

日本応用酵素協会誌

No.55

2020

総 説

タンパク質架橋酵素を介した上皮細胞の間葉転換機構の解析	1
辰川 英樹, 篠田 祥希, 竹内 大修, 人見 清隆	
チロシンキナーゼによるT細胞の分化制御	11
室 龍之介, 新田 剛	

2020年度 研究報告

酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究	19
成人病の病因・病態の解明に関する研究助成	48
Vascular Biology Innovation に関する研究助成	83
全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成	100
Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成	112

研究調査所 酵素情報

自己免疫疾患領域における創薬標的としての CaMK4	135
Prolyl Hydroxylase	138

総 説

タンパク質架橋酵素を介した上皮細胞の 間葉転換機構の解析

辰 川 英 樹*, 篠 田 祥 希*
竹 内 大 修*, 人 見 清 隆*

1. はじめに

上皮細胞の間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition; EMT) とは、上皮細胞が上皮としての性質を失い間葉系の性質を獲得する現象である。生体内の微小環境変化により上皮細胞が刺激を受けると、本来有する細胞極性が消失すると共に、細胞間接着の減少、遊走能の亢進、アクチン系細胞骨格のリモデリングが起こる。古くから EMT は原腸陥入や神経管の形成などの発生段階に関わる現象として知られてきたが、発生に特異的な現象ではなく、慢性的な炎症組織で見られる組織の硬化 (線維化) や癌細胞の増殖・浸潤・転移など癌の悪性化にも大きく関与する。

慢性腎臓病は腎障害や機能低下が持続的に続く疾患である。この主たる原疾患としては糖尿病や高脂血症などの生活習慣病が挙げられるが、初期症状がほとんどないことから早期発見が難しく、治療法としても生活習慣の改善に基づく対処療法であり、腎機能を改善させる根本

的治療薬は存在しない。病態の悪化により、細胞外マトリクス (ECM) が過剰蓄積するような組織の線維化が起こり、末期腎不全に至る。ECM の蓄積自体は創傷治癒過程に見られる生体反応であるが、過剰な蓄積は正常な組織構築を破壊し、臓器不全に繋がる。このような線維化の主原因は、腎臓の尿細管周囲の間質領域に存在して ECM を過剰産生する筋線維芽細胞の増殖・活性化である。筋線維芽細胞の由来としては、線維芽細胞や周皮細胞の形質転換、上皮間葉転換、内皮間葉転換、循環線維細胞などの遊走が挙げられるが、このうち近位尿細管に存在する上皮細胞は腎臓内で初期に変化を受ける場であり、EMT に陥った細胞が線維化促進因子の分泌を介して線維芽細胞や周皮細胞による筋線維芽細胞の増殖・活性化を誘導することから^{1,2)}、病態進行の起点となりうる近位尿細管上皮細胞の EMT の分子機構の理解が重要視されている。

最近、著者らは線維化した腎臓の尿細管上皮細胞にお

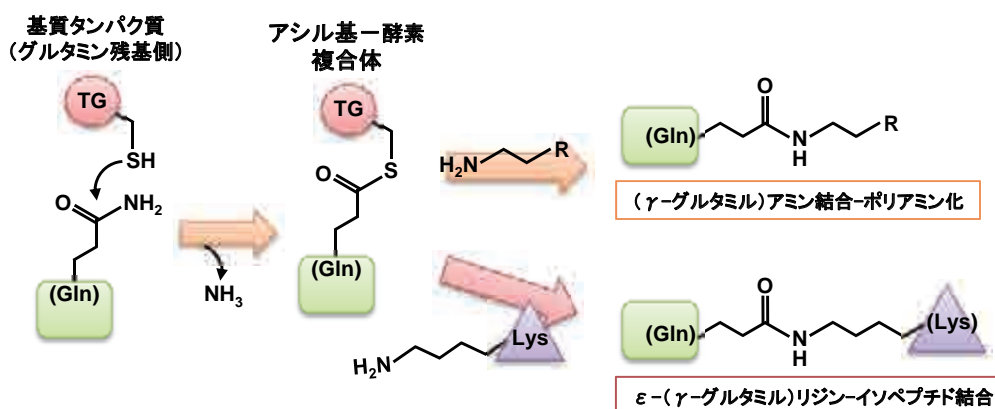


図1 TGの架橋化反応の機構

TGによる2段階架橋化反応の機構。基質タンパク質中のグルタミン (Gln) 残基と TG の間で反応中間体が形成され、これに反応する基質分子 (一級アミンまたはリジン残基を持つタンパク質) により反応産物が生成される。

いて、これまでに線維化との関連報告があるタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ (Transglutaminase; TG) の活性が顕著に増加することを見出した。本稿では同架橋酵素を標的とした組織線維化および EMT の分子機構の解明研究について近年の知見を紹介する。

2. タンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ

トランスグルタミナーゼ (TG) は、特定のタンパク質のグルタミン残基とリジン残基との間に Ca^{2+} 依存的にイソペプチド結合を形成する翻訳後架橋修飾酵素である。同時にこの反応はイソペプチドの形成だけでなく、グルタミン残基に一級アミンを付加させるアミド化や、水分子の付加によってグルタミン酸へと変換させる脱アミド化の反応も触媒する (図 1)^{3,4}。高等動物では TG は 8 種類のアイソザイムからなるファミリーを構成し、それぞれのアイソザイムが特徴的な組織分布および架橋基質を介して血液凝固、皮膚形成、死細胞除去を始め多彩な生命現象に関与する一方、異常なレベルの架橋形成は種々の疾患 (肝臓・腎臓・肺などの慢性障害や線維化、神経変性疾患、糖尿病、癌、自己免疫疾患など) の原因となる。

3. TG ファミリーの働き

TG の主要なアイソザイムとしては、Factor XIII (FXIII; 血液凝固第 XIII 因子) と TG1 (皮膚型) および TG2 (組織型) が挙げられる。FXIII は主に血漿中に存在し、トロンビンによる限定分解により活性化され、血液凝固の最終段階としてフィブリンを架橋する。皮膚表皮に発現する TG1 は TG3 および TG5 と共に角質化に関与する。これらは表皮細胞の分化に伴って段階的に活性化し、細胞膜でインボルクリンやロリクリンなどの様々なタンパク質を協調的に架橋重合し、角層細胞辺縁に強固な周辺帯 (コーニファイドエンベロープ) を形成する。TG2 は幅広い組織に存在し、細胞の生体構造の構築や安定化、増殖や分化、細胞死の制御など多彩な生命現象に寄与する。他のアイソザイム (TG4, TG6, TG7) については生化学的性質や生理的意義に関する知見は未だ少ない。このように TG ファミリーは Ca^{2+} 結合部位や活性中心部位など一次配列上の相同領域を有するものの、それぞれの組織での発現については独自のパターンを示し⁵、各アイソザイムが多様多様な基質分子の架橋反応を行う

ことにより、基質タンパク質の新たな機能の獲得や消失を引き起こし、このことが多くの生理的・病理的現象に関わる (表 1)。

4. 線維化と TG の関係性

TG2 が組織線維化の形成に寄与することは多くの論文によって報告されている。TG2 による ECM に存在するコラーゲンの架橋は、マトリックスメタロプロテアーゼによるコラーゲン分解に対して抵抗性を持たせ、コラーゲンの過剰蓄積による組織線維化を誘導する^{6,7}。また、後述のように線維化を誘導する主要なサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子- β (Transforming growth factor- β ; TGF- β) の活性化に寄与する。TG2 は潜在型 TGF- β 結合タンパク質と ECM を構成するフィブロネクチンを架橋することにより、細胞膜上への潜在型 TGF- β の蓄積に関わる。このことは、障害刺激の際にプロテアーゼやインテグリンなどによって潜在型 TGF- β 複合体から活性型 TGF- β が放出される機構に関与する^{8,9}。さらに TGF- β の下流のシグナル伝達機構に重要な転写因子である核内因子 κB (Nuclear factor-kappa B; NF- κB) は TG2 と協調したポジティブフィードバック機構による相乗的なシグナル伝達の促進に関わる^{10,11}。これまでに肝臓¹²⁻¹⁵・腎臓¹⁶⁻¹⁸・肺¹⁹⁻²¹の組織障害や線維化において、TG2 は有意に病態の増悪に関与することが著者らの研究を含め多くの論文において報告されているが、TG2 以外の TG アイソザイムに焦点を当てた解析例は乏しく、病態の理解のためにはこれらの発現や局在解析、架橋される基質分子について明らかにすることが重要である。

5. TG アイソザイム特異的な基質ペプチド配列の同定と応用方法

TG ファミリーによる架橋反応はタンパク質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、リジン残基側を含む一級アミンをアシル受容体として、タンパク質に対するアミン分子の共有結合的導入や、グルタミンとリジン残基間での ϵ -(γ -グルタミル)リジン-イソペプチド結合を触媒する (図 1)。TG アイソザイムは同じ反応段階でチオエステル中間体を形成するが、全てのペプチド鎖中のグルタミン残基が同じアシ

子供与体として認識されるわけではなく、架橋する相手には反応性に対する優劣があり、様々な基質タンパク質が同定されている。この違いは主に各 TG アイソザイムが基質タンパク質中のグルタミン残基またはリジン残基を認識する際の両残基付近のペプチド認識配列に特異性を持つことが基質反応性の差異に起因し、架橋されるタンパク質の多様性を決定していると考えられる。著者らはこれまでにランダムペプチドライブラリーから各 TG アイソザイムが反応しやすい基質ペプチド配列を探索しており、TG アイソザイムそれぞれについて基質とし

て高い反応性を有するグルタミン残基を含む 12 残基のペプチド配列を同定してきた²²⁾。これまでに FXIII²³⁾、TG1²⁴⁾、TG2²³⁾、TG3²⁵⁾、TG6²⁶⁾、TG7²⁷⁾の各アイソザイム (TG4 および TG5 を除く) において高い反応性を有する基質ペプチド配列を同定している (表 1)。

このような各 TG アイソザイム特異的な基質ペプチド配列を用いることにより、特定のタンパク質の限定されたリジン残基にペプチドタグを標識することが可能となり、様々な研究のツールとしての有効活用が期待されている^{28,29)}。著者らは生組織中の TG 架橋活性を視覚化する

TG isozyme	存在部位	生理的意義	基質ペプチド配列
FXIII	血漿	血液凝固、骨形成	DQ <u>M</u> M L P W P A V A L (pepF11)
TG1	上皮組織・脳	表皮形成	Y <u>E</u> Q H K L P S S W P F (pepK5)
TG2	全組織	細胞死・細胞接着など	H <u>Q</u> S Y V D P W M L D H (pepT26)
TG3	皮膚表皮・毛包・脳	表皮形成	P P P Y S F Y <u>Q</u> S R W V (pepE51)
TG4	前立腺	交尾栓形成(げっ歯類)	
TG5	表皮・胎盤・卵巣	表皮形成?	
TG6	表皮・小脳?	?	D D W D A M D E <u>Q</u> I W F (pepY25)
TG7	精巣・腎臓	?	Y S L <u>Q</u> L P V W N D W A (pepZ3S)

表 1 TG アイソザイムの種類, 存在部位, 生理的意義, 特異的に反応する基質ペプチド配列

TG ファミリーを構成する各アイソザイムの局在部位と生理的意義, 当グループで同定したグルタミン残基 (下線) 側の基質として高反応かつアイソザイム特異的に架橋されるペプチド配列。

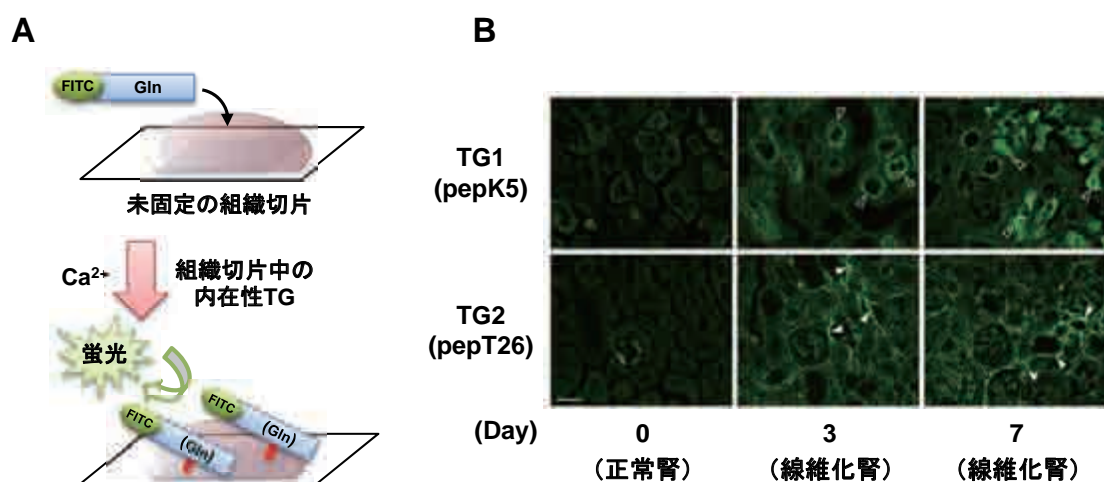


図 2 蛍光標識基質ペプチドを用いた TG 架橋活性の可視化

(A) 各 TG アイソザイムに対する蛍光標識基質ペプチドを未固定の腎組織切片上で反応させることにより、グルタミン受容基質に対する蛍光ペプチドの取り込み量を指標として TG による架橋活性を可視化し、局在分布を評価した。(B) 一側尿管結紮法によりマウスに腎線維化を誘導し、経時的な線維化腎における TG1 および TG2 の活性分布を可視化した。黒矢頭は尿細管上皮細胞で活性化した TG1, 白矢頭は間質領域で活性化した TG2 をそれぞれ示す。スケールバーは 50 μm。

るためのツールとして、蛍光標識した基質ペプチドを用いた活性測定系を開発した。FITC 標識した基質ペプチドを未固定の凍結組織切片と反応させると、内在性の TG 活性によって組織中の特定のタンパク質中のリジン残基と基質ペプチドが架橋される。この蛍光ペプチドの取り込み量は内在性の酵素活性に依存するため、後述するように各 TG アイソザイムの架橋活性の程度および局在分布を測定することが可能となる (図 2A)³⁰⁾。

6. 腎線維化におけるアイソザイム特異的な TG 架橋活性の可視化

著者らはこれまでに腎線維化の進行に伴う TG アイソザイムの役割を明らかにしてきた。一側尿管結紮法 (UUO) により作製した腎線維化モデルでは 8 種の TG アイソザイムのうち、TG1 および TG2 のみ病態増悪に相関して発現量が増加した。上記の TG アイソザイムに特異的な基質ペプチド (TG1: pepK5 ; TG2: pepT26) を用いて活性分布を調べたところ、線維化早期 (Day 3) の尿細管上皮細胞において TG1 の顕著な活性化が見られたのに対し、TG2 活性はこれまでの報告のように間質領域に活性化が見られた (図 2B)。ネガティブコントロールとしての基質ペプチドのグルタミン残基をアスパラギン残基に置換した配列 (QN) では蛍光シグナル

が見られなかったことから、各基質ペプチドのシグナル特異性は確認済みである。

架橋活性の上昇が見られた領域について更なる詳細な検討を行うため、TG1 および TG2 活性と上皮細胞マーカー E-cadherin との共染色を行った。腎線維化に伴い、E-cadherin の発現は顕著に低下したことから、尿細管上皮細胞において EMT が誘導されることが示された。TG 活性と E-cadherin の発現分布を詳細に調べるため、共染色実験を行ったところ、尿細管上皮細胞で活性上昇する TG1 は E-cadherin 発現量と逆相関性を示した。一方、TG2 については尿細管上皮細胞との共局在は見られなかった (図 3)。このことから、腎線維化において TG1 は尿細管上皮の細胞障害や形質転換に関与し、TG2 は間質領域においてマクロファージや線維芽細胞の活性化もしくは細胞外領域での線維性タンパク質の架橋による安定化を担う可能性が考えられる。

7. EMT と TG

EMT を誘導する中心的なシグナル伝達経路は TGF- β を介した経路である³¹⁾。TGF- β は哺乳類では 3 種類のアリソフォーム (TGF- β 1, - β 2, - β 3) が存在し、構造的に類似した TGF- β スーパーファミリーとしてアクチビンや BMP (骨形成誘導因子) などが含まれる。

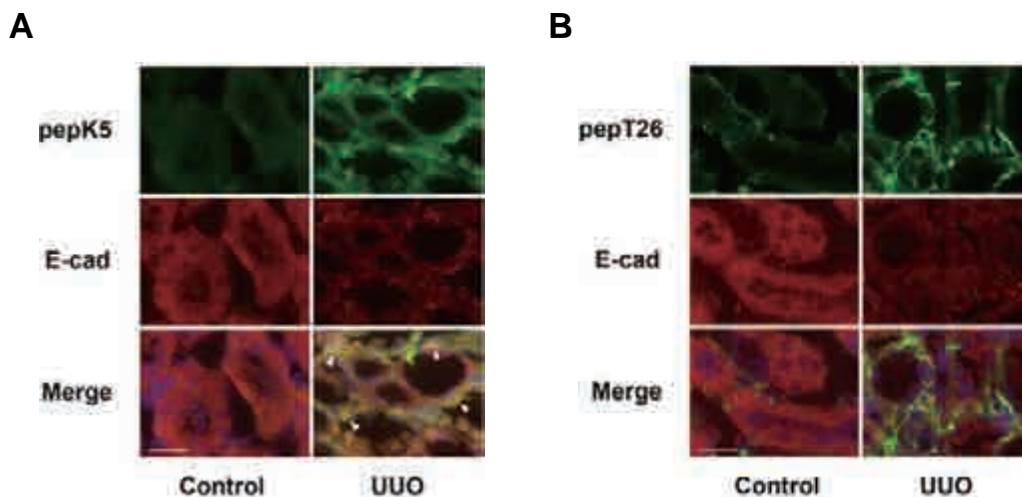


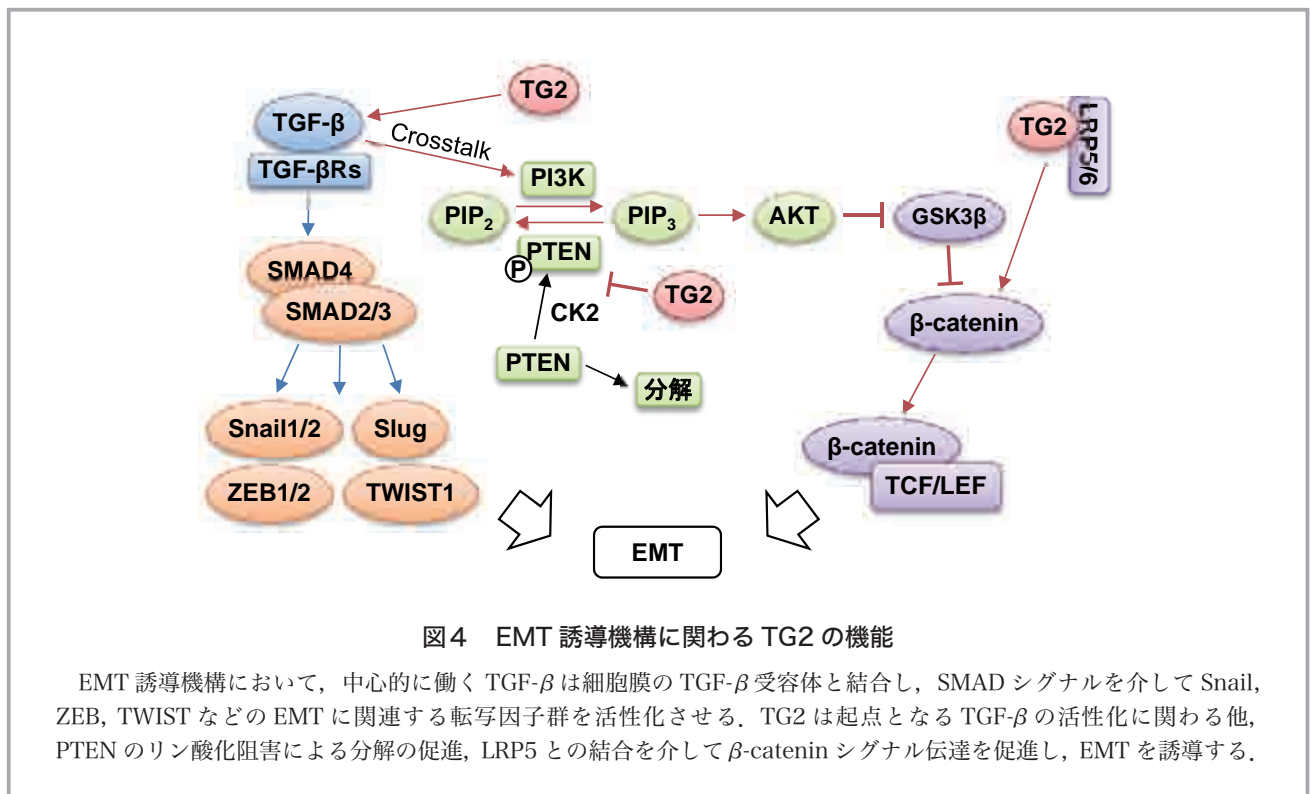
図 3 腎線維化における TG の活性分布と上皮細胞マーカーの共染色

TG1 および TG2 に対する蛍光標識基質ペプチドを用いて活性染色後、組織を固定して抗体を用いた染色により上皮細胞マーカー E-cadherin (E-cad) の発現分布を評価した。尿管結紮処置 (UUO) 後 3 日目の腎組織切片における TG1 (A, pepK5) 活性もしくは TG2 (B, pepT26) 活性と E-cadherin との共染色実験。白矢頭は TG 活性と E-cadherin の発現が共局在した領域を示す。スケールバーは 25 μ m。

TGF- β は細胞分化・遊走・接着にも関与し、個体発生や組織再構築、創傷治癒、炎症・免疫、癌の浸潤転移などの幅広い領域において重要な役割を果たしていると考えられている。これら3種のTGF- β アイソフォームはTGF- β 受容体(TGF- β R1-3)と結合し、シグナル伝達因子SMAD 2/3, ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK (Jun N-terminal kinase) など複数のMAPキナーゼファミリーが活性化され、シグナル伝達が起こる^{32,33}。これらのシグナルは最終的にEMTに関連する転写因子群SNAIL1/2 (snail family zinc finger 1/2), TWIST1 (twist family bHLH transcription factor 1), ZEB1/2 (zinc finger E-box binding homeobox 1/2), KLF8 (Kruppel-like factor 8) などが活性化され、プロモーターへの結合や関連する制御因子を介してE-cadherin や Claudin などの上皮細胞マーカーの発現を抑制する。さらに、TGF- β 以外にも様々な増殖関連因子 (FGF, EGF, HGF, Wnt/ β -catenin, Notch signal) や低酸素刺激がEMTの誘導に関わることから、関連するシグナル伝達系は多岐にわたり、生理的環境や病態に対応した分子メカニズムの理解が重要である。

癌細胞が薬剤耐性および浸潤、転移能を獲得する際にもEMTは重要である。EMTの誘導によりマトリッ

クスメタロプロテアーゼ (MMP2, MMP3, MMP9 など) の活性が増加し、癌細胞の足場の基底膜を分解する。これにより癌の遊走性が促進され、ECMを介した転移が起こる。このようなEMTが誘導される微小環境ではTGF- β の恒常的な活性化が見られるが、この活性化が安定的に誘導されるためには、TGF- β を包み込むような形で活性化を抑える潜在型TGF- β 結合タンパク質 (LTBP) の蓄積が重要であり、TGは架橋反応を介してLTBPを細胞膜に固定化する働きを持つ^{8,9}。フリーのTGF- β の半減期が僅か2分であるのに対し、LTBPに包まれたTGF- β の半減期は90分であるため、適切な状況下でのTGF- β の活性化にはLTBPが安定的に細胞膜に存在する必要がある。実際にTG2の発現量は多くの癌細胞株において癌の悪性度・転移能と関連することに加え、TG2の発現量はEMTマーカーの発現量とも相関する³⁴。膵臓癌細胞においてTG2はPTENのリン酸化阻害によるタンパク質分解を促進し、Focal adhesion kinase/AKTシグナルを亢進させる³⁵。近年はヒト結腸癌細胞株において更なるEMTの分子機構が解明されており、TG2がWnt共受容体LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) と結合し、 β -cateninシグナルを介したEMTを制御することが報告されている³⁶(図4)。



8. 尿管上皮細胞における TG1 の役割

尿管上皮細胞の EMT における TG1 の制御機構を理解するために、細胞レベルでの線維化誘導モデルを用いて評価した。線維化を誘導する主要なサイトカイン TGF- β を尿管上皮細胞株 HK-2 に処理し、E-cadherin および Collagen の発現量変化を指標として EMT 誘導の程度について評価した (図 5A)。TGF- β を処理した HK-2 では有意に E-cadherin の減少および Collagen の発現が誘導されたが、siRNA による TG1 の発現抑制下では、Collagen の発現量には変化はないものの、E-cadherin の発現の更なる減少が見られた (図 5B-D)。一方、TG1 を高発現させた HK-2 は E-cadherin の発現低下を有意に抑制したことから、

TG1 は EMT に対して抑制的に働くことが示唆された (図 5E-G)。尿管上皮細胞の EMT は近年、部分的 (partial) EMT と呼ばれ、細胞が基底膜から脱離しないため筋線維芽細胞の形質転換への寄与度が低いことが示されている³⁷⁾。尿管上皮細胞における TG1 の発現量の増減が Collagen の発現に影響しないことから、このような部分的 EMT の誘導機構に TG1 が関わる可能性が考えられる。

9. おわりに

本研究では尿管線維化におけるタンパク質架橋酵素に焦点を当て、TG ファミリー間でのアイソザイム特異的な活性分布の解析を経て、尿管上皮細胞の部分的 EMT

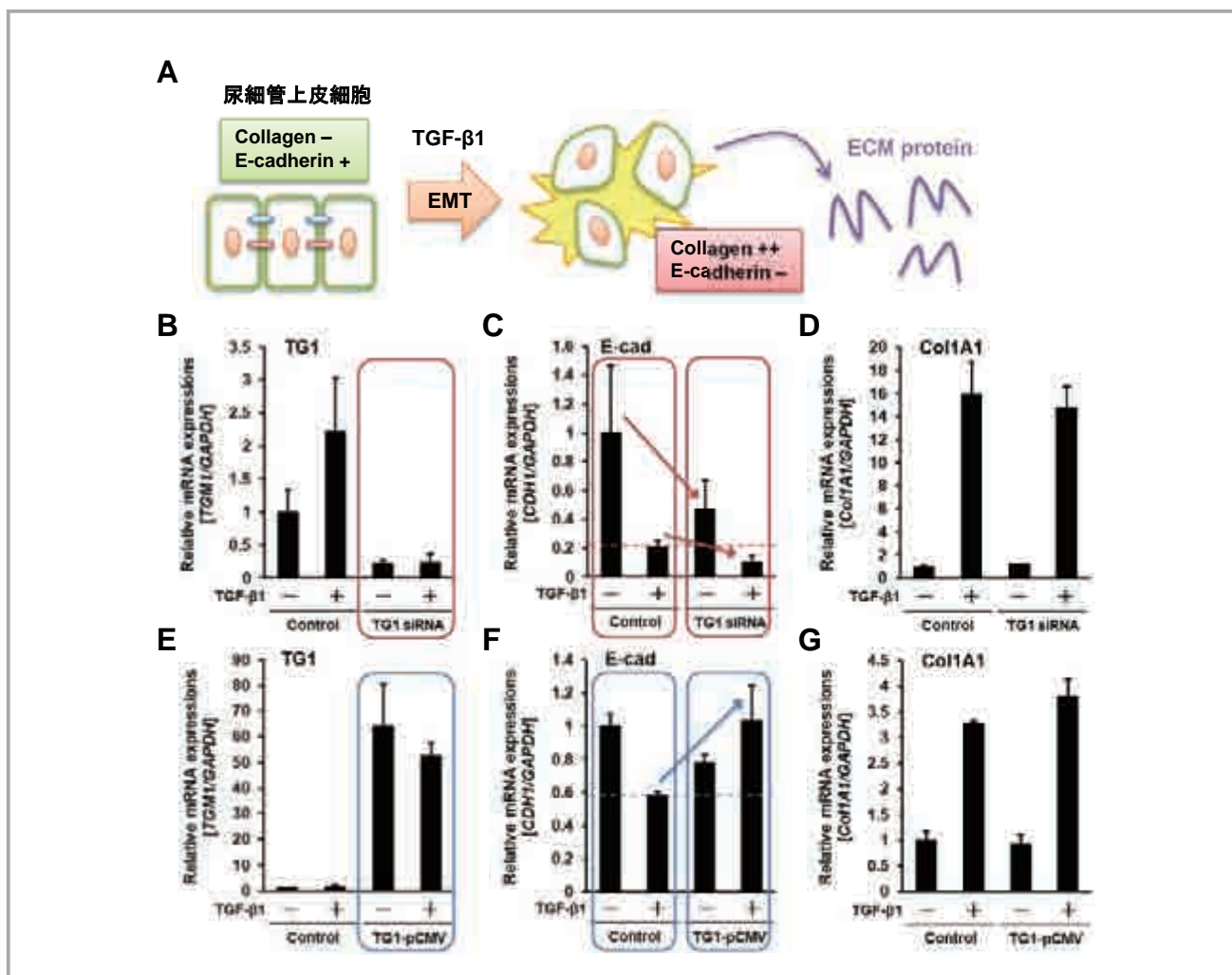


図5 尿管上皮細胞における TG1 の役割

(A) TGF- β 1 を処理した尿管上皮細胞が線維芽細胞用に形質転換する際に、上皮細胞マーカー E-cadherin (E-cad) の発現低下、線維性タンパク質の一つ Type1-collagen (Col1A1) の発現増加を誘導する。siRNA により TG1 の発現を低下 (B-D) もしくは発現ベクターにより TG1 を高発現 (E-G) させた尿管上皮細胞株 HK-2 に TGF- β 1 を処理し、EMT の誘導の程度について E-cad および Col1A1 の発現量を指標としたリアルタイム PCR により評価した。サンプル中の GAPDH の mRNA 量を用いて標準化を行い、各遺伝子の発現量を算出した。

の制御機構を解明する上で足掛かりとなる研究成果を提供することが出来た。今後は同細胞の EMT 誘導機構に関わる TG1 の基質タンパク質を同定することにより、架橋修飾による基質の機能変換を介した EMT の更なる分子機構の解明研究を進めていく。また、尿細管上皮細胞において特異的に TG1 を欠損したマウスについても現在作製中であり、動物モデルにおける TG1 と尿細管上皮細胞の EMT との因果関係について検証する。今後の研究成果に基づく新たな研究展開により、慢性腎臓病の新しい診断、治療、予防法の開発に期待したい。

参考文献

- 1) Vega, G. *et al.*: The cellular and signalling alterations conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis. *Cytokine* **88**, 115 (2016).
- 2) Wu, C. F. *et al.*: Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.*, **182**, 118 (2013).
- 3) Iismaa, S. E. *et al.*: Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.*, **89**, 991 (2009).
- 4) Tatsukawa, H. *et al.*: Transglutaminase 2 has opposing roles in the regulation of cellular functions as well as cell growth and death. *Cell Death Dis.*, **7**, e2244 (2016).
- 5) Tatsukawa, H. *et al.*: Distribution of transglutaminase family members in mouse whole body sections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**, 1046 (2015).
- 6) Philp, C. J. *et al.*: Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **58**, 594 (2018).
- 7) Collighan, R. J. & Griffin, M.: Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: Biological significance and medical applications. *Amino Acids* **36**, 659 (2009).
- 8) Kojima, S. *et al.*: Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **121**, 439 (1993).
- 9) Verderio, E. *et al.*: Regulation of Cell Surface Tissue Transglutaminase: Effects on Matrix Storage of Latent Transforming Growth Factor- β Binding Protein-1. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 1417 (1999).
- 10) Cao, L. *et al.*: Tissue transglutaminase links TGF- β , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene*, **31**, 2521 (2012).
- 11) Lee, J. *et al.*: Transglutaminase 2 Induces Nuclear Factor- κ B Activation via a Novel Pathway in BV-2 Microglia. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53725 (2004).
- 12) Chen, C. S. *et al.*: NF-kappaB-activated tissue transglutaminase is involved in ethanol-induced hepatic injury and the possible role of propolis in preventing fibrogenesis. *Toxicology*, **246**, 148 (2008).
- 13) Grenard, P. *et al.*: Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.*, **35**, 367 (2001).
- 14) Tatsukawa, H. *et al.*: Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using substrate peptides in mouse liver fibrosis. *Sci. Rep.*, **7**, 45049 (2017).
- 15) Tatsukawa, H. *et al.*: Isozyme-specific comprehensive characterization of transglutaminase-crosslinked substrates in kidney fibrosis. *Sci. Rep.*, **8**, 7306 (2018).
- 16) Johnson, T. S. *et al.*: Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 3078 (2007).

- 17) Shweke, N. *et al.*: Tissue Transglutaminase Contributes to Interstitial Renal Fibrosis by Favoring Accumulation of Fibrillar Collagen through TGF- β Activation and Cell Infiltration. *Am. J. Pathol.*, **173**, 631 (2008).
- 18) Kim, D. S. *et al.*: Transglutaminase 2 gene ablation protects against renal ischemic injury by blocking constant NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **403**, 479 (2010).
- 19) Olsen, K. C. *et al.*: Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **184**, 699 (2011).
- 20) Olsen, K. C. *et al.*: Inhibition of transglutaminase 2, a novel target for pulmonary fibrosis, by two small electrophilic molecules. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **50**, 737 (2014).
- 21) Luciani, A. *et al.*: Defective CFTR induces aggregates formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 863 (2010).
- 22) 人見 清隆: タンパク質架橋化酵素の高反応性基質の探索と活用. バイオサイエンスとバイオインダストリー, **70**, 442 (2012).
- 23) Sugimura, Y. *et al.*: Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. *J. Biol. Chem.*, **281**, 17699 (2006).
- 24) Sugimura, Y. *et al.*: Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1 - development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *FEBS J.*, **275**, 5667 (2008).
- 25) Yamane, A. *et al.*: Identification of a preferred substrate peptide for transglutaminase 3 and detection of in situ activity in skin and hair follicles. *FEBS J.*, **277**, 3564 (2010).
- 26) Fukui, M. *et al.*: Identification of a highly reactive substrate peptide for transglutaminase 6 and its use in detecting transglutaminase activity in the skin epidermis. *FEBS J.*, **280**, 1420 (2013).
- 27) Kuramoto, K. *et al.*: Phage-displayed peptide library screening for preferred human substrate peptide sequences for transglutaminase 7. *Arch. Biochem. Biophys.*, **537**, 138 (2013).
- 28) Kitaoka, M. *et al.*: Transglutaminase-Mediated in Situ Hybridization (TransISH) System: A New Methodology for Simplified mRNA Detection. *Anal. Chem.*, **84**, 5885 (2012).
- 29) Kamiya, N. & Abe, H.: New fluorescent substrates of microbial transglutaminase and its application to peptide tag-directed covalent protein labeling. *Methods Mol Biol.*, **751**, 81 (2011).
- 30) Itoh, M. *et al.*: In situ detection of active transglutaminases for keratinocyte type (TGase 1) and tissue type (TGase 2) using fluorescence-labeled highly reactive substrate peptides. *J. Histochem. Cytochem.*, **59**, 180 (2011).
- 31) Lamouille, S. *et al.*: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 178 (2014).
- 32) Rhyu, D. Y. *et al.*: Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 667 (2005).
- 33) Valcourt, U. *et al.*: TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1987 (2005).
- 34) Fisher, M. L. *et al.*: Type II transglutaminase stimulates epidermal cancer stem cell epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, **6**, 20525 (2015).
- 35) Verma, A. *et al.*: Tissue transglutaminase regulates focal adhesion kinase/AKT activation by modulating PTEN expression in pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1997 (2008).

- 36) Ayinde, O. *et al.*: Tissue transglutaminase induces Epithelial-Mesenchymal-Transition and the acquisition of stem cell like characteristics in colorectal cancer cells. *Oncotarget*, **8**, 20025 (2017).
- 37) Grande, M. T. *et al.*: Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat. Med.*, **21**, 989 (2015).

総 説

チロシンキナーゼによるT細胞の分化制御

室 龍之介*, 新 田 剛*

1. はじめに

我々の体を病原体から守る免疫系は、獲得免疫 (acquired immunity) と自然免疫 (innate immunity) からなる。獲得免疫を担うT細胞とB細胞は、ゲノム遺伝子の再構成によって多様な抗原受容体を創出し、あらゆる外来抗原に対し免疫応答を誘導する能力をもつ。T細胞は胸腺にて分化し、その過程で多様な抗原認識能をもつT細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を発現する。TCR $\alpha\beta$ 鎖を発現する $\alpha\beta$ T細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) に提示されたペプチドを認識することで活性化する。病

原体由来のペプチドを認識して活性化した $\alpha\beta$ T細胞は、クローン性に増殖してヘルパーT細胞やキラーT細胞へと分化し、病原体を攻撃して生体内から排除する。

一方、TCR $\gamma\delta$ 鎖を発現する $\gamma\delta$ T細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞に比べて数が少なく、その分化機構や生理・病理的意義には未解明の点が多い。 $\gamma\delta$ T細胞は感染初期にサイトカインを大量に産生し、防御応答に寄与する。 $\gamma\delta$ T細胞は様々な抗原 (ストレス応答性タンパク質や外来タンパク質など) を直接認識し、その抗原認識機構はMHCを認識する $\alpha\beta$ T細胞とは明らかに異なっている。また、リンパ組織に局在する $\alpha\beta$ T細胞に対し、 $\gamma\delta$ T細胞は皮

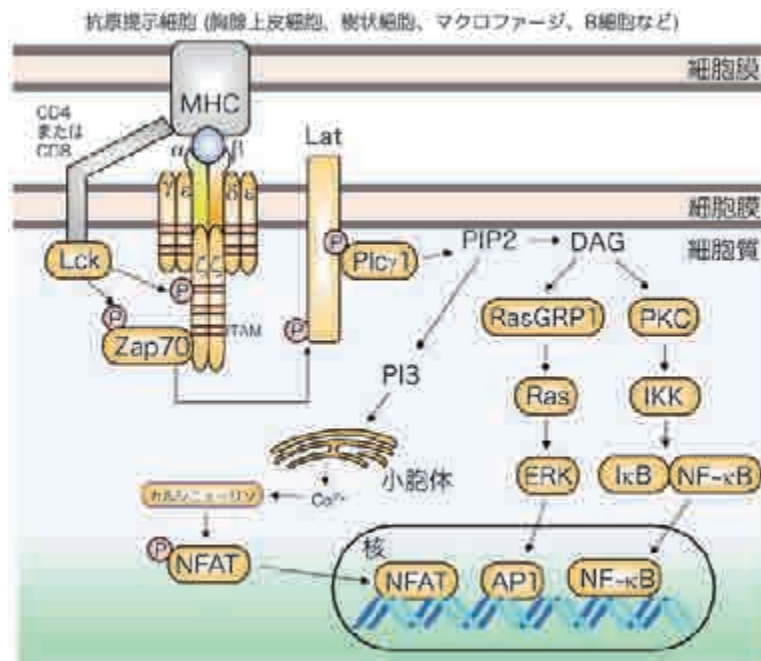


図1 TCRシグナル経路の概略

抗原提示細胞のMHC/ペプチド複合体をTCRが認識することでTCRシグナルが誘導される。LckはCD4またはCD8の細胞内領域と結合している。両者はMHCに結合することで、LckをTCR複合体の近傍へ動員し、CD3分子群のITAMをリン酸化する。この反応により、Zap70がCD3分子群に結合し、Lckによってリン酸化される。リン酸化Zap70はLatをリン酸化し、下流のシグナル (NFAT, ERK, NF- κ B) を活性化する。

膚や腸、肺などの粘膜組織に多くみられる。近年、 $\gamma\delta$ T細胞は、皮膚の修復や骨折の治癒、熱産生、神経の制御に関与することが報告され、生理的意義が徐々に明らかにされつつある。一方、がんの転移や炎症性疾患を促進することが示され、治療標的としても注目されている。

本稿では、抗原受容体シグナル伝達の重要なチロシンキナーゼである Zap70 と Syk に着目し、二つの分子が胸腺T細胞の分化へ果たす役割について解説する。

2. T細胞受容体シグナル

$\alpha\beta$ T細胞において、TCRがMHC/ペプチド複合体を認識するとTCRシグナルが伝達される(図1)¹⁾。 $\alpha\beta$ TCRは抗原認識を担うTCR α 鎖とTCR β 鎖、およびCD3複合体(CD3 $\epsilon\epsilon$, γ , δ , $\zeta\zeta$)から構成される。CD3分子群の細胞内領域にはITAM(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)と呼ばれるチロシン

残基を含む特徴的なモチーフが存在する。 $\alpha\beta$ TCRが抗原を認識すると、SrcファミリーキナーゼLckがCD3のITAMモチーフ内のチロシン残基をリン酸化する。Zeta-associated protein of 70 kDa(Zap70)は2つのSH2ドメインとキナーゼドメインを有するSykファミリーチロシンキナーゼであり、SH2ドメインを介してリン酸化されたITAMへ結合する²⁾。さらに、LckがZap70をリン酸化することで、Zap70の構造を不活性化型から活性化型へ変化させる。

活性化型Zap70は膜貫通タンパク質Latをリン酸化する。リン酸化されたLatは100種類程度のシグナル関連タンパク質が直接または間接的に結合するアダプタータンパクとして機能する³⁾。Lat結合タンパク質の一つであるホスホリパーゼC- γ 1(PLC γ 1)は、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸(PIP2)をイノシ

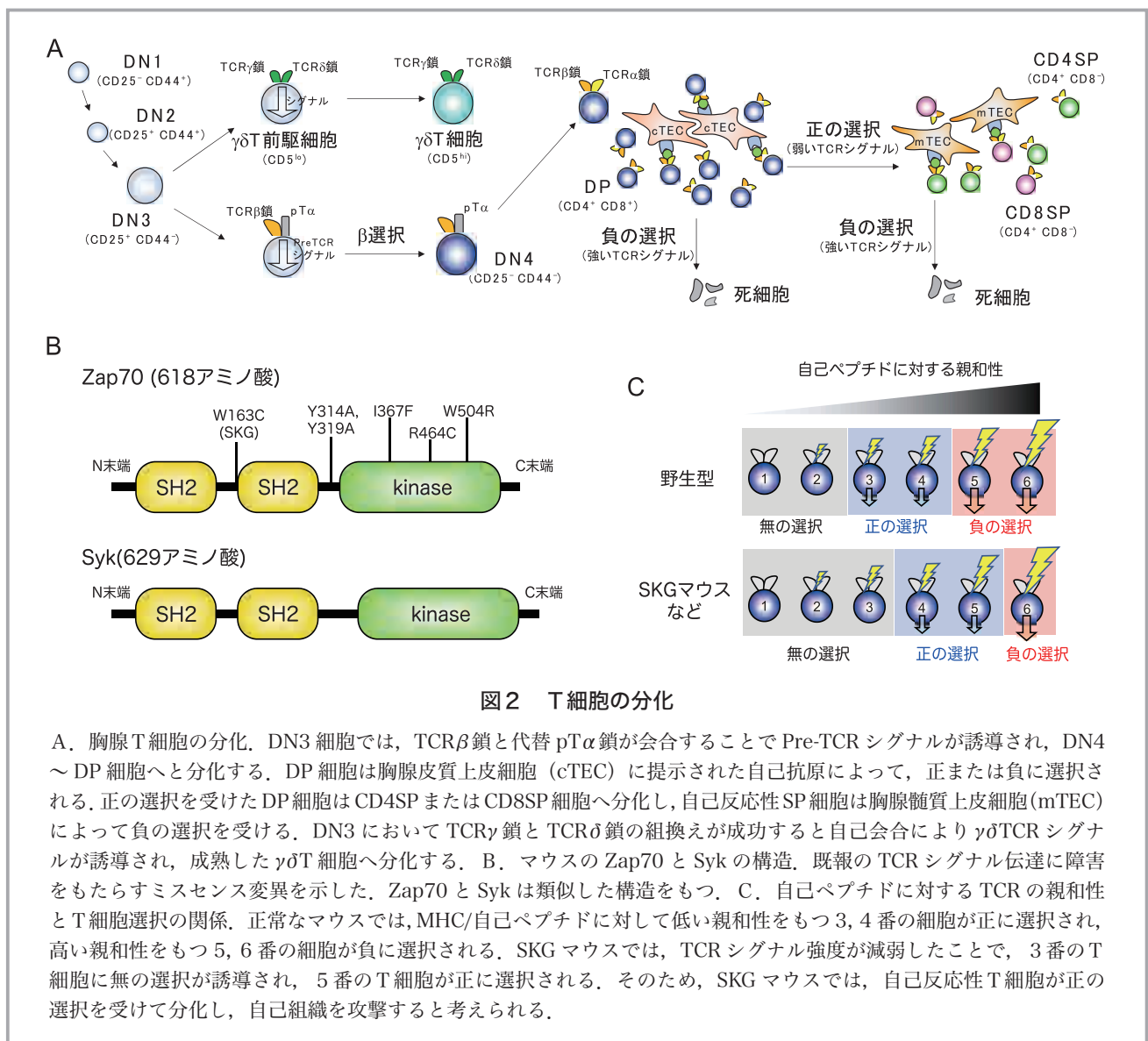


図2 T細胞の分化

A. 胸腺T細胞の分化。DN3細胞では、TCR β 鎖と代替pT α 鎖が会合することでPre-TCRシグナルが誘導され、DN4~DP細胞へと分化する。DP細胞は胸腺皮質上皮細胞(cTEC)に提示された自己抗原によって、正または負に選択される。正の選択を受けたDP細胞はCD4SPまたはCD8SP細胞へ分化し、自己反応性SP細胞は胸腺髓質上皮細胞(mTEC)によって負の選択を受ける。DN3においてTCR γ 鎖とTCR δ 鎖の組換えが成功すると自己会合により $\gamma\delta$ TCRシグナルが誘導され、成熟した $\gamma\delta$ T細胞へ分化する。B. マウスのZap70とSykの構造。既報のTCRシグナル伝達に障害をもたらすミスセンス変異を示した。Zap70とSykは類似した構造をもつ。C. 自己ペプチドに対するTCRの親和性とT細胞選択の関係。正常なマウスでは、MHC/自己ペプチドに対して低い親和性をもつ3,4番の細胞が正に選択され、高い親和性をもつ5,6番の細胞が負に選択される。SKGマウスでは、TCRシグナル強度が減弱したことで、3番のT細胞に無の選択が誘導され、5番のT細胞が正に選択される。そのため、SKGマウスでは、自己反応性T細胞が正の選択を受けて分化し、自己組織を攻撃すると考えられる。

トール-1,4,5-トリリン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DAG) へと加水分解する。IP3 は小胞体上に発現する IP3 受容体に結合することで、カルシウム流入を促し、カルシニューリン/NFAT 経路を活性化させる。一方、疎水性の DAG は、細胞膜上にて、セリン/スレオニンキナーゼであるプロテインキナーゼ C (PKC) と Ras グアニル放出タンパク質 1 (RasGRP1) を活性化する。PKC と RasGRP1 の下流では NF- κ B 経路と Ras/ERK 経路がそれぞれ活性化されて様々な遺伝子の発現を誘導し、サイトカイン産生や細胞分裂を促進する。

3. 胸腺における $\alpha\beta$ T細胞の選択

T細胞は胸腺にて分化する⁴⁾。胸腺は皮質と髄質領域に区分され、機能的に異なる上皮系細胞—胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) と胸腺髄質上皮細胞 (mTEC)—が MHC 上に自己ペプチドを提示することでT細胞の分化を制御している⁵⁾。

最も未熟なT細胞である CD4/CD8 両陰性 (double negative: DN) 細胞は、DN1-4 の分化段階に区分され (図2A)⁶⁾、DN3 と DN4 の間には β 選択というチェックポイントが存在する。DN3 内では TCR β 鎖をコードする遺伝子の再編成がおり、多様な TCR β 鎖を生成する。機能的な TCR β 鎖は代替 TCR α 鎖 (pT α) と会合し、pre-TCR シグナルが誘導され、DN3 細胞は DN4 細胞へ分化する。

β 選択を通過した DN 細胞は、補助受容体 CD4 と CD8 を発現し、CD4/CD8 両陽性 (double positive: DP) 細胞へと分化する。DP 細胞では TCR α 鎖の遺伝子再構成が起り、組換えに成功した TCR α 鎖は TCR β 鎖および CD3 複合体と会合し、TCR 複合体が完成する。TCR 遺伝子再構成はランダムであるため、一定の確率で MHC/ペプチド複合体を認識できない TCR や、自己ペプチドに反応する TCR も生成されてしまう。このような TCR 集団から外来抗原を認識しうる TCR をもつ DP 細胞を選抜し、CD4 単陽性 (CD4SP) または CD8SP 細胞の分化を誘導する機構が正の選択である⁷⁾。一方、自己ペプチドに反応する TCR をもつ DP 細胞を細胞死によって取り除く機構は負の選択と呼ばれる。MHC/ペプチド複合体を認識できない DP 細胞は自発的な細胞死に至る (無の選択)。

DP 細胞における正負の選択は、TCR と MHC/ペプチド複合体との結合力の総和 (avidity) によって決定される。正の選択は TCR との親和性が比較的低いペプチドによって誘導されることが知られている。対照的に、TCR に対して高い親和性を持つペプチドは DP 細胞に強い TCR シグナルをもたらす、細胞死を誘導する。実験的には、CD3 ϵ 抗体によって強い TCR シグナルを誘導すると、DP 細胞が細胞死を起こす⁸⁾。また、オスに発現する HY 抗原を特異的に認識する TCR を発現するマウス (HY TCR -Tg マウス) では、オス個体において全ての DP 細胞が負の選択をうける⁹⁾。一方、メス個体では、DP 細胞は何らかの自己抗原を認識することで、正の選択をうける。このような単一の抗原を認識する TCR-Tg マウスが多数作製され、TCR シグナル強度が T細胞の運命を決定づけることが証明された。正の選択をうけた SP 細胞は、ケモカインの作用により髄質へと移行する。mTEC は全身の臓器に相当する多様な自己抗原を発現し、自己反応性の SP 細胞を負の選択によって排除する⁵⁾。このような皮質/髄質における正負の選択により、T細胞の自己・非自己の識別が可能になる。

4. 正負の選択の閾値

正負の選択に TCR シグナルが関与することは、細胞内シグナル分子に欠損や変異を有する遺伝子改変マウスの解析によって証明されてきた。CD3 ζ 欠損マウスや Zap70 欠損マウス、Lck 欠損マウスでは、正の選択が障害され、DP の段階で分化が停止する。また、Lat 欠損マウスでは、 β 選択が完全に障害され、DN3 以降の T細胞集団が全く認められない¹⁰⁾。興味深い知見として、2003 年に坂口博士らが単離した SKG マウスに関する研究成果があげられる¹¹⁾。SKG マウスはヒトの関節リウマチに類似した自己免疫病態を呈する自然変異マウスであり、Zap70 遺伝子のミスセンス変異 (W163C) を有し (図2B)、TCR シグナル伝達機能が障害されている (しかし TCR シグナルが完全に遮断されている訳ではない)。HY-TCR Tg マウスと SKG マウスを交配すると、オス個体に CD8SP 細胞が検出され、メス個体では CD8SP 細胞が減少する。これは TCR シグナル強度が減弱したことで、負の選択が正の選択へ、正の選択が無の選択へと誤変換されるためと考えられる。他にも、

Zap70 や Lat にミスセンス変異を有するマウスでも、TCRシグナル伝達不全と自己免疫の病態が認められる。以上の一連の研究から、正と負の選択を誘導するTCRシグナル強度には適切なレンジが存在することが示唆された(図2C)¹²⁾

5. $\gamma\delta$ T細胞の分化

$\gamma\delta$ T細胞もまた胸腺にて分化する。TCR γ 鎖とTCR δ 鎖の遺伝子再構成はDN2～DN3の段階で起こる(図2A)。 $\gamma\delta$ TCRを発現した $\gamma\delta$ T前駆細胞は、TCR γ 鎖とTCR δ 鎖の自己会合によってシグナルを伝達し^{13,14)}、成熟した $\gamma\delta$ T細胞へと分化する(図2A)。

$\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の分化について決定的に異なる点は、その機能的成熟の機構である¹⁵⁾。 $\alpha\beta$ T細胞は胸腺で生成された後、末梢組織にて抗原刺激を受け、ヘルパーT細胞やキラーT細胞へと分化する。一方、 $\gamma\delta$ T細胞は胸腺でサイトカインIL-17やIFN γ を産生する能力を獲得する。IL-17産生型 $\gamma\delta$ T($\gamma\delta$ T17)細胞の分化は胎仔期から新生仔期に限定されるが、IFN γ 産

生型($\gamma\delta$ T1)細胞は成体期にも分化する。また、 $\gamma\delta$ T細胞の分化とTCR鎖には密接な関係があり、マウスでは $\gamma\delta$ T17細胞はV γ 4とV γ 6を、 $\gamma\delta$ T1細胞はV γ 1とV γ 5を使用している。

$\gamma\delta$ T1と $\gamma\delta$ T17細胞への運命決定は $\gamma\delta$ TCRシグナル強度が規定するという仮説がある。これは、抗原が存在しない状況下では $\gamma\delta$ T17細胞が選択的に分化し、抗原が存在する場合は $\gamma\delta$ T1細胞が分化するという実験結果に基づいている^{13,16)}。また、CD3 ϵ 抗体による強い $\gamma\delta$ TCRシグナルで $\gamma\delta$ T17細胞の分化が抑制されることも、この仮説を支持している¹⁷⁾。一方で、 $\gamma\delta$ T17細胞の分化はTCRが発現する前からプログラムされているという報告もあり¹⁸⁾、 $\gamma\delta$ TCR以外の要素も $\gamma\delta$ T細胞の機能決定を制御している。

6. Syk誘導性TCRシグナルによる $\gamma\delta$ T17細胞の分化制御

$\gamma\delta$ T細胞の胸腺内分化を制御するTCRシグナル伝達にはどのような分子が関与し、 $\gamma\delta$ T細胞のサイトカ

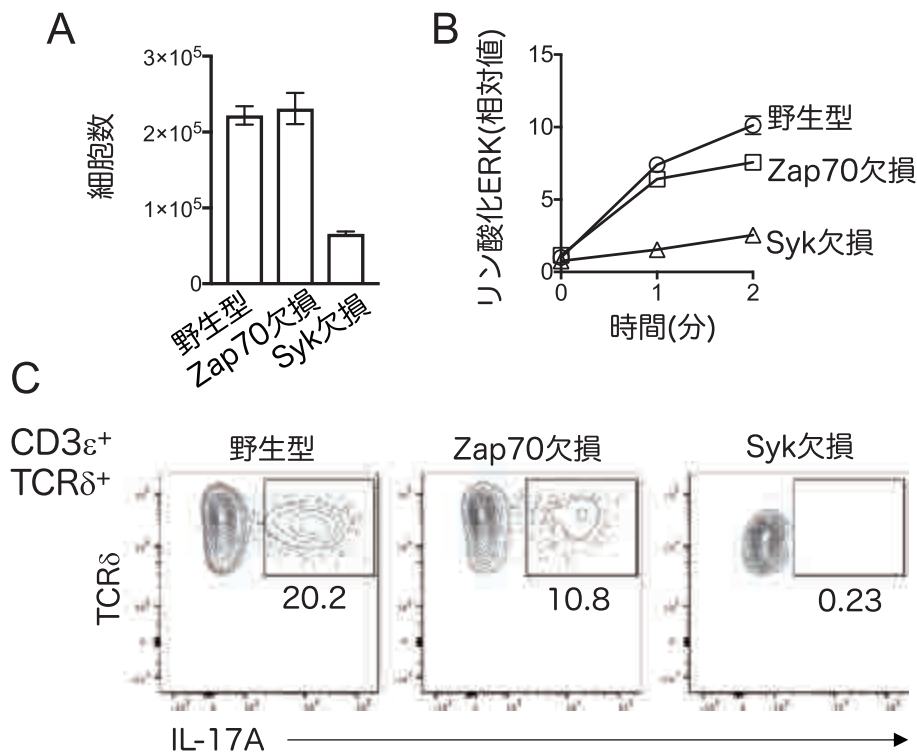


図3 Zap70欠損およびSyk欠損マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞の表現型

A. 0日齢のZap70欠損またはSyk欠損マウスの胸腺における $\gamma\delta$ T細胞数。B. TCR刺激誘導後の胸腺 $\gamma\delta$ T細胞を抗リン酸化ERK抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより解析した。C. 胸腺 $\gamma\delta$ T細胞をPMAとイオノマイシンにより刺激し、IL-17産生細胞の頻度を解析した。

イン産生能を制御しているのだろうか？過去の報告では、 $\gamma\delta$ TCR 複合体には CD3 δ が会合していないことや、CD3 γ /CD3 δ ハプロ不全マウス (CD3 $\gamma^{+/-}$ CD3 $\delta^{+/-}$) では $\alpha\beta$ T細胞は正常であるが $\gamma\delta$ T細胞の分化は障害されることが知られていた¹⁴⁾。従って、 $\gamma\delta$ T細胞におけるTCR複合体の構造や下流のシグナル伝達経路は $\alpha\beta$ T細胞とは異なり、 $\gamma\delta$ T細胞に独自のTCRシグナル伝達経路があると考えられた。

そこで我々は、抗原受容体近傍のチロシンキナーゼである Zap70 と Spleen tyrosine kinase (Syk) に着目し、 $\gamma\delta$ T細胞におけるTCRシグナル経路の解明を目指した。SykはB細胞受容体 (BCR) やFc受容体などの近傍で機能するチロシンキナーゼであり、SH2を介してITAMに結合する(図2B)¹⁹⁾。まず、我々は、胸腺 $\gamma\delta$ T細胞において、TCR刺激依存的にZap70とSykがリン酸化されることを見出した²⁰⁾。Zap70とSykのどちらが $\gamma\delta$ T細胞のシグナル伝達に必要であるかを検証するため、CRISPR/Cas9法によりZap70欠損マウスとSyk欠損マウスを作製した。Zap70欠損マウスでは、胸腺 $\gamma\delta$ T細胞の数は野生型マウスとほぼ同等であり、TCR刺激誘導後のERKのリン酸化もほぼ正常であった(図3AB)。一方、Syk欠損マウスの胸腺では、 $\gamma\delta$ T細胞の数が野生型の半分程度まで減少し、TCRシグナル伝達が著明に減弱した(図3AB)。従って、 $\gamma\delta$ T細胞におけるTCRシグナル伝達を担う主要なチロシンキナーゼはSykであり、Zap70の必要性は限定的であることが示された。

次に、Zap70欠損およびSyk欠損マウスにおける $\gamma\delta$ T細胞のサイトカイン産生を解析した。新生仔期のマウス胸腺では全 $\gamma\delta$ T細胞のうちおよそ20%が $\gamma\delta$ T17細胞であるが、Zap70欠損マウスではこれが半減していた(図3C)。驚くことに、Syk欠損マウスでは、 $\gamma\delta$ T17細胞は全く検出されなかった(図3C)。さらに、Syk欠損マウスでは、V γ 4やV γ 6陽性 $\gamma\delta$ T細胞の顕著な減少が認められ、 $\gamma\delta$ TCRレパトアに偏りが生じていた。Zap70欠損マウスでは、V γ 6陽性 $\gamma\delta$ T細胞のみが減少しており、これが $\gamma\delta$ T17細胞数の部分的な減少をもたらしたと考えられた。従って、Sykは全ての $\gamma\delta$ T17細胞の分化に必須であり、Zap70はV γ 6陽性 $\gamma\delta$ T17細胞の分化を制御していることが示された。

7. Zap70 と Syk は機能的に異なるチロシンキナーゼである

Sykはなぜ $\gamma\delta$ TCRシグナルの中核的役割を担っているのだろうか。理由の一つはZap70とSykの発現の違いにあると考えられる。Sykの発現はDN細胞で高く、分化に伴い徐々に低下するが、Zap70の発現は分化に伴い上昇していく²⁾。それゆえ、DN3細胞にて誘導されるpre-TCRシグナル伝達には、Zap70よりもSykの方が主要なはたらきをする²¹⁾。 $\gamma\delta$ T細胞はDN2-3細胞に由来するため、Sykが初期 $\gamma\delta$ TCRシグナルを制御することはリーズナブルと言える。

もう一つの理由は、Zap70とSykの生化学的性状の違いにあると考えられる。Sykは自己リン酸化能が高く、Lck非依存的に活性化されることや、Zap70とSykではITAMに対するSH2の結合様式が異なっていることが示されている^{2,19,22)}。分化段階にある $\gamma\delta$ T細胞においてZap70がSykの機能を相補できるかを検証した結果、Zap70は $\gamma\delta$ T細胞の正常な分化を十分に支持できないことが示された²⁰⁾。これは、Syk特有の機能が $\gamma\delta$ T細胞の初期分化に必要であることを示唆している。

8. Syk は Lat/ERK 経路と PI3K/AKT 経路を独立に制御する

次に、我々はSykの下流で制御される分子を探索した。以前の研究から、SykはB細胞やマスト細胞においてホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)を活性化すると報告されていた¹⁹⁾。PI3Kは、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP3)を産生することで、セリン/スレオニンキナーゼであるAktのリン

	PI3K欠損	LAT欠損
$\gamma\delta$ T細胞数	正常	減少
$\gamma\delta$ T17細胞数	検出されず	検出されず
CD5の発現	正常	減少
ERKのリン酸化	正常	減少
AKTのリン酸化	減少	正常

図4 PI3K欠損(p110 δ /p110 γ 二重欠損)マウスとLat欠損マウスの胸腺における $\gamma\delta$ T細胞の表現型

酸化を促進する。γδT細胞におけるTCR刺激誘導後のAKTのリン酸化は、Sykの欠損により有意に低下したが、Zap70が欠損しても正常であった。PI3Kの触媒サブユニットであるp110γ/p110δ二重欠損マウスを解析したところ、胸腺γδT細胞の絶対数に影響を与えることなく、γδT17細胞だけが完全に消失した(図4)。また、PI3Kの欠損によりTCRシグナル誘導性のAktのリン酸化は著しく低下したが、ERKのリン酸化にはほとんど影響がなかった。また、PI3Kを欠損するγδT細胞は正常にCD5を発現しており、成熟した状態であることがわかった。

PI3K欠損マウスでERKのリン酸化が正常であったことから、SykはERKとAKTを独立に制御している可能性が示唆された。そこで、TCRシグナル経路においてERKの直上に位置するLatに着目した。Lat欠損マウスでは、CD5^{lo}のγδT前駆細胞の段階で分化が停止し、それらはTCR刺激によるERKのリン酸化を誘導できず、IL-17産生能も全くみられなかった(図4)。しかし、TCR刺激後のAktのリン酸化は正常なまま保たれていた。また、Latを欠損するγδT細胞では、Zap70よりもSykが高発現していることが示された。以上の結果から、Sykは未熟なγδT細胞において、γδT細胞の基本的な分化・成熟を促すLat/ERK経路と、γδT17細胞への分化誘導に必須であるPI3K/AKT経路を独立に

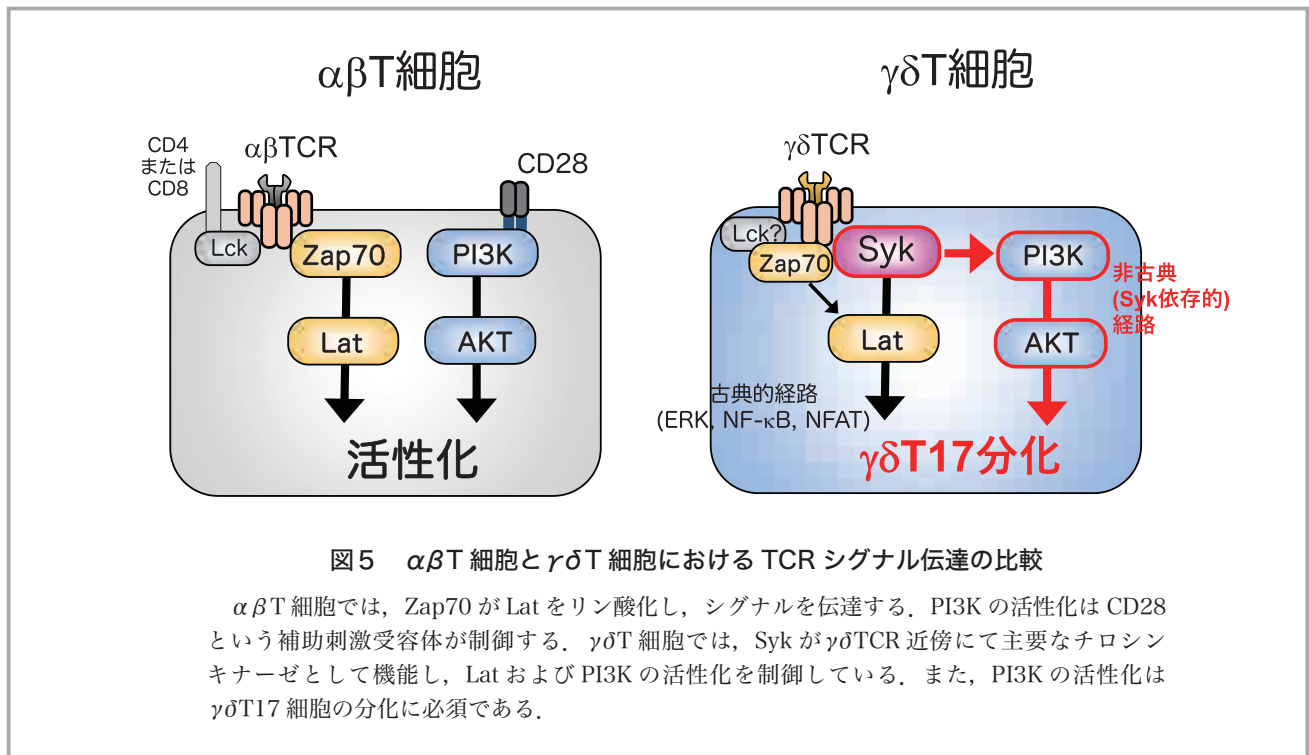
活性化することが示された(図5)。

9. おわりに

γδT細胞は、αβT細胞とB細胞に次ぐ「第3のリンパ球」であるが、その分化のしくみや機能には不明な点が多く残され、十分に研究されたとは言い難い。我々はチロシンキナーゼSykがγδT細胞における重要なシグナル分子であることを同定し、IL-17産生能の獲得に必須のシグナル経路を同定した。しかしながら、γδT細胞におけるシグナル伝達機構の一部分を解明したに過ぎず、その全体像やγδTCRとの構造的な関連は未だ不明である。今後、リンパ球系列特異的Syk欠損マウスや個々のSrcファミリーキナーゼの欠損マウスの解析を通して、γδTCRシグナル伝達機構について精査する必要がある。このような基礎研究を積み重ね、γδT細胞をよりよく理解し、その人為的な制御を実現することで、がんや難治性疾患に対する有効な治療法を確立できるかもしれない。今後、γδT細胞研究の発展にさらなる期待が寄せられる。

参考文献

- 1) Brownlie, R.J. Zamoyska, R.: T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded, *Nat Rev Immunol.*, 13, 257 (2013).



- 2) Wang, H. *et al.*: ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2, a002279 (2010).
- 3) Roncagalli, R. *et al.*: Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub, *Nat Immunol.*, 15, 384 (2014).
- 4) MILLER, JF.: Immunological function of the thymus, *Lancet.*, 2, 748 (1961).
- 5) Takahama, Y. *et al.*: Generation of diversity in thymic epithelial cells, *Nat Rev Immunol.*, 17, 295 (2017).
- 6) Blackburn, CC., Manley, NR.: Developing a new paradigm for thymus organogenesis, *Nat Rev Immunol.*, 4, 278 (2004)
- 7) Gascoigne, NR., *et al.*: TCR Signal Strength and T Cell Development, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 32, 327 (2016).
- 8) Smith, CA. *et al.*: Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures, *Nature*, 337, 181 (1989)
- 9) Kisielow, P., *et al.*: Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes, *Nature*, 333, 742 (1988).
- 10) Zhang, W., *et al.*: Essential role of LAT in T cell development, *Immunity*, 10, 323 (1999).
- 11) Sakaguchi, N., *et al.*: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice, *Nature*, 426, 454 (2003).
- 12) Takeuchi, Y., *et al.*: Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis, *Immunol Rev.*, 294, 164 (2020).
- 13) Jensen, KD., *et al.*: Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma, *Immunity*, 29, 90 (2008).
- 14) Muro, R., *et al.*: T cell receptor signaling for $\gamma\delta$ T cell development, *Inflamm Regen*, 36, 6 (2019).
- 15) Bonneville, M., *et al.*: Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity, *Nat Rev Immunol.*, 10, 467 (2010).
- 16) Fahl, SP., *et al.*: Role of a selecting ligand in shaping the murine $\gamma\delta$ -TCR repertoire, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 15, 1889 (2018)
- 17) Sumaria, N., *et al.*: Strong TCR $\gamma\delta$ Signaling Prohibits Thymic Development of IL-17A-Secreting $\gamma\delta$ T Cells, *Cell Rep.*, 19, 2469 (2017).
- 18) Spidale, NA., *et al.*: Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells originate from SOX13, *Immunity*, 49, 857 (2018).
- 19) Mócsai, A., *et al.*: The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions, *Nat Rev Immunol.*, 10, 387 (2010).
- 20) Muro, R., *et al.*: gammadeltaTCR recruits the Syk/PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program, *J Clin Invest.*, 128, 415 (2018).
- 21) Cheng, AM., *et al.*: Syk and ZAP-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94, 9797 (1997).
- 22) Chu, DH., *et al.*: The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling, *EMBO J.*, 15, 6251 (1996).

酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究

低分子抗体と酸化還元酵素を駆使した次世代型電気化学イムノセンサーの開発

浅野 竜太郎

(東京農工大学大学院工学研究院)

【目的】

現在、高感度、簡便、迅速に診断が可能なセンシング技術の開発が求められている。電極に固定化した捕捉抗体と、酸化還元酵素で標識した検出抗体を用いて ELISA 様に測定する電気化学イムノセンサーに期待が寄せられているが、検出抗体の不均一な酸化還元酵素修飾、捕捉抗体の電極表面への不均一な固定化が実用化に向けた課題となっている。

そこで、低分子抗体と酸化還元酵素を遺伝子工学的に融合させると共に、捕捉抗体も電極結合性ペプチドを融合させることで、電極表面への簡便な固定化と配向性の制御を目指した。

【方法】

がんマーカーである上皮増殖因子受容体 (EGFR) の計測をモデルに、抗 EGFR 抗体と溶存酵素の影響を受けないため、より精度の高い測定が期待されるグルコース脱水素酵素 (GDH) との融合を目指した。抗 EGFR 抗体は高い生産性を期待し単ドメインで機能するラクダ抗体由来の VHH 抗体を、また GDH は所属研究室で見出し、その熱安定性を向上させることにも成功している *Aspergillus flavus* 由来の GDH を用いた。さらに、電極結合性ペプチドはカーボンナノチューブ結合性ペプチドを用いた。

【結果】

抗 VHH 抗体と GDH を遺伝子工学的に融合させ、大腸菌発現系を用いて調製を行った。EGFR への結合活性と GDH の酵素活性の両機能を確認後、ELISA で EGFR の検出を行ったところ、優位なシグナルを得ることは出来なかった。そこで酵素を、ホモ 4 量体を形成する乳酸

酸化酵素 (LOx) に変えて検討を行った結果、EGFR の濃度に依存したシグナルを得ることに成功した。一方、カーボンナノチューブ結合性ペプチドを融合させた一本鎖抗体 (scFv) の構築も進め、発現確認まで終了したため、今後の展開に期待が持たれる。

【考察】

申請者は近年、タンパク質間を温和な条件で連結可能なモジュールを利用した抗体酵素複合体の簡便な創製法を開発し報告したが¹⁾、実製造を見据えた場合は、やはり抗体と酵素を直接融合させる方が望ましい。一方で連結モジュールを用いた場合も 2 分子の VHH を連結させることで初めて優位なシグナルが得られたので、本検出系に於いても複数の抗体を融合させることが重要であると考えられる。今後 LOx との融合抗体に関して、さらに詳細な検討を進める予定である。

【文献】

- 1) Kimura, H., Asano, R., Tsukamoto, N., Tsugawa, W. & Sode K.: Convenient and Universal Fabrication Method for Antibody-Enzyme Complexes as Sensing Elements Using the SpyCatcher/Spy-Tag System, *Anal. Chem.*, **90**, 14500 (2018).

耐熱性 D-アミノ酸アシラーゼの基質認識機構解明に向けた構造学的アプローチ

上 垣 浩 一

(近畿大学農学部)

【目的】

近年、D-アミノ酸が健康・美容・食品だけでなく医薬品等の原料として有効であることが明らかになりつつあり、光学的に純度の高い D-アミノ酸を安価に製造することが産業上重要な課題となっている。本研究では熱安定性、有機溶媒耐性、高温で反応できる利点を考慮し、耐熱菌 (*Pyrococcus* 属, *Thermomicrobium* 属等) 由

来の D-アミノアシラーゼ (Pab_DAA, Tr_DAA) の構造機能相関解明のための研究を行った。

【方法】

本研究で用いた D-アミノアシラーゼは大腸菌を用いた pET 発現系を用い、発現精製を行った。ただし Pyrococcus 属由来の D-アミノアシラーゼ (Pab_DAA) の発現・精製は大腸菌の染色体から発現を行った¹⁾。Pab_DAA, Tr_DAA の基質特異性は、種々の N-アセチル-D-アミノ酸の分解に伴い生じる酢酸の定量により評価した。また市販の結晶化条件スクリーニングキットを用い酵素の結晶化条件の検討を行った。

【結果】

Pab_DAA の溶液中での会合状態をゲル濾過クロマトグラフィーと動的光散乱法で求めた所、2 量体である事が判った。次に本酵素の活性に対する金属イオンの影響を検討するため、培養液に各種金属イオンを添加し、発現精製を行い、活性測定を行った。従来知られている D-アミノアシラーゼは亜鉛を活性発現に要求するが、本酵素は亜鉛が最適ではなくコバルトイオンである事が判った。コバルトイオンを用いた時の方が亜鉛より 2 倍以上活性が高かった。そこで本酵素の結晶構造を決めるため結晶化条件のスクリーニングを行い、比較的大きな結晶を得るができた。

Tr_DAA に関して、本酵素の活性の温度依存性を調べた所、最適温度は約 80°C、最適 pH は pH8.0 であることが判った。本酵素溶液に EDTA を添加したところ、酵素活性が消失した。活性の消失した酵素に種々の金属イオンを添加し活性を再測定したところ、亜鉛イオン添加で活性の回復が見られ Pab_DAA とは活性発現に必要な金属が異なる事が判った。本酵素の溶液中での会合状態をゲル濾過クロマトグラフィーと動的光散乱法を用いて調べたところ、三量体で存在していることが示唆された。そこで本酵素の立体構造を明らかにするために結晶化条件の探索を行い、ダイヤモンド型結晶の獲得に成功したが X 線照射実験の結果、3.0 Å 程度の反射データしか得られず、構造の解明には至らなかった。更に結晶化条件を探索し新たな結晶を得る事ができたので放射光施設での測定を行う予定である。

【考察】

本研究から Pyrococcus 属, Thermomicrobium 属由

来の D-アミノアシラーゼは活性発現に必要な金属イオンが異なる事、溶液中での 4 次構造が異なる事等、酵素としての諸性質が大きく異なっている事が判った。今後、高分解能の立体構造解明に向けて結晶化条件の検討を更に行っていく予定である。

【文献】

- 1) Nakamura T, Koma D, Oshima M, Hoshino H, Ohmoto T, Uegaki K.: Application of chromosomal gene insertion into *Escherichia coli* for expression of recombinant proteins, *J Biosci Bioeng.* 126, 266 (2018)

RNA 編集酵素 ADAR の exosome を介した伝播による老化に伴う肝発癌リスク増大機構の解明

大塚基之

(東京大学医学部附属病院)

【目的】

RNA 編集酵素 ADAR は、IFN 刺激で発現が誘導され、二本鎖 RNA に結合してアデノシンをイノシンへと変換する酵素 (A-to-I editing) である。ADAR1 の発現は老化細胞で起きるので「細胞老化における ADAR 酵素の発現増加から始まる一連の変化は、RNA 変異を誘導し、加齢に伴う発癌リスクの増加に関与している可能性があるのではないか」と考えた。

しかしながら、生体内での「細胞老化」は、例えば肝臓では、非実質細胞(間葉細胞:星細胞など)で起きる。この「非実質細胞の老化」と「実質細胞の癌化」という離れた事象を説明するために、「周囲の肝実質細胞に exosome を介し ADAR などを伝播させ、それ以降の変化を惹起するのではないか」との仮説を立てた。

本研究では、特に最近罹患数が増えている高齢者の肝炎ウイルス以外の要因による肝発癌にフォーカスし、「周囲の間葉系細胞の細胞老化に伴って発現増加した RNA 編集酵素 ADAR が、exosome を介して肝実質細胞に取り込まれ、発癌リスクが高まる」という、老化に伴う発癌リスク増大機構に関する新しい概念を提唱することを目的とした。

【方法】

- 1) 不死化肝星細胞の ADAR 遺伝子座に Hibit を遺伝子編集で挿入する。
- 2) 肝星細胞から ADAR-Hibit が exosome 中に放出されるかを検証する。
- 3) 肝実質細胞への取り込みの有無を検証する。

【結果】

1) 不死化肝星細胞の ADAR 遺伝子座に Hibit を遺伝子編集で挿入：

遺伝子編集手法を用いて、不死化ヒト星細胞の ADAR1 遺伝子座に、ADAR1 蛋白の C 端に Hibit ペプチドを挿入した。

2) ヒト肝星細胞からは ADAR-Hibit 蛋白が exosome 中に放出される：

上記の細胞の上清から Hibit を検出した。このことから、ヒト肝星細胞からは ADAR-Hibit 蛋白が放出されていることが示された。

上清から exosome を単離して、その中の Hibit 量を検討し、exosome 中に ADAR-Hibit 蛋白が含まれることが示された。

3) 肝実質細胞への取り込みの有無の検証：

不死化したヒト肝実質細胞に LargeBit を発現させた不死化ヒト肝実質細胞の上清に、上記のヒト星細胞の上清を添加すると、肝実質細胞内での luciferase 活性が検出されることから、星細胞から放出された ADAR1 蛋白を含む exosome は肝実質細胞に取り込まれることが示された。

【考察】

本研究で、IFN による誘導遺伝子である ADAR1 の発現が非実質細胞で起きると、その近傍の実質細胞に exosome を介して取り込まれることが示された。

ADAR1 は RNA 編集酵素であり、その発現量の増加は予期しない RNA 変異を惹起するため、これが実質細胞の癌化、とくに老化に伴う癌化の機序のひとつになっている可能性がある。

Sialyl-Tn 抗原による抗酸化酵素誘導を介したがん細胞の微小環境適応メカニズムの解明

大坪 和明

(熊本大学大学院生命科学研究所)

【目的】

我々は腫瘍組織内に形成される低酸素環境が sTn 抗原を誘導し、がん細胞の浸潤・転移を活性化することを発見した。さらに sTn 抗原が抗酸化酵素 HO-1 及び SOD2 の発現を誘導することを見出した。本提案研究では① sTn 抗原による HO-1 および SOD2 誘導メカニズムの解明、② sTn 抗原発現細胞の虚血再灌流抵抗性評価、③ sTn 抗原合成阻害による虚血再灌流感受性の解析を行い、がん病態形成における sTn 抗原依存的抗酸化酵素誘導のメカニズムと意義の解明を目的とする。

【方法】

① sTn 抗原による HO-1 および SOD2 誘導メカニズムの解明

インテグリンシグナル伝達経路の下流及び、転写因子 NRF2 の核移行と HO-1 遺伝子の転写制御の相関性を解析した。加えて、sTn 抗原発現細胞における NF-κB 活性化メカニズムを AKT 及 mTORC1 の阻害剤で処理することで解析した。

② sTn 抗原発現細胞の虚血再灌流抵抗性評価

in vitro 虚血再灌流実験系を用いて sTn 抗原発現細胞の虚血再灌流抵抗性を解析することで、sTn 抗原発現と虚血再灌流抵抗性との機能的関連性を解析した。

③ sTn 抗原合成阻害による虚血再灌流感受性の解析

sTn 抗原合成阻害剤処理細胞における虚血再灌流負荷への感受性を解析するとともに、担がんマウスへの sTn 抗原合成阻害剤の投与による、腫瘍形成抑制効果を組織学的に解析した。

【結果】

① sTn 抗原による HO-1 および SOD2 誘導メカニズムの解明

HO-1 遺伝子の転写調節を担う NRF2 の関与を解析した結果、sTn 抗原発現細胞では 1) HO-1 遺伝子プロモーターへの NRF2 の結合レベルの上昇、2) NRF2 の核局在レベルの上昇、3) NRF2 の核局在を制御する

AKTの活性化レベルの上昇が観察された。この結果は、sTn抗原がインテグリン-AKTシグナル伝達経路を介してNRF2の核移行を活性化し、HO-1を誘導していることを意味している。一方、SOD2遺伝子の転写制御においては、1) 転写因子NF- κ Bのエンハンサー領域への結合レベルの上昇が観察されたが、AKTやmTORC1阻害剤処理の解析から、これら分子はNF- κ B活性化の上流シグナルではないことが判明した。

② sTn抗原発現細胞の虚血再灌流抵抗性評価

培養細胞を用いた虚血再灌流負荷実験の結果、sTn抗原発現細胞ではスーパーオキシドの産生やそれに伴うアポトーシスが殆ど観察されなかった。

③ sTn抗原合成阻害による虚血再灌流感受性の解析

sTn抗原合成阻害剤処理細胞は高い虚血再灌流負荷経の感受性を示した。担がんマウスへのsTn抗原合成阻害剤投与により、腫瘍組織内でのsTn抗原の発現の低下と、腫瘍サイズの縮小が観察された。

【考察】

本研究成果は、sTn抗原によるHO-1やSOD2の誘導が、虚血再灌流後の生存を可能とするための生存戦略であることを意味している。

生物界面で機能する人工生体触媒の開発

神谷典穂

(九州大学工学研究院)

【目的】

細胞は脂質二重膜構造で区画化され、膜を介した情報・物質・エネルギー変換を通して動的に生命活動を営んでいる。本研究では、カビの細胞壁に存在するキチン層の分解に寄与し、抗真菌活性を発現する植物由来キチナーゼを題材として、当該酵素が本来有する触媒機能を人為的に拡張することを試みた。

【方法】

概念実証のためのモデルとして抗真菌活性を有するリュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ (ChiA) を選択し、酵素を用いたタンパク質の部位特異的連結技術¹⁾並びに部位特異的脂質導入技術²⁾により人工キチナーゼ集合体並びに人工脂質化キチナーゼを調製し、真菌細胞界

面で機能する酵素触媒系の構築を目指した。抗真菌活性の評価は、琉球大学 平良東紀教授の協力を仰いだ。

【結果】

1) 人工キチナーゼ集合体

ChiAは、キチン結合ドメイン (LysM) と触媒ドメイン (CatD) が柔軟なリンカー構造を介して連結されている。個々のドメインを分割し、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) により認識されるチロシン残基を含むペプチドタグ (Y-tag) の導入とそれを介した重合化¹⁾、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) による部位特異的修飾を組み合わせることで、野生型ChiAよりも高い抗真菌活性を示す人工ChiA集合体を得ることができた。

2) 人工脂質化キチナーゼ

上記の各ドメインにMTGにより認識されるペプチドタグ (Q-tag) を導入し、脂質化ペプチド基質 (K-lipid) と連結することで人工脂質化キチナーゼを調製した²⁾。これと、脂溶性抗菌薬が可溶化された市販薬剤を組み合わせたと、脂質未修飾系では観察されない特異な抗真菌活性の発現を示唆する結果を得た。

【考察】

ChiAによる抗真菌活性の向上には、細胞壁の一部を構成するキチン層へのアクセスを高める仕掛けが必要となる。1) では、LysMの導入方法に応じたキチン分解ドメインの細胞壁界面への濃縮効果、2) では、脂質の導入と適切な薬物送達キャリアとの組み合わせによる相乗効果の発現が示唆された。

【文献】

- 1) L. Jia, K. Minamihata, H. Ichinose, K. Tsumoto, N. Kamiya: Polymeric SpyCatcher scaffold enables bioconjugation in a ratio-controllable manner, *Biotechnol. J.*, 12, 1700195 (2017).
- 2) M. Takahara, N. Kamiya: Synthetic strategies for artificial lipidation of functional proteins, *Chem. Eur. J.*, 26, 4645-4655 (2020).

ハチ目昆虫の行動進化とキノコ体カルシウム情報伝達系酵素群の機能亢進の相関の実証的解析

久保健雄

(東京大学大学院理学系研究科)

【目的】

高度な社会性（真社会性）をもつハチ目昆虫であるセイヨウミツバチと、原始的で単独性のカブラハバチを用いて、脳での *CaMKII* と *PLCε* の発現パターンを、*in situ* hybridization により調べる。また、同様の実験を優れた視覚記憶を示すナミアゲハ、優れた空間記憶を示すワモンゴキブリ、原始的であるが、真社会性のネバダオオシロアリについて行い、PLC のキノコ体選択的発現と *CaMKII* の大型ケニオン細胞サブタイプに選択的発現がどの昆虫種で見られるか調べる。さらに、ハバチで *PLCε* を RNAi によりノックダウンすると、味覚-口吻伸展反射連合学習が阻害されるか調べることを目的とした。

【方法】

ミツバチとハバチ、アゲハ、ゴキブリ、シロアリの脳切片を作成し、*in situ* hybridization 法により、*CaMKII* と *PLCε* 発現の局在性を調べた。またカブラハバチにおいて嗅覚/味覚-口吻伸展反射連合学習系を確立し、RNAi により上記連合学習における *PLCε* の役割を調べた。

【結果】

(1) ミツバチでは *PLCε* は脳でキノコ体全体に選択的に、*CaMKII* はキノコ体の大型ケニオン細胞選択的に発現するが¹⁾、ハバチでは *PLCε* も *CaMKII* もキノコ体全体で選択的に発現することが判明した。これにより、ハバチでもミツバチ同様、キノコ体における Ca^{2+} 情報伝達系の機能が更新しているが、ミツバチのようなキノコ体を構成するケニオン細胞のサブタイプ分化^{1,2)} は生じていないと推察された。

(2) アゲハ、ゴキブリ、シロアリの全てで *PLCε* はキノコ体選択的に発現した一方、ゴキブリでのみ、ケニオン細胞のサブタイプ選択的な *CaMKII* の発現が検出された。このことから、昆虫全般でキノコ体が記憶・学習に働くことが示唆された一方で、ケニオン細胞サブタイ

プの分化は、社会性ではなく、むしろ高度な認知能力（空間記憶）に伴って獲得されたと考えられた。

(3) ミツバチでは *PLCε* の酵素活性を薬理的に阻害することで、嗅覚-口吻伸展反射連合学習が阻害されることが判明しているが³⁾、RNAi によりハバチでも *PLCε* が連合学習に働くことが示された。このことから、連合学習における *PLCε* の役割は、両種で保存されていると考えられた。

【考察】

ハチ目昆虫では共通に、脳のキノコ体において Ca^{2+} 情報伝達系とそれに基づく記憶学習機能が更新している可能性が考えられる。一方で、キノコ体を構成するケニオン細胞のサブタイプの分化は、ミツバチを含む進化した種類で見られる一方で、原始的なハバチにはみられないこと²⁾、社会性とは関係せず、むしろ昆虫の高度な認知機能、言わば「知性」と相関するという興味深い可能性が初めて示された。

【文献】

- 1) Suenami, S., Oya, S., Kohno, H. & Kubo, T. : Kenyon cell subtypes/populations in the honey bee mushroom bodies: possible function based on their gene expression profiles, differentiation, possible evolution, and application of genome editing. Mini Review, *Front. Psychol. –Comparative Psychology* (Edited by: Prof. Martin Gilulfa) 02 October | <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.01717> (2018)
- 2) Oya, S., Kohno, H., Kainoh, Y., Ono, M. & Kubo, T. (2017) Increased complexity of mushroom body Kenyon cell subtypes in the brain is associated with behavioral evolution in hymenopteran insects. *Sci. Rep.* 7, 13785 (2017)
- 3) Suenami, S., Iino, S. & Kubo, T. Pharmacologic inhibition of phospholipase C in the brain attenuates early memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Biol. Open* Jan 12; 7(1): bio028191. doi: 10.1242/bio.028191 (2018)

風疹ウイルス非構造タンパク質のPALMITOYL修飾機構とその意義の解明

坂田 真史

(国立感染症研究所)

【目的】

風疹ウイルスを含む1本鎖プラスRNAをゲノムに持つウイルス（1本鎖プラスRNAウイルス）は、細胞のオルガネラ膜を再構築して形成する小胞でゲノム複製を行う共通した特徴を持つ。風疹ウイルスは細胞の形質膜でゲノム複製を行う。その複製を担う非構造タンパク質（p150）は形質膜へ局在する唯一のウイルスタンパク質であり、形質膜における小胞形成に重要な役割を担っていることが予想されるしかし、膜貫通領域を持たないp150が形質膜へ局在する様式や小胞形成の機構は殆ど不明である。風疹ウイルスに近縁なシンドビスウイルスでは、非構造タンパク質（nsP1）のPALMITOYL修飾が形質膜への局在に重要であることが明らかになっている。また、申請者の予備的解析によりp150にPALMITOYL修飾部位が予測されたことから、本研究ではp150の形質膜への局在にPALMITOYL修飾が関与する可能性を考えて解析を行った。

【方法】

p150あるいはnsP1を293T細胞へ一過性に発現させて、クリックケミストリーによりウイルスタンパク質のPALMITOYL修飾を検出した。次に、修飾の基質となるPALMITIC酸の合成阻害剤を用いて、風疹ウイルスのゲノム複製とウイルス産生への影響を検討した。

【結果】

クリックケミストリーによりnsP1のPALMITOYL修飾を検出した。その一方、p150のPALMITOYL修飾の検出は出来なかった。また、PALMITIC酸合成阻害剤の処理では、ゲノム複製ならびにウイルス産生への影響は認められなかった。

【考察】

クリックケミストリーによるPALMITOYL修飾の検出結果から、シンドビスウイルスのnsP1が修飾されていることを確認した。また、修飾されるAMINO酸残基を置換した変異nsP1では、修飾が認められなくなる事から、

クリックケミストリーによるPALMITOYL修飾の検出は十分だと考えられた。その一方、風疹ウイルスのp150では修飾の検出が全く認められなかったこと、更にPALMITIC酸の合成阻害剤処理でゲノム複製とウイルス産生への影響が認められないことから、p150はPALMITIC修飾されない可能性が高いと考えられた。形質膜でゲノム複製を行う既知のウイルスは、風疹ウイルスだけが属するマトナウイルス科とシンドビスウイルスを含む数十のウイルスが属するトガウイルス科のみである。トガウイルス科のnsP1は相同性が高くPALMITOYL修飾部位も保存されているため、トガウイルス科ではnsP1のPALMITOYL修飾が形質膜への局在に重要だと考えられる。一方、風疹ウイルスにおいては、PALMITOYL修飾以外の機構でp150が形質膜へ局在していることが示唆された。

SIRT1による栄養素嗜好性の制御機序の解明

佐々木 努

(京都大学大学院農学研究科)

【目的】

食と健康を考える上で、食欲の調節メカニズムの解明が必要である。「食べる」とは、肉体的欲求（栄養補給）や精神的欲求（おいしさ）を満たす行為であり、「ニーズを満たす食は何か？」という観点での意思決定を伴う。肉体はカロリー（量）だけでなく栄養素（質）も求めるが、栄養素ニーズを満たす食行動に関する研究は乏しい。

申請者は、エネルギーセンサー分子の一つであるNAD⁺依存性のタンパク脱アセチル化酵素であるSIRT1が脳において、栄養素特異的に嗜好性を制御することを報告した¹⁾。同論文では、単純糖質に対する食欲のネガティブ・フィードバック制御機構としてFGF21-オキシトシン系を同定した。本研究では、SIRT1による栄養素嗜好性の制御メカニズムのうち、未解明となっている脂質嗜好性の制御メカニズムの解明に取り組んだ。

【方法】

1. 肝臓から生成される中鎖脂肪酸の代謝を反映するシグナルXの探索
脳特異的なSIRT1の遺伝子組換え動物では、特に中

鎖脂肪酸に対する嗜好性が変化する（未発表データ）。中鎖脂肪酸は主に肝臓で代謝されるため、中鎖脂肪酸の代謝を反映する肝臓由来のシグナルXが存在すると仮説を立て、肝臓の初代培養細胞系を用いて、代謝シグナルXの探索を試みた。

2. 肝臓特異的な中鎖脂肪酸酸化欠損マウスの作製と解析

脂肪酸のβ酸化（4ステップ）の最初の段階を触媒する acyl-CoA dehydrogenase は、基質となる脂肪酸の長さにより、VLCAD, LCAD, MCAD, SCAD と担当が異なる。そこで、肝臓特異的MCAD欠損マウスを試みた。

【結果】

1. 代謝シグナルXの探索

肝臓の初代培養系を確立した。また、その上清をプロテオミクスで解析するための準備を進めている。また、活性を含む画を同定するためのスクリーニング系を確立中である。

2. 肝臓特異的MCAD欠損マウスの作製と解析

目的のマウスを得るために、Cas9法によるAcadm遺伝子（MCADをコードする）のfloxedマウスの作製を、AMED-BINDS事業のサポートで開始した。Acadm-floxedマウスは、現在作成中である。

【考察】

本プロジェクトは経過途中であるものの、少しずつ前進している。今後数年かけて、成果を報告したい。

【文献】

- 1) Matsui S, Sasaki T (責任著者), *et al.*: Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice, *Nature Communications*, 9, 4604 (2018)

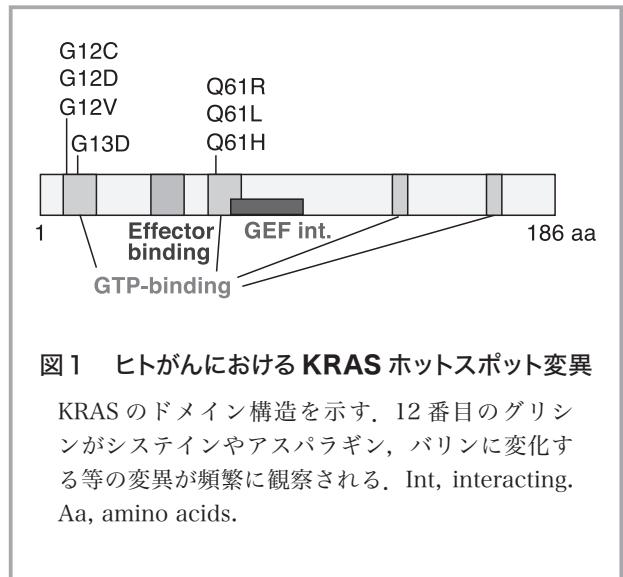
ホットスポット変異型 RAS 群ががん発生を促進する機序の差異の解明と新規治療法の開発

園下 将大

(北海道大学遺伝子病制御研究所)

【目的】

近年、がんの発生機序や治療法の研究が大きく進捗した。しかし、いまだほとんどの種類のがんに対して有効



な治療法は存在しておらず、がん発生機序のより詳細な解明とそれに立脚した新規治療法の創出は喫緊の福祉課題となっている。

近年、患者のがんゲノム解析から、膵がんや大腸がんではKRASがん遺伝子が特に高い頻度で変異していることが示された。これらはホットスポット変異（図1）として知られるが、これらに結合する化合物の開発は容易ではないことも近年明らかになりつつある。がん種によってこれらの変異の頻度が異なることも知られているが、これらの変異型RASを有するそれぞれのがんに対する有効な治療法は十分に探索が進んでいない。

そこで本研究では、異なる変異型RASががん発生に果たす役割とその機序を解明する。本研究では特に、ショウジョウバエを使用することで迅速な研究の遂行を図る。この研究を通じて、RAS変異の違いに応じた各種ヒトがんの個別化治療戦略樹立のための基盤を創出し、社会福祉の向上に貢献することを目指す。

【方法】

本研究では、各変異型RASががん形質に及ぼす影響の解明と、各変異型RASに起因するがんの新規治療法開発の2点を実施する。新規モデル動物として、哺乳類との間で遺伝的保存度が高く、遺伝子改変が容易で、迅速・安価に研究を推進できるショウジョウバエを使用する。各変異型RASを発現する新規がん遺伝子型モデルハエを作成し、このハエを使用して個体レベルの化合物スクリーニングを実施し、各々の変異を有するがんに対する新規治療薬候補を同定する。

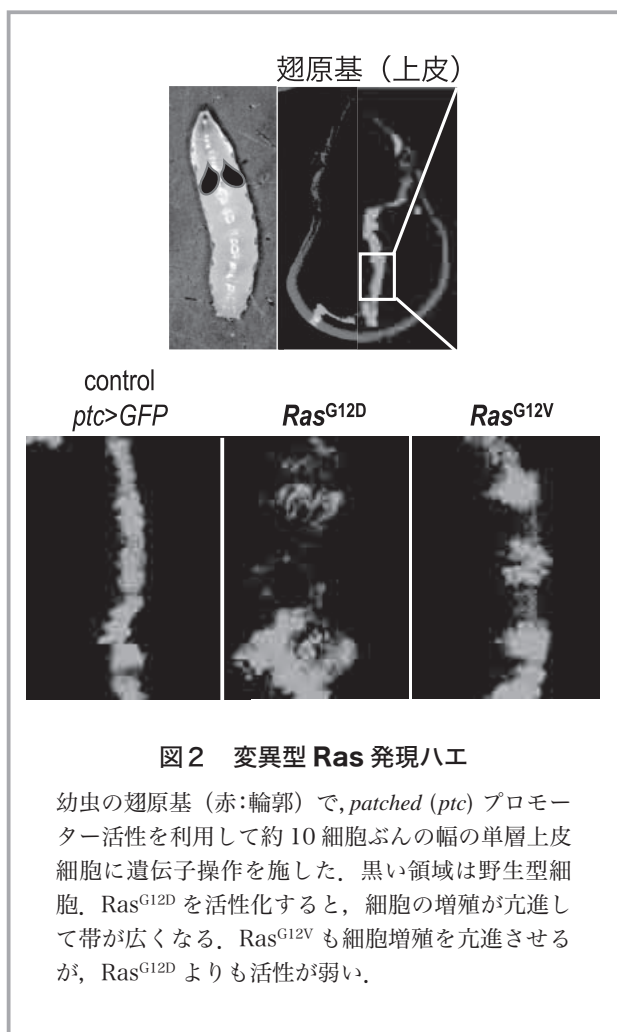


図2 変異型 Ras 発現ハエ

幼虫の翅原基（赤：輪郭）で、*patched (ptc)* プロモーター活性を利用して約 10 細胞ぶんの幅の単層上皮細胞に遺伝子操作を施した。黒い領域は野生型細胞。Ras^{G12D} を活性化すると、細胞の増殖が亢進して帯が広がる。Ras^{G12V} も細胞増殖を亢進させるが、Ras^{G12D} よりも活性が弱い。

【結果】

本研究ではまず、*patched (ptc)* プロモーターを使用して、各変異型の中でも特に高頻度に観察される Ras^{G12D} や Ras^{G12V} を幼虫の翅原基で発現するがんモデルハエを作出した。これらのハエは、細胞の過剰な増殖を招来し、個体の生存率を著明に低下させることが分かった（図2, 3）。特に、Ras^{G12D} の方が Ras^{G12V} よりも顕著な形質転換表現型をもたらした。

次に、新規治療法の創出を目指し、申請者が使用実績のある認可済みがん治療薬ライブラリ（種々の代謝拮抗薬やキナーゼ阻害薬など約 90 種類の化合物）を各系統に投与した。その結果、MEK 阻害剤がハエの生存率を有意に救済することが分かった（図3）。

【考察】

以上の研究より、ホットスポット変異 RAS は個体において異なる形質転換能を有することが分かった。さらに、ヒトがんで特に高頻度に観察される Ras^{G12D} や Ras^{G12V} が招来する形質転換の抑制に MEK 阻害剤が有

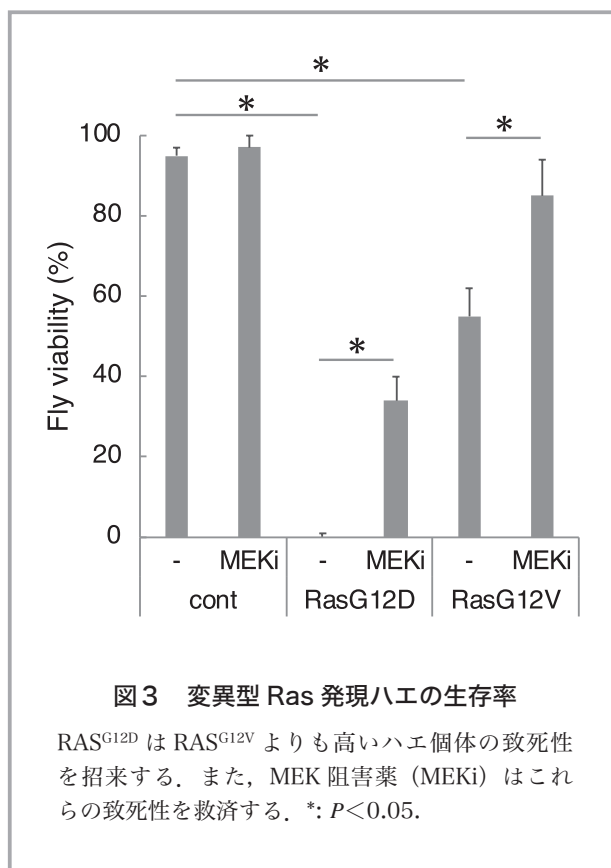


図3 変異型 Ras 発現ハエの生存率

Ras^{G12D} は Ras^{G12V} よりも高いハエ個体の致死性を招来する。また、MEK 阻害薬 (MEKi) はこれらの致死性を救済する。*: P<0.05.

効である可能性が示唆された。今後は、他のホットスポット変異型 RAS を発現するハエの作出も進め、新規治療薬候補の同定を進めるほか、これらの RAS や治療薬候補が細胞内シグナル伝達経路にどのように影響を与えるか検討する予定である。

【文献】

- 1) [Sonoshita M., Scopton A.P., Ung P.M.U., Murray, M., Silber L., Maldonado A., Real A., Schlessinger A., Cagan R.L. & Dar A.C. \(2018\). A whole animal platform to advance a clinical kinase inhibitor into new disease space. *Nat Chem Biol* 14: 291-298.](#)
- 2) [Ung PMU*, Sonoshita M*, Scopton AP, Dar AC, Cagan RL, Schlessinger A. \(2019\). Integrated computational and Drosophila cancer model platform captures previously unappreciated chemicals perturbing a kinase network. *PLoS Comput Biol*. 15: e1006878. \(*equal contribution\)](#)
- 3) [園下将大. \(2020\). 個体を用いた新規抗がん剤創薬基盤 生化学 92: 567-571.](#)

【謝辞】

本研究を共に遂行してくれた、北海道大学遺伝子病制御研究所がん制御学分野のメンバーに心から感謝します。また、公益財団法人日本応用酵素協会のご支援に深謝申し上げます。

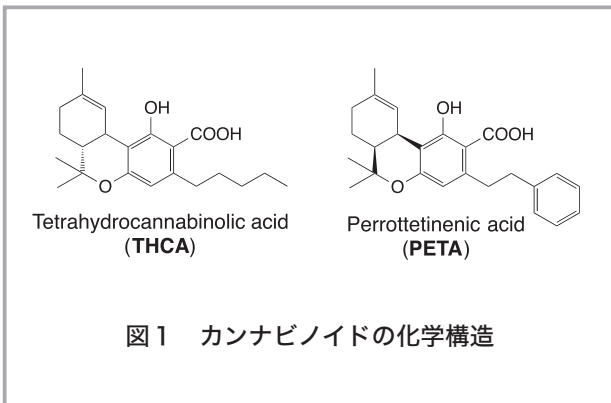
希少苔類が生産するビベンジルカンナビノイドの生合成酵素に関する基礎及び応用研究

田 浦 太 志

(富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学))

【目的】

希少苔類オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) が生産するビベンジルカンナビノイドの perrottetinenic acid (PETA) は大麻の薬理活性成分 tetrahydrocannabinolic acid (THCA) に類似した興味深い構造を有する (図1)。カンナビノイドは欧米では医薬品応用されているが、PETA の生物活性および生合成メカニズムはほとんど検討されていない。本研究ではビベンジルカンナビノイド生合成酵素の遺伝子クローニングおよび構造機能解析を目的とした。



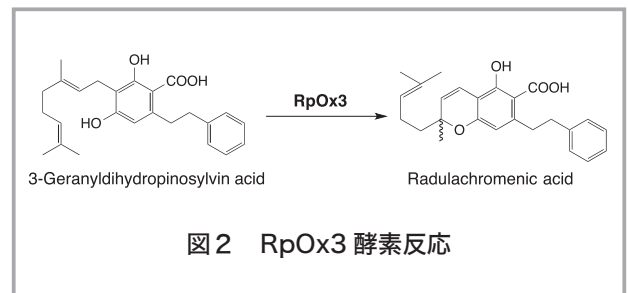
【方法】

大麻のカンナビノイドは、FAD oxidase に属するカンナビノイド合成酵素によって生成することが知られており、PETA の生合成にも類似の酵素が機能する可能性が考えられた。本研究では先ずオオケビラゴケのトランスクリプトームデータを構築し、生合成酵素の候補遺伝子として FAD oxidase のホモログ (RpOx1-3) をコードする配列を同定した。次いで *Pichia pastoris* を宿主として各組換え酵素を発現し、酵素活性の測定により生

合成酵素遺伝子の同定、機能解析を検討した。

【結果】

RpOx1-3 は既知 FAD oxidase との相同性が 34 ~ 36% と比較的ユニークな配列を持つことを確認した。その一方、結晶構造が解明された大麻由来 THCA synthase と RpOx1-3 の分子モデルの比較より、FAD 結合部位である His 及び Cys 残基は適切な位置に保存されていることが確認された。PETA の前駆体と推定される 4-geranyl dihydropinosylvin acid を基質とする酵素アッセイを行い、生成物を L-MS により分析した結果、いずれの組換え酵素を用いた場合も PETA の生成は確認されなかった一方、RpOx3 の反応液に PETA 以外の酸化生成物の明確なピークが確認された。ラージスケールの酵素反応により本生成物を調製し、分取 HPLC で精製した後 NMR により構造解析した結果、本化合物は chromene 環を有する PETA の異性体であることを確認し、これを radulachromenic acid と命名した (図2)。なお本化合物はオオケビラゴケの成分として報告されておらず、文献未記載の新規化合物である。



【考察】

RpOx3 をビベンジルカンナビノイド生合成酵素の候補と推察したが、本酵素は期待された PETA ではなく、新規なクロメン化合物 radulachromenic acid を合成するという興味深い結果を得た。現在、RpOx3 の精製ならびに詳細な生化学的キャラクタリゼーションを検討しているところである。

最後に本研究をご支援頂きましたこと心より感謝申し上げますとともに、応用研究につながる質の高い論文とできるよう今後も努めて参ります。

青色光受容体フォトトロピンキナーゼが制御する光シグナル伝達ネットワークの解明

武宮 淳史

(山口大学大学院創成科学研究科)

【目的】

植物の表皮に存在する気孔は青色光に応答して開口し、光合成に必要な二酸化炭素の取り込みを促進する。気孔を構成する孔辺細胞では、青色光は光受容体であるフォトトロピンによって感知され、細胞内シグナル伝達を経て細胞膜 H⁺-ATPase を活性化させ、気孔開口の駆動力を形成する。本研究では、シロイヌナズナ突然変異体を用いた順遺伝学的解析により、上記シグナル伝達に関わる重要因子・メカニズムを同定することを目的とした。

【方法】

赤外線サーモグラフィを用いて青色光に応答した葉面温度変化を測定し、気孔開口に異常のある変異体のスクリーニングを行った。次世代シーケンスにより原因遺伝子を同定し、当該因子の気孔開口における機能解析を行った。

【結果】

上記スクリーニングによって青色光による気孔開口および細胞膜 H⁺-ATPase の活性化が阻害された *atg2* 変異体を単離した。次世代シーケンスにより原因遺伝子同定を行ったところ、オートファジーの必須因子のひとつである *ATG2 (AUTOPHAGY-RELATED2)* の遺伝子コード領域内に 1 塩基挿入が生じ機能的なタンパク質が発現できないことが分かった。次に気孔開口が阻害される要因について解析を進めた結果、変異体の孔辺細胞では酸化されたペルオキシソームの数が増加しており、結果として青色光シグナル伝達を阻害する活性酸素が高蓄積していることが分かった。

【考察】

本研究では、オートファジーは酸化されたペルオキシソームを絶えず監視しそれを速やかに分解することで、孔辺細胞内の活性酸素の恒常性を維持し、青色光シグナル伝達・気孔開口を支える役割をもつことを明らかにした。ペルオキシソームの選択的オートファジー（ペクソ

ファジー）は真核生物に保存されたメカニズムであるが、植物における役割についてはこれまで明らかにされていなかった。本研究は植物におけるペクソファジーの生理的意義を示した初めての例となった。

【文献】

Yamauchi, S., Mano, S., Oikawa, K., Hikino, K., Teshima, K.M., Kimori, Y., Nishimura, M., Shimazaki, K. & Takemiya, A.: Autophagy controls reactive oxygen species homeostasis in guard cells that is essential for stomatal opening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116, 19187-19192 (2019).

タンパク質架橋酵素を介した上皮細胞の間葉転換機構の解析

辰川 英樹

(名古屋大学大学院創薬科学研究科)

【目的】

腎線維化は組織に細胞外マトリクスが過剰に蓄積し、正常な機能が失われる疾患である。病態初期には、腎尿細管上皮細胞の上皮間葉転換 (EMT) や細胞死が病態形成の起点として考えられているが、分子機構の解明研究は十分になされておらず、有用な制御方法は存在しない。本研究では、病態初期に起こる尿細管上皮細胞の形質転換が、皮膚型のタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ (TG1) により制御される可能性について検証した。

【方法】

腎線維化時により誘導される尿細管上皮細胞の障害を細胞レベルで模倣するため、TGF- β もしくは H₂O₂ を尿細管上皮細胞株 HK-2 に処理した。EMT の程度については線維化関連遺伝子の発現量により評価し、細胞障害の程度は生細胞数測定やアポトーシス誘導細胞数の測定により評価した。TG1 の影響を確認するため、TG1 に特異的な siRNA による遺伝子発現抑制および TG1 の高発現実験により検証した。細胞中の TGase の活性については、細胞抽出液を作製した後、ビオチン標識一級アミンと反応させ、標的基質タンパク質に架橋されて取り込まれるビオチン量を指標として評価した。

【結果】

尿管上皮細胞株 HK-2 を播種し、TG1 に特異的な siRNA を用いて遺伝子発現を抑制した後に TGF- β や H₂O₂ 処理による EMT や細胞死を誘導したところ、TG1 は上皮細胞に対して保護的に働き、同一ファミリーの別のアイソザイムである TG2 は TGF- β の作用因子として働くことが示された。細胞障害を誘導した HK-2 に対して、ビオチン標識一級アミンを添加し、TGase 活性により架橋されたビオチン修飾タンパク質の経時的な変化を検出したところ、EMT や細胞死誘導処理の 12 時間後に BPA 修飾タンパク質が増大した。このことから、EMT や細胞死の誘導に伴い TGase の活性が上昇し、特定のタンパク質を基質として架橋することにより、EMT や細胞死誘導機構を制御することが示唆された。

【考察】

尿管上皮細胞の障害時において、TG1 の発現・活性が上昇し、これによる標的基質の架橋反応を介して EMT や細胞障害が制御される新機構を見出した。

【文献】

- 1) Tatsukawa H, Takeuchi T, Shinoda Y, & Hitomi, K.: Global identification and analysis of isozyme-specific possible substrates crosslinked by transglutaminases using substrate peptides in mouse liver fibrosis, *Anal Biochem.*, 604: 113629 (2020).

誰もが安心安全に摂取できるガラクトオリゴ糖の生産基盤の構築

田中 俊一

(京都府立大学生命環境科学研究科)

【目的】

近年、消費者の低カロリー志向を受け、砂糖に代わる人工甘味料の使用量は増加の一途である。一方、最近になってそれらが原因によるアレルギーの発症が国内外で確認され始めた¹⁾。このようなアレルギーの発症が報告されている人工甘味料にガラクトオリゴ糖 (GOS) があり、便性改善などに寄与するプレバイオティクスとして広く食品に使われている。工業的には、乳糖に β -ガ

ラクトシダーゼを作用させることで、2-8 糖のオリゴ糖として製造される。最近、アレルギー原因物質の特定が試みられ、①4 糖以上の GOS にアレルギー性があり、特に分岐鎖を持つ 4 糖以上に高い、②一方で 3 糖以下の GOS は直鎖・分岐鎖問わずアレルギー性がない、ことが判明した²⁾。

そこで本研究では、4 糖以上の GOS を産生しない β -ガラクトシダーゼの創出を目指して、独自のタンパク質工学技術『Enzyme Engineering by Proxy^{3,4)}』を用いた *Bacillus circulans* 由来 β -ガラクトシダーゼ (BcBga) の基質特異性の改変に挑んだ。

【実験方法】

1. BcBga とアクセサリタンパク質 (spMB) の複合体の X 線結晶構造解析

BcBga と spMB はそれぞれ既報の方法に従い³⁾、大腸菌 BL21 (DE3) を用いたタンパク質発現と精製を行った。複合体形成後のサンプルと、リザーバー溶液 (0.15 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 15% (w/v) PEG4000) を用いて結晶化を行った。BcBga と spMB に加え、3 糖の GOS である 4-Galactosyllactose (DP3) を加えた 3 者複合体については、BcBga と spMB の 2 者複合体結晶に DP3 溶液を浸潤させるソーキング法によって結晶を得た。得られた結晶を用いて SPring-8 にて X 線回折実験を行い、X 線回折イメージを得た。その後、分子置換法により位相を決定し、構造精密化ソフトによるモデル修正を繰り返すことで、最終構造モデルの構築に至った。

2. アクセサリタンパク質への部位特異的変異導入

QuikChange 法 (Stratagene) を用いて、spMB の各種点変異体を作成した。そして、実験方法 1 と同様の操作で各タンパク質の発現、精製を行った。

3. GOS の合成反応

既報の方法に従い、GOS の合成反応を行った³⁾。単糖、二糖、および GOS の量は ULTRON AF-HILIC-CD カラム (信和化工) を用いて HPLC システム (LC-20AD, 島津製作所) で測定した。グルコース、ガラクトース、ラクトースおよび上記のように調製した 3 糖とさらに大きなオリゴ糖を、これらのアッセイの標準曲線を作成するための参照化合物として使用した。各サンプルについて N=3 で測定を行った。

【結果および考察】

1. BcBga と spMB の複合体構造：基質特異性改変の分子メカニズム

『Enzyme Engineering by Proxy』とは、人工アクセサリタンパク質を酵素の活性中心近傍に結合させることで基質特異性を改変する技術である^{3,4)}。先行研究により、BcBga に当技術を展開し、部分的にはあるが4糖以上のGOSの産生抑制に成功している³⁾。

本研究では、BcBga-spMB と BcBga-spMB-DP3 の各複合体構造を分解能 2.6 Å と 2.4 Å で決定した。これらの構造解析から、spMB は BcBga の活性中心近傍に結合しており、GOS の4糖目部分を塞ぐように存在していることが確認された(図1)。BcBga のGOS 収容ポケットは入り口(サブサイト+2)から非常に広がっており、このオープンな基質結合ポケットによって2-8糖の多様な長さのGOSの産生を可能にしていると考えられる(図1A)。一方で、spMB の活性中心近傍への結合は3糖GOSの収容スペース(サブサイト-1, +1, +2)は維持しつつ、4糖GOSの4糖目部分の収容スペースを立体障害的に狭めていることから、4糖GOS以上の産生を特異的に抑制していると考えられる(図1B)。

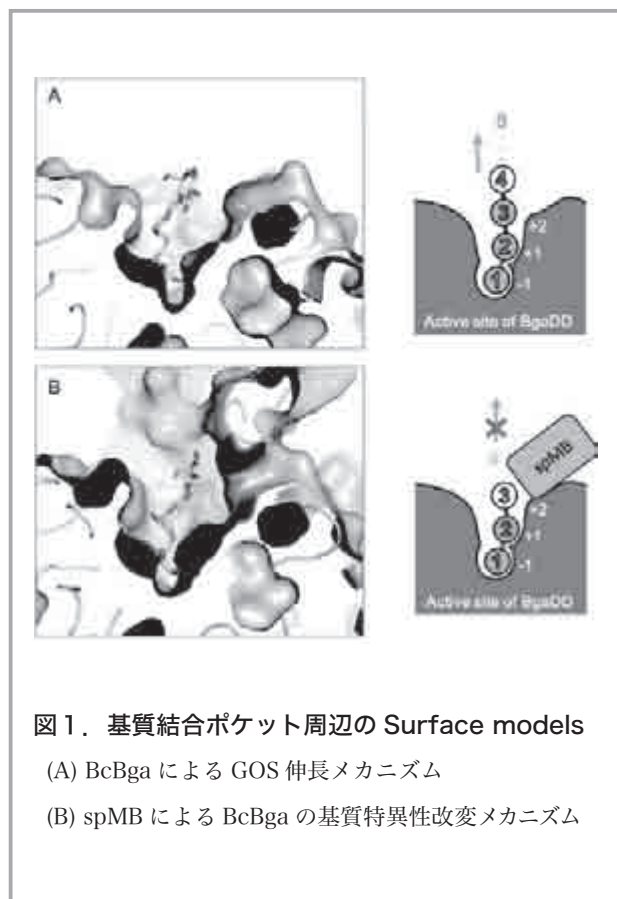


図1. 基質結合ポケット周辺の Surface models
 (A) BcBga による GOS 伸長メカニズム
 (B) spMB による BcBga の基質特異性改変メカニズム

2. BcBga による 4 糖 GOS の産生を更に抑制する改良型 spMB の創出

本研究によって得られた BcBga-spMB-DP3 複合体の構造情報を基に、4糖GOSの産生を更に抑えるような改良型 spMB の創出を目指した。4糖GOSの4糖目部分に立体障害を与えていると予想されるアミノ酸(Y31, S83)を選択し、順にかさ高いアミノ酸へと置換した。

BcBga および BcBga-spMB・各種点変異体のGOS生成分析を行った結果を表1に示す。spMB/Y31W, spMB/S83V, spMB/S83Wの3糖GOSの産生はspMBと比較して減少したが、spMB/S83Yは他の変異体と異なりspMBと同程度の値を維持していた。更に、spMB/S83Yは4-6糖GOSの産生を大幅に減少させた。したがって、3糖/4-6糖の比率は、BgaDD-spMBにおいてBgaDDより2.7倍向上しているが、本研究により創出したBgaDD-spMB/S83Yではさらに10倍向上(BcBgaと比べると27倍向上)させることに成功した。

表1 spMB が与える BcBga 産生 GOS 比率への影響

	spMB	spMB	spMB/Y31W	spMB/S83V	spMB/S83Y	spMB/S83W
DP2	22.0%	27.0%	24.0%	21.0%	27.0%	32%
≥DP3	11.0%	5.0%	4.0%	1.0%	4.0%	14.0%
DP2/≥DP3	2.0	5.4	6.0	21.0	6.8	-

【文献】

- 1) Chiang. *et al.* Anaphylaxis to cow's milk formula containing short-chain galacto-oligosaccharide. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 130, 1361 (2012)
- 2) Kaneko. *et al.* Development of hypoallergenic galactooligosaccharides on the basis of allergen analysis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 78, 100 (2014)
- 3) Tanaka. *et al.* Monobody-mediated alteration of enzyme specificity. *Nature Chem. Biol.* 11, 762 (2015)
- 4) Tanaka. *et al.* Monobody-mediated alteration of lipase substrate specificity. *ACS Chem. Biol.* 13, 1487 (2018)

メチル化DNA酸化酵素による全能性獲得機構の解明

東 田 裕 一

(九州大学稲盛フロンティア研究センター)

【目的】

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

【方法】

申請者は上述の研究目的のもと、2018年度「酵素研究助成」により以下のことを明らかにした。TET3 を欠損した体細胞核移植胚は出生しないが、TET3 欠損による発生における表現型は、①着床前の胎生 3.5 日までは発生率に顕著な影響はない、②全く着床しない、③胚が着床する胎生 4.5 日において壁栄養外胚葉形成に異常を生じる。TET3 欠損による遺伝子発現への影響は、④着床前の胎生 3.5 日では顕著な変化はないが、⑤胚が着床する胎生 4.5 日では栄養膜細胞の分化に関連する遺伝子群の発現が低下している。そこで本研究では、母性 TET3 が体細胞核移植胚の発生に果たす役割を明らかにするために、TET3 欠損により核移植後から胎生 3.5 日までの体細胞核移植胚で生じる DNA メチロームの変化を PBAT (post-bisulfite adaptor-tagging) 法を用いた DNA メチローム解析により調べた。

【結果】

体細胞核移植胚では、TET3 欠損により、着床前の胎生 3.5 日において顕著に DNA メチル化レベルが上昇していることが明らかになった。DNA の各種機能エレメントにより TET3 欠損の影響に違いは生じていなかった。しかし、TET3 欠損により DNA メチル化レベルの上昇が見られた Gene body とその周辺の DNA 領域で

は、転写開始点のみが TET3 欠損による影響が見られず、DNA メチル化レベルが上昇していないという特徴があった。また、TET3 欠損により DNA メチル化レベルが上昇した DNA 領域は、野生型では 5～20% の CpG 配列がメチル化している DNA 領域であることが示唆された。

【考察】

本研究により、母性 TET3 欠損は、体細胞核移植胚において DNA メチル化レベルを上昇させることが明らかになった。この結果、TET3 欠損により胎生 3.5 日までの胚で生じ DNA のメチル化制御異常が、胎生 4.5 日における遺伝子発現異常を引き起こし、壁栄養膜細胞が消失して着床不全が生じていることが示唆された。

時間空間的ノックアウトマウスによるビタミン K₂ 合成酵素 UBIAD1 の機能解明

中 川 公 恵

(神戸学院大学薬学部)

【目的】

ビタミン K は、血液凝固や骨形成に重要な役割を担う脂溶性ビタミンで、天然には、植物に含まれるビタミン K₁ (フィロキノロン: PK) と細菌が合成するメナキノロン類 (MK-n) がある。いずれのビタミン K 同族体も血液凝固因子の活性化を担う γ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子として働くが、特にゲラニルゲラニル側鎖構造を持つビタミン K₂ (メナキノロン-4: MK-4) は、最も補因子としての活性が強い。また、MK-4 は核内受容体 steroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとして遺伝子の発現制御作用を有する。このため、MK-4 はビタミン K の活性型ともいえる。これまでに申請者は、摂取した PK が生体内で MK-4 に変換され、それを担う酵素が UbiA prenyltransferase domain containing 1 (UBIAD1) であることを見いだした¹⁾。また、全身性 UBIAD1 欠損マウス (UBIAD1-KO) を作出し、UBIAD1-KO が胎生早期で致死となることを明らかにした²⁾。これにより、UBIAD1 が個体発生に必須の役割を担うことが明らかとなった。しかし、個体形成過程における UBIAD1 の機能は不明であり、UBIAD1 の生体に

における機能の全貌を明らかではない。そこで本研究では、UBIAD1 を時間的空間的に欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウスを用いて、発育過程ごとにおける全身での UBIAD1 欠損の影響や、成熟後における UBIAD1 欠損の影響を解析した。

【方法】

UBIAD1 を時間的空間的に欠損させることができるコンディショナルノックアウトマウス (CAG-cre-ER Ubiad1-cKO マウス) は、Tamoxifen 誘導型全身性 cre 発現マウス (CAG-cre-ERT) を用いて、cre/loxP システムにより作出した。この系では、Tamoxifen (Tam) 投与により欠損時期を制御できるため、成熟後より Tam を投与し、各組織における UBIAD1 欠損の影響を評価した。UBIAD1 欠損誘導後の生存性については、Tam 投与後の生存個体数を経時的に測定して評価した。UBIAD1 欠損誘導により著明な組織萎縮が生じた膵臓について、組織標本を作成して組織学的構造変化を精査し、免疫組織染色により各種細胞マーカー、酸化ストレス・アポトーシス・オートファジー関連因子の発現状態を評価した。さらに、糖代謝能の変化についても糖付加試験を行い、血中グルコース濃度およびインスリン濃度変化を解析した。

【結果】

出生成熟後より Tam を投与し、全身性に UBIAD1 を欠損させた結果、雌雄いずれにおいても投与後 10 から 50 日の間ですべての個体が死亡した。Tam 投与後のマウス組織を調べたところ、膵臓の著明な萎縮が観察されたことから、膵臓の組織標本を作製して評価した結果、膵腺房細胞の消失が認められ、消失箇所において脂肪細胞の形成が生じていることがわかった。これにより、糖代謝能の低下による血糖値の低下とインスリン分泌能の低下が認められた。さらに、膵腺房細胞が消失する機構を明らかにするため、種々のマーカー因子の発現を調べた結果、酸化ストレス・アポトーシス・オートファジーの全てのマーカー発現が亢進していることがわかった³⁾。

【考察】

UBIAD1 は成熟後においても全身性に欠損することで致死となることから、生存に必須の因子であるといえる。また、これまでビタミン K や UBIAD1 の機能との

関連が明らかでなかった膵臓に著明な組織構造・機能変化が認められたことから、膵臓の機能維持において、UBIAD1 が必須の役割を担っていることが明らかとなった。

【文献】

- 1) Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, *et al.* Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature*, **468**, 117-21 (2010).
- 2) Nakagawa K, Sawada N, Hirota Y, *et al.* Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One*, **9**, e104078 (2014).
- 3) Nakagawa K, Fujiwara K, Nishimura A, Murakami C, Kawamoto K, Ichinose C, Kunitou Y, Suhara Y, Okano T, Hasegawa H. UBIAD1 Plays an Essential Role in the Survival of Pancreatic Acinar Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1971 (2019).

炎症性 T 細胞を制御するチロシンキナーゼの同定と機能解明

新田 剛

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

免疫系の司令塔である T 細胞は、抗原受容体 (TCR) の種類によって、 $\alpha\beta$ T 細胞 (典型的な T 細胞) と $\gamma\delta$ T 細胞の 2 種類に区別される。 $\gamma\delta$ T 細胞は、 $\alpha\beta$ T 細胞と B 細胞に次ぐ「第三のリンパ球」であり、全ての有顎脊椎動物に存在するが、その研究は他の二者に比べて遅れている。近年、 $\gamma\delta$ T 細胞は炎症性サイトカイン IL-17 を産生し、多彩な生理的・病理的役割を有することが示され、自己免疫疾患やがんの治療標的として注目されている。本研究では、IL-17 産生型 $\gamma\delta$ T 細胞 ($\gamma\delta$ T17) の分化を制御する分子機構を理解することを目的とし、 $\gamma\delta$ TCR シグナル伝達を担うチロシンキナーゼの同定と機能解明をめざした。

【方法】

私たちはこれまでの研究で、胎仔胸腺における

$\gamma\delta$ T17の分化にチロシンキナーゼ Syk (Spleen tyrosine kinase) が重要であることを示してきた¹⁾。成体における Syk の機能と生理的意義を検討するため、Syk-flox マウスと Cd127-Cre マウスを交配し、リンパ球特異的に Syk を欠損する Syk-cKO マウスを作製した。また、TCR シグナルの下流で Syk の活性化を担う Src ファミリーキナーゼとして、 $\gamma\delta$ T 細胞に発現する Blk と Lck に着目し、CRISPR/Cas9 法により KO マウスを作製した。これらのマウスを用いて、 $\gamma\delta$ T17 の分化と TCR シグナル、および $\gamma\delta$ T17 依存的な炎症への影響を解析した。

【結果】

Syk-cKO 成体マウスでは、 $\alpha\beta$ T 細胞は正常に分化していたが、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化は未熟段階 (CD5-CD24+) で著しく阻害されていた。TCR 刺激による MAP キナーゼ経路および PI3K-Akt 経路の活性化も顕著に低下していた。また、 $\gamma\delta$ T17 は完全に消失し、イミキモド刺激による皮膚炎も抑制された。従って、Syk は $\gamma\delta$ T17 を誘導する $\gamma\delta$ TCR シグナルに必須であることが明らかとなった。 $\gamma\delta$ T17 の分化を担う Src ファミリーキナーゼとして Blk が報告されていたが、我々が作製した Blk-KO マウスは $\gamma\delta$ T17 細胞の異常を全く示さなかった。Blk の関与については $\gamma\delta$ T 細胞の研究分野として再考する必要がある。一方、Lck-KO マウスでは、Syk-cKO マウスと酷似した $\gamma\delta$ T17 分化阻害が観察され、Lck が Syk の活性化に重要である可能性が示された。

【考察】

TCR-Lck-Syk によって駆動されるシグナルが炎症性 $\gamma\delta$ T17 細胞の分化誘導に重要であることが明らかとなった。Lck と Syk は炎症性疾患に対する有効な標的酵素となる可能性がある。

【文献】

1) Muro R, Nitta T, Nakano K, Okamura T, Takayanagi H, Suzuki H. $\gamma\delta$ TCR recruits the Syk-PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program. *J Clin Invest*, 128, 415-426, (2018)

腸内細菌の宿主動物多糖グリコサミノグリカンの代謝機構とその常在性との相関

橋本 渉

(京都大学農学研究科)

【目的】

近年、腸内細菌をはじめとする常在細菌がヒトの健康と密接に関わっていることが明らかにされている。ある種の病原細菌や常在細菌は、宿主の細胞外マトリクスを分解や定着の標的とする。ヒアルロン酸やヘパリンなどのグリコサミノグリカン (GAG) は、動物の細胞外マトリクスの重要な構成多糖として存在する。我々は、プロバイオティクス (乳酸菌) を含めた多様な常在細菌が GAG を分解することを見だし、その輸送体と分解・代謝系酵素を同定した。本研究では GAG 代謝酵素 (KduI: 4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase) の構造機能相関、及び KduI と腸内細菌常在性との相関の解明を目指した。

【方法】

乳酸菌由来 KduI を基質存在下で結晶化した。SPRING-8 のビームライン (BL45XU) において X 線回折データを収集し、分子置換法により KduI の立体構造を決定した。GAG 存在下でのプロバイオティクスにおける遺伝子発現を明らかにするため、培養菌体から全 RNA を抽出し、RNA sequence 解析に供した。

【結果】

これまでに大腸菌と腸球菌由来 KduI の立体構造が決定されているが、構造機能相関は不明である。基質存在下で、KduI の立体構造 (基本骨格 double-stranded β -helix) を分解能 2.80Å で決定した。KduI ファミリーに高度に保残されているアミノ酸残基が集中するクレフト周辺では、電子密度が薄く、基質の明瞭な電子密度も確認できなかった。ドッキングシミュレーションの結果、基質がクレフトに結合することが示唆された。クレフトに位置するアミノ酸残基 (Arg163 と His200) を Ala に置換した変異体の酵素活性は顕著に低下した。

腸内細菌における KduI の普遍性を調べたところ、腸内優占種である *Bacteroides* をはじめ、*Enterococcus* や *Clostridium* などの多様な腸内細菌のゲノムに KduI

遺伝子が見いだされた。また、*Bacteroides ovatus* がヒアルロン酸を資化し、その過程で乳酸や短鎖脂肪酸を分泌することがわかった。現在、このプロバイオティクス性を示す *B. ovatus* の遺伝子発現を解析している。

【考察】

乳酸菌、大腸菌、及び腸球菌由来各 KduI の立体構造を比較した結果、Arg163 の立体配置が各酵素でほぼ同一であった。さらに、R163A と H200A の酵素活性が顕著に低下することから、このクレフトが活性部位を構成すると考えられる。

KduI 遺伝子が多様な腸内細菌のゲノムに保存されていることから、KduI と腸内細菌の常在性との相関が考えられる。GAG は動物から恒常的に分泌されており、常在細菌にとっては格好の栄養源である。実際、腸内優占種 *Bacteroides* 属細菌の多数が GAG 資化性を示すことを見いだした。また、*Bacteroides* 属細菌由来 KduI にも Arg と His が完全に保存されている。以上のことから、代謝酵素 KduI を構成要素とする細菌の GAG 資化機構は宿主における常在性と密接に関係していることが強く示唆される。

【文献】

Oiki, S., Nakamichi, Y., Maruyama, Y., Mikami, B., Murata, K. & Hashimoto, W.: Streptococcal phosphotransferase system imports unsaturated hyaluronan disaccharide derived from host extracellular matrices. *PLoS ONE*, 14, e0224753 (2019).

PB1・PB2 の 3 種のサブユニットタンパク質で構成される。ウイルス mRNA の転写の過程では、RNA 合成酵素のサブユニットタンパク質が高度に連動して機能する。このうち、PA サブユニットのエンドヌクレアーゼ活性による宿主細胞 mRNA からの 5'-cap の切り取りは、ウイルス mRNA 合成と増殖に必要不可欠である¹⁾。最近我々は、PA が宿主細胞のアセチル化酵素でアセチル化され、それによって PA エンドヌクレアーゼ活性が増強されることを発見したことから、その意義を問う本研究を開始した。

【方法】

インフルエンザウイルスの野生型 PA、ヒトのアセチル化酵素 PCAF および GCN5 の組換えタンパク質を作成し、試験管内でのアセチル化修飾解析と、アセチル化に伴う PA エンドヌクレアーゼ活性変化の解析を行っ

インフルエンザウイルス RNA 合成酵素のアセチル化修飾はウイルス増殖効率にどう影響するのか

晶 山 大

(徳島文理大学薬学部)

【目的】

現在、新規な抗ウイルス薬開発を目的として、ウイルスタンパク質の機能解析が進められている。特に注目されているのが、ウイルス粒子内に収納されているリボヌクレオプロテイン (RNP) である。RNP は、ウイルスのゲノム RNA、ヌクレオプロテイン (NP)、RNA 合成酵素複合体から成る。RNA 合成酵素複合体は、PA・

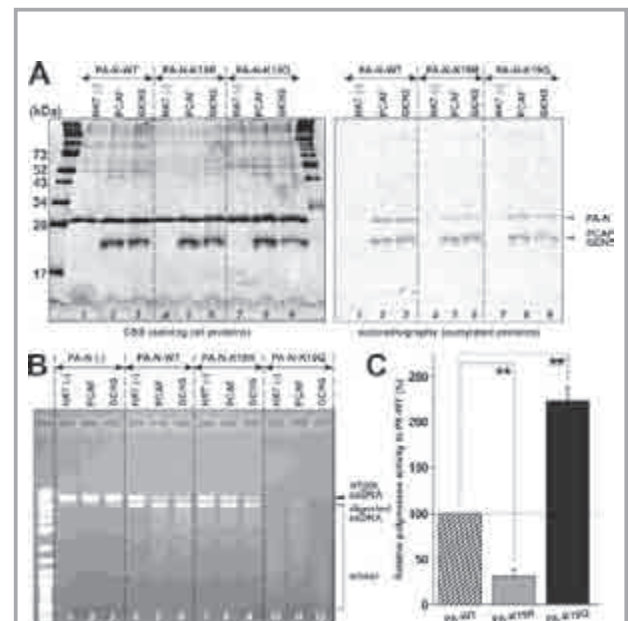


図1 PA-K19Q 変異に伴うエンドヌクレアーゼ活性変化

- A) K19 を、アルギニン (K19R)、もしくはグルタミン (K19Q) に変異させたところ、アセチル化レベルが減少したことから、K19 がアセチル化標的の一つであることが示された。
- B) アセチル化リジンのミミックである K19Q 変異により PA エンドヌクレアーゼ活性が賦活化され、PCAF や GCN5 と反応させずとも、基質である一本鎖 DNA のバンドがほぼ消失した (レーン 10)。
- C) アセチル化リジンのミミックである K19Q 変異により、ウイルス RNA 合成酵素の活性も優位に増強された。

た。質量分析によりアセチル化修飾を受けるリジン残基を特定した後、そのリジン残基を、アセチル化リジンを模倣するグルタミン残基に変異させた組換えタンパク質を作成し、上記と同様に PA エンドヌクレアーゼ活性変化の解析を行った。また、グルタミンへの変異に伴うウイルス RNA 合成酵素活性変化も解析した。

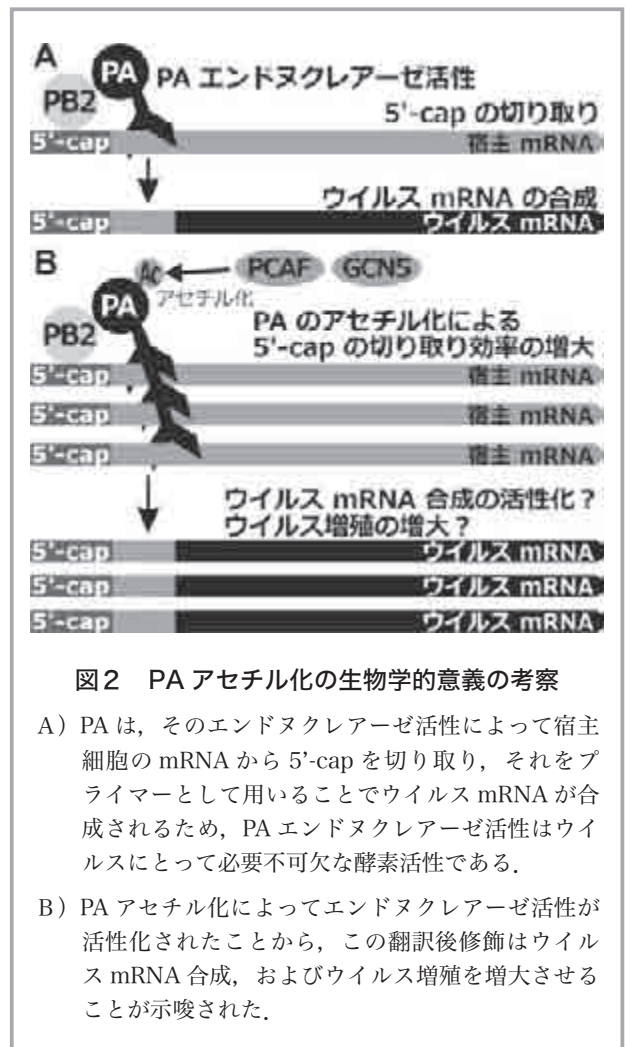
【結果】

PA 組換えタンパク質を用いた試験管内での実験により、PA はアセチル化酵素 PCAF および GCN5 によってアセチル化され、質量分析の結果、その標的は 19 番目のリジン残基 (K19) であることが示唆された。それを生化学的に解析するため、K19 をアルギニン (PA-K19R) またはグルタミン (PA-K19Q) に点変異させた組換えタンパク質を使用したところ、アセチル化のシグナル強度が有意に減少したことから (図 1 A)、K19 がアセチル化標的の一つであることが示された。また、アセチル化修飾に伴って、PA のエンドヌクレアーゼ活性が増強されることも明らかにした。そして、PA-K19Q 変異により、定常的なアセチル化をミミックすると、PCAF・GCN5 と反応させずとも PA エンドヌクレアーゼ活性が増大した (図 1 B)。さらに、ウイルスの RNA 合成能も、PA-K19Q 変異によって有意に増加した (図 1 C)。以上より、PA-K19 のアセチル化によって PA エンドヌクレアーゼ活性が増大し、それに伴って RNA 合成能が強められることを示唆した。

【考察】

以上の実験結果より、インフルエンザウイルス PA は K19 がアセチル化されることで、そのエンドヌクレアーゼ活性が増強されることが示唆された。PA エンドヌクレアーゼ活性は、宿主細胞の mRNA から 5'-cap を切り取り、ウイルス mRNA を合成するためのプライマーとして利用することから、ウイルス mRNA 合成には必要不可欠な工程である (図 2 A)。その PA エンドヌクレアーゼ活性がアセチル化によって増強されるということは、ウイルス増殖そのものの増強につながる可能性があることを示唆するものである (図 2 B)。

我々はインフルエンザウイルスのゲノム RNA と相互作用する NP もアセチル化され、ウイルス増殖に重要な働きを担っていることも示唆した²⁻⁴⁾。そこで、現在は、「インフルエンザウイルスタンパク質へのアセチル化修



飾を抑制することでウイルスの増殖を抑えられないか」と考え、まったく新しいストラテジーを持つ抗ウイルス薬の開発研究を遂行している。

なお、本研究成果は、日本薬学会第 140 年会の講演ハイライトに選出された (2020 年 3 月)。また、現在、原著論文として投稿中である。

【文献】

- 1) 畠山 大, 庄司 正樹, 葛原 隆 (2020) 「インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼが有するエンドヌクレアーゼ活性を阻害する化合物群」 *BIO Clinica*, 35: 73-77.
- 2) 畠山 大: 「インフルエンザウイルスタンパク質に対する翻訳後修飾」 *BIO Clinica*, 34: 68-73 (2019)
- 3) Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, Saitoh A, Arakaki Y, Masuda A, Komatsu T, Nagano R, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T. Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyl-

transferases, PCAF and GCN5. *J Biol Chem* 293: 7126-7138 (2018).

- 4) **畠山 大**:「新薬開発を目指したインフルエンザウイルスのリボヌクレオプロテイン構成タンパク質の構造機能的基盤研究」*薬学雑誌*, 137: 205-214 (2017)

微生物由来の天然塩基性ペプチドを利用した酵素・タンパク質の細胞内直接送達法の開発

濱野 吉十

(福井県立大学生物資源学部)

【目的】

酵素や抗体などのタンパク質、そして、DNAのような高分子化合物は、通常、生体膜を透過しないため、バイオ医薬品の有効性は限定的である(図1A)。高分子化合物を直接細胞内に導入する方法として、マイクロインジェクションや電ポレーションなど細胞膜を一過的に破壊して導入する方法、あるいは、リポソームを用いて導入する方法などが用いられてきた。しかし、導入効率や細胞に与える損傷の大きさから必ずしも満足のいく結果は得られていない。一方で、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジンなど)を主成分とするポリカチオン性の塩基性ペプチド(BP)は、分子量が1,000を超えるにも関わらず、優れた細胞膜透過性を示す。さらに、分子量が数万を超えるタンパク質をBPで化学修飾することで、タンパク質や酵素を動物細胞内に直接送達できる成功例も報告されている^{1,2)}。BPで修飾された生体高分子が細胞膜を透過できる仕組みについては完全に理解されていないが、動物細胞表面のシアル酸を含む

糖鎖の負電荷にポリカチオン性のBPが静電的に速やかに吸着することでエンドサイトーシス/マクロピノサイトーシスの経路で効率良く細胞内に取り込まれると考えられている。実際に、BPを用いてポリカチオン修飾したタンパク質は、細胞培養液に加えるだけで細胞機能が制御できた例も報告されており、細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに、抗体医薬を含むバイオ医薬の新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)として注目されている(図1B)。タンパク質や酵素をBPで修飾するための一般的、且つ、簡便な方法は、N末あるいはC末にBPタグを結合させた融合タンパク質として調製する方法である。しかし、酵素・タンパク質の等電点に大きな影響を与える本法は万能な手法ではなく、また、BPタグがタンパク質の表面に存在しない場合には、期待された生体膜透過性が得られない。一方で、タンパク質や酵素の表面を化学的にBPで修飾する方法は、この問題を解決できる。しかし、タンパク質が変性しない温和な条件でBP修飾するためには、特異的な化学反応基(例えば、クリックケミストリーに利用できるクリック官能基)を有するBPを用意する必要がある。さらに、有機化学的な固相合成法に頼るこの手法は、コストが高いためバイオ医薬品等に適用された例はない。

そこで本研究では、我々が独自に開発した微生物由来の天然BPによる化学修飾技術を用いて(図1C)、低コストにタンパク質、酵素、抗体をポリカチオン修飾し、実用的な生体膜透過性を付与するための技術開発と有効性について検証した。

【方法と結果】

現在、ポリカチオン化修飾法には塩基性オリゴペプチ

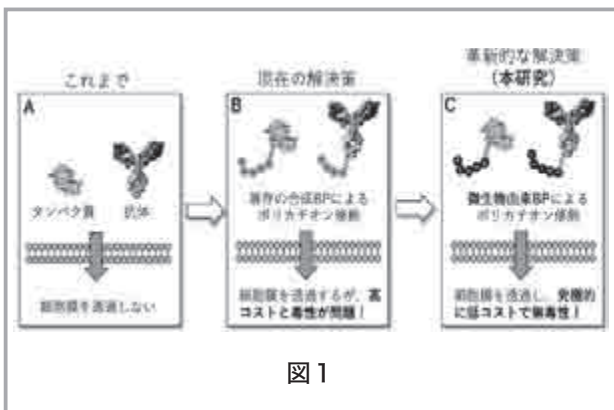


図1

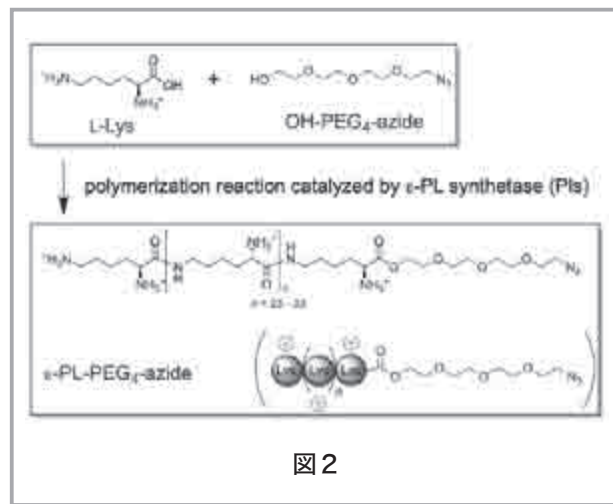


図2

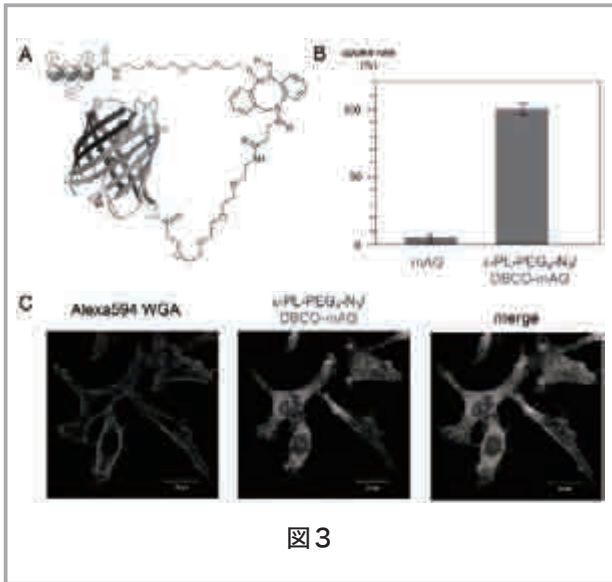


図3

ド (8 残基アルギニンペプチド : R8) が汎用的に利用されているが^{2,3)}, 放線菌由来の天然ポリカチオン化合物である ε-ポリ-L-リジン (ε-PL, 図2) もポリカチオン化修飾のツールとして期待できる。これまでに我々は, ε-PL 生産菌を OH-PEG₄-azide 含有培地で培養すると, ε-PL のカルボキシル基末端に OH-PEG₄-azide がエステル結合で導入されることを見出した (図2)。生産された ε-PL-PEG₄-azide はクリックケミストリーに直接利用できることから, 本研究では, タンパク質などの高分子化合物も ε-PL 修飾によって生体膜透過性を付与できるか検証するために, モデル実験として蛍光タンパク質である monomeric Azami-Green (mAG) の ε-PL 修飾を行った。mAG に dibenzocyclooctyne (DBCO) 基を化学的に導入し, さらに ε-PL-PEG₄-azide (図1) を混合し, クリックケミストリーにて ε-PL-PEG₄-azide/DBCO-mAG (図3A) を合成した。HeLa 細胞を用いて動物細胞内への取り込みを観察したところ, 未修飾の mAG と比較して取り込み率が10倍以上向上した(図3B)。また, 細胞内に取り込まれた ε-PL-PEG₄-azide/DBCO-mAG の一部は, 核内にも局在することが共焦点レーザー顕微鏡観察によって判明した (図3C)。

【文献】

- 1) Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-72 (1999).
- 2) Futaki, S. Oligoarginine vectors for intracellular

delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* **84**, 241-9 (2006).

- 3) Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T. & Futaki, S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* **19**, 656-664 (2008).

リン脂質輸送体群によるイオンチャネル制御機構の解明

原 雄 二

(京都大学大学院工学研究科)

【目的】

生体膜の構成成分であるリン脂質は膜タンパク質と相互作用することで, 膜タンパク質の構造や活性などを制御する。しかし生体膜中の脂質分子およびその動態, さらに脂質との相互作用によりもたらされる膜タンパク質機能の調節機構については, 未だその全容は明らかでない。我々は, これまで膜外層から内層へのリン脂質輸送活性を持つリン脂質フリッパーゼの細胞機能に着目し, 研究を進めてきた。その結果, リン脂質フリッパーゼによるリン脂質分子種の一つ (ホスファチジルセリン) の輸送が, 膜張力で活性化されるイオンチャネル PIEZO1 の活性化を規定することを明らかにした¹⁾。本申請では, 我々の仮説「フリップ・フロップ スイッチ機構」(リン脂質の膜間輸送に伴う動的な局在変化が, 膜タンパク質活性の ON/OFF を規定すること) をさらに発展させ, その普遍性を示すことを目的とした。

【方法】

- ・PIEZO1 イオンチャネルの脂質感知部位の同定:

我々がこれまで使用してきた筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた。特にリン脂質フリッパーゼ欠損株 (CDC50A 欠損株) に, PIEZO1 変異体を発現するプラスミドを導入し, カルシウム測光法により各変異体の活性評価を行った。

- ・リン脂質フリップ・フロップにより活性制御されるイ

オンチャネルの同定：

HEK293 細胞について、リン脂質フリッパーゼ欠損細胞を CRISPR/Cas9 法を用いて樹立した後、各イオンチャネルについて活性評価を行った。

【結果】

・ PIEZO1 イオンチャネルの脂質感知部位の同定：

PIEZO1 イオンチャネルがどのように脂質動態を感知するか解明を目指した。文献1で示すとおり、酸性リン脂質の一つホスファチジルセリン（以下 PS）が PIEZO1 チャネル活性に重要であることから、塩基性アミノ酸が PS 感知に関わる可能性を考えた。PIEZO1 は 2500 アミノ酸からなる長大なタンパク質であることから、膜脂質組成の異なるショウジョウバエの有するオルソログ PIEZO とのキメラ体を作製しそのチャネル活性の評価を行った。その結果、N 末端から中央領域にかけて脂質感知部位が存在することが示された。

・ リン脂質フリップ・フロップにより活性制御されるイオンチャネルの同定：

Ca²⁺透過型イオンチャネルを中心に、リン脂質の膜間輸送（フリップ・フロップ）により活性制御されるチャネルの同定を目指した。その結果、PIEZO1 だけでなく別の活性化機構を有するイオンチャネルの同定に成功した。

【考察】

これまででもイオンチャネルの活性制御機構として、リン脂質の寄与が注目されてきたが、ホスファチジルイノシタイドによる制御機構が中心であった。我々はリン脂質の膜間輸送が織りなす細胞現象について、特にイオンチャネルの活性制御への寄与を明らかにした。本研究が端緒となり、リン脂質動態を基軸とした膜タンパク質全般に対する機能制御機構の解明につながるよう、さらに研究を推進したい。

【文献】

1) Tsuchiya M *et al.*, *Nature Commun.*, 2018

「動く」酵素の光操作による分裂期染色体の自在制御

松尾 和哉

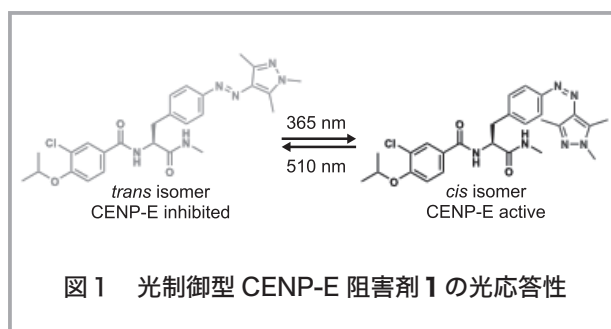
(北海道大学電子科学研究所)

【目的】

細胞分裂は、1つの細胞が2つ以上の娘細胞に分かれるダイナミックな生命現象である。遺伝情報を次世代へと正確に系譜するため、S期で染色体を複製し、染色体を一度赤道面に並べた後、等分配することで、2つの等価な娘細胞が生まれる。細胞分裂M期の前中期において、染色体の動きを制御しているのが、モータータンパク質 CENP-E (Centromere-associated protein E) である。CENP-E は、ATP を加水分解することで得られる化学エネルギーを、メカニカルな「動き」に変換することで染色体を輸送する。本研究では、光で可逆的に制御できる CENP-E 阻害剤を開発し、染色体の動きを光操作するシステムを構築することを目的とした。

【方法】

CENP-E 阻害剤として汎用される GSK923295 の基本骨格に、フォトクロミック分子であるアリルアゾピラゾール誘導体を導入した化合物 1 (図1) を設計・化学合成し、¹H,¹³C-NMR, HR-MS で構造・純度を確認した。得られた 1 の可逆的な光応答性, CENP-E 阻害活性, HeLa 細胞での CENP-E 阻害による細胞死, 分裂期染色体の光操作を検討した。



【結果・考察】

合成した 1 は、アリルアゾピラゾール誘導体の *trans* 体に特徴的な pi-pi* 遷移 (340 nm 付近) と n-pi* 遷移 (440 nm 付近) を示した。これに、365 nm の紫外光を照射し、光定常状態とすると、*cis* 体が 93% 生成した。また、510 nm の可視光照射で光定常状態とすると、

88%の *trans* 体が生成した。この光異性化反応のスイッチングは、何度も可逆的に行うことができた。1の CENP-E 阻害能は、光照射しない条件で $IC_{50}=5.9 \mu M$ であり、紫外光照射時に $IC_{50}=120 \mu M$ 、可視光照射時に $IC_{50}=14 \mu M$ と、10 倍程度の CENP-E 阻害能の光スイッチングが確認できた。細胞系で CENP-E 阻害活性を評価するため、HeLa 細胞を用い、cell viability assay を行った結果、光照射しない条件および可視光を照射した条件で $GI_{50}=0.29 \mu M$ であった。また、紫外光を照射した条件では $GI_{50}=2.4 \mu M$ であり、やはり 10 倍程度の差が見られた。以上から、細胞系でも機能する光制御型 CENP-E 阻害剤を開発した。

さらに、分裂期染色体を近赤外蛍光で染色し、1 を添加すると、光照射前には CENP-E が阻害状態のため、染色体はミス配置していたが、紫外光を照射すると、紡錘体極付近のミス配置した染色体が赤道面方向に向かって移動し始めた。さらに、移動途中で、可視光を照射すると、その動きはほぼ停止した。この染色体の動きは少なくとも 3 回スイッチングでき、最終的に赤道面へと収束した。以上から、染色体の移動を光で操作できるシステムの構築に成功した¹⁾。

【文献】

- 1) Mafy, N. N., Matsuo, K. Hiruma, S. Uehara, R. & Tamaoki, N. : Photoswitchable CENP-E Inhibitor Enabling the Dynamic Control of Chromosome Movement and Mitotic Progression, *J. Am. Chem. Soc.*, 142, 1763 (2020).

酵素コンディショナルノックアウトマウスを用いた 関節リウマチ発症機序及び新規治療法の解明

松本 佳 則

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

【目的】

関節リウマチをはじめとする自己免疫性炎症性疾患は、自己または外来抗原に対する異常な免疫応答により活性化された炎症細胞から、サイトカインやケモカインが異常産生されることで生じる。これらの機序を解明することは、治療ターゲットとなる新たな因子の発見に繋

がり、疾病と遺伝的・環境的素因の関係を明らかにする上でも重要である。蛋白 A は、下流のシグナルを介して様々な生体の恒常性維持に寄与することが想定されている。我々は、蛋白 A の機能解明を通して、関節リウマチの発症機序解明に応用出来ないかと考えた。そこで蛋白 A のノックアウトマウスを作製し、本検討を開始した。

【方法】

蛋白 A ノックアウトマウスより抽出した細胞を用いて、骨吸収を担う破骨細胞分化や機能を検討する。またマウスの骨量を histomorphometric analysis を用いて解析し、骨リモデリングにおける蛋白 A の機能を *in vivo* でも明らかにする。

【結果】

マクロファージは組織球として組織に移行する他、骨吸収を担う破骨細胞にも分化する能力を持つ。我々は、蛋白 A ノックアウトマウス骨髄より分離したマクロファージをサイトカイン RANKL で刺激し、破骨細胞への分化能や骨吸収能を検討した。その結果、蛋白 A ノックアウト細胞では破骨細胞分化が著明に亢進し、骨吸収能も増加した。更に蛋白 A と骨リモデリングの関係を *in vivo* で明らかにすべく、マウスの大腿骨を用いて Histomorphometric analysis を行ったところ、蛋白 A ノックアウトマウスでは著明な骨量の低下、破骨細胞の増加が見られた。

【考察】

蛋白 A ノックアウトにより、破骨細胞分化が亢進し、骨量が低下することが明らかとなった。蛋白 A が関与するシグナルの解明により、関節リウマチの骨破壊や骨粗鬆症を改善させる新たなターゲットを見出すことが出来ると考えており、現在更に解析を進めている。また本研究の更なる深化により、関節リウマチの病態形成に関わる蛋白 A の役割が明らかとなれば、関節リウマチの遺伝学的な発症予測も可能になると考えており、その点についても今後明らかにしたい。

最後に、本研究をご支援頂いた日本応用酵素協会の皆様方に感謝申し上げます。

ADP リボシルシクラーゼ・CD38 の概日リズム発振における役割

三 枝 理 博

(金沢大学医薬保健研究域医学系)

【目的】

中枢時計・視床下部視交叉上核による概日リズム発振には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の日内変動が重要であることが、培養スライスなど *in vitro* の実験により報告されている。CD38 は細胞膜表面に存在するエクト型酵素で、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドから環状アデノシン二リン酸リボース (cADPR) を産生する。cADPR は細胞内のリアノジン受容体のアロステリック分子で、小胞体など細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を促進する。本研究では、CD38-cADPR- Ca^{2+} ダイナミクスの概日リズム発振における重要性を、*in vivo* で解析することを目的とした。

【方法】

マウスのホームケージ内自発活動の概日行動リズムを、受動型赤外線センサーを用いて明暗、恒常暗条件下で計測した。

また Cre 依存的に Ca^{2+} インディケーター jGCaMP7s を発現する組換え AAV ベクターを、視交叉上核の主要なニューロン、AVP (バソプレシン) 産生ニューロンや VIP (血管作動性腸管ペプチド) 産生ニューロンに特異的に Cre を発現するマウスの視交叉上核に局所感染させて jGCaMP7s を発現させ、視交叉上核ニューロンにおける細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスを、ファイバーフォトメトリー法を用いて *in vivo* で計測した。

【結果】

CD38^{-/-}マウスは概日リズム周期が約 30 分延長、活動期開始から約 4 時間後に自発活動のピークがあること (野生型マウスでは活動期開始直後) を、ICR 遺伝的背景のマウスを用いた予備実験で見出し、本研究を申請した。しかし、標準的な C57BL/6J 遺伝的背景の CD38^{-/-}と野生型マウス (littermate) では、予備実験で見られた概日リズム異常が消失した。予備実験で供与を受けたマウスは littermate でなかったため、一度戻し交配を行い、littermate の CD38^{-/-}と野生型マウス (ICR

背景) を比較したが、やはり差は見られなかった。

ファイバーフォトメトリーを用いて、視交叉上核の AVP ニューロン、VIP ニューロンにおける細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスを、自由行動下マウスで長期間 (~2 週間) 計測することに成功した。

【考察】

CD38^{-/-}マウスを用いた実験では、概日リズム発振における CD38-cADPR カスケードの重要性は確認できなかった。視交叉上核における Ca^{2+} 日内変動がどのように生み出され、リズム発振をどのように調節するのか、今後の課題である。

ファイバーフォトメトリーによる視交叉上核の長期 *in vivo* Ca^{2+} 計測は難易度が高く、これまでに報告例はほとんど無い。正常マウスだけでなく、概日リズム異常モデルマウスにおける視交叉上核の動態を研究する上で極めて有用な技術である。実際、我々が作成した概日リズム異常マウスに適用して既に重要なデータが得られ、現在論文投稿中である。

ポリ ADP リボース合成酵素を介したヒトレトロトランスポゾン L1 の転移機構の解析

三 好 知 一 郎

(京都大学大学院生命科学研究所)

【目的】

レトロトランスポゾンは、自身の RNA を自身がコードする逆転写酵素によって cDNA に変換し、ゲノム上を転移する動的な DNA 配列である。Long Interspersed Element-1 (L1) は、ヒトで唯一自律的に転移可能なレトロトランスポゾンだが、未だそのゲノムへの侵入機構および宿主制御因子はよく分かっていない。ポリ ADP リボシル化酵素 (PARP) は、ポリ ADP リボースを標的タンパク質に付加し、これはタンパク質集積の目印ともなる。PARP1 と PARP2 は、L1 の逆転写酵素 ORF2 と相互作用するが、その転移制御機構は不明な点が多い。そこで本研究では PARP1/2 を介した L1 のゲノム挿入過程を明らかにし、転移によるゲノム不安定化の理解にむけた基礎的知見を得ることを目的と

する。

【方法】

1. 種々の ORF2 発現ベクターを用いて、ORF2 上のポリ ADP リボシル化の部位の探索。
2. ORF2 と相互作用する DNA 修復因子の中から、PARP の制御因子を、PARP 阻害剤を用いて探索。

【結果】

1. shRNA によるノックダウン解析から、主に PARP1 が ORF2 をポリ ADP リボシル化することが明らかとなった。様々な ORF2 断片を解析したところ、ORF2 の中央に位置する逆転写酵素ドメインが、主にポリ ADP リボシル化されていた。この逆転写酵素ドメインは PARP1 の相互作用ドメインと一致することから、PARP1 との相互作用により、迅速に結合部位領域が修飾を受けると考えられる。しかし、その候補標的配列は逆転写酵素ドメイン内に多数存在していた。
2. DNA LIG1 と LIG3 の DNA リガーゼは、ORF2 と相互作用するだけでなく、そのノックダウン細胞では、L1 の転移頻度が低下することが分かった。PARP 阻害剤を用いた実験から、LIG3 が PARP 活性依存的に ORF2 と相互作用することも分かった。一方で、LIG1 と ORF2 と相互作用するが、PARP 活性とは無関係にリクルートされるようだ。

【考察】

本研究より、ORF2 の逆転写酵素ドメイン全体が、主に PARP1 によってポリ ADP リボシル化されることが分かった。これは、ドメイン全体が修飾を受けることで、逆転写酵素活性あるいは DNA 結合能が変化するのではないかと予想される。今後、試験管内反応を用いて検証すべき課題である。一方で、PARP 活性化によって、LIG3 が ORF2 複合体にリクルートされることが分かった。LIG3 は micro homology 配列を利用して DNA 末端同士を連結する alternative NHEJ に寄与することが示唆されている。実際、一部の L1 の挿入配列近傍では micro homology が検出されるため、LIG3 L1 cDNA の挿入を担うことが予想された。今後、L1 挿入配列のシーケンス解析を実施し、この可能性を検証予定である。

【文献】

- 1) *Miyoshi T., Makino T., and *Moran J.V. Poly (ADP-ribose) polymerase 2 recruits replica-

- tion protein A to sites of LINE-1 integration to facilitate retrotransposition. *Molecular Cell* 75: 1286-1298 (2019). *co-corresponding authors
- 2) Miyoshi T. A battleground between human retrotransposons and host factors. *Seikagaku*. (2020) (In press)

種々の酵素によるヒストン修飾クロストークを介した、生殖細胞運命を規定するエピゲノム動態の解明

望月 研太郎

(東北大学大学院医学系研究科)

【背景・目的】

ヒトを含む哺乳動物では、生殖細胞が唯一、精子または卵子を形成した後に、受精を経て世代の継承を保証する。マウスの生殖細胞は、胎仔期に微量な細胞集団として出現するが、その分子メカニズムの多くは依然として不明であった。本研究では、我々がこれまでに同定した複数の酵素^{1,2)}かが調節するヒストン修飾間、ならび DNA メチル化を含めた他のエピジェネティック修飾やクロマチンリモデリング因子・転写制御因子とのクロストーク（ある分子・経路が作用するときに他の分子・経路と影響し合うこと）を明らかにすることを目的とした。さらに、マウス生殖細胞の発生分化に関わる遺伝子および内在性レトロエレメント（ゲノム DNA 中に膨大に存在し、近傍遺伝子に影響を与える特殊な配列群）の発現制御システムを、サンプル細胞数の制限を克服して、*in vitro*（試験管内）および *in vivo*（生体内）で包括的に解明することを目指した。

【方法・結果・考察】

まず、微量細胞でのクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を応用して、初期胚や生殖細胞のゲノムにおける化学修飾状態を検出するために、実験解析系を最適化した。その結果、主要なヒストン修飾である、H3 リジン 4 の 3 価メチル化 (H3K4me3)、H3 リジン 27 の 3 価メチル化 (H3K27me3) 等について、細胞 1000 個から、ゲノム全領域における局在の記述が可能となった。次に、この技術基盤を用いて、野生型マウス胎仔

の初期胚および生殖細胞の発生段階を追って各修飾状態を検証した結果、特に生殖細胞の発生分化に関わる遺伝子群において、ヒストン修飾間およびヒストン修飾とDNAメチル化との間に時系列的なキネティクスを見出すことに成功した。このことから、生殖細胞の発生分化には、複数のメカニズムによる時空間特異的で段階的な遺伝子発現調節が働いていることが示唆された。さらに、*in vitro* モデルを用いた各ヒストン修飾の責任酵素・クロマチンリモデリング因子・転写制御因子に対する簡便で効率的な遺伝子ノックアウト解析によって、E-box結合型の転写制御因子がヒストン修飾酵素をリクルートすること、次いで、DNAメチル化酵素群(DNMTs)が呼び込まれることが示唆された。また同時に、RNAシーケンズ(RNA-seq)によるトランスクリプトーム解析を行い、各ノックアウトにおける遺伝子および内在性レトロエレメントの発現変動を明らかにした。

現在、これらの成果を学術誌に投稿準備中である。

【文献】

- 1) Mochizuki K, Hayashi Y, Sekinaka T, Otsuka K, Ito-Matsuoka Y, Kobayashi H, Oki S, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y.: Repression of somatic genes by selective recruitment of HDAC3 by BLIMP1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination, *Cell Reports*, 24, 2682-2693.e6 (2018).
- 2) Mochizuki K, Tando Y, Sekinaka T, Otsuka K, Hayashi Y, Kobayashi H, Kamio A, Ito-Matsuoka Y, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y.: SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination via ensuring BMP signaling, *Development*, 145, dev.164160 (2018).

【謝辞】

日本応用酵素協会 酵素研究助成のご支援に心より感謝申し上げます。

光応答性モータータンパク質による細胞分裂制御法の開発

矢島 潤一郎

(東京大学総合文化研究科)

【目的】

細胞分裂の進行の中心的な役割を担う酵素のひとつにモータータンパク質「キネシン」がある。キネシンはATPを加水分解する酵素であるとともに、分裂に必須なタンパク質と結合し、細胞内の特定の場所まで運ぶ役割を担う。また、染色体の分配時には、紡錘体内の微小管との相互作用を通して適切なタイミング・場所で「力仕事」をする酵素でもある。本研究では、分裂過程のあらゆるタイミングで力学的機能を果たす酵素・キネシンを、光応答性タンパク質の構造変化を利用して光の照射の有無により局所的に活性化、または不活性化することで、目的のキネシンがいつ、どこで機能しているのかを調べることが可能なメカノ-オプトツールの開発を目的とする。

【方法】

(1)微小管依存性タンパク質(酵素)・キネシンの活性を制御するメカノ-オプトツールの開発

キネシンの活性を光によって制御するため、キネシンのモータードメインのN末領域に光応答性タンパク質であるLovまたはZdkを融合したタンパク質を作成する。

(2)光依存性結合解離特性を持つタンパク質を融合したキネシンの活性の光応答評価

光の照射領域とタイミングとを制御可能な顕微システムを構築し、光の照射に応答したキネシンの運動特性(並進運動速度, 回転運動速度, 運動逐次性, 最大発生力)を定量する。

【結果】

(1)キネシンファミリーのうち kinesin-1, 及び kinesin-5



のN末端側に光応答性タンパク質である Lov または Zdk をそれぞれ融合した DNA コンストラクトを作成し、大腸菌内で発現させ、目的タンパク質を精製した。Zdk を融合させた場合のみ、光に応答して Lov との結合解離特性が維持されていた。

(2)特定の波長の光の照射により、キネシンが発生する並進運動の速度、及び回転運動の速度が、それぞれ2倍、及び5倍程度上昇した。また、光の照射をやめた場合、kinesin-1 が微小管上を移動する距離（運動逐次性）が30%程度減少した。

【考察】

本申請研究では、細胞分裂を統御する仕組みとして、リン酸化酵素、もしくは脱リン酸化酵素などの化学的信号による制御機構に加え、「力仕事」酵素による制御機構の可能性に着目し、力を発生する酵素の動きを光の照射で自在に制御するツールの開発を目指した。その結果、光の照射の有無によりキネシンの並進・回転運動、及び運動逐次性が制御でき一定の成果を得ることができたが、100%の阻害効果ではないため、より効果的な光応答性タンパク質の融合部位を検証してゆく必要がある。*In vitro*でのメカノツールの検証後に、細胞内での評価に取り組むとともに、紡錘体内での力の定量が可能なFRET力センサーの開発も行い、紡錘体機能における力発生酵素による統御機構を明らかにすることを目指す。

【文献】

Yamagishi, M., Fujimura, S., Sugawa, M., Nishizaka, T., Yajima, J.: The N-terminal β -strand of single-headed kinesin-1 can modulate the off-axis force-generation and resultant rotation pitch. *Cytoskeleton*, in press, (2020)

リン脂質代謝酵素による脂質輸送制御機構の解明

山本 圭

(徳島大学大学院社会産業理工学研究部)

【目的】

エネルギー産生の根源である三大栄養素は、糖質、タンパク質、脂質からなる。栄養素として摂取された脂肪酸は中性脂肪や細胞膜リン脂質に蓄えられ必要時に脂質

分解酵素リパーゼの作用によって供給される。その中でも特にリン脂質は、様々な状況下における脂質メデイエーター産生の基質となるが、飽食および飢餓時におけるリン脂質代謝の詳細については知見が乏しい。本研究では、高脂肪食負荷および絶食時におけるリン脂質代謝に着目して脂質メタボローム解析をおこなうことで、新規の脂質代謝パスウェイが存在しないか、検討をおこなった。

【方法と結果】

通常食および高脂肪食を9週間与えたC57BL/6Nマウスを48時間完全絶食させ、エネルギー代謝に関わる臓器において変動する脂質を脂質メタボローム解析により探索した。

マウス血漿中の遊離脂肪酸量はDHA>AA>EPAの順であった。DHAは高脂肪食負荷により低下したものの、絶食による脂肪酸種の量に変化は認められなかった。血漿中のリゾリン脂質では、リゾフォスファチジルコリン(LPC)(16:0)ならびにLPC(18:0)が最も多かった。LPCのうちLPC(18:1)は高脂肪食負荷により増加し、絶食により低下傾向であった。

絶食を施したマウスの内臓脂肪は全く残っていなかった。内臓脂肪組織では中性脂肪の形で脂肪酸は取込まれているが、遊離脂肪酸やリゾリン脂質の含量は他の組織と比較して非常に低かった。

骨格筋に含まれる脂肪酸とリゾリン脂質は肝臓と比較して著しく低かった。興味深いことに、リゾプラズマローゲンの含量が他の組織と比較して多く、高脂肪食負荷ならびに絶食負荷によりリゾプラズマローゲンが増加した。

通常食および高脂肪食の区別なく絶食時の肝臓ではドコサヘキサエン酸やアラキドン酸といった高度不飽和脂肪酸およびリゾリン脂質が協調して増加していた。このことは絶食時の脂質代謝産物の変化にリン脂質代謝酵素のホスホリパーゼA₂(PLA₂)が機能する可能性が示唆されることから、肝臓におけるPLA₂遺伝子の発現を調べたところ、絶食負荷によりあるPLA₂分子種が著しく増加することが明らかになった。さらに当該PLA₂遺伝子欠損マウスに絶食負荷を施したところ、遺伝子欠損マウスの肝臓では超低密度リポタンパク質(VLDL)が合成されないこと、肝臓で合成された中性脂肪が血中に分泌さ

れないこと、が明らかになり、この PLA₂ は飢餓時におけるエネルギー代謝に寄与することが示唆された。

【考察】

本研究によって PLA₂ を介したリン脂質代謝が栄養飢餓時における肝臓の恒常性に寄与する可能性が示唆された。栄養飢餓時における PLA₂ の機能および当酵素により産生される機能性脂質の作用機序の解明が今後の課題である。

変異型 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 融合 Luciferase を用いた酸化グアニン検出法の開発

吉田 亘

(東京工科大学応用生物学部)

【目的】

スーパーオキシドやヒドロキシラジカル、過酸化水素などの活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) は酸化ストレス下で生じる。過剰に ROS が産生すると DNA 損傷が引き起こされ、グアニンの 8 位が酸化されて 8-oxoguanine (8-oxoG) が生じる。ゲノム DNA 中の 8-oxoG はがん細胞において増加していることから、8-oxoG は、がんのバイオマーカーとして期待されている。従来のゲノム DNA 中の 8-oxoG を検出する方法として、High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 法 や Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法が挙げられる。しかし、これらの手法は煩雑な操作や大型の精密機器を必要とする。そこで、本研究ではゲノム DNA 中の 8-oxoG を簡便に検出する

方法を開発することを目的とした。これまでに本研究室では、メチル化 CpG 結合タンパク質 (Methyl-CpG-binding domain; MBD) にホタル由来の発光タンパク質である Firefly luciferase (Luciferase) を融合した MBD-luciferase を用いて、ゲノム DNA のメチル化 CpG を簡便に検出する方法を開発している¹⁻⁴⁾。そこで、本研究では 8-oxoG に特異的に結合する変異型 8-oxoG DNA glycosylase 1 (OGG1) に luciferase を融合させたタンパク質 (OGG1-luciferase) を用いて 8-oxoG を検出できるか検討した (Fig. 1)。

【方法】

1. OGG1-luciferase の作製

野生型 OGG1 はゲノム DNA 中の 8-oxoG に結合した後に、8-oxoG を二本鎖 DNA から切除する。一方、249 番目のリシンをグルタミンに置換した変異型 OGG1 は 8-oxoG 結合能のみを保持していることが報告されている。そこで、この変異型 OGG1 融合 luciferase の発現ベクターを構築し、構築した発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換した BL21 (DE3) を培養し、OD₆₀₀=0.6 で終濃度 1.2 mM となるように IPTG を添加し、OGG1-luciferase の発現誘導を行なった。その後、得られた湿菌体を Bug Buster Reagent (Novagen) を用いて破碎し、水溶性画分を調製した。本融合蛋白質には精製タグとして StrepTag を融合してあるため、水溶性画分より、Streptag を利用して Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge 1 mL (QIAGEN) を用いて OGG1-luciferase の精製を行なった。精製画分として、通過画分、洗浄画分及び溶出画分を回収し、OGG1-luciferase の発光強度を測定した。その後、得られた全て精製画分を SDS-PAGE で解析した。

2. OGG1-luciferase を用いた 8-oxoG の検出

精製した OGG1-luciferase を用いて二本鎖 DNA 中の 8-oxoG を検出できるか検討した。ビオチンを修飾したオリゴヌクレオチドと 8-oxoG を修飾したオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションさせ、8-oxoG 修飾二本鎖 (ds) DNA を作製した。その後、作製した 8-oxoG 修飾 dsDNA をストレプトアビジンコートプレートに固定化した。このプレートに OGG1-luciferase を加えて洗浄後、発光基質を添加し、発光強度を測定した。

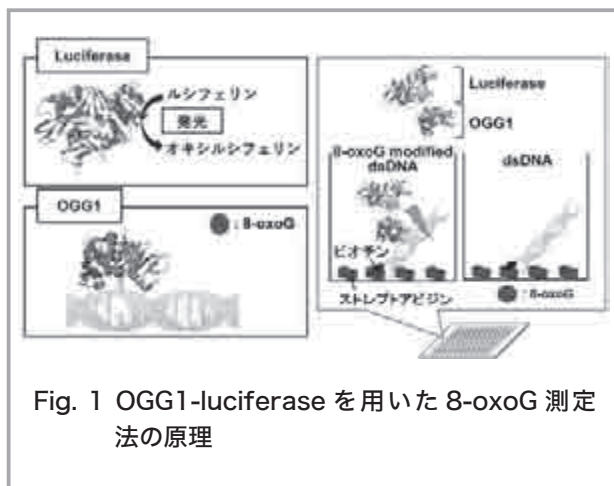


Fig. 1 OGG1-luciferase を用いた 8-oxoG 測定法の原理

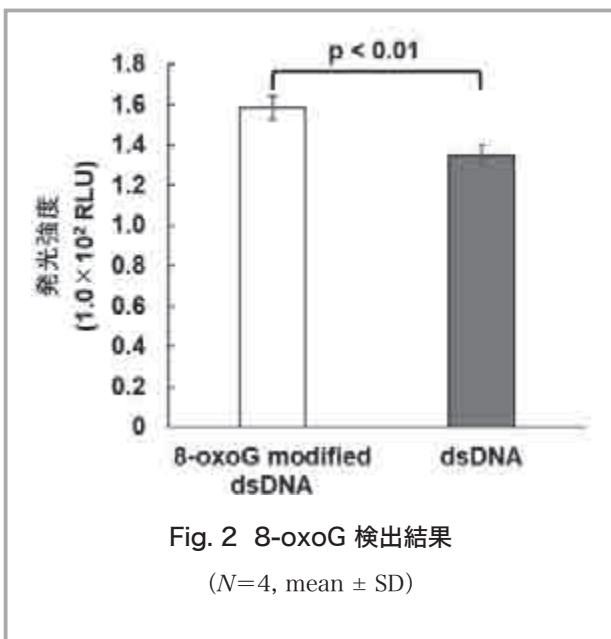
【結果・考察】

1. OGG1-luciferase の作製

Strep-Tactin Superflow Plus Cartridge を用いて OGG1-luciferase を精製後、得られた全ての精製画分の発光強度を測定した。その結果、溶出画分で最も高い発光強度が得られた。また、精製した OGG1-luciferase を SDS-PAGE により解析を行なった結果、目的の位置付近 (102kDa) にバンドが確認された。以上より、OGG1-luciferase が精製できたことが示された。

2. OGG1-luciferase を用いた 8-oxoG の検出

精製した OGG1-luciferase を用いて 8-oxoG を検出できるか検討した。その結果、未修飾 dsDNA と比較して 8-oxoG 修飾 dsDNA 存在下で、高い発光強度が得られた (Fig. 2)。t 検定では、未修飾 dsDNA に対して 8-oxoG 修飾 dsDNA 条件において有意な差が示された ($p < 0.01$)。以上より、OGG1-luciferase を用いて 8-oxoG を検出できることが示された。



【文献】

- 1) **Yoshida, W.**, Baba, Y. & Karube, I.: Global DNA methylation detection system using MBD-fused luciferase based on bioluminescence resonance energy transfer assay, *Anal. Chem.*, 88, 9264 (2016).
- 2) **Yoshida, W.**, Baba, Y., Banzawa, K. & Karube, I.: A quantitative homogeneous assay for global DNA methylation levels using CpG-binding

domain-and methyl-CpG-binding domain-fused luciferase, *Anal. Chim. Acta.*, 990, 168 (2017).

- 3) Baba, Y., Karube, I. & **Yoshida, W.**: Global DNA methylation level monitoring by methyl-CpG binding domain-fused luciferase, *Anal. Lett.*, 52, 754 (2019).
- 4) Baba, Y., Yamamoto, K. & **Yoshida, W.**: Multi-color bioluminescence resonance energy transfer assay for quantification of global DNA methylation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 411, 4765 (2019).

細胞骨格のリン酸化を介した神経軸索の根元構造の形成機構の解明

吉村 武

(大阪大学大学院連合小児発達学研究所)

【目的】

神経細胞の軸索起始部は構造的にも機能的にも高度に特殊化された区画である。軸索起始部は活動電位発生の場であり情報出力装置である。さらに、軸索起始部は軸索と細胞体/樹状突起の架け橋であり、軸索に必要なものだけを通過させ不要なものを遮断するバリアとしての機能を持つ。軸索起始部の構造はアンキリンGなどの軸索起始部に特有な膜裏打ち細胞骨格により形成されている。

アンキリン G (ANK3) の遺伝子変異は自閉スペクトラム症や知的発達症、てんかんなどを引き起こす。神経細胞が正常に機能するためには軸索起始部の膜裏打ち細胞骨格が正常に形成されることが必須であり、この構造の破綻は様々な精神・神経疾患を引き起こす。しかし、軸索起始部の構造がどのように形成されるのか、その分子機構は殆ど理解されていない。細胞骨格の制御には多くのリン酸化シグナルが関与していることが知られている。本研究の目的は、アンキリンGをリン酸化し制御する蛋白質リン酸化酵素を見出し、この酵素によるリン酸化制御が軸索起始部の形成に果たす役割を明らかにすることである。

【方法】

GST-アンキリンG変異体を COS7 細胞に発現させた

後にグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製し、Cdk5 と RI ラベルされた ATP を加えて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。試料を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーを用いて放射能標識されたバンドを検出した。

ラット胎仔脳由来の培養海馬神経細胞に Cdk 阻害剤を加えて培養した。培養神経細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後に免疫染色法を行った。

【結果】

蛋白質リン酸化酵素 Cdk5 はショウジョウバエにおいて軸索起始部様区画の形成に重要であることが報告されている。我々は Cdk5 がアンキリン G をリン酸化するか調べるために、GST-アンキリン G 変異体と Cdk5 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。Cdk5 によりアンキリン G は数カ所リン酸化されていた。特に、アンキリン G の β IV-スペクトリンと相互作用する領域が強くリン酸化されていた。次に、神経細胞において Cdk5 のキナーゼ活性の抑制が軸索に与える影響を検討した。Cdk 阻害剤を処理した神経細胞において軸索起始部の細胞骨格の破綻および MAP2 の軸索への流入が観察された。

【考察】

本研究から蛋白質リン酸化酵素 Cdk5 がアンキリン G をリン酸化することが明らかとなった。アンキリン G の β IV-スペクトリンと相互作用する領域がリン酸化される。両者は細胞骨格分子であり、軸索起始部構造の要である。故に、Cdk5 によるアンキリン G のリン酸化による制御が軸索起始部の構造形成に重要な役割を果たすと考えられる。Cdk5 のキナーゼ活性を抑制すると、軸索起始部の細胞骨格の破綻および MAP2 の軸索への流入が観察された。Cdk5 はアンキリン G のリン酸化を介して、軸索起始部のバリア機能に重要な役割を果たすと考えられる。本研究によるアンキリン G の制御機構の解明は、神経細胞における軸索形成の基盤が分かるだけでなく、神経・精神疾患の病因解明の糸口になると期待される。

破骨細胞の活性化因子として機能するグルタチオン分解酵素の反応機構の解明

和田 啓

(宮崎大学医学部)

【目的】

グルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) は、細胞内で最もロバストな水溶性抗酸化物質であり、分子内にグルタミン酸の側鎖を介した特殊な結合を持つトリペプチドである。 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) はグルタチオンを分解できる唯一の酵素であり、細胞レドックス維持の鍵酵素と 30 年以上信じられてきた。一方で、近年の研究では、GGT 酵素反応の副産物 (Cys-Gly) は活性酸素種の発生源であり、従来の GGT の生理的意義が疑問視されてきた。

ヒト GGT は γ -グルタミル基の高い転移活性を持つ。酵素反応速度解析から、グルタチオンなどのペプチド基質の C 末端領域 (Cys-Gly) を厳密に認識することが明らかとなっている。この転移活性にはドナー基質 (グルタチオンなど) とアクセプター基質 (ジペプチドなど) が必要であるが、これらの基質認識機構は未だに明らかにされていない。そこで、ヒト GGT のドナーとアクセプター 2 つの基質の認識を解明するために、基質アナログを用いた構造生物学的なアプローチを進めた。

近年、GGT は破骨細胞活性化因子として骨粗鬆症を亢進することも報告された。これまでの報告をまとめると、GGT の酵素活性とは完全に独立して、GGT 分子に破骨細胞分化を惹起するサイトカイン様の機能をもつ「構造パーツ」が存在することが推定された。本課題では、上記の目的とともに、ヒト GGT 立体構造を明らかにすることによってサイトカイン様の機能を推定することを目指した。

【方法】

ヒト GGT はバキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現した。精製酵素を用いた X 線結晶構造解析により立体構造を決定した。解析に用いた GGT 特異的な基質アナログは、京都大学化学研究所 (渡辺文太先生) との共同研究により合成頂いた化合物群を用いた。

【結果および考察】

ヒト GGT の立体構造を精度良く決定することができた。さらに、触媒残基 Thr381 と共有結合する 2 種類の基質アナログ TSA-ethyl type と TSA-phenyl type との複合体構造も明らかにした。その結果、本研究で初めて基質アナログの Cys-Gly 領域の電子密度を見出すことに成功した。これら 2 種の阻害剤の電子密度を比較することにより、ヒト GGT は Cys-Gly 領域の結合ポケットを 2 つ持ちドナー基質を認識していることが示唆された。さらに、Cys-Gly 領域とアクセプター基質の構造類似性から、ドナー基質とアクセプター基質の結合ポケットは互換性を有することが予想された。現在、結合ポケット周辺の残基に変異を導入して、活性測定を進めている。

一方、GGT 立体構造がもつサイトカイン様の機能に関して、現在、分子動力学シミュレーションも適用した検討を進めている。

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成

腸内細菌異常による疾患発症メカニズムの解明

新 幸 二

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

これまでの研究において、口腔由来のクレブシエラ菌が腸内に定着すると大腸で強い Th1 細胞の活性化し、炎症の惹起・増悪に働くことを明らかにした。また、クレブシエラ菌の腸内への定着は腸内細菌が阻害・抑制しており、過度な炎症が起こらないように制御されていることを見出している。しかしながら、どのような腸内細菌種がクレブシエラ菌の定着阻害に関与しているのか、どのような分子メカニズムでクレブシエラ菌の腸内定着を抑えているかについては明らかになっていない。そこで本研究では、ヒト由来腸内細菌の内、クレブシエラ菌の腸内への定着を阻害している腸内細菌種を同定し、その阻害メカニズムを明らかにすることを目的として、研究を行った。

【方法】

無菌マウスの腸内にクレブシエラ 2H7 株を定着させた後、健常者5人の便を経口投与し、クレブシエラ菌が腸内からどのように排除されるかを検討した。さらに、クレブシエラ菌の排除に関与している菌株を特定するため、健常者の便から細菌株を単離し、単離菌で同様の実験を行った。その後、排除能が強かった菌株セットと弱かった菌株セットのメタボロームを比較し、排除メカニズムの検討を行った。

【結果】

健常者5人の便を経口投与し、クレブシエラ菌が腸内からどのように排除されるかを検討した結果、健常者5人の便すべてにおいて、投与後1週間程度で迅速にクレブシエラ菌が腸内から排除されることを確認した。次に、健常者の一人の便から37菌株を単離し、これらの単離菌のみでクレブシエラ菌を腸内から排除できるかを検討

した。その結果、便そのまま投与マウスと同様に1週間程度で迅速にクレブシエラ菌が腸内から排除された。この37菌株を定着マウスはアンピシリンを投与するとクレブシエラ菌の排除ができないことから、37株をアンピシリン感受性と抵抗性に分け排除能を検討した。その結果、アンピシリン感受性の18菌株が強力に排除でき、残りの19株の排除能は弱いことがわかった。そこでこの18株 vs 19株定着マウスの便中のメタボライトを解析したところ、短鎖脂肪酸や胆汁酸などに差があることがわかった。

【考察】

ヒト由来腸内細菌のうち、クレブシエラ菌の腸内への定着を阻害している腸内細菌種を同定し、その阻害メカニズムを明らかにすることにより、炎症性腸疾患や原発性硬化性胆管炎 (PSC) などクレブシエラ菌が増悪に関与する疾患に対する新たな治療薬、予防法の開発につながる可能性がある。

新生児期におけるケトン合成はミトコンドリアタンパクの過度なアセチル化を抑制して機能を制御する

有馬 勇一郎

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

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

【方法】

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

討した。

【結果】

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

生後3日目の肝臓サンプルを用いてメタボローム解析を実施した結果、KO マウスにおいて解糖系は抑制されている一方で、アセチル CoA は有意に上昇していた。しかしながら、TCA サイクル内の代謝産物は *Hmgcs2* KO マウスで有意に低下しており、単離した Hepatocyte を用いて酸素消費量測定を行うと、*Hmgcs2* KO 由来の Hepatocyte において有意に酸素消費量が低下していることが確認された。

機能低下が生じる原因を解析する過程で、翻訳後修飾の関与に注目し、アセチル化プロテオミクス解析を実施した結果、*Hmgcs2* KO マウスで有意にミトコンドリアタンパクのアセチル化が亢進していることが確認された。単離ミトコンドリアを用いた検討でも、アセチル化の亢進に伴い TCA サイクルにおける酵素連続反応が低下することが確認された。

【考察】

新生児期におけるケトン体合成能の生理的意義として、ミトコンドリアタンパクの過度のアセチル化を緩和し、ミトコンドリア機能を保護する働きがあることを確認した。生後環境の変化の中で、胎盤栄養から母乳由来の脂肪酸を多く含んだ栄養環境へと変化する。ケトン体合成はこの過程で、急激に増加する脂肪酸の一部をケトン体へと変換することで、ミトコンドリア内でのアセチル CoA の蓄積を回避し、細胞保護的に作用する可能性が示唆された。また、ミトコンドリアタンパクにおけるアセチル化は、酵素非依存的に生じる可能性も示唆されており、細胞内小器官の環境により、アセチル化の程度が影響を受ける可能性が示唆された。

軟骨細胞における細胞内 Ca^{2+} 制御機構と生理機能の解析

市村 敦彦

(京都大学大学院薬学研究科)

【目的】

本研究は、軟骨細胞内 Ca^{2+} 動態を明らかとするとともに、細胞膜および小胞体膜に分布するイオンチャネルが制御している生理機能について解明することを目的とした。

【方法】

Ca^{2+} は、主要な生理機構に必須と言えるほど重要なシグナル分子であり、広範かつ重要な生理機能の制御を担っている。一方で、 Ca^{2+} シグナルが制御している生理機能は、骨形成に関連した細胞を含め多くの種類の細胞において未解明である。そこで本研究では、軟骨細胞における Ca^{2+} 動態とその制御機構や生理機能に着目した。我々は、骨伸長を担う軟骨細胞において生理的条件下での細胞内 Ca^{2+} 動態やその制御機構がほとんど未解明であったことに着目した。これは、これまで主に用いられてきた初代培養軟骨細胞では生理的条件を模倣しきれず、生体内の状態と一定程度異なっていたという実験技術的制約に起因すると考えられた。そこで、我々は胎生期マウス大腿骨のスライス培養サンプルを用いて生体内近いコンディションを保ったまま Ca^{2+} 動態を観察可能な新しい実験系を構築した。この実験系により、異なる形態の細胞が層状に積層している軟骨組織において、細胞の形態や組織構造中の位置情報を保持したまま、細胞内 Ca^{2+} 動態をライブイメージングすることが可能となった。本実験系を用い、様々な薬理的阻害及び活性化実験と網羅的遺伝子発現解析を組み合わせ、軟骨における Ca^{2+} 動態と関連する制御分子 TRPM7 を同定した。また、部位特異的遺伝子欠損マウスを作出し、軟骨細胞における細胞内 Ca^{2+} の担う生理的役割を解析した。更に、得られた結果に基づき、共役分子の活性化薬を用いて骨伸長への効果を調べた。

更に、その遺伝子変異により骨形成不全症や骨格異形成が引き起こされることがヒトで複数報告されている小胞体カチオンチャネル TRIC-B に注目した。*Tric-b* 欠損

マウスは骨芽細胞における Ca^{2+} ハンドリング異常からコラーゲン分泌が障害され、全身の膜性骨化が減弱することで骨形成不全症に至ることを我々が報告した¹⁾。更に詳細に *Tric-b* 欠損マウス由来の骨を観察したところ、軟骨においても異常に膨潤した死細胞が複数含まれていることを見出した。そこで、TRIC-B の軟骨細胞における生理機能についても上述の Ca^{2+} イメージング系を用いて解析した。また、細胞死に至る細胞内シグナル経路を探索した。

【結果】

軟骨細胞における細胞内 Ca^{2+} 自発変動現象を同定した。自発的 Ca^{2+} 変動は主として細胞膜二価陽イオンチャネル TRPM7 により媒介されており、TRPM7 の薬理的阻害や遺伝子欠損により初代培養中指骨の伸長が阻害されることが明らかとなった。軟骨細胞特異的 TRPM7 欠損マウスを作出したところ、全身の軟骨内骨化が障害され対照マウスの半分程度の体格に留まることがわかった。そこで、共役分子として特定した BK チャネル活性化剤を器官培養軟骨に処置したところ、有意に骨伸長を促進出来ることを見出した。

また、*Tric-b* 欠損マウス由来の軟骨細胞においては、軟骨細胞が全体的に大きくなるとともに細胞外基質が減少傾向にあることが明らかとなった。また、定常状態の細胞内 Ca^{2+} が有意に上昇し、ATP 刺激時に小胞体から放出される Ca^{2+} が減少するという細胞内 Ca^{2+} ハンドリング障害が観察された。更に、小胞体ストレスマーカー分子 BiP タンパク質量の有意な上昇が観察され、軟骨細胞全体が小胞体ストレス状態にあることが明らかとなった。さらなるシグナル経路解析から細胞死に至る分子機序が解明されると期待される。

【考察】

軟骨細胞における TRPM7 を介した細胞内 Ca^{2+} 自発変動が成長板軟骨細胞の正常な増殖や分化に必要であることが明らかとなった²⁾。この制御機構を活性化することで、人為的に骨伸長を促進出来る可能性を示した。また、TRIC-B 欠損により軟骨細胞内 Ca^{2+} 制御を介して成長板軟骨細胞死を引き起こす病態生理機序の一端が明らかとなった。

1) Zhao C[†], Ichimura A[†], Qian N, Iida T, Yamazaki D, Noma N, Asagiri M, Yamamoto K,

Komazaki S, Sato C, Aoyama F, Sawaguchi A, Kakizawa S, Nishi M, Takeshima H. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization, *Sci Signal*. 9(428): ra49. (2016), [†], contributed equally

2) Qian N[†], Ichimura A[†], Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca^{2+} fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development., *Sci Signal*. 9; 12(576)(2019), [†], contributed equally

疾患特異的 iPS 細胞を用いた特発性拡張型心筋症の病態解明と治療化合物の探索

伊藤正道

(東京大学医学部附属病院)

【背景】

特発性拡張型心筋症 (DCM) は、心腔の拡大と心筋壁の菲薄化、心臓収縮力の低下を特徴とする症候群で、心不全や致死的不整脈を合併する難治性の疾患である。患者の約半数で遺伝子変異の関与が示唆されているものの病態に則した治療法は開発されておらず、病態の解明と新規治療薬の開発が喫緊の課題である。我々は本邦の DCM 患者を対象とした遺伝子解析により、患者の約 10% を占めるラミン遺伝子 (*LMNA*) 変異陽性の患者は特に成人以降、既存薬物療法に反応せず病状が進行し、特に予後不良であることを見出した¹⁾。さらに我々は DCM 患者の心臓の病理組織検体を用いた解析により、診断時において心筋細胞 poly (ADP-ribose) の染色で示される DNA 損傷の蓄積程度が高度な患者ほど予後不良であることを見出して報告している²⁾。患者から樹立した iPS 細胞およびそこから誘導した心筋細胞 (iPS 由来心筋細胞; iPSCM) には、疾患発症につながる分子異常が再現されている可能性があるため、病態解明やスクリーニングへの iPS 細胞の応用が期待される。

【目的】

予後不良な LMNA 変異を有する DCM の病態を明らかにし、同疾患患者の新規治療薬候補化合物の同定を試みる。

【方法・結果】**① LMNA 変異 DCM 患者の同定と iPS 細胞の樹立、コントロール株の作成**

本学病院に通院する家族性 DCM の患者 (50 代男性、心臓移植後) 2 名を対象に遺伝子解析を実施し、LMNA にヘテロミスセンス変異を同定した (p.Q353R)。これらの患者から末梢血単核球を分離し、初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC) plasmid を導入することにより iPS 細胞コロニーを取得した。LMNA 変異の病態における意義をより明確にするため、CRISPR/Cas9 を用いて当該変異を修復した iPS 細胞株の樹立を試みた。LMNA 変異株の変異部位近傍を切断する gRNA と Cas9 タンパクを electroporation により導入し、WT 配列を有するドナーオリゴとの相同組換えによって変異修復を行った。

以上より、LMNA 変異 iPS 細胞株と編集株を各 2 クローン作製した。

② 心筋細胞への分化誘導

既報に従い、高密度で播種された iPS 細胞に Wnt 刺激剤・Wnt 阻害剤を順次作用させることにより、心筋細胞の分化誘導を行った後、グルコース非含有・乳酸含有培地で処理することによって心筋細胞の純化を行った。心筋細胞は分化開始後 30 日前後で凍結によりストックしてから実験に使用した。

③ iPSCM の表現型解析

・核形態解析；

ラミン分子は核の裏打ちタンパクとして存在しており、メカニカルストレスに対する核形態やクロマチン構造の維持に関与することが知られている。そのためラミン抗体を用いて心筋細胞の免疫染色を行って核画像を取得し、機械学習を用いて変形した核の割合を調べたところ、LMNA 変異株で有意に変形した核の割合が増えていることが判明した。

・DNA 損傷程度の評価；

ヒト検体で見出した変化が iPSCM でも再現されているかを検証するため、DNA 二重鎖切断のマーカーであ

る γ H2A.X の染色を行いその定量化を試みた。結果、LMNA 変異株では有意に高度に心筋細胞核の DNA 損傷が蓄積していることが判明した。

・細胞の収縮機能の解析の予備的検討；

DCM は心筋の収縮異常を特徴とする疾患であるため、細胞レベルで収縮機能を評価するためいくつかの検討を行った。既存の細胞収縮評価装置として xCELLigence CardioECR (ACEA), SI-8000 (SONY) を用いて評価を行ったが、いずれも有意な差を再現性よく検出することはできなかった。そこで DCM 患者由来の iPSCM を扱って収縮能評価を行った過去の文献の review を行ったところ、近年の多くの研究では、iPSCM で心筋組織を作成して評価しているケースが多いことがわかった³⁾。

【考察】

LMNA の変異は Hutchison-Gilford 症候群に代表されるような早老症と、筋ジストロフィや拡張型心筋症のような物理的ストレスを受ける臓器の変性疾患を引き起こすことが知られているが、それらの詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究によって、LMNA 変異を有する患者個体の心筋細胞と iPSCM で共通する異常表現型として DNA 損傷の蓄積を捉えた。今後はこの異常を生じるメカニズムを解明するとともに、DNA 損傷が収縮異常につながるメカニズム、またこれらの異常を是正する化合物の探索を iPSCM を用いた研究で行っていく予定である。

【文献】

- 1) Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, Satoh M, Fujita K, Naito AT, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakanishi T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I. Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep*. 31; 8 (1):1998. 2018
- 2) Ko T, Fujita K, Nomura S, Umemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H,

Fukayama M, Aburatani H, Komuro I. *JACC: Basic Transl Sci.* 4 (6), 670-80, 2019

- 3) Ito M, Nomura S, Morita H, Komuro I. Trends and Limitations in the Assessment of the Contractile Properties of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes from Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med.* In press. 2020

ナトリウムグルコース共輸送体2阻害剤が肝糖産生 応答に及ぼす作用の解明

稲葉有香

(金沢大学新学術創成研究機構)

【背景・目的】

2型糖尿病治療薬ナトリウムグルコース共輸送体2阻害剤 (SGLT2i) は、腎糖排泄を促進させることで、血糖値を低下させる。一方で、SGLT2i は、肝糖産生を増加させ、血糖低下作用を部分的に相殺する可能性が指摘されている。しかし、代謝状態の違いが、SGLT2i の肝糖産生応答作用に及ぼす影響は不明であった。また、SGLT2i は、摂食量を増加させることが知られているが、摂食量増加がSGLT2i 作用に及ぼす影響も明らかではない。本研究では、健常及び肥満マウスを用いて、自由摂餌下・制限給餌下でのSGLT2i の肝糖新生応答への作用を検討した。

【方法】

糖新生酵素遺伝子 G6pc のプロモーター制御下に、肝臓特異的に分泌型ルシフェラーゼ (GLuc) を発現する、肝 G6pc レポーターマウスを作出した。健常または肥満のレポーターマウスに、単回・長期でSGLT2i を投与した。単回投与は、経口強制投与により、長期投与は、4週間の混餌給餌 (自由摂餌, 3時間毎の制限給餌) により行った。連続的に採血を行い、同一個体での経時的な血漿パラメーターを解析した。肝糖新生応答は、血中GLuc 活性により評価した。

【結果】

肝 G6pc レポーターマウスの血中GLuc 活性は、肝 G6pc 遺伝子の8時間毎の発現量を反映した。すなわ

ち、肝 G6pc レポーターマウスの血中GLuc 活性が、肝 G6pc 遺伝子発現量の指標として有用と言える。健常マウスへの単回投与は、血糖値・インスリン値を低下させ、GLuc 活性を上昇させた。肥満マウスのGLuc 活性は、健常時に比べ約10倍に増強した。この肝糖新生応答が増強した肥満マウスへの単回投与は、血糖値・インスリン値を低下させたが、GLuc 活性には作用しなかった。健常マウスは、制限給餌下での混餌SGLT2i 投与により、体重・血糖値・インスリン値が低下し、GLuc 活性が上昇した。一方、自由摂餌下では、SGLT2i 群で摂餌量が増加し、体重・血糖値・インスリン値・GLuc 活性のいずれも対照と同等であった。肥満マウスでは、制限給餌下で、SGLT2i 群の体重・血糖値・インスリン値・GLuc 活性が低下した。自由摂餌下では、SGLT2i 群で摂餌量が増加したものの、血糖値は低下し、インスリン値は低下傾向を示した。しかし、SGLT2i によるGLuc 活性への作用は認められなかった。

【考察】

SGLT2i の肝糖新生応答に対する作用は、インスリン抵抗性の有無で異なること、肥満で増強した肝糖新生は、制限給餌下のSGLT2i 長期投与でのみ軽減されること、を明らかにした。

ムーンライト解糖系酵素に焦点を充てた脳アミロイド 血管症の治療開発

井上泰輝

(熊本大学大学院生命科学研究所)

【目的】

脳アミロイド血管症 (CAA) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の90%にみられ、アミロイドベータ (A β) が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が進みCAA 患者が増加する一方で、CAA の予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。アミロイドーシス研究において、共存タンパク質が疾患解明の鍵として認識されるようになってきている。ところが、CAA における共存タンパク質はこれまで検討されておらず、代表研究者はCAA の共存タンパク質の研究がCAA の病態生理の解明、ひいては治療法開発に結

びつく可能性があると考え、プロテオミクス解析によりCAAに罹患した脳血管における共存タンパク質を複数同定した(図1)(Inoue *et al. Acta Neuropathol.* 2017; 134: 605-17). 次に、Aβに次いで2番目に多くCAA罹患血管に発現しているα-エノラーゼ(ENO1)に着目した(図2). α-エノラーゼは、生命現象に深く関与する解糖系酵素として広く研究されている生理活性物質であるが、それ以外の機能については長らく不明であった. 前回の研究報告においてAβは、単量体が時間経過と共に次第に凝集しAβ線維形成に至るが、その過

程で形成されるAβ線維が細胞毒性を示す. これまでの研究でENO1が、①Aβ線維形成を抑制すること②一旦形成されたAβ線維を分解することを明らかにした. さらに、③ENO1をAβと共に添加するとAβによる細胞毒性が軽減されるというこれまでに報告のない新しい作用機序を見出し、ENO1がAβの重合過程の阻害、さらにAβ線維分解を介して、細胞毒性を軽減することを明らかにした. *In vitro*で示したENO1によるAβの線維形成抑制効果、分解作用、細胞毒性軽減作用が生体内においても発揮されれば、CAAの病態改善に繋がる

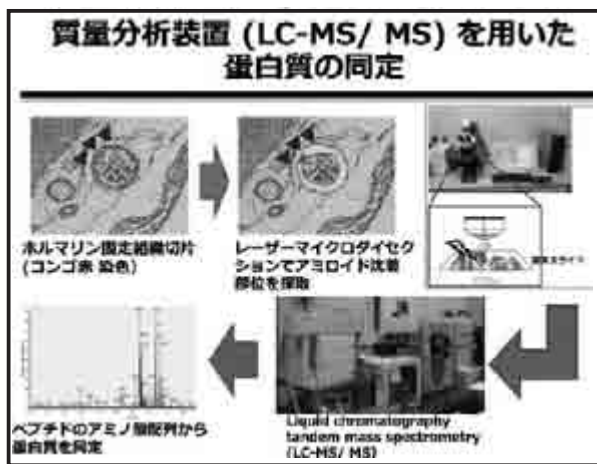


図1 プロテオミクス解析の手順



図2 CAAに高発現するタンパク質

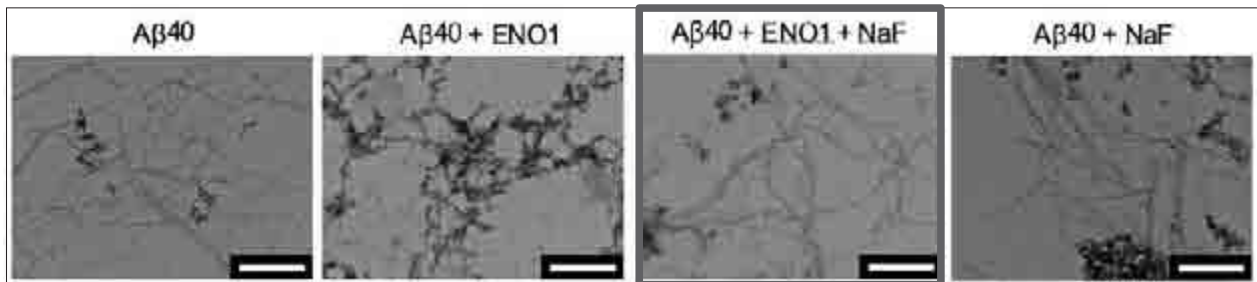


図3 フッ化ナトリウムの添加による線維形成抑制効果の消失

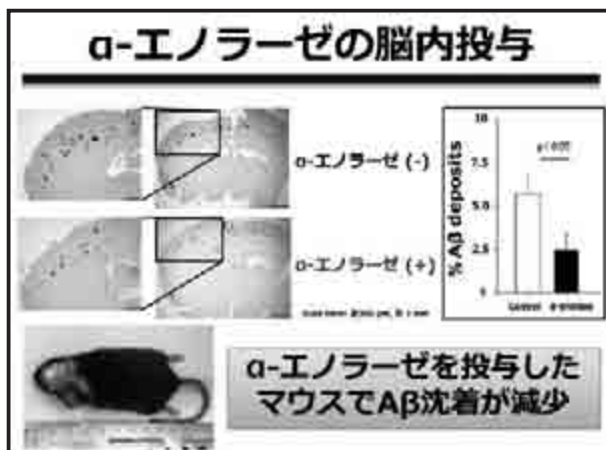


図4 CAAの病理評価

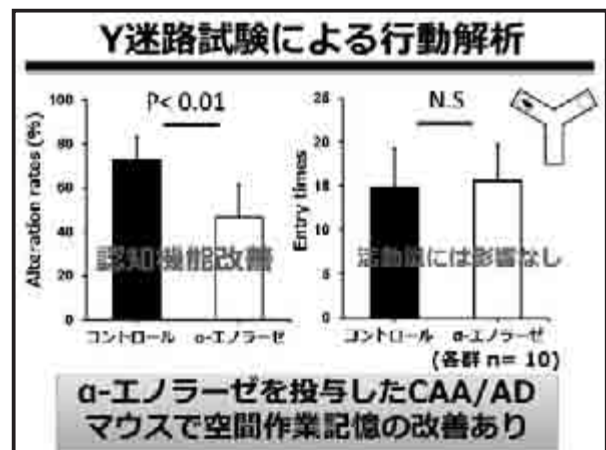


図5 認知機能の評価

と予測され、その機序の解明、およびCAAモデルマウスを用いたENO1による病態改善効果について検討を行った。

① α -エノラーゼのA β 線維形成抑制作用と酵素活性との関連

申請者は、ENO1の酵素活性がA β 線維形成抑制作用と関連するという仮説をたてた。そこで、ENO1阻害剤として用いられるフッ化ナトリウム (NaF) をA β +ENO1の反応系に添加した。次に、ENO1の酵素活性について吸光度変化を指標に算出し、その酵素活性がNaF添加によって変化するか否かを検証した。

② CAAモデルマウス (APP23) 脳内への α -エノラーゼ投与

CAA病態改善効果を検討するため、18ヶ月のAPP23マウスの海馬にENO1を投与した。脳定位固定装置を用いマウスの側脳室に30ゲージの薬物注入用カニューレを挿入し、持続注入用のポンプは皮下に留置した。ポンプは7日間、一定の速度で内容を放出することが可能であり、脳内の薬物濃度を一定にすることを目的とした。ENO1の脳内投与が後述のようにCAAモデルマウスにどのような影響を与えるか、病理学的解析、認知機能評価の観点から評価した。

a. 病理学的解析

ENO1の投与後、後述する認知機能評価を実施した後に各マウスから回収した脳の組織切片を作成し、A β の沈着の程度を、抗A β 抗体を用いて病理学的に評価した。

b. 認知機能評価

Y-迷路試験を用いて学習・記憶能力の改善効果の評価した。

【結果】

- ① NaF添加群において、ENO1によるA β 線維形成抑制作用が阻害され、最終的に多くのA β 線維が形成された。また、ENO1の酵素活性がNaF添加によって減弱することも判明した (図3, 赤枠)。
- ② ENO1投与マウスにおいて脳血管、脳実質へのA β の沈着が減少し (図4)、さらに興味深いことに認知機能も有意に改善した (図5)。①での結果も受けて、申請者はさらに、95°C 5分の熱処理により酵素活性を完全に失活させたENO1を同様にマウス脳内へ投

与したところ (n = 3)、ENO1による病理所見の改善効果がなく、認知機能についても改善を認めなかった (現在匹数を増やし解析中)。

【考察】

ENO1が有するA β 線維形成抑制作用、およびA β 線維分解作用を生体内において立証した。また、そのCAA病態改善効果は α -エノラーゼの酵素活性に関連することも同時に判明した。

アルドステロン産生腫瘍におけるコルチゾール合成の意義

馬 越 洋 宜

(九州大学病院)

【目的】

アルドステロン産生腫瘍とコルチゾール産生腫瘍において、細胞内カルシウム濃度上昇と細胞内cAMP濃度上昇に関連する遺伝子変異が報告されており、この2つは細胞機能の観点から全く異なる疾患概念として理解されている。一方、近年血中メタボローム解析により、アルドステロン産生腫瘍ではミネラルコルチコイド代謝産物に加えて、グルココルチコイド代謝産物の増加が確認され、異なる合成経路のステロイドホルモンの同時過剰産生が示唆されているが、その意義は明らかでない。

【方法】

アルドステロン産生腫瘍 (n = 7)、コルチゾール産生腫瘍 (n = 7) の腫瘍組織を用いて、ステロイド合成酵素染色 (アルドステロン合成酵素: CYP11B2, コルチゾール合成酵素: CYP11B1), RNA-seq解析, メタボローム解析, イメージング質量顕微鏡 (n = 3) を用いて組織におけるコルチゾール合成能を比較した。

【結果】

アルドステロン産生腫瘍およびコルチゾール産生腫瘍におけるCYP11B1/CYP11B2の免疫組織染色を用いた局在検討では、CYP11B1は両腫瘍共に均一に確認されたが、CYP11B2はアルドステロン産生腫瘍のみで確認され、一部の腫瘍では不均一なCYP11B2局在が見られた。RNA-seqにおいては、CYP11B2はアルドステロン産生腫瘍で有意な上昇が確認されたが、CYP11B1お

よび関連するステロイド合成酵素は両腫瘍で発現に差が見られなかった。メタボローム解析においても、組織アルドステロン濃度はアルドステロン産生腫瘍で有意な上昇がみられたが、コルチゾール濃度に差はみられなかった。イメージング質量顕微鏡における局在性の定量評価においても、アルドステロン産生腫瘍において腫瘍内で均一にコルチゾール合成が行われていることが確認できた。

【考察】

アルドステロン産生腫瘍における血中グルココルチコイド代謝産物の上昇が腫瘍組織中におけるグルココルチコイド産生の起因することが示唆された。腫瘍内のグルココルチコイド産生の機序についての検討を進めていく。

Bodywide transcriptome landscape in mouse models and human

浦山 恭次

(国際電気通信基礎技術研究所佐藤匠徳特別研究所)

【目的】

従来の疾患研究は、少数の器官や組織に限定されてきました。しかし、生体はより複雑な多臓器連関ネットワークで成り立っており、多くの疾患は一つの器官だけではなく、複数の器官に影響を及ぼすことがわかってきています。そこで本プロジェクトではこの多臓器連関ネットワークの成り立ちと作動性を理解し、Disease scienceに役立てることを最終目的として研究を行っています。

現在までに、我々は、各種疾患において従来考えられていたよりも、生体内において広範囲に変化が起きているのではないかと考え、ヒト疾患モデルマウス（心筋梗塞、糖尿病、がん、老化促進、腎障害）における全身での遺伝子発現パターンレベルの変化を解析し、全身レベルでのトランスクリプトームデータベース（全身網羅的多器官遺伝子発現地図、iOrgans Atlas）を構築しました。そこで、これらのデータベースを活用し、新たな臓器連関やバイオマーカーの発見を目的に解析を行っています。

【方法】

我々が構築した全身レベルでのトランスクリプトームデータベースをデータマイニングし、先行研究では

解明されていない新たな臓器連関を見出し、その臓器連関の Key となる臓器特異的に発現している遺伝子群の各種ノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。ノックアウトマウスの表現型を全身網羅的に解析するために、多臓器 RNA-seq 解析・多臓器 scRNA-seq や生理学および組織学的手法により全身網羅的に解析をした。

【結果&考察】

これらの各種ノックアウトマウスの表現型解析から、これまであまり知られていなかった、多臓器間のクロストークによる、臓器機能制御機構をいくつも見いだした。現在は、これらの発見をもとに、さらに詳細なシングルセルレベルかつ多臓器間レベルでの生物学的因果関係を明らかにするための研究を実施している。

短眠を作る神経メカニズムの研究

大石 陽

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

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

【方法・結果】

中脳と橋にまたがる脳部位・腹側内側中脳橋（VMP）をジフテリア毒素Aの発現により GABA 作動性選択的に欠損させ、睡眠量が顕著に少ないマウスを作り出した。同マウスの行動を調べたところ、自発運動量増加、抗うつ行動、不安様行動の減少など、多くの躁病様行動が見られた。中脳もしくは橋の脳梗塞により後天的に躁病となった症例があるため、同マウスはその病態を模している可能性が考えられた。躁病の診断基準のひとつに睡眠欲求の減少があるため、同マウスの睡眠恒常性を解析し

たところ、断眠後に通常みられる睡眠リバウンドの消失が判明した。また、ドーパミン D2 受容体欠損マウスでは VMP GABA 神経欠損による睡眠量の減少が大きく損なわれたため、ドーパミン系を介しての睡眠減少メカニズムが示唆された。一方で、D2 受容体の有無は自発運動量や抗うつ行動に影響しなかった。本研究により、VMP GABA 神経が躁病様行動の表出に関連することが明らかになった。また他の躁病様行動とは異なり、睡眠減少にはドーパミン D2 受容体が必要であることが示された。

【文献】

- 1) Honda T, Takata Y, Cherasse Y, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Funato H, Yanagisawa M, Lazarus M, Oishi Y., Ablation of Ventral Midbrain/Pons GABA Neurons Induces Mania-like Behaviors with Altered Sleep Homeostasis and Dopamine D2R-mediated Sleep Reduction., *iScience*. 23 (6): 101240 (2020)

細胞競合を介した上皮の内在性がん抑制機構の解明

大澤 志津江

(名古屋大学大学院理学研究科)

【目的】

ヒトのがんのほとんどは上皮に由来し、上皮細胞の頂底軸方向の極性の崩壊ががんの発生・進行に深く関与すると考えられている。一方で興味深いことに、極性が崩壊した細胞が正常な上皮細胞に囲まれると、正常細胞との競合“細胞競合”に敗れて組織から排除されることが近年分かってきた。すなわち、上皮組織には、がん原性の極性崩壊細胞を排除する「がん抑制」機構が内包されていると考えられる。しかしながら、正常細胞がいかにして極性崩壊細胞を認識し、細胞排除を駆動するのか、また、細胞排除システムの生理機能も不明である。本研究では、ショウジョウバエ上皮をモデル系とし、正常細胞が極性崩壊細胞を認識する分子機構の同定とその生理的意義の解明を目指した。

【結果】

我々は、大規模遺伝学的スクリーニングを行い、神

経細胞の軸索ガイダンスに関わるリガンド-受容体 Sas-PTP10D が上皮組織に生じた極性崩壊細胞を認識する上で重要な役割を果たすことを明らかにした (Yamamoto#, Ohsawa# (# Equal contribution) *et al.*, *Nature*, 2017)。一方で、研究代表者の前所属研究室では、神経系で反発作用を引き起こすリガンド-受容体 Slit-Robo が、極性崩壊細胞の排除を促進することを見いだした (*Dev Cell*, 2017)。我々は、細胞排除システムの生理機能を明らかにするために、Sas-PTP10D および Slit-Robo が機能する組織・時期を探索した。その結果、翅成虫原基（翅を形成する上皮組織）に導入された物理的損傷が修復される過程において、いずれも重要な役割を果たすことが分かった。興味深いことに、創傷付近において Slit の発現が JNK シグナルに依存して上昇している様子が観察された。また、Slit-Robo システムを遺伝学的に破綻させると、創傷治癒の間で生じた死細胞が組織から排出されないこと、および、この排出されなかった死細胞が増殖因子 Dpp (BMP ホモログ) や Wingless (Wnt ホモログ) を過剰に産生し、損傷修復を阻害することが分かった。これらの結果から、Slit-Robo が、死にゆく細胞を速やかに組織から排除し、それにより、死にゆく細胞から分泌される増殖因子の量を適正に制御して組織修復に貢献することが分かった (Iida, Ohsawa et al., *Sci. Rep.*, 2019)。

抗酸化物質キヌレン酸増加の分子機構とその意義

大橋 一登

(群馬大学生体調節研究所)

【背景および目的】

キヌレン酸はトリプトファン (Trp) 代謝化合物の一つであり、キヌレン酸の増加は二型糖尿病やうつ病で認められているが、キヌレン酸の増加の原因や意義はよく分かっていない。これらの病態を理解するためには、キヌレン酸の機能について知見が不足している。

これまでに真核生物のモデル細胞である出芽酵母を用いて細胞内におけるキヌレン酸の機能を調べてきた。その結果、キヌレン酸は過剰な Trp を分解した結果で生じた排泄物の一種であることが示唆された。すなわち、

キヌレン酸増加の一因は、Trp の蓄積であると考えられる。したがって、過剰な Trp による細胞毒性の解析が、病態の理解につながると期待される。実際、高 Trp 血症という代謝疾患も知られており、高濃度の Trp は有害であると考えられている。しかし、その原因は不明であり、高濃度の Trp が細胞にどのような影響を及ぼすかもよく分かっていない。

一方、高等動物では、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現象が知られているが、その分子機構は不明である。本研究では、高濃度 Trp による細胞毒性は、アミノ酸のバランス異常による生育抑制に相当すると考え、その分子機構を明らかにする。

【方法と結果】

これまでの研究で、出芽酵母が高濃度の Trp に強い感受性を示すことが分かった。さらに過剰な Trp による生育抑制が、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見出した。この結果から、過剰量の Trp による生育抑制は、アミノ酸のバランス異常によると予想された。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することを明らかにした。

【考察】

上記のように、過剰な Trp による細胞毒性は Leu の添加で緩和されることが明らかになった。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 の濃度はほとんど減少していないことも分かってきた。このことから、過剰な Trp によって Leu の要求量が増加することが推測された。

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

柏木雄介

（東京慈恵会医科大学医学部）

【背景および目的】

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

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

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

【方法および結果】

最初に、SGLT1 が左右心房心室全体に相当量発現していることがヒト剖検心の免疫染色及びマウス Langendorff 摘出灌流心の膜分画蛋白レベルで確認された。また、マウス心筋において、SGLT2 の発現は確認できなかった。一方、phlorizin による短期的な心臓 SGLT 阻害により虚血再灌流障害は助長され、心機能回復が低下することが確認された。さらに、虚血再灌流中の SGLT 阻害が心筋細胞内への糖取り込みと解糖系活性を抑制し、ATP 供給を低下させることが証明された¹⁾。

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

【結論】

心臓 SGLT1 の活性化は、虚血再灌流中の心筋への糖取り込み能の亢進と、これに伴う ATP 供給を介して、心保護的に働くことが示された。また臨床データの検討から、発症前から虚血に晒されている AMI 症例ではエネルギー基質として乳酸利用が促進されていることが確認された。

【文献】

1) Kashiwagi Y, Nagoshi T, Yoshino T, Tanaka T, Ito K, Harada T, Takahashi H, Ikegami M, Anzawa R and Yoshimura M. Expression of SGLT1 in Human Hearts and Impairment of Cardiac Glucose Uptake by Phlorizin during Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *PLoS One*. 2015 Jun 29; 10 (6): e0130605.

β-ガラクトシダーゼ発現細胞選択的に細胞死を誘導する activatable 型光増感剤の開発

神谷 真子

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

細胞機能や病因を解明する上で、生体内における特定の細胞を選択的に死滅させる技術は重要である。当研究室ではこれまでに、細胞種選択的な細胞死誘導を実現するべく、レポーター酵素として汎用されているβ-ガラクトシダーゼを化学スイッチとして、酵素反応により初めて光増感能が回復する activatable 型光増感剤を開発した¹⁾。しかしながら、この光増感剤は、酵素反応により生成する光毒性化合物の細胞内滞留性が十分でないため、標的細胞から漏出し非標的細胞の細胞死も誘導されてしまうことが課題であった。

【方法・結果】

そこで本研究では、当教室でこれまでに開発したβ-ガラクトシダーゼ活性を一細胞レベルで検出可能な蛍光プローブ SPiDER-βGal²⁾の分子設計に基づき、β-ガラクトシダーゼ発現細胞の選択的な細胞死を誘導する activatable 型光増感剤 SPiDER-killer-βGal を開発した。

SPiDER-killer-βGal は、酵素反応により初めて活性酸素種を産生可能な光増感剤構造になると同時に、キノンメチド活性中間体を介して細胞内蛋白質などに結合するため、細胞外へ漏出せず、標的細胞選択的な細胞死誘導が可能となった。実際に、β-ガラクトシダーゼ発現/非発現細胞の共培養系に適用したところ、発現細胞でのみ細胞の収縮・破裂が観察された。また、中胸背側にモザイク状にβ-ガラクトシダーゼを発現するショウジョウ

バエ蛹個体に、SPiDER-killer-βGal と hoechst をインジェクションして光照射を行ったところ、β-ガラクトシダーゼ発現細胞においてアポトーシスシグナルが観察され、生きた個体の組織においても標的細胞選択的かつ1細胞レベルでの細胞死誘導が可能であることが示された³⁾。

【考察】

今後、β-ガラクトシダーゼの代わりに、疾患で亢進している酵素を標的とすることで、疾患細胞選択的に細胞死を誘導する光増感剤が開発できると期待される。

【文献】

- 1) *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6772-6775 (2014).
- 2) *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 9620-9624 (2016).
- 3) *ACS Cent. Sci.* 5, 1676-1681 (2019).

副腎ペリリピン1は高血糖状態でのステロイドホルモン合成増加に関与する

亀田 啓

(北海道大学病院)

【目的】

脂肪滴周囲蛋白であるペリリピン1 (PLIN1) に着目し2型糖尿病の病態における副腎ステロイド産生の亢進のメカニズムを明らかにし、新たな治療標的を見つけ出す。

【方法】

db/db マウスならびに db/+マウスの副腎を摘出し、DNA マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現を網羅的に解析し、遺伝子発現の変化はリアルタイム PCR 法で確認した。

【結果】

db/db マウスの副腎ではステロイドホルモン合成酵素が増加、インスリンシグナルに関わる Ins1, Slc2a4 が低下、脂肪酸取り込みに関与する Cd36, Slc27a4 が増加、脂肪酸分解酵素 Acsl4 の増加、脂肪酸合成に関与する Scd1, Fasn, Elovl3 の低下を認めた。さらに *de novo* コレステロール合成系酵素 Dhcr24 が増加していた (図1)。

【考察】

肥満糖尿病病態の副腎では脂肪酸取込み・分解の亢進、

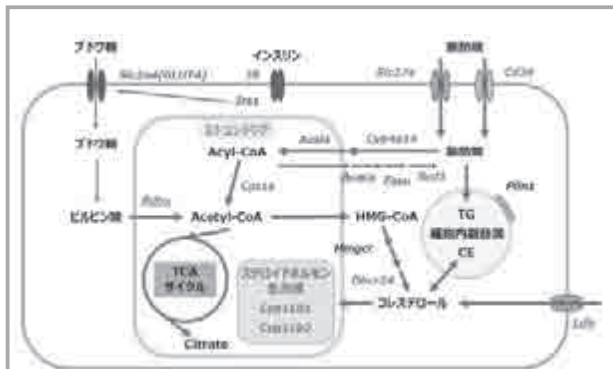


図1 肥満糖尿病マウス副腎における遺伝子発現の変化



図2：肥満糖尿病マウスの副腎における代謝変化

コレステロールの取込み・*de novo*合成の亢進という代謝変化が起きており、結果的に細胞内のコレステロール量が増加し、ステロイドホルモン合成が亢進することが示唆された(図2)。上記の代謝変化とPLIN1の関連について、今後細胞株を用いた実験を行い検証していく。

【文献】

- 1) Nakamura A, Miyoshi H, Kameda H, Yamashita K, Kurihara Y. Impact of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on renal function in participants with type 2 diabetes and chronic kidney disease with normoalbuminuria. *Diabetol Metab Syndr. Jan* 10; 12: 4 (2020). (Corresponding)
- 2) Miyoshi H, Kameda H, Yamashita K, Nakamura A, Kurihara Y. The protective effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in patients with rapid renal function decline, stage G3 or G4 chronic kidney disease, and type 2 diabetes. *J Diabetes Investig. Nov*; 10 (6): 1510-1517 (2020). (Corresponding)

がんによる宿主生理変容のメカニズム

河岡 慎平

(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

がんは、宿主個体にさまざまな悪影響をあたえる。がん悪液質はその代表であり、肝臓や脂肪、筋肉の異常を伴う全身性の代謝障害の総称である。慢性炎症が随伴することも多い。悪液質自体はがんに特異的な現象ではないが、悪液質の80%ががんに起因しており、進行がん患者の50%以上でがん悪液質が生じるとされている。

現時点では、がん悪液質を効果的に制御する方法は確立されていない。その原因はいくつもあるが、研究代表者(河岡)は、がん悪液質のメカニズムがよくわかっていないことが主要な要因のひとつであると考えている。特に、がん悪液質状態の宿主臓器においてどのような病態が生じているのかという全体像や、各病態に重要な宿主側の責任因子がわかっていない場合が多い。

研究代表者は、がん悪液質個体の宿主臓器の異常をオミクス解析によって検出し、各異常に関わる宿主側の要因を見つける、という戦略でこの問題に取り組んできた。これまでに、乳がんが肝臓の概日リズムを攪乱することや(Hojo *et al. Oncotarget*, 2017)、腸のがんが肝臓のコレステロール代謝を攪乱し、肝臓の炎症を惹起する(Enya *et al. Dis. Model. Mech.*, 2018)、などの成果を得てきた(本助成も活用させていただいている)。

本年度も、がん悪液質の病態メカニズムを理解することをめざして、上記のアプローチを活用した研究を展開した。これまでに得られた成果のうち、特に、がんによる肝臓概日リズムの攪乱に着目した。がんを移植した個体では、肝臓の概日リズムが乱れ、肝臓の肥大や炎症など、さまざまな表現型が生じる(Hojo *et al. Oncotarget*, 2017)。一方で、概日リズムの乱れと表現型の因果関係は明らかではない。また、どの遺伝子の乱れが重要であるかも不明である。そこで、特定の概日リズム遺伝子のエンハンサーを欠失させ、その遺伝子のリズムのみを乱す、という実験をおこなった。エンハンサーとは、標的遺伝子の時空間的発現パターンを制御する非コードDNA領域の総称であり、適切なエンハンサーを見つければ、特定の遺伝子発現制御のみを個体で破壊す

ることができる。この実験をおこなった結果、がんによって生じる表現型のうち少なくとも一部が、特定の遺伝子の概日リズムの乱れによって生じていることが判明した。現在、単一の遺伝子のリズム欠損によって肝臓に問題が生じるメカニズムを、個体レベル、培養細胞レベルで探っているところである。

成体における社会的行動異常に関与する大脳形成不全の原因の解明

川口大地

(東京大学大学院薬学系研究科)

【目的】

自閉症の原因は未だ多くは解明されていない。これまで同定されている自閉症リスク遺伝子も1-2%程度の患者を説明するに過ぎず、その症状を広範に説明する異常は明らかになっていない。最近、数割にのぼる多くの自閉症児について脳の局所（前頭前野など）における肥大が起こることが示された。前頭前野は言語機能や社会的行動の調節などを担う領域であり、前頭前野肥大化が自閉症発症に関与する可能性が十分に考えられるが、その関連は明らかになっていない。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見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】

前年度までに、Fgfシグナル関連因子の変異マウスを作製し、前頭前野肥大化とそのメカニズムの解析、さらには行動解析を行ってきた。その結果、Fgfシグナル関連因子の変異マウスにおいて前頭前野を含む大脳前方領域が肥大すること、また、成体において変異マウスが自

閉症様行動を示すことが明らかとなった。これらの結果から、Fgfシグナルの異常により自閉症が発症する可能性が示唆された。

本年度において、脳が肥大する遺伝子変異マウスの肥大領域をニューロンサブタイプマーカー等を用いて詳細に解析したところ、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が示唆された。さらに、成体において肥大領域における神経活動の測定を行った結果、神経活動のバランス（E/Iバランス）に異常が観察された。

【考察】

神経活動のバランス（E/Iバランス）の異常は自閉症患者において観察されている。本研究により、肥大が原因となって活動異常が起こっている可能性が示唆された。今後は、神経活動を脳の様々な領域で測定する実験を進め、脳肥大が神経ネットワークに与える影響を明らかにしたい。

Incretinsによる副腎髄質への影響とBMPの関与

小松原基志

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

【背景】

我々のグループ（PI: 岡山大学 大塚文男教授）では分化・発生に重要な役割を果たすBone Morphogenetic Protein (BMP) と、概日リズムによる内分泌臓器での日内変動やホルモン分泌調節機構の関連について、卵巣・下垂体・副腎組織を中心に研究を行ってきた。副腎髄質においては、ラット褐色細胞腫細胞PC12を用いて、副腎髄質に発現するBMP-4がカテコラミン産生・分泌を調節すること、melatoninやグルココルチコイドがBMP-4と協調的にカテコラミン産生を調節することを報告した [Endo 146 (2005), AJP-Endo 296 (2009), JSBMB 165 (2017)]。Incretins関連薬（DPP-4阻害薬、GLP-1作動薬）が糖尿病治療に広く使用されており、GIP、GLP-1受容体が全身の様々な臓器で発現していることから、血糖降下作用に加えて様々な組織、臓器への影響が注目されている。

【目的】

摂食行動、睡眠・覚醒と内分泌臓器でのホルモン調節の関連を明らかにするため、今回の検討では Incretins による副腎髄質でのカテコラミン産生調節に対する影響を検討した。

【方法】

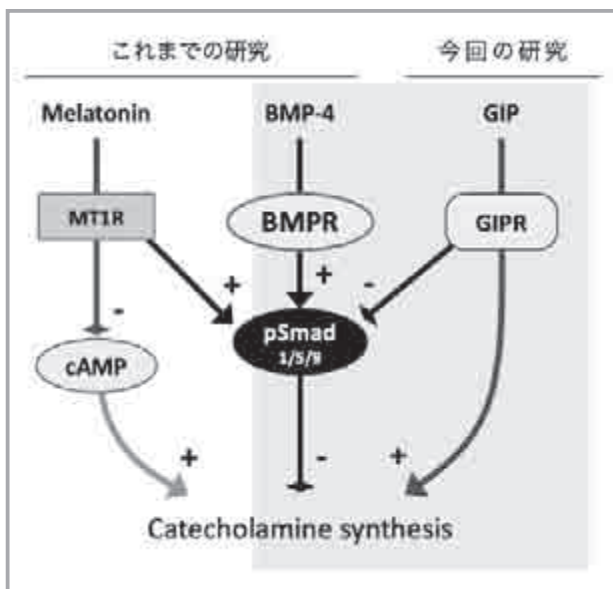
PC12 細胞を用い、GIP/GLP-1、副腎皮質ステロイド、BMP-4 添加 24 時間後の培養液中のカテコラミン濃度、mRNA 発現量、タンパク発現量を検討した。

【結果】

PC12 細胞では GIP は単独でカテコラミン合成を促進したが、GLP-1 (0-300nM) はカテコラミン合成に影響を与えなかった。カテコラミン合成は副腎皮質ステロイドにより誘導されるが、GIP は副腎皮質ホルモン受容体発現を増強することで副腎皮質ステロイドと協調的にカテコラミン合成を促進した。一方で GIP は BMP-Smad シグナルを抑制することで BMP-4 のカテコラミン合成抑制作用を減弱させた。

【考察】

GIP が卵巣において BMP-Smad シグナルを増強する結果 [JSBMB 178 (2018)] と異なり、副腎髄質では BMP-4 作用を抑制しカテコラミン合成促進に働く可能性が示唆された。



グレリン分泌細胞における GPCR 発現解析および新規調節因子の探索

小山 博之

(名古屋市立大学大学院医学研究科)

【背景および目的】

サルコペニアは筋力低下を主徴とする老年症候群であり、超高齢社会を迎える我が国においてサルコペニアの病態解明および予防・治療法の確立は喫緊の課題である。

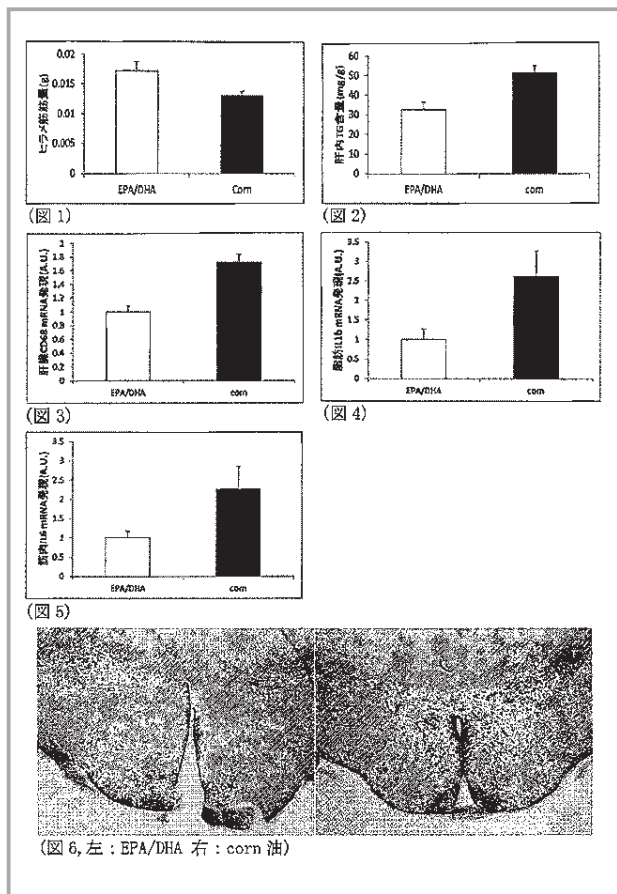
EPA/DHA に代表される n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は n-6 系 PUFA に拮抗し、抗炎症作用を有する (Calder PC. *Biochim Biophys Acta*. 2015)。関節炎モデルラットへの EPA 投与は関節炎を改善するだけでなく、ユビキチン-プロテアソーム系の抑制を介して筋量と筋力の減少をも抑制する (Castillero E *et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009) ことから、n-3 系 PUFA がサルコペニア病態一般にも有効である可能性が考えられる。

【方法および結果】

本研究では骨格筋量が低下したサルコペニアモデルマウス (SAMP1 マウス (Haramizu S *et al, J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011)) への EPA/DHA 慢性給餌実験を行った。結果、16 週齢の SAMP1 マウスに対し EPA/DHA 含有餌または (n-6 系 PUFA である) コーン油含有餌を 12 週間、自由摂食させた。結果、EPA/DHA 群はヒラメ筋重量が有意に増加していた (図 1)。また、EPA/DHA 群は肝臓内 TG 含量が減少し CD68 mRNA 発現が低下していた (図 2, 3)。また、脂肪細胞や骨格筋における炎症マーカーの遺伝子発現 (IL1b や IL6) や視床下部グリア細胞における炎症 (IBA1 免疫染色) についても EPA/DHA 群はその発現が低下していた (図 4~6)。以上のことから SAMP1 マウスへの EPA/DHA 投与は中枢および末梢の炎症を抑制していることが明らかとなった。

【考察】

これまで SAMP1 の骨格筋組織においてユビキチンプロテアソーム系の亢進 (MuRF1/Atrogin1 発現) についての報告はあるが炎症の関与を詳細に検討したものは無い。今後、SAMP1 マウスおよび対照マウス (SAMR)



(図 6, 左: EPA/DHA 右: corn 油)

の NF-κB 発現を検討する。今後は骨格筋の質・量の低下をきたすメカニズムについて炎症の観点、さらにはグレリン/GH/IGF-1 系の観点から検討を行う予定である。

臨床においては上記基礎研究に関連し、臨床試験「高齢 2 型糖尿病患者の入院糖尿病治療における EPA/DHA 製剤併用による筋肉量変化の検討 (UMIN 試験 ID:000038538)」を立ち上げ、2019 年 10 月に所属する名古屋市立大学病院倫理委員会に承認され現在稼働中である。

【文献 (2019 年度実績)】

1) Koyama H, Yasuda S, Kakoi S *et al.* 'Effect of Asfotase Alfa on Muscle Weakness in a Japanese Patient Diagnosed as Adult-onset Hypophosphatasia.' *Intern Med.* 2020 Mar 15; 59 (6): 811-815

2) Ogawa K, Yagi T, Guo T, Takeda K, Ohguchi H, Koyama H *et al.* 'Pemafibrate, a selective PPARα modulator, and fenofibrate suppress microglial activation through distinct PPARα and SIRT1-dependent pathways.' *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 2; 524 (2): 385-391

オレキシン受容体アゴニストの創製と薬理作用の解明

斉藤 毅

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

神経ペプチド「オレキシン」は、2つの受容体 (OX₁R, OX₂R) に結合することで覚醒を制御する¹⁾。脳内のオレキシン量の減少は、深刻な睡眠障害であるナルコレプシーを引き起こすことからオレキシンの機能を補完する薬物はナルコレプシー治療薬として期待される。これまでに我々は、オレキシン受容体を標的とした創薬研究を実施し、ナルコレプシーモデルマウスで症状改善効果を示す OX₂R 選択的作動薬 YNT-185 を見出した^{2,3)}。しかし、内因性オレキシンは OX₂R のみならず OX₁R にも作用するが、ナルコレプシーにおける OX₁R の機能は未だ不明である。そこで本研究では、OX₁R の薬理作用の解明に向け OX₁R に作動活性を有するリガンドの開発に着手した。

【方法】

YNT-185 より誘導した化合物群はいずれも高い OX₂R 選択性を有していることから、我々のグループで独自に見出したモルヒナン構造を有する OX₁R 選択的拮抗薬 YNT-707⁴⁾ を構造モチーフとして OX₁R 結合に必要な構造を同定し、YNT-185 の構造と組み合わせることで OX₁R 作動活性を示す薬物を得ようと試みた。

【結果】

YNT-707 の OX₁R 拮抗活性はモルヒナン構造に起因し、2つの置換基 (17-スルホンアミド、6-アミド側鎖) の適切な配置が重要であると推察した。そこで、YNT-707 の2つの置換基を保持し、それらの配向に関与する骨格上D環とE環を除去した誘導体を合成し、その活性を調査した。環構造の一方を単独で除去した誘導体では、高い OX₁R 親和性 (K_i = 20.2nM) を示し、両方の環を除去した誘導体においても親和性は減弱するものの活性は保持されることが分かった (K_i = 842 nM)⁵⁾。OX₁R に選択的な親和性を示すよりシンプルな構造が得られたため、続いてファーマコフォアの置換を行った。17-スルホンアミド基を除去すると活性は減弱した (K_i = 392nM) が、メチル基への置換では高い親和性が見

られた ($K_i = 50.1 \text{ nM}$)⁶⁾。興味深いことに、嵩高い置換基を導入した誘導体では強力な拮抗活性を示した ($K_i = 14.8 \text{ nM}$)。以上の結果から、OX₁R 拮抗活性には 17 位置換基の配向と嵩高さが重要であり、17 位置換基が受容体の構造変化を阻害していることが強く示唆された。今後、構造活性相関をより深めることで活性転換を目指す計画である。

【文献】

- 1) T. Sakurai *et al.* *Cell* 92, 573 (1998).
- 2) T. Nagahara, T. Saitoh *et al.* *J. Med. Chem.* 58, 7931 (2015).
- 3) Y. Irukayama-Tomobe *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 5731 (2017).
- 4) H. Nagase *et al.* *J. Med. Chem.* 60, 1018 (2017).
- 5) T. Saitoh *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29, 2655 (2019).
- 6) T. Saitoh *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press.

これまでの研究の概要

酒井 真志人

(University of California, San Diego Cellular & amp)

多細胞生物は、同一のゲノムと異なる発現遺伝子を持つ細胞から構成されており、細胞間の相互作用によって、各組織・臓器の性質が維持されている。そのため、細胞間のシグナル伝達依存性の転写制御メカニズムを知ることが、生体恒常性と疾患におけるその破綻を理解する上で重要である。我々はまず、膵内分泌ホルモンであるグルカゴンによる、肝細胞のシグナル伝達と転写制御を研究し、転写調節因子 CITED2 による糖新生制御機構を新たに見出した (*Nature Medicine*. 2012, *Nature Communications*. 2016)。

組織マクロファージの形質は、組織環境におけるシグナルによって確立・維持されているが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。そこで、肝臓の組織マクロファージであるクッパー細胞に必要なニッシュシグナルの同定をおこなった。マウスの肝臓を構成する細胞を分取し、トランスクリプトーム、エンハンサー等

を解析した結果、肝類洞内皮細胞による、Notch-RBPJ シグナルおよび TGF- β /BMP-SMAD シグナルの活性化と、肝細胞由来の内因性 LXR アゴニストがクッパー細胞に特異的な遺伝子の発現に必要なことが明らかとなった (*Immunity*. 2019)。次に非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) におけるマクロファージの多様性を、scRNA-seq, エンハンサー解析, イメージングによって検討した。NASH においては、クッパー細胞のエンハンサー活性の変化と、新規に肝臓に誘導された単球の肝臓の微小環境依存的なクロマチンリモデリングにより、異なる遺伝子発現を示す 4 つのマクロファージ集団が形成されることが明らかとなった (*Immunity*. 2020)。本研究により、我々は、マクロファージ前駆細胞が組織特異的表現型を獲得するメカニズムを解明するための基盤を確立し、NASH における疾患特異的なマクロファージが単球・マクロファージのニッシュ特異的なプログラミングによって出現することを明らかにした。

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

(大阪大学大学院医学系研究科)

【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、これら膵β細胞機能障害および改善に関わる分子メカニズムは明らかではない。

【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 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、同因子に着目した。Tmem163 mRNA は膵島に高発現を示し、免疫電顕での解析において膵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) の糖負荷試験において、対照群に比べて KO の血糖値は有意に低く、血中インスリンは有意に高値を示した。Tmem163 は細胞内亜鉛制御に関わる可能性が報告 (Cuajungco MP *et al.*, 2014) されていること、SG での結晶形成に亜鉛元素が必須であることから、SG の dense core を電顕で解析したところ、対照群に比べて KO では密度が低く、かつサイズが大きい所見を得た。さらに、KO の膵β細胞ではインスリンの前駆体であるプロインスリンの増加が確認された。

【考察】

これまでの結果より、Tmem163 は SG の亜鉛制御を介して顆粒成熟に寄与することが示唆されている。2型糖尿病初期には高インスリン血症を呈するが、本因子の発現低下は、SG の成熟障害を介して2型糖尿病初期の病態形成に関わる可能性を想定している。現在、KO における膵β細胞内の亜鉛分布変化や、インスリン分泌亢進の機序につき解析を進めている。

リスク因子が各アウトカムに及ぼす影響の差異の検出

高原 充 佳

(大阪大学大学院医学系研究科)

リスク因子 (説明変数) がアウトカム (従属変数) に及ぼす影響を検討する際、モデル解析は大変有用な統計学的解析手法である。これまでも種々の性質を持つアウトカムに対して、様々なモデル解析が考案され、臨床医学を含め、生命科学分野でも広く用いられてきた。ある事象に関連する作業仮説について、1つのモデル解析で分析できれば、複数の因子を投入したとしても、それらを同じ土俵、同じ尺度で評価・比較することが可能となる。臨床で観察される事象は種々の因子が互いに影響

を及ぼしあった結果として観察されることが多く、多数の因子を同時に1つのモデルに組み込める回帰分析は魅力的である。通常、回帰モデルでは多元一次式を想定しているが、リスク因子とアウトカムの関連はこれに収まらないことも多く、その場合は工夫を要する場合もある。たとえば回帰分析において正弦関数を用いて周期性を評価する場合、特定の周期を事前に設定すると、ノイズを有意な周期変動として検出してしまうリスクがある。こうした場合に Fisher-Yates の組み換えが有用な手法であることを実際の臨床疫学研究において実践した。また、リスク因子とアウトカムとの関連において交互作用の存在が想定される場合、その取扱いには慎重を要することも多い。決定木解析やランダムフォレスト解析はこうした交互作用を取り扱いうる解析モデルの1つである。我々は実際に複数の臨床疫学研究において、こうしたモデルを採用することにより、アウトカムと関連しうるリスク因子を探索・同定することを試みた。また、複数のリスク因子について、アウトカムごとにその分布が異なる場合がある。こうした場合において、異質性、すなわち、リスク因子の分布が全体としてアウトカム間でどの程度異なるかを1つの全体指標で評価することができれば感覚的にも捉えやすいと考える。我々はC統計量、すなわち受信者動作特性曲線下面積をこうした目的にも利用できる可能性を見いだした。

ヒト iPS 細胞を用いた腎疾患、糖尿病に対する新規治療法の開発

豊原 敬文

(東北大学医学部)

私は2014年度から2019年度まで成人病の病因・病態の解明に関する研究助成で継続したご支援をいただきました。助成いただいた期間の研究報告について主要論文を中心に報告させていただきます。

① 臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞から腎前駆細胞への分化誘導

【目的】

急性腎障害 (AKI) は、様々な原因により急激な腎機能低下を来とし、有効な治療法のない死亡率の高い病態で

ある。治療戦略の一つとしてヒト iPS 細胞を用いた再生医療の開発が期待されているが、その方法は確立されていない。今回、我々は、ヒト iPS 細胞から腎臓前駆細胞を作製し、AKI モデルマウスに対する細胞移植治療の検討を行った。

【方法、結果】

我々は、以前に OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株を樹立し、OSR1 陽性中間中胚葉細胞を高効率に分化誘導することに成功している¹⁾。腎臓を派生させる胎生初期の中間中胚葉および腎臓前駆細胞のマーカー遺伝子としてそれぞれ転写因子 *Osr1* と *Six2* が知られている。そこで、まず腎臓前駆細胞を単離するために OSR1-GFP レポーターヒト iPS 細胞株の SIX2 遺伝子座に tdTomato を相同組換え法により導入した OSR1-GFP/SIX2-tdTomato ダブルレポーターヒト iPS 細胞株を樹立した。さらに、我々の中間中胚葉細胞の誘導方法に、成長因子と化合物を組み合わせる追加することによって OSR1/SIX2 共陽性細胞を 30% 以上の効率で誘導することに成功した。この OSR1/SIX2 共陽性細胞は、生体の腎臓前駆細胞と同様の遺伝子発現を示し、*in vitro*, *in vivo* においてさらに分化させることでネフロン構成細胞に分化した。さらに、ヒト iPS 細胞由来腎臓前駆細胞を虚血再灌流 AKI モデルマウスの腎被膜下に移植することによって、腎機能障害や腎組織障害が有意に軽減した。一方で、iPS 細胞由来腎臓前駆細胞の急性腎障害組織への取り込みは認められず、治療効果は腎臓前駆細胞から分泌される腎保護因子のパラクライン作用によるものと考えられた²⁾。

【考察】

腎疾患に対する再生医療としては、細胞移植治療や 3 次元腎組織の再建などの方法が現在試みられており、臨床応用が期待されている³⁾。本研究は、ヒト iPS 細胞を用いた腎疾患に対する細胞移植治療の可能性を初めて示したものであり、腎疾患に対する再生医療開発への貢献が期待される。

1) Mae, S.I., Shono, A., Shiota, F. *et al.*: Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells, *Nat. Commun.*, 4, 1367 (2013).

2) **Toyohara, T.**, Mae, S., Sueta, S. *et al.*: Cell

therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice, *Stem Cells Transl. Med.*, 4, 980 (2015).

3) **Toyohara, T.** & Osafune, K.: Novel Regenerative Therapy for Acute Kidney Injury, *Renal Replacement Therapy*, 2, 34 (2016).

② 小蛋白質 Mitoregulin の脂肪細胞における役割の解明

【目的】

これまで long non coding RNA として分類されていた RNA の中には一部で機能性のペプチドに翻訳されるものがあることが、RNA-seq とプロテオミクスを組み合わせた研究から最近明らかとなっている⁴⁾。本研究は、その一つであり元々 LINC00116 という long non coding RNA として分類されていたが、実際には翻訳される Mitoregulin (MTLN) という小蛋白質に注目した。MTLN は筋肉に発現し電子伝達系の調節に関与するという報告があるが⁵⁾、我々は MTLN の脂肪細胞における役割をノックアウトマウスおよびヒト iPS 細胞より分化した脂肪細胞を用いて検討した。

【方法、結果】

MTLN は多くの種で保存され、脂肪細胞の発生分化と共に発現量が増加することが明らかとなった。また、MTLN ノックアウトマウスでは血清脂質が優位に低下することが明らかとなった。さらにマウス単離脂肪細胞やヒト iPS 細胞由来脂肪細胞で詳しく解析を行なった結果、MTLN は脂肪分解や β 酸化を促進する役割があることを解明した。さらに電子顕微鏡による局在解析や免疫沈降法とプロテオミクスによる解析を行い、MTLN はミトコンドリア蛋白質と共同して働くことで上記の役割を担うことを明らかとした⁶⁾。

【考察】

本研究は MTLN という小蛋白質が脂肪細胞内で脂質代謝に関わることを示したものであり、同様の小蛋白質をターゲットとした脂質異常症や糖尿病に対する治療法の開発につながる研究成果である。今後さらなる機能解析や創薬研究が進むことが期待される。

4) Matsumoto, A., Pasut, A., Matsumoto M. *et al.*:

mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide, *Nature* 541, 228(2017).

- 5) Makarewich, C.A., Baskin, K.K., Munir, A.Z. *et al.*: MOXI is a mitochondrial micropeptide that enhances fatty acid beta-oxidation. *Cell Rep.* 23, 3701 (2018).
- 6) Friesen, M., Warren, C., Yu, H., **Toyohara. T (co-first author)**, *et al.*: Mitoregulin Controls b-Oxidation in Human and Mouse Adipocytes, *Stem Cell Reports*, 14, 590(2020)

③ 糖尿病患者由来 iPS 細胞を用いた新規動脈硬化抑制因子の探索

【目的】

糖尿病患者の中には動脈硬化になりやすい人となりにくい人がいることが臨床的には知られているが、その原因はこれまでに明らかにされていなかった。近年、患者由来 iPS 細胞は単一の遺伝子を原因とした疾患のみならず、生活習慣病のような複数の遺伝子を原因とする疾患についても病態モデルの作製において有用である可能性が示唆されていた^{7,8)}。本研究では長期に糖尿病に罹患しているにも関わらず動脈硬化にならないという非常に稀な病態を呈する患者由来の iPS 細胞より血管細胞を分化誘導し、動脈硬化抑制因子の同定を行うことを目的とした。

【方法、結果】

申請者は数十年以上の糖尿病罹患歴があるが心臓カテーテル検査でも心血管病変が“全く認められない患者群”と比較的短期の糖尿病罹患歴にも関わらず“心血管カテーテル治療が必要になった患者群”からそれぞれ iPS 細胞を樹立して、血管細胞（内皮細胞、血管平滑筋細胞）に分化誘導したのちに遺伝子発現を比較した。その結果、心血管病変が“全く認められない糖尿病患者” iPS 細胞由来血管平滑筋では小胞体エステラーゼとして知られていた Arylacetamide Deacetylase (AADAC) の発現が上昇していることを明らかとした。AADAC はリパーゼ作用があることは知られていたため、AADAC を強制発現した血管平滑筋を Lipidomics で脂質解析を行った結果、その活性化は triacylglycerol などの細

胞内貯蔵脂質から細胞膜を構成するリン脂質への経路 (Kennedy 経路) を促進していることが明らかとなった。またこの脂質代謝変化による血管平滑筋の移動能と増殖能の低下も動脈硬化に抑制的に働いていると考えられた。さらに血管平滑筋特異的 AADAC 強制発現動脈硬化モデルマウスでは動脈硬化の改善が認められた。一方で AADAC をノックアウトした血管平滑筋マウスでは上記と逆の結果が認められた。このことから AADAC は細胞内の脂質代謝を調節することで動脈硬化に抑制的に働いていることが明らかになった⁹⁾。

【考察】

本研究は動脈硬化に罹患しにくい患者において、血管平滑筋の AADAC が上昇していることを示し、またこのたった一つの小胞体内エステラーゼの調節で病態が改善することを示している。今後 AADAC を用いた新たな動脈硬化治療の開発が期待できる。また、臨床的に稀だが特徴のある患者由来 iPS 細胞は病態のメカニズムを解明する上で有用であり、臨床と基礎の架け橋になる可能性を提示したことから、iPS 細胞を用いた病態モデルの可能性をさらに広げる研究であると考えられる。

- 7) Warren, C.R., O'Sullivan, J.F., Friesen M., Becker, C.E. *et al.*: Induced Pluripotent Stem Cell Differentiation Enables Functional Validation of GWAS Variants in Metabolic Disease, *Cell Stem Cell* 20, 547(2017).
- 8) Warren, C.R., Jaquish, C.E., and Cowan, C.A.: The NextGen Genetic Association Studies Consortium: A Foray into *In Vitro* Population Genetics, *Cell Stem Cell* 20, 431(2017).
- 9) **Toyohara. T (co-corresponding author)**, Roudnicky, F., Florido, M.H.C., Nakano, T., *et al.*: Patient hiPSCs Identify Vascular Smooth Muscle Arylacetamide Deacetylase as Protective against Atherosclerosis., *Cell Stem Cell*, 27, 147(2020).

TMFC ではご支援と多くの刺激をいただき、上記研究を進めるにあたり本当にお世話になりました。

この場を借りて、ご支援、ご指導いただいた応用酵素協会、先生方に厚く御礼申し上げます。

社会ストレスによる脳組織の超微細な細胞生物学的変化とその機序・役割の解明

永井裕崇

(神戸大学大学院医学研究科)

【目的】

社会や環境より受けるストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を誘発し、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病態モデルにおいては、前頭前皮質神経細胞の樹状突起萎縮や樹状突起スパインの喪失などの神経形態変化が情動変容に重要であることが示唆されてきているが、それらの神経形態変化の分子細胞生物学的機序は殆ど不明である。従って本研究では、最先端イメージング技術やマルチオミクス解析を用いてストレス病態を担う神経細胞の機能形態変化のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法】

社会挫折ストレスによる神経細胞や細胞内小器官の形態変化を調べるため、マウスの内側前頭前皮質を連続電子顕微鏡法（シリアルブロックフェイス走査電子顕微鏡法やアレイトモグラフィー法）あるいは膨張顕微鏡法による超解像イメージングにより観察した。さらに形態変化に関わる分子機序を明らかにするため、トランスクリプトーム解析（RNA-seq）やメタボロミクス解析を実施した。

【結果】

社会ストレスが樹状突起の形態変化と関連するミトコンドリアの形態変化を生じることを見出した。さらにストレスによりミトコンドリア関連遺伝子の発現低下やミトコンドリアの機能低下が導かれることが明らかとなった。加えて、中央代謝系関連分子における発現変動が生じた。

【考察】

以上の結果は、社会ストレスがミトコンドリアの遺伝子発現変化や機能変化を導くことにより神経細胞の機能形態変化を導く可能性を示唆する。今後はミトコンドリアへの薬理的あるいは分子生物学的制御を行うことによりストレスによるミトコンドリア変化の機能的意義やその分子機序について検討する必要がある。

心臓リモデリングに対する心臓局所のネプリライシンの役割についての検討

中川仁

(奈良県立医科大学医学部)

【背景・目的】

ナトリウム利尿ペプチド（NP）は心房・心室から分泌され、それぞれ ANP・BNP と呼ばれており、ナトリウム利尿作用や心臓リモデリングに対する抑制効果を持ち、心不全における保護的ホルモンとして作用している。近年、NP をはじめとするペプチドを分解するネプリライシン（NEP）が注目され、NEP 阻害薬と Angiotensin II 受容体拮抗薬との合剤が、心不全の予後を改善する事が大規模臨床試験で報告された。なぜ NEP 阻害薬が心不全の予後をこれほど改善したかについては、ホルモンとしての ANP・BNP の作用を亢進させた事によると考えられているが、心臓局所における ANP・BNP の局所組織濃度が血中よりもはるかに高い事を考えると、autocrine としての NP の作用を増強させた可能性がある。本研究の目的は、NEP 遺伝子改変マウスを用いて心筋細胞における NEP の作用を検討し、心臓リモデリングに対する心臓局所での NP と NEP の相互作用を明らかにする事である。

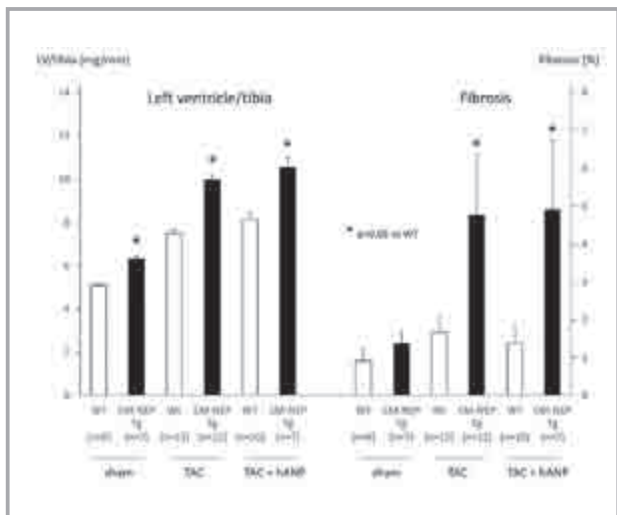
【方法・結果】

心臓局所における NEP の働きを検討するために、我々は心筋細胞での NEP の過剰発現マウス（CM-NEP Tg）を作製した。Tg マウスのベースラインの評価として、血中の ANP 濃度が著明に低下し、血中 cGMP と心臓組織の cGMP 濃度が野生型マウス（WT）と比較して有意に低下していた。Tg マウスの血中 ANP 濃度の低下を補正するために、外因性に human ANP（hANP）を浸透圧ポンプで投与し（0.66 ug/kg/min）、WT マウスの内因性マウス ANP 濃度と同程度まで上昇させた。3週間の大動脈縮窄術（TAC）を施行したところ、心重量、心臓の線維化、心機能の低下と肺重量の増加が Tg マウスにおいて WT マウスより有意に認められ、心臓組織での cGMP は Tg マウスにおいて WT マウスよりも有意に低下していた。そして、外因性の hANP を投与しても、Tg マウスにおける TAC による心臓リモデリングと心機

能低下は改善することができず、心臓組織の cGMP は Tg マウスにおいて WT マウスよりも有意に低下したままであった。これらのことは、心臓組織の NEP の働きは、血中 ANP よりも心臓組織の ANP に対してより重要であることが示唆される。興味深いことに、Tg マウスにおける TAC 後の肺重量の増加は、外因性 hANP を投与すると改善し、ホルモンとしての hANP の利尿作用により肺重量が低下したことが示唆される。

【結論】

心臓組織における NEP の発現は心臓組織の cGMP を低下させ、TAC 後の心肥大、心臓間質の線維化、心機能の低下を引き起こした。心臓組織での ANP に対する NEP の局所的な働きが、心臓リモデリングに重要であると思われる



**Atypical PKC による大腸癌発生抑制機構の分子
的解明と治療への応用**

中西 祐 貴

(京都大学医学研究科)

大腸癌発癌過程において、これまで主要ルートと考えられていた通常型腺腫を前癌病変とする conventional pathway が広く知られているが、近年大腸鋸歯状病変からの癌発生も注目を集めている。この鋸歯状病変に由来する癌化経路は serrated (alternative) pathway と呼ばれ、15-30% の孤発性大腸癌の発生に関与するとされているが、その詳細な分子メカニズム、そして腫瘍微小環境と腫瘍細胞との相互関係については明らかにされ

ていない。これまで我々は、atypical Protein Kinase C (aPKC; PKC ζ , PKC λ/l) の腸管における機能に関する研究を続けており、腸管上皮細胞特異的な aPKC の欠失が conventional pathway の大腸癌の発癌過程において腫瘍促進性に働くことを示してきた。すなわち、PKC ζ の欠失は癌細胞の代謝経路依存性の reprogramming, 幹細胞性の増大, miR-200 制御による転移能の増大を、PKC λ/l の欠失はパネート細胞の分化阻害による機能欠損や上皮細胞死誘導による腸管炎症の増大による腫瘍促進効果があることを示している。しかし aPKC が serrated pathway を介する大腸癌発癌においてどのような役割を果たすかは未解明である。我々は今回のプロジェクトにおける検討で、PKC ζ あるいは PKC λ/l のどちらかの上皮細胞特異的欠失では腸腫瘍の自然発生は認めない一方で、PKC ζ と PKC λ/l の双方を欠失させた aPKC-double knockout (DKO^{IEC}) マウスにおいては自然発生的に腸腫瘍が極めて短期間に発生することを確認した。興味深いことに、DKO^{IEC} マウスにおいて発生する腸腫瘍は組織的に極めて悪性度の高い鋸歯状病変であり、かつ間質の活性化と抗腫瘍免疫の抑制という特性を持ち合わせており、ヒト大腸癌における特に予後不良の subgroup (CCS 分類における CCS3, CMS 分類における CMS4) と相関することが明らかとなった。DKO^{IEC} マウスにおける腫瘍発生機序として、PKC λ/l 欠失が腸管慢性炎症を惹起することで細胞増殖を引き起こすのに加えて、PKC ζ 欠失が Interferon 経路を阻害することで CD8 陽性 T 細胞による抗腫瘍免疫を抑制していることが明らかになり、PKC ζ と PKC λ/l が協調的に serrated pathway における癌抑制に働いていることが示された。さらに、免疫チェックポイント阻害剤と TGF- β 経路阻害剤併用が抗腫瘍免疫を活性化し、DKO^{IEC} マウスにおける腸腫瘍に対する著明な抑制効果があることが明らかとなった。以上の結果から、aPKC は大腸癌発生の serrated pathway においても抑制性に機能していることが示された。加えて、aPKC は予後不良な大腸癌サブタイプに対する極めて有効なバイオマーカーであり、かつ aPKC による免疫および間質反応の制御機構は癌治療の新規ターゲットとなり得ると考えられた。

新たな心機能制御要素としての心臓マクロファージの機能解析

中山 幸輝

(東京大学医学部)

【目的】

高齢化社会において心不全症例の増加が顕著になっているが、従来の心不全治療では、健康寿命の延伸は得られていない。心臓の加齢変化の病態生理を解明し、繰り返す心不全を予防する新たな治療戦略を創出することは喫緊の課題である。我々は、心臓間質に存在する組織マクロファージが、恒常性維持に重要な役割を担っていることを解明した。近年の報告では、心臓マクロファージの細胞起源は、心不全や加齢に伴って胎児肝単球由来のマクロファージから骨髄単球由来に変化すると考えられている。一方で、細胞起源の変遷に伴う心臓マクロファージの表現型の変化が心機能に与える影響は未知である。また、骨髄は老化すると造血幹細胞 (HSC) レベルで質的变化をする。そこで、①骨髄老化に伴う心臓マクロファージのエピゲノムの変化が、心臓の恒常性維持を破綻させ組織リモデリングを引き起こす、②心不全になると骨髄ニッチが変化して HSC 自体が変化する、という仮説に基づき心不全の新たな病態解明を図る。

【研究成果】

骨髄老化が心機能に与える影響を評価するため、老年マウスの骨髄を若年マウスに移植したところ、自然経過で慢性期に心筋線維化が進んで収縮能が低下した。老化に伴って心臓の線維化を進ませるのは血清中蛋白ではなく細胞成分であり、加齢によって表現型が変化した免疫細胞が可塑性を失って心臓実質の恒常性を損動させると考えられた。続いて心不全マウスの骨髄だけを正常マウスに移植すると、同様の線維化と心機能低下が見られた。心不全マウスの骨髄 HSC では、老化モデルと同様 HSC の増殖が進行していた。HSC の変化が心臓マクロファージの表現型を与える影響を解析するために、老化マウスや心不全マウスの HSC を健常マウスの HSC と競合的に移植すると、前者は末梢血で骨髄系細胞に偏向して分化する一方で、これらの HSC 由来の心臓マクロファージが、より炎症性の表現型を示すことが分かった。

【考察】

心不全を起こすと脳、神経を介して骨髄に構造的リモデリングを起こし、HSC レベルでエピゲノムが変化して骨髄系細胞に分化しやすくなった。一方で心不全マウスの HSC 由来単球は心保護的な心臓マクロファージに分化しにくくなるということが分かった。このことは、老化や心不全を起こした心臓で外的ストレスに対する忍容性を低下させ、さらなる心機能低下を引き起こすと考えられた。

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) におけるウイルス由来マイクロ RNA の発現と機能

西尾 美和子

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

【目的】

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) は進行性、治療抵抗性の EBV 陽性 T, NK 細胞腫瘍である。希少疾患とされてきたが、診断基準の作成、公開と、WHO 造血器腫瘍分類への記載により世界的に報告数が増えており、発症機構解明と治療薬開発が急務である。EBV ゲノム上にはマイクロ RNA, miR-BARTs をコードする遺伝子が存在する。EBV 陽性 B 細胞腫瘍において miR-BARTs は宿主細胞の遺伝子発現を制御し不死化を促すとともに、エクソソームに含有され放出されて周囲細胞も制御、発症へ寄与することが報告されている。そこで本研究では、CAEBV における miR-BARTs の発現とその機能について解析をした。

【方法】

CAEBV またはその類縁疾患の患者検体から樹立された EBV 陽性 T 細胞株 (SNT8, SNT15, SNT16) と EBV 陽性 NK 細胞株 (SNK1, SNK6, SNK10) を用いた。CAEBV の診断は、2015 年に厚生労働省研究班によって作成された診断基準に従っておこなった。miR-BARTs の発現は、HiSeq 2000 と定量的 RT-PCR 法を使用して測定した。NF- κ B はウエスタンブロット法を用いて検出した。

【結果】

各細胞株から miR-BARTs が検出された。これら

miR-BARTs の標的タンパク質を調べるために *in silico* 分析をおこなった。NF- κ B 阻害因子である A20 が抽出できた。マイクロアレイ解析で A20 の発現をみたところ、健常人由来 EBV 陰性 T または NK 細胞と比較して、CAEBV 患者由来 EBV 陽性 T または NK 細胞では発現が低下していた。さらに、NF- κ B 活性化が確認された。

【考察】

CAEBV において、miR-BARTs が NF- κ B 阻害因子である A20 を抑制することで、NF- κ B 活性化に関与する可能性が示唆された。本研究により、miR-BARTs が CAEBV の治療的標的となり得ると期待される。

摂食関連 GPCR の活性化・不活性化における分子メカニズム解析

濱 本 明 恵

(岐阜大学工学部)

【背景】

エピジェネティクスとは DNA 塩基配列の変化を伴わない、後天的な遺伝子の修飾機構のことである。ヒストンがアセチル化された領域では DNA の巻き付きが緩むために転写が亢進するが、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) により脱アセチル化されると転写が抑制される。これまで一部の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と HDAC が相互作用すると報告されているが、摂食関連 GPCR と HDAC の関係については全く不明であった。そこで本研究では肥満に重要なメラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) に着目し、HDAC との相関関係を解析した。

【方法】

MCHR1 が安定発現した HEK293 細胞を使用して、HDAC 阻害剤処理による影響を調べた。また、HDAC クラス I, II の内、どのサブタイプが MCH-MCHR1 系に影響を与えるかを解析するために、細胞内シグナルや発現量、局在の変化を網羅的に解析した。

【結果・考察】

HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A 処理により、細胞内シグナルの下流である NFAT 転写活性や MCHR1 受容体発現量が変化したことから MCHR1 と HDAC

には相関関係があることが分かった。次に、各 HDAC と MCHR1 を共発現させたところ、MCH 添加により HDAC3, 5, 9, 10 のタンパク質発現量が増加した。また、MCHR1 安定発現細胞に HDAC3, 5, 9, 10 を過剰発現させることで、MCH 添加による NFAT 転写活性が亢進した。次に、MCH 添加による HDAC と MCHR1 の局在の変化を細胞免疫染色法で調べたところ、通常 MCHR1 は MCH 添加により細胞膜上における発現が低下するが、HDAC5, 9, 10 を共発現させることで MCH 添加による膜発現低下が抑制された。さらに、定量 PCR 法を行った結果、MCH 刺激により内在性 HDAC5, 9, 10 の mRNA 発現量が変化することを確認した。一方、細胞内シグナルの上流では HDAC 阻害剤処理や HDAC を強制発現しても差が見られなかった。

以上より、MCHR1 が HDAC と相関関係を有しており、特に HDAC5, 9, 10 が重要であることが判明した。今後詳細な分子機構を解明することで HDAC と摂食関連受容体との関係が解明され、肥満の新たな治療戦略となることが期待される。

レム睡眠の脳の恒常性維持における役割の解析

林 悠

(京都大学医学系研究科)

【背景】

哺乳類の睡眠はノンレム睡眠とレム睡眠から構成される。レム睡眠は睡眠全体の 15% 程度にしか満たないが、この間、脳が活発に活動し、鮮明な夢が生み出される。このような独特な状態が何のためにあるかは、脳科学の大きな謎であった。レム睡眠は生誕直後に最も多く、成長や加齢とともに大きく減少する。通常よりもレム睡眠が少ない成人では、認知症の発症リスクが高まることから、レム睡眠が脳の恒常性維持にかかわり、その異常が認知症の発症・進行に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、レム睡眠が脳の恒常性維持に関わることの直接的な証拠はない。レム睡眠の生理的意義を解明することで、睡眠障害に着目した全く新しい脳機能・認知症の改善方法の開発が期待される。

【目的】

本研究の目的は、レム睡眠の脳の恒常性維持における役割を解明することである。私たちは、レム睡眠の機能を追及する上で、2つのアプローチに取り組んだ。一つ目は、レム睡眠のON/OFFを司るニューロンを同定し、遺伝学的にその機能を阻害または亢進させることで、レム睡眠を大幅に増加または減少させた影響を検討する、というものである。もう一つは、脳血流に注目し、生体内イメージングによって、覚醒時・ノンレム睡眠時・レム睡眠時の皮質毛細血管の血流を比較する、というものである。この2つのアプローチから、レム睡眠の脳の恒常性維持における役割を解明することを目指した。

【方法】

古典的な研究からレム睡眠を制御するニューロンは脳幹橋にあることが支持されているが、ニューロンのサブタイプは分かっていない。我々はこの領域に選択的に発現するCreノックインマウスを多く構築してきた。そのうちの一つのニューロンが、レム睡眠を促進する作用があることを見出した。本研究では、このニューロンを遺伝学的に破壊した。また、共同研究者の柳沢正史博士らは、2光子励起顕微鏡下で、マウスの脳波・筋電図を測定しながら脳内を観察できる実験系を構築した。私たちは、この実験系を活用し、脳血流を観察した。蛍光色素(FITC-Dextran)を静脈注射により血中に加えて、血漿を蛍光で可視化した。これにより、赤血球を影として検出でき、そのスピードおよび通過数を計測することで、毛細血管の血流を計測した。

【結果】

私たちが同定したレム睡眠促進ニューロンに、ウイルスベクターを用いた細胞死を誘導する遺伝子を発現させたところ、レム睡眠を不可逆的に阻害することに成功した。このマウスでは、記憶学習能力が低下し、さらには不安やうつ様行動が低下していることが判明した。また、初期には、レム睡眠中に体が動き出すレム睡眠行動障害のような表現型も見られた。

また、自然な睡眠覚醒の条件下で、脳の毛細血管の血流を観測することに成功した。その結果、レム睡眠中は、大脳皮質の血流量が覚醒時やノンレム睡眠中と比べて大幅に上昇することが判明した。活発に運動している時と比べても、多くの皮質領域でレム睡眠中は2倍前後まで

毛細血管の血流が上昇した。

【考察】

私たちが開発したレム睡眠が不可逆的に消失したマウスでは、様々な行動への影響がみられた。レム睡眠が脳の恒常性維持に必要な役割を担う可能性が高い。ただし、私たちがレム睡眠阻害のために破壊したニューロンが、レム睡眠制御以外の役割も担っている可能性が否定できないため、今後、別の角度からのアプローチも重要となる。

また、マウスの脳血流を直接観察するアプローチでは、レム睡眠中に、大脳皮質の脳血流が大幅に上昇することが判明した。1日約1時間のレム睡眠中の大脳皮質の広範な血流上昇は、広く栄養を届けるとともに、脳の不要な老廃物を回収することに貢献している可能性がある。

【文献】

- 1) Kashiwagi M, Kanuka M, Tatsuzawa C, Suzuki H, Morita M, Tanaka K, Kawano T, Shin JW, Suzuki H, Itohara S, Yanagisawa M, Hayashi Y. Widely distributed neurotensinergic neurons in the brainstem regulate NREM sleep in mice. *Current Biology* 30:1002-1010(2020).
- 2) Maezono SEB, Kanuka M, Tatsuzawa C, Morita M, Kawano T, Kashiwagi M, Nondhalee P, Sakaguchi M, Saito T, Saido TC, Hayashi Y. Progressive changes in sleep and its relations to amyloid- β distribution and learning in single App knock-in mice. *eNeuro* 7(2) ENEURO.0093-20. 2020 (2020).

心疾患の病態生理のシステムとしての理解とその制御に関する研究

東 邦 康 智

(東京大学医学部附属病院)

心不全は予後不良の病態であり、心疾患の病態生理の解明と新たな治療戦略の創出が急務である。心疾患の病態生理は心臓における様々な細胞内シグナル伝達経路、細胞間相互作用及び多臓器連関が絡み合った複雑系により構成されるため、システムとしての理解と介入が必要である。

心機能の主な担い手は心筋細胞であるが、その機能は血管内皮細胞、線維芽細胞や免疫細胞等の非心筋細胞により裏打ちされている。特に血管内皮細胞は心筋細胞への血液灌流を維持するために重要な細胞である。我々はこの血管内皮細胞が抗酸化ストレス作用を有し、心筋梗塞後リモデリング及び圧負荷心不全における心機能の維持に重要な役割を果たすことを解明した。血管内皮細胞は ABCG2 という膜輸送蛋白を発現している。ABCG2 はプロトポルフィリンIX及び抗酸化物質グルタチオンの細胞外への排出に関与し、心負荷時の血管内皮細胞及び心筋組織の酸化ストレスを軽減する。

負荷が加わった心組織では炎症反応が誘導される。我々はこの炎症反応の心疾患における役割と制御機構を明らかにした。心組織を構成する細胞には、自然免疫受容体 TLR2 が広く発現している。我々は、心負荷時に主に心筋細胞より分泌される熱ショック蛋白質 Hsp70 が TLR2 を活性化し、その結果誘導される炎症性サイトカイン IL-1 β が圧負荷時の心リモデリングに重要な役割を果たすことを明らかにした。また、IL-1 β の活性化には自然免疫受容体 NLRP3 インフラマソームの活性化が重要である。我々は、心組織における NLRP3 インフラマソームの活性化が神経シグナルにより制御されていることを解明し、心組織の炎症反応における心脳連関の重要性を明らかにした。

心組織における炎症反応は心負荷に対する代償反応及び非代償反応の双方に寄与するが、代償期から非代償期へと移行していく時間軸における炎症反応の役割及び制御機構は不明であった。我々は、代償期と非代償期における炎症性サイトカインの発現バランスが転写制御因子 I κ B α により制御されており、この発現バランスの変化が代償期から非代償期への移行に深く関与することを明らかにした。

最後に、我々は、プール型表現型スクリーニングと合成生物学的手法を用いて、複数の治療標的に対し時間空間分解能をもった介入を可能にする合成遺伝子回路を作成した。心不全に対する次世代の遺伝子治療として期待される。

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】

睡眠は動物に不可欠な生理行動である。一時的な断眠は認知・学習機能や注意力の低下をもたらすが、断続的な不眠によって生物は様々な失調をきたし、重篤な場合には死に至る。重要なことに、睡眠の量に加えてタイミング（位相）も我々の健康に強く影響を与える。生物の行動や代謝は約1日周期のリズムを示し、このような概日性の生理リズムは概日時計と呼ばれる体内時計によって制御される。24時間型社会と呼ばれる現代社会においては、不規則な生活による概日リズム障害が社会問題となっている。規則正しいリズムな生理現象は生体恒常性の維持に必須であり、概日リズム障害とメタボリックシンドロームや精神疾患の発症には強い相関が見られる。そのため、概日時計から生理リズムへの出力経路の理解は、概日リズム障害によるメタボリックシンドローム発症メカニズムとその予防に大きく寄与すると期待できる。概日時計の中核は視床下部の視交叉上核（SCN）に存在し、個々の神経細胞は自律振動する分子時計を内在する。SCN 時計は外界の明暗サイクルに同調し、他の脳領域や末梢組織に時刻情報を出力することで生理リズムを作り出す。概日時計から生理リズムの基本である睡眠覚醒リズムへの出力は極めて重要なプロセスである。そのため、概日時計の出力系の理解なくしては生理リズム形成の根幹を理解したとは言い難いが、SCN の“細胞内”の時計発振機構に比べて生理リズムの出力系を司る“SCN 外”の神経ネットワークの理解は進んでいない。そこで本研究計画では概日時計の重要な出力である睡眠リズムに着目し、SCN から投射される神経細胞の時刻・細胞特異的な操作を行うことで、睡眠覚醒リズムの制御メカニズムとその破綻がもたらす個体への影響を明らかにする。

【方法】

本研究は、神経トレーサーを利用して SCN から神経投射される細胞群の同定を行うとともに、人為的に神経

活動を操作することでその神経連絡の睡眠覚醒サイクル制御における役割を明らかにする。特に、VLPO に投射している SCN 神経に着目し、その個性を理解するとともに睡眠覚醒リズム形成における寄与を調べて行動リズムを生み出す分子・神経機構を明らかにすることを目指した。まずはじめに、投射先特異的に SCN の神経細胞群をラベルし、その性状解析を行った。イヌ科アデノウイルス 2 型 (CAV2) は軸索末端から取り込まれ、逆行性に輸送されて細胞体において目的遺伝子を発現するため、CAV2 を VLPO に導入することで、その領域にのみ投射している神経細胞の遺伝子操作が可能である。さらに、薬理遺伝学的手法 (DREADD) を用いて、SCN → VLPO 神経を人為的に活性化したときのマウス自発行動および睡眠覚醒状態への影響を解析した。一方、神経毒素であるテタヌス毒素 (TeNT-LC) を用いて細胞の神経小胞を阻害した。具体的には、CAV2 と TeNT-LC および EYFP を発現する AAV を用いて VLPO に投射する SCN 神経のみに神経毒素を発現させた。そのあと赤外線センサーを用いてマウス行動リズムを測定した。

今後、自由行動下のマウスにおいて神経活動のリアルタイムモニタリングを行うことで、実際に生体内で 1 日のどの時刻に情報出力が行われているのかを明らかにして情報出力とマウス睡眠覚醒状態との相関を明らかにしたいと考え、*in vivo* での神経活動のイメージング系の立ち上げを試みた。しかし、神経活動のモニターに頻繁に使用される GCaMP は蛍光タンパク質であり、励起光の照射や蛍光の検出に光カニューレを挿入する必要があるため、SCN および SCN の投射先領域 (特に SCN の直上にある SPVZ および PVN) が破壊されることが強く懸念された。そこで我々は、赤色ルシフェラーゼを用いた非侵襲イメージングを用いることにした。イメージングには赤色ルシフェラーゼである AkaLuc をマウス脳内に発現させてルシフェラーゼの発光基質を投与し、自由行動下のマウスにおける発光を MIIIS *in vivo* imager を用いて観察した。

【結果】

蛍光ラベルした SCN → VLPO 神経について、SCN に発現している神経ペプチドに対する免疫組織染色の結果から、VLPO に投射する SCN 神経は腸管作動性ペプチド (VIP) を主に発現し、アルギニンパソプレシン

(AVP) 神経とは共局在しないことが明らかとなった。既に、SCN の GABA 神経のみに蛍光タンパク質を導入してその軸索を可視化した結果から SCN の GABA 神経は視索前野 (POA) 全般にわたり軸索を伸ばし、VLPO も含まれることを見出している。つまり、SCN から VLPO に神経連絡する神経は少なくとも VIP 産生神経と GABA 産生神経で構成されていることが判明した。

さらに、DREADD を用いて SCN → VLPO 神経を活性化させたところ、マウスの自発行動が有意に減少した。興味深いことに、DREADD による行動抑制の効果は夜間にしか観察されなかった。また、EEG/EMG による睡眠覚醒解析の結果、マウスの覚醒時間が有意に減少することが明らかとなった。この結果は SCN から VLPO に投射する神経回路が直接的に睡眠覚醒制御を行い、マウス自発行動の変化をもたらしていることを示唆する。一方、TeNT-LC を発現させたマウスは徐々にリズムを失い、明暗サイクルにおいても行動リズムが大きく減弱した。さらに恒暗条件においても行動リズムはほぼ消失していた。TeNT-LC ではなく GFP を発現させたコントロールマウスにおいてはウイルスの投与後も明瞭な行動リズムが観察されたが、これらの結果から、マウスにおいて睡眠中枢に神経軸索を伸ばしている SCN 神経群は行動リズムの形成に必須の役割を果たしていることが明らかになった。

Akaluc を利用した生物発光モニターを行ったところ、検出された発光は十分であり、今後、基質の連続投与の条件を確定させて SCN 神経における神経活動リズムを観察する予定である。

【考察】

本研究では、SCN から VLPO への神経投射に焦点をあててその性状解析および機能解析を行なった。その結果、SCN → VLPO 神経は GABA および VIP 神経で構成されており、SCN の中でも特異的な細胞集団を形成すると考えられた。さらに、人工 GPCR を用いて一過性に神経を活性化させた際にはマウスの行動量の減少と睡眠量の増加が観察された。重要なことに、一過性の神経活動の誘導の効果は夜間にのみ観察された。つまり、この効果には時刻依存性が存在している。これは生体内で SCN の神経活動がマウスの休息期である昼間に上昇するという先行知見の結果とよく一致する。つまり、夜

行性のマウスにおいては昼に神経活動が活発になり、神経連絡を通して視索前野の神経を活性化することで睡眠を誘導していると考えられる。また、神経毒素を用いて SCN → VLPO 神経の神経連絡を阻害したところ行動リズムの減弱が観察された。SCN から VLPO に至る出力経路の異常が行動リズム消失に寄与していると考えられた。本研究で我々は SCN から睡眠リズムを形成する神経回路を同定し、その生理的役割を明らかにした。今後は、さらに詳細に神経回路の性状を明らかにするため、生体内イメージングの実験系を確立し、1日のどのタイミングで強く神経が活性化されているのか、神経活動とマウス行動との相関を明らかにしていく。

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

(京都大学医学部医学研究科)

新規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- κ B 活性化、また細胞死の抑制に関与する。LUBAC は活性中心を有する HOIP, アクセサリー分子である HOIL-1L, SHARPIN の三者複合体から構成される(図1)。申請者らはこれまでに、LUBAC が3サブ

ユニットで初めて安定な複合体を形成するメカニズムを解明している。

そこで、その知見を利用した LUBAC を不安定化する機能抑制剤の開発を行なった。これまでに LUBAC の3つのサブユニットの結合部位の共結晶構造解析に成功しており(図2)、新たに判明した HOIL-1L/SHARPIN の結合が複合体の安定化に最も大きく寄与している。結晶構造のデータを元に同結合を阻害しうるペプチドを作成し、がん細胞株を用いてペプチドの評価を行なった。その結果、LUBAC の発現量を抑制し、また細胞の生存を LUBAC の発現量に依存しているがん細胞の viability を著しく傷害することを見出した。

また臨床応用を視野に HOIL-1L/SHARPIN 結合を阻害する低分子化合物の開発に向けた FRET アッセイ系構築を行なった。大腸菌で LUBAC 結合領域のタンパク質を精製し、複合体形成を FRET によりモニターしたところ、精製した LUBAC 結合部位のタンパク質添加で FRET 値が上昇し、上記ペプチド添加により FRET 値が減少したことから、LUBAC 複合体形成をモニターできていることが明らかとなった。またこの系を用いて小分子化合物のスクリーニングを行い、FRET 値が減少する化合物をいくつか同定した。同定した化合物が、1. ユビキチンアッセイにより LUBAC の活性を抑制するか 2. 細胞内の LUBAC 量を減少させるか 3. 野生型には効果がなく、がん細胞特異的に細胞生存を傷害するか、について解析を行った。同定した化合物の中で、劇的ではないが上記 1. 2. 3 のクライテリアを満たす化合物を一つ見出した。現在、この化合物に関して、更なる解析を行っている。

上記の FRET による化合物同定に加え、DNA encoded library (DEL) スクリーニング系の構築を行っている。DEL ライブラリーはそれぞれの化合物に特異的なバーコード DNA が結合しており、DNA の情報を次世代シーケンサーで読み取ることで、化合物を特定することができる。DEL ライブラリーの利点はライブラリーの多様性であり、数十億の化合物を一度にスクリーニングできる。DEL ライブラリーを用いて HOIL-1L/SHARPIN 特異的な結合阻害剤を同定するために、DEL スクリーニングに用いるタンパク質の精製を行った。HOIL-1L/SHARPIN の結合部位を数十アミノ酸か



図1 LUBAC リガーゼの模式図



図2 LUBAC 三量体形成部位の構造

らなる非常に小さな領域であり、それぞれの領域を大腸菌に共発現させ、精製したところ HOIL-1L/SHARPIN の小さいフラグメントが結合することが確認できた。

現在は、同タンパク質を大量精製し、DEL スクリーニングで精製タンパク質に結合する化合物を同定する予定である。

上記の解析に加え、活性中心である HOIP に加え、HOIL-1L にも存在するユビキチンリガーゼの機能、生理的意義を明らかにし、論文化を行った¹⁾。これまでに HOIL-1L の同活性を消失させると LUBAC の直鎖状ユビキチン鎖生成能が亢進して、LUBAC の 2 つの機能、NF- κ B 活性化能と細胞死抑制能が顕著に亢進することを見いだした。その詳細なメカニズムを解析し、HOIL-1L は自分自身をモノユビキチン化し、さらに HOIP がそのモノユビキチンを認識し、直鎖を付加することで LUBAC 自身が直鎖化されること、さらに LUBAC の直鎖化が LUBAC の機能を抑制することを見出した。また HOIL-1L の E3 活性を欠失させたマウスを作出し、12 ヶ月齢までは顕著な症状は示さないが、全ての臓器において直鎖の生成が顕著に亢進し、肺では炎症時に誘発される iBALT 様のリンパ球浸潤が認められた。また肝細胞傷害モデルである LPS+D-Gal 投与モデルに作成したマウスは耐性を示したのに加え、LUBAC の機能が低下することで皮膚炎を発症する SHARPIN 欠損マウスに HOIL-1L E3 欠失マウスを掛け合わせたところ、LUBAC の機能を上昇させることで、皮膚炎が回復することを見出した。また個体の中には T 細胞リンパ腫を発症する個体もいたことから、同マウスの詳細な解析を進めるとともに、免疫異常が関与する炎症モデルとの関連、LUBAC の機能亢進と慢性炎症性疾患、がんについても検索する予定である。

【文献】

- 1) Fuseya Y, Fujita H, Kim M, Ohtake F, Nishide A, Sasaki K, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi R, Iwai K. The HOIL-1L ligase modulates immune signaling and cell death via monoubiquitination of LUBAC. *Nature Cell Biology* (2020), 6, 663-673

劇症 1 型糖尿病発症メカニズムの解明

細川 吉 弥

(文部科学省研究振興局ライフサイエンス課)

【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 25HC の抗アポトーシス効果を明らかにする。②微量血液サンプルでの 25HC 濃度測定系を樹立する。③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組織学的に明らかにする。④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評価する。

【方法・結果】

①健常人由来 iPS 細胞および劇症 1 型糖尿病 iPS 細胞を INS 陽性細胞に分化誘導させ、ウイルス感染を模倣する系として poly (I;C) トランスフェクションシフローサイトメトリーにて INS 陽性細胞のみ単離した。PDL-1 や我々の既報 (Baden MY, PLoS One, 2015) で評価している 1 型 IFN やウイルスレセプター、ISG15 等の遺伝子発現を検討したがいずれにおいても健常人由来 iPS 細胞と劇症 1 型糖尿病 iPS 細胞で有意差を認めなかった。また劇症 1 型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞に poly (I;C) をトランスフェクションし 25HC の抗アポトーシス効果を検討した。種々の濃度の poly (I;C) や 25HC で検討を行ったが、poly (I;C) による Caspase3 活性の有意な低下作用は認めなかった。②大阪大学工学部と共同で、血中 25HC 濃度測定系の樹立をすすめた。サンプル間の内部標準のばらつきを軽減することができることに成功し、また微量な血液量での測定系の検証をすすめた結果、微量血液サンプルでの 25HC 濃度測定に一定の用途を立てることができた。③抗 PD-1 抗体投与後に 1 型糖尿病を発症した 2 例の膵組織において β 細胞は残存せず、CD3 陽性細胞の膵島への浸潤を認めた。④急性発症 1 型糖尿病患者 (14 \pm 10pg/ml) では 2 型糖尿病患者に比し空腹時グルカゴン値 (29 \pm 15pg/ml) は有意に低値であった。劇症 1 型糖尿病患者 (11 \pm 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

±15pg/ml) は2型糖尿病患者に近い値であった(下記論文参照)。⑤その他に *J Diabetes Investig* において劇症1型糖尿病の Mini Review が掲載された(下記参照)。

【文献】

- 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.* 5. e01715 (2019).

ノンレム睡眠特異的脳波パターンを作り出す神経回路の解析

本城 咲季子

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

ノンレム睡眠に特異的な大脳皮質神経活動の神経基盤を明らかにする。

【背景】

脳波は大脳皮質神経活動の和であり、睡眠・覚醒状態は脳波によって規定される。これは高次認知機能を担う大脳皮質の活動が覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠を通じて変化する事を反映している。ノンレム睡眠時、脳波の振幅は大きくなり、またその周波数は低くなる。この脳波は徐派あるいは Slow Wave と呼ばれ (0.5–4 Hz)、睡眠圧のマーカーであると共に、睡眠による記憶の固定にも重要な役割を果たすと考えられている。しかし、徐派が生み出される神経基盤は未だ明らかではない。

【方法】

徐派を生み出す脳領域を特定するため、ジフテリアトキシン (DTA) の発現による細胞死誘導を用いる。脳の各領域に DTA を発現させるための AAV を局所感染させ、同時に脳波・筋電測定用の電極埋め込み手術を行う。手術後は慢性的に脳波・筋電シグナルを記録し、1, 2, 3, 4 週間のタイムポイントにおいて睡眠覚醒判定および脳波解析を行う。

【結果】

これまでに睡眠覚醒調節に関与すると報告されている脳領域に AAV-DTA の局所感染を用いて細胞死を誘導するスクリーニングを行った。9 脳領域を検討した結果、視床のある核を除去するとノンレム睡眠時の Spindle と呼ばれる脳波は消失するが Slow Wave は消失しないことが分かった(図 1 B)。この核に加え、視床のもう一つの核を除去する事により Slow Wave が低くなることがわかった。

【考察】

我々の結果から、視床の一部がノンレム睡眠時特異的脳波である徐派・Slow Wave の生成に必須であることが明らかになった。また、細胞死を誘導する AAV-DTA のインジェクションから四週間経ってもこの表現型は回復しなかった。この結果から、この脳領域は徐派・Slow Wave の生成に必須であり、他の脳領域によってこの機能は補償されないと考えられる。

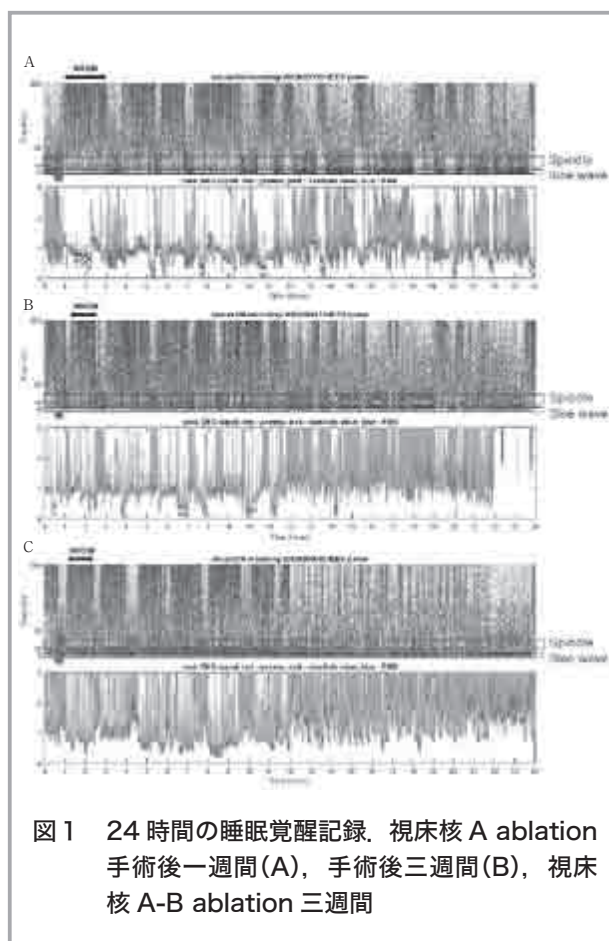


図 1 24 時間の睡眠覚醒記録。視床核 A ablation 手術後一週間(A)、手術後三週間(B)、視床核 A-B ablation 三週間

血糖変動と認知機能の関連解明のための前向き観察研究

松原正樹

(国立循環器病研究センター病院)

【背景】

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

【目的】

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

【方法】

本研究は単施設 (国立循環器病研究センター) における2年間の前向き縦断研究であり、軽度認知障害を認める高齢2型糖尿病患者を対象に、CGM (リプレ Pro)、認知機能試験 (Montreal Cognitive Assessment, Alzheimer's Disease Assessment Scale) を登録時、1年後、2年後と縦断的に行い、得られた血糖変動指標と認知機能試験スコアとの関連を解析する。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、脳小血管病変の変化 (MRI 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。

【進捗】

2019年3月-2020年6月の間に109名の患者を登録

した。サンプルサイズは当センターの統計解析室に推定を依頼し、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ることから20%の脱落を考慮すると $n = 95$ or 110 となる。以上より十分な登録数が得られたと考えられた。

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

(九州大学生体防御医学研究所)

【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、これら新規ポリペプチドがどのような機能を持つかを明らかにしていく。

【方法と結果】

今回われわれは、精子特異的に発現する lncRNA から翻訳される2つの新規ポリペプチドに着目した。興味深いことに、これら2つのポリペプチドは同一遺伝子座の第一エキソンが異なる2つのアイソフォームから翻訳されていた。さらに、これらポリペプチドはアミノ酸配列が全く異なるにも関わらず、どちらもミトコンドリアの外膜に局在する Voltage-dependent anion channel (VDAC) と非常に強く結合していた。VDAC は哺乳類では3種類のアイソフォーム (VDAC1~3) が存在し、VDAC3 欠損マウスは精子ミトコンドリアの形態異常により雄性不妊になることが知られている。そこで、2つの新規ポリペプチドを両方欠損するマウスを作製したところ、顕著な雄性不妊が見られた。この変異マウス由来の精子は、VDAC3 欠損精子と類似したミトコンドリアの形態異常を示した。次に、新規ポリペプチドをそれぞれ単独で欠損したマウスを作製したところ、どちらのポリペプチドを欠損しても受精能が低下したことから、こ

れらポリペプチドはVDACを協調的に制御していることが明らかとなった。

【考察】

以上の結果より、これら2つの新規ポリペプチドは、精子のミトコンドリア形成と受精能の獲得に必須の因子であることが明らかとなった。

脂質酸化依存性細胞死フェロトーシスを標的とした腎臓病治療薬の開発

三 島 英 換

(東北大学病院腎高血圧内分泌学分野)

【背景, 目的】

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

【方法, 結果】

培養細胞を用いたフェロトーシス誘導系においてCYP基質薬のスクリーニングを行った結果、プロメタジン (抗ヒスタミン薬)、リファンピシン (抗菌薬)、甲状腺ホルモン、エストロゲンを始めとして臨床利用可能な複数の薬剤およびホルモンにフェロトーシス抑制効果を見出した。これら薬剤の脂質酸化抑制を介するフェロトーシス抑制機序を検討した結果、これらの薬剤は共通して脂質酸化の連鎖反応に関わる脂質ペルオキシラジカルに対して高いスカベンジャー能を有することを明らかにした。これら薬剤のフェロトーシス抑制効果はいずれの細胞種 (腎臓、心筋、骨格筋、神経、がん・非がん) でも認め、さらに急性腎障害モデルおよび肝障害モデル

マウスにおいて各薬剤投与群では組織障害の軽減、組織内脂質酸化の抑制、ミトコンドリア形態保持を認めたためフェロトーシス抑制を介した臓器保護効果が示された。

【結語】

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

【文献】

Mishima E, Sato E, Ito J, Yamada KI, Suzuki C, Oikawa Y, Matsuhashi T, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki T, Ito S, Nakagawa K, Abe T. Drugs Repurposed as Antiferroptosis Agents Suppress Organ Damage, Including AKI, by Functioning as Lipid Peroxyl Radical Scavengers. *J Am Soc Nephrol.* 2020; 31: 280-296

白血病を維持する腫瘍エンハンサーの検索

村 川 泰 裕

(理化学研究所生命医科学研究センター)

【目的】

成人病の柱の一つに悪性疾患が含まれる。とりわけ白血病は、他の悪性疾患に比べて発症年齢が若く、社会的にも重大な疾病である。本研究課題では、白血病細胞を維持しているゲノム転写ネットワークの解明から、病態に基づいた新たな分子標的薬や予後予測バイオマーカーを目指す。

【背景】

エンハンサーは、細胞種に特異的に活性化し、標的となる遺伝子の発現を増大させ、ゲノムネットワークにおける中心的な役割を担う。申請者の所属機関で独自に開発されたCAGE法は、RNAの5'末端を次世代シーケンサーにより網羅的に解析する技術である。活性化した機能的なエンハンサーには、RNAポリメラーゼがリクルートされ、エンハンサー自体から両方向性にRNA (エンハンサーRNA) が合成される。従って、CAGE法によりエンハンサーRNAの5'末端を検出することで、一塩基レベルの高塩基解像度で活性化した機能的なエンハンサーを同定できる。しかし、エンハンサーRNAは

極めて短寿命であり、従来の CAGE 法ではエンハンサーの検出感度は極めて低かった。

【方法】

そこで、新生鎖 RNA を回収するための生化学的分画法を導入することで、エンハンサー RNA を超高感度に検出できる改良版 CAGE 法 (NET-CAGE 法) をオリジナルに開発した (Hirabayashi *et al. Nature genetics* 2019)。後天的なゲノム変異などによりエンハンサーが異常に活性化することが白血病においても重要であることが明らかになりつつある。そこで、京都大学血液・腫瘍内科との共同研究により、100 人の造血器悪性腫瘍の患者検体を用いて、我々の独自技術を適用して、エンハンサー解析を行った。

【結果】

独自解析の結果、白血病に特異的に活性化しているエンハンサーおよび未知の遺伝子などが新しく数万の単位で同定された。そして、新規の診断マーカーや治療標的候補と考えられる分子を同定することに成功した。今後、臨床データとも紐付けしたデータ解析や新規分子の機能解析を行い、白血病の病因・病態の解明を目指す。

【考察】

本研究により、エンハンサーや遺伝子から生成される数万単位の新規の RNA 分子を同定できた。白血病を特徴づけている分子ネットワークが患者毎にどの程度異なるのか、白血病を維持していると考えられる多数の未知 RNA 分子がどのような機能をしているのか、そして新しい治療標的を実際に生み出すことが可能なのか、などを今後明らかにしたい。

【文献】

Hirabayashi S., Bhagat S., Matsuki Y., Takegami Y., Uehata T., Kanemaru A., Itoh M., Shirakawa K., Takaori-Kondo A., Takeuchi O., Carninci P., Katayama S., Hayashizaki Y., Kere J., Kawaji H., Murakawa Y. NET-CAGE Characterizes Dynamics and Topology of Human Transcribed Cis-regulatory Elements. *Nature Genetics*, 51(9): 1369-1379 (2019)

がん免疫の成立機構に関する研究

諸石 寿朗

(熊本大学大学院生命科学研究部)

【目的】

腫瘍微小環境においてはがん細胞と免疫細胞が相互作用し、拮抗しながら腫瘍の運命を決定していく。細胞は常に自らの置かれた状況を感じ、細胞内外の環境変化に即応して増殖・分化・死などの細胞運命を適切に選択する。このメカニズムには、「細胞内シグナル伝達系」による環境変化に応じた細胞内プログラムの改変と、「代謝調節」による動力供給が協調して働くことが必要であり、その制御の中心を酵素が担う。われわれはこれまでの研究で、Hippo 細胞内シグナルや鉄代謝が広範な生命機能に必須の役割を担うことを明らかにしてきた。そこで、本研究においては、腫瘍微小環境においてがんに対する免疫応答が成立する仕組みを Hippo シグナルや鉄代謝の制御機構から理解することを目指している。

【方法】

がん細胞における鉄代謝が腫瘍の進展に与える影響を検証するため、鉄代謝動態を変化させうるマウスモデル [*Cell Metab.* 14, 339-51 (2011)] を用い、肝臓がんの進展における鉄代謝の役割を研究した。

【結果】

肝臓に鉄が蓄積するマウスでは、DEN による化学発がん、および HCV トランスジェニックマウスによる遺伝的発がんの両方が、強力に促進されることがわかった。このマウスでは酸化ストレスによる肝細胞傷害と代償性の細胞増殖、炎症が起きており、これががんの進展に寄与することが RNA シーケンス解析等で明らかになった。さらに、鉄代謝の適正な是正により、肝臓がんの進行が抑制されることも見出した。

【考察】

ヒトの肝臓がん患者においても鉄代謝異常が肝臓がんの増悪因子となることが示唆されたことから、これらの分子機能を是正する薬剤の開発は、肝臓がん進展の予防薬となることが期待される。そこで、本研究内容の継続課題として、これらの分子機能を制御する薬剤のスクリーニングや、さらに広義には、新規の鉄代謝関連分子

の発見や鉄量を変化させる薬剤の開発なども、肝臓がんの進展予防に重要であると考えられる。

【文献】

*Muto, Y., *Moroishi, T., Ichihara, K., Nishiyama, M., Shimizu, H., Eguchi, H., Moriya, K., Koike, K., Mimori, K., Mori, M., Katayama, Y., and Nakayama, K.I. Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis. *J. Exp. Med.* 216, 950-965 (2019). [*Equal contribution]

オルガネラ量の恒常性を司る仕組みの研究

柳谷 耕太

(九州大学生体防御医学研究所)

【目的】

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

【結果・考察】

ミトコンドリアに対するオルガネラ減少法、ミトコンドリア減少法を用いて、培養細胞をミトコンドリア不足状態にすると、細胞の増殖が停止することを見出した。

この細胞増殖の停止は ATP 不足ではなく、ピリミジンヌクレオチドの不足が原因であることが示唆されている。このミトコンドリア不足の状態では、G1/S 期で細胞周期を停止させる、GADD45A の発現が誘導されるので、この因子を介して細胞周期が停止している可能性がある。興味深いことに、thymidine によって細胞周期を G1/S 期に停止させた場合には、ミトコンドリア増殖が誘導される。このことから、細胞はミトコンドリア量が不十分な場合には、細胞周期を一度停止させ、ミトコンドリア量が十分になるまで増殖させた後に、再び、細胞周期を再開する、ミトコンドリア量チェックポイントを細胞は備えている可能性があるのではないかと、私は考えている。

【将来の展望】

オルガネラ減少法を用いて、オルガネラ不足に対する細胞応答の根底原理を明らかにする。

甲状腺ホルモン脱ヨード酵素を標的とした脂質・エネルギー代謝促進薬の開発

山内 一郎

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

甲状腺ホルモンは、LDL コレステロール低下作用やエネルギー代謝促進による抗肥満作用を有する。甲状腺ホルモン脱ヨード酵素には、1 型 (D1)、2 型 (D2)、3 型 (D3) の 3 種類があり、それぞれ臓器毎に分布が異なっている。我々はこれらの発現制御により臓器特異的な甲状腺ホルモン作用調節を可能とし、治療へ応用することを目指している。

2018 年度は、プロモーターアッセイを基盤としたハイスループットな系を開発し、臨床応用されている薬剤のライブラリー (2560 種類) を用いたスクリーニングを実施した。正と負に制御するものについてそれぞれ、D1 は 6 個、5 個、D2 は 34 個、5 個、D3 は 5 個、2 個のヒット化合物が得られた。

2019 年度は、ヒット化合物が生体作用を示すかを検証するにあたり、患者コホートを構築し、各ヒット化合物の内服前後での変化をレトロスペクティブに解析し

た。これは臨床応用されている化合物のライブラリーを用いるが故に可能な新手法である。

【方法】

2005年から2018年の期間に京都大学医学部附属病院糖尿病・内分泌・栄養内科に通院歴があり、甲状腺機能を測定されていた患者を電子カルテシステムで検索した。次いで検証するヒット化合物の内服開始前後3ヶ月以内に甲状腺機能を測定された患者データのみを抽出し、甲状腺機能を修飾する疾患や治療歴を有する症例を除外して、解析するコホートを構築した（京都大学医の倫理委員会承認済）。

【結果・考察】

既知のD2発現を増加させる化合物であるアドレナリン受容体作動薬について、化合物A内服後にTSH低下とfT3/fT4比上昇が認められた。次に未報告のクラスについて、D2発現を増加させる化合物B内服後にfT3上昇、D2発現を減少させる化合物C内服後にfT3/fT4比低下が見られた。これらはD2活性の変化として矛盾しない結果であった。現在D1, D3についても検証を進めている。

このようにコホート研究により生体作用が確認された化合物について、標的臓器における甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の変化が実際に生じていることを確認するため、マウスへの投与実験を準備中である。

マウスを作成し、脂肪細胞NAMPT-NAD⁺合成系が、全身のインスリン抵抗性・エネルギー代謝を制御する事を報告した(PNAS 2019, Cell Rep 2016)。

さらに、2型糖尿病に代表される代謝疾患においてNAMPTの酵素反応産物であるNMN (nicotinamide mononucleotide) などのNAD⁺中間代謝産物が主要代謝臓器のNAD⁺量を回復し、病態を改善することも報告されている(図1)。

近年申請者の研究室では、高脂肪食により生じる腸管の炎症が、脂肪組織の炎症に伴うインスリン抵抗性発症に先行することを見出し(Cell Metab 2016)、代謝疾患発症における腸管の重要性を報告している。以上の知

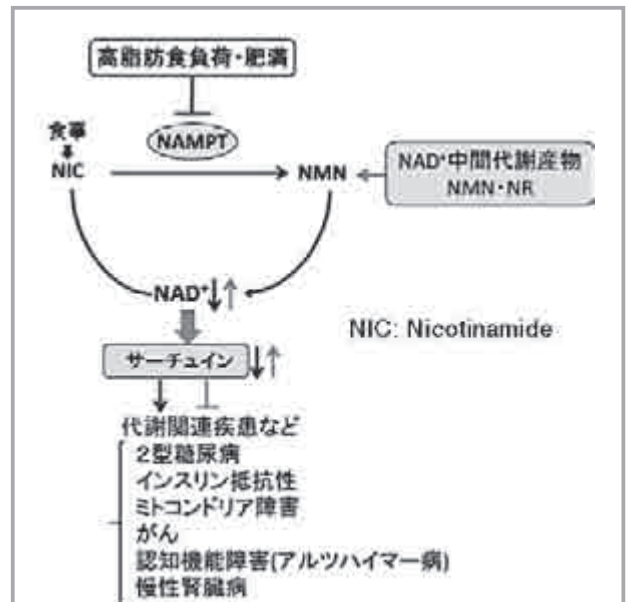


図1 哺乳類 NAD 合成系および代謝疾患制御 (生化学 第87巻2号239-244, 2015山口ら, 改)

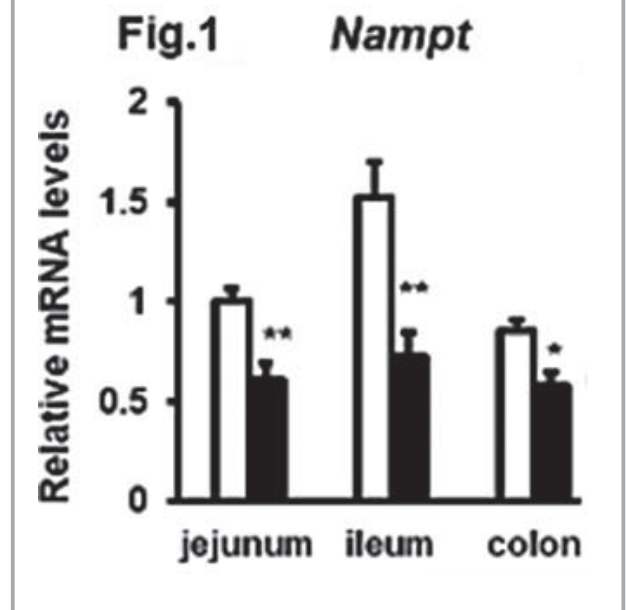
腸管 NAMPT-NAD⁺合成系を標的とした NAD⁺中間代謝産物 NMN によるインスリン抵抗性発症予防法の開究研究

山口 慎太郎

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

哺乳類 NAD⁺(nicotinamide adenine dinucleotide) 合成系の鍵酵素である NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) は環境・栄養状態に応答することで NAD⁺量を調節し、サーチュインに代表される NAD⁺消費酵素を介して代謝、老化などの生物学的な多彩な局面で重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。実際に、申請者は脂肪細胞特異的 *Nampt* ノックアウト



見を元に、2型糖尿病の先制的な発症予防法を確立するために、腸管のNAMPT-NAD⁺合成系に着目した。

【方法・結果】

①高脂肪食負荷による腸管NAMPT-NAD⁺合成系の評価

C57BL/6J オスマウスに高脂肪食負荷を8週間行ったところ、随時血糖は上昇し、通常食群と比較して小腸・大腸 *Nampt* 発現量が有意に低下した (Fig. 1)。

①腸管NAMPT-NAD⁺合成系の糖代謝における役割の検討

腸管上皮細胞特異的 *Nampt* ノックアウト (KO) マウスを新規に作成した。通常食投与下において、対照群およびKO群を用いて、インスリン抵抗性および糖代謝の評価を行った。インスリン腹腔内投与試験およびブドウ糖腹腔内投与試験での血糖値の変化には2群間で有意な差は認めなかったが、経口ブドウ糖負荷試験では、KO群で有意な血糖値の上昇を呈した。そこで、インクレチンGLP-1の前駆体、回腸 *Proglucagon* 発現量を評価したところKO群で有意な低下を認めた。

【考察】

腸管上皮細胞NAMPT-NAD⁺合成系は、インクレチン分泌を制御する可能性が示唆された (論文投稿準備中)。

Vascular Biology Innovationに関する研究助成

アルドステロン過剰におけるアルカローシス依存性の Pendrin 制御機構の解析

鮎澤 信宏

(東京大学先端科学技術研究センター)

【目的】

腎皮質集合管の β -間在細胞に発現する Pendrin は当初塩基排泄を担う因子として発見されたが、昨今レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系による調節を受けて NaCl 再吸収に働き血圧調節に関与することが明らかとなった。最近我々は、1 次性のアルドステロン過剰時には、集合管主細胞の MR-ENaC 経路の活性化により起こる低 K 血症性代謝性アルカローシスが Pendrin を活性化し食塩感受性高血圧の形成に寄与することを報告した¹⁾。一方、外因性のアルカリ負荷時には尿中 α ケトグルタル酸 (α KG) が増加し、その受容体である GPR99 を介して Pendrin が活性化して塩基排泄に働くことが報告された。そこで今回、アルドステロン過剰時や低 K 血症性代謝性アルカローシス誘導時の尿中 α KG の変化につき検討した。

【方法と結果】

マウスに高食塩食・アルドステロン投与を行ったところ低 K 血症性代謝性アルカローシスを呈し、腎において高度の Pendrin の発現量増加と管腔側膜上への集積を認めたが、尿中 α KG に変化は見られなかった。一方、マウスに重曹投与による外因性アルカリ負荷を行うと、尿中 α KG の著明な増加を認め、中程度の Pendrin 発現量増加と管腔側膜上集積を認めた。他方、重曹投与に低 K 食投与を加えて低 K 血症を起こし、より高度のアルカローシスを生じさせたところ経口重曹投与時に比べて Pendrin 変化は増強したが、この際に尿中 α KG は重曹投与単独時に比べて増加しなかった。

【考察】

以上の結果から、アルドステロン過剰時の低 K 血症

性代謝性アルカローシスによる Pendrin 制御は外因性のアルカリ負荷時に働く α KG-GPR99 経路とは異なる機序により起こることが示唆された。なお最近、アルカリ負荷時には pH センサー分子を介した経路による Pendrin 制御も起こることが報告されており、今後同分子による経路がアルドステロン過剰時の低 K 血症性代謝性アルカローシスによる Pendrin 制御に関与しているか検討する予定である。

【文献】

- 1) Ayuzawa, N., *et al.*: Two Mineralocorticoid Receptor-Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons, *J Am Soc Nephrol.*, 31, 748-764 (2020).

免疫学的介入に基づく循環器病に対する新規治療法の開発

安西 淳

(慶應義塾大学医学部)

心筋梗塞 (MI) に対する再灌流療法の発達は急性期死亡率を劇的に低下させたが、重症例の救命によって梗塞後左室リモデリングによる慢性心不全の有病率をむしろ増加させるというパラドックスを生んだ。MI 後組織修復の過程には免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、これらが一度過剰になるとかえって組織障害を進展させ、梗塞後心不全を増悪させてしまう。MI 後に免疫応答や炎症反応が過剰となる機序は未だ不明であり、これらが明らかとなれば、新たな治療標的となり得ると考えられる。申請者はマウス MI モデルを用いて網羅的遺伝子解析を行い、梗塞部で遺伝子 X が上昇していることを見出した。X はマイトジェン誘導性遺伝子で、細胞増殖・生存などに関与することが白血病などの悪性腫瘍における研究で知られているものの、MI を含めた心血管疾患における X の役割は全く知

られていない。

本研究では MI 後組織修復の過程における X の役割を明らかにするために、X のノックアウトマウス、X-GFP レポーターマウス、さらに X-flox マウスを用いる。これらの遺伝子改変マウスは、*in vivo* での X の役割を明らかにするための強力なツールである。申請者はこれまでに、1) X のフルノックアウトマウスでは MI 後の生存率や心機能が改善すること、2) X のフルノックアウトマウスでは、過剰な炎症に寄与する Ly6C^{high} 単球の浸潤が顕著に抑制されること、3) X の発現細胞として心臓間質細胞が重要であり、Ly6C^{high} 単球の遊走因子である CCL2/CCL7 の強力な産生源であること、4) MI 後、X の発現が上昇するにも関わらず、従来 X の下流の分子として知られる遺伝子群の発現に大きな変化を認めなかったこと、などを見出し、今後心臓間質細胞と骨髄由来炎症細胞のクロストーク、および X の下流に位置する未知のカスケードの解明に主眼を置き、X が MI 後の過剰な炎症を増悪させ、新たな治療標的となり得るという仮説を検証していく。

薬理的なミトコンドリア機能制御を介した新たな虚血再灌流傷害に対する治療法の確立

池田 昌隆

(九州大学大学院医学研究院)

【目的】

Ischemic preconditioning (IPC) は事前の一時的な心筋虚血の誘導によりその後の虚血再灌流傷害が減少する現象であり、IPC から発展した遠隔部位の一過性虚血により誘導される remote IPC (RIPC) は虚血再灌流傷害を予防し得るとして長らく臨床への応用が期待されてきた¹⁾。しかしながら、近年報告された 2 つの大規模臨床試験では待機的 CABG における RIPC の有効性は確認されず²⁻³⁾、IPC を利用した新たな治療戦略の確立が求められている。本研究では、Hif-1 α が好気性代謝から嫌気性代謝に metabolic shift を誘導することに着目し、新規 PHD 阻害薬であるロキサデュスタットを用いることで Hif-1 α を介した薬理的な IPC の再現により心筋虚血再灌流傷害を抑制し得るかを検討した。

【方法】

ラット単離培養心筋細胞においてロキサデュスタットが代謝変化を誘導するかを Flux Analyzer (XFp) を用いて検証した。さらに C57BL/6J マウスにおいてロキサデュスタットの事前投与が虚血再灌流傷害 (45 分虚血、6 時間再灌流) を抑制し得るかを検証した。

【結果】

XFp による解析では単離培養心筋細胞においてロキサデュスタット添加 (25 μ M) により有意な Extracellular Acidification Rate (ECAR) の増加を認め、Oxygen Consumption Rate (OCR) の低下を認めた。次にロキサデュスタットを虚血再灌流モデル作成 4 時間前に単回投与 (25 mg/kg/回、皮下注射) したところ、虚血再灌流モデルにおける梗塞巣は有意に縮小し、血中のクレアチニンキナーゼおよび虚血部位の TUNEL 陽性細胞を有意に抑制した。

【考察】

本研究は Hif-1 α による低酸素応答を介した虚血耐性を新規 PHD 阻害剤であるロキサデュスタットを用いて薬理的に再現し、その虚血再灌流傷害の抑制効果を明らかにした。この主たる分子機序は低酸素応答の一つである酸素代謝の変化による虚血耐性であると考えられるが、Hif-1 α は数百の遺伝子を制御する転写因子であることから、実際には代謝変化を含めた複数の分子機序により虚血耐性が誘導されたものと推測される。心筋代謝を嫌気性代謝に移行させることで虚血中の ATP 産生を維持することで虚血傷害を軽減したと考えられるが、一方で好気性代謝を抑えることで虚血中の組織酸素濃度を維持し、また再灌流時の活性酸素産生を抑制したことも、虚血再灌流傷害の軽減に寄与したと考えられた (Deguchi and Ikeda *et al.*, *Circ J* 2020)。

【文献】

- 1) Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, *et al.* Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2007; 370: 575-9.
- 2) Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, *et al.* Remote Ischemic

Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1408-17.

- 3) Meybohm P, Bein B, Brosteanu O, Cremer J, Gruenewald M, Stoppe C, *et al.* A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1397-407.

血液中異常タンパク質の分解経路の研究

板倉 英祐

(千葉大学大学院理学研究院)

【目的】

血液には高濃度のタンパク質が循環している。しかし血液中（細胞外）のタンパク質の品質管理システムはよくわかっていない。そこで、細胞外シャペロンが細胞外の変性タンパク質をリソソームへ運び分解するシステムがあると仮説した。

【方法】

細胞外タンパク質分解に関する因子として細胞外シャペロンの一つ Clusterin に着目した。精製した Clusterin タンパク質（赤色蛍光と融合）を変性タンパク質とともに培養培地へ添加し、培養細胞に Clusterin-変性タンパク質が取り込まれると赤色蛍光が蓄積する実験システムを構築した。

【結果】

変性タンパク質は Clusterin と複合体を形成し、細胞内に取込み分解されることがわかった。さらに Clusterin-変性タンパク質複合体を認識する細胞膜上の受容体の網羅的遺伝子スクリーニングをした。その結果、ヘパラン硫酸受容体が Clusterin-変性タンパク質の細胞膜表面受容体となっていることを見出した。

【考察】

今回の研究から血液中（細胞外）の異常タンパク質を選択的に分解するタンパク質品質管理システムが存在することを世界で初めて明らかとした¹⁾。この選択的な分解システムのより詳細な分子機構や、基質選択性など、この分野を拡張発展していく礎となる成果を導いた。またリソソームタンパク質分解の研究を促進するため、リ

ソソームの分解活性を測定する蛍光プローブの新規開発にも取り組み、新規リソソーム活性測定用蛍光タンパク質プローブの開発にも成功した²⁾。

【文献】

- 1) Itakura E*, Chiba M, Murata T, Matsuura A. (*single corresponding author) Heparan sulfate is a clearance receptor for aberrant extracellular proteins. *J Cell Biol.* 2020 Mar 2; 219 (3). pii: e201911126
- 2) Ishii S, Matsuura A, Itakura E. Identification of a factor controlling lysosomal homeostasis using a novel lysosomal trafficking probe. *Sci Rep.* 2019 Aug 12; 9(1): 11635

臓器特異的なペリサイトの機能解析

加藤 勝洋

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

毛細血管の内腔は一層の血管内皮細胞で覆われており、そのすぐ外側にペリサイトが内皮細胞と基底膜を共有して存在している。私は、脳、肺、心臓、網膜、脂肪に存在するペリサイトを単離し、いくつかの液性因子の発現を検証すると、血管内皮細胞と同様にペリサイトにおいても液性因子の発現パターンが臓器特異的であることを示唆する結果を得た。この結果から、ペリサイトもアンジオクリン因子を介して臓器特異的な生理現象を調節している可能性が示唆される。これらの組織の中で、本研究では、脂肪に存在するペリサイトに注目して機能を理解することを目的とする。

【方法】

褐色脂肪組織において、ペリサイトのマーカーの1つである PDGFR β のプロモーター下に特異的に Cre を発現誘導可能なマウス系統 (Pdgrfb-CreERT2) とレポーターマウスを用いて、免疫染色法にて細胞の局在および形態観察を行った。さらに細胞系譜追跡実験を行い、新生仔から成体になる脂肪新生過程での動態を解析した。

【結果】

Pdgrfb-CreERT2 マウス系統と蛍光蛋白質である

GFP を発現するレポーターマウスを組み合わせることで血管周囲細胞に対して新生仔から成体である 8 週齢まで細胞系譜実験を行うと、褐色脂肪細胞の 4 分の 1 が新生仔の時の血管周囲細胞由来であることが明らかとなった。さらに、その細胞周辺の脂肪細胞は、脱共役タンパク質 (UCP1) の発現が亢進していることを見出した。

【考察】

本研究により、脂肪新生過程において褐色脂肪組織に存在する血管周囲細胞から脂肪細胞に分化することが明らかとなった。さらに興味深いことに、血管周囲細胞由来脂肪細胞の周囲で熱産生効率が高いことが示唆された。今後さらに血管周囲細胞から分化する脂肪細胞の褐色脂肪組織における生理的意義を明らかにしていく予定である。

【文献】

Kato K, Diéguez-Hurtado R, Park DY, Hong SP, Kato-Azuma S, Adams S, Stehling M, Trappmann B, Wrana JL, Koh GY, Adams RH.: Pulmonary pericytes regulate lung morphogenesis. *Nat Commun.* 9: 2448. (2018)

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

菊地 良介

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) には、寛解導入療法後の予後を予測するための効果的なマーカーの開発が求められている。本研究は、血管内皮細胞成長因子 (VEGF-A) の質に着目し、AAV の治療効果を評価するために、AAV 患者での寛解導入療法前後の VEGF-A と抗血管新生因子 (VEGF-A_{165b}) の血中濃度変化と寛解までの日数との関連について評価することを目的とする。

【方法】

AAV を有する日本人患者の寛解導入療法前向きコホート研究 (RemIT-JAV-RPGN) に登録された患者

検体 (n = 172) のうち、AAV の寛解導入療法開始前と開始後 6 か月の血清サンプルが取得できた 57 人を対象とし、血中 VEGF-A (sVEGF-A) 及び VEGF-A_{165b} (sVEGF-A_{165b}) 濃度を測定した。

【結果】

AAV は、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (GPA)、顕微鏡的多発血管炎 (MPA) の 3 疾患に大別することができる。そこで、RemIT-JAV-RPGN 登録検体を用いて寛解導入療法前後での sVEGF-A 及び sVEGF-A_{165b} の濃度変化について AAV サブタイプ毎に評価した。その結果、MPA 患者では、sVEGF-A ($p < 0.001$) が、EGPA 患者では、sVEGF-A_{165b} ($p = 0.023$) が寛解導入療法前後で有意な減少が認められた。その一方で、GPA 患者における治療 6 か月後の sVEGF-A および sVEGF-A_{165b} 濃度は治療前と同等のレベルにもかかわらず、相関分析から sVEGF-A および sVEGF-A_{165b} は寛解までの日数と負の相関があることが明らかになった ($r = -0.67$, $p = 0.046$ および $r = -0.78$, $p = 0.014$)。

【考察】

今回の我々の結果から、sVEGF-A 及び sVEGF-A_{165b} は GPA 症例での寛解導入療法による寛解までの日数を評価できる有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

新規単球サブセットによる高次血管ネットワークの編成機構の解明

木戸屋 浩康

(大阪大学微生物病研究所)

【目的】

腫瘍組織の隅々にまで張り巡らされた血管ネットワークは、酸素や栄養分を供給することで腫瘍の増大に働いている。腫瘍血管の形成は主に血管新生と呼ばれる過程によって進められるため、血管新生の抑制による「兵糧攻め」のコンセプトに基づく癌治療法の開発が進められてきた。その結果、VEGF 阻害剤を始めとする血管新生阻害剤が臨床で使用されているが、期待に反して単独で使用した場合にはほとんど抗腫瘍効果を示さなかった。

しかしながら、腫瘍増殖における血管系の重要性は疑いようが無く、血管新生阻害剤が効果的でない理由は未解明のまま残されている。本研究では、血管新生阻害剤に対する治療抵抗性を創出されるメカニズムの解明を目的とし、生体内イメージング解析を基軸とした解析を進めた。

【方法および結果】

腫瘍組織中における血管形成過程を時空間的に明らかにするため、血管イメージングマウス (Apelin-TdTomato BAC Tg) の大脳表層部にグリオーマ細胞を同所移植し、多光子共焦点レーザー顕微鏡にて撮影を行った。その結果、血管新生阻害剤の投与は新たな血管の形成を抑制する一方で、腫瘍組織中の残存血管の構造変化が誘導されることで、腫瘍増殖が再開していることが明らかとなった。そこで、この血管構造変化の制御機構を明らかにするため、血管新生阻害剤投与後の腫瘍組織に起きる変化を検討したところ、特殊なミエロイド系細胞サブセット (血管制御ミエロイドと命名) が関与していることを発見した。シングルセル遺伝子発現解析を行うと、腫瘍随伴マクロファージや骨髄由来抑制細胞とは異なる新たな細胞集団であることが明らかとなった。さらに、血管制御ミエロイドから産生されて血管再分布の誘導に関わると予測される幾つかの分子を同定した。現在は、これら分子の阻害によって血管新生阻害剤による抗腫瘍効果が改善されるかの検討を進めている。

【考察】

明確なコンセプトに基づく「腫瘍血管を標的としたがん治療法」は、従来の抗がん剤と比較して副作用が少ないことから大きな期待を受けていた。しかしながら、VEGF 阻害剤による治療効果が振るわなかったため、現在ではがん研究の主軸からは外れてしまっている。本研究で提示された血管新生阻害剤への治療抵抗機構の実態は、我々の想定を超えたものであり、途絶えていた「腫瘍血管を標的としたがん治療法」の実現に繋がるものと期待できる。

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

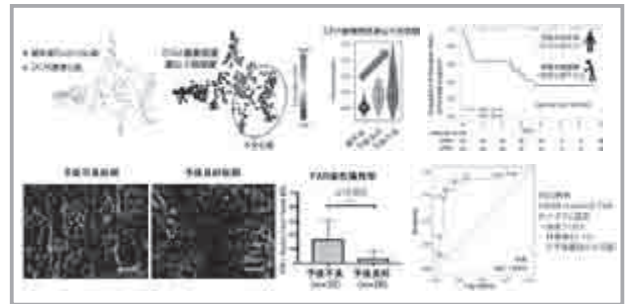
候 聡 志

(東京大学大学院医学系研究科)

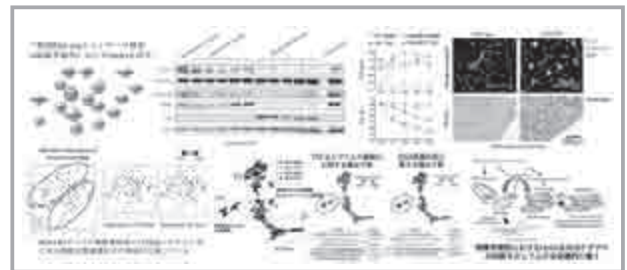
【背景・目的】

心臓は様々な細胞集団によって構成され、その恒常性の破綻は心不全をもたらす。本研究に関連して、申請者らは昨年度、心筋細胞や非心筋細胞を用いた一細胞解析を通して、以下のような成果を得た。

① 心不全患者の心筋一細胞 RNA-seq 解析により、心筋 DNA 傷害の程度が心不全患者の臨床的予後・治療応答性を規定していることが分かり、治療前心筋生検組織の DNA 傷害マーカーの染色によってこれらを高精度に予測可能である^{1,2)}。



② 心不全モデルマウスの一細胞 RNA-seq 解析により、線維芽細胞における機能未知なプロテアーゼである HtrA3 を同定した。HtrA3 は TGF β 1 の分解を介して TGF β シグナルを制御することで、線維芽細胞のみならず、間接的に心筋細胞にも影響してその線維化形質や DNA 損傷応答を制御する (Ko *et al.* in preparation).

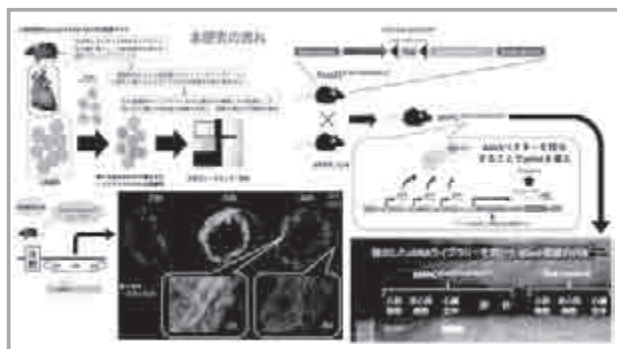


このように一細胞 RNA-seq 解析によって心不全の治療ターゲットとなり得る多くの機能的因子が同定される。近年 *in vitro* レベルで盛んに研究されている Perturb-seq の実験系は Cas9 発現細胞に各種 gRNA ラ

イブラリーを加えて一細胞レベルで様々な遺伝子欠損を生じさせ、その結果生じる Transcriptome の変化を RNA-seq でハイスループットに調べるものだが、本研究ではこれを *in vivo* で行うことを目的としている。

【方法・結果】

dCas9-KRAB-MeCP2 コンストラクトを含む flox マウスを作成し、これを心筋細胞特異的な aMHC-Cre マウスと交配させて心筋細胞特異的に dCas9-KRAB-MeCP2 が発現するマウス系統を樹立した。その心臓から心筋細胞、非心筋細胞を単離して cDNA ライブラリーを作成して解析した結果、確かに心筋細胞でのみ目的の dCas9 コンストラクトが発現していることが確認された。また、dCas9-KRAB-MeCP2 に作用する gRNA は AAV9 ベクターに搭載して心臓に導入する予定だが、予備実験の結果、AAV9 注射後 2～3 週目に最も遺伝子導入効率が高いことが分かった。



【考察】

以上のように *in vivo* Perturb-seq の準備が順調に進行しつつあるが、将来的に成獣マウスの心筋細胞に各種 gRNA を導入したとしても、細胞サイズの関係でそれを FACS で回収することが困難なことが予想される。現在は新生児マウスに AAV9 ベクターを腹腔内注射投与することで、同様に gRNA の導入が可能か検証中である。もし新生児の段階で投与して 2 週後程度で細胞をサンプリングできれば、大口径ノズルの FACS を用いることで細胞 sorting を行うことができ、効率よく gRNA 導入心筋を回収することができる。今年度は実際に心筋細胞の一細胞解析や心筋症ゲノム解析の結果を基に作成した AAV9-gRNA ライブラリーをマウスへの投与し、解析を進めていきたい。

【文献】

1) Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T,

Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, Ito M, Fujita K, Harada M, Toko H, Kobayashi Y, Ito K, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Komuro I. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun.* 9 (1), 4435 (2018).

2) Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H, Fukayama M, Aburatani H, Komuro I. Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 4 (6), 670-680 (2019).

ヒト血管内皮コロニー形成細胞の細胞小胞を介した網膜神経血管保護作用

崎 元 晋

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

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

【方法】

EV は 48 時間培養し 0.22 μ m のフィルターを通したのち、10kDa の MWCO を用いて超遠心 (4000 x g, 45min) を行ったのち、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。BCA タンパク質アッセイを用い、可溶性タンパクの少ない EV の濃縮に適した溶出分画を決定し、それらの EV サンプルを UF-SEC-UF-1-EV (Serial ultrafiltration (UF), size exclusion chromatography (SEC) extracellular vesicle) サンプルとし、残りの分画に再度同様に超遠心、アッセイを行い、得られた EV サンプルを UF-SEC-UF-2-EV とした。上記方法を用いて CD-XXhi および CD-XXlo の ECFC から EV を単離し、虚血性網膜症モデルである酸素誘導性網膜症 (Oxygen induced Retinopathy: OIR) モデルおよび網膜視細胞変性モデルマウス (RD10 マウス) に注射し、虚血および新生血管の改善および神経保護効果を検討した。

【結果】

EV に対する透過型電子顕微鏡所見では、UC-EV に比較し、UF-SEC-UF-1-EV および UF-SEC-UF-2-EV では巨大タンパクの凝集がみられなかった (図2 および赤矢印, バーは 0.2 μ m)。また、NTA 計測においても UF-SEC-UF は UC に比較して有意に多くの EV が認められた。生後 (P) 7 日からマウス仔を 75% 酸素チャンバーで 5 日間飼育する OIR モデルにおいて、P12 に CD-XXhi より分離された EV (CD-XXhi-EV) および CD-XXlo-EV を硝子体注射したところ、CD-XXhi-EV は CD-XXlo-EV に比較して、有意に新生血管 (neovascularization) の退縮効果および虚血 (Vaso-obliteration) の改善効果が認められた (図3)。RD10 マウスにおいても視細胞層の厚みが保たれており、神経保護効果が認められた (図4, 5)。

【考察】

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

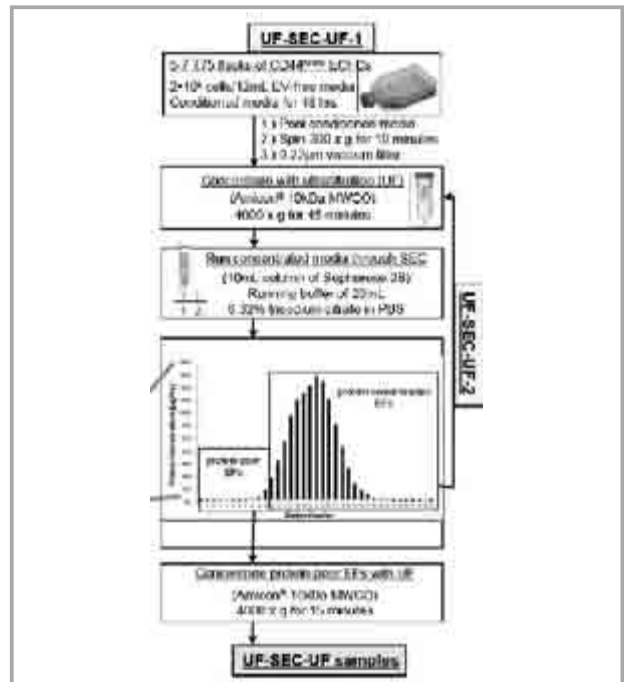


図1

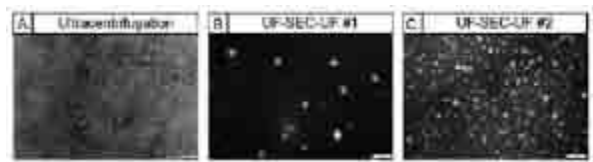


図2

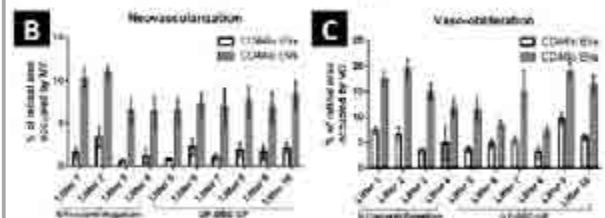


図3

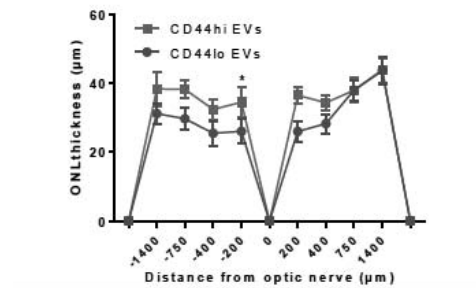


図4

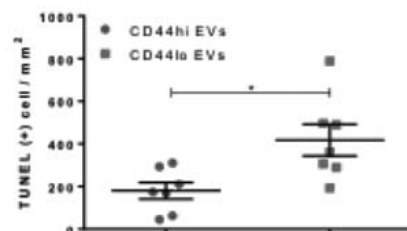


図5

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)

【目的】

本研究は、高血圧における電氣的ニューロモデュレーションの効果を検証することを目的としている。

【方法】

神経刺激装置の確立に平行し、ダール食塩負荷ラットの確立と電気刺激に先行し同ラットにおける薬物的副交感神経活性化の効果を検証した。6週令のダール食塩負荷ラット (N = 10) を用い、血圧測定を行いつつながら、生存率を観察した。また、別のダール食塩負荷ラット (N = 10) において、ドネペジル塩酸塩経口投与 (5mg/kg/day を 14 週令より投与) による血圧および心不全進展、生存率への影響を検証した。

【結果】

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。

【考察】

ダール食塩負荷ラットの心不全進展を確認した。ドネペジルは、ダール食塩負荷ラットでは明らかな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。今後、迷走神経刺激装置を同モデルに用いる場合においても、心不全前期からの介入が必要であると考えられた。

【文献】

研究推進の過程で得られた知見を基に以下の論文報告を行った。

- 1) Deguchi H *et al.*: Roxadustat Markedly Reduces Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Mice. *Circ J.* 84 (6): 1028-1033 (2020).
- 2) Tohyama T *et al.*: Smart Baroreceptor Activation

Therapy Strikingly Attenuates Blood Pressure Variability in Hypertensive Rats With Impaired Baroreceptor. *Hypertension.* 75 (3): 885-892 (2020).

- 3) Shinoda M *et al.*: Suppressed baroreflex peripheral arc overwhelms augmented neural arc and incapacitates baroreflex function in rats with pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol.* 104 (8): 1164-1178. (2019).

心不全におけるΩ6脂肪酸リノール酸の役割

高 田 真 吾

(北翔大学生涯スポーツ学部)

【目的】

心不全を予防・治療できる「バランスの取れた食事」の確立・開発のために、心不全患者における実際の食事構成やそれに関与する分子機序の特定を再検討する必要がある¹⁾。現在、心不全患者の食事（療法）に関しては、水分と塩分の制限のみが推奨されている。一方、必須栄養素の一つである脂肪は分解され、脂肪酸としてエネルギー基質や膜成分としての役割をもつ。特に、必須脂肪酸であるオメガ (Ω) 6 脂肪酸のリノール酸 (18:2) は、ミトコンドリア特有のリン脂質であるカルジオリピンの主要成分となる。カルジオリピンはミトコンドリア膜に存在し、酸化的リン酸化 (OXPHOS) 複合体の構造的な安定化に関与し、カルジオリピンレベルの低下はミトコンドリア OXPHOS 複合体の合成低下を促進するが、食事によるリノール酸の摂取がこれらの複合体の会合と心機能障害を改善できるかは不明である。

【方法および結果】

NYHA III の心不全患者 (n = 15) は、NYHA II の心不全患者 (n = 93) と比較して、食事によるリノール酸の摂取量が少なく、一方で、他の脂肪酸摂取量には差がなかった²⁾。心筋梗塞後心不全モデルマウスにおける心筋ミトコンドリア機能 (Oroboros, Oxygraph-2k) と同様に、単離ミトコンドリア当たりのカルジオリピン (質量分析) は減少した。心筋培養細胞におけるカルジオリピン合成酵素 (*Crls1*) の欠損はミトコンドリア

超複合体 (complex I/III2/IV 複合体など) の会合 (BN-PAGE), ならびに complex II サブユニット複合体の会合を低下し, それらはカルジオリピン量と有意に相関した。そこで, 心不全マウスへの食餌によるリノール酸の投与はミトコンドリア複合体の complex III2/IV, complex II サブユニット複合体の会合, ミトコンドリア呼吸能および心機能 (心エコー) を部分的に改善した。しかしながら, ミトコンドリア超複合体の complex I/III2/IV 複合体の会合不全はリノール酸の食事摂取によって修復されなかった。

【結論および考察】

リノール酸の栄養補助は, 心不全を改善するのに有益であるが, 心不全を完全に治すことはできなかった。

リノール酸の過剰摂取は有害である可能性が示唆されているが³⁾, 本研究による適度なリノール酸摂取が心不全における左心室機能, 心筋ミトコンドリア機能を改善する分子基盤の一助であることを示した²⁾。さらに, その摂取不足が心不全の重症度と関連するため, 心不全患者におけるΩ6 脂肪酸リノール酸の適切な量の摂取や栄養指導が求められる。

【文献】

- 1) **Takada S** (Corresponding author), Sabe H, Kinugawa S. Abnormalities of skeletal muscle, adipocyte tissue, and lipid metabolism in heart failure: practical therapeutic targets. *Front Cardiovasc Med* 2020 in press.
- 2) Maekawa S, **Takada S** (Corresponding author), 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* 17: 128, 2019.
- 3) Ramsden CE, Zamora D, Leelarthaepin B, Majchrzak-Hong SF, Faurot KR, Suchindran CM, Ringel A, Davis JM and Hibbeln JR. Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis. *BMJ* 346:

e8707, 2013.

多能性幹細胞における代謝機構に基づく細胞作製と心臓再生医療への応用

遠山 周 吾

(慶應義塾大学医学部)

ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含む様々な細胞に分化する能力を有するため, 心臓再生医療への応用が期待されている。一方で, ヒト多能性幹細胞を用いた心臓再生医療における臨床応用を実現化するためには多くの課題を克服する必要がある。その最も重要な課題の1つは, 分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き, 効率よく心筋細胞のみを作製する技術の確立であった。我々はこれらの課題に対して, ヒト多能性幹細胞と分化心筋細胞の代謝プロファイルを詳細に解析することにより, 培養環境により分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き, 分化心筋細胞のみを効率よくかつ大量に純化精製するという画期的手法を構築することにより克服することに成功した (Tohyama, *et al. Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016, *Stem Cell Rep* 2017)。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 (in revision), 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, 特定の代謝産物を増強することにより, ヒト多能性幹細胞の増殖が促進されることを見出した (in revision)。本研究成果は, 安価に大量のヒト多能性幹細胞および分化心筋細胞を作製することに繋がるため,

再生医療における臨床応用あるいは産業化の推進に貢献することが期待できる。

【文献】

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

iPS 細胞を用いた創薬研究

内藤 篤彦

(東邦大学医学部)

【背景】

心不全は高血圧や心筋梗塞といった様々な疾患が原因となって心臓に負荷がかかり、そのポンプ機能が失われた結果引き起こされる症候群である。遺伝子改変マウスの表現型解析を中心とした研究から、マウス心不全における心筋細胞の異常の原因と考えられる分子やメカニズムが数多く報告されているものの、人間の心不全治療薬開発にはつながっていない。これまでの心不全研究が人間の心不全治療薬の開発につながらない理由の一つとしてマウスと人間の心臓における種間差が考えられる。

ヒト iPS 細胞の樹立法が確立したことにより、倫理上の観点からこれまで利用することができなかった「ヒト心筋細胞」を利用した創薬研究が可能になった。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は成人の心臓に存在する心筋細胞とは大きさや形が大きく異なるものの、少なくとも従来のマウスやラットの胎児・新生児心筋細胞を利用した研究よりはヒト心臓に対する外挿性が高い結果が得られると考えられる。

助成者はこれまで、心不全モデルマウスにおいて非致死的な DNA 一本鎖切断が蓄積した心筋細胞が増加しており、病態を悪化させる要因になることを報告している (Higo T, Naito AT, et al. *Nat Commun*, 8, 15104, 2017)。心不全患者の心臓でも心筋細胞への DNA 損傷蓄積が報告されており、DNA 損傷は心不全の病態を形成する重要な要因の一つと考えられる。

【目的】

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPSCM) を利用して心不全に対する治療効果が期待できる化合物を同定することである。

【方法】

昨年度までの研究から助成者は、市販 hiPSCM を特定の幅で線状に培養することで収縮に配向性を持たせることで、ヒト心臓が示す生理的な表現型を模倣する独自の培養モデルを構築している。

本年度は当該モデルを用いて培養している hiPSCM に対して様々な条件で DNA 損傷を加えることで、強い細胞死を誘導することなくその収縮・弛緩運動を持続的に低下させる細胞モデルを確立するとともに、治療薬の候補となる化合物を作用させ、DNA 損傷による hiPSCM の収縮・弛緩運動を予防およびまたは改善させる化合物を同定する。

【結果】

心筋細胞に DNA 損傷を加えるための手法として、抗がん薬であるドキソルビシンを利用した。ドキソルビシンには強い心機能毒性が知られているが、工夫を加えることなく作用させると強い細胞毒性から hiPSCM は 2 から 4 日かけて死滅してしまう。そこで、臨床においてがん患者に投与した際の薬物動態を模倣するような形でドキソルビシンをさせたところ、収縮・弛緩運動機能が 4 日を底として低下し、その後 2 週間かけてドキソルビシン投与前の 80% 程度までの回復が観察された。

ドキソルビシンの心機能毒性は総投与量に比例して蓄積性に進むことが知られている。そこで、初回のドキソルビシン投与から 2 週間後に再度ドキソルビシンを作用させたところ、初回と同様に収縮・弛緩運動機能は 4 日を底として低下したが、その後の回復が 7 日目には停止し、進行性に収縮・運動機能が低下していった。これはドキソルビシンによる慢性・蓄積性の心機能毒性を再現するものであり、DNA 損傷が引き起こす心不全を模倣した細胞モデルであると考えられた。

当該モデルを利用して、市販化合物を含む化合物を作用させたところ、進行性に低下する収縮・運動機能を回復させる化合物を同定することができた。当該化合物は、DNA 損傷を加えていない hiPSCM に対してその収縮・弛緩運動を改善する作用は示さなかったことから、直接

的に心筋細胞の機能を亢進させるのではなく、DNA 損傷による心筋細胞内の未知の変化を修復することによって作用していると考えられた。当該化合物の細胞内標的は不明であり、作用機序を解明するために遺伝子発現解析等の研究を実施中である。当該化合物は非循環器疾患を対象とした臨床試験が第三相まで成功したものの、競合品との有効性・安全性の比較から市販に至らなかった薬物であり、心不全治療薬としてのドラッグリポジショニングの有望な候補となることが考えられた。

制御性 T 細胞による脂肪組織恒常性維持機構および脂肪細胞分化機構の解明

中 島 啓

(東京大学大学院薬学系研究科)

【目的】

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

【方法】

Foxp3 遺伝子変異 A384T 変異マウス, R397W 変異マウス, Treg 特異的 BATF 欠損マウスおよび野生型マウスの白色・褐色脂肪組織について、組織形態、免疫応答 (Th1/Th2/Th17 etc.), 免疫細胞集団を病理学的、免疫学的に解析し、Foxp3 依存的な *Batf* 発現制御が脂肪組織の恒常性維持および脂肪細胞分化にいかに関与しているのか検証する。また、A384T 変異マウスと野生

型マウスをそれぞれ通常食、または高脂肪食を摂取させ、エネルギー代謝変化を比較解析する。

【結果】

A384T マウスの脂肪組織を解析した結果、予想通り、脂肪組織中の Treg の数・割合が野生型マウスに比べて非常に少ないことが分かった。さらに Th1/Th2/Th17 応答を解析したところ、A384T マウスの脂肪組織では Th2 応答が過剰に起こっており、2 型炎症のマーカーである好酸球の割合が顕著に増えていることが分かった。さらに A384T マウスの脂肪組織重量は野生型マウスと比較して低い傾向にあることも分かった。一方で通常食・高脂肪食を摂取させ、体重をモニタリングしたが、体重に有意な差は認められなかった。また、通常食で飼育させた WT と A384T マウスの糖代謝 (インスリン抵抗性試験, グルコース負荷試験) を比較したが、糖代謝にも有意な差は認められなかった。

【考察】

A384T マウスの脂肪組織は Treg の数が少なく、過剰な Th2 応答が起こっているものの、糖代謝や高脂肪食負荷に伴う体重増加については、野生型マウスと比べ大きな差は認められなかった。一方で、A384T マウスの脂肪重量は野生型マウスと比較して顕著に少ない傾向にあることが分かり、過剰な Th2 反応が脂肪細胞の分化や分解に寄与している可能性が考えられる。実際、2 型サイトカインである IL-4 は脂肪細胞に直接的に作用し、脂肪分化を抑制し、さらに脂肪分解を促進することで、脂肪細胞の肥大を抑制していることが報告されている。すなわち、脂肪組織の Treg は脂肪組織の 2 型炎症を抑制することで、脂肪細胞の正常な分化を促進している可能性が示唆される。しなしながら、肥満と脂肪組織の Th1 型炎症亢進には正の相関があることが良く知られているものの、A384T マウスで見られているような脂肪組織の Th2 型炎症亢進が全身の代謝にどのように寄与しているかは現在のところ不明である。今後は脂肪組織が Th2 型に亢進している生物学的意義 (褐色化の亢進など) を明らかにし、脂肪組織における Treg の役割を解明したいと考えている。また、脂肪組織の Treg の標的細胞を明らかにするため、A384T マウスを ST2 欠損マウスと掛けあわせ、Foxp3<A384T> x ST2 KO マウスを作製している。マウスが作製され次第、

ST2WT と ST2KO 背景の脂肪組織の炎症を比較解析する予定である。もし ST2KO で脂肪組織の 2 型炎症が抑制された場合は、脂肪組織で ST2 を高発現するエフェクター T 細胞や 2 型自然免疫細胞 (ILC2) が Treg の標的と考えられるので、その抑制メカニズムを解明していきたいと考えている。

生理活性ペプチドの臨床応用に向けた研究

永田 さやか

(宮崎大学医学部)

我々は、これまで生理活性ペプチド (特に循環調節ペプチド) の探索から創薬研究までを行ってきた。そのうちの 2 種類のペプチドについて本研究助成期間に得られた成果を以下に報告する。

①ビッグアンジオテンシン-25 (Bang-25)

Bang-25 は我々が発見した新しいレニン・アンジオテンシン系 (RA 系) のペプチドである。RA 系は循環器疾患や腎臓疾患に重要な役割を果たしており、組織中には組織 RA 系が循環 RA 系とは独立して存在していると考えられるが、その生成機構や役割に関しては不明な点が多い。Bang-25 は、古典的な循環 RA 系とは異なり、レニンによるアンジオテンシン I (Ang I) 生成速度が非常に遅い。一方でキマーゼによって速やかに Ang II を生成する。そのためレニン非依存性の新しい Ang II 生成経路の鍵となる因子である可能性が高いと考えられた。さらに心臓や副腎髄質、膵臓ではラ氏島の β 細胞、腎臓のポドサイトをはじめ生体内に広く分布していた。また、様々な疾患の尿中 Bang-25 を比較したところポドサイト障害の進行した疾患で上昇傾向にあり、糖尿病では健常人に比べて有意に高い事が明らかとなった。以上より Bang-25 は糖尿病性腎症に関与している可能性が高いと考えられた。

②アドレノメデュリン (AM)

AM は、ヒト褐色細胞腫の組織抽出液より発見され、強力な血管拡張や血管新生、抗炎症作用など多彩な作用を有している生理活性ペプチドである。そのため、AM を様々な疾患の治療薬として開発する事は重要である。しかし、AM は生理活性ペプチドであるために経口投与

が困難でさらに血中半減期が短く、治療に用いる際は、長期的な入院下での経静脈持続投与が必要である。そこで独自に開発した方法論を用いて AM の N 末端にポリエチレングリコール (PEG) を結合させた PEG-AM やヒト IgG の Fc 領域を N 末端に融合した Fc-AM を開発した。PEG-AM, Fc-AM 共に AM 受容体を発現した細胞株において AM と同程度の cAMP の産生能を有し、血中半減期を著明に延長させた。また、両誘導体は、皮下の単回投与によって潰瘍性大腸炎や脳血管性認知症、高血圧のモデル動物に対して効果を示した事から、これらの疾患の治療薬になり得ると考えられた。

プロリン異性化酵素 Pin1 による代謝調節機構

中津 祐介

(広島大学大学院医系科学研究科)

【目的】

プロリン異性化酵素 Pin1 は、様々な標的蛋白のプロリン異性化を行うことにより、その機能調節を行っている酵素である。Pin1 は、従来、癌とアルツハイマー病との関係で注目された蛋白であるが、我々のグループでは、高脂肪食負荷したマウスの肝・筋・脂肪等で Pin1 の発現が増加したことから Pin1 と代謝との関係に着目した。本研究では、主に Pin1 と糖尿病性腎症、肥満、骨格筋機能調節について検討した。

【方法、結果】

① Pin1 が糖尿病性腎症発症に関与するかを明らかにするために、まずストレプトゾトシンをマウスに投与し、糖尿病を発症したマウス腎臓の Pin1 発現量について検討した。その結果、腎臓での Pin1 発現量は、顕著に増加した。興味深いことに SGLT2 阻害剤で血糖値を是正すると Pin1 の発現量は、ほとんど増加しなかった。そこで、次に腎臓のどの細胞において Pin1 の発現量が増加するかを検討したところ、メサンギウム細胞において Pin1 の発現増加が認められた。糖尿病性腎症の発症には、その一因としてメサンギウム細胞の増殖が関与することが知られている。そこで、メサンギウム細胞 CRL1927 を用い、細胞増殖に対する Pin1 の影響を調べたところ、Pin1 ノックダウンによりその増殖が軽度

ではあるが、抑制された。

②高脂肪食負荷した脂肪組織では、Pin1 の発現量が顕著に増加する。そこで、Pin1 と脂肪分解との関係について検討したところ、Pin1 は、脂肪分解の律速酵素である ATGL と結合することを見出した。Pin1 は、ATGL の分解を促進するとともに脂肪分解活性を低下させた。

③骨格筋特異的 Pin1 KO マウスは、高脂肪食負荷時の体重増加が WT マウスと比較して顕著であり、また運動能力も低下していた。興味深いことに、筋重量や筋線維タイプの割合は、両マウスで変わらなかった。以上の結果より、骨格筋の Pin1 は、筋量非依存的に代謝や運動を調節していると考えられた。

【結論】

上記の結果より、Pin1 は、各臓器において様々な代謝調節に関与していることが明らかとなった。

妊娠時ストレスによる食塩感受性高血圧発症機序の 解明

西本光宏

(国際医療福祉大学三田病院)

【目的】

高血圧を含む種々の疾患発症の要因として胎児期/新生児期におかれた環境因子の寄与が示唆される事象が報告され、DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が提唱されている。機序としてエピジェネティックな調節機構、特に比較的長期に変化の持続する DNA メチル化調節の関与が想定される。一方、低栄養母体の胎盤ではコルチゾールを不活性化する 11 β HSD2 活性が低下しており、過剰なコルチゾール暴露が子の成長後の生活習慣病発症に影響する。しかし胎児期のコルチゾール過剰が成人後に高血圧を発症させる機序は未解明である。我々は、血圧調節を司る視床下部の室傍核、食塩再吸収調節を担う腎尿細管に着目し、機序および治療を検討した。

【方法】

妊娠時低栄養、胎児コルチゾール過剰暴露のモデルとして妊娠時低タンパク食負荷ラット及び 11 β HSD2

によって不活化されない合成糖質コルチコイド (Dexamethasone) を妊娠中に投与したラット/マウスからの産仔 (LP 産仔および Dex 産仔) について成長後の血圧および室傍核での renin-angiotensin 系 (RA 系) 構成分子の遺伝子発現、DNA メチル化を検討した。またマウス培養視床下部細胞系での機序の検討を行った。更に食塩感受性の実態と考えられる腎での Na⁺再吸収機構への影響を検討するため尿管での Na⁺輸送体発現を検討した。

【結果】

LP 産仔、Dex 産仔とも成体での食塩感受性高血圧を呈した。これら産仔の室傍核では、アンジオテンシン受容体 (AT1a) 遺伝子の DNA 脱メチル化と AT1a mRNA 発現増加を認め、さらに DNA メチル化酵素 DNMT3a の発現と *AT1a* プロモータへの結合が低下していた。培養室傍核神経細胞では Dex 添加により、DNMT3a の発現低下と DNA 脱メチル化による AT1a 発現増加を認め、この反応は DNMT3a のノックダウンによって Dex 非依存性に再現された。Dex 産仔マウスの尿管では Na 再吸収に関わる蛋白 NCC の発現上昇および活性化を認めた。発現上昇・活性化は高食塩食下でも残存した。これらの反応は 3 週齢以降の薬物治療によって抑制された。一方で NCC の mRNA については発現量に有意差を認めず、蛋白発現以降の制御が関与していることが示唆された。

【結論】

妊娠時低栄養による食塩感受性高血圧発症機序として、脳内糖質コルチコイド過剰による脳内でのエピジェネティック調節異常が関与し、出生後の治療によって改善しうる可能性が示された。

心臓疾患における細胞・分子挙動の網羅的理解

野村 征太郎

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

心臓は様々な細胞が相互作用して機能する臓器であり、その病態解明には細胞レベルの理解が欠かせない。我々は、心不全患者の心筋シングルセル RNA-seq 解析

により, 予後不良の患者のみが有する不全心筋を同定し, その細胞では DNA 損傷が蓄積していることを明らかにした¹⁾. さらに臨床情報と分子病理の統合解析により, 治療前の心筋 DNA 損傷の程度がその後の治療応答性・予後を規定していることを解明した²⁾. そして不全心筋マーカーを含めた各種病態関連遺伝子の発現レベルを *in situ* で解析できる 1 分子 RNA *in situ* hybridization を確立した³⁾. 続いて, これらを応用した時空間的な遺伝子発現解析を病態の理解に繋げることが必要である.

【方法】

心臓組織から単離した全細胞を対象としたシングルセル RNA-seq 解析と空間情報を保持した Spatial transcriptomics の技術を統合して, 心不全や心筋梗塞の病態に関係する細胞種・分子メカニズムの同定を目指した.

【結果】

圧負荷心不全においては, 心臓線維芽細胞が, プロテアーゼ分子を発現することで TGF- β の量を制御することによって心筋細胞の肥大・DNA 損傷蓄積・不全化誘導を制御していることを明らかにした. また, 心筋梗塞においては, 梗塞部位の心筋細胞が, mRNA 安定化分子を発現して RNA 量を適切に調節することによって細胞の可塑性を制御していることを明らかにした. また Spatial transcriptomics によって, これらの細胞や分子の発現挙動は時空間的に制御されたものであることがわかった.

【考察】

これら細胞レベルの時空間的な遺伝子発現解析によって心臓疾患の病態理解はさらに深まり, 疾患層別化に適用することによって心臓疾患の精密医療をより高い精度で行うことが可能になるだろう.

【文献】

- 1) Nomura *et al.* Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun.* 9, 4435 (2018).
- 2) Nomura *et al.* Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as a Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 4,

670-680 (2019).

- 3) Nomura S *et al.* High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals heterogeneous responses of cardiomyocytes to hemodynamic overload. *J Mol Cell Cardiol.* 128: 77-89 (2019).

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)

【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 (induced cardiomyocyte: iCM) に直接分化転換することができる (Ieda *et al.* Cell 2010). 最近我々はリプログラミングと心臓発生の間にはエピソード的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 (Hashimoto *et al.* 2019 Cell Stem Cell). 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成果を参考にして, 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 (Zhou *et al.* Genes Dev 2017) において最も強く iCM への転換効率を改善した転写因子 ZNF281 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】

本研究では胚性幹細胞 (ESC) およびモデルマウスを利用し, 心臓形成における ZNF281 の役割を明らかにする. そのためには ZNF281 を過剰発現もしくはノックアウト (KO) した ESC を作成し, ZNF281 の発現量が心筋分化効率に及ぼす影響を解析する. また, CRISPR/Cas9 を用いて ZNF281 を心筋特異的に KO したマウスラインを樹立し, ZNF281 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 を用いて ZNF281 をノックアウトしたマウス ESC (ZNF281KOESC) を樹立した. そして野生型の mESC と同様のプロトコルで心筋分

化誘導を行ったところ、ZNF281KOmESC は心筋細胞に分化することができなかった。また、我々は同様に CRISPR/Cas9 を用いて ZNF281 遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟んだ遺伝子組み換えマウス (ZNF281 flox) を作成した。

【考察】

我々の *in vitro* の解析結果から、ZNF281 を欠損する mESC は心筋分化能を欠失しており、ZNF281 は心筋形成の転写ネットワークにおいて重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後は ZNF281 flox マウスと心筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配し、心筋特異的に ZNF281 を欠損するマウスを作成し、解析する予定である。

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

(帝京大学医学部)

【背景・目的】

糖尿病に伴う腎障害 (糖尿病性腎臓病) 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。これまで糖尿病性腎臓病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。申請者らは、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), 糖尿病性腎臓病における意義は未解明である。本研究は (1) ヒト糖尿病性腎臓病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 に焦点をあてて糖尿病性腎臓病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 マウスは顕著な蛋白尿に加え、ヒト糖尿病性腎臓病に特徴的とされる糸球体結節性病変を認め、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 障害も伴っていた。UNx-HS db/db マウスの腎皮質と単離糸球体では、活性型 Rac1, MR 標的遺伝子 Sgk1 発現の上昇を認めた。UNx-HS db/db マウスの糸球体蛍光染色では、活性型 Rac1 とポドサイト特異的マーカー podocin のシグナルが一致して認められ、ポドサイト Rac1-MR 経路活性化が示唆された。MR 拮抗薬、Rac1 阻害薬投与によりこれらの所見は改善された。

【考察】

UNx-HS db/db マウスが糖尿病性腎臓病の新たなモデルマウスとなる可能性が示唆された。さらに、糸球体ポドサイト Rac1-MR 経路活性化が糖尿病性腎臓病の病態形成に寄与すること、MR 拮抗薬および Rac1 阻害薬が糖尿病性腎臓病治療の選択肢となりうることも示唆された。

ドパミンシグナルを介した心不全の新規病態生理の解明と治療法の開発

山 口 敏 弘

(東京大学医学部附属病院)

【背景】

従来の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) を同定している。

【目的】

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

ることである。

【方法・結果】

心不全時に増加する D1R を in situ hybridization 法で評価したところ、D1R は心筋細胞で増加していた。そこで心筋特異的に D1R を欠失するマウスを作成したところ、圧負荷心不全時の心室性不整脈が抑制され、生存率も改善した。他方、心筋特異的に D1R を過剰発現すると心室性不整脈は増加した。以上より、心不全時に増加する心筋 D1R は致死的心室性不整脈の発症に寄与すると考えられた。不整脈発症の機序として心筋細胞内の Ca²⁺ handling 異常が知られるため、培養心筋細胞に D1R を強制発現させたところ D1R は細胞内 Ca²⁺ handling に異常をきたし、その機序としてリアノジン受容体のリン酸化が関与していることが示唆された。さらに、東京大学医学部附属病院及びコロラド大学附属病院の 2 施設において心筋症患者より採取した心筋の遺伝子発現解析を行ったところ、持続性心室頻拍の既往あるいは植込み型除細動器を持つ患者群において特に D1R の発現が増加しており、ヒト心臓でも同様の表現型をとることが確認された。研究者は以上の結果をまとめ、Nature Communications 誌に報告した。(In Press)

【考察と今後の展望】

本研究の結果、心筋 D1R は慢性心不全治療薬の新たなターゲットとして期待できることが明らかとなった。さらにヒト臨床応用へと進めるべく、現在 Yale 大学 PET center と共同して、D1R トレーサーの開発及び評価系を樹立し、マウスの予備実験を経て、ヒト臨床試験へ進めるための準備を行っている。

血管壁の機械刺激応答と病態形成を誘導するシグナル分子の解析

山城 義人

(筑波大学生存ダイナミクス研究センター)

【目的】

血管壁は絶えずメカニカルストレス（血圧や血流による血行力学的応力）にさらされており、その制御機構の破綻が血管疾患の根本原因ではないかと注目されています。本研究グループはこれまでに、大動脈瘤において、

メカニカルストレス応答異常と細胞骨格のリモデリングが瘤の形成に重要な役割を担っていること¹⁾、大動脈瘤病変で Thrombospondin-1 (Thbs1) が過剰に発現していること、また Thbs1 の抑制が大動脈瘤発症の抑止に効果的であることを示してきましたが²⁾、血管のメカノトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管疾患発症の分子メカニズムの詳細は明らかにされていませんでした。

【方法・結果】

ラット血管平滑筋細胞を用いて伸展刺激（20% strain, 1.0Hz, 20 時間）において分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thbs1 を含む、85 つのタンパク質を同定しました。次いで、伸展刺激により分泌された Thbs1 が細胞基質接着を制御する integrin $\alpha v \beta 1$ に結合することを明らかにしました。Thbs1 欠損細胞では、伸展刺激応答における接着斑の活性化が誘導されず、アクチンフィラメントの配向が崩れ、細胞張力が減少していることを明らかにしました。遺伝子発現解析（RNA-seq）の結果、転写調節因子 YAP の標的遺伝子の発現が、Thbs1 欠損細胞では伸展刺激後も抑制されること、伸展刺激による YAP の核内移行（活性化）には Thbs1 が必要であることを見出しました。また、YAP の核内移行は、Thbs1 の integrin $\alpha v \beta 1$ への結合と、低分子量 G タンパク質 Rap2 の不活性化を伴って、Hippo 経路依存的に制御されていることがわかりました。さらに、マウスを用いた解析において、Thbs1 欠損マウスは、横行大動脈縮窄術（TAC）による圧負荷により、血管の破裂・解離を引き起こす一方、頸動脈狭窄術による新生内膜の形成時に、新生内膜細胞の増殖を抑制することを明らかにしました³⁾。

【考察】

これらの結果から、細胞のメカニカルストレス応答の中心を担う、転写調節因子 YAP の活性化を、細胞外マトリクス Thbs1 が制御することがわかりました。さらに、Thbs1 が制御する YAP 活性化のシグナル伝達経路は、血管壁の圧負荷応答や、狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングに重要な働きを示すことを明らかにしました。

【文献】

1) Yamashiro Y et al. Abnormal mechanosensing

and cofilin activation promote the progression of ascending aortic aneurysms in mice. *Sci. Signal.* 8 (399): ra105, 2015.

- 2) Yamashiro Y *et al.* Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. *Circ. Res.* 123 (6): 660-672, 2018.
- 3) Yamashiro Y* *et al.* Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of blood vessels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 117 (18): 9896-9905, 2020. *責任著者

全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

強皮症自己抗原と強皮症感受性 HLA との会合の解析に基づく強皮症マウスモデルの樹立

大 泊 香

(大阪大学医学系研究科)

【目的】

我々は、MHC class II 分子が細胞内ミスフォールド蛋白と会合し neo-self となり細胞表面に運ぶ新たな役割を見出してきた。さらに関節リウマチのリウマトイド因子、抗リン脂質抗体症候群の抗リン脂質抗体、ANCA 関連血管炎 MPO-ANCA がそれぞれ IgG, APOH, myeloperoxidase と MHC class II の複合体に対する自己抗体であることを発見した。強皮症患者においても皮膚の線維芽細胞に MHC class II が発現することが知られており、強皮症発症の一因としても同様のメカニズムの関与が推測される。そこで MHC class II/強皮症自己抗原複合体による強皮症モデルマウスの作成を目標とした。以前の結果より *in vitro* で CD74 (Invariant 鎖) の発現を低下させると MHC class II/ミスフォールド蛋白複合体の形成が促進した。一方 *in vivo* で全身性に CD74 を conditional に欠損したマウスでは自己抗体が産生され、全身性自己免疫疾患が発症した。以上より皮膚特異的 CD74 欠損マウスでは皮膚特異的な自己免疫疾患が発症する可能性が考えられた。そこでまず表皮特異的に CD74 の発現を低下させ MHC class II と自己抗原複合体の形成を促進させる状況を作成し、表皮特異的自己免疫疾患の発症を観察した。

【方法】

Tamoxifen 依存性にケラチン 5 プロモーター存在下で CD74 を欠損させる、CD74 fl/fl Krt5-Cre-ERT2+/- マウスを作成した。

これらのマウスに Tamoxifen 投与で皮膚特異的に CD74 が欠損されるか、表皮細胞・脾臓細胞より DNA 抽出を行い、電気泳動で解析し比較した。

一方、表皮における MHC class II の発現を誘導する目的で mouse IFN γ (mIFN γ) を複数回マウスに投与し、皮膚における MHC class II の発現を flow cytometry で解析した。

Tamoxifen を経口投与 CD74 fl/fl Krt5-Cre-ERT2+/- マウス、Tamoxifen 未投与マウスを用いて、mIFN γ を投与した。

その後マウスの皮膚組織やケラチノサイトより、MHC class II, DSG3, CD74 に対する自己抗体の有無について免疫染色や flow cytometer で解析した。血清中の自己抗体について flow cytometer にて解析した。

【結果】

CD74 fl/fl Krt5-Cre-ERT2 +/- マウスに Tamoxifen を経口投与する事で、長期的に皮膚特異的 CD74 欠損が維持された。

さらに、マウスに mIFN γ を単純投与する事でケラチノサイトに MHC class II が発現した。

自己抗体に関しては皮膚・血清中に現時点でまだ検出を認めないが、今後も解析を続ける予定である。

【考察】

ケラチン 5 発現部位の CD74 を後天的に欠損させるマウスモデルの樹立ができた。現時点では皮膚特異的な自己免疫疾患の発症には至っていないが、さらに経時的な自己抗体や MHC class II の発現の推移を詳細に検討していきたい。MHC class II/ミスフォールド蛋白複合体は自己免疫疾患発症に重要と考えられるため、このマウスを用いてさらなる炎症刺激等を加えた際の臨床症状・血清学的解析を進めていきたい。

炎症性腸疾患におけるユビキチン様分子による蛋白制御を介した新規病態の解明

河本亜美

(東京医科歯科大学医学部)

【目的】

炎症性腸疾患は慢性持続性の炎症・潰瘍が消化管に惹起される「難病」であり、これらの調和を保つべき「腸上皮」の機能異常が病態に深く関与していることが明らかとされている。このため、本研究では炎症性腸疾患の病態における「UBD 依存的ユビキチン様蛋白・プロテアソーム系 (UBD 依存的 UBL-PSM 系)」の役割について、「腸上皮細胞機能の制御」に焦点を当て、分子レベルで機能的意義の描出を試みた。

【方法】

ヒト腸上皮細胞に於いて「UBD 依存的 UBL-PSM 系」が分解・機能を制御する標的蛋白を同定するため、ヒト腸上皮 UBD 過剰発現系 (UBD-OE 細胞) 及びヒト腸上皮 UBD 欠損系 (UBD-KO 細胞) を構築した。これら細胞で Notch 活性化と TNF- α 刺激を誘導する事により「UBD 依存的 UBL-PSM 系」を活性化する。複数の条件で細胞内蛋白を回収し、質量分析を用いた網羅的解析等により、UBD 存在下・非存在下における発現量変化を指標に腸上皮における UBD 標的蛋白の同定を試みる。

【結果】

1) iTRAQ 法を用いた網羅的解析により、2 種の標的候補蛋白の同定に成功した。

2) Flag タグ付き UBD 発現系 (UBD-OE 細胞) を用いた免疫沈降を行い、UBD と分子間結合能を有する分子の探索・同定を行った。また UBD-KO 細胞を用いた解析から複数の候補バンドを同定し、質量分析による解析を行った結果、既知の p62 のみならず HDJ2 及び GRP78 等の新規候補分子を同定した。

【考察と結論】

ヒト腸上皮細胞に於いて炎症環境で発現誘導される分子 UBD は、複数の標的分子を有し、同標的分子群の蛋白分解制御を介し腸上皮機能を調節することで、炎症性腸疾患の病態に機能的な役割を有すると考えられた。今後、標的分子のさらなる探索等を行うことで炎症性腸疾

患における「UBD 依存的 UBL-PSM 系」の理解が一層進展するものと考えられた。

大規模ゲノムデータを用いたパスウェイ解析によるベーチェット病の発症機序の解明

迫野卓士

(横浜市立大学医学部)

【目的】

ベーチェット病は全身の諸臓器に炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患であり、遺伝要因と環境要因が複合的に関与して発症する多因子疾患と考えられている。ベーチェット病では HLA-B*51 と HLA-A*26 が疾患の発症リスクと顕著に相関することが報告されているとともに、近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、ベーチェット病の新たな疾患感受性遺伝子が 20 個ほど報告されている。これらの遺伝情報は、ベーチェット病の発症機序の解明、ベーチェット病のより有効な治療法および予防法の確立の一助になり、非常に意義深い。しかしながら、ベーチェット病において未同定の遺伝要因が依然として多く存在することが示唆されており、ベーチェット病の発症機序 (発症パスウェイ) の全容は未だ解明されていない。本研究では、既に取得しているベーチェット病の GWAS データを用いたパスウェイ解析を実行し、ベーチェット病の発症機序の解明を行った。

【方法】

日本人集団 (患者 611 例, 健常者 737 例) とトルコ人集団 (患者 1209 例, 健常者 1278 例) におけるベーチェット病の GWAS データ^{1,2)}を対象に Imputation 解析を行ったのち、Imputed GWAS データを対象としたパスウェイ解析を実行した。本パスウェイ解析では、PANOGA (<http://panoga.sabanciuniv.edu/>) と KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を統合した手法³⁾を用いた。

【結果】

日本人集団とトルコ人集団において、ベーチェット病の発症に有意 ($P < 1.0 \times 10^{-5}$) に関与するパスウェイ (生物学的過程・経路) をそれぞれ 88 個と 92 個同定した。

各々の人種集団で同定したパスウェイの多くは両人種の間で共通のパスウェイであった。

【考察】

本研究により、ベーチェット病の発症に関与するパスウェイが網羅的に同定された。今後新たな日本人集団および海外人種集団を対象に同様の解析（追認試験）を実行し、ベーチェット病の発症に関与するパスウェイを明確にする必要がある。ベーチェット病の発症パスウェイが解明されれば、発症パスウェイを対象とした治療薬の開発も可能になり、その医学的意義は大変高いといえる。

【文献】

- 1) Mizuki N, Meguro A, Ota M, *et al.*: Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci, *Nat. Genet.*, 42 (8), 703-706 (2010).
- 2) Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, *et al.*: Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1, *Nat. Genet.*, 45 (2), 202-207 (2013).
- 3) Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, *et al.*: Identification of possible pathogenic pathways in Behçet's disease using genome-wide association study data from two different populations, *Eur. J. Hum. Genet.*, 23 (5), 678-687 (2015).

感染性ぶどう膜炎の病態形成に関与する長鎖ノンコーディング RNA の同定

白濱 新多朗

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type 1: HSV-1) の増殖を促進する宿主由来長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA: lncRNA) を同定し、同定 lncRNA が抗ウイルス薬の新規治療標的となり得るかを検証すること。

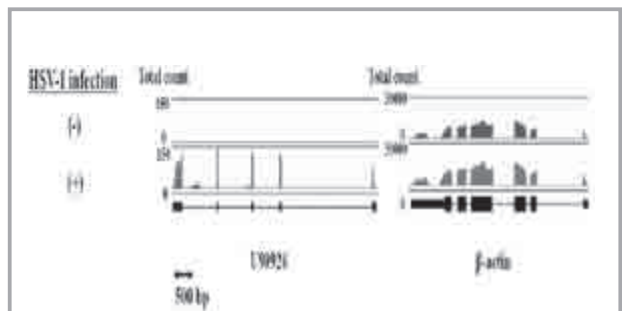


図1 lncRAN-U90926 の基本的特徴

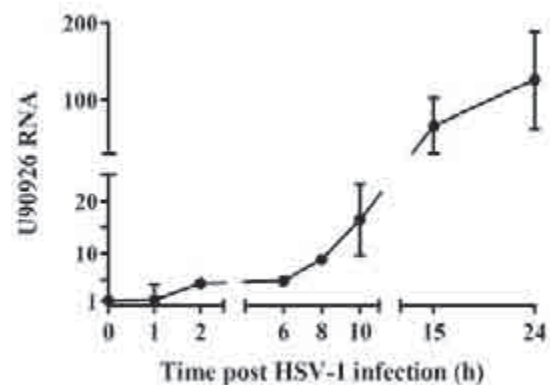


図2 HSV-1 感染後 lncRAN-U90926 発現量の経時変化

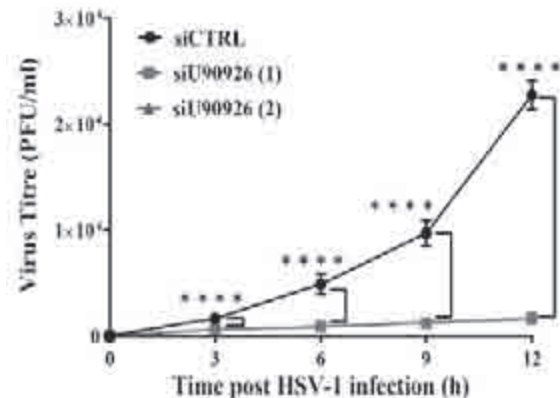


図3 HSV-1 感染後のウイルス DNA 量ならびに力価の経時変化

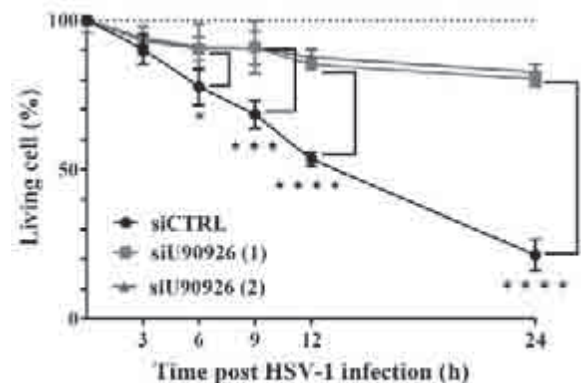


図4 HSV-1 感染後の宿主細胞生存率の経時変化

【方法ならびに結果】

初めに視細胞において、HSV-1 感染後に発現上昇する lncRNA を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に探索した。その結果、感染後に発現が2倍以上に上昇する lncRNA を合計で 19 個同定し、同定 lncRNA の中で感染後に最も発現上昇した lncRNA-U90926 に着目した。lncRNA-U90926 は全長が 522 ヌクレオチドで 5 つのエクソンで構成され、非感染時には検出されず、感染後にはのみ検出される lncRNA であった (図 1)。その発現量は感染後 10 時間まで徐々に上昇し、その後、感染後 24 時間で約 100 倍まで劇的に上昇した (図 2)。

次に、U90926 ノックダウン細胞における HSV-1 の力価は、HSV-1 感染後 3, 6, 9 および 12 時間の時点でコントロール細胞よりも有意に低かった ($p < 0.0001$)。特に HSV-1 感染後 12 時間で、U90926 ノックダウン細胞における HSV-1 力価は、コントロール細胞と比較して約 93% 減少していた (図 3)。以上のことから、lncRNA-U90926 は視細胞における HSV-1 増殖にとって重要な因子であることが示唆された。

最後に lncRNA-U90926 の HSV-1 感染後の宿主細胞生存率に及ぼす影響を評価した。その結果、HSV-1 に感染した U90926 ノックダウン細胞の生存率は、HSV-1 感染後 6 時間 ($p < 0.05$)、9 時間 ($p < 0.001$)、12 時間 ($p < 0.0001$) および 24 時間 ($p < 0.0001$) で、コントロール細胞と比較して有意に増加した。特に HSV-1 感染後 24 時間では、U90926 ノックダウン細胞の生存率は 80.2% [siU90926 (1)] および 82.6% [siU90926 (2)] であったのに対し、コントロール細胞の生存率は 21.3% であった (図 4)。これらの結果は、lncRNA-U90926 が HSV-1 の増殖を促進することで、宿主細胞死を誘導していることを示唆している。

【考察】

本研究を通じて、HSV-1 感染が宿主由来 lncRNA-U90926 の発現を誘導することで、ウイルス増殖を促進し、宿主細胞死を誘導していると考えられた。本結果は、lncRNA-U90926 が HSV-1 に対する抗ウイルス薬の新規治療標的候補となり得ることを示唆している。

ベーチェット病を含む自己炎症性疾患の遺伝子スクリーニング

土田 奈緒美

(横浜市立大学附属病院)

【目的】

自己炎症性疾患の多くは、自然免疫が病態に関わると推定されており、多遺伝子疾患と考えられている。近年、ベーチェット病の表現型を示す複数の家系発症例の全エクソーム (whole exome sequencing, WES) 解析から A20 ハプロ不全症の原因遺伝子 *TNFAIP3* 変異が報告され、多因子性と考えられていた疾患群の一部に単一遺伝子変異による疾患が含まれることが示唆された。

これまでに筆者らは、ベーチェット病の 12 家系 (患者 25 例を含む) を集積し、WES 解析で 2 家系 4 例よりそれぞれ *TNFAIP3* 遺伝子の新規変異を検出した¹⁾。また、既報の A20 ハプロ不全症患者 (54 例) と当施設の成人ベーチェット病コホート (520 例) の比較にて、A20 ハプロ不全症では、家族例、若年発症、発熱発作や腸管病変の合併が多く認められた¹⁾。今回、これらの結果を踏まえ、ベーチェット病の患者の中でも、上記の臨床的特徴を有する症例に対して、遺伝子変異スクリーニングを試みた。

【方法】

ベーチェット病の患者の中でも、前述の臨床的特徴を有し、発症に遺伝学的要因が疑われる症例を対象とする。対象症例は、当学の遺伝学教室にて WES 解析を行う。ただし可能な場合には、かずさ遺伝子検査室の遺伝性自己炎症疾患遺伝子検査を先に行う (保険診療)。検出されたバリエーションは、サンガーシーケンスなどで変異の確認や由来の確認を行う。

【結果】

当該期間に、新たに 4 例のベーチェット病患者を集積した (P1, P2, P3, P4)。全例で 10 代までに発症し、うち 2 例は親子 (P1, P2) 例で、残りの 2 例は孤発例 (P3, P4) であった。孤発例の P3, P4 は、発熱発作や腸管病変を伴い、保険診療の遺伝子検査では診断には至らなかった。P1, P3, P4 に対して、WES 解析を行った。P1 で既知の自己炎症性疾患責任遺伝子 X に稀な新規バリア

ントを認め、サンガーシーケンスによる配列決定で、罹患の母親P2と同バリエントを共有することが示された。P3, P4では有意なバリエントは検出されなかった。

【考察】

実臨床では、どのような症例に対して遺伝学的検査を検討すべきか、判断に悩むことが多い。本研究では、先行研究の結果に基づき、遺伝的な背景が疑われる症例に着目して遺伝学的検査を行った。今後、P1の家系で検出したレアバリエントに関しては、病原性の有無に関して、機能検証を検討している。P3, P4に関しては、トリオ解析を進める。

臨床的に遺伝的機序が示唆される希少疾患において、未だ原因特定に至らない症例も多く残されており、今後も引き続き症例を集積し、責任遺伝子の特定に取り組んでいきたい。

【文献】

1) Tsuchida N, Kirino Y, Soejima Y, et al: Haploinsufficiency of A20 caused by a novel nonsense variant or entire deletion of TNFAIP3 is clinically distinct from Behçet's disease. *Arthritis Research & Therapy*. 4; 21 (1):137 (2019)

生物学的製剤を使用している潰瘍性大腸炎、クローン病における血液、便、内視鏡検体を利用した薬物動態の解析

日比則孝

(北里大学北里研究所病院)

【背景・目的】

インフリキシマブ (IFX), アダリムマブ (ADA) などの生物学的製剤は難治性の潰瘍性大腸炎 (UC), クローン病 (CD) の寛解導入, 寛解維持のために重要な薬剤である。最近ではウステキヌマブ (UST), ベドリズマブ (VED) などの生物学的製剤も使用されている。しかし、多くの治療薬があるにも関わらず、治療効果が乏しく寛解導入, 維持が困難な症例も認められる。その要因としては血中濃度の不足, 抗薬物抗体の出現, 薬が便中に漏出し, 腸管組織中の濃度が上昇していないなどの複合要因が考えられる¹⁾。本研究では生物学的製剤を使

用する患者の血液, 便, 内視鏡検体を用いて薬物動態を解析し, 今後のテーラーメイド医療に役立つ礎を構築することを目指した。

【方法】

①内視鏡検体における IFX, ADA の濃度

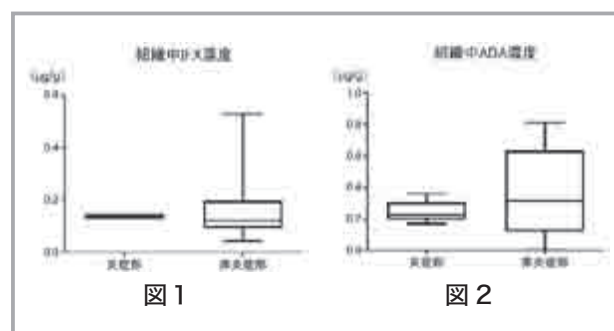
IFX, ADA 使用中で 2018 年 6 月～2019 年 8 月に大腸内視鏡検査を施行した UC, CD 患者を対象とした。内視鏡にて炎症部または非炎症部より生検施行。検体は蒸留水を加え, バイオマッシャー II で均質化した後に遠心分離を行い, 上清液を回収した²⁾。そして, IDKmonitor を用いて ELISA 法にて濃度を測定した。

② VED の血中濃度

2019 年 7 月～2020 年 7 月に VED を開始した UC, CD 患者を対象とし, 2 週, 6 週, 14 週において採血を行い, 血清を保存した。IDKmonitor を用いて ELISA 法にて VED 濃度を測定し, 14 週時点での臨床的寛解の有無について比較を行った。なお, 臨床的寛解については UC では Partial Mayo Score (PMS) 2 以下, CD では Crohn's Disease Activity Index (CAI) 150 以下と定義した。

【結果】

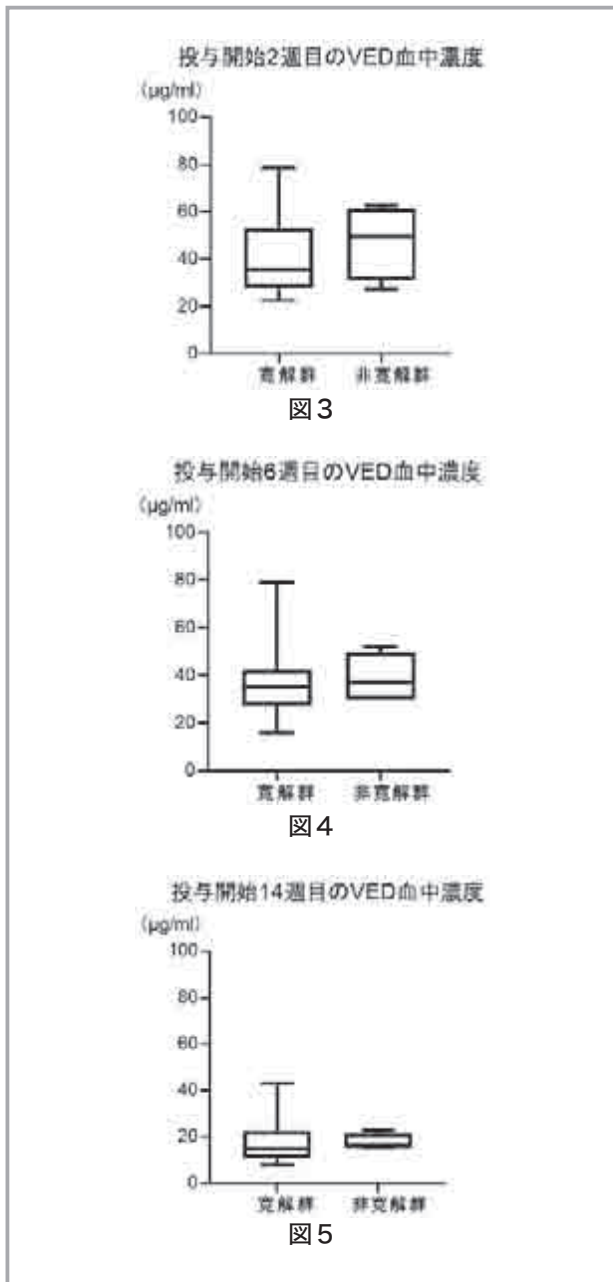
①対象患者 18 例 (IFX: 8 例, ADA: 10 例) の組織中濃度を測定した。IFX, ADA とともに炎症部と非炎症部において有意な差は認めなかった (IFX: 0.137 μ g/g vs 0.176 \pm 0.162 μ g/g, ADA: 0.246 \pm 0.07 μ g/g vs 0.364 \pm 0.3 μ g/g, p=0.42) (図1, 2)。



②対象患者 15 例 (UC: 14 例, CD: 1 例) のうち 14 週時点で臨床的寛解を得られた患者は 11 名 (73.3%) であった。いずれの期間の血中濃度において寛解群と非寛解群では有意な差を認めていなかった (2 週: 41.63 \pm 19.37 μ g/ml vs 47.3 \pm 15.93 μ g/ml, p=0.64, 6 週: 38.27 \pm 17.74 μ g/ml vs 39.08 \pm 10.83 μ g/ml, p=0.57,

14 週: 17.58 ± 9.83 vs 17.51 ± 3.34 , $p=0.34$)

(図3-5).



【考察】

今回の研究では組織中濃度および血中濃度について ELISA 法にて測定が可能であったが、サンプル数が限られていたため十分な結果を示すことができなかった。組織中濃度については血中濃度や便中濃度を含めたさらなる解析、VED については観察期間が短いため長期的な経過も含め検討していきたい。

【文献】

1) Brandse J.F. *et al.* : Loss of Infliximab Into Feces Is Associated With Lack of Response to Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis, *Gas-*

troenterology, **149**, 350-5 (2015) .

2) Yoshihara T. *et al.* : Tissue Drug Concentrations of Anti-tumor Necrosis Factor Agents Are Associated with the Long-term Outcome of Patients with Crohn's Disease, *Inflammatory Bowel Diseases*, **23**, 2172-2179 (2017).

独自のマイクロ空間デバイスを用いた全身性強皮症の抗原特異的B細胞の機能解析

深澤毅倫

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

B細胞は様々な機能を有しており、自己免疫疾患においても重要な役割を果たす。特にB細胞受容体を介した自己抗原刺激は、自己反応性B細胞の活性化とサイトカイン産生を誘導し、その結果、病態の形成と進展に大きく関与すると考えられる。しかし、自己抗原に対する反応性やサイトカイン産生能、他細胞との相互作用などを含めた自己反応性B細胞の機能に関する直接的な検討は、技術的な難しさから全く行われていない。自己免疫疾患のひとつである全身性強皮症 (Systemic Sclerosis; SSc) は免疫異常、皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害を3主徴とする予後不良な疾患である。SSc患者では線維化や血管障害が顕在化する以前から、核内抗原である topoisomerase (topo) I などに対する自己抗体が検出され、自己抗体の種類は病型と強く相関する。自己抗体産生の担い手である自己抗原反応性B細胞が病態形成において重要な役割を果たすと考えられ、SSc患者では memory B細胞が異常に活性化していることから、自己に対して免疫を獲得した memory B細胞が病態へ深く関与すると考えられる。本研究では、SScにおける自己抗原反応性B細胞の解析を行うことを目的とした。

【方法および結果】

独自の医工連携研究によって開発されたマイクロ空間上に反応場を構築した単一細胞タンパク解析デバイスと微小空間細胞相互作用解析デバイスを用い、SSc患者とSScモデルマウスから得られた自己抗原反応性B細胞を解析し、自己抗原反応性B細胞が産生するサイト

カインやT細胞・線維芽細胞へ及ぼす影響，さらには病態への関与についての検討を行った。Interleukin (IL)-6やIL-23といった炎症性サイトカインを産生するB細胞やIL-10やIL-35といった抑制性のサイトカインを産生するB細胞がtopo I特異的B細胞集団中に存在することが明らかとなった。さらに，topoI抗原への親和性とサイトカイン産生能との関係を検討したところ，high affinityなB細胞においてIL-6やIL-23を産生するB細胞の割合が多く，それぞれのサイトカイン産生量も多いことが明らかとなった。同様にlow affinityなB細胞においてはIL-10やIL-35といった抑制性のサイトカインを産生するB細胞の割合が多く，産生量も多いことが明らかとなった。さらにtopoI抗原に対してhigh affinityなB細胞が多いほど，皮膚硬化が強くなり，肺機能が悪いことが明らかとなった。

次にtopoI誘発SScモデルマウスにおいて，B細胞のaffinityの上昇がサイトカイン産生能に与える影響についての検討を行った。このモデルでは4回topo I蛋白質を免疫することで皮膚硬化と肺の線維化が完成するが，topo I蛋白質を免疫する毎にB細胞のtopo Iに対するaffinityは強められる。Low affinityなB細胞が多い，topo Iを1回だけ免疫したマウスにおいて，IL-10やIL-35といった抑制性のサイトカインを産生するB細胞の割合が多かったのに対し，high affinityなB細胞が多い，topo Iを4回免疫したマウスにおいては，IL-6やIL-23といった炎症性のサイトカインを産生するB細胞の割合が多かった。これらのB細胞の養子移入実験により，topo Iを1回免疫後に得られたtopoI反応性B細胞はtopoI誘発SScモデルマウスの線維化病変を抑制したのに対し，topo Iを4回免疫後に得たtopoI反応性B細胞は線維化病変を促進することが明らかとなった。

【考察】

topoI反応性B細胞はtopoIに対する親和性が低い場合には線維化病変を抑制し，親和性が高くなると線維化病変を増悪させ，これらの機能はB細胞からのサイトカイン産生を介して発揮されることが示唆された。全身性強皮症患者および全身性強皮症モデルマウスにおける自己抗原反応性B細胞の系にて，サイトカインプロファイルや抗原親和性，病原性，他免疫細胞との相互作用の解析を行い，その役割を明らかにした。本研究はこれまで

未知に等しかった，自己抗原反応性B細胞のサイトカインプロファイルと抗原親和性，病原性の解明に重要な貢献をなすと考えられた。

成人発症炎症性腸疾患に関する幼少期腸管 dysbiosis の検討

三好 潤

(杏林大学医学部)

【目的】

炎症性腸疾患 (IBD) は消化管炎症を主体とする全身性疾患であり，慢性的に再燃を繰り返す原因不明の疾患である。IBD発症には遺伝的背景，環境因子により生じる免疫異常が関与していると考えられている。環境因子にはさまざまな要因が含まれるが，腸管微生物叢 (microbiota) が大きな役割を果たすことが示唆されている。近年，妊娠中の母体や小児期の抗菌薬使用とIBD発症リスクの関連が報告され，幼少期のmicrobiotaの乱れ (dysbiosis) が将来的なIBD発症リスクにつながることを示唆されている^{1,2)}。我々は，周産期のマウス母体に抗菌薬を投与することにより，出生後の仔に抗菌薬に起因するdysbiosisが伝播し持続すること，小児期における免疫発達異常を引き起こすこと，および成育後に腸炎発症リスクが上昇することを報告した³⁾。これらの知見により，幼少期の腸管dysbiosisが将来のIBD発症を決定する一因となることが示唆された。そこで，本研究では，(1) dysbiosisの中のどのような要素 (構成微生物，代謝物など) がどのような機序で成育後の腸炎発症に至るのか，(2) 幼少期dysbiosisは宿主の免疫発達に長期的な影響を与えるのか，(3) 上記(2)がある場合に宿主の免疫発達の方向性の決定に重要な時期 (critical window) が存在するのか，を検討することを目的とした。

【方法】

目的1：妊娠中の母体や小児期の抗菌薬使用とIBD発症リスクの関連という疫学的知見を再現するために我々が確立したマウスモデル (周産期抗菌薬投与IBDモデル)³⁾で得られた糞便microbiomeのmetagenome shotgun sequencingデータについてのMG-RAST解析

結果を再検討した。この MG-RAST 解析は抗菌薬非投与群 (NT 群) と CPZ 群の仔の 3 週齢, 7 週齢, 11 週齢時点が解析対象であった⁴⁾。我々は, NT 群と CPZ 群では, 細菌構成のみならず, 真菌構成, microbiome 機能が長期間にわたり異なることを明らかにした。さらに CPZ 群のなかでも観察期間中の自然腸炎発症率は約 30% であったことに着目し, 自然腸炎を発症した群と発症しなかった群では, 自然腸炎を発症する前の 11 週齢時点で, すでに糞便 microbiome の機能に差異が生じ, 窒素代謝経路 (KEGG pathway: ko00910) に有意差を認めることを見出した。そこで, 同経路に注目して NT 群と CPZ 群の microbiome 機能の差異について再検討を行うこととした。

目的 2: 我々は既報で周産期抗菌薬投与による dysbiosis と仔の 3 週齢時点での T 細胞分画の変化の因果関係を示した³⁾。今回, 7 週齢での脾臓, 腸管膜リンパ節, 大腸粘膜固有層の制御性 T 細胞 (Treg), Th1, Th17 分画についてフローサイトメトリーを用いて検討することとした。

目的 3: 無菌 (germ free; GF) マウスでは T 細胞分画が Th2 優位になるなど SPF マウスとは異なる免疫状態となっていることが知られている。そこで, GF C57BL/6 マウスに対して, 性別および週齢を一致させた SPF 環境 C57BL/6 マウスの microbiota を 4 週齢または 10 週齢に移入し, 移入後 4 週間後 (8 週齢または 14 週齢) に, もともと無菌であったマウスの免疫状態が SPF マウスに類似したものに变化するかを検討することにより, 免疫発達の critical window について検討する方針とした。

【結果】

(1) 3 週齢時点で NT 群と CPZ 群では 121 代謝経路が有意に異なっており, ko00910 pathway にも有意差を認めた (corrected p value < 0.01)。しかし, 7 週齢, 11 週齢時点では, それぞれ 46 経路, 62 経路が NT 群と CPZ 群で有意に異なっている一方, ko00910 pathway については両群間に有意差を認めなかった。

(2) 7 週齢の脾臓, 腸管膜リンパ節, 大腸粘膜固有層について CPZ 群では NT 群と比較して, Treg が減少し, Th1 および Th17 が増加していた。これは, 我々の 3 週齢時の既報と同様の傾向であった。

(3) 上記結果をふまえ, 4 週齢, 10 週齢 GF マウスおよび SPF マウスを用いた microbiome 移入実験を開始した。4 週齢で microbiome を移入した GF マウス群では, 8 週齢の解剖時に GF マウスで特徴的な巨大盲腸が SPF マウスと同様のサイズにまで縮小していた。さらなる免疫学的解析を予定している。また 10 週齢で microbiome を移入したマウスは, まだ 14 週齢に達しておらず, 今後, 解析予定である。

【考察】

MG-RAST を用いた metagenome shotgun sequencing 解析データの再検討から, 窒素代謝の変化が IBD ハイリスク個体 (本検討の場合は, 遺伝的背景として IL-10KO, 環境因子として周産期抗生剤投与を有する) において腸炎発症のトリガーとなることが推測される一方で, 窒素代謝経路が 7 週時点より NT 群と CPZ 群の間で有意差を示さなくなること, NT 群と CPZ 群で非常に多くの代謝経路が異なることから, 宿主の免疫発達に影響する代謝経路については本解析法のみでは同定が困難と考えられた。また, 宿主の発達にとって重要な微生物の同定については, short reads に基づく MG-RAST 解析では限界があり, 今後, ほぼ株レベルまで細菌構成の検討が可能な metagenome-assembled genome による手法が必要と考えられた。ただし, MG-RAST 解析では真菌叢の変化も認めており, 細菌叢のみに注目した解析では他の微生物 (真菌やウイルス) を評価できないことに注意が必要と考えられる。

一方, CPZ 群において 7 週齢時点でも T 細胞分画が 3 週齢時と同様に NT 群と異なることは, 幼少期に母体から伝播した抗菌薬による dysbiosis は仔の免疫発達に長期的影響を及ぼしたことを示している。幼少期の microbiome の重要性を示唆する結果と考えられ, 現在進行中の GF マウスを用いた実験の結果と合わせた解釈が必要と考えられる。

【文献】

- 1) Kronman MP, *et al.* Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics*. 2012; 130 (4): e794-803.
- 2) Örtqvist AK, *et al.* Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory

bowel disease: a population-based study. *Gut*. 2019; 68 (2): 218-225.

- 3) Miyoshi J, *et al.* Peripartum antibiotics promote gut dysbiosis, loss of immune tolerance, and inflammatory bowel disease in genetically prone offspring. *Cell Rep*. 2017; 20 (2): 491-504.
- 4) Miyoshi J, *et al.* Metagenomic alterations in gut microbiota precede and predict onset of colitis in the IL10 gene-deficient murine model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020; S2352-345X (20) 30132-6.

炎症性腸疾患における STING 経路の活性制御機構の解明

向井 康治朗

(東北大学大学院生命科学研究所)

【目的】

自然免疫は先天的に備わっている異物への応答機構であり、感染初期の生体防御に重要である。自然免疫応答シグナルの一つである STING 経路は、DNA ウイルス感染時に細胞質中に露出した DNA に応答して炎症応答を誘導するシグナル伝達経路として同定された (Barber, *Nat Rev Immunol*, 2015)。さらに最近、炎症性腸疾患モデルである IL-10 欠損マウスの病態が、STING をさらに欠損させることでレスキューできることが報告され、炎症性腸疾患において STING 経路が創薬標的となり得ることが示唆された (Ahn, *Cell Rep*, 2017)。IL-10 の減少に伴う炎症性腸疾患の病態を改善するためには STING 経路の活性化を阻害する必要があるが、細胞内における STING 経路の活性制御機構は不明な点が多く残されている。

我々はこれまでに細胞内での STING の活性化機構を解析し、DNA 刺激依存的に STING が小胞体からゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体で STING の Cys88,91 がパルミトイル化されることが下流シグナルの活性化に必要であることを発見した³⁻⁵⁾。しかし、膜タンパク質である STING がパルミトイル化されることで、なぜ STING 経路が活性化されるのか、その分子機構は明らか

かになっていない。そこで本研究では、パルミトイル化 STING が下流シグナルを活性化する分子機構を明らかにし、炎症性腸疾患の新規治療戦略を提案することを目的とした。

【方法】

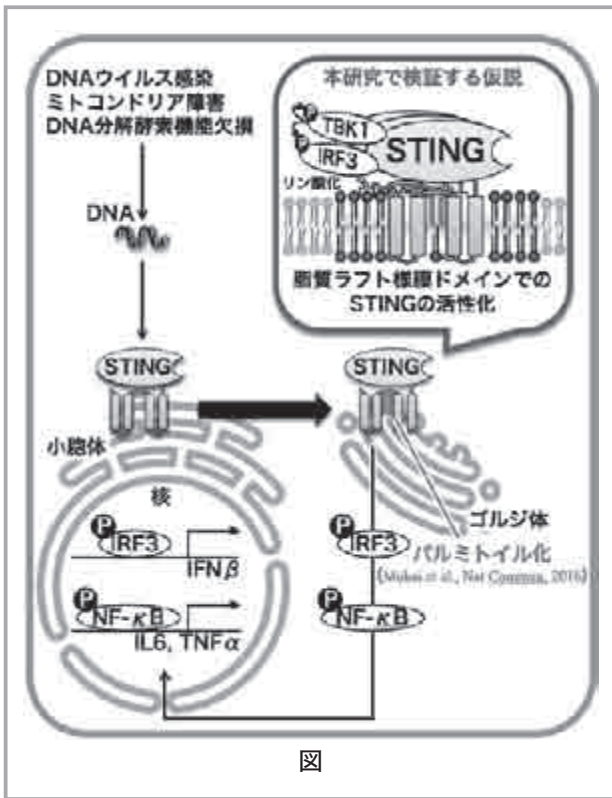
細胞膜においては、パルミトイル化されたタンパク質がスフィンゴミエリンとコレステロールで構成される脂質ドメイン (脂質ラフト) 上で会合することが知られている。そこで、ゴルジ体のスフィンゴミエリンの脂肪酸組成を変化させることが報告されている C6-セラミド処理をした所、STING の活性化が劇的に抑制されることを見出した⁵⁾。このことから、パルミトイル化された STING はゴルジ体の脂質ラフト様膜ドメインでクラスタリングして下流シグナルを活性化している可能性が考えられた。そこで本研究では、野生型 STING の DNA 刺激依存的な活性化に、ゴルジ体のスフィンゴミエリン及びコレステロールが必要であるかを、ゴルジ体に局在するスフィンゴミエリン代謝酵素 (SMS1) 及びコレステロール輸送タンパク質 (OSBP) の阻害剤を用いて検証した。また、STING がゴルジ体の脂質ラフト様ドメインで下流シグナルを活性化しているかを、STING の下流キナーゼ TBK1 の活性化体 (リン酸化体) 認識抗体による免疫染色とスフィンゴミエリン可視化プローブを用いて検証した。

【結果】

SMS1 の阻害剤である D609 や OSBP の阻害剤である 25-hydroxycholesterol (25-HC) で細胞を処理すると、DNA 刺激時の STING 経路の活性化が顕著に抑制できる結果を得た。また、DNA 刺激時にゴルジ体上に見られるリン酸化 TBK1 はスフィンゴミエリンプローブである Equinatoxin-II とよく共局在した。これらの結果から、DNA 刺激時に STING はゴルジ体の脂質ラフト様ドメインで下流シグナルを活性化している可能性が示唆された (図)。

【考察】

本研究から、細胞内における STING のパルミトイル化と脂質ラフトを介した活性制御機構が明らかとなった。加えて、最近我々は、STING の小胞体維持機構の破綻が自己炎症性疾患につながる事、及 STING 特異的パルミトイル化阻害剤が炎症病態の改善に有用である



図

ことを見出し¹⁻²⁾, STING のパルミトイル化を介した活性化機構が自己炎症性疾患の創薬標的になりうることを明らかにした。上述の通り, STING は炎症性腸疾患モデルである IL-10 欠損マウスにおいて病態発症に寄与していることが示唆されていることから (Ahn, *Cell Rep*, 2017), STING のパルミトイル化阻害剤や本研究で明らかにしたゴルジ体の脂質ラフト形成阻害剤が, 炎症性腸疾患の有用な創薬シーズとなることが期待される。

【文献】

- 1) Mukai, K., Ogawa, E., Uematsu, R., Kuchitsu, Y., Kiku, F., Uemura, T., Waguri, S., Suzuki, T., Dohmae, N., Arai, H., Shum, A. K., and Taguchi, T. Homeostatic regulation of STING by the retrograde membrane traffic to the ER. *Nat Commun* (2020). *in press*
- 2) Deng, Z., Chong, Z., Law, C. S., Mukai, K., Ho, F. O., Martinu, T., Backes, B. J., Eckalbar, W. L., Taguchi, T., and Shum, A. K. A defect in COPI-mediated transport of STING causes immune dysregulation in COPA syndrome. *J Exp Med* 217, e20201045. (2020).
- 3) Ogawa, E.*, Mukai, K.*, Saito, K., Arai, H. & Taguchi, T. The binding of TBK1 to STING

requires exocytic membrane traffic from the ER. *Biochem Biophys Res Commun* 503, 138-145 (2018). (* co-first author)

- 4) Hansen, A. L., Buchan, G. J., Rühl, M., Mukai, K., Salvatore, S. R., Ogawa, E., Andersen, S. D., Iversen, M. B., Thielke, A. L., Gunderstofte, C., Motwani, M., Møller, C. T., Jakobsen, A. S., Fitzgerald, K. A., Roos, J., Lin, R., Maier, T. J., Goldbach-Mansky, R., Miner, C. A., Qian, W., Miner, J. J., Rigby, R. E., Rehwinkel, J., Jakobsen, M. R., Arai, H., Taguchi, T., Schopfer, F. J., Olganier, D. & Holm, C. K. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E7768-E7775 (2018).
- 5) Mukai, K., Konno, H., Akiba, T., Uemura, T., Waguri, S., Kobayashi, T., Barber, G. N., Arai, H. & Taguchi, T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat Commun* 7, 11932 (2016).

炎症性腸疾患と皮膚免疫に共通する EpCAM の機能解析

森村 壮志

(国際医療福祉大学医学部)

【目的】

Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) は全ての上皮細胞に発現する細胞接着分子である。EpCAM 遺伝子の欠損は重度の腸管障害を引き起こす致死性の Congenital Tufting Enteropathy の原因となり, また EpCAM は大腸癌, 乳癌, 前立腺癌等の転移性悪性上皮腫瘍に強く発現しており, 臨床的に極めて重要である。我々は EpCAM の上皮組織における機能を解明するため, EpCAM をコンディショナルに欠損させるマウスを独自に作成した。本研究の目的は, EpCAM が腸管に強く発現することに着目し, 立体的腸上皮細胞培養法 (オルガノイド) を用いて, *in vitro* で EpCAM 欠損オルガ

ノイドを評価し、EpCAMが腸管免疫にどのような働きをするのかを解明することである。また、EpCAMコンディショナルノックアウトマウスを用いて、EpCAMが皮膚免疫にどのような役割を果たすかを解析し、皮膚疾患治療への応用についても検討することである(図1)。

【方法】

ROSA26Cre^{ERT2}EpCAM^{fl/fl}マウスの腸管から crypt を採取し、特殊な培養液(R-spondin, Noggin, EGF等を含む)の中でオルガノイドを作成培養した(図2)。4-hydroxytamoxifenを培養液に添加してEpCAM欠損オルガノイドを作成した。EpCAM欠損オルガノイドの大きさや形態、成長率や継代率をコントロールのオルガノイドと比較して評価した。細胞間接着に重要なtight junction, adherens junction, polarity, epithelial integrity等を蛍光免疫染色、ウエスタンブロットングで評価した。Fluorescence in situ hybridization (FISH)を用い幹細胞、Paneth細胞の位置や分布、数をカウントした。また、皮膚免疫を調べるため、乾癬様皮膚炎マウスモデルを用いた。マウスに連日6日間イミキモドクリームを皮膚及び耳に外用して乾癬様皮膚炎を起こさせた。乾癬様皮膚炎と皮膚の厚さを day1, 2, 7で評価した。Day1, 2, 7に耳と背部皮膚、リンパ節を採取して、病理組織学的解析(H&E, 免疫染色)、RNAレベルでEpCAMの発現やサイトカイン、ケモカインの発現を評価した。

【結果】

EpCAM欠損オルガノイドは、コントロールのオルガノイドと比較して大きさが小さく、細胞膜が粗で辺縁周囲に破砕した細胞を多数認めた。成長率は低下し、継代は不可能であった。上皮組織を構成する adherens junction マーカー (E-cadherin), polarity マーカー (f-actin) は維持されていたが、tight junction マーカー (claudin-1, claudin-7) や epithelial integrity は異常を認めた。FISHでは、EpCAM欠損オルガノイドでは幹細胞の数が著明に減少していた。次に乾癬様皮膚炎を評価した。EpCAMノックアウトマウスとコントロールマウスにイミキモドクリームを外用すると、EpCAMノックアウトマウスの方が有意に乾癬様皮膚炎と耳の厚さが減弱していた。病理組織ではEpCAMノックアウトマウスの方が炎症細胞浸潤が少なかった。また、RNAレ

ベルではTNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-23p19の産生は、EpCAMノックアウトマウスの方が減少していた。

【考察】

EpCAM欠損オルガノイドでは成長が阻害され、継代ができなかったことから、EpCAMが幹細胞に強く影響していると考えられた。上皮組織を構成するtight junction マーカーと epithelial integrity マーカーは、EpCAM欠損オルガノイドでは異常を認め、EpCAMが上皮組織に重要な分子であることを示した。FISHでは、EpCAM欠損オルガノイドでは幹細胞の数が著明に減少していたことから、EpCAMが幹細胞を維持するのに重要な分子であることがわかった。加えて、EpCAMノックアウトマウスで乾癬様皮膚炎と耳の厚さ、炎症性サイトカインが減弱減少していたことから、乾癬様皮膚炎の機序にEpCAMが関与すると考えた。浸潤する炎症細胞にも違いが生じており、どの細胞が炎症に関与しているのかを調べるのが今後の課題である。

以上より、EpCAM欠損状態では腸管幹細胞が直接障害されており、EpCAMが腸管幹細胞を維持するのに重要な細胞接着分子であることがわかった。また乾癬の病態にEpCAMが関与していることが示唆され、治療の応用に適応できる可能性がある。

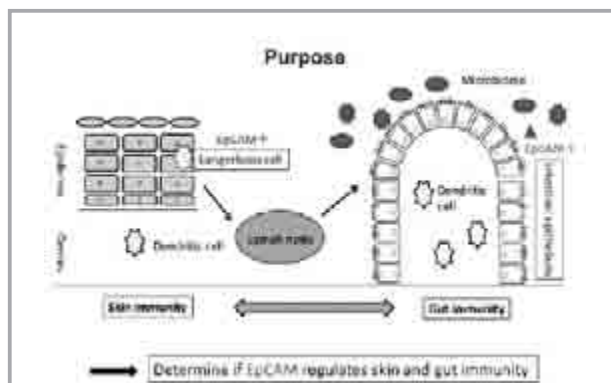


図1

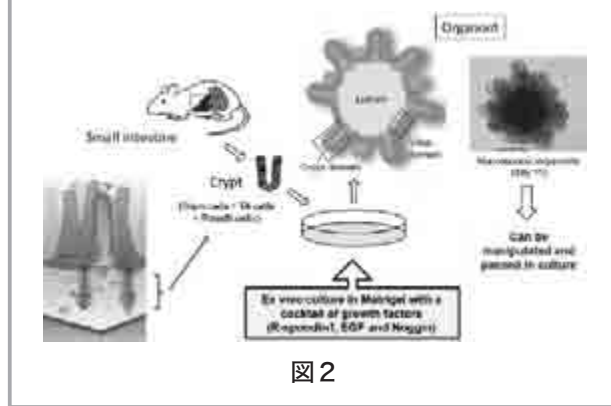


図2

エネルギー産生・代謝異常を介した炎症性腸疾患における脳腸関連の機序の解明

良原 丈夫

(大阪大学大学院医学系研究科)

【背景】

炎症性腸疾患患者では抑うつ状態を呈する患者が多く、発症・増悪において精神的ストレス・抑うつ状態が引き金となることがよく知られているが、そのメカニズムについてはよく分かっていない。うつ病の脆弱性の一つとして中枢神経系でのエネルギー代謝異常が挙げられていることから、腸管炎症がエネルギー代謝異常を介して脳に器質的な障害をもたらす抑うつ状態やうつ病の脆弱性となるのではないかと仮説を立てた。本研究では腸管炎症と抑うつ症状の相互関係、いわゆる脳腸関連における中枢神経系でのエネルギー代謝異常について検討することを目的とした。

【方法】

8-12週齢のATP濃度可視化タンパク質(GO-ATeam2)発現マウスに対して拘束ストレスを負荷し抑うつモデルマウス(Restraintマウス)を作成した。またコントロール群と抑うつモデルマウスに対して2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の経口投与により腸炎を誘導した(DSSマウス, Restraint-DSSマウス)。腸炎の評価は体重変化・腸管長・病理学的評価に加えて、脾臓・大腸粘膜固有層(LPL)からリンパ球を抽出し炎症性サイトカイン発現の解析により行った。コントロール群・DSSマウス・Restraint-DSSマウスから作成した脳スライスを人工脳脊髄液灌流下に蛍光実体顕微鏡で撮影しATP濃度の測定を行った。

【結果】

Restraint-DSSマウスではDSSマウスと比較して体重減少と腸管長の短縮、病理スコアの悪化を認め、腸炎は有意に増悪していた。またLPLの*IL-17*と脾細胞での*IFN- γ* のmRNA発現が有意に亢進していた。また詳細は未発表データのため割愛するが、Restraint-DSSマウスの脳スライスではATP産生の異常を認め、エネルギー代謝異常をきたしていることが示唆された。

【考察】

今回の検討で精神ストレスが腸炎を増悪させ、精神ストレスと腸炎刺激により中枢神経系でのエネルギー代謝異常が誘導されることが示唆された。中枢神経系でのエネルギー代謝異常が来たす神経機能異常・腸炎に与える影響について今後解析予定である。

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

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

井上 智 彰

(九州大学大学院医学研究院)

【目的】

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

【方法】

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

【結果】

GLP-1R floxed Nestin-Cre マウスの GLP-1 受容体の発現を RT-PCR 法で確認を行った。GLP-1R floxed Nestin-Cre マウスでは視床下部、脳幹において GLP-1 受容体が欠損していることを確認した。コントロールマウス及び神経組織特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを 18

週齢まで飼育し、血糖値、食事摂取量、体重の変化について評価を行ったが、両群に差を認めなかった。また、肝逸脱酵素 ALT についても両群に有意な変化は認めなかった。

【考察】

今年度は、神経特異的 GLP-1 受容体欠損マウスの作出し表現型の解析を行った。しかしながら神経特異的 GLP-1 受容体の欠損のみでは、肝機能を含めた表現系に変化を認めなかった。脂肪肝の状態での評価も重要と考えられ、神経組織特異的及び単球特異的 GLP-1 受容体欠損マウスに高脂肪負荷を行い検討する予定としている。

血管内皮における O-GlcNAc 修飾による糖尿病合併症進展機構の解明

大橋 夏子

(滋賀医科大学)

【目的】

糖尿病、特に肥満糖尿病の世界的な急増は克服すべき重要な臨床課題である。糖尿病や肥満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り立ち機構の一つとして着目されてきたことから、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の生理的役割と糖尿病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-floxed マウスとの交配を行い、10 週齢にてタモキシフェンを腹腔内投与することで血管内皮細胞特異的 OGT 欠損 (OGT-VEKO) マウスを作製し、表現型を解析した。

【結果】

通常食モデルにおいて、OGT-VEKO マウスは対照マ

ウスと比較し体重増加不良を呈した。高脂肪食モデルでは、Metabolic cage を用いた基礎代謝の検討では両マウスで差を認めなかったが、OGT-VEKO マウスでは体重増加がより顕著に抑制された。さらに、空腹時血糖、耐糖能及びインスリン感受性は改善し、皮下脂肪及び褐色脂肪組織の肥大化の抑制、肝臓への異所性脂肪沈着の軽減と、それに伴う血中 AST 及び ALT の上昇の抑制を認め、脂肪肝炎の改善が示唆された。高脂肪食及び STZ 投与では、網膜症や腎症、神経障害の惹起は認められなかった。しかし、網膜での血管新生を評価するモデルである相対的低酸素による虚血性網膜症モデル（未熟児網膜症モデル）で検討すると、OGT-VEKO マウスの網膜において新生血管の増殖が顕著に抑制された。

【考察】

OGT-VEKO マウスでは高脂肪食による肥満に抵抗性を示し、血管新生が惹起される虚血性網膜症モデルにおいて網膜の血管新生が顕著に抑制されることが明らかとなった。脂肪組織の肥大化には、組織の酸素需要の増大などにより血管新生が必要となるが、OGT-VEKO マウスでは肥満形成時の脂肪組織の増大に必要な血管新生が障害されることで、体重増加が抑制されている可能性が示唆される。脂肪組織における血管の評価を含め、引き続き詳細な機序を検討していく。

肥満脂肪細胞における酸化還元状態の病態学的意義 解明

奥野陽亮

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

肥満脂肪組織において増加する酸化ストレス (Fat ROS) の病態学的意義を探索した。

【方法・結果・考察】

Fat ROS 低減・増加マウスの解析から、Fat ROS は、healthy adipose expansion を抑制することを示した¹⁾。

また、脂肪細胞特異的グルココルチコイド受容体欠損マウスやクッシング症候群脂肪組織臨床検体の解析から、クッシング症候群において脂肪細胞 GR は、脂質分解や脂肪組織線維化を介し、healthy adipose

expansion を抑制することを示した²⁾。

更に、3T3-L1 脂肪細胞において核内 SREBP1 の新規結合因子を探索し、機能未知因子 X を同定した。結合ドメインを同定し、X が SREBP1 の活性を促進することを見出した。また、X の変異を原因とする疾患の発症には、SREBP の機能変化が原因となる可能性を明らかにした (in submission)。

【文献】

- 1) Okuno, Y., Fukuhara, A., Hashimoto, E., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Otsuki, M. & Shimomura, I.: Oxidative stress inhibits healthy adipose expansion through suppression of SREBF1-mediated lipogenic pathway, *Diabetes*, 67, 1113-1127 (2018)
- 2) Hayashi, R., Okuno, Y., Mukai, K., Kitamura, T., Hayakawa, T., Onodera, T., Murata, M., Fukuhara, A., Imamura, R., Miyagawa, Y., Nonomura, N., Otsuki, M. & Shimomura, I.: Adipocyte GR inhibits healthy adipose expansion through multiple mechanisms in Cushing syndrome, *Endocrinology*, 160, 504-521 (2019)

弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 によるインスリン抵抗性制御機構の解明

奥山朋子

(横浜市立大学医学部)

【目的】

我々は細胞外基質における弾性線維形成に必須の分子である Fibulin-5 (Fbln5) がインスリン感受性やエネルギー代謝の制御へ関与している可能性を見出しており、本研究ではその機構の解明を目的とし検討を行った。

【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) および野生型マウス (WT) に生後 8 週齢より通常食あるいは高脂肪食負荷を行った。Fbln5KO は体重非依存性のインスリン感受性の亢進を認め、高脂肪食誘導性の肥満・肝脂肪蓄積・脂肪細胞肥大化が抑制された。グルコースクランプを用いた解析により、Fbln5KO では全身においてインスリ

ン感受性が亢進していると考えられた。Fbln5KO では皮脂腺の萎縮を認め、高脂肪食負荷時の皮膚における各種脂肪酸代謝関連分子の発現誘導が消失しており、WT に比較し寒冷刺激に対する体温低下が顕著であったが、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むしろ上昇した。Fbln5-floxed マウスを入手し各臓器特異的 Fbln5KO を作成したところ、肝細胞特異的 Fbln5KO および脂肪細胞特異的 Fbln5KO は体重変化やインスリン感受性の変化を呈さなかった。さらに、野生型マウスの肝組織および初代培養肝細胞における Fbln5 の発現を比較したところ、肝臓において Fbln5 は主に肝細胞外に発現していた。Fbln5KO は血管の脆弱性を呈することから、標識インスリンをマウス下大静脈より投与し直後の肝臓におけるインスリン取り込みを評価したところ、Fbln5KO では野生型に比較し取り込みの亢進を認めた。現在血管平滑筋特異的 Fbln5KO を樹立しており、今後インスリン感受性に関する表現型を検証する。また、現在通常食負荷 Fbln5KO および WT の酸素消費量の測定を進めており、Fbln5 欠損によるエネルギー代謝の変化の機構を検証していく。

【考察】

Fbln5KO において全身におけるインスリン感受性の亢進と体重増加の抑制を認めた。臓器特異的 Fbln5 欠損マウスの解析により、Fbln5 欠損による代謝表現型の変化は臓器連関や間接作用を介した作用であると考えられ、皮膚を介したエネルギー代謝の変化や、血管におけるインスリン透過性の亢進の寄与が示唆された。弾性線維を介した新たな代謝制御機構を提唱する。

血管内皮 PDK1 の病態生理学的役割の解明

小 畑 淳 史

(川崎医科大学医学部)

【背景】

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 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)

【背景】

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。しかしながら、肥満がどのように癌発症に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。本研究では独自に作成したマウスモデルを用いて M2 マクロファージが癌の発症・進展に与える影響及びその分子機構について調べている。肥満と癌発症をつなぐ機序に M2 マクロファージが如何に関わるかを分子機構レベルで明らかにしたい。

また、腫瘍内で細胞障害性が低下した疲弊性 T 細胞は免疫チェックポイント分子である PD-1 を発現している。我々は肥満で癌発症・進展が促進される機序に T 細胞疲弊が関連しているのではないかと考え、本研究を行った。

【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。特にマクロファージ、CD8⁺ T 細胞を評価の対象とした。また、野生型同腹仔マウスを高脂肪食群と通常食群に分けて、正常乳腺についても同様に解析した。

【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。高脂肪食負荷群の腫瘍では通常食群と比較して、アポトーシス抑制などを介した癌細胞増殖促進作用をもつ OPN が上昇していた。過去にマクロファージ、T 細胞が OPN の主要な産生細胞であるとの

報告があり、特にマクロファージ、CD8⁺ T 細胞を評価することとした。正常乳腺と腫瘍から F4/80⁺のマクロファージを分離し、遺伝子発現を解析したところ、乳腺のマクロファージと比較して腫瘍内のマクロファージは *Opn* および M1 marker genes を高発現していた。通常食群と高脂肪食群の腫瘍内マクロファージの *Opn* の遺伝子発現レベルに差はなかった。FACS で腫瘍においては CD11c⁺ M1-like macrophages が多数を占めており、通常食群と高脂肪食群で差はなかった。よって、高脂肪食負荷で腫瘍の *OPN* の発現が上昇する原因となっている細胞はマクロファージ以外と考え、次に CD8⁺ T 細胞を解析した。FACS では正常乳腺と比べ腫瘍では PD-1⁺ CD8⁺ T 細胞が増加しており、通常食群と比較して高脂肪食群で著明であった。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。

【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。したがって、OPN を発現する PD-1⁺ CD8⁺ T 細胞が肥満関連癌の治療ターゲットとなる可能性がある。

【文献】

- 1) Kado T, Nawaz A, Takikawa A, Usui I, Tobe K. Linkage of CD8⁺ T cell exhaustion with high-fat diet-induced tumorigenesis. *Sci Rep.* 22; 9 (1): 12284 (2019).

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)

【目的】

本研究では、血糖値変動に応答して自律的にインスリンを放出する自律型インスリン投与デバイスを開発

し、革新的な糖尿病治療戦略の実現を目指す。そこで我々は、グルコース濃度に応答して物理的性質が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の形式で、人工膵臓様の機能を有する、スマートインスリンデバイスを開発した。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ており（*Sci. Adv.* 3: eaaq0723, 2017）、今回、臨床応用を見据えた次世代型デバイスの開発に取り組むこととした。

【方法】

我々は、インスリン放出のスケールアップを図るために、血液透析用中空糸をゲルと融合した新たなデバイスを開発した。既に、体重がマウスの約10倍の正常ラットを用いたグルコース負荷試験において、本デバイスの血糖依存的なインスリン放出や血糖降下作用を確認している。今回、詳細なインスリン放出特性や、血糖日内変動に与える影響など、その効果と安全性について解析を行った。

【結果】

ラットの皮下に本デバイスを留置し、内頸静脈に挿入したカテーテルよりグルコース溶液を持続的に静注して、血糖値と血中インスリン濃度を10分間隔で計測した。この時、血中のデバイス由来インスリン濃度は、グルコース注入のオン・オフに伴う血糖値の変動に対して、速やかに応答することを見出した。さらに、持続血糖モニタリング装置をラットの皮下に留置して、デバイスが血糖日内変動に及ぼす影響を評価した。ストレプトゾトシンを少量用いて軽症糖尿病モデルを作製したところ、主にラットの活動期に血糖値が上昇し、血糖日内変動が生じた。人工膵臓デバイスを用いて治療を行うと、活動期の高血糖がより顕著に改善し、一方で、非活動期の正常域血糖値には影響を及ぼさないことが明らかになった。

【考察】

上述の研究成果により、大幅なスケールアップ、インスリン放出特性の個体レベルでの評価などに成功した。さらに、「血糖依存性のインスリン放出」という本デバイスの特性を活かして、血糖日内変動を抑制することを新たに見出した（*Commun. Biol.* 3: 313, 2020）。次年度は、ヒトとほぼ同等の体重を有するブタを用いて、ヒト用デバイス作製の基盤となるデータを取得する予定である。

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）

【目的】

膵β細胞機能制御における GLP-1 受容体作動薬作用の新規経路を同定する。

【方法・結果】

マウス単離膵島に GLP-1 受容体作動薬リラグルチド（Lira）を添加し、定量的プロテオーム解析を行った。Lira 添加により発現上昇したタンパク質の多くは、Alpha-amylase 1（Amy-1）などの膵腺房細胞に発現する外分泌酵素関連タンパクであったことから、GLP-1 により膵島と周囲の腺房細胞の接着が促進する可能性を想定した。また Lira 添加により、膵腺房細胞に発現し膵β細胞増殖を促進することが知られる Lithostatine-1（Reg1）が発現上昇することに着目した。我々は、単離膵島と膵腺房細胞の共培養系を確立し、膵島における Reg1 遺伝子発現が、膵島単独の培養では Lira 添加による変化を認めないが、腺房細胞と共培養することで、Lira 添加により上昇することを確認した。また膵島において、Amy-1 などの膵外分泌酵素や、P-Cad や Cx26 など特定の細胞接着因子の発現も同様に、腺房細胞と共培養することで、Lira 添加により上昇することを確認した。免疫染色にて P-cad は膵島と腺房細胞の細胞表面に発現し、Lira により細胞表面における発現が上昇したことから、Lira は接着分子の発現誘導により膵島と腺房細胞の接着を促進し、腺房細胞由来の Reg1 の発現が上昇したと考えられた。次に Reg1 欠損マウスを用いた解析を行い、免疫染色にて、Reg1 は α -amylase と共染し膵腺房細胞に発現しており、膵島での発現を認めなかった。Reg1 欠損マウスの単離膵島では、野生型マウスに比較し、Lira 添加時の ATF2 遺伝子発現が低下していた。次に、Lira を添加し培養した Reg1 欠損マウス単離膵島の EdU 染色を行い、膵β細胞増殖を評価した。野生型マウス、Reg1 欠損マウスともに、腺房細胞の付着していない膵島単独では、Lira 添加による膵β細胞増殖を認めなかった。一方、Lira 皮下注後の Reg1

欠損マウスの膵β細胞増殖は、野生型マウスに比較して低下していた。

【考察】

リラグルチドは、膵島に作用し、接着分子の発現誘導により膵島と腺房細胞の接着を促進し、腺房細胞由来のReg1の誘導によりATF2を介して、膵β細胞増殖を促進する可能性がある。

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】

肥満や2型糖尿病に罹患した親を持つ子では生活習慣病の発症率が高く、その遺伝性が注目されている。この遺伝の機序として肥満・糖尿病により配偶子のエピゲノムが変化し、それが次世代に引き継がれて子の生活習慣病リスクを上昇させる可能性が注目されている。本研究では、母親の代謝異常が胎盤機能の異常を介して子供の代謝疾患リスクを上昇させるのではないかと、そして母性肥満と胎盤肥大を繋ぐメカニズムとして肥満女性の卵子におけるエピゲノムに異常が起こっているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、胎盤特異的インプリンティング破綻マウスモデルを用いて胎盤肥大が次世代の代謝に与える影響を調べる。

【方法】

肥満・糖尿病を発症した雌マウスから卵子を採取し、体外受精することで得られる次世代が安定的に代謝疾患を発症するマウスモデルの作製に取り組んだ。雌性C57BL/6マウスに高脂肪食を給餌し、肥満、糖尿病を発症させた。通常食群、高脂肪食群のそれぞれから卵子を採取し、体外受精により子世代を得て、既報条件に従い、子世代の表現型を解析した。

【結果】

子世代への高脂肪食の給餌により、通常食を摂取していた母体由来の卵子から生まれた子どもに比べ、高脂肪食を摂取していた母体由来の卵子から生まれた子どもで

はより大きな体重の増加を認めたが、既報に比べてその差は軽微であった。

【考察】

今後、詳細解析を行っていくには十分でないと考えられたため、現在、マウス系統、餌の組成や給餌時期、評価時期、評価方法、遺伝性の肥満・糖尿病発症モデルを使用するなどの条件検討を行い、最適条件の設定を進めている。並行して、胎盤機能の解析手法についても条件検討を進めている。安定して表現型が得られるマウスモデルが確立でき次第、胎盤の機能解析を実施し、表現型との関連を評価していきたい。

仔の表現型をより強く、より安定的に得るため、マウス系統、餌の組成や給餌時期、遺伝性肥満・糖尿病発症モデルの使用などの条件検討を行い、最適条件の設定を行う。並行して、胎盤の機能解析方法の条件検討を行い、安定して強い表現型の仔を得られ次第、胎盤の機能解析を実施する。

イソプレノイド合成経路で脂肪組織発達に及ぼす影響の検討

後藤 剛

(京都大学大学院農学研究科)

助成者らは「Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成 (FFDR)」の支援の下、脂肪組織機能制御機構に関する以下の2研究課題に取り組んできた。

1. 脂肪組織形成・発達における脂肪細胞イソプレノイド合成経路の生理的意義の解明
2. 褐色脂肪組織機能制御機構の解明と褐色脂肪組織機能制御活性を有する腸内細菌産生代謝産物の同定およびメカニズム解析

各研究課題の研究内容と成果の概要について以下に記載する。

1. 脂肪組織形成・発達における脂肪細胞イソプレノイド合成経路の生理的意義の解明

イソプレノイド合成経路はコレステロールをはじめとする種々の内因性物質産生を担う代謝経路である。本経

路の律速酵素である HMG-CoA reductase (HMGCR) 阻害剤はスタチン系薬剤として広く用いられており、疾患の発症とも深く関連する。助成者らはこれまでにイソプレノイド化合物である, farnesyl pyrophosphate (FPP) や geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) が核内受容体型転写因子, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) や liver X receptors (LXRs) の活性制御を介して脂肪細胞分化過程を制御する内因性代謝物であることを培養細胞レベルで明らかにしてきた (*Biochem J.* 2011, *Biochem Biophys Res Commun.* 2016)。本研究課題では脂肪細胞におけるイソプレノイド合成経路の生理的意義の検討を行った。

Hmgcr の第 12–14 エキソンを挟むように flox 配列を導入した flox マウスと脂肪細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現する Adipoq-Cre マウスを交配させ、脂肪細胞特異的 *Hmgcr* 欠損マウス (aKO マウス) を作成した。aKO マウスは全身の脂肪組織がほぼ完全に消失し、普通食条件下で摂餌量、体重の増加を示した。さらに aKO マウスは高血糖、耐糖能異常、インスリン抵抗性、高中性脂肪血症、脂肪肝などの代謝異常を示した。これらの症状は脂肪委縮時に認められる表現型であったため、野生型マウス由来の脂肪組織を aKO マウスに移植したところ、aKO マウスで認められた上記の代謝異常はほぼ完全に回復した。これらの結果より、脂肪細胞のイソプレノイド合成経路は脂肪細胞の発生・発達において生理的に重要であることが示唆された。

Hmgcr 欠損時の脂肪組織萎縮機構について詳細に検討するため、flox マウスより前駆脂肪細胞を単離したのち、タモキシフェン活性化型 Cre を安定発現させた細胞を樹立した。本細胞を脂肪細胞へと分化誘導後、タモキシフェン添加により *Hmgcr* を欠損させたところ、アポトーシスによる細胞死の亢進が認められた。*Hmgcr* 欠損によって誘導されるアポトーシスは FPP の添加では回復しなかったが、GGPP 添加によってほぼ完全に回復した。また、分化した脂肪細胞において GGPP 合成酵素をノックダウンすると、*Hmgcr* 欠損時と同様にアポトーシスが誘導された。以上より、脂肪細胞のイソプレノイド合成経路は GGPP 産生を介してアポトーシスを抑制することで脂肪組織の機能維持に必須の役割を担っていることが明らかになった (*iScience.* 2018)。

2. 褐色脂肪組織機能制御機構の解明と褐色脂肪組織機能制御活性を有する腸内細菌産生代謝産物の同定およびメカニズム解析

褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞は高い熱産生能を有し、肥満や肥満関連疾患の標的として期待されている。助成者らは褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞が担う「褐色脂肪組織 (BAT, brown adipose tissue) 機能」の新たな制御機構と制御因子について検討を行った。

助成者らは肥満状態がアドレナリン刺激による BAT 機能亢進に与える影響について検討を行い、肥満状態では寒冷刺激による BAT 機能の亢進が抑制されることを見出した。そこで、肥満状態の脂肪組織で惹起されるマクロファージ浸潤亢進に伴う慢性炎症状態と BAT 機能の亢進の関連性について、クロドロン酸リポソーム投与によりマクロファージを欠乏させたマウスを用いて検討した。クロドロン酸リポソーム投与マウスでは、肥満に伴う脂肪組織の炎症状態の軽減が認められるとともに、寒冷刺激による BAT 機能の亢進が強化され、肥満に伴う寒冷耐性の低下が減弱することが明らかになった。さらに、慢性炎症状態における BAT 機能亢進の低下は、tumor necrosis factor α や interleukin-1 β 、一酸化窒素といったマクロファージ由来の炎症性メディエーターによって惹起されることが示唆された (*Am J Physiol Cell Physiol.* 2013, *Cytokine.* 2016, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016)。その分子機構の一端として、炎症状態の脂肪組織における mitogen activated protein kinase 経路の活性化や PPAR α の発現・活性低下が関与している可能性を示した。

また、BAT 機能の制御因子として食事成分の腸内細菌代謝産物の機能に着目し、検討を行った。助成者らはこれまでの研究において、魚油に多く含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸、eicosapentaenoic acid や docosahexaenoic acid 摂取により、陽イオンチャネル transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) 依存的に BAT 機能の亢進が惹起されることを明らかにした (*Sci Rep.* 2015)。そこで、多価飽和脂肪酸の腸内細菌代謝産物に着目し、TRPV1 活性に与える影響について評価したところ、代表的な n-6 系多価不飽和脂肪酸であるリノール酸由来の代謝産物、10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid (KetoA) によっ

て、TRPV1 の活性化が惹起されることが明らかとなった。KetoA をマウスに対し長期投与したところ、高脂肪食誘導性肥満の抑制、酸素消費量の増加、BAT 機能の亢進が認められた。KetoA 長期投与によるこれらの効果は TRPV1 欠損マウスでは認められなかった。KetoA 単回投与は脂肪組織において交感神経活性の指標であるノルアドレナリン代謝回転を亢進させ、褐色脂肪細胞・ベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子 uncoupling protein 1 (UCP1) の発現を上昇させたが、KetoA による UCP1 発現誘導は β -アドレナリン受容体遮断薬および消化管迷走神経切除によって消失した。以上より、KetoA は「消化管 TRPV1 活性化」→「求心性迷走神経」→「中枢神経」→「交感神経活性化」→「BAT 機能亢進」経路を介して BAT 機能活性化作用を示すことが明らかになった (FASEB J. 2017)。さらに、n-3 系多価不飽和脂肪酸の腸内細菌代謝産物が PPAR γ および GPR40 活性化を介してマクロファージの終末分化を制御することでマクロファージ極性を調節し、抗炎症作用を示すこと (FASEB J. 2018)、enone 構造を有する多価不飽和脂肪酸代謝産物がマクロファージに対する抗炎症活性を示すことで、炎症による BAT 機能抑制作用を軽減させる可能性を示した (Mol Nutr Food Res. 2017)。以上より、多価不飽和脂肪酸の腸内細菌代謝産物は TRPV1 活性化や炎症抑制作用を介して BAT 機能調節作用を示すことが明らかとなった。これらは腸内細菌による宿主代謝制御機構の一端を担っていることが示唆される。

【総括】

肥満は脂肪組織の過剰蓄積状態と定義され、脂肪組織機能の解明は糖尿病など肥満関連疾患の有用な予防・改善策の創出への寄与が期待される。本研究課題において、助成者らは、『脂肪組織形成・発達において脂肪細胞のイソプレノイド合成経路が必須の役割を担うこと』、『肥満状態で惹起される慢性炎症状態下では脂肪組織の熱産生機能亢進が減弱すること、いくつかの多価不飽和脂肪酸の腸内細菌代謝産物が BAT 機能調節作用を有し、腸内細菌による宿主代謝制御に関与する可能性があること』を見出した。今後は、これらの知見を基盤とした肥満関連疾患の新たな予防・治療法の創出へと昇華させることを目標に、さらなる検討を進めたい。

【謝辞】

本研究課題に対して長年にわたり貴重な研究助成金を賜りましたことを、門脇孝先生をはじめとする FFDR 審査委員および選考委員の先生方、日本応用酵素協会の運営関係者の方々に厚く御礼申し上げます。助成者としてご推薦頂くとともに本研究を直接ご指導下さった河田照雄先生、研究実施に携わってくれた所属研究室の大学院生、職員および共同研究先の先生方にも心より深謝申し上げます。

血管および脂肪組織由来新規分泌因子 Favine の機能解析

小林祥子

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

我々は、血管から分泌される、糖尿病と肥満や動脈硬化症に関わると推定される新規因子として、Fat/vessel-derived secretory protein (Favine)/ Coiled-coil domain containing 3 (CCDC3) を同定した。我々の実験結果から Favine は、血管と脂肪で高く発現する分泌因子であり、糖脂質代謝異常や炎症に関連する刺激により、その遺伝子発現量が変動することが明らかとなったが、その機能は未知であった¹⁾。Favine の機能解析を目的に本研究を行った。

【方法】

Favine 遺伝子改変 3T3-L1 脂肪培養細胞および血管内皮培養細胞ならびに Favine ノックアウトマウスにおける機能解析

【結果】

Favine 過剰発現 3T3-L1 細胞は分化が亢進し、また脂肪合成が促進することが明らかとなった。Favine 欠損マウス (以下、KO マウス) は、発生、生存、成長面において野生型と差を認めなかった。KO マウスは、若齢時のインスリン感受性は正常であったが、加齢に伴う体重増加および脂肪肝の進展が抑制され、1 年齢では野生型に比してインスリン抵抗性の軽減を認めた。KO マウスの脂肪組織では脂肪細胞サイズが小さく、脂肪合成関連遺伝子発現の低下が認められた²⁾。血管内皮細胞

HUVECにおいて、TNF α により Favine 遺伝子発現量が低下し、Favineにより TNF α 誘導性の炎症関連因子の発現が変動した。Favine/ApoE欠損マウスは重篤な動脈硬化症の病態を呈した。

【考察】

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

【文献】

- 1) Identification of a new secretory factor, CCDC3/Favine, in adipocytes and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 392, 29-35 (2010)
- 2) Fat/Vessel-derived Secretory Protein (Favine)/CCDC3 Is Involved in Lipid Accumulation. *J. Biol. Chem.* 290, 7443-7451 (2015)

これまでの研究助成に深謝致します。

Activin Bによる糖・エネルギー代謝制御機構の解明

小林 直 樹

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

TGF β スーパーファミリーリガンドのひとつである Activin Bが絶食やケトジェニック食摂取などの代謝ストレス時に肝臓において発現が強く誘導されたことから、ActivinBの代謝制御における役割を明らかにすべく検討を行った。

【方法および結果】

Activin Bの強制発現によってインスリン感受性・インスリン分泌の改善を伴って糖尿病モデルマウスの耐糖能異常は著明に改善された。ActivinBによる効果の作用機序について検討したところ、絶食時に誘導され代謝調節に関与することが知られている FGF21が、Activin Bによって誘導され、逆に ActivinBのノックダウンより絶食時の FGF21発現は障害されていた。また、FGF21ノックアウトマウスを用いた検討から、ActivinB強制発現によるインスリン感受性亢進作用における FGF21の寄与が示された。

続いて、肥満マウスモデルにおいて AAV (アデノ随

伴ウイルスベクター)を用いて Activin Bを持続的に発現させることによる影響を解析したところ、短期的な Activin B強制発現時と同様に、肥満マウスのインスリン抵抗性の改善およびインスリン分泌の亢進を伴い、耐糖能異常は著明に改善した。また、持続的な Activin B発現亢進により除脂肪体重には変化を認めず、肥満マウスの脂肪量および体重は有意に低下した。遺伝子発現解析から、皮下脂肪組織および褐色脂肪組織において FGF21発現の亢進を認めた。また、持続的に Activin Bを発現亢進したマウスにおいては、肥満により組織学的に白色化した褐色脂肪組織の褐色化を認めており、Ucp1や Cideaなどの褐色脂肪組織特異的な遺伝子群の発現量は有意に上昇していた。以上から、持続的な Activin B産生亢進により褐色脂肪組織機能の改善が示唆された。現在、これらの効果が FGF21によるものかノックアウトマウスを用いて引き続き検証を行っている。

【考察】

ActivinBとその下流シグナル伝達経路は絶食時の FGF21発現誘導に寄与しており、また Activin Bの強制発現では少なくとも一部で FGF21発現誘導を介して全身の代謝改善作用を及ぼすものと考えられた。

糖尿病患者における食事調査の申告誤差と肥満との関連：CLEVER研究

近藤 慶子

(滋賀医科大学)

【目的】

糖尿病患者において、エネルギー摂取量の管理は治療上重要である。エネルギー摂取量の評価には、通常、食事記録法や思い出し法等の食事調査が用いられる。しかし、これらの方法は対象者の自己申告による情報をもとに評価しており、特に肥満者における申告誤差が報告されている。一方で、エネルギー消費量の最も正確な評価法は二重標識水法とされており、体重・体組成が一定である場合、エネルギー消費量はエネルギー摂取量と同等となる。本研究では、糖尿病患者における、食事調査によるエネルギー摂取量と二重標識水法によるエネルギー

消費量の乖離と肥満との関連について検討した。

【方法】

滋賀医科大学医学部附属病院糖尿病内分泌内科に外来通院中の60~79歳の糖尿病患者を対象とした。二重標識水法を用い、総エネルギー消費量 (total energy expenditure, TEE) を測定した。また、3日間の食事記録法によりエネルギー摂取量 (energy intake, EI) を評価した。対象者を肥満者 (BMI \geq 25kg/m²) あるいは非肥満者 (BMI < 25kg/m²) に分け、TEE と EI の差および EI/TEE 比を男女別に比較した。

【結果】

糖尿病群52名(平均年齢70.2歳, 男性28名 [53.8%])のうちインスリン治療18名(34.6%), 経口薬治療20名(38.5%), 食事療法14名(26.9%)であった。全対象者におけるTEEとEIの差は238 \pm 412kcal/day, EI/TEE比は0.90 \pm 0.19であった。女性において, EI/TEE比はBMIとの間に有意な負の関連を認めた (R = -0.515, p = 0.010) が, 男性では関連を認めなかった。一方, 女性において, EI/TEE比は肥満者で非肥満者に比し有意に低値を示し (0.85 \pm 0.15 vs 1.01 \pm 0.21, p = 0.045), 男性では有意な差を認めなかったが, 肥満者, 非肥満者ともに低値を示した (0.85 \pm 0.20 vs 0.87 \pm 0.17, p = 0.785)。

【考察】

非肥満女性のEI/TEE比は約1であり, 食事調査によるエネルギー摂取量の推定が正確であることが示唆された。一方, 肥満女性および男性におけるEI/TEEは低く, 食事調査によるエネルギー摂取量は13~15%程度の過小評価が示唆された。食事調査を用いたエネルギー摂取量の推定には注意が必要であると考えられる。

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

笹子 敬 洋

(東京大学大学院医学系研究科)

【背景・目的】

我々は肝臓における摂食状態に応じた代謝調節機構に着目し, Sdf2l1 という分子が, 摂食時に一過性に誘導

される小胞体ストレスを介して糖脂質代謝を調節する一方, その発現低下が肥満・糖尿病の病態形成に関与していることを見出し, 更なる詳細な機序について検討を加えた。

【方法】

Sdf2l1 の機能を考える上で重要な, 相互作用の相手となる蛋白を探索した。またヒト肝生検検体を用い, Sdf2l1 の発現誘導と臨床情報の照らし合わせを行なった。

【結果】

独自に樹立した Sdf2l1 欠損線維芽細胞の膜画分を用い, 免疫沈降と質量分析の手法によって候補蛋白を絞り込んだ。その中から膜輸送蛋白 TMED10 に着目し, 両者が協調的に変異蛋白のユビキチン化に寄与していることを示した。またヒト糖尿病症例における転写因子 XBP-1s による Sdf2l1 の発現誘導は, インスリン抵抗性があると低下する一方, 肝線維化と負に相関することを見出した。このような結果は非糖尿病症例では認められなかった。

【考察】

Sdf2l1 の機能はこれまで十分明らかではなかったが, 本研究により Sdf2l1 はおそらく小胞体膜周辺に分布し, TMED10 との相互作用を介して変異蛋白のユビキチン・プロテアソーム系による分解を促すことが示唆された。これが小胞体ストレスの軽減をもたらし, ひいては肝臓における糖脂質代謝の改善につながるものと考えられた。一方ヒトの糖尿病ではインスリン作用が低下しており, 肝臓においては転写因子 XBP-1s の核移行が障害されるものと想定されている。今回の肝生検検体における結果から, XBP-1s の転写活性が低下すると Sdf2l1 の発現が十分誘導されず, これが脂肪性肝炎の進展につながる事が明らかとなった。すなわち糖尿病合併脂肪性肝炎では, 同非合併脂肪性肝炎と異なり, XBP-1s の機能低下を中心とした小胞体ストレス応答不全が病態形成において重要であることが示され, Sdf2l1 の発現誘導低下がその良いマーカーとなることが期待される。

【文献】

Sasako T, Kadowaki T, Ueki K, *et al*: Hepatic Sdf2l1 controls feeding-induced ER stress and regulates metabolism, *Nat Commun* 10, 947 (2019).

腸管内分泌K細胞およびI細胞を介した高脂肪食誘導性肥満の機序解明

三小田 亜希子

(京都大学大学院医学研究科)

【背景】

コレシストキニン (CCK) は、糖や脂肪などの栄養素摂取に応答して、腸管内分泌 I 細胞から分泌され、胆嚢収縮および膵酵素分泌を促進して腸管内脂肪の分解吸収に関与している。CCK 受容体欠損マウスでは、高脂肪食誘導性肥満が軽減しており、生体内での CCK シグナルあるいは CCK 分泌抑制は、肥満治療のターゲットとなる可能性がある。しかし腸管内分泌 I 細胞の栄養素感知、CCK 分泌機序は未だ十分に解明されていない。

【方法】

CCK-IRES-Cre ノックインマウスと Rosa26-floxed tdTomato マウスの交配マウス腸管を用いて、抗 RFP 抗体と抗 CCK 抗体で免疫組織化学染色を行った。フローサイトメーターを用いて腸管内 I 細胞数の評価と RFP 陽性細胞の単離回収を行った。

【結果】

RFP 陽性細胞は、上部小腸、下部小腸、大腸で確認され、CCK 陽性細胞と一致した。全腸管細胞あたり RFP 細胞は、上部小腸 0.95%、下部小腸 0.54%、大腸 0.06% であった。CCK mRNA は、RFP 陰性細胞で発現を認めず、RFP 陽性細胞で高発現していた。小腸 RFP 陽性細胞では、大腸 RFP 陽性細胞に比較して有意に CCK mRNA 発現量が高く、上部小腸 RFP 陽性細胞で CCK mRNA 発現が最も高い傾向を示した。脂肪酸および OEA をリガンドとする GPR120, GPR40, GPR119 は上部小腸 RFP 陽性細胞で特異的に発現していた。また下部小腸 RFP 陽性細胞では、短鎖脂肪酸と胆汁酸をリガンドとする GPR43, TGR5 が特異的に発現していた。グルコースおよびフルクトース輸送担体 SGLT1, GLUT2, GLUT5 は上部小腸 RFP 陽性細胞で高い傾向にあった。アミノ酸受容体である CaSR は上部小腸 RFP 陽性細胞で特異的に発現していた。

【考察】

栄養素摂取後の CCK 分泌には小腸に局在する I 細胞

が大きく貢献している可能性が示唆された。また I 細胞上で、種々の栄養素の感知に重要な遺伝子の発現も確認された。

【結語】

I 細胞の可視化および単離回収に成功した。小腸および大腸で I 細胞が確認され、栄養素の感知に重要な遺伝子発現が確認された。

Wfs1 欠損による β 細胞機能障害とインクレチンの効果に関する研究：ヒトの糖尿病病態と膵 β 細胞脱分化の関わり

椎木 幾久子

(山口大学医学部)

【目的】

我々は Wolfram 症候群 (WS) のモデル動物 Wfs1 欠損マウスにおいて、膵 β 細胞脱分化が膵 β 細胞不全の要因であることを明らかにしてきたが、ヒトについては不明である。一方、2 型糖尿病 (T2D) 患者膵島において脱分化細胞を認めるが、脱分化の糖尿病病態進展への関与は不明である。今回、WS 患者の β 細胞不全および T2D 患者の病態進展と脱分化との関連を解明することを目的とし研究を行った。

【方法】

WS：患者 2 例および対照として年齢を対応させた剖検膵を用いた。T2D：膵胆道疾患により外科切除された膵組織標本を用いた。糖尿病の家族歴がなく全経過で過体重 (BMI 25 以上) を認め年齢、手術対象疾患をマッチさせた正常耐糖能患者 (対照群 11 例) と T2D 患者を対象とし、T2D 群を罹病期間 (5 年以下 vs. 10 年以上)、糖尿病細小血管合併症 (無 vs. 一つ以上有する)、インスリンおよび SU 薬 (無 vs. 1 年以上の薬剤使用) の条件に基づき早期群 12 例と進展群 11 例に分類した。組織解析：主要膵ホルモン (インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチド)、クロモグラニン A (ChgA) に対する抗体を用い免疫組織染色を行った。膵面積に対するインスリン陽性面積比 (β) およびグルカゴン陽性面積比 (α) を計測し、膵島量として ChgA 陽性面積比を計測した。膵島内 ChgA 陽性細胞に対す

るインスリン陽性細胞比 (β_i)、グルカゴン陽性細胞数比 (α_i) を計測した。主要膵ホルモン陰性 ChgA 陽性細胞を脱分化細胞とし、ChgA 陽性細胞に対する細胞数比を計測した。

【結果】

WS では対照に比し膵島サイズや分布に異常を認めなかったが、インスリン陽性細胞は著減し脱分化細胞が増加していた。T2D では膵島量、 β および α は対照群に比し増加しているものから低下しているものまで様々であり代謝病態の多様性が推察された。膵島あたりの ChgA 陽性細胞数に変化はなかった一方で、T2D 膵島では対照群に比し β_i 低下、 α_i 増加とともに脱分化細胞数の顕著な増加を示した。脱分化細胞数は病態進展にもなって増加し、 β 細胞機能の指標である C-peptide index と有意な逆相関を示した。

【考察】

WS の膵 β 細胞量減少と脱分化との関連が示唆された。T2D では病態進展と脱分化の臨床関連が示され、脱分化が膵 β 細胞不全の基盤病態であることが強く示唆された。

脂肪組織におけるマクロファージを介した GIP 受容体シグナルの役割の解明

清水 辰 徳

(秋田大学大学院医学系研究科)

【目的】

GIP の分泌は食事量・栄養素の違いによって変化することから、食生活を強く反映するホルモンと言える。これまで GIP シグナルは、脂肪細胞における中性脂肪の取り込みを促進することが報告されているが、我々は脂肪組織内マクロファージにも GIP 受容体が強く発現していることを見出した。本研究では、GIP シグナルが脂肪組織内マクロファージを介し、近接する脂肪細胞や全身に与える影響を考察することを目的とする。

【方法・結果】

我々はこれまでに、脂肪組織からマクロファージを含む SVF (Stromal Vascular Fraction) を分取し、これを CD45 抗体付きマグネットビーズによって CD45(+)

分画と CD45(-) 分画を作成。RT-PCR により、マクロファージを有する CD45(+) 分画に GIP 受容体遺伝子が強く発現していることを見出した。発現量は脂肪細胞を含む分画よりも多く、GIP のシグナルは脂肪細胞のみならず、脂肪細胞に近接して存在するマクロファージにも生理作用を及ぼしていることが強く推測された。

次に、GIP 受容体欠損マウスを脂肪組織内マクロファージに対する GIP の生理作用を検討する目的で、骨髄移植により、野生型マウスの脂肪組織内マクロファージを GIP 受容体欠損マクロファージへの置換を試みた。GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植したもの (KO→WT) を作成し、コントロールとして作成した野生型マウスの骨髄を野生型マウスに移植した群 (WT→WT) と比較を行った。移植後 8 週で行った採血にて、移植の成功を確認している。この時点で耐糖能を確認した後、高脂肪食の投与を開始し、体重推移・高脂肪食開始後 4 週間での耐糖能検査を行った。高脂肪食開始前の耐糖能は両群で差はなし。高脂肪食負荷後の耐糖能は有意差を認めなかったものの KO→WT 群においてインスリン感受性・血糖など耐糖能において良い傾向を認めた。また高脂肪食負荷後の体重増加は KO→WT マウス群において有意に抑えられており、興味深い結果と考えている。骨髄移植モデルの問題点として、移植細胞による置換は 100% とならず、また移植される骨髄量に個体差が生じ得ることが挙げられ、高脂肪食負荷後の有意な耐糖能の改善がみられなかった原因と考えている。遺伝子改変技術を用いて作成した新たなモデルマウスでの再検証が必要と考えている。

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

(大阪大学大学院医学系研究科)

【方法】

当該年度には、大規模ゲノム解析を実施し、2 型糖尿病に関連する遺伝子を選定した。バリエーションの選定については条件を柔軟に設定し、さまざまな選定パターンを実施した。公共データベースに登録されている 2500 人

分のゲノムデータとバリエーション情報を活用し、対象集団のジェノタイプデータを推定することで、全ゲノム上のバリエーションのカバー率を向上させた。このカバー率の向

上により層別化や分類の精度が格段に向上した。

【結果】

各種アルゴリズムによる解析を実施し、層別化や分類について新たな洞察を得た。まず、疾患の層別化については、従来より知られている疫学的な層別化に双肩しうる性能を有する可能性が明らかとなった。一方、分類についてはこれまで異質性、多様性が指摘されていたが、明らかな分類法は確立されていなかった。今年度の研究において、ゲノムデータに対して、これまで応用されることが稀であったアルゴリズム・手法を積極的に応用することにより、分類に関する新たな知見を得た。各種臨床データと各分類との関連を網羅的かつ定量的に評価し、特徴的な関連を同定した。また、オンライン上に公開されている公共データベースを用いて、分類の分子生物学的特徴を評価したところ、各分類に有意に関連する事象を同定することができ、各分類の分子生物学的特徴づけを行うことに成功した。上記結果は、2型糖尿病の病態の理解を促進し、2型糖尿病の診療改善に寄与することが期待される。

【考察】

当該年度には研究計画に記載した予定通り、大規模なゲノム解析を実施し、層別化と分類について知見を得ることができた。特に、層別化については疫学的な層別化に比肩しうる性能を有することがわかるなど、期待の持てる結果が出てきており、今後の研究の推進に資する結果となっている。また、分類に関してもこれまで明らかではなかった分類方法が見出されており、今後深く追及することにより更なる有用な知見が得られることが期待される。

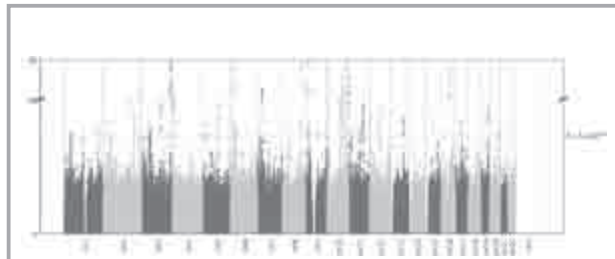


図1 層別化のためのスコア計算に用いた2型糖尿病 GWAS メタ解析の一例

2型糖尿病症例 16,870 例, 対照群 317,601 例, 22,216,661 バリエーションについて関連解析を実施した。これらの結果を用いて層別化を行った。

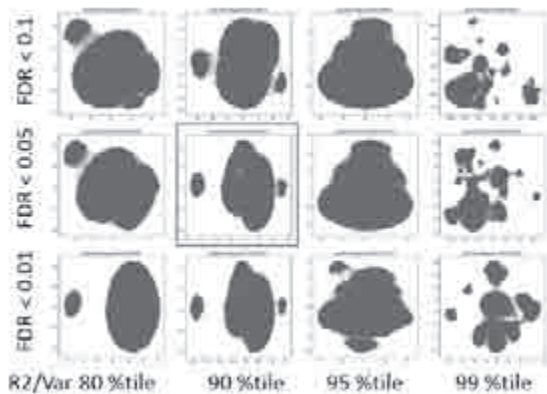


図2 ゲノムデータを用いたサブタイプ構造解析
選択の閾値の設定の仕方により様々なサブタイプ構造が見出された。

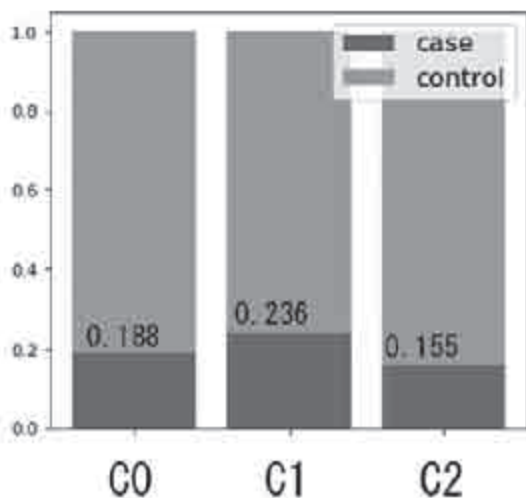


図3 クラスターごとの糖尿病有病率

各クラスターと2型糖尿病有病率との関連を評価した。

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

鈴木路可

(順天堂大学大学院医学部)

我々はこれまで、胎生期および成体におけるβ細胞新生に焦点を当てて研究を行ってきた。具体的には、“Ins1-Timer マウス”を用いて新生β細胞数を定量し、新生β細胞の遺伝子発現プロファイル、および細胞周期

の特性を明らかにした (Miyatsuka T *et al. Diabetes*, 3388-3393, 2014). このマウスでは, FACS による新生 β 細胞単離および, その遺伝子プロファイル解析に成功したものの, 新生 β 細胞の位置情報を得ることが困難であった. 本研究課題では, この問題を克服するために新たなレポーターマウス *Ins1-eGFP; Timer* double transgenic mouse (*Ins1-Timer; GFP* マウス) を作製し, 蛍光顕微鏡下で新生 β 細胞を緑色蛍光細胞として観察することに成功した. 新生 β 細胞と膵管, 血管との位置関係を解析した結果, 胎生期膵臓には起源の異なる 2 種類の新生 β 細胞, すなわち膵管近傍にある内分泌前駆細胞がその場で β 細胞へと分化した“膵管近接型”新生 β 細胞 (β^{duct} 細胞) と, 膵管近傍の内分泌前駆細胞が血管周囲に移動した後に分化する“血管近接型”新生 β 細胞 (β^{vessel} 細胞) が存在することが明らかとなった. さらに, 免疫組織学的染色を行った結果, 大部分の β^{duct} 細胞は *Mafb* を, 大部分の β^{vessel} 細胞を *Mafa* を発現していることが明らかとなった.

次に, 新生 β 細胞の遺伝子発現プロファイルを 1 細胞レベルで明らかにするために fluorescence-activated cell sorting (FACS) により新生 β 細胞を単離し, single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) を行った. 得られた scRNA-seq データをもとに t-SNE プロットを作成し, 新生 β 細胞間の heterogeneity を 1 細胞レベルで解析したところ, 新生 β 細胞は高発現する遺伝子の特徴から,

- ① *Neurog3*, *Pax4* を高発現する “ β^{Neurog3} 細胞”
- ② somatostatin (*Sst*) を高発現する “ β^{Sst} 細胞”
- ③ glucagon (*Gcg*) を高発現する “ β^{Gcg} 細胞”
- ④ *Pdx1*, *Mafb* を高発現する “ β^{Pdx1} 細胞”
- ⑤ *Ins2*, *Ins1* を高発現する “ β^{Ins2} 細胞”

の 5 つに再分類され, そのうちの 1 つ β^{Pdx1} 細胞が *Mafb* を高発現しており, イメージング解析における β^{duct} 細胞に相当する可能性が示唆された. さらに pseudotime 解析において擬似的に設定した時間軸に沿って, 上記 5 つの細胞集団を unbiased に解析した結果, β^{Neurog3} 細胞から β^{Sst} 細胞へと分化した後, α 細胞系譜の特徴を有する β^{Gcg} 細胞と, *Pdx1*, *Ins2* といった β 細胞特異的遺伝子を高発現する β^{Pdx1} 細胞・ β^{Ins2} 細胞へと別れて分化する可能性が示唆された.

さらに“分化した β 細胞 (緑色蛍光陽性かつ赤色蛍

光陽性)”と新生 β 細胞 (緑色蛍光のみ陽性) とを合わせて pseudotime 解析を行った結果, 2 つの β 細胞は擬似的な時間軸に沿って 2 つの細胞集団に分けて展開された. このことは *Ins1-GFP; Timer* マウス胎生期膵臓より FACS で単離された新生 β 細胞が, unbiased な pseudotime 解析においてもより未分化な細胞集団として同定されることを示しており, GFP と Timer 蛋白の蛍光特性の差を利用した本実験系の妥当性を異なる角度から示す結果となった.

以上のように蛍光顕微鏡での観察結果から, 位置情報として 2 つの新生 β 細胞の存在が示唆され, scRNA-seq から得られた unbiased な解析結果からも新生 β 細胞間の heterogeneity を示す結果であった. 今後は上記の scRNA-seq の結果をヒト ES 細胞由来インスリン産生細胞の scRNA-seq データと比較検討し, 上記データを統合, 論文化を目指す.

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)

【研究背景・目的】

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

低分子代謝物の探索・同定を目的とした。

【方法】

B3 アドレナリン受容体のアゴニストである CL316243 (CL) を投与し、脂肪細胞の褐色化を進行させた C57BL/6J マウスの血中及び褐色脂肪組織 (BAT)、鼠径部脂肪組織 (IWAT)、精巣周囲脂肪組織 (EWAT) の代謝物を LC-MS を用いて分析し、得られた超精密質量データを活用したメタボローム解析により、代謝変動の全体像を解析した。また、分化過程の培養脂肪細胞について、経時的に細胞内代謝物を抽出し、メタボローム解析により、分化における代謝変動の全体像を解析した。

【結果及び考察】

CL 投与により、特に IWAT において、代謝変化が大きいことが観察され、データベースを用いた解析の結果、特に核酸代謝経路やアミノ酸代謝経路上に存在する低分子代謝物が顕著に変化することが示された。また、培養細胞分化過程における経時的な代謝変化については、解析の結果、核酸代謝経路や糖代謝経路上に存在する低分子代謝物が顕著に変化することが示された。これらの結果から、脂肪細胞の分化・褐色化制御にアミノ酸・核酸・糖代謝経路が重要な役割を担うことが示唆された。

日本人の若年発症非肥満糖尿病患者における網羅的次世代シーケンスの試み

田 中 大 祐

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

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

【方法】

35 歳未満での若年発症糖尿病患者で隣島関連自己抗体陰性である 65 名およびその血縁者につき、京都大学および共同研究機関にてゲノム DNA を採取する。既知糖尿病発症原因遺伝子のエクソン領域についてゲノム

DNA のターゲットシーケンスを行い、必要に応じて全エクソンシーケンスを追加する。そして、一般人口において稀であり (ゲノムデータベース [1000 Genomes, Human Genetic Variation Database] において対立遺伝子頻度 < 1%)、タンパク機能に重大な影響を及ぼす可能性が高いと予測される変異を抽出する。罹患血縁者が存在する場合は共通する変異を絞り込み、発症原因変異候補とする。

【結果】

[1] インスリン分泌不全の顕著な非肥満糖尿病患者 4 名 (空腹時血清 C-ペプチド < 0.3ng/ml) を有する家系 (家系 1) にて、罹患者 4 名と家系内非罹患者 2 名を全エクソンシーケンスの対象とし、罹患者に共通する発症原因変異候補を 16 個に絞り込んだ。

このうち、ADAMTSL3 遺伝子 A137T 変異 (rs181914721) は、複数のゲノムコホート (ながはまコホート・高山コホート) の糖尿病非罹患者に比して、京都大学および共同研究機関の糖尿病患者 119 名において高頻度であり、さらに、同変異がみられた糖尿病患者 3 名のうち 1 名の家系 (家系 2) において、罹患血縁者 9 名中 6 名が同変異を有していたことから、糖尿病発症感受性変異である可能性が高いと考えた¹⁾。

[2] 30 歳以下で糖尿病を発症し、肥満歴がなく GAD 抗体陰性で、MODY1~6 の原因変異を有さない 13 名を対象とし全エクソンシーケンスを行った結果、既知の単一遺伝子異常による糖尿病の原因遺伝子 (35 遺伝子) における希少変異として、PPARG 遺伝子の Y173fs 変異が 1 名 (患者 1)、WFS1 遺伝子の K193del 変異が 1 名 (患者 2)、PTF1A 遺伝子の S18F 変異が 1 名 (患者 3) に検出された。各変異は糖尿病発症に寄与した可能性が示唆され、特に PTF1A 遺伝子の S18F 変異は、患者 3 の血縁者で若年発症糖尿病を有する 2 名にも存在し、家系の糖尿病発症原因である可能性が示唆された。

【文献】

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

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 拓伸

(宮崎大学医学部)

【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。グレリンの抗炎症効果のメカニズムは不明である。本研究では、迷走神経切断処置を行ったマウスに対して、グレリン抗炎症作用の効果を検討した。

【方法】

10週齢のC57BL/6マウスに、迷走神経切断術またはsham手術を行い、ブレオマイシン(BLM)の気管内投与による急性肺損傷モデルを作成した。それぞれ、PBSまたはグレリン(3 nmol/kg)を腹腔内投与し、摂餌量、体重変化、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の総細胞数、肺組織中の炎症性サイトカインとケモカインの発現を検討した。

【結果】

急性肺損傷モデルにおいて、グレリン投与はsham手術群において、摂餌量と体重の低下、BALF中の炎症細胞数の増加、血管透過性の亢進、肺組織中のTNF- α 、IL-6、IL-1 β 、CXCL2の発現の亢進が抑制されていた。迷走神経切断群においては、グレリンの投与による摂餌量の低下の抑制は認められなかったが、BALF中の総細胞数の増加、血管透過性の亢進、肺組織中のIL-6、IL-1 β の発現の亢進の抑制が認められた。

【考察】

急性肺損傷モデルにおいて、迷走神経切断群においてもグレリン投与は抗炎症効果を認めた。以上から、薬理量のグレリン投与は直接的な抗炎症作用を有することが示唆された。

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

Allah Nawaz

(富山大学医学部)

Background

White adipose tissue (WAT) markedly adapts to nutrient excess through adipocyte hypertrophy and hyperplasia¹⁻³). The WAT expansion greatly affects the pathogenesis of obesity through different cellular mechanisms⁴). Adipocyte size is inversely related to insulin resistance⁵), whereas the number of adipocytes is related to the pool size of adipocyte progenitors (APs). Several groups, including our laboratory, have reported that M1 inflammatory macrophages regulate the expression of angiogenic genes in pre-adipocytes^{3,6}), suggesting interactions between macrophages and APs. It is still unknown how the proliferation and differentiation of APs are regulated by M2 macrophages within WAT, thus controlling the insulin sensitivity.

Obesity is associated with a phenotypic transformation of macrophages, from anti-inflammatory M2 to pro-inflammatory M1 macrophages, thereby causing insulin resistance^{1,7,8}). Much has been known about M1-like macrophage role in the inflammatory process in obese adipose tissue which is known closely related to the development of insulin resistance both in human and animal. Nonetheless, it is largely unknown how depletion of M2-like macrophages in lean state regulates insulin sensitivity and adipocyte progenitors (APs) proliferation.

Purpose;

The current study aimed to investigate the effect of depletion of CD206 M2-like macrophages on systemic insulin sensitivity and adipocyte progenitor's proliferation.

Method

To understand the role of M2-like macrophages in white adipose tissue (WAT), we utilized previously generated CD206DTR mice, based on transgenic expression of diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of *Mrc1+* (CD206) promoter to specifically deplete CD206 M2-like macrophages⁹⁾. Diphtheria toxin (DT) was intraperitoneally injected at a dose of 3 ng/gram body weight 3-4 times every other day. We determined the effect of depletion of CD206 M2-like macrophages on various parameters including insulin sensitivity, glucose tolerance, and APs proliferation.

Results

The current study revealed that adipose tissue CD206+ cells are primarily M2-like macrophages, and ablation of CD206 M2-like macrophages enhanced APs proliferation and induce systemic insulin sensitivity, which was associated with an increased number of smaller adipocytes, thereby, control adiposity and systemic insulin sensitivity. The depletion of CD206 M2-like macrophages improved glucose tolerance by increasing insulin sensitivity (without affecting inflammatory status), which is associated with increased number of smaller adipocytes expressing metabolically favorable genes including *adiponectin*, *Pgc-1 α* , *Glut4* and *Cpt-1 β* . We found that depletion of CD206 M2-like macrophages induced adipogenesis and proliferation of APs. Mechanistically, we attributed these effects to the downregulation of CD206 (+) cell-derived TGF β to APs. This was further confirmed by direct injection of anti-TGF β inhibitory antibody. *In vivo* and *in vitro* studies revealed that Tgf β abundantly expressed in CD206 M2-like macrophages, thus regulating APs differentiation and proliferation. To validate this hypothesis, we generated a genetically engineered Tgf β 1 KO mice in which CD206 cell-specific Tgf β 1 was knocked out after tamoxifen treatment. Increased number of APs and smaller adipocytes were

observed in the CD206 cell-derived Tgf β 1 KO mice. Collectively, we identified a novel role of CD206 M2-like macrophages in adipose tissues to constitute an important microenvironment in which they regulate APs' growth/differentiation and thereby control adiposity and systemic insulin sensitivity^{9, 10)}.

Conclusion

We concluded that CD206 M2-like macrophages provide a niche for adipocyte progenitors to regulate their growth and differentiation into matured adipocytes, thus controlling adiposity and insulin.

References

- 1) Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 275-97. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130138
- 2) Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell.* Jun 5 2014; 157(6): 1292-308. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.066
- 3) Lee YH, Petkova AP, Granneman JG. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metab.* Sep 3 2013; 18(3): 355-67. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.003
- 4) Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* Jun 2011; 121(6): 2094-101. doi: 10.1172/jci45887
- 5) Salans LB, Knittle JL, Hirsch J. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest.* Jan 1968; 47(1): 153-65. doi: 10.1172/jci105705
- 6) Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, et al. HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes.* Dec 2016; 65(12): 3649-3659. doi: 10.2337/db16-0012
- 7) Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ,

Saltiel AR. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008; 57(12): 3239-46.

- 8) Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 219-46. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846
- 9) Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, et al. CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature communications*. 2017/08/18 2017; 8(1): 286. doi: 10.1038/s41467-017-00231-1
- 10) Nawaz A, Tobe K. M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. *Journal of diabetes investigation*. Jul 10 2019; doi: 10.1111/jdi.13114

解糖系代謝物による TOR シグナルの活性化

野村 亘

(京都大学大学院農学研究科)

【背景・目的】

栄養シグナルにおいて中心的な役割を果たしているタンパク質リン酸化酵素 TOR (target of rapamycin) は、酵母 (Tor1 および Tor2) から哺乳類 (mTOR) に至るまで進化的に高度に保存されている。TOR は、異なる 2 つの複合体である (m)TORC1 および (m)TORC2 を形成することで機能し、TOR シグナルを構成することで糖代謝や脂質代謝の制御に関与することが知られている (*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 183-203, 2020)。

エネルギー産生経路における代謝物の中には、単なるエネルギー獲得のための反応中間体としての役割以外に、遺伝子発現などに積極的に関与する機能性を有した代謝物も存在する。メチルグリオキサール (MG) は解糖系から派生する代謝物であり、古くから糖尿病との関連が指摘されている。しかしながら、これまでに MG

と糖尿病病態との因果関係や、それに関する MG の機能性については良くわかっていない。これまでに我々は、出芽酵母および脂肪細胞において、MG が mTORC2 シグナルの活性化因子として機能することを見出してきた (*Mol. Cell. Biol.* 35: 1269-1280, 2015)。また、脂肪細胞において MG は mTORC1 シグナルの活性化も引き起こしたが、その活性化機構については不明であった。そこで本年度は、脂肪細胞における MG による mTORC1 シグナル活性化機構の解明を目指して解析を行った。

【方法・結果】

mTORC2 の制御を受ける Akt は、Tsc1/2 の制御を介して mTORC1 の活性化に寄与する。MG が mTORC2 を活性化したことから、MG による mTORC1 シグナルの活性化における Akt の関与について、Akt 阻害剤を用いて検討を行った。その結果、MG による mTORC1 シグナルの活性化において、Akt 阻害剤による影響は確認されなかった。次に、p38 MAP キナーゼに着目して解析を行った結果、MG は p38 MAP キナーゼのリン酸化を亢進した。また、p38 MAP キナーゼの阻害剤は、MG による mTORC1 シグナルの活性化を阻害した。

【考察】

これらのことは、MG による mTORC1 シグナルの活性化に p38 MAP キナーゼが関与する可能性を示唆しているものと考えられた。

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

氷室 美和

(順天堂大学大学院医学研究科)

【目的・方法】

近年、膵 α 細胞が可塑性に富む細胞であることが明らかとなっており、 α 細胞の分化を制御するメカニズムの全容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。最近我々は内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生 α 細胞と成熟 α 細胞とを区別して標識

し、 α 細胞分化を時間軸に沿って解析するための新規レポーターマウス“*Gcg-Timer* マウス”を作製した。本マウスはeGFP-IRES-mRFPをproglucagon遺伝子に挿入しており、IRESの下流に配置したmRFPの発現量がeGFPより低下する影響により、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る。この特性により新生 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ため、両者を識別し経時的に観察できる。本研究課題では、同マウスを用いて「 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 マウス臍を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡およびflow cytometryを用いて新生 α 細胞数を定量化した結果、胎生12日目から生後5日目にかけて新生 α 細胞（緑色蛍光優位な細胞群）を認めたが、生後7日目以降は認めなかった。以上より、 α 細胞新生は胎生期および生後早期に特化した現象であることが示された。

胎生17日の*Gcg-Timer* マウス臍臓よりFACSを用いて新生 α 細胞、成熟 α 細胞、非 α 細胞の各分画よりRNAを抽出し、RNA sequencingを行った結果、新生 α 細胞特異的・成熟 α 細胞特異的に高発現する複数の遺伝子群を抽出することに成功した。

【考察および今後の展望】

これまでの検討により、生理的条件下において α 細胞新生は胎生期から生後早期に特化した現象であることが示された。一方、成体において α 細胞新生を誘導されるような実験条件がないかについてはさらに検討を進める必要があり、今後様々な代謝ストレス条件下で実験を進める。

また、新生 α 細胞特異的または成熟 α 細胞特異的に高発現するいくつかの遺伝子群に対して、免疫染色によりspatiotemporal patternを解析するとともに、遺伝子改変マウスを用いてその機能を明らかにする。

亜鉛トランスポーター ZIP13 による脂肪細胞褐色化制御機構の解明

福中彩子

(群馬大学生体調節研究所)

1. 背景および目的

近年、肥満を伴う2型糖尿病患者数は日本人においても増加の一途をたどっており、その病態の解明と、新規治療薬の開発は急務である。そのため、エネルギーを貯蔵する白色脂肪細胞を、エネルギーを消費する誘導性の褐色脂肪細胞であるベージュ脂肪細胞へと形質転換（ベージュ化）することによって、太りにくい体質に繋がる食品や薬の開発に注目が集まっている。

私たちは、エーラス・ダンロス症候群原因遺伝子である亜鉛トランスポーター ZIP13 を介する亜鉛シグナルが、ベージュ脂肪細胞の分化に対して抑制的に作用することを明らかにしてきた (Fukunaka A, *PLoS Genet.*, 2017)。具体的には、*Zip13*-KO マウスの白色脂肪組織でベージュ脂肪細胞の顕著な増加/エネルギー消費量の亢進/高脂肪食誘導の肥満に抵抗性を示すことを見出したが、なぜ ZIP13 を欠損するとベージュ脂肪細胞が特異的に分化亢進（ベージュ化）するのか、その分子機序はまだ解明されていない。本研究は、私たちが開発したベージュ脂肪細胞分化誘導系を用いて、ZIP13 を介する亜鉛シグナルの特異性の調節機構を明らかにし、ZIP13 を介する亜鉛シグナルによるベージュ化決定機構を解明することを目的とする。

2. 方法

(1) 不死化前駆脂肪細胞の樹立

Zip13 欠損マウスと分子Xのfloxマウスの掛け合わせを行い、*Zip13*-KO 分子X flox マウスを得た。このマウスの鼠蹊部から前駆脂肪細胞を採取し、SV40T 抗原を発現するレトロウイルスに感染させ、前駆脂肪細胞を不死化した。さらに Cre リコンビナーゼを発現させることにより *Zip13* 欠損 分子X欠損前駆脂肪細胞を得た。

(2) 細胞内亜鉛量測定

ZIP13 (野生体もしくは分子Xと結合できない変異体) を発現するレトロウイルスを *Zip13* 欠損細胞に感染させ、亜鉛蛍光プローブである FluoZin3 を添加し、細胞

内の亜鉛量をプレートリーダーで定量した。その後細胞を溶解し、タンパク質量を測定し、FluoZin3 蛍光値をタンパク質量で補正した。

(3) yeast two hybrid による結合実験

酵母 EGY48 株に bait plasmid と prey plasmid を導入した。得られた形質転換体について栄養要求性試験を行い、生育を観察することで結合の有無を検討した。Bait plasmid として ZIP13 IntL1 と IntL2 に変異を導入した変異体を用いた。Prey plasmid として分子 X の C 末端側を用いた。

(4) 脂肪細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスの作成と解析

Zip13 flox マウス（徳島文理大学 深田俊幸教授から分与）と Adiponectin-Cre マウスとの掛け合わせを行い、脂肪細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスを作成した。得られたマウスに関して、通常食・高脂肪食時の体重変化を観察した。また酸素消費量、二酸化炭素産出量、呼吸商、体組成、行動量を測定した。さらに、マウスの皮下脂肪組織を用いて遺伝子発現を調べると共に HE 染色を行い、組織像を観察した。

3. 結果

(1) ページュ化における ZIP13 標的分子の同定とその制御機構の解析

私たちが開発したページュ脂肪細胞分化系を用いると、*Zip13* 欠損細胞に ZIP13 を過剰発現させると、ページュ化は抑制できるが、亜鉛輸送能を失った ZIP13 の変異体ではページュ化抑制ができない。また、培地中に過剰量の亜鉛を添加した場合や、同じゴルジ体に局在し、ZIP13 と最も高い相同性を示す亜鉛トランスポーターを発現した場合には、細胞質内の亜鉛量は増加するにも関わらず、ページュ化は抑制できない。ZIP13 による亜鉛シグナルには特異性が存在し、ページュ化抑制を調節していると考えられる。そこで亜鉛シグナルの特異性が生じる機構を解明するために、ZIP13 のページュ化抑制に必要な領域 (Int-L2) を同定した。さらに、この領域と結合する分子が特異性を決定しているのではないかと仮定し、ZIP13 のページュ化抑制に必要な領域 (Int-L2) を用いて、yeast two hybrid (Y2H) を行い、結合する分子 (結合分子) を 3 種類選定した。結合分子の発現を *Zip13* 欠損細胞や *Zip13* 欠損マウスの皮下脂肪組織で観察したところ、分子 X は発現増加が見られた。また分

子 X は ZIP13 存在下で発現減少が観察されたことから、ZIP13 存在下で分子 X の発現は制御されていることが示唆された。次に *Zip13* 欠損細胞で分子 X を欠損したところ、*Zip13* 欠損細胞で亢進したページュ化は分子 X を欠損させることにより抑制された。さらに分子 X を過剰発現することにより、ページュ化は亢進することから、ZIP13 の下流で分子 X が機能する可能性が高いと推察された。ZIP13 と分子 X の結合がページュ化に果たす役割について検討するために、Y2H を用いて ZIP13 の分子 X と結合できない変異体を同定した。分子 X と結合できない ZIP13 の変異体は亜鉛輸送能が野生型と同程度にあるにもかかわらず、この変異体存在下では分子 X の発現は減少せずまたページュ化抑制もできないことが判明した。以上の結果から、ZIP13 と分子 X が結合することがページュ化抑制に必要であることがわかった。

次に ZIP13 がどのように分子 X の発現制御を行っているか種々の阻害剤を用いた実験により検討したところ、*Zip13* 欠損細胞ではプロテアソーム・リソソーム分解経路が障害を受けているため、分子 X が分解できない可能性が示唆された。分子 X は様々なユビキチン E3 リガーゼにより分解を受けることが報告されている。今後それらの E3 リガーゼの活性が *Zip13* 欠損細胞で変化しているか調べる必要がある。また、分子 X は細胞質に存在するタンパク質であることから、リソソーム経路で分解されることを示唆する本結果は、分子 X がオートファジー経路で分解されている可能性を示しており興味深い。

(2) 脂肪細胞特異的 *Zip13* 欠損マウスの解析

全身で *Zip13* を欠損したマウスで観察されたページュ化亢進の表現系がどの細胞依存的に起きているかを調べるために、成熟脂肪細胞特異的に *Zip13* を欠損したマウス (Adipo-*Zip13*-KO マウス) を作製し解析を行った。Adipo-*Zip13*-KO マウスは高脂肪食負荷時の肥満に抵抗性を示すが、種々のページュ化亢進を示すパラメーターに変化はなかった。また寒冷刺激時においてもページュ化亢進の所見は観察できなかった。これらの結果から、全身の *Zip13* 欠損マウスで観察されたページュ化亢進の表現系は、Adiponectin が発現するよりもより早い段階から *Zip13* を欠損させることにより観察できるのではないかと考えられた。現在、前駆脂肪細胞で *Zip13* を欠損させることができるように、PDGFR α -CreERT マ

ウスと *Zip13* flox マウスとの掛け合わせを行っているところである。

4. 考察

無機イオンを介するセカンドメッセンジャーによる細胞内シグナルに関しては、これまではカルシウムイオンによる研究が大多数を占めてきたが、近年になって、カルシウムシグナルの役割と思われていた現象が、実は亜鉛など他の無機イオンによるものであることが示されるようになった。現在では、「亜鉛シグナル」が生命活動に深く関わるシグナル伝達システムの一端を担うことが明示され、亜鉛シグナルの健康と病気への関与に注目が集まっている。一方で、「亜鉛シグナルがどのように標的分子の発現・活性を制御するのか」という生命現象の重大な命題が解明できていない (Fukunaka A, *Int J Mol Sci.* 2018)。我々は、自身が開発したベージュ脂肪細胞分化系を用いて、ZIP13 の直接の標的分子 X を同定することができ、ZIP13-分子 X の制御機構はベージュ脂肪細胞以外の細胞、例えば筋肉細胞や褐色脂肪細胞では保存されていないことを見出した。さらに *Zip13* 欠損細胞ではプロテアソーム・リソソーム分解経路が障害を受けているため、分子 X が分解できにくくなり、それによりベージュ化が亢進している可能性が示唆された。今後、分子 X の分解制御機構に関する詳細なメカニズム解析が必要である。

Zip13 欠損マウスでは結合組織 (骨・歯・皮膚) の脆弱性を示し、結合組織形成においては ZIP13 が必須の役割を果たすことから、ZIP13 による肥満糖尿病治療法確立において、脂肪細胞 (もしくは前駆脂肪細胞) 特異的に ZIP13 の機能を阻害することが重要であると考えられる。今回の我々の解析から成熟脂肪細胞特異的に *Zip13* を欠損させると、高脂肪食誘導性の肥満に抵抗性を示すものの、種々のベージュ化を示す表現系には変化が見られなかった。今後、前駆脂肪細胞特異的に *Zip13* を欠損させたマウスの解析を進め、このマウスでのベージュ化への影響、さらには肥満糖尿病への影響を観察する予定である。それにより ZIP13 をどのように欠損すれば、エーラス・ダンロス症候群を発症せず肥満糖尿病のみを防げるのかが明らかにできる。本研究の解明により、ZIP13 を利用した新しいコンセプトの抗肥満糖尿病治療法の開発に繋がるのが期待できる。

アディポネクチンの組織修復機構の解明

藤島裕也

(大阪大学大学院医学系研究科)

【背景】

脂肪細胞特異的分蛋白アディポネクチン (APN) は、GPI アンカー型蛋白 T-カドヘリン (T-cad) への特異的な結合を介して組織に集積し、動脈硬化抑制や骨格筋再生作用を発揮することを明らかとしてきた (FASEB J 2017, *Sci Rep* 2019)。また、その想定されるメカニズムとして、APN による T-cad 依存的なエクソソームの産生・分泌促進作用を報告した (*JCI Insight* 2018)。今回 APN の腎保護作用における T-cad の役割について検討を行った。

【方法・結果】

腎臓組織において T-cad および APN 蛋白は、細動脈の血管内皮に検出された一方で、糸球体の毛細血管では検出されなかった。一方で、尿細管周囲の微小血管周囲に APN の集積が確認され、血管周皮細胞 (pericyte) マーカーである PDGFR β 陽性細胞と共局在していた。また、このような腎組織の APN は T-cad 欠損マウスでは完全に消失していた。続いて、腎虚血再灌流による急性腎不全モデル作成し、24 時間後に解析を行った。その結果、野生型マウスでは傷害腎の PDGFR β 陽性が有意に増加していたのに対し、T-cad 欠損マウスや APN 欠損マウスではむしろ減少しており、pericyte loss が示唆された。また、このような血管構造の破綻に伴い、T-cad 欠損マウスでは、APN 欠損マウスと同様に、エバンスブルー静注により定量した腎血管透過性が顕著に亢進し、尿細管壊死所見の増悪が認められた。

マウスの primary brain pericyte を用いた細胞実験を行ったところ、T-cad の発現と細胞への APN の集積が確認された。また、生理的な濃度の精製 APN の添加により、pericyte からのエクソソーム分泌は有意に亢進したが、siRNA による T-cad のノックダウンによりキャンセルされた。

【考察】

pericyte は毛細血管の支持細胞として、血流調整や血管透過性の維持といった重要な生理的役割を担っている

が、組織常在性の間葉系幹細胞幹細胞としての側面を持つことも近年明らかとされている。本研究の結果から、APN/T-cad は傷害時における pericyte の機能維持や、エクソソーム分泌促進を介した組織修復に関与していることが示唆された。

糖代謝調節に関与するニューロメジン U (NMU) の機能解析

三浦綾子

(宮崎大学医学部)

【目的】

NMU のインスリン分泌調節作用を *in vivo* および *in vitro* にて検討し、NMU の臓器連関としての肥満、糖尿病の病態との関連を解析する。

【方法】

- ・NMU のミトコンドリア及び小胞体 (ER) ストレス応答性への関与を確認する
- ・ラットへの NMU 末梢投与後の電気活動を測定する

【結果】

NMU は、ミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込み及びミトコンドリアの膜電位を阻害しており、細胞内 ATP の産生を抑制した。また、NMU はミトコンドリアの呼吸商 OCR を優位に抑制しており、ROS 産生を亢進した。よって、NMU は、 β 細胞へのミトコンドリア機能を低下させることが示唆された。さらに、NMU は ER ストレス (ATF6, XBP-1s, および PERK-ATF4-CHOP を含む ER ストレスシグナル伝達経路の活性化) を誘導し、*db/db* マウスの臍島とパルミチン酸処理 MIN6-K8 細胞の両方で NMU の発現が亢進した。また、空腹時に、NMU の発現は腸管と迷走神経節で増加し、NMUR1 発現は迷走神経節で増加した。NMU のラットへの末梢投与は、迷走神経求心線維の電気活動を亢進し、視床下部室傍核の *c-fos* 発現を増加する。NMU は、空腹時に自律神経求心路を活性化してインスリン分泌を抑制するデクレチン作用を示すペプチドの可能性が示唆された。

【考察】

NMU は、ミトコンドリア機能低下、ER ストレスを誘導することによりインスリン分泌を抑制する可能性が

示唆された。また、空腹時には神経を介するデクレチン作用の両者の機序を介して、インスリン分泌を制御し、糖代謝調節に機能していると考えられる。

【文献】

- 1) Zhang W, Sakoda H, Miura A *et al.* Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β cells. *BBRC*. 2017 Nov 4; 493(1): 677-683. doi: 10.1016/j.bbrc. 2017.08.132.
- 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*. 2020 Jan; 34(1): 133-147. doi: 10.1096/fj. 201901743R.

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。我々は神経モデル細胞を用い、近位依存性ビオチンラベリング (BioID) によるタンパク質のインタラクトーム解析を実施し、USP46 が SIRT2 や DNAJC7 といったエネルギー代謝に関わる因子と相互作用することを見出した。また予備実験の結果、野生型マウスに比べ USP46 欠損マウスは体重が軽い傾向が認められた。そこで本研究では、USP46 とエネルギー代謝の関連を明らかにすることを目的とし、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* インタラクトーム解析を実施する。

【結果】

- (1) USP46 欠損マウスの体重を詳細に検討するため、生後 2 週齢から 12 週齢まで測定を行った。その結果、USP46 欠損マウスは 2 週齢の時点で野生型マウスに比べ体重が有意に低く、12 週齢まで低体重が継続してい

ることが判明した。

(2)上記の体重減少の原因となる組織を特定するため、*Usp46* 遺伝子座の exon 4 を挟むように loxP 配列を有する USP46^{fllox} マウスを作製した。計 34 匹のファウンダーマウスが得られ、floxed allele を持つマウス 2 匹を用いて系統化を進めている。

(3) *in vivo* BioID アッセイを実施するため、大腸菌由来ビオチンリガーゼの人工改変体 miniTurbo を *Usp46* 遺伝子の終止コドン直前に KI し、USP46-miniTurbo-KI マウスを作製した。計 64 匹のファウンダーマウスが得られ、このうち miniTurbo KI と判定したマウス 2 匹を用いて系統樹立を進めている。

【今後の展開】

USP46 欠損マウスを用いて代謝表現型の解析を進めるとともに、USP46^{fllox} マウスと各種 Cre ドライバーマウスを交配して、USP46 欠損による低体重の原因組織を特定する。また、USP46-miniTurbo-KI マウスを用いて *in vivo* BioID アッセイの実験系を立ち上げていく予定である。

自己免疫疾患領域における創薬標的としてのCaMK4

【序】

自己免疫疾患は、様々な原因により免疫寛容が破綻し、自己抗体や免疫細胞が過剰に産生されることにより組織の損傷や炎症が引き起こされる疾患である。T細胞受容体 (TCR) と抗原提示細胞 (APC) の結合によりT細胞が活性化され、Th1細胞とTh17細胞などのヘルパーT細胞へと分化する。これらヘルパーT細胞が関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患の発症・進展に関与することが示唆されている。

タクロリムス (FK506)、シクロスポリン A (CsA) はT細胞の増殖・活性化に重要なカルシニューリンを抑制する薬剤であり、これらカルシニューリン阻害薬は臓器移植や一部の自己免疫性疾患の治療薬として広く使用されており、ループス腎炎においても寛解導入や維持療法として使用されている。

カルシニューリンはTCR/CD3複合体からのシグナルを受け、細胞内カルシウム濃度の上昇により活性化し、

転写因子 NFAT (nuclear factor of activated T cells) を脱リン酸化し、NFATの核内移行を引き起こすことでIL-2やIFN- γ などのサイトカイン産生を誘導する。一方、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼも同様にAPCによる抗原提示によってT細胞において活性化する酵素であり、特にCaMK4 (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV) は制御性T細胞 (Treg) の機能およびTh17細胞の分化に重要であることが示され、CaMK4の阻害は自己免疫疾患の新たな治療標的として注目されている¹⁾。以下、CaMK4の機能、疾患との関連及び創薬標的としての可能性について概説する。

【CaMK4の機能】

CaMKファミリーは、特定の基質を標的とするキナーゼと幅広い基質選択性を有する多機能性カルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼに分類される。多機能性カルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ

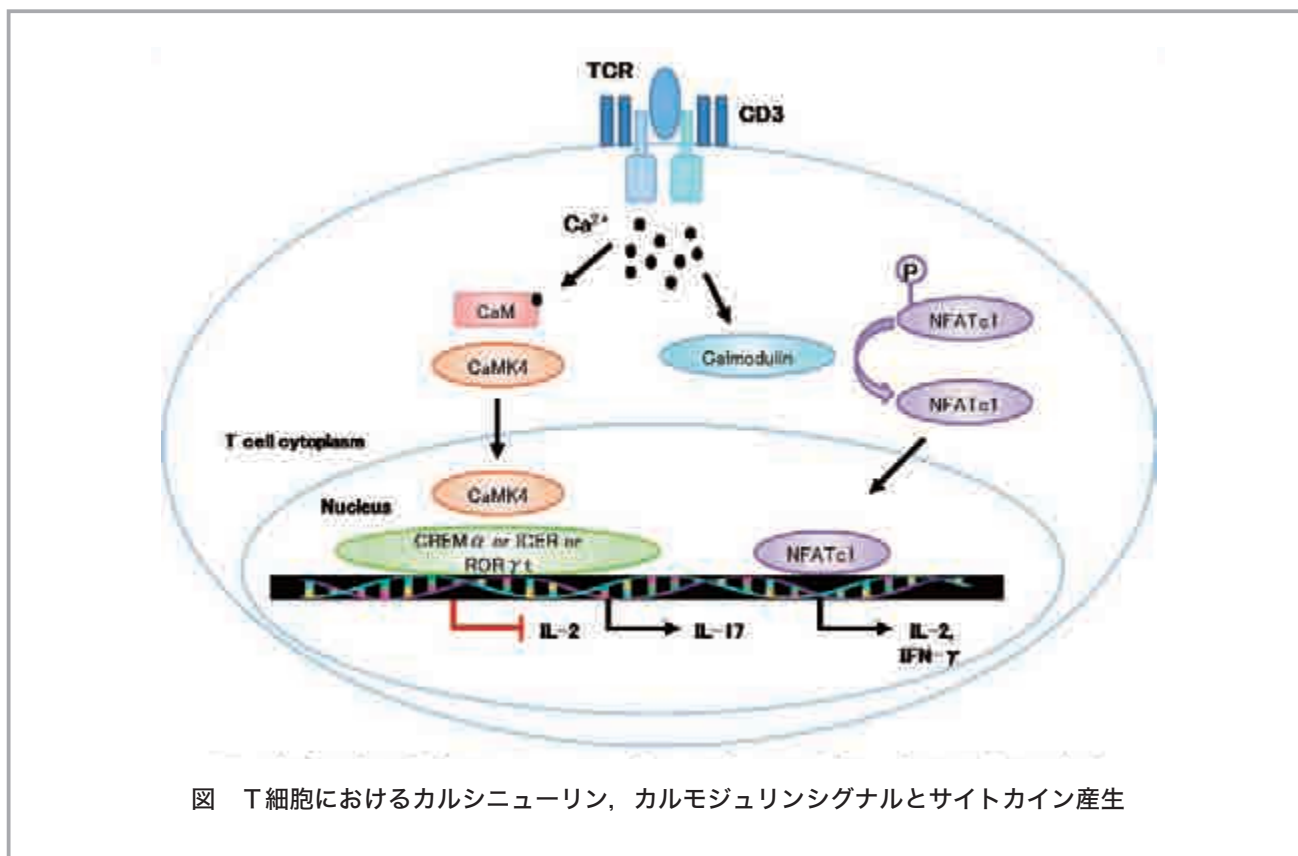


図 T細胞におけるカルシニューリン、カルモジュリンシグナルとサイトカイン産生

として, CaMKK, CaMK1, CaMK2 及び CaMK4 が存在し, その中でも CaMK4 は T 細胞の活性化を含む免疫応答に重要な役割を果たすことが示されている.

CaMK4 はセリン/スレオニン蛋白質キナーゼファミリーに属し, 主にリンパ球, ニューロン及び雄生殖細胞において転写調節に関わっている. 本酵素はセリン/スレオニンホスファターゼ 2A (PP2A) 結合領域, カルモジュリン (CaM) 結合領域を含む五つのドメインから構成される. カルシウム/カルモジュリンと CaMK4 との結合により CaMK4 から PP2A が除去された後, CaMKK によるリン酸化を受け高活性型の CaMK4 に変換される²⁾. CaMK4 活性の亢進により, CREM α 及び ICER などの転写因子の活性化, IL-2 及び IL-17 プロモーター領域への結合がそれぞれ抑制及び促進され, IL-2 の転写は負に調節し, IL-17 の転写は促進される³⁾.

【疾患との関連】

SLE 患者では Th17 細胞数の増加, Treg 細胞数の減少や機能低下が知られており, IL-2 の産生低下に起因し Th17/Treg 不均衡や組織異常が起こることが示唆されている. IL-2 は濃度により異なる作用を示し, 低用量では Treg を誘導し免疫寛容を誘導する. 一方, 高用量では naive CD8+T 細胞をエフェクター CD8+T 細胞へと誘導する. 近年, 低用量 IL-2 の SLE 患者への投与により末梢血中の Treg 細胞数を増加させることが報告され, 臨床試験の動向が注目されている⁴⁾.

【CaMK4 の創薬標的としての可能性】

CaMK4 は IL-2 の産生促進や Treg 細胞の機能改善が期待されることより, SLE の創薬標的としての可能性が注目され, 動物モデルにおいてその可能性が検証されている. CaMK4 欠損 MRL/lpr マウスにおいて, IL-2 産生促進や Treg 細胞の機能改善により, 自己抗体産生の抑制, 腎炎や生存率の改善が報告されている. また CaMK4 阻害剤である KN-93 がループスモデルマウスにおいて脾臓, 末梢リンパ節及び末梢血中に Treg 細胞が有意に誘導され, これに伴い皮膚及び腎臓の損傷が減少することが示されている. また, ループス腎炎の病因に重要であるとされるメサンギウム細胞及びポドサイト (糸球体上皮細胞) における CaMK4 の関与も報告され,

免疫細胞及び非免疫/実質細胞の両面から SLE における CaMK4 制御の可能性が示唆されている⁵⁾. カルシニューリン阻害剤は IL-2 産生を抑制するのに対し, CaMK4 阻害剤は IL-2 の回復が期待されることから新しい治療薬として期待される.

CaMK4 は Treg 細胞に対する作用のみならず, Th17 細胞に対する作用も報告されている. Th17 細胞の関与が示唆される自己免疫疾患として, 乾癬, RA, 多発性硬化症などが想定され, 多発性硬化症を想定した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルにおいて CaMK4 の欠損は組織浸潤及び脱髄の有意な抑制が示されている. CaMK4 は広く全身に分布し多くの機能を有することから, ヒトでの臨床応用に向けた CaMK4 特異的な阻害剤の開発には, DDS 等の工夫や安全性の検討が必要である.

【参考文献】

- 1) Koga T, Kawakami A. The role of CaMK4 in immune responses. *Mod Rheumatol.*, **28**, 211-214 (2017)
- 2) Naz, H., Islam, A., Ahmad, F. & Hassan, M.I. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: a multifunctional enzyme and potential therapeutic target. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **121**, 54-65 (2016)
- 3) Hedrich CM, Crispin JC, Rauen T, Ioannidis C, Apostolidis SA, Lo MS, et al. cAMP response element modulator alpha controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **109**, 16606-11 (2012)
- 4) He, J. *et al.* Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4+ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.*, **22**, 991-993 (2016)
- 5) Maeda, K. *et al.* CaMK4 compromises podocyte function in autoimmune and nonautoimmune kidney disease. *J. Clin. Invest.*, **128**, 3445-3459 (2018)

【著者】

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット
遠藤淳一

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット
柳田哲哉

Prolyl Hydroxylase

【はじめに】

嫌気性細菌等を除き、多くの生物が酸素を利用している。酸素はATP産生やオキシダーゼなどによる細胞成分の合成反応に必須のため、酸素濃度の急激な変化は生物に多大な影響を及ぼす。例えば、高山病は短期間での急激な酸素濃度の低下により引き起こされ、呼吸困難や精神神経症状、場合によっては肺浮腫や脳浮腫を引き起こす。しかし標高4000m以上の高地に存在する都市もあり、生物（特に高等生物）は低酸素環境に順応できるメカニズムが備わっている。

本稿では生物の低酸素応答に深く関わる prolyl hydroxylase (PHD) とその阻害剤の臨床応用について概説する。

【PHDの種類】¹⁾

PHDはPHD1、PHD2およびPHD3の3種類存在し、発現臓器や細胞内局在が異なる。PHD2はユビキタスに発現し、PHD1は精巣、PHD3は心臓で発現量が高い。また、細胞内局在も異なり、PHD2は主に細胞質に発現する一方で、PHD1は核に、PHD3は細胞質と核に発現する。

また、PHD2をノックアウトしたマウスは胎生致死であるが、PHD1およびPHD3は生存に影響がないことから、PHD2が生命維持には最も重要であると考えられている。

【PHDの酵素反応と低酸素応答】^{1,2)}

PHDはタンパク質中のプロリン残基に水酸基を付加する酵素である。この酵素反応には酸素分子と α -ケトグルタル酸が必要であり、さらにPHDの酸素に対するKm値が大気中の酸素濃度に近いため、鋭敏に酸素濃度を感知し、水酸基付加を調節する。

PHDの代表的な標的タンパク質として hypoxia inducible factor α (HIF α) が挙げられる。HIF α はHIF1 α 、HIF2 α およびHIF3 α の3種類存在しており、研究が進んでいるのはHIF1 α とHIF2 α である。HIF1 α とHIF2 α は、HIF β とヘテロダイマーを形成し転写因子として低酸素適応遺伝子発現を誘導する。また、HIF1 α とHIF2 α はPHDによる分解制御が行われており、PHDがHIF α のプロリン残基を水酸基で修飾するとそれを目印に Von Hippel-Lindau (pVHL) が結合する。pVHLはE3リガーゼ活性を有するため、pVHLが結合

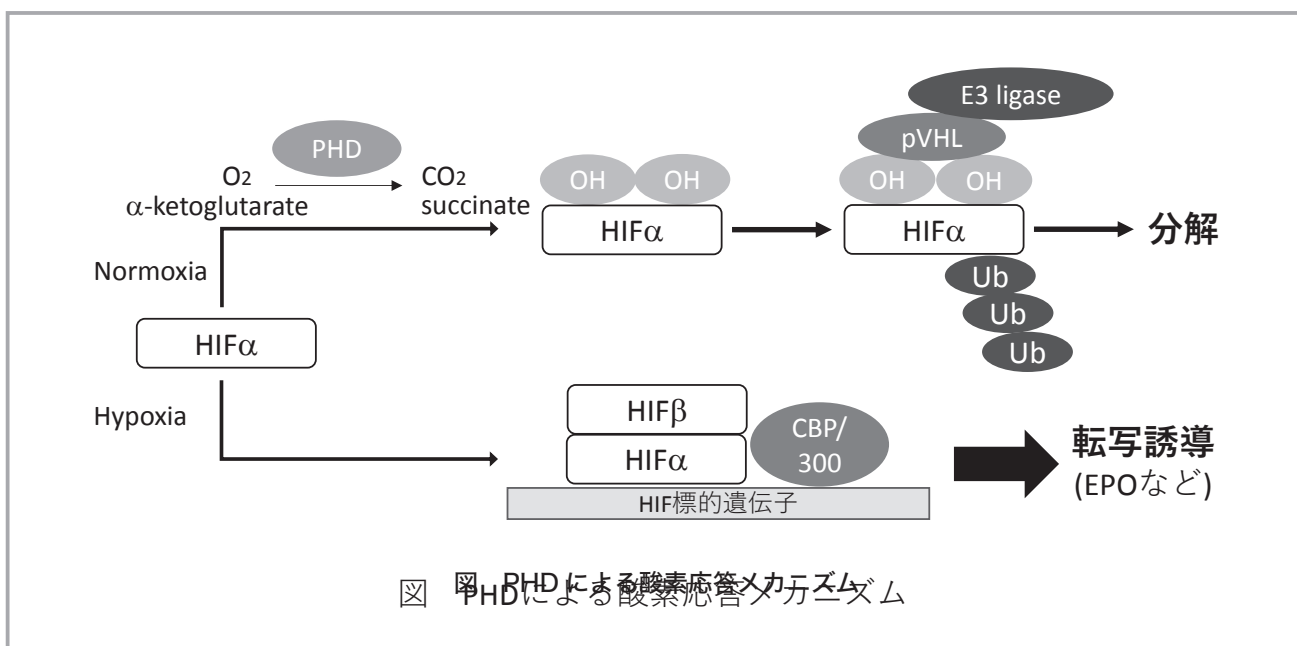


図 1 PHDによる酸素応答メカニズム

した HIF α はプロテアソームで速やかに分解される。すなわち、酸素濃度が低下すると PHD による HIF α への水酸基修飾が低下し、HIF α の安定化を介した転写活性の増加により標的遺伝子が誘導される (図)。

【PHD 阻害剤の臨床応用】^{3,4)}

上述したように PHD は酸素濃度により、HIF α の分解を制御し、下流遺伝子の転写活性を調節している。つまり PHD を阻害する事で人工的に HIF α を安定化させ、その標的遺伝子発現を誘導する事が可能になる。HIF α の代表的な標的遺伝子として VEGF, GLUT1, iNOS や erythropoietin (EPO) などが挙げられ、近年上市が相次ぐ PHD 阻害剤は主に EPO 産生誘導を目的とした薬剤である。

EPO は赤血球産生に必須のホルモンであり、腎臓の間質に存在する線維芽細胞の HIF α により発現が制御されている。健常人では酸素濃度に応じた低酸素応答が正常に機能し、EPO 発現が調節されている。一方で進行した慢性腎臓病患者では EPO を産生する線維芽細胞が線維化を担う筋線維芽細胞に分化し、何らかのメカニズムで低酸素応答が阻害される。その結果、EPO 産生が低下し、正常な造血が阻害され貧血に陥る。EPO 産生低下による貧血は腎性貧血と呼ばれ、治療薬として Erythropoiesis Stimulating Agent (ESA) 製剤が使用されている。EPO 誘導體である ESA 製剤は直接体外から投与するのに対して、PHD 阻害剤は内在性の EPO 産生を誘導し、腎性貧血を改善させる。ESA 製剤と PHD 阻害剤の主な違いとして投与経路が挙げられる。

ESA 製剤が注射剤なのに対して、PHD 阻害剤は経口剤である。ESA 製剤は、透析患者に対しては静脈内注射で、透析前の保存期腎不全患者に対しては皮下注射で使用される事が多く、そのため保存期腎不全患者において注射のため 2～4 週間に一度通院する必要があった。PHD 阻害剤の上市により ESA 製剤の注射が不要となり、保存期腎不全患者の通院頻度の改善が見込まれている。

【おわりに】

これまでの研究により PHD の基質や酸素感知メカニズムが解明され、HIF α を介した低酸素応答に深く関わる事が示された。PHD 阻害剤が上市され、PHD 研究は

大きなマイルストーンを達成したと考えられる。さらに、近年 PHD 阻害剤が急性腎障害を軽減させるといった報告もされ、腎性貧血以外の疾患治療に適応できる可能性も見出されている。今後さらに研究が進み、多くの疾患の治療に役立つ事を期待したい。

【参考文献】

- 1) Sarah E. Wilkins, Emily Flashman, John S. Scotti, Richard J. Hopkinson, Rasheduzzaman Chowdhury, Christopher J. Schofield. The Role of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases in Hypoxia Sensing: Chapter6, *The Royal Society of Chemistry* (2015)
- 2) 田中 哲洋, 南学 正臣 腎線維化と低酸素の薬物療法, *日腎会誌* 2015; 57 (7): 1215-1224.
- 3) Souza, Ernane; Cho, Katherine H; Harris, Shelby T; Flindt, Naomi R; Watt, Richard K; Pai, Amy Barton. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors: a paradigm shift for treatment of anemia in chronic kidney disease? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2020 Aug; 29 (8): 831-844
- 4) 相馬 友和 鈴木 教郎, 腎線維化と腎性貧血, *日腎会誌* 2015; 57 (7): 1193 - 1199.

【著者】

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所
高瀬 昌幸

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所
小寺 淳

