

要 旨

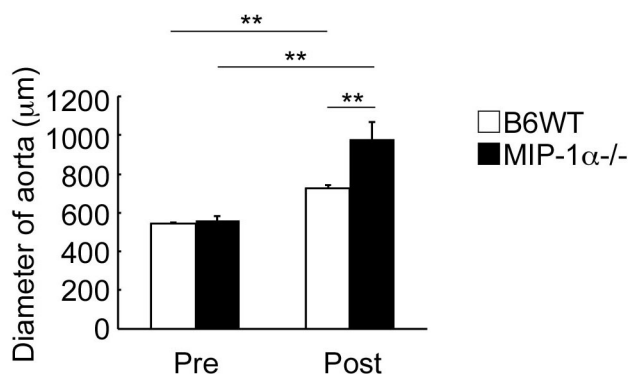
1 心臓・大血管系突然死の分子病態とその法医学的応用

石田 裕子

本研究は、心筋梗塞および大動脈瘤・大動脈解離の法医診断のための新たな分子指標を見いだすことが最終目的である。

大動脈瘤モデル：8週齢オスの野生型マウスを深麻酔下にて開腹し、左腎静脈直下の高さから腸骨動脈分岐部の高さまでの大動脈を周囲組織から剥離して、0.5 M 塩化カルシウム溶液に浸した脱脂綿を大動脈周囲に15分間置いた後、脱脂綿を取り除いて閉腹した。6週間後に大動脈を採取してRNAを抽出し、種々のサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現を検討したところ、*CC chemokine ligand 3 (CCL3)* /*MIP-1 α* 発現がコントロールと比べて有意に亢進していた。そこで、*CCL3* KO マウスを用いて同様に大動脈瘤を惹起したところ、野生型マウスと比べて大動脈瘤形成が有意に増強していた。

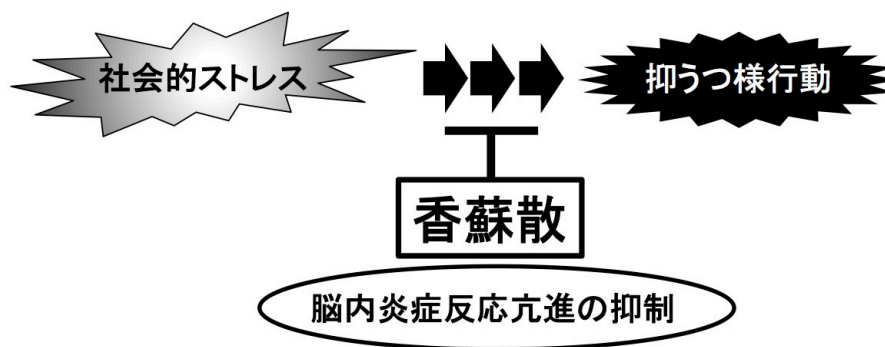
大動脈解離モデル：8週齢オスの野生型マウスの背部皮下に深麻酔下にてミニポンプを埋め込み、angiotensin II (1.4 mg/kg/d) を持続的に投与し大動脈解離を惹起した。Angiotensin II 投与15日目に大動脈を採取してRNAを抽出し、種々のサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現を検討したところ、*IFN- γ* 発現がコントロールと比べて有意に亢進していた。そこで、*IFN- γ* KO マウスを用いて同様に大動脈解離を惹起したところ、野生型マウスと比べて有意に増悪しており、生存率も低下していた。

CaCl₂ 大動脈瘤モデルにおける腹部大動脈の直径 (n=8)0.25M CaCl₂ treatment** $P < 0.01$

2 社会性ストレス誘発精神行動異常に対する漢方薬の効果	伊藤 直樹
------------------------------------	--------------

長期間のストレス暴露は、うつ病などの精神疾患の発症や増悪の危険因子として広く認識されている。また、その背景にはストレス暴露によるネガティブ思考 (negative cognitive bias: NCB) の誘導が関与することも報告されている。本研究では、社会性ストレスモデルの chronic social defeat stress (CSDS) 負荷マウスが示すうつ様行動および NCB に対する漢方薬「香蘇散」の効果並びにその作用メカニズムについて検討した。その結果、CSDS 負荷マウスで認められたうつ様行動としての忌避行動は、香蘇散の反復経口投与により抑制された。一方、CSDS 負荷により誘導された NCB 関連行動は香蘇散投与による改善は認められなかった。香蘇散の抗うつ様作用メカニズムの探索では、脳内炎症反応で中心的な役割を果たす microglia の挙動に注目し検討を行ったところ、CSDS 負荷で誘導された脳内 microglia の活性化に対して、香蘇散投与による抑制効果が認められた。以上の結果から、香蘇散は社会性ストレスにより誘導されるうつ様行動に対して改善効果を発揮することが示唆され、それには microglia の活性化の抑制による脳内炎症反応の制御が一部関与している可能性が示された。

社会性ストレスモデルにおける香蘇散の抗うつ様作用メカニズム

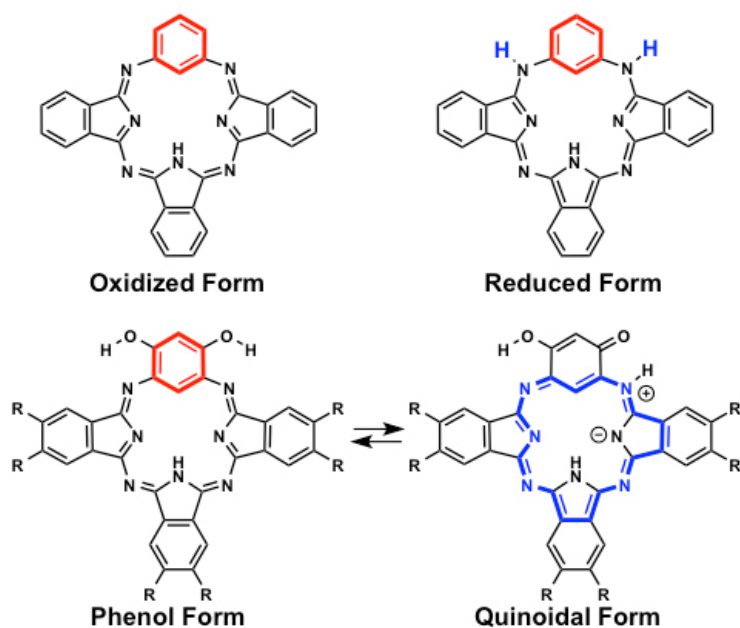


3 近赤外光を利活用する分子の創製と医薬科学への応用

内山 真伸

近赤外とは、可視光線の赤色と遠赤外線との間の領域の光で、およそ 750–2,000 nm の電磁波である。その大きな特徴として、ほとんどの物質と相互作用せず、たいいてい物質を透過できることが挙げられ、光線力学療法などの医薬化学、3D イメージングなどの診断技術への応用が期待されている。これらの技術を実現するにはいづれも、近赤外光と相互作用できる有機分子の開発が必須であるが、一般に有機分子はエネルギーの強い紫外～可視光 (UV/Vis) を利活用するのは得意であるが、近赤外光となると敷居が高いのが現状である。そこで本研究では、「理論化学・合成化学・分光学」を結集して、「最高被占軌道 (HOMO) – 最低空軌道 (LUMO) ギャップを狭くする分子設計」「LUMO を安定化するための置換基選択」「芳香属性の起源」などに着目しながら新奇近赤外クロモフォアの創製に挑んだ。ベンゼン環上にヒドロキシ基を2つ有するベンジフタロシアニン合成し、計算化学・NMR 分光法等の種々の解析の結果、芳香族性の弱いフェノール構造と芳香族性の強いキノイド構造の互変異性の混合物として存在することを明らかにした。また、酸化型構造のベンジフタロシアニンを接触水素還元したところ、定量的に還元型構造のベンジフタロシアニンが得られた。解析の結果、 20π 電子構造に由来する弱い反芳香族性を有する一方で、近赤外領域に強い吸収帯を持つことが明らかとなった。その他、面内芳香族性の解明、C1 カルボランの芳香族性と σ - π 共役、スタニルリチウムの新反応の開発を達成したので合わせて報告する。

ベンジフタロシアニンの酸化型・還元型 (上) と互変異性 (下)

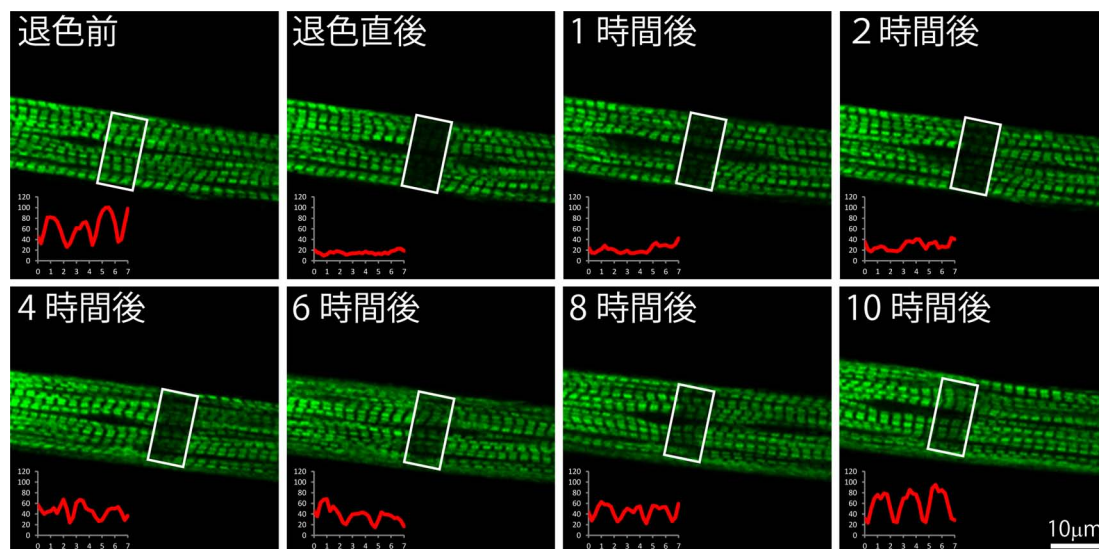


4 遅筋型線維の筋型決定および筋型変換機構の解明

尾嶋 孝一

骨格筋には二つの筋型（速筋型・遅筋型）が存在する。この筋型を決定するのがミオシンである。ミオシンは重合することで筋原線維内の太いフィラメントを形成し、筋収縮の基本単位となる。これまで生体内で筋型変換が起きることは知られているが、筋原線維レベルにおける筋型変換の作用機序は不明である。そこで、本研究では遅筋型筋線維の決定および筋型変換機構のメカニズム解明に向け、筋原線維内の太いフィラメントを形成するミオシンの置換に着目し解析を行った。蛍光タンパク質を融合した遅筋型および速筋型ミオシンを培養骨格筋細胞に発現させ、光退色後蛍光回復法などを用いて検討した結果、①筋原線維内のミオシン置換は太いフィラメントを単位としてではなく個々のミオシンを単位として起こること、②筋原線維におけるミオシンの置換には新規合成ミオシン分子が主に利用されること、③ミオシンの筋型により筋原線維内のミオシンの置換速度に差があることが明らかになった。

GFP 融合したミオシン重鎖の蛍光退色後の蛍光回復
 (各時間は蛍光退色後の時間を示し、グラフは四角で囲まれた部分の蛍光強度を line scan mode で求めて作成した)

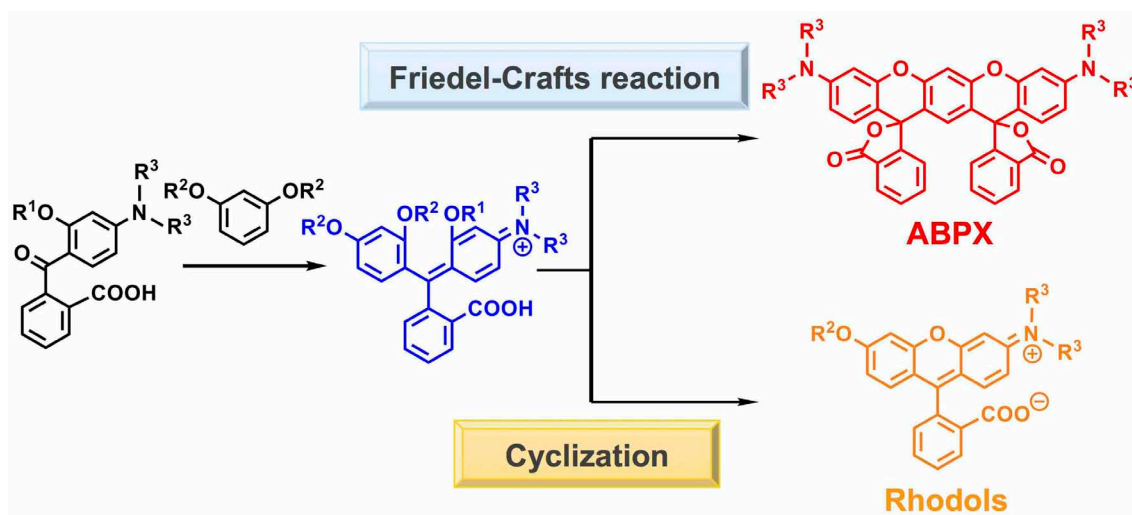


5 一分子でフルカラー調光が可能な有機色素分子の開発

神野 伸一郎

簡易な刺激や操作で、欲しい蛍光色や発色を自在にフルカラー表示可能な有機色素分子の創出に向けて、筆者らはアミノベンゾピラノキサテン系 (ABPX) 色素と命名した色素分子の開発に取り組んでいる。今回、収率の向上とデザインに応じた蛍光団の構造改変を達成する目的で、従来法の反応機構の解明と新たな合成法の構築を行った。まずベンゾフェノン誘導体とレソルシノールとのメタンスルホン酸中での溶融加熱反応を用いた従来法において、反応基質の水酸基に対してメチル基を導入することで、ABPX の生成率が飛躍的に向上することが分かった。更に水酸基を ^{18}O で同位体標識した反応基質を合成し、反応機構の解明を行った。その結果、キサテン環の閉環反応は、ベンゾフェノン誘導体及び、レソルシノールのフェノール性水酸基が、メトキシ基の根元の炭素を求核的に攻撃して、メトキシ基が脱離することで進行することを明らかとした。また水酸基へのメチル基の導入は、キサテン環の閉環反応による Rhodols の生成を抑制することで、ABPX の収率を向上させていることが分かった。更に上記の知見を踏まえ、蛍光団が非対称構造を有する ABPX 誘導体の合成に成功した。

Synthetic strategy of aminobenzopyranoxanthene (ABPX)



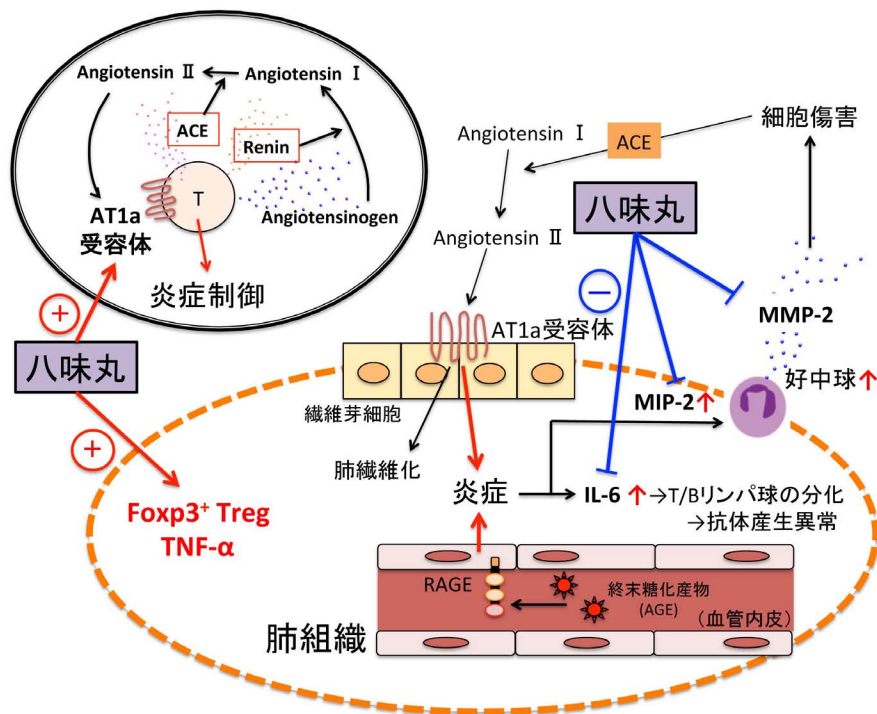
6 糖尿病での呼吸器免疫系異常と八味丸の改善作用の解明

清原 寛章

【目的】糖尿病の主要合併症の腎症、網膜症や神経障害に対しては西洋医学的治療法が確立されつつあるが、糖尿病患者で頻発する呼吸器感染症の難治・重篤化に対する有用な予防・治療は確立されていない。本研究では、streptozotocin (STZ) 誘発性の毒性型高血糖モデルでの肺粘膜免疫異常に対する八味丸煎剤の作用について解析した。

【方法・結果】雄性 C57BL/6J マウス (8 週齢) への STZ (150 mg/kg) の単回腹腔内投与により作製した毒性型高血糖モデルマウスに対するトランスクリプトーム解析により、肺への好中球の集積、好中球誘因性のケモカインの *MIP2* の発現増強が持続的な高血糖で観察されたが、八味丸の投与により、*MIP2* の発現抑制が認められた。さらに八味丸の投与で炎症性サイトカインの *IL-6* 発現は有意に低下していたが *TNF- α* の発現は顕著に増加していた。また、肺および脾臓において、八味丸投与で制御性 T リンパ球のマスター転写因子 (*Foxp3*) の発現と angiotensin II 受容体の *AT1a* の発現が著明に上昇していた。

高血糖病態における肺粘膜免疫系異常と八味丸の作用の想定図



7 光を駆動力とする新規環状骨格構築手法の開発

草間 博之

本研究は、医薬品等生理活性物質などの基本構造単位として重要な環状骨格を高効率的に合成可能な独創的方法論の開発を目指し、高反応性化学種である「カルベン」を光的作用によって発生可能なアシルシランを合成素子として活用する新規分子変換手法の開拓を行ったものである。

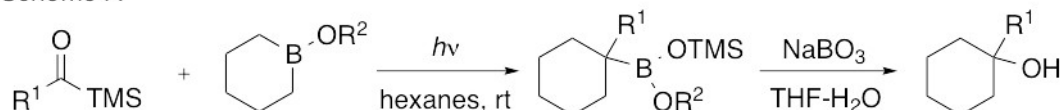
既に我々は、アシルシランの光異性化で生じたシロキシカルベンが、室温・中性条件下で有機ボロン酸エステルと効率的に分子間カップリングを起こすことを見出していたが、本研究において、この反応を基盤とした環状骨格形成手法の開発を目指した検討を行ったところ、ボロン酸エステルに代えて環状ボリン酸エステルを基質として用いると、対応する炭素環が簡便に合成できることを見出した (Scheme A)。本手法は多様な炭素環状化合物を合成するための有用な手法になり得ると考えている。

またシロキシカルベンを反応活性種とする分子内 C-H 結合挿入反応についても検討を実施し、ベンゾフラン誘導体を簡便かつ立体選択的に合成可能な新手法の開拓にも成功した (Scheme B)。

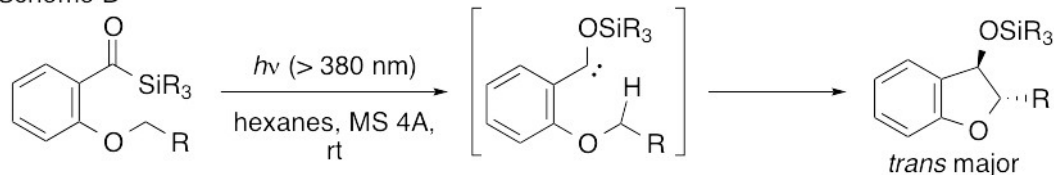
これらの成果は、外部反応剤を必要とせず、光的作用により実施可能なクリーンな環状骨格構築手法であり、今後の研究展開により、多様な環状化合物を高効率的に合成可能な実用的手法へと発展可能と期待している。

アシルシランの光反応を利用した環状骨格構築手法

Scheme A



Scheme B

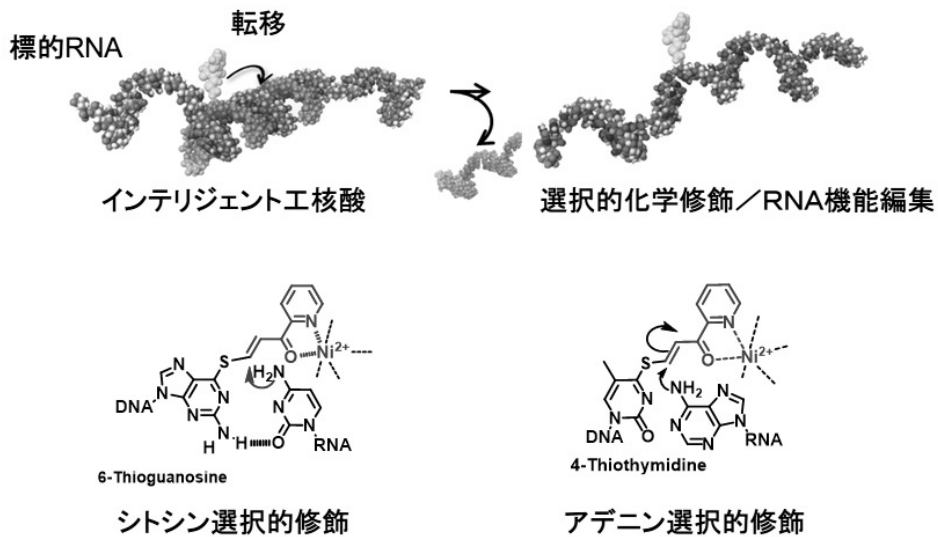


8 インテリジェント人工核酸を用いた革新的 RNA 創薬研究

佐々木 茂貴

近年のゲノム研究の進展により、酵素や受容体などのタンパク質の情報が保存されているのは全ゲノムのわずか 3 % 以下の領域であり、それ以外の非翻訳領域からはタンパク質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) が合成され、遺伝子発現を調節する重要な機能を担っていることが明らかになった。ncRNA は複製や転写および翻訳の調整、さらには発生や分化を制御し、その異常は癌などと関連することから、革新的な創薬・治療法開発のフロンティアとして期待されている。本研究では、反応性分子を搭載したオリゴ核酸を活用した特異的な RNA 化学修飾による機能制御法の開発を目指す。すでに我々は RNA 配列と塩基を正確に認識し、RNA の所望の位置に、所望の分子を導入できる、ピンポイント化学修飾インテリジェント人工核酸を開発し、これまで、RNA 中のウラシル、シトシン、グアニンおよびアデニン、4つのすべての塩基のそれぞれに対する選択的反応を実現した。今後は、さらに RNA に対する特異的な化学反応による遺伝子制御法への展開を検討中である。

RNA 配列特異的な官能基転移反応の概念図とシトシンおよびアデニン選択的な機能性人工核酸の構造

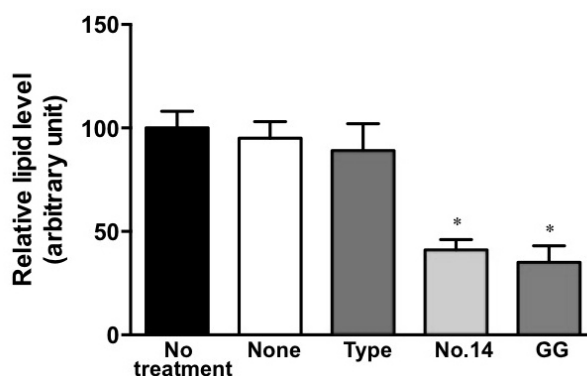


9 プレ・プロバイオティクスの健康機能を媒介する膜小胞

園山 慶

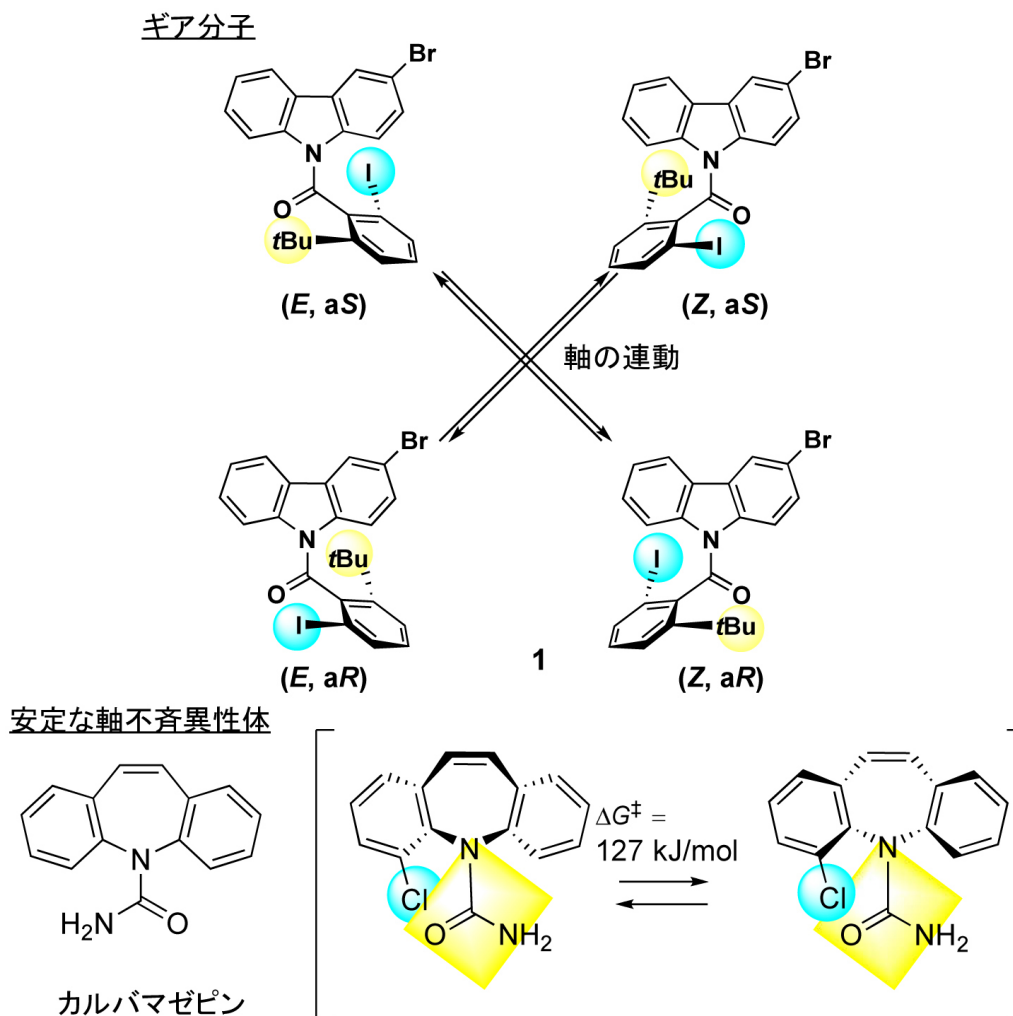
プレバイオティクスやプロバイオティクスが宿主に健康機能を発揮するときの細胞・分子機構、とりわけ腸内細菌叢の情報が腸管からアレルギー炎症局所や脂肪組織にどのようにして伝達されるのかについては良く理解されていない。本研究では、そのような情報伝達を循環血中の細胞外膜小胞であるエクソソームが担っているという仮説を立て、検証した。乳酸菌株を投与したマウスの血清から分離したエクソソームをマクロファージ細胞株および脂肪細胞株の培地に添加すると、それぞれ炎症性サイトカインの産生および脂肪蓄積が抑制された。これらの結果は、プロバイオティクスである乳酸菌株の抗炎症作用および抗肥満作用の一部はエクソソームが媒介することを示唆する。また乳酸菌株の投与ならびに難消化性オリゴ糖および抗生剤による腸内細菌叢の変化によって循環血中のエクソソームに含まれる miRNA のプロファイルが変化することがマイクロアレイ解析により明らかとなった。今後は、エクソソームの作用が miRNA のエピジェネティック制御によって発揮されることを直接的に証明する必要がある。

プロバイオティク乳酸菌株 (No.14 および GG) を投与したマウスの血清から分離したエクソソームによる 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪蓄積の抑制



医薬品の作用は、医薬品と生体内のターゲット分子との相互作用により発現される。ターゲット分子はキラルであり、医薬品のキラリティーは生体によって厳密に認識される。そのため、現在の医薬品開発においてキラリティーの制御は喫緊の課題である。キラリティーには、不斉中心だけでなく、立体配座が固定されることで生じる動的な不斉（軸不斉）もある。生理活性発現の鍵となる立体構造の解明という観点から、軸不斉は大変重要である。本研究では、カルバゾール *N*-ベンゾイル化体及びカルバマゼピン関連化合物に潜在する軸不斉を表出させ、生理活性との関連を明らかにすることを目的とした。その結果、アミド周辺の立体的な環境をととのえることによって、軸不斉異性体を分離・単離できることを明らかにした。また、カルバゾール *N*-ベンゾイル化体には、大変珍しいギア分子としての特性があることもわかった。さらに、カルバマゼピン関連化合物は、軸不斉異性体としてはこれまでになく安定な熱力学的安定性を有することもわかった。今後、それぞれの生物活性を検討し、活性コンホメーションを明らかにし、より良い医薬品候補化合物の分子設計及び合成に発展させる予定である。

活性が期待される軸不斉異性体



11 生体リズムの積極的改善を目指す生活習慣の開発

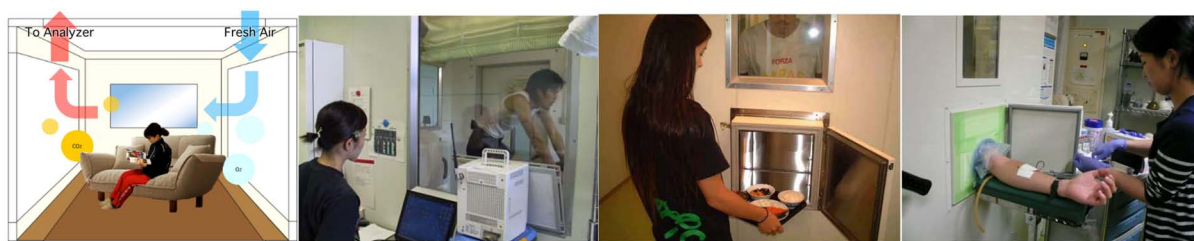
徳山 薫平

運動時の代謝・内分泌反応は、運動する時間帯の違いにより異なる。また、運動が代謝に及ぼす影響は運動後も続く。本研究では、運動する時間帯の違いが24時間の脂肪酸化に及ぼす影響について連続間接熱量測定から検討した。

被験者は若年成人男性とし、最大酸素摂取量の50%で自転車運動を60分間、朝食前、昼食後、夕食後に行う運動条件と非運動条件の4試行を行わせて24時間の代謝をヒューマン・カロリメータで測定した。朝食前の運動は血中遊離脂肪濃度を上昇させ、24時間の脂肪酸化を増大させたが、同じ運動を昼食後あるいは夕食後に行っても24時間の脂肪酸化や血中遊離脂肪酸濃度には変化がなかった。

運動が脂肪酸化を亢進する効果は運動する時間帯に依存し、早朝空腹時の運動にその効果が大きい。機序としては、グリコーゲン貯蔵量の顕著な減少が転写因子の細胞内分布を変えることで脂肪の酸化に関与する遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性が考えられる。更に脂肪酸濃度の上昇も早朝空腹時の運動で顕著であり、これが遺伝子発現の変化を介して脂肪酸酸化を亢進して24時間の脂肪酸酸化量が増大する機序も示唆された。

ヒューマンカロリメータによるエネルギー代謝測定

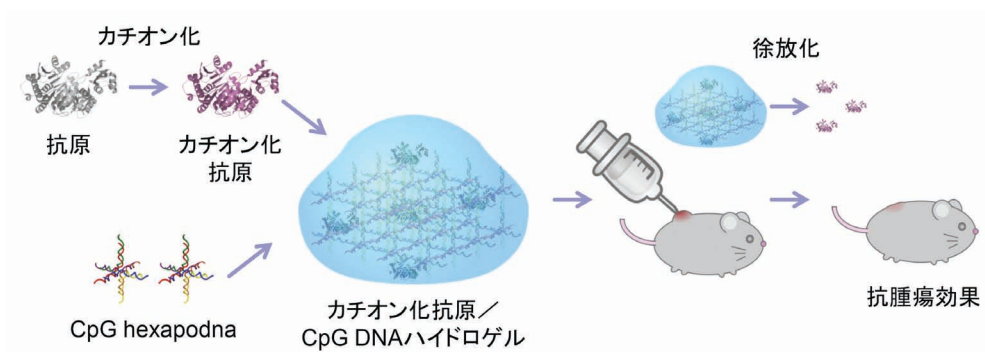


12 核酸ナノ構造体を基盤とする疾患治療システムの開発

西川 元也

抗原を投与することで抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法においては、抗原を必要な時間、必要な場所に、必要な量だけ送り届けることができるドラッグデリバリーシステムの開発が必須である。本研究では、我々がこれまでに開発した自己ゲル化核酸技術を用いて免疫刺激性 CpG DNA ハイドロゲルを作製し、カチオン化抗原を用いることで CpG DNA ハイドロゲルからの徐放化ならびにワクチン効果の増強を試みた。卵白アルブミン (OVA) をカチオン化した ED-OVA は、DNA ハイドロゲルから徐放された。また、ED-OVA は OVA と比較してマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に効率よく取り込まれた。また、この取り込みは DNA ハイドロゲルの添加により有意に増大し、これに伴い抗原提示も増大した。ED-OVA 内包 CpG DNA ハイドロゲルは効率よく OVA 特異的免疫応答を誘導した。さらに、OVA に代えて OVA の MHC クラス I エピトープペプチド pepI を用いた場合には担癌マウスの生存期間も有意に延長した。以上より、抗原をカチオン化することで CpG DNA ハイドロゲルからの徐放化が可能であり、これによりワクチン効果を著しく増強できることを見出した。

核酸ナノ構造体を基盤とするがん治療システム

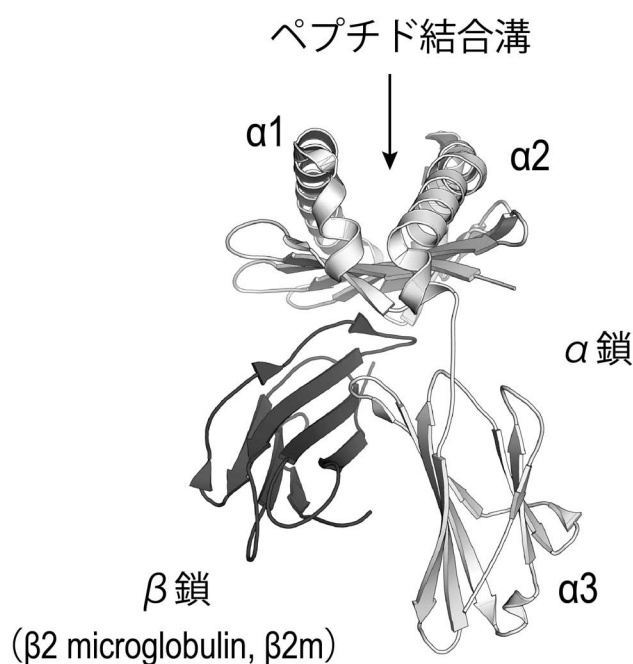


【目的】本研究は、失明率の高い難治性炎症疾患ペーチェット病（BD）発症との関連性が強く示唆されている HLA タンパク質の分子間相互作用に関する化学基盤の構築を目指す。

【方法】計算化学による相互作用メカニズムの解明と構造化学・構造生物学的研究に向けた試料調製を行った。具体的には、BD 発症者に高頻度に見られるハプロタイプ HLA-B*51:01 と HLA-A*26:01、BD 発症に関与しないハプロタイプ HLA-B*35:01 と HLA-A*11:01 に関して BD 発症に関与する可能性が示唆されている 9 アミノ酸残基の候補ペプチド（MICA-TM ペプチド）との複合体の分子動力学（MD）シミュレーションによって、HLA と MICA-TM ペプチドとの相互作用解析を行った。また、HLA の相互作用スクリーニングおよび構造生物学的研究を目指し、BD 発症に関与するハプロタイプ HLA-B*51:01 と HLA-A*26:01 の試料調製を進めた。

【結果】MD シミュレーションの結果、BD 発症に関わる HLA のエピトープ選択性を分子間相互作用の観点から計算化学的に明らかにすることに成功し、BD 発症に関与する相互作用に関する原子レベルの構造基盤を得た。また、HLA の組換えタンパク質の生産を検討した結果、大腸菌を用いた発現系を利用し、目的タンパク質の大量発現に成功した。本研究は、BD 研究のみならず強皮病等 HLA の関与が予想されている免疫疾患の病因・病態研究に資し、さらにはアバカビル・カルマゼピンに代表されるハプロタイプ依存性を有する薬剤過敏症・重傷薬疹の解決に向けた分子・原子レベルの研究へと繋がることと期待される。

HLA クラス I の基本構造



14 ナノ粒子の脳移行性に対する定量的評価基盤の構築

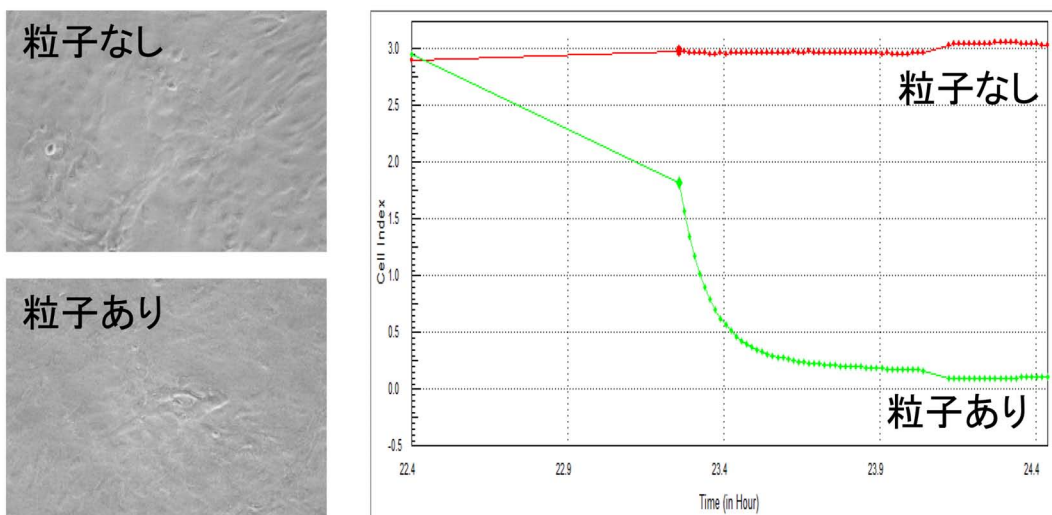
藤岡 宏樹

本研究は、脳への透過性が懸念されているナノサイズの粒子について、曝露頻度の高い粒子を中心に透過性を「定量的」に評価すること、また、脳への透過・排出機構について明らかにすることを目的とする。本研究を遂行することにより、ナノ粒子の透過性について、簡便にスクリーニングを行う方法を構築し、定量データに基づいたリスク評価を行う研究基盤を構築する。

今般、我々は透過機構を検討するため、血液脳関門モデルで透過性が確認された 30 nm のシリカ粒子を用いて、粒子添加時におけるラット脳毛細血管内皮細胞の観察、及び培養プレートに結合した内皮細胞の電気抵抗値 (Cell index) の測定を行った。

この結果、細胞の観察像からは粒子添加による大きな変化は観察できなかったが、培養プレートへの細胞の結合性を示す Cell index は粒子添加により大きく減少し、約 1 時間で細胞が付着していない状態と同程度にまで低下した。このことから、ナノ粒子が添加された際、見かけ上、細胞は定着しているものの、内皮細胞のバリア機能が低下してしまうことを示唆しており、粒子透過のメカニズムに内皮細胞の結合性の低下が寄与している可能性が考えられた。

ナノ粒子添加時における脳毛細血管内皮細胞の観察像と電気抵抗値の経時変化



15 エピゲノム因子 Brd4 を介したインスリン抵抗性誘導機構

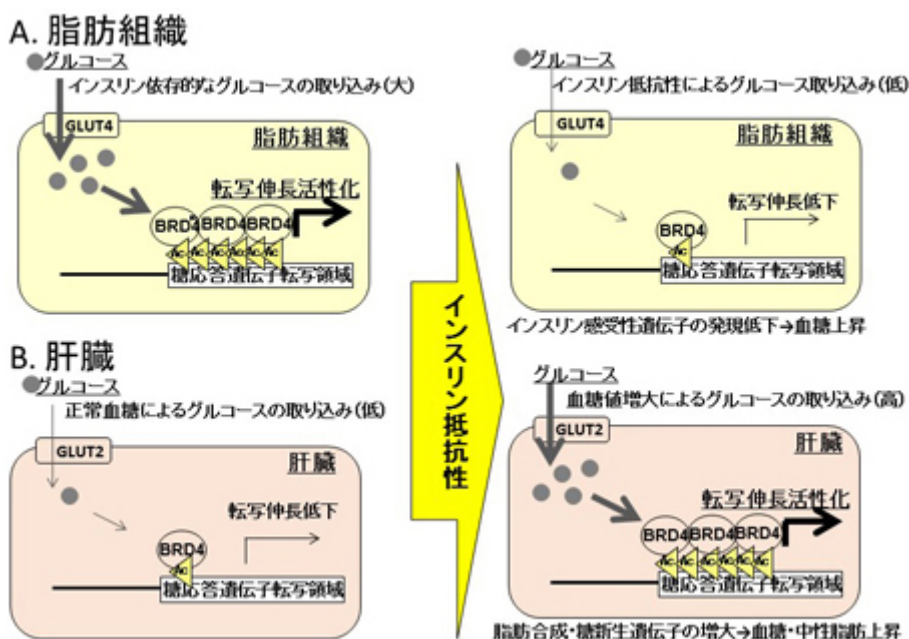
望月 和樹

本研究では、“エピゲノム因子 BRD4 は、細胞内のグルコース濃度に応答し糖応答遺伝子の転写伸長反応を調節するエネルギーセンサー因子であるとともに、インスリン感受性細胞からインスリン抵抗性細胞への変容を決定づける新規エピゲノム因子である”という仮説を検証した。その結果、糖刺激が、単球様細胞における TNF- α の発現、および肝臓における脂肪代謝関連遺伝子の発現を増大させること、これらの遺伝子発現増大には、アセチル化ヒストンおよびエピゲノム因子 BRD4 が関与することが明らかとなった。

脂肪細胞における脂肪蓄積関連遺伝子の発現のインスリン抵抗性誘導による低下には、これら遺伝子上のアセチル化ヒストン-BRD4 の結合低下が関与すること、短鎖・中鎖脂肪酸の投与は、これらの遺伝子の発現および転写領域のヒストンのアセチル化を増大させることが明らかとなった。

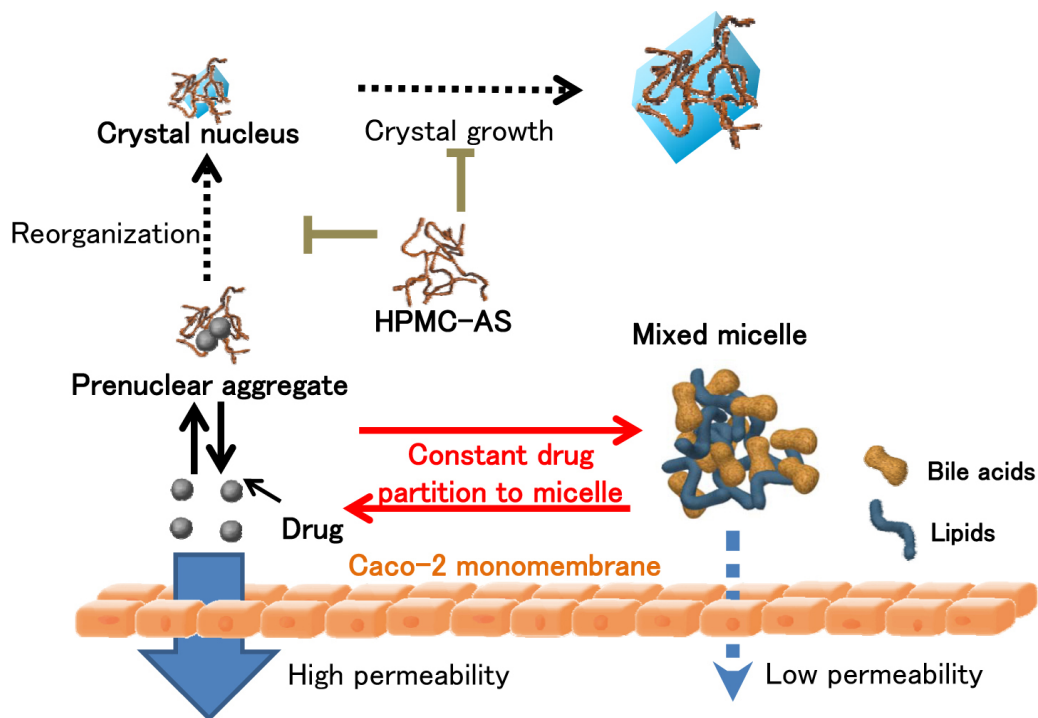
以上により、BRD4 は、糖シグナルを受容するエピゲノム因子であることが明らかになるとともに、BRD4 の活性を正常に維持することが、2 型糖尿病などの生活習慣病の予防および治療に重要である可能性が示唆された。

エピゲノム因子 BRD4 とインスリン抵抗性との関連



難水溶性薬物の溶解性及び吸収性を改善する目的で、非晶質固体分散体からの薬物の過飽和溶解を利用した製剤開発が検討されている。薬物に適した添加剤を用いることで、薬物濃度を一定時間溶解度以上に保持した過飽和溶液の形成が可能である。一方、過飽和溶解による溶解性改善が、必ずしも吸収性改善につながるとは限らない。過飽和溶解からの結晶化過程及び膜透過に適した状態で溶解している薬物が吸収性改善に寄与する。また、実際の薬物吸収は消化管環境下で起こる。過飽和製剤の消化管環境下での膜透過性の評価が、過飽和溶解と吸収性との関連予測及び処方最適化に寄与する。本研究では、胆汁酸及び脂質を含む人工消化管溶液中におけるヒプロメロースアセテートサクシネート（HPMC-AS）の薬物結晶化抑制作用を評価した。さらに、薬物過飽和溶液からの薬物結晶化に伴う分子状態の変化を溶液 NMR 測定により追跡し、過飽和状態における薬物分子状態を評価した。その結果、HPMC-AS による薬物結晶化抑制及び胆汁酸や脂質が形成する複合ミセルによる可溶化は、お互いの作用を阻害することなく薬物の溶解性及び吸収性を改善すること、薬物結晶核形成時の HPMC-AS と薬物の凝集体形成が安定な薬物過飽和形成に寄与することを明らかとした。

消化管モデル溶液中における HPMC-AS による薬物結晶化抑制作用の模式図



17 DPC データと検査値の統合データを用いた臨床疫学研究

康永 秀生

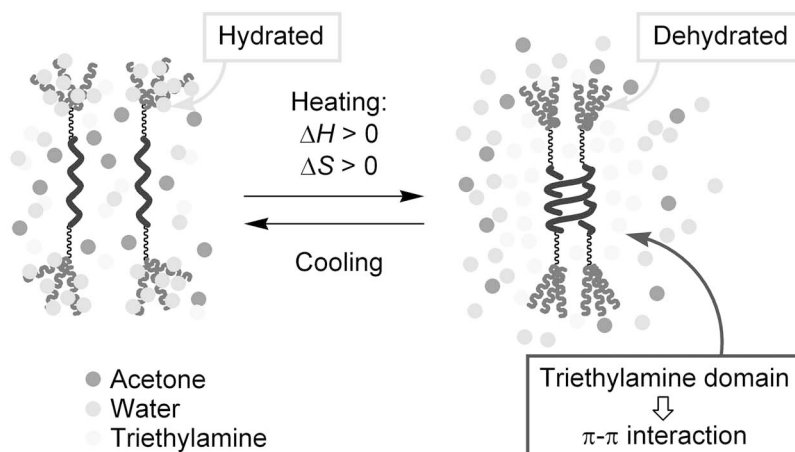
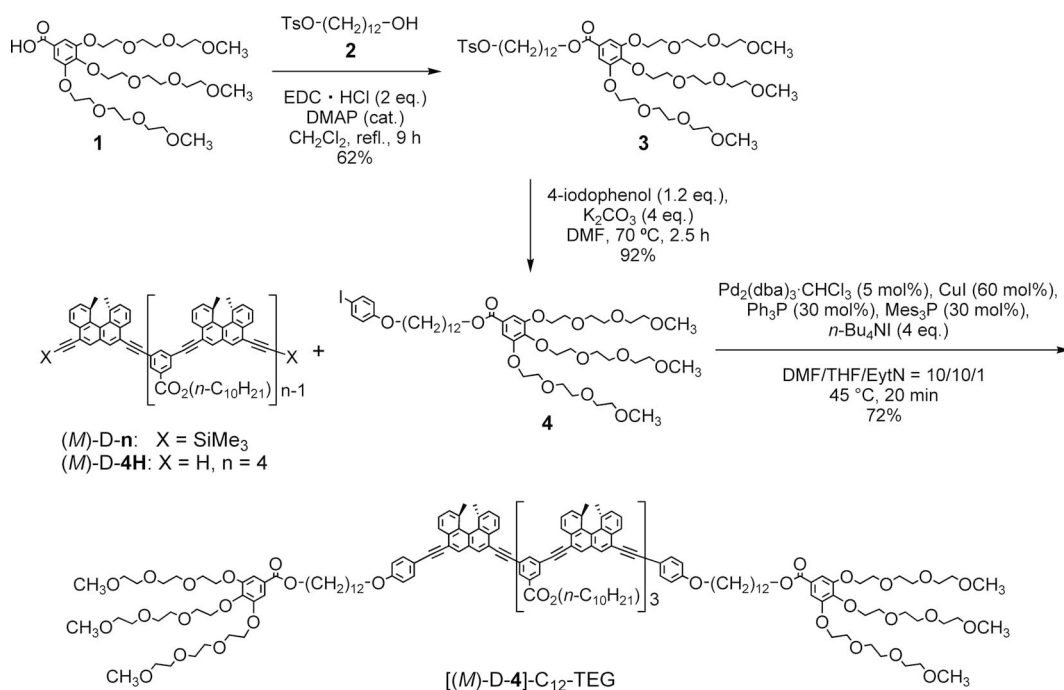
大規模診療情報データベースの研究利用が普及しつつあるが、データベースには検査値等の詳細な臨床データが集積されないことが多く、情報の妥当性も懸念されている。本研究では、国立病院機構において既存の DPC データに SS-MIX2 規格を用いて検査値データを追加した。施設のカルテとの比較により妥当性を検証した上で、その応用可能性について検討した。DPC の病名データは感度は低かったが特異度は高かった。DPC の処置データおよび SS-MIX2 の検査値データはカルテ情報を正確に反映していた。データベース上での重症敗血症および播種性血管内凝固の特定について、検査値を基準として処置情報を用いた方法と病名を用いた方法を比較したところ、前者が高い感度を示した。新たに検査値を加えたデータベースの妥当性と応用可能性が示され、今後のデータベース拡大に伴いより高いレベルの研究利用が期待される。

DPC 病名データ、DPC 処置データ、SS-MIX2 検査データの妥当性

疾患名	感度 (%)	特異度 (%)	処置名	感度 (%)	特異度 (%)	検査名	一致率 (%)
心筋梗塞	52.2	99.7	尿検査一般	98.6	98.3	WBC	98.4
うっ血性心不全	68.8	97.5	尿沈渣	97.1	99.3	Plt	98.1
末梢血管障害	34.5	99.3	細菌顕微鏡検査	91.4	100	Hb	97.5
脳血管障害	50	98.9	細菌培養検査	97.1	100	PT-INR	97.8
認知症	37.5	100	呼吸心拍監視	66.7	92.2	Na	98.7
慢性呼吸器疾患	33.3	96.9	SpO2測定	21.1	88.5	AST	98.4
リウマチ性疾患	57.1	99.7	X線撮影	97.5	99.4	T-Bil	97.8
消化性潰瘍	33.3	96.7	CT撮影	100	99.5	Cre	99
軽症肝疾患	36.4	98.3	点滴注射	72.7	98.7	T-Chol	98.7
糖尿病(合併症なし)	52.2	96.7	尿カテテル	65.5	97.2	CRP	97.1
糖尿病(合併症あり)	29.4	99.7				Glu	95.9
片麻痺・対麻痺	0	100				HbA1c	98.4
腎疾患	53.3	99.3				BNP	98.4
悪性腫瘍	83.5	97.7					
中等症以上肝疾患	50	100					
転移性腫瘍	58.5	98.5					

ラセンはタンパク質および核酸、多糖などの生体分子に広く見られる基本構造であり、右ラセンと左ラセンの鏡像体を生じる不斉構造である。アクチンやチューブリンフィラメントのように分子集合体レベルのラセン構造、内耳の蝸牛やアサガオの蔓などの器官のラセン構造など物質階層を横断して普遍的に認められる。また、ラセン構造間の相互作用が生体機能に重要な役割を果たしている。従って、ラセン構造の化学合成分子は新規な生物活性物質あるいは医薬品として重要である。我々はラセン小分子であるヘリセンを連結したオリゴマーを合成して性質と機能の研究を進めている。今回、水溶性を付与したオリゴマーを合成した。水溶性ラセンオリゴマー分子は溶液中で二重ラセンとランダムコイル間の構造変化を起こし、熱に鋭敏に応答する分子機能スイッチを発現した。有機溶媒中では加熱によって解離し冷却によって会合する通常の順熱応答を示した。ところが、アセトン／水／トリエチルアミンを混合した水系溶媒中では、加熱によって化合し冷却によって解離する逆熱応答という新しい現象を発現した。

Synthesis and inverse thermoresponse of water-soluble helicene oligomer



19 漢方薬の作用機序を探る

横山 悟

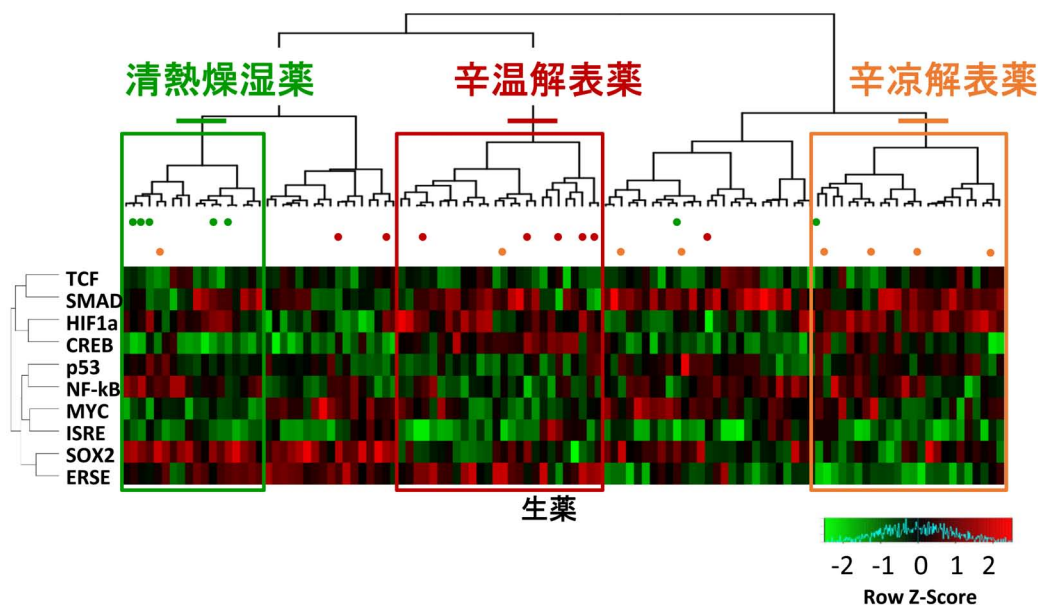
「漢方薬はなぜ効くのか？」この長年にわたる研究課題に挑戦するため、漢方薬による細胞内シグナルの変化に着目した。具体的には、生薬水抽出エキス、漢方薬による細胞内シグナルへ及ぼす効果を検討し、これまで経験的にいわれていた生薬の分類・漢方薬の分類に科学的根拠を与え、漢方薬の作用機序を考察するための新規情報を得ることを目的とした。

10種の転写因子に応答するレポーターベクターをそれぞれ構築し、細胞に遺伝子導入後、富山大学・和漢医薬学総合研究所が所有する112種の生薬水抽出エキスを含むライブラリーを用いて、デュアルルシフェラーゼアッセイを行い、そのデータを用いて、生薬のクラスタリングを行った。

その結果、清熱燥湿薬（黄連など）、辛温解表薬（生姜など）、辛涼解表薬（薄荷など）に分類される生薬が、3つのクラスターにそれぞれ有意に集合した。さらに、辛温解表薬、辛涼解表薬について比較検討を行った結果、辛温解表薬はCREBとERSFの転写活性を上昇させることが示され、辛温解表剤として知られている葛根湯においても同様の効果が確認された。

今回の結果より、漢方医学的な経験に基づいた生薬・漢方方剤の分類・効能を、細胞内シグナルへの効果を検討することで科学的に証明できる可能性が示唆された。

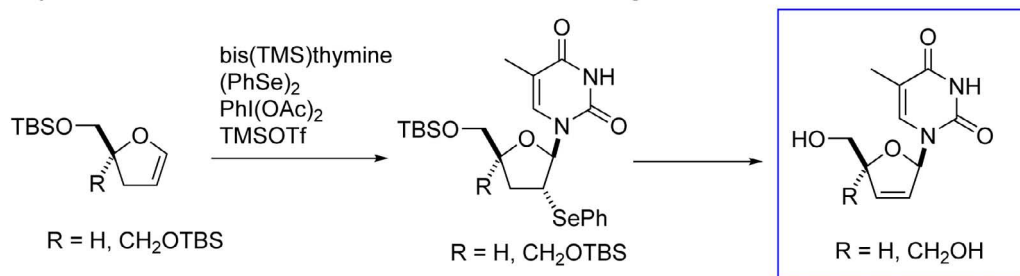
細胞内シグナルに及ぼす効果による生薬分類



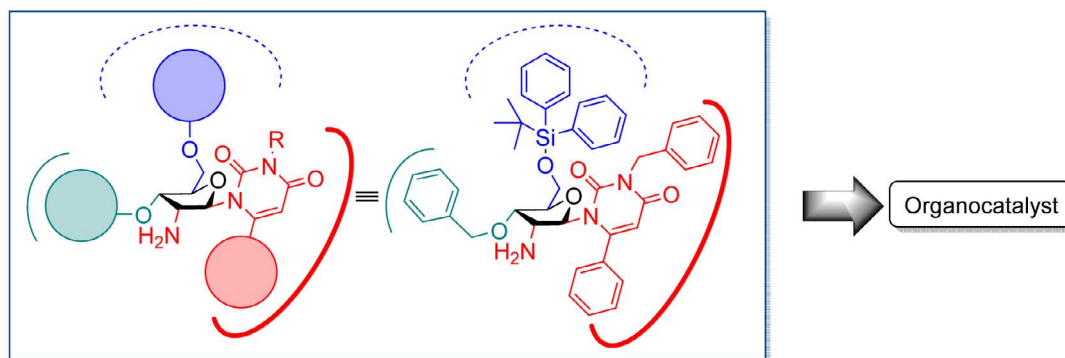
これまでヌクレオシド誘導体については、医薬品探索を目的とした合成研究が盛んに行われてきた。実際、癌やウイルス性疾患に対する代謝拮抗剤やアンチセンス等の核酸医薬の開発に関して多くの成果が報告されている。その一方で医薬開発研究以外では、一部の生化学研究用ツールを除きヌクレオシドの機能が注目を集めることはほとんどなかった。本研究では、従来の医薬品候補としてのヌクレオシド誘導体の合成研究に加え、新たな機能性分子としての可能性を探るため、近年注目を集めている有機触媒としてのヌクレオシド誘導体の利用について検討を行った。医薬品化学的研究では、当研究室で開発した超原子価ヨウ素試薬とジフェニルジセレンドを用いた酸化的グリコシル化を鍵段階とする新たな合成法の開発を行い、スタブジンとその4'-置換誘導体の合成を達成した。一方、有機触媒候補として、反応性官能基となるアミノ基を2'位に、フェニル基をピリミジン環6位にそれぞれ導入した誘導体をデザインした。反応点となるアミノ基周辺を高い置換基で囲うことでヌクレオシドを触媒の基本骨格とする特異な不斉場が構築できると考えた。目的とする2'-アジド-6-フェニルウリジン誘導体は、O-シクロヌクレオシドより鈴木-宮浦カップリングと2'位アジド化を経てその合成を行った。同誘導体を用いシナムアルデヒドの不斉 Diels-Alder 反応について検討を行った。

Synthesis of nucleoside derivatives

I. Synthesis of stavudine and its 4'-substituted analogue



II. Design and synthesis of 2'-aminonucleoside derivatives aimed to use organocatalyst



21 自然免疫応答を制御する長鎖非コード RNA の研究

秋光 信佳

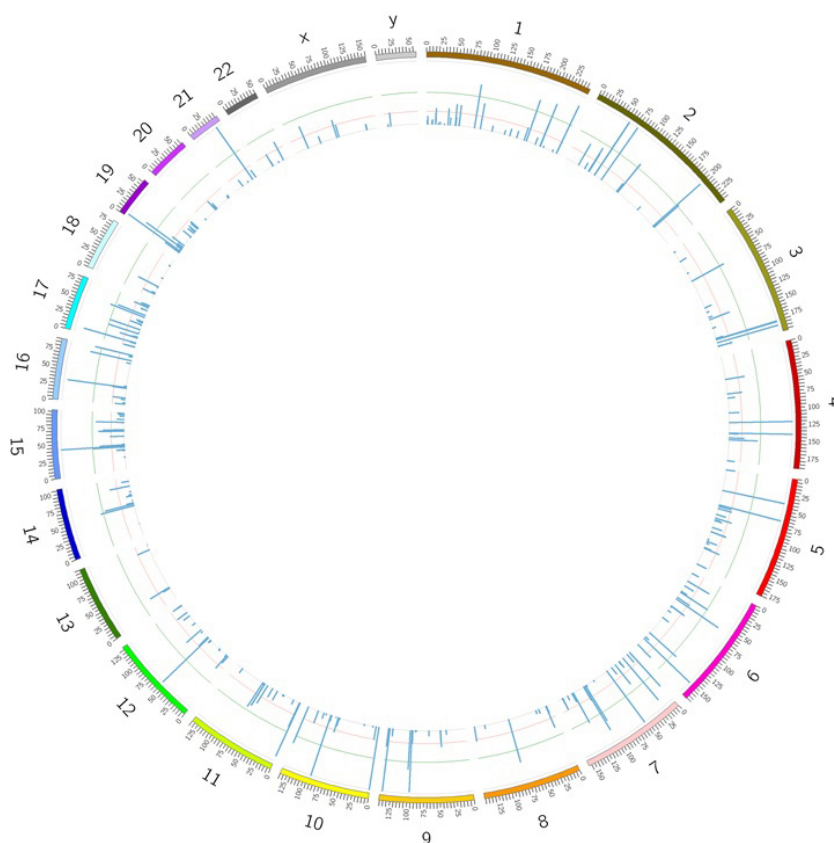
【目的】本研究では、長鎖ノンコーディング RNA のゲノムワイドな RNA 安定性測定から筆者が同定した短寿命長鎖ノンコーディング RNA (Short-Lived noncoding Transcripts: SLiTs) に着目し、病原体感染に対する細胞レベルの応答 (自然免疫応答) における SLiTs の役割の解明を目指す。

【方法】病原体として、細胞侵入性細菌であるサルモネラに着目した。サルモネラ感染によって誘導される SLiTs を同定し、①SLiTs の誘導機構、②誘導された SLiTs の機能 (サルモネラ感染に対する細胞抵抗性における役割)、を解明した。

【結果】サルモネラ感染によって誘導される 310 種類の SLiTs を同定した。SLiTs の誘導機構を調べた結果、サルモネラ感染による核内 RNA 分解機構の抑制が原因となっていた。さらに、誘導された SLiTs のノックアウト細胞に対する感染実験から、感染で誘導される SLiTs がサルモネラ抵抗性に重要な役割を担っていることが判明した。これらの結果は、SLiTs に着目することで全く新しい自然免疫応答機構を解明できることを示している。

サルモネラ感染で誘導される SLiTs を Circos プロットした結果

数字ならびに X と Y は染色体番号を表す。サークル内の棒線の長さは、非感染細胞を対照としたときの各 SLiT の発現増加量を表す。

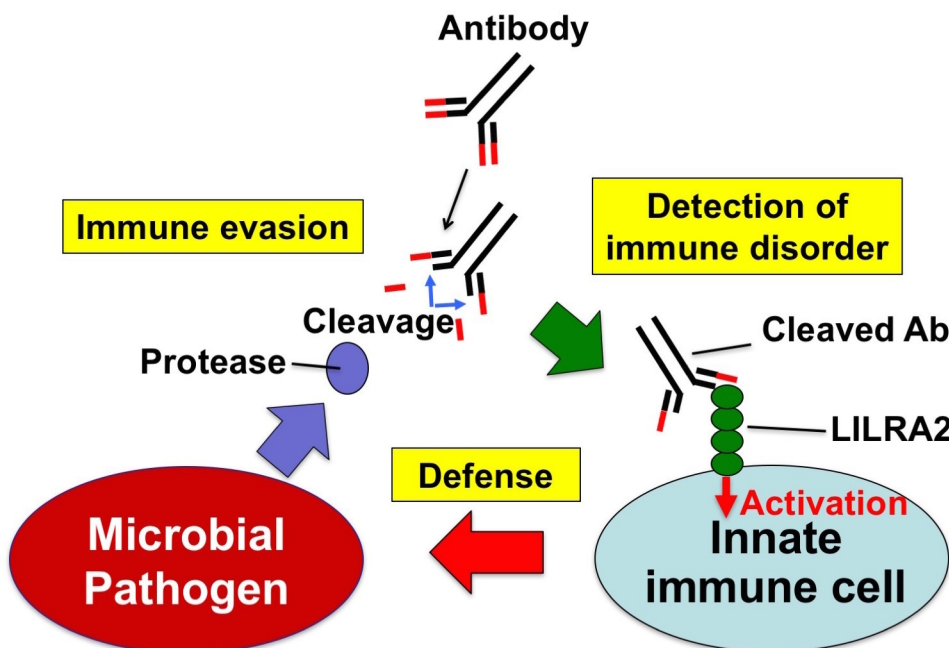


22 細菌感染における損傷抗体の免疫認識機構

荒瀬 尚

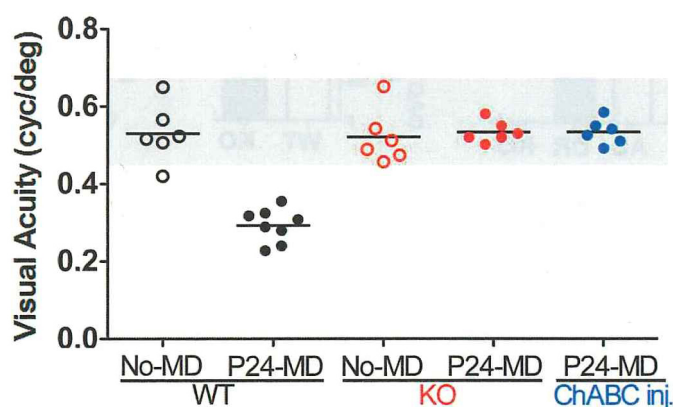
病原性微生物は、タンパク質分解酵素を産生することにより宿主の抗体を切断・分解することが知られており、抗体が切断・分解されると宿主は病原性微生物を排除することが出来なくなる。このような病原性微生物の免疫逃避機構に対して、宿主がどのような対抗手段をとっているのかはこれまで明らかになっていなかった。免疫レセプターが病原性微生物をどのように認識して生体防御に関わっているかを調べたところ、いままで、機能が知られていなかった活性化レセプターである LILRA2 がマイコプラズマ等によって切断された抗体を認識することが判明した。マイコプラズマ以外でもレジオネラ、肺炎球菌、インフルエンザ菌、カンジダもタンパク質分解酵素を産生して抗体を切断した。また、レジオネラは免疫細胞に感染して細胞内で増殖するが、免疫細胞に発現する LILRA2 が切断された抗体を認識すると細胞内においてレジオネラの増殖が阻害された。さらに、中耳炎、炎症性粉瘤、蜂窩織炎等のヒトの細菌感染局所では抗体がタンパク質分解酵素で切断され、その切断された抗体が LILRA2 の発現細胞を活性化した。本研究により今まで機能が不明であった LILRA2 という免疫レセプターが病原性微生物に対する生体防御に働いていることが判明した (Hirayasu *et al.* Nature Microbiology 2016)。従って、LILRA2 の機能をコントロールする薬剤等を開発することができれば、感染症の治療法やワクチン開発に貢献することが期待できる。

活性化レセプター LILRA2 は、病原体が産生するプロテアーゼによって分解された抗体を認識することによって感染防御に関わっている



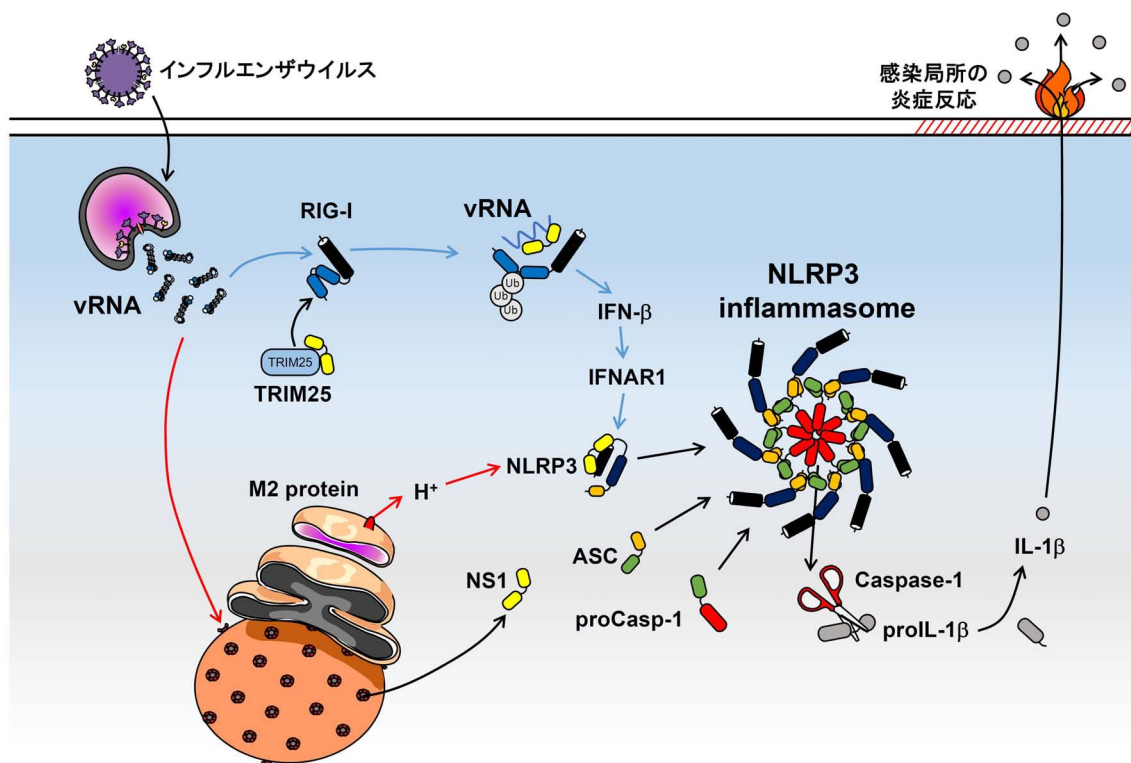
本研究では神経可塑性にコンドロイチン硫酸 (CS) が関わることを明確にするため、CSGalNAcT1 (T1) KO を用いて代表的な神経可塑性である大脳視覚野の眼優位可塑性の開始・維持に関する CS の役割を解析した。臨界期と呼ばれる時期にマウスの片眼を遮蔽して視覚を奪い、それに基づく大脳皮質視覚野の PNN やその領域の CS 定量、視覚の入力依存性を解析した。T1KO では片眼遮蔽による眼優位可塑性の開始は、明らかに阻害されており、成熟脳でも薬物的な復活は生じない。可塑性の生ずる証拠である、眼優位性の偏りは消失した。これらの結果は、CS 合成が正常な視覚臨界期可塑性の開始に必須であることを示している。T1KO における視覚野では、ペリニューロナルネット (perineuronal nets: PNN) の合成およびそこに集積する CS 結合分子のアグレカンは有意に減少した。免疫沈降実験によって、Otx2 と アグレカンは共沈し、T1KO では非常に減弱していた。よって以上の結果は、CS 合成が Otx2 とアグレカンの相互作用に必須であるという考えを支持する。

片眼遮蔽 (MD) による T1KO 眼優位可塑性の開始の消失



インフルエンザウイルスの M2 タンパク質は、トランスゴルジ中の H⁺ を細胞質中へ流出させることにより、細胞質中の自然免疫受容体である NLRP3 inflammasome を活性化させている (Ichinohe *et al.* Nat Immunol. 2010)。また RIG-I 経路によるインターフェロン応答は NLRP3 inflammasome の活性化を増大させている (Pothlichet *et al.* PLoS Pathog. 2013)。このようなインフルエンザウイルス感染による inflammasome の活性化と IL-1 β の分泌は感染局所の炎症反応だけでなく、その後のウイルス特異的な免疫応答を制御する (Ichinohe *et al.* J Exp Med. 2009, Pang *et al.* Nat Immunol. 2013)。今回、インフルエンザウイルスの NS1 タンパク質が NLRP3 と相互作用することにより、NLRP3 inflammasome の活性化とそれに続く IL-1 β の産生を抑制していることが明らかとなった。この抑制効果には、RNA 結合ドメイン (38 番目のアルギニンと 41 番目のリシン) と、TRIM25 結合ドメイン (96、97 番目のグルタミン酸) が必要であったことから、ウイルス RNA による NLRP3 inflammasome の活性化経路にもこの NS1 タンパク質が大きく関与していることが明らかとなった。

インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による NLRP3 inflammasome の抑制機構

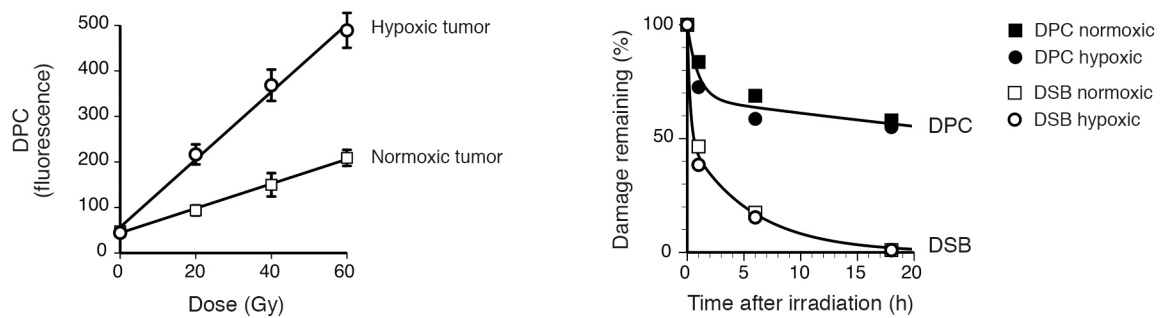


25 低酸素性腫瘍における放射線誘発致死ゲノム損傷の解析

井出 博

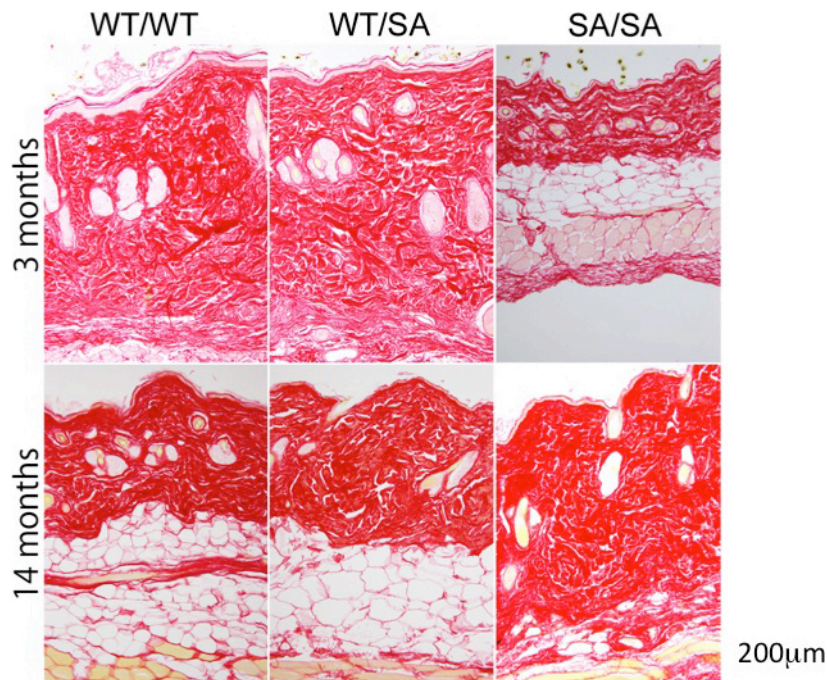
腫瘍に含まれる低酸素性細胞は、放射線感受性が低く治療効果を下げる要因となっている。放射線の致死効果は、照射された細胞のゲノム損傷に由来し、主要な致死損傷は DNA 二本鎖切断 (DSB) であると考えられている。DSB 生成には酸素濃度依存性があり、低酸素下では生成量が減少することが知られている。我々は、これまでの研究で、放射線が DSB に加え、致死性の高い DNA-タンパク質クロスリンク (DPC) 損傷を誘発することを明らかにした。したがって、低酸素性細胞の放射線照射では、DSB に加え、DPC が致死に関わっている可能性がある。本研究では、DPC と DSB の細胞致死における役割を明らかにするため、マウス腫瘍を X 線照射し、DPC と DSB の生成量と修復動態を解析した。その結果、X 線照射により、低酸素腫瘍では常酸素腫瘍に比べ高い効率 (2.8 倍) で DPC が形成されること、さらに、DPC は DSB に比べ修復速度が遅く、長期にわたりゲノムに残留することが明らかとなった。このことから、低酸素腫瘍では、放射線誘発 DPC が DNA 複製や転写に影響を与える可能性が示唆された。また、線エネルギー付与 (LET) の高い炭素イオン線は低 LET の X 線に比べ、効率よく DPC を形成することが示された。

X 線照射した常酸素腫瘍 (Normoxic tumor) および低酸素腫瘍 (Hypoxic tumor) における DPC 生成 (左) と、DPC および DSB の修復動態 (右)

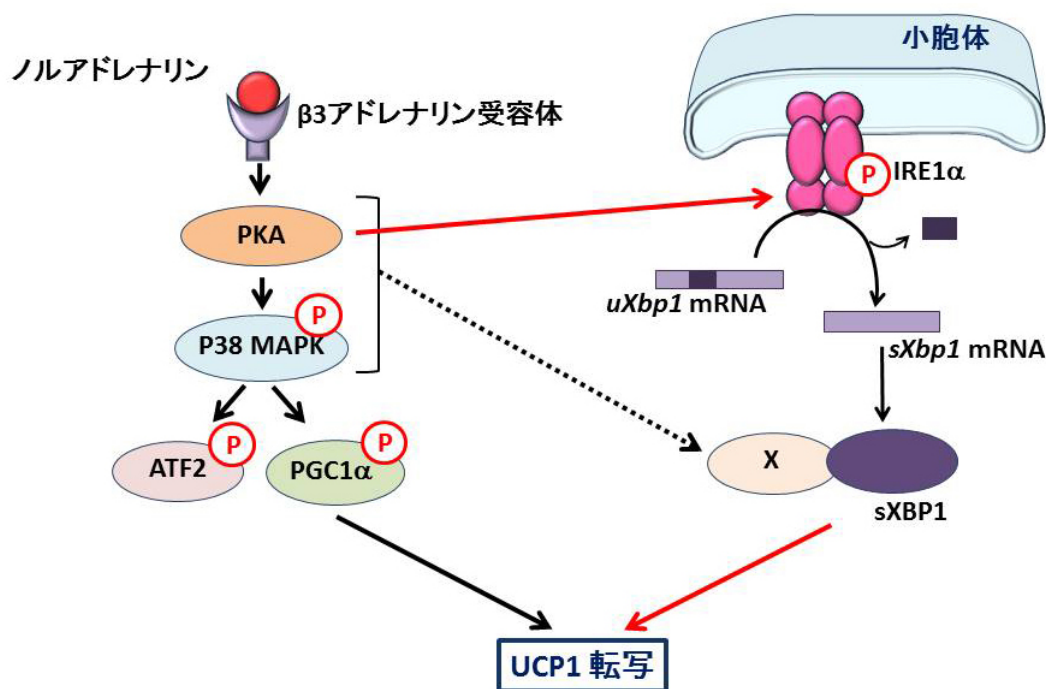


染色体不安定性の代表的な表現型である aneuploidy (染色体の異数性) は、がんにおいて高頻度に観察され、がん化の原因なのか結果なのか明瞭になっておらず 100 年以上にわたり論争が続いている。この問題の解決にはマウスモデル系の開発が必須であるが、分裂期に関与する BubR1 の低発現型変異マウスが aneuploidy 細胞を生じることは知られているものの、他に有用で問題解決にせまるモデル動物がないのが現状である。今般、我々はビメンチンが発現する間葉系細胞である皮膚の線維芽細胞や脂肪細胞に注目し、ビメンチンリン酸化変異マウスを作製した。このマウスでは標的細胞において、細胞質分裂障害により引き起こされる 4 倍体細胞が次の分裂に進み染色体異数性を示した。そして、この細胞群はがん化に向かわず、細胞老化、組織個体老化現象を引き起こすことを明らかにしたので報告する。

線維芽細胞が存在するコラーゲン層と脂肪層のマウス間の比較

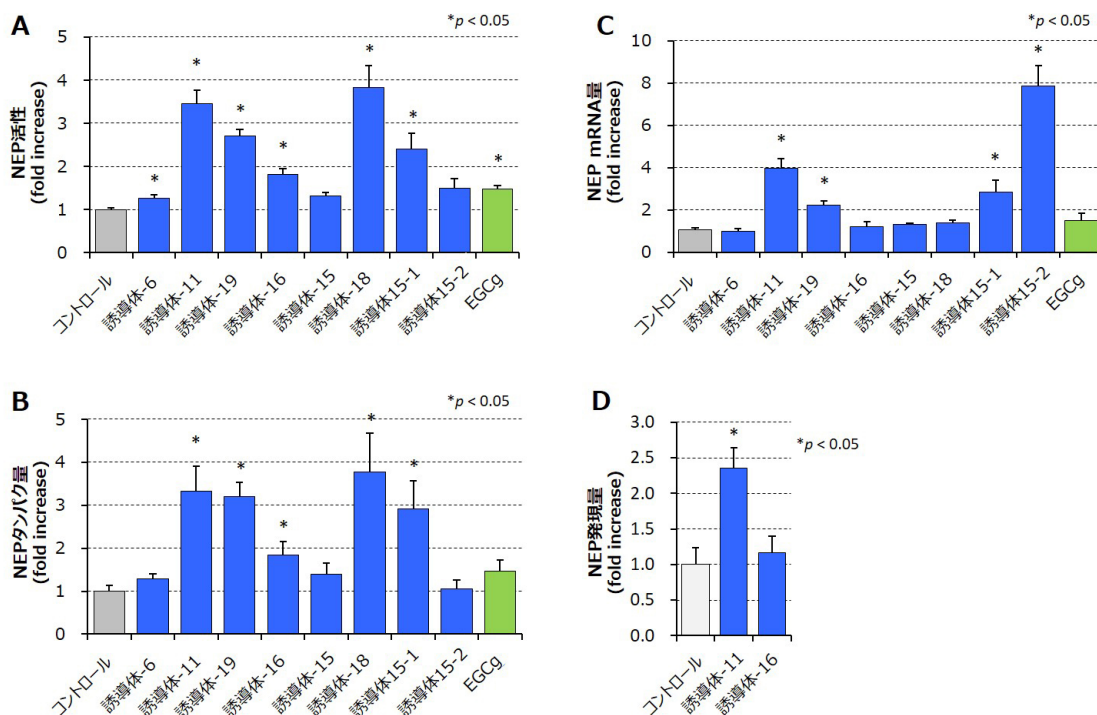


小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR) は、小胞体内に蓄積した不良タンパク質の排除だけでなく、細胞の分化や増殖、エネルギー代謝など生理現象に深く関連している。本研究では、褐色脂肪細胞の熱産生機能と UPR の関連性について解析を行った。褐色脂肪細胞には熱産生機能があり、寒冷暴露やノルアドレナリン刺激によって熱産生遺伝子 *Ucp1* の発現量が増加して、熱産生機能が亢進することが知られている。この時の UPR 関連遺伝子の発現量やタンパク質の活性化レベルを調べると、*Ucp1* の発現上昇と同調して UPR 経路の一つである IRE1 α -XBP1 経路の特異的な活性化が検出された。化合物を用いて IRE1 α -XBP1 経路を遮断すると、*Ucp1* の発現増加が有意に抑制された。しかし、小胞体ストレスによって IRE1 α -XBP1 経路を活性化させても、*Ucp1* は転写誘導されなかったため、小胞体ストレス非依存的な活性化機構が示唆された。ノルアドレナリンを受容すると細胞内では PKA が活性化する。PKA を H89 により阻害すると *Ucp1* の転写誘導及び IRE1 α -XBP1 経路の活性化が共に有意に抑制された。以上より、小胞体ストレス非依存的かつ PKA 依存的に活性化する IRE1 α -XBP1 経路が褐色脂肪細胞の *Ucp1* 転写を誘導する主要経路の一つであることが明らかとなった。

ノルアドレナリンを受容した褐色脂肪細胞における *Ucp1* 転写誘導経路

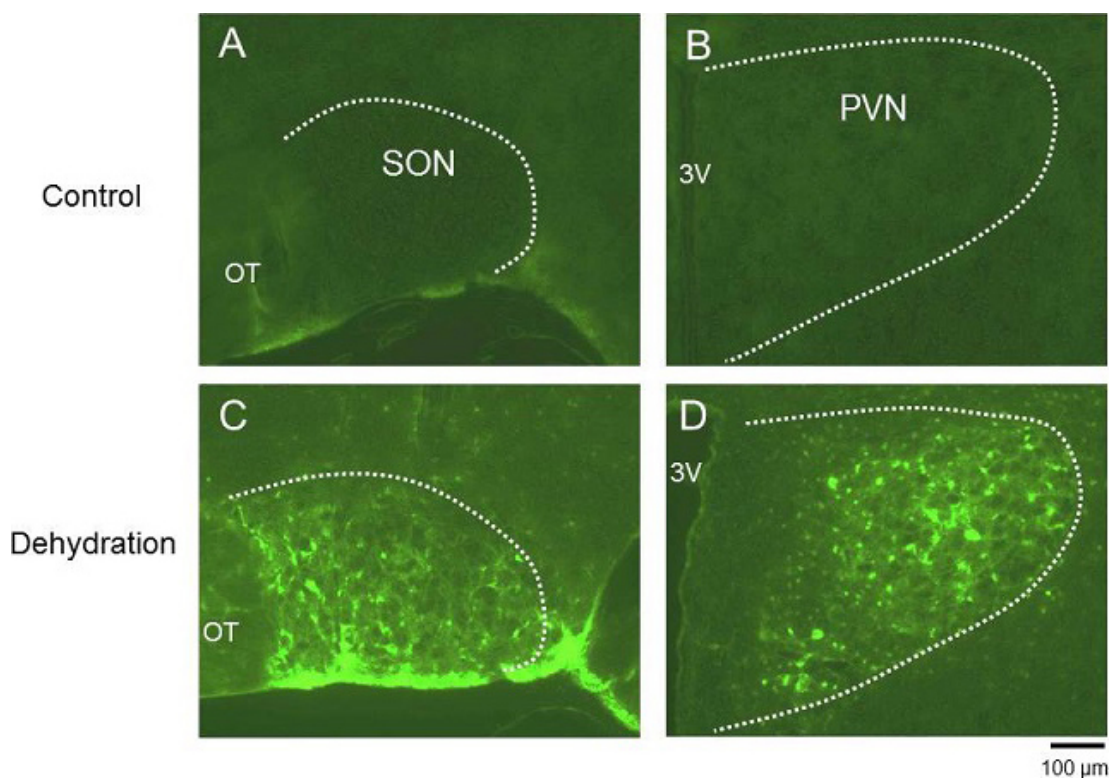
アルツハイマー病 (AD) の予防・根本的治療には発症の原因となるアミロイド β ペプチド (Aβ) を脳内から取り除く必要がある。脳内 Aβ の生理的分解に関わるネプリライシン (NEP) の発現は孤発性 AD の早期から大脳皮質・海馬で部位選択的に NEP の発現が 50 % 近く低下することから、NEP 活性の増強は新規かつ原因に即した創薬の作用点になり、NEP 活性を 2 倍程度増強出来れば治療に大きく貢献できる。本研究において NEP 活性を増強する低分子化合物の取得を目指し、天然化合物ライブラリーのスクリーニングにより候補化合物としてカテキン類を見出した。カテキン類が AD 病態を改善するという報告は以前からあるが、水溶性が高いため腸管での吸収効率や脳内移行性などの生体内利用率に問題があった。そこで、(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCg) にアルキル基を導入して脂溶性を付与した誘導体を創製したところ、NEP 活性を EGCg 以上に増強 (2.5–4.0 倍弱) するばかりか、Aβ の産生を抑制する α セクレターゼ活性の増強作用も併せ持つことが明らかになった。マウスに脳内注入する実験で、そのうち、少なくとも一つの化合物については、*in vivo* で NEP の発現を増強することが分かった。これらの脂溶性カテキン誘導体は産生系と分解系を同時に制御して、効率よく脳内 Aβ を低下させることができるため、根本的 AD 治療薬の有力な候補になると考えられる。また、カテキンによる NEP 増強を仲介する分子 (カテキン結合タンパク質) の同定にも成功し、今後はこの分子の作用機序を詳細に解析していく予定である。

In vitro および *in vivo* における脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強作用



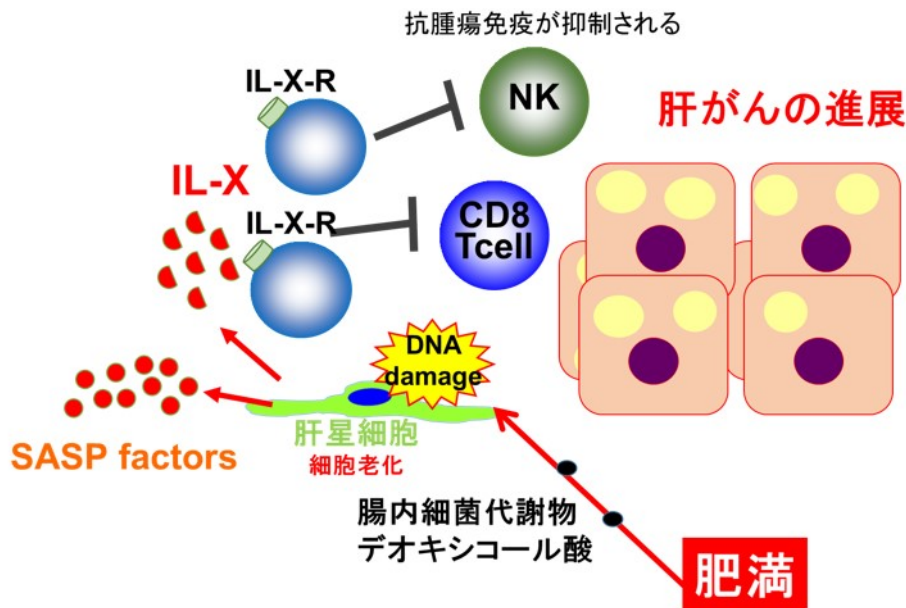
生体内の水分・浸透圧の恒常性は、飲水行動や腎臓での水分の再吸収・排泄などのバランスで維持されている。視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から血中に分泌されるバズプレッシンは、腎臓に作用して水の再吸収を促進することから、抗利尿ホルモンとも呼ばれている。今回我々は、脳内浸透圧調節ネットワークの基点となる視床下部-下垂体後葉系および関連するニューロン群に光遺伝学的手法を応用するためにチャンネルロドプシン2 (ChR2) を発現する遺伝子改変動物の作出を試みた。具体的には、神経活動の指標として汎用されている *c-fos* 遺伝子に *ChR2-eGFP* 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出した。このラットでは、脱水後に視索上核および室傍核において ChR2 発現を示す eGFP 緑色蛍光の著明な増加が認められた。このラットは、浸透圧刺激によって興奮するニューロン群に選択的に ChR2 の発現を誘導することが可能であることから、それらが中枢性浸透圧調節や飲水行動にどのように関わっているかを光刺激によって解析できると期待される。

c-fos-ChR2-eGFP トランスジェニックラットでの自由飲水 (A, B) および脱水 (2日間) 後 (C, D) の視索上核 (SON) (A, C) および室傍核 (PVN) (B, D) における ChR2-eGFP 発現変化



肥満は心血管性疾患や、糖尿病などの罹患率を高めると同時に、がんのリスクファクターでもあることが示されている。しかし、なぜ肥満によりがんの発症率が上昇するのか、そのメカニズムについては十分には明らかになっていない。著者らはマウスモデルを用いて、肥満にともない増加する腸内細菌代謝物が腸肝循環により肝臓に到達し、肝星細胞に作用してサイトカイン等の分泌促進が起これ、肝がん促進的な微小環境が形成されることを明らかにした (Yoshimoto et al. 2013 Nature)。しかし、この肥満誘導性肝がんの微小環境における様々な分泌因子の相互作用は明らかになっていない。著者らはこのがん微小環境における肝星細胞で著しく高発現しているサイトカイン IL-X を見出した。著者らはこのサイトカインが作用する標的細胞候補として、IL-X のレセプター陽性の制御性 T 細胞に着目した。肥満誘導肝がんの微小環境における IL-X のレセプター陽性の制御性 T 細胞が高脂肪食摂取群の肝臓で著しく増加していることがわかり、IL-X による制御性 T 細胞の活性化が抗腫瘍免疫を抑制し、肥満誘導性肝がんを促進する可能性が示唆された。本研究により IL-X が、肥満誘導性肝がんのがん進展に関与することが明らかになった。この研究成果は抗腫瘍免疫を標的とした新規がん治療法の開発に繋がる可能性がある。

肥満誘導性肝がんにおける抗腫瘍免疫の抑制

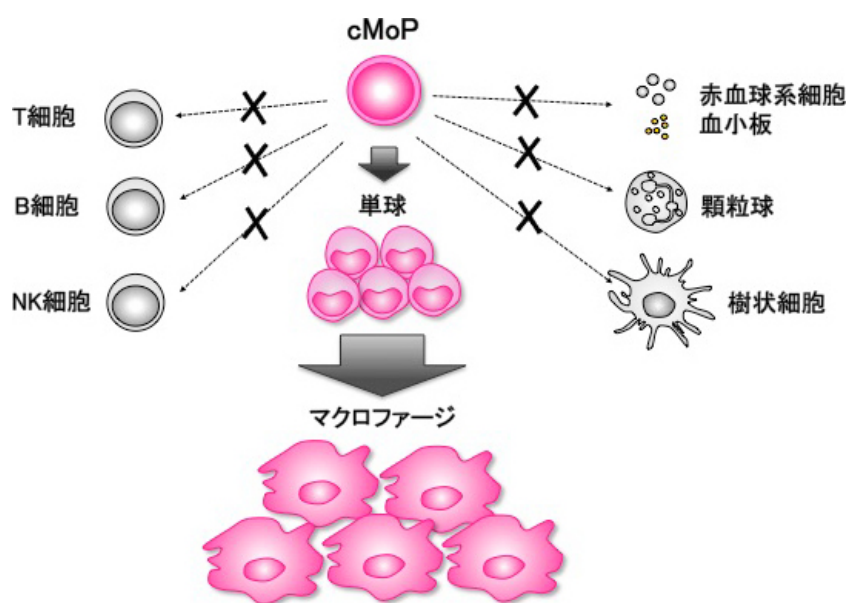


31 ヒト樹状細胞を大量に生み出す源細胞の同定

樗木 俊聡

樹状細胞（DC）は生体内で最強の抗原提示能力をもち、よって免疫の司令塔として位置付けられ、DC を用いた癌や感染症に対する臨床応用が期待されている。我々はこれまで、マウス DC を大量に生み出す源細胞（マウス DC 前駆細胞）の同定に成功してきた。この成果に基づき、臍帯血と骨髄を用いてヒト DC 前駆細胞の同定を試みた。従来型顆粒球-単球前駆細胞（cGMP）中に複数の前駆細胞が混在していることを見出し詳細な解析を行った。その結果、DC 分化能を持つ亜集団を 2 つ見出したが DC だけを生み出す前駆細胞の同定には至らなかった。一方、単球のみを生み出す前駆細胞（cMoP）、さらに真の顆粒球-単球前駆細胞（rGMP）を同定することに成功した。

ヒト単球・マクロファージ前駆細胞（cMoP）の同定

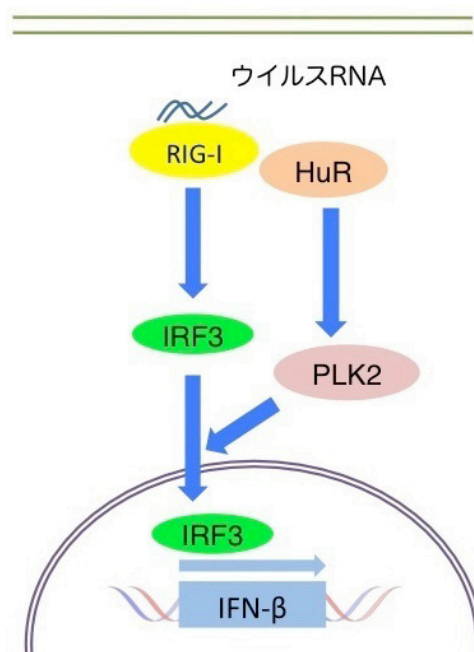


32 抗ウイルス自然免疫応答を制御する分子機構の解析

河合 太郎

ウイルス感染に対して生体はI型インターフェロンや炎症性サイトカインを分泌することでウイルス増殖を阻止する。ウイルス由来のRNAを認識し自然免疫応答を惹起する細胞質内センサーとしてRIG-I-like receptor (RLR) ファミリーが知られている。今回、ウイルスに対する自然免疫応答の詳細を理解するため、I型インターフェロンの発現誘導可能な分子の発現スクリーニングを行い、HuR (別名ELAV1) と呼ばれる分子を見いだした。HuRを欠損した細胞を樹立し解析を行ったところ、RIG-Iで認識されるウイルスに対するI型インターフェロン産生が限弱していた。詳しく解析すると、HuRはI型インターフェロン転写を制御する転写因子IRF3の活性化に関わるPLK2と呼ばれるキナーゼ遺伝子の mRNA 安定性に関わることが示唆された。これらのことから、HuRはウイルスに対する生体防御に重要な役割を果たすことが示唆された。

HuRを介した抗ウイルス自然免疫応答の制御

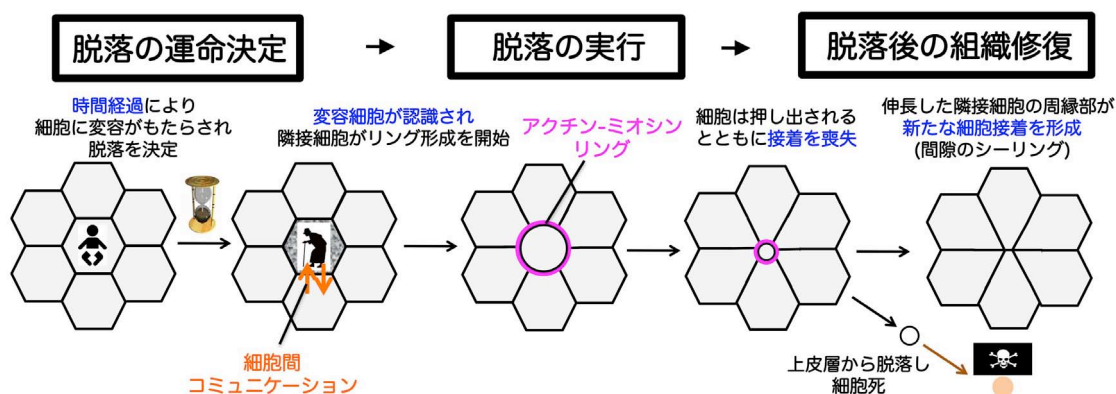


33 腸管上皮のターンオーバーにおける細胞死の研究

川根 公樹

本研究は、腸管上皮細胞のターンオーバーの際におこるアポトーシスともネクローシスとも異なる細胞死（細胞脱落）に着目し、その分子機構を解明することを目的とした。細胞脱落に関与する遺伝子の候補を得るため、マウス小腸上皮を用いたマイクロダイセクション、マイクロアレイ解析を行い、絨毛頂端部で遺伝子発現が上昇する遺伝子、減少する遺伝子を各百数十個抽出した。また、細胞脱落を司る遺伝子同定のため、ショウジョウバエ腸上皮を用いた RNAi スクリーニングの一次スクリーニングを開始した。さらに、細胞脱落の実行機構を明らかにするため、ヒト及びマウス上皮細胞株で細胞脱落が観察できる実験系を構築し、細胞接着、細胞骨格などに関わる種々の分子の分子動態を可視化できる安定発現株を樹立した。今後もこれら研究を引き続き推進し、細胞脱落の本質的な分子機構の解明を目指していく。

未解明の細胞死様式である細胞脱落の一連の過程



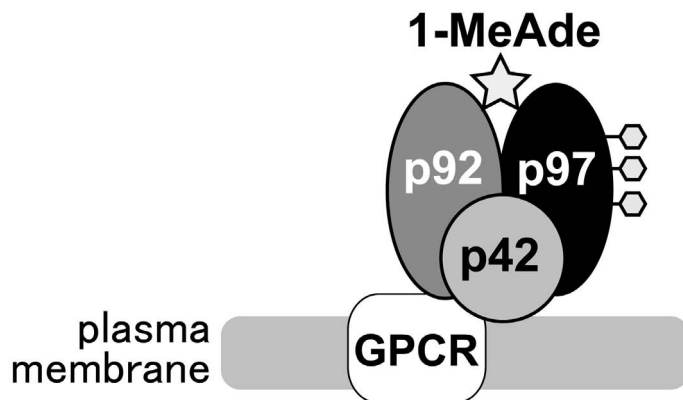
34 卵成熟誘起ホルモン受容体の同定

岸本 健雄

有性生殖を行う生物が受精によって発生を開始するためには、卵成熟は、必須の前提である。本研究では、この卵成熟を引き起こすホルモンの卵表受容体を、全動物卵を通じて初めて同定することを目指した。具体的には、ヒトデ卵を対象として、その卵成熟誘起ホルモンである 1-methyladenine (1-MeAde) の卵表受容体の分子実体を明らかにすることを試みた。まず 1-MeAde アフィニティービーズを作製し、単離したヒトデ卵表層を可溶化して、1-MeAde 結合タンパク質を得たところ、それは p97、p92、p42 の 3 種のタンパク質からなる複合体であった。ところが、これらの全ては、一種類の Rendezvin (Rdz) mRNA がコードしていたので、3 種類のタンパク質となる過程を解析した。Rdz 全長がまず翻訳され、その後に N 末端シグナルペプチドが切断されるとともに糖鎖修飾を受け、さらに Furin が 2 カ所を切断することで生成に至る可能性が判明した。しかし、1-MeAde 受容体は GPCR であるとされるが、3 種の Rdz 断片中には GPCR に特徴的な配列は見当たらない。この Rdz 断片からなるタンパク質複合体が、どのようにしてホルモン受容体として機能するかの解析は、今後の課題である。

1-MeAde 結合タンパク質についての作業仮説

1-MeAde 結合タンパク質は p97、p92、p42 からなる複合体で、p97 は N 結合型糖鎖修飾を受けており、1-MeAde は p97 と p92 に結合する。この複合体は G タンパク質を介して細胞膜にアンカーする可能性が考えられる。

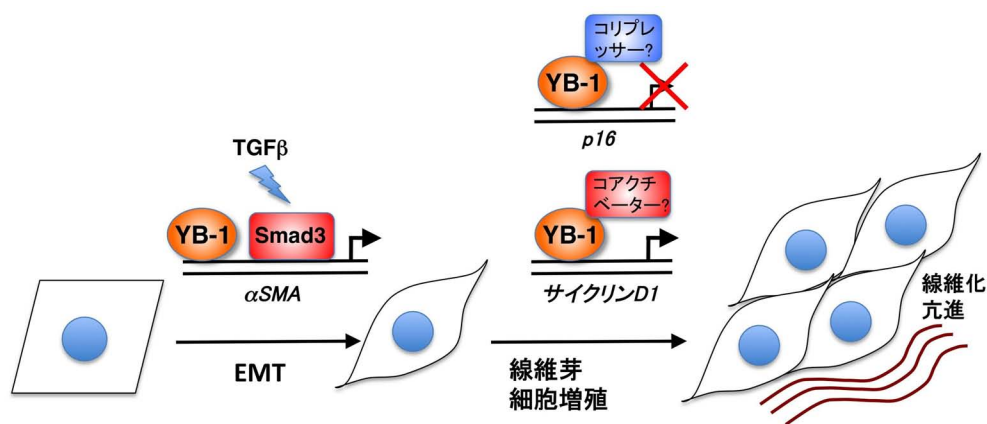


35 間質性肺炎の発症・進展を左右する遺伝子の解明と応用

北川 雅敏

間質性肺炎は、肺の間質組織の炎症、線維化が起こる疾患の総称であるが、そのうち特発性肺線維症（IPF）を含む特発性間質性肺炎は、予後不良で効果的治療法に乏しい疾患で、未だ完全な原因究明がなされていない。IPFは肺胞上皮障害、線維芽細胞の増殖と進行性の線維化を伴う。我々は細胞増殖、組織線維化、上皮間葉転換（EMT）の制御に関与する可能性の高い、転写因子 YB-1 に注目して研究を行った。YB-1 は線維化の主因となる EMT の指標の一つである α SMA（ α -smooth muscle actin）の発現制御に関わる。我々は、YB-1 が細胞周期抑制因子である CDK 阻害タンパク質 p16 の発現を抑制することを見いだした。さらに細胞周期の正の調節因子であるサイクリン D1 遺伝子のプロモーターに結合し、サイクリン D1 の発現を促進的に制御することが判明した。YB-1 は EMT を促進するだけでなく、サイクリン D1 の発現を正に制御することで線維芽細胞等の細胞増殖を促し、線維化に関与している可能性が示唆された。

YB-1 を介した組織線維化のモデル

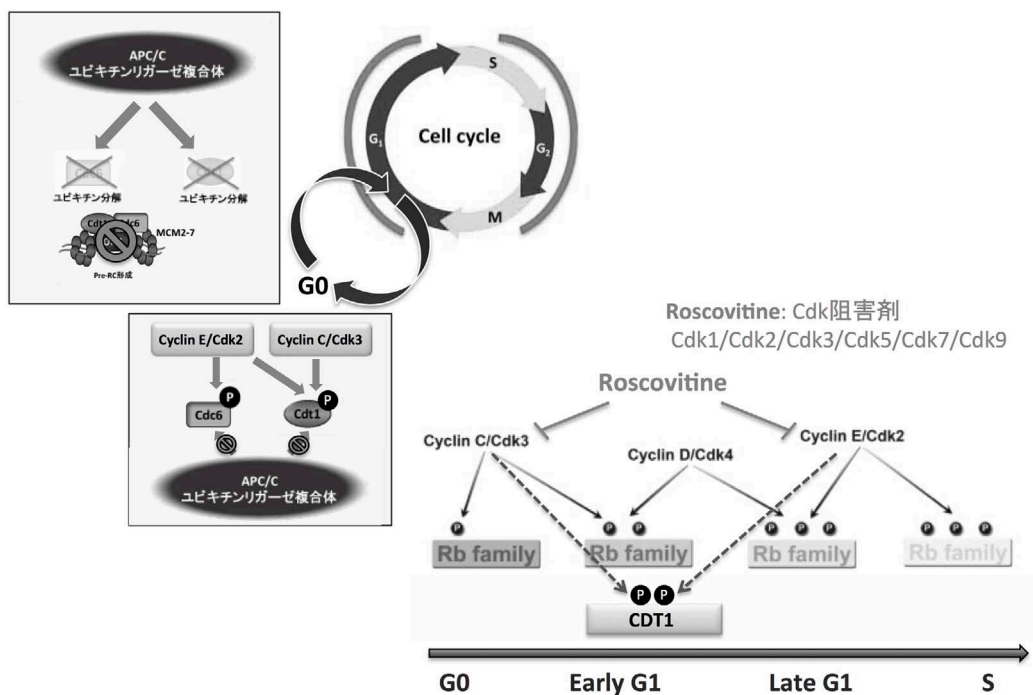


36 ユビキチン分解による DNA 複製ライセンス化機構の解明

工藤 保誠

細胞は、細胞周期という増殖サイクルを通じて分裂し、その間に遺伝情報を正確に複製する。ヒト細胞では、DNA を正確に複製するために、極めて精巧なメカニズムを持っており、その破綻が発がんの原因となる。本研究では、一細胞周期に DNA を一度だけ正確に複製する機構である DNA ライセンス化に関わる因子のユビキチン分解制御機構の詳細を明らかにし、その破綻がもたらす癌化機構を解明することを目的としている。特に、DNA 複製を一度に規定する DNA ライセンス化因子である CDT1 の G0-G1 期での制御機構に着目して研究を行った。その結果、G0 期では、CDT1 が Anaphase promoting complex/cyclosome-Cdh1 (APC/C^{Cdh1}) ユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン分解され、CDT1 の分解により複製前複合体 (pre-RC) 形成が阻害されていた。G0 期から G1 期へ移行する際には、CDT1 は Cyclin/CDK によりリン酸化され、リン酸化により APC/C^{Cdh1} によるユビキチン分解から免れ、タンパク量が増加することを見出した。G1 期において、CDT1 タンパク量が増加することにより、DNA 複製準備のための pre-RC が形成されることが明らかとなった。以上より、G0/G1 期における CDT1 タンパクのユビキチン分解制御機構は、DNA 複製制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。

CDT1 のユビキチン分解による G0/G1 期制御



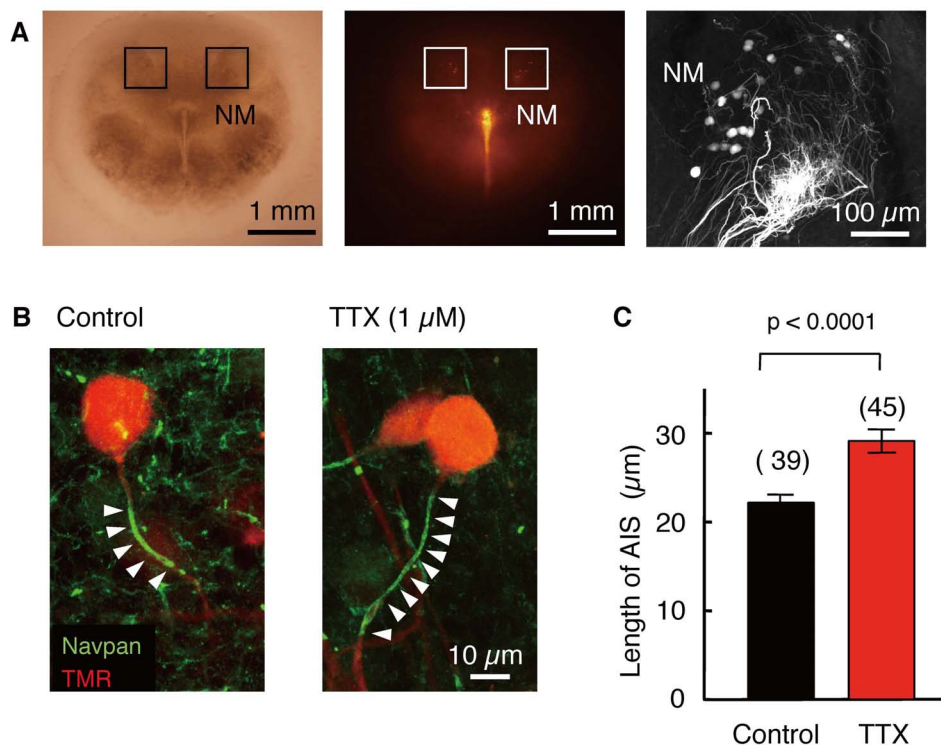
37 軸索起始部の活動依存的制御機構の解明

久場 博司

神経細胞の軸索起始部 (axon initial segment, AIS) は神経活動生成の場である。近年、AIS の分布 (軸索上の位置、長さ) は細胞毎に異なり、このことが神経回路の適切な動作に重要なことが分かってきた。しかしながら、個々の神経細胞がどのようなしくみで最適な AIS 分布を獲得するのかはよく分かっていない。本研究では、AIS 分布の決定原理の理解を目指して、AIS の長さが細胞の特徴周波数 (characteristic frequency, CF) に応じて異なることで知られるトリ脳幹の聴覚神経核 (大細胞核) を対象に研究を行い、以下の結果を得た。1) 大細胞核では高い CF の細胞ほど AIS が長く、この AIS 分布の違いは聴覚入力開始以後に作られる。2) 聴覚原基の除去により発達期の聴覚入力を遮断すると、AIS が延長し、細胞の興奮性が増加するとともに、CF 領域間の AIS 分布の違いも減弱する。3) 聴覚入力消失している切片培養下では、生体内に比べて AIS が長く、CF 領域間の AIS 分布の違いも認められない。4) 切片培養下で自発神経活動を阻害すると、AIS の長さが延長する。以上のことから、AIS の分布は神経活動によりネガティブフィードバックの制御を受けており、このことが個々の細胞での AIS 分布の決定に重要なことを明らかにした。

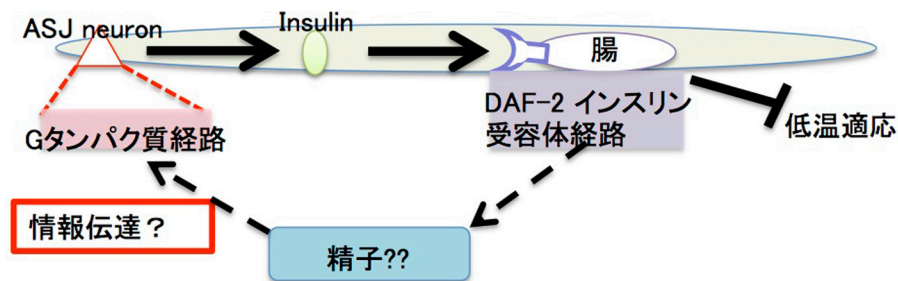
培養 NM 細胞における神経活動の阻害による AIS の延長

(A) ニワトリ胚の脳幹から作製した培養切片標本 (培養後 14 日目)。明視野 (左)、蛍光 (弱拡、中)、蛍光 (強拡、右)。Rhodamine で逆行性標識された大細胞核 (nucleus magnocellularis, NM、四角)。(B) 自発神経活動阻害後の AIS 分布。Nav pan 免疫陽性の AIS (緑)、NM 細胞 (赤)、TTX (1 μ M、右) 存在下では AIS (矢頭) が延長する。(C) 自発神経活動阻害の AIS 長に対する効果。



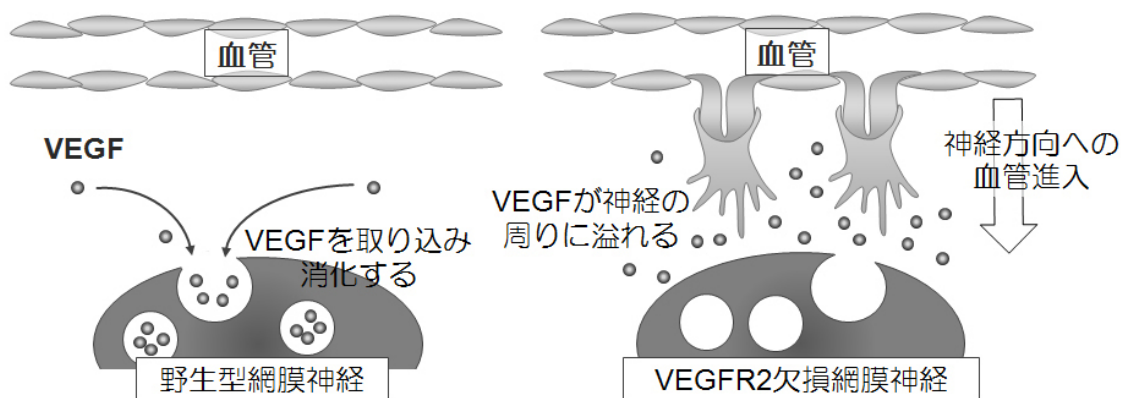
我々は、動物の温度応答と適応機構の解明を目指し、線虫の低温適応を解析モデルとしている。低温適応とは、20℃で飼育された個体を2℃に置くと死滅するが、15℃で飼育した個体は2℃でも生存できる現象である。最近、この低温適応に関して、頭部の ASJ 感覚ニューロンが温度を感知し、インスリンを分泌し、腸や神経系で受容することで遺伝子発現を促すことが分かってきた (Ohta, Ujisawa, Sonoda, Kuhara et al., Nature commun, 2014)。しかし、低温適応の遺伝子と組織制御機構には多くの未知の部分が残っている。そこで、さらなる遺伝子を同定するために、飼育温度依存的に発現変動した遺伝子等の変異体について解析を行ってきた。そして、多数の変異体で温度適応の異常が観察された。それらの遺伝子は、主に、精子形成や神経系や腸などの組織が関与するものであった。これまでに、精子と低温適応の関係は不明であったため、本研究では精子に着目し、精子に関わる複数の変異体を調べた。その結果、低温適応の異常が観察された。つまり、精子が低温適応に関与している可能性が示唆された。次に、精子が低温適応の組織ネットワーク上のどこに位置するかを、精子の変異と既知の低温適応の変異との遺伝学的上下関係から解析した。具体的には、ASJ 温度受容ニューロンにおける温度情報伝達の変異体や、腸と神経系のインスリン受容体の変異と精子変異との二重変異を作製し表現型を調べた。その結果、精子は、神経や腸などの温度適応の組織ネットワークと同一経路で機能していることが示唆された。また、精子から ASJ 温度受容ニューロンへのフィードバックの可能性が挙げられた。現在、精子の変異体において、ASJ の神経活動が変化しているかをカルシウムイメージングで測定している。次に、組織間ネットワークの情報伝達に関わる分子の同定にむけ、飼育温度依存的に発現変動する受容体分子に着目した解析も始めている。

温度適応の新規の組織間ネットワークの可能性



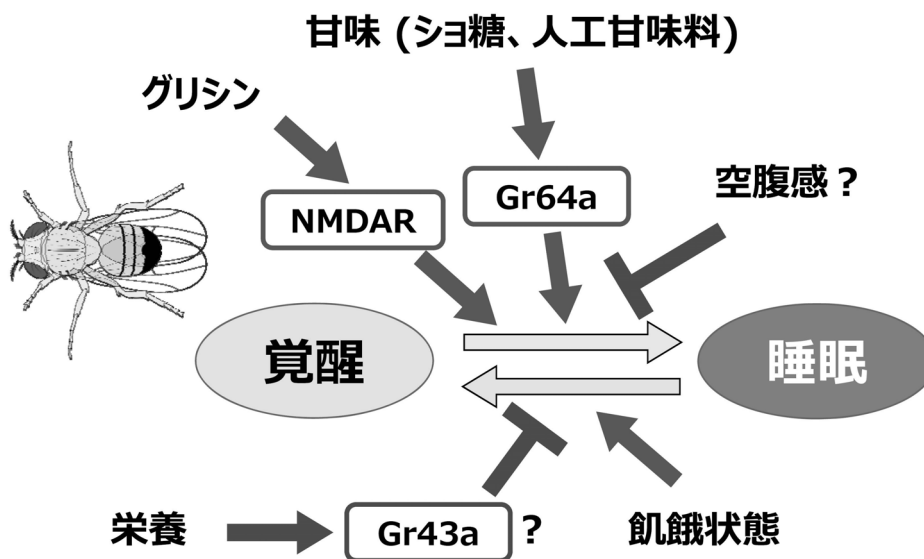
生体内のあらゆる組織がその恒常性を維持するためには、血管網から過不足なく酸素・栄養が供給されることが必須である。また、この組織酸素供給に最適な血管のパターニングを規定するメカニズムは発生期血管新生だけでなく、血管の過剰な増殖に端を発する血管新生の病態の進行においても重要である。特に糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性症など、成人において失明の大きな原因の一つとなる網膜血管新生の病態の鍵となっている。生体内のあらゆる血管新生において、血管内皮成長因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF) のシグナルは必須である。本研究は、この VEGF の主要な受容体である、2 型 VEGF 受容体 (VEGFR2) のシグナルに焦点を当て、個体全体から見た広い視点での恒常性維持におけるその役割を明らかにすべく行った。特に、中枢神経系の一部である網膜の神経に発現する VEGFR2 の役割に関し、これを欠損したマウスを作製したところ、神経周囲に VEGF タンパクが溢れ、神経方向に異所性の血管進入が見られた。これは眼球の視機能獲得に重要な網膜血管パターンニングを、神経の VEGF の取り込みが制御していることを示したものである。

網膜における VEGFR2 を介した VEGF 局在の制御機構



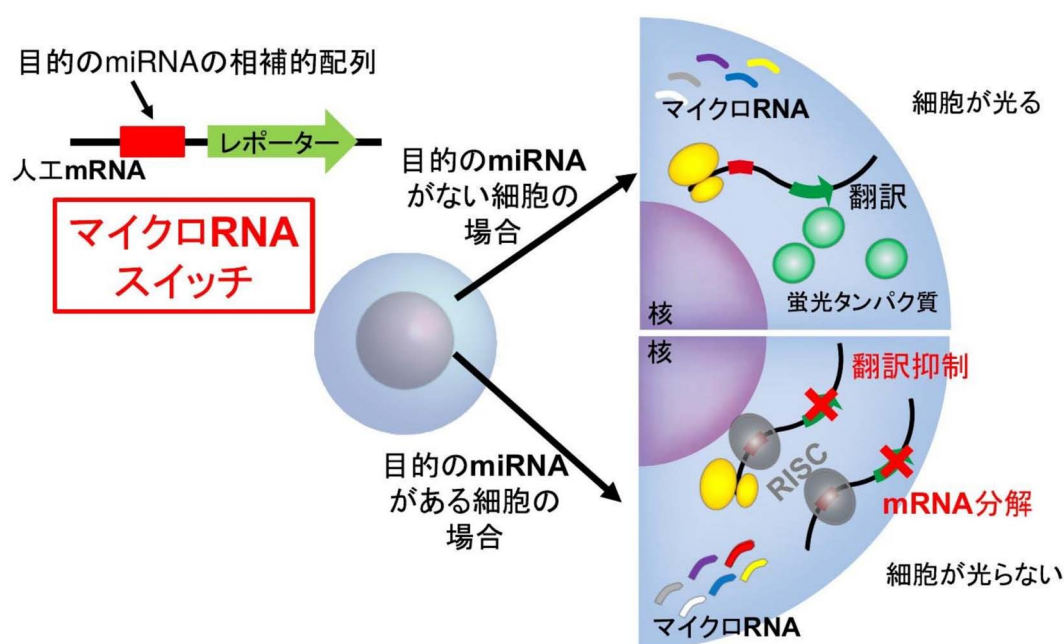
未知の部分の残る睡眠の分子基盤の解明を目的に、睡眠研究のモデル生物として注目されているショウジョウバエを用いて、新規の睡眠制御機構の探索を行った。探索手段の一つとして、個体を用いた行動レベルで睡眠に影響を与える物質（栄養素・薬剤・生薬など）の影響を解析した。その結果、食事に含まれる栄養素と睡眠・覚醒制御の関係について、興味深い新規の知見をいくつか見出した。まず、飢餓時には過活動と睡眠減少が認められ、これがショ糖投与で抑制される。この作用が、人工甘味料のスクラロースなどで認められたこと、甘味受容体である Gr64a を発現する神経細胞の活性化でも認められたこと、甘味の弱いソルビトールでは認められなかったことから、栄養成分ではなく、甘味により睡眠が制御されることが示された。一方、覚醒閾値を計測したところ、甘味のみで誘導される睡眠は生理的睡眠より浅く、より弱い刺激で覚醒することが示された。また、通常の栄養状態のハエに、種々のアミノ酸を与えたところ、グリシンが強く睡眠を誘導することを見出した。この作用はグリシン受容体欠損のハエでも認められたことなどから、グリシンは NMDA 受容体を介して睡眠を誘導する可能性が示唆された。今後、この分子機構を詳細に解析して、睡眠制御機構の新たな一面を解明したい。

栄養・味覚成分による睡眠制御の模式図



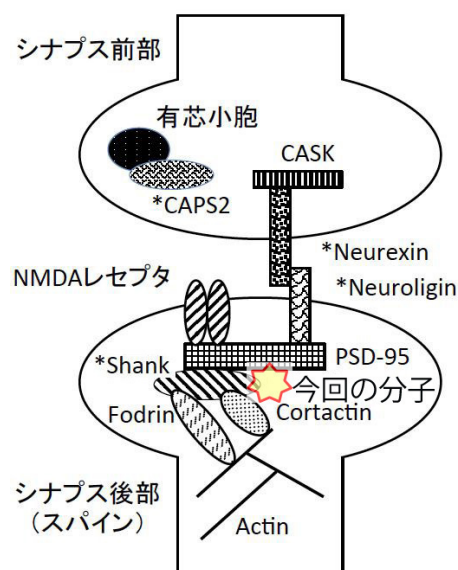
本研究では、独自の人工 RNA 技術を活用し、分子デザインした機能性 RNA を細胞に「直接導入」することで、標的細胞内の状態に応じて遺伝子発現や細胞の運命を精密に制御できる新技術を開発することを目指した。その結果、マイクロ RNA (miRNA) という小さな RNA に応答して、標的細胞を選別し、かつその運命を精密に制御できる「マイクロ RNA スイッチ」の開発に成功した。iPS 細胞等の幹細胞から標的分化細胞 (心筋細胞やインスリン産生細胞など) を高純度で得るため、従来の方法では、細胞表面の抗原を抗体で識別して細胞を選別するという操作が行われることが一般的であった。しかし最適な表面抗原が同定されていない細胞種も多く、細胞を選別することは時に困難を伴う。そこで我々は、細胞内のマイクロ RNA を検知することで細胞を識別する新たな方法の開発に成功した (下図)。さらに、複数の RNA スイッチを組み合わせることで、細胞内部の状態を識別できる「人工 RNA 回路」を構築することに初めて成功した。構築した人工 RNA システムは細胞内で速やかに分解され、かつゲノム損傷のリスクが極端に低いため、標的細胞の安全・精密・自律的な選別、かつ細胞内状態に応じた運命制御の実現が期待できる。

マイクロ RNA スイッチによる細胞選別の概念図



自閉スペクトラム症（ASD, autistic spectrum disorder）の多くは、シナプスでの情報伝達に障害がある。特に、後シナプス部位である棘（スパイン）表面やその内部にて働く Neuroligin、Neurexin、Shank などの変異が ASD 患者で報告されている。しかしながら、スパイン内で機能する分子群は十分には同定されていない。我々は、自閉症患者脳で大きく発現が変化する機能未知の分子リストを手掛かりに、それらがスパインでの新たな分子基盤となる可能性を考え探索を行い、スパイン内で機能する分子を新たに同定した。この分子は、NMDA 受容体のサブユニットの一つと関連し、また Shank と NMDA 受容体の結合を強める働きがあった。ノックアウトマウスを作製したところ、行動様式に異常が見られ、新たな創薬ターゲットとなる可能性が考えられた。

新たに機能解明を行った分子と関連する分子群のスパイン内での関連図

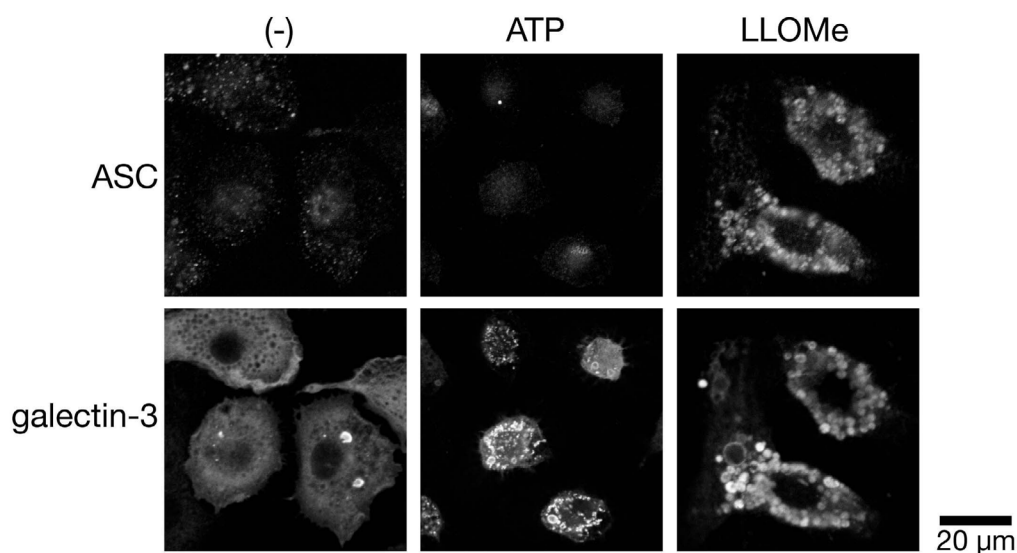


43 インフラマゾーム活性化と慢性炎症制御の分子基盤

鈴木 敏彦

インフラマゾームは、生体に対する様々な刺激（病原体、体内で生じた代謝産物等）を感知し、Nod 様受容体を介してカスパーゼ-1 を活性化する細胞内システムである。Nod 様受容体の中でも、感染症や生活習慣病等のヒトの疾患にもっとも関与しているのが NLRP3 であるが、活性化に至る詳細な分子メカニズムは不明のままである。本研究では、新たに見出したライソゾーム膜の破綻→ガレクチン-3 の集積→NLRP3 活性化の経路を解明することを目的とした。ライソゾーム障害を起こす刺激後に、ガレクチン-3 とインフラマゾームのアダプタータンパク ASC の一過性の共集積を認めた。また、NLRP3 も同様に集積することがわかった。さらにこのような集積は、ライソゾーム障害を経ない他の NLRP3 刺激因子（ATP など）で活性化させた場合には認められなかった。したがって、各種分子のライソゾーム膜周辺への共局在は、ライソゾーム障害による NLRP3 活性化にのみ起きる現象であることが示唆された。

ライソゾーム傷害を起こした時のみに認められるガレクチン-3 と ASC の共局在

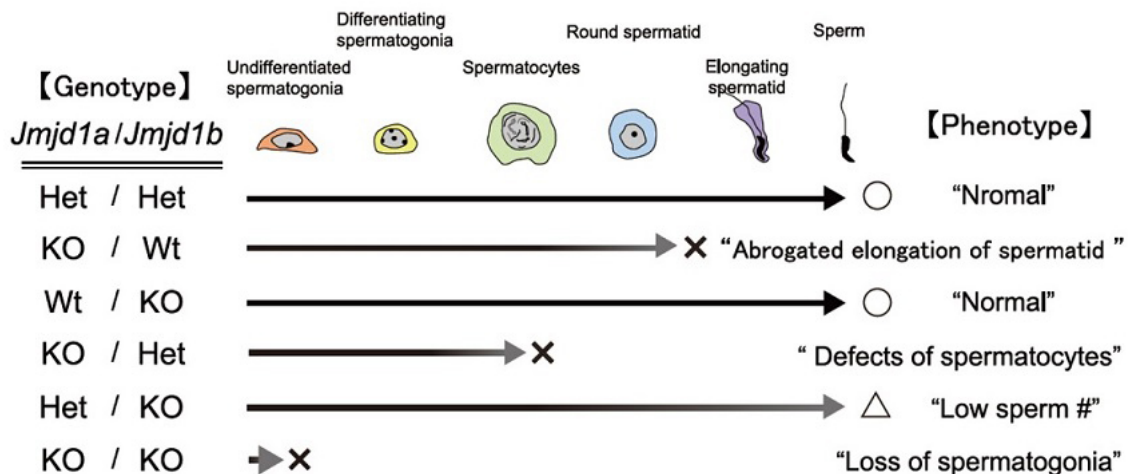


ヒストン修飾やゲノム DNA のメチル化によるクロマチンのエピジェネティック修飾は、様々な生命現象に密接に関わっている。ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化は転写の抑制に働くエピジェネティックマークであり、それに関わる分子群は分裂酵母からヒトに至るまで高度に保存されている。

生殖細胞の出現から配偶子形成に至る過程では、多彩なクロマチン修飾酵素によって時期・細胞特異的エピゲノムの再編成が行われる。胎生期における生殖細胞の分化過程と雄性生殖細胞における減数分裂過程では、H3K9 のメチル化レベルがダイナミックに変動することが、これまでの我々の研究によって明らかになっている。本研究課題では、これらの H3K9 脱メチル化が生殖細胞の分化と機能にどのように結びついているのかを明らかにすることを目的とし、研究を進めた。

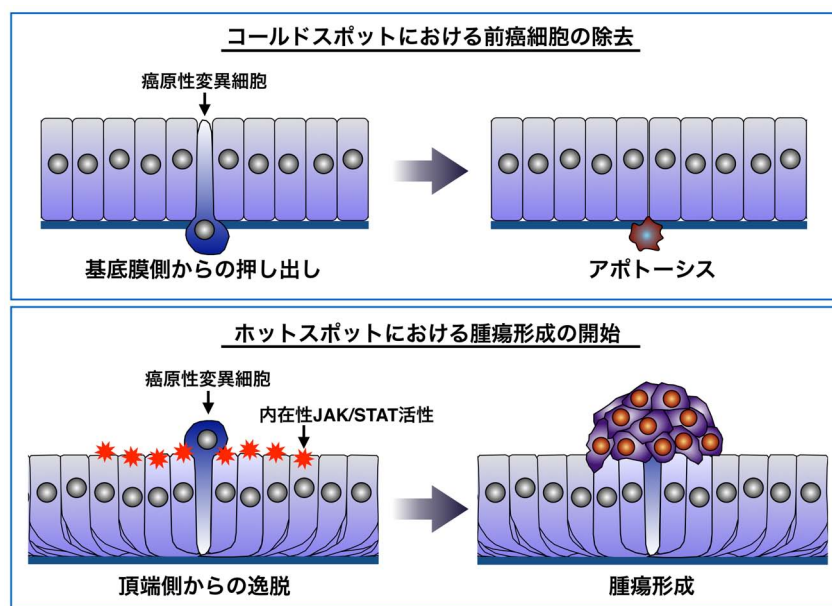
H3K9 の脱メチル化酵素である Jmjd1a ファミリー分子に注目した。我々は、Jmjd1a ファミリー分子の 1 つである Jmjd1b にも H3K9 脱メチル化酵素活性があることを見いだしている。生殖細胞特異的に *Jmjd1a* と *Jmjd1b* 双方の遺伝子が欠損するマウスを作製し、その表現型の解析を行った結果、雄性生殖細胞の分化過程において Jmjd1a と Jmjd1b には機能重複があること、Jmjd1a/b は未分化精原細胞の維持に必須であることが明らかになった。

ヒストン脱メチル化酵素である Jmjd1a/b を、生殖細胞特異的に欠損したマウスの表現型のまとめ



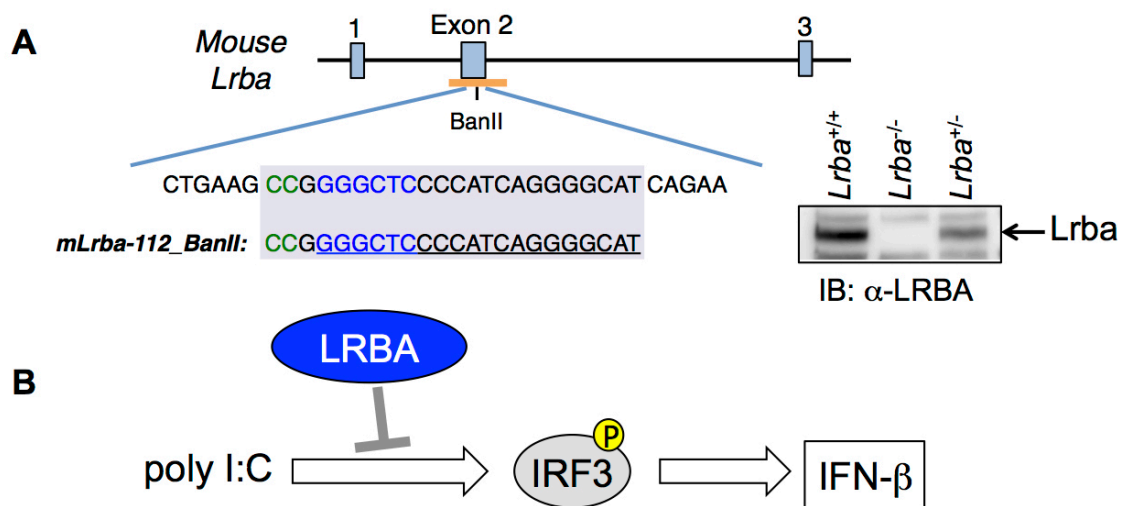
上皮組織に生じる悪性癌は、組織の統合性を維持できなくなった変異細胞の制御のきかない過増殖による。これまでに、癌の進行に関する多くの遺伝学的背景が報告されてきたが、正常な上皮組織に出現した前癌細胞が上皮組織の協調的統合性から逸脱して過増殖を始める腫瘍形成の第一段階はよく分かっていない。本研究では、ショウジョウバエの翅原基上皮組織をモデルにして、進化的に保存された新生癌抑制遺伝子（neoplastic tumor suppressor genes, nTSG）の変異細胞の解析を通し、腫瘍形成は上皮組織に局所的に内在する特異的な細胞構造を持った部域から始まることを示す。この、我々が腫瘍形成ホットスポットと呼ぶ部域では、上皮層基底側に微小管の局在を伴う特異的な細胞構造が観察されるとともに、JAK/STAT 経路の内在性の活性化が見られる。このホットスポット以外の部域（コールドスポット）では、正常細胞に囲まれた nTSG 変異細胞は通常、上皮層基底側から押し出されて細胞死を起こすが、ホットスポットに出現した nTSG 変異細胞は、上皮層頂端側から押し出されて内在性 JAK/STAT 経路の活性を利用して腫瘍形成を開始する。上皮細胞の構造が進化的によく保存されていることから、腫瘍形成は一般的に同様のメカニズムにより、組織内在性の腫瘍形成ホットスポットから始まると考えることができるだろう。

腫瘍形成ホットスポット



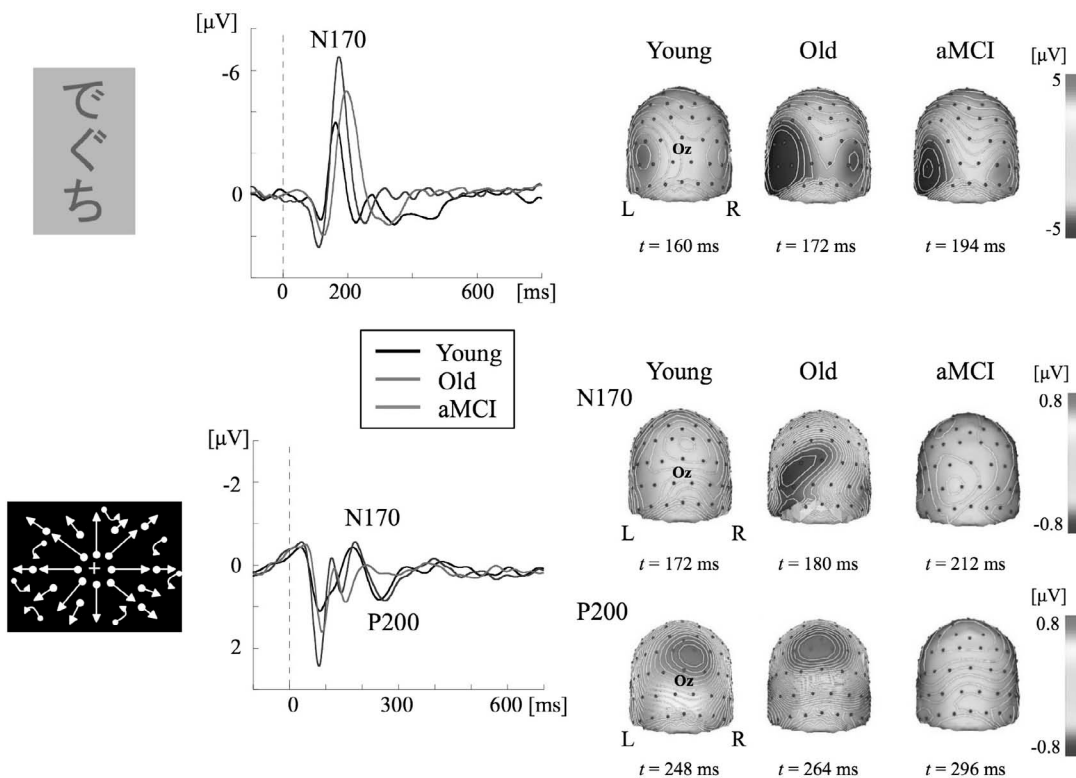
分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency: CVID) は、低 γ グロブリン血症を特徴とする原発性免疫不全症で、易感染性や悪性腫瘍併発を示すことが明らかになってきたが発症機序は不明である。最近、家族性 CVID の責任遺伝子の一つとして、LRBA (LPS-Responsive and Beige-like Anchor protein) というあらゆる臓器に普遍的に発現する 320kDa の巨大タンパク質が見出された。そこで今回、LRBA の生理機能や CVID 発症に至る細胞メカニズムを明らかにする目的で、CRISPR/Cas9 法で *LRBA* 遺伝子ノックアウト (KO) 細胞を構築し、免疫・炎症シグナル制御への影響を解析した。その結果、*Lrba*-KO マウス胎児線維芽細胞 (MEF) では、野生型に比べインターフェロン (IFN) 産生経路の応答が大きく亢進することから、LRBA は IFN 産生に対して抑制的に働くことが示唆された。現在、*Lrba*-KO マウスの樹立にも成功しており、今後、血中抗体量やリンパ球分化、個体レベルでの炎症・免疫シグナル応答を詳細に解析し、CVID 発症機序を解明する。

CRISPR/Cas9 法による *Lrba*-KO MEF 構築 (A) と LRBA による IFN 産生経路制御 (B)



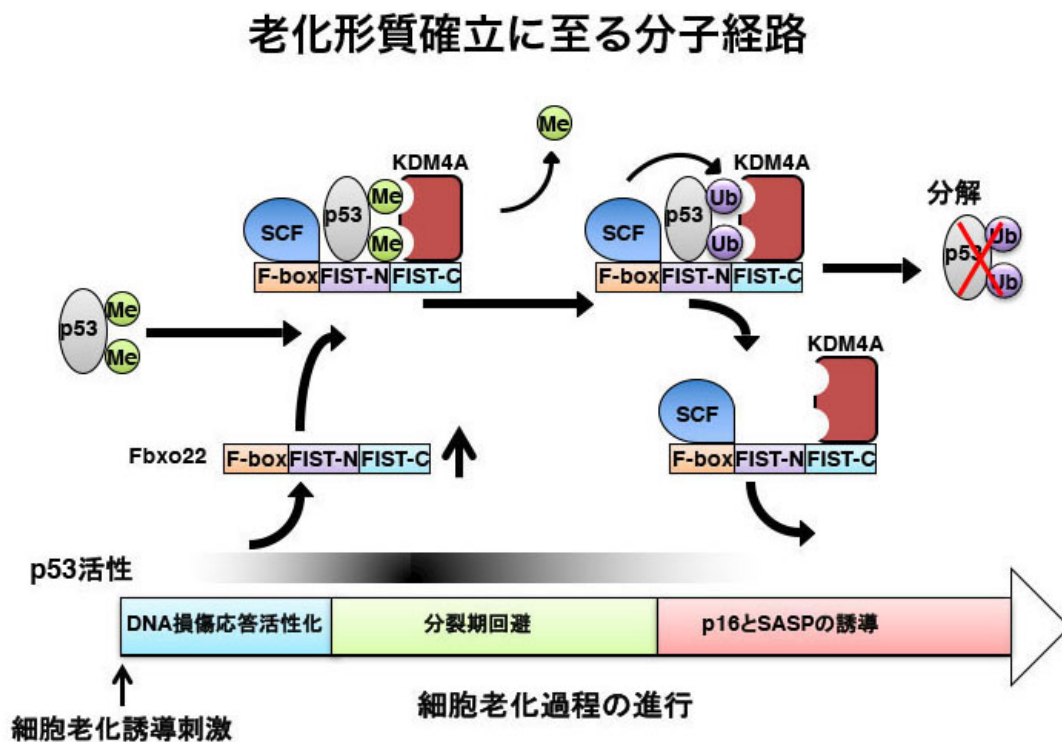
超高齢化社会の到来により、認知症の60%を占めるアルツハイマー病（AD）が急増している。ADの早期診断バイオマーカーとして、1) 脳脊髄液のアミロイドβ（Aβ）42低下、総タウやリン酸化タウ上昇、2) ポジトロンCTにおける後部帯状回、楔部、側頭・頭頂皮質の糖代謝低下/アミロイド集積などのバイオマーカーが挙げられている。しかし、侵襲性やコストの問題が指摘されており、理想的なバイオマーカーは未だ確立されていない。神経生理学的（特に電気生理学的な手法としての脳誘発反応）バイオマーカーは生化学や遺伝子バイオマーカーに比べて、非侵襲的、簡便、安価である。また日常診療において信頼性の高さ、再現性の良さ、潜在性異常の検出に優れることも証明されている。従って、電気生理学的バイオマーカーは、ADの理想的な早期診断バイオマーカーとなり得る可能性を秘めている。我々は、誘発脳波を用いて、認知症の予備群である軽度認知障害患者（aMCI）では、放射状方向の運動刺激（オプティック・フロー（OF））に対する脳反応が特異的に低下していることを報告した（J Alzheimers Dis, 2012年）。今回、その研究をさらに発展させ、新たな患者群でOF刺激は高い特異度、高い感度をもって、aMCI患者と健常老年者を区別できることを発見した。今回の研究成果は、誘発脳波が非侵襲的で安価かつ信頼性のあるaMCIの早期診断バイオマーカーとなることを示唆する。

健常若年者、健常老年者、軽度認知障害における平仮名と放射状方向運動刺激による視覚誘発反応の比較



近年、老化細胞が個体における加齢性変化や、発がんのみならず、様々な生命応答に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。老化細胞は恒久的増殖停止を主徴とすることから、がん防御に中心的役割を果たすと考えられる。一方、老化細胞は様々な炎症性サイトカインや増殖因子を分泌し（SASP）、組織微小環境に影響を与えて慢性炎症場を形成し、がん発症を促進する可能性も示唆されているが、老化細胞によるSASP誘導の詳細についてはよく分かっていない。我々は、SCF-Fbxo22-KDM4A複合体がp53のユビキチン化・分解を促進することで、老化細胞のSASP誘導に必須の役割を果たしていることを明らかにした。興味深いことに、Fbxo22の発現はp53により制御を受けており、老化誘導初期にはp53-Mdm2ループが、老化誘導後期にはp53-Fbxo22ループがp53活性を厳密に制御することで、老化細胞の様々な形質が誘導されることが示された。今後、SCF-Fbxo22-KDM4A複合体を標的とした、SASP誘導阻害剤を開発し、新たなコンセプトのがん予防法・治療法の開発を目指したい。

細胞老化誘導過程におけるp53の二相性制御とSASP誘導

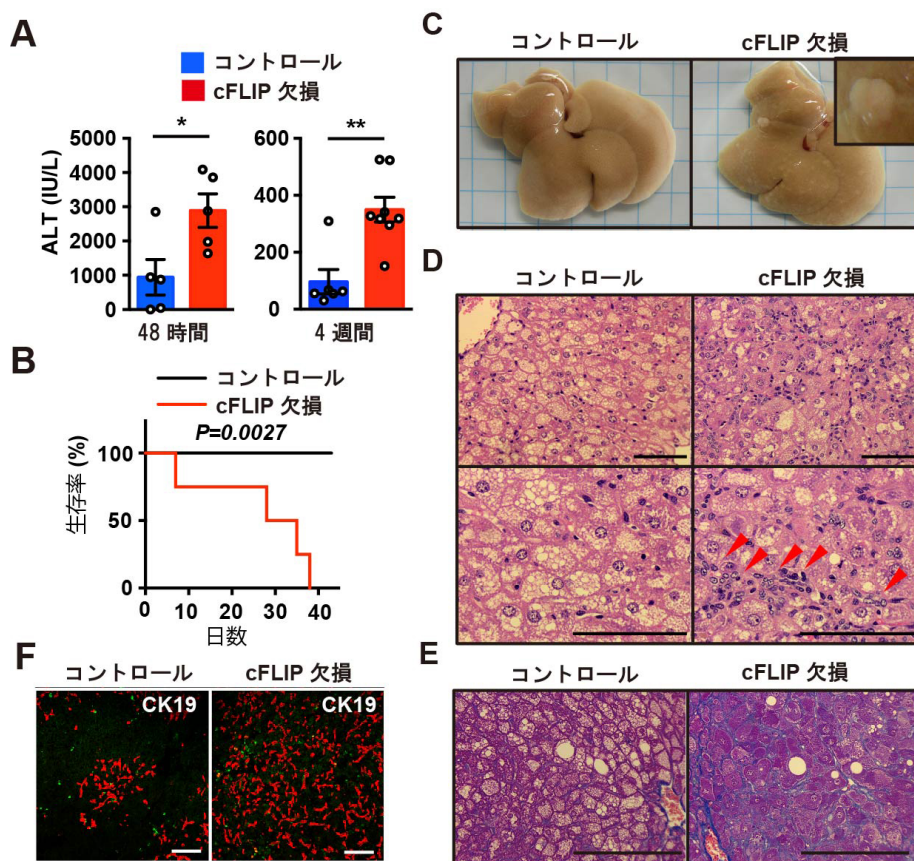


49 肝細胞死亢進マウスを用いた肝幹細胞増殖因子の同定

中野 裕康

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は飲酒歴がないにもかかわらず脂肪肝と慢性の炎症が進展し、最終的には肝がんを発症する疾患である。本研究では肝細胞特異的に cFLIP と呼ばれる細胞死抑制遺伝子を欠損したマウスに NASH モデルの一つであるコリン欠乏 (CDE) 食を投与したところ、著明に肝臓において慢性肝障害に伴う肝再生時に出現してくる Hepatic progenitor cells (HPCs) が増加するという現象を見出した。HPCs の増殖に関与する因子を検討したところ遺伝子 a および遺伝子 b を同定し、これらの遺伝子を Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法により肝臓で強制発現させると HPC の増加が認められた。また CDE 投与後 4 週後の cFLIP 欠損マウスの血中のメタボローム解析の結果、代謝産物 X および Y がコントロールマウスよりも増加しており、HPCs の増加と相関していることが明らかとなった。今後同定した遺伝子 a および b の機能解析や、代謝産物 X および Y が NASH 進展のバイオマーカーにならないかを検討していく予定である。

cFLIP 欠損マウスでは CDE 食投与により著明に HPCs が増加する



50 統合失調症における PGE₂-EP1 受容体シグナル伝達系の関与

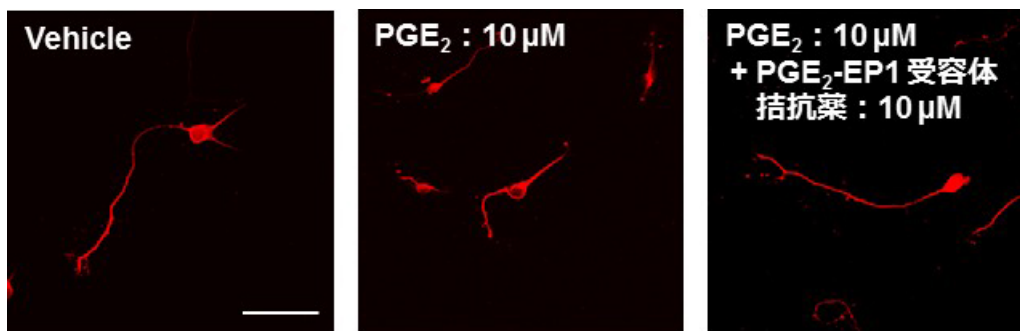
野田 幸裕

実験動物を用いた研究において、統合失調症の様々な環境的要因暴露によりプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の発現が共通して増加すること、新生仔期 PGE₂ 投与により成体期において統合失調症様の精神行動学的異常が惹起されること、その行動異常は PGE₂-EP1 受容体拮抗薬によって緩解されることが明らかになっている。

今般、我々は、①新生仔期マウスの神経発達過程および海馬神経初代培養での神経細胞に対する PGE₂ の影響、②新生仔期 PGE₂ と他の要因を複合的に負荷した場合の精神行動への影響、③汎用されている薬理学的統合失調症様モデル動物における PGE₂-EP1 受容体シグナル伝達系の関与について検討し、④統合失調症患者を対象としたゲノム解析を行った。

その結果、統合失調症の遺伝的な要因として PGE₂-EP1 受容体シグナル伝達系の関連性については明確にはできなかったが、統合失調症における生物学的要因として PGE₂-EP1 受容体シグナル伝達系が発症脆弱性に関与していること、PGE₂-EP1 受容体を介するシグナル伝達系を阻害する PGE₂-EP1 受容体拮抗薬が新たな統合失調症の治療ターゲットとなる可能性を明らかにすることができた。

海馬神経初代培養における神経突起伸長に対するプロスタグランジン E₂ (PGE₂)
および PGE₂-EP1 受容体拮抗薬の影響 (scale bar: 50 μm)

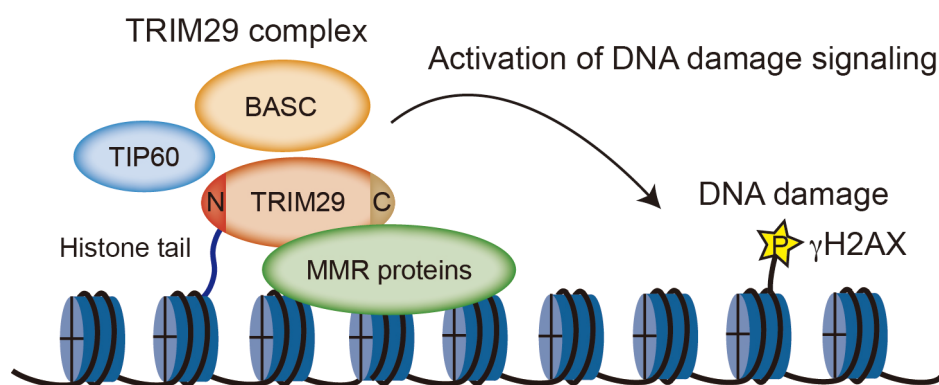


51 癌化制御に関与する TRIM 型ユビキチンリガーゼの解析

島山 鎮次

多くの細胞質・核質に存在するタンパク質の分解にユビキチン-プロテアソーム系が関与している。そして、標的タンパク質のユビキチン化に必要な酵素群の中で、特にユビキチンリガーゼ E3 は標的タンパク質を認識し、最終的にユビキチンを付加する重要な酵素サブユニットである。最近、癌化制御における TRIM ファミリーユビキチンリガーゼ群の重要性が明らかとなっている。特に、細胞の増殖及び分化過程で重要ないくつかの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現制御に、TRIM ファミリーユビキチンリガーゼが関与していることが示唆されている。本研究において、癌関連 TRIM タンパク質のひとつである TRIM29 を解析することで、癌化への関与の検討を行った。プロテオミクス的手法により、癌関連遺伝子のユビキチン化に関与する TRIM タンパク質のひとつとして TRIM29 を解析することで、癌化への関与の検討を行った。TRIM29 は B-box ドメイン、コイルドコイルドメインを有するタンパク質であり、これまでに UV に対する細胞感受性に関与することが報告されている。本研究により、TRIM29 結合タンパク質として DNA 修復関連タンパク質が同定され、TRIM29 が DNA 修復の足場タンパク質として機能することが判明した。さらに、遺伝子発現制御に関する解析を行うことにより、扁平上皮細胞系列の分化に TRIM29 が関与することが判明した。

DNA 修復シグナル活性化における TRIM29 の役割

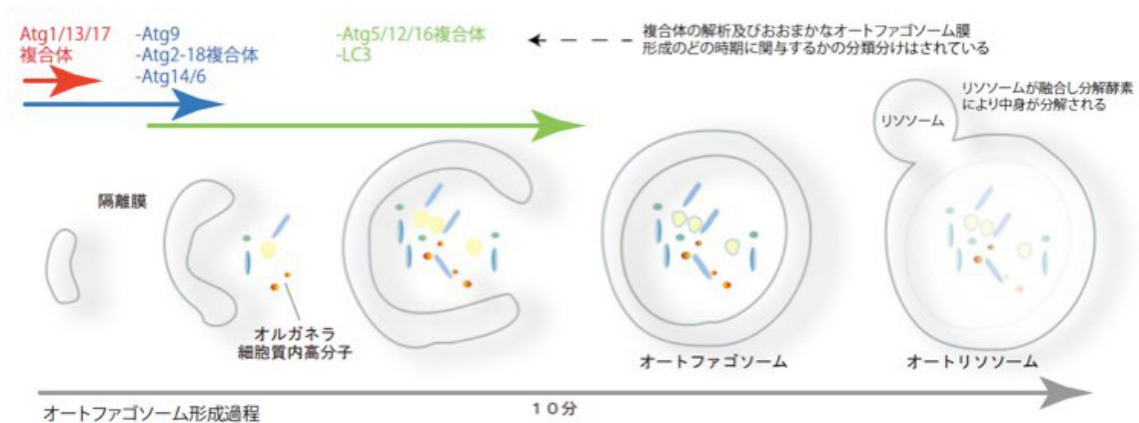


52 オートファゴソーム形成の膜動態と分子機構の解明

濱崎 万穂

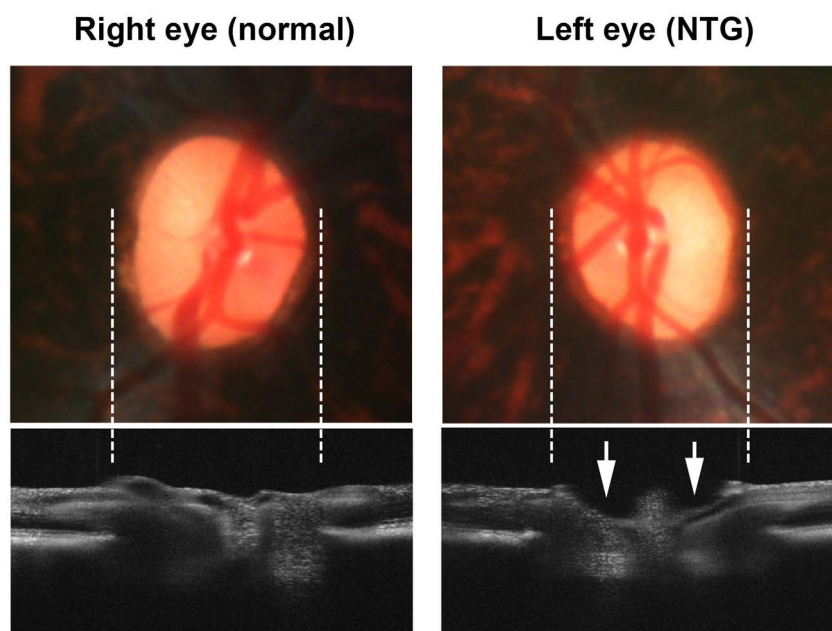
全ての真核細胞は、自己の細胞質やオルガネラをリソソームに運び分解・再利用するオートファジーと呼ばれる機構を持つ。オートファジーでは、細胞質等を取り込んだオートファゴソーム（AP）がリソソームと融合して内容物が消化される。この AP 膜がどのようにして形成されているのかは、永らく論争の的となってきた。近年我々は AP 膜が小胞体-ミトコンドリア接触部位（ER-Mt CS）で形成されることを報告した。なぜ ER-Mt CS で形成が行われるか、そこにどのオートファゴソーム形成因子（Atg）が局在するかなど更なる詳細を明らかにするために、光学顕微鏡や電子顕微鏡など主にイメージング解析を駆使した研究を行った。その結果、ER-Mt CS と AP の関係性の詳細な形態、また、Atg の比較的上流因子もオートファジー誘導時に ER-Mt CS に局在することが明らかになった。

オートファゴソーム形成過程の略図



我が国における失明原因の多くは網膜および視神経の変性疾患で占められており、Quality of Life の観点からも大きな社会的問題となっている。日本における最大の失明原因は緑内障であり、40 歳以上の有病率は約 6 % にのぼる。また本邦では眼圧が正常であるにもかかわらず緑内障症状を発症する「正常眼圧緑内障」が全体の約 7 割を占めるといふ、驚くべき事実が判明している。我々は世界初の正常眼圧緑内障モデルマウスをすでに報告しているが、ヒトとマウスでは解剖学的構造に差異があり、特に視神経を圧迫して緑内障を悪化させる篩状板がマウスには存在しない。そこで本研究ではよりヒトに近い霊長類であるマーモセットを用いて、生体イメージングによる網膜や篩状板の観察、さらに客観的な視機能測定法を確立した。さらにこの手法を用いて自然発症した正常眼圧緑内障個体を見出し、その病態を検討した。緑内障個体では発見時には片眼性であったが、1 年後の再検査では両眼発症しており、ヒト緑内障に類似した進行状況であった。また緑内障患者と同様に血中グルタチオン濃度の低下が見られるなど、ヒトに類似した所見が確認された。

正常眼圧緑内障を自然発症したマーモセットの右眼（正常眼）と左眼（緑内障眼）

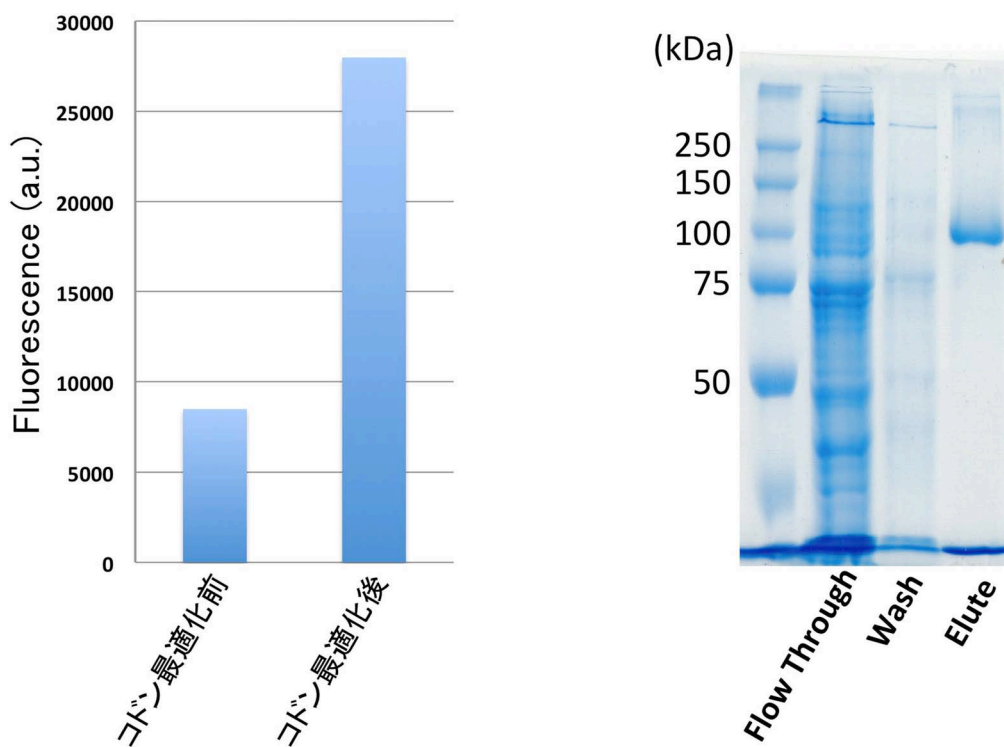


54 TRPA1 の立体構造解明と新規鎮痒剤の開発

日野 智也

アトピー性皮膚炎は、10人に1人が罹患しているといわれ、特に10代以下の低年齢層において発症確率の高い炎症性疾患である。最近になり、C線維の細胞膜上に発現しているTRPA1イオンチャネルの活性化により細胞内カルシウム濃度を上昇させることでC線維の興奮を引き起こし、炎症性メディエーターの放出とともに痒み感覚の発生を惹起することが明らかにされた。そこで、本研究ではヒト由来TRPA1タンパク質の大量調製系を確立し、立体構造に基づく合理的なアンタゴニストの創製を目指したTRPA1のX線結晶構造解析と、化合物ライブラリーを用いたタンパク質レベルでの医薬候補のスクリーニングを行うことを目的として研究を行った。その結果、酵母を発現ホストとして用い、単ドメイン抗体nanobodyを用いたアフィニティ精製手法により構造解析に十分な量と純度のTRPA1試料を調製することができた。また、細胞内可溶性ドメインの発現と精製に取り組み、機能単位である4量体構造を維持した細胞内ドメインの精製試料を調製することに成功した。現在これらの精製試料を用いた結晶化と構造解析を進めている。

Pichia pastoris 発現系を用いたコドン最適化による発現量の向上と
GFP nanobody を用いた TRP チャネルの高純度精製



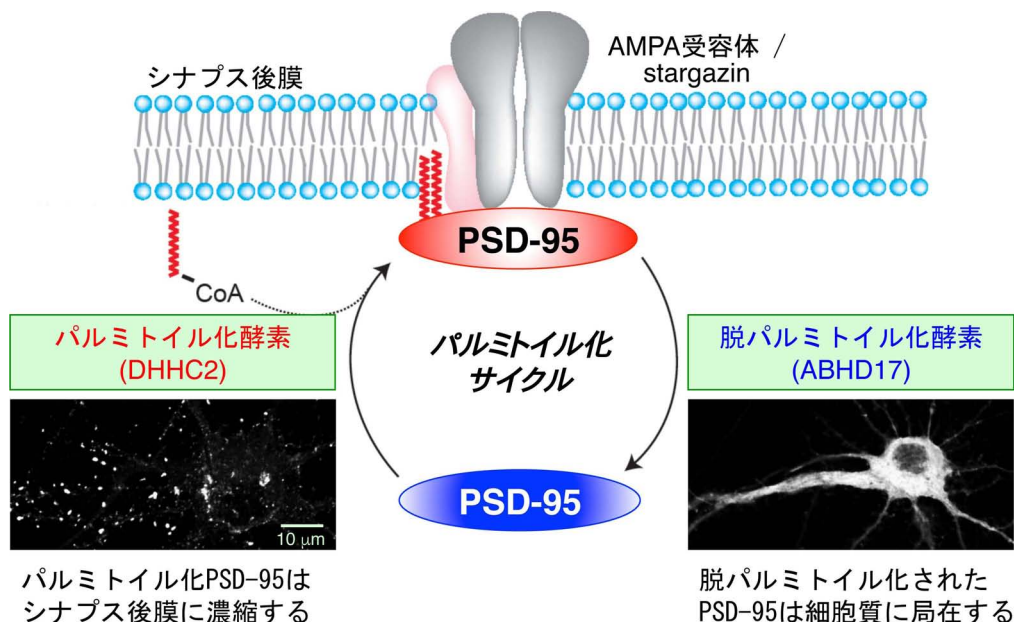
55 シナプス後膜ナノドメインを生み出す分子基盤の解明

深田 正紀

神経シナプス後膜は、Postsynaptic density (PSD) と呼ばれる特殊化した膜領域を有しており、神経伝達物質の受容体やその裏打ちタンパク質などが集積する。中でも PSD-95 は PSD の中核的な足場タンパク質として、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の裏打ちに主要な役割を果たし、シナプス伝達を制御している。これまでに PSD-95 が PSD に局在するには、パルミトイル化脂質修飾が必須であることが報告されていた。最近、私共は PSD が PSD-95 を核とするナノメートルサイズのナノドメインの集合体として構成されていることを見出した。そして、このナノドメインの構築には PSD-95 の持続的なパルミトイル化・脱パルミトイル化のサイクルが必須であり、パルミトイル化酵素 DHHC2 がその一翼を担うことを明らかにした。本研究では PSD-95 脱パルミトイル化酵素を同定し、PSD ナノドメイン構築を担う分子基盤を解明することを目的とした。

私共は、これまで十分に機能が解明されていないセリン加水分解酵素に着目し、PSD-95 を脱パルミトイル化する活性を有する候補遺伝子として α/β -hydrolase domain-containing protein (ABHD) 17A, 17B, 17C を見出した。また、パルミトイル化されたタンパク質の量比 (stoichiometry) を検出することができる acyl-PEGyl exchange gel shift 法 (APEGS 法) を開発し、神経細胞における ABHD17 の効果を検討した。そして、ABHD17 を海馬培養神経細胞に過剰発現させると、PSD-95 のパルミトイル化レベルが大きく減少し、PSD-95 と AMPA 受容体のシナプス局在が激減することを見出した。さらに、これら酵素群をノックダウンすると、PSD-95 の脱パルミトイル化過程が大きく遅延することを見出した。このように、私共は PSD-95 脱パルミトイル化酵素の同定に成功し、新たなシナプス後膜ナノドメインの制御因子を見出した。

パルミトイル化酵素 DHHC2 と脱パルミトイル化酵素 ABHD17 は、PSD-95 パルミトイル化サイクルを制御し、AMPA 受容体機能を制御する



56 上皮細胞の増殖・分化制御破綻がもたらす疾患発症機構

深見 希代子

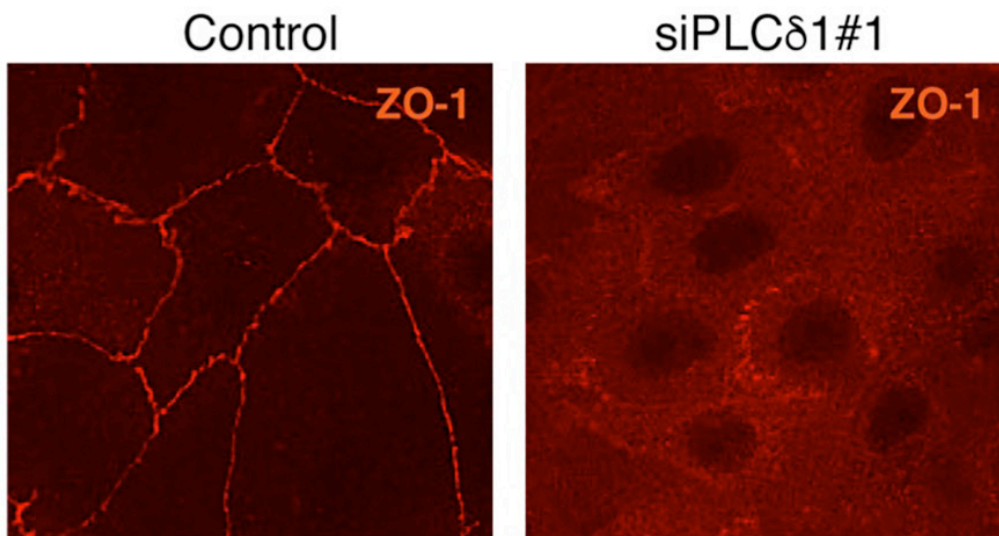
イノシトールリン脂質代謝のトリガーを引く酵素ホスホリパーゼ C δ 1 (PLC δ 1) が細胞の増殖・分化を制御し、その破綻が上皮細胞の特徴である細胞接着の異常をもたらし、がん細胞の悪性化や表皮バリア機能異常を伴う炎症性皮膚炎を発症するという仮説の検証を目的とした。

PLC δ 1 が細胞接着に重要な E-カドヘリンの発現を誘導し、大腸がん細胞の浸潤転移を阻害すること、大腸癌臨床検体で PLC δ 1 の発現が顕著に減少し PLC δ 1 ががん抑制因子として機能していることを、PLC δ 1 の過剰発現や発現抑制による増殖性や運動・浸潤性、ヌードマウスを用いたがん細胞移植実験等により明らかにした。また PLC δ 1 の活性制御を受ける下流シグナル PKC アイソフォームの探索を行ったところ、大腸癌細胞において、PLC δ 1 は特定の PKC アイソザイムをそれぞれ活性化・不活性化することを見出した。

一方、PLC δ 1 の欠損又は発現抑制が表皮細胞の増殖・分化のバランスを崩し、表皮バリア機能の異常を引き起こす事を、遺伝子欠損マウスや三次元培養（人工皮膚モデル）を用いた *in vivo*、*in vitro* の実験系により明らかにした。バリア機能の低下の原因として、角質バリアの形成に重要なフィラグリンの発現変化やタイトジャンクションの形成不全が生じていた。

こうした結果は、PLC δ 1 が様々な細胞接着機構を制御し、その破綻ががん細胞の悪性化や表皮バリア機能異常を伴う炎症性皮膚炎を誘導する事を示唆している。今後 PLC δ 1 を治療標的とした薬剤の開発に繋がると期待できる。

PLC δ 1 遺伝子発現抑制は、タイトジャンクションの形成不全を誘導する

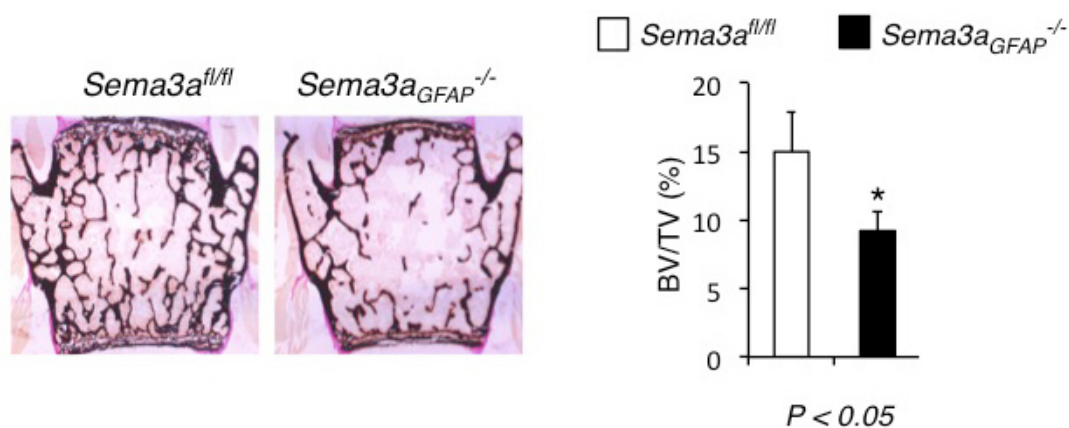


57 感覚神経を介した神経系による骨代謝調節機構の解明

福田 亨

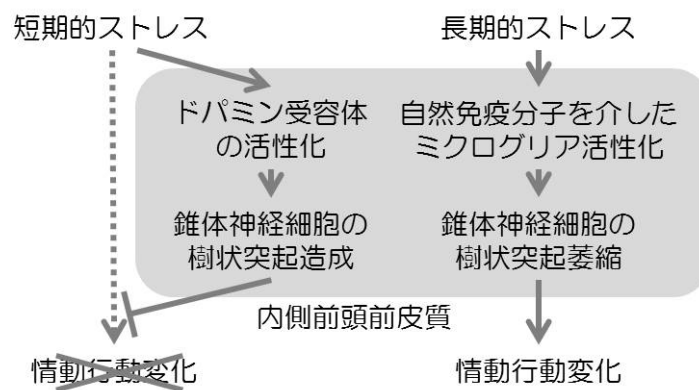
骨代謝は形成と吸収のバランス制御により恒常性が維持されている。近年の高齢化社会の進展に伴い、骨関連疾患の克服は喫緊の課題であるが、医薬応用につながる骨代謝調節の分子機構は不明のままである。我々はこれまでに神経系による骨代謝調節機構に着目し、骨組織における神経ペプチドの生理的意義を明らかにしてきた。最近我々は神経反発因子として広く知られる Semaphorine3A (Sema3A) が骨内への感覚神経投射を制御することで骨代謝調節に関わることを見いだした。本研究では神経系による骨代謝調節機構の全貌を解明するため、グリア細胞に着目し、グリア細胞を由来とする Sema3A の骨代謝に対する影響の解析を試みた。グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスを作製し、骨の組織学的解析を行ったところ、骨量の有意な低下が認められた。さらに骨代謝変化を詳細に検討するため、骨形態計測解析を行ったところ、破骨細胞数の有意な増加が認められた。これらの結果からグリア細胞由来の Sema3A は破骨細胞に作用することで骨代謝に関与する可能性が示唆された。

グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスで認められた骨量の低下



社会や環境から受けるストレスは認知情動変化を誘導し、精神疾患のリスク因子となる。我々は、短期的なストレスでは内側前頭前皮質のドーパミン系が活性化されストレス抵抗性が增强されること、長期的なストレスではミクログリアが活性化され、脳内のプロスタグランジン E₂ の産生を增强し、このドーパミン系の活性を抑制してうつ様行動を促すことを示唆してきた。しかし、短期的または長期的なストレスが内側前頭前皮質の錐体神経細胞の機能や形態に与える影響やその意義は不明であった。本研究では、マウスの社会挫折ストレスを用い、短期的なストレスが内側前頭前皮質のドーパミン受容体を介して内側前頭前皮質の錐体神経細胞の樹状突起やスパインを造成し、ストレス抵抗性を增强することを示した。一方、長期的なストレスは、自然免疫分子 TLR を介して内側前頭前皮質のミクログリア活性化や錐体神経細胞の樹状突起萎縮を誘導し、情動変化を促すことも示した。以上の研究成果は、短期的または長期的なストレスによる内側前頭前皮質の錐体神経細胞の形態変化の実態とそのメカニズムや意義に迫るものであり、今後の精神疾患創薬に貢献する可能性が期待される。

短期的または長期的なストレスによる前頭前皮質の神経形態変化とその役割



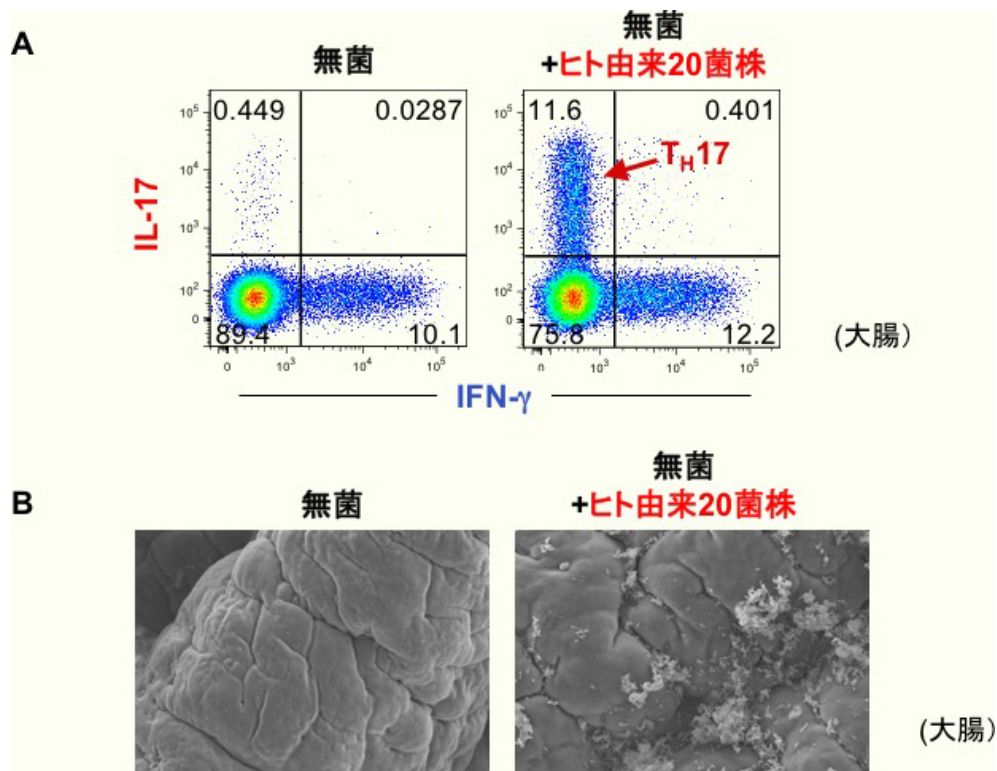
59 免疫・上皮に強く影響する腸内細菌種の同定と応用

本田 賢也

腸内細菌は上皮細胞・免疫細胞を活性化し、宿主の生理機能に深い影響を与えている。Th17 細胞は、消化管に非常に多く存在する細胞である。感染症への抵抗性や自己免疫疾患の病態に関わる重要な免疫細胞として知られている。これまでに我々は、セグメント細菌と呼ばれるマウスの腸内常在細菌が、腸管 Th17 細胞を誘導し、感染症抵抗性を高めることを同定していた。セグメント細菌は腸管上皮に突き刺さるようにして強く接着しているユニークな形態的特徴を持つ。本研究では、この上皮への接着特性が Th17 細胞の誘導に強く関与することを同定した。また、この上皮接着を介した Th17 細胞の誘導メカニズムは、セグメント細菌に限らず、大腸菌 O157 など病原性細菌にも共通する機構であることを突き止めた。また、本研究では、ヒトの腸内細菌にも着目し、Th17 細胞を誘導するヒト腸内細菌の同定に成功した。今回同定されたヒト腸内細菌は、20 種類の細菌種からなり、炎症性腸疾患患者の糞便から分離された。この 20 菌種の Th17 誘導菌もまた、前述のセグメント細菌などと同様に上皮に接着することを特徴としており、この接着を介して Th17 細胞を誘導していると考えられた。今回の成果は、炎症性腸疾患の予見やワクチンデザイン、プロバイオティクス開発などに応用出来ると考えられる。

潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された 20 菌株による Th17 細胞誘導

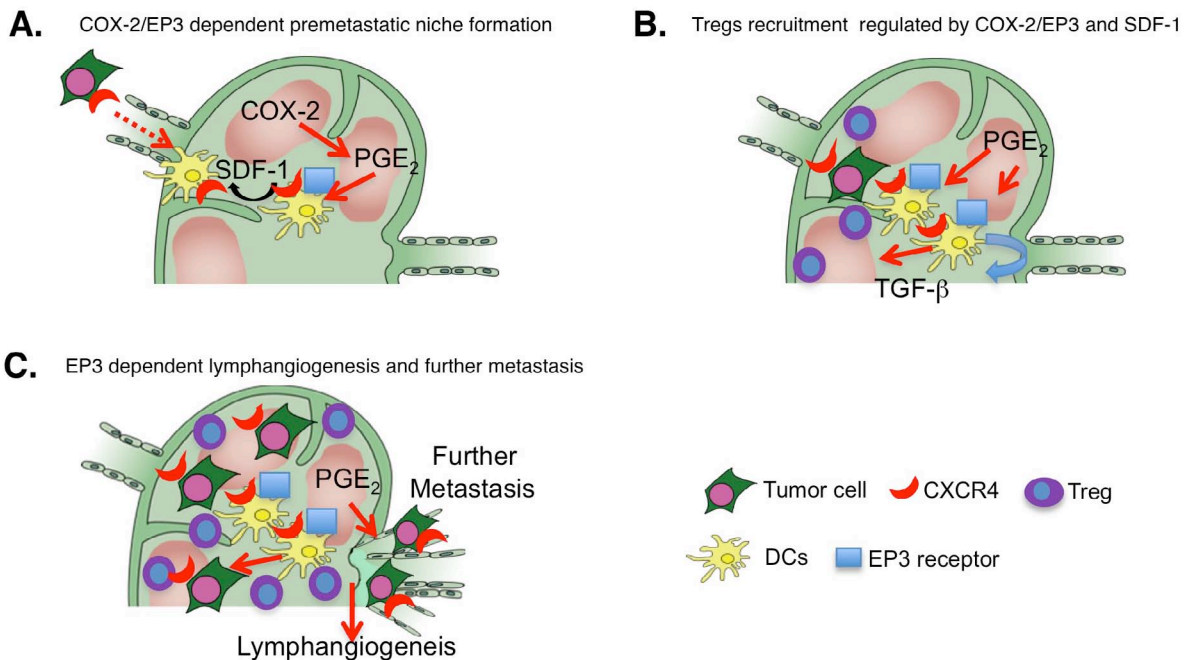
- A) 潰瘍性大腸炎患者便サンプルから単離された 20 菌株を無菌マウスに投与し、FACS で解析した。20 菌株投与ノトバイオームマウス大腸粘膜固有層において、CD4 陽性 IL-17 陽性の Th17 細胞の顕著な増加が観察された。
- B) 上記マウスの大腸粘膜を透過電子顕微鏡観察した。20 菌株投与ノトバイオームマウス大腸に多数の細菌の接着が観察された。



がんのリンパ節転移は重要な予後決定因子であり、リンパ管はがんの進展に関わる重要なルートの一つである。血行性転移の分子機構や血管新生による増強メカニズムについては解明されつつあるが、リンパ節転移に関してはその分子メカニズムの解明や治療標的の特定が遅れている。多くの腫瘍細胞が転移前段階 (premetastatic phase) において何らかの分子機構により、特定の器官により転移しやすい傾向があることが広く知られており、この転移を助長する状況 (premetastatic niche) を形成することで転移を促進することが血行性転移の過程で報告されている。我々は肺がんの所属リンパ節転移モデルを作製し、肺がんリンパ節転移における premetastatic niche の形成の有無を検討し、niche 形成における COX および PGs の役割を解明した。原発巣の増殖に伴い、所属リンパ節でごく早期から COX-2 が誘導され、COX-2 依存性に産生された PGE₂ が EP3 を刺激することによりケモカインである stromal cell derived factor (SDF) -1 の発現増大が subcapsular region で生じ premetastatic niche を形成すること、さらに、COX-2 陽性の SDF-1 産生は樹状細胞であり、EP3 依存性に TGF-β を産生することで regulatory T cell (Tregs) を動員することによって免疫寛容が生じ、腫瘍転移を増強させることが証明できた。

リンパ節転移における COX-2 および PGE₂-EP3 シグナリング、
SDF-1、樹状細胞および Regulatory T Cells の役割

(A) COX-2 由来の PGE₂ シグナルにより転移前段階で転移好発部位に樹状細胞が動員され、同樹状細胞が SDF-1 を分泌することで premetastatic niche を形成する。(B) さらに樹状細胞は由来の PGE₂ シグナルによって TGF-β を産生することにより regulatory T cells を動員し、免疫寛容を生じる。(C) COX-2 由来の PGE₂ シグナルはリンパ節内リンパ管新生を促し、さらに遠隔への器官への転移を生じさせる。

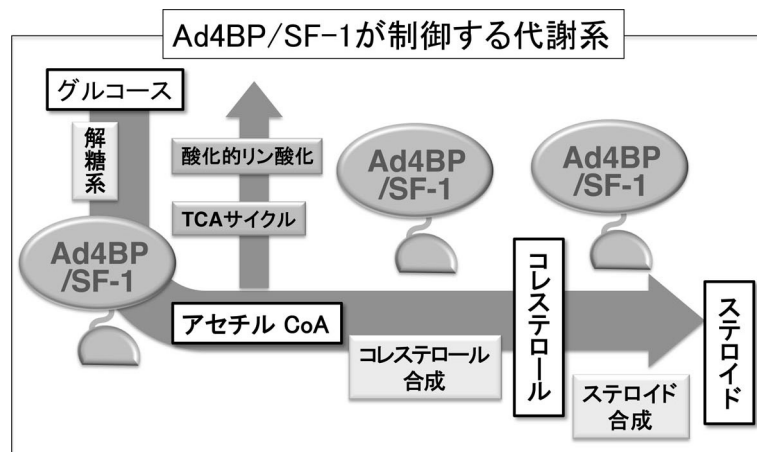


61 代謝酵素—転写因子間連携による遺伝子発現調節

諸橋 憲一郎

代謝系は一般に複数の酵素による連続した反応によって構築される。これまでの代謝の制御機構に関する研究は主に律速酵素の活性調節の観点から進められてきた。一方、代謝系を構築する全ての遺伝子を一つのユニットとして、その発現を一斉に制御するシステムは非常に合理的である。核内受容体型転写因子 Ad4BP/SF-1 (Adrenal-4 Binding Protein/Steroidogenic Factor-1) はステロイドホルモン合成に関与するほぼ全ての遺伝子の発現を制御することが示された転写因子であった。最近、我々は本因子が解糖系を構築するほぼ全ての遺伝子に結合し、その発現を制御することを見出した。本研究では、全ゲノムレベルでの解析により、新たに本因子がコレステロール合成系を構築する遺伝子を制御していることを見出した。解糖系からアセチル-CoA が供給され、アセチル-CoA からコレステロール合成が進み、そしてコレステロールがステロイドホルモンの前駆物質であることを考慮すれば、Ad4BP/SF-1 によって制御されるこれらの代謝系はそれぞれが独立したものではなく、下図に示すように連続した代謝系と捉えることが可能である。本研究では、解糖系、コレステロール合成系、ステロイドホルモン合成系という一見独立した代謝系が、遺伝子発現レベルで協調的に制御されることを明らかにした。

Ad4BP/SF-1 による代謝関連遺伝子の制御



62 T細胞における代謝リプログラミング制御機構の解明

山下 政克

抗原を認識したナイーブ T 細胞は、活性化し、活発に増殖するとともに、抗原排除のための適切な機能を獲得して、エフェクター T 細胞へと分化する。この過程を適切に行うにあたり、T 細胞は、活性化後、爆発的にエネルギー消費を増大させるが、そのエネルギーを効率よく供給するためには、細胞内代謝経路をリプログラミングすること（代謝リプログラミング）が必須である。これまでに、ナイーブ T 細胞は、遊離脂肪酸の β 酸化によって主にエネルギーを生み出しているのに対し、エフェクター T 細胞は、解糖系やグルタミン代謝系をエネルギー供給経路として用いることが報告されている。また、抗原排除後に長期間生存する一部の T 細胞（メモリー T 細胞）は、再び脂肪酸分解経路を主に利用することも分かっている。つまり、T 細胞は、ダイナミックに代謝経路を変化させることで、免疫反応をコントロールしているといえるが、その制御機構の解析は進んでいない。今回、私たちは腫瘍抑制因子 Menin に着目して T 細胞代謝リプログラミング機構を解析し、Menin が細胞内グルタミン代謝調節を介して T 細胞の活性化と分化を制御していることを明らかにした。

腫瘍抑制因子 Menin は、グルタミン代謝調節を介して CD8 T 細胞の増殖・分化を制御する



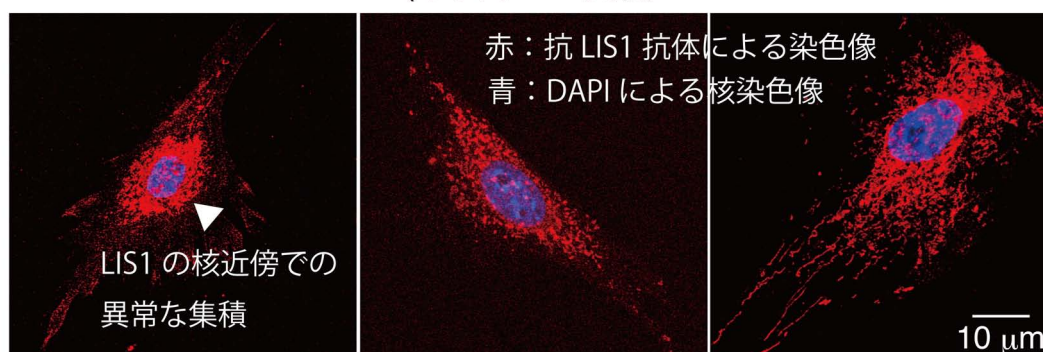
本研究課題では、発達障害などを引き起こす先天性神経疾患の中でも、とりわけ発生初期の神経細胞遊走障害に起因するものに着目し、その疾患発症メカニズムを分子レベルで解明することで創薬探索に繋げることに取り組んできた。

これまでに私たちは、代表的な当該神経疾患である滑脳症の責任遺伝子産物の一つである LIS1 の機能を微小管モーターに対する分子制御メカニズムを解析する中で、LIS1 がタンパク質分解酵素のカルパインによって分解されることを独自に発見し、カルパイン阻害薬が滑脳症疾患モデル (*Lis1* 遺伝子ヘテロ欠損マウス) にみられる滑脳症 (様) 症状を改善することを報告した (Yamada et al., *Nat Med*, 2009)。

本研究課題に於いては、LIS1 を含む微小管関連タンパク質の細胞内ロジスティクス (細胞内物質輸送) および分子ダイナミクスを検討する為に、微小管プルダウン法とインビトロ微小管トランスポートアッセイを駆使して LIS1-細胞質ダイニンの輸送過程を制御する機能分子として低分子量 GTPase ADP-ribosylation factor-like3 (ARL3) を同定した。この ARL3 は、複数の遺伝子の変異あるいは欠損に起因する神経細胞遊走障害を伴う先天性神経疾患に対して汎用な新しい創薬標的として期待できる。

LIS1 の細胞内局在に対する ARL3 ノックダウン (KD) の影響

ARL3-KD ARL3-KD + ヒト型 ARL3 野生型
(レスキュー実験)



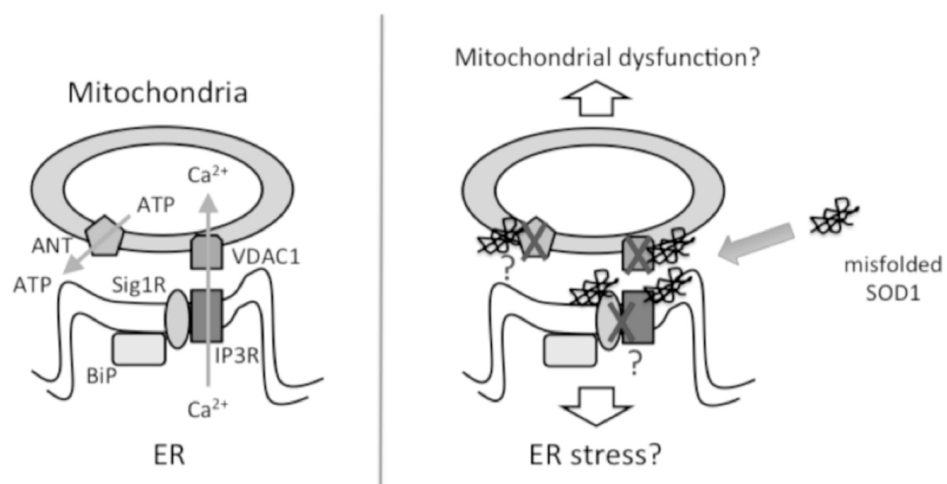
細胞：マウス胚性線維芽 (MEF) 細胞

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動神経に選択的な細胞死がおこる神経変性疾患であり、約 10 %は遺伝性に発症する。ALS の運動神経細胞では、ミトコンドリアや小胞体などのオルガネラが傷害される。本研究では、これらのオルガネラの連関に関わる小胞体・ミトコンドリア膜間領域（MAM: mitochondria-associated membranes）に着目した。

MAM は小胞体やミトコンドリアの機能維持に重要であることが指摘され、また MAM 特異的な Sigma-1 受容体 (Sig1R) タンパク質をコードする *SIGMAR1* 遺伝子の劣性変異が若年性 ALS を発症する。*SIGMAR1* 遺伝子の変異に伴う ALS では、Sig1R が IP₃R3 を介した細胞内 Ca²⁺制御能の欠失、すなわち MAM における Sig1R の機能喪失 (loss-of-function) の機序により引き起こされていることが示唆された。

さらに、Sig1R の機能喪失は、SOD1 変異による遺伝性 ALS モデルマウスの発症時期を加速し、生存期間を短縮した。Sig1R の欠失および SOD1 変異モデルにおいては、MAM の異常化が共通機序としてみられたことから、*SIGMAR1*-ALS と SOD1-ALS における運動神経変性は一部共通した機序によって惹起されることが考えられた。

A scheme for MAM dysfunction in *SIGMAR1*- and SOD1-ALS

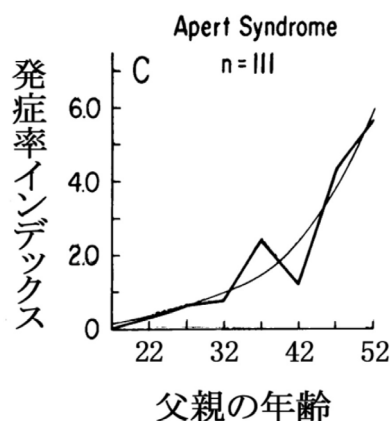


65 遺伝性疾患の父年齢効果を生み出す精子幹細胞の競合

吉田 松生

ヒトの遺伝性疾患の中には、ほぼ 100 %が父由来の孤発例で、父親の加齢に伴い子の発症率が指数関数的に上昇する、「父年齢効果」を示す一群の常染色体優性の疾患群がある。その一例が、*FGFR2* (線維芽細胞増殖因子受容体タイプ 2) 遺伝子の点突然変異により軟骨形成不全を来す Apert 症候群である。父年齢効果の原因には諸説あるが、①精子幹細胞で変異が起こり、②変異を生じた精子形成幹細胞が、変異を持たない幹細胞に比して優位に増え、③年齢とともに変異を持つ精子の割合が増加するという説が有力である。しかし、これらの仮説が示唆する、精巣内で起こる幹細胞の競合の細胞学的・分子生物学的実態や、この突然変異が競合に与える影響は謎に包まれている。本研究では、マウスを用いてこれらの謎に挑戦し、正常の精子幹細胞が、*FGFR2* を活性化するリガンドを精巣組織内で競合することで自己複製と分化のバランスをとっていることを、変異マウスの解析と数理モデルにより明らかにした。さらに、Apert 症候群型変異を人工的に導入できるマウスの開発を進め、精子幹細胞の競合の分子実態とそれを基盤とする父年齢効果の原因に迫った。

Apert 症候群の示す父年齢効果
(Risch et al. 1987 より改変)

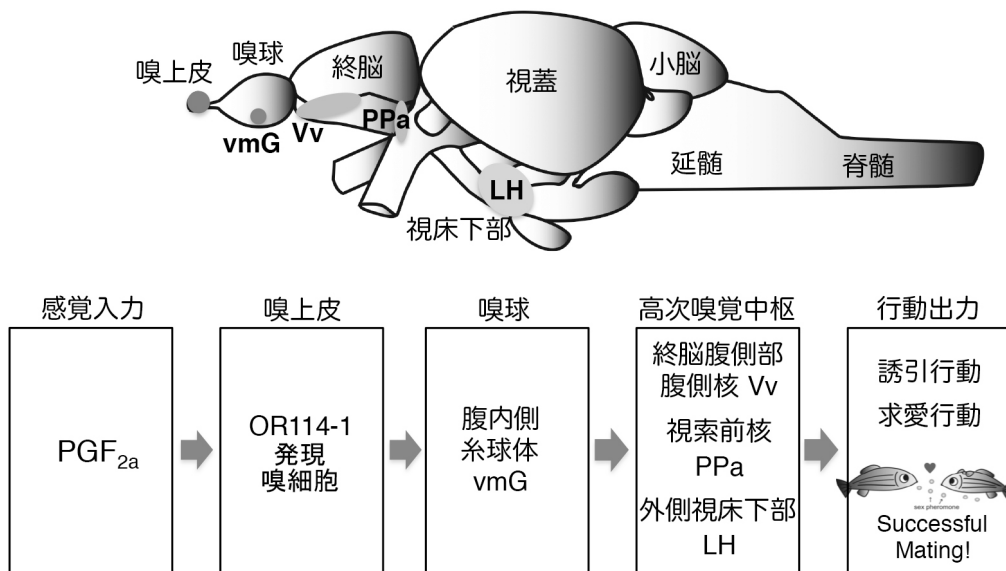


66 個体の生存と種の保存を担う嗅覚行動機構の統合的解明

吉原 良浩

嗅覚系は物体から発せられる匂い分子を受容し、その情報を鼻から脳へ伝えて、個体の生存・生体の恒常性維持・種の保存のために必要な行動や内分泌系変化をもたらす神経システムである。とりわけ、好きな匂いへの誘引行動、嫌いな匂いからの逃避行動、フェロモンを介した性行動は、多くの生物に共通する3つの根源的な嗅覚行動である。本研究ではゼブラフィッシュを用いて、オスの性行動発現を調節する嗅覚神経メカニズムを解析した。その結果、排卵時のメスが放出する性フェロモンであるプロスタグランジン F2 α (PGF $_{2\alpha}$) を特異的に認識する嗅覚受容体を同定し、さらに PGF $_{2\alpha}$ 刺激によって活性化される嗅覚中枢領域を見出した。また PGF $_{2\alpha}$ 嗅覚受容体の遺伝子欠損フィッシュを作製し、その行動学的解析から PGF $_{2\alpha}$ が本受容体を介してオスの誘引・求愛行動を促進することがわかった。以上の結果から、魚類における性フェロモン PGF $_{2\alpha}$ による性行動発現の嗅覚メカニズムが明らかとなった。

性フェロモン PGF $_{2\alpha}$ がオスの魚の誘引・求愛行動を促進する神経回路メカニズム

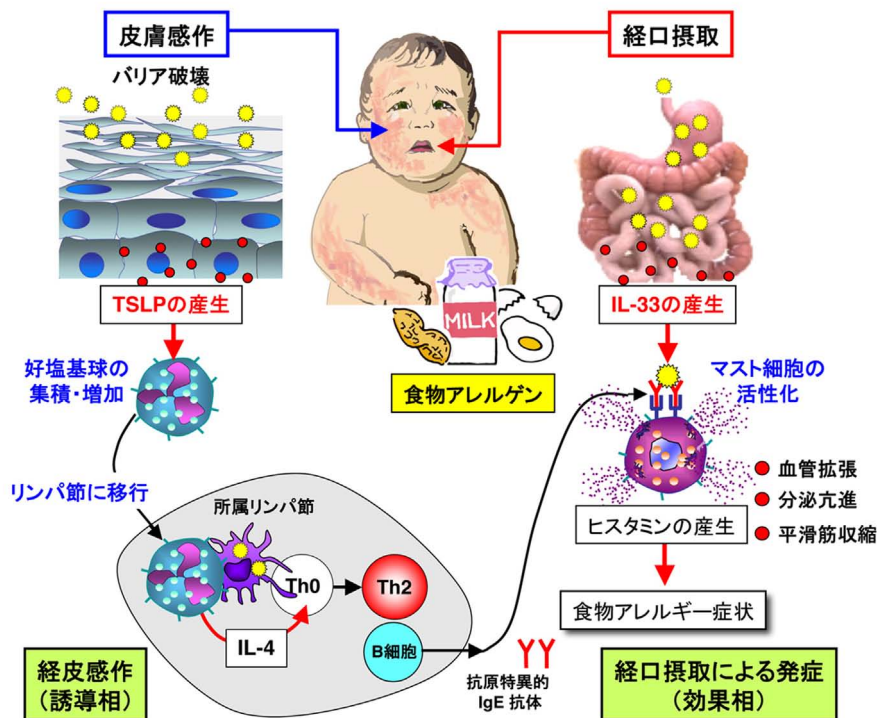


67 経皮感作食物アレルギー発症機序の解明

善本 知広

乳幼児の食物アレルギーは「経皮的に食物アレルゲンに曝露されると感作が成立し、適切な量とタイミングで経口摂取された食物は、むしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説が提唱されている。しかし、その実験的検証はなされていない。本研究では、乳幼児の食物アレルギーの特徴と良く似た経皮感作食物アレルギーモデルマウスを樹立し、その発症機序と治療・予防法を検討した。正常マウスの皮膚に界面活性剤を塗布し、皮膚バリアを脆弱にした後卵白アルブミン (OVA) を塗布すると、血清 OVA 特異的 IgE 抗体の上昇と OVA 経口投与直後の直腸温低下を伴ったアナフィラキシー症状を発症する。解析の結果、1) アレルゲンの経皮感作 (誘導相) には皮膚上皮細胞由来の Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) と好塩基球が、2) アレルゲンの経口摂取によるアナフィラキシー症状の発症 (効果相) には腸管上皮細胞由来の IL-33 がそれぞれ必須であること、3) 皮膚感作前にアレルゲンを経口摂取した後アレルゲンを経皮感作すると、所属リンパ節内に抑制性 T 細胞 (Treg) が増加して免疫寛容を誘導することを明らかにした。

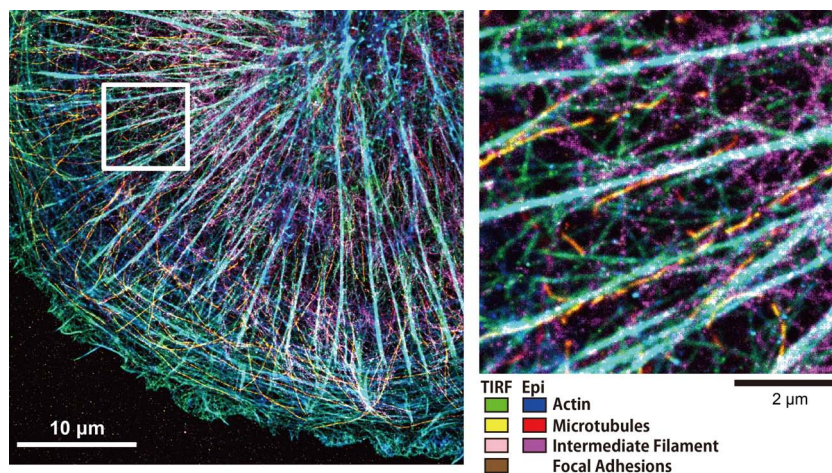
TSLP-好塩基球-IL-33 を介した経皮感作食物アレルギーの発症機序



細胞骨格は、細胞の「形」の枠組みを個々の細胞に提供するだけでなく、生理活性物質や物理刺激に反応してダイナミックに形態を変化させる。本研究は、この細胞形態を制御シグナルと、増殖因子のシグナルカスケードや細胞分化のスイッチとの間にある密接なクロストークを、これまで発展させてきた細胞分子イメージング技術を改良することで細胞骨格系分子の挙動変動として精細に捉える観察系を樹立する。その目的のため、まず新規の超解像蛍光顕微鏡 IRIS を開発した。既存の抗体等を用いた免疫組織化学とは異なり、IRIS では標的に迅速に結合・解離する蛍光プローブを用いることで、緻密な超解像観察と無数の標的に対する多重染色が可能となった。また、電気穿孔法を応用した生細胞分子イメージング法 eSiMS 顕微鏡を用い、アクチオシンの収縮力が細胞先端端のアクチン線維を安定化することを見出した。これらの技術を発展させ、接着斑分子と細胞増殖に関わる分子間の動的な相互作用に関する新知見が得られつつある。

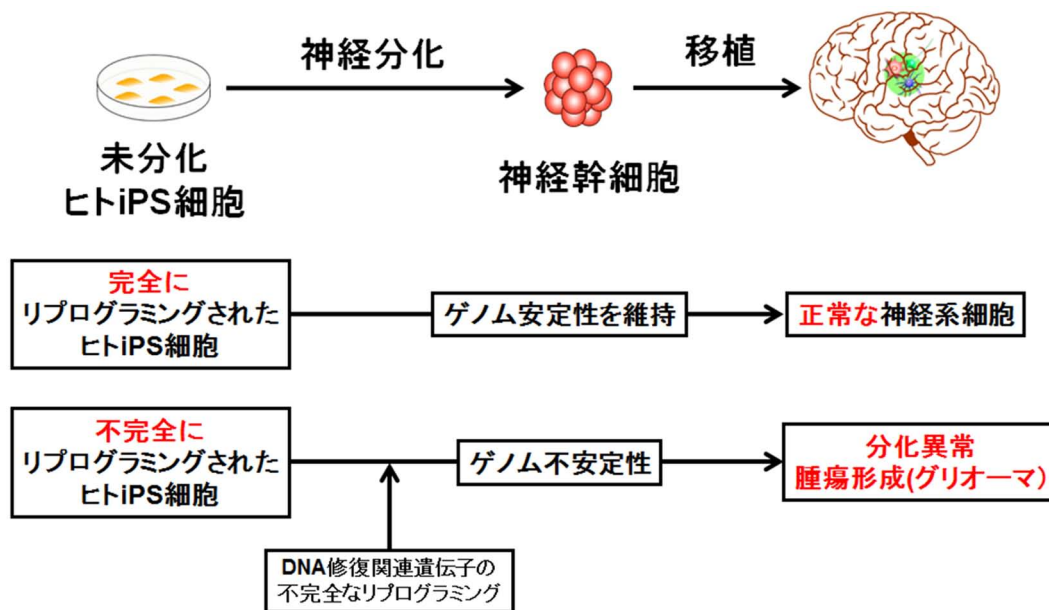
IRIS による多重染色超解像

細胞の底面、および全体で可視化されたアクチン線維、微小管、中間径フィラメント、接着斑



ヒト iPS 細胞は、神経系細胞へ分化誘導することで、中枢神経系における再生医学や、ヒト神経発生研究、神経疾患の病態解析における *in vitro* モデルへの応用が期待されてきた。しかし、不完全な iPS 細胞は分化異常や造腫瘍性の原因となり、iPS 細胞を用いた再生医療や疾患解析において問題となる。本研究では、複数のヒト iPS 細胞株から神経幹細胞を誘導して造腫瘍性解析を行い、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の腫瘍化メカニズムの解析と新たな品質評価法の検討を行った。その結果、一部のヒト iPS 細胞株由来神経幹細胞は、免疫不全マウスの脳や精巣へ移植するとグリオーマ様腫瘍を形成した。また、独自に同定したヒト ES 細胞特異的遺伝子群 (hESC signature genes) や DNA 修復関連遺伝子群に着目した遺伝子発現プロファイル解析を行ったところ、造腫瘍性を示すヒト iPS 細胞株の不完全なリプログラミングが示唆され、またこれらの iPS 細胞株は、神経幹細胞への分化誘導の過程でゲノム不安定性を示した。これらの結果から、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞株は、分化に伴うゲノム不安定性を介して造腫瘍性を示すことが示唆された。また、未分化 iPS 細胞における DNA 修復関連 17 遺伝子の発現プロファイルは、ヒト iPS 細胞のリプログラミングの程度や分化誘導に伴うゲノム不安定性、造腫瘍性と関連しており、さらに複数のヒト iPS 細胞を用いた発現解析から、リプログラミング抵抗性遺伝子 (Reprogramming recalcitrant genes) である可能性が示唆された。この 17 遺伝子を「Score Card」として用いた未分化状態での発現プロファイルは、iPS 細胞の応用にむけた「真に良質なヒト iPS 細胞」の迅速・効率的な評価方法の開発へ応用可能であると考えられた。

不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞は分化に伴うゲノム不安定性により造腫瘍性を示す



70 非アルコール性脂肪肝炎の発症機構の解明と医学応用

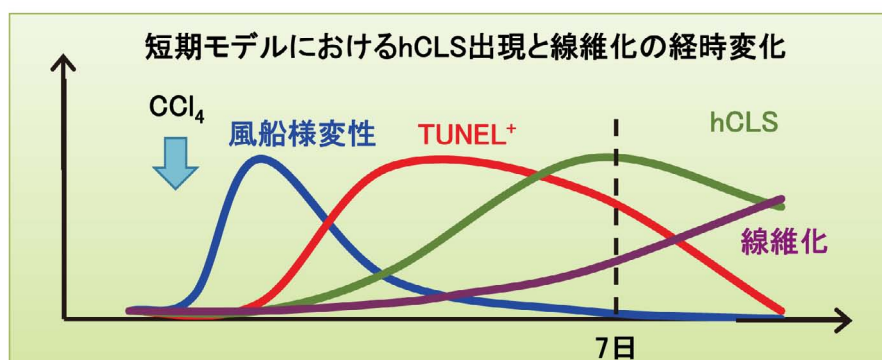
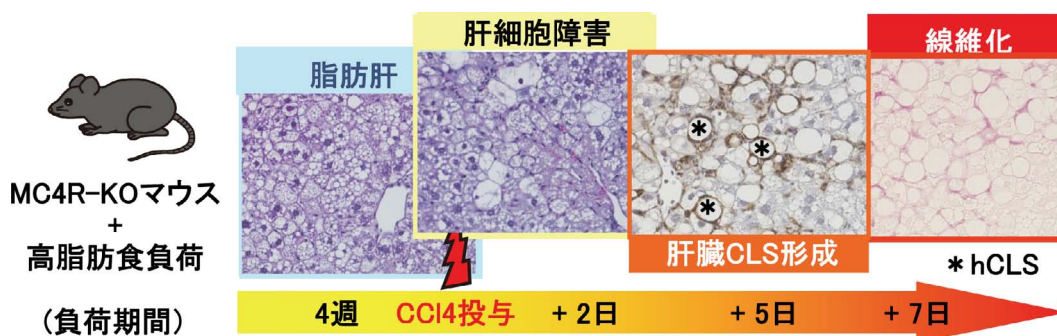
小川 佳宏

本研究は、我々が独自に開発した新しい NASH モデルを用いて NASH の発症機構の解明と早期発見・発症前診断のためのバイオマーカーと新しい治療戦略の開発を目指すものである。

本研究では、高脂肪高蔗糖食に代表的な *n-3*系多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) またはパルミチン酸 (対照群) を 5% (wt/wt) 混和した飼料を MC4R-KO マウスに投与し、24 週間観察した。EPA 群では、肝重量と肝中性脂肪含量の抑制、血中脂質プロファイルの改善、血中 ALT 値の減少が認められた。組織学的解析では、脂肪肝の改善のみならず、線維化領域の減少を認められた (2.6% vs. 1.4%, $P < 0.05$)。肝における炎症および線維化関連遺伝子の発現は EPA 投与により抑制された。NASH モデルマウスにおいて、EPA は肝臓の脂肪蓄積や炎症、線維化を抑制した。EPA 投与により、NASH の発症や進展を予防できる可能性が示唆された。

4 週間の高脂肪食負荷した MC4R-KO マウスに、ごく少量 (0.1 mL/kg) の四塩化炭素を単回投与し、投与 2 日後 2、4、7 及び 10 日後の肝臓を解析した。HE 染色により投与 2 日目には、風船様変性を呈した肝実質細胞が認められ、引き続き TUNEL 染色により、アポトーシス細胞が観察された。更に投与 7 日目には、F4/80 に対する免疫染色により、hepatic crown-like structures (hCLS) が確認され、引き続きシリウスレッド染色により、肝臓線維化が認められた。以上により、約 5 週間の短期間で、肝細胞風船様変性とアポトーシス細胞の増加とともに、炎症の慢性化と線維化の起点と考えられる hCLS の出現を経て肝臓線維化に至る過程が観察可能な「短期モデル」の確立に成功した。

新しい短期モデルの概要



71 DNA 修復遺伝子解析による抗癌剤効果予測因子の確立

掛地 吉弘

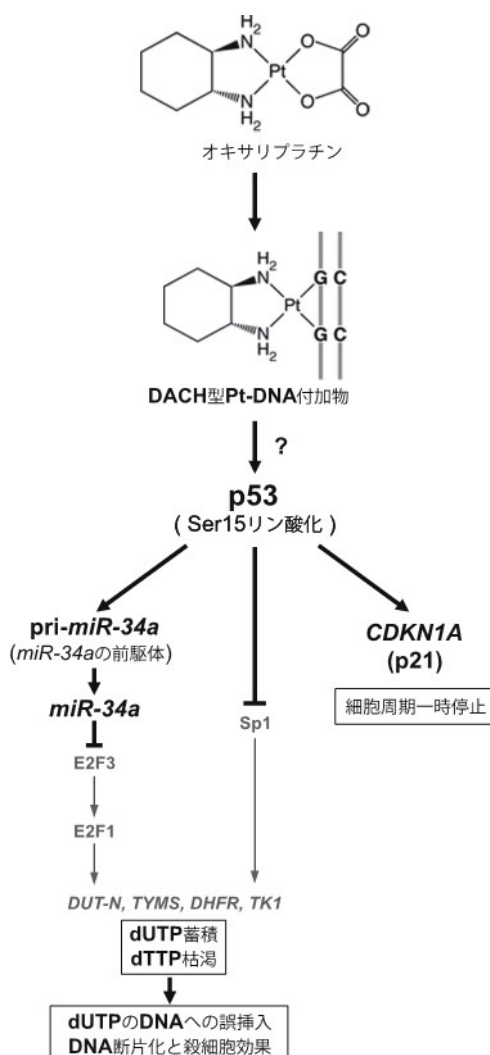
本研究の目的は、消化器癌の標準治療で用いられる 5-fluorouracil (5-FU) や Platinum (CDDP、L-OHP) について作用点を探索して感受性を規定している分子を同定し、治療効果の predictive marker の確立を目指すことである。

大腸癌における DNA 修復遺伝子 *FANCF* の過剰発現は MLH1 を介して癌細胞の 5-FU 耐性化を引き起こし、*FANCF* 発現が高い症例で 5-FU を含む術後化学療法の治療効果が少なくなることが認められた。

p53 が正常に機能するヒト大腸癌細胞株 HCT116 において、Trifluridine (FTD) 接触時に、1) 複製ストレス応答が活性化すること、2) その後 p53-p21 経路が活性化すること、3) 細胞はゲノム DNA が複製を完了した G2 期で停止し、M 期への進行が抑制されること、4) M 期進行に必須の CyclinB1-Cdk2 のタンパク量が消失することが明らかになった。

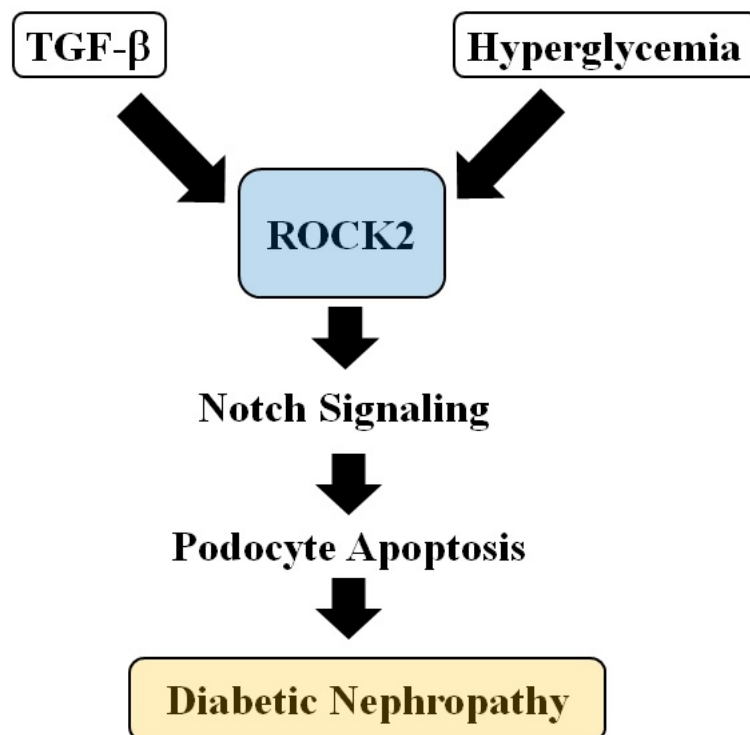
HCT116 にオキサリプラチンを曝露させると miR-34a 前駆体が誘導され、E2F1/核型 dUTPase が抑制され、dTTP 量は低下した。オキサリプラチン曝露による dTTP 枯渇は、5-FU (FdUMP) による TS 阻害時の dUTP/dTTP 量比増加をさらに亢進させ、dUTP のゲノム DNA への取込みを促進すると考えられ、DNA 鎖切断を介する細胞殺傷能、ひいては抗腫瘍効果を高めると予想された。

オキサリプラチンによる p53 活性化と抗腫瘍効果発現機序のモデル



本邦において糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。糖尿病患者の予後を規定するのは合併症であるが、その中でも糖尿病腎症（以下、腎症）は末期腎不全のみならず心血管疾患の危険因子であり、発症機序の解明が急務の課題となっている。糖尿病合併症に対しては血糖や血圧、脂質といったリスク管理が主体であり、特異的な治療が現在のところ存在しない。このような背景から、腎症の発症・進展を制御する因子の同定とその機能解析が求められている。我々は低分子量 G タンパク Rho とそのエフェクターである Rho-kinase (ROCK) が高血糖やインスリン抵抗性によって活性化し、メサンギウム細胞において炎症機転を惹起することにより糸球体硬化の形成を促進することを明らかにしてきた。しかしながら、糸球体上皮細胞（ポドサイト）において ROCK がどのような役割を果たしているかは明らかにされていない。本研究では、ROCK によるポドサイト調節機構について検討を行った。ポドサイトのアポトーシスは腎症にみられる特徴的な所見であり、Notch シグナルの活性化が関与することが報告されている。そこで、ROCK と Notch シグナルの関係に焦点を当てて解析を行った。培養ポドサイトを TGF- β で刺激したところ、Notch リガンドである Jag1 の発現レベルが亢進したが、ROCK 阻害薬および ROCK2 ノックダウンによって抑制された。同様に、糖尿病マウス腎皮質における Jag1 の発現が上昇し、アポトーシスマーカーの発現も増加していたが、ROCK 阻害薬を投与すると抑制された。これらの結果から、ROCK 中でも ROCK2 アイソフォームがポドサイト機能調節に関与し、腎症の発症・進展に重要な役割を担っていることが明らかにされた。

ROCK2 による糖尿病腎症発症機序



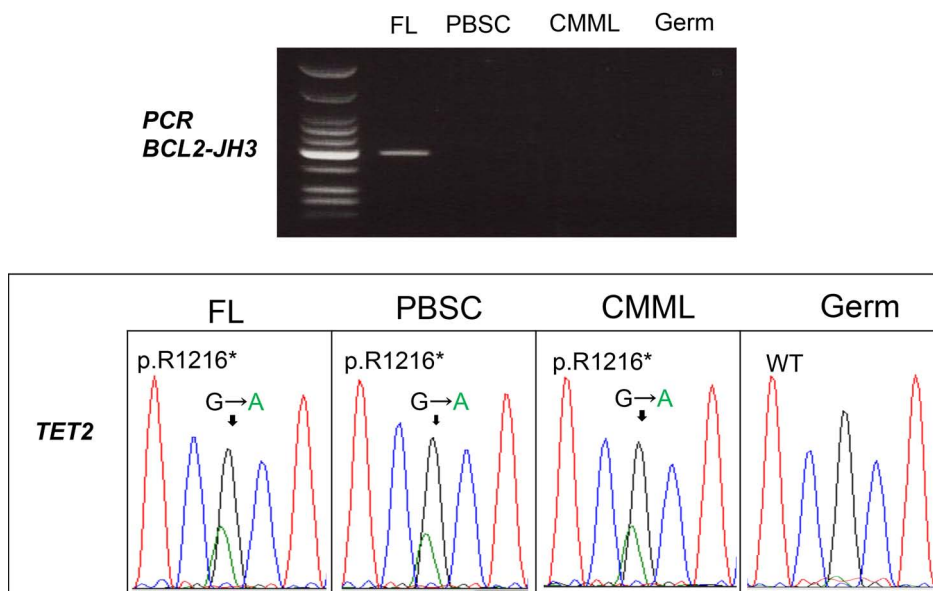
73 がん治療後に発症する二次性白血病の分子病態の解明

清井 仁

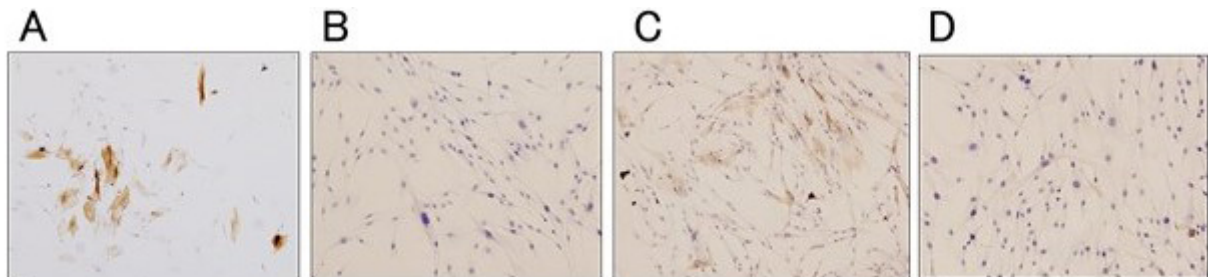
新規抗がん剤、分子標的薬、自己末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法への導入や放射線療法の進歩などにより、がん患者の予後は改善されている一方で、がん治療後に発症する二次性白血病の頻度が増加している。本研究では、治療関連二次性白血病の網羅的分子異常解析を *de novo* 白血病症例と比較しつつ実施するとともに、同定された遺伝子変異を有する Initiating/Founding clone の存在を正常血液細胞で高感度に検出することにより、発症基盤となる特徴的な分子異常や前治療特異的な遺伝子変異の蓄積様式について検討した。

治療関連二次性白血病では、*de novo* AML と異なり、*TP53* 遺伝子やエピジェネティクス関連遺伝子の変異が高頻度に認められ、遺伝子の不安定性や Initiating clone の存在がその発症基盤に関与していることが強く示唆された。悪性リンパ腫の治療後に二次性の骨髄性腫瘍を発症した2例において、一次性腫瘍と二次性腫瘍に共通する遺伝子変異の存在が同定された。1例では変異遺伝子は正常造血幹細胞中に同定され、もう1例では germline レベルでの変異が同定された。これらの結果は、二次性造血器腫瘍の発症機構には、複数の要因による遺伝子変異を有するクローンの存在が関与する可能性を示唆しており、更に詳細な検討を実施中である。

一次腫瘍、二次腫瘍、正常末梢血幹細胞で検出された *TET2* 遺伝子変異



近年、癌の治療抵抗性の要因として癌-間質相互作用が注目されているが、癌微小環境を構築する癌間質を標的とした治療が、今後の革新的な癌治療成績向上への鍵となると考えられる。難治性癌の代表格であるスキルス胃癌に象徴されるように、胃癌は腫瘍の増大に著明な間質増生を伴うことが特徴的であり、特に胃癌間質細胞の大部分を占める癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) の癌-間質相互作用における役割の解明と制御が重要である。本研究では、胃癌-間質相互作用の分子生物学機序を解明し、胃癌間質を標的とした新規分子標的治療薬創薬の基盤となる分子を同定するために、胃癌新鮮標本から Flow cytometry を用いて高精度な CAF を分離することを目的とした。スキルス胃癌および非スキルス胃癌症例の新鮮切除標本を摘出後速やかに処理し、癌部および非癌部組織から線維芽細胞を分離培養した。癌部から得た培養線維芽細胞を対象に FACS Aria™ を用いた細胞分離を行う。生細胞の状態での CAF を選別しうる表面マーカーとして fibroblast activation protein (FAP) を用い、分離後の線維芽細胞活性度の評価には α SMA による免疫細胞染色を用いた。分離された CAF より、total RNA、培養液上清 (Conditioned media: CM) を抽出した。CAF からの CM 付加の有無による胃癌細胞株の増殖能の変化を検討した。13 例の胃癌患者から得た癌部および非癌部の新鮮切除標本を細切・培養し、線維芽細胞を得た。8 例は限局型胃癌、5 例はスキルス胃癌であった。細胞表面マーカー FAP の発現度で線維芽細胞を Sorting し、活性型 CAF を分離した。分離後の線維芽細胞は培養可能であり、FAP 陽性 CAF 群では有意に α SMA 陽性率が高かった。FAP 陽性 CAF から得た CM 添加により、スキルス胃癌由来細胞株 (KATO-III、NUGC4) の増殖能が増加した。胃癌新鮮切除標本からの CAF を分離培養し、Flow cytometer を用いた細胞分離により活性型 CAF を高精度に収集した。活性型 CAF は共存するスキルス胃癌細胞の増殖を促進した。

Flow cytometry 後の α SMA 細胞染色

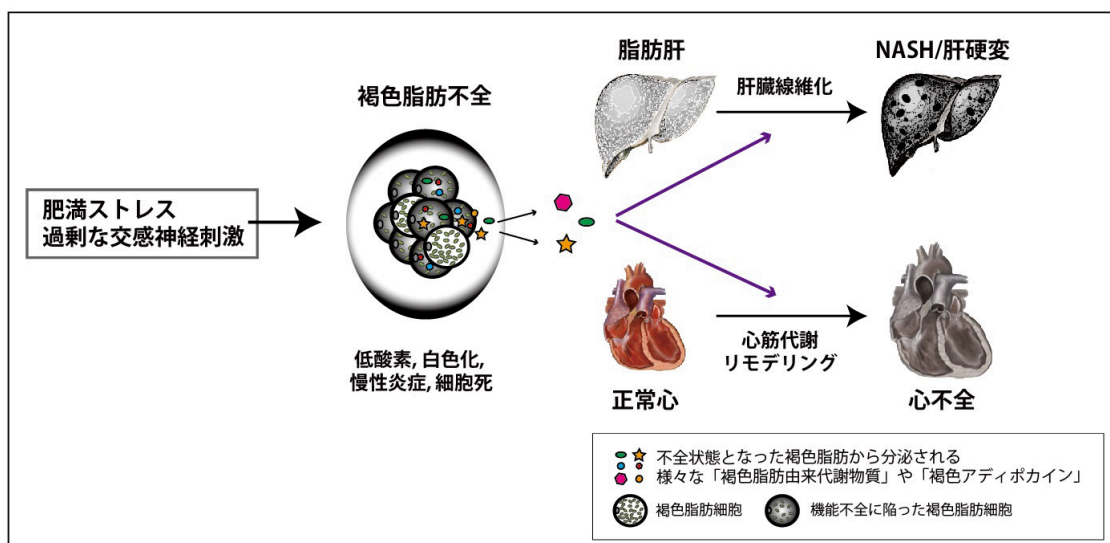
75 老化関連疾患における褐色脂肪不全の意義

清水 逸平

私はこれまで、肥満や糖尿病で白色内臓脂肪や褐色脂肪不全が生じることや、心不全時に白色内臓脂肪不全を介した全身の代謝異常が生じること、これらの老化疾患の病態が負に制御されることを明らかにしてきた。これらの研究を通して、心不全や糖尿病において全身の代謝不全を介して病態が促進するという共通の分子基盤があることがわかった。褐色脂肪組織は熱産生器官として当初認識され、全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器であることがわかってきた。1) 体温の低下が心機能低下や心不全の予後不良因子であること、2) 褐色脂肪不全を抑制すると心機能が改善することから (Shimizu I, unpublished data)、心機能低下に伴い褐色脂肪不全が生じ、褐色脂肪の恒常性を制御することで心不全を改善できる可能性が高いと考えられる。本仮説を検証した結果、心不全時に生じる過剰な交感神経刺激により褐色脂肪不全が生じ代謝不全に陥ること、褐色脂肪移植により心不全が改善することがわかった。褐色脂肪由来代謝物質が心筋代謝異常を起こす詳細な分子機序を現在も解析しているところである。

また、肥満に伴い非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症が増加するが、非侵襲的な診断法や特異的な治療法がなく、いまだ満たされない医療ニーズが存在する。本研究により、肥満ストレス下の褐色脂肪組織において線維化促進分子 ProteinX が存在することがマウスモデルで確認され、NASH 患者や肥満 NASH モデルマウスの血液中で 2 倍程度の上昇を確認することができた。ProteinX 過剰発現モデルマウスでは肝臓の線維化が促進されたため、ProteinX が NASH の非侵襲的な診断につながるバイオマーカーとしての有用性に加え、肝臓の線維化促進抑制による疾患特異的な治療標的となる可能性が示唆された。

褐色脂肪由来物質を介した NASH、心不全進展機序

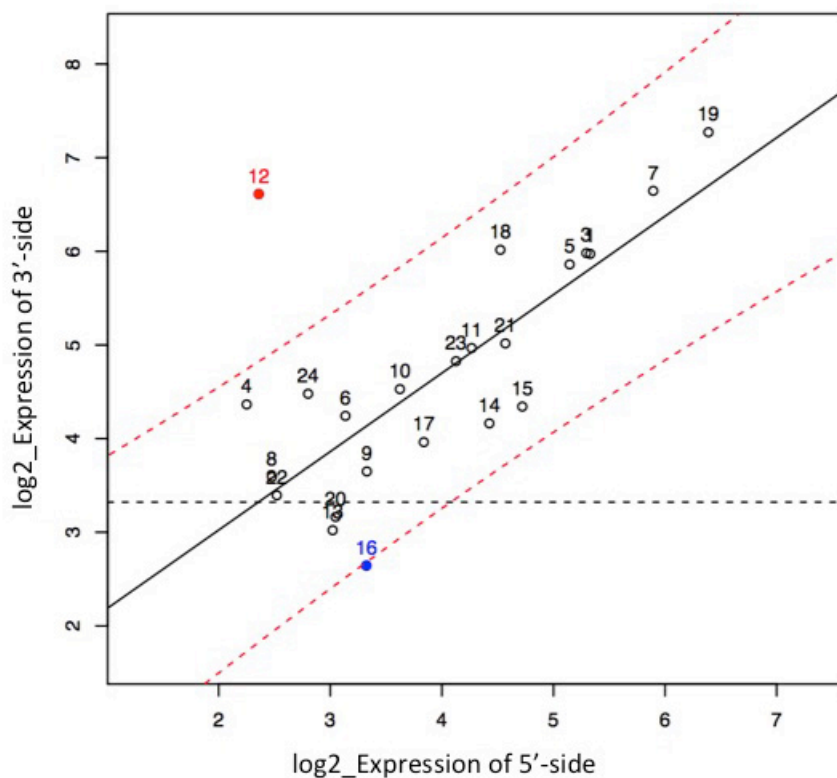


76 NanoString を用いた癌分子標的治療の開発

末原 義之

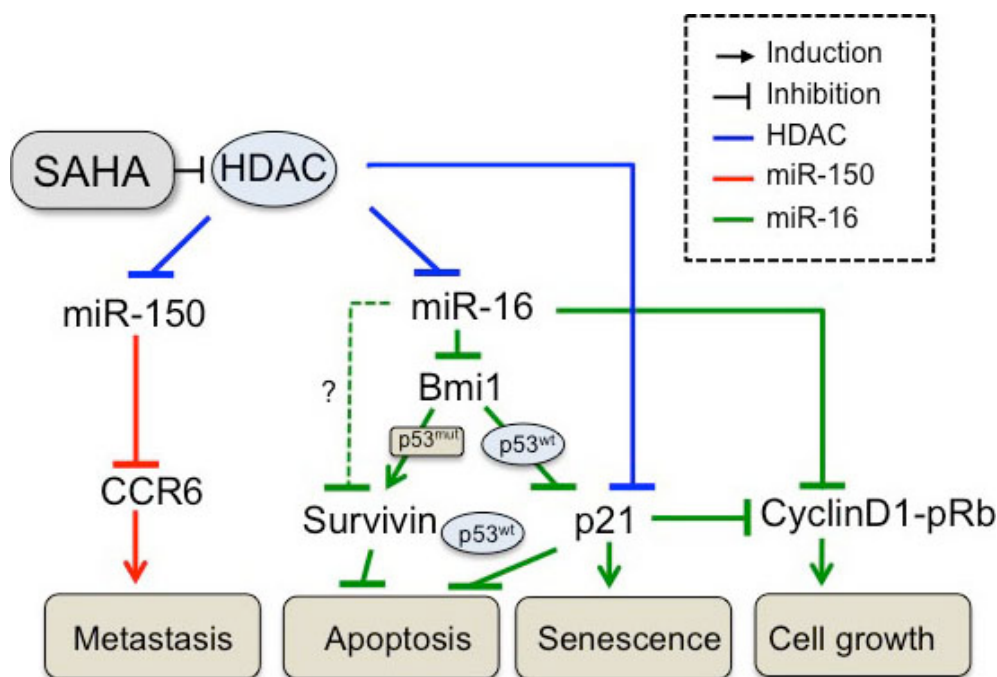
本研究では有効な分子標的治療薬が開発されていない全ての癌種の新規治療標的開発を目的とし、特に新規チロシンキナーゼ遺伝子変異に注目して探索を行った。方法は NanoString の手法に基づいた独自に開発したチロシンキナーゼ遺伝子変異解析システムを使用して、高精度かつハイスループットに全チロシンキナーゼ遺伝子に渡りその遺伝子変異及び遺伝子変異体の探索・同定を行った。有効な分子標的治療薬が開発されていない全ての癌種について解析を計画し、特に胸部悪性腫瘍、肉腫を中心に本研究では解析を行った。その結果として非喫煙肺腺がんにおいて A gene, B gene, C gene、胸腺がんにおいて D gene、後腹膜肉腫において E gene を新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補として同定した。本研究は順天堂大学呼吸器外科教室、呼吸器内科教室、人体病理病態学教室と協力して実験を行った。解析検体は胸部悪性腫瘍 160 例と肉腫 40 例に対して行い、各組織型において新規チロシンキナーゼ融合遺伝子及び遺伝子変異体候補の同定を行った。

本解析によりデータより同定された候補遺伝子



初発のがんは新たな多剤併用化学療法の改良、分子標的治療の進歩によって予後は大幅に改善されたが、転移や多臓器への浸潤を来す進行・再発性がんは依然として予後不良である。従って進行症例に対する新たな治療戦略が求められている。本研究では、転移性がん、特に転移性の皮膚浸潤性 T 細胞リンパ腫 (CTCL) やその他の T 細胞リンパ腫を研究対象にし、従来とは異なった遺伝子病因学的アプローチにより「microRNA 創薬」の開発を模索した。まず、腫瘍期 (進行期) CTCL における miRNA の異常を探索するため、発現解析を行ったところ、発現低下を示す 2 つの miRNA (miR-16、miR-150) を同定した。これらは腫瘍期の病態に密接に関わる miRNA であると考えられた。我々は「CTCL 細胞を NOG マウスに皮下移植し移植後 35 日前後で多臓器浸潤により死亡する (CTCL マウス)」 *in vivo* 実験系を確立したが、その実験系を用いて miR-150 や miR-16、あるいはその 2 つを経静脈的に CTCL マウスに投与すると生存期間が有意に延長することを見いだした。miR-150 は複数のケモカイン関連蛋白を制御し多臓器浸潤する。また、miR-16 が複数の分子を制御して CTCL 細胞に細胞老化やアポトーシスを起こすことを見いだしている。これらの miRNA はヒストン脱アセチル化阻害剤である vorinostat/SAHA により発現回復してくることも明らかにした。この結果は、miRNA の発現低下が、ヒストンア脱セチル化により生じていることが示唆される。本研究は CTCL を始めとする転移性リンパ腫の病態に密接に関わる miRNA の同定とその治療応用のための基礎的研究である。

CTCL における miR-16 と miR-150 の CTCL 腫瘍病態における役割



78 脂肪細胞由来細胞シートを用いた心筋再生療法の開発

西村 元延

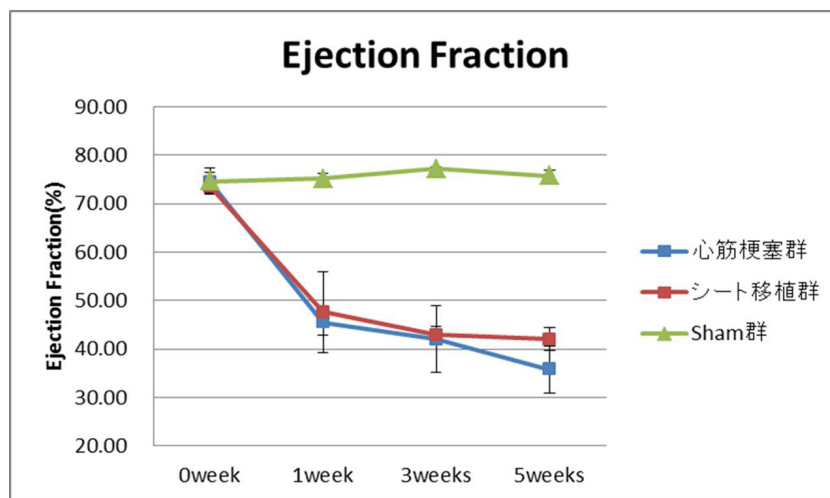
現在、薬剤耐性の重症心不全に対する治療法は補助人工心臓の装着または心臓移植が必要であるが、この治療を受けることができる患者は限られている。そこで、この治療法の新規代替法として、幹細胞と組織工学技術を併用した再生医療法が心不全の治療として期待されている。

血管新生因子を分泌する脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Derived Stem Cells: ADSCs) が再生医療の新たな細胞源として注目されている。本研究は組織工学技術を併用した ADSCs が心筋梗塞後の心不全での心機能を改善できるという仮説を立て、ラットの心筋梗塞後の心機能に及ぼす ADSCs シートの効果の検証を目的とした。

ラット脂肪から ADSCs を単離し温度感受性培養皿を用いて細胞シートを作製し、冠動脈の左前下行枝を結紮することによって作製した心筋梗塞一週間後のラット心臓に移植し、心エコー、ランゲンドルフ灌流法ならびに組織学的検討を移植前、移植後 2 週間、4 週間でいった。結果、ADSCs シート移植群において、左室駆出率 (EF)、左室短縮率 (FS)、左室収縮末期径の有意な改善が見られた。移植後 4 週間でランゲンドルフ灌流実験を行い、ランゲンドルフ灌流を用いた心機能の測定とイソプロテレノールに対する反応性の評価を行ったが、その反応性は、心筋梗塞群と ADSCs シート移植群の間に差は見られなかった。心筋梗塞群に比較して、ADSCs シート移植群ではマッソントリクローム染色により定量化した線維化領域が有意に減少し、抗 von Willebrand Factor 抗体による免疫染色により定量化した血管数の有意な増加が見られた。

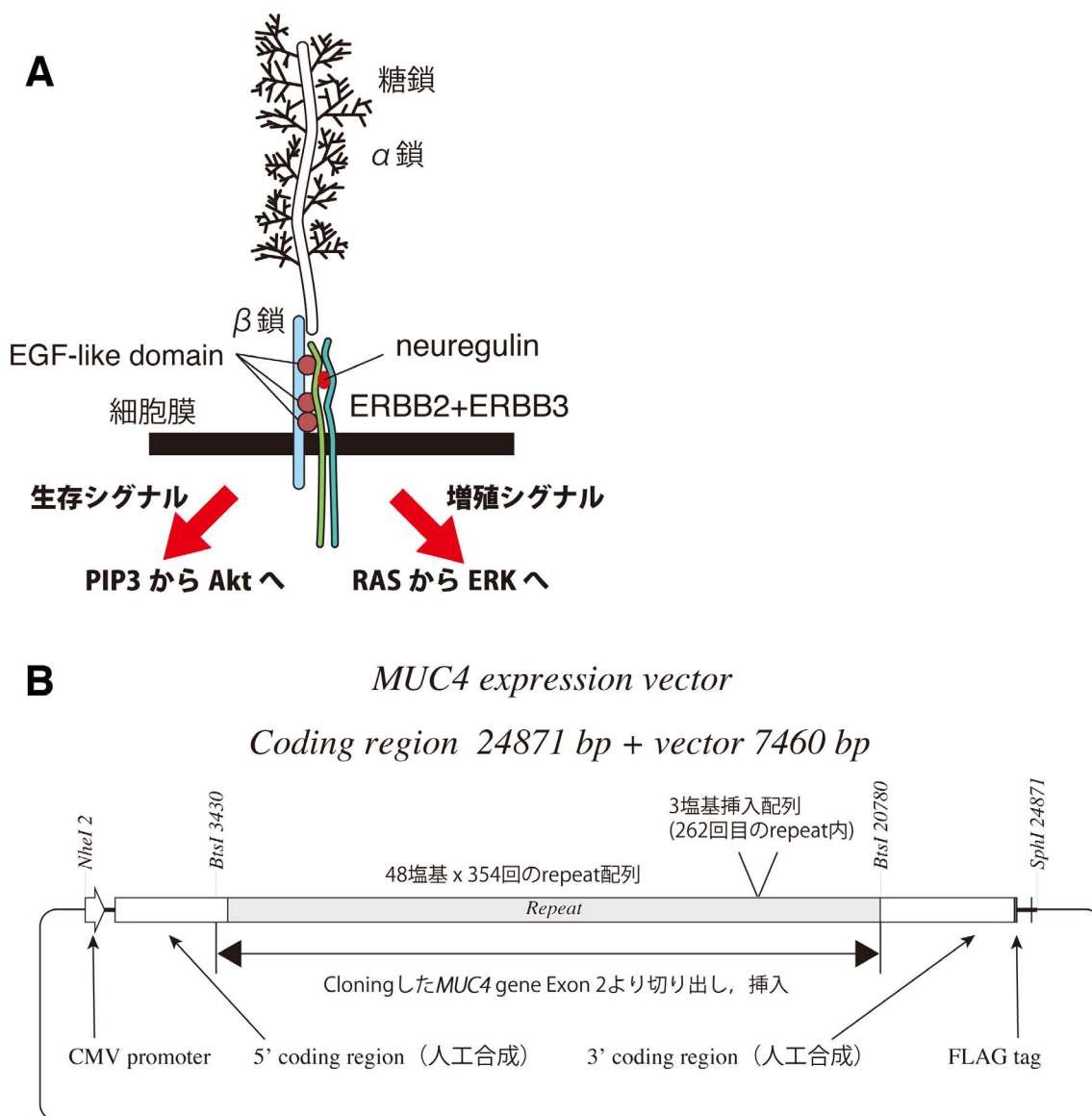
以上の結果から、ADSCs シートは線維化を抑制し、血管新生を促進することにより、心筋梗塞後の心機能を改善することが判明した。

脂肪幹細胞シートによる心機能改善作用



上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) による薬剤性肺障害・間質性肺炎は致死性病態であり、びまん性肺胞障害の病理型を取る。日本人にはほぼ特異的に見られ、他のアジア人、西欧人にはほとんど見られない。そのため、海外での治験時には問題とされなかったが、国内での使用とともに多数の患者が薬剤性肺障害・間質性肺炎で死亡し、「薬害イレッサ訴訟」として社会問題になった。この後、殺細胞性抗癌剤投与、胸部手術、肺への放射線照射でも、日本人のびまん性肺胞障害頻度は海外より高いことが明らかになってきている。明確な民族差は、遺伝子の関与を示唆する。我々は、原因遺伝子同定を目的としてエクソーム解析を施行、民族差を説明でき、肺で発現し、疾患原因となる機能・構造を有し、患者で異常配列を有する遺伝子として *MUC4* 遺伝子を同定した。*MUC4* はムチンとシグナル伝達分子が融合した分子構造を有する。コード領域が 24 kb と長大で、コード領域内に 48 塩基×300 回の繰り返し配列を持ち、通常の遺伝子工学操作は困難である。*MUC4* の肺障害における役割を検討するため、発現ベクターの構築を行った。

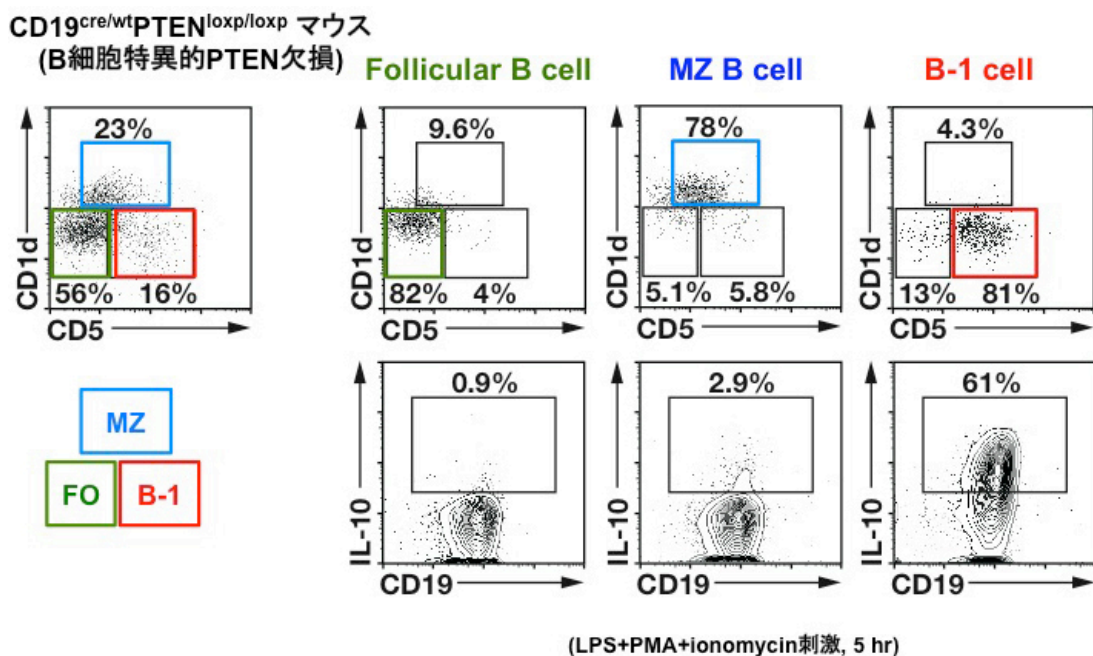
MUC4 の構造と発現ベクター



Repeatを安定的に保持するため、大腸菌1細胞が1コピーのみ保持するFosmidで作製

近年、B 細胞の中に抑制性の機能をもつ制御性 B 細胞が存在することがわれわれや他のグループから報告され、その役割が注目を集めている。制御性 B 細胞は様々な疾患において重要な役割をもっており、有効な治療標的となることが期待できる。そこで、制御性 B 細胞による免疫抑制の分子メカニズムを解析するために、制御性 B 細胞のシグナル伝達機構に関する本研究を行った。本研究では、野生型 C57BL/6 マウスおよび C57BL/6 バックグラウンドの Cd19Cre^{+/+} マウス、Pten^{loxP/loxP} マウス、および μ MT マウスを使用し、*in vivo* の皮膚疾患モデルとして接触過敏反応の系を用いた。本研究では、マウスにおける新しい制御性 B 細胞サブセットである B1-B10 細胞を同定した。また、従来から報告されている MZ-B10 細胞と共通の細胞表面マーカーとして CD9 陽性 CD80 陽性の表現型を明らかにした。これらの制御性 B 細胞を標的とした新規 B 細胞療法についてさらに検討中であり、今後明らかにしていきたい。

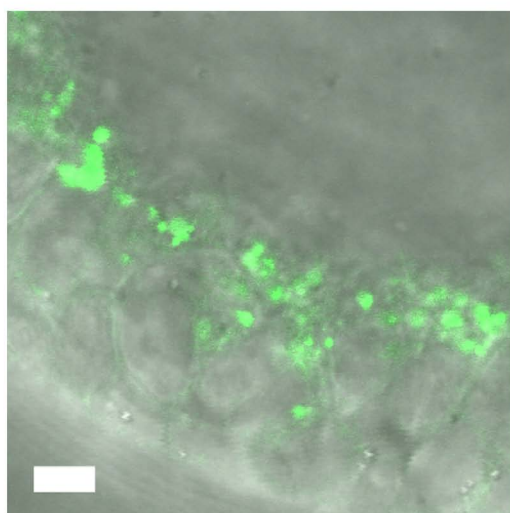
B 細胞特異的 PTEN 欠損マウスにおいて見いだされた新しい制御性 B 細胞サブセットである「B1-B10 細胞」



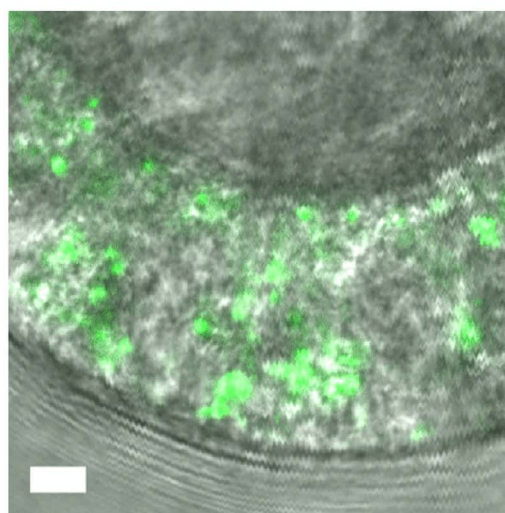
肺は再生能力の乏しい臓器であり、ヒト由来の呼吸器上皮細胞を作ることができれば、様々な研究に利用できる。本研究では無限増殖能と分化多能性を持つヒト iPS 細胞を用いて、呼吸器上皮細胞の分化誘導法を確立し、呼吸器難病研究に役立てることを目的とした。まず、ヒト iPS 細胞から肺胞上皮細胞や気道上皮細胞に効率よく分化させる方法を確立した。そして、先天性の肺線維症を呈するヘルマンスキー・パドラック症候群 (HPS) 患者から iPS 細胞を樹立し、試験管内での病態再現を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞から様々な呼吸器上皮細胞を効率よく分化させる方法を確立することができた。HPS 患者から樹立された iPS 細胞は健常者由来の iPS 細胞と同様に II 型肺胞上皮細胞まで段階的に分化させることができた。HPS 患者由来の iPS 細胞から分化した II 型肺胞上皮細胞は、健常者に比べて細胞内顆粒の異常な分布を呈していた。

LysoTracker™ で細胞内小器官を標識された II 型肺胞上皮細胞の比較

健常者由来 iPS 細胞(604A1)から
分化させた II 型肺胞上皮細胞



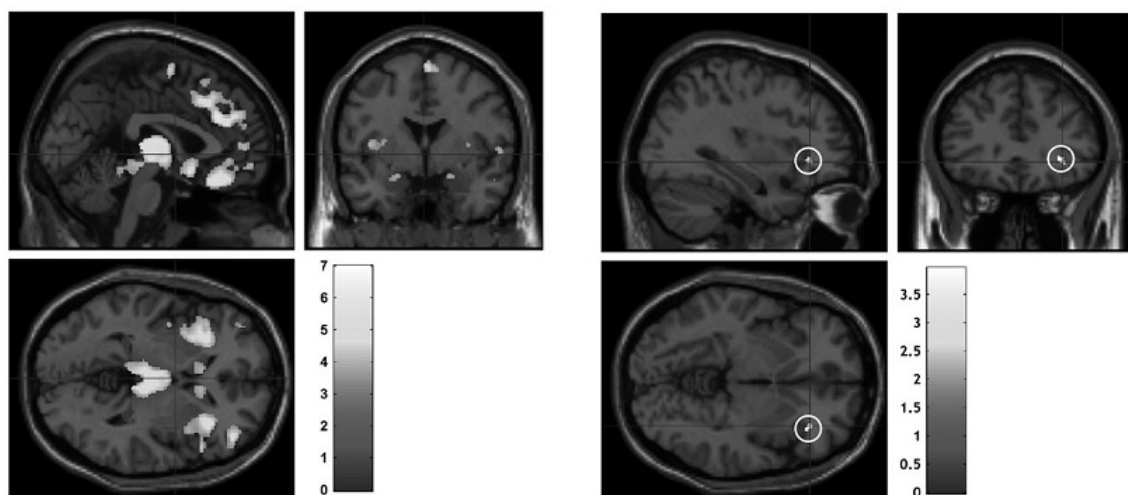
HPS2(AP3B1)に変異有する
ヘルマンスキー・パドラック
症候群患者由来 iPS 細胞から
分化させた II 型肺胞上皮細胞



Scale bar, 5 μ m

統合失調症治療において Quality of Life の改善は重要な指標であるが、その神経基盤は明らかではない。今回われわれは 統合失調症の 客観的 QOL に脳形態変化が与える影響を 33 名の統合失調症患者群及び 42 名の 健常群を対象とし、MRI 画像からの定量的局所体積評価方法である Voxel-based Morphometry によって検討した。患者群では前頭皮質を中心とした広汎な領域の灰白質体積減少を認めた。この領域内において、QOL のそれぞれの下位尺度と局所灰白質体積の相関を調べたところ、客観的 QOL 「社会的役割」下位得点と右前島皮質灰白質体積が有意に相関すること、ならびに陰性症状がこの相関を媒介することが見出された。本研究結果は主観的 QOL と関連する脳領域および症状について検討したわれわれの先行研究結果とは異なり、両者の神経基盤がその局在において異なる可能性が示唆された。

統合失調症群での灰白質体積減少部位（左）と
同群での灰白質体積と QOL サブスケール「社会的役割」との相関（右）



食道・頭頸部 (UADT) には扁平上皮癌が多発する頻度が高いが、その分子生物学的機序は不明である。ゲノム全体の低メチル化は食道発癌に関わるが、その指標である Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1) のメチル化を解析し、喫煙・飲酒などの環境因子の暴露による癌多発にゲノムワイドなメチル化が関与するか否かを検討した。一方、若年者の癌は過剰な環境因子への暴露が関与する可能性があるが、食道癌においてはリスク因子や多発癌との関連は明らかでない。今回、若年発症食道癌の臨床的特性も検討した。

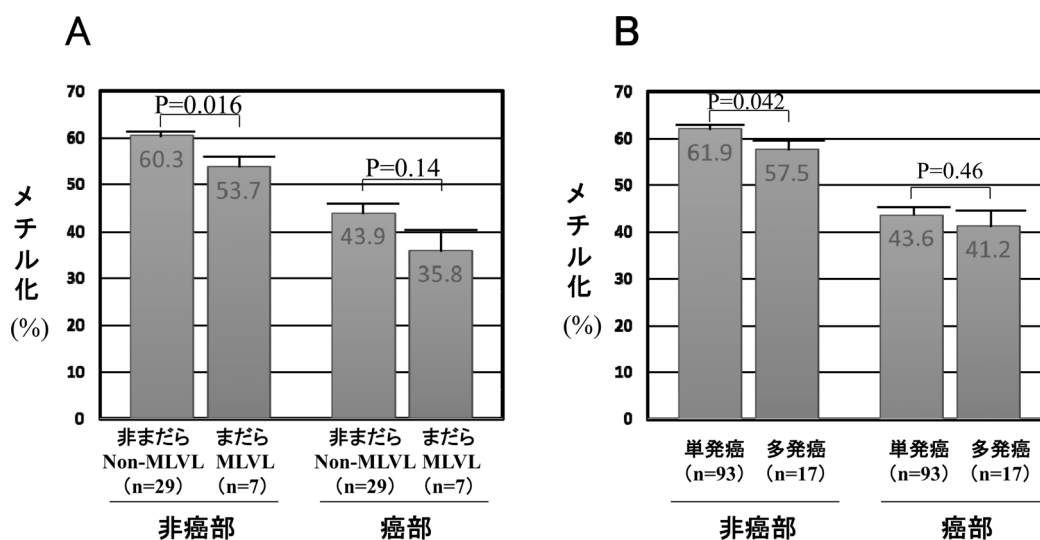
その結果、食道癌症例における非癌部食道における LINE-1 メチル化レベルと喫煙およびアルコールへの暴露量とは有意に逆相関の関係があった。さらに、ルゴール染色による不染帯の多発 (“まだら食道” multiple lugol voiding lesion: MLVL) と食道全割切片の鏡検による癌多発の検索のいずれの検討においても、食道内癌多発は非癌部のメチル化レベルの低下と関係していた。一方、若年発症 (50 歳未満) の食道癌の解析では、若年群は対照群に対し、食道多発癌、頭頸部癌合併ともに有意に多く、とくに若年発症の頭頸部癌合併例は、全例重喫煙者あるいは大酒家であった。

以上より、喫煙・飲酒等の環境因子への暴露が食道粘膜にゲノムワイドな低メチル化を惹起し、その結果、UADT に発癌の母地を形成し多発癌の発生につながる可能性が示唆された。また、過度の環境因子への暴露は若年者の UADT の多発癌発生にも関与すると考えられた。

癌多発からみた食道癌部および非癌部における LINE-1 のメチル化

A) ルゴール染色を用いた食道内視鏡所見による検討

B) 食道全割切片の鏡検にもとづく検討



[目的および背景] 原発性肺癌は世界の癌死亡原因の第一位であり、新しい治療法や予防法の開発が急務である。Sir2 (silencing information regulator 2) は NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、寿命を制御する重要な因子として機能する。ヒトにおける Sir2 のホモログの一つである SIRT1 は、ヒストン以外にも増殖調節やストレス反応、アポトーシスに関連した様々な蛋白もジアセチル化し細胞分化や寿命や老化の制御に関わり、SIRT1 を活性化あるいは抑制することで腫瘍を抑制出来る可能性がある。

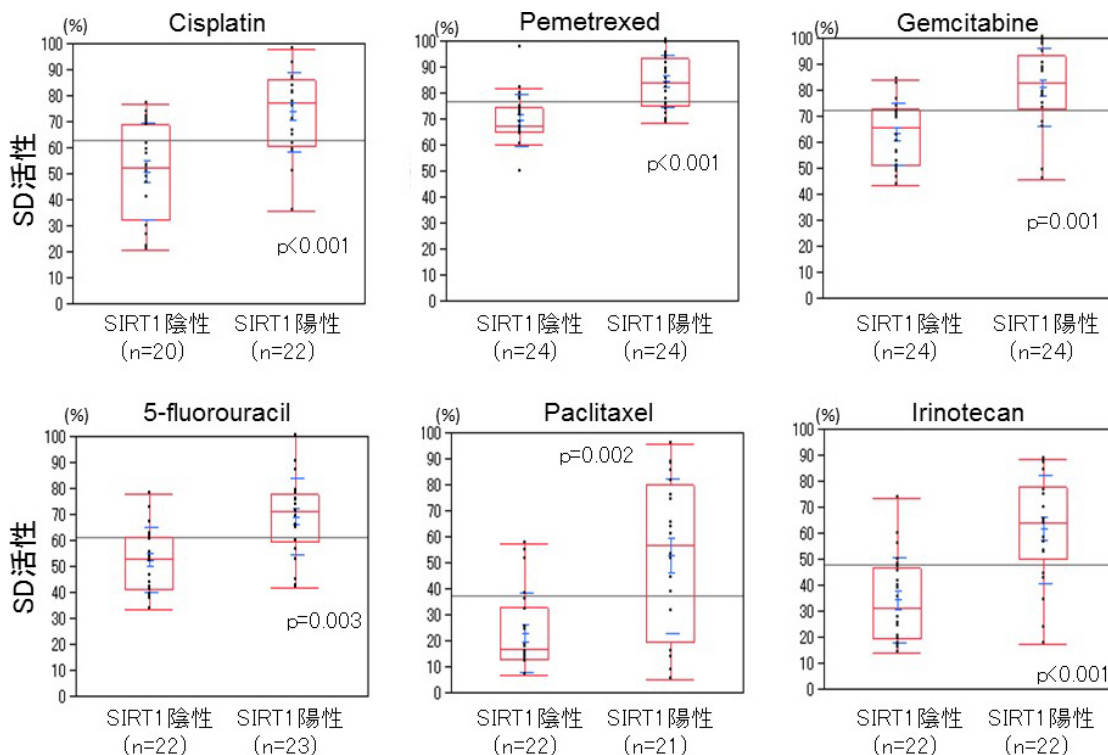
本研究では、細胞寿命制御に関わる SIRT1 に注目し、非小細胞肺癌における分子発現・作用を解明し新規の分子標的治療薬への開発を行うことを目的とした。

[方法および結果] 原発性肺癌切除例 63 例の外科切除標本を用いて、SIRT1 の発現を免疫組織化学染色法にて評価した。非癌部肺組織には SIRT1 の発現は認められなかった。腺癌組織では 49 例中 24 例で核内発現を認め、扁平上皮癌 14 例では発現症例は 2 例のみであった。次に、新鮮切除標本から癌細胞浮遊液を作製し SDI (Succinate Dehydrogenase Inhibition) 法にて *in vitro* 抗癌剤感受性を評価し、SIRT1 発現と抗癌剤感受性試験結果との関連を調べた。SIRT1 陽性腺癌症例は検索したすべての抗癌剤に対して SIRT1 陰性症例に比較して有意に薬剤耐性を示した。

肺腺癌細胞株 5 種、肺扁平上皮癌細胞株 4 種を用いた SIRT1 の発現量は細胞株ごとに様々であった。SIRT1 低発現腺癌株 2 種は cisplatin に対して高い感受性を示した。siRNA (GE Dhamacon) を用いた SIRT1 ノックダウン実験では、cisplatin ならびに pemetrexed による p53 のアセチル化が亢進し、pemetrexed による Bax 発現も亢進した。しかし、cisplatin、pemetrexed に対する感受性には変化なかった。

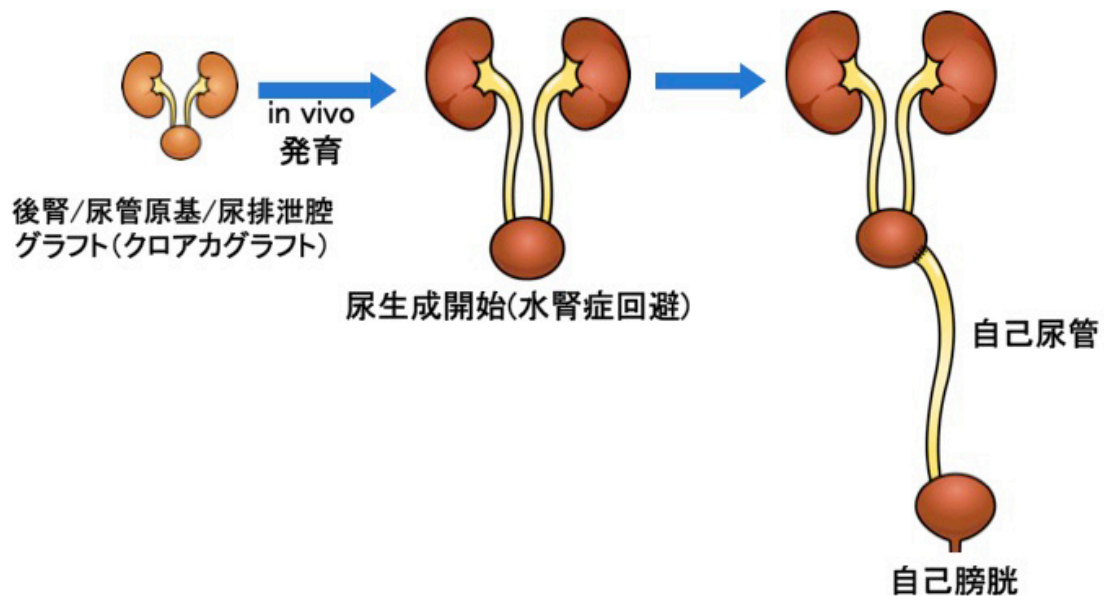
以上より、SIRT1 は腺癌により選択的に発現し抗癌剤耐性に関連があるが、抗癌剤耐性に直接的には影響していないことが示唆された。

腺癌における SIRT1 発現と抗癌剤感受性との関連



我々はこれまで自己間葉系幹細胞を発生中の異種胎仔の腎臓発生ニッチに注入することにより腎臓系譜に分化させ尿生成能を獲得した再生腎臓の作製に成功している。しかしこの再生腎臓は尿路がないため尿生成量が多くなるにつれ水腎症に陥り、約4週後から徐々に腎機能が廃絶してしまうことが問題となっていた。そこで今回再生腎臓が生成した尿を効率良く排泄させる経路の開発を行った。発生の過程で既に尿管原基は発生中の後腎からの尿量に応じた蠕動運動を開始し、これによりさらに後腎発生が促される。このため単純に拡張した尿管と自己膀胱を人工尿管で接続するだけでは尿は排泄されないことが確認された。そこでラット尿管原基とともに尿排泄腔と後腎組織（クロアカグラフト）を移植し、尿排泄腔に尿の貯留が認められる4週後に自己尿管を接続した。これにより4週後も水腎症が生じることなく尿排泄が継続し、8週後には自尿の30%までクレアチニン、BUNを濃縮するまでの機能を獲得することに成功した。このシステム（SWPU: Stepwise peristaltic ureter）はブタのクロアカグラフトを用いても同様に機能することが確認された。本法は再生腎臓の尿排泄系として他のシステムで再生された腎臓にも活用可能であり汎用性が高いと考えられ、腎臓再生医療の臨床応用に向けて一つの課題を克服できたと考えられる。

Stepwise peristaltic ureter (SWPU) システム



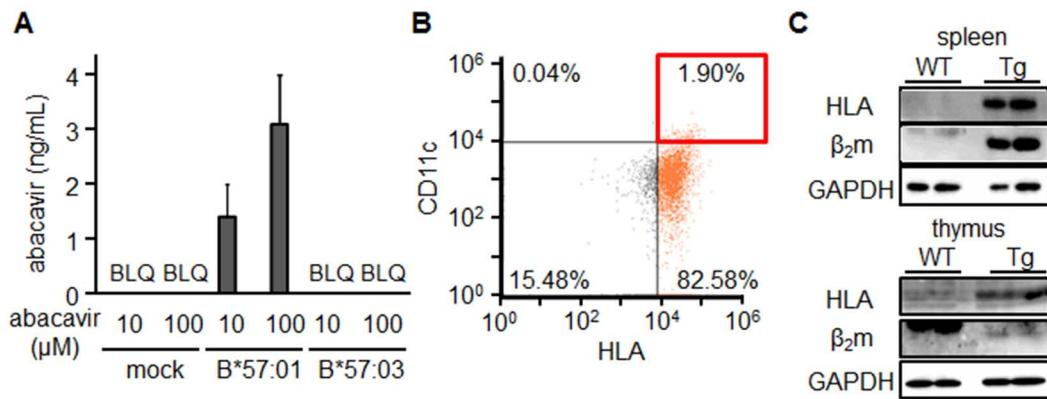
特異体質性の薬物毒性は医薬品の開発段階で見出すことは困難であり、その発現予測ならびに機序解明は、重要な課題である。近年、特異体質薬物毒性の発症とヒト白血球抗原 (HLA) との関連性が数多く報告されていることから、我々は HLA を発現する遺伝子改変マウスを作出し、特異体質毒性を動物で再現すること、さらにその機序を明らかにすることを目的に、特に *HLA-B*57:01* 多型に焦点を当てて研究を行った。

ヒト HLA をマウス体内で安定的に発現させるために、一部ドメインをマウス型に改変したキメラ型とすること、および共役タンパク質である β_2 ミクログロブリン (β_2m) を共発現させることを可能とするベクター構築を行った。そのキメラ型 HLA-B*57:01 タンパク質は抗ウイルス薬であるアバカビルと特異的に相互作用することが確認された。また、キメラ型 *HLA* 遺伝子導入マウスの組織・臓器 HLA 発現を調べたところ、免疫担当細胞である樹状細胞に発現が認められ、さらに検討した各種臓器においても導入 HLA タンパク質の発現を観察することができた。

今後、本マウスを用いた、薬物曝露時の毒性発現の再現など、臓器特異性を含めた毒性惹起にいたる機序解明が期待される。

キメラ型 HLA タンパク質の機能確認とその導入マウスにおける HLA 発現

A) キメラ型 HLA-B*57:01 タンパク質とアバカビルとの相互作用 (BLQ: 定量下限以下、サンプル数: 3、誤差範囲: SD)、B) キメラ型 *HLA-B*57:01* 遺伝子導入マウスより単離・精製した末梢血単核細胞 (PBMC) 中のリンパ球における HLA 発現 (CD11c: 樹状細胞マーカー)、C) キメラ型 *HLA-B*57:01* 遺伝子導入マウスより単離した脾臓および胸腺における導入 HLA および β_2m タンパク質の発現。



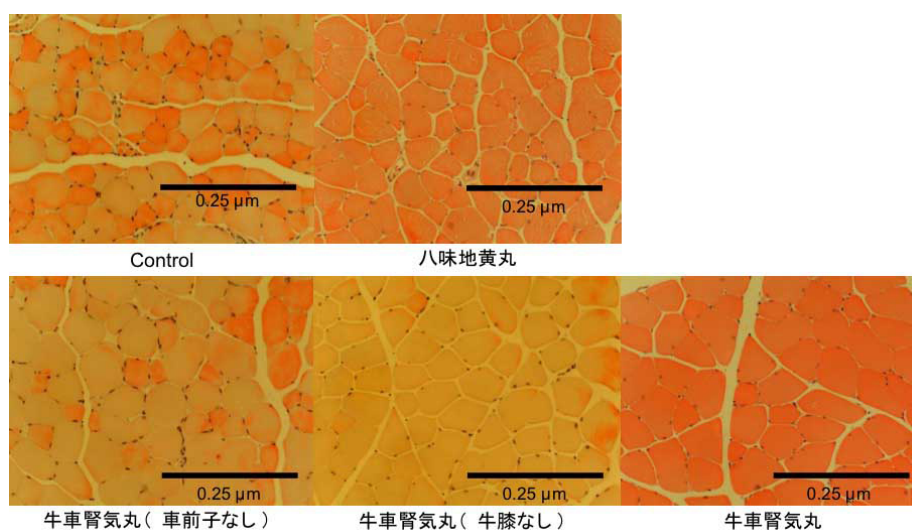
加齢による筋力の低下を主な症状とするサルコペニアは未だに効果的な予防・治療方法は確立されておらず、その対策が急務となっている。これまでに、老化促進マウス（SAMP8）でみられる骨格筋萎縮に対して牛車腎気丸エキスの予防作用が報告されている。本研究では、牛車腎気丸に含まれる各生薬の寄与を検討した。

牛車腎気丸と、それを構成する生薬の一部からなる六味丸、八味丸を構成する各生薬の混合物の熱水抽出エキスを粉末飼料中に混合した食餌を用いて、SAMP8（オス）を9～15週齢の間、飼育した。また、マウス骨格筋由来C2C12細胞に対してデキサメタゾンを追加した時のMuscle ring finger protein-1（MuRF1）転写活性に対する牛車腎気丸構成生薬の抑制作用を検討した。

牛車腎気丸エキスを投与した群では有意な筋繊維断面積の回復が、八味地黄丸エキスでは回復傾向が見られたが、六味丸エキスでは有意な効果は見られなかった。また、牛車腎気丸投与群では、コントロール群と比較して血清中のInsulin like growth factor（IGF）-1の濃度が有意に増加したが、八味丸投与群では、IGF-1の増加が見られなかった。牛車腎気丸を構成する10種の構成生薬のうち、附子、山薬、車前子の各エキスにおいて、濃度依存的に有意なMuRF1の転写活性に対する抑制作用が認められた。

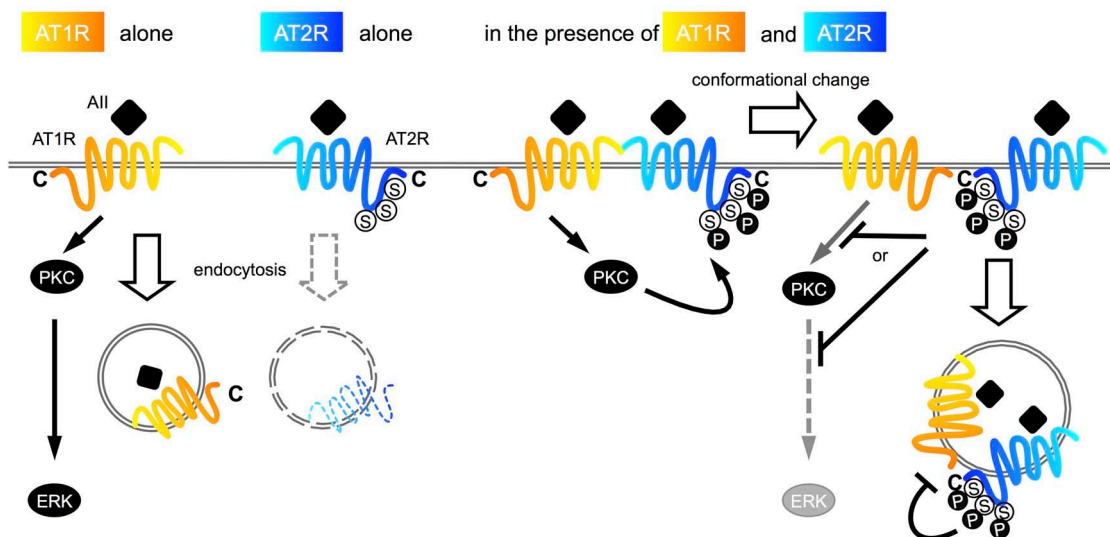
以上のことから、牛車腎気丸を構成する生薬のうち、車前子が骨格筋萎縮を保護する作用をもつことが推測された。

老化促進マウスを用いた牛車腎気丸関連処方エキスの筋萎縮抑制作用



アンジオテンシン II (AII) 2 型受容体 (AT2R) は 1 型受容体 (AT1R) シグナルを負に制御する。しかし、その分子メカニズムの詳細は未知な点が多い。本研究では、AT1R と AT2R がエンドソームにおいて複合体の構造変化が生じ、両者の機能的相互作用が生じることを明らかにした。AT2R は AII 非存在下でも細胞膜で AT1R と共局在し複合体を形成した。FRET を用いた解析により AII 刺激によって、複合体の内化化とともに AT1R と AT2R の空間的配置が変化した。AT2R の内化化は、AT2R 単独では生じず、AT1R 存在下でのみ観察された。AT1R 特異的阻害薬は AT1R と AT2R の内化化と構造変化の両方を完全に抑制し、AT2R 阻害薬は部分的に抑制した。すなわち両方の受容体の活性化がこれらの現象に不可欠であることが示された。さらに、プロテインキナーゼ C 阻害薬はエンドソームにおける AT1R と AT2R の共局在を阻害した。AT2R の PKC によるリン酸化予想部位に変異を導入したところ、AT1R と AT2R の同内化化および TR2 による AT1R 阻害効果が抑制された。これらの結果、AT2R が PKC 依存性経路を介したシグナル伝達により、リガンド依存性の AT1R をシグナルをエンドソームにおいて阻害すること、エンドソームが AT1R と AT2R 間のシグナル調節におけるプラットフォームとして機能することを示している。

AT2R による AT1R シグナル抑制機序の模式図



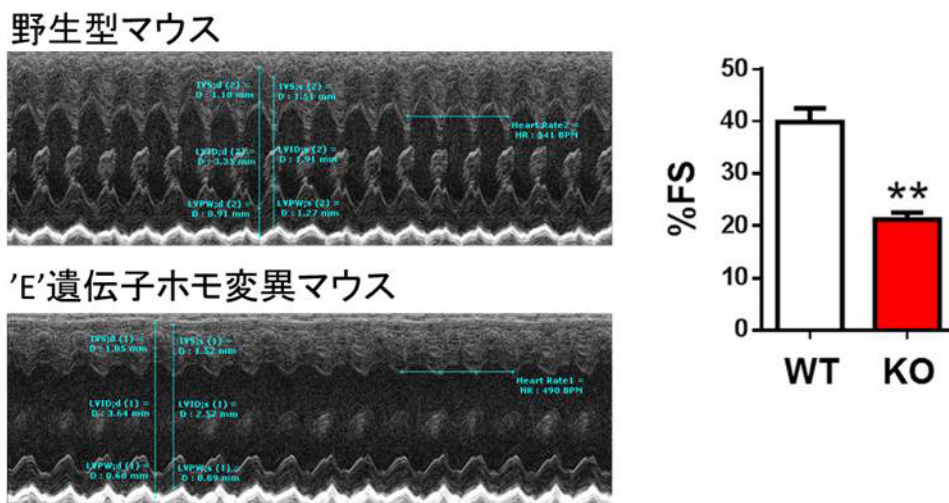
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位の運動ニューロン変性により、全身の筋力が低下する神経難病である。依然として病態が解明しておらず、治療法も確立していない。これには、実際の ALS 病態を反映したモデル動物の開発が重要である。ほとんどの ALS の変性部位では *TARDBP* 遺伝子がコードする TDP-43 が不溶化して蓄積しており、また稀ではあるが、*TARDBP* 遺伝子に点変異が見つかることもある。今回我々は、新たな ALS モデル動物の開発を目指し、ゲノム編集によって *Tardbp* 遺伝子に点変異を挿入した遺伝子改変マウスを作製し、約 1 年に渡って表現型を解析した。その結果、ホモ接合体において生後 4 ヶ月程度から上位運動ニューロン症状が認められ、10 ヶ月程度から下位運動ニューロン症状が観察された。ヘテロ接合体においても、ホモ接合体に比べ経過は緩徐であるが、やはり同様の症状を呈することが分かった。今後は、運動機能の定量化や病理学的解析を行って ALS 病態との類似性を検証し、汎用性の高い新規モデル動物として確立する。

Tardbp 点変異マウスに認められる clasping 姿勢
(右の同胞野生型には認められない clasping が、左のホモ接合体に認められる)



高血圧、動脈硬化、虚血性心疾患など心不全の原因疾患の研究が精力的に進められてきた一方で、心不全病態そのものの発症、増悪の分子機構には未だ不明な点が多い。私達は、これまでに大規模なショウジョウバエの心筋特異的 RNAi ノックダウンライブラリーを用いた *in vivo* 心不全スクリーニングを行った (Cell 2010)。また、私達は独自の ES 細胞を用いた G0 遺伝子欠損マウス作製系と CRISPR ゲノム編集技術を組み合わせた遺伝子改変マウスの作製、機能解析システムを確立してきた。本研究では、RNAi スクリーニングで見出された生理機能が不明な心不全関連の候補遺伝子群について、ゲノム編集マウスを作製し、心エコーや心電図による心機能解析を行い、これらが心機能調節に重要な遺伝子であるかどうかについて検討を行った。さらに、G0 マウスのみならず交配を重ねて F2 世代の遺伝子欠損マウスを作製して心機能解析を行い、候補遺伝子が成体の心臓の収縮力維持に寄与することを明らかにした。また、ゲノム編集を活用したノックイン技術により内因性タンパク質に FLAG タグを付加し、抗 FLAG 抗体により内因性タンパク質を免疫沈降させ、心機能調節に寄与する RNA 代謝因子複合体のサブユニットの stoichiometry を明らかにした。今後、本研究による成果は、心不全発症、増悪の分子病態の解明に貢献し、新しい治療法の開発につながる事が期待される。

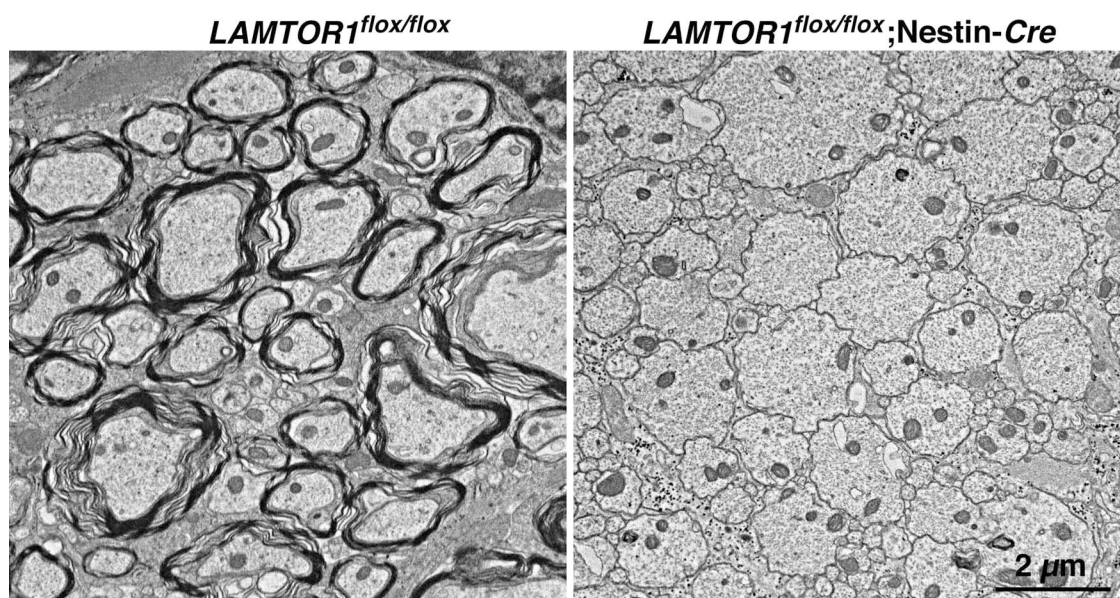
心エコーによるマウス心機能測定



mTOR (mammalian target of rapamycin) は、セリン/スレオニンキナーゼであり、過栄養や成長因子の刺激により活性を上昇し、細胞増殖や代謝機構を調節する。mTOR はラパマイシンにより抑制される mTORC1 (mTOR complex1) とラパマイシン非依存的な mTORC2 の 2 種類の巨大複合体を形成し、それぞれ異なる機能を有している。

我々の研究室では、mTORC1 の活性化に必須であるリソソーム膜結合タンパク質である p18/LAMTOR1 (late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1) の中枢神経系特異的遺伝子欠損マウスを作製したところ、振戦などの神経症状を呈し生後 14 日で致死となることを見出した。同欠損マウスの脳は対照群と比べて小さいものの、組織化学的には神経変性の徴候は認められなかった。しかし、成熟オリゴデンドロサイトのマーカータンパク質の発現が全脳にわたって消失し、電顕観察では髄鞘化を認めなかった。以上の結果は、mTORC1 の活性がオリゴデンドロサイトの分化に重要であることを示唆するものである。

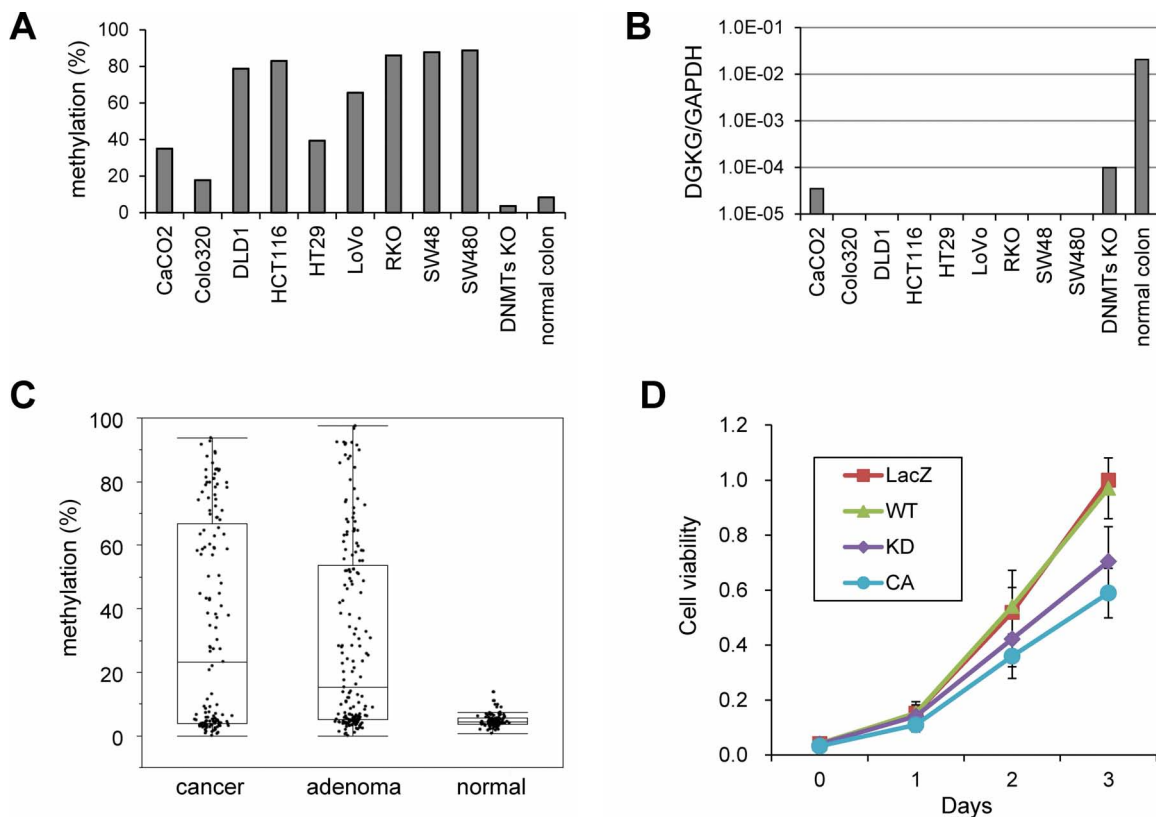
14 日齢の対照群および中枢神経系特異的 *p18/LAMTOR1* 遺伝子欠損マウス脊髓白質の電子顕微鏡像



ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、細胞内情報伝達において重要な役割を担っている。また一部の DGK ファミリーのがんにおける発現異常が報告されている。しかし、がんにおける DGK の発現変化にエピジェネティックなメカニズムが関わっているかどうかは明らかではない。本研究では、DGK γ をコードする *DGKG* 遺伝子が大腸がんにおいてエピジェネティックに不活化されていることを明らかにした。*DGKG* 遺伝子プロモーターの CpG アイランドは大腸がん細胞 9 株すべてにおいてメチル化しており、発現低下を伴っていた。また *DGKG* メチル化は大腸腺腫の 50.3%、および大腸がん組織の 51.8% に認められ、大腸発がん早期から高頻度にメチル化することが示された。また DGK γ の過剰発現により、大腸がん細胞の増殖、遊走、浸潤能が高度に抑制された。以上の結果より、*DGKG* は大腸がん抑制遺伝子として機能することが示唆された。*DGKG* メチル化は大腸がん早期診断マーカーとしての応用可能性が期待されるとともに、*DGKG* 機能の回復は新たな大腸がん治療戦略となりうると考えられた。

大腸がんにおける *DGKG* 遺伝子のメチル化と機能解析

(A) 大腸がん細胞株および正常大腸における *DGKG* 遺伝子メチル化をバイサルファイト・パイロシーケンス法により解析した結果。(B) 大腸がん細胞株および正常大腸における *DGKG* 発現を定量 RT-PCR 解析した結果。(C) 大腸がん、大腸腺腫、正常大腸の臨床検体における *DGKG* 遺伝子メチル化をバイサルファイト・パイロシーケンス法により解析した結果。(D) DGK γ (野生型、kinase-dead、constitutive-active) を大腸がん細胞株 HCT116 に過剰発現させ、細胞増殖を MTT アッセイで解析した結果。



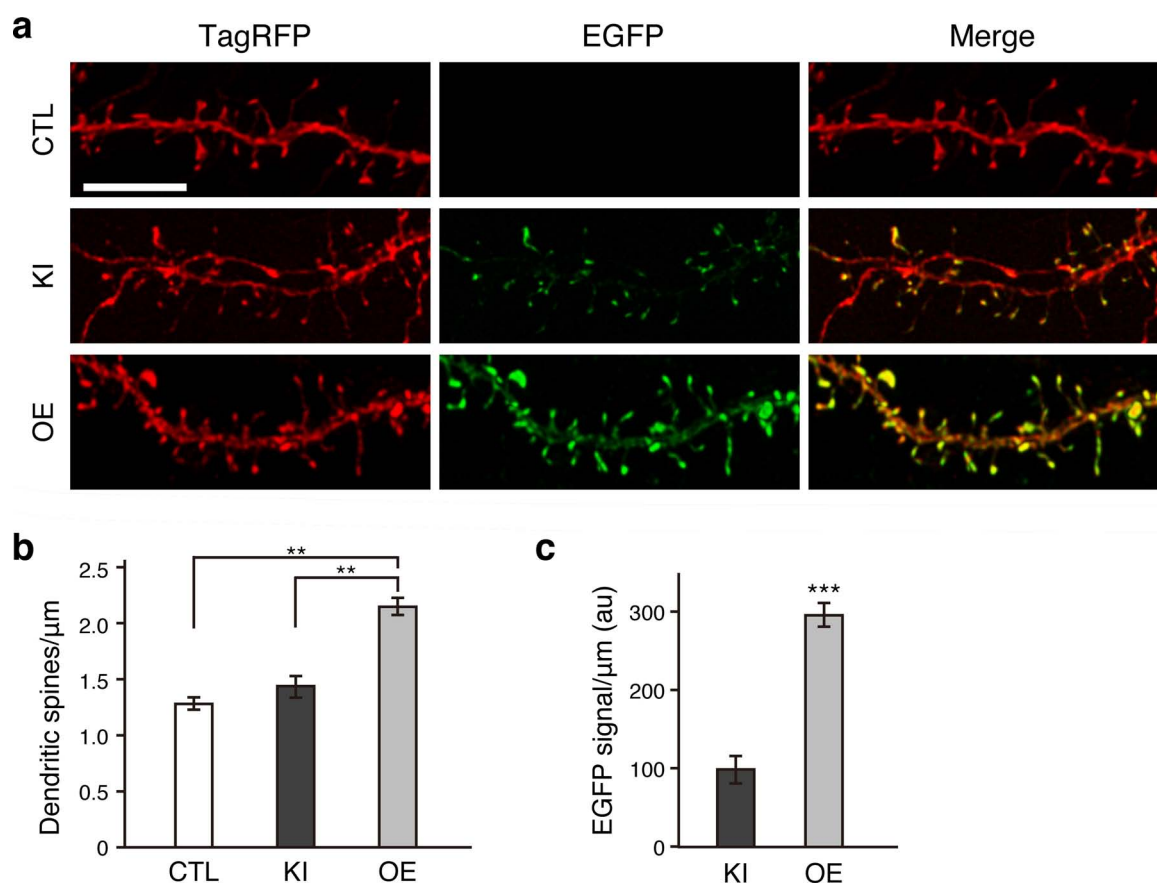
[目的] 自閉症の原因として注目されているシナプス接着因子に着目し、これらの関連分子のゲノム改変細胞、組織、個体を研究することで自閉症の分子病理像の解明を目指した。

[方法] CRISPR/Cas9 システムを利用して、iPS 細胞で Neuroligin-3 の自閉症変異 (R451C) のノックイン、マウス大脳皮質の錐体ニューロンの β -actin 遺伝子に EGFP のノックイン、従来の ES 細胞での相同組み換えを利用した方法で、 β -Neurexin のトリプルノックアウトマウス及び Neurexin-3 のノックアウトマウスの作製を行った。更に、X 染色体不活性化を利用して、Neuroligin-3 R451C ノックインのモザイクマウスを作製し、これらのシナプス機能の解析を行った。

[結果] β -Neurexin が内在性エンドカンナビノイドシグナルを抑制していることを見出した。Neurexin-3 が海馬では細胞外領域を介して AMPA 受容体機能、嗅球では細胞内領域を介して GABA 受容体機能を制御していることを見出した。CRISPR/Cas9 システムにより、ニューロン特異的ノックインの作製に成功した。Neuroligin-3 R451C 変異が細胞自律的メカニズムにより抑制性シナプス機能を亢進させていることを見出した。

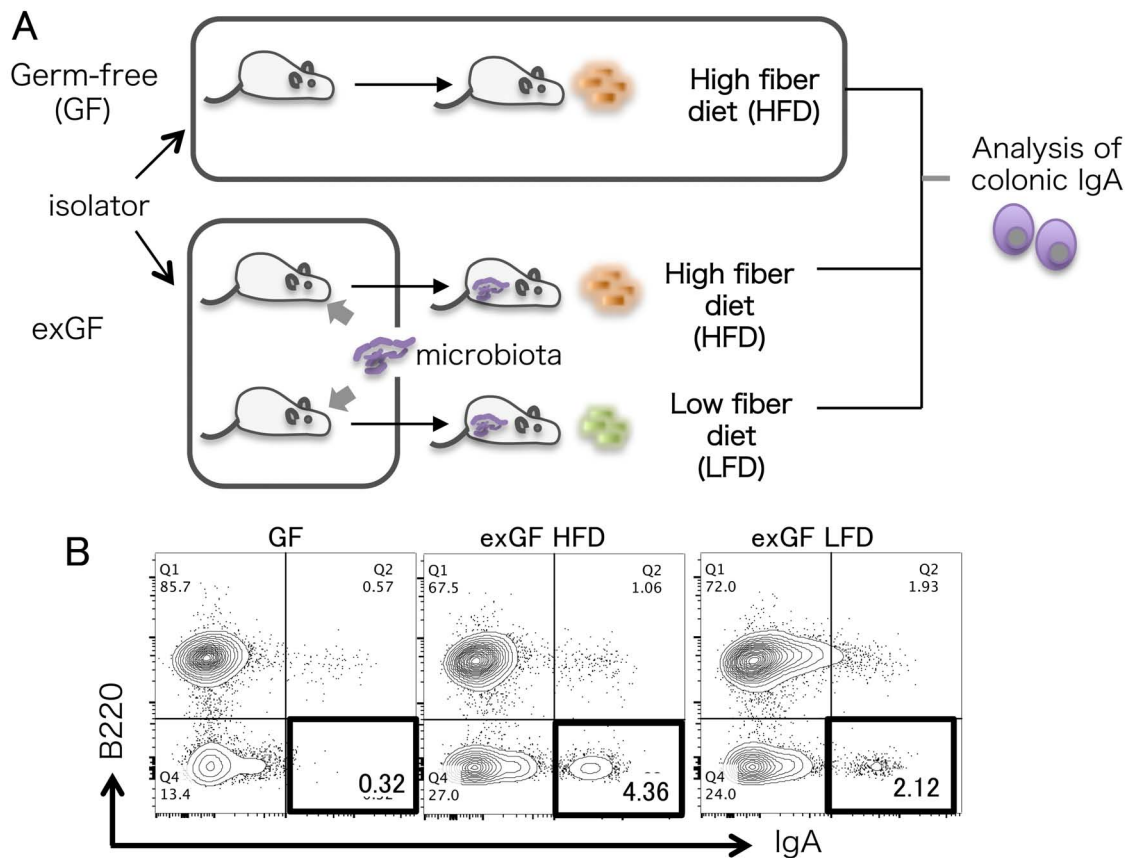
CRISPR/Cas9 による EGFP- β -actin ノックインニューロンの樹状突起

- a) 樹状突起と棘突起像。Scale Bar: $5\mu\text{m}$. b) 棘突起の数の比較。** $P < 0.01$ (Tukey's test) . c) EGFP のシグナル強度の比較。*** $P < 0.001$ (Student's t-test) . (CTL: 野生型コントロール、KI: ノックイン、OE: 過剰発現)



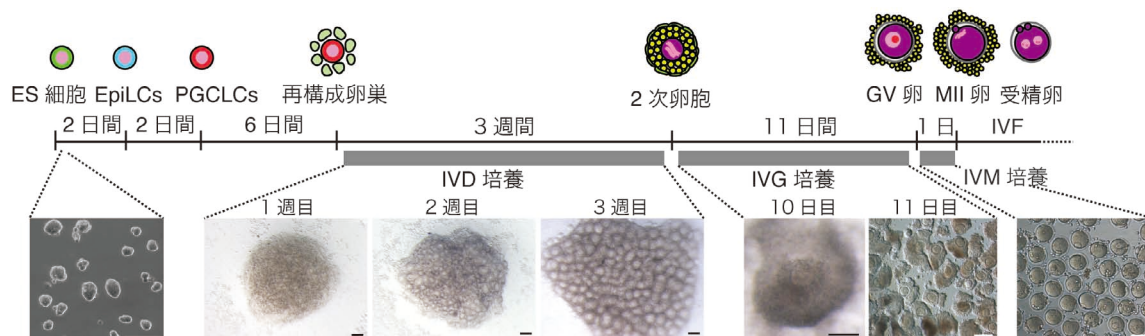
ヒトの腸管には数百兆個もの細菌が共生している。これらの腸内共生細菌は総体として、食物繊維などの難消化性食事成分を発酵分解し多種多様な代謝物を産生する代謝系を構築している。これら腸内代謝産物はヒトの健康維持に重要な役割を果たしている。腸管免疫系はIgAを粘膜面に分泌し腸内細菌の生体内への移行を抑制する一方で、免疫寛容により腸内細菌への過剰な免疫応答を抑制しているものの、その調節メカニズムには不明な点が多い。本研究では、無菌マウスに腸内細菌を定着させ、大腸におけるIgA産生細胞を解析した。その際に、食物繊維を含む食餌と含まない食餌を与え、IgA産生誘導における腸内代謝物の影響を調べた。その結果、腸内細菌を定着させることで大腸におけるIgA産生細胞が誘導された。さらに、食物繊維の分解によって産生される短鎖脂肪酸がIgAの産生を誘導することを明らかにした。

腸内細菌代謝物によるIgA産生細胞の誘導



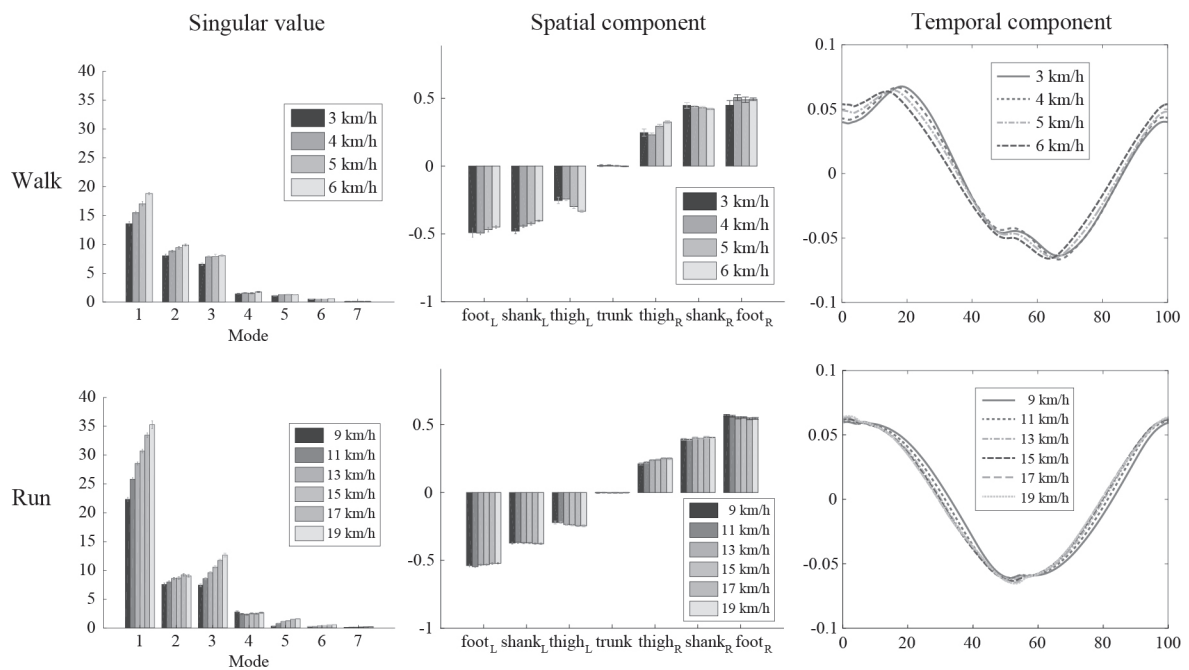
卵子のもつ生物学および医学的意義は極めて大きく、個体発生のための全能性の獲得、受精と卵割の制御、ミトコンドリアの母性遺伝などは卵子特有の現象であり、これらの異常は不妊や発生異常、次世代の個体における代謝疾患などの原因となる。このように卵子は世代をつなぐために極めて特殊化な細胞であるが、その形成過程については不明な点が多い。その理由として、解析に使用可能な卵子や卵母細胞の量的制限や、個体の性成熟に依存する卵子形成を解析するための時間的な消費が大きいことがあげられる。そこで本研究では完全培養下でマウスの多能性幹細胞から卵子を作出する分化誘導系の構築を目指した。雌の ES 細胞および iPS 細胞から BMP4 などを含む培地で分化誘導した始原生殖細胞を胎仔卵巣の体細胞と混合させた。この細胞塊を 3 種類の培養液で順次培養することにより成熟卵子 (MII 卵) を得た。MII 卵に至るまで卵母細胞系列の遺伝子発現を RNA-seq により生体由来のものと比較した結果、極めて高い類似性を示した。また刷り込み遺伝子の制御領域の DNA メチル化は体外培養由来と生体由来の MII 卵の間において差は見られなかった。さらに体外培養により得られた MII 卵は体外受精の結果、受精卵の一部は正常な個体になった。これらのことから、多能性幹細胞を起点とした個体形成能を持つ卵母細胞を作出することが可能となった。

本研究により開発された多能性幹細胞からの体外培養による卵子産生系



ヒトや動物は様々な感覚情報を統合し、筋や関節など冗長な自由度を巧みに制御して、多様な環境の中で適応的な歩行を実現している。このような運動制御における冗長性の問題に対して、生物は全ての自由度を独立に制御するのではなく、歩行などのタスクに応じて、制御すべき自由度の数を減らすような低次元構造（シナジー）を利用していることが示唆されている。特に、関節運動/筋活動に内在するものは運動学/筋シナジーと呼ばれ、ヒトだけでなくサルやラットなど様々な生物に共通して存在することが知られている。本研究では、このような低次元シナジー構造に着目して、ヒトやラットなど異なる生物を対象に、計測データに基づく解析的手法と神経筋骨格系の数理モデルに基づく構成論的手法を実施し、頑健な歩行を生成する基本原理の解明を目指した。特にヒトに関しては、歩行・走行の計測から運動学シナジーの構造を解析し、それぞれの歩容に共通もしくは特異な性質を調べた。その結果、速度変化や歩容に応じて、時間・空間基底は変えずに、運動を構成するモードの比率を調整していることが示唆された。ラットに関しては、筋シナジーに関する生理学的な知見と解剖学的に詳細な筋骨格モデルに基づいて神経筋骨格モデルを構築し、スプリットベルトトレッドミル歩行の動力学シミュレーションを行った。その結果、感覚情報に基づいて筋シナジーを適切に制御することで、計測で見られるものと同様の適応が発現することがわかった。

速度に応じたヒトの歩行・走行における運動学データの特異値分解の結果



97 予測不能な運動環境変化に伴う感覚運動系の再校正過程

牛山 潤一

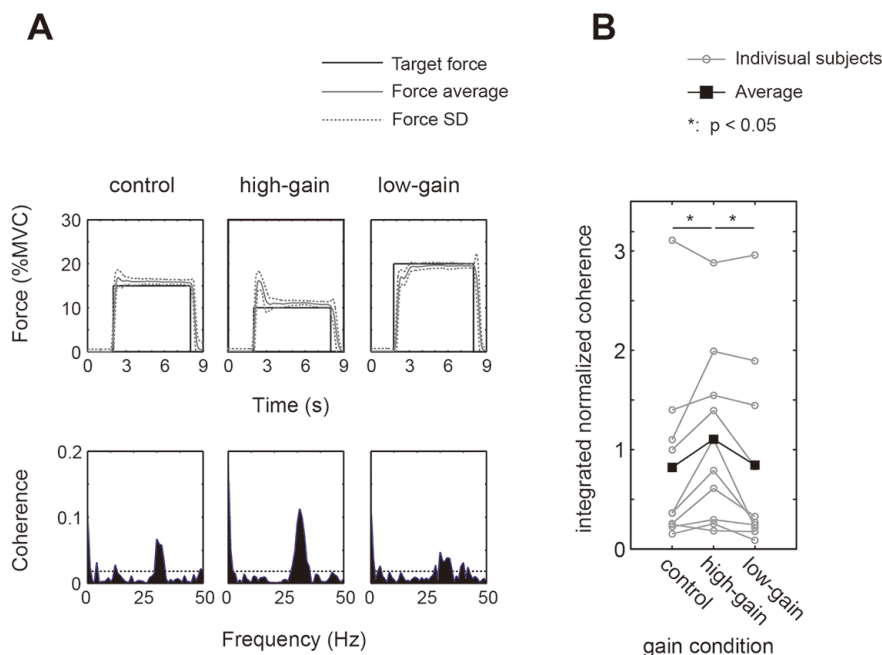
目的：本研究は、運動皮質と収縮筋の活動同調性の指標である皮質-筋コヒーレンスを用い、感覚運動再校正の観点から、予測不能な運動環境の変化によって生じる運動誤差修正の生理学的機序を解明することを目的とした。

方法：健常被験者 10 名を対象に本実験を実施した。課題は間欠的な足関節背屈運動（最大努力（MVC）の 15 %強度；6 秒収縮-6 秒弛緩）とし、このとき一次体性感覚運動野近傍より脳波を、前脛骨筋より筋電図を導出した。課題中ランダムな試行で視覚フィードバックゲインを操作し、画面上のターゲット位置の変化は伴わず、目標張力レベルを変化させた（high-gain, 15 % → 10 %MVC；low-gain, 15 % → 20 %）。一定張力保持期間中の脳波・筋電図データをコヒーレンス解析し、control 条件（通常の 15 %MVC 課題）・high-gain 条件・low-gain 条件間で比較した。

結果：high-gain 条件時には、初期には力がオーバーシュートしたのちにこれを下方修正する挙動がみられた。一方、low-gain 条件時には、初期張力ではターゲットに届かず、力を上方修正する挙動がみられた。初期の運動誤差修正後の一定張力保持期の皮質-筋コヒーレンスは、control 条件・low-gain 条件に比して、high-gain 条件において有意に高値を示した。

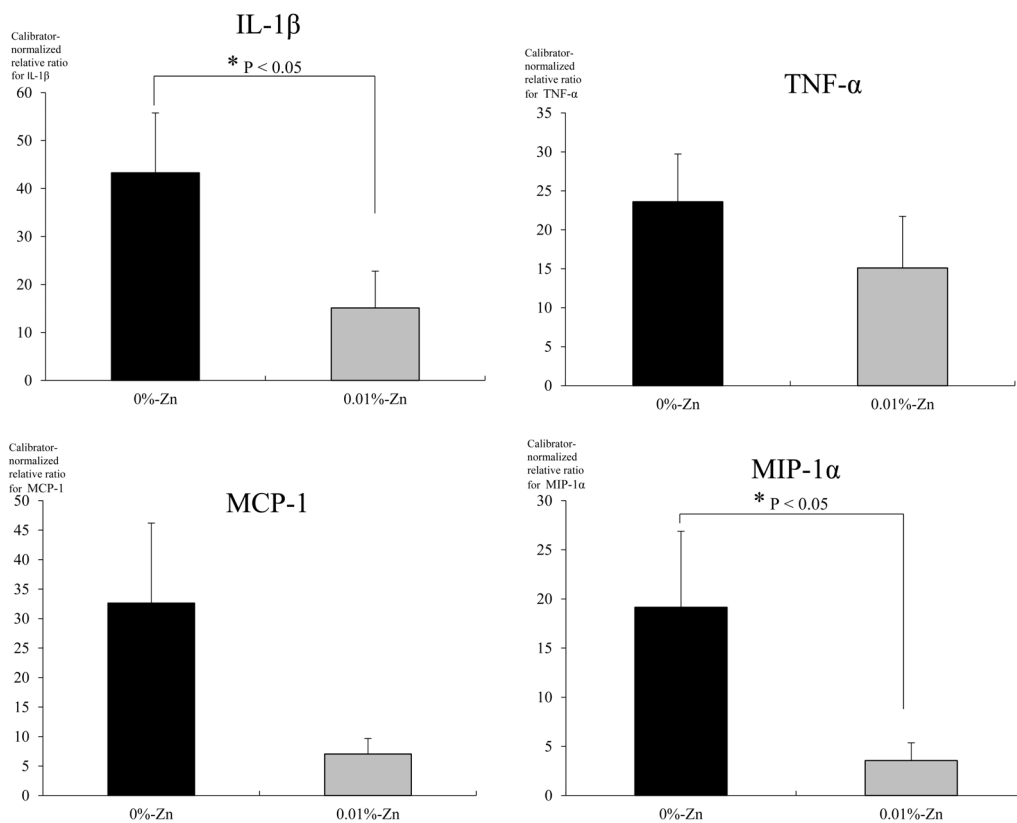
視覚フィードバックゲインの異なる課題間での発揮張力および皮質-筋コヒーレンスの差異

- A) 各条件における力の生波形および皮質-筋コヒーレンス（1 例）
- B) 条件間のコヒーレンス強度の差異（グループデータ）



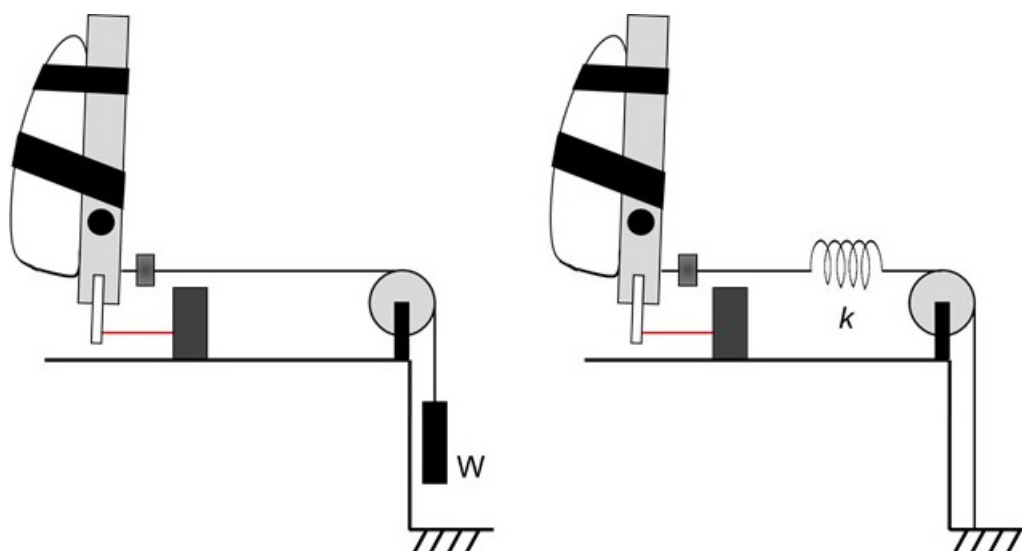
日本人の亜鉛摂取不足が問題となっている。亜鉛が不足することで、免疫機能が低下し、炎症反応を増大させることが報告されている。しかし、この亜鉛欠乏状態が起因し炎症反応を増大させるメカニズムの報告は少ない。そこで本研究では、免疫機能の中核である脾臓のマクロファージに焦点を当て、脾臓マクロファージ由来の炎症反応及びサブタイプ (M1: 炎症マクロファージ、M2: 抗炎症マクロファージ) を検討することで、脾臓で生じている病態的变化を究明した。SD ラット (n=8: 雄) に亜鉛欠乏食 (亜鉛無添加)、標準食 (Zn 0.01 %) を毎日 17 g ずつ 6 週間与えた。亜鉛モデル作製後、脾臓からマクロファージを採取し、Real-time PCR を用いて炎症の指標である IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1、MIP-1 α mRNA 発現を観察した。また、病理組織学的検討を行うため H-E 染色を施した。脾臓の H-E 染色では組織学的変化は観察されなかった。脾臓マクロファージの炎症系サイトカイン/ケモカインの IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1、MIP-1 α mRNA 発現については、亜鉛標準食群よりも亜鉛欠乏食群で有意に高値を示した。これらの結果から、亜鉛欠乏状態の脾臓で炎症反応が増強していることが示唆された。

亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓マクロファージから産生される炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現の結果



静的二足立位において、足関節に付着する筋・腱組織群は単調な等尺性筋収縮ではなく、微細な角度変動を含んだ弾性的活動動態を示す。そこで本研究は、リハビリテーション等における、二足立位時により近い筋・腱動態での筋トレーニングへの応用を目指し、微細な足関節角度変動を伴うトルク発揮課題の確立とその筋活動制御特性を検討した。若年健常者8名は、利き足にて足関節トルク調節課題を実施した。各被験者の最大随意収縮 (Maximum Voluntary Contraction, MVC) の5%に相当する力 (5%MVC) にて、新たに作製した装置 (図) を用いて2種類の位置調節課題 (非弾性負荷課題、弾性負荷課題) を行った。非弾性負荷課題では、非伸縮特性を持つワイヤーに5%MVCに相当する重りを直列に吊るし、足底背屈に向けて5%MVCの負荷をかけた。弾性負荷課題では、重り負荷の代わりにばねをワイヤーに直列に組み込み、足関節背屈負荷が5%MVCに一致するようにばねの長さを調節した。これら装置でのトルク調節課題において、筋の電氣的・機械的活動及び足関節キネティクスを分析した結果、新たに作成した弾性負荷条件により、足関節角度の微細動揺が10 Hz付近の tremor 成分にて惹起され、さらに関節角度動揺と足関節底屈筋機械的活動が tremor 成分において時間・空間的に関連することが示唆された。

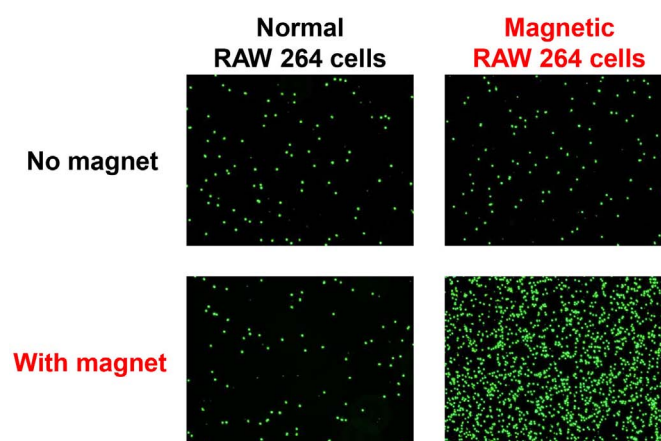
新たに作製した非弾性・弾性負荷装置



抗炎症作用を有する M2 型マクロファージを利用した細胞治療法は、炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease: IBD）に対して高い治療効果を発揮することが期待できる。一方で、本治療法を構築するためには、M2 型マクロファージを消化管炎症部位へ選択的かつ効率的に送達する技術の開発が必要不可欠である。そこで本研究では、目的物を任意の場所へ誘導することが可能な「磁場」に着目し、磁場応答性を有するマクロファージの作製、およびその機能評価を行った。

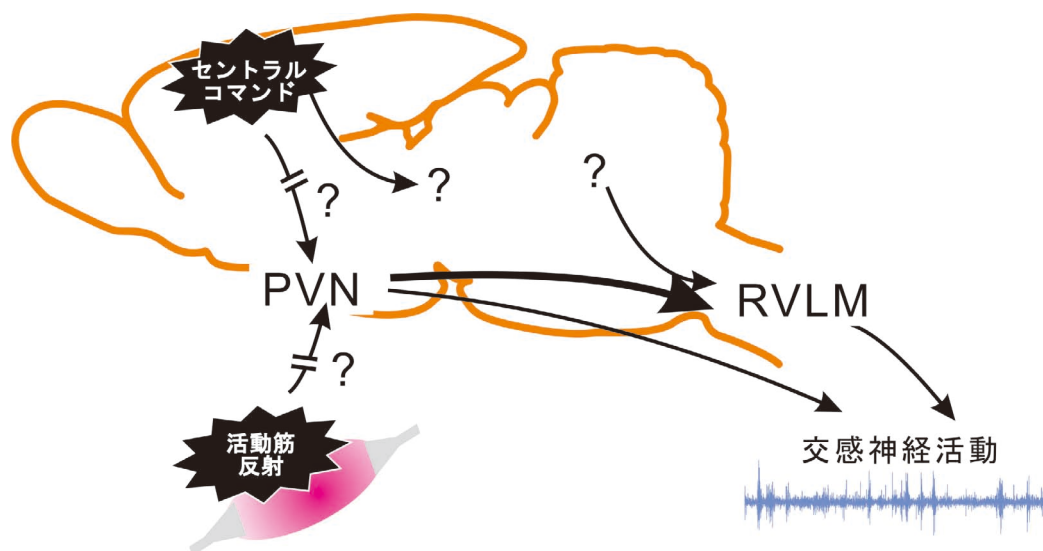
その結果、カチオン性脂質である DOTAP と中性脂質である DSPC、およびコレステロールを一定比率で混合したマグネタイト内封カチオン性リポソームを利用することで、マクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に対して短時間かつ高効率にマグネタイトおよびプラスミド DNA を導入することに成功した。また、マグネタイト、およびプラスミド DNA の導入に伴う RAW264 細胞の免疫活性の低下は認められず、本マグネタイト導入マクロファージと外部磁場の併用により、大腸組織に対して効率的にマクロファージを送達できることを示した。

Adhesion of magnetic lipoplexes-introduced RAW 264 cells to Caco-2 cells monolayer



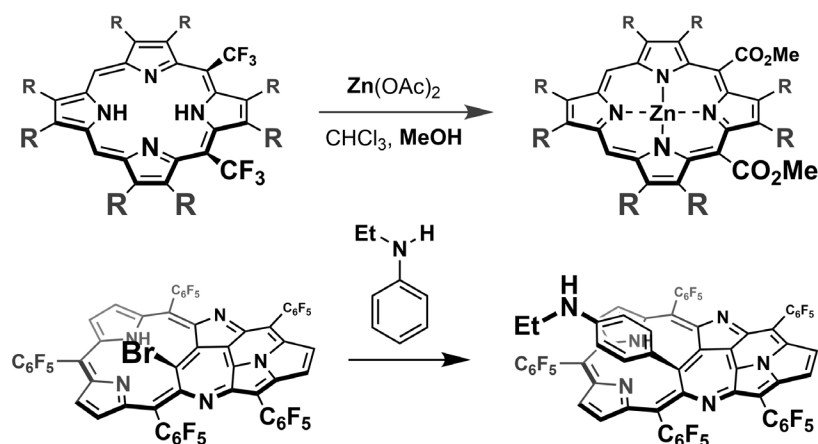
運動時にはセントラルコマンドと呼ばれる遠心性の神経信号および活動筋反射と呼ばれる求心性の神経信号が惹起する。これらの神経信号は循環中枢を刺激することで交感神経系を活性化する。運動時の交感神経活性化の中枢回路は不明である。活動筋反射は視床下部室傍核 (paraventricular nucleus of hypothalamus, PVN) や延髄吻側腹外側野 (rostral ventrolateral medulla, RVLM) といった循環中枢が刺激される。本研究では PVN から RVLM への投射 (PVN-RVLM 神経) が随意運動時の循環反応の生成に関わるか否かを検討した。まず免疫染色実験から、ラット RVLM は随意運動によって活性化することを突き止めた。次に神経トレースと免疫染色とを組み合わせた実験から、ラット PVN-RVLM 神経は随意運動によって活性化することを明らかにした。さらに光遺伝学を活用した *in vivo* 実験から、ラット PVN-RVLM 神経の活性化は循環反応を生成することを突き止めた。これらの結果から、PVN-RVLM 神経は随意運動時の交感神経活性をもたらす中枢回路の一部であることが示唆される。ただしセントラルコマンド・活動筋反射のどちらがどれだけ PVN-RVLM 経路を稼働させるかは不明であり、今後の研究課題である。

運動時の交感神経調節の中枢回路



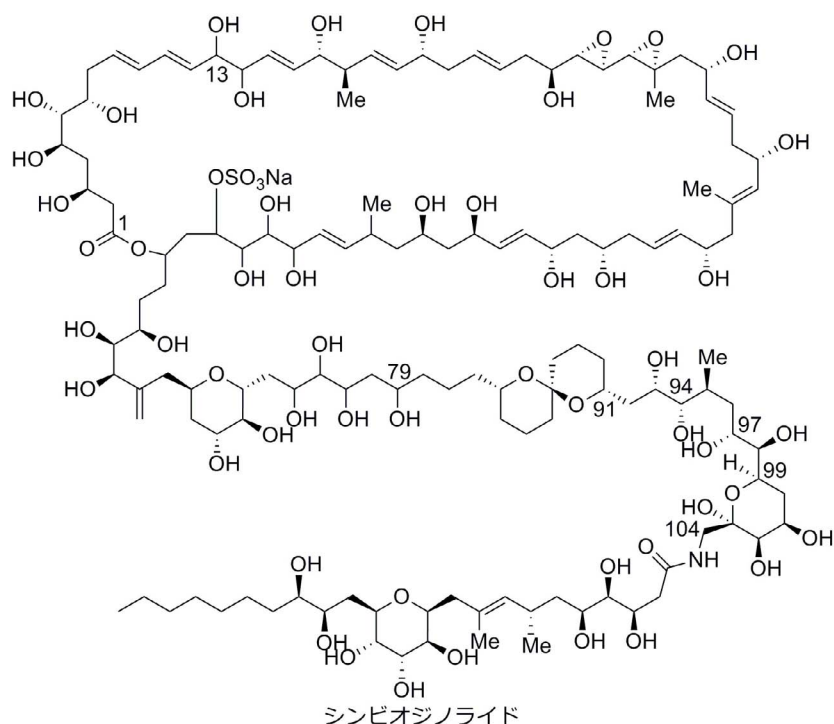
光線力学療法や画像診断に利用可能な近赤外吸収・発光素子を開発するべく、従来の π 共役系拡張法による吸収長波長化において生じる問題点を克服した新奇な骨格の創製を目指した。はじめに設計したスピロ共役芳香族性分子による空間相互作用を基盤とした三次元的な π 電子系に替わり、優れた芳香族モデル分子であるポルフィリノイドの π 平面に三次元性を付与する方向へとシフトした。その結果、立体障害と電子求引性と併せ持つトリフルオロメチル基を、これまでにない置換基パターンでポルフィリンに導入することが可能となった。環は大きく非平面化し、溶解性の向上と吸収の長波長化が観測された。中心金属に依存したトリフルオロメチル基の加溶媒分解反応も見出された。一方、環拡張ポルフィリンの中でも *N*-フェーズドペンタフィリン臭素化誘導体に対して異常な求核置換反応が起こることもわかった。三級アミン類のアルキル基とはビニレン架橋を形成し、アニリン類とはパラ位で連結されることで分岐 π 平面を達成できた。

Creation of novel three-dimensional π -electronic systems
based on unusual reactivities of aromatic porphyrinoids



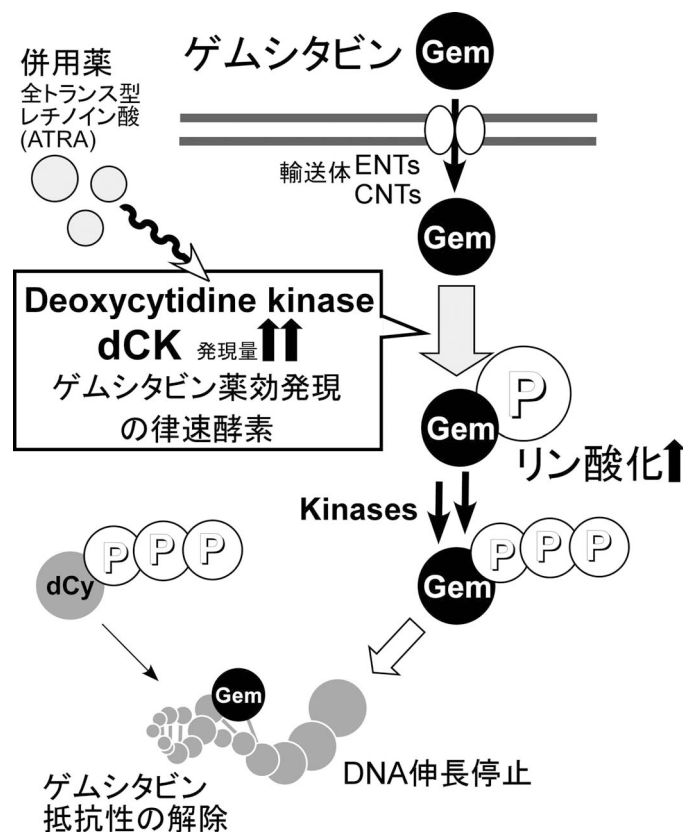
生物活性天然有機化合物は、約 40 億年という永い年月をかけて生命とともに進化を続けてきた。この永年に渡る進化の過程で獲得および蓄積された構造と機能は、人知を凌駕するほど精密である。生物活性天然物は官能基や分子形状を介して生体内標的分子と特異的に相互作用することで、その機能つまり生物活性を発現する。したがって、多官能基化された巨大天然物は、生体内標的分子と多点で相互作用したり、また複数の標的分子と同時に相互作用することで、その機能が高まる可能性がある。つまり、巨大天然物は強力な生物活性を持ちうる。本研究では、合成化学的手法を用いたポリオール天然物シンビオジノライドの構造決定について検討した。まず、C1-C13 フラグメントの分解生成物に対する詳細な NMR 解析を行うことで、本フラグメントの考え得るジアステレオマーを 8 つから 4 つに絞り込んだ。次に 4 つの標的分子の合成を検討し、統一的かつ立体発散的にこれらを合成した。合成完了後、4 つの合成品と分解生成物との NMR データの比較を行うことで、C1-C13 フラグメントの相対立体構造を決定した。また、C79-C104 フラグメントの構造解明についても検討した。その結果、C91-C99 鎖状部位に関する考え得るジアステレオマーが 64 個ある中で、C79-C97 フラグメントと C94-C104 フラグメントのジアステレオマー各々 8 つ、および C79-C104 フラグメントのジアステレオマー 4 つの計 20 個のジアステレオマーを立体発散的に合成することで、本フラグメントの相対立体配置を決定することができた。

シンビオジノライドの構造



難治性がんに分類される膵臓がんの化学療法において、ゲムシタビン抵抗性の獲得は臨床上問題である。本研究は、膵臓がん手術検体及び細胞株を用いて、ゲムシタビン抵抗性の分子機構に基づく効果予測マーカーの確立と、奏効率向上を目指したゲムシタビン抵抗性解除の基盤構築を目的とした。具体的には、ヒト膵臓がんの手術検体を用いて、ゲムシタビン薬効発現の律速酵素であるデオキシシチジンキナーゼ deoxycytidine kinase (dCK) のタンパク質発現量が、奏効性を反映するパラメーターと相関する傾向を示すことを見出した。さらに、ゲムシタビン奏効性の向上を目指した化学補助療法の確立を目的として、併用によって dCK の転写活性の増加を示し、かつゲムシタビンの膵がん細胞増殖抑制活性を濃度依存的に増強する臨床処方薬 all trans-retinoic acid (ATRA) を培養細胞レベルで同定した。以上の結果から、膵臓がん組織中における dCK タンパク質発現量が、ゲムシタビン薬効発現予測マーカーとして有用であるとともに、dCK 発現量を増加させることがゲムシタビンの抵抗性解除機構の一つであることが示唆された。特に ATRA は、dCK の発現量増加を介して、ゲムシタビン抵抗性を解除する可能性が示された。

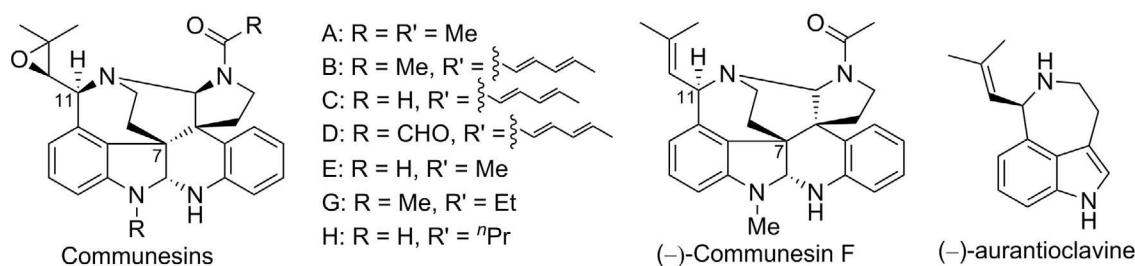
膵臓がん細胞のゲムシタビン抵抗性解除機構における deoxycytidine kinase (dCK) の位置付けと併用薬による薬効増強戦略



インドールアルカロイドはしばしば複雑な縮環構造を有することに加えて、抗腫瘍活性など有用な生物活性を示すため、化学者だけでなく、薬理学者など多くの研究者により注目されている。近年、インドール環2位が窒素置換された複雑縮環系アルカロイドが多数報告されており、天然からの供給量の希少性もあいまって、化学者からは特にその合成法の開発が注目されている。

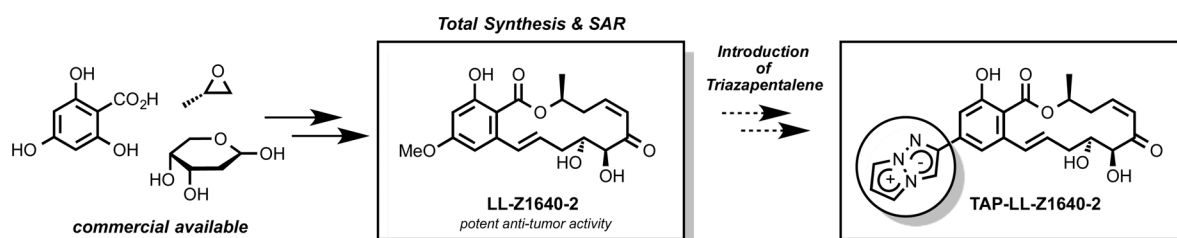
本研究ではオーランチオクラビンおよびコムネシン類の全合成について検討した。コムネシン類は複雑な縮環構造を有するインドールアルカロイドであり、二つのビスアミナル構造と二つの連続する四級炭素を含む七環性骨格が特徴である。生物活性については、細胞毒性を示すが、活性発現機構は明らかにされていない。また、オーランチオクラビンはコムネシン類の部分構造に該当する三環性骨格を有するインドールアルカロイドである。コムネシン類との生合成的な関連性が指摘されている。我々はこれら天然物の全合成は、天然物自体の試料供給、新規反応の開発の契機となるだけでなく、生合成的な知見を得ることにもつながると期待して、種々検討した。その結果、アリル位アミノ化を鍵としたオーランチオクラビンの不斉全合成、および、酸化的転位を鍵としたコムネシン類の五環性骨格の構築に成功した。

コムネシン類とオーランチオクラビン



近年、シグナル伝達系に關与するキナーゼ阻害薬の開発が注目を集めている。今回、著者は担癌モデルマウスにおいて顕著な治療効果を示した TAK-1 阻害剤 LL-Z1640-2 及びその誘導体を利用した迅速キナーゼ阻害剤スクリーニング法の確立を目指し研究を行った。本法では強力な共有結合型キナーゼ阻害剤として知られる天然マクロライド群に、当研究室で見出された極小傾向分子 1,3a,6a-triazapentalene (以下 TAP) を搭載させ、Activity-Based Probe として利用することを目的としている。これにより、本マクロライド群が阻害するキナーゼに対して高い親和性を有する阻害剤候補評価スクリーニング系を確立できると考えた。天然マクロライドを基盤とした TAP 搭載型プローブを合成するにあたり、まず強力な生物活性及びキナーゼ阻害活性を有する LL-Z1640-2 の全合成経路の確立を目指し検討を行った。その結果、合成終盤での分子内閉環メタセシス反応を鍵段階にして LL-Z1640-2 の不斉全合成を達成した。現在、本合成経路からの TAP 導入について検討を行っている。

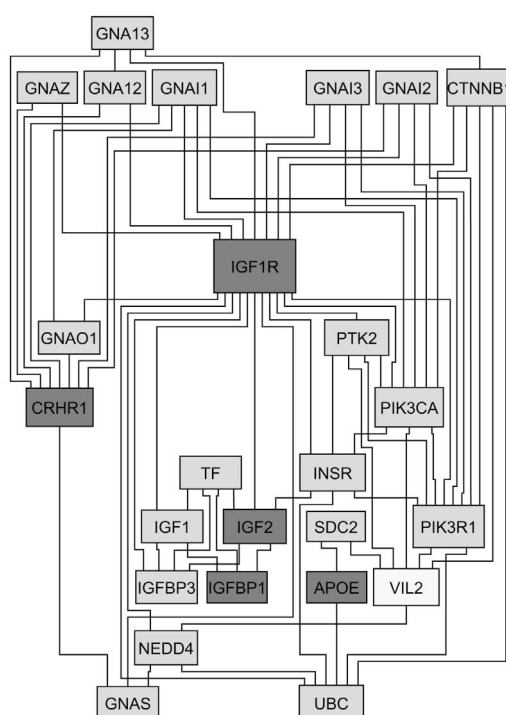
Total Synthesis and Synthetic Studies on LL-Z1640-2 and TAP-LL-Z1640-2



胎児発育不全は胎児の生命および生後の予後に関わる重篤な病態である。胎盤において母体-胎児のインターフェースとなる syncytiotrophoblast は層構造を形成する多核化された細胞で、物質輸送の関門機能を担う。生体小分子の経細胞輸送を担う細胞膜トランスポーター群は、胎児成長に必要な物質の輸送速度を調節する重要な因子である。ERM ファミリーとして細胞膜トランスポーターの機能制御を担う ezrin (遺伝子名 *Vil2*) の欠損マウスが胎児発育不全を呈することに着目し、ezrin と胎児発育制御遺伝子との遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的にした。

Ezrin と胎児発育制御遺伝子とのネットワークを推定した結果、互いに関連のあるネットワークが形成された。しかしながら、Ezrin 欠損マウスで観察されている hypotaurine 欠乏症の原因は依然として不明であった。Ezrin と hypotaurine を輸送する細胞膜トランスポーター Slc6a13 との相互作用を検討したが、胎盤において両者の直接的相互作用は検出限界以下であった。以上より、観察されている hypotaurine 欠乏の原因となる分子機構は未解決であるが ezrin は胎児発育と関連する新たな機構が推定された。

Ezrin と胎児発育不全関連遺伝子ネットワーク



交代勤務が様々な疾患の発症に独立して影響を与えることが多くの研究で示されている。しかし人間に個々に存在している概日リズムとの関係は示されていない。今回我々は概日リズムを朝型-夜型質問紙を用いて評価し、交代勤務を行っている日本人男性労働者を対象にBMIの増減との関連性について解析を行った。対象者は2007年から2011年の間に入社し、入社時以降の定期健康診断を2回以上受診した347名である。入社時の初回健康診断の際に朝型-夜型タイプを調査し、点数により「明らかな朝型」、「ほぼ朝型」、「中間型」、「ほぼ夜型」、「明らかな夜型」に分類した。その後、毎年定期健康診断を実施し、年齢、BMI、飲酒習慣、喫煙習慣、運動習慣、職業性ストレスについて追跡調査した。解析手法は混合線形モデルを用いた。解析の結果、朝型-夜型タイプとBMIの関係において、中間型と比較して、「明らかな朝型・ほぼ朝型」グループの回帰係数は0.63 (95%信頼区間 (CI) : 0.11~1.16) であり、BMIが増加することが示された。一方、「ほぼ夜型・明らかな夜型」グループの回帰係数は-0.64 (95% CI: -1.25~-0.04) であり、BMIが減少することが示された。本研究において、労働者が交代勤務を行うことで、朝型の労働者と夜型の労働者では異なる健康影響を受けるという結果が得られた。

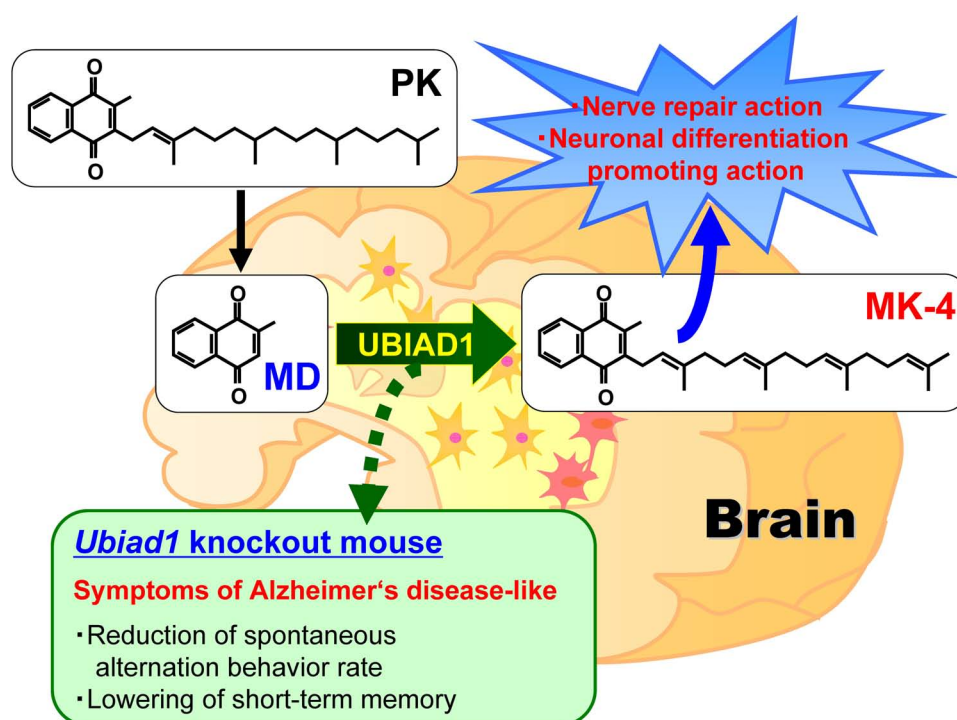
BMI増加に関する回帰係数と95%信頼区間

BMI		
独立変数	B (95%CI)	P
MEスケール (中間型)		
明らかな朝型&ほぼ朝型	0.63 (0.11, 1.16)	0.018
ほぼ夜型&明らかな夜型	-0.64 (-1.25, -0.04)	0.037
年齢	0.08 (0.04, 0.12)	<0.001
職業性簡易ストレス調査		
仕事の負担度 (High)	0.41 (0.03, 0.79)	0.034
仕事のコントロール度 (Low)	-0.12 (-0.51, 0.26)	0.524
対人関係 (Low)	0.29 (-0.14, 0.71)	0.186
仕事の適合性 (Low)	-0.55 (-1.00, -0.09)	0.019
アルコール摂取量 (合/週)	-0.09 (-0.14, -0.04)	0.001
喫煙習慣 (非喫煙者)		
1-10本/日	0.31 (-0.24, 0.86)	0.269
11-20本/日	0.42 (-0.03, 0.87)	0.068
21-40本/日	0.34 (-0.50, 1.18)	0.426
運動習慣 (≥3回/週)		
なし	-0.32 (-0.87, 0.22)	0.246
1-2回/月	0.06 (-0.50, 0.62)	0.828
1-2回/週	0.34 (-0.19, 0.88)	0.210
追跡期間 (年)	0.04 (-0.09, 0.16)	0.557

ヒトやマウスの生体内においてビタミン K 同族体は、UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) によって menaquinone-4 (MK-4) に変換される。MK-4 は脳内に高濃度に存在し UBIAD1 も強く発現することから、MK-4 や UBIAD1 は脳機能に重要な役割を担っている可能性が高い。最近、アルツハイマー病やパーキンソン病などの脳神経変性疾患にビタミン K や UBIAD1 が関与することが報告されている。そこで、MK-4 合成機構の異常が脳神経変性疾患に影響するかを明らかにするため、①神経幹細胞特異的な *Ubiad1* 欠損マウスの作出および表現型解析を試みた。さらに、ビタミン K の新たな役割を見出すため、②ビタミン K の中枢神経再生メカニズムの解明および③脳神経変性疾患に対する創薬を志向した新規ビタミン K 誘導体の評価を検討した。

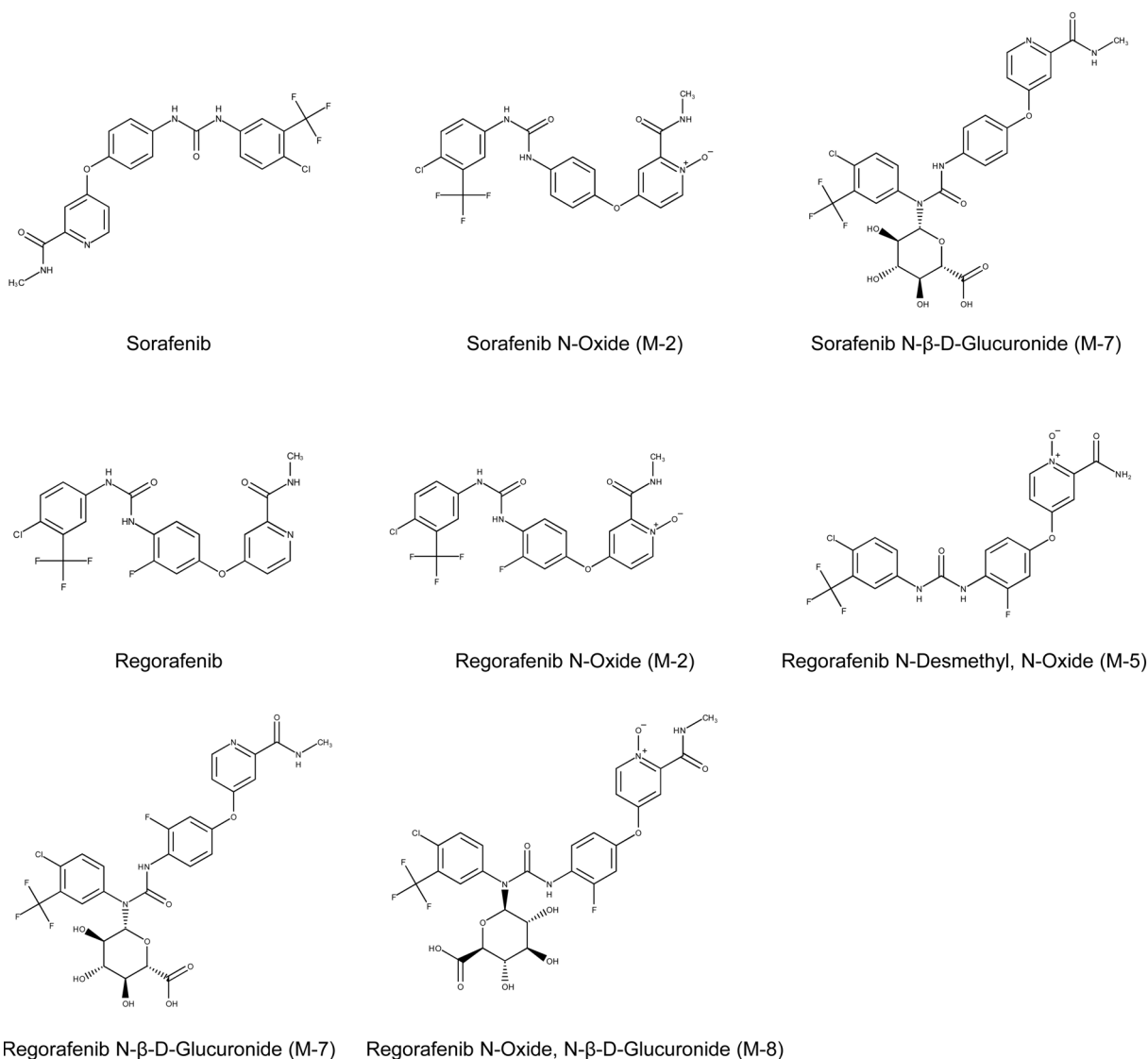
我々は神経幹細胞特異的に *Ubiad1* および MK-4 が欠損した *Ubiad1* 欠損マウスを作出した。このマウスは行動解析から短期記憶力の低下など、アルツハイマー病様の表現型を示すことを見出した。また、中枢神経損傷ラットにおいて、MK-4 は新たな軸索の再生を促し著しい改善効果を示した。さらに、既存のビタミン K よりも強いニューロンへ分化誘導活性を有するビタミン K 誘導体を創出することに成功した。

UBIAD1 による MK-4 合成機構および脳内 MK-4 の生理的な役割



分子標的抗がん薬は、従来までの殺細胞性抗がん薬とは異なる副作用を有している。本研究では、ソラフェニブおよびレゴラフェニブの安全で最適な投与法の開発を目指して、未変化体および代謝物と薬物排出トランスポータとの相互作用や両薬物の細胞毒性に及ぼす代謝反応の影響について検討した。また、レゴラフェニブ治療大腸がん患者を対象に、代謝プロファイルと有害事象の関連性について精査した。その結果、ソラフェニブとその活性代謝物である N-オキシド体 (M-2)、およびレゴラフェニブとその活性代謝物である M-2 並びに N-オキサイドアミド体 (M-5) は、P-糖タンパクおよび乳癌耐性タンパクの ATPase 活性を濃度依存的に促進することを明らかにした。一方、MRP2 の ATPase 活性に対する促進効果は認められなかった。さらに、薬物代謝酵素の誘導剤としてデキサメタゾン処置したヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2 において、vehicle 処置のみの対照群と比較してソラフェニブの細胞毒性が増強する傾向が認められた。また、重篤な手足皮膚反応が発現したレゴラフェニブ治療大腸がん患者の代謝物プロファイル調べた結果、M-2/M-5 の血中濃度がともに未変化体濃度と比べて顕著に上昇していることを見出した。

Structures of sorafenib and regorafenib and their respective metabolites



111 抗菌作用を持つ化学物質の乳児期腸内菌叢への影響評価

藤井 由希子

フェノール性ハロゲン物質（POC）は有用な化学物質とされ、抗菌剤等として使用されているが、内分泌かく乱性、神経発達毒性をもつことが知られている。さらに先行研究によると環境中に分布する POC は微生物により脂溶性の高いメトキシ（MeO）体へ変換され、海洋環境で生体濃縮された後、魚介類を通じて人が摂取する経路が知られている。本研究では、POC について、MeO 体も含め、母乳を通じた曝露とさらに腸内細菌叢への影響評価を行うことを目的としている。本報告では POC の一つであるトリクロサン（TCS）の MeO 体である MeO-TCS を泌乳期マウスに投与し、仔の曝露量の追跡と、腸内細菌叢の変化等の毒性学的評価の結果を報告する。本研究結果は以下のとおりである。①MeO-TCS を泌乳期マウスへ投与したところ、母乳中に MeO-TCS が検出された。また仔の TCS の血中濃度を 24 時間まで観察したところ、その濃度に経時的な上昇が見られた。② TCS をマウスに投与し腸内細菌叢の変化を見たところ、*Lactobacillales* が主要な構成種であることに変化はなかった。しかしながら、18 時間後に *Bifidobacterium*（ビフィズス菌）がいったん消失したにもかかわらず、65 時間後には投与前より割合が増加する等の変化が観察された。以上のことから、MeO-TCS は母乳を通じて乳児へ移行後、血中に代謝活性化された TCS が長時間残留し、腸内細菌叢の変化に影響を与える可能性が示唆された。

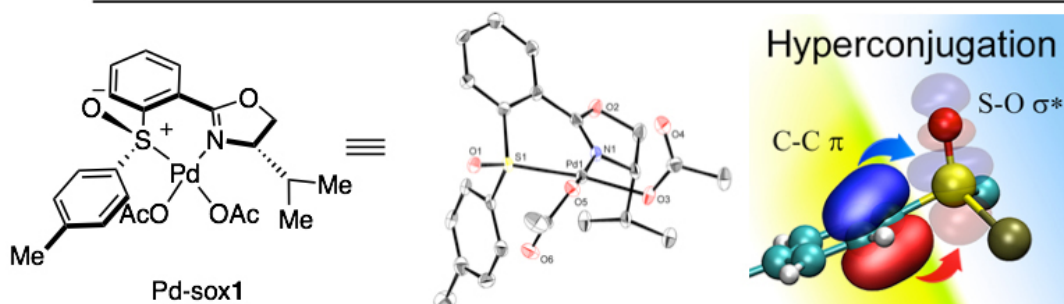
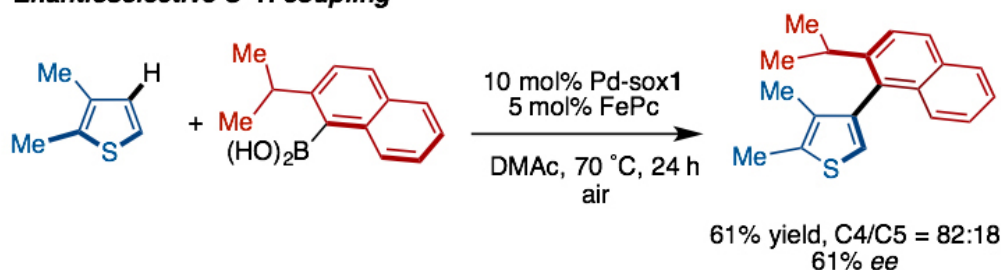
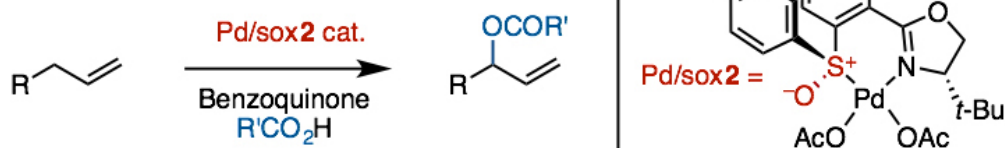
MeO-TCS 投与後の腸内細菌叢の変化

推定細菌叢(合計100%)	1	2	3	4	変化率 (1vs 2)	変化率 (1vs 3)	変化率 (1vs 4)
	TCS投与前 %	TCS投与後 (2-18hr) %	TCS投与後 (18-42hr) %	TCS投与後 (42-65hr) %			
Bifidobacterium	0.9	0.0	0.6	3.1	消失	72%	355%
Lactobacillales目	71.0	72.7	70.0	66.4	102%	99%	94%
Bacteroides	8.6	9.6	12.9	9.6	111%	150%	112%
Prevotella	3.6	0.4	1.4	4.3	12%	41%	120%
Clostridium cluster IV	0.0	0.0	0.0	0.0	n.d.	n.d.	n.d.
Clostridium subcluster XIVa	3.0	9.1	5.7	7.1	304%	190%	238%
Clostridium cluster XI	1.8	0.7	1.7	0.9	38%	95%	47%
Clostridium cluster XVIII	1.6	0.9	1.6	2.9	54%	95%	174%
others	9.5	6.6	6.0	5.7	70%	63%	60%

効率的なビアリール骨格構築法である C-H カップリングは官能基化を伴わず直接芳香環同士を繋げることが可能であるため世界中で精力的に研究されている。しかし、嵩高い芳香族化合物の C-H カップリングを実現する分子触媒はほとんど報告されていなかった。我々はこれまで様々なヘテロ芳香環の C-H カップリングを促進する独自の触媒を開発してきた。なかでも、Pd(OAc)₂/biox (ビスオキサゾリン) /TEMPO (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル) 触媒を用いたヘテロ芳香環と嵩高いアリールボロン酸の C-H カップリング反応を見出している。さらに、様々なヘテロ芳香環と嵩高いアリールボロン酸の C-H カップリングを実現する Pd(OAc)₂/sulfoxide-oxazoline (sox 配位子) 触媒の開発に成功した。Pd に併せ用いる配位子が極めて重要であり、触媒の反応性を著しく向上させる。また、不斉点を有する sox 配位子を用いることで報告例がほとんどない触媒的不斉 C-H カップリング反応へ応用し、軸不斉を発現させることに成功した。

本研究では不斉 C-H カップリング反応の確率を最終目標として、開発した反応の反応機構および不斉発現の機構解明研究に取り組んだ。不斉発現における配位子の置換基効果を実験化学により調査すると同時に、共同研究により、量子化学計算を用いて反応機構と不斉発現に関する配位子効果を明らかにした。また、開発した配位子を用いた、末端アルケンのアリル位 C-H 酸化反応の開発にも取り組み、高選択的に branch 体が生成することを見出した。

触媒的不斉 C-H カップリングと反応機構解明およびその応用

Enantioselective C-H coupling**Branch-selective allylic C-H oxidation**

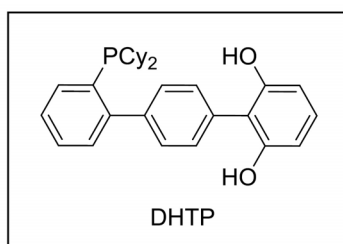
本研究では、医薬品候補化合物を始めとする種々の多置換化合物の効率的合成につながると期待される新規位置選択的反応の開発を行った。一般に広く用いられている基質の電子的性質や立体障害を利用した位置選択性制御ではなく、筆者らのグループで開発したヒドロキシ基含有ホスフィン配位子 DHTP (dihydroxyterphenylphosphine) と金属からなる触媒を用いれば、触媒による位置選択性の制御が可能となり、既存の触媒と異なる位置選択性・高い反応性を示す反応が実現すると考えた。

DHTP およびパラジウムから成る触媒を用い、ジクロロフェノールあるいはジクロロアニリン誘導体と末端アルキンのオルト位選択的菌頭カップリングを活用した二置換ベンゾフランおよびインドール合成を検討した。その結果、テトラブチルアンモニウムクロリド (TBAC) の添加によりクロロベンゾフラン/クロロインドールとボロン酸の鈴木-宮浦カップリングが促進され、基質一般性を拡大させることができた。

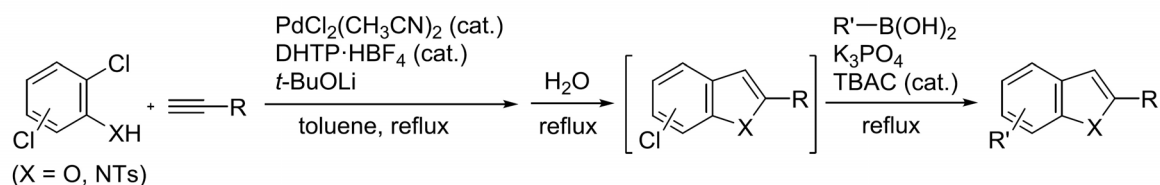
さらに同触媒を用いる新規反応の検討を行い、クロロアレーンを用いるインドールのアリール化において、既存の配位子を用いた場合と異なる位置選択性を示すことを見出した。

本研究の成果を活用することで、多様な置換パターンを有する化合物群の迅速かつ効率的合成が可能になると期待される。

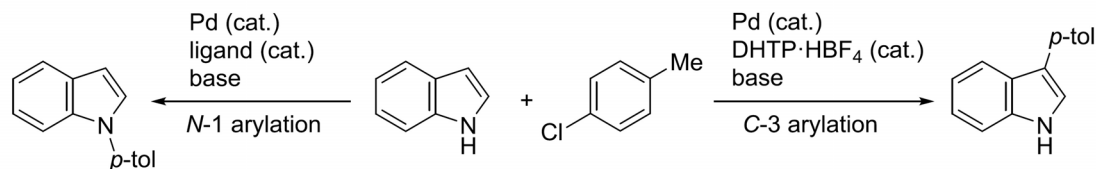
基質捕捉能を有する配位子 DHTP を用いる位置選択的反応



1. Synthesis of disubstituted benzo[b]furans and indoles

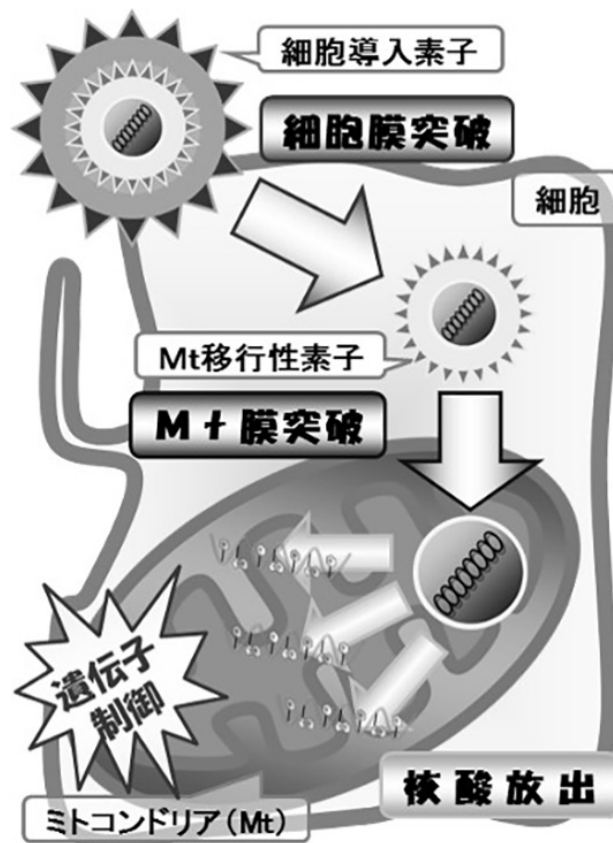


2. Arylation of indole with chloroarenes



ミトコンドリアは多彩な機能を有した細胞内小器官であり、その機能異常によって様々な疾患を誘発する。近年、ミトコンドリアの機能不全はミトコンドリア独自のゲノム (mtDNA) の変異・欠損が関連している事が報告されており、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療が種々の疾患の革新的治療法として注目されている。これらの疾患治療を実現するためには、ミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) が必要不可欠である。本研究では、ミトコンドリアを標的とする遺伝子治療の基盤技術を確認するため、疾患細胞ミトコンドリアを標的とした核酸 DDS の構築を研究目標とした。ミトコンドリアへの分子送達に関しては、研究代表者が世界に先駆けて開発したミトコンドリア融合性リボソーム、DF-MITO-Porter を基盤技術として用いた。本研究では、①疾患細胞を用いた自主臨床研究の整備、②新規ミトコンドリア標的型 DDS の開発、③ミトコンドリア発現 DNA ベクターの開発を中心に研究を進めた。これらの研究成果として、疾患細胞で遺伝子発現を可能とするミトコンドリア標的型核酸 DDS の基盤技術の構築に成功した。

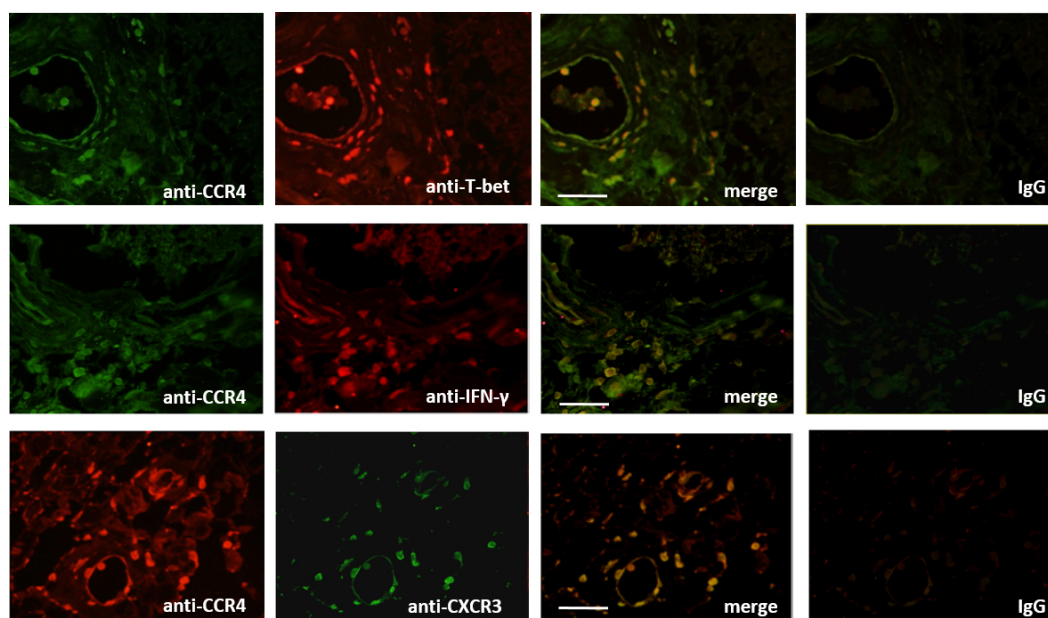
DF-MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの分子送達戦略図



115 ウイルス感染細胞に起因する HAM 病態形成機構の解析

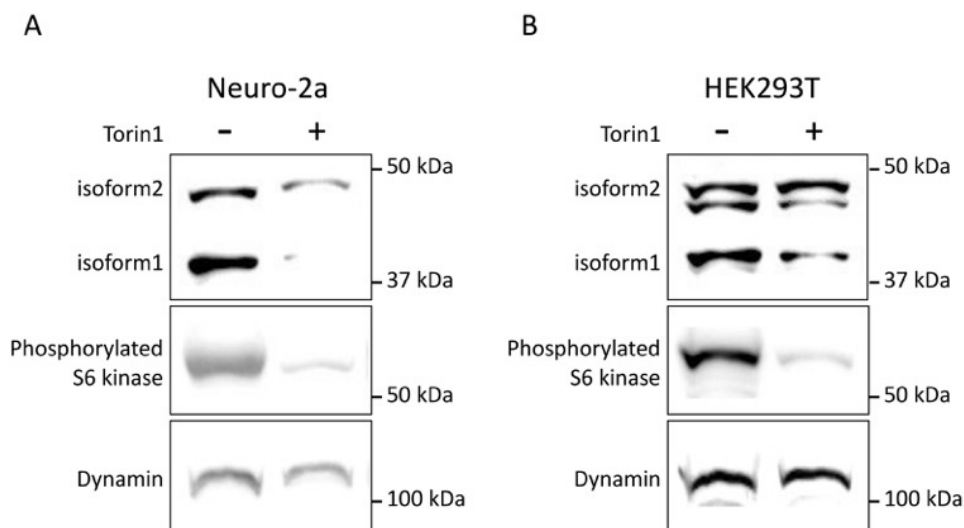
新谷 奈津美

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 関連脊髄症 (HAM) は、HTLV-1 感染細胞に起因する脊髄の慢性炎症性疾患であるが未だ発症機構には不明な点が多く、有効な治療法に乏しい難治性疾患である。近年、HAM では HTLV-1 が CD4⁺ヘルパー T (Th) 細胞の中でも、特に CCR4 を発現する制御性 T 細胞や Th2 に主に感染していること、またこの細胞群が IFN- γ を産生する Th1 様の異常細胞に変化することで、従来厳密に保たれている Th サブセットのバランスを破綻させ、免疫異常を来すことを見出した。本研究では、HTLV-1 感染による Th1 様細胞への形質転換機構として、HTLV-1 の機能遺伝子 *tax* が、Th1 分化を制御する転写因子 T-bet の発現を転写レベルで制御することを明らかにした。さらに、HAM 脊髄病変部ではこれら Th1 様感染 T 細胞が占拠し、HAM における慢性炎症病巣の形成・維持機構の主軸となっていることを明らかにした。よって HAM では、Th1 様の炎症促進的な形質を獲得した感染細胞の発生と増加が HAM の病態形成に強く関与していると予想され、HAM 発症機構の理解および治療法開発に重要と考えられる。

HAM 患者脊髄組織における CCR4⁺Th1 様異常細胞の浸潤と蓄積Scale bars: 20 μ m

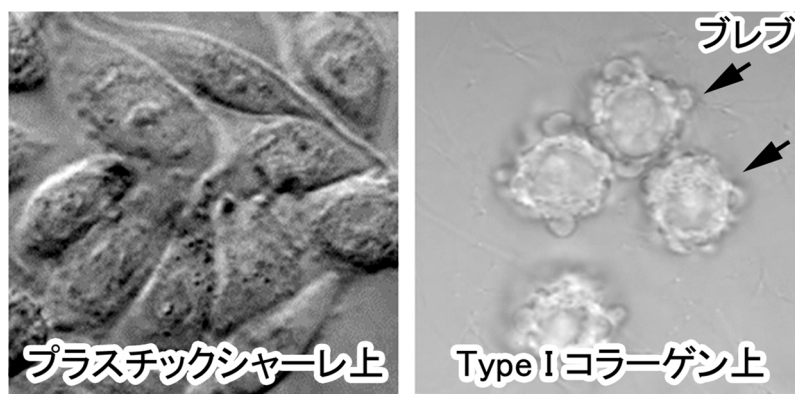
中枢神経系の症状を引き起こす結節性硬化症は、原因遺伝子 *TSC1* と *TSC2* の変異によって引き起こされる。これまでに、*TSC1* タンパク質と *TSC2* タンパク質の複合体は、mTORC1 リン酸化酵素複合体の活性を制御することでタンパク質合成を中心とした細胞内代謝を調節することが明らかにされている。神経における *TSC1/2* による mTORC1 の制御機構が明らかになりつつある一方、神経において mTORC1 の下流で制御される分子の挙動は十分に理解されていない。そこで本研究では、神経において *TSC1/2*-mTORC1 シグナル経路は特定の標的遺伝子群の発現をタンパク質合成の段階で制御することによって脳の発生と機能に寄与し、これらの標的遺伝子群の発現異常によって結節性硬化症が引き起こされると仮説を立て、神経において *TSC1/2*-mTORC1 シグナル経路依存的にタンパク質の合成が制御されている遺伝子を探索した。見出された遺伝子から合成されるタンパク質を解析した結果、神経系細胞では見出された遺伝子から生産される二種類のアイソフォームの量が mTOR 抑制により減少することが明らかになった。一方、非神経系細胞では一種類のアイソフォームのみが mTOR の制御を受けた。これらの結果から、特定のアイソフォームの生産が神経特異的に制御されていることが示唆された。

本研究による探索によって見出された遺伝子から複数のアイソフォームが産出されており、神経系細胞 Neuro-2a においてアイソフォーム 1 および 2 の両方が mTOR 阻害剤 Torin1 によって減少していた (A)。同様の解析を非神経系細胞である HEK293T において行ったところ、Torin1 処理によってアイソフォーム 1 の量は減少していたものの、アイソフォーム 2 の量は減少していなかった (B)。



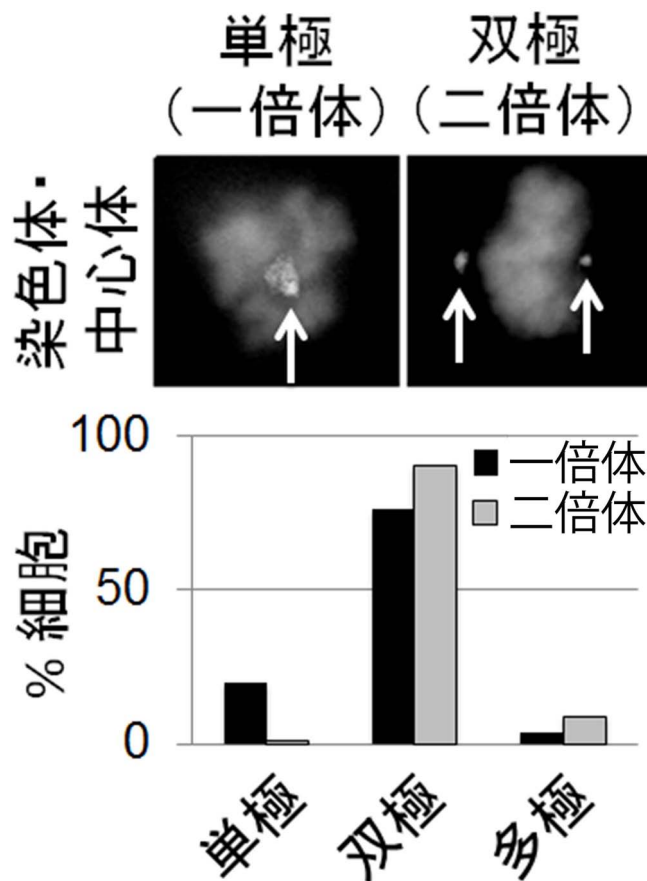
上皮細胞が癌化し浸潤癌になる過程において、細胞接着の喪失と遊走能の獲得は最も重要な段階となる。先行研究に於いて、この段階には初期発生の中胚葉や神経堤細胞の発生において観察される上皮間葉転換現象 (Epithelial mesenchymal transition: EMT) が関わっていると、これまで多くの研究が為されてきた。私は、大腸がん由来の上皮細胞 DLD1 細胞を用いて実験していたときに、通常のプラスチックシャーレに播種したときには安定的な細胞接着を示し細胞のシートを形成するのに対して、コラーゲンのゲル中に播種した場合、細胞の接着が崩壊しブレブと呼ばれる特徴的な細胞の形態を示すことに気付いた。さらにブレブを起こした細胞は、細胞外マトリックス内を遊走する能力を持つことを見出した。DLD1 細胞がブレブを形成する際に細胞接着分子の遺伝子発現は低下しておらず、またブレブを形成した DLD1 細胞を再びプラスチックシャーレに播種すると元の接着を有する上皮細胞の形態に戻る。このことから、EMT に依存しない細胞接着の喪失、遊走能の獲得機構としてブレブによる細胞運動が重要でないか、と考え、本研究ではブレブの形成に関わる分子機構の解明を行った。

ブレブの形成による細胞接着の破綻と遊走能の獲得



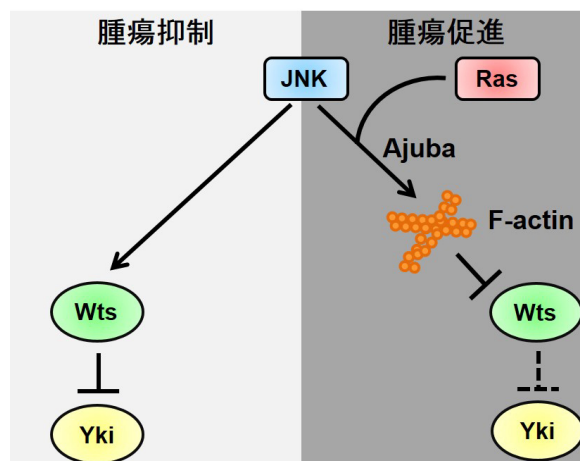
ヒトを含む多くの高等動物では体細胞期は厳密に二倍体世代に限定されており、人為的・病理的原因による、体細胞の一倍体化は重篤なゲノム不安定性を引き起こす。このことから高等動物の細胞複製システムは厳密に二倍体状態に適応していると考えられるが、倍数性が細胞複製現象に影響を及ぼす分子的仕組みは明らかでない。本研究では、一倍性のヒト培養細胞（HAP1細胞）とその二倍体コントロール細胞を用いて、倍数性の違いが染色体の量的情報として細胞システムに反映され、細胞複製のプロセスに影響を及ぼす分子的な仕組みを明らかにし、多くの高等動物体細胞で二倍体性が厳密に保持されることの生理的意義を明らかにすることを目標とした。生細胞観察、および細胞複製関連因子の細胞内局在解析や生化学解析によって、ヒト体細胞では一倍体状態特異的に中心体複製異常が生じ、その結果細胞分裂期紡錘体の単極化が引き起こされ、重篤な細胞分裂障害が起こっていることを見出した。分裂障害は染色体の分配異常を通してゲノムの不安定化を引き起こすことから、倍数性変化に応じた細胞複製系の制御異常が、動物細胞一般に見られる核相不安定化の原因となっている可能性が示唆された。

一倍体状態特異的な中心体複製異常、紡錘体形成異常および染色体整列異常



がんは、一部の正常細胞に複数の遺伝子変異が蓄積することによって細胞自律的に発生・進展すると考えられている。しかしながら、近年ヒトのがん組織は複数の異なる細胞集団によって構成されていることがわかりつつあり、これらの細胞集団が相互作用することによって細胞非自律的にがん発生・進展を促していると考えられている。しかしながら、細胞間コミュニケーションを介したがん進展の分子機構は依然として不明な点が多い。我々はこれまでに、ショウジョウバエ上皮をモデル系として、がん遺伝子 Src を活性化した細胞集団を組織中にモザイク状に誘導すると、Src 活性化細胞は JNK シグナルが誘導する細胞死によって組織中から排除されつつも、JNK シグナル依存的に周辺細胞の増殖を促進することを見出した。そこで、JNK シグナルによる腫瘍形成の制御メカニズムについて解析した。その結果、JNK シグナルは Hippo 経路の構成因子である Warts (Wts) の活性化を誘導し、それによって標的因子である Yorkie 活性を抑制することにより Src 活性化細胞の過剰な増殖能を抑制していることがわかった。一方で、Ras シグナルが活性化している細胞内において JNK シグナルは Ras シグナルと協調して LIM タンパク質である Ajuba の制御を介してアクチンフィラメントの動態変化を誘導し、それによって Wts を不活性化することで腫瘍形成を促進することがわかった。このように Src 活性化細胞は JNK シグナル活性の細胞増殖・細胞死のスイッチによってがん進展を細胞自律的・非自律的に制御していることがわかった。

JNK シグナルの腫瘍形成の促進と抑制のスイッチ機構

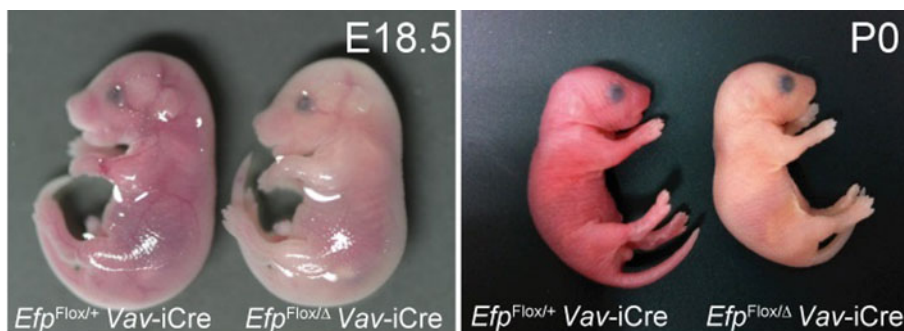


120 Ca 結合タンパク質 Efp による血球・免疫系制御の解析

岡本 一男

赤血球は末梢組織に酸素を運搬し供給する役割を担う、生命維持に必須の血液成分である。近年、輸血用血液の補給および副作用の見地より、幹細胞からの血液分化誘導系の開発が期待されており、赤血球分化の制御機構の解明は重要な課題とされている。私は EF-hand motif を有する分子 Efp が血球系にて高く発現していることを見出し、遺伝子欠損マウスを用いてその生理的意義を検討した。造血細胞系統特異的 *Efp* 遺伝子欠損マウスは、胎生期 E18.5 齢で皮膚の蒼白化が観察され、生後 1 日以内に貧血により死亡することが判明した。末梢血では赤血球数の低下、ヘモグロビン量の低下、ヘマトクリット値の低下が認められ、有核赤芽球の異常な増加が観察された。一方、血小板、CD3⁺T リンパ球集団、B220⁺B リンパ球集団、CD11b⁺骨髄・単球系細胞集団の数には差異が認められなかった。また造血細胞特異的 *Efp* 欠損マウスの胎児肝細胞を用いたキメラマウスでは骨髄と脾臓に未熟な赤芽球が多く観察され、重度な貧血を呈することがわかった。一方、T 細胞特異的 *Efp* 欠損マウス及び B 細胞特異的欠損マウスでは、骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節において各リンパ球サブセットの数・頻度に異常が認められなかった。本研究より、Efp は造血細胞系統の中でも赤血球形成に特異的に機能する必須因子であることが明らかとなった。

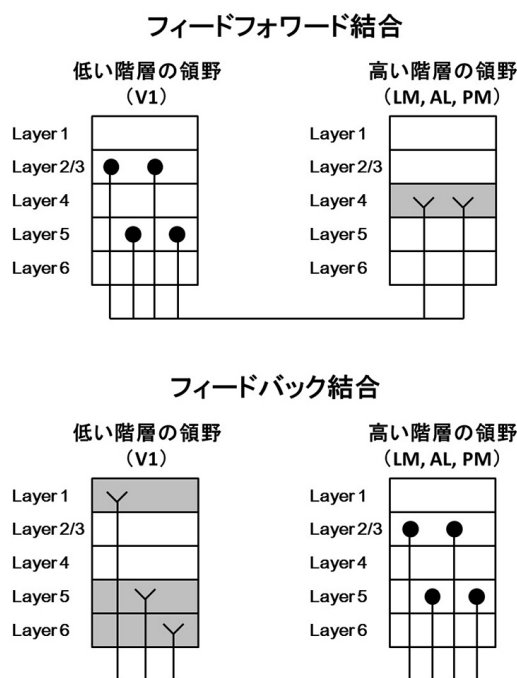
造血細胞特異的 *Efp* 遺伝子コンディショナルノックアウトは貧血を呈する
(左: 胎生期 18.5 日齢 右: 生後 0 日齢)



視覚情報は、網膜で受容され、外側膝状体 (LGN) を経て、大脳皮質 1 次視覚野 (V1) へと伝えられる。その後、V2、V3、V4、V5 などの高次視覚野へと伝達される。これらの視覚野は並列階層的に構成され、低次の領野から高次の領野に向かうに従い受容野が拡大すると共に、ローカルな特徴からよりグローバルな視覚パターンの検出が行われる。

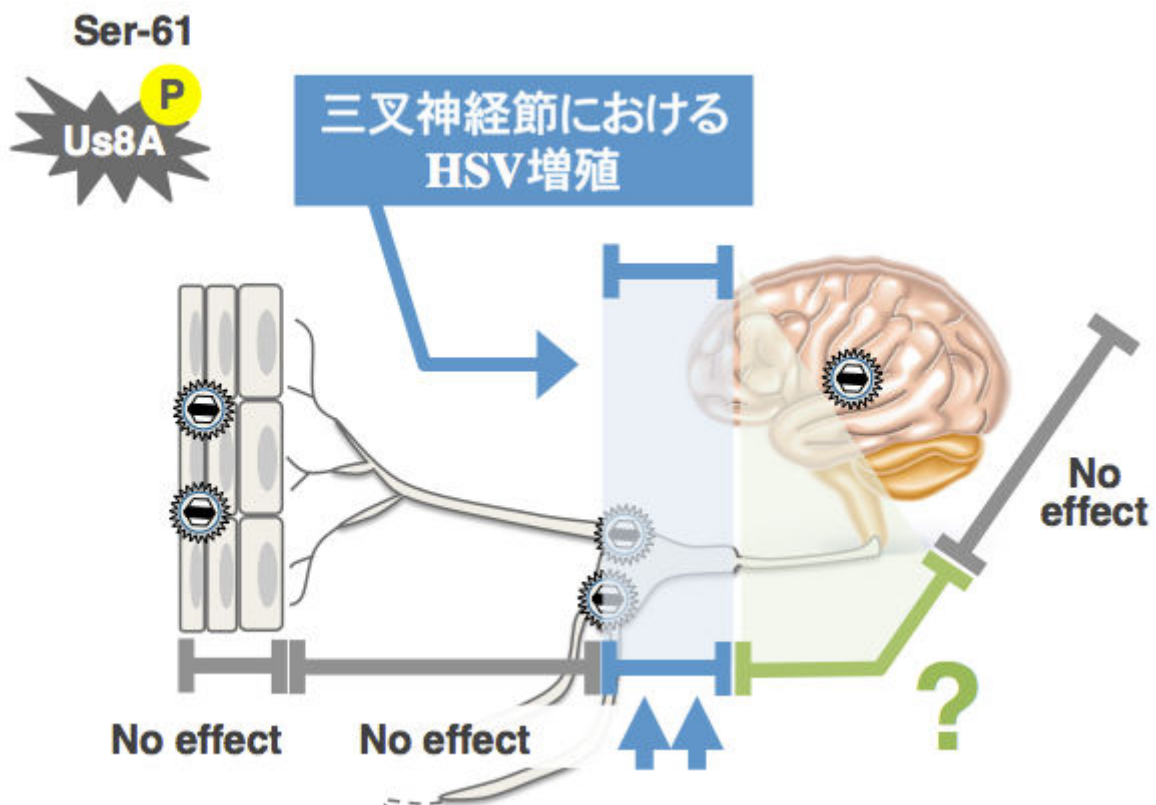
この大脳皮質の階層性は主に解剖学的な結合パターンにより規定される。低次の領野から高次の領野へのフィードフォワード結合では起始細胞の細胞体が 2/3 層あるいは 5 層に存在し、軸策終末が他の領野の 4 層に終わるのに対して、高次の領野から低次の領野へのフィードバック結合では 2/3 層および 5 層に起始細胞の細胞体を持ち、他の領野の 4 層を避けて 1 層または 5-6 層に軸策終末が入力する。ところが、大脳皮質の領野間におけるフィードバック結合の機能的な役割は、フィードフォワード結合に比べ、ほとんど解明されていない。特に、2/3 層に起因するフィードバック結合と 5 層に起因するフィードバック結合の役割の違いは、全く不明である。そこで本研究では、階層性領野間結合に着目し、大脳皮質のフィードバック結合の情報伝達機構を明らかにすることを目指した。その結果、マウス遺伝学、ウイルスベクター工学、2 光子顕微鏡イメージングおよび Optogenetics 技術を組み合わせることにより、特定の領野の第 2/3 層に起因するフィードバック結合と第 5 層に起因するフィードバック結合の機能的役割の違いを解析可能な実験系の構築に成功した。

大脳皮質の領野間におけるフィードフォワード結合およびフィードバック結合の違い



単純ヘルペスウイルス (HSV) は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに多様な病態を引き起こす。HSV は一度感染すると宿主の神経節に侵入・増殖の後、終生潜伏感染し、頻繁に再活性化し繰り返し病態を呈する。この問題の克服のため、ワクチン開発が渴望されている。本研究では疫学的知見および HSV 感染細胞のリン酸化情報に関するデータベースに基づき、Us8A というウイルス蛋白質とその新規リン酸化部位 Ser-61 に注目し、それらの HSV 病態発現能への影響を解析した。その結果、Us8A は中枢神経破壊能、末梢組織における病態発現能を司る一方、Us8A Ser-61 のリン酸化はこれらには関与せず、末梢組織から中枢神経系への HSV の侵入能、特に三叉神経節における HSV 増殖に関与することが明らかとなった。三叉神経節は、HSV の潜伏の場であり、本部位における HSV 増殖能の低下は、潜伏感染能や再活性化能の低下に直結すると考えられる。したがって、Us8A Ser-61 のリン酸化を阻害した組換え HSV は HSV 弱毒生ワクチンの開発のプラットフォームの1つとなることが期待される。

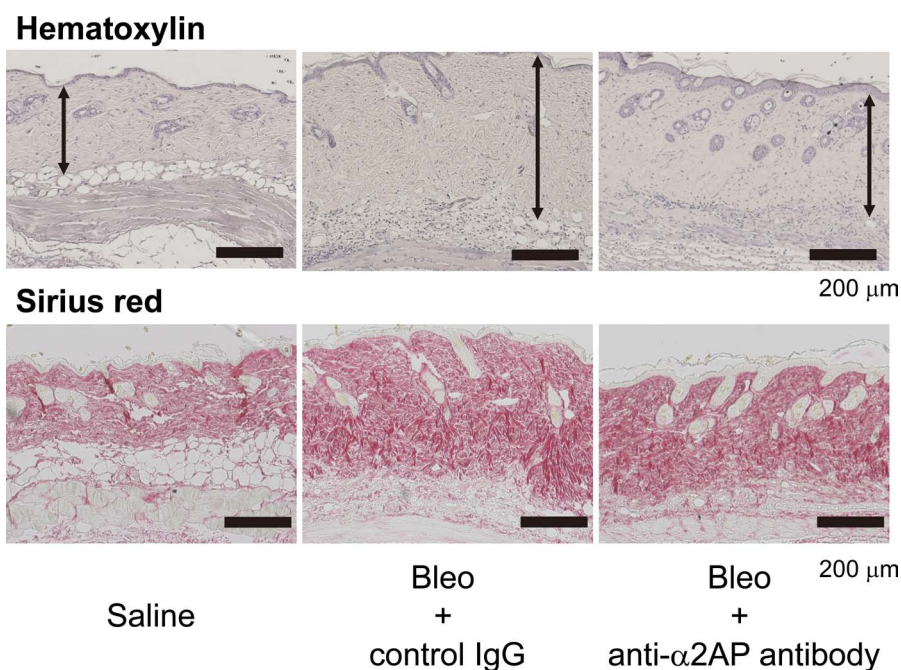
単純ヘルペスウイルス Us8A Ser-61 のリン酸化は、少なくとも三叉神経節におけるウイルス増殖を司る



全身性强皮症は皮膚及び肺、心臓、腎臓、消化管などの内蔵諸臓器の線維化を主徴とする系統的疾患で、いわゆる膠原病の1つに分類されている。その病因は、自己免疫現象、コラーゲン代謝異常、血管障害、遺伝的素因などの様々な要因が複雑に絡み合っているため、不明な点が多く、依然としてこの疾患の治療法は確立されていない。

我々は、強皮症の発症メカニズムを明らかにするために蛋白質分解酵素 plasmin の阻害因子として知られる α 2-antiplasmin (α 2AP) に着目し、本研究を行った。その結果、 α 2AP のマウスへの投与が、細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化を誘導し、皮膚の線維化を引き起こした。これに対し、bleomycin を用いた強皮症モデルマウスへの α 2AP の中和抗体の投与が、bleomycin が誘導する細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化を抑制し、皮膚の線維化病態の進行を緩和した。また、強皮症患者から採取した筋線維芽細胞において α 2AP の発現が顕著の増加していることを発見し、その細胞への α 2AP の中和抗体の添加が、細胞外基質の産生、筋線維芽細胞の分化を抑制した。以上の結果より、 α 2AP が強皮症の発症、進行に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

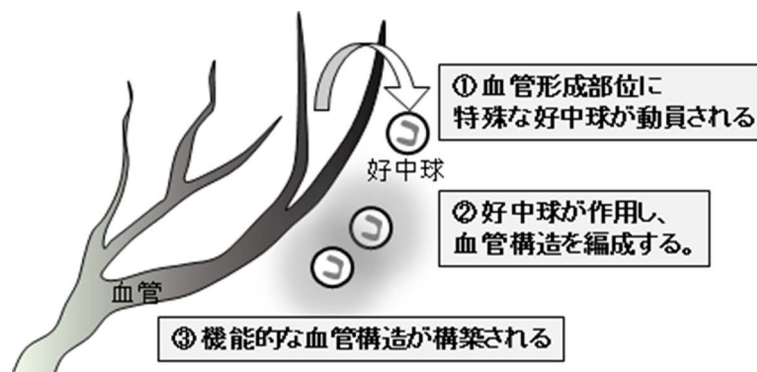
線維化における α 2AP の役割



血管は生体の隅々まで張り巡らされており、生命を維持するための基礎となる最大の組織である。そのため、血管構造を理解して形成機構を解明する「血管研究」は組織再生や疾病治療の面から注目されている。本研究では、血管系を動脈・静脈・毛細血管といった様々な管の立体的な配置によって形成される高次的な「血管組織」として捉え、その構造を形作る機構の解明を目指して研究を進めた。

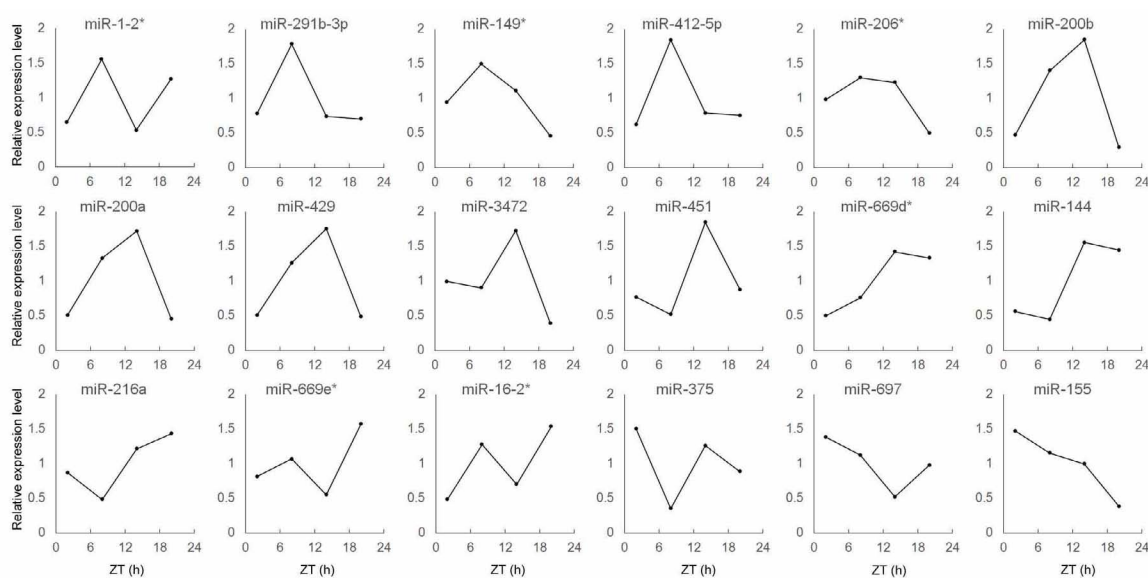
我々は、マウス胎児の皮膚発生モデルの組織学的な解析を進め、好中球様の特殊な細胞群が形成過程の血管周囲に蓄積することを発見した。これらの好中球系細胞の役割について検討するため、好中球に対する殺細胞性中和抗体にて depletion 実験を行ったところ、血管組織の構造において、走行性や形態異常を伴う大きな乱れが認められた。そこで、血管形成に関与する好中球群を「血管関連好中球」と定義付けするため、細胞表面マーカーによる分類を行ったところ、これまでに報告の無い新規のサブセットである事が明らかとなった。現在は、多光子顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング系にて、生体内での好中球がどのように血管形成に関与しているか検討を続けている。

血管関連好中球の概念図



地上の生物は地球の自轉周期に合わせた 24 時間周期の行動リズムを示すが、本来生物は自律性の体内時計を備えており、光環境下に置かれていなくても約 24 時間の概日リズムを刻むことが可能である。体内時計の中樞は脳の視交叉上核にあることが知られており、網膜からの光の信号を受け外的環境リズムに同調するとともに体中の組織や細胞が個々に持つ体内時計を同調させている。一方で光非存在下においては、生理現象リズムや行動リズムなどが次第に内的脱同調を起こすことから、視交叉上核非依存性体内時計の存在が予想される。本研究では、視交叉上核非依存性体内時計の本態として microRNA の関与を予想し、日内リズムを有する microRNA の網羅的解析を行った。その結果、既知 microRNA のうち約 10 %が顕著な発現量の日内リズムを有することが明らかになった。

顕著な日内リズムを持つ microRNA

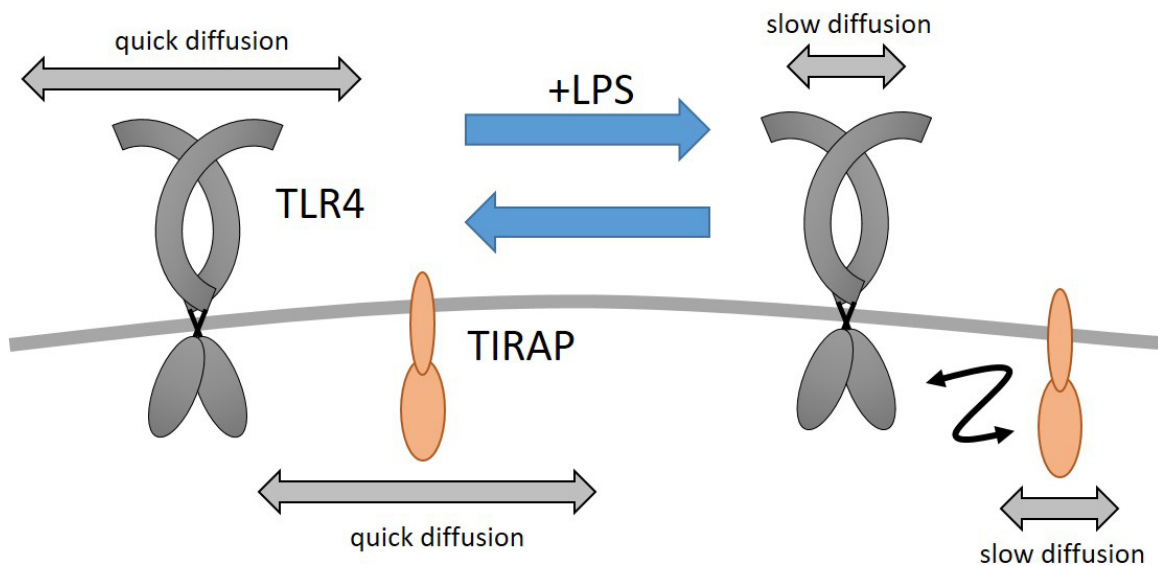


本研究は、グラム陰性細菌の細胞壁成分 LPS を認識する Toll 様受容体 (TLR) である TLR4 とその下流に位置する細胞質内のアダプター分子群との相互作用を、細胞表面近くの分子を一分子レベルで観測する技術、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いて観測し、TLR による情報処理を定量的に記述することを目指したものである。

蛍光色素と共有結合することで分子のラベリングを可能にする Halo-tag または大阪大学大学院工学系研究科の菊地和也氏と協力して開発した BL-tag と TLR4、TIRAP との融合タンパク質発現系を構築し、HEK 293 細胞に導入した。細胞を LPS で刺激前後、TIRFM を用いた一分子イメージングに供したところ、TLR4、TIRAP とも膜付近に局在し、かつ一分子の観察が可能であることが示された。その運動の解析から、両分子とも拡散が遅い状態と早い状態の 2 状態を取る可能性が示唆された。さらに、細胞を LPS または培地で刺激したのちに TLR4、TIRAP 分子の運動を解析したところ、LPS 刺激後に TLR4、TIRAP とも拡散が遅い細胞が増加することが示唆された。拡散速度が小さい TIRAP 分子の増加は、TIRAP と相互作用に必要な TLR4 の細胞内ドメインである TIR ドメインに依存しており、TIRAP の拡散速度減少はシグナル伝達の開始と強く相関していることが示唆された。

本研究ではさらに一分子イメージングによって得られた画像の解析手法として probabilistic nearest neighbor (PNN) 法を考案した。本法は通常用いられる分子トラッキングと違い、分子移動経路のリンキングに起因するエラーを回避することができる。シミュレーション実験により、本法が分子の密度が高い場合においても正確に拡散速度を推定しうることが示された。

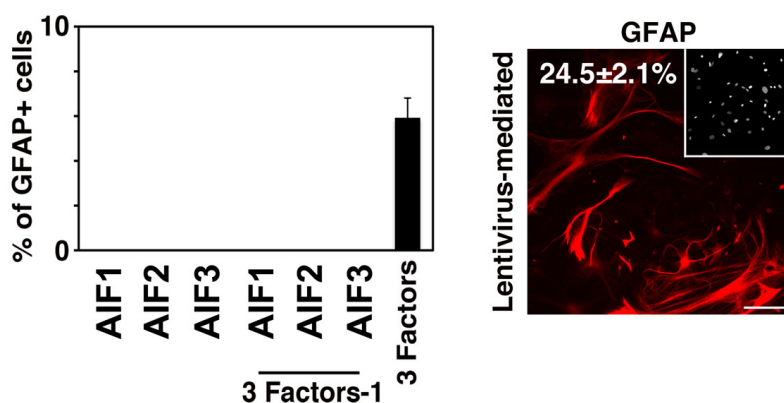
TLR4 と TIRAP の膜上での運動とその LPS による変化



従来、神経変性疾患や精神神経疾患に関する研究は神経細胞を中心に行われてきた。しかし、近年中枢神経系を構成する細胞群で神経細胞よりも多く存在するグリア細胞が特定の疾患の発症機転において重要な役割をすることが明らかとなっている。一方、iPS 細胞技術の確立により、ヒト由来の疾患感受性細胞の利用が可能となり、特により簡便な手法として線維芽細胞から直接的に特定の細胞へと分化転換を促す手法の確立が盛んに試みられている。本研究ではグリア細胞の中でもアストロサイトと呼ばれる細胞集団に着目し、アストロサイト誘導性の転写因子群の同定を試みた。その結果、ヒト線維芽細胞をアストロサイト様細胞へと直接分化誘導可能な3つの転写因子を同定した。さらに、この分子メカニズムを明らかとするためにこれら3つの因子に対する抗体を用いたChIP-seqを行った。その結果、これら3つの因子のうち、少なくとも2つに関しては協調的に作用していることが明らかとなった。また、線維芽細胞に3つの因子を導入後に、1細胞RNA-seqを実施した。その結果、線維芽細胞からアストロサイトへと分化転換する過程は4つに分類することが可能であり、全ての細胞がアストロサイト様の遺伝子発現を示すわけではなく、遷移状態にある細胞集団の同定が可能であった。

線維芽細胞からアストロサイトへの直接誘導

AIFs により線維芽細胞からアストロサイトへの直接誘導が可能であった。



[目的]

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は、アラキドン酸から産生される炎症性の脂質メディエーターで、好中球やマクロファージ等の炎症細胞を活性化する。本研究室では、LTB₄ の高親和性受容体である BLT1 を世界に先駆けて遺伝子同定し、その遺伝子欠損マウスの表現型解析を行ってきた。その結果、BLT1 欠損マウスでは、Th1、Th2、Th17 応答の全てが減弱するという興味深い知見を得ている。本研究では、免疫細胞における生理活性脂質とその受容体の機能を明らかにすることを目的とし、LTB₄ および BLT1 に着目し解析を行った。

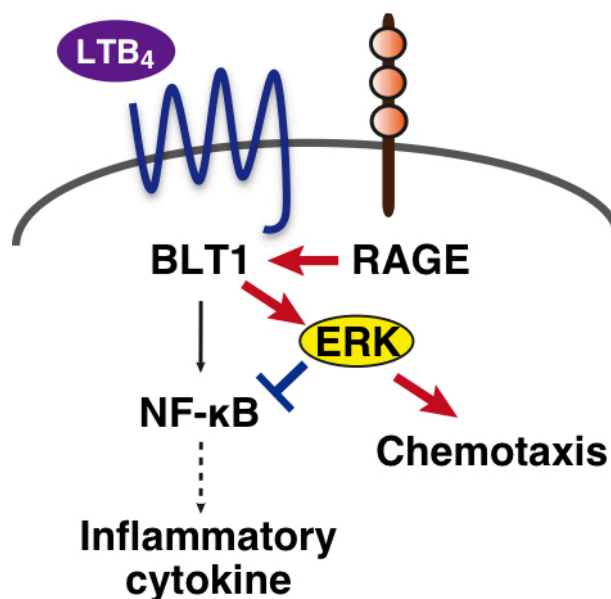
[方法]

免疫沈降： HeLa 細胞に BLT1 と RAGE を過剰発現し、免疫沈降を行った。WB： HeLa 細胞に BLT1 もしくは BLT1 と RAGE を共発現させ、LTB₄ で刺激した後の cell lysate を SDS-PAGE、WB に供した。定量的 RT-PCR： TriZol を用いて抽出した total RNA を逆転写し、Roche SYBR Green reagent を用いて PCR した。マウス： *Ager* 遺伝子欠損マウス (RAGE KO マウス) は金沢大学山本靖彦先生より供与いただいた。全ての実験は、順天堂大学動物実験倫理委員会により承認されたものである。

[結果]

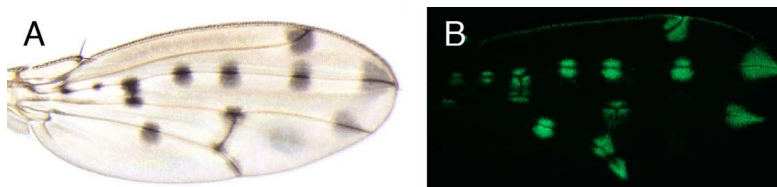
本研究では、RAGE が BLT1 と相互作用することを初めて見いだした。また、RAGE は、LTB₄-BLT1 の下流で活性化される ERK 経路を増強することで、NF-kappaB を抑制し、一方で、遊走を促進することを見いだした (Ichiki, Koga, et al. FASEB J., 2016)。

RAGE による LTB₄-BLT1 シグナルの新規制御機構



動物の模様の形成メカニズムについては良くわかっていない点が多い。本研究では、翅に水玉模様をもつショウジョウバエ *Drosophila guttifera* (ミスタマショウジョウバエ) を用い、模様をつくる細胞群で働く遺伝子を同定することを目指した。そのためには、模様をつくる細胞群を効率的に分離する方法の開発が必要である。ショウジョウバエの翅は、成熟した成虫では表皮細胞を失っているが、蛹期や羽化したばかりの成虫では、2層からなる表皮細胞を持っている。メラニン色素合成系の遺伝子 *yellow* のエンハンサーに GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子を連結し導入した系統を用いる事で、将来水玉が形成される場所の表皮細胞をラベルする事ができる。この細胞をクチクラ層から剥がし、ひとつひとつ解離するために、様々な酵素を用いた方法や物理的方法を試みた。その結果、高い歩留まりで表皮細胞を解離する方法は見つかなかった。また、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により将来水玉をつくる細胞群を切り抜く方法を試みたが、折り畳まれた翅の伸展と細胞の状態を良好に両立することができなかった。顕微鏡下で GFP の発現を指標として、外科手術用メスで物理的に切り抜く方法の洗練化を試みた。その結果、GFP 陽性細胞群を高い精度で取り出す事に成功した。また RNA 抽出の条件を検討し、水玉を形成する細胞群を用いて遺伝子発現解析をするための基盤が整った。

ミスタマショウジョウバエの成虫翅模様と、蛹での *yellow* 遺伝子の発現領域を示す GFP の発現パターン

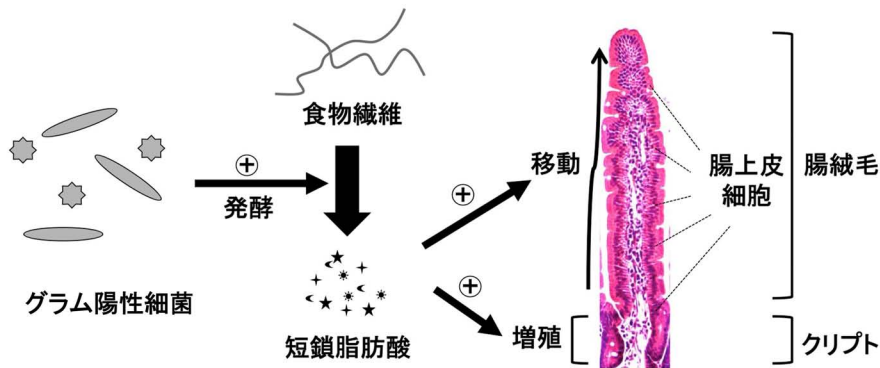


130 腸上皮細胞をモデルとした細胞寿命決定機構の解明

小谷 武徳

腸上皮細胞は絨毛下端のクリプトにおいて増殖・分化した後、絨毛の頭頂部へと移動し、絨毛先端より遊離して死滅する。最終分化した腸上皮細胞が死に到るまでの期間（寿命）はヒトやマウスにおいて約3-5日であることが知られるが、どのような因子が腸上皮細胞の寿命を制御しているかについてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、細胞外因子、特に腸内細菌による腸上皮細胞の寿命制御機構に注目した解析を行った。その結果、腸内細菌が腸上皮細胞の増殖及び移動を正に制御することで腸上皮細胞のターンオーバーを促進していることを見出し、特に腸内細菌の中でもグラム陽性細菌が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、腸内細菌の代謝産物である短鎖脂肪酸が腸上皮細胞の MAPK 経路を活性化し、腸上皮細胞の増殖及び移動を正に制御する可能性も見出した。以上の結果から、グラム陽性細菌の産生する短鎖脂肪酸が腸上皮細胞の MAPK 経路を活性化することで腸上皮細胞のターンオーバーを促進し、その結果として腸上皮細胞の寿命を短命化させている可能性が考えられた。

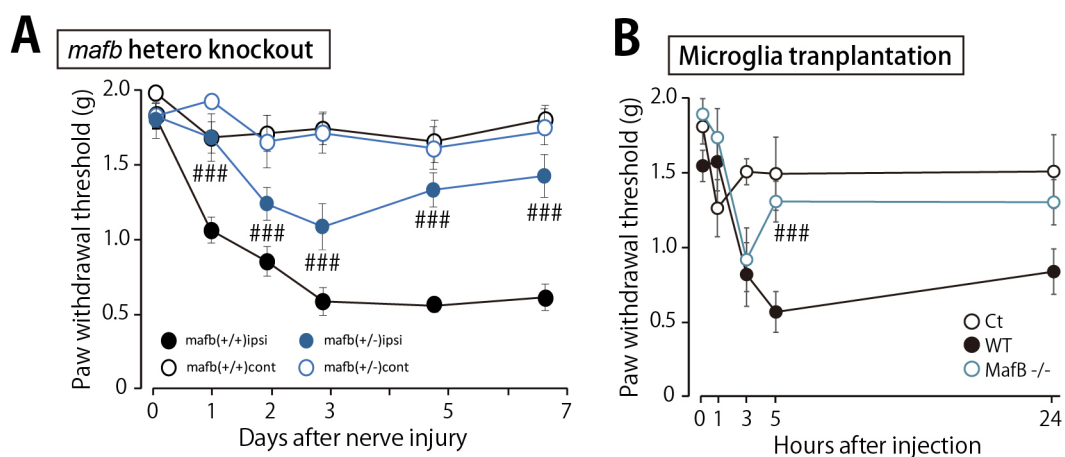
腸内細菌による腸上皮細胞の増殖及び移動の促進



脊髄ミクログリアは末梢神経の障害に応じ直ちに活性化型へと変化し、神経障害性疼痛を引き起こす。しかしながら、脊髄ミクログリアの活性化メカニズムについてはいまだ未解明な部分が多く、神経障害性疼痛の治療薬開発のために新たな知見が求められている。

本研究では、後肢へ投射する L4 脊髄神経を細胞体末梢側で切断することで神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、傷害神経の中枢端周辺の脊髄組織を用い免疫組織学的解析を行ったところ、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄組織中では一部のミクログリアの核内で、核内転写因子の一つである MafB が、脊髄ミクログリアの活性化と相関して発現増加することを見出した。*mafb* 遺伝子をノックダウンする目的で脊髄腔内へカテーテルを留置し、siRNA 投与の髄腔内投与を行ったところ、疼痛症状が軽減されることを見出した。初代培養ミクログリアの脊髄腔内移植による疼痛誘導実験において *mafb* 欠損初代培養ミクログリアを用いたところ、誘導された痛みは有意に減弱していた。本研究結果は、MafB は末梢神経傷害後の活性化ミクログリアに誘導され、疼痛発症に関与する重要な転写因子であることを示唆している。

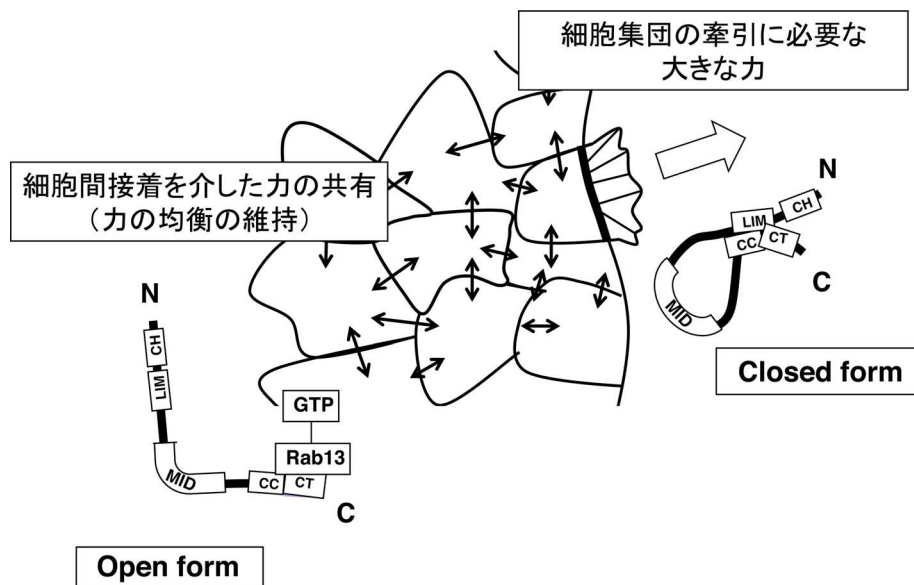
mafb 遺伝子欠損動物を用いた痛み行動評価



細胞の集団移動（集団的細胞運動）は、胎生期における組織・器官形成過程、血管新生、創傷治癒、さらには、ある種のがんの転移の際にも認められ、医学生物学的に非常に重要な現象である。集団的細胞運動では、細胞集団の先頭の一部の細胞では、集団をある方向に牽引するのに必要な強い力が生み出され、後方の大多数の細胞では、細胞間接着を介して先頭からの指令（牽引力）を隣接する細胞に伝搬してお互いに共有するといった力学的バランスが重要であると考えられる。我々は、Rab13 低分子量 G 蛋白質の標的蛋白質 JRAB の構造変化に着目して集団的細胞運動における力学的バランスの制御機構の解明を目指して研究を行った。

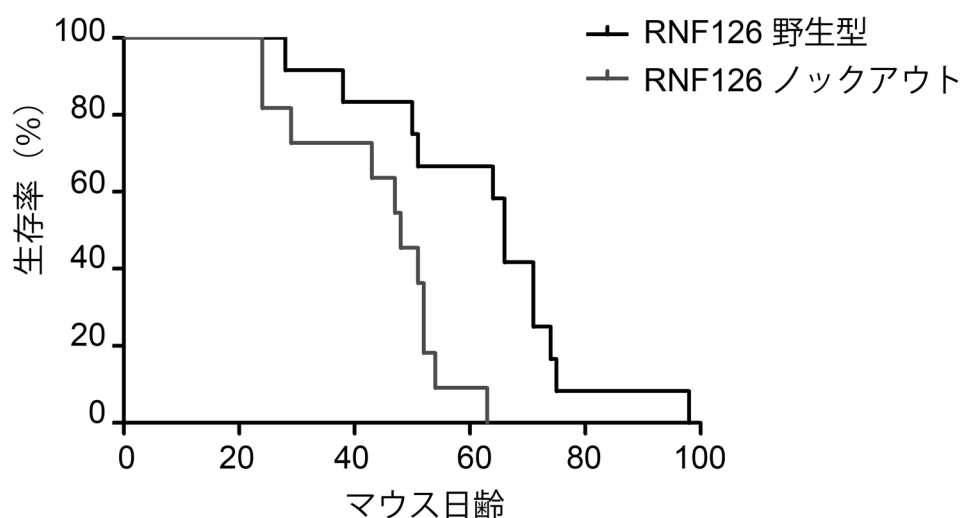
まず、医薬基盤研の水口賢司博士のグループとの共同研究でバイオインフォマティクスと生化学を組み合わせたアプローチで Rab13-JRAB 複合体の構造モデルの構築に成功し、JRAB の分子内結合が Rab13 との相互作用により解除されて closed form から open form への構造変化が引き起こされることを構造学的に証明した。さらに、open form と closed form 間の構造変化を捉えることができる JRAB の FRET プローブを作製し、その FRET プローブを用いて、実際に集団的細胞運動において JRAB が時空間的に構造変化していることを示した。また、これまでに JRAB の構造変異体 JRAB Δ CC や JRAB Δ CT を発現させた細胞では、集団移動において異常を認めていたが、その特徴を抽出・定量化することはできていなかった。本研究では、理化学研究所の横田秀夫博士のグループとともに得られていたライブイメージング像をコンピュータサイエンスの手法を用いて解析した。オプティカルフローによって自動定量化した細胞集団の動きの解析結果から構造変化を自由にできる JRAB の野生型は、open form や closed form に固定された JRAB Δ CC や JRAB Δ CT よりも効率の良い、バランスのとれた細胞集団の動きを可能にすることを証明した。さらに、大阪大学の出口真次教授との共同研究で、バイオメカニクスの手法を用いた力学的解析を行って JRAB の構造変化が細胞集団の先頭で生み出される牽引力を可逆的に調節していることを見出した。以上の結果から、細胞集団の効率の良い動きを支える力学的バランスを JRAB という 1 分子の構造変化が生み出していることが明らかになった。

集団的細胞運動における JRAB の構造変化と力学的バランス



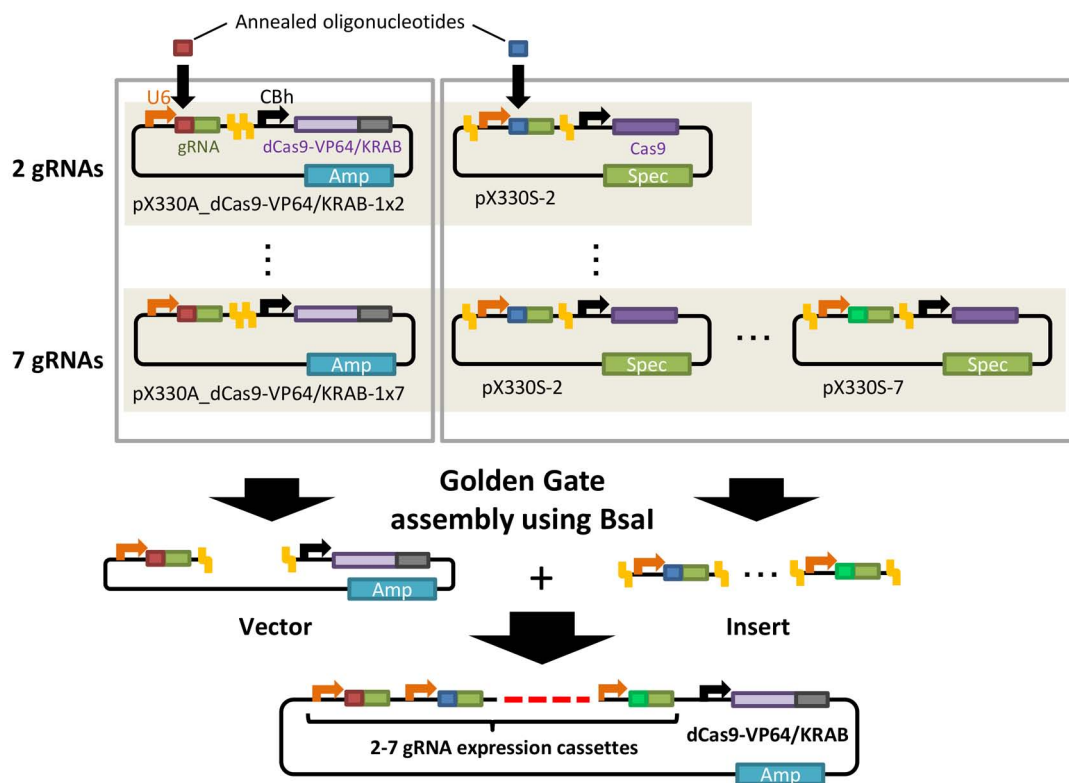
膵癌は極めて予後不良ながんである。我々は、RNF126 が乳癌細胞株などで腫瘍増殖を促進することを明らかにした。しかしながら、膵癌において RNF126 ががんの悪性を制御するかについては不明である。そこで本研究では、RNF126 が膵癌においてどのような役割を果たしているかについて検討を行った。膵癌モデルマウス作製の間、まず RNF126 の発現制御機構の解析を行った。その結果、RNF126 は ERK シグナルにより活性化される転写因子 ELK1 により転写促進されることが明らかとなった。次に、膵癌細胞 AsPC1 で RNF126 をノックダウンした結果、AsPC1 のヌードマウス皮下での腫瘍増殖が抑制され、乳癌、肺癌細胞株の結果と同じ結果であった。RNF126 欠損膵癌モデルマウス作製後、コントロールマウスとの生存期間の検討を行った。その結果、予想外のことに、RNF126 欠損により膵癌モデルマウスの生存期間が短縮した。以上の結果から、膵癌モデルマウスにおいては RNF126 はがん抑制的に働くことが明らかとなった。膵癌細胞株と膵癌モデルマウスで異なる結果が出たことから、RNF126 はがんのステージによってがん促進的、抑制的と異なる役割を果たす可能性が示唆された。

コントロールおよび RNF126 欠損膵癌モデルマウスの生存期間



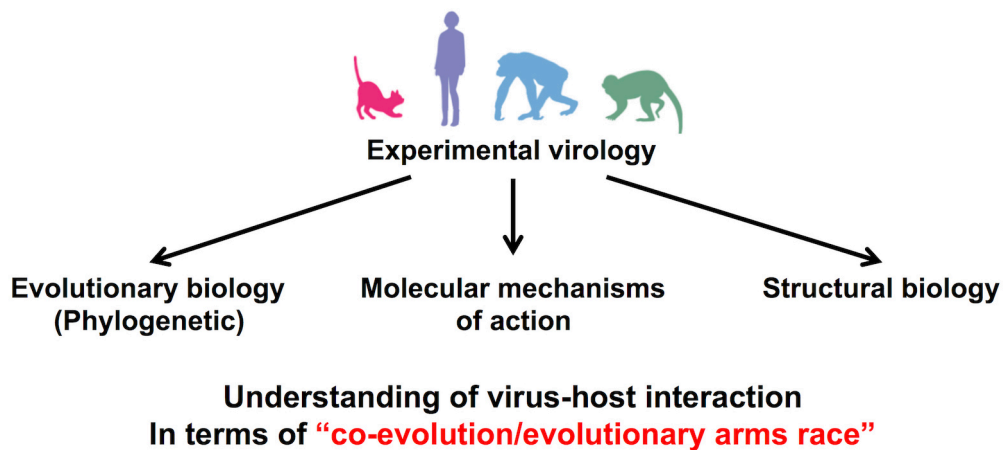
癌の発症に関わる癌遺伝子ならびに癌抑制遺伝子の異常として、DNA 配列そのものに変異が生じるゲノム異常と、エピゲノム状態が変化することで遺伝子発現に異常をきたすエピゲノム異常が知られている。近年のゲノム編集技術の進展に伴い、ゲノム異常を修復することは可能になってきているものの、エピゲノム異常を正常化するための技術（エピゲノム編集）は未だ発展途上である。本研究では、癌の抑制を目指したエピゲノム編集技術のプラットフォームを整備するため、ゲノム編集システムの一つである CRISPR-Cas9 における Cas9 タンパク質のヌクレアーゼ活性を不活性化させた dCas9 に、転写活性化ドメインである VP64 または転写抑制ドメインである KRAB ドメインを融合させた dCas9-VP64/KRAB を効率的に作用させるためのベクターシステムを構築した。本システムでは、単一のプラスミドベクター上で多数のガイド RNA と dCas9-VP64/KRAB タンパク質を同時に発現させることができ、これにより単一遺伝子の発現を強力に制御できるだけでなく、複数遺伝子の発現を同時に制御することも可能となった。実際のところ、臨床癌の発症プロセスは段階的なゲノム異常やエピゲノム異常の蓄積に依存すると考えられており、その正常化のためには複数遺伝子の発現制御が必須である。本研究において確立した複数遺伝子の同時制御システムは、エピゲノム編集による癌抑制法の開発に大きく貢献することが期待される。

多重エピゲノム編集のための dCas9-VP64/KRAB ベクターシステム



昨今、高病原性鳥インフルエンザウイルスや中東呼吸器症候群ウイルス (MERS-CoV)、エボラウイルス、ジカウイルスなど、種間伝播を介した新興ウイルス感染症が世界的な脅威となっている。新興・再興ウイルス感染症の問題は日本においても例外ではなく、2013年以降、重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) による致死性疾患の報告やデング熱の流行報告が相次いでいる。新興ウイルス感染症は、異種を自然宿主とするウイルスがヒトに種間伝播・適応進化・病原性獲得することにより勃興するが、その成否を規定する基本原理は不明である。本研究では、エイズウイルスを始めとした、ヒト・サル・ネコのレンチウイルスを対象とし、実験ウイルス学的解析とさまざまな解析手法 (分子系統学、数理科学、構造生物学、実験動物学) を融合させた独創的な研究体系により、種間伝播・病原性獲得のメカニズムの一端を解明することを目的とした。まず、ヒト化マウスモデルを用いた感染実験系により、HIV-1 の祖先ウイルス SIV_{cpz} のヒトへの適応メカニズムの一端を明らかにした。また、培養細胞を用いたウイルス学的実験と分子系統学、構造生物学の融合研究により、サル・ネコのレンチウイルスとほ乳類の進化的軍拡競争の分子メカニズムを明らかにした。さらに、実験ウイルス学と数理科学の融合研究により、HIV-1 増殖効率を定量的に解析することに成功した。

実験ウイルス学とさまざまな解析手法 (分子系統学、数理科学、構造生物学、実験動物学) の学際融合研究による、ウイルスの種間伝播・病原性獲得原理の理解・解明

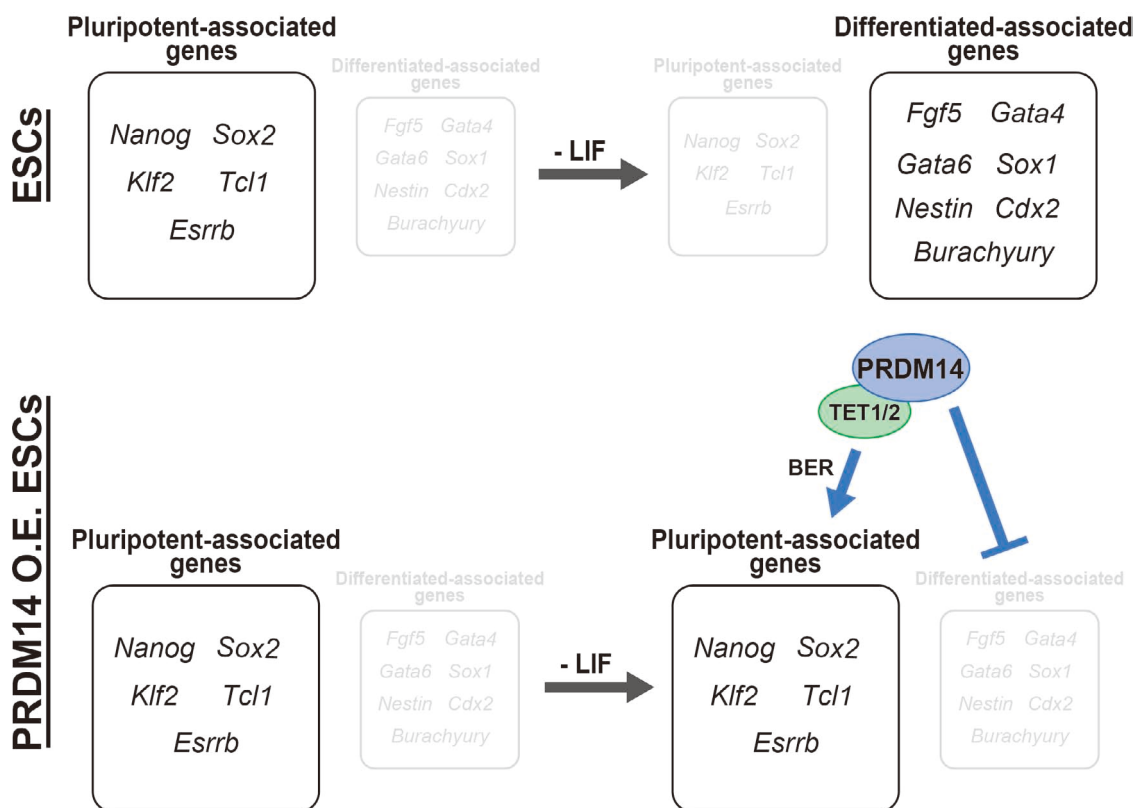


136 生殖系列の成立に必須の因子 PRDM14 の動作原理解析	関 由行
---	-------------

多能性細胞である ES 細胞は、多能性を制御する転写因子群の内在性ネットワークと液性因子によるシグナルの入力によって未分化性が維持されている。マウスの発生過程において、ES 細胞の起源である内部細胞塊は着床後 Nanog、Tcl1 及び Sox2 の発現を消失したエピブラストへ一旦分化し、エピブラストから体細胞と生殖細胞が出現する。体細胞は、細胞特有のエピゲノム情報を確立・維持することで特殊化した機能を獲得するが、生殖細胞は発生、分化、成熟過程においてエピゲノム情報を再編成することで、次世代の個体形成を可能にしている。

本研究では、生殖系列特異的に発現する転写制御因子 PRDM14 による多能性制御機構の解明を行った。ES 細胞に PRDM14 を高発現し、LIF 非依存的な未分化性維持活性を検証したところ、長期間安定的に未分化性を維持することができた。またこの細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ 3 胚葉への分化が確認されたことから、PRDM14 には LIF 非依存的な ES 細胞の未分化性維持活性が存在することが明らかとなった。また、この PRDM14 による LIF 非依存的な ES 細胞の未分化性維持活性は TET 及び塩基除去修復阻害剤で抑制されたことから、PRDM14 が能動的脱メチル化を介して多能性制御ネットワークを安定化している可能性が考えられる。

PRDM14 による LIF 非依存的な ES 細胞の未分化性維持機構 (モデル)



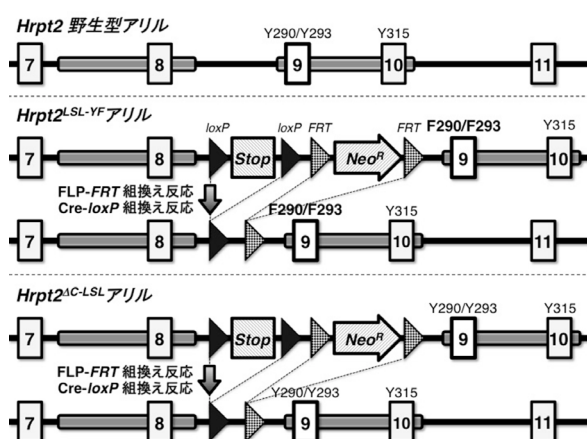
目的：機能亢進型および欠損型の Parafibromin を発現するノックインマウスの発がん解析を行い、Parafibromin のチロシン脱リン酸化が発がんに果たす役割を明らかにする。

方法：機能亢進型 Parafibromin をコードする *Hrpt2^{LSL-YF}* ノックインアレルを持つマウスを Cre 組換え酵素および FLP 組換え酵素をする発現マウスと交配し、得られたコンパウンドマウスの表現型を解析する。C 端側欠失型 Parafibromin を構成的に発現する *Hrpt2^{ΔC-LSL}* アレルをもつノックインマウスを出し、表現型解析を行う。

結果：*Hrpt2^{LSL-YF}* アレルをホモ接合型で持つマウスは得られなかった。YF 点変異を持たない *Hrpt2^{ΔC-LSL}* アレルも同様にホモ接合型個体は得られなかったことから、Parafibromin の C 端側はマウスの個体発生に不可欠な役割を持つことが示唆された。*Hrpt2^{LSL-YF}* アレルをヘテロ接合型で持つ個体と全身性に FLP 組換え酵素を構成的に発現するトランスジェニックマウスを交配した結果、予想に反して、変異 *Hrpt2* アレルと *FLP* 遺伝子を両方持つコンパウンド個体は得られなかった。この結果は、全身性に Cre 組換え酵素を構成的に発現するトランスジェニックマウスを用いた際にも同様であった。一方で、YF 点変異を持たない *Hrpt2^{ΔC-LSL}* アレルのヘテロ接合型個体を用いた同様の交配実験では、変異 *Hrpt2* アレルと *FLP* 遺伝子または *Cre* 遺伝子を共に持つコンパウンド個体が得られた。これらの結果から、*FLP* 遺伝子または *Cre* 遺伝子を持つ個体では、*Hrpt2* 遺伝子の YF 点変異の存在に依存した致死性の発生異常が誘導されることが示唆された。この致死性の発生異常を回避するために、タモキシフェン投与依存的に全身性で FLP 組換え酵素を発現する *FLP-ERT2* トランスジェニックマウスを用いて同様に交配を進めた結果、*Hrpt2^{LSL-YF}* アレルと *FLP-ERT2* 遺伝子を共に持つコンパウンド個体を得ることに成功した。現在、このコンパウンド個体の表現型を継続的に観察している。

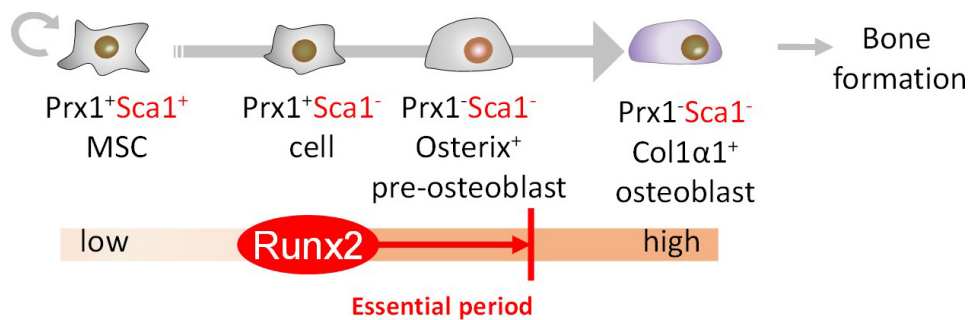
C 端側欠失型 Parafibromin を構成的に発現する *Hrpt2^{ΔC-LSL}* ヘテロ接合型ノックインマウスを継続的に飼育した結果、約 80 週齢で病変を発症する個体が観察された。現在、観察された病変の病理学的診断を進めるとともに、病変発症への *Hrpt2^{ΔC-LSL}* アレルおよび C 端側欠失型 Parafibromin の役割を明らかにするために解析を進めている。

Cre/FLP 組換え酵素に依存したコンディショナル発現型 *Hrpt2^{LSL-YF}* ノックインアレル
ならびに構成的発現型 *Hrpt2^{ΔC-LSL}* ノックインアレルの構造



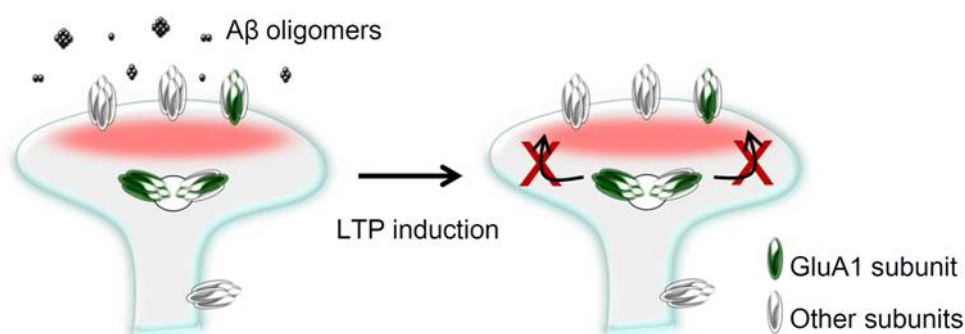
間葉系幹細胞 (MSC) は、自己複製能と間葉系細胞への多分化能を有する幹細胞である。同幹細胞に由来する骨芽細胞は、骨密度恒常性の維持を担うとともに、骨粗鬆症をはじめとする骨代謝性疾患の病態発症に関与する。本研究で注目する Runx2 は、MSC から骨芽細胞への唯一無二の必須転写制御因子である。従来は、どういった MSC が、前骨芽細胞や骨芽細胞となり、骨形成に関与するのかが分かっておらず、そのため、Runx2 が骨芽細胞分化系列のどういった段階で重要であるのかも長らく不明であった。既存の複数の MSC マーカーを用いたマウス遺伝学的解析とフローサイトメトリー解析を組み合わせた解析結果から、その内の2つ、Prx1 と Sca1 が共陽性な MSC が最も幹細胞性の高い MSC であり、まず Sca1 陰性となり、次に Prx1 陰性 な Osterix 陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成への分化過程の詳細を明らかにした。また、Prx1⁺Sca1⁺細胞から Prx1⁻Sca1⁻Osx⁺細胞になる段階までの間に、Runx2 が骨形成のうえで必須の働きを持つことが分かった。

骨形成を担う間葉系幹細胞の細胞生物学的な特徴づけ



近年、シナプス機能の制御異常と認知症などの神経疾患との関係が指摘されている。とりわけアルツハイマー病では、その発症原因分子アミロイドベータのオリゴマー ($A\beta$ オリゴマー) が、シナプス伝達の抑圧やシナプス可塑性の発現障害を引き起こし、記憶・学習障害に関わると示唆されている。しかしながら、認知症発症前から初期にかけて $A\beta$ オリゴマーがどのように神経伝達物質受容体に影響し、シナプス伝達異常が起こるのかは未だ明らかでない。そこで本研究は、記憶・学習の細胞基盤と考えられている海馬の長期増強現象 (LTP: long-term potentiation) に着目した。そして、全反射顕微鏡を用いた独自の可視化実験系を用いて、 $A\beta$ オリゴマーが LTP 発現に際して AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) のどのような動態に作用するのかを解析した。その結果、 $A\beta$ オリゴマーを培養した海馬神経細胞に投与した後に LTP 誘導刺激を加えると、蛍光標識された AMPA 受容体サブユニット GluA1 の輝度は増加しなかった。また、GluA1 のエキソサイトーシスの頻度増加が抑制されることも明らかにした。以上の結果より、 $A\beta$ オリゴマーはサブユニット特異的に AMPA 受容体の数の増加を阻害し、LTP 発現を抑制することが示唆された。

シナプス病変時における AMPA 型グルタミン酸受容体の動態異常に関する仮説



140 神経細胞の繊毛異常が引き起こす繊毛病の発症機構解明

茶屋 太郎

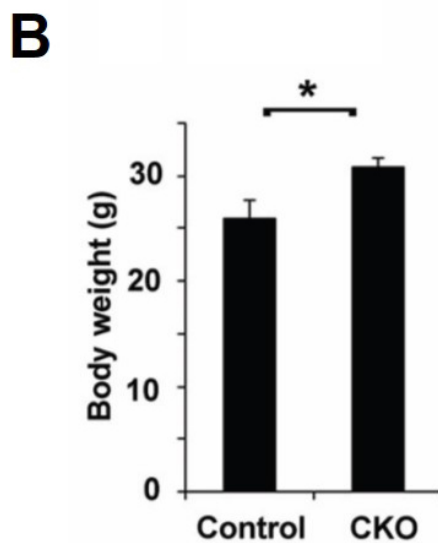
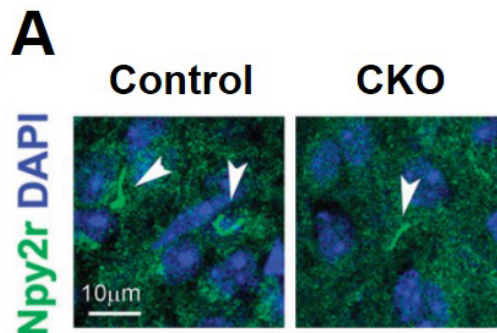
繊毛は細胞外からのシグナルを受け取る情報入力装置として機能し、ヒトにおける繊毛の形成・機能障害は発生や恒常性維持の異常に起因する「繊毛病」と呼ばれる多様な疾患を引き起こすことが知られている。本研究課題では、「繊毛病」のうち肥満の発症メカニズムの解明を目的とした。

培養細胞を用いた嗅覚受容体を除く 138 個の G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) の繊毛局在解析スクリーニングにより、そのリガンドが摂食行動に関わるプロラクチン放出ホルモン受容体 (PRLHR)、ニューロペプチド FF 受容体 1 (NPFFR1)、ニューロメジン U 受容体 1 (NMUR1)、ニューロペプチド Y2 受容体 (NPY2R) が繊毛に局在することを見出した。次に Npy2r 発現細胞において Cre リコンビナーゼを発現する BAC-Npy2r-Cre トランスジェニックマウスと、繊毛内輸送構成因子 Ift80 を Cre 依存的に欠損させることができる Ift80 flox マウスを掛け合わせた。このマウスでは Npy2r の繊毛への局在化が減少しており、体重の増加が認められた。

これらの結果より、Npy2r 陽性の繊毛は体重コントロールに重要な役割を担うことが示唆された。本研究により、繊毛の形成・機能異常による肥満の分子メカニズムの解明が進んだ。

Ift80 flox/flox; Npy2r-Cre⁺ (CKO) マウスの表現型解析

- (A) Ift80 CKO マウスの視床下部弓状核では Npy2r 陽性繊毛の数が減少している (矢頭)。
- (B) Ift80 CKO マウスでは体重増加が認められる。

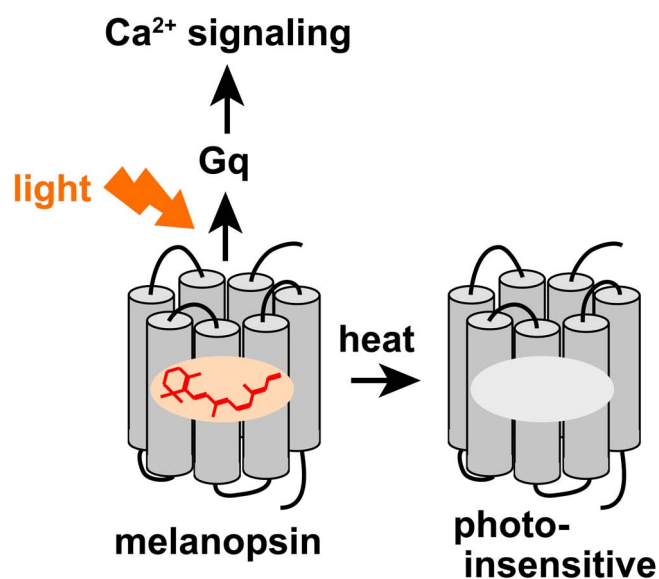


多くの動物は、外界の光情報を視覚のみならず、概日時計（体内時計）の調節などにも利用している。ヒトなど哺乳類では、網膜神経節細胞の一部が光受容能を持ち、その細胞（光感受性神経節細胞）からの光入力、概日時計の光リセットや瞳孔反射に寄与している。そして、網膜神経節細胞の光受容機能は、メラノプシンと呼ばれる光受容タンパク質が担っている。メラノプシンは、光を受容すると、Gq タイプの G タンパク質を活性化して細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすため、任意の細胞においてカルシウムシグナリングを光によって制御するツールとしても注目されている。

私たちは、哺乳類のメラノプシンが持つ分子特性を明らかにすることが、「視覚以外」の光受容機能をより深く理解するとともに、カルシウムシグナリングを光制御するツールとしてメラノプシンを利用する上でも重要であると考えた。

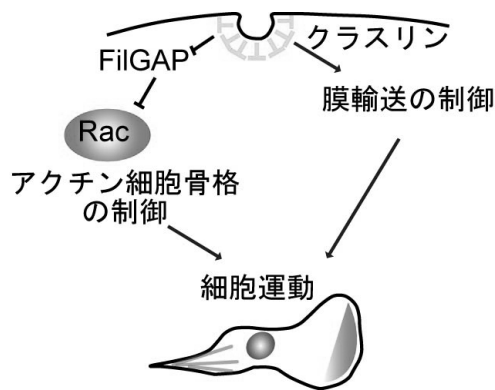
解析の結果、哺乳類メラノプシンにおいて、発色団であるレチナール分子との結合が熱的に不安定で、自発的に切断されることを見出した。このメラノプシンの特性は、網膜神経節細胞が環境光を飽和せず感知するために重要であるとともに、細胞内カルシウム濃度を光によって「適度に」上昇させるツールとしても有用であると考えられた。

カルシウムシグナリングを光で駆動するメラノプシンの分子特性の模式図



細胞の運動は個体発生から免疫応答、そしてがん細胞の浸潤転移まで様々な生命現象に関わる。細胞運動には運動に必要な力を発生させるアクチン細胞骨格が適切に制御される必要がある。また、環境を認識し細胞の進行方向を決定するために接着因子や受容体の適切な輸送も必要である。つまりアクチン細胞骨格と細胞内輸送を協調させることが効率的な細胞運動に必要であるが、その明確なシグナル伝達経路は未だ明らかとなっていない。Rhoファミリー GTPase の Rac と Rho はアクチン細胞骨格を制御する。我々は Rac の不活化因子 FilGAP を同定し、FilGAP が細胞接着やがん細胞の浸潤を制御することを明らかにしている。FilGAP の活性制御機構解明のために FilGAP 結合タンパク質を探索したところ、クラスリン被覆の主要構成タンパク質であるクラスリン重鎖を新規 FilGAP 結合タンパク質として同定した。クラスリン重鎖は FilGAP に結合し、*in vitro* および細胞内で FilGAP の RacGAP 活性を阻害した。siRNA によるクラスリン重鎖の発現抑制は FilGAP を活性化し、乳がん細胞のアメーバ型遊走を促進した。これらの結果から、がん細胞の遊走においてクラスリンは従来から知られる細胞内輸送を制御するだけでなく FilGAP の活性阻害を介してアクチン細胞骨格を制御していることが示唆された。

がん細胞の運動におけるクラスリンによる細胞内輸送と細胞骨格の協調制御モデル

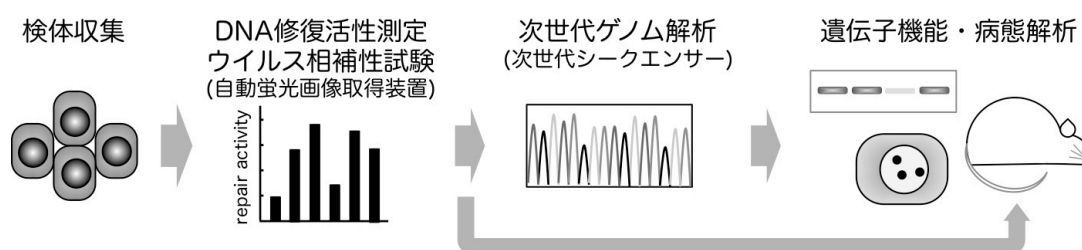


143 損傷 DNA 修復に関わる新規因子の同定と機能解析

中沢 由華

損傷 DNA 修復および DNA 損傷応答の異常は、発がんや老化を誘発すると考えられる事から、これらのメカニズム解明は極めて重要な研究分野である。本研究は、損傷 DNA 修復および DNA 損傷応答に異常を示す遺伝性疾患の解析から、疾患発症に関わる新規因子を同定し、その機能を明らかにする事を目的として行った。DNA 修復および DNA 損傷応答機構の異常が疑われる遺伝性疾患症例について、各種 DNA 修復活性を測定し、ウイルス相補性試験や次世代ゲノム解析により、疾患発症に関わる遺伝子変異の同定を試みた。既知の遺伝子上に疾患原因変異が同定される中、新規疾患責任遺伝子変異を強く疑う症例が抽出され、本遺伝子の機能解析を開始した。

新規疾患責任遺伝子探索の流れ

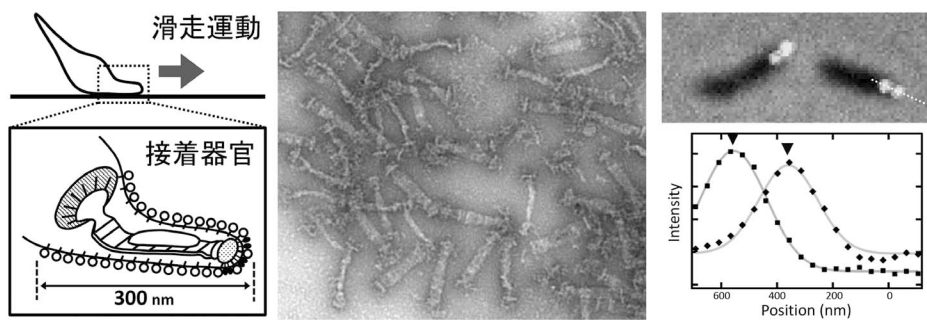


144 肺炎マイコプラズマが宿主表面で歩くメカニズムの解明

中根 大介

日本で毎年数千～数万人が発症している“マイコプラズマ肺炎”は *Mycoplasma pneumoniae* という小さな細菌によって起こります。この菌は体の片側に小さな突起“接着器官”を形成し、この突起で宿主組織の表面にはりつき、はりついたままに動く“滑走運動”を行います。この接着と滑走はマイコプラズマの感染に必須です。接着器官は、多種類のタンパク質により形成される複雑な装置で、ゲノム情報を見るかぎり既知の生物に類似のものは一切ありません。そのため、構造も接着と運動のメカニズムもあまり明らかになっていませんでした。本研究では、まず接着器官を単離・精製して、その形状と大きさをナノメートルレベルで明らかにしました。次にそこに含まれるタンパク質を網羅的に質量分析で同定し、3つの構成タンパク質を新たに発見しました。さらに、それまでに見つかったものを含む13種類のタンパク質それぞれに蛍光タンパク質を融合したものを菌体内で発現し、蛍光顕微鏡を用いて詳細に解析することで13種類のタンパク質それぞれが接着器官のどの部分を構成しているかを決定しました。そして、タンパク質の局在から、滑走運動メカニズムの解明に踏み込みました。

運動装置の模式図、運動装置の単離、および構成タンパク質の局在



145 致死性腎障害の発症機序および全身病態への関与の解明

中野 大介

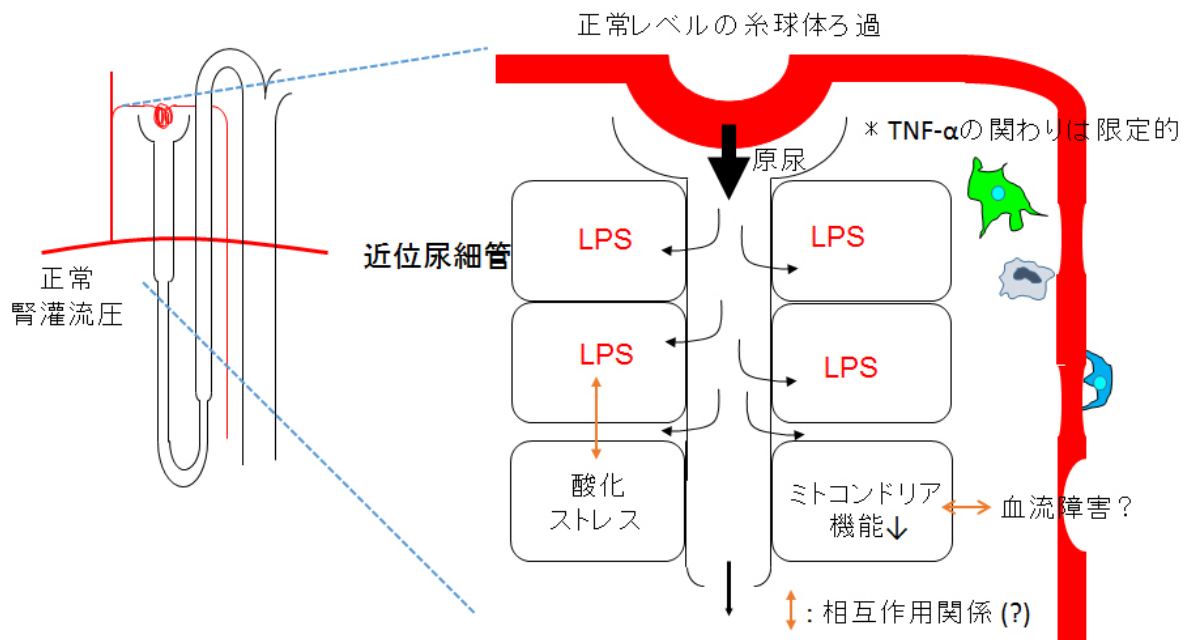
【目的】 急性腎障害の診断は糸球体ろ過量の減少と尿量減少によりなされる。しかしながら、これらの現象がどのような機序で生じているかは、深く検討されていない。我々は生体イメージング技術により管腔内における尿流速を計測する手法を開発し、敗血症性急性腎障害初期における乏尿の発生メカニズムについて検討した。

【方法】 麻酔下マウスの腎臓を2光子レーザー顕微鏡により観察した。各種蛍光色素（血漿成分：rhodamin B-70kD dextran、ミトコンドリア膜電位：tetramethyl rhodamine methylester、尿細管管腔内液流：FITC-inulinあるいはLucifer yellow等）を静脈内注射することにより、急性腎障害病理、発症機序を解析した。

【結果】 敗血症下では、糸球体ろ過速度が正常域の状態であっても、近位尿細管において尿流が遅滞することが明らかとなった。その機序は、内毒素症の場合はTLR4に依存し、サイトカインストームの一因子であるTNF- α の関与は限定的であり、尿細管局所でのメカニズムが考えられた。傍尿細管毛細血管に血流不全が確認され、その周囲尿細管においてミトコンドリア機能低下が確認されたが、乏尿との直接的関与を示す結果は得られていない。

内毒素症初期における乏尿の原因とその作業仮説

糸球体からろ過された原尿は近位尿細管において、その速度が減少し、下流ネフロンへの尿の供給が閉ざされる。管腔内液（尿）の流速減少は、LPSが蓄積した近位尿細管において生じているが、酸化ストレスや血流障害、ミトコンドリア機能低下の関わりは明らかになっていない。

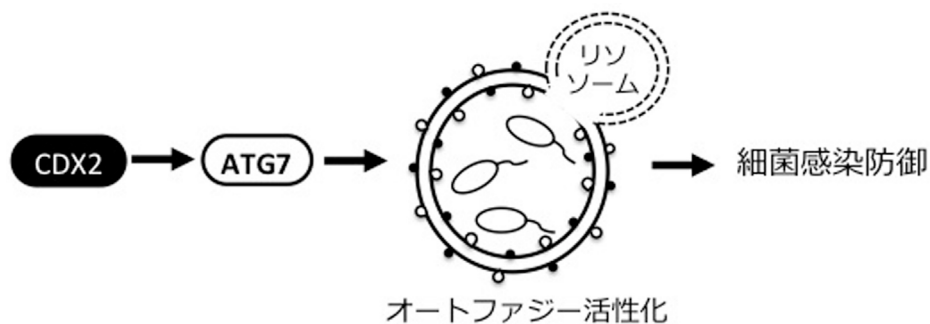


146 炎症性腸疾患に関わる CDX2 を介した粘膜防御機構の解明

中谷 真子

近年、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患への根本的治療法の開発が不可欠となっている。本研究では、独自に発見した腸上皮細胞特異的に発現する CDX2 の粘膜免疫系における機能を踏まえ、CDX2 を介した腸上皮細胞による新たな粘膜免疫防御の制御基盤の解明を目的としている。まず、*Cdx2* 遺伝子変異マウスにおいて潰瘍性大腸炎モデルである DSS 腸炎を誘発すると、腸炎が著明に増悪化したことから、CDX2 が腸炎の病態に重要な分子であることが明らかとなった。また、細菌感染性腸炎における CDX2 の役割を明らかにするため、*in vitro* での CDX2 による細菌感染防御機能について検証した。その結果、CDX2 を発現誘導した腸上皮細胞に細菌感染を行った場合、細胞内での細菌増殖が抑制された。さらに、CDX2 はオートファジー必須酵素である ATG7 を介して細菌感染防御に働くことが明らかになった。これらの結果から、CDX2 は腸粘膜における細菌感染防御に不可欠な役割を担い、腸管における粘膜防御機構において重要な分子であることが示された。

CDX2 は腸上皮細胞の粘膜免疫防御機構の司令塔として働く



- 1) CDX2はDSS腸炎の発症・病態に重要な分子である。
- 2) CDX2の結合因子としてオートファジー必須酵素ATG7を同定。
- 3) CDX2が腸上皮細胞においてオートファジーを活性化する。
- 4) CDX2がATG7を介して細菌感染防御に機能する。

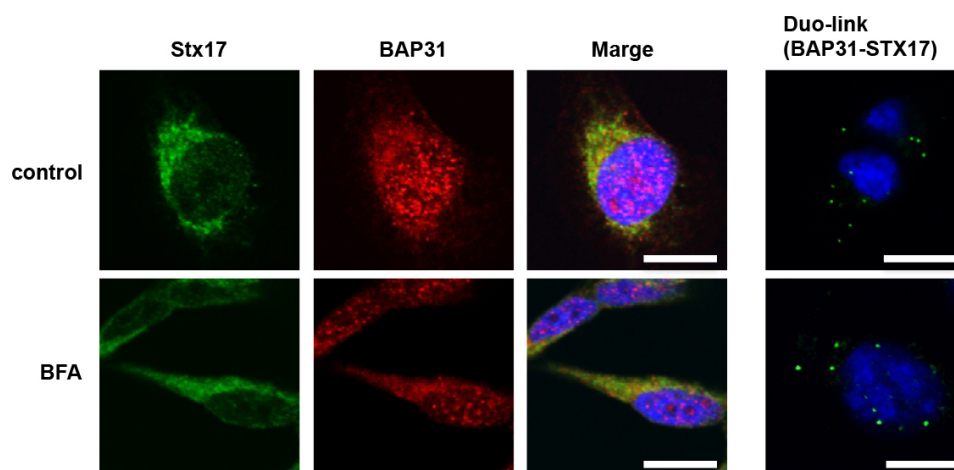
147 オートファジーと細胞死を制御する癌抑制遺伝子の発見

難波 卓司

多くの固形癌や転移した癌は低栄養環境に置かれ、増殖を行うにはその環境に適応する必要がある。そのため、癌細胞の低栄養環境（小胞体ストレス）への適応に重要な細胞応答である小胞体ストレス応答とオートファジーに関与するシグナル分子は新たな抗癌剤のターゲットとして有望であると考えられている。我々はこれまでに B-cell receptor-associated protein 31 (BAP31) が小胞体ストレス応答による細胞死の誘導に重要であることを見出しているが、細胞の生存にも関与していることを示唆しており、BAP31 は癌細胞の低栄養環境への適応をコントロールしている癌抑制遺伝子のような働きをしている可能性を考えている。

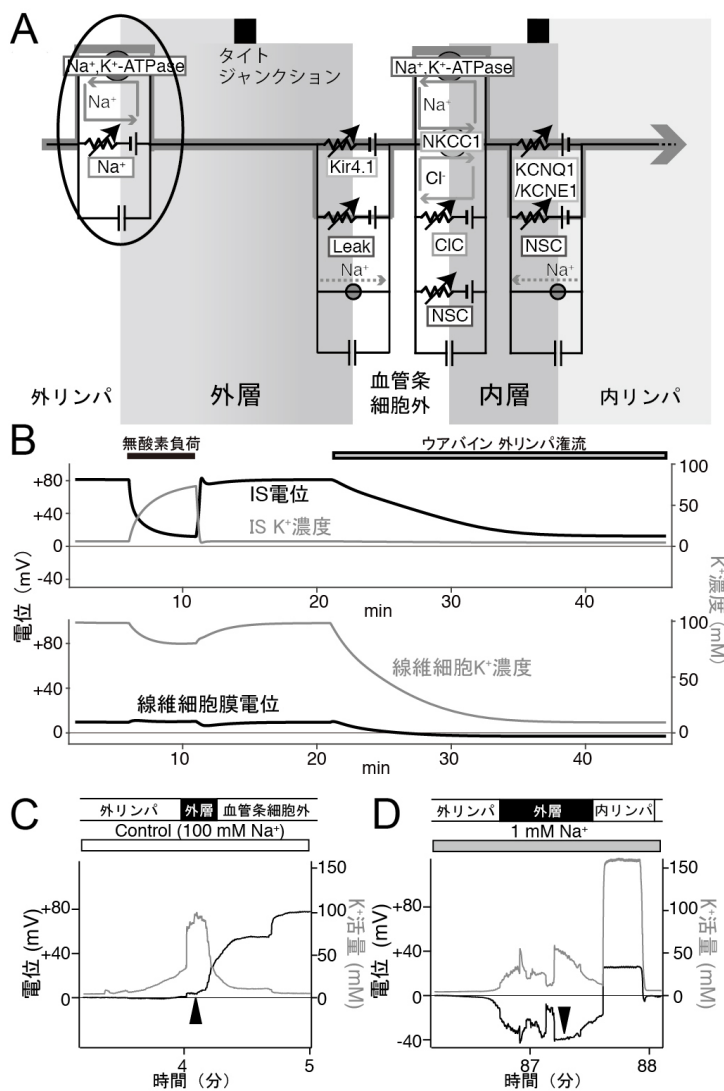
そこで本研究では BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているのか、及びその制御機構の検討を行った。その結果、BAP31 の発現を shRNA により抑制するとオートファジーが誘導され、この誘導は BAP31 の発現抑制による細胞死の耐性化機構に関与していることが示唆された。また、免疫沈降法と免疫染色法により BAP31 は Stx17 と相互作用することが確認された。Stx17 はオートファジーの誘導する Atg14 複合体の活性化に関与しているため BAP31 はこの経路の活性化を制御している可能性がある。

BAP31 と Syntaxin17 (Stx17) の細胞内局在と Duo-link 法による BAP31-Stx17 複合体の形成



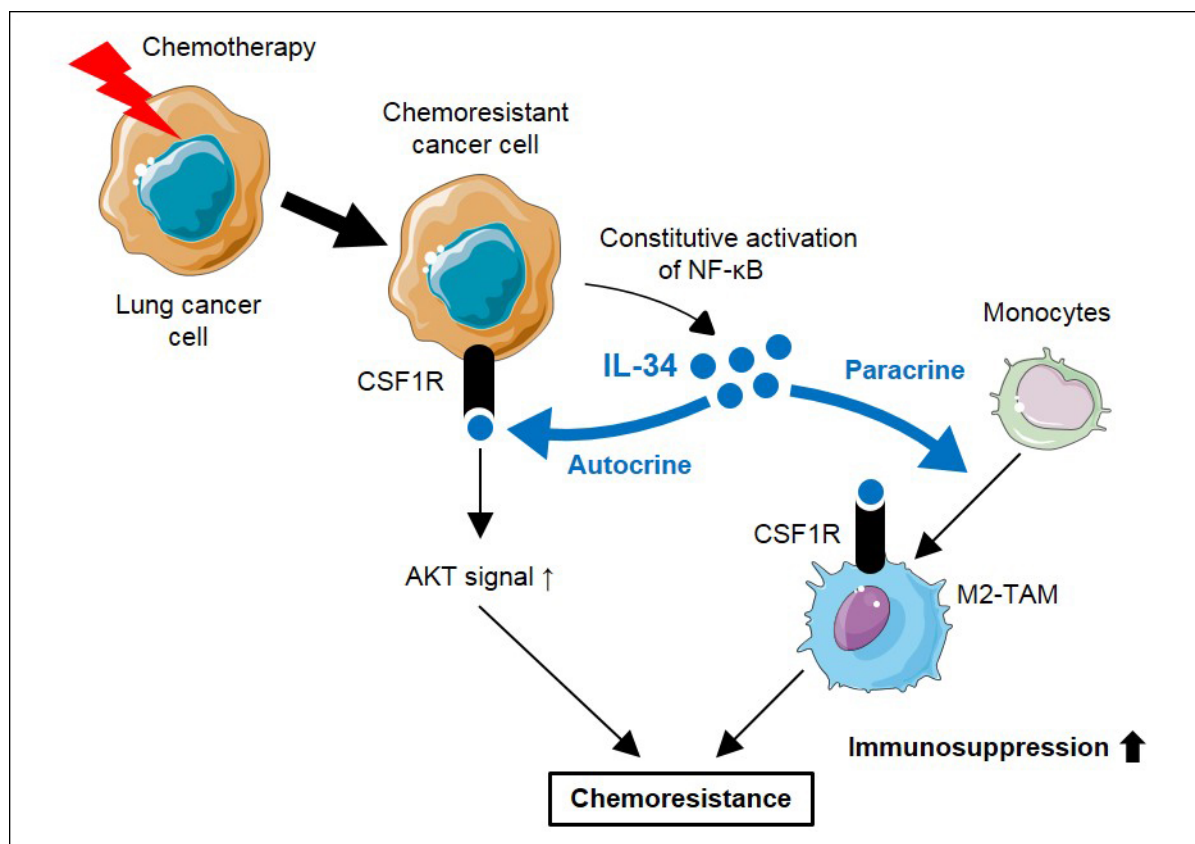
本研究では、加齢性難聴に関連する内耳電気環境である蝸牛内リンパ液高電位の成立機構に関して、理論科学と実験科学の両手法を用いて研究を行った。理論科学的手法として、過去に著者らが発表した蝸牛内 K^+ 循環の数理モデルを MATLAB を用いて改定した。新規数理モデルでは、通常の細胞膜の特性とは異なり、蝸牛内のラセン靭帯の線維細胞において Na^+ の透過性が高い膜を仮定した。この新規モデルは過去の実験結果を良く再現した。次に、モデルの仮定が正しいことを検証するため、 K^+ イオン電極を用いた電気生理実験を行った。その結果、数理モデルにおける仮定に合致して、線維細胞膜のイオン透過特性は、 K^+ や Cl^- に比較して Na^+ の透過性が大きいことが示唆された。今回明らかになった線維細胞のイオン透過特性は、内リンパ液高電位の成立に不可欠な要素であり、この組織特性の破綻は加齢性難聴を始めとする難聴の原因となりうる。今回の成果は、今後の難聴病態の解明に大きく寄与するものと考えられる。

新規蝸牛数理モデルによるシミュレーションと検証実験



抗がん剤治療は、現代の肺がん治療における重要な柱の一つである。しかし、抗がん剤耐性となった肺がんの治療は依然として難しく、耐性獲得のメカニズムの解明や新規治療法の開発が望まれている。腫瘍組織にはがん細胞だけでなく免疫細胞も存在することが知られており、著者らは「抗がん剤耐性肺がん細胞が腫瘍組織にて免疫細胞を変化させ治療抵抗性を生じている」という仮説を立て研究を行った。まず、抗がん剤感受性ヒト肺がん細胞 (A549) を抗がん剤 (ドキシソルピシン) に暴露し、抗がん剤耐性株 (A549-DR) を作製した。A549-DR について免疫関連因子の発現を調べたところ、A549-DR はインターロイキン-34 (IL-34) を新たに産生するようになることを発見した。精査の結果、IL-34 の発現は NF- κ B の活性化により誘導されていることがわかった。IL-34 は腫瘍組織にてマクロファージを免疫抑制型の腫瘍随伴マクロファージ (M2 型マクロファージ) へと誘導し、免疫抑制的腫瘍微小環境の形成に関与していた。また A549-DR では、IL-34 の受容体である CSF1 レセプターの発現が亢進しており、がん細胞自身が IL-34 をオートクライン的に受容し、AKT シグナル系を活性化してがん細胞自身の生存維持を助け、結果的に抗がん剤耐性を高めていることを見出した。また、*in vivo* 実験においても、IL-34 をノックアウトした A549 (A549-DR Δ IL-34) では IL-34 を産生する A549-DR に比べ、抗がん剤治療により腫瘍増大が顕著に抑えられることが明らかになった。これらの結果は、抗がん剤耐性肺がん細胞が産生する IL-34 が免疫抑制的な腫瘍微小環境の形成を促進していること、抗がん剤耐性を高めるのに寄与していることを示し、IL-34 の阻害は抗がん剤耐性肺がんの新たな治療法となる可能性があることを示している。

A novel pathogenic role of IL-34 in cancer chemoresistance



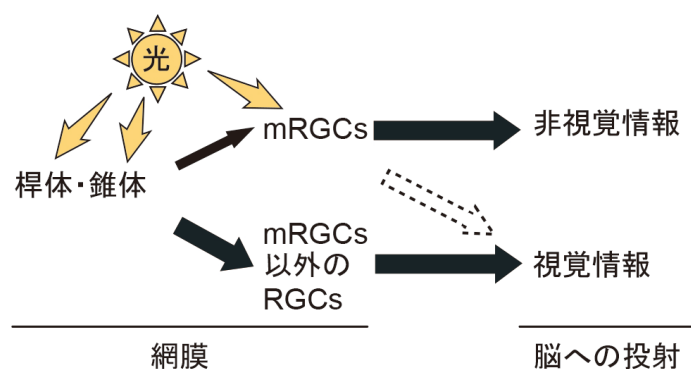
Tumor-associated macrophages (TAMs) constitute the dominant myeloid cell population in many tumors and play critical roles in multiple aspects of tumor microenvironment including chemoresistance. Growing evidence suggests that anticancer cytotoxic agents increase, directly or indirectly, the frequencies of protumoral M2-like TAMs, which in turn limit the antitumor efficacy of cytotoxic chemotherapy. Although the contribution of TAMs to chemoresistance has been clarified in detail, little is known about mechanisms that affect TAMs under chemotherapeutic conditions. In this report, we identify interleukin-34 (IL-34) as an important factor released by A549 and H1299 lung cancer cells after chronic exposure to doxorubicin and cisplatin, respectively. In addition to the enhancement of monocytes differentiation into M2-polarized macrophages, IL-34 also mediates survival of chemoresistant cells through the enhancement of Akt signal pathway downstream of CSF1R expressed in chemoresistant cells. Consistent with *in vitro* results, doxorubicin-resistant A549 cells knocked-out for IL-34 showed increased sensitivity to chemotherapy and decreased frequencies of CD163⁺ macrophages compared to IL-34-expressing doxorubicin-resistant A549 cells in a humanized mouse model. Finally, IL-34 was also found to be expressed in primary lung cancer tissues of cancer patients, and correlated with poor prognosis when highly expressed. Together, these findings identify a new role for IL-34 as an important molecular driver of chemoresistance in tumor microenvironment, suggesting it as a promising target for sensitizing chemoresistant tumors to cancer therapy.

哺乳類の光応答反応は「見ること」である視覚と「視覚以外の光応答」である非視覚応答の2種に大別される。哺乳類の網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) のうち数%の細胞には青色光感受性の光受容体であるメラノプシンが発現しており、視細胞層の桿体・錐体に加えて第三の光受容細胞として機能する。このメラノプシン発現網膜神経節細胞 (melanopsin-expressing retinal ganglion cells: mRGC) は自身が感受した光のみならず、桿体・錐体からの光情報を統合して脳に伝達し、視覚以外の光応答を担う。

私たちはこれまでに齧歯類を用いた研究により、網膜発現光受容体メラノプシンが概日時計の光入力を担うことを明らかにした。霊長類でのメラノプシンの機能を明らかにする第一歩として、桿体・錐体の光受容体には作用せずメラノプシンの機能を阻害する低分子化合物「オプシナマイド」を細胞を用いたスクリーニングとマウスを用いた *in vivo* 評価により手に入れた。昼行性の霊長類であるコモンマーモセットの網膜にもメラノプシンが発現しており、青色光感受性を保持していることを明らかにした。現在、オプシナマイドを使用してコモンマーモセットにおけるメラノプシンの機能阻害を行い、様々な非視覚応答・視覚応答に与える影響を検証している。

視覚応答と非視覚応答

矢印の幅は情報伝達の程度を反映する。目が受容した光情報はRGCを介して脳へ伝達される。非視覚情報は概日時計の位相調節、瞳孔収縮、松果体からのメラトニン分泌の抑制、片頭痛の光による悪化などを引き起こす。

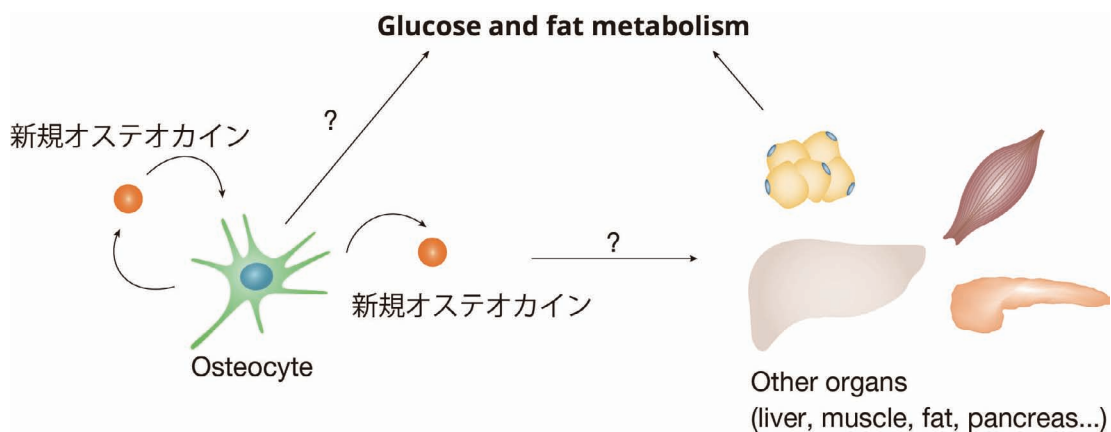


151 骨細胞産生性新規オステオカインによる糖脂質代謝制御

林 幹人

これまで、骨は単に他の内分泌系や神経系、免疫系などによって制御される受動的な臓器であると考えられてきた。しかしながら近年、骨が外的環境などに応答しながら能動的に全身の臓器に関わっている外向性の臓器であることが明らかにされつつある。本研究では、我々が発見した骨細胞特異的新規ノックアウトマウスの表現型解析から、このマウスで欠損させた液性因子が骨細胞由来新規オステオカイン候補因子となりうる可能性を見出し、当該因子による糖・脂質代謝制御の可能性を考え、研究を遂行した。当該マウスでは高週齢において食餌摂取量には変化が見られないにもかかわらず、有意な体重増加をみとめた。これらのマウスでは、内臓脂肪・皮下脂肪共に有意に増加し、血中トリグリセリドや全コレステロール、グルコースなどの著明な増加が検出された。今後、白色脂肪、褐色脂肪、筋肉、膵臓、肝臓、各種内分泌組織などでの糖・脂質代謝関連遺伝子・タンパク質の発現解析などを行い、どのような異常が起きているのかを解析する。本研究は、最近明らかにされつつある骨による全身制御に焦点をあて、新規オステオカイン候補分子の同定とその作用機序を包括的に解明しようとする画期的な試みであり、今後さらに拡大することが予想される当該分野研究を進展させるための起爆剤となりうることを予想される。

新規オステオカインによる糖・脂質代謝制御

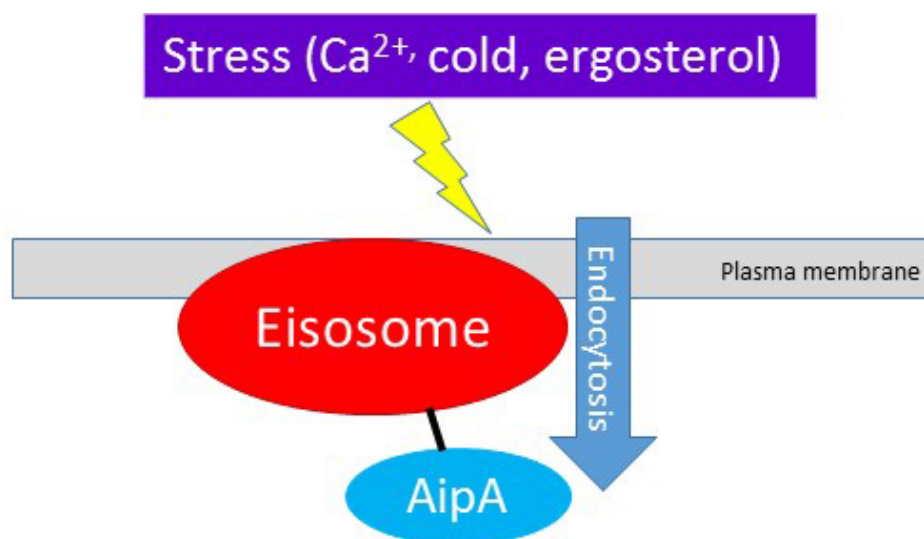


細胞内の様々な部位に局在する AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase は、主にタンパク質複合体の解離や分解において機能する。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、エンドサイトーシス関連タンパク質 AoAbp1 と相互作用する因子として AAA ATPase である AipA が同定されていた。しかし、AipA の詳細な分子機構については未解明であったため、本研究では AipA の機能解析を行った。

まず、エンドサイトーシス関連構造体であるエイソソームの構成因子 AoPil1 と AipA の相互作用を明らかにした。また、両タンパク質が生細胞内において共局在することを確認した。そして、*aipA* 破壊株がエルゴステロール生合成阻害剤に感受性を示すことを明らかにした。

さらに、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にも 2 つの機能未知な AipA オルソログ (SPAC328.04, *knk1*) が存在することを見出した。SPAC328.04 破壊株はエルゴステロール生合成阻害剤に加え、15 °C で 0.3 M の Ca 存在下でも生育の低下を示した。また、データベースにより、SPAC328.04 タンパク質がエイソソーム構成因子 Pil2 と相互作用することがわかった。以上から、AipA 様 AAA ATPase がエイソソームと関連し、ストレス条件下においてエンドサイトーシスの制御機構に関わっていることが示唆された。

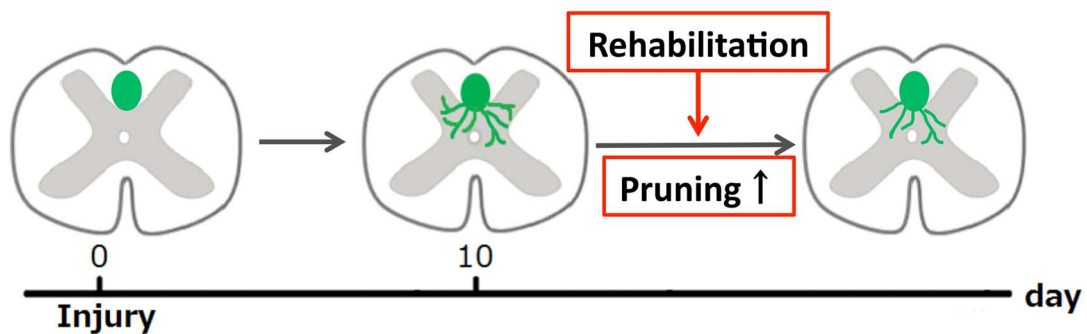
AipA-like AAA ATPases seem to function in eisosome-related endocytosis under stresses of Ca²⁺, cold and/or ergosterol



運動機能を司る皮質脊髄路が損傷されると、運動機能が障害され、麻痺などの症状を呈する。このような中枢神経損傷では、神経軸索が損傷部位よりも細胞体側で側枝を形成し、介在神経に接続することで、「迂回路」を形成し、一部の運動機能の自然回復に寄与することが明らかになってきた。神経発生の過程と同様に、損傷後伸長する側枝は過剰に形成され、適切な標的細胞と接続したものだけが残り、余分な側枝は「刈り込み」を受けると推察される。刈り込みは、精密な神経回路形成の過程で重要なステップであるが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究では、損傷を受けた中枢神経回路がリハビリテーションによって再構築される過程を明らかにする。これにより、リハビリテーションが中枢神経回路の再構築を促すメカニズムを理解し、中枢神経損傷における治療法の確立に貢献することを目的とした。

C57BL6/J マウス（7 週齢、雌）の第 8 胸髄にメスで背側半切断を施し、中枢神経損傷モデルを作製した。損傷後、皮質脊髄路の軸索から代償的に伸長した側枝を可視化するため、皮質脊髄路神経細胞の細胞体が存在する大脳皮質運動野第 V 層に順行性トレーサー Biotinylated dextran amines (BDA) を注入した。その後、頸髄の BDA 標識側枝を、蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて染色し、可視化した。損傷部より細胞体側の頸髄レベルにおいて代償的な側枝の伸長を経時的に観察した。その結果、損傷 10 日後に側枝の伸長が観察され、28 日後には側枝の刈り込みが観察された。

中枢神経損傷後における側枝の刈り込み



154 肺上皮組織の分岐形態形成機構の解析

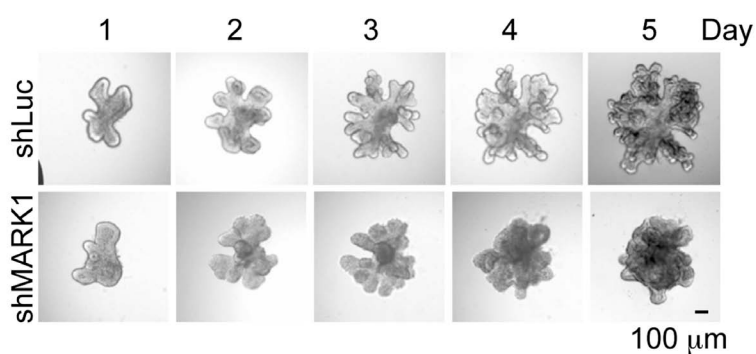
麓 勝己

胎生期肺の上皮組織は管腔様の構造をとり、伸長と分岐を繰り返しながら枝分かれ構造を形成する。この際、伸長端と分岐点が局所的に生じるために、上皮組織内で細胞群の性状（細胞形態・細胞骨格・接着の変化）がどのように変動するのかわからない。私共はこの点を解析する手法として、胎児肺の器官培養法及び肺上皮組織をマトリゲル内にて3次元培養する上皮単独培養法を構築している。また、本系を用いた解析から Wnt シグナルが上皮細胞の細胞間接着及び頂端収縮を誘導することを見出している。

そこで本研究では、1) Wnt シグナルにより誘導される遺伝子群の発現、2) 得られた遺伝子群の細胞内局在解析及び分岐形態形成に対する作用、3) 本培養系の解析により得られたメカニズムの *in vivo* での役割、を明らかにすることを目的とする。

本系を用いた遺伝子発現プロファイリングの結果、Wnt シグナル下流因子として MARK1 (MAP-microtubule affinity regulating kinase 1) を見出した。MARK1 は発生初期の肺の上皮組織において頂端側に局在した。上皮単独培養系において、MARK1 をノックダウンしたところ、分岐形態が損なわれ、細胞形態が損なわれ、頂端側への myosin の局在が損なわれた。

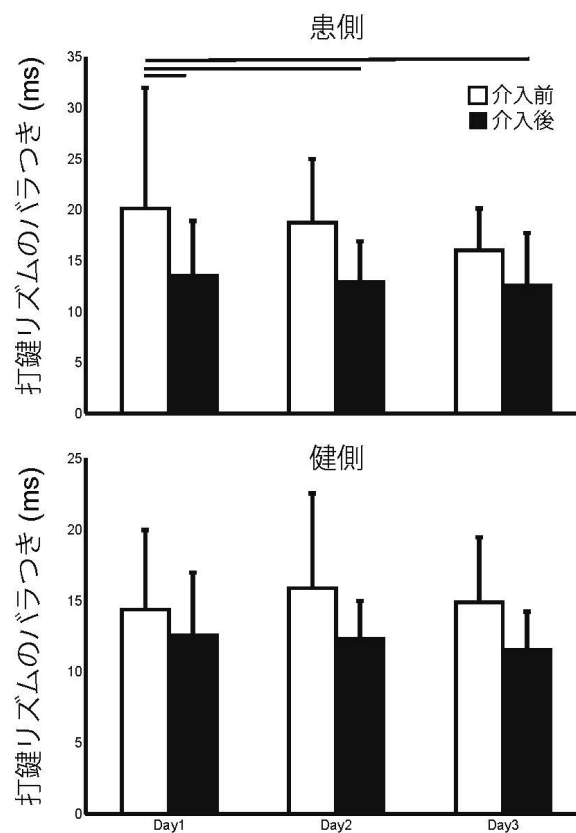
胎生期肺において分岐形態形成に制御する Wnt シグナルの下流因子として同定した MARK1 の機能解析



局所性ジストニアは脳の運動や感覚に関わる部位の機能異常を伴う脳神経疾患である。本研究では、非侵襲の経頭蓋直流電気刺激（tDCS）を両側の運動野に印加した両手鏡像運動を実施することにより、局所性ジストニアによる脳機能異常を正常化できるかを検証する実験を行った。手指に局所性ジストニアを罹患したピアニストに対して、3日間の介入を行った結果、段階的な巧緻運動機能の向上が、患側の手指に認められ、健側の手指には認められなかった。介入による手指の筋の同時収縮量の低減ならびに筋活動パターンの変化も認められた。

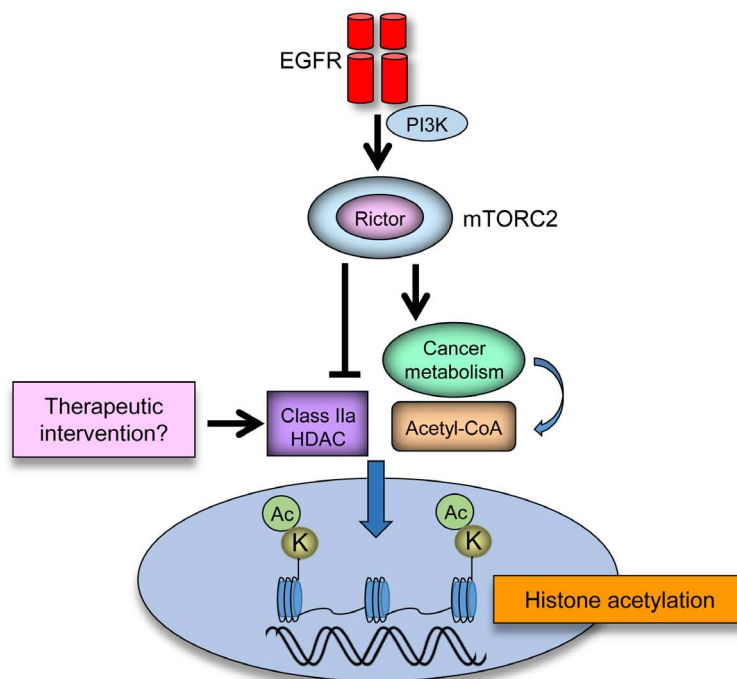
tDCS 介入訓練効果の経日的な変化

tDCSを用いた介入を3日間実施した際の
介入前後の手指の巧緻運動機能



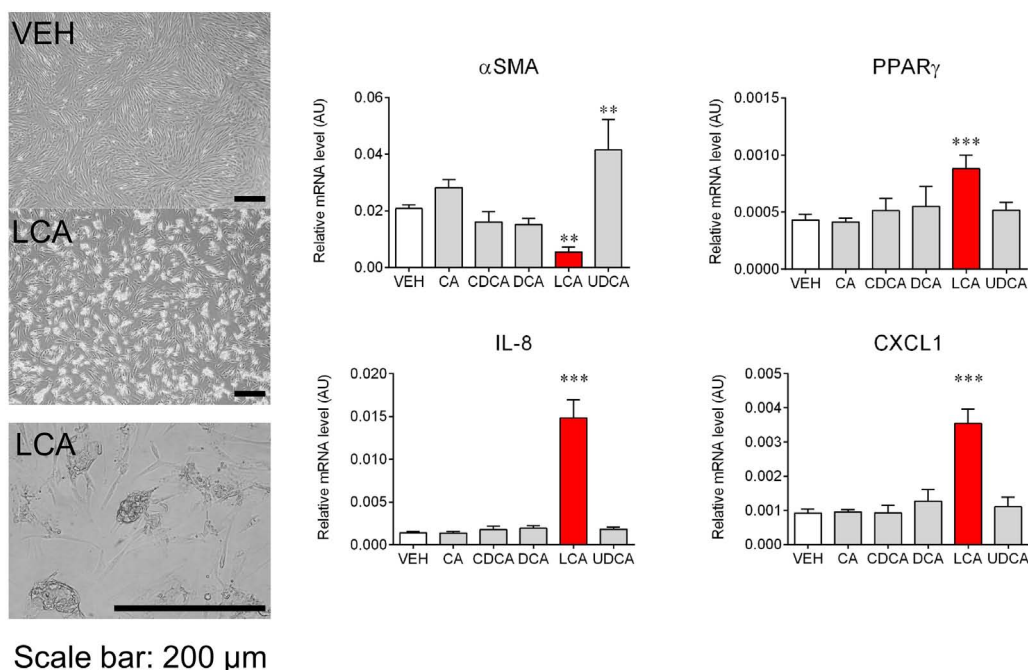
ヒト腫瘍の中でも最悪性度の脳腫瘍である膠芽腫（グリオブラストーマ）において、エピジェネティクスの重要性が提唱され始めている。しかしながら、エピジェネティクス変化の制御機構および病態への意義は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、多くの膠芽腫症例で異常活性化を認める mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路による、新規のエピジェネティクス制御機構の解明に取り組んだ。mTOR 複合体の中でも、特に mTOR 複合体 2 (mTORC2) が、タンパク質の翻訳後修飾や遺伝子のエピジェネティクス変化に広範な影響力をもつ中間代謝産物 acetyl-CoA の産生を制御していることが分かった。続いて、mTORC2 およびそれにより活性化される腫瘍代謝が、エピジェネティクス変化の中でも特に acetyl-CoA の関与が大きいと考えられる、ヌクレオソーム蛋白ヒストンのアセチル化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの結果をもとに、mTORC2 およびがん代謝活動により誘導されるエピジェネティクス変化の制御機構と悪性脳腫瘍の病態への意義を検討したところ、われわれが mTORC2 により制御されることを報告したヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の一つである class IIa HDAC を遺伝学的に改変することで、mTORC2 によるエピジェネティクスの表現型を再現することが可能であった。興味深いことに、class IIa HDAC を過剰発現させることで、mTORC2 活性化膠芽腫細胞のヒストンアセチル化および細胞増殖が抑制されたことから、今後エピジェネティクスに介入する新規治療戦略の開発が期待される。

mTORC2 によるエピジェネティクス制御機構



胆汁酸は、肝細胞で産生され胆汁中に排泄されるが、肝細胞が障害を受けると血管側にも排泄される。肝障害時に肝類洞の胆汁酸レベルが上昇し、肝星細胞など類洞壁を構成する細胞は胆汁酸の影響を受けると推定されるが、肝硬変・肝がんへの寄与は不明である。胆汁酸受容体 Farnesoid X receptor (*FXR*) は、細胞内の胆汁酸レベルが上昇すると活性化し、転写因子として機能する。本研究では、*FXR* の機能を念頭に置き、胆汁酸曝露による肝星細胞の遺伝子変化を解析した。ヒト初代培養系肝星細胞 (HHStcC) に、主要な胆汁酸、コール酸 (CA) およびケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) を 100 μ M で添加し、その後の形態変化および遺伝子発現変化を定量的 PCR にて解析した。HHStcC は、LCA 添加でスフェロイド様の形態変化を示し、Alpha-Smooth muscle actin (*aSMA*) の発現減弱ならびに Peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPAR γ*) の発現増強が濃度依存的に認められたが、CA ならびに CDCA、DCA、UDCA 添加では、必ずしも LCA 添加で観察された変化を示さなかった。また、繰り返し継代して樹立した老化肝星細胞 (P-HSC) および 20 Gy の X 線を照射して樹立した老化肝星細胞 (X-HSC) の遺伝子発現変化と比較すると、HHStcC は、LCA 添加で、P-HSC や X-HSC で観察された老化関連分泌タンパク Interleukin 8 (*IL-8*) および Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (*CXCL1*) mRNA レベルの著しい上昇が認められた。さらに、*FXR* 活性化剤 GW4064 を最大濃度 3 μ M まで添加し遺伝子発現変化を観察すると、GW4064 添加で、*aSMA* の発現減弱ならびに *PPAR γ* の発現増強に加え、*IL-8* および *CXCL1* の発現亢進が濃度依存的に認められた。胆汁酸、特に LCA は、肝星細胞の遺伝子発現を活性化抑制へ向かわせるのに加えて、細胞老化様に変化させることが示唆された。現在、これらの分子機序ならびに肝硬変・肝がんへの寄与を *FXR* 依存性および非依存性の両視点から解析している。

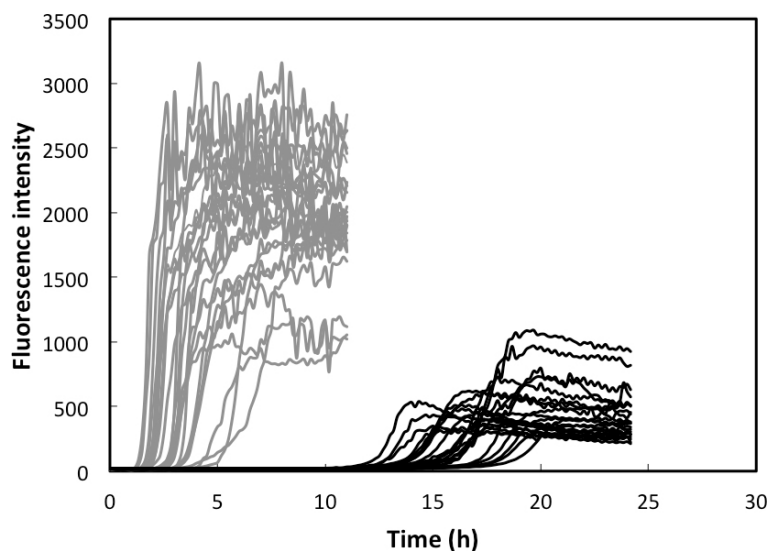
LCA 曝露による細胞形態変化と遺伝子発現変化



細胞の老化やさまざまなストレスによって生理機能を有するタンパク質やペプチドが細胞内外に異常凝集して沈着することが知られている。タンパク質異常凝集の一つであるアミロイド線維は、難治性疾患であるアルツハイマー病やパーキンソン病等を含むアミロイドーシス発症の原因産物である。アミロイドーシスは発症してからの根治的治療は難しいため、発症を予防する（アミロイド線維形成を阻害する）ことが重要であり、対象として天然有機化合物が注目されている。本研究では日本に多く生育し未利用資源として考えられている海藻に着目し、海藻が有する化合物がアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べた。

鳥取県の海から採取した数十種類の海藻から水溶性の海藻抽出液を調製し、アミロイド線維形成反応溶液に添加してその効果を蛋白質異常凝集検出装置（HANABI）で評価した。海藻は緑藻・紅藻・褐藻に区別され、それぞれの海藻抽出液のうち褐藻に含まれる2種の海藻においてアミロイド線維形成の阻害効果があることがわかった。この2種は食用の海藻ではなく雑海藻に分類されるものであり、この未利用海藻を利活用することより、機能性食品や医薬品開発といった応用研究が期待できた。

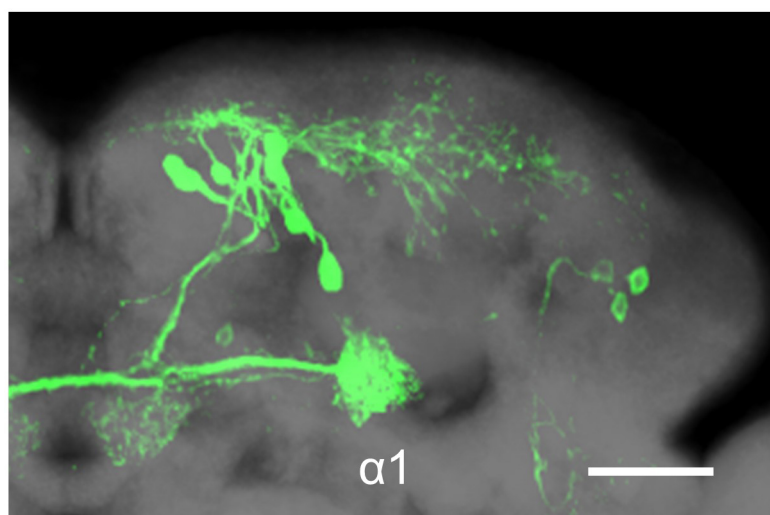
HANABIによる海藻抽出成分のアミロイド線維形成に及ぼす影響
（海藻抽出成分未添加（灰色）、添加（黒色））



159 長期記憶の迅速な形成メカニズムの解析

山方 恒宏

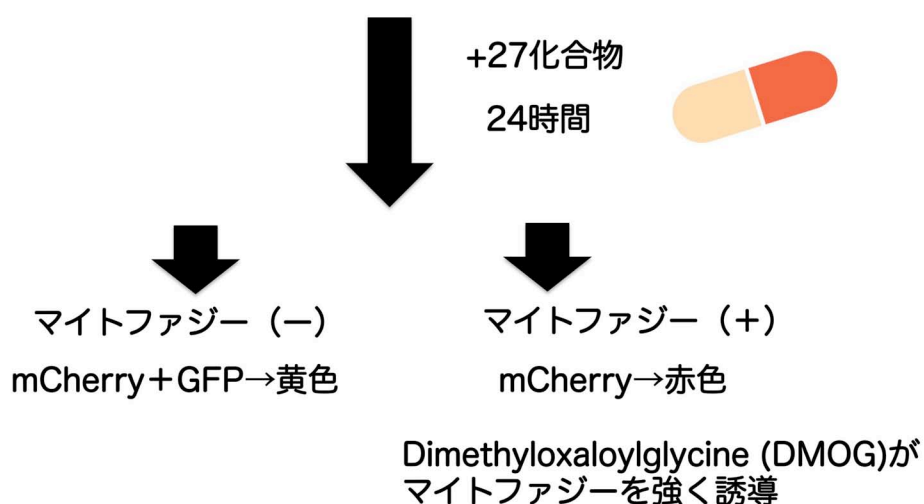
ショウジョウバエは、匂いとショ糖報酬の連合性を学習することができる。この嗅覚-糖連合学習は、一度の訓練によって長期記憶が形成されるが、そのメカニズムはこれまで不明であった。学習時、ハエ脳では Protocerebral Anterior Medial (PAM) クラスタと呼ばれるドーパミン細胞群が報酬情報を記憶中枢に伝達することが知られている。我々はこれまで、PAM 神経群の中に形態と機能の異なるサブセットが存在し、それぞれ報酬短期・長期記憶を独立に形成させていることを明らかとしている。本研究では、これらの細胞群のうち短期記憶と長期記憶の形成に関わる細胞種を同定することを目的とした。そこで PAM 細胞群の単一細胞レベルでの網羅的な形態-機能解剖を実施した。その結果、PAM- $\alpha 1$ と呼ばれる単一細胞種 (約 10 細胞) が長期記憶の形成に必要十分であることを突き止めた。これらの神経の働きにより、一度の訓練が報酬長期記憶を成立させると考えられる。本成果は、記憶の長期安定化における細胞内分子・生理機構の解明に向けた足掛かりになると期待される。

長期記憶を誘導する PAM- $\alpha 1$ 細胞の形態

老化関連疾患の病態形成には不良ミトコンドリア由来の酸化ストレスが関与する。本研究では、オートファジーによるミトコンドリア分解機構を行うマイトファジーの可視化を試みた。酸性で蛍光強度の増加する蛍光プローブ AcidiFluorORANGE に、ミトコンドリアマトリックスに局在を示すトリフェニルホスホニウムカチオン (TPP) 化合物を融合させた AcidiFluorORANGE-TPP は、プローブのミトコンドリアへの局在に依存して、蛍光強度が増加した。しかし、オートファジー経路には依存しておらず直接マイトファジーをモニターする系ではなかった。そこで既に報告されているミトコンドリア外膜に二種類の蛍光タンパク質 mCherry および GFP を発現するマイトファジー検出系を用いることとし、同プローブを安定的に発現する HeLa 細胞を樹立した。この解析系を用いて、26 種類の化合物の添加もしくはアミノ酸飢餓培地での培養を行い、マイトファジー誘導刺激の探索を試みたところ、既に知られている鉄キレート剤の他にプロリン水酸化酵素 (PHD) 阻害剤である Dimethyloxaloylglycine (DMOG) がマイトファジーを誘導することを見出した。今後、同解析系を用いて大規模にスクリーニングを行うことにより、新しいマイトファジー誘導剤が見つかることが期待される。

Dimethyloxaloylglycine (DMOG) はマイトファジーを誘導する

mCherry-GFP-FIS1を発現するHeLa 細胞

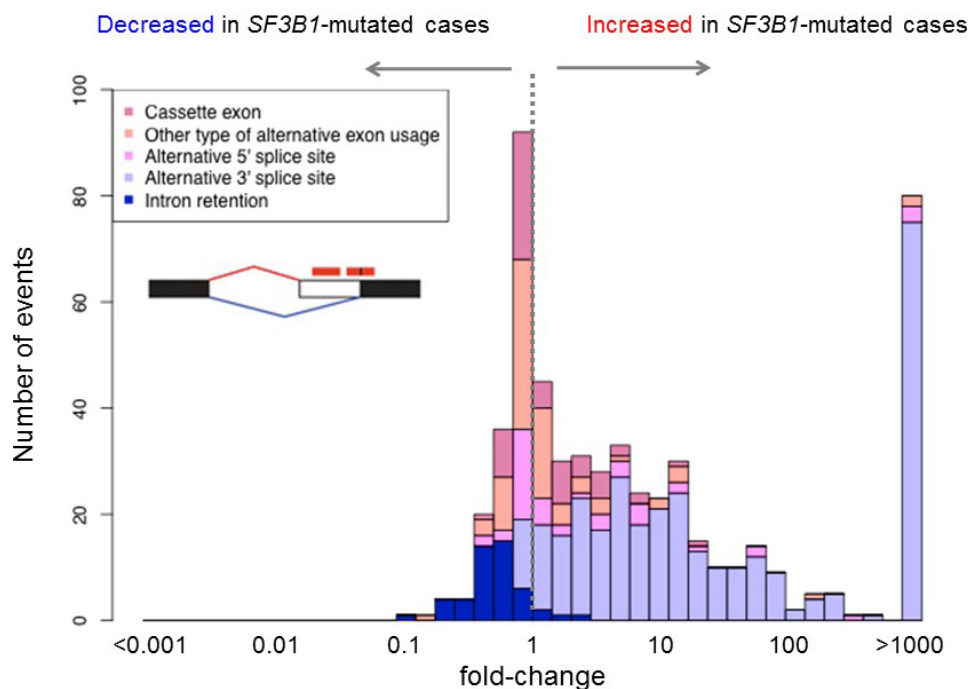


161 骨髄異形成症候群における RNA スプライシング異常の解析

吉田 健一

骨髄異形成症候群 (MDS) とその関連疾患は、血球形態の異常を伴った骨髄不全と急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とし、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。MDS において *SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*、*ZRSR2* などの RNA スプライシング因子の遺伝子変異が、高頻度 (45-85 %) かつ特異的に認められることが明らかになっているが、RNA スプライシング因子の遺伝子変異による MDS 発症の詳細なメカニズムは十分に解明されていない。本研究では RNA スプライシング因子の遺伝子変異による MDS 発症のメカニズムを明らかにするために、214 例の MDS 患者由来 RNA 検体を用いて網羅的に RNA スプライシングのパターンを解析した。その結果、*SF3B1* 遺伝子変異では 3' スプライス部位の異常が特徴的に見られるなど、MDS では変異が生じている RNA スプライシング因子により異なったスプライシング異常のパターンがみられることがわかってきた。

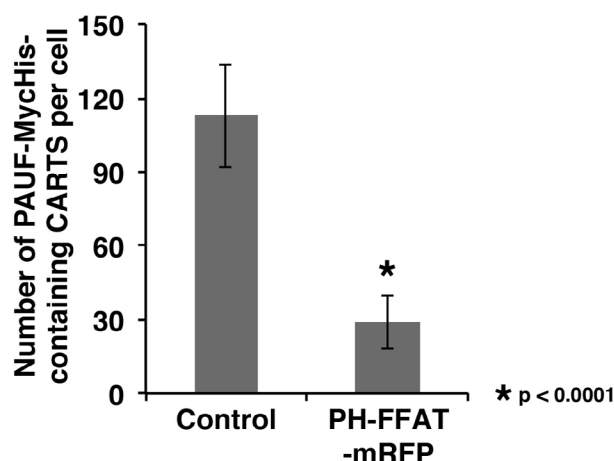
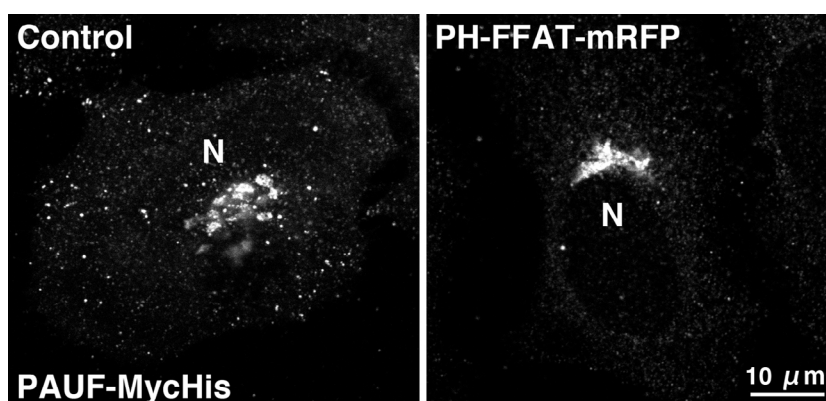
SF3B1 変異と強い相関がみられたスプライシング異常のパターン



小胞体-ゴルジ体接触部位では、小胞体膜タンパク質 VAP が脂質輸送タンパク質 CERT と OSBP との結合を介して、それぞれセラミドとコレステロールをゴルジ体へ輸送すると考えられている。本研究では、この膜接触がゴルジ体からの輸送小胞形成に関与することの直接的な証拠を得るため、OSBP 変異体 (PH-FFAT) に着目した。私たちは PH-FFAT の過剰発現が、小胞体とゴルジ体膜の結合・解離ダイナミクスを低下させ、輸送小胞 (CARTS) の形成を顕著に阻害することを見出した。また、小胞体-ゴルジ体接触が Ca^{2+} 輸送を介してゴルジ体における積み荷選別に関与する可能性を考え、VAP や CERT、OSBP の発現抑制が Cab45 (Ca^{2+} 濃度依存的にゴルジ体に留まり積み荷選別に働くタンパク質) の局在に与える影響を調べた。その結果、これら条件において Cab45 がゴルジ体から消失することがわかり、ゴルジ体内腔の Ca^{2+} 濃度が低下している可能性が示唆された。また、本研究では小胞体-ゴルジ体接触部位の新規構成因子の探索を行い、既知の膜接触部位局在タンパク質の他、興味深いタンパク質を多数同定した。

PH-FFAT の過剰発現による輸送小胞 (CARTS) の形成阻害

(CARTS は、積み荷タンパク質マーカーである PAUF-MycHis 陽性の細胞質ドットとして観察される。N は核を示す。)



163 精神機能の発達に対する海馬神経新生の役割の解明

内田 周作

うつ病の発症には遺伝的要因のみならず環境的要因（ストレス）が大きく作用すると推測されている。ストレス脆弱性はうつ病発症の要因となり得ることが指摘されているものの、そのメカニズムは依然不明である。最近、うつ病などの精神疾患の病態に対して、成体海馬における神経新生の役割が注目されている。しかし、脳発達段階における海馬神経新生とストレス脆弱性との関連は不明である。そこで本研究では、ストレス脆弱性の形成機序に対する脳発達段階における海馬神経新生の役割を検討した。その結果、幼若期のストレス脆弱性マウスにおける海馬歯状回の神経新生は、ストレス耐性マウスに比べて有意に減少していた。また、幼若期のストレス脆弱性マウスの海馬神経新生を薬理学的手法によって増加させると、成体期におけるストレス反応が変化した。以上の結果から、幼若期の海馬神経新生が成体期のストレス反応性に重要な役割を担っていることが示唆された。

幼若期の海馬神経新生が成体期のストレス反応性に関与



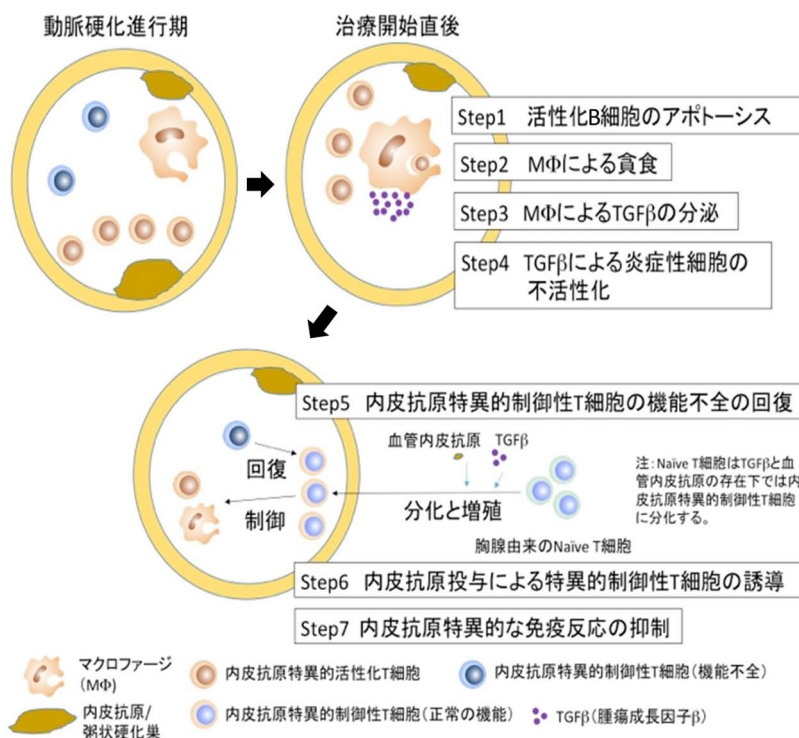
164 血管内皮抗原特異的免疫抑制療法は動脈硬化を抑制する

笠木 伸平

動脈硬化は血管内皮障害から始まる血管内皮の慢性炎症であるという考えが浸透しつつあり、何等かの血管内皮抗原が抗原特異的な T 細胞を活性化し炎症を持続させる機序が考えられている。しかし、血管内皮抗原に対する免疫寛容の破綻（免疫異常）がなぜ起こるのかや、免疫異常に対する治療介入は、動物実験レベルでも行われていない。免疫異常を沈静化させる免疫抑制療法は、抗原非特異的に免疫応答を抑制するため、免疫不全状態を誘導する。その結果、自己抗原以外の抗原（感染抗原や腫瘍抗原）に対する免疫応答が低下し感染症や腫瘍を来たしやすくなると考えられる。そこで、血管内皮抗原特異的な制御性 T 細胞のみを選択的に体内で誘導することで免疫不全を起こさずに動脈硬化の治癒や進展の予防できるのかどうかを検証した。

動脈硬化モデルマウス（LDLR-KO マウス）を用いて、血管内皮抗原である HSP65 で免疫することで動脈硬化が進展する実験系を確立した。その上で、動脈硬化が進展する過程で、B 細胞除去抗体（抗 CD20 抗体）に引き続き、HSP65 を投与したところ、動脈硬化の進行が抑制された。HSP65 単独あるいは抗 CD20 抗体に引き続き、別の抗原（OVA）を投与しても動脈硬化の進行の抑制効果が得られないことから、抗 CD20 抗体と HSP65 抗原の両方の投与が必須であると考えられた。加えて、抗 CD20 抗体と HSP65 併用療法により、HSP65 抗原特異的な免疫反応が抑制され、また、同時に HSP65 抗原特異的な CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞が誘導されていた。

血管内皮抗原特異的免疫抑制療法が動脈硬化を抑制する機序仮説

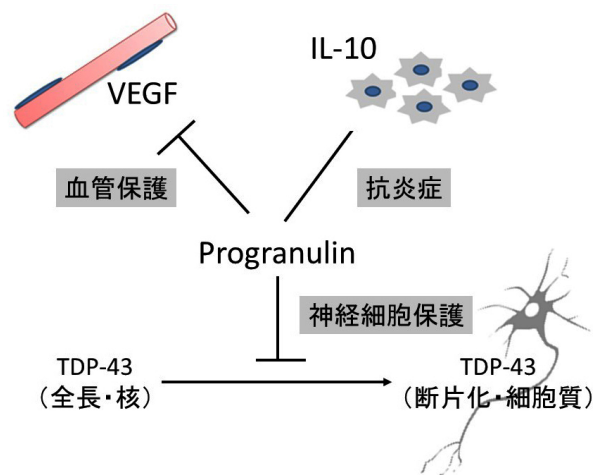


165 プログラニューリンによる新規脳保護脳梗塞治療薬の開発

金澤 雅人

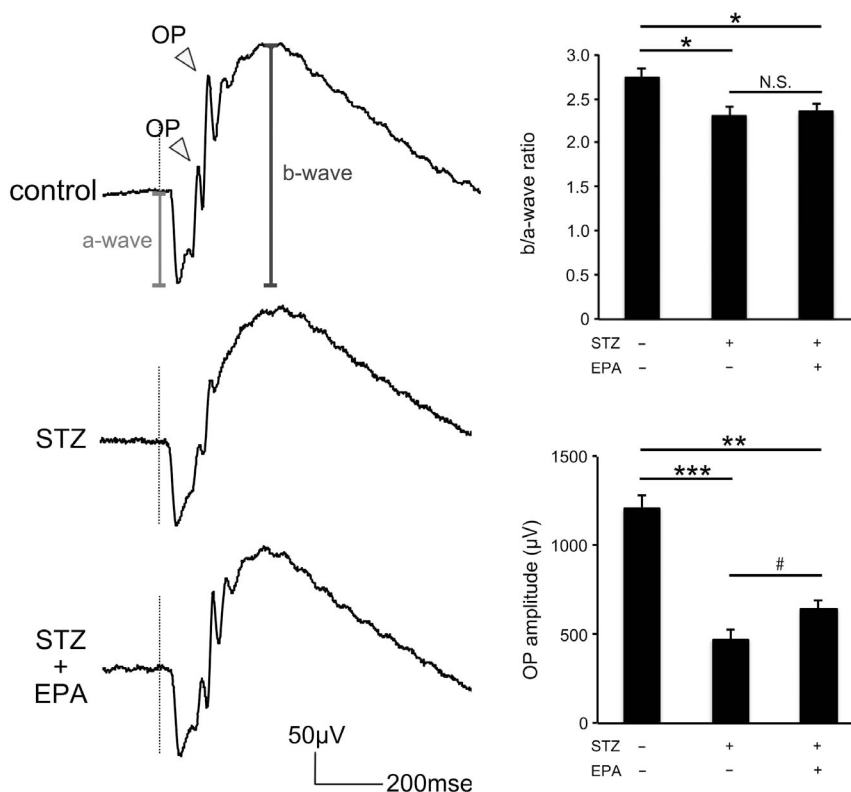
我々は、脳梗塞に対する組織プラスミノゲン・アクチベーター (tPA) 療法に併用し、予後を改善する薬剤の開発を目指している。プログラニューリン (PGRN) は、中枢神経系において生理機能の維持を担う重要な糖タンパク成長因子である。神経変性疾患における神経細胞死に保護的に作用し、また、創傷治癒における血管新生や炎症の抑制にも関与する。脳虚血に対する PGRN の保護的な働きも報告されているが、脳虚血後の動態や脳保護作用の機序については十分に明らかにされていない。本研究では、脳虚血後の PGRN の経時的な発現および局在の変化、脳保護作用の機序を解明することを目的とした。非虚血時、PGRN は神経細胞にのみ発現を認めるが、一過性脳虚血後は、虚血中心のミクログリアと虚血ペナンプラの神経細胞および血管内皮細胞で発現が認められた。また、PGRN は糖鎖修飾により 2つのアイソフォームを持つが、脳虚血により完全糖鎖修飾型の発現が減少した一方で、不完全糖鎖修飾型 PGRN の発現が著しく増加した。脳虚血における PGRN の役割を確認するため、PGRN ノックアウトマウス脳梗塞モデルを用いた検証を行ったところ、PGRN の欠乏は脳梗塞を増悪させた。PGRN の効果は多彩で、TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) を介する神経保護作用、血管内皮増殖因子 (VEGF) の抑制を介する血管保護作用、インターロイキン 10 (IL-10) を介する抗炎症作用を認めた。さらに、治療可能時間を越えた虚血 4 時間の時点で、tPA と組み換え PGRN 蛋白を同時に投与すると、脳梗塞、脳浮腫や脳出血合併症は軽減し、機能予後、生命予後も有意に改善した。PGRN は多面的な脳保護作用を持つ可能性があることから、脳梗塞の新規治療薬として有望である。

プログラニューリンによる脳保護効果



糖尿病は様々な合併症を生じ、その全てが患者の生活の質を著しく低下させるため、糖尿病そのものだけでなく、これらの合併症も軽減することが強く望まれる。一方、近年 ω -3系脂肪酸による抗炎症効果や細胞保護効果など様々な効果が報告されており、糖尿病合併症に対する治療効果も期待されている。そこで今回我々は、Streptozotocin (STZ) によって糖尿病ラットを作製し、合併症として発生する網膜障害と過活動膀胱に対する ω -3系脂肪酸：エイコサペンタエン酸 (EPA) の効果について検討した。STZ 投与から8週間 EPA (5%) を毎日混餌投与したところ、網膜電図の律動様小波に改善が見られた。また過活動膀胱の評価においても EPA 投与によって有意な改善が確認された。これらのことから、糖尿病による網膜・膀胱の機能障害に対し、EPA の摂取による機能保護効果の可能性が示唆された。

網膜電図で観察される糖尿病ラット網膜障害と EPA による機能保護効果



【緒言】

免疫応答に関わる転写因子である NFATc1 が各種癌組織で発現が上昇しているとの報告が散見される。一方、疫学調査において腎不全による人工透析患者に比べ腎移植後に免疫抑制剤を服用していた患者の方が前立腺癌発生率が低下したと報告されている。NFATc1 は免疫抑制剤の主要標的であることから、免疫抑制剤が NFATc1 を介して前立腺癌の進展に抑制効果があるのかを検討した。

【方法】

1. NFATc1 発現解析と新規診断予後予測ノモグラムの開発

免疫組織化学的染色を用いて、ヒト前立腺癌組織検体における NFATc1 や他の isoform の発現を検討し、組織病理学的特性や臨床経過を解析した。

2. *In vitro* における NFATc1 の機能解析

前立腺癌細胞株を用いて、免疫抑制剤であるシクロスポリン・タクロリムスによる NFATc1 の標的分子発現を PCR 法やウェスタンブロットによって検討した。また、前立腺癌細胞の増殖抑制効果、浸潤抑制効果については分子生物学的に検討した。

3. *In vivo* におけるシクロスポリン・タクロリムス療法の検討

マウス移植片腫瘍モデルを用いて免疫抑制剤による NFATc1 を介した前立腺癌進展に与える効果を検討した。

【結果】

1. 前立腺全摘後の再発率は NFATc1 発現群で有意に高かった ($p < 0.001$)。

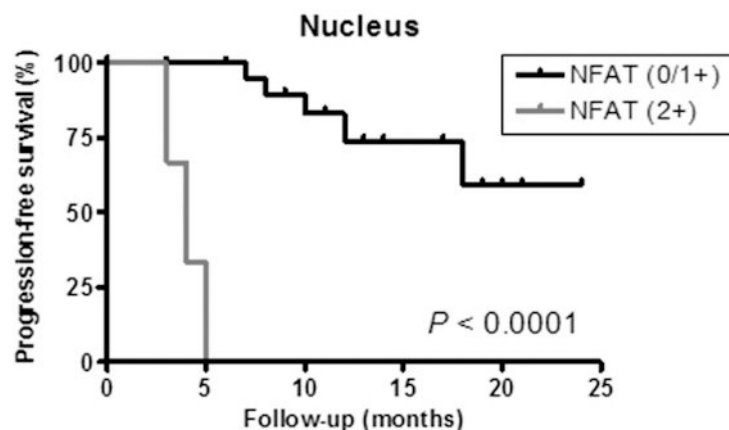
2. 前立腺細胞株において、免疫抑制剤が NFATc1 の発現・活性を低下させた。また、免疫抑制剤の刺激により細胞増殖能・創傷癒合能・細胞浸潤能の低下や MMP-2・MMP-9 の活性の低下を認めた。これらの結果は、NFATc1-shRNA を強制発現させた細胞株では認められなかった。

3. マウス移植片腫瘍モデルにおいて、免疫抑制剤使用群では有意に腫瘍の増殖抑制を認めた ($p < 0.001$)。

【結語】

NFATc1 の発現は、前立腺癌の予後とも相関したことから、新規分子マーカーとなりうると考えられた。また免疫抑制剤は NFATc1 を介して前立腺癌の進展を抑制したことから、新規治療法の可能性が示唆された。

NFATc1 の発現と前立腺癌における Progression Free Survival (LogRank 法での解析)



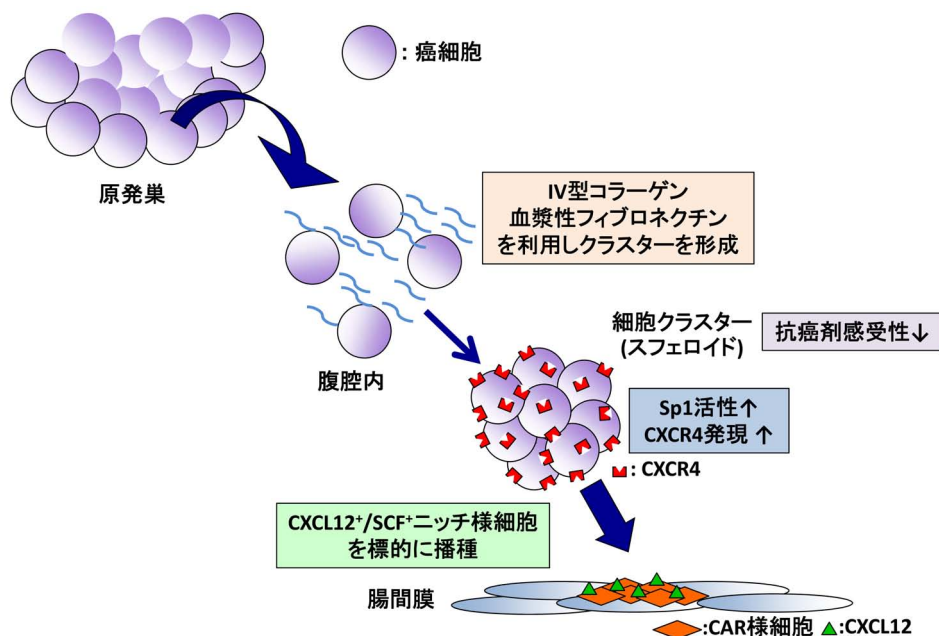
統合失調症の分子病態には不明の点が多いが、これまでの知見からシナプス機能障害の関与が指摘されている。本研究では、ゲノム変異の観点から統合失調症のシナプス病態について検討を行った。1,699名の統合失調症患者と824名の健常者を対象に高解像度アレイ CGH を用いてゲノムコピー数変異 (CNV) 解析を実施した。CNVデータの *in silico* 解析から、患者で同定した頻度の稀な (< 1%) CNV は presynapse と postsynaptic density (PSD) に局在する各遺伝子群に有意に集積することを明らかにした。とくに PSD では、グルタミン酸受容体の mGluR5 複合体に関連した遺伝子群への強い集積を見出した。第二に、CNV の家系解析を行い、22q11.21 欠失、3q29 欠失、MBD5 欠失を含む 11 個の *de novo* CNV を同定した。これら CNV にはシナプ스에서重要な働きをする遺伝子が複数含まれていた。第三に、シナプス関連遺伝子 *DLG2* (discs large homolog 2) の欠失をもつ 3 名の患者を同定し、精神症状、治療反応性について明らかにした。以上、本研究では、統合失調症病態におけるシナプス関連遺伝子の重要性を示唆する知見を得た。

Gene set analysis results

(a) Synapse-related gene sets	N genes	N genes hit by CNVs	OR (95% CI)	P_{emp}	Holm-adjusted P
PSD	685	134	1.39 (1.05, 1.84)	0.00038	0.0034
PSD/ARC	28	12	1.55 (0.77, 3.13)	0.062	0.12
PSD/NMDAR	61	15	2.62 (1.11, 6.18)	0.0029	0.015
PSD/PSD-95	65	25	1.96 (1.08, 3.54)	0.00072	0.005
PSD/mGluR5	39	6	3.63 (0.84, 15.74)	0.0038	0.015
Presynapse	431	91	1.37 (1.00, 1.88)	0.0011	0.0066
Presynapse/Synaptic vesicle	344	76	1.33 (0.95, 1.84)	0.0066	0.02
Presynapse/Pre-synaptic active zone	173	31	2.79 (1.25, 6.21)	0.00008	0.00088

癌性腹膜炎は消化器癌において非常に難治な病態であり、その形成メカニズムの解明が望まれる。元来、腹膜播種は腹腔内の原始的なリンパ組織である“Milky spots”に形成されると考えられてきた。本研究において、癌の生着や直接的な播種形成に“Milky spots”は必須でなく、傍血管脂肪織に存在するSCF⁺/CXCL12⁺を発現するニッチ様細胞こそが重要であることを発見し、従来仮説との差異を示した。興味深いことに、腹腔内にはIV型コラーゲンと血漿性フィブロネクチンが豊富に含まれており、それらが劇的にスフェロイド形成を促進することをマウスと数種のヒト大腸癌細胞株で確認した。さらに、スフェロイド形成はSp1 依存的なCXCR4 発現の亢進を強力に誘導し、ニッチ特異的な播種を促進した。特に、スフェロイド形成阻害ならびにSp1 活性の阻害により、5-FU への感受性が上昇することも見出した。本研究は腹膜播種形成メカニズムを明らかとし、播種の難知性病態の治療を進展させる上で、Sp1/CXCR4/CXCL12 カスケードが合理的な標的となることを証明した。

腹膜播種形成メカニズムと治療ターゲット

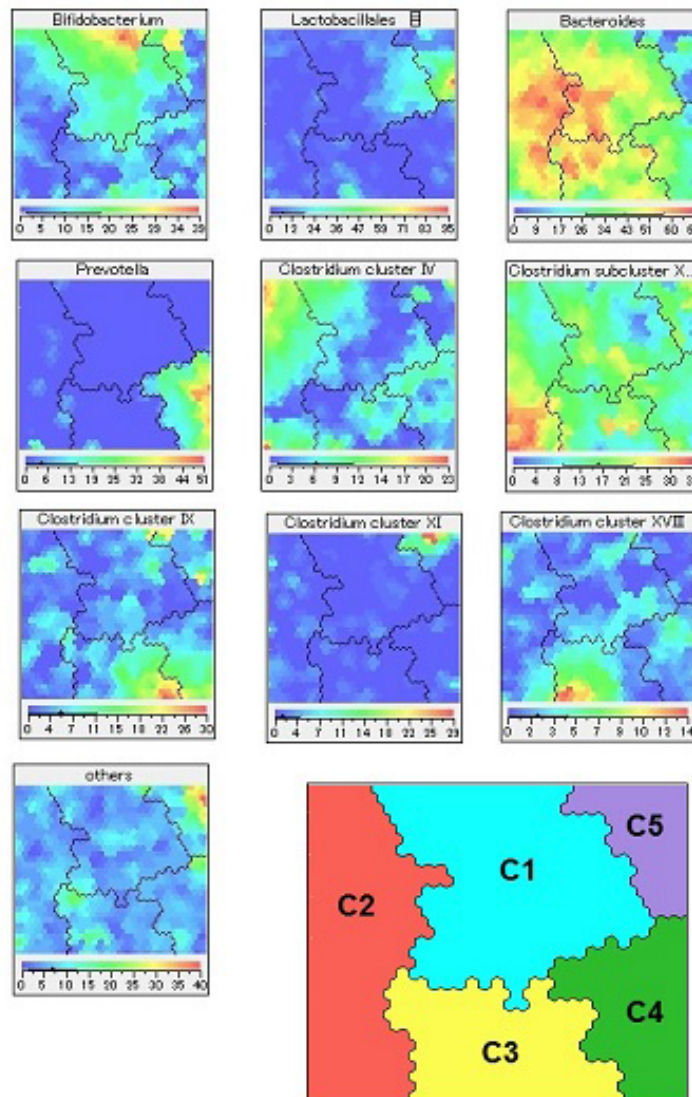


170 炎症性腸疾患腸内細菌叢パターンによる治療選択法樹立

高山 哲朗

炎症性腸疾患は我が国で増加の一途にある。世界中で研究されているが未だ原因不明であり、根治的治療法も存在しない。近年、腸内細菌叢の関与、それに対する免疫応答が発症や治療効果に影響する事が示唆されている。しかし疾患の腸内細菌叢に基づく有用な分類はなされていない。その一因には腸内細菌叢の解析は複数の菌種、量の同時解析を必要とし、従来の統計手法では解析困難な点が挙げられる。これらを解決すべく我々はこれまで他疾患で研究を重ねてきた人工ニューラルネットワークの一つである自己組織化マップ (Self organizing map: SOM) による解析を用い、パターンでの認識による解析を行った。SOM により腸内細菌のみを用いて近似するパターンにより各症例を分類し患者背景や経過との検証を行った。まず、健常者と潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢による分類を行った。健常者及び潰瘍性大腸炎患者に特徴的なクラスターと両者が混在するクラスターとに分類された。続いて潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢のみを用いて SOM により分類を行った。患者背景との相関を検証したところ、活動性や臨床経過との相関がみられた。

健常者と潰瘍性大腸炎患者の腸内細菌叢のパターンとそれにより分類されたクラスター

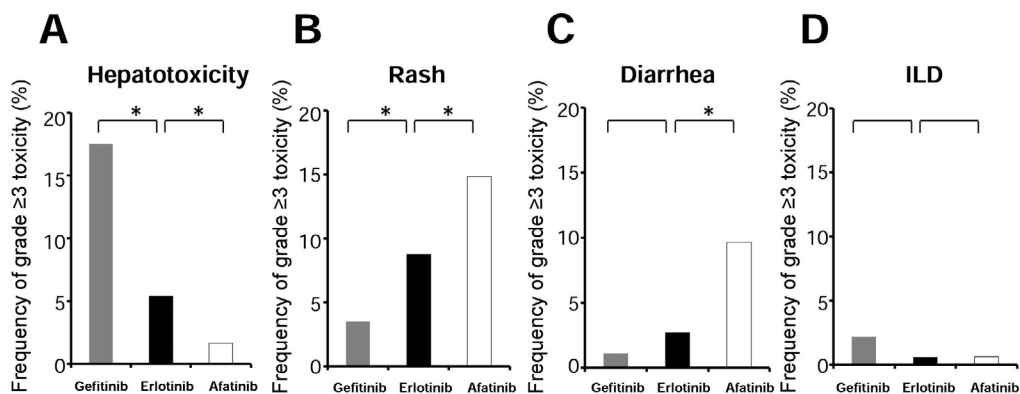


171 ドライバー遺伝子肺癌の薬剤感受性メカニズムの解明

武田 真幸

ドライバー遺伝子変異陽性肺癌に於いて、分子標的薬の効果は未だ限定的であり、新たな治療ストラテジーの構築が必須である。本研究では、EGFR 阻害剤であるゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの有害事象の発現率に違いがあるかどうかについて統合解析を実施した。Grade 3 以上の肝障害は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブの順に認められ、皮疹および下痢は、その逆の傾向が示された。このような結果は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の治療ストラテジーを考慮する上で役立つと考えられる。

EGFR 阻害剤別 Grade3 以上の有害事象 (A) 肝障害、(B) 皮疹、(C) 下痢、(D) 肺臓炎 *P<0.05

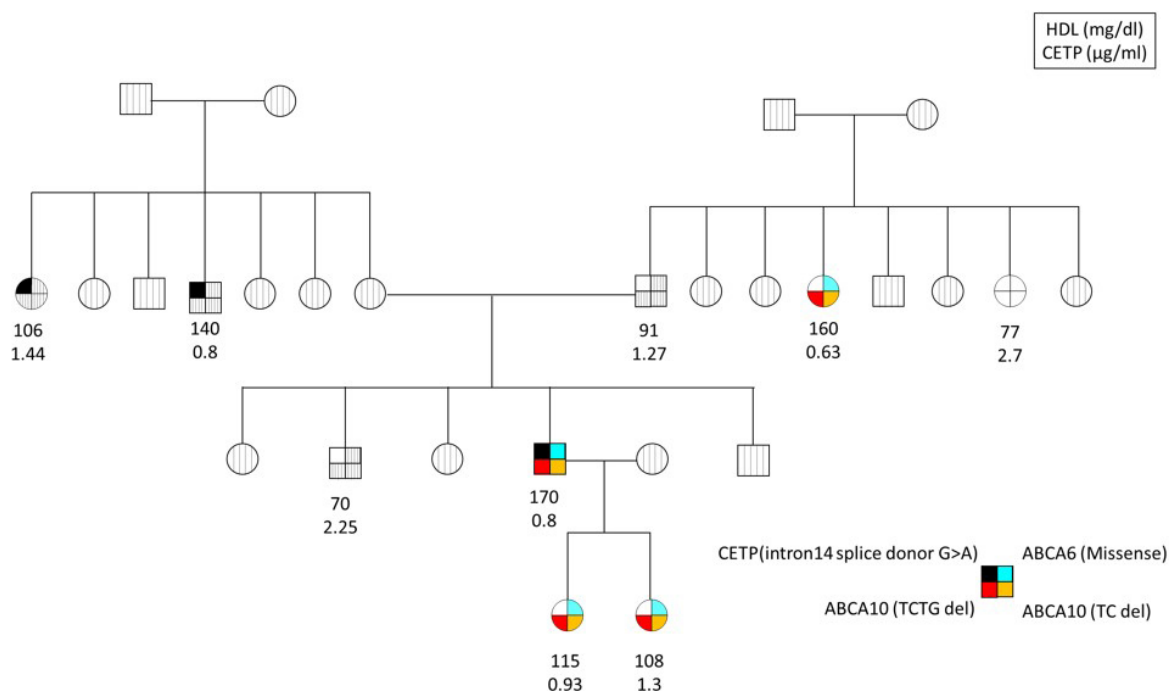


高 HDL コレステロールを呈する原発性（家族性）HDL コレステロール血症に対するコレステリルエステル転送蛋白（*CETP*）遺伝子の2つの高頻度変異のスクリーニングにより、金沢大学での検討では、382例の症例の中143例（37%）に遺伝子変異が同定されたが、残る239例（63%）で原因分子の同定には至っていなかった。

このような症例に対して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により、新規原因分子の同定を試みた。その中で、3世代に渡り詳細な臨床像を追跡し得た家系のうち4名に対して全エクソームシーケンシング解析を行い、4名（平均 HDL コレステロール 138 mg/dl）において同定された117,930個の遺伝子変異の中から、その他の低 HDL コレステロール血症家系で同定された変異を除き、さらには表現型・遺伝型のマッチングや遺伝子変異の頻度などを加味した結果、最終的には69個の候補遺伝子変異に絞り込んだ。この中で、ABCトランスポーターの1つである *ABCA10* にフレームシフト変異の複合型ヘテロ接合体変異（c.1331_1334delACAG, c.4515_4516delGA）を認め、隣接するABCトランスポーターである *ABCA6* 遺伝子にミスセンス変異（c.212T>C/p.N71S）が同定された。両蛋白ともにマクロファージにおけるコレステロール輸送に関与することが知られており、これらのいずれか、ないしは両者に起因する原発性高 HDL コレステロール血症であることが強く示唆された。

これらの知見により新たな視座からの HDL 上昇作用を有する新規創薬につながる可能性があり、さらなる機能解析を予定している。

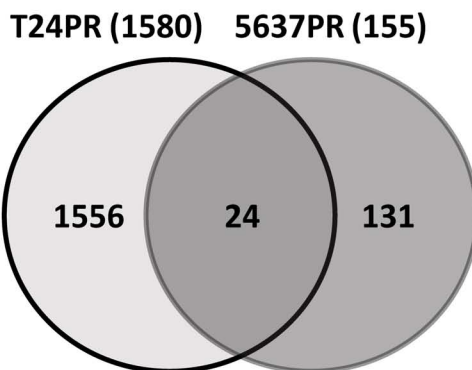
ABCA6 及び *ABCA10* 遺伝子変異による高 HDL コレステロール血症家系



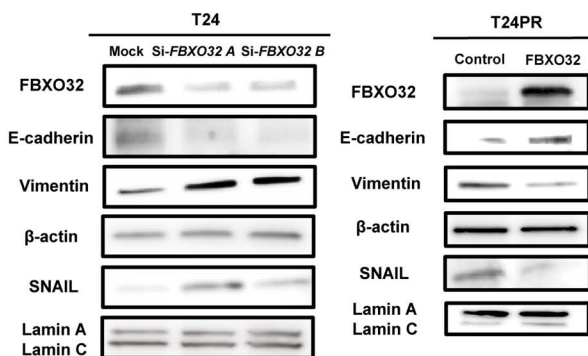
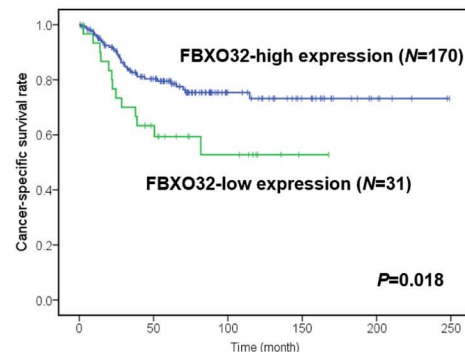
シスプラチン (CDDP) 治療後の再燃性尿路上皮癌における上皮間葉転換 (EMT) 誘導機構として、樹立した 2 種の CDDP 耐性尿路上皮癌細胞株 (T24PR・5637PR) の網羅的解析から、CDDP 耐性下におけるユビキチン E3 リガーゼ FBXO32 の発現低下に着目した。FBXO32 ノックダウンに伴い EMT 誘導並びに細胞浸潤能亢進が確認され、FBXO32 過剰発現では EMT 関連因子 (SNAIL、Vimentin) の発現低下及び E-cadherin の発現上昇が確認された。尿路上皮癌臨床検体を用いた免疫組織学的検討では、FBXO32 低発現群における SNAIL 高発現と E-cadherin 低発現が確認され、FBXO32 低発現患者群での EMT 誘導が示唆された。更に予後解析では、FBXO32 発現低下が尿路上皮癌患者において術後再発・癌死に関連する危険因子であり、FBXO32 発現の予後予測マーカーとしての有用性が示唆された。CDDP 耐性下における FBXO32 発現抑制のメカニズムとして、CGH アレイ解析では T24PR 細胞における 8 番染色体長腕領域 (FBXO32 遺伝子のコード領域) の Loss of heterozygosity が確認され、T24PR 細胞では染色体レベルでの FBXO32 発現抑制が示唆された。一方、5637PR 細胞では FBXO32 発現調節を担う FOXO1・FOXO3a の核内発現が低下しており、FBXO32 発現抑制の一因と考えられた。

マイクロアレイ法により抽出した CDDP 耐性下の尿路上皮癌における新規 EMT 制御因子 FBXO32 の発現変化と EMT 関連因子、予後との関係

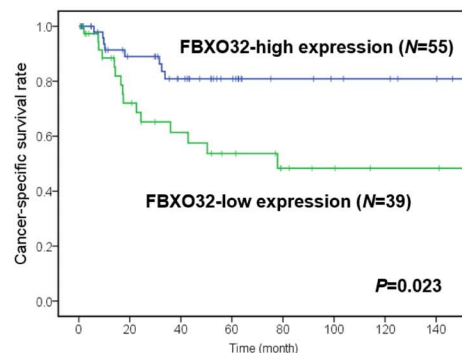
Downregulated (24)



腎盂尿管癌

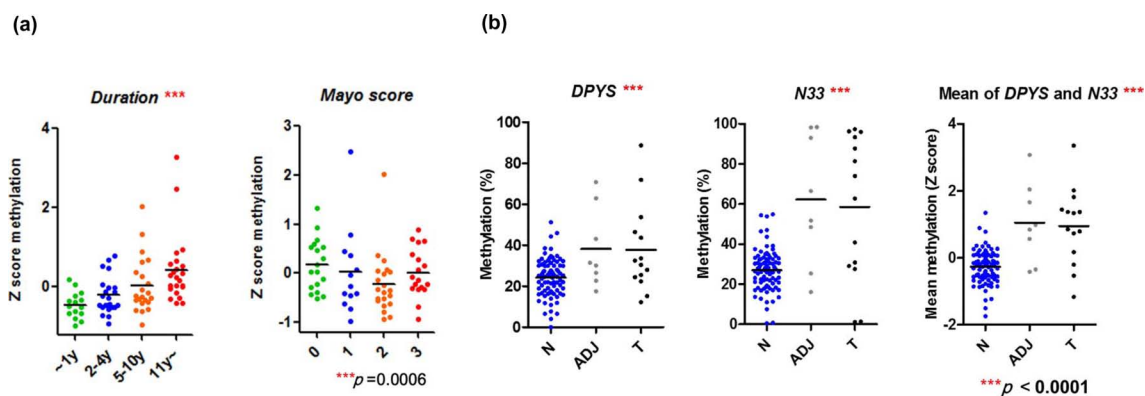


膀胱癌



本研究では、潰瘍性大腸炎（UC）における炎症性発癌の分子メカニズムを明らかにし、腫瘍合併例の絞り込みに向けたバイオマーカーを探索すべく UC 直腸炎症粘膜、および腫瘍部の遺伝子変異と遺伝子メチル化との関連を検討することを目的とした。UC 患者の直腸炎症粘膜、非炎症部粘膜および腫瘍部の DNA メチル化異常の系統的な解析により、UC 炎症大腸粘膜では非炎症粘膜に対し、DNA メチル化が亢進しており、高度炎症例や癌合併例との関連が認められた。網羅的遺伝子メチル化解析では、重症 UC では軽症例に比較し、特に CG 含有率の高い CpG islands を中心に遺伝子メチル化が亢進しており、メチル化されている遺伝子群と特定の pathway に有意な関連を認めた。UC 患者の炎症粘膜で蓄積し得る微量な遺伝子変異を定量的に解析するための方法として、PCR で増幅した候補遺伝子領域を次世代シーケンサーによりシーケンスを行い、微量な遺伝子変異を検出する方法に関して検討を重ねた。これまでに行った検討により本方法により関心領域を 200 万リード以上に増幅できることを確認した。微小変異を正確に同定するアルゴリズムの構築を今後検討する。

UC 大腸組織における Bisulfite pyrosequencing による遺伝子メチル化解析



175 1型糖尿病における持続血糖データと血管合併症の関連

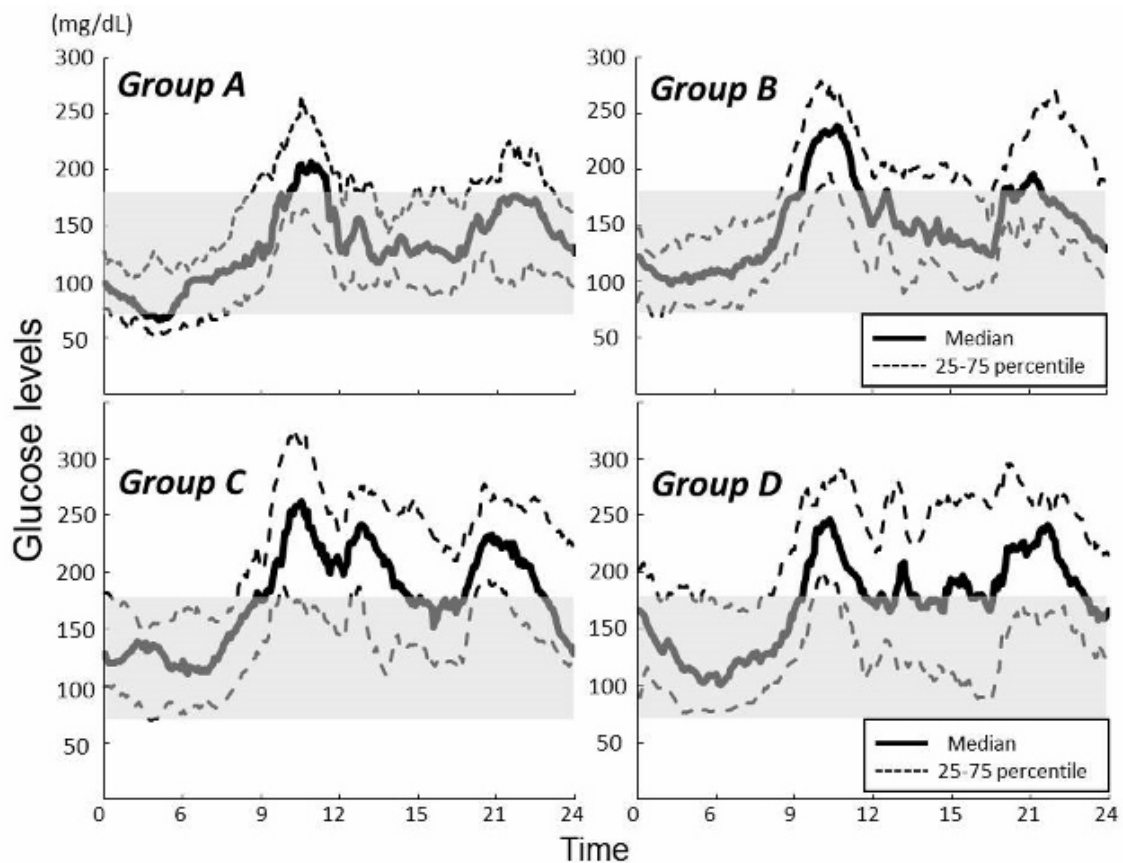
辻野 大助

本研究は、1型糖尿病に対して持続血糖モニター（CGM）を一定期間行い血糖変動を観察し、その後の大血管合併症及び細小血管合併症の経年的な発症・進展が、当初行ったCGMの各測定項目と関連があるか検討することを目的とした。CGMを施行した1型糖尿病患者に対して、大血管合併症の指標としてCAVI（心臓足首血管指数）、ABI（足関節上腕血圧指数）、細小血管合併症の指標として尿中アルブミン、尿蛋白定量、眼底検査、CVR-Rなどを測定しており、5年10年経過した後に再度検査し統計解析する予定である。

現状では、基礎となるCGMデータに関して、24時間の血糖変動の実態、特に低血糖の実態とHbA1c値との関連について解析し、学会報告し、原著論文として投稿済みである。対象者101名をHbA1c値で均等に4群に分けて比較すると（Kruskal-Wallis検定）、HbA1cが高くなるにつれて24時間平均血糖値が有意に高く（ $P < 0.001$ ）、逆に、低血糖の時間と夜間（23時-翌6時）低血糖の時間はHbA1cが高い群ほどそれぞれ有意に短かった（ $P = 0.014$, $P = 0.019$ ）。興味深いことに、24時間血糖の標準偏差（SD）はHbA1cの群間で有意差を認めなかった（ $P = 0.165$ ）。

1型糖尿病患者101名のHbA1cグループ別の24時間血糖変動

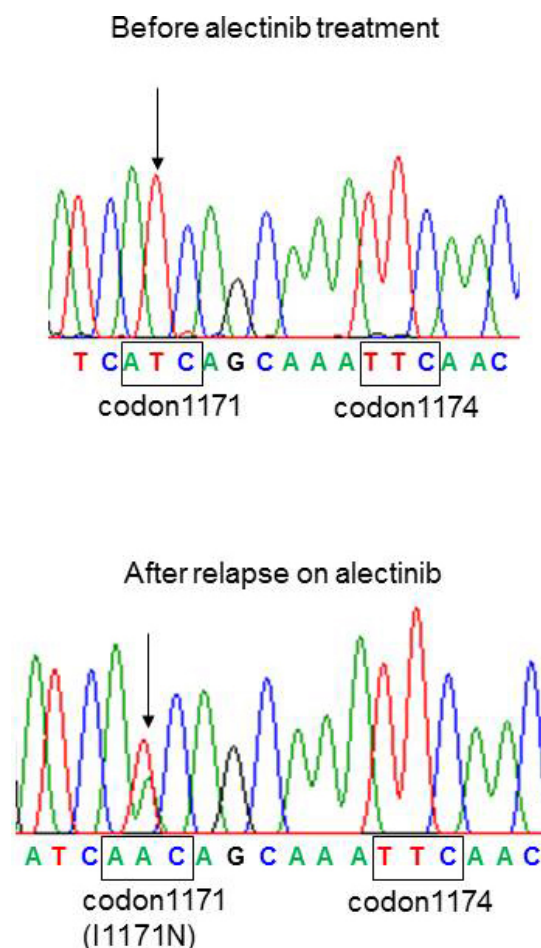
A群：HbA1c < 7.2%、B群：7.2% ≤ HbA1c < 8.2%、C群：8.2% ≤ HbA1c < 9.2%、D群：HbA1c ≥ 9.2%



ALK 融合遺伝子は 2007 年にわが国で発見された肺癌の oncogene であり、非小細胞肺癌の約 5 % の頻度である。ALK 融合遺伝子を有する症例には crizotinib、alectinib や ceritinib などの ALK 阻害剤が著効することが知られている。さらに、次世代の ALK 阻害剤も開発されており、臨床応用されることが期待されている。しかしながら、多くの症例で耐性獲得が問題となっており、耐性獲得機序の解明とその克服が喫緊の課題である。今回、我々は ALK 阻害剤に対して耐性を獲得した症例に対して再生検を行い、耐性獲得機序の解明と耐性獲得後の治療戦略について検討した。

Crizotinib、alectinib および ceritinib に対する耐性獲得機序として、ALK 遺伝子の新たな二次変異 (I1171T、I1171N、および G1123S) を同定した。さらに、alectinib に対して耐性獲得後に肝生検を行い、MET 増幅を同定した。c-MET 阻害剤として開発された crizotinib が著効したことから、MET 経路の活性化が alectinib 耐性を惹起していると考えられた。

Alectinib 耐性を惹起する新たな ALK 二次変異 (I1171N)

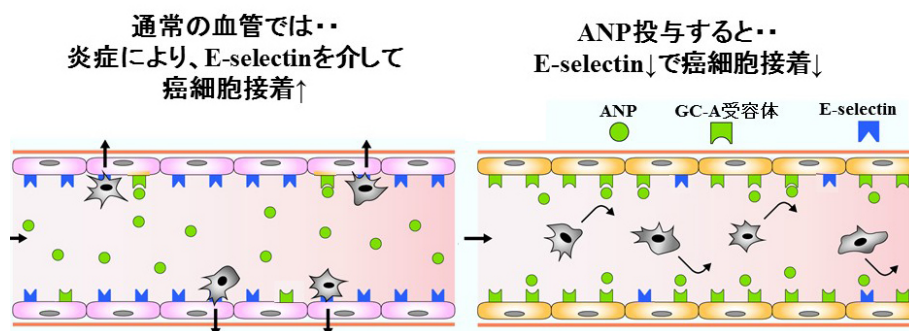
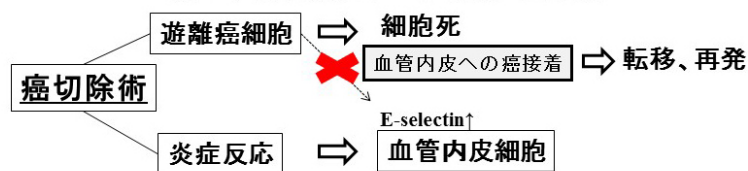


癌患者の死亡原因の多くは“転移”によるものであり、予後の改善には転移の抑制的制御が極めて重要である。しかし、現行の癌治療は、殺細胞効果を発揮する化学療法や、分子標的剤等の原発巣を標的としたものが中心であり、“転移”を標的とした治療法は少ない。

心房性ナトリウム利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptide: ANP) は、急性心不全治療薬として臨床応用されており、これまでに様々な心血管保護作用を有することが報告されている。我々は肺癌手術の際、術中より3日間 ANP を持続投与することによって、術後心肺合併症を有意に軽減できること、さらには術後無再発生存率を有意に改善できることを報告した。癌転移抑制機序として、ANP は血管 E-セレクチンの発現を抑制することによって、癌細胞の血管への接着を防ぐことを明らかにした。これらの研究成果を基に、現在我々は、多施設共同無作為化比較試験 (JANP study) を開始しており、ANP の“抗転移作用”について前向きに検証を行っている。

肺癌周術期 ANP 投与による術後再発抑制効果のメカニズム

ANPは何故周術期投与で癌転移を抑制したのか？



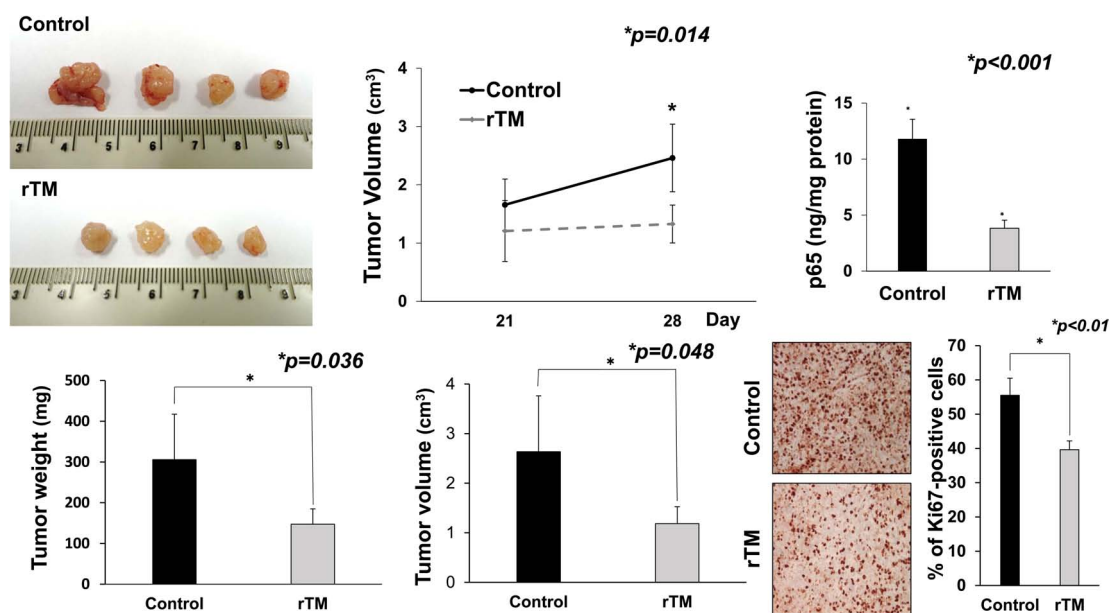
目的: 膵癌は予後の悪い消化器癌であり効果的な化学療法は限られている。リコンビナントトロンボモジュリン (rTM) は、トロンビンを阻害する抗凝固剤であり日本では disseminated intravascular coagulation (DIC) の治療薬として使用されている。本研究は、rTM の NF- κ B 活性化抑制作用と膵癌に対する抗腫瘍効果を評価するものである。

方法: 膵臓癌異種同所性マウスモデルを作製し、腫瘍接種より 4 週間後から治療を開始した。rTM は DIC の動物実験で用いられる 10 mg/kg を週 5 回腹腔内投与した。治療開始後 4 週間後に全採血し犠牲死させ、腫瘍からタンパクを抽出し、NF- κ B を ELISA 法にて、IKK β 、pI κ B α を Western blot 法にて解析した。

結果: 腫瘍の増殖は rTM によって有意に抑制された ($p < 0.05$)。rTM は、IKK β ($p < 0.05$) と pI κ B α ($p < 0.01$) の発現、NF- κ B 活性化 ($p < 0.001$) を有意に抑制した。さらに、トロンビンによる PAR1 活性化とそれに引き続く NF- κ B 活性化を確認し、さらに rTM がトロンビンによる PAR1 と NF- κ B 活性化を阻害することを認めた ($p < 0.05$)。Ki67 陽性細胞は rTM 群で有意に減少していた ($p < 0.01$)。rTM は、膵癌による体重減少を有意に減らした ($p < 0.05$)。貧血、肝機能障害、出血傾向などの副作用は認められなかった。

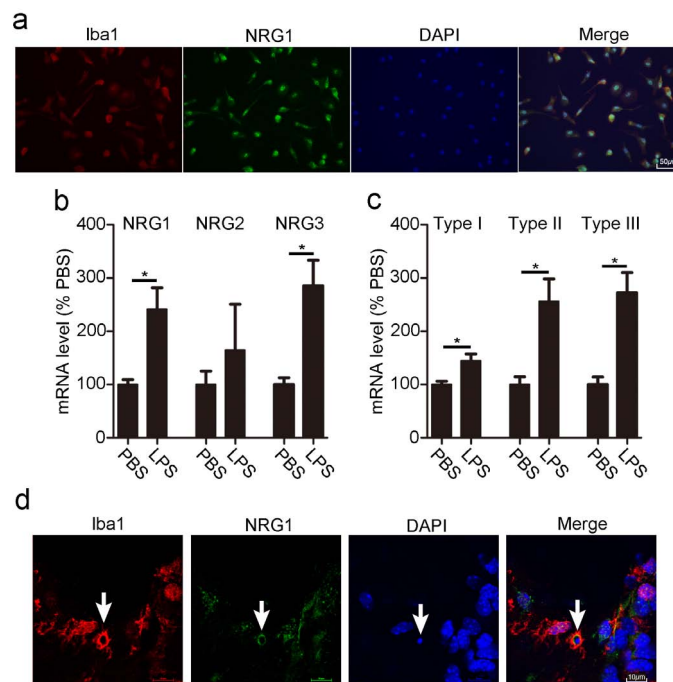
結語: rTM はトロンビンによる NF- κ B 活性化を阻害することによってヒト膵癌細胞の増殖を有意に抑制した。

rTM による抗腫瘍効果、NF- κ B 阻害作用



ニューレグリン1は神経系組織においてシナプス形成、グリア細胞発達などに関与しており、精神疾患との関連も報告されている分子であるが、これまでのほぼ全ての研究ではニューレグリン1はニューロンやアストロサイトで発現されるものとして施行されてきた。我々はニューレグリン1がミクログリアでも発現されていることを確認したため、本研究では、複数の精神疾患モデルマウスのミクログリアにおけるニューレグリン1発現量を検討した。ミクログリア由来ニューレグリン1の発現量は、自閉症モデルマウス（BTBR マウス）および虐待モデル（幼若期隔離マウス）で増加、統合失調症モデルマウス（Fabp7ko マウス）で低下していた。また、ヒトの単核球から作製したミクログリア（induced microglia-like cells;iMG cells）でもニューレグリン1は強く発現していたため、精神疾患の免疫系におけるニューレグリン1機能を検討すべく、自閉症患者の諸症状と同患者の単核球におけるニューレグリン1発現量との相関を検証した。自閉症評価尺度 ADI-R の domain A score（幼少期社会性障害）とニューレグリン1 Type III 発現量との間に正の相関を認めた。すなわち単核球のニューレグリン1発現量が亢進していると自閉症患者の幼少期における社会性がより障害されることが明らかとなった。この結果は、BTBR マウスや幼若期隔離マウスのミクログリアにおけるニューレグリン1発現上昇の結果と同様であり、免疫系のニューレグリン1が精神疾患の症状形成に何らかの影響を与えていることが示された。

ミクログリア由来ニューレグリン1発現

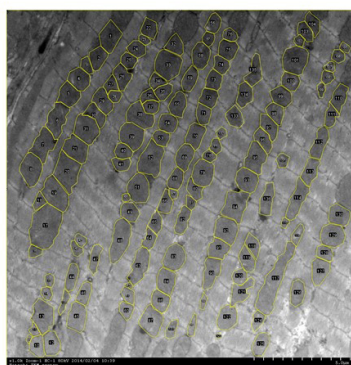


【目的】 Nox4 由来の ROS の増加によるミトコンドリア分裂・融合のバランスの破綻がミトコンドリア機能低下によるエネルギー代謝異常を引き起こし、心筋リモデリングの形成・進展に関与するという仮説を検証するとともに、Nox4 活性の制御による心筋組織内 ROS の最適化という独自の概念に基づく新たな心筋リモデリング・心不全の治療法の開発を目指すものである。

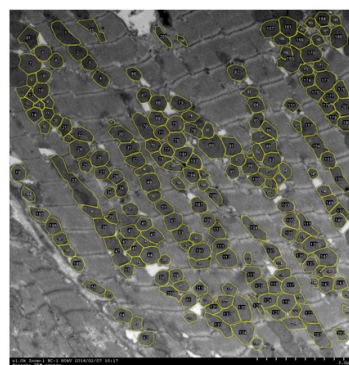
【方法・結果】 マウスに心筋梗塞 (MI) を作製したところ、左室内腔は拡大し、左室駆出率は低下を認めた。また、組織学的に非梗塞部の心筋肥大、間質線維化、アポトーシスの亢進を認め、心筋リモデリングが進行していた。電子顕微鏡にてミトコンドリア形態評価を行った。心筋梗塞作製 28 日後の非梗塞部心筋細胞におけるミトコンドリアサイズが減少し、ミトコンドリア数は増加していた。心筋梗塞 28 日後での非梗塞部における Drp-1 と Mitofusion1 の蛋白発現レベルはいずれも MI と sham マウスにおいて有意な差を認めなかったが、Mitofusion1 は MI マウスにおいて高い傾向であった (約 1.4 倍、 $p = 0.1$)。一方リン酸化された Drp-1 は MI マウスで低下していた。

梗塞後心筋におけるミトコンドリア形態

Mitochondrial area trace



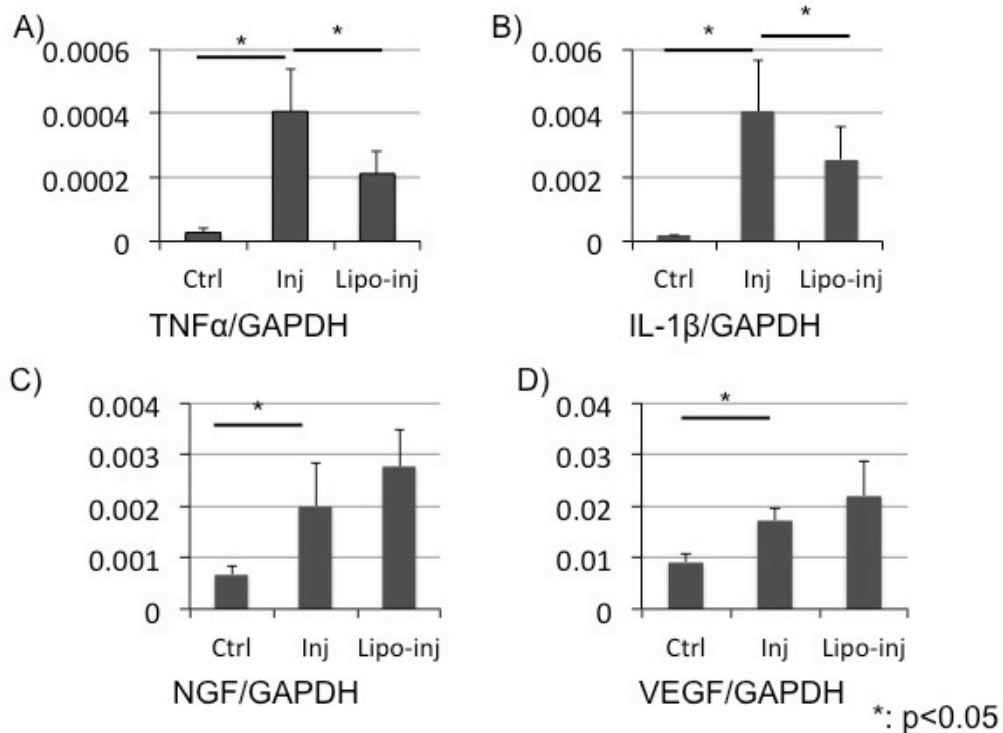
Sham (強拡大)



MI (強拡大)

慢性椎間板性腰痛の原因として、変性椎間板内における炎症性サイトカインの発現上昇と疼痛関連微小神経線維の侵入が、深く関与する。本研究の目的は椎間板傷害によりおこるこれらの現象に関わる根幹の成長因子や細胞を特定し、新規薬物治療の可能性を探る事である。マウス尾椎椎間板傷害モデルに対して、クロドロン酸内包リポソーム処置をすることによりマクロファージを枯渇化させ、椎間板に発現する物質の変化について調査した。次に同様のモデルに対し、傷害椎間板を摘出し、マクロファージを除去した後、*in vitro*で炎症性サイトカインの刺激が成長因子発現に与える影響について調査した。結果、1) 椎間板傷害によって発現上昇する炎症性サイトカインと各種成長因子が椎間板性腰痛を惹起する可能性があること、2) 炎症性サイトカインは主にマクロファージによって産生され、成長因子はその他の椎間板内細胞によって産生される可能性があること、3) マクロファージが産生した炎症性サイトカインがマクロファージ以外の椎間板内細胞を刺激し各種成長因子産生を促進することが椎間板性腰痛の原因となりうるということがわかった。

椎間板内の TNF α (A)、IL-1 β (B)、NGF (C)、bFGF (D) の発現量

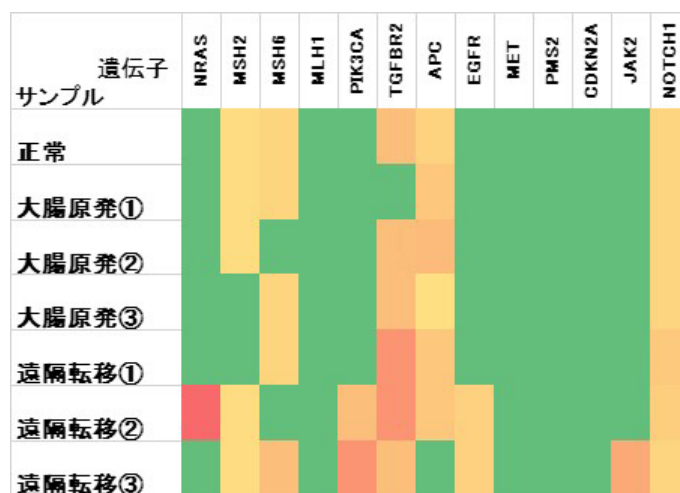


近年増加の一途をたどる悪性腫瘍のなかでも消化器癌は非常に罹患率の高い疾患である。特に日本においては、大腸癌の罹患率は死亡率とともに年々増加し、今後もさらに増加するものと考えられている。

大腸癌において、予後を反映、すなわち癌死を規定する最も大きな要因は遠隔臓器への「転移」や化学放射線療法などに対する「治療抵抗性」であり、これらには癌そのものの分子メカニズムに基づく生物学的特性が関与していると考えられる。

そこで本研究では遠隔転移を伴う大腸癌組織について、次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行い、特徴的な遺伝子変異について検討した。Ion Torrent Proton システムを用いて、genome wide で遺伝子解析を行った結果、同一患者の異なる部位の腫瘍組織において APC, NOTCH1, TP53, JAK3 など様々な遺伝子変異のパターンを認めた。Kras 遺伝子変異については正常大腸粘膜においては認めなかったが、原発大腸癌 3 か所と遠隔転移巣 3 か所とも exon2 の変異 (G12D) を認めた。今後、特徴的な遺伝子発現に関して周術期に採取した血液中遊離 DNA およびエクソソームについて比較検討を行うことで、新規バイオマーカーおよび治療効果予測因子の探索のみならず、遺伝子発現を制御することで治療につながることも期待される。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析結果

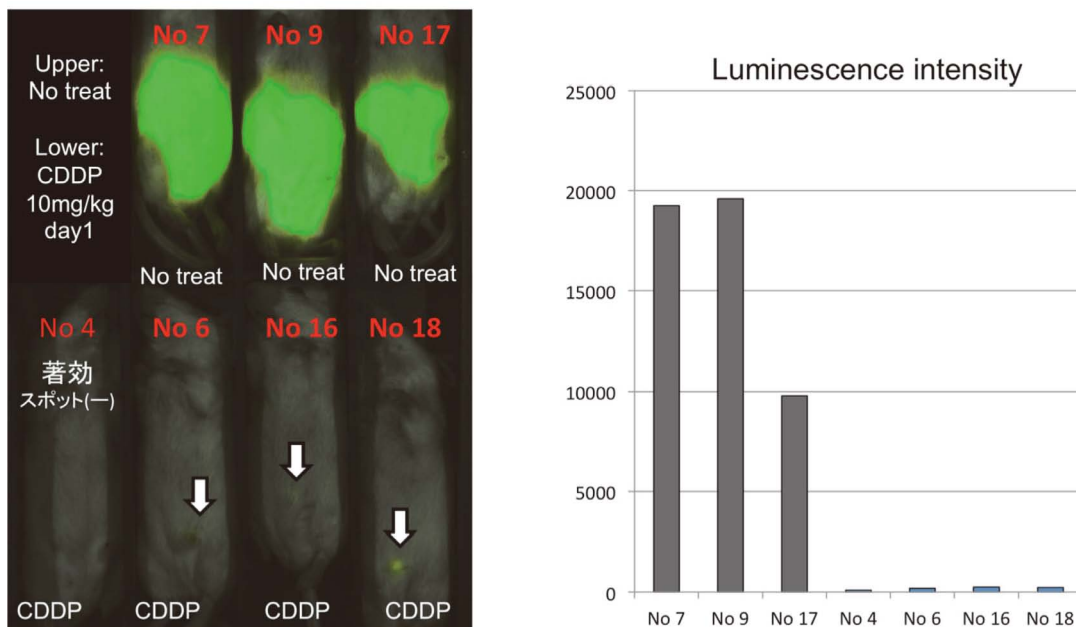


183 新規抗癌剤の迅速かつ安価な薬効評価実験モデルの開発

横堀 武彦

近年、動物愛護の観点から実験動物を減らす努力が求められており、同一個体での経時的な腫瘍評価が可能な *in vivo* luciferase assay (Luc assay) が注目されている。しかし *in vivo* Luc assay には高額な解析機器が必要であることから、我々は安価かつ高感度な Luc assay システムを開発し、本法が微小腹膜転移モデルマウスの治療効果判定に利用可能かを検証した。ルシフェラーゼ発現マウス大腸癌細胞株 colon26-luc を Balb/c マウスの腹腔内に投与し腹膜播種モデルマウスを作製した。day1 (接種 24 時間後) に Luc assay を行い腫瘍が生着しているかを検証し抗癌剤 (CDDP, Gemcitabine) を投与した。薬効評価は day10 に Luc assay (*in vivo*, *ex vivo*) で行った。day1 に 65 % に播種形成 (発光) を確認できた。day10 の *in vivo* Luc assay による薬効評価では抗癌剤投与群で有意に発光強度の低下を認めた。*ex vivo* Luc assay では播種巣の数を定量的に評価できた。これまで day10 の時点で形成される微小腹膜転移は肉眼的には認識できず、定量的な評価は困難であった。本研究により微小腹膜播種巣を定量的に評価する動物モデルを開発することが出来た。

in vivo luciferase assay を用いた腹膜播種巣に対する CDDP 薬効評価



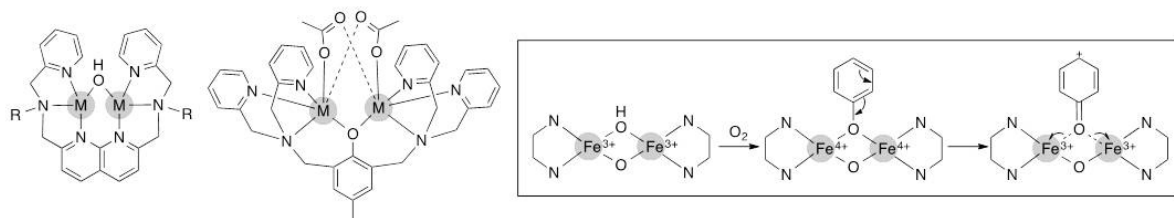
ルシフェラーゼアッセイによりCDDPの薬効を定評的に評価可能

持続可能な社会の構築に向けて、医薬品合成の分野においても廃棄物を最小限に軽減した物質生産が求められており、出発原料の C-H 結合を直接変換する反応の重要性が益々高まっている。生物無機化学分野で従来検討されてきた酵素モデルは一般に単離可能な安定モデルであるため、合成化学に応用可能な実用的酸化触媒活性を備えていない。我々の研究室では、酸化的炭素-炭素結合形成反応を新しい化学合成を開拓するための基盤技術と位置づけ、それを可能とする触媒の開発研究を開始した。具体的課題として、我々はフェノールの酸化反応を検討した。フェノールは医薬品を始めとする様々な化合物群に普遍的に存在する基本骨格であり、環境負荷のない酸化剤を用いる触媒的酸化反応の開発は合成化学的に極めて意義深い。Fe や Cu 単核触媒では反応性が低いフェノールの酸化は困難であり、より高活性な触媒開発が必要である。複核錯体には単核錯体には見られない酸化還元電位の変化が期待されるため、触媒 1 分子がふたつの金属イオンに配位し得る二核架橋構造を有する複核錯体を設計し合成した。その結果、1,8-ナフチリジン基本骨格とした N3 及び N4 型配位子が複核錯体形成に有用であることを見出し、その酸化触媒活性を評価した。

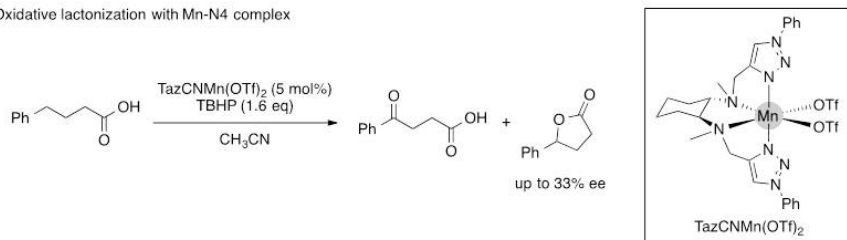
さらに我々は、C-H 結合の直接酸化反応に興味を持った。C-H 結合の直接的な酸素官能基化は、様々な反応条件に対して反応してしまう水酸基やケト基の導入を化合物合成の後半段階に行える点で redox economy に適う反応であり、官能基の保護・脱保護を省略できるため atom economy の観点からも優れた反応と言える。具体的課題として我々は基質補足型非ヘム鉄酸化触媒を用いた C-H 酸化的不斉ラクトン化反応の開発に取り組んだ。4-フェニル酪酸の酸化的不斉ラクトン化反応を検討したところ、Mn(S,SPDP) 錯体や新規に設計した TazCNMn(OTf)₂ を触媒とすることでベンジル位の酸化が円滑に進行し、ケトン体に加え目的とするラクトン化が十分な不斉誘起を伴いつつ進行することを見出した。

複核錯体合成と酸化的ラクトン化反応

(a) Synthesis of dinuclear complexes and working hypothesis



(b) Oxidative lactonization with Mn-N4 complex

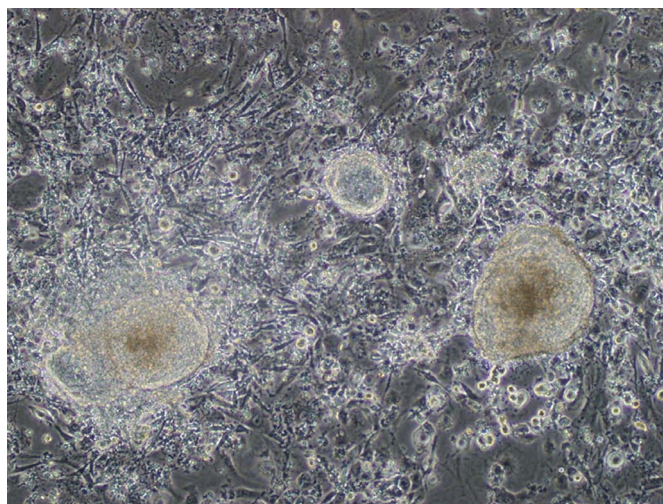


185 iPS 細胞に生じる多量のゲノム変異と p53 の関係

荒木 良子

iPS 細胞の臨床応用において、iPS 細胞樹立から、培養、分化にかけてのゲノム安定性は重要な問題である。我々は、これまでに C57BL/6 マウス iPS 細胞を用いて、リプログラミング初期に多数のゲノム点突然変異が生じることを明らかにしてきた。今回、リプログラミング時のゲノム安定性、特に点突然変異の発生に関して、p53 がどのように寄与するか解析を試みた。まず、p53 ノックアウトマウス由来体細胞から iPS 細胞樹立を試みたが、 $-/-$ 細胞のみならず $+/-$ 細胞までの全てで未分化状態を維持できなかった。次に、ドミナントネガティブ変異体による p53 一過性抑制による正常体細胞由来 iPS 細胞の樹立を行ったところ、未分化なコロニーの樹立に成功した。これら複数の iPS 細胞株について全ゲノムシーケンシングを行い、親体細胞との比較により点突然変異の抽出を試みた。本研究を通じて p53 とリプログラミング時のゲノム変異の関係を明らかにし、傷の少ない iPS 細胞樹立法の確立を目指す。

p53 一過性抑制を行い樹立したマウス iPS 細胞



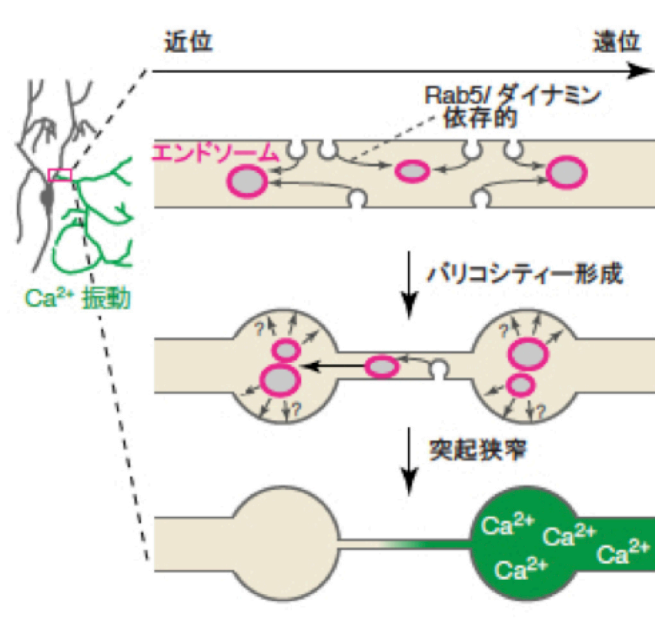
100μm

私たちの脳では、軸索と樹状突起という機能・構造的に異なる2種類の神経突起を介して、1,000億個ものニューロンがネットワークを形成する。ヒト脳神経回路の大まかなネットワークは胎児期に形成されるが、この発生初期の幼若な回路は、いわゆる「混線状態」にあり、その後の発達段階において、不要回路の切断・除去を含むネットワークの再編が起こることにより、機能的な情報処理回路へと成熟することができる。この不要回路の除去過程では、不要な突起のみが選択的に変性・除去される一方で、必要な回路は維持されることが重要ですが、ニューロンが自らの突起群の中から「要」「不要」を選択する機構は不明だった。

これまでに私たちは、ショウジョウバエの変態期において「不要な神経回路の選択的除去」を含む脳神経回路のネットワーク再編が起きることを見出し、局所性カルシウムシグナルが不要な神経回路の選択的除去を担うことを明らかにした。本研究では、不要な突起が区画化される仕組みの解明に取んだ。神経突起の構造変化を詳細に解析したところ、将来的に除去されるべき神経突起の根元が急激に細くなり、細胞内成分の往来が抑制されることを発見した。この構造変化は、Rab5とダイナミンという2つのGTPアーゼの活性により引き起こされるエンドサイトーシスが原因であり、いずれかの酵素の活性のみを一過的に阻害すると、神経突起の区画化が阻害され、同時に低頻度カルシウム振動の発生および神経突起の除去も停止した。以上の結果から、神経突起において一過的かつ局所的に誘導されるエンドサイトーシスが不要突起の区画化と除去を引き起こすことを示した。

膜構造の局所的な変化が不要な神経突起の区画化と除去を誘導する

神経突起の刈り込みが起きるときには、不要な突起の近くでエンドサイトーシスが誘導されることにより突起の根元が急激に細くなる（狭窄）。この突起構造の急激かつ局所的な変化が、ニューロンの細胞体とは反対側（遠位側）の神経突起と細胞体との物質の往来を遮断することにより、カルシウム振動が遠位側の神経突起において発生し、最終的にカルシウム依存的分解酵素カルパインを介して突起が分解される。

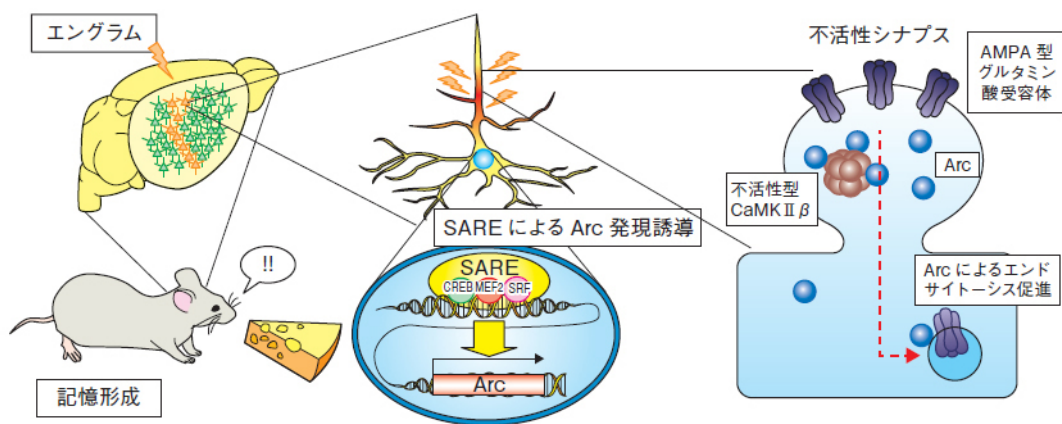


187 逆シナプスタギングの分子基盤に基づく長期記憶操作

尾藤 晴彦

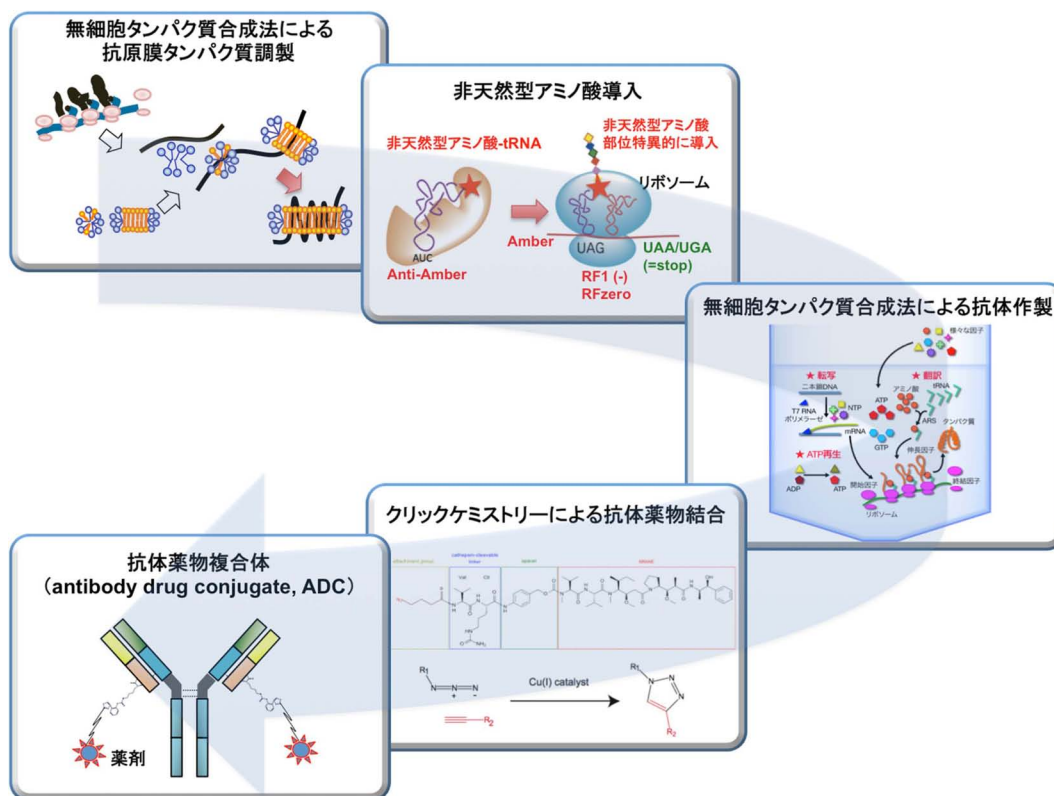
本研究では、神経ネットワークが保持する可塑性メカニズムである逆シナプスタギング機構のメカニズムの一端を明らかにし、これを改変し、長期記憶を修飾する実験システムの構築を実現した。これにより、長期シナプス可塑性を人為的に操作・誘導し、長期記憶をマウス個体で操作・破綻・向上させる実験パラダイムを確立した。具体的には、逆シナプスタギングを可能にしている2つのメカニズム、すなわち長期記憶形成における「CREB 依存的転写制御」と、活動の弱いシナプスを規定する細胞生物学的基盤について探索する方法論を樹立した。これに引き続き、逆シナプスタギングの操作を実現し、脳高次機能への影響を精査した。

逆シナプスタギングによる Arc 捕捉の意義



近年、抗体医薬への期待が著しく高まり、低分子化合物等の薬剤を結合した抗体である抗体薬物複合体 (antibody drug conjugate: ADC) が注目を集めている。本研究では、ADC 作製の新たな技術の確立を目指した。我々が新たに開発した無細胞タンパク質合成法を用いて、創薬標的として重要な膜タンパク質 (GPCR 等) の高品質な試料の大量調製を行った。この膜タンパク質を免疫原として、膜タンパク質の立体構造を認識するモノクローナル抗体を作製した。我々の開発したアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を活用する非天然型アミノ酸部位特異的導入法により非天然型アミノ酸を抗体に導入するのに適した部位を明らかにした。さらに、アジド基、アルキン基等の官能基をもつ非天然型リシンアナログ (アジド Z リシン等) を部位特異的に導入した抗体を、無細胞タンパク質合成法により大量調製し、それぞれ、アルキン基、アジド基等をもつ試薬とのクリックケミストリーを行い、蛍光基や ADC のリンカー・ペイロードを、抗体の指定した部位に効率よく結合することができた。これらの技術は、次世代 ADC 開発の新たな戦略を提供すると期待される。

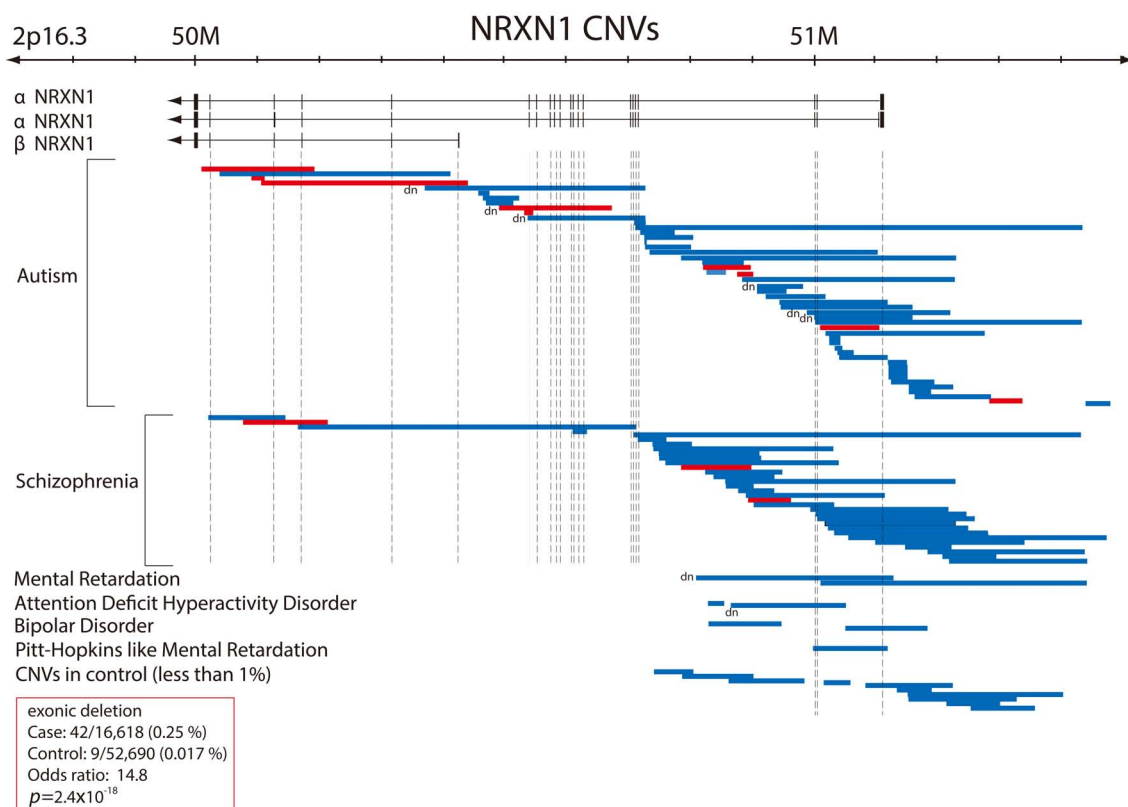
次世代 ADC 作製技術



自閉症スペクトラム障害は、「対人関係障害」、「コミュニケーション障害」、「常同的・反復的な行動等」の特徴を持つ発達障害で小児 68 人に 1 人の割合で発症する。双生児・家族研究から遺伝的要因の強い関与が判明している。コピー数多型 (CNV) は通常 1 kb から数 Mb の長さの微小染色体構造異常でありマイクロアレイで検出可能で、特に *de novo* CNV と稀少遺伝性 CNV は自閉症スペクトラム障害との関連が強い。CNV の約 5 割は遺伝子を含み、対照ゲノムと比較して相対的にコピー数が多い場合 (重複) と少ない場合 (欠失) があり、特に *de novo* CNV と稀少遺伝性 CNV は自閉症スペクトラム障害との関連が強い。CNV が遺伝子や遺伝子発現領域を含む事があり、遺伝子発現に影響を及ぼすため CNV が自閉症スペクトラム障害発症に強く関与すると考えられている。本研究では、自閉症スペクトラム障害で先行研究で明らかにしたシナプス関連遺伝子の *SHANK* 遺伝子と *NRXN1* 遺伝子領域の CNV 解析を行った。

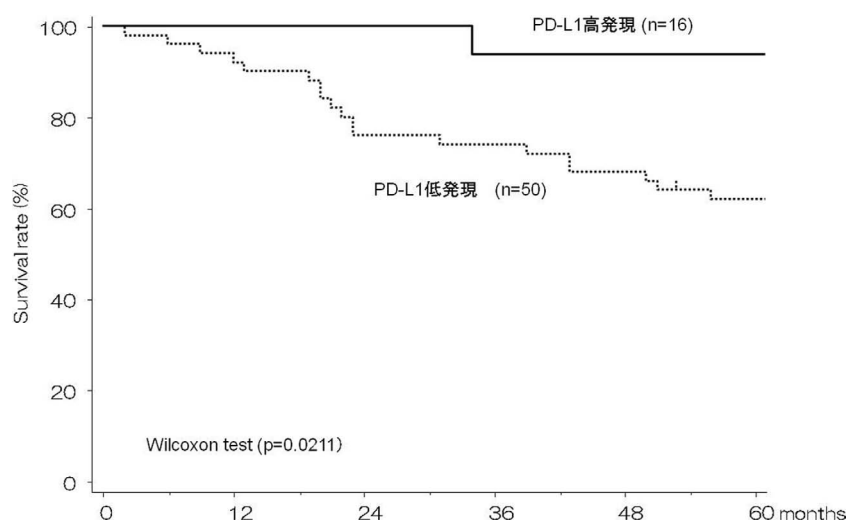
自閉症スペクトラム障害患者において、*SHANK1*, *SHANK2*, *SHANK3* 遺伝子のエクソンを伴う欠失頻度は、それぞれ 0.04 %, 0.05 %, 0.18 % であった。*NRXN1* 遺伝子のエクソンを伴う欠失頻度は、0.41 % であった。

精神疾患における *NRXN1* 領域 CNV



免疫チェックポイント阻害薬が肺癌治療における新たな免疫療法としてその有効性が報告され、腫瘍局所における免疫抑制の解除の重要性が認識されるようになった。本研究では、I期肺腺癌完全切除例 228 例という比較的均一な集団を対象に、肺癌の腫瘍微小環境における PD-L1 の発現と、*EGFR* 遺伝子変異、*ALK* 融合遺伝子をはじめとした driver mutation の発現および臨床病理学的因子との相関の解析を行った。PD-L1 発現は、強度および癌細胞での陽性率を評価し、高発現群と低発現群に分け評価した。*EGFR* 変異陽性を 46.5 %、*K-ras* 変異陽性を 4.8 %、*ALK* 融合遺伝子を 7.1 % に認めた。PD-L1 の高発現群を 32 % に認め、腫瘍サイズと逆相関をしていた。I期全症例では PD-L1 発現と予後に相関を認めなかったが、*EGFR* wild type 症例 (122 例) において腫瘍サイズと PD-L1 低発現が予後不良因子であった。また、進行した IB 期においては PD-L1 低発現が独立した予後因子であった。I期肺腺癌において、癌微小環境における PD-L1 発現が予後と相関することが示唆された。

IB 期肺腺癌完全切除例における PD-L1 発現と予後



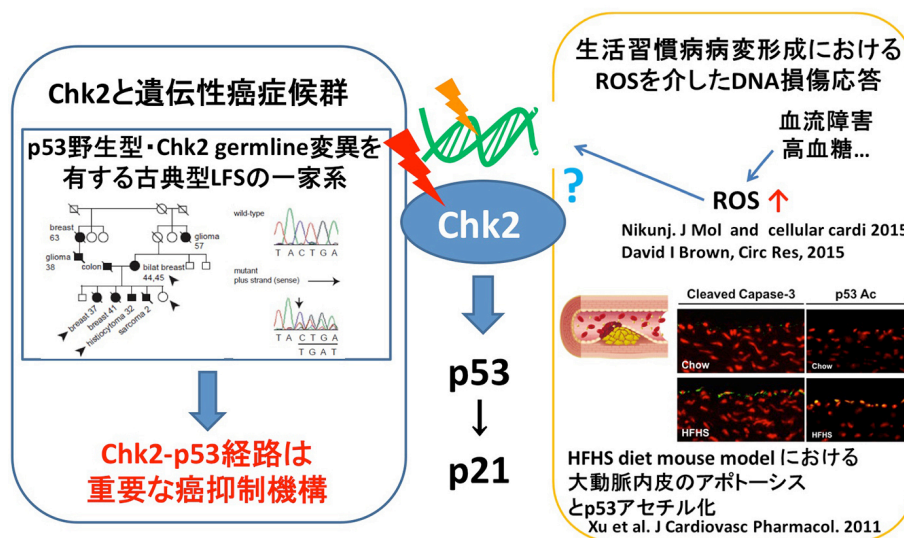
【目的】 DNA 損傷シグナルはゲノムの恒常性維持を担い、癌の制御に重要な役割を果たすが、酸化ストレスや慢性炎症に伴う肥満組織や動脈硬化巣においても機能することが報告され注目されている。そこで、癌と生活習慣病に作用する分子機構として、DNA 損傷シグナル Chk2-p53 に着目し、その制御機構を検討した。

【方法】 ヒト癌細胞株を用いて、DNA 傷害依存的な Chk2 リン酸化状態の変化を観察した。LC-MS/MS によって、Chk2 の新規リン酸化部位の同定し、結合タンパク解析を行った。Chk2 発現制御におけるユビキチン化の役割を検討するため、ユビキチン化アッセイを行い、Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) システムを用いて細胞周期制御との関連を評価した。病態生理学的な検討のため、乳癌患者のデータベース解析と肥満脂肪組織の発現解析による発現解析を行った。

【結果・考察】 フォスタグを用いた生化学的解析から、DNA 損傷応答において、時間・濃度依存的に Chk2 のリン酸化の多段階的变化を認めた。LC-MS/MS を用いてリン酸化状態を解析した結果、新規を含めたリン酸化・メチル化/Ub 化部位を同定した。また、Chk2 結合分子として、ユビキチン制御に関わる因子やリガーゼ分子を認めた。Fucci システムと変異体を組み合わせた機能解析から、Chk2 は C 末端の Cys を中心に Ub 化され、その制御に新規 Thr441/Ser442 リン酸化が関与し、p53 依存的 G1 arrest 作用を有していた。乳癌患者のデータベース解析より浸潤性乳癌群の間質組織での Chk2 発現低下が認められ、肥満脂肪組織の発現解析では、肥満患者における Chk2 リン酸化に伴う p53-p21 経路の活性化を認めた。

【結論】 DNA 損傷応答機構の key-regulator である Chk2 は、多彩なリン酸化や Ub 化による発現調整を受けて、p53 依存的細胞周期制御を果たすことが明らかとなった。

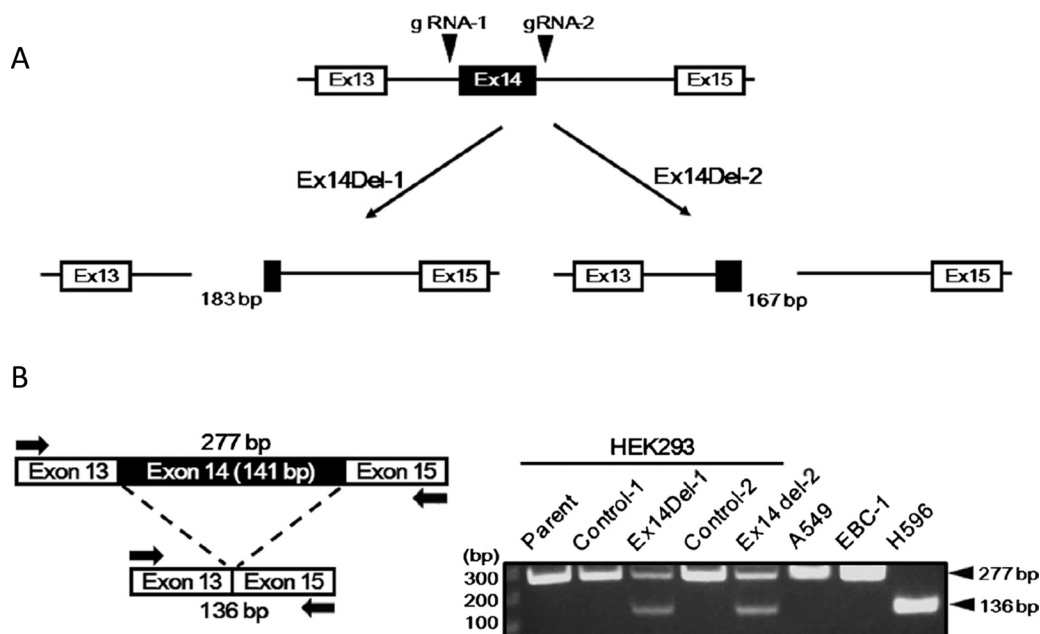
癌、生活習慣病、老化における DNA 損傷応答



EGFR や ALK などのドライバー遺伝子変異を有する肺腺癌に対する分子標的治療は、従来のプラチナ併用化学療法よりも劇的な有効性をもたらした。本研究では、日本人肺腺癌の 3% に存在する MET エクソン 14 欠失腫瘍の治療戦略構築に向けた *in-vitro* モデルを作製すること、さらに、EGFR 変異肺癌のうち 4% を占めるがその臨床的意義が十分検討されていないエクソン 18 変異の治療戦略確立を目的とする。ゲノム編集システム CRISPR/Cas9 を用いて HEK293 細胞の MET エクソン 14 欠失モデルを作製した。エクソン 14 欠失モデルは、コントロール細胞と比較して増殖速度及びコロニー形成能が増した。また、MET のリガンドである HGF の刺激後、リン酸化 MET 及びその下流のリン酸化 ERK の発現が持続することがわかった。MET 阻害剤であるクリゾチニブに感受性を示した。

EGFR エクソン 18 変異のうち代表的な 3 つの変異を Ba/F3 細胞に遺伝子導入して、7 種類の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の 90% 増殖阻害濃度 (IC90) を網羅的に調べた。最も感受性の高い変異であるエクソン 19 欠失変異と比較して、エクソン 18 変異は従来の第一世代 TKI であるゲフィチニブやエルロチニブに対しては IC90 が 11-50 倍と著明に高かったが、第二世代のアファチニブに対してはわずか 3-7 倍の差しかなく、実臨床で十分到達できる薬物血中濃度であった。また、自験例及び文献の臨床データをまとめると、エクソン 18 変異肺癌の第一世代 TKI に対する奏効率は 35-56% 程度であるのに対して、アファチニブは約 80% であった。これらの一貫したデータから、EGFR エクソン 18 変異肺癌にはアファチニブが特に有効であると考えられた。

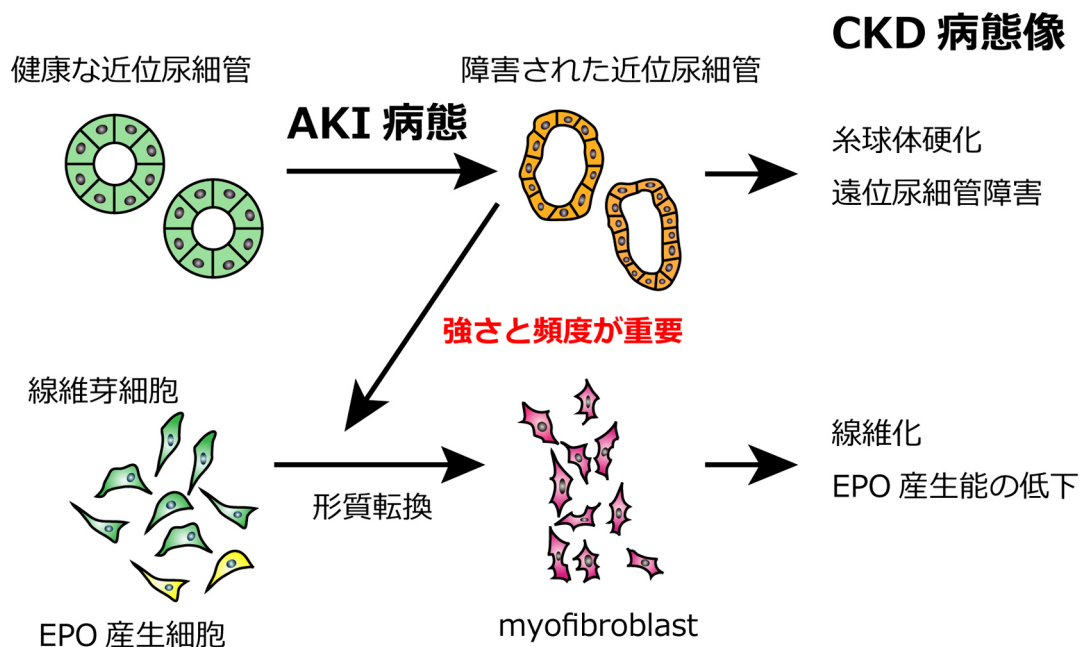
CRISPR/Cas9 システムを用いた MET エクソン 14 の欠失



線維芽細胞は腎臓の機能単位であるネフロン内の支持細胞としての役割を果たしているが、それに加えて赤血球産生に必須のホルモン、エリスロポエチン（EPO）を産生する内分泌細胞としての機能も担っている。我々は以前、系譜追跡の手法を用いて、健康な腎臓における線維芽細胞が腎臓病の過程で細胞外マトリックスを産生する myofibroblast へと形質転換し、その過程で EPO 産生能が低下することが腎線維化と腎性貧血の原因であることを見いだしている。

この形質転換の誘因には諸説あったが、我々は特定の細胞表面にジフテリア毒素受容体を発現させることでジフテリア毒素依存的に障害する TRECK 法を用いて、近位尿細管特異的な障害が線維芽細胞の形質転換を惹起し、線維化と腎性貧血の原因となりうることを、その強さと頻度次第では、糸球体硬化や遠位尿細管障害といった広範なネフロン障害を誘導することを見いだした。本モデルは、近位尿細管障害を主徴とする急性腎障害が、広範なネフロン障害と線維化を特徴とする慢性腎臓病に移行する現象を反映するモデルとして有用である。

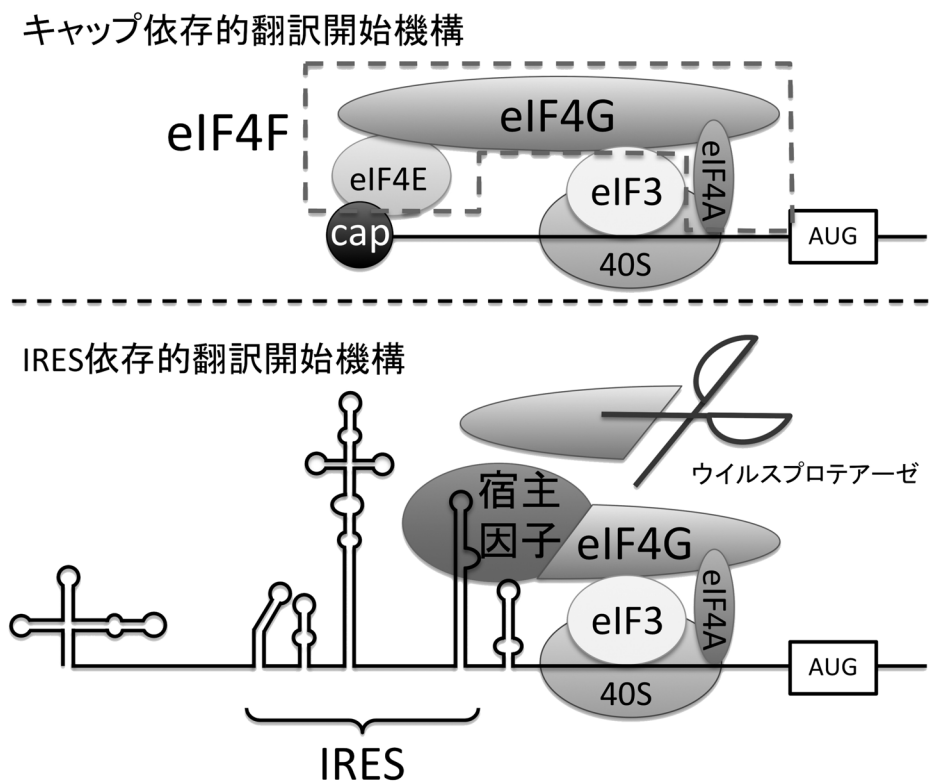
近位尿細管障害を特徴とする急性腎障害（AKI）が慢性腎臓病（CKD）への移行を惹起する



cap 構造をもたない+鎖 RNA ウイルス mRNA は、5'非翻訳領域に存在する Internal Ribosome Entry Site (IRES) を介してリボソームに結合し、宿主の cap 依存的翻訳機構をバイパスする。ポリオウイルスでは強毒株と弱毒株の病原性決定に関わる遺伝子領域として IRES が同定されている。ポリオウイルス強毒株は中枢神経系への組織特異性を有している一方、弱毒株は中枢神経系での増殖効率が著しく低下している。つまり、弱毒株の mRNA では IRES 領域の変異により、中枢神経系において IRES 依存的翻訳が活性化せず、ウイルスタンパク質の翻訳活性が低下していると予想される。しかしながら、これまでのところポリオウイルス強毒株の中枢神経系における IRES 依存的翻訳開始機構を特異的に制御する宿主因子の発見には至っていない。

本研究では非神経細胞として HeLa 細胞、神経細胞として SK-N-SH 細胞由来の *in vitro* 翻訳系を構築し、強毒型・弱毒型それぞれの IRES を付加させたレポーター mRNA を用いて各々の翻訳活性を調べた。その結果、神経細胞由来 *in vitro* 翻訳系では強毒型に比べ弱毒型の IRES 依存的翻訳活性は低くなっていた。一方で、非神経細胞由来の *in vitro* 翻訳系では強毒型と弱毒型の IRES 依存的翻訳活性には顕著な差は見られなかった。

cap 依存的翻訳機構と、ポリオウイルス IRES 依存的翻訳機構



うつとビタミンDとの関連において、介入研究では一致した結果は得られていない。その理由として、アウトカムであるうつの評価法が主観的方法によること、しかも用いられた調査票が研究により異なることが考えられる。脳由来神経栄養因子 (BDNF) はうつとの関連が報告されており、うつのバイオマーカーとなり得ることが示唆されている。本研究では、うつに対するビタミンDの効果をBDNF濃度を測定し、ビタミンDサプリメントを用いた臨床試験により検討した。大腸腫瘍再発予防に関するビタミンD介入研究に同意した92名を介入群または対照群のいずれかに無作為に割り付け、1年間ビタミンDサプリメントまたはプラセボを投与した。対象者には、エントリー時、6か月後、1年後に、うつ症状の評価 (CES-D) を含む健康調査票、食事調査票、身体計測、採血を行った。収集した血清検体よりBDNF濃度を測定した。研究に同意した92名のうち、83名が全ての調査に参加した。BDNF濃度およびCES-Dスコアともに、ベースラインから6か月または1年後の変化に両群で差は認めず、血清BDNF濃度およびうつに対するビタミンDサプリメントの効果は認めなかった。

対照群および介入群におけるBDNF濃度およびCES-Dスコアの平均値の変化

	対照群 (43名)	介入群 (40名)	P値
血清BDNF濃度 (ng/mL)			
ベースライン (平均±標準偏差)	28.5±7.3	29.7±8.0	0.47 ¹
6か月後 (平均±標準誤差) ²	26.4±0.6	27.0±0.6	0.44 ³
1年後 (平均±標準誤差) ²	25.4±0.5	24.1±0.6	0.11 ³
ベースラインと6か月後の差 (平均±標準誤差) ²	-2.7±0.6	-2.0±0.6	0.44 ³
P値 ⁴	<0.001	0.002	
ベースラインと1年後の差 (平均±標準誤差) ²	-3.6±0.6	-4.9±0.6	0.11 ³
P値 ⁴	<0.001	<0.001	
CES-Dスコア			
ベースライン (平均±標準偏差)	8.8±6.0	9.0±4.9	0.83 ¹
6か月後 (平均±標準誤差) ⁵	7.1±0.7	7.5±0.8	0.75 ³
1年後 (平均±標準誤差) ⁵	7.5±0.7	5.9±0.7	0.10 ³
ベースラインと6か月後の差 (平均±標準誤差) ⁵	-1.8±0.7	-1.4±0.8	0.75 ³
P値 ⁴	0.019	0.099	
ベースラインと1年後の差 (平均±標準誤差) ⁵	-1.3±0.7	-3.0±0.7	0.10 ³
P値 ⁴	0.067	<0.001	

BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CES-D, Center for Epidemiologic Studies Depression Scale

¹ ベースラインにおけるBDNF濃度またはCES-Dスコアの平均値の両群の差の検定には、Studentのt検定を用いた。

² ベースラインのBDNF濃度を調整した。

³ 6か月後および1年後調査のBDNF濃度またはCES-Dスコアの平均値の両群の差の検定には、共分散分析を用いた。

⁴ 各群におけるベースラインと6か月後または1年後調査のBDNF濃度またはCES-Dスコアの差の検定には、対応のあるt検定を用いた。

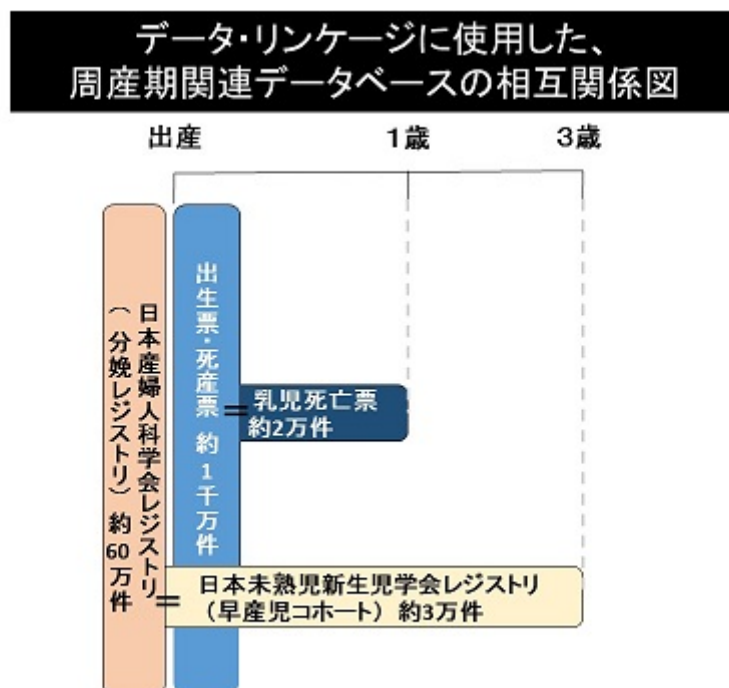
⁵ ベースラインのCES-Dスコアを調整した。

目的：本研究では、下記の4つの目標を持った。①日本産婦人科学会と日本新生児未熟児学会がそれぞれ固有に所有する周産期情報のデータベースをリンケージしたビッグデータを作成し今後の周産期疫学研究の基盤とする、②上記のデータベースの解析により日本の周産期医療の改善に直結する提言を多数算出し、妥当な根拠に基づく適切な医療に貢献する、③上記を通して、隣接する分野でありながら協力体制が希薄であった産婦人科医療関係者と小児科医療関係者の協力体制をはぐくむ、④周産期分野において、ビッグデータ解析に必要な疫学統計的知識や技術を持ちうる人材を育成する。

方法：日本産婦人科学会、日本新生児未熟児学会および日本周産期新生児学会の協力を得て、学会レジストリのデータベースを Probabilistic Linkage 法を用いて連結し、多角的に解析した。また、得られたデータベースは疫学研究セミナーを通して現場医師の疫学研究教育に用いることで、産科医と小児科医の研究分野での連携を促した。

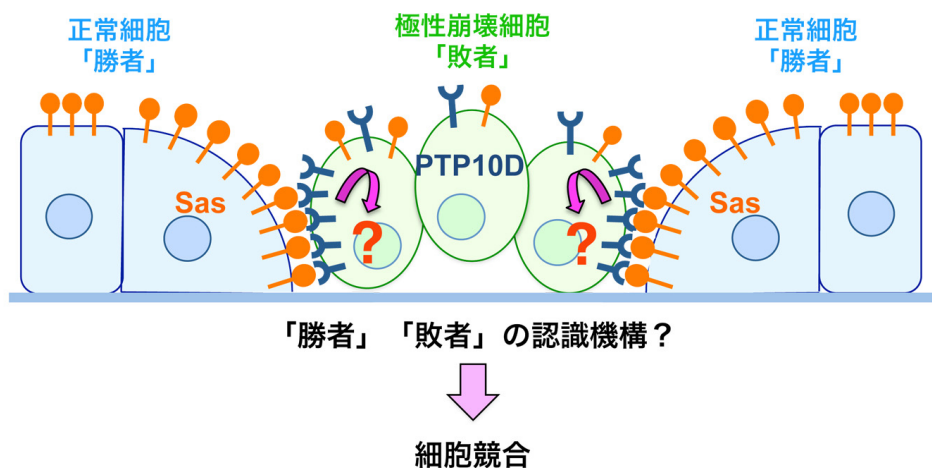
結果：入力ミスの可能性なども考慮できるように、適切な統計学的手法を用いることで、それぞれ個別に運用されている周産期データベースを高精度で連結することが可能であった。不足が叫ばれている両分野の臨床家は、時間的制約により臨床研究を主導していくことは想像よりも更に難しく、多くの医療関係者が積極的に臨床研究を行えるようにするには、統計解析を分担して専門家が行う・論文指導を行う・英文校正を行う、などのサポート体制の構築が重要であった。しかし、適切な広報、教育機会の提供を行うことで、多くの産科および小児科医に、自らが関わっているレジストリの有用性を認識していただくことができ、またその解析を通して多数の新たな知見を生むことが出来た。

周産期関連データベースの相互関係図



多細胞生物の器官形成やその恒常性維持において、「細胞競合」と呼ばれる細胞間コミュニケーション機構が重要な役割を果たすことが近年分かってきたが、その分子機構についてはいまだ不明な点が多い。我々は、上皮細胞の頂底極性が崩壊した細胞（極性崩壊細胞）が細胞競合により組織から排除される現象に着目し、それを制御する分子群を網羅的に単離・同定する大規模遺伝学的スクリーニングを実施した。その結果、極性崩壊細胞の認識に関わる、正常細胞側のリガンド様タンパク質 Sas (stranded at second) を同定することに成功した。興味深いことに、Sas は通常上皮細胞の apical 側に局在するが、極性崩壊細胞に隣接した正常細胞では lateral 膜にも局在することが分かった。そこで我々は、この Sas に結合する極性崩壊細胞側の受容体を同定する RNAi スクリーニングを実施し、進化的に保存されたがん抑制遺伝子 Ptp10D が Sas の受容体として機能することを明らかにした。この PTP10D も Sas と同様に通常は上皮細胞の apical 側に局在するが、正常細胞と隣接した極性崩壊細胞では lateral 膜にも局在することが分かった。すなわち、極性崩壊細胞が上皮組織に生じると、互いに隣接した正常細胞・極性崩壊細胞において、Sas、Ptp10D がそれぞれ lateral 膜に局在して両者が結合し、それにより細胞排除が実行されると考えられた。現在、Sas-Ptp10D システムが細胞排除を駆動する分子機構について解析を進めているところである。

Sas-PTP10D システムを介したがん原性細胞の排除

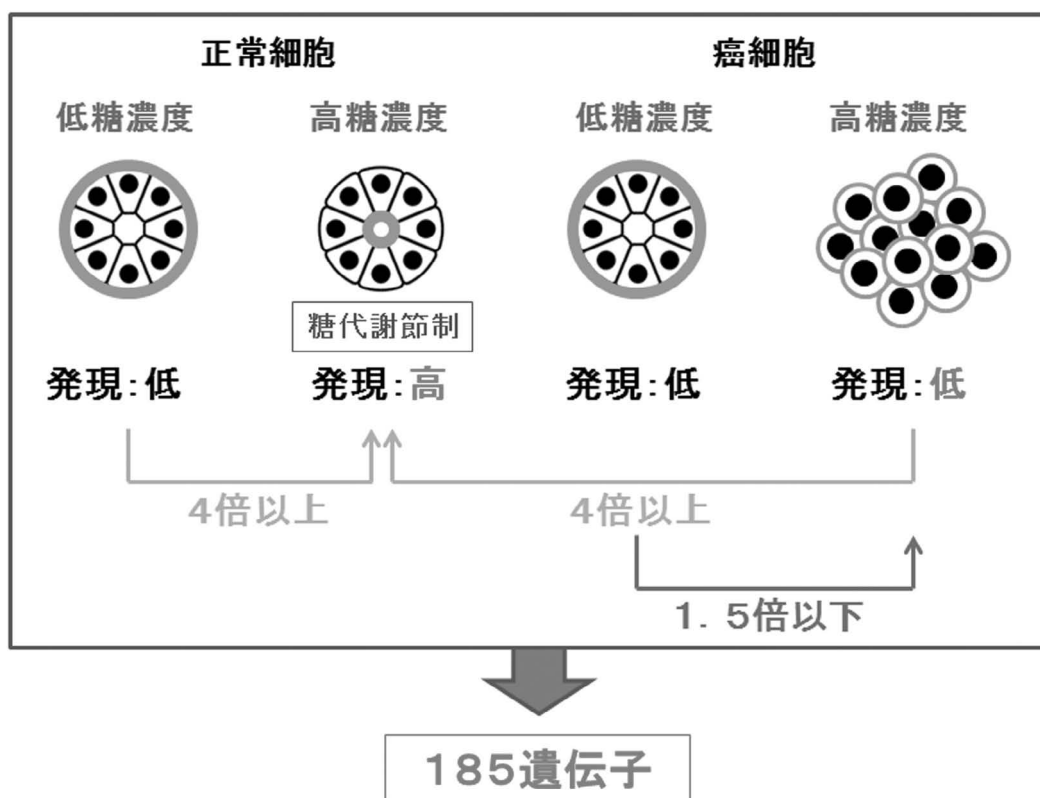


目的：正常乳腺上皮細胞において糖の取込みおよび代謝を強制的に亢進させると様々なシグナル経路が活性化し、上皮極性の喪失や増殖抑制の解除などの悪性形質が誘導される。このとき一部の細胞では正常上皮の形態が保持されるが、このような細胞群では、グルコーストランスポーター（GLUT）の局在が著しく変化しており、糖の取り込みが阻害される。本研究では、正常乳腺上皮が糖代謝の状態を感知して糖の取込みおよび代謝を自ら抑制し、がん形質の獲得を防止するメカニズムの解析を行った。

方法：様々な糖濃度で培養したヒト乳腺上皮細胞における遺伝子発現について、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、糖濃度によって発現量の変化する遺伝子群を同定した。それらの中から、GLUT 局在変化を直接的あるいは間接的に制御し得る候補を幾つか選定し、生化学的な解析を行った。

結果：正常上皮細胞において糖濃度の上昇に伴い発現亢進する一方、乳癌細胞でこのような制御が失われているものとして、185 個の遺伝子を同定した。そのうちシグナル調節に直接関与し得る細胞表面受容体と、GLUT 局在を制御し得る小胞輸送関連タンパク質について詳細な解析を行い、実際にがん抑制的に機能することを示唆する結果を得た。

正常上皮細胞において糖代謝調節に関与する遺伝子の同定

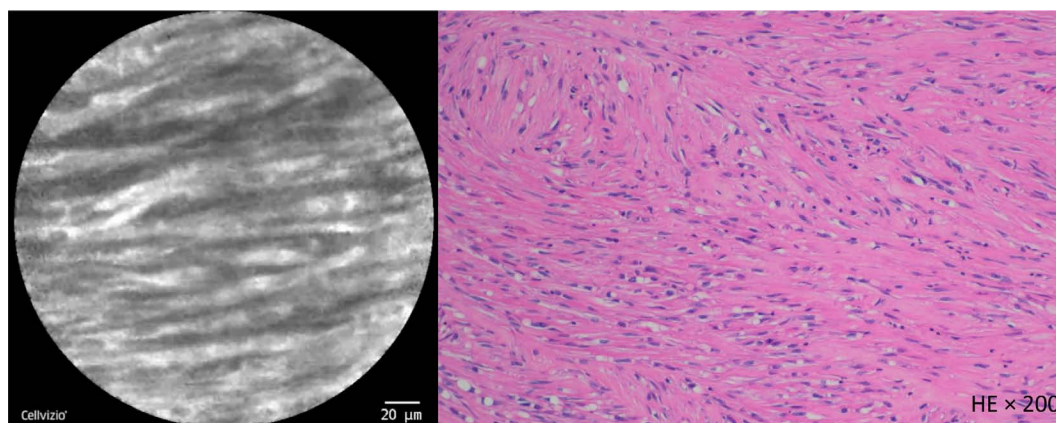


199 共焦点内視鏡による消化管粘膜下腫瘍の生体内病理観察

大谷 友彦

プローブ型共焦点レーザー顕微内視鏡 (probe-based confocal laser endomicroscopy: pCLE) は、内視鏡を介した生体内組織観察を可能とする新たな診断機器として注目されている。今回、胃粘膜下腫瘍の診断における、pCLE の有用性について検討した。まず、当施設で胃粘膜下腫瘍に対して胃局所切除を施行した6症例 (神経鞘腫3例、GIST 3例) の切除検体を用いて、*ex vivo*での pCLE 観察を行った。さらに、胃粘膜下腫瘍を有する3症例 (平滑筋腫3例) に対して、粘膜下トンネル法を併用した生体内 pCLE 観察を施行した。腫瘍別の pCLE と Hematoxylin & Eosin (HE) 染色標本における所見一致率は、GIST と神経鞘腫を合わせた群 (GS 群) では、平滑筋腫との間に有意な差を認め (88.9 % vs. 44.4 %, $p=0.036$)、HE 染色に近い所見が得られる可能性が示唆された。CLE 1 視野の平均細胞密度は GS 群では 55.2 ± 15.2 cells/ field、平滑筋腫では 17.3 ± 3.2 cells/ field であり、こちらも有意差を認めた ($p=0.024$)。平滑筋腫は細胞密度の低さが特徴であり、CLE 画像においても同様の所見が得られた。

GIST における pCLE 画像 (左) と HE 染色標本 (右) における所見



[背景] 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL) は難治性の血液がんである。AITL の腫瘍細胞は、濾胞性ヘルパー T 細胞と呼ばれるヘルパー T 細胞に性質がよく似ている。AITL が発症する仕組みは明らかではなかった。我々を含む複数グループから、AITL あるいは AITL 関連リンパ腫の遺伝子変異解析により、AITL の 82 % にエピゲノム調節因子である *TET2* 遺伝子の機能欠損型変異、70 % に small GTPase の一つである *RHOA* 遺伝子変異を認めることを報告した。

[目的] ゲノム解析の結果を元に疾患モデルマウスを作製する目的で研究を行った。

[方法] *TET2* 遺伝子異常のモデルとして *Tet2* 遺伝子のイントロン 2 にジーントラップベクターが挿入されたジーントラップマウス (*Tet2^{gt/gt}*)、*Tet2* コンディショナルノックアウトマウス (*Tet2^{ko}*)、*CD2* プロモーター下にヒト *RHOA* 変異体を発現するトランスジェニックマウス (*RHOA-Tg*) を用いた。これらのマウスの腫瘍発症の有無について観察した。

[結果] *Tet2^{gt/gt}* マウスでは、平均 67 週齢で濾胞性ヘルパー T 細胞の性質をもつ T 細胞リンパ腫を発症した。リンパ腫では、濾胞性ヘルパー T 細胞の分化誘導に関わる *Bcl6* に高発現がみられ、*Bcl6* 遺伝子座のサイレンサーに高メチル化がみられた。*Tet2^{ko}* と *RHOA-Tg* を交配したマウスについては脾腫やリンパ節腫大を認めており、詳細を解析中である。

Tet2 ジーントラップマウスにおける T 細胞リンパ腫の発症

