

日本応用酵素協会誌

No.56

2021

総 説

POCT を志向した均一かつ汎用的な抗体酵素複合体の調製法の開発と電気化学イムノセンサへの展開	1
三浦 大明, 浅野 竜太郎	
RECQ ファミリーヘリカーゼとテロメア制御	11
林 真理	
アミノ酸トランスポーター阻害薬によるがん治療 ー研究の展開と解明が進むユニークな抗腫瘍効果の発現機序ー	21
大垣 隆一	

2021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	29
成人病の病因・病態の解明に関する研究助成	64
Vascular Biology Innovation に関する研究助成	105
全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成	127
Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成	138

研究調査所 酵素情報

Cas9 ヌクレアーゼ	164
自己免疫疾患における創薬標的としての免疫プロテアソーム	167

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

総 説

POCTを志向した均一かつ汎用的な抗体酵素複合体の調製法の開発と電気化学イムノセンサへの展開

三 浦 大 明*, 浅 野 竜 太 郎*

1. はじめに

患者の生活の質 (Quality of life: QOL) の向上に寄与する臨床現場即時検査 (Point-of-care testing: POCT) は、迅速性、操作の簡便性、および定量性が必要とされており、これらを満たすには電気化学検出原理に基づく手法が好適である。高い親和性と特異性を有する抗体を分子認識素子として用いたセンサは、イムノセンサと呼ばれ、既に種々の疾病の確定診断などにも用いられているが、汎用的な POCT を目指した電気化学イムノセンサの開発には未だ多くの障壁がある。本稿では、イムノセンサの一例を紹介すると共に、高感度検出の達成に欠かせない抗体酵素複合体の調製に関して、我々の最近の取り組みも含めて紹介する。

2. POCT

POCT とは、患者のすぐそばで行われる検査であり、様々な疾患の早期発見や患者の QOL の向上に寄与する。これは、従来の患者または医療従事者が検体を採取後、検査機関へ送付する体制とは異なり、検査における迅速性と操作の簡便性、さらには定量性も求められる場合がある。POCT には、特定の分子のみを認識し、その有無や量を正確に使用者に伝える必要があることから、高い選択性を有する分子認識素子が必要となる。既に糖尿病患者の血糖管理のための POCT 機器として汎用されているグルコースセンサは、グルコース酸化酵素 (Glucose oxidase: GOx)^{1,2)} やグルコース脱水素酵素 (Glucose dehydrogenase: GDH)³⁻⁵⁾ を分子認識素子として用いており、血中のグルコースに応答した電気化学シグナルから、即時に血糖値を算出し患者に知らせることが出来る。そのため、適切なタイミングでのインスリンの投与や、低血糖を防ぐためのブドウ糖の摂取など、血糖値の

厳密な管理が可能となった。一方、我々の研究グループは最近、動物細胞培養における管理を志向し、その主要な栄養素である L-グルタミンの新規原理に基づく連続検出法の開発を行った⁶⁾。L-グルタミン結合タンパク質が、結合により構造が変化することに着目し、酸化還元プローブで修飾しておくことで、結合に伴う構造変化を電気化学シグナルとして捉えることに成功した。しかし、これらの原理に基づくセンサで測定可能な分子は多くの場合、低分子化合物に限定され、疾患関連タンパク質などの測定例は限られている⁷⁾。

3. イムノセンサ

抗体は、生体内の免疫系を担う主要な分子であり、侵入してきた外敵に強力かつ特異的に結合する能力を有する。この抗体の特徴を生かして、分子認識素子として応用したセンサは、イムノセンサと呼ばれ、検出抗体の標識の有無によって大別される⁸⁾。

抗体を標識せずに利用する検出系は、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance: SPR) 法に代表される。このようなイムノセンサは、高感度での検出を可能とするものの、検出までに時間がかかり、検出機器も大型となることから、POCT への適用は困難である。一方で、抗体を標識して利用する場合、標識物質が検出感度および POCT への適用可否を左右する。例えば、妊娠検査薬やインフルエンザの確定診断には、イムノクロマトグラフィー法に基づく POCT 機器が用いられているが、着色されたビーズを抗体に修飾することで、定性的な診断を可能としている一方で、その結果から定量的な議論をすることは難しい。

酵素によって標識された抗体を検出素子として用いたイムノセンサは、Enzyme-linked immunosorbent

*東京農工大学大学院工学府生命工学専攻

assay (ELISA) と呼ばれている⁹⁾。ELISA の感度は、修飾する酵素に大きく依存することから、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase: HRP) やアルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase: ALP) の他に、 β -ガラクトシダーゼ¹⁰⁾ や GOx¹¹⁾ を応用した例が報告されている。ELISA の多くは、比色や化学発光、および蛍光による検出を基本原理としており、検出機器の小型化は難しい。加えて、抗体抗原反応および洗浄操作、検出試薬の添加など操作が煩雑で時間がかかるため、POCT への適用はやはり困難である。

4. 電気化学イムノセンサ

電気化学検出は、定量的な POCT を達成する上で、重要な検出手法である。電気化学検出技術も様々であ

り、それぞれが異なる特徴を有することから、適切な手法の選択が求められる。サイクリックボルタンメトリー (Cyclic voltammetry: CV)¹²⁾ や電気化学インピーダンス分光法 (Electrochemical impedance spectroscopy: EIS)¹³⁾ を測定原理とした電気化学イムノセンサは、捕捉抗体を電極に固定し、測定対象である抗原の結合に伴うピーク電流値や抵抗値変化を捉える手法である。これらの手法の利点は、抗体への抗原の結合を直接電気化学シグナルに変換可能であることであり、抗体の修飾を必要としない。しかし、夾雑物の電極への非特異吸着によっても抗原結合と同様のシグナルが観察される恐れがあるため、高感度化が難しい場合がある¹²⁾。

一方でクロノアンペロメトリー (Chronoamperometry: CA) を測定原理とした電気化学センサは、世界中

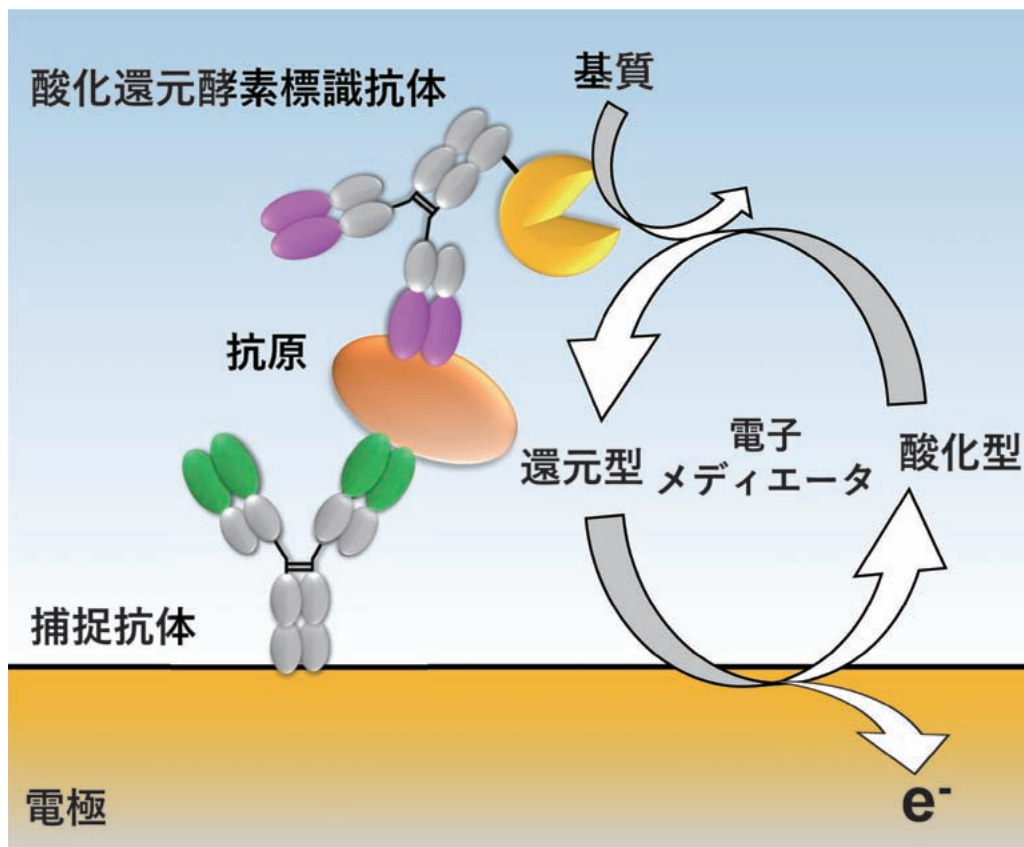


図 1 電気化学 ELISA の模式図

電極に捕捉抗体を固定し、酸化還元酵素標識抗体で抗原をサンドイッチする。洗浄後に、酵素の基質を添加すると、基質の酸化に伴って生じた電子が、電子メディエータなどを介して電極に渡され、抗原依存的な応答電流値として観察される。

で汎用されているグルコースセンサに代表される。酸化還元酵素を検出素子として用いることで、測定対象である基質の酸化に伴い補因子が還元されるため、電子メディエータなどを介させれば電極に電子が渡され、その応答電流値から基質の定量を行うことができる。しかしイムノセンサへの応用を考えた場合、抗体の抗原への結合シグナルを電気化学シグナルに変換するためには、酸化還元酵素や酸化還元プローブによる抗体の修飾などの工夫が必要である¹⁴⁾。特に、電極表面上で捕捉抗体と検出抗体で抗原をサンドイッチする電気化学ELISAの大半は、酸化還元酵素修飾された検出抗体、いわゆる抗体酵素複合体を用いたCAを測定原理としているが、いかにして機能的な抗体酵素複合体を簡便かつ汎用的に調製するかが課題となっている¹⁵⁾(図1)。

5. 抗体酵素複合体の調製法

電気化学ELISAで用いられる抗体酵素複合体は、アミンカップリングなどの手法を用いて抗体に酵素を化学的に修飾している場合が多い。システイン残基を利用したチオールカップリングによる抗体酵素複合体の調製例も報告されているが、システイン残基間のジスルフィド結合は、抗体の高次構造維持に必要であることから、抗体の機能に大きな影響を与える可能性がある¹⁶⁾。遺伝子工学的手法を用いて抗体表面に新たなシステイン残基を導入する場合もあるが、組換え生産時のミスフォールディングや凝集、さらには発現量の低下をしばしば伴う。また、このような化学修飾法は、抗体および酵素の反応点を制御することが困難であるため、均一な分子を調製することが困難で、特に低濃度の抗原の電気化学検出においては測定結果の再現性に影響を与える。

均一な抗体酵素複合体の調製法のひとつとして、抗体を低分子化し、酵素と遺伝子工学的に融合させて組換え生産する方法がある¹⁷⁾。しかしこの場合も、分子量の増大に伴う組換え生産時の発現量の低下や、不溶性の凝集体が主として生成してしまう懸念がある。また、抗体の結合部位は通常、N末端領域に位置するため、N末端への酵素の融合は、抗体の結合能に大きな影響を与える可能性がある。このため、親和性を向上させるために複数の抗体を縦列に融合させても期待する効果が得られにくい。

近年、Sortase Aに代表される酵素が触媒するタンパク質間連結反応を利用した抗体酵素複合体の調製が注目されている¹⁸⁾。タンパク質間連結反応による抗体酵素複合体調製における最大の利点は、抗体と酵素を量論的に反応させることができ、その反応点を制御することができることから、均一な抗体酵素複合体を調製できることである。しかしながら、Sortase Aは逆反応を伴うため、連結効率は必ずしも高くなく、反応させた後も精製プロセスを必要としてしまう。

6. Catcher/Tagを利用した抗体酵素複合体の調製

連結モジュールであるSpyCatcher/SpyTagは、化膿レンサ球菌由来フィブロネクチン様タンパク質CnaB2を人工的に二分割(スプリット)させたものである。スプリットされたSpyCatcherタンパク質とSpyTagペプチドは共存させると自発的に会合し、両者の間で共有結合性のイソペプチド結合が形成される¹⁹⁾。この会合は、4℃下でも安定的に進行するだけでなく、反応効率も80%以上と非常に高く、塩や界面活性剤などの影響も受けない。さらに本手法を用いることで、抗体のN末端に酵素を融合することなく抗体酵素複合体を調製することが可能であるため、抗体結合の妨げとなりにくい。化膿レンサ球菌由来タンパク質であるため、生体内での使用を考えた場合にはその抗原性が懸念されるが、*in vitro*でのセンシングを志向する場合は問題とはならない。しかし、前述の他のタンパク質間連結法と比べての欠点は、抗体酵素複合体形成後に、SpyCatcher/SpyTagがそのまま残存してしまうことであり、抗体および酵素本来の機能に影響を及ぼす可能性は捨てきれない。

我々はこのSpyCatcher/SpyTag反応の堅牢さに着目し、抗体にSpyTagを、酵素にSpyCatcherを融合することで抗体酵素複合体を調製し、イムノセンサへの応用を検討した²⁰⁻²²⁾(図2A)。遺伝子工学的にSpyTagを融合した抗体を組換え生産する場合、より安価に調製できるという点から大腸菌を宿主とすることが望ましく、その場合抗体の低分子量化が求められる。低分子抗体としては、単一ドメインで親和性を示すVHH(Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody)や一本鎖抗体(Single-chain variable fragment: scFv)が

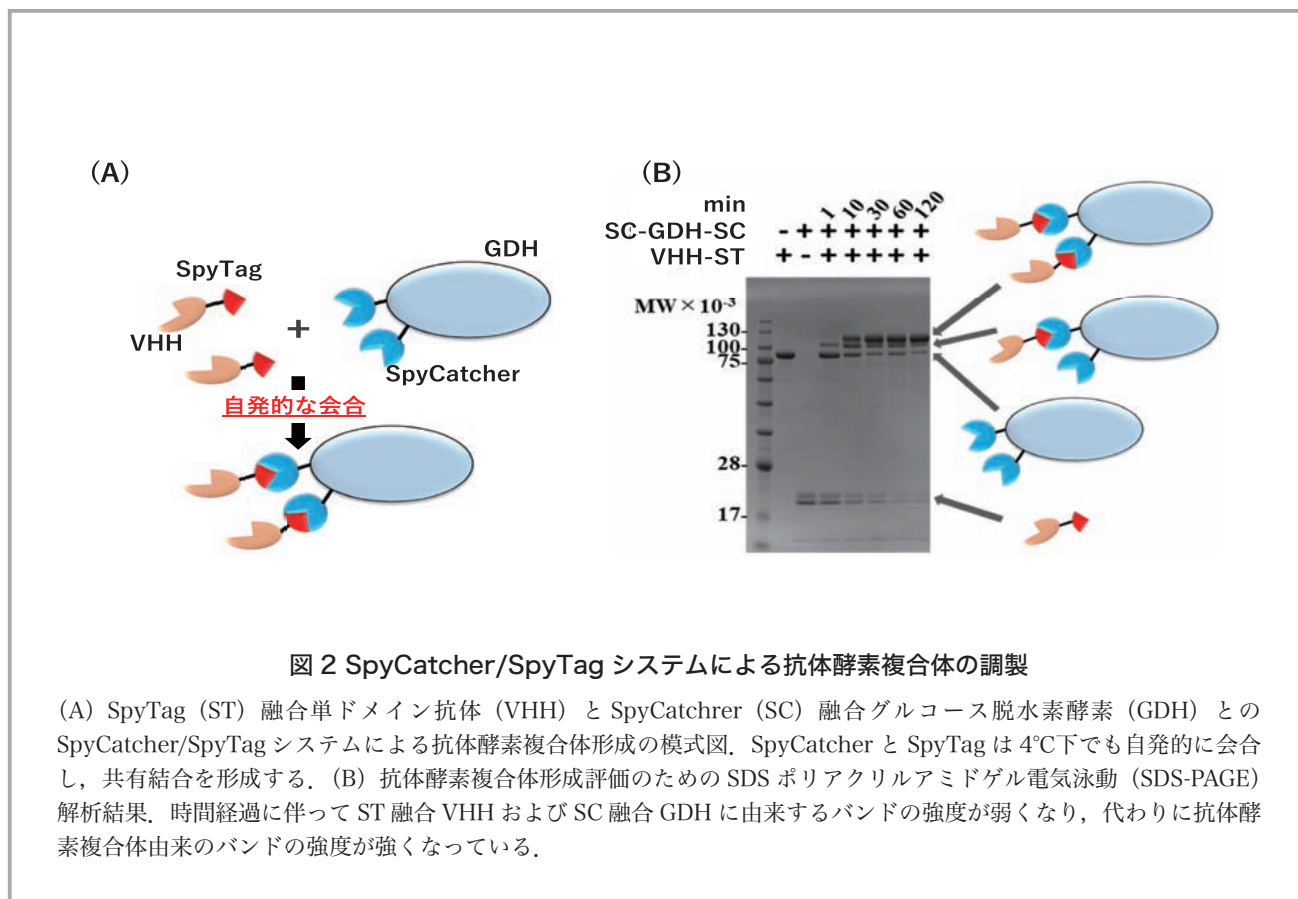
用いられる。そこで我々は、がんマーカーのひとつであるヒト上皮増殖因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) に対する VHH, および scFv の C 末端に SpyTag を融合した分子を、大腸菌を用いて組換え生産し、金属イオン固定化アフィニティークロマトグラフィー、次いでゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

一方、酵素は、*Aspergillus flavus* 由来の GDH を用いた。GDH はその高い触媒活性を有していることから、市販のグルコースセンサにも実装されており、グルコースの酸化に伴う電気化学シグナルを得ることが出来る。そこで、GDH の N 末端、あるいは C 末端、および両末端に SpyCatcher を遺伝子工学的に融合し、同様に大腸菌を用いて調製した。GDH の両末端への SpyCatcher の融合により、2 分子の低分子抗体との会合が可能となるため、親和性の向上が期待される。

SpyTag 融合 VHH と SpyCatcher 融合 GDH を量論的に混合し、4°C で静置することで、抗体酵素複合体の調製を行い、SDS-PAGE による会合の評価を行った。その結果、混合後に新たに抗体酵素複合体の理論分子量付近に明瞭なバンドが観察されたことから、SpyCatcher/

SpyTag システムによる抗体酵素複合体の調製に成功したことが示された。SpyCatcher を 2 つ融合させた GDH の場合も同様に、2 分子の低分子抗体との会合に相当するバンドがみられた (図 2B)。さらに、他の VHH や scFv を用いて、本手法の汎用性も確認することができた。

続いて、作製した抗体酵素複合体の機能評価を行った。抗体の結合能を SPR により評価した結果、SpyTag の融合や GDH との複合体化に伴う親和性の低下は確認されなかった。また期待通り VHH を 2 つ有する場合に、より高い親和性が認められた。酵素の活性は、グルコースを基質とした場合の人工電子受容体および呈色試薬の酸化還元に伴う吸光度変化により評価した。その結果、SpyCatcher の融合および複合体化により、それぞれ活性値の低下はみられたものの、検出素子としては十分な活性を保持していた。今回使用した GDH の両末端は、活性部位から離れていることが結晶構造により明らかになっている。そのため、比較的大きな SpyCatcher (15 kDa) の融合や、その後の抗体との複合体化後も、酵素活性を保持していたと考えられる。以上より、SpyCatcher/SpyTag を利用した本抗体酵素複合体の調



製法は、組換えタンパク質に与える影響が低い低温でも反応は効率的に進行し、抗体および酵素の機能に大きな影響を与えることなく2分子の低分子抗体の融合も容易である他、その汎用性も示すことができた。

続いて、開発した抗体酵素複合体を検出素子としてELISAによるEGFRの蛍光検出を試みた(図3A)。血中EGFRの濃度は非常に低く、高感度での検出が求められる。結果は、EGFRの濃度依存的な蛍光強度の増加は見られたものの、臨床検査で求められている感度を満たすことは出来ず、より親和性の高い2分子のscFvと会合させた2価抗体酵素複合体を用いても改善は見られなかった²¹⁾(図3B)。EGFRは単量体性の抗原であるため、低濃度ではGDHに融合させた2分子のscFvが同時に結合可能な範囲にEGFRが存在し得なかったことに起因すると考えられた。

7. 2種のCatcher/Tagを利用した二重特異性抗体酵素複合体の調製と電気化学イムノセンサへの展開

単量体性の抗原であるEGFRをより高感度に検出するために、新たな連結モジュールであるSnoop-

Catcher/SnoopTag²³⁾の利用を考えた。SnoopCatcher/SnoopTagは、肺炎レンサ球菌由来のタンパク質であり、SpyCatcher/SpyTagと同様に自発的に会合してイソペプチド結合を形成するが、SnoopCatcher/SnoopTagとSpyCatcher/SpyTag間での交差性はない。そこで、GDHの両末端にSnoopCatcherおよびSpyCatcherをそれぞれ融合させ、互いにEGFR上の異なるエピトープを認識する2種類のscFvにSnoopTagとSpyTagをそれぞれ融合させた分子と混合、反応させることで、二重特異性抗体酵素複合体を調製した。SDS-PAGEの結果、期待する複合体に相当する分子量付近に均一なバンドが観察された。作製した複合体を検出抗体として用いてEGFRの蛍光検出を行った結果、EGFR濃度0-5 nMの範囲で濃度依存的な蛍光強度の増加が確認されたことから、2種類のscFvを組み合わせることの有用性が示された。

続いて、この二重特異性抗体酵素複合体を用いた電気化学イムノセンサの開発を進めた(図4A)。捕捉抗体固定化磁気ビーズと微小電極を用いることで、洗浄操作が不要、かつ迅速な検出系の構築を目指した。結

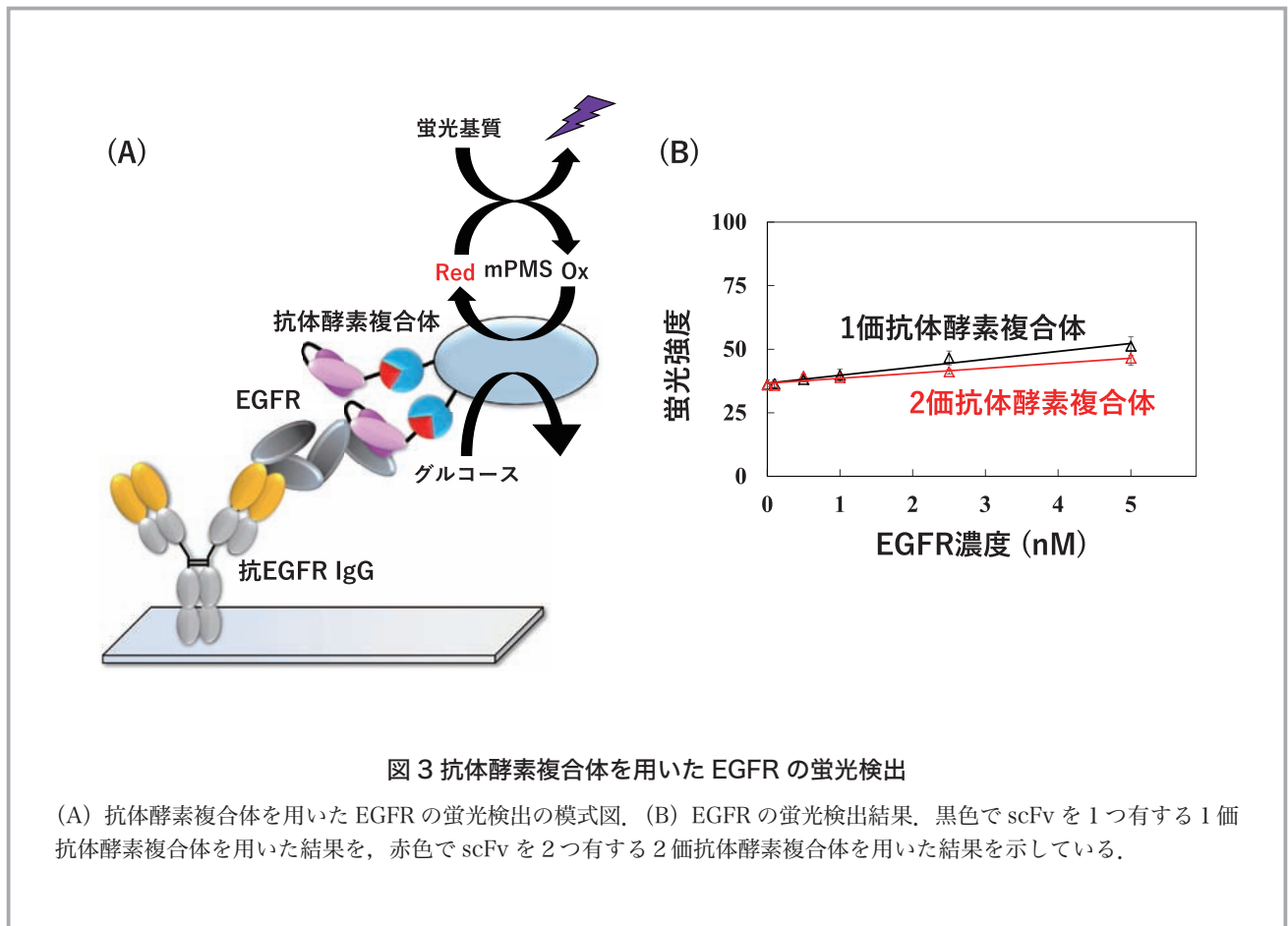


図3 抗体酵素複合体を用いたEGFRの蛍光検出

(A) 抗体酵素複合体を用いたEGFRの蛍光検出の模式図。(B) EGFRの蛍光検出結果。黒色でscFvを1つ有する1価抗体酵素複合体を用いた結果を、赤色でscFvを2つ有する2価抗体酵素複合体を用いた結果を示している。

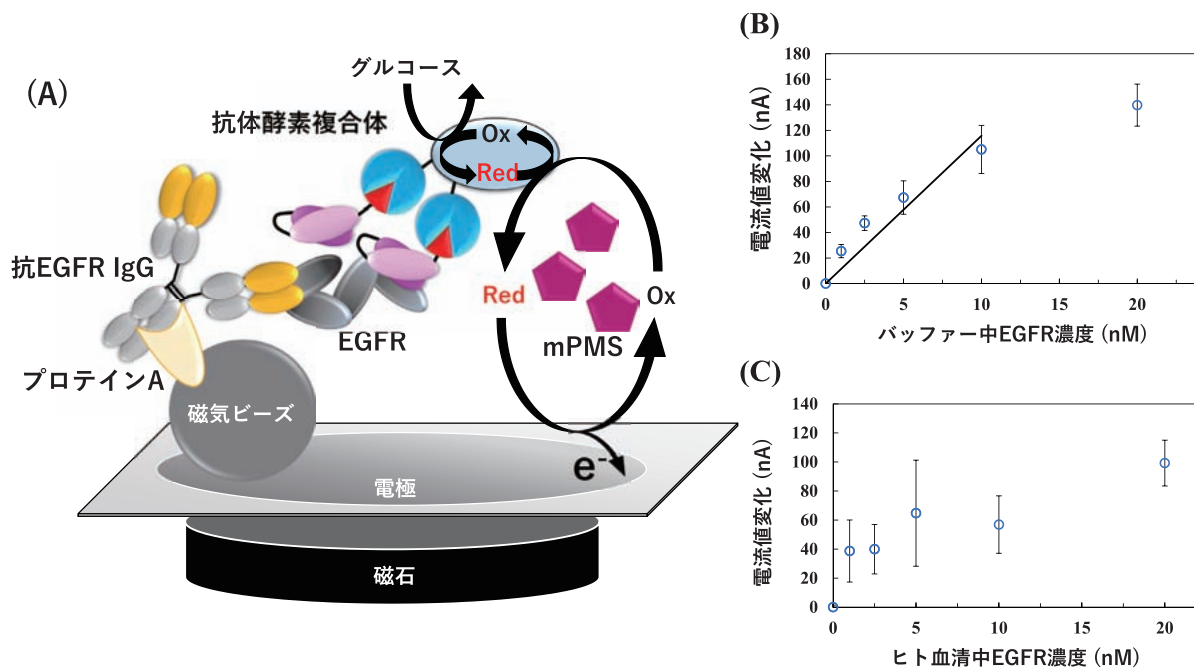


図4 抗体酵素複合体を用いた EGFR の電気化学検出

(A) 抗体酵素複合体を用いた EGFR の電気化学検出の模式図。微小電極の下に磁石を置くことで、磁気ビーズ上の捕捉抗体と EGFR をサンドイッチした抗体酵素複合体のみが集積される。(B) バッファー中の EGFR の電気化学検出結果。電流値変化は、グルコース添加前後での電流値変化を記録し、EGFR 濃度 0 nM の際の値を 0 と換算した時の値を示している。(C) ヒト血清中の EGFR の電気化学検出結果。

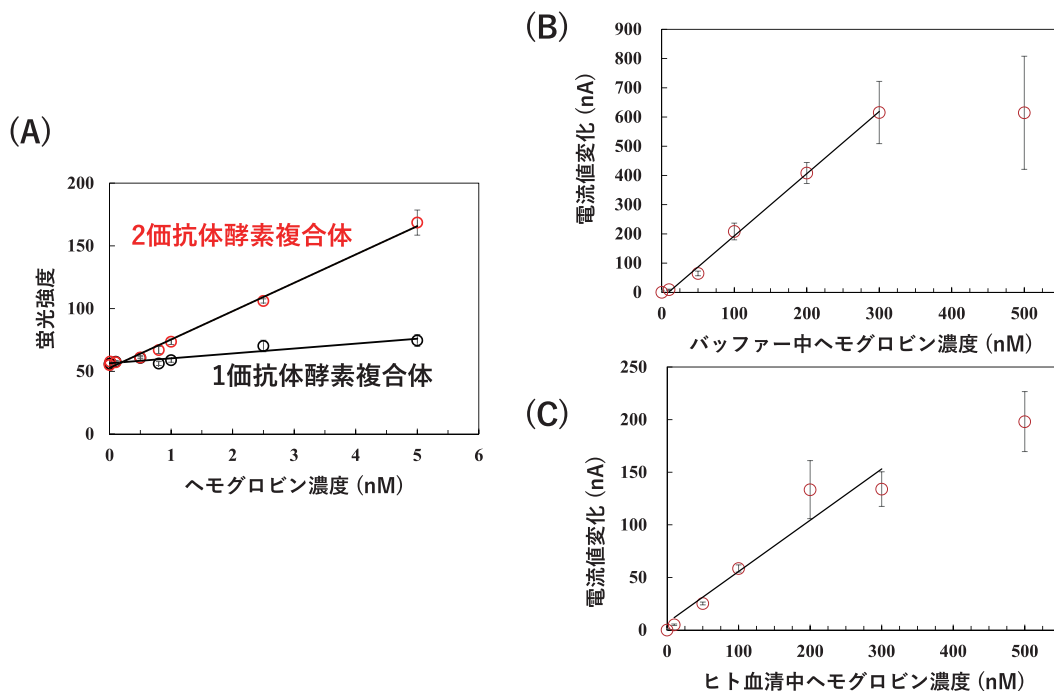


図5 抗体酵素複合体を用いたヒトヘモグロビンの蛍光および電気化学検出

(A) 抗体酵素複合体を用いたヒトヘモグロビンの蛍光検出結果。黒色で scFv を 1 つ有する 1 価抗体酵素複合体を用いた結果を、赤色で scFv を 2 つ有する 2 価抗体酵素複合体を用いた結果を示している。(B) バッファー中のヘモグロビンの電気化学検出結果。電流値変化は、グルコース添加前後での電流値変化を記録し、ヘモグロビン濃度 0 nM の際の値を 0 と換算した時の値を示している。(C) 汎用されている溶血剤成分を添加したヒト血清中のヘモグロビンの電気化学検出結果。

果、操作時間 25 分程度で EGFR を検出することができ、0-10 nM の範囲で高い直線性も確認された (図4B)。さらに、血中での検出を視野に、夾雑物の影響を評価するため、ヒト血清中での検出を行ったところ、やはり EGFR の濃度依存的な電流値の上昇が確認され、実サンプル測定の実用可能性が示された (図4C)。洗浄操作不要の検出には、二重特異性抗体酵素複合体の高い親和性に加え、磁気ビーズを利用することによる反応液の攪拌、および磁石を用いることで電極近傍に抗原と結合した検出素子を集積させることによる、GDH と電子メディエータの効率的な酸化還元サイクルが寄与したと考えている。

8. Catcher/Tag を利用した抗体酵素複合体を用いた多量体分子の電気化学検出

二重特異性抗体酵素複合体を調製することで、単量体性の抗原であっても高感度に検出することができた。一方で、捕捉抗体も含めると 3 種のエピトープが異なる抗体を用意する必要があり汎用性には欠ける。また、SpyTag 融合抗体、SnoopTag 融合抗体、および両 Catcher 融合 GDH と、3 種類の組換えタンパク質を調製する必要があるのも実用化には障壁となる。そこで、1 種の検出抗体でも高感度の検出を達成するために、多量体性の抗原検出に着目した。ヘモグロビンは α 鎖と β 鎖が 2 分子ずつ会合した四量体構造を有しており、貧血や脱水症状の診断マーカーになるだけでなく、緊急手術の際の輸血量の迅速な推定のために、POCT 機器の開発が求められている^{24, 25)}。

抗ヘモグロビン scFv の C 末端に SpyTag を遺伝子工学的に融合し、両末端に SpyCatcher を融合した GDH と量論的に混合することで、抗体酵素複合体を調製した。前述と同様の機能評価を行った結果、複合体形成による酵素活性への影響は確認されず、また親和性に関しては、scFv を 2 つ有する場合に著しい向上が確認された。これを用いて、ELISA によるヒトヘモグロビンの蛍光検出を行ったところ、抗体を 2 分子含む 2 価抗体酵素複合体を用いた方が明らかに高い検出感度を示した (図5A)。これらの結果から、同一の scFv を 2 つ有する抗体酵素複合体は、多量体性の抗原検出を目指した場合、有望な検出素子となることが示された。

続いて、2 価抗体酵素複合体を検出素子として、磁気ビーズを用いたヒトヘモグロビンの電気化学検出を試みた。結果、ヒトヘモグロビン濃度依存的な電流値の増加が見られ、その直線範囲は 10-300 nM であった (図5B)。これは、臨床的に求められている検出濃度範囲を満たす性能であった。また、血中ヘモグロビンを検出する際には、溶血させる必要がある。そこで実測定の際の夾雑物の影響を評価するため、希釈したヒト血清に対し、汎用されている溶血剤の主成分を含むバッファを添加し、測定を行った結果、測定値にほとんど影響は確認されなかった (図5C)。以上の結果より、多量体抗原を測定対象とすることで、1 種の抗体で構成される抗体酵素複合体を用いた場合でも、高感度測定を達成することが出来た。

9. おわりに

POCT を志向した電気化学イムノセンサは、患者の QOL 向上に大いに役立つことが期待されるものの、実用化までは解決すべき課題が多くある。我々は、Catcher/Tag システムを用いることで、汎用的な抗体酵素複合体の調製方法を開発、さらには検出素子として用いたイムノセンシングシステムを構築してきた。しかし依然として、検出までに 25 分程度要すること、磁気ビーズ上に捕捉抗体を固定する必要があることなど、改善すべき点はまだ残されており、現在さらなる迅速簡便化を目指した検出系の構築を進めている。近年、ナノマテリアルの応用による新規電極素材やデバイスなどの開発によるセンサの高感度化を目指した研究が数多く報告されているが、我々はタンパク質工学的手法を駆使したアプローチを試みている点に特色がある。新規材料やデバイスとうまく融合させることで、さらにより良い POCT 機器、あるいはこれらに資するセンサ素子の開発に繋がることを期待している。

参考文献

- 1) Suzuki, N. *et al.*: Engineered Glucose Oxidase Capable of Quasi-Direct Electron Transfer after a Quick-and-Easy Modification with a Mediator. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 1137, 21, 1137 (2020).

- 2) Rahman, M.M. *et al.*: Development of amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase co-immobilized with multi-walled carbon nanotubes at low potential. *Sensors Actuators B Chem.*, **137**, 327-333 (2009).
- 3) Okurita, M. *et al.*: Engineered fungus derived FAD-dependent glucose dehydrogenase with acquired ability to utilize hexaammineruthenium (III) as an electron acceptor. *Bioelectrochemistry*, **123**, 62-69 (2018).
- 4) Ito, Y. *et al.*: Third generation impedimetric sensor employing direct electron transfer type glucose dehydrogenase. *Biosens. Bioelectron.*, **129**, 189-197 (2019).
- 5) Hatada, M. *et al.*: Development of a glucose sensor employing quick and easy modification method with mediator for altering electron acceptor preference. *Bioelectrochemistry*, **121**, 185-190 (2018).
- 6) Takamatsu, S. *et al.*: Continuous electrochemical monitoring of L-glutamine using redox-probe-modified L-glutamine-binding protein based on intermittent pulse amperometry. *Sensors Actuators B Chem.*, **346**, 130554 (2021).
- 7) Hatada, M. *et al.*: Development of a screen-printed carbon electrode based disposable enzyme sensor strip for the measurement of glycated albumin. *Biosens. Bioelectron.*, **88**, 167-173 (2017).
- 8) Miura, D. and Asano, R.: Biosensors: Immunosensors. *Ref. Modul. Biomed. Sci.*, (2021).
- 9) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874 (1971).
- 10) Neurath, A.R. & Strick, N.: Enzyme-linked fluorescence immunoassays using β -galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates. *J. Virol. Methods*, **3**, 155-165 (1981).
- 11) Rathlev, T. & Franks, G.F.: New Procedure for Detecting Antinuclear Antibodies Using Glucose Oxidase Immunoenzyme Technic. *Am. J. Clin. Pathol.*, **77**, 705-709 (1982).
- 12) Dhull, N. *et al.*: Highly sensitive and non-invasive electrochemical immunosensor for salivary cortisol detection. *Sensors Actuators B Chem.*, **293**, 281-288 (2019).
- 13) Jarocka, U. *et al.*: Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. *Biosens. Bioelectron.*, **55**, 301-306 (2014).
- 14) Taylor, R.F. *et al.*: Antibody- and receptor-based biosensors for detection and process control. *Anal. Chim. Acta*, **249**, 67-70 (1991).
- 15) Kavosi, B. *et al.*: A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTS/chitosan/ionic liquid nanocomposite. *Biosens. Bioelectron.*, **52**, 20-28 (2014).
- 16) KATO, K. *et al.*: Conjugation of Rabbit Anti- (Human Immunoglobulin G) Antibody with β -D-Galactosidase from Escherichia coli and Its Use for Human Immunoglobulin G Assay. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 285-292 (1976).
- 17) Goshorn, S.C. *et al.*: Genetic Construction, Expression, and Characterization of a Single Chain Anti-Carcinoma Antibody Fused to β -Lactamase. *Cancer Res.*, **53**, (1993).
- 18) Ismail, N.F. & Lim, T.S.: Site-specific scFv labeling with invertase via Sortase A mechanism as a platform for antibody-antigen detection using the personal glucose meter. *Sci. Reports 2016* **61**, **6**, 1-13 (2016).
- 19) Zakeri, B. *et al.*: Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, E690-E697 (2012).
- 20) Kimura, H. *et al.*: Convenient and Universal Fabrication Method for Antibody-Enzyme Complexes as Sensing Elements Using the

- SpyCatcher/SpyTag System. *Anal. Chem.*, **90**, 14500-14506 (2018).
- 21) Kimura, H. *et al.*: Rapid and homogeneous electrochemical detection by fabricating a high affinity bispecific antibody-enzyme complex using two Catcher/Tag systems. *Biosens. Bioelectron.*, **175**, 112885 (2021).
- 22) Miura, D. *et al.*: Rapid, convenient, and highly sensitive detection of human hemoglobin in serum using a high-affinity bivalent antibody-enzyme complex. *Talanta*, **234**, 122638 (2021).
- 23) Veggiani, G. *et al.*: Programmable polyproteins built using twin peptide superglues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, 1202-1207 (2016).
- 24) Yip, R.: Significance of an abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 272S-279S (2000).
- 25) Awada, W.N. *et al.*: Continuous and noninvasive hemoglobin monitoring reduces red blood cell transfusion during neurosurgery: a prospective cohort study. *J. Clin. Monit. Comput.*, **29**, 733-740 (2015).

総 説

RECQファミリーヘリカーゼとテロメア制御

林 眞 理^{*}, ^{**}

1. はじめに

RECQヘリカーゼは、菌界、植物界、動物界にわたって広く保存されたタンパク質ファミリーであり、DNA複製、転写、傷害修復において重要な機能を果たす。ヒトでは5つのRECQヘリカーゼが保存されており、中でもBLM, WRN, 及びRECQ4はそれぞれブルーム症候群、ワーナー症候群、及びロスムンド・トムソン症候群2型、ラバディリーノ症候群、バレーゲロルド症候群の原因遺伝子として知られる。さらにRECQ1, RECQ5も含め、全ての因子の遺伝性変異は、がん化頻度を上昇させることが報告されており、ゲノムの正常な維持に必須の因子群である。RECQヘリカーゼの基質として、DNAフォークや複製バブル、Dループ構造、グアニン4重鎖(G4)構造、ホリデイジャンクション(HJ)など様々な構造が知られているが、これら全ての構造を

取りうる機能的なゲノム領域としてテロメアが挙げられる。テロメアは染色体末端の保護構造であり、そのDNA配列の反復性からDNA複製、転写、修復が比較的困難な領域で、その維持においてRECQヘリカーゼの機能が重要な役割を果たすことが徐々に明らかになっている。本総説では、主に哺乳類細胞RECQのテロメアにおける機能に焦点を当てて最近の知見を紹介する。

2. RECQファミリーヘリカーゼ

RECQヘリカーゼファミリーは、高度に保存されたヘリカーゼコアダメインを有する。ヒトにおいては、RECQ1(又はRECQL, RECQL1), BLM, WRN, RECQ4(又はRECQL4), RECQ5(又はRECQL5)の計5つが同定されている(図1)。ヘリカーゼコアダメイン(DEAD/DEAH BOX)に加えて、相同性の高いRecQ C-terminal

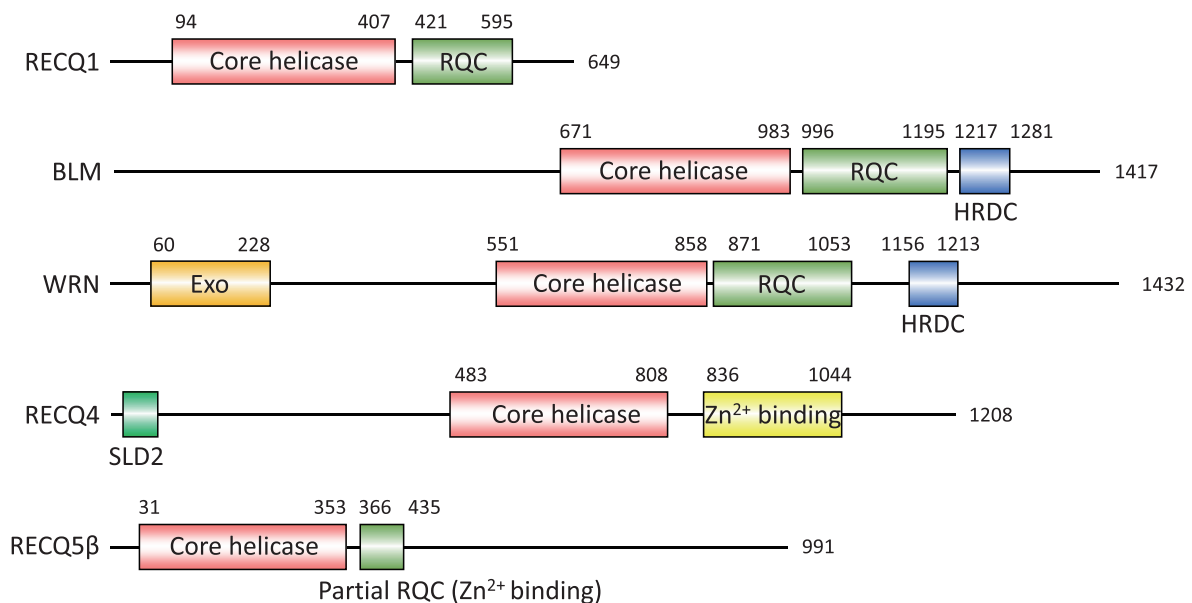


図1 ヒトRECQファミリーヘリカーゼの構造

* IFOM(イタリア分子腫瘍研究所)(Junior Principle Investigator) ** 京都大学大学院医学研究科 先端・国際医学講座 IFOM-KU 国際共同ラボ

(RQC), Helicase and RNase D-like C-terminal (HRDC) ドメインを保持しているものが多い (図1)。それぞれの RECQ ヘリカーゼは、互いにオーバーラップする様々な核酸を基質とし (図2)、DNA 複製、転写、DNA 傷害修復からテロメア維持に至るまで、核内における核酸の維持・継承に関わる様々な反応を触媒する¹⁾。

RECQ1 は多くのがん細胞で発現亢進が報告されており、ノックダウン実験により、がん細胞の増殖に必要であることが確かめられている²⁾。RECQ1 のノックダウンにより転写活性が低下する遺伝子群のプロモーター領域では G4 形成能を持つ配列が有意に検出される³⁾。しかし G4 構造の開裂活性はほとんどないため⁴⁾、どのように遺伝子活性を制御しているかは良くわかっていない。

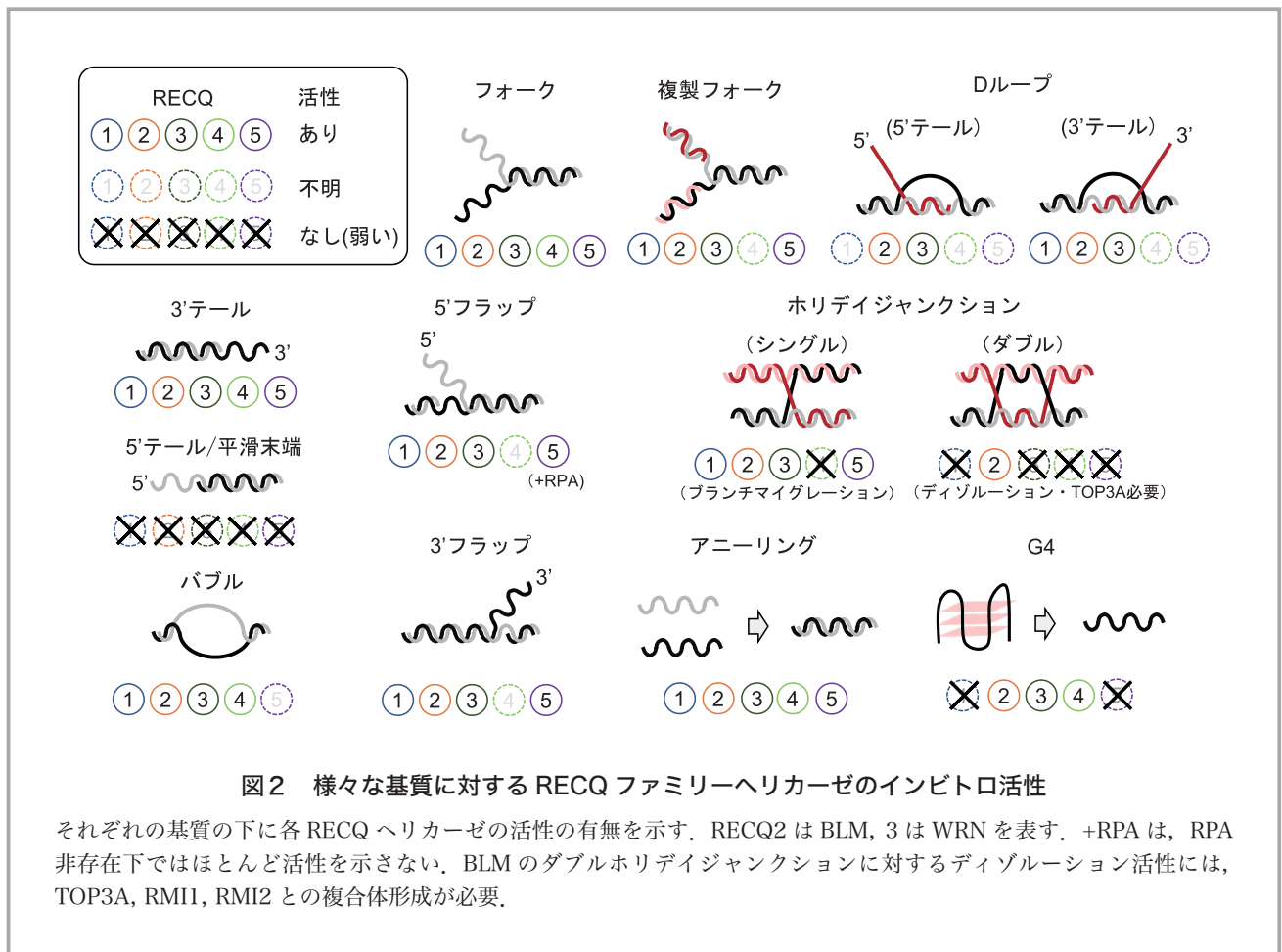
BLM はヘリカーゼ活性に加え、IA 型トポイソメラーゼ TOP3A, RMI1, および RMI2 と BTR 複合体を形成し、ダブルホリデイジャンクションの分離 (Dissolution) を促進する⁵⁾。この分離活性は、相同組換え修復の最後のステップにおいて、修復した鎖を正常に分離するのに

必要であり、有糸分裂期後期においても姉妹染色分体の分離を保障している⁶⁾。ブルーム症候群患者由来の細胞では、欠失、切断、転座等の様々な異常が確認され、特に姉妹染色分体交換の頻度が 10 倍以上増加する⁷⁾。

WRN は非相同末端修復、相同組換え修復、マイクロホモロジー媒介末端修復、一本鎖アニーリング修復等の様々な DNA 傷害修復経路に関わる⁸⁾。ワーナー症候群患者は成人型早老症の症状を示し、様々な悪性新生物の出現頻度が数倍から数十倍に亢進している⁹⁾。患者由来の細胞では染色体の欠失や転座、DNA 変異の蓄積などが検出され、染色体維持における WRN の重要性を示している¹⁰⁾。

RECQ4 の N 末端領域は、様々なタンパク質と相互作用し、DNA 複製フォークが停止した際の複製再開や¹¹⁾、非相同末端修復、相同組換え修復等の経路に寄与することが報告されている¹²⁾。RECQ4 を原因遺伝子とした症例に関わる変異の多くはヘリカーゼドメインとユニークな C 末領域に同定されている¹³⁾。

RECQ5 の細胞における機能として、相同組換え修復

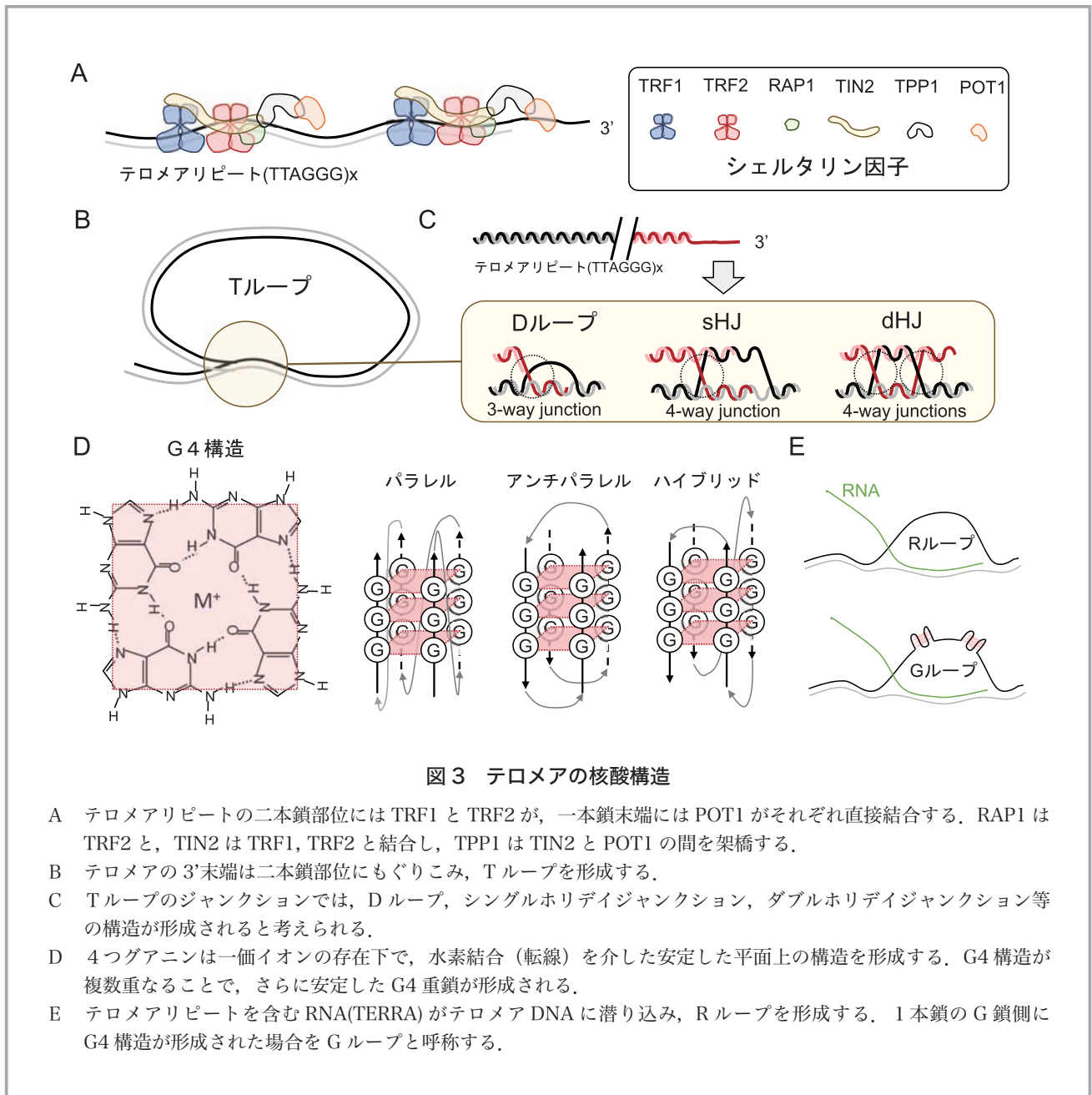


の抑制が報告されている¹⁴⁾。また RNA ポリメラーゼ II と相互作用し、ゲノム上で共局在することが分かっており、転写伸長を抑制的に制御することで、過剰な転写によるゲノム上のストレスを抑制しているとの仮説が提唱されている¹⁵⁾。

3. テロメアの構造と機能

真核生物の線状染色体の末端は、テロメアによって DSB として認識されないように保護されている¹⁶⁾。多くの生物において、テロメアの DNA 配列は単純なリピート配列で、ヒトでは 5'-TTAGGG-3' というリピートユニットが 2~10kb ほど連なる二本鎖部位と、50~

150bp 程度の一本鎖突出部位 (3'オーバーハング) から成る。テロメア二本鎖配列と結合する TRF1 と TRF2、一本鎖配列と結合する POT1、及び RAP1、TIN2、TPP1 という因子が相互作用し、シェルタリン複合体を形成する (図3A)。テロメア配列は末端複製問題により DNA 複製の度に短くなる。この問題を解決するため、多くの真核生物ではテロメラーゼという逆転写酵素により、テロメア末端を伸長している¹⁷⁾。ヒトの場合、ほとんどの体細胞ではテロメラーゼの発現は抑制されているが、幹細胞や生殖細胞系列ではテロメラーゼが発現し、世代を超えたテロメア長の維持を担っている。また、無限増殖能をもつがん細胞においても、テロメア長の維持は必須



であり、ほとんどのがん細胞はテロメラーゼによってこの問題を解決している。一方、10%程度のがん細胞では、テロメラーゼ非依存的な経路（ALT: Alternative Lengthening of Telomeres）が活性化されており、通常は抑制されている相同組換え経路を異常活性化することでテロメア長を維持すると考えられている¹⁸⁾。

以前は転写不活性と考えられていたテロメア領域であるが、現在ではテロメアリピート配列を含むノンコーディングな転写産物（TERRA）が検出されている¹⁹⁾。つまりテロメア領域では、DNA複製、転写、テロメラーゼによる末端伸長、DNA傷害修復等の核酸反応の際に、そのリピート配列の性質ゆえに生じる様々な立体構造に対処しなければならない。中でも特に重要な核酸構造としてT (Telomere) ループ、G4、及びR (RNA) ループが挙げられる。

3-a. Tループ構造

テロメア末端3'オーバーハングは、二本鎖部位に潜り込み、ループ構造を形成することができる（**図3B**）。その形成・維持には、TRF2が必要である一方、TRF1やPOT1の機能は必要ない^{20, 21)}。TRF2の阻害時にはTループ構造の解消によってテロメアがDSBとして認識され、テロメア保護異常のマーカーであるTIF (Telomere-dysfunction-Induced Foci) を形成する²²⁾。3'末端が潜り込んだ部分の構造の詳細はまだ諸説あるが、TRF2のN末塩基性ドメインが、Dループで生じる3-Way Junctionや、ホリデイジャンクションで生じる4-Way Junctionに対して優先的に結合することが知られており、これらの構造を保護すると考えられている²³⁾（**図3C**）。Dループは相同組換え反応の中間体であり、そのまま反応が進行すると鎖交換反応（クロスオーバー）によるTループの切断に至ってしまうため、テロメア領域における相同組換え反応は抑制されている必要がある²⁴⁾。一方テロメア配列を含むプラスミドを用いたインビトロ解析では、TERRAの転写がTループ形成を促進することが報告されており²⁵⁾、細胞内でのTループ形成におけるTERRAの機能については今後の解析が待たれる。

3-b. G4 構造

核酸が取りうる高次構造の一種であり、1価イオンが存在する生理条件下においてグアニンに富む核酸配列が

4本並ぶことで形成される4重鎖構造である²⁶⁾（**図3D**）。G4構造を形成しうるモチーフ配列は(GGGN₁₋₇)₄であり²⁷⁾、4本の配列の方向性の組み合わせから複数のバリエーションが生じる（**図3D**）。テロメアリピートは完璧なG4モチーフ配列であり、G4構造の形成確率が特に高い領域であると考えられる。テロメラーゼによる末端伸長反応の際に、G4構造がテロメラーゼと物理的に相互作用することで伸長反応の効率が増強されることが示唆されている²⁸⁾。また転写反応の際に、Gリッチ鎖側のDNAや、転写産物であるテロメアRNA(TERRA)、さらにはGリッチDNAとTERRAのDNA-RNA間においてもG4構造が生じることが報告されている²⁹⁻³¹⁾。G4構造はDNA複製フォークの障害である一方、Tループ構造の安定化に寄与することが示唆されており²⁵⁾、その形成と解消のタイミングは制御されていると考えられる。

3-c. Rループ構造

Rループとは、DNA二本鎖が開裂した領域にRNAが潜り込み、核酸の3重鎖が生じた構造であり（**図4E**）、出芽酵母、ヒト正常細胞やがん細胞で検出されている³²⁾。相同組換えの効率を上昇させると報告されており、RループのRNAを分解できるRNaseHIを過剰発現すると、TERRAの減少や相同組換え効率の低下が見られる³³⁾。二本鎖DNAを開裂状態にすることで、相補的なDNA末端の潜り込み反応が促進されると考えられる。Rループにおいて一本鎖となったGリッチ鎖側がG4構造をとった場合を特にGループと呼ぶ³⁴⁾（**図3E**）。Tループ形成においてTERRAが何らかの機能を果たすと仮定すると、Rループ構造やGループ構造もTループ形成と機能的な関連を持つことが示唆される。

4. テロメアにおけるRECQヘリカーゼの機能

以上のように、様々なDNA構造を基質とするRECQヘリカーゼは、DNA複製や転写、組換え修復等の反応において重要な機能を果たすが、このような構造が生じやすいテロメア領域では、その機能は特に重要となる（**図4**）。

4-a. テロメアにおけるRECQ1の機能

インビトロ解析では、非テロメア配列と比較してテロメア配列のDループの方がRECQ1の良い基質となる。

この活性は、TRF2 によって阻害されるが、TRF1 の影響は受けず、POT1 によって促進される³⁵⁾。RECQ1 と TRF2 は U2OS 細胞エクストラクトから共沈降することが報告されており、さらに RECQ1 のノックダウンにより、テロメア配列の喪失や、TIF の増加、テロメアの姉妹染色分体間交差 (T-SCE) が引き起こされる³⁵⁾。テロメアに局在した RECQ1 は、ラギング鎖複製に関わる FEN-1 をリクルートすることでテロメアの円滑な複製を補佐することが示唆されている³⁶⁾(図 4)。また ALT 細胞のテロメア維持には RECQ1 が必要であり、テロメアで亢進した組換え反応に関わっていることが示唆される³⁵⁾。

4-b. テロメアにおける BLM の機能

BLM の欠損マウスではテロメアの複製速度が遅延する³⁷⁾。同じ系において G4 構造安定化剤 PhenDC3 で処理した細胞では、テロメア配列特異的に、BLM 欠損によるテロメア複製障害が悪化した。この表現型は、BLM と WRN を両方欠失した細胞でさらに亢進された³⁷⁾。BLM をノックダウンした細胞においても、テロメア配列の消失や、M期後期においてテロメア配列を含む染色体架橋構造の形成等が認められる³⁸⁾。また、ヒ

ト・マウスの TRF1 は、BLM と結合する塩基性のモチーフを有しており、このモチーフを欠いた TRF1 を発現する細胞では、テロメアのラギング鎖複製に異常が生じる³⁹⁾。テロメア末端方向へと進行する複製フォークのラギング鎖では、鋳型の G リッチ鎖で G4 構造が形成される可能性があり、BLM による G4 の解消が円滑なテロメア複製に必要であることを示唆している (図 4)。また活性酸素によって実験的に生じた G ループ (G4+R ループ構造) の解消に必要であることが示唆されている⁴⁰⁾(図 4)。BLM は、正常な細胞では複製ストレスの解消を通じて相同組換えに依存した ALT 細胞の出現を抑制するが⁴¹⁾、ひとたび ALT 細胞が出現した際にはテロメア維持に必要であることを支持する結果が複数報告されている⁴²⁻⁴⁴⁾。

4-c. テロメアにおける WRN の機能

DNA フォーク基質に対する WRN のヘリカーゼ活性は TRF2 によって促進される⁴⁵⁾。一方、シングルホリダイジャンクション上では、TRF2 はテロメア配列への結合を介して WRN の活性を阻害する⁴⁶⁾(図 4)。WRN シンドローム患者が早期老化の症状を呈し、健常人と比較してテロメアが有意に短いことは特筆に値する^{47, 48)}。

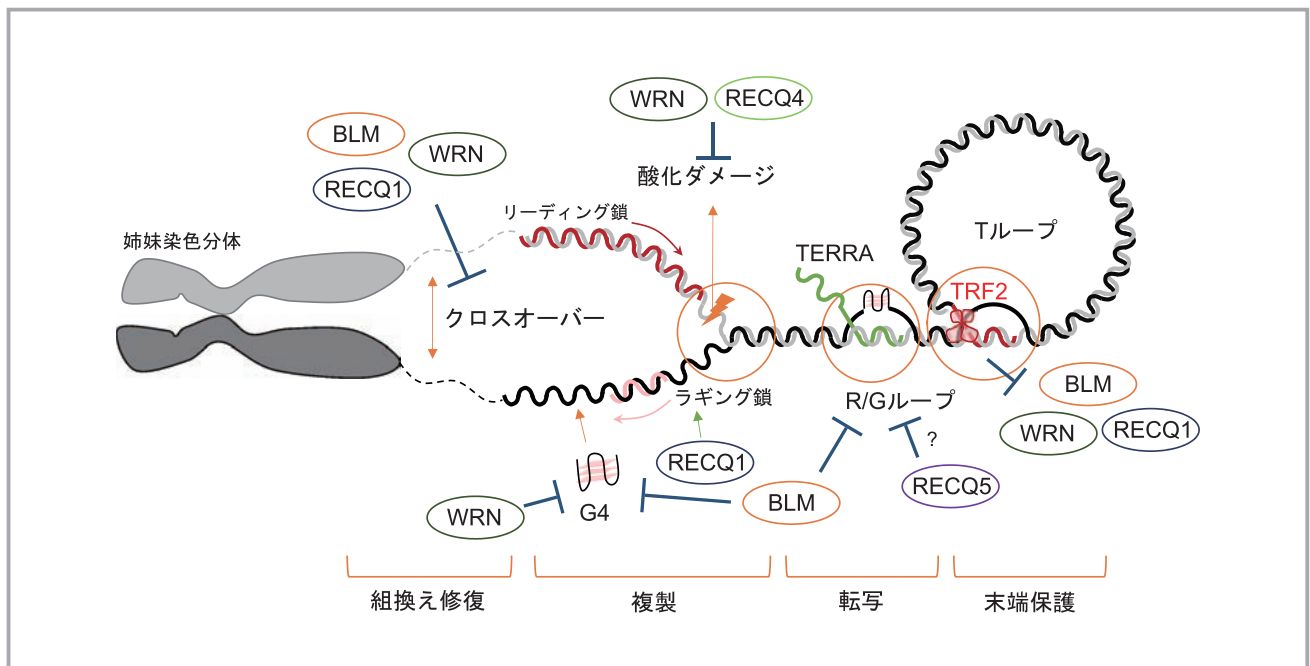


図4 RECQ ヘリカーゼが対処する様々なテロメア構造

テロメアリピートでは、Tループ、G4 重鎖、R/G ループ、酸化ダメージ等の様々な構造が形成され、これらは DNA 複製や転写・修復の際の障害となる。RECQ ヘリカーゼはこれらの構造を解消する役割を担う。一方、Tループのジャンクションは機能的に重要であるため、解消されないように TRF2 によって保護されている。

患者由来の細胞では、ラギング鎖特異的なテロメア喪失や、染色体不安定化が検出されるが、これらの表現型はテロメラーゼの過剰発現によって抑制されることから、テロメアの短小化による染色体末端保護機能の消失がこれらの表現型の原因と考えられる^{49, 50}。

蛍光毒性を持つタンパク質によってテロメアに酸化ダメージを与える細胞実験で、酸化ダメージを受けたテロメアに TRF1 依存的に WRN が局在し、WRN をノックダウンした細胞では、テロメア酸化ストレス後の生存率が低下することが示された⁵¹。テロメアはゲノム上で特に酸化ストレスを受けやすい領域であり⁵²、テロメアにおける酸化ダメージの修復が WRN の主要な機能の一つであることが示唆される (図4)。また ALT 細胞のテロメアに局在し、Dループの開裂を介してテロメア維持に機能している可能性が示唆されている⁵³。

4-d. テロメアにおける RECQ4 の機能

ロスムンド・トムスン症候群患者由来細胞では、テロメア構造異常が報告されている⁵⁴。RECQ4 のノックダウンは、がん細胞において TIF の増加、T-SCE の増加等を生じる。インビトロでは TRF2 と共沈し、過剰な ssDNA 存在下でテロメア配列の Dループを開裂するヘリカーゼ活性をもつ。興味深いことにこの活性は非テロメア配列では見られず、8 オキソグアニンをもつテロメア配列では促進される⁵⁴。また BLM, WRN と異なり、酸化損傷の一種であるチミングリコール化を受けたテロメア配列からなる Dループに対して、比較的高い活性を示すことが報告されており、特定の酸化ストレスを受けたテロメアの修復に関与する可能性が示唆されている⁵⁵ (図4)。

4-e. テロメアにおける RECQ5 の機能

BLM, 及び WRN と比較したインビトロ解析では、テロメア配列からなる Dループに対するヘリカーゼ活性や G4 構造に対する活性は比較的弱い^{56, 57}。多数のがん患者の血液サンプルを用いたテロメア長と一塩基多型 (SNP) の相関解析から、短いテロメア長と Recq5 の SNP との間に有意な相関があることが明らかになっているが^{58, 59}、どのようにテロメア長の制御に関わっているのかは良く分かっていない。転写伸長や相同組換えを抑制的に制御するという報告から鑑みるに^{14, 15},

TERRA の制御を介してテロメア長制御に寄与しているのかもしれない (図4)。

5. おわりに

RECQ ヘリカーゼは、テロメアの複製・転写・傷害修復等の反応において、核酸の高次構造を解消するという重要な機能を担っている (図4)。一方、相同組換えに依存した一部の ALT がん細胞においてはテロメアの維持に関与しており、ドラッグターゲットとしても注目されている。ここで取り上げた RECQ の機能は、細胞周期間期におけるものがほとんどであるが、我々は近年、RECQ ヘリカーゼ因子が有糸分裂期においてもテロメア保護構造の制御に関わることを指示する解析結果を得ている。今後の研究の進展によりテロメアにおける RECQ のさらに多様な機能が明らかになることが展望される。

参考文献

- 1) Lu, H. & Davis, A. J.: Human RecQ Helicases in DNA Double-Strand Break Repair. *Frontiers Cell Dev Biology* **9**, 640755 (2021).
- 2) Debnath, S. & Sharma, S.: RECQ1 Helicase in Genomic Stability and Cancer. *Genes* **11**, 622 (2020).
- 3) Li, X. L. *et al.*: Identification of RECQ1-regulated transcriptome uncovers a role of RECQ1 in regulation of cancer cell migration and invasion. *Cell Cycle* **13**, 2431-2445 (2014).
- 4) Popuri, V. *et al.*: The Human RecQ Helicases, BLM and RECQ1, Display Distinct DNA Substrate Specificities. *J Biol Chem* **283**, 17766-17776 (2008).
- 5) Bizard, A. H. & Hickson, I. D.: The Dissolution of Double Holliday Junctions. *Csh Perspect Biol* **6**, a016477 (2014).
- 6) Chan, K. L. *et al.*: BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *The EMBO Journal* **26**, 3397-3409 (2007).
- 7) Chaganti, R. S. K. *et al.*: A Manyfold Increase in Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syn-

- drome Lymphocytes. *Proc National Acad Sci* **71**, 4508-4512 (1974).
- 8) Shamanna, R. A. *et al.*: Recent Advances in Understanding Werner Syndrome. *FI000research* **6**, 1779 (2017).
 - 9) Lauper, J. M. *et al.*: Spectrum and Risk of Neoplasia in Werner Syndrome: A Systematic Review. *Plos One* **8**, e59709 (2013).
 - 10) Friedrich, K. *et al.*: WRN mutations in Werner syndrome patients: genomic rearrangements, unusual intronic mutations and ethnic-specific alterations. *Hum Genet* **128**, 103-111 (2010).
 - 11) Xu, X. *et al.*: MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication. *The EMBO Journal* **28**, 3005-3014 (2009).
 - 12) Lu, H. *et al.*: Cell cycle-dependent phosphorylation regulates RECQL4 pathway choice and ubiquitination in DNA double-strand break repair. *Nat Commun* **8**, 2039 (2017).
 - 13) Larizza, L. *et al.*: Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 2 (2010).
 - 14) Andrs, M. *et al.*: RECQ5: A Mysterious Helicase at the Interface of DNA Replication and Transcription. *Genes* **11**, 232 (2020).
 - 15) Saponaro, M. *et al.*: RECQL5 Controls Transcript Elongation and Suppresses Genome Instability Associated with Transcription Stress. *Cell* **157**, 1037-1049 (2014).
 - 16) Maciejowski, J. & Lange, T. de: Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 175-186 (2017).
 - 17) Wu, R. A. *et al.*: Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **86**, 439-460 (2017).
 - 18) Bryan, T. M. *et al.*: Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine* **3**, 1271-1274 (1997).
 - 19) Lingner, J.: TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO journal* **28**, 2503-2510 (2009).
 - 20) Doksan, Y. *et al.*: Super-Resolution Fluorescence Imaging of Telomeres Reveals TRF2-Dependent T-loop Formation. *Cell* **155**, 345-356 (2013).
 - 21) Ly, D. V. *et al.*: Telomere Loop Dynamics in Chromosome End Protection. *Molecular Cell* **71**, 510-525.e6 (2018).
 - 22) Takai, H. *et al.*: DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**, 1549-1556 (2003).
 - 23) Schmutz, I. *et al.*: TRF2 binds branched DNA to safeguard telomere integrity. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 734-742 (2017).
 - 24) Sfeir, A. *et al.*: Loss of Rap1 Induces Telomere Recombination in the Absence of NHEJ or a DNA Damage Signal. *Science* **327**, 1657-1661 (2010).
 - 25) Kar, A. *et al.*: Transcription of telomeric DNA leads to high levels of homologous recombination and t-loops. *Nucleic Acids Res* **44**, 9369-9380 (2016).
 - 26) Sen, D. & Gilbert, W.: A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* **344**, 410-414 (1990).
 - 27) Huppert, J. L. & Balasubramanian, S.: Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* **33**, 2908-2916 (2005).
 - 28) Jansson, L. I. *et al.*: Telomere DNA G-quadruplex folding within actively extending human telomerase. *Proc National Acad Sci* **116**, 201814777 (2019).
 - 29) Tan, J. & Lan, L.: The DNA secondary structures at telomeres and genome instability. *Cell Biosci* **10**, 47 (2020).
 - 30) Collie, G. W. *et al.*: Electrospray Mass Spectrometry of Telomeric RNA (TERRA) Reveals the Formation of Stable Multimeric G-Quadruplex Structures. *J Am Chem Soc* **132**, 9328-9334 (2010).
 - 31) Bryan, T. M.: G-Quadruplexes at Telomeres:

- Friend or Foe? *Molecules* **25**, 3686 (2020).
- 32) Rippe, K. & Luke, B.: TERRA and the state of the telomere. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 853-858 (2015).
- 33) Arora, R. *et al.*: RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nat Commun* **5**, 1-11 (2014).
- 34) Duquette, M. L. *et al.*: Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Gene Dev* **18**, 1618-1629 (2004).
- 35) Popuri, V. *et al.*: Human RECQL1 participates in telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* **42**, 5671-5688 (2014).
- 36) Sami, F. *et al.*: RECQ1 interacts with FEN-1 and promotes binding of FEN-1 to telomeric chromatin. *Biochem J* **468**, 227-244 (2015).
- 37) Drosopoulos, W. C. *et al.*: BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. *J Cell Biol* **210**, 191-208 (2015).
- 38) Barefield, C. & Karlseder, J.: The BLM helicase contributes to telomere maintenance through processing of late-replicating intermediate structures. *Nucleic Acid Res* (2012).
- 39) Zimmermann, M. *et al.*: TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev* **28**, 2477-2491 (2014).
- 40) Tan, J. *et al.*: Resolution of ROS-induced G-quadruplexes and R-loops at transcriptionally active sites is dependent on BLM helicase. *Febs Lett* **594**, 1359-1367 (2020).
- 41) Lu, R. *et al.*: The FANCM-BLM-TOP3A-RMI complex suppresses alternative lengthening of telomeres (ALT). *Nat Commun* **10**, 2252 (2019).
- 42) Stavropoulos, D. J. *et al.*: The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum Mol Genet* **11**, 3135-3144 (2002).
- 43) Sobinoff, A. P. *et al.*: BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres. *The EMBO Journal* **36**, 2907-2919 (2017).
- 44) Loe, T. K. *et al.*: Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev* **34**, 650-662 (2020).
- 45) Opresko, P. L. *et al.*: Telomere-binding Protein TRF2 Binds to and Stimulates the Werner and Bloom Syndrome Helicases. *J Biol Chem* **277**, 41110-41119 (2002).
- 46) Nora, G. J. *et al.*: Telomeric protein TRF2 protects Holliday junctions with telomeric arms from displacement by the Werner syndrome helicase. *Nucleic Acid Res* **38**, 3984-3998 (2010).
- 47) Ishikawa, N. *et al.*: Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging* **3**, 417-429 (2011).
- 48) Tokita, M. *et al.*: Werner syndrome through the lens of tissue and tumour genomics. *Sci Rep* **6**, 32038 (2016).
- 49) Crabbe, L. *et al.*: Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* **306**, 1951-1953 (2004).
- 50) Crabbe, L. *et al.*: Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc National Acad Sci* **104**, 2205-2210 (2007).
- 51) Sun, L. *et al.*: WRN is recruited to damaged telomeres via its RQC domain and tankyrase1-mediated poly-ADP-ribosylation of TRF1. *Nucleic Acid Res* **45**, 3844-3859 (2017).
- 52) Baquero, J. M. *et al.*: Small molecule inhibitor of OGG1 blocks oxidative DNA damage repair at telomeres and potentiates methotrexate anticancer effects. *Sci Rep* **11**, 3490 (2021).
- 53) Opresko, P. L. *et al.*: The Werner Syndrome

- Helicase and Exonuclease Cooperate to Resolve Telomeric D Loops in a Manner Regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **14**, 763-774 (2004).
- 54) Ghosh, A. K. *et al.*: RECQL4, the Protein Mutated in Rothmund-Thomson Syndrome, Functions in Telomere Maintenance. *J Biol Chem* **287**, 196-209 (2012).
- 55) Ferrarelli, L. K. *et al.*: The RECQL4 protein, deficient in Rothmund-Thomson syndrome is active on telomeric D-loops containing DNA metabolism blocking lesions. *Dna Repair* **12**, 518-528 (2013).
- 56) Ghosh, A. *et al.*: Telomeric D-loops Containing 8-Oxo-2'-deoxyguanosine Are Preferred Substrates for Werner and Bloom Syndrome Helicases and Are Bound by POT1. *J Biol Chem* **284**, 31074-31084 (2009).
- 57) Budhathoki, J. B. *et al.*: A Comparative Study of G-Quadruplex Unfolding and DNA Reeling Activities of Human RECQ5 Helicase. *Biophys J* **110**, 2585-2596 (2016).
- 58) Mirabello, L. *et al.*: The association of telomere length and genetic variation in telomere biology genes. *Hum Mutat* **31**, 1050-1058 (2010).
- 59) Pellatt, A. J. *et al.*: Genetic and lifestyle influence on telomere length and subsequent risk of colon cancer in a case control study. *Int J Mol Epidemiology Genetics* **3**, 184-94 (2012).

総 説

アミノ酸トランスポーター阻害薬によるがん治療 —研究の展開と解明が進むユニークな抗腫瘍効果の発現機序—

大 垣 隆 —*, **

1. はじめに

生体内には、20種類のタンパク質構成アミノ酸をはじめ様々なアミノ酸が存在する。生体膜を介したアミノ酸の輸送は、「アミノ酸トランスポーター」と呼ばれる膜輸送タンパク質が担っている。ヒトでは約60種類が同定されており、ATP非共役型の溶質キャリア (SLC; Solute carrier) ファミリーに属する。輸送基質アミノ

酸の種類、共役イオン (Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻など) の有無、臓器・組織・細胞・オルガネラレベルの発現・局在といった諸性質が異なる多彩なアミノ酸トランスポーターが、生体内のアミノ酸分布と動態を制御する分子基盤となっている。

その生理機能の重要性を反映して、アミノ酸トランスポーターの異常は、上皮輸送障害に起因するアミノ酸尿

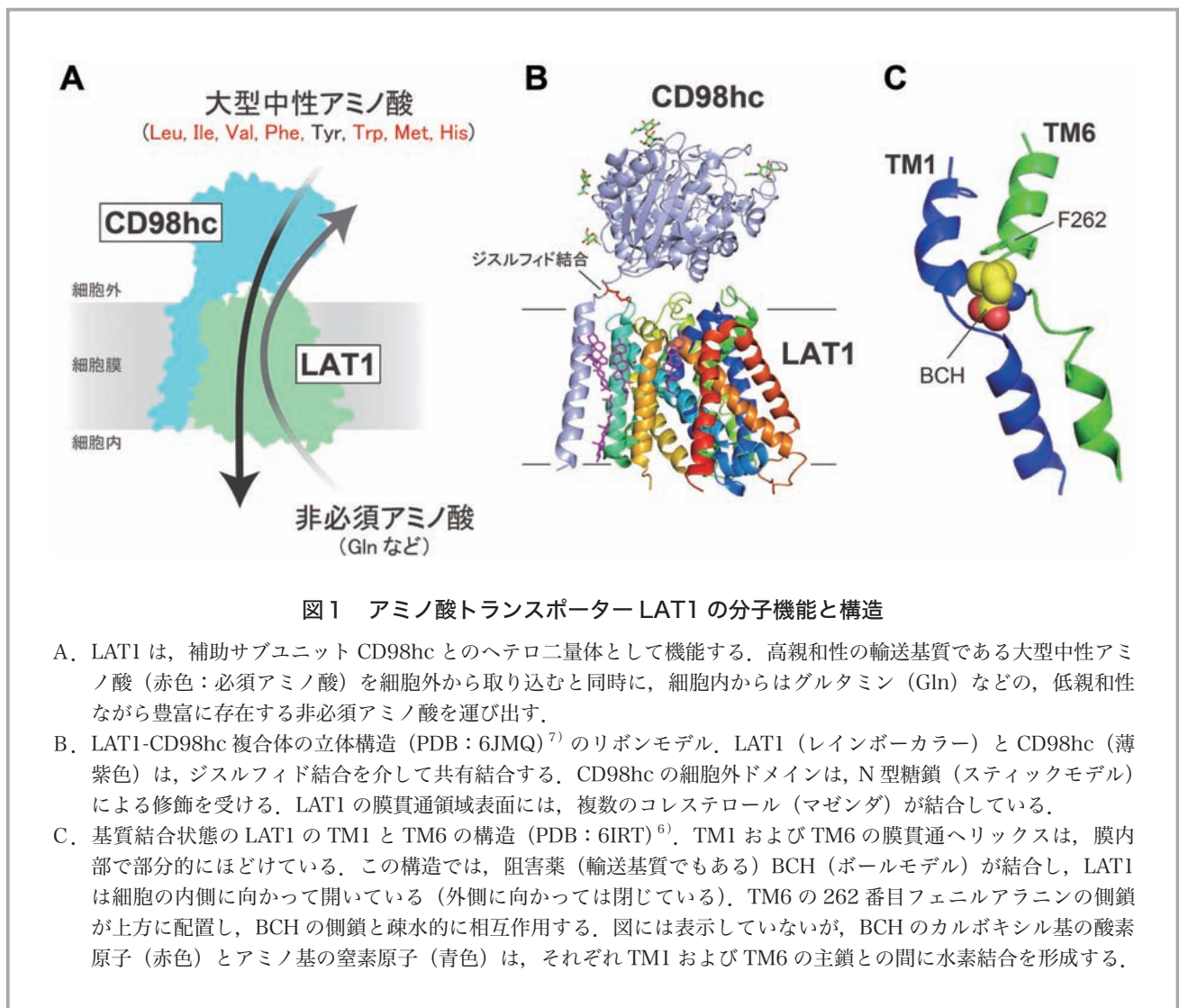


図1 アミノ酸トランスポーター LAT1 の分子機能と構造

- LAT1 は、補助サブユニット CD98hc とのヘテロ二量体として機能する。高親和性の輸送基質である大型中性アミノ酸 (赤色: 必須アミノ酸) を細胞外から取り込むと同時に、細胞内からはグルタミン (Gln) などの、低親和性ながら豊富に存在する非必須アミノ酸を運び出す。
- LAT1-CD98hc 複合体の立体構造 (PDB: 6JMQ)⁷⁾ のリボンモデル。LAT1 (レインボーカラー) と CD98hc (薄紫色) は、ジスルフィド結合を介して共有結合する。CD98hc の細胞外ドメインは、N 型糖鎖 (スティックモデル) による修飾を受ける。LAT1 の膜貫通領域表面には、複数のコレステロール (マゼンダ) が結合している。
- 基質結合状態の LAT1 の TM1 と TM6 の構造 (PDB: 6IRT)⁶⁾。TM1 および TM6 の膜貫通ヘリックスは、膜内部で部分的にほどけている。この構造では、阻害薬 (輸送基質でもある) BCH (ボールモデル) が結合し、LAT1 は細胞の内側に向かって開いている (外側に向かっては閉じている)。TM6 の 262 番目フェニルアラニンの側鎖が上方に配置し、BCH の側鎖と疎水的に相互作用する。図には表示していないが、BCH のカルボキシル基の酸素原子 (赤色) とアミノ基の窒素原子 (青色) は、それぞれ TM1 および TM6 の主鎖との間に水素結合を形成する。

症、神経変性疾患、代謝異常を伴う肥満や糖尿病、がんなどの疾患と深く関連する¹⁾。がん細胞では、アミノ酸や糖といった栄養の取込み活性が亢進し、その活発な増殖や成長を支えている。高い腫瘍選択性をもって幅広いがん種で高発現するアミノ酸トランスポーターとして、LAT1 (L-type amino acid transporter 1; SLC7A5)²⁾が知られている。LAT1 阻害薬は、がん細胞へのアミノ酸供給の遮断による優れた抗腫瘍効果を示し、新たな抗がん薬として臨床応用が期待されている³⁾。本稿は、LAT1 阻害薬を用いたがん治療研究を概説するとともに、*in vivo*における意外な抗腫瘍効果の発現機序に関する最近の知見を紹介する。

2. アミノ酸トランスポーター LAT1

LAT1 のアミノ酸輸送機能には、補助サブユニット CD98hc (CD98 heavy chain または 4F2 heavy chain; SLC3A2) が必須である。CD98hc とのヘテロ二量体形成によって、LAT1 の細胞膜への移行が可能になる。LAT1 は、大型中性アミノ酸 (ロイシン, イソロイシン, バリン, フェニルアラニン, チロシン, トリプトファン, メチオニン, ヒスチジン) を、高親和性の基質として細胞内に輸送する^{2,4)}。実際には LAT1 は、アミノ酸を 1 分子取り込むと同時に、細胞内から 1 分子のアミノ酸を運び出す交換輸送体である。しかし、細胞内の大型中性アミノ酸に対する LAT1 の親和性は低い⁵⁾。しかも細胞内には低親和性ながら LAT1 により輸送される中性の非必須アミノ酸 (がん細胞ではグルタミンなど) が豊富に存在しており、これらが細胞外へと排出される。したがって、LAT1 は大型中性アミノ酸の濃度勾配に逆らった取り込みに実質的に寄与する (図1A)。

近年、著者らも参画したグループを含め、複数の研究グループが、低温電子顕微鏡 (Cryo-EM) によって解かれた LAT1-CD98hc 複合体の立体構造を報告した^{6,7)} (図1B)。LAT1 は、12 回の膜貫通ヘリックス (TM1~12) を持つ。このうち TM1~5 と、TM6~10 が回転対称で配置した特徴的な構造「LeuT フォールド」⁸⁾をとる。TM1 と TM6 は、膜内部で部分的にほどけており、この部分が基質結合に重要な役割を果たす (図1C)。CD98hc は、大きな細胞外ドメインを有する 1 回膜貫通型の糖タンパク質である。LAT1 と CD98hc は、細胞外

のシステイン残基間でジスルフィド結合を形成する。膜内部では CD98hc の膜貫通ヘリックスと LAT1 の TM4 との間に、複数の疎水性残基を介した相互作用が見られる。また、CD98hc の細胞外ドメインと、それに向き合う LAT1 の細胞外表面の間には親水的相互作用も認められる。これらの多点的な相互作用が、複合体の構造安定性に寄与する。

3. がんにおける LAT1 の重要性

正常臓器・組織における LAT1 の発現は、血液脳関門、胎盤、精巣、膵臓、活性化 T 細胞などに見られるが、比較的限定的である^{2,4,9,10)}。一方で、大腸がん、前立腺がん、胃がん、肝臓がん、膵がん、肺がん、乳がんといった主要がん種をはじめ、殆どあらゆる臓器・組織由来の腫瘍で LAT1 の発現亢進が報告されている^{11,12)}。さらに、様々ながん種において、LAT1 の高発現が、細胞増殖能、ステージ、予後不良などと相関を示す^{11,12)}。LAT1 はいわば「がん細胞型必須アミノ酸トランスポーター」である。

腫瘍特異的な LAT1 の発現亢進に関する報告は、免疫組織染色を主な手法としたタンパク質レベルでの知見である。がん細胞において、これほどまでに広範に LAT1 が高発現する分子機構には未だに不明な点が多い。転写レベルでは、がん遺伝子 c-Myc^{13,14)} や低酸素誘導因子 HIFs (Hypoxia-inducible factors)^{15,16)} による直接的制御が報告されている。ER 陽性乳がんでは足場タンパク質 LLGL2 が、細胞内局在の制御を介して細胞膜上の LAT1 を増加させることも報告されており¹⁷⁾、転写以外の制御機構についても更なる解明が待たれる。

LAT1 の選択的輸送基質の多くは、生体内で合成できない必須アミノ酸である。これらは、タンパク質合成の材料として利用されることはもちろん、ロイシン、バリン、イソロイシンといった分岐鎖アミノ酸 (BCAA; Branched-chain amino acids) は多様な役割を担う。BCAA は細胞質およびミトコンドリアの分岐鎖アミノ酸トランスフェラーゼ (BCAT1 および 2; Branched-chain aminotransferase 1 or 2) が触媒する脱アミノ反応により、分岐鎖 α -ケト酸に代謝される。アミノ基は共基質の α -ケトグルタル酸に受け渡されてグルタミン酸を生じ、さらにグルタミンに変換されて核酸合成(お

よび非必須アミノ酸合成)の窒素源となる。また分岐鎖 α -ケト酸の更なる代謝産物であるアセチル Co-A やスクシニル Co-A は、TCA サイクルに供給されて ATP 産生や脂質合成にも利用され得る¹⁸⁾。

さらに、ロイシンやグルタミン (BCAA の代謝によっても生じる) といったアミノ酸は、タンパク質・核酸・脂質合成の制御において中心的な役割を果たすセリンシレオニンキナーゼ複合体 mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) の活性化に必須のシグナル分子でもある¹⁹⁾。BCAA 代謝の意義は、がんの種類やドライバー変異などによっても異なるため、一般化した記述が難しい面もある。しかし、いずれにしても LAT1 は、がん細胞の代謝を支える栄養としてのアミノ酸の供給口であると同時に、多様な生体反応の制御を担うアミノ酸シグナリングの起点としての役割を併せ持っている (図2)。

4. LAT1 阻害薬によるがん治療研究の展開

がん病態との深い関わりから、LAT1 は治療と診断の分子標的として期待されてきた。LAT1 によってがん細胞へと運搬される治療薬として、抗がん薬 (DNA アルキル化薬) のメルファランがある⁴⁾。これは、フェニルアラニンにナイトロジェンマスタードが結合したもので、LAT1 によってがん細胞に取り込まれる。同様に、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT; Boron neutron capture therapy) やアルファ線内用療法といった、次世代放射線療法においても、LAT1 の輸送基質が治療薬として研究されている³⁾。LAT1 を薬物送達に利用するというアイデアは、陽電子放射断層撮影 (PET: Positron emission tomography) や単一光子放射断層撮影 (SPECT;

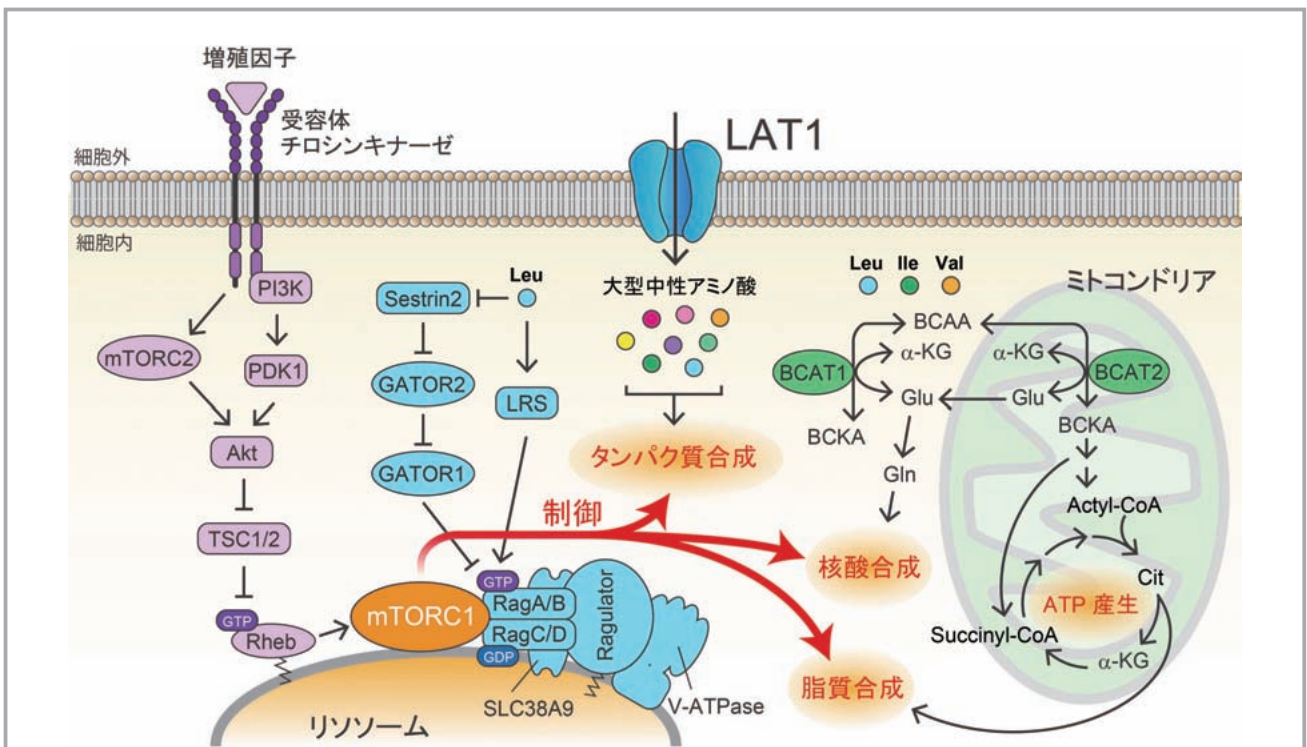


図2 がん細胞において LAT1 が担うアミノ酸輸送の意義

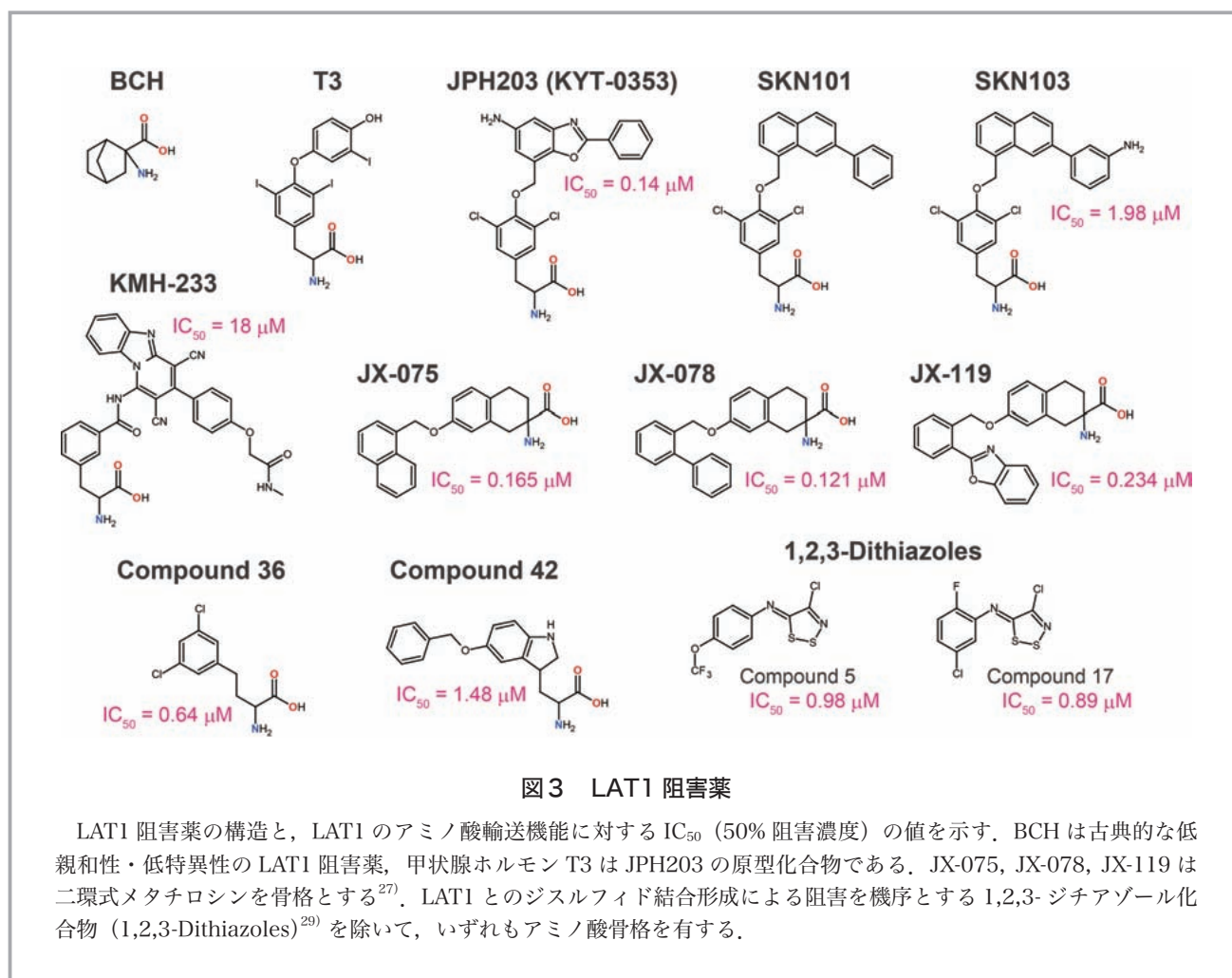
LAT1 によりがん細胞に取り込まれたアミノ酸は、タンパク質合成の材料となる (図中央)。また分岐鎖アミノ酸 (BCAA) のアミノ基は、分岐鎖アミノ酸トランスフェラーゼ (BCAT1 および 2) により、 α -ケトグルタル酸 (α -KG) に受け渡されてグルタミン酸を生じ、グルタミンを経て核酸合成の窒素源となる。分岐鎖 α -ケト酸 (BCKA) の更なる代謝産物であるアセチル Co-A やスクシニル Co-A は、TCA サイクルに入り ATP 産生や脂質合成に利用される (図右側)。さらに、ロイシンやグルタミン (BCAA の代謝によっても生じる) は、タンパク質合成・核酸合成・脂質合成といった多様な生体内反応の制御を司る mTORC1 の活性化に必須のシグナル分子でもある (図左側)。図はロイシンによる mTORC1 活性化の経路を示す。一般的な増殖因子のシグナル経路は、受容体チロシンキナーゼ-PI3K-Akt-TSC1/2 を介して mTORC1 に入力する。しかし、アミノ酸は mTORC1 をリソソーム膜へとリクルートし、増殖因子とは異なる仕組みで mTORC1 の活性化に寄与する。

Single photon emission computed tomography) の、がん診断プローブとして開発されている診断薬（陽電子放出核種や単一光子放出核種で標識した LAT1 の輸送基質）にも共通する。本稿では、これらとは異なり LAT1 阻害薬によってアミノ酸供給を遮断するというアプローチによるがん治療研究について解説する。

古典的な LAT1 阻害薬の環状アミノ酸 BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid) は、種々の前臨床試験で抗腫瘍効果を示す。しかし、BCH は LAT1 に対する親和性と特異性が低く、しかも実際には LAT1 の輸送基質（アミノ酸と競合して細胞内に取り込まれることで、相対的にアミノ酸の取り込みを抑制する）である。現在では、LAT1 に高親和性で結合し、かつ実質的に殆ど輸送されない化合物が開発されている（図3）。大きな疎水性側鎖を持つアミノ酸でもある甲状腺ホルモン T3 (Triiodothyronine) は、LAT1 に高親和性で結合して阻害効果を示すが、殆ど輸送されない²⁰。しかも、LAT1 の近縁のトランスポーターで正常組

織での発現が高い LAT2 (SLC7A8) には作用しない。LAT1 との相互作用には、かさ高い疎水性側鎖が重要であり、このアイデアを基に T3 を構造展開して得られた高親和性の LAT1 選択的阻害薬 JPH203 (KYT-0353)²¹ は、がん細胞のアミノ酸輸送を阻害しその増殖を抑制する。また、がん細胞株の免疫不全マウス皮下移植モデルなど、複数の腫瘍モデルでの抗腫瘍効果が実証されている²¹⁻²⁵。進行性固形がん患者を対象にした第 I 相臨床試験 (UMIN000016546) では、JPH203 が十分な認容性を示し、胆道がん患者の一部で奏功および病勢制御を認めた²⁶。現在、進行性胆道がん患者に対する第 II 相臨床試験が実施中である (UMIN000034080)。

JPH203 以外にも、様々な LAT1 阻害薬が開発されているが²⁷⁻³¹、*in vivo* での抗腫瘍効果はまだ示されていない。幾つかの化合物については LAT1 に対する選択性も報告されておらず、その薬理作用の詳細な評価が待たれる。最近、二環式メタチロシンを骨格とする LAT1 阻害薬 (JX-075, JX-078, JX-119) が結合した状態の



LAT1-CD98hc 複合体の立体構造が報告された²⁷⁾。両者の結合に関する分子構造情報を基に、化合物の構造改変も一層加速することが予想される。

5. LAT1 阻害薬が *in vivo* で示す血管新生抑制作用

従来の研究では、LAT1 阻害薬の抗腫瘍効果は、がん細胞に対する直接的な増殖抑制作用によるものと解釈されてきた。しかし著者らは近年、*in vivo* で LAT1 阻害薬の抗腫瘍効果の一端を担うと考えられる血管新生抑制作用を報告した²³⁾。腫瘍組織は、血管新生促進因子を分泌し、周辺組織から新たな血管の形成を誘導する。新生血管は、酸素・栄養を供給して腫瘍組織の成長に寄与するとともに、老廃物の排泄経路や、転移経路としても機能する³²⁾。この病的な血管新生を標的とするがんの治療法が血管新生阻害療法であり、既に抗 VEGF-A 抗体などが臨床で実用化されている。

きっかけとなった観察は、膵臓がん組織において、がん細胞のみならず腫瘍間質の血管内皮細胞にも LAT1 の高発現を見出したことである (図4A)。一方で、正常な膵臓組織の血管内皮細胞には LAT1 の発現は見られなかった。同様の所見は、免疫不全マウスの皮下移植腫瘍モデル (ヒト膵臓がん MIA PaCa-2 細胞, ヒト肺がん H520 細胞) や、マウスメラノーマ B16-F10 細胞の同種同所移植腫瘍モデルでも確認される。腫瘍血管内皮細胞における LAT1 の発現亢進は、ある程度の一般性を持った病態特異的な現象であると想定される。

血管内皮細胞の LAT1 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを用いて作製したマウスメラノーマ B16-F10 細胞の皮下移植腫瘍モデルでは、野生型マウスに比べて腫瘍組織内の血管密度が低下し、腫瘍成長が有意に抑えられる (図4B)。すなわち、腫瘍血管内皮細胞の LAT1 は、血管形成を介して腫瘍の増大に寄与し

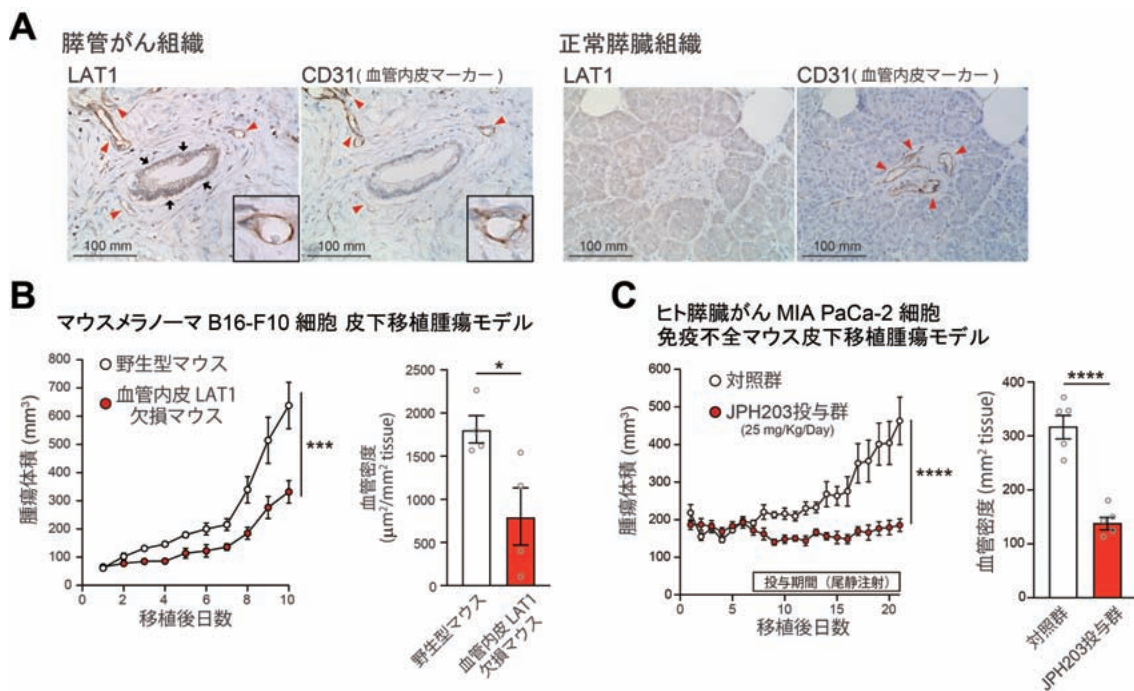


図4 腫瘍血管内皮細胞における LAT1 の発現と LAT1 の阻害による血管新生抑制効果

- ヒト膵臓がん組織では、がん細胞 (黒矢印) に加えて、腫瘍間質の血管内皮細胞 (赤矢頭) にも LAT1 が発現する。正常な膵臓組織の血管内皮細胞には、LAT1 の発現は見られない。
- 血管内皮細胞の LAT1 遺伝子が欠損したコンディショナルノックアウトマウス (赤) では、野生型マウス (白) に比べてマウスメラノーマ B16-F10 細胞の皮下移植腫瘍の成長が抑制され、腫瘍組織内の血管密度も有意に低下する。
- LAT1 阻害薬 JPH203 投与群 (赤) では、対照の非投与群 (白) に比べて免疫不全マウス皮下移植腫瘍 (ヒト膵臓がん MIA PaCa-2 細胞) の成長が抑制され、腫瘍組織内の血管密度も有意に低下する。JPH203 投与量: 25 mg/Kg/Day。

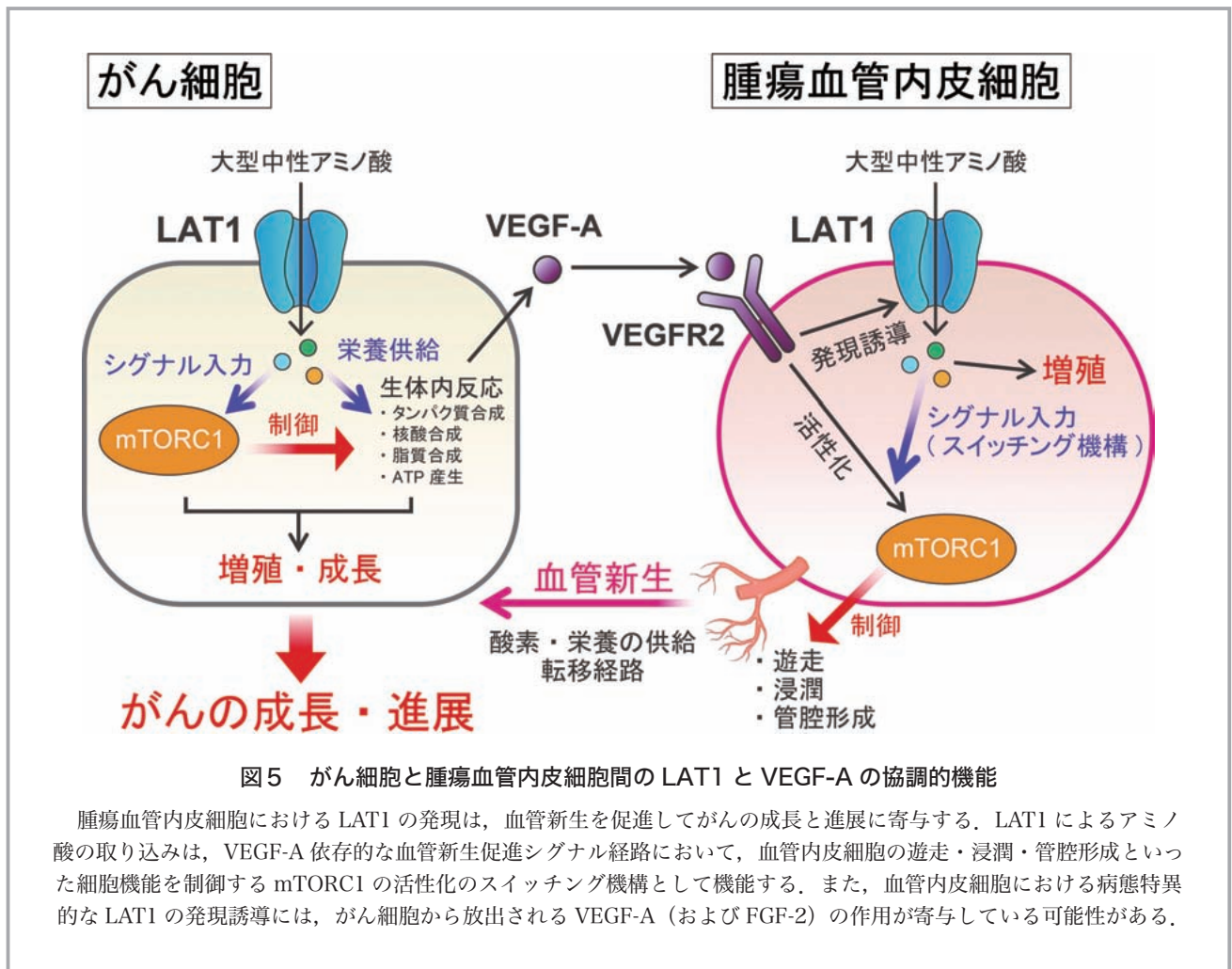
ていることがわかる。また、ヒト膀胱がん MIA PaCa-2 細胞の免疫不全マウス皮下移植腫瘍モデルでは、LAT1 阻害薬 JPH203 の投与によってやはり腫瘍成長が抑制されると同時に、内部の血管密度が有意に低下する (図 4C)。以上より、LAT1 阻害薬の *in vivo* での抗腫瘍効果には、がん細胞の LAT1 を標的とした増殖抑制効果に加えて、腫瘍血管内皮細胞の LAT1 を標的とした血管新生抑制作用も寄与していると考えられる。

6. がん細胞 - 血管内皮細胞間における LAT1 と VEGF-A の協調的機能

腫瘍血管内皮細胞で LAT1 の発現が亢進する仕組みはまだ十分に明らかになっていないが、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) を用いた解析では、VEGF-A (Vascular endothelial growth factor - A) や FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) などの血管新生促進因子によって、転写レベルで LAT1 の発現が誘導される。したがって、がん細胞から腫瘍組織内に放出される血管新生促進因子の作用が、血管内皮細胞の LAT1 発現亢進の一因となっている可能性がある。

がん細胞株に対する報告と同様に、JPH203 は HUVEC の増殖を抑制する。さらに LAT1 の阻害は、VEGF-A 刺激による遊走・浸潤・管腔形成といった血管内皮細胞の血管新生関連機能をも抑制する。細胞内リン酸化シグナルの解析では、VEGF-A の受容体チロシンキナーゼ VEGFR2 の下流に位置する mTORC1 の活性化が、JPH203 で顕著に阻害されることが示されている。VEGF-A の刺激は、一般的な増殖因子のシグナル経路 (受容体チロシンキナーゼ -PI3K-Akt-TSC1/2) を介して mTORC1 へと伝わる (図 2 参照)。しかし、LAT1 の阻害はこの経路の活性には影響しない。アミノ酸 (ロイシンやグルタミンなど) は、リソソーム膜への mTORC1 のリクルートを制御し、増殖因子とは異なる仕組みで mTORC1 の活性化に寄与することが多くの研究で明らかになっている¹⁹⁾。VEGF-A 刺激下の腫瘍血管内皮細胞

から腫瘍組織内に放出される血管新生促進因子の作用が、血管内皮細胞の LAT1 発現亢進の一因となっている可能性がある。



胞では、LAT1がこのアミノ酸シグナルの入力を担い、mTORC1活性化のスイッチング機構として血管新生に寄与するものと考えられる。以上より、がん細胞と腫瘍血管内皮細胞の間には、血管新生への寄与を通じてがんの成長と進展を促進する、LAT1とVEGF-Aの協調的な機能の存在が想定される(図5)。

7. おわりに

LAT1阻害薬によるがん治療研究は、近年著しい進展を見せている。最近の研究では、*in vivo*での抗腫瘍効果の新たな発現機序として血管新生抑制作用が示された²³⁾。がん細胞のLAT1を標的とした増殖抑制効果に加えて、腫瘍血管内皮細胞のLAT1を標的とした血管新生抑制作用を併せて持つLAT1阻害薬は、ユニークな機序の抗がん薬として期待される。このような知見は、効果的な治療法の提案にも重要な示唆を与える。たとえば、LAT1阻害薬と既存の血管新生阻害薬(抗VEGF-A抗体や抗VEGFR2抗体など)は、併用療法の組み合わせとして興味深い。腫瘍組織の成長は、がん細胞と様々な非がん細胞(腫瘍関連マクロファージ、がん関連線維芽細胞、骨髄由来免疫抑制細胞、腫瘍血管内皮細胞、その他の免疫細胞など)の間の相互作用で支えられている³³⁾。腫瘍血管内皮細胞と同様にLAT1の発現が病態特異的に亢進していれば、これらの間質細胞もLAT1阻害薬の新たな作用標的となり得る。またそうでなかったとしても、LAT1阻害薬が腫瘍血管新生の抑制を介して、多様な腫瘍構成細胞の挙動にどのような影響をあたえるのかを検討する意義は大きい。LAT1阻害薬が、腫瘍-間質相互作用にどのように介入するのかを明らかにすることは、その抗腫瘍効果の全容理解と実用化に向けてますます重要になると思われる。

参考文献

- 1) Kandasamy, P. *et al.*: Amino acid transporters revisited: New views in health and disease, *Trends. Biochem. Sci.*, **43**, 752 (2018).
- 2) Kanai, Y. *et al.*: Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98), *J. Biol. Chem.*, **273**, 23629 (1998).
- 3) Kanai, Y.: Amino acid transporter LAT1 (SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics, *Pharmacol. Ther.*, 107964 (2021). [Online ahead of print]
- 4) Yanagida, O. *et al.*: Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Characterization of function and expression in tumor cell lines, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1514**, 291 (2001).
- 5) Meier, C. *et al.*: Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates, *EMBO J.*, **21**, 580 (2002).
- 6) Yan, R. *et al.*: Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex, *Nature*, **568**, 127 (2019).
- 7) Lee, Y. *et al.*: Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 510 (2019).
- 8) Yamashita, A. *et al.*: Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters, *Nature*, **437**, 215 (2005).
- 9) Kageyama, T. *et al.*: The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier, *Brain. Res.*, **879**, 115 (2000).
- 10) Sinclair, L. V. *et al.*: Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation, *Nat. Immunol.*, **14**, 500 (2013).
- 11) Zhang, J. *et al.*: Review of the correlation of LAT1 with diseases: Mechanism and treatment, *Front. Chem.*, **8**, 1 (2020).
- 12) Lu, J.J. *et al.*: Prognostic value of LAT-1 status in solid cancer: A systematic review and meta-analysis, *PLoS One*, **15**, 1 (2020).
- 13) Hayashi, K. *et al.*: c-Myc is crucial for the expression of LAT1 in MIA Paca-2 human pancreatic cancer cells, *Oncol. Rep.*, **28**, 862 (2012).
- 14) Yue, M. *et al.*: Oncogenic MYC activates a

- feedforward regulatory loop promoting essential amino acid metabolism and tumorigenesis, *Cell Rep.*, **21**, 3819 (2017).
- 15) Elorza, A. *et al.*: HIF-2 α acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5, *Mol. Cell*, **48**, 681 (2012).
 - 16) Zhang, B. *et al.*: Regulation of branched-chain amino acid metabolism by hypoxia-inducible factor in glioblastoma, *Cell Mol. Life Sci.*, **78**, 195 (2021).
 - 17) Saito, Y. *et al.*: LLGL2 rescues nutrient stress by promoting leucine uptake in ER⁺ breast cancer, *Nature*, **569**, 275 (2019).
 - 18) Sivanand, S. & Heiden, M. G. V.: Emerging roles for branched chain amino acid metabolism in cancer, *Cancer Cell*, **37**, 147 (2021).
 - 19) Liu, G. Y. & Sabatini, D. M.: mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183 (2020).
 - 20) Uchino, H. *et al.*: Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition, *Mol. Pharmacol.*, **61**, 729 (2002).
 - 21) Oda, K. *et al.*: L-Type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth, *Cancer Sci.*, **101**, 173 (2010).
 - 22) Yothaisong, S. *et al.*: Inhibition of L-type amino acid transporter 1 activity as a new therapeutic target for cholangiocarcinoma treatment, *Tumor Biol.*, **39**, 1010428317694545 (2017).
 - 23) Quan, L. *et al.*: Amino acid transporter LAT1 in tumor-associated vascular endothelium promotes angiogenesis by regulating cell proliferation and VEGF-A-dependent mTORC1 activation, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **39**, 266 (2020).
 - 24) Enomoto, K. *et al.*: A novel therapeutic approach for anaplastic thyroid cancer through inhibition of LAT1, *Sci. Rep.*, **9**, 14616 (2019).
 - 25) Rosilio, C. *et al.*: L-type amino-acid transporter 1 (LAT1): A therapeutic target supporting growth and survival of T-cell lymphoblastic lymphoma/T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, **29**, 1253 (2015).
 - 26) Okano, N. *et al.*: First-in-human phase I study of JPH203, an L-type amino acid transporter 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors, *Invest. New Drugs*, **38**, 1495 (2020).
 - 27) Yan, R. *et al.*: Mechanism of substrate transport and inhibition of the human LAT1-4F2hc amino acid transporter, *Cell Discov.*, **7**, 0 (2021).
 - 28) Kongpracha, P. *et al.*: Structure-activity relationship of a novel series of inhibitors for cancer type transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1), *J. Pharmacol. Sci.*, **133**, 96 (2017).
 - 29) Napolitano, L. *et al.*: Potent inhibitors of human LAT1 (SLC7A5) transporter based on dithiazole and dithiazine compounds for development of anticancer drugs, *Biochem. Pharmacol.*, **143**, 39 (2017).
 - 30) Huttunen, K. M. *et al.*: A selective and slowly reversible inhibitor of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) potentiates antiproliferative drug efficacy in cancer cells, *J. Med. Chem.*, **59**, 5740 (2016).
 - 31) Singh, N. *et al.*: Discovery of potent inhibitors for the large neutral amino acid transporter 1 (LAT1) by structure-based methods, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 27 (2018).
 - 32) Hanahan, D. & Weinberg, R. A.: Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, **144**, 646 (2011).
 - 33) Bejarano, L. *et al.*: Therapeutic targeting of the tumor microenvironment, *Cancer Discov.*, **11**, 933 (2021).

酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究

酸化還元酵素融合低分子抗体を用い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 *Aerococcus viridans* 由来の乳酸酸化酵素 (AvLOx) の融合を目指した。AvLOx はホモ四量体を形成するため、融合させた抗体の結合価数も四価となり、親和性の向上による高感度検出が期待できる。また独自に、変異導入による脱水素酵素化に成功しており、溶存酸素の影響を著しく低減させている。一方、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】

申請者は近年、連結モジュールを利用した抗体酵素複合体の簡便な創製法の開発と、これをセンシング素子として用いた電気化学検出を報告した¹⁾。そこで、抗 EGFR 抗体と AvLOx の遺伝子工学的な融合に加えて、連結モジュールを用いた融合も試みた。それぞれ、大腸菌発現系を用いて調製したところ、遺伝子工学的に融合

させた場合のみ、酵素活性を保持しており、抗原への結合活性も認められた。そこでセンシング素子として用いて EGFR の検出検討を行った結果、蛍光検出に加えて、濃度依存的な電気化学的な検出にも成功した。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抗 EGFR 抗体は、大腸菌を用いた発現は認められたものの発現量が低く、精製には至らなかった。

【考察】

連結モジュールを用いた手法は、グルコース脱水素酵素 (GDH) では良好な結果が得られていたが、AvLOx では酵素活性の著しい低下がみられた。これは、使用した連結モジュールが基質の結合を阻害したためであると考えている。

【文献】

- 1) Kimura, H., Miura, D., Tsugawa, W., Ikebukuro, K. Sode, K. & Asano, R.: Rapid and homogeneous electrochemical detection by fabricating a high affinity bispecific antibody-enzyme complex using two Catcher/Tag systems, *Biosens. Bioelectron.*, **175**, 112885 (2021).

腸管における硫酸基転移酵素を介した炎症抑制機構の解明

安 保 博 仁

(千葉大学薬学研究院)

【目的と意義】

炎症性腸疾患は日本を含む先進国で患者数が増加している疾患で、腸管において過剰な炎症が持続する難治性の慢性疾患である。遺伝的要因、環境的要因が複雑に組み合わさり発症することから、決定的な治療ターゲットは未だ見つかっておらず、さらなる研究が求められている。

Muc2 ムチンは大腸および小腸において、腸管上皮細

胞,特に杯細胞から分泌され粘液層を形成する.そのノックアウトマウスは,腸組織への細菌の侵入が増加し腸炎を自然発症することから,Muc2は腸管上皮のバリア機能に大きく寄与していると言える.またMuc2は多数のO-型糖鎖修飾を受けるが,これらO-型糖鎖の欠損マウスはDSS腸炎の悪化が報告されている.つまり,Muc2のO-型糖鎖修飾は腸炎病態と深く関わることを示されており,この糖鎖修飾を理解することは炎症性腸疾患の病態を解析する上で非常に重要である.

申請者らは,硫酸基転移酵素GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスを作製し,腸管におけるMuc2糖鎖の硫酸化について解析したところ,O-型糖鎖の硫酸化が欠損することを見出した[Tobisawa., et al. *J Biol Chem.* 2010].そこで本研究では,GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスを用いて,「ムチン糖鎖硫酸化は炎症性腸疾患病態にどのように寄与するか」を明らかにすることを目的とした.

【方法】

① マウス腸炎モデルを用いた解析

GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスに腸炎モデルであるDSS腸炎を適用することで,GlcNAc6ST-2は腸炎病態を悪化させるか,あるいは抑制するのかを明らかにする.また,qPCRにより炎症性サイトカインの発現も同時に解析する.

② カルノア固定法を用いたムチン層の観察

大腸組織切片をMuc2抗体および腸内細菌を染色するEUB338プローブで染色することにより,GlcNAc6ST-2が腸内細菌の侵入に影響を与えるかを解析する.

【結果】

GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスは,DSS腸炎において顕著な体重減少を示した.また,qPCRを用いた解析から,GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスにおいて炎症性サイトカインの発現上昇がみられた.また,カルノア固定法を用いたムチン層の解析から,GlcNAc6ST-2ノックアウトマウスの大腸では,腸管上皮細胞と腸内細菌の距離が近接していた.以上の結果から,ムチン糖鎖硫酸化修飾は腸管バリア機能に必須の糖鎖修飾であり,炎症抑制的に働くことが示唆された.

【考察】

本研究により,腸管における硫酸化糖鎖が持つ機能が明らかになり,未解明な点が多い硫酸基転移酵素の生理機能に関する知見を蓄積することができた.今後は,腸炎病態における更なる機能解析を進めていく計画である.

糸状菌 P450 酸化酵素の反応改変および立体構造解析

淡川 孝義

(東京大学大学院薬学系研究科)

【目的】

微生物の酸化酵素は反応性に富む.医薬品骨格生合成に関わるものも多く,この有用な生体触媒の構造解析を行い,触媒機能の改変を行うことで,新たな医薬品合成に繋げることができる.細菌由来P450酸化酵素は構造解析が容易である一方,糸状菌由来の酵素は膜結合型であり,構造解析は容易ではない.研究代表者は,糸状菌由来でありながら,膜結合部位を持たず,大腸菌可溶性P450酸化酵素AscEを同定し,その反応解析に成功した^{1,2)}.AscE骨格を糸状菌酸化酵素へ適応することで可溶性酵素を作成し,その構造解析につなげることを計

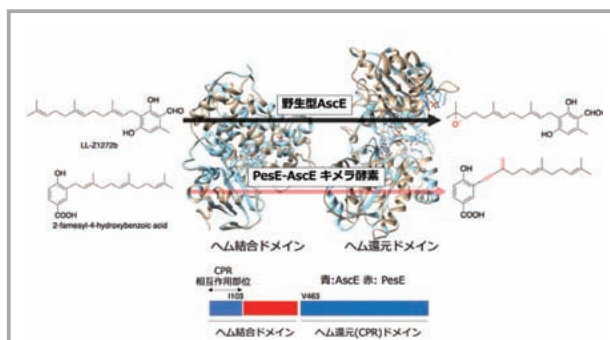


図1 糸状菌 P450 融合キメラ酵素のデザイン

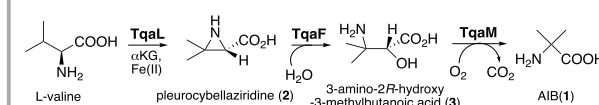


図2 L-valine からの TqaLFM 反応による 2-aminoisobutyric acid (AIB) 合成反応

画した。さらに新たな糸状菌由来酸化酵素発掘を目指して、アミノ酸より特異な化学骨格を合成する酸化酵素の発掘を行った。

【方法】

AscE のヘム結合ドメインと、糸状菌由来膜結合型 P450 の対応部位を入れ替えることで、糸状菌由来 P450 酸化酵素の大腸菌での発現、可溶化について検討を行った。有用物質合成に関わる糸状菌酸化酵素の発掘、機能解明のため、アジリジン生合成酵素の同定、触媒機能の同定を試みた。

【結果】

AscE のヘム結合ドメインと膜結合型 P450 PesE³⁾ を入れ替えることで、これまで不可能だった糸状菌由来 P450 酸化酵素の大腸菌での発現、可溶化酵素を用いての活性検出を試みた (図 1)。その結果、三重結合を持つ PesE 生産物がわずかに検出され、膜結合型 P450 酵素が機能を保ったまま、可溶化された。現在、N 末膜結合型領域、Loop との細胞膜との相互作用に注目して、膜結合型 P450 酸化酵素の大腸菌でのさらなる可溶化、機能向上のための検討を進めている。

Penicillium 属糸状菌より見出した α -ketoglutarate 依存性酸化酵素 TqaL を大腸菌で His-tag 付き組換え酵素として発現、精製し、*in vitro* 反応を試験した。その結果、TqaL は L-valine より pleurocybellaziridine を生成することを明らかにした (図 2)。次いで、TqaL タンパク質結晶構造解析によって、2.0 Å 解像度の回折データを取得した。さらに、TqaL 産物の加水分解に関わる TqaF、その産物を酸化的脱炭酸する金属酵素 TqaM を同定し、新規酸化酵素発掘に成功した⁴⁾。以上より、アジリジン骨格の合成、修飾に関わる生合成酵素の同定に初めて成功した。

【考察】

糸状菌酸化酵素の大腸菌での機能化に成功し、構造解析のための基盤となる知見を取得した。また、自然界において初の糸状菌由来アジリジン骨格合成酸化酵素の同定とその結晶構造解析に成功し、今後の構造情報を基盤としたエンジニアリング、物質生産の道を開いた。

【文献】

1) Araki, Y. *et al.*: Complete biosynthetic pathways of ascofuranone and ascochlorin in *Acremonium*

egyptiacum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1**, 19254 (2019).

2) Quan, Z., Awakawa, T., Wang, D., Hu, Y. & Abe, I.: Multidomain P450 Epoxidase and a Terpene Cyclase from the Ascochlorin Biosynthetic Pathway in *Fusarium* sp. *Org. Lett.* **21**, 2330 (2019).

3) Lv, J. M. *et al.*: Biosynthesis of Biscognienyne B Involving a Cytochrome P450-Dependent Alkynylation. *Angew. Chemie-Int. Ed.* **59**, 13531 (2020).

4) Bunno, R., Awakawa, T., Mori, T. & Abe, I.: Aziridine Formation by a FeII/ α -Ketoglutarate Dependent Oxygenase and 2-Aminoisobutyrate Biosynthesis in Fungi. *Angew. Chemie-Int. Ed.* **60**, 15827 (2021).

視覚における活性酸素産生酵素 (Nox) の全く新しい機能・生理的意義の解明

上山 健彦

(神戸大学バイオシグナル総合研究センター)

【目的】

活性酸素産生酵素 (NADPH oxidase: Nox) の網膜での発現や生理的機能については、全く不明と言っても過言ではない。本研究では、Nox promoter の下流に Nox に代わり Cre recombinase を発現するノックインマウス (Nox-Cre^{KI}) を作製し、Nox 発現細胞が赤色蛍光 tdTomato で標識されるマウスを作出する。このマウスを用いることで、網膜での Nox 発現細胞を同定し、Nox 由来 reactive oxygen species (ROS) の視覚における機能解明、Nox 由来 ROS が関与する網膜疾患の機序解明と新規治療法開発に繋げようというものである。

【方法】

1. Nox promoter の下流に Nox に代わり Cre recombinase を発現するノックインマウス (Nox-Cre^{KI}) を作製し、レポーターマウス CAG-STOP^{lox}-tdTomato との交配により、Nox 発現細胞が赤色蛍光 tdTomato で標識されるマウス (Nox-Cre^{KI}; tdTomato) を作出する。

- このマウスを還流固定し、眼球を摘出、網膜を顕微鏡下で観察し、網膜全体での tdTomato 陽性細胞数を蛍光顕微鏡下で経時的（開眼前の生後 7 日、開眼後の生後 21 日、28 日、2, 4, 6, 12 ヶ月齢）に計測する。又、網膜切片を作製し、tdTomato 陽性細胞が、網膜 10 層中どの層に分布し、どの細胞種なのかを種々の抗体を用いた免疫染色により明らかにする。
- 2, 4, 6 ヶ月齢のホモ Nox-KO 及びヘテロ KO マウスに、網膜毒性で有名な抗癌剤シスプラチン (CDDP) を腹腔内投与する。投与 7 日後にマウスを還流固定し、眼球を摘出、上記の要領で網膜全体での tdTomato 陽性細胞数を計測・比較する。

【結果】

- Nox-Cre^{KI}; tdTomato を作出した。
- 網膜全体での tdTomato 陽性 Nox 発現とその細胞数と経時変化を観察すると、tdTomato 陽性細胞数は、開眼後、経時的に増加することを発見した（未報告）。
- 網膜切片を用いて、網膜 10 層内での tdTomato 陽性細胞の存在を確認した。神経系細胞を標識するため Pax6, Thy1 染色、双極性細胞標識のため Chx10, PKC α 染色、水平細胞標識のため Calbindin 染色、ミュラーグリア細胞標識のため Glutamine synthetase, S100b 染色を行った結果、tdTomato 陽性細胞種を同定した（未報告）。
- 網膜毒性で有名な抗癌剤シスプラチン (CDDP) の腹腔内投与後、網膜全体での tdTomato 陽性細胞数を比較したところ、ヘテロ KO マウスで見られる CDDP 投与による tdTomato 陽性細胞減少が、ホモ Nox-KO では統計学的有意差を持って低下する事を見出した（未報告）。

【考察】

現在に至るまで、網膜での Nox 発現やその生理機能について言及された論文は、極めて少ない。本研究で我々は、網膜にも ROS の発生源として Nox が発現しており、その発現細胞数が、開眼後に増加することを見出した。加えて、Nox 発現細胞種を同定した。更に、抗癌剤シスプラチン (CDDP) の有名な網膜・視神経毒性（球後性視神経炎による霧視が最多）の原因・機序の少なくとも 1 つとして、「シスプラチンが Nox 陽性細胞からの

ROS 産生を誘発し、産生された ROS が、自身及び周囲の細胞を脱落させるため」である事を、Nox-KO マウスを用いた実験により明らかにした。

【参考文献】

論文準備中

皮膚バリア機能修復療法の提唱に向けた新規膜貫通型因子のリパーゼ活性の実証

大 垣 隆 一

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

表皮組織特異的発現を示す新規因子 LIPX の遺伝子ノックアウトマウス (KO マウス) は、皮膚バリア機能の破綻を示し、過度の水分蒸散によって出生直後に死亡する。野生型マウスの表皮最外層の角質層では、規則的に配列した脂質の周期構造を反映した「角質細胞間脂質ラメラ」が観察され、これが皮膚バリア機能の実体を成す重要な生体内構造であることが知られている。しかし、KO マウスの角質層では、角質細胞間脂質ラメラに構造的な異常が見られ、脂質恒常性が破綻していることが想定される。LIPX はリパーゼ様の膜タンパク質であるが、その分子機能の詳細は未だに不明である。本研究は、LIPX のリパーゼ活性を実証するとともに、その反応基質および生成物の脂質分子種を同定し、LIPX が皮膚バリア機能の形成と維持に果たす役割の解明を目的として実施した。

【方法と結果】

リポミクス解析による LIPX の反応基質と生成物の絞り込みに向けて、野生型新生仔マウスの表皮組織およびその角質層から、Bligh-Dyer 法によって脂質を抽出するプロトコルを確立した。また、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を改変した Flp-In T-REx293 細胞を用いて、ドキシサイクリン誘導性の発現系を構築した。この細胞に、LIPX 分子の C 末端に 3xFlag タグを付加した LIPX-3xFlag を発現させ、細胞を破碎して調製した粗膜画分から、抗 Flag 磁気ビーズを用いて精製タンパク質を得ることに成功した。リパーゼファミリーで高度に保存されているセリンプロテアーゼ様の触媒三つ組残

基（セリン，アスパラギン酸，ヒスチジン）は，LIPX においても予想される活性中心に保存されている．そこで，LIPX の三つ組み残基をアラニンに置換し，ネガティブコントロールとして用いるための活性消失変異体の発現・精製系も同様に構築した．

【考察】

本研究の成果として，表皮組織および角質層からの脂質抽出法と，精製 LIPX タンパク質の発現・精製法が確立され，反応基質と生成物を同定するためのリポドミクス解析実施に向けた重要な技術基盤を整えることが出来た．今後，野生型および変異体 LIPX の精製タンパク質と，角質抽出脂質を反応させて，反応前後のサンプル間の比較リポドミクス解析を実施することで，反応基質と生成物の候補となる脂質分子種の絞込みをおこなう予定である．LIPX の反応生成物である脂質分子種には，角質層の脂質の恒常性を回復させて，破綻した皮膚バリア機能を改善する機能が期待できる．そこで，KO マウスの皮膚に塗布することで，皮膚バリア機能修復効果の有無を検証する．本研究の成果は，アトピー性皮膚炎や先天性魚鱗癬などの皮膚バリア疾患の病理理解と新規治療法の提唱にも繋がるものと期待している．

RF 経路による膵臓がん形質の促進機構の解明

大 塩 貴 子

(北海道大学遺伝子病制御研究所)

【背景と目的】

膵臓がんは種々のがんの中で最も予後が悪く，その発生機序の解明や新規治療法の開発は極めて重要な福祉課題である．申請者らは最近，膵臓がん患者の中でも最も予後不良の群で観察される 4 遺伝子変異（がん遺伝子 *KRAS* の活性化，がん抑制遺伝子群 *TP53*・*P16*・*SMAD4* の不活性化）を模倣した初の動物モデル，4-hit ショウジョウバエの作出に成功した．この 4-hit ハエは，腫瘍細胞の過剰な増殖・浸潤により，成虫になる前に全個体が死亡した．申請者らは，このハエを用いて全キナーゼの遺伝学的スクリーニングを実施し，リボフラビン（RF）経路や MEK の阻害がこのハエの致死表現型を救済することを見出した．RF は水溶性ビタミンの一

種であるが，膵臓がんとの関係は不明である．さらに，RF 経路と MEK の阻害剤の組み合わせは，4-hit ハエの生存率を大幅に回復させた．そこで本研究では，膵臓がんのがん形質における RF 経路の役割を解明し，RF 経路と MEK の共阻害が新規膵臓がん治療法として有効性であるか検討する．

【方法】

まず，ヒト膵臓がん細胞を三次元培養し，RF 経路と MEK の阻害剤の添加がスフェロイドの大きさや数に与える影響を調べた．次に，膵臓がん細胞を RF 経路阻害剤で処置し，液体クロマトグラフィー質量分析法による細胞内の RF 経路の代謝産物（FMN・FAD）の測定と MTS 試験（CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega）を実施した．さらに，マウスへの阻害剤投与の予備実験として，マウスの体重減少や行動異常の見られない RF 経路阻害剤の最大投与量を決定し，その量で薬物動態試験を行った（メディシロン社に委託）．

【結果】

本研究ではまず，膵臓がん細胞における RF 経路と MEK 阻害剤の影響を検討した．その結果，10 μ M の RF 経路阻害剤や 10nM の MEK の阻害剤の単独処置はスフェロイド形成を抑制し，それらを組み合わせるとその効果が増強した．また，RF 経路阻害剤は，膵臓がん細胞内の FMN と FAD の量とミトコンドリアの呼吸鎖の活性を濃度依存的に低減した．さらに，マウスへの腹腔内投与時の RF 経路阻害剤の最大耐用量は 10mg/kg，最高血中濃度は 7.6 μ M だった．

【考察】

RF 経路阻害剤を最大耐用量でマウスに投与した時の最高血中濃度は，膵臓がん細胞のスフェロイド形成を抑制した濃度とほぼ同等であり，RF 経路と MEK の共阻害が膵臓がんの新規治療法として有効であることが示唆された．今後は，膵臓がん細胞を同所移植したマウスに RF 経路と MEK の阻害剤を同時投与し，腫瘍の大きさや転移能，マウスの生存期間への影響を検討する予定である．

【文献】

Yamamura, R.*, Ooshio, T.*, & Sonoshita, M.: Tiny *Drosophila* makes giant strides in cancer research.

Cancer Sci., 112, 505-514 (2021). *equal contribution

糸状菌より見出された新規な α -マンノシド β -ガラクトフラノース転移酵素の機能解明

岡 拓 二

(崇城大学生物生命学部)

【目的】

真菌型ガラクトマンナン (FTGM) は、 β -(1 \rightarrow 5)- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトフラノース (Gal_f) 残基と α -(1 \rightarrow 2)- α -(1 \rightarrow 6)-マンノース (Man) 残基で構成される糖鎖であり、 α -マンナン鎖と Gal_f 糖鎖は β -(1 \rightarrow 2)-, β -(1 \rightarrow 3)-あるいは β -(1 \rightarrow 6)-結合で連結されている (図 1)。FTGM は、細胞外や細胞の表層に局在することから、病原性真菌の「宿主細胞と最初に接触する分子」である。このことから FTGM は、病原性真菌の感染機構や毒性の発揮に関与していると考えられている。我々は、これまでの研究においてマンナン主鎖生合成を担う α -マンノシド α -(1 \rightarrow 2)-Man 転移酵素である CmsA および CmsB と Gal_f 糖鎖生合成を担う β -ガラクトフラノシド β -(1 \rightarrow 5)- Gal_f 転移酵素である GfsA および GfsC を同定してきた。しかし、 α -マンナン鎖に Gal_f 残基を転

移する α -マンノシド β - Gal_f 転移酵素 (Mgf) に関する情報は全く知られていなかった。近年、我々は Mgf は「ゴルジ体に局在する機能未知 II 型膜タンパク質の中にある」という仮説に基づいて遺伝子の同定を試みた。その結果、MgfA と名付けたタンパク質が Man 残基に Gal_f を転移する酵素であることを明らかにすることができた (図 1)。本研究では MgfA およびそのオルソログ酵素の性状と機能を明らかにすることを目的とした。

【結果および考察】

MgfA と 5 個のパラログ (MgfB~MgfF) について大腸菌発現系を用いた組換え酵素の発現を試みた。その結果、6 個すべてのタンパク質に関して組換えタンパク質を得ることが出来た。特に、MgfA と MgfB では大量に発現 (>5 mg/L) した。組換え酵素を Gal_f 転移酵素活性測定系に供したところ、MgfA と MgfB で 4-メチルウンベニフェリル- α -マンノシド (4MU- α -Man) を受容基質、UDP- Gal_f を糖供与基質したときに、酵素反応産物への転換が認められた (図 2)。MgfC, MgfD, MgfE および MgfF については Gal_f 転移活性が認められなかった。MgfA および MgfB の酵素反応産物を β -ガラクトフラノシダーゼによって消化したところ、全て 4MU- α -Man に変換された。また、酵素反応産物を精製し、 $^1\text{H-NMR}$ およびメチル化分析によって構造の決定を行ったところ共に Gal_f - β -(1 \rightarrow 6)-Man- α -4MU であることが明らかになった (図 3)。以上のことから、MgfA および MgfB は α -マンノシド β -(1 \rightarrow 6)- Gal_f 転移酵素

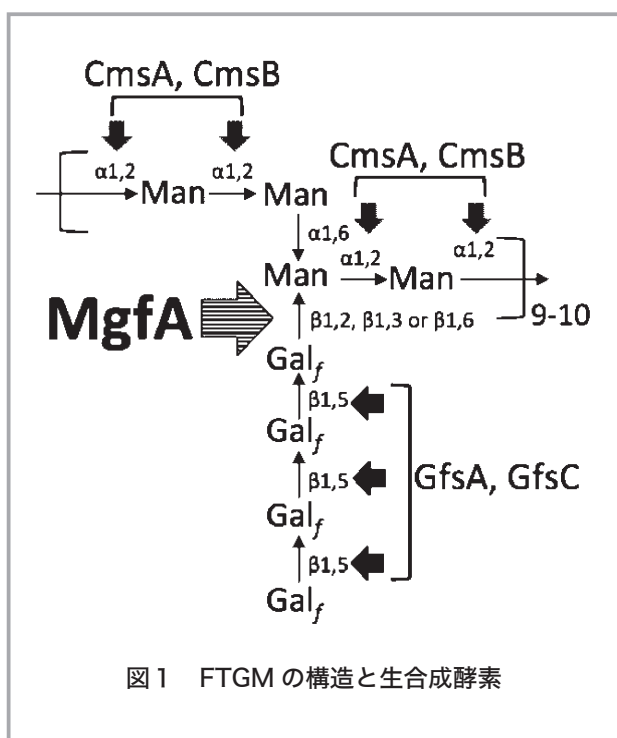


図 1 FTGM の構造と生合成酵素

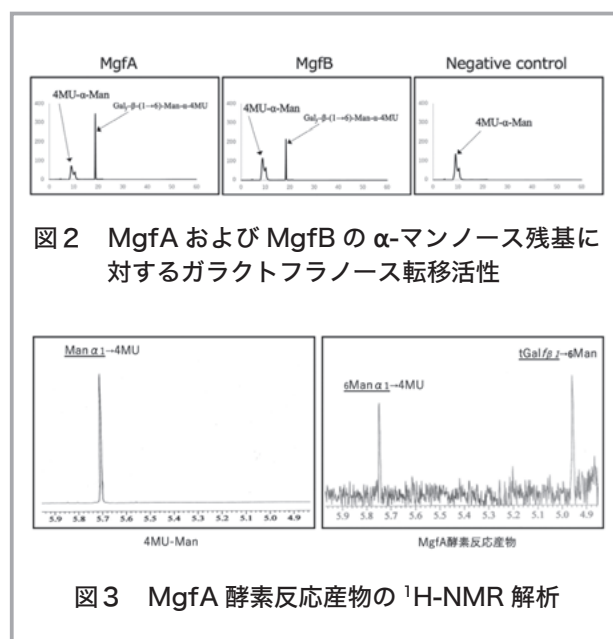


図 2 MgfA および MgfB の α -マンノース残基に対するガラクトフラノース転移活性

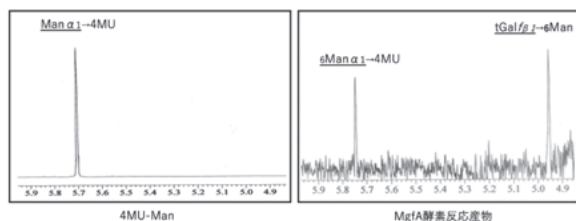


図 3 MgfA 酵素反応産物の $^1\text{H-NMR}$ 解析

であることを明らかにした。すなわち、MgfA および MgfB は、 α -Man 残基の 6 位の水酸基に β -結合で Gal_f 残基を転移する反応を担う酵素であり、これは全生物を通じて初めての発見であった。

カルシウムによる PDI ファミリー酵素の構造機能制御の理解

奥村正樹

(東北大学学際科学フロンティア研究所)

【目的】

細胞内小器官の 1 つである小胞体は新たに合成された蛋白質が立体構造を獲得する環境であり、蛋白質の品質が管理されている。小胞体は他の細胞内小器官と比べ比較的酸化的な環境にあり、蛋白質内のシステイン残基間でジスルフィド結合の形成が促進される。全タンパク質の約 1/3 はジスルフィド結合の形成を伴う蛋白質の立体構造形成を小胞体で受けると言われており、その基質には生物学的にも医学的にも重要な免疫グロブリンやインスリンなどが知られている。例えばインスリンの場合 A-B 鎖間の天然型ジスルフィド結合様式が形成されないとアミロイド線維を形成するといった性質があり、ジスルフィド結合形成は天然構造の構築だけでなく、アミロイド線維に伴った疾病との強い関係性がある。しかしながら、たった 3 本のジスルフィド結合で構成されているインスリンでさえ、未だジスルフィド結合形成経路やその触媒のしくみは不明であり、その根底にある個々の酵素による触媒システムの理解は急務であった。その触媒システムの根幹を担う 20 種類以上の Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリー酵素は特定の基質を標的にしているのではなく、幅広い基質をターゲットにしており、「1 酵素に対して 1 基質の概念」が通用しないため、PDI ファミリー酵素による基質認識に関する普遍的知見は得られていない現状である。

また細胞内小器官の 1 つである小胞体は細胞内のカルシウム貯蔵庫として働き、約 1 mM のカルシウム濃度が保たれている。そこでカルシウムが PDI ファミリー酵素の機能制御に関わっていると仮説を立て、これまでに申請者はカルシウムと結合する PDI ファミリー

酵素を 4 種同定した。そこで、本研究課題の目的・意義はこれまで申請者が確立した膨大な解析手法や材料を駆使し、全く新たな概念「カルシウムによって制御される PDI ファミリー酵素による基質認識」の作用機序を明らかにすることで、「幅広い基質をターゲットとする酵素基質反応」の理解の深化を目指す。以上、本計画課題の意義は、酵素による多種多様な基質の「分子認識」、「品質管理」、「ジスルフィド結合の触媒反応」という重要な問題を対象とし、未だ明らかでない小胞体内カルシウムの生理学的意義を探究する点にある。

以上、原子、分子、細胞レベルで、カルシウムにより制御される PDI ファミリー酵素の構造機能相関を探究し、小胞体におけるタンパク質品質管理に関する新たな概念を打ち立てることを目指す。

【方法】

■ PDI ファミリー酵素による基質認識のカルシウム依存的な制御

等温滴定型熱量計を用いて、PDI ファミリー酵素である P5, ERp57, ERp72, PDI がカルシウムと結合することを見出した。そこで X 線結晶構造解析および NMR を用いて、カルシウムが結合する部位を同定する。これまでに我々は、他の PDI ファミリー酵素 ERp46 (Kojima#, Okumura# *et al.*, *Structure* 2014 (# 同等貢献)), P5 (Sato#, Kojima#, Okumura#, *et al.*, *Sci Rep* 2013 (# 同等貢献)) の構造決定に成功しノウハウを蓄積しているため、遂行が可能である。カルシウム結合によって PDI ファミリー酵素による基質触媒反応にどのように影響を与えるのか、① RP-HPLC と MALDI-TOF/MS を用いジスルフィド結合位置のモニタリング、②アミロイド線維を特異的に検出するチオフラビン蛍光を用いたシャペロン機能の評価、により検証する。得られた成果は、小胞体内カルシウム枯渇剤タブシガルジンを用い、細胞生物学的検証にフィードバックし、生理的意義を追求する。

■カルシウム存在下酵素基質反応の可視化

カルシウム結合型 PDI ファミリーによって基質を触媒する様子をリアルタイムで可視化する。手法は、既にノウハウの蓄積がある高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いる。本手法は構造と動的挙動を同時に調べることができ、PDI ファミリー分子をサブ 100 ms の

時間分解能、数 nm オーダーの空間分解能で直視することが可能であり、酵素基質反応の可視化が可能である (Okumura*, *et al.*, *Nature Chemical Biology* 2019). 「大きさ」や「形」そして「ジスルフィド結合の本数」が違う基質、すなわち HLA (Human leukocyte antigen) や BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) を使用することで、カルシウムにより制御される PDI ファミリー酵素の構造機能相関を探究し、各論的および普遍的知見を得る。

【結果】

哺乳動物細胞の小胞体において、酸化のフォールディングの触媒や小胞体ストレス応答因子である IRE1 の機能制御能に関わる P5 はこれまで構造未知なためその作動原理は不明であった。今回 X 線小角散乱と SEC による構造解析より、その N 末端に存在するチオレドキシン様ドメイン a0 が二量体化に関わることを明らかにした。これまで解かれていた結晶構造を基に、新たに a0 ドメインに二量体化に重要な Leu-Val adhesive motif を見出した。二量体形成 motif として遺伝子調節に関わる Leu-zipper motif が非常によく知られるが、この motif はアルファヘリックス 2 巻きごとに外側に露出した Leu 残基同士が平行に接着することで機能を発現する。一方、この Leu-Val adhesive motif はアルファヘリックス 1 巻きごとに外側に露出した Leu/Val 残基同士が逆並行に接着することを見出した。これら接着力を in silico 比較すると、20 種類の Leu-zipper motif では -15 から -20×10^{-3} (kcal/mol/A2) 程度の範囲の接着力が見積もられたことに対し、Leu-Val adhesive motif は -10×10^{-3} (kcal/mol/A2) であった。したがって、この motif は Leu-zipper motif よりも接着力が弱く、Leu-zipper motif の母集団から外れ、新規な motif であることが示唆された。さらに、このモノマー化変異体は artifact な分子間ジスルフィド結合種を生成するだけでなく、部分構造の崩壊を起こしており、細胞内で小胞体ストレスを引き起こしていた。以上の結果は、2021 年 *Structure* 誌に研究成果として発表した¹⁾。

ERp57 と CNX の複合体形成が HLA (Human leukocyte antigen) の酸化のフォールディングの触媒及び凝集抑制に効果を示すか検証した。その際、本複合体形成がカルシウムによって制御されることを見出した。すな

わち、カルシウム非存在下の方が存在下に比べ、複合体を強く形成することを ITC や 2D-PAGE により検証した。さらに、これら複合体は酸化的フォールディングの触媒の加速と、凝集抑制効果を示し、複合体形成とその機能について新たな機序を明らかにした²⁾。

【考察】

PDI family は小胞体内のタンパク質品質管理に関わり、品質管理の破綻によるミスフォールド体の蓄積を起因とする様々な疾患の原因となっていることが指摘されているが³⁾、未だ根底にある分子メカニズムが不明である。近年申請者らのグループによって、高速 AFM による PDI による基質認識の可視化に成功し⁴⁾、1 分子レベルでの触媒機序の一端を明らかにしつつあり、今後 1 分子観察による PDI family による酵素基質反応の可視化の研究が本格化すると予測される⁵⁾。

一方で、これら PDI family が局在する小胞体内は、カルシウムが ~ 1 mM と豊富に存在するが、これまでカルシウム存在下での PDI family の構造機能相関の理解は殆ど進んでいなかった。特に、本課題で構造決定した P5 はカルシウム結合型の PDI family としても知られていたが、カルシウム非結合型の全長構造を本課題で決定した¹⁾。さらに、ERp57 と CNX 複合体形成にカルシウムが関わることも証明し²⁾、今後カルシウムによる PDI family の構造機能制御の研究が深化し、PDI family が関与する疾患の理解が深まることを期待したい。

【文献】

- 1) Okumura, M., Kanemura, S., Matsusaki, M., Kinoshita, M., Saio, T., Ito, D., Hirayama, C., Kumeta, H., Watabe, M., Amagai, Y., Lee, Y.H., Akiyama, S. & Inaba, K.: A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization, *Structure (Cell Press)* **29**, 1-14 (2021).
- 2) Tanikawa, Y., Kanemura, S., Ito, D., Lin, Y., Matsusaki, M., Kuroki, K., Yamaguchi, H., Maenaka, K., Lee, Y.H., Inaba, K. & Okumura, M.: Ca²⁺ Regulates ERp57-Calnexin Complex Formation. *Molecules*. **11**; **26**(10): 2853 (2021).
- 3) Matsusaki, M., Kanemura, S., Kinoshita, M.,

Lee, Y.H., Inaba, K. & Okumura, M.: The Protein Disulfide Isomerase Family: From Proteostasis to Pathogenesis” *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1864**, 129338, (2020).

- 4) Okumura, M., Noi, K., Kanemura, S., Kinoshita, M., Saio, T., Inoue, Y., Hikima, T., Akiyama, S., Ogura, T. & Inaba, K.: Dynamic Assembly of Protein Disulfide Isomerase in Catalysis of Oxidative Protein Folding, *Nature Chemical Biology* **15**, 499-509, (2019).
- 5) Okumura, M., Noi, K. & Inaba, K.: “Visualization of structural dynamics of protein disulfide isomerase enzymes in catalysis of oxidative folding and reductive unfolding” *Current Opinion in Structural Biology* **66**, 49-57 (2021).

ペプチド分解酵素による骨格筋量調節機構の解明

長名 シオン

(東北大学医工学研究科)

【目的】

骨格筋は日々の生活動作や運動を行うために不可欠な組織である。超高齢社会を迎える本国においてはサルコペニア（加齢性筋萎縮）に伴う要介護者の増加が問題となっている。このような課題を解決するためにも骨格筋量の調節メカニズムを明らかにし、予防法などを開発する事が喫緊の課題である。本研究では骨格筋におけるアミノペプチダーゼの機能・役割を明らかにすることを目的とし、骨格筋におけるアミノペプチダーゼは骨格筋量の調節に寄与するという仮説を立てた。

【方法】

アミノペプチダーゼは基質特異性の異なる複数の分子が報告されている。それら種々のアミノペプチダーゼが骨格筋量の維持に必須となる筋芽細胞の増殖・分化にどのような役割を持つのかを明らかにするため、siRNAによるアミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が筋芽細胞の細胞増殖能・筋分化能に与える影響を検証した。アミノペプチダーゼ遺伝子として Aminopeptidase-A～Aminopeptidase-K までの 11 遺伝子に着目した（未発

表データのため遺伝子名の詳細は非公開）。細胞増殖能は各 siRNA による遺伝子発現抑制の 2 日後に細胞数を測定することにより評価した。また、各 siRNA による遺伝子発現抑制の 2 日後から低血清培地による筋分化を誘導し、分化マーカーであるミオシン重鎖（MyHC）を蛍光免疫染色し形態的な変化、筋管細胞の長さ、分化指数を算出することで筋分化能を評価した。

【結果】

はじめに、siRNA 処理の 2 日時点で筋芽細胞株 C2C12 における各アミノペプチダーゼ遺伝子の発現が抑制されることを確認した。同様の条件において、アミ

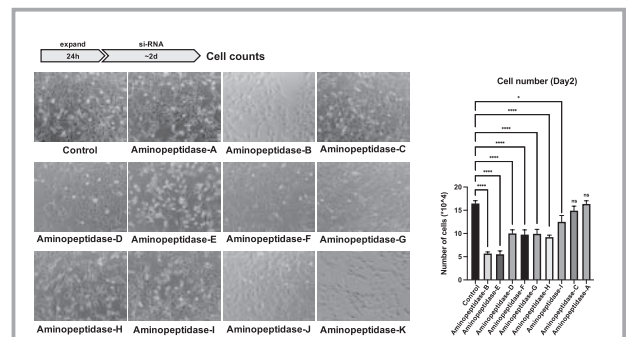


図1 アミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が筋芽細胞の増殖能に与える影響

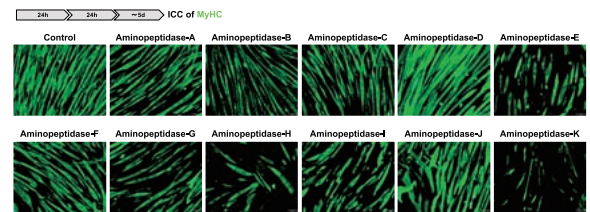


図2 アミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が筋芽細胞の分化能に与える影響

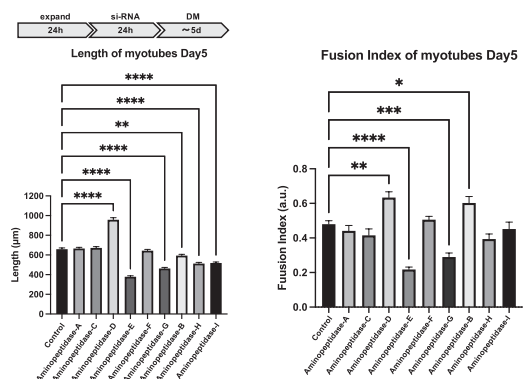


図3 アミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が筋管細胞の形成に与える影響

ノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が細胞増殖能に与える影響を検証した結果、アミノペプチダーゼ遺伝子 B, E, D, F, G, H, I の発現抑制は細胞数を有意に減少させることが明らかとなり、筋芽細胞の増殖に寄与するアミノペプチダーゼ遺伝子特定することができた (図 1)。さらに、アミノペプチダーゼ遺伝子発現抑制が筋管細胞への分化能に与える影響を検証した結果、アミノペプチダーゼ遺伝子 D, E, F, B, G, H, I の発現抑制は筋管細胞への分化に著しい影響を与えることが明らかとなった (図 2)。また、形態評価として筋管細胞の長さや分化指数を算出した結果、興味深い結果として、Aminopeptidase-D は筋分化を促進することが明らかとなった (図 3)。

【考察】

本研究ではアミノペプチダーゼ発現抑制が筋芽細胞の増殖・分化に異常をもたらすことが明らかになった。このことから、アミノペプチダーゼにはペプチド分解酵素としてだけでなく、細胞増殖や筋分化の制御といった様々な生理現象に寄与する可能性が考えられる。今後、それぞれのアミノペプチダーゼ分子の役割について解明を進めていく。

【文献】

- Shion, Osana., Yasuo, Kitajima., Naoki, Suzuki., Aki, Nunomiya., Hiroaki, Takada., Takahiro, Kubota., Kazutaka, Murayama. & Ryoichi, Nagatomi.: Puromycin sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation. *Journal of cellular physiology*. **236**(7), pp5293-5305, (2021).
- Shion, Osana., Yasuo, Kitajima., Naoki, Suzuki., Yidan, Xu., Kazutaka, Murayama. & Ryoichi, Nagatomi.: siRNA knockdown of alanine aminopeptidase impairs myoblast proliferation and differentiation. *Experimental cell research*. **397**(1), 112337, (2020).
- Shion, Osana., Kazutaka, Murayama. & Ryoichi, Nagatomi.: The impact of intracellular aminopeptidase on C2C12 myoblast proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. **524**(3), pp608-613, (2020).

ヘテロクロマチンによる血管老化制御機構の解明

神 吉 康 晴

(東京大学アイソトープ総合センター)

【目的】

申請者は最近、ヒト血管内皮細胞に炎症性刺激を加えた際に Hi-C を行い、ヒストン修飾酵素 Lysine demethylase 7A (KDM7A) が働いて染色体構造を変化させることが、炎症惹起に必須であることを証明した (2020 *EMBO J*). Kdm7a は抑制系ヒストン修飾である H3K9me2 を脱メチル化する酵素であり、血管発生や神経発生に関わる遺伝子を転写活性化する可能性が報告されている。しかしながら、生体における役割はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、Kdm7a の生体での機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

CRISPR/Cas9 システムを用いて Kdm7a 酵素活性ドメインにフレームシフト変異を導入することで Kdm7a ノックアウトマウスを作成し、その表現系解析を行った。また、その分子機構を解明するために RNA-seq, ChIP-seq を行った。

【結果】

出生直後のマウスの骨形態を詳細に解析したところ、ノックアウトマウスにおいて、胸椎・腰椎および腰椎・仙椎の境界がそれぞれ1つ後方にシフトする、すなわち体節のアイデンティティに変化が生じることが判明した。胎生 9.5 日齢、10.5 日齢のマウス胚尾側領域 (耳胞を目印としてそれより尾側) の遺伝子発現パターンを RNA-seq により網羅的に調べたところ、野生型マウスと比較してノックアウトマウスでは、後方の体節形成に関わる Hox 遺伝子群が有意に減少していることが明らかとなった。次に、ChIP-seq を用いて H3K9me2 修飾領域をゲノムワイドに解析したところ、この結果と一致して、ノックアウトマウスでは、Hox 遺伝子群後方領域に H3K9me2 修飾が強く分布することが分かった。以上より、Kdm7a はマウス発生期において Hox 遺伝子群の発現調節を行うことで、前後軸形成を制御する可能性が示唆された。

【考察】

Hox 遺伝子の発現制御における H3K9me2 の関与についてはこれまで報告がなかった。本研究で H3K9me2 の脱メチル化が Hox 遺伝子の転写制御に重要な可能性を示したことにより、それ以外のヒストン修飾やその修飾酵素による厳密な時空間的制御機構の存在が考えられ、今後の発展に繋がる成果である。

【文献】

Higashijima, Y., Nagai, N., Yamamoto, M., Kitazawa, T., Kawamura, YK., Taguchi, A., Nakada, N., Nangaku, M., Furukawa, T., Aburatani, H., Kurihara, H., Wada, Y. & Kanki, Y.: Lysine demethylase 7a regulates murine anterior-posterior development by modulating the transcription of Hox gene cluster. *Commun Biol.*; **3**(1): 725., 2020 Nov 30

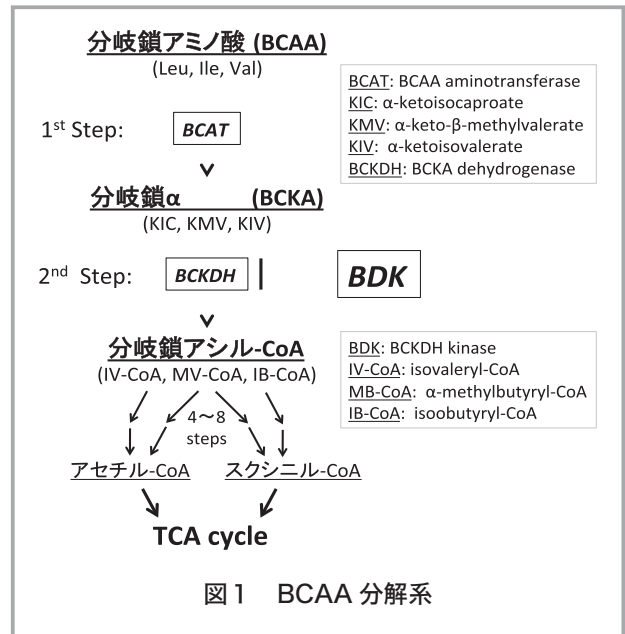


図1 BCAA 分解系

(muscle: 心筋・骨格筋) 特異的 BDK-musKO マウス, 脳神経系 (neuron: 主に前脳興奮性ニューロン) 特異的 BDK-neuKO マウスの走運動持久力 (走行可能距離) をトレッドミルにより測定した。さらに、走運動トレーニングを負荷した後の走運動持久力を再度測定し、それぞれのマウスの血中代謝物を GC-MS で測定した。また、既存薬ライブラリーを用いて、BDK の活性測定を行った。さらに、阻害活性が認められた薬剤をラットに投与し、血中 BCAA 濃度を測定した。

【結果】

Control マウスに比べて、BDK-musKO マウス, BDK-neuKO マウスでは、走運動持久力に有意な差は認められなかったが、BDK-KO マウスでは有意に増加した。さらに、走運動トレーニング後、走運動持久力を測定した結果、Control マウスに比べて BDK-musKO マウスでは有意な差は認められなかったが、BDK-neuKO マウス, BDK-KO マウスで有意に増加した。それぞれのマウスで走運動持久力と関連するいくつかの代謝物を見出した。また、既存薬の中から高血圧の治療に使用されるバルサルタンに BDK 阻害活性が認められ、バルサルタンをラットに投与すると、血中 BCAA 濃度が有意に低下した。

【考察】

全身での BCAA 代謝の亢進は走運動持久力を増大させ、また、走運動トレーニングによる走運動持久力を増加させるには、主に前脳興奮性ニューロンでの BCAA 代謝の亢進が重要であることが示唆された。このことは、

分岐鎖アミノ酸分解促進による走運動持久力への影響

北 浦 靖 之

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

【目的】

必須アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリンは、分岐鎖アミノ酸 (Branched-Chain Amino Acids: BCAA) と呼ばれ、他のアミノ酸と異なり肝臓以外の組織 (主に骨格筋, 脳神経系など) で分解される。BCAA 分解系 (図1) の最初の2つの反応は3つの BCAA に共通であり、第二反応は不可逆的の反応で、律速段階とされている¹⁾。この反応を触媒する分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素 (BCKDH) は BCKDH キナーゼ (BDK) によるリン酸化により不活性化される。

安静状態における BCAA 分解は強く制御されておりその消費は少ないが、運動中ではその制御が一部解除されてエネルギー源になると考えられる。本研究では、BDK を阻害することでエネルギー代謝に対する BCAA 分解系の貢献度を高めることにより、走運動持久力が向上するか、それに関連する代謝物について解析した。また、新たな BDK 阻害剤を見出すことを試みた。

【方法】

全身で BDK を欠損させた BDK-KO マウス, 筋組織

バルサルタンなどの BDK 阻害剤により走運動持久力が増加する可能性が考えられる。

【参考文献】

- 1) Shimomura, Y. & Kitaura, Y.: Physiological and pathological roles of branched-chain amino acids in the regulation of protein and energy metabolism and neurological functions. *Pharmacol Res.* **133**: 215-217 (2018).
- 2) Mizusawa, A., Watanabe, A., Yamada, M., Kamei, R., Shimomura, Y. & Kitaura, Y.: *Nutrients*. BDK Deficiency in Cerebral Cortex Neurons Causes Neurological Abnormalities and Affects Endurance Capacity. **12**(8): 2267 (2020).
- 3) Kitaura, Y., Shindo, D., Ogawa, T., Sato, A. & Shimomura, Y.: Antihypertensive drug valsartan as a novel BDK inhibitor. *Pharmacol Res.* **167**: 105518 (2021).

新規ヒアルロン酸分解系を介した炎症・発癌制御機構の解明

下田 将之

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid=HA) は、細胞外マトリックス (extracellular matrix=ECM) の一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。本研究では、生体内 HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素として HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) に着目し、Hybrid 遺伝子欠損 (KO) マウスおよびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いて、腸炎及び腸炎関連大腸癌発症・進展における HYBID-HA 代謝系の役割を明らかとすることを目的とする。

【方法】

はじめに Hybrid KO マウスおよび野生型マウスを用いて DSS 誘導大腸炎マウスモデルを作製し、各種手法により経時的に腸炎の重症度を検討した。また、腸管組織における HYBID 発現細胞の同定、組織学的変化と

間質 HA 代謝・沈着との関連について検討するとともに、各マウスから単離・培養した間質細胞の HA 分解活性を解析した。また、ヒト潰瘍性大腸炎組織における HYBID 発現や各種間質変化を解析した。さらに、これまでに *in vitro* において同定した HYBID 阻害候補物質に関して、DSS 誘導性腸炎に対する薬効を評価した。

【結果】

DSS 誘導性大腸炎モデルでは、Hybrid KO マウスは野生型マウスと比較して体重減少が軽度であり、生存率の改善傾向が認められるとともに、DSS 投与後も上皮細胞障害および腸管バリア破綻が抑制されていることが示された。HYBID は主に線維芽細胞をはじめとする間質細胞で発現しているとともに、Hybrid KO 培養線維芽細胞ではより高分子量 HA が培養上清中に蓄積している傾向が認められた。以上の結果から、HYBID-HA 代謝系が大腸炎の進展に寄与している可能性が示唆された。現在一部の HYBID 阻害候補物質が DSS 誘導性腸炎の重症度を抑制する可能性を見出している。腸炎関連大腸癌モデルに関しては、引き続き Tp53 +/- Hybrid -/- 複合遺伝子変異マウスを用いて解析を進めていく予定である。

【考察】

本研究では、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルである DSS 誘導性大腸炎モデルおよびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いて、HYBID-HA 分解系が大腸炎進展に寄与することを明らかにするとともに、一部の HYBID 阻害候補物質が大腸炎に対する新規創薬となりうる可能性を見出した。今回のデータから、炎症時の HYBID-HA 分解系促進に伴う腸管内 HA 蓄積量・分子量変化が大腸炎の進展に関与している可能性が考えられる。一方、近年我々は HYBID-HA 分解系が脂肪細胞分化を制御し細菌感染防御に関わることを報告しており (*Cell Rep* 30: 61-68. e4, 2020)、腸管内脂肪組織代謝変化も大腸炎の進展や腸内細菌叢変化に影響を与えている可能性も考えられ、そのメカニズムについては今後さらなる検討が必要と考えられる。引き続き腸炎関連大腸癌モデルの解析を継続し、HYBID-HA 分解系、炎症および炎症性発癌との関連を詳細に調べていく予定である。

【文献】

Dokoshi, T., Zhang, L.J., Li, F., Nakatsuji, T., Butcher, A., Yoshida, H., Shimoda, M., Okada, Y. & Gallo,

RL.: Hyaluronan degradation by cemip regulates host defense against staphylococcus aureus skin infection. *Cell Rep.* 2020; **30**: 61-68. e4.

リゾ型血小板因子特異的ホスホリパーゼDの創製と体外臨床診断薬キットへの応用

杉森大助

(福島大学共生システム理工学類 物質科学コース)

【目的】

放線菌 *Thermocrispum* sp. RD004668 が分泌生産するリゾプラズマローゲン (LyPls) 特異的ホスホリパーゼ D (LyPls-PLD) はコリン型リゾプラズマローゲン (LyPlsCho) に対して最も良く作用し、その活性を100%とした場合、リゾ型血小板活性化因子 (LysoPAF) には約 50% の活性を示した。LysoPAF は冠動脈性心疾患 (Coronary Heart Disease:CHD) リスク評価のバイオマーカーであることから、LyPls-PLD は CHD リスク評価検査キットに応用可能である。そこで本研究では、学術的な興味も含め LyPls-PLD の基質特異性を逆転させる、つまり LyPlsCho よりも LysoPAF に作用するよう

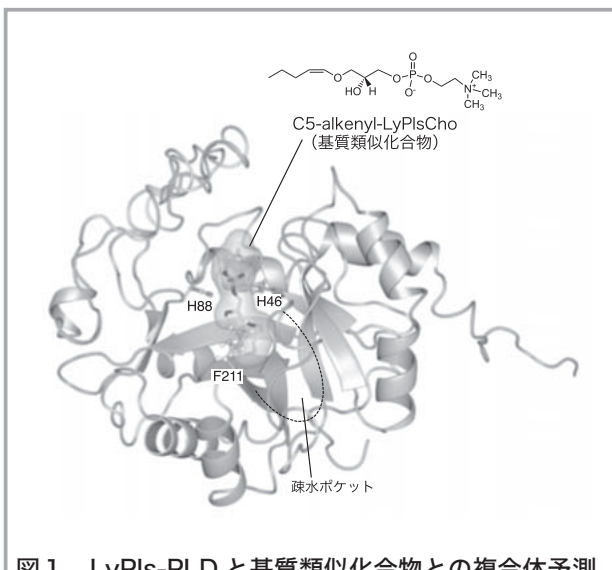


図1 LyPls-PLD と基質類似化合物との複合体予測モデル

H46 と H88 は触媒残基と予想され、F211 は基質分子の sn-1 位アルキルエーテル鎖が結合するポケット入口に存在すると予想された。基質類似化合物のサーフィスは各原子の van der Waals 半径を示している。

に機能改変させることを目的とした。また、機能改変を通して基質識別メカニズムについて考察することを旨とした。

【方法】

LyPls-PLD の X 線結晶構造解析は未完了であったため立体構造モデル予測と基質類似化合物のドッキングシミュレーション解析により、酵素基質複合体予測を行った (図1)。基質認識に関与すると推測した5ヶ所のアミノ酸残基に置換を導入し、基質特異性が変化した変異型酵素を取得した。顕著な変化を示した変異体については精製し、速度論解析により基質識別メカニズムについて考察した。

【結果】

211 番フェニルアラニン (F211) を側鎖体積がより小さな疎水性アミノ酸に置換した変異体において興味深い結果を得た (図2)。なかでも F211L 変異体は LysoPAF に対する活性が WT の約 2 倍向上し、LyPlsCho に対する活性が約 1/13 まで低下した。また、LysoPAF に対する k_{cat}/K_m は WT の約 5 倍に達した (表1)。

【考察】

F211 が基質特異性に深く関与するという結果は、図3に示すように F211 が基質結合ポケットの入口に位置

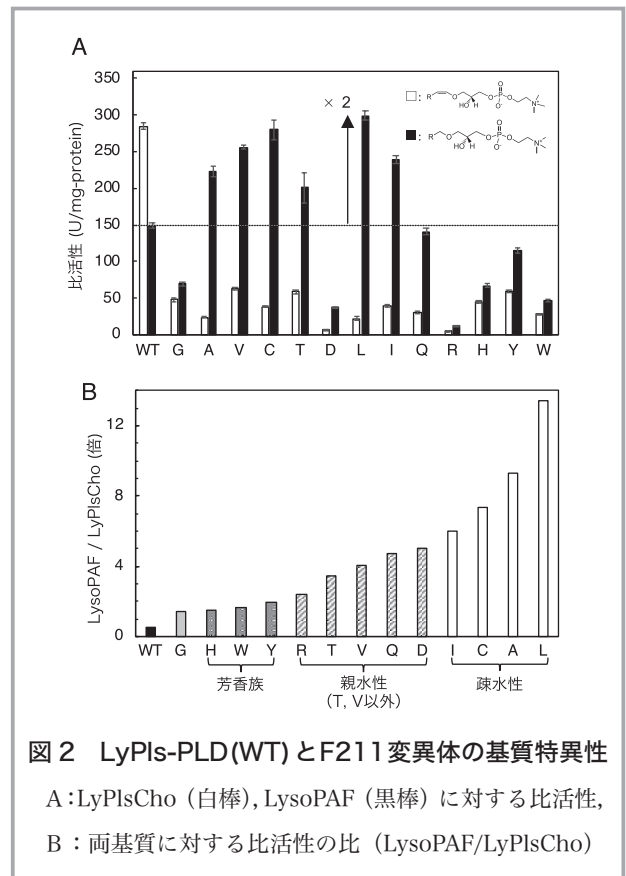


図2 LyPls-PLD (WT) と F211 変異体の基質特異性
A: LyPlsCho (白棒), LysoPAF (黒棒) に対する比活性,
B: 両基質に対する比活性の比 (LysoPAF/LyPlsCho)

		K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
LyPlsCho	WT	88.9±8.8	122±4	1371±141
	F211L	76.7±12.6	21.0±0.9	271±46
LysoPAF	WT	56.4±16.9	74.0±4.9	1303±400
	F211L	26.8±8.6	187±6	6970±2239

表1 LyPls-PLD (WT) と F211L 変異体の動力学定数

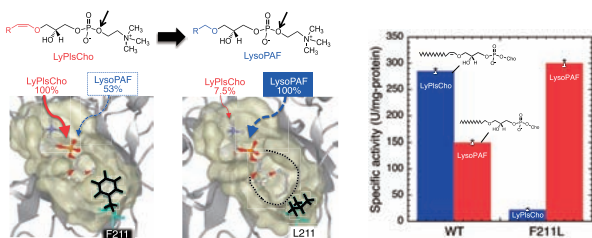


図3 基質類似化合物と WT, F211L 変異体の複合体予測モデルおよび基質特異性

すると予想された点からもリーズナブルな結果といえる。

次に、表1に示す動力学パラメーター (k_{cat} , K_m) から、基質認識メカニズムについて以下のように考察した。まず、基質である LyPlsCho と LysoPAF の構造の違いに注目すると、LyPlsCho の *sn*-1 位は剛直なアルケニルエーテル結合のためアルキル鎖の回転を伴う屈曲が制限されるのに対し、LysoPAF はアルキルエーテル結合のためそのアルキル鎖は LyPlsCho のそれよりも柔軟な回転・屈曲が許容される。結果として、LyPlsCho よりも LysoPAF は酵素の疎水ポケットに結合しやすいものの、ポケット内で動くために触媒作用を受け難いと考えられる。F211L 変異体の速度論解析の結果から、F211L 変異体ではフェニルアラニンよりもアミノ酸側鎖体積が小さいロイシンに置換されたことによって LyPlsCho はやや結合しやすくなるものの、それでもなおアルケニルエーテル鎖の剛直さゆえ触媒作用を受ける前に酵素基質複合体から解離してしまうために WT よりも k_{cat} が低下したのだろうと考えた。一方、LysoPAF に関してはアルキルエーテル鎖の柔軟さから、より一層基質結合ポケットに結合しやすくなり、ポケット内で動いてもサイズの小さいロイシンになったことによりその動きが許容されスムーズに酵素基質複合体を形成して触媒作用を受けやすくなったと考えられる。

最後に、報告者は、より詳細な考察を行うために LyPls-PLD の X線結晶構造解析を進めてきた。最近に

なって、Spring8 において WT, F211L, ES 複合体の 3 種類の回折データが取得できたため、現在構造解析を進めている。

【文献】

- 1) Takayuki, Oyama., Kazutaka, Murayama. & Daisuke, Sugimori: Switching the substrate specificity of lysoplasmalogen-specific phospholipase D, *FEBS Open Bio*, 11(4), 1132-1143 (2021).
- 2) 杉森大助, オレオサイエンス, 偏在性リン脂質定量用ホスホリパーゼの開発, Vol.21 No.8, P.3-10, (2021).
- 3) 旧式酵素探索法・非データ駆動型ウェット実験で見つけたホスホリパーゼの試験管内分子進化と社会実装, *化学と生物 (解説)*, Vol.59 No.10, P.488-494, (2021).

マルトトリオシル配糖体合成酵素における糖転移反応の分子基盤

炭谷 順一

(大阪府立大学生命環境科学研究科)

【目的】

本研究では、X線結晶解析や NMR を用いた構造生物学的アプローチと変異酵素を用いた酵素化学的アプローチを組み合わせて、マルトトリオシル配糖体合成酵素の糖転移活性が上昇した変異酵素 L191R に着目し、糖転

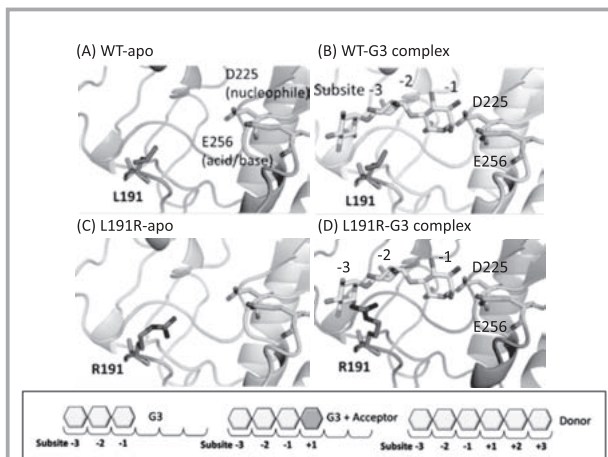


図1 WT および L191R のアポ型および G3 複合体のマイナス側サブサイト構造の比較

移活性が上昇した構造基盤と作用機序を明らかにすることで、糖質加水分解酵素の加水分解活性と糖転移活性を別つ分子機構について知見を得ることを試みる。

【方法】

変異酵素遺伝子の作製は、メガプライマー PCR 法を用いて行い、*Brevibacillus* を宿主、pBIC3 を発現プラスミドとして各種変異酵素遺伝子を導入した形質転換体の培養上清から、各種クロマトグラフィーを経て変異酵素を精製し、濃縮した。得られた精製酵素を Sitting drop 蒸気拡散法により針状結晶を取得し、SPRing-8 にて回折データを取得することで X 線結晶構造解析を行った。

【結果と考察】

WT と L191R のアポ型と G3 複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ (図 1), 触媒残基 (D225, E256) の位置は一致しており, WT のアポ型と G3 複合体における L191 の配置も一致していた。しかし L191R のアポ型と G3 複合体における R191 の配置を比較すると, アポ型では側鎖がサブサイト +1 側に向いている

のに対し, G3 複合体では側鎖がサブサイト -2 側に向いていた。また, L191R の求核残基欠失変異酵素 L191R/D225A と G4 の共結晶を解析したところ, マイナス側サブサイトには微弱ながら残存する触媒作用を受けた G3, プラス側サブサイトには G4 が配置していたが, R191 側鎖はサブサイト -2 とサブサイト +1 に存在するグルコース残基に向いていた (図 2A)。さらに L191R/D225A-G3-G4 複合体結晶を G6 溶液に浸漬することで作製した L191R/D225A G6 複合体では, R191 側鎖の配置については揺らぎが大きく電子密度として確認することができなかった (図 2B)。以上の結果から, 糖転移活性が上昇した変異酵素 L191R は, R191 側鎖がマイナス側サブサイトに存在する糖転移反応の供与体となる G3 のグルコース残基と相互作用しながら, プラス側サブサイトに存在する糖受容体となるグルコース残基とも相互作用することで糖転移反応を促進している可能性が考えられた。

また, 糖転移反応の際に G3 受容体となる基質が配置するプラス側サブサイトに存在する F258, P259, G260 から構成されるループに着目してみると, プラス側サブサイトに基質が存在しない L191R のアポ型や G3 複合体での配置と, プラス側サブサイトに基質が存在する L191R/D225A-G3-G4 複合体や G6 複合体における配置では異なっていることがわかった (図 3)。この F258-G260 ループは, アノマー保持型酵素の二段階目の加水分解と糖転移の分かれ目となる反応に関与する酸塩基触媒である E256 と非常に近く, このループの配置の変化は二段階目の反応に大きく影響する可能性が考えられた。プラス側サブサイトにおける基質の存在が酸塩基触媒の配置を制御している可能性が考えられ, その制御に F258-G260 ループが大きな影響を与える可能性が示唆された。

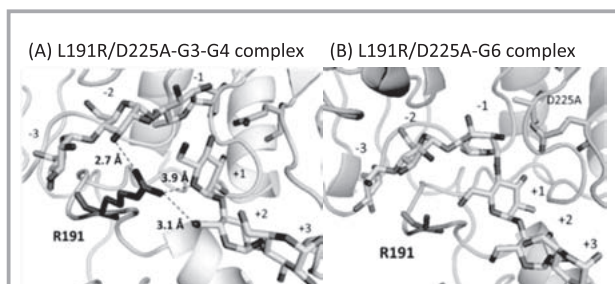


図 2 L191R-G3-G4 複合体 (A) と L191R/D225A-G6 複合体 (B) における R191 側鎖の比較

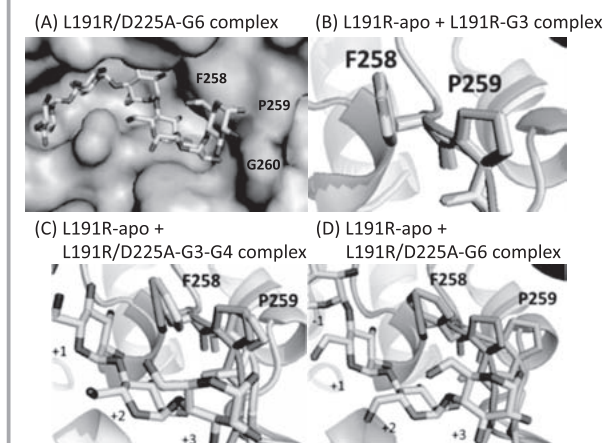


図 3 L191R-apo と L191R および L191R/D225A 基質複合体の重ね合わせ

**流行性耳下腺炎のウイルス酵素阻害剤の探索による
抗ウイルス剤および診断薬の開発**

高橋 忠伸

(静岡県立大学大学院薬学研究院)

【目的】

流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）は日本国内だけで毎年 40 万人～140 万人に感染する小児を中心とする急性ウイルス性疾患である。現状の治療は対症療法のみであり、病因のムンプスウイルスに直接作用する特異的な抗ウイルス剤は無い。任意接種の国内ワクチンは費用が自己負担で接種率 30%と低く、国内流行を制御できていない。青年期の発症では精巣炎や卵巣炎を起し、「不妊」の原因になる。無菌性髄膜炎、脳炎、難聴は、ムンプスウイルスによる中枢神経障害の合併症である。特に難聴は代表的な合併症で「ムンプス難聴」と呼ばれ、乳幼児・小児の感染時に気づかずに、回復して相当な時間が経ってから発覚することが多い。ムンプス難聴、不妊は完治することの無い永続的な後遺症となる。発症すると回復の見込みの無いムンプス難聴、不妊などの合併症は、ムンプスウイルスが神経組織や内分泌腺に直接侵攻したことに起因する。現状ではウイルスに直接作用する薬剤は無く、予測できない後遺症の発症を直接防ぐことはできない。ムンプスウイルスに特異的に直接作用して抗ウイルス効果を示す治療薬を開発することで、ムンプスウイルス感染による重篤な合併症や後遺症を直接防ぐことができる。学校などで集団流行の発生時、ワクチンを接種しても即時的な予防効果は期待できない。一方、ウイルスに直接作用する抗ウイルス剤は投与後すぐに予防効果が期待でき、周囲への流行拡大を防ぐ即効性の高い予防薬としても利用できる。抗ウイルス剤を患者に適切に処方するため、臨床現場で高感度、簡易、迅速に感染を確定する診断薬が必須である。そのため、抗ウイルス剤と診断薬はセットで開発することに意義がある。ムンプスウイルスに特異的な化合物の構造を利用して、ウイルス特異的な酵素活性の検出剤を開発することで、ムンプスウイルス感染による流行性耳下腺炎を確定する診断薬を開発できるものと考えられる。

ムンプスウイルスの表面酵素ヘマグルチニン-ノイラ

ミニダーゼ (HN) の酵素活性「シアリダーゼ活性」はウイルス増殖に必須である。本研究は、HN の認識構造のシアル酸 (*N*-アセチルノイラミン酸, Neu5Ac) の誘導体から酵素活性を特異的に強力に阻害する低分子化合物を探索することで、ムンプスウイルスの増殖を直接抑制する抗ウイルス剤の開発をめざす。これにより、ムンプスウイルス感染による重篤な合併症や後遺症を直接防ぐことができる。将来、代表者らが開発したムンプスウイルス HN 酵素活性の蛍光イメージング剤を利用して¹⁾、ムンプスウイルスを特異的、高感度に検出する診断薬の開発をめざす。

【方法】

ムンプスウイルスの表面酵素である HN が認識する基質構造 Neu5Ac の誘導体でムンプスウイルスの増殖阻害剤として唯一報告されている、シアリダーゼ阻害剤の 2-デオキシ-2,3-ジデヒドロ-*N*-アセチルノイラミン酸 (DANA) (図 1)²⁾を骨格構造に DANA の誘導体を合成して、37°C、30 分間、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) における HN 発現 293T 細胞のシアリダーゼ活性の 50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) を、4-メチルウンベリフェリル-Neu5Ac を蛍光基質として使用して測定した。すべての実験で DANA の IC₅₀ 値を基準に実験誤差を補正し、各誘導体の独立した 3 回の結果から、各誘導体の IC₅₀ 値を、統計表計算ソフトウェア GraphPad Prism v5.0 を用いて計算した。

シアリダーゼ阻害効果の高い (IC₅₀ 値の低い) 3 つの誘導体の安全性の指標として、細胞毒性を測定した。DANA は既報のシアリダーゼ阻害剤として用いた。ムンプスウイルスの感染や増殖に使用されるアフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞に、DANA および各誘導体を添加後、37°C、24 時間培養した。細胞毒性を起し、細胞内から培養上清中へ漏出した乳酸脱水素酵素

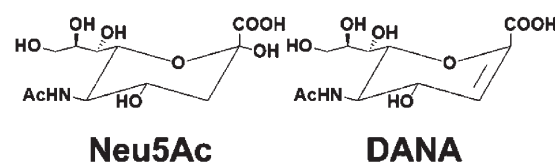


図 1 Neu5Ac と DANA の構造

(Lactate dehydrogenase, LDH) 量を, CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay kit を使用して測定した. キット付属の Lysis 試薬により, 実験条件において全細胞を溶解して最大の LDH 放出量を求めた. この時の最大 LDH 量をポジティブコントロールの 100% として, 各誘導体の濃度依存的な細胞毒性 (相対 LDH 放出量) を測定した.

シアリダーゼ阻害効果を示す誘導体を実際に, ムンプスウイルスの増殖を抑制するのか評価した. コンフルエント Vero 細胞に, $2^{5-6} \times 10^{-3}$ 赤血球凝集活性 (hemagglutination units, HAU) のムンプスウイルス (13V165E2 株)¹⁾ を 37°C, 1 時間感染させた. 細胞を洗浄後, 10 段階希釈した誘導体 (0.01~100 μ M) を含有する無血清培地 (ウイルス感染を促進する 2 μ g/ml アセチル化トリプシン含有) で感染細胞を 37°C, 48 時間培養して, ウイルスを増殖させた. 回収した培養上清は遠心 (4°C, 800 \times g, 9 分間) により浮遊した細胞を沈降させ, 遠心後の上清は感染価測定まで -80°C で保存した. 上清中のウイルス感染価として focus-forming units (ffu) を, フォーカス形成アッセイで求めた.

誘導体のムンプスウイルスに対する特異性を検討するため, ムンプスウイルスの IC₅₀ 測定時と同条件で, ムンプスウイルス HN 発現 293T 細胞と A 型インフルエンザウイルス (A/Hong Kong/1/1968 H3N2 型株) のノイラミニダーゼ (NA) 発現 293T 細胞のシアリダーゼ活性を, 10 μ M または 100 μ M の誘導体および DANA

添加時において測定した.

【結果】

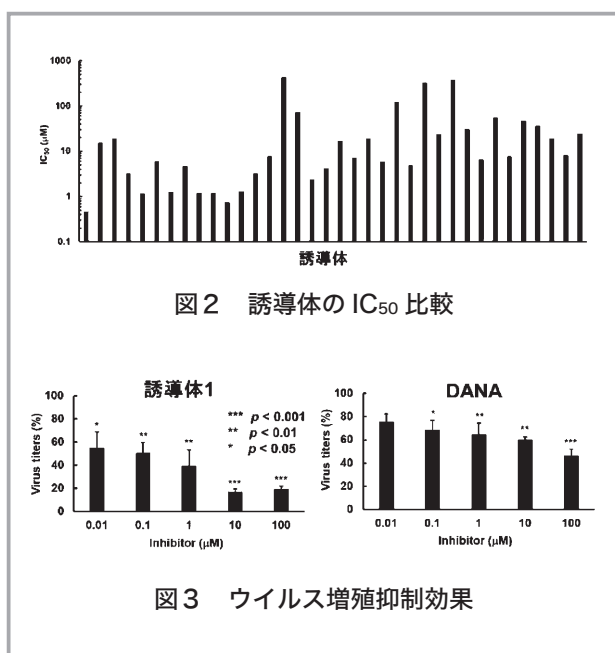
既知のムンプスウイルスシアリダーゼ阻害剤の DANA (IC₅₀ 5 μ M) を基準に各誘導体の IC₅₀ 値を測定し (図 2), DANA よりも高いシアリダーゼ阻害効果を示す誘導体を創出した.

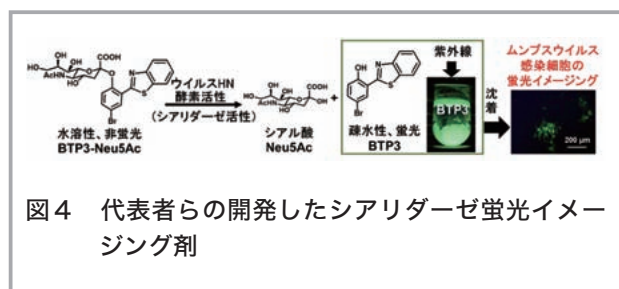
シアリダーゼ阻害効果の高い 3 つの誘導体で, Vero 細胞に対する細胞毒性は 100 μ M まで見られなかった. 細胞毒性を示さなかった誘導体の中の 1 つの誘導体 1 は, 既存の DANA よりも高いウイルス増殖抑制効果を示した (図 3).

抗インフルエンザ薬として市販されているシアリダーゼ阻害剤は, インフルエンザウイルスに対して極めて高い特異性を示す. 宿主細胞の内在性シアリダーゼに影響を与えないと予想されることから, 重大な副作用のリスクは極めて低くなる. このように, 抗ウイルス薬として利用するためにはウイルス特異性が重要と考えられる. ムンプスウイルス HN のシアリダーゼ活性は, 10 μ M および 100 μ M の誘導体 1 および DANA 添加のすべてでほぼ消失した. 一方, インフルエンザウイルス NA のシアリダーゼ活性は, 10 μ M および 100 μ M の誘導体 1 添加でほぼ阻害されず残存していた. 10 μ M および 100 μ M の DANA 添加ではインフルエンザウイルス NA のシアリダーゼ活性はほぼ消失した. ムンプスウイルス HN で, 誘導体 1 は DANA と比較して高いシアリダーゼ阻害効果を示す. 一方, インフルエンザウイルス NA では, DANA と比較して誘導体 1 は明確なシアリダーゼ阻害効果を示さなかった. 誘導体 1 はムンプスウイルス HN に高い特異性を示すことが示唆された.

【考察】

最近, 代表者は緑茶成分で代表的なカテキン類について抗ムンプスウイルス効果とそのメカニズムを調べた (*J. Funct. Foods* に受理). しかし, ムンプスウイルスのシアリダーゼ活性阻害をターゲットにした低分子化合物のウイルス感染増殖抑制剤は 1986 年に DANA が報告されて以降²⁾, 報告されていない. 本研究では, シアリダーゼ阻害効果およびウイルス増殖抑制効果が既報の DANA よりも高い低分子化合物を得た. さらに, DANA はいろいろなウイルスや菌, 哺乳動物細胞のシアリダーゼ活性に阻害効果を示すため, ムンプスウイル





スに対する特異性は無い。本研究では、インフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性と比較して、ムンプスウイルスに対して明らかに特異性の高い低分子化合物を得た。今回得た化合物構造は、今後、抗ムンプスウイルス薬のリード化合物として貢献することが期待される。また、インフルエンザウイルスなど他のウイルス、菌などのシアリダーゼとの違いや基質認識機構を研究するためのツールとしても貢献する。

代表者は、共同研究者（広島国際大学薬学部 池田潔先生、大坪忠宗先生）とシアリダーゼ蛍光イメージング剤を開発してきた。イメージング剤は、疎水性の緑色蛍光物質（2-ベンゾチアゾール-2-イル）-4-ブロモフェノール（BTP3 と省略）のフェノール性 OH 基に、シアル酸の Neu5Ac を付加して蛍光性を OFF 制御させた化合物である。シアリダーゼ活性により Neu5Ac が加水分解されると、疎水性蛍光物質の BTP3 がその酵素活性の存在部位に沈着して、固定化や抗体を必要とせずに 5~15 分程度で蛍光イメージングできる（図4）^{1,3,4)}。

BTP3-Neu5Ac 構造のシアリダーゼが認識する基質構造 Neu5Ac を、ムンプスウイルスに特異性の高い構造に変換することで、ウイルスのシアリダーゼ活性を特異的に検出するムンプスウイルス診断薬に利用できる蛍光イメージング剤が開発できるものと期待される。BTP3-Neu5Ac によるインフルエンザウイルスのシアリダーゼ検出法の改良により、市販のイムノクロマト法を原理とするインフルエンザ診断薬以上の検出感度で、15 分程度でウイルス検出可能な方法を確立した⁵⁾。本研究で明らかになってきたムンプスウイルスのシアリダーゼに特異性の高い誘導体構造を、BTP3-Neu5Ac の Neu5Ac 構造に導入することで、ムンプス診断薬に利用できるムンプスウイルス特異的なシアリダーゼ蛍光イメージング剤を開発していく。また、インフルエンザウイルスでは薬剤耐性ウイルスが出現してきた。ムンプスウイルスに

ついて、今回開発したシアリダーゼ阻害剤を用いて薬剤耐性化機構を調査していく。

【文献】

- 1) Takahashi, T., Agarikuchi, T., Kurebayashi, Y., Shibahara, N., Suzuki, C., Kishikawa, A., Fukushima, K., Takano, M., Suzuki, F., Wada, H., Otsubo, T., Ikeda, K., Minami, A. & Suzuki, T.: Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells, *PLoS ONE*, **10**, e0144038 (2015).
- 2) Waxham, M. N. & Wolinsky, J. S.: A fusing mumps virus variant selected from a nonfusing parent with the neuraminidase inhibitor 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid, *Virology*, **151**, 286-295 (1986).
- 3) Kurebayashi, Y.*, Takahashi, T.*(*equally as first authors), Otsubo, T., Ikeda, K., Takahashi, S., Takano, M., Agarikuchi, T., Sato, T., Matsuda, Y., Minami, A., Kanazawa, H., Uchida, Y., Saito, T., Kawaoka, Y., Yamada, T., Kawamori, F., Thomson, R., von Itzstein M. & Suzuki, T.: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells, *Sci. Rep.*, **4**, 4877 (2014).
- 4) Kurebayashi, Y.*, Takahashi, T.* (*equally as first authors), Miura, T., Otsubo, T., Minami, A., Fujita, Y., Sakakibara, K., Tanabe, M., Iuchi, A., Ota, R., Ikeda, K. & Suzuki, T.: Fluorogenic probes for accurate in situ imaging of viral and mammalian sialidases, *ACS Chem. Biol.*, **14**, 1195-1204 (2019).
- 5) Kato, D.*, Kurebayashi, Y.*, Takahashi, T.*(*equally as first authors), Otsubo, T., Otake, H., Yamazaki, M., Tamoto, C., Minami, A., Ikeda, K. & Suzuki, T.: An easy, rapid, and sensitive method for detection of drug-resistant influenza virus by using a sialidase fluorescent imaging probe, BTP3-Neu5Ac, *PLoS ONE*, **13**, e0200761 (2018).

青色光受容体フォトリポ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し、植物の成長を促進する。我々はモデル植物シロイヌナズナを用いた順遺伝学的解析から、青色光受容体キナーゼであるフォトリポピンのリン酸化基質として BLUS1 キナーゼを同定し、BLUS1 が気孔開口の駆動力を形成する細胞膜 H⁺-ATPase の活性化に必須であることを明らかにした。本研究では、BLUS1 が H⁺-ATPase の活性化を導く分子機構をさらに理解するために、BLUS1 の C 末端領域に着目した機能解析を行った。

【方法】

BLUS1 は N 末端側にキナーゼドメインをもち、C 末端側に機能未知の配列をもつ。この C 末端領域の機能を明らかにするために、BLUS1 の C 末端領域を 30 アミノ酸ずつ欠損させた断片タンパク質を blus1 変異体に導入し、気孔応答を詳しく解析した。

【結果】

上記形質転換体を用いた機能解析から、BLUS1 の C 末端領域には自身のキナーゼドメインを抑制する自己阻害領域が存在することを示した。さらにフォトリポピンによるこの領域内の Ser 残基のリン酸化はこの抑制の解除に働き、BLUS1 を活性化させることを示した。この形質転換体では H⁺-ATPase が常に活性化されているにも関わらず、暗所では気孔開口を示さず、光合成が飽和する強い赤色光下で大きな開口を示すことを見出した。詳細な解析により、この現象には光合成による葉内 CO₂ 濃度の低下が関係することが分かった。さらにこの形質転換体では青色光を照射すると気孔が著しく閉鎖する現象がみられ、これにはフォトリポピンが関与することが明らかとなった。

【考察】

本研究では、BLUS1 を介した詳細なシグナル伝達機構に加え、光による気孔開口には BLUS1 を介した細胞

膜 H⁺-ATPase の活性化に加え、光合成による葉内 CO₂ 濃度の低下が同時に起こることが必要であることを明らかにした。また、フォトリポピンは気孔開口を誘導するのみならず、気孔が開き過ぎないように開口を抑制し、気孔開度を厳密に制御する働きをもつことを明らかにした。本研究を通じて、植物が変動する光環境下において気孔開度を最適化する分子機構の一旦が明らかとなった。

【文献】

Hosotani, S., Yamauchi, S., Kobayashi, H., Fuji, S., Koya, S., Shimazaki, K. & Takemiya, A.: A BLUS1 kinase signal and a decrease in intercellular CO₂ concentration are necessary for stomatal opening in response to blue light, *Plant Cell*, **33**, 1813-1827 (2021).

マクロファージの極性を制御するタンパク質架橋酵素の解析

辰川 英樹

(東海国立大学機構名古屋大学大学院創薬科学研究科)

【目的】

慢性腎臓病は日本国内で 1,330 万人 (成人の 13%) が罹患する国民病であり、組織の硬化 (線維化) を伴う末期の機能不全に至る共通所見として、組織へのマクロファージの広範囲の浸潤がある。実際に虚血再灌流や尿管結紮による腎障害モデルにおいて、特定のマクロファージの抑制は病態を有意に改善する (Sung SA *et al.* 2007, Kim MG *et al.* 2015) ことから、病態の治療標的としての重要性が示されている。

マクロファージは組織の微小環境の変化によって感染防御や死細胞除去に関わる M1 型と障害を受けた組織の再生に関わる M2 型の極性の異なる 2 種類のサブタイプに大別される。慢性炎症組織の過剰な修復を伴う線維化疾患では、M2 型マクロファージの組織浸潤が病態形成に寄与する。申請者はこれまでに特定のグルタミン残基とリジン残基の間にイソペプチド結合を形成するタンパク質架橋酵素トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) が M2 型マクロファージの極性化と組織浸潤に関わることを見

出した。本研究はTG2を標的として、M2型マクロファージの極性化に関わる分子機構を解明し、制御方法に繋げることを目的とする。

【方法】

細胞レベルでM2マクロファージの極性化機構を調べるため、マウスから単離した腹腔マクロファージおよび線維芽細胞(L929)上清培地により骨髄から分化させたマクロファージを用いた。加えて、ヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)由来のヒトマクロファージも併せて解析し、一部のmRNAについて次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。これらの細胞に対して、M2マクロファージの誘導因子であるIL-4を処理し、TG2 siRNAやTG2阻害剤処理下での比較検討により、M2マクロファージの極性化におけるTG2の役割を解析した。

TG2欠損マウスが腎線維化および腎臓に浸潤するマクロファージを有意に抑制することから、腎臓浸潤したマクロファージを解析するため、一側尿管結紮法(UUO)処置したマウスを用いてフローサイトメトリー(FACS)により細胞特性を調べた。さらに、GFP発現マウス由来の骨髄細胞を単離してX線照射レシピエントマウスに移植し、病態増悪と共に腎臓に浸潤する細胞の系譜解析を行った。同様に野生型およびTG2欠損マウス由来の骨髄を単離し、それぞれ野生型および欠損マウスに移植した後にUUOによる腎線維化の程度を比較解析した。

【結果】

IL-4処理したマウスおよびヒト由来のマクロファージでは、TG2の発現量が増加すると共にM2マクロファージのマーカー遺伝子が顕著に増加した。一方、TG2 siRNAやTG2阻害剤の処理下では、M2マクロファージの極性化は有意に抑制された。TG2は潜在型TGF- β 結合タンパク質を細胞膜表面に架橋固定し、TGF- β の活性化を誘導することが知られているため、TG2の細胞透過性および非透過性阻害剤の効果を検証したところ、細胞透過性の阻害剤のみM2マクロファージの極性化を抑制した。TG2によるM2マクロファージの極性化機構をさらに解析するため、次世代シーケンスを実施したところ、IL-4処理により発現が上昇し、かつTG2阻害剤により発現が低下する遺伝子群の抽出に成功した。これらの遺伝子については現在解析中であるが、脂

肪酸の代謝に関わる因子が多く抽出されたことは興味深い。

次に、一側尿管結紮法による腎線維化モデルマウスを用いて、病態形成に伴い腎臓に浸潤する分極化マクロファージを解析した。TG2欠損マウスにおいては腎臓内に浸潤したM2マクロファージ(F4/80^{high}CD11b⁺MRC-1⁺)が顕著に消失した。さらに、GFPを発現する骨髄細胞の移植によりTG2依存的に誘導されるM2マクロファージの由来について調べたところ、同細胞は骨髄由来ではなく、常在性の細胞からの形質転換由来であることが示唆された。同様に、TG2欠損マウスの骨髄移植実験により、常在性の細胞でのTG2の欠失が腎線維化の誘導に影響することを見出した。

【考察】

今回の解析から、腎線維化の分子機構においてTG2がマクロファージの腎浸潤およびM2型の極性化に関わること、さらに同M2マクロファージは常在性の細胞由来で誘導されることが明らかになった。

【文献】

Tatsukawa, H. & Hitomi, K.: Role of Transglutaminase 2 in Cell Death, Survival, and Fibrosis., *Cells.*, **10**, 1842 (2021).

タンパク質凝集体代謝酵素の構造・機能解析

田中元雅

(理化学研究所脳神経科学研究センター)

【目的】

神経変性疾患には中高年で発症するものが多く、アルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などを含む。これらの神経難病では、原因タンパク質が細胞内または外で凝集し、 β シートを多く含む線維状の凝集体である“アミロイド”を脳内に蓄積する¹⁻³⁾。このようなアミロイドの蓄積は、細胞毒性や脳内および脳-末梢間での凝集体伝播に深く関与すると考えられている。アミロイドは自発的に生成するが、複数の細胞内因子によってその凝集化の速度が変化することが知られている。また、アミロイドは細胞内因子によって分断、脱凝集されることも最近、分かっている⁴⁾。このように、細胞内因

子がアミロイドの生成および断片化に関わると示唆されるが、その詳細には不明な点が多い。

そこで本研究では、これまでに我々が新たに開発してきた実験系を応用しアミロイド研究に適した酵母プリオンタンパク質 Sup35 の実験系を用いて、アミロイドの生成・代謝のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

酵母プリオンタンパク質 Sup35 の凝集ドメインである Sup35NM と各種細胞内因子をリコンビナントタンパク質として高度に精製し、Sup35NM の凝集化および Sup35NM アミロイドに対する細胞内因子の添加の影響を調べるため、アミロイドに特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T を用いた蛍光法やウエスタンブロッティングを用いた沈降実験、原子間力顕微鏡による観察などから、細胞内因子の影響を評価した。

【結果】

チオフラビン T を用いた蛍光法から、Sup35NM タンパク質の凝集化が、各種細胞内因子によって著しく促進することを見出した。また、その凝集加速化は、温度や緩衝液の組成などの反応条件によっても大きく変化することが明らかになった。また、原子間力顕微鏡による観察により、各種細胞内因子によって Sup35NM の凝集化が促進されることを見出し、促進化される際には多くの短いアミロイド断片が観察されることが明らかになった。一方で、細胞内因子の条件によっては、アミロイドの凝集化を阻害する可能性があることも見出した。これらの結果は、アミロイド生成における複雑な制御機構を示唆している。

さらに、Sup35NM アミロイドを基質に用いて各種細胞内因子の影響を詳しく調べたところ、アミロイドが脱凝集されること、Sup35NM アミロイドの構造に依存して脱凝集効率が大きく異なることを明らかにした。また、それぞれの細胞内因子がアミロイドに対して協調的に働くことによって、アミロイドが効率的に断片化されることを見出した。その結合パラメータの生物物理的な解析から、複数の細胞内因子がアミロイドに順番に結合することを明らかにした。また、その実験結果は、超遠心を用いた沈降実験実験からも支持された。

【考察】

本研究によって、アミロイドが生成および代謝されて

いく過程を調べる実験系を確立した。それによって、アミロイドの生成および脱凝集反応において、細胞内因子によって受けている精密な制御機構の一端を明らかにした。本研究で得られた技術や成果は、他の多くのアミロイド研究にも応用が可能であると期待される。

【文献】

- 1) Tanaka, M. & Komi, Y.: Layers of structure and function in protein aggregation. *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 373 (2015).
- 2) Ohhashi, Y., Yamaguchi, Y., Kurahashi, H., Kamatari, Y.O., Sugiyama, S., Uluca, B., Piechatzek, T., Komi, Y., Shida, T., Müller, H., Hanashima, S., Heise, H., Kuwata, K. & Tanaka, M.: Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 2389 (2018).
- 3) Shida, T., Kamatari, Y.O.*, Yoda, T.*, Yamaguchi, Y., Feig, M., Ohhashi, Y., Sugita, Y., Kuwata, K. & Tanaka, M.: Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion. *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 756 (2020).
- 4) 中川幸姫, 田中元雅: シャペロンによるプリオン凝集体の形成と伝播の制御, *蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで*, 医学のあゆみ, 医歯薬出版, 1111 (2018).

【謝辞】

公益財団法人日本応用酵素協会の酵素研究助成に深謝いたします。

RNA- タンパク質複合体の再編成を駆動する RNA ヘリカーゼの網羅的同定方法の開発

谷 口 一 郎

(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

【目的】

RNA ヘリカーゼは ATP 依存的に RNA とタンパク質との複合体 (Ribonucleoprotein: RNP) の形成または解体 (再編成) を促進する。ただし、細胞には多くの RNA ヘリカーゼが存在し RNP も膨大にあり、どの

RNA ヘリカーゼがどの RNP 再編成に関与するか、不明な点が多い。そこで本研究では、RNP 再編成に関与する RNA ヘリカーゼを同定するための統一的方法の開発を目的とした。

【方法】

RNP 再編成に関与する RNA ヘリカーゼを同定するため、HeLa 細胞の核抽出液を用いた RNP 再編成の試験管内再構成系を構築する。その実験系において ATP 依存性を調べる。RNP 再編成が ATP 依存性である場合、何らかの RNA ヘリカーゼの関与が推測されるので、RNA ヘリカーゼを生化学的に探索する。

次に、候補となった RNA ヘリカーゼが RNP 再編成に関与するかを検証するために、その組換えタンパク質を試験管内再構成系へ添加する。その結果、RNP 再編成が促進されるかを調べる。

最後に、試験管内再構成系で同定された RNA ヘリカーゼが細胞内で機能するかを検証する。そのために、アフリカツメガエル卵母細胞への顕微注入実験やヒト培養細胞でのノックダウン実験を行う。

【結果と考察】

① 輸送 U snRNP 形成を促進する RNA ヘリカーゼ

スプライシングに関わる U snRNA に着目し、その核外輸送複合体（輸送 U snRNP）形成の試験管内再構成系の構築に成功した。輸送 U snRNP 形成は ATP 依存性であることがわかり、候補 RNA ヘリカーゼとして輸送 U snRNP と相互作用する UAP56 を同定した。試験管内において、UAP56 の組換えタンパク質が輸送 U snRNP 形成を促進した。アフリカツメガエル卵母細胞では、UAP56 に対する抗体が U snRNA の核外輸送を阻害した。以上の結果は、UAP56 が U snRNA 核外輸送に関与することを示す。以上の研究成果に関して、現在、論文投稿準備中である。

② hnRNP 解体を促進する RNA ヘリカーゼ

mRNA は核内で転写後に一群のタンパク質と安定な複合体（hnRNP）を形成する。その後、hnRNP 中のタンパク質は RNA から解離し、mRNA の核外輸送を担うタンパク質群（輸送 mRNP）に置き換わる必要がある。hnRNP の中心的因子である hnRNP C に焦点を絞り、hnRNP C の RNA からの解離の試験管内再構成系を構築した。この実験系において hnRNP C は ATP 依

存的に RNA から解離することがわかった。さまざまな RNA ヘリカーゼの組換えタンパク質を用いた結果、特定の RNA ヘリカーゼ群に解離活性があることがわかった。今後、それらが hnRNP 解体に関与するかを HeLa 細胞のノックダウン実験を利用して検証する。

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】

申請者らは上述の研究目的のもと、2018 年度、2019 年度の「酵素研究助成」により以下のことを明らかにした。TET3 欠損体細胞核移植胚は、①着床前の胎生 3.5 日までは発生率に顕著な影響がないが、②全く着床せず、③胚が着床する胎生 4.5 日において壁栄養外胚葉形成に異常を生じる。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。⑥着床前の胎生 3.5 日において顕著にメチル化レベルが上昇している。そこで本研究では、全能性に必要なメチル化状態を明らかにするために、胎生 4.5 日の受精胚、体細胞核移植胚、TET3 欠損体細胞核移植胚の単一胚 RNA-seq 解析およびその情報解析を行い、壁栄養外胚葉形成異常に関連する hub genes を探索し、TET3 欠損によるこれらの遺伝子領域の DNA メチル化状態への影響を調べた。

【結果】

受精胚，体細胞核移植胚，TET3 欠損体細胞核移植胚間の遺伝子発現を比較し，TET3 欠損体細胞核移植胚で特異的な発現状態を示す遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群の PPI (protein-protein interaction) networks 解析を 12 種類の異なる方法を用いて行い，それぞれの方法でトップ 10 の hub genes を同定した。重複を除くと 12 種類の方法で 46 個の hub genes が同定された。同定した hub genes について，そのプロモーター領域，gene body 領域の DNA メチル化状態に TET3 欠損が与える影響を調べた結果，顕著な影響を受けている領域は存在しなかった。

【考察】

本研究により，TET3 欠損体細胞核移植胚において壁栄養外胚葉形成異常を引き起こす原因となっている可能性のある hub genes を同定した。しかし，同定した hub genes のプロモーター領域，gene body 領域では，TET3 欠損による DNA メチル化異常が生じなかったことから，hub genes のエンハンサー領域において DNA メチル化異常が生じている可能性が示唆された。

そうした影響を受けにくい新たな創薬手法として期待されている。しかしながら一方で，この手法はユビキチンリガーゼと標的タンパク質の相性が問題となる場合がある。そこで，プロテアソームと標的タンパク質を直接近づけることでユビキチンを介さずにタンパク質を分解できれば，これまで標的とならなかったタンパク質を分解できる（図 1 下），と考えた。そこで本研究では，酵素複合体であるプロテアソーム上のユビキチン受容体を利用し，標的タンパク質に直接近づける分子による「ユビキチン非依存的な分解誘導剤の開発」を行うことを目的とした。

【方法】

我々が最近報告したプロスタグランジン D 合成酵素 (HPGDS) 分解誘導剤 (PROTAC (HPGDS)-1, E3 リガーゼとしてセレブロン CRBN を利用するために CRBN リガンドの Pomalidomide を搭載)¹⁾ をモデルとして，HPGDS 阻害剤 (TFC007) とプロテアソームに存在するユビキチン受容体 (Rpn13) に結合するリガンド (RA190)，および，ユビキチン受容体 (Rpn6) に結合するリガンド (TXS8) をそれぞれリンカーで繋いだキ

ユビキチン非依存的な標的タンパク質分解誘導剤の開発

出水庸介

(国立医薬品食品衛生研究所)

【目的】

新たな創薬モダリティとして，有機小分子を用いてユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) を利用し，標的タンパク質の分解を誘導する手法が注目されている。本手法のひとつである，Crews 教授 (Yale 大) や内藤博士 (東大) らにより開発された PROTAC は，標的タンパク質のリガンドとユビキチンリガーゼリガンドを有したキメラ化合物であり，標的タンパク質とユビキチンリガーゼを物理的に近づける分子 (分子糊) として機能し，標的タンパク質のユビキチン化およびプロテアソームによる分解を誘導する (図 1 上)。従来の有機小分子阻害剤はフィードバックシグナルによる薬理効果の低下が問題となる一方で，標的タンパク質を分解する PROTAC は，

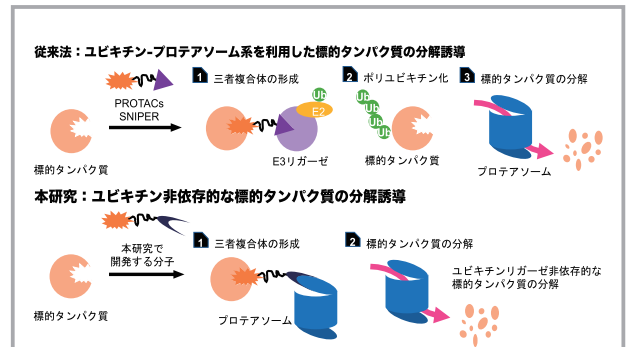


図 1 プロテインノックダウン法による標的タンパク質の分解誘導

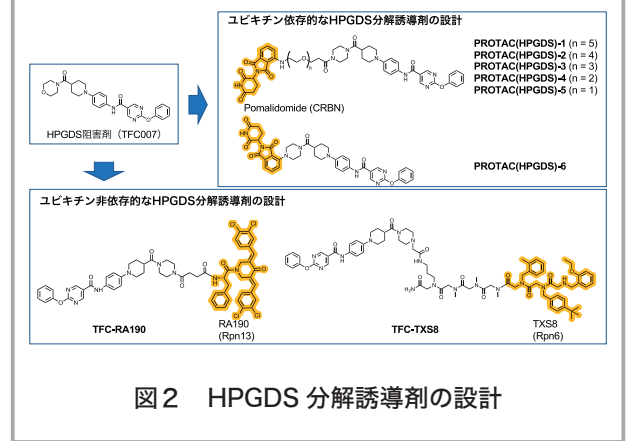


図 2 HPGDS 分解誘導剤の設計

メラ分子 (TFC-RA190, TFC-TXS8) を設計・合成した。更に, PROTAC (HPGDS)-1 の PEG リンカー長についての検討 (n=0-5) も行なった (図2)。合成した化合物の HPGDS 分解誘導活性は, KU812 細胞を用いたウエスタンブロット法により評価した。さらに, 活性を示した化合物については, 分解メカニズム評価, 標的タンパク質特異性評価, モデルマウスによる *in vivo* 評価についても検討した。

【結果と考察】

ウエスタンブロットの結果, 残念ながら現在までにユビキチン非依存的な分解誘導剤の発見には至っていない。一方で, PROTAC (HPGDS)-1 の PEG リンカー長の検討を行なった結果, リンカーが短くなるに伴い HPGDS 分解活性が向上し, リンカーを持たない PROTAC (HPGDS)-6 が非常に高い分解活性 (DC50=17.3 pM, DC50: 50% のタンパク質を分解する濃度) を有することが明らかとなった (図3)。更に, PROTAC (HPGDS)-7 は, CRBN を利用し UPS により HPGDS を分解すること, タンデム MS/MS によるプロテオーム解析により, 8194 種類のタンパク質が検出された中で HPGDS のみを特異的に分解することが明らかとなった。また, デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスに PROTAC (HPGDS)-6 を投与し指標となる血中のサイトカインを測定した結果, HPGDS 阻害剤 TFC-007 と比較して高い治療効果を示した。

今回設計したユビキチン受容体リガンドを搭載したキメラ分子では, ユビキチン非依存的な HPGDS 分解を誘導できなかった。現在, 異なるユビキチン受容体リガンド, リンカー長等を検討し, 目的を達成できる分子の開発を継続している。一方で, UPS を介して高活性および高選択的に HPGDS を分解できる PROTAC (HPGDS)-6 を見出すことに成功した²⁾。

本研究の遂行に多大なるご協力を賜りました, 国立医薬品食品衛生研究所の柴田識人博士, 横尾英知博士, 東京都医学総合研究所の遠藤彬則博士, 佐伯泰博士, 第一薬科大学の有竹浩介教授, 東京大学の内藤幹彦教授に感謝申し上げます。また, 多大なるご支援を賜りました, 公益財団法人日本応用酵素協会に深く感謝申し上げます。

【文献】

- 1) Yokoo, H., Shibata, N., Naganuma, M., Murakami, Y., Fujii, K., Ito, T., Aritake, K., Naito, M. & Demizu, Y.: Development of a hematopoietic prostaglandin D synthase-degradation inducer, *ACS Med. Chem. Lett.*, **12**, 236 (2021).
- 2) Yokoo, H., Shibata, N., Endo, A., Ito, T., Yanase, Y., Murakami, Y., Fujii, K., Hamamura, K., Saeki, Y., Naito, M., Aritake, K. & Demizu, Y.: Discovery of a highly potent and selective degrader targeting hematopoietic prostaglandin D synthase via *in silico* design, *J. Med. Chem.*, **64**, 15868 (2021).

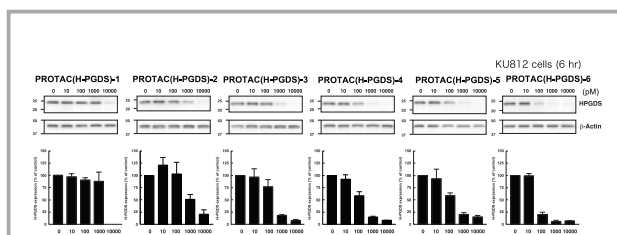


図3 PROTAC (HPGDS) 1-6 の HPGDS 分解誘導活性評価

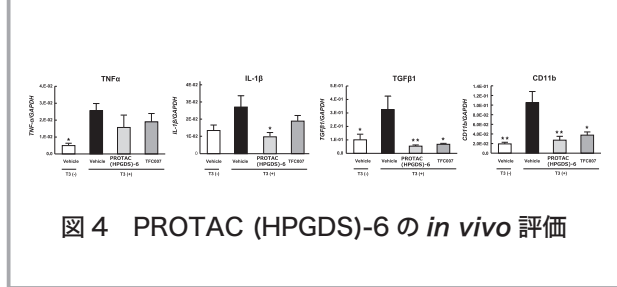


図4 PROTAC (HPGDS)-6 の *in vivo* 評価

温度変化にตอบสนองした膜脂質代謝を介するミトコンドリア機能制御機構の解析

長尾 耕治郎

(京都大学大学院工学研究科)

【目的】

環境温度の変化に対して, 柔軟に適応することは細胞機能を維持するために重要である。しかし, 温度変化を感知する機構やその適応機構については不明な点が多く残されている。我々はこれまでに, ショウジョウバエ培養細胞 S2 を用いた解析から, 脂肪酸の Δ9 位に二

重結合を導入することで膜リン脂質組成の制御において中心的な役割を担う $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 に依存して、低温曝露時にミトコンドリア内膜の F_1F_0 -ATPase の多量体形成及び酵素活性が亢進することにより、ミトコンドリア電子伝達経路の活性化が引き起こされることを明らかにした。電子伝達経路の活性化は細胞内での熱産生に繋がるため、本現象は環境温度の低下に抗うために重要であると考えられる。しかし、温度変化に応答して小胞体に局在する DESAT1 がどのようにしてミトコンドリア内膜に局在する F_1F_0 -ATPase の機能を制御しているのか、その機構は不明であった。そこで、本研究課題では小胞体に局在する DESAT1 がミトコンドリア機能を制御する機構の解明を目指した。

【方法】

DESAT1 の細胞内局在は共焦点顕微鏡観察および分画遠心により評価した。膜リン脂質組成は三連四重極型質量分析装置 LCMS8040 により分析した。

【結果・考察】

GFP 融合型 DESAT1 をショウジョウバエ S2 細胞に発現させると、小胞体マーカー (Bip-GFP-KDEL) との共局在が観察された。しかし、一部の DESAT1 タンパク質はミトコンドリアマーカー (Mito-GFP) と近接して存在していた。さらに、生化学的なミトコンドリアの分画実験から、DESAT1 がミトコンドリア膜分画にも存在することが示された。また、ミトコンドリア膜の膜リン脂質組成を分析したところ、DESAT1 の産物である一価不飽和脂肪酸を含むリン脂質の割合が低温曝露により、DESAT1 依存的に増加することが示された。 F_1F_0 -ATPase の構造と機能は膜リン脂質組成変化の影響を受けやすいことが報告されている。このため、ミトコンドリアに近接した DESAT1 が低温曝露時にミトコンドリア膜のリン脂質組成を制御することにより、電子伝達経路が活性化されると考えられる。

【文献】

Murakami, A., Nagao, K., Juni, N., Hara, Y. & Umeda, M.: An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of $\Delta 9$ -desaturase in *Drosophila*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 19976 (2017).

ニトロ化タンパク質の脱ニトロ化・還元酵素の探索・同定・機能解析

那須野 亮

(奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

【背景と目的】

シグナル分子である一酸化窒素 (NO) に依存的なタンパク質翻訳後修飾の一つであり、タンパク質のチロシン (Tyr) 残基をニトロチロシン (NT) 残基へ変換するニトロ化 (Protein Tyrosine Nitration; PTN) 修飾は、脱修飾に酵素反応が必要と考えられているが、酵素は同定されていない。

本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、PTN シグナルの消去経路として、NT を Tyr へ変換する脱ニトロ化酵素 (DNTase)、AT へ還元する NT 還元酵素 (NTred) を同定することを目的とした。

【方法】

2-1. 酵母抽出液の調製

最少培地で培養した酵母 *S. cerevisiae* をガラスビーズにより破碎し、遠心上清を 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5% glycerol 緩衝液により透析した。酵素活性測定の際は、 ^{15}N ラベルした窒素源を用いて酵母を培養した。

2-2. DNTase, NTred 活性の測定

酵母抽出液と 1 mM NT を、Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液, NADPH, NADH, FAD, FMN, ATP, GTP, MgSO_4 , CaCl_2 とともに 37°C で反応させ、InertSustain[®] C18 カラム (GL science), QTRAP4500 質量分析計 (AB SCIEX) を用いた逆相系 LC/MS/MS に供し、Tyr および AT を定量した。

2-3. NT 結合タンパク質の探索と同定

NT と NHS-activated Sepharose[™] 4 Fast Flow (Cytiva) を用いて作製した NT 結合樹脂を、酵母抽出液と反応させた後、10 mM NT により溶出した。続いて、溶出画分に含まれる NT 結合タンパク質を質量分析にて同定した。

【結果と考察】

3-1. 酵母粗酵素液中の遊離 NT に対する DNTase, NTred 活性の解析

遊離 NT をモデル基質として用い、酵母抽出液中の

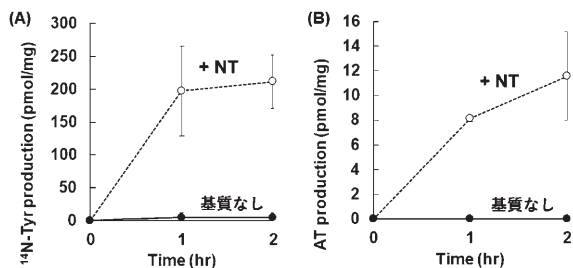


Fig.1 DNTase および NTred 活性の測定

¹⁵N ラベルした最少培地で培養した酵母由来の抽出液を NT と反応させ、経時的に LC/MS/MS にて解析した。¹⁴N-Tyr の定量により (A) DNTase 活性を、AT の定量により (B) NTred 活性を解析した。¹⁴N-Tyr の定量は 182.0 から 136.1, AT は 1970.0 から 134.2 の transition による MRM にて行った。

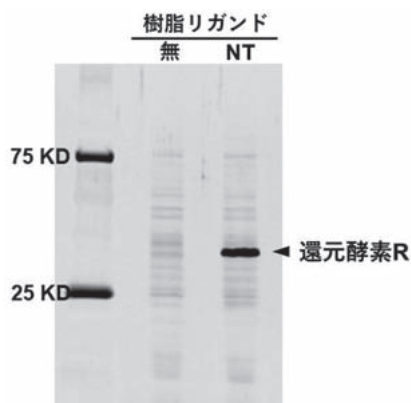


Fig.2 NT 結合樹脂を用いた NT 結合蛋白質の探索・同定

NT 結合樹脂を酵母抽出液と混合した後、NT 溶液にて溶出した。NT を樹脂リガンドとして用いた条件でのみ得られたタンパク質を質量分析にて解析し、機能未知の還元酵素 R を NT 結合タンパク質として同定した。

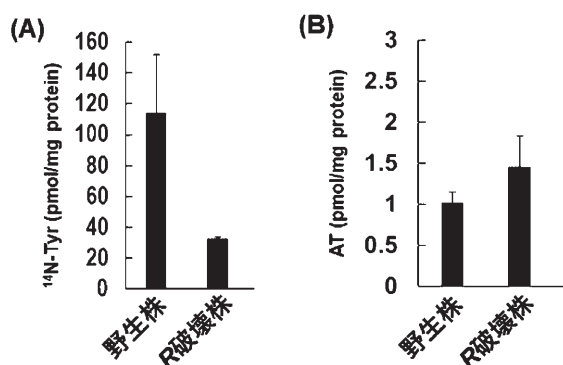


Fig.3 R 遺伝子破壊株の抽出液中の DNTase および NTred 活性

(A) 野生株および (B) R 遺伝子破壊株由来の抽出液を用いて 2 時間酵素反応を行い、DNTase および NTred 活性を測定した。

DNTase および NTred 活性を測定した結果、明確な Tyr および AT 合成活性を検出した (Fig. 1)。このことから、酵母が DNTase 活性、NTred 活性を有することが示された。

3-2. NT 結合タンパク質の同定

NT 結合樹脂を用いたプルダウン法と質量分析の結果、生理機能未知の還元酵素 R を NT 結合タンパク質として同定した (Fig. 2)。

3-3. R 遺伝子破壊株の DNTase, NTred 活性の解析

還元酵素 R の遺伝子破壊株を用い、抽出液中の DNTase および NTred 活性を測定した。その結果、野生株と破壊株で NTred 活性に大きな差はなかったものの、破壊株の DNTase 活性は野生株の 3 分の 1 以下に低下した (Fig. 3)。この結果から、還元酵素 R が DNTase 活性に寄与する可能性が示唆された。

CRISPR-Cas 系が誘導する新規な DNA 転移メカニズムの解明

沼田 倫 征

(九州大学大学院農学研究院)

【目的】

CRISPR-Cas 系は様々な生物種において利用可能なゲノム編集ツールとして大きな注目を集めており、生命科学に革命を起こしつつある。一方で、ゲノム上の予期しない場所の遺伝情報をランダムに書き換えてしまうオフターゲット効果も確認されており、ゲノムを人為的に改変する上での大きな支障となっている。今後、CRISPR-Cas 系をさらに有益な分子ツールとして多方面において利活用するためには、オフターゲット効果を抑制する技術の開発、既存のゲノム編集技術の改善、さらには大規模な塩基配列の挿入や欠失を可能にする新たなゲノム編集技術の開発が不可欠である。これを実現するためには、CRISPR-Cas 系の作動原理を詳細に理解することが不可欠であると同時に、新たな分子特性を持った CRISPR-Cas 因子の発見と開発が強く求められる。

自然界において、CRISPR-Cas 系は原核生物における獲得免疫に重要な役割を果たしている。Cas タンパク質が crRNA と結合してエフェクター複合体を形成し、こ

のエフェクター複合体が crRNA の塩基配列と相補的なウイルス核酸を配列特異的に認識して分解する。この配列特異的な DNA 切断活性を利用してゲノム編集技術が開発されており、現在、Cas タンパク質の一種である Cas9 を用いたゲノム編集が主流となっている。本研究では、環境メタゲノムからの新規な Cas 候補遺伝子を発掘するとともに、新たな Cas タンパク質を利用したゲノム編集技術の基盤を確立するための基礎的な研究の遂行を目的としている。

【方法】

海洋および温泉に由来するメタゲノムデータベースを構築するために、海水および温泉水サンプルを濾過して、バクテリアおよびアーキア画分、およびウイルス画分を分画した。得られたバクテリア/アーキア画分およびウイルス画分サンプルから DNA を抽出し、メタゲノムを調製した。次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定し、配列解析によってメタゲノムデータベースを構築した。得られたデータベースを解析し、これまでに報告されている Cas9 や Cas12 と配列相同性の低い Cas タンパク質を検索した。

配列相同性の低い Cas12 に注目し、その性状を解析するため、メタゲノム由来 Cas12 およびその周辺の DNA 領域を PCR により増幅し、発現ベクターにクローニングした。このプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、大腸菌内において Cas12 タンパク質を大量産生した。超音波破碎によって大腸菌から目的タンパク質を抽出し、各種クロマトグラフィーを用いて Cas12 タンパク質を精製した。

【結果】

メタゲノムデータベースを構築し解析した結果、これまでに報告されている Cas12 と配列相同性の低い Cas12 タンパク質をコードすると推定される遺伝子を多数同定することに成功した。これら遺伝子を含む周辺 DNA 配列を大腸菌発現ベクターにクローニングして、大腸菌内で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて Cas12 タンパク質を精製した。精製した Cas12 タンパク質は核酸を含んでいた。この核酸は、*cas12* 遺伝子の周辺領域にコードされている crRNA であると推定される。

【考察】

海洋および温泉に由来する環境メタゲノムから、従来のものとは配列相同性の低い多数の *cas12* 候補遺伝子を同定した。当該遺伝子の周辺領域を含んだ DNA 配列を大腸菌発現ベクターにクローニングし、大腸菌内で Cas12 タンパク質を合成した。精製した Cas12 タンパク質サンプル中には核酸が含まれており、Cas12 と結合する crRNA である可能性が推定される。今後、この核酸を同定するとともに、Cas12 による DNA 切断活性を測定する計画である。また、結晶構造解析もしくはクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、Cas12 の立体構造を決定し、構造と機能の両面から新規 Cas12 の性状解析を行う計画である。さらに、様々な生物を用いたゲノム編集を試み、当該 Cas12 タンパク質がゲノム編集に応用展開可能かどうか検討する。

【文献】

特になし

トポイソメラーゼ3酵素によるM期テロメア脱保護機構の解明

林 眞 理

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

染色体 DNA の末端は、テロメアというタンパク質-DNA の複合体によって、DNA 二本鎖切断末端として認識されることを免れている。テロメア配列は、脊椎動物では TTAGGG の単純リピート配列で、その末端は 3' が突出している。さらに、テロメアリピート配列を認識して結合する Shelterin 複合体の働きにより、3' 突出末端が二本鎖リピート領域にループして潜り込む T ループと呼ばれる構造をとることで、末端が保護されている。我々や他のグループは、細胞周期の有糸分裂 (M) 期停止が、テロメア T ループの乖離による脱保護を引き起こすことを報告した^{1,2)}。本計画では、M期テロメア脱保護の分子メカニズム解明を目指し、トポイソメラーゼ3酵素を含む BTR 複合体 (BLM-TOP3A-RMI1/2) の酵素活性が本反応に関与するという仮説の検証を目的とした。

【方法】

ヒト繊維芽細胞 IMR-90 をモデルとし、微小管融合阻害剤コルセミドによってM期停止を誘導、テロメアの脱保護状態を、DNA 傷害マーカーである γ -H2AX で検出した。BTR 複合体のうち、酵素活性を担う TOP3A、及びBLMをshRNAによってノックダウンし、さらに正常、及び酵素活性変異を持つそれぞれの因子の cDNA を細胞に導入することで、それぞれの酵素活性がM期テロメア脱保護に寄与する可能性を解析した。

【結果】

shRNAに耐性をもったBLM, TOP3Aの野生型をノックダウン前の細胞へ導入したところ、脱保護が回復した。一方、BLMの酵素活性変異であるD795Aや、double-holiday junction (DHJ) への結合を失活するK1270V変異、及びTOP3Aの酵素活性変異であるY337Fは、表現型を回復することができなかった。

【考察】

BLM, TOP3Aの点変異についての報告から、BTR複合体の持つ、DHJ 乖離活性こそが、M期テロメア脱保護に必要であることが強く示唆された。試験管内反応によってこの仮説を検証するために、国外グループとの共同研究を進めている。Tループの乖離はShelterin因子であるTRF2によって抑制されるため、今後はTRF2とBTR複合体との関係について解析を展開する。

【文献】

- 1) Hayashi, MT., Cesare, AJ., Fitzpatrick, JA., Denchi EL. & Karlseder, J.: A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19** (4), 387-394 (2012).
- 2) Ly, DV., Low, RRJ., Frolich, S, Bartolec, TK., Kafer, GR., Pickett, HA., Gaus K. & Cesare, AJ.: Telomere Loop Dynamics in Chromosome End Protection, *Mol. Cell*, **71**, 510-525 (2018).

霊長類特異的 TRIM ファミリーによるユビキチン修飾制御機構の生物学的意義の解明

平田 祐介

(東北大学大学院薬学研究科)

【目的】

TRIM48をはじめとする霊長類特異的 TRIM ファミリーは、遺伝子重複等によって生じた遺伝子群で、染色体上で遺伝子クラスターを形成しており、ファミリー分子内の配列相同性が極めて高い(40–80%の相同性)。我々は、このユニークな特徴に着目し、ファミリー分子全般を対象とした解析から、TRIM48とファミリー分子間の機能的な類似性や、共通の転写・翻訳レベルでの発現制御機構が存在することを見いだした(*Cell Reports*, 2017)。本研究では、本ファミリーが関連するがんや希少難治性の遺伝性疾患である顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)に焦点を当て、本ファミリー分子群によるユビキチン化修飾の進化的・生物学的な重要性および病態生理学的意義の解明を目的として以下の解析を行った。

【方法】

各TRIMファミリー分子を過剰発現、あるいは発現抑制した際の、過酸化水素処置時(酸化ストレス時)およびDUX4(FSHDの原因遺伝子として知られる転写因子)誘導性の細胞死への影響を評価した。その際の関連分子の活性化、本ファミリー分子との結合性や発現の変動について、ウェスタンブロットによる生化学的解析、qPCRによるmRNAの発現解析を行った。

【結果】

TRIM48を含む複数のファミリー分子について、エフェクター分子PRMT1や他の関連分子との結合性が確認できた。酸化ストレス時およびDUX4誘導性の細胞死について、TRIM48単独あるいは他のファミリー分子を同時に発現抑制することで、細胞生存率の増加あるいは減少が認められた。またこの時、TRIM48の下流で制御を受けるp38/JNK MAPキナーゼ経路の活性化抑制が認められた。

【考察】

本研究より、本ファミリー分子がファミリー間で同様

の機能を保持し、がんやFSHDなどの病態に関与していることが示唆された。本ファミリー分子群は、霊長類が進化の過程で獲得し、高度なユビキチン化制御に関与していると考えられ、今後はその病理的意義だけでなく、生理的意義も含めた機能的役割の全容解明が期待される。

【文献】

Hirata, Y., Katagiri, K., Nagaoka, K., Morishita, T., Kudoh, Y., Hatta, T., Naguro, I., Kano, K., Udagawa, T., Natsume, T., Aoki, J., Inada, T., Noguchi, T., Ichijo, H. & Matsuzawa, A.: TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitin-dependent degradation of the ASK1 negative regulator PRMT1. *Cell Reports*, 21(9), 2447-2457 (2017).

T細胞上のコアフコースを標的とする炎症性腸疾患治療薬候補の検討

深瀬 浩一

(大阪大学大学院理学研究科)

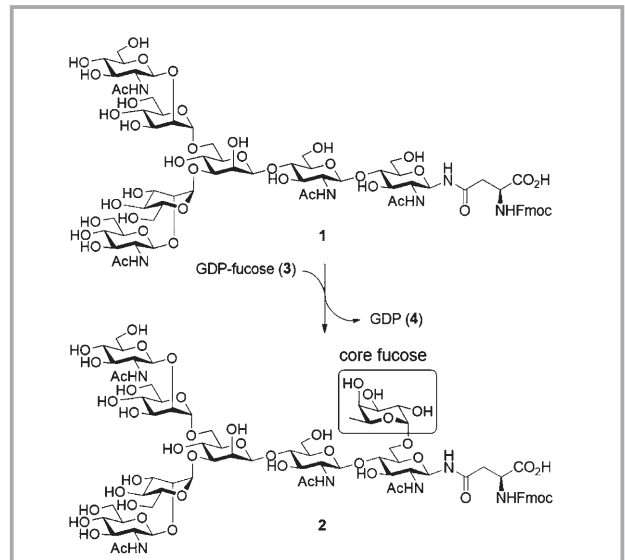
【目的】

クローン病は、潰瘍性大腸炎とならぶ主要な炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) であり、主に小腸や大腸などの消化管に炎症を繰り返す慢性疾患で、近年その患者数が増加している。クローン病患者の腸管炎症部において、非炎症部に比べ浸潤T細胞にコアフコースが増加することが見出された。Fut8をノックアウトしたコアフコース欠損マウスに対してTNBSを作用させて誘導した実験的クローン病モデルでは、腸炎が劇的に抑制されることが見出された。コアフコースは、アスパラギン結合型糖タンパク質 (N-グリカン) の修飾糖鎖の一つであり、上記のFut8という糖転移酵素によってアスパラギンに結合したN-アセチルグルコサミンの6位に導入される (Scheme 1)。我々は、以上のことからコアフコースならびにFut8をクローン病治療の新しい糖鎖治療の標的として期待し、Fut8阻害剤の開発、さらには、これを標的とする治療法のPOC取得を目的とした。

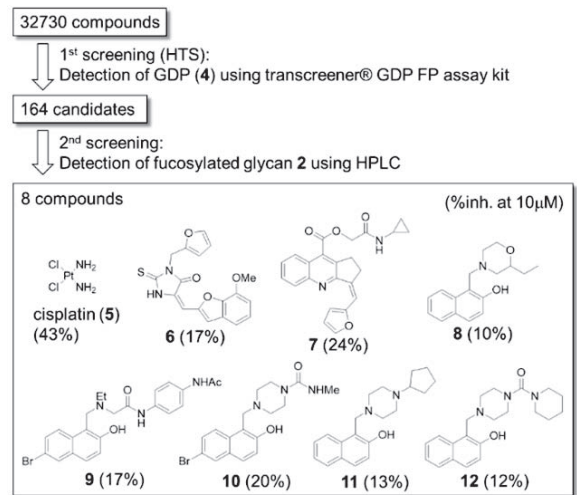
【方法と結果】

1. ハイスループットスクリーニング (HTS) を用いた Fut8 阻害剤の開発

コアフコースの機能解明・制御に利用可能なFut8阻害剤の開発を目指した。その結果、Figure 1に示す8個の化合物が10μMでFut8の酵素反応を阻害した。HTSで得られたFut8阻害剤の中で、8-12は共通構造を保持していた。我々は、これをFut8阻害剤のファーム



Scheme 1. FUT8によるコアフコース形成反応



SFigure 1. FUT8阻害剤のHTS

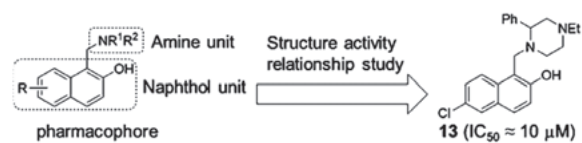


Figure 2. FUT8阻害剤のHTS

マコフォアと考えた。そこでこの構造をもとに構造活性相関研究を進めることで、細胞抽出液を用いた酵素アッセイ系で、IC₅₀が10μM程度のFut8阻害剤**13**の創製に至った (Figure 2)。

2. Fut8 阻害剤 **13** の作用機構解析

続いて、**13**のFut8阻害の作用機構について考察した。我々は、化合物**13**がPBS緩衝液中で速やかに分解し、**15**を生じていることを見出した (半減期：<1h, Figure 3)。これは、**13**のアミノユニットが脱離し、エキソメチレン**14**が生じ、ここに水が付加したと考えられる。この結果から、**13**から分解して生じた**14**がFut8と共有結合を形成することで、Fut8を阻害していると考えた。そこで、MS解析を行ったところ、予想通り、Fut8と**14**の共有結合複合体の生成を確認することができた。

また発現させたFut8と阻害剤**13**のアフィニティーを等温滴定型カロリメーター (ITC) によって測定したところ、結合にはGDPが必要であることがわかり、GDP存在下での乖離定数は50 nMであった。またその結合は、エントロピー駆動型であった。

3. Fut8 阻害剤のプロドラッグ化と細胞系での機能評価

化合物**13**を用いて細胞系でのFut8阻害活性を測定したが、再現性の低い結果であった。これは、2で示した分解反応が原因であると考えた。そこで、**13**のプロドラッグ化による安定化を検討した。ナフトールのヒドロキシ基を保護することで、**13**の分解を防ぐことが

できた。種々の検討の結果、化合物**16**がPBS中で十分な安定性を保持した (半減期：>12h)。この化合物**16**は、膜透過性を有しており、培養細胞系で再現性良くFut8を阻害することをフローサイトメトリーで確認した。

さらに本化合物のマウス脾臓細胞に対する抗炎症効果を、サイトカイン誘導能で評価した。その結果100 nMレベルで炎症生サイトカインの産生を抑制し、抗炎症性サイトカインの産生を誘導した。またそのフェノタイプは、Fut8ノックアウトに類似していた。この結果はT細胞を標的としたFut8阻害剤による炎症制御が可能であり、Fut8がクローン病治療の新しい標的となり得ることを示唆している。

現在は、実験的クローン病モデルにおける本薬剤の腸炎抑制効果を検証中である。

HER2 陽性乳癌細胞における EGFR/HER2 phosphatase の活性化機構の解明

前川 大志

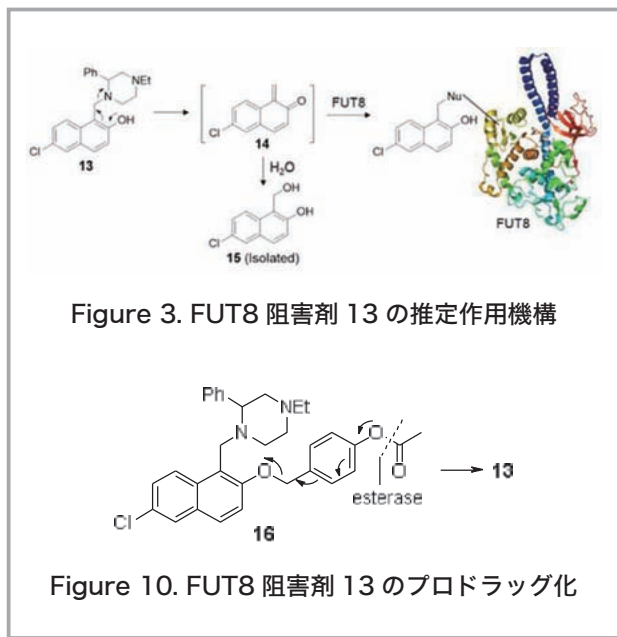
(慶應義塾大学薬学部)

【目的】

研究代表者は今までに、種々の乳癌サブタイプの中でも、HER2陽性乳癌細胞特異的に作動する細胞増殖制御分子として、ユビキチン (Ub)-E3複合体 CUL3/KCTD10/RhoBを同定している¹⁾。CUL3/KCTD10/RhoB軸による細胞増殖機構を更に解析した所、CUL3または、KCTD10の発現抑制によって蓄積したRhoBが原因となり、EGFR/HER2のリン酸化レベルが著しく低下する事が分かった。そこで本研究では、このRhoB依存的なEGFR/HER2のリン酸化制御機構の分子基盤を詳細に解明する事を目的とした。

【方法】

RhoBに結合するタンパク質を愛媛大学プロテオサイエンスセンターが保有するヒトプロテインアレイ (今回は約4000タンパク質のアレイを使用) の中から、アルファスクリーンを用いて探索した。また、質量分析法によっても、HER2陽性乳癌細胞の細胞抽出液中の中からRhoB結合タンパク質の同定を試みた。この時、バイ



トタンパク質として RhoB の dominant-negative 体と constitutive active 体の両方を用意し、両者の結合タンパク質を比較した。同定された RhoB 結合タンパク質に結合するホスファターゼをヒトホスファターゼアレイ (171 分子) の中から、アルファスクリーンを用いて探索した。最後に、RhoB 結合タンパク質及び、同定されたホスファターゼの細胞レベルでの機能を EGFR と HER2 のリン酸化を指標に HER2 陽性乳癌細胞を用いて解析した。また、各タンパク質の細胞内局在を免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン化 RhoB の dominant-negative 体 と constitutive active 体に直接結合するタンパク質をヒト 4000 タンパク質アレイの中から探索した結果、RhoB の constitutive active 体に特異的に結合するタンパク質として、足場タンパク質 X を同定した (論文投稿中)。この足場タンパク質 X は幾つかの癌細胞で増殖シグナルを正に制御する事が知られている一方で、HER2 陽性乳癌細胞における機能の報告は一切無い。重要な事に、HER2 陽性乳癌細胞で足場タンパク質 X を発現抑制した結果、EGFR と HER2 のリン酸化が著しく減少し、細胞増殖が強く阻害された。更に、足場タンパク質 X に結合するホスファターゼとして、複数の細胞膜型ホスファターゼ PTPs の同定に成功した (論文投稿中)。それぞれ単独の PTP の発現抑制では EGFR と HER2 のリン酸化に対する影響は弱かった。一方で、過剰発現系では単独でも、EGFR と HER2 のリン酸化レベルを著しく低下させ、細胞増殖も強く阻害した。この表現型はホスファターゼ活性を失った CS 変異体では見られなかった。興味深い事に、質量分析を用いた RhoB 結合タンパク質探索では、足場タンパク質 X も PTPs も検出される事は無かった。また、*in vitro* での結合実験から、RhoB と PTPs は足場タンパク質 X の同じドメインに相互排他的に結合する事が分かった。

【考察】

本研究の解析から、次のモデルが提唱できる。通常は CUL3/KCTD10 により常に RhoB が分解され、その発現が低く保たれる事で、細胞膜型ホスファターゼ PTPs が足場タンパク質 X に結合し、不活性化され、増殖に

十分な EGFR/HER2 のリン酸化が生じている。一方で、RhoB のタンパク質量が増えると、足場タンパク質 X に RhoB が強く結合し、細胞膜型ホスファターゼ PTPs が遊離して、活性化し、EGFR と HER2 の脱リン酸化を促し、HER2 陽性乳癌細胞の増殖が阻害される。RhoB の恒常的タンパク質分解が OFF になるような生理的条件は未だ不明であるので、追加の検証が必要である。また、質量分析を用いた RhoB 結合タンパク質探索で、足場タンパク質 X も PTPs も検出されなかったのは、これらのタンパク質のイオン化効率が著しく悪い可能性や、発現量が低い可能性、可溶化効率が悪い可能性が挙げられる。今後は、足場タンパク質 X と PTPs の HER2 陽性乳癌細胞における機能解析を更に進め、当該分子基盤に対する人為的制御剤を HER2 陽性乳癌治療薬の新規シーズとして導出していきたい。

【文献】

- 1) Murakami, A., Maekawa, M., Kawai, K., Nakayama, J., Araki, N., Semba, K., Taguchi, T., Kamei, Y., Takada, Y. & Higashiyama, S.: Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Cancer Science*. 110(2): 650-661. (2019).

D-サイクロセリン生合成に関わる金属酵素の活性化制御機構に関する研究

的 場 康 幸

(安田女子大学薬学部薬学科)

【目的】

一酸化窒素 (NO) は、アルギニンを原料として、ヘム結合酵素である NO 合成酵素 (NOS) により合成される。この反応では、中間体として *N^ω*-ヒドロキシアルギニン (NOHA) が生じる。中間体として生じた NOHA は、二核マンガン酵素であるアルギナーゼを阻害し、アルギニンの分解を抑制する。このため、生体内で NO が必要なとき、効率よくアルギニンから NO を合成できる。研究代表者らは、抗生物質 D-サイクロセ

リンの生合成機構を研究する過程で、アルギニンから NOHA までの反応しか触媒しないヘム酵素 DcsA と、NOHA を特異的に加水分解するアルギナーゼ類似酵素 DcsB を発見した。本研究では、DcsA と NOS の違い、DcsB とアルギナーゼの違いをもたらす構造的要因を明らかにすることを目的とした。

【方法】

高分解能で明らかにした DcsA と DcsB の結晶構造をもとに、種々の部位特異的変異を導入し、変異体の酵素活性や、三次元構造を明らかにした。

【結果および考察】

DcsA と NOS の全体構造は著しく異なる。また、DcsA の基質結合ポケットは小さくなっており、NOHA に対する活性を示さない原因になっていると考えられた。ただし、DcsA と NOS では、その遠位配位子がシトクローム P450 と同じくシステインのチオール基であるが、チオール基からヘム鉄への電子供与性が、P450 に比べて弱いことが明らかとなった。チオール基への水素結合が電子供与性を弱める要因として考えられたため、水素結合が消失すると考えられる F60P 変異体を作成した。ただしこの変異体では、ヘムと結合した酵素が得られなかった。

DcsB の全体構造はアルギナーゼと似ている。しかしながら、活性に関わる複数の残基で置換が見られた。特に、MnA に対する配位子のひとつが、アルギナーゼではヒスチジン、DcsB ではシステインになっている。DcsB の C86H 変異体では、酵素活性が著しく減少した。また、その結晶構造を解析したところ、MnB の一部が別の位置に移動していることが判明した。このことは、DcsB の活性中心における通常の架橋分子は水であり、電子供与性を弱めると 2 つの Mn (II) の間に反発が生じること、および、DcsB の酵素反応中に陽イオンが生じ、それを保持する機構が備わっていることが示唆された。

西洋わさび由来ペルオキシダーゼ反応による任意ペプチド抗原を提示可能なタンパク質ポリマーの創製

南 畑 孝 介

(九州大学大学院工学研究院)

【目的】

本研究では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の酵素反応を用いたタンパク質重合化技術を用い、任意のペプチドを提示可能な高免疫原性タンパク質ポリマーの構築を試みた。戦略として SpyTag(ST) と自発的に結合する SpyCatcher (SC) を用いた。ST に任意のペプチド配列を融合し、SC と共発現することで、大腸菌内において任意ペプチドを SC 上に提示する。このペプチド提示 SC を HRP によって重合化させることで、高い免

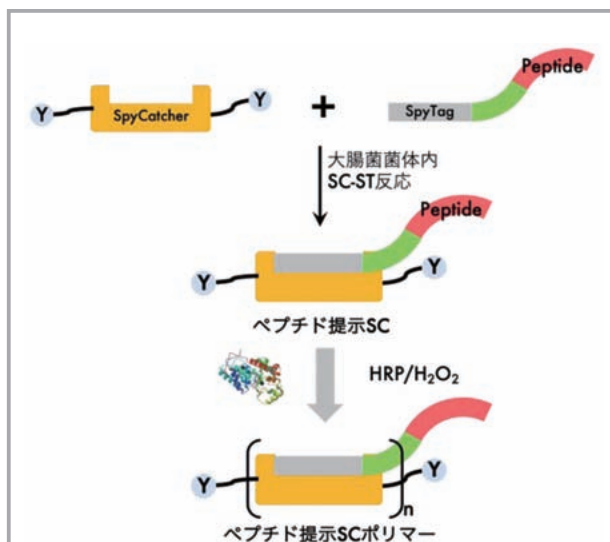


図1 高免疫原性ペプチド提示 SC ポリマー

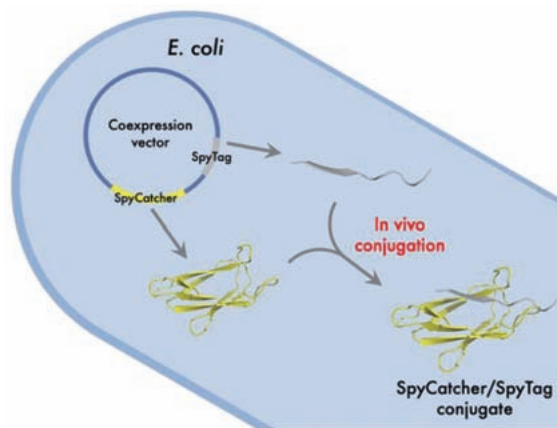


図2 大腸菌菌体内における SC-ST 複合体形成

疫原性を有するタンパク質ポリマーの創製を目指し検討を行った (図1)。

【実験方法】

1) ペプチド提示 SC の調製

共発現ベクターを用い、チロシンを含むペプチドタグ

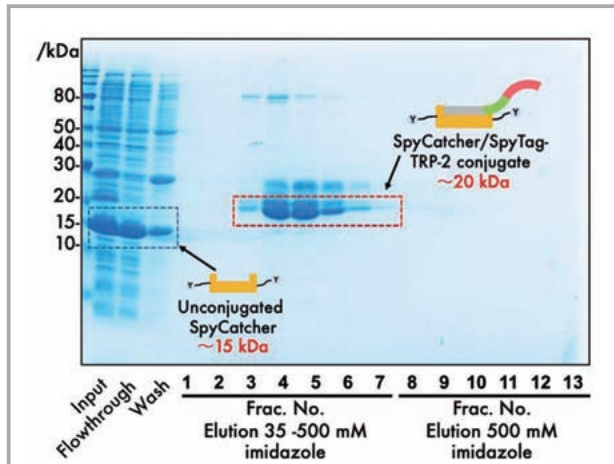


図3 大腸菌菌体内におけるペプチド提示 SC の調製結果

(Y-tag) を N/C 両末端に導入した SC 遺伝子および, ST とモデルペプチドを融合したペプチド遺伝子が大腸菌で発現することで, ペプチド提示 SC を調製した (図2)。

2) ペプチド提示 SC の HRP 酵素反応による重合化

ペプチド提示 SC に対して, HRP および H₂O₂ を添加することで, HRP 酵素反応処理を行った. SDS-PAGE 解析によってポリマー化の有無を評価した。

3) ペプチド提示 SC ポリマーの樹状細胞への取り込み

評価

ペプチド提示 SC ポリマーを樹状細胞, DC2.4 細胞に添加し, 取り込み挙動を共焦点顕微鏡観察によって評価した。

【結果および考察】

1) ペプチド提示 SC の調製結果

図3にペプチド提示 SC の精製結果を示す. 溶出画分において, 20 kDa 付近にバンドが確認され, ペプチド提示 SC の調製に成功した。

2) HRP による重合化反応結果

ペプチド提示 SC に対して HRP および H₂O₂ を添加した条件において, 高分子量側にバンドが確認され, 重合化を確認した (図4). H₂O₂ 濃度が 25 μM の条件において, モノマーのバンドが完全に消失した。

3) ペプチド提示 SC ポリマーの樹状細胞への取り込み

評価結果

図5にペプチド提示 SC ポリマーを添加した樹上細胞の共焦点顕微鏡観察結果を示す. ペプチド提示 SC ポリマーにおいて有意に細胞内への取込が観察された. この結果より, ポリマー化によって免疫原性が向上したことが示唆された. 今後, 実際にマウスに免疫することを検討する。

【学会発表】

化学工学会 第52回秋季大会「がんペプチド抗原を提示したポリマー型キャリアタンパク質の開発」, 上野利晃, 南畑孝介, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏

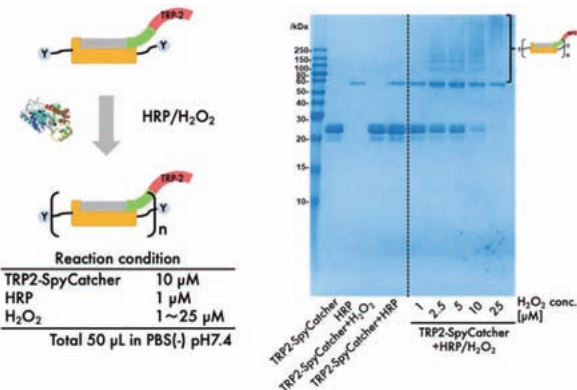


図4 HRP 酵素反応によるペプチド提示 SC ポリマーの調製

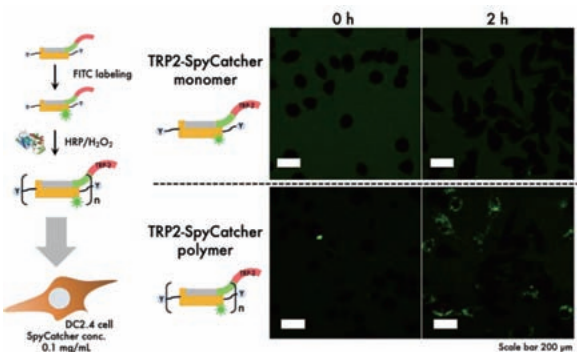


図5 ペプチド提示 SC ポリマーの樹状細胞による取込評価結果

新奇酵素が担う過酸化タンパク質除去によるバイオフィルム維持のメカニズム

三原久明

(立命館大学生命科学部)

【目的】

切断型ヘモグロビン (trHbO) はグラム陽性細菌や植物などに広く分布しているが、その生理機能は不明であった。我々はこれまでの研究から、*Bacillus subtilis* において、「過酸化タンパク質」を trHbO が除去し、タンパク質の酸化変性・凝集を防いでいる可能性を見出した。本研究では、trHbO が種々の酸化要因に対してどのような役割を果たすかを評価した。また、他の細菌種において、trHbO の役割が *B. subtilis* と同様であるかを検証した。

【方法】

酸化剤耐性への影響評価

trHbO 破壊株 (*yjbl*⁻) をラジカル開始剤である 2,2-アゾビス (2-アミノジプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) 存在下で培養し、酸化剤への影響を評価した。また、同様にタンパク質を過酸化することが報告されている次亜塩素酸を用いて、破壊株における最小殺菌濃度を算出した。

Mycobacterium の trHbO 評価

M. tuberculosis 由来のリコンビナント trHbO を発現・

表 1 次亜塩素酸の最小殺菌濃度

HClO (mM)	WT	<i>yjbl</i> ⁻
62.5	-	-
31.3	+	-
15.6	+	-
5.00	+	-
2.50	+	-
1.25	+	-
0.625	+	-
0.313	+	+
0.156	+	+

+ 生育を確認
- 生育無し

精製した。次に、この trHbO をモデルタンパク質であるウシ血清アルブミン (BSA) および AAPH を含む溶液に添加し、過酸化した BSA への凝集抑制能を評価した。

【結果】

酸化剤耐性への影響

yjbl 破壊株では、AAPH による生育抑制が、野生株と比較してより顕著にみられた (図 1)。また、*yjbl* 破壊株では次亜塩素酸の感受性が著しく上昇しており

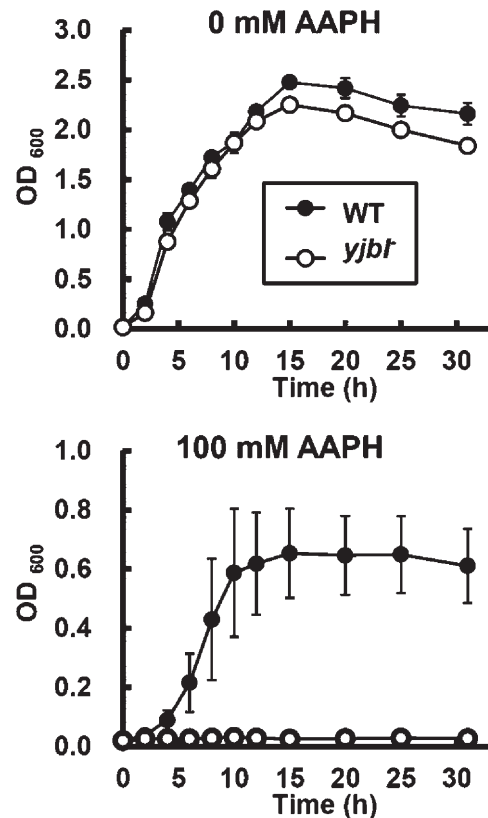


図 1 AAPH 下における各破壊株の生育

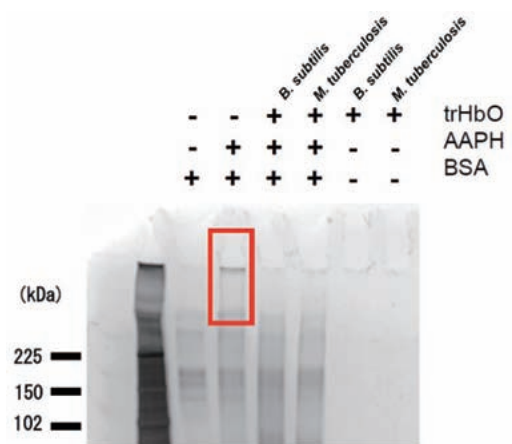


図 2 過酸化タンパク質の凝集評価

(表1), 野生株と比較して約100倍差がみられた¹⁾。

Mycobacterium の trHbO 評価

SDS-PAGEの結果, trHbOを含まない試料では泳動開始点付近に巨大分子が観察された。一方, trHbOを添加した場合は同様のバンドは確認されなかった(図2)。

【考察】

*yjbl*の破壊が, 酸化剤への感受性を著しく高めていることがわかった。この結果は, 酸化剤耐性の低下が不完全なバイオフィーム形成を引き起こしている可能性を示唆している。

また, *M. tuberculosis*のtrHbOも過酸化タンパク質の凝集抑制能を有していることが確認された。この結果は, 細菌種横断的にtrHbOが過酸化タンパク質の凝集を抑制する生理機能を担っていることを示唆しており, 病原性細菌の酸化剤耐性を狙った新たな薬剤開発に繋がるものと期待している。

【文献】

- 1) Imai, T., Tobe, R., Honda, K., Tanaka, T., Kawamoto, J. & Mihara, H.: Group II truncated haemoglobin Yjbl prevents reactive oxygen species-induced protein aggregation in *Bacillus subtilis*, *bioRxiv.*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.28.446166>, (2021).

傍血管線維芽細胞は脳内プロスタグランジン産生の場となるか

柳田 圭介

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

プロスタグランジン (PG) はアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) および各種 PG 合成酵素により産生される脂質メディエーター群であり多彩な生理機能を発揮する。PG は脳においても様々な機能に深く関わるが, その産生場所には不明な点が多い。これまでの予備検討により, リゾホスファチジルコリン (LPC) の形態で投与した脂肪酸が脳内で PDGFR α 陽性細胞に蓄積することを見出しており, また近年新規脳細胞クラス

として PDGFR α 陽性の傍血管線維芽細胞 (PVF) の存在が報告された。従って本研究は PVF が脳内 PG 合成の場となる可能性について迫ることを目的とした。

【方法】

- (1) 蛍光ラベル脂肪酸含有 LPC である TopFluor (TF)-LPC をマウスに投与し脳細胞の分散後, PDGFR α 陽性細胞を TF 陽性および陰性細胞に分け, RNAseq 解析を行なった。
- (2) マウスにリポポリサッカライドを投与し, 炎症時の脳内における COX2 の局在を検討した。
- (3) 脳内 PDGFR α 陽性細胞を単離し, 各種 PG の産生を LC-MS により検討した。

【結果】

- (1) 予備検討により脳内 PDGFR α 陽性細胞の中でも一部の細胞集団が TF-LPC を取り込むことを明らかにしていた。今回の RNAseq 解析の結果, TF 陽性細胞で高発現となる上位遺伝子の多くが線維芽細胞マーカーであることが確認された。従って, TF-LPC を蓄積する細胞集団が PVF であるという仮説がトランスクリプトーム解析から強く支持された。
- (2) 既報通り COX2 は主に血管内皮細胞に発現が認められたが血管周囲部にも認められた。これら非血管内皮性の COX2 染色が PDGFR α 染色と重なることから, 炎症時脳において血管内皮細胞と並んで PVF で COX2 が発現していることがわかった。
- (3) 単離 PDGFR α 陽性細胞において, カルシウムイオノフォア刺激により PGE2 をはじめとする PG 類の産生が確認された。

【考察】

以上より, PVF が脳内 PG 産生の場となる可能性が極めて高いと考えられた。一方, PG 産生を確認したのは *ex vivo* 実験であり, かつ PVF を含むヘテロな集団での実験である。現在のところ PVF の特異的な細胞表面マーカーとなりうる分子は見いだせていない。そこで Col1a1-Cre マウスを用いて「PVF レポーターマウス」を作成したため, これにより純粋な PVF での PG 産生能について今後検討を行う。また, 新たに PVF 特異的 COX2 欠損マウスを樹立したため, *in vivo* における PVF による PG 産生の意義を明らかにしていきたい。

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成

肥満に伴う高インスリン血症における肝臓が及ぼす影響とその機序の探索

浅井 洋一郎

(東北大学大学院医学系研究科)

【目的】

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

【方法】

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

【結果】

1. 高脂肪食群では肝臓のインスリンクリアランスが低下することがわかった。
2. 肝臓における IDE, CEACAM1 の遺伝子発現は通常食群と高脂肪食群で同等であった。

3. 高脂肪食群において類洞内皮細胞の篩板孔の減少が観察された。

4. 高脂肪食群の類洞内皮細胞では、炎症や細胞外基質に関わる遺伝子群が上昇していることがわかった。

【考察】

高脂肪食負荷マウスにおいて肝臓のインスリンクリアランスの低下を認めたが、インスリン分解に関わる遺伝子の発現は変化がなかった。類洞内皮細胞の篩板孔の減少は肝臓におけるインスリン取り込み低下に関与することが報告されており、高脂肪食群における肝臓インスリンクリアランス低下の原因の一つである可能性が考えられた。また、高脂肪食群の類洞内皮細胞において発現が上昇していた炎症や細胞外基質に関わる遺伝子群が、篩板孔減少に関与しているか今後検証を行う予定である。肥満に伴う高インスリン血症における肝臓の役割を検討し、肥満を予防するための基盤となる知見を得ることを目指して研究を進める予定である。

免疫学的アプローチによる腎臓病に対する新規治療戦略の開発

畔上 達彦

(慶應義塾大学保健管理センター)

【目的】

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

CKD を制御するために、本研究では、原因として最

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

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

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

【方法】

1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

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

2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

腎線維化モデルとして片側尿管結紮 (UUO) マウスを、腎不全モデルとしてアデニン負荷マウスを利用する。マウスに、CTGF ワクチンを隔週で計 3 回投与し、腎間質線維化を評価する。

【結果】

1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

抗 RAGE ワクチン接種により、尿中アルブミン排泄が軽減し、糸球体肥大、メサンギウム基質拡大、糸球体基底膜肥厚が、いずれも軽減された。

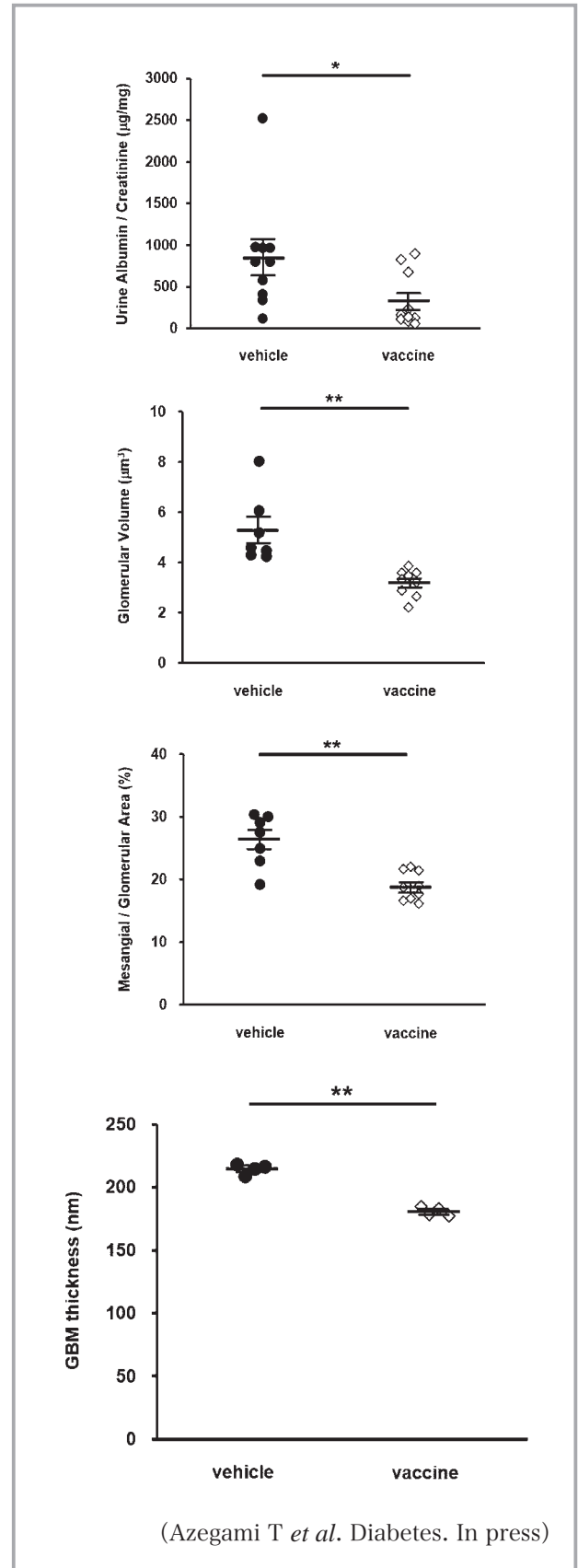
2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

抗 CTGF ワクチンにより、アデニン投与マウスの血清クレアチニン上昇が軽減された。アデニン投与マウス、UUO マウスにて、腎間質線維化の軽減が確認された。

【考察】

本研究にて、抗 RAGE ワクチンの腎保護が確認され

た。ワクチン接種により産生された抗体は、*in vitro* にて、RAGE の下流シグナルを抑制しており (内皮細胞における AGE 刺激後の VCAM-1, ICAM-1 の発現抑制)、*in vivo*, *in vitro* の両面から、抗 RAGE ワクチンの効果



を確認することができた。

抗 CTGF ワクチンに関しては、*in vivo* にて、腎間質線維化の軽減が確認されており、今後、*in vitro* 検討を含め、多角的にワクチンの効果を評価していく。

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】

本年度は長寿者特異的な腸内細菌種の同定とその機能解析を行った。当研究室では慶應義塾大学百寿総合研究センターと共同で日本全国の百歳以上の方（百寿者）の健康診断、血液・便の採取を行っている。百寿者は健康長寿の一つの理想型であり、百寿者の腸内細菌を解析することで長寿の秘訣を明らかにできる可能性があると考えた。そこで、百寿者、高齢者（平均 85 歳）、若者（平均 30 歳）の腸内細菌叢の比較および代謝物の比較を行い、百寿者特異的に存在する腸内細菌種および代謝産物の解析を通して百寿者の長寿の秘訣の一端を明らかにすることを目指した。

【方法】

百寿者、高齢者、若者（ $n = 47$ ）から提供を受けた便を用いて、16S rRNA 解析、メタゲノム解析を行い、腸内細菌叢を検討した。また同時に GC-MS、LC-MS/MS を使用して便中の短鎖脂肪酸・胆汁酸を測定した。その後、百寿者に特徴的な二次胆汁酸について検討を行うため、便から細菌株の培養・単離を行い、*in vitro* における責任細菌の同定・責任遺伝子の同定を行った。

【結果】

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

MS/MS を用いて測定できる系を確立した。この測定系で解析した結果、これまでほとんど知られていなかった iso-allo-LCA や 3-oxo-allo-LCA などの allo 体 (5 α) の二次胆汁酸が百寿者の便中で有意に増加していた。このことから、iso-allo-LCA や 3-oxo-allo-LCA が長寿に関与している可能性が考えられた。そこで次に、この iso-allo-LCA や 3-oxo-allo-LCA を合成できる細菌種を探索するため百寿者の便から細菌株を単離し、*in vitro* において基質と考えられる一次胆汁酸であるケノデオキシコール酸 (CDCA) やヒト便中に豊富に存在する二次胆汁酸の一種であるリトコール酸 (LCA)、中間産物と考えられる 3-oxo- Δ 4-LCA を加えそれぞれの細菌株を培養し、どのような細菌種が百寿者特異的な二次胆汁酸の変換を行うことができるかを解析した。培養 48 時間後の培養上清を回収し、LC-MS/MS により胆汁酸量を測定したところ、CDCA や LCA からは iso-allo-LCA, 3-oxo-allo-LCA とともに検出されなかったが、3-oxo- Δ 4-LCA を培養液に加えた場合には *Parabacteroides merdae* や *Odoribacteraceae* などの細菌株が iso-allo-LCA を産生できることが明らかになった。一方で CDCA を基質として加えた場合は *C. scindens* が LCA へと変換することができること、LCA を基質として加えた場合は *E. lenta* が iso-LCA へと変換できることも明らかになった。さらに、*P. merdae* や *Odoribacteraceae* が iso-LCA から iso-allo-LCA を合成できることがわかり、これらの *C. scindens*, *E. lenta*, *Odoribacteraceae* の共培養系に一次胆汁酸である CDCA を加えたところ、3 種の菌の組み合わせにより iso-allo-LCA が産生された。以上のことから、百寿者に多く存在する複数の腸内細菌種を介した二次胆汁酸の代謝経路によって CDCA から iso-allo-LCA へと変換されていることが明らかになった。次に、二次胆汁酸である DCA や iso-LCA がグラム陽性の Pathogen の増殖を抑えることが知られていたため、この iso-allo-LCA も同様の機能を有しているのかを解析した。*In vitro* の解析結果から、DCA や iso-LCA と比較して 3–10 分の 1 の低濃度で *Clostridium difficile* や VRE, MRSA などのグラム陽性菌の増殖を抑え、さらにマウスを用いた *in vivo* の解析においても *Odoribacteraceae* を定着させることで有意に *C. difficile* の感染を抑制することが

できた。

【考察】

本研究では、百寿者に特徴的な新規二次胆汁酸を特定し、長寿に関与する腸内細菌種の同定を行った。百寿者の便中に有意に多く存在していた iso-allo-LCA がグラム陽性 Pathogen の腸内での増殖を抑え炎症抑制に寄与していること、それが長寿につながっている可能性が考えられた。また、胆汁酸は宿主の FXR や TGR5などを介し、コレステロール代謝や糖代謝に関与していることが知られていることから、今後は iso-allo-LCA の宿主への影響を詳細に解析していく予定である。同時に百寿者に有意に多く存在していた 3-oxo-allo-LCA などの他の二次胆汁酸についても腸内細菌による代謝経路の同定、その役割の解明を行って行きたいと考えている。

【文献】

Sato, Y., Atarashi, K., Plichta, DR., Arai, Y., Sasajima, S., Kearney, SM., Suda, W., Takeshita, K., Sasaki, T., Okamoto, S., Skelly, AN., Okamura, Y., Vlamakis, H., Li, Y., Tanoue, T., Takei, H., Nittono, H., Narushima, S., Irie, J., Itoh, H., Moriya, K., Sugiura, Y., Suematsu, M., Moritoki, N., Shibata, S., Littman, DR., Fischbach, MA., Uwamino, Y., Inoue, T., Honda, A., Hattori, M., Murai, T., Xavier, RJ., Hirose, N. & Honda, K.: Unique bile acid-metabolizing bacteria in centenarians' microbiome, *Nature* (accepted)

新生児期のケトン体合成はミトコンドリアタンパクのアセチル化修飾を調節して機能を維持する。

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、空腹時のエネルギー基質として知られる。しかしながら、新生児期においては、摂餌状態に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には、エネルギー基質供給以外の作用があると考えて検討を進めた。

【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。

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。

一方核においては、*Hmgcs2* KO マウスでヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性が亢進し、ヒストンタンパクの脱アセチル化が亢進していることを確認した。 β ヒドロキシ酪酸の投与により HDAC 活性が抑制されることから、*Hmgcs2* KO では β ヒドロキシ酪酸を失うことにより、内因性の HDAC 阻害作用が低下すると考えられた。

【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。新生仔期は、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と考えられる。また、HDAC 活性を介してケトン体がエピゲノム修飾に

作用することも確認され、これらの影響がどの程度遺伝子発現に影響しているのか、検討を進めている。

【文献】

Arima, Y., *et. al.*: Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation. *Nature Metabolism*, Feb; 3(2): 196-210, (2021).

C型ナトリウムペプチドによる軟骨細胞内 Ca²⁺活性化と骨伸長作用の解析

市村 敦彦

(京都大学大学院薬学研究科)

【目的】

本研究では、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が軟骨細胞内 Ca²⁺に与える影響の解析と骨伸長促進作用との関連の解明を目的とした。

【背景】

C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) は強力な骨伸長促進効果を持つことが知られている。現在、CNPアナログを用いて軟骨無形成症への適用を目指した臨床第III相試験が進められている。CNPは膜型グアニル酸シクラーゼである受容体 NPR2 を介して cGMP 産生を促し、cGMP 依存性タンパク質キナーゼ (PKG) が MAPK 経路を抑制することが報告されていたが、細胞内シグナル経路には不明な点が残されていた。我々は、生理的な軟骨細胞内 Ca²⁺動態をイメージングできる新たな実験系を構築するとともに、TRPM7 チャンネルを介した軟骨細胞内 Ca²⁺自発変動が骨伸長を促進していることを最近発見した。TRPM7 軟骨特異的欠損マウスは CNP や NPR2 の遺伝子欠損マウスと類似した表現型であったことから、CNP が TRPM7 を介した Ca²⁺シグナルを活性化することで骨伸長に寄与しているのではないかと考えて検証を行った。

【方法】

マウス胎児軟骨に CNP を処置し Ca²⁺イメージングを行った。想定されるシグナル経路上の分子群に対して阻害薬や活性化薬を用いて CNP による影響について検討した。膜電位感受性色素によるイメージングや免疫学

的手法による検証を実施し、CNP の Ca²⁺を介した新たなシグナル経路の同定を試みた。さらに、鍵となる分子の欠損器官培養軟骨を用いて骨伸長に与える影響を検証した。

【結果】

CNP 処置により軟骨細胞内 Ca²⁺が活性化されていることが明らかとなった。薬理的阻害・活性化実験と膜電位測定等で多角的に検討した結果から、CNP 刺激により活性化した PKG が大コンダクタンス Ca²⁺依存性 K⁺ (BK) チャンネルを活性化して過分極を引き起こし、TRPM7 を介した Ca²⁺流入を活性化していることが示唆された。実際に、*Trpm7* 欠損器官培養軟骨では CNP による伸長促進効果は観察されなかった。また、BK チャンネル活性化薬の処置により骨伸長が *Trpm7* 発現依存的に促進されることがわかった。

【考察】

一連の結果から CNP が細胞内 Ca²⁺を介して骨伸長を促進する新たな細胞内シグナル経路を同定した。これらの知見は臨床応用間近の CNP の作用の改善に寄与する基盤情報となると期待される。

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、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。我々は DCM 患者の約 10% を占めるラミン遺伝子 (*LMNA*) 変異陽性の患者は既存薬物療法に反応せず、特に予後不良であることを報告した¹⁾。さらに DCM 患者の心臓組織検体を用いた解析により、診断時心筋細胞における 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²⁾、*LMNA* 変異患者の検体でも著明な DNA 損傷蓄積を認めた。

【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 細胞株の樹立

家族性 DCM の患者 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、初期化因子を導入することにより iPS 細胞を樹立した。また、CRISPR/Cas9 を用いて該当変異を修復したコントロール株を作成した。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、これらから心筋細胞 (iPSCM) を誘導して実験を行った。

② iPSCM の DNA 損傷程度の評価

iPSCM を用い、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。

③ 化合物スクリーニング

先行研究で、DNA 損傷の蓄積は DNA 損傷応答シグナルを引き起こして心機能低下をもたらすことを示していたことから³⁾、DNA 損傷の蓄積軽減をリードアウトとして化合物のスクリーニングを行った。その結果、vitamin D2 が再現性のあるヒット化合物として抽出された。同化合物は心不全モデルマウスの心機能を改善することが分かった。

同定した vitamin D2 が DNA 損傷を軽減する機序を明らかにするため、LMNA 変異 iPSCM に同薬剤を投与して RNA-seq を行った。その結果、投薬後に DNA 修復に関与する酵素群の発現が誘導されていることが判明した。

【考察】

LMNA の変異は Hutchison-Gilford 症候群に代表されるように老化の促進と関与するが、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、vitamin D が DNA 修復酵素の誘導により DNA 損傷を軽減し、心機能悪化を防ぐ可能性が示唆された。今後は LMNA 変異で DNA 損傷が蓄積する機序、同薬の臨床応用に向けた知見の獲得を目指して研究を行う見込みである。

【文献】

- 1) *Sci Rep.* 2018, 31; 8(1):1998.
- 2) *JACC: Basic Transl Sci.* 2019, 4(6), 670-80
- 3) *Nat Commun.* 2017, 24; 8: 15104.

脂肪肝再生過程で生じる細胞死様式の誘導メカニズムの解明

稲葉有香

(金沢大学新学術創成研究機構)

【背景・目的】

脂肪肝における再生障害は、肝障害の遷延化・重症化を惹起するという危険性が知られる一方で、その病因・治療法の詳細は、解明されていない。我々は、脂肪肝再生障害誘導メカニズムの解明を進める過程で、肝再生過程の統合的ストレス応答に伴う細胞死の増加が、肝再生障害に重要であることを見出ししている。肝再生過程で発症する細胞死の様式は、脂肪肝の重症化に伴い変化する。実際、中等度脂肪肝ではアポトーシスが、高度脂肪肝では Ripk3 誘導性のネクロトーシスが誘導される。我々は、高度脂肪肝で発症するネクロトーシスが、ストレス応答性転写因子 Atf3 の欠損により阻害されることを明らかにしている。本年度は、*in vitro* 解析を中心として、ネクロトーシス誘導における Atf3 の役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】

野生型マウスから単離した初代培養肝細胞において、アデノウイルスにより Atf3 を過剰発現した。Atf3 過剰発現により、ネクロトーシス誘導因子 Ripk3 発現が増加した。そこで、Ripk3 プロモーター領域を有するレポーター遺伝子アッセイを行った。Atf3 は、-540 から +210 までの配列から成るマウス Ripk3 プロモーターの活性を容量依存的に亢進させた。Atf3 依存的なプロモーター活性化は、-60 から +210 までの配列では誘導されたが、-12 から +210 のみの配列では誘導されなかった。また、クロマチン免疫沈降法では、Atf3 は、Ripk3 プロモーターの -139 から -9 の配列に結合した。

次に、ネクロトーシスを特異的に検出する FRET プローブの安定発現細胞株を用い、Atf3 によるネクロ

トローシス誘導の検討を行った。当該安定発現細胞株においても、アデノウイルスによる ATF3 過剰発現が Ripk3 の遺伝子発現を誘導した。そこで、ネクロプトーシスを FRET により、細胞死を SYTOX (破綻した細胞膜のみを通過する核酸染色試薬) により評価した。Atf3 過剰発現により FRET 陽性細胞死を誘導した。また、TNF α 刺激は、FRET プローブ安定発現細胞株において、アポトーシスの特徴である細胞収縮を伴う FRET 陰性細胞死を誘導した。一方、Atf3 過剰発現下では、TNF α 刺激により細胞死が増加し、細胞の膨張を伴う FRET 陽性細胞死を来した。

【考察】

Atf3 は、Ripk3 発現を誘導し、TNF α などの刺激により誘導される細胞死の様式を、アポトーシスからネクロプトーシスに変容させることが示唆された。

を抑制 ② A β 線維を分解、さらに ③ A β の細胞毒性を抑制するという全く新しい作用機序を見出した。

【目的】

α -エノラーゼの A β 毒性制御機構のメカニズムを解明すること。

【方法】

α -エノラーゼがプロテアーゼ作用を介して、A β タンパクを切断するとの仮説を立てた。そこで、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いて、 α エノラーゼによる A β 線維形成抑制効果が減弱するか否かを検討した。セリンプロテアーゼ阻害剤:Pefabloc, アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤:PepstatinA, システインプロテアーゼ阻害剤:E-64, 金属プロテアーゼ:Phosphoramidon と EDTA を用いた。

【結果】

セリンプロテアーゼ阻害剤である Pefabloc SC を用いた際に、 α エノラーゼの線維形成抑制効果が阻害されることが判明した。まず、チオフラビン T 吸光度を用いた解析を行った。チオフラビン T はアミロイドの β シート構造を認識し、それに応じて吸光度が上昇し線維形成を間接的にモニタリングする測定手法である。 α エノラーゼの添加により抑制されていた吸光度の上昇(1A 緑)が、Pefabloc SC の添加によって、吸光度が上昇した(1A 紫)。透過型電子顕微鏡を用いた検討でも、 α -エノラーゼによる A β 線維形成抑制 (B 右上) が Pefabloc SC の添加によって線維が形成された (B, 左下)。ウェスタンブロット法を用いた検討でも、 α -エノラーゼの添加により A β 線維に該当するバンドが消失するが (C, 矢頭, 2 レーン目) (D, 右から 2 つ目の棒グラフ), Pefabloc SC の添加によって A β 線維に該当するバンドが出現した (C, 矢頭, 3 レーン目) (D, 右から 3 つ目の棒グラフ) (論文投稿中)。

【考察】

α -エノラーゼがセリンプロテアーゼ活性を介し A β を分解し、A β の細胞毒性を軽減させる可能性を示した。

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部)

【目的】

申請者は CAA 罹患血管のプロテオミクス解析を行い、特異的な発現分子を同定した。その中で α -エノラーゼに着目し検討を行い、 α -エノラーゼが ① A β 線維形成

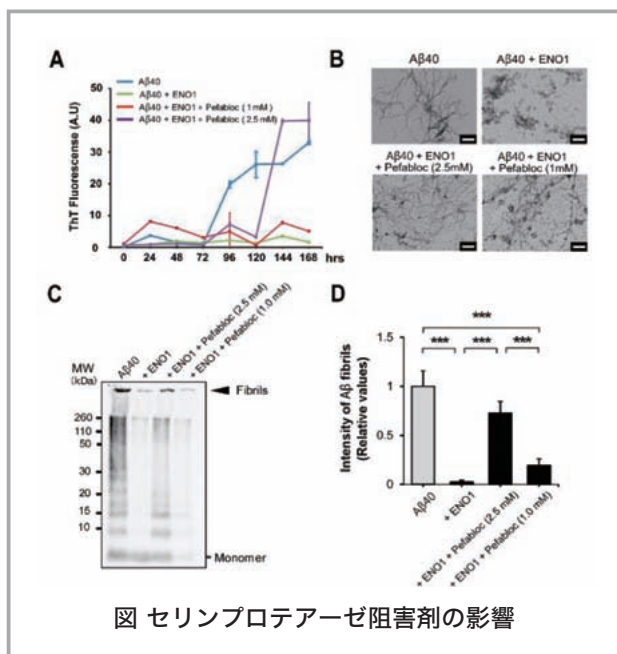


図 セリンプロテアーゼ阻害剤の影響

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)

【背景】

アルドステロン産生腫瘍はミネラルコルチコイドであるアルドステロンの自律的過剰分泌を認める腫瘍だが、近年グルココルチコイド過剰分泌の併存が示唆され、その心血管および代謝合併症への寄与に関する報告も蓄積されつつある。しかしグルココルチコイド過剰は血中・尿中代謝産物での評価にとどまっており、腫瘍内における生合成を直接的に評価した報告はないため、グルココルチコイド過剰の由来は明らかでない。

【目的】

アルドステロン産生腫瘍において、主要なグルココルチコイドであるコルチゾールの合成を直接的に評価する。

【方法】

副腎摘除術を施行したアルドステロン産生腺腫 11 例、対照群として非副腎皮質腺腫である副腎神経節細胞腫 3 例、および軽度のグルココルチコイド自律的過剰分泌を認める副腎性サブクリニカルクッシング症候群 7 例の腫瘍内コルチゾール含有量を液体クロマトグラフィー質量分析法で測定した。ついで、コルチゾールの質量分析イメージングを施行し、腫瘍内におけるコルチゾールの産生の局在を評価した。ターゲットキャプチャー法を用いて、副腎皮質腫瘍関連の体細胞遺伝子変異を網羅的に検索した。

【結果】

アルドステロン産生腺腫における単位重量当たりの腫瘍内コルチゾール含有量は、副腎神経節腫より有意に高値、副腎性サブクリニカルクッシング症候群より低値であった。質量分析イメージングではアルドステロン産生腫瘍内で均一にコルチゾールが検出され、その強度は副腎神経節細胞腫より高値、副腎性サブクリニカルクッシング症候群より低値であった。アルドステロン産生腺腫において、コルチゾール自律性分泌に関連する体細胞遺伝子変異は検出されなかった。

【考察】

本研究より、アルドステロン産生腫瘍において、アルドステロンのみならずコルチゾールも産生することが示唆された。副腎皮質由来細胞では複数のステロイドホルモン産生能を有する可能性が考えられる。

Bodywide transcriptome landscape in mouse models and human

浦 山 恭 次

(国際電気通信基礎技術研究所佐藤匠徳特別研究所)

【目的】

従来の疾患研究は、少数の器官や組織に限定されてきました。しかし、生体はより複雑な多臓器連関ネットワークで成り立っており、多くの疾患は一つの器官だけではなく、複数の器官に影響を及ぼすことがわかってきている。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る。

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（全身網羅的多臓器遺伝子発現地図、iOrgans Atlas）を構築した。これらのデータベースを活用し、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、それら臓器連関の詳細な解明を行っている。

【方法】

我々が発見した新たな臓器連関の 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表現型の解析を行った。これら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・scRNA-seq 解析や生理学的および組織学的実験手法により全身網羅的に解析を行った。また、ヒト由来検体を用いた臨床研究も行い、ヒトにおける役割の解明も行っている。

【結果&考察】

多臓器 RNA-seq 解析及び scRNA-seq 解析の解析結果より、新たな臓器連関の Key となる遺伝子の発現臓器と発現細胞種を同定する事が出来た。また、生理学的解析結果より、Key となる遺伝子が生体内恒常性を維持するのに重要な因子と作用する事で、多臓器連関に寄与している可能性を示唆するデータが得られた。現在、ヒト由来検体を用いた臨床研究にて、この Key となる遺伝子の発現の変化が特定の疾患のバイオマーカーになりうるか解析を行っている。

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、短眠状態を長期間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、同マウスの代謝調節に関わるパラメータを測定し、短眠との関連性を探った。

【方法・結果】

中脳と橋をまたぐ脳部位・腹側内側中脳橋 (VMP) をジフテリア毒素の発現により GABA 作動性神経選択的に欠損させ、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。しかし D2 受容体の欠損は睡眠リバウンドの消失に影響しなかったため、この睡眠恒常性調節は D2 受容体を必要とせず、かつ睡眠量調節とは異なるメカニズムであると示唆された。一方、VMP GABA 神経欠損マウスに高脂肪食を摂取させた結果、摂食量が多いことが判明し、

摂食行動における異常が明らかとなった。さらに高脂肪食摂取にも関わらず肥満になりにくく、代謝調節における異常も推察された。詳細に調べた結果、エネルギー代謝の有意な増加が判明し、これが抗肥満作用の原因であると示唆された。このように、VMP GABA 作動性神経は睡眠・躁病様行動・摂食行動・代謝調節など多岐にわたる機能を持つことが判明した。

【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).

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。本研究では高濃度 Trp による細胞毒性の原因を明らかにする。

【方法と結果】

出芽酵母の非必須遺伝子変異株ライブラリ (5,153 遺

伝子の欠損株)を用いて、高濃度 Trp への耐性に必要な遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、1,111 遺伝子の欠損株が、高濃度 Trp に感受性を示すことを見出した。この中には、細胞膜や細胞壁へのストレス応答に必要な Cell Wall Integrity (CWI) 経路の遺伝子欠損株がいくつか含まれていた。そこで、CWI 経路の遺伝子欠損株について、改めて高濃度 Trp への感受性を調べた。その結果、CWI 経路上流の分子(細胞膜や細胞壁のセンサーなど)の遺伝子欠損株は高濃度 Trp に感受性を示さなかったが、その下流のキナーゼカスケードや転写因子の遺伝子欠損株は高濃度の Trp に感受性を示した。このことから、CWI 経路の下流のシグナルが高濃度 Trp への耐性に必要であることが示された。また、細胞内に Trp が蓄積する遺伝子変異株を用いて、細胞内 Trp の蓄積は細胞壁ストレスへの感受性を引き起こすことも示唆された。

【考察】

以上の結果から、過剰な Trp によるアミノ酸恒常性の異常への応答に CWI 経路が必要であり、細胞内の Trp の蓄積は細胞壁ストレスへの正常なシグナル伝達を妨げる可能性が示された。すなわち、Trp の蓄積による正常な CWI シグナルのかく乱が、Trp の毒性に寄与している可能性がある。

食品由来シグナルによる視床下部の摂食調節ホルモンの感受性変容

金子 賢太郎

(京都大学大学院農学研究科)

【背景】

視床下部は栄養状況に応じたエネルギー・糖代謝の制御中枢であり、栄養情報を脳に伝えるホルモンにより調節されている。外因性の食シグナルが視床下部機能に介入していることが想定されるが、その分子的全容はほとんど分かっていない。

【目的】

我々はこれまでに高脂肪食飼育マウスの脳において、低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性化に起因し、肥満や

レプチン抵抗性、糖代謝異常が誘発されることを報告した (*Cell Rep* 2016)。本研究では、視床下部 Rap1 と糖代謝制御の相互作用を解明することを目的とした。

【方法】

AAV 活性型 Rap1 (GTP-locked *Rap1* variant) および AAV-Cre の視床下部内側野への局所投与または視床下部腹内側核特異的な Rap1 欠損マウスの作製により、視床下部特異的に Rap1 を活性化/欠損させたマウスを作製し、それぞれのマウスにおける糖代謝やインスリン感受性の表現型を解析した。

【結果】

視床下部内側野における Rap1 活性化の誘導または抑制により、急速に血糖が変化することを見出した。さらに、糖代謝への関与が知られている視床下部腹内側核特異的な Rap1 欠損マウスを作製した結果、高脂肪食飼育条件下において、欠損マウスでは体重変化を伴わずに血糖値が正常化すること、耐糖能やインスリン感受性が増大すること、高脂肪食によるレプチン抵抗性やインスリン抵抗性が改善されること、を明らかにした。加えて、薬理的に脳の Rap1 を阻害することにより、肥満マウスにおける糖代謝異常の改善効果を示した。

以上より、視床下部 Rap1 が糖代謝制御における重要分子であり、Rap1 経路が糖尿病治療における新しいターゲットであることを明らかにした (*JCI insight* 2021)。

【考察】

Rap1 シグナルは、GPCR-Gs/cAMP/Epac シグナルにより活性化される。最近、腸管ホルモン GIP による視床下部 GPCR/Rap1 活性化を介したレプチン抵抗性発症機構を報告した (*J Clin Invest* 2019)。つまり、視床下部 Rap1 が腸脳連関を介した内・外因性の GPCR リガンドの制御下にあると考えられる。そこで現在、食由来 GPCR シグナル (*Peptides* 2021) と視床下部 Rap1 シグナルのクロストークの実態解明に向けた研究を遂行している。

細胞内滞留型 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ 活性検出蛍光プローブの開発とがんイメージングへ の応用

神谷 真子

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

がんの外科手術において、蛍光物質を用いてがん部位を可視化する「術中イメージングガイダンス」が注目されている。我々はこれまでに、がんの特徴的な酵素活性により蛍光が大きく増強する蛍光プローブを開発し、それを用いたがんイメージング法の確立に取り組んできた。しかしながら、これらの蛍光プローブは、酵素反応により生成する蛍光性生成物の細胞内滞留性が十分でないことが課題であった。そこで本研究では、我々が確立した細胞内滞留型蛍光プローブの設計法に則り¹⁾、特定のがんで活性が亢進している γ -glutamyltranspeptidase (GGT) を標的とした新たな細胞内滞留型蛍光プローブの開発とがん蛍光イメージングへの応用を検討した。

【方法・結果】

具体的には、GGT との反応によりアザキノンメチド活性中間体を産生し、それが細胞内求核分子と反応することで、蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する細胞内滞留型蛍光プローブ 4-CH₂F-HMDiEtR-gGlu を開発した。GGT を高発現・低発現する培養がん細胞に適用したところ、GGT 発現量に応じた蛍光シグナルを示し、さらにその蛍光シグナルは洗浄・固定操作に耐性があり、既存プローブ (gGlu-HMRG) に比べて細胞内滞留性が向上したことが示された。次に、動物個体におけるがんを高い細胞内滞留性で可視化できるか、すい臓がんの患者腫瘍組織移植 (PDX) モデルマウスを用いた評価を行った。その結果、gGlu-HMRG を用いた場合には時間とともに蛍光性生成物が拡散してしまうのに対し、4-CH₂F-HMDiEtR-gGlu を用いた場合には長時間のがん *in vivo* イメージングが可能であることを示した。また、*in vivo* 蛍光イメージング後に腫瘍組織を摘出して免疫染色を行うことも可能であり、4-CH₂F-HMDiEtR-gGlu は既存プローブに比べて高い細胞内滞留性・固定処理耐性を有することが示された²⁾。

【考察】

今後、外科手術で摘出した臨床検体に適用し、感度・特異度、細胞内滞留性などを評価し、実臨床で利用できる性能を有するか評価していく。

【文献】

- 1) *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 9620-9624 (2016).
- 2) *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 2125-2129 (2021).

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。2019 年度の実験では db/db マウスの副腎において PLIN1 の発現増加を認め、また代謝変化によりステロイドホルモン合成が亢進することが示唆された。2020 年度は PLIN1 を副腎癌細胞株に過剰発現・ノックダウンした際の代謝関連遺伝子群の変化を検討した。

【方法】

マウス副腎癌細胞株 Y-1 細胞に PLIN1 の過剰発現プラスミドならびに siRNA を投与した状態でブドウ糖濃度を変え、ステロイドホルモン産生ならびに代謝への影響を検討した。ブドウ糖濃度は 100mg/dL, 450mg/dL で 24 時間培養後 ACTH 投与を 3 時間行い、上清、RNA, 蛋白を回収し解析を行った。同様の系で脂肪滴の観察も行った。

【結果】

PLIN1 の Y1 細胞への過剰発現によりステロイド合成酵素のベースの発現が増加し、Dhcr24 のベースの発現も増加した (図 1)。Irs1, Acc の発現は低下しインスリンシグナルと脂肪酸合成の低下が示唆された。PLIN1 過剰発現によりプロゲステロン分泌量は増加し、PLIN1 siRNA 投与によりベースならびに ACTH 投与時の分泌量は低下傾向を認めた (図 2)。脂肪滴の観察では PLIN1a, 1c の過剰発現で脂肪滴発現は増加し、siRNA

投与により低下した (図3).

【考察】

PLIN1 の発現は副腎内の代謝を調整しステロイドホルモンの合成を制御する可能性が示唆された. 治療標的としての検討を進めていく.

【文献】

- 1) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor may exacerbate Graves' disease: a multicenter observational case-control study. Sekizaki, T., Kameda, H., Nomoto, H., Cho, KY., Nakamura, A., Takahashi, K., Miyoshi, A., Wada, N., Takeuchi, J., Nagai, S., Miyoshi, H., Atsumi, T.: *J Diabetes Investig.* 2021 May 17. (corresponding)

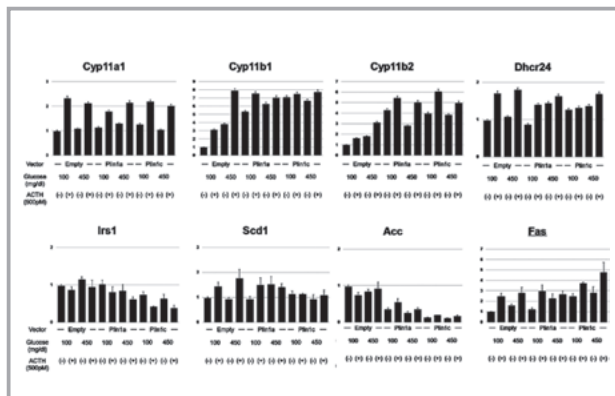


図1 PLIN1 過剰発現 リアルタイム PCR

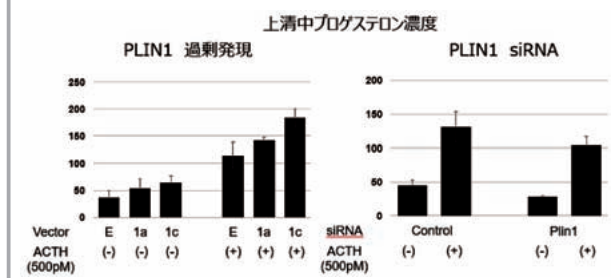


図2

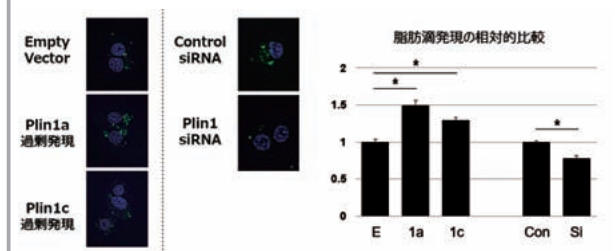


図3

AT1/RAGE 複合体を介した AGE による新規シグナル伝達メカニズム

河合達男

(Temple University School of Medicine)

【目的】

生体内を循環する脂質や蛋白は、加齢や生活習慣等で様々な修飾を受け細胞傷害の原因となる物質に変化し、血管・臓器障害をきたす。また、RAAS の過度の亢進は、Ang II の増加から、主に G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である Angiotensin receptor type 1 (AT1) の過剰な活性化をきたし臓器障害に繋がる。我々は既報において、酸化 LDL のパターン認識受容体である LOX-1 が AT1 と細胞膜上で結合しており、加齢等により増加した酸化 LDL は AT1 活性化を介して血管障害・組織障害を促進することを報告した。今回我々は、最終糖化産物 (AGE) のレセプター RAGE が同様に細胞膜上で AT1 と結合しており、AGE は AT1/RAGE 複合体を介して細胞内シグナル伝達を起こすとの仮説を立て検討をおこなった。

【方法と結果】

我々はまず RAGE とともに AT1, AT1 変異体 (細胞内シグナル伝達を惹起しないよう変異をおこしたもの)、AT2 をそれぞれ共発現させた CHO 細胞を作成し、共免疫沈降や *in situ* PLA 法にて細胞膜上で RAGE と AT1 が結合していること、および RAGE と AT2 は近接していない事を確認した。また AT1 拮抗薬である ARB の投与によって RAGE と AT1 の複合体は影響を受けなかった。RAGE および AT1 を発現させた CHO 細胞を RAGE リガンドで刺激すると、AngII で刺激した場合と同様に細胞内 cAMP 濃度が低下したが、RAGE のみ、もしくは RAGE と AT1 変異体を共発現させた細胞ではこうした結果は見られなかった。Gai 阻害薬および ARB の前処置によりこれらの影響が阻害されたことから、RAGE リガンドは AT1/RAGE 複合体を介して Gai 依存的にシグナル伝達を惹起していることが示された。ラット腎由来の上皮細胞 NRK52E を RAGE リガンドで刺激することにより ERK リン酸化が起こり、これは ARB で前処置をすることにより抑制された。また、RAGE リガンドの刺激による ERK リン酸化は、RAGE

のノックダウンのみならず、AT1 のノックダウンによっても抑制された。同様に、RAGE リガンドによる NF κ B の活性化も ARB および RAGE 阻害薬によって抑制された。RAGE リガンドは NRK52E に上皮間葉転換を起こすが、この反応も ARB の前投与により抑制された。一方、RAGE を介さない TGF β による刺激による上皮間葉転換は ARB の前投与では抑制されなかった。

【考察】

RAGE と AT1 が細胞膜上で複合体を形成しており、RAGE リガンドはこの複合体を介して Gi を活性化し、AT1 依存的な細胞内シグナル伝達を惹起することが証明された。このことは、Ang II および最終糖化産物 AGE が共通の受容体を介して血管・臓器障害を促進する、という全く新規の概念を提唱するものである。最終糖化産物は糖尿病など高血糖状態で増加しており、それらによる RAGE 活性化は ROS 産生や炎症などを介して動脈硬化、糖尿病、腎疾患、アルツハイマー病など多くの疾患に関与することが示されている。一方、高血圧患者において AT1 の活性化が臓器障害を惹き起こすことも広く知られている。本研究により、糖尿病患者等で AT1 を重要な治療標的と考えることにより、血管・組織障害の発症・進展に対する革新的な介入が可能となることが期待できる。

【研究総括、現状および今後の抱負】

私は、大阪大学の医学部及び大学院医学系研究科を卒業した後、2014年からアメリカにわたって研究を続けています。そのため、応用酵素協会の活動への参加ができない期間が長くなっていましたが、昨年2020年は新型コロナウイルスの広がりもあり、研究会もオンライン発表となるなど、卒業の年度依頼ひさしぶりに参加することができ、大変刺激を受けました。日本にいてこの助成を受けた本テーマについては、大阪大学老年総合内科学の先生方に引き継いでもらいながら、ともに研究を続けていくことができました。また、アメリカにおいても、同様の研究テーマである心血管病や老化・炎症・代謝といったことを主な研究テーマとして研究を続けています。応用酵素協会でサポートいただいたことや、また研究会でいろいろな刺激をもらったことを糧にして、今後も引き続き、こうした疾患の病態の解明や治療につながる礎となるような研究を続けていきたいと思えます。

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)

【目的】

本研究の目的は、がん起因する宿主の病態生理のメカニズムを理解することである。がんは宿主個体にさまざまな悪影響を及ぼす。例えば、がん起因する脂肪や筋肉の減少、体重の減少などを代表例として挙げることができる。これらの症状は臨床的にはがん悪液質として知られる。現時点では、がん悪液質を強力に制御する方法は存在しない。がん悪液質の実態がきわめて複雑であり、その詳細なメカニズムがわかっていないことが原因であると考えている。実際、ある臓器（例えば脂肪）の異常について、どのような因子がどのようにその異常に関わっているのか、ということに関する我々の理解は極めて限定的である。そこで、本研究では、がん起因して起こる宿主臓器の異常について、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

【方法】

マウスにがんを移植し、宿主臓器を採取、その状態をマルチオミクスによって調べる、という戦略を採用している。がんによって起こるマルチオミクスの変化を手がかりとして責任因子の候補をリストアップし、当該遺伝子を欠失または過剰発現させたマウスを作る。当該マウスに改めてがんを移植し、がん起因して起こる病態生理に変化があらわれるかを観察する、という流れである。

【結果】

これまでに、本助成の支援を受けながら、乳がんが肝臓の概日リズムを攪乱するということや (Hojo *et al.*, *Oncotarget*, 2017)、腸のがんが肝臓のコレステロール代謝を乱し、炎症をひき起こす、ということを見出してきた (Enya *et al.*, *Dis. Model. Mech.*, 2018)。本年度は、これらの成果をもとに、がん起因する肝臓の異常に関わる新規因子を探索した。その結果、肝臓に起こる異常の一部の責任を担う新規因子を発見することができた。

【考察】

本研究の進展により、がん起因する肝臓の異常を、新規宿主因子の立場から捉えることができるようになった。

た。特に、がんによって起こる多様な異常を、本因子に依存するものとそうでないものに分けることができるようになった点が重要であると考えている。今後も、上記の戦略に基づいた研究を展開し、がん悪液質という複雑な現象を丁寧に理解していきたい。

【文献】

参考として、本年度に執筆した和文の総説を2件、付記させていただく。

- 1) 小西理予, 河岡慎平. (2020). エンハンサーを利用した細胞の制御. *実験医学*. **38**, 17: 100-106.
- 2) 北條広朗, 水野林, 河岡慎平. (2020). マルチオミクスを活用したがん悪液質の理解. *実験医学*. **38**, 8: 1300-1305.

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】

自閉症スペクトラムは、言語障害・コミュニケーション障害・限定された興味・反復行動などを主徴とする発達障害である。自閉症発症率は子供の50-100人に1人と高く、社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症原因について多くは不明である。これまでに、数割にのぼる多くの自閉症児について脳の局所（前頭前野など）における肥大が起こることが報告されている。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を明らかにした。また、自閉症患者においてみられる特徴である神経活動のバランス異常（E/Iバランス異常）が観察された。これらの結果から、Fgfシグナルの異常は脳肥大を引き起こすことで自閉症発症につながる可能性が示唆された。

自閉症児や脳局所肥大モデルマウスは生後初期に脳肥大が見られるため、肥大の原因は胎生期の神経幹細胞の増殖異常に起因する可能性を考えた。そこで本年度においては、胎生期神経幹細胞においてどのような分子的異常が引き起こされるのかを調べた。その結果、胎生早期の大脳領域特異的な遺伝子発現の変化が明らかになった。

【考察】

本年度の結果から、局所脳肥大を伴う自閉症の発症メカニズムの一旦として、胎生期における脳局所的な遺伝子変化に関与する可能性が示唆された。自閉症研究は主に生後の自閉症症状を担う分子メカニズムの解析が中心となってきたが、本研究により胎生期において既に発症に関わる異常が引き起こされている可能性が考えられる。

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

神戸悠輝

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

【目的】

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）は、視床下部に高発現する神経ペプチドで、摂食調節に関与することが明らかとなっている。これまでの研究から、PACAPの脳内投与は摂食を抑制するが、PACAPをノックアウト（KO）しても摂食を抑制する事から、PACAPには相反する正負の摂食制御メカニズム

が存在すると推察されるが、その詳細は不明であった。近年申請者は、視床下部・腹内側核に存在する PACAP 発現細胞は昼と夜の間で役割を変え、昼は摂食抑制、夜は摂食促進に寄与することを報告し (Nguyen, Kambe (2020) *Mol. Neurobiol.*), GPCR 研究会にて松尾研究奨励賞を受賞した (Nguyen (2020)). すなわち、PACAP・KO マウスでは、昼の摂食量の増加、夜の摂食量の減少が観察され (図 1)、一方で、腹内側核への PACAP 過剰

発現マウスでは、昼の摂食量の減少、夜の摂食量の増加が観察された (図 2 上段)。特に、同マウス視床下部・弓状核において、昼間では POMC (摂食抑制ペプチド) の、夜間では AgRP (摂食亢進ペプチド) の発現が増加した事は興味深い (図 2 下段)。このメカニズムを追求すると、腹内側核に存在する PACAP 発現細胞からの神経投射が、弓状核の POMC 発現細胞 (摂食抑制神経細胞) と、AgRP 発現細胞 (摂食促進神経細胞) の間で交代し、昼では POMC 発現細胞を、夜では AgRP 発現細胞を選択的に活性化する可能性を世界で初めて見出した (図 3)。本研究では、腹内側核 PACAP 発現細胞からの神経投射が、POMC および AgRP 発現細胞間で交代するメカニズムと、同メカニズムの肥満症における病理学的な関与を解明する。

【方法】

申請者は、POMC あるいは AgRP プロモータの下流で RCaMP あるいは GCaMP (赤色あるいは緑色のカルシウムセンサータンパク質) を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を開発した。さらに、申請者は腹内側核 PACAP 発現細胞の活動を特異的に調節するために、PACAP-Cre マウスを導入した。PACAP-Cre マウスの腹内側核に hM3D (人工リガンド CNO で特異的に活性化される Gq 共役型受容体) を発現する AAV を、POMC あるいは AgRP プロモータの下流で RCaMP あるいは GCaMP シウムセンサータンパク質を発現する AAV をマウス弓状核に感染させ、CNO 投与後の弓状核における赤色あるいは緑色の蛍光をファイバーフォトメトリー

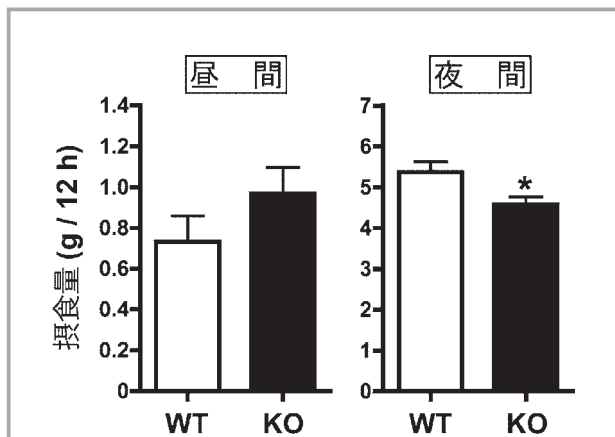


図 1 昼夜間における PACAP KO マウスの摂食量 (n=8)

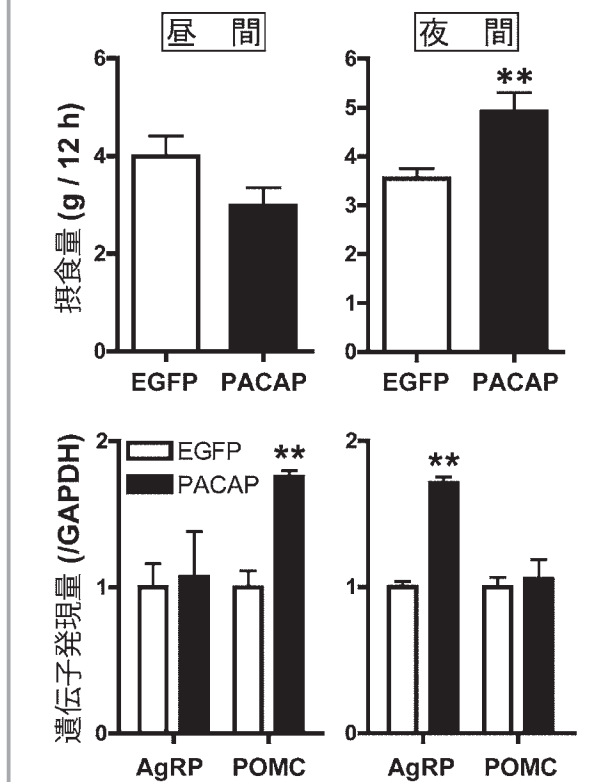


図 2 昼夜間における腹内側核 PACAP 過剰発現マウスの摂食量と遺伝子発現量 (n=8)

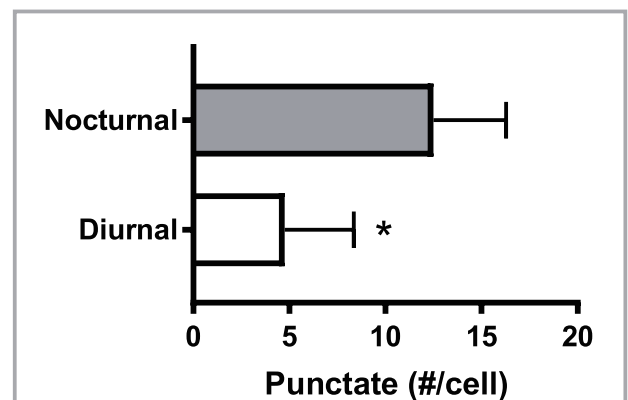


図 3 昼夜間における腹内側核 PACAP 発現細胞と弓状核 AgRP 発現細胞のシナプス結合数 (n=5)

で計測すると、腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化したときにおける、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を同時に、自由行動下のマウスから測定できる。この実験系を利用して、夜間に CNO を投与した後、グレリンを脳室内投与した後において、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を計測した。

【結果】

夜間に CNO を投与しても、弓状核 AgRP 発現細胞の発現する GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、弓状核 POMC 発現細胞の発現する RCaMP 蛍光強度の減弱が観察された。すなわち、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、弓状核 POMC 発現細胞の活動を抑制する可能性が示された (図4a)。さらに、同様の処置をしたマウスの脳室内にグレリンを投与すると、弓状核 AgRP 発現細胞の発現する GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、弓状核 POMC 発現細胞の発現する RCaMP 蛍光強度の増強が観察された。この結果は、グレリンによる POMC 発現細胞の活性化を示唆する。一方、RCaMP および GCaMP を発現

しているマウスを灌流固定し、組織学的な解析に供すると、ファイバーフォトメトリ用オプティカルフェールが挿入されていた部位において RCaMP 陽性神経細胞が多数検出されたのに対して、GCaMP 陽性の細胞はほとんど観察されなかった (図5)。このことが、GCaMP の蛍光の増減が観察出来なかった理由と推察される。

【考察】

以上の解析から、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、摂食抑制系の弓状核 POMC 発現細胞を抑制する可能性が明らかとなった。申請者らはこれまでの報告において、腹内側核 PACAP 発現細胞は夜間に摂食亢進作用を惹起する可能性を示唆しており、その結果をサポートする重要なデータである。今回は AgRP 発現細胞の神経活動を記録することが出来なかったが、今後は、AgRP プロモータの下流に最小のサイトメガロウイルスプロモータを組み込むなど、GCaMP の発現を増強する処置を施した AAV を調製し、AgRP 発現細胞が上記と同条件において活性化することが確認できれば、非常に興味深い結果となる。一方で、グレリンは摂食亢進ホルモンであることから、グレリンの投与によって摂食を抑制する働きのある POMC 発現細胞を活性化したことは意外であった。この理由は不明であるが、今後詳細に解析していく。

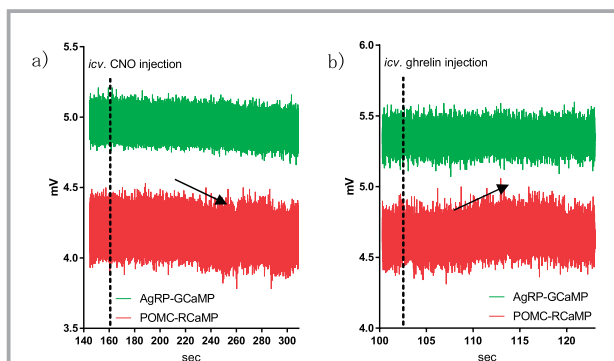


図4

a) 夜間に CNO を脳室内投与した後の、RCaMP (POMC 発現細胞, 下段) および GCaMP (AgRP 発現細胞, 上段) の蛍光強度, b) 夜間にグレリンを脳室内投与した後の、RCaMP (POMC 発現細胞, 下段) および GCaMP (AgRP 発現細胞, 上段) の蛍光強度

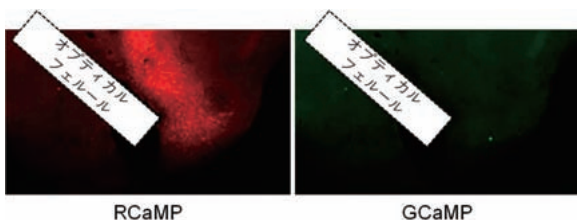


図5 オプティカルフェールが留置された位置および弓状核における RCaMP あるいは GCaMP の発現分布

骨格筋再生を主導する多細胞間相互作用ネットワークの解析

小池博之

(日本医科大学大学院医学研究科)

【目的】

本研究では、3次元ライブイメージング技術および経時的なシングルセルトランスクリプトーム解析技術を組み合わせることで、筋衛星細胞を起点とした筋組織の再生過程を時空間的に捉えることを試みた。

【方法】

(1)細胞局在の経時的な変動追跡

筋衛星細胞とマクロファージとの空間的配置情報を取得するため、マクロファージ特異的な蛍光レポーターマ

ウスを対象に、組織透明化処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて筋組織中の三次元的な局在情報を取得した。

(2)シングルセル RNA シークエンスを用いた筋再生を制御する分子基盤の解析

筋組織の炎症や再生が見られる時期を対象に、筋組織中の筋衛星細胞、マクロファージおよび周囲の間葉系細胞を対象としたシングルセル RNA シークエンスを実施し、相互作用解析を進めた。

【結果】

(1)細胞局在の経時的な変動追跡

マクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスを対象に、カルジオトキシン誘導性筋損傷モデルを作出し、筋組織中の三次元的な局在情報を取得した結果、炎症反応の活性化が見られる損傷3日目の組織では、一部のマクロファージが骨格筋線維の周囲に密接に集積していることが確認された。

(2)シングルセル RNA シークエンスを用いた筋再生を制御する分子基盤の解析

炎症期の骨格筋組織からフローサイトメトリーで単離した筋衛星細胞、マクロファージおよび周囲の間葉系細胞を対象に、シングルセル RNA シークエンスを実施した。組織に含まれる細胞集団を特定するために Seurat を用いてクラスターへ分割した。分割されたクラスターのうち、筋衛星細胞と筋芽細胞を含む集団を抽出し、擬時間解析を用いて連続的な細胞分化状態を捉えることを試みた。未分化なマーカーと分化マーカーの発現量を比較したところ、擬時間軸の進行に伴って、筋衛星細胞の分化が進むことが確認され、また、分化途上にある細胞集団では、細胞周期に関わる遺伝子発現が亢進しており、活発に増殖していることが示唆された。さらに増殖の活性化している時期特異的に発現増加が見られるシグナル候補を抽出することに成功した。

グレリン分泌細胞における GPCR 発現解析および新規調節因子の探索

小山 博之

(名古屋市立大学大学院医学研究科)

【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。

サルコペニアのメカニズムは不活動な生活習慣や不十分な栄養など外的要因にくわえ、神経変性や(同化・異化)ホルモンの異常、慢性炎症、ミトコンドリア機能の低下、オートファジーやプロテアソーム系の亢進など多岐にわたる。メカニズムの更なる解明や新規治療法の探索のためには実験モデルマウスが必要であるが定まったものではなく、骨格筋内の主要分子の遺伝子改変マウスや後肢懸垂モデル、あるいは老化マウスが用いられることが多い。我々は現在 AKR/J をベースとした交配のなかで寿命短縮を呈した近交マウス SAMP (Senescence-Accelerated Mouse) に注目し、モデルマウスとしての妥当性を検証するため本マウスのヒトサルコペニアとの類似点の検討を行っている。

【方法および結果】

SAMP1 マウスは対照マウス (SAMR) と比較し有意に四肢握力が低下し、ヒラメ筋骨格筋量も減少していた。また、トレッドミルを用いた走行試験にて走行距離が有意に低下し、試験終了時における血中乳酸値上昇を認め運動耐容能の低下が示唆された。また、SAMP1 マウスは血中 T-chol や ALB、テストステロンの有意な低下を認め、ipGTT を行うと 0 分および 30 分における血糖値が有意に上昇していた。一方で 18 週齢における血中デスアシルグレリン・IGF-1 は SAMP1 マウスが有意に上

		SAMP1 マウス(SAMRと比較して)	
体重			不変
四肢握力	18週齢		低下
	48週齢		低下
ヒラメ筋量	48週齢		低下
トレッドミル試験	18週齢	走行距離	低下
		血中乳酸	上昇
	48週齢	走行距離	低下
		血中乳酸	上昇
血中総コレステロール	48週齢		低下
血中アルブミン	48週齢		低下
ipGTT血糖値	48週齢		上昇(0分、30分値)
血中TNF-α	18週齢		上昇
血中テストステロン	18週齢		低下
血中デスアシルグレリン	18週齢		上昇
血中IGF-1	18週齢		上昇

昇していた。両マウスの表現型の差異を図に示す。

【考察】

今回の検討により SAMP1 マウスがヒトサルコペニア診断に必須の筋力・筋量が低下し、運動耐容能の低下、(体重減少はないが) 低栄養、耐糖能異常、慢性炎症亢進、テストステロン低下という共通する表現型を複数有していることが明らかとなった。本マウスを用いて昨年度は EPA/DHA が視床下部・肝臓・骨格筋の慢性炎症改善を介してサルコペニアを改善させることを報告したが、今後、受容体アゴニストが臨床応用可能となったグレリンの抗サルコペニア作用に期待し検討を進めていく予定である。

【文献 (2020 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

独自骨格を用いる三次元ライブラリアプローチによる新規オレキシン受容体リガンドの創製

齊藤 毅

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

オレキシンは視床下部外側野で産生される神経ペプチドであり、2つのオレキシン受容体 (OX₁R, OX₂R) に結合することで睡眠覚醒や情動を制御する¹⁾。特に、オレキシン受容体の活性化は覚醒を安定化することから、その拮抗薬は不眠症治療薬として利用されている。一方、脳内オレキシン量が減少すると、深刻な睡眠障害であるナルコレプシーを発症することが知られ、特に OX₂R 作動薬はナルコレプシー治療薬として期待される²⁾。これまでに我々は、世界初の OX₂R 選択的作動薬 YNT-185 を見出し³⁾、OX₂R 選択的作動薬がナルコレプシー症状の抑制に有効であることを立証してきた⁴⁾。このようにオレキシン受容体は創薬上有用な標的であるものの、これまでに同一骨格を共通して有する拮抗薬、作動薬は見出されておらず、リガンドの合理的な設計指針は未だ確

立されていない。そこで本研究では、同一骨格を有するリガンドの開発を目指し、独自に開発した三次元的骨格を活用するライブラリースクリーニングから構造最適化までを実施した。

【方法】

1,3,5-Trioxazatriquinan は、我々の研究室で見出した新奇複素環化合物であり、その骨格は堅牢で半球状の構造を取るため、骨格上の置換基を3次元的に配置することを可能とする。この特性に注目し、様々な置換基を有する 1,3,5-trioxazatriquinan フォーカスライブラリーを構築し、OXR に対する活性を評価した。

【結果】

ニトロアセトフェノンを出発物質として 1,3,5-trioxazatriquinan 骨格を構築後、種々のファーマコフォアを導入することで 72 化合物からなるライブラリーを構築した。まず、OXR 拮抗活性を評価した結果、5 化合物が 1 μM 以下の濃度で OXR に対し結合親和性を示した。得られた Hit 化合物に対し置換基の最適化を行うことで、マウス腹腔内投与にて薬効を示す強力な OX_{1/2}R デュアル拮抗薬 YNT-2293 ($K_i = 3.99$ nM for OX₁R, 6.01 nM for OX₂R) および OX₁R 選択的拮抗薬 YNT-2294 ($K_i = 1.87$ nM for OX₁R) の創出に成功した⁵⁾。

一方、OXR 作動活性を評価したところ、いずれの化合物も作動活性を示さなかった。そこで、本骨格からさらに誘導化を行ったところ、弱いながらも作動活性を示す化合物を見出すことに成功した。

【文献】

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

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来mRNAを用いてmicroarray解析を実施し、非治療群に比べ治療群で2倍以上の有意な高発現を示す43因子を抽出した。高血糖毒性に対し感受性の高いこれら遺伝子の中には、膵β細胞機能における役割は未知だが、GWASにおいて2型糖尿病疾患感受性遺伝子として報告 (Tabassum, R. *et al.*, 2013) されている *Tmem163* が含まれており、ヒトの糖尿病病態との関連性を想定し、同因子に着目した。マウスにおける局在に関し、免疫染色および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) の経口ブドウ糖負荷試験において、血糖値は対照群に比べ有意な低値を、血漿インスリン値は有意な高値を示した。単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌も対照群に比べ有意な高値を示した。また電顕での解析において、対照群に比べSGのdense coreの密度低下が確認された。さらに免疫染色により、対照群に比べKOではインスリンの前駆体であるプロインスリンの分布が核周囲から細胞質全体へと変化しており、定量評価において膵島プロインスリン含量が増加傾向を示すことが明らかになった。

【考察】

これまでの結果からは、*Tmem163* はSGの成熟に必須で、膵β細胞機能に密接に関わることが示唆された。上記インスリン分泌亢進や電顕におけるSG成熟障害の像は、いずれも2型糖尿病初期に認められる所見であり、その病態形成への関与が想定される。本因子と細胞内重鉛制御との関連や、インスリン分泌亢進の機序に関し、昨年度に引き続き解析を進めている。

ドパミン-D1R シグナルが心不全に果たす役割の解明

住 田 智 一

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

神経伝達物質ドパミンは運動調節や情動に関わり、パーキンソン病等神経疾患の発症と治療に重要な役割を持っている。一方、ヒトの心不全においても、ドパミンアナログ、D1ドパミン受容体 (D1R) アゴニストの長期投与はその予後を悪化させることが報告されているが、心臓におけるドパミンの生理的作用や心不全における役割はほとんど明らかにされていない。本研究は、ドパミン-D1Rシグナルが心不全の発症・進展に関与するという仮説を検証することで、心不全発症および進展における新たな分子機構の解明に取り組む。

【方法】

心不全の進展とともに顕著に変化する遺伝子としてD1Rを見だし、その発現が主に心筋細胞に多く認められることから、心筋細胞におけるドパミン-D1Rシグナルの機能解析を、心筋細胞特異的D1Rノックアウトマウス及び心筋細胞特異的D1R強制発現マウスを用いて行った。さらにはアデノウイルスによるD1Rの強制発現培養心筋細胞の系を確立し *in vitro* による心筋のCa²⁺シグナル伝達異常との関連を検討した。最後にシングルセルレベルでのヒト心不全患者の遺伝子発現プロファイルの解析を用いてD1Rの発現上昇と不整脈との関連を検討した。

【結果】

心筋特異的D1Rノックアウトマウスでは心不全モデ

ルにおいて致死的不整脈の頻度が減少しており、予後が改善した。その分子メカニズムとしては、心不全時に増加する心筋D1Rが心筋細胞内カルシウムハンドリングに異常をきたすことで致死的不整脈の惹起に寄与していることを明らかとした。さらに、重症心不全患者の不整脈イベントに関する後ろ向き解析を行うことで、D1Rがヒト心不全における致死的不整脈の惹起に関与している可能性も明らかとし、動物実験結果が実際にヒトでも保たれていることを示した。この研究結果は *Nature Communications* (PMID: 32868781) に掲載された。

【考察】

持続的なドパミンシグナルの増強は心不全の病態を悪化させ、代償機構の破綻としてD1Rの持続的発現増加が生じているという仮説を立てた。多くの臨床試験によりβ遮断薬の予後改善効果は十分に検証されてきたものの、ドパミン受容体拮抗薬に関する検証は行われておらず、ドパミンシグナルの遮断をターゲットとした治療は臨床応用可能な現実的治療方法と予想される。

体細胞核初期化に関する分子機構の解析

高橋 和利

(京都大学 iPS 細胞研究所)

【目的】

転写因子を強制発現させることにより体細胞を多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPSC) へと変換する技術に関して、詳細な分子機構を解明することを目標とした。主に、iPSC へと変化する過程における細胞の性質に焦点を当て解析を行った。

【方法】

体細胞が iPSC へと形質転換する確率は 1% 程度であることから、iPSC ができる過程において 99% の細胞は iPSC にならないと考えられた。そこで本研究では、将来 iPSC になる細胞のマーカーを同定し、それを用いて選別した細胞の遺伝子発現およびエピジェネティクス状態を解析した。また、解析結果により同定した遺伝子群の機能解析を行い、iPSC の樹立効率や性質に関する分子機構に迫った。

【結果】

iPSC になる細胞を特異的に認識する TRA-1-60 抗体を同定し、iPSC 前駆細胞を経時的に分離することに成功した。この技術を用いて、iPSC 前駆体が高確率で再び体細胞様状態に戻ってしまい iPSC にならないこと¹⁾や、iPSC 前駆細胞がヒト内在性レトロウイルス²⁾および中内胚葉関連遺伝子³⁾を一過的に発現することを明らかにした。また、体細胞が TRA-1-60 陽性に変化する際に細胞周期阻害因子 p21 の発現上昇により Retinoblastoma 経路が活性化され、細胞増殖が停止することを見出した⁴⁾。これらの成果を受けて、分化多能性細胞におけるタンパク質翻訳の役割について興味を持ち、翻訳開始因子 NAT1 が多能性幹細胞の自己複製および神経分化能に必須であることを示した⁵⁾。

【考察】

iPSC になる過程を解析した他の類似研究とは異なり、本研究では独自に開発した系を用いて iPSC 前駆体を純化することにより詳細な解析結果を得た。その結果、一過的に発現する遺伝子群を同定することができ、iPSC ができる過程に関して新たな知見を多く見出すことができた。また、同定した遺伝子のいくつかは iPSC の樹立効率を改善する効果を持ち、標準的な iPSC 作製技術に採用されている。

【文献】

- 1) Tanabe. *et al.*: "Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts." *PNAS*. **110**, 12172-12179 (2013).
- 2) Ohnuki. *et al.*: "Dynamic Regulation of Human Endogenous Retroviruses Mediates Factor-induced Reprogramming and Differentiation Potential." *PNAS*. **111**, 12426-12431 (2014).
- 3) Takahashi. *et al.*: "Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm." *Nat. Commun.* **5**, 3678 (2014).
- 4) Rand. *et al.*: "MYC Releases Early Reprogrammed Human Cells from Proliferation Pause via Retinoblastoma Protein Inhibition." *Cell Reports* **23**, 361-375 (2018).

5) Takahashi, *et al.*: "Critical roles of translation initiation and RNA uridylation in endogenous retroviral expression and neural differentiation in pluripotent stem cells." *Cell Reports* **31**, 107715 (2020).

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)

糖尿病をはじめとする代謝異常が動脈硬化性疾患のリスクであることはよく知られているが、それぞれのインパクトは必ずしも一様とは限らない。たとえば「内臓脂肪蓄積が代謝異常のリスクとなる」というメタボリックシンドロームの概念は、高血糖、血圧上昇、脂質異常が各々内臓脂肪蓄積と関連する、という臨床データで裏付けられている。だが、これは内臓脂肪蓄積が代謝異常の共通の病態基盤であることの証明にはならない。我々は分散構造解析を用いることにより、内臓脂肪蓄積とそれに関連する低アディポネクチン血症は、代謝異常の共通基盤を7割説明するという、メタボリックシンドロームの概念を支持する知見を得た。一方で、各代謝異常が共通基盤により説明される割合は、代謝異常によって大きく異なることも見出した。別の例として、末梢動脈疾患は冠動脈疾患と同じ動脈硬化性疾患であるが、リスク因子の関連については大きく異なる。一般に動脈硬化性疾患において糖尿病は死亡リスクの上昇と関連することが示されているが、我々は、重症虚血肢症例では糖尿病は死亡リスクとは関連しないことを見出した。さらに末梢動脈疾患患者と冠動脈疾患患者における動脈硬化リスク因子の集積状況は大きく異なることも示した。末梢動脈疾患、とくに重症虚血肢の診療に関するエビデンスは極めて少なく、診療ガイドラインでも、そのリスク管理に関しては、同じ動脈硬化性疾患である冠動脈疾患領域で得られたエビデンスが借用されることも珍しくない。しかし、我々のこうした知見は、末梢動脈疾患を冠動脈疾患と同列に論じるには注意が必要であることを示唆している。末梢動脈疾患はエビデンスが不足しているのみならず、実地での認知度も低い。たとえば糖尿病診療で

は古くからフットケアの重要性が周知されてきたはずだが、我々は、重症虚血肢を発症した糖尿病患者のうちABIの受検既往がある患者は3分の1に過ぎない実態を明らかにした。さらに、虚血性潰瘍・壊疽を発症してもすぐには循環器内科・血管外科の受診にはつながらず、創傷発生から受療までの期間が長くかかっている症例が少なくない実態も明らかにした。末梢動脈疾患の診療の質の向上には、エビデンスの累積と診療体制の構築が欠かせないと考える。

ブタ LES において神経型ニコチン受容体刺激が引き起こす弛緩反応の機序

田中 義将

(九州大学大学院医学研究院)

嚥下時の LES 弛緩反応は迷走神経に由来する壁内神経叢のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) 及びカハールの介在細胞 (ICC) により調節されていると推測されるため、前回申請書に記載した内容のとおり屠殺場より得た新鮮なブタ食道胃接合部より神経終末、壁内神経叢、ICC を含む 5mm×2mm のブタ LES 輪走平滑筋条片を作成、nAChR 刺激による弛緩反応に対して、各種阻害剤を使用し等尺性張力を測定して検討した。

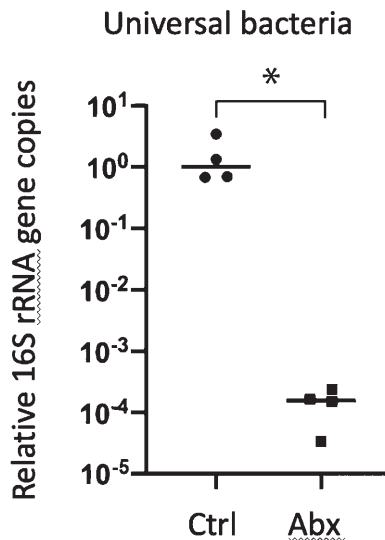
前回、申請書に記載した内容に加えてブタ LES において、nAChR 刺激による弛緩反応には、主に ICC/過分極因子が関与する機序を P2X アンタゴニストである NF279 を用いることで P2X 受容体の関与を明らかにするなど P2 受容体のサブタイプ毎の役割の違いを明らかにするなど、さらに詳細に薬理的に明らかにした。

以上の結果にて現在ここまでの研究は Otsuka Y, Tanaka Y. *Eur J Pharmacol* 2021 にて報告した。

【抗生剤投与マウスにおける消化管機能の解析】

現在、さらに消化管生理学についての研究を進めていくうえでここまでの研究の延長線上の研究として、アカラシア患者のヒト筋層サンプル解析を行っている。また、消化管機能と腸内細菌や脳腸相関の影響などの検討を進めており、まずは腸内細菌の影響を調べるためアンピシリン、バンコマイシン、ネオマイシン、メトロニダゾール投与による糞便中の 16S rRNA gene copies を調べ

ることで腸内細菌が99%以上除去できることを確認している(図)。この結果をもとにさらにこれらの消化管機能へどのように影響するかについて現在各種実験をすすめているところである。



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及び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、RNA-seqやプロテオミクス解析、メ

タボロミクス解析を実施した。

【結果と考察】

社会ストレスがリボソームタンパクやミトコンドリア関連タンパクの遺伝子発現を低下し、タンパク分解系の遺伝子発現が亢進することが分かった。また、プロテオミクス解析によりシナプソーム分画特異的にオートファジータンパクの著明な発現亢進やミトコンドリアの構成タンパク・転写翻訳機構の発現低下を示すことを、さらに生化学解析によりシナプソーム分画のミトコンドリア選択的に機能低下を示すことを明らかにした。これらの知見はシナプソーム分画のミトコンドリア機能破綻の背景にタンパク質の合成・分解バランスの破綻が生じていることを示唆する。また、ミトコンドリアを含むシナプソームにおいて構造退縮が顕著であること、及びエネルギー代謝や核酸代謝経路を担う酵素群がシナプソーム特異的に変容していることも分かった。これらの知見はストレスによる神経機能変化と並行して代謝変化が生じていることを示唆する。今後はストレスによる認知情動変容や神経形態変化における代謝変化の機能的意義やその分子機序について検討する。

心臓圧負荷時における $p22^{phox}$ の分子メカニズムの解明

中田康紀

(奈良県立医科大学医学部)

【目的】

NADPH オキシダーゼ (NOX) は、体内の活性酸素種 (ROS) の主要な供給源である¹⁾。NOXファミリーの7つのメンバーのうち、NOX2およびNOX4は心筋細胞でも豊富に発現している²⁾。NOX1-4は、膜貫通タンパク質である分子量22.0kDaの $p22^{phox}$ と1:1の複合体を形成している³⁾。 $p22^{phox}$ の主な生理学的役割は、NOXと形成するヘテロダイマーの安定化であり、さまざまな臓器でのROS産生に関与している。しかしながら、心筋細胞における $p22^{phox}$ の正確な役割は未だ解明されておらず、本研究では心臓における内因性 $p22^{phox}$ の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

はじめに、ヒトの心臓サンプルで $p22^{phox}$ の発現を確認したところ、心不全患者では健常者に比較して、 $p22^{phox}$ の発現が有意に増えていた。また、マウスの胸部大動脈狭窄 (TAC) 後も同様に $p22^{phox}$ の発現が有意に増えていた。そこで、心臓特異的 $p22^{phox}$ ノックアウトマウス ($p22^{phox}\text{-cKO}$) を作成した。 $p22^{phox}\text{-cKO}$ マウスに TAC を施行したところ、 $p22^{phox}\text{-cKO}$ マウスではコントロールマウスに比較して、有意に心収縮能の低下を認め、肺重量も増加していた。次に、質量分析で $p22^{phox}$ と結合するタンパクを調べたところ、心筋筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ (SERCA2a) が最も多い結果であった。 $p22^{phox}\text{-cKO}$ マウスではコントロールマウスと比較し、SERCA2a の mRNA の発現量に差は認めなかったが、SERCA2a のタンパク発現量が有意に減少していた。

【考察】

今後は、 $p22^{phox}$ がどのように SERCA2a を安定化しているかについて検討し、 $p22^{phox}$ の心臓における分子メカニズムを明らかにする。

【文献】

- 1) Maejima, Y., Kuroda, J., Matsushima, S., Ago T. & Sadoshima, J.: Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* **50**, 408-16. (2011).
- 2) Schulz, E. & Munzel, T.: NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol.* **52**, 1810-1812. (2008).
- 3) Bedard, K. & Krause, KH.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313. (2007).

神経ガイダンス因子による神経-免疫-代謝関連メカニズムの解明

中西 由 光

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

セマフォリンを介した神経-免疫-代謝関連の制御機構の解明

【方法】

セマフォリン 6D (Sema6D) 欠損マウス由来ミクログリアを用いて *in vitro* phagocytosis assay を行なった。次に、同マウスを用いて行動試験を行い、Sema6D を介したミクログリアの機能と中枢神経応答の関連を探索した。さらに、同マウスを用いてクプリゾン誘導脱髄モデルを行い、脱髄疾患における Sema6D の機能解析を行なった。

【結果】

in vitro phagocytosis assay を行なったところ、Sema6D 欠損ミクログリアでは貪食能の低下を認めた (図 1)。Open field test, Elevated maze test などの行動試験を行なったところ、Sema6D 欠損マウスでは不安様行動の亢進を認めた (図 2)。また、クプリゾン誘導脱髄モデルでは Sema6D 欠損による脱髄増悪を認めた (図 3)。

【考察】

以上の結果から、ミクログリアの貪食作用には Sema6D シグナルが必要であり、Sema6D 欠損による貪食異常は不安用行動の亢進や脱髄の進行を引き起こすことが明らかとなった。ミクログリアの貪食作用には細胞内脂質代謝の変容を伴うことが近年明らかにされており、代謝変容を介したミクログリアの機能制御が注目を集めている。先行研究において我々は、Plexin-A4-Sema6D シグナルが脂肪酸代謝を介して抑制性マクロファージ分化を制御することを報告している (*Nature Immunol* 2018)。ミクログリアは中枢神経系における組織常在性マクロファージであり、先行研究と同様に Sema6D がミクログリアの脂質代謝制御を介して貪食能の維持を担う可能性がある。

一方で、Sema6D は神経細胞やオリゴデンドロサイ

ト、血管内皮細胞など中枢神経系を形成する多様な細胞集団に発現しており、行動異常や脱髄進行などの表現系における各細胞集団の寄与は不明である。この点に

関しては、Cx3cr1-Cre^{ERT2}; *Sema6d*^{fl/fl}, VEcad-Cre^{ERT2}; *Sema6d*^{fl/fl} マウスなどのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を行う予定である。

【結論】

Sema6D はミクログリアの貪食能制御を介して中枢神経系の恒常性維持を担う。

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。繰り返す心不全と多臓器合併症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。我々はこれまでに、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。そこで、①一度心不全を経験すると心臓常在マクロファージの表現型が変わって、心臓の恒常性維持を破綻させる、②心不全になると、マクロファージの細胞起源となる造血幹細胞(HSC)レベルで変化する、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】

心不全が骨髄のHSCに与える影響を評価するため、心不全マウスの骨髄を移植したところ、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。心不全時のHSCの変化が心臓マクロファージの表現型を与える影

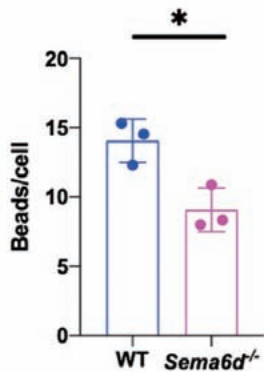


図1 *Sema6d* 欠損ミクログリアでは貪食能の低下を認める

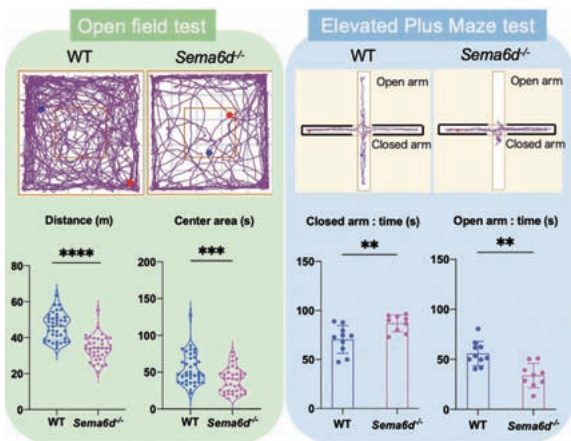


図2 *Sema6d* 欠損マウスでは不安様行動の増強を認める

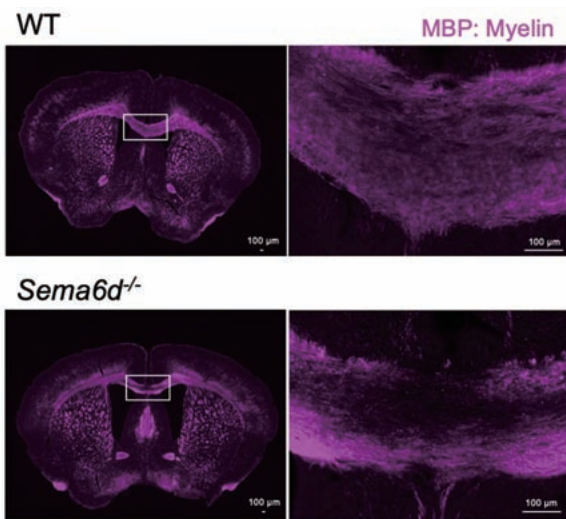
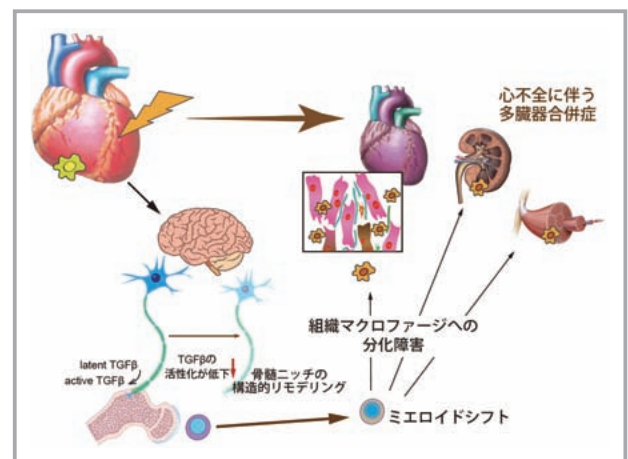


図3 *Sema6d* 欠損マウスではクプリソンによる脱髄の進行を認める



響を解析するために、心不全マウスのHSCを野生型マウスのHSCと競合的に移植した後の分化様式を解析した。すると、心不全を経験したHSCはエピゲノム変化により、末梢血では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。

【今後の展望】

心不全になると脳、神経を介して骨髄に構造的リモデリングを起こし、HSCの幹細胞維持に関わるニッチのサイトカイン発現が変化することがわかった。このことが、末梢血の白血球分化のみならず、多臓器の組織マクロファージの表現型に影響を与え、外的ストレスに対する忍容性を低下させることが分かった。これらが、心不全に伴う多臓器合併症の一つの要因になりうると考えられた。今後は、ヒトの心不全症例におけるHSCの解析を行い、心不全の早期診断、治療に繋げていく。

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 患者由来 iPS 細胞の作製

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、EB ウイルスが T もしくは NK 細胞に感染し、活性化、腫瘍化して発症する。希少かつ難治性疾患であり、唯一の根治療法は造血幹細胞移植である。造血幹細胞移植以外の根治療法は未だない。

本研究では、CAEBV 患者の末梢血単核細胞からヒト iPS 細胞を作製し、CAEBV 患者由来 iPS 細胞から各種細胞に分化誘導することで、これまで誰もが見られなかった *in vitro* での CAEBV 発症を実証し、病態解明につなげることを目的とする。

【方法】

本学血液内科 CAEBV 専門外来で同意を取得した。具体的には、CAEBV 患者 6 名の末梢血単核細胞からセン

ダイウイルス (SeV) ベクターを使用して初期化 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc) を遺伝子導入し、iPS 細胞誘導をおこなった。CAEBV は様々な病態をもつことから、なるべく多数の患者からの樹立を試みており、今後も増やす計画である。作製した iPS 細胞の評価は、アルカリホスファターゼ染色と未分化マーカー (Nanog, Sox) の発現を蛍光免疫染色法を行った。またリアルタイム PCR で未分化マーカー (Nanog, Sox2, Oct3/4) の発現をみた。SeV ゲノムの消失確認は抗 SeV 抗体での免疫蛍光染色法を行った。

【結果】

初期化遺伝子導入後、約 20-30 日でコロニーは大きく、内部の細胞が緊密に接着し均質な形態を示した。EB ウイルス T 細胞感染型、NK 細胞感染型、様々な病態を持つ患者 6 名からの樹立に成功した。

作製した iPS 細胞の評価はアルカリホスファターゼ染色、未分化マーカーの発現を免疫蛍光染色法とリアルタイム PCR 法で確認した。SeV ゲノムの消失を確認した。

【考察】

COVID19 感染の拡大の影響で予想以上に来院者数が減少し、患者検体の収集に時間を要した。すでに 6 株の様々な CAEBV 患者由来 iPS 細胞の樹立に成功したが、引き続き検体収集と iPS 細胞樹立を進め、様々な病態を有する CAEBV 患者さんの病態解明と新規治療法開発につなげていきたい。

オートファゴソーム形成とグリセロリン脂質生合成系の密接な関係

西村 多喜

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

オートファジー関連 (ATG) 分子はダイナミックな膜動態を伴うオートファゴソーム形成に必須の役割を果たしており、一部の ATG 分子は両親媒性 α ヘリックス (AH) を介して膜脂質と直接結合することが知られている¹⁾。しかしながら、これらの AH 領域が具体的にどのような機能を果たしているのか全く分かっていない。そこで本研究では、特に、LC3 脂質化に関与する ATG3

に注目した解析を行い、ATG3-AHの機能解明に取り組む。

【方法】

まずHuman ATG3のAH部分を他のAHに置換したATG3キメラのコンストラクトを準備した。レトロウイルス発現系を使ってATG3ノックアウト細胞にATG3野生型やATG3キメラを発現させることで、ATG3の機能が正常に回復するかどうか解析を行なった。また、ATG3の機能を正常にレスキューしたATG3キメラとそうでないものの違いを調べるため、trRosettaを用いた全長ATG3の構造解析を行なった。さらに、ATG3で機能的なAHに共通した特徴を見出すため、Graph Splitting法によるアミノ酸配列比較や様々なパラメーターを考慮した多変量解析も行なった。

【結果】

他のタンパク質由来のAH領域に置換したATG3キメラではATG3の機能を完全に回復させることが出来なかったのに対して、他の生物種ATG3ホモログのAHに置換したATG3キメラは野生型のhuman ATG3と同程度にまで回復させることが分かった。全長ATG3の構造予測解析から、AH領域と酵素活性部位の距離がATG3キメラの活性にある程度の正の相関があること、またAH領域のアミノ酸配列にも特徴的な配列があることが示唆された。

【考察】

ATG3のAH領域は活性部位の近傍に位置していることが必要なこと、また種を超えて保存された独自の機能を果たしていることが考えられた。今後は詳細な分子機構を明らかにしていきたい。

【文献】

- 1) Nishimura, T.#, Tooze, S.A.#: Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov.*, **6**, 32 (2020).

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

服部 佑佳子

(京都大学大学院生命科学研究所)

【背景・目的】

栄養環境は、個体の成長のみならず、成体や次世代にまで影響を与える。しかし、様々な栄養環境に動物がどのように応答し適応しているかには、不明な点が多い。これまでに、ショウジョウバエ近縁種群のマルチオミクスによる比較解析から、高炭水化物食条件下での個体成長にTGF- β /Activinシグナリングが機能していることを見出した^{1,2)}。本研究課題では、ヒストン修飾酵素によるクロマチン構造の変化が、高炭水化物食への適応に果たす意義とその分子機構について解析を行う。

【方法・結果】

キイロショウジョウバエの野生型および変異体、そして、セイシエルショウジョウバエの幼虫全身を用いて、CUT&RUN法によるヒストン修飾のゲノムワイドなプロファイリングを行った。その結果、遺伝子型間、あるいは、食餌間でヒストン修飾パターンが有意に異なる領域、および、その近傍にある遺伝子群を同定した。

【考察】

今後、栄養バランス変化に対して、クロマチン構造がどのように調節されて適応を支えているか、栄養適応においてクロマチン構造の調節機構とTGF- β /Activinシグナリングとの間に関係があるか、そして、高炭水化物食に適応できないセイシエルショウジョウバエでは適応を支えるクロマチン制御が機能しているかを中心に解析を進めていく。また、ショウジョウバエ近縁種間での、成虫期における寿命や生殖を指標にした栄養環境への適応能力の違いも明らかにしており³⁾、成熟個体の栄養適応におけるクロマチン制御機構の役割についても解析を行っていきたい。

【文献】

- 1) Watanabe, K., Kanaoka, Y., Mizutani, S., Uchiyama, H., Yajima, S., Watada, M., *Uemura, T., & *Hattori, Y.: Interspecies comparative analyses reveal distinct carbohydrate-responsive sys-

tems among *Drosophila* species. *Cell Reports*. **28**, 2594-2607.e7 (2019).

- 2) 上村匡, 渡辺佳織, 服部佑佳子. モデル生物と非モデル生物との対比で迫る栄養環境への適応機構. 生化学 特集「食・栄養から健康を拓く生化学」**93**, 67-77 (2021).
- 3) Watada, M., Hayashi, Y., Watanabe, K., Mizutani, S., Mure, A., *Hattori, Y. & *Uemura, T.: Divergence of *Drosophila* species: Longevity and reproduction under different nutrient balances. *Genes to Cells*. **25**, 626-636 (2020).

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】

ヒストン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 DNA の巻き付きが固くなり転写が抑制される。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。そこで肥満との関連性が高いメラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) に着目し、昨年度は MCHR1 と HDAC との相関を明らかにした。今年度は MCHR1 と同じ脳領域における発現が報告されている HDAC10 に焦点を当てて解析を行った。

【方法】

MCHR1 が安定発現した HEK293 細胞を使用し、HDAC 活性測定やウエスタンブロット、リアルタイム PCR 法、細胞免疫染色法などを行った。

【結果・考察】

MCH 添加により MCHR1 安定発現細胞の HDAC 活性が有意に低下し、内在性 HDAC10 のタンパク質および mRNA 発現も有意に低下した。さらに、細胞質に広く発現していた HDAC10 が MCH 添加により細胞内で凝集し、分解されることが推測された。以上より、MCHR1 シグナル系が HDAC10 を抑制することが判明

した。次は反対に HDAC10 が MCHR1 シグナル系に与える影響について解析を行った。MCHR1 発現細胞に MCH を添加すると cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) が活性化するが、この活性化は HDAC10 過剰発現下で抑制した。また CRE 活性も HDAC10 過剰発現で有意な抑制を示した。一方、分裂促進因子活性化タンパクキナーゼ (ERK1/2) は HDAC10 過剰発現による影響を受けなかった。さらに、MCHR1 は Gi/o, Gq と共役するが、Gi/o 阻害剤である百日咳毒素 (PTX) により HDAC 活性や細胞内シグナルに対する影響を与えなかったことから、HDAC10 は Gq 経路選択的に関与する可能性が推測された。以上より、MCHR1 は MCHR1 シグナル系を部分的に抑制する HDAC10 を抑制することが分かった。本研究により HDAC と摂食関連受容体との関係が解明され、肥満の新規メカニズム解明に繋がることを期待される。

また MCHR1 が微小膜小胞エクソソームに存在することを見出した。そこで、MCHR1 含有エクソソームの機能を解析し、GPCR 含有エクソソームを薬物輸送システムのように活用可能か今後検討する。

腎臓病における DNA 損傷修復応答とエピゲノム変化の関連

林香

(慶應義塾大学医学部)

【背景・目的】

慢性腎臓病の増加は、近年日本のみならず世界的な問題となっている。近年、腎臓病の発症・進展にエピゲノム変化が関与していることが報告されている。我々もこれまで糸球体上皮細胞 (ポドサイト) を中心に、エピゲノム変化の病態に及ぼす影響に関して検討し報告してきた^{1,2)}。更に、基本的に分裂・補充されない最終分化細胞であるポドサイトにおいてエピゲノム変化を惹起する原因として、DNA 損傷修復応答に注目し、多様な腎臓構成細胞におけるエピゲノム変化と DNA 損傷修復応答の関連性、及び腎機能および病態に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

まずポドサイト特異的 KAT5 ノックアウト (KO) マウスおよびタモキシフェン誘導型ポドサイト特異的 KAT5KO マウスを用いて、二本鎖 DNA 切断 (DNA DSB) 修復因子 KAT5 がポドサイト維持に必須であり、糖尿病性腎症においては、KAT5 発現低下、DNA メチル化増加によってポドサイト形質遺伝子発現低下、尿蛋白バリア破綻に関与している可能性を報告した³⁾。また DNA 損傷と DNA メチル化等のエピゲノム変化の関連についてヒトにおける関連についても示した^{4,5)}。一方、KAT5 は近位尿細管上皮細胞において、DNA 修復のみならず、Cl チャネル発現制御を介して糸球体濾過量調節にも関与する可能性が示唆された⁶⁾。更にポドサイトや近位尿細管上皮細胞特異的に二本鎖 DNA 切断を誘導するトランスジェニックマウスを作成し、DNA 損傷と DNA メチル化との関連、腎老化と全身老化との関連について現在解析を進めている。

【考察】

腎臓病における DNA 損傷とエピゲノム変化の理解により、新たな治療法や診断法の開発につながる可能性が期待される。

【文献】

- 1) Hayashi*, Sasamura*. *et al.*: *JCI* 2014
- 2) Hayashi*. *et al.*: *Kidney Int* 2015
- 3) Hishikawa., Hayashi*. *et al.*: *Cell Rep* 2019
- 4) Hishikawa., Hayashi*. *et al.*: *Sci Rep* 2020
- 5) Hayashi*. *et al.*: *Sci Rep* 2020
- 6) Hishikawa, Hayashi*, *et al.*: *iScience*, 2021

*Corresponding author

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。レム睡眠は新生児期に最も多く、成長や加齢とともに

に大きく減少する。また、成人においては、通常よりもレム睡眠が少ないと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関わる可能性が考えられる。しかしながら、レム睡眠が脳の発達や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、レム睡眠の脳における役割を解明することである。そのため私たちは、これまで主に 2 つのアプローチに取り組んできた。一つ目は、レム睡眠を有効に阻害または増加させる方法がこれまでなかったことを踏まえて、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、レム睡眠を外部からの刺激に依存することなく増加または減少させて、その影響を調べる、というものである。もう一つは、生体内イメージングによって、レム睡眠中に脳でどのような変化が生じているかを調べる、というものである。この 2 つのアプローチから、レム睡眠の脳における役割を解明することを目指してきた。

【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の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。そこで私たち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数作製し、Cre 依存的な遺伝子発現技術を用いることで、レム睡眠の制御を担うニューロンの同定と操作に取り組んだ。さらに、レム睡眠操作の効果を、脳活動や行動実験によって評価した。また、2 光子励起顕微鏡下で、睡眠中または覚醒時のマウスの脳の毛細血管の血流を観察した。

【結果】

これまでに、活性化するとレム睡眠を阻害できるニューロン、すなわちレム睡眠を強く抑制するニューロンとして、橋の Atoh1 陽性細胞、Nts 陽性細胞、Cpne7 陽性細胞等を同定することに成功した。これらの細胞の機能操作によるレム睡眠操作実験から、レム睡眠には徐波と呼ばれる脳の可塑性に重要な脳活動を促す作用があることを見出した。また、レム睡眠を誘導するニューロンについても複数同定することに成功し、こうしたニューロンの遺伝学的破壊により、レム睡眠がほぼ

消失したマウスの作出にも成功した (Kashiwagi *et al.*, Liu *et al.*, 未発表). こうしたマウスでは, 様々な行動異常が見られたことから, レム睡眠が脳の恒常性維持に必要な役割を担うことが強く支持された. 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】

本研究を通じて, レム睡眠の ON/OFF を司る神経回路の理解が大きく進み, 当初の目的通り, マウスにおいてレム睡眠を人為的に操作できることに成功した. その結果, レム睡眠による徐波の促進作用など, 新たな作用を見出すことに成功した. さらに, 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の様々な行動異常を踏まえると, 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. そのような視点から取り組んだのが, レム睡眠中に脳で起こる変化のイメージングによる観察である. その結果, 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.

最後に, 貴財団に8年もの間, 研究をご支援頂くとともに多くの貴重なご指導を頂いたことを心より感謝申し上げます. 貴財団の今後の益々のご発展をお祈り申し上げます.

【文献】

- 1) Hayashi, Y., Kashiwagi, M., Yasuda, K., Ando, R., Kanuka, M., Sakai, K. & Itohara, S.: Cells of a common developmental origin regulate REM/non-REM sleep and wakefulness in mice. *Science* **350**: 957 (2015).
- 2) 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).

- 3) Liu, CY., Tsai, CJ., Yasugaki, S., Nagata, N., Morita, M., Isotani, A., Yanagisawa, M. & Hayashi, Y.: Copine-7 is required for REM sleep regulation following cage change or water immersion and restraint stress in mice. *Neuroscience Research* doi: 10.1016/j.neures. 2020. 04. 002. (2020).
- 4) 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* doi: 10.1523/ENEURO. 0093-20. 2020. (2020).
- 5) Nakai, A., Fujiyama, T., Nagata, N., Kashiwagi, M., Ikkyu, A., Takagi, M., Tatsuzawa, C., Tanaka, K., Kakizaki, M., Kanuka, M., Kawano, T., Mizuno, S., Sugiyama, F., Takahashi, S., Funato, H., Sakurai, T., Yanagisawa, M. & Hayashi, Y.: Sleep Architecture in Mice Is Shaped by the Transcription Factor AP-2 β . *Genetics* **216**: 753 (2020).

虚血性心疾患に対する精密医療の推進

原 弘 典

(アムステルダム大学病院)

【背景・目的】

本邦における心臓疾患に伴う死亡者数は年間約20万人(死因原因別で第2位)と多い. 特に, 生活習慣病の増加に伴い, 冠動脈内の動脈硬化の進行が原因で起こる虚血性心疾患(狭心症や心筋梗塞)は, 今後も増加することが予想される. 狭窄・閉塞した冠動脈に対し, 冠動脈バイパス術(CABG), 経皮的冠動脈形成術(PCI)が

広く普及しているが、どちらの治療を選択すべきか、長期予後の改善という観点では課題が多い。本課題では、大規模臨床試験をもとに予後予測因子を検討し、患者背景に応じた最適な治療の提供を目標とする。

【方法・結果】

複雑冠動脈病変患者における CABG, PCI の選択では、年齢、性別、腎機能、左室駆出率、左冠動脈主幹部病変、冠動脈病変の解剖学的な複雑さ (SYNTAX score)、慢性閉塞性肺疾患、末梢動脈疾患が予後規定因子となること、1800 例の複雑冠動脈病変患者を CABG, PCI に無作為に割り付けた SYNTAX 試験の 4 年時点の結果から証明されていた。現在 10 年フォローの結果が得られており、糖尿病や喫煙も予後予測因子となること、さらに、CRP、ヘモグロビン、HbA1c といったバイオマーカーも予後と関連することを見出しており、機械学習を用いた新規予測モデルの構築に取り組んでいる。

日常臨床では術後に生じる心筋梗塞や脳卒中も治療選択に影響を与えるため、PCI と CABG において周術期心筋梗塞が予後に与える影響の検討を試みた。検討における前提として、定義が定まっている必要がある。しかし、様々な定義が臨床試験に適用されており、心筋逸脱酵素の上昇のみで定義されたものもあれば、心筋逸脱酵素の上昇に加えて梗塞を示唆する心電図変化や壁運動の低下を要する定義もあった。さらに、PCI と CABG にて定義が異なることもあった。これらの定義を SYNTAX 試験に適用したところ、周術期心筋梗塞とその後の死亡との関連の程度は定義に応じて大きく変化し、さらに、心筋梗塞のイベント数の変化に伴い臨床試験の結論が変わりうることも明らかとなった¹⁾。

【考察】

CABG, PCI ともに確立された治療である一方で、適切な治療選択が長期予後の改善には必要であり、複数の大規模臨床試験における患者レベルでの統合解析から、日常臨床で有意義なスコアリングシステムの確立を目指したい。その一方で、適切な臨床試験を推進するため、申請者も関わり、国際的な Academic Research Consortium にて臨床的に妥当な心筋梗塞の定義の作成をすすめている。

【文献】

1) Hara, H., Serruys, PW., Onumna, Y. *et al.*: Im-

pact of Peri-Procedural Myocardial Infarction on Outcomes After Revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 2020; **76**(14): 1622-1639.

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。さらに、今年度は SCN において第三の細胞集団を形成しながらその生理的役割のよくわかっていなかったガストリン放出ペプチド (GRP) 産生神経に着目し、その概日リズム形成における役割を調べた。

【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。我々は既に、睡眠中枢である視索前野 POA に投射する SCN の神経細胞のみを特異的にラベルする手法を確立している。神経毒素であるテタヌス毒素 (TeNT-LC) を用いて細胞の分泌小胞を阻害するとマウスの行動リズムが消失した。今年度は、このマウスにおいて SCN の時計機能が破壊されたのか、出力経路が阻害されたのかを明らかにするため SCN における細胞リズムの可視化を行った。具体的には、PER2 タンパク質にルシフェラーゼを融合させたタンパク質を発現する PER2::LUC ノックインマウスを用いて PER2 タンパク質量を可視化する。PER2 の量はリズムミックに変動するため、細胞の概日時計が機能しているのか、細胞間で同調しているのかを明らかにすることが可能である。我々は、TeNT-LC を発現させて行動リズムが消失したマウスから SCN 切片を作成し、CCD カメラによるイメージングおよび光電子倍增管 (フォトマル) による測定を行った。CCD カメラから得られた画像から 1 細胞レベルで輝度の変化を解析し、神経間で細胞時計が同調しているかどうかを調べた。

一方、SCN における GRP 神経の生理的役割を明らかにするため、Grp-iCre ノックインマウス (富山大学森寿教授との共同研究) を導入した。Grp-iCre マウスの SCN に Cre 依存的に TeNT-LC を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを導入し、GRP 神経でのみ神経連絡を阻害した。そのマウスの行動リズムおよび PER2::LUC を用いた細胞リズムの測定を行い、GRP 神経の阻害による概日リズムへの影響を解析した。さらに、GRP 神経がどのような脳領域に軸索を伸長しているかを調べるため、Cre 依存的に蛍光タンパク質とシナプス局在タンパク質であるシナプトファイジンの融合タンパク質を発現させて、GRP 神経の投射地図を作成した。

【結果】

TeNT-LC を用いて SCN→VLPO 神経を阻害したところ、マウスの自発行動リズムが消失した。このマウスにおいて SCN における概日時計を可視化したところ、コントロールのマウスと変わらない細胞リズムが観察された。1 細胞レベルでの解析の結果、神経細胞間のリズム同調にも変化は観察されなかった。つまり、TeNT-LC の発現による行動リズムの消失は SCN の時計細胞における時計機能の変化ではなく、出力系への影響が原因である可能性が高い。

Grp-iCre マウスにおいて TeNT-LC を発現させると、同様に行動リズムの消失が観察された。このマウスにおいても PER2::LUC の測定により、SCN における時計機能を解析した。その結果、GRP 神経を阻害した条件では、PER2::LUC の発光シグナルが減弱し、リズム振幅も大幅に低下することが明らかとなった。この結果は、SCN→VLPO 神経の阻害とは対照的に GRP 神経が SCN の時計発振機能の維持において重要な役割を果たすことを示している。GRP 神経からのシグナルが細胞時計そのものに必要なのか、神経細胞間の同調に必要なのかは今後明らかにするべき課題である。一方、GRP 神経の投射地図を作成したところ、SCN 神経の投射パターンと似たパターンを示した。ただし、視床下部の腹内側核 (VMH) にはほとんど軸索が見られず、これは他の SCN の神経とは異なっている。このことから、GRP 神経は時計出力にも関与していること、GRP 神経特異的な制御機構の存在が示唆される。

【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ている。これまで、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ことを見出した。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。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 の時計機能の可視化実験により、SCN の時計機能が消失したのではなく、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。さらに我々は SCN 神

経の中でも機能のわかっていない GRP 神経を特異的に操作することで、その生理リズム形成における役割を明らかにした (Li and Hirano *et al.*, 投稿準備中)。興味深いことに、我々は Grp 遺伝子を欠損させたマウスでは行動リズムの減弱は起こらず、光による位相シフトのみが影響を受けることを見出している。つまり、Grp の遺伝子が重要なのではなく、GRP 神経に発現している神経伝達物質などによる制御が重要である可能性が高い。最近、SCN の VIP 神経は GRP 陽性神経と陰性神経の 2 種類の集団に分別されることがシングルセル RNA-seq の解析により明らかとなった。このことから、我々は現在 GRP 神経に発現する GRP と VIP が時計発振に必須である可能性を検証している。

FRET イメージングによる CNP の骨伸長作用と ERK 活性制御機構の時空間的解析

廣田 圭 昭

(京都大学大学院医学研究科)

【目的】

長管骨の伸長は内軟骨性骨化により達成される。CNP は強力な骨伸長促進因子であり、その受容体である Guanylyl cyclase-B (GC-B) の活性化を介した cGMP 産生により生理作用を発揮する。しかし、生体内での ERK 活性の検出は難しく、このモデルは十分に検証されているとは言いがたい。そこで本研究では、どのようにして CNP/GC-B 系が ERK 活性制御を介して成長板軟骨細胞分化と組織全体の伸長を制御しているのかという点を明らかにし、さらに、これらの知見をもとに成長板軟骨組織局所での ERK 活性制御に基づく新たな発想の低身長症の治療法のコンセプト確立を目的とする。

【方法】

生体内の ERK 活性を FRET の原理に基づき定量化できる ERK-FRET バイオセンサー発現マウスの胎仔成長板軟骨を器官培養条件下で二光子顕微鏡を用いて生組織イメージングし、生理的条件および CNP 添加条件下での成長板軟骨での軟骨細胞の分化状態と ERK 活性の関連を解析した。また、CNP による成長板軟骨伸長作用を組織全体で個々の細胞レベルで解析するため、CUBIC

による組織透明化を用いた観察法の確立に取り組んだ。

【結果】

ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の成長板軟骨を器官培養条件下で生組織イメージングした結果、生理的条件下では肥大化軟骨細胞層近傍の軟骨膜下で ERK が活性化されていることが明らかとなった。また、本実験系を用いて CNP の添加実験を行った結果、肥大化軟骨細胞層近傍の軟骨膜下の ERK 活性が CNP により抑制されることが明らかとなった。

さらに CNP による肥大化軟骨層における ERK 活性の抑制と成長板軟骨伸長との関連を明らかにするため、マウス胎仔成長板軟骨を透明化し観察する方法の確立に取り組んだ。その結果、マウス胎仔橈骨の近位成長板軟骨の形態を組織全体で個々の細胞レベルで描出することに成功した。

【考察】

ERK-FRET バイオセンサー発現マウス胎仔の成長板軟骨の生組織イメージングの系を用いて CNP による局所的な ERK 活性の抑制を明らかにした。今後は、組織透明化を用いて CNP による成長板軟骨における ERK 活性の抑制と組織伸長との関連の解析を継続する予定である。

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)

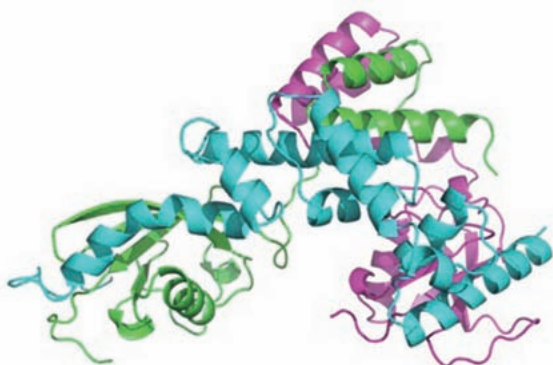
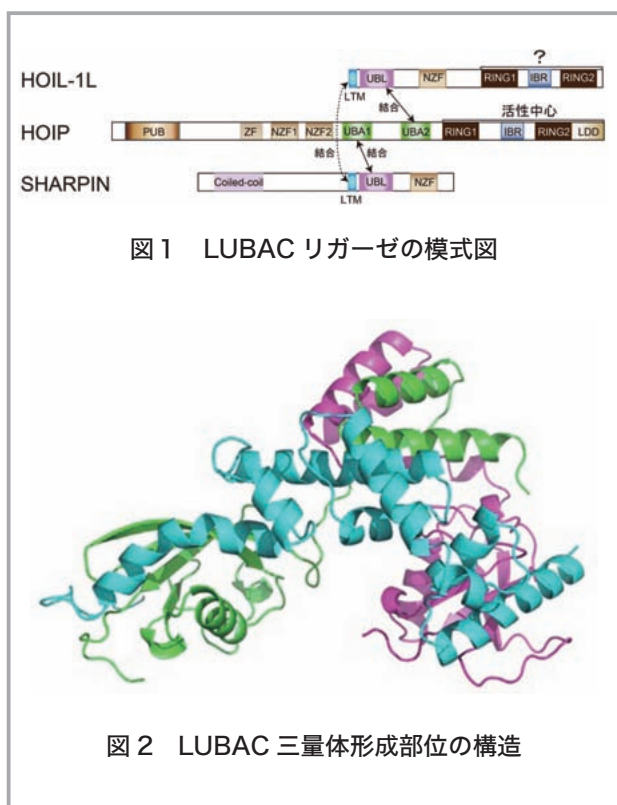
新規のタンパク質翻訳後修飾である直鎖状ユビキチン鎖(直鎖)を特異的に生成する唯一の酵素である LUBAC ユビキチンリガーゼ (E3) は、催炎症性転写因子である NF- κ B 活性化、細胞死の抑制に関与する。LUBAC は直鎖生成の活性中心を有する HOIP, アクセサリー分子である HOIL-1L, SHARPIN の三者複合体から構成される (図 1)。

これまでに我々は LUBAC の 3 サブユニット全てを欠損させた細胞を樹立し、細胞死の制御に必須な LUBAC のドメインを探索した。その結果、LUBAC の 3 量体形成に必要な HOIP の 2 つの UBA ドメインと HOIL-1L と SHARPIN に存在する UBL ドメインを欠損させる

と、LUBACが不安定化し、直鎖状ユビキチン鎖生成活性が顕著に減弱することで細胞死が起こることを発見した¹⁾。とりわけ、HOIL-1LのUBLとHOIPとの結合がより重要であるとの知見を得て、HOIL-1LのUBL欠損マウスを作成したところ、LUBAC複合体が消失し活性中心のHOIPを欠失したマウスと同時期に胎生致死になることを見出した¹⁾。

LUBACの安定化に着目してさらに解析したところ、生化学的実験よりHOIL-1LとSHARPINのUBLのN末側に存在する α -ヘリックスに富んだ領域(LTMモチーフと命名)が安定な複合体形成に不可欠であることに気付いた。そこでLUBACの3サブユニットの結合に必要な領域の共発現系を構築し、共結晶構造解析に成功した(図2)。その結果、HOIL-1LとSHARPINの2つのLTMモチーフが1つドメインを形成することで安定な結合体形成に寄与することを発見した。またLTMモチーフの変異によってLUBACが著減し、細胞死が誘発されることを見出した。これまでにLUBAC阻害によりB細胞リンパ腫の増殖を抑制できることが報告されていたが、LTMの相互作用を抑制するステープルペプチドはLUBACを減少させることでBリンパ腫細胞の増殖を抑制することも示した。

現在、臨床応用を視野にHOIL-1L LTM/SHARPIN



LTM結合を阻害する低分子化合物の開発を行なっている。これまでにLUBAC3サブユニットの結合領域を大腸菌から精製し、精製タンパク質を用いて3サブユニットの結合を評価するFRET系を構築した。そのFRET系を用いてLTM結合を阻害する小分子化合物のスクリーニングを行った。またカウンターアッセイとしてHOIL-1L/HOIP間の結合を得られた化合物が阻害しないか解析を行った。得られた化合物でBリンパ腫細胞を処理すると、LUBAC発現量の減少に加え、細胞増殖を抑制できることを見出し、化合物の検討を行なっている。

また別の視点からLTM阻害剤の開発もすすめている。HOIL-1L LTM/SHARPIN LTMの結合部位は数十アミノ酸からなる非常に小さな領域であるが、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 LTM/SHARPIN LTM二者複合体を大腸菌からほぼ夾雑物なく精製することに成功している。この二者タンパク質に特異的に結合する化合物の探索をこれまでに行った。得られた化合物に関して、LTM結合を阻害するか、またLUBACの発現量を減少させるか、などを指標に解析を進める予定である。

上記解析に加え、LUBACの機能賦活化に向けた解析を行なっている²⁾。LUBACは直鎖を生成する活性中心であるHOIPに加え、HOIL-1Lにもユビキチンリガーゼ活性が存在する。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だしている²⁾。その詳細なメカニズムを解析から、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ている。またHOIL-1LのE3活性を欠失させたマウスを作成し、12ヵ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することを見出している。

上記よりHOIL-1Lのユビキチンリガーゼ阻害剤はLUBAC機能賦活剤となると考えられる。既にHOIL-1Lのユビキチンリガーゼドメインのタンパク質を大腸菌より大量精製しており、そのタンパク質を用いてHOIL-1Lユビキチンリガーゼ阻害剤の探索を進めていく予定

である。またマウスの詳細な解析を行い、疾患との検索を検討中である。

【文献】

- 1) Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, A.L., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., Walinda, E., Sasaki, Y., Shimokawa, T., Mizushima, T., Ohki, I., Ariyoshi, M., Tochio, H., Bernal, F., Shirakawa, M. & Iwai, K.: Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization. *Cell reports*, **23**, 1192-1204 (2018)
- 2) 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

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)

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

【背景】

視床は末梢の感覚情報を大脳皮質に伝達する必須の役割を担っている。睡眠時、我々は外部感覚情報を認識しないため、視床の活動が低下する事が睡眠に重要ではないかと考えられてきた。これまでに我々は、視床の感覚情報の伝達を担う神経群（コア細胞）は睡眠覚醒制御に関与しない事、大脳皮質のほぼ全域に広く、非特異的に投射している神経群（マトリックス細胞）が高頻度で発火すると覚醒を促進する事を報告した。しかし、これらの神経群が睡眠時に果たす役割は明らかではなかった。

【方法】

自由行動下のマウスの睡眠覚醒サイクルを通じて、大脳皮質の神経活動を測定するために NeruoNexus 社製シリコン微小電極をマウス脳内に慢性的に留置する手

術を行った。同時に脳波・筋電電極も挿入した。さらに視床の神経群がノンレム睡眠時特異的脳波の生成に果たす役割を解析するために、ジフテリアトキシンを視床の各神経核に AAV を用いて導入して細胞死を誘導した。これらのマウスにおいても脳波・筋電電極を挿入し、AAV 局所注入から四週間にわたって睡眠覚醒パターンを解析した。

【結果】

まず脳波、筋電シグナルをもとに 24 時間の睡眠覚醒段階判定を行った。同時に大脳皮質運動野、および視床の微小電極から取得した局所電位の解析を行い、活動電位の抽出および Spike Sorting を行った。次に、ノンレム睡眠時特異的脳波・徐波に対して視床神経の活動電位のタイミングを解析した結果、大脳皮質で徐波が起きると視床神経の発火が低下する事を見出した。

AAV によりジフテリア毒素を遺書的に導入してから 1, 2, 3, 4 週間後に 24 時間の睡眠覚醒記録、睡眠覚醒段階判定を行った。さらに、ノンレム睡眠中の脳波のパターンを解析したところ、高周波数成分は変化しないのに対し、0.5-4Hz の低周波数成分は二週間目から顕著に低下していた。

【考察】

我々の結果から、視床マトリックス細胞の発火は大脳皮質のノンレム睡眠特異的脳波、徐波と同調している事が明らかとなった。また、マトリックス細胞から構成される視床 VM 核、および視床 CM 各の神経を除去する事により、睡眠の深さの指標である徐波が減弱する事が明らかとなった。

血糖変動と認知機能の関連の解明のための前向き観察研究—血糖変動と頭蓋内血管狭窄の関連についてのサブ解析—

松原 正樹

(国立循環器病研究センター病院)

現在、血糖変動と認知機能の関連の解明を目的とした 2 年間の観察研究（PROPOSAL 研究）を行っており、研究終了は 2022 年 6 月を予定している。今回、登録時の血糖変動と頭蓋内血管狭窄の関連について解析を行っ

たので報告する。

【背景】

2型糖尿病患者において、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性疾患（ASCVD）が増加する。2型糖尿病患者において、ACCORD、ADVANCE、VADTといった大規模臨床研究では、HbA1cを管理目標とした厳格な血糖コントロールを行っても心筋梗塞、脳卒中などは減少せず、ASCVDと重症低血糖や血糖変動との関連が注目されるようになってきた。血栓性脳梗塞のリスクである頭蓋内動脈狭窄についても、空腹時血糖値やHbA1cとの関連は報告により異なり一定した見解が得られていない。最近になり、持続血糖モニタリング（CGM）を用いて評価した血糖変動と、冠動脈疾患、内頸動脈の内膜中膜複合体厚（IMT）、上腕-足首脈波伝播速度（baPWV）などとの関連が報告されているが、我々の知る限り頭蓋内動脈狭窄との関連は報告されていない。

【目的】

本解析では、血糖変動と頭蓋内動脈狭窄との関連を明らかにする。

【方法】

2019年2月～2020年6月にPROPOSAL研究に登録した、当院糖尿病・脂質代謝内科外来に通院中の高齢2型糖尿病患者で軽度認知機能障害（MCI）を認める患者109例において、血糖値、HbA1c、FreeStyleリブレから得られたSD、%CV、mean amplitude of glycemic excursions（MAGE）と、頭部MRAでWarfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease法（WASID）法で評価した血管狭窄との関連をロジスティック回帰分析にて解析を行った。

【結果】

登録患者全109例中103例が対象となった。WASID法で70%以上の高度狭窄がみられた8例は全て内頸動脈サイフォン部の狭窄であり、高度狭窄のない95例と比較し、SD 53 ± 12 mg/dl vs. 39 ± 10 mg/dl, % CV 36 ± 7 % vs. 29 ± 6 %, MAGE 114 ± 18 mg/dl vs. 90 ± 23 mg/dlといずれも有意に高値であった（ $p < 0.01$ ）。またロジスティック回帰分析では、性別で調整した高度狭窄群のオッズ比（OR）はSD（OR, 3.00; 95% confidence interval（CI）, 1.32-6.84）, %CV（OR, 5.55; 95% CI, 1.23-25.2）, MAGE（OR, 1.52; 95% CI, 1.06-2.19）と有意であっ

た。

【考察】

MCIを認める高齢2型糖尿病患者において、頭蓋内内頸動脈狭窄は血糖変動指標であるSD、%CV、MAGEとの関連を認めた。頭蓋内血管狭窄病変を同定するにあたり、血糖変動指標に注目することが有用である可能性が示唆された。

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、ケラチノサイト特異的に発現するlncRNAから翻訳される新規タンパク質を同定した。このタンパク質はTINCRというlncRNAにコードされていたが、TINCRは2013年の*Nature*誌にlncRNAとして報告されたRNAである。興味深いことに、この新規タンパク質はユビキチン様ドメインを持っており、タイプ2ユビキチン様タンパク質であることがわかった。そこでわれわれは、この新規ユビキチン様タンパク質をTUBL（Tincr-encoded UBiquitin Like protein）と名付けた。

TUBLのORFのC末端にFLAG配列をノックインしたマウスを作製して、マウスのケラチノサイトで内在性のTUBLの発現を検出した。

TUBLを過剰発現したケラチノサイトでRNA-seq解析を行ったところ、細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していた。BrdU assayにより、TUBL過剰発現ケラチノサイトで増殖が亢進していることを見出した。

次に、TUBLノックアウトマウスを作製したところ、

このマウスから採取した初代培養ケラチノサイトの増殖が低下していた。さらに TUBL ノックアウトマウスを用いて、パンチによる皮膚の傷害実験を行ったところ、ケラチノサイトの増殖低下に伴う、皮膚の再生遅延が観察された。

【考察】

以上の結果より、lncRNA として同定されていた TINCR が、TUBL という新規ユビキチン様タンパク質を翻訳することを明らかにし、TUBL はケラチノサイトの増殖と皮膚の再生促進に重要であることが明らかとなった。今後、TUBL がどのようにして増殖を制御しているのかという分子機構を明らかにしていく必要がある。

腸内環境をターゲットした慢性腎臓病の病態解明と新規治療法の開発

三 島 英 換

(ヘルムホルツ研究センター)

【目的】

尿酸を含むプリン体の代謝異常は痛風のみならず動脈硬化性の心血管疾患や慢性腎臓病における残余リスクとして重要である。したがって生体内の尿酸を含むプリン核酸の制御メカニズムの解明は臨床的に重要な課題である。尿酸を含む生体内のプリン代謝は食事摂取、腎排泄、腸管排泄が主な規定因子とされてきた。しかし近年、腸内細菌叢も生体内プリン・尿酸代謝に関わることが示唆されている。申請者はこれまで腎臓病における腸内細菌叢の関与を腸管と腎臓の臓器連関「腸腎連関」の観点から研究を進めてきたが、その過程で通常マウスと腸内細菌叢を有さない無菌マウスをそれぞれアデニン誘発性の腎不全状態にすると無菌マウスでは腎障害がより高度になることを見出しているがその機序は不明であった。アデニン誘発腎不全モデルはプリン塩基であるアデニンを経口過剰負荷することでキサンチン脱水素酵素 (XDH) を介して代謝された不溶性代謝物 2,8-DHA が腎臓に蓄積し腎障害を引き起こすモデルである。したがって、腸内細菌叢の有無がプリン体であるアデニン代謝自体に影響を及ぼすことで腎障害悪化に寄与している可能性が考

えられる。本研究ではその機序を解析することを通して生体内のプリン・尿酸代謝制御における腸内細菌叢の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

通常マウスと無菌マウス、およびそれぞれのアデニン誘発腎不全モデルを作成し、血漿、尿、糞便中のプリン核酸代謝物を含むメタボローム解析、およびプリン体代謝関連酵素の遺伝子発現量を評価した。

【結果・考察】

無菌マウスではプリン体代謝酵素であり、アデニンから腎毒性物質 2,8-DHA への変換も担うキサンチン還元酵素 (XDH) の発現が上昇していることを見出した。また無菌マウスは通常マウスと比較してプリン体最終代謝物である尿中アラントインの増加に加え糞便中のプリン代謝物に大きな変化が生じていた。無菌環境による腸内細菌の消失はプリン代謝酵素の発現増加を介してアデニンから腎毒性物質 2,8-DHA への変換を促進し、その結果アデニン腎障害の病態を悪化することを明らかにした。本知見はプリン体代謝制御における腸内細菌の新たな関与機序を明らかにしたものである。

【文献】

Mishima, E. et al.: *Toxins*. 2020; 12: 547

白血病を維持する腫瘍エンハンサーの検索

村 川 泰 裕

(京都大学高等研究院)

【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、発症年齢が若く、社会的にも重大な疾病である。本課題では、オリジナルなゲノム解析法から、病態解明、新たな分子標的薬やバイオマーカー検索を目指す。

そのため、がんの細胞で特異的に発現している RNA 分子をゲノムワイドにとらえ、正常細胞との比較解析を行う。興味深いことに、ヒトゲノム 90%以上の領域から RNA 分子が転写されており、この中には、(1)蛋白質をコードする mRNA の他にも、(2)蛋白質をコードしないノンコーディング RNA (lncRNA)、そして(3)エンハンサー領域から合成されるエンハンサー RNA (eRNA)

などが挙げられる。しかし、特に eRNA の大多数がゲノム配列上にアノテーションさえされておらず、未知分子・未踏分子となっている。本研究では、独自のゲノム解析法を確立することで、こうした一連の RNA 分子を世界で初めて包括的に同定し、医学応用を試みる。

【方法】

① 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。我々は、短寿命で低発現の lncRNA や eRNA も超高感度に同定できる NET-CAGE 法 (Hirabayashi *et al. Nature Genetics*, 2019) を開発した。

②また、プロトコルを大幅に改良することで、従来では 1 週間かかる工程を 2 日に短縮し、さらにインデックスライブラリー法を導入し、1 週間程度で約 1,000 検体のサンプルを処理できる基盤を 2021 年から構築している (論文執筆中)。

③さらに、ドライ解析においても工夫することで、飛躍的な正確度・感度で真の転写開始点のみを同定する新しい方法を確立した。本手法は 1 細胞トランスクリプトーム解析にも応用することができ、一細胞レベルで mRNA, lncRNA, eRNA を網羅的に同定することに成功している (論文執筆中)。

こうしたオリジナルのゲノム解析基盤をもとに、京都大学血液・腫瘍内科との共同研究により、約 100 人の造血器悪性腫瘍の患者検体からゲノム解析を実施している。

【結果】

白血病に特異的に活性化している mRNA, lncRNA, eRNA などが新しく数万の単位で同定された。これらは、病態解明の手掛かりにもなり、新規の診断マーカーや治療標的候補になりえる。今後、臨床データとも紐付けした統合解析や、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】

本研究により同定された数万もの新規 RNA 分子が、患者毎にどのような発現分布をするのか、どのような機能を担っているのか、そして実際に臨床現場に実装することが可能なのかを今後明らかにする。

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。特に、本年度は腫瘍微小環境における鉄代謝の役割を中心に研究を進めた。昨年度までの研究では、肝細胞 (肝臓がん細胞) における鉄の蓄積が、肝臓がんの進行を促進することを明らかにした [*J. Exp. Med.* 216, 950-965 (2019)]。そこで、次に腫瘍微小環境に存在する免疫細胞における鉄代謝が、腫瘍運命の決定に及ぼす影響を検討した。

【方法】

ヒト大腸がん組織を用い、腫瘍微小環境における鉄の蓄積と免疫細胞の関係を調べた。マクロファージに分化誘導した THP1 細胞を用い、鉄量の変化が遺伝子発現に及ぼす影響を RNA シーケンス解析により調べた。また、鉄代謝の変容により遺伝子発現パターンが変化する分子メカニズムを探索した。

【結果】

腫瘍微小環境に鉄の蓄積が見られた症例は予後が悪く、鉄の蓄積は主にマクロファージに認められることがわかった。RNA シーケンス解析の結果、マクロファージに分化誘導した THP1 細胞において鉄量を増減すると遺伝子発現パターンが変化し、鉄が多い環境下では炎症性サイトカインの産生が増加することがわかった。こ

の炎症性サイトカインの増加はNFκBシグナルに依存していた。鉄量が少ない状態では、NFκBの核内移行に変化は認めなかったものの、その抑制性リン酸化が増強しており、これにより炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制されることを見出した。

【考察】

腫瘍微小環境に存在するマクロファージに鉄が蓄積すると、NFκBシグナルの増強により炎症性サイトカインの産生が亢進し、慢性炎症環境をつくりだすことが示唆された。本現象の分子メカニズムは今後詳細を明らかにしていく必要があるが、マクロファージにおける鉄代謝が腫瘍運命に影響を及ぼす可能性が示された。そこで、今後の課題として、T細胞など他の免疫細胞における鉄代謝と腫瘍増殖の関係をさらに調べていきたい。

【発表論文】(2020年度)

- 1) Moroishi, T.: ANXious for YAP. *Nat. Chem. Biol.* in press, doi: 10.1038/s41589-021-00766-x (2021).
- 2) Yamauchi, T., & Moroishi, T.: The Yin and Yang of tumor-derived extracellular vesicles in tumor immunity. *J. Biochem.* **169**, 155-161 (2021).
- 3) Horiguchi, H., Kadomatsu, T., Miyata, K., Terada, K., Sata, M., Torigoe, D., Morinaga, J., Moroishi, T., & Oike, Y.: Stroma-derived ANG-PTL2 establishes an anti-tumor microenvironment during intestinal tumorigenesis. *Oncogene* **40**, 55-67 (2021).
- 4) Luo, M., Meng, Z., Moroishi, T., Lin, K. C., Shen, G., Mo, F., Shao, B., Wei, X., Zhang, P., Wei, Y., & Guan, K.L.: Heat stress activates YAP/TAZ to induce the heat shock transcriptome. *Nat. Cell Biol.* **22**, 1447-1459 (2020).
- 5) Shimoda, M., & Moroishi, T.: The Emerging Link between the Hippo Pathway and Non-coding RNA. *Biol. Pharm. Bull.* **43**, 1-10 (2020).

生体の恒常性システム解明に向けた研究プロテオスタシスからオルガネラホメオスタシスへ

柳谷 耕太

(九州大学生体防御医学研究所)

熱力学第二法則によると、秩序のある状態は、やがて、無秩序になることが自然であると考えられている。生命体は、究極に秩序を持った存在であり、外部からエネルギーを注入することで、その秩序ある状態を保っている。恒常性は、ある秩序が保たれた状態を指す概念で、生体内においては、分子から個体まで、様々な階層で、恒常性を保つシステムが張り巡らされている。私は、TMFCの期間には、タンパク質の恒常性(プロテオスタシス)とオルガネラ量の恒常性に興味を持ち、その解明を目指した。

【プロテオスタシスについての研究】

タンパク質は、単量体で働くものと、複合体で働くものがある。私は、サイトゾルで異常なタンパク質を見つけて、分解する因子を探索する過程で、複合体からあぶれた、みなしごサブユニットを見つけて処理する因子UBE2Oを見出した(*Science*, 2017)。この遺伝子に変異を有するマウスは極度の貧血になることから、生体内においても、みなしごサブユニットの処理が重要であることが示唆された。

小胞体に構造異常タンパク質が蓄積すると、小胞体膜上で転写因子XBP1の前駆体(XBP1u)mRNAがスプライシングされて、転写因子XBP1が合成されるようになり、異常タンパク質を処理する因子群が誘導される。私は、前駆体であるXBP1u mRNAから合成されるタンパク質が、自身をコードするmRNAを小胞体膜上に局在化させることを明らかにした(*Mol Cell*, 2009; *Science*, 2012; *PNAS*, 2016)。

【オルガネラ量ホメオスタシスに関する研究】

生体内で、同じ種類の細胞間では、オルガネラの量はよく似ていることから、オルガネラ量の恒常性が存在することが示唆される。私は、オルガネラ量を人為的に減らす方法を樹立し、オルガネラ量に摂動を与えることで、オルガネラ量恒常性を司るシステムの解明を目指した。ミトコンドリアに関しては、そのシステムの一端が明らかになりつつある(投稿準備中)。

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 (2480種類) を用いたスクリーニング (HTS) を実施した。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。2020年度は、コホート研究でも有意な変化が確認された化合物について、臓器における甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の変化を確認するため、マウスへの投与実験を行った。

【方法】

6週齢雄の C57BL/6 マウスに化合物を給水投与し、甲状腺機能 (血清)、遺伝子発現 (甲状腺、肝臓、下垂体) を評価した。

【結果】

HTSにおいて、正と負に制御するものについてそれぞれ、D1は6個、7個、D2は34個、0個、D3は5個、2個のヒット化合物が得られた。次いでこの結果を元に患者コホートにおける甲状腺機能の変化を検証し、アドレナリン受容体作動薬であるリトドリンによる TSH 低下と fT3/fT4 比上昇、PDE5 阻害薬であるタダラフィルによる fT3 上昇、チロシンキナーゼ阻害薬による fT3 低下・fT4 低下・TSH 上昇が認められた。

マウスへの投与実験へ進み、リトドリンにより血清 fT3/fT4 上昇、甲状腺 Dio2 mRNA 増加、チロシンキナーゼ阻害薬であるスニチニブにより血清 fT4 減少、肝臓 Dio3 mRNA 増加が生じることを確認した。

【考察】

化合物を出発点とするケミカルバイオロジーに臨床データを統合させる新たな手法を考案し実施した。チロシンキナーゼ阻害薬による D3 増加は既知ではあるが、臨床的エビデンスを追加する成果を得た。またリトドリンが、甲状腺ホルモン脱ヨード酵素調節因子としてだけでなく、その有意な生体作用を有することを明らかとした。

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

山口 慎太郎

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

哺乳類 NAD⁺合成系の鍵酵素である NAMPT は環境・栄養状態に応答することで NAD⁺量を調節し、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。申請者は脂肪細胞特異的 *Nampt* 欠損マウスを作製し、脂肪細胞 NAMPT-NAD⁺合成系が、インスリン抵抗性・エネルギー代謝を制御す

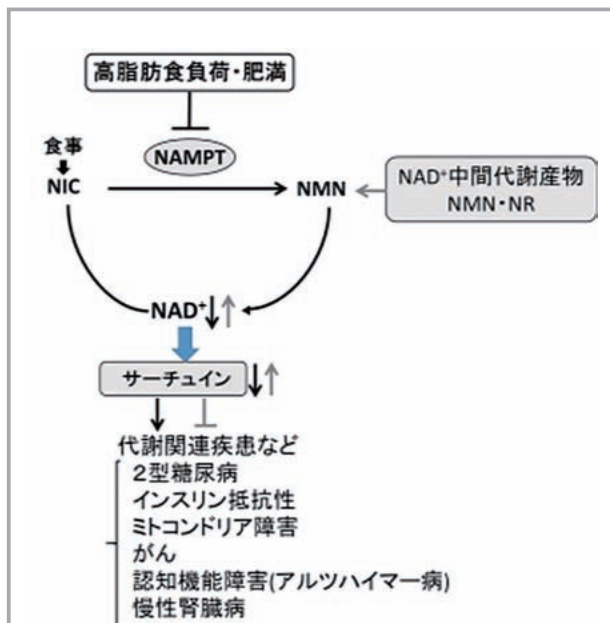


図1 哺乳類 NAD 合成系および代謝疾患制御 (生化学 第 87 巻 2 号 239-244, 2015 山口ら, 改)

る事を報告した (*PNAS*. 2019, *Cell Rep*. 2016).

さらに、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)。重要なことに、最近 NMN のトランスポーターが小腸に存在することが報告され (*Nature Metab*. 2019)、主要代謝臓器の NAD⁺ 合成系を制御する主座として腸管が注目されている。

また、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が報告され (*Cell Metab*. 2016)、代謝疾患発症における腸管の重要性も認識されている。以上の知見を元に、2 型糖尿病の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高脂肪食と腸管 NAMPT-NAD⁺ 合成系

高脂肪食を負荷した C57BL/6 マウスでは、通常食群と比較して腸管 NAMPT-NAD⁺ 合成系が有意に低下し、一方で随時血糖は上昇した。これらの結果は、肥満による糖代謝障害には NAMPT-NAD⁺ 合成系の低下に伴う腸管の変化が寄与している可能性を示唆する。

②腸管 NAMPT-NAD⁺ 合成系と糖代謝

腸管上皮細胞特異的 *Nampt* ノックアウト (KO) マウスを新規に作製した。腹腔内ブドウ糖投与試験での血糖値の変化にはコントロール群と有意な差は認めなかったが、経口投与では、KO マウスで血糖値は有意に上昇した。その背景病態として、KO マウスではインクレチンおよびインスリン分泌障害を認めた。

③ NMN を用いた肥満マウスへの介入

高脂肪食負荷肥満マウスに NMN を投与したところ、インクレチン分泌が回復し、食後高血糖が改善した。

【考察】

腸管の NAMPT-NAD⁺ 合成系の障害が、肥満におけるインクレチン分泌不全および食後高血糖の原因であることが示された。本研究内容は、現在論文投稿中である。

多能性幹細胞を用いた体節時計の再現

戎 家 美 紀

(EMBL Barcelona Ebisuya Group)

【目的】

それぞれの生物種は固有の生物時間を持っており、一般的に体の大きな動物ほどゆっくりした時間を示す。例えば、ヒトの妊娠期間は 9 か月だが、マウスは 20 日、ゾウだと 2 年である。生物時間の種間差は面白い問題だが、良いモデル系が存在しないためか、研究がすすんでいない。そこで私たちは、体節時計と呼ばれる、発生過程の遺伝子発現振動現象に注目した。ヒトやマウスの多能性幹細胞を用いて体節時計を再現し、生物時間の種間差の原因を探った。

【方法】

ヒト iPS 細胞あるいはマウス ES 細胞を、Wnt・FGF・BMP 阻害剤・TGFβ 阻害剤などで処理することにより、体節時計を示す時期の細胞 (未分節中胚葉と呼ばれる) を分化誘導した。体節時計のマーカーである HES7 遺伝子の発現状態が振動する様子をライブイメージングで測定した。次に、体節時計の振動周期に影響する生化学反応の速さをヒトとマウス細胞で測定した。

【結果】

マウスとヒト未分節中胚葉での測定の結果、マウスの体節時計の振動周期は 2-3 時間であるが、ヒト体節時計の振動周期は 5-6 時間であった。そしてこれは、ヒト細胞においてはマウス細胞よりも、HES7 タンパク質の分解速度が遅く、転写翻訳による時間遅れが長いからだとわかった。この結果は、数理モデルを用いたシミュレーションでも確認できた。つまり、ヒト細胞では種々の生化学反応が遅く、これが生物種特有の時間の原因かもしれないと示唆された。

【考察】

一般的になぜヒトの時間はマウスより遅いのかという問いにつながる面白い手掛かりを得ることができた。今後は、なぜヒトの細胞では種々の生化学反応が遅いのかという疑問を追求する。さらに研究を発展させるため、ヒトとマウス以外の生物種の多能性幹細胞も試す予定である。

【文献】（下線はラボメンバー，*は責任著者）

- 1) Matsuda, M., Hayashi, H., Garcia-Ojalvo, J., Yoshioka-Kobayashi, K., Kageyama, R., Yamanaka, Y., Ikeya, M., Toguchida, J., Alev, C. & *Ebisuya, M.: Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds. *Science*, **369**, 1450-1455 (2020).
- 2) Martínez-Ara, G., Taberner, N., Takayama, M., Sandaltzopoulou, E., Villava, C., Takata, N., Eiraku, M. & *Ebisuya, M.: Optogenetic control of apical constriction induces synthetic morphogenesis in mammalian tissues. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.20.440475> (2021).

Vascular Biology Innovationに関する研究助成

ミネラルコルチコイド受容体の活性化機構とその意義

鮎澤 信宏

(東京大学先端科学技術研究センター)

アルドステロン受容体であるミネラルコルチコイド受容体 (MR) は高血圧性疾患の発症に関与する。我々は MR の活性化機構とその意義につき研究を行っており、助成期間に得た成果を報告する。

1) 病的状態における MR 活性化は必ずしもリガンド量のみには依らない。我々は低分子 G 蛋白 Rac1 がリガンド非依存性に MR を活性化し、臓器障害を引き起こすことを示してきた。マウス圧負荷性心不全モデルでは心臓における Rac1 および MR の活性化が起こるが、Rac1 阻害薬や心筋特異的 Rac1 ヘテロ欠損、MR 拮抗薬による介入は Rac1-MR 経路を遮断し、酸化ストレスを減じて心不全を抑制した。

2) 腎遠位ネフロンにおける NaCl 再吸収は血圧の調節に深く関与するが、最近接合尿管・皮質集合管の β -間在細胞に発現する pendrin が新規 NaCl 再吸収関連因子であることが示された。pendrin はアンジオテンシン II 刺激時や 1 次性のアルドステロン過剰時に活性化するが、その機序には MR が関わる。定常状態では間在細胞 MR は特異的リン酸化を受けてリガンド結合能が抑制されているが、アンジオテンシン II 刺激時には間在細胞 MR は脱リン酸化・活性化して pendrin 活性化を起こす。間在細胞特異的 MR 欠損マウスでは減塩時のアンジオテンシン II 増加による pendrin 活性化が抑制されており、低血圧を示した。一方、1 次性のアルドステロン過剰時には主細胞の MR-ENaC 経路活性化により起こる代謝性アルカローシスが直接 pendrin 活性化を起こし高血圧発症に寄与することが示された。これら経路は高血圧治療における新規標的となり得る。

【文献】

1) Ayuzawa, N. *et al.*: Rac1-Mediated Activation

of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. *Hypertension*. 67, 99-106 (2016).

2) 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)

【研究目的】

本研究では遺伝子 X を中心とした心筋梗塞後の炎症・修復過程の新たな分子機序を明らかにし、新規治療法へと発展させることを目的とする。

【研究方法・結果】

X-KO マウスに MI を作製し、28 日間観察すると、その生存率は WT マウスと比較して改善傾向にあり、左心機能は有意差を持って良好であった。梗塞部位に集積する炎症細胞を flow cytometry 法で解析すると、X-KO マウスでは Ly6C^{high} 単球 (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁻Ly6C^{high}) の浸潤が有意に低く、qPCR で解析した IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカイン、CCL2/CCL7 などのケモカインの遺伝子発現を検討すると、X-KO マウスで有意に減少していた。梗塞部においてどの細胞由来の X が重要かを骨髄移植モデルで確認すると、間質系細胞の重要性が示唆された。Flow cytometry 法により X の発現を検討すると、内皮細胞と線維芽細胞で X の発現を認めた。一方、各細胞群を FACS でソートし、CCL2 と CCL7 の遺伝子発現を検討すると、線維芽細胞でのみ有意な発現を認めた。以上より、心臓線維芽細胞由来の X の重要性が示唆されたため、心臓線維芽細胞特異的 X コ

ンディショナル KO マウス ($Tcf21^{Cre/+}$ $X^{flox/flox}$) に MI を作製し、4 週間後の生存率、心機能、梗塞部炎症性サイトカインや CCL2/CCL7 などのケモカインの発現、炎症細胞浸潤などを検討すると、X-KO マウスで見られた表現型が再現された。

【今後の展望】

$X^{GFP/+}$ レポーターマウスで MI 4 日後に GFP+(X+) と GFP-(X-) 線維芽細胞を FACS でソートし、RNA-seq による網羅的解析を行う。本研究が成就された時、心臓線維芽細胞を標的とした、MI 後心不全を予防する新たな治療方法の開発に繋がる可能性があると考えられた。

ペリサイトにおける ATP 依存性カリウムチャネルの心・脳における機能解析

安藤 康史

(日本医科大学先端医学研究所)

【目的】

ペリサイト選択的に発現する ATP 依存性カリウムチャネル (K-ATP チャネル) の心・脳機能に対する生理的・病態時における役割の解明を通して、ペリサイトを基軸とした脳・心疾患発症機構の理解と治療法開発の実現を目指す。

【結果・考察】

K-ATP チャネル活性は細胞膜電位変化を促し、膜電位依存性カルシウムチャネルを介したカルシウムイオンの流入促進、抑制へと変換される。しかし、ペリサイトにおいて *Abcc9/Kcnj8* から為る K-ATP チャネルが細胞内 Ca^{2+} 調節に関わるのかは十分には明らかではなかった。そこで、カルシウムイオン変化を指標としてペリサイトにおける K-ATP チャネルの基本特性を明らかにする為、ペリサイトでカルシウムバイオセンサーを発現する改変ゼブラフィッシュを樹立し (図1A), 検討を行った。その結果、K-ATP チャネル遮断薬はペリサイトにおいて T 型 Ca^{2+} チャネルを介して Ca^{2+} オシレーション頻度を増加させることが分かった (図3B, C)。しかし、K-ATP チャネルの活性化剤は予想に反して、細胞内 Ca^{2+} オシレーション頻度を抑制することはな

かった。今後詳細な解析が必要だが、仮にこれまでに知られている K-ATP チャネル活性の細胞応答として知られているペリサイト内 Ca^{2+} 変動と心疾患の関連が認められない場合は、ペリサイト内 Ca^{2+} 異常がトリガーではない可能性が予想される。

一方、発生初期では *Kcnj8* は心外膜細胞にも発現することを見出し (図2), 当初予想していたペリサイト異常が心疾患を惹起するという仮説以外の新たな機序の可能性が浮上した。これまでに、心外膜細胞はペリサイトだけではなく線維芽細胞や心筋細胞など、異なる細胞種へと分化する可能性が示唆されていることから、*Kcnj8* 遺伝子変異性心疾患がペリサイト以外の細胞腫に起因する可能性が浮上した。今後 *Kcnj8* 遺伝子変異性心疾患の分子メカニズムを明らかにするためには成獣マウスにおいてペリサイト選択的な遺伝子欠損により心機能に与える影響を検討することが重要であると考えられ

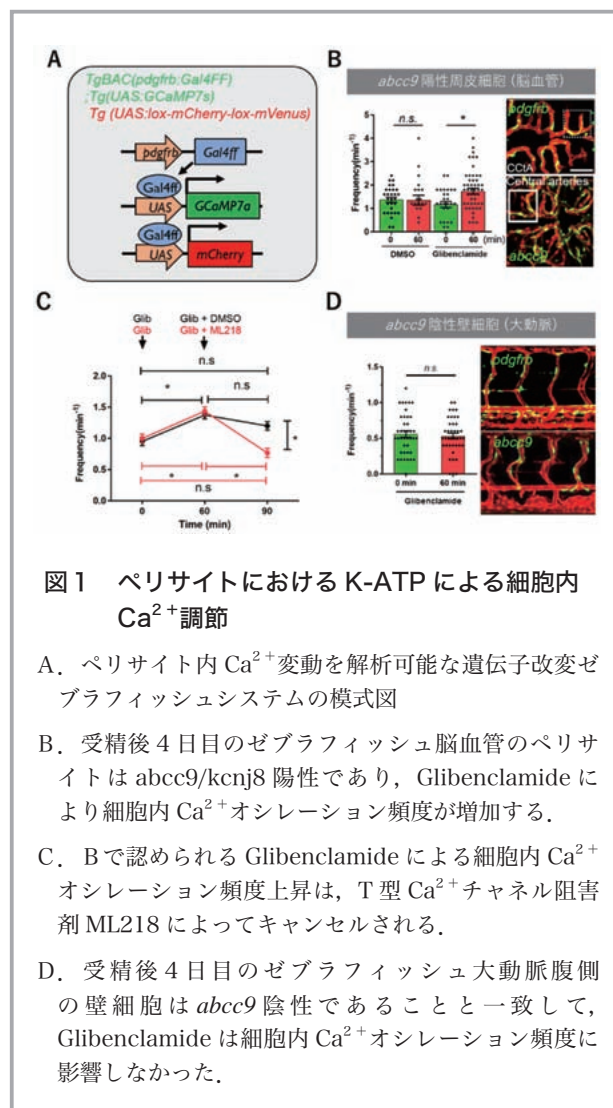


図1 ペリサイトにおける K-ATP による細胞内 Ca^{2+} 調節

- A. ペリサイト内 Ca^{2+} 変動を解析可能な遺伝子改変ゼブラフィッシュシステムの模式図
- B. 受精後4日目のゼブラフィッシュ脳血管のペリサイトは *abcc9/kcnj8* 陽性であり、Glibenclamide により細胞内 Ca^{2+} オシレーション頻度が増加する。
- C. Bで認められる Glibenclamide による細胞内 Ca^{2+} オシレーション頻度上昇は、T型 Ca^{2+} チャネル阻害剤 ML218 によってキャンセルされる。
- D. 受精後4日目のゼブラフィッシュ大動脈腹側の壁細胞は *abcc9* 陰性であることと一致して、Glibenclamide は細胞内 Ca^{2+} オシレーション頻度に影響しなかった。

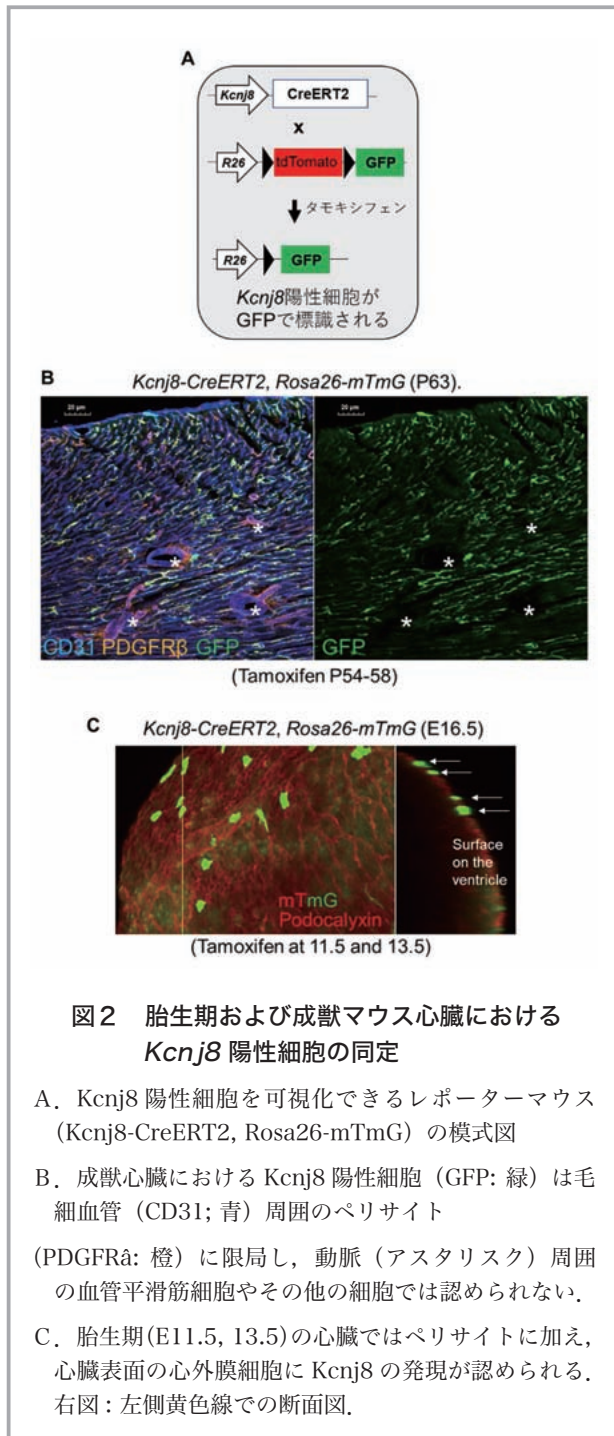


図2 胎生期および成獣マウス心臓における *Kcnj8* 陽性細胞の同定

- A. *Kcnj8* 陽性細胞を可視化できるレポーターマウス (*Kcnj8*-CreERT2, *Rosa26*-mTmG) の模式図
- B. 成獣心臓における *Kcnj8* 陽性細胞 (GFP: 緑) は毛細血管 (CD31; 青) 周囲のペリサイト (PDGFR α : 橙) に限局し、動脈 (アスタリスク) 周囲の血管平滑筋細胞やその他の細胞では認められない。
- C. 胎生期 (E11.5, 13.5) の心臓ではペリサイトに加え、心臓表面の心外膜細胞に *Kcnj8* の発現が認められる。右図: 左側黄色線での断面図。

る。本期間では予定していた CreERT2 ラインに問題があり成獣において *Kcnj8* 欠損の心機能への影響を検討することはできなかった。今後、新たに実験系を整備しペリサイトの役割を検証することで、ATP 依存性カリウムチャネルの機能異常が心疾患を誘発するメカニズムの全容解明を目指す。

心筋梗塞後心破裂における Hif-1 α の役割と心破裂に至る分子機序の解明

池田 昌隆

(九州大学大学院医学研究院)

【目的】

梗塞後心破裂は一旦発症すると致死的な転帰に至る急性心筋梗塞の機械的合併症である。我々はがん抑制遺伝子である p53 のノックアウトマウスでは梗塞後心破裂が著明に抑制されることを示し、p53 およびアポトーシスが梗塞後心破裂において重要な役割を果たしていることを報告した¹⁾。しかしながら、心筋梗塞において p53 が増加し、心破裂に至る分子機序は依然として不明である。本研究では、低酸素応答の主制御を担う hypoxia inducible factor (Hif)-1 α が p53 の誘導分子であることに着目し、p53、アポトーシス、さらに心破裂における Hif-1 α の役割を検討した。

【方法】

C57BL/6J マウスおよび心筋特異的 Hif-1 α ヘテロノックアウトマウス (caHif1 α HetKO) に心筋梗塞モデルを作成し、梗塞後心破裂について解析した。ラット培養心筋細胞に低酸素を模擬した塩化コバルトを添加し、p53 およびアポトーシスについて解析した。

【結果】

梗塞境界部の心筋組織の解析では、Hif-1 α が増加し、p53 および cleaved caspase-3 (CC-3) が誘導された。培養心筋細胞に塩化コバルトを添加したところ、Hif-1 α ・p53・CC-3 が上昇し、細胞死が誘導された。siRNA を用いて Hif-1 α を silencing したところ、塩化コバルトにより誘導される p53, CC-3 および細胞死は抑制された。さらに caHif1 α HetKO では、境界部の Hif-1 α ・p53・CC-3 および梗塞後心破裂が有意に抑制された。

【考察】

本研究は、心筋梗塞において過剰な Hif-1 α が p53 を介してアポトーシスを惹起し、心破裂を誘導していることを明らかにした。一般的に Hif-1 α は虚血傷害に対して低酸素に対する適応応答として保護的に働くが、過剰な Hif-1 α が蓄積した場合には p53 を介した不適切応

答として心破裂を誘導し得ることを明らかにした²⁾。

【文献】

- 1) Matsusaka, H. *et al.*: Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular Res.* 2006; **70**: 457-465.
- 2) Ikeda, M. *et al.*: Excessive Hif-1 α expression induces cardiac rupture via p53-dependent apoptosis after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc.* in press.

臓器特異的な血管網の機能解析

加藤 勝洋

(名古屋大学医学部附属病院)

私は、シグナル伝達経路と組織形成・恒常性維持機構の関係性解明が疾患の原因及び治療法確立に重要であると考えて、細胞外シグナルから細胞内シグナル因子の解析を *in vivo* 及び *in vitro* の実験系を用いて行ってきた。

それぞれの細胞は生体内で特有の形態を呈し極性を獲得し、これらの過程は細胞が臓器や組織で特有の機能を発揮するために必要不可欠である。一方、これらの過程が障害されると多様な疾患が引き起こされる。極性形成の制御機構を解明することで生物の基本原則を明らかにするだけでなく、様々な疾患の原因や治療法を確立する上で欠くことができない。私は遊走細胞における前後軸形成の分子メカニズムに着目し、ホスファチジルイノシトール-(3,4,5)-三リン酸に対する脱リン酸化酵素である SHIP2 を新規 RhoA 標的蛋白質として同定し、SHIP2-RhoA の相互作用が PIP3 の局在を制御し細胞の極性形成及び遊走を調節していることを明らかにした (Kato *et al. Mol Biol Cell.* 2012)。

私は渡独後より一貫して血管新生の制御メカニズム、臓器特異的な血管細胞（内皮細胞及びペリサイト、血管周囲細胞）機能および性状解析、血管自体からのシグナルに注目して研究に取り組んできた。細胞外基質を認識するインテグリン $\beta 1$ が、VE カドヘリンの細胞内輸送を制御することで、血管内皮細胞間接着を調節

していることを見出した (Yamamoto, Kato *et al. Nat Commun.* 2015)。また、複数の遺伝子改変マウスとマウス肺厚切り切片の三次元的形態観察法を用いることで肺ペリサイトからのシグナル分子が肺胞形成を制御していることの証明に成功した (Kato *et al. Nat Commun.* 2018)。脳ペリサイトの機能異常が脳梗塞などの疾患の重篤化に寄与することを見出した (Diéguez-Hurtado, Kato *et al. Nat Commun.* 2019)。さらに受容体型チロシンキナーゼである EphB4 は、心臓の毛細血管網特異的に細胞間接着および脂質輸送を制御することで、心筋細胞の恒常性を維持していること (Luxan, Kato *et al. Elife.* 2019)、各臓器における組織中の酸素レベルの違いが、臓器特異的な血管網の特徴を規定する一因になっていることを見出した (Sivaraj, Kato *et al. Elife.* 2020)。現在、各臓器血管網の性状の違いに着目して、疾患との関連を明らかにすることを目指して研究を進めている。

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

菊地 良介

(名古屋大学医学部附属病院)

【目的】

抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎 (AAV) は、顕微鏡的多発血管炎 (MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) の 3 つの異なる疾患から構成されている。AAV の寛解導入療法による治療効果を早期に予測できる場合、綿密なフォローアップや追加療法を選択できる可能性がある。しかし、急性期指標である C-reactive protein (CRP) をはじめ、これまで報告があった候補因子は、AAV の寛解までの期間を予測するには不十分であった。一方で、血管内皮細胞成長因子 (VEGF-A) は CRP と抗ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 抗体価との相関が示されており、VEGF-A は抗 MPO 関連血管炎の疾患活動をモニタリングするための潜在的なマーカーであることが示唆できる。しかし、VEGF-A および抗血管新生因子 (VEGF-A_{165b}) と AAV の寛解までの関係は不明

であった。そこで、AAV 患者での寛解導入療法前後の VEGF-A と 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した。

【方法】

AAV を有する日本人患者の「抗好中球細胞質抗体関連血管炎・急速進行性糸球体腎炎の寛解導入治療の現状とその有効性と安全性に関する観察研究 (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】

対象患者の 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マーカーとなる可能性が示唆された¹⁾。

【文献】

1) Kikuchi, R., Tsuboi, N., Sada, K., Nakatochi, M., Yokoe, Y., Suzuki, A., Maruyama, S., Murohara, T., Matsushita T, and Research Committee of Intractable Vasculitis Syndrome and Research Committee of Intractable Renal Disease of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Amano, K., Atsumi, T., Takasaki, Y., Ito, M., Hasegawa, H., Dobashi, H., Ito, T., Makino, H. & Matsuo, S.

VEGF-A and VEGF-A_{165b} are associated with time to remission of granulomatosis with polyangiitis in a nationwide Japanese prospective

cohort study. *Ann. Clin. Biochem.* **58**(2), 86-94 (2021).

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

(福井大学学術研究院)

【目的】

血管新生などにより形成された血管は、リモデリングされることで階層性を持った機能的な高次血管網へと成熟していく。私は発生過程のリモデリング過程において、静脈が組織内を動脈近傍へと移動することによって動・静脈の併走構造が完成することを発見し、この現象を「血管束移動」と名付けた。また、その過程には新規単球サブセットが関与していることを見出している。本研究では、腫瘍組織内における「血管束移動」の解析を進めた。腫瘍血管に対しては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が、期待に反して単独で使用した場合には抗腫瘍効果が得られていない。血管新生阻害剤が効果的でない理由は未解明となっているが、この血管新生阻害剤への治療抵抗性に「血管束移動」が関与しているのではないかと考え研究を行った。

【方法および結果】

血管束移動は動的な現象であり、従来の組織学的な解析ではその動態を確認することは不可能である。そこで、多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた生体内イメージング解析系を構築し、血管新生阻害剤を投与した際の腫瘍血管の変化を経時的に観察した。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移動を誘導することで、腫瘍増殖の再開を誘導していることが明らかとなった。また、この腫瘍組織における血管束移動に関しても発生期と同様に特殊な単球サブセット (血管制御ミエロイドと命名) が関与していることをシングルセル遺伝子発現解析から発見した。さらに、血管制御ミエロイドから産生される血管束移動の誘導分子を幾つか同定し、その阻害によって抗腫瘍効果が得られることをマウスモデルで明らかにした。

【考察】

本研究にて発見された腫瘍組織における血管束移動と現象の解明から、血管新生阻害剤への治療抵抗性という大きな壁を乗り越える大きなヒントが得られた。現在はヒトの病理サンプルでの解析を進め、実際に血管束移動や血管制御ミエロイドが癌治療における治療標的となるかの検討を進めている。今後も「腫瘍血管を標的としたがん治療」という血管研究分野の大きな目標の実現に向けて、引き続き研究を進めていく所存です。日本応用酵素協会からの支援は本年で終了となるが、私の研究人生の礎となるであろう本研究を進めることができたことに、この場をお借りして感謝申し上げます。

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

候 聡 志

(東京大学大学院医学系研究科)

【背景と研究目的】

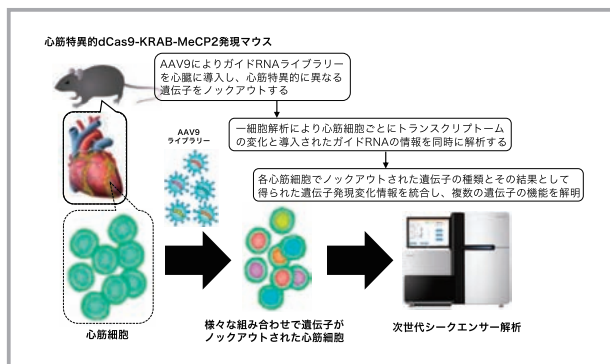
申請者らはこれまで心不全モデルマウス及び心不全患者の心筋細胞を用いて、Single-cell RNA-seq (scRNA-seq) という手法により解析を行い、心筋細胞の遺伝子発現プロファイルは心不全発症過程において、肥大型状態を経て代償型心筋細胞もしくは不全型心筋細胞に変化していくことを明らかにし、各細胞状態に特徴的な遺伝子シグナルネットワークを同定した。scRNA-seq 解析は近年急速に普及しつつあるが、得られた膨大なデータを如何に処理し、有用な情報を抽出 (新規心不全治療ターゲットの探索) するのが課題と言える。申請者らは本研究助成を受け、この課題に対して以下のように取り組み、一定の成果を得た。

【方法】

(1) *in vivo* Perturb-seq 実験系の確立

dCas9-KRAB-MeCP2 という gRNA 依存性に対象遺伝子をサイレンシングする分子を心筋細胞特異的に発現するマウスを作り、複数の対象遺伝子に対する gRNA を各々搭載した AAV9 ライブラリーを投与・感染させることで、個々の心筋で異なる遺伝子の発現が抑制され

る。その心筋達を scRNA-seq で解析 (Perturb-seq) することでサイレンシングにより生じた表現系を確認する。



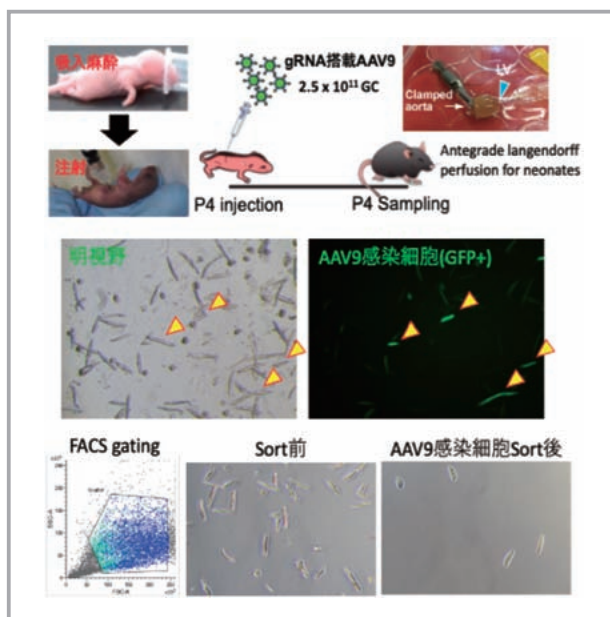
(2) scRNA-seq データの解析による心不全治療ターゲットの絞り込み

scRNA-seq データを用いて重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析 (WGCNA) やリガンド-受容体解析 (LR 解析), Pathway 解析を行うことで、効率よく重要そうな標的候補を探索する。

【結果及び考察, 今後の方針】

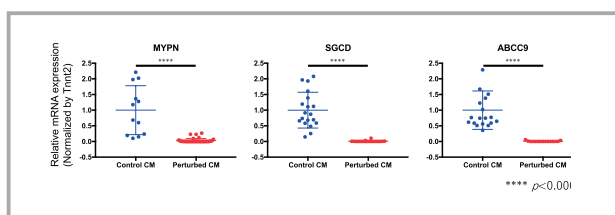
(1) *in vivo* Perturb-seq 実験系の確立

心筋特異的 dCas9-KRAB-MeCP2 マウスを樹立し、実験系が確立されていることを示すために、各種心筋症や先天性心疾患の原因として報告されている計 43 種類の遺伝子の各々に対して、gRNA 搭載 AAV9 ベクターを全て設計・作成した。その機能を *in vivo* Perturb-seq により網羅的に調べることで、各心筋症・心疾患間での分子病態やその差異が明らかになると期待される。予備実験の結果、gRNA 搭載 AAV9 ベクターの感染効率が



高すぎると複数種のベクターが同じ細胞に共感染して効果を判定しづらくなることから、10%未満の感染率となるようなウイルス投与量 (2-5x10¹¹GC/匹) を決めた。感染した細胞で GFP を発現するようにベクター設計し、それを FACS による single cell sort する方針とした。通常、心筋細胞はその大きさ故に FACS にかけることはできないが、新生児マウスの心筋細胞は比較的小さいため、FACS のノズルを通る。各種実験の結果、生後 4 日目の新生児マウスに AAV9 を感染させ、14 日目に (新生児心臓用に改良したランゲンドルフ灌流法を用いて) マウス心筋を単離し、かつ FACS により AAV9 感染心筋 (GFP+) のうち、形態が杆状に保たれている良質なもののみを Sort 単離できる系を確立した。これにより *in vivo* Perturb-seq を実施する上での技術的障壁を乗り越え、現在 gRNA 搭載ベクターを順次マウスに投与して感染心筋のサンプリングを行っている最中である。シーケンスをする上での Batch effect を避けるため、心筋検体は今後十分に数が揃ってから一斉に RNA-seq を行う予定だが、先に一部の心筋細胞検体を用いて、いくつかの対象遺伝子の発現を qPCR で確認することで、dCas9-KRAB-MeCP2 による対象遺伝子のサイレンシング効率を検証した。

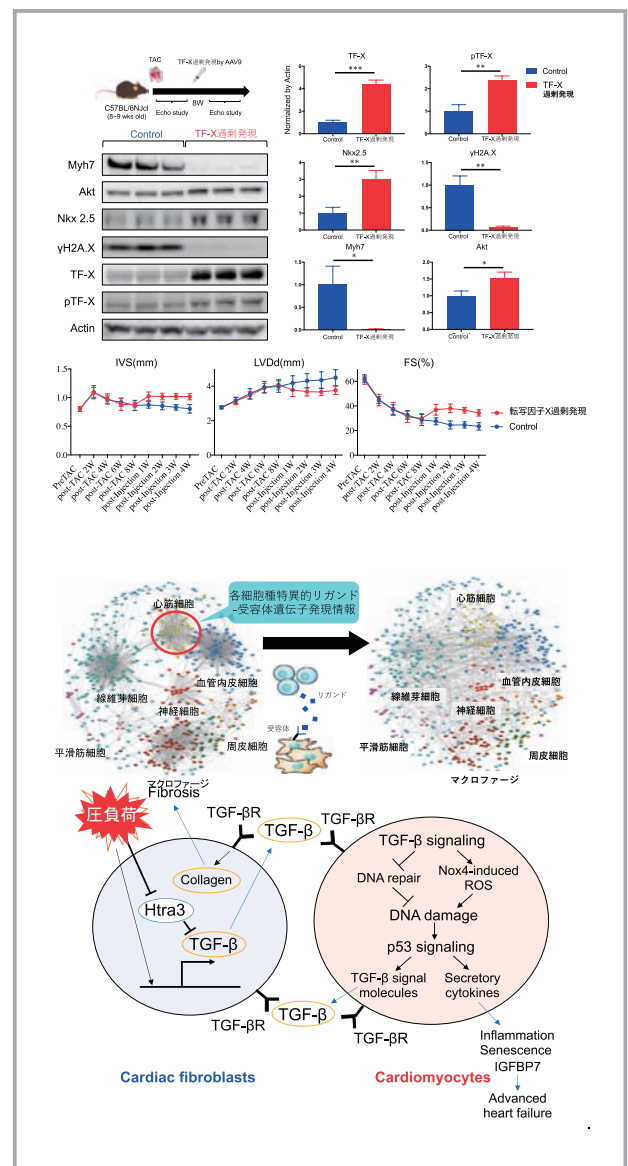
その結果、元々どの遺伝子についてもシングルセルレベルで見ればその発現量にばらつきはあるものの、いずれも AAV9 感染によって gRNA が細胞内に導入された心筋 (Perturbed CM) では対象遺伝子の発現量が元々の平均の 5% 未満まで抑制されていることが判明し、サイレンシングが十分機能していることが分かった。今後は前述の通り、Perturbed 心筋の検体が十分揃ったところでまとめてシーケンスし、サイレンシングされた遺伝子別にトランスクリプトームがどのように変化するかを解析していく予定である。



(2) シングルセル解析データの解析による心不全治療ターゲットの絞り込み

in vivo Perturb-seq はマウスに感染させられる

gRNA 搭載ウイルスの量の制約から、一度に調べられる遺伝子の種類は 30-50 種類程度に限られる。そのため、やはり scRNA-seq のデータを解析して事前にある程度解析対象の絞り込みを行う必要がある。Perturb-seq の技術開発を行うと同時に、ターゲット絞り込みのための効果的な解析方法の開発にも取り組んだ。まず Sham/TAC マウス心筋細胞の scRNA-seq データを用いて細胞系譜解析や WGCNA を行って代償型心筋と不全型心筋を比較すると、有意に変化している遺伝子は数百種類以上に上った。だが細胞の性質を決める上で重要なのは転写因子であるため、代償型心筋のみで発現が高く保たれている転写因子に限定して WGCNA のデータを細かく分析した結果、候補は一気に約 10 種類に狭まった。将来的には *in vivo* Perturb-seq によってこれらの役割を解明していくが、試しにその中から 5 種類を選



んで AAV9 による TAC マウスへの過剰発現実験を行ったところ、特に心機能保護効果が強いものとして、転写因子 X (以下 TF-X とする) を見出した。

TF-X を過剰発現させたマウスはその後の TAC 手術による圧負荷に耐性があるだけでなく、圧負荷後 8 週経過した晩期心不全の状態のマウスに TF-X を過剰発現させても、左室壁の代償性肥大が再度見られ、心拡大や収縮能の改善を認めた。晩期心不全の段階で TF-X が過剰発現された心筋細胞は、Control に比べて胎児化ミオシンの発現や DNA 損傷の蓄積が有意に減っており、逆に細胞の肥大に重要な Akt や心筋発生 / 分化時の転写因子として知られる Nkx2.5 の発現が増えていた。今後 scRNA-seq やエピゲノム解析を通してさらに TF-X の機能を明らかにしていきたい。WGCNA 自体も優れた scRNA-seq 解析法の一つだが、そこからさらに発展して、異なる細胞種の WGCNA で判明した遺伝子ネットワークのうち、特にリガンド / 受容体 (LR) 遺伝子を抜き出し、LR データベースを基に対応するリガンド - 受容体 (LR) 同士をつなげることによって細胞種間コミュニケーションを可視化し、さらに Pathway 解析により重要なリガンド受容体関係を明らかにすることができた。こうした LR 解析や Pathway 解析も scRNA-seq データからの対象遺伝子の絞り込みに有用であると考えられる。現在こうした解析結果から、線維芽細胞特異的に発現する Htra3 という分子に着目し、機能解析を進めている。Htra3 KO マウスは圧負荷に脆弱であり、圧負荷後に線維芽細胞で TGF β シグナルの過剰活性化が生じ、それがさらに心筋細胞にも影響してこれを不全心筋化させることが scRNA-seq 解析から明らかとなった。逆に Htra3 の過剰発現は心保護的であり、新たな治療ターゲットであると考えられる。(Ko, Komuro *et al.* *Nat Commun*, in revision)

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。本期間では、電気刺激装置開発と平行し、有効性を確認するために、薬理的迷走神経刺激治療 (ドネペジル) の肥満性高血圧 + 心不全を示すラットモデルにおいて検証した。

【方法】

8 週令の肥満性高血圧ラットを用いて、麻酔下に血圧テレメトリ装置を埋め込んだ。1 週間の回復期を置き、麻酔下に左冠状動脈の基部を閉塞し、30 分後に再灌流を行った。生存したラットを無作為に非治療群 (UT, n=16)、ドネペジル (DT, n=16, 3mg/kg/日) 治療群に割り付け、治療を開始した。10 週後に、ドネペジルの治療効果を血行動態、神経体液性因子、炎症因子及び組織学検査で評価した。

【結果】

UT 群に比べて、DT 群では心筋梗塞巣が有意に縮小しており (17 ± 2 vs. $24 \pm 2\%$, $P < 0.05$)、心機能が保たれていた (心係数: 91 ± 4 vs. 73 ± 9 ml/min/kg, $P < 0.01$; 左心室拡張末期圧: 11 ± 1 vs. 20 ± 2 mmHg, $P < 0.01$)。また、心臓重量低下や梗塞周辺の血管新生増加も認めた。また、DT 群において血中のカテコラミン、BNP, AngII および CRP はいずれも有意に低下していた。

【考察】

ドネペジル治療は、再灌流心筋梗塞を伴う肥満性高血圧ラットの心不全モデルにおいて、著明な心臓リモデリング抑制効果および心機能障害の改善効果を示した。

【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) A novel method of trans-esophageal Doppler cardiac output monitoring utilizing peripheral arterial pulse contour with/without machine

learning approach. *J Clin Monit Comput.* 2021, in press. Uemura, K*, Nishikawa, T., Kawada, T., Zheng, C., Li, M., Saku, K., Sugimachi, M. (順位 / 著者数 : 6/7)

- 2) Development of an automated closed-loop β -blocker delivery system to stably reduce myocardial oxygen consumption without inducing circulatory collapse in a canine heart failure model: a proof of concept study. *J Clin Monit Comput*, 2021, in press. Nishikawa, T*, Uemura, K., Hayama, Y., Kawada, T., Saku, K., Sugimachi, M. (順位/著者数 : 5/6)
- 3) Aging steepens the slope of power spectrum density of 30-minute continuous blood pressure recording in healthy human subjects. *PLoS One.* 2021, **16**(3): e0248428. Mano, J., Saku, K*, Kinoshita, H., Mannoji, H., Kanaya, S., Sunagawa, K. (順位/著者数 : 2/6)
- 4) Prediction of haemodynamics after interatrial shunt for heart failure using the generalized circulatory equilibrium. *ESC Heart Fail.* 2020, **7**(5): 3075-3085. Nishikawa, T., Saku, K*, Uike, K., Uemura, K., Sunagawa, G., Tohyama, T., Yoshida, K., Kishi, T., Sunagawa, K., Tsutsui, H. (順位/著者数 : 2/10)
- 5) Prediction of hemodynamics after atrial septal defect closure using a framework of circulatory equilibrium in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020, **319**(5): H938-H947. Uike, K., Saku, K*, Nishikawa, T., Yamamura, K., Nagata, H., Muraoka, M., Ohga, S., Tsutsui, H., Sunagawa, K. (順位/著者数 : 2/9)
- 6) The Partial Support of the Left Ventricular Assist Device Shifts the Systemic Cardiac Output Curve Upward in Proportion to the Effective Left Ventricular Ejection Fraction in Pressure-Volume Loop. *Front Cardiovasc Med.* 2020, **7**:163. Kakino, T., Saku, K*, Nishikawa, T., Sunagawa, K. (順位/著者数 : 2/4)

心筋梗塞における骨格筋異常の発症機序

高田 真吾

(北翔大学生涯スポーツ学部)

【背景】

心疾患は、質と量の両方で“骨格筋異常”を伴うことが多く、日常生活動作や生活の質を著しく損なう主要原因となっている。これらの異常に対して、運動療法は心疾患の予防や治療にさえ有益であることが知られているが、しばしば運動が実施できない患者が存在するため、運動療法の代替法の発見も重要な課題となっている¹⁾。また、心臓リハビリテーションを含め、骨格筋異常の発症後における治療のエビデンスはわずかながら蓄積されつつある^{2,3)}。一方で、骨格筋異常は心疾患発症直後から開始される虚血/再灌流、酸化ストレス、炎症、神経体液性因子により生じると考えられているが、その発症機序・時期も未だ不明な点が多い。

【結果】

心筋梗塞 (MI) マウスの骨格筋は一時的な低酸素環境により、キサンチンオキシダーゼ由来の活性酸素種 (XO-ROS) 産生が急性期にのみ増加した。このMI急性期におけるXO-ROSの産生増加の抑制は、慢性期における骨格筋異常および運動耐容能の低下を予防した。

【結論】

今回の研究結果は、MI後から心不全に至る過程で生じる骨格筋異常の発症機序の一つであることを示唆した⁴⁾。

【引用文献】 (* contributed equally to this work.)

- 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* **12**; **7**: 79, 2020.
- 2) Matsumoto, J*, Takada, S*, Kinugawa, S. et al.: Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure. *Circulation* **138**: 2064-2066, 2018.
- 3) Matsumoto, J*, Takada, S*, ..., Kinugawa, S.: Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves

Impaired Fatty Acid Oxidation Via the Activation of Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase- α -Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α Signaling in Skeletal Muscle of Mice With Heart Failure. *Circulation Heart Fail* **13**: e005890, 2021.

- 4) Nambu, H., Takada, S. (corresponding author), ..., Kinugawa, S.: Inhibition of xanthine oxidase in the acute phase of myocardial infarction prevents skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance. *Cardiovasc Res* **22**; **117**(3): 805-819, 2021.

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

田中 愛

(信州大学医学系研究科)

【目的】

アドレノメデュリン (AM) は血管作動性のペプチドとして同定されたが、それ以外にも様々な作用を有することが知られている。我々は、AM とその受容体活性調節タンパク RAMP2 が血管の発生と恒常性維持の双方に不可欠であり、それらのノックアウトマウスは血管の異常で胎生致死となることを報告してきた。本研究では、AM-RAMP2 系の癌増殖や転移における役割を明らかにするために、誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) を用いた検討を行った。

【結果】

DI-E-RAMP2^{-/-}では、皮下移植した癌細胞の原発巣における血管新生と癌増殖が抑制される一方で、足底部にメラノーマ細胞を移植し、一旦それを切除した後に生じる自然肺転移が著明に亢進していた。RAMP2 欠損誘導後の肺では、細胞骨格異常を伴う内皮細胞の形態異常や血管透過性亢進が生じ、癌細胞遊走因子の高発現を認め、「転移前土壌」が形成されることが明らかとなった。次に、ルイス肺癌細胞を用いたリンパ節転移の検討においても、DI-E-RAMP2^{-/-}ではリンパ節転移の亢進が見

られた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、リンパ節内に存在する、高内皮細静脈 (HEV) の構造異常が認められた。さらに、リンパ節内の T 細胞の減少、樹状細胞の分布異常が認められた。HEV は CCL21, CCL19, CXCL12 などのケモカインや、ICAM-1, L-selectin といった接着因子を産生し、リンパ球を誘引、接着させ、リンパ節内に引き込むことが知られている。DI-E-RAMP2^{-/-}のリンパ節において、これらのケモカインや接着因子の遺伝子発現を解析すると、癌を移植して 2 週間の早期の段階で、すべて有意に低下することが明らかとなった。一方で、DI-E-RAMP2^{-/-}とは異なり、リンパ管内皮細胞特異的 RAMP2^{-/-} (DI-LE-RAMP2^{-/-}) ではリンパ節転移に変化を認めなかった。

【考察】

以上の結果から、血管恒常性の破綻は、癌細胞の血行性転移だけでなく、リンパ節転移亢進にもつながることが明らかとなった。AM-RAMP2 系が有する血管恒常性維持作用は、心血管疾患だけでなく、癌転移抑制のための新しい治療標的となることが期待される。

多能性幹細胞における代謝機構に基づく細胞作製と 心臓再生医療への応用

遠山 周 吾

(慶應義塾大学医学部)

ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含む様々な細胞に分化する能力を有するため、心臓再生医療への応用が期待されている。一方で、ヒト多能性幹細胞を用いた心臓再生医療における臨床応用を実現化するためには多くの課題を克服する必要がある。その最も重要な課題の 1 つは、分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、効率よく心筋細胞のみを作製する技術の確立であった。我々はこれらの課題に対して、ヒト多能性幹細胞と分化心筋細胞の代謝プロファイルを詳細に解析することにより、培養環境により分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、分化心筋細胞のみを効率よくかつ大量に純化精製するという画期的手法を構築することにより克服することに成功した (*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 (*iScience* 2020), これまで確立してきた培養液による純化精製法との組み合わせによりさらに安全な心筋細胞の作製が可能となった。

しかしながら、依然として課題が存在する。それは、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療における臨床応用さらには産業化を実現化するためには、大量の細胞を作製する必要があり、それに伴い多くのコストが発生することである。この課題を克服するためには、ヒト多能性幹細胞を安価かつ効率よく作製する必要がある。一方で、ヒト多能性幹細胞における従来の培養液は、未分化維持および増殖において最適な条件ではなかった。そこで、我々はヒト多能性幹細胞の増殖に最適な培養条件を探索し、必須アミノ酸の1つとして知られるトリプトファン代謝を制御することにより、ヒト多能性幹細胞の増殖が促進されることを見出した (*iScience* 2021)。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。

さらに、ヒト iPS 細胞由来心筋組織球を小動物大動物心不全モデル心臓に移植し、心機能が有意に改善することを確認している (*JACC-BTS* 2021)。現在、これらの技術を用いて臨床グレード心筋細胞を作製し、重症心不全患者への移植に向けて準備を進めている。

【文献】

- 1) Tohyama, S. *et al.*: (2013) *Cell Stem Cell* **12**, 127-137.
- 2) Tohyama, S. *et al.*: (2016) *Cell Metabolism* **12**, 663-674.
- 3) Tohyama, S. *et al.*: (2017) *Stem Cell Rep.* **9**, 1406-1414.
- 4) Tanosaki, S., Tohyama, S. (Corresponding author), *et al.*: (2020) *iScience* **23**, 101535.
- 5) Someya, S., Tohyama, S. (Corresponding author), *et al.*: (2021) *iScience* **24**, 102090.
- 6) Tabei, R., Kawaguchi, S., Tohyama, S. *et al.*: (2019) *J Heart Lung Transplant* **38**, 203-214.
- 7) Kawaguchi, S., Soma, Y., Tohyama, S. *et al.*: (2021) *JACC-BTS* **6**, 239-254.

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】

転写因子 Foxp3 を発現した制御性T細胞 (Treg) は、さまざまな組織環境、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。組織特異的な Treg の機能を調べるためには、Treg を特異的に操作したマウスを用いる必要があるが、Foxp3 欠損マウスや Treg 除去マウスは致死性の炎症反応を全身で発症してしまうため、この目的には適さない。そのため、Treg の組織適応メカニズムはこれまで十分に明らかにされていなかった。

当研究室はこれまでに、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壊させることを見出した。さらに、A384T マウスは、全身性の致死的な自己免疫疾患は発症せず、炎症組織が末梢組織に限定しているため、組織特異的な Treg の機能解明が可能なマウスである。

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した。

【方法】

Foxp3 遺伝子変異 A384T 変異マウス、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.)、免疫細胞集団を免疫学的に解析し、Foxp3 依存的な脂肪組織の恒常性維持および脂肪細胞分化を検証した。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した。

【結果】

A384T マウスの脂肪組織を解析した結果、当初の予想通り、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。肺組織などでは、IL-33 シグナル依存的に活性化された病原性の高い Th2 細胞が 2 型サイトカイン（特に IL-5 と IL-13）を高産生し、炎症性好酸球の集積を促進することで、アレルギー病態の増悪に寄与することが知られている。そこで、A384T マウスの脂肪組織で見られる Th2 型炎症破綻のメカニズムを解明する目的で、A384T マウスを IL-33 受容体 (ST2) 欠損マウスと掛けあわせた (Foxp3<A384T> x ST2 KO) マウスを作製した。Foxp3<A384T> x ST2 KO マウスの脂肪組織を解析した結果、A384T マウスで見られていた Th2 サイトカイン、好酸球の浸潤が顕著に減少することが分かった。さらに、それと相関して Foxp3<A384T> x ST2 KO マウスの脂肪組織重量は、A384T マウスよりも増加していることが分かった。

次に、A384T マウスで見られている脂肪組織の恒常性破綻の意義を解明する目的で、WT マウスと A384T マウスに通常食・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。

さらに、脂肪組織の Treg の抑制標的細胞も明らかにしたいと考えている。Foxp3<A384T> x ST2 KO マウスの解析から、A384T マウスの脂肪組織では 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) などが活性化している可能性が考えられる。今後は、シングルセル解析などを行い、脂肪組織における Treg の抑制メカニズムも明らかにしたいと考えている。

高血圧発症機序の解明－血管内皮機能調節と食塩感受性規定因子の研究－

西本光宏

(国際医療福祉大学三田病院)

【目的】

食塩感受性高血圧の病態形成には腎、脳、血管など様々な臓器・経路が寄与している。血管内皮は種々の生理活性物質を通じて血管の機能調節を通じて血圧を制御する。内皮機能の中心を担う NO の産生は Ca²⁺シグナルによって調節されている。この細胞内 Ca²⁺を調節する STIM1 に着目し、血管内皮機能調節の分子機構の検討を行った。また個体によって異なる食塩感受性を規定する因子の一つとして、胎児期の過剰ストレス暴露が報告されている。胎児期に何らかのプログラミンが行われるとの仮説が提唱されており、この機構にエピジェネティクス調節異常、特に長期に持続する変化として DNA メチル化の異常が想定されている。母体ストレスが胎児に過剰なコルチゾール負荷を与えることに着目し、産仔の DNA メチル化調節を検討した。

【方法】

1) 血管内皮特異的 STIM1 ノックアウトマウスを作成し、血管内皮細胞の Ca^{2+} 濃度調節 / NO 産生能、大動脈の血管拡張能、血圧日内変動を検討した。2) 妊娠期に低蛋白食を与えたラットおよび妊娠後期に合成コルチコステロイドであるデキサメサゾンを投与した妊娠時ストレス動物モデルについて食塩負荷時の血圧変化、血圧制御に関与する遺伝子発現、ならびに DNA メチル化制御について検討した。

【結果】

1) 血管内皮特異的 STIM1 ノックアウトマウスでは血管内皮のアゴニスト依存性 NO 産生、ない非依存性血管拡張が有意に抑制された。血圧については拡張期血圧および活動性の亢進する夜間で収縮期血圧の有意な上昇を認めた。2) 低蛋白食ストレス負荷および妊娠後期糖質コルチコイド過剰の母体からの産仔は成人後食塩感受性高血圧を示した。負荷モデルの産仔では視床下部室傍核においてアンジオテンシン受容体遺伝子の DNA メチル化の低下と遺伝子発現の亢進を認めた。腎においては Na 輸送体の発現亢進を認めた。

【考察】

血管内皮の STIM1 が内皮機能調節・血圧制御自体に大きな役割を担っていることが明らかになった。活動期と休止期において血圧制御に寄与するアゴニスト依存性の血管内皮機能と shear stress に代表されるアゴニスト非依存性の役割の違いが示唆された。また妊娠時ストレスが成人後の食塩感受性高血圧を発症させる機序について中枢での部位特異的な DNA メチル化の異常が寄与し、腎での Na 輸送体発現制御に至ることが明らかになった。

【文献】

- 1) Nishimoto, M., Mizuno, R., Fujita, T. & Isshiki, M.: Stromal interaction molecule 1 modulates blood pressure via NO production in vascular endothelial cells. *Hypertens Res.* 2018; **41**(7): 506-514.
- 2) Kawakami-Mori, F., Nishimoto, M. *et al.*: Aberrant DNA methylation of hypothalamic angiotensin receptor in prenatal programmed hypertension. *JCI Insight.* 2018

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】

心臓疾患はゲノム要因と環境要因の組み合わせによって生じる。その詳細は明らかにすれば、心臓疾患における精密医療を加速できると思われる。

【方法】

患者の組織検体を用いたオミックス解析・患者から樹立した iPS 細胞を用いた疾患 iPS 細胞解析・疾患モデル動物のオミックス解析によって心臓疾患のゲノム要因・環境要因を明らかにし、それに基づいた精密医療を進展させる。

【結果】

高血圧・弁膜症・心筋症・心筋梗塞は心臓に病的な血行力学的ストレスを誘導して心不全を惹起する。これを模倣する圧負荷心不全マウスモデルを用いて我々は世界で初めて心筋細胞のシングルセル RNA-seq 解析を確認し、肥大型心筋が代償型・不全型心筋に分岐すること、不全型心筋の誘導には DNA 損傷・p53 シグナル活性化が必須であることを明らかにした¹⁾。そして組織において位置情報を保持して遺伝子発現を解析できる 1 分子 RNA *in situ* hybridization によって、圧負荷で胎児化する心筋細胞は中間層で多く認められるだけでなく、形態的に小さく肥大していないことを解明した。さらに心不全患者の治療前の心筋生検検体の分子病理解析によって、DNA 損傷を定量評価することで治療応答性や予後を予測できることを実証した²⁾。また心不全患者の心筋シングルセル RNA-seq 解析によって、致死的不整脈を有する心不全患者で特異的に認められるドパミン D1 受容体陽性心筋を同定し、このシグナルがリアノジン受容体のリン酸化を介して細胞内カルシウム挙動を攪乱することを解明した³⁾。さらに拡張型心筋症のゲノム解析によって、LMNA 遺伝子変異が予後不良な心不全の遺伝的要因であることを解明した。その成果を診療ガイドラインに反映させて精密医療の実現へと結実した⁴⁾。そして LMNA 変異患者由来の iPS 心筋細胞および LMNA 変異マウスの心臓をシングルセル解析し、分化異常・細胞内

構造異常・DNA 損傷がその病態であることを解明した。さらに心筋梗塞のゲノム解析によって、糖尿病・高血圧・肥満・脂質異常・炎症と関係する原因遺伝子を同定し、遺伝要因を統合したポリジェニック・リスクスコアを構築した⁵⁾。また心筋梗塞モデルマウスの空間的遺伝子発現解析によって、梗塞直後に梗塞境界部で発現上昇するメカノセンシング遺伝子による心臓リモデリングの保護的効果を明らかにした。

【考察】

ゲノム・シングルセルオミックス解析によって疾患システム構造を理解し、精密医療の実現を加速できる。

【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) Yamaguchi, Nomura. *et al.*: Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure. *Nat Commun.* **11**, 4364 (2020).
- 4) Nomura. *et al.*: Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep.* **8**, 1998 (2018).
- 5) Koyama, Nomura. *et al.*: Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* **52**, 1169-1177 (2020).

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¹⁾。最近我々はリプログラミングと心臓発生の間にはエピジェネティックなプロセスにおいて多くの共通点があることを見出した²⁾。このような知見から、今度は逆にリプログラミングの研究成果を参考にして、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³⁾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/Zfp281 に着目し、ZNF281 の司る心臓発生の新たな転写制御機構を解析することを目的として、研究計画を立案した。

【方法】

本研究では胚性幹細胞 (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 ZNF281 をノックアウトしたマウス ESC (ZNF281KOmESC) 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 (図 1)。

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。このマウスを用いて心臓特異的に ZNF281 を欠損したマウスを作製したところ、胎生致死の表現型が確認できた (図 2)。

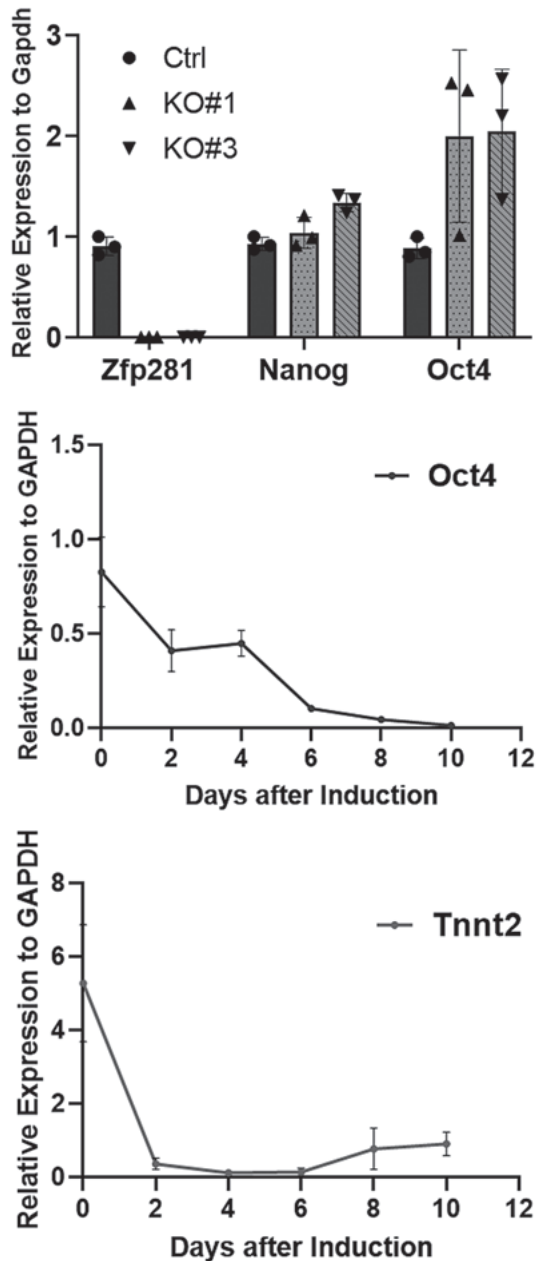


図1 ZNF281KOmESCの樹立と心筋分化誘導における未分化マーカーと心筋マーカーの発現変動

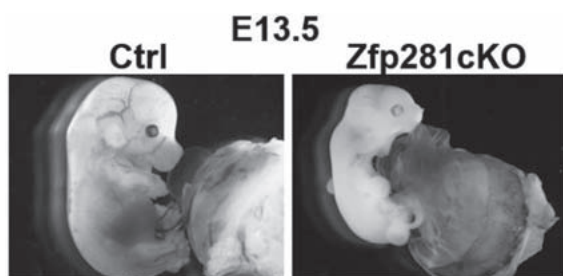


図2 心臓特異的 ZNF281KO マウスの胎生致死の表現型

【考察】

我々の *in vitro* 及び *in vivo* の解析結果から、ZNF281 は心筋分化及び心臓発生に必須の因子である事が明らかとなった。今後はマルチオミクス解析を用いて ZNF281 がどのように心筋形成の転写ネットワークを司っているのかを明らかにする予定である。

【参考文献】

- 1) Ieda, M. *et al.*: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, **142**, 375-386, (2010).
- 2) Hashimoto, H. *et al.*: Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers. *Cell Stem Cell*, **25**, 69-86 e65, (2019).
- 3) Zhou, H. *et al.*: ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression. *Genes & development*, **31**, 1770-1783, (2017).

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，DKD）は腎不全の原疾患として最も多いが，根本的な治療法は未確立である．これまで DKD に対する治療法開発を妨げていた要因の一つとして，ヒトの病態と類似するモデル動物の欠如があげられる．申請者らは，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），DKD における意義は未解明である．本研究は（1）ヒト DKD と類似した病態を示すマウスモデルを確立すること（2）確立したマウスモデルを用い，主に MR に焦点をあてて DKD 進行の分子基盤の一端を解明することが目的である．

【方法】

肥満2型糖尿病モデルの db/db マウスに対して4週齢で片腎摘出を施行後、10週間高食塩食を投与し (UNx-HS db/db マウス)、その表現型を評価した。db/m マウスに同様の処置を行った群をコントロール群とした。MR拮抗薬、Rac1阻害薬をUNx-HS db/db マウスに投与し効果を検討した。

【結果】

UNx-HS db/db マウスは高アルドステロン血症を認め、上皮性ナトリウムチャンネル活性化、低カリウム血症、高血圧を呈した。UNx-HS db/db マウスは顕著なアルブミン尿に加え、糸球体結節性病変を認めた。UNx-HS db/db マウスの腎皮質と糸球体で、Rac1活性化、MR標的遺伝子 Sgk1 発現の上昇を認めた。これらの結果から遠位ネフロン、糸球体両者での Rac1-MR 経路活性化が示唆された。MR拮抗薬、Rac1阻害薬によりこれらの所見は改善された。

【考察】

本研究を通して DKD の新たなモデルマウスとして UNx-HS db/db マウスを確立した。UNx-HS db/db マウスは、これまで一般的な糖尿病マウスでは認められなかった高血圧を呈し、顕著なアルブミン尿、DKD に特徴とされる糸球体結節性病変を伴っていたため、ヒト DKD に近い病態を示している可能性が考えられた。UNx-HS db/db マウスを用いた検討により、糸球体での Rac1-MR 経路活性化と、遠位ネフロンでの Rac1-MR 経路活性化によってもたらされる血圧上昇の両者が DKD の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Hirohama *et al.*: *Hypertension* 2021, publish ahead of print)。

腸内環境変化に着目した肥満症に関する基礎的研究

宮本潤基

(東京農工大学大学院農学研究院)

【目的】

これまでの研究で、食事脂質由来腸内細菌代謝物群が腸管ホルモンでインクレチンの一つである GLP-1 (glucagon like peptide-1) の分泌亢進を介して、生体

エネルギー代謝調節に関与することを明らかにした¹⁾。その過程で、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示すことを見出した (unpublished data)。加えて、野生型と GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの腸内細菌を解析した結果、全く異なる腸内細菌の構成を示すことを見出した。そこで、本研究では、腸内環境変化と GLP-1 シグナルの相互作用が生体エネルギー代謝調節に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの腸内細菌変化が、遺伝子型による影響か、高脂肪食による影響かを評価するために、若齢期 (高脂肪食負荷前) における腸内細菌解析を実施した。また、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスで観察された高脂肪食誘導性肥満に対する腸内細菌の影響を評価するために、抗生物質処置することで腸内細菌の影響を消失したマウスを作出した。これまでと同様に、4週齢から3ヶ月間、高脂肪食負荷による肥満を誘導した。その際、抗生物質カクテル (アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン及びメトロニダゾール) を自由飲水で摂取させ、肥満発症に及ぼす影響を評価した。

【結果】

若齢期における腸内細菌解析の結果、野生型と GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの間で顕著な差は認められなかった。加えて、抗生物質処置による高脂肪食負荷誘導性肥満への影響もまた、野生型と GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの両方で、体重増加が抑制された。

【考察】

本研究によって、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの肥満に伴う腸内細菌の及ぼす影響は微弱であることが示唆された。しかしながら、別のグループの研究報告で、無菌マウスの GLP-1 分泌は顕著に亢進していることが報告されていること (Wichmann *et al.*, *Cell Host Microbe*. 2013)、そして、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは若齢期の段階で、体重が軽いことに着目し、今後、胎児期や乳児期における GLP-1 シグナルが、生後に伴う肥満や腸内細菌の定着などと関与している可能性を明らかにする。

【文献】

1) Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, K.,

Karaki, S.I., Mukouyama, H., Kishino, S., Li, X., Ichimura, A., Irie, J., Sugimoto, Y., Mizutani, T., Sugawara, T., Miki, T., Ogawa, J., Drucker, D.J., Arita, M., Itoh, H. & Kimura, I.: Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat Commun.* 10, 4007 (2019).

低分子化合物による新生児期及び成体期線維芽細胞からの心筋直接誘導促進

村岡直人

(ワシントン大学医学部)

再生能力の限られている心筋細胞は、障害を受けると失われ、線維芽細胞に置換されることで、心機能は低下していく。多能性幹細胞由来心筋細胞の移植は心筋再生の代表的な手法として大きく期待されているが、その使用には多能性幹細胞の残存による腫瘍形成のリスク、移植心筋細胞の生着率などの課題が残されている。一方で、心臓に内在する線維芽細胞をその場で直接、高率に心筋細胞に転換できればこれらの問題を解決できる。これまでの研究により心筋特異的転写因子である Gata4/Mef2c/Tbx5 (GMT) または GMT/Msep1/Myocd を導入することでマウスの *in vitro*, *in vivo*, さらにはヒト細胞で線維芽細胞から心筋細胞を直接誘導することが可能となった (Ieda M, *Cell*, Inagawa K, *Circ Res*, Wada R, *PNAS*, Yamakawa H, *Stem Cell Rep*, Miyamoto K, *Cell Stem Cell*). また、心筋細胞で高発現する miR-133 によりマウス及びヒト線維芽細胞からの心筋誘導効率が改善すること、そしてそのメカニズムとして、上皮間葉移行のマスター因子である Snail を miR-133 が直接抑制することで線維芽細胞の特性を消去し、心筋誘導が促進されることを明らかとした (Muraoka N, *EMBO J*). しかしながら、従来の心筋直接誘導法は胎児期の線維芽細胞においては高効率であるものの、臨床で治療対象となる小児期及び成体期の線維芽細胞では効率が低いという課題があった。さらに、この加齢や老化に伴って心筋誘導効率が低下するメカニズムは不明であった。

そこで、注目したのが低分子化合物である。低分子化合物はコスト、安全面、簡便さから臨床応用に向け優れた選択肢と考えられる。低分子化合物のライブラリーの中から用いて、マウス新生児期および成体期線維芽細胞から心筋細胞への誘導を促進する化合物を網羅的に探索した。その結果、これらの細胞で心筋誘導を顕著に改善するとして、日常臨床で汎用されている非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナクを同定した (Muraoka N, *Nature Commun*). そのメカニズムとして、加齢に伴い線維芽細胞においてシクロオキシゲナーゼ-2, プロスタグランジン E2/プロスタグランジン E 受容体 4, インターロイキン-1 β /インターロイキン 1 受容体タイプ 1 経路により炎症及び線維化が活性化していること、また、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるジクロフェナクはこの経路を抑制することにより活性化されている炎症さらには線維化特性を抑え、心筋誘導を改善することを明らかとした。

遺伝性大動脈瘤・解離症の病態生理の探索と創薬に向けたトランスレーショナルリサーチ

八木宏樹

(東京大学医学部附属病院医学系研究科)

【目的】

遺伝性胸部大動脈瘤・解離症の代表疾患であるマルファン症候群 (MFS) はフィブリリン 1 をコードする *FBNI* 遺伝子の変異によって大動脈瘤などを生じる常染色体優性遺伝の全身性結合織病である。その病態形成には TGF- β シグナルの過剰な活性化が深く関与している。ロサルタンは TGF- β シグナルの過剰な活性化を抑制することで大動脈瘤に対する治療効果が期待されたが、無作為化比較対照臨床試験では β 遮断薬を上回る効果が得られなかった。本疾患の問題点は、原因遺伝子が同定されているにもかかわらず、*FBNI* 遺伝子変異により大動脈瘤が形成される分子病態については依然として不明な点が多く残され、有効な治療法が確立されていないことである。

我々は、MFS 患者と *Fbn1*^{C1039G/+} マウスの大動脈組織を用いて、活性酸素種 (ROS) が血管全層で亢進し、血管内皮細胞 (vECs) において ROS の産生起源である

キサランチンデヒドロゲナーゼ (*Xdh*) の遺伝子発現, キサンチンオキシドレダクターゼ (*XOR*) の蛋白発現と活性が有意に亢進していることを見出してきた. 血管内皮特異的 *Xdh* ノックアウト *Fbn1*^{C1039G/+}マウスを作成し, 或いは *Fbn1*^{C1039G/+}マウスに *XOR* 阻害剤 (フェブキシソスタット) を投与したところ, 共に大動脈径の拡大が有意に抑制され, 細胞内シグナル伝達系である Smad2 と ERK1/2, p38-MAPK のリン酸化の亢進が減弱した. 以上から, MFS の大動脈瘤形成に vECs の *XOR* が重要な役割を果たしていることが明らかとなった. さらに, MFS 患者と *Fbn1*^{C1039G/+}マウスの大動脈でメカニカルストレス転写因子の *Egr-1* が有意に上昇していたことから, *FBNI* 遺伝子変異に伴う vECs のメカニカルストレス応答異常が *XOR* 活性を上昇させると仮説を立て, 以下の実験を試みることにした.

【方法】

Fbn1^{C1039G/+}マウスの大動脈に横行大動脈縮窄術 (TAC) で圧負荷をかけ, 或いはヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) に低浸透圧刺激と伸展刺激をし, *XOR* の発現とシグナル伝達系がどのように変化するかを検証する.

【結果】

Fbn1^{C1039G/+}マウスの大動脈に TAC で圧負荷をかけ

たところ, p38-MAPK と focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化が有意に亢進した. また HAEC に低浸透圧刺激と伸展刺激をしたところ FAK, p38-MAPK のリン酸化とともに *Egr-1*, *XOR* の発現が有意に亢進した. 低浸透圧刺激をした HAEC に FAK 阻害剤や p38 阻害剤, *Egr-1* をノックダウンしたところ, *XOR* の発現上昇が抑制された.

【考察】

MFS の大動脈瘤形成において vECs に端を発したメカニカルストレスの異常応答に伴う *XOR* の過剰発現と ROS が重要な要因であることを初めて見出した点で画期的であり, 新たな分子標的治療を提唱できる可能性が示唆された.

生体膜リン脂質の“質”制御による血管内皮機能調節戦略

柳田 圭介

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的】

申請者は生体膜リン脂質中の脂肪酸の「質」の変容が成人病リスクや進行に関わる可能性を考えている. 本研究では, マウスの生体膜リン脂質脂肪酸組成を遺伝学的に *in vivo* レベルで操作し, 血管機能検証や成人病モデルにおける病態観察により, 「血管内皮細胞リン脂質の“質”の違いによるその機能変容」仮説を検証する.

【方法】

本年度はまずリゾリン脂質アシル基転移酵素群欠損マウスのうち, 8 種類の酵素欠損マウスを用いて, 血管新生における機能について検証を行った. 具体的には 6 日齢マウスの網膜の血管内皮細胞やペリサイト, 血管平滑筋細胞の染色を行い, その血管構造について比較を行った.

【結果】

検討したリゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子欠損マウス 8 系統のうち 6 系統については著明な変化が認められなかった. 一方, 酵素遺伝子 X および Y の欠損マウスにおいて血管新生異常が認められた. 具体的には, 遺

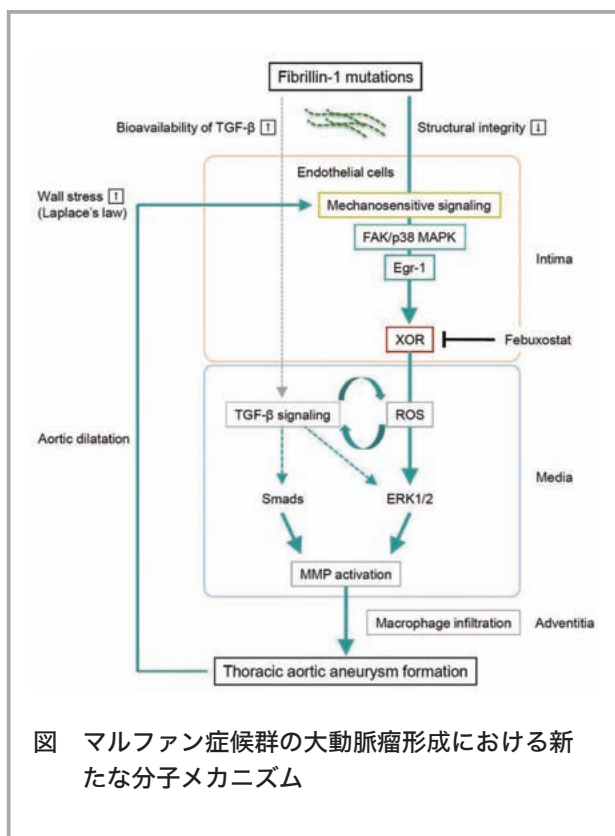


図 マルファン症候群の大動脈瘤形成における新たな分子メカニズム

伝子XおよびYのいずれの欠損マウスにおいても、対照群である野生型マウスに比較し血管網の進展が遅延しており、また分岐数も減少していた。一方、ペリサイトによる被覆や動静脈分化についてはいずれの系統においても異常は認めなかった。網膜血管内皮細胞のリン脂質脂肪酸組成については現在検討中であるが、単離脳血管内皮細胞を用いたリピドミクス解析により、XおよびY欠損マウスにおいてそれぞれ特定の脂肪酸を含有するリン脂質が減少していることが確認された。これらの遺伝子が血管新生に関わるその責任細胞を同定すべく、遺伝子Xについては flox マウスを用いて、血管内皮細胞およびペリサイト特異的欠損マウスの作製を開始した。

【考察】

以上の遺伝子欠損による *in vivo* リン脂質脂肪酸組成操作アプローチにより、リン脂質脂肪酸組成変動が血管新生に影響しうることが示された。今後、リン脂質脂肪酸の質が血管新生やその他の血管機能に影響するその分子メカニズムに迫るとともに、糖尿病や脂質代謝疾患をはじめとする病的な背景において血管のリン脂質の脂肪酸の質が如何に変動するかを明らかにし、リン脂質脂肪酸の質をターゲットとした血管病変の治療戦略の開発へとつなげていきたい。

ドパミンシグナルを介した心不全の新規病態生理の 解明と治療法の開発

山口 敏 弘

(東京大学医学部附属病院)

【背景】

従来、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 (DIR) 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 DIR 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、DIR 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 DIR を *in situ* hybridization 法で評価したところ、DIR は心筋細胞で増加していた。そこで心筋特異的に DIR 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 DIR 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 DIR 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 DIR を強制発現させたところ DIR 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 DIR 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、2020 年 8 月 *Nature Communications* 誌に報告した。(Nature Communications. Cardiac dopamine D1 Receptor Triggers Ventricular Arrhythmia in Chronic Heart Failure. Toshihiro Yamaguchi *et.al.* DOI 10.1038/s41467-020-1812-x)

【考察と今後の展望】

本研究の結果、心筋 DIR 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、DIR 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予備実験を行っている。また、心不全において心臓 DIR が発現上昇しているメカニズムを明らかにするために、心不全時の心臓 DIR の転写因子モチーフ解析によって抽出したファクターに着目した検証実験に引き続き取り組んでいるところである。

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に晒されており、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)とThbs1の発現を制御する転写因子Early growth response 1 (Egr1)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や細胞表面受容体の役割と、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】

Egr1の欠損マウスを作成し、大動脈瘤の抑制効果を検証したが、部分的な効果しか認められなかったため、大動脈瘤の初期シグナルとして‘別の分子の関与が示唆された。遺伝子発現解析と相互作用解析の結果から、プロテアーゼ活性化型の受容体Protease activated receptor 1 (PAR1)がマウスやヒトの大動脈瘤血管壁で高発現していることを見出した。マウス大動脈瘤モデルにおいては、PAR1は大動脈瘤発生の初期から発現亢進しており、PAR1がEgr1-Thbs1のシグナルを制御する事を見出した³⁾。また、伸展刺激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た。分泌されたThbs1は、integrin $\alpha v \beta 1$ と結合し、転写調節因子Yes-associated protein (YAP)の核内移行(活性化)を制御する事を見出した。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⁴⁾。

【考察】

これらの結果から、細胞外マトリクスの刺激と細胞表面受容体PAR1の活性化が、大動脈瘤発生に関与していることを明らかにしました。また、メカニカルストレス応答の中心を担う、YAPの活性化が細胞外マトリクスを介して制御されていることを明らかにしました。さらに、Thbs1/YAPのシグナル伝達経路は、血管病態の発生にも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) Shin, S.J., Hang, H.T., Thang, B.Q., Shimoda, T., Sakamoto, H., Osaka, M., Hiramatsu, Y., Yamashiro, Y*. & Yanagisawa, H*.: Role of PAR1-Egr1 in the initiation of Thoracic Aortic Aneurysm in Fibulin-4 deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**(8): 1905-1917, 2020. *責任著者
- 4) 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

分岐鎖ケト酸とその代謝酵素に着目した肥満症に対する新規治療薬の開発

吉田 尚史

(神戸大学大学院医学研究科)

肥満に起因する多くの疾患が増加しており社会問題となっているが、肥満そのものに対する治療法は、限定的な抗肥満薬や外科手術しか存在しない。近年、腸内細菌が肥満の発症に関与する事が数多く報告されており、腸

内細菌への介入による肥満治療の開発が期待されている。我々は既に、ヒトとマウスの1000種類に及ぶ血漿メタボロミクスにおいて、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) とその cognate である分岐鎖ケト酸 (BCKA) が体重と強く正に相関する唯一の共通代謝物である事を同定した。BCAA/BCKA は褐色脂肪組織でエネルギーとして利用される事で熱産生能が高まり、肥満の抑制に繋がる事が既に報告されているが、腸内細菌が、遠隔臓器である褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝に与える影響は未だ解明されていない。

【目的】

本研究の目的は、腸内細菌と褐色脂肪組織における BCAA/BCKA 代謝の関連を解明する事である。これにより、プロバイオティクスを含む肥満症に対する新規治療の開発が期待される。

【方法】

SPF マウスと無菌マウス (共に野生型) を用いた動物実験を行った。褐色脂肪組織における BCAA/BCKA 代謝は、同代謝の律速酵素である BCKDH の活性を反映

する指標である P-BCKDHA/BCKDHA 比で検討を行った (図1A)。

【結果】

1. SPF マウス-普通食飼育下では、週齢があがり体重が増加しても、褐色脂肪組織における P-BCKDHA/BCKDHA 比の変化は認めなかった (図1B)。
2. SPF マウス-高脂肪食飼育下では、体重依存的に、褐色脂肪組織における P-BCKDHA/BCKDHA 比が増加した (図1C)。
3. 無菌マウス-高脂肪食飼育下では、体重依存的に、褐色脂肪組織における P-BCKDHA/BCKDHA 比が劇的に増加した (図1D)。
4. 我々が同定した動脈硬化抑制腸内細菌 “*Bacteroides*” を SPF マウス-高脂肪食飼育下に投与すると、腸内細菌叢が大きく変わり、体重増加が抑制され (図1E), 褐色脂肪組織における BCAA/BCKA が低下した (図1F)。

【考察】

結果1-3からは、腸内細菌叢は褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝に保護的に働いており、高脂肪食負荷に伴う腸内細菌叢の異常が褐色脂肪組織における BCAA/BCKA 代謝を停滞させる一因である事が示唆された。さらに結果4では、*Bacteroides* は肥満において停滞する褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を亢進させる役割があり、それにより抗肥満効果を発揮する事が示唆された。これらの事から、腸内細菌が褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を制御する環境因子である事が分かった。2021年度は、腸内細菌がどのように褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を制御しているのかについて、解明を試みたい。

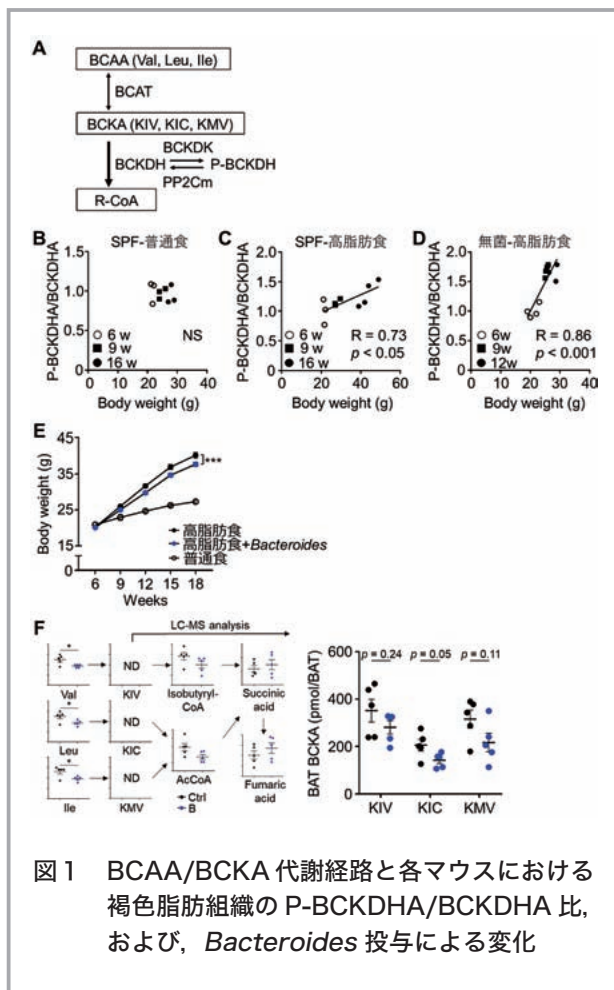


図1 BCAA/BCKA 代謝経路と各マウスにおける褐色脂肪組織の P-BCKDHA/BCKDHA 比、および、*Bacteroides* 投与による変化

心血管系分化における BMP-Smad シグナルの役割の解明

関 庚 徳

(国立循環器病研究センター)

【目的】

心臓発生を正常に進めるにあたっては緻密な分化過程の制御が重要であり、BMP シグナルは中心的役割

をになっている。BMP シグナルの細胞内シグナルは Smad1/5/9 の 3 種類が担っているが、このうち Smad9 の役割については、ほとんどわかっていない。本研究では Smad9 を介した BMP シグナルが担う心血管分化における役割を解明することを目標とした。

【方法】

Smad9 の結合タンパクの同定し、心臓分化への影響をゼブラフィッシュモデルで検討した。また転写因子である Smad9 の標的遺伝子を同定しその働きについて解析した。

【結果】

In silico で Smad9 の結合タンパクとして新規 E3 リガーゼである Asb2 を発見した。Asb2 は Smad9 と結合し、Smad9 をユビキチン化し分解に導くことが示された。*In situ* にて Asb2 はマウス発生初期においては心臓にきわめて限局した発現を示すことが分かった。心臓分化の解析のため行ったゼブラフィッシュモデルでは、Smad9 のノックダウンでは表現型が見られなかったが、Asb2 のノックダウンでは拡張型心筋症様の表現型が認められたことから、Smad9 の蓄積は正常な心臓分化を阻害すると考えられた。実際に Smad9 を過剰に発現する P19CL6 細胞を作成すると、野生型にくらべ心筋細胞への分化が抑制された。同細胞を用いて Smad9 の標的遺伝子を検索したところ、心臓分化に重要な Tbx2 遺伝子が Smad9 によって誘導されることがわかった。先に示されたゼブラフィッシュの Asb2 ノックダウンモデルでは、Tbx2 過剰発現によると考えられるアルシアンブルー染色陽性で示される結合織増生などの心筋組織表現型が確認された。

【考察】

我々の研究結果から、心臓発生のごく早期の段階で Asb2 による Smad9 の量的制御が行われている可能性が示唆された。Smad9 の量的抑制はなんら表現型を示さない一方、Smad9 の蓄積は心筋細胞分化を抑制し正常な心臓発生を阻害していた。このことは、Smad1/5 による Redundancy が存在する一方、Smad9 の過剰な転写促進は心臓発生を抑制することを示唆していた。さらに我々の結果からは Smad9 が Tbx2 を誘導していることが示された。Tbx2 は心筋細胞分化を抑制し非心筋組織への分化を誘導することが知られており、Asb2 ノッ

クダウンで Smad9 が蓄積し、Tbx2 シグナルが過剰となることで心筋細胞分化が抑制される可能性が示唆された。

全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

血中エクソソーム由来 miRNA 解析によるベー チェット病のバイオマーカーの探索

石戸 みづほ

(横浜市立大学医学部)

【目的】

ベーチェット病 (BD) は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性疾患である。BD は口腔内アフタ性潰瘍, 眼症状, 皮膚症状, 外陰部潰瘍を主症状とし, しばしば関節炎, 精巣上体炎, 消化器症状, 血管病変, 中枢神経病変などの副症状を伴う。BD の発症には, 遺伝要因と環境要因が複合的に関与していると考えられているが, その全容は未だ明確ではない。BD の眼症状は重篤な視力障害をしばしば引き起こし得るとともに, BD の特殊型症状は生命予後に大きな影響を及ぼすため, 早期診断・早期治療が必要とされる。

近年, エクソソーム由来の分子 (主にマイクロ RNA (miRNA)) が癌を含む様々な疾患のバイオマーカーとして有用であることが報告されているとともに, エクソソーム由来の分子をターゲットとした治療薬の開発も行われている。したがって本研究では, BD 患者のエクソソーム由来 miRNA を対象に網羅的な発現解析を実行し, BD に特異的なエクソソーム由来 miRNA (バイオマーカー候補) を探索する。また, BD の各臨床症状と特異的に相関するエクソソーム由来の miRNA の探索も行い, BD の早期の臨床症状診断・予後予測の確立を行う。

【方法】

日本人 BD 患者 20 例と日本人健常者 20 例から採取した血液から分離した血漿を実験試料とした。血漿から単離したエクソソーム由来の miRNA を対象に, SurePrint miRNA マイクロアレイ (Agilent 社) を用いて, ゲノム全域に位置する miRNA の網羅的な発現解析を実行した。

【結果】

BD 患者群において有意に変動するエクソソーム由来の miRNA を複数同定した。また, 特定の臨床症状と特異的に相関を示す miRNA も複数同定した。

【考察】

本研究により同定された miRNA は, BD のバイオマーカーとなる可能性が考えられ, BD の早期診断および BD の臨床症状分類といった臨床医学への応用に繋がることが期待される。本研究で同定した miRNA の発現量変動の再現性を評価し, BD の診断に有用な真のバイオマーカーを特定するため, 今後新たな BD 患者および健常者を用いて追認試験を実行する予定である。

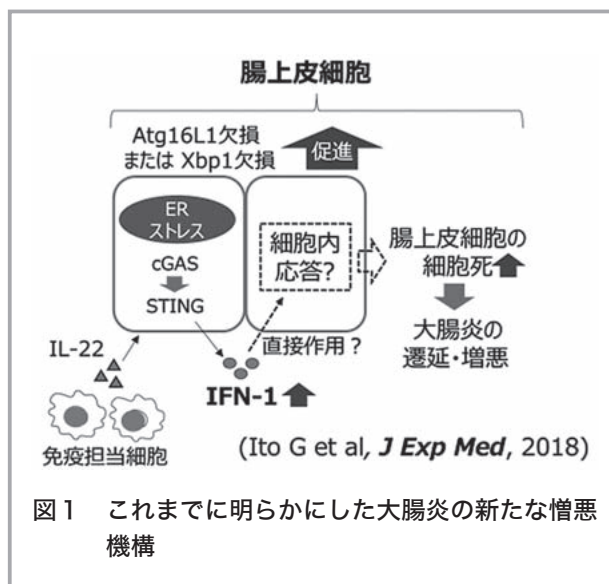
炎症性腸疾患における IFN-1 誘導性細胞死制御機構の解明

伊藤 剛

(東京医科歯科大学高等研究院)

【目的】

IBD の発症・再燃因子の一つとしてウイルス感染等を契機とした I 型インターフェロン (IFN-1) を中心とし



た免疫応答があるが、腸上皮における IFN-1 応答の意義・役割の詳細は明らかでない。また IBD の疾患感受性遺伝子の一つとしてオートファジー関連遺伝子 Atg16L1 が同定されている。我々は IFN-1 受容体の阻害により、Atg16L1 欠損マウスにおける IL-22 を介した DSS 腸炎の増悪が抑制されることを報告した (図1)。以上から腸上皮におけるオートファジーと局所炎症の惹起・遷延に繋がる IFN-1 応答に焦点を当て、その分子機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

【方法】

本研究では JAK-STAT 経路、細胞死 (アポトーシス・ネクロプトーシス) 経路の遺伝子変異・欠損マウスから作成した腸上皮オルガノイドを用いて解析を行う。細胞死応答の定量的・網羅的評価には FACS, Western Blot, RNA-Seq などを用いる。

【結果】

IFN-1 は腸上皮細胞において細胞死を誘導すること、同作用は Atg16L1 欠損腸上皮で著しく増幅・促進されることを明らかとした (図2)。次に細胞死制御におけるキー分子の一つである RIP1 に着目し、RIP1D138N (RIP キナーゼ不活化) マウスと Atg16L1 欠損マウスを交配し解析を行った。RIP1D138N オルガノイドは IFN-1 誘導性細胞死に抵抗を示し、Atg16L1 欠損下における細胞死増強作用も抑制することを明らかとした。また RNA シークエンスの結果、Atg16L1 欠損により細胞周期に関わる遺伝子の発現は低下するが、RIP1 キナーゼ不活性化により改善を認めることを明らかとした (図3)。

【考察】

細胞内オートファジーが障害された環境では IFN-1 応答が増強・促進されることから、腸上皮における IFN-1-オートファジー相互作用が、炎症性腸疾患の病態

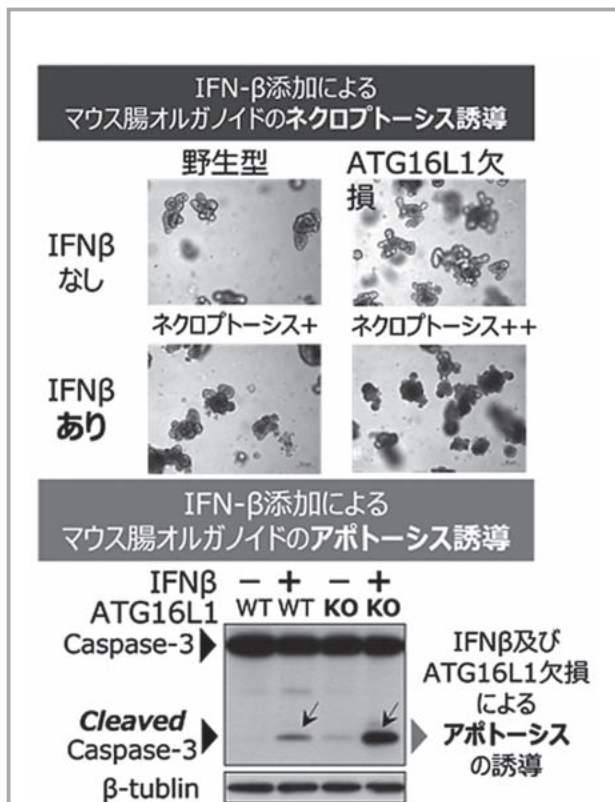


図2 腸上皮において IFN-β は細胞死を誘導する

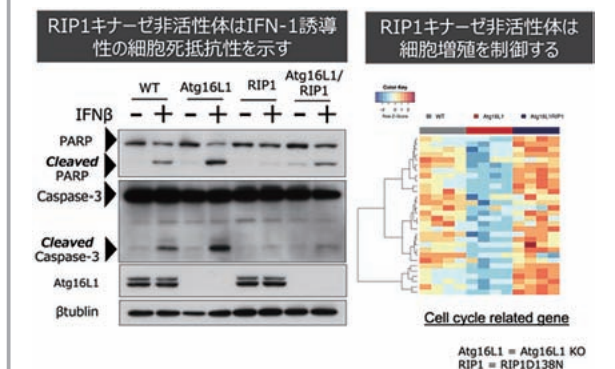


図3 RIP1 は IFN1 誘導性細胞死・増殖の master regulator

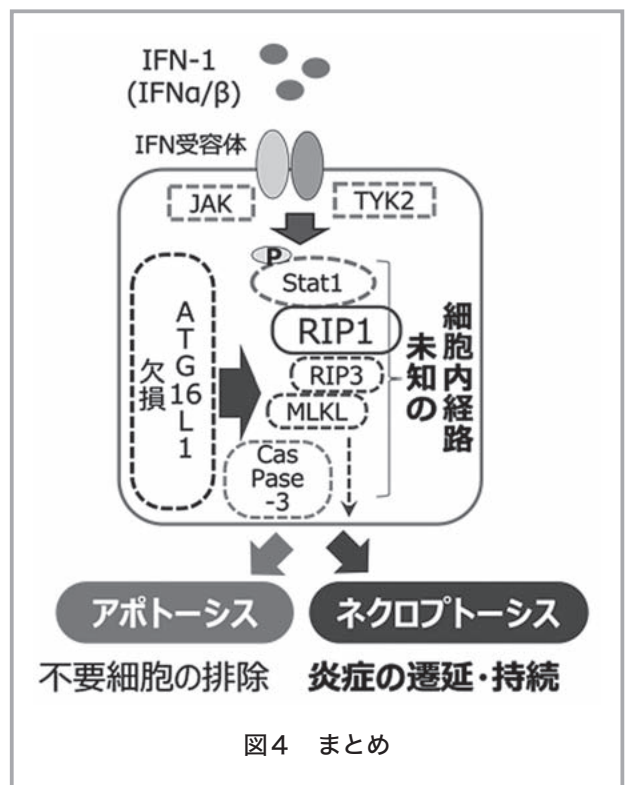


図4 まとめ

において重要な役割を担っていることが考えられ、同作用において RIP1 キナーゼ活性が重要な役割を果たしている可能性が示唆された (図4)。

【文献】

- 1) Welz, L., Ito, G., Aden, K. *et al.*: Epithelial XBP1 coordinates TP53-driven DNA damage responses and suppression of intestinal carcinogenesis. *Gastroenterology*. Sep 29; S0016-5085 (21) 03606-4 (2021).
- 2) Kuno, R., Ito, G., Okamoto, R. *et al.*: Notch and TNF- α signaling promote cytoplasmic accumulation of OLFM4 in intestinal epithelium cells and exhibit a cell protective role in the inflamed mucosa of IBD patients. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan, 11; **25**: 100906 (2021).
- 3) Tsuchiya, M., Ito, G., Okamoto, R. *et al.*: Functional analysis of isoflavones using patient-derived human colonic organoids. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan, 20; **542**: 40-47 (2021).
- 4) Stengel, ST., Ito, G., Rosenstiel, P. *et al.*: Activating Transcription Factor 6 Mediates Inflammatory Signals in Intestinal Epithelial Cells Upon Endoplasmic Reticulum Stress. *Gastroenterology*. Oct; **159**(4): 1357-1374 (2020).
- 5) Aden, K*, Tran, F*, Ito, G*, Rosenstiel, P. *et al.*: ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING. *J Exp Med*. 5; **215**(11): 2868-2886 (2018) (*equal contribution)

から筋線維芽細胞への分化やその後の細胞外基質の産生を促進して線維化が生じ、血管平滑筋細胞の増殖や血管の破壊・減少による顕著な血管障害が認められる。上皮細胞や内皮細胞が段階的に移行して、上皮または内皮細胞と間葉系細胞の両方の性質を様々な程度に併せ持つハイブリッド移行細胞の存在することが方臆されている。我々は、全身性強皮症の病態形成において上皮細胞や血管内皮細胞の間葉系細胞への移行が重要ではないかと考え、1200種類以上の化合物の中から TGF- β による上皮間葉移行を強く抑制する化合物をスクリーニングし、いくつかの候補を見出すことに成功した。今回はその候補薬剤の中でもすでにヒトへの投与試験が行われ、生体内の安全性が非常に高い化合物である LG283 に関して検討を行った。

【方法】

TGF- β で刺激した培養ヒト皮膚線維芽細胞の増殖・遊走・分化・活性化、線維芽細胞からの細胞外基質の産生能、線維芽細胞での TGF- β の発現や Smads やそれ以外のシグナル伝達分子のリン酸化に対する LG283 の抑制作用を検討した。同様にヒト上皮細胞を TGF- β で刺激した際にみられる間葉系細胞への移行を LG283 が抑制するか検討した。さらに TGF- β による培養ヒト血管内皮細胞の内皮間葉移行を誘導する際に LG283 を添加し、血管内皮と間葉系マーカー、内皮間葉移行に関与する転写因子の発現を確認した。最後にマウスにブレオマイシンを連日皮下注射して真皮の線維化を誘導した。このモデルに LG283 を経口投与することで生体での抗線維化作用や副作用を確認し、作用機序を詳細に解析した。

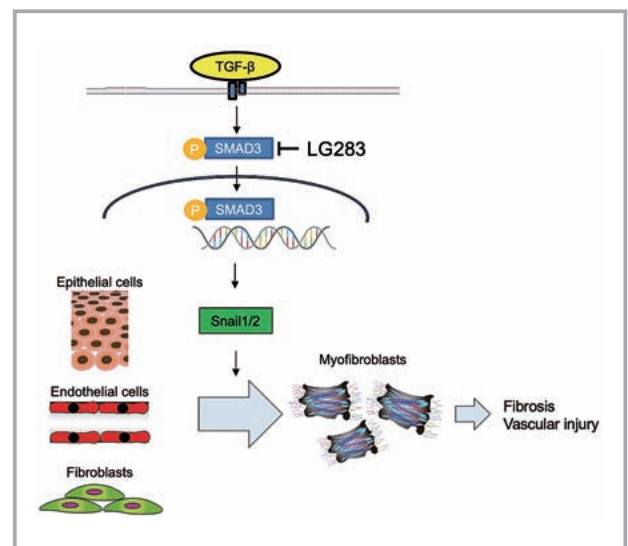
全身性強皮症病態における上皮・内皮間葉転換阻害に関する検討

宇都宮 慧

(福井大学医学部)

【目的】

全身性強皮症は、皮膚や内臓諸臓器の線維化と血管障害を呈する膠原病である。先行して局所に浸潤するマクロファージなどが産生するサイトカインが、線維芽細胞



【結果】

TGF- β で刺激した培養ヒト皮膚線維芽細胞とコラーゲンやファイブロネクチン1の発現が増加するが、LG283を加えるとmRNA、タンパクレベルでその変化が抑制された。上皮・内皮間質転換において重要な転写因子SNAIL1, 2の発現の上昇が有意に抑制された。さらにSmad2/3のリン酸化も抑制された。また、ヒト上皮細胞をTGF- β で刺激すると上皮マーカーであるEカドヘリンの発現は低下し、間葉系マーカーであるファイブロネクチン1, α -smooth muscle actinの発現が上昇した。LG283を共培養するとその変化は有意に抑制された。また、線維芽細胞での検討と同様にSNAIL1, 2の発現上昇とSmad2/3のリン酸化も有意に抑制された。さらに内皮細胞に間葉転換を誘導した際に発現の低下する内皮細胞マーカーのCD31, 発現の上昇する間葉系マーカーのファイブロネクチン1の変化はLG283により有意に抑制された。ブレオマイシンによる強皮症モデルではコントロール群に比較しLG283を投与した群では皮膚の肥厚、線維化が有意に抑制された。また、Smad2/3のリン酸化とSNAIL1, 2の上昇が有意に抑制された。

【考察】

今回の成果や知見を統合すると、LG283はTGF- β による上皮間葉移行を抑制する化合物としてスクリーニングされたが、TGF- β のシグナル制御などにより局所の線維芽細胞からのコラーゲン産生、内皮間葉移行などを抑制することで、強皮症のモデルマウスの皮膚の線維化を抑制したと考えられた。

マイクロ空間-微小血管モデルを用いた強皮症におけるB細胞の病原性解析

江 畑 慧

(東京大学医学部附属病院医学部)

【目的】

B細胞は全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) で中心的な役割を果たし、我々の施行した医師主導治験 (DesiReS 試験) では、リツキシマブの強皮症に対する高い効果が示されている。しかし、リツキシマブに対し治療抵抗性を示す症例も存在する。全身性エリテマトー

デスなどの研究により、リツキシマブ投与後に残存するわずかなB細胞は、この治療抵抗性に関わる重要な一因と考えられるが、これまでsingle B cellを蛋白質レベルで解析する技術はなく、これらのB細胞の解析は困難であった。

本研究の目的は、全身性強皮症 (Systemic Sclerosis; SSc) 患者やSScモデルマウスの末梢血中B細胞のうち、血管内皮細胞と反応する自己応答性B細胞を単一細胞解析することである。さらに、その自己応答性B細胞中のエフェクターB細胞とレギュラトリブ細胞とのバランスが、SScの重症度や治療抵抗性に影響するのかを解明する。

【方法】

マイクロチャンネル内で、ヒトまたはマウスの血管内皮細胞を培養し、毛細血管モデルを構築した。そこにSSc患者またはトポイソメラーゼI誘発SScモデルマウスのB細胞を導入した。血管内皮細胞と結合できるB細胞内は、マイクロチャンネル内の血管内皮細胞に付着した状態となる。

このB細胞の回収し、個々に刺激して放出された自己抗体やサイトカインの産生量を、マイクロ流路ELISAシステムを利用して測定した。

また、血管内皮細胞と接着したマウスB細胞を回収し、これらを他の野生型マウスに移植してからトポイソメラーゼI誘発SScモデルマウスを作成した。これらのマウスについて、背部皮膚や肺の組織学的評価を行った。同様の評価を、抗CD20抗体のみを投与したマウス、抗BAFF受容体抗体のみを投与したマウス、双方を投与したマウス、コントロールのみを投与したマウスの4群でも再度行った。

【結果】

SSc患者やトポイソメラーゼI誘発SScモデルマウスでは、それぞれ健常人やコントロール群のマウスと比べて、マイクロ血管モデル内で多くのB細胞が血管内皮細胞に接着した。この傾向は、線維化の程度が強く重症度が高いSSc患者やSScモデルマウスで顕著であった。これらのB細胞をマイクロELISAで単一細胞解析したところ、抗血管内皮細胞抗体や抗トポイソメラーゼI抗体を産生する、自己応答性B細胞の比率が高かった。

この自己応答性B細胞の亜集団は、血管内皮細胞との

接着力が強い集団（強接着B細胞）と接着力が弱い集団（弱接着B細胞）とに分けることができ、このうち強接着B細胞の数が重症のSSc患者やSScモデルマウスでは増加していた。弱接着B細胞は抗炎症サイトカインIL-10を産生するものが多かったのに対して、強接着B細胞は炎症性サイトカインIL-6を産生するのに加えて抗トポイソメラーゼI抗体産生量やBAFF受容体発現量が増加していた。

続いて、強接着B細胞を移植してからトポイソメラーゼIによる誘発を行ったマウスでは、対照群と比較して皮膚や肺の線維化が増悪した。逆に、弱接着B細胞を移植した場合には、線維化の程度は抑制された。また、強接着B細胞の亜集団は抗CD20抗体によるB細胞除去に抵抗性を示したが、抗BAFF受容体抗体を併せて投与すると、効率的に除去された。さらに、トポイソメラーゼI誘発SScモデルマウスにおいて抗CD20抗体は単独でも線維化病変を改善したが、抗BAFF受容体抗体と併用すると線維化抑制効果が増強された。

【考察】

本研究により、SScの増悪には血管内皮細胞との反応性が強い自己応答性のB細胞が関与しており、それらのB細胞はIL-6を産生し、自己抗体の産生量が多く、BAFF受容体の発現量が高いものが多いことが明らかになった。また、これらのB細胞は抗CD20抗体を投与しても他のB細胞より相対的に残存しやすく、その残存数が抗CD20抗体投与後の治療反応性を予測する因子になりうることが示された。加えて、血管内皮細胞と強く接着するB細胞は抗CD20抗体投与後も残存しやすいがBAFF受容体の発現が強いため、抗BAFF受容体抗体を追加投与すると効率的に除去されること、実際

にマウスモデルで抗CD20抗体と抗BAFF受容体抗体を併用することで皮膚や肺の著明な線維化改善効果が確認されたことにより、血管内皮細胞との反応性が強い病原性のB細胞を効率的に除去し、血管内皮細胞との反応性が弱い制御性のB細胞との比率を拡大させないことがSScに対する新たな治療戦略になりうるということが初めて示された。

腸管マクロファージにおけるIL-1Rを介したIL-10産生機序の解明

黒 沼 智

(北里大学北里研究所病院)

【背景と目的】

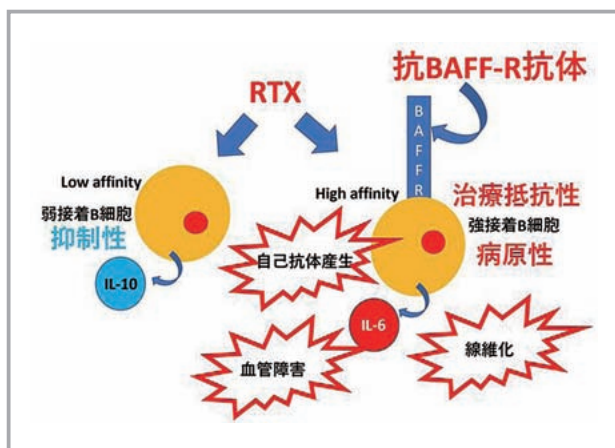
腸管は腸内細菌叢と宿主の免疫担当細胞が常に相互作用している特殊な環境である。中でも腸管マクロファージ(Mφ)は中心的役割を果たしている。病原体に対してはIL-12やIL-23などの炎症性サイトカインを産生することで炎症反応を誘導し、病原体を排除する。しかし、その一方で炎症抑制性サイトカインであるIL-10を恒常的に産生することで、腸内細菌や食餌高原に対する過剰な免疫応答を抑えている。このように腸管の恒常性維持には腸管Mφによる恒常的なIL-10産生が重要な役割を果たしているが、その産生機序は明らかになっていない。

我々はこれまで腸管MφのIL-10産生が腸内細菌非依存かつMyD88依存的事であることを明らかにしてきた。また、マウスにおいて他の臓器Mφに比べ腸管Mφ特異的に*Il1r1*が高発現であったことから、マウスマクロファージ由来細胞株を用いてIL-1R過剰発現株を作製し検討してきた。IL-1R過剰発現株に対し、IL-1β刺激を行ったところ*Il10*の発現誘導が観察された。

これらの結果を踏まえ、本研究では腸管MφからのIL-10産生機序を明らかにするために、作製したIL-1R過剰発現株を用いて細胞シグナル伝達経路の探索を行う。

【方法】

1) Western Blotting (WB) によるシグナル伝達の検討
IL-1R過剰発現RAW264.7cellsにLPS, IL-1β刺激を行い、細胞質分画と核分画の蛋白を抽出した。それぞれの蛋白を用いてWBにてシグナル伝達経路の探索を行っ



た。

2) small interfering RNA (siRNA) による発現抑制

IL-1R 過剰発現 RAW264.7cells に siRNA Negative Control (NC) と CREB をトランスフェクションし、IL-1 β 刺激による *Il10* の発現、IL-10 の産生について qPCR, ELISA を行った。

【結果】

1) M ϕ の LPS 刺激を介した IL-10 産生について p38, extracellular single-regulated kinase (ERK), 転写因子として cAMP-response element-binding protein (CREB) が関与していることが示されており¹⁾、それらについて検討を行った。LPS 刺激と同様に IL-1 β 刺激にて細胞質分画において p38, ERK のリン酸化、核分画において CREB のリン酸化を認めており、これらが IL-1 β /IL-1R の刺激経路の一つと考えた (図1~3)。

2) IL-10 産生経路として WB で確認した CREB が関与していると考え、siRNA で発現抑制を行い、IL-1 β 刺激における *Il10* の発現を確認したところ、発現上昇が抑制されていた (図4)。また、IL-10 の産生も抑制されており (図5)、IL-10 の産生には IL-1 β /IL-1R-CREB が関与している。

【考察】

IL-1 β /IL-1R の下流で CREB のリン酸化を介して IL-10 を産生している経路が腸管免疫恒常性の維持に関与していると考えられた。今後はクロマチン免疫沈降 (Chip 法) による免疫沈降による転写因子の同定や臨床検体を用いて IL-1R の発現を検証することでヒト IBD における IL-1R/IL-10 経路の意義について検討する。

【文献】

1) Margarida, Saraiva. & Anne, O'Garra.: (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10, 170-181.

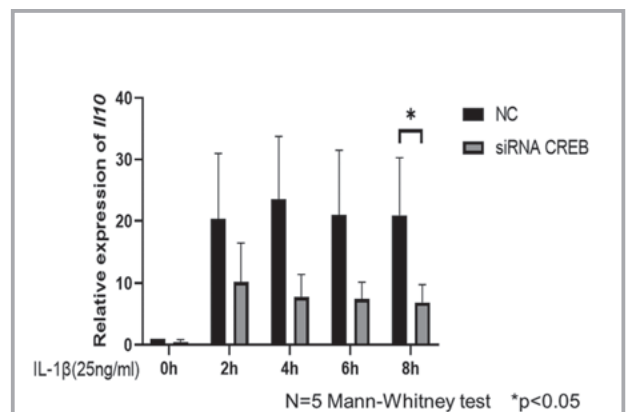
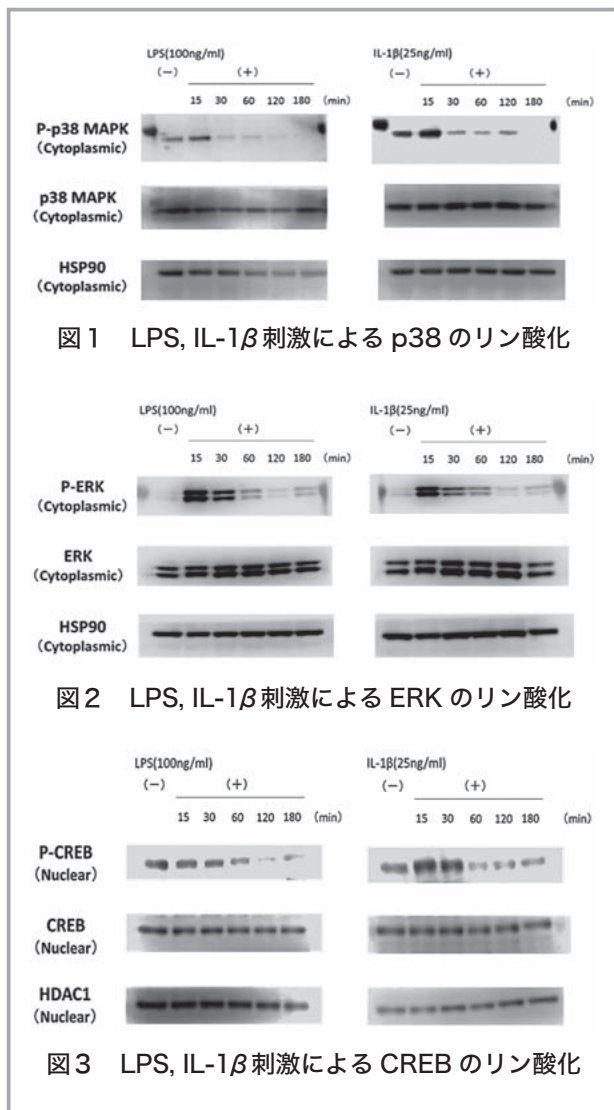


図4 siRNA CREB による *Il10* 発現量の変化

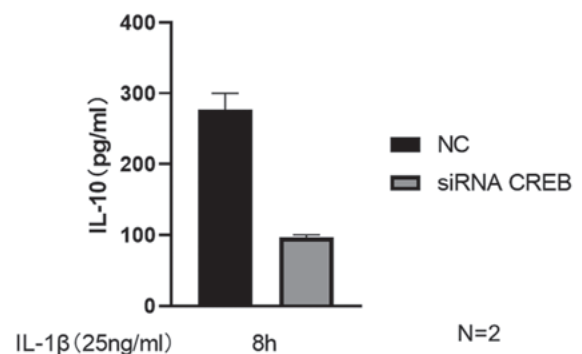


図5 siRNA CREB による *IL-10* 産生量の変化

全身性強皮症患者の病態における MAIT 細胞の関与

外村 香子

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

自然リンパ球のサブセットとして主として粘膜や腸間膜リンパ節および肝臓に局在する mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞が近年発見された。ヒト MAIT 細胞は T 細胞受容体としてセミンバリアント α 鎖 (ヒト V α 7.2 J α 33) を発現し、MHC class I 関連分子 1 (MR1) に提示された微生物由来ビタミン B2 代謝中間産物を抗原として認識して活性化され、IL-17, IL-10 などのサイトカインを分泌する。抗原特異的な T 細胞としては非常に大きな集団で様々な免疫応答に関与すると考えられる。MAIT 細胞が多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなど種々の自己免疫疾患の病態への関与が報告されているが、病態の増悪と抑制の両方に関与することが知られ、その病態調節は非常に複雑である。本研究では、全身性強皮症 (以下、SSc) における MAIT 細胞の病態形成への関与を解明する。

【方法】

1) SSc 患者の末梢血における MAIT 細胞の頻度およびその活性化の有無

SSc 患者末梢血より単核球を単離し、CD3, CD161, TCRV α 7.2 などの蛍光色素で標識した抗体で表面染色しフローサイトメトリーにより検出し、MAIT 細胞の頻度を正常人と比較する。

2) SSc 患者の病変皮膚における MAIT 細胞の検出

患者から採取した皮膚を蛍光色素で標識した CD3, CD161, TCRV α 7.2 の抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡にて MAIT 細胞の有無を確認する。

【結果】

末梢血中の MAIT 細胞は、SSc 患者全体および限局皮膚硬化型 SSc (lcSSc) において健常人と比較し有意に頻度が低下していた。その中で CD69 陽性細胞の頻度が SSc 患者において上昇していた。次に、MAIT 細胞の頻度の異常と SSc 患者における臨床症状との関連について検討した。消化管病変のない患者で MAIT 細胞の頻度が有意に低かった。

【考察】

SSc とくに lcSSc 患者において MAIT 細胞の頻度は低下していたが、活性した MAIT 細胞と考えられる CD69 陽性細胞の頻度が上昇していた。今後 SSc の MAIT 細胞におけるサイトカイン産生、末梢血中サイトカイン濃度を測定し、MAIT 細胞と各種サイトカインとの相関がないかどうかについて検討予定である。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来免疫抑制性細胞によるぶどう膜炎軽症化の検討

長谷 敬太郎

(北海道大学大学院医学研究院)

【目的】

実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) マウスにおけるマクロファージ様人工多能性幹細胞由来免疫抑制性細胞 (iPS-SCs) による免疫抑制効果について検討するため

【方法】

C57BL/6 マウスの脾臓細胞から B 細胞を抽出し、レトロウイルスベクターを使用して *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の遺伝子を移入した後に、17 日間培養し、iPS 細胞のコロニーを得た。iPS 細胞にマクロファージコロニー刺激因子、顆粒球単球コロニー刺激因子、インターロイキン (IL)-4 などのサイトカインを順次添加し、26 日間培養し、iPS-SCs を誘導した。この細胞は Sasaki H *et al.* Transplantation. 2015 で報告されたものであり、誘導方法は確立されている。EAU はヒト視細胞間レチノイド結合タンパク質 (hIRBP) 由来合成ペプチドをマウスに皮下注射 (免疫) することにより、誘導した。その後、EAU マウスの所属リンパ節から抽出した CD4⁺T 細胞の細胞内に蛍光色素を取り込ませ、hIRBP 合成ペプチドとともに 4 日間培養した後に、蛍光強度をフローサイトメーターで計測することにより、T 細胞の増殖率を測定した。培養時に iPS-SCs を添加することにより、T 細胞の増殖が抑制されるかどうかについて検討した。また、培養後の上清中の炎症に関わるサイトカイン濃度を ELISA で測定し、比較した。さらに、*in vivo* 実験として免疫の 1 日前に iPS-SCs を腹腔内投与し、EAU マ

ウスの炎症が軽症化するかどうかについて、免疫1週後から3,4日毎に眼底検査を行い、炎症の程度を評価した。

【結果】

iPS-SCsは細胞数に応じて、hIRBPに特異的なT細胞の増殖反応を有意に減少させた。さらに、iPS-SCsはT細胞との接着がなくてもT細胞の増殖反応を抑制したことから、何らかの液性因子が関与していることが推察された。また、培養上清中のヘルパーT細胞1型(Th1)サイトカインである腫瘍壊死因子- α とインターフェロン(IFN)- γ は、iPS-SCsを添加した群では有意に減少し、抑制性のサイトカインであるトランスフォーミング増殖因子- β や一酸化窒素やIL-13は上昇していた。一方で、培養上清中のヘルパーT細胞17型(Th17)サイトカインであるIL-17AやIL-17FはiPS-SCsを添加した群では有意に上昇していた。In vivo実験では、iPS-SCsを事前に投与したマウスの眼底所見ではEAUの炎症が有意に軽症化されていた。

【結論】

iPS-SCsはEAUマウスにおいてTh1による免疫応答を減少させ、炎症を軽症化することが示唆された。

【文献】

Sasaki, H., Wada, H., Baghdadi, M., Tsuji, H., Otsuka, R., Morita, K., Shinohara N. & Seino, K.: New Immunosuppressive Cell Therapy to Prolong Survival of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Allografts, *Transplantation*, **99**(11): p. 2301-10 (2015).

本研究成果は、Hase, K. *et al.*: Macrophage-like iPS-derived Suppressor Cells Reduce Th1-mediated Immune Response to a Retinal Antigen, *Curr Eye Res.*, Jul 19; 1-9 (2021) に報告した。

慢性腸管炎症により生じる腸管マクロファージのエピジェネティック変化の継代的持続についての検討

和田 晴香

(杏林大学医学部)

【目的】

腸管炎症下で誘導された腸管レジデントマクロファージにおけるエピジェネティック変化の少なくとも一部が炎症鎮静後も継代的に残存し、炎症再燃に寄与するのではないかという仮説を検証するため、本研究では、以下の3点を目的とした。

- 目的1：デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎により生じるマクロファージにおけるエピジェネティック変化の評価
- 目的2：DSS誘導性腸炎改善後のマクロファージにおけるエピジェネティック変化の評価
- 目的3：炎症誘導性エピジェネティック変化のうち炎症改善後も残存する変化の評価

【方法】

SPF環境下で腸管微生物叢を均一化した8週齢のC57BL/6雄マウスを4群(Group 1-4)に分ける(図1)。Group 2, 4ではDSSによる慢性腸炎を誘導し、腸炎時(Group 2)および腸炎改善後(Group 4)の解析に用いる。それぞれGroup 1, 3を対照群とする。DSSによ

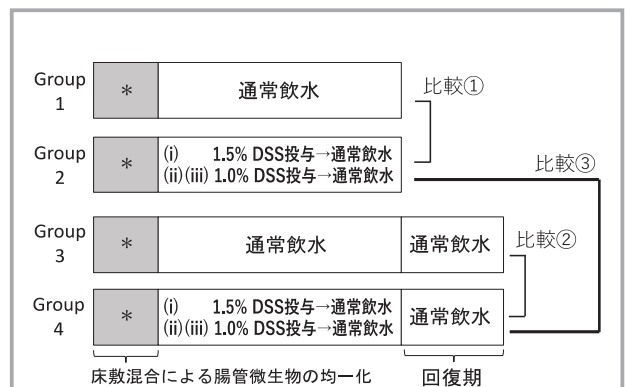


図1 本研究における動物実験デザイン

Group 2および4において(i)-(iii)のようにDSS投与を繰り返す。DSS投与は1周期あたりDSS摂取を5日間、通常飲水を7日間とする。Group 3および4における回復期は21日間とする。

る慢性腸炎誘導後に解剖を行い、各群の比較により炎症誘導性のエピジェネティック変化の中で残存するものについて検討する。腸管炎症について臨床所見（体重変化、糞便の性状）および糞便中 LCN-2 濃度、病理組織学的スコアにより評価する。大腸粘膜固有層のマクロファージにおけるエピジェネティック変化について DNA メチル化をビーズアレイ法により解析する。結腸粘膜固有層に存在する細胞を回収し、磁気ビーズ法によって CD11b 陽性細胞をマクロファージとして単離して解析に用いる。糞便を用いた 16S rRNA 遺伝子シーケンシング解析により腸管細菌叢の構成について評価する。

【結果】

Group 2 および 4 では、体重変化を含む臨床症状から、本研究で用いた DSS 投与プロトコルにより慢性腸炎を誘導できたと考えられた。DSS 投与 3 周期目を終

了後、Group 1 および 2 について解剖を行い、肉眼的所見上、腸管壁肥厚、腸管長の短縮を認めた（図 2）。大腸の一部を病理組織学的検討のため採取した後、磁気ビーズ法により大腸粘膜固有層 CD11b 陽性細胞を回収し、DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子シーケンシング解析、LCN-2 測定のため、糞便を回収した。これらの解析は現在継続中である。

Group 4 は現在 DSS による慢性腸炎誘導後の回復期間中であり、回復期間を終えた後に Group 3 とともに解剖して、Group 1 および 2 と同様の検体採取、検討を行う。

【考察】

DSS 腸炎は動物の性別、週齢、飼育環境などのさまざまな条件により、腸炎誘導の強度が異なることが知られている。本研究では、3 周期の DSS 投与を実施して慢性腸管炎症を生じることができた。また Group 1 および 2 についてマクロファージ DNA 抽出を含め予定通りの検体回収が可能であったことから、同様のプロトコルを Group 3 および 4 にも用いることで、当初の目的に対する解析用検体を全て回収できると考えられる。検体解析用の試薬類等は準備済みであり、検体採取後に速やかに解析を実施する。

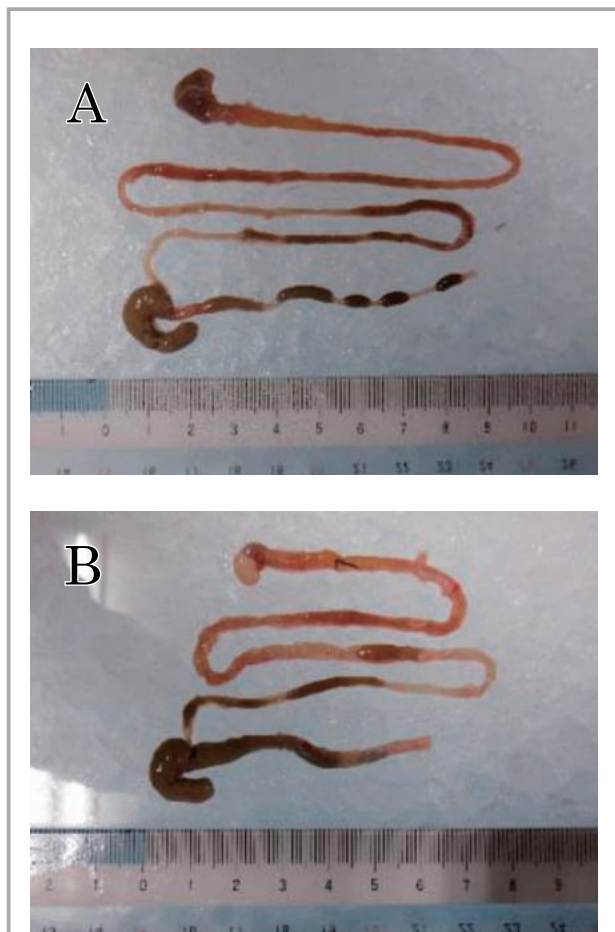


図 2 解剖時の消化管所見

(A) Group 1: DSS 投与なし、(B) Group 2: DSS 投与あり DSS 投与群で腸管の壁肥厚および腸管長の短縮を認める。

難治性眼炎症性疾患における抗 TNF- α 製剤の役割と治療法の確立

國見敬子

(東京医科大学医学部)

【目的】

ぶどう膜炎眼は白内障、緑内障、網膜上膜などを発症することがあり、その際に内眼手術が施行される。これらの内眼手術後に炎症が再燃することがあり、その予防として術前の消炎が重要である。非感染性ぶどう膜炎治療にはステロイド点眼、内服に加え、消炎目的で生物学的製剤を併用することがある。インフリキシマブ (IFX) とアダリムマブ (ADA) は、免疫関連炎症疾患に関与する腫瘍壊死因子に対する生物学的抗体製剤として、本邦で承認されている。これらの製剤は副作用として術後感染症を誘発する可能性がある。ぶどう膜炎眼における

IFX や ADA 使用下での内眼手術の安全性については、安全に施行できた症例報告はあるものの、まとまった報告はない。そこで本研究では、ADA 使用下で内眼手術に至ったぶどう膜炎眼 23 眼の術後について、その有効性と安全性を分析した。

【方法】

2016 年から 2019 年に東京医科大学病院眼科で非感染性ぶどう膜炎と診断後、ADA 治療中に内眼手術が施行された症例を対象として、術前後の視力、眼圧、炎症の活動性、硝子体混濁 (OCV)、ぶどう膜炎性黄斑浮腫 (UME)、感染症の有無を分析した。

【結果】

内眼手術に至った 23 眼すべてにおいて、術後感染症の発症はなかった。非感染性の炎症再燃は 3 眼で観察され、2 眼は UME、1 眼は OCV であった。UME を再発した 2 眼のうち、1 眼は施術時に UME が認められていた。

【考察】

ADA 治療下での非感染性ぶどう膜炎に対する内眼手術は感染症を惹起することなく、安全に施行することができた。術後成績は、非ぶどう膜炎眼と同等と考えられた。また、手術施行時に UME が存在する場合、術後に再燃する可能性があるため注意が必要である。

【文献】

- 1) Kunimi, K., Usui, Y., Tsubota, K., Mitsuhashi, R., Umazume, A., Kezuka, T., Sakai, J. & Goto H.: Changes in Etiology of Uveitis in a Single Center in Japan. *Ocul Immunol Inflamm.* **18**, 1-6 (2020).
- 2) Kunimi, K., Usui, Y., Asakage, M., Maehara, C., Tsubota, K., Mitsuhashi, R., Umazume, A., Kezuka, T., Sakai, JI. & Goto H.: Anti-TNF- α Therapy for Refractory Uveitis Associated with Behçet's Syndrome and Sarcoidosis: A Single Center Study of 131 Patients. *Ocul Immunol Inflamm.* **20**, 1-8 (2020).
- 3) Kunimi, K., Usui, Y., Tsubota, K., Kezuka, T. & Goto, H.: Intraocular surgery under adalimumab therapy in patients with refractory uveitis: a single center study of 23 eyes. *Jpn J Ophthalmol.* **65**, 836-842 (2021).

インドメタシン腸炎に対する水素水の抗炎症作用の検討

秋田 義博

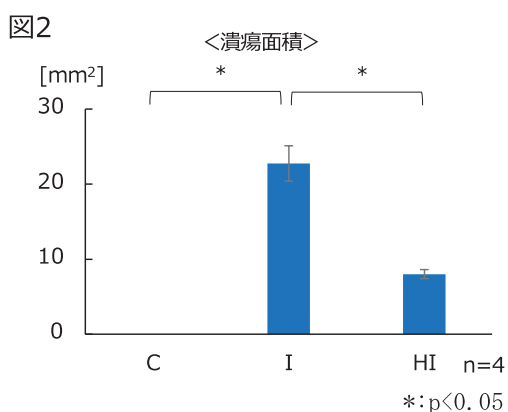
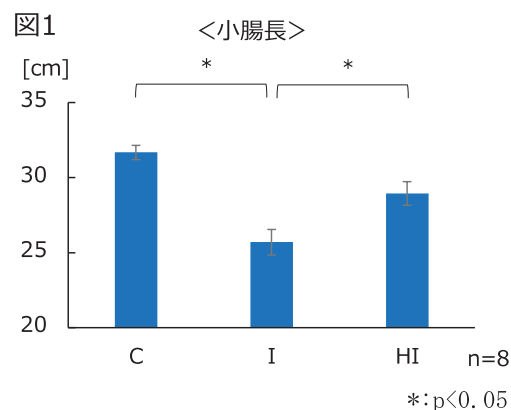
(防衛医科大学校医学部)

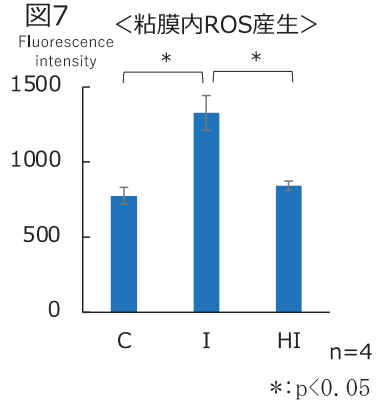
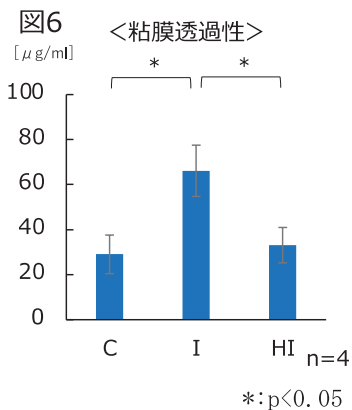
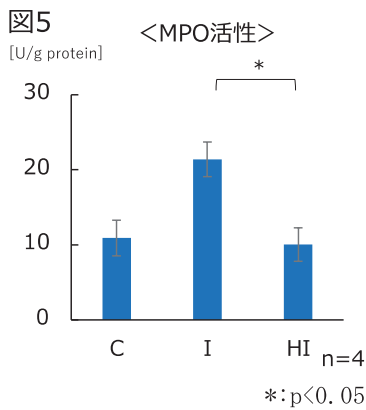
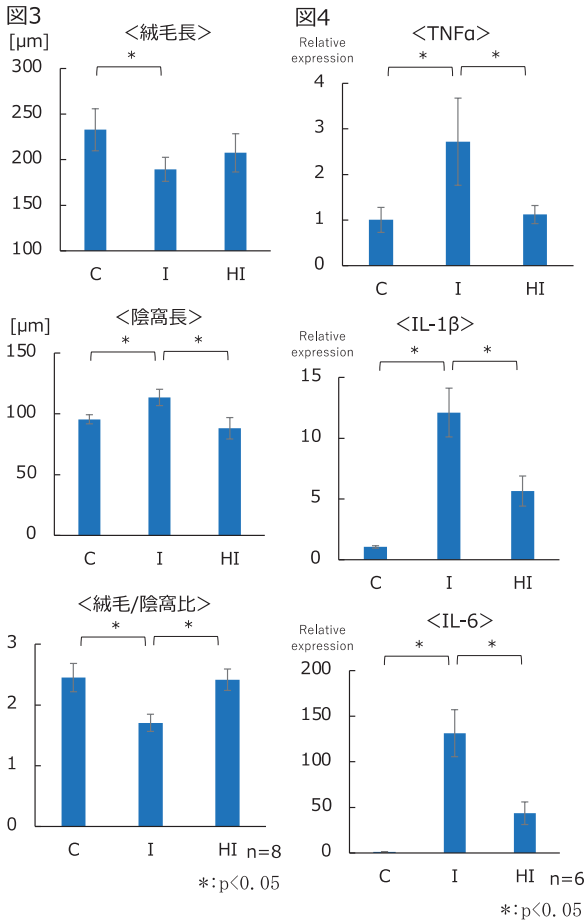
【目的】

NSAIDs は解熱鎮痛剤として広く使用されているが、消化管障害が臨床問題になる。特に小腸病変に関して病態が徐々に解明されてきているが、効果的な治療は未だない。小腸病変の一因と考えられるフリーラジカルに注目し、水素水の効果を検討した。

【方法】

8 週齢の C57BL/6J を用いて、水素水 (1.0mg/L) を自由飲水させた。4 日目にインドメタシン (IND) 10mg/kg を腹腔内投与し、5 日目に安楽死させた。小腸を採取し、腸管長・エバンスブルーによる潰瘍面積の測定、絨毛・陰窩長による組織学的評価を行った。小腸の一部を用いて RT-PCR による TNF α , IL-1 β , IL-6 の mRNA 発現と MPO 活性を測定した。また FITC デキス





トランを用いた小腸粘膜透過性を評価した。同じモデルを用いて麻酔下で小腸粘膜面を露出し、Aminophenyl Fluorescein (APF) を添加することで、Reactive oxygen species (ROS) の産生量を蛍光強度で評価した。

【結果】

INDによる腸管長の短縮や小腸潰瘍は水素水の自由飲水により有意に軽減された(図1, 2)。また絨毛/陰窩比の低下や陰窩長の短縮も有意に軽減された(図3)。INDによるTNFα, IL-1β, IL-6のmRNA発現の上昇は水素水の自由飲水により有意に低下しており(図4)、MPO活性も同様だった(図5)。INDにより亢進した腸管粘膜の透過性は、水素水の自由飲水により有意に軽減された(図6)。INDにより増加した小腸粘膜のROS産生量は、水素水の自由飲水により有意に軽減された(図7)。

【考察】

水素水の自由飲水によりインドメタシン小腸炎が軽減された。NSAIDsによるミトコンドリア障害に伴うフリーラジカルの産生が水素の抗酸化作用により抑制された可能性が考えられた。病態の一因として想定されるタイトジャンクションや腸内細菌への水素の直接的・間接的な効果に関しては今後の検討を要する。

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

膵β細胞におけるMEK/ERKシグナルの役割の解明とその治療応用

生島 芳子

(国立国際医療研究センター研究所)

【目的と方法】

MEK/ERKシグナルの膵β細胞における役割は未解明であったため、膵β細胞でMEK/ERKシグナルを欠損したマウス(MIP-CreERT+/Mek1^{f/f}/Mek2^{ko/ko}(Tmx+)マウス(以下βDKOマウス))を作成し、解析を進めた。

【結果と考察】

βDKOマウスは、高脂肪食負荷時に随時血糖値の上昇・随時インスリン値の低下を呈し、また長期高脂肪食負荷後の糖負荷試験では、耐糖能障害とインスリン分泌の低下を示した。また、高脂肪食負荷後のβDKOマウス膵臓切片では膵β細胞領域の減少とKi67+細胞/Insulin+細胞の割合の低下を認め、単離膵島ではCyclinD1の発現低下とCdkn1a(p21)の発現上昇が認められた。2光子顕微鏡を用いた膵β細胞でのグルコース刺激時のインスリン顆粒開口放出数測定では、βDKOマウスで開口放出数が低下していた。以上から、MEK/ERKシグナルは膵β細胞の量と分泌能の両者を制御していると考えられた。さらに、単離膵島を用いたリン酸化プロテオミクス解析からは、MEK/ERKシグナルが開口放出関連因子や細胞骨格関連因子のタンパクリン酸化制御を介して開口放出を制御している可能性が考えられた。また、グルコース刺激有り/無しの条件で採取された膵β細胞株サンプルでのリン酸化プロテオミクス解析からは、細胞骨格関連因子の一部が、acuteなグルコース刺激下でMEK/ERKシグナル依存的なリン酸化制御を受ける可能性が見出された。

【文献】

Ikushima, Y.M., Awazawa, M., Kobayashi, N., Os-
ono, S., Takemiya, S., Kobayashi, H., Suwanai, H.,

Morimoto, Y., Soeda, K., Adachi, J., Muratani, M.,
Charron, J., Mizukami, H., Takahashi, N. & Ueki, K.:
MEK/ERK Signaling in β Cells Bifunctionally Regu-
lates β-cell Mass and Glucose-stimulated Insulin-se-
cretion Response to Maintain Glucose Homeostasis,
Diabetes 2021 Jul; 70(7): 1519-1535.

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

(株式会社 麻生 飯塚病院)

【目的】

糖尿病合併非アルコール性脂肪肝疾患(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】

申請者らが独自に作出したloxP配列でglp1r遺伝子のエクソン4,5を挟む,floxマウス(GLP-1r flox/flox mice)と,LysM-Creマウスとの交配によって、単球・マクロファージ特異的GLP-1受容体欠損マウスを作出する。単球・マクロファージ特異的GLP-1受容体欠損マウスに10週間高脂肪食負荷を行い、コントロールマウスと比較検討することで、単球・マクロファージに発現するGLP-1受容体と肝臓との関連を検討する。

【結果】

GLP-1R flox/flox LysM^{-Cre} マウスの GLP-1 受容体の発現が単球特異的に欠損していることを RT-PCR 法で確認した。コントロールマウス及び単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを 10 週齢から 20 週齢まで高脂肪食負荷を行い、血糖値、体重、肝臓の線維化について評価を行ったが、両群に差を認めなかった。肝逸脱酵素 ALT、炎症性サイトカイン TNF α 、肝臓マクロファージについては、単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスで増加していた。

【考察】

肝臓マクロファージ GLP-1 受容体を介したシグナルが、高脂肪食負荷での肝臓炎症・肝細胞障害に寄与している可能性が示唆された。しかしながら今回の検討では、肝臓の線維化はきたしておらず、長期間の高脂肪負荷モデルによる検討を行う必要があると考えられた。

プロスタシンを介した新規インスリン分泌機序の解明

内村 幸平

(山梨大学医学部)

【目的】

プロスタシン (PRSS8) は分子量 40kDa の GPI アンカー型及び分泌型のトリプシン様セリンプロテアーゼであり、我々は肝細胞特異的 PRSS8 ノックアウトマウスで慢性炎症による肝糖代謝異常を惹起することを報告した¹⁾。インスリン抵抗性患者の血中では分泌型 PRSS8 レベルが低下しており、糖尿病における PRSS8 の関与が示唆された。ヒト胚性腎細胞由来細胞株では、PRSS8 によって上皮成長因子受容体 (EGFR) が切断され、その下流シグナルの活性化が報告されている。膵 β 細胞において、EGFR はインスリン分泌に関与するが、PRSS8 との関連は知られていない。本研究の目的は、膵 β 細胞において PRSS8 が EGFR を介してインスリン分泌に及ぼす影響を明らかにすることである。

【方法】

膵 β 細胞特異的 PRSS8 ノックアウト (β KO) 及び PRSS8 過剰発現 (β TG) マウスを作製し耐糖能異常について表現型を観察した。次に単離膵島をグルコースで

刺激してインスリン分泌能を評価した。更に MIN6 細胞に対して PRSS8 発現抑制および PRSS8 過剰発現を行い、特異的 EGFR 阻害薬 Erlotinib による EGFR 活性化及びその下流シグナルとインスリン分泌を比較した。

【結果】

β KO マウスの血糖値は IPGTT にて有意に高値を示し、血清インスリン値曲線下面積 AUC と、単離膵島のインスリン分泌の有意な低下を認めた。反対に β TG マウスの単離膵島ではインスリン分泌が有意に増加した。同様に MIN6 細胞を用いた検討でも PRSS8 の強制発現によってインスリン分泌は増強し、特異的 EGFR 阻害薬 Erlotinib によってキャンセルされた。

【考察】

膵 β 細胞 PRSS8 はインスリン分泌を刺激するため、新規糖尿病治療のターゲットとなり得る可能性が示唆された。

【文献】

- 1) The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signaling. Uchimura K, et. al.: *Nat Commun.* 2014 Mar 11

副腎由来ホルモンの多様性に基づいた糖尿病および慢性合併症進展機構の解明

馬 越 真 希

(九州大学大学院医学研究院)

【背景】

副腎に由来する Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) は、性ホルモン合成のためのプロホルモンである。DHEAS は成人早期にピークに達し、年齢とともに著明に低下する。これは「副腎閉経」とも表現され、DHEAS の相対的欠乏は加齢性疾患に関連するとされるが、観察研究では DHEAS と糖尿病、あるいは糖尿病合併症として知られる骨粗鬆症との関連は一定の見解が得られていない。

【目的】

遺伝子多型を操作変数として用いて形質間の因果関係を推測するメンデルランダム化 (MR) 研究を用いて、

DHEAS と糖尿病および骨粗鬆症との因果関係を検討する。

【方法】

操作変数は健常人対象のゲノムワイド関連解析 (GWAS) より、血清 DHEAS 濃度 (n=9,722) に関連する 4 つの一塩基多型を選択した。アウトカムの GWAS 要約統計量は、血糖関連形質として、空腹時血糖・インスリン値、HOMA-IR、HbA1c、糖尿病の有無、骨関連形質として、DXA 法による大腿骨頸部、腰椎骨密度、超音波法による踵骨骨密度、骨折の有無を用いた。

【結果】

DHEAS は空腹時血糖・インスリン値、HOMA-IR、HbA1c、糖尿病の有無と関連を認めなかった。一方で、DHEAS は踵骨骨密度の上昇と関連し (β , 0.120; 95%CI, 0.081-0.158, $P=9e-10$)、大腿骨頸部あるいは腰椎骨密度でも一貫していた。DHEAS は骨折リスク減少と関連した (オッズ比, 0.989; 95%CI, 0.981-0.996, $P=0.005$)。DHEAS と骨密度および骨折の関連は、身長、体重、テストステロン、エストラジオール、IGF-1 による補正後も有意であった。DHEAS と骨折の関連は、転倒歴、握力、身体活動度による補正後も有意であったが、骨密度による補正後に消失した。MR ベイジアンモデル平均化法では、骨密度が DHEAS と骨折の関連における最上位の媒介因子であった。

【考察】

DHEAS は血糖関連形質に因果関係を認めなかった。一方で、DHEAS は骨密度上昇と骨折リスク減少に因果関係を認めた。DHEAS は主に骨量の増加を介して骨折を抑制することが示唆され、加齢性骨粗鬆症に対する DHEAS の保護的役割が明らかとなった。

【文献】

Yokomoto-Umakoshi, M., Umakoshi, H., Iwahashi, N., Matsuda, Y., Kaneko, H., Ogata, M., Fukumoto, T., Terada, E., Nakano, Y., Sakamoto, R. & Ogawa, Y.: Protective Role of DHEAS in Age-related Changes in Bone Mass and Fracture Risk: A Mendelian Randomization Study. *J Clin Endocrinol Metab*, In press (2021).

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】

糖尿病や肥満の世界的な急増は克服すべき重要な臨床課題である。それらの疾患では高血糖やインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症により、全身の血管の内皮機能障害から様々な臓器障害が惹起される。O-GlcNAc 修飾は、全身の血管障害により引き起こされる糖尿病合併症の成因進展機構の一つとして着目されてきたが、詳細な機序に関しては明らかにされていない点が多い。そこで、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割と、糖尿病及び肥満状態における病態生理に与える影響に関して検討する。

【方法】

タモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウス (VEcad-BAC-CreERT2 マウス) と Ogt-flox マウスとの交配を行い、タモキシフェンを腹腔内投与し血管内皮細胞特異的 Ogt 欠損 (Ogt-VEKO) マウスを作製した。通常食モデル、高脂肪食摂餌による肥満モデル、STZ 投与による高血糖モデルを作製し、その表現型を解析した。

【結果】

Ogt-VEKO マウスは対照マウスと比較し通常食モデルにおいて体重増加不良を呈し、高脂肪食モデルでは、体重増加がより顕著に抑制された。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。収縮期血圧は通常食群では対照マウスと Ogt-VEKO マウスは同等であったが、肥満モデル・高血糖モデルにおいて、Ogt-VEKO マウスは対照マウスと比較して有意に収縮期血圧が低値であった。Apo-E と Ogt の double KO マウスに高脂肪食を摂餌させる動脈硬化モデルでは、大動脈弓部における動脈硬化巣面積に差異を認めなかったが、収縮期血圧は double KO マウスにおいて有意に低下していた。

【考察】

Ogt-VEKO マウスは病態モデルにおいて血圧が低値であったことから、O-GlcNAc 修飾は肥満/高血糖で誘発される高血圧発症に関わる重要な因子であることが示唆された。これまでの検討で、Ogt-VEKO マウスは肥満及び高血圧に対して抵抗性を示しているが、両表現型に関して、それぞれ詳細な機序を現在検討している。

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医学研究科)

【目的】

弾性線維形成に必須の細胞外マトリックス分子である Fibulin-5 (Fbln5) による糖代謝およびエネルギー代謝の制御機構を解明する。

【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) および野生型マウス (WT) に生後 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 マウスを入手し各組織特異的 Fbln5KO を作成したところ、肝細胞特異的 Fbln5KO、脂肪細胞特異的 Fbln5KO、皮膚 (表皮) 特異的 Fbln5KO、血管平滑筋特異的 Fbln5KO は体重変化やインスリン感受性の変化を呈さなかった。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。現在血管内皮特異的 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、通常食下で Fbln5KO の酸素消費量は WT と同等であったが、活動量は有意に低下を認めた。現在 30°C 温室での飼育による表現型解析を進めている。

【考察】

Fbln5 欠損により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ものの、組織特異的 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た。弾性線維による、皮膚を介したエネルギー代謝制御や、血管を介したインスリン移行性の制御といった新たな代謝制御機構が示唆された。

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)

【目的】

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。しかしながら、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。肥満者は世界的に増加傾向であり、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序が解明できれば社会的な貢献は大きいものと考えられる。血管新生や免疫抑制を介して癌細胞の増殖や転移に寄与するマクロファージが存在する (*Cell*. 141: 39-51, 2010.)。乳癌、肺癌、メラノーマ等の数種類の癌においてマクロファージの浸潤が高度であるほど予後が悪いことが知られ、マクロファージを標的とした癌治療が有望である可能性が指摘されている。マクロファージは細胞表面マーカーを用いて M1 マクロファージ、M2 マクロファージに大別して解析されてきた。しかしながら、それぞれのマクロファージが癌の発症・進展にどのような役割を果たしているか、*in vivo* モデルでの検討は充分に行われておらず分子機構についても未だ明確ではない。本研究の目的は 1) CD206+M2 マクロファージが癌発症・進展を促進していないか、2) 肥満による CD206+M2 マクロ

ファージの表現型や細胞数の変化が、癌の発症・進展を促進していないかを解明することである。

【方法】

乳癌を発症する遺伝子改変マウスを高脂肪食群と通常食群に分けて、腫瘍の発生時期や、重量、体積、数を測定。摘出した腫瘍をFACS, MACS, IHC, qPCRなどを用いて解析した。

また、独自に作製した乳癌マウスモデルでCD206 + M2マクロファージの数を減らした際の癌の発症・進展への影響を評価した(腫瘍の発生時期, 腫瘍重量, 腫瘍体積)。摘出した腫瘍について組織学的評価, 遺伝子発現解析, FACSなどを行った。

【結果】

高脂肪食負荷で腫瘍の発生が早まり、腫瘍の重量・体積・数が増加した。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。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。

独自に作製した乳癌マウスモデルでCD206+M2マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制された。摘出した腫瘍について組織学的評価、遺伝子発現解析(qPCR, RNA seq), FACSなどを行い、CD206+M2マクロファージの減少による癌周囲微小環境の変化について確認した。

【考察】

高脂肪食による肥満で細胞障害性が低く、OPNを発現し癌細胞増加促進作用をもつPD-1+CD8+T細胞が腫瘍内で増加した。肥満によるCD8+T細胞の疲弊

の加速が癌発症・進展促進と関連することが示唆された。また、CD206+M2マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制されることが明確となった。今後、その機序の解明を進める予定である。CD206+M2マクロファージの数を減らす方法の開発が臨床応用するにあたり重要と考えられる。

【文献】

- 1) Kado, T., Nawaz, A., Takikawa, A., Usui, I. & Tobe, K.: Linkage of CD8+ T cell exhaustion with high-fat diet-induced tumourigenesis. *Sci Rep.* 22; 9(1): 12284 (2019).
- 2) Nishida, Y., Nawaz, A., Kado, T., Takikawa, A., S, Kunimasa, Y., Tobe, K. *et al.*: Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 11(1): 241-258 (2020).

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、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で、人工膵臓様の機能を有する、インスリンデバイスを開発する。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)、さらなるケールアップを目指して、血液透析用中空糸をゲルと融合したデバイス(中空糸融合型デバイス)を開発した。既にラットを用いて、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ており、本年度は、ヒトとほぼ同等の体重を有するブタに装着して効果を検証した。さらに、新たに開発したマイクロニードルとゲルを融合したデバイス(マイクロニードル融合型デバイス)を用いて機能を評価した。

【方法】

我々は、ラットの約100倍の体重を有するブタを用いて、ストレプトゾトシン (STZ) を投与し、翌日に中空糸融合型デバイスを装着することで、経時的な血糖上昇に対するデバイスの効果を評価した。また、更なる低侵襲化、スケールアップを図るために、新たにマイクロニードル融合型デバイスを開発した。STZ 誘発1型糖尿病モデルマウスもしくは、通常マウスにマイクロニードル融合型デバイスを装着し、その効果を検証した。

【結果】

中空糸融合型デバイスを8個装着したブタでは、STZ 投与後の血糖値の上昇が抑制されるとともに、デバイスから血糖依存的にインスリンが放出された (*Commun. Biol.* 3: 313, 2020)。また、マイクロニードル融合型デバイス装着後、通常マウスと比較して、1型糖尿病モデルマウスで、有意に高く、デバイス由来のインスリンが放出されており、血糖値も抑制されていた。

【考察】

中空糸融合型デバイスにより、ブタに対して一定の効果が得られたが、臨床応用に向けては、さらなる低侵襲化とスケールアップが必要と考えられた。そこで、新たにマイクロニードル融合型デバイスを開発し、マウスレベルでの機能実証に成功した。次年度は、ヒト用デバイス作製の基盤となるデータの取得のために、マイクロニードル融合型デバイスを用いて、ラットによる詳細な機能解析を行うとともに、ブタを用いて、臨床応用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】

GLP-1 による膵β細胞増殖制御における新規経路を同定する。

【方法・結果】

GLP-1 受容体作動薬のリラグルチド (Lira) を添加し

一晚培養したマウス単離膵島の定量的プロテオーム解析を行った。Lira 添加により、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が、発現上昇したタンパク質として多数同定され、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が想定された。また Lira 添加により、膵腺房細胞に発現し膵β細胞へ作用する可能性が報告される分泌因子である 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 添加では変化を認めないが、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、免疫染色において、Reg1 は膵腺房細胞に発現し、膵島での発現を認めなかった。Reg1 欠損マウス (KO) 単離膵島では、野生型マウス (WT) に比較し、Lira 添加時の ATF2 遺伝子発現が低下した。WT 膵島を WT 腺房細胞と共培養すると、Lira による膵β細胞増殖は促進された。一方、WT 膵島と KO 腺房細胞の共培養では、Lira による膵β細胞増殖は低下した。また、マウスへの Lira 皮下注による膵β細胞増殖は、WT に比較し KO で低下した。

【考察】

Lira 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い。本研究では、この遺伝機序のひとつとして卵子のエピゲノム変化とそれに伴う胎盤異常に注目している。胎盤は母親から胎児への栄養供給のほか、ガス交換、物質交換、ホルモン分泌、免疫寛容など妊娠を支える重要な役割を担っており、これまでの報告から、胎盤機能と産仔の代謝機能には関連があることが示唆されている。また、胎盤肥大と胎盤機能の低下は肥満女性の妊娠時においても高頻度で認められる。そこで、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、検証を行っている。

【方法】

我々は卵子のヒストンメチル化修飾が欠損すると、着床後発生において胎盤が過形成することを見出しており、卵子のエピゲノムを操作することで母子ともにゲノムは正常、胎盤にのみ異常をきたすモデルマウスを作出した (Mei H *et al. Nat Genet* 2021)。このモデルマウスを用いて、胎盤の異常が成長後の産仔の代謝に及ぼす影響を検討した。また、母体の代謝異常が胎盤の異常を介して産仔の代謝に影響する可能性を検証するため、高脂肪食誘導性の肥満・糖尿病モデルでも同様の検討を行った。また、胎盤の機能を評価するため、母体血と胎児血との間の物質交換の場である胎盤血管ネットワーク構造の可視化と胎盤を介した母子間での物質輸送能の評価に取り組んだ。

【結果】

高脂肪食モデル、胎盤異常モデルともに、対照群の母体由来の卵子から生まれた子どもに比べて大きな体重の増加を認めた。しかし、いずれのモデルにおいても大きな個体差が見られた。そこで、出生後に同じ母親に哺育

させ、同一ケージ内で飼育することで環境因子の影響をできる限り排除しつつ、胎盤機能と個体を紐づけて表現型を追えるシステムを確立した。胎盤血管ネットワーク構造の可視化には透明化手法を用い、透明化条件の最適化を行った。物質輸送能の評価には、トレーサーを用いて、妊娠マウスに投与したトレーサーを胎児で検出するための条件検討を行っている。

【考察】

今後は子どもの表現型に相関する胎盤機能を絞り込み、子ども世代の肥満・二型糖尿病を予防する方法の開発に繋げていきたい。

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)

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、代謝制御における役割を明らかにすべく検討した。Activin Bの強制発現によって耐糖能は著明に改善され、これには複数の作用、すなわち、全身インスリン感受性の亢進、インスリン分泌の亢進およびインスリン非依存的な肝糖産生の抑制が関係することが明らかとなった。

まず、Activin Bによる全身インスリン感受性の亢進の作用機序について検討した。Activin Bは肝臓においてFGF21の発現を亢進させ、FGF21欠損マウスを用いた検討からインスリン感受性亢進作用にはFGF21が寄与することが明らかとなった。また、肥満モデルマウスにおいてAAVを用いた持続的なアクチビンシグナルの増強による効果を検討したところ、除脂肪体重・筋重量・握力には影響せず、酸素消費量の亢進を伴って体重・脂肪量を低下させた。一方で、FGF21欠損マウスにおいては、AAVによる持続的なアクチビン過剰発現によるインスリン感受性の改善作用および脂肪量減少効果は明らかに減弱していた。これらの結果から、Activin Bによるインスリン感受性亢進作用および肥満改善効果はFGF21の亢進を介した効果であると示唆された。

Activin Bによる耐糖能異常改善作用は、STZマウスにおいても認められた。Activin B強制発現はピルビン

酸からの糖産生を著明に抑制しており、実際に培養細胞系でも確認されたことから、直接肝細胞に作用して糖産生を抑制していると考えられた。一方で、これらの効果は FGF21 欠損マウスにおいても認められたことから、インスリン非依存的な肝糖産生抑制作用は FGF21 と独立した作用であると考えられた。

Activin B の強制発現によって、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) の亢進を認めた。また、膵インスリン含量、 β 細胞量には著変を認めず、単離後にリコンビナント Activin B 存在下で培養した膵島における GSIS にも差を認めなかったことから、Activin B は直接膵 β 細胞に作用してインスリン分泌を亢進させないと結論した。一方で、我々は Activin B によって肝臓において活性化される細胞内シグナル経路のうちの一つを肝臓において人為的に活性化させることで、GSIS の亢進を観察したことから、Activin B によって変化する肝臓における何らかのシグナルが膵 β 細胞におけるインスリン分泌に影響していると考えられた。

上記の結果から、代謝制御における Activin B の多面的な効果を明らかにすることができた。基礎研究の結果に基づいた糖尿病・代謝性疾患における新規治療法の開発を進める。

日本人一般男性における血中 n-3 系多価不飽和脂肪酸濃度と脳血管病変との関連

近藤 慶子

(滋賀医科大学)

【背景】

魚および n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) 摂取量を増やすことによる抗動脈硬化作用について、我々を含めた介入研究の結果より報告されている^{1,2)}。また、長期に追跡した疫学研究では、n-3 PUFA の摂取が多いほど冠動脈疾患死亡リスクが低いことが報告されている。しかし、n-3 PUFA と脳卒中の関連は研究により異なり、結果が一致していない。

【目的】

日本人一般男性において MRI で評価した脳血管病変と血中 n-3 PUFA 濃度との関連を検討した。

【方法】

滋賀県草津市住民から無作為抽出された 40-79 歳の男性 739 名を対象とした。血中 n-3 PUFA (エイコサペンタエン酸 [EPA] + ドコサヘキサエン酸 [DHA]) 濃度を測定した。脳血管病変として、脳動脈狭窄 (> 1%)、ラクナ梗塞、微小出血および白質病変 (グレード 3 以上) を MRI により評価した。ロジスティック回帰分析を用い、血中 n-3 PUFA 濃度の 1 標準偏差増加あたりの脳血管病変の多変量調整オッズ比および 95% 信頼区間を算出した。

【結果】

脳動脈狭窄、ラクナ梗塞、微小出血および白質病変の有所見率はそれぞれ、30.0%、21.9%、13.9%、22.2%であった。血中 n-3 PUFA 濃度 1 標準偏差 (9.6mg/dL) 増加あたりの脳動脈狭窄の多変量調整オッズ比 (95% 信頼区間) は、0.80 (0.67-0.97) と有意に低かった。また、血中 EPA (4.8mg/dL) および DHA (5.5mg/dL) 濃度 1 標準偏差増加あたりの脳動脈狭窄の多変量調整オッズ比 (95% 信頼区間) は、それぞれ 0.88 (0.74-1.04)、0.76 (0.62-0.92) と低かった。一方、その他の脳血管病変 (ラクナ梗塞、微小出血、白質病変) と n-3 PUFA 濃度との明らかな関連は認めなかった。

【結語】

n-3 PUFA は脳内大血管病変に対して保護的に作用する可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Kondo, K. *et al.*: *J Atheroscler Thromb* 17(6): 628-37, 2010.
- 2) Kondo, K. *et al.*: *Metabolism* 63(7): 930-40, 2014

Wfs1 欠損による β 細胞脱分化とインクレチンの効果および人の糖尿病病態と膵内分泌細胞脱分化に関する研究

椎木 幾久子

(山口大学医学部)

【これまでの研究概要】

インスリン依存性糖尿病を主徴とする遺伝性疾患

Wolfram 症候群の疾患モデル *Wfs1* 欠損マウスは、膵β細胞が進行性に減少し高血糖を来す。我々は本モデルにおけるβ細胞消失の要因としてβ細胞が脱分化することを突き止めた。一方、*Wfs1* 欠損β細胞では WFS1 の機能障害により小胞体ストレスおよび酸化ストレスが亢進する。我々は *Wfs1* 欠損マウスにおいて、小胞体・酸化ストレス応答分子 Thioredoxin-interacting protein (Txnip) を欠損させることで、β細胞脱分化および糖尿病の発症を抑制することを明らかにした。加えて、*Wfs1* 欠損マウスに GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 (Ex-4) を慢性投与することにより、膵島での Txnip 発現の抑制と、インスリン分泌機能の改善を認めた。

さらに、人の糖尿病におけるβ細胞脱分化の意義を明らかにするため、2型糖尿病 (T2D) の膵島の病理と脱分化の関連を病態進展 (正常耐糖能群, T2D 早期群, T2D 進展群) の中で検討した。脱分化細胞数は病態進展にともなって増加し、β細胞機能の指標である C-peptide index と有意な逆相関を示すことを報告した (*JCI insight*, 6, e143791, 2021)。人β細胞の病態進展における脱分化の重要性が示唆された。

【今後の研究計画】

これまでの研究成果を踏まえ、主に下記の2点について研究を進展させる。

1. インクレチンによる膵β細胞脱分化抑制効果の解明

Wfs1 欠損マウスに対する Ex-4 のβ細胞脱分化抑制効果を検討するため、β細胞を YFP で永久標識した *Wfs1*^{-/-}; *RIP-Cre*; *Rosa26-YFP* マウスに Ex-4 を6週齢より4週間投与し、投与終了時点での膵組織切片を用いて免疫染色を行いβ細胞脱分化について評価する。

2. 人の糖尿病におけるα細胞脱分化の解明

前述の T2D 膵島の病理解析では、病態進展にともないα細胞の増加を認める一方、進展群ではα細胞数の減少およびグルカゴン染色性の低下を示す症例も存在した。そこで、進展群の膵組織を中心にα細胞の分化マーカー (*MafB*, *Arx*, *Pax6* など) の免疫染色を行い、α細胞の細胞可塑性と糖尿病病態との関連を明らかにする。

膵α細胞におけるインスリンシグナル依存性機能制御メカニズムの解明

渋江 公尊

(北野病院)

【背景】

膵α細胞より分泌されるグルカゴンは1型糖尿病患者や進行した2型糖尿病患者において低血糖からの回復に重要なホルモンであるが、その詳細な機能制御機構は明らかではない。助成者はα細胞におけるインスリンシグナルに注目し、インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御機構について研究することとした。

【目的】

インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御機構を明らかにする

【方法】

IRS1, IRS2 ノックダウン細胞株 (*alphaIRS1KD*, *alphaIRS2KD*) に対してグルコース応答性のグルカゴンの変化を観察すると同時にマイクロアレイ解析を行い、インスリンシグナル下流にある新規調節因子を検討した。

また膵α細胞特異的 IRS1 および IRS2 ノックアウトマウスに対して糖負荷試験、インスリン低血糖試験、さらに単離膵島を用いたグルコース依存性のグルカゴン分泌の検討を行った。

【結果】

alphaIRS1KD ではインスリンによるグルカゴン抑制が対照群および *alphaIRS2KD* に比べて有意に障害されており、AKT リン酸化の減弱に加えてカルシウムイオンの応答とミトコンドリア機能も減弱していた。各細胞株のマイクロアレイ解析ではカルシウム応答に関連する *Trpc3* 遺伝子が *alphaIRS1KD* で変化していた。

マウスモデルの検討では、*alphaIRS1KO* マウスにおいて低血糖時のグルカゴン応答が障害され、単離膵島ではインスリンによるグルカゴン分泌抑制が対照群および *alphaIRS2KO* マウスで見られていたのに対して *alphaIRS1KO* マウスでは分泌抑制が障害されていた。

【考察】

インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御には IRS1 が主要な役割を果たしていることが示された。

脂肪組織マクロファージを介した GIP 受容体シグナルの作用

清水 辰 徳

(秋田大学大学院医学系研究科)

【目的】

近年、世界の肥満人口が急増する中、抗肥満薬の開発が進められている。Gastric inhibitory polypeptide (GIP) 受容体アンタゴニストや Glucagon-like peptide (GLP)-1 受容体・GIP 受容体のダブルアゴニストは有力な候補として注目を集めており、脂肪組織における GIP 受容体シグナルの解明は極めて重要である。我々はこれまでに、他組織(精巣)において、高脂肪食下(高 GIP 血症下)での GIP 受容体の発現低下(Endocrinology 2017)を示しており、脂肪組織においても同様の発現低下を確認している。また、脂肪組織においては、脂肪細胞に加え、マクロファージに GIP 受容体が高発現していることを見出した。本研究では、脂肪組織マクロファージに対する GIP 受容体シグナルの作用とその基盤となる分子メカニズムを解明することを目的とする。

【方法・結果】

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。これまでに、GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植することにより、脂肪組織のマクロファージを GIP 受容体欠損マクロファージに置換するモデル(以下、骨髄移植モデル)を用いた検討を重ねている。GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植した群 (KO → WT)、野

生型マウスの骨髄を野生型マウスに移植した群 (WT → WT) をそれぞれ移植後 8 週経過したところから高脂肪食とし、体重推移・耐糖能を評価した。高脂肪食開始前の耐糖能は両群で差はなかった。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。また、末梢血での移植細胞の置換率は確認しているが、脂肪組織内での置換率の把握は困難であり、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である。現在、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によりマクロファージ特異的 GIP 受容体欠損マウスの作製を進めており、完成後は、当マウスの摂餌量・体重推移・耐糖能を通常食下で評価する。その後、骨髄移植モデルで示された高脂肪食下の肥満耐性について、当マウスで確認を行う。具体的には、高脂肪食開始前後の耐糖能・インスリン抵抗の調査、高脂肪食開始後の体重推移、脂肪組織の炎症性サイトカインの多寡について検討を行う。

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)

【目的】

本研究では、我々が実施してきた 2 型糖尿病疾患ゲノム研究¹⁻³⁾をさらに発展させる形で、様々な斬新なアルゴリズムを駆使し、2 型糖尿病のリスク層別化および疾患のサブタイプ分類を行う。本研究により、「遺伝情報により 2 型糖尿病の発症リスクおよびその表現型はどのように規定されるか」、という疾患ゲノム研究の重要課題が明らかになることが期待される。

【方法】

2020年度は、遺伝情報により2型糖尿病発症リスクおよびその表現型はどのように規定されるか、という医学的に重要な問いに対して、以下の3つの方法で取り組んだ。

- ①：トレーニングデータを用いた2型糖尿病感受性遺伝子変異の選定
- ②：各種既存アルゴリズムを適用した2型糖尿病発症リスクの層別化とサブタイプ分類
- ③：新規アルゴリズムの開発によるリスク層別化・サブタイプ分類の精度向上

【結果】

2020年度は1. トレーニングデータを用いた2型糖尿病感受性遺伝子変異の選定, 2. 各種既存アルゴリズムを適用した2型糖尿病発症リスクの層別化, 3. 新規機械学習アルゴリズムの開発によるリスク層別化の精度向上, の3つの課題を実施した。1. については、バイオバンク・ジャパン 20万人（うち糖尿病4万人, 非糖尿病16万人）のデータを活用し、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施し、2型糖尿病に関連する遺伝子変異を選択した。2. については、1. で同定した2型糖尿病感受性遺伝子変異に関するジェノタイプデータを用いてバイオバンク・ジャパンのサンプルにおいてゲノムデータの主成分 (PCA) による次元縮約やポリジェニック・リスク・スコア (PRS) によるリスク層別化を実施した。既存の高次元圧縮技術などのアルゴリズムが抱えている問題点を克服するため、高次元圧縮技術の組み合わせ (PCA-UMAP) を適用し⁴⁾、2型糖尿病のリスク層別化の精度を向上させた。さらに、分子生物学的経路(以下、パスウェイ) のデータベースからパスウェイ情報を網羅的に取得し、各パスウェイに属する遺伝子が存在するゲノム領域の SNP に限定してポリジェニック・リスク・スコアを計算した (パスウェイ PRS)。パスウェイ PRS 同士の相関係数を算出し、相関が強いパスウェイ同士を同一のクラスターに所属させるクラスタリングを実施し、パスウェイのクラスターごとに PRS を算出した。また、各パスウェイの全ゲノム SNP のカバー率やパスウェイ同士の重複率を求めた、パスウェイ・クラスター PRS を代謝疾患に関わる形質との関連に基づき特徴付を行った。

【考察】

パスウェイ・クラスター PRS の算出により、同一の PRS を有する被検者であっても、そのパスウェイ・クラスター PRS の分布は異なることが明らかとなった。これは、2型糖尿病発症に関して同程度の遺伝的リスクを有する被検者であっても、そのパスウェイ特異的な遺伝的捧啓は異なることを示唆しており、本成果は2型糖尿病の病態の理解を促進し、2型糖尿病の個別化医療の促進に寄与することが期待される。

【文献】

- 1) Suzuki, K. *et al.*: Identification of 28 new susceptibility loci for type 2 diabetes in the Japanese population. *Nat. Genet.* **51**, 379–386 (2019).
- 2) Ishigaki, K., Suzuki K. *et al.*: Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. *Nat. Genet.* **52**, 669–679 (2020).
- 3) Spracklen, C. N., Suzuki K. *et al.*: Identification of type 2 diabetes loci in 433, 540 East Asian individuals. *Nature* **582**, 240–245 (2020).
- 4) Sakaue, S., Suzuki K. *et al.*: Dimensionality reduction reveals fine-scale structure in the Japanese population with consequences for polygenic risk prediction. *Nat. Commun.* **11**, 1569 (2020).

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】

脂肪組織は生命維持に必要なエネルギーを脂肪として蓄積する役割に加え、アディポカイン分泌等を介した生体恒常性維持にも重要な役割を担う。脂肪組織を構成する細胞の中で、脂肪細胞の機能についてはこれまでの多くの先行研究において多面的に解析されており、特に脂肪細胞の分化過程、及び熱産生能を有するベージュ脂肪

細胞への変換（褐色化）過程は、主に遺伝子やタンパク質発現制御に関する知見に基づくメカニズム解析が盛んである。他方、これらの過程における低分子代謝物の挙動についての知見は限られており、低分子代謝物の量的・質的变化の全体像については不明確な点が多く存在する。そこで、本研究では低分子代謝物の網羅的解析手法の一種であるメタボローム解析を活用し、脂肪細胞の分化過程及び褐色化過程における代謝変動の全体像の把握を目的とし、研究を行った。

【方法】

脂肪細胞の分化過程に関するメタボローム解析：マウス白色脂肪組織由来不死化培養細胞（cell line）について分化誘導処理を行い、分化誘導直後から48時間後に至るまで経時的に細胞内代謝物を抽出し、得られた抽出液をLC-MSを用いたメタボローム解析に供した。また、得られた不死化培養細胞について分化度が異なるcell line間での代謝変化の相違について差分解析を実施した。

脂肪組織の褐色化に関するメタボローム解析： $\beta 3$ 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。

【結果・考察】

脂肪細胞分化過程でのメタボローム解析の結果、分化促進に寄与する可能性がある代謝物として、核酸関連代謝物に属する低分子代謝物Aと脂質関連代謝物に属する低分子代謝物Bを特定した。また、脂肪組織の褐色化に関するメタボローム解析の結果、褐色化促進に寄与する可能性がある代謝物として、核酸関連代謝物に属する低分子代謝物Cを特定した。代謝物AとCは構造が異なる一方、共に核酸関連代謝物に属することから、脂肪細胞の分化・褐色化過程において、核酸に関連する代謝経路の活性化が重要であることが示唆された。

ニューロメジンUが膵 β 細胞機能に与える影響とその分子機序の解析

張 維 東

(宮崎大学医学部)

【目的】

Neuromedin U (NMU), a highly conserved peptide in mammals, is involved in a wide variety of physiological processes. NMU has two receptors, NMU receptor 1 (NMUR1) and NMUR2, both of which are G-protein-coupled receptors (GPCRs). Only NMUR1 is expressed in mouse islets and β cell-derived MIN6-K8 cells. We previously reported that NMU produced in β cells suppresses GSIS and causes β -cell failure via NMUR1^{1,2}). NMU was up-regulated both after chronic palmitate treatment and in diabetic *db/db* mice islets, and then participated in β -cell dysfunction and development of diabetic pathogenesis via induction of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress²). However, the downstream signal transduction of NMUR1 in β cells has not been elucidated. In this study, we aimed to investigate the molecular mechanisms underlying the insulinostatic action mediated by NMUR1 in β cells.

【方法】

All types of $G\alpha$ proteins are expressed in β cells and are involved in the regulation of insulin secretion. Given that NMUR1, but not NMUR2, is expressed in β cells, and NMU suppresses intracellular calcium mobilization and insulin secretion, we hypothesized that NMUR1 might use $G\alpha_{i/o}$ for signal transduction in β cells. Using β cell-derived MIN6-K8 cells, isolated mouse and human islets, and single islet cells, we identified the molecular mechanisms by which NMU and NMUR1 regulate insulin secretion in β cells.

【結果】

The results were published in *PLoS ONE* in 2021³⁾.

We showed that NMUR1 in β cells uses $G\alpha_{i/o}$ signaling to mediate the detrimental effects of NMU on insulin secretion. Pretreatment with the $G\alpha_{i/o}$ inhibitor *Bordetella pertussis* toxin (PTX), but not the $G\alpha_q$ inhibitor YM254890, abolished NMU-induced suppression of glucose-stimulated insulin secretion and calcium response in β cells. Knockdown of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ in β cells counteracted NMU-induced suppression of insulin secretion and gene alterations related to mitochondrial fusion (*Mfn1*, *Mfn2*), fission (*Fis1*, *Drp1*), mitophagy (*Pink1*, *Park2*), mitochondrial dynamics (*Pgc-1 α* , *Nrf1*, and *Tfam*), ER stress (*Chop*, *Atp2a3*, *Ryr2*, and *Itp2*), intracellular ATP level, and mitochondrial membrane potential. NMU decreased forskolin-stimulated intracellular cAMP in both mouse and human islets. We concluded that upon NMU binding, NMUR1 coupled to PTX-sensitive $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ proteins in β cells, reduced intracellular Ca^{2+} influx and cAMP level which in turn suppresses insulin secretion, thereby causing β -cell dysfunction and impairment. These results highlight a novel signaling mechanism of NMU and provide valuable insights into the further investigation of NMU functions in β -cell biology.

【考察】

Here, we showed that PTX abolished the suppressive effects of NMU in β cells, whereas knockdown of *Gnai2* and *Gnao1* abolished NMU's effects, suggesting that $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ are involved in signal transduction of NMUR1 in β cells. Both $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ belong to the $G\alpha_{i/o}$ subfamily, and it is usually assumed that if a receptor couples to $G\alpha_i$, it will also couple similarly to $G\alpha_o$. In addition, GPCRs can bind to distinct classes of heterotrimeric G-proteins in different cell types. A $G\alpha_s$ and $G\alpha_q$ signaling switch in β cells exposed to chronic hyperglycemia underlies the differential insulinotropic potential of incretins in diabetes. Understanding more about these endogenous G-proteins opens the door to pharmaceutically targeting their activation, which

would have major therapeutic potential in diabetes and obesity.

Despite the fact that NMUR1 and NMUR2 were discovered as GHSR homologs, it remains to be determined whether such dimerization occurs between NMUR1 and somatostatin receptors. Although the mechanisms underlying the involvement of $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ signaling in NMU inhibitory effects on insulin secretion require detailed investigation, including studies at the structural level, our findings provide important leads regarding the endogenous NMUR1 transduction pathway. In addition, the diversity of GPCR coupling to various types of G-proteins and the subsequent activation of distinct intracellular signal transduction may be explained by alterations in guanine nucleotide exchange factor or $G\alpha$ subunit-regulated GTP hydrolysis. In this study, PTX abolished NMU-suppressed calcium influx in β cells, suggesting that using different $G\alpha$ proteins, NMUR1 apparently exhibits opposite effects on calcium mobilization, depending on different cell types.

Previously, we showed that NMU induced β -cell failure by triggering mitochondrial dysfunction and ER stress²⁾. In this study, we showed that knockdown of $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ in β cells restored NMU-induced mitochondrial dysfunction and ER stress. These findings suggest that $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ proteins couple to NMUR1 and induce β -cell dysfunction. In addition, $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ proteins are crucial in the NMU-NMUR1 regulating glucose-stimulated Ca^{2+} signaling and insulin secretion in β cells. Knowledge of the NMU signaling cascades, NMU-NMUR1- $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ -cAMP-calcium- insulin, may provide insight into β -cell biology and the pathogenesis of diabetes related to NMU.

【文献】

- 1) Zhang, W., Sakoda, H., Miura, A., Shimizu, K., Mori, K., Miyazato, M., Takayama, K., Hayashi, Y. & Nakazato, M.: Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancre-

atic β cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**: 677-683 (2017).

- 2) Zhang, W., Sakoda, H., Nakazato, M.: Neuro-
medin U suppresses insulin secretion by trigger-
ing mitochondrial dysfunction and endoplasmic
reticulum stress in pancreatic β -cells. *FASEB J.*
34: 133-147 (2020).
- 3) Zhang, W., Sakoda, H., Nakazato, Y., Islam,
MN., Pattou, F., Kerr-Conte, J. & Nakazato, M.:
Neuromedin U uses $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_o$ to suppress
glucose-stimulated Ca^{2+} signaling and insulin
secretion in pancreatic β cells. *PLoS ONE.*, **16**:
e0250232 (2021).

交感神経過活動によるグレリンの発現の低下と疾患との関連の検討

坪内 拡伸

(宮崎大学医学部)

【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、リポポリサッカライド (LPS) 5mg/kg 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。次に、グレリンの受容体である Growth Hormone Secretagogue receptor (GHSR) の欠損マウス (GHSR-KO マウス) へ LPS を気管内投与し、GHSR の有無が肺炎症にもたらす影響を検討した。

【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、血管透過性の亢進、肺組織中の TNF- α , IL-6, CXCL2 の発現の亢進が抑制された。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、肺組織中の IL-6, CXCL2 の発現の亢進の抑制が認められた。次に GHSR-KO マウスと野生型マウスにおいて、LPS 気管内投与 24 時間後の肺炎症の程度を比較した結果、GHSR-KO マウスでは、血管透過性の亢進、P/F 比の低下の抑制、肺組織中の炎症性サイトカインの発現の亢進の抑制、72 時間生存率の低下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グレリン投与は肺炎症を一部抑制することが示された。GHSR-KO マウスを用いた検討では、予想に反して GHSR-KO マウスが野生型と比較して肺炎症が軽度であることが確認された。以上の結果から、薬理量のグレリン投与と内因性のグレリンが LPS 誘導性肺傷害における役割が異なること、内因性のグレリンは肺炎症の誘導または維持に重要であることが示唆された。

解糖系代謝物による TOR シグナルの活性化

野村 亘

(京都大学大学院農学研究科)

【背景・目的】

TOR (target of rapamycin) は、酵母から哺乳類に至るまで高度に保存されたタンパク質リ酸化酵素であり、栄養シグナルの中心因子として異なる 2 つの複合体である (m)TORC1 および (m)TORC2 を形成することで糖代謝や脂質代謝などに関与する。

生体の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代謝中間体としてだけでなく、細胞や生体機能に積極的に関与する機能性を有した代謝物も存在する。そのような代謝物の中で、我々はシグナル伝達の制御に機能する“代謝性シグナル分子”として、解糖系由来の代謝物であるメチルグリオキサール (MG) に着目し、MG が (m)TORC2 シグナルを活性化することを見出した (*Mol. Cell. Biol.* 35:

1269-1280, 2015). 一方, MG は古くから糖尿病病態との関連が指摘されているが, その因果関係については不明な部分が多い. 本研究では, MG の TOR シグナルへの影響に着目することで, MG と糖尿病病態との関連性の理解に資する知見の獲得を目指した.

【方法・結果】

脂肪細胞 (3T3-L1 細胞) を用いた解析で, MG が mTORC2 シグナルに加えて mTORC1 シグナルを活性化することを見出した. mTORC2 は Akt を介して mTORC1 の活性化に寄与するが, MG による mTORC1 シグナルの活性化は Akt に依存しなかった. その代わりに, MG はストレス応答性 MAP キナーゼである p38 を介して mTORC1 シグナルを活性化した.

mTORC1 の基質である S6K は, インスリン受容体基質 (IRS-1) をその標的分子の一つとする. また, IRS-1 のセリン残基のリン酸化はインスリン抵抗性の発症に関与する. IRS-1 のリン酸化状態に及ぼす MG の影響について検討した結果, MG は mTORC1 依存的に IRS-1 のセリン残基 (Ser307) のリン酸化を亢進した. さらに, MG はインスリン刺激によるインスリンシグナル伝達経路の活性化, および細胞内への糖取り込み活性を阻害した.

【考察】

以上のことは, MG が mTORC1 シグナルの活性化による IRS-1 のリン酸化を介してインスリン抵抗性様の作用を引き起こすことを示唆しており, この作用が糖尿病病態の増悪化における MG の作用機序の一つとなる可能性が考えられた.

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 細胞の可塑性が明らかとなってきており, α 細胞の分化機構を明らかにすることは, α -to- β reprogramming を介した β 細胞再生医療へと繋がる可能性がある. 我々は α 細胞分化を時間軸に沿って解析

するための新規レポーターマウス“*Gcg-Timer*”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. 内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生 α 細胞は緑色蛍光, より分化した α 細胞は緑色および赤色蛍光を呈するため, 共焦点レーザー顕微鏡および flow cytometry を用いて両者を識別し経時的に観察できる. 「 α 細胞がいつ・どこで生まれるのか?」を明らかにするとともに, α 細胞新生・分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化を解析する.

【結果】

Gcg-Timer マウス膵を摘出し, 顕微鏡および flow cytometry で新生 α 細胞数を定量化した結果, 新生 α 細胞は生理条件下では胎生期から生後7日未満の新生仔に観察され, 成体マウスでは認めなかった. そこで成体マウスにおいて α 細胞新生が誘導されるか検討した. *Gcg* 欠損マウスなどグルカゴンシグナル抑制下で α 細胞過形成が生じることが報告されており, その過程に α 細胞新生が寄与するかを明らかにするため, *Gcg* 欠損 *Gcg-Timer* マウスを作製した. 3~10 週齢の膵切片において緑色蛍光陽性, 赤色蛍光陰性の細胞が観察され, 成体マウスでも新生 α 細胞を認めた.

【考察および今後の展望】

Gcg 欠損 *Gcg-Timer* マウスの結果から, 成体マウスにおいても, グルカゴンシグナルの抑制によって生理的条件下では認めなかった α 細胞新生を誘導できることが明らかとなった. 既報においては, グルカゴンシグナルによる α 細胞過形成は自己増殖によると考えられてきたが, α 細胞新生も寄与していることが新たに示された. ただし, 今回の実験系は genetic ablation による特殊な条件下での観察であるため, 他の実験系を用いて再現性を確認する必要がある. 現在 *Gcg-Timer* マウスにグルカゴン抗体を投与することによりグルカゴンシグナルを抑制する新たな実験系を構築中であり, 上記知見の再現性を確認するとともに, その機序を明らかにしたい.

NFIA が褐色脂肪細胞分化を制御するメカニズム及び全身代謝への影響の解明

平池 勇雄

(東京大学保健・健康推進本部)

【背景】

肥満症や2型糖尿病などの生活習慣病は遺伝因子、環境因子および両者の相互作用により発症する。2017年時点で世界には6億人の肥満患者が存在し (Afshin A. *et al. N Engl J Med.* 2017), また成人における肥満の有病率は1975年から2020年までに3倍に上昇した (WHO, 2020)。現時点で上市されている抗肥満薬はすべて「エネルギーの摂取を抑制する」という考え方に基づいて開発されたものだが、副作用等の懸念から現実には実臨床において十分に活用されていない。高度肥満症に対する減量手術の有効性は確立されつつあるが、適応に限られることは明らかである。そのため現時点で肥満症の治療は食事や運動といった生活習慣に関する指導が主体となっており、安全かつ効果的な新たな治療法の開発が望まれている。

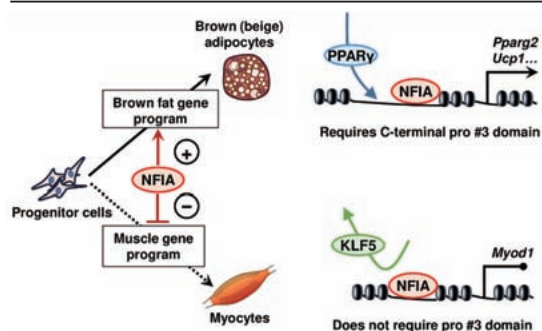
褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) はミトコンドリアにおける uncoupling protein-1 (UCP1) の機能を介して熱を産生しエネルギーを消費する点において、主にエネルギーの貯蔵を担う白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) とは対照的な組織である。リニエージトレーニングの結果から BAT と WAT は発生学的な由来が異なる一方、BAT と骨格筋は共に Myf5 陽性の前駆細胞から分化すると報告されている。また近年になってヒト成人においても機能的な BAT が存在すること、BAT の活性と BMI は負に相関することが示されており、BAT は「エネルギー消費の促進」に基づく肥満症、メタボリックシンドローム、肥満2型糖尿病の新しい治療標的になり得るとして注目されている。我々は以前、マウス BAT/WAT に対するゲノムワイドなオープンクロマチン解析と BAT 特異的オープンクロマチン領域のモチーフ解析から、BAT の分化を正に制御する因子として転写因子 NFIA (nuclear factor I-A) を同定した。NFIA は BAT 特異的遺伝子エンハンサーを分化に先駆けて活性化し、脂肪細胞分化のマスター転

写因子 PPAR γ のエンハンサーへの結合を促進することで BAT の遺伝子プログラムを正に制御する。またヒト BAT においても WAT と比較して NFIA は高発現しており、かつその発現は UCP1 を含む BAT 特異的な遺伝子群の発現と正に相関した (Hiraike Y. *et al. Nature Cell Biology* 2017)。

【結果 (Project 1)】

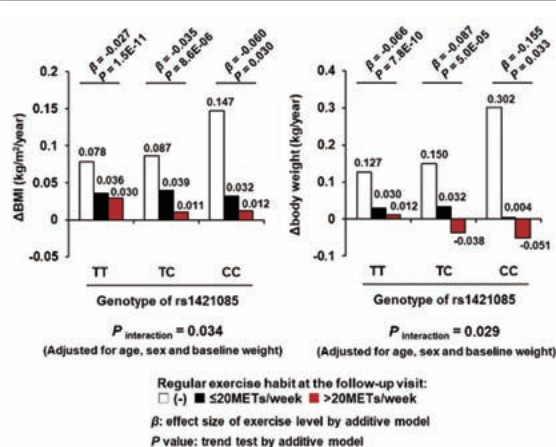
中胚葉系の細胞が褐色脂肪細胞に分化するためには BAT の遺伝子プログラムの活性化に加えて、骨格筋の遺伝子プログラムが不活性化される必要がある。申請者は NFIA がその脂肪細胞分化作用とは独立に、骨格筋分化のマスター転写因子 MyoD をコードする *Myod1* のエンハンサー上で KLF5 を含む他の転写因子と競合し *Myod1* の転写を抑制すること、その結果として骨格

NFIA は褐色脂肪遺伝子プログラムの促進と骨格筋遺伝子プログラムの阻害の双方を介して褐色脂肪細胞分化を制御する



Hiraike Y et al. *PLoS Genetics* 2020 より引用改変

体重増加や BMI 上昇に対して、FTO 遺伝子近傍の肥満感受性 SNP と運動習慣は gene-environment interaction を呈する



Hiraike Y et al. *J Clin Endocrinol Metab.* accepted より引用改変

筋の遺伝子プログラムを不活性化し褐色脂肪細胞分化を担保することを明らかにした。また NFIA の褐色脂肪細胞分化促進作用にはその C 末端に位置する 17 アミノ酸残基が必須である一方、この 17 アミノ酸残基を欠失させた変異型 NFIA も骨格筋分化の抑制作用は保持しており、NFIA の褐色脂肪細胞分化促進作用と骨格筋細胞分化抑制作用は異なるドメインが担っていると考えられた。従来、脂肪細胞と骨格筋細胞それぞれのマスター転写因子である PPAR γ と MyoD はお互いにその発現を抑制することで運命決定の一意性を担保することが知られていた。今回の結果により NFIA が PPAR γ 依存的な経路による褐色脂肪細胞分化の促進及び PPAR γ 依存的な MyoD の発現抑制を介した骨格筋分化の抑制に加えて、PPAR γ 非依存的に *Myod1* のエンハンサー上で KLF5 と競合し骨格筋分化を抑制することによって褐色脂肪細胞分化を担保する機能を有していることが判明した (Hiraike Y. *et al. PLoS Genetics* 2020).

【結果 (Project 2)】

前述の通り、肥満症を含む生活習慣病は遺伝因子と環境因子およびこれらの相互作用によって発症する。遺伝因子は BMI (body mass index) の約 40% 程度を説明すると考えられており、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) によって数百の肥満感受性 SNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) が明らかとなっている。中でも *FTO* 遺伝子の intron 1 と intron 2 の間に位置する SNPs は最大の effect size を有すると報告されており、risk allele を 1 つ有することによって BMI は 0.25-0.41kg/m² 上昇し、肥満の odds risk を 1.18-1.27 程度上昇させると報告されている。遺伝因子と環境因子それぞれの研究に加えて、これら 2 つの相互作用 (gene-environment interaction) を検討する研究が近年盛んに行われている。例えば運動習慣や食事摂取、喫煙習慣、アルコール摂取と疾患感受性 SNP の間の gene-environment interaction がよく検討されており、定期的な運動習慣が *FTO* SNP の BMI に対する効果を減弱させるという interaction が複数の文献で報告されている。しかしこれら文献は cross-sectional に評価された BMI に対する検討であり、臨床的により重要な「追跡期間中における BMI や体重の変動」に対する gene-environment

interaction はこれまで十分に検討されていなかった。

我々は台湾 biobank の約 2 万人のデータを用いて、もっともよく知られた肥満感受性 SNP であり白色脂肪細胞の褐色化を介して作用する *FTO* rs1421085 と定期的な運動習慣 (なし, ≤ 20 METs/週, > 20 METs/週 の 3 群) の間に体重や BMI の増加に対する gene-environment interaction が存在することを明らかにした。Risk allele を有する被験者であっても、定期的な運動習慣によって追跡期間中の体重増加が抑制された。更に baseline で定期的な運動習慣がないと回答した被験者に注目したサブグループ解析を実施し、baseline で定期的な運動習慣がなかったとしても、追跡期間中に運動習慣を獲得することで risk allele 保有者の体重増加が抑制されることを明らかにした。この知見は遺伝的な高リスク群に対して最適な生活指導を行うことで生活習慣病の発症を予防する精密医療の実現に向けた重要な示唆に富んでいる (Hiraike Y. *et al. J Clin Endocrinol Metab.* Accepted).

【今後の展望】

褐色脂肪細胞における NFIA が全身代謝に及ぼす影響及び作用メカニズムの全貌が明らかになれば、「エネルギー消費の促進」に基づく新たな抗肥満治療の実現が期待される。またバイオバンクを用いた gene-environment interaction の解析は、遺伝的リスクに基づいた最適な生活指導という形で生活習慣病領域における精密医療の実現につながることを期待される。

【文献】

- 1) Hiraike, Y.*, Yang, CT., Liu, WJ., Yamada, T. & Lee, CL.: *FTO* obesity variant-exercise interaction on changes in body weight and BMI: The Taiwan Biobank study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Accepted * Corresponding author
- 2) Yamada, T., Yoneoka, D., Hiraike, Y., Hino, K., Toyoshiba, H., Shishido, A., Noma, H., Shojima, N. & Yamauchi, T.: Deep Neural Network for Reducing the Screening Workload in Systematic Reviews for Clinical Guidelines: Algorithm Validation Study. *Journal of Medical Internet Research* 2020; **22**(12): e22422
- 3) Hiraike, Y., Waki, H., Miyake, K., Wada, T.,

Oguchi, M., Saito, K., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: NFIA differentially controls adipogenic and myogenic gene program through distinct pathways to ensure brown and beige adipocyte differentiation. *PLoS Genetics* 2020; **16**(9): e1009044

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

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、T-カドヘリン (T-cad) への特異的な結合を介して、血管内皮細胞 (JCI Insight 2018)・骨格筋細胞 (*Sci Rep* 2019)・間葉系幹細胞 (*Mol Ther* 2020) からのエクソソーム (Exo) 産生を促進し、臓器保護作用を発揮することを明らかとしてきた。そこで、APN および T-cad の腎臓における局在と、その腎保護作用への関与について検討した。

【方法・結果】

腎臓では心血管組織と比較すると相対的に少ないものの、APN および T-cad 蛋白の存在を認めた。次に、蛍光免疫染色により腎臓における APN の局在を評価したところ、細動脈の血管内皮だけでなく、特に近位尿管周囲の毛細血管で APN が検出された。このような尿管周囲毛細血管の APN は、血管内皮細胞マーカーである CD31 とはほとんど共染せず、PDGFR α /PDGFR β

共陽性の血管周皮細胞 (pericyte) に、T-cad とともに局在していた。

pericyte は内皮細胞の支持細胞として、血管構造の維持に重要な役割を果たすだけでなく、組織常在性の間葉系幹細胞として、組織修復もしくは線維化にも関与することが近年報告されている。そこで、腎虚血再灌流 (IRI) による急性腎障害モデルを用いて、腎臓における APN/T-cad の役割を評価した。その結果、APN-KO および Tcad-KO マウスの IRI 腎では、野生型 (WT) マウスに比して、著しい血管透過性亢進と尿管細管壊死所見の増悪が認められた。続いて、IRI 後の腎微小血管構造の変化を確認したところ、Tcad-KO マウスの IRI 腎では血管内皮細胞に隣接する PDGFR β 陽性細胞が顕著に減少しており、重篤な pericyte loss が示唆された。

マウスの primary pericyte を用いた細胞実験では、精製高分子多量体 APN の添加により、APN の集積と培養上清への Exo 亢進促進を認めたが、T-cad のノックダウンによりキャンセルされた。

【考察】

腎臓において APN は、T-cad を介して尿管周囲毛細血管の pericyte に存在しており、急性腎障害モデルにおける血管透過性亢進を抑制することで、腎保護効果を発揮することが示された (*AJP-endo* 2021)。現在 T-cad flox マウスおよび PDGFR α Cre^{ERT2} マウスを入手しており、これらのマウスを掛け合わせることで、pericyte/間葉系幹細胞 特異的な T-cad 欠損マウスを樹立し、糖尿病性腎症等への病態形成の影響について検討する予定である。

非侵襲的膵 β 細胞イメージング技術を用いた、膵 β 細胞量を標的とした糖尿病の予防・治療法の開発

村 上 隆 亮

(京都大学医学部附属病院)

【背景・目的】

本邦では軽微な肥満であっても糖尿病を発症する患者が急増しており、耐糖能異常が出現する段階から既に膵 β 細胞量は減少していることが報告されている。このため、糖尿病の発症・重症化予防のためには、膵 β 細胞量

を指標に、より早期に介入することが有用と考えられる。また、膵β細胞量の減少は、食事・薬物など各種治療効果の減弱または治療抵抗性の可能性に直結するため、膵β細胞量の減少を予防、または維持・回復させることが求められる。一方で、これまで非侵襲的な膵β細胞量評価が困難であったために、糖尿病治療薬の膵β細胞量保護効果については評価が定まっていないものも多い。われわれは、Glucagon like-peptide-1 (GLP-1) 受容体に特異的に結合する Exendin-4 を骨格とした放射性同位元素標識プローブを用いた非侵襲的膵β細胞イメージング技術を開発し、Positron emission tomography (PET) や Single photon emission tomography (SPECT) での生体マウス膵描出、同法を用いた膵β細胞量の縦断的評価が可能であることを複数の糖尿病モデルマウスで示した。この技術を応用することで、非侵襲的かつ経時的に膵β細胞量の変化を捉え、糖尿病発症・進展または各種治療における、個体のインスリン分泌能、インスリン抵抗性、食欲・食行動の変化などと膵β細胞量との互いの時相的な相互関係性については明らかにし、膵β細胞量を標的とした糖尿病の予防・治療法の開発を目的とする。

【方法】

本年度は、SPECT 用プローブである (Lys¹²[¹¹¹In-BnDTPA-Ahx]) exendin-4 (¹¹¹In-Ex4) を用い、マウス個体の中枢神経系領域に有意集積を描出できるかを検討した。

【結果】

¹¹¹In-Ex4 を投与したマウスの頭蓋内視床下部相当領域に、SPECT にて有意集積を検出した。Biodistribution Study にても、大脳などと比し、視床下部で有意に高い分布を認めた。さらに、SPECT 画像から算出されたプローブ集積値と視床下部での GLP-1 受容体 mRNA 発現量は有意な相関関係を示した。

【考察】

¹¹¹In-Ex4 SPECT にて、視床下部領域の GLP-1 受容体発現量を Mass として評価できる可能性を示した。

うつ様行動制御遺伝子 USP46 によるエネルギー代謝制御に関する研究

村田 知 弥

(筑波大学医学医療系)

【目的】

脱ユビキチン化酵素 USP46 は神経系に高発現し、*Usp46* 欠損マウスはうつ様行動をほとんど示さない。我々は培養細胞を用い、近位依存性ビオチンラベリング (BioID) によるタンパク質相互作用の解析を行い、USP46 がエネルギー代謝関連因子と相互作用することを見出した。また *Usp46* 欠損マウスは生後 2 週の時点より低体重を示す。そこで本研究では、USP46 とエネルギー代謝の関連の解明を目指し、*Usp46* 欠損マウスの解析と USP46-BioID ノックイン (KI) マウスを用いた *in vivo* BioID を実施する。

【結果】

(1) 脳特異的 *Usp46* 欠損マウスの作製

体重減少の原因となる組織を特定するため、組織特異的ノックアウト (cKO) マウスの作製に着手した。まず *Usp46* が高発現する脳の寄与を検証すべく、昨年度に樹立した *Usp46*^{fllox} マウス卵子に対し、Nestin-Cre マウスの精子を体外受精した。現在解析に向け繁殖中である。

(2) *Usp46* Exon4 欠損マウスの解析

目的に記載の *Usp46* 欠損マウスは、*Usp46* 遺伝子座 Intron 1 にトラップベクターが挿入されており、遺伝的背景が C57BL6/J と CBA の mixed である。一方 (1) に用いた *Usp46*^{fllox} マウスは Cre 依存的に Exon4 を欠損し、また C57BL6/J 背景であるため、両モデル間で体重表現型が一致するか検証した。*Usp46*^{fllox} マウス作製時に副次的に得られた *Usp46* Exon4 欠損マウスを解析した所、このマウスも生後 2 週より体重低下を示した。このことから、*Usp46*^{fllox} マウスを用いた cKO による体重表現型の解析が可能であることが示された。

(3) USP46-miniTurbo-KI マウスを用いた *in vivo* BioID の確立

昨年度樹立した USP46-ビオチンリガーゼ (miniTurbo)-KI マウスを用い、*in vivo* BioID によるマウス生体内における USP46 の相互作用タンパクの網羅的解析を

実施し、脳内における USP46 の相互作用因子候補を多数見出した。

【今後の展開】

本研究に必要な遺伝子改変マウス、*in vivo* BioID の確立が完了した。次年度より USP46 による新生仔期の代謝制御のメカニズムを探るとともに、*in vivo* BioID の結果を精査していく。

ネットワークメタアナリシスによる糖尿病の最良の治療選択エビデンスの確立：人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化

山田 朋 英

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

本研究は人工知能を用いたヘルスケアの個別化アプローチと集団的アプローチの統合と展開への挑戦を目標とし、以下のプロジェクトを中心に進めており、SDGs の理念に一致する。

【方法と結果】

1. ヘルスケアの個別化アプローチ

○ Precision Nutrition

精密栄養（精密治療）は、最適な健康のための栄養素の必要量、生活習慣が個人間で大幅に異なるという認識に起因する考え方である。我々は、ある個別の食生活や生活習慣によってその後の生存期間が改善するという個人を人工知能でクラスター化するためのアルゴリズムを開発した。つまりある種の食事や生活習慣介入を個別に提案し、また薬剤反応性が個人で異なるという点で、最適な個別薬剤介入の設計も行う。

○ Dynamic Treatment Regimes

最良の個別化治療の提案と、糖尿病専門医と同じ処方パターンを提案できる AI を作る。Dynamic Treatment Regimes は、ある状態の各糖尿病患者さんに最適の治療法を強化学習（Q-Learning）で予測するものである。単に今ある治療法を選ぶのではなく、その結果こうなった場合にはどのように治療するか、など、あたかも将棋の手を読むかのように動的に予測する。我々は糖尿病治

療のアドヒアランスの継続の価値を最大化するモデルを作成検証した（ISPOR 他）。さらに現在は糖尿病専門医と同じ処方パターンを提案できる AI 構築準備を進めている。糖尿病専門医の暗黙知を機械学習によってアプリ化し利用できれば、非専門医（医師、患者、製薬会社）でも専門医と同等の治療選択方法をあらかじめ知ることができる。

2. ヘルスケアの集団的アプローチ

○ Real-time Systematic Review and Meta-analysis の実現化

システマティックレビュー・メタアナリシスは臨床ガイドラインの礎である。この一連のプロセスを人工知能に自動化させ、常に最新の臨床治験をアップデートする研究を進めている。我々は深層学習の技法を用い文献検索の 10 倍の省力化を報告した（JMIR）。また、メタアナリシスの国際共同研究に参加した（Nature 他）。本研究の発展により全疾患領域で、現時点で最もエビデンスレベルが高い臨床知見を迅速かつ精密に提供することができる。ネットワークメタ解析に関し多くの報告を行った（Diabetes Care 他）、その成果は米国内科学会の ACP-Journal Club (Annals of Internal Medicine) や米国の救急治療ガイドラインに引用され、現場の臨床医の治療方針の意思決定に寄与した。本研究は全疾病領域に応用可能である。

【考察】

人間の経験値・暗黙知を学んだ人工知能が代行することで人類はより創造的かつ生産的な作業に従事することが可能となる。

【謝辞】

長い期間支えてくださった財団様、ご推薦いただいた門脇先生他、すべての諸先生方に御礼申し上げます。おかげ様で留学することができ、かつ当初の課題から大きく変わって視座を広げることができ、様々な経験を積むことで、Front の研究へ変えることができました。

Depletion of CD206 M2-like macrophage activates fibro-adipogenic progenitors, and enhances myogenesis during recovery process

Nawaz Allah

(富山大学医学部)

Skeletal muscle has a remarkable regenerative capacity that is clinically important for muscle injury and other myopathies^{1,2)}. Previous reports have shown that the recovery of muscle after injury requires the coordinated activation of muscle satellite cells, non-myogenic progenitor cells and immune cells²⁻⁷⁾. Several pieces of research have clearly demonstrated a potential role of FAPs during the recovery of muscle^{2, 5, 8, 9)}. These newly identified FAPs play a critical role in the recovery process and potentially secrete various paracrine factors that support the recovery process in response to injury^{2, 5, 9-11)}. To understand the hierarchical organization of various stem/progenitor cells, single-cell RNA sequencing (scRNA seq) analyses unveiled the characteristics of stem/progenitor cells in adipose tissue¹²⁻¹⁵⁾ and muscle^{1, 16, 17)}. Consistent with previous reports^{2, 9)}, recent advances in scRNA seq analysis have revealed a distinct myogenic subpopulation during the recovery process^{1, 16, 17)}. These reports also explored a newly discovered cell hierarchy during the recovery process that emphasizes the potential role of FAPs. Various subtypes of FAPs have been identified using scRNA seq analysis. Activated FAPs, which mainly contribute to boosting the recovery process, expressed higher levels of *Fst*, *Ccl7*, *Cxcl5*, *Serpine1*, *Cxcl3*, *Mt2*, *Timp1*, and *Tnc*^{16, 17)}.

Macrophages (MΦ) are critical for the recovery of muscle from injury, and macrophage-derived signals regulate the proliferation of muscle stem cells¹⁸⁻²⁰⁾. During the early phase of muscle recovery, proinflammatory M1-type MΦ are recruited to the injury

site, followed by a switch from proinflammatory MΦ to anti-inflammatory M2-MΦ^{1, 16, 17)}, consistent with the previous reports^{19, 21-23)}. Although, proinflammatory M1-type MΦ reportedly have a negative effect on the repair process^{19, 21, 24-26)}, the role of Mrc1⁺ MΦ is reported to be involved in the tissue repair and inflammation resolution^{7, 27, 28)}. Evidence to support this hypothesis is not sufficiently accumulated.

We recently reported that Mrc1⁺ M2-like MΦ-derived TGF-β1 inhibited the proliferation of beige and white adipocyte progenitors in adipose tissue²⁹⁻³¹⁾. These mesenchymal stem cell (MSC)-like progenitors also reside in muscle as FAPs, where they secrete various paracrine factors to support the recovery of muscle following injury. Therefore, we presumed that the depletion of Mrc1⁺ MΦ might affect the activation of FAPs in muscle after injury, thereby promoting recovery.

To investigate the role of Mrc1⁺ MΦ in muscle recovery, we will utilize previously generated CD-206DTR mice in which conditional depletion of Mrc1⁺ MΦ is possible²⁹⁾. Depletion of Mrc1⁺ MΦ during the early phase of repair considerably accelerated the recovery of the injured skeletal muscle. We will proceed with this project to further dissect how Mrc1⁺ M2-like MΦ contributes to the recovery process.

References

- 1) Giordani, L., He, GJ., Negroni, E., Sakai, H., Law, JYC., Siu, MM., Wan, R., Corneau, A., Tajbakhsh, S., Cheung, TH. *et al.*: High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. *Mol Cell*. 2019; **74**(3): 609-621.e6.
- 2) Joe, AW., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So L, Wang, J., Rudnicki, MA., & Rossi FM.: Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology*. 2010; **12**(2): 153-63.
- 3) Blau HM, Cosgrove BD, and Ho ATV. The cen-

- tral role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nature medicine*. 2015; **21**(8): 854-62.
- 4) Wang, YX. & Rudnicki, MA.: Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012; **13**(2): 127-33.
 - 5) Wosczyzna, MN., Konishi, CT., Perez Carbajal, EE., Wangm, TT., Walshm, RA., Ganm, Q., Wagner, MW. & Rando, TA.: Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Reports*. 2019; **27**(7): 2029-35.e5.
 - 6) Tierney, MT., Stec, MJ., Rulands, S., Simons, BD. & Sacco, A.: Muscle Stem Cells Exhibit Distinct Clonal Dynamics in Response to Tissue Repair and Homeostatic Aging. *Cell Stem Cell*. 2018; **22**(1): 119-27.e3.
 - 7) Tidball, JG.: Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017; **17**(3): 165-78.
 - 8) Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, MM., Miyagoe-Suzuki, Y. *et al.*: Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of Cell Science*. 2011; **124**(21): 3654-64.
 - 9) Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K.: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nature cell biology*. 2010; **12**(2): 143-52.
 - 10) Lukjanenko, L., Karaz, S., Stuelsatz, P., Gurriaran-Rodriguez, U., Michaud, J., Dammone, G., Sizzano, F., Mashinchian, O., Ancel, S., Migliavacca, E. *et al.*: Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell*. 2019; **24**(3): 433-46.e7.
 - 11) Serrano, AL., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M. & Muñoz-Cánoves, P.: Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2008; **7**(1): 33-44.
 - 12) Schwalie PC, Dong H, Zachara M, Russeil J, Alpern D, Akchiche N, Caprara C, Sun W, Schlaudraff KU, Soldati G. *et al.* A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots. *Nature*. 2018; **559**(7712): 103-8.
 - 13) Burl, RB., Ramseyer, VD., Rondini, EA., Pique-Regi, R., Lee, YH. & Granneman, JG.: Deconstructing Adipogenesis Induced by beta3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling. *Cell Metab*. 2018; **9**(18): 30332-2.
 - 14) Hepler, C., Shan, B., Zhang, Q., Henry, GH., Shao, M., Vishvanath, L., Ghaben, AL., Mobley, AB., Strand, D., Hon, GC. *et al.*: Identification of functionally distinct fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in visceral adipose tissue of adult mice. *eLife*. 2018; **7** (e39636).
 - 15) Merrick, D., Sakers, A., Irgebay, Z., Okada, C., Calvert, C., Morley, MP., Percec, I. & Seale, P.: Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science*. 2019; **364** (6438).
 - 16) De Micheli, AJ., Laurilliard, EJ., Heinke, CL., Ravichandran, H., Fraczek, P., Soueid-Baumgarten, S., De Vlaminck, I., Elemento, O. & Cosgrove, BD.: Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Reports*. 2020; **30**(10): 3583-95.e5.
 - 17) Oprescu, SN., Yue, F., Qiu, J., Brito, LF. & Kuang, S.: Temporal Dynamics and Heterogeneity of Cell Populations during Skeletal Muscle Regeneration. *iScience*. 2020; **23**(4): 100993.

- 18) Ratnayake, D., Nguyen, PD., Rossello, FJ., Wimmer, VC., Tan, JL., Galvis, LA., Julier, Z., Wood, AJ., Boudier, T., Isiaku, AI. *et al.*: Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature*. 2021; **591**(7849): 281-7.
- 19) Tidball, JG. & Villalta, SA.: Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; **298**(5): R1173-87.
- 20) Tidball, JG. & Wehling-Henricks, M.: Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *The Journal of physiology*. 2007; **578**(Pt 1): 327-36.
- 21) Tidball, JG. & Wehling-Henricks, M.: Shifts in macrophage cytokine production drive muscle fibrosis. *Nature medicine*. 2015; **21**(7): 665-6.
- 22) Mann, CJ., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, AL. & Munoz-Canoves, P.: Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle*. 2011; **1**(1): 21.
- 23) Heredia, JE., Mukundan, L., Chen, FM., Mueller, AA., Deo, R., Locksley, RM., Rando, TA. & Chawla, A.: Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013; **153**(2): 376-88.
- 24) Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, RK. & Chazaud, B.: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2007; **204**(5): 1057-69.
- 25) Jia, G. & Sowers, JR.: Increased Fibro-Adipogenic Progenitors and Intramyocellular Lipid Accumulation in Obesity-Related Skeletal Muscle Dysfunction. *Diabetes*. 2019; **68**(1): 18-20.
- 26) Contreras-Shannon, V., Ochoa, O., Reyes-Reyna, SM., Sun, D., Michalek, JE., Kuziel, WA., McManus, LM. & Shireman PK.: Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2^{-/-} mice following ischemic injury. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007; **292**(2): C953-67.
- 27) Villalta, SA., Rinaldi, C., Deng, B., Liu, G., Fedor, B. & Tidball, JG.: Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Human molecular genetics*. 2011; **20**(4): 790-805.
- 28) Akahori, H., Karmali, V., Polavarapu, R., Lyle, AN., Weiss, D., Shin, E., Husain, A., Naqvi, N., Van Dam, R., Habib, A. *et al.*: CD163 interacts with TWEAK to regulate tissue regeneration after ischaemic injury. *Nature communications*. 2015; **6**(7792).
- 29) Nawaz, A., Aminuddin, A., Kado, T., Takikawa, A., Yamamoto, S., Tsuneyama, K., Igarashi, Y., Icutani, M., Nishida, Y., Nagai, Y. *et al.*: CD206⁺ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature communications*. 2017; **8**(1): 286.
- 30) Nawaz, A. & Tobe, K.: M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. *Journal of diabetes investigation*. 2019.
- 31) Igarashi, Y., Nawaz, A., Kado, T., Bilal, M., Kuwano, T., Yamamoto, S., Sasahara, M., Jiuxiang, X., Inujima, A., Koizumi, K. *et al.*: Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. *Sci Rep*. 2018; **8**(1): 14567.

脂肪組織量規定因子の同定とその機能解析

Shin Jihoon

(大阪大学大学院医学系研究科)

【目的】

ヒトの脂肪組織量は個人差が大きく、遺伝的、環境的、病態的要因が総合的に関与しているが、その主要な因子の報告はまだない。本研究では脂肪組織量を規定する因子の同定とその機能解析を目的とする。

【方法】

脂肪組織量に関わる遺伝的、環境的、病態的要因トランスクリプトームの解析から脂肪組織量を規定する可能性の高い因子を探索する。マウスモデルを用いた *In vivo* の実験及び 3T3-L1 脂肪細胞を用いた *In vitro* の実験系でその因子の機能解析を行う。

【結果】

脂肪組織量を規定する因子のスクリーニングの結果、HSP47 を同定した。HSP47 はコラーゲン特異的シャペロンとして知られており、脂肪組織に高発現し、遺伝的 (SNP)、環境的 (過食、肥満、運動、絶食)、病態的 (Cachexia) 環境の脂肪組織量と相関して発現が制御されることを見出した。HSP47 阻害剤をマウスに投与すると脂肪組織が小さくなり、脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR γ のタンパク発現が低下した。脂肪細胞特異的 HSP47 ノックアウトマウスでも同様に脂肪組織量が少なく、PPAR γ のタンパク発現が低下した。3T3-L1 脂肪細胞を用いた *In vitro* の実験でも同様の結果で、HSP47 のノックダウン及び阻害により PPAR γ のタンパク発現が低下した。そのメカニズムとして、HSP47 は脂肪細胞のコラーゲンのフォールディング状態を調節し、これら細胞外基質と細胞膜インテグリンとのバインディングを介し細胞内 FAK シグナルを誘導、PPAR γ を安定化させ、脂肪組織量を規定していることが分かった。HSP47 の発現は摂食により増加し、絶食により低下することから、ホルモンによる発現制御を考えた。3T3-L1 脂肪細胞を用いた実験ではインスリンの添加により HSP47 の発現が増加し、コルチゾールにより低下した。

【考察】

脂肪組織のコラーゲンマトリックスは病態的な繊維化因子としてよく知られていたが、その生理的意義や重要性については解明されていなかった。本研究ではヒトやマウスで脂肪組織に高発現し、脂肪組織量を規定する因子として HSP47 を同定した。HSP47 は脂肪細胞外の栄養状態もしくは遺伝的 SNP により発現が制御され、脂肪細胞のコラーゲンのフォールディング状態を変化させることで細胞内の PPAR γ タンパク発現を調節し、脂肪組織量を規定していることが分かった。現在その詳しい分子メカニズムを解明中であり、今後ヒト肥満脂肪細胞の研究に大きく寄与できると考えられる。

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医学科)

【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 PDPK1 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 PDPK1 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 PDPK1 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 でもヒト臍動脈血管内皮細胞を用いて PDPK1 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 PDPK1 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 PDPK1 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 PDPK1 欠損は STZ 誘導性高血糖下では骨格筋でのインスリン抵抗性が惹起される。また、様々な条件により血管内皮 PDPK1 の発現は「恒常的ではない」ことが明らかになった。

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や細胞周期の特性を明らかにした (Miyatsuka T *et al. Diabetes*,

3388-3393, 2014)。同マウスを用いることにより新生 β 細胞を単離し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、即ち膵管に接したまま、 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} 細胞が *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。

抗 MAFB 抗体を用いて免疫染色を行った結果、胎生 15～18 日の膵臓において 80% 以上の β^{duct} 細胞が MAFB を発現し、 β^{vessel} 細胞における MAFB 陽性率は 20% 以下であったことから、前述の β^{Pdx1} 細胞は主に β^{duct} 細胞で構成されることが示唆された。

上記マウス胎生膵における遺伝子発現プロファイルの heterogeneity と、ヒト ES 細胞から β 細胞への分化過程もにおける遺伝子発現プロファイルの heterogeneity との類似性、相違性を解析するため、ヒト ES 細胞由来インスリン産生細胞を用いて scRNA-seq を行った結果、ヒト ES 細胞由来インスリン産生細胞においても、ソマトスタチンやグルカゴンを強く発現する細胞集団が存在することを見出した。

以上のように高時間分解能で新生インスリン産生細胞を解析することにより、その位置情報や遺伝子発現プロファイルの不均質性を明らかにすることができた。

Cas9ヌクレアーゼ

【はじめに^{1,2)}】

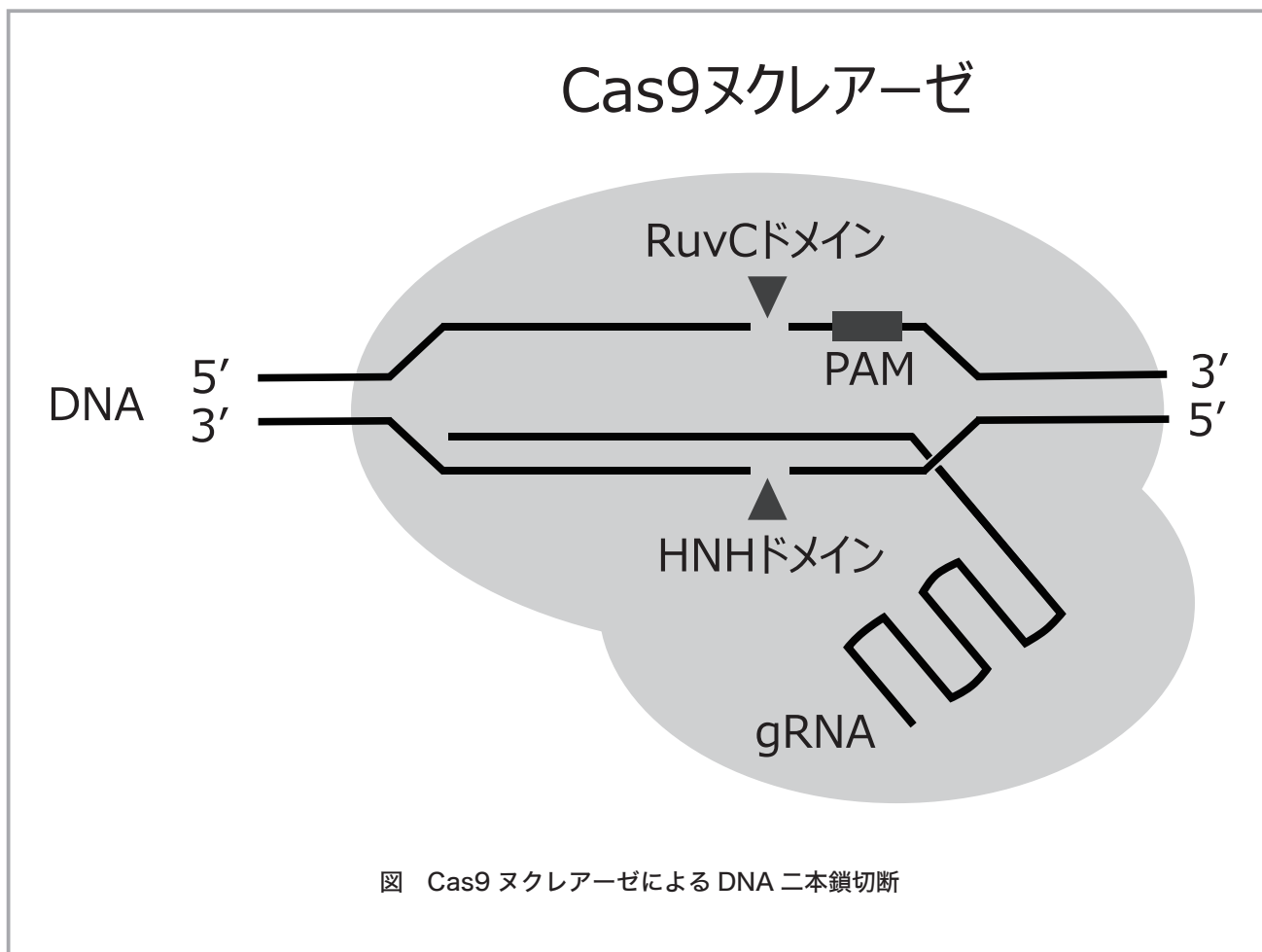
Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-CRISPR associated protein (CRISPR-Cas) システムは、真正細菌や古細菌などの多くの原核生物において、ウイルスなどの外来性遺伝子を排除するために用いられる獲得免疫機構である。過去に感染した外来核酸に由来する CRISPR RNA (crRNA) が、別の短鎖 RNA である transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) および Cas タンパク質と複合体を形成し、crRNA と相補的な外来核酸を認識し切断することで、外来因子の再感染を防いでいる。この crRNA と tracrRNA を 1 本の guide RNA (gRNA) とし、任意の配列に Cas タンパク質をリクルートできる事が判明しており、このシステムは Zinc-finger nuclease (ZFN) および transcription

activator-like effector nuclease (TALEN) に次ぐ第三世代のゲノム編集技術として、遺伝子改変に広く活用されている。

本稿では、2020 年ノーベル化学賞の対象にもなった Cas9 ヌクレアーゼを中心に、その改変体や臨床応用について概説する。

【CRISPR-Cas システムのクラスと型³⁾】

CRISPR-Cas システムは、複数のタンパク質複合体から構成されるクラス 1 と単一のタンパク質から構成されるクラス 2 に大きく分けられる。生物学的研究・臨床応用には、利便性に長けたクラス 2 の CRISPR-Cas システムが主に使用されている。クラス 2 は構成されるタンパク質の種類に応じて II 型、V 型、VI 型の 3 タイプがあ



り、II型のCas9 ヌクレアーゼ及びV型のCas12 ヌクレアーゼが主にDNA エンドヌクレアーゼとして機能するのに対し、VI型のCas13 ヌクレアーゼはDNA よりもRNA を切断しやすいという特徴を有している。

【Cas9 の酵素反応^{3,4)}】

Cas9 ヌクレアーゼはRNA 依存性DNA エンドヌクレアーゼであり、crRNA またはgRNA に存在する20塩基程のガイド配列と相補的な二本鎖DNA を認識して切断する。DNA 切断には、標的配列近傍の非相補鎖配列に protospacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる塩基配列が必要である。例えば、広く使用されている化膿レンサ球菌由来のSpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) ヌクレアーゼでは、NGG (Nは任意の塩基) がPAMとして知られている。DNA 切断反応は、まずCas9-RNA 複合体がPAM を認識し、二本鎖DNA をほどこしながらCas9-RNA 複合体中のガイド配列と標的DNA がRNA-DNA ヘテロ二重鎖を形成する事で開始される。続いて、Rループ形成に伴うCas9 ヌクレアーゼの立体構造変化が、ヌクレアーゼドメインの活性化を促す。Cas9 ヌクレアーゼは2つの既知ヌクレアーゼ (HNH およびRuvC) と相補的な領域を有しており、HNHドメインがガイド鎖と相補的なDNA 鎖を切断し、RuvCドメインが逆側のDNA 鎖を切断する事で、DNA の二本鎖切断が引き起こされる (図)。

なお、ヌクレアーゼドメインのうち片方に点変異 (RuvCドメインのD10A) を入れて片側だけのDNA を切断できるようにしたCas9 ニッカーゼや、両側に点変異 (RuvCドメインのD10AとHNHドメインのH840A) を入れて切断活性を消失させたdCas9 (dead Cas9) が報告されている。前者のCas9 ニッカーゼは、異なる2カ所にニックを入れる事でオフターゲット切断リスクの低下を図る目的等で使用されてきた。近年では逆転写酵素と融合させ、Indel (ランダムな挿入・欠失) 頻度を抑えた状態で塩基置換や短鎖の挿入や欠失を行うプライム編集にも活用されている。また後者のdCas9は、主に別の機能性タンパク質と融合させて任意の塩基配列近傍へリクルートする目的で使われており、機能性タンパク質の種類に応じて転写制御やエピジェネティック制御など様々な用途に活用されている。

【Cas9 の臨床応用⁵⁾】

CRISPR Therapeutics や Beam Therapeutics といった複数の企業が、CRISPR-Cas9 及びその関連技術をβサラセミアや鎌状赤血球症などのヘモグロビン症治療に活用しようとしている。例えばCRISPR Therapeuticsは、患者自身の造血幹細胞を化学的に除去した後にCRISPR-Cas9 でゲノム編集した造血幹細胞を患者に注入する治療を実施しており、2020年11月には4人の患者が輸血を必要としなくなったと報告している。また、Editas Medicine が手掛けるレーバー先天性黒内障などのように、*in vivo* ゲノム編集が臨床の場で検証されるケースも出てきている。更にDNA 二本鎖切断を起こさないCas9 改変体についても創薬への実用化が検討されており、例えばBeam Therapeuticsは、Cas9 改変体にシチジンデアミナーゼ (シトシンをチミジンに変える酵素) やアデノシンデアミナーゼ (アデノシンをグアニンに変える酵素) を結合させる事で点変異異常を治療するbase editing 技術の臨床応用を目指している。

【おわりに】

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集が初めて報告されて以降、ノックアウトマウスの迅速な作製やgRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングなど、ライフサイエンスはこの技術の多大なる恩恵を受けてきた。そして、早くもその技術は難病治療にも活かされようとしている。無論、オフターゲット効果による意図しないゲノム編集の懸念やCas タンパク質の免疫原性懸念など、安全面には細心の注意を払わなければならない。その前提の下で、今後さらに研究が進み、難病に苦しむ多くの患者さんの治療に役立つ日が来る事を期待したい。

【参考文献】

- 1) 西増弘志: Cas9 の結晶構造, 日本結晶学会誌, **57**, 96-103 (2015).
- 2) 西増弘志: CRISPR-Cas9 の構造と機能, 生化学, **87**, 686-692 (2015).
- 3) Andrew V. Anzalone, Luke W. Koblan, David R. Liu: Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 824-844 (2020).

- 4) Adrian Pickar-Oliver & Charles A. Gersbach:
The next generation of CRISPR-Cas technologies
and applications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**,
490-507 (2019).
- 5) Carrie Arnold: What's new in clinical CRISPR?,
Nat.Med., 27, 184-185 (2021).

【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
小笠原 彬

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

自己免疫疾患における創薬標的としての免疫プロテアソーム

【序】

細胞内で役割を終えたタンパク質や不良品タンパク質の大半は、ユビキチン化されたのち、プロテアソームと呼ばれる巨大な分解酵素複合体によってペプチド断片にまで分解され、新たなタンパク質の合成に再利用される。そのプロテアソームは、プロテアーゼ活性を有する20Sプロテアソームに制御ユニットである19S複合体(PA700)がその両端または片側に結合した構造をしている(合わせて26Sプロテアソームと呼ばれる)。また、20Sプロテアソームは、7種類の α サブユニットからなる α リングと7種類の β サブユニットからなる β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順番に積み重なった樽状の構造を取っている。このサブユニットのうち、触媒活性を有しているのは $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ のみであり、内壁にプロテアーゼ活性中心が露出している。

プロテアソームにはいくつかのアイソフォームが存在しており、その中でも、構成型プロテアソームと免疫プロテアソームが良く知られている。構成型プロテアソームは全身の細胞に広く発現しているのに対し、免疫プロテアソームは通常、免疫細胞に特異的に発現している。

しかし、炎症性サイトカインであるインターフェロン(IFN) γ や腫瘍壊死因子(TNF) α の刺激などによっても免疫プロテアソームは形成される。その構造は、構成型プロテアソームの $\beta 1c$ (カスパーゼ様活性), $\beta 2c$ (トリプシン様活性), $\beta 5c$ (キモトリプシン様活性)がそれぞれlow molecular mass polypeptide (LMP) 2 ($\beta 1i$; キモトリプシン様活性), multicatalytic endopeptidase complex-like (MECL) 1 ($\beta 2i$; トリプシン様活性), LMP7 ($\beta 5i$; キモトリプシン様活性)に置き換わった形になっている(図(A))。

免疫プロテアソームは、全身に発現している構成型プロテアソームと違い、免疫特異的であるゆえに毒性の回避が期待でき、近年様々な自己免疫疾患に対する治療標的として注目を集めている。本稿では、その免疫プロテアソームに着目し、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。

【免疫プロテアソームの機能】

プロテアソームの働きの一つとして、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスIによる抗原提示がある。

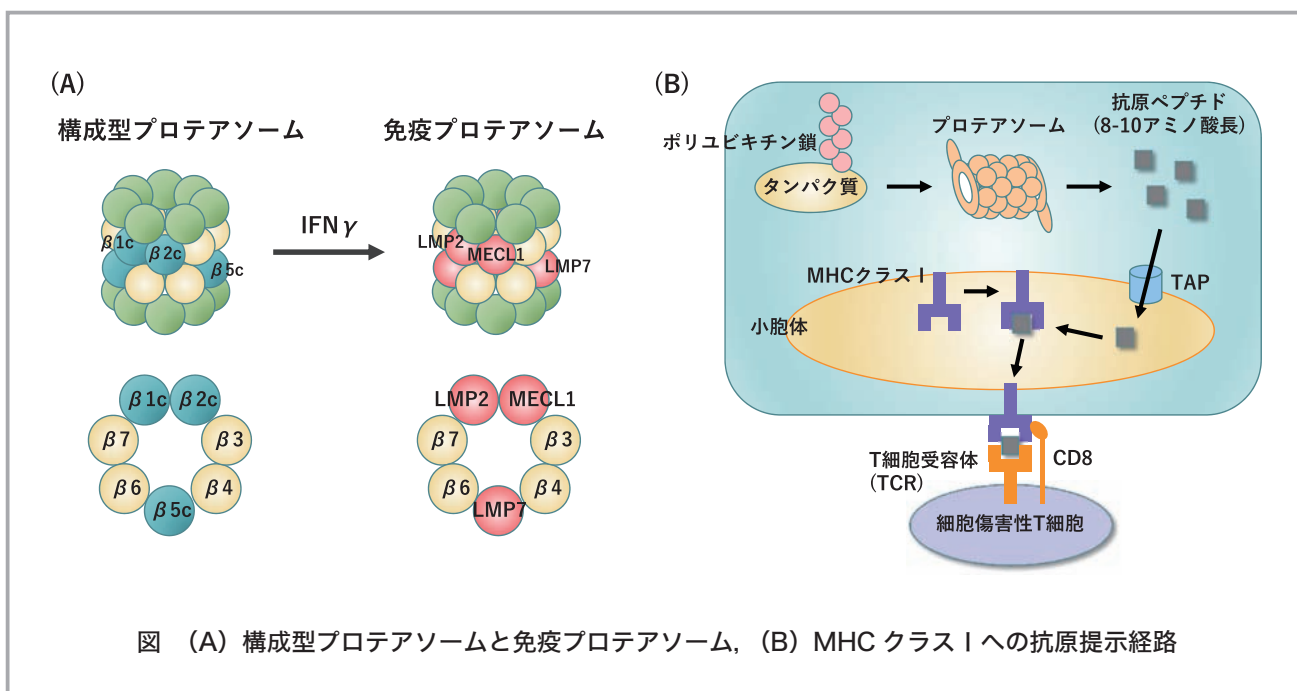


図 (A) 構成型プロテアソームと免疫プロテアソーム, (B) MHC クラス I への抗原提示経路

プロテアソームの分解産物であるペプチドの一部が抗原処理関連トランスポーター (TAP) を介して小胞体内へ輸送され, MHC クラス I のペプチド収容溝に結合して細胞表面へと運ばれる. その後, 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が MHC クラス I を介して提示された抗原を認識することで, 免疫応答が開始される (図(B)).

免疫プロテアソームでは, カスパーゼ様活性を有する $\beta 1c$ からキモトリプシン様活性を有する LMP2 に変換されることで, 基質特異性が構成型プロテアソームとは異なってくる. すなわち, 酸性アミノ酸の C 末端側の切断活性が低下する一方で, 疎水性及び塩基性アミノ酸の C 末端側を切断する活性が上昇する. MHC クラス I 結合ペプチドはその C 末端がアンカーとなるが, その大部分が疎水性アミノ酸, 一部が塩基性アミノ酸であり, 酸性アミノ酸がアンカーとなることはない. そのため, 免疫プロテアソームでは MHC クラス I に対して高い親和性を持ち, 抗原提示に有利なペプチドを効率的に産生するようになる.

また, 最近の研究により, 抗原提示以外の機能も明らかになってきている. 免疫プロテアソームの活性化は, 制御性 T 細胞 (Treg 細胞) の誘導を抑制する一方で, Th1 及び Th17 細胞の分化促進にも関与している¹⁾. さらに, B 細胞の分化にも関与しているという報告もある²⁾.

【疾患との関連】

様々な自己免疫疾患や炎症性疾患において, 免疫プロテアソームの発現上昇が報告されており, 免疫プロテアソーム阻害薬である ONX-0914 は, 関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE), 炎症性腸疾患 (IBD), 多発性硬化症 (MS) などの動物モデル試験で有効性を示している. また, 免疫プロテアソーム阻害により, Th1 及び Th17 の分化抑制, Treg の分化促進が観測され, IL-6, IFN γ , TNF α , GM-CSF 及び IL-23 などのサイトカインの発現抑制も見られている³⁾.

代表的な自己免疫疾患の一つである SLE は何らかの原因により種々の自己抗体を産生し, それらによる全身性の炎症性臓器障害を引き起こす疾患であるが, その患者では抗体産生細胞であるプラズマ細胞の増加が知られている. ONX-0914 の投与により, NZB/NZW などの

動物モデルにおける病態進行が抑制され, プラズマ細胞数の減少とともに血清中の総 IgG 及び抗 dsDNA 抗体レベルの低下が見られている⁴⁾.

【免疫プロテアソームの創薬標的としての可能性】

プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブは, 米国 FDA により多発性骨髄腫の治療薬として承認されている. そのボルテゾミブは最近, 難治性 SLE 患者を対象にした臨床試験にて高い有効性を示したが, 構成型プロテアソーム及び免疫プロテアソームともに阻害する薬剤であるために, 血液毒性や末梢神経障害などの重篤な副作用が課題となっている. そこで, 免疫プロテアソームを特異的に阻害する薬剤の研究が活発に行われている⁵⁾. 現在臨床入りしている KZR-616 は LMP7, LMP2 に対する特異的な不可逆的共有結合型化合物であり, 自己免疫疾患 (ループス腎炎, 多発性筋炎, 皮膚筋炎) にて開発が進められている. また, M3258 は $\beta 5c$ との選択性が非常に高い LMP7 特異的な可逆的共有結合型化合物であり, 多発性骨髄腫を適応症として開発中である. 両薬剤とも現在のところ, ボルテゾミブで見られているような末梢神経障害などの重篤な毒性は報告されていない. このような共有結合型化合物以外にも, 非共有結合型化合物も報告されており, 免疫プロテアソーム阻害薬の利用は, 現在治療選択肢が限られている疾患に対して新規クラスの薬剤となり得ることが期待されている.

【参考文献】

- 1) Kalim, K.W. *et al.*: Immunoproteasome Subunit LMP7 Deficiency and Inhibition Suppresses Th1 and Th17 but Enhances Regulatory T Cell Differentiation, *J. Immunol.*, **189**, 4182 (2012).
- 2) Hensley, S.E. *et al.*: Unexpected Role for the Immunoproteasome Subunit LMP2 in Antiviral Humoral and Innate Immune Responses, *J. Immunol.* **184**, 4115 (2010).
- 3) Basler, M. *et al.*: The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases, *Clin. Exp. Rheumatol.*, **33**, S74 (2015).
- 4) Ichikawa, H.T. *et al.*: Beneficial Effect of Novel

Proteasome Inhibitors in Murine Lupus via Dual Inhibition of Type I Interferon and Autoantibody-Secreting Cells, *Arthritis Rheum.*, **64**, 493 (2012).

- 5) Huber, E.M. *et al.*: A Nut for Every Bolt: Subunit-Selective Inhibitors of the Immunoproteasome and Their Therapeutic Potential, *Cells*, **10**, 1929 (2021).

【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

舌間 裕晃

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

