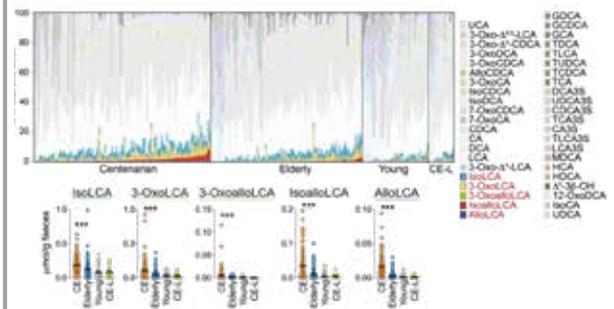


図 2 便中胆汁酸組成の比較

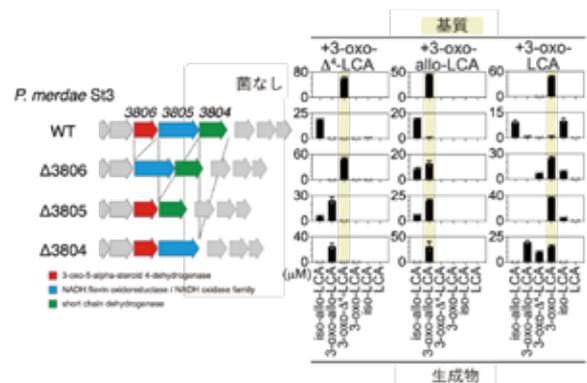


図 3 胆汁酸代謝酵素の同定

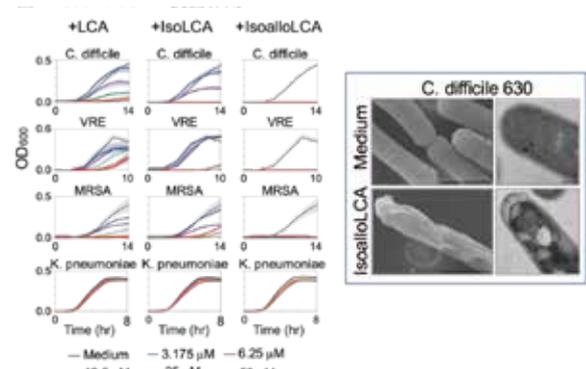


図 4 isoalloLCA の抗菌作用

【考察】

本研究では、百寿者に特徴的な二次胆汁酸を特定し、長寿に関与すると想定される腸内細菌種の同定を行った。その結果、百寿者の便中に有意に多く存在していた isoalloLCA が腸内細菌によって産生され、グラム陽性病原性細菌の増殖を抑えることが明らかになった。このことから isoalloLCA 産生する腸内細菌が増加することで長寿につながる可能性が想定された。また、胆汁酸は宿主の受容体である FXR や TGR5 などを通じ、コレステロール代謝や糖代謝に関与していることが知られていることから、今後は isoalloLCA の宿主への影響を解析していく予定である。同時に胆汁酸代謝を行う腸内細菌がステロイドホルモンの代謝も行っていることも見出しており、腸内細菌がステロイドホルモンの代謝を調整することで長寿へ関与していることも示唆される。そこで、今後は長寿につながる腸内細菌の同定とその作用機序について、胆汁酸代謝とともにステロイド代謝にも注目し解明を行って行きたいと考えている。

【文献】

- 1) Johansen J, Atarashi K, & Plichta DR.: Centenarians have a diverse gut virome with the potential to modulate metabolism and promote healthy lifespan. *Nat Microbiol.* 8 (6) :1064-1078. (2023)
- 2) Sato Y, Atarashi K, Plichta DR, & Honda K. Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. *Nature.* 599 (7885) :458-464. (2021)
- 3) Atarashi K, Suda W, & Honda K. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science.* 358 (6361) :359-365. (2017)

骨の生理機能を調節する細胞内Ca²⁺シグナルの理解と制御

市村 敦彦

(京都大学大学院薬学研究科)

【背景】

細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇は多彩な生理的応答のスイッ

チとして伝達物質やホルモンの放出、細胞増殖、細胞死など様々な細胞機能を制御することで、組織発生などの高次機能をも規定している。そのため、細胞内 Ca²⁺ シグナルの動態や制御分子機構を理解することは、その破綻により発症する疾患病態の解明や新たな治療法の提案に資する。

我々は、小胞体膜に分布するイオンチャネル *Tric-b* 欠損マウスの表現型解析をきっかけとして、骨の生理機能を調節する細胞内 Ca²⁺ シグナルの研究を推進してきた。本年度は、*Tric-b* 欠損が非典型的な軟骨細胞死を引き起こす分子メカニズムについて解析した。

【目的】

本研究の目的は、TRIC-B の骨の生理機能調節における生理的役割を解明し、関連するヒト疾患における病態分子機序を明らかとすることである。

【方法】

Tric-b 欠損マウス大腿骨骨端軟骨組織について、病理組織学染色、電子顕微鏡解析、免疫組織学的解析を行った。細胞死に至る経路について遺伝子発現やリン酸化経路等総合的に解析した。軟骨細胞内 Ca²⁺ イメージングにより細胞内 Ca²⁺ ハンドリング異常を評価した。

【結果】

Tric-b 欠損は軟骨細胞の小胞体 Ca²⁺ ハンドリングを障害し、II 型コラーゲン細胞外分泌を阻害することで小胞体ストレスを誘導し、主として PERK 経路の活性化からカスパーゼ 12、カスパーゼ 3 を活性化し、軟骨組織中の一部の細胞において非典型的な細胞死を引き起こすことが一連の研究により解明された (*Cell Death and Disease*, in press)。

【考察】

TRIC-B 遺伝子変異はヒト骨形成不全症のみならず軟骨内骨化障害を伴う胎児骨格異形成症の原因として報告されている。*TRIC-B* 遺伝子変異による重篤な *TRIC-B* チャネルの機能障害が推定されており、マウスモデル系での観察と同様の病態メカニズムが想定される。*Tric-b* 欠損マウスは、これらの希少疾患治療のみならず、骨密度改善薬などの開発に向けて有用なモデル実験系を提供することが期待される。

DNA損傷応答に着目した心不全・心筋症治療法の開発

伊藤 正道

(東京大学大学院医学研究科先端臨床医学開発講座)

【背景】

心不全は心臓の機能異常によって全身循環の失調を来した状態である。所属研究室では、心臓でメカニカルストレスや酸化ストレスの結果生じる「DNA 損傷応答の亢進」が重要な心機能の低下の原因であることを報告してきた¹⁻³⁾。しかし、これを抑制する介入方法は開発されていない。

【目的】

心筋細胞の DNA 損傷応答を軽減する方法を確立することで、新たな心不全の治療薬の開発を目指す。

【方法・結果】

- ・ LMNA 変異 (p.Q353R) を有する心不全患者から iPSC 細胞を作成し心筋細胞に分化させた。患者由来細胞の該当変異を修復した isogenic control 株を対照とした。
- ・ 変異株では核の高度な変形、収縮力の低下を認めた。また変異株では DNA 二重鎖切断マーカー γ H2AX の発現増加を認めた。
- ・ 変異株細胞を用い、 γ H2AX の集積を軽減させる化合物のスクリーニングを行った。その結果、vitamin D2 (VD2) が変異株の DNA 損傷を有意に軽減させることが判明した。RNA-seq の結果、VD2 は疾患株で低下している DNA 修復酵素の発現を回復させた。
- ・ プロテインアレイを用いた検討の結果、変異 LMNA タンパクは vitamin D 受容体 (VDR) との結合性がと野生型と比較して亢進しており、変異株で VDR の転写活性が低下していることが分かった。
- ・ VD2 analog は圧負荷心不全モデルマウス、Lmna ナンセンス型変異心筋症モデルマウスの 2 つのモデルで DNA 損傷の蓄積を軽減させ、心機能を改善させた。

【考察】

VD2 はすでに安全に使用しうる薬剤であり、本研究で LMNA 変異ヒト心筋細胞の異常表現型を是正できることが判明した。Drug repositioning を目指した臨床試験が期待される。

【文献】

- 1) Higo T, Ito M et al. *Nat Commun.* 2017 Apr 24;8:15104
- 2) Nomura S, Ito M et al. *Nat Commun.* 2018 Oct 30;9 (1) :4435
- 3) Ko T, Ito M et al. *JACC Basic Transl Sci.* 2019 Sep 25;4 (6) :670-680

転写調節因子・エピゲノム制御因子に着目した心不全の病態解明と新たな心不全治療法の開発

稲住 英明

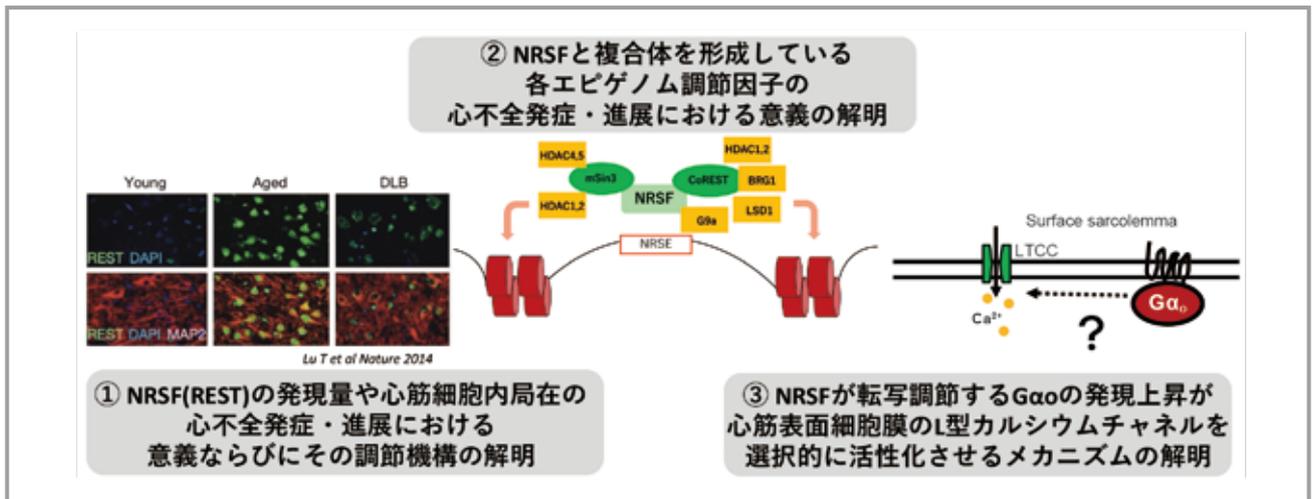
(東京大学大学院医学系研究科循環器内科学)

【目的】

- ① 転写調節因子 NRSF ならびにそのスプライシングバリエーションの発現量の心不全発症進展における意義ならびにその調節機構の解明
- ② NRSF と複合体を形成している各エピゲノム調節因子 (HDAC1,2, LSD1, G9a) の心不全発症進展における意義の解明
- ③ NRSF が転写調節する $G\alpha o$ の発現上昇が心筋表面細胞膜の L 型カルシウムチャネルを選択的に活性化させるメカニズムの解明を通して心不全病態の理解を更に進め、新たな治療標的の同定を目指す。

【方法 / 結果】

- ① 心筋における NRSF の発現をウエスタンブロットティングで評価したところ、加齢に伴い心室筋における NRSF の発現量が低下していることが明らかになった。心筋特異的に、タモキシフェン投与により後天的に NRSF の発現を抑制できる NRSFicKO を作成し表現系の評価を行ったところ、ただ NRSF の発現を抑制しただけでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で、横行大動脈縮窄による圧負荷を加えるとコントロールと比較した生存率の低下や心機能の低下を示すことが明らかになった。
- ② 心筋特異的に、タモキシフェン投与により後天的に HDAC1/2 の発現を抑制できる HDAC1/2 icKO を作成し表現系の評価を行ったところ、オスのマウスでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で、メスのマウ



スでは著明な心機能の低下，心拡大，心筋の線維化を示すことが明らかになった。

③ $G\alpha_o$ の心筋特異的過剰発現マウスの心筋細胞で免疫染色での評価を行ったところ， $G\alpha_o$ はT管構造にはほとんど存在せず，主に細胞表面膜に限局することが明らかになった。

【考察】

転写制御因子 NRSF は発生途上のみならず，成体においても心筋の恒常性維持に寄与していること，また加齢に伴いその発現が減少していることが明らかになり，加齢に伴い心機能が低下しやすくなる原因の一端を担っている可能性が示唆された。

エピゲノム制御因子である HDAC1/2 の心筋恒常性維持における役割の性差が示され，メスにおいてはかなり重要な役割を担っている可能性が示唆された。

$G\alpha_o$ の発現上昇に伴い心筋表面細胞膜の L 型カルシウムチャンネル電流が選択的に増加するメカニズムとして， $G\alpha_o$ 自身の局在の違いが関与している可能性が示唆された。

ポトーシスと，炎症性の細胞死が知られる。特に，高度脂肪肝で発症する炎症性細胞死は，急性肝障害や非アルコール性脂肪肝肝炎（NASH）の発症・増悪と密接に関連する。

【目的】

高度脂肪肝で発症する炎症性細胞死の様式を同定し，その制御メカニズムの解明を行う。

【方法】

急性肝障害モデルとして，高脂肪食誘導性の中等度または高度脂肪肝 70% 肝切除マウスを用いた。慢性肝障害モデルとして，メチオニン・コリン欠損餌（MCD）誘導性の NASH マウスを用いた。これらモデルマウスにおいて，血中パラメーター解析，肝細胞死解析，遺伝子発現解析，タンパク発現解析を行った。さらに，ヒト NASH の肝生検組織を用いた免疫組織学的解析を行った。

【結果・考察】

高度脂肪肝では，中等度脂肪肝と比べ，肝切除後の細胞死が増加しただけでなく，肝組織中に巣状細胞死が発生し，肝障害が悪化した。肝切除後に発症する細胞死の様式は，中等度脂肪肝ではアポトーシスのみであったが，高度脂肪肝ではアポトーシスに加え，炎症性細胞死が発症した。その際，高度脂肪肝では，炎症性細胞死であるネクロプトーシスの制御因子 Ripk3 の発現と，ストレス誘導性転写因子 Atf3 の発現が誘導された。肝細胞 Ripk3 ノックダウンによる検討から，高度脂肪肝で発症した炎症性細胞死がネクロプトーシスであることを明らかにした。さらに，ATF3 欠損・過剰発現による検討から，高度脂肪肝でのネクロプトーシス発症に，ATF3 が重要な役割を果たす可能性を見出した。培養肝細胞への

脂肪肝再生障害に対する肝細胞死制御の有用性の解明

稲葉有香

(金沢大学 新学術創成研究機構)

【背景】

肝細胞内脂肪蓄積は，その多寡により，異なる様式の細胞死を誘導する。細胞死の様式として，非炎症性のア

ATF3 過剰発現による検討を行い、ATF3 が Ripk3 プロモーター領域に結合し、Ripk3 発現を誘導することで、ネクロプトーシスを誘導することを明らかにした。MCD 誘導性 NASH では、細胞死の増加、肝 Atf3・Ripk3 発現の増加を呈した。Atf3・Ripk3 は高頻度で同一細胞に発現した。さらに、肝 ATF3 欠損が、MCD 負荷後の Ripk3 発現を抑制し、NASH を改善させた。ヒト NASH 症例の肝生検組織においても、肝細胞障害・線維化の高度な症例で、ATF3・RIPK3 陽性細胞数が増加し、これらが高頻度で同一細胞に発現した。

【結語】

高度脂肪肝で発症する炎症性細胞死が、RIPK3 依存的ネクロプトーシスであり、その制御メカニズムとして ATF3 が中心的役割を担うことを明らかにした。本研究成果は、ATF3 誘導性 RIPK3 発現が、急性・慢性肝障害の新規治療標的として有用である可能性を示唆している。

社会経済因子が生活習慣病及び合併症を引き起こす機序の疫学的解明

井上浩輔

(京都大学)

【背景・目的】

冠動脈石灰化 (CAC) は、心血管疾患 (CVD) の重要な予測因子である。冠動脈 CT の限られた資源を考えると、CT スクリーニングによって CAC を検出することで最もベネフィットを受ける個人を特定することが喫緊の課題となっている。しかし、CAC が CVD に与える負担が、複合的な個人特性によって異なるかどうかについては、いまだエビデンスが乏しい。そこで本研究では、多民族コホートの縦断観察データに因果フォレストを用いることで、個人レベルの CAC による CVD 発症リスクの上昇度を推定し、どのように冠動脈 CT スクリーニングの対象集団を選定すべきかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

具体的には Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis という心血管系疾患のない 45 歳以上の成人を対象とした縦断コホートに、傾向スコアマッチング及び因果フォレストを応用し、CAC と CVD の関連 (CAC による CVD リ

スク上昇の程度) における異質性を評価した。マッチングされた 3,348 人の平均年齢は 62 歳、女性は 52%であった。CAC による CVD リスク上昇の程度は個人レベルではばらつきが強いことが、因果フォレストモデルから明らかとなり、10 年後 CVD リスクと用量反応関係が認められた。10 年後 CVD リスクが低い集団においても、70% の個人が CAC によって CVD リスクが大きく上昇することが示され、その傾向は男性で強く認められた。

【考察】

本研究において CAC と CVD 発症の関連には個人ごとのばらつきがあることが示された。例え絶対的な 10 年後 CVD リスクが低くても、CAC によって CVD リスクが上昇する個人が一定数いることが明らかとなり、今後そのような患者にも冠動脈 CT スクリーニングが行き届くような仕組みが必要である。本研究結果は、絶対的な CVD リスクのみならず CAC によりどの程度 CVD リスクが上昇するかを個人レベルで考えることの重要性を示唆しており、適切な医療資源の分配からも重要である。2023 年度は、研究課題テーマである社会経済因子とのかかわりを紐解くことで、社会格差への影響も検討する予定である。

【文献】

Inoue, K., Seeman, T. E., Horwich, T., Budoff, M. J., & Watson, K. E. (2023) . Heterogeneity in the association between the presence of coronary artery calcium and cardiovascular events: a machine-learning approach in the MESA study. *Circulation*, 147 (2) , 132-141.

原発性アルドステロン症の病態解明と新規診断法の確立

馬越洋宜

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【背景】

原発性アルドステロン症 (primary aldosteronism: PA) は、代表的な二次性高血圧の成因の 1 つであり、疾患頻度に加えて臓器障害頻度も高率である。PA は、その成因によりアルドステロン産生腺腫と副腎過形成に大きく分類される。両者は治療方針および重症度が大きく

異なるため病型の鑑別は重要であり、PAにおけるさらなる治療成績の向上には早期診断・治療を可能とする医療基盤の確立が求められている。

【目的】

本研究では、¹⁾機械学習を用いたPAの病型・治療予後予測モデルの確立と²⁾PAの成因であるアルドステロン産生細胞群（APCC:Aldosterone Producing Cell Clusters）の発生過程をシングルセルRNAシーケンス（scRNA-seq）を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

1) ランダムフォレスト法を用いて、かかりつけ医レベルで測定可能な18種類の検査項目において、血中ナトリウム、カリウム、アルドステロンの3項目のみでアルドステロン産生腺腫を高率（精度89%）で診断可能なモデルを開発した。次に機械学習モデル解釈手法を用いて、術後治療に関わる因子の寄与度の差異を個人間で明らかにした。

2) ヒト成人副腎2個から2928個の副腎細胞のscRNA-seqデータを取得し、教師なしクラスタリングとマーカー遺伝子の発現に基づいてAPCCを同定した。RNA velocity解析により、副腎皮質球状層細胞からへの発生方向が推定された。多くのCYP11B2陽性細胞が、コルチゾール産生には必須だがアルドステロン産生には必須でないCYP11B1および/またはCYP17A1に陽性であることが判明した。

【結語】

機械学習技術を用いて、PAの病型・予後予測モデルを確立した。さらに、PAの成因であるAPCCを1細胞レベルから特徴づけた。

【文献】

- 1) Kaneko H, Umakoshi H* (corresponding author), Ogata M, Wada N, Iwahashi N, Fukumoto T, Yokomoto-Umakoshi M, Nakano Y, Matsuda Y, Miyazawa T, Sakamoto R, Ogawa Y*: Machine learning based models for prediction of subtype diagnosis of primary aldosteronism using blood test. *Sci Rep.* 11 (1) : 9140, 2021.
- 2) Kaneko H, Umakoshi H* (corresponding

author), Ogata M, Wada N, Ichijo T, Sakamoto S, Watanabe T, Ishihara Y, Tagami T, Iwahashi N, Fukumoto T, Terada E, Katsuhara S, Yokomoto-Umakoshi M, Matsuda Y, Sakamoto R, Ogawa Y*:

Machine learning-based models for predicting clinical outcomes after surgery in unilateral primary aldosteronism.

Sci. Rep. 12 (1) :5781, 2022.

- 3) Iwahashi N*, Umakoshi H* (equal to 1st author), Seki T, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Suematsu M, Umezawa Y, Oya M, Kosaka T, Seki M, Suzuki Y, Horiuchi Y, Ogawa Y, Nishimoto K: Characterization of aldosterone-producing cell cluster (APCC) at single-cell resolution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107 (9) :2439-2448, 2022.
- 4) Iwahashi N, Umakoshi H* (corresponding author), Ogata M, Fukumoto T, Kaneko H, Terada E, Katsuhara S, Uchida N, Sasaki K, Yokomoto-Umakoshi M, Matsuda Y, Sakamoto R, Ogawa Y*: Whole transcriptome profiling of adrenocortical tumors using formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* . 13: 808331, 2022.
- 5) Kaneko H, Umakoshi H* (corresponding author), Fukumoto T, Wada N, Ichijo T, Sakamoto S, Watanabe T, Ishihara Y, Tagami T, Ogata M, Iwahashi N, Yokomoto-Umakoshi M, Matsuda Y, Sakamoto R, Ogawa Y*: Do multiple types of confirmatory tests improve performance in predicting subtypes of primary aldosteronism? *Clin. Endocrinol. (Oxf)* . 98 (4) :473-480, 2023.

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附属拠点研究支援センター)

【背景および目的】

キヌレン酸 (KA) はトリプトファン (Trp) 代謝化合物の一つであり、KA の増加は 2 型糖尿病やうつ病で認められ、近年では、炎症によって KA が増加することも報告されている。KA は AMPA 受容体や NMDA 受容体のアンタゴニスト、GPR35 や AHR のアゴニストとして知られており、病態との関連が示唆されている。しかし、KA と上記の病態の因果関係はいまだに不明であり、KA の機能や作用機序についての知見が不足していると考えられる。そこで、KA が単細胞生物でも生合成されることに着目し、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 KA の機能を調べてきた。その結果、KA は過剰な Trp の分解で生じた排泄物の一種と考えられ、過剰な Trp が有害であることが示された (Ohashi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017)。この結果を受けて、KA の増加は Trp の蓄積と関連があると推測し、Trp の細胞毒性について解析を行なった。

【方法と結果】

これまでに、過剰な Trp による生育抑制は、トリプトン (タンパク質分解物) の添加によって回復することを偶然に見出した。この結果から、過剰な Trp の毒性は、摂取するアミノ酸に極端な偏りがあると生育が抑制されるアミノ酸インバランスという現象に関係があると考えられた。そこで、出芽酵母の栄養要求性に着目し、過剰な Trp に加えて Trp と同濃度の Leu を添加すると、Trp によって抑制された出芽酵母の生育が回復した。しかし、メタボロミクス解析では、過剰な Trp を与えても、細胞内 Leu はほとんど減少していないことも分かった。このことから、過剰な Trp は Leu の要求量を増加させたと考えられた。さらに、KA の添加によっても Leu の要求量が増加することが分かってきた。KA 増加に伴う Leu 要求量の増加がヒトや高等動物で認められれば、2 型糖尿病やうつ病の理解に貢献する可能性が考えられる。

原発性アルドステロン症における病型診断・病態解明に関する基礎及び臨床の双方向性研究

岡本 健太郎

(京都大学 糖尿病・内分泌・栄養内科)

【背景】

原発性アルドステロン症 (PA) には、主に片側性であるアルドステロン産生腺腫 (APA) と、両側性である特発性アルドステロン症 (IHA) という 2 病型があり、両者はその病態も治療法も異なる。臨床においては副腎静脈サンプリングによって両者を鑑別しているが、侵襲性のある検査であり、より低侵襲な鑑別法の開発が期待されている。

【目的】

本研究では、循環血液中の miRNA に着目し、鑑別に有用な新規バイオマーカーを開発するとともに、APA や IHA の病態における循環血液中 miRNA の意義についても検討することを目的とする。

【方法】

昨年度までに、背景因子をマッチングさせた各群 5 例ずつの副腎静脈血において qPCR パネルを用いた miRNA 網羅的発現解析を行い、両群間で数種類の miRNA の発現量が異なっていることを見いだした。その結果を踏まえ、各候補 miRNA について、症例数を増やして副腎静脈血および下大静脈血で同様の発現差がみられるかを確認する。また、多数症例において発現差が確認された miRNA に対し、ヒト副腎由来細胞を用いたトランスフェクション実験を行い、細胞増殖能やアルドステロン産生能などに与える影響を評価する。

【結果】

症例数を各群 14 例ずつに増やしたバリデーション検討において、2 種類の miRNA (miRNA-A および miRNA-B) は、各群の副腎静脈血で発現量が異なっていることが確認された。また、このうち miRNA-A については、下大静脈血においても発現量が有意に異なっていた (IHA 群よりも APA 群で発現量が高かった)。さらに、miRNA-A の作用を模倣する mimic およびその作用を抑制する inhibitor をヒト副腎由来細胞にトランスフェクションしたところ、mimic では細胞生存能が上昇し、

inhibitor では細胞生存能が低下した。

【考察】

miRNA-A は下大静脈血においても APA 群で発現量が有意に高く、in-vitro において副腎細胞の生存能を上昇させることが示唆された。バイオマーカーとしての有用性はさらに症例数を増やして検証しなければならないが、APA の病態に一部関与している可能性が考えられる。

ここまでの結果について、論文として投稿準備中である。

加齢に伴う熱産生脂肪減少メカニズムの解明

小栗 靖生

(京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 栄養化学分野)

【目的】

熱産生脂肪細胞（褐色脂肪細胞、及び、ベージュ脂肪細胞）は、熱産生を行うことにより、エネルギー消費の増大に寄与する。また熱産生脂肪の発現は年齢と負の相関を示すことが報告されている¹⁾。これらのことから、加齢に伴う熱産生脂肪の減少が、糖尿病や肥満症などの生活習慣病の発症に関与すると示唆される。

本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞における増殖機構を明らかにすることを目的とする。これにより、加齢による熱産生脂肪の減少メカニズムの一端を明らかにすると共に、肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新たな介入法の開発の端緒とする。

【方法】

野生型マウスの皮下脂肪組織より、magnetic cell separation (MACS) 法、および、fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法を用いることで、常法に従い、ベージュ脂肪前駆細胞を単離し、同細胞の増殖に関わる制御因子を探索した。

【結果】

前駆細胞の増殖能は、特定の栄養成分により亢進することが明らかとなった。

【考察】

ベージュ脂肪前駆細胞の増殖能は特定の栄養成分により制御されることから、栄養学的な介入は、加齢に伴うベージュ脂肪細胞の減少を防ぐ有効なツールとなる可能

性が考えられる。

【文献】

1) Becher, T., Palanisamy, S., Kramer, D.J., Eljalby, M., Marx, S.J., Wibmer, A.G., Butler, S.D., Jiang, C.S., Vaughan, R., Schöder, H., Mark, A., & Cohen, P.: Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health, *Nat Med.*, 27, 58 (2021)

食品由来シグナルによる視床下部の摂食調節ホルモンの感受性変容

金子 賢太郎

(明治大学農学部農芸化学科栄養生化学研究室)

【目的】

視床下部の食欲中枢機能は栄養情報を脳に伝える摂食調節ホルモンにより制御されている。しかし、高脂肪食摂取等の過栄養状態においては、視床下部における摂食抑制ホルモンであるレプチンやインスリンの感受性が障害され、過食や過体重が誘導される。私たちはこれまで、肥満状態において腸管由来のインクレチンホルモン GIP の分泌増大が視床下部の GPCR/Rap1 の活性化を惹起することにより、レプチンやインスリンの感受性障害を誘導する新しいホルモン感受性制御機構を解明し、視床下部のホルモン感受性が腸脳連関を介した内因性・外因性の GPCR リガンドの制御下にあること示した (*Cell Rep* 2016, *J Clin Invest* 2019, *Endocrinology* 2020, *JCI Insight* 2021)。

さらに最近、食品由来成分（緑葉タンパク質由来ペプチド）を肥満マウスに経口投与することにより、視床下部レプチン感受性を増強し抗肥満効果を発揮すること、その作用は脳の Rap1 活性化の抑制によることを明らかにした (*Sci Rep* 2022)。

上述した通り、高脂肪食摂取によりホルモン感受性障害が誘導される。しかし、どのような脂質摂取により個体のホルモン感受性が変容されるのか不明である。そこで本研究では、代表的な自然界油脂を複数種類選定し、動個体におけるエネルギー代謝やレプチン感受性、糖代

謝への影響を検討した。

【方法】

さまざまな自然界油脂を原料とした特殊高脂肪食 (45kcal%Fat) を作製した。マウスに給餌し、個体のエネルギー代謝、糖代謝、行動、認知学習、運動、睡眠といった生体機能に対する自然界油脂の影響を解析した。

【結果・考察】

脂質組成が類似している2種の脂質を使った高脂肪食をマウスに給餌したところ、体重増加が異なることを明らかにした。そこで体重一致条件下において、小動物総合モニタリングシステム (CLAMS) を用いて抗肥満効果の原因を解析したところ、暗期摂食量の違いや呼吸商の違いを見出した。次に糖代謝を確認したところ、空腹/満腹時の血糖値、耐糖能、インスリン感受性についても違いが認められた。さらに、レプチンの脳室内投与による抗肥満 (体重減少/摂食抑制) 作用と視床下部の細胞内レプチンシグナルについても2種の高脂肪食で差異を確認した。

以上の実験結果より、体重や食欲、グルコースバランスの正常維持に貢献しやすい脂質、ホルモン感受性に正負の影響を及ぼす脂質が存在する可能性を明らかにし、肥満や糖尿病の制御に有用な脂質が存在する可能性を示した。

今後の検討により、脳機能の正常維持に最適な油脂を紐解くとともに、脂質の質による抗肥満・健康長寿戦略の提示を目指していきたい。

がんによる宿主生理変容のメカニズム

河岡 慎平

(東北大学加齢医学研究所・京都大学医生物学研究所)

根治不能となったがんは個体に様々な悪影響を引き起こす。研究代表者は、TMFCの支援を受けながら、がんが宿主個体に与える悪影響についての研究をおこなっている。これまでに、がんによる肝臓概日リズムの破綻 (Hojo et al., *Oncotarget*, 2017)、後腸のがんによる肝臓コレステロール代謝の破綻と炎症の関係性 (Enya et al., *Dis. Model. Mech.*, 2018)、を報告してきた。また、この間、細胞系譜特異的なエンハンサーによる自己反応性

T細胞の除去についても発表した (Hojo et al., *Nat. Commun.*, 2019)。

当該年度は、がん起因する肝臓ニコチンアミド代謝の変容 (Mizuno et al., *Nat. Commun.*, 2022)、がんによる肝臓の空間機能の破綻 (Vandenbon et al., *Commun. Biol.*, 2023)、肝臓における急性期応答と炎症の関係性 (He et al., *Front. Immunol.*, 2023)、肝細胞におけるNNMTの機能解析 (Yoda et al., *J. Biochem.*, 2023) を報告した。Mizuno et al., *Nat. Commun.*, 2022 については昨年度の報告書に詳細を記載したので、本報告書ではそれ以外の3件の論文について内容をまとめる。

肝臓の遺伝子発現には空間的なパターンがあることが知られている。例えば、アルブミンの発現は門脈付近の肝細胞において高い。門脈付近では血液中の酸素濃度や栄養素の含有量が高く、代謝を活発に行える環境だからであると考えられている。一方、酸素や栄養に乏しい血液にさらされる中心静脈付近の肝細胞では解毒系代謝経路が活発である。このような分けを肝臓のゾネーションといい、肝臓の正常な機能発現にとって極めて重要である。

本研究では、乳がんをもつマウスの肝臓におけるゾネーションを空間トランスクリプトーム解析によって調べた。その結果、がんをもつマウスとまたないマウスの肝臓では、生物学的経路ごとに異なるゾネーションの破綻が認められた。例えば、アスパラギン酸代謝経路は門脈付近で活発であるが、このパターンは担がんマウスの肝臓でもある程度維持されていた。一方、解毒系代謝経路の中心静脈付近への偏りは、がんの存在によってほぼ失われていた。また、急性期応答が門脈付近の肝細胞に偏って活性化されていることも発見した。肝細胞がエネルギー代謝から急性期応答へとその役割を切り替えたのだと考えている。これまでに、担がん個体の肝臓に多量の好中球が浸潤することを見出している (Hojo et al., *Oncotarget*; Enya et al., *Dis. Model. Mech.*, 2018)。この好中球の浸潤にもパターンがあることがわかった。以上の結果から、乳がんが肝臓のゾネーションを様々な様式で攪乱することがわかった (Vandenbon et al., *Commun. Biol.*, 2023)。

担がん個体の肝臓では急性期応答が活性化する。急性期応答とは、感染などに応じて肝細胞における急性期応答タンパク質 (C反応性タンパク質や血清アミロイドα

など)の発現が亢進し、これらのタンパク質の血中濃度が高まることをいう。この反応は免疫系の活性化に重要であると考えられている。また、担がん個体の肝臓では炎症が起こる。急性期応答と炎症が同時に観察されることから、この二つには密接な関係があると考えられており、実際、膵臓がんではそのような報告がある (Lee et al., *Nature*, 2019)。本研究では、この観察の一般性を調べるべく、乳がんモデルにおける炎症と急性期応答の関係性を調べた。

具体的には、血清アミロイド α 1-2を同時に欠損させたマウスを作成し、その炎症への影響を調べた。乳がんの発生によって血清アミロイド α 1-2の肝臓における発現が増加するが、血清アミロイド α 1-2の欠損によって当該タンパク質は全く検出されなくなった。興味深いことに、血清アミロイド α 1-2が存在しなくても、乳がんによる肝臓の炎症に変化はなかった。以上のことから、少なくともこのモデルでは血清アミロイド α 1-2に非依存的に炎症が起こるものと考えられた。膵臓がんモデルとの結果の相違が興味深く、おそらく、がんの種類によって、炎症の惹起に血清アミロイド α 1-2を必要とするものとそうでないものがあると考えられた (He et al., *Front. Immunol.*, 2023)。

ニコチンアミドメチル基転移酵素 (NNMT) は S-アデノシルメチオニンからニコチンアミドへとメチル基を転移させ、メチルニコチンアミドを生成する酵素である (Mizuno et al., *Nat. Commun.*, 2022)。これまでに NNMT ががんに関与する肝臓の異常の一端に関わることを示したが、その分子機能については未解明の点が多く残されていた。そこで本研究では、マウスの AML12 肝細胞培養株を用いて、NNMT の機能解析を行った (Yoda et al., *J. Biochem.*, 2023)。AML12 において NNMT をノックダウンしたところ、S-アデノシルメチオニンが蓄積し、メチルニコチンアミドが減少した。また、この条件では、中性脂肪が減少した。中性脂肪の減少にどちらの代謝物の変動が重要なのかを調べたところ、S-アデノシルメチオニンの合成阻害剤であるシクロロイシンの処理によって S-アデノシルメチオニンの蓄積を阻害すると、中性脂肪の減少がレスキューされることがわかった。また、メチルニコチンアミドにも中性脂肪を蓄積させる活性があった。以上、NNMT が S-アデノシルメチオニンとメチルニコチンアミド

を介して AML12 における中性脂質の代謝を制御していることを報告した (Yoda et al., *J. Biochem.*, 2023)。

以上、がんがどのように個体の恒常性を破綻させるのかという情報が蓄積してきた。今後は特にヒト検体に対する解析を行い、これまでの発見がヒトに通用するかどうか、また、ヒト独自の現象を見出すことができるか、を明らかにしていきたい。

【参考文献】

- 1) Mizuno, R., Hojo, H., Takahashi, M., Kashio, S., Enya, S., Nakao, M., Konishi, R., Yoda, M., Harata, A., Hamanishi, J., Kawamoto, H., Mandai, M., Suzuki, Y., Miura, M., Bamba, T., Izumi, Y., and **Kawaoka, S***. (2022) . Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-*N*-methyltransferase. *Nat Commun* 13, 3346. *Featured in Editor 's highlights*.
- 2) Vandenbon, A#*, Mizuno, R#., Konishi, R#., Onishi, M#., Masuda, K., Kobayashi Y., Kawamoto, H., Suzuki, A., He, C., Nakamura, Y., Kawaguchi, K., Toi, M., Shimizu, M., Tanaka, Y., Suzuki, Y*., and **Kawaoka, S***. (2023) . Murine breast cancers disorganize hepatic transcriptome in a zonated manner. *Commun Biol.* 6, 97
- 3) He, C#., Konishi, R#., Harata, A., Nakamura, Y., Mizuno, R., Yoda, M., Toi, M., Kawaguchi, K*., and **Kawaoka, S***. (2023) . Serum amyloid alpha 1-2 are not required for liver inflammation in the 4T1 breast cancer model. *Front Immunol.* 14, 300.
- 4) Yoda, M., Mizuno, R., Izumi, Y., Takahashi, M., Nakao, M., Bamba, T., and **Kawaoka, S***. (2023) . Nicotinamide-*N*-methyltransferase regulates lipid metabolism via SAM and 1-methylnicotinamide in the AML12 hepatocyte cell line. *J Biochem.* 174, 89-98.

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)

【目的】

自閉スペクトラム症（以下、自閉症）は社会的コミュニケーションの障害や限定された興味などを主徴とする神経発達症であり、罹患率は子供の50-100人に1人と高く、社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症原因について多くは不明であり、治療法も確立していない。これまでに、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報告されている。また近年、新生児の脳局所肥大パターン解析が早期自閉症診断に利用できる可能性が提唱されている。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。そこで本研究では、局所肥大を起こす分子メカニズムを明らかにすることを目指している。これにより、多くの自閉症患者に共通する疾患発症メカニズムの解明に繋がることを期待している。

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みられる前頭前野肥大化に関与する可能性を考え解析を進めている。

【方法と結果】

自閉症リスク因子に挙げられているFGFシグナル関連因子のマウス大脳発生における発現パターンを調べたところ、脳発生初期の大脳前方の限局した領域に一過的に発現することを見出した。そこで、この時期および場所依存的なFGF因子を独自に開発したCreマウスラインを用いて特異的にノックアウトしたマウスを作製した結果、生後に前頭前野が肥大すること、また、成体においてノックアウトマウスが自閉症様行動を示すことを見出した。

このノックアウトマウスの前頭前野において、電気生理的手法により神経活動状態を調べた結果、自閉症患者に

においてみられる特徴である神経活動のバランス異常（E/Iバランス異常）が観察された。また、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの構成比に異常が見られる可能性も示唆された。

興味深いことに、異なるCre発現マウスラインを用いてニューロンに分化してからFGF因子をノックアウトしても前頭前野の肥大や行動異常はみられなかった。これらの結果から、胎生期の特定の時期および場所におけるFGFシグナルの異常が脳肥大を引き起こすことで自閉症発症につながる可能性が示唆された。

さらに、ノックアウトマウスの胎生期脳において、どのような分子的な異常が見られるのかを調べるため、single cell RNAseq解析を行った。その結果、大脳領野形成に関わるモルフォジェンのシグナル伝達に関与する遺伝子群に発現変動が見られた。組織学的な解析からも、脳局所においてこのモルフォジェンのシグナル伝達に変化していることが観察された。現在、このモルフォジェンによるシグナル伝達が、生後の前頭前野肥大および行動異常に関与するのかを調べている。

【考察】

本研究の結果から、局所脳肥大を伴う自閉症の発症メカニズムの一旦として、胎生期（脳発生初期）における脳局所のFGFシグナルの異常が関与する可能性が示唆された。自閉症研究は主に生後の自閉症症状を担う分子メカニズムの解析が中心となってきたが、本研究により胎生期（脳発生初期）において既に発症に関わる異常が引き起こされている可能性が考えられる。今後は、脳発生初期に、いかなる細胞におけるいかなる分子メカニズムの破綻により生後の表現型が表出するのかについて、その詳細を明らかにしたい。

腹内側核PACAP発現細胞の双方向性摂食調節メカニズムの解明と肥満症への関与

神戸悠輝

(鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・生体情報薬理学)

【序論】

厚生労働省「国民健康・栄養調査報告」によると、20歳以上の人の肥満の割合は男性で33.0%、女性で

22.3%と報告されている。肥満は単なる過剰体重だけでなく、心血管疾患、糖尿病、脂肪肝、肝硬変などの原因となることが知られている。このことから、新しい抗肥満薬の開発あるいは創薬ターゲットの探索は社会的に強く求められている。肥満の基準であるBMIの遺伝率は約40-70%と高いことが知られている。このような遺伝要因は主に視床下部に存在する摂食を調節する種々の神経ペプチドおよびその受容体と考えられており、本研究で注目した下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)もまた、視床下部に高発現する神経ペプチドで、体温調節あるいは摂食などエネルギー収支のバランスを制御する因子である事が報告されている。しかしながら、PACAPによる摂食調節メカニズムはそれぞれの報告で異なっており、詳細な解析が必要であった。

【方法と結果】

そこでまず、我々はPACAP-KOマウスを用いて、同マウスの摂食量の検討を行った。その結果、10週齢時においてPACAP-KOマウスは、同腹仔のワイルドタイプ(WT)マウスと比較し、体重に顕著な差は観察されなかったにも関わらず、1日の摂食量は有意に少なかった。さらに、2日間絶食したそれぞれのマウスに対して餌を再度提示し、摂食量を測定すると、PACAP-KOマウスはWTマウスと比較して、摂食量が有意に少なかった。すなわち、PACAPは摂食を促進する神経ペプチドであると考えられた。続いて、摂食を促進する作用のあるPACAPが発現する脳領域を探索するため、絶食下のマウスの脳標品に対しPACAPを認識するRNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーションを実施すると、PACAPのmRNA発現は、絶食に伴って視床下部腹内側核で顕著に増加した。さらに、in situハイブリダイゼーションの結果は、定量的PCRによっても確認された。すなわち、視床下部腹内側核におけるPACAPは摂食促進作用を示すことが明らかになった。

しかし興味深いことに、1日の摂食量をマウスの休息期である明期、あるいは活動期である暗期に分けて計測すると、WTマウスと比較してPACAP-KOマウスでは、明期の摂食量は増加傾向を示し、暗期の摂食量は有意に減少した。また、上述の様に視床下部腹内側核のPACAPは絶食に伴って増加することから、アデノ随伴ウイルス(AAV)によって腹内側核にPACAPを過剰発現さ

せた。この腹内側核PACAP過剰発現マウスの摂食量は、コントロールの腹内側核緑色蛍光タンパク質過剰発現マウスと比較して、明期に減少傾向を示し、暗期に有意に増加した。視床下部弓状核には、アグーチ関連ペプチド(AgRP, 摂食亢進ペプチド)およびプロオピオメラノコルチン(POMC, 摂食抑制ペプチド)が発現し、食欲を中心的に制御することが広く受け入れられている。そこで、腹内側核PACAP過剰発現マウス弓状核におけるこれら神経ペプチドの発現を、明期あるいは暗期に分けて測定すると、明期ではPOMCの、暗期ではAgRPの発現が有意に増加することを見出した。一方で、過剰発現させたPACAPは明期・暗期間わず増加傾向であった。すなわち、腹内側核PACAPは、弓状核AgRPあるいはPOMCを介して、個体の状態依存的(今回の研究では明期と暗期)に摂食を調節する可能性が明らかとなった。近年、弓状核のAgRP発現細胞あるいはPOMC発現細胞に接続されるグルタミン酸含有細胞が、摂食を制御するホルモンであるレプチン(明期に高値)の作用によって比較的短時間において、接続相手を両細胞間でスワップすることが報告されている。一方、我々はPACAPが主にグルタミン酸含有神経細胞に共存することを明らかにしている。そこで、腹内側核PACAP発現細胞による明期・暗期間における双方向性の摂食調節メカニズムとして、腹内側核PACAP発現細胞から弓状核のAgRP発現細胞あるいはPOMC発現細胞への神経投射先がスワップすると仮説した。そこで、PACAPプロモータの制御下でCreリコンビナーゼを発現するノックインマウスの腹内側核に、Cre依存的にシナプトフィジンEGFPキメラタンパク質(軸索末端を緑色蛍光で標識)を発現させ、腹内側核PACAP発現細胞から弓状核AgRP発現細胞への神経投射をシナプトフィジンEGFPの蛍光強度により定量化すると、明期と比較して暗期では神経投射が有意に多い事が明らかとなった。以上の結果から、腹内側核PACAP発現細胞は、明期・暗期で神経投射をダイナミックに変えることで、明期では摂食抑制的、暗期では摂食促進的に作用する可能性が明らかになった(Kambe Y et al., 2020)。

この解剖学的に観察された現象の機能的評価を試みた。AgRPあるいはPOMCプロモータの下流でRCaMPあるいはGCaMP(赤色あるいは緑色のカルシウムセンサータンパク質)を発現するAAVを開発し、PACAP-Cre

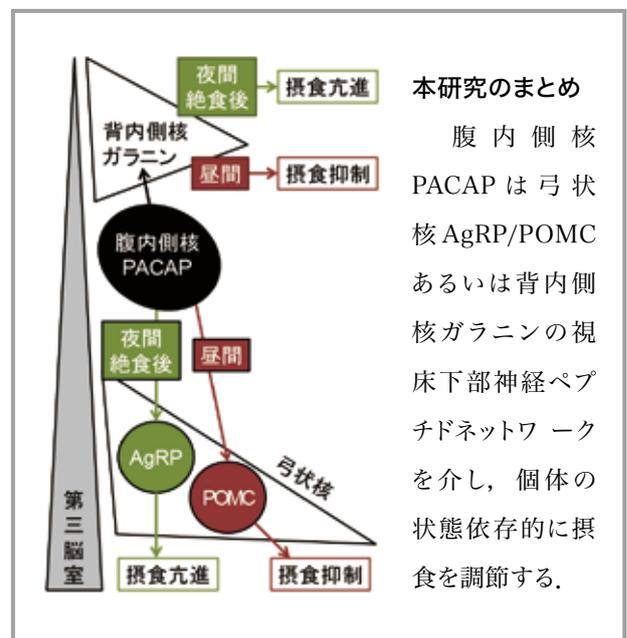
マウスの弓状核に感染させた。さらに、腹内側核 PACAP 発現細胞の活動を特異的に調節するために、PACAP-Cre マウスの腹内側核に、Cre 依存的に hM3D (人工リガンド CNO で特異的に活性化される Gq 共役型受容体) を発現する AAV を感染させた。その後、CNO 投与後の弓状核における赤色あるいは緑色の蛍光をファイバーフォトメトリーで計測すると、腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化したときにおける、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を同時に、自由行動下のマウスから測定できる。この実験系を利用して、夜間に CNO を投与した後、グレリンを脳室内投与した後において、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を計測した。夜間に CNO を投与しても、GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、RCaMP 蛍光強度の減弱が観察された。すなわち、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、弓状核 POMC 発現細胞の活動を抑制する可能性が示された。さらに、同様の処置をしたマウスの脳室内にグレリンを投与すると、弓状核 AgRP 発現細胞の発現する GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、弓状核 POMC 発現細胞の発現する RCaMP 蛍光強度の増強が観察された。この結果は、グレリンによる POMC 発現細胞の活性化を示唆する。一方、RCaMP および GCaMP を発現しているマウスを灌流固定し、組織学的な解析に供すると、光ファイバーが挿入されていた部位において RCaMP 陽性神経細胞が多数検出されたのに対して、GCaMP 陽性の細胞はほとんど観察されなかった。このことが、GCaMP の蛍光の増減が観察出来なかった理由と推察される。そこで、AgRP-GCaMP のプロモータ領域を最適化し、マウスに感染後、発現細胞を観察すると、弓状核の POMC-RCaMP を発現しない細胞において、緑色蛍光が観察された。

一方で、腹内側核 PACAP 発現細胞は視床下部背内側核にも非常に強く投射していた。非常に興味深いことに、背内側核もまた摂食調節において双方向性が報告されている領域である。背内側核は神経ペプチド・ガラニンが高発現する領域であることから、ガラニンの発現を検討すると、絶食によって増加し、この増加は PACAP-KO マウスでキャンセルされた。続いて、ガラニン発現制御における腹内側核 PACAP の重要性を検討した。その結果、腹内側核において PACAP を過剰発現あるいはノックダウン

すると、ガラニンの発現は増加あるいは減少した。すなわち、ガラニンは腹内側核 PACAP の下流シグナルと推察される。そこで、背内側核のガラニンをノックダウンする目的で、背内側核にガラニンに対する shRNA を発現させると、明期の摂食量は増加し、暗期あるいは絶食後の摂食量は減少した。これは、PACAP-KO マウスのフェノタイプと全く同じだった (Kambe Y, et al., 2023)。

【考察】

以上の解析から、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、摂食抑制系の弓状核 POMC 発現細胞を抑制する可能性が明らかとなった。申請者らはこれまでの報告において、腹内側核 PACAP 発現細胞は夜間に摂食亢進作用を惹起する可能性を示唆しており、その結果をサポートする重要なデータである。今回は、ファイバーフォトメトリー法を用いて、AgRP 発現細胞の神経活動を記録することが出来なかったが、AgRP プロモータの配列を最適化したことで、GFP の蛍光を観察することができた。今後は、この AAV を用いたファイバーフォトメトリー法を適用し、AgRP 発現細胞が上記と同条件において活性化することが確認できれば、非常に興味深い結果となる。一方で、グレリンは摂食亢進ホルモンであることから、グレリンの投与によって摂食を抑制する働きのある POMC 発現細胞を活性化したことは意外であった。この理由は不明であるが、今後詳細に解析していく予定である。また、腹内側核 PACAP の下流シグナルとして、背内側核のガラニンを見出した。背内側核ガラニンもまた、腹内側核



PACAP と同様に双方向性の摂食制御を示すことが明らかとなった。

PACAP およびガラニンは摂食を促進する神経ペプチドである可能性があり、同シグナルを抑制する分子は抗肥満薬となりうる。加えて、PACAP およびガラニンによる摂食調節は、“状態依存的”な可能性がある。すなわち、食事は個体の生命活動に必須であり、過度な食欲の抑制は逆に健康を害すると考えられるが、PACAP およびガラニンは食への渴望が強い場合にのみ、摂食促進作用を発揮するかもしれない。この特徴をうまく利用すれば、肥満症患者の食物の過剰摂取のみを抑制できる安全な抗肥満薬の創薬ターゲットになる可能性がある。

全身全細胞解析技術を用いた微小炎症制御機構の解明

久保田 晋平

(北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野・特任講師)

【目的】

多細胞生命システムは自律的に機能する神経細胞ネットワーク・免疫細胞ネットワークによりその恒常性が維持されているが、この恒常性維持機構の破綻に起因する疾患発症機構は技術的な困難から、その多くが不明である。加齢・ストレスは神経免疫連環により維持されている恒常性を破綻させることにより制御不能な慢性炎症を誘導し、関節リウマチや炎症性腸疾患などの自己免疫性疾患だけでなく、動脈硬化に起因する血管障害、さらに脳機能障害である認知症など近年の長寿社会で大きな問題となる疾患、病態を引き起こす。慢性炎症性疾患の予防法を開発するためには、疾患の基本単位となる微小炎症の時空間的多様性・遷移状態の背景に存在する神経免疫連環機構に介入することによる微小炎症の制御方法を確立する必要があると考え、微小炎症の発生・消滅・増幅・定着機構を担う神経免疫連環機構の解明に取り組んだ。

【方法】

久保田らは微小炎症の発生・消滅・増幅・定着機構を担う神経免疫連環機構を定量的に解析することを可能にするために、ライトシート蛍光顕微鏡、蛍光プローブ、画像解析手法の開発に取り組んだ。開発した手法を自己

免疫疾患、がん研究やデュピトラン拘縮など様々な疾患に応用することで微小炎症制御法の確立を目指す。

【結果】

ライトシート蛍光顕微鏡は高速に三次元画像を取得することが可能な顕微鏡であるが、撮影可能なサンプルサイズは光学設計の制限により限られていた。久保田らはオープントップ型のライトシート蛍光顕微鏡を開発することによってこれまで一度に撮影することが困難であったヒト脳断面 (12x7.5x1cm) に蓄積するアミロイドブラークの可視化 (図 1)、マウス脳転移モデルマウスにおける脳転移量の定量的マルチスケール解析 (図 2) に成功した¹⁾。

また同時に蛍光プローブの開発²⁾ や画像解析手法の開発³⁾ を行うことで、神経免疫連環の解明に必要な要素技術を確立した。開発した手法はがんの治療効果の定量的評価⁴⁾ や炎症性疾患の病態解析に応用されている⁵⁾。

【考察】

微小炎症の制御方法を確立するためには病態を可視化することにより時空間的多様性・遷移状態を定量評価することが重要である。時空間的多様性・遷移状態を定量評価する実験系として single cell RNAseq など取り入れながら研究を進めていく。

【文献】

- 1) Glaser AK, Bishop KW, Barner LA, Susaki EA, **Kubota SI**, (20名略), Liu JTC: A hybrid open-top light-sheet microscope for multi-scale imaging of cleared tissues. Nature Methods, 19, 613–619,
- 2) Naim F, Hasebe R, Hojyo S, Shichibu Y, Tanaka Y, Tainaka K, **Kubota SI**, Konishi K, Murakami M: Gold-nanocluster-mediated microinflammation detection by using a tissue-clearing method, bio-protocol, 2023
- 3) Takahashi K, #Abe K, #**Kubota SI**, #Fukatsu N, (7名略), Shimamura T, Miyazono K: An analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis. Nature Communications, 13, 5239, 2022 #equal contribution
- 4) Zhai T, Mitamura T, Wang L, **Kubota**

SI, Murakami M, Tanaka S, Watari H: Combination therapy with bevacizumab and CCR2 inhibitor for women with ovarian cancer: in vivo validation study, Cancer medicine, 22, 2023

Iwasaki N, Hashimoto S, Tanaka Y, Murakami M, Dupuytren's contracture-associated SNPs increase SFRP4 expression in nonimmune cells including fibroblasts to enhance inflammation development, Int Immunol., 31 January 2023

5) Kida H, (9 名 略) , Kubota SI, Hojyo S,

図1. アルツハイマー病患者死後脳断面 (12x7.5x1 cm) に蓄積するアミロイドプラークの可視化

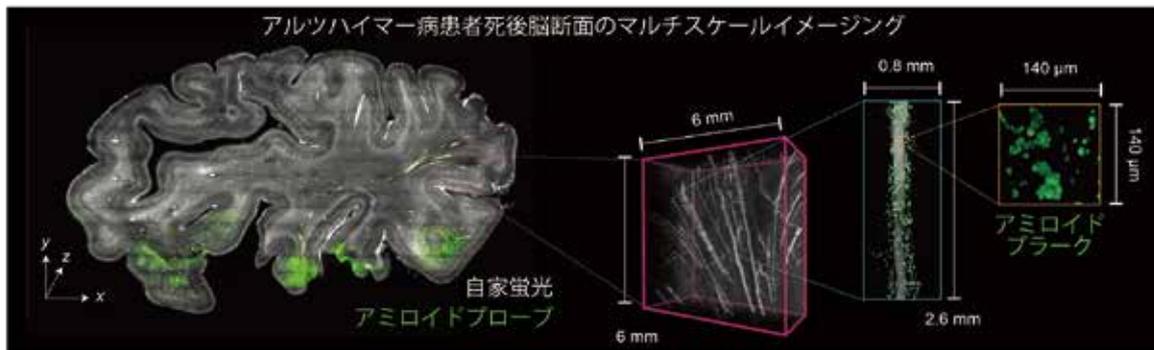
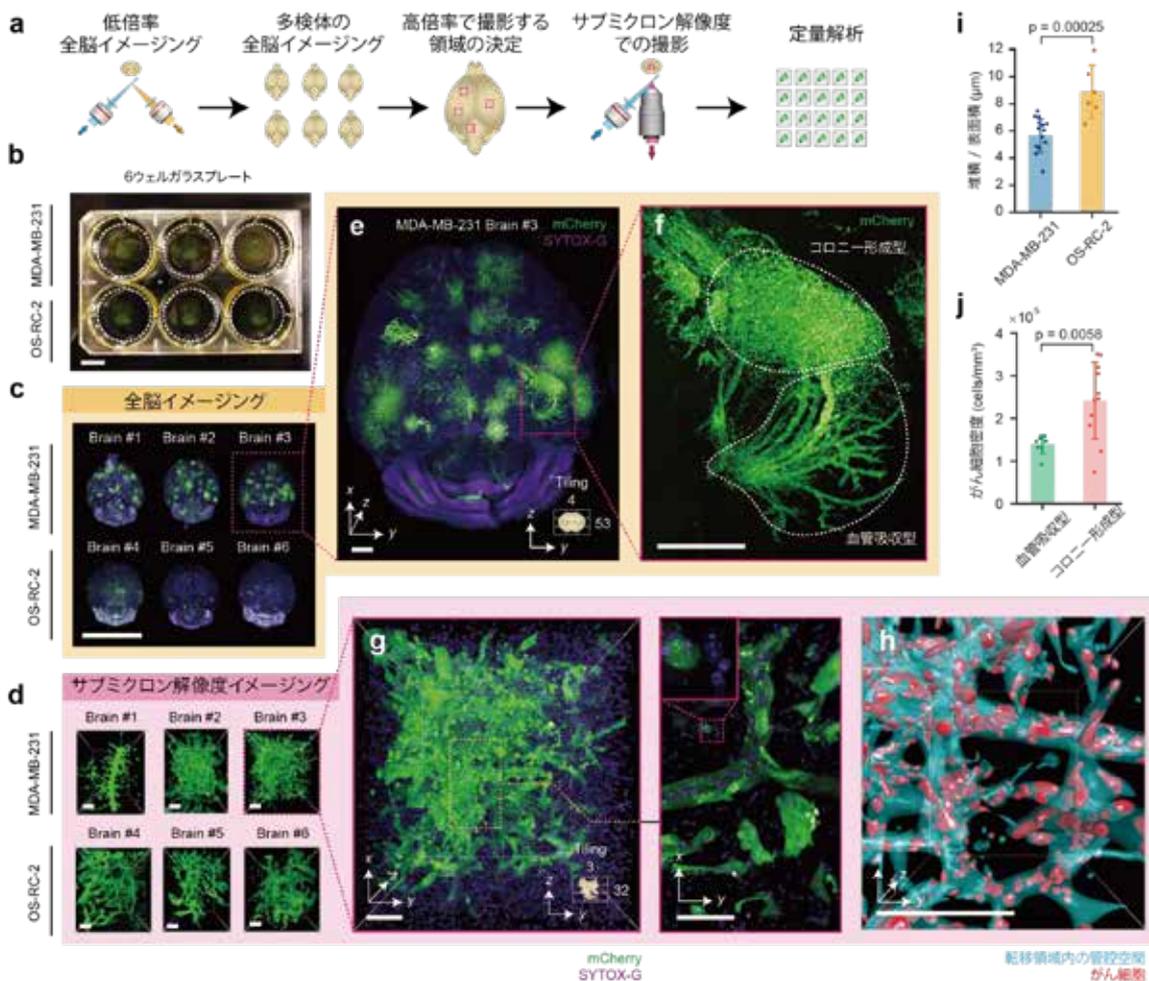


図2. マウス脳転移モデルマウスにおける脳転移巣の定量的マルチスケール解析



a. オープントップ型ライトシート蛍光顕微鏡を用いたマルチスケール解析の流れ. b. 6匹分の全脳をガラスプレートにセットしイメージングを行う. c. 高倍率で撮影する領域を決定するために低倍率で全脳イメージング. d. ROIを指定した後にサブミクロン解像度でイメージング. e-g. 乳がん脳転移巣のイメージング画像. i. 乳がん脳転移巣と腎がん脳転移巣脳の体積-表面積比. j. 乳がん脳転移巣に異なる細胞密度を呈する領域が存在した. スケールバーの長さは以下の通り: b, c, 1 cm; d, 100 μm; e, 1 mm; f, 500 μm; g, h, 100 μm.

骨格筋再生を主導する多細胞間相互作用ネットワークの解析

小池博之

(東京医科歯科大学)

【目的】

サルコペニアは、骨格筋の再生が正常に機能しないことにより起こる疾患である。骨格筋の再生は、骨格筋幹細胞の活性化、増殖、筋分化という大きく3つのステップを経て、連続的に行われる。この骨格筋再生過程の調節に中心的な役割を果たす細胞の一つがマクロファージである。本研究では、マクロファージが骨格筋幹細胞の増殖を制御するシグナルを明らかにすることを試みた。

【方法】

骨格筋再生におけるマクロファージの亜集団とその機能を解析することを目的とし、カルジオトキシンによるマウス骨格筋再生モデルから骨格筋組織を回収し、シングルセル RNA シークエンス解析を実施した。さらに、この経路に関与するマクロファージ亜集団の機能を解析するために、シングルセル RNA シークエンスデータからフローサイトメトリーでの単離に用いることが可能な細胞膜タンパク質を探索した。マクロファージ亜集団が骨格筋幹細胞と相互作用しながら再生を促進している可能性を検証するため、オルガノイド評価系を用いた。

【結果】

再生過程のマウス骨格筋のシングルセル RNA シークエンス解析により、再生骨格筋組織中のマクロファージが様々なサブタイプ（亜集団）に分類されることを確認した。リガンド・レセプター解析の結果、これらのマクロファージ亜集団の1つが、他の亜集団よりも増殖中の骨格筋幹細胞と密接に相互作用していることが示唆された。このマクロファージ亜集団の機能を詳細に調べるには、マクロファージ集団全体からこの亜集団を分画することが必要である。そこで、シングルセル RNA シークエンス解析で得られた遺伝子発現情報をもとに、フローサイトメトリーに使用できる表面抗原マーカーの検証を行った。その結果、このマクロファージ亜集団が高い頻度で濃縮される条件を見出すことに成功した。骨格筋再生モデルマウスからフローサイトメトリーでマクロファージ亜集団を分取して骨格

筋幹細胞との相互作用を *in vitro* で検証した。その結果、再生中の骨格筋組織に含まれるマクロファージの中で一つのマクロファージ亜集団が増殖している骨格筋幹細胞と密接に相互作用していることを示唆した。

グレリン分泌細胞におけるGPCR発現解析および新規調節因子の探索

小山博之

(名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器代謝内科学)

【背景】

サルコペニアは筋力と筋量の低下により QOL 低下や死の転帰を辿りうる疾患であり、早期診断と積極的な薬物介入は健康寿命を延伸し社会への貢献につながる。筆者はこれまで、グレリン細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い高発現 GPCR を同定し、トリプトファンなどの栄養分子がグレリン分泌におよぼす影響および細胞内シグナル伝達経路の解明を行ってきた。ヒトにおいて複数の疾患でグレリン投与は食欲や骨格筋量を増やすことが報告されており (Nagaya et al. Circulation. 2004 など)、サルコペニアに対する薬物治療としてグレリンは有望視されている。

薬物を含めた治療介入の効果・作用機序の解析にはモデルマウスが有用であるが、マウスはヒトと遺伝学・組織学的に相同性が高く加齢プロセスも類似するため、サルコペニアモデルとして老化マウスが多く用いられている。しかし、長期間飼育すると個体差が大きくなり、統計学的解析が困難になる問題点が存在する。一方、骨格筋量や筋力が低下する遺伝子改変マウスも数多く報告されているが、正常な加齢とは異なる外観や表現型を呈するためヒトへの外挿性に乏しい欠点がある。

【目的】

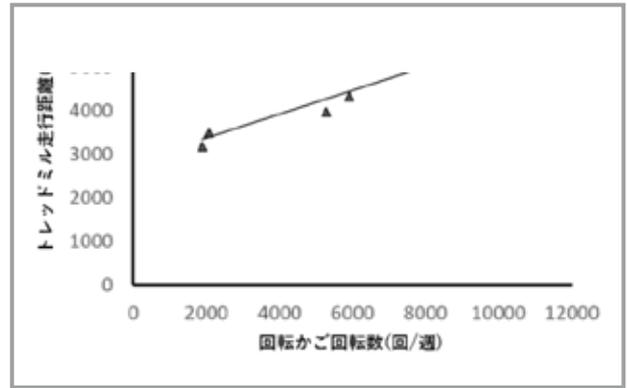
SAMP1 マウスのサルコペニアモデルマウスとしての Proof of Concept 確立を目指す。

【方法】

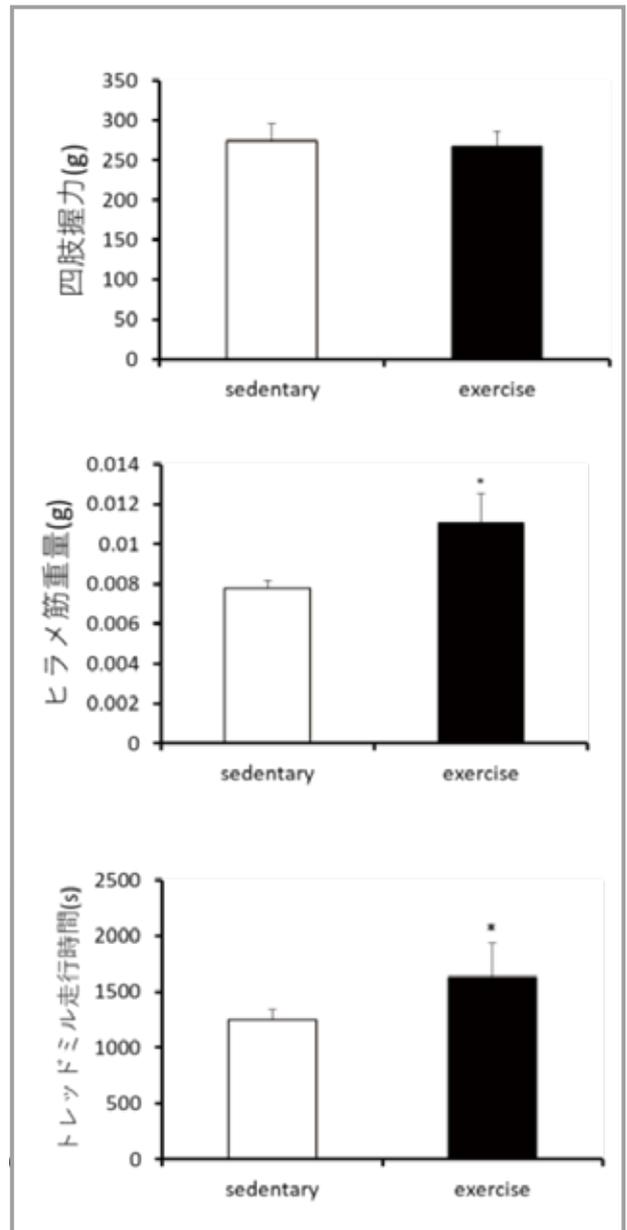
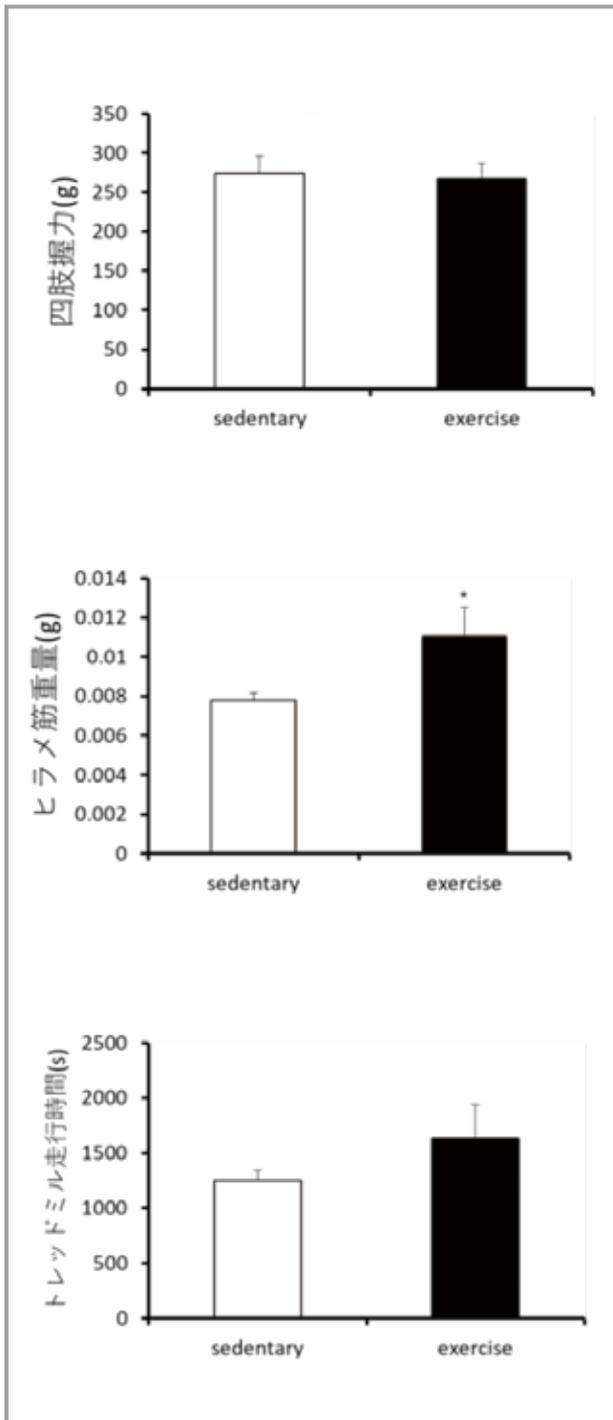
18 週齢の SAMP1 マウスおよび対照マウス (SAMR マウス) を通常飼にて飼育し、運動介入 (回転かごによる自発運動) を 8 週間おこなった。投与期間中は体重、骨格筋量、四肢握力、トレッドミル試験を用いて評価した。

【結果】

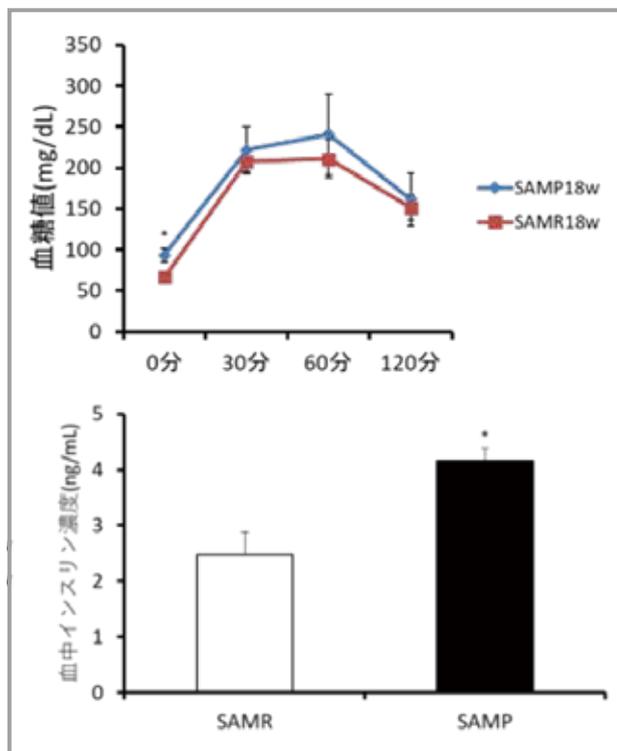
18週齢のSAMP1マウスは対照マウス(SAMR)と比較して、サルコペニアの診断(AWGS2019サルコペニア診断ガイドライン)に必須の筋量・筋力・身体機能の低下を認めた。さらにヒトサルコペニアと共通する複数の表現型(低栄養・耐糖能異常・テストステロン低下)を有していた。また、SAMP1の血中デスアシルグレリンおよびIGF-1は有意な上昇を認めた。また、自発運動量はマウスにより個体差が大きく、自発運動量と身体機能改善は正の相関を認めた。



次に、18週齢のSAMPマウスを①回転かごを置いたケージで飼育したExercise群、②回転かごを置かないSedentary群に分け、8週間飼育した。結果、Exercise群は有意にヒラメ筋重量、トレッドミル試験走行距離が増加していた。



次に SAMP1 マウスの耐糖能を評価するため、16 週齢の時点で腹腔内ブドウ糖負荷試験 (ipGTT, 1g/kg) を行った。その結果、血糖値の推移は 2 群間に大きな差異を認めなかったが、負荷 30 分後の血中インスリン濃度を測定すると SAMP1 マウスは約 2 倍の有意な増加を認めていた。



【考察】

2 型糖尿病患者は骨格筋や肝臓・脂肪組織でのインスリン抵抗性が病態の大きな要因であり、とくに骨格筋はインスリンによって促進される血糖利用の大半を担っている。糖尿病とサルコペニアは双方向性に影響を与えており、骨格筋量減少は骨格筋への糖取り込み能低下 (≒骨格筋におけるインスリン抵抗性) につながる。また、サルコペニアにより身体機能が低下していると、糖尿病治療に重要な運動療法が十分に行えず骨格筋での糖・脂質代謝がさらに低下する。一方、糖尿病が存在するとインスリン作用の減弱により異化が亢進し骨格筋量が低下してしまう。SAMP1 マウスにおいても血中総コレステロールやアルブミン値は低栄養を反映しているのか有意な低下を認めたが、血中中性脂肪は逆に有意に上昇し、骨格筋 (ヒラメ筋) における中性脂肪蓄積量も増加している傾向を有していた。原水らの報告によると、SAMP1 マウスでは、血中レプチン濃度上昇・アディポネクチン濃度低下というアディポカインレベルの変化が認められ、体重は SAMR と変わらないがインスリン抵抗性の存在が示唆されている。

これまでの研究結果から、SAMP1 マウスは加齢に伴うサルコペニア、耐糖能異常を模したよいモデルであることが示唆された。今後、本モデルを用いて、近年次々に登場する新規糖尿病治療薬の骨格筋への影響や、新規サルコペニア治療薬の開発などに利用していきたいと考えている。

オレキシン1受容体作動薬の創製

斉藤 毅

(筑波大学医学医療系/国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

オレキシンは、G タンパク質共役型受容体である 2 種類のオレキシン受容体 (OX₁R, OX₂R) に作用することで睡眠覚醒や情動を制御する神経ペプチドである¹⁾。オレキシン/OX₂R 系の機能不全が睡眠障害ナルコレプシーを引き起こすことが明らかになって以降²⁾、OX₂R 選択的作動薬はナルコレプシー治療薬として精力的な開発が進められている。一方で、ナルコレプシーはオレキシン欠損により引き起こされることから、OX₁R を介する経路も不全となっているものの、ナルコレプシーにおける OX₁R の治療標的としての有効性の検証は十分に進んでいない。本研究では、OX₁R の機能解明研究の一層の加速に貢献すべく、世界でも未だ報告のない OX₁R 選択的作動薬の創製に取り組んだ。

【方法】

我々は、独自に見出した OX₂R 選択的作動薬 YNT-185 の活性立体配座探索の過程で、柔軟なエチレンジアミン側鎖の配向をテトラリン骨格により屈曲型に固定した誘導体を合成したところ、活性が 10 倍向上した OX₂R 選択的作動薬 (S) -YNT-2655 に加え、OX₁R にも強い作動活性を示すデュアル性作動薬 (R) -YNT-2655 を見出した (EC₅₀=13.5 nM for OX₁R, OX₂R/OX₁R=0.043)³⁾。この結果は、アミノテトラリン骨格の 1 位炭素の立体化学が OX₁R 作動活性の発現に重要であることを示唆していた。そこで本研究では、(R) -YNT-2655 を元に、OX₁R 作動活性を維持しつつ OX₂R 作動活性を減弱させる分子構造の探索を行った。

【結果】

構造活性相関により、ピフェニルアミド基の片方の芳香

環を除去することで OX₂R 作動活性が顕著に減弱することを見出した。芳香環の代替として様々な長さの炭化水素鎖を導入した結果、アクリルアミド構造を付与した際に OX₁R 選択的な作動活性が発現することを発見した。さらに、アミド基上の置換基を最適化したところ、末端に水素結合受容基を配置することで劇的に活性が向上することを見出し、世界初となる OX₁R 選択的作動薬 (R)-YNT-3708 (EC₅₀=7.48 nM for OX₁R, OX₂R/OX₁R=22.5) の創製に成功した⁴⁾。得られた (R)-YNT-3708 を用いてマウスにおける *in vivo* 薬理評価を行ったところ、テールフリック試験において顕著な鎮痛活性を示すことを見出し、また条件場所嗜好性試験においてはコカインよりは弱いものの薬物強化作用を示すことを見出した。これら作用は、OX₁R を欠損したマウスでは確認されなかったことから、(R)-YNT-3708 は OX₁R を介してこれら作用を発現していることが示唆された。

【文献】

- 1) T. Sakurai *et al. Cell* 92, 573–585 (1998) .
- 2) M. Mieda *et al. PNAS*. 101, 4649–4654 (2004) .
- 3) T. Saitoh and T. Sakurai *Peptides* 167, 171051 (2023) .
- 4) K. Iio *et al. J. Med. Chem.* 66, 5453–5464 (2023) .

β細胞保護を主眼とする2型糖尿病治療実現に向けたヒトβ細胞量の調節因子の検討

佐々木 裕伸

(慶應義塾大学医学部 予防医療センター 特任助教)

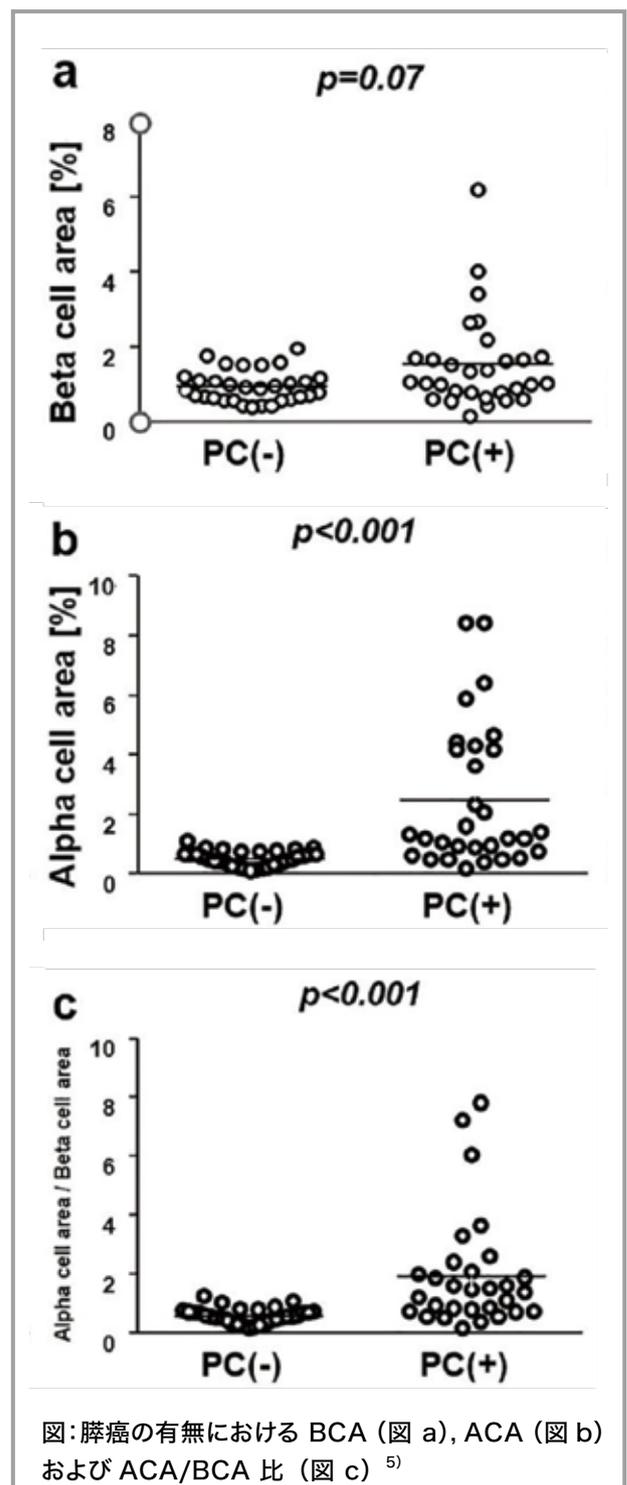
【目的】

β細胞の総量 (β細胞量) は境界型糖尿病の段階から減り始め、2型糖尿病は、正常耐糖能と比較してβ細胞量が20～65%も減少する不可逆的な病態である¹⁾。しかし、β細胞量を維持・保護するような早期介入を行えば、2型糖尿病の発症や進展を防ぐことができる可能性がある。以上より、外科手術や剖検で得られたヒト膵組織を用いて、患者の臨床的背景からヒトβ細胞量の調節因子を検討することを本研究の目的としている。我々は、以前に出生体重²⁾やDPP-4阻害薬使用³⁾に伴う膵島形態の変化、2型糖

尿病によるβ細胞サイズ・数の変化⁴⁾を検討してきた。

【方法】

膵癌患者における糖尿病の有病率は非常に高く、特に新規発症の糖尿病症例が多いことが知られており、膵癌と糖尿病には密接な関係がある¹⁾。我々は、膵癌によるβ細胞量・α細胞量の変化を検討するため、膵癌が原因で死亡した30例の剖検例と、年齢とBMIをマッチさせた31例の膵癌でない剖検例を比較した。腫瘍のない部位の膵切片をインスリンとグルカゴン染色を行い、分画β



細胞面積 (BCA) と α 細胞面積 (ACA) を定量化した⁵⁾。

【結果】

膵癌患者の BCA は、対照群と比較して有意差はなかった (図 a: $1.53 \pm 1.26\%$ vs $0.95 \pm 0.42\%$, $p = 0.07$)。しかし、ACA および ACA/BCA 比は、対照群と比較して膵癌患者において有意に高かった (図 b: $2.48 \pm 2.39\%$ vs $0.53 \pm 0.26\%$ および 図 c: 1.94 ± 1.93 vs 0.59 ± 0.26 , いずれも $p < 0.001$)⁵⁾。

【考察】

膵癌患者における ACA の上昇や BCA に対する ACA 比率の上昇は、 α 細胞量の増加や α 細胞量に対する相対的な β 細胞量の減少を示唆している。これら比率の変化に伴う血漿グルカゴン濃度の上昇やグルカゴン/インスリン濃度比率の上昇などが、膵癌患者における耐糖能悪化に寄与している可能性がある⁵⁾。

【文献】

- 1) Sasaki H, Saisho Y, et al.: Revisiting regulators of human β -cell mass to achieve β -cell-centric approach toward type 2 diabetes, *J Endocr Soc*, 5, bvab128 (2021) .
- 2) Sasaki H, Saisho Y, et al.: Associations of birthweight and history of childhood obesity with beta cell mass in Japanese adults, *Diabetologia*, 63, 1199-1210 (2020) .
- 3) Sasaki H, Saisho Y, et al.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and beta cell mass in Japanese adults with type 2 diabetes, *Endocr Pract*, 28, 563-564 (2022) .
- 4) Sasaki H, Saisho Y, et al.: Reduced beta cell number rather than size is a major contributor to beta cell loss in type 2 diabetes, *Diabetologia*, 64, 1816-1821 (2021) .
- 5) Tsuchiya T, Saisho Y, Inaishi J, Sasaki H, et al.: Increased alpha cell to beta cell ratio in patients with pancreatic cancer, *Endocr J*, 69, 1407-1414 (2022)

モデル魚類を用いた網膜変性疾患の研究

佐藤 恵太

(岡山大学)

【目的】

網膜色素変性症 (RP) は遺伝性・進行性の網膜変性疾患で、*EYS* は東アジア、欧州で高頻度な RP の原因遺伝子である。そのオーソログはモデル動物であるマウスやラットのゲノム上から失われているため、同じ脊椎動物で、ヒトと同様の網膜層構造、視細胞構造を持つ魚類メダカを用い、*EYS* を原因とする RP の分子病理の理解を目指した。

【方法】

ゲノム編集により *ey*sKO メダカを作成し、稚魚の光に対する応答、網膜視細胞における外節タンパク質の発現パターン変化、視細胞微細構造の変化を観察した。TUNEL 法により細胞死を検出し、網膜における酸化ストレス・細胞死・オートファジー等に関連する遺伝子発現レベルの変化を qPCR と in situ hybridization により観察した。

【結果】

*ey*s KO メダカ稚魚では WT と比較して光応答が減弱した。通常視細胞外節に局在する視物質やペリフェリン 2 が *ey*s KO では内節やシナプス終末など誤った位置に局在する例が見られ、外節長は短縮した。透過電子顕微鏡 (TEM) 観察により、*ey*s KO メダカ視細胞外節の一部でラメラ構造の乱れが見られた。また一部の細胞でオートファジーを示す構造が見られた。WT と *ey*s KO の視細胞層厚には 8 ヶ月齢でも差がなく、細胞死の亢進、酸化ストレス・細胞死関連遺伝子発現レベルにも変化はなかった。一方、オートファジー関連遺伝子 *gabarap* と *sqstm1* が視細胞特異的に発現亢進した。

【考察】

メダカ *ey*s KO ではヒト RP と同様、視細胞の形態的・機能的な変化があるが、細胞死や網膜の進行性変性は見られない。*ey*s KO メダカの視細胞でオートファジー関連遺伝子が発現亢進し、オートファジーを示す TEM 観察像が見られたことから、メダカ視細胞は *ey*s KO により異常な局在を示す外節タンパク質等をオートファジーによ

って処理し、ストレスを低減して細胞死を抑制し、生存を維持する可能性が考えられる。

【文献】

Sato, K., Liu, Y., Yamashita, T., & Ohuchi, H.: The medaka mutant deficient in eyes shut homolog exhibits opsin transport defects and enhanced autophagy in retinal photoreceptors, *Cell Tissue Res.*, 391, 249-267 (2023)

睡眠覚醒サイクルにおける遺伝的な制御と環境的な制御の統合機構に関する研究

史 蕭 逸

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

睡眠覚醒サイクルは神経系を持つ生物に幅広く保存される生命現象である。生物種によって1日の睡眠時間や睡眠覚醒サイクルの構造が異なり、同種内の個体は近い睡眠時間と構造を示すことから、遺伝的な制御がその背後に潜んでいると考えられる。近年、シナプスタンパク質のリン酸化を通じた睡眠覚醒サイクルの制御メカニズムが明らかになりつつある。一方で、例えば、発熱時には睡眠時間が上昇することや、性周期などの内分泌系の変化による過眠や不眠の誘導といった内外の環境変化による睡眠覚醒サイクルの構造変化に関する説明はまだ不十分である。そこで、本研究では2種類の動物を用いて、環境変化による睡眠覚醒サイクルの構造変化に迫る。

【マウス】

近年、アストロサイトによる細胞外イオン濃度の調節が睡眠覚醒サイクルの制御に寄与することが報告された (Ding et al., 2016; Clasadonte et al., 2017)。特に、睡眠覚醒サイクルの重要な側面である睡眠恒常性 (1日の睡眠時間が一定に保たれるメカニズム) に関して、アストロサイトの機能を薬理的に阻害すると断眠後のリバウンド睡眠が観察されないことが報告されたことは (Blum et al., 2021)、睡眠覚醒サイクルの制御におけるグリア細胞の重要性を強く支持した。そこで本研究では、グリア細胞のマウス睡眠における役割を理解することを目指す。

【アリ】

社会性昆虫は、一つの巣の中では遺伝的にほぼ同一でありながら、生後の環境によって、もしくは成体になったあとに受ける社会的な入力によって、役割の分担を行う。トゲオオハリアリは遺伝的に極めて均質であるにも関わらず、後天的な闘争により女王、巣の世話をを行うナース、採餌を行うフォレジャーに役割が分担される。更に各役割の中でもカーストが存在している。申請者はこれまでの予備実験で、トゲオオハリアリの巣内に四種類以上の睡眠表現型の種類があることを見出しており、特にナースとフォレジャーにおける睡眠表現型の違いは、ドーパミンによる可能性が高いことを見出している。本研究では、このような睡眠表現型の多様性を生み出す分子・細胞的な基盤について調査する。

【方法】

本研究では、組織透明化と免疫染色法、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を組み合わせることで、睡眠覚醒サイクルに伴う神経細胞・グリア細胞の可視化を行う。その初めてとして、まずは透明化および染色法の開発を行った。

【結果】

【マウスにおけるグリア細胞の染色およびイメージング】

図 1. グリア細胞の全脳染色

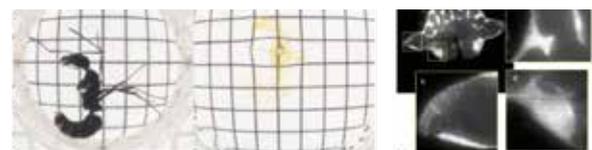
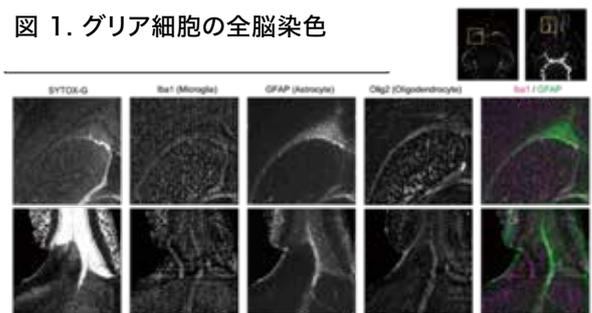


図 2. トゲオオハリアリの組織透明化 (左)

図 3. アリの全脳イメージング (右)

(a) 全脳 (b) キノコ体 (c) LX 側部複合体 (d) ME 延髄の PI 染色

これまでの成果として、グリア細胞の全脳染色に成功している。ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの細胞マーカーである Iba1, GFAP, Olig2 といったタンパク質の抗体染色と一細胞解像度のイメージングを全脳レベルで実現した。また、データ解析に関しても脳領域ごとにシグナル陽性細胞の数や、シグナルの強さを定量することが可能となった (Mano et al., 2022)。

【アリにおける全身・全脳透明化手法の開発】

アリの外骨格は水溶性の透明化手法では透明にできなかったため、疎水性の手法を用いた。

条件検討を行った結果、アリの全身および全脳の透明化に成功し、核 (ヨウ化プロピジウム, PI) 染色によるキノコ体などの特異的な構造を可視化することに成功した。

【考察】

核染色・抗体染色によるマウス、アリのイメージングに成功したので、今後は蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法の開発を行う。特にアリのような非モデル動物においては、適切な抗体を見つけ、購入することは容易ではなく、RNA の配列からイメージングプローブがデザイン可能な蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法が好ましいと考えられる。

【文献】

- 1) Ding, F. et al., Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle. *Science* (2016) doi: 10.1126/science.aad4821
- 2) Clasadonte, J. et al., The special relationship: glia–neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat. Rev. Endocrinol.* (2018) . doi: 10.1038/nrendo.2017.124
- 3) Blum, I., et al., Astroglial Calcium Signaling Encodes Sleep Need in *Drosophila*. *Curr. Biol.* (2021) . doi: 10.1016/j.cub.2020.10.012
- 4) Mano, T. et al., CUBIC-Cloud provides an integrative computational framework toward community-driven whole-mouse brain mapping. *Cell. Rep. Meth.* (2021) doi: 10.1016/j.crmeth.2021.100038

膵β細胞高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定と解析

下 直 樹

(和歌山県立医科大学 内科学第一講座)

【背景】

2型糖尿病における慢性的な高血糖は膵β細胞機能障害を引き起こすことが示されており、高血糖毒性として知られている。一方、糖尿病治療による膵β細胞機能の改善も経験されるが、このような機能変化に関わる分子機序の全容は明らかでなく、未知の因子の関与が想定される。

【目的】

高血糖毒性に対する感受性が高く、膵β細胞機能において重要な役割を果たす新規因子を同定し解析する。

【方法・結果】

我々は、過食2型糖尿病モデルの *db/db* マウスに対する1週間の SGLT2 阻害薬投与により、高血糖毒性を選択的に軽減し得ることを報告している (Shimo N et al., 2015)。今回、本系の治療群と非治療群の膵島由来 mRNA を用いて microarray 解析を実施し、非治療群に比べ治療群で2倍以上の有意な高発現を示す43因子を抽出した。高血糖毒性に対し感受性の高いこれら遺伝子の中には、膵β細胞機能における役割は未知だが、GWASにおいて2型糖尿病疾患感受性遺伝子として報告 (Tabassum R et al., 2013) されている *Tmem163* が含まれており、ヒトの糖尿病病態との関連性を想定し、同因子の解析を開始した。マウス膵組織の免疫染色および免疫電顕での解析により、膵β細胞インスリン分泌顆粒 (SG) の顆粒膜への高度の限局が示唆された。膵β細胞特異的 *Tmem163* ノックアウトマウス (KO) の経口ブドウ糖負荷試験において、血糖値は対照群に比べ有意な低値を、血漿インスリン値は有意な高値を示した。単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) も対照群に比べ有意な高値を示した。また電顕での解析にて、対照群に比べ SG の未成熟性が認められた。さらに対照群に比べ KO では、免疫染色にてインスリンの前駆体であるプロインスリンの分布が核周囲から細胞質全体へと変化しており、定量評価では膵島プロインスリン含量が増加傾向を示した。加えて定量的 PCR にて、KO ではインス

リン合成および小胞体ストレスの増大が示唆された。

【考察】

Tmem163 は、SG の成熟を介して膵β細胞からの適切な GSIS 制御に関わるとともに、その発現低下は膵β細胞への負荷となり得るものと推察される。これら GSIS 亢進や膵β細胞負荷は 2 型糖尿病の初期の病態に合致することから、本因子の 2 型糖尿病における意義を明らかにすべく、今後も解析を継続する。

ニューロペプチド B/W はこれまでに痛みの制御、自律神経系の調節などに関わることが知られているが、その生理的役割は不明な点が多い。ニューロペプチド B/W の受容体であるニューロペプチド B/W 1 受容体 (Npbwr1) は情動応答に重要な役割を果たす扁桃体中心核 (CeA) の GABA 作動性ニューロンにおいて顕著な発現を示すことを確認した。さらに、Npbwr1 欠損マウスを独自に作成し、様々な行動テストを行った結果、このマウスは初めて対峙する相手に対して社会的接触時間が非常に長く、執拗な追尾行動を示すことが明らかになった。この時の心拍数、血圧を測定したところ、対照群に比べ顕著かつ持続的な上昇が見られた。また、恐怖記憶の形成に障害が観察された¹⁾。また、これまでに Npbwr1 を発現するニューロン (Npbwr1 ニューロン) の神経活動が新規個体との接触時に亢進することを確かめている。Npbwr1 を手がかりとして Npbwr1 が発現するニューロン (Npbwr1 ニューロン) の生理的役割を神経回路レベルで探索することで個体間距離を制御する分子・神経基盤の描出を試みる。

ソーシャルディスタンスを制御する神経回路とその分子の探索

征 矢 晋 吾

(筑波大学医学医療系、国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

本研究では、ソーシャルディスタンスを制御する神経基盤を探索するためニューロペプチド B/W に注目した。ニ

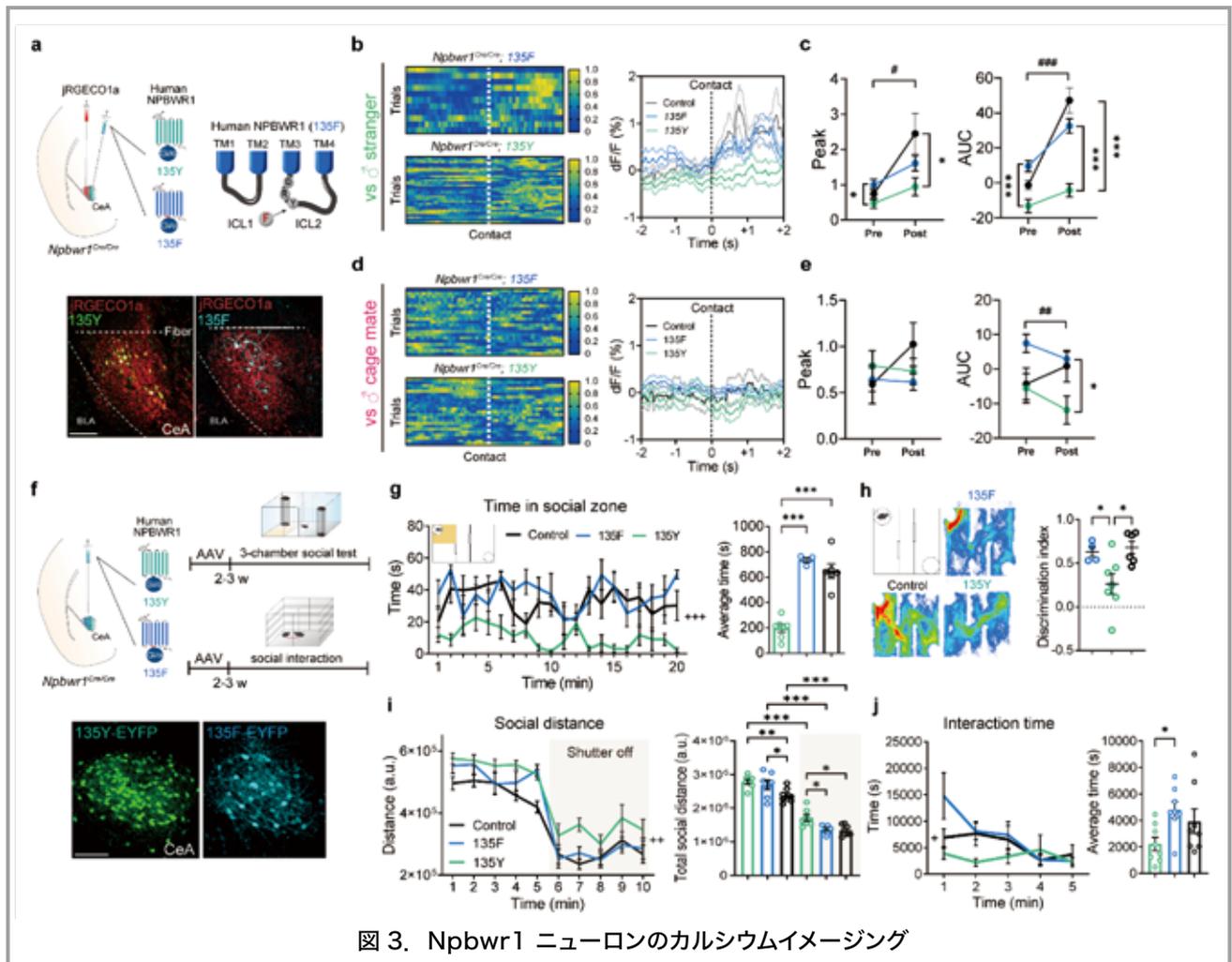


図 3. Npbwr1 ニューロンのカルシウムイメージング

【方法・結果】

- a) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV-DIO-jRGECO1a と AAV-DIO-F1-EYFP または AAV-DIO-Y1-EYFP を混合したものを投与した。免疫抗体染色により jGCaMP7c および EYFP 陽性細胞を CeA において可視化した (スケールバー: 100 μ m)。
- b) 新規の雄マウスに対する社会的接触前後 (± 2 秒) の *Npbwr1* ニューロンのカルシウム動態
- c) 社会的接触前後 (± 2 秒) における平均最大蛍光強度。
- d) 既知の雄マウスに対する社会的接触前後 (± 2 秒) の *Npbwr1* ニューロンのカルシウム動態
- e) 社会的接触前後 (± 2 秒) における平均最大蛍光強度。
- f) 3チャンバー社会行動テストおよび社会相互作用テストの概要。
- g) 新規マウス周辺における滞在時間。
- h) 新規マウス周辺における滞在時間を示したヒートマップおよび Discrimination index。
- i) 社会相互作用テストにおける新奇マウスに対するソーシャルディスタンスの変化。
- j) 社会相互作用テストにおける新奇マウスに対する接触時間の変化。

【考察】

Npbwr1 の生理的役割を明らかにするため、これまでに情動応答の変化が報告されているヒト *Npbwr1* 遺伝子の SNP² を含む AAV (AAV-DIO-F1-EYFP) および正常な *Npbwr1* を発現する AAV (AAV-DIO-Y1-EYFP) を作成した。*Npbwr1-iCre* の homo 接合マウスを用いて F1 および Y1 を発現させた結果、Y1 投与群では3チャンバー社会行動テストおよび社会相互作用テストにおいて社会性の低下およびソーシャルディスタンスの増加を示した。F1 投与群においてはコントロール (*Npbwr1-iCre*, homo 接合マウス) 群と比較して変化は見られなかった。このことから、CeA に発現する *Npbwr1* が機能低下型の SNP によってその生理的機能を失うことで、*Npbwr1* ニューロンの活動を脱抑制させることにより社会性の増加およびソーシャルディスタンスの減少を引き起こすことが示唆される。今後は、新奇個体の接触により活動が増加する CeA の *Npbwr1* ニューロンの経時的変化を観察することで、新奇と既知の個体を識別する神経メカニズムの解明を試みる。

【文献】

- 1) Nagata-Kuroiwa, R. *et al.* Critical role of neuropeptides B/W receptor 1 signaling in social behavior and fear memory. *PLoS One* 6, e16972 (2011)
- 2) Watanabe, N. *et al.* A single nucleotide polymorphism of the neuropeptide B/W receptor-1 gene influences the evaluation of facial expressions. *PLoS One* 7, e35390 (2012)

**メタボリックシンドロームにおけるURAT1の
インスリン抵抗性の制御機構の解明**

田中 祥朗

(東京慈恵会医科大学 内科学講座 循環器内科)

【背景】

尿酸トランスポーター URAT1 は腎臓近位尿細管に発現して、尿酸の再吸収を行うトランスポーターである。我々は、URAT1 が肝臓や褐色脂肪組織に発現して慢性炎症や酸化ストレスを介してインスリン抵抗性を惹起している事を報告した (Tanaka Y *et al* Mol Metab 2022)。しかし、メタボリックシンドロームの心臓組織、心筋細胞における URAT1 の病態生理学的意義に関しては不明な点が多いのが現状である。

【目的】

インスリン抵抗性、メタボリックシンドローム下における心臓組織、心筋細胞における URAT1 の病態生理学的意義を明らかにする事。

【方法】

In vivo : 8 週齢で購入した C57/BL6 マウスモデルに対して 16-20 週間、通常食もしくは高脂肪食を投与した。更に URAT1 選択的阻害薬であるドチヌラドを 50mg/kg/day を 4 週間投与した。4 週間投与後の心機能評価を経胸壁心臓超音波検査、線維化の評価を行った。

In vitro : 仔ラットの心筋培養細胞を用いて、尿酸、パルミチン酸を用いて 24 時間刺激した際の心筋細胞の URAT1 の発現量を mRNA で検討した。

【結果】

マウスの心臓組織において免疫染色，ウエスタンブロット法により URAT1 の発現が確認された。通常食マウス群 (NFD 群) と比較して高脂肪食群では (HFD 群)，経胸壁心エコーで心機能は低下していた。HFD

にドチヌラド (HFD+Doti 群) を投与した群では HFD 群と比較して心機能は改善していた (図 1)。また，Massontrichrome 染色では HFD 群で認めた線維化の領域が HFD+Doti 群で有意に減少していた (図 2)。更に，心臓組織の炎症性サイトカインは HFD 群で NFD 群と比較して増加していたが，HFD+Doti 群で HFD 群と比較して低下していた。

更に，In vitro の検討では，100 μ M，200 μ M の濃度のパルミチン酸で刺激した際に心筋細胞の URAT1 の mRNA 発現が濃度依存的に増加した事を確認した (図 3)。一方で高血糖，尿酸，インスリン刺激では URAT1 の発現の増加は確認されなかった。

【考察】

URAT1 選択的阻害薬を用いて，HFD 群での線維化や心機能を改善した可能性が考えられた。また，パルミチン酸投与により心筋細胞で URAT1 の発現が増加している事からは，パルミチン酸により URAT1 の発現や機能が制御されている可能性が示唆された。

【文献】

Y. Tanaka, T. Nagoshi, H. Takahashi, Y. Oi, A. Yoshii, H. Kimura, K. Ito, Y. Kashiwagi, T.D. Tanaka, M. Yoshimura, URAT1-selective inhibition ameliorates insulin resistance by attenuating diet-induced hepatic steatosis and brown adipose tissue whitening in mice, *Mol Metab* 55 (2022) 101411.

図 1：4 群間での心機能評価

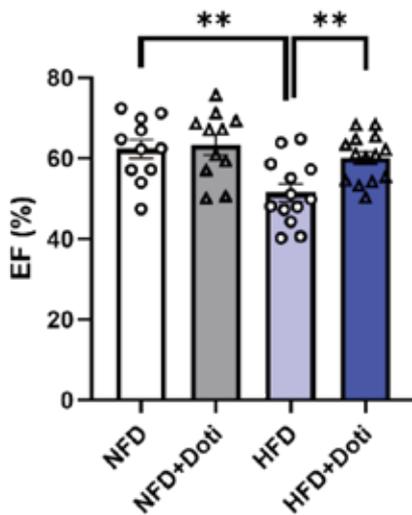


図 2：4 群間での心臓組織像

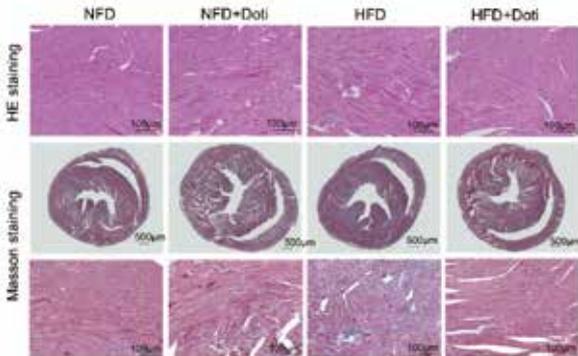
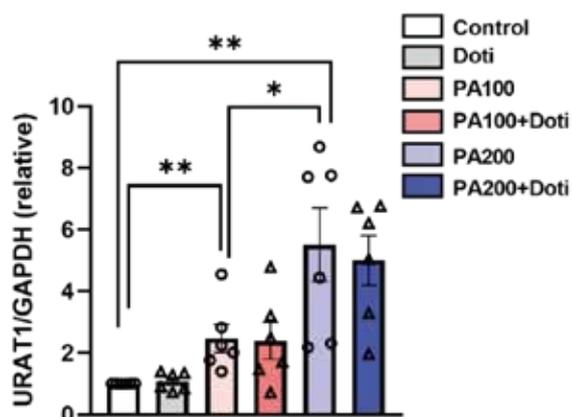


図 3 パルミチン酸 (PA) 刺激の際の心筋細胞 URAT1 の発現レベル (mRNA)



ブタLESにおいて神経型ニコチン受容体刺激が引き起こす弛緩反応の機序

田中 義将

(九州大学病院 肝臓・膵臓・胆道内科)

【目的】

嚥下時の LES 弛緩反応は迷走神経に由来する壁内神経叢のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 及びカハールの介在細胞 (ICC) により調節されていると推測され，我々は当初上記研究課題に対して，ブタ LES において，nAChR 刺激による弛緩反応には，主に ICC/ 過分極因子が関与する機序を詳細に薬理的に明らかに

し Otsuka Y and Tanaka Y et al. Eur J Pharmacol 2021 にて報告した。その後さらに消化管機能に関する研究として排便を制御する中枢神経の局在と役割について未だ不明な部分が多く、光遺伝学的手法等を用いて解明することとした。

【方法】

排便中枢の同定のために複数のシナプスに逆行性感染する仮性狂犬病ウイルス (pseudorabies virus; PRV) を肛門及び遠位結腸に注射し、脳内に標識される PRV を評価した。次に、これにより得られた排便中枢候補部位の機能を評価するために VGluT2-cre マウス、CRH-cre マウス、TH-cre マウスを用意し、これらマウスに対して光遺伝学的手法等を用いて排便に関する各種評価を行った。

【結果】

PRV を用いたトレーシング実験においては橋に存在するバリントン核 (Bar) や青斑核 (LC) において PRV 標識ニューロンが確認された。Bar や LC に存在する VGluT2 陽性ニューロンに対する光遺伝学的手法による光刺激と連動して遠位結腸内圧上昇を引き起こし、Bar に存在する CRH 陽性ニューロンに対する光刺激は時間差があるが遠位結腸内圧上昇を引き起こした。いずれもビーズ排出時間や排便量の増加を認めた。一方で、LC に存在する TH 陽性ニューロンに対する光刺激は control 群と比較し有意な遠位結腸内圧変化やビーズ排出時間の短縮を引き起こさなかった。

【考察】

Bar に存在する VGluT2 陽性ニューロン、CRH 陽性ニューロンが排便に関与し、排便に対して異なるメカニズムで寄与する可能性を初めて明らかにした。これらの更なる役割の追求が、便秘症の亜型である便排出障害の病態の理解および病型に合わせた治療法の創出につながる事が期待される。

【文献】

- 1) Otsuka Y, Bai X, Tanaka Y et al.: Involvement of interstitial cells of Cajal in nicotinic acetylcholine receptor-induced relaxation of the porcine lower esophageal sphincter, Eur J Pharmacol. 5:910:174491 (2021).

ノンターゲットマルチオミクスによる生活習慣病の理解

津川 裕司

(東京農工大学グローバルイノベーション研究院)

【目的】

生活習慣病は代謝システムの破綻による「代謝性疾患」と考えられる。ヒトの三大栄養素とは糖質、脂質、タンパク質であり、その分解・産生の分子機構を網羅的に理解することは代謝性疾患の背後に潜む動作原理を理解する上で必須である。本研究では、代謝物の多様性 (メタボローム) を捉えるノンターゲット解析を基軸としたデータ駆動型研究により、加齢に伴う代謝変容とその生物学的重要性を明らかにする研究を行う。

【方法】

2ヶ月齢、12ヶ月齢、19ヶ月齢、そして24ヶ月齢のマウスに関して、腸内細菌の有無および雌雄差を区別し、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析 (LC-MS/MS) を用いたノンターゲットリピドミクスデータの解析を実施した。肝臓、腎臓などを含む合計13臓器を計測に供した。特にメタボローム変容が大きかった腎臓に関しては、RNA-seq を実施し、統合解析を試みた。

【結果】

大規模メタボローム解析の結果より、多くの臓器でドコサヘキサエン酸を含む bis (monoacylglycerol) phosphate (BMP) が加齢に伴い増加していることがわかった。また多変量解析手法により、腎臓メタボロームが加齢に伴い最も変動する臓器として同定された。そこで、腎臓メタボロームを詳細に解析したところ、スフィンゴ脂質代謝に顕著な雌雄差があることがわかった。特に雄マウスでは、糖を2つ以上含むグロボシドが加齢に伴い増加していることがわかり、雌マウスではほとんど検出されていなかった。RNA-seq データからスフィンゴ脂質代謝に関連する遺伝子発現データを探索したところ、セラミドにガラクトースを付与する代謝反応を担う UDP glycosyltransferase 8a (UGT8a: ヒトでは UGT8) が雄に高発現していることがわかった。

【考察】

UGT8 の遺伝子発現結果から、雄特異的な加齢変容

を示すグロボシドはガラクトースを持つものである可能性が高い。現在、グロボシドの糖異性体を識別する手法を開発することで詳細な構造解析を実施している。また、UGT8の阻害剤を使用した介入実験を現在行っており、老化に伴う慢性炎症などの表現型と糖脂質発現変容の関係について今後解析を進める。

【文献】

Hiroshi Tsugawa, Tomoaki Ishihara, Kota Ogasa, Seigo Iwanami, Aya Hori, Mikiko Takahashi, Yutaka Yamada, Aki Minoda, Makoto Arita. A lipidome landscape of aging in mice. Research Square (preprint) 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2139359/v1>

社会ストレスによる脳組織の超微細な細胞生物学的变化とその機序・役割の解明

永井裕崇

(神戸大学大学院医学研究科薬理学分野)

【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、うつ病など精神疾患のリスクとなる。うつ病患者やマウスのストレスモデルにおいて前頭前皮質神経細胞の機能形態変化が情動変容に重要であることが示唆されているが、その分子機序は未だに不明である。これまで、慢性ストレスがミトコンドリア過剰分裂を伴う樹状突起退縮を生じること、また、シナプスミトコンドリアを含むシナプス特異的にシナプス構造退縮を生じることを明らかにしてきた。その分子基盤を調べるべくプロテオミクス解析やメタボロミクス解析を実施し、シナプス特異的に糖輸送体や解糖系を担う酵素の発現亢進が生じること、さらに解糖系中間代謝物質の蓄積が生じ、その程度がうつ様行動と相関することを見出してきた。本研究においては、ストレスによる中央代謝系変容の実態と意義を明らかにすることを目的とする。

【方法】

発現亢進の認められた中央代謝系を担うタンパク質について、その遺伝子発現を抑制する人工マイクロRNAを発現するアデノ随伴ウイルスを両側の内側前頭前皮質に局

所注入した上で慢性社会挫折ストレスに供し、マイクログリアをFACSにて分取した後にRNAseq解析を実施した。また、前頭前皮質の神経細胞活動を二光子顕微鏡観察で調べた。

【結果と考察】

前頭前皮質の中央代謝系正常化によって、慢性社会ストレスによるマイクログリア活性化や神経細胞の活動減弱が抑制できることが分かった。これまで、ストレス病態における脳代謝変容や脳内炎症は独立に論じられてきたが、これらの知見は代謝変容が脳内炎症の引き金になることを示唆する。今後は、代謝変容が脳内炎症を導く機序について検討する予定である。また、並行して実施した解析で、慢性ストレス後に前頭前皮質や側坐核において脂質代謝物の変動が生じ、特に側坐核の12-LOX代謝物蓄積がストレスレジリエンスと関連することを見出した。

【文献】

- 1) Akiyama S, Nagai H, Oike S, Horikawa I, Shinohara M, Lu Y, Futamura T, Shinohara R, Kitaoka S, Furuyashiki T. Chronic social defeat stress increases the amounts of 12-lipoxygenase lipid metabolites in the nucleus accumbens of stress-resilient mice. *Sci Rep*, 2022, 12, 11385. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15461-7>
- 2) Kawashima Y, Nagai H, Konno R, Ishikawa M, Nakajima D, Sato H, Nakamura R, Furuyashiki T, Ohara S. Single-shot 10K proteome approach: Over 10,000 protein identifications by data-independent acquisition based single-shot proteomics with ion mobility spectrometer. *J Proteome Res*, 2022, 21, 6, 1418-1427 <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00023>

心臓圧負荷時におけるp22^{phox}の分子メカニズムの解明

中田康紀

(奈良県立医科大学 循環器内科)

【目的】

NADPH オキシダーゼ (NOX) は、体内の活性酸素種 (ROS) の主要な供給源である¹⁾。NOX ファミリーの 7 つのメンバーのうち、NOX2 および NOX4 は心筋細胞でも豊富に発現しており²⁾、NOX1-4 は膜貫通タンパク質である分子量 22kDa の $p22^{phox}$ と 1:1 の複合体を形成している³⁾。 $p22^{phox}$ の主な生理学的役割は、NOX と形成するヘテロダイマーの安定化であり、さまざまな臓器での ROS 産生に関与しているとされる。しかしながら、心筋細胞における $p22^{phox}$ の正確な役割は未だ解明されておらず、本研究では心臓における内因性 $p22^{phox}$ の役割を明らかにすることを目的とした。

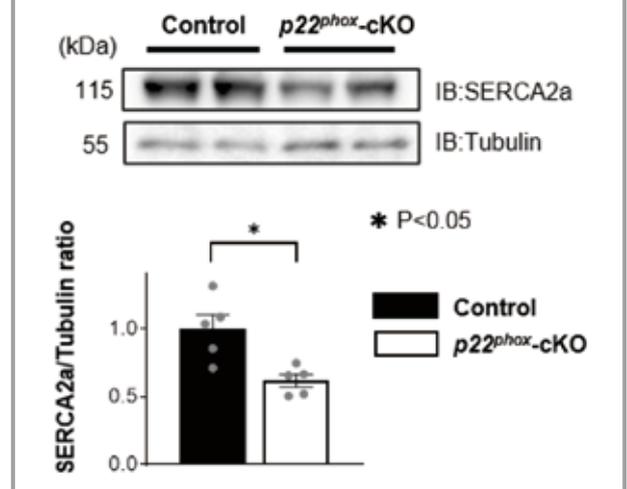
【方法と結果】

はじめに、ヒトの心臓サンプルで $p22^{phox}$ の発現を確認したところ、心不全患者では健常者に比較して、 $p22^{phox}$ の発現が有意に増えており (図 1)、マウスの心臓圧負荷モデルである胸部大動脈狭窄 (TAC) 後も同様に $p22^{phox}$ の発現が有意に増えていた。

そこで、心臓特異的 $p22^{phox}$ ノックアウトマウス ($p22^{phox}$ -cKO) を作成し、TAC を施行したところ、 $p22^{phox}$ -cKO マウスではコントロールマウスに比較して、有意に心収縮能の低下を認め、肺重量も増加していた。このことから、心不全において、 $p22^{phox}$ は代償的に増加し、心保護的に働いていることが予想された。次に、質

量分析で $p22^{phox}$ と結合するタンパクを調べたところ、心筋筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) が最も多い結果であった。そこで、 $p22^{phox}$ -cKO マウスの SERCA2a の発現量を調べたところ、興味深いことにコントロールマウスと比較して SERCA2a の mRNA の発現量に差を認めなかったが、SERCA2a のタンパク発現量は有意に減少していた (図 2)。

図 2 $p22^{phox}$ -cKO マウスでの SERCA2a 発現 (ウエスタンブロット)



そこで、 $p22^{phox}$ -cKO マウスの心機能低下に SERCA2a が関与しているかを確認するために AAV9-SERCA2a を用いて、 $p22^{phox}$ -cKO マウスに SERCA2a の補充を行った。その結果、TAC4 週間後において、 $p22^{phox}$ -cKO マウス + AAV9-SERCA2a では心収縮力が保たれる傾向があり、肺重量の増加も抑えられる結果であった (図 3)。

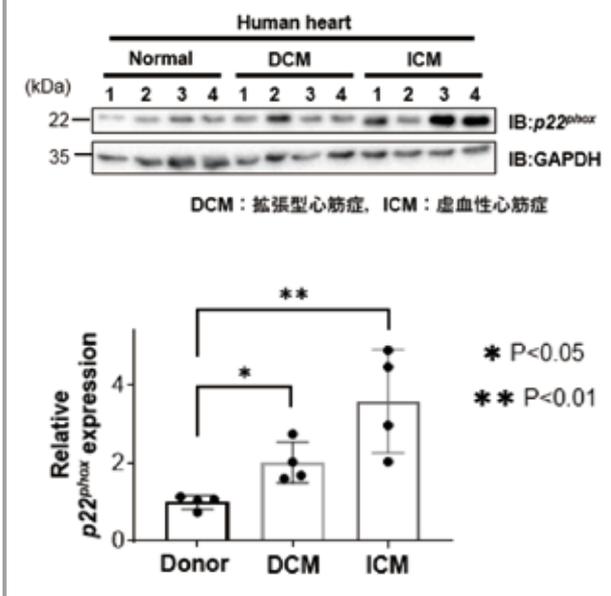
【考察・結論】

$p22^{phox}$ は ROS の産生に関わるだけでなく、心筋細胞において SERCA2a の安定化に関与し、心不全時に心保護的な役割を担っていることが示唆された。

【文献】

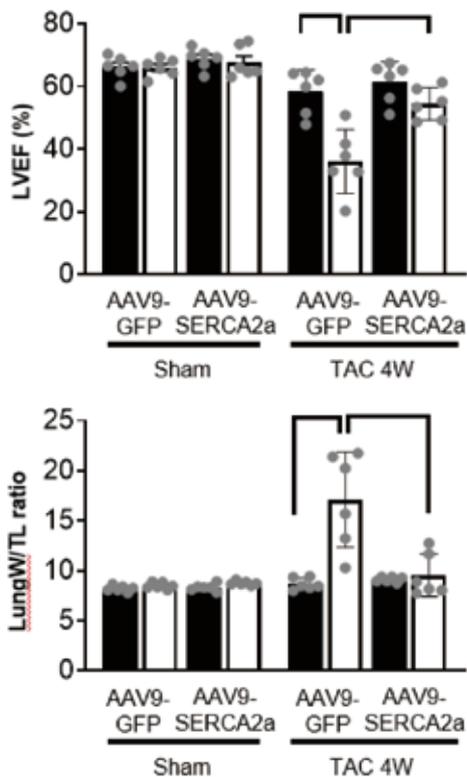
- 1) Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, Ago T and Sadoshima J. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* 50, 408-16. (2011)
- 2) Schulz E and Munzel T. NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol.* 52, 1810-1812. (2008)

図 1 ヒト心不全患者 (HF rEF) の心臓サンプルでのウエスタンブロット



- 3) Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245-313. (2007)

図3 AAV9-SERCA2a 投与後の左室収縮能 (LVEF) と肺重量



細胞競合を介した腫瘍形成機構の遺伝学的解析

永田理奈

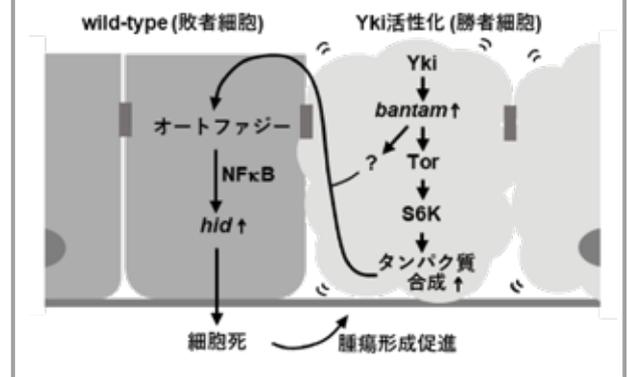
(京都大学大学院 生命科学研究所)

【目的】

細胞競合とは、組織中の適応度の高い細胞（勝者）が適応度の低い細胞（敗者）に細胞死を誘導して排除する現象であり、がんの制御に重要であることがわかっている。例えば、転写共役因子 Yki/YAP が活性化した細胞は、自身が増殖するだけでなく周りの正常細胞に細胞死を誘導し、細胞競合の勝者となることが知られている。我々はこれまでに、Yki 活性化細胞では Yki のターゲットである miRNA *bantam* を介して TOR シグナルが活性化し、これが周りの正常細胞のオートファジー依存的な細胞死を誘導することで腫瘍を拡大することを見いだした¹⁾。重

要なことに、*bantam* の過剰発現細胞は細胞競合の勝者となるが、TOR シグナルを活性化しただけの細胞は細胞競合を引き起こさなかった。そこで本研究では、*bantam* の下流で周囲の正常細胞に細胞死を引き起こすのに必要なシグナル（図1の“？”）を明らかにすることを目的とした。

図1 Yki 活性化による細胞競合メカニズム



【方法】

bantam 過剰発現をモデルとし、細胞競合を制御する因子を見つけるための遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ複眼原基に *bantam* 過剰発現細胞集団と正常細胞集団をモザイク状に誘導し、正常細胞側のみ CRISPR-Cas9 ノックアウト変異を一つ一つ誘導していった際に、複眼の腫瘍形成が抑制される系統を探索した。得られた変異系統に関してさらなる遺伝学的解析を進めた。

【結果】

スクリーニングの結果、*bantam* 過剰発現による腫瘍形成を抑制する変異3系統を同定することに成功した。このうち、最も強い表現型を示した YL-1 遺伝子の変異を誘導した際の遺伝学的解析を進めた。その結果、YL-1 変異の誘導により、*bantam* 過剰発現細胞の周囲の正常細胞で引き起こされる細胞死やオートファジーが抑制された。一方、*bantam* 過剰発現細胞内の TOR シグナルの活性化やタンパク質合成能の上昇は抑制されなかった。

【考察】

bantam 過剰発現細胞内の YL-1 の機能が周囲の正常細胞のオートファジー依存的な細胞死誘導に必要であることがわかった。一方、*bantam* 過剰発現細胞内の TOR シグナル活性やタンパク質合成能には影響を与えなかったことから、YL-1 は TOR シグナルとは別のシグナルを制

御することで細胞競合を引き起こすことがわかった。YL-1 はヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子であることから、今後はこの変異によって発現変動する遺伝子群を解析することで、細胞競合に必要な勝者細胞内のシグナルを明らかにできる可能性が高い。

【文献】

1) Nagata, R *et al.*, Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in Drosophila. *Current Biology* 32,1064-1076 (2022) .

神経ガイダンス因子による神経-免疫-代謝関連メカニズムの解明

中西由光

(大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学)

【目的】

神経-免疫-代謝関連形成を担う分子の同定および機能解析

【方法】

ゲノムワイドアプローチを用いてヒトにおける精神系形質、代謝系形質に共通する分子の探索を行った。次に同定した分子であるセマフォリン 6D (Sema6D) の機能解析をマウスモデルで行った。Sema6D 欠損マウスを用いて行動試験を行い、Sema6D を介した中枢神経応答を評価した。さらに、同マウスを用いて高脂肪食負荷肥満モデルを行い、脂肪組織、肝臓における代謝及び骨髄における造血への Sema6D の関与を検討した。また、交感神経系の関与を検討するため、Sema6D 欠損マウスにおいて β 3 アドレナリン受容体 (Adrb3) を欠損させ、高脂肪食負荷肥満モデルを行った。次に Spatial transcriptomics と single nucleus RNA-seq (snRNA-seq) の統合解析を行い、脳内における Sema6D の機能探索を行った。さらに、in situ hybridization による *Sema6d* 発現評価および質量分析イメージングによる神経伝達物質定量評価を行うとともに、ゴルジ染色による神経細胞樹状突起の形態評価を行った。

【結果】

ヒトデータを用いたゲノムワイド関連解析およびフェノムワイド関連解析から精神系形質、代謝系形質に共通する分子として Sema6D を同定した (図 1)。Sema6D 欠損マウスを用いて行動試験を行ったところ、神経細胞の Sema6D 欠損 (*Sema6d*^{CKO-Tau}) により不安様行動の増強を認めた (図 2)。次に高脂肪食負荷を行ったところ、*Sema6d*^{CKO-Tau} マウスでは肥満抵抗性を認めた (図 3)。また、肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、褐色脂肪への脂肪沈着が抑制された。高脂肪食はミエロイド系血球の造血を亢進させることが知られているが、*Sema6d*^{CKO-Tau} マウスでは高脂肪食負荷下において著明な好中球増加を認めた (図 3)。さらに、Sema6D 欠損マウスにおいて Adrb3 を欠損させると肥満抵抗性の改善を認めた (図 4)。次に情動と自律神経応答を制御する Sema6D シグナルの主要な同定を行った。Sema6D は脳に高発現していることから、まず Spatial transcriptomics を用いて脳の構造的変化を遺伝子発現レベルで検討したが、Sema6D 欠損による構造変化は認めなかった。情動と自律神経応答とともに制御する部位として大脳辺縁系の扁桃体が知られており、in situ hybridization を行ったところ、扁桃体の抑制性ニューロンが Sema6D を高発現していた (図 5)。そこでマウス扁桃体を用いて snRNA-seq を行ったところ、Sema6D 欠損による興奮性ニューロンのシナプス機能異常、抑制性ニューロンの GABA シグナル異常が示唆された。実際、ゴルジ染色で Sema6D 欠損マウスの興奮性ニューロンでは異常スパインの増加を認め、質量分析イメージングで Sema6D 欠損マウス扁桃体の GABA 産生低下を認めた (図 6)。

【考察】

以上の結果から、扁桃体の抑制性ニューロンに発現する Sema6D は GABA 産生およびスパイン形成制御を介して情動と自律神経応答を共役させることが明らかとなった。Sema6D は神経細胞、免疫細胞を含む多様な細胞に発現している。また他のセマフォリン分子とは異なり、class A Plexin のリガンドとしても、受容体としても機能することが知られている。我々は先行研究で免疫細胞由来 Sema6D の逆行性シグナルが細胞内代謝制御を介して抑制性マクロファージ分化を促進することを明らかにした。今回の我々の知見から神経細胞由来 Sema6D の神

経, 免疫, 代謝応答における新たな機能が明らかとなった。これらの結果から, 複数の細胞腫に由来する Sema6D がそれぞれ異なる機序で炎症応答制御に関与することがわかった。一方で神経細胞における Sema6D の順行性シグナルと逆行性シグナルのどちらが GABA 産生およびスパイン形成制御を担うのかは不明であり, 今後検討する予定である。

【結論】

扁桃体の抑制性ニューロンに発現する Sema6D は GABA 産生を介して情動と自律神経応答を共役させる。

再生医療技術を用いた新規治療薬の開発に向けて

西尾 美和子

(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 血液・生体システム解析学分野)

1. ヒト多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞を用いた新規糖尿病治療薬の開発

近年, メタボリックシンドロームの新規治療標的として褐色脂肪組織 (Brown Adipose Tissue; BAT) が注目されている。私達はヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) か

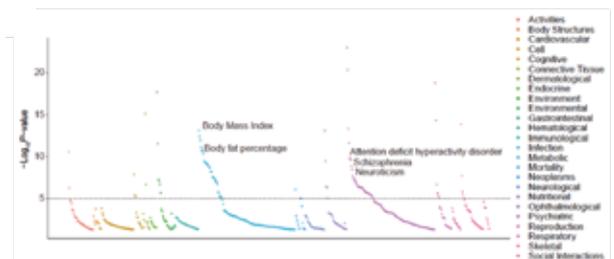


図 1 Sem6D に関するフェノワイド関連解析

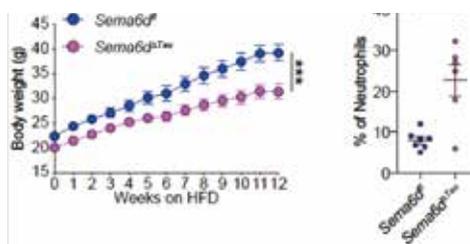


図 3 神経細胞由来 Sema6D は全身代謝および造血を制御する

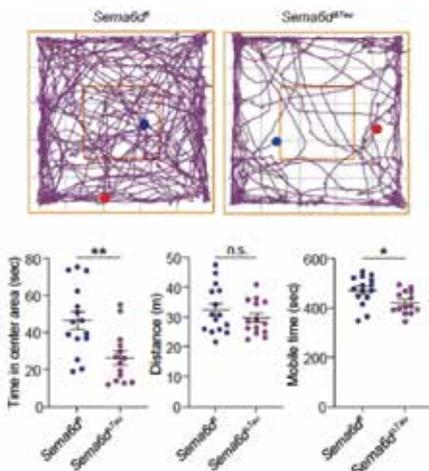


図 2 神経細胞由来 Sema6D は不安応答を抑制する

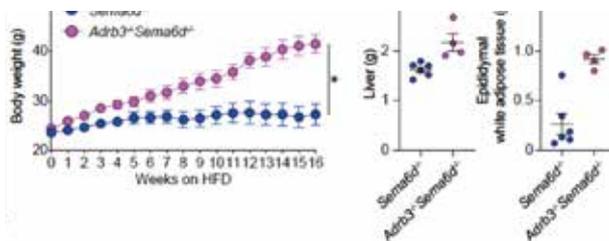


図 4 Sema6D は交感神経応答を抑制する

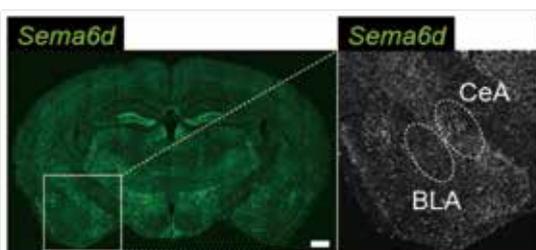


図 5 Sema6D は扁桃体中心核の抑制性ニューロンに高発現する

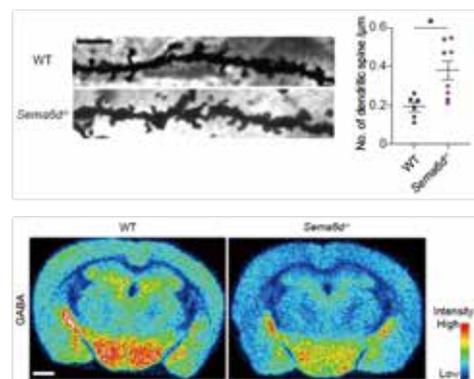


図 6 Sema6D はスパイン形成および GABA 産生を制御する

ら高機能性褐色脂肪細胞 (Brown adipocyte; BA) を高純度に作製するための技術を開発した (Nishio, M et al. *Cell Metab.*16 (3) : 394-406. 2012.). これまで「BA に特異的に発現するタンパク質」は知られていなかったが、「ヒト多能性幹細胞由来 BA」を免疫源として「ヒト BA を特異的に認識するモノクローナル抗体」を作製することに挑戦し、2 株の「ヒト ES 細胞由来 BA を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞」を得ることができた。現在、これらの抗体が認識する抗原分子の同定を進めている。主には (国研) 国立国際医療研究センター研究所にて行った仕事であり、本学に異動後に継続して進めている。

2. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の新規治療薬の開発に向けて

慢性活動性 Epstein-Barr virus 感染症 (Chronic active EBV infection: CAEBV) は、EB ウイルスに感染した T 細胞もしくは NK 細胞がクローナルに増殖、多臓器に浸潤し、感染細胞の活性化が生じて、全身臓器の慢性炎症が生じる重篤な疾患である。現在の治療法は造血幹細胞移植のみであり、有効な薬剤はない。炎症と腫瘍の 2 つの性質を合わせ持つため、両者の制御を目的とした治療を行う必要がある。本研究グループは本学に CAEBV 専門外来を有し、CAEBV 研究、治療の中心的役割を担ってきた。2015 年厚労省研究班により作成された診断基準で診断し、同意を取得した CAEBV 患者の末梢血単核細胞からセンダイウイルスベクターを用いて初期化 4 因子を遺伝子導入し、疾患 iPS 細胞を 8 株作製した。これら細胞を用いて各種細胞に分化誘導することで希少疾患である CAEBV の *in vitro* モデル、創薬スクリーニングシステムを構築中である。本学に異動後に始めた研究であり、新しいアプローチから基礎研究を進め、臨床に還元できるよう引き続き遂行する。

腸内細菌が腸管運動機能に及ぼす影響とその機序

白 曉 鵬

(九州大学病院肝臓膵臓胆道内科)

【研究背景】

腸内細菌は、宿主における糖質、脂質およびビタミンと

いった栄養素の消化・吸収に不可欠であると共に、短鎖脂肪酸や胆汁酸などの代謝物を介した全身の恒常性維持機構において重要な役割を果たしている。腸内細菌の種類、局在、数量および多様性に影響を及ぼす主要因として腸管運動機能が注目されてきたことは理にかなうことであるが¹⁾、最近の研究にて、腸内細菌自体が宿主の腸管神経の発達や維持に必須の役割を果たし、逆に腸管運動機能を制御している可能性が示唆されたが詳細は不明である。すなわち、腸内細菌叢変化が腸管運動機能異常を病態とする慢性便秘症、過敏性腸症候群さらには慢性特発性偽性腸閉塞症の原因となることを示すものである²⁾。本研究の目的は、腸内細菌を標的とする腸管運動機能異常に起因する疾患群の新規治療薬の開発を目指して、腸内細菌が腸管運動機能に及ぼす影響とその機序を解明することである。

【方法】

通常の腸内細菌を有するマウス (SPF)、無菌マウス (GF)、単一菌種定着ノトバイオームマウス (EC : *E.coli* 或は LB : *Lactobacillus*) に、*in vivo* 消化管運動機能、*ex vivo* 腸管平滑筋収縮機能、Nanostring による腸管組織遺伝子発現、蛍光免疫染色による筋間神経叢の蛋白質発現評価を行った。

【結果】

胃排出機能は各群間に有意な差を認めなかった。腸管運動機能は、GF 群でその他の群と比較して有意に低下した (図 1)。腸神経のアセチルコリン産生酵素 (ChAT) の発現は各群間に有意な差を認めなかったが、それと共局在する神経に Vasoactive intestinal peptide (VIP) の発現は腸内細菌が存在する 3 群は GF 群のそれと比較して有意に強い発現を認めた (図 2)。VIP 発現量は腸管運動機能と有意な正の相関を認め、腸内細菌が腸神経の発達を制御することが示唆され、腸管自然免疫の関与が考えられた。TLR 経路が活性化されない MYD88^{-/-}TRIF^{-/-} マウスを用いて、無菌条件、SPF 環境条件下における VIP 発現量と腸管運動機能を評価した。MYD88^{-/-}TRIF^{-/-} マウスは無菌条件、SPF 条件のいずれも VIP 発現量と腸管運動機能の低下を示している。

【考察】

VIP 発現量は腸管運動機能と有意な正の相関を認め、腸内細菌が腸神経の発達を制御することが示唆された。

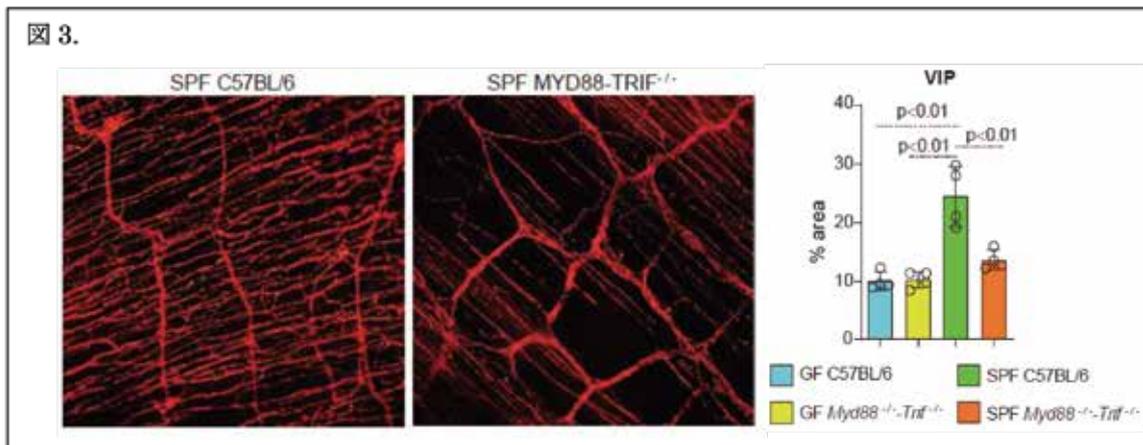
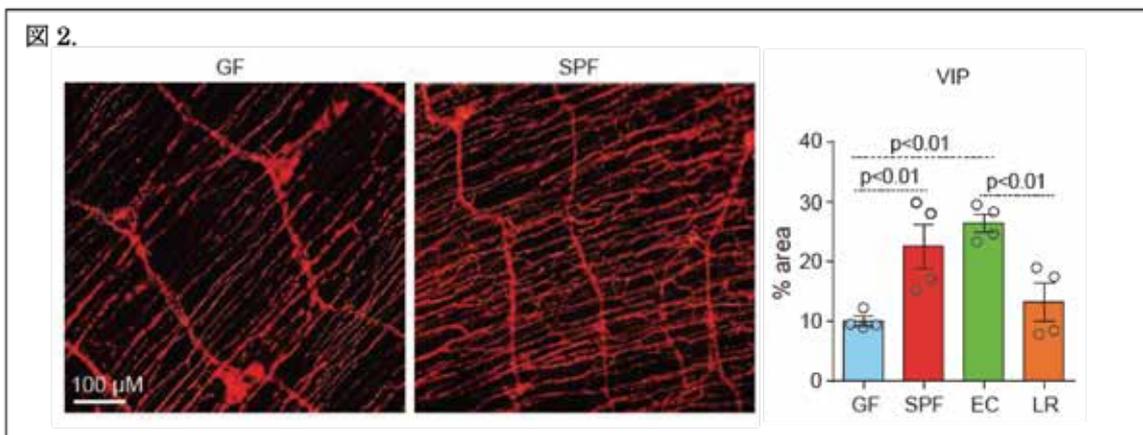
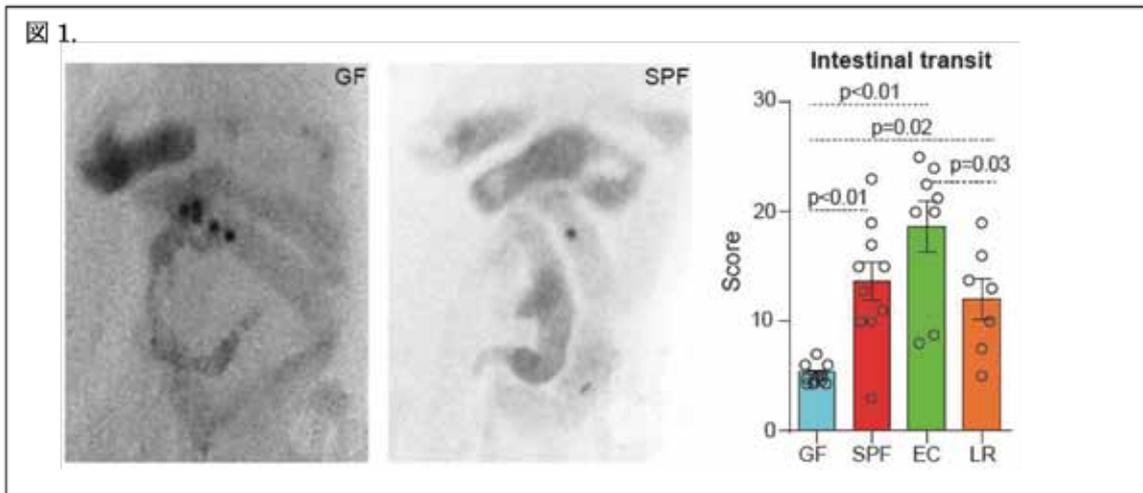
さらに、TLR 経路が活性化されない MYD88^{-/-}/TRIF^{-/-} マウスには無菌条件, SPF 環境条件下の腸管運動及び VIP 発現量が低下し, 腸管自然免疫の関与が示唆されている。

【文献】

1) Quigley, E.M., Microflora modulation of motility. *J Neurogastroenterol Motil*, 17 (2) :

p. 140-7. 2011.

2) Barбора, W., Gut microbiota-motility interregulation: insights from in vivo, ex vivo and in silico studies. *Gut Microbes*. 14 (1) : 1997296. 2022.



経時的一細胞RNA-seqを用いた多発性骨髄腫が持つ薬剤反応性遺伝子の同定

土師 正二郎

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【はじめに】

多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma: MM) は高齢者に多くみられる難治性血液悪性腫瘍であり、今後の超高齢化社会において患者数の更なる増加が予想される。近年 Proteasome inhibitors (PI) などの新規薬剤が登場し治療成績は飛躍的に向上したが、ほとんどの症例で薬剤耐性を生じ再発するため、治癒をもたらすことは依然困難である。新規薬剤耐性獲得の分子機構の解明とそれを踏まえた最も有効な薬剤選択指標の確立は喫緊の課題であるが、薬剤耐性に関与する遺伝子の同定が進んでおらず、耐性獲得の分子基盤は不明な点が多い。

耐性遺伝子の同定が困難な要因として MM の腫瘍内不均一性が知られている。MM では初期に発生に関わる遺伝子異常が起り、さらに一部クローンにおいて増幅に有利な遺伝子異常が加わる“枝分かれ”な腫瘍進展を示すため、ゲノム異常パターンの異なる大小複数のクローンが存在する。このため従来の細胞集団全体を対象とした解析では、MM 幹細胞などのマイナークローンに存在する耐性遺伝子を同定することが困難であり、single cell レベルでの解析が望まれている。一方、MM は治療経過中にもゲノム異常が蓄積し薬剤耐性を獲得するため、診断時サンプルの解析のみでは治療関連の獲得耐性に関連する遺伝子異常を同定できない。以上より、MM に出現する薬剤耐性遺伝子の網羅には、同一患者の経時的なサンプルを対象とした single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析によるクローンの追跡と解析が不可欠である。

【結果】

ごく最近我々は、同一患者の治療前後のサンプルを対象とした scRNA-seq 解析を行い、PI 投与により速やかに消失する細胞集団 (cluster) のみに強く発現する遺伝子 *PELI2* を PI 感受性に関与する候補遺伝子として同定した。遺伝子の多寡により MM を 2 群化し、各々の PI 投与時の予後を検索することができる共用 database (PRECOG) を用い、*PELI2* 発現の多寡による全生存

率を比較したところ、高発現する患者において生存率が有意に高いことを確認した。さらに *PELI2* を欠損あるいは過剰発現させた骨髄腫細胞株を樹立しこれらの PI への感受性を細胞毒性アッセイにより検討したところ、*PELI2* 発現が PI 感受性を高めることを見出した (図 1)¹⁾。

同様の手法を用い、治療前後のみでなく寛解期の骨髄サンプルも対象とした解析を行い、薬剤耐性遺伝子を探索している。経時的に初発時から新規薬剤抵抗性となる経過を追う事が出来、さらに治療が奏功し寛解となった時点での骨髄検体も取得できている症例を対象として経時的 scRNA-seq 解析を行った。寛解期の骨髄中にごく少数存在する MM 細胞は薬剤抵抗性が高く、これらが治療奏功時にも残存することが再発の一因と考えられている。寛解時に残存する耐性細胞集団において特異的に発現する耐性遺伝子の同定を目的とし、下記検討 1 を進めた。

検討 1：経時的 scRNA-seq 解析による新規薬剤抵抗性遺伝子の同定

骨髄検体より、BD FACS Melody™ セルソーターを用い、CD38⁺CD45⁺CD19⁻ の MM 細胞を、患者 1 検体あたり 960 細胞を目標としてプレートに 1 細胞ずつソーティングを行った。CEL-Seq2 法によってライブラリーを作成し、1 細胞当たり 50 万リードを想定し、Illumina HiSeq 1500 sequencers でペアエンドシーケンスを行った。解析結果は、GRCh38 human reference を用いてマッピングを行った。

得られたリードカウント情報を解析用ツール Seurat で解析し、UMAP plot とクラスター毎の variable gene list を作成した。臨床経過と照らし合わせ、治療奏功時にその比率が増大する Cluster2, 3, 4 を同定した (図 2)。

現在、P2 で細胞数比率が上昇する cluster2, 3, 4 に特異的に発現する遺伝子のうち $p < 0.05$ の遺伝子リストを作成中であり、この中から薬剤抵抗性遺伝子の候補を同定する。さらに今後検討 2-3 を行う予定である。

検討 2：同定した候補遺伝子を欠損・強発現する骨髄腫細胞株の樹立

データベースより候補遺伝子を持たない骨髄腫細胞株を検索する。該当するものがない場合は CRISPR-Cas9 システムを用い、候補遺伝子を欠損した骨髄腫細胞株を樹立する。

さらに欠損株に、候補遺伝子を含む発現ベクターをトランスフェクションし高発現株を作製する。遺伝子欠損・高発現株を対象とした細胞増殖アッセイやRNA-seq解析を行い、これらの遺伝子が増殖など細胞機能に与える影響を解析する。

検討 3：樹立した細胞株における新規薬剤反応性の評価と新規治療法の探索

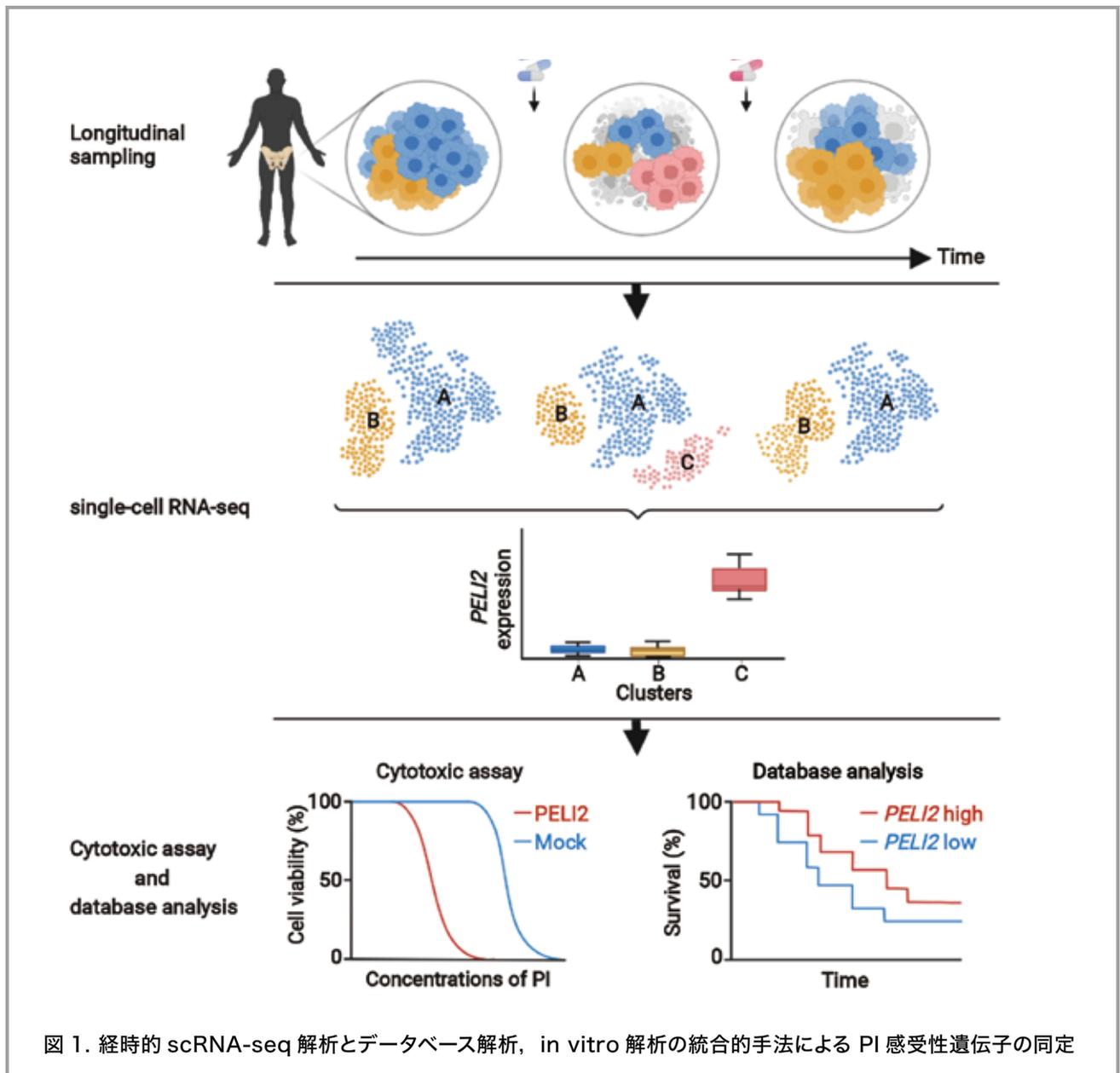
検討 2 で樹立した細胞株の、新規薬剤への感受性を細胞毒性アッセイにより検討する。

具体的には各濃度の新規薬剤添加 24, 48 時間培養後に細胞生存率を評価し IC₅₀ を算出する。また、検討 1 にて同定された遺伝子に対し阻害作用の報告がある薬剤が存在する場合、高発現細胞株にその薬剤を新規薬剤と

共に添加し、細胞生存・増殖率に与える影響を解析し、新規治療薬としての有用性を検討する。

【考察】

寛解期に残存する MM 細胞は微小残存病変と言われ、再発・予後と関連することが予想されるがその希少性から詳細な解析はこれまでのバルク解析では困難であった。本研究では scRNA-seq 解析を用いることで、寛解期の骨髄細胞のうち 0.2% しか存在しない MM 細胞のトランスクリプトを解析することが可能であった。また同定した「寛解期に拡大する細胞集団」のうち cluster4 は cytotracer 解析の結果、より未分化な細胞集団であることが示唆されており再発の原因となりうる MM 幹細胞の同定につながる可能性がある。本研究により、微小残存



病変が持つ耐性遺伝子が同定できれば、新規予後指標や新規治療法の開発につながると考えられる。

【要約】

MM が持つ腫瘍内・腫瘍間多様性を克服し薬剤反応性遺伝子を同定しうる統合的手法を先行研究において樹立したことから¹⁾、本研究では再発時のみならず寛解期のサンプルも対象とし同様の解析を行うことで寛解期に残存する耐性細胞が持つ耐性遺伝子の同定を試みた。その結

果、寛解期に拡大する細胞集団を同定でき、現在これらの細胞集団が持つ耐性遺伝子の同定を進めている。

【文献】

1) Masuda T*, Haji S*, 他 (*: contributed equally, 13 名中 2 番目) . Identification of a drugresponse gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing. *iScience*. 2022 in press 査読有

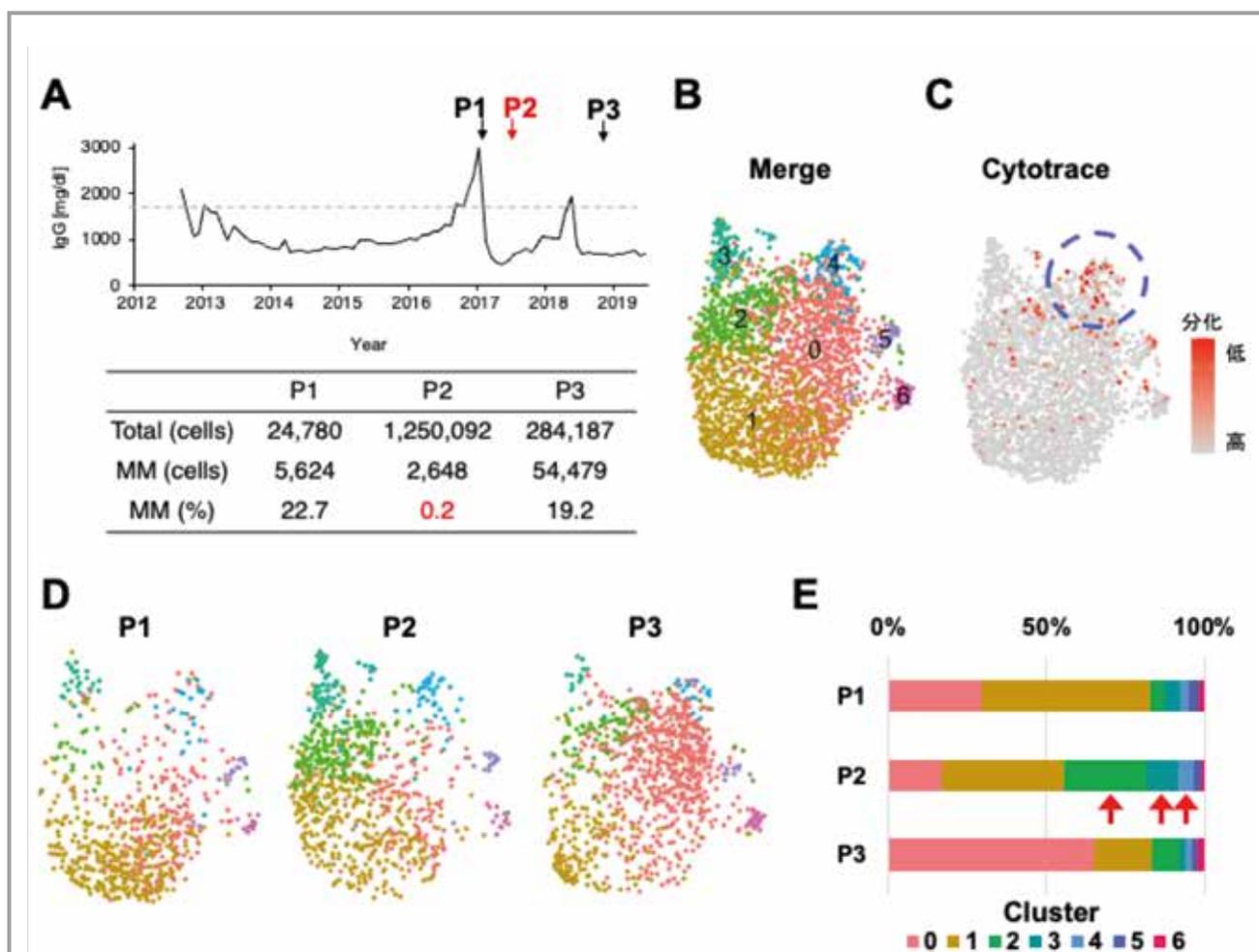


図 2. 寛解期に割合が増大する cluster の同定

寛解期を含む骨髄サンプルを対象とした scRNA-seq 解析を行った。

(A) 寛解期 (P2) を含む骨髄サンプルを得られた症例を対象とした。P2 では MM 細胞の比率は 0.2% とごくわずかであった。

(B) 全サンプルより得られたリードカウント情報を解析用ツール Seurat で解析し、UMAP plot を作成したところ 7 つの cluster に分けることができた。

(C) 細胞の成熟度を推定できるアルゴリズムである Cytotrace を用いて解析を行ったところ、cluster4 に未熟な細胞が多くみられることがわかった。

(D) (B) で作成した UMAP plot を採取ポイント毎に分割した。

(E) 採取ポイント毎の各 cluster の細胞数比率を積み上げグラフとして表示した。

Cluster2, 3, 4 が寛解期である P2 で増加することが判明した。

栄養への応答と代謝恒常性を支える全身性および エピジェネティック制御機構の解明

服部 佑佳子

(京都大学 大学院 生命科学研究科)

【背景・目的】

栄養環境は、個体の成長のみならず、成体や次世代にまで影響を与える。しかし、様々な栄養環境に動物がどのように応答し適応しているかには、不明な点が多い。我々はこれまでに、ショウジョウバエ近縁種群のマルチオミクスによる比較解析を行ってきた。そして、自然界で様々な果物を食べるキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) の幼虫では、全身性の TGF- β /Activin シグナル伝達経路 (Activin 経路) を介した遺伝子発現の抑制が、高炭水化物食下での幼虫期の成長に寄与することを見出した。一方、自然界で低炭水化物の果物しか食べないセイシェルショウジョウバエ (*D. sechellia*) では、そのような制御が働かず、高炭水化物食に適応できないことを明らかにした (Watanabe et al., *Cell Reports*, 2019)。本研究課題では、ヒストン修飾酵素によるクロマチン構造の制御が、高炭水化物食への適応に果たす意義とその分子機構について解析を行う。加えて、オス成熟個体の生殖細胞における Activin 経路が、高炭水化物食下での生殖機能に果たす役割の解明を目指す。

【方法・結果】

1) 高炭水化物食下での個体成長を支えるクロマチン制御機構の解析

D. melanogaster の野生型および変異体、そして、*D. sechellia* を用いたマルチオミクス解析の結果、*D. melanogaster* では、H3K9 ヒストンメチル基転移酵素 (H3K9 HMT) と Activin 経路が H3K9me3 修飾制御を介して遺伝子発現を抑制的に制御することにより、高炭水化物食への適応を支えていることを見出した。一方、*D. sechellia* では、そのような機構が働かず、栄養環境の変化に対してヘテロクロマチンが不安定になり、高炭水化物食条件下で遺伝子が過剰に発現し、発生率が低下することが示唆された。

2) 高炭水化物食下での生殖機能を支える Activin 経路の解析

また、高炭水化物食を摂食した *D. melanogaster* の精巣では、H3K9 HMT と TGF- β /Activin シグナリングを介して精巣特異的に発現する遺伝子などが発現上昇することを見出している。この遺伝子発現調節は、精巣での代謝産物量の調節に機能しており、交配したメス体内に保持される精子の数や次世代数の向上に役割を担うことを明らかにした。

【考察】

今後、*D. melanogaster* での Activin 経路と H3K9HMT との関係などの詳細な分子機構を明らかにするとともに、*D. sechellia* では、それらの機構にどのような異常が生じているか、そして、そのような種間の違いを生み出す分子基盤の解明を目指す。

一次繊毛における中枢性摂食受容体の機能解析

濱本 明恵

(広島大学大学院統合生命科学研究科)

【目的】

一次繊毛は、微小管から構成される非運動性の繊毛で、ほとんどの細胞が一本のみ持つ細胞小器官である。その機能不全は腎嚢胞、肥満など様々な症状を呈する繊毛病を引き起こし、一次繊毛は周辺環境を感知する細胞のアンテナだと考えられている。一次繊毛膜には肥満に関与するメラニン凝集ホルモン受容体 1 をはじめとした限られた種類の G タンパク質共役受容体 (GPCR) が局在することが報告されたが、繊毛局在型 GPCR の機能や生理的役割については未解明な部分が多い。報酬系、運動機能、認知機能に関与するドーパミン (DA) 受容体 5 型 (DR5) も繊毛局在型 GPCR のひとつであるが、解析はあまり進んでいない。そこで、今回は DR5 陽性繊毛に対する DA の作用とそのシグナル経路を解析した。

【方法】

DR5 を一過性または安定発現させたマウス腎集合管由来細胞 (mIMCD3) に DA を添加し、DR5 陽性一次繊毛の変化を細胞免疫染色法で観察した。また、薬理的解析により細胞内シグナルを調べた。

【結果・考察】

DR5 陽性一次繊毛に DA を添加すると、一次繊毛の

長さは保持したまま DR5 陽性繊毛を保有する細胞の割合が約 60% 低下し、DR5 が一次繊毛膜上から排出 (exit) されることを初めて見出した。この現象は、DA 添加時間および DA 濃度に依存的であり、EC50 値は生理的濃度に近い 0.69 μ M であった。また、ヒト網膜色素上皮細胞 (hRPE1) においても同様の現象が認められた。通常、一次繊毛は LiCl により伸長するが、DR5 が排出された繊毛では LiCl に対する感受性が低下し、繊毛機能の変化を示した。次に、DR5 は Gs, G12/13 共役型 GPCR であることから、PKC, PKA, ROCK, Epac, Akt, JNK 阻害剤を用いて DR5 排出現象を制御する細胞内シグナルを検討した結果、2 種類の Epac 阻害剤により DR5 排出現象が有意に抑制された。加えて、シクロヘキシミドによっても本現象が有意に抑制されたことから、DR5 の排出現象はタンパク質翻訳を介していると考えられる。また、KD 実験等から受容体インターナリゼーション関連因子 (クラスリン, ダイナミン 2, β アレスチン 2 等) の関与も示唆された。本研究により、一次繊毛における DR5 の機能が明らかになり、いまだ謎が多い一次繊毛および DR5 の生理的意義の解明に繋がることが期待される。

虚血性心疾患に対する精密医療の推進

原 弘 典

(東京大学医学部附属病院 循環器内科)

【背景・目的】

高齢化に伴い虚血性心疾患が増加、患者背景も多様化しつつあり、患者個人に応じた最適な治療を提供することが求められている。しかし、患者背景の多様化により、ランダム化比較試験の結果が最適な治療として適応できない状況も増えている。患者ごとのリスクを予測する様々なモデルが提唱されているが、リスクの層別化にとどまり、最適な治療の提供にまでは至らないことも多い。そのため、ランダム化比較試験のデータを基に、患者ごとに最適な治療を提供できる治療選択決定モデルの創出が求められている。機械学習を用いることで、重症冠動脈病変を有する患者に対する最適な冠動脈血行再建術を、患者背景に応じて提供する治療選択決定モデルの作成を目指す。

【方法・結果】

SYNTAX 試験は、重症冠動脈病変を有する患者に対する冠動脈血行再建術として、経皮的冠動脈形成術と冠動脈バイパス手術を比較したランダム化試験であり、10 年間の生存率がフォローされている。

この試験の、患者背景、10 年間の生存率のデータに機械学習モデルを適応させることで、血行再建術前の心身の健康 (36-Item Short Form Health Survey (SF-36)) が術後 10 年後の生存率と関連することを見出した。そのため、心身の健康データをもとに予後解析をおこなったところ、心身ともに健康である患者においては、経皮的冠動脈形成術よりも冠動脈バイパス手術による冠動脈血行再建術を行ったほうが予後が良かった¹⁾。

【考察】

統計学的アプローチをもとに患者個々の経皮的冠動脈形成術と冠動脈バイパス手術の選択基準を提示する SYNTAX Score II 2020 が提示されていた。機械学習を適応させることで、SYNTAX Score II 2020 においては組み込まれていなかった予後予測因子「心身の健康」が明らかとなった。今後、機械学習を用いることでより精密なリスク予測モデルを確立することが望まれる。

【文献】

- 1) Ono M, Serruys PW, Hara H, et al. Effect of Patient-Reported Preprocedural Physical and Mental Health on 10-Year Mortality After Percutaneous or Surgical Coronary Revascularization. *Circulation*. 2022;146 (17) :1268-1280

高齢者急性腎障害における DNA 修復因子を介したアニオントランスポーター制御機構の役割の解明

菱 川 彰 人

(慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科)

【目的】

慢性腎臓病 (Chronic kidney disease, CKD) は加齢を背景として世界的に増加しており、CKD と非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) をはじめとする他

臓器の代謝変容との関連が報告されているが、腎臓におけるDNA損傷が直接の誘因となりうる可能性や臓器連関の詳細な分子機序は明らかになっていない。本研究では、近位尿細管におけるDNA損傷修復が全身の代謝変容連関にどのように関わっているのか明らかにすることを目的とした。これまで、腎臓病におけるDNA修復因子の病態生理学的意義を報告してきた(*Cell rep* 2019, *iScience* 2021)が、近位尿細管に直接的にDNA損傷を誘発するモデルマウスを新規に作成し、

腎臓のDNA損傷に関連した全身の代謝変容の分子機序の解明を目指す。

【結果】

腎臓は分裂能の異なる多種多様な細胞種で構成されており、それぞれの細胞種におけるDNA損傷修復の腎臓病病態に果たす役割を解明するため、申請者らは細胞種特異的に non-mutagenic なDNA損傷を惹起するマウスモデルを作成して検討を開始した。ポドサイト特異的にホーミングエンドヌクレアーゼ I-PpoI を発現させたマウスでは、尿蛋白および急激な腎機能悪化とともに腎臓にCD11b陽性マクロファージの浸潤を認め、腎不全により半年程度で死亡し、ポドサイトにおけるDNA損傷修復の重要性が示唆された(図2)。そして、近位尿細管特異的にI-PpoIを発現させたマウス(I-PpoIマウス)を作成したところ、16週齢の時点で体重が有意に減少しており、臓器重量を評価したところ、腎臓、肝臓、脂肪重量が減少していることが明らかとなった。特に長期飼育により、I-PpoIマウスでは野生型と比べて有意な脂肪肝の所見を示すことを見出した(図3)。すなわち、近位尿細管におけるDNA損傷が他臓器の代謝変容に影響を及ぼす可能性が想起された。現在、近位尿細管細胞と他臓器の変化を媒介する因子を同定する基礎的検討を進めている。

図1：糖尿病性腎症におけるKAT5を介しDNA損傷応答とエピゲノム変化形成

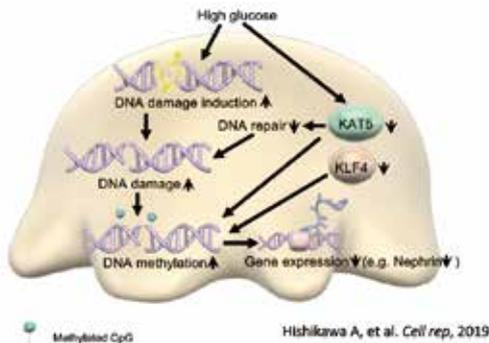


図2：ポドサイト特異的I-PpoIマウスはCD11b+細胞浸潤を認め、腎不全で死亡

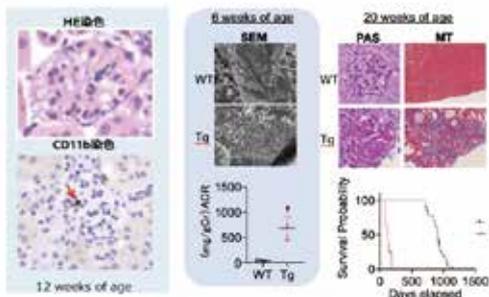
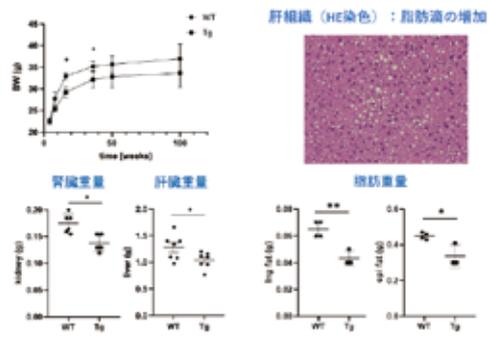


図3：近位尿細管特異的I-PpoIマウスは体重減少、脂肪肝を示す



概日リズム障害発症メカニズムの理解に向けた睡眠リズム制御機構の解明

平野有沙

(筑波大学医学医療系)

【目的】

睡眠覚醒を制御する神経核は複数同定されているが、中でも視床下部外側野(LH)に存在するオレキシン産生ニューロンは覚醒の維持に重要な役割を果たす。一方、視床下部腹側視索前野(VLPO)は睡眠の導入に必要であると考えられている。本研究では、オレキシン産生ニューロンと腹側視索前野との解剖学的、機能的な関係を明らかにし、睡眠覚醒制御に関わる神経メカニズムの解明を目指す。

【方法】

経シナプス性神経トレーサーである改変型狂犬病ウイルス

スを用いることで特定の神経の上流神経をラベルすることが可能である。本研究では、オレキシン産生神経に神経接続するVLPO神経をラベルし、in situ hybridizationにより各種神経マーカーの発現を解析した。さらに光遺伝学を用いてLHに神経投射するVLPOのGABA作動性神経の睡眠覚醒制御における機能を調べた。

【結果】

オレキシン産生ニューロンに神経投射するVLPOニューロンの大多数はGABA作動性神経であった。さらにLHに投射しているVLPOのGABA作動性神経の上流を調べたところ、多くの脳領域からの入力認められ、その多くが視索前野内であった。一方、LHからの入力も観察されたことより、LHとVLPOの間に解剖学的なループ構造があると考えられた。光遺伝学を用いてVLPOのGABA作動性神経のLHにある軸索を刺激したところ、マウスにおいて覚醒時間が有意に上昇した。

【考察】

VLPOからLHへの神経投射は覚醒を促進することが明らかになった。一方、同じVLPOのGABA作動性神経でも乳頭核(TMN)への神経投射は睡眠を促進すること、LHとTMNへ神経投射するVLPOのGABA作動性神経は大部分が異なることからVLPOは不均一な神経集団で構成されており、投射先や入力元による機能的差異が生まれていると考えられた。これらの研究成果は論文に発表した。

【文献】

Prokofeva K, Saito YC, Niwa Y, Mizuno S, Takahashi S, Hirano A*, Sakurai T*. (*co-corresponding) Structure and Function of Neuronal Circuits Linking Ventrolateral Preoptic Nucleus and Lateral Hypothalamic Area. *J Neurosci.* 43, 4075-4092 (2023)

生理的アディポネクチン受容体・T-カドヘリンの
血中可溶性フォーム(可溶性T-カドヘリン)の生理
病態学的意義

福田 士郎

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 助教)

【背景】

GPIアンカー型膜タンパク質であるT-カドヘリン(T-cad)は、脂肪細胞特異的に分泌されるアディポネクチン(APN)と非常に高い特異性と親和性で結合する。APNは血中に $\mu\text{g/mL}$ オーダーという、一般的なホルモンやサイトカインと比べて非常に高い濃度で存在する。またAPNは三量体、六量体、多量体構造をとり、特に多量体APNと2型糖尿病や冠動脈疾患の関連が臨床疫学的に示されているが、この多量体APNと生理的濃度域で結合するのはT-cadのみである。しかしT-cadはGPIアンカー型膜タンパク質であり細胞内ドメインを持たないので、それ単体では細胞内シグナル伝達に関与することは困難である。

我々は最近、APNがT-cadと結合し、エクソソームの合成分泌を促進することが臓器保護効果に重要であることを報告した。一方で、血中にもT-cad分子が検出されるという報告があったが、その分子形態や臨床的意義、生理病態学的意義は不明であった。

【目的】

血中可溶性T-cadの分子形態ならびに臨床的意義・生理病態学的意義を明らかにする。

【方法1】

T-cadに対する新規モノクローナル抗体を取得し、ヒト血中のT-cad分子を精製し解析する。

【結果1】

ヒト血中には130kDa体、100kDa体、30kDa体の合計3種類のT-cad分子が存在した。ゲルろ過解析でそれぞれのT-cadは予測分子量の所に溶出され、いわゆるエクソソームに係留された膜型ではなく、アディポネクチンとも結合していない、可溶性として存在することを明らかにした。さらにこの新規抗体を用いて3種類の可溶性T-cad分子を測り分けるELISAを確立した¹⁾。

【方法2】

T-cad ELISAを用いて、健常者や患者における血中T-cad濃度を検討する。

【結果2】

2型糖尿病患者の血中T-cad濃度は、メタボリックシンドロームに関連する複数の臨床パラメータと相関した¹⁾。また心筋梗塞患者では発症から経時的に血中T-cad濃度が大きく変動した²⁾。

また、人間ドック施設を有する他院と共同研究を行い、連続症例で1000余名の人間ドック受診者の検査結果データならびに残余血清を取得した。これらの血中T-cad濃度を測定し、現在健常者のT-cad濃度ならびに基準値について検討中である。

【方法3】

血中T-cadが生体内で作用を持つかどうか、野生型マウスもしくはT-cad欠損マウス、疾患モデルマウスを用いて検討する。

【結果3】

STZ投与による高血糖モデルマウスにおいて、血中T-cad濃度が上昇することを見出した。T-cad欠損マウスにSTZを投与すると、野生型マウスと比べさらに著しい血糖上昇をきたすが、外因性に可溶性T-cadを投与しておくとその血糖上昇は緩和された。また、高脂肪食負荷T-cad欠損マウスに可溶性T-cadを投与すると、対照群と比較して膵β細胞におけるBrdU取り込み率が上昇し、可溶性T-cadは膵β細胞の増殖促進作用を示すことが明らかとなった³⁾。

【考察】

以上よりT-cadは、APNと結合しエクソソーム合成に関与する膜型だけでなく、血中に可溶性として存在し、様々な病態で変動することを明らかとした。また基礎実験レベルであるが、血中可溶性T-cadは膵β細胞への増殖促進作用を有することも明らかとした。最近では心圧負荷モデルに対する可溶性T-cadの保護的作用も見出しつつあり(未発表)、様々な臓器にまたがる有益な作用を示す可能性がある。

今後、可溶性T-cadの産生細胞・臓器の同定および産生メカニズムの解明、臨床的意義(基準値の設定と疾患マーカーとして有用性)の解明、そして臓器保護効果メカニズムの解明ならびに治療応用の可能性を検討していく。

【文献】

- 1) **Fukuda, S.**, Kita, S., Miyashita, K., et al.: Identification and Clinical Associations of 3 Forms of Circulating T-cadherin in Human Serum, *J. Biol. Chem.*, 106 (5), 1333-1344, 2021
- 2) Iioka, M., **Fukuda, S.**, Maeda, N., et al.: Time-Series Change of Serum Soluble

T-Cadherin Concentrations and Its Association with Creatine Kinase-MB Levels in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction, *J. Atheroscler. Thromb.*, 29, 1823-1834, 2022

- 3) Okita, T., Kita, S., **Fukuda, S.**, et al.: Soluble T-cadherin promotes pancreatic b-cell proliferation by upregulating Notch signaling, *iScience*, 25, 105404, 2022

直鎖状ユビキチン鎖が惹起する疾患の検索と制御戦略

藤田 宏明

(京都大学 大学院医学研究科 細胞機能制御学)

新奇のタンパク質翻訳後修飾である直鎖状ユビキチン鎖(直鎖)を特異的に生成する唯一の酵素であるLUBAC(ユビキチンリガーゼ(E3))は、催炎症性転写因子であるNF-κB活性化、細胞死の抑制に関与する。LUBACは直鎖生成の活性中心を有するHOIP、アクセサリ分子であるHOIL-1L、SHARPINの三者複合体から構成される(図1)。

これまでに我々はLUBACの3サブユニット全てを欠損させた細胞を樹立し、NF-κB活性化、細胞死の制御に必須なLUBACのドメインを探索した。その結果、

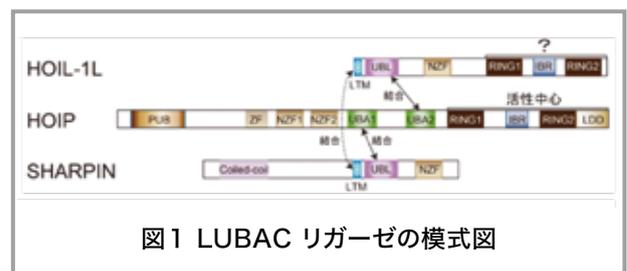


図1 LUBAC リガーゼの模式図

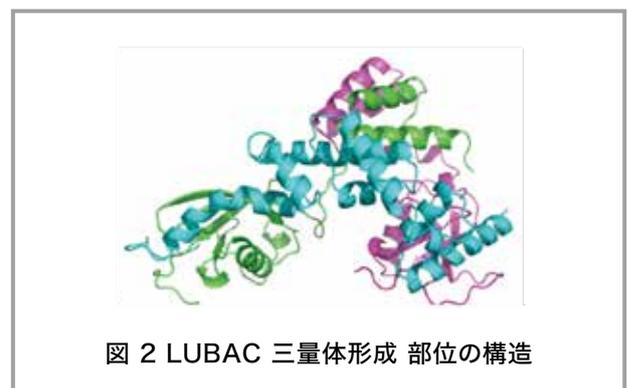


図2 LUBAC 三量体形成 部位の構造

LUBAC の 3 量体形成に必要な HOIP の 2 つの UBA ドメインと HOIL-1L と SHARPIN に存在する UBL ドメインを欠損させると、LUBAC が不安定化・著減し、直鎖状ユビキチン鎖生成活性が顕著に減弱することで NF- κ B 活性化の減弱、細胞死が惹起されることを見出した。とりわけ、HOIL-1L の UBL と HOIP との結合がより重要であるとの知見を得て、HOIL-1L の UBL 欠損マウスを作成したところ、LUBAC 複合体が消失し、活性中心の HOIP を欠失したマウスと同時期に胎生致死になることを見出した。また LUBAC の 3 サブユニットの結合に必要な領域の共結晶構造解析に成功し、詳細な LUBAC の結合様式を明らかにした (図 2)。

現在、LUBAC 間の結合を阻害する低分子化合物の開発を行なっている。これまで LUBAC 間の結合をモニターする FRET を構築し、小分子化合物のスクリーニングを行ってきたが、現在は取得した LUBAC3 サブユニットの結晶構造から AI 技術を用いて LUBAC 間の結合を阻害する化合物の *in silico* スクリーニングを進めている。*In silico* で同定した化合物に関しては、実際に結合を阻害するか上記で樹立した FRET を用いて 2nd screening を行い、有望な化合物に関しては細胞に処理し LUBAC を不安定化するか解析を行う。

上記に加え、別の角度から LUBAC の機能を阻害する薬剤の探索を行なっている。LUBAC の NF- κ B 活性化に重要な領域の探索より、その領域の機能を阻害する薬剤を小分子化合物スクリーニングにより同定した。得られた化合物に関して NF- κ B 活性化を抑制するかなどを含め詳細な検討を進めている。

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内分泌・代謝内科学 大阪大学感染症総合教育研究拠点企画室)

【目的】

- ①劇症 1 型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞における 25-hydroxycholesterol (25HC) の効果を明らかにする。
- ②免疫チェックポイント阻害薬投与後の 1 型糖尿病発症機序を免疫組織学的に明らかにする。

- ③劇症 1 型糖尿病患者を含む糖尿病患者における新規血中グルカゴン測定系による空腹時グルカゴン値の意義を明らかにする。

【方法・結果】

- ①劇症 1 型糖尿病 iPS 細胞 3 クローンをインスリン陽性細胞に分化誘導させ、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ を投与しアポトーシスを誘導した。ここに 25HC を投与した群では投与しない群に比し有意に Caspase-3 活性の低下およびインスリン陽性細胞に占める Cleavedcaspase-3 陽性細胞率の低下を認め、アポトーシスが抑制された。
- ②抗 PD-1 抗体投与後に 1 型糖尿病を発症した 3 例、発症しなかった 3 例、コントロール 7 例の膵組織を免疫組織学的に比較検討した。抗 PD-1 抗体投与後に 1 型糖尿病を発症した群においては、 β 細胞面積は有意に低値であるとともに、CD68 陽性マクロファージ数は有意に高値であった。さらに、抗 PD-1 抗体投与後に 1 型糖尿病を発症した群においては膵島における PD-L1 発現陽性細胞は有意に低値であり、このことが抗 PD-1 抗体投与後の 1 型糖尿病発症に寄与することが示唆された。
- ③大阪大学医学部附属病院糖尿病・内分泌・代謝内科に血糖コントロール目的に入院した糖尿病患者で、入院直後に早朝空腹時においてサンドイッチ ELISA 法を用いて血中グルカゴン値を測定し、各種臨床指標との関係を検討した。急性発症 1 型糖尿病患者 (14 ± 10 pg/ml) では 2 型糖尿病患者に比し空腹時グルカゴン値 (29 ± 15 pg/ml) は有意に低値であった。劇症 1 型糖尿病患者 (11 ± 2 pg/ml) では急性発症 1 型糖尿病患者と同程度に空腹時グルカゴン値は低値であるいっぽう、緩徐進行 1 型糖尿病患者の空腹時グルカゴン値 (25 ± 15 pg/ml) は 2 型糖尿病患者に近い値であった。糖尿病患者における空腹時グルカゴン値は空腹時血糖値とは相関しない一方、2 型糖尿病患者においては空腹時 C-ペプチド値と有意な正相関を示した。多変量解析においても空腹時 C-ペプチド値は空腹時グルカゴン値の有意な説明変数であった。

【文献】

- ・Kawata S, Hosokawa Y, et al.: Inflammatory Cell Infiltration into Islets without PD-L1

Expression is Associated with the Development of Immune Checkpoint Inhibitor-Related Type 1 Diabetes in Genetically Susceptible Patients. *Diabetes*, 72, 511-9 (2023)

- Hosokawa Y, et al.: Pathogenesis of Fulminant type 1 diabetes: genes, viruses and the immune mechanism, and usefulness of patient-derived iPS cells for future research. Mini Review. *J Diabetes Investig*, 10, 1158-64 (2019)
- Hosokawa Y, et al. : Positive correlation between fasting plasma glucagon and serum C-peptide in Japanese patients with diabetes. *Heliyon*, 5, e01715 (2019)
- 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*, 42, e116-8 (2019)

グルカゴンツールとしたタンパク質嗜好性制御機構の解明

松居 翔

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻栄養化学分野)

【目的】

タンパク質に対する食欲は、エネルギー摂取とは別個に調節されているが、その調節機序は全く未解明である。これまでに申請者は、野生型マウスにグルカゴンを投与することで、タンパク質の摂食量が減少することを見出している。なお、グルカゴンの投与は、炭水化物や脂質の摂食量には影響しないことを確認している。そこで2022年度の研究では、グルカゴンがどの臓器に作用し、タンパク質の食欲を制御しているのかについて明らかにすることを目的とした。

【方法】

グルカゴン受容体 (Gcgr) は、食欲調節を担う脳においても広範囲に発現しているのに加えて、各種の代謝臓器にも発現している。また、グルカゴンのタンパク質に対する食欲抑制効果は、2021年度の研究結果から、投

与後10時間で認められることを明らかにしている。以上より、グルカゴンによるタンパク質に対する食欲の制御は、グルカゴンの脳への直接作用、もしくは、他の臓器を介した間接作用の可能性が考えられる。そこで、Gcgrを多く発現する臓器を中心に、それらのCreマウスとGcgr-floxマウスを掛け合わせて、各臓器特異的Gcgrノックアウトマウスを作製し、グルカゴンによるタンパク質に対する食欲制御を担う標的臓器を明らかにする。本研究では、まずUCP-1-Cre (褐色脂肪組織) マウスとGcgr-floxマウスを交配させ、褐色脂肪組織特異的Gcgr欠損 (UCP-1 Gcgr-KO) マウスを作製し、食事嗜好性試験 (普通食 (NC) vs. 高タンパク質食 (HPD)) を行った。

【結果】

0.9%生理食塩水 (NaCl) および1 mg/kgのグルカゴンをGcgr-floxマウスとUCP-1 Gcgr-KOマウスに腹腔内投与し、食事嗜好性試験を行った。その結果、NaClの投与では、両方のマウスで食行動に変化は認められなかったが、グルカゴンの投与によりHPDの摂食量が減少した (図1)。

【考察】

グルカゴン投与によりタンパク質の摂食量が減少するが、その効果を得るためには約10時間を要することから、脳への直接作用ではなく、他臓器を経由してタンパク質の食欲を制御していることが予想される。しかしながら、褐色脂肪細胞のGcgrを欠損させても、グルカゴンの効果を打ち消すことはできなかった。そのため、グルカゴンによるタンパク質の食欲抑制効果は、Gcgrの発現が最も多くアミノ酸代謝の主臓器である肝臓や、アディポカインを分泌する白色脂肪組織を介していることが考えられる。2023

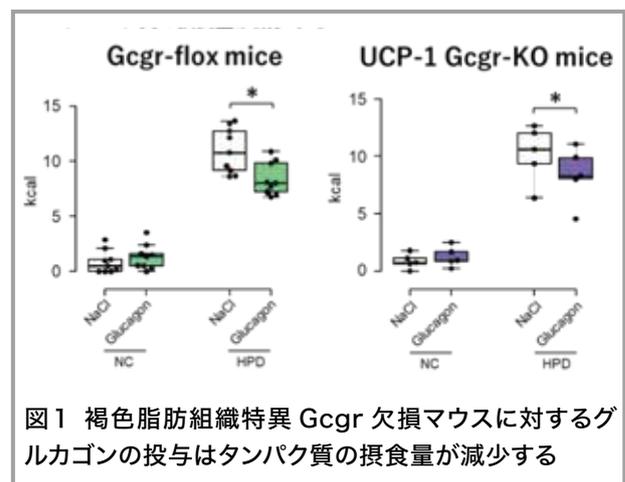


図1 褐色脂肪組織特異Gcgr欠損マウスに対するグルカゴンの投与はタンパク質の摂食量が減少する

年度は, *Albumin-Cre* (肝臓特異的), *Adiponectin-Cre* (白色脂肪組織) マウスと *Gcgr-flox* マウスを交配させ, 肝臓特異的 *Gcgr* 欠損マウス, 白色脂肪特異的 *Gcgr* 欠損マウスを作製し, 食事嗜好性試験を行う予定である。

慢性腎臓病の治療を目指したポドサイトにおける Rac1 制御機構の解明

松田 潤

(大阪大学大学院医学系研究科 腎臓内科学講座)

【背景・目的】

我が国では透析や腎移植にかかる費用が医療経済を圧迫しているが, 慢性腎臓病の進行に歯止めをかける有効な治療手段の確立には至っていない。それは, 腎機能低下の主な原因である糸球体障害の機序が明らかになっていないためである。

ポドサイト (糸球体上皮細胞) は, アクチン線維に富む特徴的な足突起を有し, 血管内皮細胞および糸球体基底膜とともに濾過バリアを形成することで, 蛋白の尿への漏出を防いでいる。このアクチン線維の調節に関わるのが, 20 種類から成る Rho GTPase と呼ばれる蛋白群である。Rho GTPase は GTP 結合型 (活性型) と GDP 結合型 (不活性化型) の 2 形態をとる分子スイッチである^{1,2)}。遺伝子改変マウスや蛋白尿を呈する患者の腎検体を用いた既存研究から, ポドサイトにおける代表的な Rho GTPase である Rac1 の活性異常が糸球体病変や蛋白尿に関与することが分かってきた。しかし, ポドサイトでどのような機序によって Rac1 活性が制御されているかは不明であった。そこで本研究では, ポドサイトにおける Rac1 の活性化 / 不活性化機構を解明すべく, 近位依存性ビオチン標識法 (BioID) を用いて Rac1 と相互作用する蛋白を網羅的に同定した。

【方法】

Rac1 配列を含む pSTV6 ベクターを培養ポドサイトにトランスフェクションした。ドキシサイクリンとビオチンを培地に加えることで, Rac1 と相互作用する蛋白をビオチンリガーゼにより選択的にビオチン化した後, ビオチン化蛋白をストレプトアビジンで回収し質量分析に供した。

培養ポドサイトを用いた免疫染色により, BioID で同定された GIT2 蛋白の細胞内局在を評価した。RNAi により GIT2 欠損 (KD) ポドサイトを樹立し, Rac1 活性, 細胞面積および接着斑構成蛋白のリン酸化を対照群と比較した。CRISPR/Cas9 により GIT2 欠損 (KO) マウスを作製し, ポドサイト傷害薬剤である Lipopolysaccharide (LPS) 投与後の尿蛋白およびポドサイトの足突起幅を対照群と比較した。

【結果】

Rho GTPase の活性化因子として知られる ARHGEF7 や, 同不活性化因子として知られる ARHGAP31 の他, GDP/GTP 交換能を持たない GIT2 がポドサイトの Rac1 関連蛋白として同定された。

GIT2 は接着斑構成蛋白であるパキシリンと共局在していた。GIT2KD ポドサイトでは対照細胞と比較して Rac1 活性の有意な上昇を認めた。KD 細胞の面積は対照細胞と比較して有意に増加し, Rac1 阻害剤 NSC23766 投与により有意に減少した (対照群 $5427 \pm 309 \mu\text{m}^2$, KD 群 $8958 \pm 806 \mu\text{m}^2$, KD+NSC 群 $4337 \pm 363 \mu\text{m}^2$)。さらに KD 細胞ではパキシリンのチロシン残基 118 で有意なリン酸化を認めた。GIT2KO マウスでは, LPS 投与 48 時間後に対照マウスと比較して有意な尿蛋白の増加 (対照群 $77.6 \pm 11.2 \text{mg/gCr}$, KO 群 $129.9 \pm 26.8 \text{mg/gCr}$) およびポドサイト足突起幅の延長 (対照群 $441.1 \pm 9.7 \text{nm}$, KO 群 $500.5 \pm 14.1 \text{nm}$) を認めた。

【考察】

ポドサイトの GIT2 は接着斑に局在し, 細胞形態と糸球体濾過バリアの維持に重要な役割を担っていると考えられた。GIT2 による Rac1 制御機構は, 慢性腎臓病における新規の治療標的となる可能性がある。

【文献】

- 1) Asano-Matsuda K, Ibrahim S, Takano T, Matsuda J. Role of Rho GTPase Interacting Proteins in Subcellular Compartments of Podocytes. *Int J Mol Sci.* 22:3656,2021.
- 2) Matsuda J, Asano-Matsuda K, Kitzler T, Takano T. Rho GTPase regulatory proteins in podocytes. *Kidney Int.* 99:336-345,2021

血糖変動と認知機能の関連の解明のための前向き観察研究

松原正樹

(奈良県立医科大学)

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 (*Intern Med J.* 42 (5), 484-91 2012). 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 (*Nat Rev Endocrinol.* 2011 7 (2), 108-14). 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、横断研究ではあるが血糖変動と認知機能の関連を示唆する報告がなされるようになった (*Diabetes Care.* 2010 33 (10) :2169-74, *PLoS One.* 2014 9 (1) :e86284). そこで、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が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して以下の研究を行った。

2019 年 2 月から 2020 年 6 月までに、国立循環器病研究センター通院中の Mild Cognitive Impairment (MCI) を認める高齢 (65-85 歳) 2 型糖尿病患者 109 名をエントリーし、CGM (リブレ Pro)、認知機能試験 (Montreal Cognitive Assessment : MoCA)、Alzheimer's Disease Assessment Scale : ADAS) を登録時、1 年後、2 年後に行い、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主要評価項目とした。また副次評価項目として、空腹時血糖値、

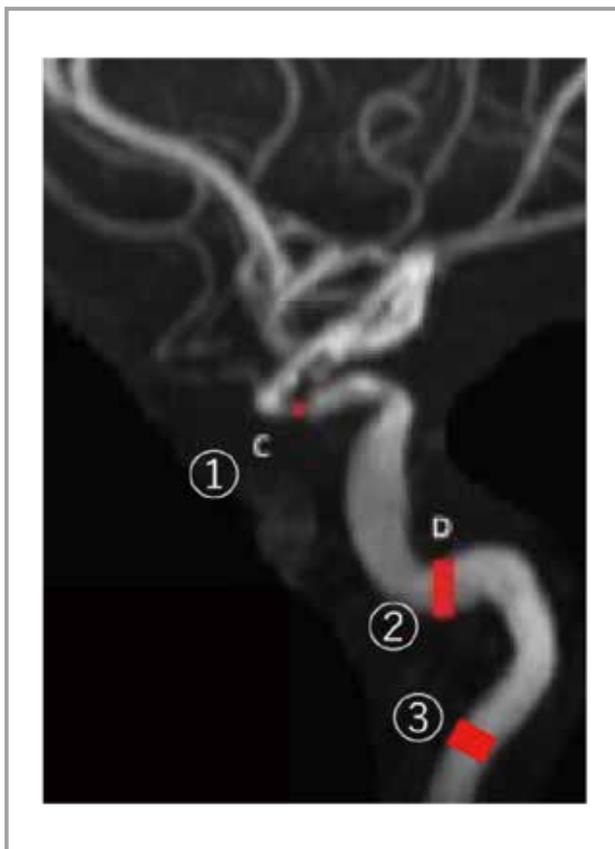
HbA1c, 診察室血圧, 抑うつ・意欲の変化, 炎症マーカーを登録時, 1 年後, 2 年後に, 脳血管病変の変化 (頭部 MRI/MRA で評価), 頸動脈の内中膜厚 (IMT) を登録時, 2 年後に, また観察期間中の心血管イベント, 腎イベントの発症をそれぞれ評価し, 得られた血糖変動指標もしくは認知機能試験スコアとの関連を解析することにした。MCI は認知症の前駆段階として知られ年間約 10% が認知症に移行する集団であり, 2 年間の観察期間において認知機能の変化が生じやすいと考えられたためにエントリー基準に組み込んだ。またサンプルサイズは, 横断研究の既報 (*Diabetes Care* 2010 33:2169-2174, *PLoS One.* 2014 9 (1) :e86284) と照らし合わせて, α -level=0.05, power=0.90 or 0.95 で計算を行ったところ n=76 or 92 であり, 本研究が経時データであり 20% の脱落を考慮しても n=95 or 110 となり十分な登録数が得られたと考えられた。なお本縦断研究の protocol については論文化している (*Diabetes Ther.* 2020 11:2729-2737). 現在, 得られた結果についての解析を行っており, 併せて論文投稿を予定している。そのため, 現時点で得られた登録時での解析結果について以下で述べる。

2 型糖尿病患者において, 心筋梗塞, 脳卒中などの動脈硬化性疾患 (ASCVD) が増加するが, ACCORD (*Lancet Neurol.* 2011 10 (11) :969-77) に代表される大規模臨床研究では, HbA1c を管理目標とした厳格な血糖コントロールを行っても心筋梗塞, 脳卒中などは減少せず, ASCVD と重症低血糖や血糖変動との関連が注目されるようになってきた。血栓性脳梗塞のリスクである頭蓋内動脈狭窄についても, 空腹時血糖値や HbA1c との関連は報告により異なり一定した見解が得られていないが, CGM を用いて評価した血糖変動と冠動脈疾患 (*Circ. J.* 2016, 80, 202-210), あるいは上腕-足首脈波伝播速度との関連 (*Cardiovasc Diabetol.* 2021 20 (1) 15) が報告されているが, 我々の知る限り頭蓋内動脈狭窄との関連は報告されていない。そこで血糖変動と頭蓋内動脈狭窄との関連を明らかにするために, 本研究の登録患者全 109 例中 103 例を対象に, 登録時の血糖値, HbA1c, CGM から得られた SD, % CV, mean amplitude of glycemic excursions (MAGE) と, 頭部 MRA で Warfarin - Aspirin Symptomatic



Intracranial Disease 法 (WASID) 法 (*AJNR Am J Neuroradiol.* 2017 38 (5) :986-990) で評価した血管狭窄との関連をロジスティック回帰分析にて解析を行った。その結果、WASID 法で 70% 以上の高度狭窄がみられた 8 例は全て内頸動脈サイフォン部の狭窄であり、高度狭窄のない 95 例と比較し、SD 53 ± 12 mg/dl vs. 39 ± 10 mg/dl, % CV 36 ± 7 % vs. 29 ± 6 %, MAGE 114 ± 18 mg/dl vs. 90 ± 23 mg/dl といずれも有意に高値であった ($p < 0.01$)。またロジスティック回帰分析では、性別で調整した高度狭窄群のオッズ比 (OR) は SD (OR, 3.00; 95% confidence interval (CI), 1.32-6.84), % CV (OR, 5.55; 95% CI, 1.23-25.2), MAGE (OR, 1.52; 95% CI, 1.06-2.19) と有意であった。以上より、頭蓋内内頸動脈狭窄は血糖変動指標である SD, % CV, MAGE との関連を認め、頭蓋内血管狭窄病変の同定にあたり血糖変動指標に注目することが有用である可能性が示唆された。なお上記結果については論文化した (*Nutrients.* 2021 13 (7) :2379)。

* WASID 法 (C が狭窄部の場合、 $((2) - (1)) / (2) \times 100\%$, もし②にも狭窄がみられる場合は $((3) - (1)) / (3) \times 100\%$)



Long non-coding RNAから翻訳される新規ポリペプチドの解析による疾患の病因解明

松本 有樹修

(名古屋大学)

【目的】

Long noncoding RNA (lncRNA) はタンパク質を翻訳しない RNA と定義されているが、われわれは一部の lncRNA が翻訳されてポリペプチドを産生していることを明らかにした [Matsumoto A. et al., *Nature* (2017)]. そこでこれまでに、このような新規ポリペプチドを複数解析して、それら機能を明らかにしてきた [Nita A. et al., *PLoS Genet.* (2021), Mise S. et al., *Nat. Commun.* (2022)]. また、これら機能を解析するにつれて、どのような RNA が翻訳され、どのような RNA が翻訳されないのかを理解するためには、タンパク質翻訳機構を理解することが重要であると考えようになってきた。近年、タンパク質翻訳を担うリボソームにおいて、いくつかのリボソームタンパク質のパラログは組織特異的に発現していることが知られてきている。しかし、組織特異的なリボソームタンパク質が翻訳にどのように影響するのか、またなぜ特定の組織でのみ必要とされるのかは不明なままであった。そこでわれわれは、組織特異的なリボソームの解析を行うことにした。

【方法と結果】

われわれは、RPL3 のパラログである RPL3L が心臓と骨格筋に特異的に発現していることを見出した。すなわち、心臓や骨格筋では RPL3 が RPL3L に入れかわった横紋筋特異的なリボソームが存在しており、われわれはこれを Myo-ribosome と名付けた。次に Myo-ribosome の機能を解明するために、RPL3L ノックアウトマウスを作製したところ、RPL3L を含むリボソーム (Myo-ribosome) が欠損すると心臓の収縮力が低下することを見いだした。さらに分子機能を明らかにするために、Ribo-seq や Disome-seq 解析を行ったところ、Myo-ribosome は RPL3 を含む canonical ribosome に比べて翻訳伸長ダイナミクスが異なっており、これが心臓における適切な翻訳に重要であることがわかった。Myo-ribosome の欠損は転写産物全体の翻訳伸長ダイナミクスを変化させたが、

その影響は心筋収縮と拡張型心筋症に関連する転写産物で最も顕著であった。さらに、それら心収縮に関わるタンパク質の存在量も Myo-ribosome の欠損により減少していた [Shiraishi C. et al., *Nat. Commun.* (2023)].

【考察】

以上の結果より、心臓や骨格筋特異的に Myo-ribosome という特殊なリボソームが存在しており、Myo-ribosome は心筋収縮と拡張型心筋症に関連するタンパク質の効率的な翻訳に重要であることがわかった。Myo-ribosome を欠損したマウスは心収縮力の低下を示したが、ヒトの拡張型心筋症の患者で RPL3L の変異が報告されている。Myo-ribosome の理解は心疾患の治療へとつながる可能性が期待される。

【文献】

Kito Y † , **Matsumoto A.* † (corresponding and equally first author)** , Ichihara K, Shiraishi C, Tang R, Hatano A, Matsumoto M, Han P, Iwasaki S, Nakayama KI.*: The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes. *EMBO J.* Jun 15;42 (12) :e112869 (2023) .

Shiraishi C † , **Matsumoto A.* † (corresponding and equally first author)** , Ichihara K, Yamamoto T, Yokoyama T, Mizoo T, Hatano A, Matsumoto M, Tanaka Y, Matsuura-Suzuki E, Iwasaki S, Matsushima S, Tsutsui H, Nakayama KI.: RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function. *Nat Commun.* Apr 20;14 (1) :2131 (2023) .

Ichihara K, Nakayama KI, **Matsumoto A.*:** Identification of unannotated coding sequences and their physiological functions. *J Biochem.* Mar 31;173 (4) :237-242 (2023)

フェロトーシス細胞死を標的とした病態解明と治療薬開発

三島英換

(ヘルムホルツセンターミュンヘン、東北大学大学院医学系研究科)

フェロトーシス (Ferroptosis) は 2012 年に新規細胞死概念として報告された、非アポトーシスの制御性細胞死の一種であり、細胞内における過酸化脂質の蓄積をトリガーとして発動する細胞死である。種々の急性臓器障害 (虚血再灌流含む)、神経変性疾患、がん細胞における抗がん薬感受性に寄与するため、フェロトーシスの制御機構の解明はこれら病態の新規治療法への展開が期待されている。生体は、過剰な脂質酸化によるフェロトーシスに対抗する制御機構として Glutathione peroxidase-4 (GPX4) や CoQ10-Ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) 経路、内因性抗酸化ビタミンとしてのビタミン E を備えており、これらはフェロトーシスの主要な内因性防御機構として働く¹⁾。

我々は、フェロトーシス抑制能を有する新規内因性代謝物を探索した結果、血液凝固作用がよく知られているビタミン K が強力なフェロトーシス抑制能を有していることを同定した。そのフェロトーシス抑制機構として、i) 通常存在様式である酸化型ビタミン K 自体に抗酸化能は認められないものの、還元型ビタミン K が脂質ラジカルを捕捉する抗酸化物質として作用してフェロトーシスを抑制すること、ii) これまで CoQ10 還元酵素として知られていた FSP 1 が、フェロトーシス抑制に必要なビタミン K の還元を担う酵素であることを同定した。さらに FSP1 は、血液凝固作用に必要なビタミン K サイクルにおいてこれまで正体が未同定であったワルファリン非依存性のビタミン K 還元酵素でもあることを明らかにした。この FSP1 によるビタミン K の還元経路がわかったことは、臨床的に抗凝固薬として頻用されるワルファリンの中毒時になぜビタミン K が解毒剤となるのかの分子機序を解明したものである^{2,3)}。

また、ジヒドロオロト酸脱水素酵素 (DHODH) 阻害薬の一種が、がん細胞のフェロトーシス感受性を高めることで、がんに対する抗がん薬感受性を高めることが他グループから報告されていた (Mao et al, *Nature* 2021)。我々は、この機序について検討した結果、ブレキナールなどの DHODH 阻害薬は、本来の薬剤標的である DHODH ではなく、オフターゲット効果として、フェロトーシス制御に関わる分子である FSP1 を高濃度では阻害することで、がん細胞のフェロトーシス感受性を高めていることを明らかにした⁴⁾。

最後に、長期にわたり研究を支援していただいた

TMFC および日本応用酵素協会の財団関係者の皆様に、深く感謝を申し上げます。

【文献】

- 1) Mishima E, Conrad M. Nutritional and Metabolic Control of Ferroptosis. *Annu Rev Nutr.* 2022;42:275-309
- 2) Mishima E et al. Diverse biological functions of vitamin K: from coagulation to ferroptosis. *Nat Metab.* 2023;5:924-932
- 3) Mishima E et al. A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature.* 2022;608:778-783
- 4) Mishima E et al. DHODH inhibitors sensitize to ferroptosis by FSP1 inhibition. *Nature.* 2023;619:E9-E18.

腫瘍内不均一性に着目した原発性アルドステロン症の病態解析

村上正憲

(東京医科歯科大学病院 糖尿病・内分泌・代謝内科)

【背景・目的】

近年のオミクス解析の発展に伴い、アルドステロン産生腺腫（APA）の分子生物学的特徴の理解が進んでいる。ステロイド合成酵素の免疫染色の結果から、APA 組織内におけるアルドステロン合成酵素の不均一な分布が観察されており、腫瘍内を構成する副腎皮質由来細胞の不均一性が予想されている。APA の腫瘍内不均一性の評価は、発症メカニズムを理解する上で重要と考えられるが、従来の bulk RNA-seq によるアプローチでは詳細な解析が困難であった。今回、Single Nucleus RNA-seq 解析 (snRNA-seq) を行い、APA 特異的なクラスター核集団の抽出とその特徴を解析した。

【方法】

非機能性副腎腫瘍 (NF)、APA の 2 種類の凍結腫瘍検体より核抽出を実施し、FACS で精製を行った。BD Rhapsody で核とバーコード付きビーズを結合し、逆転写の後に TAS-Seq によるライブラリー調整およびシーケンシング解析を行い、Seurat で解析を実施した。

【結果】

NF : 2188 個, APA : 3993 個の計 6181 個の核が解析できた。NF と APA を比較し、アルドステロン合成酵素遺伝子 (*CYP11B2*) をマーカーとする APA に特異的な複数のクラスターを同定した。擬似時系列解析により、それらのクラスター間の関係は、ステロイド合成酵素の発現量に応じた腫瘍内細胞集団の分化度を反映していると推定された。核集団の分化度が高まると共に、アルドステロン合成に直接寄与する *CYP11B2* や *HSD3B2* といった遺伝子のみならず、むしろコルチゾール合成を誘導する *CYP11B1* や *CYP17A1* などのステロイド合成酵素遺伝子の発現量上昇も伴っていることが特徴であった。また、分化度が低い集団では、WNT シグナル経路や AMPK シグナル伝達経路に含まれる遺伝子がマーカーとして含まれていた。さらに APA37 症例の bulk RNA-seq のデータを使用し、snRNA-seq のデータに基づいた deconvolution 解析によって各症例のクラスター構成を推定したところ、*KCNJ5* 体細胞変異を有する APA 間でもクラスターの構成に不均一性があることが示された。

【考察】

腫瘍検体を用いた snRNA-seq により、APA の腫瘍内、並びに腫瘍間不均一性の評価をすることが出来た。腫瘍内の分化経路を規定する因子を同定することで、APA 発症メカニズムを解明できる可能性がある。

過剰発現マウスからみた甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の生理的意義

山内一郎

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【背景と目的】

3 種の甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (以下 D1, D2, D3) は、組織において局所の甲状腺ホルモン作用を調節することが良く知られている。しかし、臨床的には臓器における脱ヨード酵素の活性は、血中甲状腺ホルモン濃度 (甲状腺機能) から推測せざるをえない。ノックアウトマウスを用いた検討では酵素学的特性から推測される結果と乖離がある。本研究では甲状腺機能への脱ヨード酵素の影響を追究するため、肝臓特異的に D1, D2, D3 を

過剰発現するマウスを開発し解析する。

【方法】

ヒト D1, D2, D3 配列をクローニングした pcDNA3.1 ベクターを HEK293T 細胞に導入し、発現タンパクの分子量、発現量、酵素活性を評価したところ、酵素活性が低い非完全長蛋白の発現が主であった。コーディング配列の下流にセレノシステイン挿入配列を付加することで、完全長蛋白の発現と十分な酵素活性が得られた。この付加ベクターから、マウス肝臓での遺伝子発現に適した pLIVE ベクターにサブクローニングし、ハイドロダイナミック法を用いて雄 C57BL/6J マウスに導入した。

【結果】

D1, D2, D3 の各過剰発現マウスにおいて、肝臓特異的に脱ヨード酵素が発現し、甲状腺、下垂体でも有意な発現を認めないことを確認した。D1 過剰発現マウスでは血清甲状腺ホルモン濃度の変化を認めなかったが、D2 過剰発現マウスでは血清 fT3 濃度の有意な上昇が見られた。D3 過剰発現マウスでは血清 fT3・fT4 濃度が低下する一方、血清 rT3・TSH 濃度は増加した。ただ肝臓内で過剰発現による消費に起因すると思われる T4 の減少が見られ、レボチロキシン給水投与により肝 T4 量を維持したマウスを追加解析した。血清では D1, D2, D3 過剰発現マウスとも同様の变化を認め、D2 過剰発現マウスでは D1 過剰発現マウスより肝 T3 標的遺伝子群の発現が増強する傾向にあった。

【考察】

過剰発現マウスのフェノタイプはヒト遺伝子多型による変化とも概ね矛盾せず、脱ヨード酵素の甲状腺機能に対する生理的意義は次のように特徴づけることができると考えた。D1 は rT3 のクリアランスと弱いながら T3 への変換を行う。D2 は細胞内のみならず体循環へも T3 を供給する。D3 は rT3 を産生しながら甲状腺機能を低下させ、作用過剰により消費性甲状腺機能低下症に至る (FASEB J.2022; 36: e22141)。

Vascular Biology Innovationに関する研究助成

血管リモデリング進展過程における血管周囲脂肪褐色化の病態生理学的意義の解明

安達 裕助

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科)

【背景と研究目的】

本邦における心筋梗塞、脳卒中、大動脈疾患を中心とする動脈硬化性疾患の死亡率は、がん全体とほぼ同等の高い水準を示している。この状況を打破するためには、動脈硬化の原因となるメカニズムの深い理解が欠かせない。1976年にRossらによって提唱された「動脈硬化は血管内皮の傷害を起点として発生する」との仮説（傷害反応仮説）は、現代の動脈硬化研究における基盤となっているが、疾患の完全な克服には至らず、問題解決の課題は残っている。申請者らは、本研究助成のもと、上記の課題を解決すべく取り組みを進め、本年度においても一定の研究進展を確認している。

【方法と結果・進捗状況】

①血管内の細胞ネットワークの解明

単一細胞解析技術の進歩により、動脈硬化の詳しい病態が徐々に明らかとなってきている。申請者らはこの技術を活用し、血管炎症応答を制御する脂肪細胞由来因子（Neuregulin4）を同定した（Adachi Y. *Nat Commun* 2022）¹⁾。ただし、この技術は細胞の空間的関係性を維持できないため、別のアプローチとして空間的網羅的解析を取り入れ、血管組織の空間的挙動や免疫細胞との相互作用の解明を進めている。

②動脈硬化性疾患の臨床サンプルに基づく研究

動脈硬化性疾患の中でも、急性大動脈解離（acute aortic dissection; AAD）は緊急性が高く、迅速な診断が求められる。申請者らは、動物実験とAAD患者剖検検体による検討を組み合わせ、AAD発症時には強い炎症が大動脈自体のみならずその周囲組織において生じ、炎症細胞は血管の外側から内側へと浸潤していく

という事実を見出した¹⁾。大動脈をはじめ主要な動脈の多くは周囲に脂肪組織を伴っており、血管周囲脂肪組織（perivascular adipose tissue; PVAT）として知られている²⁾。本研究では、AADの大動脈PVATにおいても、急性血管炎症に伴う性質的变化が生じているのではないかと仮説のもと臨床研究を実施し、CT検査から求められる大動脈の脂肪減衰指数測定によりAADを高感度で検出できることを見出した（論文投稿中）。さらに、人工知能を用いた大動脈自動認識プログラムの開発を行い、非造影CTから血管炎症を可視化するプログラムの構築に成功した（特開2023-038720）。

【考察】

これらの研究成果は、動脈硬化の発症や進行に関連する細胞間の相互作用や分子メカニズムの詳細な解明に寄与している。これらの知見を基に、新しい治療ターゲットの同定や先進的な医療技術の開発を進めていく予定である。

【文献】

- 1) Adachi Y, Ueda K, Nomura S, Ito K, Katoh M, Katagiri M, Yamada S, Hashimoto M, Zhai B, Numata G, Otani A, Hinata M, Hiraike Y, Waki H, Takeda N, Morita H, Ushiku T, Yamauchi T, Takimoto E and Komuro I. Being of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nat Commun.* 13, 5117 (2022).
- 2) Adachi Y, Ueda K, Takimoto E. Perivascular adipose tissue in vascular pathologies-a novel therapeutic target for atherosclerotic disease? *Front Cardiovasc Med.* 10:1151717 (2023).

ペリサイトにおけるATP依存性カリウムチャネル の心・脳における機能解析

安藤 康史

(国立循環器病研究センター研究所・心臓再生制御部)

【目的】

近年、脳と脊髄を覆う髄膜に走行するリンパ管が見出され、脳内のクリアランスや免疫細胞の動員への関与が注目されている。この髄膜を走行するリンパ管は中間髄膜動脈に並走するように形成され、両者の相互作用が予想された。本年度はK-ATPチャネルによって制御がなされる動脈壁の壁細胞が、血管とリンパ管を繋ぐ可能性を検証することで、中枢における新たな機能の提唱を目指した。

【結果・考察】

血管壁細胞の発生を観察することにより、我々はマウスの髄膜リンパ管で見られるように、ゼブラフィッシュの体幹部のリンパ管が動脈周囲に形成された血管壁細胞に近接して形成されていることを見出した。血管壁細胞を欠損させると、その後の分節間リンパ管や胸管の形成が抑制されることが明らかとなった。更に、血管壁細胞の発現遺伝子解析などから、血管壁細胞から分泌されるcxcl12やvegfc,CCBE1がリンパ管形成時のガイダンスや生存シグナルとして機能することが示唆された。これらの結果から、血管壁細胞が適切な血管形成だけでなく、リンパ管形成にも重要な役割を担っていることが示唆された。

以上のように、本研究において動脈血管によって血管壁細胞への運命決定がなされ、これらの血管壁細胞がその後動脈周囲のリンパ管形成が誘導されることが見出され、生体内における時空間的に協調した血管・壁細胞・リンパ管形成の多細胞間コミュニケーションが明らかになった。(Di,Ando et al., *eLife*. 2022). 今後、ATP依存性カリウムチャネルにより誘導される血管壁細胞機能異常とリンパ管形成を解析することにより、本チャネル異常により誘発される中枢神経障害に対するリンパ管の関与を明らかにすることで、より詳細な病態形成機構の解明に迫る。

【文献】

1) Peng D., Ando K (Co-corresponding author), Gloger M., Skoczylas R., Mochizuki N.,

Betsholtz C., Fukuhara S., Koltowska K. Proper migration of lymphatic endothelial cells requires survival and guidance cues from arterial mural cells. *eLife*. 2022; doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.74094>

ドキシソルビシン心毒性におけるフェロトーシス 誘導の分子機序の解明

池田 昌隆

(九州大学病院循環器内科)

【目的】

ドキシソルビシン心毒性では、鉄依存性に生じる脂質過酸化により誘導される細胞死・フェロトーシスがミトコンドリアを契機に生じており、また心毒性の主たる病態生理でもある¹⁻²⁾。しかしながら、ドキシソルビシン (doxorubicin, DOX) によりフェロトーシスが誘導される分子機序は明らかではない。DOXは鉄と複合体を形成し、脂質過酸化を引き起こす³⁾。本研究は、「心筋細胞のミトコンドリアにmtDNA量依存性にDOXが集積、DOXがヘム合成経路を阻害することでミトコンドリア内に鉄が蓄積し、集積したDOXと鉄が協調してフェロトーシスを誘導する」との仮説を検証することを目的とした。

【方法】

心筋細胞においてmtDNA helicaseであるTwinkleをsiRNAにてsilencingすることによりmtDNAを減少させ、フェロトーシスを評価した。心筋細胞においてヘム合成経路の律速酵素であるALAS1をアデノウイルスにより過剰発現、もしくはALAS1が合成するアミノ酸である5-aminolevulinic acid (5-ALA)を添加することで、DOXにより生じる鉄の蓄積およびフェロトーシスを評価した。5-ALA投与によるDOX心筋症モデルマウスの心毒性の抑制効果を検証した。

【結果】

心筋細胞へのDOX添加により、DOXはミトコンドリアに集積した。Twinkleのsilencingにより心筋細胞のmtDNAの量は約30%程度低下し、一致してミトコンドリアへのDOXの集積は低下、脂質過酸化およびフェロトーシスが抑制された。一方で、心筋細胞への

DOX 添加により, ALAS1 の発現, 中間代謝物である protoporphyrin IX およびヘム合成は低下し, ミトコンドリア鉄は増加した. ALAS1 過剰発現および 5-ALA 添加により, DOX によるミトコンドリア鉄, 脂質過酸化の増加およびフェロトーシスが抑制された. DOX 心筋症モデルマウスへの 5-ALA の投与は DOX による心収縮能の低下を抑制した.

【考察】

悪性腫瘍の細胞増殖を抑制することで抗腫瘍効果を示す DOX が, 細胞増殖能のない心筋細胞優位に心毒性を誘導する分子機序は長らく不明であった. 本研究では, mtDNA 量が豊富な心筋細胞に DOX が集積し, また DOX によりヘム合成経路が阻害されることで鉄が蓄積する, という二つの現象が協調して心筋細胞優位に心毒性を示していた. 本研究では, 5-ALA が DOX による鉄の蓄積およびフェロトーシス, そして心筋症の発症を抑制することも明らかにしており, 今後は 5-ALA を用いた DOX による心毒性予防法の開発が期待される⁴⁾.

【文献】

- 1) Tadokoro et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. *JCI insight* 2020;5:e132747
- 2) Fang et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019;116:2672-2680
- 3) Miura et al. Lipid peroxidation of rat erythrocyte membrane induced by Adriamycin-Fe³⁺ *Pharmacol & Toxicol* 1991;69:296-300
- 4) Abe et al. Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis. *Sci Signal* 2022;15:eabn8017

心不全におけるERADによるオルガネラ機能制御機構の解明と新規治療法の開発

池田 宗一郎

(ラトガース大学)

【目的】

心不全患者は増加しており, 心不全の病態基盤の解明および新規治療法の開発が必要である. 近年, 不全心筋においてミトコンドリアと ER 間のオルガネラ相互作用が細胞機能維持において重要であることが明らかとなってきた. また, ER ストレスにおいて小胞体関連分解 (ER-associated degradation:ERAD) が注目されている. ERAD は ER ストレスや酸化ストレスなどにより活性化され異常タンパク質を小胞体から細胞質へ逆輸送してユビキチン化により分解することで ER ストレスを軽減する極めて重要な機構である. また, homocysteine-responsive ER resident ubiquitin-like domain 1 (HERPUD1) は ERAD の構成因子としてその機能維持に必須であることが知られている. 本研究は不全心筋における ERAD および HERPUD1 の役割を解明することを目的とした.

【方法】

心筋細胞において RNA 干渉法を用いた HERPUD1 のノックダウンを行い, 過酸化水素投与下での小胞体ストレス関連遺伝子の発現の確認を行った. また, 左前下行枝の結紮による心筋梗塞モデルマウスにおいて HERPUD1 の homozygous KO マウスに対して作成し心筋梗塞を作成し, 梗塞後心筋における小胞体ストレス関連遺伝子の発現の確認を行った.

【結果】

昨年度は梗塞後心筋において HERPUD1 のタンパク量が有意に増加すること, また心筋細胞に対しての過酸化水素刺激で HERPUD1 のタンパク量が増加することを報告した. また, HERPUD1 の homozygous KO は野生群と比較し心筋梗塞後の左室駆出率を低下させた. 心筋細胞における RNA 干渉法を用いた HERPUD1 のノックダウンは, 小胞体ストレスのマーカーである PERK の発現を増加し, 過酸化水素投与下で心筋細胞死を増加した. 梗塞後心筋を用いた解析では, 非梗塞部心筋において心筋細胞と同様に PERK の発現を増加させ, TUNEL 陽性

細胞数を増加させた。

【考察】

以上より、内因性の HERPDU1 は酸化ストレス環境下で小胞体ストレスを軽減することにより心筋細胞死の抑制に関与している可能性が示唆された。

プラコフィリン2変異による心筋収縮力低下の機序の解明

井上 裕之

(スタンフォード大学 心臓血管研究所)

【背景】

遺伝性拡張型心筋症患者では、デスモゾーム関連遺伝子の変異を高頻度に認めることが報告され、プラコフィリン2をコードする PKP2 の変異が最多である。このことから、PKP2 変異による心筋収縮力低下の機序を理解することが重要である。

【目的】

iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、PKP2 変異による心筋収縮力低下機序の解明すること

【方法・結果】

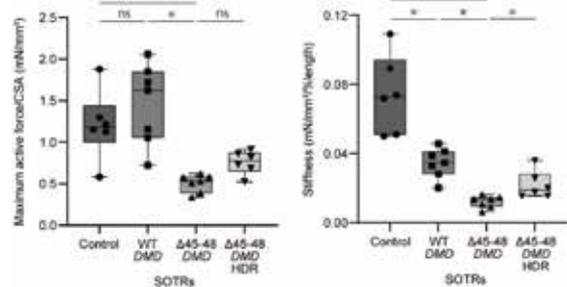
1) 3次元組織を用いた収縮不全モデルの作成

我々は、PKP2 ヘテロ変異患者より樹立したアイソジェニック iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、心筋分化誘導早期において、PKP2 変異による収縮力障害をモーションベクトル解析により検出し得る、2次元収縮モデルを報告した¹⁾。また、立体臓器に近い状態での心筋収縮力を直接評価し、2次元収縮モデルでは測定が不可能であるステイフネスの評価も行うため、3次元組織リングを作成し報告した²⁾ (図1)。文献2では、重症心不全を発症したベッカー型筋ジストロフィー女性患者より樹立したアイソジェニック iPS 細胞を用い、筋ジストロフィーの原因遺伝子である DMD 変異に加えて、コラーゲン合成に関わる遺伝子の一つである PLOD3 変異が加わることで収縮不全とステイフネスの低下が顕在化し、心不全発症に関与していることを示した (図2)。今後は、文献2で用いた手法を本研究課題にも応用し、PKP2 変異による収縮力、ステイフネスの評価を行う予定である。

図 1



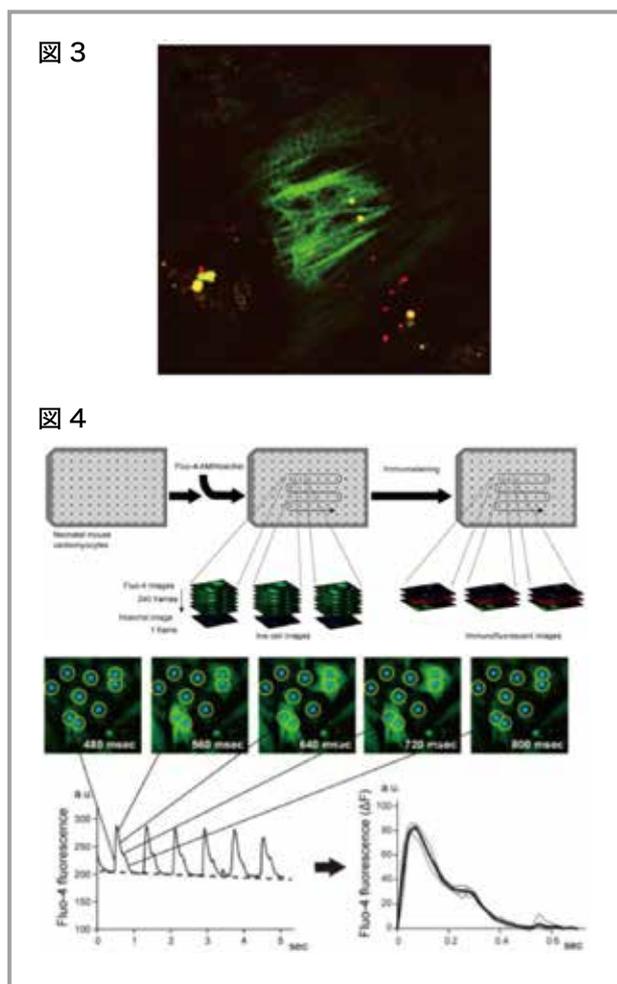
図 2



2) サルコメア収縮の生細胞イメージング

我々は、PKP2 ヘテロ変異患者から樹立したアイソジェニック iPS 細胞に対し、デスモゾームを構成する蛋白質の一つである DSG2 に対し遺伝子編集を用いた蛍光蛋白標識を行い、報告した¹⁾。今回は、デスモゾーム・サルコメアの同時生細胞イメージングによる PKP2 変異によるサルコメア構造・機能の評価を目指し、サルコメアの構成蛋白質に対して蛍光蛋白標識を行った。CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集により、PKP2 アイソジェニック 3 株のサルコメア蛋白質に対して同様に EGFP で標識することに成功し、心筋分化誘導が可能であることを確認した (図3)。今後は、心筋細胞において、EGFP 標識蛋白質と WT 蛋白質がアイソジェニック間で同等に発現していることを確認する予定である。三株において両者の発現比が同等であれば、EGFP の局在による株間での構造・機能の比較が可能であると考えられる。

また、我々はハイスループットイメージングとカルシウム動態イメージングを組み合わせ、個別の心筋細胞ごとにカルシウム動態を解析する手法を報告した³⁾ (図4)。本手法を PKP2 変異株に応用することにより、デスモゾームの構成異常と、カルシウム動態やサルコメア機能の関連が明らかになる可能性が期待される。



3) 細胞骨格蛋白質の評価方向性

一方向性ナノファイバー（ANF）を施した培養プレートに心筋細胞を播種することにより、心筋細胞の成熟を促進する方法が当研究室の共同研究者より報告された（Li et al. Stem Cell Reports 2017）。同方法を本アイソジェニック iPS 細胞由来心筋細胞にも応用し、免疫染色において細胞骨格蛋白質の局在の評価を行っている。

【考察】

収縮不全を再現するモデル、個別の細胞ごとに詳細なカルシウム動態を評価する実験系を確立した。今後はこれらのモデルと実験系を駆使、さらに発展させ、細胞骨格・サルコメア構造の2点に焦点をあてて、引き続き本研究を推進する予定である。

【文献】

1) Inoue H, Nakamura S, Higo S, Shiba M, Kohama Y, Kondo T, Kameda S, Tabata T, Okuno S, Ikeda Y, Li J, Liu L, Yamazaki S, Takeda M, Ito E, Takashima S, Miyagawa S, Sawa Y, Hikoso S, Sakata Y.; Modeling

reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes; Stem Cell Reports, 17(2):337-351(2022)

2) Kameda S, Higo S, Shiba M, Kondo T, Li J, Liu L, Tabata T, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Kuramoto Y, Yasutake H, Lee JK, Takashima S, Ikeda Y, Hikoso S, Miyagawa S, Sakata Y.: Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Female Becker Muscular Dystrophy Carrier, JACC: Basic to Translational Science, 8(6):599-613 (2023).

3) Tabata T, Masumura Y, Higo S, Kunimatsu S, Kameda S, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Takashima S, Watanabe M, Miyagawa S, Hikoso S, Sakata Y; Multiplexed measurement of cell type-specific calcium kinetics using high-content image analysis combined with targeted gene disruption: Biochemical and Biophysical Research Communications, 637:40-49(2022).

睡眠時間断的低酸素モデルを用いたNon-dipper型血圧発症腎機序の解析

上田 浩平

(国際医療福祉大学医学部生理学)

【背景】

ストレスホルモンであるGRリガンドが低カリウム血症を介して高血圧を発症する機序について報告したが¹⁾、同時に血圧の概日リズム異常（Non-dipper）も呈することを本研究会で報告した。Non-dipperは睡眠時無呼吸症候群にしばしば合併し、強力な心血管病リスク因子であることが知られている。

【目的】

睡眠時間断的低酸素がNon-dipper型血圧を発症する機序を明らかにする。

【方法】

C57Bl/6 マウスを明暗条件下、明期中に8時間 (ZT1-ZT9), 3分毎に酸素濃度が緩徐に室内気 (21%) から5%まで低下するケージ内で2週間飼育した (睡眠時間断続的低酸素 (IH) モデル). テレメトリを用いて連続的に頸動脈血圧を計測し, 明期・暗期に分けて日内変動を解析した. 最終日 ZT4 に通常酸素対照群 (NX) と共に IH モデルの腎臓を採取し, 超遠心法を用いた膜分画蛋白と mRNA 発現量を比較した.

【結果】

NX 群マウスの血圧は明期よりも暗期に有意に高かったが, IH 群のマウスでは明期・暗期で有意な差は認められなかった. 腎試料膜分画においてリン酸化 Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NCC) と Na⁺-K⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NKCC2) の発現が有意に増加していた. Sgk1, Gilz, Per1/2, および Cry1/2 の遺伝子発現レベルは, IH モデルにおいて有意に増加し, Bmal1 および Clock の遺伝子発現レベルは減少した.

【結論と考察】

睡眠時間断続的低酸素により Non-dipper 発症の機序として腎 NCC・NKCC2 活性化の重要性が示唆された. また, その活性化機序として GR 関連遺伝子や時計遺伝子の関連が示唆された. 腎 NCC・NKCC2 の活性化機序を明らかにするために阻害剤やノックアウトマウスを用いた解析を予定している.

【文献】

1) Ueda, K., Nishimoto, M., & Hirohama, D.: Renal Dysfunction Induced by Kidney-Specific Gene Deletion of Hsd11b2 as a Primary Cause of Salt-Dependent Hypertension, Hypertension., 70(1):111-118.(2017).

腸-骨髄連関から動脈硬化を制御する

江本 拓 央

(神戸大学大学院医学研究科 内科学講座循環器内科学分野)

【目的】

腹部大動脈瘤は無症状で瘤径が大きくなり, 破裂すると半数以上の人を命を落とす疾患である. 現在のところ,

外科的な人工血管置換術, もしくは腹部大動脈ステントグラフト内挿術 (Endovascular Aneurysm Repair) の選択肢がなく, 5cm 以下の小さい状態で発見されても有効な治療法が存在しない¹⁾. ヒトの検体のシングルセル解析から動脈硬化プラークが腹部大動脈瘤を形成させるメカニズムを明らかにし, マクロファージをターゲットとする治療薬を開発する.

【方法】

腹部大動脈瘤で人工血管置換術適応となった患者について, 瘤中心部とその中枢側で断端に近い組織を採取し, コラゲナーゼ処理, FACS ソーティングで CD45 陽性細胞を回収し, 10X Chromium にてシングルセル化し, 解析を行った.

1, 瘤中心部 (5例) 2, 瘤中枢側断端部 (3例) 3, 健常大動脈 (公開データ 3例)²⁾ で比較検討した (図1参照).

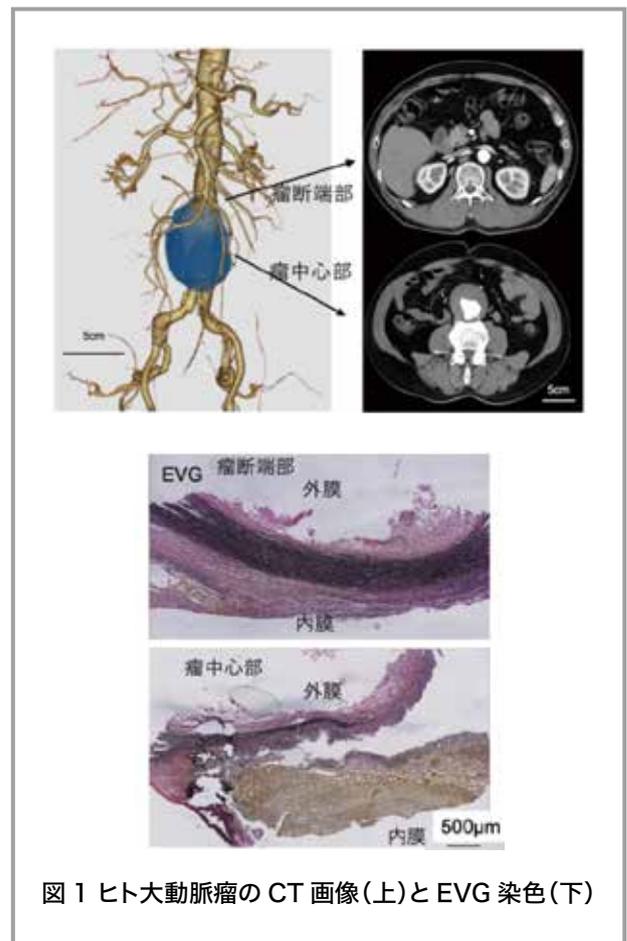


図1 ヒト大動脈瘤の CT 画像(上)と EVG 染色(下)

【結果】

全体の細胞の UMAP を描き, annotation を行うとコントロールにおいてはほとんど認めなかった B 細胞が大動脈瘤断端部, 中心部ともに著明に増加していることが分か

った(図2)。マクロファージや単球にのみ絞ってUMAPを当てて解析を行うと、瘤中心部では、単球の浸潤が起こっていること、また、TREM2formy マクロファージが存在しているが、単球の増加に比べ、その割合が増えていないということがわかる(図3)。

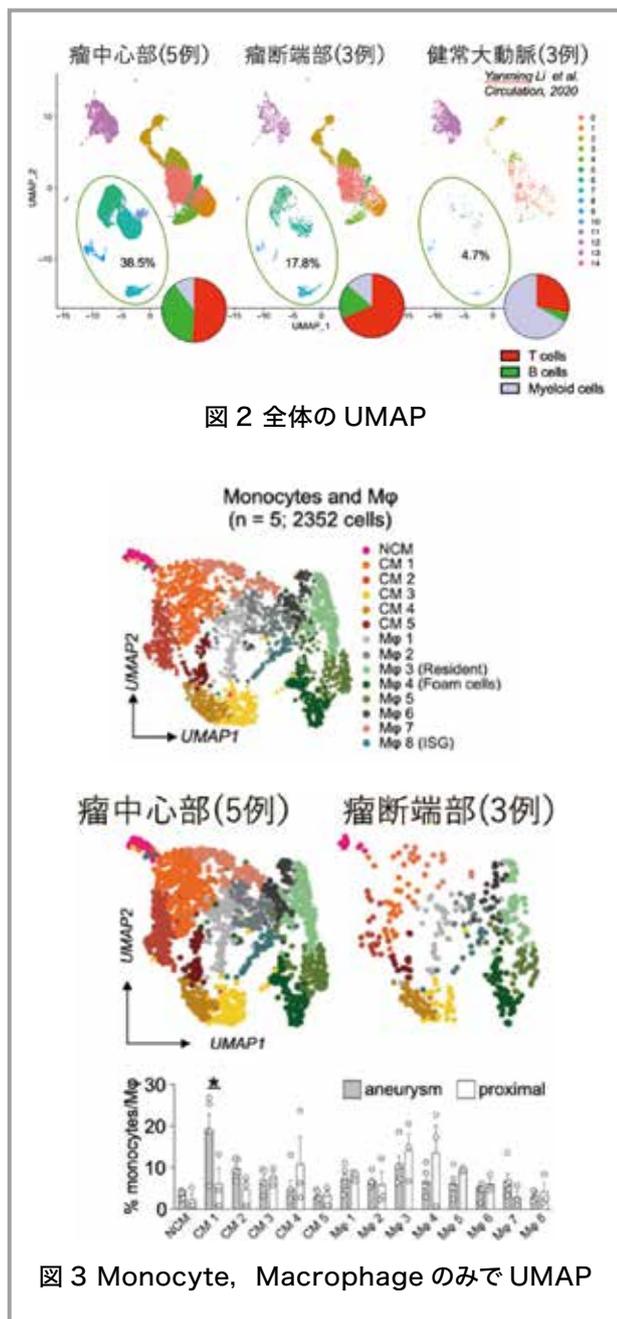


図2 全体のUMAP

図3 Monocyte, MacrophageのみでUMAP

【考察】

瘤中心部では、エラスチン構造が破壊されていると同時に陳旧性の血栓が付着しており除去できない状態になっていることから、マクロファージの機能不全が想定される。TREM2は脳においてβ-Amyloidを除去するのに必須のパターン認識受容体であり、大動脈瘤では血栓や動脈硬化プラークの除去に不可欠の分子である可能性が

考えられる。ヒトの研究だけでは因果関係が分からないので、reverse translational researchとして、動脈硬化マウスにタバコの煙を吸わせるタバコ大動脈瘤モデルを用いて、TREM2KOマウスをAPOEKOマウスと掛け合わせマウスを用いてタバコを吸わせた時の大動脈瘤形成に与える影響を解明すると同時に、アルツハイマー病で臨床研究が行われている、TREM2刺激薬をタバコ大動脈瘤モデルに投与することで治療となるか検討したい。また、B細胞が集積する理由を調べ、B細胞が大動脈瘤に影響を与える可能性を検討したいと考えている。

【文献】

1) Raffort J, Lareyre F, Clement M, Hassen-Khodja R, Chinetti G, Mallat Z. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14:457-471. doi: 10.1038/nrcardio.2017.52

2) Li Y, Ren P, Dawson A, Vasquez HG, Ageedi W, Zhang C, Luo W, Chen R, Li Y, Kim S, et al. Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Dynamic Cell Populations and Differential Gene Expression Patterns in Control and Aneurysmal Human Aortic Tissue. *Circulation.* 2020;142:1374-1388. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046528

統合オミクス解析による心不全の遺伝的基盤解明と精密医療の実現

円山 信之

(理化学研究所生命医科学研究センター)

循環器ゲノミクス・インフォマティクス研究チーム)

【目的】

心不全患者は増加しており、治療法の発展にも関わらずその予後は不良であるため病態解明が急務である。過去の心不全ゲノムワイド関連解析(GWAS)では発見された疾患感受性遺伝子は僅か11に留まり¹⁾、心不全発症メカニズムの全貌は明らかにされていない。今回は日本人の心不全ゲノムワイド関連解析による病態解明を目的とした。

【方法】

1000 ゲノムプロジェクトと日本人 3,256 名の全ゲノムシーケンズデータによりリファレンスパネルを構築した。バイオバンクジャパン 1 期・2 期に参画しマイクロアレイでタイプングされた症例に対し、同一人物・主成分解析外れ値・性別齟齬・Call rate 低値除外などのクオリティコントロールを行った。先のリファレンスパネルを用いてインピュテーションを行った。心不全ゲノムワイド関連解析を行い、欧州人・アメリカ人・アフリカ人のサマリ統計量とメタ解析を行った。

【結果】

クオリティコントロール後にバイオバンクジャパン 1 期は 181,715 例、2 期は 78,078 例が得られた。心不全症例 15,550 例、コントロール 190,945 例に対して、ゲノムワイド関連解析を行い 3 つの新規感受性座位を同定した。欧州人・アメリカ人・アフリカ人のサマリ統計量との民族横断的メタ解析により 4 つの新規感受性座位を同定した (図)。

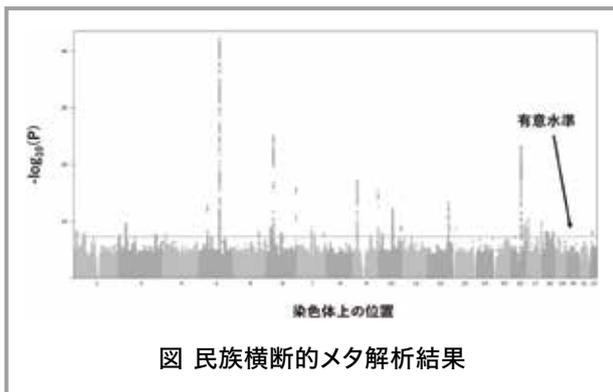


図 民族横断的メタ解析結果

【考察】

日本人の情報を加えることで新規感受性座位を同定することが可能であった。近年、HFReEF, HFpEF など左室駆出率で層別化した解析も行われており²⁾、今後はそちらの解析も進める予定である。

【文献】

- 1) Shah S, Henry A, Roselli C et al. Genome-wide association and Mendelian randomisation analysis provide insights into the pathogenesis of heart failure. Nat Commun 11,163(2020)
- 2) Joseph J, Liu C, Hui Q et al. Genetic architecture of heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. Nat Commun 13,7753 (2022)

シングルセル分子病理解析によるサルコイドーシスの病態解明

片桐 美香子

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり難病に指定されている。肉芽腫の形成には、マクロファージや T 細胞、それらから放出される様々なサイトカインが関与することが報告されているが、その詳細な機序は解明されていない。サルコイドーシスの心臓病変は心不全や致死的不整脈をきたし、本疾患の主な死因となっている。しかし、心筋生検による診断陽性率は 15 ~ 20% と非常に低い。ステロイド治療により予後が改善するため早期診断が重要であり、病態解明が早期診断に繋がると考えられる。

本研究の目的は、心臓サルコイドーシス患者の末梢血液中単核細胞 (PBMC) を用いたシングルセル解析と心臓組織を用いた空間トランスクリプトーム解析を用いて、組織における肉芽腫の形成機序や臓器機能低下の機序を明らかにすることである。

【方法・結果】

患者の血液から PBMC を単離して、10xChromium (10xGenomics) を用いて single cell RNA/TCR-seq 解析を行った。これまで病態の中心と考えられていた CD4 T 細胞でなく、CD8 T 細胞において Naïve 分画の減少と Effector Memory 分画の増加といった細胞集団の変化と細胞活性化を認めた。また、CD8 T 細胞で TCR レパトアのクローン増殖を認め、CD4 T 細胞では同様のクローン増殖は認めなかった。単球においては、炎症性シグナルに関係する経路が活性化し、ステロイド治療により改善していることが分かった。

次に、この PBMC の変化が組織における免疫細胞と関連しているか検討するため、心臓組織を用いて空間的解析を行った。30 種類以上のタンパクマーカーを同時に観察可能な CODEX (co-detection by indexing) を用いたマルチプレックス Spatial 解析では、肉芽腫の中心部には CD68 陽性のマクロファージが存在し、その周囲に CD4 T 細胞、外側に CD8 T 細胞が認められ、ほ

とんどの免疫細胞は活性化した状態で増殖していた。一切片上で網羅的に mRNA を検出できる GeoMx Whole Transcriptome Atlas (Nanostring) を用いて、心臓組織の空間的トランスクリプトーム解析を行ったところ、サルコイドーシスの肉芽腫部分では免疫細胞が複数のケモカインを強く発現しており、肉芽腫以外の部分では代謝に関連する因子が増加していた。この肉芽腫におけるケモカインの発現増加は、Visium CytAssist (10xGenomics) でも観察された。

【考察】

本研究により、心臓サルコイドーシスにおける免疫細胞の活性化と、組織中の局在の変化が観察された。今後は、T細胞や単核球系細胞を用いて、疾患に関連するサイトカインの同定と組織における代謝経路の変化を中心とした心機能低下の機序を検証していく。

Developmental Origins of Health and Disease としてのAT₁受容体による腎脈管・血管形成誘導 メカニズムの解明

川 岸 裕 幸

(国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部第三室)

【目的】

本研究では、哺乳類の後腎発生における尿細管・血管形成過程でのアンジオテンシン II (AngII) の作用メカニズムを解明し、子宮外後腎形成誘導法の開発を目指すことを目的としている。AngII は、アンジオテンシン 1 型受容体 (AT₁R) に結合することで作用し、G タンパク質経路とβアレスチン経路を介して細胞機能を調節しているが、後腎発生におけるこれらの経路の特異的な作用については不明な点が多い。これまでに我々は、G タンパク質、βアレスチンの両経路を抑制する「AT₁R 逆アゴニスト」カンデサルタンを生後 1 日目から投与することで、離乳期までに深刻な腎障害が誘導されることを見出している。一方、G タンパク質経路を抑制しβアレスチン経路を活性化する「βアレスチンバイアス AT₁R アゴニスト」TRV027 は腎毒性を示さなかった。

【方法】

後腎形成が進行する出生 1 日目から 14 日目までの

雌雄 BALB/c マウスに、生理食塩水、カンデサルタン、TRV027 を継続投与した。腎組織を回収後、免疫・化学組織染色を行い、腎皮質、髄質の形成およびネフロン数について評価を行った。

【結果】

マウス腎病理切片の解析の結果、生後 15 日目のカンデサルタン投与群において、小葉間動脈の血管平滑筋の顕著な肥厚、および皮質の異常なレニン産生細胞の増加が明らかとなった。これらの現象は、生後 5、10 日目では認められなかった。さらにカンデサルタン投与群では髄質の萎縮が確認された。尿細管各部位の特異的マーカーによる免疫組織染色を行ったところ、近位尿細管やヘンレループの形態的な異常が確認された。これらの所見は、生理食塩水群、TRV027 群では見られなかった。なお、皮質におけるネフロン数については、投与薬物による顕著な影響は確認されなかった。

【考察】

以上の結果から、哺乳類の後腎発生において、AngII-AT₁R/βアレスチン経路が、尿細管や血管の形成・成熟に重要な役割を持つことが示唆された。本研究は継続中であり、今後は発達段階ごとの詳細な解析を進めることで、後腎発生における AT₁R/βアレスチン経路の作用時期や作用部位の同定を目指す。

一細胞解析とin vivo CRISPR/Cas9システムの融合 による心不全リプログラミング因子スクリーニング

候 聡 志

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座)

【背景と研究目的】

scRNA-seq 解析は近年急速に普及しつつあるが、得られた膨大なデータを如何に処理し、有用な情報を抽出(新規心不全治療ターゲットの探索)するのが課題と言える。申請者らは本研究助成を受け、本年主に以下の二つの課題に取り組み、一定の成果を得た。

【方法及び結果】

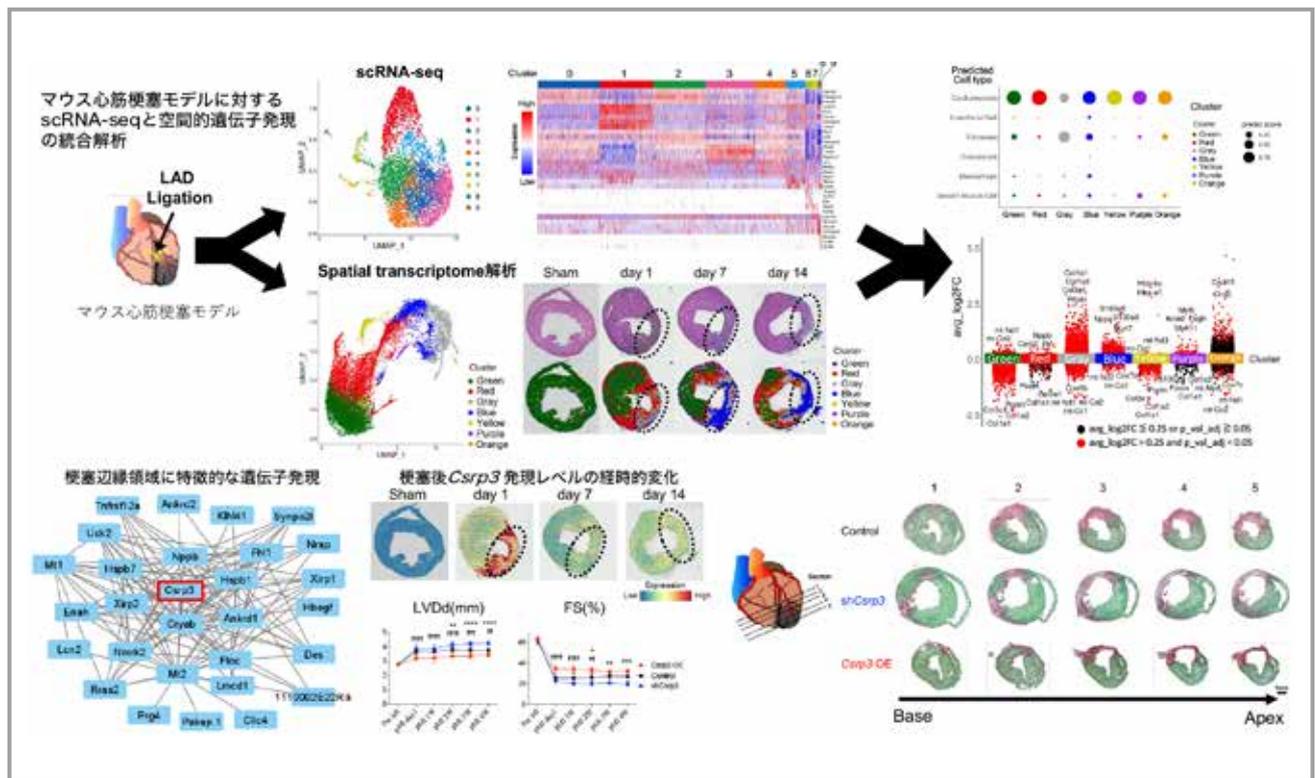
(1) シングルセル解析と空間的遺伝子発現解析の統合

シングルセル解析の欠点の一つとして、細胞を単離する過程で、その細胞が元いた位置情報が失われる点が挙げ

られる。この問題を解決するため、組織標本切片上で網羅的に mRNA プロファイル調べていく方法 (Spatial transcriptome 解析) を心臓に応用し、健常及び梗塞後の心臓組織標本を“数細胞レベル”の細かい解像度で空間的遺伝子発現プロファイルの解析を行うことに成功した。これを scRNA-seq と統合解析した結果、心筋梗塞後急性期に梗塞周辺領域の心筋細胞にのみ見られる、*Csrp3* に代表されるようなメカノストレス応答遺伝子の発現増加という事象を見出した。AAV9 を用いたメカノストレス応答遺伝子の過剰発現及びノックダウンによる検証の結果、こうした梗塞後急性期の梗塞周辺領域におけるメカノストレス応答遺伝子の発現増加は心保護的に働き、将来的な梗塞後リモデリングを抑制することを見出した¹⁾ (下図参照)。

(2) シングルセルマルチオミクス解析

近年では scRNA-seq のみならず、他の階層のオミクス情報の解析も盛んに報告されるようになった。我々は重症の家族性拡張型心筋症の原因となる *LMNA* Q353R 変異を同定し、その患者由来 iPS 心筋細胞や変異を再現したノックインマウスを作成して scRNA-seq 及び scATAC-seq (オープンクロマチン領域を同定するエピゲノム解析の一種) を行った。その結果、*LMNA* Q353R 変異心筋細胞においては転写因子である TEAD1 の働きが弱くなるせいで心筋成熟化に関連する遺伝子の転写制御が損なわれ、未熟な心筋細胞となることが分かった。その原因を調べるため健常型及び変異型ラミンと各種タンパクとの結合力を網羅的に解析した結果、変異型ラミンは TEAD1 との結合力が亢進し、さらに画像解析から TEAD1 が核



糖尿病性腎症の進展における新規BMP拮抗分子の機能解析

小林 洋輝

(日本大学医学部 腎臓高血圧内分泌内科)

【序論】

申請者は糖尿病患者を対象に、血漿中蛋白を網羅的に解析し、その中から NBL 1 が糖尿病性腎症の進展において重要な役割を担うことを明らかにした。昨年度に引き続き、本研究において、NBL 1 が腎線維化にどのように関与するかについて検討した。

【方法】

- ① ヒト近位尿管細胞 (HK-2 細胞) に、NBL 1 の siRNA を導入し、腎線維化に関連する蛋白の発現の変化について検討した。
- ② NBL 1 ノックアウトマウスに対して、ストレプトゾトシン (STZ) にて糖尿病を誘導し、尿蛋白や腎線維化の程度を評価し、糖尿病性腎症における NBL 1 の役割について検討した。

【結果】

- ① 昨年度までに、HK-2 細胞を無血清培地で serum starvation 後、リコンビナント NBL 1 や TGF β 1 で 24 時間刺激すると、コントロールに比べて α SMA や fibronectin などの mRNA が上昇することがわかった。そこで今年度は、HK-2 細胞に NBL 1 の siRNA を導入し、これらの蛋白の発現について検討を行った。HK-2 細胞に 10 nM の siRNA をリバーストランスフェクションした後に、serum starvation を行い、TGF β 1 で 24~48 時間刺激した。siRNA 導入細胞において、NBL 1 mRNA は、negative control siRNA の 1/10 以下に発現が抑制され、この NBL1 抑制下において、 α SMA と fibronectin mRNA は、negative control siRNA より発現が有意に低下していた。TGF β 1 による刺激を行うと negative control siRNA では、 α SMA と fibronectin mRNA の発現が増加したが、NBL1 siRNA では、これらの増加が抑制された。一方、TGF β 1 刺激 48 時間後の蛋白の発現についても、negative control では、 α SMA と fibronectin の増加が認められたが、NBL 1 siRNA では抑制された。

- ② これまでに動物実験は、KO (NBL1:-/-) マウスと WT (NBL1:+/+) マウスを使用し、マウスの右腎臓を摘除後に、高脂肪餌を負荷し、STZ を腹腔内投与して糖尿病群のマウスを作成した。また STZ を投与せず普通餌で飼育する KO マウスおよび WT マウスをコントロール群とし、4 週ごとに体重および血糖値、尿蛋白等の測定を行い、糖尿病発症後 24 週まで飼育し、検体を採取した。飼育期間中のコントロール群、糖尿病群のマウスにおいて、それぞれ KO マウスと WT マウスの間に体重、血糖値の差は認められなかったが、腎臓では WT マウスの糖尿病群で、コントロール群より NBL 1 mRNA の発現が増加していた。現在、腎組織において、線維化に関する蛋白の発現や組織染色による障害の程度についての解析を行っている。

【考察】

培養細胞において、siRNA で NBL 1 を抑制すると、 α SMA や fibronectin の発現が低下し、TGF β 1 の刺激においても、その発現は negative control と比べて抑制されていた。今後は、NBL 1 の発現機序について検討する。

ヒト iPS 細胞由来心臓予定領域および心筋細胞の作り分け

斎藤 幸弘

(岡山大学病院)

【目的】

ヒト iPS 細胞由来左室型心筋細胞と右室型心筋細胞の違いについて検討を行った。

【方法】

ヒト iPS 細胞から左室型心筋細胞と右室型心筋細胞を別々に誘導し、細胞の各種特徴を比較した。

【結果】

右室型心筋細胞は左室型心筋細胞に比べて、細胞のサイズ (面積) が有意に大きく (図 1)、サルコメア密度が疎であった (図 2)。収縮開始から弛緩終了までの時間は右室型心筋細胞のほうが有意に長かった。自律拍動数は、右室型心筋細胞のほうが有意に少なく、Ca²⁺ トランジェントの立ち上がり速度は右室型心筋細胞のほうが

有意に遅かった。脂肪酸代謝に関連する遺伝子 84 個の発現は、全体的な明らかな偏りはないものの、心臓で高発現する脂肪酸代謝関連遺伝子については右室型心筋細胞のほうが多く上昇していた (図3)。

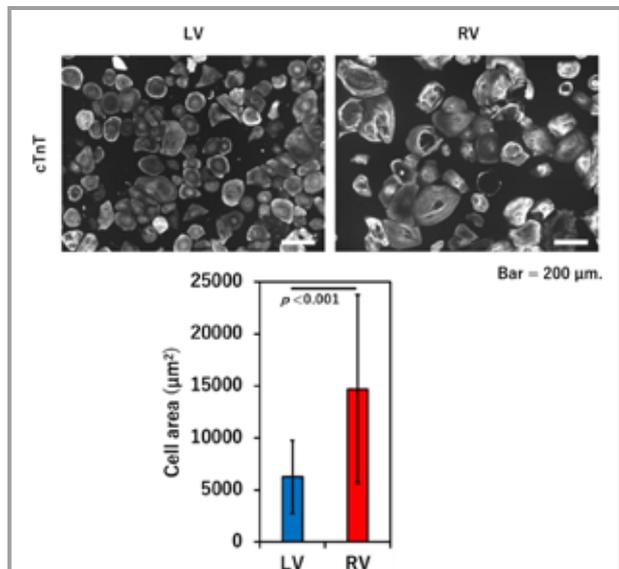


図1 ヒト iPS 細胞由来左室型心筋細胞 (LV) と右室型心筋細胞 (RV) のサイズの比較

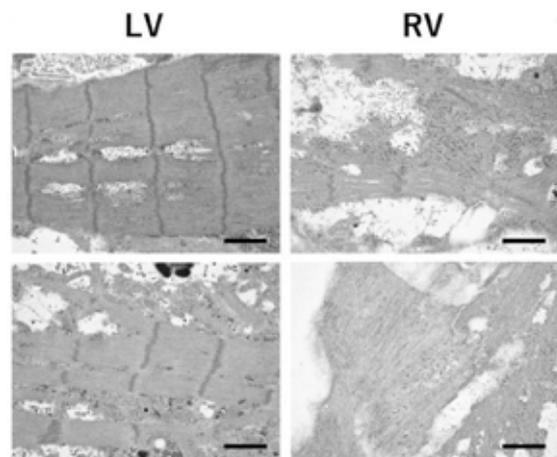


図2 ヒト iPS 細胞由来左室型心筋細胞と右室型心筋細胞の電子顕微鏡像

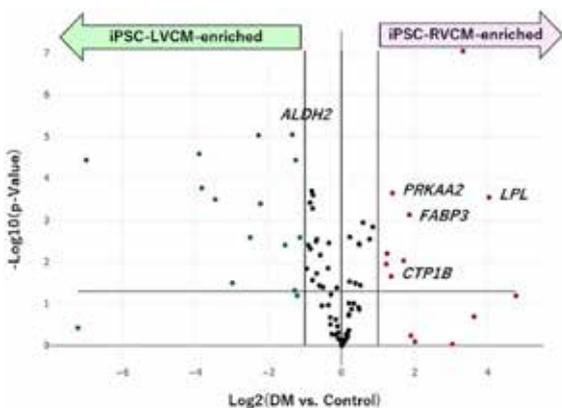


図3 ヒト iPS 細胞由来左室型心筋細胞と右室型心筋細胞の脂肪酸代謝関連遺伝子の発現の違い

【考察】

同じ iPS 細胞由来心室筋細胞でも様々な性質の違いを認めた。TBX5 をノックアウトした iPS 細胞由来心筋細胞も、細胞サイズが大きくサルコメア構造が疎であることから¹⁾、右室型心筋細胞の特徴が TBX5 の低発現によるものであることが示唆される。脂肪酸代謝関連遺伝子群については、成体の右室心筋細胞が左室・心房心筋細胞に比べて発現が高い²⁾。iPS 細胞由来右室型心筋細胞と左室型心筋細胞には様々な違いがみられ、疾患の表現型や治療ターゲットの探索に iPS 細胞由来心筋細胞を用いるときにはサブタイプを区別して研究することが重要であると考えられる。

【文献】

- 1) Kathiriyai, I.S., et al. Modeling Human TBX5 Haploinsufficiency Predicts Regulatory Networks for Congenital Heart Disease, *Dev Cell*, 56, 292-309 (2021).
- 2) Gandhi, S., et al.: Evolutionarily conserved transcriptional landscape of the heart defining the chamber specific physiology, *Genomics*, 113, 3782-3792 (2021).

神経-免疫ネットワークを介して高血圧の臓器障害を抑制するニューロモデュレーション治療の開発

朔 啓 太

(国立循環器病研究センター 循環動態制御部)

【目的】

本研究は、「高血圧に対しての電氣的ニューロモデュレーションは、神経-炎症ネットワークを介し、慢性炎症を是正することで降圧と臓器保護効果を誘導する。」という仮説のもとに、高血圧および高血圧性心不全ラットに植え込み型自律神経刺激装置を用いることで、降圧作用を超えた遠隔期アウトカム改善 (ラットの生命予後改善や心肥大抑制) をもたらすことを明らかにするとともに、各臓器における炎症制御機序を検証することを目的とした。しかしながら、申請者の施設移動やコロナ禍による刺激装置調達が不可能となり、研究計画を変更せざる得ない状況が発生した。ニューロモデュレーション治療の可能性を見出

すことがもっとも大きなテーマであったことから、2019年～2023年に事業期間においては、薬物的ニューロモデュレーションを用いた高血圧モデルラットの効果検証やデバイスを用いたニューロモデュレーションによる心保護効果の検証に計画を変更した。

【方法・結果】

研究①：薬理的迷走神経刺激治療の高血圧性心不全モデルラットモデルへの効果

方法・結果：ダール食塩負荷ラットにおける薬物的副交感神経活性化（ドネペジル）の効果を検証した。ダール食塩負荷ラットは6週令より塩分負荷を行うことで、血圧上昇を認め、12週令で定常となった。17週令までの観察期間で10匹中5匹が死亡し、全てのラットで14週令以降に左室短縮率の低下を認めた。また、14週令からのドネペジル塩酸塩投与では、血圧、心エコー所見および生存率を改善させない一方で、活動性低下による体重減少を認めた。一方、ドネペジルは、ダール食塩負荷ラットでは明らかな血圧低下や心不全改善を認めず、投与タイミングや容量に最適化が必要であった。

研究②：薬理的迷走神経刺激治療の肥満性高血圧+心不全ラットモデルへの効果

方法・結果：薬理的迷走神経刺激治療（ドネペジル）を用い、肥満性高血圧+心不全を示すラットモデルへの効果を検証した。ドネペジル群では心筋梗塞後、有意に心機能が保たれていた（心係数： 91 ± 4 vs. 73 ± 9 ml/min/kg, $P < 0.01$; 左心室拡張末期圧： 11 ± 1 vs. 20 ± 2 mmHg, $P < 0.01$ ）。また、血中のカテコラミン、BNP、AngIIおよびCRPはいずれも有意に低下していた。Early donepezil monotherapy or combination with metoprolol significantly prevents subsequent chronic heart failure in rats with reperfused myocardial infarction. The Journal of Physiological Sciences. 2022,72(12).として報告した。

研究③：迷走神経刺激カテーテルの開発

方法・結果：上大静脈に留置したバスケットカテーテルを介して右迷走神経を刺激できる静脈内留置型VNSカテーテル（JOHAKU）を開発した。急性心不全状態において、JOHAKUが心拍数、心筋酸素消費（MVO₂）、血行動態に与える影響について大動物を用いて検討した。

VNSカテーテルは急性心不全モデル犬において、血行動態を悪化させることなく、心拍数とMVO₂を抑制させることができた。本機器は不安定な血行動態における過剰な心臓負荷の抑制に寄与する可能性がある。

【考察】

迷走神経刺激治療は徐脈などの生理的反応とともに炎症を介した心血管保護効果を有する。特に炎症が明確な急性期病態においては明確な効果を示す一方、慢性的なモデルでは、明らかな効果を認めないこともある。よってデバイスへの展開は急性デバイスをターゲットにした方が早期の臨床応用が可能となると考えられた。高血圧のような慢性病態において治療戦略として迷走神経刺激を応用するには、効果のある病態・病期に関するさらなる検討が必要である。

【謝辞】

2020年に九州大学から国立循環器病研究センターへの移動があり、さまざまな環境を一旦リセットする必要性が出ましたが研究関連機材・資料の移動にかかる費用をVBICにてご支援いただきました。また、同年よりコロナが始まり、当初の研究計画を継続することが非常に難しくなりました。研究計画の変更や支出方法などについて財団にさまざまな問合せをさせていただきましたが、一貫して、励ましのお言葉と寛大なご配慮をいただきました。必ず、今困っている患者さんに財団より頂いた御恩をお返ししたいと思います。関係者の皆様、本当にありがとうございました。

【文献】

研究推進の過程で得られた成果論文で特に関連する5つを以下に示します。

- 1) Yoshida K, Axelsen J, Saku K, Andersen A, S. de Man F, Sunagawa K, Noordegraaf A, Bogaard H. How to Incorporate Tricuspid Regurgitation in Right Ventricular-Pulmonary Arterial Coupling. Journal of Applied Physiology. 2023, 35: 53-59.
- 2) Kawada T, Yokoi A, Nishiura A, Kakuuchi M, Shohei Yokota S, Hiroki Matsushita H, Li M, Uemura K, Saku K. Dynamic accentuated antagonism of heart rate control during different levels of vagal nerve stimulation

intensity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2023, 1; 324: R260-R270.

- 3) Yoshida K, Saku K, Jan Bogaard H, Abe K, Sunagawa K, Tsutsui H. Vagal nerve stimulation preserves right ventricular function in a rat model of right ventricular pressure overload. *Pulm Circ.* 2022, 1; 12: e12154.
- 4) Li M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Inagaki M, Saku K, Sugimachi M. Early donepezil monotherapy or combination with metoprolol significantly prevents subsequent chronic heart failure in rats with reperfused myocardial infarction. *The Journal of Physiological Sciences.* 2022,72(12).
- 5) Toyama T, Hosokawa K, Saku K, Oga Y, Tsutsui H, Sunagawa K. Smart baroreceptor activation therapy strikingly attenuates blood pressure variability in hypertensive rats with impaired baroreceptor. *Hypertension.* 2020, 75:885-892.

心筋リプログラミングによる革新的心不全治療法の開発

貞廣 威太郎

(筑波大学医学医療系循環器内科)

【目的】

慢性心不全には心移植を除いては根本的な治療法はなく、心臓再生医療の応用が望まれている。我々は、心臓線維芽細胞に心筋特異的遺伝子を導入し、体内で直接心筋細胞を誘導して心臓を再生する「心筋直接リプログラミング法」を開発し、マウス急性心筋梗塞モデルにおいて心筋再生と心臓機能の改善に成功している。本研究では、新規治療が熱望される慢性心不全に対し、心筋直接リプログラミングによる革新的治療法の確立を目的とする。

【方法】

陳旧性心筋梗塞の慢性心不全マウスを作製し、心筋直接リプログラミングによる心臓再生を検討する。心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子を発現させるため、タモキシフェン投与により遺伝子発現を制御できる

遺伝子改変マウスを作製し、治療効果や分子生物学的機序を検討する。

【結果】

1. 前年度に開発したリプログラミング遺伝子発現を時期・細胞特異的に制御できる CAG-CAT-MGTH2A Tg マウスを用いて、陳旧性心筋梗塞内の心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子を発現させたところ、梗塞領域 - 境界領域を中心に 2-3% の線維芽細胞が心筋細胞へと転換した。
2. 陳旧性心筋梗塞における心筋直接リプログラミングによって、成熟した癒痕組織面積が減少した。心筋再生と、抗線維化作用によって、心筋梗塞によって失われた心臓収縮能が改善した。
3. さらなる心機能改善のメカニズムを明らかにするため、対照群とリプログラミング群の心臓における非心筋細胞のシングルセル解析を行った。リプログラミング因子を発現したが心筋へと再生しなかった線維化促進性の遺伝子を多く発現する悪玉線維芽細胞が、これらの遺伝子発現が抑制された健全な善玉線維芽細胞へと転換する事を見出し、*Circulation* 誌に報告した^{1, 2)}。

【考察】

心筋直接リプログラミングが心筋再生と共に、強力な抗線維化作用をあわせもつ、心臓再生医療である可能性がある。現在は、これらのマウス心臓のシングルセル解析によって、線維芽細胞以外の非心筋細胞への影響や機序の解明を目的として、更なる解析が続いている。

【文献】

- 1) Tani H*, Sadahiro T*, Yamada Y, Isomi M, Yamakawa H, Fujita R, Abe Y, Akiyama T, Nakano K, Kuze Y, Seki M, Suzuki Y, Fujisawa M, Sakata-Yanagimoto M, Chiba S, Fukuda K, Ieda M: Direct reprogramming improves cardiac function and reverses fibrosis in chronic myocardial infarction. *Circulation* 2023; 147: 223-238. *Equal contributors.
- 2) Yamada Y*, Sadahiro T*, Ieda M: Development of direct cardiac reprogramming for clinical applications. *J Mol Cell Cardiol* 2023; 178: 1-8. *Equal contributors.

大動脈弁狭窄症の時空間的病態解明と重症化予防のための治療標的の探索

白川 公亮

(慶應義塾大学医学部循環器内科)

【目的】

本研究は、大動脈弁狭窄症（AS）の時空間的病態を解明し、AS重症化予防の治療標的を解明することを目的とした。ASは、心不全や狭心症を引き起こすことで健康寿命を著しく損なうが、有効な予防策が見出されていない重要な循環器病である。本邦における60歳以上のAS患者は約300万人で、医療経済的にも大きな社会問題となっており、ASを予防する標的の探索が求められている。ASの治療標的探索の先行研究として、大動脈弁のゲノム解析や単細胞遺伝子発現解析などの様々なアプローチが行われてきたが、極度に変性しきった大動脈弁全体を解析する研究が主体であり、弁変性過程や大動脈弁特異的な変性部位に注目していないため有望な治療標的は未だに解明されていない。

研究者は、過去のAS研究背景を踏まえて、大動脈弁変性機序を、①重症度の進行に応じた時系列的変性と、②弁輪と弁尖の空間的変性に分けて病態を理解することがASの進行を抑制する治療標的の探索につながると考えている。最近、遺伝子共発現ネットワーク解析により、炎症性蛋白オステオポンチン（OPN）が大動脈弁の変性機序の鍵分子であることが報告された（Cao et al., BMC Med Genomics. 2021）。本研究では、OPN産生免疫細胞を追跡できる独自に開発したASモデルマウスを用いて、大動脈弁変性過程におけるOPNの時空間的役割と変性した大動脈弁特異的に出現するOPN産生マクロファージの機能を解明し、大動脈弁の変性を予防する治療標的を探索することを目的とした。

【方法】

自然発症ApoE欠損高脂血症マウス（B6.KOR/StmSlc-Apoesh1）に、60%高脂肪食とアンジオテンシンIIを皮下植え込み型シリンジポンプで6週間持続皮下注したASモデルマウスを作成する。B6.KOR/StmSlc-Apoesh1にOPNをコードする*Spp1*遺伝子のノックアウトマウスの骨髄を移植した後にASモデルマウスを作

成し、移植後の大動脈弁を病理学的に評価し、RNA-seq及びsingle cell RNA-seq解析を実施する。また、大動脈弁のマクロファージをフローサイトメトリーで回収し、RNA-seq解析を行う。さらに、B6.KOR/StmSlc-Apoesh1に*Spp1*-EGFP Knock-in (KI) reporter マウス（*Spp1*Egfp/wtt KI reporter マウス）の骨髄を移植した後にASモデルマウスを作成し、*Spp1*-EGFP陽性細胞をフローサイトメトリーで回収し、RNA-seq解析を行う。

AS治療のハイボリュームセンターである慶應義塾大学病院の大動脈弁硬化及びAS（軽症・中等症・重症）患者の症例登録をし、超音波専門医・心エコー図専門医である研究者が、2D及び3D心臓超音波画像のデータ解析を行い、大動脈弁の開放角や変性の程度を評価する。また、慶應義塾大学病院で病理解剖を受けた大動脈弁硬化からASが併存する病理検体の情報を統合する。

【結果】

【大動脈弁狭窄症（AS）患者の大動脈弁において*Spp1*遺伝子を発現する細胞はマクロファージだった】

研究者は公共データベースにあるAS患者大動脈弁とコントロール患者の単細胞遺伝子解析データを再解析すると、ASでのみ*Spp1*遺伝子を発現する細胞が出現し、その細胞がマクロファージであることを解明した。また、マクロファージの特定のサブセットでのみ*Spp1*遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。

【ASモデルマウスの確立とオステオポンチン産生マクロファージの局在の確認】

研究者は自然発症ApoE欠損高脂血症マウス（B6.KOR/StmSlc-Apoesh1）に、60%高脂肪食とアンジオテンシンIIを皮下植え込み型シリンジポンプで6週間持続皮下注したASモデルマウスを開発した。このマウスは弁輪部を中心とした肥厚・線維化と微小な石灰化を認め、心臓超音波検査でもコントロールマウスと比較して、大動脈弁通過血流速度の有意な上昇を認めた。

研究者は、B6.KOR/StmSlc-Apoesh1に*Spp1*のEGFPノックインレポーターマウスの骨髄を移植することで、OPN産生免疫細胞を追跡・回収ASモデルマウスを作成した。この大動脈弁のFlow cytometryでは、ヒト大動脈弁狭窄症患者の単細胞遺伝子解析の結果と同様に、OPN転写活性が上昇する細胞はマクロファージであった。また、このマウスの変性した大動脈弁の蛍光免疫

染色では、OPN 産生マクロファージが肥厚変性した弁輪部を中心に局在していた。この結果は、OPN が弁輪を中心とした局所の変性を惹起することが AS 発症初期段階の原因となる可能性を示唆した。

【マクロファージのオステオポンチンは大動脈弁変性機序に重要であった】

B6.KOR/StmSlc-Apoesh1 マウスに *Spp1* ノックアウトマウスの骨髄を移植した AS モデルマウスを作成し、Wild-type の骨髄を移植した AS モデルマウスと比較することで、マクロファージの産生する OPN が弁の変性に与える影響を解析した。*Spp1* ノックアウトマウスの骨髄移植群では Wild-type に比して心臓超音波検査での大動脈弁通過血流の圧較差が有意に抑制された。また、病理学的には弁輪部を中心とした肥厚変性が軽減し、Von Kossa 染色での微細な石灰化も軽減した。定量 PCR 検査では、*Col1a1* をはじめとした線維化の遺伝子発現が、*Spp1* ノックアウトマウスの骨髄移植群で抑制されていた。現在、各 AS モデルマウスの大動脈弁の RNA-seq 及び単細胞遺伝子解析を実施中であり、マクロファージのオステオポンチンが大動脈弁変性に与える詳細な機序を解明する予定である。また、各 AS モデルマウスからマクロファージをフローサイトメトリーによりソート済みであり、現在 RNA-seq 解析を実施している。

【心臓超音波検査による AS 患者大動脈弁変性の時系列的変化の解明】

大動脈弁は、空間的に弁輪・弁腹・弁尖に分かれる。大動脈弁変性過程には、これらの空間的要素だけではなく、重症化過程の時系列的な要素が存在する。しかし、現状、大動脈弁の時空間的変性に関する研究は乏しい。慶應義塾大学病院の弁硬化から重症までの患者の心臓超音波検査を解析したところ、大動脈弁は硬化の時点で既に弁輪部の可動性が低下しており、軽症、中等症、重症と進行するにつれて弁尖部へと変性が進行していくことが分かった。このことは、大動脈弁には重症度の進行に応じた時系列的変性に加えて、弁輪・弁腹・弁尖の空間的変性が存在することを強く支持する結果であった。

そこで研究者は、AS の診断を受け、大動脈弁置換術を受けた被検者の大動脈弁の遺伝子・蛋白発現と病理学的評価を臨床データに統合し、大動脈弁変性機序の鍵分子と治療標的の探索を実施する予定である。慶應義塾大

学病院で大動脈弁置換術を受けた被検者の大動脈弁の炎症性遺伝子・蛋白の発現を、重症度と変性部位に分けて、RNA シーケンス、質量分析を用いて解析する計画である。

【考察】

AS モデルマウスを用いた実験により、マクロファージのオステオポンチンが大動脈弁変性に与える影響を解明した。また、ヒトの心臓超音波検査データから大動脈弁の空間的変性機序の存在が明らかになった。今後、ヒト AS 患者大動脈弁を弁輪と弁尖の部位別に分別し、弁の RNA シーケンス、質量分析及び ATAC シーケンスのデータを統合し、今までの研究とは異なるアプローチから大動脈弁変性機序を時空間的に解析する予定である。また、B6.KOR/StmSlc-Apoesh1 に *Spp1* の EGFP ノックインレポーターマウスの骨髄を移植した AS モデルマウスを用いて *Spp1*-EGFP 陽性及び陰性マクロファージを Flow cytometry で回収し、bulk RNA-seq 解析と質量分析を統合したマルチオミクス解析を実施し、AS 弁特異的に出現する OPN 産生マクロファージのより詳細な機能を解明する。さらに、ATAC シーケンスを実施し、bulk RNA シーケンス解析のデータと統合して、OPN 産生誘導に必要な転写因子を推定し、OPN の発現調節機序を明らかにする予定である。

【文献】

Shirakawa K and Sano M. Drastic transformation of visceral adipose tissue and peripheral CD4 T cells in obesity. *Front Immunol.* 2022;13:1044737.

興奮転写連関を介した血管リモデリング形成機構の解明

鈴木 良明

(名古屋市立大学 大学院薬学研究所 細胞分子薬効解析学分野)

【背景・目的】

動脈に対するストレス負荷は、マクロファージ (MΦ) の集積と炎症により、血管平滑筋細胞 (VSMC) の脱分化・増殖を促して血管リモデリングを誘発する。我々は、VSMC の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が、興

奮 - 転写連関 (E-T coupling) を介して, MΦの集積と VSMC の脱分化・増殖を促して血管リモデリングを「発生」させることを見出した (Suzuki ら *PNAS*, 2022). 脱分化した増殖型 VSMC (pVSMC) では, Ca^{2+} シグナルは増殖や遊走を促進し, 病変が「成熟」する. しかし, pVSMC における E-T coupling の存在やその役割については不明な点が多い. そこで本研究では, 血管リモデリングの発生・成熟に対する E-T coupling の役割の解明と, それに基づく血管リモデリング疾患治療薬の開発を目的とした.

【方法】

ゲノム編集法により CaMKK2-KO を作製した. 腸間膜動脈結紮 (ML) モデルを作製して, 血管リモデリングを誘発した.

【結果】

1. CaMKK2-KO マウスを用いた血管リモデリング発生に対する CaMKK2 の寄与の解明

CaMKK2-KO マウスを用いて, 脱分極刺激誘発性 E-T coupling に対する CaMKK2 の役割を調べた. その結果, CaMKK2-KO 由来の細胞・組織において, E-T coupling が抑制された. ML モデルから腸間膜動脈を単離して, リモデリングを評価したところ, CaMKK2-KO においてリモデリング形成が減少した (図 1).

2. Junctophilin (JP) -2 の血管リモデリングの成熟に対する役割の解明

ラット由来 pVSMC において, JP2 と caveolin (cav) -1 が細胞膜 - 筋小胞体間の結合膜構造に共局在して, Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} (CRAC) チャネル - AKAP5- カルシニューリン (CaN) から成る Ca^{2+} マイクロドメインを形成することを見出した (図 2). CRAC チャネル阻害薬や JP2 ノックダウンにより転写因子 NFAT の核移行や増殖が抑制された.

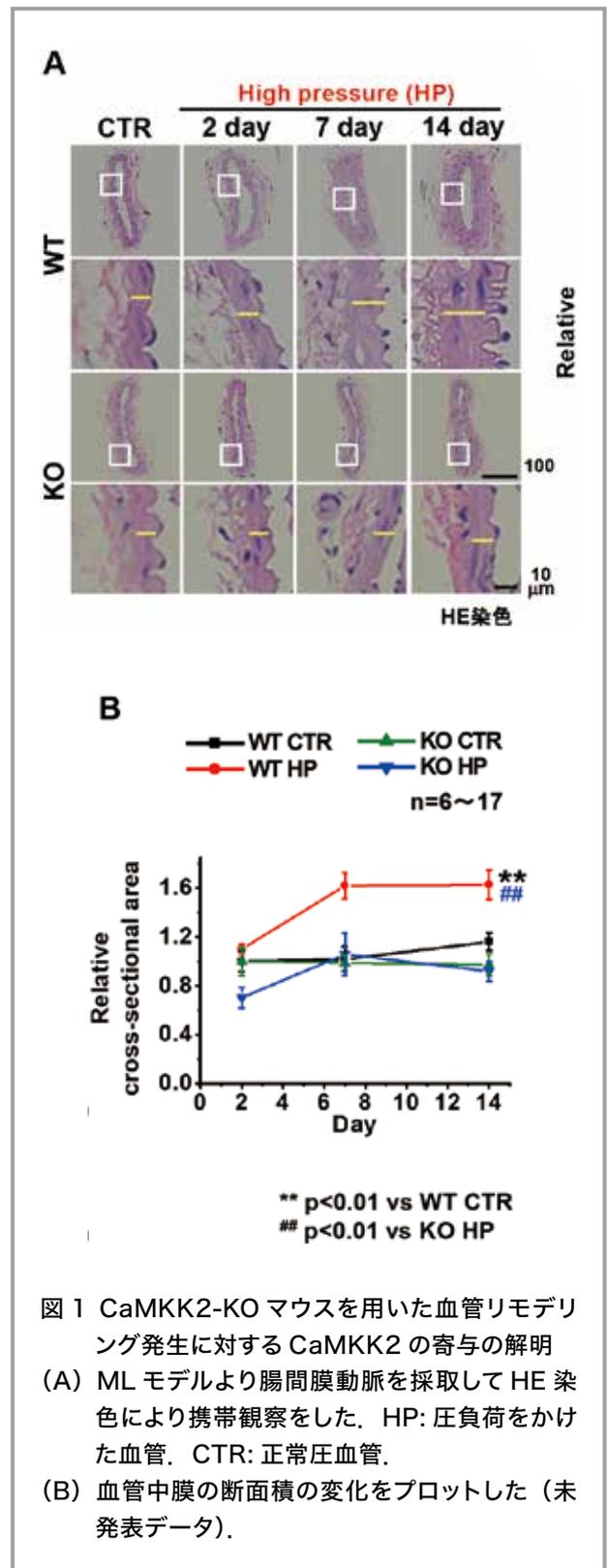


図 1 CaMKK2-KO マウスを用いた血管リモデリング発生に対する CaMKK2 の寄与の解明
(A) ML モデルより腸間膜動脈を採取して HE 染色により携帯観察をした. HP: 圧負荷をかけた血管. CTR: 正常圧血管.
(B) 血管中膜の断面積の変化をプロットした (未発表データ).

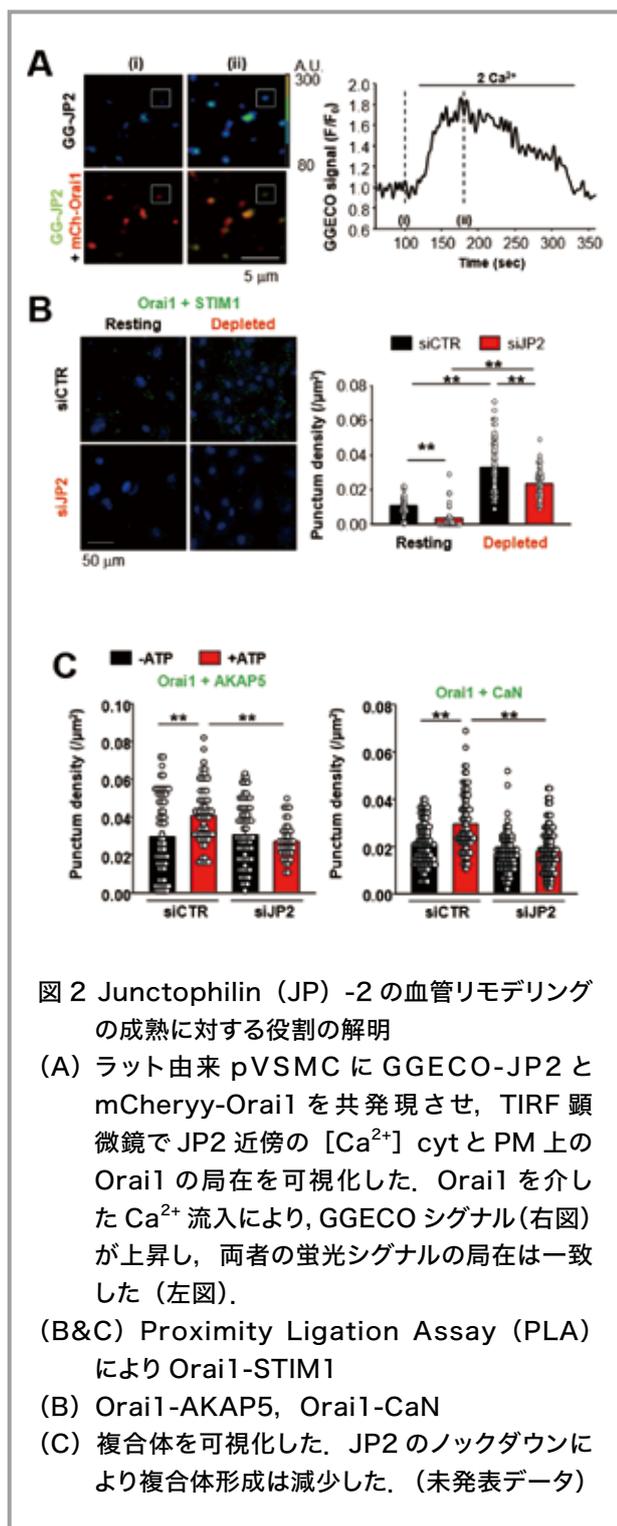


図 2 Junctophilin (JP) -2 の血管リモデリングの成熟に対する役割の解明

- (A) ラット由来 pVSMC に GGECO-2 と mCherry-Orai1 を共発現させ、TIRF 顕微鏡で JP2 近傍の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ と PM 上の Orai1 の局在を可視化した。Orai1 を介した Ca^{2+} 流入により、GGECO シグナル(右図)が上昇し、両者の蛍光シグナルの局在は一致した(左図)。
- (B&C) Proximity Ligation Assay (PLA) により Orai1-STIM1
- (B) Orai1-AKAP5, Orai1-CaN
- (C) 複合体を可視化した。JP2 のノックダウンにより複合体形成は減少した。(未発表データ)

【考察】

CaMKK2 が E-T カップリングを介した血管リモデリング形成に重要であることが示唆された。また、JP2 は CRAC チャネルを起点とした E-T coupling によりリモデリングの成熟に関わると考えられた。

慢性心不全におけるスクシニル-CoAに基づくエネルギー代謝機能障害

高田 真吾¹ 絹川 真太郎²

(1 北翔大学生涯スポーツ学部スポーツ教育学科)

(2 九州大学大学院医学研究院循環器内科学)

心不全 (HF) は死亡や入院を繰り返す主な原因であり、しばしば心臓ミトコンドリア機能障害を伴う¹⁾。しかし、その基礎となるメカニズムはほとんど解明されていない。ここでは、冠動脈結紮により心筋梗塞 (MI) を誘発したマウスモデルを用いて、慢性心不全におけるミトコンドリア機能障害の代謝的基盤を明らかにする。

冠動脈結紮の 4 週間後、心筋梗塞マウスは心筋のスクシニル-CoA レベルの有意な減少を示し、この減少はミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) 能力を低下させた。心筋梗塞マウスでは、ヘム合成とケト分解、およびこれらの現象でスクシニル-CoA を消費するいくつかの酵素のタンパク質レベルが増加し、 α -ケトグルタル酸とグルタミン酸からスクシニル-CoA を合成する酵素も増加した。さらに、スクシニル-CoA 合成酵素の ADP 特異的サブユニットは減少し、GDP 特異的サブユニットはほとんど変化しなかった。スクシニル-CoA からヘム合成への経路の中間体である 5-アミノレブリン酸の投与は、スクシニル-CoA レベルと OXPHOS 能力を著しく回復させ、心筋梗塞マウスの HF 進行を予防した。以前の報告では、HF 患者の心筋におけるスクシニル CoA 代謝異常の存在も示唆されていた。

我々の結果は、ミトコンドリアエネルギー産生系のさまざまな代謝におけるスクシニル-CoA の使用量の変化が慢性 HF に特徴的であることを明らかにした²⁾。同様の変化は、激しい運動時など健康な状態でも起こることが知られているが、慢性 HF ではしばしば不可逆的に起こり、スクシニル-CoA の減少につながる可能性がある。従って、スクシニル-CoA の消費を補う栄養学的介入は、HF の治療戦略として有望であると期待される。

1. Maekawa S, Takada S, Nambu H, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueyanagi Y, Kang D, Sabe H, Kinugawa S. Linoleic acid improves assembly of the CII subunit and CIII2/CIV

complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system in heart failure. *Cell Commun Signal*. 2019;17:128. doi: 10.1186/s12964-019-0445-0

2. Takada S, Maekawa S, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueda K, Nambu H, Hagiwara H, Handa H, Fumoto Y, et al. Succinyl-CoA-based energy metabolism dysfunction in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119:e2203628119. doi: 10.1073/pnas.2203628119

**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)

【目的】

アドレノメデュリン (AM) は血管拡張ペプチドとして同定されたが、それ以外にも様々な作用を有することが明らかとなっている。私はこれまで、AMとその受容体活性調節タンパク RAMP2 が、血管の恒常性維持に必須であること、誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) では、血管の傷害が転移前土壌形成を促進し、癌細胞の血行性転移を亢進させることを報告した。昨年度の報告では、癌細胞のリンパ節転移の検討を行い、DI-E-RAMP2^{-/-} ではリンパ節転移が亢進することを見出した。本年度は、血管内皮細胞特異的 RAMP2 過剰発現マウス (E-RAMP2 Tg) を用いて、同様のリンパ節転移の検討を行った。

【結果】

DI-E-RAMP2^{-/-} とは逆に、E-RAMP2 Tg ではリンパ節転移が抑制され、リンパ節内 HEV 数は増加していた。それに伴い、転移リンパ節内の CD4⁺、CD8⁺T 細胞も有意に増加していた。HEV は CCL21, CCL19, CXCL12 などのケモカインや、ICAM-1, MadCAM-1 といった接着因子を産生し、T リンパ球をリンパ節内に引き込むことが知られている。E-RAMP2 Tg のリンパ節では、これらの遺伝子発現がすべて有意に上昇することがわか

った。さらに、E-RAMP2 Tg の抗 PD-1 抗体投与群では、Control マウスの抗 PD-1 抗体投与群よりも生存率が向上した。

【考察】

これらの結果から、AM-RAMP2 系は HEV の適切な機能に不可欠であり、HEV の恒常性を維持し、リンパ球の動員に寄与することで、リンパ節転移を抑制する新しい治療法の開発につながる可能性が示された。血管の恒常性制御は、循環器疾患だけでなく、癌治療の標的となることが期待される。

**ヒトiPS由来三次元心臓組織を用いた心臓病に対する
病態解明と新規治療法の開発**

谷 英 典

(慶應義塾大学医学部 循環器内科)

【目的】

申請者はこれまでにヒト iPS 由来細胞心筋細胞 (hiPSC-CM) を用いて Engineered Heart Tissue (EHT) という配列化したマイクロ三次元心筋組織を作製するにあたって、心臓由来コラーゲンを用いることで成熟度の高い心臓組織を開発し、細胞外基質としてのコラーゲンの重要性、心臓由来コラーゲンの特性を示した (Tani et al., Biomaterials. 2023)。本研究ではこの EHT を用いて線維芽細胞、血管内皮細胞などの**非心筋細胞を組み合わせた三次元的心臓組織を作製し**、従来の hiPSC-CM 単独では明らかにならなかった**心臓病の病態を解明し、新規治療法を開発することが目的**である。具体的には**薬物添加や培地・培養条件の負荷によって拡張障害モデルを作製し**、心臓組織における心筋細胞以外の要素、相互作用にも着目して**収縮様式や遺伝子発現、上清培地中に分泌されるエクソソームの解析を行う**。

【方法・結果】

先行研究の際にはブタの心臓線維芽細胞を用いていたが、本研究を進めるにあたって同じヒト iPS 由来の細胞である方が望ましいと考え、まず非心筋細胞の混入条件を検討した。既存のプロトコル (Nature protocol 2017, STAR protocol 2022) に準じて高純度の心外膜細胞、線維芽細胞を誘導して心筋細胞と混入して EHT

を作製し、ブタ心臓線維芽細胞の条件と比較したところ、ヒト iPS 由来心外膜細胞と心臓線維芽細胞を用いた場合に早期から強い収縮力を示し、成熟関連の遺伝子発現が上昇することを確認した (図 1)。心外膜細胞は増殖能がよく、心臓線維芽細胞の誘導には心外膜細胞よりも時間とコストを要することから、非心筋細胞として心外膜細胞の混入を用いた。ここにヒト iPS 由来血管内皮細胞を混入させて EHT を作製した。

この実験系では EHT の移動距離や速度を測ることで、非侵襲的に組織の収縮力と収縮時間、拡張時間を測定することで拡張能も評価が可能である。我々は条件 X において EHT の収縮力は変化せずに、相対的な拡張時間が有意に延長することを確認した (図 2)。こうした拡張能の低下は心臓コラーゲンや血管内皮細胞を含有しない EHT モデルでは小さく、心臓由来コラーゲン (特に type3) と血管内皮細胞の混入が重要であった。さらに既知の拡張障害の pathway は本実験系においても再現されることを遺伝子、タンパクレベルで確認した。今後は治療薬での評価を進めるとともに、網羅的な解析を進めて未だ十分に解明されていない治療薬による改善の機序を解明し、新規の治療薬のスクリーニングを進めていく方針である。

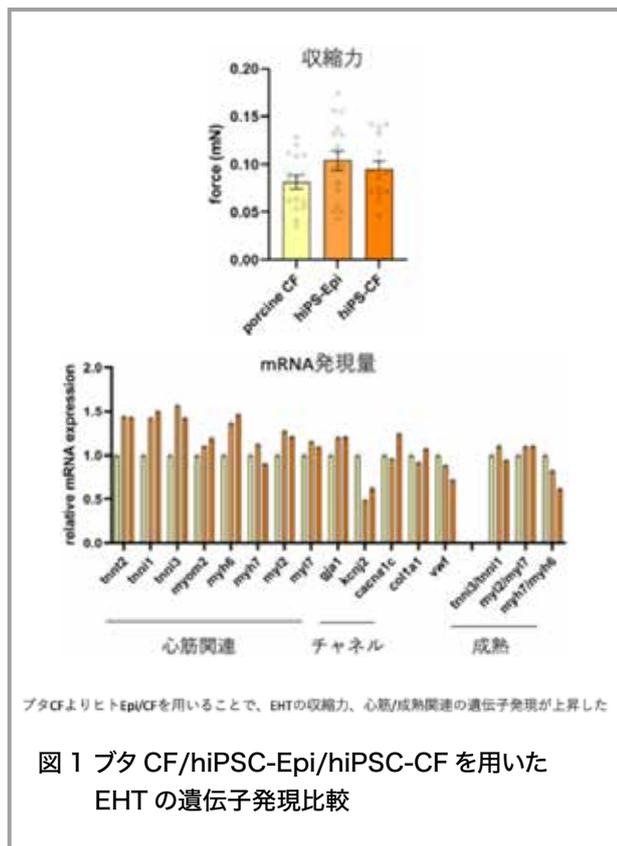


図 1 ブタ CF/hiPSC-Epi/hiPSC-CF を用いた EHT の遺伝子発現比較

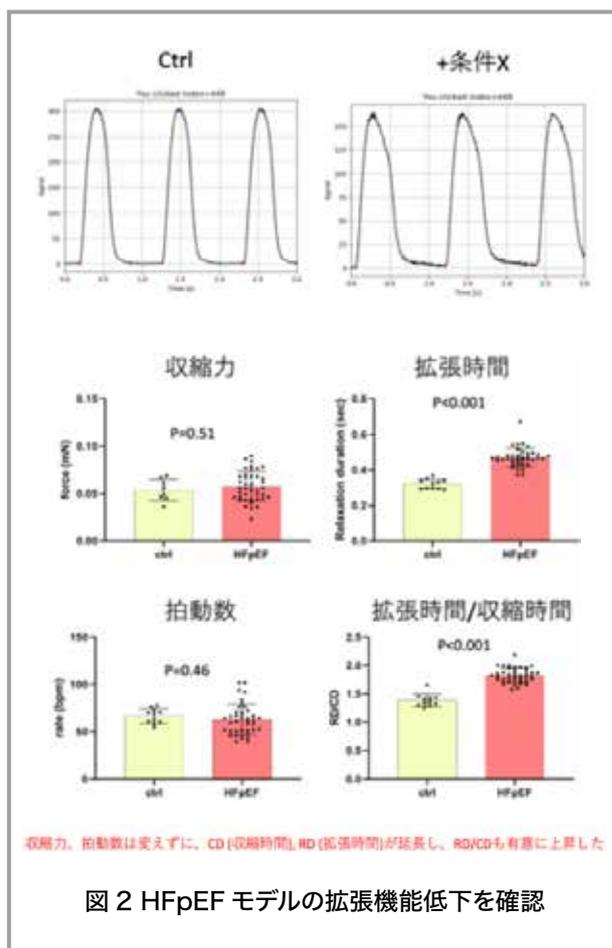


図 2 HFpEF モデルの拡張機能低下を確認

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循環器内科)

【要旨】

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¹⁻³⁾。

さらに、我々は多能性幹細胞特異的な代謝機構に着目することにより、残存する未分化幹細胞を特異的に除去する手法を確立し^{4,5)}、これまで確立してきた培養液による純化精製法との組み合わせによりさらに安全な心筋細胞の作製が可能となった。

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、必須アミノ酸の1つとして知られるトリプトファン代謝を制御することにより、ヒト多能性幹細胞の増殖が促進されることを見出した^{6,7)}。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。

また、再生医療の産業化を推進するためには、従来のように作製した目的細胞を用いて flow cytometry や免疫染色、QPCR 等で評価する手法ではなく、簡便に心筋の分化効率や成熟度、残存未分化幹細胞等をチェックする品質評価システムの確立が望まれてきた。そこで、申請者らは培養液中の miRNA を網羅的に解析し、簡便に心筋の分化効率や成熟度、残存未分化幹細胞等をチェックするシステムを開発することに成功した⁸⁾。

作製したヒト iPS 細胞由来心筋組織球をラットあるいはブタの心不全モデル心臓に移植し、心機能が有意に改善することを確認している^{9,10)}。また、最近では臨床グレードのヒト iPS 細胞から臨床グレードの培養液を用いて心筋細胞を製造し、サル的心不全モデルに移植することで、3 か月間移植細胞が生着・成熟し、心機能が有意に改善することを確認している (in revision)。これらの技術を用いて作製した臨床グレード心筋組織球を虚血心筋症患者へ移植する企業治験を開始している。

さらに、最近では、ブタの心臓由来のコラーゲンを用いることで、皮膚由来のコラーゲンを用いた従来の方法と比べて、成熟度の高いヒト人工心筋組織の作製にも成功し

ており¹¹⁾、創薬研究や疾患の病態解明研究を進展させていきたいと考えている。

【謝辞】

私は 2012 年に VBIC に入会させていただき、以降 10 年という長期に渡って、研究をご支援いただきました。また、毎年行われる夏の研究会においていただけたご質問やご意見が研究を進展させる活力となっております。この場を借りまして、日本応用酵素協会および VBIC のオーガナイザーの先生方に深謝申し上げます。

【文献】

- 1) **Tohyama S**, et al. (2013) *Cell Stem Cell* 12, 127-137.
- 2) **Tohyama S**, et al. (2016) *Cell Metabolism* 12, 663-674.
- 3) **Tohyama S**, et al. (2017) *Stem Cell Reports*. 9,1406-1414.
- 4) Tanosaki S, **Tohyama S** (Corresponding author), et al. (2020) *iScience* 23, 101535.
- 5) Tanosaki S, **Tohyama S** (Corresponding author), et al. (2022) *STAR Protocols* 3, 101360.
- 6) Someya S, **Tohyama S** (Corresponding author), et al. (2021) *iScience* 24, 102090.
- 7) Kameda K, **Tohyama S** (Corresponding author), et al. (2022) *STAR Protocols* 3, 101341.
- 8) Sekine O, **Tohyama S** (Corresponding author), et al. (2023) *Stem Cell Reports* accepted
- 9) Tabei R, Kawaguchi S, **Tohyama S**, et al. (2019) *J Heart Lung Transplant* 38, 203-214.
- 10) Kawaguchi S, Soma Y, **Tohyama S**, et al. (2021) *JACC-BTS* 6, 239-254.
- 11) Tani H, **Tohyama S**, (Corresponding author), et al. (2023) *Biomaterials* 299, 122174.

DPCデータおよびAIを活用した心不全患者の リスク層別化モデルの構築と心不全治療の最適化

遠山 岳 詩

(九州大学 先端医療オープンイノベーションセンター)

【目的】

本研究の目的は、わが国における心不全患者の予後予測をより高精度に実現するAIモデルを開発するとともに、その因子を解析することで、データに基づいた新たな心不全治療の最適化を目指すことである。

【方法】

JROADHFに登録された心不全患者のうち、長期予後情報が取得された11120人を対象とし、レジストリデータから臨床背景情報および予後情報と、DPCから入院基本情報やレセプト情報を取得した。これらのデータを用いて、患者背景から退院後の予後を予測する機械学習モデルを構築した。欠測値については、ベイジアンリッジにより補完し、ランダムサバイバルフォレストによる予後予測モデルを構築した。予測性能は5分割交差検証におけるHarrell's C-indexで評価を行った。また、予後予測に重要な因子については、Permutation Importanceによって評価を行った。

【結果】

レジストリおよびDPCデータからは患者背景となる153因子を抽出した。全因子を利用したランダムサバイバルフォレストは、C-indexが 0.75 ± 0.01 であった。なお、既存の心不全リスクモデルであるMAGGICのC-indexは 0.68 ± 0.01 であった。ランダムサバイバルフォレストにおいては、年齢、退院時BNP、Barthel index (ADL指標)、アルブミン、BMIの順に重要視していることが明らかとなった。

【考察】

今回、心不全患者予後予測AIモデルを構築した。既報の心不全予後予測のAIモデルは1年生存割合など、固定期間での予後予測モデルであり、早期打ち切りとなった患者については解析の対象外となりバイアスの原因となっていた。一方で、本モデルでは、そのような症例も全て利用した解析となり、よりバイアスを取り除いたモデルである。本モデルにおいては、機械学習手法により欠測を合

む変数(例:退院時BNPは約64%の欠測)については、その他の変数から値を補完しながら予測を行うことができるため、実臨床においても適応しやすいモデルと言える。AIモデルは、心不全の予後予測因子として、心不全自体の重症度(BNP)の他、ADL(Barthel index)、栄養状態(アルブミン、BMI)が重要であることを改めて示した。

核内受容体RXRに関連した肺高血圧血管リモデリングの機序解明とそれに関連した治療薬の開発

沼田 玄 理

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科)

【背景・目的】

肺高血圧症(PH)は肺血管リモデリングを特徴とする難治性疾患であり、種々の肺血管拡張薬によって予後改善が得られてきたが、現行使用されている血管拡張薬に反応しない患者や血管拡張薬による合併症のために使用困難な患者も存在する。ゆえにPHの新規メカニズムの解明及びそれに基づいた肺血管リモデリング改善を主たる効果とする治療法の開発が望まれている。PHの進展には核内受容体が関与し、レチノイドX受容体 α (RXR α)は様々な核内受容体関連シグナルを調節することが知られているが、RXR α とPHとの関連は明らかではない。本研究はRXR α と関連したPHメカニズムの解明および治療方法の開発を目指すものである。

【方法】

RNA網羅的解析の公共データを用いてPH患者肺RXR α mRNA発現を解析した。また、肺動脈性PH(PAH)および強皮症PHマウスモデル(SSc-PH)に対するRXR α 刺激薬(Acyclic retinoid:ACR)の効果を生理的、組織学的、分子生物学的手法で検討した。さらにマウス単離肺内皮細胞およびヒト内皮細胞を用い、内皮間葉転換(EndMT)とRXR α の関連を解析した。

【結果】

公共データ(GSE113439)解析によりPH患者肺でRXR α mRNAが低下していることが確認された。また、PAHおよびSSc-PHマウスにおいてRXR α 刺激薬ACRは肺血管抵抗を改善し、EndMTの抑制および肺血管リモデリングを起すことが確認された。

また単離内皮細胞においてRXR α はp53の活性化を介して間葉内皮転換 (MEndT) を誘導した。

【考察】

RXR α 刺激薬 ACRは肺血管内皮細胞においてp53を介してMEndTを誘導し、マウスPHモデルおよび培養細胞におけるEndMTを改善した。

RXR α -p53経路と関連したMEndTによるPHの治療メカニズムに関する報告はこれまでなく、RXR α -p53経路はPHの新規治療標的として期待される。

リプログラミング法を利用した新たな心臓形成転写ネットワークの探索

橋本 寿之

(慶應義塾大学医学部 循環器内科)

【目的】

心臓発生に重要な複数の転写因子を強制発現させることにより線維芽細胞を心筋様細胞に直接分化転換することができる¹⁾。最近我々はリプログラミングと心臓発生の間にはエピジェネティックなプロセスにおいて多くの共通点があることを見出した²⁾。このような知見から、今度は逆にリプログラミングの研究結果を参考にして、心臓発生を司る新たな転写制御機構を解明できるのではないかと考えた。よって、我々は先行研究結果³⁾において最も強く心筋分化転換効率を改善した転写因子ZNF281/Zfp281に着目し、ZNF281の司る心臓発生の新たな転写制御機構を解析することを目的として、研究計画を立案した。

【方法】

本研究ではCRISPR/Cas9システムを用いてZfp281KO_ES細胞及びマウスを作成し、Zfp281の発現量が心筋分化効率に及ぼす影響を解析する。また、Zfp281を心臓特異的にKOしたマウスラインを樹立し、Zfp281が心臓発生に必須の遺伝子かを明らかにする。

【結果】

我々はCRISPR/Cas9システムを用いてZfp281KO_ES細胞を作製した。そしてZfp281KO-ES細胞では心筋分化誘導を行っても心筋細胞が誘導されない事を確認した。同様にZfp281KOマウスを作製したが、産仔が確

認できず、胎生致死であることが示唆された(図1)。

また、器官形成期の胎仔シングルセル解析⁴⁾でZfp281は個体において普遍的に発現している事が確認された(図2)。そのため、Zfp281欠損が心臓の発生より早い原腸形成期等に影響を及ぼしている可能性が否定できなかった。

よって、次にZfp281floxマウスを作製し、Mesp1-CreマウスとZfp281floxマウスを交配することにより心臓中胚葉特異的Zfp281cKOマウスを作製した(図3)。その結果、Zfp281cKOマウスの産仔が認められず、胎生9日目頃より発達異常や胎生致死を認めた(図3,4)。

また、Zfp281cKOマウス胎仔を解析すると、心臓に様々な心奇形を認め、特に右室流出路系の形成不全が多く観察された(図5)。

この表現型の分子機序を解明するために胎生9.5日目の胎仔心臓を用いてRNA-seq解析を行った。その結果、興味深い事にZfp281cKOマウスの心臓においては野生型と比較して様々な非心臓系統の運命決定に寄与する転写因子の発現が上昇していることが判明した(図6)。よって、Zfp281は中胚葉において非心臓系統を誘導する転写因子群の発現を抑制することにより心臓形成に寄与していることが示唆された。

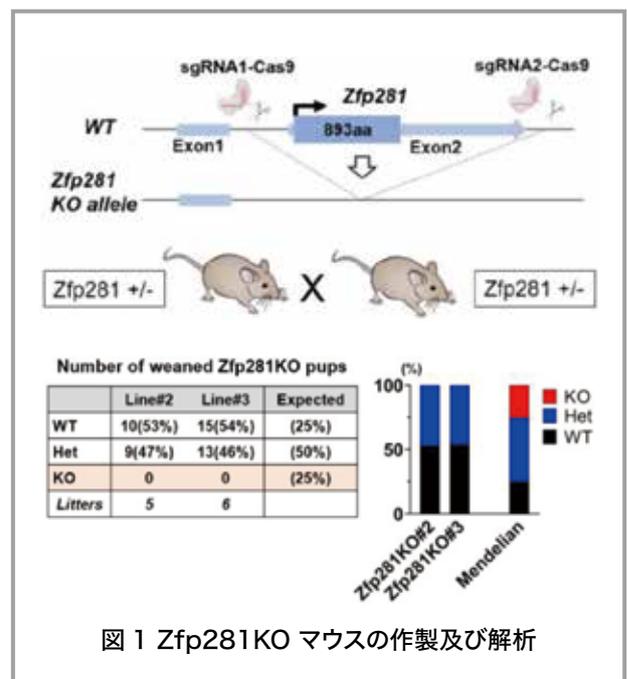


図1 Zfp281KOマウスの作製及び解析

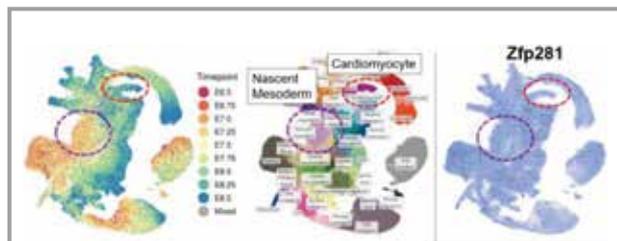


図2 原腸形成期 (胎生 6.5-8.5 日) のシングルセル解析

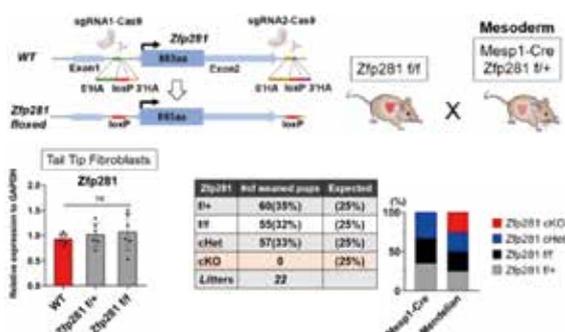


図3 心臓中胚葉特異的 Zfp281cKO マウスの作製及び解析

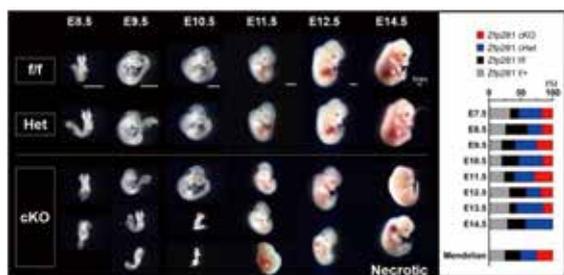


図4 Zfp281cKO 胎児マウスの解析及び胎生致死の表現型

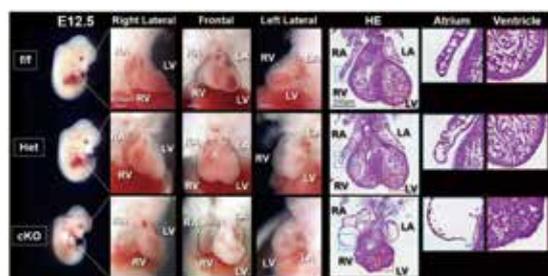


図5 Zfp281cKO マウスにおける心奇形の表現型

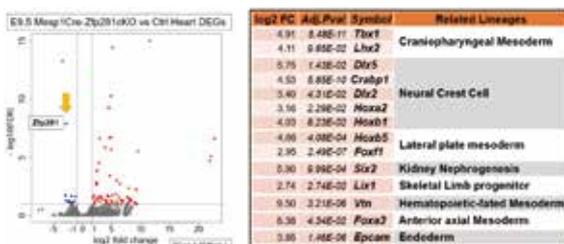


図6 Zfp281cKO マウス心臓の RNA-seq 解析

【考察】

我々の遺伝子改変モデルマウス解析結果から、ZNF281 は心臓発生に必須の因子である事が明らかとなった。今後はマルチオミクス解析及びタンパク質間相互解析を用いて ZNF281 がどのように非心臓系統の遺伝子群の発現を調整しているかを明らかにする予定である。

【参考文献】

- 1) Ieda, M. et al: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell, 142, 375-386, (2010).
- 2) Hashimoto, H. et al: Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers. Cell Stem Cell, 25, 69-86 e65, (2019).
- 3) Zhou, H. et al: ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression. Genes & development, 31, 1770-1783, (2017).
- 4) Pijuan-Sala, B. et al: A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. Nature, 566, 490-495 (2019).

オミクス解析を用いた遺伝子関連全身血管病の病態解明と新規創薬ターゲットの探索

平出 貴裕

(慶應義塾大学医学部 難治性循環器疾患病態学寄付研究講座 特任助教)

【研究の背景と目的】

難病疾患に指定されている血管病には、肺動脈疾患や脳動脈疾患、大動脈疾患などがあり、本邦での推定患者数は併せて2万人を超える。しかし発症原因の多くは特定されておらず、根本的な治療法に乏しい。肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病である。申請者の研究チームは特発性 PAH 患者検体の次世代シーケンサー解析を施行し、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 (RNF213) 遺伝子の多型変異 (R4810K) を同定した。RNF213 R4810K は従来の治療に反応性が乏しく予後不良であり、PAHの根

本的治療法の開発が望まれる患者群であることを報告した (Hiraide T, et al.2021). *RNF213* はもやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病において関連があり、*RNF213* 関連血管病という新規疾患概念を提唱した (図 1). これら疾患を網羅的に解析することで、新規発症機序の解明や創薬が期待できる。

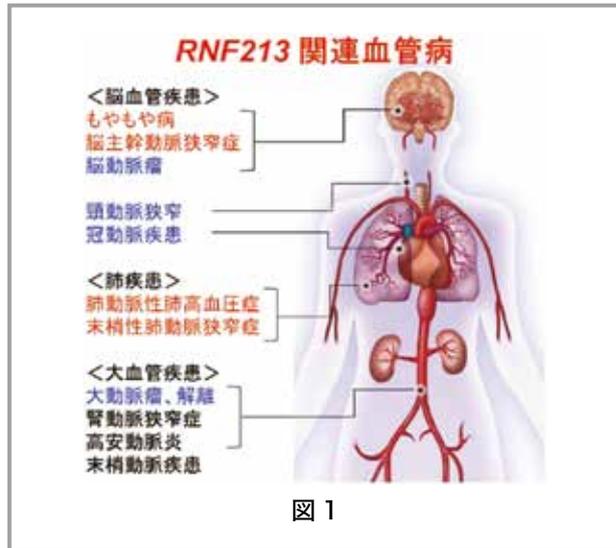


図 1

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension:PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病であり、「告知番号 86」として指定されている。PAH 難病登録患者数は本邦では約 3700 名で、PAH 患者の背景疾患として結合組織病や先天性心疾患などがあるが、全体の約 3/4 は原因を特定できない「特発性 PAH」である。PAH は肺血管壁細胞が異常に増殖することで、肺血管の内腔が狭窄し、肺血管抵抗の上昇によって右室の圧負荷が増大し、右心不全を呈する疾患である。有効な治療法がなかった時代、診断からの平均余命は約 2.8 年と極めて予後不良な疾患であった。PAH は遺伝子型因子と環境因子が関わる多因子疾患であるが、PAH 発症に至る分子機構の大半は不明であり、根本的な治療方法は確立していない。

【実験方法と結果】

ヒトでの *RNF213* R4810K 病的バリエントは現行の肺血管拡張薬への治療抵抗性がある予後不良因子であり、また複数の血管病に関連していることから、疾患発症に関連する分子メカニズムの解明が求められる。申請者の研究チームは CRISPR-Cas9 システムを用いて、*Rnf213* R4810K バリエントのノックインマウスの作製に成功した。野生型および *Rnf213* R4810K ヘテロマウスを常酸素下、

および 10% 低酸素下で 3 ヶ月間飼育したところ、常酸素環境下 (Nx) では PAH の発症は両群とも認めなかったが、低酸素環境下で飼育した *Rnf213* R4810K ヘテロマウス (hetero+Hx) は野生型 (wild+Hx) と比較して、有意な右室収縮期圧の上昇、および肺血管中膜肥厚を認めた。右室および肺動脈のリモデリングが確認され、低酸素負荷により PAH が惹起された (図 2)。

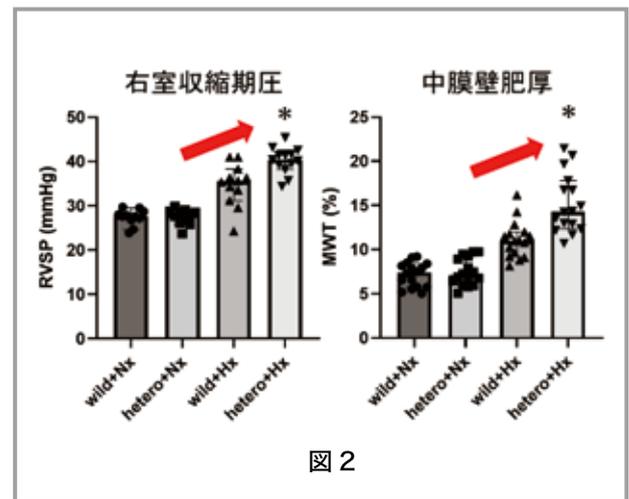


図 2

実臨床でも *Rnf213* R4810K は発症感受性遺伝子として報告されており、*Rnf213* バリエントという内的要因に、低酸素負荷 (外的要因) が加わる second hit により PAH が発症したと考えられた。マウス肺組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を施行したところ、低酸素負荷を行った *Rnf213* R4810K ヘテロマウスは、低酸素負荷をした野生型マウスと比較して、*Cxcl12* や *Cdk19* など細胞増殖シグナルを促進する因子の上昇を認めた (図 3)。既報で癌細胞の増殖との関連性が報告されている *Cxcl12* に着目し、受容体である *Cxcr4* の阻害薬 (AMD3100) を追加で腹腔内投与すると、低酸素負荷をしたヘテロマウスでの PAH が軽症になることを確認した。*Cxcl12*-*Cxcr4* シグナルが *Rnf213* R4810K マウスの PAH 発症に関連していることが示唆された (論文未発表データ)。今後は *Cxcl12* や *Cxcr4* の局在を免疫染色やシングルセル RNA 解析等で確認し、PAH 発症に関わる詳細なメカニズムを解明していく。*Cxcl12*-*Cxcr4* シグナルが新規根治療法のターゲットになる可能性があり、実臨床への応用に向けて検証を進めていく。

【ヒト肺組織での検証】

RNF213 R4810K バリエントに関しては、患者肺を用いた免疫染色を行った。マウスでは炎症性ケモカインであ

る CXCR4 は肺動脈の内皮、及び肺動脈と気管支の間(間質領域)の細胞に高発現していたが、重症肺高血圧症を呈したヒト患者肺においても、同様の所見を認めた(図4, 論文未発表データ)。マウスで確認した事象をヒトにおいても再現性があるかを確認できるのは、臨床および基礎の両面から研究を行ってきた本施設にしかできない優位性がある。

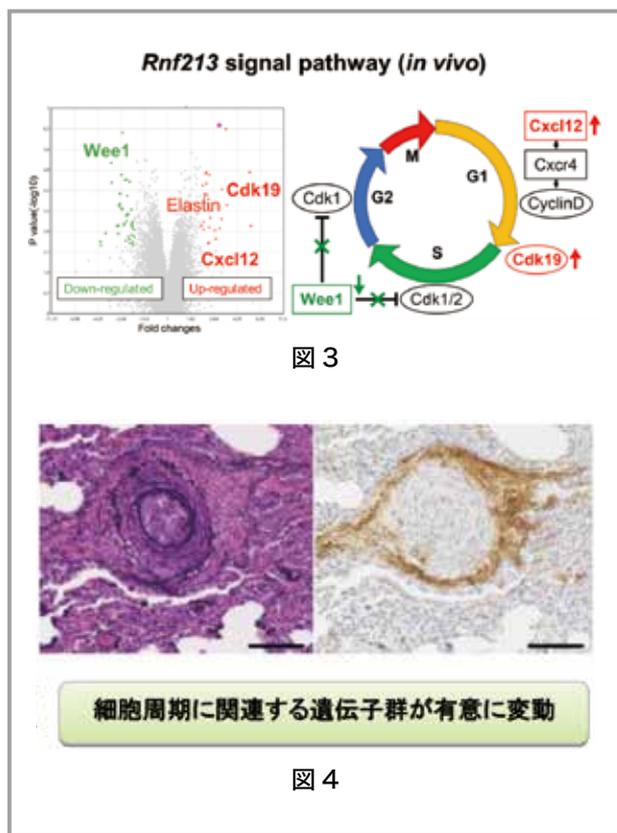


図3

図4

【出口戦略】

肺動脈性肺高血圧症の根治療法開発に向けて、分子標的薬や抗体薬、mRNA 治療などの開発を行い、実臨床への応用を目指したい。RNF213 R4810K 陽性マウスでPHの発症を抑制したCXCR4阻害薬は、投与方法に関する追加の検証を必要とするが、化合物としては別の疾患(血液疾患)においてすでに薬事承認を得ているものもあり、実臨床への橋渡しが比較的容易なシグナル経路であると考え。ヒトの肺組織での検証では肺動脈と気管支の間に炎症性サイトカインの関与があるため、従来の静脈注射よりも吸入薬の方が効果を期待できる。新規吸入薬の化合物を企業または薬学研究室と連携し、知的財産の取得を目指したい。

ミネラルコルチコイド受容体経路を標的とした糖尿病性腎症の新規治療法開発

広 浜 大 五 郎

(University of Pennsylvania)

【背景・目的】

糖尿病に伴う腎障害(糖尿病性腎臓病, DKD)は腎不全の原疾患として最も多いが、根本的な治療法は未確立である。これまでDKDに対する治療法開発を妨げていた要因の一つとして、ヒトの病態と類似するモデル動物の欠如があげられる。申請者は、低分子量G蛋白質Rac1がミネラルコルチコイド受容体(MR)転写活性化を促進し、この経路が生活習慣病に伴う腎障害の病態に関与する可能性を明らかにしてきたが(Shibata et al. *Nat Med* 2008, Shibata et al. *JCI* 2011, Hirohama et al. *Int J Mol Sci* 2020), DKDにおける意義は未解明である。本研究は(1)ヒトDKDと類似した病態を示すマウスモデルを確立すること(2)確立したマウスモデルを用い、主にMRに焦点をあててDKD進行の分子基盤の一端を解明することが目的である。

【方法】

肥満2型糖尿病モデルのdb/dbマウスに対して4週齢で片腎摘出を施行後、10週間高食塩食を投与し(UNx-HS db/dbマウス)、その表現型を評価した。db/mマウスに同様の処置を行った群をコントロール群とした。MR拮抗薬、Rac1阻害薬をUNx-HS db/dbマウスに投与し効果を検討した。

【結果】

UNx-HS db/dbマウスは高アルドステロン血症を認め、上皮性Na⁺チャネル活性化、低K血症、高血圧を呈した。UNx-HS db/dbマウスは顕著なアルブミン尿に加え、糸球体結節性病変、糸球体障害も認めた。UNx-HS db/dbマウスの腎皮質と単離糸球体で、Rac1活性化、MR標的遺伝子Sgk1発現の上昇を認めた。これらの結果から遠位ネフロン、糸球体両者でのRac1-MR経路活性化が示唆された。MR拮抗薬、Rac1阻害薬によりこれらの所見は改善された。

【考察】

本研究を通してDKDの新たなモデルマウスとして

UNx-HS db/db マウスを確立した。UNx-HS db/db マウスは、これまで一般的な糖尿病マウスでは認められなかった高血圧を呈し、顕著なアルブミン尿、DKD に特徴とされる糸球体結節性病変を伴っていたため、ヒト DKD に近い病態を示している可能性が考えられた。UNx-HS db/db マウスを用いた検討により、糸球体での Rac1-MR 経路活性化が、遠位ネフロンでの Rac1-MR 経路活性化によってもたらされる血圧上昇と協力して、DKD の進行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

【文献】

Hirohama, D. et al.: *Hypertension* 2021; 78: 82-93

時空間的イメージングシステムを用いた肺動脈性肺高血圧症の病態解明およびその治療応用

藤原 隆行

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 基礎研究における課題である (1) 従来の病理組織学的評価では複雑な血管の形態描出が困難であること、(2) PAH 動物モデルの多くは人為的誘発モデルであること、(3) PAH では肺生検は禁忌であり、ヒト組織を用いた実証が難しいこと、を解決し、PAH 新規治療薬開発につながる研究を展開する。

【方法】

申請者が開発した三次元可視化システム¹⁾を用いて得られた、低酸素負荷 PAH モデルにおける肺血管内皮細胞 PGC-1 α の代償的血管新生²⁾ について効能検証を行うため、CRISPR-Cas9 を用いてヒト重症 PAH 家系における遺伝子変異 (*BMP2^{Y247X/+}*) をマウスに導入し、より生理的な動物モデルとしての実証を進めたのちに、肺内皮細胞 PGC-1 α の役割について検討する。またヒト PAH 患者の肺移植時における摘出肺の採取を行い、遺伝子・タンパク発現や三次元解析における動物モデルとの共通点・差異について検討し、モデル動物における現象の検証を推し進めていく。

【結果】

BMP2^{Y247X/+} マウスは通常大気下で血管中膜肥厚を

呈するものの有意な右室圧上昇はきたさなかった。そのため PAH モデルの確立のため、*BMP2^{Y247X/+}* マウスにおいて肺血管内皮細胞特異的に PGC-1 α を欠損させ (*BMP2^{Y247X/+}; Alk1-Cre; Pgc1 α ^{fl/fl}*)、評価を行った。このマウスでは通常大気下で右室圧は有意に上昇し、PAH を発症したと考えられた。また血管中膜肥厚に加えて内膜の異常増殖、特に PAH 病理所見のうち最重症である叢状病変の出現を認めた。また三次元可視化システムにより、叢状病変の三次元可視化に成功した。

この新規 PAH モデルマウスの発症機序を探索すべく、シングル核 RNA シーケンスを施行したところ、細胞老化に関する遺伝子群の発現上昇を認め、病態への関与が示唆された。

またヒト PAH 患者の肺検体採取 (移植時) の施行について倫理審査を通過し、すでに 3 例の PAH 患者の肺検体の採取を行っている。

【考察】

BMP2 単独の変異導入ではマウスにおいて PAH は発症しなかったが、肺血管内皮細胞特異的 PGC-1 α 欠損により通常大気下で PAH を誘導することに成功した。これは PAH 発症メカニズムで提唱されているセカンドヒットセオリーに合致するものであり、また病理像もヒト重症 PAH 病変と類似しており、生理的な PAH モデルの確立に成功したと言える。またシングル核 RNA シーケンスにより、細胞老化が病態に関与していることが示唆されたため、今後は老化細胞除去薬による治療介入を推し進めていく予定としている。さらにヒト肺検体を用いた病態の検証を行っていく。

【文献】

- 1) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Seo K, Sakata A, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Nishimura S, Komuro I. Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice. *Circulation*, 144, 1452-1455 (2021)
- 2) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Katoh M, Maemura S,

Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Nishimura S, Komuro I. PGC-1 α -mediated angiogenesis prevents pulmonary hypertension in mice. JCI Insight, 2023;8(17):e162632.

リンパ管新生による炎症収束を介した心臓病治療

丸山和晃

(三重大学修復再生病理学)

【背景】

心筋炎は心筋を主座とする炎症性疾患である。心筋炎は自然免疫系による過剰なサイトカインの産生、獲得免疫系による心筋細胞の障害、炎症反応の消退といった過程をたどり、臨床的には炎症反応をいかに抑制するかと自然軽快までの血行動態維持が重要な課題である。心筋炎の病因は未解明で、治療法も好酸球性心筋炎に対するステロイド以外に有効なものがない。したがって臨床的、社会的にも心筋炎の病態解明や新規治療法の探索はニーズが高い。

【目的】

リンパ管は過剰な間質液や炎症細胞回収を通じ組織微小環境を制御する(業績1,2)。本研究はリンパ管新生によりマクロ分子や炎症細胞動態などの微小循環制御に着目し心臓におけるリンパ管の機能解析を行い心臓病の治療法開発を目指すものである。

【方法】

我々は血管内皮細胞でリンパ管発生に重要な転写因子であるホメオボックス型タンパク Prox1 をノックアウトし、心臓リンパ管欠損を引き起こせる事を見出した(業績3,4)。本研究では Tie2-Cre, CDH5-CreERT2 の2種類のマウスで心臓リンパ管の形成を阻害し、心筋炎モデルを作成し、炎症・線維化・浮腫の状態などを解析する。さらに臨床応用を見据え、リンパ管新生を促進する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)-Cを同モデルに投与し、リンパ管による心臓保護効果を確認する。また、リンパ管内皮細胞で Prox1 をノックダウンし、遺伝子解析をする事でリンパ管内皮細胞の生体内での機能を予測する。

【考察・進行状況】

リンパ管欠損マウスでは当初、胚発生期の解析結果からリンパ管数は減少するかと思われたが、心臓では8週齢では拡張したリンパ管の過形成を認めた。またリンパ球循環障害による異所性リンパ組織を様々な臓器で認めた。このリンパ管欠損マウスで心筋炎を引き起こすと心筋炎が劇症化する。さらに Prox1 をノックダウンした場合にはリンパ管内皮細胞でのケモカイン、接着分子の発現が変化しており、リンパ管内皮細胞と炎症細胞のインタラクションが変化している事が推察された。したがってリンパ管内皮細胞が心臓の炎症を制御している可能性が示唆される。

【文献】

- 1) ***Kazuaki Maruyama (責任著者)**, Kyoko Imanaka-Yoshida (*corresponding) The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress International Journal of Molecular Sciences, 23(5) 2617-2617 2022年2月
- 2) ***Kazuaki Maruyama (責任著者)**, Kazuaki Naemura, Yuichiro Arima, Yasunobu Uchijima, Hiroaki Nagao, Kenji Yoshihara, Manvendra K. Singh, Akiyoshi Uemura, Fumio Matsuzaki, Yutaka Yoshida, Yukiko Kurihara, Sachiko Miyagawa-Tomita, *Hiroki Kurihara Semaphorin3E-PlexinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery. iScience, 24(4) 102305-102305 2021年4月
- 3) ***Kazuaki Maruyama (責任著者)**, Sachiko Miyagawa-Tomita, Yuka Haneda, Mayuko Kida, Fumio Matsuzaki, Kyoko Imanaka-Yoshida, *Hiroki Kurihara The cardiopharyngeal mesoderm contributes to lymphatic vessel development eLife 11 2022年10月5日
- 4) **Kazuaki Maruyama**, Sachiko Miyagawa-Tomita, Kaoru Mizukami, Fumio Matsuzaki, Hiroki Kurihara. Isl1-expressing non-venous cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development Developmental Biology, 452(2) 134-143 2019年8月

腸内環境変化に着目した肥満症に関する基礎的研究

宮本潤基

(東京農工大学 大学院農学研究院)

【目的】

これまでの研究で、食用油由来腸内細菌代謝物群が腸管ホルモンでインクレチンの一つである GLP-1 (glucagon like peptide-1) の分泌亢進を介して、生体エネルギー代謝調節に関与することを明らかにした。その過程で、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示すことを見出した (unpublished data)。しかしながら、GLP-1 受容体の欠損が、どのような分子機構によって高脂肪食誘導性肥満モデルに対して抵抗性を示すかは不明なままである。そこで、2022 年度では、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの高脂肪食誘導性肥満モデルマウスにおける肥満抵抗性が胎児期や乳児期における組織発達遅滞の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】

同腹仔で比較検討を行うために GLP-1 受容体遺伝子改変マウスのヘテロ交配を行い、妊娠 18 日目 (E18.5) で解剖し、腸管、肝臓、心臓、膵臓および肺を単離した。解剖した胎児は、Genotyping PCR によって遺伝子型を確定した。単離した各種臓器から RNA 抽出および逆転写を行い、各遺伝子型における臓器発達マーカーを qRT-PCR によって mRNA 発現を検討した。

【結果】

E18.5 における肝臓の臓器発達に関連する遺伝子の mRNA 発現を解析した結果、肝臓マーカーは野生型とホモ型で有意な差は観察されなかったことから、E18.5 における肝臓は正常に発達していると判断した。一方、肝細胞の分化マーカーは野生型と比較してホモ型で顕著に減少した。また、GLP-1 分泌臓器である大腸組織においては、腸管マーカー及び分化マーカーなどに大きな変化は観察されなかった。

【考察】

これまでの検討によって、成獣期よりも胎児期などで GLP-1 の発現や分泌が顕著に亢進することをこれまでの

検討で明らかにしている。成獣期における GLP-1 はインクレチンや摂食調節などの作用が明らかにされているが、胎児期などの作用については詳細には明らかにされていない。2022 年度に検討において、胎児期における肝細胞の分化において、GLP-1 シグナルが何らかの影響を及ぼす結果、成長に伴う肝細胞 (あるいは肝臓) の正常な発達が阻害される結果、高脂肪食誘導性肥満に対して、抵抗性を示したことが考えられる。すなわち、本来は高脂肪食によって体重増加することが正常な生体応答であるにもかかわらず、GLP-1 受容体を欠損したことで、体重増加の抑制、正常な臓器の発達に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、より詳細に胎児期における GLP-1 シグナルを解明することを目的に検討を進める。

遺伝性大動脈瘤・解離症の病態生理の探索と創薬に向けたトランスレーショナルリサーチ

八木宏樹

(東京大学医学部附属病院 循環器内科)

マルファン症候群 (MFS) は、フィブリリン 1 をコードする *FBNI* の異常により全身の結合組織の構造や機能に変化し、大動脈 (洋ナシ状の大動脈基部拡大：大動脈弁輪拡張症) や骨格、目、肺、皮膚などの全身の多臓器に障害が生じる常染色体顕性遺伝の難治性疾患である。大動脈弁輪拡張症の進行に伴う大動脈瘤破裂や大動脈解離は若年の突然死の原因となるため、早期からの大動脈基部拡大に対する介入が重要である。アンジオテンシン II 1 型受容体阻害薬 (ARB) であるロサルタンは大動脈瘤の進展抑制効果が期待されたが、無作為化比較対照臨床試験では β 遮断薬を上回る効果が得られず、依然として大動脈瘤の増大を確実に抑制する治療薬はない。我々は今日までに MFS の病態解明と創薬を目的とした基礎研究を行い、MFS モデルマウスとヒト大動脈組織を用いて、血管内皮キサンチンオキシドレダクターゼ (XOR) を標的とした治療 (XOR 阻害剤：フェブキソスタット (フェブリク (R)：商品名)) によって MFS の大動脈瘤形成を抑制できる可能性を明らかにした (ATVB in revision)。そこで標準治療 (ARB や β 遮断剤) と既存の尿酸降下薬である XOR 阻害剤フェブキソスタットの

【考察】

脂質 Z は BBB の維持 / 恒常性に関わることが明らかとなった。また脳血管内皮細胞において脂質 Z の生合成 / 分解のターンオーバーが著しく速いことが明らかとなった。さらに、脂質 Z は量依存的に BBB の強固さを担保している可能性が示唆された。

【研究全体の総括】

本研究全体を通じ、血管内皮細胞のリン脂質脂肪酸組成が血管新生に影響しうることを、特定の脂質クラスが BBB 維持 / 恒常性に関わることを新たに明らかにした。今後、脂質の“質”がこれらの血管機能に影響する分子メカニズムに迫るとともに、糖尿病や認知症などの病的な背景において血管の脂質の“質”が如何に変動するかを明らかにし、脂質の“質”をターゲットとした疾患治療戦略の開発へとつなげていきたい。

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予防医学センター)

【背景】

従来 of 心不全の基礎研究では「モデル動物とヒトとの種差及び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) を同定した上で、同 D1R がヒト、マウスのいずれにおいても心不全時の致死的心室性不整脈の発症に寄与していることが示唆されることを明らかとしてきた。しかし、心不全において心臓 D1R が発現上昇をきたしているメカニズムは不明であり、先行研究において、心不全において D1R が発現増加している心筋細胞は一部の心筋細胞に限局しているが、どのような心筋細胞において D1R の発現増加するのか、その機序も不明であった。

【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

に、D1R を介した心不全の新規治療法の開発に繋げることである。

【方法・結果】

心不全時の心臓 D1R 増加するメカニズムの解明のために転写因子モチーフ解析を行ったところ、NF- κ B が心不全時の心臓 D1R 増加を制御している可能性があることが示唆された。この結果を受け、我々は、心不全時の心臓には小胞体ストレスがかかるとされていることに着目し、本研究で用いている圧負荷モデルマウスの不全心において、小胞体ストレスの上昇及び NF- κ B pathway の活性化が生じていることを確認した。その上で、ラットの培養心筋細胞を用い、小胞体ストレスを誘導したところ、D1R の発現が上昇し、かつこの発現上昇は NF- κ B pathway を抑制することにより抑制されることを確認した。以上の結果から、心不全時の D1R の発現上昇は、小胞体ストレスを介した NF- κ B pathway が寄与していることが示唆された。これらの研究成果について取りまとめ、2022 年 Biochemical and Biophysical Research Communications 誌において報告した。

【考察と今後の展望】

本年度の学術研究において、心不全時の心臓 D1R の発現上昇に、小胞体ストレスを介した NF- κ B pathway が寄与していることを国際学術誌に報告することができたが、これまでの検討においては、小胞体ストレスを介した NF- κ B pathway の活性化が特定の限られた心筋細胞においてのみ生じるのか、また生じるとすればその機序はどのようなものであるのかについては明らかにできておらず、また、なぜ心不全において D1R が発現増加する心筋細胞は一部の細胞に限局するのかについても未だ不明である。今般、心臓基礎研究領域において心筋細胞の heterogeneity が注目されており、D1R に着目した本研究においても、引き続きその機序の解明に努めていきたい。

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

(国立循環器病研究センター)

2022 年 9 月 (第 17 回研究発表会) で卒業させて頂

きましたので、以下、本報告書はこれまでの総括的な内容とさせていただきます。

私どもの研究室（採択当時：筑波大学・柳沢裕美研究室）では、大動脈瘤の自然発症マウスを用いて、大動脈瘤の形成メカニズムや薬理介入の分子標的を探索することを目的に研究を進めておりました。そこで、大動脈瘤形成の初期に、細胞骨格を制御する cofilin の脱リン酸化やそれを制御するフォスファターゼ Slingshot-1 の活性化を見出し、cofilin を介した血管リモデリングの抑制が大動脈瘤発生の抑止につながる可能性を見出しました (Yamashiro. *Sci. Signal.*, 2015)。次いで、横行動脈縮窄術 (TAC) 後の血管壁で高発現する分子として、Angiotensin-converting enzyme (ACE) や、細胞外マトリクス Thrombospondin-1 (Thbs1)、機械刺激応答性の転写因子 Early growth response 1 (Egr1) を同定し、これから血管壁のメカニカルストレス応答分子として定義しました。Thbs1 はマウスの大動脈瘤血管壁や、胸部大動脈瘤の臨床検体においても高発現することから、大動脈瘤形成にメカニカルストレス応答が寄与する可能性を見出しました。また、マウスにおける Thbs1 の欠損は、大動脈瘤の形成を完全に抑止できることを見出しました。これらの知見は、メカニカルストレスに応答する細胞外マトリクスの発見とその抑止が、病態形成の抑制に効果的であることを示しており、当該分野のトップジャーナルに掲載されました (Yamashiro. *Circ. Res.*, 2018)。

次の疑問は、Thbs1 がどのようにメカニカルストレス応答に関与するのか?ということでした。私どもは、ラット血管平滑筋細胞を用いて、細胞をシリコン製チャンバーに播種し、一軸方向に伸展 (ストレッチ) させることで血管壁のメカニカルストレス応答を模倣するシステムを構築しました。ストレッチ刺激に伴って Thbs1 は分泌され、integrin $\alpha v \beta 1$ に結合し細胞接着斑を活性化することを見つめました。また、低分子量 G タンパク質 Rap2 の不活性化とメカニカルストレス応答性の転写調節因子 YAP の核内移行を制御する知見を見出しました (Yamashiro. *PNAS.*, 2020)。さらに、Thbs1/YAP シグナル伝達経路は、血管圧負荷における血管壁のリモデリングや、血管狭窄時の新生内膜形成に重要な働きを示すことを報告しました。興味深いことに、YAP の核内移行は細胞内の Rap2 を制御するだけでも調整できるにも関

わらず、細胞外に Thbs1 を分泌し外から接着斑を制御するシステムが存在する、という事象を見つけたことです。これは、細胞外マトリクスを介した細胞機能制御という研究概念を創出するに至り、今現在に至るまでの研究基盤となる成果となりました。

大動脈瘤に関連する成果として、Thbs1 の発現が、細胞膜にあるプロテアーゼ活性化型受容体 PAR1 によって制御されていることを見出しました (Shin. *ATVB.*, 2020)。機械刺激応答性の転写因子 Egr 1 の欠損は大動脈瘤の発症を部分的に抑制すること、PAR1 が胸部大動脈瘤の臨床検体において高発現すること、伸展刺激に伴う MMP-9 の活性化が PAR1 を活性化すること、活性化した PAR1 が Egr1 や Thbs1 の発現亢進に関与することを明らかにしました。

直近の成果として、血管の内腔面を構成する血管内皮細胞が非上皮系の間葉細胞へと分化転換するプロセスである内皮間葉転換 (EndMT: Endothelial-to-Mesenchymal Transition) は、血管リモデリングにおいて重要な役割を担うことを報告しました。一般的な EndMT は、サイトカイン TGF- β (transforming growth factor-beta) の働きが活性化することで生じる不可逆的な変化だと解釈されていますが、可逆的な状態としての部分的内皮間葉転換 (partial EndMT) が治療介入点になりうる状態として注目され始めています。しかし、partial EndMT の分子メカニズムについては不明な点が多く、血管病態への関与も分かっていません。また、血管狭窄の原因となる新生内膜肥厚機構や、新生内膜形成時の血管リモデリング機構の詳細については、さまざまな報告がされており、統一された見解がないのが現状です。

まず、8 週齢のマウスに頸動脈結紮を施行し、血流を停止させ、結紮部より中枢側の狭窄進展部位の新生内膜形成による血管狭窄のプロセスを経時観察しました。狭窄初期の術後 1 週間では、血管内皮細胞に、間葉系細胞のマーカータンパク質である α -SMA と血管内皮細胞のマーカーである細胞接着分子 PECAM が共発現するとともに、血球細胞マーカーである CD45 が発現していました。狭窄が起き始める術後 2 ~ 3 週になると、新生内膜細胞に、 α -SMA と PECAM の両方が発現しました。また、結紮した頸動脈では、TGF- β の働きが活性化し

ていることから、EndMTが新生内膜の形成に寄与している可能性が示されました。次に、新生内膜細胞の起源と血管内皮細胞との関連性を精査するために、血管内皮細胞系譜解析システム（VE-Cadherin (*Cdh5*)-BAC-Cre^{E^{RT2}}-LSL-EGFP マウス）を用いて頸動脈結紮を行い、蛍光標識された血管内皮細胞が狭窄のプロセスでどこに局在するのかを解析しました。その結果、新生内膜細胞がEGFPで標識されることから、血管内皮細胞が新生内膜に寄与しており、血管狭窄の原因であることが強く示唆されました。

さらに、生体での血流停止、すなわち内皮細胞への低酸素状況による影響を調べるために、ヒト動脈内皮細胞を用いて低酸素状態を誘導すると、CD45発現を伴うEndMTが引き起こされることが分かりました。加えて、CD45の脱リン酸化酵素活性依存的に、細胞膜上の細胞接着分子 integrin $\alpha 11$ の発現誘導と、integrin $\beta 1$ 内因性阻害タンパク質である SHARPIN との複合体形成が促進されることで、血管内皮細胞同士の接着が維持され、partial EndMTの保持に重要な役割を担っていることを明らかにしました。血管内皮細胞特異的な *Hif1 α* 欠損マウスでは、新生内膜形成が抑制されることから、血管狭窄の発症に低酸素応答シグナルが関与していると考えられます。

これらの知見により、血管狭窄の原因となる新生内膜の形成に関わる細胞が、血管内皮細胞由来であることを明らかにし、EndMTが血管狭窄時の血管リモデリングに寄与することを示しました（Yamashiro. *Cardiovasc. Res.*, 2022）。

末筆となりましたが、長きに渡りご支援頂き、誠にありがとうございました。財団関係者の方々、VBICの運営に関わる先生方に厚く御礼申し上げます。

ラミン変異特発性拡張型心筋症の分子病理学的機序の解明

山田 臣太郎

（東京大学医学部附属病院 循環器内科）

【目的】

特発性拡張型心筋症（DCM）は進行性の心機能低下

と不整脈を来す予後不良の疾患である。DCM患者の中でラミン遺伝子（*LMNA*）変異を有する患者群は特に予後不良である。そこで、ラミン変異DCMの分子病理学的機序の解明を目的とした。

【方法・結果】

当院に通院するDCM患者より同定された*LMNA* Q353R変異をCRISPR/Cas9システムを用いてマウスに導入した。電子顕微鏡解析により、*Lmna*変異マウスでは心臓組織において核の異形およびサルコメア構造の異常を認めることを明らかにした。また、変異マウスはDCM患者と同様に心拡大を認め、胎生致死となった。

胎子マウスにおいて心臓組織のシングルセルRNA-seq解析を行ったところ、*Lmna*変異マウスにおいて成熟した心筋細胞集団が減少することが分かった。次に、シングルセルATAC-seq解析を行ったところ、それらの成熟心筋細胞集団の遺伝子発現は転写因子Teadファミリーの制御を受けるとことが分かった。これらのことより、*Lmna*変異マウスでは心筋細胞の成熟不良を認めるが、それは転写因子Teadファミリーの制御不全が関与していることが考えられた。TeadファミリーにはTead1-4までの転写因子が存在するが、Tead1の発現が心筋細胞において最も高く、表現型への影響が大きいと考え、Tead1に注目して以下の実験を行った。

患者由来のiPS細胞から、遺伝子変異を修正して心筋細胞に分化させた細胞株（コントロール株）および遺伝子変異を修正せずに心筋細胞に分化させた細胞株（変異株）を作成した。同細胞株において転写因子TEAD1のChIP-seq解析を行ったところ、コントロール株において認める心筋細胞成熟遺伝子群の近傍のピークの一部を変異株において認めないことが分かった。さらに、結合タンパク質のスクリーニングや免疫染色により、TEAD1は変異ラミントタンパクと強く結合し、核膜付近に局在することを明らかにした。これらのことより、ラミン変異心筋細胞においては、転写因子TEAD1が変異ラミントタンパクにトラップされ、機能不全となり、心筋細胞成熟遺伝子の発現を制御できず、心筋細胞が未熟な状態となると考えられた。さらに、YAP-TEAD活性促進剤である化合物TT-10を変異iPS由来心筋細胞株に投与したところ、病的な表現型の改善を一部認めた。

これらの結果は*Science Advances*誌に報告しました¹⁾。

【文献】

1) Yamada S, Ko T, Ito M, Sassa T, Nomura S, Okuma H, Sato M, Imasaki T, Kikkawa S, Zhang B, Yamada T, Seki Y, Fujita K, Katoh M, Kubota M, Hatsuse S, Katagiri M, Hayashi H, Hamano M, Takeda N, Morita H, Takada S, Toyoda M, Uchiyama M, Ikeuchi M, Toyooka K, Umezawa A, Yamanishi Y, Nitta R, Aburatani H, Komuro I. TEAD1 trapping by the Q353R-Lamin A/C causes dilated cardiomyopathy. *Sci Adv.* 2023 Apr 14;9(15):eade7047.

クローン性造血が心血管病に与える影響の解明

由良 義 充

(名古屋大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

高齢者に高頻度に確認されるクローン性造血という現象は、近年明らかになった心血管疾患の新規危険因子である。クローン性造血はがん治療を受けた患者にも高頻度に認められ、がん治療関連クローン性造血と呼ばれているが、心血管疾患に与える影響は不明であった。我々はがん治療関連クローン性造血に特徴的な DNA 損傷応答遺伝子 PPM1D に注目し、変異を有する免疫細胞が生体に与える影響について検討した。

【方法】

免疫細胞における PPM1D 変異が心臓血管病に与える影響を解析するために、レンチウイルスと CRISPR/Cas9 システムを用いて、Ppm1d クローン性造血モデルマウスを作成した。このマウスにアンジオテンシン II 負荷による心不全を発症させてその表現型を確認した。加えて、Ppm1d 変異を有するマクロファージ細胞株を作成し、その細胞機能を解析した。

【結果】

Ppm1d クローン性造血モデルマウスは、アンジオテンシン II 刺激に対してコントロール群と比較して高度のリモデリングを来した。Ppm1d 変異マクロファージを用いた細胞実験においては、DNA 損傷応答が抑制され、

NLRP3 インフラマソーム・炎症性サイトカインの過剰な活性化をきたしていることが確認された。変異免疫細胞における機能異常がマウスの心臓傷害につながることを示唆された。これらの知見を論文報告した。

【考察】

本研究により DNA 損傷応答遺伝子変異によるクローン性造血が、心臓機能障害を引き起こす可能性が示唆された。がん治療により増強するクローン性造血が、治療関連心血管合併症の発症に関わる可能性を示したことで、この病態の新たな治療に繋がる道が開かれた。今後は詳細なメカニズムの解明や他病態に与える影響について研究が期待される。

【文献】

Yura Y, Cochran J., Walsh K. Therapy-related clonal hematopoiesis: A new link between cancer and cardiovascular disease. *Heart Fail Clin.* 8(3):349-359. (2022)

Yura Y, Miura-Yura E, Katanasaka Y, et al. The cancer therapy-related clonal hematopoiesis driver gene Ppm1d promotes inflammation and non-ischemic heart failure in mice. *Circ Res.* 129(6):684-698. (2021)

分岐鎖ケト酸とその代謝酵素に着目した肥満症に対する新規治療薬の開発

吉田 尚 史

(Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School)

昨年までの研究により、褐色脂肪組織におけるマクロファージが、同組織の分岐鎖アミノ酸 / 分岐鎖ケト酸 (BCAA/BCKA) 代謝を制御し、肥満形成に強く関与している事を明らかとした¹⁾。そこで本年度以降は、褐色脂肪組織における BCAA/BCKA 利用がどのように制御されているのか、特に未だ未同定な BCKA のミトコンドリアトランスポーターの解明も含めて、その全容を明らかとする事とした。

【目的】

BCKA のミトコンドリアトランスポーターを解明する事。

【方法】

過去の報告²⁾から、BCKAのミトコンドリアトランスポーターとBCKAのミトコンドリア代謝酵素であるBranched Chain Amino Acid Transaminase 2 (BCAT2)が近接しているという仮説を立てた。そこで、ラット心筋細胞株H9c2を用いた近接依存性標識法により、BCAT2に近接しているタンパク/トランスポーターを同定し、トランスポーター候補を抽出した。近位依存性ピオチン化酵素としてTurboIDを用いた。

【結果】

プロテオミクスにより、H9c2のBCAT2に近接するタンパクが1200個同定された。そのうちペプチド数が5以上のタンパクは276個であった。この内、コントロール(empty vector)と比べてTurboID群で3倍以上検出されたタンパクは150個であった。

【考察】

今後は、この150個の中からトランスポータータンパクだけを抽出し、過去の文献とも見比べながら、BCKAのトランスポーター候補となり得るものを5つ程度選定する。その後候補タンパクをコードする遺伝子をノックアウト/ノックダウンしたH9c2細胞を作成し、BCKAの取り込みを評価する予定としている。

【文献】

- 1) Yoshida N, Yamashita T, Osone T, Hosooka T, Shinohara M, Kitahama S, Sasaki K, Sasaki D, Yoneshiro T, Suzuki T, Emoto T, Saito Y, Ozawa G, Hirota Y, Kitaura Y, Shimomura Y, Okamatsu-Ogura Y, Saito M, Kondo A, Kajimura S, Inagaki T, Ogawa W, Yamada T, Hirata KI.: Bacteroides spp. promotes BCAA catabolism in brown fat and inhibits obesity. *iScience*. 24(11); 103342 (2021).
- 2) S M Hutson, T R Hall.: Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain alpha-keto acid transport protein. *J Biol Chem*.268(5): 3084-91 (1993).

全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

サルコイドーシス患者における硝子体液を用いた網羅的miRNA解析による新規バイオマーカーの探索

朝 蔭 正 樹

(東京医科大学臨床医学系眼科学分野)

【目的】

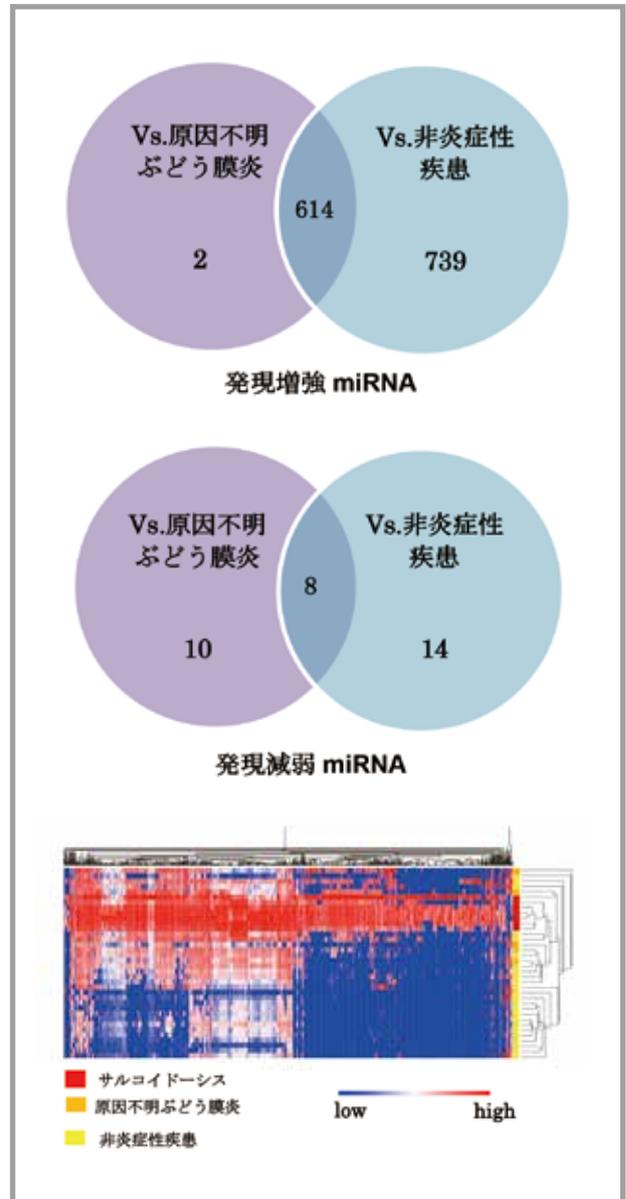
サルコイドーシスは全身に肉芽腫性病変を生じる疾患であり、眼科領域においてはぶどう膜炎の原因として最も頻度が高い。しかし、同様の肉芽腫病変を示しながら、全身の所見が無いためにサルコイドーシスの診断に至らない症例も少なくない。マイクロRNA (miRNA) はヒトでは既に2,600種類以上のmiRNAが同定され、多くの疾患でバイオマーカーとして注目されている。今回、サルコイドーシスに特異的なバイオマーカーを探索するために、硝子体中のmiRNAを解析したので報告する。

【方法】

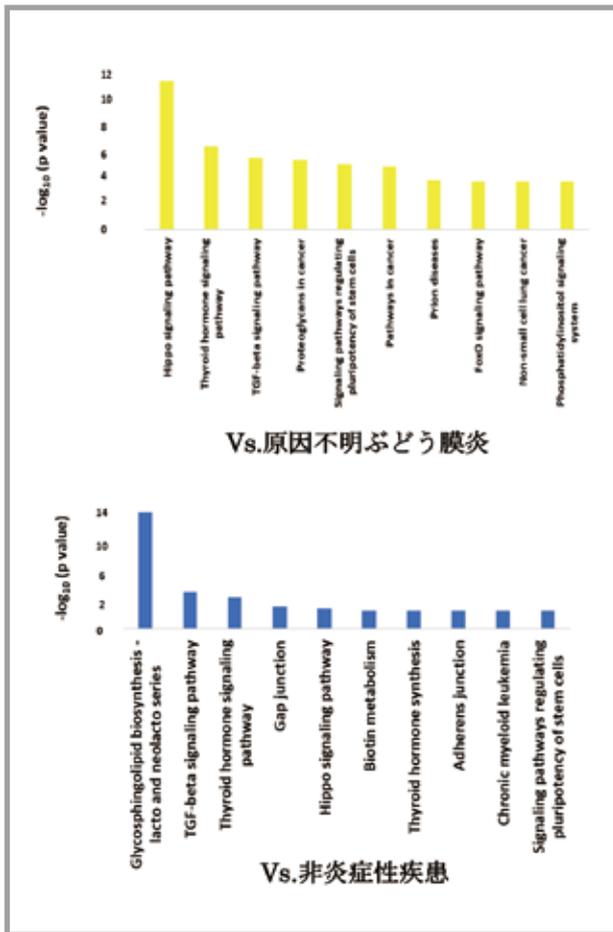
東京医大病院眼科を受診し、硝子体混濁を呈したサルコイドーシス患者7例を対象とした。硝子体手術の際に採取された硝子体からRNAを抽出し、マイクロアレイを用いてmiRNAの発現を網羅的に解析した。対照として非炎症性疾患24例、原因不明ぶどう膜炎5例の硝子体を用い、本症に特異的なmiRNAとパスウェイの同定を試みた。

【結果】

非炎症性疾患と比較した場合、サルコイドーシスでは1,353種類のmiRNAの発現が有意に上昇し、22種類のmiRNAの発現が有意に低下していた。原因不明ぶどう膜炎との比較では616種類の発現が有意に上昇し、18種類の発現が有意に低下していた。これらのmiRNAを用いたクラスター解析ではサルコイドーシスはクラスターを形成した。



また、発見減弱 miRNA を用いたパスウェイ解析ではいずれの疾患群との比較でも TGF-β などのパスウェイの関連が示唆された。



【結論】

硝子体液の miRNA を網羅的に解析することで、サルコイドーシスに特異的な miRNA を同定した。サルコイドーシスでは他の疾患と異なるプロファイルを示し、その発現の解析は診断マーカーになる可能性がある。

慢性腸管炎症により生じる腸管マクロファージの持続的エピジェネティック変化が免疫機能へ及ぼす影響についての検討

小栗 典明

(杏林大学消化器内科学)

【目的】

網羅的なエピゲノム解析によって炎症性腸疾患 (IBD) の発症, 病態, 予後に関連した DNA メチル化が報告されている。腸管マクロファージは IBD 病態において重要な役割を果たしていると考えられている。また, DNA メチル化などのエピジェネティック変化は細胞分裂後も継承される。我々は慢性炎症により腸管マクロファージに誘

導されたエピジェネティック変化が, 炎症寛解後も残存し, 腸管免疫機構が炎症性に傾くことが IBD 再燃に寄与するという仮説を立てた。そこで, 慢性炎症によって腸管マクロファージに生じるエピジェネティック変化を評価し, エピジェネティック変化の持続性および腸管マクロファージの機能に及ぼす影響を解析することを目的とした本研究を立案した。

【方法】

デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性慢性腸炎モデルマウスを用いた。慢性腸炎時における評価として比較①を実施するため, Group1 : DSS 誘導性慢性腸炎群, Group2 : Group1 の対照群を作成した。また炎症改善後について評価するため, 3 週間の回復期をおいた比較②を実施した。比較②のために Group3 : DSS 誘導性慢性腸炎改善後群, Group4 : Group3 の対照群を作成した。さらに, Group1 と Group3 により慢性腸炎後の回復期間で生じる変化を比較した (比較③) (図1)。

各 Group のマウス腸管から磁気ビーズ法を用いて腸管マクロファージとして CD11b 陽性細胞を回収し, ビーズアレイ法により DNA メチル化を評価した。

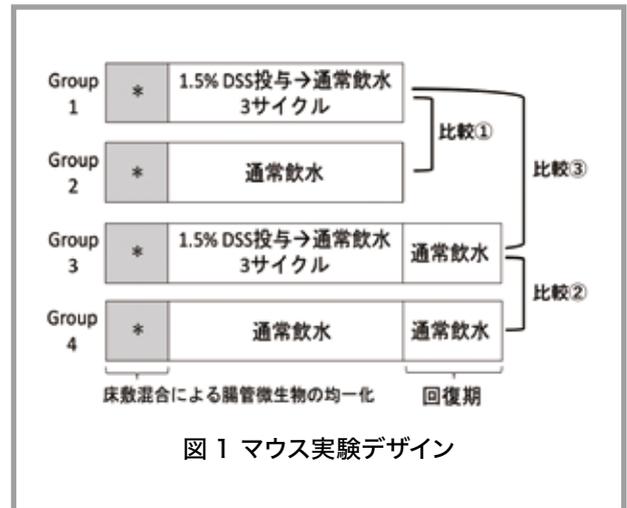


図1 マウス実験デザイン

【結果】

各 Group の DNA メチル化プロファイルを UMAP plot により示す (図2)。慢性腸炎を生じている Group1 とその対照群である Group2 の比較①において, DNA メチル化の構成は両群で異なった分布を示した。3 週間後の比較②において, 慢性腸炎改善後の Group3 の DNA メチル化は対照群である Group4 とは異なっていた。Group1 と Group3 のメチル化プロファイルは類似していた (比較③)。DNA メチル化遺伝子の個別解析では, 比較①で Group2 に生じた DNA メチル化変化の一部は Group4 でも持続を認めた。

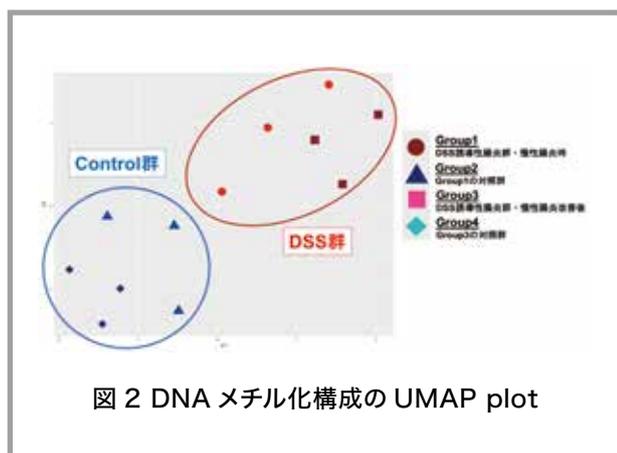


図 2 DNA メチル化構成の UMAP plot

【考察】

本研究において、慢性腸炎により腸管マクロファージの DNA メチル化に変化が生じ、慢性腸炎改善後も、健全な対照群と異なったまま炎症時のプロファイルに類似することが示唆された。今後、慢性炎症に伴って生じたエピジェネティック変化による腸管マクロファージの機能変化を評価するために、上記 Groups1-4 から得られた腸管マクロファージの炎症性刺激時のサイトカイン産生能を比較検討する予定である。

感染性腸炎後に誘発されるPI-IBSの病態に関わる自然免疫受容体シグナルの解明

古谷 聡 史

(島根大学医学部附属病院消化器内科)

【目的】

過敏性腸症候群 (IBS) は、器質的異常がないにも関わらず腹痛や排便異常を生じる症候群である。その IBS のなかで、重篤な腸炎回復後に生じる post-infectious IBS (PI-IBS) という病態が知られている。われわれは、大規模な食中毒患者の追跡調査で、Toll 様受容体 (TLR) -9 の SNPs が PI-IBS 発症に有意な相関を示した報告に着目し、「TLR9 シグナル異常と PI-IBS の病態の関連、さらに TLR9 pathway をターゲットとした治療が可能か」についてマウスモデルを用いて検討することを目的とした。

【方法】

マウス天然病原菌である *Citrobacter rodentium* (*C.rodentium*) を野生型 (WT), TLR2KO, TLR4KO, および TLR9KO マウスに経口投与して感染性腸炎を誘発

し、腸炎が自然完治する感染 6 週間後に、バロスタット法 (図 1) によって内臓知覚を定量評価した。

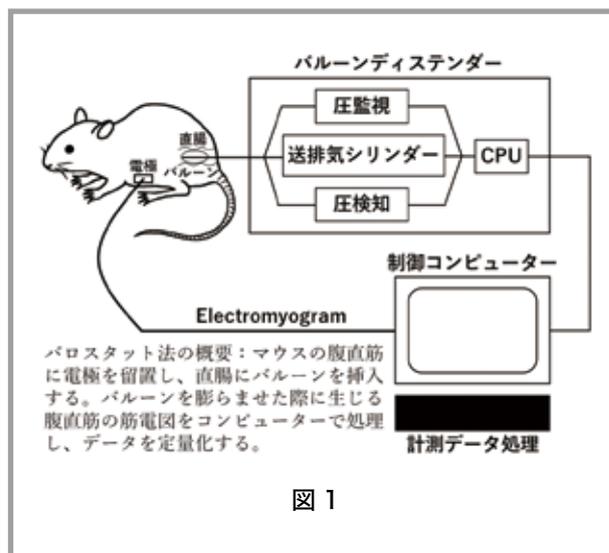


図 1

【結果】

C.rodentium 未感染状態では生じなかったが、TLR9KO マウスに感染させると、直腸内バルーン刺激に対する顕著な知覚過敏を認めた (図 2)。一方、WT, TLR2KO, TLR4KO マウスでは感染後においても知覚過敏は生じなかった (図 2)。この結果から、生来の TLR9 シグナル欠損と病原細菌感染の両者が内臓知覚過敏誘発に必要であると考えられた。次に、この現象に関わる腸管組織の遺伝子群を microarray 解析したところ、感染後 TLR9KO マウスでは WT マウスと比較して、疼痛を誘導するブラジキニン受容体の一つである BDKRB2 の発現量が有意に増加しており、内臓知覚過敏の一因と考えられた。そこで PI-IBS を発症した TLR9KO マウスに対して BDKRB2 選択的拮抗薬 (HOE140) を投与して IBS 症状緩和に効果があるか検討した。結果、バロスタット法の直前に HOE140 を腹腔内投与することによって、内臓知覚過敏は顕著に抑制された (図 3)。

【考察】

TLR9 シグナル欠損に腸管感染が加わることが PI-IBS 発症のトリガーになると考えられた。PI-IBS の病態に BDKRB2 の関与が示唆され、その拮抗薬は有効な治療法になる可能性があると考えられた。

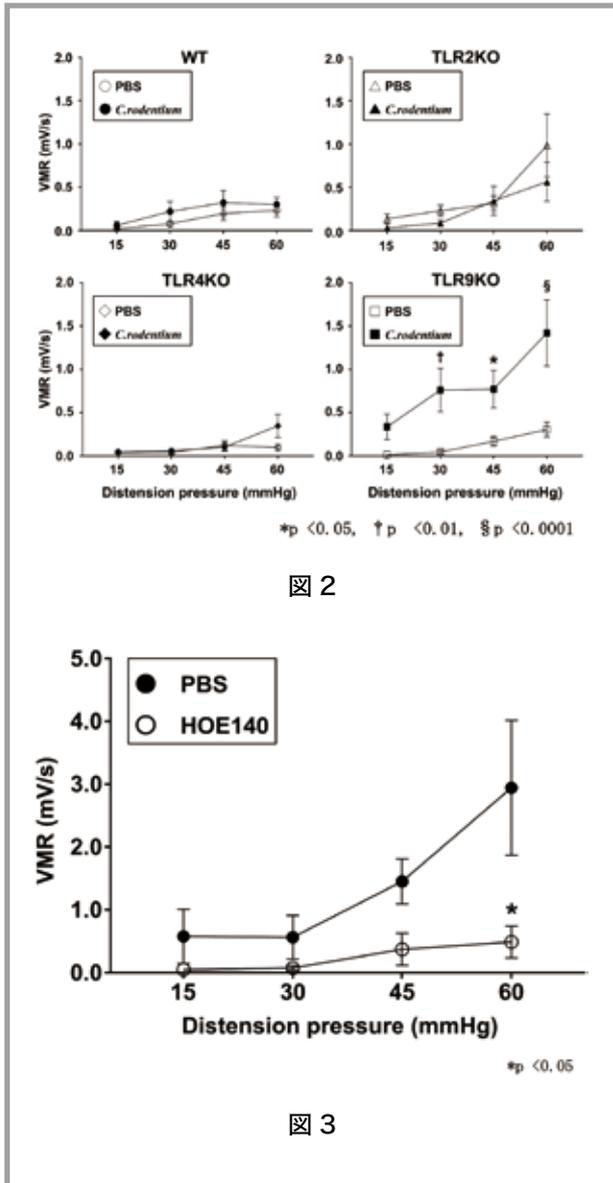


図 2

図 3

Farnesoid X receptor (FXR) アゴニストが炎症性腸疾患の大腸上皮に与える影響の解明

澁谷 尚希

(東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科)

【目的】

過脂質代謝と腸内細菌に密接な関わりがある胆汁酸は炎症性腸疾患 (IBD) の病態に関与していると考えられる。胆汁酸の受容体である Farnesoid X receptor (FXR) は IBD の大腸上皮にも発現しており、胆汁酸のうち FXR と親和性が最も高いケノデオキシコール酸 (CDCA) は IBD の大腸上皮機能に関与している可能性がある。しかし、その詳細については不明瞭な点が多い。本研究では、

FXR の内因性アゴニストである CDCA が IBD の大腸上皮機能に与える影響について検証する。

【方法】

IBD 患者における CDCA 代謝異常を確認するため、IBD 患者の便検体を用いて、液体クロマトグラフィ質量分析 (LC-MS) による CDCA の定量を行った。また、IBD 患者の便検体より抽出した DNA を用いて CDCA 代謝に関わる腸内細菌の 16SrRNA 予測メタゲノム解析を行った。続いて、大腸上皮細胞株である Caco2 細胞に CDCA を投与し Transendothelial electrical resistance (TEER) により大腸上皮透過性を評価した。

【結果】

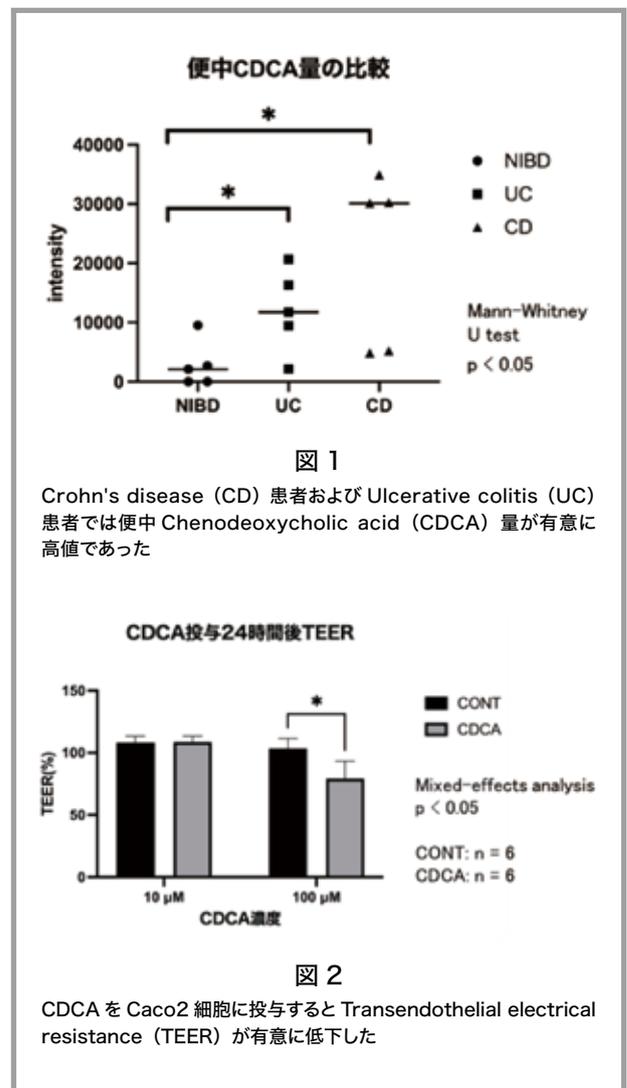


図 1

Crohn's disease (CD) 患者および Ulcerative colitis (UC) 患者では便中 Chenodeoxycholic acid (CDCA) 量が有意に高値であった

図 2

CDCA を Caco2 細胞に投与すると Transendothelial electrical resistance (TEER) が有意に低下した

IBD 患者では non-IBD (NIBD) 患者よりも有意に便中 CDCA 量が高かった (図 1)。また、IBD 患者では CDCA からリトコール酸に変換する腸内細菌の存在量が低下していた。続いて、Caco2 細胞に CDCA100μM を投与すると、24 時間後の TEER が有意に低下した (図 2)。

【考察】

本研究では、IBDの腸管内では内因性のFXRアゴニストであるCDCA量が増加し大腸上皮機能を障害することを示した。しかし、人工的に生成したFXRアゴニストであるobeticholic acidではIBDの上皮障害性を改善したとも報告されており¹⁾、CDCAの上皮障害作用がFXRを介したものであるのかその機序についてさらなる検証が必要と考えた。

【文献】

1) Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. Gut. 2011 Apr;60(4):463-72.

ユビキチン修飾系によるネクロプトーシス制御に立脚した炎症性腸疾患発症機構の解明

清水 康平

(大阪公立大学大学院医学研究科医化学)

【目的】

我々が新規LUBAC結合因子として同定したLAP1 (LUBAC associated protein 1) は、炎症シグナルに反応してLUBACに結合し、RIPK1に複合型ユビキチン(Ub)鎖を形成することで炎症誘導性細胞死であるネクロプトーシスを抑制していることが明らかになりつつある。そこで本研究では、LUBAC/LAP1による複合型Ub鎖形成を介したネクロプトーシス制御機構を詳細に解析し、ネクロプトーシスが病態形成に関与するとされる炎症性腸疾患 (IBD) との連関を究明することを目的とした。

【方法】

① LUBAC/LAP1によるRIPK1のUb化の意義の解析
質量分析によりLUBAC/LAP1が標的とするRIPK1のUb化部位を同定し、当該Ub化部位の点変異体(Δ Ub変異体)にて再構成したマウス胚性線維芽細胞(MEF)を樹立した。野生型MEFとΔ Ub変異体発現MEF(Δ Ub-MEF)にネクロプトーシスを誘導し感受性を比較した。

② *LAP1*欠損マウスのDSS誘導性潰瘍性大腸炎モデルの解析

8週齢の*LAP1*欠損マウス及び野生型対照群に自由飲水にて2.5%のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を投与し、1週間に渡り病態形成を観察した。その後、安楽死させ病理解析を実施した。

【結果】

① Δ Ub-MEFは野生型MEFに比べてネクロプトーシスに対する脆弱性を示した。また、*LAP1*欠損MEFと*LAP1*欠損Δ Ub-MEFではネクロプトーシスに対する感受性に有意な差が認められなかったことから、LUBAC/*LAP1*によるRIPK1のUb化はネクロプトーシスを抑制することが示唆された。

② *LAP1*欠損マウスでは下痢・血便スコアが有意に悪化するという結果が得られた。また大腸の病理組織学的解析を行ったところ、*LAP1*欠損マウスでは粘膜上皮の脱落が激しく、炎症細胞浸潤の増大も観察された。

【考察】

*LAP1*はLUBACと協調してRIPK1に複合型のUb鎖を形成することでネクロプトーシスを抑制していることが考えられた(図1)。また、*LAP1*欠損マウスはDSS誘導性潰瘍性大腸炎モデルに脆弱になることが確認できた。現在、この脆弱性がネクロプトーシスに依存しているかマウス遺伝学にて解析中である。

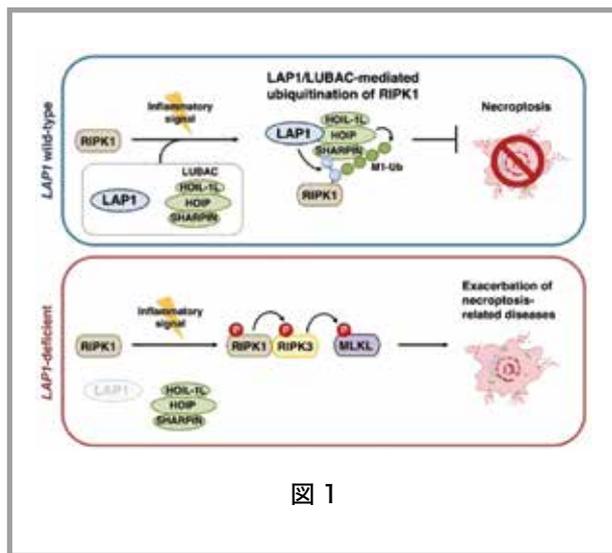


図 1

プラスミノゲン活性化阻害因子-1に着目した非感染性ぶどう膜炎治療効果の検討

鈴木佳代

(北海道大学大学院 医学研究院 眼科学教室)

【背景と目的】

非感染性ぶどう膜炎の治療には、主としてステロイド薬、免疫抑制薬や tumor necrosis factor 阻害薬などが用いられている。しかしながら、これらの治療薬でも重篤な視力障害に陥る症例がみられ、新薬の開発が今も強く望まれている。そこで新たな治療標的として、plasminogen activator inhibitor (PAI)-1に着目した。PAI-1は線溶系の生理的阻害因子の一つであるが、近年、PAI-1は活性化マクロファージの遊走に不可欠なタンパクとして機能していることが明らかとなり、炎症と線維化を呈する疾患の新たな治療標的分子として注目されている。そこで、本研究ではPAI-1の眼炎症病態への関与について検討することを目的とした。

【対象と方法】

特発性ぶどう膜炎患者16名（ぶどう膜炎群）、非炎症性眼疾患患者16名（対照群）を対象とし、硝子体手術時に採取された硝子体液中のPAI-1のタンパク濃度を測定した。実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）マウスを用いた検討では、免疫後、11、16、21日目のEAUマウスの網脈絡膜組織から、PAI-1のmRNA発現を測定し、対照群と比較した。EAUマウスに対するPAI-1阻害の効果を検討するため、PAI-1阻害剤もしくは溶媒のみ（対照群）を免疫の3日後から20日目まで連日投与した群を複製し、臨床的重症度を経時的（3-4日毎）に観察した。

【結果】

硝子体液中のPAI-1はぶどう膜炎群において対照群と比べ、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。EAUマウスを用いた検討では、免疫後16日目の網脈絡膜組織において、EAU群でPAI-1のmRNA発現が対照群と比べて有意に亢進していた ($p < 0.05$)。EAUマウスの臨床的重症度は、PAI-1阻害剤投与群では対照群と比較して、免疫後14、17、21日目で有意に低下した ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究では、ぶどう膜炎患者においてPAI-1の硝子体液中濃度が上昇していること、EAUの網脈絡膜組織においてPAI-1のmRNA発現が亢進していること、そしてPAI-1阻害によりEAUの臨床的重症度が低下することが示された。PAI-1はlow-density lipoprotein receptor-related proteinを介したマクロファージの遊走に關与すること (Ichimura, *et al.*, 2013; Park, *et al.*, 2020) や、toll like receptor-4を介してマクロファージを活性化すること (Gupta, *et al.*, 2016) が報告されており、これらの機序が炎症を軽減させた要因として考えられる。以上のことから、PAI-1がぶどう膜炎に対する新たな治療標的となる可能性が示された。

【文献】

Ichimura, A, Matsumoto, S, Suzuki, S, Dan, T, Yamaki, S, Sato, Y, et al. : A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 935-942 (2013).

Park, HJ, Chi, GY, Choi, YH, Park, SH. : Lupeol suppresses plasminogen activator inhibitor-1-mediated macrophage recruitment and attenuates M2 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*, 527, 889-895 (2020).

Gupta, KK, Xu, Z, Castellino, FJ, Ploplis, VA. : Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4. *Biochem Biophys Res Commun*, 477, 503-508 (2016).

多能性幹細胞由来浮遊腸オルガノイドによる炎症性腸疾患に対する再生医療基盤技術の開発

高橋純一

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科消化器病態学)

【目的】

近年の炎症性腸疾患の増加に伴い、あらゆる薬剤に抵抗性を示す難治例も増加している。そのような症例では高度炎症や狭窄、線維化により広範な腸管切除を余儀なく

され短腸症候群に陥る危険性を有する。短腸症候群の根本的治療である腸管移植は、生着率の低さやドナー不足から一般治療としては確立していない。多能性幹細胞由来の腸オルガノイド（HIO）は全層性の腸管構造が再現可能であり腸管再生医療への応用が期待されるが、従来の誘導法は培養効率の低さや不均質性、大型化が困難といった問題から、臨床応用に向けた課題が指摘されていた。本研究では腸管再生医療への実用化を見据え、均質なHIOの効率的な培養法の確立及びHIOの大型化を目指した。

【方法】

ヒトiPS細胞から誘導した中・後腸細胞を単一細胞化し、マイクロウェルを多数有する低接着プレート上に播種しスフェロイド化を試みた。スフェロイドの最適な浮遊培養の条件検討を行い、HIOへと分化誘導した。浮遊状態で誘導されたHIOを免疫不全マウスの腸間膜へ移植し、体内での組織構築を検討した。

【結果】

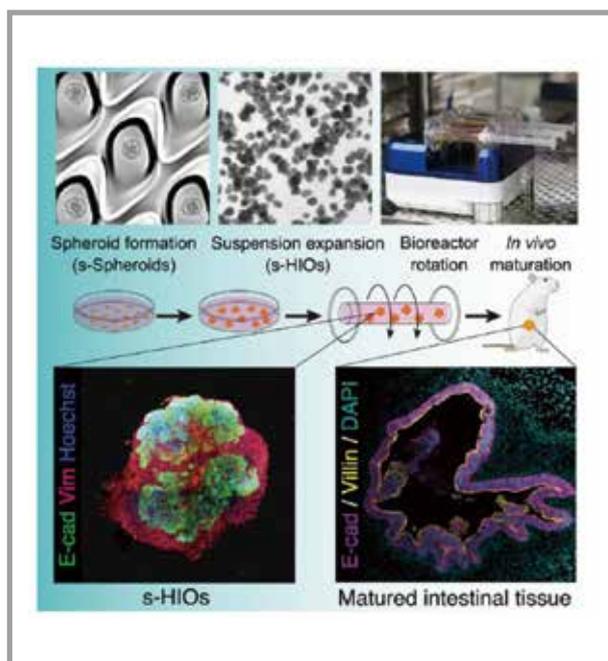
中・後腸細胞は速やかに凝集しスフェロイド(s-Spheroid)を形成した。s-Spheroidは腸前駆体としての性質を有し、形態や遺伝子発現において高い均一性を示した。マイクロウェル径や播種細胞数を調整することで、大型のs-Spheroidが作成可能であった。s-Spheroidは低濃度の細胞外基質を含有する培地での浮遊培養が可能であり、大型のs-Spheroidはバイオリクター内での回転浮遊培養で効率的に成熟したHIOへと分化した。浮遊状態で誘導したHIOはマウスへの移植を経て成熟した上皮、粘膜下層及び筋層を伴う腸組織を構築した。

【結語】

HIOの浮遊状態での培養法を樹立した。また回転浮遊培養を用いHIOの大型化に成功した。均質かつ安定的なHIO誘導が可能な本法は腸管再生医療の基盤技術としての応用が期待される。本研究成果は下記の通り学術誌¹⁾に報告した。

【文献】

1) Takahashi J, et al: Suspension Culture in a Rotating Bioreactor for Efficient Generation of Human Intestinal Organoids. Cell Reports Methods, Volume.2, Issue.11, 2022



全身性強皮症における新たな治療：抗フラクタルカイン抗体の実用に向けて

長谷川 巧

(福井大学医学部附属病院)

【目的】

全身性強皮症は免疫異常を背景に皮膚や内臓に線維化や血管病変をきたす膠原病であるが、その病態は明らかでない。また、ケモカインを標的としたヒトにおける抗体治療は確立されていない。強皮症患者の血清中ではフラクタルカイン（FKN：別名CX3CL1）が著明に上昇しており、そこでFKNを標的とした中和抗体を全身投与することで炎症および線維化を緩和できるのではないかと考え、検討することとした。

【方法】

放射線を照射したBALBc背景のマウスにD10B2背景のマウスの骨髄を移植し、GVHDによる全身の皮膚や肺の線維化を誘導し、これらを抗FKN抗体投与群、コントロールIg投与群、Syngeneicの3群に分けて効果を検討した。各群の間で皮膚硬化による脱毛の面積をスコア化し、皮膚、肺の線維化の程度を組織学的な検討、組織中のコラーゲン定量、筋線維芽細胞の数などから評価した。また免疫染色にて浸潤する炎症細胞の組織浸潤の評価を行った。

さらに組織中のサイトカインについて RNA シークエンスで網羅的に、そして ELISA 法を用いて蛋白レベルで測定した。

【結果】

GVHD 群では皮膚、肺ともに著明な線維化が誘導され、抗 FKN 抗体投与群で濃度依存性に抑制された。

免疫染色では皮膚、肺ともに GVHD 群でリンパ球やマクロファージの組織浸潤が多くみられたが、抗体投与により抑制された。さらに蛍光免疫染色では GVHD 群で、CX3CL1 の特異的レセプターである CX3CR1 陽性のリンパ球やマクロファージの組織浸潤が著明にみられたが、抗体投与により CX3CR1 陽性細胞の割合が低下した。皮膚と肺の組織抽出液において、皮膚では IL-4,6, TNF- α 、肺では TNF- α が GVHD で増加したが抗体投与により抑制された。皮膚の RNA シークエンスでは M1,2 マクロファージの指標となる iNOS と Arg1、炎症や線維化に重要な IL-6、炎症を抑制する IL-10、線維化に重要な TGF- β や Spp1、炎症性サイトカインである TNF- α 、CX3CR1 陽性 non-classical monocytes のマスター制御因子である Nr4a1 の遺伝子発現が GVHD により増加したが、抗体投与で抑制された。

【考察】

GVHD モデルにおいて、抗 FKN 抗体は CX3CR1 陽性単球マクロファージ、T 細胞の浸潤を抑制した。そしてそれらの細胞による炎症、線維化を引き起こすサイトカインの産生が抑制され、さらに線維芽細胞からの細胞外マトリックス産生が低下することで線維化が抑制されると考えられた。

腸管免疫の恒常性と破綻における IL-1R 経路の役割の解明

日 比 則 孝

(北里大学北里研究所病院)

【背景と目的】

腸管マクロファージ (M ϕ) は IL-10 を恒常的に産生することで、外来抗原に対する過剰な免疫応答を抑え、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまで腸管 M ϕ の恒常的な IL-10 産生が腸内細菌非依存的かつ MyD88 依存的であることを見出し、その経路として IL-1 β /IL-1R が関与している可能性を考えた。

興味深いことに *Il1r1* は腸管 M ϕ のみに発現し、他臓器の M ϕ には発現していないことから、腸管 M ϕ の特殊性を規定していると仮説を立てた。また、マウス M ϕ 由来細胞株を用いて IL-1R1 過剰発現株を作製し、IL-1 β 刺激を行ったところ IL-10 の発現および産生が観察された。本研究では IL-1R 拮抗薬の投与によってマウスの IL-10 が低下し IBD を発症するのか、マウス腸炎モデルが同様に増悪するのかについて検討する。さらにヒト IBD 患者において IL-1R の発現と IL-10 の産生について検討し、IBD の病態解明および治療の一助になることを目的とする。

【方法】

1) マウスへの IL-1R 拮抗薬投与

Recombination activating gene 2 knockout (Rag2KO) マウスに Isotype control および Anti-IL-1R1 抗体を腹腔内投与した。腸管から粘膜固有層単核細胞 (LPMC) を回収し、MACS で CD11b⁺ の腸管 M ϕ を分離し、*Il10* の発現を qPCR で評価した。

2) 腸炎モデルを用いた検討

DSS を経口投与した Rag2KO マウスに対して、上記と同様に抗体を投与し、腸管長にて炎症を評価した。

3) ヒト病理組織を用いた検討

IBD 患者と正常の大腸組織切片を用いて、CD68、IL-1R1 の蛍光二重免疫染色を行い、腸管 M ϕ に発現する IL-1R1 を検討した。

4) ヒト手術検体を用いた検討

IBD 患者の手術検体の炎症・非炎症部位および大腸癌患者の正常部位から LPMC を回収し、MACS にて CD3⁻、CD33⁺ の腸管 M ϕ を分離し、*IL1R1* および *IL10* の発現を検討した。

【結果】

Isotype control および Anti-IL-1R1 投与群では、腸管 M ϕ における *Il10* の発現に統計学的な差は認められなかった (図 1)。さらには DSS 投与腸炎モデルを用いた検討では、Anti-IL-1R1 抗体投与群で腸管長は短い統計的な差は認めなかった (図 2)。

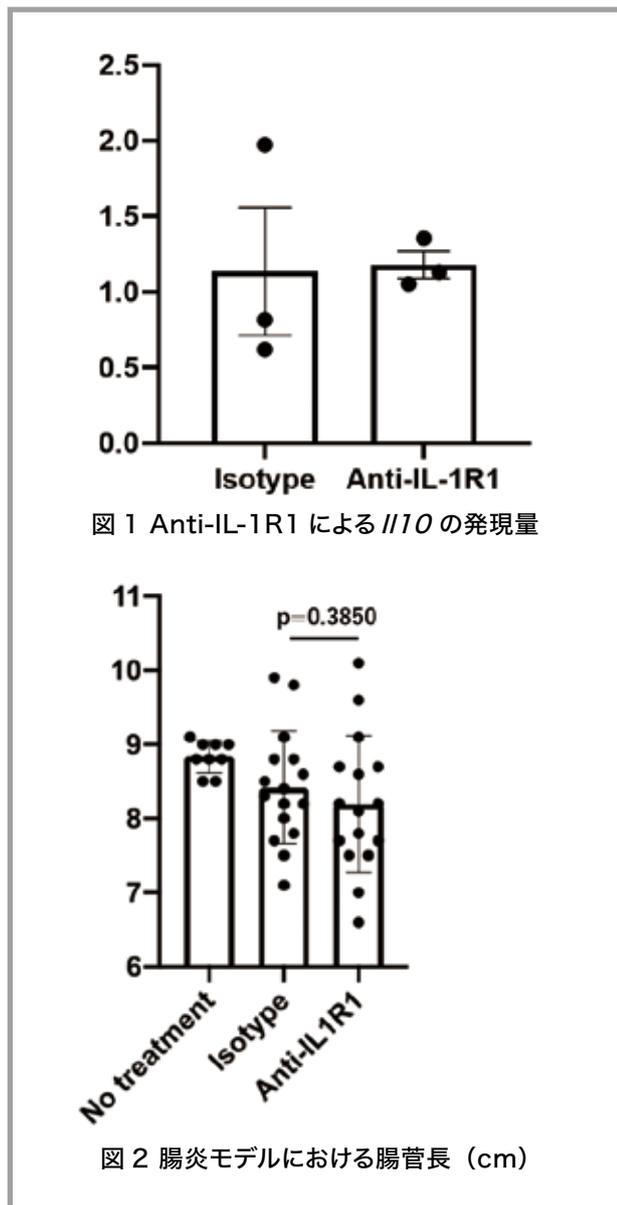


図 1 Anti-IL-1R1 による *IL10* の発現量

図 2 腸炎モデルにおける腸管長 (cm)

また、ヒト病理組織では腸管 M φ での IL-1R1 の発現は認められたものの陽性細胞の判断が難しく比較が困難であった。手術検体を用いた検討では *IL1R1* の発現に差は認めなかったが、クローン病 (CD) の非炎症部では *IL10* の発現が上昇する傾向がみられた (図 3, 4)。

【考察】

マウスを用いた Anti-IL-1R1 抗体投与で *IL10* の発現は抑制されなかった。また、腸管の炎症は改善しなかった。IL-1 β /IL-1R 経路以外の経路による代償的な IL-10 の活性化が影響している可能性が考えられた。病理組織では IL-1R1 の発現はみられたが、非特異的な蛍光のため比較が困難であり、さらなる条件検討は必要と考えられた。また、ヒト腸管 M φ では *IL1R1* の発現に差は認められていなかった。ただし、各検体でバラツキがあるため、患者背景や病理組織も含めた検討も必要と考えた。今後は

conditional knockout マウスによる IL-1R-KO マウスを作製し観察を行い、さらにはヒト IBD 患者のサンプル数を増やし検討を行う予定である。

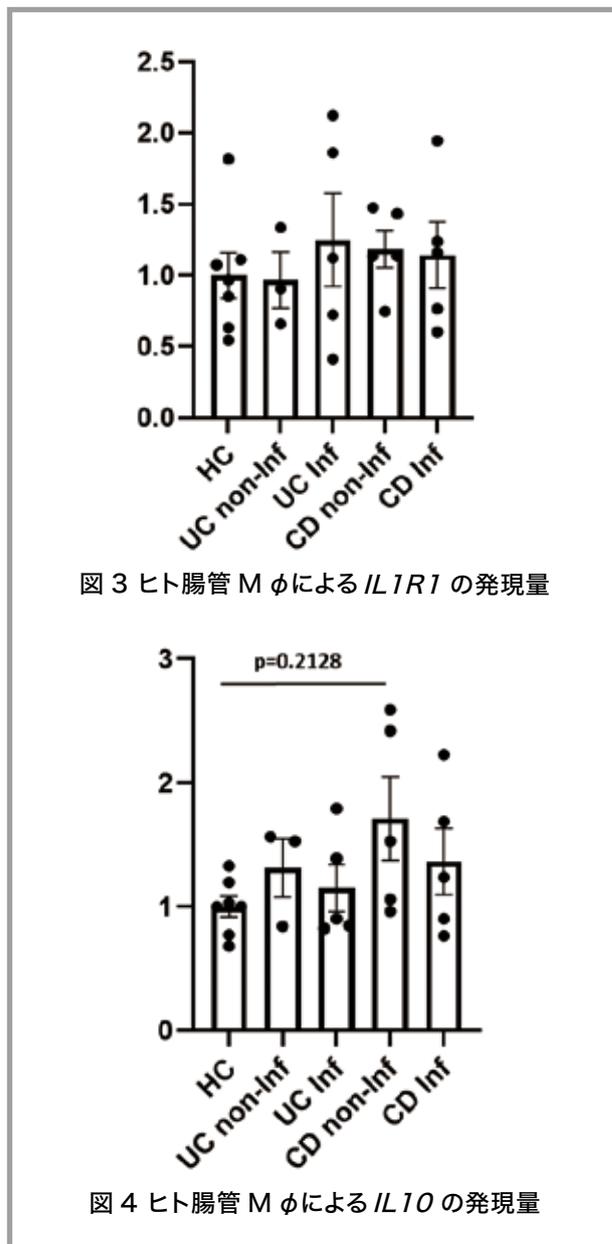


図 3 ヒト腸管 M φ による *IL1R1* の発現量

図 4 ヒト腸管 M φ による *IL10* の発現量

【文献】

- 1) Kobayashi T et al. IL-10 regulates *IL12b* expression via histone deacetylation: implications for intestinal macrophage homeostasis. *J Immunol*, 189(4), 1792-1799(2012).
- 2) Shubhra S et al. IL-1 α Mediates Innate and Acquired Resistance to Immunotherapy in Melanoma. *J Immunol*, 206(8), 1966-1975(2021).

イメージングサイトメトリーを利用した全身性強皮症でのB細胞形態異常に関する検討

松田和樹

(東京大学医学部附属病院皮膚科)

【目的】

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) の病態には B 細胞が大きく寄与することが分かっている¹⁾。しかし、患者の B 細胞の中で正常 B 細胞と病原性 B 細胞を明確に識別できる優れた表面マーカーは見つかっていない。本試験では、イメージングサイトメトリー技術の一つである ghost cytometry (GC) を用いて²⁾、細胞形態情報に基づいた正常 B 細胞と SSc 患者の異常 B 細胞の判別を試みた。

【方法】

健康人 (healthy control; HC), SSc 軽症患者 (SSc mild) および SSc 重症患者 (SSc heavy) の末梢血 (全血) を、10mL ずつ採血した。密度勾配遠心により末梢血単核球を単離後、untouched isolation により B 細胞を単離した。機械学習の教師用ラベルおよび細胞プロファイル解析のために細胞を免疫染色したのち、2ドナー由来の B 細胞を混合し、GC で測定を行った。異常 B 細胞を分類するための機械学習モデルのトレーニングを行う目的で、HC の B 細胞については、刺激あり / なしの条件で培養し、3日間の培養後にも GC で測定を行った。測定データを用いて、教師あり学習 (①②③)、および教師なし学習のアプローチ (④) で、SSc 患者の異常 B 細胞の分類を検討した (図 1)。

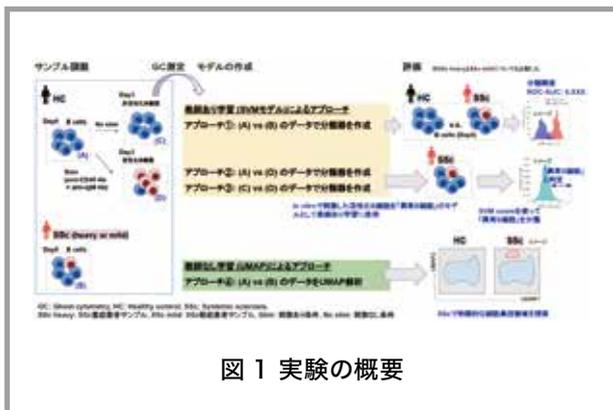


図 1 実験の概要

【結果】

全 B 細胞のデータを使用して「Day3 HC 刺激あり vs Day3 HC 刺激なし」の分類器を作成し、Day0 の各サンプルで評価したところ (アプローチ③)、教師あり学習モデルである support vector machine (SVM) スコアの陽性率が SSc heavy > SSc mild > HC の順となった (図 2)。SVM スコア陽性と判断された Day0 の各検体では、CD27/CD86 high の細胞が enrich されていたが、CD27/CD86 low の細胞も一定数含まれていた (図 3)。さらに教師なし学習によるアプローチとして、Day0 HC, Day0 SSc mild, Day0 SSc heavy, Day3 HC 刺激あり, Day3 HC 刺激なしの測定データを Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) により展開したところ (アプローチ④)、SVM スコアが高い B 細胞の局在が認められた (図 4)。

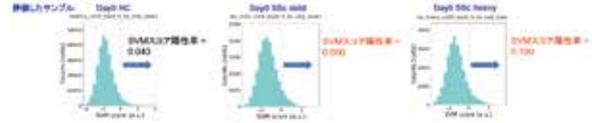


図 2 教師あり学習による異常 B 細胞の検出

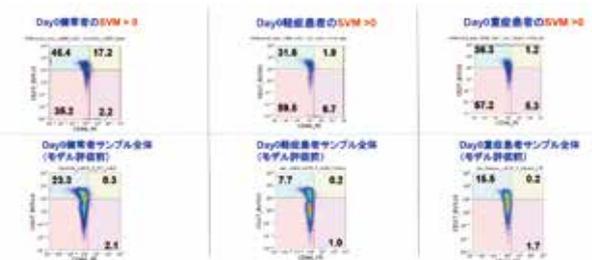


図 3 教師あり学習により異常 B 細胞と判定された細胞集団の marker profile

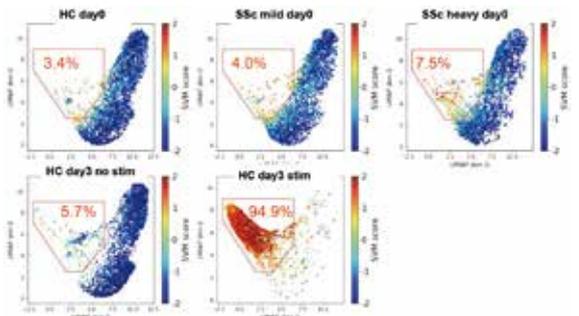


図 4 教師なし学習による異常 B 細胞集団の可視化

【考察】

細胞表面マーカーでは分類できない細胞サブセットの違いを GC が捉えている可能性が示唆された。GC により選別される異常 B 細胞の病態生理学的な意味を検討するには、セルソーティングにより異常 B 細胞を分取し、さらに解析する必要があると考えられた。

【文献】

- 1) Yoshizaki A. “Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis” *Immunol Lett.*, 2018, 195:76-82.
- 2) Ota S *et al.*, “Ghost cytometry” *Science.*, 2918, 360:1246-1251.

全身性強皮症の病態における Regnase-1 の関与

森 坂 広 行

大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教室
(現所属:大阪大学大学院医学系研究科 幹細胞遺伝子治療学共同研究講座)

【目的】

全身性強皮症は皮膚と内臓での線維化、血管障害を特徴とする自己免疫性疾患である。線維化は主に皮膚に起こり、皮膚硬化と血管障害による難治性皮膚潰瘍は重篤になることが多い。全身性強皮症の病態は未だ不明な点が多い。Regnase-1 は RNase 活性を持ち、IL-1 や IL-6 といったサイトカインあるいはケモカインなどの mRNA を分解することで炎症の制御に関わっている。我々はこれまでに、表皮における Regnase-1 が皮膚慢性炎症において抑制因子としての役割を持つことを報告した。皮膚における Regnase-1 が強皮症の病態に関連していることが予想される。本研究では、強皮症における Regnase-1 の関与を解明するために、線維芽細胞特異的 Regnase-1 KO マウス、Regnase-1 過剰発現マウスを用いて、プレオマイシン誘発強皮症モデルにおいて皮膚線維化について検討する。

【方法】

線維芽細胞特異的に Cre を発現するマウス (Coll1a2-CreER) と Regnase-1 flox マウスより線維芽細胞特異的に Regnase-1 を KO したマウスを作出する。Regnase-1 flox マウス、Regnase-1 過剰発現マウスは

作成元の審良研究室との共同研究により使用する。これらのマウスにプレオマイシンを背部皮下に 4 週間連日皮下注を行い、組織学的に皮膚の線維化や各種遺伝子発現量の検討を行う。

【結果と考察】

Regnase-1 過剰発現マウスは IL-6 の産生を抑える事が示されており、プレオマイシンによる線維化の抑制を期待して実験を開始した。しかし、背部皮膚に紅斑を自然発症することが判明し、組織学的にも野生型と比較して表皮肥厚と真皮へのリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤が見られることが明らかになった。背部皮膚から行った RNA sequencing では、野生型と比較して、ケラチン遺伝子群の有意な上昇が見られたが、病態に関与していると考えられるサイトカインやケモカインの遺伝子発現は有意差が見られなかった。今後再検討を予定している。線維芽細胞特異的 Regnase-1 KO マウスは現在作成中であり、作成でき次第プレオマイシン誘発強皮症モデルにて検討予定である。

ぶどう膜炎における眼局所と腸内細菌の関連についての検討

山 名 智 志

(九州大学大学院医学研究院眼科学)

【目的】

自己免疫性ぶどう膜炎は眼組織に発現する分子に対する炎症反応により、失明を起こしうる自己免疫性疾患である。申請者らは、メラノサイトを標的とする自己免疫性ぶどう膜炎である Vogt・小柳・原田病 (VKH) 患者の検体および実験的自己免疫性ぶどう膜炎マウスモデル (EAU) を用いた解析により、Mucosal associated invariant T (MAIT) 細胞の活性化が臨床症状の改善と視機能回復に関わることを明らかにした¹⁾。MAIT 細胞は、腸内細菌を含む細菌や真菌にのみ存在するビタミン B2 合成経路の中間体を認識する T 細胞サブセットである²⁾。そこで本研究では、自己免疫性ぶどう膜炎における MAIT 細胞の活性化機構を明らかにするため、腸内細菌の関与を検討することを目的とした。

【方法】

異なる抗菌スペクトラムを持つネオマイシン（グラム陰性細菌特異的抗生剤）、バンコマイシン（グラム陽性細菌特異的抗生剤）を用いてマウスの腸内細菌を除去後、実験的自己免疫性ぶどう膜炎（Experimental Autoimmune Uveitis : EAU）を誘導し、誘導後 7, 10, 14, 17, 21 日目に眼炎症の重症度を評価した。また、抗原認識に伴い GFP を高感度に発現する MAIT レポーター細胞を用いて、各種抗生剤を投与したマウスの腸管から採取した腸内細菌由来代謝産物による MAIT 細胞活性化能を評価した。

【結果】

ネオマイシン投与群では、抗生剤未投与群と比較し、EAU の臨床症状が増悪する傾向にあった。バンコマイシン投与群では抗生剤未投与群、ネオマイシン投与群と比較し、EAU 誘導後 14 日目、17 日目、21 日目で EAU の臨床症状が有意に軽減した。バンコマイシン投与群の腸内細菌由来代謝産物は、ネオマイシン投与群、抗生剤未投与群と比較し、MAIT 細胞活性化能が有意に高かった。

【考察】

本研究助成のサポートを受け、自己免疫性ぶどう膜炎においてグラム陰性細菌由来代謝産物が、MAIT 細胞の増殖・活性化を誘導し、病態改善に関わることを明らかにすることができた。今後、この発見を基盤として、さらに MAIT 細胞認識抗原の同定、MAIT 細胞の病態制御のメカニズムの解明を目指し研究を発展させていきたい。

【参考論文】

- 1) Yamana S, *et al.* Mucosal-associated invariant T cells have therapeutic potential against ocular autoimmunity. *Mucosal Immunol.* 15(2):351-361 (2022).
- 2) Corbett AJ, *et al.* T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature.* 509(7500):361-5 (2014).

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

高脂肪食負荷に対する全身代謝応答における骨格筋でのリジン脱メチル化酵素LSD1の役割

荒木 裕 貴

熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学講座
(熊本大学発生医学研究所 細胞医学分野)

【目的】

栄養は骨格筋の筋線維組成や代謝表現型に影響を及ぼす環境刺激の一つだが、その応答を制御するエピジェネティックな機構は十分に解明されていない。そこで、高脂肪食負荷時の骨格筋環境応答において、最近骨格筋において環境ストレス応答を緩和し過剰な環境適応を防ぐ役割が報告された¹⁾、LSD1 が果たす役割を明らかにする。また、LSD1 の補酵素である FAD 合成の元となるリボフラビンの投与が高脂肪食負荷時の骨格筋表現型に影響するか評価し、LSD1 を標的とした代謝疾患等の治療の可能性に関して検討する。

【方法】

7 週齢の野生型マウス及び骨格筋特異的 LSD1 KO マウス (LSD1-mKO マウス) に通常食及び高脂肪食を 17 週間負荷し、糖負荷試験 (GTT) やインスリン負荷試験 (ITT)、骨格筋や他の代謝臓器の重量測定、骨格筋の qRT-PCR 等を行なった。

また、食餌負荷後の 10-17 週に飲水中にリボフラビンを加え、同様の評価を行なった。

【結果】

高脂肪食を与えた野生型マウスでは通常食を与えたマウスと比較し、LSD1 発現が腓腹筋では上昇、ヒラメ筋では低下した。また、高脂肪食を負荷した mKO マウスは野生型と比較し、ヒラメ筋、肝臓重量の増加を認め、空腹時血糖値の有意な低下、GTT や ITT の改善傾向を認めた。しかし、ヒラメ筋の qRT-PCR では筋線維型、代謝遺伝子の有意な発現変化は認めなかった。

リボフラビンを与えた野生型高脂肪食群では、リボフラビン非投与群と比べ体重の有意な減少、前脛骨筋、腓

腹筋重量の増加、さらに空腹時血糖値の有意な低下及び GTT での血糖上昇の抑制傾向を認めた。一方、mKO マウスではリボフラビンによる体重や筋重量の有意な変化や空腹時血糖値の有意な改善は認めず、また GTT での血糖上昇の抑制は野生型と比較し減弱した。

【考察】

骨格筋の LSD1 欠損により骨格筋、肝臓重量、さらに糖代謝も変化したことから、高脂肪食に対する骨格筋での代謝応答の制御に LSD1 が関わる可能性が示唆された。

また、高脂肪食負荷時のリボフラビン投与による骨格筋重量変化、体重減少及び糖代謝の改善が LSD1-mKO マウスでは認められないことから、リボフラビンが骨格筋の LSD1 を介して代謝表現型を改善しうる可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Araki H, et al. LSD1 defines the fiber type-selective responsiveness to environmental stress in skeletal muscle. *eLife* 12: e84618, 2023.

膵β細胞におけるMEK/ERKシグナルの役割の解明とその治療応用

生島 芳子

(University/BHF Centre for Cardiovascular Science,
The University of Edinburgh)

【概要】

2021 年度より、骨髄脂肪に焦点を当てた新たな研究を展開している。カロリー制限 (Caloric restriction: CR) 下で認められる血中 Adiponectin の濃度上昇に骨髄脂肪から分泌される Adiponectin の増加が寄与していることから、現在は主に Adiponectin の CR 下での役割の検討を行っている。昨年度は、本プロジェクトに関連して、CR 下におけるエネルギー代謝の雌雄差について新たな知見を得ることができた。

【結果と考察】

以前に所属したポストドクにより、CR時に、雄マウスでは体脂肪率の低下と血糖値の改善が顕著に認められる一方で雌ではこの効果が低いことが確認されていたが、この分子的背景は明らかでなかった。

研究者らは、まず、皮下脂肪サンプルにおいて、脂肪分解 (lipolysis) に働く酵素 HSL のリン酸化が、雄でのみ CR 下で有意に亢進していることを見出した。

また、肝臓サンプル RNA-seq の GSEA 解析を行った結果、CR 下において、雄の肝臓では雌に比べて、酸化リン酸化、クエン酸回路関連遺伝子群の発現が有意に集積していることを見出した。加えて、CR 下の雄の肝臓では、通常食マウスの雄の肝臓に比べてもこれらの遺伝子群の発現が有意に集積していた。さらに、血中ケトン値測定の結果、特に CR 下では雄より雌で血中ケトン値が高いことが確認された。血中ケトン値は肝臓のアセチル CoA のバイオマーカーであり、肝臓アセチル CoA は糖新生を亢進させる作用がある。以上から、CR 下において、雄の肝臓ではアセチル CoA をクエン酸回路に利用する一方で、雌においては肝臓アセチル CoA が蓄積しこれが糖新生を促進するため、雌では CR 時の血糖値改善効果が雄に比べて低いという可能性が考えられた (Suchacki et al. *eLife*, 2023)。

【文献】

Suchacki KJ*, Thomas BJ*, Ikushima YM* et al. The effects of caloric restriction on adipose tissue and metabolic health are sex- and age-dependent. *eLife*. 2023 Apr 25;12:e88080.

グレリン受容体の内因性アンタゴニスト liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) の糖尿病と肥満における生理的役割の解析

イスラム エムディヌル

(宮崎大学 医学部 生体制御医学研究講座)

【目的】

肝臓や腸管に高発現する LEAP2 は、摂食亢進、血糖上昇、体温低下などのグレリン作用を抑制する。グレリンと LEAP2 は、摂食時・絶食時に反対の血行動態を示して、

食欲やエネルギー代謝を調節している。グレリンと LEAP2 の糖尿病や肥満の病態との関連を明らかにする目的で、LEAP2 とグレリンの発現と分泌調節機構を解析した。

【方法】

糖質あるいは脂質を経口負荷したマウスの血中と臓器の LEAP2 とグレリンを測定した。また、マウス初代培養肝細胞を、栄養素やサイトカイン、ホルモンで刺激し LEAP2 の発現量を調節する因子を同定した。

【結果】

マウスの肝静脈血の LEAP2 は門脈血より高く、経口糖負荷によりさらに上昇した。Corn oil やパルミチン酸を経口投与したマウスでも、同じように血中 LEAP2 濃度は上昇した (図 1)。LEAP2 は肝臓から分泌されていて、糖や脂肪の負荷がさらに LEAP2 分泌を刺激すると考えられた。マウスに、ブドウ糖あるいは corn oil を経口投与すると、3 時間あるいは 6 時間後に肝臓の LEAP2 発現量が増加した。初代培養肝細胞をブドウ糖あるいはパルミチン酸で刺激すると LEAP2 発現量が増加した。

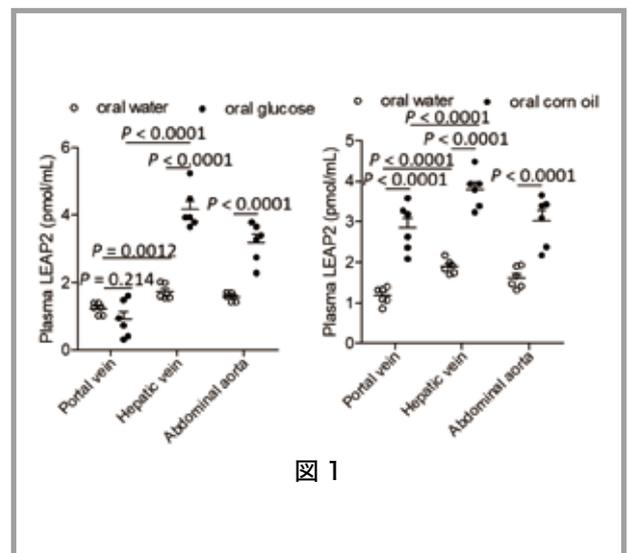


図 1

【考察】

肝臓が LEAP2 を分泌して血中 LEAP2 濃度を規定する責任臓器と考えられる。また糖や脂質などの栄養素は、肝臓からの LEAP2 分泌を刺激するとともに、肝臓での LEAP2 発現も刺激した。摂食時にはこのような LEAP2 の分泌と発現量の変化が食欲やエネルギー代謝を調節して、次の摂食に備える環境を整備している。しかし、長期間、過栄養が持続すると、LEAP2 高値から炎症の惹起やグレリン抵抗性を生じて、体重増加やインスリン抵抗性の一因となる可能性があり今後の検討課題としたい。

ユビキチン様修飾因子UFM1の膵β細胞における病態生理学的意義の解析

鶴澤博嗣

(順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌内科学講座 助教)

【目的】

ユビキチン様修飾因子 (UFM1) による翻訳後修飾であるUFMylationは、小胞体 (ER) ストレス応答やオートファジーとの関連が注目されている。一方で、その病態生理学的意義は未解明な点が多い。膵β細胞は大量のインスリン産生に伴う恒常的ストレスに晒されている細胞であり、特に2型糖尿病発症に先行すると考えられるインスリン抵抗性の増大によってインスリン分泌需要が増大することは、膵β細胞に対して過酷な負荷がかかることを意味する。従って、膵β細胞はそれらのストレスに対する応答システムを発達させており、細胞内恒常性維持のためのERストレス応答やオートファジー機構の重要性は我々も以前から指摘している。我々は、これらの恒常性維持機構の制御にUFMylationが関与していることに注目し、UFMylationは膵β細胞の恒常性維持にも重要な役割を果たすという仮説を提示するに至った。本研究ではこの仮説を検証するために、膵β細胞特異的UFM1欠損マウスを中心に解析を行い、膵β細胞においてUFMylationが持つ病態生理学的意義を解明することを目的とする。

【方法】

Ins1 制御下に Cre-ERT を発現する *Ins1*-Cre-ERT マウスおよび *Ufm1^{lox/lox}* マウスを交配し、タモキシフェン (TM) 誘導性に膵β細胞特異的 *Ufm1* 欠損が可能な *Ufm1^{lox/lox}:Ins1*-Cre-ERT (UFM1-βKO) マウスを作製した。これまでの検討により UFM1-βKO マウスでは耐糖能が悪化することが明らかになったため、本年はそれらの膵β細胞の組織学的検討を行なった。

【結果】

UFM1-βKO マウスでは対照群と比較してβ細胞容積が減少していることが明らかとなった。その理由として膵β細胞死や膵β細胞の分化転換が関与している可能性が考えられたため、これらを検討したところ、UFM1-βKO マウスでは TUNEL 陽性膵島の増加および、膵島内のグルカゴン陽性領域の増大を認めた。

【考察】

UFM1-βKO マウスの耐糖能悪化の背景として、UFMylation 不全によって膵β細胞死の増加とα細胞など他の膵内分泌細胞へ分化転換が生じている可能性が示唆された。これまでの電子顕微鏡観察により、UFM1-βKO マウス膵島では ER 形態異常を観察しており、UFMylation 不全によって ER ストレスが適切に処理できなくなった結果、これらの表現型を呈している可能性がある。今後は、その分子メカニズムの詳細を細胞生物学的手法により明らかにしていきたい。

副腎由来ホルモンの多様性に基いた糖尿病および慢性合併症進展機構の解明

馬越真希

(九州大学大学院医学研究院病態制御内科学分野)

主要な内分泌臓器である副腎は、内外のストレスにตอบสนองしてホルモンを分泌し、生体の恒常性を維持している。副腎は3層構造を呈する皮質と髄質より構成され、皮質では層特異的にステロイドホルモン (ミネラルコルチコイド、グルコルチコイド、副腎アンドロゲン) が産生され、髄質ではカテコールアミンが産生される。ホルモン過剰状態では、ストレス応答性が破綻し、糖尿病などの様々な加齢性疾患を引き起こす。我々は既に、「副腎由来ホルモン過剰モデル」である副腎腫瘍患者での検討より、代表的なグルコルチコイドであるコルチゾール過剰に加えて、アルドステロン過剰や副腎アンドロゲンが加齢性疾患と関連することを報告した^{1,2)}。更に、生理的条件下での血中コルチゾール濃度の高値は、高血糖を介してサルコペニアの進展に影響することを明らかにした³⁾。一方、近年、ステロイドホルモンのみならず、その代謝産物が代謝疾患の発症・進展に関連することが示唆されている。今年度は、LC/MS/MS法を用いたステロイドミクス解析により、副腎腫瘍患者を対象として、副腎由来ステロイド代謝産物と代謝疾患との関連を検討した。その結果、特に閉経前女性のコルチゾール産生副腎腫瘍患者では、特徴的なステロイドプロファイルを呈しており、副腎腫瘍はグルコルチコイドに加えてミネラルコルチコイド代謝産物 (11-デオキシコルチコステロン) を産生し、これは骨量低下に関与

すること、グルココルチコイド過剰は付随副腎を萎縮させて副腎アンドロゲン産生は抑制し、これは骨質劣化に関与することが示唆された。一方、女性の主要なアンドロゲンである副腎アンドロゲンは、標的組織で活性型に変換されて非活性化されるため、活性型アンドロゲンの主要な不活性代謝産物であるアンドロステロン・グルクロニドは標的組織での副腎アンドロゲン作用を反映する指標となると考えられた⁴⁾。今後は血糖関連指標との関連を検討し、健常者における検証を実施する。

【文献】

(* , equally contributed; # , [corresponding author](#))

- 1) [Yokomoto-Umakoshi M](#), Sakamoto R, Umakoshi H#, Matsuda Y, Nagata H, Fukumoto T, Ogata M, and Ogawa Y#; Q-AND-A study group. Unilateral primary aldosteronism as an independent risk factor for vertebral fracture. *Clin. Endocrinol.* 92 (3) :206-213, 2020.
- 2) [Yokomoto-Umakoshi M](#)#, Umakoshi H, Iwahashi N, Matsuda Y, Kaneko H, Ogata M, Fukumoto T, Terada E, Nakano Y, Sakamoto R, and Ogawa Y#. Protective role of DHEAS in age-related changes in bone mass and fracture risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 106(11): e4580-e4592, 2021.
- 3) Katsuhara S, [Yokomoto-Umakoshi M](#)#, Umakoshi H, Matsuda Y, Iwahashi N, Kaneko H, Ogata M, Fukumoto T, Terada E, Sakamoto R, and Ogawa Y#. Impact of cortisol on muscle strength and mass: A Mendelian randomization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107(4): e1477-e1487, 2022.
- 4) Nakao H*, [Yokomoto-Umakoshi M](#)*#, Nakatani K*, Umakoshi H, Ogata M, Fukumoto T, Kaneko H, Iwahashi N, Fujita M, Ogasawara T, Matsuda Y, Sakamoto R, Izumi Y, Bamba T, Ogawa Y#. Adrenal steroid metabolites and bone status in patients with adrenal incidentalomas and hypercortisolism. *eBioMedicine.* 2023, in press.

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 内科学講座 糖尿病内分泌・腎臓内科)

【目的】

糖尿病や肥満の世界的な急増は克服すべき重要な臨床課題である。それらの疾患では高血糖やインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症により、全身の血管の内皮機能障害から様々な臓器障害が惹起される。O-GlcNAc 修飾は、全身の血管障害により引き起こされる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。しかし、内皮細胞におけるO-GlcNAc 化の役割、特に肥満と内皮細胞との関係については未だ不明である。そこで、血管内皮細胞におけるO-GlcNAc 修飾の生理学的役割と、糖尿病及び肥満状態における病態生理に与える影響に関して検討する。

【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*-flox マウスとの交配を行い、タモキシフェンを腹腔内投与し血管内皮細胞特異的 *Ogt* 欠損 (*Ogt*-ECKO) マウスを作製した。通常食モデル、高脂肪食摂餌による肥満モデルを作製し、その表現型を解析した。

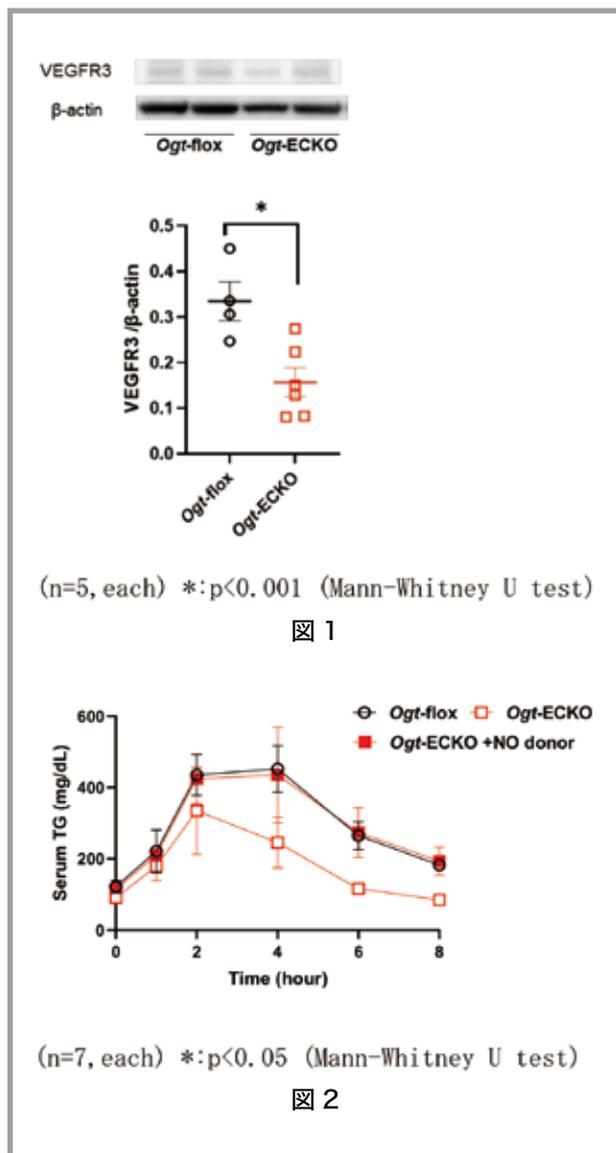
【結果】

通常食モデルにおいて、*Ogt*-ECKO マウスは対照マウスと比較し体重増加の抑制を認めたが空腹時血糖や耐糖能、インスリン感受性などに有意な差を認めなかった。高脂肪食モデルにおいて、*Ogt*-ECKO マウスでは体重増加が顕著に抑制され、白色及び褐色脂肪組織の肥大化が抑制されていた。基礎代謝は両群に差を認めなかった。経口での脂質投与では血中 triglyceride (TG) 増加が有意に低下していたが経静脈での脂質投与では差がなく、*Ogt*-ECKO マウスの便中 TG が有意に増加していたことから、*Ogt*-ECKO マウスでは腸管からの脂質吸収が低下することが示された。走査電子顕微鏡 (TEM) で腸管を観察したところ、小腸絨毛リンパ管内皮細胞間結合が *Ogt*-ECKO マウスにおいて強固な zipper type へ変化していた。そのため摂取した脂質がリンパ管内へ移行

できず排泄され、高脂肪食による肥満に抵抗性を示すと考えた。リンパ管の透過性の調節には VEGFR の関与が報告されており、*Ogt*-ECKO マウス内皮細胞の VEGFR3 の発現が低下していた (図 1)。VEGFR3 の下流に NO 産生系があるため血清 NO 濃度を測定したところ、*Ogt*-ECKO マウスで有意に血清 NO 濃度が低下していた。NO donor (DETA NONOate) を投与し血清 NO 濃度を増加させたところ、低下していた腸管からの TG 吸収が control 群と同等まで改善した (図 2)。TEM で観察すると zippering していたリンパ管内皮細胞間結合が開大し、カイロミクロンのリンパ管内への移動が確認できた。

【考察】

Ogt-ECKO マウスは絨毛リンパ管内皮細胞間結合が変化することにより腸管からの脂質吸収が抑制され、高脂肪食による肥満に抵抗性を示す。脂質吸収抑制は体内 NO 濃度の増加によりキャンセルされることも示された。



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 内分泌・糖尿病内科学)

【目的】

細胞外弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 (Fbln5) を介した糖代謝およびエネルギー代謝の制御機構を解明する。

【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) および野生型マウス (WT) における通常食 / 高脂肪食負荷における代謝表現型の解析により、Fbln5 欠損による体重非依存性のインスリン感受性の亢進、体重増加の抑制、高脂肪食誘導性の肥満・肝脂肪蓄積・脂肪細胞肥大化の抑制を認めた。グルコースクランプを用いた解析では Fbln5 欠損による全身のインスリン感受性亢進が示唆された。Fbln5KO では弛緩性皮膚を認めるが、同時に皮脂腺の萎縮を認め、寒冷刺激に対する体温低下が顕著であった。一方で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亢進しており、代償性変化と考えられた。通常食下で Fbln5KO の酸素消費量は WT と同等であったが活動量は顕著に低下していた。30°C 飼育環境下でも検証したが、Fbln5KO では体重増加が抑制され、インスリン感受性の亢進は残存した。

弾性線維は血管にも豊富に発現することから、Fbln5KO における血管を介したインスリンの組織移行性への影響についても検証した。下大静脈からの標識インスリン投与後の肝臓におけるインスリン取り込みは Fbln5KO で亢進した。Fbln5 欠損によるインスリン感受性亢進の責任臓器を同定するため、Fbln5-floxed マウスを用いてこれまでに肝細胞特異的 Fbln5KO、脂肪細胞特異的 Fbln5KO、皮膚 (表皮) 特異的 Fbln5KO、血管平滑筋特異的 Fbln5KO、血管内皮特異的 Fbln5KO、骨格筋特異的 Fbln5KO、血管内皮 / 血管平滑筋両特異的 Fbln5 欠損マウスを樹立したが、いずれにおいてもインスリン感受性や体重はコントロールマウスと同等であった。

【考察】

弾性線維関連蛋白 Fbln5 による、皮膚を介したエネルギー代謝制御や血管を介したインスリン移行性の制御の

存在が示唆され、Fbln5 欠損によるインスリン感受性亢進や体重変化は臓器連関や組織周辺環境、細胞外-細胞内作用を介した間接作用である可能性が示唆された。

血管内皮PDK1の病態生理学的役割の解明

小畑 淳 史

医療法人仁聖会 小畑醫院 内科
(川崎医科大学 特任研究員)

【背景】

我々は血管内皮特異的に PDK1 を欠損させることで、生理的または高脂肪食負荷条件下では、主に脂肪組織における血管新生が抑制され、脂肪の縮小に伴うアディポカイン発現の改善に伴い、全身でのインスリン抵抗性が改善することを明らかにした。一方で、血管内皮特異的に PDK1 を欠損させることで、膵β細胞における血流が低下し、血管内皮構造の構築の乱れを生じ、膵β細胞機能が低下することを明らかにした。これらの研究は主に生理的条件または高脂肪食負荷下での表現型であり、高血糖状態での血管内皮 PDK1 が果たす役割は明らかにされていない。また、これまで「恒常的に発現している」とされていた PDK1 は、ヒト大動脈血管内皮では肥満に相関して発現が低下していることも明らかにしている。

【目的】

高血糖状態における血管内皮 PDK1 の役割を解明すること、及び血管内皮における PDK1 の発現制御のメカニズムを明らかにする。

【方法】

血管内皮特異的 PDK1 欠損マウスを用いて、STZ で高血糖を誘発し、全身の糖代謝に及ぼす影響を解明すること、及び様々なモデルを用いて血管内皮 PDK1 の発現がどのように制御されているかを明らかにする。

【結果】

STZ によって高血糖を誘発すると、血管内皮特異的 PDK1 マウスではインスリン抵抗性が惹起された。また Akt のリン酸化を評価したところ、その主たる臓器は骨格筋であることが明らかになった。骨格筋における vascularity は PDK1 欠損マウスで有意に低下しており、TUNEL assay でも有意に血管内皮の apoptosis の亢進が確認された。In vitro でもヒト臍帯動脈血管内

皮細胞を用いて PDK1 をノックダウンすると cleaved caspase3 の発現が有意に増加し、血管増殖に重要な役割を果たす VEGFR2 の発現は有意に低下していた。電子顕微鏡による評価では、骨格筋のミトコンドリア構造の乱れや脂肪の蓄積が確認された。以上から血管内皮特異的 PDK1 欠損マウスは STZ 誘導性高血糖下では骨格筋の vascularity を低下し、さらには mitochondria biogenesis を低下することで骨格筋においてインスリン抵抗性を惹起することが明らかになった。血管内皮 PDK1 の発現については db/db マウス及び高脂肪食負荷 C57BL/6J マウスにおいては有意に発現が低下しており、一方で STZ 誘導高血糖モデルでは有意に発現が増加していた。

【結論】

血管内皮 PDK1 欠損は STZ 誘導性高血糖下では骨格筋でのインスリン抵抗性が惹起される。また、様々な条件により血管内皮 PDK1 の発現は「恒常的ではない」ことが明らかになった。

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第一内科)

【目的】

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・進展に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。肥満者は世界的に増加傾向であり、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序が解明できれば社会的な貢献は大きいものと考えられる。血管新生や免疫抑制を介して癌細胞の増殖や転移に寄与するマクロファージが存在する (Cell.141:39-51,2010.)。乳癌、肺癌、メラノーマ等の数種類の癌においてマクロファージの浸潤が高度であるほど予後が悪いことが知られ、マクロファージを標的とした癌治療が有望である可能性が指摘されている。マクロファージは細胞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。本研究の目的は 1) CD206+M2 マクロファージが癌発症・進展を促進していないか、2) 肥満による CD206+M2 マクロファージの表現型や細胞数の変化が、癌の発症・進展を促進していないかを解明することである。

【方法】

乳癌を発症する遺伝子改変マウスを高脂肪食群と通常食群に分けて、腫瘍の発生時期や、重量、体積、数を測定。摘出した腫瘍を FACS, MACS, IHC, qPCR などを用いて解析した。独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 マクロファージの数を減らした際の癌の発症・進展への影響を評価した（腫瘍の発生時期、腫瘍重量、腫瘍体積）。摘出した腫瘍について組織学的評価、遺伝子発現解析、FACS などを行った。

【結果】

高脂肪食負荷で腫瘍の発生が早まり、腫瘍の重量・体積・数が増加した。PD-1+CD8+T 細胞の遺伝子発現を解析すると PD-1-CD8+T 細胞と比較して Opn を高発現し、細胞障害性の指標となる Ifng, Gzmb は低発現であった。免疫組織化学でも PD-1+ 細胞が OPN を高発現していた。独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制された。摘出した腫瘍について組織学的評価、遺伝子発現解析 (qPCR, RNA seq), FACS などを行い、CD206+M2 マクロファージの減少による癌周囲微小環境の変化について確認した。

【考察】

高脂肪食による肥満で細胞障害性が低く、OPN を発現し癌細胞増加促進作用をもつ PD-1+CD8+T 細胞が腫瘍内で増加した。肥満による CD8+T 細胞の疲弊の加速が癌発症・進展促進と関連することが示唆された。また、CD206+M2 マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制されることが明確となった。今後、その機序の解明を進めると同時に臨床応用を目指した基礎研究を行う予定である。

1) Nawaz A, Bilal M, Fujisaka S, Kado T, Aslam MR, Ahmed S, Okabe K, Igarashi Y, Watanabe Y, Kuwano T, Tsuneyama K, Nishimura A,

Nishida Y, Yamamoto S, Sasahara M, Imura J, Mori H, Matzuk MM, Kudo F, Manabe I, Uezumi A, Nakagawa T, Oishi Y, Tobe K. Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. Nat Commun. 21;13(1):7058. 2022.

2) Nawaz A, Nishida Y, Takikawa A, Fujisaka S, Kado T, Aminuddin A, Bilal M, Jeelani I, Aslam MR, Nishimura A, Kuwano T, Watanabe Y, Igarashi Y, Okabe K, Ahmed S, Manzoor A, Usui I, Yagi K, Nakagawa T, Tobe K. Astaxanthin, a Marine Carotenoid, Maintains the Tolerance and Integrity of Adipose Tissue and Contributes to Its Healthy Functions. Nutrients. 6;13(12):4374. 2021.

3) Bilal M, Nawaz A, Kado T, Aslam MR, Igarashi Y, Nishimura A, Watanabe Y, Kuwano T, Liu J, Miwa H, Era T, Ikuta K, Imura J, Yagi K, Nakagawa T, Fujisaka S, Tobe K. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. Mol Metab. 23:101328,2021.

グルコース応答性高分子ゲルを用いた自律型インスリン投与デバイスの開発

木村 真一郎

(名古屋大学環境医学研究所分子代謝医学分野)

【目的】

インスリン療法は糖尿病治療の根幹を成すが、QOL を損なう上、低血糖の危険を有する。また近年では、平均血糖の高値に加えて、血糖変動が糖尿病血管合併症のリスクになることが報告されている。そのため、血糖応答性にインスリンを放出する人工膵臓様デバイスの開発が求められている。そこで我々は、グルコース濃度に応答して物理的性質が劇的に変化するフェニルボロン酸を含む高分子ゲル（ゲル）を利用して、エレクトロニクスフリーで操作が簡便な、人工膵臓様デバイスを開発した。本研究で

は、デバイスの効果と安全性を評価するとともに、臨床応用の可能性について検討した。

【方法・結果】

既に我々は、ゲルとシリコンカテーテルを融合させて、マウスを用いた機能実証に成功した。今回、臨床応用を見据え、インスリン放出の有効表面積を拡大するために、血液透析用中空糸を融合した次世代型デバイスを開発した。マウスの10倍の体重を有するラットの皮下にデバイスを留置したところ、血糖依存的なインスリン放出と血糖低下作用および、良好な生体適合性を認めた。また、1型糖尿病モデルを用いた検討では、平均血糖の低下のみならず、夜間活動期の血糖上昇がデバイス留置群で有意に抑制され、血糖日内変動が改善された。さらに我々は、ブタを用いて検討を行い、1型糖尿病ブタにラット用のデバイスを8個挿入することで、血糖依存的なインスリン放出と、血糖低下を認め、臨床応用に向けては更なるスケールアップの必要性和、侵襲性の改善が必要と考え、マイクロニードル技術を応用することを着想した。マウスやブタに装着し、血糖依存性のインスリン放出を確認しているが、臨床応用に向けては、皮膚への刺入性および機能の持続性について改善が必要であり、課題に取り組んでいる。

【考察】

血液透析用中空糸を融合した次世代型デバイスにより、大幅なスケールアップに成功し、安全性を確認するとともに、グルコース応答性のインスリン放出特性により、平均血糖のみならず血糖日内変動が改善することを示した。さらに我々は、臨床応用を見据え、マイクロニードルを融合した新たなインスリンデバイスの開発を進めている。本デバイスにより、インスリン療法の早期導入の促進、および糖尿病合併症の発症・進展抑制に重点を置いた新たなインスリン治療を提案できると考える。

【目的】

GLP-1による膵β細胞増殖制御における新規経路を同定する。

【方法・結果】

GLP-1受容体作動薬のLiraglutide (Lira) を添加したマウス単離膵島の定量プロテオミクス解析を行った。Lira添加により膵島において13個のタンパク質が有意(>2倍, $P<0.05$)に上昇し、9個が膵腺房細胞に発現する外分泌酵素関連タンパク(ex. Amy2, Cel, Prss2)であり、膵β細胞増殖因子のLithostathine-1 (Reg1)の上昇も認めた(2.77倍)。Liraにより膵島周囲に付着する腺房細胞が増加し、GLP-1は膵島と腺房細胞の接着を促進することが示された。単離膵島と膵腺房細胞の共培養系を確立し、Lira添加により膵島への腺房細胞の付着が増加し、膵島においてReg1およびP-CadやCx26等の細胞接着因子の発現が上昇した。Reg1欠損マウスではLira皮下注による膵β細胞増殖促進が消失した。野生型マウス(WT)単離膵島とWT腺房細胞との共培養では、Liraにより膵β細胞増殖は促進されたが(1.51倍, $P=0.04$)、WT単離膵島とReg1欠損マウス(KO)腺房細胞との共培養ではLiraによる膵β細胞増殖は促進を認めなかった。一方、KO単離膵島とWT腺房細胞の共培養では、Liraにより膵β細胞増殖は促進された(1.60倍, $P=0.03$)。これより、Liraにより誘導された腺房細胞由来のReg1が膵β細胞増殖を促進していることが示された。マウス単離膵島にリコンビナントReg1を添加すると膵β細胞増殖は促進された(2.05倍, $P=0.01$)、Lira添加による膵β細胞増殖の増大は認めなかった。膵腺房細胞にはGlp1r発現を認めず、腺房細胞の単独培養ではLiraによりReg1発現は変化しなかった。一方、Lira添加膵島の培養上清で刺激した腺房細胞ではReg1の発現が上昇した。

【考察】

Liraは膵島のGLP-1Rに作用し、膵島からの液性因子を介して、腺房細胞でReg1が誘導され、腺房細胞由来のReg1が膵β細胞増殖を促進するという、膵島と腺房細胞との接着因子や分泌因子を介した連関が想定された。GLP-1による膵β細胞増殖作用において、膵島と腺房細胞の相互作用による、Reg1を介した新規経路の存在が示唆された。

膵島と腺房細胞の相互作用によるGLP-1を介した膵β細胞制御機構の解析

京原麻由

(横浜市立大学大学院 医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学)

エピゲノムを介した肥満・糖尿病遺伝機構の解明と応用

小塚 智沙代

(理化学研究所生命医科学研究センター)

【目的】

胎盤は妊娠中の母子間の物質交換を選択的輸送によってコントロールしている。胎盤における選択的輸送の異常は出生後のこどもの代謝に長期的な影響を及ぼす。これまでに我々の研究から、胎盤特異的なゲノム刷り込みが胎盤の正常な形成に重要であることがわかっている。ゲノム刷り込みは父親と母親のどちらの由来の遺伝子であるかが記憶される現象であり、胎盤特異的なゲノム刷り込みでは、遺伝子発現を抑制する機能をもつヒストン修飾であるH3K27me3が受精後に母方染色体にのみ維持されることで、父方染色体のみから遺伝子発現が起こる。そこで本研究では、どの遺伝子のゲノム刷り込みが胎盤の形成に寄与しているのかを明らかにすることで、肥満や糖尿病の疾患素因が形成される機序解明や予防法確立に繋げることを目標とした。

【方法・結果】

H3K27me3により制御される胎盤特異的なゲノム刷り込みのうち、妊娠末期まで維持されるのは9個の遺伝子のみである。これらの遺伝子は本来であれば父方染色体のみから発現するが、卵子におけるH3K27me3をなくすことで胎盤において両親性発現(2倍量発現)を示すようになり、胎盤は過形成する。9個の遺伝子それぞれについて、ヘテロ欠損させることで片親性発現(1倍量発現)に戻し、どの遺伝子が胎盤の正常発現に関与しているのかを調べた。その結果、Chromosome 2-miRNA cluster (C2MC), solute carrier 38 member 4 (Slc38a4)のヘテロ欠損により、胎盤過形成の改善が認められた。一方で、その他の遺伝子のヘテロ欠損では、胎盤の改善は認めなかった。

【考察】

C2MCは胎盤に高発現するマイクロRNAクラスターであり、Slc38a4は胎盤におけるアミノ酸輸送を担うアミノ酸トランスポーターである。胎児においてはアミノ酸がインスリン分泌を制御しているという報告もあり、Slc38a4の

胎盤における刷り込み異常が胎児の糖代謝にどのような影響を及ぼすのか今後検討していきたい。

【文献】

Matoba S, Kozuka C (Co-first author), *et al.* Noncanonical imprinting sustains embryonic development and restrains placental overgrowth. *Genes Dev* 36:483-494 (2022)

糖尿病患者のミトコンドリア機能とインスリン抵抗性・インスリン分泌能や血管合併症との関連の解明

小森田 祐二

(九州歯科大学総合内科学分野)

【目的】

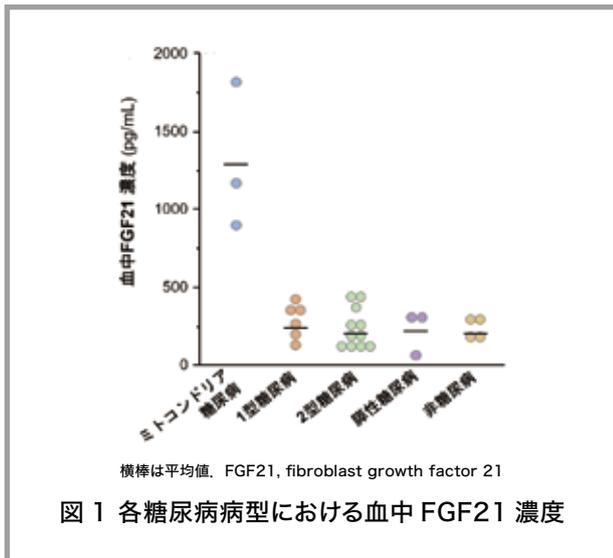
ミトコンドリア機能異常は、糖尿病発症、増悪、合併症進展の全ての段階に関与している。近年、末梢血中のFibroblast Growth Factor 21 (FGF-21)が、全身のミトコンドリア機能を反映することが不明であるが、狭義のミトコンドリア糖尿病患者を含む糖尿病患者における臨床的意義、インスリン抵抗性・分泌能・合併症との関連は不明である。本研究期間においては、外来通院中の糖尿病患者において、血中FGF21濃度と糖尿病病型、インスリン指標との関連を検討した。

【方法】

九州歯科大学付属病院、小倉第一病院外来に通院中の糖尿病・非糖尿病患者に対して研究内容の説明、文書による同意取得し、静脈採血(FGF21、乳酸、ピルビン酸、クレアチニンキナーゼ)、患者背景(糖尿病病型、性別、年齢、家族歴、既往歴、飲酒歴、喫煙歴、体重歴)、身長、体重、血圧、薬剤情報、一般血液検査データ、尿検査データを収集を行い、各糖尿病病型と血FGF21との関連を検討した。

【結果】

ミトコンドリア糖尿病患者3名において、血清中のFGF21が高値であることが確認された(図1)。一方でFGF21とインスリン分泌能には関連はみられなかった。



【考察】

これまでにも FGF21 はミトコンドリア機能障害に反応して増加することが知られていたが、血清 FGF21 値は 2 型糖尿病、全身性酸化ストレス、肥満と正の相関があることが報告されており、ミトコンドリア糖尿病と他のタイプの糖尿病との鑑別における血清 FGF21 値の有用性は不明なままであった。しかし、本研究では、ミトコンドリア糖尿病患者の血清 FGF21 は、他の糖尿病患者よりもはるかに高い可能性があることを示した。ごく少数での検討であり一般化にはより大規模な研究が必要であるが、FGF21 は、ミトコンドリア糖尿病の診断にも有用である可能性を示唆した。

【発表論文】

- 1) Komorita Y, Shiroozu A, Nakamura H. Fibroblast growth factor 21 as a candidate of a novel serum biomarker for mitochondrial diabetes J Diabetes Investig. 14(8): 1009-1010, 2023

低炭水化物/高蛋白質食で惹起される神経ネットワークを介した膵α細胞量調節の解明

椎木 幾久子

(山口大学医学部分子代謝制御学講座)

【目的】

グルコース、アミノ酸および脂肪酸は膵内分泌ホルモン分泌の制御因子であるが、膵島細胞への直接作用以外に

よる膵内分泌細胞量やホルモン分泌制御には不明な点が多い。一方、グルカゴンは肝臓でのアミノ酸代謝に重要な役割を担い、蛋白質を主体とする栄養環境ではグルカゴンの要求性が高まると考えられる。しかし、このような栄養環境での膵α細胞の挙動は不明であり、本研究はその解明を目的とする。

【方法・結果】

低炭水化物/高蛋白質食 (P:F:C=70:22:8%kcal, Low Carbohydrate/High Protein; LCHP) を 8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに 10 日間摂餌させ標準食 (P:F:C=22:22:56%kcal) と比較した。血糖値には変化がないものの、LCHP 摂餌マウスでは血中グルカゴン上昇とインスリン低下および血中総アミノ酸濃度低下を認めた。肝臓では、LCHP 摂餌によるグリコーゲン含量低下とともにアミノ酸異化および糖新生亢進を認めた。膵組織を観察したところ膵管近傍にグルカゴン陽性細胞クラスター出現を伴いα細胞数増加が観察された。クラスターを構成する細胞は Glucagon+;Pax6+;MafB- であり膵管近傍に存在する前駆細胞から分化新生したα細胞であることが推察された。さらに、α細胞新生・増加は交感神経の分布と一致していた。そこで、α細胞新生と交感神経の関連を明らかにするために 6-hydroxydopamine を用いて薬理的に交感神経の除神経を行ったところ、LCHP 摂餌で誘導されるグルカゴン陽性細胞クラスター出現とα細胞数増加が抑制された。また、LCHP 摂餌マウスでは、求心性迷走神経の中樞投射先である延髄孤束核および交感神経起始核である淡蒼縫線核において神経活性化マーカーである FosB 陽性細胞の著明な増加が観察された。そこで、細胞新生に基づくα細胞増加を惹起する生理メカニズムとして肝臓-脳-膵臓連関を想定し、迷走神経肝臓枝切断術を施術したマウスに同様に摂餌させたところ、α細胞新生・増加が完全に抑制された。

【結論】

蛋白質を主に利用する栄養環境下で自律神経を介したα細胞量調節が示唆され、肝臓-中枢神経-膵α細胞での臓器間ネットワークの存在が明らかとなった。今後は神経ネットワーク惹起に関連する肝臓での代謝変化およびグルカゴン分泌への影響の解明に取り組む予定である。

脂肪組織量規定因子の同定とそのメカニズムの解明

Shin Jihoon (シン ジフン)

(大阪大学大学院 医学系研究科 内分泌代謝内科学)

【目的】

脂肪組織はエネルギーの貯蔵や代謝制御に特化した臓器であり、ヒトの健康や病態に密接に関係している。ヒトの脂肪組織量は個人差が大きく、生理的、環境的、病態的、遺伝的要因が総合的に関与する。しかし、様々な要因・要素に全般的に関わる因子やそのメカニズムは不明である。本研究で脂肪組織量を規定する因子とそのメカニズムを解明すること目的とする。

【方法】

脂肪組織量に関わる生理的、環境的、病態的、遺伝的な環境のトランスクリプトームの解析から、それぞれの遺伝子リストを作成し、相互的な解析を行い、脂肪組織量の規定因子を探索した。脂肪組織量を来てる可能性の高い因子として、HSP47を見出し、その生理的意義とメカニズムを、遺伝的/薬剤的機能阻害モデルを作成し、脂肪組織量への寄与を調べた。また、In vitroの細胞モデルを樹立し、詳しいメカニズムを調べた。

【結果】

脂肪組織量に関わるトランスクリプトームの総合的な解析から可能性の高い因子として、HSP47を同定した。HSP47はERに局在するコラーゲンタンパクに特異的なシャペロンタンパクとして知られており、コラーゲンのフォールディングや分泌に重要な役割を果たす。HSP47は脂肪組織に高発現し、脂肪が蓄積する環境の摂食や過食、肥満では発現が増加し、逆に脂肪組織量が低下する絶食や運動、肥満外科治療、Cachexiaでは発現が低下した。遺伝的な変異によるHSP47遺伝子発現の増加はヒトの脂肪組織量の増加と相関しており、逆にマウスのHSP47阻害や欠損モデルでは脂肪組織量が低下した。欠損モデルの脂肪組織では脂肪蓄積のマスターレギュレーターであるPPAR γ のタンパク発現が低下しており、遺伝子発現には影響ないことから、PPAR γ タンパク発現制御の可能性が示唆された。3T3-L1脂肪細胞を用いた実験でも同様に、HSP47のノックダウン及び阻害によりPPAR γ の遺伝子発現には影響なく、タンパク発現が低下した。そのメ

カニズムとして、HSP47はシステミックな栄養状態に応じて、その発現の調節し、脂肪細胞外のコラーゲンマトリックスのフォールディングや分泌を制御し、細胞膜インテグリンとの結合、その下流の細胞内FAKシグナルを誘導し、PPAR γ を安定化させることで、脂肪組織量を規定していることが分かりつつある。

【考察】

脂肪組織のコラーゲンマトリックスは病態的な繊維化因子としてよく知られていたが、その生理的意義や重要性については解明されていなかった。本研究ではヒトやマウスで脂肪組織に高発現し、脂肪組織量を規定する因子としてHSP47を同定した。HSP47は栄養・病態・遺伝的環境により発現が制御され、脂肪細胞外のコラーゲンマトリックスのタンパクの恒常性を変化させることで脂肪組織量を規定していることが分かった。現在その詳しい分子メカニズムを解明中である。

臨床情報、ゲノム情報を活用した2型糖尿病のサブタイプ分類

鈴木 顕

(The University of Manchester)

【目的】

2型糖尿病に関連するバリエントを同定し、2型糖尿病のリスク因子である心血管・代謝形質に与える影響に基づき、特徴付けを行う。一細胞アトラスを用いてバリエントの詳細な細胞特異性を評価し、糖尿病合併症への効果を検証する。

【方法】

136のゲノムワイド関連研究(GWAS)のデータを使い、ヨーロッパ系、東アジア系、アフリカ系、混血アメリカ系、南アジア系の集団を対象にメタ解析を行った。心血管・代謝関連形質に対する関連プロファイルに基づいて2型糖尿病関連シグナルをクラスタリングした。2型糖尿病関連シグナルを222種類の細胞種の一細胞ATAC-seqデータとの統合解析を行い、各クラスターの細胞種特異性を評価した。各クラスターごとに2型糖尿病シグナルのリスクアレル数をリスク上昇効果で重みづけして足し合わせたpolygenic risk score (PRS)を算出し、GWASと

は独立した各民族集団のコホートで糖尿病合併症との関連を評価した (図 1)。

【結果】

2 型糖尿病に関連する 611 領域 (内, 145 は新規領域), 1,289 の独立した関連シグナルが同定された。クラスターの分類を評価する指標を最適化したところ, 8 つのクラスターが同定された。5 つのクラスターは以前に報告されたものであり, 関連シグナル全体の 35.8% を占めた。残りの 3 つのクラスターは以前に報告された特定の心血管・代謝プロファイルと一致せず, 新たなメカニズムが示唆された。一細胞 ATAC-seq アトラスを用いた細胞特異性解析では 2 型糖尿病関連シグナルは 20 種類の細胞種で有意に濃縮された。2 つの β 細胞クラスターとその他の血糖クラスターは胎児・成人膵島細胞に濃縮していた。 β 細胞・プロインスリン低下クラスターは成人腸管内分泌細胞にも濃縮していた。脂肪栄養症クラスターは成人脂肪細胞に, 肥満クラスターは膵島細胞と副腎細胞, メタボリック症候群クラスターは血管周皮細胞, 内皮細胞に濃縮していた。クラスター PRS 解析では, 冠動脈疾患と, 脂肪栄養症と肥満クラスターに正の関連があった。末期糖尿病性腎臓病と肥満クラスターが正の関連を示し, β 細胞・プロインスリン増加クラスターは負の関連を示した。また, 増殖糖尿病網膜症は糖尿病シグナル全体から算出した PRS と最も強い正の関連を示した。

【考察】

心血管・代謝形質による 2 型糖尿病関連シグナルのクラスタリングおよびクラスター PRS は 2 型糖尿病のリスク評価, 特徴付けに有用であると考えられる。

メタボローム解析を用いた脂肪細胞分化・褐色化制御に関する研究

高橋 春 弥

(京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻
食品生理機能学分野)

【研究背景・目的】

脂肪組織は生命維持に必要なエネルギーを脂肪として蓄積する役割に加え, アディポカイン分泌等を介した生体恒常性維持にも重要な役割を担う。脂肪組織を構成する細胞の中で, 脂肪細胞の機能についてはこれまでの多くの先行研究において多面的に解析されており, 特に脂肪細胞の分化過程, 及び熱産生能を有するベージュ脂肪細胞への変換 (褐色化) 過程は, 主に遺伝子やタンパク質発現制御に関する知見に基づくメカニズム解析が盛んである。他方, これらの過程における低分子代謝物の挙動についての知見は限られており, 低分子代謝物の量的・質的变化の全体像については不明確な点が多く存在する。そこで, 本研究では低分子代謝物の網羅的解析手法の一種であるメタボローム解析を活用し, 本年度は特に, 脂肪細胞の分化過程に関与する低分子代謝物の機能及びメカニズム解明を目的とし, 研究を行った。

【方法】

培養脂肪細胞の分化誘導期に代謝物 A を添加し, 脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量及び中性脂肪蓄積量を解析した。また, 代謝物 A が作用する受容体 R の阻害剤, 及び siRNA 処理による受容体 R の機能阻害時の脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量及び中

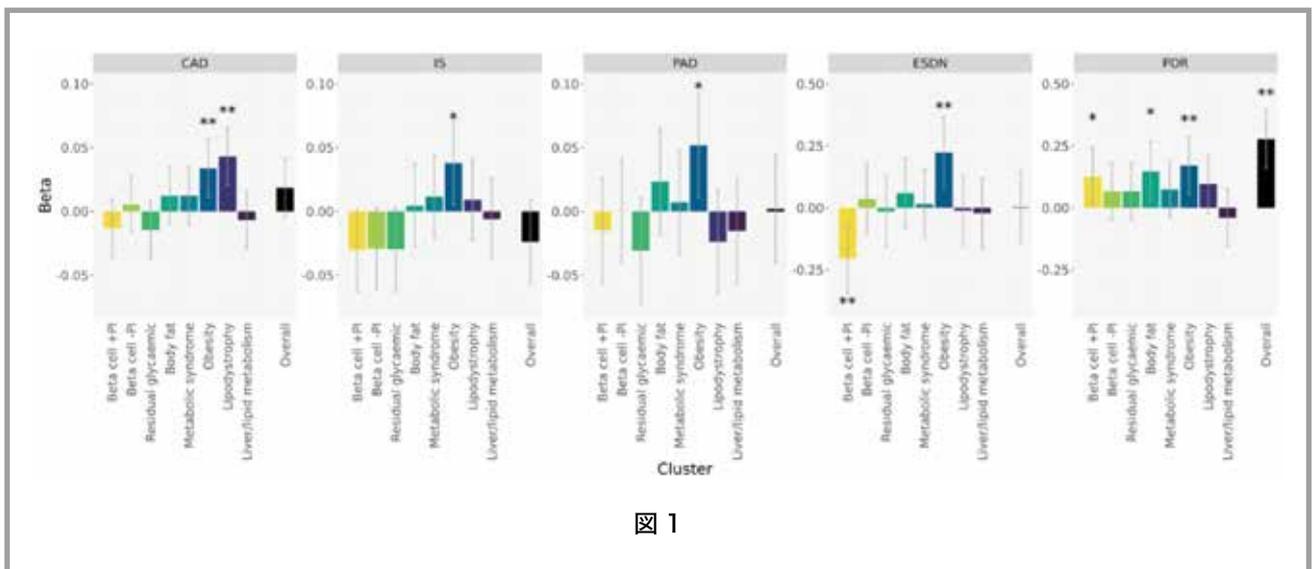


図 1

性脂肪蓄積量を解析した。

【結果・考察】

これまでの研究において、メタボローム解析を中心としたこれまでの研究結果より、脂肪細胞の分化過程において、脂肪細胞中の代謝物 A 量が増加し、当該代謝物量と *Pparγ* mRNA 発現量に正の相関関係が存在することを明らかにしていた。培養脂肪細胞の分化誘導期に代謝物 A を添加することにより、脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量が増加し、中性脂肪蓄積量も増加することを見出した。他方、受容体 R の阻害剤、及び siRNA 処理による受容体 R の機能を阻害することにより、脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量が減衰し、中性脂肪蓄積量も減少することを見出した。これらの結果より、代謝物 A は受容体 R を介して、脂肪細胞の分化制御に重要な役割を果たしていることが示唆された¹⁾。

【文献】

1) Takahashi H, Nishitani K, Kawarasaki S, Martin-Morales A, Nagai H, Kuwata H, Tokura M, Okaze H, Mohri S, Ara T, Ito T, Nomura W, Jheng H-F, Kawada T, Inoue K, Goto T. Metabolome analysis reveals that cyclic adenosine diphosphate ribose contributes to the regulation of differentiation in mice adipocyte. *FASEB J.* 38(1), e23391 (2024).

ニューロメジンUが膵β細胞機能に与える影響とその分子機序の解析

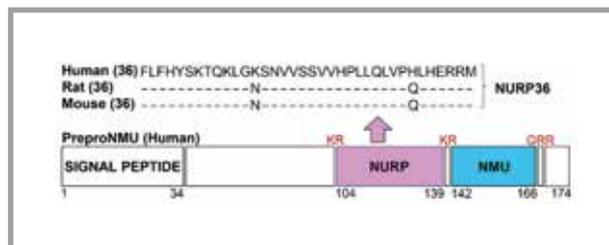
張 維 東

(宮崎大学医学部医学科生体制御医学研究講座)

【目的】

Neuromedin U (NMU) is a highly conserved 23–25-amino acid neuropeptide in mammals, which was first isolated from the spinal cord of pigs in 1985, and later from other species. It is widely expressed in the central nervous system and peripheral tissues and has emerged as a new player in regulating appetite control, stress response, energy metabolism, inflammation, and

glucose homeostasis. NMU has two receptors, NMU receptor 1 (NMUR1) and NMUR2, both of which are G-protein-coupled receptors (GPCRs). Only NMUR1 is expressed in mouse islets and β cell-derived MIN6-K8 cells, implying NMU regulates insulin secretion via NMUR1. In addition to NMU, preproNMU also produces NMU precursor-related peptide (NURP). ICV administration of NURP to mice increased their metabolic rate and caused a short-term (~4 h) increase in feeding. However, NURP cannot activate the two NMU receptors. This study is to investigate the possible involvement of NMU and NURP in the β cell maintenance and function and the regulating mechanisms.



【方法】

We first confirmed the expressing patterns of NMU and NURP in the mouse islets, and explored their potential on insulin secretion and glucose homeostasis. To investigate how they affect insulin, we studied the intracellular signaling and β cell maintenance with these peptides.

【結果】

We reported that NMU produced in β cells suppresses GSIS and causes β-cell failure via NMUR1^{1,2)}. NMU was upregulated both after chronic palmitate treatment and in diabetic *db/db* mice islets, and then participated in β-cell dysfunction and development of diabetic pathogenesis via induction of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress²⁾. All types of Gα proteins are expressed in β cells and are involved in the regulation of insulin secretion. Given that only NMUR1 is expressed in β cells, and NMU suppresses intracellular calcium

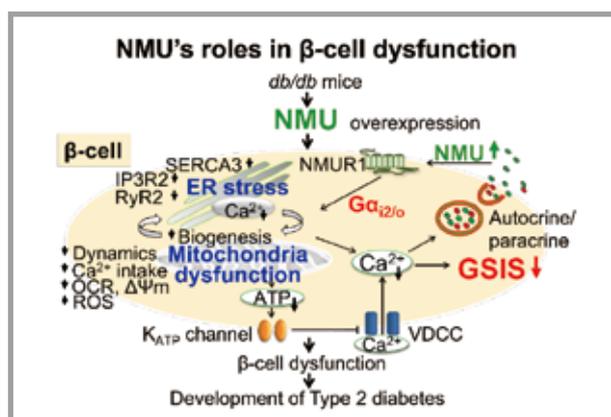
mobilization and possesses insulinostatic action, we hypothesized that NMUR1 might use $G\alpha_{i/o}$ for signal transduction in β cells. Using β cell-derived MIN6-K8 cells, isolated mouse and human islets, and single islet cells, we identified the molecular mechanisms by which NMU and NMUR1 regulate insulin secretion in β cells³⁾. We showed that NMUR1 in β cells uses $G\alpha_{i/o}$ signaling to mediate the detrimental effects of NMU on insulin secretion. Pretreatment with the $G\alpha_{i/o}$ inhibitor *Bordetella pertussis* toxin (PTX) abolished NMU-induced suppression of glucose-stimulated insulin secretion and calcium response in β cells. Knockdown of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ in β cells counteracted NMU-induced suppression of insulin secretion and gene alterations related to mitochondrial function and dynamics, ER stress, intracellular ATP level, and mitochondrial membrane potential. NMU decreased forskolin-stimulated intracellular cAMP in both mouse and human islets. We concluded that upon NMU binding, NMUR1 coupled to PTX-sensitive $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ proteins in β cells, reduced intracellular Ca^{2+} influx and cAMP level which in turn suppresses insulin secretion, thereby causing β -cell dysfunction and impairment.

In addition, I also published an article to discuss the current findings of NURP in energy homeostasis and its possible interaction with NMU⁴⁾. Intriguingly in our study, NURP was found to expressed in α cells not as expected in β cells of mouse islets. We further confirmed that NURP suppressed GSIS in both isolated mouse islets and MIN6-K8 cells. In MIN6-K8 cells, NURP was also found to reduce intracellular Ca^{2+} influx, and impaired mitochondrial OCR. NURP suppressed GSIS via $G\alpha_i$ proteins and the binding assay showed NURP had a dose-dependent binding ability in MIN6-K8 cells. Peripheral NURP increased metabolic rate in mice.

【考察】

Collectively, NMU acts directly on β -cells through NMUR1 coupled with $G\alpha_{i2/o}$. NMU causes mitochondrial dysfunction and induces ER stress. Decreased intracellular ATP and calcium influx hamper GSIS to cause β -cell dysfunction, which may lead to further pathological development of type 2 diabetes. Understanding more about endogenous G-proteins opens the door to pharmaceutically targeting their activation, which would have major therapeutic potential in diabetes and obesity. Although the mechanisms underlying the involvement of $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ signaling in NMU inhibitory effects on insulin secretion require detailed investigation, including studies at the structural level, our findings provide important leads regarding the endogenous NMUR1 transduction pathway.

Knowledge of the NMU signaling cascades, NMU-NMUR1- $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ -cAMP-calcium-insulin, the further identification of cognate receptor for NURP, and functional interactions between NMU and NURP may provide new insight into β -cell biology and the pathogenesis of diabetes.



【文献】

- 1) Zhang W, Sakoda H, Miura A, Shimizu K, Mori K, Miyazato M, Takayama K, Hayashi Y, Nakazato M. : Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493, 677-683 (2017).
- 2) Zhang W, Sakoda H, Nakazato M. : Neuromedin

U suppresses insulin secretion by triggering mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cells. *FASEB J.* 34,133-147 (2020).

- 3) Zhang, W, Sakoda, H, Nakazato, Y, Islam, MN, Pattou, F, Kerr-Conte, J, Nakazato, M. : Neuromedin U uses $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_o$ to suppress glucose-stimulated Ca^{2+} signaling and insulin secretion in pancreatic β cells. *PLoS ONE.*, 16, e0250232 (2021).
- 4) Ueno, H, Zhang, W, Nakazato, M. : Regulation of feeding and therapeutic application of bioactive peptides. *Pharmacol Ther.*, 239, 108187 (2022).

【結果】

グレリン投与により、摂餌量と体重の減少が抑制された。また、骨格筋重量、脂肪重量の低下はグレリン投与により軽減された。骨格筋中の *IL-6*, *Atrogin-1*, *MuRF-1* の発現はグレリン投与により抑制された。老齢マウスへの LPS 気管内投与により REE は強力に抑制されたが、グレリン投与群では LPS コントロール群より早期に REE 値が基準値に復帰した。また、グレリン投与群では LPS 気管内投与後の自発運動量の低下が抑制された。

【考察】

本邦では高齢化が進行し、高齢者における肺炎後の ADL の低下が問題となっている。グレリンシグナルの活性化により、肺炎後の骨格筋萎縮を抑制することが期待できる。

交感神経過活動によるグレリンの発現の低下と疾患との関連の検討

坪内 拡伸

(宮崎大学医学部内科学講座 呼吸器・膠原病・感染症・脳神経内科学分野)

【背景・目的】

グレリンは胃から分泌される生理活性物質であり、摂食亢進作用と強力な抗炎症作用を有する。我々は、グレリンの投与が強力な抗炎症作用を発揮し、肺炎症や線維化を強力に抑制することを見出した。また、これまでの検討により、内因性グレリンシグナルの欠損は、マクロファージの好氣的呼吸→解糖系へのシフトを障害し、LPS に対する炎症応答を抑制することが明らかになった (*Biochem Biophys Res Commun* 2022)。高齢者ではグレリンの産生が低下するが、肺の炎症時におけるグレリン値の変動がどのように炎症病態に関与するのかは不明である。今回我々は、グレリンの投与が肺炎症における代謝障害、骨格筋萎縮を改善させるのかを検討した。

【方法】

18 カ月齢の C57BL/6 マウスに、リポポリサッカライド (LPS) 4mg/kg の気管内投与による急性肺損傷モデルを作成した。摂餌量、体重変化、安静時 Energy Expenditure (REE)、骨格筋における筋蛋白質合成系/分解系の分子の発現を、グレリン投与 (40nmol/頭) の有無で検討した。

摂食時の正常な腸管免疫応答を維持する新規肥満治療の検討

戸田 郷太郎

(東京大学医学部附属病院)

【目的】

免疫細胞の食後の反応が肥満時に破綻するメカニズムを検討するため、今年度は腸管内短鎖脂肪酸が代謝機能に及ぼす影響を解析した。

【方法】

飲料水を介して肥満に対し保護的だと報告されている腸内細菌が産生する酪酸を投与し、糖代謝を解析した。また食物が早期に流入する小腸のリンパ組織であるパイエル板で、絶食時、摂食後に 1 細胞レベルで明らかになった遺伝子発現変化をもとに、siRNA を用いて機能解析を行った。

【結果】

これまで Bulk RNA-seq による検討で小腸パイエル板では食後、Hsp70 の発現が増加し、scRNA-seq では骨髄系細胞、B 細胞、T 細胞で食後の発現が確認された。発現変化が見られる遺伝子の転写開始点近傍のモチーフ解析では NF- κ B, Fos:Jun など急性期応答を促進すると考えられる転写因子に対応するモチーフが複数の遺伝子で共通していた。RT-PCR で同様のサンプルを解析すると、IL-1 β , IL-10 などいずれも NF- κ B により発現誘導される因子の発現が増強していた。酪酸の存在下で、

食後に増強するシグナルであるLPS、インスリン刺激下でIKB α のRNA発現は減少しない一方で蛋白量が減少したことから同蛋白の分解が促進されている可能性が考えられた。同じ条件でsiRNAによりHsp70をknockdownするとLPSとインスリンによる分解が障害されたことからこの応答はHsp70依存的なプロセスだと考えられた。高脂肪食を給餌し肥満状態となった野生型マウスに飲料水を介して酪酸を投与すると、経口ブドウ糖負荷試験、また食後の高インスリン状態が改善し、血糖降下傾向が見られたことから、特に食後のインスリン抵抗性を改善する因子であると考えられた。RT-PCRでの解析では肥満状態で障害される小腸パイエル板のサイトカイン発現増加が酪酸投与下で部分的に見られるようになった。

【考察】

NF- κ Bの活性化は肥満状態で障害される、腸管免疫の正常な応答と考えられた。肥満状態では短鎖脂肪酸により促進されるIKB α 蛋白のHsp70依存的な分解およびNF- κ Bの活性化が障害されることにより免疫細胞の機能異常をきたす可能性がある。肥満状態で障害される小腸パイエル板のサイトカイン発現増加が酪酸投与下で部分的に見られるようになったことから、細胞レベルで確認される蛋白分解促進などのプロセスが全身の代謝を維持する可能性が考えられた。正常な短鎖脂肪酸がIKB α 蛋白の分解プロセスを維持し肥満状態で介入可能な因子を明らかにするため解析を進める予定である。

ヒトiPS細胞レポーター株を用いた新生児糖尿病原因遺伝子RFX6の膵・腸管発生成熟機構に関する役割の解明

中村 聡 宏

(京都大学)

【背景・目的】

インスリン依存型糖尿病に対して、将来的に幹細胞由来細胞移植が期待されている。幹細胞から内分泌組織を誘導していく過程を模倣するにあたっては、ヒトにおける膵・腸管を含めた内分泌臓器発生分化過程のメカニズムの解明が重要である。我々は、膵形成不全、腸管形成不全を伴う新生児糖尿病を主徴とするMitchell-Riley症候群(MRS)

の原因遺伝子として同定された転写因子RFX6に着目し、内胚葉発生におけるRFX6の機能解明を目指している。

【方法】

RFX6ヒトiPS細胞ノックインレポーター株RFX6^{+/eGFP}及びRFX6^{eGFP/eGFP}ノックイン・ノックアウト株を用いて、*in vitro*での胚性内胚葉を経由した原始腸管への分化誘導を用い、原始腸管レベルにおける上流、下流遺伝子制御機構についての検討を行った。

【結果】

RFX6^{eGFP/eGFP}株において原始腸管発生段階においてPDX1及びCDX2の発現低下が認められたが、胚性内胚葉から原始腸管への成熟段階のday-by-dayでの追跡により、RFX6の発現上昇タイミングから2-3日後にPDX1やCDX2の発現上昇が認められることを確認した。これまで不明であったRFX6の上流制御機構については、誘導で用いた3種の低分子化合物因子の一つが決定的にRFX6発現上昇を引き起こす因子であることを、基礎培地への添加実験、完全培地からの除去実験、およびアゴニストを用いた用量依存性の反応の検討により確認できた。

【考察と展望】

内胚葉発生早期の段階において、これまで膵前駆細胞以降の分化段階で知られていたRFX6とPDX1の制御関係と異なった上流下流関係を持っていることが示された。また、今回RFX6発現上昇を引き起こす上流の因子を同定したが、この因子は生体内で合成される物質であり、合成に関与する遺伝子の欠損胎仔マウス体幹においてRfx6発現が低下したとの支持的な既報もあり、今後さらなる上流制御機構の解明を行っていきたいと考えている。また、上記株を用いた腸管オルガノイドの作成、腸管内分泌細胞の分化制御機構の解明についても並行して行っていく予定である。

Unveiling the Role of CD206 M2-like Macrophage Depletion in Activating Fibro-Adipogenic Progenitors and Enhancing Myogenesis During Tissue Recovery

Allah Nawaz, Kazuyuki Tobe

(University of Toyama, Toyama, Japan)

【Abstract】

Macrophages play a pivotal role in tissue homeostasis and repair, regulating various cellular processes. This study investigates the effects of depletion of CD206 M2-like macrophages on the activation of fibro-adipogenic progenitors and myogenesis during the recovery process. In this study, we employed a CD206DTR mouse model, characterized by diphtheria toxin injections for conditional depletion of CD206-expressing cells. Subsequently, we administered cardiotoxin to induce muscle injury in both CD206DTR and wild-type (WT) mice. The recovery process was analyzed 7-days post-injury to investigate and compare the regenerative response between the two groups. Our findings reveal that the depletion of CD206 M2-like macrophages promotes a shift in the microenvironment, leading to the activation of fibro-adipogenic progenitors and subsequently enhancing the myogenic differentiation process. This research sheds light on the complex interplay between macrophages and progenitor cells, offering potential therapeutic targets for promoting tissue repair and regeneration.

【Introduction】

Tissue repair and regeneration are intricate processes involving various cell types and molecular signals. Macrophages, as key components of the immune system, exhibit a range of functional phenotypes that modulate tissue healing. Macrophages indeed play a critical role in the muscle recovery process after injury. Among these, M2-like macrophages, characterized by CD206 expression, are associated with anti-inflammatory and tissue remodeling activities. During muscle regeneration, proinflammatory M1 macrophages are recruited to the injury site and remove necrotic debris, followed by a switch from

proinflammatory M1 macrophages into anti-inflammatory M2 macrophages to promote muscle growth. Although, proinflammatory M1 macrophages reportedly have a negative effect on the repair process, the role of M2-like macrophages is currently unknown. We previously reported that CD206-derived TGF β 1 inhibited the proliferation of adipocyte progenitors in adipose tissue (Nawaz A, et al., Nature Communications, 2017). These mesenchymal stem cell (MSC)-like progenitors also reside in muscle and are called fibro-adipogenic progenitors (FAPs), which may regulate muscle recovery following injury. FAPs are multipotent cells that contribute to tissue repair by participating in adipogenesis, fibrogenesis, and myogenesis. Therefore, we presumed that the depletion of CD206 M2-like macrophages might enhance the activation of FAPs in muscle after injury. In this study, we investigated the role of CD206 M2-like macrophages in the activation of FAPs and their impact on myogenesis during the recovery process.

【Methods】

CD206DTR and FAP-derived follistatin KO mice model of skeletal muscle injury and regeneration was utilized. The model involved inducing acute muscle injury through administration of cardiotoxin and subsequent recovery. Administration of tamoxifen selectively deleted FAP-derived follistatin. Muscle samples were collected at 7-days post-injury. Histological analysis, immunofluorescence staining, and gene expression profiling were conducted to assess changes in tissue architecture, macrophage populations, FAP activation, and myogenesis.

【Results】

We reported that depletion of CD206 M2-like macrophages led to a shift in the tissue microenvironment, characterized by

altered cytokine expression and immune cell composition. We also reported that depletion of CD206 M2-like macrophages resulted in the activation of FAPs within the injured tissue, as evidenced by increased expression of activated FAPs-related marker genes including follistatin, Fstl1, CCL7, DPP4 etc. The activated FAPs exhibited an increased capacity for myogenic differentiation, contributing to accelerated muscle fiber regeneration. Molecular analysis (Total RNA sequence analysis of muscle and isolated FAPs, qRT-PCR) revealed upregulation of factors associated with FAP activation, myogenesis, and tissue remodeling in response to CD206 M2-like macrophage depletion. We further determined that deletion of FAP-specific follistatin resulted in the downregulated expression levels of activated FAP-related marker genes, myogenesis-related marker genes, and increases fibrosis, thereby delaying the recovery process. Altogether, follistatin deletion resulted in a reduction in the expression of key myogenic markers and impaired muscle fiber regeneration.

【Discussion】

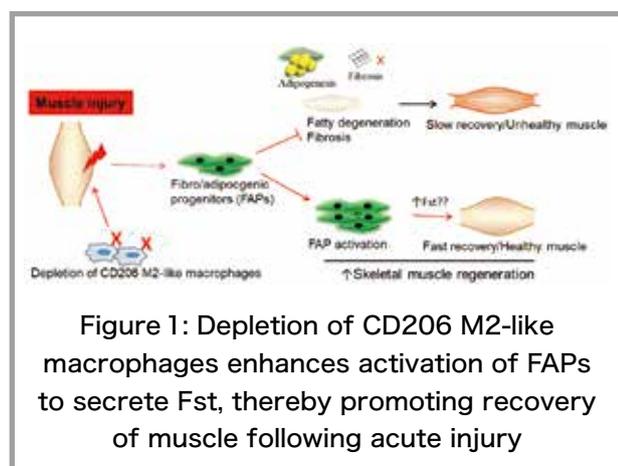
The findings of this study underscore the intricate interplay between CD206 M2-like macrophages, FAPs, and myogenesis during tissue repair and regeneration. Depletion of CD206 M2-like macrophages appears to trigger a cascade of events leading to FAP activation and subsequent enhancement of myogenic differentiation. These results suggest a potential therapeutic avenue for promoting tissue repair by targeting macrophage phenotypes and manipulating their interactions with progenitor cells. CD206 M2-like macrophages are known for their anti-inflammatory and tissue remodeling properties, often associated with the resolution phase of inflammation and tissue repair. Our results align with this notion, revealing that the

depletion of CD206 M2-like macrophages triggers a shift in the tissue microenvironment. This shift is characterized by altered cytokine expression patterns and changes in the composition of immune cell populations within the injured tissue. Depletion of CD206 M2-like macrophages may disrupt the finely tuned balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory signals, potentially influencing the activation of various resident cell types involved in tissue repair. The most notable outcome of CD206 M2-like macrophages depletion is the activation of FAPs within the injured tissue. The activation of FAPs in response to CD206 M2-like macrophages depletion suggests a potential cross-talk between immune cells and progenitor cells. The upregulation of myogenic markers and the accelerated muscle fiber regeneration observed in response to CD206 M2-like macrophages depletion provide compelling evidence of the direct involvement of FAPs in this process. These results show that the activated FAPs may act as a source of myogenic precursor cells, contributing to the efficient generation of new muscle fibers during tissue recovery.

It is possible that the altered tissue microenvironment, resulting from the absence of CD206 M2-like macrophages, provides cues that promote FAP activation. This activation could be driven by changes in cytokine profiles, extracellular matrix composition, or other signaling molecules that influence FAP behavior. Targeting CD206 M2-like macrophages or modulating their activity could be a viable strategy to manipulate the activation of FAPs and subsequently enhance myogenesis in situations of tissue injury. Further research is warranted to elucidate the signaling pathways and molecular mechanisms that underlie the interaction between CD206 M2-like macrophages and FAPs.

【Conclusion】

In conclusion, this study provides novel insights into the role of CD206 M2-like macrophages in tissue repair and regeneration. Depletion of these CD206 M2-like macrophages activates FAPs and enhances myogenesis, offering potential strategies for enhancing tissue healing in various clinical contexts (Fig. 1). Further research is warranted to elucidate the underlying mechanisms and explore the translational implications of these findings.



【Acknowledgments】

We acknowledge the support of funding agencies and the dedicated efforts of the research team members who contributed to this study. This work was supported by the Japan Foundation for Applied Enzymology (a grant for Front Runner of Future Diabetes Research to A.N.), and Young Research Grant from the Japan Diabetes Society (to A.N.). This research was supported by Moonshot R&D (Grant numbers JPMJMS2021, and JPMJMS2023). This work was also supported by JSPS KAKENHI (Grant numbers 20H03730 to K.T., and 20K08882 to S.H. and K.T.), The Mitsubishi Foundation / Research Grants in the Natural Science (2019), Grant from Japan Diabetes Foundation (2020), Research Activities of First Bank of Toyama Scholarship Foundation (2020). This work was additionally supported by Grants-in-Aid from the Japan Society for the Promotion of Science

(JSPS) Fellow (18F18102 to T.N. and A.N.). This work was also supported by JSPS KAKENHI (Grant numbers 20K22733, and 22K16408 to A.N.). Additional support was provided by the Daiichi Sankyo Foundation for Life Science Research, AMED-FORCE (Development of Treatment for Obesity in Humans Targeting NFIA in Adipocytes), Tamura Science and Technology Foundation (2021) to K.T. and Cell Science Foundation (to A.N.).

【References】

- 1) **Nawaz A.**, Bilal M, Fujisaka S, Kado T, Aslam MR, Ahmed S, et al. Depletion of CD206⁺ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nature Communications*. 2022 Nov; 13: 7058, doi:10.1038/s41467-022-34191-y.
- 2) **Nawaz A.**, Fujisaka S., Kado T. et al. Heterogeneity of adipose tissue-resident macrophages-beyond M1/M2 paradigm. *Diabetology International*. 2023 April; 14, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s13340-023-00624-2>.
- 3) Bilal M, **Nawaz A.**, Kado T, Aslam M. R, Igarashi Y, Nishimura A, Watanabe Y, Kuwano T, Liu J, Miwa H, Era T, Ikuta K, Imura J, Yagi K, Nakagawa T, Fujisaka S, Tobe K. “Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis upon high-fat-diet. *Molecular Metabolism*. 2021 Sep 23;101328.
- 4) Giordani, L. et al. High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations. *Mol. Cell* 74, 609–621.e606 (2019).
- 5) Joe, A. W. et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 12, 153–163 (2010).
- 6) Uezumi, A. et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 124,

- 3654–3664 (2011).
- 7) Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 12, 143–152 (2010).
 - 8) Wosczyzna, M. N. et al. Mesenchymal stromal cells are required for regeneration and homeostatic maintenance of skeletal muscle. *Cell Rep.* 27, 2029–2035.e2025 (2019).
 - 9) Ratnayake, D. et al. Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature* 591, 281–287 (2021).
 - 10) Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1173–R1187 (2010).
 - 11) **Nawaz A.**, and Tobe K. M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. **Journal of Diabetes Investigation.** 2019 Nov; 10(6):1394-1400.
 - 12) Takikawa A, Usui I, Fujisaka S, Tsuneyama K, Okabe K, Nakagawa T, **Nawaz A.**, Kado T, Jojima T, Aso Y, Hayakawa Y, Yagi K, Tobe K. Macrophage-specific hypoxia-inducible factor-1 α deletion suppresses the development of liver tumors in high-fat diet-fed obese and diabetic mice. **Journal of Diabetes Investigation.** 2019 Nov; 10(6):1411-1418.
 - 13) Igarashi Y, **Nawaz A.**, Kado T, et al. Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. **Scientific Reports.** 2018;8(1):14567.
 - 14) **Nawaz A.**, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K. CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. **Nature Communications.** 2017 Aug 18; 8(1):286.
 - 15) **Nawaz A.**, Mehmood A, Kanatani Y, Kado T, Igarashi Y, Takikawa A, Yamamoto S, Okabe K, Nakagawa T, Yagi K, Fujisaka S, Tobe K. Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice. **Scientific Reports.** 2018;8(1):11370.
 - 16) Ono Y, Nagai M, Yoshino O, Koga K, **Nawaz A.**, Hatta H, Nishizono H, Izumi G, Nakashima A, Imura J, Tobe K, Fujii T, Osuga Y, Saito S. CD11c+ M1-like macrophages (M Φ s) but not CD206+ M2-like M Φ are involved in folliculogenesis in mice ovary. **Scientific Reports.** 2018 May 25; 8(1):8171.
 - 17) Takikawa A, Mahmood A, **Nawaz A.**, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. **Diabetes.** 2016 Dec; 65(12):3649-3659.
 - 18) Fujisaka S, Usui I, **Nawaz A.**, Takikawa A, Kado T, Igarashi Y, Tobe K. M2 macrophages in metabolism. **Diabetol Int.** 2016; 7(4):342-351.

新規レポーターマウスを用いた膵 α 細胞新生・分化
機構の解明

水 室 美 和

(順天堂大学代謝内分泌内科学)

【目的・方法】

近年、膵 α 細胞の可塑性が明らかとなってきたおり、 α 細胞の分化機構を明らかにすることは、 α -to- β reprogramming を介した β 細胞再生医療へと繋がる可能性がある。我々は α 細胞分化を時間軸に沿って解析するため、レポーターコンストラクト eGFP-IRES-mRFP を proglucagon gene に挿入した“Gcg-Timer マウス”を作製した。本マウスでは IRES の影響により eGFP の緑色蛍光と mRFP の赤色蛍光との検出にタイムラグが生じ、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生 α 細胞は緑色蛍光、より分化した α 細胞は緑色および赤色蛍光を呈する細胞として標識されるため、共焦点レーザー顕微鏡及び flow cytometry を用いて α 細胞を経時的に観察できる。本マウスを用いて「 α 細胞がいつ・どこで生まれるのか？」を明らかにするとともに、 α 細胞新生・分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化を解析する。

【結果】

Gcg-Timer マウス膵を共焦点レーザー顕微鏡及び flow cytometry を用いて観察した結果、緑色蛍光を呈する新生 α 細胞は胎生期及び生後 7 日未満の新生仔期においてのみ観察された。胎生 17.5 日膵切片の膵管・血管を免疫染色した結果、新生 α 細胞は膵管のみでなく血管にも接しており、またどちらにも接していない新生 α 細胞は認めなかった。内分泌前駆細胞は膵管周囲から生じるとされているが、この結果は既報にある新生 β 細胞が血管周囲にも認められるという結果と合致している。同時期のマウス膵を用いて非 α 細胞・新生 α 細胞・より分化した α 細胞に FACS で sorting 後 RNA sequencing を行った。分化した α 細胞群と比し、新生 α 細胞群で増加している遺伝子群には血管新生に関わる遺伝子群も抽出されており、上記新生 α 細胞と血管との関連性を支持する結果と考えられた。

【考察および今後の展望】

胎生期マウス膵の免疫染色や FACS・トランスクリプトーム解析により、新生 α 細胞の特性を明らかにすることができた。

これまでに得られた、 α 細胞新生時期、場所（膵管と血管との位置関係）、関連する遺伝子変化（トランスクリプトーム解析）、そして成体マウスにおけるグルカゴンシグナル抑制下の α 細胞新生誘導の結果をもとに、さらに詳細なデータ解析を行い、論文化に取り組んでいる。

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

(東京大学保健・健康推進本部)

【背景】

肥満や 2 型糖尿病などの生活習慣病は全世界に蔓延している。また現存する肥満の薬物治療、外科治療は全て「エネルギー摂取の抑制」を意図しているが、エネルギー収支を平衡させるためには「エネルギー消費の促進」というアプローチも考えられる。褐色脂肪細胞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機能を有し、既に BMI と褐色脂肪細胞の活性が負に相関すること、加齢に伴い褐色脂肪細胞の活性が低下することが報告されている。申請者らは褐色脂肪細胞の分化を制御する鍵因子である転写因子 nuclear factor I-A (NFIA) をゲノムワイドなオープンクロマチン解析で同定し解析してきた (Hiraike Y. et al. *Nature Cell Biology* 2017, Hiraike Y., et al. *PLoS Genetics* 2020, Hiraike Y., et al. *iScience* 2022)。更に我々は台湾 biobank の解析からもっとも代表的な肥満感受性 SNP のひとつであり褐色脂肪細胞の機能を介して作用する *FTO* 遺伝子近傍の rs1421085 と定期的な運動習慣の間に追跡期間中の体重増加に対する遺伝子環境相互作用を同定した (Hiraike Y. et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021)。

本研究は NFIA を標的として褐色脂肪細胞の数や働きを高めることで「エネルギー消費の促進」に基づく生活習慣病の治療を実現するための理論的基盤の提供を目指すものである。

【結果】

我々は最近、脂肪細胞特異的 NFIA トランスジェニックマウス (NFIA-Tg) の解析から NFIA の抗肥満作用、抗糖尿病作用を明らかにした。NFIA-Tg の白色脂肪細胞では予想通り褐色脂肪細胞特異的遺伝子群およびミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に関与する遺伝子群が正に制御されていた一方、炎症を促進する遺伝子群は予想外に負に制御されていた。NFIA は脂肪細胞から分

泌され全身の炎症を促進し肥満や糖尿病を増悪させる因子として良く知られる Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) の発現を抑制し、結果として脂肪組織の慢性炎症を改善させた。すなわち NFIA はミトコンドリアの活性化ならびにエネルギー消費の亢進作用と抗炎症作用の双方を介して肥満や糖尿病に保護的に作用することを明らかにした (Hiraike Y., et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2023)。また我々の研究グループの基盤技術である脂肪細胞のクロマチン免疫沈降およびマウス白色脂肪組織からの stromal vascular fraction (SVF) の単離と脂肪細胞への分化誘導について method 論文を発表した (Hiraike Y. *STAR Protocols* 2023, Saito K., Hiraike Y., et al. *Journal of Visualized Experiments* 2023)。更にまた Global Burden of Disease (GBD) Collaborator Network Member として様々な疾病、外傷ならびにそれらのリスク因子が死亡と障害に与える影響のメタ解析にも取り組んでおり、糖尿病による全世界的な疾病負荷の現状と将来展望について解析し発表した (GBD 2021 Diabetes Collaborators, Hiraike Y., et al. *The Lancet* 2022)。

【今後の展望】

褐色脂肪細胞における NFIA が全身代謝に及ぼす影響及び作用メカニズムの全貌が明らかになれば、「エネルギー消費の促進」に基づく新たな生活習慣病の治療法の開発に結実することが期待される。また褐色脂肪細胞の活性が体重や血糖、心血管イベント等に与える影響をバイオバンクの大規模データで検証し特に遺伝子環境相互作用に注目して解析することにより、遺伝リスクに基づいた最適な生活指導という形で生活習慣病領域における精密医療の実現につながることを期待される。

【文献】

1) Hiraike Y*, Saito K, Oguchi M, Wada T, Toda G, Tsutsumi S, Bando K, Sagawa J, Nagano G, Ohno H, Kubota N, Kubota T, Aburatani H, Kadowaki T, Waki H and Yamauchi T. NFIA in adipocytes reciprocally regulates mitochondrial and inflammatory gene program to improve glucose homeostasis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2023; 120(31): e2308750120.

*Corresponding author

2) GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 2023; 402(10397): 203-234.

3) Saito K, Hiraike Y*, Oguchi M and Yamauchi T. Semi-Automated Isolation of the Stromal Vascular Fraction from Murine White Adipose Tissue Using a Tissue Dissociator. *Journal of Visualized Experiments* 2023; (195): e65265.

*Corresponding author

4) Hiraike Y*. Chromatin immunoprecipitation with mouse adipocytes using hypotonic buffer to enrich nuclear fraction before fixation. *STAR Protocols* 2023; 4(1): 102093.

*Corresponding author

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 内分泌・代謝内科学)

脂肪細胞特異的分泌蛋白・アディポネクチン (APN) は、肥満・特に内臓脂肪蓄積により血中濃度が低下し、メタボリックシンドロームの病態に重要な役割を果たす。我々は APN が GPI アンカー型膜蛋白である T-cadherin (Tcad) への特異的な結合を介して、心血管組織や骨格筋に集積・存在していることを見出した¹⁾。特に血管構成細胞において APN は、大動脈や網膜細動脈の血管内皮細胞や動脈硬化巣の増殖型平滑筋細胞、腎細管周囲微小血管の血管周皮細胞 (pericyte) に Tcad 依存的に集積しており、動脈硬化症や糖尿病性網膜症、虚血再灌流後の急性腎障害に対し保護的に作用することを示した²⁻⁴⁾。そして、このような APN の多彩な臓器保護作用を説明しうるメカニズムとして、APN/Tcad がエクソソ-

ムの生成・分泌を強く促進し、細胞内に蓄積したセラミドをはじめとする不要物質の細胞外への放出を介した自身の細胞の恒常性維持や、エクソソームそのものを介した組織修復に寄与することを明らかとした³⁻⁶⁾ (図1)。

また現在は、Tcad flox マウスを、Ubiquitin-CreERT2 マウスや VEcadherin-CreERT2 マウスおよび PDGFR α -CreERT2 マウスと交配させることで、タモキシフェン誘導的に全身性あるいは、血管内皮細胞および pericyte/体性幹細胞・特異的に T-cad を欠損させるマウスをすでに樹立している。Preliminary な検討ではあるが、全身性・Tcad 欠損マウスにタモキシフェンを投与し Cre を誘導すると、血中 APN 濃度は経時的に約4倍程度まで上昇する一方で、血管内皮細胞あるいは pericyte/体性幹細胞・特異的な Tcad 欠損マウスでは、Cre 誘導後に血中 APN はいずれも2倍程度に上昇し、これらを合わせると全身性・Tcad 欠損マウスと同等の血中 APN 濃度となる結果が得られた。このことから、これら2つの血管構成細胞の Tcad が、心筋細胞や骨格筋細胞といった血管外の Tcad 発現組織への APN の移行や分布、さらにはその全身作用をも強く規定するのではないかと想定し研究を進めている。

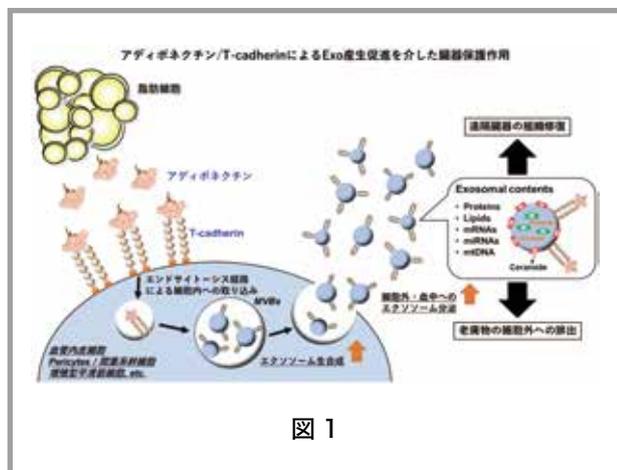


図1

【文献】

1) Matsuda K, Fujishima Y, Maeda N, Mori T, Hirata A, Sekimoto R, Tsushima Y, Masuda S, Yamaoka M, Inoue K, Nishizawa H, Kita S, Ranscht B, Funahashi T, Shimomura I. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice. *Endocrinology*. 2015;156:934-46.

2) Fujishima Y*, Maeda N, Matsuda K, Masuda

S, Mori T, Fukuda S, Sekimoto R, Yamaoka M, Obata Y, Kita S, Nishizawa H, Funahashi T, Ranscht B, Shimomura I. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. *FASEB J*. 2017 31:1571-1583

3) Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y**, Kita S, Minami S, Sakaue TA, Nakamura Y, Okita T, Kawachi Y, Fukuda S, Namba-Hamano T, Takabatake Y, Isaka Y, Nishizawa H, Ranscht B, Maeda N, Shimomura I. Increased vascular permeability and severe renal tubular damage after ischemia-reperfusion injury in mice lacking adiponectin or T-cadherin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021 Feb 1;320(2):E179-E190.

4) Sakaue TA, Fujishima Y**, Fukushima Y, Tsugawa-Shimizu Y, Fukuda S, Kita S, Nishizawa H, Ranscht B, Nishida K, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin accumulation in the retinal vascular endothelium and its possible role in preventing early diabetic microvascular damage. *Sci Rep*. 2022 Mar 9;12(1):4159.

5) Obata Y, Kita S, Koyama Y, Fukuda S, Takeda H, Takahashi M, Fujishima Y, Nagao H, Masuda S, Tanaka Y, Nakamura Y, Nishizawa H, Funahashi T, Ranscht B, Izumi Y, Bamba T, Fukusaki E, Hanayama R, Shimada S, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release. *JCI Insight*. 3(8):e99680, 2018.

6) Nakamura Y, Kita S, Tanaka Y, Fukuda S, Obata Y, Okita T, Nishida H, Takahashi Y, Kawachi Y, Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Nishizawa H, Takakura Y, Miyagawa S, Sawa Y, Maeda N, Shimomura I. Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of

Heart Failure in Mice. *Mol Ther.* 2020;S1525-0016(20)30316-6.

免疫チェックポイント阻害薬投与により誘発される 1型糖尿病への間葉系幹細胞投与効果の検討

堀谷 恵美

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学)

【背景・目的】

近年、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が種々の悪性腫瘍に対して適応拡大され、副作用としての急性発症 / 劇症 1 型糖尿病が増加しつつあるが、未だ有効な治療法が確立していない。間葉系幹細胞 (MSC) は抗線維化、組織再生、及び免疫調節に機能するとされており、ICI に誘発される 1 型糖尿病に対する MSC の投与効果の検討を進めている。我々は、雄性 NOD/ShiJcl マウスに、抗 PD-L1 抗体を投与することで、1 型糖尿病が発症し、同時にヒト脂肪由来 MSC (hAD-MSC) を週 3 回計 6 回投与することで糖尿病発症を抑制すること、血中 MSC 由来 exosome は顕著に増加し、MSC の効果に影響している可能性を報告した。さらに、PD-L1 抗体投与により膵島内の CD3 陽性 T 細胞と Cxcl9 陽性 MΦ が有意に増加し、MSC 投与群では有意に減少したことを報告した。また、ICI 投与により劇症 1 型糖尿病を発症したヒト症例の膵島においても、CD3 陽性 T 細胞および Cxcl9 陽性 MΦ の存在を認めた。臨床化に向け、① MSC の投与量、投与回数の最適化、② MSC の腫瘍免疫に対する作用、③投与細胞の Quality Control、臨床非臨床を繋ぐバイオマーカーの課題を解決することを目的としている。

【方法】

① NOD/ShiJcl マウスのモデルを用いて、1 回の投与でも薬効が示されるか検討した。② B6 マウス由来大腸癌細胞株 MC38 を B6.MRL-FasLpr/J マウスに移植して固形癌を形成させた後、抗 PD-1 抗体・抗 CTLA4 抗体および MSC を投与することで、MSC が ICI の抗癌作用に与える影響を検討した。

【結果と展望】

① MSC の投与回数を 1 回に減らしても 1 型糖尿病発症を有意に抑制できた。② MSC 投与群でも ICI の腫瘍

退縮効果に影響を与えなかった。ICI 投与により同マウスに種々の自己免疫疾患が誘発されることが知られており、MSC 投与が全般的な自己免疫疾患症状の発症を抑制するかどうかについても検討を進めている。③エクソソームが投与細胞の Quality control に有用であることを確認するために、T-cadherin ノックダウン MSC を作製し、NOD/ShiJcl マウスのモデルを用いてコントロール MSC との薬効を比較する予定である。

Irs2 アンチセンス RNA/PPAR γ 経路制御による新たな NAFLD/NASH 治療法の開発

松下 真弥

(国立国際医療研究センター 分子糖尿病医学研究部)

【背景】

NAFLD/NASH は糖尿病の併存疾患として罹患率も高く、我が国の肝臓癌の原因として 40% 近くを占めるようになっており、その正確な病態形成メカニズムや有効な治療法の開発が求められている。

我々のゲノムの 90% 以上の領域は何らかのレベルで転写され RNA を産出しており、その様な転写産物の多くはタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) に分類される。これまでの研究で我々は、代謝関連遺伝子と、そのイントロンやアンチセンス鎖から産生される ncRNA とがしばしば協調的に制御され代謝作用を持ちうるということに着目し、新たな代謝関連 ncRNA を同定してきた¹⁾。

直近の研究において我々は、主要なインスリンシグナル伝達分子の一つ *Irs2* のアンチセンス鎖からこれまで未解析のアンチセンストランスクリプトである ncRNA (*ASIRS2*) が転写され、その発現が栄養状態によって大きく変化すること、*ASIRS2* の発現抑制によって肝脂肪蓄積関連遺伝子が有意に低下し、肥満モデルマウスの脂肪肝が著明に改善することを示した。また、*ASIRS2* の結合タンパクとしてミトコンドリアタンパク HARS2 が同定され、この HARS2 が脂質代謝に関わる未知の機能を持ちうることを示した²⁾。

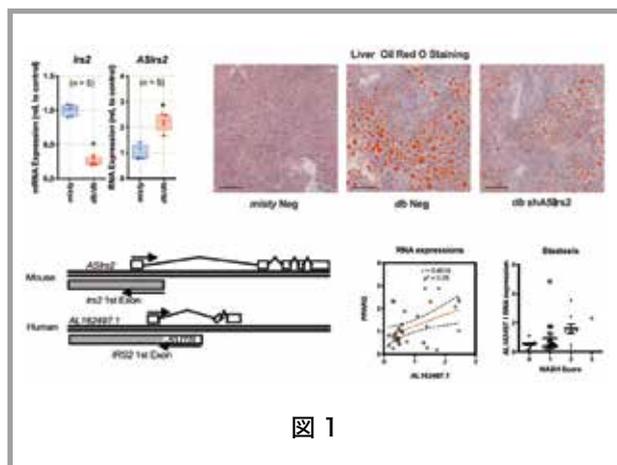


図 1

【目的】

近年の遺伝解析手法の進歩により多くのノンコーディング RNA が同定され、一部のものについては代謝に関わることが報告されてきている。現時点でこうしたノンコーディング RNA を治療標的とした臨床応用可能な治療薬は報告されていないが、RNA 医薬品は肝臓へのアクセスが容易であり、実際に複数の siRNA 医薬が臨床応用されつつある。先述の通り、これまでの研究で我々は、マウスの *Irs2* 遺伝子座のアンチセンス鎖から産生されるノンコーディング RNA である *ASIRS2* が、HARS2 (histidyl-tRNA synthase mitochondria) との結合を介して *PPARG* の発現を誘導し、肥満に伴う脂肪肝の形成に重要な役割を持つことを解明した。ヒトでもマウスの場合と同様に *IRS2* 遺伝子の対側に *AL162497.1* というノンコーディング RNA が存在し、その発現レベルはヒトの脂肪肝の程度や NASH スコアと正に相関することから²⁾、*AL162497.1* がマウスの *ASIRS2* の orthologue であり、ヒトの脂肪肝の病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究ではこれらの知見を踏まえ、*AL162497.1* の代謝作用の解析、また *ASIRS2*-*HARS2* を軸とした脂肪肝の病態メカニズムの更なる解析と、その臨床的な応用を目的とする。

【方法】

1) ヒト肝細胞系の培養細胞を用いて *AL162497.1* が実際にどのような作用を持つかを検証する。

ヒトの *IRS2* 遺伝子座には *ASIRS2* の Orthologue (*AL162497.1*) が存在する。*AL162497.1* はマウス *ASIRS2* と比較して配列の相同性は 50-60% 程度と低いものの、そのゲノム上の配置は似通っており、一般的な ncRNA の性質として両者の機能が保存されている可能性が高い。実際 *AL162497.1* の発現は内臓脂肪蓄積や

NASH スコアと有意に相関しており、ヒト *AL162497.1* がマウス *ASIRS2* の orthologue である可能性がある。しかしながら、そのヒトにおける機能およびその作用機序については改めての検証が必要である。ここでは *AL162497.1* がマウス *ASIRS2* と相同の機能をもつことを想定し、ヒト肝細胞を用いた pull down assay やヒト肝細胞で *AL162497.1* を抑制した検証を行う。

2) *Hars2* はどのようなメカニズムで *Pparg* を制御しているか調べる

マウスの肝細胞特異的に *Hars2* をノックダウンした組織では *Pparg* の上昇を認めた。*Hars2* をノックダウンした組織において RNA シークエンスで網羅的に解析する。そこでコントロール群と比較して変化のあった遺伝子を脂質関連遺伝子中心に確認し、*Hars2* から *Pparg* へと至るシグナル伝達経路を明らかにし、新たな治療標的として提案する。

3) チアゾリジン系薬剤との併用効果を調べる

チアゾリジン系薬剤は血糖降下作用と抗動脈硬化作用を示す一方で、副作用として骨粗鬆症や浮腫、心不全の増悪などのリスクを有するとともに、その肝臓への直接作用は肝脂肪蓄積の亢進を含む肝毒性が懸念される。一方で、*ASIRS2* の抑制は、脂肪肝の改善につながるものの、むしろマウスの糖代謝は悪化した²⁾。これらの治験を踏まえ、今回 *db/db* マウスにロシグリタゾンと *ASIRS2* のノックダウンを併用することで、脂肪肝の改善効果やロシグリタゾン必要量の減少とともに、糖代謝の改善が併せて得られることを期待し、実験を行った。

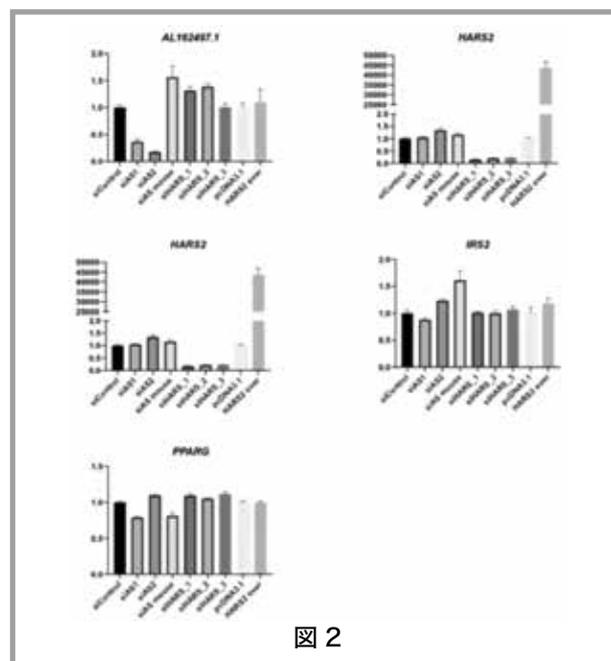


図 2

【結果・考察】

1) ヒト肝細胞系の培養細胞を用いて *AL162497.1* が実際にどのような作用を持つかを検証する。

初め我々は Human primary hepatocytes を用い、Human Hepatocytes Care Manual を参照の上複数の LNA で *AL162497.1* を抑制した際の遺伝子発現変化を確認したが、Off Target が多いため一貫した結果にならなかった。Hep3B 細胞では *AL162497.1* の発現が確認されたため、これを複数の方法で発現抑制したが、マウス肝癌細胞の系とは異なり *Pparg* の発現に差が見られなかった。

2) *Hars2* はどのようなメカニズムで *Pparg* を制御しているか調べる

Hars2 を肝臓特異的に抑制したマウスの肝組織で RNA-seq を行ったところ、mitoUPR 関連の遺伝子発現が増加していた。実際に、qPCR も同様の結果が得られた。

マウス由来の肝癌細胞を用いて *ATF4* を抑制したところ、*ATF4* の抑制により *Trib3* や *Nupr1* など mitoUPR 遺伝子の誘導は完全に抑制された一方、*Pparg1* の発現は逆に上昇した。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされるタンパク質の発現を阻害するクロラムフェニコールをコントロールにおいて再度確認したところ、*Hars2* の変化によって下流の *Pparg* に変化はなかった。

ATF よりも上流の *Gcn2*、また *ATF3*、*ATF5* の siRNA を確認。またこれ以外の pathway として JNK のリン酸化を Western blot で確認したが、そちらも刺激の有無で明らかな差は見られなかった (未公開データ)。

3) チアゾリジン系薬剤との併用効果を調べる

ロシグリタゾンと sh*AS1rs2* を併用することで、少量のロシグリタゾンで血糖改善効果が見られた。また、体重増加に関してもロシグリタゾン単剤で治療するよりも増加が乏しく、ロシグリタゾンによる脂肪蓄積関連遺伝子の発現誘導は、*AS1rs2* の発現抑制によりほぼ完全にキャンセルされ、これに伴い肝臓の炎症マーカー遺伝子の発現も抑制された。

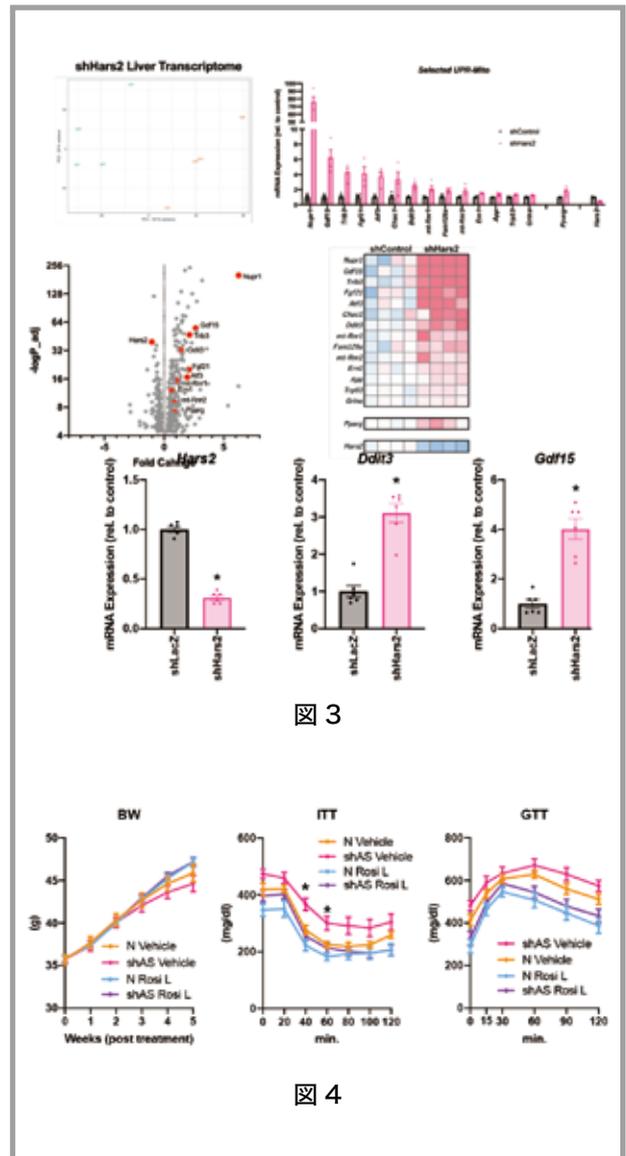


図 3

図 4

【考察】

初め我々は Human primary hepatocytes を用い、複数の LNA で *AL162497.1* を抑制した際の遺伝子発現変化を確認したが、Off Target が多いため一貫した結果にならなかった。そこでヒト肝癌由来細胞株である HepG2 や Hep3B を用いることとした。この中で Hep3B 細胞では *AL162497.1* の発現が確認されたため、これを複数の方法で発現抑制したが、マウス肝癌細胞の系とは異なり *Pparg* の発現に差が見られなかった。*AL162497.1* の作用と *AS1rs2* の作用とが異なるものであるか否かは更なる検証が必要であるが、一方でその結合蛋白として *AS1rs2* の下流で作用する *Hars2* については、その作用は種間で保存されている可能性が高い。そこで並行して、*HARS2* の作用機序についても以下の検討を行った。*HARS2* はヒスチジンの tRNA 合成酵素であるが、既報でも飢餓などで tRNA とアミノ酸が結合しない状況下で

は、tRNAの結合によりGCN2が活性化され、その下流でmitoUPRが惹起されると共に、*Pparg*の発現増加や脂肪肝形成は報告されている³⁾。GCN2の下流でmitoUPRを活性化する主要転写因子として*ATF3*、*ATF4*および*ATF5*が知られている。そこで、マウス由来の肝癌細胞を用いて*ATF4*を抑制した。*ATF4*の抑制により*Trib3*や*Nupr1*などmitoUPR遺伝子の誘導は完全に抑制された一方、*Pparg1*の発現は逆に上昇した。

これらのことから、1、*Pparg*の誘導は*ATF4*ではない別のpathwayの下流である2、そのpathwayは*ATF4*が無い条件下ではおそらく代償性に活性化されているという二つの可能性が考えられた。今後、*in vivo*で更なる検討を進める予定である。また、ロシグリタゾンとsh*ASirs2*を併用することで、少量のロシグリタゾンで血糖改善効果が見られた他、体重増加に関してもロシグリタゾン単剤で治療するよりも増加が乏しく、ロシグリタゾンによる脂肪蓄積関連遺伝子の発現誘導は、*ASirs2*の発現抑制によりほぼ完全にキャンセルされ、これに伴い肝臓の炎症マーカー遺伝子の発現も抑制された。このことから、*ASirs2*の抑制と少量のチアゾリジンとの併用は、肥満に伴う脂肪肝および糖代謝異常に対する有効な治療である可能性が示唆された。

【計画】

当初予定していた*IRS2*遺伝子座の*ASirs2*と*AL162497.1*との相同性の確認を目的として、次年度はIPS細胞由来の幹細胞をつかった検討をする。またGCN2の阻害薬を使用した場合に、*in vivo*で*Hars2*の変化や*Pparg*、脂肪肝などにどのような変化が生じるかを解析する。

【引用文献】

- 1) Awazawa M et al, A microRNA screen reveals that elevated hepatic ectodysplasin A expression contributes to obesity-induced insulin resistance in skeletal muscle, *Nat Med*,23;1466-1473(2017).
- 2) Awazawa M & Maya Matsushita et al. An antisense transcript transcribed from *Irs2* locus contributes to the pathogenesis of hepatic steatosis in insulin resistance. *Chembiol*,29;680-689(2021).
- 3) J Dong et al. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell*,6;269-279(2000).

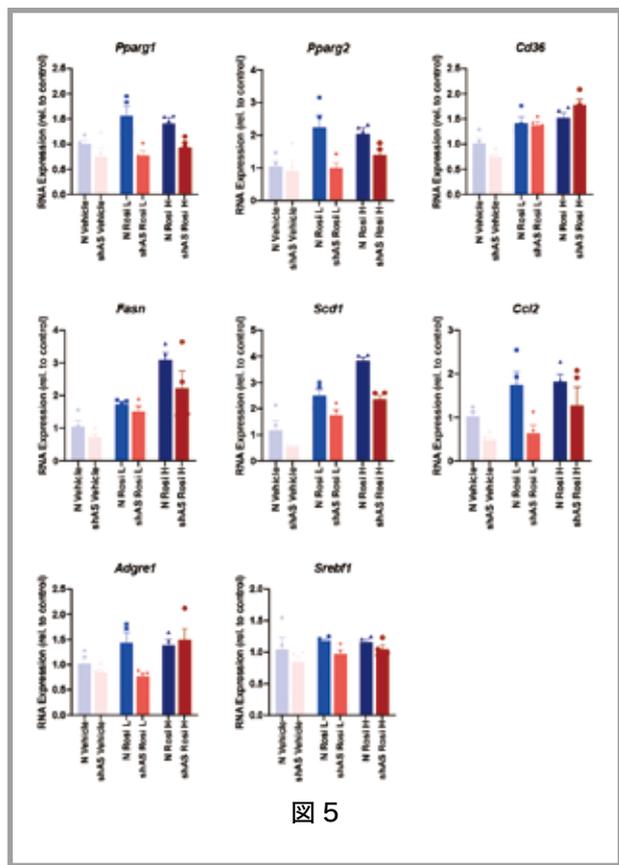


図 5

新規代謝物を起点とした、褐色脂肪組織の分化制御機構の解明および糖尿病・肥満症へ治療応用

南野 寛人

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【目的】

我々は、これまでの研究で、代謝物：テトラヒドロピオプテリン (BH4) が、褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue:BAT) の分化に不可欠な因子であることを、遺伝子改変マウスや細胞実験系を用い明らかにし、代謝物レベルでのBAT制御が生体内で重要であることを示してきた。しかし、詳細な制御機構や、BAT分化に関与するその他の代謝物についての知見は非常に乏しいのが現状である。

本研究課題では、これまでに同定した、BAT分化を制御する代謝物：BH4の下流シグナルや代謝物を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

野生型マウス、BAT 分化障害を来す BH4 欠乏マウス (Hph-1)、ならびに BH4 の補充を行った BH4 欠乏マウス由来の BAT を採取し、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、BH4 欠乏下で遺伝子発現が大きく減損し、BH4 補充による回復する遺伝子群をパスウェイ解析により複数同定した。同定された一部の候補について詳細な実験を行うため、褐色脂肪細胞株を用いた *in vitro* の検討を行い、BH4 と各パスウェイの阻害薬の共投与実験を行った。結果、一酸化窒素 - グアニル酸シクラーゼ - cGMP の経路が BH4 由来の褐色脂肪分化に大きく寄与することが明らかとなった。

上記実験と並行し、上述の BAT 試料を用いメタボロミクス解析を行い、網羅的な代謝物の挙動の変化を調査することを試みている。サンプル抽出条件などの予備的な検討を本年度既に行い、現在データを取得・解析中である。

【考察および今後の展開】

本年度の課題の遂行により、代謝物：BH4 による BAT 分化の制御機構に寄与する遺伝子群を同定し、その一部の経路に関して細胞実験系において BAT 分化に寄与することを明らかになった。本研究では、メタボロミクスによる網羅的代謝物解析も同時に施行している。今後はヒト応用への基盤構築を見据え、京都大学が保有するヒトにおいて BAT が同定可能な FDG-PET/CT を含む臨床データベースと照合しながら、ヒトでも同定可能な、BAT 制御に関与する新規の代謝物探索も並行して行う予定である。

1型糖尿病におけるCD8+T細胞の分化制御機構の 解明

宮 地 康 高

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【目的】

1 型糖尿病は、膵島炎を病理学的特徴とする自己免疫疾患であり、CD8+T 細胞は膵島炎において最も多く認められる炎症細胞である。樹状細胞などの抗原提示細胞は膵島自己抗原を取り込み、CD4+T 細胞が認識する。CD4+T 細胞はヘルパー細胞 (Th1) に分化し、CD8+T 細胞が細胞障害性 T 細胞 (エフェクター T 細胞)

に分化するのを促進する。細胞障害性 T 細胞はインターフェロン (IFN) やパーフォリンを分泌して β 細胞を破壊する。

助成者は既に、転写因子 FoxO1 が 1 型糖尿病モデル (NOD) マウス由来の CD8+T 細胞の細胞分化に重要な働きを担っていることを見出しており、FoxO1 阻害薬により CD8+T 細胞の分化並びに IFN γ の分泌が抑制されることを確認している。

本研究では、1 型糖尿病において FoxO1 が CD8+T 細胞の分化を制御するメカニズムを明らかにし、FoxO1 阻害が 1 型糖尿病の病態を改善させるか否かを検証する。

【方法】**1) CD8+T 細胞の RNA-seq 解析**

2 種類の FoxO1 阻害薬を用いて CD8+T 細胞を前処置後に、抗 CD3/CD28 抗体で T 細胞を刺激して 24 時間後に細胞を回収した。RNA 抽出をおこない、RNA-seq 解析を施行した。

2) NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

6 週齢の雌性 NOD マウスに浸透圧ポンプ (Alzet 1004) を植え込み、FoxO1 阻害薬を 4 週間持続投与した。経時的に血糖値を測定し、糖尿病の発症・進展が抑制されるか否かを検討した。投与終了後に膵臓組織を採取し、残存 β 細胞面積と炎症細胞浸潤を評価した。

【結果】**1) CD8+T 細胞の RNA-seq 解析**

主成分分析 (PCA) から、2 種類の FoxO1 阻害薬群と対照群が分かれた。PCA rotation でのパスウェイ解析により、上位に細胞死、翻訳、酸化的リン酸化のパスウェイが抽出された (図 1)。次に、変動発現遺伝子解析を行ったところ、上位 100 遺伝子の中に 1 型糖尿病の GWAS 関連遺伝子が 8 個 (PTPN22, BACH2, TRIB2, CD69, RASGPR1, PTPRC, IRF1, IRF4) 含まれており、特に BACH2 は、2 種類の FoxO1 阻害薬の前処置により有意に減少することが明らかとなった (図 2)。

2) NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

4 週間の FoxO1 阻害薬 (高用量, 低用量) 投与中に対照群を含め糖尿病を発症する個体はいなかった。また、いずれの容量でも FoxO1 阻害薬により、体重増加に影響はなかった。投与終了後に肝臓および膵臓を摘出し、それぞれ遺伝子発現と免疫染色を行い、FoxO1 阻

害薬の作用を検証した。肝臓の遺伝子発現解析では、用量依存的に糖新生関連酵素 G6Pase の減少を認め、膵臓の組織解析では、β細胞の残存面積ならびにリンパ球 (CD3, CD4, CD8) の浸潤に明らかな差は認めなかった。以上から、4 週間の FoxO1 阻害薬投与に忍容性があることが確認された。

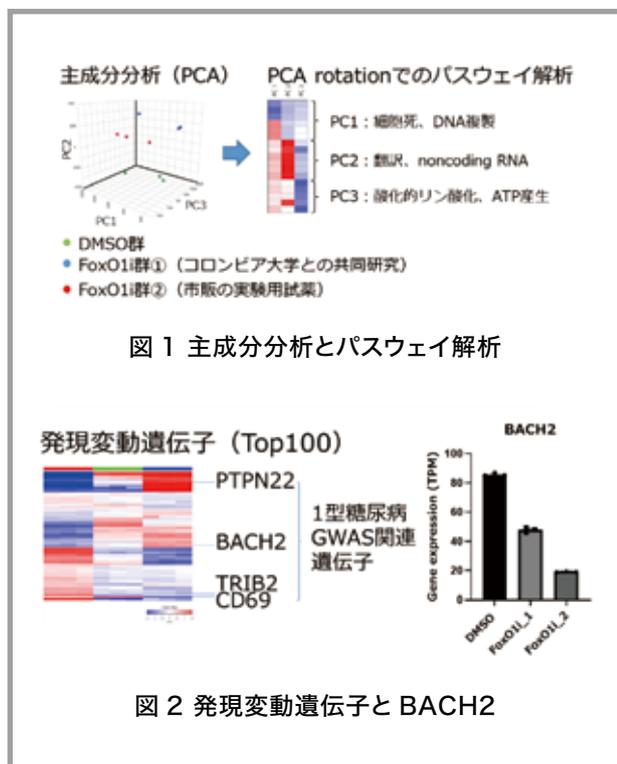


図 1 主成分分析とパスウェイ解析

図 2 発現変動遺伝子と BACH2

【考察】

1 型糖尿病モデルマウスの CD8+T 細胞において、FoxO1 が細胞分化を制御するメカニズムは不明であった。本研究で、RNA-seq 解析から BACH2 を FoxO1 の標的分子として同定した。BACH2 は、1 型糖尿病の GWAS 関連遺伝子であるが、これまでに B 細胞、NK 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の細胞分化に重要で、幾つかの細胞では FoxO1 が BACH2 を直接制御していることが報告されている。今後は、1 型糖尿病の病態で FoxO1 並びに BACH2 が CD8+T 細胞の分化と機能をどのように制御しているかについての解析をすすめる。

非侵襲的膵β細胞イメージング技術を用いた、膵β細胞量を標的とした糖尿病の予防・治療法の開発

村上隆亮

(京都大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科)

【背景・目的】

膵島移植は 1 型糖尿病の有用な治療法である。しかし、移植後生存膵島量の維持・保護に関しては課題が多く、インスリン治療からの離脱の維持など長期成績の更なる向上には、移植後生存膵島量の非侵襲的評価法の確立が重要である。近年、我々は、¹¹¹In ジウム (In) 標識 exendin-4 プローブを用いた Single photon emission tomography (SPECT) による非侵襲的な膵β細胞量評価法を開発した。具体的には、Glucagon like-peptide-1 (GLP-1) 受容体に特異的に結合する Exendin-4 を骨格とした放射性同位元素標識プローブを用いた非侵襲的膵β細胞イメージング技術を開発し、Positron emission tomography (PET) や SPECT での生体マウス膵描出、同法を用いた膵β細胞量の縦断的評価が可能であることを複数の糖尿病モデルマウスで示した。本研究では、生体の膵臓におけるβ細胞量評価法である ¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を用い、移植後生存膵島量の非侵襲的評価を試みた。

【方法】

ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスに同系統マウスから単離した異なる数の膵島を経門脈的に移植し、¹¹¹In-exendin-4 プローブを尾静注した。その凍結肝切片を用いて、インスリン免疫染色とオートラジオグラフィを行った。次に、切除肝臓全体における ¹¹¹In-exendin-4 プローブ集積値、及び肝内インスリン含有量を測定した。また、生きて膵島移植マウスの ¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を撮像し、SPECT/CT 画像上の ¹¹¹In-exendin-4 プローブ肝集積値、およびインスリン免疫染色による病理学的に算出した肝内β細胞量を評価した。

【結果】

同系統マウスの膵島を経門脈的に移植したストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスでは、その凍結肝切片オートラジオグラフィにおける放射能シグナル像はインスリン免疫染色による蛍光シグナル像と一致した。また、切除肝臓全体における ¹¹¹In-exendin-4 プローブ集積値は移植した膵島数が多いほど高値であり、肝内インスリン含有量の結果とも一致した。また、¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT では肝内移植膵島を描出可能であった。さらに、SPECT/CT 画像上の ¹¹¹In-exendin-4 プローブ肝集積値は移植した膵島数が多いほど高値であり、組織学的手法により算出

された肝内膵β細胞量と正の相関を示した。

【結語】

¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CTを用いて非侵襲的に移植後生存膵島の描出、肝内生存膵β細胞量の評価が可能であった。

【文献】

Botagarova A*, Murakami T*, Fujimoto H, Fauzi M, Kiyobayashi S, Otani D, Fujimoto N, Inagaki N. Noninvasive quantitative evaluation of viable islet grafts using ¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT. FASEB J. 2023;37(4):e22859. doi: 10.1096/fj.202201787RR. (* Equal contribution)

うつ様行動制御遺伝子USP46によるエネルギー代謝制御に関する研究

村田 知 弥

(筑波大学 医学医療系)

【目的】

脱ユビキチン化酵素 USP46 は神経系に高発現し、*Usp46* 欠損マウスはうつ様行動をほとんど示さない。我々は培養細胞を用い、近位依存性ビオチンラベリング (BioID) によるタンパク質相互作用の解析を行い、USP46 がエネルギー代謝関連因子と相互作用することを見出した。本研究では、USP46 とエネルギー代謝の関連の解明を目指し、*Usp46* 欠損マウスの解析と USP46-BioID ノックイン (KI) マウスを用いた *in vivo* BioID を実施する。

【結果】

1) 脳特異的 *Usp46* 欠損マウスの解析

全身性 *Usp46* 欠損マウスは若齢期に低体重を示す。この体重低下が神経系の USP46 機能喪失によるものか検証するため、神経幹細胞特異的 Cre (*Nestin-Cre*) マウスと *Usp46*^{fllox} マウスを交配した。しかし、*Nestin-Cre* の生殖細胞系列における異所性組換えが頻発し、脳特異的 *Usp46* 欠損マウスを得られなかった。そこで現在、新規神経特異的 Cre マウスを開発中しており、樹立次第、*Usp46*^{fllox} マウスとの交配を進める。

2) USP46-BioID-KI マウスを用いた *in vivo* BioID

全身性 *Usp46* 欠損マウスが低体重を示す若齢期におけ

る *in vivo* BioID の確立に取り組んだ。USP46-BioID-KI マウスを交配し、母体に対し、出産日から7日間の高ビオチン含有餌を投与した。その結果、ミルクを介したビオチンの移行により、仔 KI マウスの脳において USP46 の近位タンパクのビオチン化を誘導できることが判明した。

3) USP46 変異マウスの作製

USP46 と高い相同性を有する USP12 は、脱ユビキチン化活性非依存的な機能をもつ。*Usp46* 欠損マウスの表現型が酵素活性依存的であるか検証するため、Cofactor である WDR48 との結合能を失った USP46-Q236A, E237A 変異マウスを樹立した。若齢マウスの体重測定を行ったところ、全身性 *Usp46* 欠損マウスと同様に、この変異マウスも低体重を示すことが判明した。

【今後の展開】

新規開発中の Cre マウスを用いて、神経特異的 *Usp46* 欠損マウスを作製し、代謝表現型、行動解析を実施する。また、*in vivo* BioID の質量分析解析により、若齢期マウス脳における USP46 の相互作用因子を同定する。

