

日本応用酵素協会誌

No.59

2024

総 説

- ホスファターゼPTENの活性制御メカニズム 1
長谷川 純矢
- アルツハイマー病に係るプロテアーゼ概論 7
渡部 博貴

酵素情報

- ヒトスフィンゴリエリン合成酵素ファミリーの新たな酵素活性
— 長年分子実体が不明だったホスファチジルコリンおよび
ホスファチジリエタノールアミン特異的ホスホリパーゼCである可能性 — 14
村上 千明, Kamila Dilimulati, 角田(熱田) 京子, 坂根 郁夫
- タンパク質合成に潜むリスク「難翻訳配列」とその合成を促進する翻訳因子群 18
茶谷 悠平
- 計算機を用いた酵素設計法の新展開 21
新井 宗仁

2024年度 研究報告

- 酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成 24
- 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 (TMFC) 60
- Cardiovascular Innovative Conference に関する研究助成 (CVIC) 111
- Front Runner of Future Diabetes Researchに関する研究助成 (FFDR) 145
- Innovative Research Group of Gastroenterology に関する研究助成 (IRGG) 174

公益財団法人 日本応用酵素協会

理事長	小林 義広		
専務理事	奥野 直樹		
理事	小川 佳宏 小室 一成 塩見美喜子 谷藤 道久	門脇 孝 佐藤 文彦 福井 清 渡辺 守	
監事	岸田 光正	村上 誠一	
評議員	大内 章子 川村 哲二 田邊 良輔 濱岡 純治 渡邊 明	川北 英隆 小林 敏男 縄野 雅夫 棕本 友子	

総 説

ホスファターゼ PTEN の活性制御メカニズム

長谷川 純矢

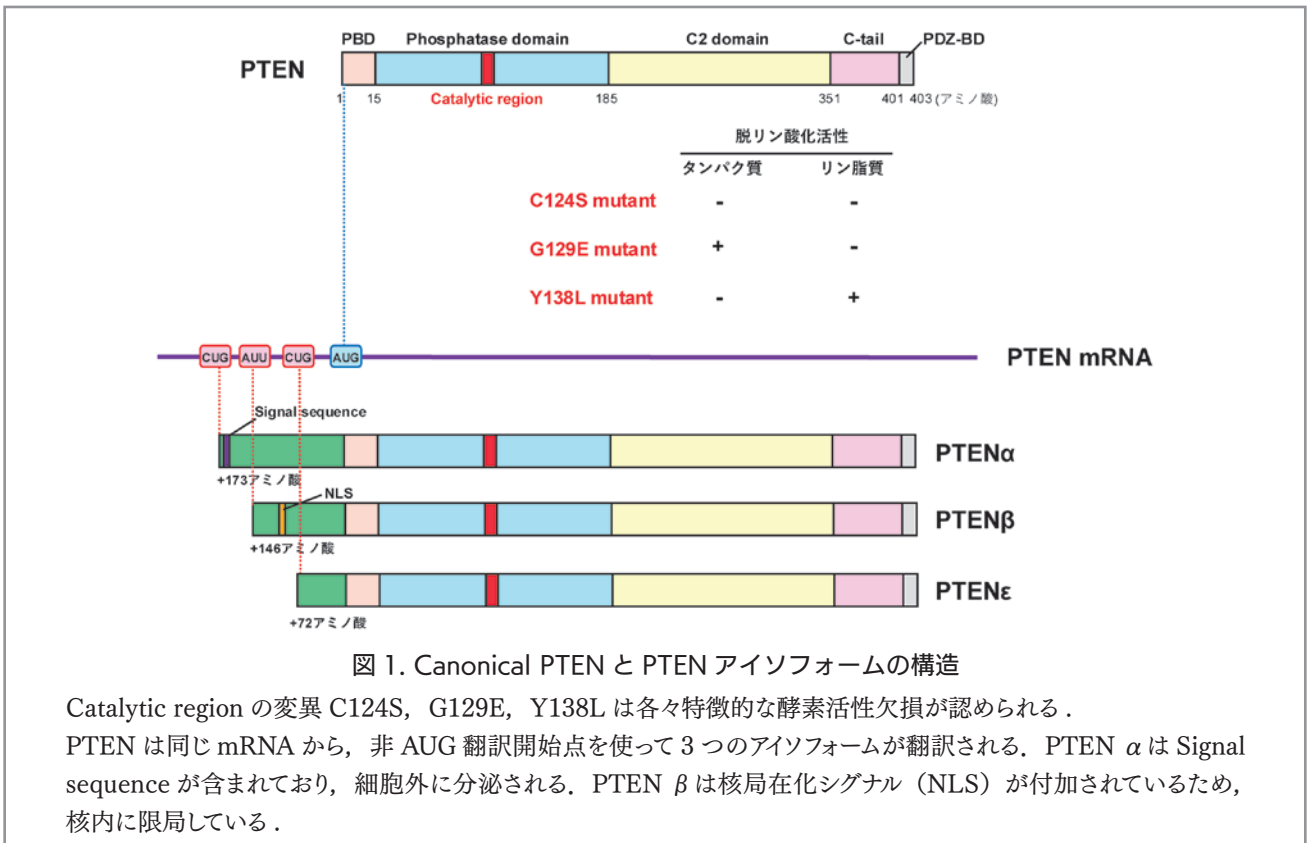
1. はじめに

リン脂質ホスファターゼである PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) は、リン脂質の一つホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PI(3,4,5)P3) を脱リン酸化し、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P2) を生成する。PI(3,4,5)P3 の蓄積は Akt シグナルを活性化することで、がん細胞の増殖や生存に寄与すると考えられている。実際、PI(3,4,5)P3 を合成する *PIK3CA* (PI3-Kinase) や *PTEN* の遺伝子変異は、多くのがん患者で認められている^{1,2)}。特に *PTEN* の遺伝子変異は多岐にわたるがん種にて、約 40% の高頻度で観察され、p53 と並びがん抑制遺伝子の代表例と言える。

一方、PTEN はリン脂質だけではなく、リン酸化されたタンパク質を脱リン酸化する活性も持っている。このように PTEN は、様々な基質を脱リン酸化することで、多様な生物応答を制御していることが明らかになってきている。本総説では、PTEN がどのような活性制御を受け、どのような基質を脱リン酸化し、生体のホメオスタシスを維持しているのかについて概説する。

2. PTEN の構造とアイソフォーム

ホスファターゼである PTEN (canonical PTEN) は、403 アミノ酸で構成されている。その "canonical PTEN" は、403 アミノ酸の中に 5 つの機能ドメインが濃縮されている (図 1)。N 末端側から、PI(4,5)P2 に



結合するPI(4,5)P₂-binding domain (PBD), 酵素活性を持つ”Phosphatase domain”, lipid-membrane 結合活性を示す”C2 domain”, PTEN のタンパク質安定化に寄与するC末端領域”C-tail”, そしてPDZドメインを持つタンパク質と相互作用する”PDZ-binding domain”(PDZ-BD)である^{3,4)}. 最も研究が進んでいる canonical PTEN の他にも, 同じ転写産物から異なる翻訳開始点を持つアイソフォームが知られている. Canonical PTEN より, N末側に173アミノ酸長い”PTEN α ” (PTEN-Long)⁵⁾, 146アミノ酸長いPTEN β ⁶⁾, そして72アミノ酸長いPTEN ϵ ⁷⁾の存在が確認されている. 興味深いことに, canonical PTEN はAUGを翻訳開始点としているのに対し, PTEN α , PTEN β , そしてPTEN ϵ はそれぞれ, CUG, AUU, CUGから翻訳が開始される. このように非AUG翻訳開始点から合成されたタンパク質であるため, canonical PTEN よりも細胞内の発現レベルは極めて低い. また, 分解も受けやすいなど不安定なタンパク質であることも知られているが, そのPTENアイソフォーム群の機能は近年注目されつつある. PTEN α のN末端にはシグナルペプチドの存在が予測されており, 実際発現させたPTEN α は細胞外に分泌されていることが示されている⁵⁾. 分泌されたPTEN α はエクソソーム内に包含され, 近隣の細胞へと輸送された後, 取り込まれる. そのPTEN α を取り込んだ細胞は, Aktシグナルを抑制するなど, PTENはエクソソームを介した「ホルモン」のような働きをされると考えられている. また, PTEN α はcanonical PTENとの相互作用を介して, ミトコンドリアのエネルギー産生を制御しているとの報告もある⁸⁾. PTEN β は, PTEN α が持つシグナルペプチ

ドは含有していないが, N末端領域に核局在化シグナル(NLS)を含んでいるため, 核内に局在する⁶⁾. PTEN β は核内にてnucleolinという分子と相互作用し, リボソームDNAの転写調節を行うことで細胞増殖を制御する. PTEN ϵ は, 細胞骨格を制御する分子群を脱リン酸化することで, フィロポディアと呼ばれる形質膜の伸展した構造体の形成を制御し, がん細胞の悪性化の抑制に寄与している⁷⁾. このように, canonical PTEN以外のアイソフォームの機能に関して幾つか報告されてきているが, まだ発展途上段階であり, 今後の研究進展によりさらなる機能の解明が期待される.

3. PTENの遺伝子変異

PTENの遺伝子変異は, 生殖細胞系列の病的バリエーションを原因とする常染色体優性遺伝性の希少疾患のCowden症候群(Cowden syndrome)で見つかっている⁹⁾. 皮膚, 粘膜, 消化管, 乳腺, 甲状腺, 中枢神経, 泌尿生殖器などに良性の過誤腫性病変が多発する疾患である. その疾患で見出された有名なPTEN変異(C124S)は, リン脂質・タンパク質双方に対するホスファターゼ活性を欠失しており, 基礎実験でも活性欠失変異体として汎用されている. また, 同疾患で認められたG129E変異は, リン脂質に対する活性は失っているが, タンパク質ホスファターゼ活性は保持している(図1).

前述した通り, PTENの遺伝子変異は多くのがん患者から見出されている¹⁰⁾. その変異の多くは, Phosphataseドメインに集中している(図2). そのドメインで認められる変異は, C124S, G129E, Y138L, そしてR130Gが主であり, いずれの変異も酵素活性が欠失する. R130G

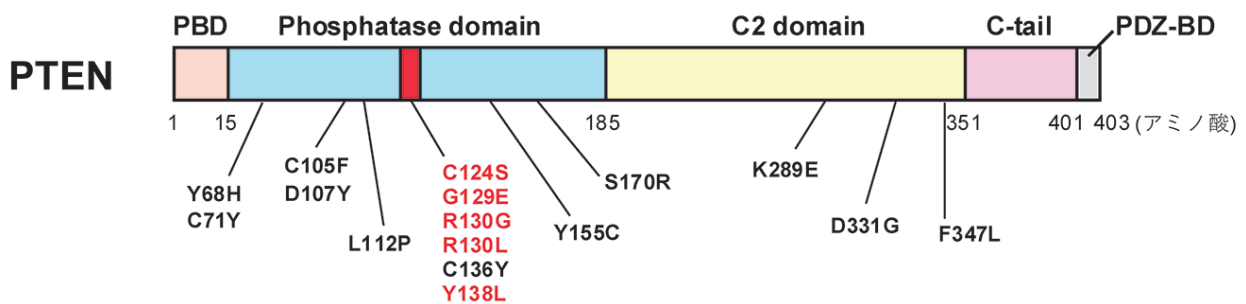


図2. 患者で発見されているPTENの変異

ホスファターゼ活性が低下する変異体を抜粋した. 赤文字は活性が完全に消失する変異体を示す.

は、C124S 同様リン脂質・タンパク質両方への活性が欠損している。一方で、Y138L はタンパク質ホスファターゼ活性を欠失しているが、リン脂質に対する活性は残っている興味深い変異である。がん患者で最も変異が認められているアミノ酸は、R130 (*PTEN* 遺伝子変異の約 11%) である。R130 の変異を含めた R233 及び R235 は、*PTEN* 遺伝子のエクソン 5 に局在しており、これらはがん患者で遺伝子変異が集中している、いわゆる "hotspot" として有名である。図 2 には、カウデン症候群や各種がんでは認められた遺伝子変異のうち、ホスファターゼ活性に影響を与えるものを抜粋した。また表 1 には、*PTEN* 遺伝子変異が多発する前立腺がんでは認められる *PTEN* 遺伝子変異の一覧をのせた。この表や図を見ると、*PTEN* は数多くの変異が発見されているのがわかる。これら変異体において、ホスファターゼ活性や細胞内機能を詳細にかつ網羅的に解析を行うことで、未だ理解

されていない *PTEN* 機能の全貌解明に一歩近づくかもしれない。

4. *PTEN* とイノシトールリン脂質

イノシトールリン脂質は、極性基にイノシトールを持つ生体膜リン脂質の総称である。イノシトールの 3,4,5 位の水酸基がリン酸化されることで、計 7 種類の位置異性体が生成する¹¹⁾。*PTEN* は PI(3,4,5)P₃ の 3 位の脱リン酸化活性を示す (図 3)¹²⁾。この作用により Akt シグナルを活性化する PI(3,4,5)P₃ レベルを減少させ、細胞の生存や増殖を抑制している。この PI(3,4,5)P₃ へのホスファターゼ活性は、*PTEN* α / β / ε いずれのアイソフォームにも保存されている。よって、細胞内局在が異なる各 *PTEN* アイソフォームは、それぞれの場所にて PI(3,4,5)P₃ レベルを制御することで、様々な細胞機能を調節していることが想定される。

また一方、canonical *PTEN* は PI(3,4,5)P₃ だけでなく、ホスファチジルイノシトール 3,4- ニリン酸 (PI(3,4)P₂) に対してもホスファターゼ活性を示すことが知られている (図 3)¹³⁾。この活性は、INPP4A/B といった PI(3,4)P₂ の 4 位のホスファターゼを欠損した場合に顕著である。*PTEN* の主な基質は PI(3,4,5)P₃ である

表 1. 前立腺がんでは認められた *PTEN* の遺伝子変異文献²⁵⁾ を参照にした。

変異場所	変異による影響
G20stop	ナンセンス変異
T38G	活性低下
E91Q	活性低下
H118Y	活性低下
I101A	ミスセンス変異
I135V	ミスセンス変異
Q150G	ミスセンス変異
Q110stop	ナンセンス変異
A164stop	ナンセンス変異
D223N	ミスセンス変異
E201stop	ナンセンス変異
D326N	活性低下
H272Y	ミスセンス変異
T348I	ミスセンス変異
K344R	ミスセンス変異
T382S	ミスセンス変異

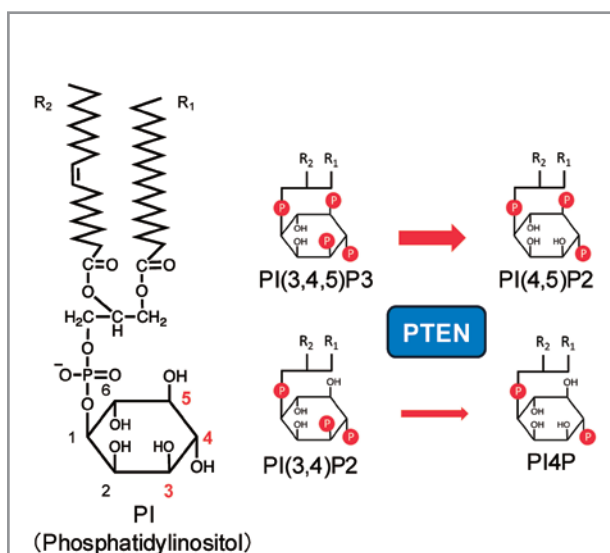


図 3. イノシトールリン脂質と *PTEN*
イノシトールリン脂質は 2 つの脂肪酸 (R₁, R₂) と、極性基にイノシトールを持つ。イノシトールの 3,4,5 位の水酸基は可逆的にリン酸化される。3 位のホスファターゼである *PTEN* は主に PI(3,4,5)P₃ を脱リン酸化するが、特殊な条件では PI(3,4)P₂ も脱リン酸化する。

が、がんなどの疾患においてPI(3,4)P2 レベルが上昇した場合に限り、INPP4A/B に対応しきれないPI(3,4)P2 をPTENは減少させる役割を持っているのだろう。しかしながら、同じイノシトールリン脂質で、イノシトールの3位にリン酸基のあるホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸 (PI(3,5)P2) やホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) には、ほとんどホスファターゼ活性は示さないことが知られている。このことから、PTENはイノシトール3,4位両方にリン酸基をもつイノシトールリン脂質にのみ、ホスファターゼ活性を示す性質を持っていると言える。

5. タンパク質の脱リン酸化活性としてのPTEN

以上のようにPTENは、リン脂質のホスファターゼ活性により、がんに関連のあるリン脂質PI(3,4,5)P3 レベルを抑制することから、この酵素活性に多くの研究者は注目している。一方で、PTENは多岐にわたるリン酸化タンパク質に対しても活性を示す²⁾。しかも、セリン・スレオニン・チロシン全てのリン酸化アミノ酸への活性が報告されている。現在までに報告されているリン酸化タンパク質(基質)に関して、表2にまとめた。

基質	脱リン酸化部位	局在
Abi1	Tyr213	形質膜 / アクチン
Cofilin-1	Ser3	形質膜 / アクチン
CREB	Ser133	核
Drebrin	Ser647	形質膜 / アクチン
Dvl	Ser143	細胞質
FAK	Tyr397	形質膜 / アクチン
IRS1	Tyr612	形質膜 / 細胞質
NKX3.1	Ser185	核
PLK1	Thr210	中心体 / 細胞質
Pol II	Ser5	核
PTEN	Thr383	細胞質 / 核
Shc	Tyr239/240	細胞質
Src	Tyr416	細胞質

Abl-interactor 1 (Abi1) は、アクチン骨格制御に重要な WAVE 2 と相互作用し、アクチン重合を促進する¹⁴⁾。PTENは、Abi1のTyr213とTyr216を脱リン酸化し、上皮形態形成を制御することが知られている¹⁵⁾。PTENは、Focal adhesion kinase (FAK) および Src homology collagen (Shc) のリン酸化チロシンを脱リン酸化することが報告されている¹⁵⁾。FAKは細胞膜を介した接着や運動、ShcはMAPKシグナルを調節するタンパク質である。また、アクチン重合の重要な因子Cofilin-1もPTENによりSer3が脱リン酸化され、活性の制御を受ける¹⁶⁾。その他にもPTENは、形質膜やアクチン骨格に局在するタンパク質の活性制御を担っていることが知られている。このようにPTENは、形質膜近傍に局在する多くのタンパク質やリン脂質の制御を担っている極めて重要な酵素と言える。

PTENは核内での機能も幾つか報告されている。転写因子であるCREBは、Ser133のリン酸化により活性化し、細胞増殖や生存に関わる遺伝子発現を促進する。PTENが欠損しているとCREBのSer133リン酸化レベルが亢進することから、PTENはCREBを脱リン酸化し、これら遺伝子発現の制御に関わっていることが示唆されている¹⁷⁾。転写装置であるRNAポリメラーゼII (Pol II) にもPTENが作用することが報告されている。Pol IIのC末端ドメインは、転写産物の伸長や終結などに重要な働きを持つ。この機能を調節しているのが、C末端ドメインのリン酸化 (Ser5) である。PTENはこのSer5の脱リン酸化を行い、mRNAの転写発現を制御していると考えられている¹⁸⁾。また前述したが、核内に局在するPTENβは、リボソームDNAの転写調節を行っている⁶⁾。このような核内でのPTENの機能については、canonical PTENの作用というより、PTENβの貢献の方が大きいのかもしれない。

6. PTEN の post-translational regulation

PTENはそれ自身様々な修飾を受けることが知られており、PTENの酵素活性やタンパク質の安定化などに寄与する^{19,20)}。CK2, GSK3β, LKB1などがPTENのSer380, Thr382, Thr383をリン酸化することで、PTENのホスファターゼ活性を抑制することが知られている。一方で、PTENは自身を脱リン酸化す

ることも知られており、PTENは酵素活性を自分自身で調節可能なユニークなホスファターゼと言える。

PTENはリジン残基(Lys13, Lys289)を持っており、ユビキチン化を受ける。NEDD4-1は最初に同定されたPTENに対するE3ユビキチンリガーゼである²¹⁾。NEDD4-1はPTENをユビキチン化し、PTENの分解を促進する。実際に、NEDD4-1を発現抑制すると、PTENのタンパク質レベルは上昇し、それに伴いがん細胞の増殖は抑制されている。NEDD4-1も含めたPTEN特異的なユビキチンリガーゼは、抗がん剤開発の新規標的になり得ると強く期待されている。

ヒストンアセチル基転移酵素であるPCAFは、PTENのLys125/128をアセチル化する²²⁾。アセチル化PTENは、ホスファターゼ活性が野生型の約半分にまで減少することが示されている。このアセチル化はPTENの基質(PI(3,4,5)P3)への親和性を減弱させると考えられているが、その詳細な分子機構はまだ解明されていない。

PTENは活性中心にシステイン(Cys124)を持っており、このアミノ酸は過酸化水素などの酸化ストレスにより酸化され、酵素活性が阻害される²³⁾。Cys124とCys71のSH基同士が連結(ジスルフィド結合)し、活性に必須な基質と相互作用する“ポケット”が消失することで、ホスファターゼ活性が失われる。実際に、高濃度の過酸化水素を細胞に添加するとPI(3,4,5)P3レベルの著しい蓄積は、筆者の手によっても観察されている。このPTENのジスルフィド結合は、NOXなどから生成される低いレベルの過酸化水素によっても起きると考えられている。PTENは還元酵素であるチオレドキシシンやペルオキシレドキシシンと相互作用しており、PTENが酸化されても、これらの酵素により常時還元を受け、PTENのホメオスタシスは保たれている。PTENは生体内での発現レベルが高く、非常に重要な機能を持つタンパク質であるため、このような防御システムが必要なのであろう。

7. まとめ

PTENは様々な変異が起き、酵素活性やタンパク質の安定化などへの影響を介し、がんなどの病態発症に関係している。本総説では、PTENの構造、アイソフォーム、遺伝子変異、活性調節機構に絞って概説したが、

スペースの関係で説明できなかった項目も多々ある。PTENの欠損はがんだけでなく、老化を誘導することも知られている²⁴⁾。細胞増殖亢進(がん)と細胞分裂抑制(老化)と、一見相反する現象であるが、PTENは細胞内のミクロな世界で、我々がまだ見知らぬ様々な機能を発揮しているのかもしれない。遺伝子編集技術や質量分析技術は、今後益々発展していくと思われ、これら技術によりPTENのさらなる生体内機能解明に繋がることだろう。

References

1. Akbani, R. *et al.* Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**, 1681–1696 (2015).
2. Liu, A., Zhu, Y., Chen, W., Merlino, G. & Yu, Y. PTEN Dual Lipid- and Protein-Phosphatase Function in Tumor Progression. *Cancers (Basel)*. **14**, 1–20 (2022).
3. Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 283–296 (2012).
4. Liu, J. *et al.* The regulation of PTEN: Novel insights into functions as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J. Cell. Physiol.* **238**, 1693–1715 (2023).
5. Hopkins, B. D. *et al.* A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* **341**, 399–402 (2013).
6. Liang, H. *et al.* PTEN β is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription. *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
7. Zhang, Q. *et al.* PTEN ϵ suppresses tumor metastasis through regulation of filopodia formation. *EMBO J.* **40**, 1–20 (2021).
8. Liang, H. *et al.* PTEN α , a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Metab.* **19**, 836–848 (2014).
9. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic

- development and tumour suppression. *Nat. Genet.* **19**, 348–355 (1998).
10. Bonneau, D. & Longy, M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum. Mutat.* **16**, 109–122 (2000).
 11. Balla, T. Phosphoinositides: Tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev.* **93**, 1019–1137 (2013).
 12. Lee, Y. R., Chen, M. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 547–562 (2018).
 13. Malek, M. *et al.* PTEN Regulates PI(3,4)P2 Signaling Downstream of Class I PI3K. *Mol. Cell* **68**, 566–580.e10 (2017).
 14. Innocenti, M. *et al.* Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* **6**, 319–327 (2004).
 15. Gu, J. *et al.* Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J. Cell Biol.* **146**, 389–403 (1999).
 16. Serezani, C. H. *et al.* Host-pathogen interactions: PTEN directly activates the actin depolymerization factor cofilin-1 during PGE2-mediated inhibition of phagocytosis of fungi. *Sci. Signal.* **5**, 1–10 (2012).
 17. Gu, T. *et al.* CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res.* **71**, 2821–2825 (2011).
 18. Abbas, A., Romigh, T. & Eng, C. PTEN interacts with RNA polymerase II to dephosphorylate polymerase II C-terminal domain. *Oncotarget* **10**, 4951–4959 (2019).
 19. Xu, W., Yang, Z., Zhou, S. F. & Lu, N. Posttranslational regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and its functional impact on cancer behaviors. *Drug Des. Devel. Ther.* **8**, 1745–1751 (2014).
 20. Li, X., Yang, P., Hou, X. & Ji, S. Post-Translational Modification of PTEN Protein: Quantity and Activity. *Oncol. Rev.* **18**, 1–8 (2024).
 21. Wang, X. *et al.* NEDD4-1 Is a Proto-Oncogenic Ubiquitin Ligase for PTEN. *Cell* **128**, 129–139 (2007).
 22. Okumura, K. *et al.* PCAF modulates PTEN activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 26562–26568 (2006).
 23. Zhang, Y. *et al.* Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. *Redox Biol.* **34**, 101553 (2020).
 24. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725–730 (2005).
 25. Phin, S., Moore, M. W. & Cotter, P. D. Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer. *Front. Oncol.* **3 SEP**, 1–9 (2013).

総 説

アルツハイマー病に係るプロテアーゼ概論

渡 部 博 貴

1. はじめに

認知症患者の大部分を占めるアルツハイマー病 (AD) は記憶障害が主な症状であり、特徴的な神経病理像として、老人斑、神経原線維変化、神経細胞死が認められる初老期発症の神経変性疾患である。老人斑は発症の数十年前から脳実質に蓄積し始め、その主成分はアミロイド β ペプチド ($A\beta$) と呼ばれる 40 アミノ酸前後のペプチドである。1990 年代に常染色体優性遺伝を示す家族性 AD 家系で、浸透率がほぼ 100% の 3 つの原因遺伝子 *Amyloid precursor protein (APP)*, *Presenilin 1* および *Presenilin 2 (PS1, PS2)* に変異が同定されたことで、疾患の分子的理解が飛躍的に進んだ¹⁻³⁾。本総説では、筆者らの研究成果を含め、 $A\beta$ 産生に係る酵素について概説したい。

2. $A\beta$ 産生に関わる酵素群

家族性 AD 家系で同定されている 3 つの原因遺伝子は、 $A\beta$ の前駆体タンパク質 (APP) とそれを切り出す酵素 (PS1, PS2) をそれぞれコードしている。 β -セクレターゼと γ -セクレターゼと命名されたプロテアーゼが段階的に APP の $A\beta$ 配列の N 末および C 末側をそれぞれ切断することで、その膜貫通領域を含む 38 ~ 43 アミノ酸長の異なる長さで $A\beta$ が産生される (図 1)。家族性 AD の原因遺伝子変異によって、神経毒性が高いとされる $A\beta$ 42 の産生比率が上昇する。一方、 α -セクレターゼが最初の切断を担う場合、APP は $A\beta$ 産生を伴わない非アミロイド経路で代謝される (図 1)。いずれの場合においても、 γ -セクレターゼは基質として膜に係留された C 末断片領域 (CTF α また

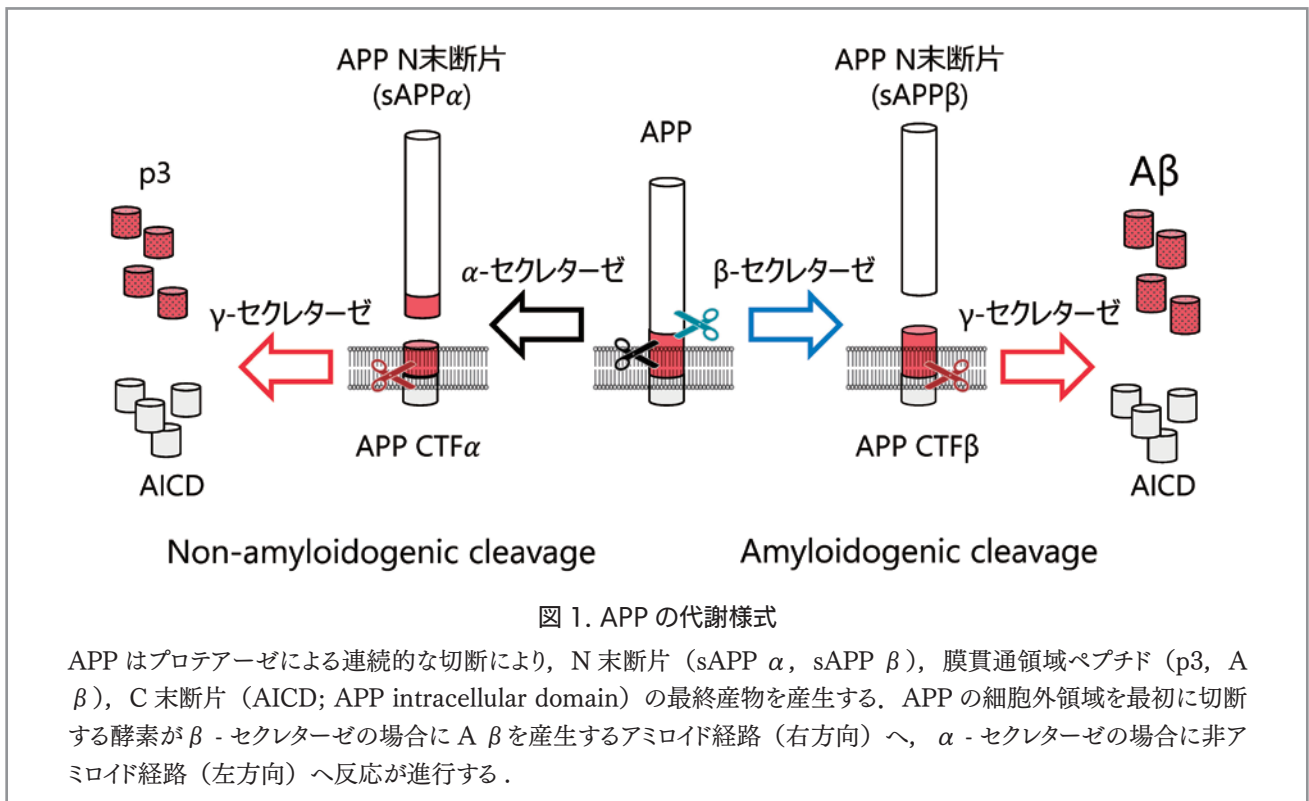


図 1. APP の代謝様式

APP はプロテアーゼによる連続的な切断により、N 末断片 (sAPP α , sAPP β)、膜貫通領域ペプチド (p3, $A\beta$)、C 末断片 (AICD; APP intracellular domain) の最終産物を産生する。APP の細胞外領域を最初に切断する酵素が β -セクレターゼの場合に $A\beta$ を産生するアミロイド経路 (右方向) へ、 α -セクレターゼの場合に非アミロイド経路 (左方向) へ反応が進行する。

はCTF β)しか認識しないため、 γ -セクレターゼの作用にはAPPタンパク質の細胞外領域のシェディングは必要不可欠である。

2-1. β -セクレターゼ

APPタンパク質内A β 配列のN末側を切断する酵素は β -セクレターゼと呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼであり、1999年にその酵素実体は β -site APP converting enzyme 1 (BACE1, または別名 memapsin 2) であることが報告された^{4,6)}。ヒトのBACE1は501アミノ酸長の膜貫通タンパク質であり、2つの活性中心によって(Asp93, Asp289), APPやneuregulin-1を含む多くのI型膜タンパク質の細胞外膜近傍をシェディングする。これらの基質の切断箇所には法則性はないため、他の多くのBACE1基質候補のタンパク質は先入観のないプロテオミクスによって同定されている^{7,8)}。BACE1のアスパラギン酸プロテアーゼ活性はやや酸性側を至適pHとしているため、その細胞内での作用箇所はエンドソーム膜上である。多くの基質を標的にすることから分かるように、BACE1の脳神経内での生理的作用は、神経軸索の伸長、神経系細胞の分化、およびシナプス可塑性など多岐にわたっている。

BACE1によるAPP切断はA β 産生の律速段階であることから、AD治療薬候補としてBACE1阻害剤は有望であると考えられたが、重篤な副作用のために臨床試験の段階で中止されている⁹⁾。

2-2. γ -セクレターゼ

γ -セクレターゼは、その酵素学的特性からアスパラギン酸プロテアーゼであることが推定され、その後、家族性ADの原因遺伝子産物であるPS1およびPS2がその活性中心(PS1ではAsp257とAsp385, PS2ではAsp263とAsp366の2箇所)を持つことが証明された^{10,11)}。ヒトのPS1およびPS2タンパク質(PS)は、それぞれ467と448アミノ酸の9回膜貫通型の膜タンパク質であり、150~250 kDの分子量を示す γ -セクレターゼ複合体の相互排他的な触媒サブユニットである。PSタンパク質以外に、 γ -セクレターゼ複合体にはNicastrin, Aph-1, Pen-2が必須サブユニットとして構成することで γ -セクレターゼ活性を示す^{12,13)}。PS/ γ -セクレターゼは、

APP C末断片領域(CTF)の膜貫通領域内で最初の切断(ϵ 切断)を行った後、さらにN末側に向かって数アミノ酸ずつ連続的にトリミング(γ 切断)する特徴を持つアスパラギン酸プロテアーゼである^{14,15)}。PS/ γ -セクレターゼの最終的な切断箇所によってA β のC末端アミノ酸が決定するため、異なるアミノ酸長のA β が神経細胞内で産生されうるが、実際には40アミノ酸長のA β 40と42アミノ酸長のA β 42がA β の大部分を占めている¹⁵⁾。APP以外にもPS/ γ -セクレターゼは多くのI型膜タンパク質を基質とするが¹⁶⁾、その切断箇所には法則性はないため、先入観のないプロテオミクスによって基質候補の同定が試みられている¹⁷⁻¹⁹⁾。PS/ γ -セクレターゼのように脂質二重膜内の疎水性環境下で基質タンパク質を切断する酵素群は膜内切断プロテアーゼ(I-CLiP)と総称されており、アスパラギン酸プロテアーゼでは他にシグナルペプチドペプチダーゼ(SPP)やSPP様プロテアーゼが存在する²⁰⁾。

初期の分子生物学的な研究から、より凝集しやすい生化学的性質を持つA β 42量の相対的增加と、それに引き続く老人斑としての脳実質への沈着が、その後のADの病的経路を活性化するという“アミロイド仮説”が提唱されている²¹⁾。この仮説に基づき、家族性ADにおけるPS遺伝子変異は、より毒性の高いA β 42の相対増加を促す機能獲得型変異であると広く考えられている。現在までに300以上のPS遺伝子変異が報告されており(<http://www.alzforum.org/mutations>)、実際に多くのPS変異ではA β 42の相対増加が認められている。図1に示すように、PS/ γ -セクレターゼによる切断過程はA β 産生における最終ステップであることから、 γ -セクレターゼ阻害剤はAD治療薬候補として有望であったが、重篤な副作用のために臨床試験の段階で中止されている²²⁾。一方、現在は γ -セクレターゼの重要な生理機能を残しつつ、神経毒性を持つA β 種のみを抑制する γ -セクレターゼ調節薬の開発が進められている²²⁾。

2-3. α -セクレターゼ

APPを非アミロイド経路へ代謝する際には、その最初の切断は α -セクレターゼによって担われる(図1)。

脳組織内における α -セクレターゼの分子本体は A disintegrin and metalloprotease (ADAM) メタロプロテアーゼファミリーのひとつである ADAM10 と報告されている^{23,24}。さらに, ADAM10 のレアバリエント (Gln170His または Arg181Gly) は孤発性 AD の遺伝性危険因子として同定されている²⁵。このレアバリエントは α -セクレターゼ活性を障害することで, APP の代謝を非アミロイド経路からアミロイド経路へ変えることが報告されている²⁵。

3. PS/ γ -セクレターゼの生理および病態生理機能

生体における *PS1* および *PS2* 遺伝子の機能を検討するため, 多くのマウスモデルやヒト細胞モデルが作製されてきた。以降では, A β 産生に重要な役割を担う PS/ γ -セクレターゼの生理機能および病態生理機能を精査した一連の研究を概説したい。

3-1. *PS* 遺伝子改変マウスの表現型

生体における *PS1* および *PS2* 遺伝子の機能を検討するため, 1990 年代にノックアウト (KO) マウスが作製された。*PS1* 遺伝子の KO は周産期致死となる一方^{26, 27}, *PS2* 遺

伝子の KO マウスは個体レベルで明らかな表現型はみられなかった²⁸。しかし, *PS1* と *PS2* の両遺伝子を KO すると胎生致死となることから²⁹, お互いに一部の機能を補填していることが考えられた。以上のように, *PS1* 遺伝子の KO マウスは周産期致死であるため, AD 患者発症時に相当する週齢における脳神経の機能解析は難しい状況であった。筆者らは, Cre/loxP 技術を用いて遺伝的に *PS* 発現を神経細胞でのみ欠損させた *PS* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製したところ, 進行性の神経細胞死と記憶障害を認めた (図 2)^{30,31}。これらの結果から, *PS* は神経細胞の生存や記憶・学習に重要であることが明らかになっている。

同様に, *PS* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製も行われた³²。野生型 *PS* 遺伝子に比べ家族性 AD 家系で同定された変異型の *PS* 遺伝子を発現させた場合, 毒性の高い A β 42 産生の相対的亢進が報告されたが, いずれのトランスジェニックマウスでも老人斑の形成はみられていない。また, 外来遺伝子の過剰発現やゲノムへの挿入部位効果等を排除するため, *PS1* 遺伝子変異のノックインマウスも作製されたが, *APP* 遺伝子変異を同時に導入しなければ老人斑の出現

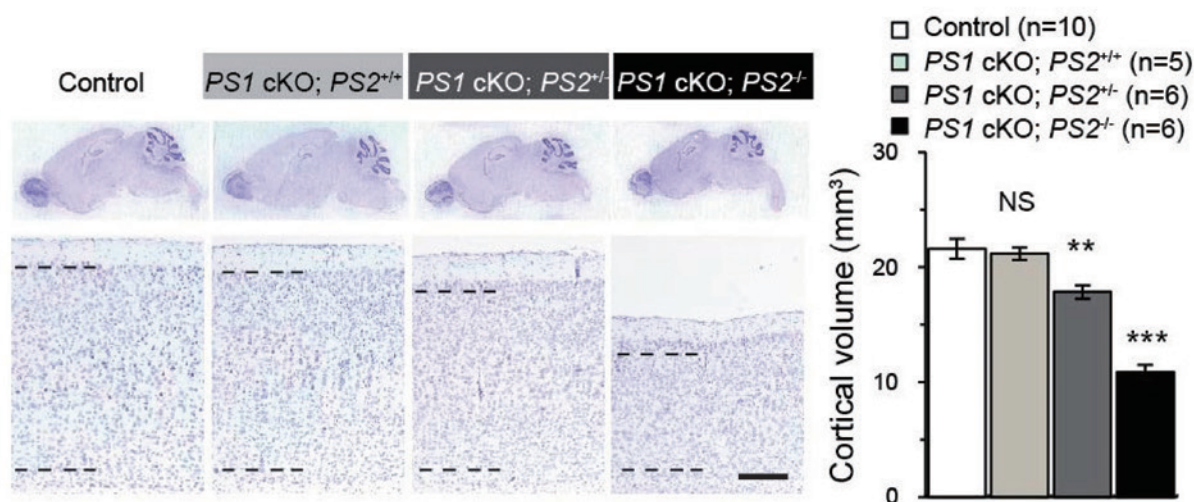


図 2. *Presenilin* 遺伝子のノックアウトによる神経変性

floxed PS1 マウスと *CaMK2-Cre* トランスジェニックマウスを掛け合わせた *PS1* conditional knockout (cKO) マウスを遺伝的背景に, *PS2* 遺伝子量の効果を 16 ヶ月齢のマウス脳で検証した。*PS2* 遺伝子を完全に KO した場合は顕著な大脳皮質の変性が起こり (黒色), 1 コピーの *PS2* 遺伝子で神経変性が部分的に回復 (灰色), 2 コピーの *PS2* 遺伝子で完全にレスキューされる (薄茶)。参考文献 31 から改変。Scale bar, 200 μ m. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

は観察されなかった³³⁾。筆者らも *PS1* 変異を持つ複数の *PS1* ノックインマウスを作製したところ、*PS1* 遺伝子変異が脳組織内 γ -セクレターゼ活性低下と記憶・学習障害を引き起こすことを示した^{34, 35)}。これらの *PS* 遺伝子改変マウスを用いた研究から、*PS* 変異は $A\beta$ 病理に関与するだけでなく、*PS/\gamma*-セクレターゼ活性の部分的機能障害によって *AD* 病態に深く関わることを示唆された³⁶⁾。

3-2. *PS* 遺伝子改変ヒト細胞の表現型

AD 患者では *APP* 変異よりも *PS1* 変異での発症年齢が早いにもかかわらず³⁷⁾、*PS1* 変異のみを持つモデルマウスでは老人斑形成はみられない³²⁾。この点において、ヒト神経細胞を用いた検証が必要であった。近年のヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) 技術によって、ヒト神経細胞における生理機能や病態生理機能解析が可能となった。筆者らは、*PS* 遺伝子のヒト神経細胞での生理的機能を検討するため、CRISPR/Cas9 を用いて、健常人由来ヒト iPSC から *PS* cKO iPSC を作製した³⁸⁾。この iPSC から *PS1* または *PS2* 遺伝子を欠失するヒト神経細胞を

作出することによって、*PS1/\gamma*-セクレターゼまたは *PS2/\gamma*-セクレターゼの切断様式が基質ごとに特異性を持つことを明らかにした (図 3)³⁸⁾。さらに、家族性 *AD* 患者由来 iPSC を用いて、*PS* 遺伝子変異を持つヒト神経細胞では $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40 比の有意な上昇を見出した³⁹⁾。重要なことに、*PS* 遺伝子変異を発現するモデルマウス脳では老人斑が現れない一方、*PS* 遺伝子変異を持つ家族性 *AD* 患者由来 iPSC から作製した脳オルガノイドでは老人斑様の病理像が再現されている^{40, 41)}。これらの知見から、*PS/\gamma*-セクレターゼに相互作用するタンパク質や細胞内環境のヒトとマウスでの違いが想定され、*PS* 遺伝子変異による *AD* 患者病理像の表出には、ヒト特異的な何らかの要因が重要であると示唆された。

4. *PS/\gamma*-セクレターゼ基質の生理機能

PS/\gamma-セクレターゼは、多くの I 型膜タンパク質の細胞膜内切断を行うことで、様々な細胞機能を担っている¹⁶⁾。著者らは *PS/\gamma*-セクレターゼの代表的な基質である *APP* ファミリーおよび *Notch* ファミリー遺伝子の成体前脳の興奮性神経細胞特異的 cKO マウスの作

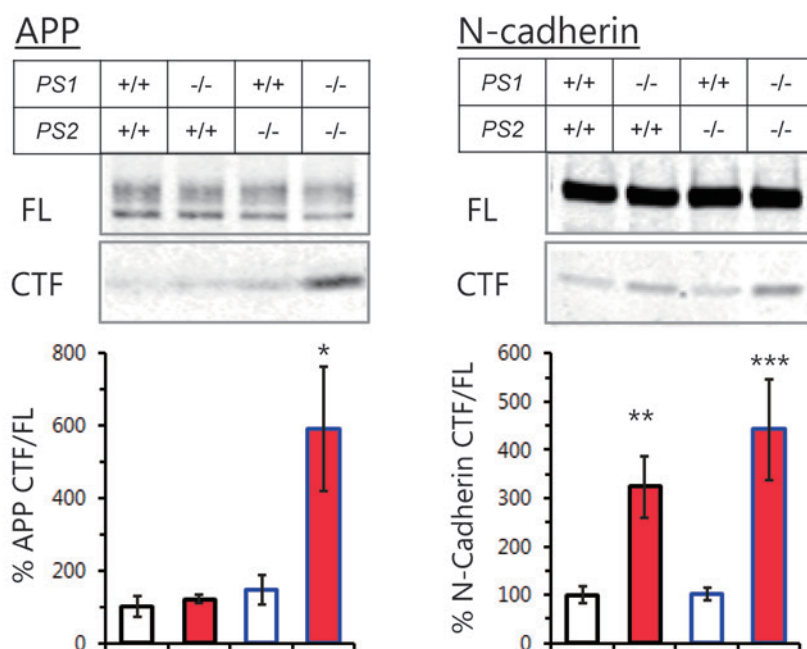


図 3. *PS/\gamma*-セクレターゼによる基質切断のサブユニット特異性

PS1 または *PS2* 遺伝子を KO したヒト大脳皮質神経細胞において、*PS/\gamma*-セクレターゼの 2 つの基質の切断効率をそれぞれの C 末側を認識する抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。*PS/\gamma*-セクレターゼ 活性阻害による C 末側断片 (CTF) の蓄積を指標に、それぞれの遺伝子型のヒト神経細胞の *PS/\gamma*-セクレターゼ活性を評価した。参考文献 38 から改変。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

製・解析を行った。胎児期脳に比べ成体脳神経細胞での Notch ファミリー遺伝子 (*Notch1*, *Notch2*) の発現は極めて低く、成体脳神経細胞での KO による脳組織の形態的な影響はほとんどないことを示した⁴²⁾。このことから、胎児期脳における神経系細胞の発生制御に Notch シグナルが重要であることが再確認された。一方、*APP* ファミリー遺伝子 (*APP*, *APLP1*, *APLP2*) は成体の成熟神経細胞で高発現しており、神経細胞の興奮性を規定する M チャネル機能に関与することを明らかにした⁴³⁾、しかしながら、*APP* や Notch 以外の PS/ γ セクレターゼの基質の多くでは詳細な機能が明らかにされておらず、今後の研究が待たれる。

5. まとめ

高齢化社会に伴い、認知症に掛かる経済コストは年々膨れ上がっており、癌・心疾患・脳卒中のそれをはるかに凌駕する数字となっている。しかし、これまでの治療法は対症療法が主流であったため、発症機序に基づく根本治療法が喫緊の課題である。A β 産生に係る酵素は創薬標的として期待されていたが、限定した効果や重篤な副作用のため、現在は A β を取り除く抗体療法に開発の主軸が移っている。実際に、抗 A β 抗体は実用化され、多くの患者に投与され始めている現状である。しかし、本総説で概説したように、A β 産生に係る PS/ γ -セクレターゼは、その作用機序や性質も含めて未知の部分も多い。これらの未解明の分子機序を解明する基礎研究から新たな創薬開発につながれば、AD 患者とその家族に福音をもたらす意味で社会的利益は非常に大きい。

参考文献

- 1) Levy-Lahad, E. *et al.*, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. **269**, 973–977 (1995)
- 2) Sherrington, R. *et al.*, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. **375**, 754–760 (1995)
- 3) Chartier-Harlin, M. C. *et al.*, Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at

- codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. **353**, 844–846 (1991)
- 4) Yan, R. *et al.*, Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*. **402**, 533–537 (1999)
- 5) Vassar, R. *et al.*, Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **286**, 735–741 (1999)
- 6) Sinha, S. *et al.*, Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*. **402**, 537–540 (1999)
- 7) Kuhn, P.-H. *et al.*, Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons: Proteomic identification of BACE1 substrates. *EMBO J.* **31**, 3157–3168 (2012)
- 8) Hemming, M. L. *et al.*, Identification of beta-secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS One*. **4**, e8477 (2009)
- 9) McDade, E. *et al.*, The case for low-level BACE1 inhibition for the prevention of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 703–714 (2021)
- 10) Wolfe, M. S. *et al.*, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. **398**, 513–517 (1999)
- 11) Li, Y. M. *et al.*, Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature*. **405**, 689–694 (2000)
- 12) Kimberly, W. T. *et al.*, Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6382–6387 (2003)
- 13) Takasugi, N. *et al.*, The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*. **422**, 438–441 (2003)
- 14) Takami, M. *et al.*, gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal

- fragment. *J. Neurosci.* **29**, 13042–13052 (2009)
- 15) Qi-Takahara, Y. *et al.*, Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci.* **25**, 436–445 (2005)
- 16) Haapasalo, A., Kovacs, D. M., The many substrates of presenilin/ γ -secretase. *J. Alzheimers. Dis.* **25**, 3–28 (2011)
- 17) Hemming, M. L. *et al.*, Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol.* **6**, e257 (2008)
- 18) Inoue, E. *et al.*, Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J. Cell Biol.* **185**, 551–564 (2009)
- 19) Hou, P. *et al.*, The γ -secretase substrate proteome and its role in cell signaling regulation. *Mol. Cell.* **83**, 4106–4122.e10 (2023)
- 20) Kühnle, N. *et al.*, Intramembrane proteolysis at a glance: from signalling to protein degradation. *J. Cell Sci.* **132**, jcs217745 (2019)
- 21) Hardy, J., Selkoe, D. J., The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* **297**, 353–356 (2002)
- 22) Wolfe, M. S., Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* **5**, 391–398 (2008)
- 23) Jorissen, E. *et al.*, The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* **30**, 4833–4844 (2010)
- 24) Kuhn, P.-H. *et al.*, ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032 (2010)
- 25) Suh, J. *et al.*, ADAM10 missense mutations potentiate β -amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron.* **80**, 385–401 (2013)
- 26) Shen, J. *et al.*, Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell.* **89**, 629–639 (1997)
- 27) Wong, P. C. *et al.*, Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature.* **387**, 288–292 (1997)
- 28) Steiner, H. *et al.*, A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673 (1999)
- 29) Donoviel, D. *et al.*, Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev.* **13**, 2801–2810 (1999)
- 30) Watanabe, H. *et al.*, Partial loss of presenilin impairs age-dependent neuronal survival in the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**, 15912–15922 (2014)
- 31) Saura, C. A. *et al.*, Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron.* **42**, 23–36 (2004)
- 32) Elder, G. A. *et al.*, Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* **214**, 127–143 (2010)
- 33) Saito, T. *et al.*, Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat. Neurosci.* **14**, 1023–1032 (2011)
- 34) Watanabe, H. *et al.*, Familial frontotemporal dementia-associated presenilin-1 c.548G>T mutation causes decreased mRNA expression and reduced presenilin function in knock-in mice. *J. Neurosci.* **32**, 5085–5096 (2012)
- 35) Xia, D. *et al.*, Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron.* **85**, 967–981 (2015)
- 36) Shen, J., Kelleher, R. J., 3rd, The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for

- a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 403–409 (2007)
- 37) Ryman, D. C. *et al.*, Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* **83**, 253–260 (2014)
- 38) Watanabe, H. *et al.*, Flexible and Accurate Substrate Processing with Distinct Presenilin/ γ -Secretases in Human Cortical Neurons. *eNeuro.* **8** (2021), doi:10.1523/ENEURO.0500-20.2021
- 39) Sho, M. *et al.*, A combinational treatment of carotenoids decreases A β secretion in human neurons via β -secretase inhibition. *Neurosci. Res.* **158**, 47–55 (2020)
- 40) Raja, W. K. *et al.*, Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer’s disease phenotypes. *PLoS One.* **11**, e0161969 (2016)
- 41) Shimada, H. *et al.*, A next-generation iPSC-derived forebrain organoid model of tauopathy with tau fibrils by AAV-mediated gene transfer. *Cell Rep. Methods.* **2**, 100289 (2022)
- 42) Zheng, J. *et al.*, Conditional deletion of Notch1 and Notch2 genes in excitatory neurons of postnatal forebrain does not cause neurodegeneration or reduction of Notch mRNAs and proteins. *J. Biol. Chem.* **287**, 20356–20368 (2012)
- 43) Lee, S. H. *et al.*, APP Family Regulates Neuronal Excitability and Synaptic Plasticity but Not Neuronal Survival. *Neuron.* **108**, 676-690.e8 (2020)

酵素情報

ヒトスフィンゴミエリン合成酵素ファミリーの新たな酵素活性 —長年分子実体が不明だったホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノール アミン特異的ホスホリパーゼCである可能性—

村上千明^{1,2}, Kamila Dilimulati², 角田(熱田)京子², 坂根郁夫²

はじめに

スフィンゴミエリン (SM) 合成酵素 (SMS) はホスファチジルコリン (PC) の極性頭部のホスホコリン (PCho) をセラミド (Cer) に転移する化学反応を触媒し, SM とジアシルグリセロール (DG) を産生する酵素である (図1) (酵素番号: EC 2.7.8.27). SMS は哺乳類で SM を合成する唯一の酵素であることから, 細胞および個体レベルにおける SM 代謝に注目した研究が多く, 多くの研究グループより報告されている. 最近, 我々の研究により, SMS が SM 合成活性以外にホスホリパーゼ C (PLC) 活性を有し, スフィンゴ脂質非依存的に DG を産生することが明らかとなってきた. 本稿では, SMS の有する新たな酵素活性に関して我々の研究を中心に紹介する.

哺乳類 SMS ファミリー

哺乳類 SMS は現在までに SMS1, SMS2, および SMSr (SMS-related protein) の3種の遺伝子が同定されている (表1). SMS 活性を示すのは SMS1 と SMS2 のみで, SMSr はホスファチジルエタノールアミン (PE) の極性頭部のホスホエタノールアミン (PEA) を Cer に転移しセラミドホスホエタノールアミン (CPE) を合成する酵素活性 (CPES) を有する (酵素番号: EC 2.7.8.48). SMS は6つの膜貫通ドメインを有する非常に疎水性の高いタンパク質であることから, 今までにタンパク質精製の報告例はなく, その酵素学的性質に不明点が多かった [1].

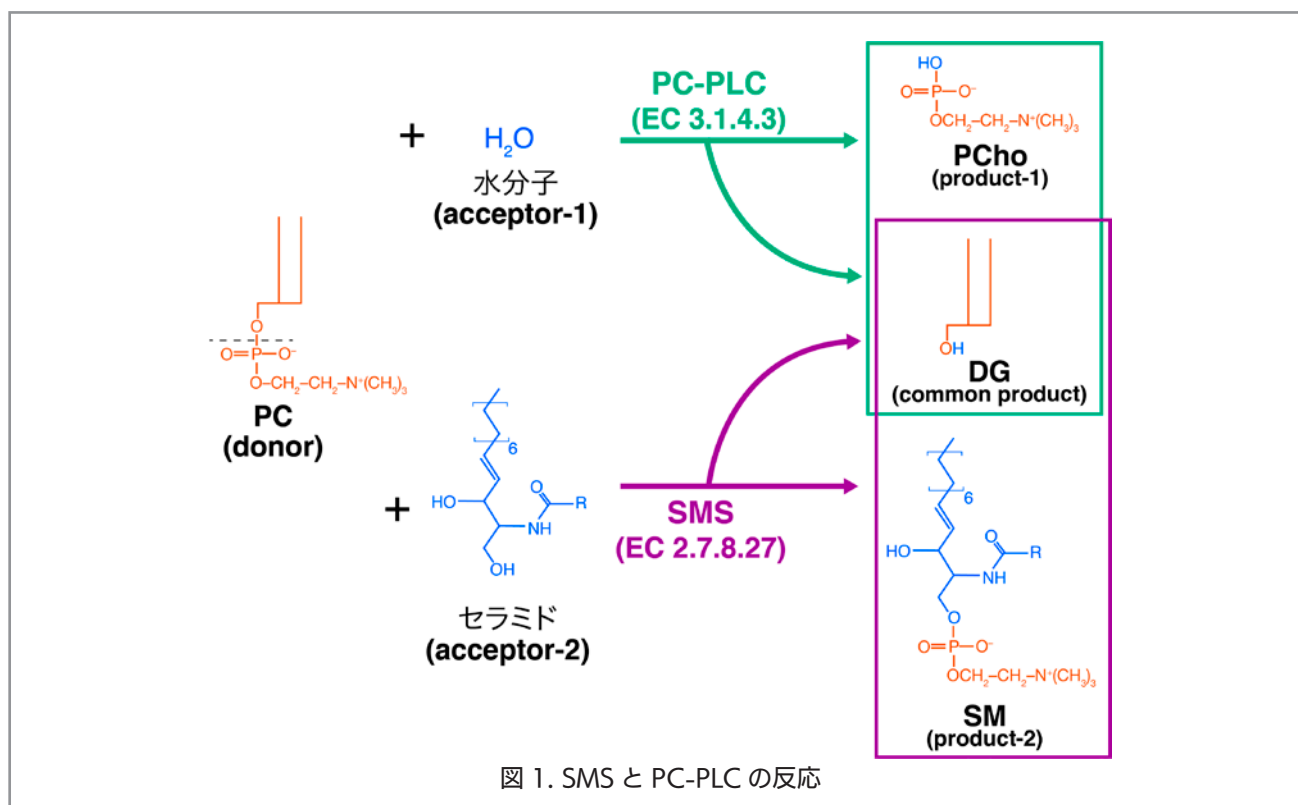


図1. SMS と PC-PLC の反応

1, 国立大学法人千葉大学 国際高等研究基幹 2, 国立大学法人 千葉大学 大学院理学研究院化学研究部門

哺乳類 PC-PLC と PE-PLC

PLC はグリセロリン脂質を加水分解し、DG を産生する酵素の総称である。哺乳類 PLC は現在までにホスファチジルイノシトール (PI) (4,5) ニリン酸 (PIP₂) 特異的 PLC (PIP₂-PLC) (酵素番号: EC 3.1.4.11) の

みクローニングされている。

PC 特異的 PLC (PC-PLC) (酵素番号: EC 3.1.4.3) は PC を基質とし DG を産生する (図 1)。バクテリアと植物の PC-PLC はクローニングされているが、哺乳類では活性発見後 70 年以上も分子実体 (遺伝子, タン

表 1. ヒト SMS ファミリー

Properties	SMS1	SMS2	SMSr
遺伝子名	SGMS1	SGMS2	SAMD8
Primary accession No. (UniProt)	Q86VZ5	Q8NHU3	Q96LT4
アミノ酸数	413	365	414
細胞内局在	ゴルジ体	形質膜, ゴルジ体	小胞体
酵素反応 (基質→生成物)	<p>SMS: Cer + PC→SM + DG</p> <p>CPES: Cer + PE→CPE + DG</p> <p>PC-PLC: PC + H₂O→DG + PCho</p> <p>PE-PLC: PE + H₂O→DG + PEA</p>	<p>SMS: Cer + PC→SM + DG</p> <p>CPES: Cer + PE→CPE + DG</p> <p>PC-PLC: PC + H₂O→DG + PCho</p> <p>PE-PLC: PE + H₂O→DG + PEA</p> <p>PG-PLC: PG+ H₂O → DG + glycerol-3-phosphate</p>	<p>CPES: Cer + PE→CPE + DG</p> <p>PC-PLC: PC + H₂O→DG + PCho</p> <p>PE-PLC: PE + H₂O→DG+PEA</p> <p>PAP: PA + H₂O→DG + phosphate</p> <p>PI-PLC: PI + H₂O → DG + inositol monophosphate</p> <p>PIP₂-PLC: PIP₂ + H₂O→DG + inositol trisphosphate</p> <p>PG-PLC: PG+ H₂O→DG + glycerol-3-phosphate</p>
Relative activity (最も高い活性を 100)	SMS (100) PC-PLC (36) CPES (23) PE-PLC (4)	SMS (100) PC-PLC (58) CPES (46) PE-PLC (7.5) PE-PLC (4)	PAP (100) PI-PLC (3.6) PE-PLC (1.2) PC-PLC (0.9) PG-PLC (0.4) CPES (0.3)
K _m 値 (mol%=ミセル中の基質となるリン脂質のモル分率)	<p>SMS activity (d18:1/18:0-Cer) 4.5 mol%</p> <p>PC-PLC activity (16:0/18:1-PC) > 30 mol%</p>	<p>SMS activity (d18:1/18:0-Cer) 11.2 mol%</p> <p>CPES activity (d18:1/18:0-Cer) 5.1 mol%</p> <p>PC-PLC activity (16:0/18:1-PC) > 50 mol%</p> <p>PE-PLC activity (16:0/18:1-PC) > 50 mol%</p>	<p>PAP activity (16:0/18:1-PA) 3.9 mol%</p> <p>PI-PLC activity (16:0/18:1-PI) 6.8 mol%</p>
Maximum rate of reaction (V _{max}) in mixed-micelle activity assay (pmol/mg/min)	<p>SMS activity (d18:1/18:0-Cer and 16:0/18:1-PC) SM production: 240 DG production: 288</p> <p>PC-PLC activity (16:0/18:1-PC) > 200</p>	<p>SMS activity (d18:1/18:0-Cer) SM production: 4,850 DG production: 3,910</p> <p>CPES activity (d18:1/18:0-Cer) DG production: 1,127</p> <p>PC-PLC activity (16:0/18:1-PC) >3,000</p> <p>PE-PLC activity (16:0/18:1-PC) >300</p>	<p>PAP activity (16:0/18:1-PA) 704</p> <p>PI-PLC activity (16:0/18:1-PI) 32</p>
脂肪酸側鎖に対する選択性	SFA/MUFA-containing PC	SFA/MUFA-containing PC SFA-containing PE	SFA/MUFA-containing PC SFA/MUFA-containing PA
DGK との相互作用	DGKζ	相互作用せず	DGKδ, DGKζ
主な参考文献	[4, 6]	[4, 7]	[3-5]

パク質)が不明であった。また, PE 特異的ホスホリパーゼC (PE-PLC) (酵素番号: EC 3.1.4.62) も哺乳類細胞で活性発見後 35 年以上分子実体が不明であった。哺乳類細胞の界面活性剤不溶性画分に PC-/PE-PLC 活性が強く検出されることから, 生体試料からの単離・精製(いわゆる「モノとり」)が困難である(膜タンパク質である)と考えられる。

哺乳類 PC-PLC の発見

我々は DG kinase (DGK) [2] の機能解析を行っていたところ, DGK δ isozyme (DGK δ) は飽和脂肪酸 (SFA) または一価不飽和脂肪酸 (MUFA) を含有する DG 分子種 (SFA/MUFA-DG) を選択的にリン酸化し, さらに, DGK δ 抗体の免疫沈降物中に PC-PLC 活性が検出された。すなわち, DGK δ は PC-PLC と相互作用することが示唆された。そこで, 我々は DGK δ の相互作用タンパク質中から PC-PLC の同定を試みた。特に DGK δ , SMS1, および SMSr にはタンパク質間相互作用モジュールの sterile α motif domain (SAMD) が保存されていることに注目し, SMS を DGK δ と相互作用する PC-PLC 候補として見出した。

全ての哺乳類 DGK isozyme (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , および κ) と SMS の相互作用を解析した結果, DGK δ と SMSr が SAMD を介してヘテロダイマーを形成することが明らかとなった [3]。興味深いことに, DGK ζ と SMSr および SMS1 の間でも相互作用が認められた [4]。

次に, 全ての SMS を高純度に精製し *in vitro* で酵素活性を評価した (表 1)。その結果, SMSr は CPES 活性に加え, PC や PE をはじめとする複数種のグリセロリン脂質 (ホスファチジン酸, PA; ホスファチジルイノシトール, PI; PI (4,5) ニリン酸, PIP₂; ホスファチジルグリセロール, PG) に対する PLC 活性 (multi-glycerophospholipid phospholipase C hydrolase, MG-PLC) を有することが明らかとなった [5]。また, SMS1 と SMS2 は SMS 活性に加え, CPES, PC-PLC, PE-PLC 活性を有することが明らかとなった [6, 7]。さらに, 全ての SMS isoform は SFA/MUFA-PC に対する選択性を示す事が明らかとなった。

今後の展望

SMS はセラミドを代謝する SMS 活性や CPES 活性に加え, PLC 活性を有し, SFA/MUFA-DG を選択的に産生することが明らかとなった。PIP₂-PLC は主に多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のアラキドン酸含有 DG を選択的に産生することから, SMS と PIP₂-PLC の産生する DG 分子種は異なる。さらに, SMS は SFA/MUFA-DG を選択的にリン酸化する DGK δ や DGK ζ [2] と相互作用することから, SMS が近接した DGK に SFA/MUFA-DG を供給し, PI 代謝回転 (PUFA-DG 代謝) とは独立した未知の SFA/MUFA-DG シグナル伝達経路を形成する可能性がある。

なお, 我々の一連の研究成果によって, 国際生化学分子生物学連合 (IUBMB) が管理する酵素番号 (The Enzyme Commission number) に 35 年ぶりに新タイプの PLC が登録された (EC3.1.4.62, 登録名: PE-PLC)。

参考文献

- 1) Taniguchi, M., et al.: Ceramide/Sphingomyelin Rheostat Regulated by Sphingomyelin Synthases and Chronic Diseases in Murine Models, *J. Lipid. Atheroscler.*, **9**, 380-405 (2020).
- 2) Sakane, F., et al.: Upstream and downstream pathways of diacylglycerol kinase : Novel phosphatidylinositol turnover-independent signal transduction pathways, *Advances in Biological Regulation*, **95**, 101054 (2025).
- 3) Murakami, C., et al.: Diacylglycerol kinase delta and sphingomyelin synthase-related protein functionally interact via their sterile alpha motif domains, *J. Biol. Chem.*, **295**, 2932-2947 (2020)
- 4) Furuta, M., et al.: Diacylglycerol kinase zeta interacts with sphingomyelin synthase 1 and sphingomyelin synthase-related protein via different regions, *FEBS Open Bio*, **13**, 1333-1345 (2023).
- 5) Murakami, C., et al.: Sphingomyelin synthase-related protein generates diacylglycerol via the hydrolysis of glycerophospholipids in the

absence of ceramide, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100454 (2021).

- 6) Suzuki, R., et al.: Human sphingomyelin synthase 1 generates diacylglycerol in the presence and absence of ceramide via multiple enzymatic activities, *FEBS Lett.*, **597**, 2672-2686 (2023).
- 7) Murakami, C., et al.: Multiple activities of sphingomyelin synthase 2 generate saturated fatty acid- and/or monounsaturated fatty acid-containing diacylglycerol, *J. Biol. Chem.*, **300**, 107960 (2024).

タンパク質合成に潜むリスク「難翻訳配列」とその合成を促進する翻訳因子群

茶 谷 悠 平

はじめに

細胞を形作る多種多様なタンパク質は、すべてリボソームによって合成される。経験則的に、リボソームは万能のタンパク質合成装置と考えられてきたが、実際には様々なアミノ酸配列の合成を苦手としていることが明らかになりつつある。これは合成途上の新生ペプチド鎖がリボソームトンネルを通過する際、トンネルと密な相互作用を形成して異常な歪みを生じさせ、ペプチド転移反応を阻害することなどに起因する(図1)。こうしたリボソームの弱点とも言える「難翻訳」アミノ酸配列は生物のゲノム配列に広く見出され、タンパク質の安定発現に対してのリスクとなり得る。一方で、このリスクを遺伝子発現制御にうまく取り入れた事例も報告されている。大腸菌 *secM* 遺伝子のポリペプチド発現産物は機能を持たないが、その合成中間体は翻訳の異常停止を誘導して同一 mRNA 上の別の遺伝子 (*secA*) の発

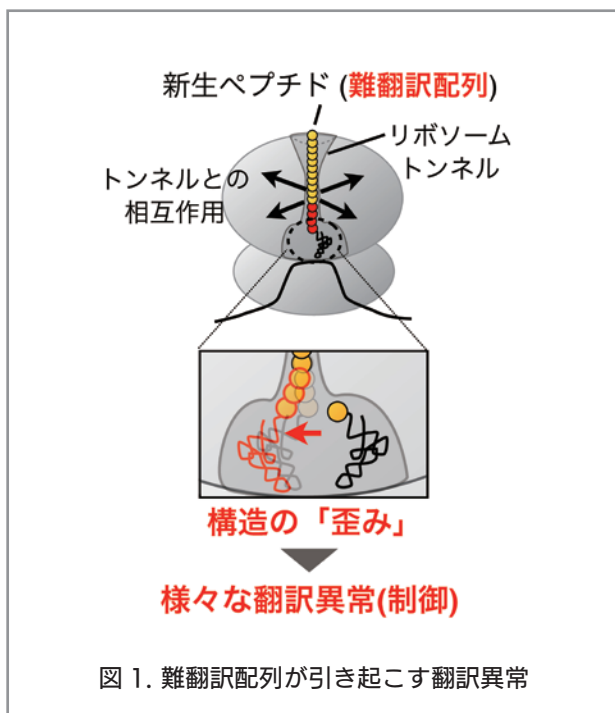
現を制御する、翻訳制御因子としての機能を持つ¹⁾。こうした翻訳途上でのみ機能する新たな「遺伝情報」の発見、さらにはクライオ電子顕微鏡やリボソームプロファイリング法²⁾に代表される近年の技術革新も合わさって、20世紀で一旦完了したと考えられていた「翻訳」研究は今一度の活況を見せつつある。

難翻訳配列への対抗手段

リボソームでのタンパク質合成を脅かす難翻訳配列として、これまでに1. プロリンが2~3残基以上連続したアミノ酸モチーフ、2. 正電荷アミノ酸に富んだ配列、3. 負電荷アミノ酸に富んだ配列などが同定されている。これらの配列は新生ペプチド鎖と連結したリボソーム内 tRNA の構造を歪ませる(図1)ことで翻訳異常を誘発すると考えられるが、生物はこれらに由来するリスクを野放しにしているのだろうか? 実際には、生物は様々な対抗手段を用いてこの問題に対処していることが、近年の研究から明らかとなりつつある。一つは EF-P (eIF5A) と呼ばれる翻訳因子で、これはリボソーム E-site から内部に作用し、構造の異常を抑制することが明らかにされている^{3,4)}。しかし EF-P はプロリン連続配列には作用する一方、他の難翻訳配列には作用しないため、他にも難翻訳配列に対処する因子の存在が推察されるものの、その詳細は明らかにされていなかった。

ABCF タンパク質

近年、グラム陽性細菌での研究から、ABCF (ATP Binding Cassette subfamily-F) と呼ばれるタンパク質ファミリーの一部が、EF-P 同様リボソーム E-site に作用し、リボソームを標的とする抗生物質の作用を緩和す



ることが報告された⁵⁾。これら薬剤耐性 ABCF はリンカーと呼ばれる構造モチーフをリボソーム内に挿入し、結合した薬剤を掻き出すことで細菌の薬剤耐性化に寄与する。ABCF タンパク質は、細菌からヒトなど真核生物に至るまで広く保存され、大腸菌には4種の ABCF タンパク質が見出される。そのうちの一種 EttA もリボソーム内部に作用することが構造解析から示されていたが、薬剤耐性 ABCF とはリンカーの長さに見られ、その機能の詳細は明らかにされていなかった⁶⁾ (図2)。残り三種の ABCF (Uup, YheS, YbiT) も EttA 同様短いリンカーを持つが、やはりどのような機能を持つかは未解明の状況にあった。

著者は ABCF タンパク質が EF-P 同様リボソーム E-site から内部に作用するならば、「難翻訳配列」によって引

き起こされた歪みを正し、翻訳異常を抑制する作用を持つのではないかと考えた。この仮説を検証するため、細胞内の他の因子の影響を排除できる再構成型無細胞翻訳系 PURE system に精製した ABCF4 種 (EttA, Uup, YheS, YbiT) を添加し、それぞれの活性を評価した。結果、4種の ABCF は仮説通り難翻訳配列の合成を促進し、タンパク質合成効率を向上させることを見出した (図3)⁷⁾。着目すべき点として、各 ABCF は異なる難翻訳配列の合成をほぼ特異的に促進することが明らかとなった。4種の ABCF は配列的には最大で50%程度の相同性を有するが、予測される三次元構造は非常に近似している。そのため、特定箇所のアミノ酸配列の相違が、各 ABCF がどの難翻訳配列に作用するかの特異性を定義していると予想される。

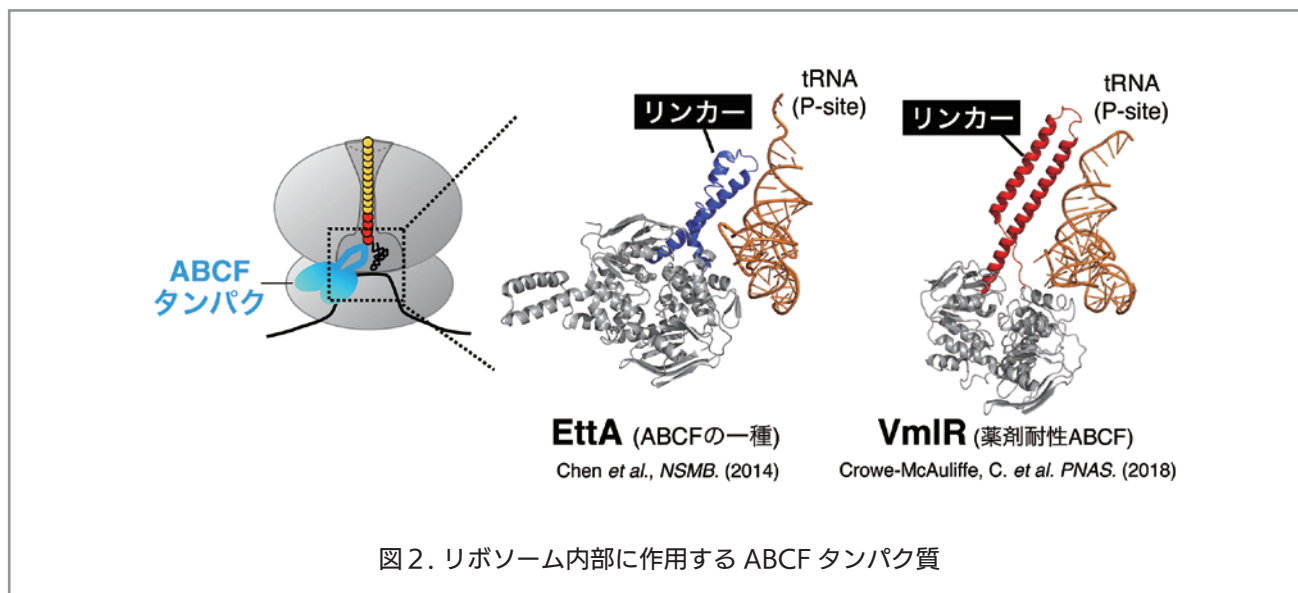


図2. リボソーム内部に作用する ABCF タンパク質

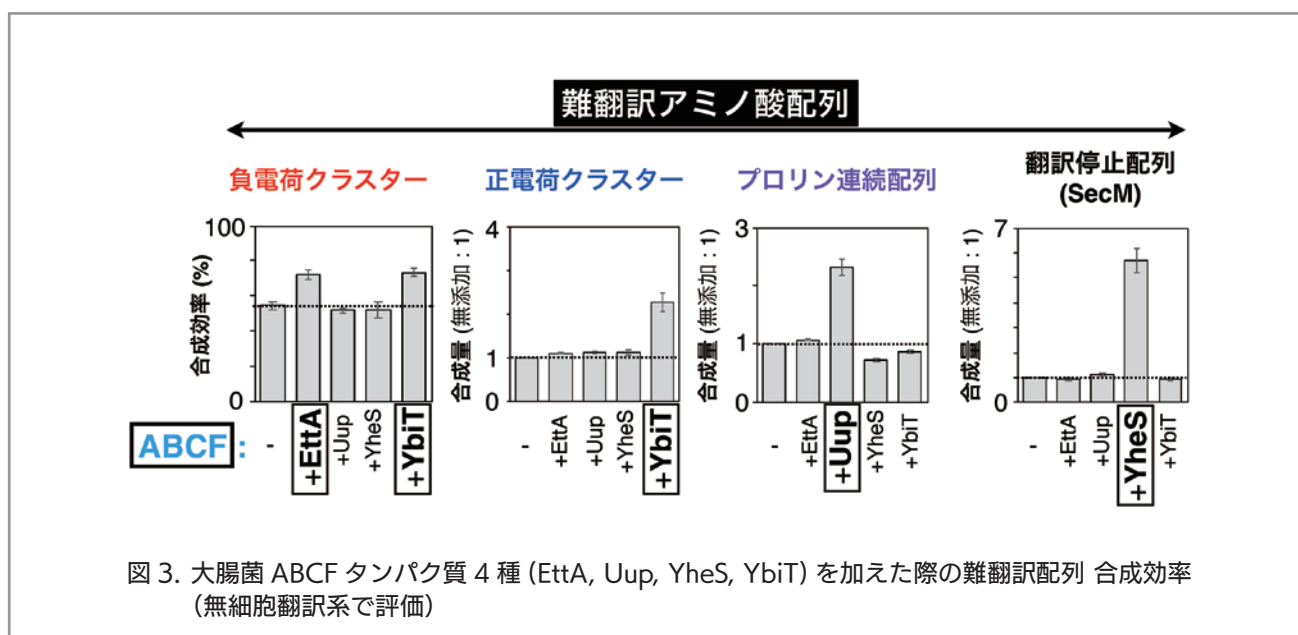


図3. 大腸菌 ABCF タンパク質 4 種 (EttA, Uup, YheS, YbiT) を加えた際の難翻訳配列 合成効率 (無細胞翻訳系で評価)

将来展望

現時点では、各 ABCF の配列特異性がどのように獲得されているかの詳細は明らかとなっていない。この点は構造的観察も含めた今後の研究から明らかにされていくであろうが、ここでは当該研究がタンパク質科学にもたらす新たな可能性について言及したい。配列予測から、生物の遺伝子の半数以上には今回記載した難翻訳配列が含まれることが示唆されている⁸⁾。また近年、機会学習や AI を利用したタンパク質の人工設計が新たな研究領域を形成しつつあるが、それら人工設計タンパク質は生物で「合成可能」かはほとんど顧みられていない。将来、ABCF タンパク質などリボソーム内部の歪みに作用できる翻訳因子の機能を十分に理解し、自在に改変できたなら、「難翻訳」問題の解決を通じて無限とも言えるタンパク質資源の十全な活用を実現できるのではと考えている。このコンセプトに基づいて研究を推進していき、今後の社会問題解決に貢献できたなら、著者としては望外の喜びである。

参考文献

1. Nakatogawa, H. & Ito, K. Secretion Monitor, SecM, Undergoes Self-Translation Arrest in the Cytosol. *Mol. Cell* 7, 185-192 (2001).
2. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218-223 (2009).
3. Ude, S. *et al.* Translation Elongation Factor EF-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches. *Science* 339, 82-85 (2013).
4. Doerfel, L. K. *et al.* EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues. *Science* 339, 85-88 (2013).
5. Crowe-McAuliffe, C. *et al.* Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 8978-8983 (2018).
6. Chen, B. *et al.* EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting

ribosome-tRNA dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 1-11 (2014).

7. Chadani, Y. *et al.* The ABCF proteins in *Escherichia coli* individually cope with ‘hard-to-translate’ nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Res.* 52, 5825-5840 (2024).
8. Ito, Y. *et al.* Nascent peptide-induced translation discontinuation in eukaryotes impacts biased amino acid usage in proteomes. *Nat. Commun.* 13, 7451 (2022).

計算機を用いた酵素設計法の新展開

新井 宗 仁

はじめに

2024年のノーベル化学賞は、計算機を用いた新規タンパク質の設計と、深層学習によるタンパク質の立体構造予測に授与された。これらの技術は今後、産業用酵素や医療用タンパク質などの開発に大きく貢献するだろう。ここでは主に、酵素の合理的設計に利用可能な計算手法について概説する。

物理学ベースのタンパク質設計法 Rosetta

ノーベル化学賞の半分は、物理学ベースのタンパク質設計用ソフトウェア Rosetta を開発したワシントン大の David Baker 博士に授与された。Rosetta は当初、タンパク質の構造予測用ソフトウェアだったが¹⁾、その後さまざまな設計用プログラムが追加され、構造予測、構造設計、結合設計、酵素設計等のためのパッケージとなっている²⁾。2003年に Baker 博士らは、天然にない新規構造を持つタンパク質 Top7 を、Rosetta を用いてゼロから設計することに成功した³⁾。しかも、実験で明らかになった主鎖構造は、設計構造と 1.17 Å の精度で一致していた。続いて Baker 博士らは、天然酵素にはみられない反応を行う新規酵素の開発にも成功した^{4, 5)}。その設計では、Gaussian ソフトウェアを用いた量子化学計算により、触媒反応の遷移状態を安定化するアミノ酸の配置（活性部位）を設計した後、それらのアミノ酸をタンパク質のポケットに適切に配置した構造を Rosetta でデザインした。つまり、低分子の基質に対する比較的単純な触媒反応の設計は、酵素の構造設計に落とし込めることを示した。また、下記の深層学習ベースのツールでは扱いにくい分子も、Rosetta ならば扱うことができ、現在も有用である。

深層学習ベースのタンパク質構造予測法 AlphaFold 2

Baker 博士と共同受賞したのは、Google DeepMind 社の Demis Hassabis 博士と John Jumper 博士である。両博士はタンパク質の三次元立体構造を正確に予測可能な深層学習モデル AlphaFold 2 (AF2) を 2020 年に開発した⁶⁾。AF2 は、世界中の研究者が 70 年以上かけて集めた 22 億のアミノ酸配列と 17 万のタンパク質構造のデータを、自然言語翻訳などに用いられる深層学習モデル Transformer を用いて学習した集大成である。巨大な酵素複合体の構造も予測できる。続いて、酵素反応の基質となるリガンド（低分子、核酸など）とタンパク質との複合体構造も予測できる AF3 を 2024 年にリリースしたが⁷⁾、AF2 とは異なり、AF3 は商用利用できない。Baker 博士らも追随し、AF2 や AF3 とそれぞれ同様の機能を持つ RoseTTAFold (RF) と RF All-Atom を開発している^{8, 9)}。酵素のように open/close 構造のあいだを揺らいでいるタンパク質の構造予測は今も難しいが、AF2 に入力するマルチプル配列アライメント (MSA) を限定することで構造多型を予測する手法も提案されている¹⁰⁾。今後のタンパク質設計では AF2 を使いこなすことが重要であろう。

物理学ベースのフォールディング反応予測法 WSME-L

AF2 はアミノ酸配列と天然構造を結びつけたが、その間に存在するタンパク質の「フォールディング反応過程」はブラックボックスのままである。筆者らは最近、このプロセスを正確に予測する統計力学理論 WSME-L モデルを開発した¹¹⁾。この理論では、入力として天然構造が必要になる。実験や予測で得られた構造さえあれば、タンパク質がどのような順序で、どのような中

間体を経て構造を形成していくのかを予測できる。また、製造しやすい酵素変異体の設計にも利用可能である。

深層学習ベースのさまざまなタンパク質設計法

AF2の成功後、タンパク質デザインの研究に深層学習が多用されている。Baker博士らは、画像生成AIなどに用いられる拡散モデルを用いることで、安定にフォールド可能な主鎖構造を生成する深層学習モデルRFdiffusion¹²⁾、リガンドと結合しうる主鎖構造を生成するRFdiffusion All-Atomを開発した⁹⁾。各手法で生成されたタンパク質構造を安定化するアミノ酸配列は、それぞれProteinMPNN^{13, 14)} (あるいはESM-IF1¹⁵⁾)とLigandMPNN¹⁶⁾によって設計でき、それらの配列が設計通りの構造を形成するかどうかはAF2やRF All-Atomで確認する。この一連の流れは標準プロトコールとなっており、タンパク質の構造設計やリガンド結合設計における成功率は格段に向上した。また、このプロトコールを一部改変して、タンパク質の安定性や可溶性を向上させる手法¹⁴⁾なども開発されている。ただし、酵素活性には構造揺らぎが重要なため、ProteinMPNNなどで構造を安定化しすぎると失活しうる。驚くべきことに、Baker博士らは最近、深層学習を用いた新規酵素設計ツールRFamとChemNetを開発した^{17, 18, 19)}。RFamでは、RFdiffusionで使われた拡散モデルの代わりにFlow matchingという生成AIモデルが用いられており、活性部位を取り巻くタンパク質の全体構造を効率的に設計できる¹⁹⁾。その構造を安定化するアミノ酸配列をLigandMPNNで複数設計後、ChemNetで活性部位の構造アンサンブルをモデリングし、適切な活性部位構造をもつ配列を選択することで、新規構造を持つ酵素が開発された¹⁹⁾。深層学習を用いたタンパク質設計においてもBaker博士の功績は大きく、2つ目のノーベル賞を受賞するかもしれない。なお、酵素の大きな構造変化を必要とする触媒反応の理論設計は現在も難しく、今後の課題である。上記の他に、酵素のアミノ酸配列と基質構造を入力すれば代謝回転数 k_{cat} を予測できるツールDLKcat²⁰⁾、ミカエリス定数 K_m 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m をすべて予測するツールUniKPなどもあり²¹⁾、酵素を高性能化させた変異体の設計などに利用できる。

21世紀は生命科学の時代であると同時に情報科学の時代でもある。これらの融合領域に最先端研究がある。深層学習の新たな手法開発とともに今後も酵素設計法は発展していくだろう。これからも酵素の理論設計から目が離せない。

参考文献

- 1) Simons, K.T. et al.: Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. *Proteins, Suppl 3*, 171 (1999).
- 2) Lemn, J.K. et al.: Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nat. Methods*, 17, 665 (2020).
- 3) Kuhlman, B. et al.: Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science*, 302, 1364 (2003).
- 4) Röthlisberger, D. et al.: Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, 453, 190 (2008).
- 5) Siegel, J.B. et al.: Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science*, 329, 309 (2010).
- 6) Jumper, J. et al.: Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583 (2021).
- 7) Abramson, J. et al.: Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *ibid.*, 630, 493 (2024).
- 8) Baek, M. et al.: Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373, 871 (2021).
- 9) Krishna, R. et al.: Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom. *ibid.*, 384, ead12528 (2024).
- 10) Wayment-Steele, H.K. et al.: Predicting multiple conformations via sequence clustering and AlphaFold2. *Nature*, 625, 832 (2024).
- 11) Ooka, K., Arai, M.: Accurate prediction of protein folding mechanisms by simple structure-based statistical mechanical models. *Nat.*

- Commun. 14, 6338 (2023).
- 12) Watson, J.L. et al.: De novo design of protein structure and function with RFDiffusion. *ibid.*, 620, 1089 (2023).
 - 13) Dauparas, J. et al.: Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science*, 378, 49 (2022).
 - 14) Goverde, C.A. et al.: Computational design of soluble and functional membrane protein analogues. *Nature*, 631, 449 (2024).
 - 15) Hsu, C. et al.: Learning inverse folding from millions of predicted structures. *bioRxiv*, 2022.04.10.487779 (2022).
 - 16) Dauparas, J. et al.: Atomic context-conditioned protein sequence design using LigandMPNN. *ibid.*, 2023.12.22.573103 (2023).
 - 17) Lauko, A. et al.: Computational design of serine hydrolases. *ibid.*, 2024.08.29.610411 (2024).
 - 18) Anishchenko, I. et al.: Modeling protein-small molecule conformational ensembles with ChemNet. *ibid.*, 2024.09.25.614868 (2024).
 - 19) Kim, D. et al.: Computational design of metallohydrolases. *ibid.*, 2024.11.13.623507 (2024).
 - 20) Li, F. et al.: Deep learning-based k_{cat} prediction enables improved enzyme-constrained model reconstruction. *Nat Catal.* 5, 662 (2022).
 - 21) Yu, H. et al.: UniKP: a unified framework for the prediction of enzyme kinetic parameters. *Nat. Commun.* 14, 8211 (2023).

酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成

多面的な抗腫瘍効果を発揮する乳酸酸化酵素融合抗体の開発

浅野 竜太郎

(東京農工大学大学院グローバルイノベーション研究院)

【目的】

がん細胞近傍では、酸素濃度に関わらず細胞の代謝が乳酸産生に傾いており、高濃度の乳酸は免疫からの回避、および血管新生に関与している。このため近年、乳酸を標的としたがん治療法の開発が注目されており、中でも、LOx は乳酸の分解に伴い過酸化水素を生成するため、がん細胞近傍で作用することができれば酸化傷害効果が期待できる。そこで、本研究ではがん細胞に結合する抗体と LOx との融合分子の調製と機能評価を目指した。

【方法】

ヒトへの投与を志向して、ヒト型化が終了している一本鎖抗体 (scFv) と LOx を遺伝子工学的に融合させた分子を設計し大腸菌発現系を用いて組換え発現させた。また、センシング素子の調製に於ける有効性を申請者らが近年報告しているタンパク質間連結モジュールを介した複合体化検討も行った。SDS-PAGE により複合体形成を確認後、LOx の酸化酵素活性、バイオレイヤー干渉法による抗体の結合能、および MTS アッセイによるがん細胞傷害活性をそれぞれ評価した。

【結果】

scFv を直接融合させた LOx は、発現は確認されたものの、各種イオン交換クロマトグラフィーや抗原固体化カラムを用いても精製することはできなかった。一方、scFv と LOx をタンパク質間連結モジュールを介して複合体化することで目的の分子を得ることができた。複合体は LOx の酸化酵素活性と抗体の結合能を保持しており、またがん細胞傷害活性を有することも確認された。

【考察】

LOx と単ドメイン抗体である VHH との融合分子の調製にはこれまでに成功しているものの¹⁾、本研究では、scFv との直接融合分子は精製には至らなかった。LOx への直接融合には、VHH の様な高い安定性や、より小さい分子量であることが必要とされる可能性が示された。

【文献】

- 1) Oda, M., Hiraka, K., Tsugawa, W., Ikebukuro, K., Sode, K., & Asano R.: Development of tetravalent antibody-enzyme complexes employing a lactate oxidase and the application to electrochemical immunosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 267, 116741 (2025)

液滴への酵素封じ込めによる多段階酵素反応の効率化

新井 宗仁

(東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系)

【目的】

生物は複数の酵素を用いた多段階反応で有用物質を生産できるため、その反応を効率化させる技術の開発は、産業や医療において重要である。多段階酵素反応では、ある酵素の生成物を次の酵素に基質として受け渡すステップが律速段階となりうるため、基質受け渡しの効率化が課題となる。そこで本研究では、複数の酵素を集めた反応場を細胞内で作り出す技術の開発を目指した。

【方法】

利用した技術は液-液相分離という細胞内現象であり、この現象では天然変性タンパク質¹⁾が集合して「液滴」を形成する。液滴内に複数の酵素を封じ込めることで、多段階の酵素反応を効率化できると考えた。本

研究では、液滴を形成するタンパク質（液滴形成タンパク質）を、細胞内での多段階反応に関与する酵素に付加し、これらを液滴内に封じ込めることにした。モデル系として、二段階反応で炭化水素を合成する2つの酵素 AAR と ADO を用いた。また、液滴形成タンパク質として、Fused in sarcoma の天然変性領域を用いた。

【結果】

まず、AAR と ADO を細胞内で局在化させるために、それぞれに液滴形成タンパク質を付加させた。また、細胞内での位置を調べるために、それぞれに蛍光タンパク質を付加した。両者を大腸菌で共発現した結果、それらが細胞内の同じ位置に共存している様子が観察された。また、光褪色後蛍光回復法による実験から、これらのタンパク質が液滴を形成することが示唆された。次に、液滴を形成しうる条件で炭化水素合成量を測定したところ、期待通り、液滴形成タンパク質を付加した方が、付加していない場合よりも炭化水素合成効率が高かった。また、液滴を形成しない条件下であっても、液滴形成タンパク質を付加した場合には、酵素の可溶性増大によって炭化水素合成量が増大した。

【考察】

以上のことから、液滴形成タンパク質を付加することで多段階酵素反応を効率化するという本手法の妥当性が示された。今後は多様な酵素反応に適用していくことで汎用的な手法として確立していきたい。

【文献】

- 1) Arai, M., Suetaka, S. & Ooka, K.: Dynamics and interactions of intrinsically disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 84, 102734 (2024).

Fli1^{+/-} マウスを用いた HOCl 誘発モデルにおける酸化ストレスの全身性強皮症への関与と抗酸化酵素による治療可能性の検討

淡路 健太郎

(東京大学大学院医学系研究科皮膚科学教室)

【目的】

全身性強皮症 (Systemic Sclerosis: SSc) は皮膚を含

む諸臓器の慢性炎症及び線維化や血管障害、免疫異常を特徴とする難治性の自己免疫疾患で、病因の1つとして転写因子 Fli1 の発現低下がヒトおよびマウスモデルの双方で強く示唆されている¹⁾。Fli1 の発現を低下させた Fli1^{+/-} マウスは皮内ブレオマイシン (BLM) 投与により皮膚の線維化や血管障害など SSc 様の形質が強く誘導されるが、その他の線維化モデルとして次亜塩素酸 (HOCl) を投与したマウスにおける皮膚の線維化が報告され、BLM より SSc の病態への類似性が高い可能性が近年示唆されている²⁾。HOCl は強力な酸化作用を持ち組織に酸化ストレスを与える薬剤の1つであり、Fli1^{+/-} マウスと HOCl を用いて SSc の病態誘導との関連を調べた。

【方法】

WT マウスおよび Fli1^{+/-} マウスの背部に HOCl (6% の活性塩素を含有するものを 100mM, pH6.2 の KH₂PO₄ で 70 倍希釈) を 6 週間連日、皮下に 200 μL の投与を行った。マウスの皮膚、肺、脾臓、血液などを採取し、組織所見の比較および免疫細胞のフローサイトメトリー (FCM) による解析、蛍光抗体間接法 (IIF) や ELISA を用いた自己抗体の発現量を中心に、SSc における特徴的な形質の評価を行った。

【結果】

HOCl を投与した Fli1^{+/-} マウスでは WT と比較し真皮が有意に肥厚しており、組織学的に膠原線維の膨化増生と間質における線維組織の増加、皮下脂肪織の萎縮や減少がみられた。肺においても、HOCl を投与した Fli1^{+/-} 群でより広範な線維化がみられた。FCM による脾細胞の解析では B 細胞における CD19 の発現上昇ならびに各種活性化マーカーの上昇がみられ、末梢血を用いた IIF では IgG 型の抗核抗体が Fli1^{+/-} 群で強陽性を示すとともに ELISA を用いた定量でも Fli1^{+/-} 群における抗核抗体の抗体価が有意に上昇していた。

【考察】

本研究により HOCl は Fli1 の発現が低下したマウスにおいて SSc 様の形質を強く誘導するとともに、特に BLM モデルでは明らかとなっていなかった抗核抗体の誘導にも関与している所見が見出された。本モデルを用いて病態機序の更なる検討を行うことで、SSc における抗酸化治療の可能性を見出せる可能性がある。

【謝辞】

本研究の実施に際し、日本応用酵素協会より助成を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

【文献】

- 1) Asano Y. What can we learn from Fli1-deficient mice, new animal models of systemic sclerosis? J Scleroderma Relat Disord. 3:6–13 (2018)
- 2) Meng Meng, Jieqiong Tan, Weilin Chen, Qian Du, Bin Xie, Nian Wang, Honglin Zhu, Kangkai Wang. The Fibrosis and Immunological Features of Hypochlorous Acid Induced Mouse Model of Systemic Sclerosis. Front Immunol. 10:1861 (2019)

マクロファージ鉄ストレスを標的とした慢性腎臓病の新たな治療法創出

池田 康 将

(徳島大学 大学院医歯薬学研究部薬理学分野)

【目的】

高齢化の進展に伴い、慢性腎臓病（CKD）は世界的に増加しているものの根本的な予防法・治療法は無い。申請者は過去の研究から、鉄が腎臓病の治療標的であること、鉄依存性の炎症・酸化ストレスはマクロファージ由来であることを明らかにした¹⁾。本研究では、CKDにおける腎老化に対するマクロファージ鉄の役割を解明することを目的とした。

【方法】

Lysosome M(LysM)-Cre マウスと FTH-floxed マウスを交配し、マクロファージにおいてフェリチン重鎖（FTH）を欠失させたコンディショナルノックアウト（FTHKO）マウスを作製した。このマウスモデルに葉酸（250mg/kg）を腹腔内投与し、腎障害を誘発後、2日目をAKI期、14日目をCKD期として経過を観察した。さらに、腎臓およびマクロファージからRNA-seq解析を行い、遺伝子発現の変化を調べた。

【結果】

CKD期において、WTマウスでは腎機能の低下、尿細管障害および腎線維化の進行が顕著であったが、FTHKO

マウスではこれらは抑制された。また、WTマウスにおける炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカーの発現増加は、FTHKOマウスでは抑制され、腎老化マーカーの増加も軽減された。AKI期においても、FTHKOマウスの腎障害はWTマウスに比べて軽度であった。RNA-seq解析の結果、FTHKOマウスではエネルギー代謝関連遺伝子の発現が増加し、炎症関連遺伝子の発現は減少していた。さらに、マクロファージのRNA-seq解析では、NRF2依存性抗酸化経路が活性化され、炎症や老化に関与する遺伝子群の発現が抑制されていた（図2）。

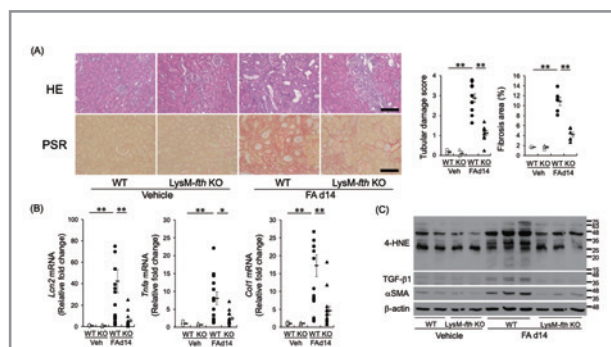


図1 FTHKOではCKD（葉酸投与後14日目）進展が軽減される

(A) 左：代表的な病理組織像（上：HE染色，下：ピクロシリウスレッド染色，scale bar 100μm），右：尿細管障害と線維化の定量グラフ，(B) 腎障害(Lcn2)，炎症(Tnfa)，線維化(Col1)の遺伝子発現定量グラフ，(C)代表的なウエスタンブロットバンド

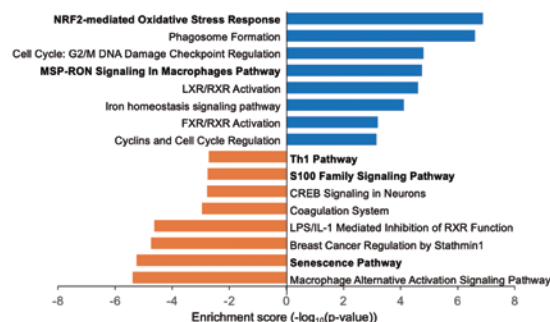


図2. WTマウスとFTHKOマウスのマクロファージ変動遺伝子のエンリッチメント解析

【考察】

FTHKOマウスにおいて、AKIおよびCKDによる腎老化の進行が抑制されており、マクロファージの鉄ストレスが腎機能障害および老化に関与していることが

明らかになった。また、腎臓 RNA-seq 解析の結果も、FTHKO マウスの腎障害が軽度であることに一致した。同様に、マクロファージ RNA-seq 解析から、マクロファージ鉄を減じることで炎症性タンパク質分泌を減少させて周囲細胞の老化を抑制につながる可能性が示唆された。本研究の成果は、マクロファージにおける鉄ストレスの抑制が腎老化および腎障害の進行を緩和する新たな治療戦略となる可能性を示している。

【文献】

- Ikeda Y, Watanabe H, Shiuchi T, Hamano H, Horinouchi Y, Imanishi M, Goda M, Zamami Y, Takechi K, Izawa-Ishizawa Y, Miyamoto L, Ishizawa K, Aihara KI, Tsuchiya K, Tamaki T. Deletion of H-ferritin in macrophages alleviates obesity and diabetes induced by high-fat diet in mice. *Diabetologia*. 63, 1588-1602 (2020)

‘Atopic March’ のゲートキーパーとしてのロリクリン

石塚 洋典

(大阪大学医学系研究科 皮膚科学教室 / アレルギー-免疫疾患統合医療学)

【目的】

‘Atopic March’ は、乳児期に湿疹（アトピー性皮膚炎 [AD]）を発症し、その後、気道過敏性や食物アレルギー（FA）など、IgE を介した反応が続く状態を指す。しかし、炎症を抑制する目的で使用される保湿剤が、必ずしも FA を予防できないことが明らかになってきている。申請者らは、表皮の構造タンパク質であるロリクリンの機能解析を行う過程で、ロリクリンが抗原提示の制御に関与していることを発見した。ロリクリン自体は保湿機能と直接関係はないが、AD の病変部ではその発現が低下していることが知られている。そこで、本研究は、局所免疫が未発達な乳幼児期における AD の発症が、FA など獲得免疫異常の発症における「Window of Opportunity」（脆弱な時期）となるかどうかを、実験医学的に検証することを目的とする。

【方法】

1. 新生児期における異種抗原特異的 IgE 抗体の誘導

2 週齢未満のマウスは局所免疫が T_H2 に偏向しており、異種抗原に対する抗体産生が促進される¹⁾。抗原提示能が亢進したロリクリン欠損（LKO）マウスに、不完全フロイドアジュバント（IFA）と卵白リゾチーム（HEL）を皮下注射し、完全フロイドアジュバント（CFA）で免疫した群と比較し、HEL 特異的抗体産生のプロファイルを比較する。

2. 成人期における免疫寛容の誘導

経皮経路は抗原特異的免疫寛容の誘導にも利用される。FoxP3-DTR マウスを用い、ロリクリンが新生児期に異種抗原に対する寛容誘導に関与するか検討する。

【結果】

1. 新生児期に HEL/IFA で免疫した LKO マウスは、野生型に比べ特異的 IgE の産生が亢進。一方、HEL/CFA では差は見られなかった。
2. 新生児期に HEL/IFA で免疫し、6 週後に HEL を投与した際、LKO マウスでは特異的抗体産生が低値を示した。

【考察】

ロリクリンは新生児期に TH2 型反応を誘導し、成人期には抗原特異的な免疫寛容を促進する。ロリクリンは末梢性免疫寛容の主要な制御因子である可能性が示唆され、現在 FoxP3-DTR マウスを用いた検討を進めている。

【文献】

- 1) Forsthuber and Lehmann. *Science*. 1996; 271: 1728-30.
- 2) Hadis et al. *Immunity*. 2011; 34: 237-46.

膜受容体による加水分解活性と代謝性疾患制御メカニズムの解明

岩部 美紀

(東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 / 香川大学医学部生化学)

【目的】

これまでに、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンの受容体 AdipoR1 および AdipoR2 を同定し、立体構造も明らかにした¹⁾。AdipoR は、Progesterone and AdipoQ Receptor (PAQR) ファミリー分子の一つであ

り、ファミリー全体が新規の逆向き7回膜貫通型の受容体であり、加水分解活性を有することが明らかになりつつある²⁾。本課題では、PAQRファミリー分子の新しい機能として、加水分解活性メカニズムのみならず、新規のシグナル伝達機構の解明を目的とする。

【方法】

(1) PAQRファミリー分子の糖・脂質代謝における細胞内シグナル伝達機構の解明：ファミリー分子における基質特異性および代謝産物の関連性を明らかにし、糖・脂質代謝における新規の細胞内シグナル伝達機構を解明する。さらに、受容体の構造と加水分解の分子制御メカニズムを明らかにする。

(2) PAQRファミリー分子の変異体マウスを用いた病態生理的意義の検討：加水分解活性が消失したPAQRファミリー分子の変異体マウスを作製し、全身の糖・脂質代謝に対する影響を検討、各変異体マウスの各臓器における代謝産物の変化を解析し、臓器特異的な加水分解活性、さらに、肥満関連疾患の病態との関連について明らかにする。

【結果】

(1) PAQRファミリー分子における基質特異性および代謝産物の関連性を明らかにし((2), 未発表), 糖・脂質代謝における新規の細胞内シグナル伝達機構の一部を解明した³⁾。MASHの状態を改善する効果があることを明らかにし⁴⁾、さらに、AdipoR1が肥満による男性不妊症のメカニズムの一部を担っていることを明らかにした⁵⁾。

(2) PAQRファミリー分子の変異体マウスの各臓器における代謝産物の変化を解析し、臓器特異的な加水分解活性を検討し、肥満関連疾患の病態との関連についても明らかにした(未発表)。

【考察】

本課題の成果により、PAQRファミリー分子の多様性と普遍性の理解がより深まり、生物界における未知の受容体活性化メカニズムが存在する可能性も示唆され、学術的貢献・意義も極めて高いと考えられる。

【文献】

1. Tanabe H, et al.: Crystal structures of the human adiponectin receptors, Nature.520,312-326 (2015)
2. Tanabe H, et al.: Human adiponectin receptor

AdipoR1 assumes closed and open structures. Commun Biol. 3,446 (2020)

3. Ohn J, et al.: Discovery of a transdermally deliverable pentapeptide for activating AdipoR1 to promote hair growth, EMBO Mol Med.13,e13790 (2021)
4. Asahara N, et al.: A monoclonal antibody activating AdipoR for type 2 diabetes and nonalcoholic steatohepatitis. Sci Adv. 9,eadg4216 (2023)
5. Kobori T, et al.: Decreased AdipoR1 signaling and its implications for obesity-induced male infertility, Sci Rep. 8,14 (2024)

ゲノムマイニングとタンパク質工学の融合による三員環合成生体触媒の創出

牛丸 理一郎

(東京大学大学院薬学系研究科)

【目的】

病気の予防や治療に使用される医薬品化合物の多くは天然物に由来しており、そのほとんどが生物活性発現において重要な役割を果たす環状構造を有している。天然物生合成経路の再構築や変異導入に基づく生合成酵素の触媒機能改変は新規活性物質を効率的に創製するための有力な手段である。天然物の形や柔軟性を規定する環状構造の生成機構の理解は重要であるものの、天然物にみられる複雑環構造の中には、比較的理解の進んでいるルイス酸・塩基触媒機構のみでは生合成が説明できないものも多く、その解明が待たれる。本研究では、未利用のゲノム情報を利用したシクロプロパン化活性やアジリジン化活性を示す新規ホモログ酵素の同定し、さらには工学的手法を用いた基質適応性や立体選択性を拡張することにより、効率的かつ選択的な三員環合成を可能にする生体触媒の開発を目的とする。

【方法】

申請者らが同定した α -ケトグルタル酸(α -KG)依存性非ヘム鉄酵素Bellは6-ニトロノロロイシンのシ

クロプロパン化を触媒し (1'S,2'R)- ニトロノルロイシン (NcpA) を与える (J. Am. Chem. Soc. Ushimaru et al. 2021). 一方で相同性酵 HrmJ は同一の基質を受け入れるものの立体異性体である (1'R,2'S)-NcpA へと変換する. HrmJ/BelL をコードする遺伝子を指標に微生物ゲノムゲノムデータベースを網羅的に調査したところ, HrmJ/BelL の相同性タンパク質をコードする微生物株が約 80 株見つかった. 複数の入手可能な株から対応する遺伝子をクローニングし, 精製酵素の活性を評価した.

【結果】

大腸菌から発現, 精製した HrmJ/BelL のホモログ酵素を用いて 6- ニトロノルロイシンと反応させたところ, 熱力学的により不安定なシス体の異性体 (1'S,2'R)-NcpA と (1'R,2'S)-NcpA を与える新規シクロプロパン化酵素が見出された. すなわち, 異なる 4 種類の立体化学を持つシクロプロパンが酵素によって作り分けることが可能であった. これらの酵素の高立体選択性発現機構をより詳細に精査するためタンパク質構造解析, 変異導入実験を行ない立体選択性の制御に関与する活性部位アミノ酸残基を明らかにした.

【考察】

本研究ではシクロプロパンの立体異性体をほぼ完全な選択性で作り分ける酵素を同定し, そのタンパク質構造とメカニズムを解析した. 今後は触媒メカニズムや酵素基質複合体の構造に基づき, 合理的に基質特異性を拡張, 最適化し多様なニトロアルカンを環化しニトロシクロプロパンを構築できる革新的酵素反応システムの構築を目指す.

【文献】

1. Wenger, E., Martinie, R., Ushimaru, R., et al. “Optimized substrate positioning enables switches in C–H cleavage site and reaction outcome in the hydroxylation-epoxidation sequence catalyzed by hyoscyamine 6 β -hydroxylase.” *J. Am. Chem. Soc.* 146, in press (2024)
2. Ushimaru, R.* “Three-membered ring formation catalyzed by α -ketoglutarate dependent nonheme iron enzymes.” *J. Nat. Med.* 78, 21-32 (2024)
3. Ushimaru, R.,* et al. “Mechanistic analysis of

the stereo divergent nitroalkane cyclopropanation catalyzed by nonheme iron enzymes.” *J. Am. Chem. Soc.* 145, 24210-24217 (2023)

抗癌剤耐性克服を目指した積極的フェロトーシス誘導におけるアルドケト還元酵素の制御の意義の解明

遠藤智史

(岐阜薬科大学)

【目的】

抗癌剤耐性細胞は高度に脂質過酸化経路が亢進¹⁾, フェロトーシスや脂質酸化依存的新規細胞死 (リポキナーゼ) に対する感受性が高いことが知られる. そのため, フェロトーシス誘導は抗癌剤耐性克服の新たな治療標的として注目されている. フェロトーシスの抑制には GPx4 や下流の FSP1 の阻害が関わることから, フェロトーシス誘導にはそれらの阻害剤が使用される. しかし, GPx4 は生存に必須であることから, GPx4 阻害剤の臨床応用は難しいと考えられている. 申請者は, 過酸化脂質由来反応性アルデヒドである 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) を還元代謝するアルドケト還元酵素 (AKR) の選択的阻害剤が抗癌剤耐性細胞にフェロトーシスを誘導することで, 耐性克服効果を示すことを見出した. AKR は癌化に伴い発現亢進することが知られるが, 我々は複数の癌細胞において抗癌剤耐性獲得時にさらに亢進することを確認した²⁾. 本研究では, AKR によるフェロトーシス制御機構を詳細に解明し, 独自に樹立したアパルタミド耐性前立腺癌細胞株 (Apa-R), ベムラフェニブ耐性メラノーマ細胞株 (Vem-R) を用いて, AKR 阻害剤によるフェロトーシス誘導を介した抗癌剤耐性克服効果を実証した.

【方法と結果】

Apa-R 細胞は AKR1C3 を高発現しており, Apa-R 細胞へのアパルタミド (Apa) と AKR1C3 阻害剤の併用処理によって, アポトーシスの指標である切断型 PARP, 切断型 caspase-3, 切断型 caspase-9, ミトコンドリア膜障害の指標である Bax/Bcl-2 比の上昇が認められた. また, 活性酸素種 (ROS) 産生量を調べたと

ころ、Apa-R 細胞における Apa 処理時の ROS 産生量は親株である 22Rv1 細胞に Apa を処理した時と比べて顕著に少なかったが、AKR1C3 阻害剤との併用で顕著に増大した。したがって、AKR1C3 阻害剤の併用によって ROS 産生に伴うミトコンドリア機能障害が起こり、アポトーシス性細胞死が惹起されたと考えられた。AKR1C3 は NADPH 依存的に脂質過酸化由来反応性アルデヒド 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) をより低毒性のアルコール体に代謝する。抗 HNE 抗体を用いた蛍光免疫染色によって、AKR1C3 阻害剤の併用によって明らかな蛍光強度の増大が認められた。このことは過酸化脂質量の増加に伴うフェロトーシス誘導を示唆する。また、併用時には RNA 結合タンパク質 TIAR や PABPC1 の凝集体が確認され、PKR/eIF2 α 経路を介したストレス顆粒の形成が示唆された。

【考察】

本研究では、AKR1C3 を高発現しているアパルタミド耐性前立腺癌細胞では、AKR1C3 阻害剤がアパルタミド感受性を有意に回復させることを示した。また、その機序として過酸化脂質の蓄積に伴うフェロトーシスの誘導が考えられた。また、ストレス顆粒の形成を誘導することも見出した。しかし、ストレス顆粒の形成の作用機序や、前立腺癌細胞が自信を保護するために誘導されたのかどうかなどの病態生理学的意義については不明な点が多いため、今後の詳細な解析が望まれる。以上、AKR1C3 を標的とすることでがん治療を向上させる可能性が期待される。

【文献】

1. Viswanathan, V., Ryan, M., Dhruv, H. et al. : Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway, *Nature*, 547, 453-457 (2017).
2. Endo, S., Matsunaga, T., Nishinaka, T. : The roles of AKR1B10 in human physiology and disease. *Metabolites*, 11, 332 (2021).

真珠バイオミネラリゼーションに関わる酵素の機能解明と新規 CO₂ 固定法への応用

小川 智久

(東北大学大学院農学研究科)

【目的】

生物が創り出す有機-無機ナノ構造体バイオミネラルは、例えば真珠貝は、カルサイトとアラゴナイトを巧みに作り分けられている。これまでマベガイ真珠バイオミネラリゼーションに関わるマトリックスタンパク質および酵素の構造と機能を明らかにしてきた¹⁾。真珠貝ゲノム解析などが近年進められ、個々の特性や機能が明らかにされているが、どのように機能的な硬組織が作り出されているのか、分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究は、真珠バイオミネラリゼーションに関わるマトリックスタンパク質および酵素を、生きた試験管である酵母発現系を利用して発現を制御し、複雑な機能的ナノ構造体の構築原理を明らかにすることを目的とする。

【方法】

マベガイ炭酸脱水酵素 (CA1 と CA2) の GFP との融合タンパク質として酵母発現系を構築し、発現・機能を解析した。また、ジャカリン様レクチン (PPL2A, PPL2B, PPL3, PPL4) の酵母発現系を構築し、発現酵母での炭酸カルシウム結晶構造を走査型電子顕微鏡および X 線回折 (XRD) により解析した。

【結果】

マベガイの 2 種の炭酸脱水酵素 (CA1 および CA2) を酵母で発現したところ、CA1 と CA2 で局在が異なることが蛍光顕微鏡観察で判った。液体培養では CA 発現により生成した炭酸イオンのため、急激に pH が低下し酵母の生育に影響した。

また、マトリックスタンパク質であるヘテロ 2 量体 PPL2A (α , γ) と PPL4 (α , β) の発現は、1 つのサブユニットのみでは見られず、2 量体でのみ発現が見られた。また XRD 解析の結果、PPL2A でバテライト結晶形成が確認された。

【考察】

CA1 と CA2 で発現量と局在が異なるが、CA1 には

GPI アンカーシグナルが含まれており小胞体からゴルジ体を経由して細胞表層に移行することが示唆された。異なるジャカリン様レクチンにより、炭酸カルシウムの結晶系に違いがみられた。

【文献】

1. Ogawa T*, Sato R, Naganuma T, Liu K, Sato S, Sakaue S, Osada M, Yoshimi K, Muramoto K. Diversified biomineralization roles of *Ptereria penguin* pearl shell lectins as matrix proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(3)**, 1081 (2021)

文化財の修復作業におけるタンパク質性酵素阻害剤の応用

押 鐘 浩 之

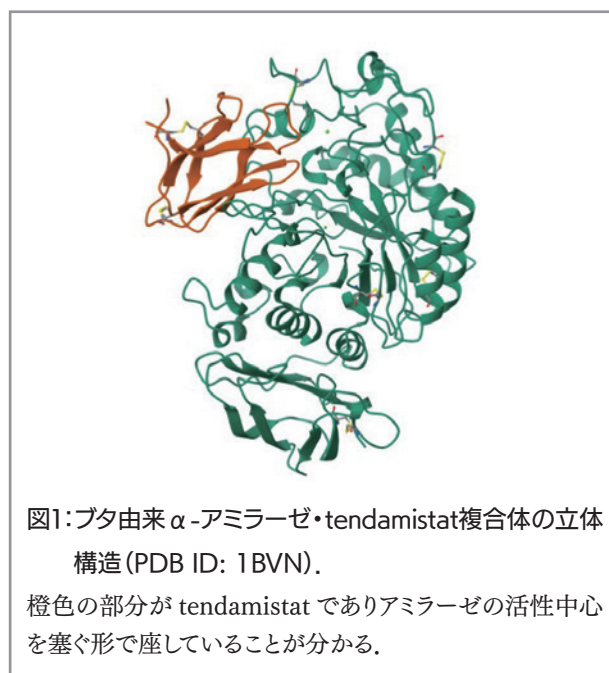
(大阪大学大学院薬学研究所 (現・一般社団法人上池台研究所 代表理事))

【目的】

本研究は文化財修復における裏打ち紙を貼り替える修復作業における、 α -アミラーゼとそのタンパク質性阻害剤である tendamistat とを組み合わせた新規修復法の確立に関する。古来より、絵画や書画の素材の開発だけではなく、文化財本体である本紙を劣化から守るために「裏打ち」と呼ばれる本紙支持技術も並行して発展してきた。裏打ちとは紙をデンプン糊によって本紙に接着させることで本紙を支持する作業であるが、当然のことながら接着成分であるデンプン糊や裏打ち紙自身も劣化するために、裏打ち紙を貼り替える修復作業も必要となる。従来の裏打ち紙の修復作業では、ピンセットなどで物理的に裏打ち紙繊維を除去した後に再度裏打ち紙をデンプン糊で貼付していたため、文化財本体を傷つけてしまうというリスクと隣り合わせの作業であり、裏打ち紙の修復工程に対する改善が求められていた。そこで、アミラーゼによってデンプン糊を分解することで本体と裏打ち紙の剥離を容易にさせる研究が為されてきた。確かにアミラーゼにより剥離は容易になるものの、剥離工程の後の新しい裏打ち紙にデンプン糊を塗布する際に先程のアミラーゼが残存してしまい、接着性が減弱する可能性があった。この剥離工程後のアミラーゼ残存問題に対し、例えばアミラーゼを失活させる、

またはアミラーゼ阻害剤を添加するなどのアイデアが考えられる。アミラーゼ失活の例として熱変性を利用する場合、文化財本体に対する熱によるダメージが問題となる。一方、アミラーゼ阻害剤については糖尿病等の創薬研究において低分子化合物を中心に研究開発が進められてきた。本用途で阻害剤を使用することで、確かにデンプン糊による裏打ち紙の再接着は可能であると考えられるものの、時間を経て再び修復が必要になった際、アミラーゼは環境中の UV や乾燥によって自然的に分解されていく一方で、アミラーゼ阻害剤のみが接着面に残存してしまうため、アミラーゼによる糊剥がしが困難になると予想される。

そこで本研究では、アミラーゼに対するタンパク質性阻害剤である tendamistat の使用を着想した。tendamistat は放線菌の一種である *Streptomyces tendae* が産生する 74 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質であり、哺乳類由来のアミラーゼに対する阻害作用が知られている (図 1)。タンパク質性阻害剤であれば、環境中の UV や乾燥による経年劣化によりアミラーゼと共に分解されるものと期待されることから、上記アミラーゼ阻害剤の例のように再修復を邪魔することが無くなると期待できる。以上から、本研究では tendamistat を本用途のアミラーゼ阻害剤として採用し、裏打ち紙の修復工程における改良法構築に向けた実証実験を行った。



【方法】

Streptomyces tendae 由来 tendamistat は遺伝子組換え技術を通して作製した。具体的には、大腸菌発現用にコドン最適化した当該遺伝子配列を大腸菌発現ベクター pET28a に組み込むことで、N 末端 His タグを有する tendamistat 発現プラスミドを得た。その後、当該発現プラスミドを大腸菌発現株 (Tuner(DE3)) に形質転換させ、LB 培地で培養下、0.5 mM IPTG 添加 (18°C O/N で培養) により tendamistat タンパク質の発現誘導を行った。その後、1 mM PMSF を加えた PBS で菌体破碎を行い Ni カラムで粗精製を行った。続いて tendamistat の分子量が小さいことを利用して限外濾過を通して tendamistat タンパク質の精製・濃縮を行った。次にアミラーゼ活性に対する tendamistat の阻害作用について、アミラーゼとしてコウジカビ由来アミラーゼ・ブタ膵臓由来アミラーゼ (Sigma Aldrich 社) を用意し、 α -アミラーゼ測定キット (キッコマンバイオケミファ社) を用い、比色法により活性測定による tendamistat の阻害効果に対する定量を行った。

【結果・考察】

リコンビナント技術を通して作製した tendamistat タンパク質の収量は数 mg/L 培養程度と作製自体には成功したものの、とりわけ大量生産までには至らなかった。

次に tendamistat の阻害効果について、ブタ由来アミラーゼに対しては添加によって切れ良く活性を阻害していることが分かる (図 2(a) #5 ~ #8: (b) 橙線)。他方、コウジカビ由来アミラーゼに対してもブタ由来程ではないにしても阻害作用を有していることが分かる (図 2(a) #1 ~ #4: (b) 青線)。本技術の文化財修復における応用を考えると、コウジカビ由来のアミラーゼの方がブタ由来アミラーゼと比較してコスト的に好ましいことから、tendamistat を過剰量滴下することによってアミラーゼ活性を抑制する戦略が得策であると考えられた。

【今後の展開】

本研究により、tendamistat は哺乳類由来だけではなくカビ由来のアミラーゼに対しても阻害効果があることを初めて見出したものの、カビ由来アミラーゼの酵素活性を完全に阻害するには過剰量の滴下が必要であ

り、tendamistat タンパク質の生産量上げる必要があると考えられた。したがって、今後は tendamistat タンパク質の生産量向上のために最適な発現宿主を探索する、または *Streptomyces tendae* の培養を通して直接的に tendamistat タンパク質を獲得する、といった実験を計画している。加えて、*Streptomyces parvulus* が産生する parvulostat (Z-2685) というタンパク質など、tendamistat 以外のタンパク質性アミラーゼ阻害剤も知られていることから、tendamistat 以外のタンパク質性アミラーゼ阻害剤の採用も視野に入れて展開する計画である。

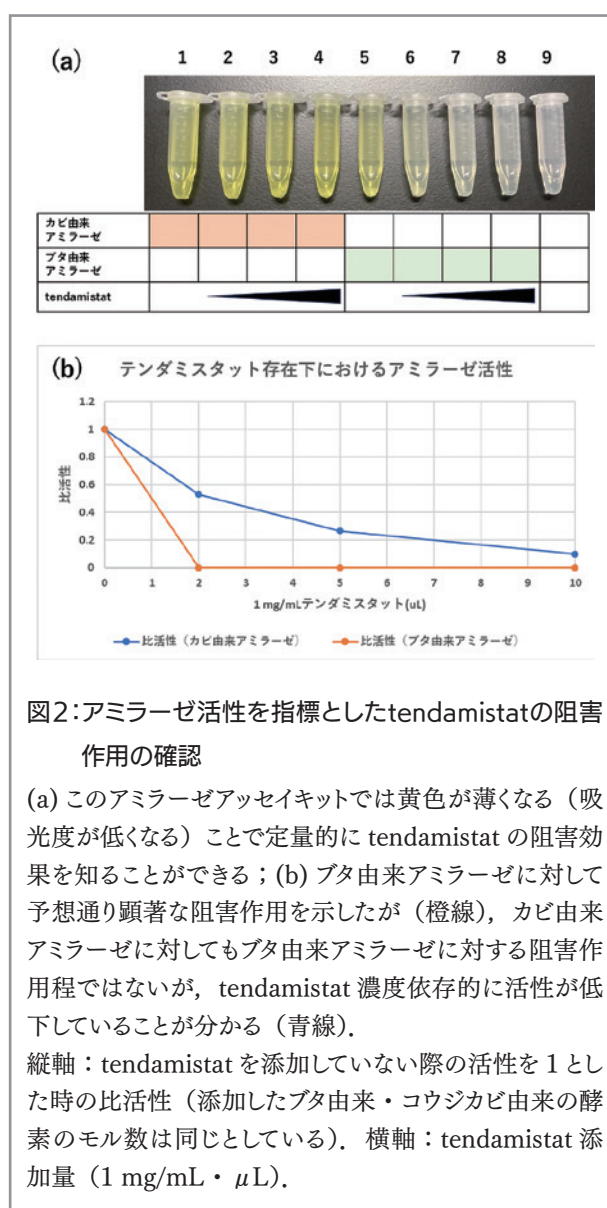


図2:アミラーゼ活性を指標としたtendamistatの阻害作用の確認

(a) このアミラーゼアッセイキットでは黄色が薄くなる (吸光度が低くなる) ことで定量的に tendamistat の阻害効果を知ることができる; (b) ブタ由来アミラーゼに対して予想通り顕著な阻害作用を示したが (橙線)、カビ由来アミラーゼに対してもブタ由来アミラーゼに対する阻害作用程ではないが、tendamistat 濃度依存的に活性が低下していることが分かる (青線)。

縦軸: tendamistat を添加していない際の活性を 1 とした時の比活性 (添加したブタ由来・コウジカビ由来の酵素のモル数は同じとしている)。横軸: tendamistat 添加量 (1 mg/mL · μL)。

さらに本技術の社会実装として、文化財だけではなく建築用途にも応用できると考えている。接着用途と

してのデンプン糊は建築業界でもシックハウス症候群の観点から近年再評価を受けており、一般住宅の壁紙の施工例においては約半数程度がデンプン糊を使用しているとされている。建築業界におけるデンプン糊剥がしは、界面活性剤やテルペンを成分とする剥がし剤、または高温蒸気の圧着により行われることが多いが、これらの手法は建築基材に対する物理的・化学的なダメージがあることが問題であったことから、本技術の応用を通し、建築基材に対するダメージを最小に出来る糊剥がし法の開発も視野に今後展開していきたいと考えている。

がん細胞のゴルジ体で起きてしまう変異チロシンキナーゼシグナル
 ～ Phospholipase D2 (PLD2) 異常活性化が原因となるゴルジ停留メカニズム～

小幡 裕希

(国立がん研究センター研究所 がん細胞内トラフィック研究ユニット)

【目的】

本研究は、がん発症のドライバーの一つである受容体チロシンキナーゼ (RTK) 変異体の異常な細胞内局在と、その原因と予想されるホスホリパーゼ D2 (PLD2) の機能解析である。これまでに本グループは、消化管肉腫 (GIST) の発症の主な原因 RTK である KIT 変異体が、プロテインキナーゼ D2 (PKD2) に依存してゴルジ領域に停留し、そこで細胞増殖シグナルを発信することを報告した。複数知られている PKD2 エフェクターのうち、PLD2 が GIST の KIT のゴルジ停留の原因であることを示唆するデータを得ており、本研究ではその機能解析を試みた。

【結果・考察】

GIST 細胞に対し、複数知られる PKD エフェクターに対するインヒビターを処理した際、PLD 阻害剤である CAY10594 を処理した時に、KIT のゴルジ停留が解除、それに伴うシグナル発信の抑制が認められ、PKD2 抑制の効果をミミックした (図 1A)。哺乳細胞で PLD 活性を主に担う PLD1, PLD2 のうち、PLD2 をノックダウンした際に、PLD 阻害剤の効果のフェノコピーと

なった。さらに、KIT チロシンキナーゼ阻害剤と共免疫沈降法により、KIT が PKD2 を介して PLD2 を活性化することを明らかにした。即ち、GIST の KIT は、PKD2-PLD2 経路を活性化し、KIT 自身をゴルジ停留させていることが示唆された。一方、PKD2-PLD2 経路の活性化は、他がんの RTK のゴルジ停留には影響を与えず、それぞれの RTK に対して停留機構が備わっていることが明らかになった (図 1B)。

PKD-PLD 経路の活性化は、ゴルジ体における輸送キャリア形成を促し、タンパク質輸送を担うと考えられてきたが、本研究で、その調節破綻がチロシンキナーゼのゴルジ停留の原因となりうることを示唆された (投稿準備中)。一方で、他がんの RTK のゴルジ停留には PLD は関係しないことが明確なので、その理由についても今後明らかにしていきたい。

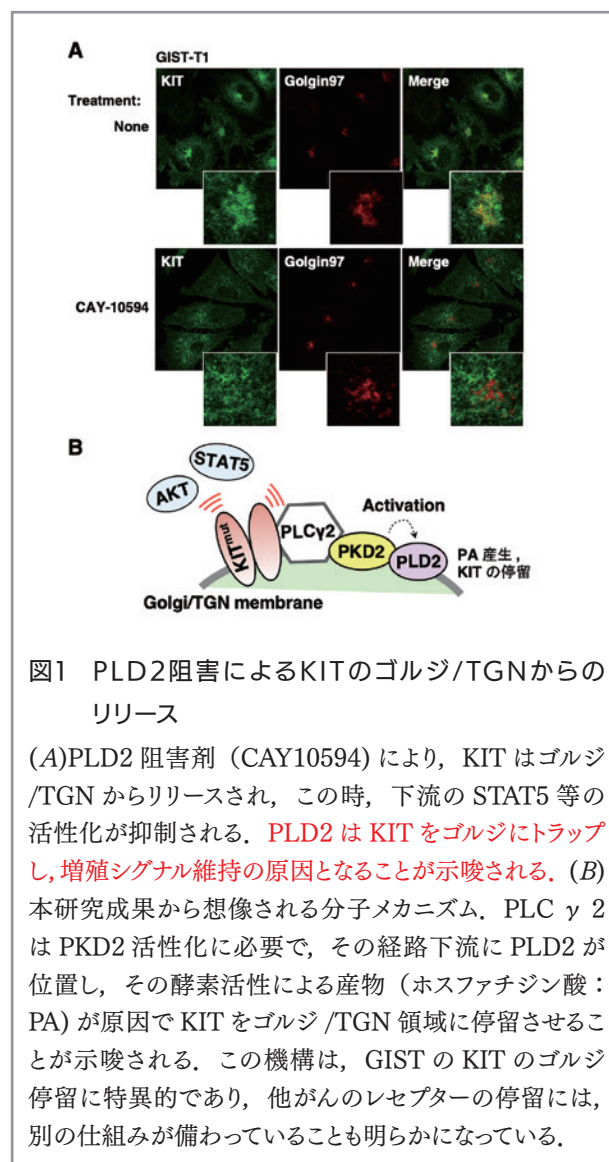


図1 PLD2阻害によるKITのゴルジ/TGNからのリリース

(A)PLD2 阻害剤 (CAY10594) により、KIT はゴルジ/TGN からリリースされ、この時、下流の STAT5 等の活性化が抑制される。PLD2 は KIT をゴルジにトラップし、増殖シグナル維持の原因となることが示唆される。(B) 本研究成果から想像される分子メカニズム。PLC γ 2 は PKD2 活性化に必要で、その経路下流に PLD2 が位置し、その酵素活性による産物 (ホスファチジン酸: PA) が原因で KIT をゴルジ/TGN 領域に停留させることが示唆される。この機構は、GIST の KIT のゴルジ停留に特異的であり、他がんのレセプターの停留には、別の仕組みが備わっていることも明らかになっている。

【文献】

- (1) Obata Y, Natsume M, Shiina I, Takahashi T, Nishida T. Golgi retention of KIT occurs in a phospholipase D-dependent manner in gastrointestinal stromal tumor cells. *Manuscript in preparation*.
- (2) Obata Y & Nishida T. Golgi Retention and Oncogenic Signaling of KIT Tyrosine Kinase in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Subcellular Biochemistry*, Chapter 18, “The Golgi Network” *In Press*.

皮膚微小環境における癌の免疫逃避と進展に関わる細胞外基質の役割

尾山 徳 孝

(福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学)

【目的】

本研究の目的は、皮膚微小環境において、細胞外基質 (ECM) が癌の免疫逃避および進展にどのように寄与するかを解明することである。特に、ECM が免疫細胞の機能に及ぼす影響と、癌細胞の浸潤や転移に関連する役割に焦点を当て、これを通じて癌治療における新たな標的を見出すことを目指した。

【方法】

皮膚癌のマウスモデルを用い、ECM 成分と免疫細胞との相互作用を解析した。免疫組織化学的手法により、コラーゲンやフィブロネクチンなどの ECM 構造を可視化し、フローサイトメトリーを用いて癌周囲の免疫細胞動態を定量評価した。さらに、ECM を分解する酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の抑制剤を投与し、癌細胞の増殖および浸潤に及ぼす影響を検討した。

【結果】

解析の結果、皮膚癌における ECM の構成成分が免疫細胞の浸潤に強く影響を与えることが確認された。特に、癌組織周囲でコラーゲンが過剰に蓄積し、その結果、免疫細胞の浸潤が阻害される現象が見られた。また、MMP 抑制剤の投与により、ECM の再構成が抑制され、癌細胞

の浸潤および転移が有意に減少することが示された。

【考察】

本研究から、皮膚微小環境における ECM が、免疫逃避および癌進展において重要な役割を果たすことが明らかとなった。ECM の構成成分が免疫細胞の浸潤を妨げることで、癌が免疫監視から逃れ、浸潤や転移を促進していることが示唆される。MMP 抑制剤による ECM 再構成の阻害は、癌治療において有望な戦略となり得る。今後、他の癌モデルでも同様の効果を検証する必要がある。

スプライシング因子による DNA 編集酵素の活性調節機構の解明

金 山 直 樹

(岡山大学)

【目的】

抗体遺伝子の体細胞高頻度突然変異には DNA 編集酵素 Activation induced cytidine deaminase (AID) が必須である。我々は、DNA 編集酵素 AID の活性発現およびそれによる高頻度突然変異の誘導に必須な因子の一つとして、スプライシング因子 Serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) のアイソフォーム SRSF1-3 が必須であることを見出している。SRSF1-3 は抗体遺伝子に集積し、AID と結合して AID の核内への蓄積や AID の活性制御に関与する。本研究は、スプライシング因子 SRSF1-3 による、DNA 編集酵素 AID の DNA 編集活性の調節機構およびその抗体遺伝子特異性を決定する機構を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】

- (1) 体細胞高頻度変異における SRSF1-3 の機能部位の同定 -1

SRSF1 転写産物の選択的スプライシングにより生成する SRSF1-3 は、SRSF 1 とは異なる C 末領域を有する。共通の N 末端領域について、2 つある RNA 結合領域の一方しか持たない変異体を作製 AID との結合能を評価したところ、全ての変異体で結合活性を示した。

- (2) 体細胞高頻度変異における SRSF1-3 の機能部位の同定 -2

SRSF1 はトポイソメラーゼI と相互作用して互いの活性を制御しあっている。そこで SRSF1-3 および、これまで製した各種変異体との結合を評価したところ、AID と場合と同様に SRSF1 と SRSF1-3 の全長型は AID と結合し、C 末端領域を欠失した変異体および N 末端領域の部分変異体でもトポイソメラーゼI と相互作用した。

(3) 体細胞高頻度変異における SRSF1 のリン酸化の評価

体細胞高頻度変異への関与については低リン酸化状態が重要であることを見出している。今回、リン酸化の責任酵素の阻害剤を、体細胞高頻度変異を自然発生する細胞株に添加したところ、SRSF1 の局在は細胞質に変化し、変異は低下した。

【考察】

SRSF1 および SRSF1-3 は、AID やトポイソメラーゼI と狭い領域で結合しているのではなく大きな領域で結合している可能性がある。今回用いた方法が細胞内で発現させたタンパク質の相互作用であるため他のタンパク質を介した複合的な相互作用である可能性もある。SRSF1 はリン酸化されることが核内輸送に必要であることから、変異誘導に関する低リン酸化状態は核内で発生していることが考えられる。

カルシニューリンにおける基質特異性の分子機構と創薬応用

神 沼 修

(広島大学原爆放射線医学研究所・疾患モデル解析研究分野)

【目的】

転写因子 Nuclear factor of activated T cells (NFAT) は、脱リン酸化酵素カルシニューリン (Calcineurin : CN) によって脱リン酸化され、多くの機能遺伝子の発現を制御する。本研究は、CN の NFAT に対する基質特異性のメカニズム解明を目的とした。

【方法】

NFAT における新たな CN 結合領域として同定したペプチド (p8) と、CN 側の NFAT 結合領域の配列情報¹⁾ を元に、両者の結合様式を解析した。p8 に膜透過性ペプチドを付与して (膜透過性 p8) ヒト T 細胞に導

入し、サイトカイン発現に与える影響を検討した。T 細胞移入マウスのアレルギー性皮膚炎モデルを用い²⁾、CN 阻害薬タクロリムスの効果を検討した。

【結果】

p8 は NFAT における既知の CN 結合領域とは異なる部位に結合することがわかった。膜透過性 p8 は、ヒト T 細胞における一部のサイトカイン発現を選択的に抑制した。タクロリムスは T 細胞移入マウスの抗原誘発皮膚炎症を抑制し、その効果にはサブセット選択性がみられた。

【考察】

研究を継続し、p8 の効果を in vivo でも明らかにする。

【文献】

- Kitamura, N., Shindo, M., Ohtsuka, J., Nakamura, A., Tanokura, M., Hiroi, T. & Kaminuma O. : Identification of novel interacting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells, *FASEB J.*, 34, 3197-3208 (2020).
- Hayashi, K., Kaminuma, O., Nishimura, T., Saeki, M., Matsuoka, K., Hiroi, T., Jutabha, P., Iwata, Y., Sugiura, K., Owada, T., Kurasawa, K., Okayasu, I., Ouchi, M., Fujita, T., Kanai, Y., Endou, H. & Anzai, N. : LAT1-specific inhibitor is effective against T cell-mediated allergic skin inflammation, *Allergy*, 75, 463-467 (2020).

プロテオリシスを介した精子成熟メカニズムの解明

浄 住 大 慈

(科学技術振興機構さきがけ、自然科学研究機構基礎生物学研究所)

【目的】

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

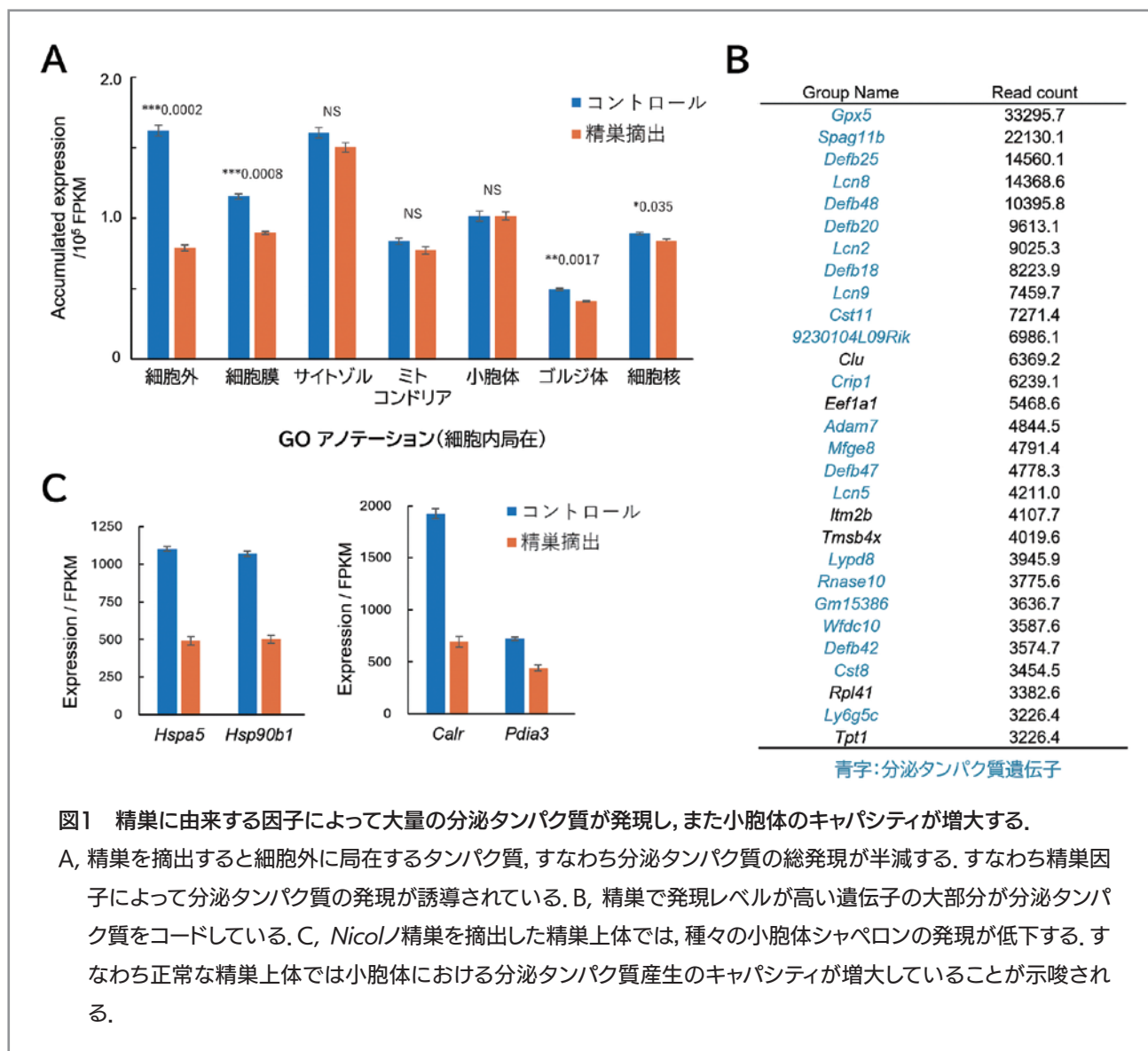


図1 精巣に由来する因子によって大量の分泌タンパク質が発現し、また小胞体のキャパシティが増大する。

A, 精巣を抽出すると細胞外に局在するタンパク質, すなわち分泌タンパク質の総発現が半減する。すなわち精巣因子によって分泌タンパク質の発現が誘導されている。B, 精巣で発現レベルが高い遺伝子の大部分が分泌タンパク質をコードしている。C, *Nicol*/精巣を抽出した精巣上体では、種々の小胞体シャペロンの発現が低下する。すなわち正常な精巣上体では小胞体における分泌タンパク質産生のキャパシティが増大していることが示唆される。

オリシスによって精子の成熟がどのように制御されているかを明らかにする。

【方法】

精子成熟に関わる器官である精巣上体の形成や機能発現に注目しながら、プロテオリシスによる精子成熟に関わる遺伝子や制御メカニズムを検討した。研究代表者が見出した、精巣に由来し精巣上体の機能を制御する分泌シグナル伝達である「ルミクリン」に注目しながら、ルミクリンと同様に精子成熟を担うプロテオリシスを上位制御する他の機構や、その制御下での分泌プロテアーゼの発現機構を検討した。

【結果】

精子成熟を上位制御する機構を検討した結果、ルミクリンと並んで精巣に由来する内分泌（エンドクリン）による制御が重要であることを見出した（図 1A,B）。

精巣上体ではプロテアーゼをはじめ様々な分泌タンパク質が発現しているが、これらの多くがルミクリンとエンドクリンによって制御されている。また、これらの精巣に由来するルミクリン、エンドクリンによる分泌遺伝子発現誘導によって精巣上体に小胞体ストレス応答が生じる結果、分泌タンパク質を発現・分泌するための小胞体のキャパシティが増大していることを見出した（図 1C）。精子を成熟させるために精巣上体は大量のプロテアーゼを分泌しなければならないが、これを可能としているのは、精巣上体における小胞体ストレス応答によって、分泌タンパク質の産生キャパシティが増大しているからである可能性が示唆された。

【考察】

精子を成熟させるために精巣上体は大量のプロテアーゼを分泌しなければならないが、これを可能とし

ているのは、精巣上体における小胞体ストレス応答によって、分泌タンパク質の産生キャパシティが増大しているからである可能性が示唆された。

【文献】

1. **Kiyozumi D.***, Distinct actions of testicular endocrine and lumicrine signaling on the proximal epididymal transcriptome. *Reprod Biol Endocrinol.* 22(1):40 (2024)
2. **Kiyozumi D.***, Busulfan administration replicated the characteristics of the epididymal initial segment observed in mice lacking testis-epididymis lumicrine signaling. *J Reprod Dev.* 70(2):104-114 (2024)
3. **Kiyozumi D.***, Expression of NELL2/NICOL-ROS1 lumicrine signaling-related molecules in the human male reproductive tract. *Reprod Biol Endocrinol.* 22(1):3 (2024)

ペプチド修飾酵素の流用による小分子汎用プレニル化技術の確立

後 藤 佑 樹

(京都大学大学院理学研究科化学専攻)

【目的】

プレニル基による分子修飾は、天然有機化合物にしばしば存在し、分子の疎水性や細胞膜親和性、さらには体内動態に大きく影響を与える重要な要因である。しかし、化学的なプレニル化試薬は多くの場合、過酷な反応条件を伴い、しばしば適切な保護が必要となる。また、天然物合成に関わるプレニル転移酵素は、特定の基質に対してのみ反応する 경우가多く、プレニル基を導入できる化合物の範囲が限られている。つまり、さまざまな骨格の分子に分子に対して汎用的にプレニル基を導入する手法は、残念ながら存在しないのが現状である。そこで我々は、基質許容性が広い性質をもとと有するペプチドプレニル化酵素を改変し、小分子へのプレニル基導入を可能とする新たな生体触媒に流用することを目指した。

【方法】

我々は最近、シアノバクテリア由来の天然物合成に

関わる、ペプチドの His 残基側鎖上の C2 炭素を選択的にグラニル化する新奇ペプチド修飾酵素 LimF を発見・同定した。本酵素は、プレニル化素反応(C-グラニル化)としては厳密な特異性を示す一方で、アクセプター基質については類い稀な広範な基質許容性を示した。そこで、【方法 1】プレニル化認識部位への変異導入により、実施可能なプレニル化素反応を拡大しつつ、【方法 2】アクセプター基質を種々検討することで、本酵素でプレニル化されうる有機小分子の要件の理解を深める、ことを計画した。

【結果】

以前に取得済みの LimF の結晶構造を基に、本来の基質であるグラニルニリン酸の結合ポケットを縮小/拡大する変異を種々設計し、その変異体の活性を評価した。その結果、本来の C-グラニル化以外に、C-ジメチルアリル化および C-ファルネシル化を触媒する変異体の構築に成功した。また、同じく結晶構造を基に、アクセプター基質結合部位に変異を導入することで、天然のペプチド基質とは異なる配列要素の人工ペプチドを修飾可能な変異体も確立した【方法 1 の成果】。また、LimF を用いて種々の有機小分子のプレニル化を検討したところ、短鎖ペプチドや His 単量体に留まらず、イミダゾール環含有小分子薬剤の C-グラニル化を実施できることを見出した。さらに、ベンゾイミダゾール環の C-グラニル化も一部の化合物群で確認され、本酵素が含窒素ヘテロ環小分子をアクセプター基質として広く許容しうることを実証した【方法 2 の成果】。

【考察】

本研究により、1. LimF 本来のプレニル選択性を合理的に拡大することに成功し、2. LimF が有機小分子も修飾しうることを確認した。今後、1 で確立した LimF 変異体群を 2 の有機小分子に適用することで、本酵素群でプレニル修飾しうる有機小分子の構造要件に関する知見を深め、有機化合物の簡便なプレニル化を実施する生体触媒のツールボックスの構築を進めていく。

【文献】

Y. Zhang; K. Hamada; D.T. Nguyen; S. Inoue; M. Satake; S. Kobayashi; C. Okada; K. Ogata; M. Okada; T. Sengoku; Y. Goto; H. Suga LimF is a versatile

prenyltransferase for histidine-C-geranylation on diverse non-natural substrates, *Nat. Catal.*, **5**, 682-693 (2022).

Y. Zhang; K. Hamada; M. Satake; T. Sengoku; Y. Goto; H. Suga Switching Prenyl Donor Specificities of Cyanobactin Prenyltransferases, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 23893-8 (2023).

Y. Zhang; Y. Goto; H. Suga Modulating the acceptor preference of His-C-geranyltransferase LimF, *Isr. J. Chem.*, in press (2024).

膵臓発生分化および機能維持における亜鉛酵素の役割解明

白木 伸明

(東京工業大学・生命理工学院)

【目的】

糖尿病患者や糖尿病モデルマウスでは膵臓での亜鉛の減少が認められることから、糖尿病の発症や進行における亜鉛代謝異常の関与が示唆されている。また、膵臓には亜鉛酵素である炭酸脱水酵素、カルボキシペプチダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼなどが発現する。このように、成人の膵臓における亜鉛酵素の役割は研究されているが、発生分化過程においてこれらの亜鉛酵素が果たす具体的な役割はまだ十分に理解されていない。

本研究では、まずはヒト iPS 細胞の膵臓分化系を用いて、膵臓の各発生分化段階で発現する亜鉛酵素を明らかにする。さらに、ゲノム編集技術と特殊組成培養液を組み合わせることで、上記のように既に成熟膵臓β細胞での発現が報告されている亜鉛酵素に加えて、新たに同定した亜鉛酵素が膵臓発生に果たす役割を明らかにすることを旨とする。

【方法】

未分化ヒト iPS 細胞をβ細胞へと分化誘導し、未分化細胞、胚性内胚葉、膵臓前駆細胞、および膵臓β細胞における網羅的遺伝子発現解析を RNA シーケンス法により評価した。膵臓β細胞特異的に発現する遺伝子の内、亜鉛酵素遺伝子を抽出した。また、グルコース応

答性インスリン分泌試験を実施し、インスリン分泌と発現が相関する遺伝子を抽出した。

【結果】

検討の結果、各分化段階で特異的に発現する遺伝子を抽出することに成功し、膵臓前駆細胞および膵臓β細胞において5倍以上の発現上昇を示す71個および241個の遺伝子をそれぞれ同定した。この遺伝子群には前駆細胞では1つ、β細胞では6つの亜鉛酵素が含まれていた。さらに、インスリン分泌と発現が相関する複数の遺伝子も見出した。

【考察】

同定した亜鉛酵素は、膵臓発生分化において重要な役割を果たしている可能性があり、現在、これらの亜鉛酵素の機能的な重要性を評価するため、遺伝子ノックダウン実験を実施している。さらに、インスリン分泌と発現が相関する遺伝子はβ細胞の機能を推定するための有用なマーカー遺伝子候補として注目し、詳細な解析を進めている。これらの発見は、膵臓分化および機能制御における亜鉛酵素の役割について新たな洞察を与え、今後の糖尿病研究への応用可能性を示唆している。

電極による「電子供与システム」を活用する微生物酵素探索

竹内 道樹

(京都工芸繊維大学)

【研究の背景と目的】

「電子供与システム」は、微生物活性を顕在化させるシステムとして重要である。「電子供与システム」の産業への応用に成功した例として、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用いた NAD(P)H 再生系による、キラルアルコール生産が挙げられる。GDH による NAD(P)H 再生系を共存させることで、立体選択性の高い酵素活性の顕在化に成功している¹⁾。GDH による NAD(P)H 再生系は極めて有用な「電子供与システム」であるが、NAD(P)H よりも酸化還元電位が負の化合物を還元することは熱力学的に難しい。そこで本研究では、酸化還元電位がより負の化合物として、酸

性～中性条件における還元型メチルピオロゲンに着目し、NAD(P)Hでは還元が難しい化合物の還元への応用を考えた。pH酸性～中性では、メチルピオロゲンの酸化還元電位が、相対的にさらに負になるため、NAD(P)Hで還元することは難しいが、電極を用いれば、pHに関わらず容易に還元型メチルピオロゲンを供給できる。電極によりメチルピオロゲンを還元・供給し、NAD(P)Hでは還元が難しい化合物を還元できる酵素の取得を目標とした。本研究で狙う酵素反応の既報例としては、タングステン酵素のギ酸脱水素酵素によるCO₂還元が挙げられる²⁾。このようなユニークな酵素の取得を目指して、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系を構築し、微生物探索を実施した。

本研究での探索ターゲットとして、CoA化を介さないコハク酸の1,4-ブタンジオールへの直接還元とした。酸性条件下での還元型メチルピオロゲンは、還元力が非常に強いため、カルボン酸のアルデヒドへの直接還元（一般的にCoA化を介して還元される）も熱力学的に可能である。Genomatic社が報告した、CoA化を介するコハク酸から1,4-ブタンジオールへの還元も、CoA化を介さずに還元できる可能性があり、バイオポリマー原料の生産において、大きなインパクトをもたらさう。

【方法・結果】

BMAL-CHO脱水素酵素³⁾はモリブデン酵素であり、サリチルアルデヒドを基質とすることから、還元型メチルピオロゲンを供給することで、サリチル酸還元が可能と期待できる。本酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌を用いたサリチル酸還元をモデルとして、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系の構築に取り組んだ。休止菌体を用いて電極により活性を検出するには、活性がかなり高い必要がある。そのため、菌体濃度を高くする工夫として、サンプルホルダー9.0 mm φ (BAS社製、**図1**)内に高濃度の菌体を添加し、グラッシーカーボン作用電極をセットした。

反応液として1.6 mM サリチル酸、1.6 mM メチルピオロゲン、20 mM KPB pH 6.0を含む溶液を用いた。構築した系を用いて測定した結果を**図2**に示す。サリチル酸添加時において、触媒電流が観察されたことから、還元型メチルピオロゲンによりサリチル酸が還元

されていると考えられる (**図3**)。

休止菌体を用いて活性を検出できたことから、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系が構築できたと考え、本系を用いた微生物酵素の探索を実施した。探索ターゲットの反応として、コハク酸からコハク酸セミアルデヒドへの直接還元できる微生物酵素の取得を試みた (**図4**)。



図1 測定に用いた電気化学測定セル

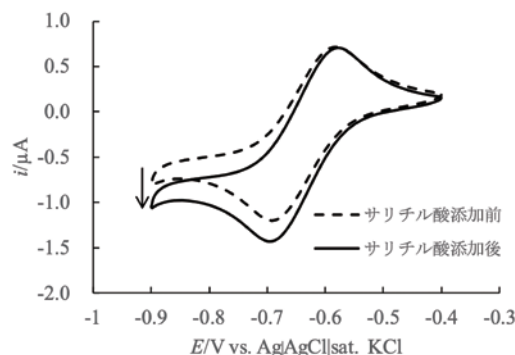


図2 BMAL-CHO脱水素酵素遺伝子発現組換え大腸菌を用いたサリチル酸の還元

スループロット性が低いことから、探索対象をある程度絞る必要があったため、BMAL-OH資化性菌からBMAL-CHO脱水素酵素が取得された経緯を踏まえて、1,4-ブタンジオール資化性菌を探索対象とした。1,4-ブタンジオールを単一炭素源とする培地として、0.1 % NH₄Cl, 0.2 % K₂HPO₄, 0.005 % MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 % Yesat extract, 0.5 % 1,4-ブタンジオール, 1 μM Na₂MoO₄を含む培地を用いた。集積培養を実施し、取得した菌株を用いて、コハク酸還元活性を本系により評価した。現在のところ、還元型メチルピオロゲンを

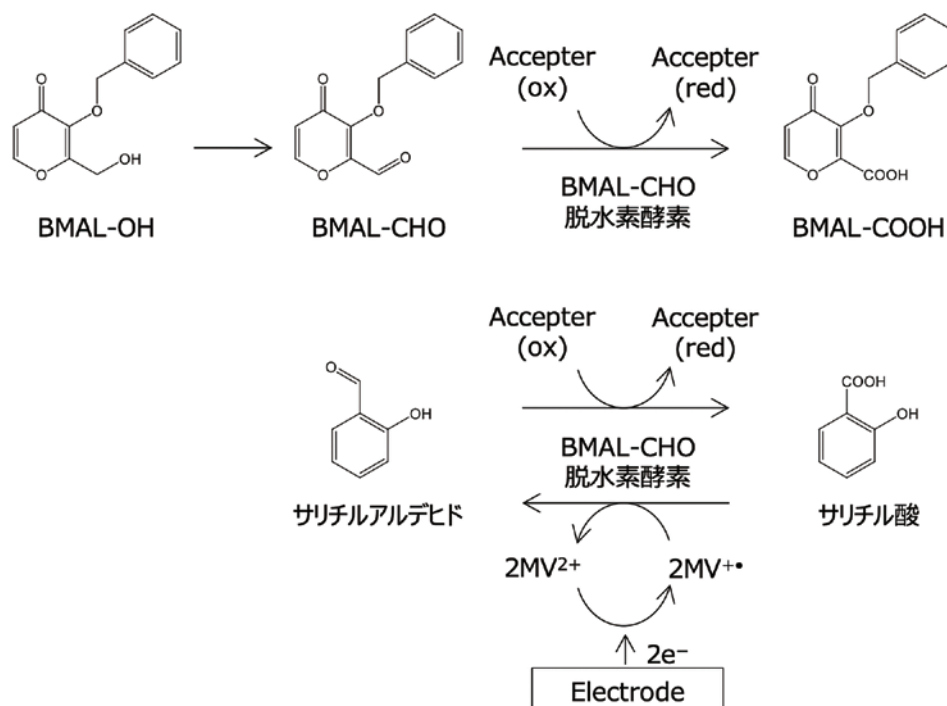


図3 BMAL-CHO脱水素酵素の触媒する反応と本研究で構築した電極による電子供与システム

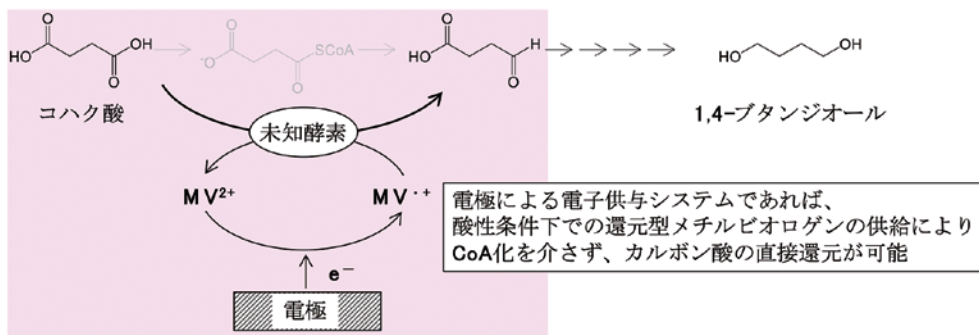


図4 本研究でターゲットとした微生物酵素(コハク酸からの1,4-ブタンジオール生産)MV, メチルビオロゲン

利用してコハク酸を還元する微生物は取得できていないが、今後探索を継続し、ユニークな微生物酵素の取得を試みる。

【参考文献】

- 1) 八十原 良彦, 木崎 憲之, 川野 茂, 長谷川 淳三, 高効率バイオ不斉還元システムの開発と工業化 2006年農芸化学技術賞
- 2) K. Sakai, B.C. Hsieh, A. Maruyama, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kano, Interconversion between formate and hydrogen carbonate by tungsten-containing formate dehydrogenase-catalyzed

mediated bioelectrocatalysis. *Sens. Bio-Sens.* 5, 90–96 (2015)

- 3) I. Kozono, M. Hibi, M. Takeuchi, J. Ogawa, Purification and characterization of molybdenum-containing aldehyde dehydrogenase that oxidizes benzyl maltol derivative from *Pseudomonas nitroreducens* SB32154. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 84, 2390–2400 (2020)

青色光に応答した気孔開口の必須因子 BLUS1 キナーゼを介したシグナル伝達機構の解明

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、一对の孔辺細胞により形成される孔であり、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や蒸散を介した根からの水や無機養分の取り込みを促進する。フォトリポピンは植物に特有の青色光受容体キナーゼであり、細胞膜 H^+ -ATPase の活性化を介して気孔開口の駆動力を形成する。我々はサーマルイメージングを用いた変異体スクリーニングから、気孔開口の必須因子 BLUS1 キナーゼを同定し、BLUS1 がフォトリポピンと相互作用し光依存的にリン酸化される基質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明らかにするため、孔辺細胞において BLUS1 と複合体を形成する因子の探索と機能解析を行った。

【方法】

緑色蛍光タンパク質 GFP を融合した BLUS1 を発現する形質転換体から孔辺細胞プロトプラストを単離し、GFP 抗体を用いた免疫沈降を行い、GFP-BLUS1 と共同沈降するタンパク質を質量分析により同定した。同定された因子について、生化学的・細胞生物学的解析を実施するとともに、T-DNA 挿入変異体を用いた機能解析を行った。

【結果】

上記の免疫沈降産物の質量分析から、GFP-BLUS1 と共同沈降する因子として、プロテインキナーゼやホスファターゼ、機能未知因子など、多くの因子が同定された。このうちのひとつについて、生化学的・細胞生物学的解析により興味深い結果が得られている。本因子は *in vitro* において BLUS1 と直接相互作用し、BLUS1 のキナーゼ活性を上昇させることが分かった。本因子を GFP と融合し共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在を解析したところ、細胞質において蛍光が観察された。一方で、BiFC アッセイにより BLUS1 と本因子

を共発現させた細胞では、細胞膜において蛍光が観察された。このことから、BLUS1 と本因子は複合体を形成すると、細胞膜にリクルートされる可能性が示唆される。

【考察】

本研究により、本因子は細胞膜において BLUS1 のキナーゼ活性を制御する活性制御因子として機能する可能性が示唆される。本因子には重複遺伝子が存在し、シロイヌナズナの多重変異体は致死性を示すことが分かった。今後は孔辺細胞特異的 amiRNA やゲノム編集を利用して、*in vivo* における機能について解析を進める。

エクテナサイジン 743 高機能化類縁体の化学 - 酵素合成

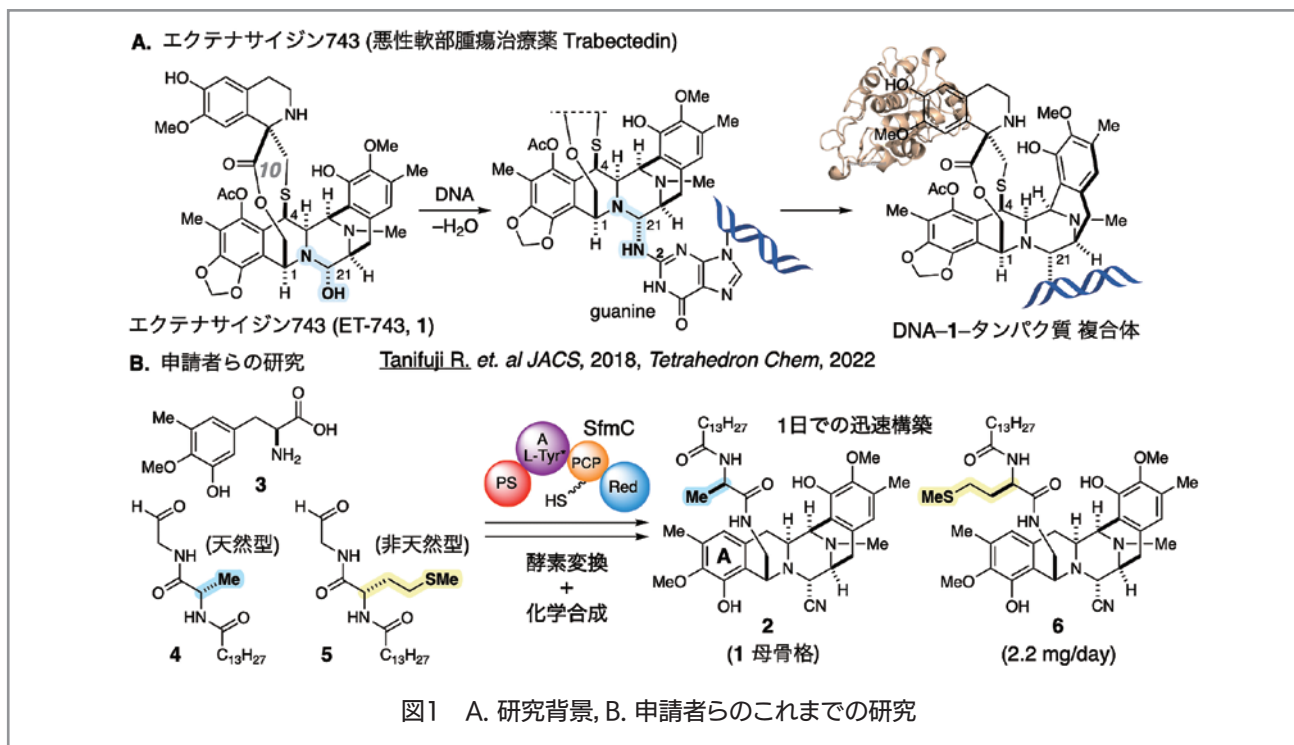
谷 藤 涼

(東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻)

【目的】

海洋天然物エクテナサイジン 743 (1) は、DNA・核内タンパク質と三成分複合体を形成して強力な生理活性を発現する中分子であり、悪性軟部腫瘍の治療薬 Trabectedin として各国で臨床応用されている (図 1 A)。多官能性の複雑な縮環骨格を有するため、1 の半合成には 20 工程以上の化学変換を必要とし、構造多様化の障壁となっている。

申請者らは非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) のモジュールである SfmC を活用し、1 の母骨格 (2) を単純な基質 (3, 4) から 1 日以内で迅速合成するプロセスを開発している (図 1 B)¹⁾。合成基質 (5 等) を用いて、適用範囲の拡大も進めている²⁾。本研究はこのハイブリッド合成法を基盤とし、骨格修飾酵素群とのカスケード酵素変換や化学変換を駆使した 1 の高機能化類縁体の迅速合成を目的とした。



【方法】

合成基質 **3**, **4** から、酵素 SfmC の連続変換により五環性骨格 **2** 等を合成する。擬対称構造を解消しながら短工程で変換するため、A 環を位置選択的に酸化する。化学変換では得難い選択性であるため、FAD 依存性モノオキシゲナーゼを活用する。その後数段階の化学変換と酵素的脱アシル化を経て、マクロ環構造を有する高機能化類縁体を合成する。

【結果】

大腸菌発現系にて NRPS モジュールと FAD 依存性モノオキシゲナーゼをそれぞれ発現・精製した。補酵素 NADPH, ATP, FAD の存在下、合成基質 **3**, **4** 等と 2 つの酵素をワンポットで作用させた。検討開始当初、A 環が選択的に酸化された目的の五環性骨格は、中間体に対して痕跡量のみ得られた。補酵素である FAD の当量、モノオキシゲナーゼの精製方法を最適化したところ、ほとんどの中間体が位置選択的に酸化された。現在、NADPH 再生系の適用と単離スケールでの合成を進めている。

設計中分子群の合成には長鎖脂肪酸側鎖を除去する必要があるため、膜貫通型ペプチダーゼの活用も検討した。ペプチダーゼを発現した大腸菌を破碎した後、膜画分を回収して半合成基質にそれぞれ作用させた。低収率ながら脱アシル化が進行し、目的の一級アミンが

得られた。

【文献】

- 1) Tanifuji, R.; Oikawa, H.; Oguri, H. *et al.* Chemo-enzymatic Total Syntheses of Jorunnamycin A, Saframycin A, and N-Fmoc Saframycin Y3, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 10705–10709 (2018).
- 2) Tanifuji, R.*; Haraguchi, N., Oguri, H.*: Chemo-enzymatic total syntheses of bis-tetrahydroisoquinoline alkaloids and systematic exploration of the substrate scope of SfmC, *Tetrahedron Chem*, **1**, 100010 (2022).

一分子ディスプレイとバイオインフォマティクスの統合によるトランスグルタミナーゼの基質嗜好性の網羅的解析

ダムナニョヴィッチ ヤスミナ

(名古屋大学大 生命農学研究科 応用生命科学専攻 分子生物工学研究室)

【目的】

本研究は、独自に確立したトランスグルタミナーゼ (TG) 基質スクリーニング系とバイオインフォマティクスを駆使することで、医学研究やバイオテクノロジーにおいて重要な TG であるヒト TG1 および微生物 TG

(MTG)の基質プロファイルを包括的に分析し、反応性の高い基質ペプチドを創成し、また新奇な天然たんぱく質基質分子を見出すことを目的としている。

【方法】

申請者は、図1に示す実験手法によって、ヒトTG1とMTGの基質プロファイリングを行った。まず、TG1とMTG基質ペプチドの配列に、Qの前後の複数のアミノ酸残基にNNKコドン(ランダム変異のため)を入れ、DNAライブラリーを作成した(図2)。

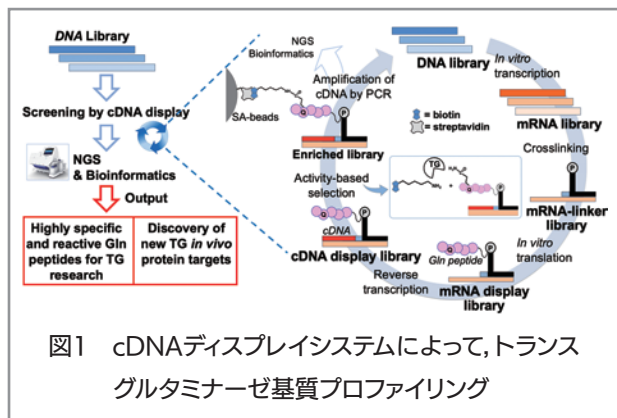


図1 cDNAディスプレイシステムによって、トランスグルタミナーゼ基質プロファイリング

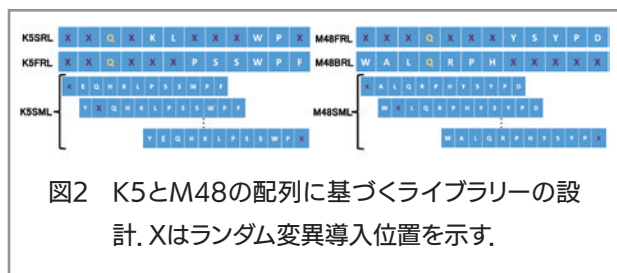


図2 K5とM48の配列に基づくライブラリーの設計。Xはランダム変異導入位置を示す。

In vitro 転写後、作製した mRNA ライブラリーにピューロマイシンリンカーを化学結合させ、無細胞タンパク質合成反応を行うと、mRNA がコードするペプチドが翻訳され、mRNA に結合したピューロマイシンがリボソームによる合成過程でペプチド鎖に取り込まれる。次に、逆転写によって cDNA-ピューロマイシンリンカー-ペプチドライブラリーが形成される。得られた cDNA ディスプレイを、TG (TG1 または MTG) 存在下、ビオチン化一級アミンと反応させる。目的の TG と反応させた cDNA ディスプレイ複合体をストレプトアビジンプルダウンにより濃縮し、選択した各プールの反応性を評価した。反応性の高い DNA プールは NGS とバイオインフォマティクスを用いて解析した。

【結果】

TG1 と MTG に好まれる配列プロファイルを同定し、その情報を用いて、TG1 と MTG に対する反応性が高

く特異的な基質となるペプチドプローブの候補を同定した。これらのペプチド配列を、さまざまなアッセイで評価し、最も反応性が高く特異的なものを同定した(図3:A,B)。TG1 基質特異性のスコアリングマトリクスデータを用い、我々が以前に開発したオリジナルプログラムにより、ヒトタンパク質データベースを検索した。発見された基質候補タンパク質は、その一次構造における実験的に濃縮されたモチーフの出現率に基づいてランク付けした(図4)。

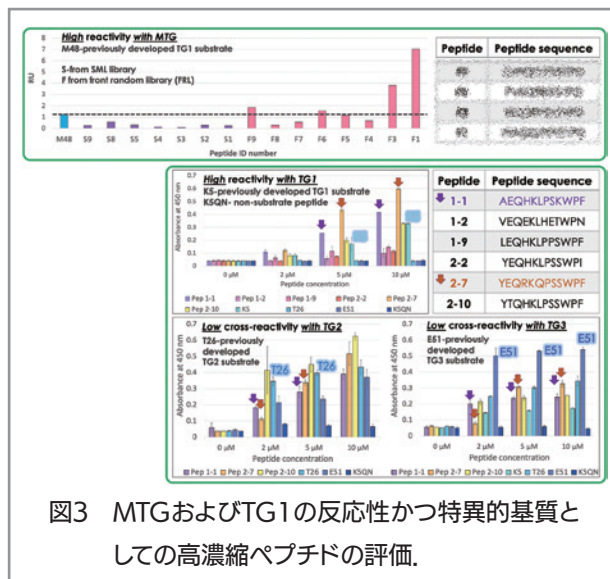


図3 MTGおよびTG1の反応性かつ特異的基質としての高濃縮ペプチドの評価。

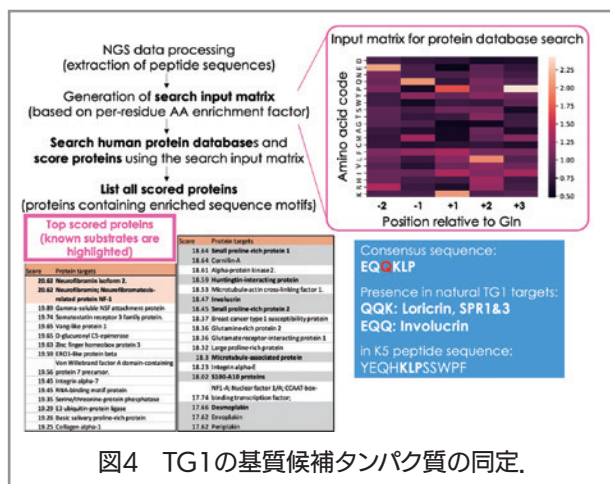


図4 TG1の基質候補タンパク質の同定。

【考察】

現在、プロテオミクス手法を用いて、TG1の基質として高ランクの候補タンパク質を調査している。TG1の新たな基質が確認されれば、TG関連疾患の創薬ターゲットになりえる。新たに発見されたTG1のペプチド基質は、TG1研究を促進し、TG1阻害剤設計のための新しい鑄型となることが期待される。

同定された高反応性MTG配列は、現在競合アッセ

イにより特異性を調べている。ここでは、ランダムなグルタミンを持つペプチドと実験により選択された反応性の高いペプチドを混合し、どの配列がMTGによって架橋されるかを解析することで、高濃縮されたペプチド候補のうち、どのペプチドが食品や医薬品産業で注目される部位特異的架橋反応に使用できるか検討中である。

【文献】

1. Munaweera, T., I., K., Damjanovic, J., (corresponding), Camagna, M., Nezu, M., Jia, B., Hitomi, K., Nemoto, N., Nakano, H.: Substrate profiling of human Transglutaminase 1 using cDNA display and next-generation sequencing, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 88, 620-629 (2024).

酵素の安定発現を実現させる「酵素」の解析

茶谷悠平

(岡山大学学術研究院 環境生命自然科学学域 (理))

【目的】

リボソームは万能のタンパク質合成装置ではなく、特定のアミノ酸配列の合成（翻訳）に困難が伴うことが明らかになってきた。これは合成途中の新生ペプチド鎖が、リボソームの内部構造を歪めて様々な異常を誘発するためである。本研究課題では、上記「難翻訳配列」への対抗手段として働く新規翻訳制御因子、ABCFタンパク質の作用機序解明を試みた。

【方法、結果】

大腸菌が保持する4種のABCFタンパク質が、構造的に類似しながら異なる難翻訳配列に作用する原理を解明すべく(図1)、「歪み」が発生しているリボソーム内部に作用するリンカーモチーフに着目した解析を行った。本研究では大腸菌 SecM による翻訳停止を解消する YheS タンパク質のリンカーモチーフに網羅的な変異導入（アラニンスキャニング）を行い、YheS の翻訳促進活性への影響を評価した。

解析の結果、複数のアミノ酸残基が YheS の機能に重要であることが示された(図2)。まず tRNA と相互作用するリンカーモチーフ先端には、当初予想されて

いたように重要残基が多数見出された。加えて、リンカーの基部領域に見られる F298, F300, F302 からなるフェニルアラニンクラスターの重要性が明らかとなった。同部位はリンカーを ATPase ドメイン -2 に固定し、タンパク質の構造全体を安定化するように働いているものと考えられる。興味深いことに、変異解析から重要性が示唆されたアミノ酸残基は異なる細菌種の YheS 間でも保存される傾向にあり、配列解析からも遺伝学的解析の結果が支持された。

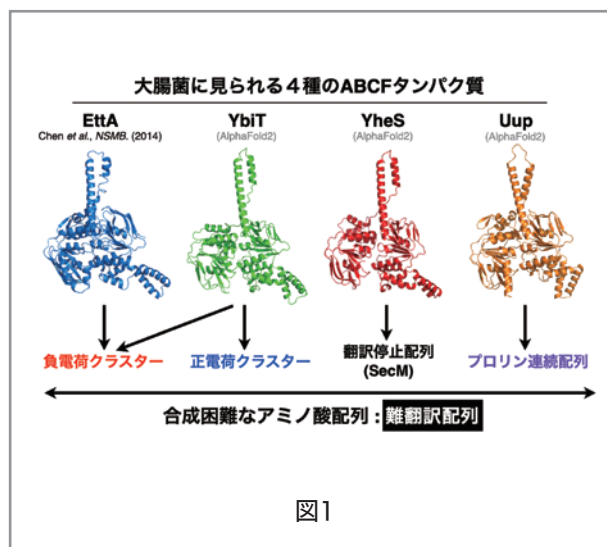


図1

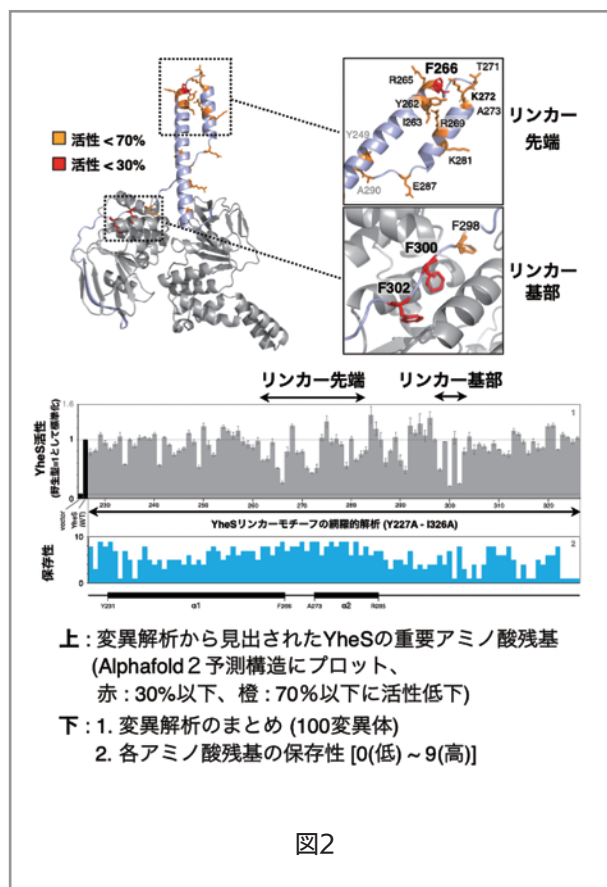


図2

上: 変異解析から見出されたYheSの重要アミノ酸残基 (AlphaFold2 予測構造にプロット、赤: 30%以下、橙: 70%以下に活性低下)
 下: 1. 変異解析のまとめ (100変異体) 2. 各アミノ酸残基の保存性 [0(低)~9(高)]

【考察】

本研究から、YheS が機能するうえで重要なアミノ酸残基が明らかとなった。YheS はすでに構造が報告されている EttA と同様、リンカー先端でリボソーム内部の tRNA などと相互作用し、アミノ酸配列に起因する歪みの解消から翻訳異常を解消しているものと考えられる。今後、構造解析あるいは他の ABCF との比較などを行っていくことで、YheS をはじめとした ABCF タンパク質による翻訳異常解消の詳細な分子メカニズムが明らかになるものと考えている。

【本助成に基づく成果発表（文献）】

1. Akinao Kobo, Hideki Taguchi, Yuhei Chadani
Non-specific N-terminal tetrapeptide insertions disrupt the translation arrest induced by ribosome arresting peptide sequences. *The Journal of Biological Chemistry* **300**, 107360. (2024)
2. Yuhei Chadani, Shun Yamanouchi, Eri Uemura, Kohei Yamasaki, Tatsuya Niwa, Toma Ikeda, Miku Kurihara, Wataru Iwasaki, Hideki Taguchi
The ABCF proteins in *Escherichia coli* individually cope with ‘hard-to-translate’ nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Research* **52**, 5825-5840 (2024)
3. Yuhei Chadani, Takashi Kanamori, Tatsuya Niwa, Kazuya Ichihara, Keiichi I. Nakayama, Akinobu Matsumoto, Hideki Taguchi
Mechanistic dissection of premature translation termination induced by acidic residues-enriched nascent peptide. *Cell Reports* **42**, 113569. (2023)

硫黄資化に関わるチオ硫酸イオン分解酵素の解析

塚崎 智也

(奈良先端科学技術大学院大学)

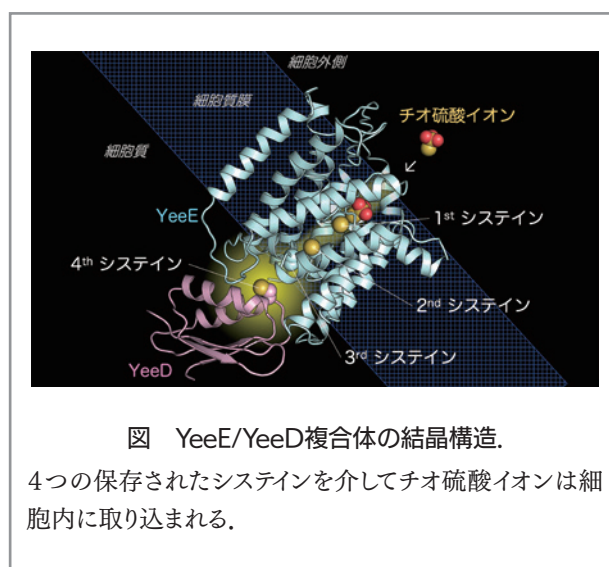
【目的】

本研究は、細菌におけるチオ硫酸イオンの取り込みと分解に関与する YeeE および YeeD の協働メカニ

ズムを解明することを目的とし、特に YeeE-YeeD 複合体の X 線結晶構造解析を行いました。これらの相互作用と酵素活性を明らかにすることで、細菌の硫黄代謝経路に関する新たな知見を提供することを目指しました。

【方法】

YeeE-YeeD 複合体の X 線結晶構造解析を行いました。まず、結晶化条件の最適化を進め、最終的に 2.60Å の分解能で結晶構造を決定しました (図)。また、YeeD によるチオ硫酸イオンの分解活性を、蛍光試薬を用いて可視化し、分解反応中間体を質量分析で同定しました。



【結果】

X 線結晶構造解析により、YeeE と YeeD が密接に相互作用し、チオ硫酸イオンが YeeE から YeeD に受け渡されるメカニズムが明らかになりました。YeeE に保存された 3 つのシステインがチオ硫酸と相互作用しながら細胞内に取り込み、YeeD の保存されたシステイン残基がチオ硫酸と結合し、分解反応を進行させる重要な触媒部位として機能することが示されました。

【考察】

分子動力学シミュレーションにより、チオ硫酸が結合した YeeD が YeeE から解離しやすくなることが示されました。これにより、YeeE はチオ硫酸を細胞内に輸送し、その後、YeeD がチオ硫酸と結合し、複合体が解離することでチオ硫酸を効率的に分解し、細菌の硫黄同化に寄与することが分かりました。この知見は、細菌の硫黄代謝における新たな経路を明らかにするとともに、産業的

応用にもつながる基盤情報を提供します。

【文献】

Ikei, M., Miyazaki, R., Monden, K., Naito, Y., Takeuchi, A., Takahashi, Y.S., Tanaka, Y., Murata, K., Mori, T., Ichikawa, M. and Tsukazaki, T. : YeeD is an essential partner for YeeE-mediated thiosulfate uptake in bacteria and regulates thiosulfate ion decomposition, PLoS Biol., 22; e3002601 (2024).

リン脂質ホスファターゼが制御する膵臓がん細胞 特性の解析

長谷川 純矢

(北里大学薬学部)

【目的】

膵臓がんは、日本において5年生存率が10%以下と他のがんと比べて極めて低く、難治性がんの代表である。その新たな治療法の開発のため、その発症・増悪に関与する分子メカニズムの解明は必要と言える。イノシトールリン脂質(PIPs)は脂肪酸鎖を2つと極性基にイノシトールを持つリン脂質で、そのイノシトールの3,4,5位の水酸基のリン酸化により、計8種類の異性体が存在する。そのリン酸化を主に制御しているのが、PIPsホスファターゼである。申請者は、The Cancer Genome Atlas データベースを活用し、PIPsホスファターゼの発現と膵臓がん患者の生存率の関連を網羅的に解析した。その結果、PIPsの一つホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) を脱リン酸化する酵素 MTMR3 の低発現が、膵臓がん患者の予後を悪化させていることが判明した。そこで本課題は、MTMR3/PI3Pによる膵臓がん細胞の増殖メカニズムの解明を目的とした。

【結果】

膵臓がん細胞株 PANC-1 細胞で、MTMR3 ノックダウンにより PIPs レベルを測定したところ、PI3P が蓄積していた。その条件下で、細胞増殖シグナルである ERK1/2 のリン酸化の亢進並びに高い細胞増殖能が認められ、MTMR3 により制御される PI3P レベルが膵臓がん細胞の増殖に重要であることが示唆された。PI3P

はエンドソームに局在することが知られているため、MTMR3 欠損によるエンドソームの挙動を観察した。その結果、Rab5 陽性エンドソームの肥大化が認められ、MTMR3 欠損による PI3P の蓄積はエンドソームに影響を及ぼすことが推測された。実際、MTMR3 欠損により、EGF 受容体の細胞内輸送が遅延し、エンドソーム-リソソーム間の輸送が障害されていた。以上のことから、MTMR3/PI3P はエンドソームを介した細胞内膜輸送を制御し、すい臓がん細胞の増殖をコントロールしていることが示唆された。

【考察】

本研究ではリン脂質である PI3P ががん細胞の増殖を制御していることを明らかにしたが、その脂質がどのように細胞内シグナル ERK1/2 を操作しているのかまだ未解明である。今後 PI3P に結合する標的タンパク質を同定し、PI3P の細胞増殖シグナルを明確にしたい。さらに将来的には、膵臓がんに対する新しい創薬ターゲットの提示をしたい。

糖代謝関連酵素が制御する新たながん細胞の免疫 回避機構の解明

早川 芳弘

(富山大学 和漢医薬学総合研究所)

【目的】

悪性化進展に伴うがん細胞の遺伝子的進化は腫瘍に不均一性を与え、それによってがん細胞の生体適応性、治療抵抗性、転移能の獲得が促進される。一方、腫瘍の発生・増殖の過程で、免疫応答による排除を回避する能力を有した腫瘍細胞の選択が起きる事は免疫エディティングとして知られている。既に抗原特異的ながん免疫応答においては、がん抗原や抗原提示分子 MHC の発現低下、T 細胞疲弊や抑制性免疫細胞の誘導によってがん細胞が免疫監視から逃避することが数多く報告されているが、どのような分子機序によってがん細胞が抗腫瘍エフェクター細胞による傷害機構に対して抵抗性を獲得し、さらに免疫応答からの排除を回避するのか、その詳細な機構は未だ明らかでない。つまり、がん細胞の免疫逃避に関わるメカニズムを明らかにする

ことは、がん免疫療法の強化に繋がる点で大きな意義を持つ。申請者はこれまでの研究成果から、がん抗原特異的 CTL による IFN- γ 依存的な免疫応答が、DNA 損傷応答や遺伝子改変酵素群の発現誘導によって、がん細胞の免疫適応や悪性化進展に関わること¹⁾、免疫抵抗性を獲得したがん細胞ではレドックス関連遺伝子である GSTA4 の高発現により IFN- γ 誘導性の酸化ストレス応答に対して耐性を示すことを報告した²⁾。さらにこれらの成果に加え、免疫抵抗性を獲得したがん細胞の包括的なメタボローム解析から、免疫逃避に関わる糖代謝経路を新たに見出した。これらの背景から、本研究ではがん細胞の免疫抵抗性の獲得に重要な糖代謝経路へのスイッチに関わる酵素が制御する新たな免疫回避機構を解明し、さらにはがん免疫治療法の新規創薬ターゲットの創出へとつなげることを目的とした。

【方法・結果】

免疫抵抗性獲得がん細胞バリエーションは、HA 発現 4T1 乳がん、または CMS5a 線維肉腫はそれぞれの腫瘍抗原 T 細胞の養子免疫療法したマウスから¹⁾、OVA 発現 B16 メラノーマは OVA 抗原ワクチン投与マウスから²⁾それぞれ樹立した細胞株を用いた。また糖代謝酵素の阻害には特異的阻害剤を用い、細胞生存率は WST-8 試薬を用いて評価した。また in vivo における抗マウス PD-1 抗体 (BioXCell) を用いた免疫療法に対する感受性を共阻害剤との併用効果を評価した。その結果、免疫抵抗性獲得がん細胞バリエーションでは糖代謝経路の活性化が認められ、さらにこの代謝経路へのスイッチを担う律速酵素の遺伝子発現および酵素活性が亢進していた。またこの代謝経路の阻害は in vitro における免疫回避形質を獲得したがん細胞の IFN- γ への応答性を回復し、さらに in vivo における PD-1 抗体により誘導される抗腫瘍免疫応答への感受性を回復させた。以上の結果は、免疫エディティングによる免疫回避能力の獲得にはがん細胞の代謝シフトに関わること、またこの代謝経路の阻害が免疫応答性の回復につながる可能性があることを示唆すると考えられた。

【考察】

がん細胞が免疫療法に対する治療耐性を獲得する要因として、がん細胞におけるがん抗原・MHC 分子の発現低下、IFN シグナルの欠失などによって免疫監視か

ら逃避することが指摘されているが、がん細胞がどのような分子機序によって免疫応答による排除に対して抵抗性を獲得するのか詳細な機構について全く明らかでなく、がん細胞の代謝スイッチに着目してそのメカニズムの一端を示す結果が得られたことは、これまでにない全く新たなアプローチでのがん免疫療法の強化に繋がる点で大きな意義を持つと考えられる。

【文献】

1. Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, Ogasawara K, Okumura K, Thomas DM, Smyth MJ. IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat Commun.* 2017;8:14607.
2. Ucce S, Yokoyama S, Mojic M, Oki K, Ohshima C, Tsuihiji H, Takasaki I, Tahara H, Hayakawa Y. GSTA4 governs melanoma immune resistance and metastasis. *Mol Cancer Res.* 2022; 21(1):76-85.

M 期テロメア脱保護を促進する酵素の探索と解析

林 眞 理

(京都市大学院医学研究科 先端・国際医学講座 IFOM-KU 国際共同ラボ)

【目的】

ヒト細胞の細胞周期を有糸分裂 (M) 期に停止させると、テロメアの保護機構が失われ (M 期テロメア脱保護)、テロメア末端が DNA 傷害として認識される^{1, 2, 3)}。我々は、RECQ ファミリー因子 WRN が M 期テロメア脱保護を抑制することや、WRN-S282 のリン酸化が抑制能を阻害することを発見した⁴⁾。そこで本研究では、WRN による脱保護抑制機構の分子メカニズムの解明を目指した。

【仮説】

WRN は、M 期テロメア脱保護を促進する因子と結合することで、当該因子の機能を抑制する。この結合は S282 のリン酸化によって阻害される。

【方法】

M 期テロメア脱保護の抑制能をもつ WRN の断片 WRN168-333、および脱保護の抑制活性を失う S282D リン酸化模倣変異体を用いた免疫沈降産物の質量分析

と比較を行い、S282D で結合が消失する因子を候補因子とした。本研究では候補因子の一つから、BLM ヘリケースと結合して酵素活性を補助すると報告されている SPIDR に着目し⁵⁾、shRNA によるノックダウンによって M 期テロメア脱保護機能を検証した。

【結果】

SPIDR のノックダウンは、通常の細胞周期においてテロメアの脱保護を引き起こすことが分かった。一方、M 期停止中のテロメア脱保護は、コントロール shRNA と比較して影響を受けていないことが示唆された。

【考察】

我々は BLM が M 期脱保護を促進することを発見していたが、SPIDR は M 期脱保護に関与しないことが示唆された。一方、通常の細胞周期において SPIDR がテロメア保護に必要であるという興味深い制御機能の存在が示唆された。

【文献】

- [1] MT Hayashi, *et al.*, *NSMB*, 2012;
- [2] AJ Cesare, *et al.*, *Mol Cell*, 2013;
- [3] MT Hayashi, *et al.*, *Nature*, 2015;
- [4] D Romero-Zamora and MT Hayashi, *Sci Rep*, 2023);
- [5] Li Wan, *et al.*, *PNAS*, 2013.

グラム陰性菌感染によるシステインプロテアーゼの活性化と感染病態への影響

原 英 樹

(旭川医科大学)

【目的】

グラム陰性菌は外膜にリポポリサッカライド (LPS) を発現しており、細胞内に LPS を曝露することでシステインプロテアーゼであるカスパーゼ 11 を活性化させる。LPS を認識したカスパーゼ 11 はガスダーミン D を活性化することで細胞死を誘導し、二次的にインフラマソーム応答を活性化する。本研究では、薬剤耐性化が国際問題となっている *Acinetobacter baumannii* (アシネトバクター) 感染におけるカスパーゼ 11 の役割と感染病態への影響を検討した。

【方法】

マウス骨髄から分化したマクロファージにアシネトバクターを感染させ、カスパーゼ 11 活性化の指標として培養上清中の LDH を測定し細胞死を数値化した。また、二次的なインフラマソーム応答の指標として培養上清中の IL-1 β 濃度を ELISA で測定した。カスパーゼ 11 の関与を検証するために、同遺伝子欠損マウスおよびマクロファージを回収し、野生型との炎症応答を比較した。また、各酵素の活性化はウエスタンブロット法で活性型タンパク質を検出することで評価した。

【結果】

アシネトバクターをマクロファージに感染させるとカスパーゼ 11 依存的に細胞死が誘導された。また、細胞死依存的に二次的なインフラマソーム応答が活性化することが判明した。一方で、新たな細胞内 LPS センサーとして報告された NR4a1 の関与も検討したが有意な細胞死の低下は認められなかった。そこで、カスパーゼ 11 欠損マウスにアシネトバクターを感染させたところ臓器内菌数が減少した。

【考察】

LPS の細胞内受容体が複数報告されていることから、アシネトバクター感染病態への影響を検討したところ、システインプロテアーゼであるカスパーゼ 11 が細胞死の誘導に関与していることが判明した。一方で、他の LPS センサーの役割についてはさらなる検証が必要となる。カスパーゼ 11 の活性化が感染病態を悪化させることから、薬剤耐性化が国際的に懸念されているアシネトバクターに対する治療法の開発に向けて今後の更なる研究が期待される。

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

リゾホスホリパーゼを介した肝臓のトリグリセリド蓄積の制御機構

平 林 哲 也

(公益財団法人 東京都医学総合研究所)

【目的】

肝臓へのトリグリセリド (TG) の蓄積は、代謝機

能障害関連脂肪肝炎 (MASH), 2 型糖尿病, 心筋梗塞, 脳卒中のリスク要因であるが, 有効な治療法は確立していない。我々は最近, リゾホスホリパーゼ PNPLA7 (Patatin-like phospholipase domain containing 7) が肝臓のホスファチジルコリン分解を介してコリンやメチル基を取り出すことを報告したが, その過程で全身性 *Pnpla7* 欠損マウスの肝臓における TG の産生と分泌の低下を見出した。そこで, この遺伝子の肝臓特異的欠損マウスを用いて, リン脂質分解と TG 蓄積を繋ぐ分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】

24 時間絶食したマウスを麻酔下で灌流して肝臓を摘出した。組織片をビーズクラッシャーで破碎し, TG 含量を測定した。抽出した RNA から cDNA を合成し, リアルタイム PCR によって各種代謝酵素等の mRNA 発現量を解析した。

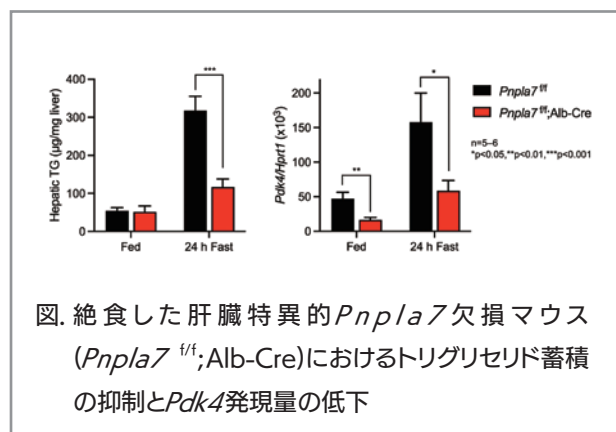


図. 絶食した肝臓特異的 *Pnpla7* 欠損マウス (*Pnpla7*^{fl/fl}; Alb-Cre) におけるトリグリセリド蓄積の抑制と *Pdk4* 発現量の低下

【結果・考察】

絶食した肝臓特異的 *Pnpla7* 欠損マウスの体重減少率は, コントロール群と同程度であったが, 肝臓への TG 蓄積は 3 分の 1 程度に減少した (図). 肝臓における脂肪酸や TG の生合成・分解に関わる酵素群の発現量は両群で有意差が見られなかった一方で, 絶食により誘導されるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 4 (PDK4) の発現は, 肝臓特異的 *Pnpla7* 欠損マウスで大きく低下していた。したがって, 肝臓の *Pnpla7* 欠損によりリン脂質分解が抑制されると, 解糖系から TCA 回路へのアセチル CoA 供給が絶食時に阻害されにくいために, 解糖系中間代謝物 DHAP から生じるグリセロール 3-リン

酸が不足し, TG 生合成が阻害される可能性が考えられた。

【文献】

- Hirabayashi, T., et al. : Hepatic phosphatidylcholine catabolism driven by PNPLA7 and PNPLA8 supplies endogenous choline to replenish the methionine cycle with methyl groups, *Cell Rep.*, **42**, 111940 (2023)
- 平林哲也, 村上誠 : 肝疾患における PNPLA ファミリーの役割. *実験医学*, **17**, 2860 (2023)

超小型改変 Cas12f ヌクレアーゼによるゲノム編集治療の確立

星野 温

(京都府立医科大学 大学院医学研究科 循環器内科学)

【目的】

ゲノム編集による遺伝子治療開発が進められているが Cas タンパク質のサイズが大きいため遺伝子送達の問題となっている。本研究では一般的に使用される SpCas9 と比較して 1/3 以下のサイズである AsCas12f に着目し, アデノ随伴ウイルス (AAV) による遺伝子送達可能な高機能ゲノム編集ツール開発に取り組んだ。

【方法】

タンパク質の 1 アミノ酸置換による機能変化を全ての 1 アミノ酸置換において評価する Deep Mutational Scanning の手法を用いて AsCas12f の機能を向上させるアミノ酸置換を網羅的に同定し, それらを組み合わせることで高機能改変体を作製する。

【結果】

AsCas12f における機能向上変異を 4 つ組み合わせることで SpCas9 と同等のゲノム編集効率を達成した。この高機能 AsCas12f を DMD 遺伝子エクソン 45 が欠損した筋ジストロフィーモデルに対してエクソン 44 を欠失してリーディングフレームを合わせるエクソスキッピング治療に応用した。DMS 遺伝子エクソン 44 上流と下流のイントロン領域において高い編集活性が得られる gRNA 領域を選抜し, 改変 AsCas12f と 2 つの gRNA を一つの AAV に搭載した。この AAV をエク

ソン 44 欠損 iPS 細胞から分化させた心筋細胞に感染させたところエクソン 44 の欠損とジストロフィンタンパク質の回復が確認された。

【考察】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは X 染色体上の DMD 遺伝子異常による筋ジストロフィーで、多くの場合エクソン欠損によるフレームシフトで遺伝子欠失となっている。そのため周辺エクソンを欠失してフレームを修復するエクソンスキッピングが治療法となる。全世界の出生男児 3500 人のうち 1 人の割合で発症する最も頻度の高い重篤な遺伝性筋疾患であるが根本的治療は確立されおらず、ゲノム編集治療による骨格筋の機能回復が期待される。

【文献】

Hino T, Omura SN, Nakagawa R, Togashi T, Takeda SN, Hiramoto T, Tasaka S, Hirano H, Tokuyama T, Uosaki H, Ishiguro S, Kagieva M, Yamano H, Ozaki Y, Motooka D, Mori H, Kirita Y, Kise Y, Itoh Y, Matoba S, Aburatani H, Yachie N, Karvelis T, Siksnyš V, Ohmori T*, Hoshino A*, Nureki O*. An AsCas12f-based compact genome-editing tool derived by deep mutational scanning and structural analysis. Cell. 2023 Oct 26;186(22):4920-4935.e23.

ポリアミン代謝酵素が作り出す腎間質ニッチに介入して腎疾患に対抗する

松井 功

(大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学)

【目的】

尿細管間質線維化病変の主要な病態は、間質細胞が筋線維芽細胞に形質転換して増殖することにある。しかし、同細胞をターゲットにした治療法は未確立である。間質細胞は in vitro 培養系で表現型維持が困難で、その機能は細胞周囲環境に強く依存する。本研究では、腎構成細胞間コミュニケーションが作り出す腎尿細管間質線維化病変のニッチを解明し、新たな抑制法開発の学術的基盤構築を目指す。

【方法】

虚血再灌流 (IRI) モデルと、糸球体上皮細胞特異的 Tln ノックアウトマウス (Pod-Tln-KO マウス) を用い、scRNA-seq により両者に共通する因子を探索した。

【結果】

Pod-Tln-KO マウスは day10 で軽度腎障害、week 5 で進行した腎障害を呈した (図 1)。Pod-Tln-KO マウスの day 10, week 5 サンプル、および偽手術マウス、IRI マウスの day 0, 2, 5, 14 サンプルで scRNA-seq を実施した。両モデルマウスに共通して出現する障害近位尿細管クラスター (PT_inj) を同定し、筋線維芽細胞 (MF) クラスターとの細胞間コミュニケーションを可視化した結果、全時相で PT_inj クラスターが MF クラスターと最も強い相互作用を示した (図 2)。

両モデルの PT_inj クラスターに高発現する遺伝子として、分泌蛋白ポリアミン代謝酵素 Aoc1 を同定した。免疫組織化学染色で、障害尿細管細胞 (Kim1 陽性) における Aoc1 発現上昇を確認した (図 3)。Aoc1 はプトレシン代謝に関与し、プトレシン投与により培養尿細管間質細胞の表現型変化が認められたことから、Aoc1-プトレシン系の進行性腎障害への関与が示唆された。

【考察】

本研究では、scRNA-seq により新たな腎尿細管間質線維化病変のニッチの存在を証明した。これらの知見は、腎尿細管間質線維化病変の形成メカニズムの理解を深め、新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。今後は、本ニッチへの介入が腎疾患治療に有用か、さらなる詳細な検討が必要であり、本研究成果を基に、腎線維化抑制のための新規治療法開発に向けた研究を継続していく予定である。

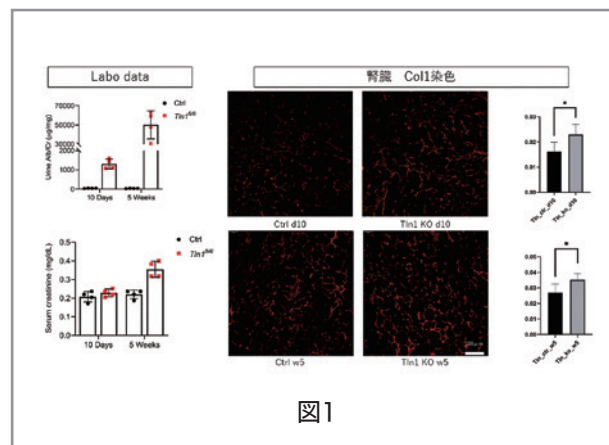


図1

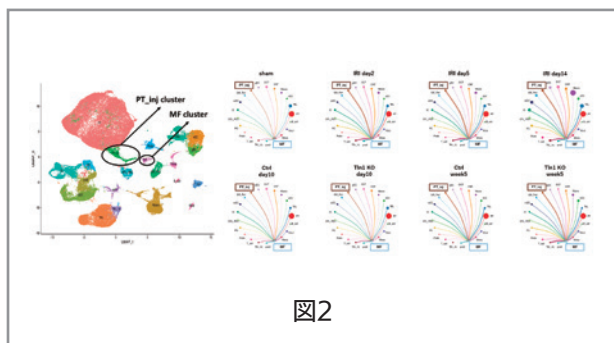


図2

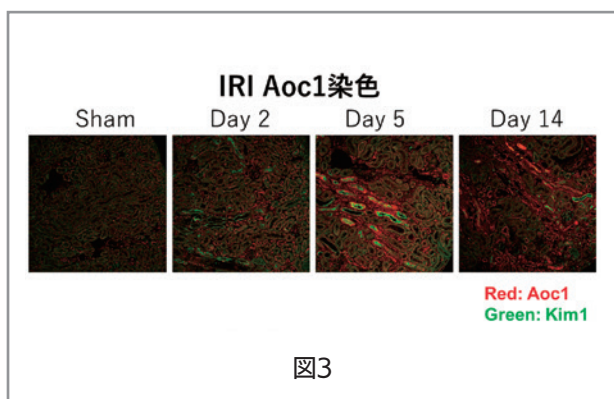


図3

カゼインキナーゼ 1 δ が概日リズム周期を決定する場所の同定

三 枝 理 博

(金沢大学 医薬保健研究域 医学系)

【目的】

視交叉上核 (SCN) は概日リズム中枢 (中枢時計) として機能する。各 SCN 細胞内で Casein kinase 1 δ (CK1 δ) はリン酸化を通して時計タンパク質 PER2 の分解速度を制御し、時計分子機構 (細胞時計) の周期決定に中核的な役割を果たす。一方で、SCN 内の複数タイプのニューロン間で役割分担があり、CK1 δ の概日周期決定への影響もニューロンタイプにより異なると考えられる。本研究では CK1 δ が概日リズム周期を決定する場 (細胞の種類) を同定することを目的とした。

【方法】

CK1 δ を SCN 全体, AVP ニューロン特異的, VIP ニューロン特異的に欠損したマウスを作成し、概日行動リズム周期を比較した (AVP, VIP ニューロンは SCN の主要なニューロン)。また、AVP ニューロン特異的 CK1 δ 欠損マウスにおける AVP, VIP 両ニューロンの細胞内 Ca²⁺ リズムを、蛍光センサー jRCaMP7s

と fiber photometry を用いて in vivo 計測した。さらに Prok2 ニューロンの貢献も調べるため、Prok2-tTA マウスを作成した。

【結果】

AVP ニューロン特異的 CK1 δ 欠損マウスの概日行動リズム周期は、正常マウスに比べ約 50 分長かった。全 SCN ニューロン欠損マウスの周期も同程度に延長した。VIP ニューロン特異的欠損マウスは正常マウスと変わらなかった。AVP ニューロン特異的欠損マウスにおける AVP ニューロン, VIP ニューロンの細胞内 Ca²⁺ リズム周期は、行動リズム周期と同程度に延長した。

【考察】

行動リズム計測から、AVP ニューロンの細胞時計周期が概日行動リズム周期の主要な決定因子であると示唆された。Ca²⁺ リズム計測は、AVP ニューロンの細胞時計周期延長に従って VIP ニューロンのそれも延長することを直接示した。よって AVP ニューロンは、SCN が発振する概日リズムの周期を決定する、ペースメーカー細胞であると示された。以上の結果を論文発表した (Tsunoo et al, 2023)。さらに Prok2 ニューロンの貢献も検討中で、そのための遺伝子改変マウスを作成し、当該ニューロンの Ca²⁺ リズム in vivo 計測にも既に成功した (Onodera et al, 2023)。

【文献】

- Tsunoo Y, Peng Y, Horike SI, Wang M, Matsui A, Yamagata K, Sugiyama M, Nakamura TJ, Daikoku T, Maejima T, Mieda M*. In vivo recording of suprachiasmatic nucleus dynamics reveals a dominant role of arginine vasopressin neurons in circadian pacesetting. *PLoS Biol* 21, e3002281 (2023).
- Onodera K, Tsunoo Y, Hiraoka Y, Tanaka K, Maejima T, Mieda M*. In vivo recording of the circadian calcium rhythm in Prokineticin 2 neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Sci Rep* 13, 16974 (2023).

AI 解析を用いたイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素 VSP の基質特異性決定部位の解明

水谷 夏希

(大阪大学大学院医学系研究科、大阪大学蛋白質研究所)

【背景・目的】

イノシトールリン脂質 (PIPs) は生体膜を構成する脂質で、細胞内シグナル伝達やイオンチャネルの活性を制御するなど生体の恒常性維持に極めて重要である。電位依存性ホスファターゼ VSP は細胞膜電位を感知する膜貫通ドメインに PIPs 脱リン酸化酵素が接続されたユニークな分子で、その酵素活性により精子の運動能を制御している。VSP の酵素ドメインとがん抑制遺伝子として有名な PIPs 脱リン酸化酵素 PTEN は高い構造類似性を持つが、VSP だけが PI(3,4,5)P₃ と PI(4,5)P₂ の 5 位リン酸基を認識し脱リン酸化する (図 1)。両分子の生理的重要性から、この基質特異性の違いを生み出す原理は研究されてきたが明らかでない。そこで機械学習を足掛かりに、VSP に固有の基質特異性の形成に寄与するアミノ酸部位の解明を目指した。

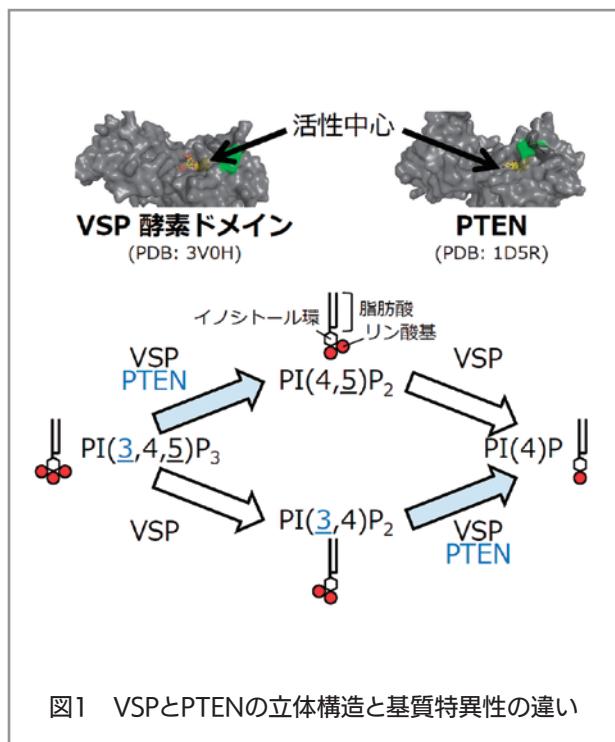


図1 VSPとPTENの立体構造と基質特異性の違い

【方法】

共同研究者 (大阪大学大学院情報科学研究科 清水

教授, 二井手助教) の開発した機械学習ツール¹⁾を用い、種々の VSP と PTEN のアミノ酸配列比較から VSP に固有の基質特異性の形成に寄与するアミノ酸残基を推定した。推定された残基のアミノ酸変異体をカタユウレイボヤ由来 VSP で作製し、アフリカツメガエル卵母細胞に各 PIPs の蛍光プローブと共発現させ、電気生理学的手法により蛍光強度の変化から電位依存的な酵素活性の強さを測定した。

【結果・考察】

VSP 234 種, PTEN 390 種のアミノ酸配列による解析から、これまでも注目されてきた G365, E411, T412 (ヒト PTEN A126, T167, I168 に相当) 残基に加え、活性中心付近の Q408 (ヒト PTEN K164 に相当) 残基が新たに基質特異性形成に寄与すると推定された。

各残基に PTEN の相当する残基のアミノ酸を導入した G365A/Q408K/E411T および T412I/Q408K/E411T 変異体は、PI(3,4,5)P₃ と PI(3,4)P₂ の 3 位リン酸基脱リン酸化活性を消失していた。個別のアミノ酸変異だけでは酵素活性の消失は再現されなかったため、活性中心を取り囲むように位置する 3 残基の変異が基質結合ポケットの構造に複合的な影響を与え、基質特異性が変化したと考えられた。また、PTEN 型にアミノ酸を変異させた VSP で PTEN と共通の基質特異性に变化が確認されたことは、VSP と PTEN で基質特異性決定に関わる部位が異なることを示唆している。

【謝辞】

本研究の遂行に当たり、日本応用酵素協会より助成を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

【文献】

- 1) Sugiki, S., Niide, T., Toya, Y. & Shimizu, H.: Logistic regression-guided identification of cofactor specificity-contributing residues in enzyme with sequence datasets partitioned by catalytic properties, *ACS Synth. Biol.*, **11**, 3973-3985 (2022).

酵素活性を高められる不織布型の新規酵素固定化担体の開発

水野稔久

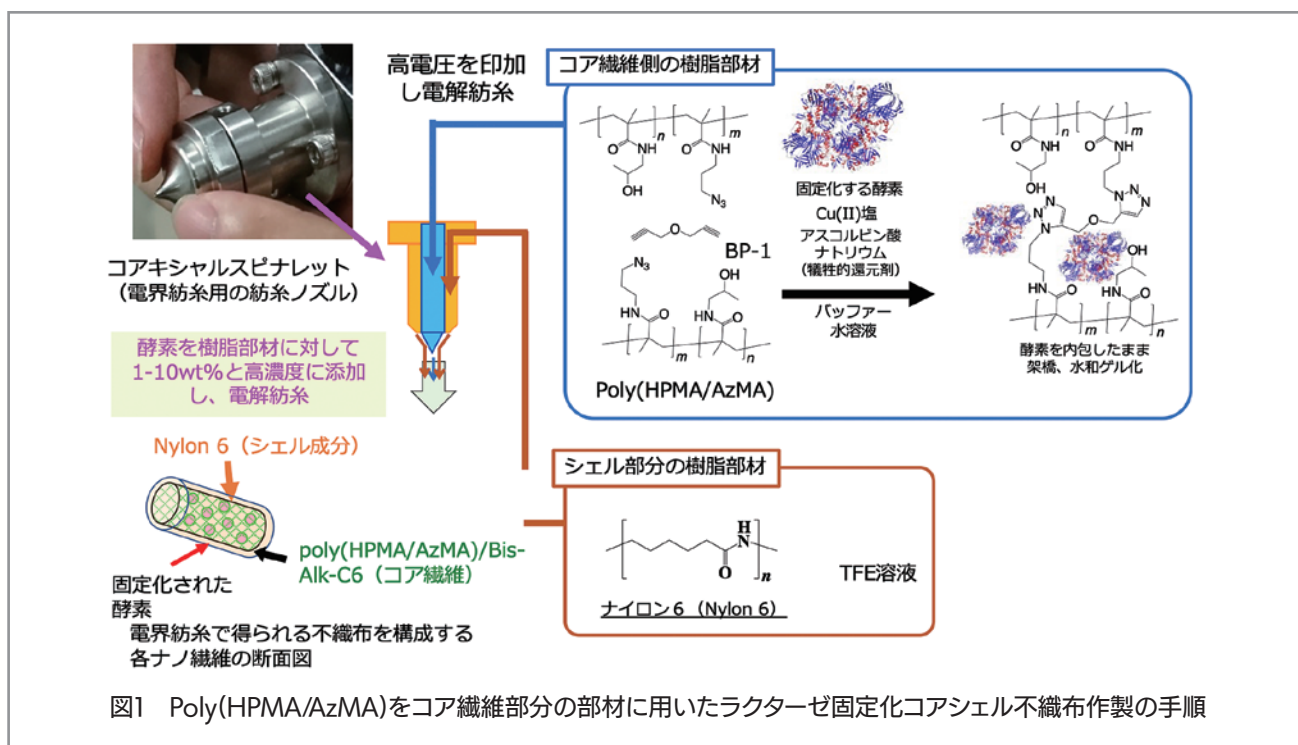
(名古屋工業大学 大学院工学研究科工学専攻生命・応用化学系プログラム)

【目的】

酵素固定化担体に関しては膨大な先行開発があるが、固定化された酵素への基質アクセス性を高めるため、形状は種々あるものの、担体表面に溶媒に晒される形で固定化する方法が、現在においても主流である。しかしこれに対し我々は、適切な方法を用いれば、担体となる樹脂内部に酵素を固定化した状態でも酵素機能を十分発揮できるのではないかと、更に担体内部への固定化であれば単位体積あたりの固定化密度、局所濃度を高めることで K_m を低下させられるため、単に溶液に酵素を溶解した場合よりも酵素活性を高められるのではないかと考え、この検討を進めてきた。本研究では、我々が独自に確立した水に不溶な電界不織布のナノ繊維の中に蛋白質を変性させることなく固定化可能となる技術 (SCES 法)¹⁻⁵⁾ を、新たに開発した後架橋可能な高分子 poly(HPMA/AzMA) を用いて適応させることで、不織布繊維内部に高濃度に酵素を固定化し、これにより酵素活性をどの程度高められるか検討を行った。

【方法】

Poly(HPMA/AzMA) の合成は、対応するモノマーのフリーラジカル重合により行った。¹H-NMR 測定より架橋点となるアジド基を含む AzMA ユニット割合は 26%、GPC 分析より数平均分子量、分子量分散度は 34 kDa, 3.37 であった。不織布に固定化する酵素には *Aspergillus oryzae* 由来のラクターゼを用いたが、酵素量の定量のため FITC ラベル化して用いた (FITC-lactase)。コアキシャルスピナレットを用いた電解紡糸により、ラクターゼ固定化不織布の作製は行ったが、コア部分の前駆体溶液は 20wt% poly(HPMA/AzMA) 溶液 (in 100 mM Tris HCl (pH 7)) に所定量の FITC-lactase を溶かし、架橋剤 BP-1 (0.29 mmol), CuCl₂ (0.50 μmol), アスコルビン酸 (2.50 μmol) を添加して用いた。一方でシェル部分の前駆体溶液は nylon 6 の 10wt% TFE 溶液を用い、コア、シェル溶液の押し出し速度を 0.28 mL/h, 1.50 mL/h, 紡糸距離 16 cm, 印加電圧 20 kV で行った。Lactase を固定化した不織布の酵素活性は、*o*-nitrophenyl-galactopyranoside (ONPG) の 50 mM phosphate buffer 溶液 (5.25 mM) 4 mL に、各不織布を 0.35, 0.70, 1.0 mg ずつ添加し、37°C で 1 時間反応させることにより評価した。酵素生成物である *o*-nitrophenol の定量は、500 mM Na₂CO₃ を反応溶液に 0.5 mL 添加後の A_{420} から行った ($\epsilon_{420} =$



996.4 M⁻¹ cm⁻¹).

【結果と考察】

作製された不織布のSEM, TEM測定を行った結果を図2に示したが, ナイロンをシェルに持つコアシェル不織布に特徴的な真っ直ぐ伸びた繊維からなる集積構造が確認された。またTEM測定から, いずれの不織布についても, コアシェルの二層構造が形成されていることがわかった。また不織布のコア部材に対して10wt%と高濃度にラクターゼを添加したとしても, その繊維形態には大きな影響が見られず, これまでに検討を行っていたpoly(AM/DAAM)/ADH²⁻⁴⁾, poly(HPMA/DAMA)/ADH⁵⁾の系では5wt%以上の酵素固定化が不可能であったことに対する, poly(HPMA/AzMA)系の優位性が見られた。

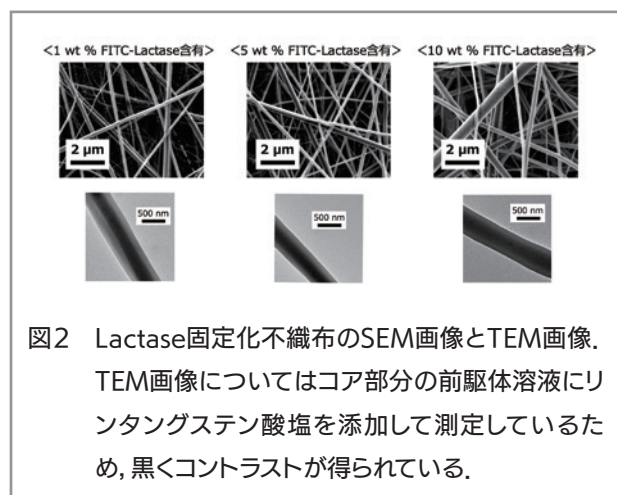


図2 Lactase固定化不織布のSEM画像とTEM画像。TEM画像についてはコア部分の前駆体溶液にリンタングステン酸塩を添加して測定しているため, 黒くコントラストが得られている。

そこでこちらを用いて, ONPGを基質として用いた酵素活性の評価を行った(37°C, 1時間)。その結果, 興味深いことに1wt% FITC-lactaseを含有する不織布と比較し, 5wt% FITC-lactaseを含有する不織布について約1.8倍の活性増加が見られた。一方で10wt%のFITC-lactaseを含有する不織布では, この効果は1.2倍にとどまり, 不織布の繊維内部に固定化される酵素量を高めたとしても, その上昇効果には上限があることが示唆された。高密度に固定化することで活性上昇の効果が得られるのは間違いはないものの, 慎重な議論には, 詳細な再現性確認が必要なため, 今後さらにこちらに取り組みつつ, 我々が世界的にも先導し取り組んでいる, 不織布型の酵素固定化担体の有効性に関して知見を深めていきたい。

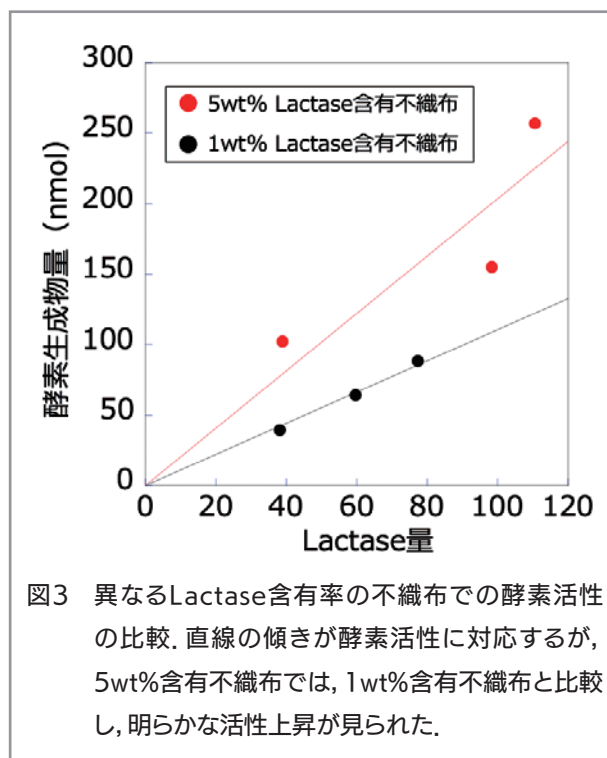


図3 異なるLactase含有率の不織布での酵素活性の比較。直線の傾きが酵素活性に対応するが, 5wt%含有不織布では, 1wt%含有不織布と比較し, 明らかな活性上昇が見られた。

【文献】

- 1) S. Koeda, K. Ichiki, N. Iwanaga, K. Mizuno, M. Shibata, A. Obata, T. Kasuga, T. Mizuno*, *Langmuir*, **32**, 221-229 (2016).
- 2) Y. Ido, A. L. B. Maçon, M. Iguchi, Y. Ozeki, S. Koeda, A. Obata, T. Kasuga, T. Mizuno*, *Polymer*, **132**, 342-352 (2017).
- 3) Y. Tanikawa, Y. Ido, R. Ando, A. Obata, K. Nagata, T. Kasuga, T. Mizuno*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **93**, 1155–1163 (2020).
- 4) T. Ishiguro, A. Obata, K. Nagata, T. Kasuga, T. Mizuno*, *RSC Advances*, **22**, 34931- 34940 (2022).
- 5) Y. Kato, S. Iwata, Y. Nasu, A. Obata, K. Nagata, R. E. Campbell, T. Mizuno*, *RSC Advances* **23**, 29584–29593 (2023).

新奇の哺乳類ホスホリパーゼ C 酵素群の発見と生理機能の解明

村上千明

(国立大学法人 千葉大学 国際高等研究基幹)

【背景】

ジアシルグリセロール (DG) は protein kinase C (PKC) 等を活性化することで様々な細胞応答を促す脂質セカンドメッセンジャーである。ホスホリパーゼ C (PLC) は生体膜主成分のグリセロリン脂質 (図 1) を加水分解し, DG を産生する酵素である。既知の哺乳類 PLC はホスファチジルイノシトール (PI) (4,5) ニリン酸 (PIP₂) のみを基質とする (PIP₂-PLC と表記)。当該酵素は PI 代謝回転の一部として主に多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 含有 DG を選択的に産生する。一方で, 哺乳類中の DG の大部分は飽和脂肪酸 (SFA) 含有 DG (SFA-DG) である。SFA-DG を選択的に産生する PLC は半世紀以上前に活性が報告されている。しかし, 今日に至るまでその責任酵素 (遺伝子) は同定されていなかった。哺乳類中の DG の大部分は SFA-DG である。近年, SFA-DG の蓄積 (未知の PLC の活性上昇) が種々の病態や生理機能 (動脈硬化症, がん, 免疫, II 型糖尿病等) と関連することが示唆されている。しかし, 分子実体が不明のため, 遺伝子を基盤とした研究が展開できず, SFA-DG 代謝の分子機構に不明点が多い。我々は, SFA-DG をリン酸化する DG kinase (DGK) δ isozyme (DGK δ) の相互作用タンパク質中から, 生体膜主要成分のホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジエタノールアミン (PE) 等を加水分解し SFA-DG を選択的に産生するタンパク質 (遺伝子名: SAMD8, SMS-related protein, SMSr) を発見した¹⁾。すなわち, PC 特異的 PLC (PC-PLC) および PE 特異的 PLC (PE-PLC) 活性を持ち, SFA-DG を選択的に産生する哺乳類 PLC を発見した。哺乳類 PC-PLC は活性発見後 70 年以上, PE-PLC は 35 年以上分子実体 (遺伝子) が不明の「幻の酵素」であった。また, 従来の哺乳類 PLC (ホスファチジルイノシトール (PI) (4,5) ニリン酸 (PIP₂) 特異的 PLC: PIP₂-PLC) は主にアラキドン酸 (20:4) などの多価不飽和脂肪酸含有 DG

を選択的に産生することから (図 1 左), 本酵素群は従来の PLC (PIP₂-PLC) と異なる「SFA-DG シグナル伝達経路 (脂質新大陸)」を形成する可能性がある (図 1 右)。

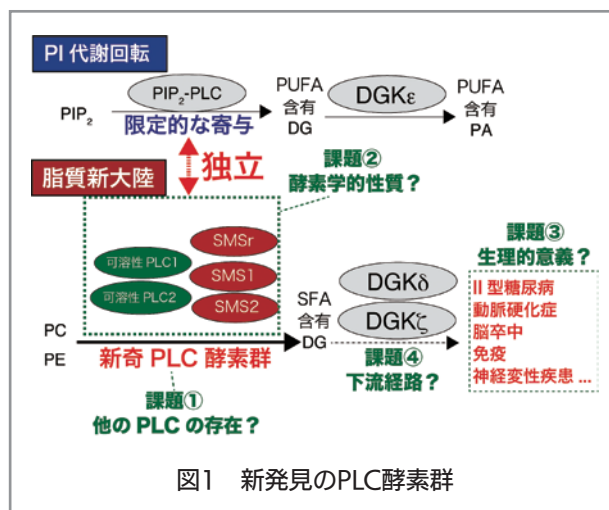


図1 新発見のPLC酵素群

【目的】

新奇 PLC の生理的意義の解明を目的とし, 特に本年度は, SMSr の他に PC-PLC または PE-PLC 活性を有する酵素を探索・同定し (図 1, 課題①), これに成功した場合, 新発見の PLC の酵素学的性質を解析すること (図 1, 課題②) に焦点をおいた。

【方法】

SMSr と最も配列類似性の高い, SMS isoform 1 および SMS isoform 2 をクローニングし, Twin-Strep-tag (TS) 融合 SMS を哺乳類細胞 (HEK293) で発現し, Strep-Tactin XT を用いて高純度に精製し, *in vitro* で酵素学的性質を調べた。

【結果】

①研究基盤の構築 (PLC 精製法): SMS は 6 回膜貫通タンパク質であることから, 活性を保持したまま高純度に精製し, 酵素学的性質を調べるのが難しく, *in vitro* における SMS の酵素学的性質に不明点が多く残る²⁾。そこで我々は, 哺乳類細胞を用いた PLC 酵素精製系を新たに構築した³⁾。具体的には, ストレプトアビジンとビオチンの結合を利用したアフィニティークロマトグラフィー精製系を導入し, 図 2 に示した通り, TS 融合 SMS1 および SMS2 を高純度 (95% 以上の純度) に精製することに成功している。

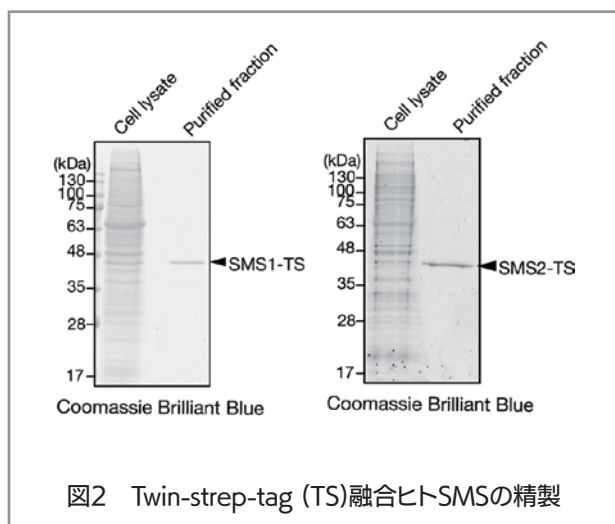


図2 Twin-strep-tag (TS)融合ヒトSMSの精製

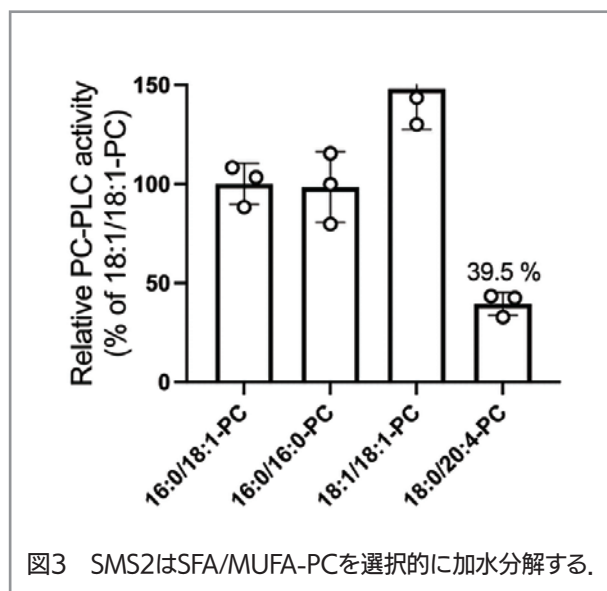


図3 SMS2はSFA/MUFA-PCを選択的に加水分解する。

②精製 SMS1 および SMS2 は SMS 活性に加え、PC-PLC 活性を示す：精製 SMS1 の酵素学的性質を調べた結果、従来報告されている SMS 活性に加えて PC-PLC 活性を示し、さらに、SFA または一価不飽和脂肪酸 (MUFA) 含有 PC に対する選択性を示した。一方で PUFA のアラキドン酸 (20:4, 脂肪酸の炭素数総和：不飽和度) 含有 PC に対する PLC 活性は低かった³⁾。興味深いことに、SMS2 も同様に PC-PLC 活性を示し、SFA/MUFA 含有 PC に対する選択性を示した (Murakami *et al.* 投稿中)。以上より、SMSr に加えて、SMS1 および SMS2 も SFA-PC 選択的 PLC 活性を有し、SMS ファミリーは新奇 PLC 酵素群の 1 種であることが示唆された。

③ SMS1 および SMSr は DGK ζ isozyne (DGK ζ) と相互作用する：DGK δ が PC-PLC と相互作用するという報告から⁴⁾、SMS1/2 と DGK (α , β , γ , δ , η , ϵ , ι , ζ , θ , and κ isozyne) との相互作用を解析した。その結果、SMS2 は DGK との相互作用は認められなかった。興味深いことに、SMS1 は DGK δ との相互作用は認められなかったが、同じく SFA-DG を選択的にリン酸化する DGK ζ との相互作用が認められた (図 4)。また、SMSr は DGK δ に加え、DGK ζ とも相互作用することが明らかとなった。以上より、SMS1 と SMSr は DGK ζ と相互作用を介して機能的に関連する可能性がある⁵⁾。

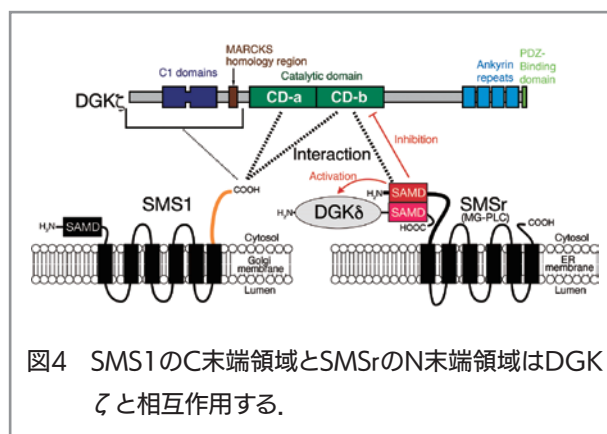


図4 SMS1のC末端領域とSMSrのN末端領域はDGK ζ と相互作用する。

【考察】

本年度は SMSr を指標に、さらに他の PLC の同定を試みた。その結果、SMS ファミリーの新たな酵素学的性質とその機能について明らかになった。現在、SMS の配列を指標にさらに他の PLC を探索し、2 種の可溶性タンパク質が PLC 活性を有することを発見した (図 1)。本研究課題は、次年度も助成が決定していることから、上記の新発見の可溶性 PLC の酵素学的性質に関しては次年度の報告会にて詳細を報告する。

【文献】

1. **C. Murakami**, F. Sakane *J. Biol. Chem.* **296** 100454 (2021)
2. Taniguchi, M. and Okazaki, T. *J. Lipid Atheroscler.* **9** 380–405 (2020)
3. R. Suzuki, **C. Murakami** *et al. FEBS Letters* **597**, 2672–2686 (2023)
4. H. Sakai *et al. J Biol Chem* **289**, 26607–26617 (2014)

5. M.Furuta, **C. Murakami** *et al.* *FEBS Open Bio* **13**, 1333 (2023)

ユニークな巨大酵素ミステリンの病態機能解明

森戸 大介

(昭和大学医学部)

【目的】

ミステリンはモータータンパク質ダイニンに類似した ATP 加水分解コアおよび 2 つのユビキチンリガーゼドメインを持つ、推定分子量約 600 kDa のユニークな細胞内酵素である。ホヤおよび脊椎動物に保存され、ヒト、マウスではユビキタスな発現パターンを示すが、特に脾臓、マクロファージなど免疫関連組織、細胞において発現が高い。

ミステリンのユビキチンリガーゼドメイン周辺の変異により脳血管疾患もやもや病が引き起こされると考えられているが、そのメカニズムは明らかでない。本研究では長らく不明とされてきたもやもや病の原因の解明を目的として、変異ミステリンによる細胞障害の実態とメカニズムの解明に取り組んだ。

【方法】

培養細胞に一過的にもやもや病変異ミステリンを導入し、変異ミステリンの異常な細胞内局在の詳細な同定や、異常な細胞内局在の下流で起こる現象の同定を行った。

【結果】

野生型ミステリンの局在・機能として主に 2 つが知られている。我々の見出した脂肪滴局在および脂肪分解抑制 (*J Cell Biol*, 2019) と、複数のグループにより相次いで見出された細胞に侵入した病原体への局在化とそれらへの抗菌応答 (*Nature*, 2021; *Nat Commun*, 2021; *Cell Host&Microbe*, 2022 など) である。

もやもや病変異ミステリンは驚いたことに野生型ミステリンとは完全に区別可能な異常な細胞内局在を示した。この異常局在の下流では野生型ミステリンによる抗菌応答と部分的に類似した炎症の活性化や、また特定の細胞機能の著明な障害が引き起こされていた (未発表)。

【考察】

以上の結果は、①長らく原因不明とされてきたもやもや病の分子病因の同定であり、また、②異所的な抗菌応答を含む新奇な自己免疫応答の発見であるとも言える。加えて、もやもや病の 2 段階発病仮説(ダブルヒット仮説) について重要な示唆を含んでいる。

【文献】

1. Morito D. Molecular structure and function of mysterin/RNF213. *J Biochem.* 2024 Apr 29;175(5):495-505. doi: 10.1093/jb/mvae020. Review

ヒト TUT1 による U6 snRNA ウリジル化の分子構造基盤

山下 征輔

(東京大学大学院 新領域創成科学研究科)

【目的】

本研究の目的は、ヒト TUT1(Terminal Uridylyl Transferase 1) による U6 snRNA のオリゴウリジル化の分子構造基盤を明らかにすることである。U6 snRNA はスプライソソームの触媒活性を担う、スプライシングの中心因子である。U6 snRNA は RNA ポリメラーゼ III に転写されたのち、TUT1 による 3' 末端へのオリゴウリジル化を受ける。合成されたウリジンテイルはスプライシング因子 Lsm2-8 の結合部位として働き、続く U4 snRNA との対合を促進する。したがって U6 snRNA の 3' 末端の成熟化は真核生物の遺伝子発現に重要なプロセスである。しかし全長の TUT1 と U6 snRNA の複合体立体構造は明らかになっておらず、U6 snRNA の認識機構については完全にはわかっていなかった。

【方法】

クライオ電子顕微鏡 (クライオ-EM) の手法により、全長のヒト TUT1 とヒト U6 snRNA の複合体立体構造の解明に取り組んだ。ヒト TUT1 は大腸菌で発現させ、カラムクロマトグラフィーで精製した。U6 snRNA は T7 ポリメラーゼを用いた試験管内転写にて調製した。タンパク質と RNA を試験管内にて混合して複合体とし

たのち、さらにゲル濾過クロマトグラフィーで精製してクライオ EM 測定のグリッド作成に用いた。電子顕微鏡 Krios2 でデータセットを取得し、計算機で解析して複合体のポテンシャルマップを得た。マップをもとに立体構造モデルを構築し、TUT1 による U6 snRNA の認識機構を明らかにした。

【結果・考察】

ヒト TUT1 と U6 snRNA の複合体の、クライオ EM 構造を分解能 3.2 オングストロームで決定した。複合体構造中において、U6 snRNA の 5'-short stem-loop と telestem の間の AUA-rich モチーフは TUT1 の N-末端 ZF-RRM と触媒パームによってクランプされていた。U6 snRNA の telestem は N-末端の Zinc Finger と Fingers の 2つのドメインに挟まれるように認識され、telestem の 3'-末端が触媒ポケットに入るのを助けていた。さらに U6 snRNA の内部ステムループは TUT1 の C末端の KA-1 ドメインによって固定され、オリゴウリジル化の際に U6 snRNA が TUT1 表面上でずれるのを防いでいた。これらの結果から、TUT1 は、U6 snRNA の配列と構造の特徴を認識し、複数のドメインを用いて U6 snRNA 全体を保持することで、U6 snRNA 特異的なオリゴウリジル化酵素として働いていることがわかった。

ウイルス感染の動物種間バリアにおける胆汁酸トランスポーターの意義

渡 士 幸 一

(国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター)

【目的】

B型肝炎ウイルス (HBV) は胆汁酸トランスポーターであるナトリウムタウロコール酸共輸送体 (NTCP/SLC10A1) を受容体として結合しヒト肝細胞に感染する一方で、サルやマウス由来の Ntcp は HBV 感染を媒介できない。しかしこれら非ヒト動物種由来 Ntcp がなぜ HBV 受容体として機能せず、ウイルス感染のバリアとなっているかは明らかでない。本研究では、非ヒト Ntcp の HBV 受容体機能の有無を解析し、特にサル Ntcp が HBV 感染受容体として機能しないメカニズム

を明らかにする。

【方法】

サル Ntcp タンパク質構造はクライオ電子顕微鏡単粒子解析により解析した。また各 Ntcp の HBV preS1 結合、HBV 感染媒介、胆汁酸トランスポーターのそれぞれの活性は、蛍光 HBV preS1 ペプチドを用いた結合アッセイ、HBV 感染実験、 $[^3\text{H}]$ 標識タウロコール酸取り込み実験によって評価した。

【結果】

今回、サル Ntcp タンパク質のクライオ電子顕微鏡構造を明らかにした。全体構造はこれまで我々が報告したヒト NTCP とほぼ相同の 9 回膜貫通型タンパク質であるが、158 番目アミノ酸がアルギニンであることによってその側鎖と HBV preS1 が立体衝突を引き起こしていた。このアミノ酸をヒト型のグリシンに置換したところ、サル Ntcp は HBV preS1 および感染媒介能を獲得したことより、サル Ntcp の 158 番目アルギニンが HBV 受容体機能喪失の原因の一つであることが示された。またこの置換とともに、86 番目アスパラギンをヒト型のリジンに置換することにより、ヒト NTCP と同等レベルまで HBV 受容体機能を獲得した。86 番目がリジンに置換することにより、preS1 と Ntcp の結合が安定することが示唆された。

【考察】

以上のように構造およびウイルス学的解析から、サル Ntcp は独立した 2 箇所のアミノ酸の置換によって HBV 受容体機能を喪失していることが示唆された。この 2 箇所のアミノ酸はいずれも胆汁酸結合ポケットから離れておりトランスポーター機能に大きな影響を与えないことから、サル Ntcp はその本来のトランスポーター機能を犠牲にすることなく HBV 感染逃避能を獲得したと考えられる。

【文献】

1. Shionoya K, Park JH, Ekimoto T, Takeuchi JS, Mifune J, Morita T, Ishimoto N, Umezawa H, Yamamoto K, Kobayashi C, Kusunoki A, Nomura N, Iwata S, Muramatsu M, Tame JRH, Ikeguchi M, Park SY, Watashi K. Structural basis for hepatitis B virus restriction by a viral receptor homologue. *Nat Commun* 15(1):9241 (2024)

アルツハイマー病に係るプロテアーゼの基質同定法の開発

渡部 博貴

(慶應義塾大学)

【目的】

家族性アルツハイマー病 (AD) 家系で報告されている変異の ~90% は, *Presenilin 1* と *Presenilin 2* (*PS1*, *PS2*) 遺伝子上に存在することから, PS タンパク質の機能変化は AD 病態形成の根幹をなす. PS タンパク質はアスパラギン酸プロテアーゼ複合体である γ -セクレターゼの触媒サブユニットであり, 基質である多くの I 型膜タンパク質の切断を行うことで多面的な生理的機能を持つ. 本研究では, PS/ γ -セクレターゼの生体内基質タンパク質を高感度・網羅的に同定する手法を開発し, 酵素-基質タンパク質の点から AD 発症の分子機序を解明する.

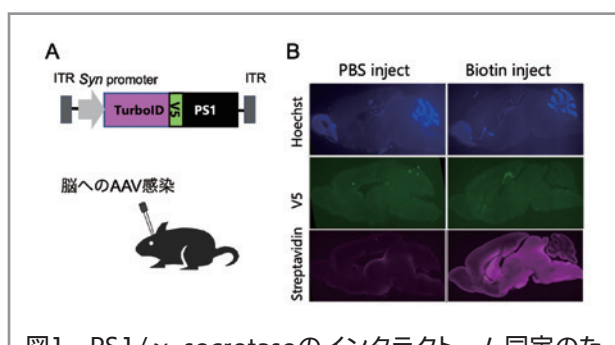


図1 PS1/ γ -secretaseのインタラクトーム同定のための実験系構築

A. TurboID-PS1 発現 AAV コンストラクトの構築
 B. マウス脳へ AAV を感染後に Biotin 投与を行い, 組織切片の免疫組織化学染色を行った. Biotin 投与により Biotin 化タンパク質が切片上で確認できた.

【方法】

近接依存性標識酵素である TurboID を PS1 または PS2 に融合したアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを設計・産生し, 後眼窩静脈へのインジェクションによりマウス脳全体へ発現させる (図 1). ビオチン溶液を皮下注射し, PS/ γ -セクレターゼ近傍のタンパク質をビオチン標識し, 大脳皮質の組織抽出液をストレプトアビジンビーズで免疫沈降する. 溶出した免疫沈降

産物を質量分析法で同定する.

【結果】

Synapsin プロモーター下で TurboID-PS1 を神経細胞へ発現したマウス脳から, 質量分析によってビオチン標識された 197 タンパク質を同定した (図 2A). これらのタンパク質には, 以前に PS1 と相互作用するタンパク質と報告されている Stim1 も含まれていたことから, 構築した実験系は妥当であると判断できた. 次に, これらのタンパク質に I 型膜タンパク質が含まれているかどうか, 公共データベース上の I 型膜タンパク質 944 個と比較したところ, わずか 11 個しか TurboID-PS1 と近接していなかった (図 2B).

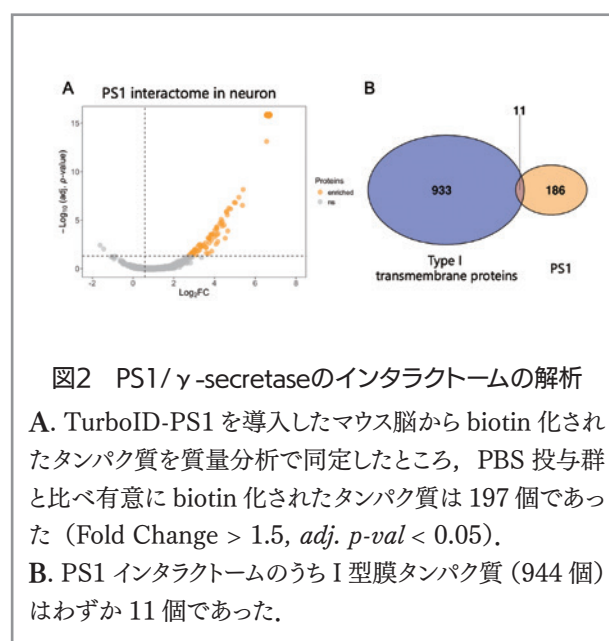


図2 PS1/ γ -secretaseのインタラクトームの解析

A. TurboID-PS1 を導入したマウス脳から biotin 化されたタンパク質を質量分析で同定したところ, PBS 投与群と比べ有意に biotin 化されたタンパク質は 197 個であった (Fold Change > 1.5, *adj. p-val* < 0.05).
 B. PS1 インタラクトームのうち I 型膜タンパク質 (944 個) はわずか 11 個であった.

【考察】

PS/ γ -セクレターゼの作用機序を考慮すると, I 型膜タンパク質と近接する時間が短いために TurboID によるビオチン化が生じなかった可能性が考えられる. PS1 の酵素活性中心変異体を用いることで, 基質タンパク質の効率的なビオチン化がみられるか検討する必要がある.

【文献】

渡部博貴: アルツハイマー病に関するプロテオーム解析, Medical Science Digest (特集 先進プロテオミクス の解き明かすもの), 49, 586-589 (2023)

成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 (TMFC)

肥満に伴う高インスリン血症における肝臓が及ぼす影響とその機序の探索

浅井 洋一郎

(東北大学大学院医学研究科 糖尿病代謝内科学分野)

【目的】

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

【方法】

1. 高脂肪食負荷マウスおよび老化マウスにおいて，ブドウ糖負荷試験の血中インスリン/C ペプチドのモル比を用いて肝臓のインスリンクリアランス (HIC) 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), CEACAM1 について遺伝子発現・タンパク発現を評価した。
3. 肥満および老化モデルにおいて，走査型電子顕微鏡を用いて類洞内皮細胞 (LSEC) の形態学的評価を行った。
4. MACS を用いて LSEC を単離し，RNA sequence による網羅的遺伝子解析を行った。
5. 血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスを用いて，肥満モデル，老化モデルで HIC，走査型電子顕微鏡による LSEC の形態学的評価を行った。
6. 加齢マウスに対し，X の阻害薬を投与し，HIC について評価を行った。

【結果】

1. 高脂肪食群，老化マウスでは，いずれも HIC が低下することがわかった。
2. 肝臓における IDE, DEACAM1 の遺伝子発現・タンパク発現は高脂肪食群で低下していた。一方，加齢マウスにおいては遺伝子発現・タンパク発現に変化はなかった。
3. 肥満モデル・老化モデルにおいて，LSEC の篩板孔の減少が観察された。
4. 肥満モデル・老化モデルの LSEC において，炎症関連遺伝子群の発現が上昇していた。
5. 血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスでは，肥満モデル・老化モデルで HIC の低下が改善し，LSEC の篩板孔の減少についても改善していた。
6. X の阻害薬により，加齢マウスにおける HIC が改善することがわかった。

【考察】

LSEC 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，HIC 低下の原因の一つである可能性が考えられた。また，高脂肪食・加齢モデル，いずれの LSEC においても炎症に関わる遺伝子群が増加していた。血管内皮特異的に炎症を抑制する遺伝子改変マウスにおける実験では，肥満モデル・老化モデルで観察された HIC 低下や LSEC の篩板孔の減少が改善していることがわかり，篩板孔の減少に炎症が寄与していることが推察された。炎症において誘導される X の阻害薬を投与したところ，加齢による HIC 低下が改善することもわかり，同分子の関与が示唆された。今後，肥満や老化に伴う高インスリン血症における肝臓の役割をさらに明らかにすることで，肥満を予防するための治療につながることが期待される。

免疫学的アプローチによる腎臓病に対する新規治療戦略の開発

畔上 達彦

(慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科)

【背景・目的】

慢性腎臓病 (CKD) は末期腎不全や脳心血管疾患の発症・死亡のリスク因子で、患者数は本邦で2000万人、世界で8億5000万人にのぼる。CKD, 末期腎不全やその合併症の治療に要する医療費は、医療保険財源を逼迫する一因となるが、CKDに対する根本的な治療法は確立していない。したがって、CKDに対する新たな治療戦略を構築することは、患者個人の生命予後、健康寿命の観点だけでなく、医療経済的な側面からも、喫緊かつ重要な医療課題であると考えられる。

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

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

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

【方法】

1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

1型糖尿病モデルとして、DBA/2Jマウスに膵β細胞毒性を持つストレプトゾトシンを投与する。また、2型糖尿病モデルとして、BKS.Cg+Leprdb/Leprdbマウス (db/dbマウス) を利用する。DKDモデルマウスに、RAGEワクチンを隔週で計3回投与し、尿中アルブミ

ン排泄測定、光学顕微鏡解析 (メサンギウム基質面積、糸球体径)、電子顕微鏡解析 (糸球体基底膜厚) を行う。

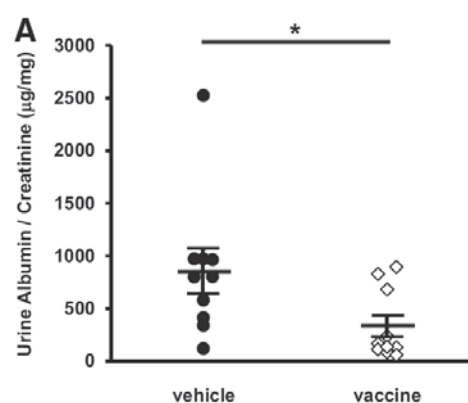
2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

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

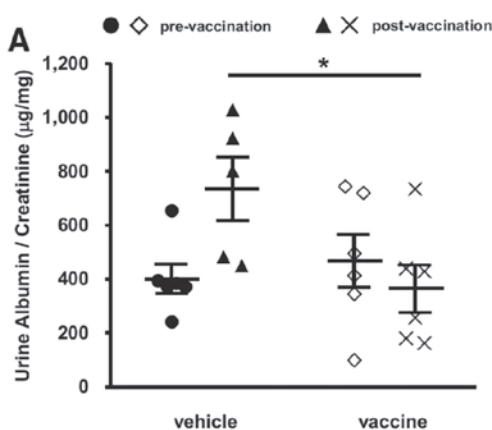
【結果】

1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

1 型糖尿病モデル



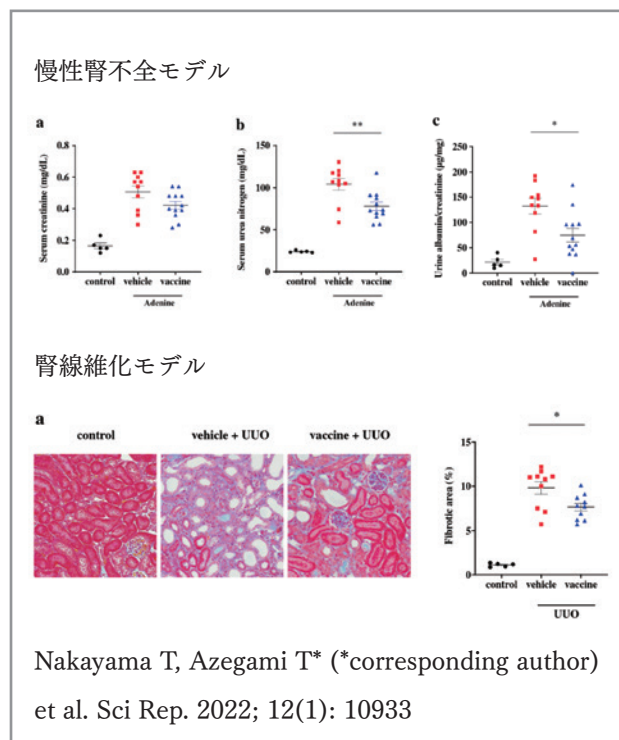
2 型糖尿病モデル



Azegami T et al. Diabetes. 2021; 70(9): 2147-2158

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

2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討



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

【考察・今後の展望】

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

骨の生理的・病理的機能を制御する細胞内 Ca^{2+} シグナルとその分子機構

市村 敦彦

(立命館大学薬学部 / 京都大学大学院薬学研究科)

【目的】

本研究では、主として軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナルに注目し、生理的機能調節や骨系統疾患発症に関与する分子メカニズムを明らかとすることを目的とした。

【方法】

生理的な軟骨細胞内 Ca^{2+} 動態を解析するため、マウス胎児軟骨スライス試料を用いた Ca^{2+} イメージング実験系を独自に樹立した。本実験系を用いた薬理的解析を行うとともに、遺伝子改変マウス由来の軟骨細胞を用いた解析も行った。軟骨細胞特異的遺伝子欠損マウスやヒト軟骨無形成症モデルマウスなど複数の遺伝子改変マウス系統を樹立または入手し、その表現型を生化学的・分子生物学的手法を用いて多角的に解析した。

【結果】

軟骨細胞において、自発的に細胞内 Ca^{2+} が変動していることを発見し、軟骨細胞内 Ca^{2+} 自発変動と名付けた。この現象が主として細胞膜二価陽イオンチャネル TRPM7 により制御されていることを見出した。軟骨細胞特異的 *Trpm7* 欠損マウスを作出して解析したところ、全身の軟骨内骨化が障害され体長が著しく小さくなることを発見した。

骨の伸長を促進する C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナルに関与することを推測して検証した。その結果、CNP 処置によって軟骨細胞内 Ca^{2+} 自発変動が活性化されることがわかった。一連のシグナル解析から、NPR2-PKG-BK チャネル-TRPM7 チャネル-CaMKII シグナル経路を同定した。*Trpm7* 欠損器官培養軟骨においては CNP の骨伸長効果が観察されなくなった。

小胞体に分布する陽イオンチャネル TRIC-B の遺伝子欠損により骨形成不全および成長障害が引き起こされることから、その分子病待機所を解析した。*Tric-b* 欠損により骨芽細胞における Ca^{2+} ハンドリング異常により細胞外基質分泌が障害され、骨形成不全へ至るこ

とを見出した。さらに、*Tric-b* 欠損軟骨細胞では細胞が膨らみ核が濃縮した非典型的死細胞が出現することを見出した。*Tric-b* 欠損により軟骨細胞内にII型コラーゲンが蓄積することが明らかとなった。小胞体ストレス経路の活性化が観察され、アポトーシスが惹起されていることがわかった。*Tric-b* 欠損により定常状態の細胞内 Ca^{2+} が上昇しており、軟骨細胞内 Ca^{2+} ハンドリングに異常が生じていることを見出した。

【考察】

一連の解析から、これまでほとんど不明であった軟骨細胞内 Ca^{2+} シグナルの動態とその制御機構の一端が明らかとなった^{2,4)}。また、小胞体の Ca^{2+} 放出を補助するカウンターイオンチャネル TRIC-B が骨形成に果たす役割と、その遺伝子変異によって引き起こされる骨系統疾患の分子メカニズムが示された^{1,5)}。これらの知見は、希少疾患の治療法探索のみならず、類似の骨系統疾患の分子メカニズムの解明に資するとともに、新たな治療薬の開発に貢献するものと期待される。

【文献】

1. Atypical cell death and insufficient matrix organization in long-bone growth plates from *Tric-b*-knockout mice. **Ichimura A**, et al., *Cell Death Dis.* 2023 Dec 20;14:848.
2. C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca^{2+} entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth. Miyazaki Y[†] & **Ichimura A**,[†], et al., *eLife.* 2022 Mar 15;11:e71931.
3. Elucidation of the Physiological Functions of Membrane Proteins as Novel Drug Target Candidate Molecules. **Ichimura A**, *Biol Pharm Bull.* 2021;44:1167-1173
4. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca^{2+} fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. Qian N[†] & **Ichimura A**,[†], et al., *Sci Signal.* 2019 Apr 9;12:eaaw4847.
5. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. Zhao C[†], & **Ichimura A**,[†], et al., *Sci Signal.* 2016 May 17;9:ra49.

LMNA 変異拡張型心筋症を対象とした治療法の開発

伊藤 正道

(東京大学医学部附属病院先端臨床医学開発講座)

【背景】

高ラミン遺伝子 (*LMNA*) 変異は拡張型心筋症(DCM)と呼ばれる進行性の心機能低下を生じる。*LMNA* 変異による DCM は重篤であるにも関わらず、有効な治療法は開発されていない。

【目的】

LMNA 変異 DCM の心筋細胞で生じる様々な異常を明らかにし、それらの改善を指標とした化合物探索によって新たな心不全の治療薬の開発を目指す。

【方法・結果】

LMNA 変異 (p.Q353R) を有する心不全患者から iPS 細胞を作成し心筋細胞に分化させた。患者由来細胞の該当変異を修復した isogenic control 株を対照としてつつ実験を進めた。

- ① *LMNA* 変異心筋細胞のエピゲノム変化、遺伝子発現異常に着目した探索
- *LMNA* 変異マウスの心筋細胞のシングルセル RNA-seq を実施した結果、変異マウスでは発生段階で structural development に関連する遺伝子の発現が低下していた。ATAC-seq で、変異個体で消失する open chromatin region の共通モチーフを解析すると、TEAD1 が抽出された。
- 変異 / 修復 iPS 心筋細胞 (iPSCM) を用いて TEAD1 の ChIP-seq を行うと、TEAD1 は muscle structure development に関与する遺伝子群を標的としていた。
- TEAD1 の活性を増強する化合物 TT-10 を投与すると、疾患心筋細胞においてサルコメア密度が回復し、収縮力が改善する傾向が確認された。

以上から、薬理的な TEAD1 の活性化 (Hippo 経路の抑制が) *LMNA* 変異 DCM の治療標的となる可能性が示唆された¹⁾。

- ②心筋細胞の DNA 損傷を指標とした治療候補化合物のスクリーニング
- 先行研究で我々は DNA 損傷が心臓の機能喪失の原因

であること、様々な心不全において予後や治療応答性を予測する因子であることを報告している²⁾。

- p.Q353R 変異 *LMNA* DCM 患者の心筋細胞, *LMNA* 変異 iPS 心筋細胞双方で, DNA 損傷マーカーである γ H2AX の集積亢進を確認した。そこで, この細胞を用いて γ H2AX の集積を軽減させる化合物のスクリーニングを行った。その結果, vitamin D2(VD2) が変異株の DNA 損傷を有意に軽減させることが判明した。RNA-seq の結果, VD2 は疾患株で低下している DNA 修復酵素の発現を回復させた。
- プロテインアレイを用いた検討の結果, 変異 *LMNA* タンパクは vitamin D 受容体 (VDR) との結合性がと野生型と比較して亢進しており, 変異株で VDR の転写活性が低下していることが分かった。
- VD2 analog は圧負荷心不全モデルマウス, *Lmna* ナンセンス型変異心筋症モデルマウスの2つのモデルで DNA 損傷の蓄積を軽減させ, 心機能を改善させた³⁾。

【考察】

本助成にて, *LMNA* 変異 DCM の治療候補化合物として, TT-10, VD といったシーズを同定することができた。今後は患者における治療効果の確認を目指した臨床試験が期待される。

【文献】

- 1) Yamada S*, Ito M*, et al. *Sci Adv.* 2023 Apr 14;9(15):eade7047
- 2) Higo T, Ito M et al. *Nat Commun.* 2017 Apr 24;8:15104.
- 3) Ito M, Katoh M et al. *Circulation.* 2024, in press (accepted in June, 2024).

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

稲住 英明

(東京大学大学院医学系研究科循環器内科学)

【目的】

- ① NRSF(REST) の発現量や心筋細胞内局在の心不全発症・進展における意義ならびにその調節機構の解明
- ② NRSF と複合体を形成している各エピゲノム調節因子の心不全発症・進展における意義の解明
- ③ NRSF が転写調節する *G α* の発現上昇が心筋表面細胞膜の L 型カルシウムチャンネルを選択的に活性化させるメカニズムの解明

【方法 / 結果】

- ①心筋における NRSF の発現をウエスタンブロッティングで評価したところ, 加齢に伴い心室筋における NRSF の発現量が低下していることが明らかになった。

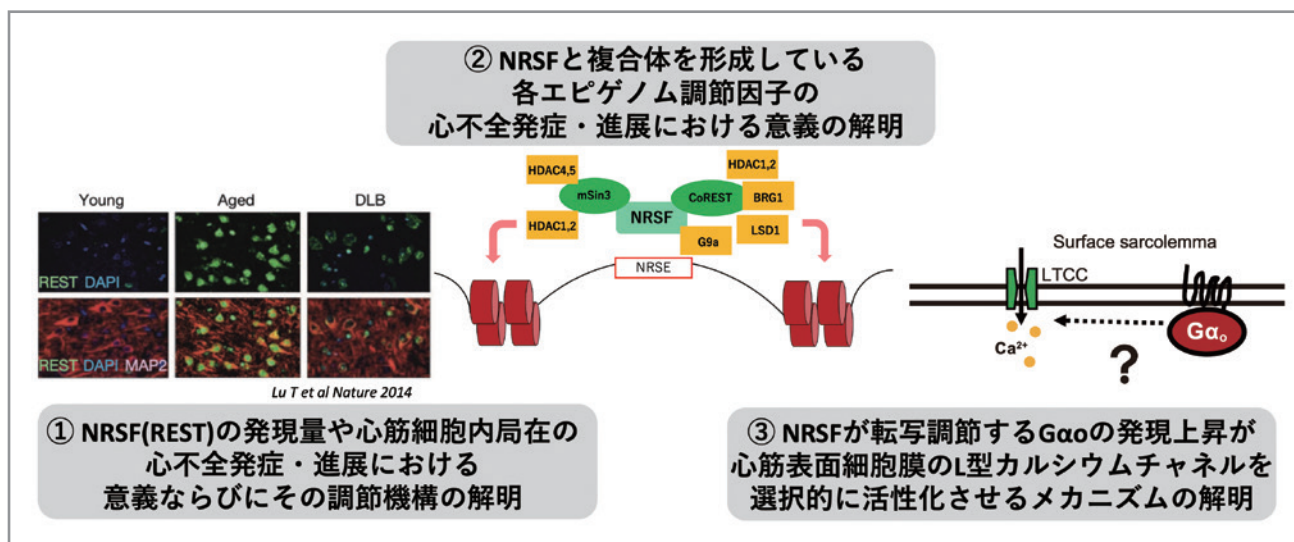
心筋特異的に, タモキシフェン投与により後天的に NRSF の発現を抑制できる NRSFicKO を作成し表現系の評価を行ったところ, ただ NRSF の発現を抑制しただけでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で, 横行大動脈縮窄による圧負荷を加えるとコントロールと比較した生存率の低下や心機能の低下を示すことが明らかになった。

- ②心筋特異的に, タモキシフェン投与により後天的に HDAC1/2 の発現を抑制できる HDAC1/2 icKO を作成し表現系の評価を行ったところ, オスのマウスでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で, メスのマウスでは著明な心機能の低下, 心拡大, 心筋の線維化を示すことが明らかになった。

心臓に対する RNA シークエンスの結果からカルシウムシグナルやイオンチャンネルに関わる遺伝子群の発現が上昇していることがわかり, NRSF の転写抑制能の減弱が影響している可能性が示唆された。

またミトコンドリアに関わる遺伝子群の発現低下を認めたことから, 今後ミトコンドリアにフォーカスした実験を進める予定である。

- ③ *G α* の心筋特異的過剰発現マウスの心筋細胞で免疫



染色での評価を行ったところ、GαoはT管構造にはほとんど存在せず、主に細胞表面膜に局限することが明らかになった。その他の心不全モデルマウス由来心筋細胞での免疫染色を現在検討している。またGαoをターゲットとした創薬にもチャレンジしており、モデルティとして核酸医薬を使用して実験を進めている。

【考察】

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

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

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

**社会経済因子が生活習慣病及び合併症を引き起こす
機序の疫学的解明**

井 上 浩 輔

(京都大学)

【背景・目的】

医療保険が医療へのアクセスやメンタルヘルスを改善することは過去の研究から示されているが、血圧や血糖値などをどの程度改善するかについては十分なエビデンスがない。実際、米国オレゴン州で無作為にメディケイド（米国の医療保険の一つ）加入を割り当てた Oregon Health Insurance Experiment（以下 OHIE）というランダム化比較試験では、全体集団において統計的有意な改善は認められなかった。しかし、一部の集団は医療保険の恩恵を受けていて、それ以外の集団は受けていない、という可能性も考えられる。そこで本研究では、OHIE に操作変数法と因果フォレストという因果推論・機械学習の手法を用いることで、医療保険の生活習慣病に与える影響は個人ごとに異なるのか、異なる場合はどのような特徴を有する個人が医療保険の恩恵を受けるのか、という2点を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

2008 年に行われた OHIE に参加した 12134 人を対象に、操作変数法及び因果フォレストを応用し、メディケイドが1年後の血圧・血糖値に与える効果の異質性を評価した。参加者の平均収縮期血圧は 119 mmHg、

平均 HbA1c は 5.3% であった。因果フォレストの応用により、メディケイド加入による収縮期血圧および HbA1c の変化が個人ごとにばらつきがあることが明らかとなった。具体的にはベースラインにおいて医療費が低かった個人において、メディケイドによる血圧改善が顕著に認められた（ -4.96 mmHg (95% 信頼区間 -7.80 to -2.48)). 同様に効果が高い群では HbA1c の改善が統計的有意に認められたが、その変化量は臨床的意義がある程度ではなかった（ -0.12% (95% 信頼区間 -0.25% to -0.01%)).

【考察】

本研究において、メディケイド（医療保険）加入は集団全体においては血圧や HbA1c などの心血管リスク要因を改善しなかったが、その効果は個人ごとにばらつきが認められた。特に効果が高いと予想された個人は、加入前に医療費の利用がないか低いことが明らかになった。本研究結果は、特に血圧に関して医療保険が一部の人々の心血管リスク要因を改善することを示唆しており、生活習慣病予防に向けた今後の医療政策を評価していくうえで重要な知見となる。

【文献】

Inoue, K., Athey S, Baicker K, Tsugawa Y (2024). Heterogeneous effects of Medicaid coverage on cardiovascular risk factors: secondary analysis of randomized controlled trial. *BMJ In press*

SIK3 下流遺伝子による睡眠恒常性制御機構の解明

岩崎 加奈子

(筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構 研究員)
(現在：スタンフォード大学 ポスドク)

【目的】

本研究では、睡眠覚醒を制御する神経回路の活動が睡眠要求に応じてどのように調節されるのか調べるため、リン酸化酵素 SIK3 に着目した。我々は近年、SIK3 の機能獲得型変異 SIK3(SLP) が視床下部内側の神経細胞に発現すると睡眠が増加すること、この脳領域を興奮させると覚醒が増加すること、また SIK3(SLP) 発現細胞の遺伝子発現パターンは睡眠要求が高い状態の細胞

と類似していることを明らかにした。そこで「SIK3 および睡眠要求の蓄積は、遺伝子発現制御を介して覚醒を促進する神経細胞の活動を抑制する」という仮説を立て、この検証を研究目的とした。

【方法】

- ① SIK3 が睡眠量を制御する神経細胞群のマーカー遺伝子を同定し、SIK3(SLP) により発現量が変化する遺伝子を明らかにするため、SIK3(SLP) を発現するマウスの視床下部を用いてシングルセル RNA シーケンスを行った。また睡眠要求の蓄積による変化と比較するため、睡眠剥奪マウスを用いて同様の実験を行った。
- ② SIK3(SLP) が神経活動をどのように制御するか明らかにするため、視床下部に SIK3(SLP) を発現するマウス脳を用いてホールセルパッチクランプ（電流固定法）を行った。SIK3(SLP) の発現によって睡眠が増加する視床下部内側領域の神経細胞をターゲットとした。

【結果】

- ① SIK3(SLP) が発現することで遺伝子発現パターンが変化する神経細胞サブタイプと、睡眠剥奪による睡眠要求の増加によって遺伝子発現パターンが変化する神経細胞サブタイプを同定した。
- ② 静止膜電位、自発発火頻度、入力抵抗といった神経細胞の興奮性の指標となるパラメーターにおいて、SIK3(SLP) の発現による有意な変化は見られなかった。活動電位の幅は SIK3(SLP) 発現マウスにおいてわずかに増加していた。

【考察】

視床下部において、SIK3(SLP) の発現による遺伝子発現が特定の神経細胞集団で見られることが明らかとなった。これらの神経細胞群は、パッチクランプを行った神経細胞群と異なる集団であった。パッチクランプ法で SIK3(SLP) による顕著な変化が見られなかった原因として、標的とした神経細胞サブタイプが適切でなかった可能性が考えられる。また、シナプス後電位など、電流固定法では見られないパラメーターに変化が起こっている可能性も考えられる。

原発性アルドステロン症の病態解明と新規診断法の確立

馬 越 洋 宜

(九州大学大学院医学研究院病態制御内科学)

【背景】

加齢に伴い副腎皮質は機能的・構造的変化(副腎老化)を起こし、ステロイドホルモンの不均衡な産生をもたらす。副腎皮質ホルモンの過剰病態である原発性アルドステロン症(PA)は加齢に伴って発症頻度が増加し、二次性高血圧の主要な成因の1つである。PAは高い有病率と臓器障害の高頻度を呈するため、重要な公衆衛生上の課題となっている。

【目的】

本研究では、1) PAの診断モデルの確立、2) PAの前駆病変であるアルドステロン産生細胞クラスター(APCC)の発生過程の解明、3) ヒト副腎皮質の加齢に伴う機能的・構造的変化のメカニズム解明を目指した。

【方法と結果】

- 1) PAの診断モデル開発: 機械学習(ランダムフォレスト法)を用いて、血中ナトリウム、カリウム、アルドステロンの3項目でアルドステロン産生腺腫を高精度(89%)で診断可能なモデルを開発した。
- 2) APCCの解析: シングルセルRNAシーケンシング(scRNA-seq)により、APCCは副腎皮質球状層細胞から発生することを明らかにした。さらに、多くのCYP11B2(アルドステロン合成酵素)陽性細胞がCYP11B1および/またはCYP17A1(コルチゾール合成酵素)も発現していることを発見した。
- 3) ヒト副腎皮質の加齢メカニズム解析: 高齢者のヒト副腎皮質のscRNA-seqおよび空間的トランスクリプトミクス解析から、層特異的な複数のシグナル伝達経路の変化が、異常な層構造と層特異的なステロイド産生細胞の変化の基礎にあることが示唆された。また、マクロファージが加齢関連の副腎皮質細胞の炎症と老化を媒介していることが明らかになった。

【結論】

機械学習技術を用いてPAの診断モデルを確立し、

PAの前駆病変であるAPCCの特徴を1細胞レベルで明らかにした。さらに、高齢者のヒト副腎皮質を1細胞解像度で初めて詳細に分析し、ヒトの副腎老化メカニズムの解明に貢献した。これらの成果は、PAの診断精度向上と病態解明、および加齢関連疾患の病態生理学の理解に寄与し、個別化医療の発展に貢献する可能性がある。

【文献】

- 1) Kaneko H, Umakoshi H* (corresponding author), Ogata M, Wada N, Iwahashi N, Fukumoto T, Yokomoto-Umakoshi M, Nakano Y, Matsuda Y, Miyazawa T, Sakamoto R, Ogawa Y*: Machine learning based models for prediction of subtype diagnosis of primary aldosteronism using blood test. **Sci Rep.** 11(1): 9140, 2021.
- 2) Iwahashi N†, Umakoshi H† (equal to 1st author), Seki T, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Suematsu M, Umezawa Y, Oya M, Kosaka T, Seki M, Suzuki Y, Horiuchi Y, Ogawa Y*, Nishimoto K*: Characterization of aldosterone-producing cell cluster (APCC) at single-cell resolution. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 107(9):2439-2448, 2022.
- 3) Iwahashi N, Umakoshi H* (corresponding author), Fujita M, Fukumoto T, Ogasawara T, Yokomoto-Umakoshi M, Kaneko H, Nakao H, Kawamura N, Uchida N, Matsuda Y, Sakamoto R, Seki M, Suzuki Y, Nakatani K, Izumi Y, Bamba T, Oda Y, Ogawa Y*: Single-cell and spatial transcriptomics analysis of human adrenal aging. **Mol Metab.** 84:101954, 2024.

細胞内品質管理破綻による組織障害とその治療可能性

江 口 智 也

(東京大学大学院医学系研究科分子生物学分野)

【背景】

オートファジーは細胞内の主要な分解経路の1つであり、細胞内品質管理に重要な役割を果たしている。

オートファジーを欠損するマウスは神経変性疾患様の表現型を呈し、またヒトの神経変性疾患にもオートファジーの障害が寄与している可能性が指摘されている。しかしオートファジー障害による神経機能の低下が可逆的、すなわち治療可能であるのかは不明である。そこで我々はドキシサイクリン依存的にオートファジーを可逆的に制御可能なマウスを新たに作出した。これまでに、このマウスがオートファジー抑制時には神経原性の運動機能障害を呈すること、この運動機能障害はオートファジーのレスキューによって回復することを明らかにしてきた。

【目的】

オートファジー抑制時、回復時における脳組織中のタンパク質の変化を網羅的に解析するため、ラベルフリープロテオーム解析により比較解析を行った。

【方法】

生後13～15週齢までオートファジーをONで維持した群(ON群)、その後4週間オートファジーをOFFにした群(OFF群)、4週間のOFFの後さらに4週間ONに戻した群(Rescue群)、の3群についてオスマウスを5匹ずつ用意した。大脳組織を凍結破碎・溶解しプロテアーゼで消化、ペプチドをdata-independent acquisitionモードで解析した。

【結果・考察】

8337タンパク質が解析した15匹のマウスに共通して検出できた。ON群と比較するとOFF群では413のタンパク質が有意(|Log2 fold change| > 0.5かつp値 < 0.05)に増加した。この中にはp62をはじめとする既知のオートファジー基質が含まれていた。さらにこの蓄積していたタンパク質群についてGene ontology解析を行ったところ小胞体・ゴルジ体の膜タンパク質が濃縮されていた。mRNAレベルでは膜タンパク質の発現変動は認められなかったことから、オートファジーが神経組織において恒常的に膜オルガネラを分解していることが示唆された。OFF群とRescue群を比較すると既知の基質やオルガネラ膜タンパク質を含め、OFF時に蓄積したタンパク質のほとんどが減少していた。結果としてON群とRescue群の比較ではプロテオームの変化はほとんど見られなかった。以上の結果はオートファジーによってプロテオームの高い弾性がもたら

されていることを示している。

抗酸化物質キヌレン酸増加の分子機構とその意義

大橋 一登

(群馬大学生体調節研究所附属拠点研究支援センター)

【背景と目的】

トリプトファン(Trp)は、生体に欠かせないタンパク質構成アミノ酸の一つであるが、過剰なTrpは高Trp血症など有害な事象の原因となることが知られている。一方、キヌレン酸(KA)はTrp代謝化合物の一つであり、KAの増加は2型糖尿病やうつ病で認められ、近年では、炎症によってKAが増加することも報告されている。KAはNMDA受容体やAHRなど細胞内外の受容体に作用するが、上記の病態との因果関係はよく分かっていない。これまでに真核細胞のモデル生物である出芽酵母で、KAの細胞内における機能を調べてきた。そして、過剰にTrpを添加することにより、細胞内のKAが増加することも明らかにした。そこで、KA増加の一因として、Trpの増加に着目し、過剰なTrpによる細胞増殖抑制の解析を行った。

【結果と考察】

過剰なTrpによる遺伝子発現と代謝物の変動をそれぞれRNAシーケンスとメタボロミクスで解析したところ、アミノ酸代謝に関わる遺伝子と代謝物の変動していた。そこで、実験室酵母株のアミノ酸要求性に着目し、アミノ酸要求性がない酵母S288C株の高濃度Trp存在下での細胞増殖を調べた。その結果、S288C株は高濃度のTrpに耐性を示した。実験室酵母株の欠損遺伝子をプラスミドで導入したところ、ロイシン(Leu)合成酵素の導入によって、高濃度Trpへの耐性が付与された。これと一致して、高濃度Trp処理によって、Leu生合成が亢進し、Leu前駆体が蓄積することも確認できた。さらに、高濃度Trpと同程度のLeuを与えると細胞増殖が回復した。しかし、メタボロミクスの結果では細胞内Leuはほとんど減少していなかった。以上より、過剰なTrpによってLeu要求量が増加すると推測された。実際、Leuを減少させると、通常の培地に含まれるTrp濃度でも、その細胞増殖が抑制されることが分かった。

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

岡本 健太郎

(京都大学 糖尿病・内分泌・栄養内科)

【背景】

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

【目的】

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

【方法】

背景因子をマッチングさせた各群 5 例ずつの副腎静脈血において qPCR パネルを用いた miRNA 網羅的発現解析を行い、両群間で数種類の miRNA の発現量が異なっていることを見いだした。続いて、各候補 miRNA について、症例数各群 14 例ずつに増やしバリデーション検討を行い、2 種類の miRNA が、各群の副腎静脈血で発現量が異なっていることを確認した。このうち miRNA-A については下大静脈血においても発現量が有意に異なっており、バイオマーカーとしての可能性について検討した。また、miRNA-A は APA の同一症例内でも腫瘍側副腎静脈で非腫瘍側副腎静脈より発現量が有意に高く、その意義に関して、ヒト副腎由来細胞を用いたトランスフェクション実験を行い、細胞増殖能やアルドステロン産生能などに与える影響を評価した。

【結果】

APA と IHA の鑑別における miRNA-A の診断能について ROC 解析を行ったところ、感度 64.3 %、特異度 78.6 %、AUC 0.735 であった。一方、miRNA-A の作用を模倣する mimic およびその作用を抑制する

inhibitor を APA 由来 primary culture cell にトランスフェクションしたところ、mimic では細胞生存能が上昇し、inhibitor では細胞生存能が低下した。

【考察】

miRNA-A の感度特異度は十分でなく、それ単独でバイオマーカーとして使用するのには難しいかもしれない。一方、miRNA-A は in-vitro において副腎由来 primary culture cell の生存能を上昇させることが示唆され、APA の病態に一部関与している可能性が考えられる。

以上の内容に関して、まもなく論文投稿予定である。

その他、ヒト iPS 細胞を用い、副腎皮質の発生分化に関わる未知の制御因子に関する研究も行っている。これまでに、ヒト iPS 細胞から誘導した中間中胚葉細胞に SF-1 遺伝子を導入することでステロイド産生細胞を誘導できることや、ドーパミン D1 受容体がステロイド産生細胞分化に重要な役割を果たしている可能性などが報告されているものの、これらの研究で誘導された細胞は、副腎皮質ステロイドだけでなく性腺ステロイドも分泌しており、より特異的に副腎皮質ステロイドを産生する細胞への分化誘導が必要と考えられる。RNA-seq 解析にて OSR1 陽性細胞に SF-1 を導入することで変動する遺伝子群を網羅的に解析したところ、既知のステロイド合成に関わる遺伝子群だけでなく、神経活性リガンド受容体 B や RAS シグナル経路に関わる因子の発現も上昇することを見いだした。神経活性リガンド受容体 B は、一部の副腎疾患においてその病態に関与していることや、そのノックアウトマウスでは副腎の異常をきたすことが報告されており、受容体 B を介する刺激が副腎皮質分化の初期段階において一定の役割を果たしている可能性が考えられる。現在、SF-1 導入細胞における受容体 B を介する刺激の表現型について、副腎皮質ステロイド産生能や細胞生存率などへの影響を中心に検証を進めている。

加齢に伴う熱産生脂肪減少メカニズムの解明

小栗 靖 生

(京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 栄養化学分野)

【目的】

熱産生脂肪細胞（褐色脂肪細胞、及び、ベージュ脂肪細胞）は、熱産生を行うことにより、エネルギー消費の増大に寄与する。また熱産生脂肪の発現は年齢と負の相関を示すことが報告されている¹⁾。これらのことから、加齢に伴う熱産生脂肪の減少が、糖尿病や肥満症などの生活習慣病の発症に関与すると示唆される。本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞における増殖機構を明らかにすることを目的とする。これにより、加齢による熱産生脂肪の減少メカニズムの一端を明らかにすると共に、肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新たな介入法の開発の端緒とする。

【方法】

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

【結果】

ベージュ脂肪前駆細胞の増殖能は、特定の栄養成分や液性因子により調節されることが明らかとなった。

【考察】

ベージュ脂肪前駆細胞の増殖能は特定の栄養成分や液性因子により制御されることから、これらを標的とした介入は、加齢に伴うベージュ脂肪細胞の減少を防ぐ有効なツールとなる可能性が考えられる。

【文献】

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

免疫・炎症が関与する希少循環器疾患の病態解明

金岡 幸嗣朗

(国立循環器病研究センター・情報利用促進部)

【目的】

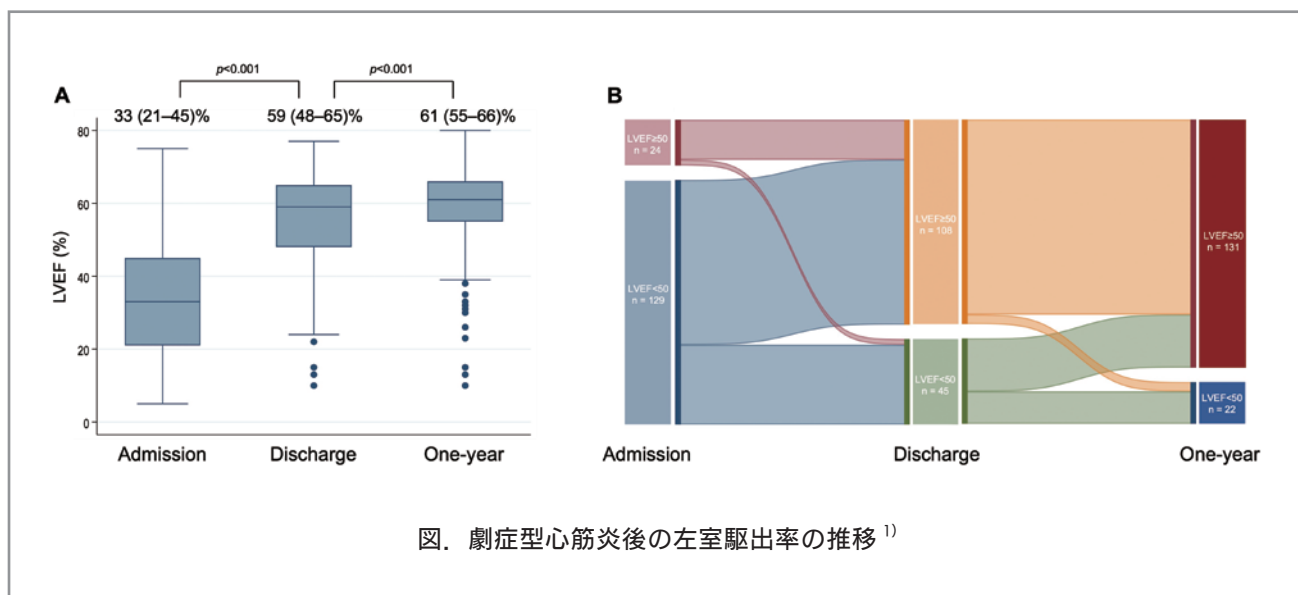
循環器疾患の中でも、心筋炎は比較的稀な疾患である。心筋炎の中では、ウィルスや自己免疫等による心筋の炎症を契機として起こる急性心筋炎が比較的頻度が高い。急性心筋炎は、一般的に、症状や心機能は可逆的であるが、その一部では、炎症の遷延化等により、慢性心筋炎へと移行することが報告されている。一方で、心筋炎は比較的希少であり、十分な患者集積がなく、発症機序や病態解明に至っていなかった。

【方法】

今回、我が国の235の循環器研修施設から臨床情報等の収集を行った。劇症型心筋炎患者の登録研究(JRFM)のデータを用いて、心筋炎の中でも、特に心筋の炎症が広範に起こる劇症型心筋炎を対象として、慢性期の心筋症様の病態へ移行する頻度、ならびに退院時の左室駆出率と退院後の心血管イベントとの関連について解析を行った。

【結果】

JRFMに登録された、生検等で心筋炎の組織学的診断がされた劇症型心筋炎患者(N=344)のうち、院内死亡(N=94)、他院への転院(N=24)、入退院時の心機能の記録がない患者(n=12)を除外し、214症例について解析を行った。症例の年齢の中央値[四分位範囲]は48[35-62]歳で、63人(38%)は女性であった。左室駆出率(中央値[四分位範囲])は、入院時33[21-45]%, 退院時59[48-65]%, 1年後61[55-66]%であった(図)。214例のうち、58例(27%)で退院時の左室駆出率は50%未満であった。退院時の左室駆出率50%未満群では、入院時に洞調律である割合が少なく、来院時左室駆出率が低く、入院中の最大CK-MB値は高かった。左室駆出率の改善は、心筋炎の組織型(リンパ球性、好酸球性、巨細胞性)で差はなかった。追跡期間の中央値[四分位範囲]は1,385[508-1,841]日で、退院後3年後の全死亡は、退院時左室駆出率低下群で13%(N=6)、退院時左室駆出率非低下群で2.8%(n=3)



であった。逆確率重み付け法を用いた調整後 Cox 比例ハザードモデルでは、退院時左室駆出率低下群は、退院時左室駆出率非低下群と比較し、退院後の全死亡と心血管疾患入院が多い結果であった。

【考察】

比較的稀な疾患である劇症型心筋炎を対象として、慢性期の心機能の推移を明らかにした。本研究の結果は、劇症型心筋炎患者の退院後の通院方針等を判断する上で基礎的な情報となると考えられた。

【文献】

1. Kanaoka K, Onoue K, Terasaki S, Nakai M, Iwanaga Y, Miyamoto Y, Saito Y. Changes in Cardiac Function Following Fulminant Myocarditis. *Circ Heart Fail.* 2024 Apr;17(4):e010840. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.123.010840.

ものも視床下部を直接活性化し、その制御に関わる。しかし、過栄養状態ではその恒常性が破綻することが知られている。

私たちはこれまでに、過栄養による視床下部 Rap1 活性化が代謝異常や過食、レプチン感受性障害や炎症反応を惹起すること (Cell Rep 2016)、全身性の糖代謝異常やインスリン抵抗性を誘導すること (JCI Insight 2021)、腸管ホルモン GIP が過栄養状態において視床下部 Rap1 活性化を介してレプチン抵抗性を惹起する液性因子であること (J Clin Invest 2019, Endocrinology 2020)、を証明してきた。さらに独自の視床下部器官培養系を駆使し、経口摂取した食由来成分による視床下部レプチン感受性の向上効果を明らかにしてきた (Peptides 2021, Sci Rep 2022)。つまり私たちによるこれらの成果は、視床下部におけるホルモン感受性制御機構およびエネルギー代謝・糖代謝恒常性維持機構が、腸脳連関を介した内因性・外因性リガンドの制御下にあることを初めて証明したことにある。

上述した通り、高脂肪食の摂取によりホルモン感受性障害が誘導される。長鎖飽和脂肪酸であるパルミチン酸は天然油脂に最も豊富に含まれる脂肪酸の一つであるが、近年の研究により、パルミチン酸は炎症反応を惹起し中枢におけるインスリンやレプチンの感受性障害を誘導することで肥満や生活習慣病の発症に関与することが知られている。しかしながら、母乳中脂質のうち約 25% がパルミチン酸であるが、母乳と炎症 / 肥満誘導についての報告はほとんどない。つまり、パ

食品由来シグナルによる視床下部の摂食調節ホルモンの感受性変容

金子 賢太朗

(明治大学農学部農芸化学科栄養生化学研究室)

【目的】

視床下部の代謝恒常性維持機能は栄養情報を脳に伝えるホルモン (レプチンやインスリンなど) により調節されているが、グルコースや脂肪酸等の食成分その

ルミチン酸には矛盾が存在する。そこで私たちは、脂肪酸組成が類似しパルミチン酸を高含有している天然油脂として、ラードと牛脂に着目した。ラードに含まれるパルミチン酸の約7割がグリセロール骨格の2位に結合している“2-モノパルミチン”である一方、牛脂中のパルミチン酸は1位に結合している。本研究では、パルミチン酸の結合位置の影響を解析することを目的として、ラードと牛脂を使用した高脂肪食を作製することで、個体におけるエネルギー代謝やレプチン感受性を検討した。

【方法】

ラードと牛脂を原料とした特殊高脂肪食(30 - 45 kcal% fat)を作製した。マウスに給餌し、体重、エネルギー代謝、視床下部レプチン感受性における油脂構造の影響について解析を実施した。

【結果・考察】

ラードまたは牛脂を用いた過栄養条件下(45 kcal% fat)でマウスを飼育したところ、牛脂摂取と比較してラード摂取のほうが高脂肪食摂取による体重増加が抑制されることを明らかにした。そこで体重一致条件下において、小動物総合モニタリングシステム(CLAMS)および行動量測定システム(ACTIMO)を用いて体重減少効果の原因を解析したところ、ラード摂取は牛脂摂取と比較して、暗期摂食量の減少、呼吸商の低下、が生じることを明らかにした。そこで摂食関連遺伝子発現をqPCRにて解析したところ、摂食促進AgRP遺伝子発現がラード摂取マウスでは低いことが明らかになった。さらにレプチン感受性について検討を行った結果、ラード摂取マウスのほうが牛脂摂取マウスと比較して、レプチンの脳室内投与による摂食抑制および体重減少効果が強く発揮されることを明らかにした。私たちは次に、生理的条件に近い脂質摂取条件下(30 kcal% fat)での検討を実施した結果、この条件下ではラードと牛脂間で特に体重推移に差が生じないこと、さらには、通常食(10 kcal% fat)と比較しても体重差が生じないことを確認した。しかしながら、レプチン感受性について検討を行った結果、30 kcal% fat飼育条件下においてもラード摂取マウスのほうが高い視床下部レプチン感受性を示すことを明らかにした。私たちはさらに、ラード摂取マウスとレプチンの関係を明ら

かにすることを目的とし、レプチン欠損 *ob/ob* マウスを用いた検討を実施した。45 kcal% fat のラードおよび牛脂を *ob/ob* マウスに給餌した結果、野生型マウスで認められた表現型がすべて消失することを確認し、ラード摂取と牛脂摂取における体重の差および呼吸商の差にはレプチンの関与が示唆された。最後に、過栄養条件下におけるラード摂取による高いレプチン感受性の維持効果についてはレプチンシグナル阻害因子である *SOCS3* の発現低下の関与を明らかにした。

以上の結果より、脂肪酸組成が類似したラードおよび牛脂の摂取による過栄養状態においては、ラード摂取のほうが牛脂摂取と比較して高いレプチン感受性を維持し体重の増加が抑制されることを明らかにした。本結果がパルミチン酸の結合位置の違いによるものかどうかについては更なる検討が必要であるが、肥満症や糖尿病に罹患した状態における動物性脂質の摂取においては、牛脂よりもラードの摂取が適していることを本成果は示唆している。

がん起因する宿主の病態生理に関する研究

河 岡 慎 平

(東北大学加齢医学研究所・京都大学医生物学研究所)

がん医療の進歩は目覚ましいが、根治不能な症例の数は依然として多い。我が国の場合、年間38万人以上ががんで亡くなっている。全死亡の約26%に相当する数である。

根治不能となったがんは個体全体にさまざまな悪影響を与える。最もよく知られているのががん悪液質だ。臨床的には体重の減少で判断される「痩せほそり」が主症状である。最近では、全身的な代謝の異常や炎症をがん悪液質の症状に含めることもある。がん悪液質状態では患者の生活の質が損なわれ、治療の効率が落ちる。就労が妨げられることによる経済毒性のインパクトも見逃せない。以上、がん悪液質が患者に与える負のインパクトはきわめて大きい。

研究代表者は、がんによって生じる宿主病態生理の全体をがん悪液質として捉え、がん悪液質を強力に制御する方法を見つけようとしている(*Cancer Sci.*, 2024)。

その過程で、がんが遠隔にある肝臓の概日リズムや空間的遺伝子発現を乱すこと (*Oncotarget*, 2017; *Commun. Biol.*, 2023; *Front. Immunol.*, 2023), コレステロール代謝やニコチンアミド代謝を攪乱すること (*Dis. Model Mech.*, 2018; *Nat. Commun.*, 2022), などを見出してきた。

当該年度は、乳がんがリンパ節に与える影響について興味深い結果を得ることができた。乳がん患者さんから転移をもつリンパ節（転移リンパ節）と転移を持たないリンパ節（非転移リンパ節）を採取した。これらを直接的に比較することにより、乳がんが転移することによるリンパ節への悪影響を明らかにしようとした。リンパ節をレーザーマイクロダイセクションによって切り分け、宿主細胞をエンリッチしたサンプルを作り、RNA-seqによる遺伝子発現解析を行なった。

解析の結果、*CD5L* や *MARCO* といった、マクロファージに特徴的なタンパク質群をコードする遺伝子の発現量が、転移リンパ節において低下していることがわかった。そこで、2名の患者さんに由来する転移リンパ節と非転移リンパ節について、10x Visium による解析を実施した。得られたスポットを観察したところ、10種類の細胞を検出することができた。そのうちの1つは転移した乳がん細胞であった。T細胞やB細胞、マクロファージ、樹状細胞といった主要な細胞に該当するスポットも検出されていた。

空間トランスクリプトームデータにおいてもマクロファージは際立っていた。転移リンパ節と非転移リンパ節を比較したところ、マクロファージとアノテーションされたスポットの減少が顕著であった。T細胞やB細胞とアノテーションされたスポットについてはこのような変化は観察されなかった。乳がんの転移によってマクロファージに特異的な影響が生じていると考えられる結果であった。

さらに、このマクロファージが、*CD169* 陽性マクロファージというサブセットであることがわかった。まず、バルク RNA-seq 解析から、転移リンパ節における *CD169* (別名 *SIGLEC-1*) 遺伝子の発現量が低下していることに気がついた。*CD169* は空間解析でマクロファージとアノテーションされたスポットに強く発現していた。さらに、*CD169* を強く発現するスポットの

空間分布と組織像を突き合わせた結果、*CD169* スポットが髄洞や皮膜下洞という特徴的な構造に集まっていた。*CD169* 陽性マクロファージは髄洞や皮膜洞に局在することが知られていたため、筆者らが観察しているものが *CD169* 陽性マクロファージだという結論が得られたのである。イメージングマスサイトメトリーやより大きな患者コホートに対する組織学によってもこの結論は支持された。

CD169 陽性マクロファージはがん免疫に重要なマクロファージである。このような重要なマクロファージがステージ 2-3 という早期に減少することは極めて興味深く、がんが、早期の段階から宿主の免疫系を抑え込もうとしているのではないかと考えている。

当該年度は、リンパ節の研究に加えて、乳がん患者の時系列サイトカインプロファイリングに関する研究を発表することもできた。本研究では、*IL-1 α* や *TRAIL* といったサイトカインの量が、抗がん剤の効果を予測することに使えることを明らかにした。

以上、当該年度は、乳がん患者の免疫・サイトカインに関する重要な知見が得られた。

【文献】

1. Maeshima, Y., Kataoka, R.T., Vandenbon, A., Hirata, M., Takeuchi, Y., Suzuki, Y., Fukui, Y., Kawashima, M., Takada, M., Ibi, Y., Haga, H., Morita, S., Toi, M., **Kawaoka, S***, and Kawaguchi, K*. (2024). Intra-patient spatial comparison of non-metastatic and metastatic lymph nodes reveals the reduction of *CD169*⁺ macrophages by metastatic breast cancers. **eBioMedicine**, accepted.
2. Saldajeno, D.P#, **Kawaoka, S#**, Masuda, N., Tanaka, S., Bando, H., Nishimura, T., Kadoya, T., Yamanaka, T., Imoto, S., Velaga, R.V., Tamura, N., Aruga, T., Ikeda, K., Maeshima, Y., Takada, M., Suzuki, E., Ueno, T., Ogawa, S., Haga, H., Ohno, S., Morita, S., Kawaguchi, K., and Toi, M. (2024). Time-series blood cytokine profiles correlate with treatment responses in triple-negative breast cancer patients. **Br J Cancer** 130, 1023-1035.

個体レベルでの糖代謝に関する中枢制御機構の解明

川名 洋平

(東北大学大学院医学系研究科 糖尿病代謝・内分泌内科学分野)

【背景・目的】

肥満でインスリン抵抗性が高まると、生体は代償的に膵β細胞の量を増加させ、インスリン分泌を亢進させて高血糖を防ぐ。この仕組みをβ細胞量が減少した糖尿病に活用することで、β細胞を増やす治療法の開発への応用が期待される。以前に私の所属研究室では、肥満において肝臓でのERK活性化を端緒として神経ネットワークを介して代償的にβ細胞が増殖することと (Imai et al., *Science*, 2008, Yamamoto et al., *Nat Commun*, 2017) と、迷走神経刺激のみでβ細胞の増殖を促進できることを示した (Kawana et al., *Nat Biomed Eng*, 2024)。しかし、この肝-膵β細胞間臓器間神経ネットワークにおいて、肝臓からの求心性シグナルを感知した脳から遠心性迷走神経へとシグナルが伝達される脳内経路は不明である。したがって、脳内で内受容感覚を受容する部位から迷走神経の起始核に至るまでの神経回路を解明する。

【方法】

臓器間神経ネットワーク活性化モデルにおいて活性化している脳領域を明らかにするための実験を行った。c-Fosを発現した細胞においてタモキシフェン存在下でtdTomatoの発現を誘導できるFos-TRAP (tdTomato) マウスを用いた。Fos-TRAPマウスにおいて肝ERK経路を活性化した1日後、あるいは高脂肪食負荷を2週間行った後にタモキシフェンを投与することにより、Fosを発現している細胞をマーキングした。後日、脳を採取して透明化し、全脳で領域ごとにtdTomato陽性細胞の数を計測した。

【結果】

両モデルマウスにおいて、皮質、中脳辺縁系、視床、視床下部、延髄といった各階層の多数の脳領域で、対照群と比べて陽性細胞数の有意な増加または増加傾向を認めた。

【考察】

臓器間神経ネットワークが活性化した際に、皮質も

含め、中脳辺縁系、視床、視床下部、橋、延髄といった幅広い階層の多数の脳領域が活性化していることが示唆された。これらのうち多くの脳領域は、先行研究で内受容感覚部位として挙げられる領域群と共通していた。しかし、臓器間神経ネットワークにおいてこれらの脳領域が担う機能は不明である。今後は、各脳領域でTRAPした神経細胞を再活性化した際に膵β細胞量に生じる変化を調べたり、各脳領域から迷走神経起始核までの神経線維の投射関係を調べる方針である。

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

川野 義長

(慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科)

【目的】

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

【方法】

Tリンパ球特異的Foxo1ノックアウトFoxo3ヘテロノックアウトマウス(T-QuarterKO;T QKO)と、コロンビア大学留学中には、腸管SFBTh17細胞の役割を解析した。

【結果・考察】

申請者は、海外留学中に、SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) という常在性腸内細菌が小腸に誘導する抗炎症性Th17細胞が、小腸の脂肪吸収や肥満関連腸炎を抑制して抗肥満効果を示し、その恒常性が高ショ糖(果糖)により破綻する事を見出した(2022, *Cell*) SFBによる腸管免疫機能特にILC3に及ぼす効果についても論文化した(2024, *Sci Immunology*) 現在は、樹状細胞に果糖輸送体GLUT5に注目し、その機能的役割を解析している。

T-QKOは高脂肪食負荷において負荷10週で有意に体重増加が抑制され、耐糖能およびインスリン抵抗性が有意に改善した。Tリンパ球におけるFoxoファミリーは、Th2リンパ球への分化を抑制する事で脂肪Beige化を抑制する作用があると考えられた(2019, *iScience*) T-QKOの「小腸の慢性炎症」における役割は、今後の

検討が必要と考えられた。

【文献】

1. **Kawano Y**, Edwards M, Huang Y et al. Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome. *Cell*. S0092-8674 (22) (2022)
2. Kikuchi T, Nakae J, **Kawano Y** et al. Watanabe N, Onodera M, Itoh H. Foxo in T Cells Regulates Thermogenic Program through Ccr4/Ccl22 Axis. *iScience*.22:81-96 (2019)
3. Araujo LP, Edwards M, **Kawano Y** et al. Context-dependent role of group 3 innate lymphoid cells in mucosal protection. *Sci Immunol*. 9 (98) (2024)

成体神経幹細胞と上衣細胞の系譜選択機構の解明

國屋 敬章

(東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室)

【目的】

成体神経幹細胞と上衣細胞は成体で環境に応答し、神経新生を行うために重要な神経新生ニッチを形成する細胞である。しかし、成体神経幹細胞と上衣細胞が発生過程でどのように形成されるのか、その細胞系譜の関係は不明であった。これを検討するため、胎生 16.5 日目の大脳基底核原基で分裂抑制した神経幹細胞のみを当研究室で確立した手法により分取することで 1 細胞遺伝子発現解析を行なった。その結果、胎生期の「成体神経幹細胞の起源細胞」と「上衣細胞の起源細胞」を 1 細胞レベルで分離して同定し、さらに、BMP シグナルが成体神経幹細胞の運命を促進し、上衣細胞の運命を抑制することがわかった。では、BMP シグナルはどのようにして成体神経幹細胞と上衣細胞の運命分岐に貢献するのだろうか。これを検討するために、本年度の TMFC の予算を用いて以下の実験を行った。

【方法】

本研究目的を検討するため、BMP シグナルを胎生 14.5 日目の神経幹細胞で亢進し、胎生 17.5 日目に神経幹細胞を分取して網羅的に遺伝子発現を解析したとこ

ろ、TMEM100 の発現量が増加していた。TMEM100 は BMP シグナルの下流で神経幹細胞の未分化性の維持に重要な Notch シグナルを亢進することが血管の系で知られていた。そこで、TMEM100 を胎生 14.5 日目の神経幹細胞で過剰発現し、生後約 1 ヶ月齢で成体神経幹細胞として幹細胞性を維持し続けた細胞と上衣細胞へと分化した細胞を解析した。

【結果】

TMEM100 を胎生 14.5 日目に過剰発現した神経幹細胞では、コントロールの神経幹細胞と比べて上衣細胞よりも成体神経幹細胞に貢献した細胞の割合が増加していた (図 1)。この時、下流で Notch シグナルが亢進するのかを検討するために、TMEM100 を過剰発現してから 3 日後の胎生 17.5 日目の神経幹細胞で検討したところ、TMEM100 の過剰発現により、Notch シグナルが亢進していた。

本研究成果等をまとめて論文投稿し、リバイス中である (Yamaguchi*, **Kuniya***, Omiya* et al., bioRxiv., 2024, *co-first authors)。

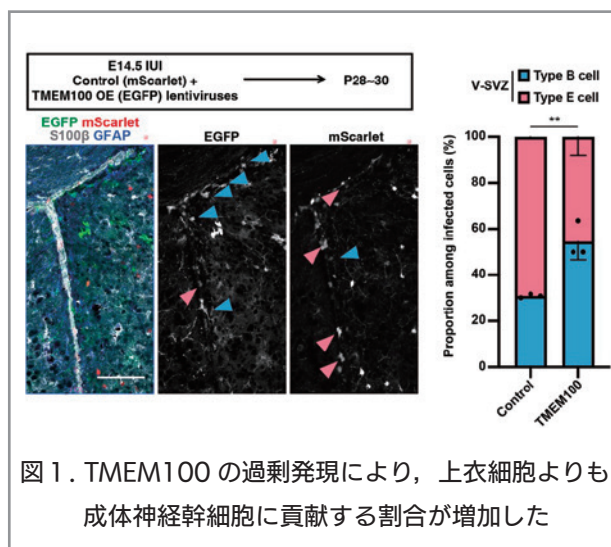


図 1. TMEM100 の過剰発現により、上衣細胞よりも成体神経幹細胞に貢献する割合が増加した

【考察】

Notch シグナルは上衣細胞の分化・成熟抑制に寄与することが知られているため、BMP シグナルはその下流で部分的に TMEM100 を介して Notch シグナルを亢進することで上衣細胞の分化運命を抑制し、成体神経幹細胞への運命を促進するのではないかと考えている。現在、BMP シグナルがどのように成体神経幹細胞と上衣細胞の胎生期起源細胞の運命分岐に貢献するのか、他のシグナルとの関わりに注目し、更に検討中である。

【文献】

1. S. Yamaguchi*, **T. Kuniya***, H. Omiya, Y*. Suzuki, M. Seki, H. Ukai, L. Fang, Y. Harada, D. Kawaguchi, Y. Gotoh, Embryonic diversification of adult neural stem cells and ependymal cells, *bioRxiv* (2024) p. 2024.05.12.593751. (*co-first authors)

全身全細胞解析技術を用いた微小炎症制御機構の
解明

久保田 晋平

(北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野・特任講師)

【目的】

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

【方法】

久保田らは微小炎症の発生・消滅・増幅・定着機構を担う神経免疫連関機構を定量的に解析することを可能にするために、ライトシート蛍光顕微鏡、蛍光プローブ、画像解析手法の開発に取り組んだ。開発した手法を自己免疫疾患、がん研究やデュピイトラン拘縮など様々な疾患に応用することで微小炎症制御法の確立を目指す。

【結果】

組織透明化手法とライトシート蛍光顕微鏡を組み合わせることで、高速に三次元画像を取得することが可能になるが、レポーターシステムの制限により生体内の微小環境を定量的かつ包括的に評価することは困難であった。久保田らは主要な蛍光色素と組織透明化試薬が蛍光色素に対して及ぼす影響を評価した上で（図1）、酸素分圧 10 mmHg 以下の低酸素環境で還元されるピモニダゾールを元に共有結合型蛍光プローブを作製した（図2）。また作製した共有結合型蛍光プローブを用いることで腎臓内の低酸素環境を可視化（図3）に成功した¹⁾。

【考察】

微小炎症の制御方法を確立するためには病態を可視化することにより時空間的多様性・遷移状態を定量評価することが重要である。時空間的多様性・遷移状態を定量評価する実験系としてレポーター系の開発などに取り組みながら研究を進めていく。

【文献】

1. Sakamoto DM, (6名略), **Kubota SI**, (5名略), Tainaka K*, Sando S*: Whole-body and whole-organ 3D imaging of hypoxia using an activatable covalent fluorescent probe compatible with tissue clearing. *ACS Nano*, 2024, 18, 6, 5167-5179, PMID: 38301048, DOI: 10.1021/acsnano.3c12716
2. Naito S, (6名略), **Kubota SI**, Hojyo S, Hashimoto S*, Murakami M*: DDX6 is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases via NF-κB activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2024, 703, 149666 (1-8), PMID: 38377944, DOI:10.1016/j.bbrc.2024.149666
3. Murakami K, **Kubota SI**, (22名略), Taniguchi M*, Murakami M*: High-Precision Rapid Testing of Omicron SARS-CoV-2 Variants in Clinical Samples Using AI-Nanopore. *Lab on a Chip*, 2023, 23, 4909-4918, PMID: 37877206, DOI: 10.1039/d3lc00572k
4. Yamamoto R#, Yamada S#*, Atsumi T#, Murakami K#, Hashimoto A#, Naito S#, (8名略), **Kubota SI**, Hashimoto S*, Murakami

- M*: Computer simulation of an IL-6 dependent rheumatoid arthritis model in F759 mice. *International Immunology*, 2023, 35(9), 403-421, PMID: 37227084, DOI: 10.1093/intimm/dxad016
5. Matsuyama S#, Yamamoto R#, Murakami K#, Takahashi N#, (13名略), **Kubota SI**, (4名略), Murakami M*: GM-CSF promotes the survival of peripheral-derived myeloid cells in the CNS for pain-induced relapse of neuroinflammation. *Journal of Immunology*, 2023, 211(1), 34-42, PMID: 37212607, DOI: 10.4049/jimmunol.2200567
 6. Senjo H, Harada S, **Kubota SI**, (14名略), Murakami M, Teshima T*, Hashimoto D*: Calcineurin inhibitor inhibits tolerance induction by suppressing terminal exhaustion of donor T cells after allo-HCT. *Blood*, 2023, 142(5), 477-492, PMID: 37216687, DOI: 10.1182/blood.2023019875
 7. Yamasaki T#, Nagata N#, Atsumi T#, Hasebe R#, Tanaka Y#, Ohki I, **Kubota S**, (10名略), Takiguchi M#, Murakami M*: Zoobiquity experiments show the importance of the local MMP9-plasminogen axis in inflammatory bowel diseases in both dogs and patients. *International Immunology*, 2023, 35(7), 313-326, PMID: 36933193, DOI: 10.1093/intimm/dxad006

図 1. 組織透明化試薬中における蛍光色素特性の評価

Dye	Solvent	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{ex}(nm)$	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	ϕ_f	Brightness ($\epsilon \times \phi_f$)	Dye	Solvent	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{ex}(nm)$	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$	ϕ_f	Brightness ($\epsilon \times \phi_f$)
FITC	PBS	495	519	86,500	0.55	47,600	Tokyo Green	PBS	493	512	62,600	0.84	52,600
	BABB	464	536	400	n.d.	n.d.		BABB	464	526	18,500	0.40	7,400
	Basified BABB	508	530	115,000	0.60	69,000		Basified BABB	513	530	74,600	0.87	64,900
	CUBIC-R	461	530	8,800	0.14	1,200		CUBIC-R	464	530	17,700	0.10	1,800
	CUBIC-R+	507	530	104,400	0.53	55,300		CUBIC-R+	513	529	62,600	0.78	48,900
TAMRA	PBS	550	579	81,600	0.43	35,100	Me-Si-Rhodol	PBS	614	633	105,800	0.28	29,600
	BABB	552	581	40,300	0.91	36,700		BABB	578	639	40,000	0.85	34,000
	CUBIC-R	556	582	77,800	0.63	49,000		CUBIC-R	612	645	60,800	0.68	41,300
Si-Rhodamine	PBS	645	668	96,600	0.37	35,800	Me-Si-Rhodamine	PBS	648	665	79,400	0.37	29,400
	BABB	n.d.	678	n.d.	n.d.	n.d.		BABB	664	681	89,600	0.72	64,500
	Acidified BABB	663	682	49,000	0.71	34,800		CUBIC-R	662	679	86,400	0.52	44,900
	CUBIC-R	655	673	1,600	0.61	1,000	PO-Rhodamine	PBS	713	739	130,300	0.12	15,600
Acidified CUBIC-R	663	682	64,600	0.48	31,000	BABB		716	736	157,300	0.48	75,500	
Cy3	PBS	549	565	162,400	0.06	9,700	BODIPY	CUBIC-R	720	743	145,000	0.14	20,300
	BABB	564	582	122,600	0.39	47,800		PBS	503	512	97,100	0.94	91,200
	CUBIC-R	561	577	140,300	0.53	74,400		BABB	511	520	113,600	0.89	101,100
Cy5	PBS	647	688	315,600	0.22	69,400	BODIPY	CUBIC-R	510	521	96,400	0.16	15,400
	BABB	666	690	246,400	0.53	130,600							
	CUBIC-R	660	683	284,900	0.61	173,800							

図 2. In vivo 低酸素プローブの作製

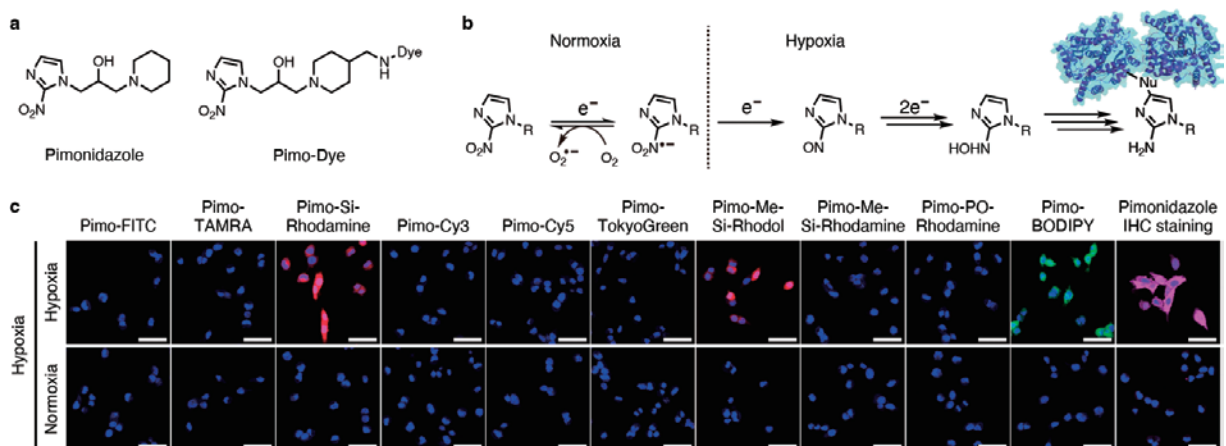
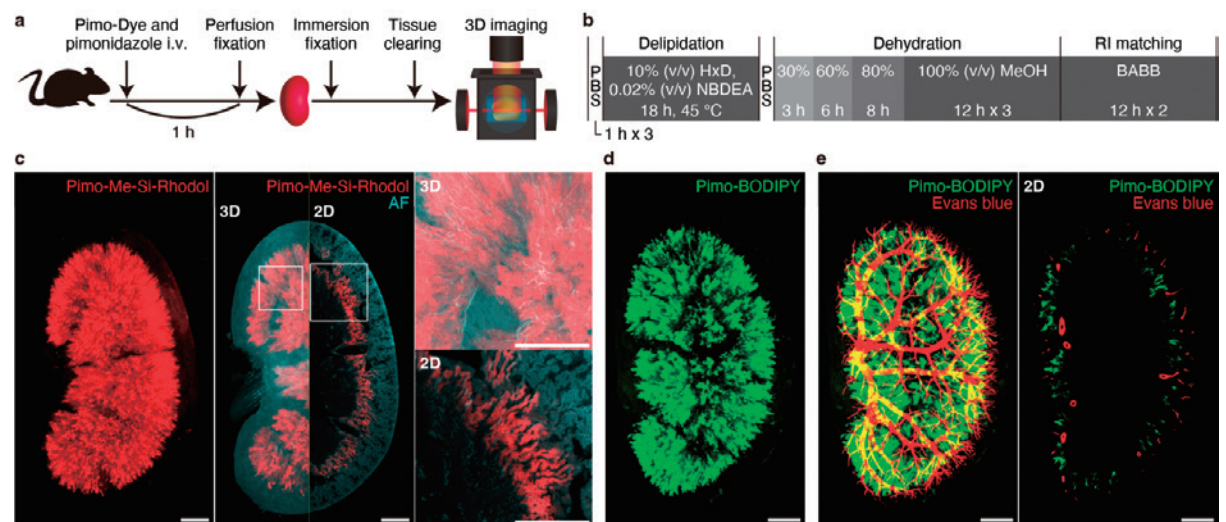


図 3. In vivo 低酸素プローブを用いた腎臓内低酸素環境の可視化



骨格筋再生を主導する多細胞間相互作用ネットワークの解析

小池博之

(東京医科歯科大学)

【目的】

再生筋組織では、固有の細胞集団と傷害後に血中から動員された細胞集団が混在しており、組織微小環境の変化に応じて機能を変化させて相互作用ネットワークを形成している。そのため、従来のバルク組織解析では、単一細胞レベルでの機能変化を捉えることが困難だった。近年の解析技術の進展に伴い、単一細胞解析からより細分化されたマクロファージ亜集団の骨格筋再生に対する関与が想定されつつあるが、それらマクロファージ亜集団の実態およびサルコペニアの要因となる筋再生不全に寄与しているかについては未だ不明である。仮に、どの細胞間相互作用が適切な修復・再生に必須で、どのメカニズムの変調や破壊が線維化のような不可逆的な再生欠損につながるのかが解明できた場合、再生障害を特徴とする疾患に対する新しい治療法を開発できる可能性が高いものの、単一細胞解析から得られる情報を反映できる評価系が確立されていないことが大きな阻害要因となり、単一細胞間相互作用の時系列的な変化やその制御機構も不明だった。本研究では、マクロファージが骨格筋幹細胞の増殖を制御するシグナルを明らかにすることを試みた。

【方法】

本研究では、まずマウスの正常筋組織と傷害後3日目の再生筋組織から単一細胞 RNA シークエンシング (scRNA-seq) 法によって取得した遺伝子発現プロファイルから、細胞集団間の相互作用ネットワークを推定した。次に、単一細胞解析から得られた情報を反映できる *in vitro* 評価系として十分な骨格筋線維構築を促すことができる骨格筋オルガノイドを作製した。 *in vivo* で見られるような骨格筋幹細胞とマクロファージ亜集団の細胞間相互作用や分子シグナル伝達を詳細に解析することを試みた。

【結果】

再生過程のマウス骨格筋のシングルセル RNA シーク

エンス解析により、再生骨格筋組織中のマクロファージが様々なサブタイプ (亜集団) に分類されることを確認した。マクロファージ亜集団の中で骨格筋幹細胞らとの相互作用を持つマクロファージ亜集団を同定するため、CellPhoneDB の解析を実施し、全マクロファージ亜集団と、未分化状態の骨格筋幹細胞、増殖中の骨格筋幹細胞、筋芽細胞、分化した筋線維の4つの細胞とのリガンド-受容体の相互作用を解析した。マクロファージ亜集団全てが骨格筋幹細胞らとリガンド-受容体の相互作用を有していたが、その中でも一つの亜集団 (Mac1) は、未分化な骨格筋幹細胞、増殖している骨格筋幹細胞、筋芽細胞、分化した筋線維を含む全ての筋線維関連の細胞と密接に相互作用を担っていた。特に増殖している骨格筋幹細胞との相互作用が強く観察された。さらに、この Mac1 と、未分化状態の骨格筋幹細胞、増殖中の骨格筋幹細胞、筋芽細胞、分化した筋線維との相互作用を担うリガンド-受容体を探索したところ、多数のリガンド-受容体が同定された。

これまでに、再生中の骨格筋には新規なマクロファージ亜集団が複数存在しており、その中でもマクロファージ亜集団 Mac1 が増殖系骨格筋幹細胞と密接な相互作用を示した。次に、Mac1 が骨格筋再生に重要な細胞であるかを明らかにするため、骨格筋再生に対するマクロファージの作用を評価可能な *in vitro* 培養系を構築することにした。骨格筋幹細胞とマクロファージの細胞間相互作用を再現するため、細胞間接着が強い3次元培養系「オルガノイド」で検討した。CTX を投与してから3日目の骨格筋組織をシングルセル化し、マトリゲルで培養し、凝集開始から6日目のオルガノイドを評価した。オルガノイドは、活性化骨格筋マーカー MyoD1、骨格筋線維マーカー MyHC を発現した細胞で構成され、10日目には横紋筋やサルコメアといった成熟度の高い構造を有していた。骨格筋線維ができるまでの6日間のオルガノイドにおける骨格筋マーカー Myog、Myh3、Myh4 の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で検証したところ、全てのマーカーの発現が、日数が経つにつれ徐々に増加した。つまり、オルガノイド内で、骨格筋の再生が起きていることが示唆される。また、骨格筋幹細胞マーカー PAX7 の系譜追跡マウスとマクロファージマーカー CX3CR1 のレポーターマウスを掛け

合わせたマウスより作製したオルガノイドを用いた解析では、オルガノイドが構築される過程で、PAX7とCX3CR1をそれぞれ発現する細胞が共存していることが明らかとなった。また、培養する過程でPAX7の発現がほとんど変わらなかったことを踏まえると、オルガノイドで観察される骨格筋線維は、PAX7陽性の骨格筋幹細胞由来であることが示唆される。

Mac1をCTX投与骨格筋線維から単離し、骨格筋オルガノイドにおいて欠如させた時の骨格筋再生への影響を検証した。その結果、Mac1を欠如させた骨格筋オルガノイドでは、MyHCの陽性細胞が減少し、Myf5の遺伝子発現が優位に減少した。Mac1の欠如は、また、細胞増殖抑制因子の発現を増加させた。scRNAseqのデータから、Mac1が増殖性の高い骨格筋幹細胞との強い相互作用を示していたことから、Mac1は、骨格筋幹細胞の増殖を促進し、骨格筋再生を寄与していることが示され、骨格筋オルガノイドの骨格筋再生において、Mac1が重要なマクロファージ亜集団であることが示唆された。

十分な症例数に基づく解析が必要とされていた。また、CHによって重症化リスクが上昇する場合そのメカニズムも明らかではなく、多層的なオミックス解析による機能的評価が必要とされていた。

【方法】

今回代表者らは、コロナ制圧タスクフォースに由来する過去最大のCOVID-19コホート(4731名)について、末梢血由来DNAの標的シーケンス解析、およびSNPアレイ解析を実施し、CHに関連する遺伝子変異および染色体異常を検出した。また、重症化リスクと関連する場合はそのメカニズムを解明するため、2,994例については末梢血のRNAシーケンス(RNA-seq)、1,200例ではOlink社のアッセイを用いた血漿プロテオミクス解析を実施した。

【結果】

上記の解析の結果、全体の16%において遺伝子変異、6%において染色体異常を同定した。2551人の重症例と2180人の非重症例の間で、これらの頻度を比較したところ、末梢血中における細胞割合が10%以上のCHは重症例に有意に濃縮しており、年齢・性別について層別化したオッズ比は1.28 [95%信頼区間:1.01-1.61]であることから、CHはリスクの上昇に関与していると考えられた。(図1)しかし、遺伝子変異・染色体異常による詳細な層別化のもとリスクを評価すると、CHの中で最も頻度の高い異常である、DNMT3AおよびTET2の変異(DT変異)は全くリスクに関与しておらず、リスク上昇に寄与しているのは専らそれ以外の変異(non-DT変異)であった(オッズ比:1.75 [1.21-2.54])。また、CHに関連する染色体異常についても、重症化リスクとの関連が示唆されていたが、今回の検討で遺伝子変異が共存しない単独の染色体異常はリスクに全く関連しないことが判明した。

クローン性造血による疾患発症メカニズムの解明

佐伯 龍之介

(京都大学 大学院 医学研究科 腫瘍生物学講座)

【背景・目的】

クローン性造血(Clonal hematopoiesis, CH)は血液腫瘍の前駆状態であるのみならず、心血管疾患等の様々な病態の促進に関与することから、近年注目されている。本プロジェクトにおいては、CHに基づく疾患リスクモデル構築、バイオマーカーの同定、CHによる疾患発症メカニズムの解明等を目的として研究を進めてきた。2023年度は特に、CHと新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の重症化リスクの関連性について興味深い知見が得られたため、その成果を中心に報告する。今回、研究代表者らは日本における最大のCOVID-19レジストリである「コロナ制圧タスクフォース」に参画し、CHとCOVID-19の重症化リスクの関連性について検討を行った。CHと重症化リスクの関連性については、肯定的な報告と否定的な報告が混在しており、

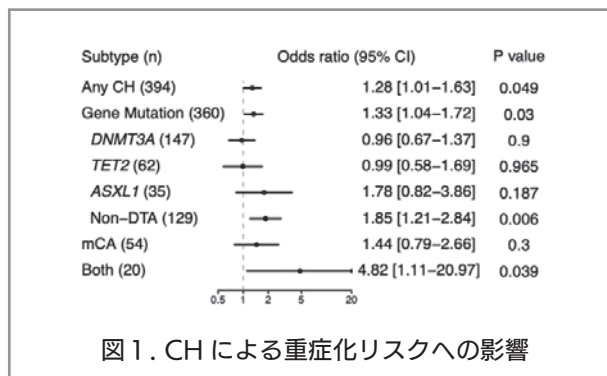


図1. CHによる重症化リスクへの影響

上記の結果を受けて、特に non-DT 変異陽性の CH による COVID-19 の重症化のメカニズムを明らかにするため、末梢血の RNA-seq の解析を行った。CH の効果を評価する前に、COVID-19 の重症化に関わる分子・パスウェイを明らかにするために、重症例と非重症例の比較を行ったところ、重症例では 6534 および 6403 個もの遺伝子が有意に発現上昇、低下しており、特徴的なパスウェイの変動としては、IL6 シグナル、TNF/NF-KB シグナルをはじめとする、全般的な炎症性応答の増強を認めた。(図 2) 上記の解析により、遺伝子発現プロファイルは COVID-19 の重症度によって強く変動していることが明らかとなり、CH に効果を評価するためには重症度の影響を排除する必要があるため、重症例・非重症例を分けて解析を行った。

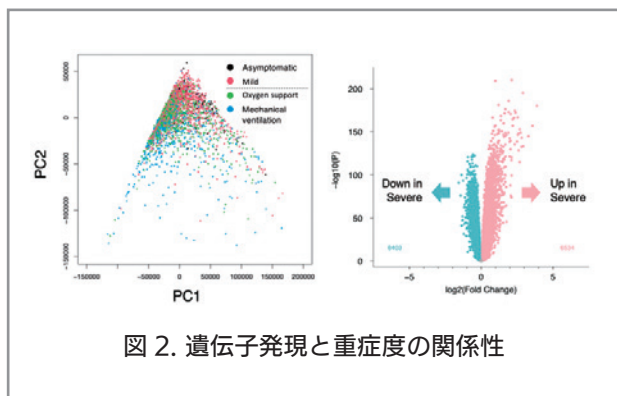


図 2. 遺伝子発現と重症度の関係性

まず重症例の解析では、DT 変異、non-DT 変異の有無に関わらず重症例においてはほぼ同様の変化が起こっていることが明らかとなった。この結果から、すでに重症化によって強い炎症性応答が惹起された状態では、CH の効果を観測することは困難と考えられた。(図 3) 一方で、非重症例における解析では、重症化によって強く上昇していた遺伝子が、非重症の non-DT 変異陽性例においても上昇する傾向が認められた、パスウェイ解析においても重症化において活性化が認められていた複数の炎症関連パスウェイが、non-DT 陽性の非重症例においても有意に活性化していた。(図 4) これらの傾向は、リスクに関与しなかった DT 変異においては全く認められなかった。これらのことから、臨床的に重症化していない患者でも、non-DT 変異がある場合には重症例に類似した炎症性応答が認められ、non-DT 変異を有する CH は炎症の増強を通じて COVID-19 の重症化に関与している可能性が示唆された。

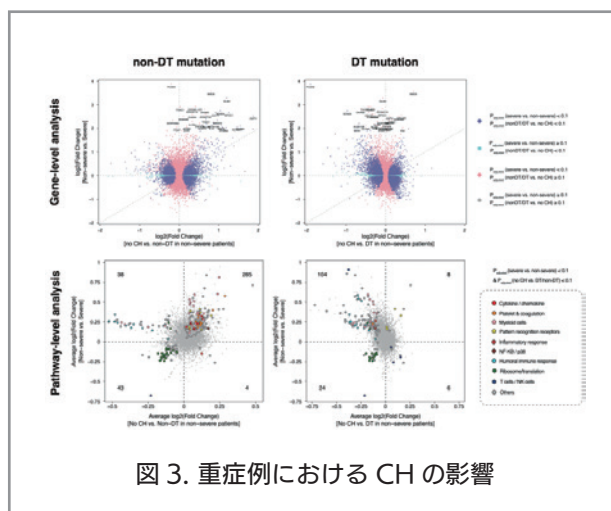


図 3. 重症例における CH の影響

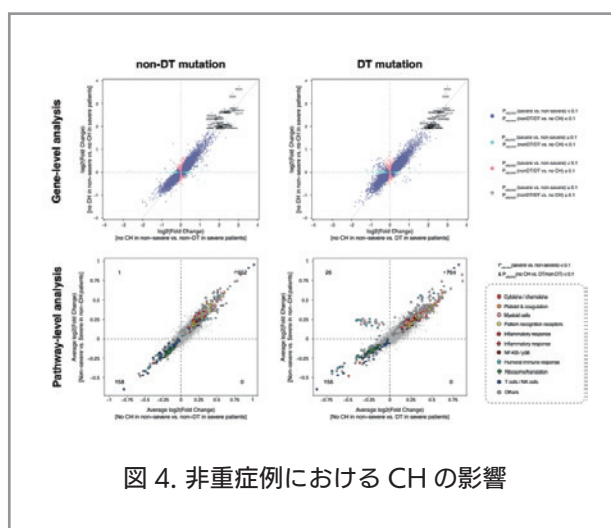


図 4. 非重症例における CH の影響

さらに、このような non-DT 変異による炎症性応答の増強が、COVID-19 感染化ではなくとも観測される一般的な特徴であるか確認するため、健常者 672 名について追加解析を行った。その結果、非重症の COVID-19 症例と同様に、non-DT 変異特異的に、炎症関連パスウェイの上昇を認め、non-DT 変異例ではベースラインで炎症性応答が亢進しており、そのような状態が SARS-CoV-2 感染時に重症化の引き金となっている可能性が考えられた。(図 5)

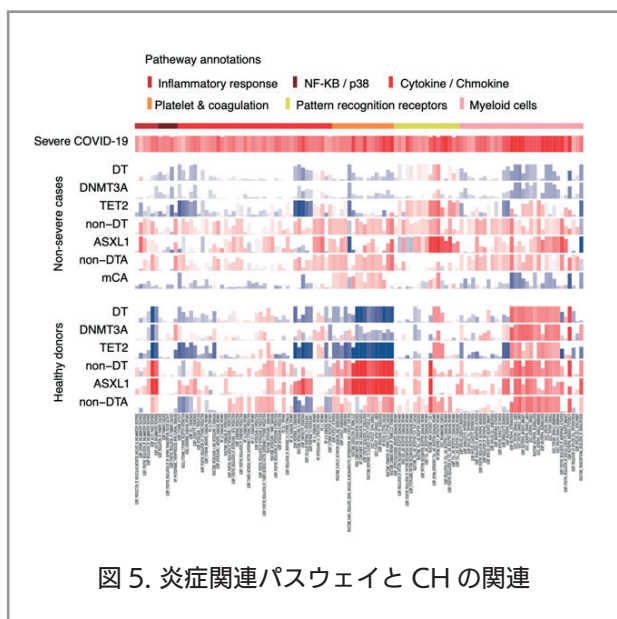


図 5. 炎症関連パスウェイと CH の関連

上記の見解は、CH に基づく COVID-19 重症化リスクの予測に役立つのみならず、重症化リスクの上昇メカニズムについて示唆が得られたことにより、次のパンデミックが訪れた際のための適切な予防方法の開発にも貢献することが期待される。これらの成果を基盤として、2024 年度以降は CH と COVID-19 以外の疾患の関連についても検討を広げていく。準備段階として、現在バイオバンク・ジャパンから約 3 万例の DNA 分譲を受けて、CH の解析を進めている。

睡眠の時空間制御を目指した光活性化薬の開発

斉藤 毅

(筑波大学医学医療系 / 国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

睡眠誘発物質であるアデノシンは、側坐核 (NAc) に存在するアデノシン A_{2A} 受容体 ($A_{2A}R$) 発現ニューロンの活性化を介して睡眠を誘導する¹⁾。そのため、NAc- $A_{2A}R$ を活性化する薬物は新たな機序の不眠症治療薬として期待される。しかしながら、アデノシンおよび既存の $A_{2A}R$ 作動薬は脳移行性が低く、4 種類存在する他のアデノシン受容体に対する選択性が低いという課題がある。さらに、 $A_{2A}R$ は脳以外にも全身に広く発現しており、特に循環器系においてはその活性化により低血圧や頻脈、不整脈を引き起こすために、 $A_{2A}R$ 作動薬を不眠症治療薬として開発することは困難であった。

本研究では、このような薬物の部位特異性の課題を解決するために、光により正確な時空間解像度で薬物を放出する新たな光ケージド $A_{2A}R$ 活性化薬を開発し、遺伝子改変を伴わずに睡眠を遠隔制御する手法の開発をおこなった²⁾。

【方法, 結果】

$A_{2A}R$ 選択性の課題を解決するために、アデノシンとは異なるポケットに結合することで $A_{2A}R$ のアデノシン感受性を増強させる positive allosteric modulator (PAM) YNT-378³⁾ を利用し、YNT-378 に光反応性保護基を導入することで光ケージド $A_{2A}R$ 活性化薬を合成した。汎用される光反応性保護基の課題を解決するために、新たに可視光を吸収帯する 3-アリールクマリンをベースとした光反応性保護基を開発し、光ケージド薬物 opto- $A_{2A}R$ PAM (**1**) を合成、評価した。**1** は良好な水溶性を示し、420 nm に極大吸収波長を有しており、405 nm の光を用いて光反応を行ったところ、わずか 30 秒で反応は収束し、89% の YNT378 が放出された。**1** は in vivo に利用可能な特性を有していたことから、次にマウスにおいて機能を評価した。NAc に光ファイバーと micro dialysis probe を留置したマウスに対し、**1** を遮光下、流通させ、光照射したところ、除波睡眠の有意な増加が認められた。一方で、腹腔内投与にて同様の実験を行うと、低い脳移行性のために有意な睡眠増加は見られなかった。

1 の低い脳移行性を改善するために極性を調整した opto- $A_{2A}R$ PAM (**2**) を開発し、脳移行性を調査した。その結果、**2** は **1** と比較して有意な脳移行性の向上が確認された。そこで、**2** を用いて末梢投与による実験を行った。NAc に光ファイバーのみを留置したマウスに対し、**2** を腹腔内投与し、光照射を行ったところ、期待通り除波睡眠の有意な増加が認められた。一方で、この効果は $A_{2A}R$ 欠損マウスでは確認されなかった。

これらの結果から、**2** は末梢投与で脳に移行し、光照射により NAc- $A_{2A}R$ を選択的に活性化することで睡眠を人為的にリモート誘導する薬物であることが示された。

【文献】

- 1) Oishi Y. *et al.* Nat Commun. 8, 734 (2017).
- 2) Roy K. *et al.* Nat Commun. 15, 3661 (2024).

- 3) Korkutata M. *et al.* *Neuropharmacology*, 144, 122–132 (2019).

モデル魚類を用いた網膜変性疾患の研究

佐藤 恵太

(岡山大学学術研究院医歯薬学域細胞組織学分野)

【目的】

一定以上進行した網膜変性疾患では光遺伝学による視覚再生が期待されている。光遺伝学は、光受容分子の遺伝子を異所的に発現させ細胞を光操作する技術で、そのツールとして動物の光受容タンパク質も有望な候補になる。脊椎動物は視覚その他の光受容を担うオプシンと総称されるタンパク質群を持つ。紫外光感受性のオプシン Opn5m は、マウスの視床下部、メダカの下垂体に発現する。脳深部で働くオプシンは高感度な光遺伝学ツールとして有望な光受容分子であると考え、Opn5m の分子機能を解析した。

【方法】

種々の脊椎動物 Opn5m と発光 Ca⁺⁺ センサーイクオリンを 293T 細胞で発現させ発光測定を行った。Gq 系 α サブユニット *GNAQ/GNA11/GNA14/GNA15* を KO した細胞株 (293T Δ GQ) を作製した。293T Δ GQ にイクオリン、Opn5m とマウス *G α q*, *G α 11*, *G α 14*, *G α 15* をそれぞれ共発現し、発光測定を行った。G14 活性化能が高かったことから、マウス *G α q* と *G α 14* のキメラ、変異体により原因アミノ酸の同定を試みた。ニワトリとメダカの眼球で *G α 14* と Opn5m の遺伝子を蛍光 in situ hybridization(FISH) により解析した。

【結果】

どの脊椎動物 Opn5m も紫外光で細胞内 Ca⁺⁺ 応答を惹起し、293T Δ GQ ではこれが消失した。さらにマウス *G α q*, *G α 11*, *G α 14*, *G α 15* のいずれの共発現でも回復し、*G α 14* で有意に大きい応答を得た。キメラ、変異体実験では Opn5m が G14 を高効率に活性化する原因アミノ酸が GPCR と *G α* の相互作用に重要と言われる領域と異なる位置にあった。FISH によりニワトリ *OPN5M/GNA14*, メダカ *opn5m/gna14a* の眼球強膜軟

骨細胞での共発現を見出した。

【考察】

脳深部で機能する特性を持ち、短波長光感受性で Gq 系を活性化し細胞内 Ca⁺⁺ 応答を惹起する Opn5m は視覚再生を含む光遺伝学での利用のため有用なツールであると考えられる。

【文献】

Sato K, Yamashita T, Ohuchi H. Mammalian type opsin 5 preferentially activates G14 in Gq-type G proteins triggering intracellular calcium response. *J. Biol. Chem.* **299**, 105020 (2023).

睡眠覚醒サイクルにおける遺伝的な制御と環境的な制御の統合機構に関する研究

史 蕭 逸

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

睡眠は神経系を有するすべての生物に保存された生理現象である。しかし、我々はまだ、“生物はなぜ眠るのか？”というシンプルな問いに対する統一的な答えを持たない。睡眠研究者は 100 年以上の間、睡眠圧の生物学的実体、すなわち覚醒の間に蓄積し、睡眠を誘導、そして睡眠の間に減弱する因子を同定することで、その問いに答えようとしてきた。今日、リン酸化、シナプス強度、神経細胞の発火特性、脳波の特定周波数帯の強さといった、分子から脳活動に至る空間・時間的に異なるスケールの現象が睡眠圧の生物学的実体として提唱されている (Franken et al., *J. Neurosci.* 2001; Tononi and Cirelli *Neuron* 2014; Tatsuki et al., *Neuron* 2016; Funato et al., *Nature* 2016; Wang et al., *Nature* 2018; Kim et al., *Nature* 2022; Sawada et al., *Science* 2024)。そこで、本提案では、異なる階層に跨る睡眠圧の生物学的実体を接続することで睡眠をシステムとして理解することを目指すものである。

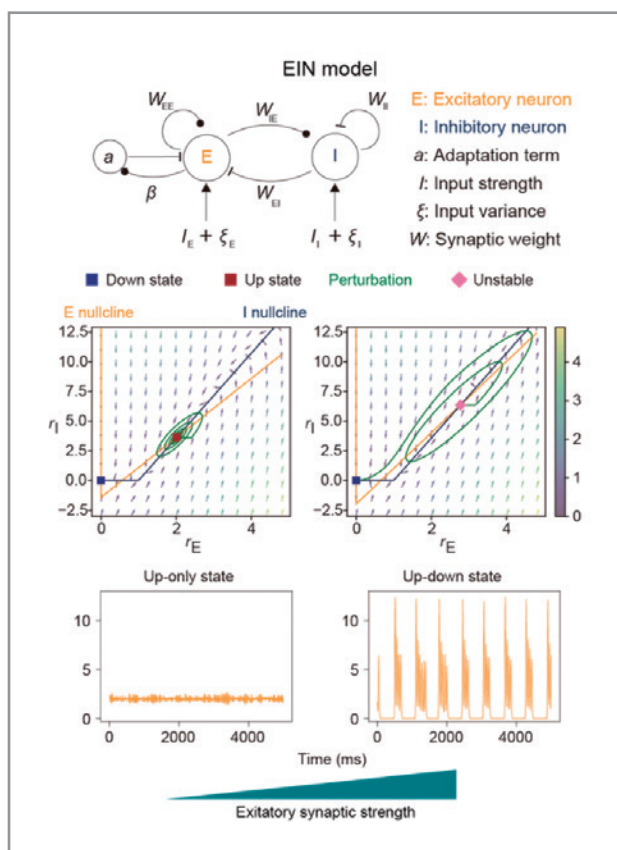
【背景】

睡眠圧の全容を理解するためには、リン酸化、シナプス強度、down state、デルタパワーといった、分子から脳活動に至る空間・時間的に異なるスケールの現象

を統合して理解することが求められる。特に、興奮性シナプス強度の増加と、down stateやデルタパワーの増加といった電気生理学的変化との関係は不明である。直感的には、興奮性シナプス強度の増加は、脱分極を誘導し、神経集団の発火率を上昇させる。しかしdown stateやデルタパワーの増大には、過分極が必要である。つまり、シナプス強度の増加と過分極の誘導は一見矛盾する。

【方法・結果】

申請者らは、excitatory-inhibitory neuronal network model (EIN モデル) を用いて、シナプス強度の増加によって脱分極 (up state) が不安定化し、down state が誘導される数学的に新しい分岐機序を発見した (下図)。



さらに、2つのEINモデルを統合することで、1つの興奮性神経細胞のシナプス強度の増加させることで、down stateが上流から下流に伝播することが示された。さらに、高密度多電極アレイ (MEA) システム上で皮質神経細胞を解離培養し、AMPA受容体のアゴニストを投与することで、down stateの増加を確認した。これらの結果は、大脳皮質局所におけるシナプス増強が、アップダウン状態を広範囲に伝播させる可能性があることを示唆している。

さらに、薬剤依存的にLTP (Long-term potentiation) を誘導するツールを用いて、前頭前皮質の興奮性神経細胞におけるLTPがNREM睡眠の増加とデルタ波の増加を誘導することで、深く長い睡眠を誘導することを明らかにした (Sawada et al., *Science in press*).

【考察】

PFCにおける局所的シナプス増強が、より長く深い睡眠を引き起こすという結果からいくつかの考察が提供される。PFCと視覚野を比較するとPFCのほうがシナプス依存的な電流が強いことや、PFCでは他の皮質領域と比較してデルタ波が強いことを合わせると、シナプス強度の差に依存したPFCを起点とするデルタ波の伝播経路の存在が示唆される (Wang et al., *PNAS* 2008; Massimini et al., *J. Neurosci.* 2004; Leemburg et al., *PNAS* 2010). さらに、生物間で睡眠の機能が多様であること (Anafi et al., *Nat. Rev. Neurosci.* 2019) を考慮すると、種間で睡眠圧の構成要素に相対的な違いがあることが予想される。特に、高度に進化した大脳皮質を持つ哺乳類では、記憶の形成と持続に不可欠なシナプス強度の調節が、睡眠制御の重要な構成要素として現れるのは当然かもしれない。

【文献】

1. Franken P, Chollet D, Tafti M. The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J Neurosci.* 2001 Apr 15;21(8):2610–21.
2. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron.* 2014 Jan 8;81(1):12–34.
3. Tatsuki F, Sunagawa GA, Shi S, Susaki EA, Yukinaga H, Perrin D, et al. Involvement of Ca(2+)-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron.* 2016 Apr 6;90(1):70–85.
4. Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, et al. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature.* 2016 Nov 17;539(7629):378–83.
5. Wang Z, Ma J, Miyoshi C, Li Y, Sato M, Ogawa Y, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis

- of the molecular substrates of sleep need. *Nature*. 2018 Jun 13;558(7710):435–9.
6. Kim SJ, Hotta-Hirashima N, Asano F, Kitazono T, Iwasaki K, Nakata S, et al. Kinase signalling in excitatory neurons regulates sleep quantity and depth. *Nature*. 2022 Dec 7;612(7940):512–8.
 7. Sawada T, Iino Y, Yoshida K, Okazaki H, Nomura S, et al., Prefrontal synaptic regulation of homeostatic sleep pressure revealed via synaptic chemogenetics. *Science*. In press
 8. Wang H, Stradtman GG, Wang X-J, Gao W-J. A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Oct 28;105(43):16791–6.
 9. Massimini M, Huber R, Ferrarelli F, Hill S, Tononi G. The sleep slow oscillation as a traveling wave. *J Neurosci*. 2004 Aug 4;24(31):6862–70.
 10. Leemburg S, Vyazovskiy VV, Olcese U, Bassetti CL, Tononi G, Cirelli C. Sleep homeostasis in the rat is preserved during chronic sleep restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Sep 7;107(36):15939–44.
 11. Anafi RC, Kayser MS, Raizen DM. Exploring phylogeny to find the function of sleep. *Nat Rev Neurosci*. 2019 Feb;20(2):109–16.

ソーシャルディスタンスを制御する神経回路とその分子の探索

征 矢 晋 吾

(筑波大学医学医療系, 国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

本研究では, ソーシャルディスタンスを制御する神経基盤を探索するためニューロペプチド B/W に注目した。ニューロペプチド B/W はこれまでに痛みの制御, 自律神経系の調節などに関わることが知られているが, その生理的役割は不明な点が多い。ニューロペプチド B/W の受容体であるニューロペプチド B/W 1 受容体

(Npbwr1) は情動応答に重要な役割を果たす扁桃体中心核 (CeA) の GABA 作動性ニューロンにおいて顕著な発現を示すことを確認した。さらに, Npbwr1 欠損マウスを独自に作成し, 様々な行動テストを行った結果, このマウス新奇個体に対して社会的接触時間が非常に長く, 執拗な追尾行動を示すことが明らかになった。この時の心拍数, 血圧を測定したところ, 対照群に比べ顕著かつ持続的な上昇が見られた。また, 恐怖記憶の形成に障害が観察された (Nagata-Kuroiwa et al. 2011)。また, これまでに Npbwr1 を発現するニューロン (Npbwr1 ニューロン) の神経活動が新奇個体との接触時に亢進し, 既知の個体に対しては同様の活動が見られないことを確かめているから, 新奇と既知の識別に関与している可能性が示唆される。また, Npbwr1 ニューロンを人為的に操作することによって新奇個体との社会性およびソーシャルディスタンスが変化することを突き止めている。本研究では, 新奇個体を繰り返し暴露することによって Npbwr1 ニューロンがどのような活動を示すのか観察することで, 新奇個体に対するソーシャルディスタンスの制御メカニズムの解明を目指す。

【方法・結果】

- A) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV-DIO-GCaMP6s を投与した。2 週間後に新奇の野生型マウスとの社会行動テスト (3 分) を 10 分のインターバルを挟んで計五回行った。
- B) 新奇の雄個体に対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態 (1 回目)。
- C) 新奇の雄個体に対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態 (2 回目)。
- D) 新奇の雄個体に対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態 (3 回目)。
- E) 新奇の雄個体に対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態 (4 回目)。
- F) 新奇の雄個体に対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態 (5 回目)。
- G) 5 回の社会行動テスト時における社会的接触時の最大カルシウム応答の平均値。
- H) 5 回の社会行動テスト時における社会的接触時のカルシウム応答の平均曲線下面積。

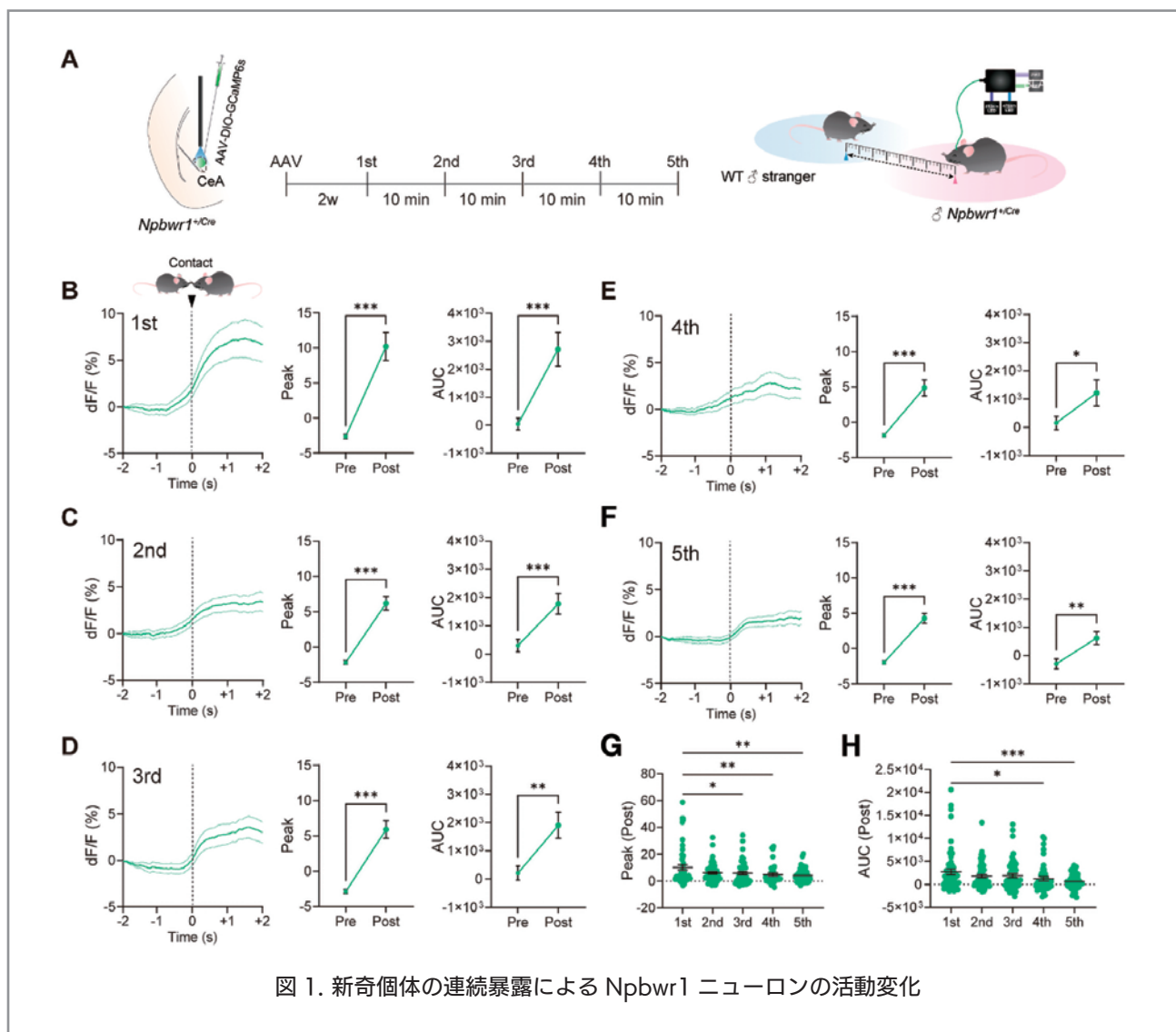


図 1. 新奇個体の連続暴露による Npbwr1 ニューロンの活動変化

【考察】

新奇個体との接触時における Npbwr1 ニューロンの活動は回数を重ねるごとに減少する傾向が観察され、特に 4 回目以降のテストでは著しいカルシウム応答の減弱が観察された。また、これまでの実験から Npbwr1 ニューロンは新奇の雄・雌個体との接触時にカルシウム応答が上昇し、既知の雄個体や物体との接触ではこのような応答は見られなかった。また、Npbwr1 ニューロンを人為的に興奮させることで新奇個体との社会性の増加およびソーシャルディスタンスの減少を示すことを確認している。げっ歯類は新奇社会的嗜好性を示すことが知られている (Moy et al. 2004) がその神経メカニズムは不明な点が多い。CeA に発現する Npbwr1 ニューロンは新奇の個体との接触により顕著にその活動が亢進し、新奇個体との社会性増加およびソーシャルディスタンスの低下を制御しており、新奇社会的嗜

好性の神経メカニズムの一端である可能性が示唆される。今後は、Npbwr1 ニューロンを制御する CeA の上流の神経メカニズムについて探索することで、新奇社会的嗜好性を制御する神経ネットワークの描出を試みる。

【文献】

1. Moy, S. S., J. J. Nadler, A. Perez, R. P. Barbaro, J. M. Johns, T. R. Magnuson, J. Piven, and J. N. Crawley. 2004. "Sociability and Preference for Social Novelty in Five Inbred Strains: An Approach to Assess Autistic-like Behavior in Mice." *Genes, Brain, and Behavior* 3 (5): 287–302.
2. Nagata-Kuroiwa, Ruby, Naoki Furutani, Junko Hara, Mari Hondo, Makoto Ishii, Tomomi Abe, Michihiro Mieda, et al. 2011. "Critical Role of Neuropeptides B/W Receptor 1 Signaling in Social Behavior and Fear Memory." *PloS One* 6 (2): e16972.

メタボリックシンドロームにおける心臓組織
URAT1 の機能に関して

田中 祥朗

(東京慈恵会医科大学 内科学講座 循環器内科)

【目的 / 背景】

高尿酸血症は、メタボリックシンドローム、心不全、虚血性心疾患などの心血管代謝疾患と関連があると報告されている。我々は、虚血性心疾患患者のカテーテル検査データベースを使用して高尿酸血症が、高血圧、脂質異常症、腎機能、糖尿病などとは関係なく左室駆出率と負の相関関係にある事を明らかにした¹⁾。この結果からは、①左室駆出率が悪くなった結果、尿酸値が上昇した可能性および②高尿酸血症自体が左室駆出率を悪化させた2つの可能性があると考えられた。①の可能性に関して我々は、不全心筋のエネルギー代謝に着目して、不全心筋では心臓組織のキサンチンオキシダーゼが活性化する事により尿酸産生が亢進している事を明らかにした²⁾。一方で、②の可能性について考察すると、細胞外尿酸が心筋細胞や心臓組織に悪影響を与えるためには、心血管組織に何らかの尿酸トランスポーターがあると考えられる。我々は、まず腎臓の近位尿細管に発現して尿酸の再吸収をしている URAT1 に着目した。URAT1 は、メタボリックシンドロームなどの高インスリン血症の状態において、発現 / 活性が亢進して尿酸の再吸収を促進する事により高尿酸血症が生じる事が報告されている。我々は、URAT1 が腎臓以外にも褐色脂肪、白色脂肪、肝臓に発現してメタボリックシンドローム下で炎症や酸化ストレスを惹起してメタボリックシンドロームの病態に寄与している事を報告した³⁾。そこで、②の可能性を明らかにするために、心筋細胞 / 心臓組織における URAT1 の機能、発現、活性化条件に検討する事として、特にメタボリックシンドローム下での条件において解析する方針とした。

【方法】

- (a) マウスの心臓組織における URAT1 の発現に関する検討 (RT-qPCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学染色)
- (b) 16-20週間の通常食 (NFD) もしくは高脂肪食 (HFD)

を投与してメタボリックシンドロームマウスモデルを作成して、そこに更に4週間 URAT1 選択的阻害薬である Dotinurad (Doti) を経口投与した。

- (c) 仔ラットの心筋培養細胞を用いて心筋細胞の URAT1 を介した尿酸取り込み能の評価および活性化条件の検討

【結果】

マウスの心臓組織および腎臓組織での URAT1 の発現量を検討した。マウスの心臓組織と腎臓組織では腎臓組織と比較して発現量は少ないものの URAT1 の発現が認められた。(図 1A RT-qPCR, 図 1B ウェスタンブロット)

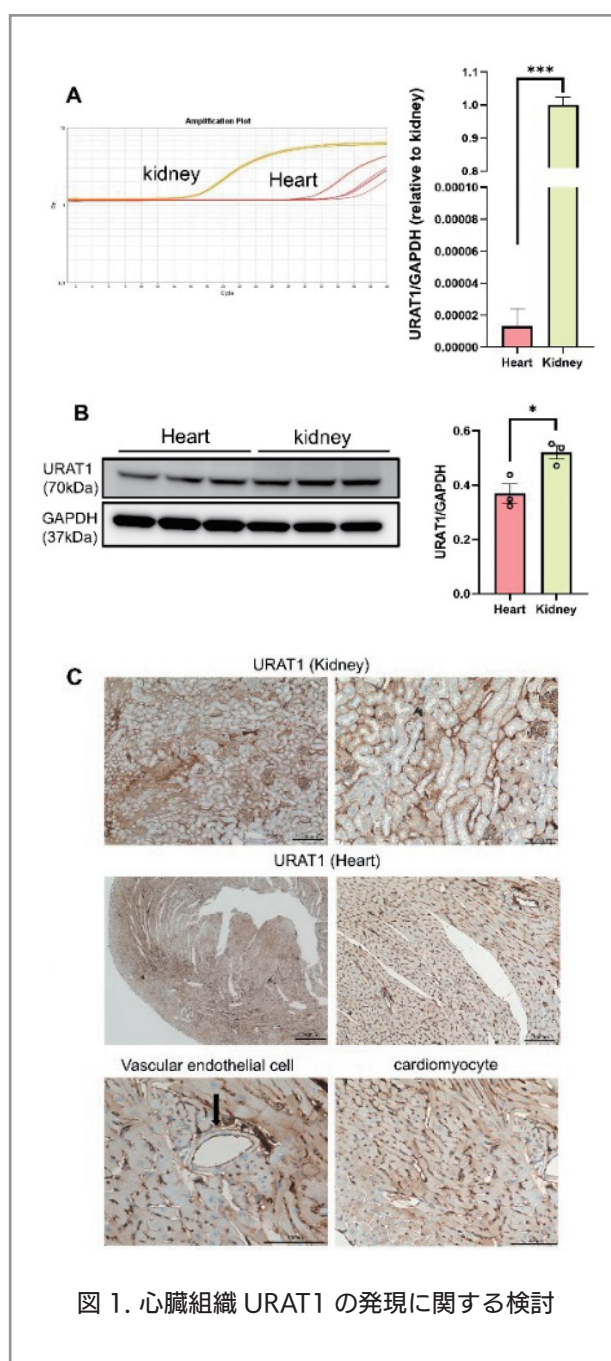


図 1. 心臓組織 URAT1 の発現に関する検討

また、免疫組織化学染色では腎臓の近位尿管に染色される URAT1 と同様の抗体を使用して心臓組織を染色した。血管内皮細胞と同様に心筋細胞にも URAT1 が染色される事が確認できた (図 1C)。更に、16-20 週間の高脂肪食を投与したマウスに対して URAT1 選択的阻害薬を 4 週間使用して検討した。心臓組織の線維化の改善が認められた (図 2)。また、高脂肪食で誘導された心臓組織の炎症性サイトカイン (TNF α , MCP1, IL-1 β) は URAT1 選択的阻害薬の投与により改善を認めた。次に、心筋細胞レベルで URAT1 の発現や機能を観察するために、仔ラットの心筋培養細胞を用いて検討を行った。仔ラットの心筋培養細胞を用いて URAT1 の発現に関する検討を行った。仔ラットの心筋培養細胞においては URAT1 のバンドが確認され、更に URAT1 を特異的にノックダウンする siRNA システムを用いて観察すると URAT1 の発現が减弱している事が確認された (図 3)。また、仔ラットの心筋培養細胞を尿酸濃度 0mg/dl, 5mg/dl, 15mg/dl で培養して URAT1 選択的阻害薬の有無により 1 時間後の細胞内の尿酸濃度を測定した。尿酸濃度依存的に細胞内尿酸濃度は増加しており、更に URAT1 選択的阻害薬により細胞内尿酸濃度の有意な減少が確認された (図 4A)。更に、仔ラットの心筋培養細胞で URAT1 の発現を制御する因子に関して検索したところ、高血糖、高尿酸、高インスリンなどの因子では URAT1 の発現上昇が認められなかったが、飽和脂肪酸であるパルミチン酸は濃度依存的に URAT1 の発現が上昇している事が明らかとなった (図 4B)。

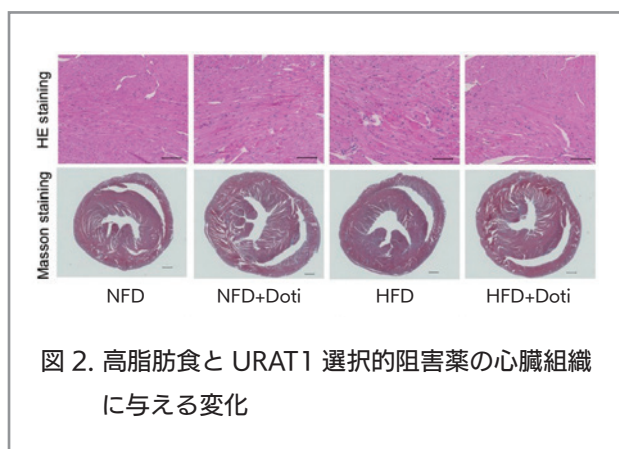


図 2. 高脂肪食と URAT1 選択的阻害薬の心臓組織に与える変化

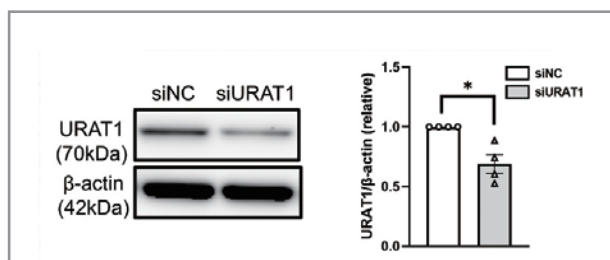


図 3. 仔ラット心筋培養細胞での URAT1 発現について

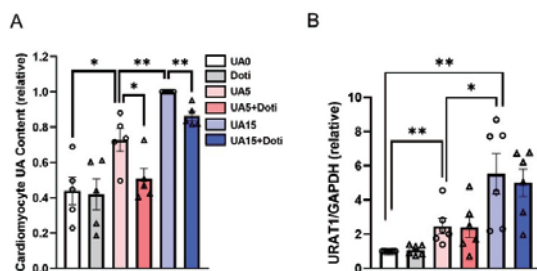


図 4. (A) 仔ラット心筋培養細胞での URAT1 を介した尿酸取り込み能および (B) パルミチン酸刺激による URAT1 発現量の変化

【考察】

URAT1 は、心臓組織、心筋細胞で発現している事が新たに分かった。また、同モデルでは、高脂肪食では血中尿酸値が通常食群と比較して上昇している事を確認しているが、URAT1 選択的阻害薬を投与しても尿酸値の有意な減少が認められなかった³⁾。URAT1 選択的阻害薬を投与する事で血中尿酸値が変化しないにも関わらず、線維化や炎症などが改善する事からは、心臓組織の URAT1 を直接阻害する事で改善した可能性が考えられる。実際に、心筋細胞レベルで URAT1 が発現、尿酸トランスポーターとして機能している事や、更にはメタボリックシンドロームの構成要素の一つであるパルミチン酸投与により発現上昇している事からはメタボリックシンドローム下で URAT1 が活性化して心臓組織に炎症や線維化を惹起させている可能性があると考えられる。高尿酸血症治療薬であるキサンチンオキシダーゼ阻害薬の心血管代謝疾患におけるエビデンスは明確なものがないが、後ろ向き研究で痛風の既往のある患者で尿酸降下薬の一つであるベンズプロマロン (URAT1 非選択的阻害薬) を使用している患者の方が、キサンチンオキシダーゼ阻害薬であるアロプリノー

ルを使用している患者よりも心血管イベントの発症が少ないという報告がある⁴⁾。今後、URAT1 選択的阻害薬が肥満患者の高尿酸血症患者などの心血管イベントに与える影響に関して更なる検討が必要であると考えられる。

【文献】

1. Tanaka Y, Nagoshi T, Kawai M, Uno G, Ito S, Yoshii A, et al. Close linkage between serum uric acid and cardiac dysfunction in patients with ischemic heart disease according to covariance structure analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):2519.
2. Tanaka Y, Nagoshi T, Yoshii A, Oi Y, Takahashi H, Kimura H, et al. Xanthine oxidase inhibition attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Free Radic Biol Med*. 2021;162:298-308.
3. Tanaka Y, Nagoshi T, Takahashi H, Oi Y, Yoshii A, Kimura H, et al. URAT1-selective inhibition ameliorates insulin resistance by attenuating diet-induced hepatic steatosis and brown adipose tissue whitening in mice. *Mol Metab*. 2022;55:101411.
4. Kang EH, Park EH, Shin A, Song JS, Kim SC. Cardiovascular risk associated with allopurinol vs. benzbromarone in patients with gout. *Eur Heart J*. 2021;42:4578-4588.

ノンターゲットマルチオミクスによる生活習慣病の理解

津川 裕 司

(東京農工大学グローバルイノベーション研究院)

【目的】

加齢に伴うマウスの脂質代謝変容を捉えるためノンターゲットリポドミクスを行ったところ、腎臓において雄特異的な糖脂質代謝を見出した。2023年度は、この雄特異的な糖脂質代謝の責任遺伝子は何で、その生物学的意義を探求することを目的とし、研究を行った。

【方法】

マウス腎臓の脂質メタボロームと RNA-seq データの統合解析を WGCNA により行った。加齢および雌雄差

について有意な脂質分子群については、Lipid Ontology 解析に供した。その後、糖脂質代謝に関連する代謝物・遺伝子発現情報をパスウェイ解析に供し、データ解釈を行った。雄・雌で有意に差が認められた Ugt8a 遺伝子に着目し、その阻害剤を用いてメタボローム解析やサイトカインなどの発現解析を行った。

【結果】

WGCNA により、加齢および雌雄差に関連のある脂質代謝物群をオントロジー解析に供したところ、糖脂質代謝に関わるオントロジーが抽出できた。そのため、糖脂質代謝に着目し、詳細を確認したところ二糖セラミドや三糖セラミドが雄マウス特異的に加齢に伴い発現が上昇することが分かった。セラミド分子にガラクトースを付加する遺伝子である Ugt8a の発現レベルが雄マウスで有意に高かったことから、その阻害剤を用いて腎臓メタボローム解析を行ったところ、ガラクトースを糖骨格として持つ糖脂質が有意に減少することを見出した。また、IFN γ や TNF α のようなサイトカインは加齢に伴い腎臓で発現上昇する一方、この阻害剤投与マウスにおいては発現が減少することを見出した。

【考察】

腎疾患のリスクファクターとして性差がある。本研究では着目した三糖セラミドはグロボシド (Gb3) と呼ばれ、リソソーム病の1つであるファブリー病では Gb3 の蓄積が慢性炎症を引き起こす。今回得られた結果は、腎臓における加齢に伴う炎症性変化と関連する可能性があると考えられる。本研究においては、腎臓以外にも様々な臓器についてユニークな脂質代謝変容を捉えていることから、今後も解析を進めていく予定である。

【文献】

Tsugawa, H. et al. A lipidome landscape of aging in mice. *Nature Aging* 4, 709–726 (2024).

細胞間コミュニケーション解析から導き出す、三次リンパ組織形成メカニズムの解明

辻本 考平

(大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫内科学)

【目的】

三次リンパ組織 (tertiary lymphoid structures; TLS) は自己免疫疾患や感染症, 癌, 移植拒絶反応など侵入する病原体や局所抗原に対する局所免疫応答の結果として後天的に形成される構造体である。成熟した TLS ではリンパ球凝集体, 高内皮細静脈の発達, 濾胞樹状細胞ネットワークなど, 二次リンパ組織といくつかの典型的な構造的特徴を共有し, 炎症組織の微小環境における細胞の生存と維持のハブとして機能すると考えられている。遺伝子改変マウスを用いた検討により TLS の形成には種々の細胞間の相互作用が必要であると考えられているが, 特にヒトにおけるその詳細な形成機序は不明であり, その一端を明らかにすることを目的とする。

【方法】

シェーグレン症候群は唾液腺や涙腺などの外分泌腺へのリンパ球浸潤を特徴とする自己免疫疾患である。病理学的には, 唾液腺の導管周囲に顕著なリンパ球浸潤が見られ腺房細胞の消失が特徴とされる一方で, 唾液腺内における TLS の形成が疾患の病態に深く関与していると考えられている。そこで今回の研究ではシェーグレン症候群の患者から採取した唾液腺を用いてシングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq), 空間トランスクリプトーム解析などの一細胞レベルの遺伝子発現解析を実施し, その TLS 形成機序の解明を試みた。

【結果】

大阪大学医学部附属病院にて臨床的用途で小唾液腺生検を実施された患者のうち, シェーグレン症候群の診断基準をみたし, また文書で同意を得た症例に対して検査残の小唾液腺を用いて解析を行った。scRNA-seq による一細胞レベルの遺伝子発現データを取得したところ, 腺房細胞や導管細胞などの唾液腺の非免疫細胞および形質細胞, T 細胞, B 細胞, 樹状細胞などの様々な免疫細胞が同定し, 各細胞間で様々な相互作用を認

めることが明らかとなった (図 1)。また, 空間トランスクリプトーム解析により空間的に近接した細胞クラスター間の相互作用が明らかになり, 特定の微小環境内での相互作用が明らかとなった (図 2)。

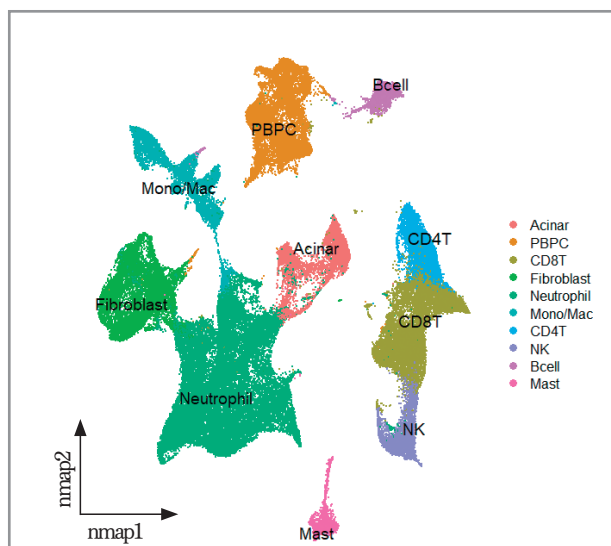


図 1 : scRNAseq による細胞ポピュレーションの同定

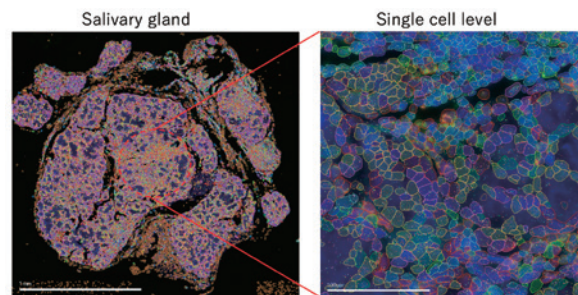


図 2 : 空間トランスクリプトーム解析による遺伝子発現情報の取得

【考察】

ヒトにおける TLS 形成においても様々な細胞間相互作用が認められることが示唆された。今後, 詳細な分子レベルでの機序の解明を進めていく予定である。

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薬理学分野)

【目的】

社会や環境より受けるストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を誘発し、うつ病など精神疾患のリスクとなる。うつ病患者やマウスのストレスモデルにおいて前頭前皮質神経細胞の機能形態変化が情動変容に重要であることが示唆されているが、その分子機序は未だに不明である。これまで未発表ながら、慢性ストレスが前頭前皮質シナプスの糖代謝系変容を介して神経細胞の機能構造変化や脳内炎症、認知情動変容を導くことを見出してきた。一方で、前頭前皮質は多様な領域から投射を受ける脳領域であり、前頭前皮質のシナプス病態を理解するためには神経回路機序の解明が必要であるが、その実態は不明であった。本研究では前頭前皮質の神経回路特異的な代謝変化の意義を明らかにすることを目的とする。

【方法】

質量分析イメージングを用いて、前頭前皮質、海馬、運動感覚野、側坐核に生じる代謝物変化を調べた。海馬から前頭前皮質への神経投射に着目し、神経回路特異的な代謝操作として糖輸送体の発現抑制を行った。

【結果と考察】

質量分析イメージングによる代謝物マッピングを行い、前頭前皮質と海馬に類似の代謝物変化があることを見出した。共通した代謝物変化を示す海馬と前頭前皮質に着目し、海馬から前頭前皮質への神経回路特異的な糖輸送体の発現抑制を行ったところ、ストレス後の認知機能障害が抑制できることが分かった。すなわち、ストレスが当該回路の代謝変容を介して認知機能障害を招いていることが示唆された。この知見は、回路特異的な代謝変化の病態における重要性を世界に先駆けて示唆するものである。今後は、回路特異的な代謝変化が生じる分子機序、並びに回路特異的な代謝変化が前頭前皮質神経細胞の機能や構造に与える影響を明らかにする。

また、並行して実施した解析で、ストレスが骨髄や脾臓において免疫細胞の動態変化を生じる際に、抗炎症性脂質メディエーターの減少を伴うことを明らかにした (J Pharmacol Sci 2024)。すなわちストレス病態における中枢の糖代謝、末梢の脂質代謝の重要性が示唆された。

【文献】

Horikawa I#, Nagai H#,* , Taniguchi M, Chen G, Shinohara M, Suzuki T, Ishii S, Katayama Y, Kitaoka S, Furuyashiki T*. Chronic Stress Alters Lipid Mediator Profiles Associated with Immune-Related Gene Expressions and Cell Compositions in Mouse Bone Marrow and Spleen. J Pharmacol Sci, 2024, 154, 279-293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2024.02.010> (#Co-first authors, *Co-corresponding authors)

細胞競合の分子機構の遺伝学的解明

永田 理 奈

(京都大学大学院 生命科学研究所)

【目的】

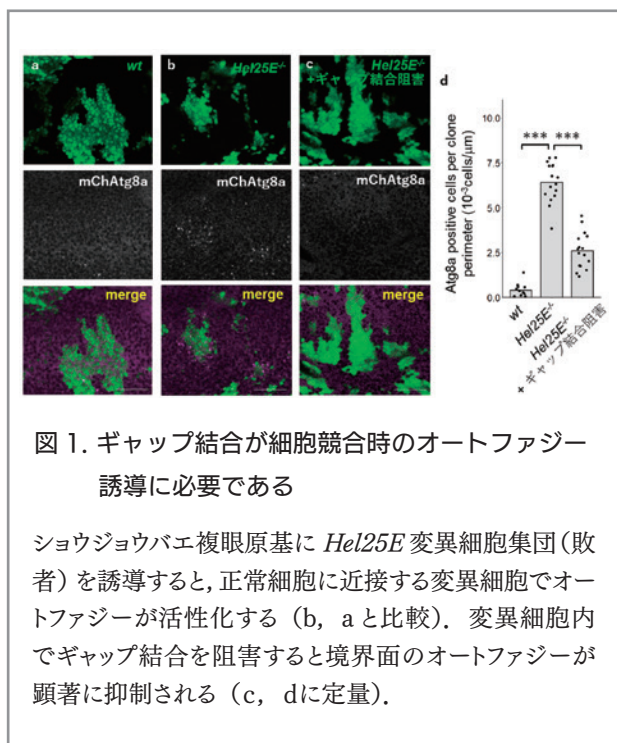
細胞競合とは、組織中の適応度の低い細胞（敗者）が適応度の高い細胞（勝者）との相互作用を介して排除される現象である¹⁾。これまでに、正常細胞（勝者）に近接した変異細胞（敗者）はオートファジーを活性化上昇し、これにより細胞死を引き起こして排除されることを見いだした²⁾。さらに、転写共役因子 Yki/YAP 活性化細胞（勝者）に近接した正常細胞（敗者）も同様のメカニズムを介して排除され、これにより Yki 活性化細胞の腫瘍形成が引き起こされることもわかった³⁾。このように、種々の細胞競合現象が共通してオートファジー依存的な細胞死メカニズムによって制御されることがわかった。しかしながら、細胞非自律的現象である細胞競合において最も重要な点である「なぜ勝者細胞に近接する敗者細胞でのみオートファジー活性が上昇するか」については分かっていない。そこで本研究ではこのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

勝者細胞に近接する敗者細胞で特異的に発現上昇する遺伝子群を網羅的に探索するために、細胞競合を誘導した組織を用いて遺伝子発現解析を行った。具体的には、ショウジョウバエ翅原基に、細胞競合を誘導することが知られている4種の敗者細胞をそれぞれ正常細胞とモザイク状に誘導して細胞競合を起こし、この組織を用いて single-cell RNA-seq 解析を行った。敗者細胞では細胞死遺伝子 *hid* が発現上昇することがわかっているため、*hid* と相関して発現上昇する遺伝子群を解析した。

【結果】

4種の敗者細胞に共通して発現上昇する遺伝子群が得られた。これら遺伝子を敗者細胞内で一つ一つノックダウンしていき、細胞競合を制御する遺伝子を探索した。その結果、ギャップ結合タンパク質が細胞競合に必要であることがわかった。実際に、ギャップ結合タンパク質を敗者細胞内でノックダウンすると、勝者細胞に近接する敗者細胞で活性上昇するオートファジーが顕著に抑制された(図1)。



【考察】

勝者-敗者細胞間のオートファジー誘導にはギャップ結合の機能が必要であると考えられた。ギャップ結合を介した何らかの小分子のやり取りによって細胞競合

が引き起こされる可能性が考えられるため、現在遺伝学的解析を進めている。

【文献】

- 1) Nagata, R and Igaki T. Cell competition: emerging signaling and unsolved questions. *FEBS Letters* 598, 379-389 (2024).
- 2) Nagata, R *et al.*, Cell competition is driven by autophagy. *Developmental Cell* 51,99-112 (2019).
- 3) Nagata, R *et al.*, Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in Drosophila. *Current Biology* 32,1064-1076 (2022).

神経ガイダンス因子による神経-免疫-代謝関連メカニズムの解明

中西 由光

(大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学)

【目的】

神経-免疫-代謝関連形成を担う分子の同定および機能解析

【方法】

ゲノムワイドアプローチを用いてヒトにおける精神系形質、代謝系形質に共通する分子の探索を行った。次に同定した分子であるセマフォリン6D (SEMA6D)の機能解析をマウスモデルで行った。SEMA6D欠損マウスを用いて行動試験を行い、SEMA6Dを介した中枢神経応答を評価した。さらに、同マウスを用いて高脂肪食負荷肥満モデルを行い、脂肪組織、肝臓における代謝及び骨髄における造血へのSEMA6Dの関与を検討した。また、交感神経系の関与を検討するため、SEMA6D欠損マウスにおいてβ3アドレナリン受容体 (Adrb3)を欠損させ、高脂肪食負荷肥満モデルを行った。次に Spatial transcriptomics と single nucleus RNA-seq(snRNA-seq)の統合解析を行い、脳内におけるSEMA6Dの機能探索を行った。さらに、in situ hybridizationによるSema6d発現評価および質量分析イメージングによる神経伝達物質定量評価を行うとともに、ゴルジ染色による神経細胞樹状突起の形態評価

を行った。

【結果】

ヒトデータを用いたゲノムワイド関連解析およびフェノムワイド関連解析から精神系形質、代謝系形質に共通する分子として SEMA6D を同定した (図 1)。

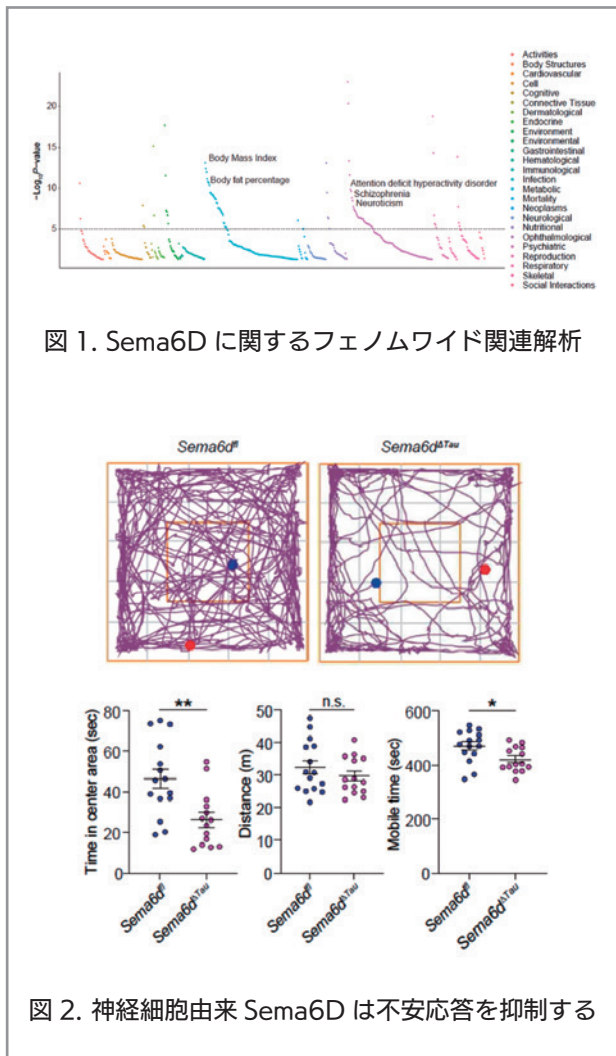


図 1. Sema6D に関するフェノムワイド関連解析

図 2. 神経細胞由来 Sema6D は不安応答を抑制する

SEMA6D 欠損マウスを用いて行動試験を行ったところ、神経細胞の SEMA6D 欠損 (*Sema6d^{CKO-Tau}*) により不安様行動の増強を認めた (図 2)。次に高脂肪食負荷を行ったところ、*Sema6d^{CKO-Tau}* マウスでは肥満抵抗性を認めた (図 3)。また、肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、褐色脂肪への脂肪沈着が抑制された。高脂肪食はミエロイド系血球の造血を亢進させることが知られているが、*Sema6d^{CKO-Tau}* マウスでは高脂肪食負荷下において著明な好中球増加を認めた (図 3)。さらに、SEMA6D 欠損マウスにおいて *Adrb3* を欠損させると肥満抵抗性の改善を認めた (図 4)。次に情動と自律神経応答を制御する SEMA6D シグナルの主座同定を行った。SEMA6D は脳に高発現していることから、まず

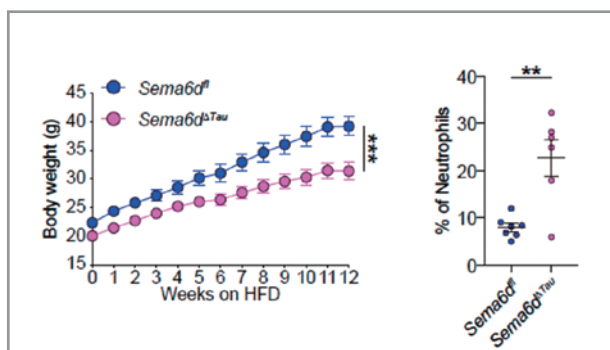


図 3. 神経細胞由来 Sema6D は全身代謝および造血を抑制する

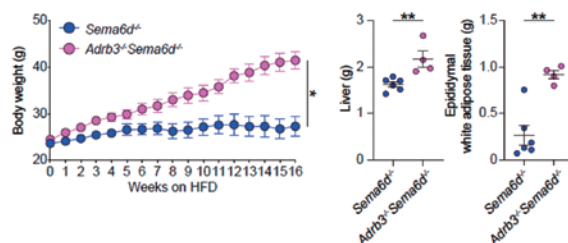


図 4. Sema6D は交感神経応答を抑制する

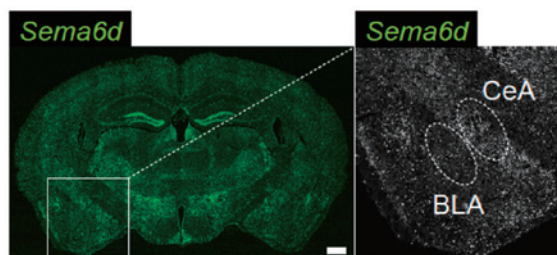


図 5. Sema6D は扁桃体中心核の抑制性ニューロンに高発現する

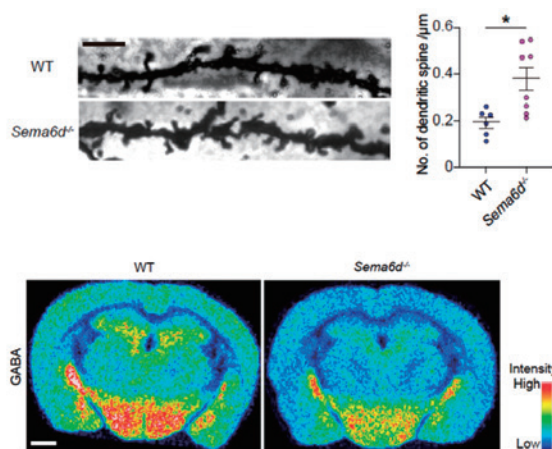


図 6. Sema6D はスパイン形成および GABA 産生を制御する

Spatial transcriptomics を用いて脳の構造的変化を遺伝子発現レベルで検討したが、SEMA6D 欠損による構造

変化は認めなかった。情動と自律神経応答をともに制御する部位として大脳辺縁系の扁桃体が知られており、in situ hybridization を行ったところ、扁桃体の抑制性ニューロンが SEMA6D を高発現していた (図 5)。そこでマウス扁桃体を用いて snRNA-seq を行ったところ、SEMA6D 欠損による興奮性ニューロンのシナプス機能異常、抑制性ニューロンの GABA シグナル異常が示唆された。実際、ゴルジ染色で SEMA6D 欠損マウスの興奮性ニューロンでは異常スパインの増加を認め、質量分析イメージングで SEMA6D 欠損マウス扁桃体の GABA 産生低下を認めた (図 6)。

最後に、アデノ随伴ウイルスを用いて扁桃体中心核特異的に SEMA6D を欠損させたところ、不安様行動の増強と共に肥満抵抗性を認めた。

【考察】

以上の結果から、扁桃体の抑制性ニューロンに発現する SEMA6D は GABA 産生およびスパイン形成制御を介して情動と自律神経応答を共役させることが明らかとなった。SEMA6D は神経細胞、免疫細胞を含む多様な細胞に発現している。また他のセマフォリン分子とは異なり、class A Plexin のリガンドとしても、受容体としても機能することが知られている。我々は先行研究で免疫細胞由来 SEMA6D の逆行性シグナルが細胞内代謝制御を介して抑制性マクロファージ分化を促進することを明らかにした。今回の我々の知見から神経細胞由来 SEMA6D の神経、免疫、代謝応答における新たな機能が明らかとなった。これらの結果から、複数の細胞腫に由来する SEMA6D がそれぞれ異なる機序で炎症応答制御に関与することがわかった。一方で神経細胞における SEMA6D の順行性シグナルと逆行性シグナルのどちらが GABA 産生およびスパイン形成制御を担うのかは不明であり、今後検討する予定である。

【結論】

扁桃体の抑制性ニューロンに発現する SEMA6D はスパイン形成および GABA シグナルの制御を介して情動と自律神経応答を共役させる。

ポドサイトレトロトランスポゾンと慢性腎臓病

中道 蘭

(内科学教室 腎臓内分泌代謝科)

【背景】

日本では高齢化に伴い、慢性腎臓病 (CKD) 患者が増加しているものの、根本的な治療法は確立されていない。CKD では腎糸球体のポドサイト障害が蛋白尿を引き起こし、腎機能低下に寄与している。また、CKD が他臓器の老化の独立したリスク因子であることも報告されており、特に T 細胞の機能不全や疲弊が進行していることが指摘されている。しかし、CKD においてどの腎構成細胞が T 細胞を含む免疫環境に変化を誘導するのかが未解明である。我々はポドサイトにおける DNA 損傷により、細胞質に二本鎖 DNA 断片が蓄積し、自然免疫応答を惹起し、CD8+T 細胞を活性化させ、ポドサイト障害に寄与するとともに、末梢血の CD8+T 細胞の変化を誘導することを報告した (Nakamichi, Cell Rep 2023)。しかしながら、DNA 損傷ポドサイトの細胞質 DNA 断片の供給源や自己抗原については未解明のままである。

【目的】

本研究の目的は、DNA 損傷ポドサイトが免疫システムに与える影響について ERT (内在性レトロトランスポゾン) について着目することで、ERT 蛋白由来の自己抗原がポドサイトにより提示される可能性を検証し、CKD ならびに全身老化に関連する新規自己抗原の解明に挑む。

【方法】

まず、マウスポドサイトを用いて UV 照射により DNA 損傷を誘導し、ERT のサイレンシングに必須な因子 Trim28 の低下が ERT の発現上昇を引き起こすことを確認した。その後、ポドサイト特異的に Trim28 をノックアウト (KO) したマウスを作成し、ERT の発現と自然免疫応答、さらには CD8+T 細胞のクロストークが腎臓および全身の免疫システムに与える影響を解析した。

【結果】

Trim28KO マウスは 6 週齢からアルブミン尿を呈し、24 カ月齢でネフローゼレベルに達した。これらのマウ

スではポドサイトにおける ERT の発現が上昇し、IFN- β の発現増加が確認された。また、末梢血の CD8+T 細胞には疲弊化の形質が認められた。

【考察】

Trim28KO マウスにおいて、ERT の脱抑制がポドサイトの自然免疫応答を引き起こし、全身の T 細胞の変化を誘導することが明らかとなった。今後単離したポドサイトの RNA-seq を行い、ERT 配列と比較することで MHC に提示される自己抗原を検索する。また、KO マウスを用いて他臓器の老化評価や T 細胞疲弊と老化の関連について解析を行う予定である。

腸内細菌が腸管運動機能に及ぼす影響とその機序

白 曉 鵬

(九州大学病院肝臓膵臓胆道内科)

【研究背景】

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

【方法】

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

質発現評価を行った。

【結果】

胃排出機能は各群間に有意な差を認めなかった。腸管運動機能は、GF 群でその他の群と比較して有意に低下した (図 1)。腸神経のアセチルコリン産生酵素 (ChAT) の発現は各群間に有意な差を認めなかったが、それと共局在する神経に Vasoactive intestinal peptide (VIP) の発現は腸内細菌が存在する 3 群は GF 群のそれと比較して有意に強い発現を認めた (図 2)。VIP 発現量は腸管運動機能と有意な正の相関を認め、腸内細菌が腸神経の発達を制御することが示唆され、腸管自然免疫の関与が考えられた。TLR 経路が活性化されない MYD88^{-/-}TRIF^{-/-} マウスを用いて、無菌条件、SPF 環境条件下における VIP 発現量と腸管運動機能を評価した。MYD88^{-/-}TRIF^{-/-} マウスは無菌条件、SPF 条件のいずれも VIP 発現量と腸管運動機能が低下した。Nanostring 解析では GF マウス群に S100b 発現低下したため、腸管 Glia 細胞の関与について確認した。SPF マウスに対して Gliotoxin 投与で Glia 細胞を抑制すると、VIP 発現も腸管運動機能も低下し、Glia 細胞の関与を確認できた。更に、保菌状態の腸管運動を維持するため、腸内細菌の必要性について調べた。生存期間調整可能な変異型 *E.coli* (HA107) を無菌マウスに定着された。2 週間菌生存期間中にマウス小腸運動も VIP 発現も維持されていたが、菌死滅 4 週間後に小腸筋間神経叢に VIP 発現が低下し、腸管運動も低下した。SPF マウスに 3 種類の抗生剤を 1 週間投与後も、VIP 発現低下及び腸管運動低下が見られた。

【考察】

小腸において、腸内細菌が自然免疫を介して VIP+ 神経を活性化する。これにより、コリン作動性神経が活性化され、アセチルコリンを放出し、腸管運動が促進される。この経路は腸管運動の成立及び維持に必要とする。

【文献】

1. Quigley, E.M., Microflora modulation of motility. *J Neurogastroenterol Motil*, 17(2): p. 140-7. 2011.
2. Barbora, W., Gut microbiota-motility interregulation: insights from *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* studies. *Gut Microbes*. 14(1): 1997296. 2022.

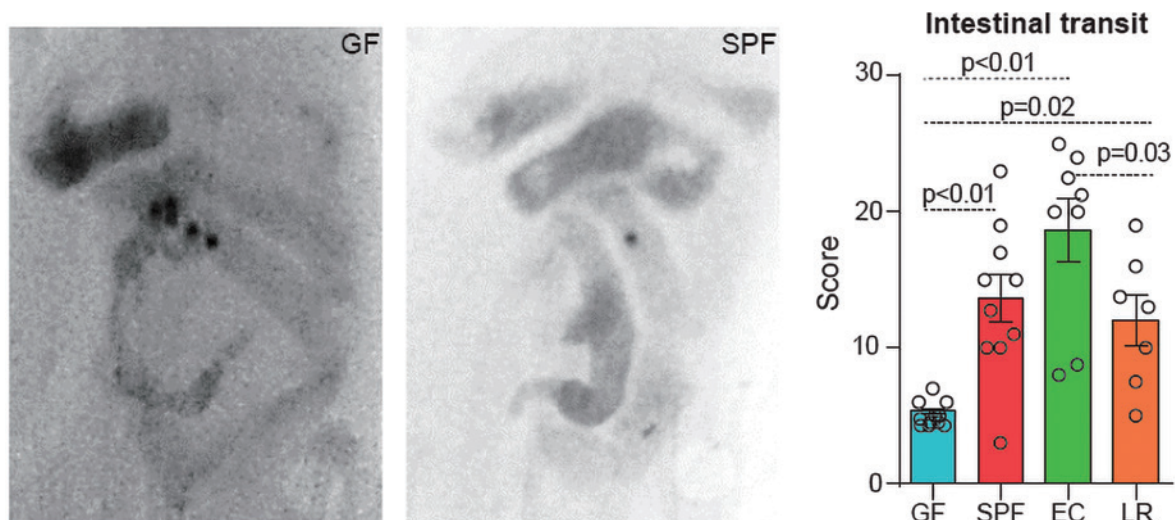


図 1.

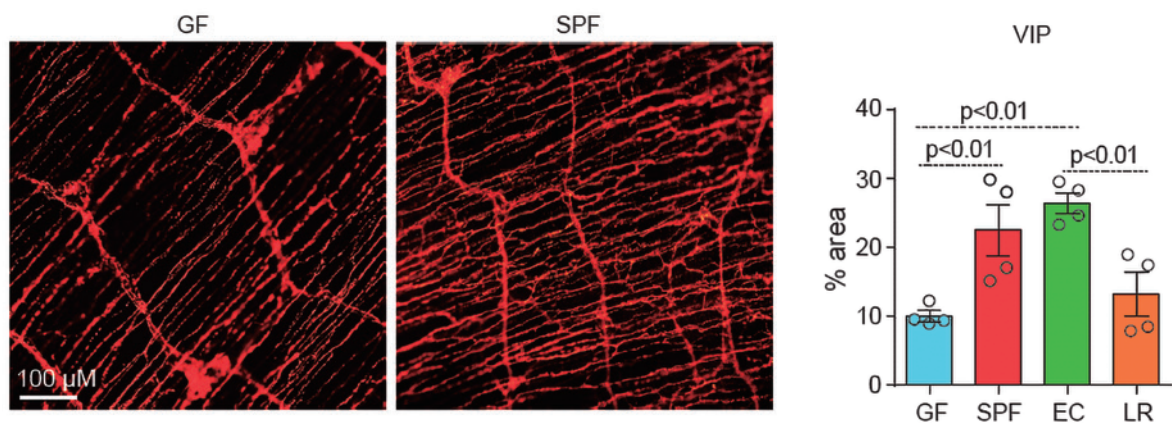


図 2.

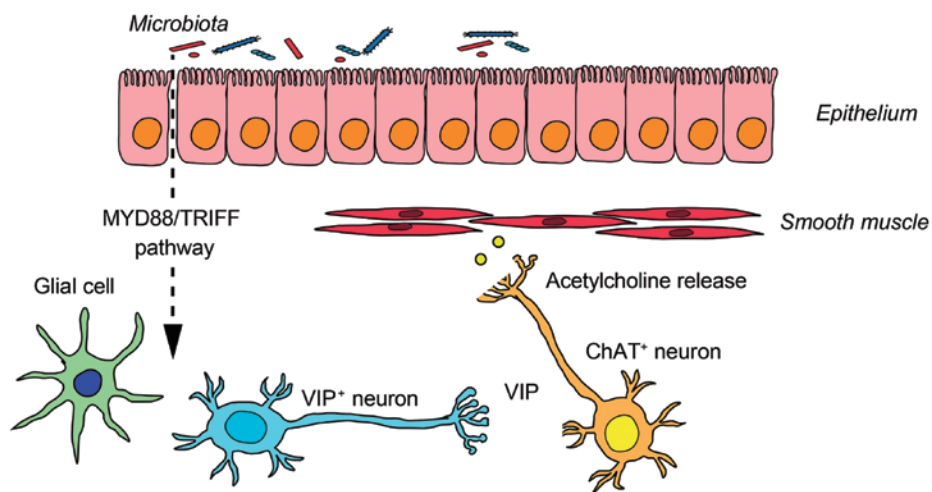


図 3.

多発性骨髄腫と腫瘍微小環境における治療抵抗性・再発機構の解明

土師 正二郎

(九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学分野)

【背景】

多発性骨髄腫 (MM) は多くの症例で再発する。特に髄外病変として再発した場合高い薬剤耐性と増殖能を有し予後が不良である。再発には寛解期にも残存する耐性細胞が関与するため、耐性細胞の除去は喫緊の課題であるが、腫瘍不均一性が障壁となり耐性細胞の同定が進んでいない。

近年一細胞 RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析技術の登場により少数細胞の解析が可能となり、治療介入による構成クローンの変化が報告され始めている。しかしこれまで寛解時の検体を一細胞レベルで詳細に解析した報告はなく、寛解時にも残存する耐性細胞の生物学的特徴や耐性機序は不明である。

一方、MM 患者骨髄中の非腫瘍細胞を対象とした scRNA-seq 解析により、腫瘍微小環境を構成する免疫細胞や間葉系細胞が MM 細胞の耐性獲得に与える影響の重要性が示唆された。しかしこれまで細胞の位置情報を伴う網羅的遺伝子発現解析が困難であったため、耐性細胞やその近傍に存在する微小環境を空間的に同定できず、耐性細胞—微小環境間相互作用は不明である。

こうした耐性細胞や耐性細胞特異的な微小環境に関する理解の遅れが、耐性細胞を克服できない一因となっている。

【目的】

単一細胞・空間オミクス解析を用いて、「寛解期に残存する耐性細胞自体」と「耐性細胞に特異的な微小環境」の双方による薬剤耐性獲得機構を包括的に解明することで、耐性細胞を克服可能な治療法の開発や MM の治療に繋げることを目的とする。

【結果】

再発を繰り返し髄外病変を形成した MM 患者の、寛解時を含む経時的な骨髄検体に対し scRNA-seq 解析を行った。寛解期に残存し、予後不良と相関する遺伝子を高率に発現する未分化な細胞集団を同定した。公共

データベースに登録された scRNA-seq データを再解析し、この細胞が MM 患者で広く存在すること、進行期や治療反応性不良の患者で増加する事を見出した。また、髄外病変を対象とした scRNA-seq データを再解析したところ、この細胞が髄外病変の大部分を占めることを見出した。

【考察】

同定した細胞は病勢進行・薬剤耐性・髄外病変形成に関与する細胞集団であると考えている。今後この細胞自体や微小環境との相互作用における有効な治療標的が同定できれば髄外病変を克服可能な治療法の開発や MM の治療に繋がる可能性がある。

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。我々はこれまでに、自然界で様々な果物を食べるキイロシヨウジョウバエの幼虫では、全身性の Activin 経路を介した遺伝子発現の抑制が、高炭水化物食下での幼虫期の成長に寄与することを見出した。一方、自然界で低炭水化物の果物しか食べないセイシエルシヨウジョウバエでは、そのような制御が働かず、高炭水化物食に適応できないことを明らかにした (Watanabe et al., *Cell Reports*, 2019)。本研究課題では、H3K9 ヒストンメチル基転移酵素 (H3K9 HMT) によるヘテロクロマチンの制御が、高炭水化物食への適応に果たす意義とその分子機構について解析を行った。

【方法・結果】

マルチオミクス解析の結果、キイロシヨウジョウバエでは、H3K9 HMT と Activin 経路が H3K9me3 修飾制御を介して遺伝子発現を抑制的に制御することにより、高炭水化物食への適応を支えていることを見出した。一方、セイシエルシヨウジョウバエでは、そのよ

うな機構が働かず、遺伝子発現の上昇などが生じており、発生率が低下することが示唆された。加えて、成虫期における栄養適応や、神経細胞と栄養の関係についても着目し、個体が摂取したビタミンなどの栄養素の増減に依存した Wingless/Ror/Akt シグナル経路を介した臓器連関による神経突起発達機構などを明らかにした (Kanaoka et al., eLife, 2023; Abe et al., *Journal of Experimental Biology*, 2022; Watada et al., *Genes to Cells*, 2020)。

【考察】

今後、クロマチン上でのタンパク質結合プロファイラや転写イメージング、クライオ電子顕微鏡による解析などを進め、キイロショウジョウバエでの Activin 経路と H3K9 HMT との関係などの詳細な分子機構を明らかにする。また、セイシエルショウジョウバエでは、それらの機構にどのような異常が生じているか、そして、そのような種間の違いを生み出す分子基盤を理解し、環境適応を支えるヘテロクロマチン制御機構の普遍性と多様性の解明を目指す。

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

(広島大学大学院統合生命科学研究科)

【目的】

エクソソームは細胞外へ放出される極めて小さい (50-150 nm) 膜小胞である。エクソソームにはタンパク質、脂質、核酸など様々な物質が含まれており、放出されたエクソソームは異なる細胞に取り込まれることで細胞間情報伝達を行う。エクソソームに発現する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の探索を試みたところ、食欲や情動を制御するメラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) がエクソソームに存在し、異なる細胞に取り込まれることを見出した。本研究では引き続きそのメカニズムや機能の詳細な解析を行った。

【方法】

MCHR1 安定発現細胞から培地を回収し、アフィニティー精製キットでエクソソームを精製した。WB 法、

細胞免疫染色法等により MCHR1 の発現と機能を解析した。

【結果・考察】

糖鎖付加阻害剤および糖鎖付加欠損体により、エクソソームにおける MCHR1 発現が消失し、MCHR1 のエクソソーム発現には糖鎖付加が重要であることを見出した。次に、 β アレスチン 2 ドミナントネガティブ変異体を用い、MCHR1 のエクソソーム発現への影響を調べた。その結果、エクソソーム内の MCHR1 が著しく減少し、細胞膜上に発現した MCHR1 が細胞内へインターナリゼーションした後にエクソソームに輸送されることが分かった。そこで、各種エンドサイトーシスマーカーを用いて MCHR1 の挙動を解析した。MCHR1 は時間経過により初期エンドソーム、後期エンドソームに移行した後、一部はリサイクルエンドソームに移行した。しかし、リソソームにはほとんど移行せず、エクソソームマーカーと高い割合で共局在することが分かった。さらに、細胞内 C 末端領域を除去した変異体の解析により、細胞内 C 末端領域が MCHR1 のエクソソーム発現に重要だと判明した。以上より、エクソソームによる GPCR の送達機構や GPCR 含有エクソソームの生理機能解明が期待される。

【文献】

Yamada, R., Michimae, M., Hamamoto, A. & Takemori, H: Melanin-concentrating hormone receptor 1 is discarded by exosomes after internalization. *Biochem. Biophys Res Commun.*, 710, 149917 (2024).

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

菱 川 彰 人

(慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科)

【背景・目的】

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

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

【結果】

我々は、近位尿細管上皮細胞 (PTEC) に特異的に DNA 切断酵素 I-PpoI を発現させ、二本鎖 DNA 損傷を誘発するマウスモデルを開発した。このマウスは腎機能を維持しつつ、16 週齢時点で体重減少、肝臓における遊離脂肪酸の上昇、耐糖能の異常、そして肝臓および脂肪組織における炎症・老化マーカーの発現増加を示した。メタボローム解析と PTEC 培養細胞を用いた flux analyzer の検討により、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。さらに、Single cell RNA-seq 解析によって、腎皮質における CD11c 陽性の活性化マクロファージの増加、および末梢血、肝臓、脂肪組織における活性化マクロファージの増加が確認された。

ヒト腎生検検体の検討でも、尿細管の DNA 損傷と腎臓のマクロファージ数との間に正の相関が観察された。末梢血の DNA メチル化解析では、メチル化が減少した領域で KLF9 結合モチーフが検出され、KLF9 の下流でマクロファージの活性化に関与する Gsdmd 遺伝子の低メチル化が認められた。培養細胞実験および clodronate 投与によるマクロファージ除去実験により、PTEC の DNA 損傷がマクロファージの活性化を介して脂肪細胞の分化障害を引き起こすことが実証された。

【結論】

近位尿細管上皮細胞における DNA 損傷は、DNA メチル化パターンの変化を通じてマクロファージを活性化し、それによって脂肪細胞の分化が障害されることで、全身の代謝に広範な影響を及ぼすことが明らかとなった。

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】

日本では近年、夜間の光環境やスマートフォンの普及により中高生などの若年層を中心に概日リズム睡眠障害の症例が増加している。最近の症例報告で、抗精神病薬のアリピプラゾールの投与により、気分障害の患者で併発する概日リズム睡眠障害の症状が緩和されることが報告されている (Omori et al., 2018 など)。しかし、アリピプラゾールと概日リズム睡眠障害に関する報告はほとんどが症例報告であり、リズム改善の作用機序は不明であった。我々は、アリピプラゾールが哺乳類の概日時計中枢である視床下部の視交叉上核 (SCN) に作用する機序を個体・組織・分子レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】

マウスの飲水に溶かしてアリピプラゾールの経口投与を行い、明暗サイクルを 6 時間前進させる時差ボケ実験を行ったときの新しい明暗サイクルへの同調速度を解析した。さらに、アリピプラゾールの細胞時計および細胞内シグナリング (cAMP 濃度) への影響を調べるため、時計タンパク質 PER2 とルシフェラーゼの融合タンパク質を発現する PER2::LUC マウスを利用して SCN 切片培養の細胞リズムを可視化した。細胞内シグナリングは、cAMP 濃度をルシフェラーゼによって可視化できる Okiluc-Act を用いた。

【結果】

アリピプラゾールを投与した群のマウスはコントロールマウスがかかる半分の時間で新しい明暗サイクルに同調することが明らかとなった。さらに、アリピプラゾールを SCN 切片培養の添加すると SCN 神経細胞間の同期率が経時的に減少することがわかった。数理モデルを用いてアリピプラゾール添加による適度な神経細胞間の脱同期が 6 時間の時差ぼけ時の回復を早めることを明らかにした。また、cAMP 可視化実験を各種標的受容体の拮抗薬または作動薬と組みあわせる

ことでアリピプラゾールが5-HT_{1A}Rに作用してSCN細胞内においてcAMP上昇を引き起こしていることが明らかになった。

【考察】

アリピプラゾールがSCNに発現している5-HT_{1A}Rに作用し、これにより間接的もしくは直接的にSCN神経細胞の脱同期が引き起こされ、SCNの摂動耐性が低下するために個体の光同調能が亢進することが明らかとなった。ヒトにおいて概日リズム障害に効果があるのは、アリピプラゾールが光サイクルへの同調を促進するからではないかと考えられた。

【文献】

R. Li, K. Masuda, D. Ono, T. Kanbayashi, A. Hirano, T. Sakurai. Aripiprazole disrupts cellular synchrony in the suprachiasmatic nucleus and enhances entrainment to environmental light–dark cycles in mice. *Frontiers in Neuroscience*. Vol. 17, 1201137, 2023.

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

福田 士郎

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 助教)

【背景】

GPIアンカー型膜タンパク質であるT-カドヘリン(T-cad)は、脂肪細胞から特異的に分泌され、2型糖尿病や冠動脈疾患の関連が臨床疫学的に示されているアディポネクチン(APN)と非常に高い特異性と親和性で結合する。T-cadはGPIアンカー型膜タンパク質であり細胞内ドメインを持たず、単体では細胞内シグナル伝達に関与することは困難である。

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

【目的】

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

【方法・結果】

・血中可溶性T-cadの分子形態の解明

T-cadに対する新規モノクローナル抗体を取得し、ヒト血中に130kDa体、100kDa体、30kDa体の合計3種類の可溶性T-cad分子を証明し、これらを測り分けるELISAを確立した¹⁾。

・血中可溶性T-cadの臨床研究

上記ELISAを用いて、2型糖尿病患者の血中T-cad濃度が、メタボリックシンドロームに関連する複数の臨床パラメータと相関¹⁾し、心筋梗塞患者では発症から経時的に血中T-cad濃度が大きく変動すること²⁾を明らかにした。

・可溶性T-cadの生理的意義の探索

T-cad欠損マウスにSTZを投与すると著しい血糖上昇をきたすが、可溶性T-cad投与によりその血糖上昇は緩和されること、また可溶性T-cadは膵β細胞の増殖促進作用を示すことを明らかにした³⁾。ヒトでも糖尿病性ケトアシドーシスで血中T-cad濃度が上昇し、インスリン治療により低下することを見出し、可溶性T-cadの分泌制御にインスリンシグナルが関与すること⁴⁾を明らかにした。

【考察】

T-cadは血中に可溶性として存在し、様々な病態での変動、膵β細胞への増殖促進などの生理的作用を示すことを見出した。最近では心圧負荷モデルに対する可溶性T-cadの保護的作用も見出しつつあり、従来のホルモン-受容体-細胞内シグナル伝達とは異なる機序で、様々な臓器に有益な作用を示す可能性があると考えられる(図)。今後さらに検討をすすめ、可溶性T-cadの生理病態学的意義を明らかにしていく。

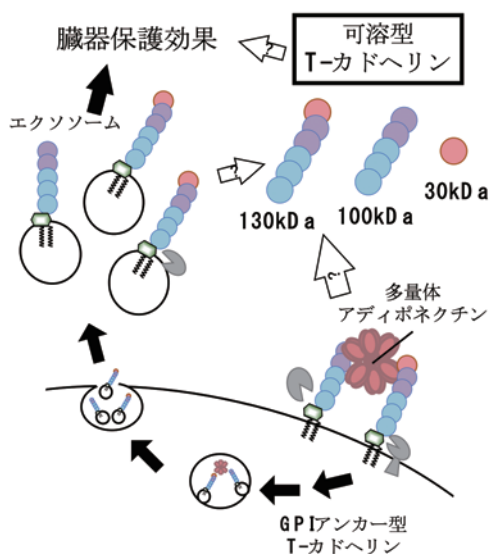
【文献】

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

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

3. Okita, T., Kita, S., **Fukuda, S.**, et al.: Soluble T-cadherin promotes pancreatic b-cell proliferation by upregulating Notch signaling, *iScience*, **25**, 105404, 2022
4. Okita, T., Kita, S., **Fukuda, S.**, et al.: Soluble T-cadherin secretion from endothelial cells is regulated via insulin/PI3K/Akt signalling, *Biochem Biophys Res Commun*, **732**, 150403, 2024

従来のホルモン-受容体-細胞内シグナル伝達とは異なる, 新たな内分泌因子作用機構



① どこで, どのように作られるか?

血管内皮? 筋? 神経?
膜からの切断?
どのような病態で増減するか?

② 臨調的な意義は?

「基準値」は?
疾患マーカーとして使えるか?

③ 臓器保護効果作用を持つか?

そのメカニズムは?
対象臓器は? レセプターは?

副腎皮質腫瘍の発生機構と副腎皮質リモデリング機構の解明

福元多鶴

(九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学分野)

【背景】

ヒト副腎皮質は球状層・束状層・網状層の3層から構成され, 層特異的にステロイドホルモンを分泌し, ストレス応答の司令塔として重要な役割を果たす内分泌臓器である. 遺伝子操作マウスを用いた細胞系譜追跡実験により, 副腎皮質の層構造は, Wnt/ β カテニン経路と ACTH 刺激により活性化される PKA 経路の濃度勾配を背景として, 被膜あるいは被膜下の幹細胞から球状層細胞, 束状層細胞に求心性に分化し形成されることが報告されている. しかしながら, 副腎皮質には著しい種属差 (マウスには網状層はない) があり, ヒト副腎皮質の形成・維持機構, 特に網状層の形成機構には不明の点が多い. 一方, 代表的な副腎皮質腫瘍であり, 副腎性クッシング症候群の原因となるコルチゾール産生腫瘍 (CPA) は, PKA 経路に関連する *GNAS* や *PRKACA* の体細胞変異によりコルチゾールを自律的に産生することが報告されているが, その初期発生機構は明らかではない.

【目的】

CPA の前駆病変を見出し, その発生機構を解明する.

【方法】

副腎切除術により摘出された副腎腫瘍付随副腎を用い, 病理組織学的解析, ゲノム・トランスクリプトーム解析を行った.

【結果】

副腎腫瘍に付随する副腎皮質組織の病理組織学的解析により, 副腎皮質内に自律的にステロイド合成酵素を発現する微小病変 (steroids-producing nodule; SPN) の同定に成功した (図 1). 全エクソームあるいはターゲットシーケンシングによるゲノム解析により, 複数の症例において SPN に *GNAS* 体細胞変異 (R201H, R201S, Q227H) を同定した. 詳細な病理組織学的解析により, SPN は, 外側に束状層様 (HSD3B2 陽性・CYB5A 陰性の明細胞), 内側に網状層様 (HSD3B2 陰性・

CYB5A 陽性の緻密細胞)の2層構造を形成することが明らかになった(図1)。興味深いことに、ACTH 刺激の抑制により束状層と網状層が萎縮したCPA 付随副腎皮質内においても、形態とステロイド合成能を維持する2層構造としてSPN が認められた。以上より、ヒト副腎皮質の束状層と網状層の形成と維持は、必ずしもACTH 刺激を必要としない分子機構によることが示唆された。

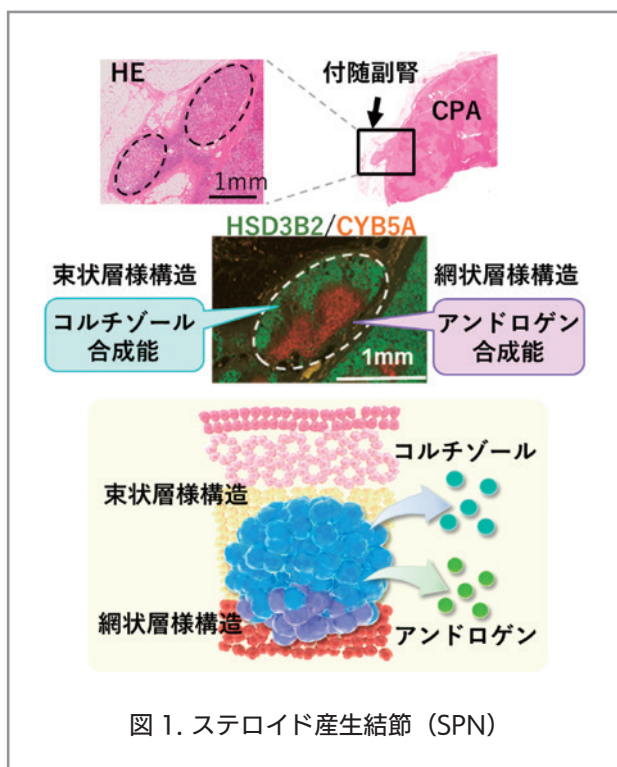


図1. ステロイド産生結節 (SPN)

空間トランスクリプトーム解析により、SPN の束状層様構造が Wnt シグナル経路に関連した腫瘍形成・増殖作用を有する一方、網状層様構造はマクロファージを主体とした免疫応答により抗腫瘍効果を有することが示唆された。副腎皮質癌 (ACC) 患者の TCGA データを用いて、網状層様構造の抗腫瘍効果を検討したところ、網状層様構造を特徴付ける遺伝子群 (SPN-zR 成分) が高発現である ACC 患者群は、低発現である患者群と比較して予後が良好であり、網状層様構造の抗腫瘍効果が示された(図2-1)。細胞の変遷を推定する擬似時間解析により、SPN の束状層様構造が CPA に進展することが示唆された(図2-2)。

以上により、SPN は CPA の前駆病変であり、SPN を構成する2つの異なる細胞集団が副腎皮質腫瘍の形成において異なる機能的意義を有することが推定された(図3)。

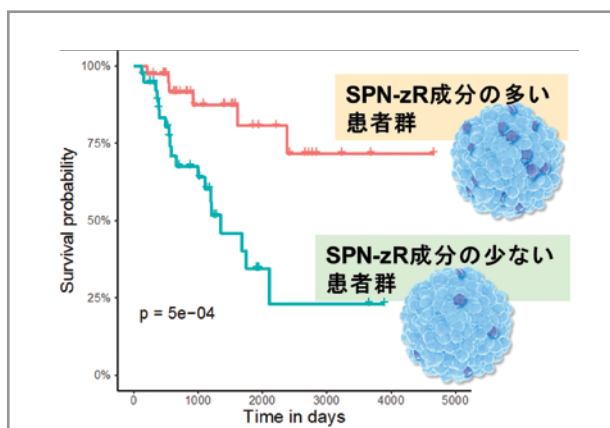


図2-1. 副腎皮質癌(ACC)患者のTCGAデータ解析

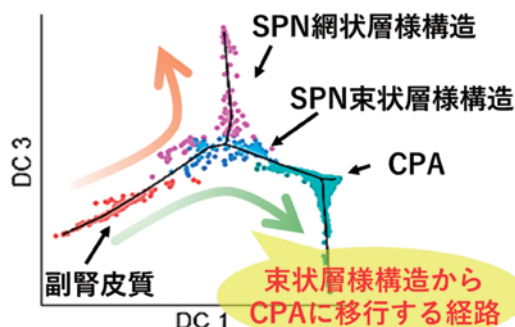


図2-2. 擬似時間解析

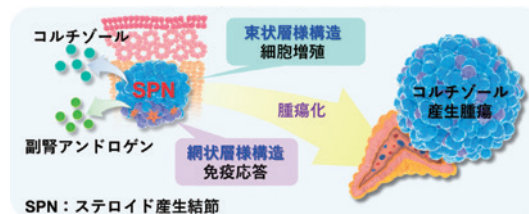


図3. 副腎皮質腫瘍の発生機構

【考察】

本研究の成果は、CPA の腫瘍形成の初期病変を明らかにするとともに、未解明のヒト副腎皮質の層構造の形成・維持機構に関する新たな知見をもたらすものであり、ヒト副腎皮質の腫瘍形成機構や副腎皮質リモデリング機構の解明に貢献することが期待される。

【文献】

Fukumoto T, Umakoshi H, Iwahashi N, et al. Steroids-producing nodules: a two-layered adrenocortical nodular structure as a precursor lesion of cortisol-producing adenoma. EBioMedicine.105087(2024).

鉄誘導性フェロトーシスのメカニズム解明

藤田 宏明

(京都大学 大学院医学研究科)

【目的】

フェロトーシスは、鉄により細胞膜リン脂質中の多価不飽和脂肪酸が酸化・傷害されることで惹起される鉄依存性の細胞死であり、がんや虚血性疾患、神経変性疾患との関連から精力的に解析されている。フェロトーシスは鉄による脂質過酸化と、セレンタンパク質 GPX4 などの過酸化脂質抑制系のバランスの乱れによって引き起こされる。これまでのフェロトーシス研究は「フェロ＝鉄」の名称に相反して、鉄の側面からのフェロトーシス研究は行われていなかった。そこで、鉄の側面からフェロトーシスを再解析し、新たな鉄毒性・フェロトーシス制御因子の探索を目指した。

【方法】

上記目的のため鉄添加のみでフェロトーシスを誘導できる新たな系を樹立した。

細胞内の鉄量は鉄センサータンパク質である FBXL5 によって厳密に調節されている。まず鉄過剰細胞を作成するため、FBXL5 欠損細胞を作成した。FBXL5 欠損細胞は鉄添加によって細胞内の鉄が増加し、細胞死を誘導できた。次に鉄誘導性フェロトーシスの制御因子を探索するべく、CRISPR スクリーニングを行なった。

【結果】

CRISPR スクリーニングの結果、鉄や脂質の制御因子を含む多種多様な制御因子の同定に成功した。中でも既知のセレンタンパク質合成因子がほぼ全て細胞死抑制因子として Hit していた。セレンタンパク質は活性中心に 21 番目のアミノ酸であるセレノシステインを含むタンパク質群で、フェロトーシスのマスター制御因子である GPX4 も活性中心のセレノシステイン残基でフェロトーシスを抑制するセレンタンパク質である。本スクリーニングより新たなセレンタンパク質合成因子を探索した結果、PRDX6 を同定した。PRDX6 欠損細胞では、GPX4 を含むセレンタンパク質の発現が著減し(図 1)、鉄添加のみで細胞死が誘導された。また、

そのメカニズムを探索したところ、PRDX6 はセレンタンパク質の原材料となるセレン元素と結合し、セレン元素の利用効率を制御していることを見出した。

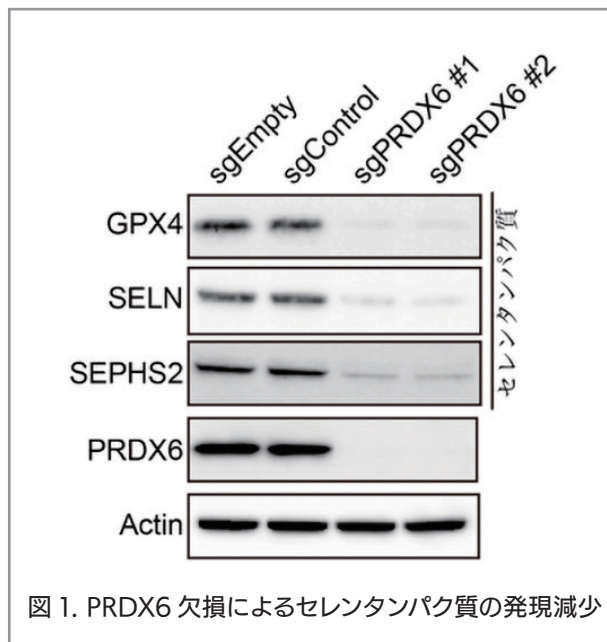


図 1. PRDX6 欠損によるセレンタンパク質の発現減少

【考察】

細胞内のセレン元素は極少量、かつ反応性の高さから細胞内の輸送タンパク質が存在し、安全に、かつ効率よくセレンタンパク質合成因子へと運ばれることが想定されていた。PRDX6 は、セレン元素と結合し、セレンタンパク質合成因子との結合も見られたことから、未同定のセレン輸送タンパク質であると考えている(図 2)。

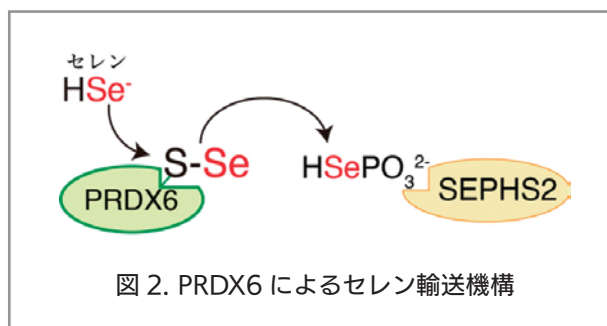


図 2. PRDX6 によるセレン輸送機構

劇症1型糖尿病発症メカニズムの解明

細川 吉 弥

(大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学)
(大阪大学感染症総合教育研究拠点企画室)

【目的】

- ① 劇症1型糖尿病患者 iPS 細胞由来インスリン陽性細胞における 25-hydroxycholesterol (25HC) の効果を明らかにする。
- ② 免疫チェックポイント阻害薬投与後の1型糖尿病発症機序を免疫組織学的に明らかにする。
- ③ 劇症1型糖尿病患者を含む糖尿病患者における新規血中グルカゴン測定系による空腹時グルカゴン値の意義を明らかにする。

【方法・結果】

- ① 劇症1型糖尿病 iPS 細胞3クローンをインスリン陽性細胞に分化誘導させ、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ を投与しアポトーシスを誘導した。ここに25HCを投与した群では投与しない群に比し有意にCaspase-3活性の低下およびインスリン陽性細胞に占めるCleaved caspase-3陽性細胞率の低下を認め、アポトーシスが抑制された。以上より、劇症1型糖尿病における β 細胞傷害に対し、25HCが保護的に作用することが示唆された。
- ② 抗PD-1抗体投与後に1型糖尿病を発症した3例、発症しなかった3例、コントロール7例の膵組織を免疫組織学的に比較検討した。抗PD-1抗体投与後に1型糖尿病を発症した群においては、 β 細胞面積は有意に低値であるとともに、CD68陽性マクロファージ数は有意に高値であった。さらに、抗PD-1抗体投与後に1型糖尿病を発症した群においては膵島におけるPD-L1発現陽性細胞は有意に低値であり、このことが抗PD-1抗体投与後の1型糖尿病発症に寄与することが示唆された。現在、制御性T細胞のマーカーやアポトーシスシグナルについて検討中である。
- ③ 大阪大学医学部附属病院糖尿病・内分泌・代謝内科に血糖コントロール目的に入院した糖尿病患者で、入院直後に早朝空腹時においてサンドイッチ ELISA

法を用いて血中グルカゴン値を測定し、各種臨床指標との関係を検討した。急性発症1型糖尿病患者(14 \pm 10pg/ml)では2型糖尿病患者に比し空腹時グルカゴン値(29 \pm 15pg/ml)は有意に低値であった。劇症1型糖尿病患者(11 \pm 2pg/ml)では急性発症1型糖尿病患者と同程度に空腹時グルカゴン値は低値であるいっぽう、緩徐進行1型糖尿病患者の空腹時グルカゴン値(25 \pm 15pg/ml)は2型糖尿病患者に近い値であった。糖尿病患者における空腹時グルカゴン値は空腹時血糖値とは相関しない一方、2型糖尿病患者においては空腹時Cペプチド値と有意な正相関を示した。多変量解析においても空腹時Cペプチド値は空腹時グルカゴン値の有意な説明変数であった。これまで1型糖尿病患者では高グルカゴン血症を認めるとされていたが、今回の結果より、早朝空腹時において血中グルカゴン値はインスリン能の低下を反映し低値であることが明らかとなった。

【文献】

- Kawata S, Hosokawa Y, et al.: Inflammatory Cell Infiltration into Islets without PD-L1 Expression is Associated with the Development of Immune Checkpoint Inhibitor-Related Type 1 Diabetes in Genetically Susceptible Patients. *Diabetes*, 72, 511-9 (2023).
- Hosokawa Y, et al.: Pathogenesis of Fulminant type 1 diabetes: genes, viruses and the immune mechanism, and usefulness of patient-derived iPS cells for future research. Mini Review. *J Diabetes Investig*, 10, 1158-64 (2019).
- Hosokawa Y, et al.: Positive correlation between fasting plasma glucagon and serum C-peptide in Japanese patients with diabetes. *Heliyon*, 5, e01715 (2019).
- Yoneda S, Hosokawa Y, et al.: T lymphocyte infiltration to islets in the pancreas of a patient who developed type 1 diabetes after administration of immune checkpoint inhibitors. *Diabetes Care*, 42, e116-8 (2019).

グルカゴンツールとしたタンパク質嗜好性制御機構の解明

松 居 翔

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻栄養化学分野)

【目的】

タンパク質の摂取は、エネルギー摂取とは別個に調節されているが、その調節機序は全く未解明である。これまでに申請者は、野生型マウスにグルカゴンを投与することで、タンパク質の摂食量が減少することを見出している。また、その効果を得るためには、グルカゴン投与から約10時間を要することから、脳への直接作用ではなく、他臓器を経由してタンパク質の食欲を制御していることが予想される。そこで本研究では、グルカゴンがどの臓器に作用し、タンパク質の食欲を制御しているのかについて明らかにすることを目的とした。2022年度では、褐色脂肪組織特異的グルカゴン受容体 (*Gcgr*) 欠損マウスの解析を行ったが、褐色脂肪細胞の *Gcgr* を欠損させても、グルカゴンのタンパク質摂取抑制効果を打ち消すことはできなかった。そこで2023年度は、肝臓特異的 *Gcgr* 欠損マウスの解析を行った。

【方法】

Gcgr を多く発現する臓器を中心に、それらの Cre マウスと *Gcgr-flox* マウスを掛け合わせて、各臓器特異的 *Gcgr* ノックアウトマウスを作製し、グルカゴンによるタンパク質に対する食欲制御を担う標的臓器を明らかにする。本研究では、*Albumin-Cre* (肝臓) マウスと *Gcgr-flox* マウスを交配させ、肝臓特異的 *Gcgr* 欠損マウスを作製し、食事嗜好性試験 (普通食 (NC) vs. 高タンパク質食 (HPD)) を行った。

【結果】

0.9%生理食塩水 (NaCl) および 1 mg/kg のグルカゴンを肝臓特異的 *Gcgr* 欠損マウスに腹腔内投与し、食事嗜好性試験を行った。その結果、肝臓特異的 *Gcgr* 欠損マウスの HPD 摂取量は、NaCl、およびグルカゴンの投与で違いが認められなかった。

【考察】

肝臓特異的に *Gcgr* を欠損させると、グルカゴンの

タンパク質摂取抑制効果を打ち消すことができた。このことから、グルカゴンによるタンパク質摂取抑制効果は、*Gcgr* の発現が最も多くアミノ酸代謝の主臓器である肝臓を介していることが明らかとなった。今後は、肝臓からどのような経路を介してタンパク質栄養の情報が脳に伝わるのかを明らかにしていく。

慢性腎臓病の治療を目指したポドサイトにおける Rac1 制御機構の解明

松 田 潤

(大阪大学大学院医学系研究科 腎臓内科学講座)

【背景・目的】

ポドサイト (糸球体上皮細胞) は、アクチン線維に富む特徴的な足突起構造を有し、血管内皮細胞および糸球体基底膜とともに濾過バリアを形成することで、蛋白の尿への漏出を防いでいる。このアクチン線維の調節に関わるのが、20種類から成る Rho GTPase と呼ばれる蛋白群である。Rho GTPase は GTP 結合型 (活性化型) と GDP 結合型 (不活性化型) の2形態をとる分子スイッチである^{1,2)}。遺伝子改変マウスや蛋白尿を呈する患者の腎検体を用いた既存研究から、ポドサイトにおける代表的な Rho GTPase の1つである Rac1 の活性異常が糸球体病変や蛋白尿に関与することが知られている^{3,4)}。しかし、ポドサイトでどのような機序によって Rac1 活性が制御されているかは不明であった。そこで本研究では、ポドサイトにおける Rac1 の活性化/不活性化機構を解明すべく、近位依存性ビオチン標識法 (BioID) を用いて Rac1 と相互作用する蛋白を網羅的に同定した。

【方法】

- ① Rac1 配列を含む pSTV6 ベクターを培養ポドサイトにトランスフェクションし、ドキシサイクリンとビオチンを培地に添加した後、回収したビオチン化蛋白の質量分析を行った。
- ② BioID で同定された GIT2 蛋白の細胞内局在を、免疫染色と共免疫沈降により評価した。
- ③ 樹立した GIT2 欠損 (KD) および過剰発現 (OE) ポドサイトの表現型を、Pull-down assay と Time-lapse live cell imaging を用いて解析した。

- ④ ポドサイト特異的 GIT2 欠損 (KO) マウスを樹立し、微小変化型ネフローゼモデル (LPS) と塩分感受性高血圧モデル (DOCA+salt) における尿蛋白およびポドサイトの足突起幅を対照群と比較した。

【結果】

- ① Rho GTPase の活性化因子として知られる ARHGEF7 や、同不活化因子として知られる ARHGAP31 の他、GDP/GTP 交換能を持たない GIT2 を含む 185 個の Rac1 関連蛋白を同定した。
- ② GIT2 は接着斑構成蛋白であるパキシリンと共局在し、相互作用を認めた。
- ③ GIT2 KD 細胞では対照細胞と比較して Rac1 活性が有意に高く、Rac1 依存的に仮足形成が亢進して細胞面積が増加した。また、接着斑の分解が亢進し、それによる未熟な接着斑の増加、接着斑寿命の短縮、細胞運動の亢進を認めた。KD 細胞のこれらの表現型はいずれも OE 細胞で回復した。
- ④ GIT2 KO マウスは、両モデルで対照群より尿蛋白の増加と足突起の消失が顕著であった。

【考察】

GIT2 は Rac1 活性を抑えて接着斑の分解を制御し、正常なポドサイト形態と糸球体濾過バリアの維持に重要な役割を担っていると考えられた。GIT2 による Rac1 制御機構は、慢性腎臓病における新規の治療標的となる可能性がある。

【文献】

1. Matsuda J, Asano-Matsuda K, Kitzler T, Takano T. Rho GTPase regulatory proteins in podocytes. *Kidney Int.* 99:336-345,2021.
2. Asano-Matsuda K, Ibrahim S, Takano T, Matsuda J. Role of Rho GTPase Interacting Proteins in Subcellular Compartments of Podocytes. *Int J Mol Sci.* 22:3656,2021.
3. Yu H, Suleiman H, Kim AH, et al.: Rac1 activation in podocytes induces rapid foot process effacement and proteinuria. *Mol Cell Biol.* 33: 4755-4764, 2013.
4. Robins R, Baldwin C, Aoudjit L, Cote JF, Gupta IR, Takano T: Rac1 activation in podocytes induces the spectrum of nephrotic syndrome.

Kidney Int. 92: 349-364, 2017.

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

松本 有樹修

(名古屋大学)

【目的】

近年 Ribo-seq などの次世代シーケンサーを用いた技術の発展により、ゲノムにはこれまで思われていた以上に非典型的な翻訳領域が存在することが明らかになってきた。例えば、long non-coding RNA (lncRNA) はその定義によるとタンパク質を翻訳しない RNA であるが、われわれは lncRNA が小さなタンパク質を翻訳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】

TMFC の期間においてわれわれは、lncRNA に潜む新規タンパク質を多く同定し、それらが精子の形態形成や皮膚や骨格筋の再生などに寄与することを明らかにした (PLoS Genet. 2021, *Nat. Commun.* 2022).

さらにわれわれは、Ribo-seq だけでなく、TI-seq や Sel-TCP-seq といった最新の技術を組み合わせることにより、翻訳開始点 (開始コドン) を精密に同定する TISCA という手法を確立し、多くの mRNA が複数の翻訳開始点を持つ polycistronic であることを明らかにした (*Nucleic Acids Res.* 2021). これら開始コドンには AUG と類似した開始コドン (near cognate codons) も多く存在した。このような非典型的な開始コドンにより、upstream ORF (uORF) や N-extended ORF などが生じる。

lncRNA は少なくとも 3 万種以上あり、それらの多くが翻訳領域を持つことが予想される。さらに非典型的な開始コドンから polycistronic に翻訳されることを考慮すると、非典型的な翻訳領域は膨大に存在することが分かる。しかし、これら非典型的な翻訳産物が全て機能的であるとは限らない。例えばある遺伝子は uORF と main ORF を一つずつ持つが、uORF のアミノ酸配

列の保存性は種間で低いため翻訳産物の機能は重要でないことが推測される。

一方で、その遺伝子の uORF のみを欠損したマウスを作製したところ、その下流から翻訳されるメインタンパク質の発現量が、コントロールと比較して脳で2倍、肝臓で10倍も増加することが分かった。このことからタンパク質量は mRNA レベルだけでなく翻訳レベルでも制御されており、臓器によって異なる制御を受けることが分かった。非典型的な翻訳領域はタンパク質としての機能だけでなく、下流の翻訳領域の発現調節として機能している例もあることがわかってきた。

【考察】

上述の通り、ゲノムには未知の翻訳領域が膨大に存在することが明らかとなってきた。しかしこれら非典型的な翻訳領域は多くの場合は小さなタンパク質をコードしており、それら翻訳産物の多くは機能的でない可能性も高い。われわれは、polycistronic な遺伝子に潜む非典型的な翻訳領域は、それ自身のタンパク質の機能は重要ではなく、その下流から翻訳されるメインタンパク質（既知遺伝子としてアノテーションされている領域）の発現制御に寄与している例も明らかにしている。今後は、ゲノムに潜む非典型的な翻訳領域を網羅的に同定し、それらが機能的であるかどうかを予測するアルゴリズムの開発が必要となってくる。さらに疾患患者などのゲノム配列データを用いて、疾患と関連する非典型的な翻訳領域の変異が存在しないかを探索する必要もある。これら研究により、疾患原因の解明や創薬シーズ等の発見に繋がる例を示すことにより、世界に新たな研究の潮流を示すとともに、その領域を世界でリードしていきたい。

【文献】

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

Shiraishi C., Tang R., Hatano A., Matsumoto M., Han P., Iwasaki S., Nakayama KI.*: The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes. *EMBO J.* 42(12): e112869 (2023).

- 3) Mise S.†, **Matsumoto A.*†**, Shimada K., Hosaka T., Takahashi M., Ichihara K., Shimizu H., Shiraishi C., Saito D., Suyama M., Yasuda T., Ide T., Izumi Y., Bamba T., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Miyata H., Ikawa M., Nakayama KI.*: Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis. *Nat. Commun.* Feb 28;13(1):1071 (2022).
- 4) Nita A., **Matsumoto A.***, Tang R., Shiraishi C., Ichihara K., Saito D., Suyama M., Yasuda T., Tsuji G., Furue M., Katayama B., Ozawa T., Murata T., Dainichi T., Kabashima K., Hatano A., Matsumoto M., Nakayama KI.*: A ubiquitin-like protein encoded by the "noncoding" RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing. *PLoS Genet.*, 17:e1009686 (2021).
- 5) Ichihara K.†, **Matsumoto A.*†**, Nishida H., Kito Y., Shimizu H., Shichino Y., Iwasaki S., Imami K., Ishihama Y., Nakayama KI.*: Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons. *Nucleic Acids Res.*, 49:7298-7317 (2021).

腫瘍間・内不均一性に着目したアルドステロン産生腺腫の病態解析

村上正憲

(東京医科歯科大学病院 糖尿病・内分泌・代謝内科)

【背景・目的】

近年のオミクス解析の発展に伴い、アルドステロン産生腺腫（APA）の分子生物学的特徴の理解が進んでいる。APAにはイオンチャンネルをコードする遺伝子の

体細胞変異があることが知られており、その中でも大多数の APA で *KCNJ5* 変異が存在することが特徴である。我々はこれまで *KCNJ5* 変異を有する APA 組織では DNA 低メチル化状態、ハイブリッドステロイドの上昇など様々な特徴があることを明らかにしてきた。一方で、同じ *KCNJ5* 変異を有していても、アルドステロン合成能やトランスクリプトームのパターンには幅があり、腫瘍間の不均一性も認められている。さらに、ステロイド合成酵素の免疫染色の結果から、APA 組織内におけるアルドステロン合成酵素の不均一な分布が観察されており、腫瘍内を構成する副腎皮質由来細胞の不均一性が予想されている。APA の腫瘍間・内不均一性の評価は、発症メカニズムを理解する上で重要と考えられる。今回、Single Nucleus RNA-seq 解析 (snRNA-seq) を行い、APA 特異的なクラスター核集団の抽出とその特徴を解析した。

【方法】

非機能性副腎腫瘍 (NFA) 2 症例、*KCNJ5* 変異を有する APA 3 症例の合計 5 症例の凍結腫瘍検体より核抽出を実施し、TAS-Seq によるライブラリー調整およびシーケンシング解析を行い、Seurat で解析を実施した。

【結果】

NFA : 7319 個, APA : 13476 個の計 20795 個の核が解析でき、核集団は合計 13 個のクラスターに分かれた。NFA と APA で共通する副腎皮質由来のクラスターが同定され、それらは *CYP11B2* の発現量が低くアルドステロン合成能の低い細胞集団であることが推定された。疑似時系列解析では、*CYP11B2* の発現上昇を反映した分化経路が推定された。核集団の分化度が上昇するにあたり、アルドステロン合成の上流で機能する *HSD3B2* や *CYP21A2* といったステロイド合成酵素遺伝子の発現量上昇も伴っていることが特徴だった。さらに分化経路は 2 方向に分岐し、リボソームや神経変性疾患に関連のある遺伝子の発現上昇が特徴的な fate1 と、解糖系に関連する遺伝子の発現上昇が特徴的な fate2 に分かれていた。同一体細胞変異を有していても APA 発症に至る経路には多様性があるものと考えられた。

【考察】

腫瘍検体を用いた snRNA-seq により、APA の腫瘍内、並びに腫瘍間不均一性の評価をすることが出来た¹⁾。

APA の腫瘍内不均一性は、腫瘍細胞がアルドステロン合成能を獲得していく分化経路を反映している可能性がある。

【文献】

1. Murakami, et al. Single-Nucleus Analysis Reveals Tumor Heterogeneity of Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension*.81(2):361-371.(2024)

甲状腺ホルモン作用 in vivo 評価系の開発とかく乱物質の検証

山内 一郎

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【背景】

甲状腺ホルモンは、内分泌かく乱物質の標的として近年重要視されている。我々は、下水処理場排水中に甲状腺ホルモン受容体に対するアゴニスト活性が存在し、その多くは TRIAC に拠ることを明らかにした (*Environ Sci Technol* 2022)。本研究では、甲状腺ホルモン作用を評価できるマウスモデルを開発し、TRIAC のかく乱作用の検証を行った。

【方法・結果】

3 週齢雄の C57BL/6J マウスにプロピルチオウラシルを 4 週間給水投与して、甲状腺機能低下症を誘導したところ、成長障害、視床下部 - 下垂体 - 甲状腺軸 (HPT axis) の変化、肝臓、心臓、大脳における甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現変化を確認することができた。この甲状腺機能低下症マウスに TRIAC を給水投与したところ、ポジティブコントロールの LT3 を投与した際と同様に、肝臓と心臓において甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現増強が見られた。興味深いことに、大脳では TRIAC を投与しても甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現が変化しなかった。臓器含有量を測定すると、LT3 投与は肝臓・大脳とも T3 含有量を増加させたが、TRIAC 投与は大脳では TRIAC 含有量を増加させなかった。

TRIAC が血液脳関門を通過し難いことが示唆されたのを受けて、甲状腺機能正常のマウスへ TRIAC を投与し、かく乱が生じるか検証した。TRIAC を高用量投与すると、大脳内の TRIAC 含有量は増加せず、一方

でHPT axis抑制から血中・大脳のT4とT3が大幅に減少した。甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現は、肝臓ではLT3, TRIACのいずれの投与によっても増強したが、大脳においてはLT3投与により増強した一方で、TRIAC投与によりむしろ減弱した。

【考察】

フィードバックと臓器移行の不均一性という2つの要素の複合により生じた新規機序によるかく乱現象であった。健康影響が懸念されるため、TRIACに着目したさらなる環境調査、疫学研究が求められる。

【文献】

Yamauchi, I., Hakata, T., Ueda, Y., et al. TRIAC disrupts cerebral thyroid hormone action via negative feedback and heterogenous distribution among organs. *iScience*, 26, 107135 (2023).

細胞群の変化が個体レベルの糖・脂質代謝に寄与するか検討するため、特に増加していた細胞集団に関して特異的な除去抗体を投与したところ、脂肪細胞特異的Regnase-1欠損マウスにおいてみとめられた耐糖能の変化が抗体の投与処置により消失した。

【考察】

以上のことから、脂肪組織での転写後調節が免疫細胞に作用することで、全身の代謝を調節することが示唆された。

【文献】

1. Iwai N, Akaki K, Hia F, Li W, Yoshinaga M, Mino T, & Takeuchi O. UPF1 plays critical roles in early B cell development. *Nat Commun*. 15, 5765 (2024).
2. Yoshinaga M*, Takeuchi O*. Regulation of inflammatory diseases via the control of mRNA decay. *Inflamm Regen*. 44, 14 (2024).
3. Yoshinaga M & Takeuchi O. RNA Metabolism Governs Immune Function and Response. *Adv Exp Med Biol*. 1444, 145-161 (2024).

転写後調節を介した肥満制御機構の解明

吉永正憲

(京都大学 大学院医学研究科 医化学分野)

【目的】

遺伝子発現はmRNAレベルでの転写後調節機構によって動的に制御される。これまで筆者は、転写後調節機構が代謝制御において重要な役割を果たすことを示しており、生体における様々な栄養素の吸収や代謝は転写後調節機構による制御を受けるのではないかと考えるに至った。実際、脂肪細胞特異的にRegnase-1を欠損したマウスにおいて体重および脂肪量が著明に減少し耐糖能が改善することを見出している。そこでこのマウスを足掛かりとして、転写後調節機構が糖・脂質の吸収や代謝にも関与するか解明する。

【方法と結果】

代謝調節においては脂肪組織における免疫細胞が重要な役割を果たす。そこで本年度は脂肪組織に含まれる免疫細胞とその遺伝子発現の変化について網羅的に検討するため、1細胞シークエンスにより精巣上体脂肪(eWAT)を解析した。その結果、脂肪細胞特異的Regnase-1欠損マウスでは代謝に関与する自然免疫細胞の割合が著明に変化することを見出した。この免疫

炎症性腸疾患に対する新薬開発に向けた制御性T細胞による腸管上皮修復機序の解明

吉松裕介

(慶應義塾大学医学部内科学(消化器))

【目的】

潰瘍性大腸炎(UC)は、上皮近傍の炎症再生修復がアンバランスとなり修復機構が破綻し炎症が持続することが知られている。免疫を抑制する薬剤が多数開発され使用されているが、既存治療に抵抗性である症例も多数存在する。近年、生薬の一つである青黛がUCの改善に効果を認めることが明らかになり、医師主導治験においても有用であることが示された(Naganuma M, et al. *Gastroenterology* 2018)。しかし、生薬であることから本邦での医薬品としての承認は難しく、肺高血圧症、肝機能障害を始め副作用事例があり長期の使用は困難であることが判明しているから、この青黛がAryl hydrocarbon receptor(Ahr)リガンド(Ahr-L)を

主成分としていることに着目し、Ahr-Lによる大腸上皮組織修復メカニズムを解明することによりターゲットを絞った安定的なドラッグを作成することを考えた。

これまでに申請者はマウスモデルを利用し、このAhr-Lの混合物(Ahr-L食)が腸炎抑制効果を有しており、作用機序として、腸管上皮細胞のAhrシグナルを介した腸管内制御性T細胞(regulatory T cells; Tregs)の管腔側への集積を伴う増加も可能性があることを見出した。さらに、このTreg誘導効果は上皮細胞AhrシグナルにおけるMHC classII及びheme oxygenase経路を介した経路で腸管内に存在するTregは大腸上皮からのAhrシグナルによって管腔側に集積することも明らかとなった。

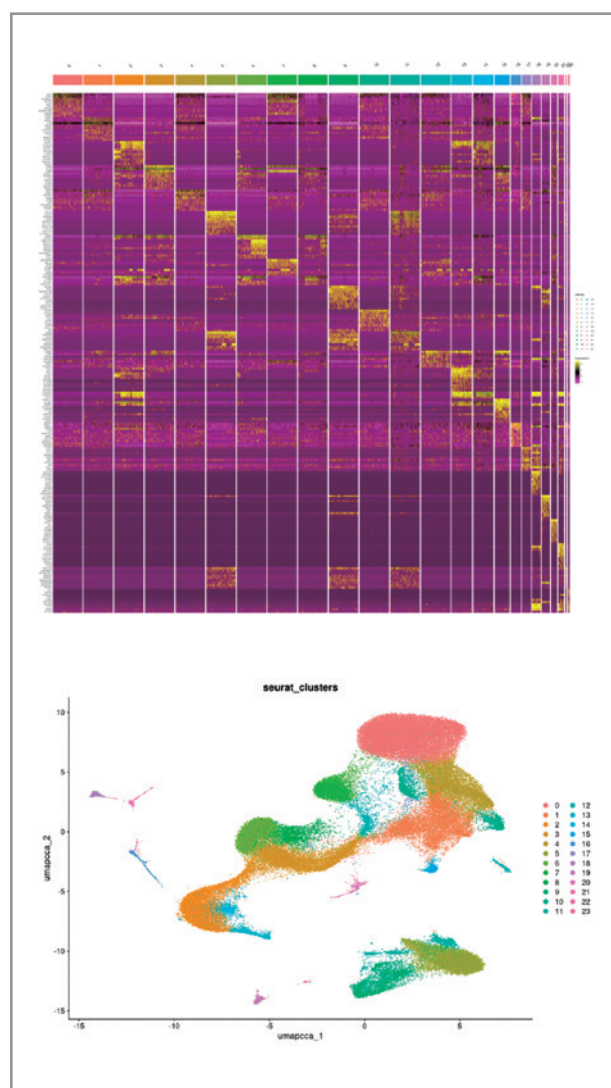
そこで、申請者はヒトUC患者の青黛投与前後の血液および大腸粘膜内の免疫細胞についてマウスの大腸と同様の現象が起こっているかを検証し、UCの原因究明、治療薬開発につながることを目的に研究を行っている。

【方法】

臨床試験として、UC患者に青黛FC腸溶錠を投与した前後で、血液検査および大腸内視鏡検査において直腸粘膜から採取した組織検体の粘膜固有層の生細胞を分取し、single cell RNA sequenceを行う。

【結果】

目標症例数に到達していないため preliminary data ではあるが、末梢血中の免疫細胞について全4患者の single cell RNA sequence を実施しクラスタリングを行なうことが可能であった(図参照)。今後症例を蓄積して大腸粘膜の免疫細胞の検討、ならびに、治療前後の比較についても進めていく予定である。



Cardiovascular Innovative Conference に関する 研究助成 (CVIC)

血管リモデリング進展過程における血管周囲脂肪褐色化の病態生理学的意義の解明

安達 裕助

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科)

【目的】

心筋梗塞や脳卒中、大動脈疾患（瘤・解離）等の動脈硬化性疾患による死亡者数は、日本人の死因の中でがんと同等の割合を占めており、これらの疾患の克服には、動脈硬化の病態メカニズムを解明することが極めて重要である^{1,2)}。急性大動脈解離は、動脈硬化性疾患の中でも死亡率と健康寿命にとりわけ大きな影響を与える重大な疾患である。申請者らは、本研究助成のもと、動脈硬化性疾患の中でも特に急性大動脈解離に焦点を当て、その炎症・免疫制御機構の解明および新規診断モダリティの開発に取り組んでいる。本年度も一定の研究進展が得られた。

【方法】

本研究では、基礎的な知見を得るため、動物実験とヒト剖検検体の分析を並行して行った。マウスの大動脈解離モデルは、野生型 C57BL/6J マウスにアンジオテンシン II と β -アミノプロピオニトリルを浸透圧ポンプで投与することで作製した³⁾。同時に、ヒト剖検標本を用いて、大動脈解離患者の血管周囲組織における炎症細胞の分布を詳細に観察した。さらに、急性大動脈解離患者の非造影 CT 画像を用いて、血管炎症を非侵襲的に検出するための機械学習アルゴリズムの開発に取り組んだ。

【結果】

マウスモデルの解析により、大動脈解離時には血管周囲組織に特定の炎症細胞（CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ マクロファージ、特に CD11c⁺ CD206⁻ 炎症型マクロファージ）の集積を認めることを血管周囲脂肪の間質血管細胞群を用いた FACS によって確認した。また、ヒト大動

脈解離患者の病理組織標本の分析では、解離した血管周囲組織に誘導型一酸化窒素合成酵素陽性の炎症型マクロファージが顕著に集積していることが確認された。加えて、非造影 CT 画像を用いた大動脈の自動識別と血管炎症の可視化技術の開発に成功した。この技術を用いた解析により、解離患者では非解離患者と比較して、血管炎症の指標である血管周囲脂肪減衰指数 (FAI) 値⁴⁾が有意に上昇していることが判明し、急性大動脈解離の新たな診断マーカーとしての可能性が示唆された（論文投稿中）。

【考察】

申請者らは、マウスモデルとヒト血管臨床サンプルを用いて、大動脈解離に関連する血管周囲組織の炎症と免疫動態に迫る基礎および臨床研究を実施している。従来、大動脈の炎症を非侵襲的に評価する方法は限られていたが、FAI は非造影 CT を用いて算出できる非侵襲的な指標であり、造影剤を必要としない新たなバイオマーカーとして機能する可能性が考えられる。この研究成果は、急性大動脈解離の早期診断や治療効果のモニタリングに貢献することが期待される。

【文献】

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

Yasukawa H, Imaizumi T, Hiromatsu S, Tanaka H, Fukumoto Y. Genetic deletion of Socs3 in smooth muscle cells ameliorates aortic dissection in mice. *JACC Basic Transl Sci.* 5, 126–144 (2020).

- 4) Antonopoulos AS, Sanna F, Sabharwal N, Thomas S, Oikonomou EK, Herdman L, Margaritis M, Shirodaria C, Kampoli AM, Akoumianakis I, Petrou M, Sayeed R, Krasopoulos G, Psarros C, Ciccone P, Brophy CM, Digby J, Kelion A, Uberoi R, Anthony S, Alexopoulos N, Tousoulis D, Achenbach S, Neubauer S, Channon KM, Antoniades C. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci Transl Med.* 9, eaal2658 (2017).

ペリサイトにおける ATP 依存性カリウムチャネル
の心・脳における機能解析

安藤 康史

(国立循環器病研究センター研究所・心臓再生制御部)

【目的】

毛細血管を被覆するペリサイトは中枢神経組織における血液脳関門維持や血流制御に重要であることは良く知られているものの、脳梗塞を含む神経組織傷害に対する役割は十分に明らかではない。脳梗塞では神経細胞の損傷に伴い、損傷関連分子パターン (DAMPs) が放出されることで炎症反応が誘発され、神経障害領域の拡大につながる。本研究課題では、主に炎症反応に着目し、脳梗塞後の超急性期における脳ペリサイトの役割の解明を目的とした。

【結果・考察】

本研究では炎症応答に対して中心的な役割を担うとされる NF- κ B の活性化細胞を指標に、急性期における組織傷害と炎症進展機構を解析した。具体的には野生型マウスに塞栓系を挿入により中大脳動脈を閉塞することで、一過的に脳虚血を誘導した MCAO モデルを用いて、脳梗塞後の炎症惹起がどの細胞で感知されるのかを調べた。MCAO 後 1 時間から 24 時間までの継時的な NF- κ B の核移行頻度を計測した結果、脳梗塞急性

期では主に血管内皮細胞とペリサイトといった血管系において NF- κ B の活性化が惹起されることが見出された。

次に、神経傷害形成に対して NF- κ B が関与するかを調べるために、NF- κ B の構成因子である Rela 遺伝子の条件付き欠損マウス (RelaFlox/Flox) を用いて解析を進めた。その結果、ミクログリアやペリサイトにおける NF- κ B 経路の活性化は急性期における神経傷害の進展に対する寄与は少なく、主に血管内皮細胞における NF- κ B 経路の活性化が傷害進展に重要であることが明らかになった。一方で、ペリサイトを介して内皮細胞における NF- κ B の活性を強力に抑制し脳梗塞後の組織障害を抑制する経路を見出し、新たなペリサイト-内皮細胞間コミュニケーションが示唆されるとともに、ペリサイトが新たな脳梗塞に対する治療標的となる可能性が見出された。

心疾患におけるフェロトーシスの病的意義の解明と
治療法の開発

池田 昌隆

(九州大学病院 循環器内科)

【目的】

本研究は、心疾患の病態進展における細胞死フェロトーシスの役割の解明と、同細胞死を標的とした治療法の開発を目的とした。

【方法】

C57BL/6J マウスおよび GPX4 の遺伝子改変マウスを用い、ドキシソルビシン心筋症モデルおよび虚血再灌流傷害モデルを作成し、病態評価を行った。解明した病態機序に沿った治療介入の有効性を検証した。

【結果】

ドキシソルビシン心筋症モデルでは、GPX4 の過剰発現により心機能障害が改善され、フェロトーシスが心筋症発症に重要な細胞死であることを明らかにした¹⁾。培養心筋細胞での検討では、ドキシソルビシンにより誘導されるフェロトーシスはミトコンドリアに蓄積する鉄が誘因であり、鉄の増加はヘム合成障害による遊離鉄の蓄積が原因であることが明らかになった。5-アミノレ

プリン酸 (5-ALA) によりヘム合成を促進することで、ミトコンドリアに停滞した遊離鉄を解消し、フェロトーシスを抑制できることが示され、さらに5-ALAの心筋症モデルへの投与により心機能障害が予防できることが明らかになった²⁾。

虚血再灌流傷害モデルでは、GPX4の過剰発現により梗塞巣が縮小し、フェロトーシスが虚血再灌流傷害において重要な細胞死であることが示された。培養心筋細胞での検討では、虚血再灌流傷害に反応して発現が亢進したヘムオキシゲナーゼ-1によるヘムの分解で小胞体内に鉄が増加することが明らかになった³⁾。さらに、鉄のキレート剤であるデフェラシロクスが、虚血後再灌流前の投与によりフェロトーシスを抑制し、心筋梗塞時の新たな虚血再灌流傷害に対する治療薬となり得ることが示された⁴⁾。

【考察】

フェロトーシスはドキシソルピシン心毒性および心筋虚血再灌流傷害の病態発症に重要であった。一方で、鉄が蓄積する分子機序および有効な治療介入はそれぞれで異なっていた。前者に対しては5-アミノレブリン酸、後者に対してはデフェラシロクスがフェロトーシスを標的とした治療薬になり得ることが期待される。

【文献】

- 1) Tadokoro, T., Ikeda, M. & Ide, T.: Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity, *JCI Insight*, 5, e132747 (2020)
- 2) Abe, K., Ikeda, M. & Ide, T.: Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis, *Sci. Signal.*, 15, eabn8017 (2022).
- 3) Miyamoto D.H., Ikeda, M. & Ide, T.: Iron overload via heme degradation in the endoplasmic reticulum triggers ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury, *J. Am. Coll. Cardiol. Basic. Transl. Sci.*, 7, 800 (2022)
- 4) Ishimaru, K., Ikeda, M. & Ide, T.: Deferasirox targeting ferroptosis synergistically ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury in

conjunction with cyclosporine A, *J. Am. Heart Assoc.*, 13, e9114 (2024)

心不全における ERAD によるオルガネラ機能制御機構の解明と新規治療法の開発

池田 宗一郎

(ラトガース大学)

【目的】

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

【方法】

心筋細胞においてRNA干渉法を用いたHERPUD1のノックダウンを行い、過酸化水素投与下での心筋障害進行過程における機序の解明を行った。また、左前下行枝の結紮による心筋梗塞モデルマウスにおいてHERPUD1のhomozygous KOマウスに対して作成し、心筋リモデリングに関連する因子の同定を行った。

【結果】

昨年度までに、梗塞後心筋組織と過酸化水素刺激による心筋細胞でHERPUD1のタンパク量が増加すること、また、HERPUD1のhomozygous KOは野生群と比較し心筋梗塞後の左室駆出率を低下し、HERPUD1のノックダウンは小胞体ストレスのマーカーであるPERKの発現を増加し、過酸化水素投与下で心筋細胞死を増加することを報告した。今年度は、上記の心筋リモデリ

ングおよび心筋障害の過程に、ミトコンドリア複合体の形成を制御する因子が関与することを見出した。

【考察】

以上より、内因性の HERPDU1 は酸化ストレス環境下で小胞体ストレスを軽減するのみならずミトコンドリア機能制御に関与することにより心筋細胞死の抑制に関与している可能性が示唆された。

プラコフィリン 2 変異による心筋収縮力低下の機序の解明

井上 裕之

(スタンフォード大学 心臓血管研究所)

【背景】

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

【目的】

iPS 細胞由来心筋細胞を用いた、*PKP2* 変異による心筋収縮力低下機序の解明および治療薬開発。

【昨年度までの成果】

PKP2 ヘテロ変異患者より樹立したアイソジェニック iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、1) *PKP2* 変異による収縮力障害をモーションベクトル解析により検出し得る 2 次元収縮モデル、2) デスモゾーム生細胞イメージングモデルを報告した¹⁾。また、ベッカー型筋ジストロフィー女性患者より樹立したアイソジェニック iPS 細胞を用いて、3) *PLOD3*, *DMD* 変異による収縮力、スティフネス評価を行う 3 次元組織リングモデルを報告した²⁾。さらに、4) ハイスループットイメージングとカルシウム動態イメージングを組み合わせ、個別の心筋細胞ごとにカルシウム動態を解析する手法を報告した³⁾。

【本年度の成果】

1) 3 次元組織リングモデルを用いた *PKP2* 変異による心筋収縮力、スティフネスに対する影響の評価

我々は、*PKP2* ヘテロ変異患者より樹立したアイソジェニック iPS 細胞由来心筋細胞に対し、文献 2 で報

告した 3 次元組織リングモデルを用いて、収縮力、スティフネス評価を行った (図 1)。その結果、*PKP2* 修復株と *PKP2* ノックアウト株の間に、最も明らかな収縮力回復、スティフネス低下を認めた。

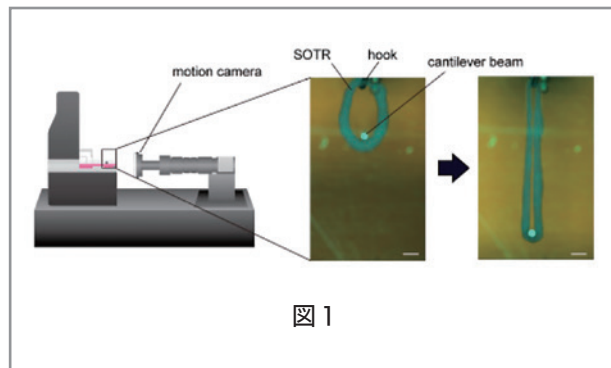


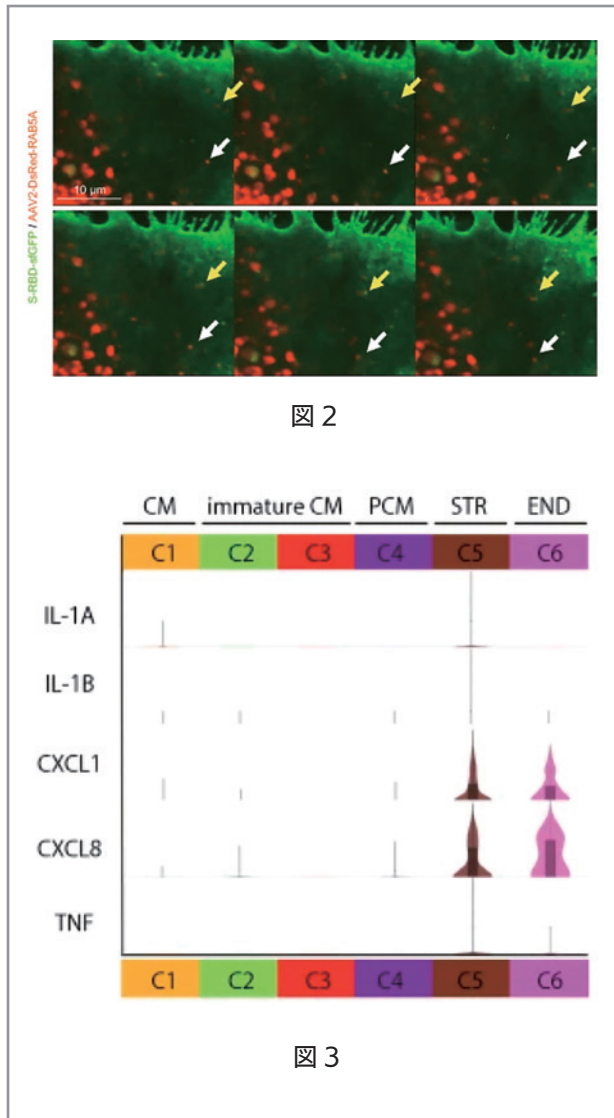
図 1

2) 細胞骨格に対する生細胞イメージング

細胞骨格は、サルコメアの心筋収縮を細胞全体に伝えるための重要な役割を担う。したがって、*PKP2* 変異による収縮能低下の機序解明のため、*PKP2* 変異による細胞骨格への影響評価も重要と考えられる。まず、予備実験として細胞骨格蛋白質に対して免疫染色を行った。その結果、*PKP2* 修復株において、同蛋白質はサルコメア周辺に規則正しく局在するのに対し、*PKP2* ノックアウト株においては無秩序な局在と凝集を認め、両者で著明な差異を認めた。この結果から、細胞骨格の局在異常と収縮能低下の関連が示唆された。生細胞で細胞骨格とデスモゾームの同時評価、さらに治療効果による細胞骨格への影響の評価を行うため、現在は遺伝子編集を用いてアイソジェニックデスモゾーム・細胞骨格同時生細胞イメージング iPS 細胞を作成中である。

また、本研究を通じて培った生細胞イメージングの技術を応用し、SARS-CoV-2 スパイクタンパク受容体結合ドメイン (Spike-RBD) が iPS 細胞由来心筋細胞の細胞膜受容体 ACE2 を介して細胞質に取り込まれ、RAB5 によりリソソームへ輸送されることを観察し、報告した⁴⁾ (図 2)。さらに、single-cell RNA sequencing を駆使して、Spike-RBD の取り込みによる心筋細胞におけるインターフェロン応答遺伝子 (*IFI16*, *ISG15*, *IFITM3*) の発現上昇と、非心筋細胞における NF- κ B 経路関連遺伝子 (*CXCL1*, *CXCL8*) の発現上昇を証明した (図 3)。特にウイルス応答に関わる ISG15 による

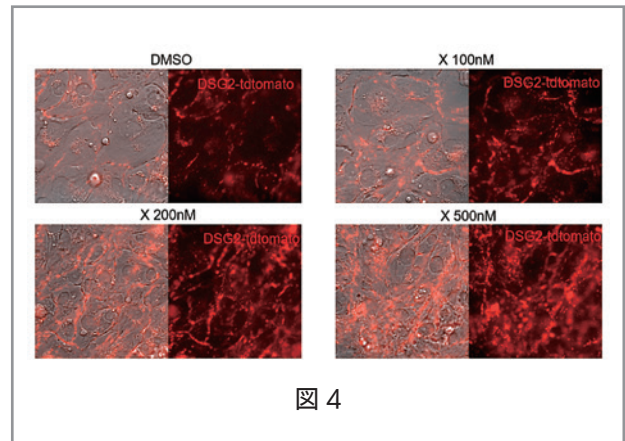
翻訳後修飾である ISGylation が心筋細胞において促進していることを示した。これらの研究結果は、SARS-CoV-2 ワクチン接種後心筋炎の機序解明の一助になることが期待された。



3) デスモゾームを標的とした治療薬開発

化合物 X は、デスモゾーム関連タンパク質を含む経路 A の阻害薬で、他疾患の治療薬として開発されてきた。ドラッグリポジショニングは安全性、開発費、開発時間の観点から新規開発薬に対して優位であり、有用な薬剤開発戦略である。今回は、化合物 X が *PKP2* 変異による収縮能低下に対する治療薬候補となり得るか、本研究で確立した生細胞イメージングを用いて評価を行った。化合物 X を 3 群の濃度 (100nM, 200nM, 500nM) に分けて投与した結果、濃度依存性にデスモゾームが回復することが確認された (図 4)。現在、化

合物 X による収縮能、スティフネスへの影響を検討中である。



【今後の研究計画】

収縮不全を再現するモデル、デスモゾームの生細胞イメージングモデルを確立した。細胞骨格に *PKP2* 変異による優位な局在変化を認めた。今後はこれらの実験系と結果に基づき、細胞骨格・デスモゾームの 2 点に焦点をあてて、引き続き本研究を推進する予定である。

【文献】

- 1) Inoue H, Nakamura S, Higo S, Shiba M, Kohama Y, Kondo T, Kameda S, Tabata T, Okuno S, Ikeda Y, Li J, Liu L, Yamazaki S, Takeda M, Ito E, Takashima S, Miyagawa S, Sawa Y, Hikoso S, Sakata Y.; Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPSC cell-derived cardiomyocytes; Stem Cell Reports, 17(2):337-351(2022)
- 2) Kameda S, Higo S, Shiba M, Kondo T, Li J, Liu L, Tabata T, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Kuramoto Y, Yasutake H, Lee JK, Takashima S, Ikeda Y, Hikoso S, Miyagawa S, Sakata Y.: Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Female Becker Muscular Dystrophy Carrier, JACC: Basic to Translational Science, 8(6):599-613 (2023).
- 3) Tabata T, Masumura Y, Higo S, Kunimatsu

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

- 4) Okuno S, Higo S, Kondo T, Shiba M, Kameda S, Inoue H, Tabata T, Ogawa S, Morishita Y, Sun C, Ishino S, Honda T, Miyagawa S, Sakata Y. SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain is internalized and promotes protein ISGylation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Scientific Report. 2023;13(1):21397.

睡眠時間断的低酸素モデルを用いた Non-dipper 型血圧発症腎機序の解析

上田 浩平

(国際医療福祉大学医学部生理学)

【背景】

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

【目的】

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

【方法】

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

用いた膜分画蛋白と mRNA 発現量を比較した。野生型 IH モデルマウスに 0.05%-NaCl 減塩食, Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NCC) ノックアウトマウスに Na⁺-K⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NKCC2) 阻害薬フロセミド 0.3g/L 飲水を投与した。

【結果】

NX 群マウスの血圧は明期よりも暗期に有意に高かったが, IH 群のマウスでは明期・暗期で血圧に有意差は認められず non-dipper 型血圧を呈した。腎試料膜分画においてリン酸化 NCC と NKCC2 の発現が有意に増加していた。野生型 IH モデルは減塩食により血圧の日内変動は改善し, NCC ノックアウトマウスの IH モデルでは NKCC2 阻害薬フロセミド投与により同様に血圧の日内変動が改善した。Sgk1, Gilz, Per1/2, および Cry1/2 の遺伝子発現レベルは, IH モデルにおいて有意に増加し, Bmal1 および Clock の遺伝子発現レベルは減少した。

【結論と考察】

睡眠時間断的低酸素により Non-dipper 発症の機序として腎 NCC・NKCC2 活性化の重要性が示唆された。また, その活性化機序として GR 関連遺伝子や時計遺伝子の関連が示唆された。今後は IH モデルにおける腎 NCC・NKCC2 の活性化機序の解析をさらに進める予定である。

【業績】

- 1) Ueda K, Shimosawa T. Regulating distal nephron functions and salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2024 Oct 1;327(4):F566-F580.
- 2) Bonnard B, El Moghrabi S, Ueda K, Lattenist L, Soulie M, López-Andrés N, Xhaard C, Shimosawa T, Rossignol P, Jaisser F. NGAL is a Novel Target in Hypertension by Modulating the NCC-Mediated Renal Na Balance. *Hypertension*. 2023 Sep;80(9):1860-1870.
- 3) Ueda, K., Nishimoto, M., & Hirohama, D. Renal Dysfunction Induced by Kidney-Specific Gene Deletion of Hsd11b2 as a Primary Cause of Salt-Dependent Hypertension. *Hypertension*. 2017 Jul;70(1):111-118.

腸 - 骨髄連関から動脈硬化を制御する
—大動脈弁狭窄症を悪化させる免疫メカニズムの解明—

江本 拓 央

(神戸大学医学部循環器内科)

【目的】

大動脈弁狭窄症は大動脈弁が狭小化することによって左室から上行大動脈への血流が妨げられる病態であり、高齢化社会において、増加し続けている。現在のところ、狭窄度が進行し、失神や心不全症状の出現があれば、外科的もしくは経カテーテル的大動脈弁置換術の適応になるが、有効な薬物治療は存在しない。メカニズムの探索や薬物療法の開発が遅れている理由の1つとして、マウスの大動脈弁狭窄症モデルが存在しない点が大きな制限になっていると考える。

申請者は冠動脈疾患において、慢性冠症候群患者（安定狭心症）と急性疾患群患者（不安定狭心症, 心筋梗塞）の冠動脈粥腫切除術で切除したプラークをシングルセル RNA シークエンス比較解析を行い、マクロファージの subcluster の違いを捉えることに成功している¹⁾。大動脈弁のシングルセル解析は既に一報論文が出ている²⁾が、繊維化石灰化を含んだ組織をシングルセル化することが非常に難しく、マクロファージは数%しか検出されておらず、その多様性についての評価ができなかった。その欠点を補って、免疫細胞にフォーカスを当てたシングルセル解析を行うことでマクロファ

ージの多様性を捉え、治療標的を見出したい。大動脈弁石灰化の病態にマクロファージなどの免疫細胞が関与していることが報告されつつあるが、その詳細なメカニズムについては不明であるため、大動脈弁に存在する常在性マクロファージ、石灰化を誘導するようなマクロファージなどの存在を捉え、また平滑筋や弁の支持組織がどのように変化しているのかをシングルセルレベルで捉えることで、治療標的を見出したい。

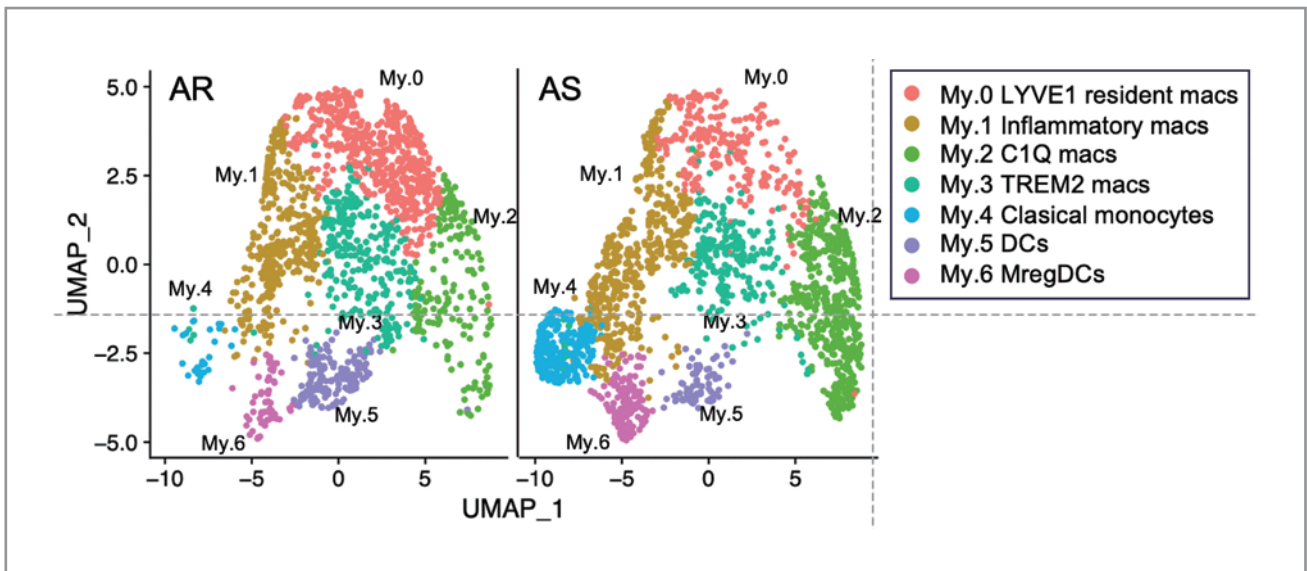
【方法、結果】

1. 組織学的な解析

弁置換術の適応となった、ヒト大動脈弁狭窄症患者の大動脈弁9例とコントロールとして大動脈弁閉鎖不全症の大動脈弁4例を組織学的に比較した。大動脈弁狭窄症では明らかな弁肥厚、石灰化を認め、石灰化の周囲にはCD68陽性のマクロファージの集積を認めた。一方、大動脈弁閉鎖不全症の大動脈弁サンプルでは、CD68陽性のマクロファージがまばらに認められ、その分布に大きな違いが認められた。

2. 大動脈弁狭窄症の病変部のシングルセル解析

大動脈弁サンプルをコラゲナーゼ処理し、CD45を sorting を行い、全免疫細胞のシングルセル解析を行った。大動脈弁狭窄症と大動脈弁閉鎖不全症において、遺伝子発現に差があるのかを解析した。一番多く認められたのはT細胞で、その次にMyeloid細胞がくるという順番であった。Myeloid細胞をさらに解像度を上げてUMAPを描くと、図に示すように、マクロファージの細胞集団はMy.0 LYVE1 resident macs, My.1



Inflammatory macs, My.2 C1Q resident like macs, My.3 TREM2 macs, My.4 Classical monocytes, My.5 DCs, My.6 MregDCs と 7 つの細胞集団に分けることができた。興味深いことに AS では、My.0 LYVE1 resident macs が減少し、逆に My.2 C1Q resident like macs, My.4 Classical monocytes が増加するという特徴を得ることができた。Monocyte の浸潤は急性冠症候群でも認めた所見であり、動脈硬化性疾患の病態に深く関わっていると考える。UMAP 上にて Myeloid 系細胞を取り出して、その遺伝子発現に差があるのかを単球の浸潤が明らかに増えていること、レジデントタイプのマクロファージが減っていることが分かった。

大動脈弁のレジデントマクロファージの特徴としては、貪食に関与するスカベンジャーレセプターを有しており、大動脈弁狭窄症では、その働きが落ちていることが病態に関与すると考えられる。また、大動脈弁狭窄症では、単球や炎症性マクロファージにおいて、NFkB, TNF, IL1B の発現が上昇していることが分かった。

間葉系細胞への影響としては、シングルセル FLEX RNA 解析を行うと、マクロファージの割合が増え、間葉系細胞の Valvular interstitial cells (VICs) の割合が減少することが分かった。また、バルク RNA シークエンス解析では石灰化に関与する pathway が活性化していることが判明した。

3. マウスへの介入試験

LDL 受容体欠損マウスに wire injury を加える大動脈弁狭窄症モデルを用いて TNF 阻害薬を投与すると石灰化を抑制する効果があることを証明した。

【結論】

シングルセル RNA 解析から、AS 症例では AR 症例と比べ、スカベンジャー機能を有するレジデントマクロファージの割合が減少する一方、単球が多く浸潤していることが分かった。また NK 細胞の集積を認めた。病理学的所見からは、AS 症例の石灰化周囲にマクロファージの集積が見られ、マクロファージ機能への介入は、大動脈弁狭窄症に対する今後の新たな治療ターゲットになりうる。

【謝辞】

本研究において、貴重な手術サンプルを頂きました、神戸大学医学部心臓血管外科・岡田健次先生、高橋宏

明先生、山中勝弘先生、井上大志先生、長命俊也先生、そして、ご指導頂いた、神戸大学医学部循環器内科・平田健一先生、神戸大学イノベーション研究科・山下智也先生に感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) Emoto T et al. Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Distinct Immune Landscape of Myeloid Cells in Coronary Culprit Plaques Causing Acute Coronary Syndrome. *Circulation*.145:1434-1436. 2022.
- 2) Xu K et al. Cell-Type Transcriptome Atlas of Human Aortic Valves Reveal Cell Heterogeneity and Endothelial to Mesenchymal Transition Involved in Calcific Aortic Valve Disease. *ATVB*.40:2910-2921. 2020.

統合オミクス解析による心不全の遺伝的基盤解明と精密医療の実現

円山信之

(理化学研究所 生命医科学研究センター 循環器ゲノミクス・インフォマティクス研究チーム)

【目的】

心不全患者は増加しており、治療法の発展にも関わらず、その予後は不良であるため、病態解明は喫緊の課題である。過去の心不全ゲノムワイド関連解析 (GWAS) では同定された疾患感受性座位はわずか 47 に留まった¹⁾。これは同じ心血管病である冠動脈疾患や心房細動に比較するとはるかに少ない数値である。これは心不全があらゆる心血管病の終末像のため不均質な表現型であることが一つの原因と考えられる。近年では Heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) や Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) の GWAS が行われ、心不全 GWAS のみでは同定されてこなかった疾患感受性座位も同定された²⁾。これらのことから、心不全全体並びにサブタイプを解析することは、心不全の遺伝的要因を同定するのに有用と考えられる。しかしこれまでの心不全 GWAS の多くは欧州人で行われており、非欧州人における情報は少ない。更に欧州人で構築されたポリジェニックリスクスコア

(PRS) はそのままでは他民族にはあてはめられないことも知られている。

そこで本研究では、本邦最大となる全心不全、HFrEF, HFpEF, 非虚血性心不全の GWAS を行った後に民族横断的メタ解析を行い、日本人における心不全の遺伝的基盤の解明、ならびに日本人に適した PRS の構築を行うことを目的とした。

【方法】

BioBank Japan プロジェクトの内、第1期・第2期コホートをを用いた。7825名の日本人全ゲノムシーケンズデータを用いて日本人特異的なリファレンスパネルを作成した。Illumina DRAGEN Bio-IT Platform でバリエントコールを行った。DRAGEN を用いてジョイントコール後に、マルチアレル・シングルトン・5%以上のバリエントレベルコールレート・Hardy-Weinberg Equilibrium $P < 1e-6$ のバリエントを除外した。GWAS に用いた症例は Illumina Human OmniExpress Genotyping BeadChip あるいは Illumina HumanOmniExpress/HumanExome BeadChips でタイピングを行った。SNP コールレート $< 99\%$ 、マイナーアレル頻度 < 0.01 、Hardy-Weinberg equilibrium P 値 $< 1e-6$ のバリエントを除外後に、Minimac4 を用いてインピュテーションを行った。GWAS は年齢・年齢²・性別・トップ10 PCA を共変量としてロジスティック回帰分析にて施行した。各心不全タイプに対し、欧州人・アメリカ人・アフリカ人との民族横断的メタ解析、欧州人の要約統計量と心エコーパラメータの要約統計量を用いた多表現型統合解析を施行した。PRS 構築のために、BBJ の症例を (i)PRS 計算用 (ii)PRS の線型結合用 (iii)PRS 性能評価用 (iv) 生存解析用データセットに分割した。PRS 計算用データセットから上記方法と同様にロジスティック回帰分析を行い、得られた要約統計量を用いて PRS を算出した。心不全タイプの要約統計量・心房細動並びに冠動脈疾患の要約統計量・心エコーパラメータの要約統計量を線型結合データセットを用いて、Cross validation を用いて結合し、性能評価データセットで性能評価を行った。最後に生存解析用データセットを用いてコックス回帰分析を行った。

【結果】

16,251名の心不全、4,254名の HFrEF, 7,154名の

HFpEF, 11,122名の非虚血性心不全を解析対象とした。前者3つの表現型に対しては197,577名の対照群が選定され、非虚血性心不全に対しては冠動脈疾患を除外した171,995名の対照群が選定された。GWASの結果18個の疾患感受性座位が同定され、そのうち5つは新規に同定された座位であった。民族横断的メタ解析では58の疾患感受性座位が同定され、そのうち8つは新規に同定された座位であった。次にPRSを構築し、民族間での検討を行ったところ、欧州人より日本人解析で解析対象人数が少ないにもかかわらず、日本人データで構築したPRSはより高い性能を示した(日本人データを元にしたPRS: Pseudo R^2 0.737, 欧州人データを元にしたPRS: Pseudo R^2 0.709)。全心不全データのみならず、HFrEF・HFpEF・非虚血性心不全に加え、心房細動・冠動脈疾患・左室重量の要約統計量をLasso回帰で線型結合を行うことで更にPRSの性能は向上した。最も性能の高いPRSでは、5分位のトップ層はボトム層と比較して約2倍心不全発症リスクが高かった。更に、生存解析用に残しておいた解析データセットを用いてPRSの予後に与える影響を検討した。心不全と診断されていない症例においてPRS高値・中間値・低値に分け解析を行ったところ、心血管死亡・心不全死亡はPRS高値群で有意に高かった。

【考察】

本研究では16,251名の心不全とそのサブタイプを解析し、日本人解析・民族横断的解析・多表現型統合解析を行い合計で20の新規感受性座位を同定した。これにより、日本人特異的な座位と欧州人と共通する座位があることが判明した。心不全PRSはこれまでも作成してこられたが、その臨床的意義について検討されたことはなかった。本研究により、PRSを用いることで、心不全と診断がついていない症例の内、心不全死亡のリスクが高い症例を同定可能であることが証明され、プレジジョンメディシン実現に向けて応用可能性があることが示された。本PRSにおいて特許を取得している³⁾。

【参考資料】

- 1) Levin MG, Tsao NL, Singhal P et al. Genome-wide association and multi-trait analyses characterize the common genetic architecture of

heart failure. Nat Commun. 2022;13:6914.

- 2) Joseph J, Liu C, Hui Q et al. Genetic architecture of heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. Nat Commun. 2022;13:7753.
- 3) 特願 2024-051916 心不全のリスク判定方法及びリスク判定システム

シングルセル分子病理解析によるサルコイドーシスの病態解明

片桐 美香子

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、難病に指定されている。肉芽腫の形成には、マクロファージやT細胞、それらから放出される様々なサイトカインが関与することが報告されているが、その詳細な機序は解明されていない。

心臓サルコイドーシスは、伝導障害、心室性不整脈、心不全を引き起こし、全臓器のサルコイドーシス患者の死亡の約半数を占める。早期診断によるステロイド治療で予後が改善するが、肉芽腫は心臓内に散在的に存在するため、心筋生検による診断陽性率は15～20%と非常に低い。近年では、¹⁸F-FDG-PETやガドリニウム造影MRIが心臓サルコイドーシスの診断や再燃の評価に利用され、臨床所見に基づいて診断することも可能であるが、それでもなお、診断や治療効果の判定に時間を要することも多く見られる。

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

【方法・結果】

心臓サルコイドーシス患者の血液から密度遠心勾配法によりPBMCを単離して、10x Chromium(10x Genomics)を用いてsingle cell RNA/TCR-seq解析を

行った。その結果、これまで病態の中心と考えられていたCD4 T細胞でなく、CD8 T細胞においてNaïve分画の減少とEffector Memory分画の増加といった細胞集団の変化と細胞活性化を認めた。また、CD8 T細胞でTCRレパトアのクローン増殖を認め、CD4 T細胞では同様のクローン増殖は認められなかった。

心臓組織を用いた空間的解析では、3つの異なる手法を用いた。切片上で特定の領域におけるmRNAの発現を網羅的に検出できるGeoMx Whole Transcriptome Atlas (Nanostring)では、コントロール、サルコイドーシス、拡張型心筋症の比較を行ったところ、肉芽腫部分では免疫細胞が複数のサイトカイン、特にケモカインを強く発現しており、肉芽腫以外の部分では代謝に関連する因子が増加していた。この肉芽腫におけるサイトカインの発現増加は、解像度の高い10x Visium CytAssist spatial transcriptomics (10x Genomics)でも観察され、サルコイドーシス組織では多様な免疫細胞が集簇して増加していることが明らかになった。さらに、数十種類以上のタンパクマーカーを一細胞レベルで観察可能なCODEX(co-detection by indexing)/PhenoCycler-Fusion (Akoya Bioscience)を用いたマルチプレックスSpatial解析では、GeoMxや10x Visiumにより導き出されたサイトカインを含む35種類のタンパク発現の検討を行った。核の情報や、細胞膜を染色するコムギ胚芽凝集素(WGA)、細胞表面マーカーを使用してsegmentationを行い、細胞の分布を観察したところ、肉芽腫の中心部にはCD68陽性のマクロファージが存在し、その周囲にCD4 T細胞、外側にCD8 T細胞が認められた。その免疫細胞の半数以上はCD45ROやHLA-DR陽性であり、IFN γ やGZMB陽性のものも認められることから、組織中の免疫細胞は活性化した状態であることが分かった。

【考察】

ヒト心臓組織を用いた詳細な空間的トランスクリプトーム解析により、心臓サルコイドーシスにおける肉芽腫内の免疫細胞の分布と、炎症関連サイトカインの発現を明らかにした。癌や自己免疫疾患など、免疫細胞が関与する疾患においては、組織内の3次リンパ組織と呼ばれる免疫細胞の集積が強力な炎症反応の起点となることが報告されているが、心臓サルコイドーシ

スにおいても、同様の機序により炎症性因子が誘導され、心機能低下や不整脈の発症に寄与している可能性が示唆される。また、PBMC 中の CD8 T 細胞の変化は、組織内サイトカインの増加を反映している可能性があり、拡張型心筋症など非炎症性心筋症との鑑別に有用であると考えられる。

さらに、急性心筋炎を代表とする他の炎症性疾患との比較を通じて、心臓サルコイドーシスにおける免疫細胞を中心とした病態を明らかにし、今後は特定の免疫細胞をターゲットとした新規治療薬の開発につなげたいと考えている。

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

川 岸 裕 幸

(国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部第三室)

【背景】

近年、慢性腎臓病 (CKD) 患者数は増加しており、その治療に係る医療コストの増大が問題となっている。特に、未熟児や低体重出生児は、CKD や高血圧症の発症リスクが高いことが疫学調査により示されており、後腎の形成を制御する因子やシグナル経路を理解することは、CKD の予防・治療法の開発に重要である。生体の循環調節に機能するアンジオテンシン II (Ang II) は、腎臓の発生、発達にも必須である。Ang II は、アンジオテンシン 1 型受容体 (AT₁ 受容体: AT₁R) に結合し、G タンパク質経路と β アレスチン経路を活性化する。しかしながら、後腎形成におけるこれらの経路の特異的な作用に関しては不明な点が多い。これまでに我々は、AT₁R / β アレスチン経路の薬理的抑制が、離乳前マウスにおいて特異的な腎脈管の形成異常を引き起こし、深刻な腎障害を誘導することを見出している。

【目的】

本研究の目的は、離乳前マウスの後腎形成における AT₁R 下流シグナル経路の時期特異的な作用を明らかにすることである。

【方法】

後腎形成が進行する生後 1 日目から 14 日目までの雌雄 BALB/c マウスに、生理食塩水、カンデサルタン (AT₁R 拮抗薬)、TRV027 (β アレスチン経路バイアス AT₁R アゴニスト) を継続投与した。生後 5 日目、10 日目、15 日目に腎組織を回収し、免疫・化学組織染色を行うことで、腎皮質、髄質の形成、および腎脈管の形態に関して評価した。

【結果】

マウス腎病理切片の解析の結果、生後 5 日目の各投与群においては、顕著な腎形態の変化を認められなかった。生後 10 日目では、カンデサルタン投与群で髄質の萎縮が見られた。腎脈管各部のマーカートンパク質による免疫組織染色の結果、上行脚、下行脚の形態不良が疑われた。生後 15 日目では、カンデサルタン投与群で髄質の萎縮や尿細管走行の不整が認められ、上行脚、下行脚の形成不良に加え、近位尿細管やヘンレループに形態異常が確認された。一方、TRV027 投与群では、生理食塩水投与群と比べ、顕著な異常は観察されなかった。

【考察】

マウスを用いた検討により、AngII-AT₁R シグナルが正常な後腎形成に必要であることが示された。AT₁R 下流シグナルの阻害による後腎形成異常は、G タンパク質経路のみを抑制する TRV027 では認められず、G タンパク質と β アレスチン経路の両方を抑制するカンデサルタンで認められたことから、AT₁R / β アレスチン経路が腎脈管の形成・成熟に重要な機能を果たすことが判明した。後腎形成における AT₁R / β アレスチン経路の役割は、生後 2 週間前後で最も顕著であり、作用部位としては、近位尿細管や上行脚、ヘンレループ、下行脚への作用が主であると推測された。今後は、マウスの発達段階における AT₁R / β アレスチン経路の役割に関して、腎臓に加え心臓や肝臓への影響も明らかにしていく。

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

候 聡 志

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座)

【背景と研究目的】

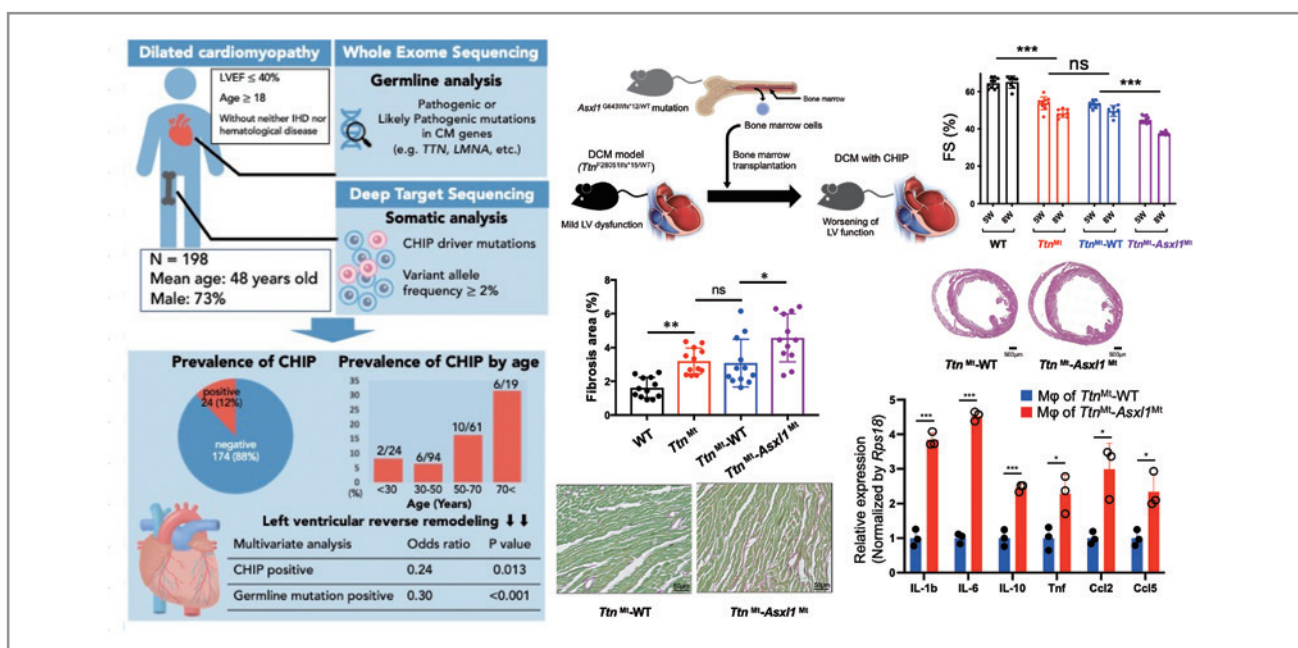
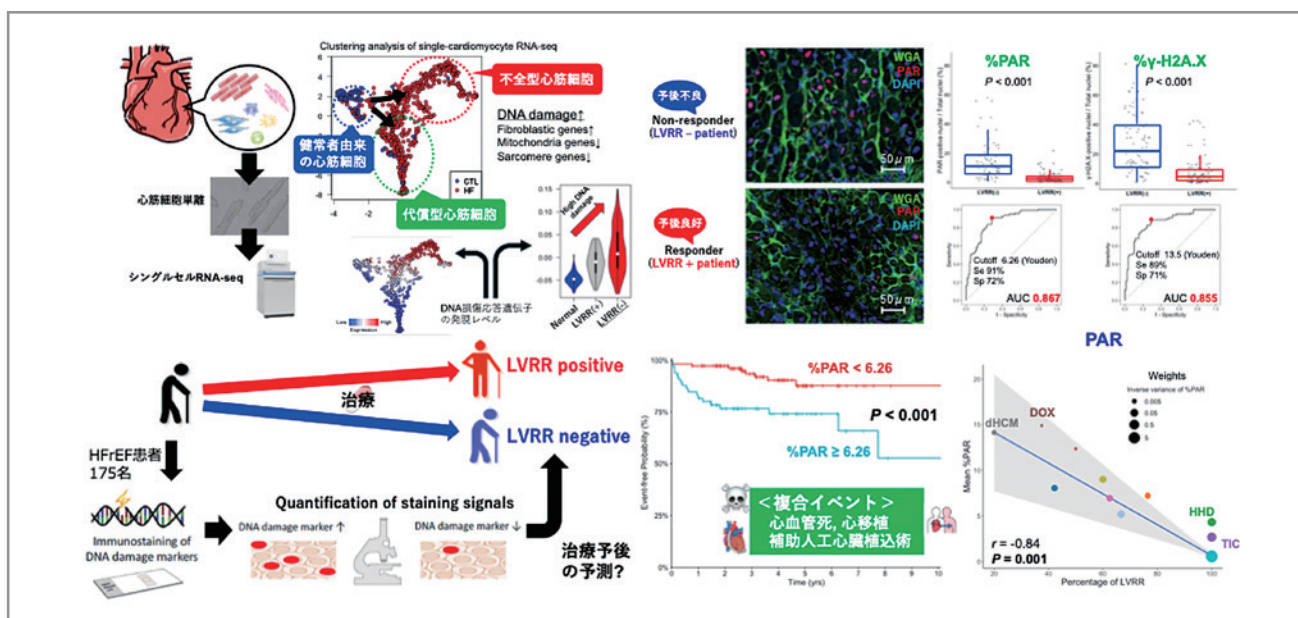
心不全は国内外問わず患者数が増えており、治療予後も悪い。申請者らはこれまで各種心不全モデルマウスや患者検体を用いてシングルセル RNA-seq 解析 (scRNA-seq) やマルチオミクス解析等により、心不全の分子病態機序に迫ってきた。申請者らは本研究助成を受け、

本年は主に以下の二つのトランスレーショナル研究に取り組み、一定の成果を得た。

【方法及び結果】

(1) DNA 損傷定量評価による HFrEF 患者予後予測

これまでの研究を通して圧負荷心不全モデルマウスやヒトの心不全症例の心臓検体を用いて scRNA-seq を行った結果、終末期心不全の心筋細胞では DNA 損傷応答遺伝子の発現レベルが上昇しており、さらにその発現レベルは患者の治療応答性(左室リバーズリモデリング: LVRR) と関連していることが明らかとなった。臨床的には心不全患者の LVRR 予測を行うことは重要であるものの、精度の高い方法はなく、また様々な心不全の背景疾患に関係なく予後予測できる指標もまだ報告さ



れていなかった。そこで、トランスレーショナル研究として、治療導入前に採取された心筋生検検体を用いて DNA 損傷マーカー染色を行い、それを定量評価することで LVRR や予後の予測能を検証する後ろ向き研究を実施した。東京大学医学部附属病院及び奈良県立医科大学病院より原因を問わず 175 名の収縮力の低下した心不全 (HFrEF) 症例の検体を集めて評価した結果、DNA 損傷定量評価が LVRR や予後予測に有用であることを証明すると共に、心不全の原因別に LVRR 達成率と DNA 損傷マーカー染色性の間に線形の逆相関関係があることも明らかにした¹⁾。さらに、DNA 損傷マーカーの陽性率は心筋症関連ゲノム変異とは独立した予後予測マーカーであることも示した²⁾。

(2) クロウン性造血の拡張型心筋症予後に及ぼす影響の解明

クロウン性造血 (CHIP) は単なる前がん性病変のみならず、様々な心血管系疾患の予後不良因子として近年注目されている。申請者らは拡張型心筋症 (DCM) 患者の生殖細胞変異と体細胞変異の同時解析により、DCM 患者では比較的若年期から CHIP 陽性者が存在すること、そして CHIP が心筋症関連遺伝子変異とは独立した予後不良因子であることを明らかにした。また、DCM モデルマウスに対して骨髄移植によって CHIP を導入することで CHIP-DCM モデルマウスを樹立することに成功し、その解析により CHIP が心臓で炎症や線維化を引き起こすことで心機能を増悪させることを明らかにした³⁾。

【本研究助成により報告した主な論文 5 報】

- 1) Dai Z, **Ko T (co-first author)**, et al. Myocardial DNA Damage Predicts Heart Failure Outcome in Various Underlying Diseases. *JACC Heart Fail.*, 12(4): 648-661. (2024)
- 2) Dai Z, **Ko T**, et al. Myocardial DNA Damage Predicts Heart Failure Outcome in Various Underlying Diseases. *Circ Heart Fail.* 2024 in press
- 3) Inoue S, **Ko T (co-first author)**, et al. Association between Clonal Hematopoiesis and Left Ventricular Reverse Remodeling in Non-ischemic Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl*

Sci. Jun 12, 2024. Epublished DOI: 10.1016/j.jacpts.2024.04.010

- 4) **Ko T**, et al. Applying the HARMS₂-AF Risk Score for Japanese population: An analysis of a nationwide epidemiological dataset. *Eur J Prev Cardiol.* 2024 Mar 19: zwae111. Online ahead of print.
- 5) Ito M, Katoh M, **Ko T**, et al. *LMNA* mutation causes cardiomyopathy through impaired vitamin D signaling. *Circulation.* 2024 in press.

糖尿病性腎症の進展における新規 BMP 拮抗分子の機能解析

小林 洋輝

(日本大学医学部 腎臓高血圧内分泌内科)

【序論】

申請者は糖尿病患者を対象に、血漿中蛋白を網羅的に解析し、その中から NBL1 が糖尿病性腎症の進展において重要な役割を担うことを明らかにした。昨年度に引き続き、本研究において、NBL1 が腎臓および心臓の線維化にどのように関与するかについて検討した。

【方法】

ヒト近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) をリコンビナント NBL1 で刺激を行い、腎線維化に関連する蛋白の発現の変化について検討した。

- ① NBL1 ノックアウトマウスに対して、ストレプトゾトシン (STZ) にて糖尿病を誘導し、心臓組織における NBL 1 の役割について検討した。

【結果】

- ① HK-2 細胞にリコンビナント NBL1 (500ng/ml) を添加して 3 日間培養を行うと、コントロールに比べて TGF β 1 や α SMA, fibronectin などの mRNA が上昇することがわかった。また western blotting を行うと、コントロールと比べて mRNA と同様に、TGF β 1 や α SMA, fibronectin の発現が増加した。さらに SMAD2/3 について検討すると、リコンビナント NBL1 との培養は、コントロールと比較して SMAD2/3 のリン酸化を亢進させた。

② 動物実験は、KO (NBL1 : -/-) マウスと WT (NBL1 : +/+) マウスを使用し、マウスの右腎臓を摘除後に、高脂肪餌を負荷し、STZ を腹腔内投与して糖尿病群のマウスを作成した。また STZ を投与せず普通餌で飼育する KO マウスおよび WT マウスをコントロール群として、糖尿病発症後 20 週まで飼育した。実験終了時の WT マウスの血清 NBL1 値は、コントロール群と比較して糖尿病群で有意な上昇が認められた。同様に心臓組織においても WT マウスの NBL1 mRNA は、コントロール群よりも糖尿病群で有意に上昇していた。また fibronectin, CTGF の mRNA は、糖尿病群の WT マウスと比較して KO マウスで有意に減少していた。現在は、さらに蛋白レベルでの解析や組織の障害の程度についての解析を行っている。

【考察】

本研究では、リコンビナント NBL1 が腎臓および心臓の線維化における役割について、in vitro および in vivo の両面から検討を行った。まず、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) を用いた実験では、NBL1 が TGF- β 1 や α SMA, フィブロネクチン (fibronectin) などの線維化関連遺伝子の発現を亢進させることが明らかとなった。この結果は、NBL1 が TGF- β シグナル伝達経路を活性化し、特に SMAD2/3 のリン酸化を通じて、線維化促進遺伝子の転写を誘導する可能性を示唆している。TGF- β は既知の線維化因子であり、SMAD2/3 のリン酸化を介したシグナル伝達は、EMT および線維化の主要な経路とされている。この経路の活性化は、腎臓の線維化や腎機能低下に直接的な影響を与えることが多くの研究で示されており、NBL1 が TGF- β 経路を介して腎線維化を促進する重要な因子である可能性を強く支持する。

さらに、NBL1 ノックアウト (KO) マウスを用いた動物実験においては、糖尿病モデルマウスでの NBL1 の発現が、特に心臓組織で有意に増加することが確認された。これは、糖尿病性心筋症や心臓線維化における NBL1 の寄与を示唆しており、心臓における線維化関連遺伝子 (fibronectin, CTGF) の発現が NBL1 欠損により抑制されることから、NBL1 が心臓線維化の進展に寄与する因子であることが明らかとなった。また、糖尿病群の WT マウスと比較して、KO マウスで

はこれらの遺伝子の発現が有意に減少していたことから、NBL1 は糖尿病誘発性の心臓線維化において中心的な役割を果たしている可能性が高い。

これらの結果は、NBL1 が腎臓および心臓の線維化を促進する新規のメカニズムを提唱するものであり、NBL1 を標的とした治療が糖尿病性腎症および心筋症の進展を抑制する可能性を示している。しかし、NBL1 がどのようにして TGF- β /SMAD 経路に作用するのか、その詳細なメカニズムについてはさらなる研究が必要である。特に、SMAD1/5/9 などの他の SMAD ファミリーメンバーの役割や、NBL1 が直接的にこれらの経路に影響を与えるのか、あるいは他の調節因子を介して間接的に影響を与えるのかを解明することが今後の課題である。また、糖尿病性心筋症における NBL1 の役割を明確にするために、心筋線維化の程度や心機能に対する NBL1 の影響をさらに詳細に解析する必要がある。

心不全における非心筋細胞の役割の全貌解明と多臓器関連の解明に基づく新規治療法開発

小室 仁

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

これまで非心筋細胞の中でも線維化の中心的な役割を担っている線維芽細胞の線維化以外の心不全発症における役割を検討することを目的として研究してきた。既に、心不全特異的な心臓線維芽細胞が存在し、その細胞に高発現する転写因子 c-Myc が心不全の病態に深く関与していることを明らかにしたので、本年度は線維芽細胞に発現する c-Myc がどのようにして心筋細胞の機能を低下させるかを特定し、その中から心不全の病態に関与し治療標的になりうるものを同定する。

【方法】

①まず、心臓線維芽細胞において c-Myc によって転写が活性化される液性因子が心筋細胞に作用して心不全の病態に関与するという仮説を検証した。②次にこれまでのオミクス解析の結果から c-Myc のターゲットとなる液性因子を絞り込み、③候補となった液性因子が

実際に心臓線維芽細胞，心筋細胞間で働き心不全の病態に関与するかを検証した。

【結果】

①仮説の検証

c-Myc を過剰発現した培養心臓線維芽細胞の培養上清を初代培養心筋細胞に添加し心筋細胞の遺伝子発現を確認したところ，コントロールに比べて c-Myc 過剰発現心臓線維芽細胞の培養上清を添加した心筋細胞において Nppa, Nppb, Myh7 などの心不全マーカーの有意な上昇を確認できた。

②液性因子に絞り込み

オミクス解析の結果から c-Myc 陽性心不全特異的心臓線維芽細胞において Cxcl1 の発現が上昇していることを発見した。また，転写因子である c-Myc が Cxcl1 のプロモーター領域に結合すること，Cxcl1 の特異的受容体である Cxcr2 が心筋細胞に発現していることも確認した。

③ Cxcl1 が心不全の病態に関与することの検証

Cxcl1 は培養心筋細胞に添加すると心不全マーカーが上昇し肥大することや収縮能が低下することもわかった。また，心不全マウスに Cxcr2 の中和抗体を投与すると心機能の低下が抑制されることも示した。

【考察】

これまでの研究によって，心臓線維芽細胞が c-Myc-Cxcl1-Cxcr2 経路を介して心筋細胞に直接作用して心不全の病態に関与するという心臓線維芽細胞の線維化以外の役割を世界で初めて解明した。この結果は，いまだに解決できていない難治性心不全の新規治療法の開発に繋がる可能性がある。これまでは心筋細胞をターゲットにしていたので限界があった治療も，線維芽細胞を新たにターゲットにすることや特定の因子が病態に関与していることを示したことで分子標的薬や抗体医薬などこれまで心不全治療に用いられていない手法で治療が可能となることが期待される。

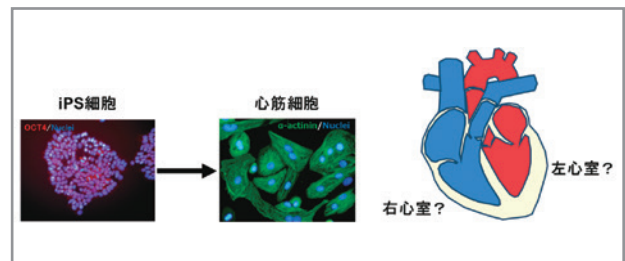
**ヒト iPS 細胞由来心臓予定領域および心筋細胞の作
り分け**

斎藤 幸弘

(岡山大学病院 循環器内科)

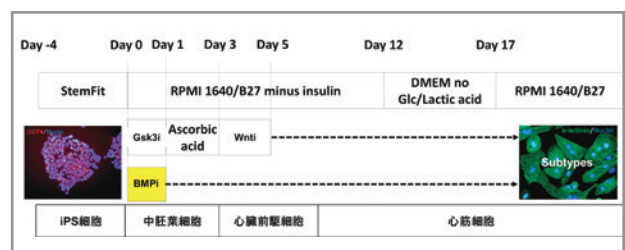
【目的】

心疾患の病態研究，治療方法開発の一つのツールとして，ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が使用されている。これまでに，ヒト iPS 細胞から心筋細胞を誘導するいくつかの方法が確立されており，主に心室筋細胞が誘導されるが，心房筋細胞および洞結節細胞が混在する。また，心室筋細胞は一次心臓領域由来の左室心筋および前方二次心臓領域由来の右室心筋に分類されるが，これまでに病態研究や細胞移植研究に使用されたヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞が，左室心筋あるいは右室心筋のどちらに相当するかについては言及されていない。そこで，ヒト iPS 細胞からそれぞれ異なる心臓予定領域に由来する左室心筋細胞および右室心筋細胞を特異的に誘導する方法を確立する。



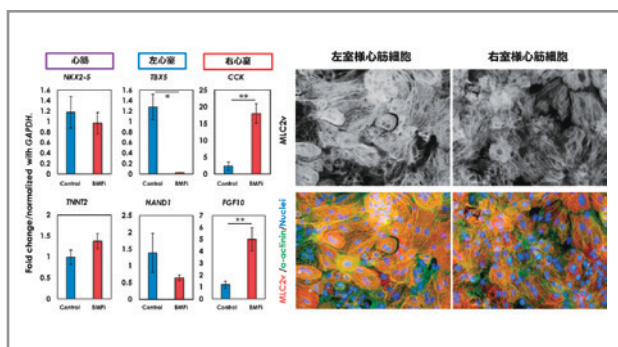
【方法】

GSK3 阻害剤で中胚葉を誘導し，その後 Wnt 阻害剤で心臓前駆細胞および心筋細胞を誘導するプロトコルをベースとして，異なる心臓前駆細胞および心筋細胞を誘導する方法を検討した。



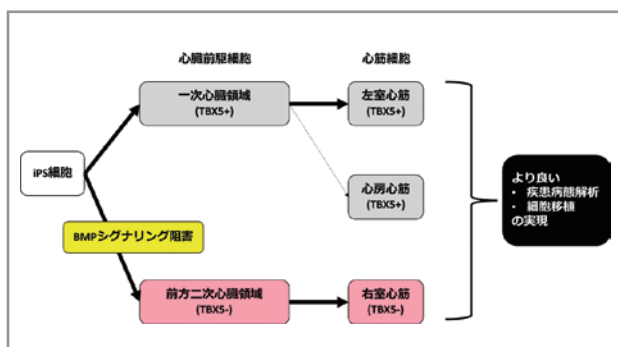
【結果】

ヒト iPS 細胞を通常プロトコルを用いて分化させると、TBX5 陽性一次心臓領域細胞が誘導され、その後 NKX2-5 陽性 TBX5 陽性左室心筋細胞が生じた。一方、分化開始 0 日目にインスリンあるいは BMP シグナリング阻害剤を加えると、TBX5 陰性前方二次心臓領域前駆細胞が誘導され、その後 NKX2-5 陽性 TBX5 陰性右室心筋細胞が生じた。誘導された右室様心筋細胞は左室様心筋細胞と比較して、細胞のサイズが大きい、サルコメア構造が疎、刺激伝導に関連する connexin 43 および Nav1.5 の発現が低い、細胞外マトリックス関連遺伝子である TGFβ1 および collagen の発現が低い、脂肪酸関連代謝遺伝子の発現が高い、ミトコンドリア呼吸が亢進しているといった生体（胎児あるいは成体）で見られる左心室と右心室の違いを反映している結果が得られた。



【考察】

病態研究においては、使用する心筋細胞が左室様なのか右室様なのかをチェックする必要があると思われる。そうすることで実験の再現性が改善することが期待される。また、右室が優位に傷害される不整脈原性右室心筋症、Brugada 症候群などの疾患解析や、不全右室への心筋細胞移植には iPS 細胞由来右室様心筋細胞が有用であることが期待され、現在研究中である。



【謝辞】

本研究の実施にあたってサポートをいただいた公益法人日本応用酵素協会に感謝いたします。

メカニカルストレスを利用した介入による、運動の動脈硬化予防効果の再現とそれに基づく動脈硬化症の新規治療法開発のための基盤構築

崎谷直義

(産業技術総合研究所)

【背景】

動脈硬化症に対する運動の有効性は示されているが、その分子メカニズムには未解明な点が多い。運動動作では、身体局所に変形や内圧変化が生じ、その部の細胞に力学的刺激が加わる。我々はこれまでに、齧歯類動物を用いた実験で「適度な運動」として用いられる中速度トレッドミル走行で前肢の接地時に頭部に伝わる衝撃は約 $1 \times g$ であること、この衝撃を再現する受動的頭部上下動が中速度トレッドミル走行と同様に高血圧を改善し、その効果は、間質液流動で生じる流体せん断力を介したアストロサイトの機能制御によるものであることを明らかにした (Murasé & Sakitani et al., *Nat Biomed Eng* 2023) (図 1)。頭部あるいは脳のみならず、骨格筋においても運動、すなわち筋収縮で生じる間質液流動により細胞に加わる流体せん断力が、炎症抑制を介して筋萎縮を軽減することも見出している (Saitou et al., *Clin Sci* 2018)。間質液は身体の全ての器官・組織に存在しており、「身体運動→器官・組織局所の変形・内圧変化→間質液流動→細胞への流体せん断力」という系による機能制御が、運動の健康増進効果に広く関与している可能性がある。そこで、本研究では、運動による動脈硬化症予防効果は運動動作で生じる力学的刺激による細胞機能制御を介するという仮説を立てた。

【目的】

運動模倣力学的刺激にて運動による動脈硬化症予防効果を再現し、その分子メカニズムを明らかにすることを本研究の目的とする。

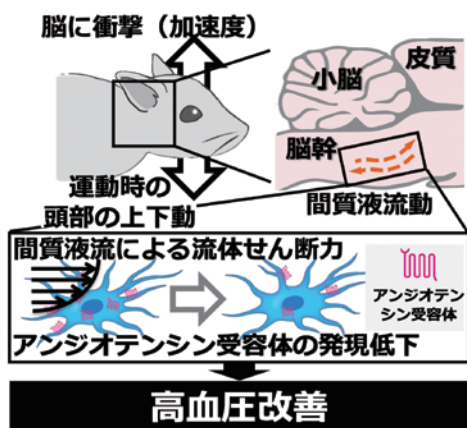


図1. 運動による高血圧改善効果の分子メカニズム

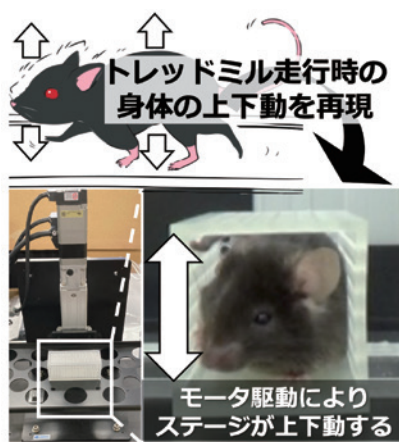


図2. 受動的体上下動装置

身体を圧迫しない程度の保定を行い、無麻酔での介入が可能。

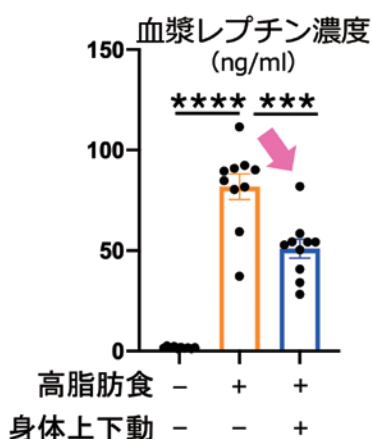


図3. 高脂肪食給餌による血漿レプチン濃度の上昇と、受動的体上下動によるその抑制効果

【方法・結果・考察】

運動の動脈硬化予防効果における力学的刺激の関与を検証するために、中速度トレッドミル走行時の身体

の上下方向の動きとピーク加速度(約 $0.5 \times g$)を再現する受動的体上下動介入(図2)を確立した。高脂肪食給餌マウスに対する、受動的体上下動介入(1日30分、5回/週、12週間)は高レプチン血症を改善した(図3)。運動による動脈硬化予防効果に、レプチンを介した免疫細胞の過剰産生の抑制機構の関与が示されている(Frodermann et al., *Nat Med* 2019)。今後は、レプチンの主たる産生組織である脂肪組織を検討対象に加え、受動的体上下動による動脈硬化予防効果の検証、および、作用点となる組織の同定を行う。

心筋リプログラミングによる革新的心不全治療法の開発

貞廣 威太郎

(慶應義塾大学医学部循環器内科)

【目的】

我々は、心臓線維芽細胞に心筋特異的遺伝子を導入し、体内で直接心筋細胞を誘導して心臓を再生する「心筋直接リプログラミング法」を開発した。本研究では、新規治療が熱望される慢性心不全に対し、心筋リプログラミングによる革新的治療法の確立を目的とする。

【方法】

陳旧性心筋梗塞の慢性心不全マウスを作製し、心筋リプログラミングによる心臓再生を検討する。心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子を発現させるため、薬剤投与により遺伝子発現を制御できる遺伝子改変マウスを作製し、治療効果や分子生物学的機序を検討する。

【結果】

1. 陳旧性心筋梗塞内の心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子を発現させたマウス心臓の遺伝子発現変化を解析したところ、心機能増悪を惹起する炎症関連遺伝子の発現低下が確認された。
2. 炎症改善のメカニズムを明らかにするため、対照群とリプログラミング群の心臓における非心筋細胞のシングルセル解析を行った。リガンド-受容体遺伝子の発現パターンの解析の結果、心筋梗塞後の心機能低下に関与する多くの炎症細胞と線維芽細胞間の

細胞間相互作用の存在が示唆された。

3. 対照群とリプログラミング群の心臓組織内の炎症細胞を FACS によって定量評価したところ、リプログラミングによって、特に虚血による障害が発生していない健常領域において、心機能低下と関連する CCR2⁺ マクロファージの浸潤が抑制されていることが明らかとなった。この抗炎症作用を心筋再生・抗線維化に続く、心筋リプログラミングによる第3の心機能改善作用として、BBRC 誌に報告した¹⁾。

【考察】

心筋リプログラミングが心筋再生・抗線維化・炎症を介した、心臓再生医療である可能性がある。

【文献】

1) Abe Y*, Tani H*, **Sadahiro T***, Yamada Y, Akiyama T, Nakano K, Honda S, Ko S, Anzai A, Ieda M: Cardiac reprogramming reduces inflammatory macrophages and improves cardiac function in chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 690, 149272 (2024). *Equal contributors.

「加齢関連線維性疾患」概念の確立及び治療法開発

蕭 詠 庭

(国立循環器病研究センター 心血管老化制御部)

【目的】

本研究の目的は、加齢関連線維性疾患 (A-FiD) に対する疾患横断的な治療法を開発することであり、AFP を標的とした治療法を開発を目指した。特に MASH と HFpEF の病態に着目し、AFP 抑制による新規治療法の開発に挑戦した。HFpEF の分子機序は未だ未解明な点が多いが、心臓の線維化による拡張不全が主たる病態である。MASH は肝臓の線維化が主たる病態の一つである。HFpEF や MASH の治療法は極めて限定され新規治療法の開発は急務である (Harrison *et al*, 2023)。そこで、本研究課題において MASH, HFpEF における AFP の病的意義を明らかにし、同分子を標的とした新規治療法を開発を目指した。

【方法】

1. A-FiD としての HFpEF, MASH 疾患概念の確立とマウスモデルを用いた検討

研究開始時点までの予備的検討の結果、AFP は、1) ヒト老化個体、2) 高度左室拡張不全症例、3) 肥満モデルマウスの血漿で上昇することが明らかになっていった。AFP 全身ノックアウト (KO) マウス、褐色脂肪特異的 KO マウス (AFP は褐色脂肪で主に産生される) を用いて検討を行った。

2. AFP を標的とした MASH, HFpEF 治療法の開発

様々な遺伝子改変動物を用いた検討の結果、MASH における、AFP の病的意義が明らかになりつつあった。AFP ペプチドワクチンの系に加え、中和抗体を用いて本分泌分子を抑制する系の確立を目指した。AFP を抑制するスクリーニングの系の確立も目指した。

3. AFP 制御メカニズムの検討

バイオインフォマティクスの手法等を用いた検討の結果、AFP のプロモーター領域に転写因子である cFOS が結合し、発現を生に制御する可能性が示唆されていた。高脂肪食負荷時には褐色脂肪の cFOS の発現が上昇することがわかった。そこで cFOS を発現するアデノ随伴ウイルスを作成し、代謝ストレス→cFOS の核への移行→AFP 発現レベルの上昇、という経路を検討することとした。

【結果】

A-FiD を加齢と共に罹患率が増加し組織の線維化が中心的病態を形成する疾患と新しく定義した。様々な検討の結果、AFP は機能不全に陥った褐色脂肪から分泌されていることがわかった。全身 AFP KO マウス、褐色脂肪特異的 AFP KO マウスに高脂肪食を負荷したところ、心臓の線維化が抑制され左室拡張能が改善した。肝臓の線維化も抑制されることがわかった。また、中神らとの共同研究で AFP に対するペプチドワクチンを作成し肥満モデルマウスに投与したところ、心臓の線維化が AFP ペプチドワクチン投与により抑制され、拡張能が改善することもわかった。同様に肝臓の線維化も抑制された。肥満ストレスが加わると、褐色脂肪細胞で過剰な脂肪酸流入→cFOS→AFP という経路で AFP の発現が上昇することアデノ随伴ウイルスを用いた検討からわかった。

【考察】

加齢に伴い AFP の発現が褐色脂肪で上昇するが、その詳細な機序を現在検討中である。これらの検討を踏まえ、組織特異的に AFP の発現を強発現できるマウスを開発したいと考え、ヒト AFP 過剰発現マウスを開発し現在コロニーを増やしているところである。また、AFP に対する中和抗体の開発を行うこととし、現在シーズ抗体の探索を行なっているところである。これらの疾患を A-FiD という概念で包括的に定義し、AFP を標的とした次世代の治療法開発に引き続き挑んでいきたい。

【文献】

Harrison SA, Allen AM, Dubourg J, Noureddin M, Alkhouri N: Challenges and opportunities in NASH drug development. *Nat Med* 29: 562-573 (2023).

Osteopontin 産生マクロファージによる肺線維化機序の解明

白川 公亮

(慶應義塾大学医学部循環器内科)

【目的】

生活習慣病に関連する免疫学的病態において、炎症性タンパク質 Osteopontin(OPN) は疾患臓器特異的な細胞に発現し、線維化や炎症を惹起する重要な病態増悪因子である。近年、左室駆出率が維持された心不全(HFpEF)は循環器疾患の重要な治療標的となっているが、左室駆出率が低下した心不全と同様に予後不良であるのにも関わらず有効な治療法のエビデンスが蓄積していない。これには HFpEF の複雑な病態が関与しており、心肺連関は息切れや右心不全などの病態と直結する重要な治療標的である。肺の線維化は肺高血圧を惹起し右心不全を増悪させる HFpEF の増悪因子となり、肺線維化にも OPN が重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では肺線維化に関連する OPN 産生細胞の同定とその制御方法を解明し、肺線維化を抑制する治療標的の解明を目的とした。

【方法】

Spp1-EGFP knock-in reporter マウスの Bleomycin

による肺線維症モデルを作成した。Flow cytometry により Bleomycin 投与後からの Spp1-EGFP 発現の時系列を解析し、病理学的な Spp1-EGFP 細胞の局在を確認した。Spp1-EGFP 陽性細胞を同定・回収し、RNA-seq, scRNA-seq, 質量分析によるマルチオミクス解析を実施した。また、Spp1-EGFP 陽性細胞と肺線維芽細胞初代培養を共培養し、肺線維芽細胞の遺伝子発現解析を実施した。また、ヒト肺線維症患者の scRNA-seq 解析を解析し、肺における Spp1 発現細胞を同定し、CellChatDB によりヒト肺における Spp1 signaling を解明する。

【結果】

①線維化肺の Spp1 発現細胞はマクロファージであった

Bleomycin 誘発 Spp1-EGFP knock-in reporter マウス肺線維症モデルの肺組織細胞の Flow cytometry 解析では Spp1 転写活性上昇細胞は間質マクロファージであり、Bleomycin 投与後 3 日目から Spp1-EGFP の発現が上昇し始め、7 日目をピークに 14 日目以降も Spp1 の転写活性が維持されていた(図 1)。

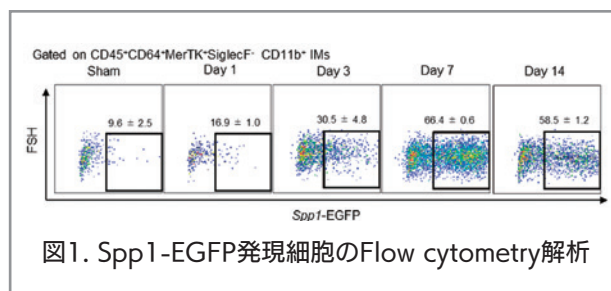


図1. Spp1-EGFP発現細胞のFlow cytometry解析

このマウスの病理学的評価では高度に肥厚線維化した肺組織に浸潤する EGFP 陽性マクロファージの集積を認めた(図 2)。

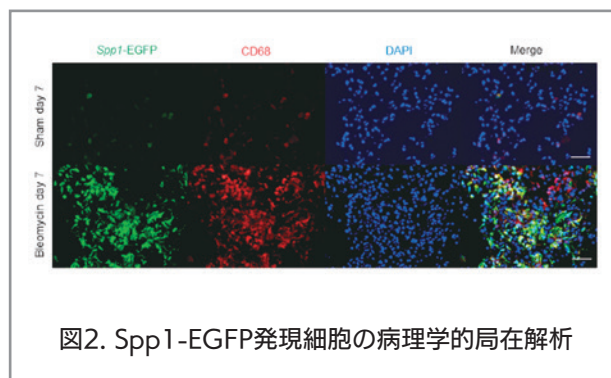


図2. Spp1-EGFP発現細胞の病理学的局在解析

ヒト肺線維症患者肺組織の single cell(sc)RNA-seq 解析では Spp1 発現細胞は唯一マクロファージであり、病

理学的にも線維化部位に一致した OPN を発現するマクロファージを認めた (図 3)。

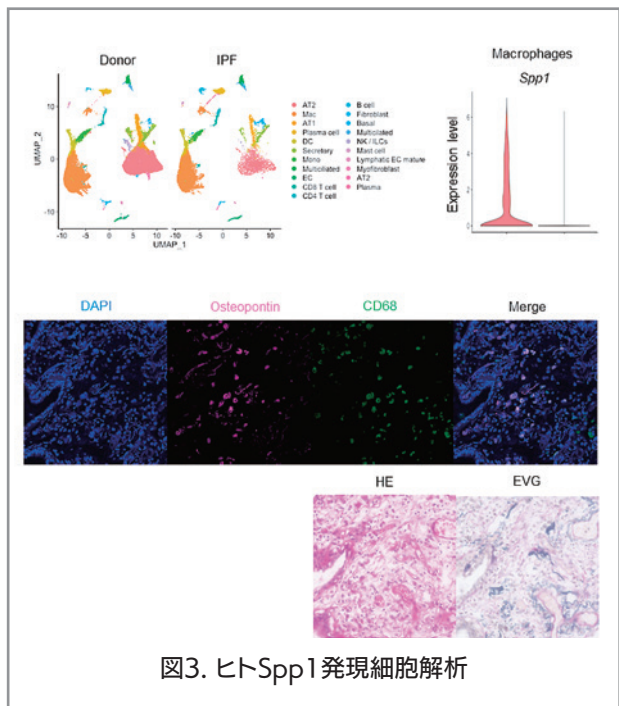


図3. ヒトSpp1発現細胞解析

②線維化肺のオステオポンチン産生マクロファージは線維芽細胞と強力に細胞間相互作用していた

ヒト scRNA-seq の CellChat による細胞間相互作用解析を実施し, RankNet 解析では健常肺に比して肺線維症患者では Spp1 signaling が最も活性化しており, Spp1 を発現するマクロファージは線維芽細胞と最も強力に相互作用を来していた (図 4)。

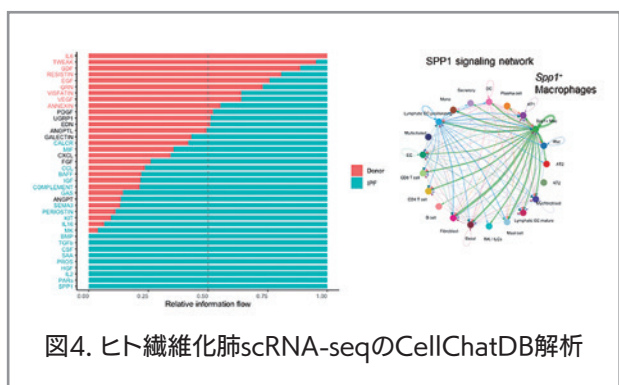


図4. ヒト線維化肺scRNA-seqのCellChatDB解析

実際, Spp1-EGFP knock-in reporter マウス肺線維化肺から FACS で sort した EGFP 陽性マクロファージと線維芽細胞の primary culture の共培養による線維芽細胞の活性化を認めた。また, Spp1 knock-out マウスを骨髄照射し, Spp1 wild-type マウスの骨髄移植をした群では肺線維化が惹起されたが, Spp1 knock-out マウス

では線維化が軽減した (図 5)。以上の結果は, マクロファージの Spp1 は肺線維化に重要な役割を果たすことが示唆された。

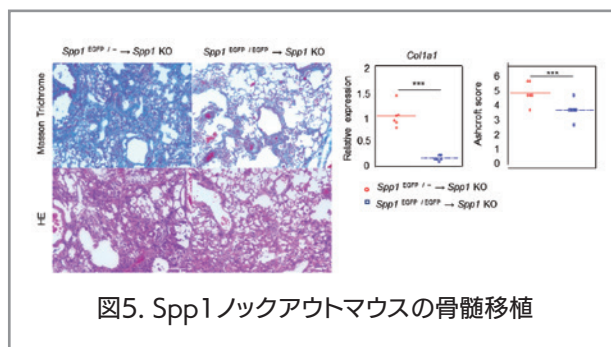


図5. Spp1 ノックアウトマウスの骨髄移植

③オステオポンチン産生マクロファージのマルチオミクス解析

Bleomycin 誘発 Spp1-EGFP knock-in reporter マウス線維化肺の EGFP 陽性マクロファージの RNA-seq, 質量分析, scRNA-seq によるマルチオミクス解析とヒト線維化肺の scRNA-seq データを統合して肺線維化及び炎症に重要ないくつかの遺伝子 / 蛋白を同定した (図 6)。

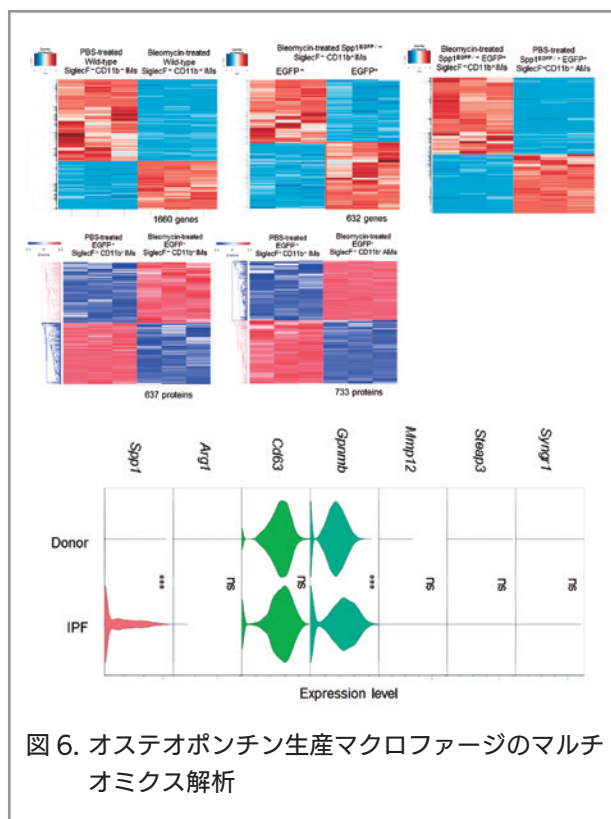


図 6. オステオポンチン産生マクロファージのマルチオミクス解析

【考察】

本研究により, 線維化肺の OPN 産生細胞はマクロファージであり, OPN 産生細胞は肺線維芽細胞と強力

に相互作用することによって肺線維化を惹起している可能性が示唆された。また、マルチオミクス解析により同定されたオステオポンチン産生マクロファージを制御するいくつかの因子を同定し、それらに介入することで肺線維化を制御出来る可能性が示唆された。

興奮転写連関を介した血管リモデリング形成機構の 解明

鈴木 良 明

(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

【背景・目的】

動脈に対するストレス負荷は、マクロファージ (MΦ) の集積と炎症により、血管平滑筋細胞 (VSMC) の脱分化・増殖を促して血管リモデリングを誘発する。我々は、VSMC の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇が、興奮-転写連関 (E-T coupling) を介して、MΦ の集積と VSMC の脱分化・増殖を促して血管リモデリングを発生させることを見出した (Suzuki ら *PNAS*, 2022)。脱分化した増殖型 VSMC (pVSMC) では、 Ca^{2+} シグナルは増殖や遊走を促進し、病変が成熟する。しかし、pVSMC における E-T coupling の存在やその役割については不明な点が多い。そこで本研究では、血管リモデリングの発生・成熟に対する E-T coupling の役割の解明と、それに基づく血管リモデリング疾患治療薬の開発を目的とした。

【方法】

ラットあるいはマウスの大動脈より VSMC を単離して、初代培養細胞を調整した。蛍光イメージングには、全反射蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、超解像度顕微鏡 (N-STORM) を用いた。平滑筋特異に Cre を発現する SM22-Cre マウスと細胞周期インジケーター Fucci2a を Cre 依存的に発現する Fucci2aR を交配して、平滑筋特異的に Fucci2a を発現するマウスを作製した。

【結果】

細胞膜-筋小胞体間の結合膜構造を特異的に染色する蛍光標識体 (Mapper) を用いた解析から、Junctophilin (JP)-2 が pVSMC の結合膜構造形成を促進することが明らかになった。近接ライゲーションアッセイ (PLA)

法や N-STORM を用いた解析から、その領域に Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) チャネル - AKAP5 - カルシニューリン (CaN) から成る Ca^{2+} マイクロドメインが形成されることを見出した。JP2 は ATP や PDGF-BB による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を促進した。BrdU アッセイや Fucci2a を用いた解析から、JP2 は CaN/NFAT 系介して細胞増殖を促進することが明らかになった。

【考察】

JP2 は CRAC チャネルを起点とした E-T coupling によりリモデリングの成熟に関わると考えられた。現在、JP2 の平滑筋特異的 KO マウスを作製中であり、JP2 の欠損により血管リモデリング形成が抑制されるか検証する予定である。

In vivo perturb-seq 技術を用いた心不全における 心筋リプログラミング治療候補因子の網羅的解析

戴 哲 皓

(東京大学大学院医学系研究科循環器内科学)

【背景・目的】

心不全の進展過程において心筋細胞にける保護的因子が存在し、それらの因子の導入による心筋リプログラミング治療が期待されている。しかし、古典的に個々の候補に対する遺伝子改変動物を作成することは効率が低いため、網羅的且つハイスループットな遺伝子機能解析法の確立が急務である。

【方法・結果】

CRISPR/Cas9 を応用しマウス個体における *in vivo* perturb-seq が開発され、神経系や腫瘍領域の研究に応用した報告があるが、心臓における応用は皆無である。心不全をレスキューする心筋リプログラミング治療候補をスクリーニングする目的に、心筋特異的に特定遺伝子の発現を上昇させるモデル動物の作製も重要であり、申請者は世界初の TET1-XTEN80-dCas9 を心筋細胞特異的に発現してターゲット遺伝子の脱メチル化を可能とする遺伝子改変マウス (以下、CRISPRon マウス) の樹立に成功した。転写活性化因子 Rta と連結した gRNA を搭載した MyoAAV2A ウイルスライブラリーを作製し投与することで、個々の心筋細胞に異な

る gRNA が搭載された MyoAAV2A が感染し、心筋細胞ごとに異なった遺伝子の発現が活性化されるシステムを構築している。初期検証実験として、心筋細胞特異的 CRISPRon マウスに、ターゲット遺伝子に対する gRNA を搭載した MyoAAV2A 投与で、ターゲット遺伝子の発現活性化が得られることは検証された。

【考察】

本研究は堅実に進行しており、今後心筋細胞特異的 CRISPRon マウスに 30 種類の候補遺伝子に対する gRNA 搭載 MyoAAV2A ライブラリーを投与したのち、心筋細胞を回収し、シングルセル解析により心筋細胞ごとのトランスクリプトームとエピゲノムの変化を解析し、心筋細胞の状態（不全心筋、代償心筋）を分類して明らかにする。同時に識別バーコードの判読により対象細胞で発現活性化された遺伝子の種類の情報が得られ、これらの情報を統合することで網羅的かつ効率的に心筋細胞傷害をレスキューする遺伝子・シグナル経路を同定する。同定された因子に対して、改めて遺伝子過剰発現を個別に行った上で、心不全モデルを作製し、心機能の変化を追跡するとともに、組織学的な変化やシングルセル解析による遺伝子発現制御の変化を評価し、さらに空間的遺伝子発現解析を用いて細胞間相互作用を含め、シグナル経路を検証する。機能が確認された因子に対して、心不全の心筋リプログラミング治療の開発を進めていく。

不全心筋におけるスクシニル-CoA に基づくエネルギー代謝機能障害

高田 真吾

(北翔大学生涯スポーツ学部スポーツ教育学科)

【目的】

心不全 (HF) は死亡や入院を繰り返す主な原因であり、しばしば心臓ミトコンドリア機能障害を伴う¹⁾。しかし、その基礎となるメカニズムはほとんど解明されていない。ここでは、冠動脈結紮により心筋梗塞 (MI) を誘発したマウスモデルを用いて、慢性心不全におけるミトコンドリア機能障害の代謝的基盤を明らかにする。

【方法・結果】

冠動脈結紮の 4 週間後、心筋梗塞マウスは心筋のスクシニル-CoA レベルの有意な減少を示し、この減少はミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) 能力を低下させた。心筋梗塞マウスでは、ヘム合成とケト分解、およびこれらの現象でスクシニル-CoA を消費するいくつかの酵素のタンパク質レベルが増加し、 α -ケトグルタル酸とグルタミン酸からスクシニル-CoA を合成する酵素も増加した。さらに、スクシニル-CoA 合成酵素の ADP 特異的サブユニットは減少し、GDP 特異的サブユニットはほとんど変化しなかった。スクシニル-CoA からヘム合成への経路の中間体である 5-アミノレブリン酸の投与は、スクシニル-CoA レベルと OXPHOS 能力を著しく回復させ、心筋梗塞マウスの HF 進行を予防した。以前の報告では、HF 患者の心筋におけるスクシニル CoA 代謝異常の存在も示唆されていた。

【考察】

我々の結果は、ミトコンドリアエネルギー産生系のさまざまな代謝におけるスクシニル-CoA の使用量の変化が慢性 HF に特徴的であることを明らかにした²⁾。同様の変化は、激しい運動時など健康な状態でも起こることが知られているが、慢性 HF ではしばしば不可逆的に起こり、スクシニル-CoA の減少につながる可能性がある。従って、スクシニル-CoA の消費を補う栄養学的介入は、HF の治療戦略として有望であると期待される。

【文献】

- 1) Maekawa S, **Takada S***, Nambu H, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueyanagi Y, Kang D, Sabe H, Kinugawa S. Linoleic acid improves assembly of the CII subunit and CIII2/CIV complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system in heart failure. *Cell Commun Signal*. 2019;17:128. doi: 10.1186/s12964-019-0445-0
- 2) **Takada S***, Maekawa S, Furihata T, Kakutani N, Setoyama D, Ueda K, Nambu H, Hagiwara H, Handa H, Fumoto Y, et al. Succinyl-CoA-based energy metabolism dysfunction in

chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119:e2203628119. doi: 10.1073/pnas.2203628119

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

田 中 愛

(信州大学)

【目的】

アドレノメデュリン (AM) は血管拡張ペプチドとして同定されたが、それ以外にも様々な作用を有することが明らかとなっている。昨年度までに私は、AM とその受容体活性調節タンパク RAMP2 が、血管の恒常性維持に必須であること、誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2^{-/-}) では、リンパ球を免疫応答の場であるリンパ節へと移行させる特殊な血管：高内皮細静脈 (HEV) の内皮細胞が形態異常を認めることを報告した。本年度は、HEV の恒常性維持に RAMP2 が関与すると考え、Control と DI-E-RAMP2^{-/-} のリンパ節から HEV を単離し、シングルセル RNA-seq を試みた。

【結果】

解析の結果、単離できた細胞は、内皮細胞マーカーである CD31 陽性かつリンパ球マーカーである CD45 陽性の細胞集団であった。そこで、転移したリンパ節内の染色を行うと、DI-E-RAMP2^{-/-} では Control と比較して、CD31/CD45 共陽性の細胞が血管内に存在した。DI-E-RAMP2^{-/-} における癌組織内の血管の内皮細胞は、内皮間葉転換 (EndMT) を生じ、間葉系マーカーである FSP-1 陽性となることを過去に報告した (*Cardiovasc Res*. 2016)。しかしながら、EndMT を起こした内皮細胞の一部では、本来の内皮細胞のマーカーである VE-カドヘリンの発現も残存していた。ごく最近、種々の疾患において、EndMT に至る中間段階、すなわち Partial EndMT 状態の血管が存在することが報告された。EndMT が不可逆的な変化であるのに対し、Partial EndMT は可逆的な変化であり、さらに癌関連線維芽細胞 (CAF) の悪性化の前段階の状態とも考えら

れており、治療介入の余地が考えられる。実際に癌が転移したリンパ節から細胞を単離し、フローサイトメトリーで解析を行うと、CD31/CD45 共陽性の細胞集団が存在することが確認された。現在、それらの細胞集団がどんな細胞なのか、外因性に AM を投与することで可逆的な変化を起こすことが可能なのか検討を進めている。

【考察】

これらの結果から、AM-RAMP2 系は HEV の適切な機能に不可欠であり、HEV の恒常性を維持し、リンパ球の動員に寄与することで、リンパ節転移を抑制する新しい治療法の開発につながる可能性が示された。

**ヒト iPS 由来三次元心組織を用いた心臓病に対する
病態解明と新規治療法の開発**

谷 英 典

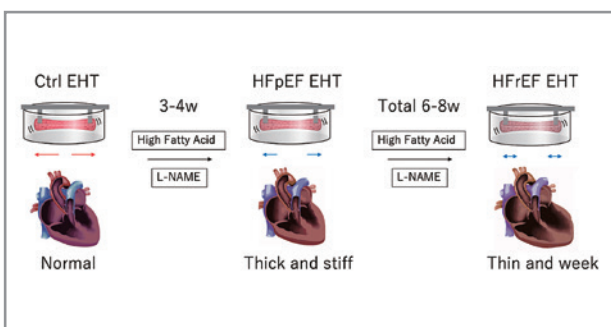
(慶應義塾大学医学部 循環器内科)

【目的】

HFpEF (Heart failure with preserved ejection fraction : HFpEF) は拡張不全が主体であり、病態としては高血圧などの併存疾患により全身性に酸化ストレスや炎症が惹起された結果、血管内皮の障害が起き、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が関与するシグナル伝達経路 (eNOS-NO-cGMP-PKG 経路) が障害されることに起因するというのが定説である。動物においては 高脂肪食と NOS 阻害薬の投与 によって再現性の高いモデルが報告されているが (*Nature* 2019), HFpEF の機序の解明や治療薬の開発が急務である中、ヒトのモデルは確立していない。我々はこれまでにヒト iPS 由来心筋細胞を用いて創薬や疾患モデルに応用すべく、ブタ心臓コラーゲンを用いた Engineered Heart Tissue (EHT) と呼ばれる三次元心組織の開発を進め、従来法よりも収縮・拡張力の強い成熟した心組織を作ること成功した (Tani et al., *Biomaterials* 2023)。本研究では、こうした 成熟度の高いヒト iPS 由来心組織において高脂肪酸と NOS 阻害薬の添加培地下で HFpEF モデルのヒト心組織を作製し、心不全の新規病態機序の解明や治療薬の発見に応用することを目的とする。

【方法・結果】

本実験系では非侵襲的に EHT の移動距離や速度を測り、組織の収縮力と収縮時間と拡張時間を見ることで拡張能も評価が可能である。これまでに心組織の構成成分の条件検討を重ね、我々は高脂肪酸と NOS 阻害薬の容量依存的に心組織の拡張障害が出現することを確認した。さらに、培養初期には収縮力の有意な変化を認めないものの、培養を継続することで時間依存的に、容量依存的に収縮力低下も進行することを確認した。これらの結果、本実験系においては初期には HFpEF モデルとして、後期には HFrEF モデルとして使用することが可能と考えられた(下図)。免疫染色や電顕による観察においては、組織の線維化や、心不全変化に伴うミトコンドリアやサルコメア構造の異常を認めた。既知の拡張障害の pathway が本実験系においても再現されることも遺伝子、タンパクレベルで確認した。拡張障害の原因としては、タイチンの isoform が N2BA より N2B 優位になり、コラーゲンが type1 優位になることで組織の stiffness が上昇することが関与すると考えられる。現在は、こうした表現型を改善させる薬剤のスクリーニングを進めている。本研究は培養皿上での再現性の高い心筋の収縮・拡張能障害に関する研究のスタンダードとなり、新たな心不全機序、治療法の開発に応用されることが期待される。



ヘマトキシリン/エオシン染色心筋組織から心アミロイドーシスを診断するための深層学習モデルの開発

遠山 岳 詩

(マサチューセッツ工科大学)

【背景】

近年ではピロリン酸シンチグラフィや心臓磁気共鳴画像法などの侵襲性の低い画像診断法が、心アミロイドーシスの診断として確立されているが、依然として心筋生検での組織へのアミロイド沈着は、心アミロイドーシスの診断における決定的な特徴の一つである。

【目的】

この研究は、ヘマトキシリン/エオシン (HE) で染色された心筋組織からの心アミロイドーシスの診断を支援する深層学習モデルを開発することを目的とした。

【方法】

本研究は、単一施設の後ろ向き観察研究であり、2008年から2022年の間に心筋生検を受けた166人の患者が登録され、そのうち76人は心アミロイドーシスと診断され、90人は他の診断とされた。各心筋標本から切り取られたすべての小さなパッチについて、心アミロイドーシスの確率を出力するために、深層学習モデルを開発した。アミロイドーシスの診断は病理診断はDylon染色、またはCongo-red染色による診断とした。

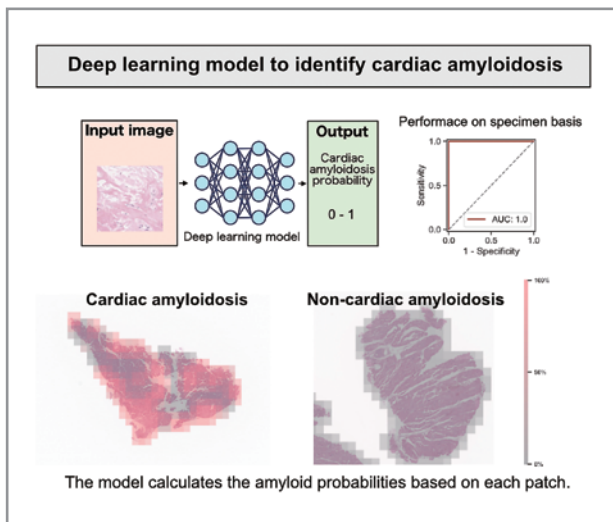
【結果】

開発したモデルは、特殊染色によってアミロイド沈着が特定されたパッチ内の領域を非常に疑わしいものとして認識し、評価データセット内のパッチを0.965の曲線下面積で識別することが可能であった。心アミロイドーシスの診断基準が、すべてのパッチで心アミロイドーシスの確率中央値 >50%)と定義とした場合、このモデルは、標本単位で心アミロイドーシスの患者とそうでない患者を完全に区別することが可能であった。

【結論】

HE染色された心筋組織から心アミロイドーシスを正確に診断するために、深層学習モデルが開発した。本モデルは、心アミロイドーシスの見逃しのリスクを効果的に最小化し、臨床診療における組織学的診断の有

用性を最大化する可能性がある。本研究は単施設研究であり、今後、外的妥当性を検討するための多施設研究が必要である。



核内受容体 RXR に関連した肺高血圧血管リモデリングの機序解明とそれに関連した治療薬の開発

沼田 玄理

(東京大学アイソトープ総合センター)

【背景・目的】

肺高血圧症 (PH) は肺血管リモデリングを特徴とする難治性疾患であり、種々の肺血管拡張薬によって予後改善が得られてきたが、現行使用されている血管拡張薬に反応しない患者や血管拡張薬による合併症のために使用困難な患者も存在する。ゆえに PH の新規メカニズムの解明及びそれに基づいた肺血管リモデリング改善を主たる効果とする治療法の開発が望まれている。PH の進展には核内受容体が関与し、レチノイド X 受容体 α (RXR α) は様々な核内受容体関連シグナルを調節することが知られているが、RXR α と PH との関連は明らかではない。本研究は RXR α と関連した PH メカニズムの解明および治療方法の開発を目指すものである。

【方法】

RNA 網羅的解析の公共データを用いて PH 患者肺 RXR α mRNA 発現を解析した。また、肺動脈性 PH (PAH) および強皮症 PH マウスモデル (SSc-PH) に対する RXR α 刺激薬 (Acyclic retinoid: ACR) の効果

を生理学的、組織学的、分子生物学的手法で検討した。さらにマウス単離肺内皮細胞およびヒト内皮細胞を用い、内皮間葉転換 (EndMT) と RXR α の関連を解析した。

【結果】

公共データ (GSE113439) 解析により PH 患者肺で RXR α mRNA が低下していることが確認された。また、PAH および SSc-PH マウスにおいて RXR α 刺激薬 ACR は肺血管抵抗を改善し、EndMT の抑制および肺血管リバースリモデリングを起こすことが確認された。

また内皮細胞において RXR α は GAPDH 核内移行に伴う p53 の活性化を介して間葉内皮転換 (MEndT) を誘導した。

【考察】

RXR α 刺激薬 ACR は肺血管内皮細胞において GAPDH-p53 経路を介して MEndT を誘導し、マウス PH モデルおよび培養細胞における EndMT を改善した。GAPDH 核内移行と MEndT に関する報告はこれまでなく、RXR α -GAPDH-p53 経路は PH の新規治療標的として期待される。

オミクス解析を用いた遺伝子関連全身血管病の病態解明と新規創薬ターゲットの探索

平出 貴裕

(慶應義塾大学医学部 プリチストン臓器再生医学寄付研究講座)

【研究の背景と目的】

難病疾患に指定されている血管病には、肺動脈疾患や脳動脈疾患、大動脈疾患などがあり、本邦での推定患者数は併せて 2 万人を超える。しかし発症原因の多くは特定されておらず、根本的な治療法に乏しい。肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病である。申請者の研究チームは特発性 PAH 患者検体の次世代シーケンサー解析を施行し、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 (RNF213) 遺伝子の多型変異 (R4810K) を同定した。RNF213 R4810K は従来の治療に反応性が乏しく予後不良であり、PAH の根

本的治療法の開発が望まれる患者群であることを報告した (Hiraide T, et al. 2021). *RNF213* はもやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病において関連があり、*RNF213* 関連血管病という新規疾患概念を提唱した。これら疾患を網羅的に解析することで、新規発症機序の解明や創薬が期待できる。

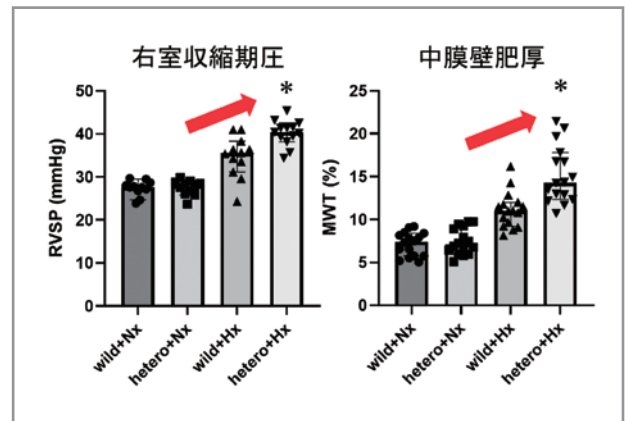


肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病であり、「告知番号 86」として指定されている。PAH 難病登録患者数は本邦では約 3700 名で、PAH 患者の背景疾患として結合組織病や先天性心疾患などがあるが、全体の約 3/4 は原因を特定できない「特発性 PAH」である。PAH は肺血管壁細胞が異常に増殖することで、肺血管の内腔が狭窄し、肺血管抵抗の上昇によって右室の圧負荷が増大し、右心不全を呈する疾患である。有効な治療法がなかった時代、診断からの平均余命は約 2.8 年と極めて予後不良な疾患であった。PAH は遺伝子型因子と環境因子に関わる多因子疾患であるが、PAH 発症に至る分子機構の大半は不明であり、根本的な治療方法は確立していない。

【実験方法と結果】

ヒトでの *RNF213* R4810K 病的バリエントは現行の肺血管拡張薬への治療抵抗性がある予後不良因子であり、また複数の血管病に関連していることから、疾患発症に関連する分子メカニズムの解明が求められる。申請者の研究チームは CRISPR-Cas9 システムを用いて、*Rnf213* R4810K バリエントのノックインマウスの作製に成功した。野生型および *Rnf213* R4810K ヘテ

ロマウスを常酸素下、および 10% 低酸素下で 3 ヶ月間飼育したところ、常酸素環境下 (Nx) では PAH の発症は両群とも認めなかったが、低酸素環境下で飼育した *Rnf213* R4810K ヘテロマウス (hetero+Hx) は野生型 (wild+Hx) と比較して、有意な右室収縮期圧の上昇、および肺血管中膜肥厚を認めた。右室および肺動脈のリモデリングが確認され、低酸素負荷により PAH が惹起された (下図)。

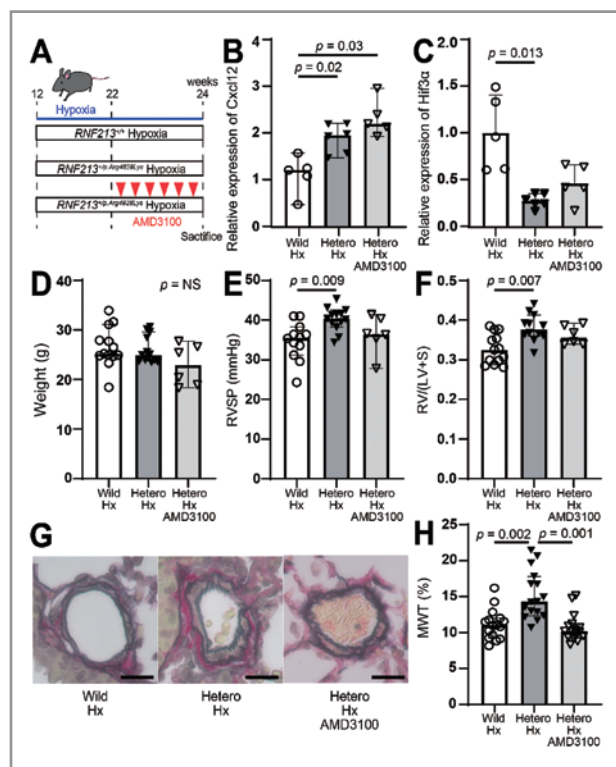


実臨床でも *Rnf213* R4810K は発症感受性遺伝子として報告されており、*Rnf213* バリエントという内的要因に、低酸素負荷 (外的要因) が加わる second hit により PAH が発症したと考えられた。マウス肺組織から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を施行したところ、低酸素負荷を行った *Rnf213* R4810K ヘテロマウスは、低酸素負荷をした野生型マウスと比較して、*Cxcl12* や *Cdk19* など細胞増殖シグナルを促進する因子の上昇を認めた (次頁図)。既報で癌細胞の増殖との関連性が報告されている *Cxcl12* に着目し、受容体である *Cxcr4* の阻害薬 (AMD3100) を追加で腹腔内投与すると、低酸素負荷をしたヘテロマウスでの PAH が軽症になることを確認した。*Cxcl12*-*Cxcr4* シグナルが *Rnf213* R4810K マウスの PAH 発症に関連していることが示唆された (次頁図, 論文未発表データ)。今後は *Cxcl12* や *Cxcr4* の局在を免疫染色やシングルセル RNA 解析等で確認し、PAH 発症に関わる詳細なメカニズムを解明していく。*Cxcl12*-*Cxcr4* シグナルが新規根治療法のターゲットになる可能性があり、実臨床への応用に向けて検証を進めていく。

【ヒト肺組織での検証】

RNF213 R4810K バリエントに関しては、患者肺を

用いた免疫染色を行った。マウスでは炎症性ケモカインである CXCR4 は肺動脈の内皮、及び肺動脈と気管支の間（間質領域）の細胞に高発現していたが、重症肺高血圧症を呈したヒト患者肺においても、同様の所見を認めた。マウスで確認した事象をヒトにおいても再現性があるかを確認できるのは、臨床および基礎の両面から研究を行ってきた本施設にしかできない優位性がある。



【出口戦略】

肺動脈性肺高血圧症の根治療法開発に向けて、分子標的薬や抗体薬、mRNA 治療などの開発を行い、実臨床への応用を目指したい。RNF213 R4810K 陽性マウスで PH の発症を抑制した CXCR4 阻害薬は、投与方法に関する追加の検証を必要とするが、化合物としては別の疾患（血液疾患）においてすでに薬事承認を得ているものもあり、実臨床への橋渡しが比較的容易なシグナル経路であると考え、ヒトの肺組織での検証では肺動脈と気管支の間に炎症性サイトカインの関与があるため、従来の静脈注射よりも吸入薬の方が効果を期待できる。新規吸入薬の化合物を企業または薬学研究室と連携し、知的財産の取得を目指したい。現在炎症性サイトカインに着目した PH 発症機序に関する論文を投稿中である。

心不全における生体膜リン脂質リモデリング機構の解明

武城 怜史

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

リン脂質リモデリング（リン脂質が含有する脂肪酸組成の変化）は生体膜の機能調節や恒常性維持に働き、代謝疾患や癌の発症メカニズムに関与することが知られている。心不全でもリン脂質の増減が報告されており、リン脂質リモデリングの関与が示唆されるが、その役割は不明である。今回、心筋生体膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンのリモデリングに寄与するリゾリン脂質アシル基転移酵素 7 (LPLAT7/LPGAT1) に着目し、心不全への影響を検討した。

【方法】

- ① 遺伝子発現情報データベース (Gene Expression Omnibus) を用いて、心不全における LPLAT7 遺伝子発現を解析した。
- ② Cre/loxP システムを用いて心筋細胞特異的 *Lplatt7* コンディショナルノックアウト (cKO) マウス (α MHC-Cre^{+/-}; *Lplatt7*^{fllox/fllox}) を作成した。心臓超音波や心重量測定、RT-qPCR を用いて、心機能や心不全の評価を行った。
- ③ コントロールマウス (*Lplatt7*^{fllox/fllox}) と *Lplatt7*-cKO マウスをそれぞれ 5 匹ずつ用いて、心臓の RNA-seq 解析を実施した。

【結果】(未発表)

① LPLAT7 遺伝子発現は心不全で低下

GSE21610 (ヒト心不全マイクロアレイ)、GSE224211 (マウス心不全 RNA-seq)、GSE95140 (マウス心不全 single-cell RNA-seq) の解析の結果、LPLATs の中で唯一 LPLAT7 発現が一貫して有意に低下していた。LPLAT7 が心不全、そして心筋細胞で重要な役割を担うことが示唆された。

② *Lplatt7*-cKO マウスで心機能が低下

コントロールと比較し、*Lplatt7*-cKO マウスで左室拡大・収縮能低下、心重量増加を認めた。また、心不

全指標である *Nppa*, *Nppb* 遺伝子発現の増加を伴った。

③ *Lplatt7-cKO* マウス心臓で心筋収縮関連の遺伝子発現が低下

発現変動遺伝子を抽出した結果、マウス表現型と一致し、心筋収縮関連の遺伝子発現が低下しており、シグナル経路 X の異常が示唆された。

【考察】

LPLAT7 が心不全発症・進展に関与することが分かったが、今後は LPLAT7 によるリン脂質リモデリングとシグナル経路 X の関連をリン脂質解析や蛋白質発現評価を行い、明らかにする。

時空間的イメージングシステムを用いた肺動脈性肺
高血圧症の病態解明およびその治療応用

藤原 隆行

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 基礎研究における課題である (1) 従来の病理組織学的評価では複雑な血管の形態描出が困難であること、(2) PAH 動物モデルの多くは人為的誘発モデルであること、(3) PAH では肺生検は禁忌であり、ヒト組織を用いた実証が難しいこと、を解決し、PAH 新規治療薬開発につながる研究を展開する。

【方法】

申請者が開発した三次元可視化システム¹⁾を用いて得られた、低酸素負荷 PAH モデルにおける肺血管内皮細胞 PGC-1 α の代償的血管新生²⁾について効能検証を行うため、CRISPR-Cas9 を用いてヒト重症 PAH 家系における遺伝子変異 (*BMP2^{Y247X/+}*) をマウスに導入し、より生理的な動物モデルとしての実証を進めたのちに、肺内皮細胞 PGC-1 α の役割について検討する。またヒト PAH 患者の肺移植時における摘出肺の採取を行い、遺伝子・タンパク発現や三次元解析における動物モデルとの共通点・差異について検討し、モデル動物における現象の検証を推し進めていく。

【結果】

MPR2^{Y247X/+} マウスは通常大気下で血管中膜肥厚を呈

するものの有意な右室圧上昇はきたさなかった。そのため PAH モデルの確立のため、*MPR2^{Y247X/+}* マウスにおいて肺血管内皮細胞特異的に PGC-1 α を欠損させ (*MPR2^{Y247X/+}; Alk1-Cre; Pgc1 α ^{fl/fl}*)、評価を行った。このマウスでは通常大気下で右室圧は有意に上昇し、PAH を発症したと考えられた。また血管中膜肥厚に加えて内膜の異常増殖、特に PAH 病理所見のうち最重症である叢状病変の出現を認めた。また三次元可視化システムにより、叢状病変の三次元可視化に成功した。

この新規 PAH モデルマウスの発症機序を探索すべく、シングル核 RNA シーケンスを施行したところ、炎症応答に関する遺伝子群の発現上昇を認め、病態への関与が示唆された。特にその中の因子 X はヒト PAH 内皮細胞においても発現が上昇しており、現在因子 X の PAH 肺内皮細胞での役割を解明すべく、ウイルス導入による発現制御を行っている。

またヒト PAH 患者の肺検体採取 (移植時) の施行について倫理審査を通過し、すでに 5 例の PAH 患者の肺検体の採取を行っている。これらの検体を用いて、末期 PAH 患者の肺では PGC-1 α の発現が低下していることを確認している。

【考察】

BMP2 単独の変異導入ではマウスにおいて PAH は発症しなかったが、肺血管内皮細胞特異的 PGC-1 α 欠損により通常大気下で PAH を誘導することに成功した。これは PAH 発症メカニズムで提唱されているセカンドヒットセオリーに合致するものであり、また病理像もヒト重症 PAH 病変と類似しており、生理的な PAH モデルの確立に成功したと言える。またシングル核 RNA シーケンスにより、炎症細胞応答が病態に関与していることが示唆され、そのうちの因子 X はヒト PAH 肺内皮細胞において発現が増強することが知られているため、これについて機能解析を進めていく。さらにヒト肺検体を用いた病態の検証を行っていく。

【文献】

- 1) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Seo K, Sakata A, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Nishimura S, Komuro I. Three-Dimensional

Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice. *Circulation*, 144, 1452-1455 (2021)

- 2) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Katoh M, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Nishimura S, Komuro I. PGC-1 α -mediated angiogenesis prevents pulmonary hypertension in mice. *JCI Insight*, 2023;8(17):e162632.

リンパ管新生による急性心筋炎治療

丸山和晃

(三重大学大学院医学系研究科修復再生病理学)

【目的】

急性心筋炎はウイルス感染や薬剤などを契機に発症する自己免疫疾患と考えられている。急性心筋炎は病理組織像によりリンパ球性、好酸球性、巨細胞性心筋炎などに分けられるが、好酸球性心筋炎に対するステロイド治療以外には治療法がなく、自然軽快までの血行動態維持が主な治療となる。心筋炎は特殊な心疾患と認識されてきたが、COVID-19 急性心筋炎や小児多系統炎症性症候群 (MIS-C/PMIS)、COVID-19 mRNA ワクチン関連心筋炎などが注目を集めた。また、免疫チェックポイント阻害剤治療に伴う心筋炎ががん治療上の問題として浮上している。

リンパ管は血管から遊走した炎症細胞の回収や過剰な間質液の回収、さらには炎症細胞との相互作用による免疫寛容などを通じて、炎症反応の抑制に働くと考えられている¹⁾。こうした現象は injury associated lymphangiogenesis (IAL) と呼ばれ、生体の普遍的な組織修復過程の一部と考えられている。心臓は人体の中で最もリンパ管密度が高い臓器の一つで²⁻⁴⁾、リンパ管は心筋梗塞時などに心臓保護的に作用すると考えられている⁵⁾。

心筋炎時には炎症反応のみならず、浮腫液の大幅な増加を認め、拘束性心機能障害を引き起こすことが知

られている。本研究は、リンパ管内皮細胞特異的に作用し、リンパ管を増生する作用を持つ物質 X [企業との共同研究に発展しており、特許申請予定] を投与し、心臓リンパ管新生を刺激することで、浮腫や炎症反応の改善を通じ、心筋炎の新たな治療法を開発することを目的とする。

【方法】

自己免疫性心筋炎モデルを用いた。ミオシン重鎖ペプチド 2 回投与による急性心筋炎モデルの 2 回目ペプチド投与後に、物質 X を投与しリンパ管新生を促進する。組織、心臓エコー、心臓乾燥重量、RNA-seq などにより物質 X によるリンパ管新生が心筋炎心臓に与える効果を検証する。

【結果】

物質 X 投与により、対照群に比較し、介入群ではリンパ管の増生 (数, 分岐, sprouting, 太さなど) を認めた。また、浸潤炎症細胞の大幅な減少を認め、線維化の減少を認めた。RNA-seq でも炎症関連遺伝子、細胞外マトリクス産生関連遺伝子の減少などを認め、心臓中の水分量減少を認めた。したがって、浮腫、炎症、線維化抑制など総合的に心臓の状態が改善していた。

【考察】

物質 X 投与は心筋炎の新たな治療法となりうる。今後も、臨床応用に向けて基礎的な知見を積み重ねていきたい。

【文献】

- 1) Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 2617.
- 2) Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, Mizukami K, Matsuzaki F, Kurihara H. Isl1-expressing non-venous cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development. *Dev Biol* 2019; **452**: 134–43.
- 3) Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, Haneda Y, *et al.* The cardiopharyngeal mesoderm contributes to lymphatic vessel development in mouse. *Elife* 2022; **11**. DOI:10.7554/elife.81515.
- 4) Yamaguchi S, Minamide N, Imai H, *et al.* The development of early human lymphatic vessels as

characterized by lymphatic endothelial markers. *EMBO J* 2024; : 1–18.

- 5) Maruyama K, Naemura K, Arima Y, *et al.* Semaphorin3E-PlexinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery. *Iscience* 2021; : 102305.

腸内環境変化に着目した肥満症に関する基礎的研究

宮本潤基

(東京農工大学 大学院農学研究院)

【目的】

これまでの研究で、食用油由来腸内細菌代謝物群が腸管ホルモンでインクレチンの一つである GLP-1 (glucagon like peptide-1) の分泌亢進を介して、生体エネルギー代謝調節に関与することを明らかにした。その過程で、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示すことを見出した (unpublished data)。しかしながら、GLP-1 受容体の欠損が、どのような分子機構によって高脂肪食誘導性肥満モデルに対して抵抗性を示すかは不明なままである。加えて、昨年度までの検討で、同腹仔における GLP-1 作用臓器 (肝臓) における分化マーカーや機能マーカーには大きな差は確認されなかった。そこで、2023 年度では、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの高脂肪食誘導性肥満モデルマウスにおける肥満抵抗性が胎児期や乳児期における組織発達遅滞の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】

同腹仔で比較検討を行うために GLP-1 受容体遺伝子改変マウスのヘテロ交配を行い、野生型マウス (WT) と GLP-1 受容体遺伝子改変マウス (Homo) を Genotyping PCR によって遺伝子型を確定した。離乳時に WT マウスと Homo マウスを解剖し、盲腸中に腸内細菌を評価するために 16S rRNA 解析を Miseq を用いて実施した。

【結果】

離乳時 (4 週齢) における同腹仔の WT マウスと

Homo マウスにおける盲腸の腸内細菌解析を実施した。その結果、腸内細菌の構成は僅かに変化であることが確認された (特に、Bacteroidota の微増)。また、主成分分析では、WT マウスと Homo マウスの間で、明確なクラスター形成に差があることが確認された。

【考察】

これまでの検討で、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは高脂肪食誘導性肥満の症状を緩和することと、胎児期でインクレチンである GLP-1 の発現や分泌が亢進することを見出していたが、その詳細な機序は明らかにされていない。4 週齢における腸内細菌解析は WT マウスと Homo マウスで軽微ではあるものの腸内細菌の構成変化が観察された。このことは、食用油由来腸内細菌代謝物群が GLP-1 分泌を促進するだけでなく、GLP-1 シグナルが直接的・間接的に腸内環境を制御していることを示しており、GLP-1 シグナルと腸内環境が双方向に制御し合う可能性が示唆された。今後、腸内環境の制御がインクレチン分泌作用を介した生体エネルギー代謝調節の制御に寄与する可能性に着目して検討を進める。

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

八木宏樹

(東京大学医学部附属病院 循環器内科)

【背景・目的】

マルファン症候群 (MFS) は細胞外基質であるフィブリリン 1 をコードする *FBN1* の病的変異によって大動脈瘤などを発症する常染色体顕性遺伝の指定難病疾患である。*FBN1* 変異による大動脈瘤形成の分子機序は、様々な大動脈の構成細胞と細胞外基質がどのように時空間的に制御されているのかを理解する必要がある。血管周囲の炎症は血管疾患の発症に関与することが報告されているが、MFS における大動脈瘤形成過程への関与は不明である。本研究の目的は、血管周囲の炎症が MFS の大動脈瘤の進展にもたらす影響を明らかにし、新規治療法を開発することである。

【方法】

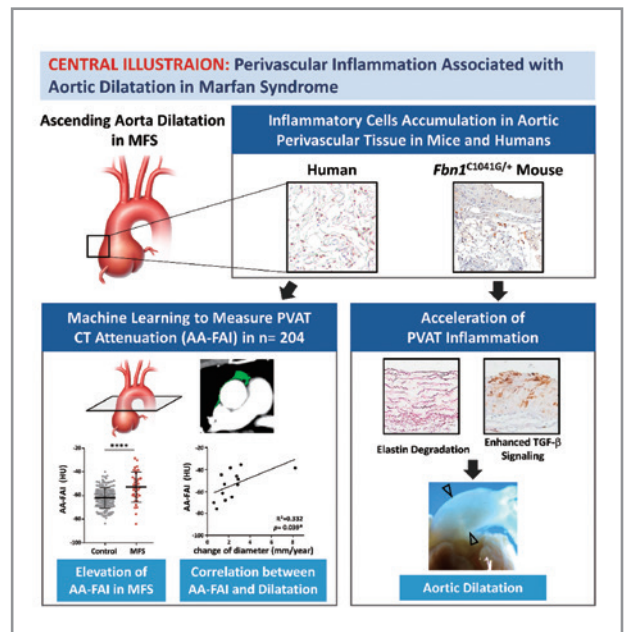
MFS 患者および *Fbn1*^{C1041G/+} (MFS モデル) マウスにおける大動脈周囲組織の炎症を、免疫組織染色および qRT-PCR によって評価した。続いて、高脂肪食 (HFD) を用いて *Fbn1*^{C1041G/+} マウスの血管周囲脂肪組織の代謝ストレスを亢進させ、血管周囲の炎症と大動脈瘤形成に与える影響を評価した。また、脂肪組織に対して抗炎症作用を呈する低用量ピタバスタチン (0.3mg/kg/day) も投与した。さらに血管周囲の炎症を臨床面から評価するために、大動脈周囲脂肪の炎症を反映した上行大動脈の血管周囲脂肪減弱指数 (AA-FAI) を算出する自動解析プログラムを開発した。非遺伝性結合組織疾患 (non-HCTDs) 患者 159 人、MFS 患者 36 人、Loeys—Dietz 症候群 (LDS) 患者 9 人を対象に AA-FAI を算出し、心エコー検査で測定した大動脈径拡大率と AA-FAI の相関を検証した。

【結果】

コントロール群と比較し、MFS 患者と *Fbn1*^{C1041G/+} マウスでは、大動脈周囲組織の炎症性サイトカインの発現上昇とマクロファージの顕著な集積を認めた。*Fbn1*^{C1041G/+} マウスでは、HFD 負荷により大動脈周囲の炎症の増悪と大動脈瘤形成の進展を認め、中膜における弾性線維の断裂、線維化、プロテオグリカンの貯留、TGF-β シグナルの活性化が生じていた。これらの所見は、低用量ピタバスタチンによって血中脂質パラメーターを変化させることなく抑制された。MFS と LDS を含む HCTDs 患者では、non-HCTDs 患者に比べて AA-FAI が有意に高かった (それぞれ $-52.90 \pm 12.69\text{HU}$, $-51.70 \pm 7.99\text{HU}$ vs $-62.02 \pm 8.54\text{HU}$; $p < 0.0001$)。AA-FAI の上昇は、MFS 患者における大動脈拡大率と相関していた ($R^2=0.332$, $p = 0.039$)。また non-HCTDs 患者内のスタチン使用群で、AA-FAI は有意に低かった (スタチン非使用群: $-60.46 \pm 8.76\text{HU}$ vs スタチン使用群: $-65.37 \pm 6.84\text{HU}$; $p = 0.039$)。

【結論】

血管周囲の炎症は MFS の大動脈瘤進展の重要な要因である。血管周囲の炎症を標的とした治療によって、MFS の大動脈瘤形成を抑制できる可能性が示唆された (図) (*JCI insight* in revision)。



シングルセルマルチオーム解析を用いた特異性拡張型心筋症における病態経路の探索

山田 臣太郎

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

難治性拡張型心筋症に対する病態理解は不十分であり、既存の治療のみでは、心移植が必要となる症例が少なくない。本研究ではその病態経路の探索を目的とした。

【方法】

まず、当院で左室補助人工心臓 (LVAD) 植え込み術を施行した 38 例の心不全患者 (拡張型心筋症 23 例, 拡張相肥大型心筋症 5 例, 心筋炎 3 例, アドリアマイシン心筋症 2 例, サルコイドーシス心筋症 4 例, 周産期心筋症 1 例) を対象として、LVAD 植え込み術時の左心室検体の single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) 解析を行った。コントロール群は心疾患歴がなく、他疾患で死亡した患者の剖検検体 6 例とした。次に上記のうち、拡張型心筋症 7 例、コントロール群 4 例に対して、同単一細胞における snRNA-seq および single-cell ATAC-seq (scATAC-seq) (マルチオーム解析) を行った。

【結果】

snRNA-seq の結果、心筋細胞や線維芽細胞、内皮細胞など各細胞種を明瞭に区分することができた (図 1)。

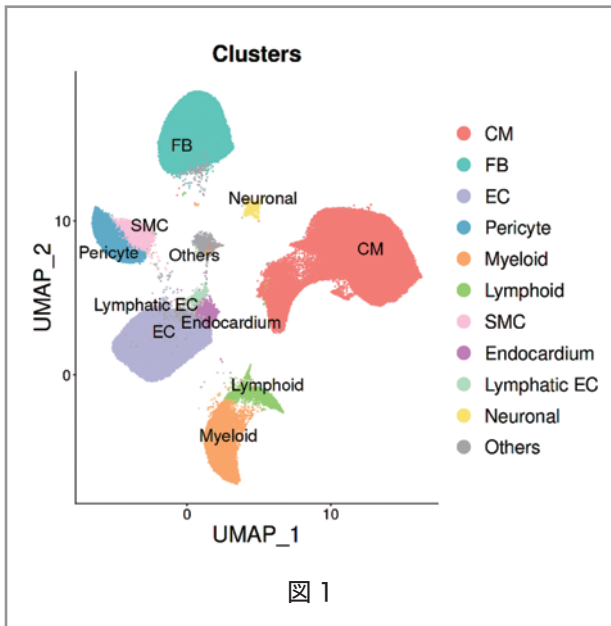


図 1

次に、各細胞種における遺伝子発現変化を評価したところ、心筋細胞においては sarcomere 関連遺伝子および ribosome 関連遺伝子がコントロール群と比較して心不全群ではいずれの病因でも共通して発現増加していた (図 2)。一方、カルシウムイオン結合や細胞間接着に関連する遺伝子の発現は、心不全群で低下していた。また、心不全群の中でも心筋炎群では血管新生に関連する遺伝子の発現が低下するなど、各病因の遺伝子発現の違いも見出した。

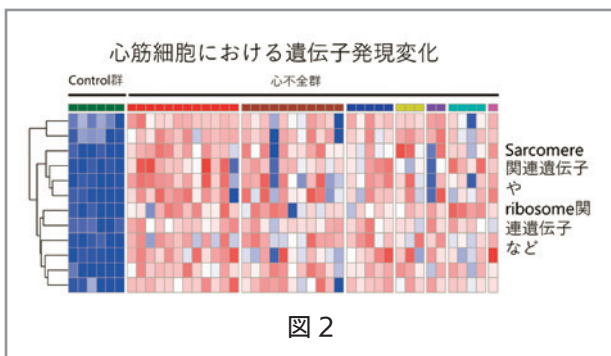


図 2

さらにマルチオーム解析により、拡張型心筋症群では、転写因子 X とそれが制御する心筋細胞非特異的な sarcomere タンパク遺伝子群の発現が上昇していることが分かった。転写因子 X は他の病因の心不全群でも発現の上昇を認めた。

【考察】

snRNA-seq 解析により、心不全群において各病因で共通する、あるいは特異的な遺伝子発現変化があること

が分かった。今後はこれらの遺伝子発現変化から、各病因で共通する経路および特異的な経路を推察し、実証実験を行っていくことが課題である。

また、マルチオーム解析により、拡張型心筋症群では転写因子 X およびそれが制御する心筋細胞非特異的な sarcomere タンパク遺伝子群の発現上昇を認めた。また、転写因子 X の発現は他の病因の心不全群でも増加を認めており、心不全群で共通する病態経路可能性がある。また、転写因子 X の発現は心筋非特異的な sarcomere タンパク遺伝子の増加を制御しており、心不全の病態において、転写因子 X が心筋細胞の“心筋細胞らしさ”の喪失に寄与している可能性がある。今後はこれらの実証実験を行っていく方針である。

クローン性造血が心血管病に与える影響の解明

由 良 義 充

(名古屋大学医学部附属病院 循環器内科)

【目的】

高齢者に高頻度に確認されるクローン性造血という現象は、近年明らかになった心血管疾患の新規危険因子である。我々は、クローン性造血がインフラマソーム活性化を介して心臓や血管において過剰な炎症や組織傷害を引き起こし、その結果、心血管疾患を引き起こすことを報告してきた。本研究では、クローン性造血が病態生理が未解明である心収縮能が保たれた心不全 (HFpEF) の病態へ与える影響を基礎実験を通じて解明することを目指す。

【方法】

高齢者に高頻度に変異が検出される遺伝子の一つである DNA 脱メチル化酵素 (Ten-Eleven Translocation-2 :TET2) に着目し、クローン性造血モデルマウスを作成した。野生型マウスに、Tet2 遺伝子変異を有するマウスから採取した骨髄を大量かつ複数回 (5x10⁶, 3 日間) 移植する手法を用いた。HFpEF モデルマウスに関しては、野生型マウスに高脂肪食 (HFD) と NO 合成酵素阻害剤 (L-NAME) を投与する手法を用いた。

【結果】

Tet2 クローン性造血モデルマウスに HFD+L-NAME 処理を行い、末梢血液における変異細胞の割合と心臓機能の経時的な変化を定量した。末梢血液のフローサイトメトリー解析を行うと、変異細胞（ドナー由来細胞）は正常細胞（レシピエント由来細胞）と比べて経時的に著明に割合が増加し、さらに HFD+L-NAME 処理によりその増加が一層顕著となった。また、心臓機能を評価すると、両群において心臓の収縮能には変化がみられなかったものの、拡張能 (E/e') が低下し、Tet2^{-/-} 群において Tet2^{+/+} 群と比べて強い拡張能障害が惹起された。このマウスでは、心筋間質繊維化（% Fibrosis）および心筋細胞表面積（CSA）拡大が増強していることが確認された。これらの実験結果から、高血圧や糖尿病といった刺激によりクローン性造血が増強し、その結果としてクローン性造血が免疫・炎症を介して HFpEF の発症および進展に寄与する可能性が示唆された。そして、これらの知見を論文報告した。

【考察】

今回提示したように、クローン性造血が HFpEF 病態を悪化させるという仮説を基礎実験で検証したが、現時点では詳細なメカニズムはまだ解明されていない。変異細胞が心臓を構成する他の細胞にどのように影響を与えるのか、また変異免疫細胞が正常免疫細胞に与える影響について現在解析を進めている。今後、免疫細胞における体細胞変異という既存の研究とは全く異なる視点から心血管病の病態生理の理解が進むことで、将来の循環器病診療に新しいゲノム医療の導入という大きなイノベーションが起こることが期待される。

【文献】

Cochran JD, Yura Y, Thel MC, Doviak H, Polizio AH, Arai Y, Arai Y, Horitani K, Park E, Chavkin NW, Kour A, Sano S, Mahajan N, Evans M, Huba M, Naya NM, Sun H, Ban YH, Hirschi KK, Toldo S, Abbate A, Druley TE, Ruberg FL, Maurer MS, Ezekowitz JA, Dyck JRB, Walsh K. Clonal Hematopoiesis in Clinical and Experimental Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2023 Oct 10;148(15):1165-1178.

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

(国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所)

昨年までの研究により、分岐鎖アミノ酸の代謝物である分岐鎖ケト酸が、肥満症患者の血液で増加している事を明らかとし、動物実験により褐色脂肪組織における分岐鎖アミノ酸/ケト酸代謝の低下が肥満の強い誘導因子である事を明らかとした¹⁾。そこで同代謝を促進する化合物のスクリーニングにより、肥満を治療する薬剤の同定を試みている。

一方、分岐鎖ケト酸のトランスポーターに着目した新しい肥満制御法の開発も試みている。分岐鎖ケト酸はミトコンドリアで代謝され、その代謝経路については解明されているが、分岐鎖ケト酸のミトコンドリアトランスポーターについては未解明である。トランスポーターを同定できれば、ミトコンドリア内への分岐鎖ケト酸の流入を制御できるため、画期的な肥満制御法の開発に繋がる可能性がある。

【目的】

分岐鎖ケト酸のミトコンドリアトランスポーターを同定する事。

【方法】

1. ミトコンドリア内への分岐鎖ケト酸の取り込みが多いラット心筋細胞株 H9c2 を用いて、TurboID を用いた近接依存性標識法により、トランスポーター候補を抽出する。
2. 昆虫細胞を用いたゲノムワイド CRISPR screening により、トランスポーター候補を抽出する。

【結果】

1. H9c2 細胞株を用いた近接依存性標識法により、数十のミトコンドリアトランスポーター候補を抽出した。さらに候補を絞るために、ミトコンドリアへの分岐鎖ケト酸の取り込みが多い AML12 細胞株を用いて再度 TurboID による近接依存性標識法を行った。これにより、候補が約 10 個に絞られた。
2. CRISPR screening により、トランスポーター候補を約 10 個得た。

1と2で挙げられた候補に重複は認めなかった。20個ほどある候補トランスポーターを1つずつロックダウン/ロックアウトした細胞株を作製し、ミトコンドリアへの分岐鎖ケト酸の取り込み量に変化するかを評価中である。

【考察】

分岐鎖ケト酸はモノカルボン酸である事から、分岐鎖ケト酸のトランスポーターは、既知のモノカルボン酸トランスポーターに類似する構造をもつものを推測している。今回挙げられたトランスポーターの中には、分岐鎖ケト酸以外のモノカルボン酸輸送に関与する事が報告されているトランスポーターもあり、downstream assayの結果に期待したい。

【文献】

- 1) Verkerke ARP, Wang D, Yoshida N, et al. BCAA-nitrogen flux in brown fat controls metabolic health independent of thermogenesis. *Cell.*, 187,1–16(2024).

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

高脂肪食負荷に対する全身代謝応答における骨格筋でのリジン脱メチル化酵素 LSD1 の役割

荒木 裕 貴

(熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学講座)
(熊本大学産生医学研究所 細胞医学分野)

【目的】

栄養は骨格筋の筋線維組成や代謝表現型に影響を及ぼす環境刺激の一つだが、その応答を制御するエピジェネティックな機構は十分に解明されていない。そこで、骨格筋において環境ストレス応答を緩和し過剰な環境適応を防ぐ役割が報告された LSD1 の、高脂肪食 (HFD) 負荷時の骨格筋環境応答における役割を明らかにする。また、LSD1 の補酵素である FAD 合成の元となるリボフラビン (Rf) の投与が HFD 負荷時の骨格筋表現型に影響するか評価し、LSD1 を標的とした代謝疾患等の治療の可能性に関して検討する。

【方法】

7 週齢の野生型マウス及び骨格筋特異的 LSD1 KO マウス (LSD1-mKO マウス) に通常食及び HFD を 17 週間負荷し、糖負荷試験 (GTT) や代謝ケージ飼育での全身代謝評価、体重・筋重量変化の評価、採取した骨格筋の RNA-seq、組織染色などを行なった。

また、食餌負荷後の 10 - 17 週に飲水中に Rf を加え、同様の評価を行なった。

【結果】

HFD を与えた野生型マウスでは通常食を与えたマウスと比較し、LSD1 発現が腓腹筋では上昇、ヒラメ筋で低下した。また、HFD を負荷した mKO マウスは野生型と比較し、空腹時血糖値や GTT の AUC の有意な低下を認めた。さらに、前脛骨筋の RNA-seq の結果、mKO マウスで TNF α シグナリングや IF γ 応答など炎症に関連する遺伝子の発現上昇、好気代謝遺伝子の発現低下を認めた。

Rf を与えた野生型 HFD 群では、Rf 非投与群と比べ体

重の有意な減少、前脛骨筋、腓腹筋重量の増加、さらに空腹時血糖値の有意な低下及び GTT での血糖上昇の抑制傾向を認めた。さらに、代謝ケージではエネルギー消費量の増加傾向を示し、RNA-seq では TNF α シグナリングに関連する遺伝子の発現低下を認めた。一方で、これらの Rf 投与による変化は mKO マウスでは認められなかった。

【考察】

骨格筋の LSD1 欠損により全身代謝が悪化し、好気代謝遺伝子や炎症関連遺伝子の発現変化が認められたことから、HFD に対する骨格筋での代謝応答の制御に LSD1 が関わる可能性が示唆された。

また、HFD 負荷時の Rf 投与による骨格筋重量変化、体重減少及び糖代謝の改善が LSD1-mKO マウスでは認められないことから、Rf が骨格筋の LSD1 を介して代謝表現型を改善する可能性が示唆された。

膵 β 細胞における MEK/ERK シグナルの役割の解明とその治療応用

生島 芳子

(University/BHF Centre for Cardiovascular Science, The University of Edinburgh)

【目的と方法】

2021 年度より、骨髄脂肪に焦点を当てた新たな研究を展開している。カロリー制限 (Caloric restriction: CR) 下で認められる血中 Adiponectin の濃度上昇に骨髄脂肪から分泌される Adiponectin の増加が寄与していることから、現在は Adiponectin の CR 下での役割の検討を行っており、indirect calorimetry (Promethion system) による代謝解析や RNA-seq 解析を進めてきた。

【結果と考察】

研究者らのグループでは、CR 下の Adiponectin 全身欠損 (*Adipoq* KO) マウスは、OGTT において CR 下の WT マウスより一層低い血糖値を示すこと、この

Adipoq KO の表現型が雌より雄でより顕著に認められることを確認した。この分子メカニズムを明らかにするため、Promethion system を用いて RER (Respiratory Exchange Ratio) や EE (Energy Expenditure) の測定を進めたが、OGTT での表現型を説明する data は得られなかった。次に、肝臓・筋肉のサンプルを用い、RNA-seq 解析を進めた。肝臓での RNA-seq の結果、AL 下では従来の報告と一致して Adiponectin が脂質代謝制御に寄与していることを示唆する結果が得られたが、予想外に、CR 下の肝臓では Adiponectin がアミノ酸代謝を制御している可能性が示唆された。また、CR 下の *Adipoq* KO マウスの雄の筋肉では、エネルギー産生が障害されている可能性が見出された。今後、こうした transcriptomics の data と OGTT で認められた表現型の link をさらに詳細に検討していく計画である。また、骨・骨髄脂肪における Adiponectin の作用を評価するために、AL および CR マウス脛骨の μ CT data、および、脛骨を脱灰し骨髄脂肪を Osumium tetroxide 染色したサンプルから得られた μ CT data の解析を進めており、CR 下における Adiponectin の役割を包括的に解明することを目指している。

グレリン受容体の内因性アンタゴニスト liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) の糖尿病と肥満における生理的役割の解析

イスラム エムディヌル

(宮崎大学 医学部 生体制御医学研究講座)

【目的】

肝臓や腸管に高発現する LEAP2 は、摂食亢進、血糖上昇、体温低下などのグレリン作用を抑制する。グレリンと LEAP2 は、摂食時・絶食時に反対の血行動態を示し、食欲やエネルギー代謝を調節する。グレリンと LEAP2 の糖尿病や肥満の病態との関連を明らかにする目的で、LEAP2 とグレリンの発現分泌調節機構を解析した。

【方法】

栄養素を経口負荷したマウスの血中と臓器の LEAP2 とグレリンを測定した。マウス肝細胞を、栄養素やホ

ルモンで刺激し LEAP2 の発現量調節因子を同定した。スリーブ状胃切除術 (VSG) 前後で、LEAP2 とグレリンの発現量と血中濃度を測定した。

【結果】

空腹時 LEAP2 は肝静脈>腹部大動脈>門脈という濃度勾配のパターンを示し、LEAP2 は肝臓から分泌されたと考えられた。グルコース、コーン油またはパルミチン酸塩を絶食マウスに経口投与すると、血漿 LEAP2 と肝臓の *Leap2* mRNA を上昇させた。グルコースやパルミチン酸は、マウス肝細胞の *Leap2* mRNA を増加させた。VSG の効果を普通食マウスと高脂肪食マウスで検討した。VSG 後、普通食マウスの体重と血漿グレリンは低下し、血漿と肝臓の LEAP2 は増加した。VSG 後 7 日目より 7 日間のグレリン腹腔内投与は、血漿と肝臓の LEAP2 を低下した。グレリン投与マウスに生理食塩水投与マウスと同じ摂食量を負荷しても、血糖、体重が増加することから、摂食量に依存しないグレリン作用が考えられた。高脂肪食を 16 週間摂餌させたマウスでは血漿グレリンは低下し、VSG によりさらに低下した。血漿 LEAP2、肝臓 *Leap2* mRNA は高脂肪食、体重増加により増加し、VSG により低下した。糖尿病のヒトでは、クッキー試験後のグレリンと LEAP2 の血中濃度変化が遅延した¹⁾。

【考察】

LEAP2 の主たる分泌臓器は肝臓で、糖や脂質などの栄養素が肝臓の *Leap2* 発現を直接制御し、血中に分泌することが示唆された。高脂肪食マウスでは VSG 後、グレリンの低下にも関わらず LEAP 2 が低下したが、高脂肪食による肥満でグレリン抵抗性が高まり、術後の体重減少の影響が相対的に強く反映されたと考えられる。糖尿病では、グレリンと LEAP2 の血行動態が異常を示しており、グレリンと LEAP2 の相反作用による胃・肝臓臓器連関が、摂食行動やエネルギー代謝の調節に重要であると考えられた。

【文献】

- 1) Islam M. N. et al. Liver-expressed antimicrobial peptide 2 is a hepatokine regulated by ghrelin, nutrients, and body weight. *Sci. Rep.* **14**, 24782 (2024)

ユビキチン様修飾因子 UFM1 の膵β細胞における病態生理学的意義の解析

嶋 澤 博 嗣

(順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌内科学講座 助教)

【目的】

ユビキチン様修飾因子 UFM1 による翻訳後修飾である UFMylation (UFM 化) は、小胞体 (ER) ストレス応答や選択的オートファジーの一つである ER ファジーおよびリボソームの品質管理 (RQC) との関連が注目されている一方で、その病態生理学的意義は未解明な点が多い。膵β細胞はインスリン産生に伴う恒常的なストレスに曝されており、2型糖尿病発症に先行するインスリン抵抗性の増大は、膵β細胞に対して過剰な負荷がかかることを意味する。従って膵β細胞では、それらのストレスに対して ER ストレス応答やオートファジーといった細胞内恒常性維持機構が発達している。我々は、これらの機構の制御に UFM 化が関与していることに注目し、UFM 化は膵β細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすという仮説を提示するに至った。本研究ではこの仮説を検証するために、膵β細胞特異的 UFM1 欠損 (UFM1-β KO) マウスおよび細胞株を用いた解析を行い、膵β細胞において UFM 化が持つ病態生理学的意義を解明することを目的とする。

【方法】

これまでの検討で、UFM1-β KO マウスでは生理学的には耐糖能が悪化し、組織学的には膵β細胞容積の減少および TUNEL 陽性膵島の増加、膵島内のグルカゴン陽性領域が増大することを明らかにした。本年は UFM1 欠損とこれらの表現型を繋ぐ因子を特定するため、ラット膵β細胞株である INS1E 細胞に Cas9 を安定発現させた細胞株を樹立し、gRNA を導入して UFM1 欠損 INS1E (*gUfm1*-INS1E) 細胞を作製し、解析を行った。

【結果】

gUfm1-INS1E 細胞ではコントロールの細胞と比較して、ER ストレスセンサーである PERK と IRE1 のリン酸化が亢進していた。また免疫染色による評価では、ER 内腔マーカーの一つで S-S 結合の形成に必要なタン

パクジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の染色性が増強していた。さらに、様々な膵内分泌細胞由来ホルモンに対する免疫染色を行なったところ、*gUfm1*-INS1E 細胞ではグルカゴン陽性細胞数が増加していた。

【考察】

UFM1-β KO マウスの耐糖能悪化の背景として、UFM 化不全によって ER ストレス応答が障害され、小胞体の品質管理が毀損される結果、膵β細胞死の増加および他の膵内分泌細胞へ分化転換が生じている可能性が考えられた。UFM 化不全と ER の品質管理を繋ぐ分子メカニズムとして、我々は ER- ファジーおよび RQC に着目しており、その詳細を細胞生物学的手法により明らかにしていきたい。

副腎由来ホルモンの多様性に基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病態制御内科学分野)

主要な内分泌臓器である副腎は、内外のストレスに応答してホルモンを分泌し、生体の恒常性を維持している。副腎は3層構造を呈する皮質と髄質より構成され、皮質では層特異的にステロイドホルモン (ミネラルコルチコイド、グルココルチコイド、副腎アンドロゲン) が産生され、髄質ではカテコールアミンが産生される。ホルモン過剰状態では、ストレス応答性が破綻し、糖尿病などの様々な加齢性疾患を引き起こす。我々はこれまで、LC/MS/MS 法を用いたステロイドミクス解析を開発し、副腎由来ホルモンの過剰状態をきたす副腎腫瘍患者を対象として、副腎由来ステロイド代謝産物と代謝疾患との関連を検討してきた。その結果、コルチゾール産生副腎腫瘍患者では、特徴的なステロイドプロファイルを呈しており、複数のステロイド代謝産物が協調して糖尿病の合併症の1つである骨粗鬆症の発症・進展に影響することを見出した¹⁾。更に、生理的条件下での血中コルチゾールの高値や副腎アンドロゲンの低下は、骨粗鬆症やサルコペニアの進展に影響することを明らかにした^{2,3)}。今年度は、副腎由来ホルモンの過剰を呈さない、非機能性副腎腫瘍の患者を対象と

した血中ステロイドミクス解析を実施した。その結果、糖尿病のある群ではない群と比較して、血中ステロイドプロファイルが顕著に異なっていることを明らかにした。特に、副腎由来アンドロゲンとして知られている 11 β ヒドロキシテストステロンが糖尿病の発症・進展や、 β 細胞機能の低下に関与していた⁴⁾。

これらの知見は、副腎由来ステロイドホルモンおよびその代謝産物が、糖代謝異常を含む様々な代謝疾患の病態生理に重要な役割を果たしていることを示唆している。今後は、これらの結果を健常者での検証や、より詳細な分子メカニズムの解明につなげていく予定である。

【文献】

(* , equally contributed; # , corresponding author)

- 1) Nakao H*, Yokomoto-Umakoshi M*#, Nakatani K*, Umakoshi H, Ogata M, Fukumoto T, Kaneko H, Iwahashi N, Fujita M, Ogasawara T, Matsuda Y, Sakamoto R, Izumi Y, Bamba T, Ogawa Y#. Adrenal steroid metabolites and bone status in patients with adrenal incidentalomas and hypercortisolism. **eBioMedicine**. 95:104733, 2023.
- 2) Yokomoto-Umakoshi M#, Umakoshi H, Iwahashi N, Matsuda Y, Kaneko H, Ogata M, Fukumoto T, Terada E, Nakano Y, Sakamoto R, and Ogawa Y#. Protective role of DHEAS in age-related changes in bone mass and fracture risk. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 106(11): e4580-e4592, 2021.
- 3) Katsuhara S, Yokomoto-Umakoshi M#, Umakoshi H, Matsuda Y, Iwahashi N, Kaneko H, Ogata M, Fukumoto T, Terada E, Sakamoto R, and Ogawa Y#. Impact of cortisol on muscle strength and mass: A Mendelian randomization study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 107(4): e1477-e1487, 2022.
- 4) Nakano Y*, Yokomoto-Umakoshi M*#, Nakatani K*, Umakoshi H, Nakao H, Fujita M, Kaneko H, Iwahashi N, Ogasawara T, Fukumoto T, Matsuda Y, Sakamoto R, Izumi Y, Bamba T, Ogawa Y#. Plasma steroid profiling between patients with and without diabetes mellitus in non-functioning

adrenal incidentalomas. **J. Endocr. Soc.** (In press)

血管内皮における O-GlcNAc 修飾による糖尿病合併症進展機構の解明

大橋 夏子

(滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病内分泌・腎臓内科)

【目的】

糖尿病や肥満の世界的な急増は克服すべき重要な臨床課題である。それらの疾患では高血糖やインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症により、全身の血管の内皮機能障害から様々な臓器障害が惹起される。O-GlcNAc 修飾は、全身の血管障害により引き起こされる糖尿病合併症の成因進展機構の一つとして着目されてきた。しかし、内皮細胞における O-GlcNAc 化の役割、特に肥満と内皮細胞との関係については未だ不明である。そこで、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割と食事誘導性の肥満状態における病態生理に与える影響に関して検討する。

【方法】

タモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Cre 発現マウス (VEcad-BAC-CreERT2 マウス) と *Ogt*-flox マウスとの交配を行い、タモキシフェンを腹腔内投与し血管内皮細胞特異的 *Ogt* 欠損 (*Ogt*-ECKO) マウスを作製した。通常食モデル、高脂肪食摂餌による肥満モデルを作製し、その表現型を解析した。

【結果】

通常食モデルにおいて、*Ogt*-ECKO マウスは対照マウスと比較し体重増加の抑制を認めたが空腹時血糖や耐糖能、インスリン感受性などに有意な差を認めなかった。高脂肪食モデルにおいて、*Ogt*-ECKO マウスでは体重増加が顕著に抑制され、白色及び褐色脂肪組織の肥大化が抑制されていた。基礎代謝は両群に差を認めなかった。経口での脂質投与では血中 triglyceride (TG) 増加が有意に低下していたが経静脈での脂質投与では差がなく、*Ogt*-ECKO マウスの便中 TG が有意に増加していたことから、*Ogt*-ECKO マウスでは腸管からの脂質吸収が低下することが示唆された。走査電子顕微鏡 (TEM) で腸管を観察したところ、小腸絨毛リンパ管内皮細胞間結合が

Ogt-ECKO マウスにおいて強固な zipper type へ変化していた。そのため摂取した脂質がリンパ管内へ移行できず排泄され、高脂肪食による肥満に抵抗性を示すと考えた。また、*Ogt*-ECKO マウス内皮細胞の VEGFR3 及び NOS3 の発現が低下していた (Figure 1,2)。VEGFR3 は腸のリンパ管維持とトリグリセリド吸収に関与していることから、*Ogt*-ECKO マウスでは VEGFC-VEGFR3 経路を介してトリグリセリド吸収が低下していると考えられた。VEGFC-VEGFR3 シグナル伝達は、リンパ管の透過性に影響を及ぼす一酸化窒素 (NO) の産生に重要であることが知られており、*Ogt*-ECKO マウスでは NOS3 の発現が低下していることから、血清 NO 濃度を測定した。その結果、*Ogt*-ECKO マウスでは *Ogt*-flox マウスに比べて NO 濃度が有意に低いことが示された。そこで我々は、血清 NO 濃度の低下を回復させることで、腸からの脂質吸収が改善するのではないかと考え、NO 供与体である DETA-NONOate を用いて OLTT を行ったところ、NO ドナーを投与された *Ogt*-ECKO マウスでは OLTT 中に低下した血清 TG レベルが無処置対照群である *Ogt*-flox マウスと同様のレベルに戻り (Figure 3)、体重も増加した (Figure 4)。さらに、TEM 分析でも腸乳管内皮細胞間結合が観察され、ジッパー結合の開通と乳管内への TG の移動が確認された。

【考察】

今回の検討により、以下の知見が得られた。第一に、*Ogt*-ECKO マウスは *Ogt*-flox 対照マウスに比べて食事誘導性肥満に抵抗性であることを見いだした。第二に、内皮細胞における O-GlcNAcylation が腸からの脂肪吸収に関与していることを発見し、脂肪吸収に影響する腸リンパ管内皮細胞の細胞間結合の変化を同定した。第三に、*Ogt*-ECKO マウスに NO ドナーを補充すると脂肪吸収が回復した。

Ogt-ECKO マウスは、VEGFC-VEGFR3 シグナルを介した NO 産生が減少したためと思われる、高脂肪食負荷時の腸管脂肪吸収の減少を示した。このことは、内皮細胞における O-GlcNAcylation が腸の脂肪吸収に重要な役割を果たしていることを示唆している。

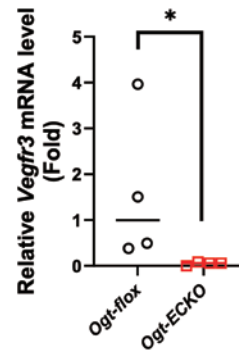


Figure1.

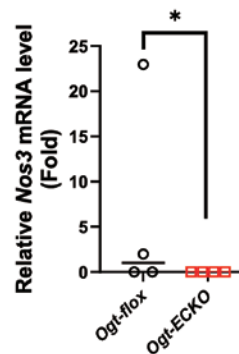


Figure2.

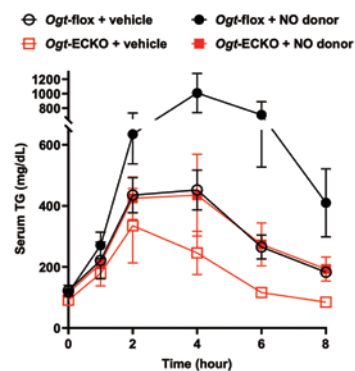


Figure3.

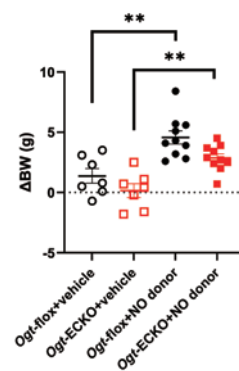


Figure4.

新規褐色脂肪活性化因子の筋代謝制御の解明と臨床応用

岡川 章太

(熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学講座)

【背景】

脂肪組織には、脂肪滴を蓄えてエネルギーを貯蔵する白色脂肪組織と、エネルギーを消費して体温を維持する働きのある褐色脂肪組織がある。近年、ヒト成人においても褐色脂肪組織の活性化は肥満やインスリン抵抗性を抑制することが明らかとなり、生活習慣病に対して予防的効果をもつと注目されている。我々は、成熟脂肪細胞特異的インスリン受容体・IGF1 受容体 inducible ダブルノックアウト (Ai-DKO) マウスにおいて、タモキシフェン投与後すぐに全身の脂肪組織が消失してメタボリックシンドロームを呈するが、長期間観察すると新たに褐色脂肪組織も再生し代謝改善することを報告している¹。

【目的】

Ai-DKO マウスを用いて、褐色脂肪組織の再生に関与する新規の褐色脂肪活性化因子を同定し、その作用と分子機序を明らかにする。

【研究内容】

Ai-DKO マウスの血清プロテオミクス解析で、褐色脂肪組織再生時に発現が上昇する褐色脂肪活性化因子として、Serpina1 を同定した。この Serpina1 は肝臓由来であり、脂肪前駆細胞の増殖及び成熟脂肪細胞におけるミトコンドリア活性化・熱産生に機能することを明らかにした。また、遺伝子改変 (Serpina1 過剰発現及びノックアウト) マウスを作製し、Serpina1 には生体内でエネルギー代謝及び糖代謝改善効果があることを示した。さらに、Serpina1 は褐色脂肪において EphB2 受容体と複合体を形成し、その下流のシグナル伝達に影響を及ぼすことを見出した。

【考察】

肝臓由来の Serpina1 は、褐色脂肪前駆細胞の増殖を促し、成熟褐色脂肪細胞の活性化を誘導することから、メタボリックシンドロームにおける肝臓 - 脂肪の臓器連関作用による 2 型糖尿病治療への展開が期待できる。

【文献】

- 1) Sakaguchi M, *et al.* Adipocyte Dynamics and Reversible Metabolic Syndrome in Mice with an Inducible Adipocyte-Specific Deletion of the Insulin Receptor. *Cell Metab* **25**, 448-462 (2017).

可溶性 T-カドヘリンの生理的役割と産生制御

沖田 朋憲

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学)

【背景】

T-カドヘリン (T-cad) は心臓、血管内皮、骨格筋、間葉系幹細胞等に発現し、アディポネクチンに特異的に結合する GPI アンカー型タンパク質である¹⁾。また T-cad は可溶性 T-cad (sT-cad) として血中にも存在する²⁾。T-cad 全身 KO マウスは高脂肪食負荷時に膵β細胞の代償性増殖不全を示し、肝特異的発現プラスミドベクターを用いて血中 sT-cad を補充すると膵β細胞増殖が改善することを明らかにした³⁾。またインスリンが欠乏すると血中 sT-cad が増加することを見出したが、血中 sT-cad 濃度を制御するメカニズムは不明であった。

【目的】

血中 sT-cad 濃度を制御するメカニズムを明らかにする。

【方法】

ストレプトゾシン (STZ) およびインスリン受容体阻害薬 S961 を負荷した WT マウス、および *db/db* マウスの血中 sT-cad を測定した。また 1 型糖尿病患者の DKA 急性期における血中 sT-cad を測定した。次に組織特異的 T-カドヘリン (T-cad) KO マウスを作製し血中 sT-cad を測定した。ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用いインスリンシグナルと培養上清中 sT-cad の関係性を評価した。

【結果・考察】

血中 sT-cad は STZ, S961 負荷および *db/db* マウスの 11 週齢以降で有意に増加した。1 型糖尿病患者の DKA 急性期において、血中 sT-cad はインスリン治療後に減少した。また卵巣癌患者に対し PI3K α 阻害薬 (インスリン-Akt シグナル阻害薬) を投与すると、血中 sT-cad が増加した。以上より、sT-cad はグルコース

濃度だけでなく、インスリンによる制御を受けていると考えられた。

次に、心筋および骨格筋特異的 T-cad KO マウスでは血中 sT-cad は低下せず、血管内皮特異的 T-cad KO マウスでは 26% 減少したことから、血管内皮細胞由来の sT-cad に着目した。HUVEC にインスリンを添加すると培養上清中 sT-cad は有意に減少し、インスリン受容体阻害薬または Akt 阻害薬を添加すると培養上清中 sT-cad の減少が見られなくなったので、血管内皮細胞由来 sT-cad の産生はインスリン-Akt シグナルにより制御されていると考えられた⁴⁾。今後膵β細胞を中心とした sT-cad の受容機構を明らかにし、その臨床応用に向けて研究を進める。

【文献】

- 1) Kita S, et al. eLife 2019
- 2) Fukuda S, et al. JCEM 2021
- 3) Okita T, et al. iScience 2022
- 4) Okita T, et al. BBRC 2024

弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 によるインスリン抵抗性制御機構の解明

奥山 朋子

(横浜市立大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)

【目的】

細胞外弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 (Fbln5) を介した糖代謝およびエネルギー代謝の制御機構を解明する。

【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (*Fbln5*KO) および野生型マウス (WT) における通常食 / 高脂肪食負荷における代謝表現型の解析により、*Fbln5* 欠損による体重非依存性のインスリン感受性の亢進、体重増加の抑制、高脂肪食誘導性の肥満・肝脂肪蓄積・脂肪細胞肥大化の抑制を認めた。グルコースクランプを用いた解析では *Fbln5* 欠損による全身のインスリン感受性亢進が示唆され、*Fbln5* 発現アデノウイルスを用いた肝における in vivo/in vitro *Fbln5* 過剰発現からは *Fbln5* 欠損における臓器連関を介したインスリン感受性の亢進が示唆された。弾性線維は血管にも豊富に発現することから *Fbln5*KO における血

管を介したインスリンの組織移行性への影響についても検証した。下大静脈からの標識インスリン投与後の肝臓におけるインスリン取り込みは *Fbln5*KO で亢進した。*Fbln5* 欠損によるインスリン感受性亢進の責任臓器を同定するため、*Fbln5*-floxed マウスを用いてこれまでに肝細胞特異的 *Fbln5*KO、脂肪細胞特異的 *Fbln5*KO、皮膚(表皮)特異的 *Fbln5*KO、血管平滑筋特異的 *Fbln5*KO、血管内皮特異的 *Fbln5*KO、骨格筋特異的 *Fbln5*KO、血管内皮 / 血管平滑筋両特異的 *Fbln5* 欠損マウスを樹立したが、いずれにおいてもインスリン感受性や体重はコントロールマウスと同等であった。さらに *Fbln5*KO では弛緩性皮膚および皮脂腺の萎縮を認め、寒冷刺激に対する体温低下が顕著であった。この際脂肪組織における熱産生・脂肪酸燃焼に関連する遺伝子群の発現は亢進しており代償性変化と考えられた。通常食下で *Fbln5*KO の酸素消費量は WT と同等であったが活動量は顕著に低下し、30°C 飼育環境下において *Fbln5*KO では体重増加が抑制され、インスリン感受性の亢進は残存した。

【考察】

弾性線維関連蛋白 *Fbln5* による、皮膚を介したエネルギー代謝制御や血管を介したインスリン移行性の制御の存在が示唆され、*Fbln5* による組織周辺環境を介した代謝制御機構の存在が示唆された。

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第一内科)

【目的】

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。しかしながら、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。肥満者は世界的に増加傾向であり、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序が解明できれば社会的な貢献は大きいものと考えられる。血管新生や免疫抑制を介して癌細胞の増殖や転移に寄与するマクロファージが存在する (Cell. 141: 39-51, 2010.)。乳癌、肺癌、メラノーマ等の数種類の癌におい

てマクロファージの浸潤が高度であるほど予後が悪いことが知られ、マクロファージを標的とした癌治療が有望である可能性が指摘されている。マクロファージは細胞表面マーカーを用いて M1 マクロファージ, M2 マクロファージに大別して解析されてきた。しかしながら、それぞれのマクロファージが癌の発症・進展にどのような役割を果たしているか、in vivo モデルでの検討は充分に行われておらず分子機構についても未だ明確ではない。本研究の目的は 1) CD206+ M2 マクロファージが癌発症・進展を促進していないか、2) 肥満による CD206+M2 マクロファージの表現型や細胞数の変化が、癌の発症・進展を促進していないかを解明することである。

【方法】

乳癌を発症する遺伝子改変マウスを高脂肪食群と通常食群に分けて、腫瘍の発生時期や、重量、体積、数を測定。摘出した腫瘍を FACS, MACS, IHC, qPCR などを用いて解析した。独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 マクロファージの数を減らした際の癌の発症・進展への影響を評価した (腫瘍の発生時期, 腫瘍重量, 腫瘍体積)。摘出した腫瘍について組織学的評価, 遺伝子発現解析, FACS などを行った。また, CD206-CreERT2; X-f/f モデルを用いて, 上記と同様の解析を行った。

【結果】

高脂肪食負荷で腫瘍の発生が早まり、腫瘍の重量・体積・数が増加した。PD-1+ CD8+ T 細胞の遺伝子発現を解析すると PD-1⁻CD8+ T 細胞と比較して Opn を高発現し、細胞障害性の指標となる Ifng, Gzmb は低発現であった。免疫組織化学でも PD-1+ 細胞が OPN を高発現していた。独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 マクロファージの数を減らすと癌の発症, 進展は抑制された。摘出した腫瘍について組織学的評価, 遺伝子発現解析 (qPCR, RNA seq), FACS などを行い, CD206+M2 マクロファージの減少による癌周囲微小環境の変化について確認した。CD206-CreERT2; X-f/f モデルの解析については進行中である。

【考察】

高脂肪食による肥満で細胞障害性が低く, OPN を発現し癌細胞増加促進作用をもつ PD-1+ CD8+ T 細胞が

腫瘍内で増加した。肥満による CD8+ T 細胞の疲弊の加速が癌発症・進展促進と関連することが示唆された。また, CD206+M2 マクロファージの数を減らすと癌の発症, 進展は抑制されることが明確となった。今後, その機序の解明を進めると同時に臨床応用を目指した基礎研究を行う予定である。

- 1) [Kado T*](#), Nishimura A, Tobe K*. History and future perspectives of adipose tissue macrophage biology. *Front Pharmacol.* 18;15:1373182. 2024.
- 2) Watanabe Y, Fujisaka S, Morinaga Y, Watanabe S, Nawaz A, Hatta H, [Kado T](#), Nishimura A, Bilal M, Aslam MR, Honda K, Nakagawa Y, Softic S, Hirabayashi K, Nakagawa T, Nagai Y, Tobe K*. Isoxanthohumol improves obesity and glucose metabolism via inhibiting intestinal lipid absorption with a bloom of *Akkermansia muciniphila* in mice. *Mol Metab.* 12;77:101797. 2023.
- 3) Nawaz A, Bilal M, Fujisaka S, [Kado T*](#), Aslam MR, Ahmed S, Okabe K, Igarashi Y, Watanabe Y, Kuwano T, Tsuneyama K, Nishimura A, Nishida Y, Yamamoto S, Sasahara M, Imura J, Mori H, Matzuk MM, Kudo F, Manabe I, Uezumi A, Nakagawa T, Oishi Y, Tobe K*. Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nat Commun.* 21;13(1):7058. 2022.
- 4) Nawaz A, Nishida Y, Takikawa A, Fujisaka S, [Kado T](#), Aminuddin A, Bilal M, Jeelani I, Aslam MR, Nishimura A, Kuwano T, Watanabe Y, Igarashi Y, Okabe K, Ahmed S, Manzoor A, Usui I, Yagi K, Nakagawa T, Tobe K*. Astaxanthin, a Marine Carotenoid, Maintains the Tolerance and Integrity of Adipose Tissue and Contributes to Its Healthy Functions. *Nutrients.* 6;13(12):4374. 2021.
- 5) Bilal M, Nawaz A, [Kado T](#), Aslam MR, Igarashi Y, Nishimura A, Watanabe Y, Kuwano T, Liu J, Miwa H, Era T, Ikuta K, Imura J, Yagi K, Nakagawa T, Fujisaka S, Tobe K*. Fate of adipocyte progenitors

during adipogenesis in mice fed a high-fat diet.
Mol Metab. 23:101328,2021.

膵島と腺房細胞の相互作用による GLP-1 を介した膵β細胞制御機構の解析

京原 麻由

(横浜市立大学大学院 医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学)

【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 (GLP-1RA) を添加したマウス単離膵島の定量プロテオミクス解析を行った。GLP-1RA 添加により膵島において 13 個のタンパク質が有意 (>2 倍, $P < 0.05$) に上昇し, 9 個が膵腺房細胞に発現する外分泌酵素関連タンパク (ex. Amy2, Cel, Prss2) であり, 膵β細胞増殖因子の Lithostathine-1 (Reg1) の上昇も認めた。GLP-1RA にて有意に発現上昇したタンパク質群は, KEGG パスウェイ解析にて, Protein/Fat digestion and absorption といった, 膵外分泌に関わる term に顕著なエンリッチメントが認められた。GLP-1RA により膵島周囲に付着する腺房細胞が増加し, GLP-1 は膵島と腺房細胞の接着を促進することが示された。単離膵島と膵腺房細胞の共培養系を確立し, GLP-1RA 添加により膵島への腺房細胞の付着が増加し, 膵島において Reg1 および P-Cad や Cx26 等の細胞接着因子の発現が上昇した。Reg1 欠損マウスでは GLP-1RA 皮下注による膵β細胞増殖促進が消失した。野生型マウス (WT) 単離膵島と WT 腺房細胞との共培養では, GLP-1RA により膵β細胞増殖は促進されたが, WT 単離膵島と Reg1 欠損マウス (KO) 腺房細胞との共培養では GLP-1RA による膵β細胞増殖は促進を認めなかった。一方, KO 単離膵島と WT 腺房細胞の共培養では, GLP-1RA により膵β細胞増殖は促進された。マウス単離膵島に組み換え Reg1 を添加すると膵β細胞増殖は促進され, GLP-1RA 添加による膵β細胞増殖の増大は認めなかった。膵腺房細胞には Gp1r 発現を認めず, 腺房細胞の単独培養では GLP-1RA により Reg1 発現は

変化しなかった。一方, GLP-1RA 添加膵島の培養上清で刺激した腺房細胞では Reg1 の発現が上昇した。

【考察】

GLP-1RA は膵島の GLP-1 受容体に作用し, 膵島からの液性因子を介して, 腺房細胞で Reg1 が誘導され, 腺房細胞由来の Reg1 が膵β細胞増殖を促進するという, 膵島と腺房細胞との接着因子や分泌因子を介した, 膵島と腺房細胞の相互作用による Reg1 を介した新規経路の存在が示唆された。

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。この遺伝機構を担う物質のひとつとして卵子や精子に含まれる脂質に注目している。これまでの研究から卵子が卵巣内において周囲の細胞とは異なる脂質組成を有していることがわかってきており, 脂質が卵子の成長過程において何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。今年度は雌マウスへの高脂肪食給餌によって卵巣および卵子に含まれる脂質組成がどのように変化するかを質量分析イメージングにより調べた。

【方法・結果】

雌マウスに高脂肪食を給餌したのち, 卵巣および卵子をそれぞれ採取し, 含まれている脂質を質量分析により網羅解析した。その結果, 約 800 種類の脂質が同定され, これまでの結果と同様に卵巣全体と卵子とでは脂質の組成割合が異なっていた。高脂肪食の介入に対しても, 卵巣全体と卵子とでは異なる挙動を示した。次に同定した脂質について, 卵巣内でどのような細胞に分布するかを質量分析イメージングにより調べた。多くの脂質は細胞種を問わず卵巣全体に一樣に分布していた。これは細胞膜を構成する脂質であるためと考えられる。一方で, 卵子にのみ, あるいは卵子が成長する場である卵胞にのみ局在する脂質が存在していた。

また、高脂肪食の介入によって、卵胞に局在するようになる脂質も認められた。

【結果】

母親の高脂肪食摂取による卵子の脂質変化が受精後に長期的に影響を及ぼすメカニズムとして、脂質の変化がエピゲノム修飾を変化させる可能性を考えている。そこで脂質の解析と並行して、高脂肪食介入が卵子および受精後の胚におけるエピゲノム修飾や遺伝子発現に及ぼす影響を解析している。今後は顕微操作や体外培養系を用いて卵子の成長過程における脂質を変化させることで、高脂肪食介入により認められるエピゲノムの変化が脂質変化により再現されるのかを検証していきたい。

糖尿病患者のミトコンドリア機能とインスリン抵抗性・インスリン分泌能や血管合併症との関連の解明

小森田 祐二

(林眼科病院付属林内科クリニック)

【目的】

近年、末梢血中の Growth Differentiation Factor 15(GDF15)、全身のミトコンドリア機能を反映し、従来のリスク因子とは独立して糖尿病合併症や心血管病、生命予後と関連することが報告されている。本研究では、2型糖尿病患者を対象に、末梢血 GDF15 濃度と、糖尿病腎症との関連を検討した。

【対象と方法】

福岡県糖尿病患者データベース研究に登録された 5131 名中 148 名の 2 型糖尿病患者の保存血清を用いて、血中 Growth Differentiation Factor 15(GDF15) を測定し、推定糸球体濾過量 (eGFR)、尿中アルブミン、慢性腎臓病ステージの関連について、多変量調整モデルを用いて横断的に解析した。調整因子は年齢、性別、BMI、喫煙、飲酒、糖尿病罹病期間、蛋白摂取量、余暇身体活動量、HbA1c、LDL コレステロール、収縮期血圧、心血管疾患既往、RAS 阻害薬使用の有無を用いた。

【結果】

血中 GDF と推定糸球体濾過量 (eGFR) は直線的な関連を認めた ($p < 0.007$, $r = -0.77$)。同様に、腎障害の程

度を表す尿中アルブミン/クレアチニン比 (UACR) とともに直線的な正の関連を認めた ($p < 0.001$, $r = 0.67$)。慢性腎臓病 (CKD) ステージ分類毎の GDF15 の平均値は、CKD Stage 1,2,3,4 で、それぞれ 1289, 1784, 2894, 4868pg/ml と CKD Stage 3,4 で高値であり、多変量調整後も統計学的に有意であった。さらに、尿中アルブミン/クレアチニン比 (UACR) 分類毎の GDF15 の平均値は、UACR 30 未満で 1458, 30-299 で 2014, 300-999 で 3454, 1000 以上で 4848pg/ml と UACR 300 以上で高値であり、多変量調整後も統計学的に有意であった。また、年齢が高齢であるほど、余暇身体活動量が少ないほど、メトホルミン内服者で血中 GDF15 濃度は有意に高い傾向にあった。また GDF15 の糖尿病関連腎症 ($eGFR < 60$ もしくは $UACR \geq 30$) 予測能として ROC 曲線を描くと、ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.87 であり、高い予測能と判断された。

【考察】

本研究では、日本人 2 型糖尿病患者において、血中 GDF15 濃度が従来の腎症リスク因子と独立して eGFR, UACR と関連し、eGFR と UACR との関連はまた独立していることが明らかになった。今後、GDF15 は、汎用自動分析機器に搭載されることも検討されており、比較的安価・迅速に、糖尿病患者へのスクリーニング検査として汎用性が高くなる可能性がある。

低炭水化物 / 高蛋白質食で惹起される神経ネットワークを介した膵 α 細胞量調節の解明

椎木 幾久子

(山口大学大学院医学系研究科病態制御内科学講座)

【目的】

グルコース、アミノ酸および脂肪酸は膵内分泌ホルモン分泌の制御因子であるが、膵島細胞への直接作用以外による膵内分泌細胞量やホルモン分泌制御には不明な点が多い。一方、グルカゴンは肝臓でのアミノ酸代謝に重要な役割を担い、蛋白質を主体とする栄養環境ではグルカゴンの要求性が高まると考えられる。本研究では、このような栄養環境での膵 α 細胞の挙動とその制御機構について臓器連関に着目し解明する。

【方法・結果】

低炭水化物 / 高蛋白質食 (P:F:C=70:22:8%kcal, Low Carbohydrate/High Protein; LCHP) を 8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに 10 日間摂餌させ標準食 (P:F:C=22:22:56%kcal) と比較した。LCHP 摂餌マウスでは血糖値に変化はないものの、標準食摂餌群に比し血中グルカゴン値の上昇を認め、肝臓では、グリコーゲン含量低下とともにアミノ酸異化および糖新生亢進を認めた。膵組織では交感神経の分布に一致して α 細胞の新生・増加を認め、それらは薬理的交感神経遮断により抑制された。脳組織では求心性迷走神経の中核投射先である延髄孤束核および交感神経起始核である淡蒼縫線核において FosB 陽性細胞の著明な増加を観察した。さらに、右側に対し左側迷走神経下神経節において FosB 陽性細胞の増加を認めたことから、左迷走神経肝臓枝求心路を介した中枢経路の活性化が示唆された。そこで、迷走神経肝臓枝切断術を施したマウスに同様に摂餌させたところ、肝グリコーゲン含量低下は回復しないものの、 α 細胞新生・増加が完全に抑制された。 α 細胞増加を惹起する生理メカニズムとして肝臓-脳-膵臓連関が想定された。本経路の起点と考えられる肝臓では、LCHP 摂餌により門脈近傍でのグリコーゲン減少と門脈周囲に分布する神経の活性化を認めた。ケトン食摂餌マウスにおいても肝グリコーゲン総含量は低下するが、門脈周囲では維持されており、 α 細胞増加は認められなかった。門脈周囲における肝グリコーゲン低下が本ネットワークの惹起に関与すると示唆された。

【結論】

蛋白質を主に利用する栄養環境下において惹起される肝臓-中枢神経-膵 α 細胞の臓器連関による α 細胞量調節が示唆された。本経路は栄養環境変化に対して臓器連関を介したグルカゴンによる糖新生を活性化する一種の飢餓応答経路と考えられる。

細胞外コラーゲンマトリックス調整による体脂肪量の規定機構

Shin Jihoon (シン ジフン)

(ハーバード大学 メディカルスクール)

【背景】

体脂肪量 (アディポシティ) は体の脂肪組織の量や割合を指し、ヒトによって大きく異なる。非常に痩せたヒトでは 5% 程度から、病的肥満の場合には 40% 以上に達することもある。その差は様々な生理的、環境的、病態的、遺伝的要因の組み合わせによって影響されるが、統一された分子機構は解明されていなかった。

【目的】

本研究では脂肪組織量を規定する因子の同定とその分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】

ヒト脂肪組織や脂肪細胞の公開されたトランスクリプトームのデータを用い、生理的、環境的、病態的、遺伝的な環境で脂肪組織量の規定因子を探索する。マウスモデルや脂肪細胞モデルを用い、規定因子の機序を調べる。

【結果】

脂肪組織量に関わるトランスクリプトームの総合的な解析から可能性の高い因子として、HSP47 を同定した。HSP47 は ER に局在し、コラーゲンマトリックスのシャペロンタンパクとして知られており、そのフォールディングや分泌に重要な因子である。HSP47 は脂肪組織に高発現し、摂食 / 過食、肥満では増加し、逆に絶食や運動、肥満外科治療、Cachexia では低下した。

ヒト脂肪組織の大規模コホート研究のデータ解析から、HSP47 遺伝子発現は体脂肪量や体格指数 (BMI)、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径と相関があった。また、遺伝子変異とヒト組織の遺伝子発現レベルの相関の解析から、HSP47 遺伝子変異 (rs606452-A, rs668347-T, rs645935-T, rs584961-A) は、脂肪組織で HSP47 の遺伝子発現を増加させ、ウエストやヒップ周囲径などの体脂肪量の増加と関連していることを見出した。

HSP47 と体脂肪量の因果関係を調べるため、マウ

モデルを用いた。まず、Hsp47flox/flox マウスと AdipoqCre マウスを交配させて脂肪特異的 Hsp47 ノックアウト（以下、AdHSP47KO）マウスを作成した。AdHSP47KO マウスは体重と摂食量に差はないが、内臓脂肪および皮下脂肪量が低かった。また、薬理学的モデルで HSP47 阻害剤の投与によっても同様な結果が見られ、内臓脂肪および皮下脂肪組織を有意に減少させた。

そのメカニズムとして、HSP47 はコラーゲン線維の折りたたみと細胞外マトリックスへの分泌を促進し、インテグリン受容体との物理的結合をする。細胞外コラーゲン線維とインテグリンの相互作用は FAK シグナル伝達を誘導し、MDM2 による PPAR γ タンパク質の分解を抑制することが分かった。

本研究では HSP47 が体脂肪量を規定する因子であることが示され、個人の体脂肪量を一つの因子で科学的に説明できる重要な基礎知識が得られ、今後、体脂肪量と関連する臨床応用にも期待できる。

【論文実績】

Shin, J. et al. HSP47 levels determine the degree of body adiposity. Nature communications 14, 7319 (2023).

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

鈴木路可

(University of California, San Francisco)

2019年より上記研究ではなく、 β 細胞におけるオートファジーを対象とした研究を行ってきた。

【目的】

本研究の目的は、膵 β 細胞におけるオートファジー不全が糖代謝に与える分子機構を解明することである。先行研究において、胎生期から膵 β 細胞でオートファジーを欠失させたマウスでは耐糖能異常が誘導されることが報告されているが、その背景にある分子機構は未解明であった。

【方法】

β 細胞特異的かつ時期特異的にオートファジー不全

を誘導可能な遺伝子改変マウス ($i\beta$ Atg7KO) を作製し、2週間および6週間オートファジー不全を誘導したマウス ($i\beta$ Atg7KO-2W, $i\beta$ Atg7KO-6W) を用いて解析を行った。まず、耐糖能試験を実施し、その後、膵島を単離し RNA sequencing を行った。

【結果】

$i\beta$ Atg7KO-2W では耐糖能は対照群と同等であったが、 $i\beta$ Atg7KO-6W ではインスリン分泌不全を伴う高血糖が認められた。RNA sequencing の結果、 $i\beta$ Atg7KO-2W では Sprr1a の発現が最も顕著に変動していた。さらに、 $i\beta$ Atg7KO-6W の膵島では Sprr1a がタンパクレベルで強く発現しており、dbdb マウスの膵島においても同遺伝子の高発現が確認された。

【考察】

これらの結果から、オートファジー不全の蓄積が β 細胞の機能不全を引き起こすことが示唆された。また、Sprr1a はオートファジー不全下の β 細胞においてなんらかの役割を果たしている可能性が示された。現在、Sprr1a の機能を詳細に検討するため、floxed Sprr1a マウスを作製し、 $i\beta$ Atg7KO マウスとの交配を進めている。

臨床情報、ゲノム情報を活用した 2 型糖尿病のサブタイプ分類

鈴木 顕

(東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科)

【目的】

本研究の目的は、2 型糖尿病に関連する遺伝的バリエーションのメカニズムを解明することである。この目的を達成するため、異なる祖先集団から得られた複数の組織におけるオミクスデータと、2 型糖尿病に関連する形質の GWAS (ゲノムワイド関連解析) データを統合して解析を行った (図 1)。

【方法】

16 の組織における遺伝子発現 (トランスクリプトーム)、タンパク質 (プロテオーム)、代謝物 (メタボローム) の量的形質遺伝子座 (QTL) 解析データ、および 46 の代謝関連形質 GWAS データを用いた。これらのデータ

と2型糖尿病のGWASデータを統合し、1,289の2型糖尿病関連バリエントについて、オミクスQTLデータや代謝関連形質GWASデータで同定されたバリエントとの共局在を解析した。さらに、バリエント、遺伝子、代謝物、代謝形質をネットワーク化し、2型糖尿病関連バリエントが疾患リスクに及ぼす影響のメカニズムを探った。最後に、効果遺伝子がコードするタンパク質を標的とする薬剤と、承認された2型糖尿病治療薬との関連を解析した。

【結果】

1,289の2型糖尿病GWASバリエントのうち、716(56%)がオミクスデータまたは代謝関連形質との強い共局在を示した。これにより、657の近位効果遺伝子、1,691の遠位効果遺伝子、731の代謝物、43の2型糖尿病関連形質が同定された。773の近位および遠位効果遺伝子は、これまで十分に研究されていなかった祖先集団グループのeQTLデータや、少数民族において濃縮された2型糖尿病バリエントのデータから同定され

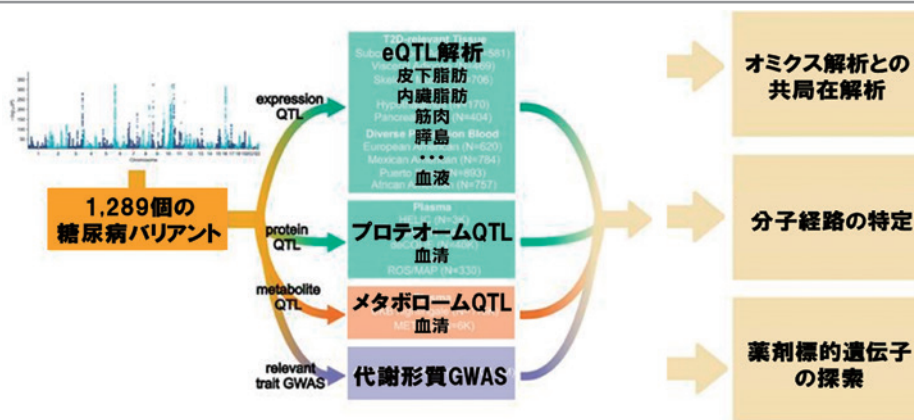


図1 GWASとオミクスデータを活用した共局在解析と薬剤標的遺伝子の探索

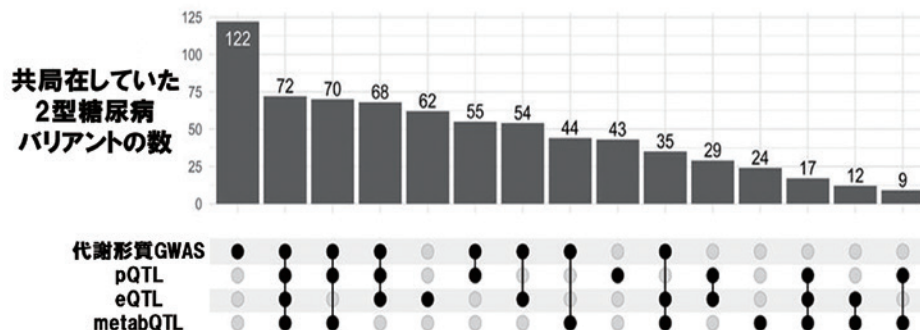


図2 2型糖尿病バリエントと各種QTL解析で同定されたバリエントの共局在の数

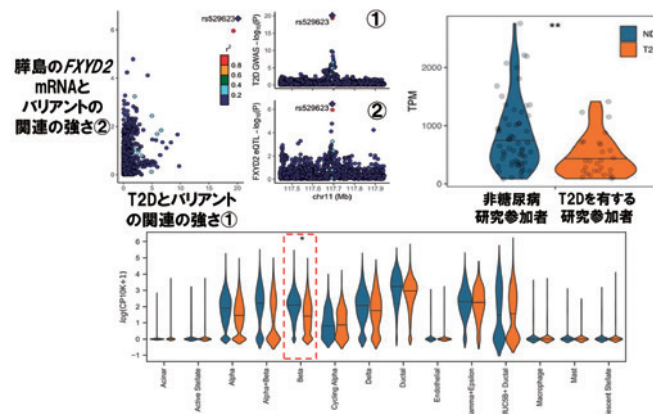


図3 FXD2のGWAS, eQTL共局在(左上), 膵島(右上), 膵島内細胞種(下)における遺伝子発現

たものである。また、ネットワーク解析により、2型糖尿病関連バリエーションが疾患リスクに与える影響のメカニズムが明らかとなった。さらに、効果タンパク質を標的とする薬剤は、2型糖尿病治療薬として承認されているものに多く含まれていた。

eQTL 共局在解析によって、膵臓β細胞特異的バイオマーカーとして知られる FXYP2 遺伝子が同定された (図3)。FXYP2 は Na,K-ATPase の活性と細胞増殖を調節し、ヒト内分泌膵臓発生の初期段階で発現する。2型糖尿病関連バリエーション rs529623 のリスクアレルは、膵島での FXYP2 発現低下と関連していた。また、2型糖尿病患者の膵島、特にβ細胞で FXYP2 の発現が有意に低下していることが確認された。現在、FXYP2 を標的とする5つの承認薬が存在するが、糖尿病治療には用いられていない。これらの薬剤は、前臨床研究でβ細胞機能を標的とし調節できることが示されれば、2型糖尿病治療のために再利用される可能性がある。この発見は、FXYP2 が2型糖尿病の病態生理学において重要な役割を果たす可能性を示唆しており、新たな治療の開発に繋がる可能性がある。

【結論】

本研究は、2型糖尿病関連遺伝的バリエーションの分子メカニズムに関する理解を大きく前進させた。これらの結果は、遺伝的知見をもとに新しい治療戦略を考案する上で重要な役割を果たすと期待される。また、多様な祖先集団のデータを活用した機能マッピングの価値を示し、2型糖尿病の病態生理学に関する新しい仮説生成を可能にする包括的なリソースを提供した。さらに、同定された効果遺伝子は、2型糖尿病の新たな薬物標的としての優先順位を高める可能性がある。ただし、因果関係の特定や薬剤化の可能性、機能的な検証には更なる研究が必要である。

Mandla R, Suzuki K, et al. Multi-omics characterization of type 2 diabetes associated genetic variation. Under review in Nature Genetics <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2024.07.15.24310282v1.full>

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や熱産生能を有するベージュ脂肪細胞への変換 (褐色化) 過程は、主に遺伝子やタンパク質発現制御に関する知見に基づくメカニズム解析が盛んである。他方、これらの過程における低分子代謝物の挙動についての知見は限られており、低分子代謝物の量的・質的变化の全体像については不明確な点が多く存在する。そこで、本研究では低分子代謝物の網羅的解析手法の一種であるメタボローム解析を活用し、本年度は特に、脂肪細胞の分化過程に関与する低分子代謝物の機能及びメカニズム解明を目的とし、研究を行った。

【方法】

培養脂肪細胞の分化誘導期に cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR) の代謝経路近傍に位置する成分や関連成分を添加し、脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量を解析した。また、蛍光分析法を用いて、培養脂肪細胞への cADPR 添加時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を解析した。

【結果・考察】

ADP-ribose の添加では脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量の増加は確認されなかった一方、nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate の添加では脂肪細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現量の増加が確認された。また、蛍光分析において、培養脂肪細胞への cADPR 添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、dantrolene (RyR inhibitor) 共添加により、先述した効果が失われることから、昨年度までに得られた知見と本年度得た知見を合わせて考察すると、cADPR は RyR

及び細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節を介して、脂肪細胞分化制御に貢献することが示唆された。

【文献】

Takahashi, H., Nishitani, K., Kawarasaki, S., Martin-Morales, A., Nagai, H., Kuwata, H., Tokura, M., Okaze, H., Mohri, S., Ara, T., Ito, T., Nomura, W., Jheng, H.F., Kawada, T., Inoue, K. & Goto, T.: Metabolome analysis reveals that cyclic adenosine diphosphate ribose contributes to the regulation of differentiation in mice adipocyte, *FASEB J.*, 38(1), e23391 (2024).

肝臓の脂肪滴形成におけるミトコンドリアダイナミクスの機能的意義の解明

武市幸奈

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【目的】

近年、脂肪滴 (LD) 結合タンパクであるペリリピン (PLIN) がミトコンドリア分裂因子 (Mff) を介して心筋における LD 形成を制御し、心機能障害などの病態形成に関与する可能性が示された (*Cardiovasc. Res.* 2020)。一方で、metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) の発症起点である肝細胞の LD 形成において、ミトコンドリア分裂因子の役割は不明である。我々は、肝細胞特異的 Mff 欠損 (KO) マウスの解析により、ミトコンドリア分裂不全マウスでは、肝細胞における ER ストレス亢進と脂肪酸代謝障害を認め、肝細胞の LD が過剰に蓄積し MASH 発症に寄与することを明らかにした (Takeichi Y, et al. *Diabetologia* 2021)。以上より、ミトコンドリア分裂阻害は肝臓における DL の形態変化を制御し MASH 発症へ影響を与えるのではないかと考えた。本研究の目的は、ミトコンドリア分裂が肝細胞の DL 形成に与える影響を評価し、MASH の脂肪蓄積機序を明らかにすることである。

【方法と結果】

ミトコンドリア分裂阻害による DL 形態評価 (1) in vivo: 高脂肪食負荷コントロール (CONT), KO マウ

スの肝臓における DL サイズを電子顕微鏡で解析すると、MASH 所見を呈した KO マウスでは、肝細胞内 LD が有意に大型化していた。(2) ex vivo: 初代培養肝細胞 (PH) にミトコンドリア分裂刺激であるグルコース (25mM) / オレイン酸 (300 μ M) 処理を行い、LipidTOX™にて DL を蛍光染色し共焦点顕微鏡を用いて DL サイズを解析すると、いずれの刺激でも、CONT マウスでは小型化した DL が増加したのに対し、KO マウスでは DL が大型化していた。更に NASH を発症した KO マウスではオートファジー制御に関わるとされる PLIN2 の遺伝子発現が増加していた。

【考察】

Mff を介したミトコンドリア分裂阻害は、肝細胞における LD 形成や大きさの制御に関与する可能性が示された。今後は、PH において Mff を knock down し、ミトコンドリア分裂刺激後の DL 形態やミトコンドリアとの interaction について共焦点顕微鏡で観察し、DL 形成に与えるミトコンドリア分裂の直接的作用を評価する予定である。

摂食時の正常な腸管免疫応答を維持する新規肥満治療の検討

戸田郷太郎

(東京大学医学部附属病院)

【目的】

免疫細胞の食後の反応が肥満時に破綻するメカニズムを検討するため、今年度の助成金を用いて門脈内代謝物が免疫細胞を介して代謝機能に及ぼす影響を解析した。

【方法】

短鎖脂肪酸の一つである酪酸を培地に添加した初代培養マクロファージを用いて NF- κ B 活性化の各段階への影響を解析した。

【結果】

これまで Bulk RNA-seq による検討で小腸パイエル板では食後、Hsp70 の発現が増加し、scRNA-seq では骨髄系細胞、B 細胞、T 細胞で食後の発現が確認された。発現変化が見られる遺伝子の転写開始点近傍のモ

チーフ解析では NF- κ B, Fos:Jun など急性期応答を促進すると考えられる転写因子に対応するモチーフが複数の遺伝子で共通していた。RT-PCR で同様のサンプルを解析すると, IL-1 β , IL-10 などいずれも NF- κ B により発現誘導される因子の発現が増強していた。酪酸の存在下で, 食後に増強するシグナルである LPS, インスリン刺激下で I κ B α の RNA 発現は減少しない一方で蛋白量が減少したことから同蛋白の分解が促進されていると考えられた。同様の条件で NF- κ B p65 の核内移行は減少したがインスリンによる p65 リン酸化, 核内蛋白の増加は保たれた。I κ B α と共免疫沈降される p65 は酪酸の作用下で亢進した。Cre-loxP システムによる Hdac2 欠損下でも同様の変化が見られた。

【考察】

NF- κ B の活性化は肥満状態で障害される, 腸管免疫の正常な応答と考えられた。肥満状態では短鎖脂肪酸により促進される I κ B α 蛋白の分解が低下し, 複数シグナルによる相加的な NF- κ B 活性化が障害されることにより免疫細胞の機能異常をきたす可能性がある。今後この経路が生体で果たす役割を解析する予定である。

ヒト iPS 細胞レポーター株を用いた新生児糖尿病原因遺伝子 *RFX6* の膵・腸管発生成熟機構に関する役割の解明

中村 聡 宏

(京都大学)

【背景・目的】

RFX6 は膵・腸管形成不全を伴う新生児糖尿病を主徴とする Mitchell-Riley 症候群 (MRS) の原因遺伝子として同定された。一方で, 若年発症成人型糖尿病家系の遺伝子変異の報告や膵 β 細胞でのインスリン分泌調節への関与, また, 腸管内分泌細胞である K 細胞での発現を示す報告もあり, 本研究は, 内分泌臓器発生分化, また, 分化後の膵・腸管を含めた内分泌細胞における成熟過程, 調整メカニズムにおける *RFX6* の発現調節機構及び機能解明を目的としている。

【方法】

樹立した *RFX6* ヒト iPS 細胞ノックインレポーター株 *RFX6*^{+/*eGFP*} 及び *RFX6*^{*eGFP*/*eGFP*} ノックイン・ノックアウト株を用いた。 *in vitro* での胚性内胚葉を経由した原始腸管への分化誘導を用い, 原始腸管レベルにおける *RFX6* 制御機構についての検討を行った。また, 腸管内分泌細胞を発現可能な *in vitro* での腸管オルガノイドへの誘導を試みた。

【結果】

原始腸管レベルでの発生段階において retinoic acid が *RFX6* の発現刺激物質として同定され, 臨床応用されている Am80 でも同様の結果が得られた。これらはレチノアルデヒド脱水素酵素 (RALDH) 欠損マウスにおける *Rfx6* 発現低下を示す報告とも矛盾しない。腸管オルガノイドへの分化については株内の分化効率が安定せず, 安定的に腸管内分泌細胞を誘導可能な系の確立を目指している。

【文献】

Nakamura T, Fujikura J, Ito R, Keidai Y, Inagaki N. Human *RFX6* regulates endoderm patterning at the primitive gut tube stage. PNAS Nexus. 3(1), pgae001, 2024.

Unveiling the Role of CD206 M2-like Macrophage Depletion in Activating Fibro-Adipogenic Progenitors and Enhancing Myogenesis During Tissue Recovery

Allah Nawaz, Kazuyuki Tobe

(University of Toyama, Toyama, Japan)

【Objective】

The primary objective of this research is to elucidate the role of CD206⁺ M2-like macrophage depletion in regulating the activation of fibro-adipogenic progenitors (FAPs) and enhancing myogenesis during tissue recovery. Specifically, this study aims to:

- a) Investigate the impact of CD206⁺ M2-like macrophage depletion on the functional behavior of FAPs, including their proliferation, differentiation, and influence on the muscle regeneration

environment in lean and obese states.

- b) Examine the molecular mechanisms by which CD206⁺ M2-like macrophage depletion alters the tissue microenvironment, promoting or inhibiting myogenesis.

【Methods】

Lean and obese CD206DTR (Tg) mice model following diphtheria toxin (DT) administration were utilized to introduce acute injury. The model involved inducing acute muscle injury through administration of cardiotoxin and subsequent recovery. Muscle samples were collected at 7-days post-injury. Histological analysis, immunofluorescence staining, and gene expression profiling were conducted to assess changes in tissue architecture, macrophage populations, FAPs activation, and myogenesis.

【Results】

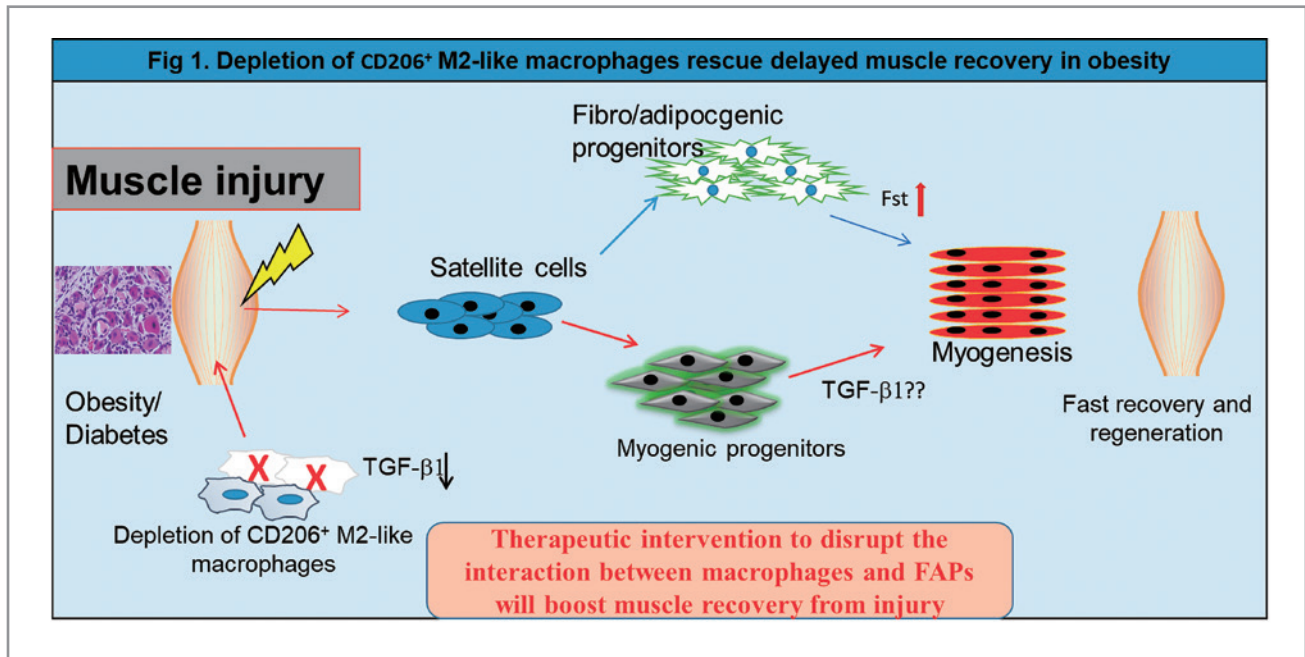
Previous reports show that obesity delay the recovery process¹⁻³⁾. In addition to negative effects of obesity-induced inflammation on metabolic profile⁴⁻⁸⁾, obesity can impair skeletal muscle function, leading to reduced mobility in obese individuals⁹⁾. To confirm this, we fed the Tg and WT mice an HFD for 12 weeks and then administered DT injection to deplete CD206 M2-like macrophages following CTX-injury. One week after injury, the mice were sacrificed to collect muscles for recovery analysis. Immunostaining analysis revealed that HFD delay the recovery process but depletion of CD206 M2-like macrophages improves the recovery process (Fig. 6A). Gene expression analysis also show that myogenesis related genes were upregulated in CTX-injured TA of HFD-fed Tg mice. Similar to chow-fed mice data, we also observed enhanced MyoD⁺ cells, Fst⁺ cells and reduced number of Mst⁺ cells in the tibialis anterior (TA) of CTX injured HFD-fed Tg mice, showing that even in obesity state, depletion of CD206⁺ M2-like macrophages promoted muscle recovery. Furthermore, we isolated FAPs from obese Tg mice and isolated FAPs were subjected for RT-

qPCR analysis. We found that depletion of CD206⁺ M2-like macrophages resulted in the activation of FAPs within the injured tissue, as evidenced by increased expression of activated FAPs-related marker genes including follistatin, and Fstl1.

【Discussion】

Obesity and type 2 diabetes is increasing rapidly worldwide and is accompanied by many complications, including impaired muscle regeneration. In a rapidly aging society, the number of elderly people with sarcopenia has been rapidly increasing. Thus, it is an urgent task to develop an effective method to maintain muscle mass and strength. However, in elderly people and/or obese and diabetic patients, in which systemic inflammation occurs, muscle injury was accelerated by worsened inflammation and recovery from muscle injury has been delayed¹⁰⁻¹⁴⁾. Multiple lines of evidence show that FAPs in injured muscle is main source of Fst that facilitate muscle regeneration^{11, 15-21)}. Fst and Fstl1 are essential for the acute repair of the infarcted myocardium, and stimulation of early cardiac fibroblast activation is a novel function of Fstl1. Previous studies show that loss of Myostatin (Mst) promotes satellite cells and MPs differentiation and proliferation in injured muscle²²⁻²⁵⁾.

The secreted glycoprotein Fst and Fstl1 is found to be robustly expressed in fibroblasts and myofibroblasts in the infarcted heart^{11, 16, 17, 26)}. Single cell RNA-sequence analysis revealed that PDGFR⁺ cells specifically express Fst in adipose tissue²⁷⁾. Other studies also revealed that in skeletal muscle FAPs are major source of Fst^{18, 21, 28)}. Mst required phosphorylation of smad2/3 to block myogenic differentiation²³⁾. We previously reported that depletion of CD206⁺ M2-like macrophages enhanced adipocyte progenitor's proliferation in adipose tissue²⁹⁾. We hypothesized that depletion of CD206⁺ M2-like macrophages might enhances FAPs proliferation in CTX-injured muscle. We also showed that depletion of CD206⁺ M2-like macrophages enhances myogenesis and FAPs



activation, thereby promoting muscle regeneration in lean mice³⁰. Current study underscore the intricate interplay between CD206⁺ M2-like macrophages, FAPs, and myogenesis during tissue repair and regeneration in obese mice. Depletion of CD206⁺ M2-like macrophages appears to trigger a cascade of events leading to activation of FAPs and subsequent enhancement of myogenic differentiation in obese state (Fig. 1). These results suggest a potential therapeutic avenue for promoting tissue repair by targeting macrophage phenotypes and manipulating their interactions with progenitor cells.

In conclusion, this study provides novel insights into the role of CD206⁺ M2-like macrophages in recovery process in obese state.

【References】

- 1) Geiger, A.E., et al., *Dual effects of obesity on satellite cells and muscle regeneration*. *Physiol Rep*, 2020. **8**(15): p. e14511.
- 2) Park, M.J. and K.M. Choi, *Interplay of skeletal muscle and adipose tissue: sarcopenic obesity*. *Metabolism*, 2023. **144**: p. 155577.
- 3) Werner, J.U., et al., *Comparison of Fatty Acid and Gene Profiles in Skeletal Muscle in Normal and Obese C57BL/6J Mice before and after Blunt Muscle Injury*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 19.
- 4) Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Obesity-related derangements in metabolic regulation*. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006. **75**(1): p. 367-401.
- 5) Bilal, M., et al., *Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet*. *Molecular metabolism*, 2021. **54**: p. 101328.
- 6) Fujisaka, S., et al., *Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1α-dependent and HIF-1α-independent manner in obese mice*. *Diabetologia*, 2013. **56**: p. 1403-1412.
- 7) Nawaz, A., et al., *Heterogeneity of adipose tissue-resident macrophages-beyond M1/M2 paradigm*. *Diabetology international*, 2023. **14**(2): p. 125-133.
- 8) Nawaz, A., et al., *Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 11370.
- 9) Teasdale, N., et al., *Obesity alters balance and movement control*. *Current Obesity Reports*, 2013. **2**: p. 235-240.
- 10) Akhmedov, D. and R. Berdeaux, *The effects of obesity on skeletal muscle regeneration*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 371.

- 11) Chaly, Y., et al., *Follistatin-like protein 1 enhances NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion from monocytes and macrophages*. Eur J Immunol, 2014. **44**(5): p. 1467-79.
- 12) Cree-Green, M., et al., *Delayed Skeletal Muscle Mitochondrial ADP Recovery in Youth With Type 1 Diabetes Relates to Muscle Insulin Resistance*. Diabetes, 2015. **64**(2): p. 383-392.
- 13) Fearing, C.M., et al., *Increased Adipocyte Area in Injured Muscle With Aging and Impaired Remodeling in Female Mice*. The Journals of Gerontology: Series A, 2016. **71**(8): p. 992-1004.
- 14) Fu, X., et al., *Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK*. Diabetes, 2016. **65**(1): p. 188-200.
- 15) Biferali, B., et al., *Fibro-Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network*. Frontiers in Physiology, 2019. **10**(1074).
- 16) Zhang, W., et al., *Follistatin-like 1 protects against hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45820.
- 17) Maruyama, S., et al., *Follistatin-like 1 promotes cardiac fibroblast activation and protects the heart from rupture*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(8): p. 949-66.
- 18) Roberts, E.W., et al., *Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia*. J Exp Med, 2013. **210**(6): p. 1137-51.
- 19) Pannerec, A., et al., *Defining skeletal muscle resident progenitors and their cell fate potentials*. Development, 2013. **140**(14): p. 2879-91.
- 20) Saccone, V., et al., *HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles*. Genes Dev, 2014. **28**(8): p. 841-57.
- 21) Mozzetta, C., et al., *Fibro-adipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(4): p. 626-39.
- 22) Yamada, M., et al., *High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(3): p. C465-76.
- 23) Trendelenburg, A.U., et al., *Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(6): p. C1258-70.
- 24) Benabdallah, B.F., et al., *Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice*. Cell Transplant, 2008. **17**(3): p. 337-50.
- 25) Tsao, J., et al., *Myostatin genetic inactivation inhibits myogenesis by muscle-derived stem cells in vitro but not when implanted in the mdx mouse muscle*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(1): p. 4.
- 26) Oshima, Y., et al., *Activin A and Follistatin-like 3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury*. Circulation, 2009. **120**(16): p. 1606-1615.
- 27) Burl, R.B., et al., *Deconstructing Adipogenesis Induced by beta3-Adrenergic Receptor Activation with Single-Cell Expression Profiling*. Cell Metab, 2018. **9**(18): p. 30332-2.
- 28) Formicola, L., et al., *Inhibition of the Activin Receptor Type-2B Pathway Restores Regenerative Capacity in Satellite Cell-Depleted Skeletal Muscle*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 515.
- 29) Nawaz, A., et al., *CD206+ M2-like macrophages*

regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors.

Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 286.

- 30) Nawaz, A., et al., *Depletion of CD206(+) M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 7058.

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

(順天堂大学代謝内分泌内科学)

【目的・方法】

α 細胞分化を時間軸に沿って解析するため、レポーターコンストラクト eGFP-IRES-mRFP を proglucagon gene に挿入した“Gcg-Timer マウス”を作製した。本マウスでは、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生 α 細胞は緑色蛍光、より分化した α 細胞は緑色および赤色蛍光を呈する細胞として標識されるため、 α 細胞を経時的に観察できる。本マウスを用いて「 α 細胞がいつ・どこで生まれるのか？」を明らかにするとともに、 α 細胞新生・分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化を解析する。

【結果】

Gcg-Timer マウス膵を共焦点レーザー顕微鏡及び flow cytometry を用いて観察した結果、緑色蛍光を呈する新生 α 細胞は胎生期及び生後7日未満の新生仔期においてのみ観察された。胎生17.5日膵切片の膵管・血管を免疫染色した結果、新生 α 細胞は膵管のみでなく血管にも接しており、両方またはいずれかに接していた。この位置関係は、Gcg^{CreER/+} マウスと ROSA26^{mT/mG} レポーターマウスを交配させ、母体にタモキシフェン投与することにより新生 α 細胞を緑赤共陽性の細胞として標識可能な別のマウスモデルを用いても同様に観察された。同時期のマウス膵を FACS で sorting 後 RNA sequencing を行った結果、新生 α 細胞群で増加している遺伝子群には血管新生に関わる遺伝子群も抽出されており、上記新生 α 細胞と血管との関連性を支持する

結果と考えられた。

【考察】

新規 Gcg-Timer マウスを用い、時期、場所、関連する遺伝子変化などの新生 α 細胞の特性を明らかにするとともに、成体マウスにおいてグルカゴンシグナル抑制下 α 細胞新生が誘導されうる結果を得た。以上の結果をもとに論文を作成し、Diabetologia に掲載された。Himuro M, Wakabayashi Y, Taguchi T, Katahira T, Suzuki L, Iida H, Ogihara T, Nishida Y, Sasaki S, Lynn FC, Hiraoka Y, Oshima S, Okamoto R, Fujitani Y, Watada H, Miyatsuka T.: Novel time-resolved reporter mouse reveals spatial and transcriptional heterogeneity during alpha cell differentiation, Diabetologia., **67**(1):156-169, (2024).

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 (～2024年7月31日))
(東京大学大学院医学系研究科 先進代謝病態学講座 (2024年8月1日～))

【背景】

褐色脂肪細胞は「エネルギー消費の促進」に基づく肥満や糖尿病の治療標的として期待される。我々は褐色脂肪細胞の分化と機能を制御する鍵因子 nuclear factor I-A (NFIA) を同定し解析してきた (Hiraike Y, et al. *Nature Cell Biology* 2017, *PLoS Genetics* 2020, *iScience* 2022)。NFIA はミトコンドリアの活性化ならびにエネルギー消費の亢進作用と抗炎症作用の双方を介して肥満や糖尿病に保護的に作用する (Hiraike Y, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2023)。更に我々は台湾 biobank の解析から褐色脂肪細胞の機能を介して作用する肥満感受性 SNP である FTO 遺伝子近傍の rs1421085 と定期的な運動習慣の間に追跡期間中の体重増加に対する遺伝子環境相互作用を同定した (Hiraike Y. et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021)。

【結果】

我々は最近、UK Biobank のデータを用いて2型糖尿病の遺伝子リスクと身体活動が糖尿病患者における心筋

梗塞や脳卒中など心血管病の発症に対して及ぼす遺伝子環境相互作用について検討した。一般に適度な運動習慣は心血管病を抑制すると考えられ、各国のガイドラインにおいても心血管病の予防のために推奨されている。しかしながら、心血管病の高リスク群である糖尿病患者において身体活動の心血管病抑制効果が遺伝リスクによって増強したり減弱したりする可能性についてはこれまで十分に検討されていなかった。我々の解析では、polygenic risk score が高値の糖尿病患者においては血糖管理の水準を調整した後においても身体活動による心血管イベントの保護的効果が失われていた。ただし、身体活動は polygenic risk score の高低に関わらず 2 型糖尿病患者の全死亡を有意に抑制しており、この遺伝子環境相互作用は心血管イベントに特異的と考えられた (Lee CL., Hiraike Y., et al. *European Journal of Preventive Cardiology* 2024).

【今後の展望】

引き続き褐色脂肪細胞の分子生物学的なメカニズム解析と大規模バイオバンクの統計解析を両輪として進めるとともに、両者を統合することによって生活習慣病領域における精密医療の実現を目指した研究を進める所存である。

【文献】

- Lee CL, Liu WJ and Hiraike Y*. Reply to Tsai et al.: Exploring the effect of physical activity on cardiovascular outcomes in individuals with diabetes. *European Journal of Preventive Cardiology* 2024; zwae238, online ahead of print.
* **Corresponding author**
- GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators. Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability-adjusted life-years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 2024; 403(10440): 2133-2161.
- Lee CL, Yamada T, Liu WJ, Hara K, Yanagimoto S and Hiraike Y*. Interaction between type 2 diabetes polygenic risk and physical activity on cardiovascular outcomes. *European Journal of Preventive Cardiology* 2024; zwae075, online ahead of print.* **Corresponding author** [Highlighted in Editorial, *European Journal of Preventive Cardiology* 2024; zwae106, online ahead of print.]
- Mensah GA, Fuster V, Murray CJL, Roth GA; Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaborators. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. *Journal of the American College of Cardiology* 2023; 82(25): 2350-2473.
- Sakurai Y, Kubota N, Takamoto I, Wada N, Aihara M, Hayashi T, Kubota T, Hiraike Y, Sasako T, Nakao H, Aiba A, Chikaoka Y, Kawamura T, Kadowaki T and Yamauchi T. Overexpression of UBE2E2 in mouse pancreatic β -cells leads to glucose intolerance via reduction of the β -cell mass. *Diabetes* 2024; 73(3): 474-489.

肥満によるインスリン抵抗性発症における M2 マクロファージ上の CD206 表面抗原の役割

The role of CD206 surface antigens on M2 macrophages in the development of insulin resistance due to obesity.

Bilal Muhammad, Kazuyuki Tobe

(The First Department of Internal Medicine, University of Toyama, Japan)

Obesity primarily targets white adipose tissue (WAT), liver, and muscles and induces insulin resistance (IR), leading to the development of type 2 diabetes. In obesity, the WAT expands through either hyperplasia or hypertrophy (Blüher M. et al. 2019; Bilal M. et al. 2021). Previously, we reported that subcutaneous inguinal white adipose tissue expands through cellular hyperplasia, whereas visceral epididymal white adipose tissue expands via hypertrophy under high-fat-fed conditions (Bilal M.

et al. 2021). Obesity is a key driver of macrophage infiltration, initiation of chronic inflammatory conditions, disruption of WAT function, and development of IR (Chakarov S. et al. 2022; Nance S.A. et al. 2022). On the other hand, obesity is associated with macrophage remodeling; another form of macrophages that appears with obesity, known as lipid-associated macrophages (LAMs), in addition to inflammatory M1 macrophages, suggesting that these two types of macrophages are associated with obesity-induced insulin resistance and impaired glucose tolerance (Hill D.A. et al. 2018; Jaitin D.A. et al. 2019). M2 macrophages is believed to maintain insulin sensitivity through its anti-inflammatory. However, recent reports that challenge this notion arose from studies such as Tontonoz's group, where mice lacking the IL-10 gene improve insulin resistance, and limit the obesity (Rajbhandari P. et al. 2018). In alignment with this report, our group evaluated that the partial depletion of CD206⁺ M2 macrophages in lean mice correlates with improved glucose tolerance and insulin sensitivity (Nawaz et al. 2017). This study aims to elucidate the mechanism by which some CD206-positive macrophages, which have been thought to be beneficial, become LAMs and induce insulin resistance on a high-fat diet (HFD). I will also elucidate the signaling pathways that trigger LAMs formation. My data showed that CD206 macrophages become LAMs under HFD-fed obese conditions. Moreover, I found lysosomal biogenesis genes were upregulated and associated with reduced expression of a metabolic favorable gene in Wild-type (WT) mice compared to CD206 knock-out (CD206 KO) mice. I hypothesize that CD206 macrophages might promotes LAMs formation and these LAMs were associated with higher expression of lysosomal pathway-related genes. The mice lacking CD206 surface antigen promote insulin sensitivity with higher expression of metabolically favorable genes.

Furthermore, macrophages under an energy

surplus environment secrete exosomes that contain various miRNAs (small non-coding RNA) that control adipose tissue metabolism, especially mir-155, which targets PPAR γ in adipose tissue and causes insulin resistance (Ying W. et al. 2017). We hypothesized that as there were reduced accumulations of LAMs in the mice lacking CD206 surface antigen, there might be reduced exosome-derived miRNA secreted by these LAMs, thereby improving insulin sensitivity.

Next, I am also generating CD206 floxed mice to conditionally deletion, and evaluate the underlying mechanism in more detail. After 12 weeks HFD-feeding, I will isolate the LAMs from floxed and KO mice and will perform miRNA-Sequencing. Then next, my focus will be on performing a comprehensive analysis to evaluate the molecular mechanism that accelerates miRNAs secretion from macrophages-derived exosome that inhibit metabolically favorable genes under HFD-fed energy surplus environment.

【References】

- Blüher, M., 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 15(5): 288-298.
- Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, M.R., Igarashi, Y., Nishimura, A., et al., 2021. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. *Molecular Metabolism* 54: 101328.
- Chakarov, S., C. Blériot, and F. Ginhoux, 2022. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *Journal of Experimental Medicine* 219(7): e20211948.
- Nance, S.A., L. Muir, and C. Lumeng., 2022. Adipose tissue macrophages: regulators of adipose tissue immunometabolism during obesity. *Molecular Metabolism* 66: 101642.
- Hill, D.A., Lim, H.W., Kim, Y.H., Ho, W.Y., Foong, Y.H., Nelson, V.L., 2018. Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue.

Proceedings of the National Academy of Sciences 115(22): E5096-E5105.

- Jaitin, D.A., Adlung, L., Thaiss, C.A., Weiner, A., Li, B., Descamps, H., et al., 2019. Lipid-associated macrophages control metabolic homeostasis in a Trem2-dependent manner. *Cell* 178(3): 686-698. e14.
- Rajbhandari P, Thomas BJ, Feng AC, Hong C, Wang J, Vergnes L, Sallam T, Wang B, Sandhu J, Seldin MM, Lusis AJ, Fong LG, Katz M, Lee R, Young SG, Reue K, Smale ST, Tontonoz P. IL-10 Signaling Remodels Adipose Chromatin Architecture to Limit Thermogenesis and Energy Expenditure. *Cell*. 2018 Jan 11;172(1-2):218-233. e17.
- Nawaz, A., Aminuddin, A., Kado, T., Takikawa, A., Yamamoto, S., Tsuneyama, K., et al., 2017. CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature Communications* 8(1): 286.
- Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, Ofrecio JM, Wollam J, Hernandez-Carretero A, Fu W, Li P, Olefsky JM. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*. 2017 Oct 5;171(2):372-384.e12.

免疫チェックポイント阻害薬投与により誘発される 1型糖尿病への間葉系幹細胞投与効果の検討

堀谷 恵美

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学)

【背景・目的】

近年、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が種々の悪性腫瘍に対して適応拡大され、副作用としての急性発症 / 劇症 1 型糖尿病が増加しつつあるが、未だ有効な治療法が確立していない。間葉系幹細胞 (MSC) は炎

症抑制作用や組織再生能を有する移植治療細胞として臨床応用が模索されている。我々は ICI に誘発される 1 型糖尿病に対する MSC の投与効果の検討を行ない、雄性 NOD/ShiJcl マウスへの抗 PD-L1 抗体投与で 1 型糖尿病が発症し、同時にヒト脂肪由来 MSC (hAD-MSC) の投与で糖尿病発症を抑制すること、血中 MSC 由来エクソソーム (Exo) が顕著に増加し、MSC の効果に寄与している可能性を報告した。現在、ヒトへの臨床応用に向け、MSC が腫瘍免疫に対して与える影響や作用機序の解明を目的とした研究を行なっている。

【方法】

① B6 マウス由来大腸癌細胞株 MC38 を B6.MRL-Fas^{lpr}/J マウスに移植して固形癌を形成させた後、抗 PD-1 抗体・抗 CTLA4 抗体および MSC を投与し、MSC が ICI の抗癌作用に与える影響を検討した。② MSC の投与による 1 型糖尿病発症抑制の機序として、Exo の効果を確認するために、Exo の生合成に重要な働きを有するとされる T-cadherin (T-cad) および Alix をノックダウン (KD) した MSC とコントロール MSC との効果と比較した。

【結果と展望】

① ICI 単独投与群と ICI/MSC 併用群は共に強く腫瘍形成を抑制し、両者に差を認めなかった。また MSC 単独投与群においても抗腫瘍効果を認めた。② T-cad KD MSC の投与では、糖尿病発症の抑制効果が減弱する傾向を認めたが、Alix KD MSC ではこの傾向は見られなかった。原因として、KD が不十分であった可能性や、今回の試験では MSC の糖尿病発症抑制作用が部分的であり、有意差を呈するには至らなかった可能性がある。一方で、MSC において Exo の生合成を阻害すると、炎症関連の遺伝子発現が上昇することを見出した。MSC の炎症や細胞老化などの質的変化が MSC 投与の治療効果に悪影響を及ぼすと想定され、今後検討を進める予定である。

【結語】

MSC の投与が腫瘍免疫に悪影響を与えないことを明らかにした。MSC の質的変化が治療効果と密接に関連すると考えられ、今後は MSC の質の改善に着目して検討を行なう。

Irs 2 アンチセンス RNA/PPAR γ 経路制御による
新たな NAFLD/NASH 治療法の開発

松下 真弥

(国立国際医療研究センター 分子糖尿病医学研究部)

【目的】

これまでの研究で我々は、*Irs2* のアンチセンス鎖から ncRNA (*ASIrs2*) が転写され、その発現が栄養状態によって大きく変化すること、*ASIrs2* の発現抑制によって肥満モデルマウスの脂肪肝が著明に改善すること、ヒトにおいても *ASIrs2* 遺伝子の遺伝子座には NAT *AL162497.1* がコードされており、ヒトの肝組織サンプルの解析結果では、*AL162497.1* の発現はインスリン抵抗性を引き起こす内臓脂肪面積や *PPAR γ* などと正の相関があったことなどを同定した。さらに、*ASIrs2* の結合蛋白として *HARS2* を同定し、これが脂質代謝に関わる未知の機能を持つことなどを示した¹⁾。

本研究では、*AL162497.1* や *ASIrs2*-*HARS2* を軸とした脂肪肝の病態メカニズムの更なる解析と、その臨床的な応用を目的とする。

【方法】

1. iCell Hepatocyte で *AL162497.1* の発現抑制を行い *Pparg* の発現を解析した
2. *Hars2* を肝臓特異的に抑制したマウスの肝組織で RNA-seq を行ったところ mitoUPR 関連の遺伝子発現が増加しており (図 1)、以下の実験を行なった。

- ① 培養細胞への mitoUPR 誘導剤投与による、遺伝子発現解析
- ② *Hars*-like ドメインを持つ GCN2 に着目し、GCN2iB 投与マウスの *Hars2* 抑制によるストレス応答系を解析
- ③ Ribotrap 法(医薬基盤研・木村友則教授との共同研究) で、マウスの *Hars2* 発現抑制による tRNA 量の検討
- ④ 共免疫沈降法で *Hars2* の抑制下で GCN2 と ribosomal P-stalk との結合を検討

【結果】

1. 発現抑制により、*Pparg* は有意ではないものの低下傾向を示した。トランスフェクション後に細胞の弱体化が確認され、発現抑制の条件を調整して何度か繰り返す方針とした。

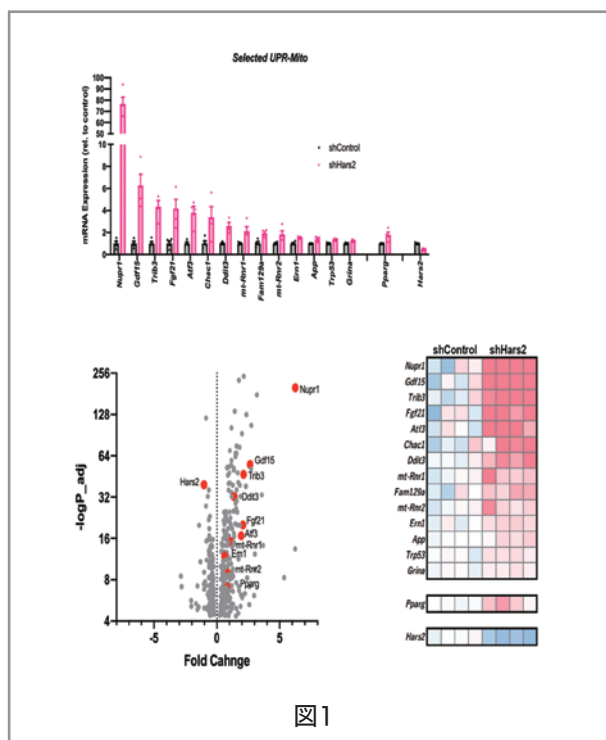


図 1

2.

- ① mitoUPR 関連遺伝子と並行して *Pparg* 遺伝子の発現誘導が確認された。
- ② GCN2 の抑制下では、*Hars2* の発現抑制による肝臓のミトコンドリアストレス経路の活性化は有意に抑制された
- ③ *Hars2* の発現抑制下の肝臓で、ミトコンドリア内のヒスチジル tRNA のアミノ酸ローディング割合のみ低下し、*Hars2* の発現抑制がミトコンドリアにおけるヒスチジン欠乏状態を mimic したモデルであることが示唆された。
- ④ *Hars2* の発現抑制により GCN2 と RPLP0 との結合は有意に増加した。

【考察】

今回ヒスチジル tRNA 合成酵素である *Hars2* を抑制することでミトコンドリア内の uncharged tRNA が増加し、uncharged tRNA と結合した GCN2 が活性化した可能性が考えられた。また、*Hars2* の抑制によって細胞質において ribosomal stalling が生じ、これが GCN2 を活性化させることが明らかとなった。

これらの知見は、ミトコンドリアでのみアミノ酸欠乏が生じれば、細胞全体のアミノ酸欠乏と同様の反応を引き起こすのに十分であり、かつその結果として脂肪肝を惹起しうることを示唆している。

【引用文献】

- 1 Matsushita M et al. An antisense transcript transcribed from *Irs2* locus, contributes to the pathogenesis of hepatic steatosis in insulin resistance. *Cell Chem Biol*, 29;680-689(2021).

腸管の老化細胞除去における耐糖能改善作用の検討

三浦 雅 臣

(東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科)

【目的】

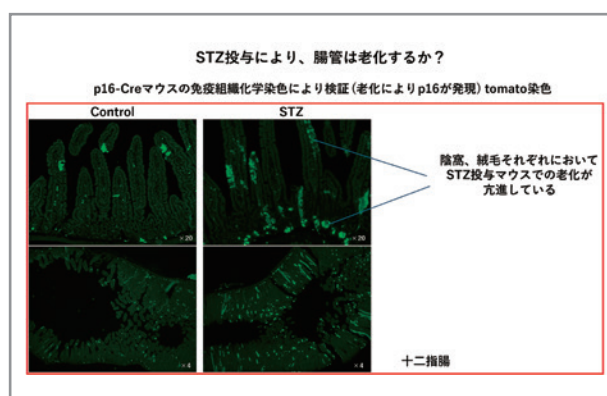
これまでに行ったマウス腸管上皮幹細胞の RNA シークエンスの結果から、加齢に伴って最も変化する幹細胞の遺伝子は、細胞周期に関する遺伝子群であることが明らかとなった。細胞老化が腸管上皮細胞の老化を規定する重要な因子であると考え、腸管での細胞老化を抑制 / 促進するモデルマウスを作製した。①それらのマウスにおける糖吸収のメカニズム解明、②加齢における腸管上皮の細胞老化の検証・腸管における細胞老化を促進させるような病態の解明、③それらの解析から得られた結果を応用して耐糖能障害を改善させることを目的として研究を行った。

【方法】

腸管での細胞老化を抑制するモデルとして、Villin cre-ERT2 floxed p53 (腸管上皮特異的 p53KO) マウス、Villin cre-ERT2 floxed Rb (腸管上皮特異的 RbKO) マウス、腸管での細胞老化を促進するモデルとして Villin cre-ERT2 floxed Mdm2 (腸管上皮特異的 Mdm2KO) マウスを作成し、糖・脂質の負荷試験を行った。また、腸管オルガノイドを用いて単層上皮を作成し、細胞周期関連遺伝子を変化させた際の糖・脂質吸収に関わる遺伝子変化を検証した。また、in vivo で細胞老化を検出する p16 cre-ERT2 マウスと、cre 活性に反応して tdTomato 蛍光を発するマウスとを交配させることで、p16 陽性細胞を検出できるマウス (= 老化を検出できるマウス) を作成し、高脂肪食やストレプトゾトシン (STZ) を投与したマウスにおいて、腸管の老化の蓄積があるかを確認した。

【結果】

腸管の老化が抑制されたマウス (腸管上皮特異的 p53KO マウス, RbKO マウス) では耐糖能改善を認め、逆に腸管の老化が促進されたマウス (上皮特異的 Mdm2KO マウス) では耐糖能の悪化を認めた。一方で脂質吸収に変化は認められなかった。それぞれのマウスの腸上皮の RNA 解析では、SGLT1, GLUT2 といった糖吸収に関わる遺伝子の変化が認められた。また、腸管オルガノイドから作成した単層上皮において、Tamoxifen を用いて p53 あるいは Rb をノックダウンしたうえで単層上皮の RNA 発現を確認すると、in vivo での実験系と同様に SGLT1, GLUT2 の発現変化が認められた。上記方法で述べた p16 陽性細胞を検出できるマウスに高脂肪食・STZ を投与して腸管の老化を確認すると、腸管上皮の陰窩、絨毛それぞれの領域において老化が認められる結果であった。



【考察】

腸管の細胞老化において、糖吸収遺伝子が増加することで糖代謝に影響を与えている可能性が示唆された。今後、上記モデルマウスの腸管上皮を用いた RNA sequence を行うことで、下流に介在するメカニズムを明らかにしたいと考えている。

新規代謝物を起点とした、褐色脂肪組織の分化制御機構の解明および糖尿病・肥満症へ治療応用

南野 寛 人

(京都市立大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【目的】

我々は、これまでの研究で、代謝物：テトラヒドロピ

オプテリン (BH4) が、褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue: BAT) の分化に不可欠な因子であることを、遺伝子改変マウスや細胞実験系を用い明らかにし、代謝物レベルでの BAT 制御が生体内で重要であることを示してきた。しかし、詳細な制御機構や、BAT 分化に関与するその他の代謝物についての知見は非常に乏しいのが現状である。本研究課題では、これまでに同定した、BAT 分化を制御する代謝物: BH4 の下流シグナルや代謝物を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

我々は前年度までに、代謝物 BH4 が一酸化窒素 - グアニル酸シクラーゼ - cGMP の経路が BH4 由来の褐色脂肪分化に大きく寄与することが明らかとし、現在同機序について論文投稿中である。

上記実験と並行し、上述の BAT 分化不全を来す、BH4 欠乏マウス由来の BAT や野生型マウス由来の BAT、ならびに BH4 欠乏マウスに BH4 を補充し BAT 分化不全の改善した BAT 由来などの試料を用い、メタボロミクス解析を行い、網羅的な代謝物の挙動の変化を調査した。結果、種々の triglyceride の組成が BAT 分化の状態と関連すること、ならびにこれまで報告のない複数の BAT 分化障害と関連する候補代謝物を同定した。

【考察および今後の展開】

本年度の課題の遂行により、代謝物による BAT 分化に制御機構の一端が明らかになった。本研究では、メタボロミクスによる網羅的代謝物解析により、BAT 分化の状態と関連する候補代謝物を複数拾い上げている。これらの代謝物について、今後マウスなどの齧歯類に対して、BAT 分化が変動する様々な条件における候補代謝物の挙動を把握する。また、候補代謝物の生成し、マウスへの投与を行い、マウスのエネルギー代謝へ与える影響を詳細に検討する。さらに、その後ヒト応用への基盤構築を見据え、京都大学が保有するヒトにおいて BAT が同定可能な FDG-PET/CT を含む臨床データベースと照合しながら、ヒトでも同定可能な、BAT 制御に関与する新規の代謝物探索も並行して行う予定である。

1 型糖尿病における CD8+T 細胞の分化制御機構の解明

宮地 康高

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【目的】

1 型糖尿病は、膵島炎を病理学的特徴とする自己免疫疾患であり、CD8+T 細胞は膵島炎において最も多く認められる炎症細胞である。樹状細胞などの抗原提示細胞は膵島自己抗原を取り込み、CD4+T 細胞が認識する。CD4+T 細胞はヘルパー細胞 (Th1) に分化し、CD8+T 細胞が細胞障害性 T 細胞 (エフェクター T 細胞) に分化するのを促進する。細胞障害性 T 細胞はインターフェロン (IFN) やパーフォリンを分泌して β 細胞を破壊する。

T 細胞が分化するときに、複数の転写因子が協調して働くが、転写因子 FoxO1 は主要なものとして知られている。実際、ナイーブ CD8+T 細胞は、ウイルス感染などにより FoxO1 の転写活性が低下すると、エフェクター CD8+T 細胞に分化することが報告されている (*Immunity* 2012;36:374-387)。同時に転写活性が維持されることが、メモリー CD8T 細胞への分化に必須であることも報告されている (*Immunity* 2013;39:286-297)。

本研究では、1 型糖尿病において FoxO1 が CD8+T 細胞の分化を制御するメカニズムを明らかにし、薬理的 FoxO1 阻害が 1 型糖尿病の病態を改善させるか否かを検証する。

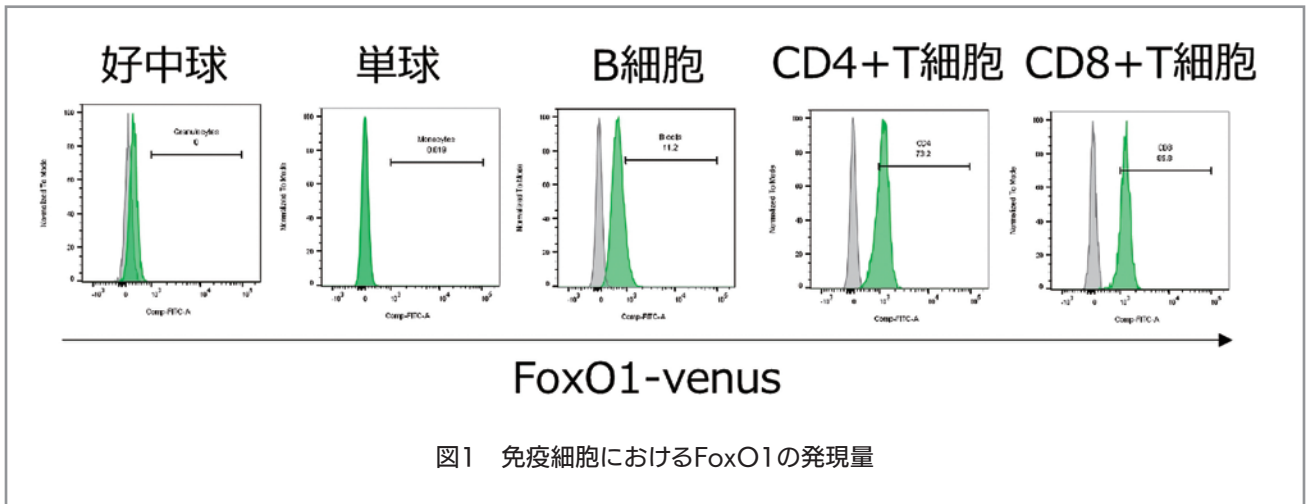
【方法】

1) 免疫細胞における FoxO1 の発現と局在解析

FoxO1-Venus マウスから脾臓を採取して、好中球、単球、B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞における FoxO1 の発現量を検討した。また、脾臓から単離した CD8+T 細胞に抗 CD3/CD28 抗体で刺激後に FoxO1 の局在を検討した。

2) NOD マウス由来 CD8+T 細胞の分化解析

自然発症 1 型糖尿病モデル NOD マウス由来脾細胞を 2 種類の FoxO1 阻害薬を用いて前処置後に、抗 CD3/CD28 抗体で脾細胞を刺激し、48 時間後にフローサイ



トメーターを用いて CD8+T 細胞の分化を解析した。

3)NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

6 週齢の雌性 NOD マウスに浸透圧ポンプ (Alzet 1004) を植え込み、FoxO1 阻害薬 A を 4 週間持続投与した。経時的に血糖値を測定し、糖尿病の発症・進展が抑制されるか否かを検討した。投与終了後に膵臓組織を採取し、残存 β 細胞面積と炎症細胞浸潤を評価した。

4)NOD マウス由来 CD8+T 細胞の RNA-seq 解析

2 種類の FoxO1 阻害薬を用いて CD8+T 細胞を前処置後に、抗 CD3/CD28 抗体で T 細胞を刺激して 24 時間後に細胞を回収した。RNA 抽出をおこない、RNA-seq 解析を施行した。

5)NOD マウス由来脾細胞のサイトカイン分泌解析

NOD マウス由来脾細胞を 2 種類の FoxO1 阻害薬を用いて前処置後に、抗 CD3/CD28 抗体で脾細胞を刺激して培養上清を回収し、サイトカイン分泌を解析した。同様の検討を CD8+T 細胞特異的 TCR 改変 (NY8.3-NOD) マウス由来の脾細胞を用いて行った。

【結果】

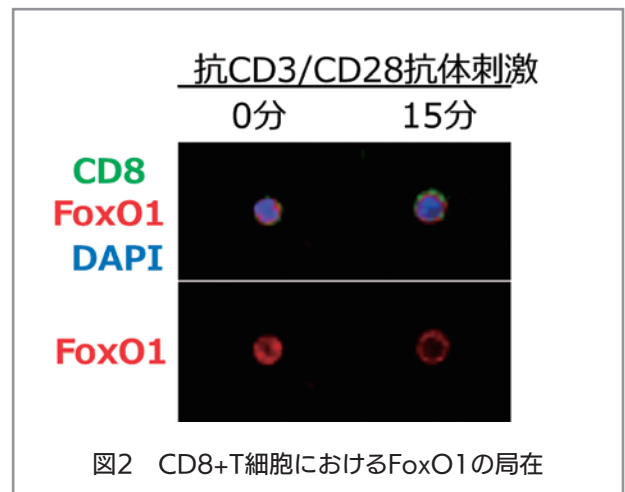
1) 免疫細胞における FoxO1 の発現と局在解析

好中球、単球ではほとんど FoxO1 の発現は確認できず、B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞で発現を確認した(図 1)。また、NOD マウス由来 CD8+T 細胞では、FoxO1 は核内にあり、抗 CD3/CD28 抗体刺激 15 分後に、細胞質へ移行した (図 2)。

2)NOD マウス由来 CD8+T 細胞の分化解析

2 種類の FoxO1 阻害薬を用いて NOD マウス由来脾細胞の FoxO1 を薬理的に阻害したところ、共に

メモリー様 CD8+T 細胞 (CD62L high, CD44 high) を 10 ~ 20% 程度減少した。この結果は、T 細胞特異的 FoxO1 欠損マウスを用いた過去の報告 (Immunity 2012, 2013) と矛盾しないものと考えられた。



3)NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

4 週間の FoxO1 阻害薬 A 投与期間中に随時血糖値および体重増加は対照の DMSO 投与群と差は無く、薬剤の忍容性が確認された。4 週間の薬剤投与後に、膵臓組織切片の免疫染色を行ったところ FoxO1 阻害薬 A は、CD8+T 細胞の浸潤に大きな影響を与えなかった (図 3)。

4)NOD マウス由来 CD8+T 細胞の RNA-seq 解析

主成分分析 (PCA) から、2 種類の FoxO1 阻害薬群と対照群が分かれた。エンリッチメント解析により、2 種類の FoxO1 阻害薬で共通して IFN γ 関連の Gene Ontology タームが抽出された。次に、変動発現遺伝子解析を行ったところ、上位 100 遺伝子の中に、リボゾーム遺伝子などの翻訳に関連する遺伝子や 1 型糖尿病の

GWAS 関連遺伝子が 8 個 (PTPN22, BACH2, TRIB2, CD69, RASGPR1, PTPRC, IRF1, IRF4) 含まれた。

5) NOD マウス由来脾細胞のサイトカイン分泌解析

抗 CD3/CD28 抗体刺激後の NOD 由来脾細胞で IFN γ の分泌が 2 種類の FoxO1 阻害薬で減少した。同様に、CD8+T 細胞特異的 TCR 改変 (NY8.3-NOD) マウス由来の脾細胞に、膵島自己抗原 IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 刺激後の培養上清でも IFN γ の分泌が減少した (図 4)。最後に、IFN γ の産生・分泌の重要な転写因子である T-bet の発現量をフローサイトメトリーで評価したところ、2 種類の FoxO1 阻害薬で減少していることを確認した。

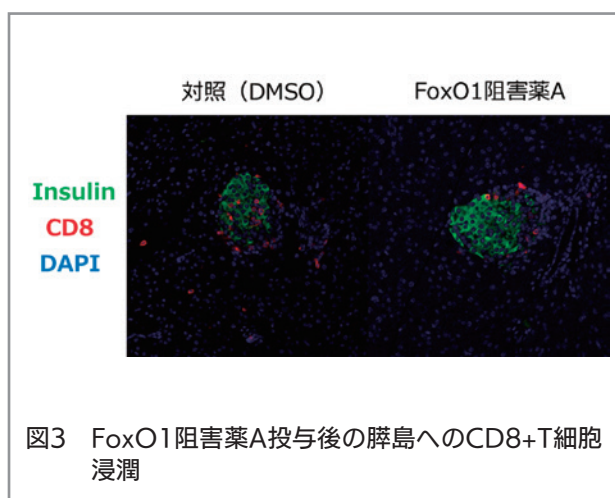


図3 FoxO1 阻害薬A投与後の膵島へのCD8+T細胞浸潤

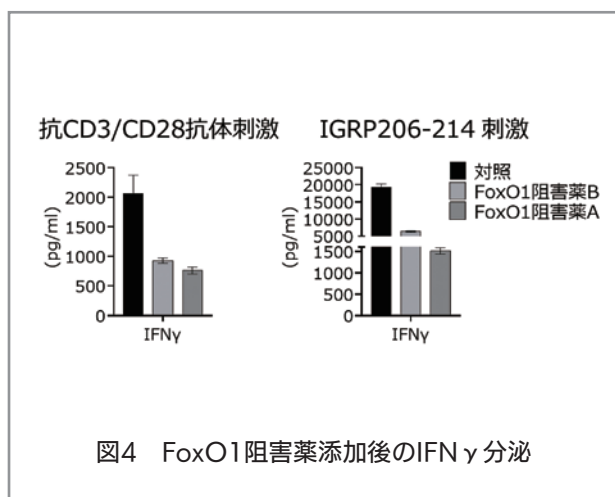


図4 FoxO1 阻害薬添加後のIFN γ 分泌

【結語】

薬理的 FoxO1 阻害により、1 型糖尿病モデルマウス由来の CD8 + T 細胞の分化と IFN γ 分泌が抑制された。

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

(京大医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科)

【背景・目的】

膵島移植は 1 型糖尿病の有用な治療法である。しかし、移植後生存膵島量の維持・保護に関しては課題が多く、インスリン治療からの離脱の維持など長期成績の更なる向上には、移植後生存膵島量の非侵襲的評価法の確立が重要である。近年、我々は、¹¹¹In-Exendin-4 標識 exendin-4 プローブを用いた Single photon emission tomography (SPECT) による非侵襲的な膵 β 細胞量評価法を開発した。具体的には、Glucagon like-peptide-1 (GLP-1) 受容体に特異的に結合する Exendin-4 を骨格とした放射性同位元素標識プローブを用いた非侵襲的膵 β 細胞イメージング技術を開発し、Positron emission tomography (PET) や SPECT での生体マウス膵描出、同法を用いた膵 β 細胞量の縦断的評価が可能であることを複数の糖尿病モデルマウスで示した。今年度は、1) 膵島皮下移植における prevascularization の効果検証への同法の応用を行った。また、2) 臨床にて同法を用いて膵 β 細胞由来腫瘍であるインスリノーマの特異的な描出・検出を試みた。

【方法】

1) C57BL/6 マウスに 500 個の同系統膵島を 1・2 週前に基本線維芽細胞成長因子 (bFGF) を含む寒天ロッドを埋め込み血管新生を誘導した皮下部位に移植し、移植 100 日後に、¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を撮像した。2) 膵島部に膵神経内分泌腫瘍を認め臨床的にインスリノーマが疑われたが EUS-FNA ではインスリン染色が陰性であった 63 歳女性に対し、[¹⁸F]FB(ePEG12)12exendin-4 (¹⁸F-exendin-4)PET/CT を撮像した。

【結果】

1) 移植 1 週間前群に比し、2 週間前群の方が、血糖コントロールの改善を認めた。¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT では皮下移植膵島を非侵襲的に検出可能であった。2) 膵島部に有意なプローブ集積を認め、根治的核出術

を施行し得た。手術病理学的にもインスリノーマであったことが証明された。

【結語】

1)¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を用いて非侵襲的に皮下移植後生存膵島の描出評価が可能であった。

2)¹⁸F-exendin-4 PET/CT にてインスリノーマの描出が可能であり、同プローブのヒトでの膵β細胞特異性を証明できた。

【文献】

- Inoguchi K, Anazawa T, Fujimoto N, Tada S, Yamane K, Emoto N, Izuwa A, Su H, Fujimoto H, Murakami T, Nagai K, Hatano E. Impact of Prevascularization on Immunological Environment and Early Engraftment in Subcutaneous Islet Transplantation. *Transplantation.*, 108, 1115-1126 (2024).
- Otani D, Murakami T, Murakami S, Hanaoka I, Fujimoto H, Shimizu Y, Kawai Miyake K, Sakaki K, Ueda Y, Tanaka D, Ohno T, Shimizu H, Uyama N, Iizuka N, Yabe D, Nakamoto Y, Inagaki N. [18F]FB(ePEG12)12-exendin-4 noninvasive imaging of insulinoma negative for insulin immunostaining on specimen from endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: a case report with review of literature. *Endocr J.* 2024. Epub ahead of print.

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

(岐阜大学 高等研究院 One Medicine トランスレーショナルリサーチセンター)

【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 (2024 論文投稿中)。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。

【結果と考察】

(1) 新規神経特異的 Cre マウスの開発と神経細胞 *Usp46* 欠損マウスの解析

全身性 *Usp46* 欠損マウスは若齢期に低体重を示すが、その責任組織・細胞は不明である。昨年度、神経幹細胞特異的 *Usp46* 欠損マウスを作製したが、*Nestin-Cre* の生殖細胞系列における異所性組換えと、広範な脳内細胞種での組換えが課題となった。そこで新たに成熟神経細胞特異的 Cre 発現マウスの開発を行った。成熟神経にて発現する遺伝子の下流に iCre 遺伝子をノックインしたマウスを樹立したところ、脳組織の神経細胞で遺伝子組換えが認められ、その他グリア細胞では組換えは認められなかった。末梢組織では、末梢神経での組換えに加え、心臓や膀胱、生殖組織の一部細胞における異所性組換えが確認された (2024 論文投稿中)。本 Cre マウスを用いて作製した *Usp46*-conditional knockout マウスは低体重傾向を示しており、異所性組換えの影響に留意する必要があるものの、神経細胞における USP46 が生後の体重制御に関与する可能性がある。

(2) USP46 変異マウスの解析

Usp46 欠損マウスの若齢期低体重が酵素活性依存性であるか検証するため、昨年度に Cofactor である WDR48 との結合能を失った USP46-Q236A, E237A 変異マウスを樹立し、このマウスも若齢期に低体重を示すことを見出していた。この USP46 変異が USP46 や WDR48 のタンパク発現に影響を与えるか検証したところ、USP46, WDR48 タンパク発現が大きく減少していることを見出し、USP46-WDR48 の結合は両タンパクの安定性に重要であり、USP46 発現低下がこの変異マウスの低体重の原因であることが示唆された。

Innovative Research Group of Gastroenterology に関する研究助成 (IRGG)

慢性腸管炎症により生じる腸管マクロファージの持続的エピジェネティック変化が免疫機能へ及ぼす影響についての検討

小栗 典明

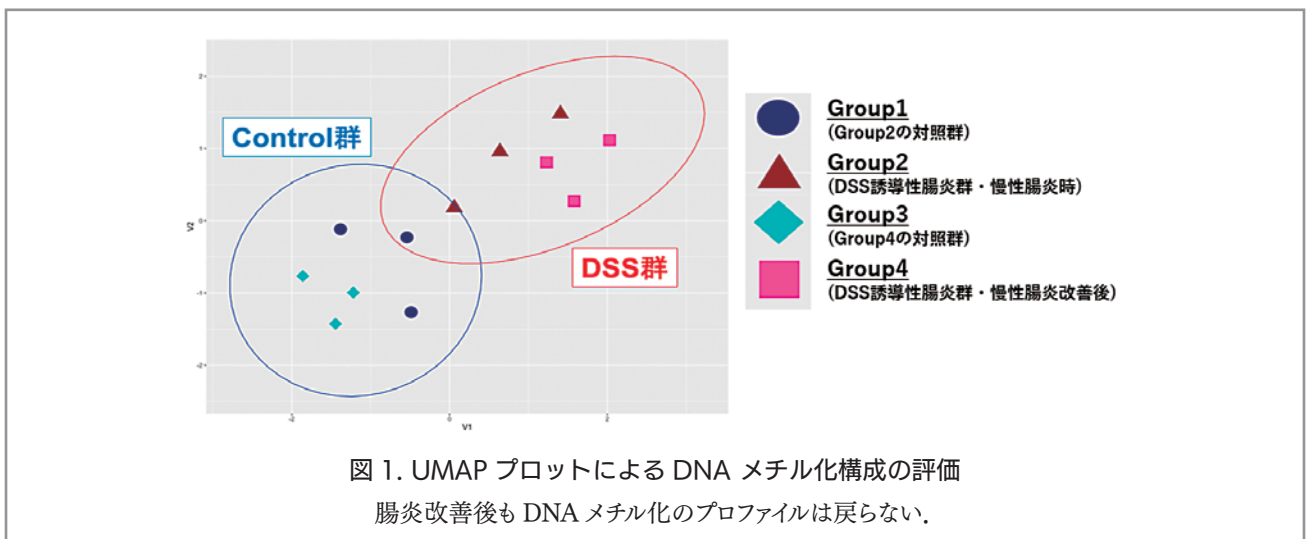
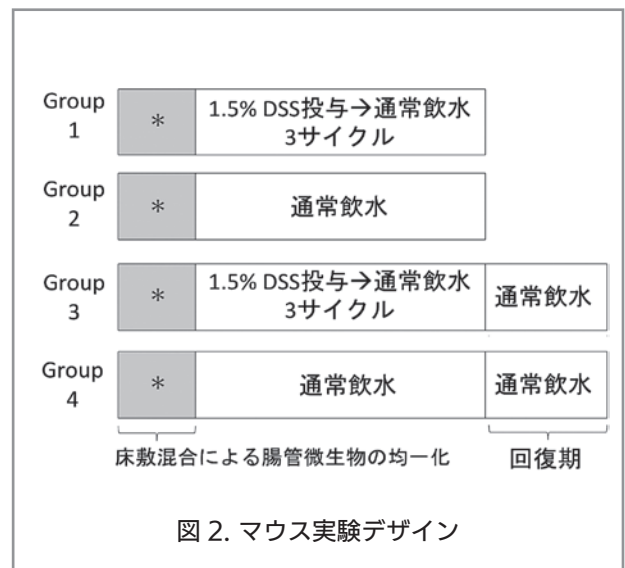
(杏林大学医学部 消化器内科学)

【目的】

我々は慢性炎症によって生じた腸管マクロファージ (Mφ) のエピジェネティック変化が、炎症寛解後も残存し腸管免疫機構が炎症性に変化することで、炎症性腸疾患 (IBD) の再燃に寄与するという仮説を立てた。本研究課題において、我々は今までに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性慢性腸炎モデルマウスを用いた検討から、慢性腸炎により腸管 Mφ に DNA メチル化の変化が生じ、腸炎改善後もそれらの変化の一部が持続することを明らかにした (図 1)。さらに、慢性腸炎により生じた DNA メチル化変化には、IBD の再燃と関連する TNF-α の産生亢進に関わるものが含まれたことから、腸管 Mφ の機能が炎症性に変化したことが示唆された。よって、慢性腸炎により DNA メチル化変化が生じた腸管 Mφ の機能を解析することを目的として本研究を実施した。

【方法】

DNA メチル化を評価した先行研究と同様に DSS 誘導性慢性腸炎モデルマウスを用いて検討した (図 2)。慢性腸炎時における評価として、Group 1 : DSS 誘導性慢性腸炎群、Group 2 : Group 1 の対照群を作成した。また、腸管炎症の改善後を評価するため、Group 3 : DSS 誘導性慢性腸炎改善後群、Group 4 : Group 3 の対照群を作成した。各群の腸管粘膜より腸管 Mφ として CD11b 陽性細胞を抽出し、24 時間培養後に、培養液の ELISA により TNF-α 産生能を評価した。



【結果】

DSS による慢性腸炎時である Group1 では、Group2 と比較し有意に TNF- α 濃度が高値であった (図 3A)。さらに、DSS による慢性腸炎改善後である Group3 においても、Group4 と比較し有意に TNF- α 濃度が高値であった (図 3B)。

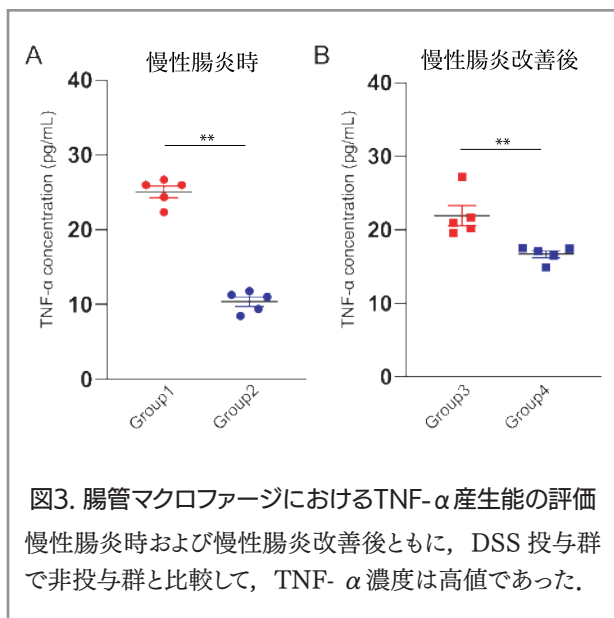


図3. 腸管マクロファージにおけるTNF- α 産生能の評価
慢性腸炎時および慢性腸炎改善後ともに、DSS 投与群で非投与群と比較して、TNF- α 濃度は高値であった。

【考察】

本研究では DSS による慢性腸炎により、腸管 $M\phi$ の TNF- α 産生が増加し、腸炎改善後もその変化が持続することが示された。この結果からは、DSS により定常状態における腸管 $M\phi$ に機能的変化が生じていることが示唆された。さらに、我々の予備実験からは、DSS により変化した腸管 $M\phi$ では、炎症を惹起する刺激に対する反応性が異なることを示唆する結果も得られている。よって、現在、エピジェネティック変化した腸管 $M\phi$ に対して、細菌性、真菌性、免疫複合体、炎症性サイトカインによる刺激を加えることで、刺激に対する反応性を評価する検討を実施中である。

cfDNA メチル化解析による炎症性腸疾患の新規分子マーカーの探索

清原 裕 貴

(慶應義塾大学医学部 内科学(消化器))

【目的】

炎症性腸疾患 (IBD) の疾患活動性のモニタリング方法として、近年便中カルプロテクチンや血清 leucine-rich alpha-2 glycoprotein, 尿中 Prostaglandin E-major urinary metabolite といった非侵襲的なバイオマーカーが次々と実用化されてきている。これらはいずれも、炎症の程度を反映するものであるが、炎症の局在を評価することは難しいという側面がある。クローン病に対する分子標的治療において、小腸病変の内視鏡的寛解の達成のためには、大腸病変単独の場合に比べてより高いトラフ濃度が必要である可能性が報告されており¹⁾、予後予測や治療戦略の構築の上で病変の局在を知ることが重要といえる。MR enterography や、腸管エコーなどの画像モダリティではこれら进行评估することが可能であるが、前者は前処置を必要とすること、後者は術者の技量により結果が大きく左右されるといった問題点もあり、繰り返し行うことを想定した場合には、より普遍的で簡便な手法の開発が望まれる。

近年がん研究の領域では Liquid biopsy の手法が注目されている。血液等の液体サンプルと主にゲノム解析技術を組み合わせることで残存腫瘍の検出などに応用されている。一方、炎症の存在下では組織傷害によって血液中に組織由来の DNA が流入する (cell free DNA; cfDNA) ことから、cfDNA をもとに組織傷害を推定できる可能性がある。さらに DNA のメチル化部位には組織特異性があることから、腸管組織に特異的な cfDNA を同定することで、疾患活動性を評価できる可能性もある。本研究は、Liquid biopsy を応用した IBD における新たなバイオマーカーの可能性を探索することを目的とする。

【方法】

本研究は、東京大学医科学研究所 (以下 医科研) ゲノム医科学分野、慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器)、医科研付属病院 腫瘍総合内科ならびに東京大学医学部

附属病院 大腸・肛門外科の多施設共同研究として実施している。研究全体では、探索的な Discovery cohort と、得られた知見の再現性と治療介入による変化を検証する Validation cohort とに分けて行う。Discovery cohort では、活動期潰瘍性大腸炎患者、活動期クローン病患者、および健常人について、血漿約 5 mL より cfDNA を抽出し、エピゲノム解析としてメチル化のプロファイル解析を行う。なお、活動期の定義は、潰瘍性大腸炎では 2-items patient-reported outcome (PRO2) 1 点以上、クローン病では Harvey-Bradshaw index (HBI) 5 点以上とした²⁾。これにより、活動性を有する疾患毎における特徴を探索する。Validation Cohort では、上述の活動期の基準をみだし、新たな寛解導入療法を実施する潰瘍性大腸炎およびクローン病患者について、寛解導入療法前と、寛解導入療法開始 14 週後の 2 時点において、血漿約 5 mL を採取し、Discovery cohort と同様の解析を行う。Validation cohort においては、臨床的改善（潰瘍性大腸炎：PRO2 50% 以上の減少、クローン病 HBI 3 点以上減少）との関連についても検討する。

【結果】

現在 Discovery cohort において、20 名の活動期潰瘍性大腸炎患者、10 名の活動期クローン病患者より血漿検体を収集の収集を終えている。このうち潰瘍性大腸炎 10 名の検体より、cfDNA を抽出し cfDNA のメチル化プロファイルを cfMeDIP-seq³⁾ により取得した。

cfMeDIP-seq の手順を簡単に説明すると、1 ng の cfDNA にフィラー DNA を加え、末端修復、A-tailing、アダプターライゲーションを行い、その後、メチル化された DNA 断片を抗 5-メチルシトシン抗体を用いて免疫沈降し、Polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。次に、AMPure XP ビーズを用いたサイズ選択とクリーンアップを行い、最終的にバイオアナライザーでライブラリの品質を確認した。作成したライブラリは illumina Next-seq をもちいて、75 bp ペアエンド、1 サンプルあたり 3000 万リードの深度でシーケンスをおこなった。

シーケンスデータとして得られた Fastq ファイルは FastQC (v0.11.9) を用いて品質をチェックし、アダプターのトリミングを Trim Galore! をもちいておこ

なった。トリミングされたリードは Bowtie2 (v2.4.4) を用いてヒト参照ゲノム (hg38) にマッピングし、Samtools 1.17 を用いてマッピング品質を 20 に設定し、Samtools を用いて PCR 重複を除去した。マップされたリードを 300 bp のゲノムウィンドウに分割し、R の QSEA パッケージを使用して各ウィンドウ内のリード数をカウントした。

以上のように得られたリードカウントデータより、各コーディング遺伝子のプロモータ領域（転写開始点から上流 1 kbp まで）にオーバーラップするゲノムウィンドウのみを抽出した。そのデータと他プロジェクトで得られた健常者血漿サンプルデータを合わせて主成分解析を行った結果、潰瘍性大腸炎患者群と健常者群が異なるクラスターを形成することが観察された（図 1）。

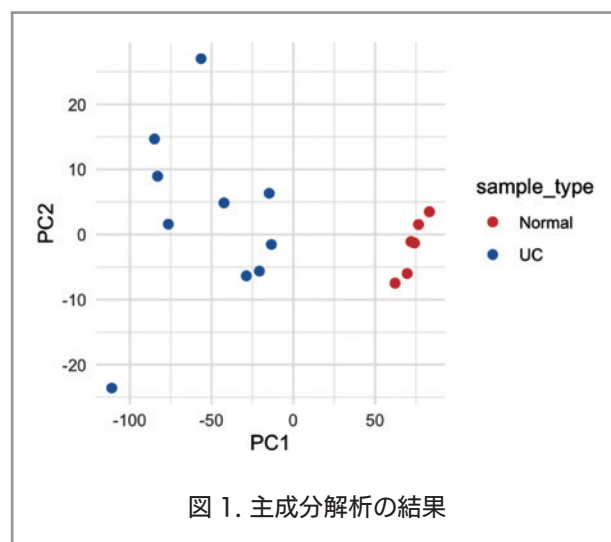


図 1. 主成分解析の結果

【考察】

以上の結果は、バッチエフェクトの可能性も排除できず、更なる検証が必要であるが、活動期潰瘍性大腸炎と健常者との間には異った特徴を有している可能性が示唆された。今後サンプル数を増やすとともに、クローン病についても比較検証していく予定である。

【引用文献】

- 1) Takenaka K, et al. Higher concentrations of cytokine blockers are needed to obtain small bowel mucosal healing during maintenance therapy in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2021;54:1052-1060.
- 2) Turner D, et al. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory

Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. *Gastroenterology* 2021;160:1570-1583.

- 3) Shen Shu Yi, et al. Preparation of cfMeDIP-seq libraries for methylome profiling of plasma cell-free DNA. *Nature protocols*, 2019, 14.10: 2749-2780.

感染性腸炎後に誘発される PI-IBS の病態に関わる
自然免疫受容体シグナルの解明

古谷 聡 史

(島根大学医学部附属病院消化器内科)

【目的】

感染後過敏性腸症候群 post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) の詳細な病態は依然不明であり、実臨床において治療に難渋する症例も多い。PI-IBS 患者の遺伝子解析結果をもとに当教室で行った動物モデルを用いた検証により、Toll 様受容体 (TLR) 9 シグナル異常に腸管感染が加わることで顕著な腸管知覚過敏を生じること、その要因として疼痛を誘導するブラジキニン B1/B2 受容体 (BDKRB1/2) の大腸粘膜での発現量の増加が関与していること (図 1)、さらに BDKRB2 選択的拮抗薬 (HOE140) により腸管知覚過敏の抑制効果が得られる知見を見出した。本研究では主に TLR9 や BDKRB1/2 に着目した PI-IBS の発症機序の更なる解明を目的とする。

【方法】

まずは以下の項目について追加検討を加える方針とした。① BDKRB1 の過剰発現に対する治療効果。② BDKRB1/2 の発現部位の評価。③ 腸管知覚過敏と腸内細菌叢の関連。④ 非感染性の腸管炎症 (DSS 腸炎) による腸管知覚過敏誘発の有無。

① については先行実験と同様に *Citrobacter rodentium* 投与後 6 週間後にバロスタット法による腸管知覚測定時に BDKRB1 選択的拮抗薬である R715 を使用し、治療効果を検証する。② については採取していた腸管検体に免疫染色 (Keratin8/18・PGP9.5) を行うことにより評価する。③ については *C. rodentium* 感染 6 週間後の TLR9KO マウスから採取した糞便を、4 種類の抗生剤 (バンコマイシン・メトロニダゾール・アンピシリン・ネオマイシン) 投与により腸内細菌を滅菌した後の WT マウスに移植し、腸管知覚過敏の誘発の有無を評価する。④ については 3% DSS の投与により腸炎を発症させ、続いて通常の飲料水に戻して腸炎が改善した後にバロスタット法による腸管知覚測定や RT-PCR による BDKRB1/2 発現の評価を行う。

【これまでの結果】

① R715 は HOE140 と同程度の腸管知覚過敏の症状抑制効果が確認でき (図 2)、BDKRB1/2 いずれも治療ターゲットとなりうることが示唆された。また、薬剤投与後もマウスに異変はみられず、安全性も高いと考えられた。② 免疫染色から、BDKRB1/2 の発現は主に粘膜上皮に発現しており、一方で神経系には明らかな発現はみられなかった (図 3)。③④ については現在実験と解析を進めている段階であり順次報告予定である。

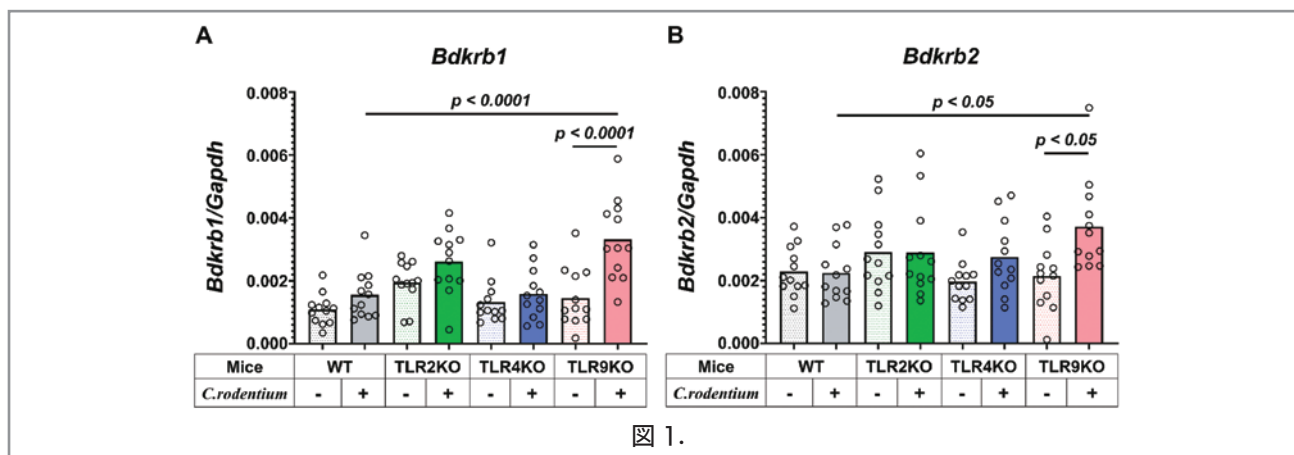


図 1.

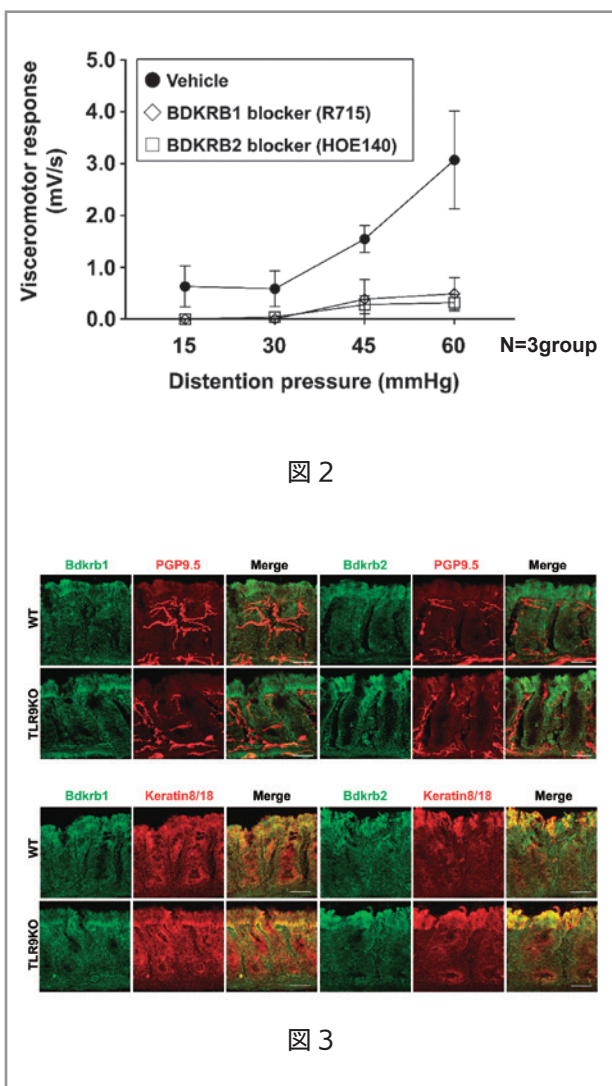


図 2

図 3

【今後の検討課題】

これまでの実験結果からは、TLR9KO マウスは、感染性腸炎が改善した後も BDKRB1/2 が腸管上皮に過剰に発現した状態が持続し、それが腸管知覚過敏の要因となっていること、BDKRB に対する拮抗薬を用いることで症状が緩和されることが示唆された。しかしながら、腸管炎症がどのような機序で腸管の BDKRB1/2 の発現を促進し、その状態が維持されているのかという点については未だ未解明である。今後は、非メチル化 CpG-DNA による TLR9 シグナルの活性化と BDKRB1/2 の発現抑制の関連について in vitro 実験での検証も進めていく予定である。

Farnesoid X receptor (FXR) アゴニストが炎症性腸疾患の大腸上皮に与える影響の解明

澁谷 尚希

(東京慈恵会医科大学 内科学講座 消化器・肝臓内科)

【目的】

胆汁酸が炎症性腸疾患 (IBD) の病態に関与していると報告されている。しかし、その機序についてはよく分かっていない。胆汁酸の受容体である Farnesoid X receptor (FXR) は IBD の大腸上皮にも発現しており、胆汁酸のうち FXR と親和性が最も高いケノデオキシコール酸 (CDCA) は IBD の大腸上皮機能に関与している可能性がある。しかし、その詳細については不明瞭な点が多い。本研究では、FXR の内因性アゴニストである CDCA が IBD の大腸上皮機能に与える影響について検証する。

【方法】

IBD 患者における CDCA 代謝異常を確認するため、IBD 患者の便検体を用いて、液体クロマトグラフィ質量分析 (LC-MS) による CDCA の定量を行った。続いて、大腸上皮細胞株である Caco2 細胞に CDCA および CDCA の代謝物であるリトコール酸 (LCA) を投与し Transendothelial electrical resistance (TEER) および FITC-Dextran により大腸上皮透過性を評価した。

【結果】

IBD 患者では non-IBD (NIBD) 患者よりも有意に便中 CDCA 量が高かった (図 1)。続いて、Caco2 細胞に CDCA100 μ M, LCA 100 μ M を投与すると、24 時間後の TEER が有意に低下し (図 2)、CDCA100 μ M 投与で FITC-Dextran の透過性が有意に亢進した。

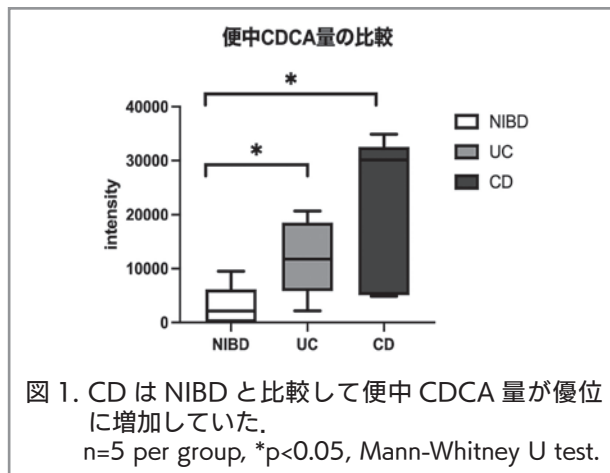
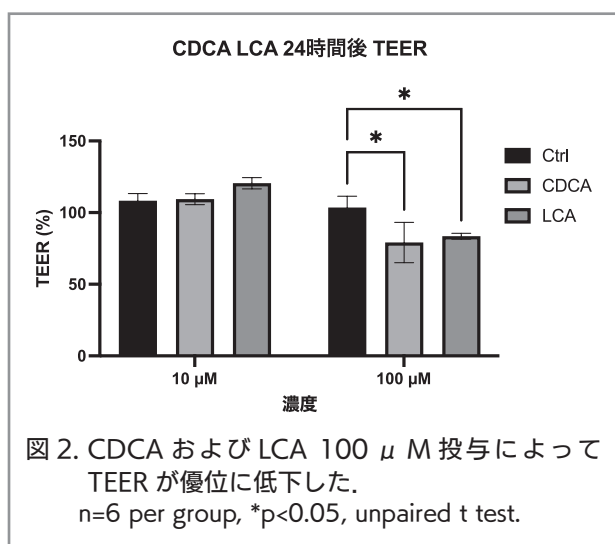


図 1. CD は NIBD と比較して便中 CDCA 量が優位に増加していた。
n=5 per group, *p<0.05, Mann-Whitney U test.



【考察】

本研究では、IBD の腸管内では内因性の FXR アゴニストである CDCA 量が増加し大腸上皮機能を障害することを示した。しかし、人工的に生成した FXR アゴニストである obeticholic acid では IBD の上皮障害性を改善したとも報告されており¹、CDCA の上皮障害作用が FXR を介したものであるのかその機序についてさらなる検証が必要と考えた。

【文献】

- Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2011 Apr;60(4):463-72.

ユビキチン修飾系によるネクロトーシス制御に立脚した炎症性腸疾患発症機構の解明

清水 康平

(大阪公立大学大学院医学研究科医化学)

【目的】

新規 LUBAC 結合因子として同定した LAP1(LUBAC associated protein 1) は、TNF 誘導性細胞死の重要な制御因子である RIPK1 に対し、LUBAC と協調して複合型ユビキチン (Ub) 鎖を形成し、炎症誘導性細胞死のネクロトーシスを抑制していることを見出した。そこで本研究では、LAP1/LUBAC による複合型 Ub 鎖形

成を介したネクロトーシス制御機構の解明と、ネクロトーシスが病態形成に関与する炎症性腸疾患 (IBD) との関連解明を目指した。

【方法】

- LAP1/LUBAC によるネクロトーシス制御機構の解析

LAP1/LUBAC が標的とする RIPK1 の Ub 化部位点変異体 (KR 変異体) で再構成したマウス胚性線維芽細胞 (KR-MEF) を用いてネクロトーシスに高感受性となる原因を調べた。

- Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスの DSS 誘導性潰瘍性大腸炎モデルの解析

野生型・*Lap1* 欠損・*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスに自由飲水にて 2.5% のデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与し、3 日目に大腸の病理組織学的解析を実施した。

【結果】

- ネクロトーシス誘導刺激により、KR-MEF では野生型と比べて同程度の RIPK1 のリン酸化 (Ser166) が生じるものの、続く RIPK3 や MLKL のリン酸化は顕著に亢進していることが判明した。さらに Proximity ligation assay から、LAP1/LUBAC による RIPK1 の複合型 Ub 鎖修飾が RIPK1 と RIPK3 の結合を阻害し、ネクロトーシスの抑制に帰結する可能性を見出した。

- Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスは、*Lap1* 欠損マウスで観察された病理スコアの悪化が有意に改善された。また、大腸組織の遺伝子発現解析の結果、*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスでは、*Lap1* 欠損マウスにおいて上昇した炎症性サイトカインの発現が野生型マウスと同程度まで抑制されることが分かった。

【考察】

LAP1 は LUBAC と協調して RIPK1 に複合型の Ub 鎖を形成することで RIPK3 との結合を制限し、ネクロトーシスを抑制することが考えられた。また、*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスの解析結果から、*Lap1* 欠損マウスにおける DSS 誘導性潰瘍性大腸炎モデルの病態形成がネクロトーシスに依存していることが明らかとなった。

潰瘍性大腸炎病変部特異的機構の解明

鈴木 宏 清

(筑波大学医学医療系消化器内科クリニックアシスタント 筑波大学大学院 医学学位プログラム・大学院生)

【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) の病態について遺伝因子や環境因子などの関連が報告されているが、腸管の上皮因子に着目した研究は少ない。UC は直腸から連続的に発症するが、直腸が好発部位となる理由は不明である。そこで、病変部 (直腸) と非病変部 (右側結腸) の上皮因子の違いの中に、好発部位となる原因があるのではないかと、さらに、その原因に UC 病態の本態の一部が含まれているのではないかと着想した。本研究の目的は、UC の病変部と非病変部の違いから病態に関連する上皮因子を抽出し、その機能を解明することである。

【方法】

UC 患者全結腸切除術検体の病変部、非病変部から大腸オルガノイドを樹立し、非炎症下の条件で体外培養を行った。各オルガノイドのマイクロアレイ解析を行い、発現差異を認める遺伝子を抽出した。さらに、10 症例の手術検体組織においてもオルガノイドと共通して病変部と非病変部の発現差異を認める遺伝子を同定した。候補遺伝子の機能解析のために健常者大腸由来オルガノイドに、レンチウイルスを用いて強制発現、または sh-RNA を用いて欠損させたオルガノイドを作成した。オルガノイドを TNF α 、IL-1 β 、フラジェリンで炎症刺激を行い、細胞増殖率を MTS アッセイで評価した。

【結果】

病変部、非病変部の組織及び組織由来大腸上皮オルガノイドの両方で共通して発現差異を認めた候補遺伝子の中から、病変部で発現亢進する 2 遺伝子、非病変部で発現亢進する 2 遺伝子を選定した。非病変部で発現亢進する上皮因子は病変形成を阻害する作用が予測されることから、本研究では非病変部で発現亢進した候補遺伝子 X に着目した。遺伝子 X を強制発現させた大腸上皮オルガノイドでは、通常培養では WT と比較して細胞増殖は同じであった。しかし、1 週間の炎症刺激環境では強制発現オルガノイドは WT と比較して増殖率が向上した。sh-RNA による遺伝子 X 欠損オルガ

ノイドでは通常培養では WT と同等の増殖率であったが、炎症刺激下では WT オルガノイドより増殖率が低下した。

【考察】

UC 病態に関連する上皮因子として 4 個の候補遺伝子を抽出した。非病変部での候補遺伝子 X の発現は炎症環境下の腸管上皮細胞の増殖維持することで、病変形成を抑制させること可能性が示唆された。しかし、UC 病態または炎症刺激応答を回避させ、非病変部形質の獲得に関与す分子機構は不明であり、病態解明に向けたさらなる研究を進める予定である。

多能性幹細胞由来腸オルガノイドによる腸再生医療基盤技術の開発

高 橋 純 一

(東京科学大学 消化器内科)

【目的】

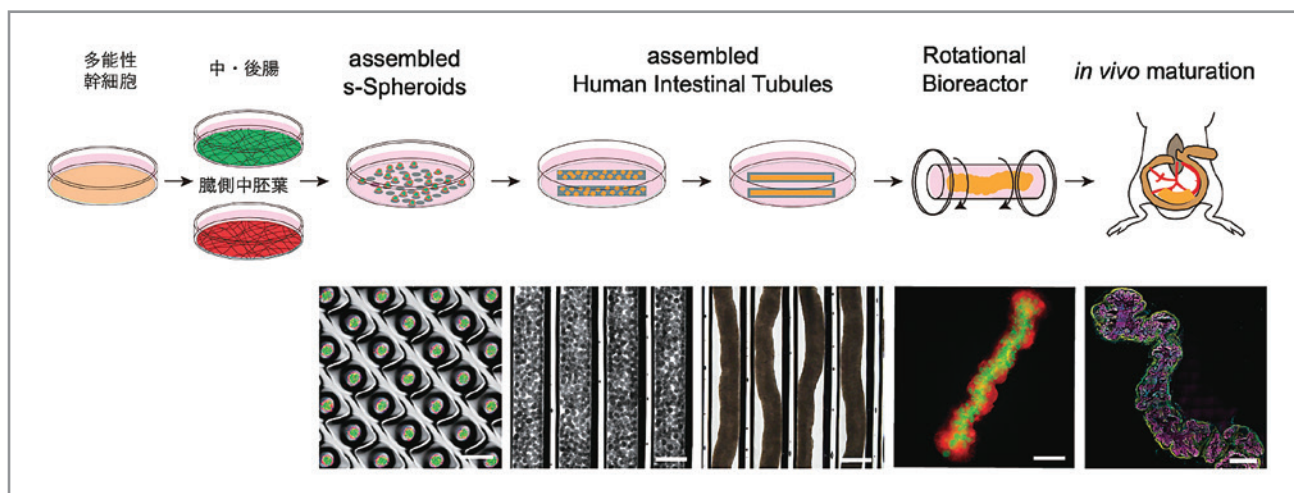
多能性幹細胞由来の腸オルガノイド (HIO) は全層性の腸組織構造が再現可能であり¹⁾腸再生医療への応用が期待されているが、腸の生理的な形態である管腔構造の再現には至っていない。本研究は腸管再生医療への応用を見据え、管腔構造を有する腸組織の創出を目的とした。

【方法】

多能性幹細胞から中・後腸細胞及び臓側中胚葉へと個別に分化誘導後に単一細胞化しスフェロイド形成プレートに播種しスフェロイド形成を促した。スフェロイド長軸溝を多数有する特殊超プレート (Org-SP plate) に播種し溝内での長軸方向の融合を促した。作成された紐状構造体 (assembled Human Intestinal Tubules; a-HITs) を回転式バイオリアクター^{2,3)}にて培養した後超免疫不全マウスの腸間膜に移植し体内での成熟を促した。免疫染色にて組織の性状や形態を評価した。

【結果】

中・後腸細胞及び臓側中胚葉は速やかに凝集し均一なスフェロイド (assembled spheroids; as-Spheroids) を形成した。長軸溝を多数有する特殊プレートに as-Spheroid を播種すると、溝内で速やかに凝集し紐状構



造体 (assembled Human Intestinal Tubules; a-HITs) が形成された。A-HIT をバイオリアクターを用いた回転浮遊培養を行うと、自己組織化を経て上皮層及び周囲の間葉組織を伴う腸管組織へと分化した。浮遊培養を経た a-HIT は超免疫不全マウスの腸間膜移植を経て数センチにわたる大型の腸管組織へと成熟した。陰窩構造を有する上皮層、それを裏打ちする粘膜下層、筋層を含む層状の間質組織を認め、免疫染色にて腸上皮は各種分化細胞及び幹細胞を有することが確認された。

【結語】

多能性幹細胞から全層性の大型腸管組織が作成可能であることを示し、腸管再生医療への基盤技術としての応用が期待される⁴⁾。

【文献】

1. Spence, J.R, et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105-109.
2. Takahashi, J, et al. (2022). Suspension culture in a rotating bioreactor for efficient generation of human intestinal organoids. *Cell Reports Methods* 2.
3. Takahashi, J, et al. (2023). Protocol to generate large human intestinal organoids using a rotating bioreactor. *STAR Protocols* 4, 102374.
4. Takahashi, J, et al. (2024). Controlled aggregative assembly to form self-organizing macroscopic human intestine from induced pluripotent stem cells. *Cell Reports Methods* 4.

原発性硬化性胆管炎の病態における腸内細菌代謝産物の役割解明

田中美帆

(東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科)

【目的】

原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis, PSC) は、胆道の線維性炎症を特徴とする慢性胆汁滯性肝疾患であり、肝不全や胆道癌を惹起する予後不良の疾患である。PSC 患者の約 80% が炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) を合併しており、PSC の発症と腸内細菌代謝産物の構成変化の関連についての報告も見られることから、PSC と腸内細菌・腸管免疫の関与が示唆されている。本研究の目的は PSC の病態に関わる腸内細菌代謝産物を同定することである。

【方法】

当院に通院中の PSC 合併 IBD 患者より便を採取した。健常者・PSC 以外の自己免疫性肝疾患 (自己免疫性肝炎 :AIH/ 原発性胆汁性胆管炎 :PBC) ・IBD 患者を比較対象とした。

【結果】

現在、健常者 5 名、PSC 合併 IBD 患者 10 名、PSC 1 名、IBD 患者 1 名、非 PSC 肝疾患 (AIH 4 名、PBC 4 名) の糞便の採取を行った。肝予備能は全て Child A であり、IBD の内訳は 8 名が潰瘍性大腸炎、1 名がクローン病、1 名がパーチェット病であった。PSC 合併 IBD 患者の免疫抑制治療前後での PSC の明らかな病勢改善は認め

なかったことから、PSC の病態には腸管免疫以外の関与が示唆された。今後は検体集積が終了し次第、質量分析を用いた非標的メタボロミクス解析を行う。PLS 解析により PSC 患者に特徴的な腸内細菌代謝産物を同定し、PSC 重症度との関連を評価する。

【文献】

- (1) Awoniyi M, et al: Protective and aggressive bacterial subsets and metabolites modify hepatobiliary inflammation and fibrosis in a murine model of PSC, Gut. 2023; 72:671-685

腸管微生物叢介入による宿主免疫機構の再教育を目指す炎症性腸疾患新規治療法の開発

西成田 悠

(杏林大学医学部 消化器内科学)

【目的】

我々は、炎症性腸疾患モデルマウスを用いて、幼少期の dysbiosis により炎症性に傾いた免疫プロファイルは成長後も持続することを示してきた。さらに、4 週齢または 10 週齢の無菌 (GF) マウスに同性・同週齢の SPF マウスからの腸管微生物叢移入 (FMT) を行ったところ、レシピエントには 4 週齢・10 週齢のいずれでもドナー類似の腸管細菌叢が生着したが、10 週齢レシピエントでのみ免疫プロファイルがドナーと異なる変化をすることを見出した。一方、10 週齢 SPF マウスをドナーとして 4 週齢 GF レシピエントマウスに FMT した場合に、4 週齢 SPF に類似した細菌叢が生着し、レシピエントは健全な免疫発達を示した。以上より、我々は、幼少期宿主において「健全な免疫発達のために必要な微生物の生着を可能にする機構」と「構築された微生物叢に応じる免疫可塑性」が存在するという仮説を立てた (図 1)。本研究では、宿主が腸管微生物に提供する局所環境の一面として宿主腸管粘膜の遺伝子発現の週齢による違いを検討した。

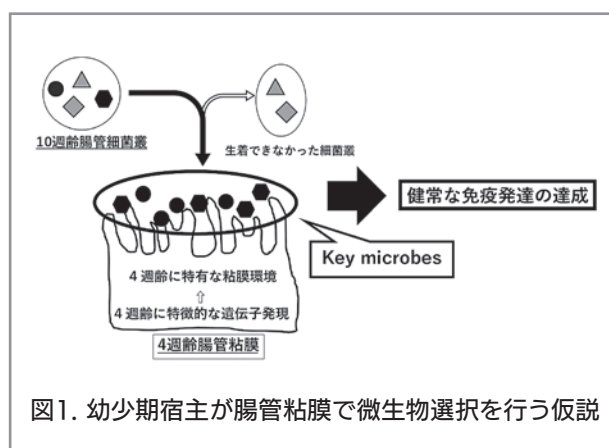


図1. 幼少期宿主が腸管粘膜で微生物選択を行う仮説

【方法】

本研究では、宿主腸管粘膜の遺伝子発現における週齢という 1 因子の影響を検討するため、微生物群の要因を排除した GF マウスを用いることとした。4 週齢と 10 週齢 GF マウスの回腸および大腸の粘膜遺伝子発現について、mRNA マイクロアレイ (Clariom™ S Assay, mouse) を実施し、週齢特徴的な発現を示す遺伝子を探索した。

【結果】

回腸および大腸粘膜において、4 週齢 GF マウスと 10 週齢 GF マウスの遺伝子発現プロファイルは異なっていた。回腸粘膜における遺伝子発現プロファイルの PCA プロットを図 2 に示す。また、図 3 に提示するように 4 週齢と 10 週齢で発現が 2 倍以上かつ有意 ($p < 0.05$) に変化した遺伝子が存在し、週齢ごとの遺伝子発現パターンを特徴付ける知見と考えられた。

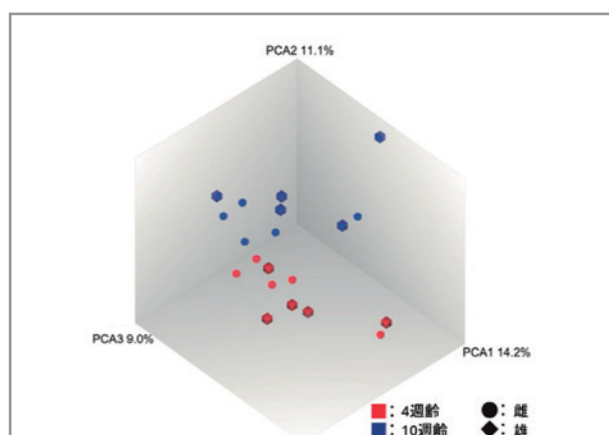


図2. 回腸粘膜 mRNA プロファイルの PCA プロット
4 週齢 (赤) と 10 週齢 (青) で異なるクラスターを形成した。

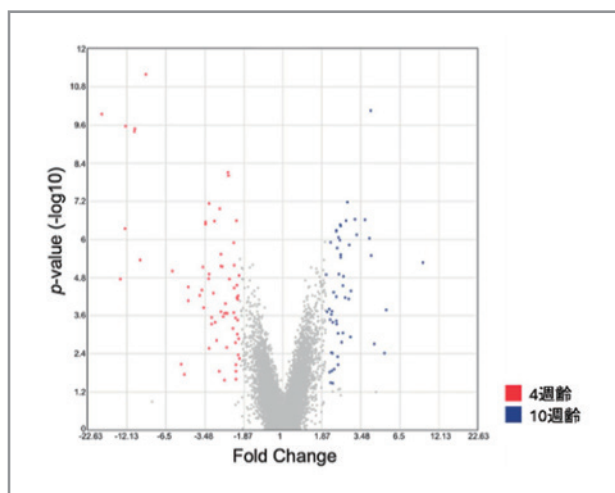


図3. 回腸粘膜mRNA発現の週齢による比較

赤色（または青色）のドットは4週齢（または10週例）で高い mRNA 発現がみられた遺伝子を示す。灰色のドットは、4週齢と10週齢の比較で「2倍以上の有意な変化 ($p < 0.05$)」を満たさなかった遺伝子を示す。

【考察】

GF マウスを用いた本研究において、腸内微生物叢を含む周囲環境に依らず、宿主自身が週齢に応じて腸内局所環境を調整する機構が有することが明らかとなった。本機構により微生物に提示される環境が、特に幼少期において、健全な免疫構築に必要な微生物の生着にどのように寄与するのかを検討することで、炎症性腸疾患の根本的治療に至る可能性がある宿主免疫機構の「再教育」を目指す腸管微生物叢介入につながることを期待される。

腸管免疫の恒常性と破綻における IL-1R 経路の役割の解明

日 比 則 孝

(北里大学北里研究所病院)

【背景と目的】

腸管マクロファージ (M ϕ) は IL-10 を恒常的に産生することで、外来抗原に対する過剰な免疫応答を抑え、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまで腸管 M ϕ の恒常的な IL-10 産生が腸内細菌非依存的かつ MyD88 依存的であることを見出し、その経路として IL-1 β /IL-1R が関与している可能性を考

えた。興味深いことに *Il1r1* は腸管 M ϕ のみに発現し、他臓器の M ϕ には発現していないことから、腸管 M ϕ の特殊性を規定していると仮説を立てた。また、マウス M ϕ 由来細胞株を用いて IL-1R1 過剰発現株を作製し、IL-1 β 刺激を行ったところ IL-10 の発現および産生が観察された。本研究では IL-1R 拮抗薬の投与によってマウスの IL-10 が低下し IBD を発症するのか、マウス腸炎モデルが同様に増悪するのかについて検討する。さらにヒト IBD 患者において IL-1R の発現と IL-10 の産生について検討し、IBD の病態解明および治療の一助になることを目的とする。

【方法】

1) マウスへの IL-1R 拮抗薬投与

Recombination activating gene 2 knockout (Rag2KO) マウスに Isotype control および Anti-IL-1R1 抗体を腹腔内投与した。腸管から粘膜固有層単核細胞 (LPMC) を回収し、MACS で CD11b⁺ の腸管 M ϕ を分離し、*Il10* の発現を qPCR で評価した。

2) 腸炎モデルを用いた検討

DSS を経口投与した Rag2KO マウスに対して、上記と同様に抗体を投与し、腸管長にて炎症を評価した。

3) ヒト手術検体を用いた検討

IBD 患者の手術検体の炎症・非炎症部位から LPMC を回収し、MACSにて CD3⁻, CD33⁺ の腸管 M ϕ を分離し、*IL1R1*, *IL10* の発現を検討した。

【結果】

Isotype control および Anti-IL-1R1 投与群では、腸管 M ϕ における *Il10* の発現に統計学的な差は認められなかった (図 1)。さらには DSS 投与腸炎モデルを用いた検討では、Anti-IL-1R1 抗体投与群で腸管長は短い統計的な差は認めなかった (図 2)。

また、ヒト手術検体を用いた検討では潰瘍性大腸炎 (UC) の炎症部と非炎症部では *IL1R1*, *IL10* の発現に差は認めなかったが (図 3)、クローン病 (CD) の炎症部では *IL1R1* の発現が低い傾向があり、*IL10* の発現が有意に低下していた (図 4)。

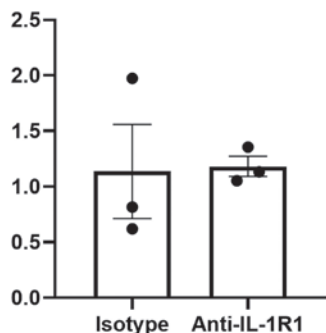


図1. Anti-IL-1R1による*IL10*の発現量

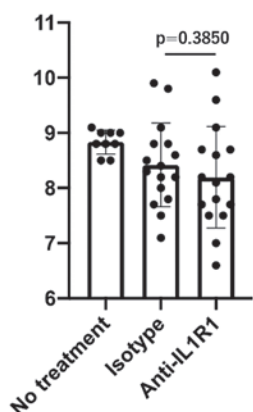


図2. 腸炎モデルにおける腸管長 (cm)

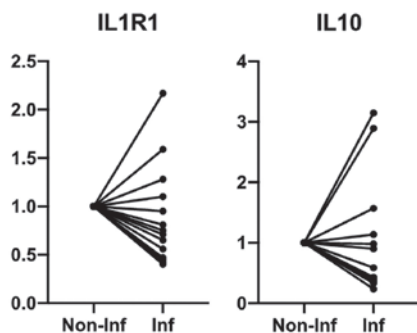


図3. UC 患者の腸管 M φ における発現量

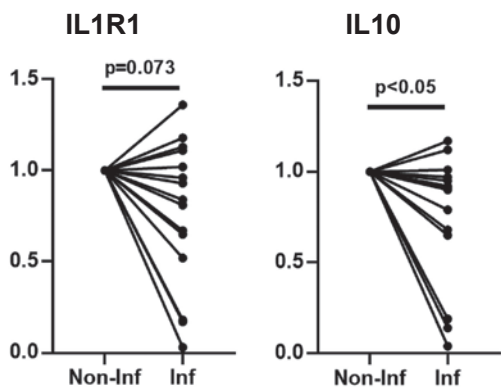


図4. CD患者の腸管M φ における発現量

【考察】

マウスを用いた Anti-IL-1R1 抗体投与で *IL10* の発現は抑制されなかった。また、腸管の炎症は改善しなかった。IL-1 β /IL-1R 経路以外の経路による代償的な IL-10 の活性化が影響している可能性が考えられた。今後は conditional knockout マウスによる IL-1R-KO マウスを作製し、検討を行う予定である。また、ヒト腸管 M φ では CD において *IL10* の発現に差を認めていた。ただし、各検体でバラツキがあるため、患者背景や病理組織も含めた検討も必要と考えた。さらにはヒト IBD 患者のサンプル数を増やし検討を行う予定である。

【文献】

- 1) Kobayashi T et al. IL-10 regulates *Il12b* expression via histone deacetylation: implications for intestinal macrophage homeostasis. *J Immunol*, 189(4), 1792-1799(2012).
- 1) Shubhra S et al. IL-1α Mediates Innate and Acquired Resistance to Immunotherapy in Melanoma. *J Immunol*, 206(8), 1966-1975(2021).

TNF 発現制御機構の生物学的意義および病態生理学的役割の解明

村上 舞

(公立大学法人福島県立医科大学医学部消化器内科学講座・病院助手)

【背景と目的】

炎症性腸疾患 (IBD) では腸管局所で TNF の発現が亢進し、抗 TNF 抗体の有効性から、その病態に TNF が深く関与すると考えられている。TNF 受容体 (TNFR) は、NFκB や Caspase の活性化など TNFR1 下流のシグナルカスケードの理解が飛躍的に進んだ。一方で TNF の産生は、翻訳された膜型 TNF が TACE により切断され遊離型 TNF となることが知られているが、それらの制御機構の多くは不明である。本研究では TNF の発現制御機構を解明することを目的とし、本年度はテトラサイクリン応答型制御システム (Tet-On システム) による TNF 強制発現系の構築・評価を行った。

【方法と結果】

① Mouse *Tnf* の exon1 に対する crRNA, tracrRNA 及び Cas9 タンパクを RAW264 細胞へ導入した。シングルセルクローニングを行い、TNF タンパクの発現が誘導されないことを確認し、*Tnf* ノックアウト RAW264 細胞 (*Tnf* KO RAW264) を樹立した。② レンチウイルスを用いて、reverse tetracycline transactivator 発現ベクターと Tetracycline response element をプロモーターに持つ *Tnf* 遺伝子発現ベクターを *Tnf* KO RAW264 に形質導入し、TNF 強制発現 RAW264 細胞を樹立した。この細胞を doxycycline (Dox) 1 µg/mL で刺激し、TNF が細胞内及び培養上清中でそれぞれ発現することを確認した。③ Dox はマトリックスメタロプロテアーゼ阻害作用を有することが知られており、TACE の切断活性に対する Dox の影響を明らかにするため、野生型 RAW264 細胞へ Dox 存在下で LPS 刺激を行った。Dox 1 µg/mL では細胞内及び培養上清中の TNF 発現に変化を認めず、TACE の切断活性への影響は少ないことが明らかとなった。

【考察と今後の展開】

TNF の主な産生源である免疫系細胞は遺伝子編集の効率が悪いので、ウイルスベクターへの遺伝子編集を行い形質導入することが有用である。また、TNF を誘導する LPS などは細胞内の様々なシグナルを活性化するが、Tet-On システムを用いることで特異性高く TNF が誘導可能である。今後、これらの利点を活かして TNF 発現制御機構の解明を進める計画である。

炎症性腸疾患に対する HTS による新規薬剤開発及び初代培養細胞を用いた疾患関連遺伝子の同定

渡 辺 論

(Massachusetts General Hospital)

報告者は2023年10月より、米国Harvard大学Massachusetts General Hospital (MGH) また Massachusetts Institute of Technology の合同研究施設であるBroad Institute of Harvard and MIT に研究員として留学し、下記の基礎研究を中心に行っている。

実施中の研究

【目的】

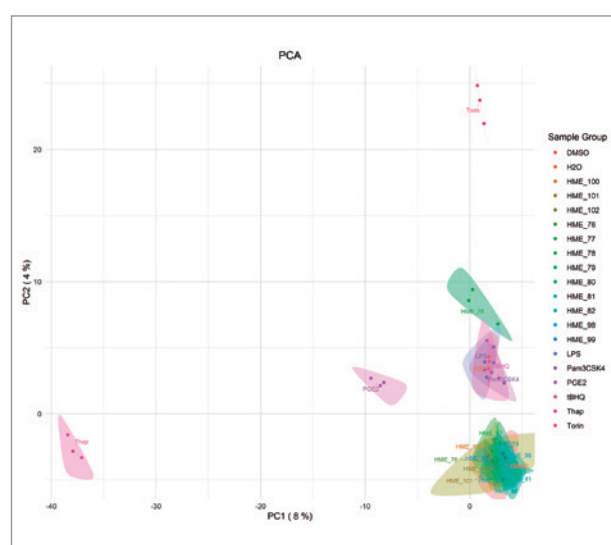
クローン病と腸内細菌の関係性の RNA シークエンス解析による解明

【方法】

クローン病の患者の大腸組織生検検体から培養したオルガノイドに対して様々な種類の細菌分画を投与し、その後 RNA を抽出、次世代 RNA シークエンス解析を行い、その網羅的 RNA 解析から定量的に遺伝子発現を評価する。

【結果】

スクリーニング用に培養した大腸オルガノイドに対して、今後 RNA シークエンスを行い、結果が分かり次第、解析を行う予定である。未公表データかつスクリーニングの途中であり、詳細なデータの掲載は差し控え、一部のデータのみ掲載となるが、現時点で極めて有用な結果が出ている。図で示した PCA plot おける注目すべき点として、HME_78 は特定の細菌由来の分画であり、その刺激を受けたサンプルは他の条件と明確に区別される一貫したクラスターを形成している。HME_78 の位置は、他のサンプル群との大きな違いを示し、この細菌分画が特に強力でユニークな刺激因子であることを示している。今後のこの細菌分画に関して詳細な評価、プロテオミクス解析やトランスレーショナルリサーチを行っていく予定である。



【考察】

報告書執筆時点では RNA シークエンスの結果及び解析待ちの状況であるが、この研究は世界有数の細菌学

研究室である John Clady 研究室との合同研究であり、オルガノイドのみならず樹状細胞、T細胞などの免疫に関わる細胞に対しても同様に細菌分画に対する反応性を評価する、非常に規模の大きい研究である。この研究によりクローン病患者における細菌に対する細胞内反応と免疫制御の関係を明らかにし、その病態解明に迫る。

【文献】

Munhyung Bae et al.: *Akkermansia muciniphila* phospholipid induces homeostatic immune responses, Nature, 608, pages 168–173 (2022)

実施予定の研究

- ・オルガノイドを用いたハイスループット・スクリーニング (HTS)

オルガノイドを疾患モデルとして利用し、迅速かつに大量に薬剤スクリーニングを行うことが可能なシステムを用いることにより新規薬剤の開発を目指す。すなわち IBD 患者由来の腸上皮幹細胞をオルガノイドとして培養し、HTS によって薬剤感受性があるかを調べる。MGH/Broad Institute は IBD 患者に関して世界有数の膨大なデータベースを有し、この研究により既存の薬剤とは異なる機序を持った新規薬剤の開発、さらには特効薬の開発も実現に一步近づくと考えられる。

- ・初代培養細胞を用いた IBD 関連遺伝子変異の機能解明

初代培養細胞と呼ばれる生体内の特徴を反映したまま細胞を培養する技術を利用することにより生体内での遺伝子変異を特定することが可能となる。これにより例えば疾患感受性遺伝子の特定、すなわちどのような遺伝子を持つヒトが IBD になりやすいか、を特定することが可能となり、IBD 患者に対する予防医療の確立にもつながると考えられる。

