

要 旨

1 運動による、キヌレニン代謝とうつ症状の変化

安保 雅博

【目的】運動は、いろいろな疾患の予防や治療に効果があるとされている。運動によってもたらさせる効果をいろいろな方面から検証をした。

【方法】運動群、対照群ともに8週間の観察を行った。3名の運動群に対しては週2回担当療法士介入の元、集団での準備体操、マット体操および筋力トレーニング、有酸素運動を含む約2時間の運動プログラムを行い、加えて、週1回約30分の自主トレーニングの指導を行った。4名の対照群に対しては、観察期間中、それ以前と変わらない生活を指導した。訓練は問題なく施行された。一般情報、一般採血、KYN、BDNF、pro-BDNなどの採血抑うつの評価としてPHQ-9、認知機能評価としてHDS-R、MMSE、不安評価として新版STAI、生活の質の評価としてEQ-5D-5Lなどの以上の項目に関して、介入前後の評価を運動群、対照群ともにを行い、比較検討した。

【結果】運動群で、増加したのが、WBC、CK、BNP、BDNFであった。対照群で、増加したのが、KYN、pro-BDNFであった。運動群において、精神的評価の減少を示したのが新版STAIの状態不安(Y-I)であった。また、運動群で減少した血液生化学検査では、LDL-Cho、Glu、好感度CRP、グリコAlb、血圧(収縮期のみ)、pro-BDNFであった。

運動介入前後評価

一般情報	年齢 性別 身長	運動群		対照群	
		83.3±6.5 女性3名 153.2±4.6		70.3±6.3 女性3名、男性1名 151.7±12.5	
体組成計	体重	42.3±8.5	42.5±8.7	53.4±8.4	52.9±8.6
	筋肉量	27.3±3	27.5±3.1	36.4±8.5	36.3±8.2
	体脂肪量	12.9±7.8	12.8±8.8	14.6±2.2	14.4±2.3
	BMI	19.1±4.2	19.3±4.4	23.2±1.3	23.0±1.3
	体脂肪率	29±14.7	28.5±17.6	26.4±6.6	27.6±5.4
	血圧	147/82	127/76	134/85	138/85
精神神経評価	HDS-R	26.7±4.2	27.7±1.5	27.5±2.4	29.3±1.0
	MMSE	27.7±3.2	27.3±3.8	27.5±3.1	29.3±1.0
	PHQ-9	4.3±4.9	5.7±5.1	1±2	0
	STAIY1	34.7±4.2	30±1	37±9.9	32.3±6.0
	STAIY2	39.3±9.9	38.7±9.5	32.3±6.4	31.3±5.6
	EQ5D	0.8±0.02	0.9±0.1	0.9±0/2	0.9±0.1
末梢採血	HbA1c (%)	5.9±0.1	5.7±0.3	5.5±0.2	5.5±0.1
	WBC (/uL)	4966.7±665.9	5666.7±723.4	5225±1024.3	4825±590.9
	RBC (x10000/uL)	408±30.4	418±38.0	454±13.7	460.8±21.4
	Hb (g/dL)	12.2±0.8	12.5±1.1	13.5±0.9	13.8±0.8
	Ht (%)	38.3±2.2	39.2±4.0	42.8±2.5	43.3±2.9
	MCV (fL)	94.0±2.9	93.7±1.6	94.3±5.8	94±5.9
	MCH (pg)	29.9±2.0	30±1.0	29.8±2.1	29.9±1.6
	MCHC (%)	31.7±1.1	32±0.7	31.6±0.8	31.8±0.5
	PLT (x10000/uL)	23.6±6.6	23.4±5.7	25.9±6.0	24.8±3.8
	好感度CRP (ng/mL)	1620.3±1878.4	483.7±182.6	387±129.5	319.8±119.2
	IGF-1 (ng/mL)	54.3±16.9	54.3±16.1	81.5±3.3	86.3±5.0
	インスリン (uIU/mL)	14.6±6.7	8.9±2.1	11.7±5.2	9.2±4.7
	DHEA-S (ug/dL)	77.3±44.1	79.3±46.4	68±24.1	79±44
	HANP (pg/mL)	63.9±40.6	67.1±27.6	65.3±26.4	55±23.8
	BNP (pg/mL)	56.1±40.5	69.5±40.6	51.7±37.2	42.2±38.8
	アディポネクチン (ug/dL)	33.3±13.8	35.8±15.7	15.6±6.3	14.9±5.7
	TP (g/dL)	7.2±0.3	7.1±0.3	7.3±0.4	7.3±0.7
	HDL-Cho (mg/dL)	69.7±0.6	71.7±3.1	75.8±18.2	79.3±23.1
	LDL-Cho (mg/dL)	146.3±25.5	136.3±16.5	113.5±31.5	116±37.8
	グリコAlb (%)	16.7±0.7	16.1±0.3	14.4±1.1	14.4±1.1
	Alb (g/dL)	4.2±0.1	4.2±0.2	4.5±0.2	4.4±0.3
	Glu (mg/dL)	127±14.7	102±8.7	107±17.3	100.3±9.6
	T-Cho (mg/dL)	238±17.3	232.7±1.5	212.5±17.3	213.8±22.7
	UN (mg/dL)	16.7±4.5	17.7±2.7	15.4±4.1	16.1±2.9
	Cr (mg/dL)	0.7±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1	0.7±0.2
	CK (U/L)	59.3±12.7	72±11.5	120.2±35.4	117.5±57.1
	AST (U/L)	22.3±5.0	20.7±3.2	23.5±4.2	21.5±2.6
	ALT (U/L)	12.7±6.4	11±4.6	19±6.4	16.3±3.2
	LDH (U/L)	182±28.2	185±16.1	188.5±27.7	180.8±22.4
	ALP (U/L)	238.7±39.8	226.7±15.9	277.5±77.5	264.8±63.4
	γGTP (U/L)	21±7.8	15.7±1.2	21.5±16.3	22±16.7
	フィブリノーゲン (mg/dL)	398.3±107.9	322.7±32.5	291.3±43.7	296±16.6
	総ホモシステイン (nmol/mL)	8.8±3.0	7.7±0.4	8.7±3.0	8.6±2.7
	KYN (ng/mL)	281.0±139.6	213.7±76.1	261.3±91.3	155.5±30.1
	BDNF (pg/mL)	12539.9±6203.2	14657.6±6319.6	22001.6±5490.3	21420.2±9565.5
	pro-BDNF (pg/mL)#	537.2±0	515.7±0	173.2±133.1	204.8±155.5

検量線定値下限値以下 2名あり

2 ソフト分子活性化による生物活性チオクロマンの創製

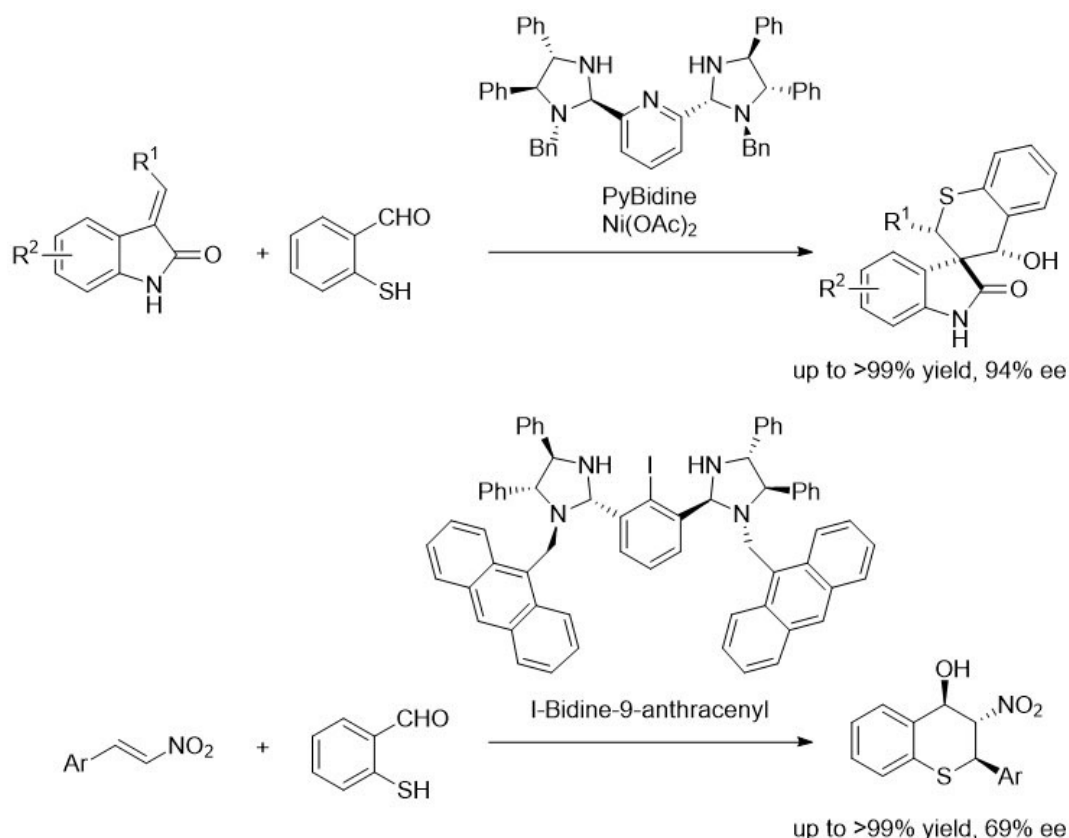
荒井 孝義

医薬の開発において、リード化合物中に存在する『ヘテロ原子を自在に異なった原子に置き換える化学』は、活性と選択性向上のために重要である。本研究では、酸素や窒素などのハード性の高い元素を硫黄やリンなどのソフトな原子に置き換える化学を『ソフト分子活性化科学』として創始し、新規光学活性チオクロマン類の立体選択的合成手法の確立を行った。

チオクロマン骨格を有するスピロオキシインドール化合物の触媒的不斉合成を目指し、チオサリチルアルデヒドとメチレンインドリノンの触媒的不斉 Michael/aldol 反応を検討した結果、研究室で独自に開発した C_2 対称ビスイミダゾリジンピリジン (PyBidine) 配位子-Ni(OAc)₂ 錯体を用いた際に高ジアステレオ、高エナンチオ選択的にチオクロマンルースピロオキシインドール化合物を得ることに成功した。本錯体触媒による反応では、金属中心とその近傍に位置するプロトンとの協調機能が発現し、高立体選択性を得ていることが示唆された。

そこで、次に金属中心をソフト性の高い非金属元素に置き換えた不斉有機触媒の開発に着手した。ビスイミダゾリジン-ヨードベンゼン (I-Bidine) 有機触媒を開発し、ソフト性の強いイオウと高い親和性の期待できる含ヨウ素有機触媒によるチオクロマンの触媒的不斉合成にも可能性を見出した。

新規光学活性チオクロマン化合物の触媒的不斉合成

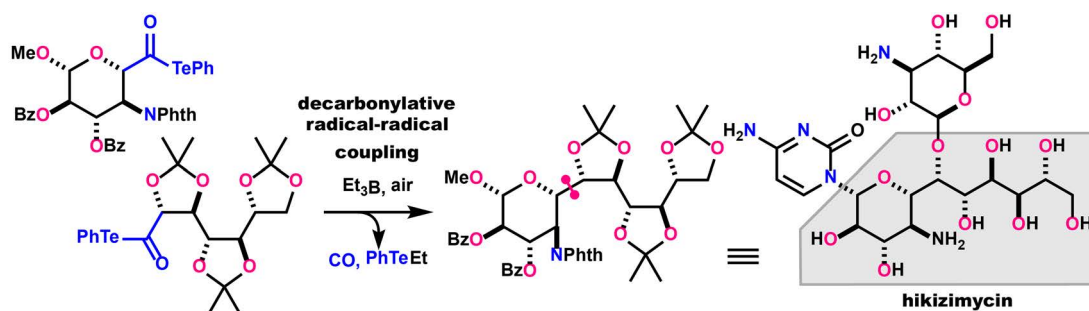


3 複雑天然物の全合成による未踏ケミカルスペース開拓

井上 将行

生物活性天然物からの医薬品としての合理的な開発は、現代科学における緊急課題である。分子量が 500 を超える巨大複雑天然物は、一般的な医薬品や天然物では実現不可能な、タンパク質の高選択的阻害・活性化を可能にする。我々は、革新的な収束的合成戦略を確立し、数多くの巨大天然物の全合成を達成してきた。本研究では、巨大複雑天然物にしばしば含まれるポリヒドロキシ化された非分岐炭素鎖を、収束的に 1 工程で形成できる新たなラジカル反応を開発した。これにより、海洋産天然物サジタミド D の C5-C10 部分構造およびマイトキシンの C51-C60 の鏡像異性体構造を、糖由来のカルボン酸より合成した α -アルコキシアシルテルリドのホモラジカル-ラジカル連結反応によって合成した。さらに、駆虫薬ヒキジマイシンの 9 連続不斉中心を有するポリオール構造の構築を、2 つのアシルテルリドのクロス-ラジカル-ラジカル連結反応により実現した。本新戦略は、新しい逆合成解析を可能とし、高酸化度天然物やその類縁体群の迅速な全合成に寄与する。

Direct assembly of multiply oxygenated carbon chains
by decarbonylative radical-radical coupling reactions

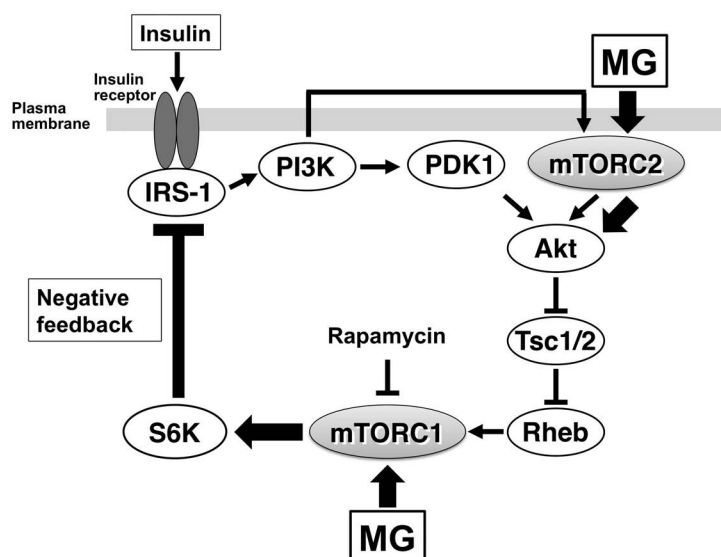


4 メチルグリオキサールによるインスリン抵抗性モデル

井上 善晴

メチルグリオキサール (MG) は解糖系から派生する 2-オキソアルデヒドである。2 型糖尿病患者では血中の MG レベルが恒常的に上昇していることが知られているが、MG レベルの上昇が糖尿病の原因や増悪に関わっているのか、あるいは糖尿病の結果として MG レベルが上昇しているのかについてはよく分かっていない。本研究では、MG によるインスリンシグナル経路への影響について、インスリン抵抗性との関連を主眼として検討を行った。その結果、MG で処理した脂肪細胞では、mTORC1 依存的に IRS-1 の Ser³⁰⁷ のリン酸化が起こった。IRS-1 の Ser 残基のリン酸化は、インスリン受容体とのアフィニティーを低下させる。そこで、MG で前処理した脂肪細胞をインスリンで処理すると、MG で前処理しなかった細胞に比べ、インスリンに応答した mTORC2 依存的な Akt Ser⁴⁷³ のリン酸化が抑制された。これらのことから、MG レベルが恒常的に上昇している糖尿病患者では、インスリンの効果が減弱していると考えられ、MG はインスリン抵抗性に関与している可能性が示唆された。

メチルグリオキサールが関与するインスリン抵抗性モデル

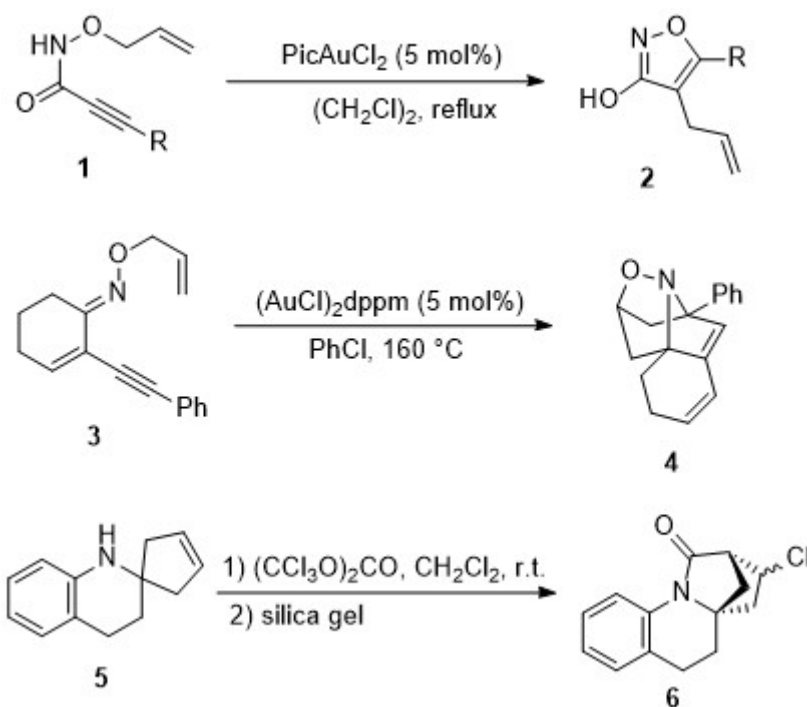


5 革新的医薬品の開発を目指した新規ヘテロ環の創製

上田 昌史

ヘテロ環骨格は、生合成や代謝過程などの生命活動の維持に重要な役割を果たしているだけでなく、現在市販されている低分子医薬品の半数以上に部分骨格として含まれている。したがって、ヘテロ環化合物を簡便かつ迅速に供給する新たな方法論の開発は、効率的に創薬研究を行うための重要な課題の一つである。そこで、効率的なヘテロ環構築法の確立を目指して、アルキンを含むヒドロキシアミン誘導体の閉環反応とアルコキシ基上の置換基の反応性を駆使した新規連続反応の開発研究を行った。その結果、アルキンを含む *O*-アリルヒドロキサマート **1** を金触媒で処理すると閉環反応と転位反応が連続的に進行し、3-ヒドロキシイソキサゾール **2** が得られることを見出した。また、アルキンを含む *O*-アリルオキシムエーテル **3** を高温条件下金触媒と反応させると、閉環-転位-付加環化-開環-付加環化が連続的に進行し、架橋構造をもつイソキサゾリジン環が構築できることを見出した。さらに、分子内にアミン部分とオレフィン部分を有するホモアリルアミン誘導体 **5** のトリホスゲンを用いたアミノカルボニル化反応を開発し、架橋型ラクタム **6** の合成に成功した。

Syntheses of heterocycles using gold catalyst or triphosgene



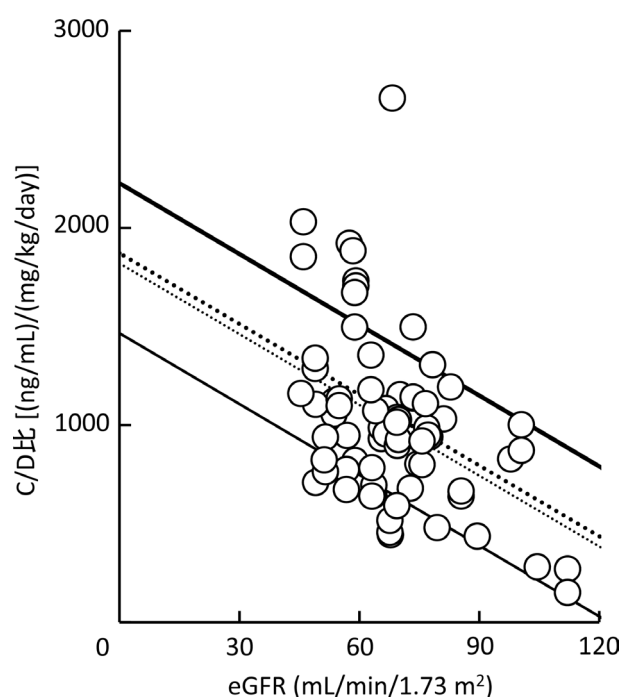
6 第 Xa 因子阻害薬の薬物動態・薬効の変動要因の解明

桂 敏也

直接トロンビン阻害薬や血液凝固第 Xa 因子阻害薬などのビタミン K 非依存性経口抗凝固薬 (DOACs) は、規定の用法・用量に基づいて投与しても、高頻度で出血症状を示すことが問題になっている。また、DOACs の薬効や出血症状を反映する指標が確立されていないことから、DOACs の体内動態や薬効の関係を把握することは抗凝固療法の適正化を実践していく上で重要である。そこで本研究では、第 Xa 因子阻害薬アピキサバンに焦点を当て、血中薬物濃度の変動要因や血中濃度と第 Xa 因子活性の関係について速度論的に解析した。アピキサバン内服患者における体重当たりの投与量に対する血中トラフ濃度の比 (C/D 比) は、糸球体濾過量の推算値 (eGFR) と正比例の関係にあること、薬物排出トランスポーター ABCG2 の遺伝子多型 (*ABCG2* 421AA) や薬物代謝酵素 CYP3A5 の遺伝子多型 (*CYP3A5*3) を保有する患者では高くなることが明らかになった。また、第 Xa 因子活性はアピキサバンの血中濃度と良好に相関し、血中濃度の上昇に伴って非線形的に低下した。以上より、アピキサバンの血中濃度や薬効に及ぼす患者の腎機能や薬物動態関連遺伝子多型の影響を考慮することで、アピキサバンの個別化抗凝固療法を実践し得ることが示唆された。

アピキサバンの C/D 比と eGFR の相関

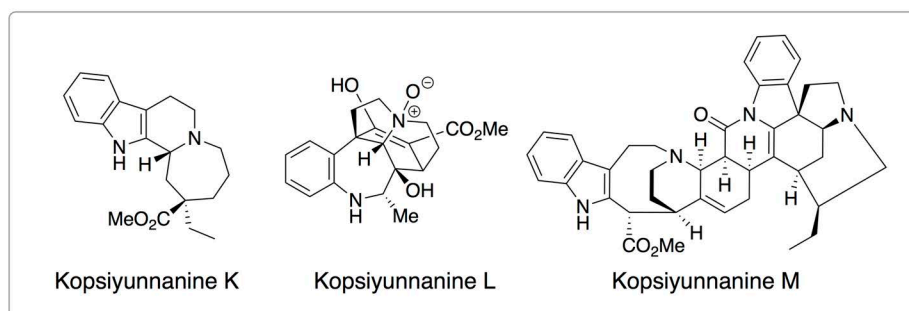
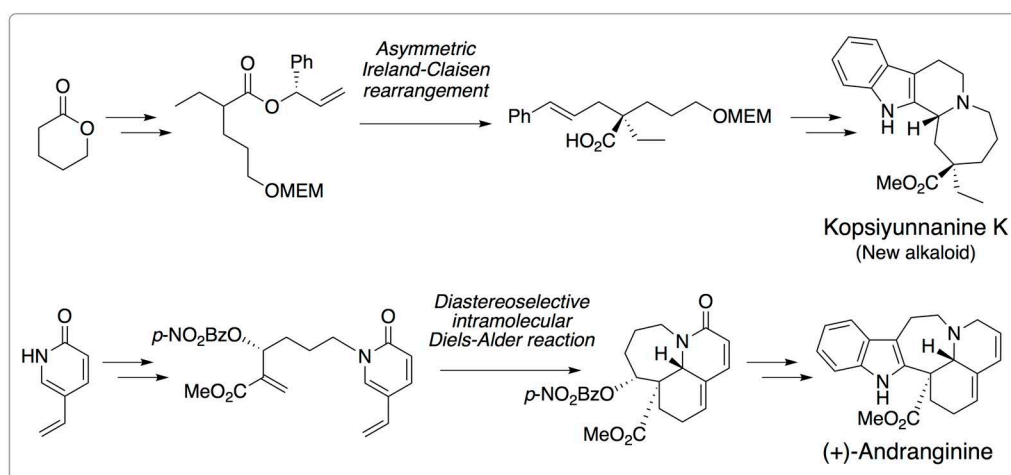
実線は *CYP3A5*3 と *ABCG2* 421C>A 遺伝子型を保有しない群、点線は *CYP3A5*3 遺伝子型を保有する群、太い点線は *ABCG2* 421C>A 遺伝子型を保有する群、太い実線は *CYP3A5*3 と *ABCG2* 421C>A 遺伝子型を保有する群を示す。



7 コプシア属植物含有生物活性アルカロイドの探索と合成

北島 満里子

天然有機化合物は、多様な化学構造と顕著な生物活性から医薬品開発における重要なシーズとなっている。本研究では、薬用資源植物からの新規医薬品開発の為にシード分子の探索研究の一環として、中国雲南省産キョウチクトウ科植物 *Kopsia arborea* のアルカロイド成分の探索と *Kopsia* アルカロイド類の不斉全合成研究を行った。その結果、特異な構造を有する新規モノテルペノイドインドールアルカロイド kopsiunnanine K、kopsiunnanine L、ビスインドールアルカロイド kopsiunnanine M を見出すとともに、kopsiunnanine K 並びに andranginine の不斉全合成を達成した。Kopsiunnanine K は、tetrahydro- β -carboline に azepane 環が縮環した構造を有し、不斉転写型の Ireland-Claisen 転位による四級不斉中心の構築と分子内ジアステレオ選択的 Pictet-Spengler 反応を鍵段階として不斉全合成した。Kopsiunnanine L は、2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-benzazepine 骨格を含む五環性のアルカロイドである。Andranginine は、hexahydroquinoline 環と tetrahydroazepine 環が縮環した構造を有し、ジアステレオ選択的な分子内 Diels-Alder 反応により連続した不斉中心を構築することで、(+)-体の不斉全合成を達成した。

New monoterpenoid indole and bisindole alkaloids isolated from Yunnan *Kopsia arborea*Asymmetric total syntheses of *Kopsia* alkaloids

8 自殺予防のヘルスコミュニケーションのエビデンス構築

須賀 万智

自殺予防には、精神的不調を感じたときの援助要請（受診）を促進する取り組みが求められ、一般市民に向けて、健康情報（メッセージ）を伝え、問題解決行動を促すアプローチ（ヘルスコミュニケーション）が必要である。しかし、メッセージの設計とアウトカム評価に関する標準的手法が示されておらず、自殺予防や援助要請促進のために、どのようなメッセージを発信すべきなのかが明らかでない。本研究では、うつ病発症者に受診意図を持たせることを目標として、より効果的なメッセージを開発することを目指した。文献レビュー結果に基づき、うつ病発症時の症状・対応に関するメッセージ（基本型、損失型、利得型）を作成し、全国 35～45 歳男女 1,000 名を対象としてアウトカム評価を試行した。主要アウトカムを 2 週間以上続く不眠に対する受診意図、副次的アウトカムを知識、主観的規範、態度として、メッセージを読む前と読んだ後で比較すると、利得型のメッセージを読んだ群で主観的規範と態度が改善し、受診意図が有意に増加した。また、メッセージの内容と表現によってメッセージを読んだときの感情的反応が異なり、アウトカムに影響すること、受け手の状況（特にメッセージとの関係性）によってメッセージに対する評価が異なることが示された。

うつ病発症時の症状・対応に関するメッセージ案

① 基本型

2週間以上続く不眠はうつサインかもしれません。
うつ病かも…と思ったら、かかりつけの医師や専門機関に相談しましょう。

② 損失型

2週間以上続く不眠はうつサインかもしれません。
うつ病かも…と思ったら、かかりつけの医師や専門機関に相談しましょう。
・うつ病では、「ゆううつだ」「何をするのもおっくうだ」などのこころのサインと、「体がだるい」「疲れているのに眠れない」「頭痛」「めまい」「吐き気」などのからだのサインが見られます。
・うつ病は、脳の神経細胞の情報伝達機能にトラブルを生じて、気分の落ち込みやさまざまな症状を起こす病気です。
・適切な治療を受けなければ、症状が長引いて、約80パーセントが以前の状態に回復しません。

③ 利得型

2週間以上続く不眠はうつサインかもしれません。
うつ病かも…と思ったら、かかりつけの医師や専門機関に相談しましょう。
・うつ病では、「ゆううつだ」「何をするのもおっくうだ」などのこころのサインと、「体がだるい」「疲れているのに眠れない」「頭痛」「めまい」「吐き気」などのからだのサインが見られます。
・うつ病は、脳の神経細胞の情報伝達機能にトラブルを生じて、気分の落ち込みやさまざまな症状を起こす病気です。
・適切な治療を受ければ、症状が治まり、約80パーセントが以前の状態に回復します。

9 遺伝子多型と心血管疾患罹患リスクの大規模追跡調査

諏訪園 靖

本調査は遺伝子多型と心血管疾患罹患の関連を明らかにすることを目的とし、コホート調査を実施することとした。対象者は、男性 1,458 人、女性 1,191 人である。遺伝子多型はアディポネクチン受容体 2 遺伝子 (*AdipoR2*) と、BRCA1 関連蛋白遺伝子 (*BRAP*) の多型とした。基礎調査として、高血圧 (140/90 mmHg 以上または内服)、高脂血症 (総コレステロール値 240 mg/dl 以上)、糖尿病 (HbA_{1c} 6.4% 超あるいは内服) と遺伝子多型の関連について、年齢、BMI、生活習慣、血液生化学検査結果をモデルに組み込み補正したオッズ比と 95% 信頼区間を logistic 回帰分析により算出した。結果として、男性では *BRAP* の TC 型で高血圧のオッズ比 (95% 信頼区間) が 0.65 (0.46, 0.92) と低く、一方女性では CC 型で高血圧のオッズ比 (95% 信頼区間) が 2.62 (1.05, 6.54) と有意に高かった。さらに、男性で *AdipoR2* 多型 (rs9805049) の CA 型で、高脂血症のオッズ比 (95% 信頼区間) が 1.58 (1.02, 2.43) と有意に増加していた。今後さらに縦断的に追跡調査を実施し、様々な遺伝子多型と心血管疾患罹患の関連を明らかにしていく予定である。

遺伝子多型の高血圧に関するオッズ比と 95% 信頼区間

Polymorphism	Men		Women	
	Odds ratio	P-value	Odds ratio	P-value
<i>AdipoR2</i> (rs9805042) (/CC)				
CT+TT	1.07 (0.70, 1.63)	0.768	1.08 (0.51, 2.32)	0.839
<i>AdipoR2</i> (rs34903315) (/GG)				
GA+AA	1.08 (0.70, 1.68)	0.714	1.17 (0.54, 2.51)	0.690
<i>AdipoR2</i> (rs9805049) (/AA)				
CA	1.05 (0.77, 1.44)	0.758	0.76 (0.44, 1.31)	0.316
CC	0.98 (0.64, 1.49)	0.913	0.77 (0.37, 1.62)	0.495
<i>BRAP</i> (rs11066001) (/TT)				
TC	0.65 (0.46, 0.92)	0.014	1.17 (0.68, 2.02)	0.563
CC	0.57 (0.29, 1.12)	0.103	2.62 (1.05, 6.54)	0.039

10 高学習能の母子間伝達シグナルの分子学的解明

立道 昌幸

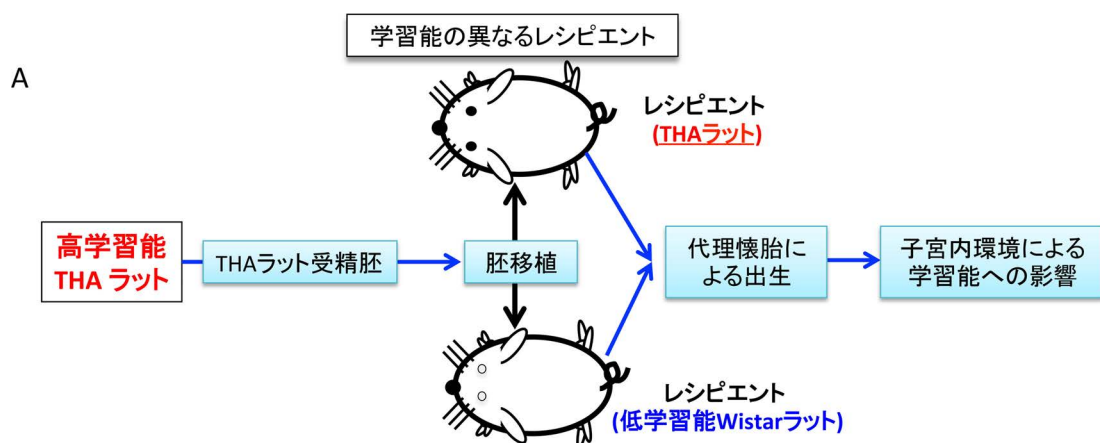
胎生期および出生後の発育環境が、高次脳機能を含めた次世代の発達に影響を与えることは良く知られている。発育環境の中で、母子間の相互作用は発達過程において最も重要な要素であると考えられているが、代理出産や代理保育行動が次世代の学習・記憶能力にどのような変化を及ぼすかを個体レベルで検討することは困難であった。Tokai High Avoider (THA) ラットは、レバー押しによる電気ショック回避行動学習試験により好成績を示す個体同士を掛け合わせて確立した、近交系の高学習能モデル動物である。本研究では、THA ラットを用いて、代理出産や代理保育行動を通じて次世代に受け継がれる母子間シグナルの存在を証明し、母子間相互作用が影響を及ぼす THA ラットの高学習能を規定する分子の解明を目的とした。

THA ラットの受精胚を用いて、THA および低学習能 Wistar ラットをレシピエントとし得られた仔の学習能力を評価したところ、低学習能 Wistar ラットを介して出生した THA ラットの学習能力が有意に低下することが分かった。一方で、里親交換による検討から、里親の学習能力の相違は出生後の学習能力に影響を与えなかった。それ故、子宮内環境が THA ラットの高学習能を規定する重要な要因であることが明らかとなった。代謝産物の網羅的解析により、分岐鎖アミノ酸が THA ラットの表現型の形成や学習・記憶の保持に関与することが示唆され、THA ラットの高学習能を支える母子間相互作用因子の一つになるものと考えられた。

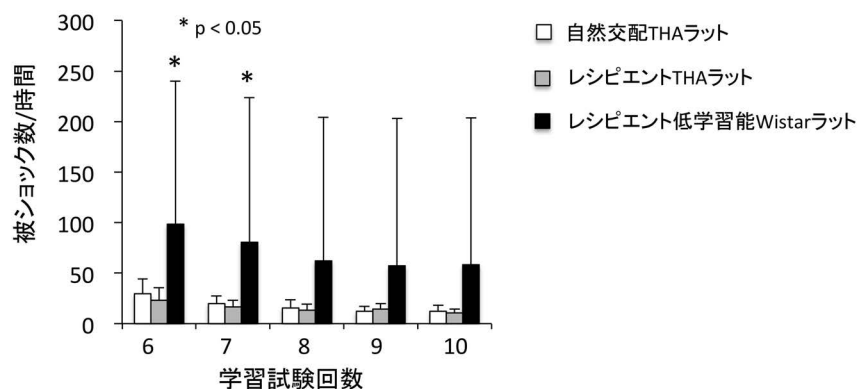
高学習能 THA ラットにおける母子間シグナルの役割

(A) 本研究の概略図

(B) レシピエントを介して出生した THA ラットの学習試験結果の比較



B



11 漢方：気の異常における診察法と治療のエビデンス構築

長井 篤

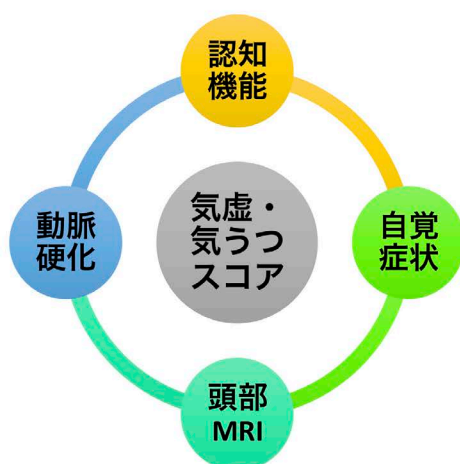
【目的】本邦で漢方薬の有効性が確認され実臨床で使用頻度も高いが、一方で適切な漢方薬の選択が困難なことも多い。その理由として漢方の診断が証という難解な診断手法に基づいており、エビデンスが得られにくい点が挙げられる。そのような中、漢方薬の治療効果についてはエビデンスの報告が見られるが、診断手法についてのエビデンスは乏しい。今回、我々は漢方の診断の中でも東洋医学に特徴的である“気”の異常についてエビデンスが得られないか検討した。また、漢方薬の効果について、自律神経検査を用いた客観的な分析を行った。

【方法】1) 気が不足した病態である気虚、気が閉塞した病態である気うつについて検討した。脳ドックの質問項目として「気虚スコア」、「気うつスコア」を導入した。脳ドック台帳にスコアを入力し、他の因子との関連性がないか統計的に解析した。2) 漢方薬の特徴として、自律神経に作用して症状を改善する効果が認識されているが、その客観性について検討した。臥位と座位で脈拍および血圧変動を計測できる Head up-tilt 装置を用いて、健康成人ボランティア 10 名に葛根湯服用前後で測定を行い、自律神経指標を解析した。

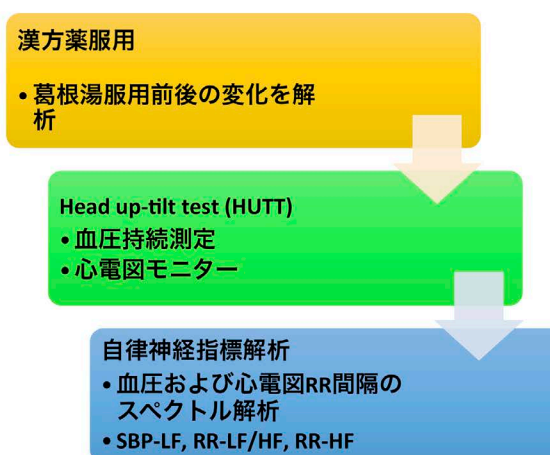
【結果】1) 脳ドック症例の分析結果であるが、気虚・気うつスコアは SDS（うつスケール）、症状数と相関がみられた。動脈硬化度と相関がみられたが、頭部 MRI 所見とはいずれも相関がみられなかった。2) Head up-tilt test (HUTT) で、葛根湯服用後では立位での交感神経指標の亢進がみられた。交感神経の亢進は、20 歳代例に比べて 50 歳代例で低下していた。副交感神経は臥位では葛根湯服用後に逆に亢進していた。立位での減弱はみられなかった。今回 2 つの研究デザインで漢方薬の客観的評価を試み、興味深い結果が得られたことより、さらなる研究の推進が必要であると考えられた。

漢方薬と客観的指標の関連性を明らかにする

1) 脳ドックデータ解析



2) 自律神経指標



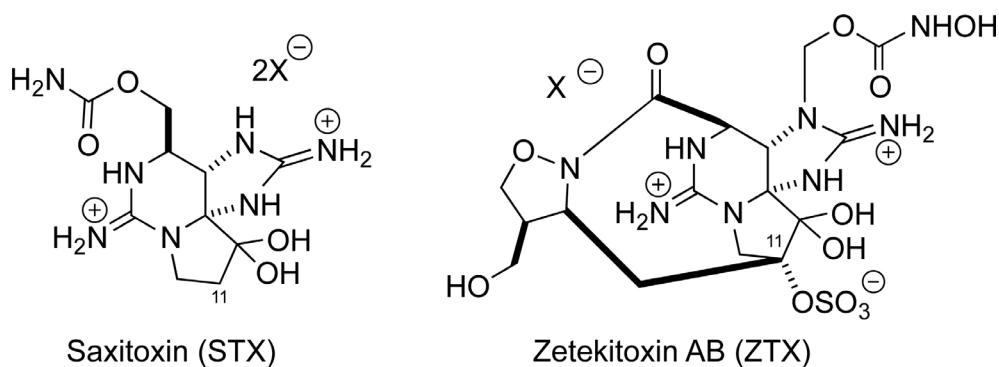
12 テトロドトキシン抵抗型 NavCh 阻害剤の創製研究

長澤 和夫

電位依存性ナトリウムチャネル (NavCh) は、心筋、骨格筋、中枢神経などの興奮性細胞に発現する膜タンパクであり、生命活動における活動電位の発生・伝播に関与している。NavCh のリガンドとして、フグ毒テトロドトキシン (TTX) が知られている。NavCh はこれまでに9つのサブタイプ (Nav1.1~Nav1.9) が見出されているが、これらは TTX に対する感受性の違いから、TTX 感受性型 (TTX-s) と TTX 抵抗型 (TTX-r) に大別される。TTX-r (Nav1.5, Nav1.8, Nav1.9) は、心筋、痛覚に関与することから、これらを選択的に阻害する化合物の創製は、抗不整脈、抗疼痛に対する薬剤開発につながる。貝毒サキシトキシン (STX) は、TTX と同様、NavCh に対する数少ないリガンドであり、TTX-s に対して阻害活性を示すが、TTX-r には阻害活性を示さない。一方、矢毒ガエルから単離されたゼテキトキシン AB (ZTX) は、STX の基本構造を有しながら、NavCh のいずれのサブタイプにも阻害活性を示す。従って STX の骨格をもとに適切な構造展開を行うことで、TTX-r への阻害剤の開発が期待できる。

本研究では、ZTX と STX の構造の違いから、STX の C11 に着目した構造展開を行った。即ち、STX の C11 位に炭素-炭素結合を形成する合成手法を開発した。ついで本手法を基盤として C11 位に種々の置換基を有する STX 誘導体を合成した。これらについて NavCh に対する阻害活性を評価した結果、TTX-s と TTX-r への感受性が逆転する化合物を見出した。

Structures of saxitoxin and zetekitoxin AB



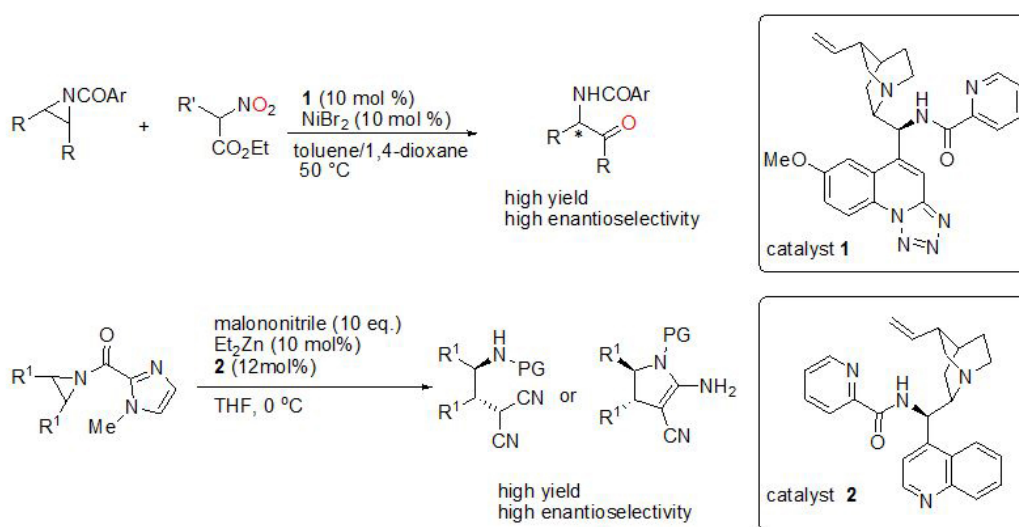
13 薬品合成を目指した高機能性活性化基と不斉触媒の開発

中村 修一

近年、光学活性な医薬品類の効率的かつ環境にやさしい合成技術の開発が強く求められている。そこで、本研究では、この社会的要請を解決する新しい不斉触媒の開発を行い、これまで達成が難しかった不斉合成反応を検討し、その困難の克服と共に、生物活性物質の部分骨格の構築を目指し研究を行った。

まず、新規の不斉触媒の創製を目指し、配位性置換基を導入した触媒分子を開発した。本触媒の機能性を確認するために、これまでに全く報告例のないアジリジンの酸化的不斉非対称化反応とマロノニトリルによる不斉開環反応を行ったところ、キナアルカロイド骨格にヘテロアレーンカルボニル基を導入した触媒が非常に高機能性を示すことが明らかとなった。特に、キナアルカロイド骨格にテトラゾール骨格を導入した触媒 **1** は、これまでに全く触媒デザインされた例はないものの、テトラゾール部位を有さない触媒と比べて、優位に高機能性を示すことが明らかとなった。また、ここで開発した触媒は、アジリジンの不斉開環反応を 1,000 倍以上活性化しながら、高立体選択的に反応が進行する。得られた生成物群は、光学活性な α -アミノカルボニル化合物、アミノ酸、トリアミン類へと変換が可能であり、合成的に有用であることも明らかにした。

開発した不斉触媒を用いた不斉合成反応



14 Palau'amine をリードとした新規免疫抑制化合物の創製研究

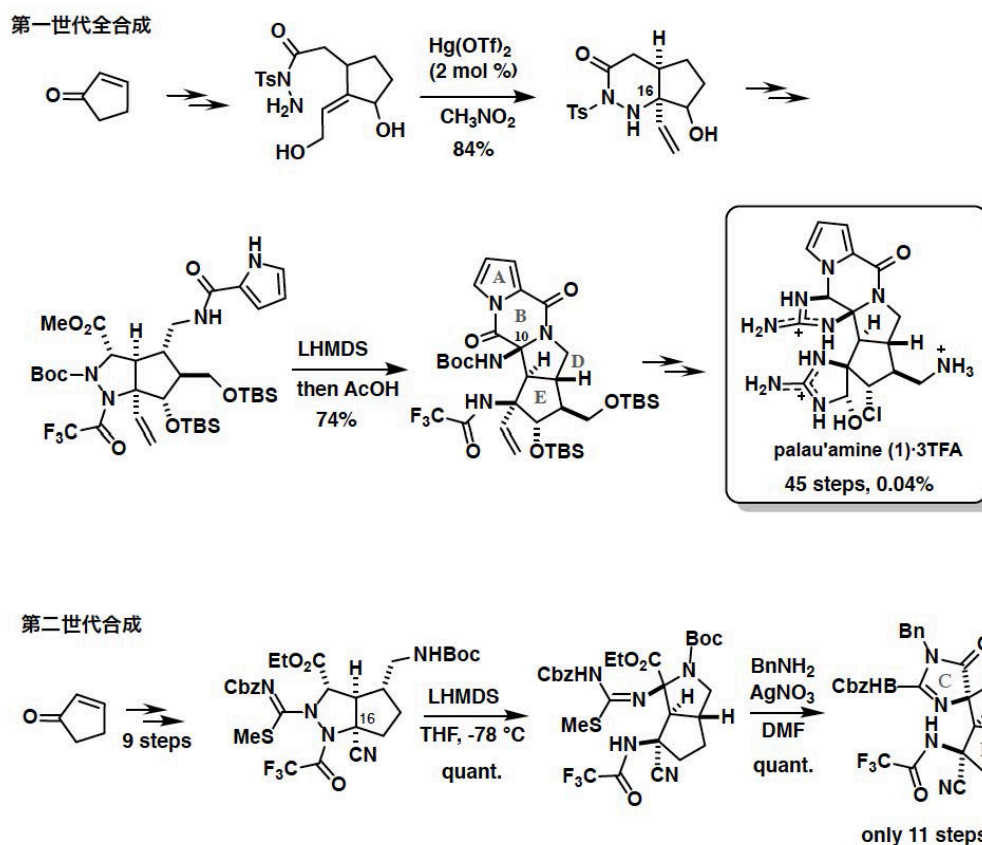
難波 康祐

Palau'amine は非常に優れた免疫抑制活性を示すものの、その極めて複雑な化学構造ゆえに、実用化はもとより機能解明に必要な最低量の供給も覚束ない現状があった。そこで本研究では palau'amine の免疫抑制機構の解明および新規リード化合物の創製を目指した全合成研究に取り組んだ。すなわち、後のプローブ化や構造活性相関研究を視野に入れ、palau'amine の基本骨格となる ABDE 環を構築した後に官能基変換による全合成を試みた。

市販のシクロペンテノンを出発原料とし、独自に開発した触媒的オレフィン環化反応を *N,N*-アシルトシルヒドラジドに適用することで、C16 位含窒素 4 置換炭素を構築すると共に、二つの窒素原子を分子内に組み込んだ。ついで、側鎖を導入した基質を強塩基で処理することで、二つの窒素原子を切り離しながら二つの環構造 (BD 環) を構築した。これにより、基本骨格となる ABDE 環の構築に成功した。ついで CF 環の構築と各種官能基変換により palau'amine の全合成 (第一世代) を達成し、その免疫抑制活性を確認した。

第一世代全合成では非常に多くの工程数を必要としており、機能解明研究を円滑に進めるためには更なる工程数の短縮化が求められた。そこで、C 環グアニジノ基を導入したモデル基質を合成し、このものが第一世代の 5, 5-トランス環構築反応に適用可能であることを明らかにした。これにより、palau'amine 合成の大幅な工程数短縮が今後期待できる。

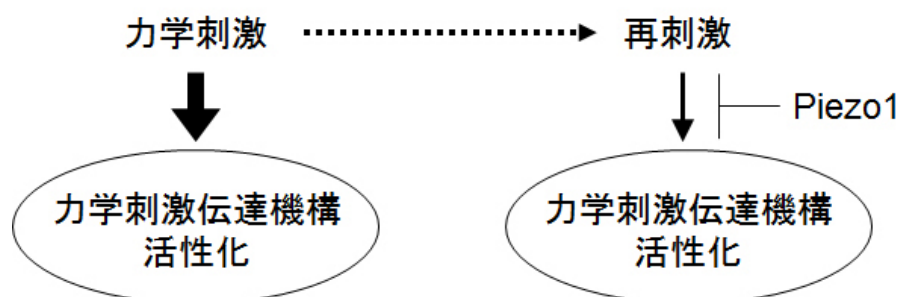
著者らによる palau'amine 第一世代全合成と第二世代合成研究



15 運動力学刺激伝達制御による骨メカノリミッターの解除

納富 拓也

運動のような力学的刺激では、同レベルの刺激で骨量・骨強度は維持されるが、持続的に増加しない。同レベルの運動負荷により、持続的に骨量・骨強度を増大させるために、力学刺激適応反応に関与する骨メカノリミッター機構を検討した。骨細胞株に伸展刺激をおこない、力学刺激反応の指標としてリン酸化 ERK (pERK) 量を比較したところ、初回の刺激で pERK は増加するが、その 10 分後の再刺激では pERK の増加は認められなかった。この現象に着目して、力学的刺激感受性イオンチャネル *Piezo1* を遺伝子ノックダウンすると、伸展刺激による pERK の増加量が著しく減少するとともに、細胞外 Ca^{2+} の関与が認められた。興味深いことに、再刺激時の力学刺激反応は、*Piezo1* 遺伝子ノックダウンにより回復した。この原因を検討するため、力学刺激後の細胞膜電位変動を蛍光観察したところ、コントロール細胞では、再刺激時に蛍光強度が低下するが、*Piezo1* 遺伝子ノックダウンでは変化が見られなかった。これらの結果から、骨細胞における力学刺激適応反応には、*Piezo1* 機能と細胞膜電位変動の関与が示唆された。

骨細胞における力学的刺激適応反応と *Piezo1*

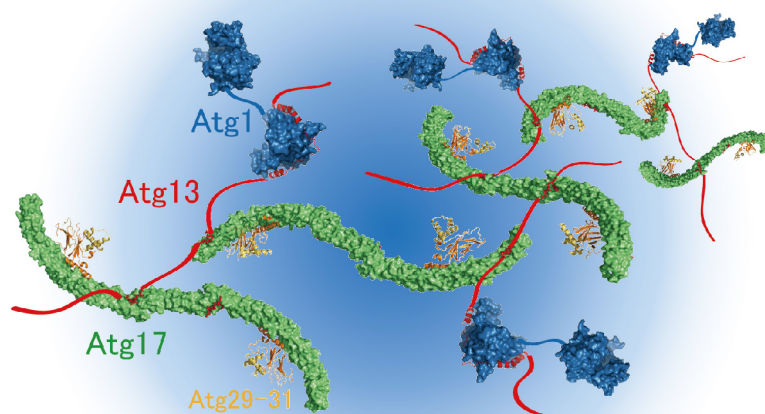
16 オートファジーの始動機構の解明と特異的制御剤の開発

野田 展生

オートファジーは基本的な細胞内分解システムであり、細胞の恒常性維持を通して様々な疾病から我々を守っている。オートファジーが誘導されると Atg 蛋白質が集まってオートファゴソーム形成の場が作られ、オートファジーが進行する。我々は Atg 蛋白質中最上流で機能する Atg1 複合体に関する構造機能解析を行い、天然変性蛋白質 Atg13 が互いに独立して機能できる二ヶ所の Atg17 結合領域を有することを見出した。*In vitro*での解析の結果、Atg13 は2つの結合領域で同一の Atg17 に結合するのではなく、異なる Atg17 に結合すること、その結果 Atg13 はひも状構造を用いて Atg1 複合体同士を架橋し、巨大 Atg1 複合体の形成を引き起こすことが明らかとなった。出芽酵母を用いた解析の結果、Atg13 による架橋活性は実際のオートファゴソーム形成場の構築に必須であり、さらに Atg1 のキナーゼ活性の上昇や Atg9 小胞のリクルートなど、オートファジーの初期の重要なイベントに必須な役割を担うことが明らかとなった。

Atg13 により高次会合した Atg1 複合体の模式図

オートファゴソーム形成の場

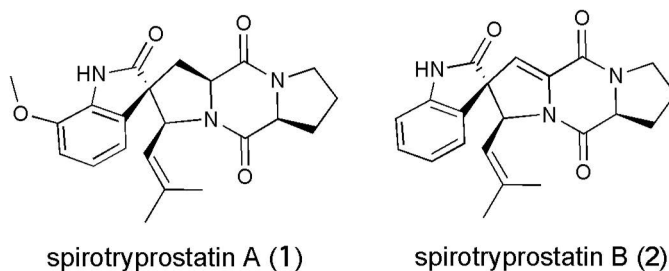


17 酸化的合成反応を触媒する酵素の機能解析

渡辺 賢二

切れ味鋭い生物活性や複雑な化学構造などに魅了された先人の天然物化学者により、自然界から数多くの天然物が見出されてきた。現代においても新たな生物活性天然物を取得することは学術的にも産業的にも重要であるが、近年ではその獲得が益々難しくなっている。地球上に存在する甚大な数の生物種について研究されてきたことから、現在では容易に獲得出来る天然物は既に取り尽された状況にある。ところで、近年の飛躍的な遺伝子解析技術の発展により、数多くの微生物種の全ゲノム情報が明らかにされた。その解析から、一生物種のゲノム中には予想よりも遥かに多い数の天然物生合成遺伝子が存在することが明らかにされた。特に放線菌や糸状菌など、これまでに数多くの天然物が発見されてきた微生物種においてこの傾向は顕著であり、すなわちこれまでの実験室レベルにおける培養法では多くの天然物生合成遺伝子がうまく働いていないことが示唆された。つまり、人類は微生物の本来もつ高い天然物生産能力を見逃していたのかも知れない。一方で、このような生合成遺伝子を人為的に制御し発現させることができれば、これまでになかった骨格を有した天然物の獲得が期待できる。我々は、天然物生合成遺伝子の情報をもとに新たな天然物を生合成させる、高い汎用性を有するプラットフォームの構築を目指し、研究を展開してきた。本研究では、そのモデルとして糸状菌の生産する極微量成分 spirotryprostatin 類の生合成について解析を行ったので、以下にその詳細を報告する。

Spirotryprostatin 類の化学構造

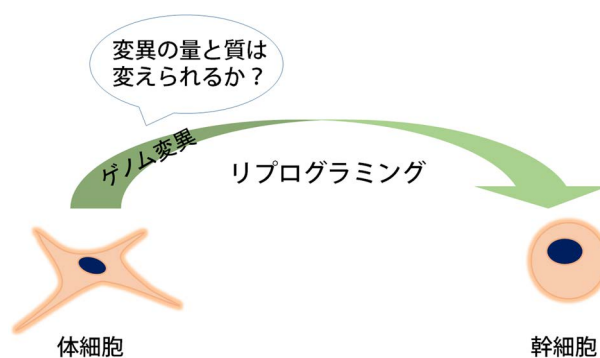


18 iPS 化に伴い生じる点突然変異の低減化

安倍 真澄

様々な疾患において、自己の iPS 細胞を用いた再生医療への期待は高い。しかしながら、その樹立および（もしくは）培養過程でゲノムに多くの変異が生じることから、癌関連遺伝子等への変異の可能性が指摘されてきた。このような突然変異の発生は再生医療への利用の障害となることから、その低減化が喫緊の課題となっている。今回、我々は、そもそも変異の頻度や質が、種々の因子によって変化するのか？即ちその制御が可能か否かを検証した。そして、制御の可能性が示された後、どのような因子をどのような方向でコントロールすべきかを考える基礎的情報を得る為に、変異生成機構の解明に取り組んだ。そして、最後に、実際に変異制御の試みとして、トランスバージョン変異を強く誘導することが知られている酸化ストレスに注目して、低減化実験を行った。

リプログラミングにおける点突然変異の制御

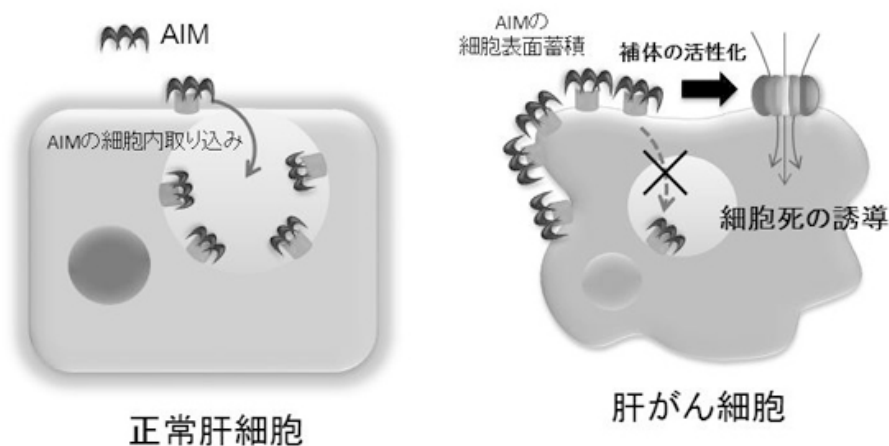


19 マクロファージ由来蛋白質 AIM による肝がん治療法の開発

新井 郷子

AIM (apoptosis inhibitor of macrophage) は、肝臓のクッパー細胞等の組織マクロファージが特異的に産生する分泌型タンパク質であるが、最近、AIM は肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma: HCC) の細胞表面に蓄積し、それが補体系の活性化を促すことでがん細胞に特異的に細胞死を誘導し、がん細胞の速やかな除去に貢献していることが明らかになった。本課題では、この AIM のもつ「がん細胞除去機構」を用いて新しいがん治療法を確立することを目標とし、AIM をより効率的に HCC へ集積させる方法について検討を行った。その結果、本研究において新たに、HCC には IgG が抗原認識を介さずに集積していることを発見し、この現象を利用した AIM の効率的な HCC への集積系構築を考案するに至った。今後はこの系を利用し、AIM による HCC 治療や予防法について模索していく予定である。

AIM によるがん細胞特異的な細胞死誘導



20 レジオネラの宿主細胞内における多彩な生存戦略の解明

新崎 恒平

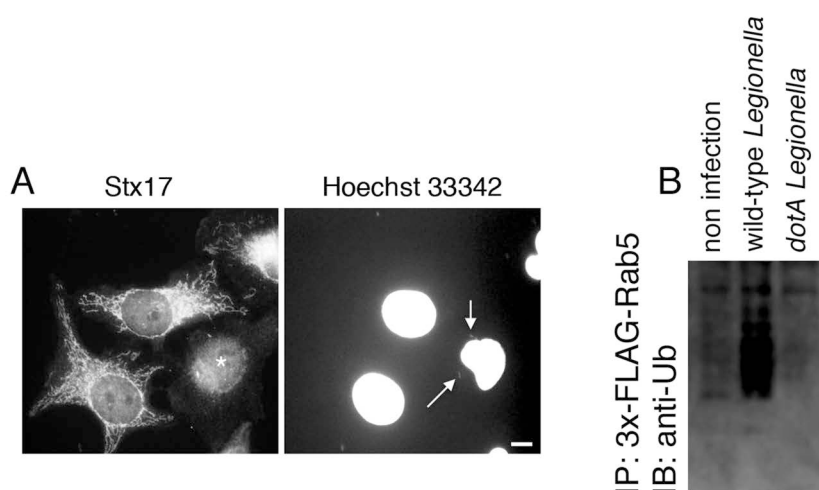
重篤な肺炎を引き起こすレジオネラは、レジオネラから放出する「レジオネラエフェクター」と呼ばれるタンパク質群を宿主細胞に放出することで、オートファジーやアポトーシスの抑制及びファゴソームのリソソームへの輸送を遮断している。しかしながら、これらの抑制に寄与するレジオネラエフェクターの解析には不十分な点が多く残されている。

本研究において我々は、①オートファジーやミトコンドリアの切断に関わる syntaxin 17 (Stx17)、及び②ファゴソームをリソソームへと運搬する Rab5 にレジオネラ感染が与える影響を解析した。

レジオネラ感染が Stx17 に与える影響においては、レジオネラ感染により Stx17 が分解されることを見だし、当該分解機構に関わるレジオネラエフェクターの同定に成功した。更に、レジオネラによる Stx17 分解はオートファジーのみならずアポトーシスの抑制にも重要であることを明らかにした。

一方、Rab5 への影響に関しては、Rab5 がレジオネラ感染依存的にユビキチン化され分解されることを見だし、Rab5 に対して E3 ライゲースとして振る舞うレジオネラエフェクターをコードしている遺伝子群の同定まで完了した。

レジオネラ感染による Stx17 の分解 (A) と Rab5 のユビキチン化 (B)

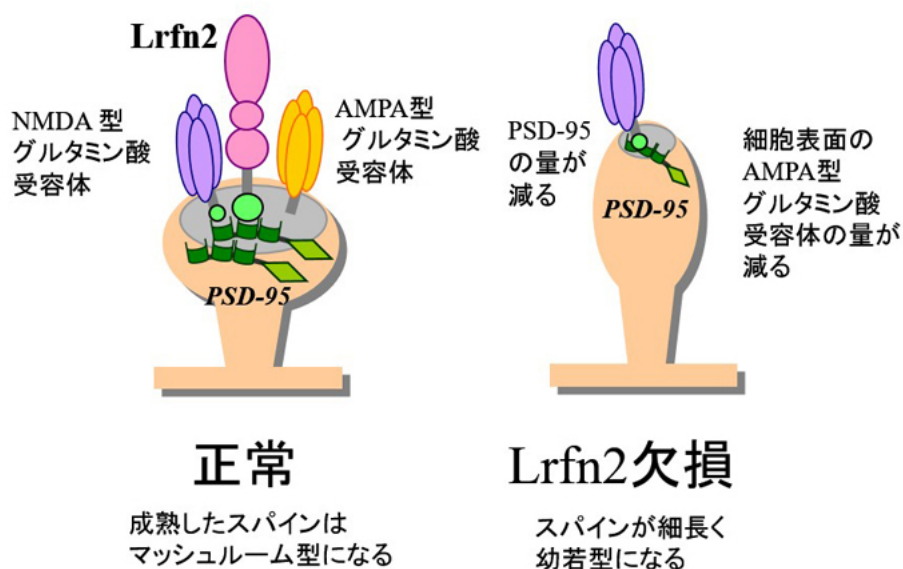


21 LRR 膜タンパク質による内分泌・血管制御機構の解明

有賀 純

Leucine-rich repeat (LRR) ドメインを持つ膜タンパク質群がシナプス機能の成立・調節に重要な持つことが示されている。我々は LRR シナプス膜タンパク質の生理的役割を明らかにするために、ヒトで学習障害への関与が報告された *Lrfn2* を欠損するマウスを作製して、その表現型を検討した、その結果、*Lrfn2* がシナプスの成熟に重要な役割を果たし、その欠損マウスが、発達障害に類似する病態を示すことを明らかにした。また、自閉スペクトラム症の患者から *Lrfn2* の機能低下型の変異を見いだした。これらの結果は LRR シナプス膜タンパク質遺伝子の変異は特に自閉スペクトラム症、多動症、学習障害などの発達障害の遺伝リスクとなり得るという仮説を支持する。一方、LRR シナプス膜タンパク質が自律神経・内分泌系においても役割を持つのかについては明らかにされていない。最近の研究から、LRR シナプス膜タンパク質欠損動物群の一部に内蔵機能異常、代謝異常を示唆する症状が現れることが明らかになった。これを踏まえ、LRR シナプス膜タンパク質の内分泌代謝系・血液循環系における役割に関する解析が進行中である。

Lrfn2 欠損マウスのシナプス異常



22 細胞内メチル化恒常性の維持機構とその異常

五十嵐 和彦

エピゲノム制御の根幹を成す DNA やヒストンのメチル化は、メチオニン回路で合成される S-アデノシルメチオニン (SAM) をメチル基供与体とする。これまでの生化学研究から、SAM 量が DNA やヒストンのメチル化量を大きく左右することが明らかになっている。細胞には SAM 量を厳密に調節するシステムが存在すると予想される。そこで本研究では、SAM 量が厳密に制御される仕組みを、SAM 合成酵素 mRNA の発現制御に焦点をあて解明する。また、SAM 合成酵素細胞内局在のエピジェネティクス制御における意義も追求する。

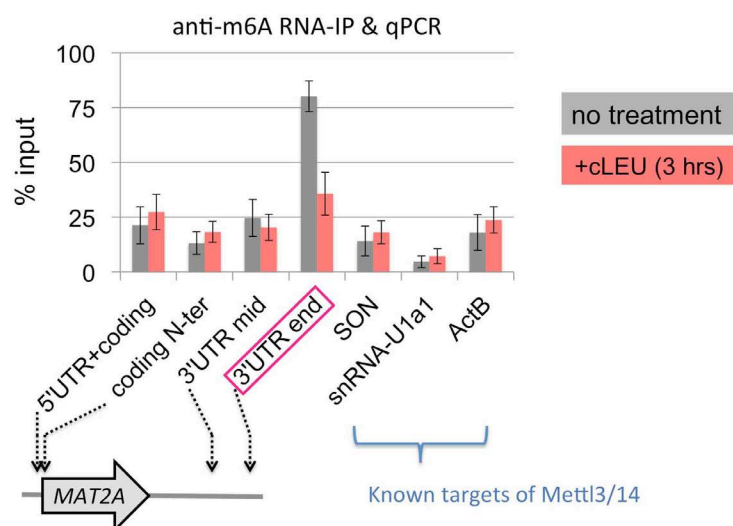
SAM 合成酵素阻害剤を細胞培地に添加し、SAM 合成酵素の発現変動を調べる。その変動の原因が遺伝子転写にあるのか、転写後にあるのかをアクチノマイシン D を用いることで調べる。メチル化アデニン (m^6A) 抗体を用いる RNA 免疫沈降法により、同 mRNA のメチル化とそのおよその領域を決定する。SAM 合成酵素抗体を用いて、細胞内 SAM 量と細胞内局在の関連を調べる。

細胞内 SAM 量の低下とともに SAM 合成酵素 MAT2a の mRNA の半減期が延長すること、この際、同 mRNA の 3'非翻訳領域の m^6A 修飾が低下することを証明した。さらに、この m^6A 修飾には、既知 RNA メチル化酵素は関わらず、新規 RNA メチル化酵素によることを見いだした。細胞内 SAM 量の低下時には MAT2a が核に蓄積することを見いだした。哺乳類細胞では、SAM 合成酵素 mRNA 安定性制御により、SAM 量が調節されること、SAM 量低下時には MAT2a の核蓄積を上昇させることで DNA やヒストンのメチル化を維持することが考えられた。

SAM 合成酵素 3'非翻訳領域のアデニンメチル化 (m^6A) は SAM 合成量低下とともに減少する

m^6A in the *MAT2A* 3' UTR end is responding to SAM.

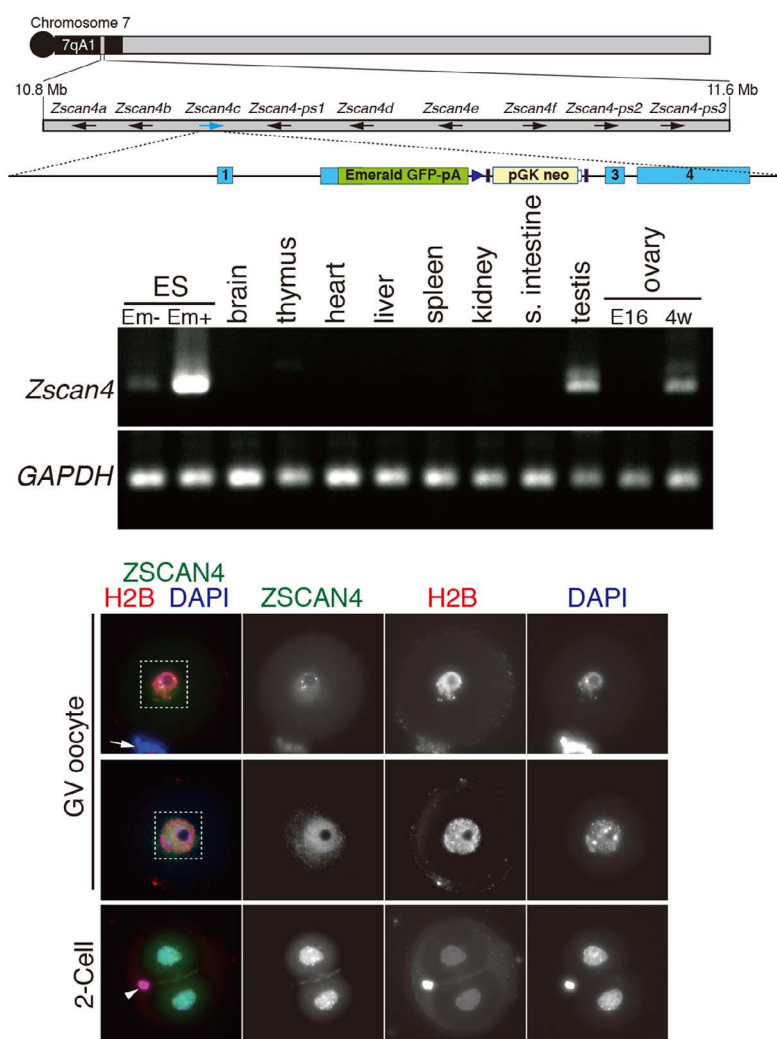
(the X63/0 mouse plasma cell line)



23 胚性幹細胞・着床前初期胚・生殖細胞の染色体研究

石黒 啓一郎

本研究はマウス着床前胚 2 細胞期と ES 細胞で特異的に発現する *Zscan4* の分子機能の解明を目的とする。*Zscan4* 遺伝子は複数のパラログ遺伝子から構成されるため、内在性 *Zscan4* 遺伝子クラスター領域内の *Zscan4c* 遺伝子座に GFP をノックインした ES 細胞およびマウスを作製して解析を行った。その結果、ES 細胞内の内在性 *Zscan4c* の発現パターンは全 *Zscan4* 陽性 ES 細胞のうち約 1/3 であることが判明し、特定の *Zscan4* 遺伝子座のみが stochastic に活性化されていることが示唆された。さらに内在性 *Zscan4* を検出する抗体を用いた免疫染色による *in vivo* における発現の検討の結果、着床前初期胚の 2-cell stage のみならず、GV oocyte およびパキテン期の精母細胞で *Zscan4* の発現が見られることが判明した。興味深いことに、GV oocyte のうち NSN と呼ばれる集団では *Zscan4* は核内に均一に観察されるのに対して、RNA pol II による転写が不活性化されている SN と呼ばれる集団では dot 状の核内配置を示すことが明らかとなった。これらの結果は *Zscan4* が着床前初期胚のみならず生殖細胞においても何らかの機能を持つことを示唆している。

内在性 *Zscan4* の発現パターン

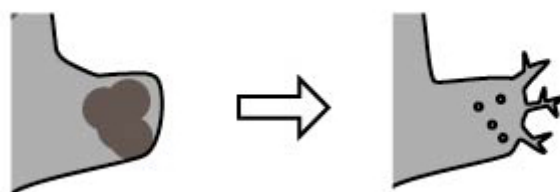
24 超解像位相差顕微鏡の開発

居波 渉

本研究の目的は、光の回折限界を超えた空間分解能を有する微分位相コントラスト超解像顕微鏡の開発である。位相差顕微鏡は、無染色細胞などの位相物体の形態や表面形状、屈折率などの情報を可視化できる。しかし、その空間分解能は、光の回折限界により制限されている。STED 超解像顕微鏡などの超解像顕微鏡は、試料を蛍光色素で染色する必要がある。幹細胞の応用や創薬などの分野では、蛍光染色等の細胞への操作をなるべく減らして、細胞のありのままを超解像観察したいという要望がある。本研究では、これまで開発してきた電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡に、微分位相コントラスト法を導入した。電子ビームを用いた超解像光学顕微鏡は、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を組み合わせた構造を持ち、大気中及び液中の試料の高空間分解能観察が可能である。これにより、コントラスト増強する染色などの操作をすることなく細胞を無染色で超解像観察できる。本実験では、検出面が4分割されている光検出器を用いて差分検出を行うことにより、観察像のコントラストが向上することを示した。さらに、微分位相コントラスト超解像顕微鏡の結像特性の解析とその改善を行った。

微分位相超解像顕微鏡の利点

位相差顕微鏡 超解像位相差顕微鏡



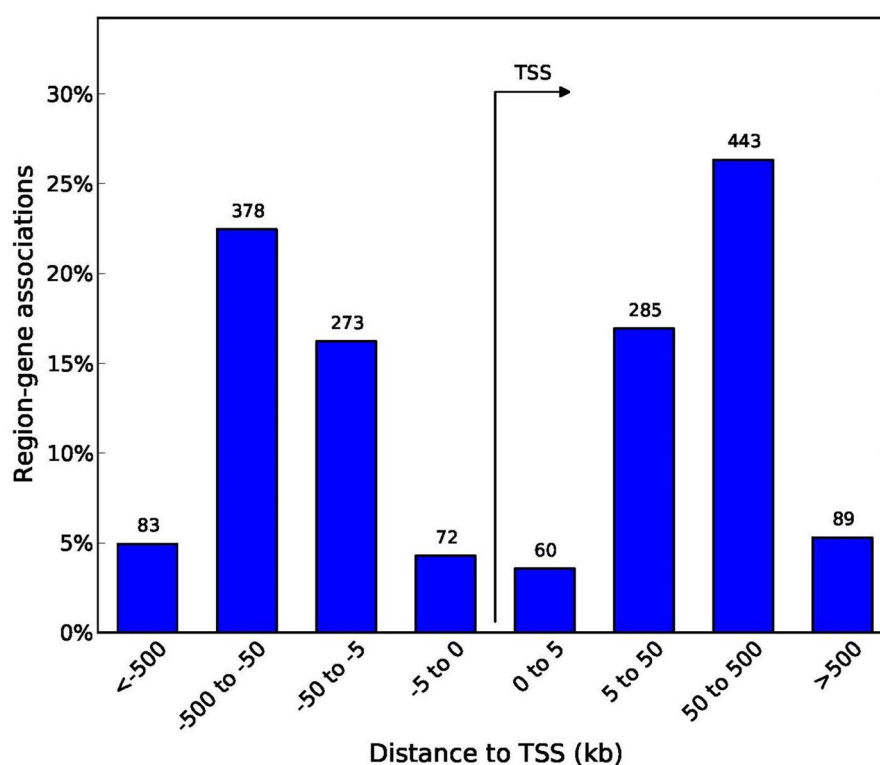
より細かい構造を明瞭に観察する

25 ヘッジホッグと Wnt による骨格形成転写ネットワーク

大庭 伸介

本研究は、骨形成性細胞への細胞運命の決定において、Hh シグナルと Wnt シグナルの下流で働く「転写制御因子 Gli と β -catenin の位置」をゲノムワイドで明らかにし、骨格形成のマスター転写因子群 (Sox9、AP-1、Sp7) に関するデータや遺伝子発現情報と併せて統合的に解析することで、この二つのシグナルの段階的・協調的転写ネットワークを明らかにすることを目指した。まず、マウス初代細胞において、骨格形成のマスター転写因子群の結合領域に関するゲノムワイドデータを取得し、それらの作動様式を明らかにした。次に、Gli (Gli2 及び Gli3) あるいは β -catenin (Ctnnb1) の高効率な ChIP のために、各遺伝子座に Biotin-3xFLAG (BioFL) タグがノックインされたマウス ES 細胞を作出した。我々が開発した骨芽細胞分化系で培養した *Gli2*-BioFL ES 細胞における ChIP-seq により、骨芽細胞前駆細胞への運命決定期における Gli2 の結合領域をゲノムワイドで明らかにした。現在、Gli3 および β -catenin の ChIP-seq データの取得と RNA-seq データとの統合的解析を行っている。

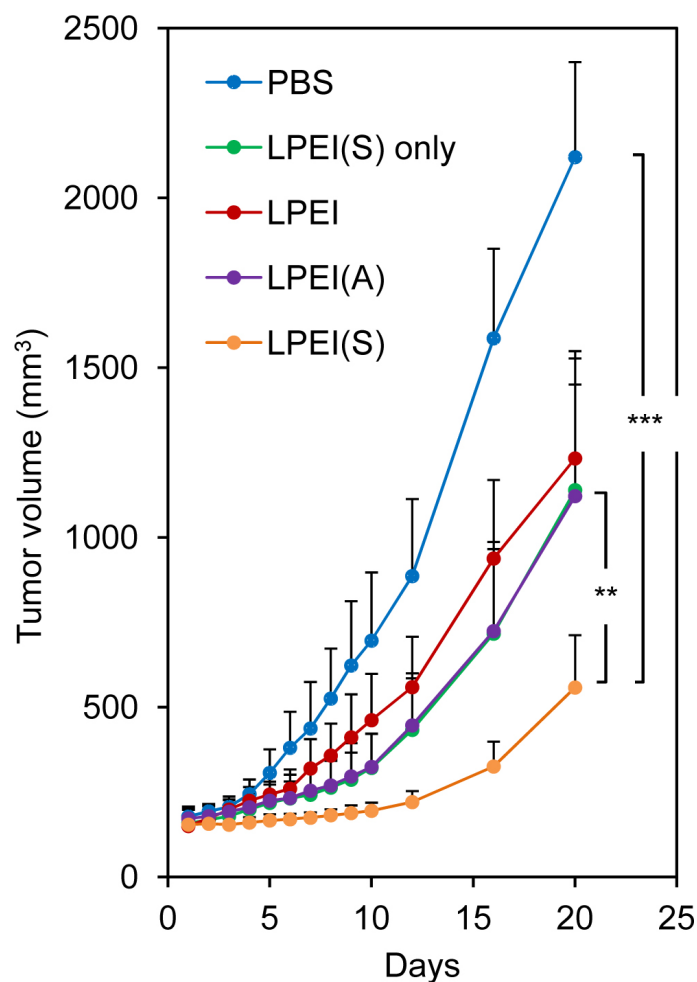
骨芽細胞分化過程にある細胞のゲノムにおける Gli2 結合領域の分布
(横軸は転写開始点からの距離を、縦軸は各領域の割合を示す)



26 細胞対話型キャリアを用いる悪性がん治療法の開発

片山 佳樹

本研究は、悪性がんで亢進しているプロテインキナーゼC α (PKC α) により遺伝子を開放するキャリアを用いて、悪性のがんでの治療法を確立することを目的としていた。そこで、まず、高いPKC α 応答性を有するこれまでに開発したキャリアを用いて悪性度の高いがんに応用してその治療効果を評価した。自殺遺伝子を用いて、本システムをマウスを用いて悪性がんに応用したところ顕著な治療効果とがん特異的な遺伝子の開放が認められた。また、本システムが血中安定性に問題があり、がんの局注では効果が出るが、静脈投与では効果が出ないことが分かったので、次にキャリアに血清アルブミンに結合できるユニットを導入して、遺伝子との複合体ナノ粒子の血中での安定化を増強できる分子を開発した。その結果、血液条件下での複合体の凝集を顕著に抑制することに成功した。また、*in vivo*への適用に際して、がん部へのナノ粒子の到達を増強できるシステムが必要となり、がん部でのみ血流を増大させるために、一酸化窒素放出型ナノ粒子を開発し、実際にがん部への蓄積量を2倍に増大させることにも成功した。これらの結果、以上の知見をすべて組み込んだ理想的キャリアの設計が可能となった。

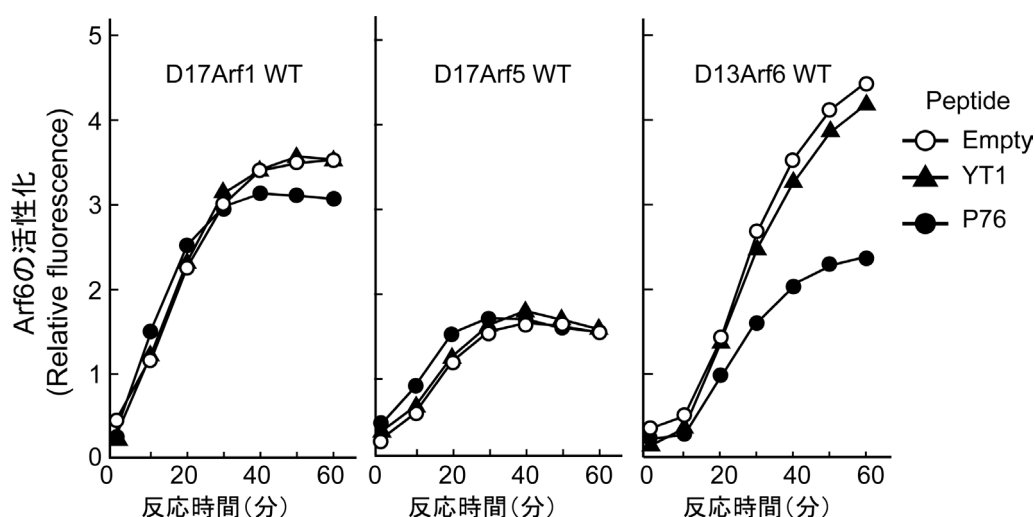
PKC α 応答型キャリアと *Caspase-8* 遺伝子を用いた悪性がん治療効果

27 Arf6 シグナル伝達を標的とした革新的抗癌剤の開発

金保 安則

本研究は、腫瘍血管新生と癌転移を同時に抑制できる革新的抗癌剤の開発を目指して、これらの両現象を制御する低分子量 G 蛋白質 Arf6 を介するシグナル伝達機構を明らかにし、その共通分子機構をターゲットとして抗癌剤開発のための創薬リードペプチドを創出することを目的として行い、その結果、以下の結果を得た。Arf6 に特異的な GTPase-activating protein (Arf6 GAP) である ARAP3 は、上皮増殖因子受容体 (EGFR) がエンドサイトーシスにより蓄積するエンドソームにおいて Arf6 を不活性型へ変換することによりリン脂質キナーゼ PIP5K1A の活性化を解消して PI(4,5)P₂ 量を低下させ、その結果、EGFR の細胞膜へのリサイクリングを促進して浸潤仮足を形成することを明らかにした。この結果と、我々が以前に得た Arf6 の腫瘍血管新生における重要性から、 α -ヘリックス立体構造を固定化した約 35 アミノ酸残基からなるデノボペプチドのファージ表面提示ライブラリーを用いて、Arf6 に特異的に結合してその活性化を阻害するペプチドのスクリーニングを行った。その結果、Arf6 に特異的に結合する 29 種類のペプチドを同定した。これらのペプチドのうち、1 つのペプチドが Arf6 の活性化を特異的に阻害することを見出し、抗癌剤開発へと繋がる創薬リードペプチドの創出に成功した。

ペプチド P76 は ARF6 の活性化を特異的に抑制する

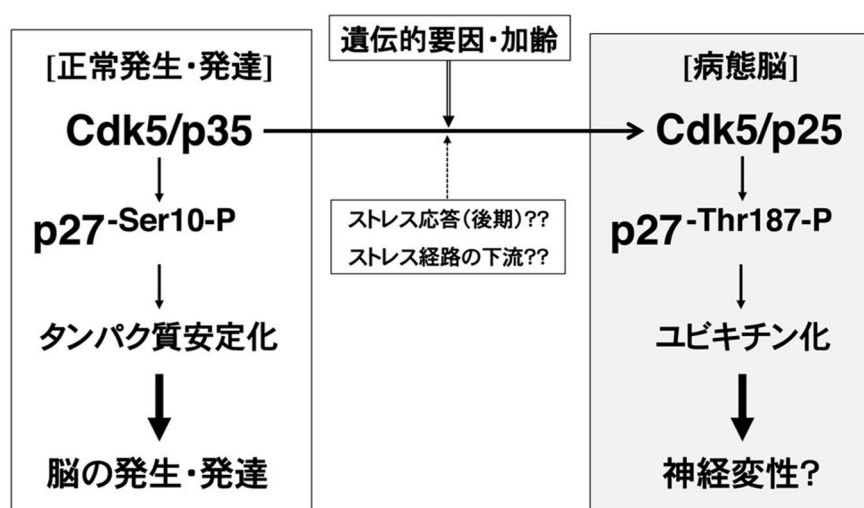


28 細胞周期関連分子による神経成熟と環境応答の制御機構

川内 健史

多細胞生物の形態形成および機能維持には、細胞が適切に分裂することが必須である。これまでに我々は、増殖停止後の細胞において一部の細胞周期関連分子が機能をもつことを明らかにしてきた。細胞周期の長さの調節や細胞周期からの離脱に必要な $p27^{kip1}$ は、特殊なサイクリン依存性キナーゼ Cdk5 の制御の下、細胞骨格の再編成など細胞周期とは異なる機能をもち、この活性が脳の形態形成に必要であることを報告した。このような発生期における役割に加えて、細胞周期関連分子が老化関連疾患にも関与する可能性が示唆されているが、その詳細は不明である。本研究は、神経変性疾患およびストレスの初期応答における細胞周期関連分子の活性変化機構を明らかにすることを目的とした。神経変性疾患において、Cdk5 の異常な活性化が起きており、その基質である $p27^{kip1}$ に対しても、発生期とは異なる制御を行っていることが分かった。これに対して、Cdk5 はストレス応答にも関与することが報告されていたが、少なくとも拘束ストレスの初期応答については複数の脳領域で Cdk5 の活性に変化はなく、より短期的な応答に必要な上流因子の存在が示唆された。

正常脳および病態脳における細胞周期関連分子の活性変化

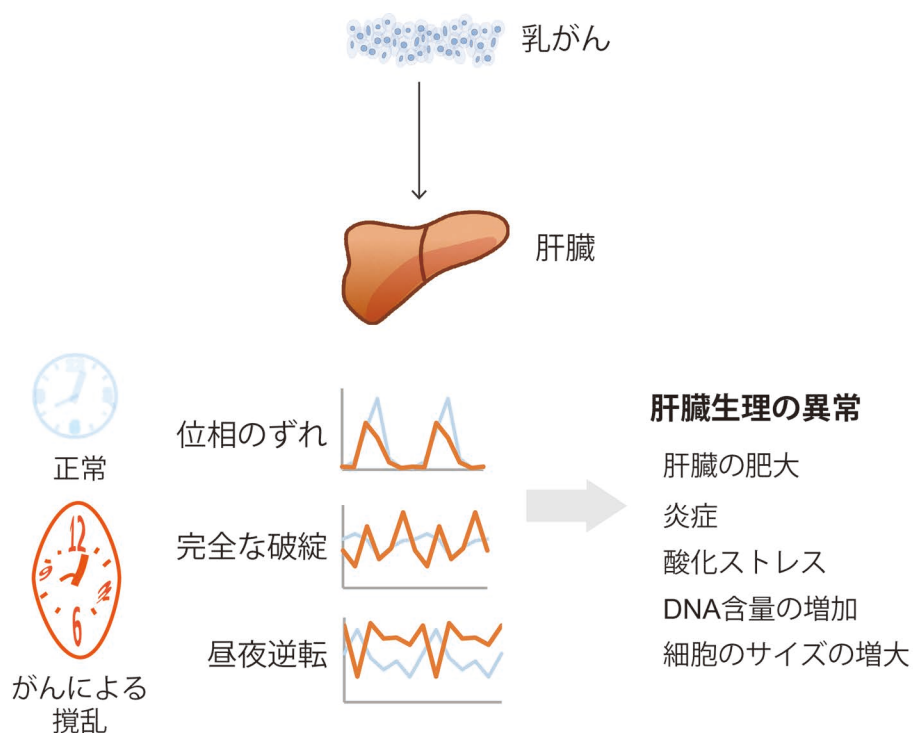


29 腫瘍惹起性の遠隔臓器炎症が起こるしくみ

河岡 慎平

腫瘍は個体全体に多様な影響を与える。例えば、肝臓の肥大や脂肪、筋肉、体重の減少、遠隔臓器の炎症などをあげることができる。しかし、このような多様な生理的異常がどのように引き起こされるのか、それぞれの生理的異常がどのようにリンクしているのか、といった問題は謎に包まれている。本研究では、ゼブラフィッシュ・マウスの実験系を用いて、腫瘍惹起性の遠隔臓器の炎症が起こるしくみを解明することを試みた。その結果、マウスを用いた実験から、興味深い知見を得ることができた。まず、マウスに4T1乳がんを移植し、肝臓、肺、腎臓、心臓におけるトランスクリプトーム解析を行った。すると、肝臓において、他の臓器よりも早期のタイムポイントで炎症が起こることが判明した。同時に、肝臓における概日リズム遺伝子の発現パターンが乱れることがわかった。特に、細胞周期ならびに倍数性を制御する *E2f8* 遺伝子の乱れは顕著であり、発現パターンがほぼ昼夜逆転していた。実際、4T1 を移植した個体の肝臓では倍数性の異常が観察された。以上から、腫瘍惹起性の炎症や細胞倍数性の異常といった生理的異常が複合的に作用しあい、肝臓の生理機能を低下させていると考えられた。

4T1 乳がんが肝臓に及ぼす炎症をはじめとする多様な生理的異常

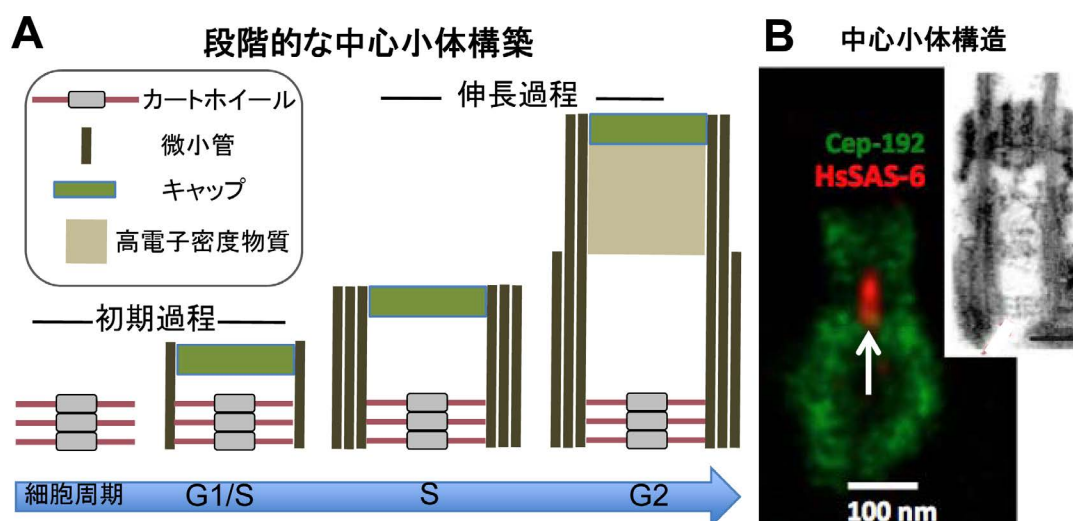


30 超微小空間における中心小体形成初期の分子機構の解明

北川 大樹

微小管形成中心として機能する中心小体は真核生物において進化的に保存された細胞小器官であり、細胞分裂、染色体分配制御に重要である。中心小体はカートホイール構造を基底部に有する極小（直径～100 nm）の複雑な構造体である。このスケールは光学顕微鏡の理論限界である 200 nm 以下であり、その構築過程を解析することが非常に困難であった。我々は最新の超解像顕微鏡技術を解析に導入し、これまでに～30 nm の分解能を達成している。本研究では、ヒト培養細胞における中心小体構築の初期過程、特にカートホイール構造の形成過程の解析に焦点をおき、超解像、且つ時系列に沿った中心小体の構築過程を観察することに成功した。さらに、無細胞蛋白質合成法、Lipid Monolayer 複合体形成法、構造生物学的解析などの多彩で独創的な手法を融合することで、進化的に保存された因子である HsSAS-6 が9回対称のリング様の複合体を形成し、カートホイール構造の中心部のコンポーネントとして重要であることを明らかにした。これらの結果は、中心小体という複雑な細胞内構造体が段階的に構築される発端となる分子機構を示すものである。

段階的な中心小体構築と超解像顕微鏡による解析



A. 細胞周期依存的に段階的に構築される中心小体構造. B. ヒト中心小体の超解像顕微鏡観察像. 免疫染色; Cep192抗体(緑)は中心小体の外枠, HsSAS-6抗体(矢印)はカートホイール構造が中心小体内部で積み重なる様子を示す。横は電子顕微鏡画像(Nakazawa et al. (2007)から引用, スケールバー, 100nm)

31 ヒト iPS 細胞を用いた 2 型糖尿病発症機序の解明

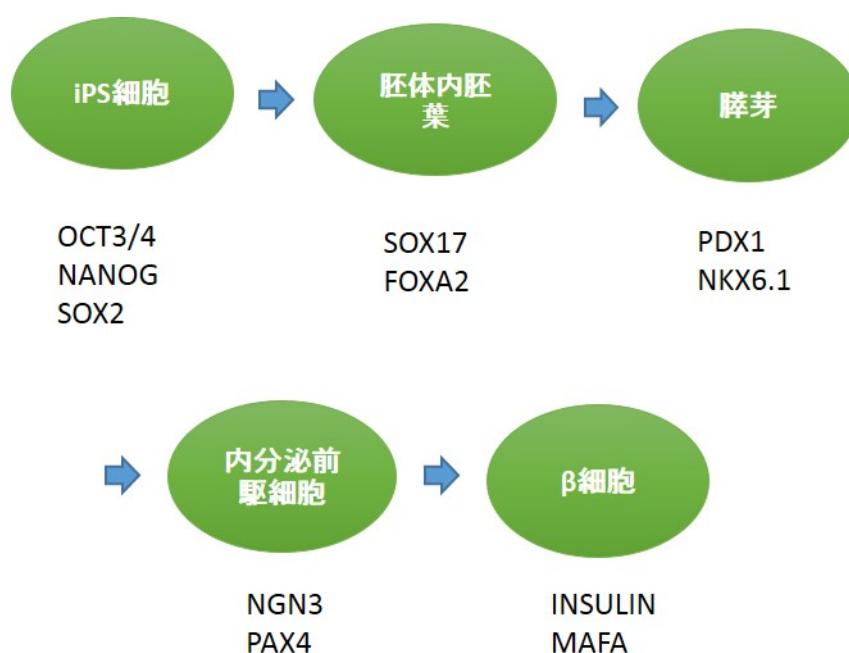
木戸 良明

【目的】近年、日本人 2 型糖尿病感受性遺伝子として *KCNQ1* 遺伝子が重要な原因遺伝子として同定されている。しかしながら、その原因と考えられる変異はイントロンに存在し、糖尿病発症機序についてはよくわかっていなかった。我々は *Kcnq1* 遺伝子の変異により、膵 β 細胞量が有意に減少することをマウスの実験系で明らかにした。これがヒトにも相当することを確認すべく、ヒト iPS 細胞を用いて膵 β 細胞不全の分子メカニズムを解析することにした。

【方法】複数のヒト iPS 細胞株について対象遺伝子変異を検索した。そして、それらの細胞に対して既報で報告された方法を用いて膵芽への分化誘導を試みた。

【結果】複数のヒト iPS 細胞株に *Kcnq1* 遺伝子の SNP を認めた。ヒト iPS 細胞に ActivinA、CHIR99021、NOGGIN などを負荷すると胚体内胚葉、原始腸管、後方前腸への分化が確認できた。続いて細胞塊を浮遊培養にて培養し NOGGIN、KGF、EGF を負荷すると、PDX1 と NKX6.1 の発現が得られた。現時点ではこの PDX1 と NKX6.1 を発現した膵芽までの分化が確認できている。現在、既報を参考にして膵 β 細胞までの分化を行っている。

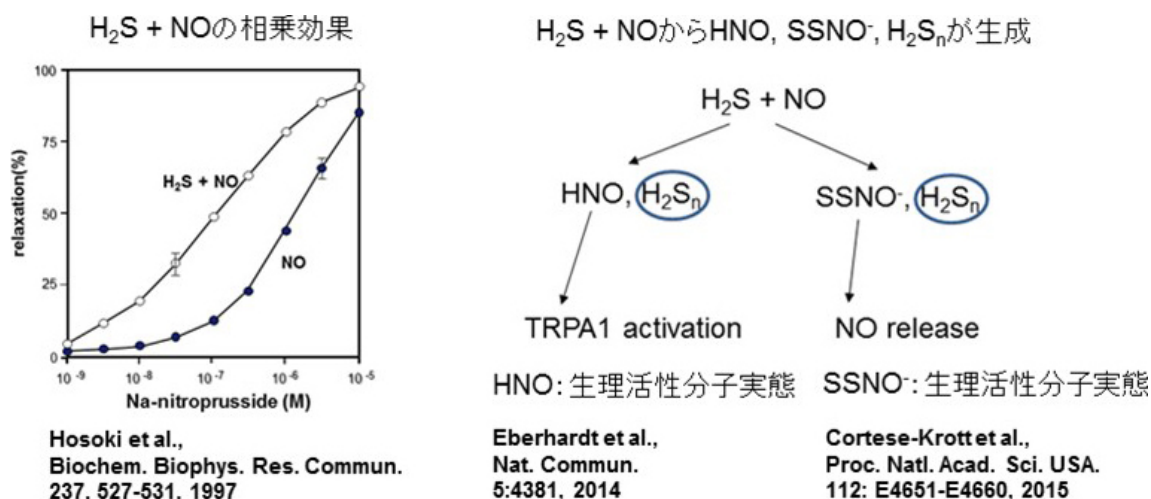
【結論】ヒト iPS 細胞において *Kcnq1* 遺伝子の SNP が認められた。この細胞の膵芽までの分化誘導が確認できた。

ヒト iPS 細胞から膵 β 細胞までの分化誘導

32 シグナル分子としての硫化水素とポリサルファイド

木村 英雄

神経伝達調節や血圧調節にかかわるシグナル分子硫化水素 (H_2S) は、その血管平滑筋弛緩作用において、一酸化窒素 (NO) と強い相乗効果を示すことを 1997 年に報告した。しかし、そのメカニズムについては解明されていなかった。本研究で、LC-MS/MS を使用することにより、 H_2S が NO と化学的反応を起し、新規シグナル分子として最近注目を集めているポリサルファイド (H_2S_n) ができることが明らかになった。さらに、 H_2S_n 特異的蛍光プローブを開発し、これと Ca^{2+} イメージングを組み合わせることにより、生成した H_2S_n による transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) チャネル活性化を示すことに成功した。これまで、 H_2S と NO との化学反応により、ニトロキシル (HNO) やニトロソパーサルファイド (SSNO^-) が生成され、これらが活性分子実態であると考えられてきた。本研究では、1) H_2S と NO との化学反応による生成分子と H_2S_n とは、シアンにより分解されるが、 HNO はシアン抵抗性であること、2) H_2S と NO との化学反応による生成分子と H_2S_n とは還元性剤により分解されるが、 SSNO^- は還元剤に抵抗性であることから、 H_2S_n が活性分子実態であることを解明した。

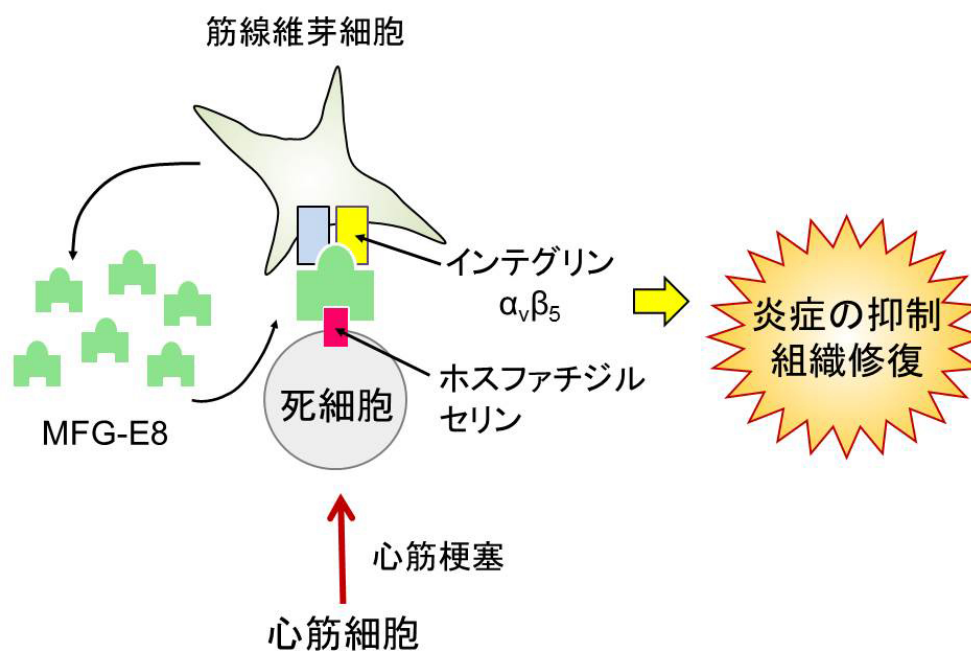
 H_2S と NO の相乗効果とそのメカニズムの解明

33 筋線維芽細胞の制御による心筋梗塞後の線維化抑制

黒瀬 等

組織が傷害を受けたときに、欠落した部位はコラーゲンによって置き換わり形態が維持される。しかし、コラーゲンは機能を補完できないため、細胞外での過剰な蓄積は組織の機能低下をもたらす。過剰なコラーゲンの蓄積を線維化と呼び、コラーゲンの産生を担う細胞が筋線維芽細胞である。本研究では、これまで組織の線維化のみに関わるとされてきた筋線維芽細胞が、心筋梗塞時に生じる死細胞を貪食（除去）することを明らかにした。さらに、この筋線維芽細胞による死細胞の貪食が、MFG-E8（Milk Fat Globular Protein Epidermal Growth Factor-8）に依存していることも見出した。これまで、心筋梗塞時に生じる死細胞を貪食する細胞は、梗塞部位へ浸潤してきたマクロファージなどの細胞であると考えられてきた。本研究は、血球系細胞以外の細胞（筋線維芽細胞）が心筋梗塞時の死細胞の貪食に関わっていることを明らかにした。さらに、MFG-E8の局所投与が、心筋梗塞後の病態を改善させることも示した。心筋梗塞時の死細胞の貪食が治療標的となることが明らかになった。

心筋梗塞後に生じる死細胞の筋線維芽細胞による貪食

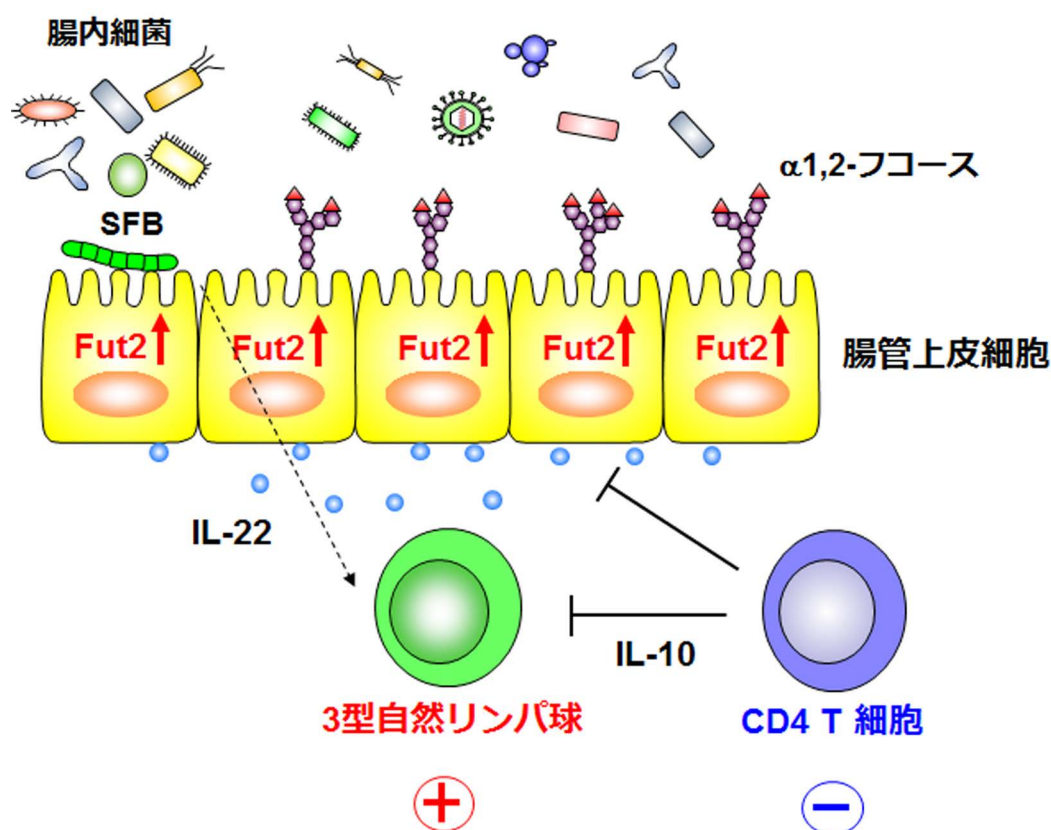


34 免疫細胞による腸管上皮細胞の糖鎖修飾制御機構の解明

後藤 義幸

腸管は無数の外来抗原に恒常的に曝されている特殊な組織である。腸管は細胞表面に様々な糖鎖を発現する上皮細胞に覆われている。上皮細胞の糖鎖の末端には II 型フコース転移酵素 (Fucosyltransferase 2: Fut2) を介して α 1,2-フコースが付加され、腸内細菌の恒常性維持に寄与している。本研究では、腸管上皮細胞の Fut2 および α 1,2-フコースの発現制御機構について、獲得免疫系細胞、特に T 細胞の役割を検討した。その結果、T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) β 鎖を欠損したマウスでは、上皮細胞の Fut2 ならびに α 1,2-フコースの発現が大きく亢進しており、TCR β 鎖欠損マウスに野生型マウス由来の CD4T 細胞を移入すると、その発現が抑制された。一方、IL-10 欠損マウス由来の CD4T 細胞を移入しても、上皮細胞の Fut2 ならびに α 1,2-フコースの発現は抑制されなかった。以上の結果から、IL-10 を産生する TCR β 鎖陽性 CD4T 細胞、つまり制御性 T 細胞 (Treg/Tr-1) が上皮細胞の Fut2 ならびに α 1,2-フコースの発現を負に制御する役割があることが示された。

IL-10 産生 CD4T 細胞は腸管上皮細胞の Fut2 ならびに α 1,2-フコースの発現を負に制御する

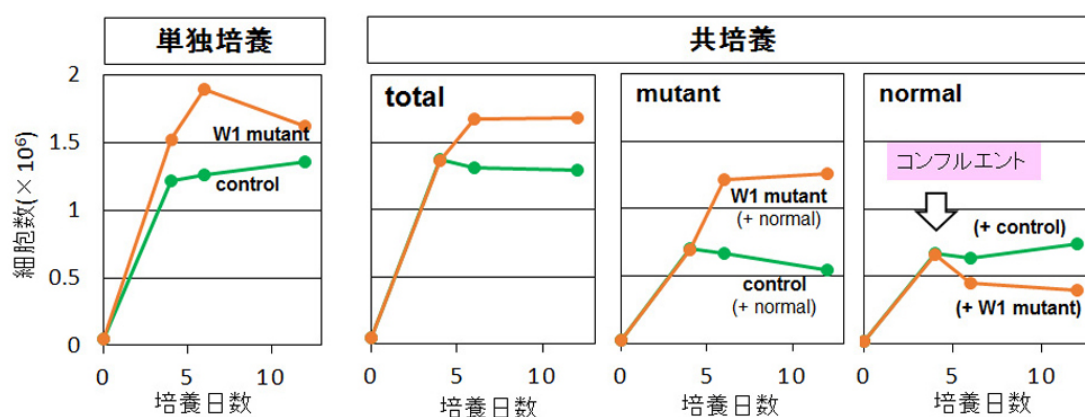


35 細胞競合の分子基盤と発生における役割の研究

佐々木 洋

発生の重要な特徴の一つはその正確性であるが、胚内の個々の細胞の挙動にはばらつきがあり、細胞集団が正確に体をつくり上げるためには、隣接する細胞同士のコミュニケーションが必要である。本研究では、マウスを研究対象として、隣接細胞の状態認識に関わる細胞間コミュニケーションである細胞競合と、細胞間接着によって活性化される Hippo シグナル経路に注目し、それらの分子基盤の解明と胚発生における役割を明らかにすることを目的とした。キメラマウス胚の作製による *in vivo* での細胞競合検定系を新たに樹立し、マウス胚においては、Hippo 経路の転写因子 Tead の活性が異なる細胞間で、着床後の非常に早い時期に細胞競合が起こることを見出した。また、我々が樹立した、マウス胚線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞における細胞競合のモデル系を用いた新規遺伝子のスクリーニングを行い、新規の細胞競合関連因子の候補を得ることに成功した。さらにスクリーニングで得られた新規遺伝子についても *in vivo* での細胞競合への関与を検討した結果、1つの遺伝子で原腸陥入期に細胞競合が起こることを見出した。今後は、着床後の早い時期に見られた細胞競合の発生学的な意義を明らかにすること、また、新たに得られた新規遺伝子による細胞競合機構とその発生学的な意義の解明を進める必要がある。

NIH3T3 細胞における新規遺伝子の変異による細胞競合

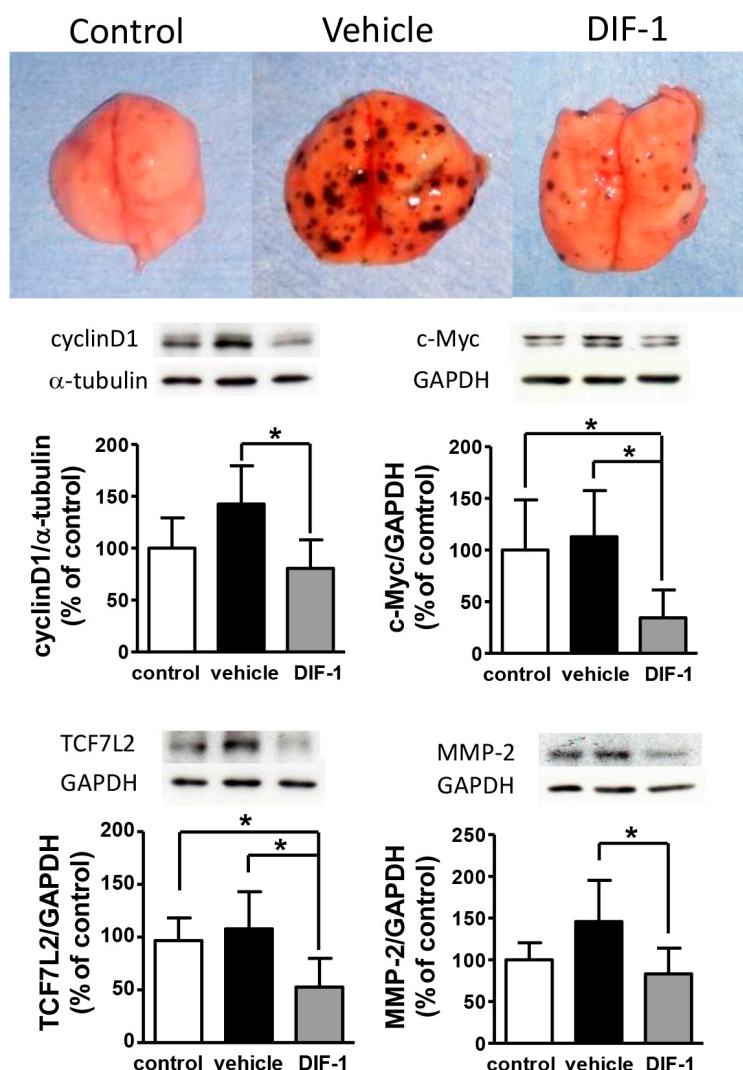


36 細胞性粘菌分化誘導因子 DIF の抗がん作用標的分子の同定

笹栗 俊之

細胞性粘菌が分泌する低分子化合物 differentiation-inducing factor (DIF) は、細胞性粘菌の柄細胞への分化を誘導する活性物質である。しかしこの物質は、哺乳類の正常細胞・がん細胞に対しても、可逆性に増殖抑制・分化誘導を起こすことが示されている。今回我々は、DIF の標的分子を明らかにし DIF の作用機序の全貌を明らかにするため、主に悪性黒色腫細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* での検討を行った。標的分子については未だ結論に至らず、さらに検討を重ねる必要があるが、悪性黒色腫への抗がん作用については興味深い知見を得ることができた。DIF-1 は、GSK-3 を介してサイクリン D1 と c-Myc の分解を促し、また TCF7L2 の発現低下による Wnt/ β -カテニン系の抑制によって、悪性黒色腫細胞の増殖を抑制した。一方、MMP-2 の発現を減少させることで細胞遊走および浸潤を抑制した。さらに、悪性黒色腫細胞の静注によるマウス肺転移モデルで、経口投与した DIF-1 は肺転移と転移腫瘍の増大を顕著に抑制した。以上の結果より、DIF-1 は悪性黒色腫の増殖・浸潤・転移をいずれも抑制する抗がん薬となり得ることが示唆された。

DIF-1 による悪性黒色腫肺転移の抑制



37 疾患膜タンパク質の細胞内蓄積に働く新規品質管理機構

佐藤 健

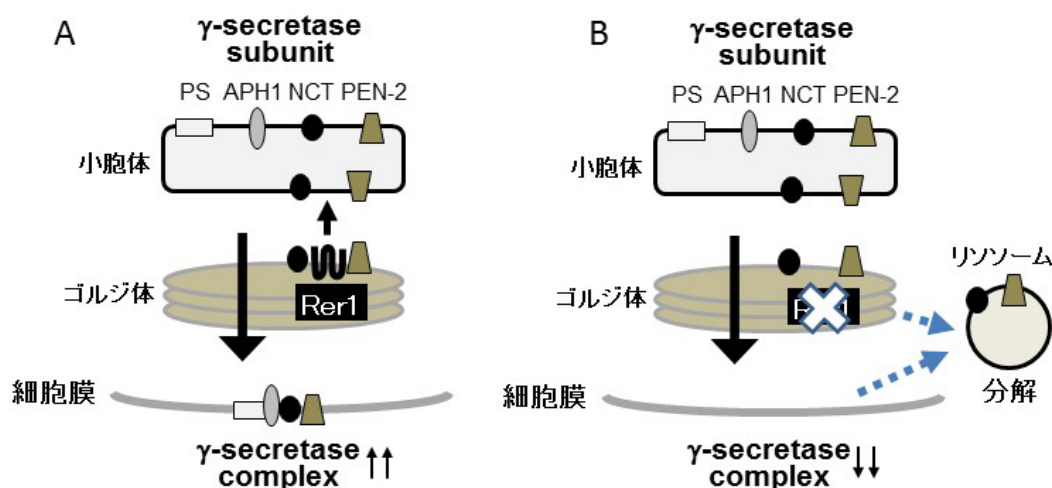
細胞膜等で働く膜タンパク質はまず小胞体において合成され、品質管理機構によるチェックを受けた後、正常なものがゴルジ体を経由してそれぞれの目的地へと輸送される。一方、ある種の遺伝病では細胞膜等で働く膜タンパク質に変異が生じた結果、これらが活性を保持しているにも関わらず小胞体に蓄積してしまい、重篤な疾患を引き起こすことが知られている。本研究ではこの小胞体蓄積に関与する因子の1つとして我々が同定している初期ゴルジ体膜タンパク質 Rer1 を中心に研究を行った。まず網膜色素変性症の原因となる 14 種類のロドプシン変異体を作製し、安定発現株を樹立した。また、それぞれの変異体の小胞体蓄積における Rer1 依存性について解析したところ、Rer1 非依存的な分子機構の存在も示唆された。次に、Rer1 の哺乳類における生理機能を解析するために Rer1 欠損マウスを作製した。その結果、Rer1 ホモ欠損マウスは胎生致死となることが判明した。一方、脳特異的 Rer1 欠損マウスは出生したものの、脳の形態異常が観察された。そこで、Rer1 欠損細胞を作製し詳細に解析したところ、脳形成に関与する Notch の活性化や β アミロイドの産生に働く γ -セクレターゼ複合体のサブユニットがリソソームにおいて分解され、細胞膜における複合体の顕著な減少が観察された。このことから、Rer1 は γ -セクレターゼ複合体の形成を正に制御することにより脳形成に関与している可能性が示唆された。

Rer1 は γ -セクレターゼ複合体形成を正に制御する

γ -セクレターゼ複合体は Presenilin (PS)、APH-1、Nicastrin (NCT)、PEN-2 が会合することによって形成される。

Rer1 は未会合のサブユニットを小胞体に留めることにより、複合体形成を正に制御すると考えられる (A)。

Rer1 が欠損すると複合体を形成しないうちにゴルジ体以降に輸送されてしまい、リソソームにおいて分解され、細胞膜における γ -セクレターゼ複合体の量が減少することが示唆された (B)。



38 配偶子形成における紡錘体の位置と卵子劣化の関連性

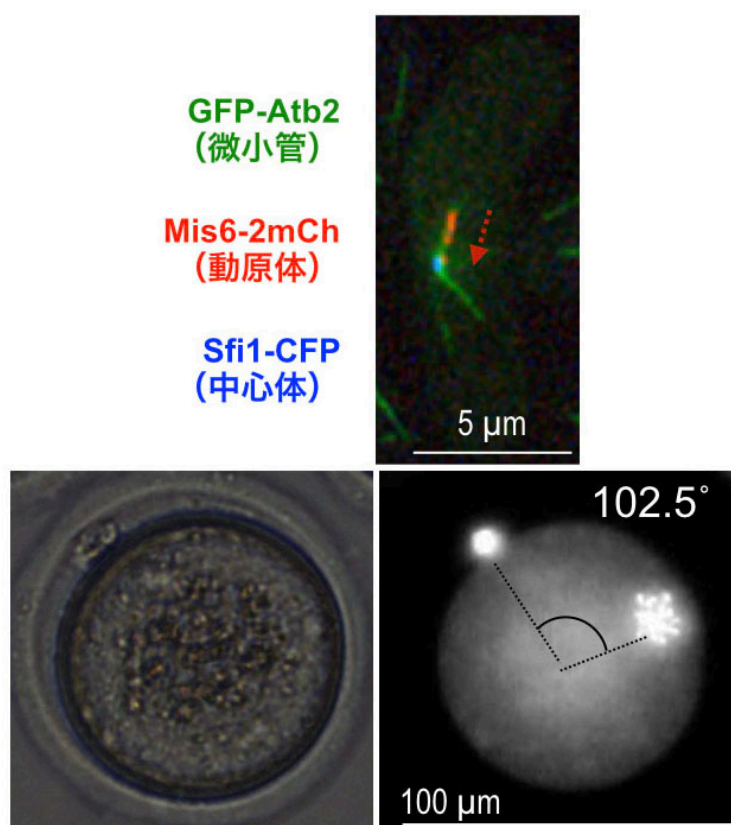
佐藤 政充

本研究は、精子・卵子など配偶子の形成における染色体分配の謎に迫る。配偶子を作るための分裂は減数分裂と呼ばれる。減数分裂における染色体分配の異常は、不妊・流産・ダウン症候群などの原因となるため社会的関心度が高い。しかし、それらが起きるメカニズムは十分に解明されていない。

そこで我々は、減数分裂において染色体分配の異常が生じる原因を解明する。これまでモデル生物である分裂酵母を用いて追究したところ、染色体分配の異常が起きやすくなる主たる原因が減数分裂に特有の複雑な染色体構造にあることが分かった。さらに我々は、このリスクを乗り越えるためには微小管が重要な機能を担うことを発見した (図)。本研究では酵母におけるこの微小管が機能するメカニズムを解明するとともに、これらの知見をもとに研究を哺乳類の卵母細胞にも適用して、減数分裂・配偶子形成における微小管の特徴について研究をおこなった。

その結果、酵母において減数分裂特異的な微小管の機能には、微小管結合タンパク質 Alp7 が重要な働きを担うことを明らかにした。また、マウス卵母細胞においては、紡錘体微小管の位置についてある頻度で異常が見られることが分かった。すなわち、卵母細胞内の紡錘体微小管は、通常では極体と呼ばれる構造の近くにあるが、一部では極体から遠くに存在していることが分かった (図)。現在はこれがマウスの加齢にともなってどのように変化するかを検討しており、その結果から、加齢にともなう卵母細胞の品質について新たな視点を加えることができると思われる。

分裂酵母と卵母細胞における減数分裂期の微小管の挙動



39 抗体の機能的差異を生み出す分子機構の解析

菅井 学

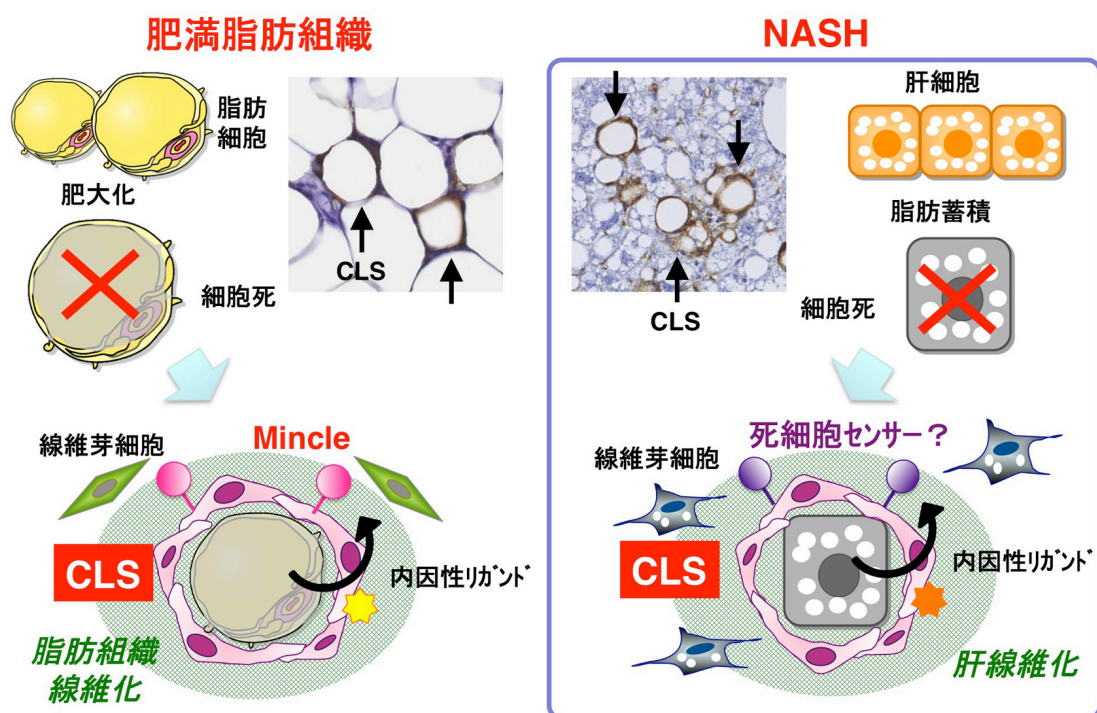
抗体の質の変化に関わる活性化 B 細胞で起こる二つのイベント「クラススイッチ組換え」と「形質細胞への分化」は相互排他的な過程であり、それぞれに必要な転写因子の多くは既に同定されているにも関わらず、分化の方向を決定する初期過程に関する知見はほとんど無い。私たちは、活性化 B 細胞に起こる様々な変化を調べた結果、活性化 B 細胞はミトコンドリアの機能的相違によって、クラススイッチしやすい細胞集団と、形質細胞に分化しやすい細胞集団に事前に区別できることを見いだした。この細胞集団を詳細に調べることによって、活性化 B 細胞の分化決定プログラムの初期過程を明らかにすることを目指した。In vitro にて、クラススイッチ（形質細胞分化）誘導した脾臓 B 細胞から、ミトコンドリア機能の違い（ミトコンドリア量・ミトコンドリア膜電位とも高い細胞集団 P1 と、ミトコンドリア量・ミトコンドリア膜電位とも低い細胞集団 P2）によって分取した細胞を用いて、RNA 発現量、タンパク発現量などを調べた結果、発現に違いを認めるいくつかの遺伝子を同定した。これらの data をもとに鍵となる分化制御因子の候補を絞り、活性化 B 細胞分化制御機構を明らかにすることが今後の課題である。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による上位 20 位までの結果

Rank	Pathway enriched in P1	Rank	Pathway enriched in P2
1	RNA degradation	1	Protein export
2	Spliceosome	2	Ribosome
3	Homologous recombination	3	Aldosterone regulated sodium reabsorption
4	Cysteine and Metionine metabolism	4	Regulation of autophagy
5	One carbon pool by polate	5	Lyosome
6	Butanoate metabolism	6	N glycan biosynthesis
7	ABCTransporters	7	Methabolism of xenobiotics by cytochrome P450
8	Citrate cycle TCA cycle	8	Autoimmune thyroid disease
9	Viral myocarditis	9	Intestinal immune network for IgA production
10	Pentose phosphate pathway	10	T cell receptor signaling pathway
11	Aminoacyl tRNA biosynthesis	11	Snare interactions in vesicular transport
12	Glycolysis gluconeogenesis	12	Leukocyte transendothelial migration
13	DNA replication	13	Cell adhesion molecules cams
14	Galactose metabolism	14	Natural killer cell mediated cytotoxicity
15	Mismatch repair	15	Vibrio cholerae infection
16	NOD like receptor signaling pathway	16	Drug metabolism cytochrome P450
17	RNA polymerase	17	Leishmania infection
18	Lysine degradation	18	Glycosaminoglycan degradation
19	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	19	Drug metabolism other enxymes
20	Nucleotide excision repair	20	Antigen processing and presentation

本研究では、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）をモデルとして、過栄養による代謝性組織リモデリングの分子機構の解明を目的とした。我々は既に、細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲んで貪食・処理する特徴的な組織像（CLS: crown-like structure）が肝線維化の起点となることを報告している。本研究では、肝臓に常在する組織マクロファージ（クッパー細胞）を選択的に消去することにより、浸潤マクロファージではなくクッパー細胞が肝臓 CLS を形成することを明らかにした。一方、肥満の脂肪組織では浸潤マクロファージが CLS を形成して線維化を誘導する。このように、CLS は過栄養による代謝性組織リモデリングの駆動エンジンとして働くが、脂肪組織と肝臓では臓器特異性や疾患特異性を認めることが明らかになった。

過栄養による代謝性組織リモデリングの分子機構

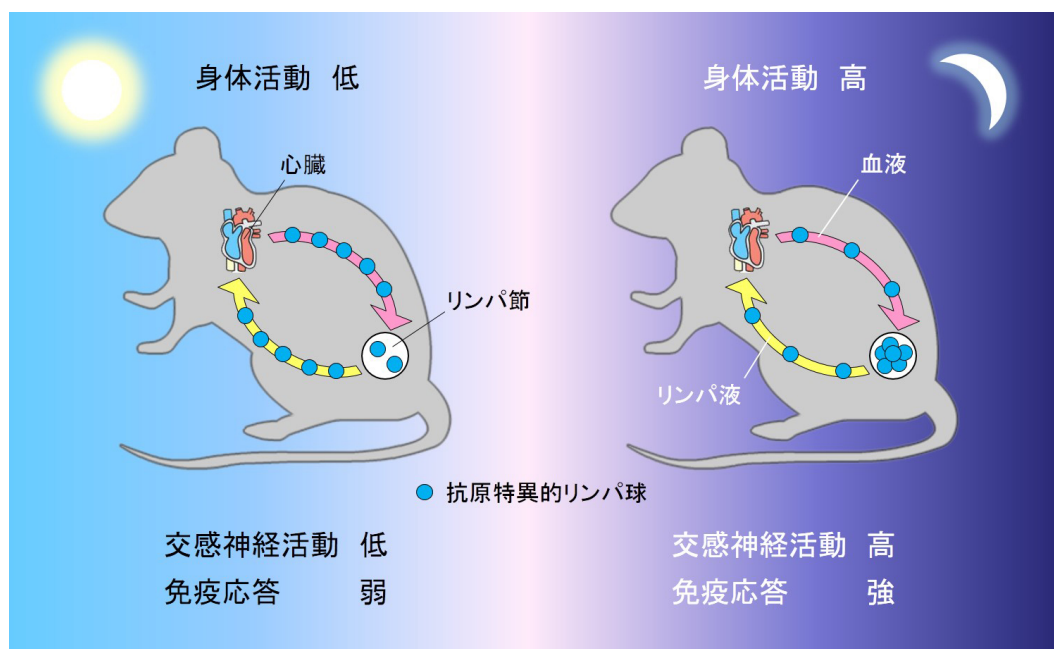


41 交感神経によるリンパ球動態制御の生理的意義

鈴木 一博

神経系による免疫系の制御機構が存在することは古くから指摘されてきたが、そのメカニズムは現在でもなお十分に理解されていない。我々はこれまでの研究において、交感神経からのノルアドレナリンの入力がリンパ球に発現する β_2 アドレナリン受容体を介して特定のケモカイン受容体の反応性を高めることによって、リンパ球のリンパ節からの脱出を抑制することを見出した。本研究では、この交感神経によるリンパ球動態の制御機構の生理的意義を明らかにすることを目的とした。交感神経活動の日内変動に注目して解析を進めた結果、マウスの交感神経活動が高まる夜間に、リンパ球のリンパ節からの脱出が抑制されるのにもなって、リンパ節におけるリンパ球数が増加し、それを反映して免疫応答が昼間に比べて強く誘導されることがわかった。さらに、交感神経入力を遮断する、あるいはリンパ球のリンパ節における出入りを止めることによって、リンパ節における免疫応答の日内変動が消失した。これらの結果から、我々が見出した交感神経によるリンパ球動態の制御機構が、リンパ節における免疫応答の日内変動の形成に寄与することが明らかになった。

交感神経による免疫応答の日内変動の仕組み

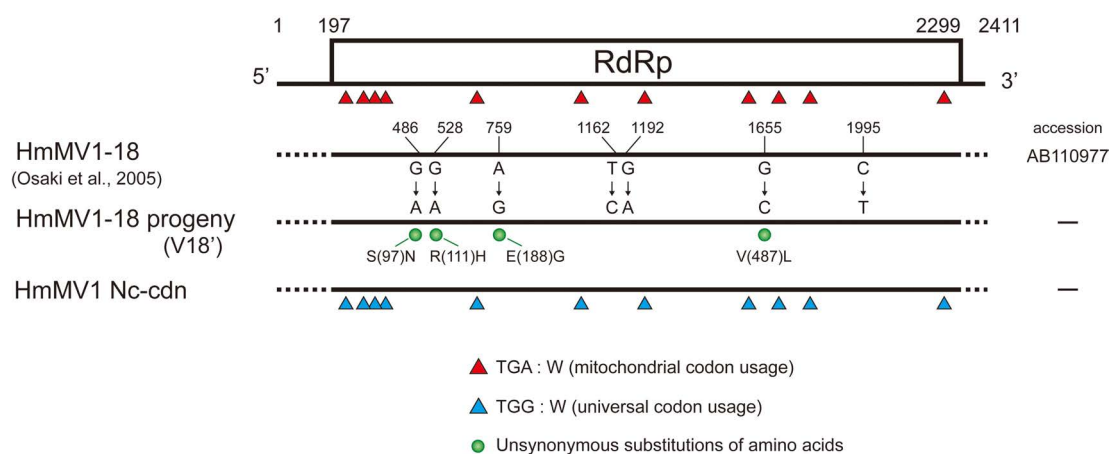


42 ウイルスを利用したミトコンドリアの形質転換

鈴木 信弘

ミトコンドリア (mt) の形質転換は、mtDNA の変異が原因の mt 病の治療に道を拓く。本研究では、唯一無二の真核生物の mt に感染するミトウイルス (2~3 kb の一本鎖 RNA ゲノムをもち、RNA 合成酵素のみをコードする最も単純なキャプシドレス) の感染性核酸を構築し、その課題に挑戦した。具体的には、紫紋羽病菌から分離されたミトウイルス (*Hlicobasidium mompa* mitovirus 1, HmMV1) を材料に著者らが開発した糸状菌類プロトプラスト作製技術、RNA 導入技術、感染性 cDNA 構築技術を駆使し、4 種のコンストラクトの糸状菌モデル宿主であるクリ桐枯病菌の免疫不全株で感染性を試験した。4 種の内 2 つは試験管 RNA 合成用で、核型ミトコンドリア型トリプトファンコドン (UGA) を 11 個有するものと、それらを核型コドン (UGG) に全て変換したコンストラクトである。残りの 2 つは HmMV1 cDNA の形質転換用コンストラクトである。しかし、結果は単独あるいは 2 種のコンストラクト組合せで処理した全てで陰性であった。今後、ミトコンドリア標的 RNA 及びペプチド配列を付加したコンストラクトを作製し、試験する必要がある。

ミトウイルスの完全長 cDNA



43 抗がん免疫アジュバントとがんワクチン療法の確立

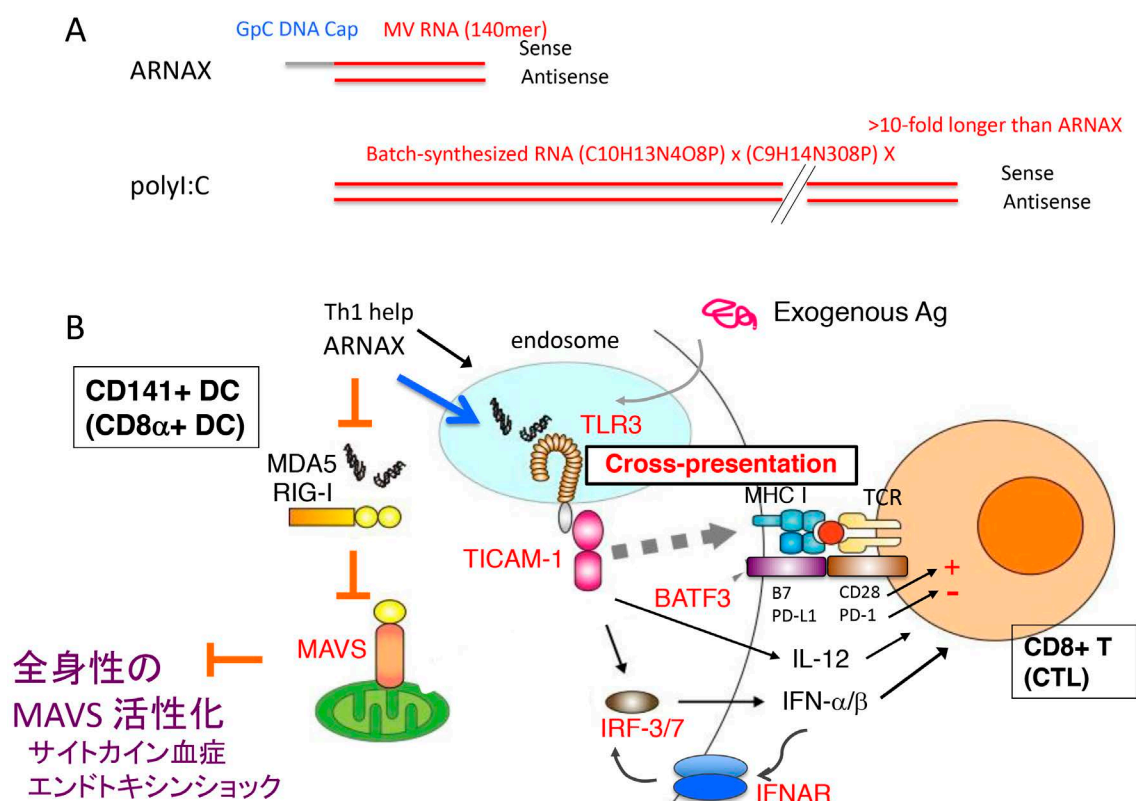
瀬谷 司

がんの撲滅は人類の悲願である。免疫チェックポイント阻害剤（ICI）は、がん治療領域にブレイクスルーを齎した。しかし、対象とならない患者が80%以上存在し、また、重篤な有害事象の発生率が10%以上という弱点がある。これは抗がんCTLが用意できていない（pre-existし）がん症例が多いことと符合する。本研究では有害事象の無い免疫増強剤の候補として長鎖二本鎖核酸アジュバント（ARNAX）を開発し、マウス移植がんモデルで抗原+ARNAXが極めて優れた腫瘍寛解に導くことを証明した。加えてICIに効きが弱い腫瘍モデルでもARNAX+抗原を（例えば）PD-L1抗体と併用すれば寛解に導けることを証明した。これまで樹状細胞のプライムアジュバント（CTLを誘導）は認可されていない。本ARNAXを臨床に導入できればがん患者に新たな治療法を提供することが可能となる。

ARNAX の概略

A) ARNAX の構造と polyI:C の構造との比較。

B) ARNAX の機能とサイトカイン毒性を発揮しない特徴。

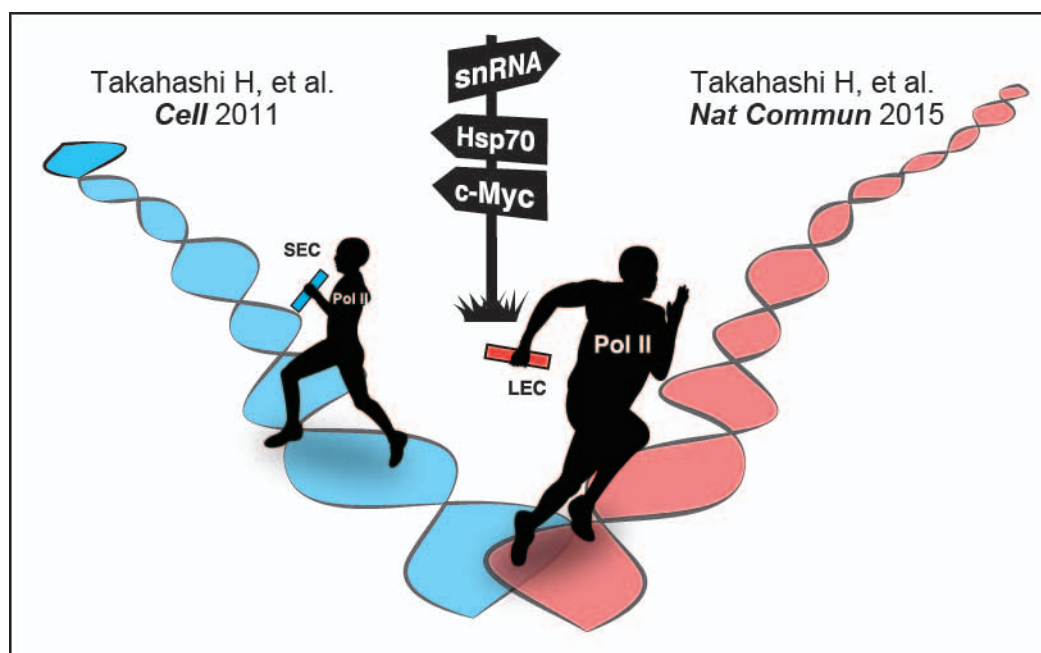


44 転写伸長制御因子 Med26 による遺伝子発現制御機構の解明

高橋 秀尚

タンパク質をコードする遺伝子や Non-coding RNA 遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写される。これまでに、私はメディエーター複合体のサブユニット Med26 が、転写伸長因子複合体 Super elongation complex (SEC) を *c-Myc* や *Hsp70* などの腫瘍関連遺伝子領域にリクルートし、Little elongation complex (LEC) を small nuclear RNA (snRNA) 遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写を促進することを明らかにした。(Takahashi H, et. al. *Cell* 2011)。Med26 は LEC と共に核内ボディ Cajal bodies (CBs) において snRNA 遺伝子の転写を制御する (Takahashi H, et. al. *Nature communications* 2015)。本研究によって、私は Med26 と LEC が複製依存的ヒストン遺伝子の転写終結 (ポリ A 付加) も制御することを明らかにした (未発表)。snRNA 遺伝子と複製依存的ヒストン遺伝子の mRNA は共にポリ A 付加されないことから、Med26 と LEC は、snRNA や複製依存的ヒストン遺伝子の転写を正常に終結させ、ポリ A 付加を抑制する機能を果たす可能性が考えられる。

Pol II に手渡されるバトン (SEC か LEC か) によって進む道 (発現遺伝子) が変わる

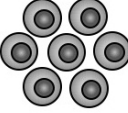
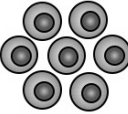
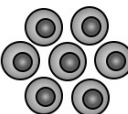
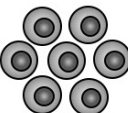
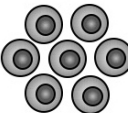
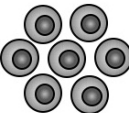


45 粘膜メモリー T 細胞のオートファジー非依存的維持機構

高村 史記

インフルエンザウイルス感染・排除後の肺粘膜には莫大な数の抗原特異的メモリー CD8T 細胞が長期間蓄積することが知られている。この大部分は循環することなく粘膜に滞在し続ける滞在型（レジデント）メモリー CD8T 細胞（CD8T_{RM}）であり、再感染初期の防御免疫に重要な役割を果たしている。しかしながら、CD8T_{RM} が存在する上皮組織は低栄養環境であるため、CD8T_{RM} の長期維持には飢餓刺激に対応し老化した細胞内小器官を消化・再利用するオートファジーが必須であると考えられた。しかしながら、予想に反し、肺 CD8T_{RM} はオートファジー不全状態でも通常に維持されうること、更には全身のメモリー細胞数が激減するほど深刻な飢餓状態に曝されても肺 CD8T_{RM} 数は維持されることが解った。また、肺 CD8T_{RM} は高い脂肪酸取り込み能及び代謝能を有していることも明らかとなった。従って、肺 CD8T_{RM} は低グルコース環境に適応することで飢餓刺激の影響を受けにくいことが示唆された。これは、未だ深刻な栄養不足が問題となっている発展途上国においては、CD8T_{RM} を誘導するための粘膜投与型ワクチン開発が急務であることを示している。

ナイーブ及びメモリー CD8T 細胞におけるオートファジーもしくは飢餓抵抗性、及び脂肪酸酸化能の関係

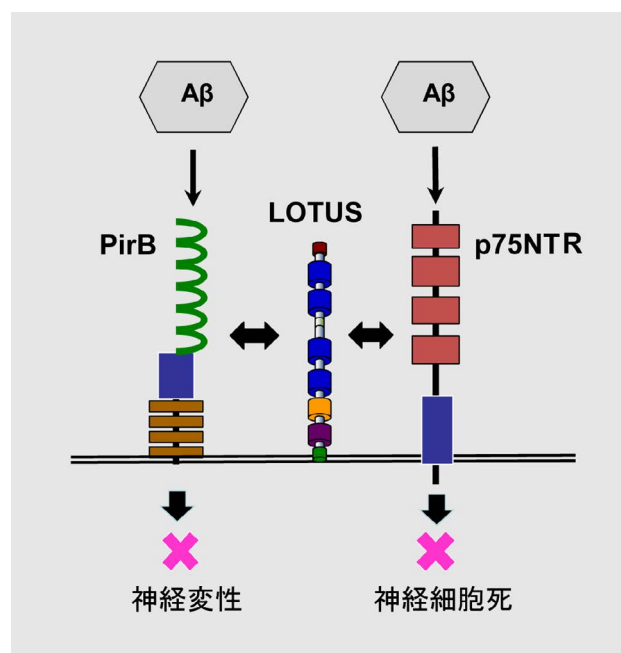
	定常時	オートファジー 不全	飢餓	グルコース 取り込み	脂肪酸 取り込み	脂肪酸 代謝
ナイーブ CD8T細胞				+++	+	+
セントラルメモリー CD8T細胞				+	+++	+
肺レジデントメモリー CD8T細胞				+	+++	+++

46 神経回路形成因子 LOTUS による認知症治療法開発

竹居 光太郎

神経再生を阻む受容体の一つである Paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) は、アルツハイマー病の病因因子である β -amyloid ($A\beta$) と結合してアルツハイマー病様の神経変性・神経細胞死を惹起する (Kim *et al.*, 2013)。一方、低親和性神経成長因子受容体である p75NTR (neurotrophin receptor) も $A\beta$ の受容体として機能して細胞死を誘導する (Yaar *et al.*, 1997)。神経回路形成因子 LOTUS はこれら 2 種の受容体 (PirB と p75NTR) と結合して $A\beta$ 作用を制御する可能性が見いだされた。そこで、本研究では $A\beta$ による PirB を介した神経変性や p75NTR を介した神経細胞死に対する LOTUS の作用を詳しく検討することで、アルツハイマー病型神経変性の新たな治療基盤を創成することを目的とする。最初に、COS7 細胞に発現させた PirB に対する $A\beta$ オリゴマーの結合が LOTUS の共発現によって変化するかについて調べたところ、LOTUS は PirB と結合し、 $A\beta$ オリゴマーと PirB の結合を約 30% 減弱させた。これにより、LOTUS は $A\beta$ による PirB を介した神経変性に対する抑制作用を有することが判明した。次に、ラット副腎褐色細胞腫由来の細胞株である PC12 細胞に発現させた p75NTR に対する $A\beta$ オリゴマーの結合による細胞死が LOTUS の共発現よりコンビナント LOTUS タンパク質投与によって変化するかについて調べたところ、共発現させた LOTUS や外来性に投与した LOTUS は何れの場合も p75NTR と結合し、 $A\beta$ オリゴマーの結合による細胞死を有意に抑制した。更に、神経細胞の初代培養系において上記の抑制作用を検証するため、p75NTR を発現する培養海馬神経細胞において同様の実験を行ったところ、PC12 細胞と同様に LOTUS は $A\beta$ オリゴマーの結合による細胞死を有意に抑制した。これらのことから、LOTUS は $A\beta$ による p75NTR を介した神経細胞死に対する抑制作用を有することが判明した。現在、LOTUS を過剰発現するトランスジェニックマウス (*lotus*-Tg マウス) と *lotus* 遺伝子欠損マウス (*lotus*-KO マウス) の脳内における $A\beta$ 蓄積量の違いを検討したり、*lotus*-Tg マウスとアルツハイマー病のモデルマウスとの交配実験を行ってモデルマウスにおける学習能力の低下が軽減されるかについて検討したりしている。これらの実験によって生体における LOTUS の認知症改善作用を確認する予定である。

神経回路形成因子 LOTUS の PirB および p75NTR を介する $A\beta$ 作用に対する拮抗作用



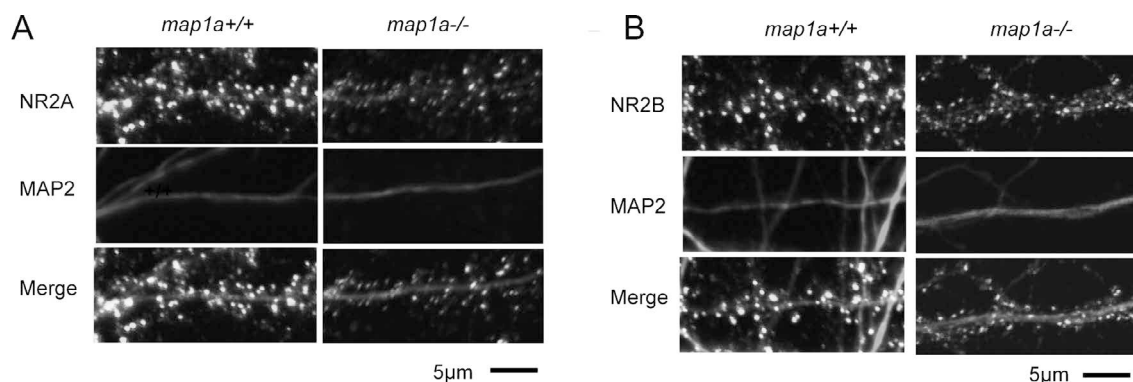
47 スパイン内 NMDA 受容体輸送機構の解明

武井 陽介

NMDA 型グルタミン酸受容体は、グルタミン酸に結合してはたらく受容体であり、動物の記憶や学習に深くかかわりを持つことが知られている。脳のなかで記憶が形成されるためには、この NMDA 型グルタミン酸受容体があらかじめシナプスに輸送されて集積される必要がある。

今般、我々のグループは、MAP1A という分子が、シナプスへ輸送される途中の NMDA 型グルタミン酸受容体を微小管やアクチンなどの細胞骨格につなぎ、安定化することでレールからの『脱線』を防ぎ、輸送の効率化と安全性の向上に役立っていることを明らかにした。MAP1A を欠いたマウスの神経細胞では、NMDA 型グルタミン酸受容体のシナプスへの輸送が阻害され、その結果シナプスの NMDA 受容体の量が著明に低下した。個体レベルの解析により神経細胞の活動依存的可塑性（海馬 C A 1 の長期増強および長期抑制）、マウスの記憶（恐怖記憶）が損なわれることが明らかになった。MAP1A は人間の脳にも存在する。今回の知見は、記憶や学習のような重要な脳の機能を支える細胞骨格によるメカニズムを明らかにしたばかりでなく、認知症や統合失調症など NMDA 型グルタミン酸受容体機能とかかわりの深いヒトの精神神経疾患の病態解明・治療法開発につながると期待される。

MAP1A ノックアウトニューロンにおける NMDA 受容体低下
NMDA 受容体サブユニット NR2A（図 A）および NR2B（図 B）のシグナルが
MAP1A ノックアウトマウス（*map1a*^{-/-}）の神経細胞では低下する。
それぞれ、樹状突起マーカー MAP2 と二重染色してある。

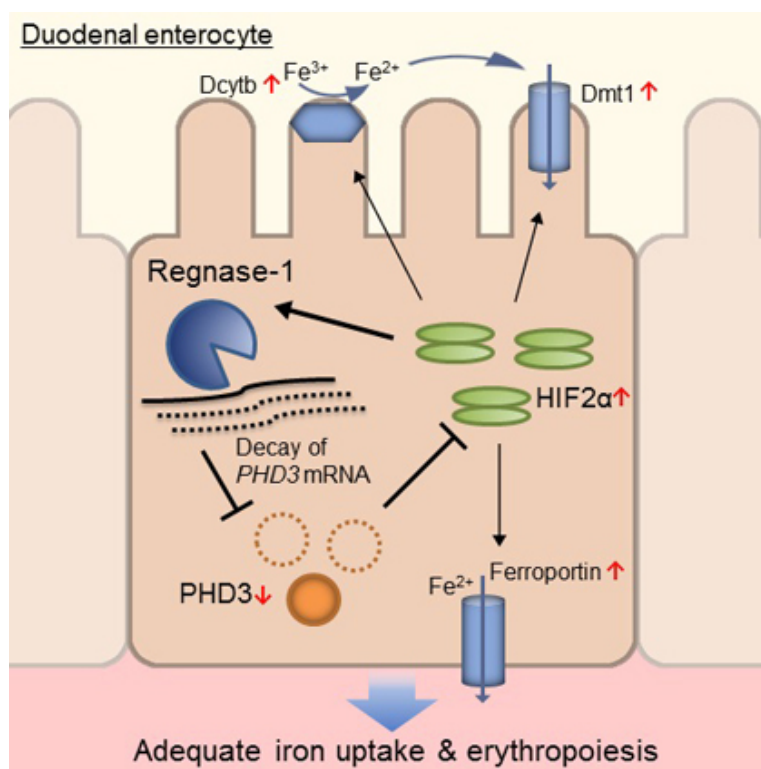


48 mRNA 分解による免疫制御機構の解明

竹内 理

RNA 分解は免疫システム制御に重要な役割を果たしている。我々の同定した RNA 分解酵素 Regnase-1 は、免疫細胞で Interleukin-6 mRNA を始めとした免疫応答に関連する mRNA を分解することにより、免疫細胞の恒常性を制御し、炎症性疾患発症を抑制している。炎症と鉄代謝、貧血は密接に関わることが知られている。我々は、*Regnase-1* 欠損マウスが重篤な貧血をも示すことを見出しその機構を解析した。その結果、1) *Regnase-1* がトランスフェリン受容体の 3'非翻訳領域に存在するステムループ構造を介して mRNA を分解することで細胞への鉄取り込みを制御すること、2) *Regnase-1* が十二指腸からの鉄吸収に必須の役割を果たしており、*Regnase-1* 欠損マウスでは鉄取り込みの異常で貧血を発症すること、3) 十二指腸上皮において、*Regnase-1* が鉄吸収を司る転写因子 HIF2 α を分解する PHD3 mRNA を分解することで鉄代謝を調節していること、を明らかにした。この結果は、*Regnase-1* が mRNA 分解を通じ炎症と鉄代謝を調節する鍵分子であり、免疫応答と鉄代謝の接点として機能していることを示している。

腸管での Regnase-1 による鉄吸収の調節機構

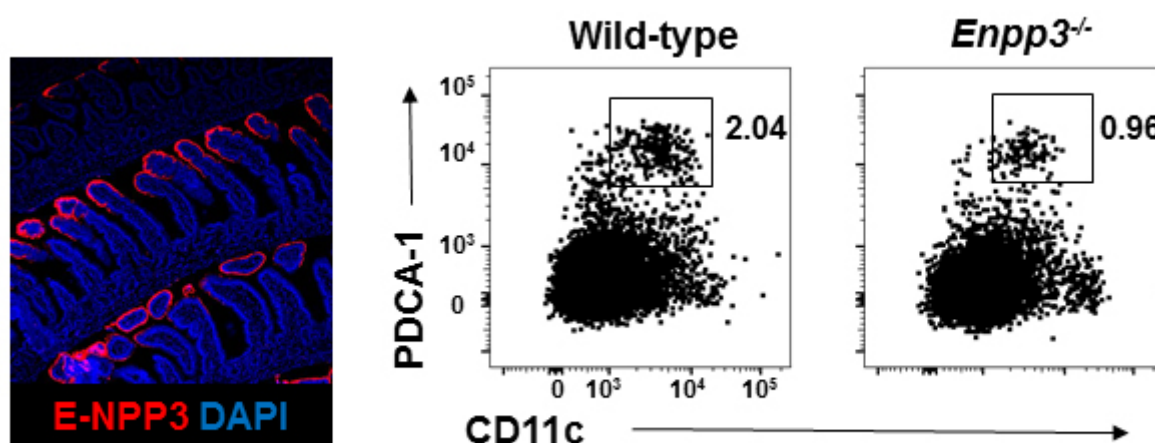


49 ATP 依存的な腸管恒常性の維持機構の解明

竹田 潔

細胞外のアデノシン 3 リン酸 (ATP) は、免疫細胞をはじめ様々な細胞の活性化や細胞死の誘導などを引き起こすことが知られている。膜型 ATP 分解酵素の一つ ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (E-NPP3) は、活性化された肥満細胞・好塩基球に発現し、ATP 依存性の慢性アレルギー炎症を抑制することが明らかになっている。E-NPP3 は小腸の上皮にも高発現していることから、E-NPP3 の腸管における役割を解析した。*E-NPP3* 欠損マウスでは、小腸内腔の ATP 濃度が上昇した。小腸粘膜組織における免疫細胞を解析すると、*E-NPP3* 欠損マウスの小腸粘膜固有層やパイエル板で形質細胞様樹状細胞 (pDC) のアポトーシスが亢進し、数が減少していることが明らかになった。pDC は、ATP 誘導性の細胞死に対する感受性が古典的樹状細胞 (cDC) より高かった。ATP センサーである *P2rx7* 欠損マウスの pDC では、ATP 誘導性の細胞死が抑制された。さらに、E-NPP3/P2X7 二重欠損マウスでは、小腸粘膜組織の pDC 数が正常に戻った。以上の結果から、E-NPP3 は、小腸における ATP 濃度を調節することにより、ATP 依存性の pDC 細胞死を抑制することにより、pDC 数を維持するために重要な分子であることが示された。

E-NPP3 は小腸上皮に高発現し、形質細胞様樹状細胞の数を制御する



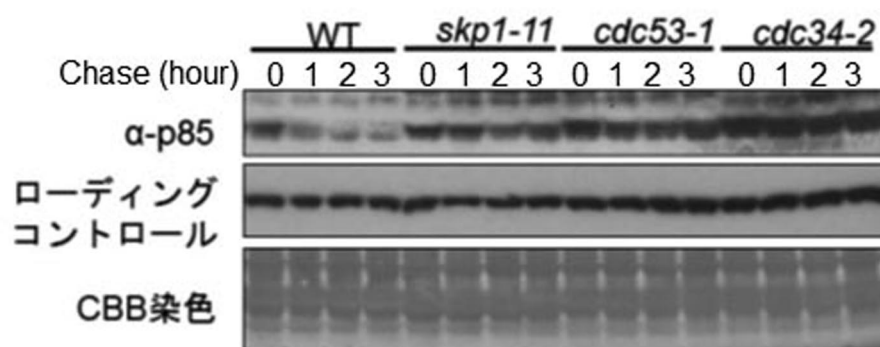
50 タンパク質分解による代謝制御機構の解明

中務 邦雄

ユビキチン・プロテアソーム系は特異的なタンパク質の分解系であり、細胞周期、癌、品質管理など、様々な細胞機能の制御に関わっている。興味深いことに、過去 5～10 年の間に、ユビキチン・プロテアソーム系が代謝経路の様々なステップを制御することが明らかになってきた。しかしながら、ユビキチン・プロテアソーム系による代謝制御の研究は散発的であり、これまでに系統的に調べられた例はなかった。代謝の新しい制御機構を明らかにできれば、ヒトでは疾患の予防と克服を目的とした医学分野への貢献が期待され、微生物では有用物質の生産を目指した代謝工学への貢献が期待される。本研究では、出芽酵母をモデルに、ユビキチン・プロテアソーム分解系によって制御される代謝酵素と、その分解に関わるユビキチンリガーゼを同定し、分解のメカニズムと生理的意義の解明を目的とした。

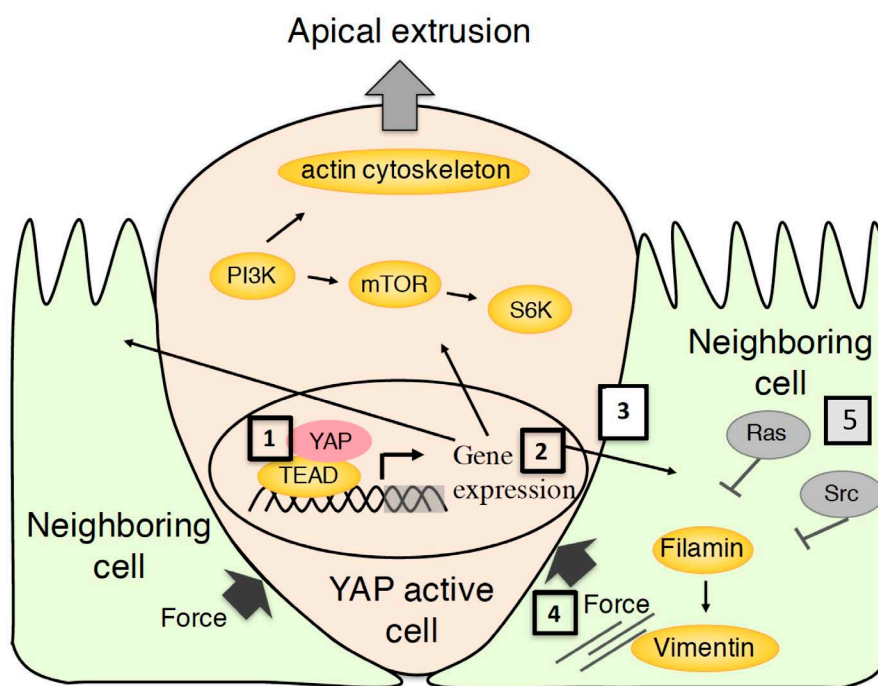
出芽酵母データベースから、「ユビキチン修飾」、「短寿命」、「高等動物との保存性」、「細胞内局在」などを指標に、分解制御を受ける可能性が高い代謝酵素を選び出した。次に、それぞれの代謝酵素に内在性のエピトープタグを付加して、シクロヘキシミドチェイス法によって安定性を実験的に検証することで、候補タンパク質を絞り込んだ。エピトープタグの付加は、細胞内のタンパク質を簡便に検出する手段ではあるが、タンパク質の安定性に影響を与えることがある。そこで最終確認として、特異的抗体（ウサギポリクローナル抗体）を網羅的に作製して、内在性タンパク質の安定性を調べた。本研究期間内に、p103、p85、p42、p43 の解析を行った。このうち、エピトープタグを付加していない内在性の p103 は予想に反して安定であることが明らかになったが、Cdc14 による脱リン酸化の制御を受けることが分かった。内在性の p85 は SCF ユビキチンリガーゼによる分解制御を受けることが明らかになった。また、p42 と p43 はほとんど分解されない安定なタンパク質であるにもかかわらず、ユビキチン修飾を受けることが明らかとなった。p42 と p43 は細胞内の存在量が多く機能も明らかなので、分解をとまなわないユビキチン修飾の役割を解析するうえで、有用なモデルタンパク質となることが期待された。

ユビキチン・プロテアソーム分解系によって制御される代謝酵素の探索



脊椎動物の体は複雑な三次元的（3D）形態をしており、組織や器官が正しく形作られ適切に配置されることにより初めて機能を発揮できる。こうした 3D 形態形成の場には物理的な力の制御が不可欠であるが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。これまでに著者らは、体全体が扁平化する hirame (hir) メダカ変異体を見出し、その原因遺伝子産物である転写共役因子 YAP が細胞張力の制御に関与することを報告した。そこで著者らは、YAP が制御する物理的力の探索と、YAP 依存的な物理的力を可視化可能なプローブの開発を研究目的とした。研究方法としては、正常細胞集団中の一部に活性化 YAP を発現する細胞をモザイク状に誘導可能な実験系を用いて、活性化 YAP 細胞の動態を追跡した。その結果、正常 MDCK 細胞中に誘導された活性化 YAP 発現細胞は隣接細胞集団から排除されることを見出した（図）。現在、これら物理的力の可視化に適切なプローブを検討している。以上の研究成果は、YAP はストレスセンサーとして機能し、障害細胞の排除を誘導し、組織や器官の恒常性維持の制御に関与することを示唆する。

YAP 活性化異常細胞が隣接する正常細胞から排除される機構

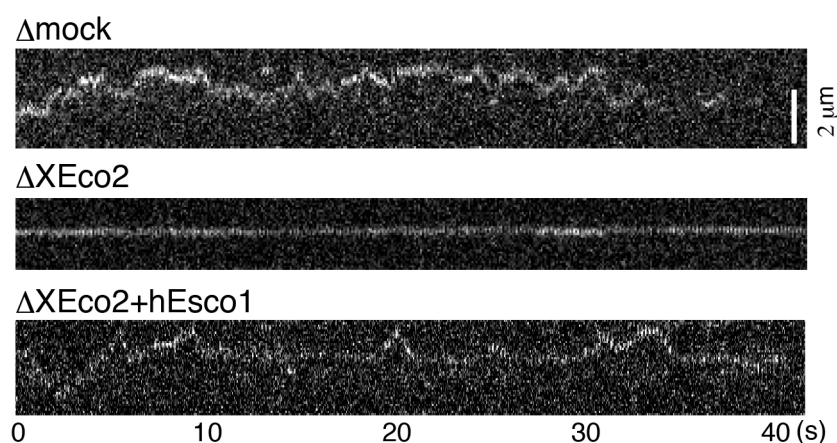


52 コヒーシン依存的な染色体機能制御機構の解析

西山 朋子

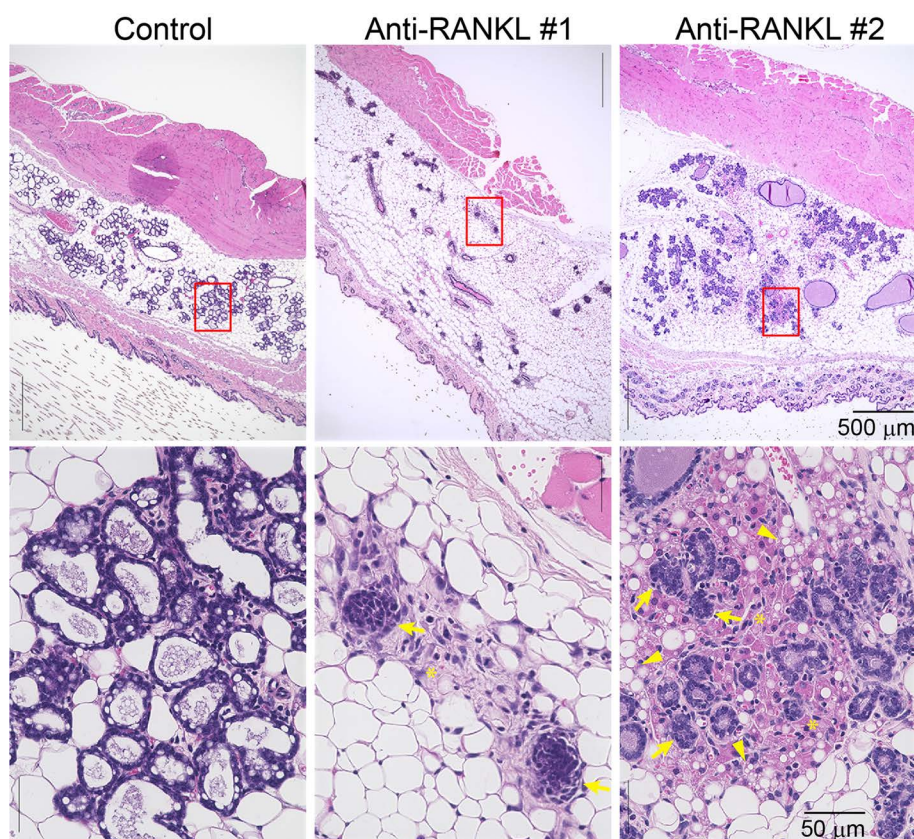
コヒーシンは姉妹染色分体間接着を担うリング状のタンパク質複合体で、真核生物においてゲノムの均等分配に不可欠な因子である。一方コヒーシンは、コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) をはじめとした遺伝性疾患 (「コヒーシン病」) の原因遺伝子としても複数の変異が同定されており、それらの変異は、四肢形成不全や精神発達遅延など多様な症状を伴う疾患の原因となることが知られている。CdLS は遺伝子発現制御の異常に起因することが示唆されているが、複雑なクロマチン環境中で、個々のコヒーシン動態に関する知見が欠如していることから、接着に必須であるコヒーシンがどのように遺伝子発現と関連し得るのか、その分子メカニズムの理解には至っていない。本研究ではコヒーシン複合体の DNA 上およびクロマチン上での一分子ダイナミクスを、複製や転写等の染色体機能ドメイン毎に解析することでコヒーシン動態に関する知見を集め、コヒーシン病発症のしくみを分子レベルで理解することを目指した。独自に開発した一分子観察系においてコヒーシンダイナミクスを観察した結果、コヒーシンリングは二本鎖 DNA を抱え込むようにして DNA に結合し、自由拡散運動を示すこと、またこの動きは ATP 加水分解活性やコヒーシン結合因子・修飾因子の影響を受けることが明らかになった。またコヒーシンはその Smc3 サブユニットのアセチル化に依存してクロマチン上を移動し、ヌクレオソームの形成はコヒーシンの運動に対して阻害的に働くことが明らかになった。

ツメガエル卵抽出液中で形成させたクロマチン上でのコヒーシンの運動を示すカイモグラフ
(コヒーシンアセチル化酵素 XEco2 はコヒーシンのクロマチン上での動きに必要である)



日本は世界に先駆けて超高齢社会を迎え、運動器の障害が QOL の低下や社会的・医療的負担の増大につながり、社会的問題となっている。骨粗鬆症は、加齢や閉経が原因となるもの（原発性）と、糖尿病や慢性腎臓病といった生活習慣病、関節リウマチなどの自己免疫疾患に付随するものや、疾患治療に用いたステロイド薬によっておこる続発性骨粗鬆症に大きく分けられる。高齢者に多いパーキンソン病では運動能の低下、すなわち不動により骨量が減少するという報告があるが詳細は不明であった。神経毒の一つである 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の投与によってパーキンソンモデルマウスを作製し、中枢神経障害と骨代謝の関連について検討している。また、近年、骨量減少を予防・治療する抗体薬として、破骨細胞の分化促進因子 RANKL に対する抗体が臨床応用されているが、抗体が完全ヒト型であり、げっ歯類に交差しないため、臨床前動物実験で得られた知見はすくなく、妊婦への使用は禁忌とされている。抗 RANKL 抗体が妊娠中の母体と胎児の骨や全身に及ぼす影響を解析した結果、仔の骨量増加だけでなく、母体側の乳腺が未発達になりそのため新生児への授乳が障害される、さらには育児行動の異常なども引き起こし、仔は出生後生存不能になることを明らかにした。

交配7日後の妊娠マウスに抗 RANKL 抗体を投与した母マウス
(Anti-RANKL #1 および Anti-RANKL #2) の出産直後の乳腺

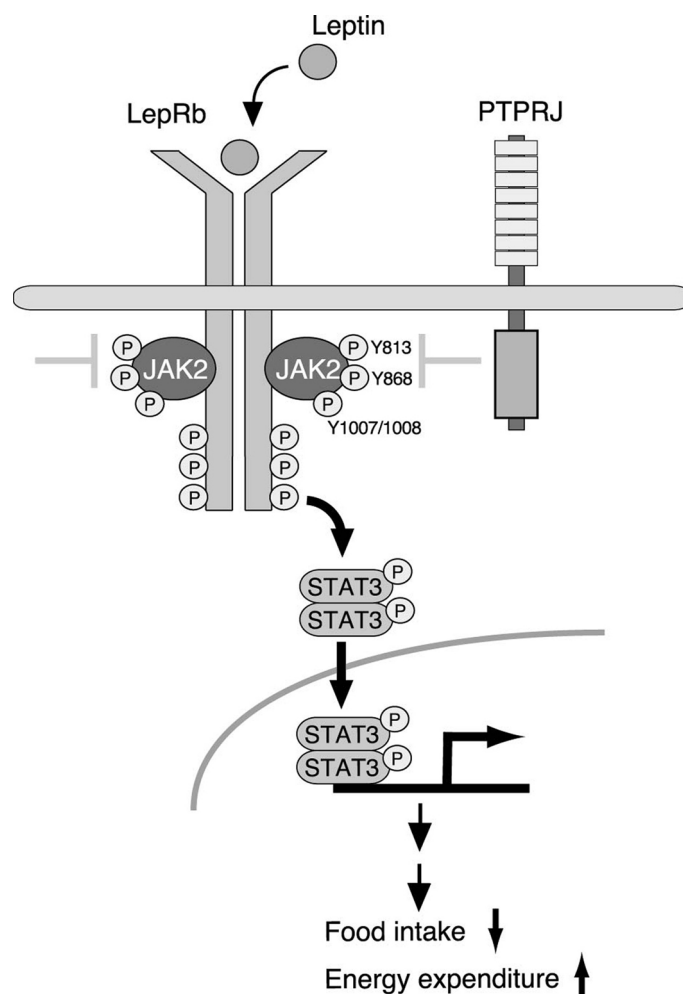


54 Ptprij による摂食・エネルギー代謝制御機構の解明

野田 昌晴

レプチンは脂肪細胞から分泌され、視床下部の摂食中枢に働いて強力に摂食を抑制するペプチドホルモンである。レプチン受容体は、その細胞内領域にプロテインチロシンキナーゼである JAK2 を結合しており、タンパク質のチロシンリン酸化を介した情報伝達を行う。本研究においては、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTP) の一つである Ptprij による、レプチン受容体の活性制御機構について解析を行った。Ptprij 欠損マウスは、野生型マウスに比べて、摂食量が少なく低体重であった。また、Ptprij は摂食中枢である視床下部内の弓状核において高発現することが明らかになった。さらに生化学的解析から、Ptprij は JAK2 の特定のリン酸化チロシン残基を脱リン酸化し、レプチン受容体の活性化に対して抑制的に働いていることが判明した。Ptprij 遺伝子欠損マウスの脳室内にレプチンを投与すると、予測通り野生型マウスに比べて摂食量及び体重が有意に減少するとともに、レプチン受容体の下流の情報伝達分子である STAT3 の活性化の亢進が観察された。このように、Ptprij はレプチン受容体と複合体を形成している JAK2 を基質とし、これを脱リン酸化することによって、レプチンシグナルを負に制御していることがわかった。

Ptprij によるレプチンシグナル抑制機構

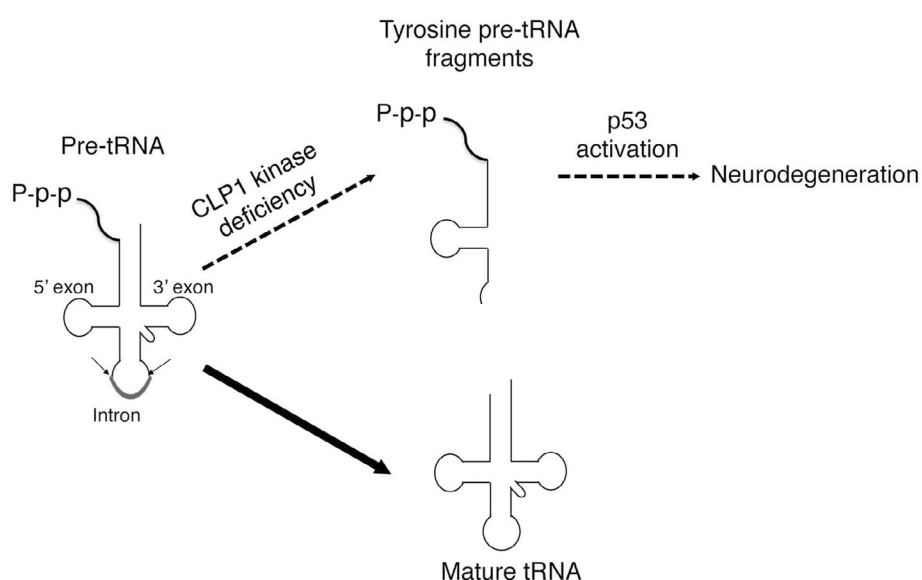


55 RNA キナーゼの分子機構と生体内における役割

花田 俊勝

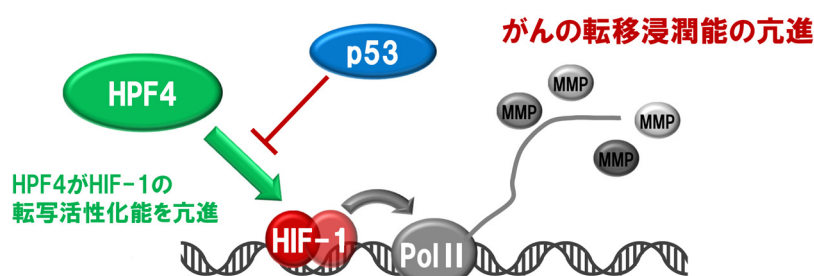
最近、我々は 2007 年に哺乳類で初めて発見された RNA キナーゼ分子 CLP1 が橋小脳低形成 10 型の原因遺伝子であることを報告した。その病態メカニズムとして tRNA 前駆体から生じる RNA 断片の細胞内蓄積が、神経の酸化ストレスに対する脆弱性を高めることを見出した。しかしながらその病態分子機構の詳細は今のところ明らかとなっていない。本研究では、現段階で疾患との関連性が示唆されている RNA 断片 3 種のうち、実際に神経細胞死を惹起するものを特定し、さらにその分子機能について *in vivo* モデルを用いて検証を行った。まずヒト神経細胞株に各 RNA 断片を導入したところ、tyrosine tRNA 前駆体の 5' 側より生じる RNA 断片が有意に酸化ストレスに対する p53 の活性化増強と細胞死を誘導した。また、この RNA 断片による神経細胞死の分子機構について、生化学的手法によりこの RNA 断片と結合するタンパク質の探索を行ったところ、有意に結合するタンパク質の存在が示唆された。

CLP1 のキナーゼ活性喪失による tRNA 断片の細胞内蓄積



悪性固形腫瘍の内部には、血管から十分な酸素が供給されない低酸素環境が存在する。低酸素環境に曝されたがん細胞は、HIF-1 を活性化し、低酸素環境への適応（糖代謝のリプログラミング）、低酸素環境の改善（血管新生）、低酸素環境からの回避（転移・浸潤）といった悪性形質を獲得する。がんの悪性進展を制御するためには、HIF-1 を中心とする遺伝子ネットワークが活性化するメカニズムを解明することが肝要である。このような状況下で我々は、独自に確立した遺伝学的スクリーニング法によって新規の HIF-1 活性化因子を同定することに成功した（HIF-1-Promoting Factor 4: HPF4）。本プロジェクトで我々は、HPF4 が HIF-1 を活性化する機序、HPF4-HIF-1 経路ががんの悪性形質に及ぼす影響、HPF4 の腫瘍内発現量と予後不良の相関を解析した。分子細胞生物学的な研究を通じて、HPF4 が HIF-1 の主要制御サブユニット HIF-1 α の発現には影響を及ぼさず、転写活性化能を亢進することが明らかになった。また、HPF4-HIF-1 経路の活性化によって、一連のマトリックスメタロプロテアーゼの発現が誘導され、がん細胞の浸潤能が亢進することが確認された。興味深いことに、HPF4 の HIF-1 への作用はがん抑制遺伝子 p53 によって抑制された。最後に、ヒト肺がんにおける HPF4 の発現レベルが高いほど、患者の生命予後が不良であることを見出した。以上の結果から、がん抑制遺伝子 p53 の機能が失われた時に HPF4 が HIF-1 を活性化できるようになる、がん細胞が悪性進展するというメカニズムの存在が示唆された。

HPF4・HIF-1・p53 の機能的相互作用



57 シヌクレイン変異によるパーキンソン病の分子機構解明

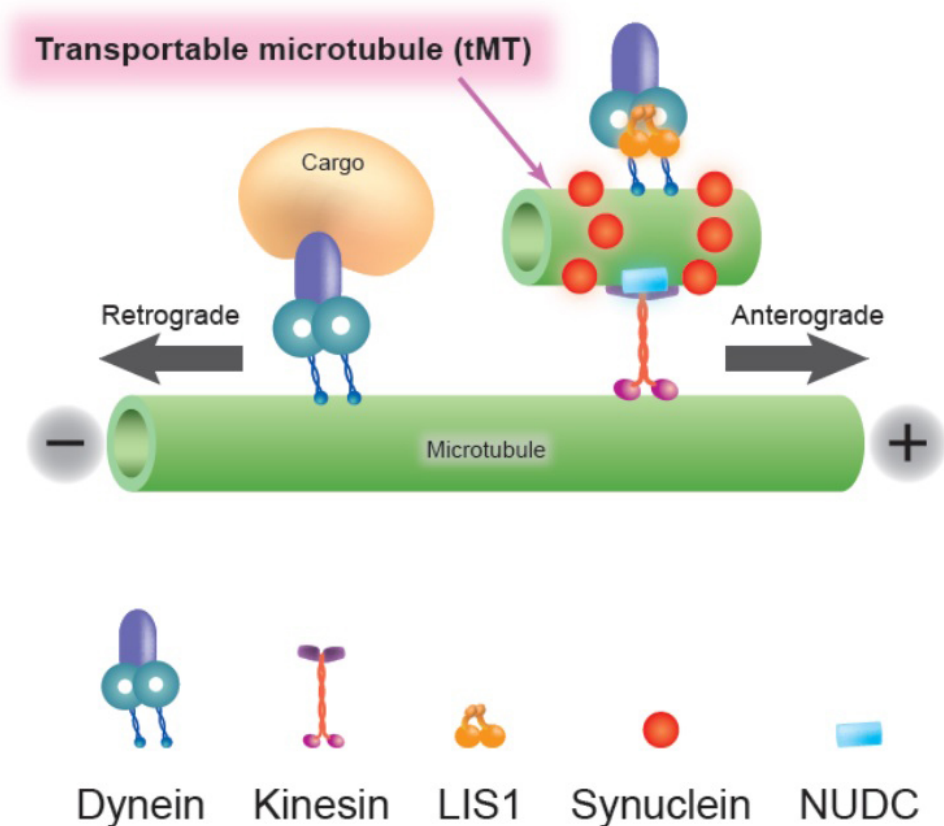
広常 真治

【目的】 アルファシヌクレインは家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるが、アルファシヌクレインの変異がどのように神経変性をきたすかは不明である。本研究計画ではアルファシヌクレインの生理的機能を解明し、アルファシヌクレイン変異によるパーキンソン病発症の病態生理を解明することを目的とする。

【方法】 後根神経節細胞におけるアルファシヌクレインの動態をライブセルイメージングで解析する。さらにアルファシヌクレインが微小管と結合する様式を電子顕微鏡、クライオ電子顕微鏡で解明する。さらにアルファシヌクレインの結合した微小管の特殊性を免疫電子顕微鏡解析、超解像顕微鏡（PALM）で明らかにする。

【結果】 ライブセルイメージングの解析からアルファシヌクレインは後根神経節細胞で、細胞質ダイニンと複合体を形成する形で移動することが分かった。さらに、電子顕微鏡解析の結果から、アルファシヌクレインは微小管とネックレス様に結合することが分かった。最後にアルファシヌクレインの結合した微小管はプロトフィラメント 14 の特殊な微小管であり、我々はこれを非定型微小管と名づけ、生体内において特殊な微小管が存在することを証明した。

非定型微小管の模式図



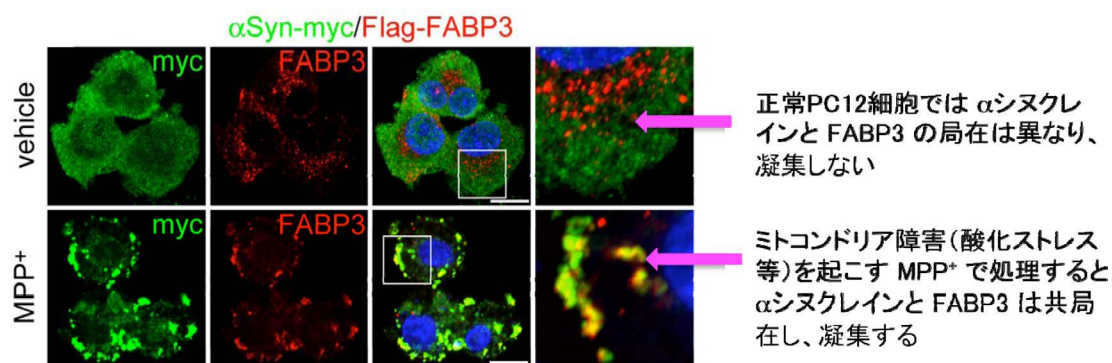
58 神経変性疾患における FABP3 の機能解明と治療薬の開発

福永 浩司

脂肪酸結合蛋白質 (FABP) はアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸の細胞内輸送に関わる。脳内では3種の FABP (FABP3、FABP5、FABP7) が発現している。FABP3 は主に神経細胞に、FABP5 と FABP7 はグリア細胞に発現する。*FABP3*、*FABP5*、*FABP7* 遺伝子の変異が統合失調症や自閉症など精神疾患発症に関わるという報告がある。しかし、神経変性疾患における FABP3 の機能は不明である。私達は FABP3 がパーキンソン病の原因となる細胞内封入体を形成する α シヌクレインと結合すること、両者を神経細胞に共発現すると凝集体を形成することを見いだした (J Biol Chem 2014)。本研究ではパーキンソン病における FABP3 の機能的役割を解明し、FABP3 の標的とする治療薬の探索を行った。

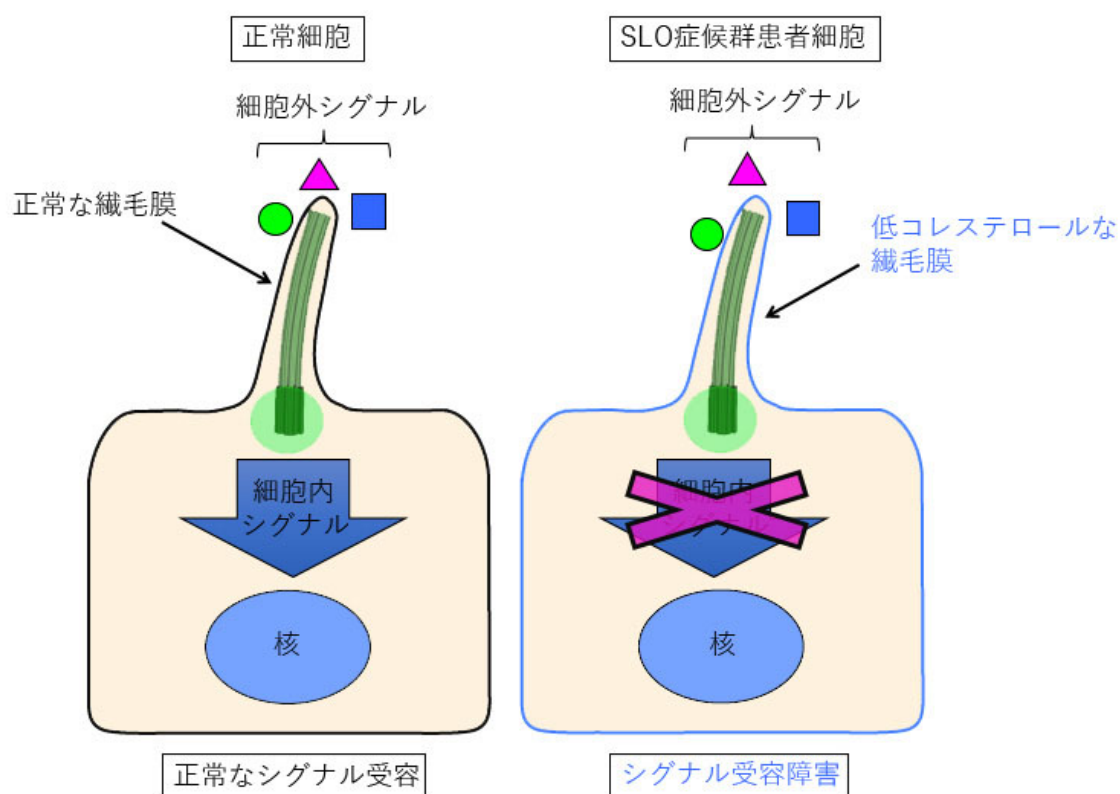
パーキンソン病を発現する神経毒である 1-Methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を *FABP3* 欠損マウスに投与しても、パーキンソン病様症状は見られない。すなわち、酸化ストレス障害によって誘発される α シヌクレイン細胞内蓄積は *FABP3* 欠損マウスの黒質ドパミン神経では見られない。つぎに、FABP3 に特異的に結合する FABP3 リガンドを開発し、凝集への効果を検討した。パーキンソン病モデル細胞および動物において、 α シヌクレイン細胞での発現と凝集を抑制することを確認できた。従って FABP3 リガンドはパーキンソン病の疾患修飾治療薬となる可能性を示すことができた。

パーキンソン病モデル細胞における FABP3 による α シヌクレインの凝集促進
(PC12 細胞に myc- α シヌクレインと Flag-FABP3 を過剰発現した)



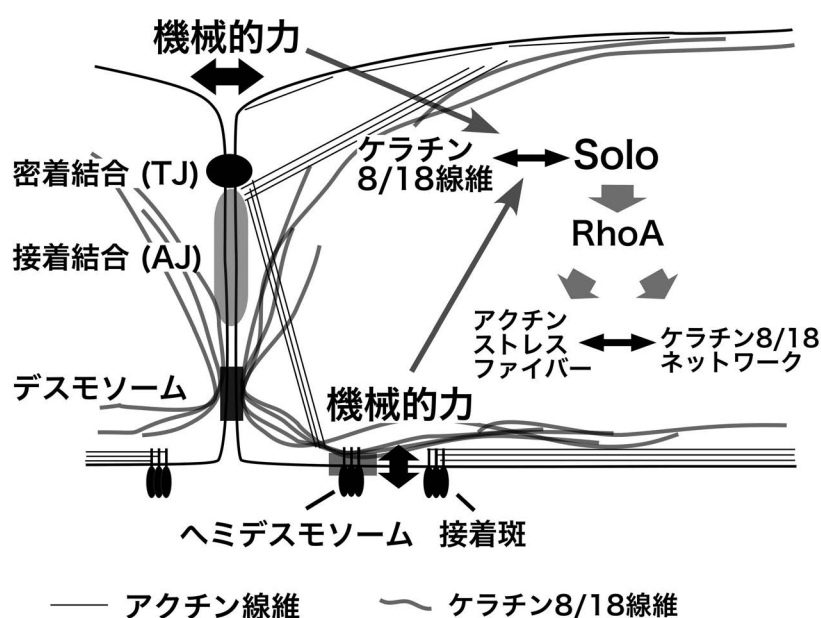
一次纖毛は、静止期の細胞表面に1本の毛様に発達する微小管性の突起構造であり、細胞増殖や細胞分化を担う細胞外シグナルのセンサーとして、個体発生や組織幹細胞の維持などを司る細胞小器官である。コレステロール生合成の最終段階を担う7-デヒドロコレステロール還元酵素をコードする *DHCR7* 遺伝子の変異によって発症する Smith-Lemli-Opitz (SLO) 症候群は、コレステロール欠乏による性腺発達不全を示すだけでなく、纖毛病を特徴づける多発性腎嚢胞や軸後性多指症を合併する。これらの臨床所見から SLO 症候群が纖毛病の一つであることの着想を得て、本研究では纖毛構造および機能におけるコレステロールの役割を解明することを研究目的として SLO 症候群患者細胞の細胞生物学解析を行った。コレステロールは纖毛形成には必須でないが、纖毛関連シグナルの Sonic Hedgehog (Shh) シグナルの活性化に必要な Smoothed 受容体の纖毛局在に必須であることが示された。SLO 症候群患者細胞は、Shh シグナル応答性が著しく低下しているため、Shh シグナルに依存した発生形態異常が合併することが示唆された。

Smith-Lemli-Opitz (SLO) 症候群における纖毛シグナル伝達不全



力学的刺激（メカニカルストレス）に対する細胞応答は生体の恒常性維持や組織形成において重要な役割を担っているが、細胞の力覚応答の分子機構の多くは不明である。以前の研究から、力学的刺激によって細胞内アクチン骨格の動態が変化すること、この変化には Rho ファミリーが関与していることが知られてきた。私達は最近、細胞の力覚応答に関与する RhoA 活性化因子（RhoA-GEF）として Solo を同定した。本研究では、Solo の力学的刺激依存的な活性化機構を解明するとともに、細胞の集団移動や管腔形成における Solo の機能を解明することを目的として研究を行った。その結果、Solo はケラチン 8/18 繊維と複数箇所では結合すること、張力刺激依存的な RhoA の活性化やストレスファイバーの形成・強化には Solo とケラチン 8/18 繊維の両者の結合が重要であることを明らかにした。さらに、Solo やケラチン繊維の発現抑制実験によって、上皮細胞の集団移動や 3 次元培養下での管腔形成においても Solo とケラチン繊維が関与していることが強く示唆された。

細胞の力覚応答における Solo とケラチン繊維の機能



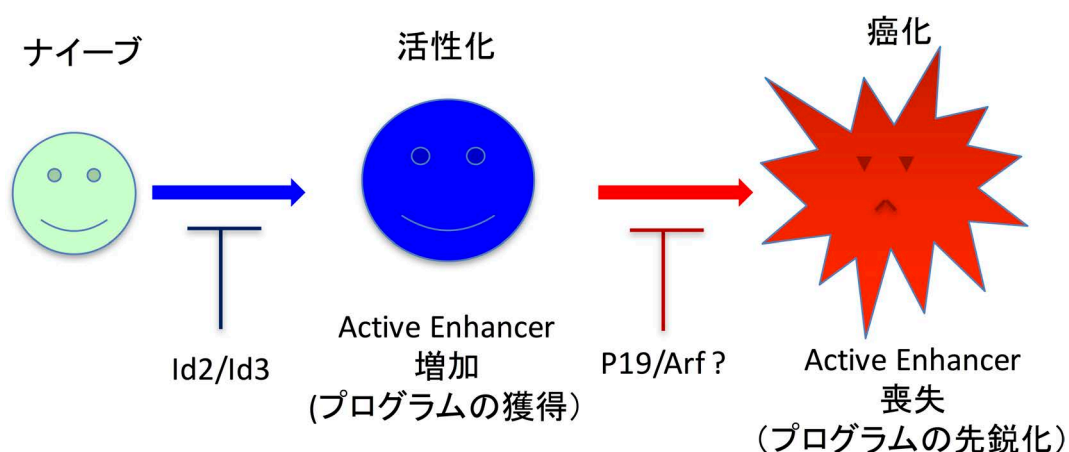
61 E-Id 転写因子による遺伝子発現プログラム発動の解明

宮崎 正輝

細胞分化・活性化の過程において、その分化系列、または活性化に特異的な転写因子は、新たな遺伝子発現プログラムを発動し、同時に他の系列へのプログラムを抑制することで細胞の運命を適正に制御すると考えられている。この制御の破綻は、分化異常、活性化異常や細胞の癌化などを引き起こすと考えられる。しかしながら、この過程で一体何が起きているのか、その分子機構は未だ明らかでない。転写制御因子である Id 因子は、T 細胞の分化・活性化を制御する重要な転写制御の軸であることをこれまで報告してきた。特に Id2/Id3 の欠損マウスでは、T 細胞の異常な活性化、濾胞性ヘルパー T 細胞への分化誘導が認められ、さらに高齢マウスでは、高率に T 細胞性リンパ腫の発生を認めた。特に我々が注目したのは、このマウスモデルを解析することで“異常に活性化した T 細胞”から“悪性リンパ腫細胞”への進展が観察できることである。この活性化から癌化へのプロセスの分子機構を解明するため、RNA-seq/ChIP-seq/ATAC-seq などの分子生物学実験を行った。結果、活性化 T 細胞では遺伝子発現プロファイルの大きな変化があり、アクティブエンハンサーレパトア (Regulome) の変化を認めた。一方、リンパ腫になると逆にアクティブエンハンサーの絶対数が明らかな減少を認めた。このことは、活性化から癌化に至る過程は、新たなプログラムを獲得するのではなく、より先鋭化したプログラムだけを発動しているとも言える。

さらにマウス遺伝学的解析から、リンパ腫発生抑制は、Ink4a-Arf の発現に依存していることが明らかとなった。現在、さらなる詳細な解析を進めている。

T 細胞の活性化とリンパ腫発生のまとめ



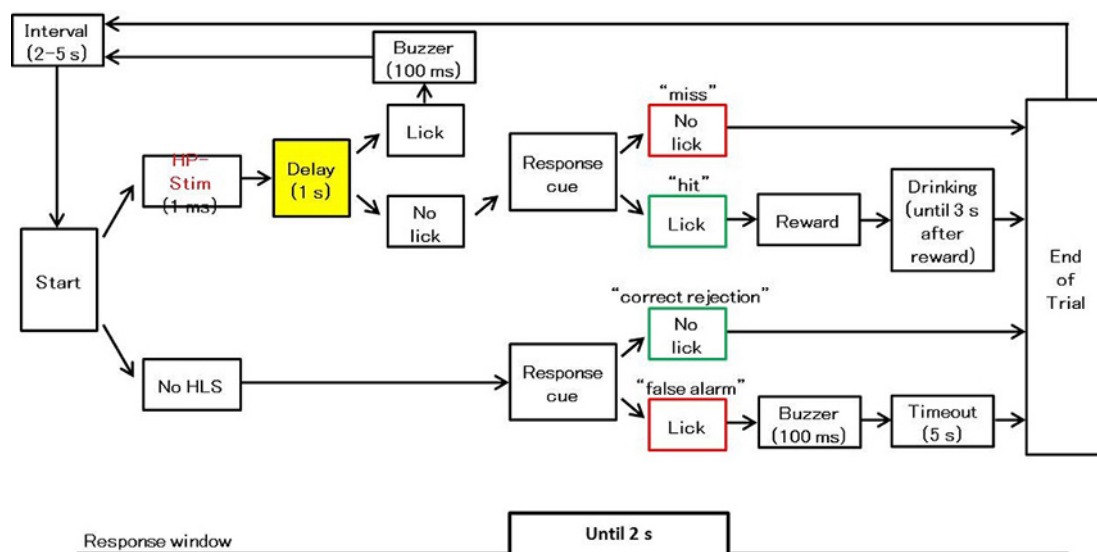
63 知覚に伴う皮質樹状突起活動の役割

村山 正宜

近年、皮質における5層錐体細胞の樹状突起が示す樹状突起スパイクが動物の知覚行動に関連する事が示されてきた。しかし、知覚行動時の詳細な樹状突起活動、樹状突起スパイクと知覚との因果関係は不明のままである。本研究ではこれら疑問点の解明に向けて、多様な生理学的手法が適用可能な行動課題の構築を目指した。2光子顕微鏡を用いた樹状突起 Ca^{2+} イメージング法を視野に入れ、マウスの頭部固定下で、マウス後肢への電気刺激を用いた弁別課題 (Go/No-go 課題) を行った。第一体性感覚野からマルチユニット記録を行った場合、脚刺激直後にリック行動 (報酬獲得行動) に関連した神経応答が記録された。この課題では、肢刺激からリック行動開始までの間に、静止状態をマウスに取らせる遅延時間を付加していなかったため、記録された神経活動に知覚関連以外の応答も混在してしまったと考える。そこで、脚刺激からリック行動開始まで、1秒間の遅延時間を付加した行動課題を構築した (下図)。その結果、9/10匹のマウスが所定の条件を満たし、学習が成立した。今後はこの行動課題中のマウスの脳から樹状突起活動を記録し、行動と神経活動との因果関係を明らかにしていく予定である。

遅延入り後脚刺激弁別課題

構築済みの後脚電気刺激を用いた弁別課題を改良した遅延入りの弁別課題。後脚刺激 (HP-Stim) 直後に遅延 (Delay) を入れて、遅延の間にリックしたら試行をキャンセルし、リックをしなかったら行動を提示するための音による合図 (Response Cue) が与えられる。



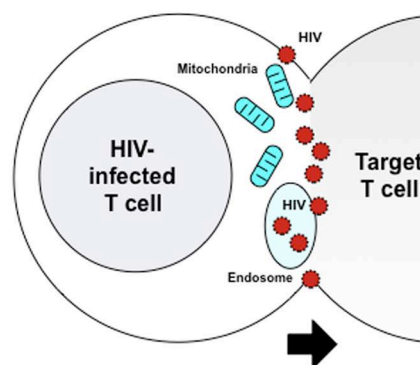
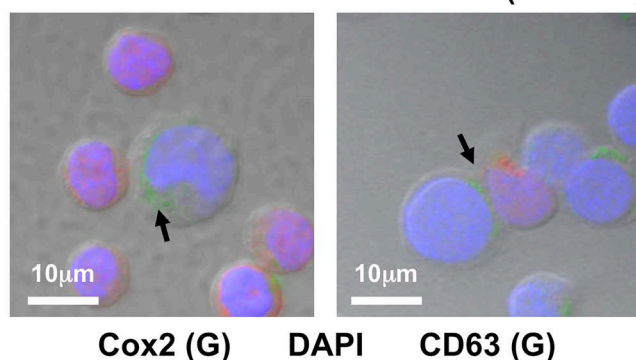
64 感染シナプスによる HIV 伝播：免疫シナプスの略奪利用

森川 裕子

HIV (human immunodeficiency virus) の感染 T 細胞や樹状細胞は、標的細胞と「感染シナプス」と呼ばれる免疫シナプス類似の細胞間接着構造を形成して、極めて効率良く標的細胞に HIV を伝播する。HIV は感染細胞の「感染シナプス」接着面から放出され、標的細胞の接着面に HIV 受容体 CD4 が集積することが報告されている。本研究では、HIV の感染シナプスを介した細胞間伝播機構を解明する目的で、HIV 感染細胞と標的細胞を共培養し、感染シナプス形成による細胞リモデリングを解析した。共焦点顕微鏡解析したところ、HIV 感染シナプスの接着面には HIV タンパク質と受容体 CD4 が集積するとともに、SMAC (supramolecular activation complex) 分子である Lck、CD28 の集積が認められた。接着分子インテグリン (LFA1-ICAM1) も観察された。また、接着部位側の細胞質にエンドソーム (CD63 分子) とミトコンドリア (Cox2 分子) の局在が認められた。エンドソーム分子 (Rab7 や Rab9) をノックダウンすると、HIV 放出とシナプス部位における HIV タンパク質の局在が減少した。

感染シナプスにおける細胞内小器官の局在

Coculture : Inf JKT + Uninf JKT (CMTMR)



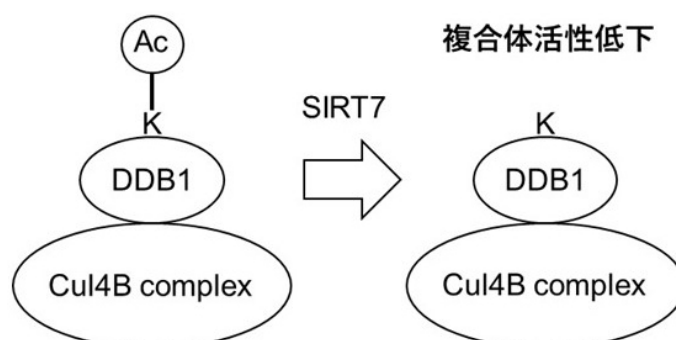
65 サーチュイン (SIRT7) による代謝制御機構の解明

山縣 和也

サーチュインは NAD 依存性脱アセチル化酵素であり、翻訳後修飾の制御を介して代謝、ストレス応答、老化、発がんなど種々の生命現象に深く関与することが報告されている。哺乳類では 7 種類のサーチュイン (SIRT1-SIRT7) の存在が知られているが、SIRT7 の代謝作用は不明であった。我々は SIRT7 のノックアウト (KO) マウスを用いて SIRT7 の働きについて検討を行った。その結果、*Sirt7* KO マウスにおいては高脂肪食により惹起される脂肪肝・肥満・糖尿病などの代謝異常がコントロールに比して軽度であることが判明した。また SIRT7 は Cul4B E3 ユビキチン複合体の活性を抑制することで脂質蓄積作用を持つ転写因子 TR4 の発現を増加させることで肝臓内脂質蓄積を制御していること、褐色脂肪組織 (BAT) の活性を制御することでエネルギー代謝を調節していることが明らかになった。

本研究において SIRT7 結合タンパク質の検索を行ったところ Cul4B E3 ユビキチン複合体の構成分子である DDB1 が SIRT7 に結合することが判明した。さらに SIRT7 は DDB1 を脱アセチル化する作用を有することが判明したことから、DDB1 のアセチル化状態が Cul4B E3 ユビキチン複合体の活性を制御している可能性が考えられた (Karim MF, BBRC 2017)。また、脂肪細胞特異的 *Sirt7* KO マウスを作製したところ、全身性の KO マウスと同様な熱産生の亢進が認められたことから、BAT 自身の SIRT7 が熱産生・エネルギー代謝制御に重要であることが明らかになった。

SIRT7 は DDB1 を脱アセチル化することで Cul4B 複合体の活性を低下させ、肝における脂質蓄積を制御する

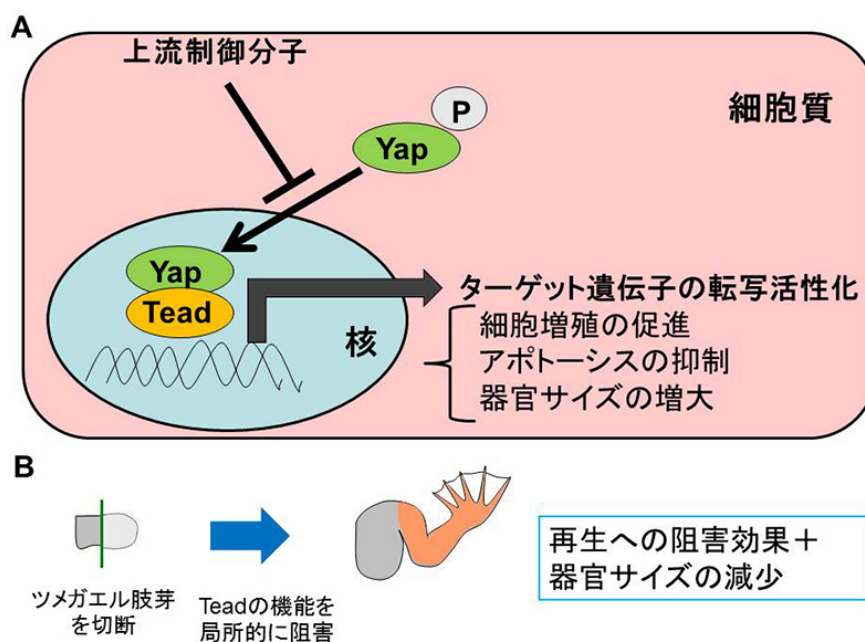


66 器官再生における Hippo シグナル経路の重要性の解明

横山 仁

Hippo シグナル経路は器官のサイズ調節への関与から近年注目を集めている。この経路の下流では転写因子の Tead とコアクチベーターの Yap が働いており、これら分子が核に局在してターゲット遺伝子の転写を活性化すると細胞増殖を促進し、器官サイズを増大させる方向に働く (図 A)。本研究ではアフリカツメガエルの四肢再生を対象に Tead に着目してその機能を四肢特異的に阻害した。これまでの研究では全身で Tead の機能を阻害した際にツメガエルの四肢や尾の再生が阻害されることを示してきたが、四肢のみで機能を阻害する実験は行われてこなかった。本研究では熱ショック依存的な発現誘導系を用い、金属プローブの温度を制御できる温冷負荷装置を利用した局所的な熱ショックにより四肢のみでの遺伝子発現の誘導を実現した。四肢の再生そのものと、再生される四肢のサイズ調節に対する Tead の直接の機能を検証するために、ツメガエルの幼生において四肢 (肢芽) を切断してその領域のみでドミナントネガティブ型の Tead を発現させた。その結果、切断直後に Tead の機能を阻害すると四肢再生がほぼ完全に阻害されるのに対して、やや再生が進行してから Tead を阻害すると再生される四肢で特定の骨格要素のサイズが減少することが明らかになった (図 B)。

Hippo シグナル経路と本研究の概略



67 Sirt7 による血管病変制御機構の解明

泉家 康宏

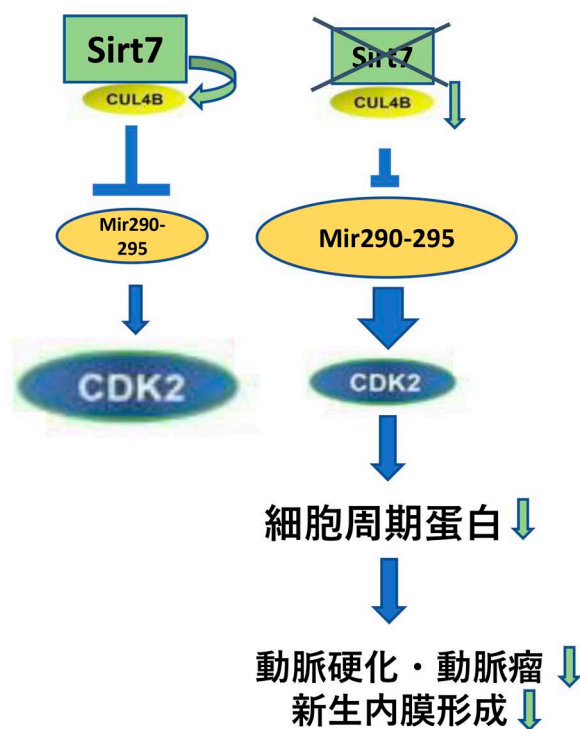
【目的】我々はサーチュインのひとつである Sirt7 が心筋梗塞後の創傷治癒において重要な分子であることを報告してきた。しかしながらこれまで Sirt7 の血管疾患における役割は全く検討されていない。今回 Sirt7 の血管病変形成における役割を検討し、その分子機序解明を行った。

【方法】*Sirt7* ノックアウト (*Sirt7* KO) マウスと野生型 (WT) マウスに対し、動脈硬化モデル、腹部大動脈瘤モデル、大腿動脈ワイヤー障害モデルを作製し病変形成の程度を検討した。また WT マウスと *Sirt7* KO マウスから初代培養平滑筋細胞を採取し、増殖刺激後の細胞応答を比較検討し、さらにその分子機序の解明を行った。

【結果】高脂肪食負荷後の動脈硬化巣は *ApoE* KO マウスと比較して *Sirt7* と *ApoE* のダブルノックアウト (DKO) マウスで有意に減少していた。腹部大動脈瘤モデルにおいても同様に、動脈瘤の直径と病変部の炎症性サイトカインの発現は DKO マウスで有意に減少した。ワイヤー障害後の内膜/中膜比は *Sirt7* KO マウスで有意に小さく新生内膜の形成の抑制が認められた。血清刺激による細胞増殖、遊走は *Sirt7* KO マウス由来の平滑筋細胞で有意に減弱した。*Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞では CDK2 や CyclinA/E などの細胞周期制御タンパクの発現が著明に減弱していた。CDK2 を負に制御する miRNA290-295 の発現は *Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞で発現が有意に上昇していた。

【結論】Sirt7 は細胞周期調節因子を介して血管平滑筋の機能を制御することにより、血管障害後の病変形成に寄与することが明らかになった。Sirt7 の発現制御が加齢に伴う血管疾患の新規治療手段となりうる可能性が示唆された。

Sirt7 は細胞周期調節因子を介して血管平滑筋の機能を制御することにより、血管障害後の病変形成に寄与する



68 老年病の新規ホルモン作用標的の解明とその臨床応用

井上 聡

【目的】女性ホルモンであるエストロゲンは、老化と老年病と関連する。本研究では、とくに病態としてはサルコペニアと関連し、エストロゲンの筋量や筋力の維持作用と、運動能力への作用に着目し、そのメカニズムの解明を目指した。具体的には、卵巣除去マウスを用いてエストロゲンが運動持続能や骨格筋に果たす役割を検討し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】C57BL/6 マウスの卵巣を摘出 (OVX) して、ホルモン枯渇状態のマウスを作製し、コントロール群では偽手術 (Sham) を行った。OVX ならびに Sham を施行したマウスに Corn oil を Vehicle として投与した ① Sham + Vehicle 群と、② OVX + Vehicle 群、③ OVX + Estradiol benzoate (E) 群 の 3 群に分け、2 週間おきにトレッドミル走行実験による運動能の評価を行った。試験終了後に骨格筋などの各種組織を採取し、標的メカニズムの検討を行った。

【結果】術後 10 週において OVX + Vehicle 群は Sham + Vehicle 群と比較して走行持続時間が短縮し、OVX + E 群は走行時間の回復を認めた。筋肉組織のマイクロアレイによる遺伝子発現解析と機能解析によってミトコンドリア関連遺伝子 *Ucp3* がエストロゲン作用を媒介することが示された。

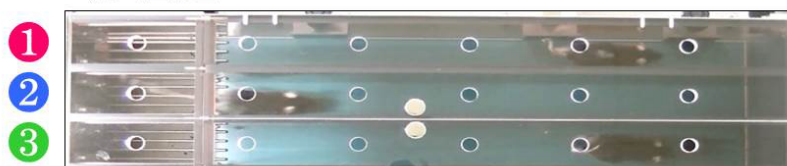
【考察】エストロゲンは骨格筋の遺伝子プロファイルを制御し、ミトコンドリア関連遺伝子を制御することによりマウス個体レベルの運動持続能に関与することが示唆された。この作用機序を、サルコペニアの治療への応用を目指して今後の検討を進めていく。

Treadmill を用いた運動持続試験により明らかにされたエストロゲンの筋作用

エストロゲンはマウス運動持続能の維持に関わる

トレッドミル走行実験

30分経過



雌C57BL/6J マウスを、① 偽手術 (Sham) + Vehicle 投与群、② 卵巣摘出 (OVX) + Vehicle 投与群、③ 卵巣摘出 (OVX) + Estradiol benzoate (E) 投与群 の 3 群に分け、Treadmillにて運動持続能を検討した。

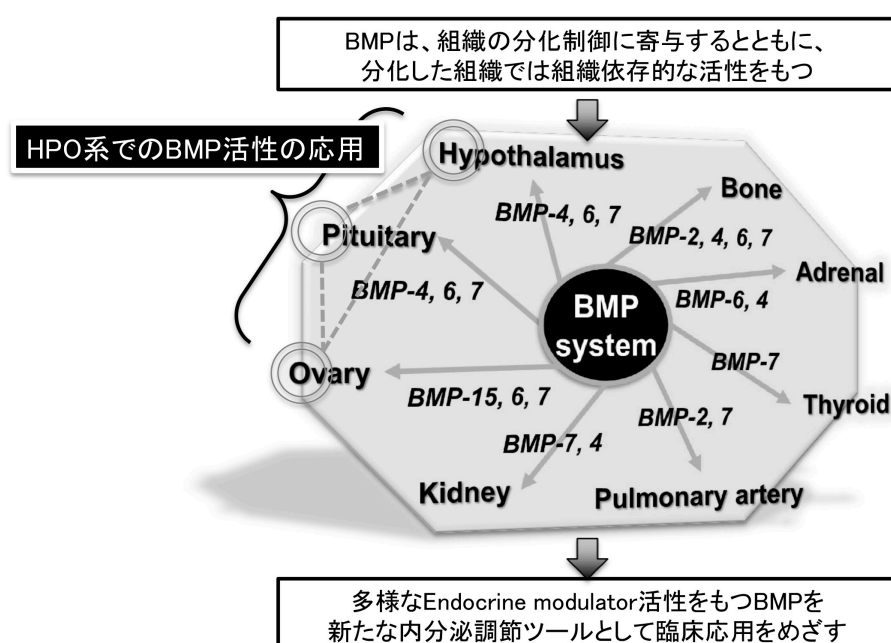
我が国を含む先進国では動脈硬化性疾患をはじめとする心血管病の病態解明と有効な治療法の確立は最重要課題である。肥満、特に内臓脂肪の過剰蓄積が動脈硬化性疾患の重要な発症基盤であることが知られているが、詳細な分子機序は解明されていない。脂肪組織は「アディポサイトカイン」を分泌する内分泌臓器であり、肥満に伴うアディポサイトカインの調節異常が心血管病の病態として重要であることが明らかとなってきた。私たちは、ヒト内臓脂肪に高発現しているオメンチンに着目し、血中オメンチン濃度が動脈硬化性疾患患者において有意に低下していることを明らかにした。本研究では、オメンチンの動脈硬化に及ぼす影響とその分子機序について検討した。動脈硬化モデルであるアポリポ蛋白 E (ApoE) 欠損マウスと脂肪組織オメンチン過剰発現マウスを交配して ApoE 欠損マウスにオメンチンを過剰発現させると、動脈硬化巣形成は有意に抑制され、動脈壁でのマクロファージの集積と炎症性サイトカイン発現の抑制を伴っていた。培養系の検討では、オメンチンはヒトマクロファージにおける脂肪蓄積を抑制し、炎症性サイトカインの発現も抑制していた。以上より、オメンチンはマクロファージにおいて泡沫化や炎症反応を抑制することにより動脈硬化進展に防御的に作用すると考えられた。従って、オメンチンは動脈硬化性疾患の病態解明や治療法の開発につながる標的分子になりうると考えられた。

オメンチンによる動脈硬化防御作用



我々は、骨形成や骨分化誘導を来す蛋白として発見された BMP 分子が、卵胞細胞間ネットワークを形成し、多彩な内分泌機能を調節することを明らかにしてきた。本研究では、BMP 活性から新たな創薬や診断法への応用として、卵発育の促進など生殖補助療法、閉経を制御する骨粗鬆症や更年期の治療、間脳下垂体障害の指標への応用展開を目指して、その基盤となるべき研究を遂行した。種々の卵巣顆粒膜細胞、下垂体前葉細胞、副腎皮質細胞、副腎髄質細胞および未分化間葉系細胞などを用いて、アンドロゲン・メラトニン・メトホルミン・オレキシンなどの生理活性物質と BMP シグナルとのユニークな機能的リンクを見出し、卵巣・下垂体・骨・副腎における新たな BMP の作用機転を明らかにした。

内分泌調整因子としての BMP 研究の展開



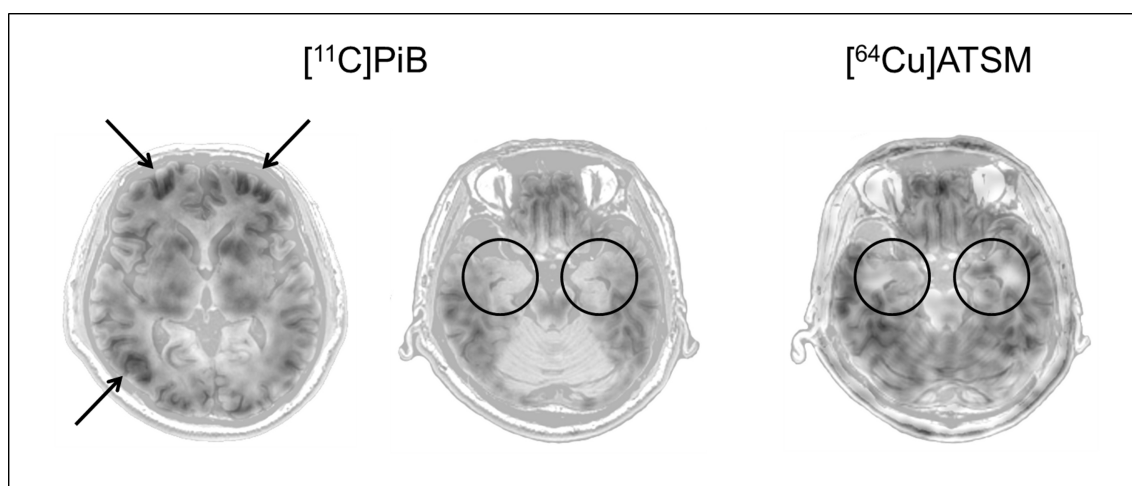
71 酸化ストレス・イメージングの認知症診断への応用

岡沢 秀彦

ミトコンドリア変性による酸化ストレスは、神経変性の原因の一つと考えられている。本研究では、酸化ストレス・イメージングを認知症の早期診断に応用し、認知症の病期に応じた最適な治療を選択するための非侵襲的診断法の開発を目指した。対象は認知機能低下を主訴として神経内科もしくは精神神経科を受診した患者 20 名および健常ボランティア 6 名である。いずれの被験者も認知機能を計測した後、 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ PET/MRI によるアミロイドイメージングを行い、集積の有無により病型を確認した。さらに酸化ストレス・イメージングを患者に施行するため、毒性試験等の基礎検討を経て、 $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ PET/MRI 検査を倫理審査委員会に諮り、承認された。 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ PET/MRI で前頭葉や頭頂葉に集積を認めた早期アルツハイマー病 (AD) 患者および健常ボランティアに対して $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ PET/MRI を施行し、比較的特徴的と思われる海馬の酸化ストレス亢進が AD 患者で認められた。まだ症例数が少ないものの、 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ 集積をあまり認めない海馬において、酸化ストレスが亢進している可能性が示唆され、今後の病態解明に繋がる結果と考えられた。

早期アルツハイマー型認知症患者のアミロイド画像と酸化ストレス画像

$[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ の皮質集積は有意なアミロイド沈着を示すが (左: 矢印)、両側海馬には集積亢進を認めない (中: 円内)。一方、酸化ストレスを描出する $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$ は両側海馬に高い集積を認める (右: 円内)。



72 小児特発性再生不良性貧血における遺伝学的基盤の解明

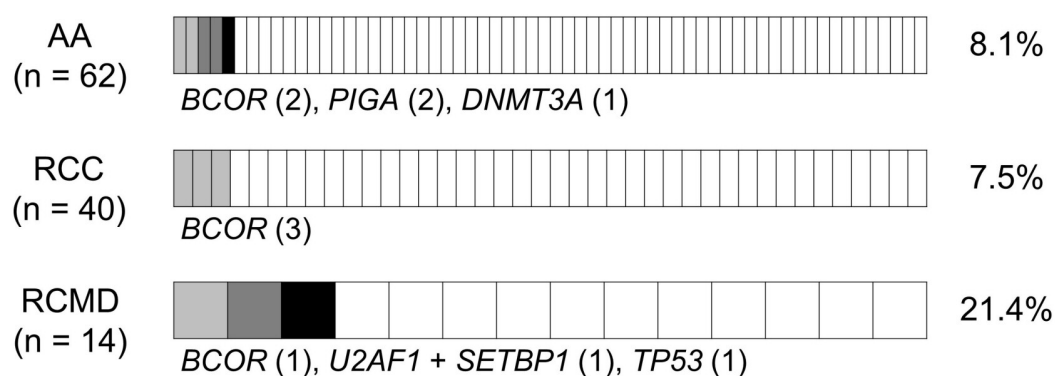
奥野 友介

小児特発性再生不良性貧血は自己免疫性の汎血球減少を来す疾患であるが、病態の解明は十分ではない。本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた小児特発性再生不良性貧血の網羅的な遺伝子解析を行い、先天性造血不全症や小児不応性貧血等の小児特有の問題を含めて、遺伝学的な基盤を解明することである。

116 例の小児特発性再生不良性貧血症例について、網羅的遺伝子解析を行った。先天性造血不全症の遺伝子診断が得られた症例は 1 例 (0.8%) であり、非常に稀であると考えられた。体細胞変異については、116 例中 11 例 (9.5%) について、1 つ以上の体細胞変異が検出された。遺伝子ごとの変異の分布は、成人におけるそれとは大きく異なっていた。小児特有の問題として、病理組織学的な分類と、体細胞変異との相関を検討した。病理組織学的な再生不良性貧血 (AA)、小児不応性貧血 (RCC) と refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) の間で、体細胞変異の頻度に違いは見られなかった。

本研究により、小児特発性再生不良性貧血の遺伝学的な基盤が明らかになった。これに基づいて、診断時とその後の定期的な遺伝子解析など、よりよい診療に貢献できる臨床検査の構築が期待される。

体細胞変異と病理組織学的分類の相関



73 門脈圧亢進症の分子機序解明と革新的肝硬変治療の開発

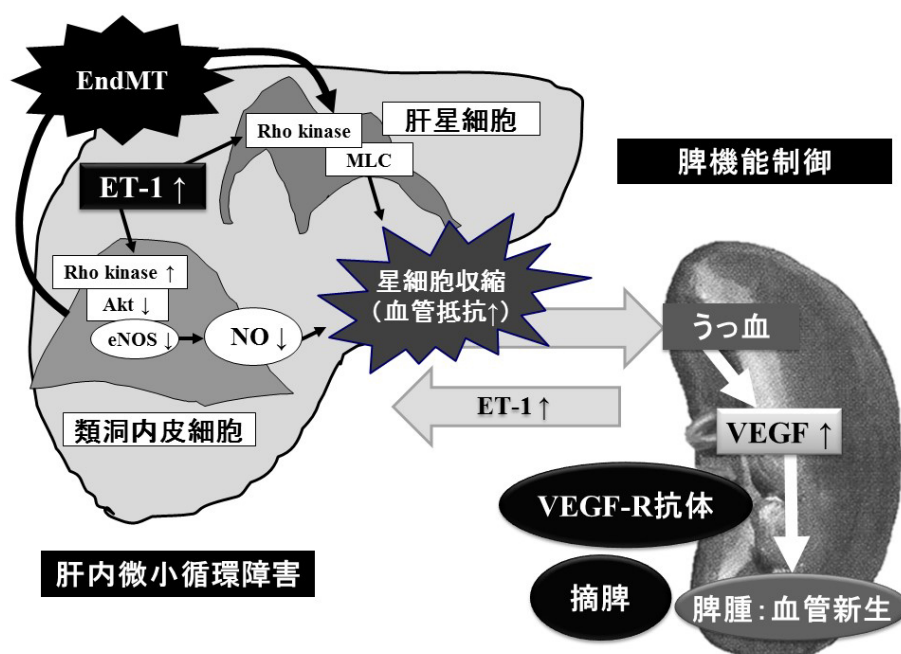
川中 博文

肝硬変における微小循環障害ならびに肝脾相関の分子機序を解明し、肝内微小循環障害の改善のための脾機能制御を含めた革新的治療法を開発することで、門脈圧亢進症だけでなく肝硬変症をも改善することを目的とした。

類洞血流は、Endothelin (ET) などの血管収縮物質と類洞内皮細胞より分泌される NO などの血管拡張物質による肝星細胞の収縮と弛緩のバランスにより調節されている。肝硬変における微小循環障害は、肝硬変症における高 ET 血症や類洞内皮細胞の機能障害による NO 分泌の低下により、肝星細胞が収縮し類洞血管抵抗が増大しているためと考えられている。本研究では、肝硬変症における類洞内皮細胞機能障害のメカニズムとして、類洞内皮細胞における Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) について検討した。マウスの肝硬変モデルにて、初代培養された線維芽細胞の多くが内皮細胞由来であることが確認できた。しかし、硬変肝の免疫組織染色にて EndMT が確認できたが、類洞内皮細胞の FACS では EndMT を来したと考えられる細胞の増加は微量であったが確認できた。肝硬変症における類洞内皮細胞の機能障害のメカニズムの一つとして EndMT が関与していることが示唆された。

肝脾相関に関しては、肝硬変症における摘脾後の予後について解析したところ、Child-Pugh B で 5 年生存率 82%、Child-Pugh C で 5 年生存率 52% と摘脾を行うことで予後の改善が得られ、肝炎研究 10 ヶ年計画における非代償性肝硬変症の予後改善目標を凌駕していた。肝硬変症において、摘脾は肝内の ET と NO のバランスを改善し微小循環障害を改善させる可能性があり、摘脾による肝機能改善のメカニズムの一つと考えられた。さらに、VEGF 受容体などの血管新生阻害剤であるソラフェニブを投与された肝硬変症において、脾腫が有意に改善したことより、VEGF など血管新生シグナルの制御が脾腫を改善させる可能性が示された。

肝硬変に伴う門脈圧亢進症の成因と新規治療の開発

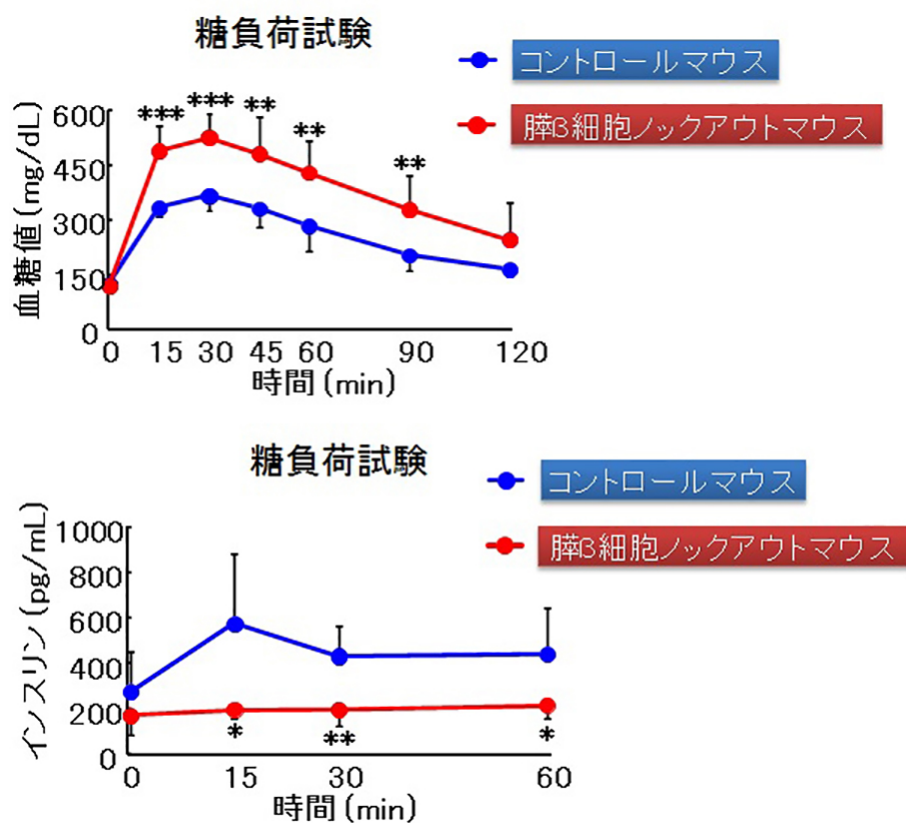


74 PRSS8 によるインスリン分泌制御機構の分子基盤の解明

北村 健一郎

近年、肥満による2型糖尿病が急速に増加しており、多くの国々において極めて重要な健康課題となっているが、その詳細な発症メカニズムは不明な点が多い。これまでに私たちはセリンプロテアーゼのプロスタシンが肝臓において炎症シグナルを制御することによって耐糖能を維持することを明らかにしている。本研究は、膵β細胞におけるプロスタシンの役割を明らかにするために膵β細胞特異的プロスタシン KO マウスを作製し、肝臓におけるインスリン感受性のみならず、膵臓のインスリン分泌におけるプロスタシンの役割を明らかにして、プロスタシンによる糖尿病発症の包括的な分子基盤を解明することを目的とした。本研究の結果、プロスタシンは膵β細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌を制御し、インスリン分泌には必要不可欠な因子であることが明らかとなった。本研究のさらなる推進によってインスリン分泌の新たな制御因子が明らかになることが期待されるだけでなく、プロスタシンを標的とした新規治療法の開発が可能になる。

膵β細胞特異的プロスタシン KO マウスにおけるブドウ糖負荷試験での
血糖値ならびに血中インスリン濃度の推移

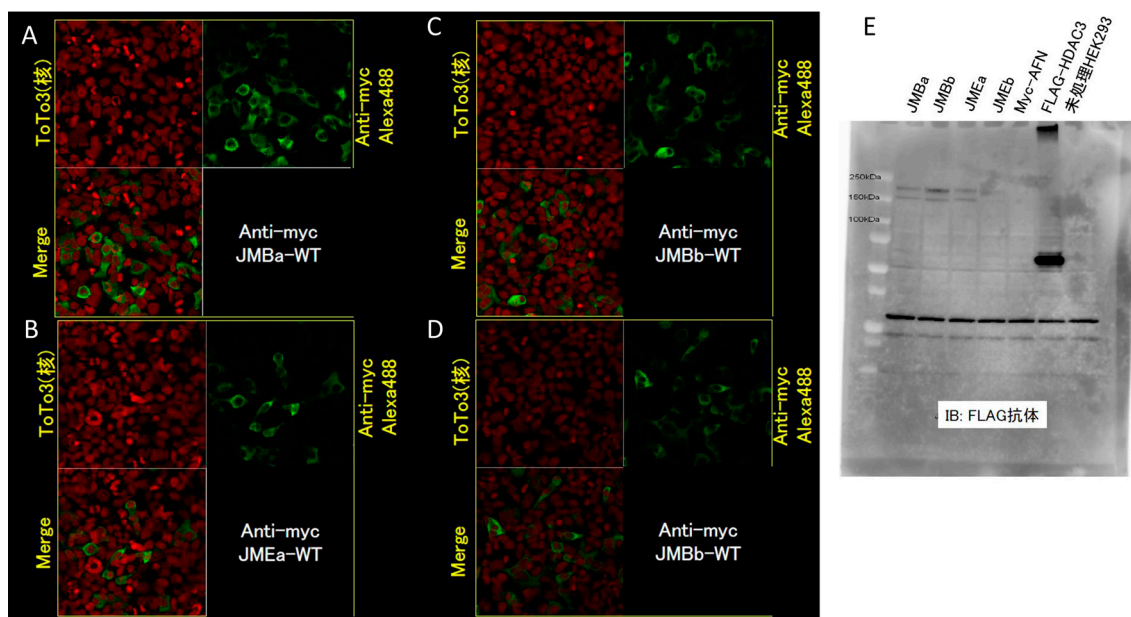


75 新規病因遺伝子 *ERBB4* を基軸とする ALS の分子病態解明

高橋 祐二

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子 *ERBB4* は Neuregulin をリガンドとする受容体型チロシンリン酸化酵素であり、軸索伸長や神経筋接合部形成など、運動神経に重要な機能を司っている。ErbB4 は膜貫通部位と細胞内ドメインの選択的スプライシングによるアイソフォームが存在する。本研究の目的は、ErbB4 の病理性変異による運動神経細胞死のメカニズムを明らかにして、ALS の病態解明と病態抑制治療に向けた分子標的を同定することである。各アイソフォームの野生型・変異型発現ベクターを構築した。HEK293 由来野生型・変異型 ErbB4 定常発現細胞を構築し、免疫細胞化学により発現を確認した。神経細胞由来初代培養細胞への野生型・変異型発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験系を構築した。野生型 ErbB4 を導入した初代培養細胞では軸索伸長の促進傾向が見られ、特に核移行型のアイソフォームにおいて促進効果が顕著だった。一方、変異型 ErbB4 の導入実験では、野生型と比較して軸索伸長機能障害が認められ、特に、細胞質移行型のアイソフォームで顕著であった。ErbB4 の機能障害が、軸索伸長機構の障害を介して運動神経細胞死をもたらす可能性が示唆された。

野生型 ErbB4 各アイソフォームの HEK293 細胞における発現



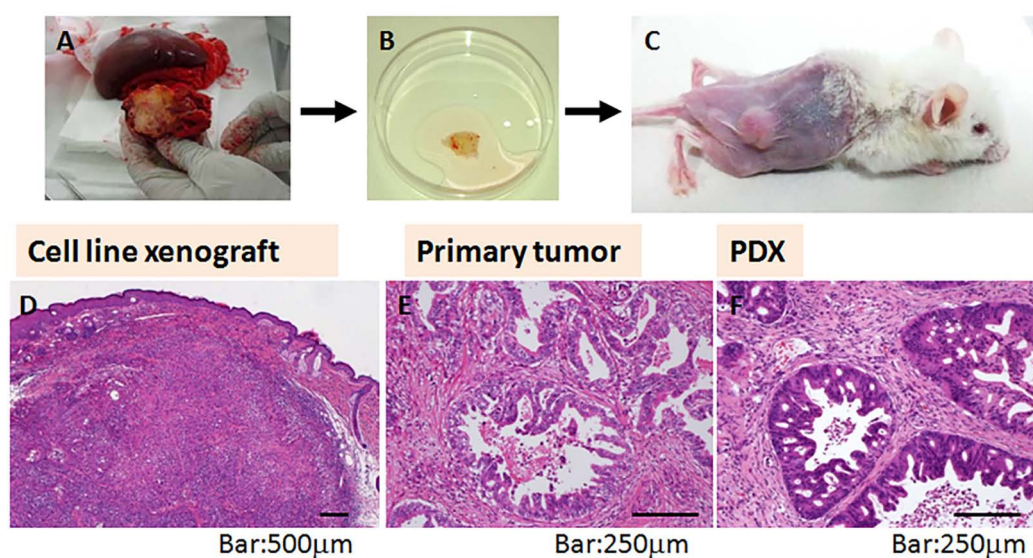
76 Living サンプルを用いたがん微小環境のエピゲノム解析

立石 敬介

微小環境を含めた腫瘍組織のエピゲノムの変化を経時的かつ包括的に追跡することはその生物学的動態を理解する上で重要であるとともに新たな治療標的発掘にもつながる可能性があると考えられる。

本研究では微小環境を含めたヒト腫瘍組織の解析を行うために、Patient-derived Direct Xenograft (PDX) を樹立した。その PDX を用いて BET タンパク阻害剤 (BETi) が膵がんに対し腫瘍抑制効果を有することとともに、その抗腫瘍効果は腫瘍随伴線維芽細胞 (CAF) の不活性化を介することを見出した。活性化された CAF は細胞外マトリックスや炎症性サイトカイン、増殖因子を産生して、膵がん細胞の増殖や生存に寄与する微小環境を形成するが、BETi は Hedgehog と TGF β pathways を介した各遺伝子の発現を阻害し、パラクラインによる膵がん細胞の増殖を抑制した。今回の研究成果は膵がん腫瘍組織に対する BETi の有効性の proof of concept の一つとなりうる。

膵がん PDX の樹立

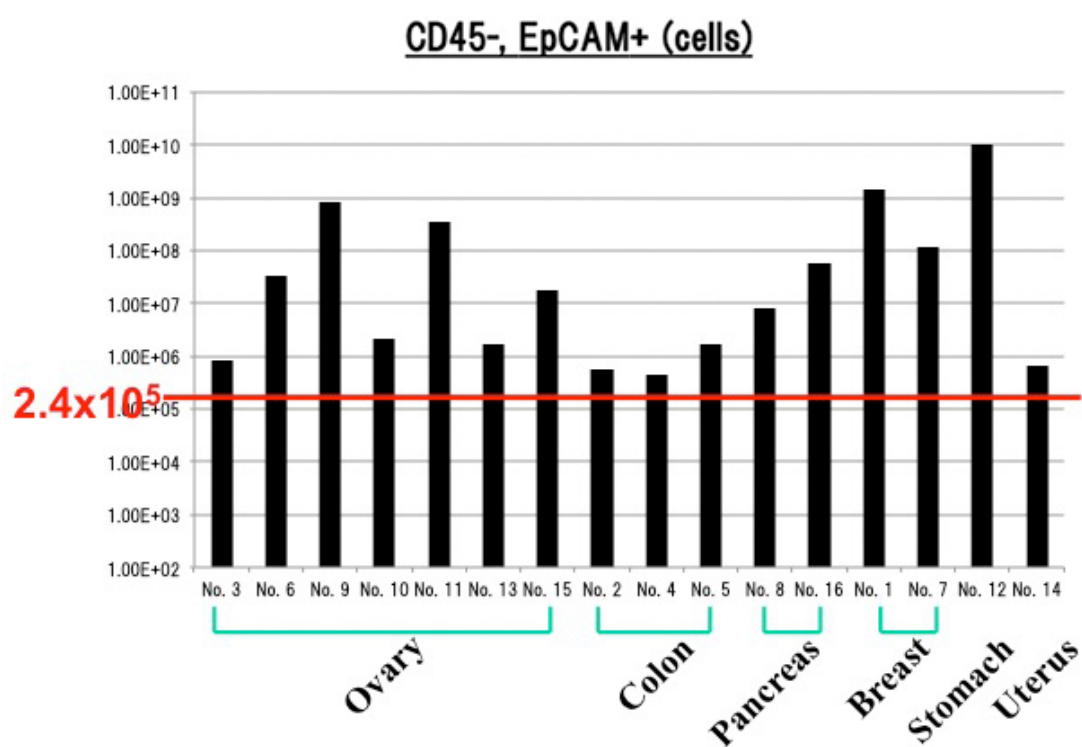


77 がん幹細胞を標的とする胃癌腹膜播種の免疫治療

辻谷 俊一

腹膜播種を生じる胃癌幹細胞を標的とした治療を開発するため、胃癌細胞株 MKN45、MKN74 を用いて FACS にてがん幹細胞と報告されている CD44⁺細胞と CD44⁻細胞の分画に分け、細胞内サイトカインの発現を調べた。がん幹細胞には TGF- β の発現が更新し、IL-10、VEGF の発現も高く、がん幹細胞は高度な免疫回避機構を有すると考えられた。しかし、CD44⁺細胞で誘導した健常人由来の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は CD44⁻細胞で誘導した CTL と同様の CTL 感受性を示した。したがって、がん幹細胞はそれ自体が免疫治療に抵抗性なのではなく、局所の免疫回避機構によって守られている可能性が示唆された。さらに腹膜播種を揺するがん患者 16 例において癌性腹水中のがん細胞を改良型の難治性腹水濾過濃縮再静注法 (CART) によって回収し、FACS にて CD45⁻EpCAM⁺がん細胞を分離した。すべての症例で 2.4×10^5 個以上のがん細胞を回収でき、腫瘍を lysate として樹状細胞ワクチン療法に使用できることが明らかになった。

CART にて回収された腹水中がん細胞数

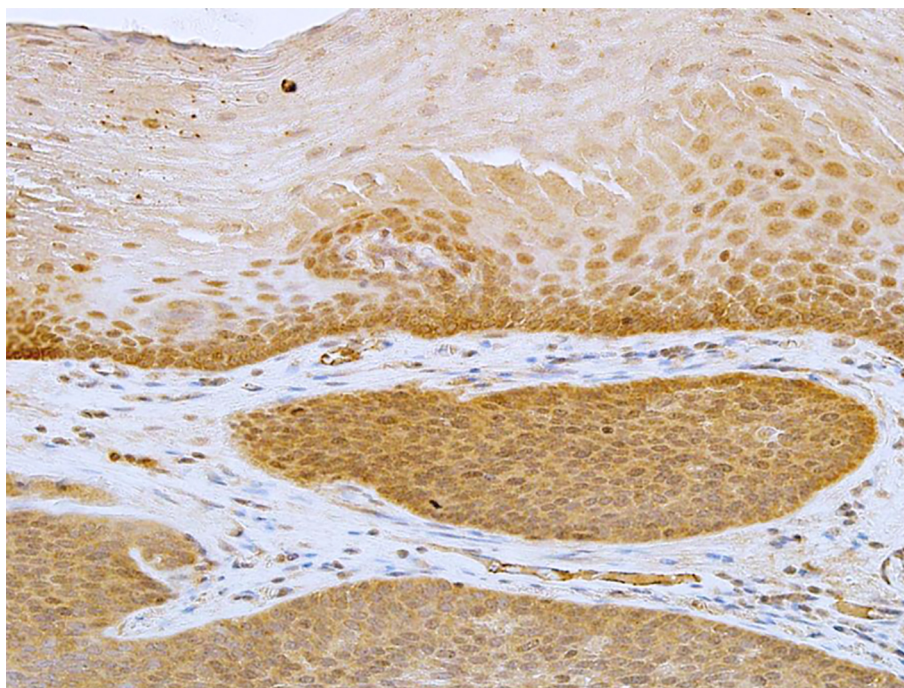


78 消化器癌における補体発現と Wnt 系分子異常の解析

中島 政信

Wnt シグナル伝達系遺伝子の異常が様々な癌の発生、進展にかかわることがこれまでの数多くの研究で証明されている。一方、近年、異物に対する免疫を担う第一捕体である C1 の構成成分である C1q が Wnt レセプターである Frizzled に結合することによって Wnt シグナル伝達系を活性化し、腫瘍発生にも関係する可能性が示唆されている。本研究では、消化器癌のうち、創薬開発の面でやや遅れをとっている食道癌において、補体が腫瘍に及ぼす影響を調べる目的で研究を行った。その結果、食道扁平上皮癌において C1q の発現と臨床病理学的因子との間に相関を認めるには至らなかったが、ELISA 法では食道癌患者の血清中の C1q 濃度が高い患者で、食道癌の静脈侵襲が有意に高度であった。さらに、補体活性の分解産物である C4d について免疫染色を行ったところ、C4d の発現が弱い群で深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、進行度が有意に高度であるという結果を得た。本研究では C1q の Wnt 系を介しての癌の進展への関与は明らかとはならなかった。しかしながらそれ以前の発生の段階にかかわる可能性については否定できないものと思われた。また C4d の癌への関与は C1q とは異なる経路を介している可能性が示唆された。

C4d 免疫染色像



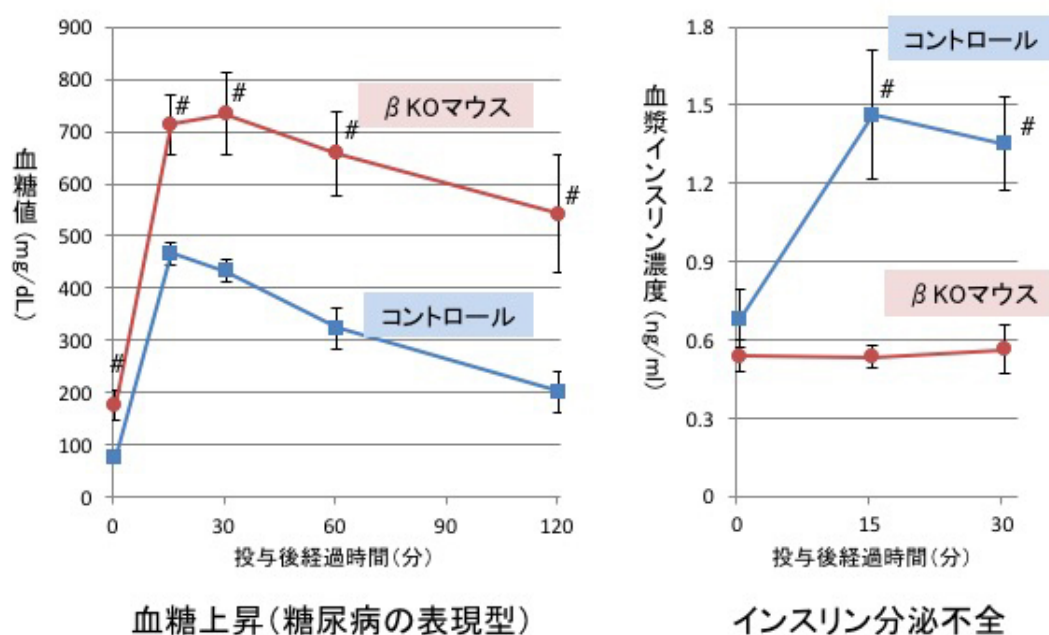
79 多機能ペプチダーゼによる転写制御機構の解明

西 英一郎

【目的】 糖代謝は、膵 β 細胞によるインスリン分泌と、末梢組織（肝臓、骨格筋、脂肪組織など）によるインスリン感受性のバランスによって制御されており、この均衡の破綻によって糖尿病が引き起こされる。本研究は、糖代謝制御における多機能ペプチダーゼ、ナルディライジン（NRDC）の役割を明らかにすることを目的に行った。

【方法および結果】 糖負荷試験、インスリン負荷試験にて、NRDC 全身欠損（*Nrhc*^{-/-}）マウスは著明なインスリン分泌不全とインスリン感受性の亢進を示し、軽度の耐糖能異常を呈した。膵 β 細胞特異的 NRDC 欠損（ β KO）マウスを作製し解析を行ったところ、*Nrhc*^{-/-}マウスと同様に著明なインスリン分泌反応の減弱を示し、顕著な耐糖能異常を呈した（図）。NRDC 欠損膵島において、GLUT2 や Glucokinase などグルコース取込みや利用に関わる遺伝子群の発現が低下していたため、それらの上流にある膵 β 細胞特異的転写因子群について解析したところ、MafA の発現が低下していた。 β 細胞株を用いてクロマチン免疫沈降法を施行したところ MafA の enhancer 領域に NRDC が結合しており、 β 細胞において NRDC が MafA の発現調節を介してインスリン分泌を制御していることが示唆された。

膵 β 細胞特異的 NRDC 欠損（ β KO）マウスにおける糖尿病表現型とインスリン分泌の低下
(n = 4~8 per genotype, Error bar: SE, #P < 0.05, Student t-test)

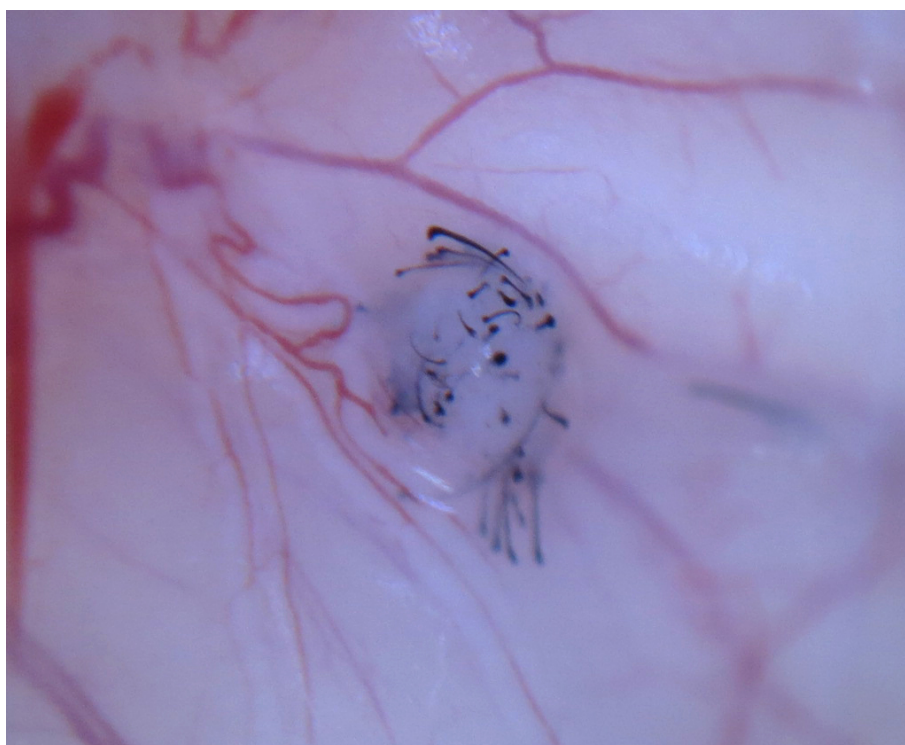


80 遺伝子導入を伴わない毛乳頭細胞のリプログラミング

西江 渉

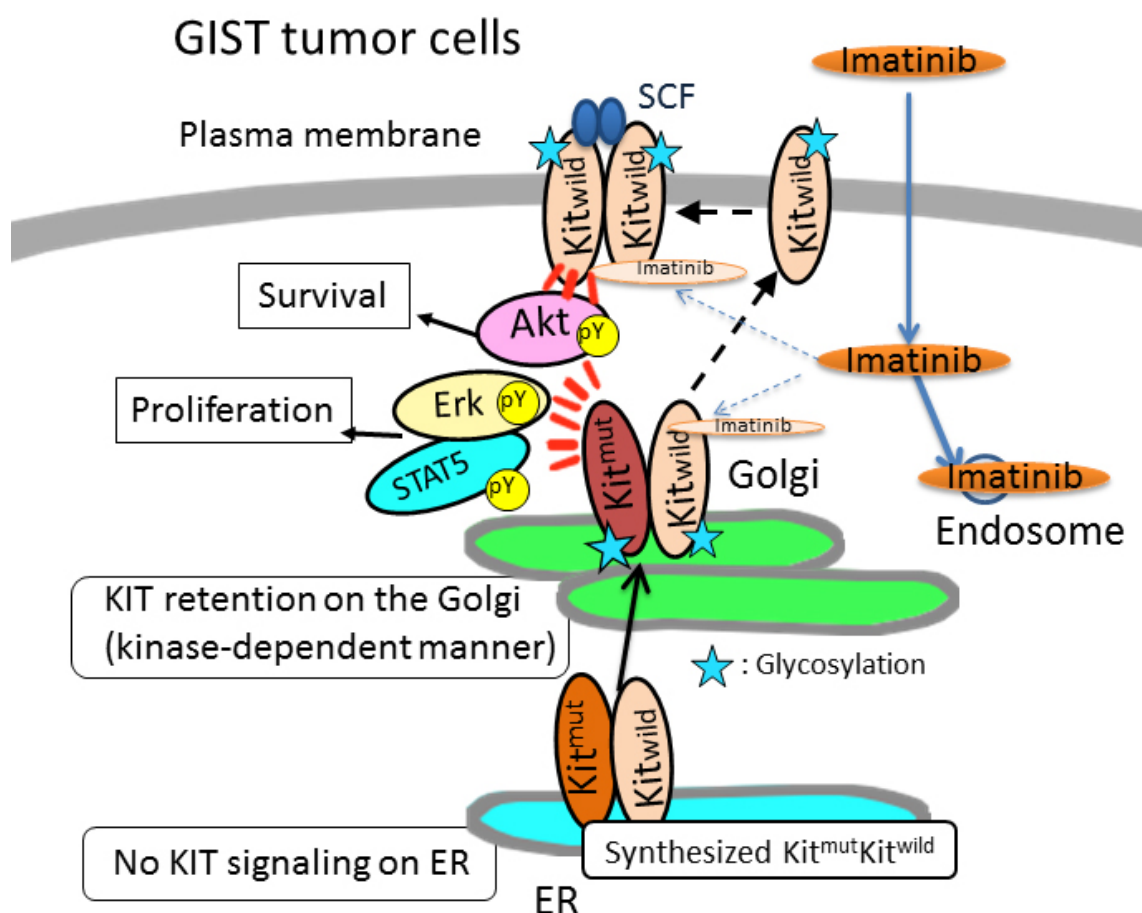
皮膚の毛包の毛球部に存在する毛乳頭細胞 (dermal papilla cells、DP 細胞) は、Sox2、c-Myc に加え ALP も発現する特殊な組織幹細胞であり、*Oct3/4* のみ遺伝子導入すると初期化可能である。近年、遺伝子を導入せず化合物等で初期化する試みが報告されている。その際、DP 細胞を用いると他の細胞より効率的な初期化が期待できるが、DP 細胞を一旦培養系で維持すると組織幹細胞としての特性を急速に失ってしまう。本研究の目的は、組織幹細胞としての特性を維持可能な DP 細胞の培養法を確立し、遺伝子導入を伴わない DP 細胞の初期化を目指すことである。最初に、ヒト DP 細胞を FGF-2 を含有する既知の DP 細胞培養培地で培養したところ、継代に伴い ALP 発現陽性細胞が減少することを確認した。一方、DP 細胞を幹細胞用コンディション培地で培養すると、ALP 発現陽性細胞を培養可能だったが増殖は極めて緩徐であった。そこで、生体内の DP 細胞がラミニン 511 を含む多量の細胞外マトリクス (ECM) 内に存在する点に着目し、ラミニン 511 上で DP 細胞を培養したところ、ALP 陽性細胞を選択的に培養可能であることが判明した。培養 DP を新生仔マウス表皮細胞と共にヌードマウス皮下へ投与したところ、新たに毛包が誘導され、組織幹細胞としての特性を維持していることを確認した。ラミニン 511 による DP 細胞への増殖効果は、 $\beta 1$ インテグリンを介し Akt のリン酸化を伴うシグナル経路のほか、 $\beta 1$ インテグリン非依存性の未知の因子の関与が予想された。最後に、DP 細胞をラミニン 511 上で BMP4 とルテオリン、FGF-2 を含む加えた幹細胞用培地で培養したところ、RNA レベルで *Oct3/4*、*Nanog* が発現誘導されることを確認した。本研究によって、組織幹細胞としての機能を維持した DP 細胞の培養法開発が確立され、培養条件によって幹細胞マーカーが発現誘導可能であることが判明した。近い将来、遺伝子導入を伴わない DP 細胞のリプログラミングの実現が期待できる。

培養毛乳頭細胞によって免疫不全マウス皮下で誘導された毛包組織



薬剤の標的特異性に関しては分子標的治療薬と言えど改善の必要がある。また分子標的治療薬も含め薬剤の細胞内動態は全く不明である。本研究では超解像ライブイメージングシステムを用い、トランスゴルジでのKIT（蛋白）の Sorting と変異 KIT のゴルジ局在化の機構を明らかにすることと、阻害剤イマチニブの細胞内動態を明らかにすることが目的である。研究は GIST（消化管間質腫瘍）の臨床検体と細胞株を用いて行った。GIST では変異 KIT はトランスゴルジで活性化しており、ゴルジ停留には KIT の活性化が必須であり、糖鎖修飾は必然ではなかった。変異 KIT のゴルジでの活性化には、下流シグナル伝達系の活性化も必要であるが、それぞれのシグナルの阻害剤は変異 KIT の細胞内活性化場所を変化させなかった。一方、その阻害剤イマチニブは、細胞膜を通過後は速やかにエンドソームと小胞体に移動し、細胞内集積場所としてはエンドソームが主体であった。

Intracellular KIT localization in Mastocytoma and GIST



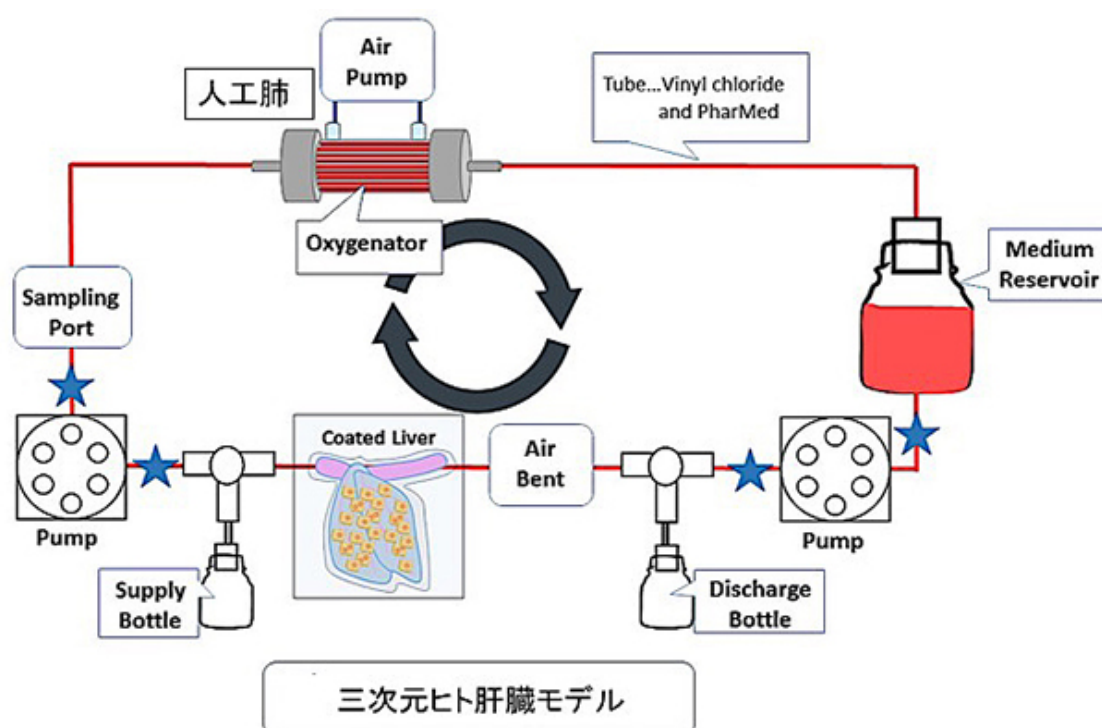
82 三次元ヒト肝臓モデルによる肝癌の浸潤・転移の解明

山下 洋市

【目的】肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma: HCC）は経門脈的に転移するとされるが、血流の流れに反したこの転移機序を説明できる分子生物学的根拠は皆無であるのが現状である。そこで、三次元ヒト肝臓モデルを創り、ヒト HCC 株を播種して腫瘍を形成させ、その浸潤・転移過程をサンプリングしながらトレースして、その機序を分子生物学的に解明することを目的とした。

【方法】ラット肝右葉の門脈に Triton X を還流して脱細胞鋳型肝臓を作製する。*ex vivo* 長期還流培養システムを新しく構築し、ヒト由来肝細胞を播種して『三次元ヒト肝臓モデル』を作る。そこに *GFP* 遺伝子を導入したヒト肝癌株（HLE など）を播種して腫瘍を形成させ、蛍光 *in vivo* リアルタイムイメージングや経時的なサンプリングによる病理学的評価でその浸潤・転移過程を評価する。

【結果】ラット右葉脱細胞鋳型肝臓の安定した作製が可能となった。また、病院倫理委員会の承認のもと、肝切除ヒトサンプルから初代培養肝細胞を採取・培養することに成功し、レンチウイルスベクターを用いた不死化ヒト肝細胞の作製に成功した。人工肺などを組み込んだ *ex vivo* 長期還流培養システム（図 1）を新しく構築することに成功した。

ex vivo 長期還流培養システム

83 食道腺癌の分子機序の解明と治療標的の探索

渡邊 雅之

本研究の目的は、現在、我が国においても増加が危惧されている食道胃接合部腺癌において、その治療標的因子としての *KRAS* 遺伝子増幅異常に着目し、その検出方法の確立と、*KRAS* 遺伝子増幅の臨床病理学的特徴を明らかにすることである。

まず方法として、Real-time PCR 法を用いて *KRAS* 遺伝子増幅を検出し、*KRAS* タンパクの過剰発現や FISH による *KRAS* 遺伝子増幅と比較検討することで、本法の妥当性を検討した。また本法による *KRAS* 遺伝子増幅の有無と臨床病理学的因子や予後との相関関係を検討した。

その結果、*KRAS* 遺伝子増幅は、免疫染色による *KRAS* タンパクの過剰発現と有意に相関した ($P < 0.05$)。さらに、本法による *KRAS* 遺伝子増幅ありの 5 症例を FISH にて確認を行ったところ、4 例 (80%) に明らかな *KRAS* 遺伝子増幅を認め、本法が *KRAS* 遺伝子増幅を検出する方法として妥当であると考えられた。対象とした 147 例の食道胃接合部腺癌のうち、本法により 35 例 (23.8%) に *KRAS* 遺伝子増幅を認めた。この *KRAS* 遺伝子増幅は、腫瘍占居部位が食道側に位置する Siewert type I-II ($P = 0.0195$) に多く、より進行した病期 ($P = 0.0128$) や低分化型 ($P = 0.0443$) に頻度が高いという特徴を有していた。生存解析を行った結果、*KRAS* 遺伝子増幅あり群は *KRAS* 遺伝子増幅なし群と比較して、無再発生存率、癌特異的生存率、全生存率のいずれにおいても有意に予後不良であることが判明し (いずれも $P < 0.05$)、独立した予後不良因子であった。

結語として、*KRAS* 遺伝子増幅は食道胃接合部腺癌の悪性度に深くかわり、将来有望な治療標的として期待できると考えられた。

多変量解析による *KRAS* 遺伝子増幅と予後との関連

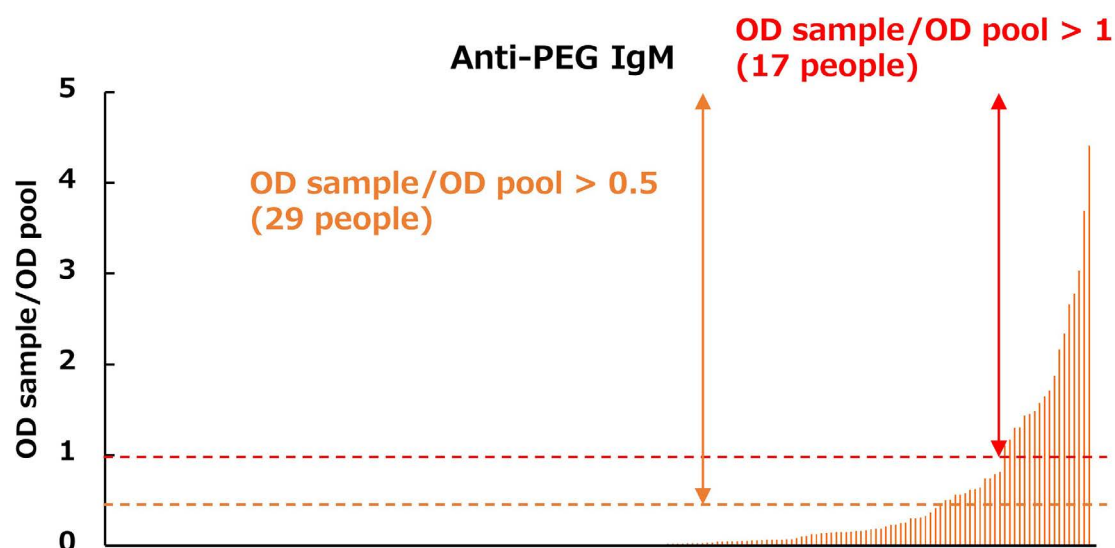
Variable	N	DFS			CSS			OS		
		No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)	No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)	No. of events	Univariate HR (95% CI)	Multivariate HR (95% CI)
<i>KRAS</i> copy number										
Not amplified	112	21	1 (referent)	1 (referent)	10	1 (referent)	1 (referent)	18	1 (referent)	1 (referent)
Amplified	35	14	3.44 (1.69-6.83)	3.02 (1.46-6.10)	11	5.98 (2.45-15.0)	6.11 (2.36-16.6)	13	3.65 (1.71-7.63)	3.11 (1.44-6.65)
P			0.001	0.0036		0.0001	0.0002		0.0011	0.0046

84 核酸医薬デリバリーにおける自然免疫活性化機構の解明

石田 竜弘

核酸は新規医薬品として期待されているが、その実現には送達システムの開発が重要である。多くのキャリアが報告されてきたが、その多くが臨床試験の初期段階でドロップアウトしている。これは、生体にとって異物である核酸・キャリア複合体の免疫原性に関する検討が行われてこなかったためである。本研究では、核酸送達デバイスとしてのキャリア開発において真に重要となる全身投与後の自然免疫システムによる認識を詳細に検討することを目的として検討を行った。検討の結果、核酸キャリアの生体内安定性を高めることを目的としてその表面修飾のために汎用されるポリエチレングリコールに対して抗体が出現し、繰り返し投与時の体内動態が大きく変化することが明らかとなった。この抗体の分泌には脾臓辺縁帯の B 細胞が関与しており、siRNA に対しては Toll-like receptor (TLR) 7 を介して、pDNA に対しては TLR 9 を介して anti-PEG IgM の分泌を亢進していることが確認された。また、日本赤十字社から譲渡された献血血液を評価したところ、一定の割合（陽性：17 名）で anti-PEG IgM を保有するヒトが存在することが明らかとなった。これらの結果は、核酸医薬デリバリーにおける自然免疫の活性化とその結果誘導される抗体による動態変化がヒトにおいても生じることを示唆しており、当該領域の発展において重要な知見となるものと考えられる。

日本赤十字社提供献血血液中の anti-PEG IgM 保持者



85 創薬を指向した生物活性アルカロイドの全合成研究

大野 浩章

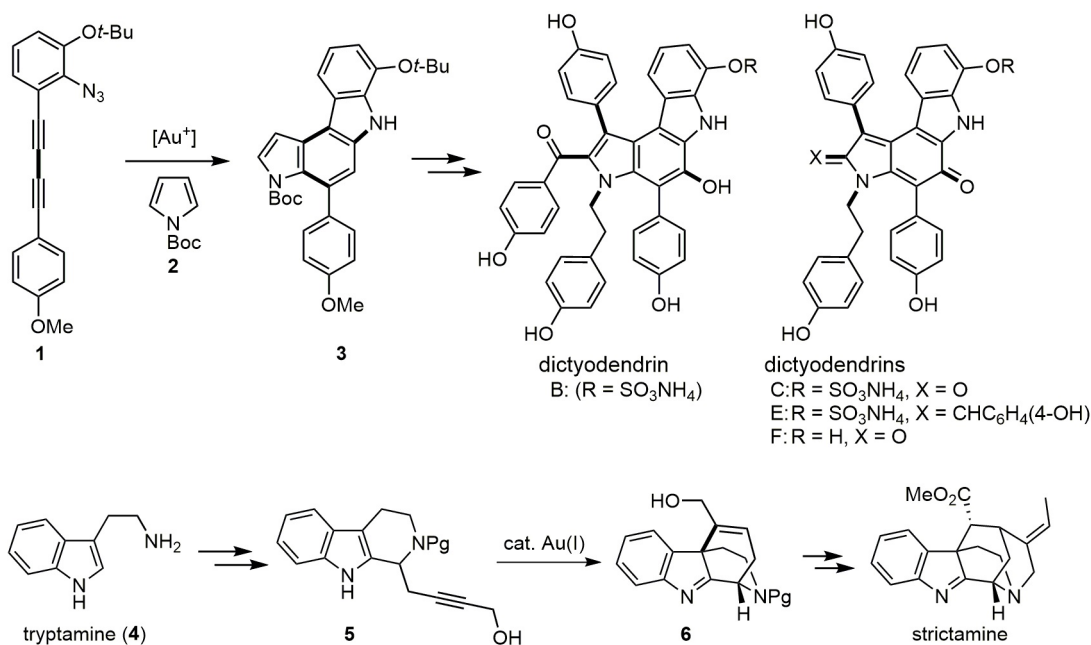
【目的】 近年、天然物型の複雑な基本骨格を有する化合物の重要性が再認識されている。我々は、ドラッグライクな天然物型複素環化合物を多連続反応により一挙に構築し、多様性指向型合成に展開することができれば、複雑な基本骨格を有する天然物型化合物を創薬研究に利用する上で極めて有効であると考えている。本研究においては、革新的な天然物骨格一挙構築反応の開発と応用について検討を行った。

【方法】 金触媒連続環化反応を利用して、生物活性アルカロイドに広く存在する多環式インドール骨格を一挙に構築する反応の開発と全合成展開を実施し、アルカロイド型化合物をリードとする創薬展開を行うための基盤構築を行った。

【結果】 ディクチオデンドリン類の全合成：分子内にアジド部分を有する基質を用いた連続環化反応によるピロロカルバゾール骨格構築反応をデザインした。検討の結果、**1** に対して、金触媒存在下 Boc ピロール **2** を作用させると、チオデンドリン型のピロロカルバゾール **3** が優先的に得られることを見出した。引き続き置換基の導入について検討を行い、ディクチオデンドリン B、C、E、および F の全合成を達成した。

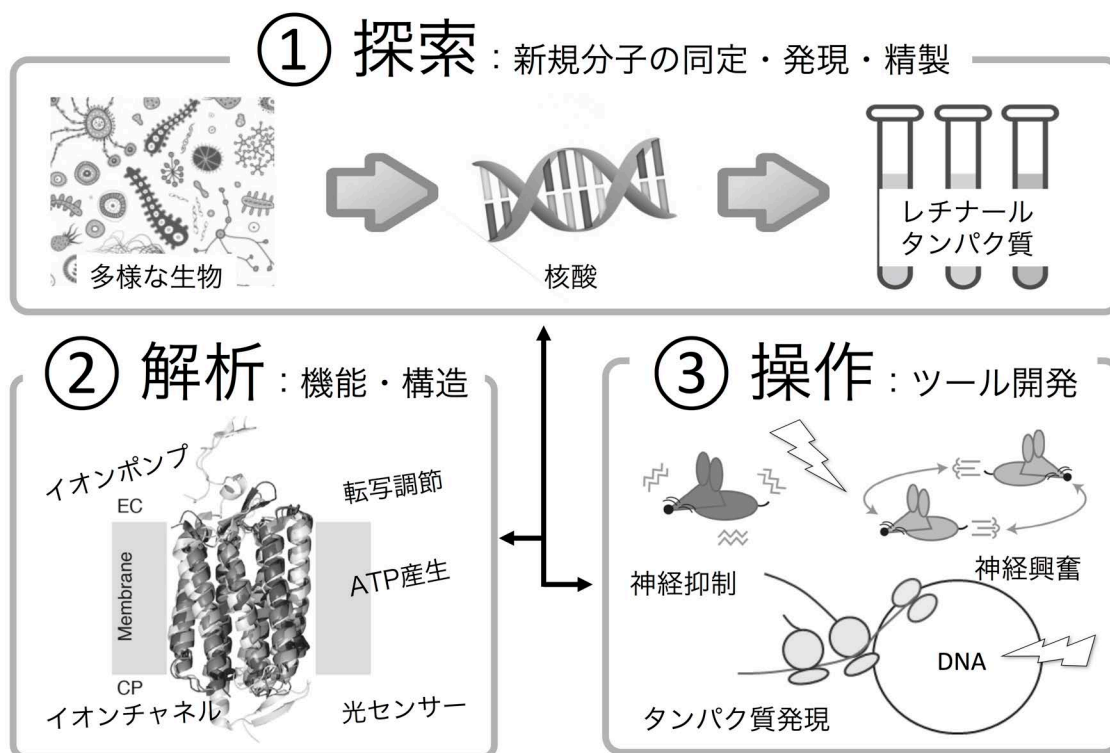
ストリクタミンの合成研究：トリプタミン **4** から誘導したテトラヒドロ- β -カルボリン誘導体 **5** に対して金触媒を作用させると、四環性インドレニン **6** を効率的に構築できることを見出し、(±)-ストリクタミンの形式全合成に成功した。さらに、キラル補助基を用いた立体選択的 Pictet-Spengler を用いて、ストリクタミンの不斉形式全合成を達成した。

ディクチオデンドリン類およびストリクタミンの全合成



レチナールタンパク質は、7回膜貫通ドメインに発色団レチナールが結合した光受容膜タンパク質であり、ロドプシンとも呼ばれる。レチナールタンパク質は、様々な生物中で生命活動に必須の光エネルギー変換や光情報伝達を司っている。このような生物学的重要性に加え、生命機能を光で操作する分野（オプトジェネティクス：光遺伝学）の突破口を開いたタンパク質としても有名であり、基礎・応用の両面から注目を集めている。私たちの研究室では、「光をくすりへ」をスローガンに、基礎と応用を橋渡しするためのレチナールタンパク質の包括的研究を行っている。このような背景のもと、「1. 新規分子の探索」として、植物着生細菌、熱水環境由来細菌、硫酸を豊富に含む水棲細菌から、新規レチナールタンパク質を発見し、それぞれ PvR、RxR、SyHR と命名した。次に、「2. 分子機能・構造の解析」として、様々な時空間領域での解析を行い、これまでの常識を覆す新奇機能や構造・物性との相関などを明らかにした。さらに、上記1および2の知見を基盤とした「3. 光操作ツールの開発」に取り組み、動物個体での新しい光生命機能操作を実現した。このように、探索と解析という基礎に立脚したボトムアップ型の光操作技術の開発に成功した。

レチナールタンパク質の「探索、解析」を基盤とした光「操作」ツール開発

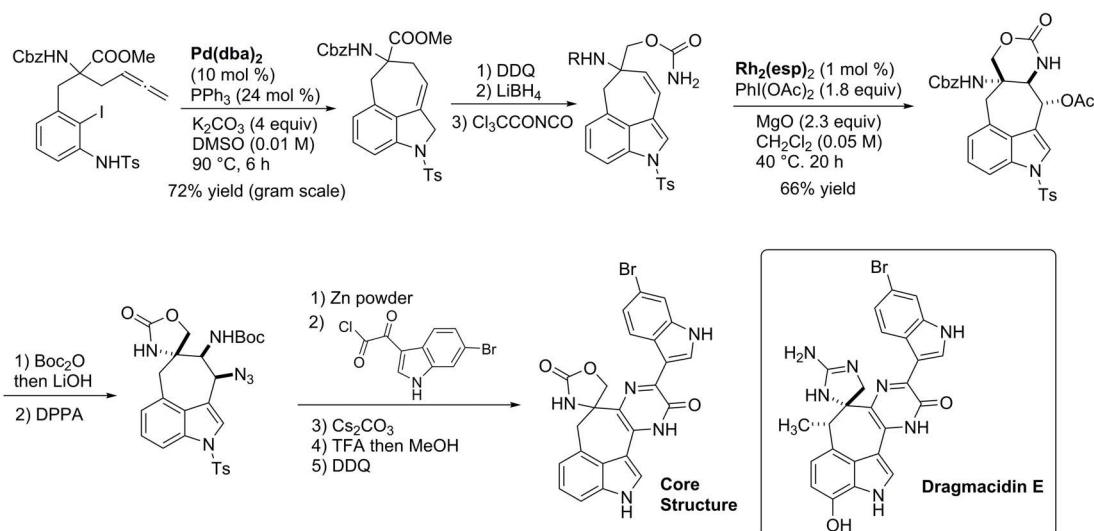


87 ドラグマシジン E の全合成を基盤とした医薬化学研究

根本 哲宏

インドールの 3,4 位から中員環が縮環した有機分子には、天然物や医薬品など生物活性を示すものが数多く存在する。私達は、本骨格の新規構築法開発を近年進めており、Pd 触媒および Pt 触媒を用いるカスケード環化反応を用いる独自の合成手法を開発してきた。今回これらの手法を、本骨格を有する天然物：ドラグマシジン E の合成研究に応用した。ドラグマシジン E は南オーストラリア産海綿より単離されたインドールアルカロイドであり、セリンスレオニンホスファターゼ阻害作用を示すことが報告されている。特徴的な構造から幾つかの合成研究が報告されているが、全合成は 2011 年に Feldman らにより報告されたラセミ体合成 1 例のみとなっている。我々は、本天然物の全合成を目指すにあたり、主骨格構築法の確立を本研究にて行った。まず、Pd 触媒を用いるカスケード環化反応を用いることで 3 環性骨格を構築したのち、酸化条件処理によってオレフィン共役型インドール誘導体へと変換した。さらに、エステル部をカルバメートへと変換したのち、Rh 触媒を用いる分子内アミノアセトキシ化反応を行うことで連続官能基の導入を行った。さらにラクタム開環に続くスピロラクトン化、アジドの還元、酸クロリドとの縮合、ジヒドロピラジノン環の構築を経て主骨格の合成法開発に成功した。

Synthetic Study of Dragmacidin E



88 記憶の想起を促す薬物の作用機構の解明

池谷 裕二

忘却された記憶であっても脳内の神経細胞または神経回路に記憶痕跡が残されている可能性がある。本研究は、時間経過に伴う忘却を再現できる物体認識試験を記憶・学習課題として用い、ヒスタミン H3 受容体逆アゴニストが忘却された記憶の想起にもたらす作用、及びそのメカニズムを解明することを目的とした。その結果、H3 受容体逆アゴニストであるチオペラミドが、忘却された物体認識記憶を回復することを明らかにした。今後は、作用メカニズムの更なる解明すると共に、他の H3 受容体逆アゴニストや、他の学習課題においても同様の効果が見られるかを明らかにしていきたい。

物体認識試験におけるチオペラミドによる記憶の回復

A) 行動試験パラダイム。

トレーニングとテストの間隔は 72 時間または 7 日に設定した。

テストの 30 分前にチオペラミドを腹腔内投与した。

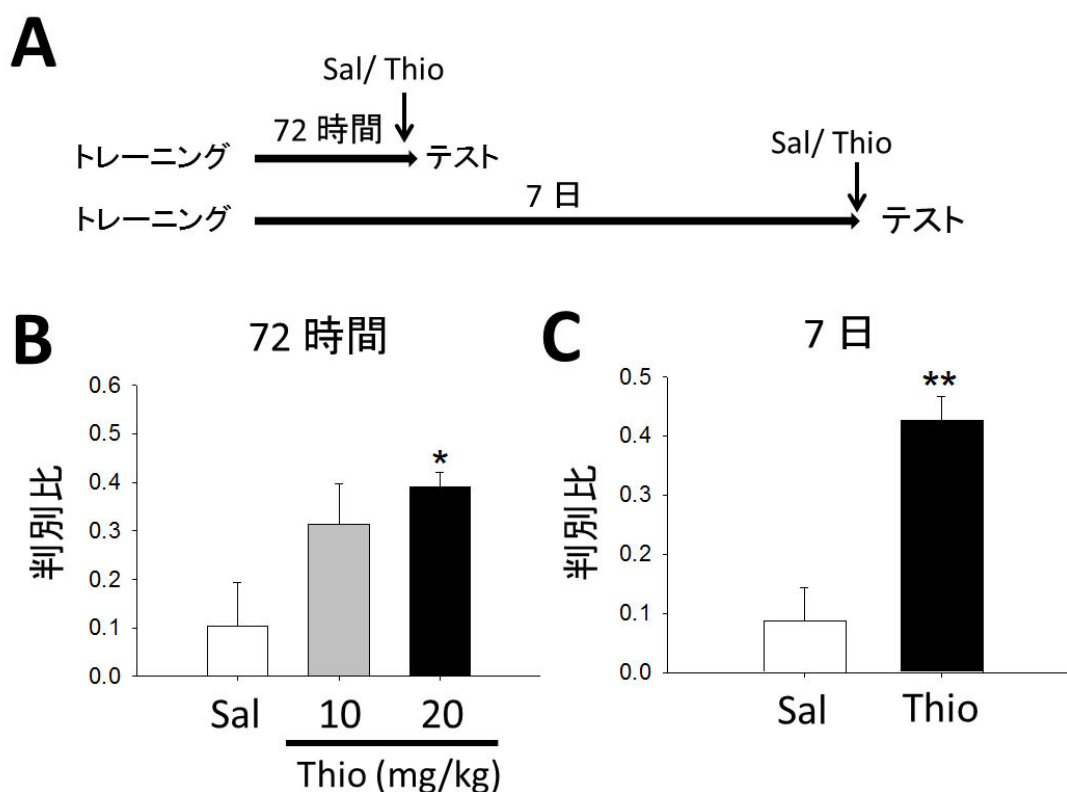
Sal: 生理食塩水、Thio: チオペラミド。

B) トレーニングとテストの間隔が 72 時間の際の判別比。

チオペラミド 20 mg/kg により判別比が有意に増加した。N = 6~7。

C) トレーニングとテストの間隔が 7 日間の際の判別比。

チオペラミド 20 mg/kg により判別比が有意に増加した。N = 7~9。



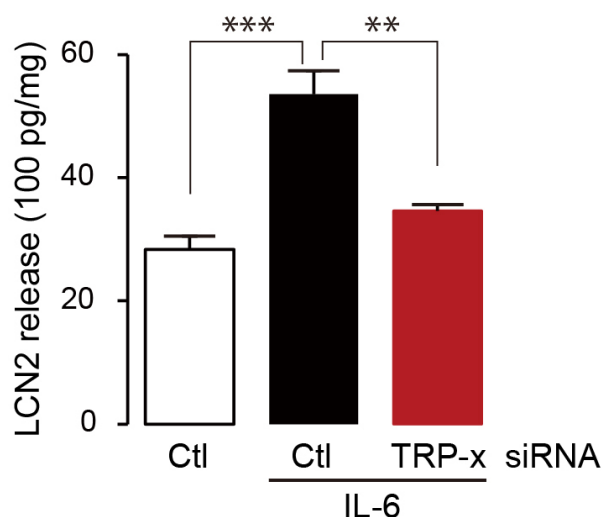
89 感覚制御の仕組みとその破綻による感覚異常メカニズム

津田 誠

アトピー性皮膚炎などに伴うかゆみは慢性的で耐えがたく、過剰な引っかき行動を繰り返してしまう。抗ヒスタミン薬が十分に効かず、メカニズムも未だ不明である。最近我々は、慢性掻痒モデルマウスを用いた研究から、脊髄後角において長期的に活性化するアストロサイトの STAT3 とそれに続く LCN2 (lipocalin 2) の産生放出が慢性掻痒に重要であることを明らかにした。そこで本研究では、アストロサイトからの LCN2 産生放出における細胞内カルシウム制御分子 (IP3 受容体 (IP3R) と TRP (transient receptor potential) チャネル) の関与を検討した。

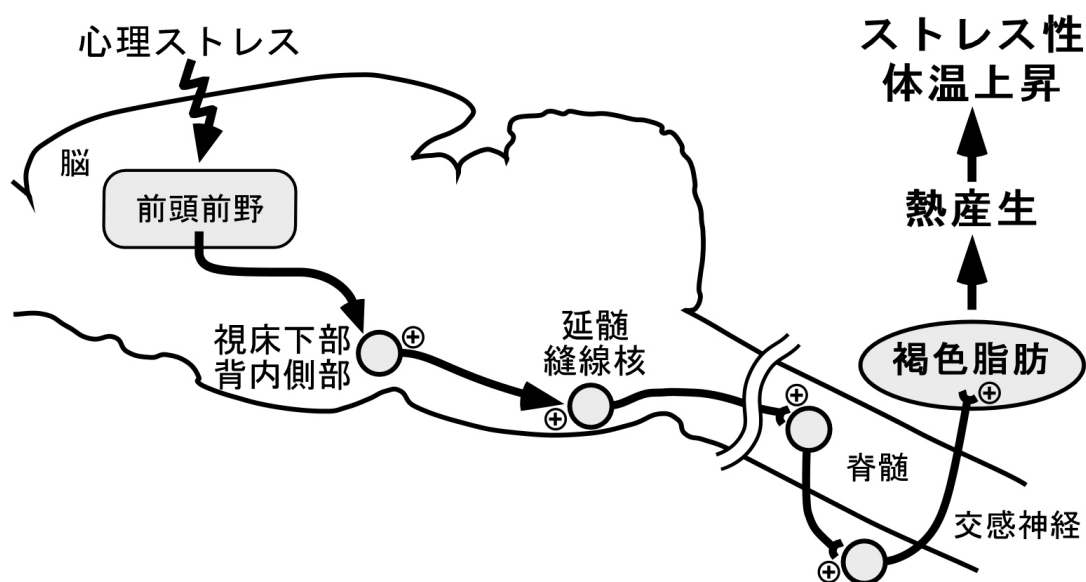
初代培養アストロサイトにおいて、IL-6 刺激により持続的な STAT3 のリン酸化が認められ、LCN2 の産生放出と相関した。その STAT3 のリン酸化は IP3R1 と TRP チャネルの阻害薬やノックダウンによりそれぞれ抑制され、LCN2 産生放出も有意に抑制された。さらに、慢性掻痒モデルマウスの頸髄くも膜下腔内への TRP 阻害薬の処置により痒み行動が抑制された。以上より、アストロサイトの LCN2 産生放出と慢性掻痒における IP3R1 や TRP チャネルの関与が示された。

培養アストロサイトからの IL-6 誘発 LCN2 産生放出における TRP-x ノックダウンの効果



心理ストレスや情動が恒常性維持システムへ影響を与え、体温、血圧、脈拍などを上昇させることはヒトを含めた哺乳類で幅広く観察される。我々は、これまでに、視床下部背内側部から延髄へ至る神経路がこうした心理ストレス性の交感神経反応を駆動することを報告した。本研究では、心理ストレス信号を視床下部背内側部へ入力する上位の脳領域を探索し、その情報伝達機構の解析を行った。ラットの視床下部背内側部へ逆行性神経トレーサーを注入した後、社会的敗北ストレスを与えたところ、いくつかの前脳領域において、視床下部背内側部へ心理ストレス信号を入力する神経細胞が分布していた。それらの前脳領域のうち、前頭前野に神経細胞刺激薬を微量注入すると、褐色脂肪組織熱産生など、ストレス反応に似た交感神経反応が惹起された。さらに、光遺伝学技術を用いて、前頭前野から視床下部背内側部への直接の神経伝達を選択的に光刺激すると褐色脂肪組織熱産生が惹起された。これらの実験結果は、前頭前野から視床下部背内側部への直接の神経投射を通じて心理ストレス信号が伝達され、その結果、褐色脂肪熱産生をはじめとする交感神経反応が駆動されることを示唆する。

心理ストレスによる自律生理反応を駆動する中枢神経回路のモデル



91 第四世代膵島分離法を用いた膵島移植の前臨床試験

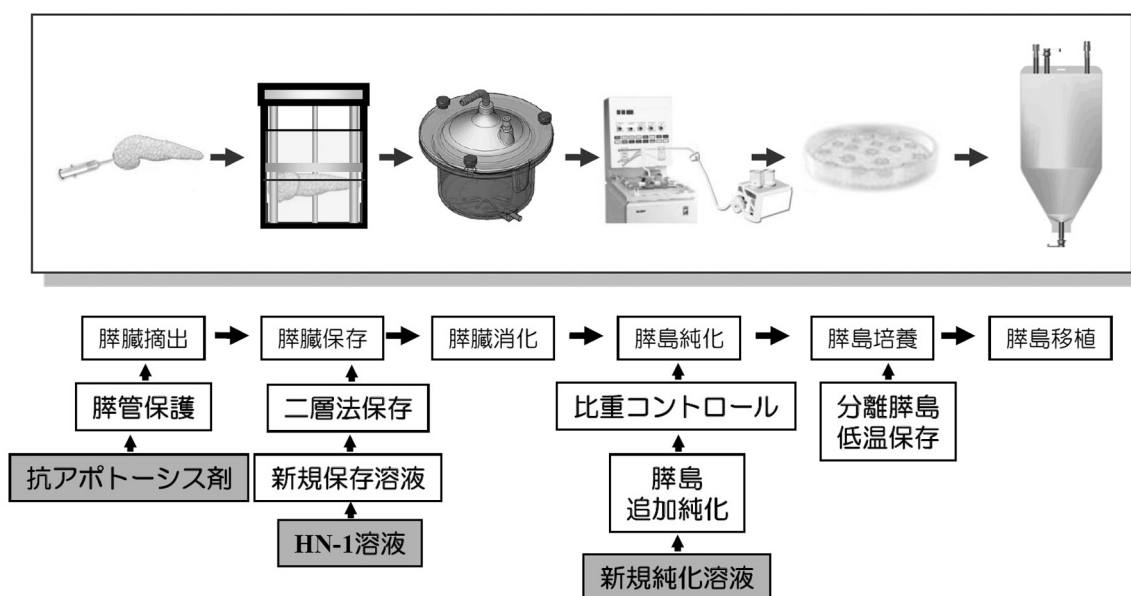
野口 洋文

【目的】膵島移植は1型糖尿病や膵摘出後の膵性糖尿病の患者に対して行われる移植療法であり、局所麻酔下にて膵臓から分離した膵島を経門脈的に注入するため、膵臓移植に比べ低侵襲である。一方、膵島分離技術は非常に複雑であるため、移植成績の施設間格差が大きいことが知られている。われわれはこれまでに6つの膵島分離技術改変を行い、第三世代膵島分離法を確立した。本研究では、さらに3つの技術改変を加えた第四世代膵島分離法を確立し、前臨床試験としてブタ膵を用いた大動物実験を実施した。

【方法】生後3年のブタ (n = 18) より膵臓を摘出し、第三世代および第四世代膵島分離法にて膵島を分離した。膵島の評価は、膵島数やサイズをカウントし、膵島収量を算出した。また、膵島スコア、FDA/PI 染色による細胞の Viability 測定、グルコース応答性試験を行った。さらに糖尿病化した免疫不全マウスにブタ膵島を移植し、血糖改善効果を確認した。

【結果】ブタ膵を用いた膵島分離を実施したところ、膵島収量は純化前・純化後ともに、第四世代膵島分離法 (n = 9) のほうが第三世代膵島分離法 (n = 9) と比べて有意に多かった。膵島スコア、FDA/PI 検査には有意差がなく、グルコース応答性試験では、いずれの群もグルコース応答性が認められ、良好な膵島が分離できていると考えられた。また、糖尿病化した免疫不全マウスにブタ膵島を移植したところ、第三世代分離法を用いた膵島では血糖改善率が55.6%であったのに対し、第四世代分離法を用いた膵島では改善率が77.8%であった。以上の結果より、第四世代膵島分離法により膵島分離成績のさらなる向上が見込まれ、この技術は近い将来、日本の膵島移植の成績向上に寄与できるものと考えられた。

第三世代・第四世代膵島分離法

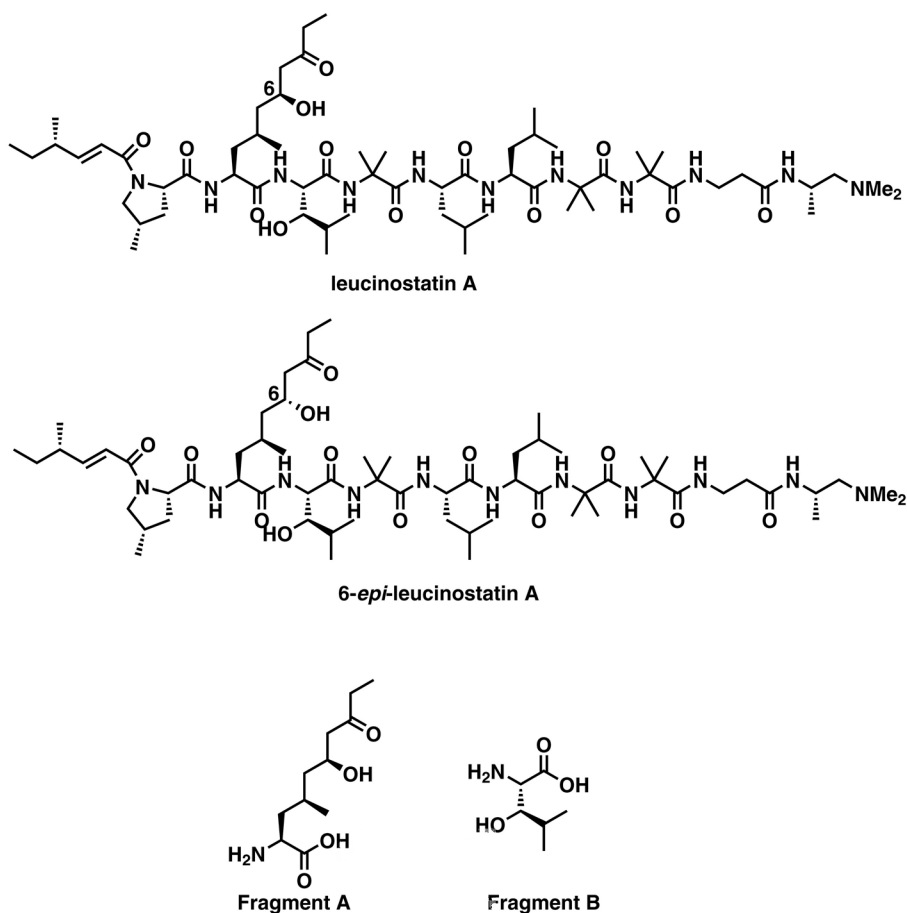


92 天然物ロイシノスタチン A の生物有機化学的研究

阿部 光

がん組織はがん細胞のみならず、その周辺に存在する間質細胞を含め成立している。がん細胞の増殖はこの間質細胞由来の分泌因子によっても制御されていることが知られるようになり新たな抗がん剤創薬ターゲットとして認知されている。がん細胞よりも遺伝子の安定性が高い間質細胞（正常細胞）のタンパク因子を分子標的とする抗がん剤は、従来の分子標的薬でしばしば問題となる耐性発現頻度を大幅に低減することが期待される。本研究で取り扱う Leucinostatin A は間質細胞存在下において単独培養時と比較し、がん細胞の増殖をより強力に抑制する。

本研究は Leucinostatin A の効率的合成法の確立と、これを応用した本化合物の作用機序解明を目的とした。今回、所属研究室で開発された 4 つの触媒的不斉反応を利用し得られた 2 つの異常アミノ酸を含むモノマー単位を順次縮合させることで Leucinostatin A およびその 6-エピ体それぞれの全合成を達成した。

Structure of leucinostatin A and 6-*epi*-leucinostatin A and fragemnt A, B

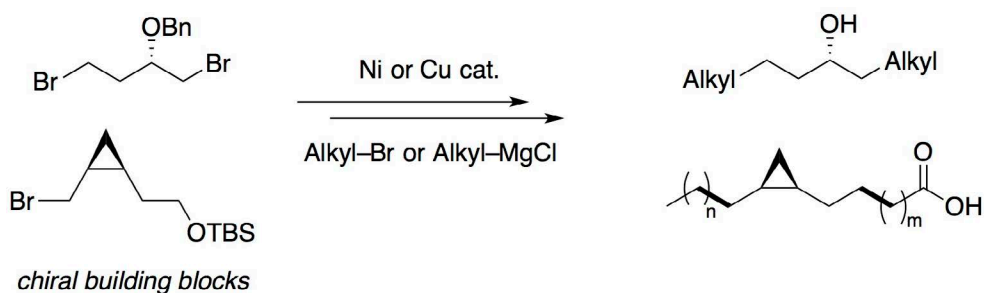
93 光学活性炭素骨格の不斉認識に関する研究

岩崎 孝紀

本研究では、独自の遷移金属触媒を用いたハロゲン化アルキルとアルキルグリニャール試薬とのクロスカップリング反応を利活用することにより、二官能性ビルディングブロックに対する逐次的なアルキル鎖導入による光学活性な飽和炭素骨格構築手法の開発研究に取り組んだ。具体的には、シクロプロパン環を有する新規ビルディングブロックを開発し、アルキルグリニャール試薬およびブロモアルカン酸との逐次的なクロスカップリング反応により、光学活性なシクロプロパン環を有する脂肪酸類の効率的な合成手法を確立した。また、水酸基等価体を有する光学活性なビルディングブロックを用いることにより、光学活性な第2級アルコールの合成手法を開発した。

本研究で開発した手法により、水酸基の α 炭素に長さが1炭素異なるアルキル鎖を2つ有する光学活性第2級アルコールが合成可能である。このようなアルキル鎖長の僅かな違いにより生じる不斉炭素が化学反応において不斉として認識されるか、すなわち不斉認識の限界がどこにあるのかを明らかにすることは、化学のみならず生命現象を司る生体内の反応を理解する上でも興味深い研究課題である。本研究では光学活性第2級アルコールの不斉認識についても併せて検討を行った。

Construction of chiral carbon frameworks by cross-coupling reaction of chiral building blocks



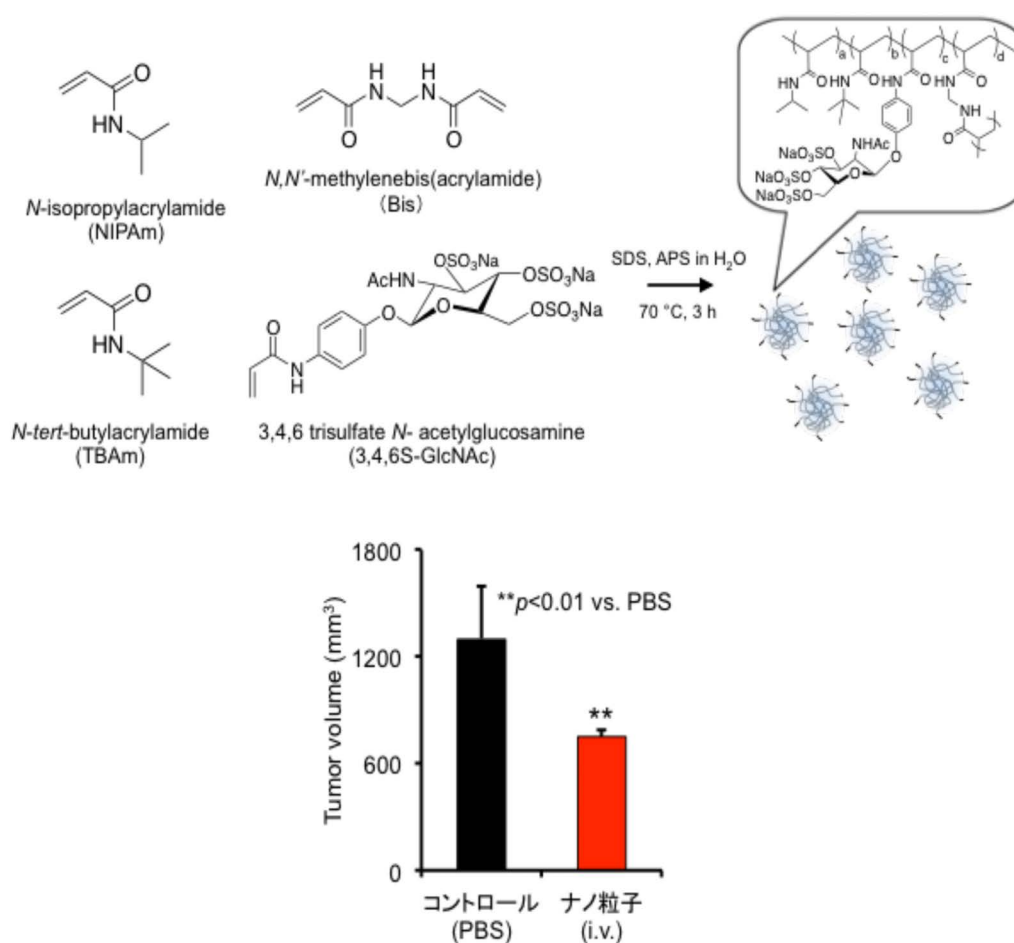
94 抗 VEGF プラスチック人工抗体の開発とがん治療への応用

小出 裕之

様々な官能基を導入した多官能性 poly-*N*-isopropylacrylamide (NIPAm) のナノ粒子は、官能基の組合せや導入量を最適化することにより、標的分子と強く結合することができる。これまでに、26 個のアミノ酸からなる蜂毒メリチンに対して強く、特異的に結合する多官能性ナノ粒子の合成に成功している。本研究では、がんの増殖に必要なタンパク質である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF165) に結合し、機能を阻害する抗 VEGF プラスチック人工抗体を合成し、がん治療への応用を目的とした。

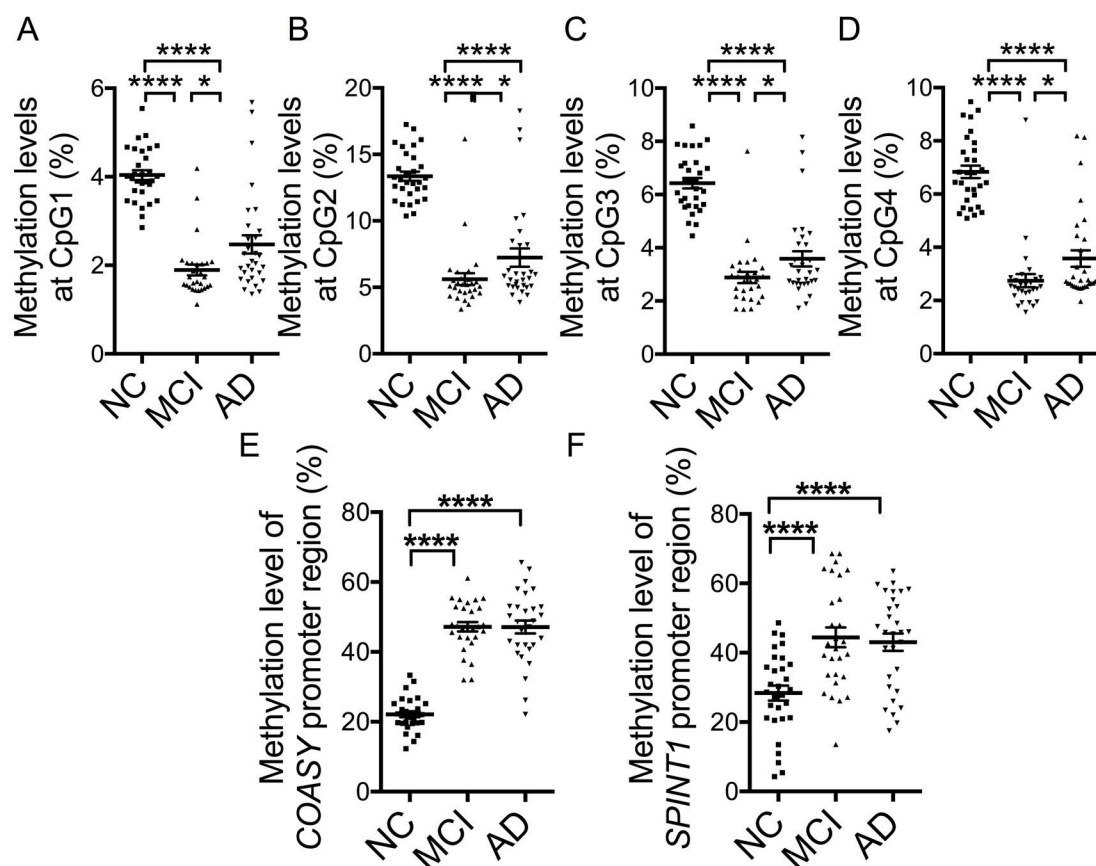
VEGF165 は、その配列中にヘパリン結合部位を有している。そこで、ナノ粒子はヘパリン類似モノマーである 3,4,6 trisulfate *N*-acetylglucosamine (3,4,6S-GlcNAc)、NIPAm、*N*-tert-butylacrylamide (TBAm、疎水性モノマー)、*N,N'*-methylenebis (acrylamide) (Bis、架橋剤) を用いて合成した。ナノ粒子と VEGF₁₆₅ の相互作用は 3,4,6S-GlcNAc を総モノマーに対して 1.7% 組み込むことで高い親和性を示した。ナノ粒子の *in vitro* における活性の評価には、新生血管モデル細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。その結果、ナノ粒子は VEGF 添加による受容体 (VEGFR-2) のリン酸化を阻害することで VEGF 依存的な細胞増殖を阻害することを明らかにした。さらに、結腸がん細胞である Colon26NL17 細胞を皮下移植したマウスに、尾静脈からナノ粒子を投与することで、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。

プラスチック人工抗体の合成とがん治療効果



高齢社会による認知症の増加は大きな問題であり、認知症疾患への早期診断と早期介入が求められている。そこで、本研究では、血液中 DNA メチル化量が診断バイオマーカーとして、認知症疾患のスクリーニングに有用となるか検討した。まず、健常人 (NC)、アルツハイマー病 (AD) 及びその前段階である軽度認知機能障害 (MCI) の少数例で、網羅的に血液 DNA メチル化量の変化を定量した。その結果、AD、MCI では様々な遺伝子領域の DNA メチル化量が変化していることが明らかとなった。それらの遺伝子領域をスクリーニングし、得られた結果をパイロシーケンス法または methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM) 法で検証した。その結果、*NCAPH2* (*LMF2*) 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は、AD、MCI で有意に低下し、*COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は AD、MCI で有意に上昇していた。以上のことから、*NCAPH2* (*LMF2*)、*COASY*、*SPINT1* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量の測定は、認知症疾患の早期診断、鑑別に有用となることが示唆された。

AD、MCI における DNA メチル化量の変化

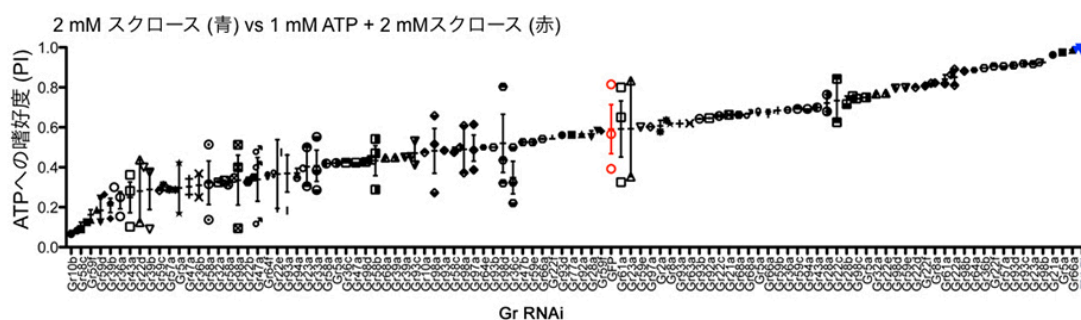


96 デング熱媒介蚊の吸血行動の解明と社会医学的应用

佐久間 知佐子

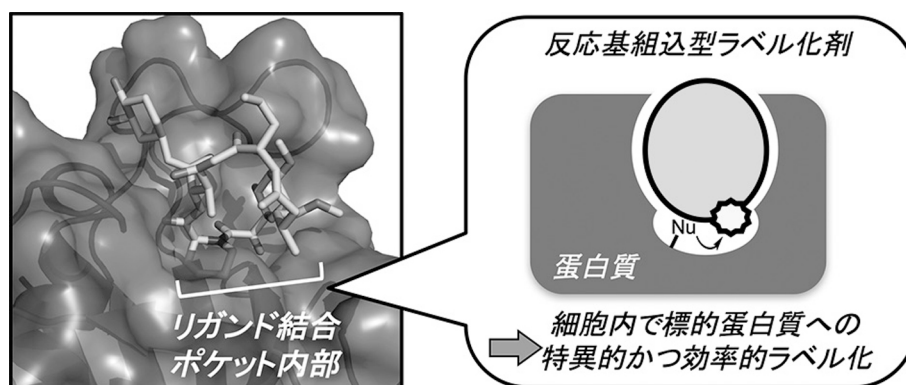
マラリア、デング熱などの疾患は蚊によって媒介される感染症であり、吸血行動が寄生虫やウイルスなどの病原体伝播の根源となる。吸血開始のために蚊が血液成分の ATP を感知していることが報告されてきたが、ATP 受容体や ATP 情報を処理する神経回路は未知であった。哺乳類などで ATP 受容に関わる P2X 受容体の相同志が蚊や蚊と同じ双翅目のショウジョウバエのゲノムから脱落しているため、液性成分の感知を一般的に担う味覚受容体に着目し、遺伝学を用いることのできるショウジョウバエで ATP 認識に関わる味覚受容体探索を行った。まずショウジョウバエにおいて ATP 嗜好性をテストする系を確立し、蚊同様に ATP を嗜好することを確認した。次に神経において 52 味覚受容体遺伝子に対する RNAi102 系統を発現させたところ、17 遺伝子に対する RNAi を発現させた時に ATP 嗜好の異常が生じることが判明した。これらのうち 4 遺伝子はネッタイシマカに相同志が存在するため、これらがネッタイシマカにおいて ATP を認識し吸血開始を制御している可能性が示唆される。並行してネッタイシマカの口吻において発現に性差がある味覚受容体 Gr5 に注目し、ネッタイシマカ機能欠損変異体を作製したところ吸血行動に異常が生じた。以上より、味覚受容体群は血液認識に重要であると考えられる。

味覚受容体 (*Gr*) -RNAi ライブラリーを用いたショウジョウバエにおける ATP 嗜好性のテスト



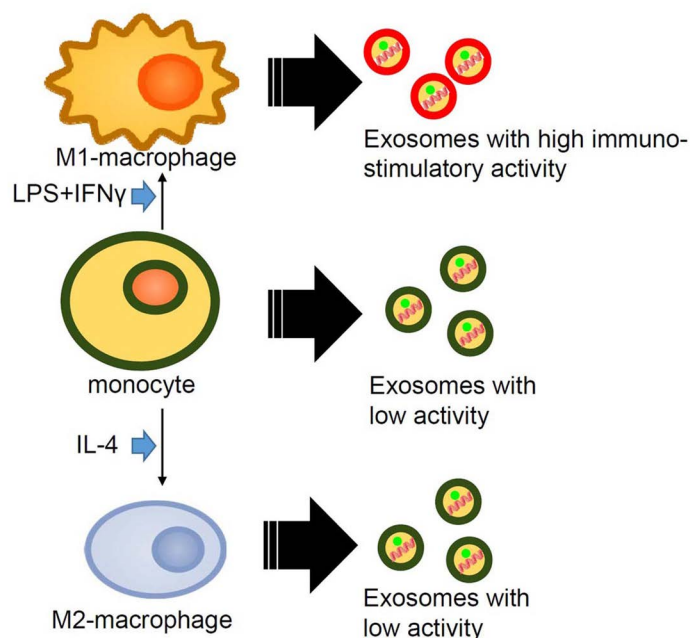
細胞の中には無数の蛋白質がひしめき合い、それらが複雑に相互作用しあって細胞外のシグナルを内側へと正確に伝えていく。この中でただ1種類の蛋白質を化学的に見分けるのは極めて困難であるが、特異的に化学修飾する方法論として、アフィニティーラベル化という方法がある。これは、蛋白質に認識される小分子リガンドに反応基を導入した「アフィニティーラベル化剤」と呼ばれる試薬を用いるもので、細胞の中でラベル化剤が蛋白質に特異的に認識され、反応基が蛋白質と近接することによって効率的なラベル化が達成される。本研究ではこのアフィニティーラベル化の新規分子設計指針として、反応基組込型ラベル化剤を開発した。本ラベル化剤は、反応基をリガンド結合ポケット内部に向けることで、顕著な近接効果と迅速な反応性を併せ持ち、細胞に内在的に発現するごく微量の蛋白質を、特異的かつ効率的にラベルできることが明らかとなった。さらにこの効率の高さは細胞内の分子クラウディング環境によるものであることなどが示唆され、新たな細胞内蛋白質ラベル化法となることが期待される。

反応基組込型アフィニティーラベル化剤による蛋白質リガンド結合ポケット内部へのラベル化の模式図



本研究では、抗炎症作用が期待できる間葉系幹細胞および M2 マクロファージのエクソソームを利用した、炎症疾患の治療に適用可能な機能性エクソソーム製剤を開発することを目指した。マウスより採取した間葉系幹細胞からエクソソームの回収を試みたところ、ほとんどエクソソームを回収できなかったことから検討は行わなかった。モデルマクロファージとしてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を選択した。RAW264.7 細胞を M1 あるいは M2 に分化させたのち、エクソソームを回収した。RAW264.7 細胞にリポ多糖 (LPS) を添加後の炎症性サイトカイン産生量を指標にエクソソームの抗炎症能を評価したところ、M1・M2 いずれより回収したエクソソームも抗炎症作用を示さなかった。一方で、M1 マクロファージより回収したエクソソーム (M1 exo) は免疫活性化作用を示すことが明らかとなった。そこで、免疫賦活化剤としての M1 exo の利用の可能性について検証したところ、M1 exo は樹状細胞による抗原提示能を増強可能であった。以上、M1 exo は免疫賦活化剤として利用可能である可能性を見出した。

各種マクロファージから産生されるエクソソームの機能

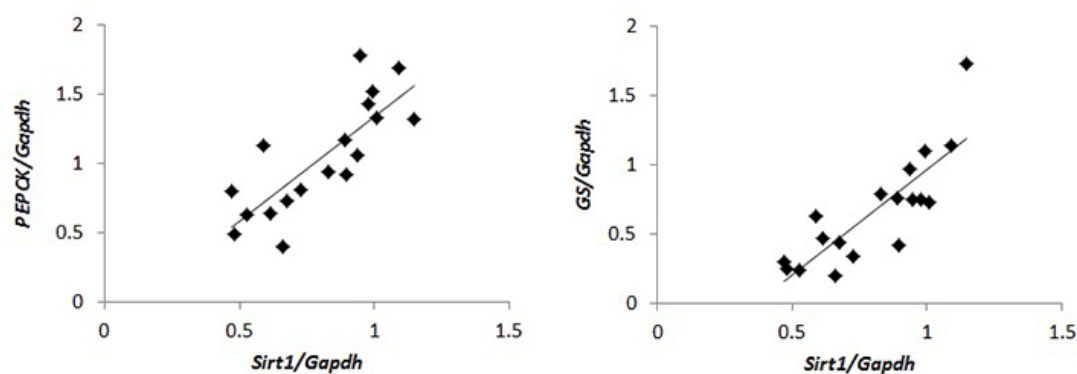


99 亜鉛欠乏食による病態発症における Sirt1 の役割

内匠 正太

必須微量元素である亜鉛は 300 種以上の酵素の活性中心として存在し、2,000 種以上のタンパク質と転写因子の安定性に寄与しており、亜鉛の欠乏は、様々な健康障害を引き起こすことが知られている。近年、加齢に関与するとして着目されている長寿遺伝子 *Sirt1* も、亜鉛が配位する Zn フィンガードメインを構造内に有しており、Zn フィンガードメイン内の亜鉛が *Sirt1* の構造の安定化及び活性に重要であることが報告されている。そこで本研究では、食餌中の亜鉛が *Sirt1* に及ぼす影響について解析することを目的に研究を行った。具体的には、亜鉛量の異なる食餌（亜鉛含量 0、0.005、0.01%）を与えた Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製した cDNA を用いた遺伝子発現解析を行い、*Sirt1* と相関性の高い遺伝子の探索を行った。その結果、亜鉛欠乏食（亜鉛含量 0%）において *Sirt1* の有意な発現抑制が認められ、*Sirt1* の遺伝子発現と各遺伝子との相関分析を行った結果、糖代謝に関与する *PEPCK* ($r = 0.808$, $p < 0.0001$) と *GS* ($r = 0.882$, $p < 0.0001$) が極めて高い正の相関を示すことが明らかとなった。このことから、亜鉛欠乏時に *Sirt1* が糖代謝を制御するこれらの遺伝子発現に関与していることが示唆された。

Sirt1 遺伝子の発現と高い相関性が認められた遺伝子

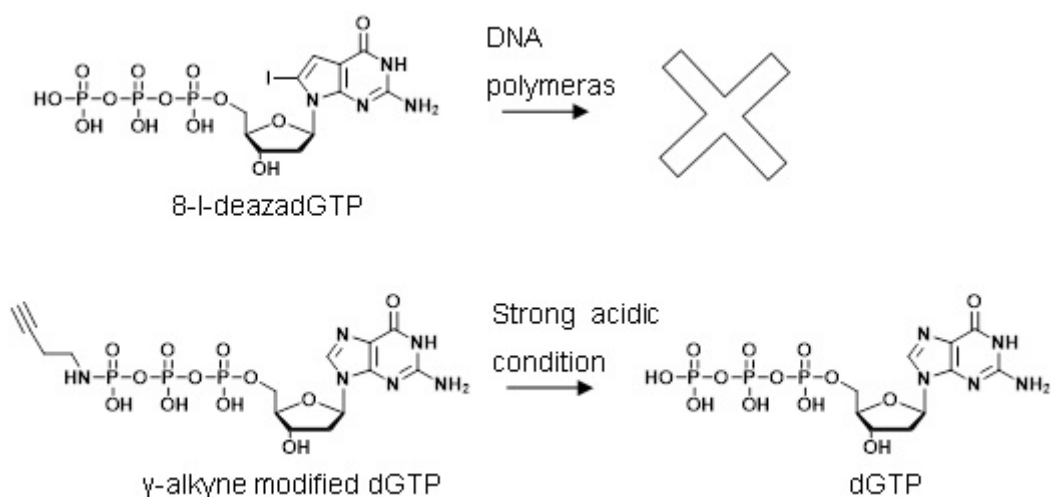


100 修復酵素阻害剤への展開を目指した核酸誘導体の創製

谷口 陽祐

細胞は絶えず酸化ストレスにさらされており、DNA や RNA の核酸類は酸化損傷を受けている。その代表例としてグアノシンの 8 位が酸化された 8-オキシグアノシンがあり、このような損傷塩基による遺伝子変異は、修復酵素の作用により除去されることで防がれている。最近、がん細胞で過剰発現している損傷塩基加水分解酵素 (hMTH1) を特異的に阻害可能な低分子化合物は、新規メカニズムによる抗がん剤になりうるという報告がなされた。我々は、損傷塩基類似核酸を創製しており、その分子が hMTH1 に強力に結合することを見いだしている。そこで本研究では、この核酸誘導体の細胞内への導入に向けた誘導体への変換や機能評価を行った。まず、DNA 合成酵素に対する性質を調べた結果、我々の化合物は鋳型鎖の DNA 鎖に対して、伸長鎖には取り込まれないことが分かった。また、エレクトロポレーション法を用いて直接細胞内に導入することにより、その作用は僅かではあるが細胞死を誘導することを見いだした。さらに、細胞内導入へ向けたモデル化合物の誘導体を合成し酸性条件下で処理すると、一部が加水分解されることが明らかとなり、細胞内に導入することで活性本体と切り離されるという有用な情報を得ることができた。

Properties of triphosphate analogues

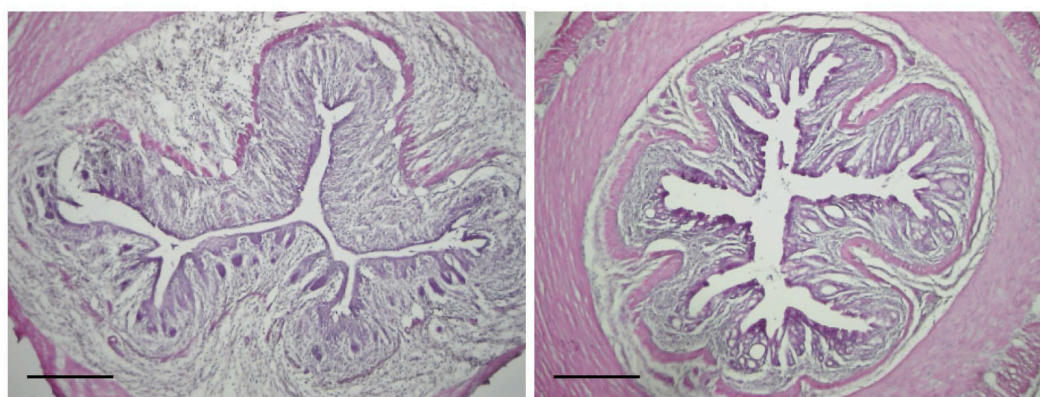


101 和漢薬を応用した炎症性腸疾患に対する新規治療薬探索

林 周作

炎症性腸疾患（IBD）は、病因不明の慢性炎症疾患であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。既存の治療法では十分な病態改善に至らないことも多く、IBD に対する新規で有用な治療薬の創出が求められている。これまでの研究から我々は、腸管マクロファージにおける IL-10 の産生を亢進させることが IBD に対する新たな治療戦略として有用である可能性を見出してきた。そこで、腸管マクロファージの IL-10 産生亢進を介した IBD に対する新規治療薬の探索を目的として本研究を行った。IL-10 を高産生する骨髄細胞由来マクロファージ（BMDM）の移入は、マウスにおける実験的大腸炎の発症を抑制し、この効果は抗 IL-10 抗体の投与により減弱した。伝統薬物である和漢薬や天然薬物を創薬リソースとして活用し、BMDM の IL-10 産生を亢進させる薬物のスクリーニングを行ったところ、11 種類の生薬エキスおよび 3 種類の生薬由来化合物が BMDM の IL-10 産生を上昇させた。さらに、生薬エキスのうち 2 種類が腸管粘膜から単離した腸管マクロファージの IL-10 産生を亢進させた。

IL-10 を高産生するマクロファージはマウスにおける実験的大腸炎の発症を抑制する
左図は通常のマクロファージを、右図は IL-10 高産生マクロファージを移入した大腸炎モデルの病理像を示しており、左図で認められる大腸粘膜構造の破綻が右図では改善している。



WT + WT BMDM

WT + p85α+/- BMDM

102 大規模疫学分析に基づく大動脈弁硬化変性の病態解明

久松 隆史

大動脈弁狭窄症の主因である大動脈弁硬化変性の病態は十分に解明されているとはいえず、我が国における詳細な検討は皆無である。本研究では日本人一般住民における大動脈弁硬化変性の分布実態および関連する要因を検討することを目的とした。滋賀県草津市地域住民から無作為抽出した一般健康人 1,009 名（40–79 歳男性、平均年齢 63.7 ± 10.0 歳）を分析対象とした。大動脈弁硬化変性（石灰化）は、CT 画像にもとづき、Agatston 法により評価した。ロジスティック回帰を用いて、大動脈弁硬化変性に対する各変数のオッズ比（OR）および 95% 信頼区間（CI）を求めた。大動脈弁硬化変性の有病率は 18.9% であった。大動脈弁硬化変性に関連していた要因は、加齢（5 歳上昇あたりの OR、1.76；95%CI、1.50–2.05）、収縮期血圧（10 mmHg 上昇あたりの OR、1.14；95%CI、1.04–1.26）および LDL コレステロール（10 mg/dl 上昇あたりの OR、1.08；95%CI、1.02–1.15）の上昇、糖尿病治療薬の使用（使用無しに対して OR、1.86；95%CI、1.05–3.28）、および現在喫煙（現在非喫煙者に対して OR、1.65；95%CI、1.10–2.47）であった。結語として、健康な日本人一般住民における大規模疫学分析の結果、大動脈弁硬化変性は、加齢、収縮期血圧および LDL コレステロールの上昇、糖尿病治療薬の使用、および現在喫煙に関連した。

日本人一般住民 1,009 名（40–79 歳）における大動脈弁硬化変性に関連する要因
（SESSA、2006–8 年、滋賀）

	大動脈弁硬化変性(石灰化)*	
	オッズ比 (95% 信頼区間)	P value
年齢(5歳上昇あたり)	1.76 (1.50–2.05)	<0.001
BMI(5kg/m ² 増加あたり)	1.26 (0.90–1.76)	0.171
収縮期血圧(10mmHg増加あたり)	1.14 (1.04–1.26)	0.008
降圧剤の使用(vs. 使用なし)	1.12 (0.76–1.66)	0.560
HDLコレステロール(10 mg/dl低下あたり)	0.97 (0.86–1.10)	0.680
LDLコレステロール(10 mg/dl増加あたり)	1.08 (1.02–1.15)	0.009
中性脂肪(1単位増加あたり)†	0.82 (0.52–1.30)	0.400
脂質異常症治療薬の使用(vs. 使用なし)	1.30 (0.79–2.14)	0.297
空腹時血糖(10 mg/dl増加あたり)	1.01 (0.92–1.12)	0.769
糖尿病治療薬の使用(vs. 使用なし)	1.86 (1.05–3.28)	0.034
現在喫煙(vs. 現在非喫煙)	1.65 (1.10–2.47)	0.016
飲酒(vs. 飲酒なし)	0.91 (0.60–1.36)	0.638
GFR(10 mL/min/1.73m ² 低下あたり)	1.08 (0.94–1.25)	0.276
CRP(1単位増加あたり)†	1.03 (0.86–1.24)	0.727

ロジスティック回帰における調整モデルは表内の全ての変数を同時に組み込んだ。

*大動脈弁硬化変性の定義:「石灰化あり」はAgatstonスコア0超とした。

†正規分布に従わない変数は対数変換してモデルに組み込んだ。

略語: BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; GFR, glomerular filtration rate; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein

103 高齢者における座位行動の現状とその関連要因の検討

福島 教照

近年、長時間の座位行動は様々な健康影響を及ぼす危険因子として注目されている。しかし、高齢者の座位行動の現状を客観的手法で評価した研究は極めて少なく、またその関連要因についても十分検討されていない。そこで、本研究では地域在住高齢者を対象に座位行動を3軸加速度計で精確に測定し、座位行動時間と社会参加・外出頻度の多寡との関連について検討を行った。本調査に同意した70～79歳の地域在住高齢者478名に、3軸加速度計（Omron Healthcare：HJA-350IT）を連続7日間装着するよう郵送にて依頼した。加速度計データの採択基準は、加速度信号ゼロが60分間以上継続した場合を非装着時間と定義し、1日10時間以上、4日以上装着記録のあることとした。また、継続する座位行動（以下、バウト）は1.5メッツ以下の活動強度が持続している状態（時間）とし、1.6メッツ以上の活動強度が計測された場合にバウトの中断と定義した。社会参加は「個人的活動（趣味等）」と「地域的活動（ボランティア活動への参加等）」の2つに類型化し、外出頻度の程度は「週6～7日」、「週4～5日」、「週0～3日」の3群に分類し、それぞれを独立変数とし、社会人口統計学的要因および加速度計装着時間を調整し、座位行動時間を従属変数とし、重回帰分析にて男女別に検討した。本研究の分析対象者は450人であった。3軸加速度計で測定した1日あたりの平均座位行動時間は男性で約9時間、女性で約8時間であった。また、1日あたりのバウト回数は男性が 56.1 ± 14.4 回であり、女性の 62.5 ± 13.6 回より有意に少なかった。総座位時間に占める60分以上継続する座位行動の割合は男女とも20%以上であった。また、男性では「個人的活動」が少ないこと、女性では「地域的活動」が少ないこと、そして男女とも外出頻度が少ないことはそれぞれ長い座位行動時間と関連していた。以上より、高齢者における社会参加および外出の促進は座位行動を減少させる可能性が示唆された。

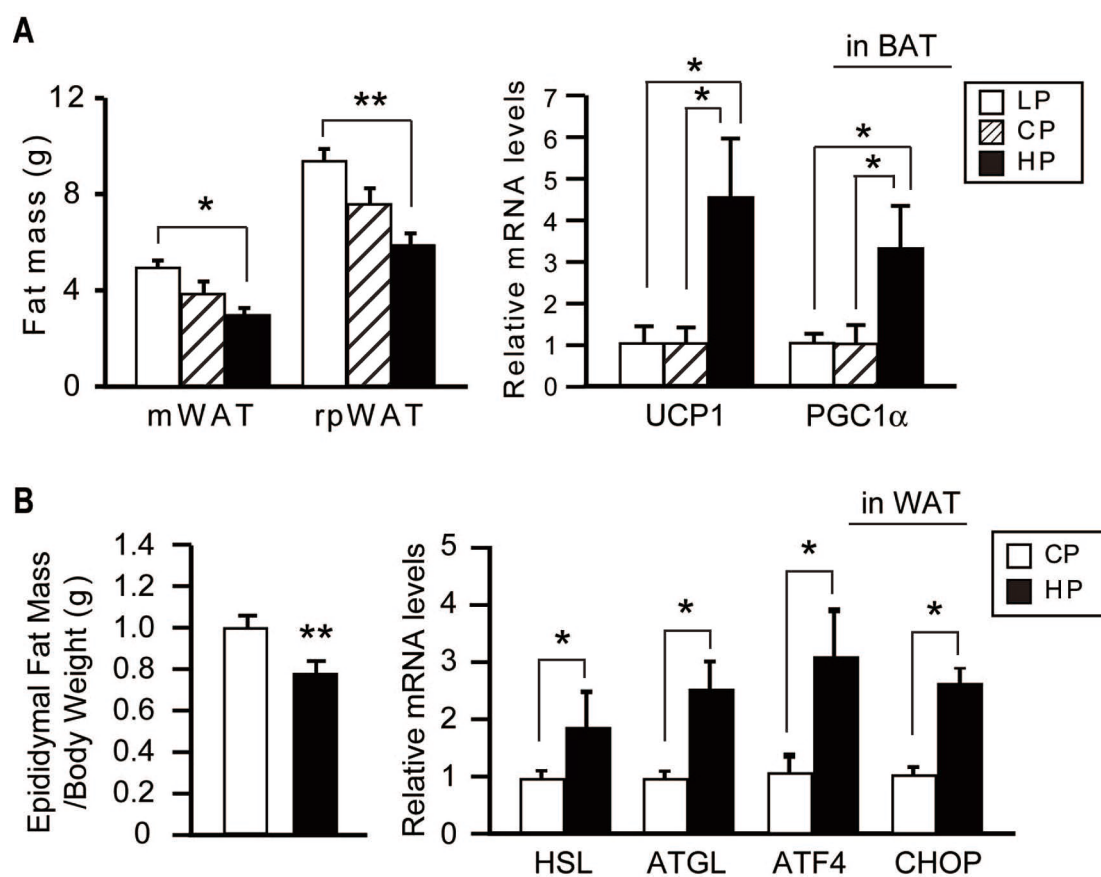
Gender differences in objectively-measured physical activity (minutes/day) classified by intensity

	Men				Women				p value
	mean±SD	median	(25%,75%)	% wear time	mean±SD	median	(25%,75%)	% wear time	
Wear time	854.9±89.1	858.9	(789.4, 918.4)		898.6±86.4	897.5	(843.6, 952.8)		<0.001
SB (≤1.5 METs)	548.3±118.7	551.1	(481.2, 619.6)	64.0	487.0±111.6	481.9	(418.1, 543.6)	54.2	<0.001
LPA (1.6-2.9 METs)	263.1±87.4	260.6	(198.9, 319.8)	30.9	365.3±90.2	359.3	(304.2, 421.0)	40.7	<0.001
MVPA (≥3.0 METs)	43.6±30.1	39.3	(20.4, 60.6)	5.1	46.3±32.8	38.8	(21.3, 65.6)	5.1	0.526

P-value was calculated using the Mann-Whitney U test or t test, as appropriate. SB; sedentary behavior, LPA; light-intensity physical activity, MVPA; moderate-to-vigorous physical activity.

食の欧米化が進み、肥満症を発症している日本人が多いが、肥満症は心血管疾患の発症を高めるため、その効果的な治療法の確立が急務とされている。しかしながら、現在の肥満患者に対する食事療法はエネルギー・糖質・脂質の量の制限が基本方針であり、それ以上の治療法は未だ構築されていない。近年、リンが脂質代謝に関わることを示唆する研究内容が報告されているが、その詳細な機序は不明のままである。本研究では、高リン食が体脂肪量の減少を引き起こす詳細な機序の解明を目的に、リン濃度の異なる食餌を与えたラットの褐色脂肪組織および白色脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子発現を中心に解析した。ラットにリン濃度の異なる食餌を与えると高リン食により白色脂肪組織量が減少し、それには褐色脂肪組織における uncoupling protein 1 (UCP1) などによる熱産生能の向上が影響することを見出した。さらに、白色脂肪組織中の過剰な小胞体ストレスを介した adipose triglyceride lipase (ATGL) などによる脂肪分解の亢進が、高リンによる内臓脂肪量の減少を誘発するもう一つの経路である可能性を示した。

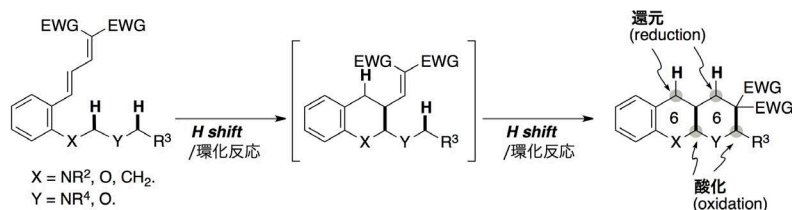
高リン食による褐色脂肪組織および白色脂肪組織への影響



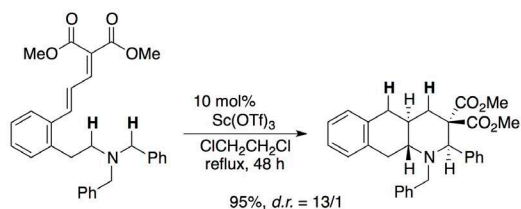
105 酸化還元を利用する多重 C(sp³)-H 結合変換法の開発

森 啓二

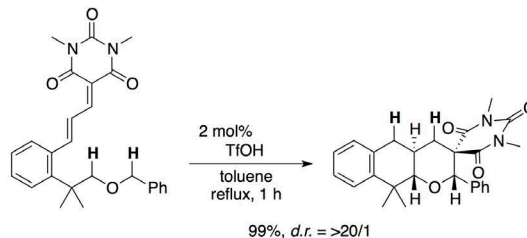
環境問題が大きく取りざたされる現在、環境に優しい分子変換法への需要が急速に高まっている。その中でも、様々な化合物中に偏在する炭素-水素結合を直接変換する C-H 結合官能基化法は、ハロゲン化などの事前の基質調製を必要とせず、また余分な廃棄物を出さない有用な合成法の一つである。本研究では近年我々が開発した分子内のヒドリド転位に基づく環境調和型 C-H 結合官能基化法（「分子内 redox 反応」）の連続利用による多重 C(sp³)-H 結合官能基化反応の開発を目指し、研究に取り組んだ。その結果、反応性の高いシンナミリデンバルビツレートを用いることで望みの二重 C(sp³)-H 結合官能基化反応が効率よく進行することを見出した。ドーパミン受容体アゴニストの母核となる多置換オクタヒドロベンゾキノリン骨格を単工程で与える有用な合成反応である。残念ながら、そのジアステレオ選択性は低い値にとどまったが、求電子部位をマロナートに変更することで極めて高いジアステレオ選択性を達成できた。さらに本二重 C(sp³)-H 結合官能基化が、酸素誘導体を用いた多置換ピラン誘導体の高ジアステレオ選択的合成にも展開できることも明らかとした。

分子内 redox 反応を駆使する二重 C(sp³)-H 結合官能基化反応の開発

【三環性多置換ペリジシン合成】



【三環性多置換ピラン合成】



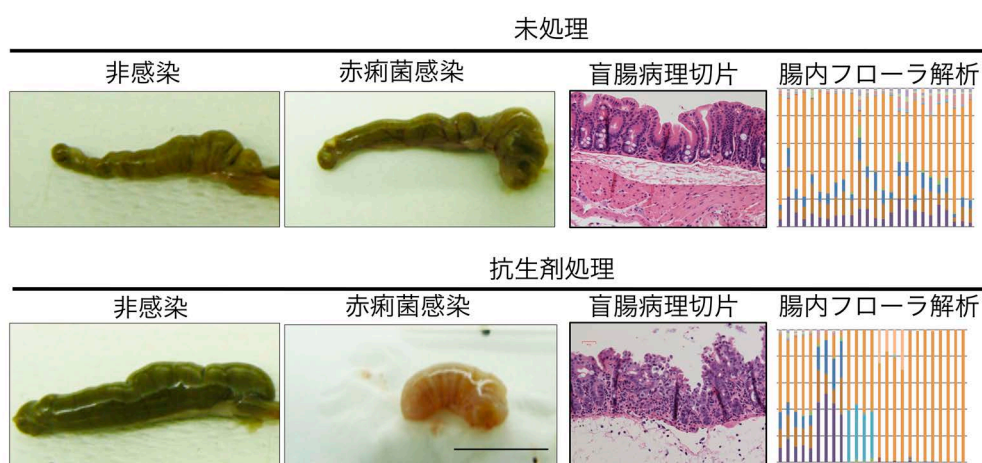
106 病原細菌腸管感染マウスモデルの構築

芦田 浩

赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、開発途上国では乳幼児を中心に年間1億人以上が罹患している。安全で有効なワクチンは存在せず、また現在では抗生剤治療が行われているが、多剤耐性赤痢菌の出現が問題となっていることから、新たな治療法の開発が望まれている。しかしながら、赤痢菌をはじめとする腸管病原細菌の多くはワクチン・創薬開発の動物モデルとして最適なマウス腸管に対して感染が成立せず、研究ツールとしてのマウスモデル欠如は大きな障害となっている。一方、近年の分子生物学的手法による腸内細菌叢の解析法や網羅的代謝産物解析法の確立によって、腸管感染において腸内細菌叢は感染防御に重要な役割を担うことが明らかにされた。そこで本研究では抗生物質処理によるマウス腸内細菌叢変動による病原細菌-腸管免疫-腸内細菌の3者相互作用改変により病原細菌腸管感染マウスモデルの構築を試みた。

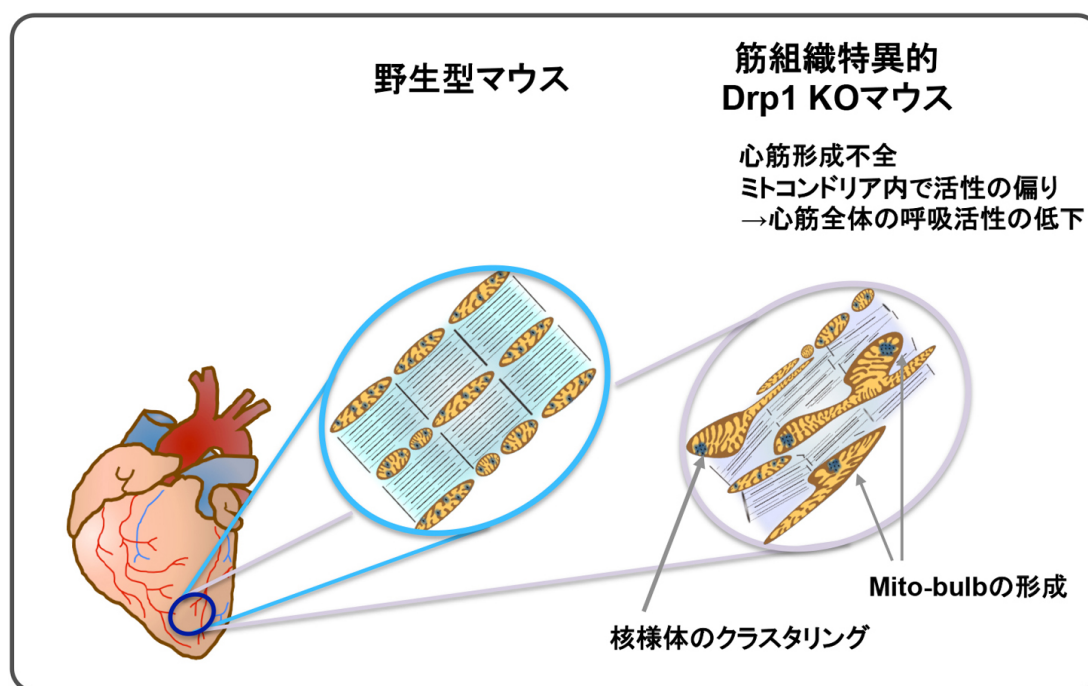
抗生物質処理後のマウス糞便より腸内細菌叢解析を行うと、腸内細菌叢の多様性の変化が認められた。抗生物質処理後のマウスに赤痢菌を経口投与すると、腸管内での菌の定着、粘膜下層の肥厚、上皮細胞の破壊・剥離、および好中球をはじめとするリンパ球浸潤といった赤痢菌感染兆候が認められ、赤痢菌腸管感染マウスモデルとしての有効性が示された。本研究による成果は従来困難であった安全な病原細菌ワクチンの開発の評価ツールとして、ブレークスルーをもたらすことが期待される。

赤痢菌腸管感染マウスモデル
上段：未処理マウス、下段：抗生剤処理マウス



細胞内でミトコンドリアは分裂・融合を頻繁に繰り返し、ダイナミックにその形態を変化させている事が知られている。近年の研究から、その形態変化は細胞・組織の機能発現およびその維持にとっても重要であることが分かってきた。また、ミトコンドリアが保持する独自のゲノム (mtDNA) も DNA 結合タンパク質であるミトコンドリア転写因子 A (TFAM) などとともに核様体という構造を形成し、内膜上を移動していると考えられている。本研究では、ミトコンドリア膜と mtDNA の挙動に着目し、解析を行った。HeLa 細胞でミトコンドリアの分裂を抑制すると mito-bulb という構造体を形成し、ある種のアポトーシスに対して抵抗性を示すことが分かった。これは mito-bulb 内で核様体がクラスターを形成し、クリステ膜を密にすることによって起こることが考えられた。また心筋やその初代培養細胞でも分裂を抑制すると核様体のクラスターリングが確認できた。心筋では、この核様体の分布の偏りが呼吸鎖複合体サブユニットの発現分布を不均一にし、細胞全体の呼吸能を低下させていることが示唆された。本研究から、新たに mtDNA の分布も細胞機能維持に重要であることが分かった。

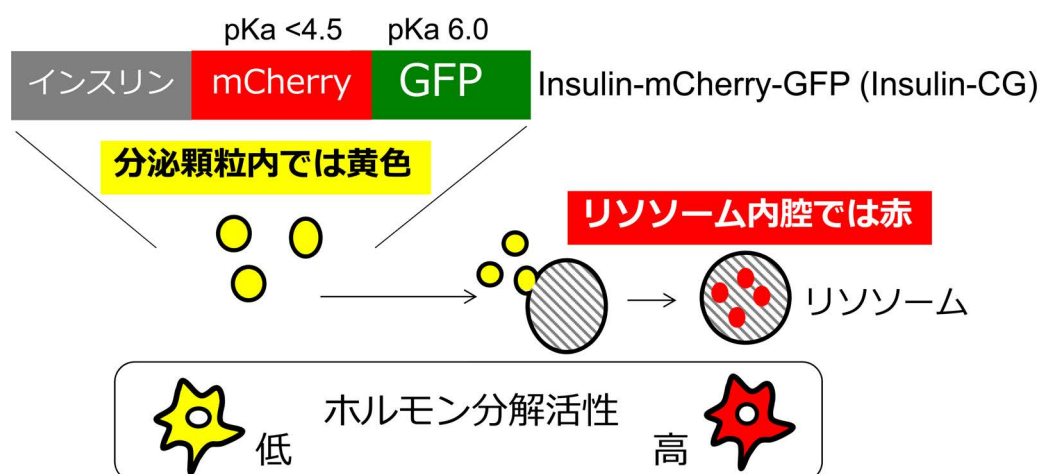
心筋におけるミトコンドリア膜と mtDNA のダイナミクス



高齢化社会を迎え、生活習慣病は増加する一方である。ホルモンの異常は様々な生活習慣病の起因となる。ホルモンは低濃度で働くため、その量的制御は厳密に管理されている。そのため、ホルモンの合成や分泌調節に関する多くの研究がされてきた。だがホルモンを細胞外分泌前に分解する経路が存在し、その重要性も生理機能も理解が進んでいない。

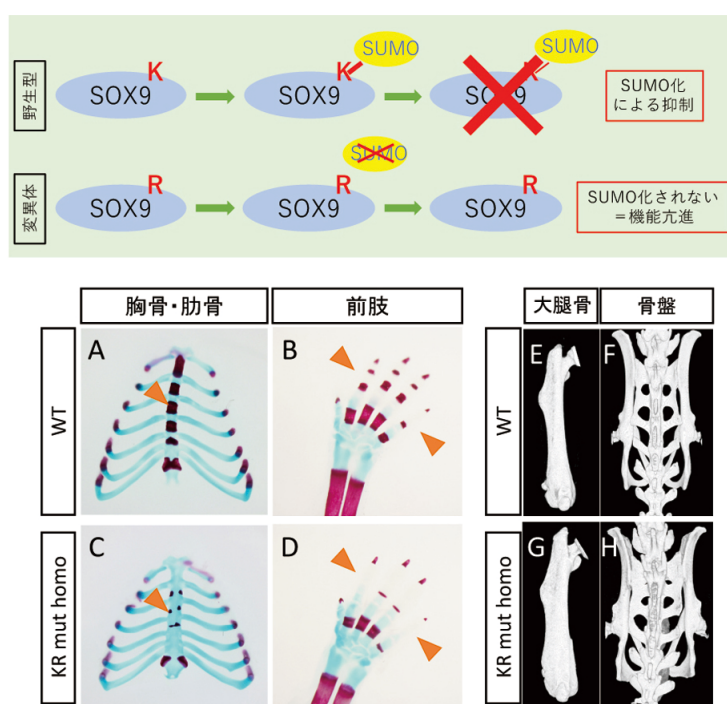
今回、我々はリソソームへ輸送されたホルモンを検出するため新規の細胞内ホルモン分解アッセイ法を開発した。この方法を用いることで細胞あたりの緑色と赤色の蛍光比率によりリソソーム内に輸送されたホルモンの量を定量的に測定することが可能となった。さらにどのような細胞外刺激がリソソームへのホルモン輸送を促進するのか検討した。その結果アミノ酸飢餓によって促進することが示唆された。今回開発した新規のホルモン分解アッセイ法を用いることで、簡便・定量的にホルモン分解を測定することができ、詳しい分子メカニズムの解明が期待できる。

細胞内ホルモン分解経路の新規測定方法



哺乳類の発生過程において骨の形が正確に規定されるメカニズムは未だ不明である。*Sox9* 遺伝子は軟骨の前駆細胞に発現し、軟骨、硬骨の形成に重要な役割を果たす転写因子であり、*Sox9* 遺伝子のヘテロ変異マウスやトランスジェニックマウスが骨格異常を示すことから、正常な骨格形成のために SOX9 の活性は定量的に厳密に制御される必要があると考えられる。本研究において我々は SOX9 のタンパク質翻訳後修飾による活性制御が骨格形成に果たす役割を解明するために CRISPR/Cas9 技術を用いて翻訳後修飾標的のアミノ酸 K396 に点変異を導入した SOX9K396R マウスを作製し、その骨格を解析した。SOX9K396R マウスでは内軟骨性骨化の遅延など SOX9 の機能亢進の表現型が見られ、また骨格の形に異常が観察された。軟骨細胞における SOX9 タンパク質の量に変化がなかったことから K396 に対する翻訳後修飾は分解性ではなく制御性であることが示された。K396 は SUMO 化の標的であることから SUMO 化 SOX9 の機能を解析したところ、SUMO 化 SOX9 は野生型 SOX9 の標的に対して抑制的に働くことが示された。また SOX9 の SUMO 化は SOX9 の DNA 結合ドメインに依存することからネガティブフィードバックによる SOX9 の機能抑制機構である可能性が示唆された。

SOX9K396R 変異体のコンセプト（上段）と骨格における表現型（下段）

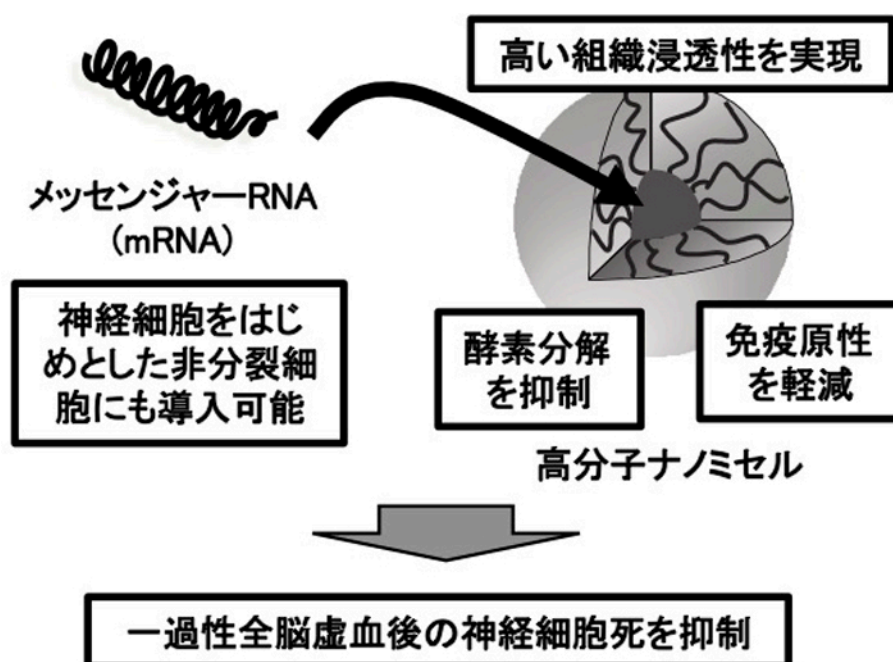


110 神経細胞標的 mRNA デリバリーによる脳虚血性疾患治療

内田 智士

mRNA 導入は、新たな遺伝子治療の手法として注目されている。我々は、高分子ナノミセルに mRNA を搭載することで、脳脊髄液への投与において、安全かつ効率的に中枢神経系へ mRNA を送達できることを世界に先駆けて報告している。一方で、治療応用に向けて、患部にナノミセルが効率的に送達されることが必要である。そこで、本研究では、まず投与したナノミセルの組織分布を評価した。すると、ナノミセルは投与部位近傍に効率的に集積するだけでなく、離れた部位へも脳脊髄液を介して送達され、さらに脳組織深部まで浸透することが明らかとなった。さらに、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の mRNA を用いて、一過性全脳虚血に伴う海馬 CA1 領域における神経細胞の細胞死抑制を試みた。ラットモデルに対して、mRNA を 2 回投与することにより BDNF タンパク質を 1 週間程度発現させたところ、ほぼ永続的に神経細胞死を抑制することに成功した。BDNF の持続発現は副作用の危険性もあるため、一過性発現が得られる mRNA 導入の特長を活かした戦略である。本研究では mRNA 搭載ナノミセルの疾患治療への有用性が示されたが、今後はナノミセルに神経細胞選択的な mRNA 送達といった機能を付与することで、より高度な治療法の構築を目指す。

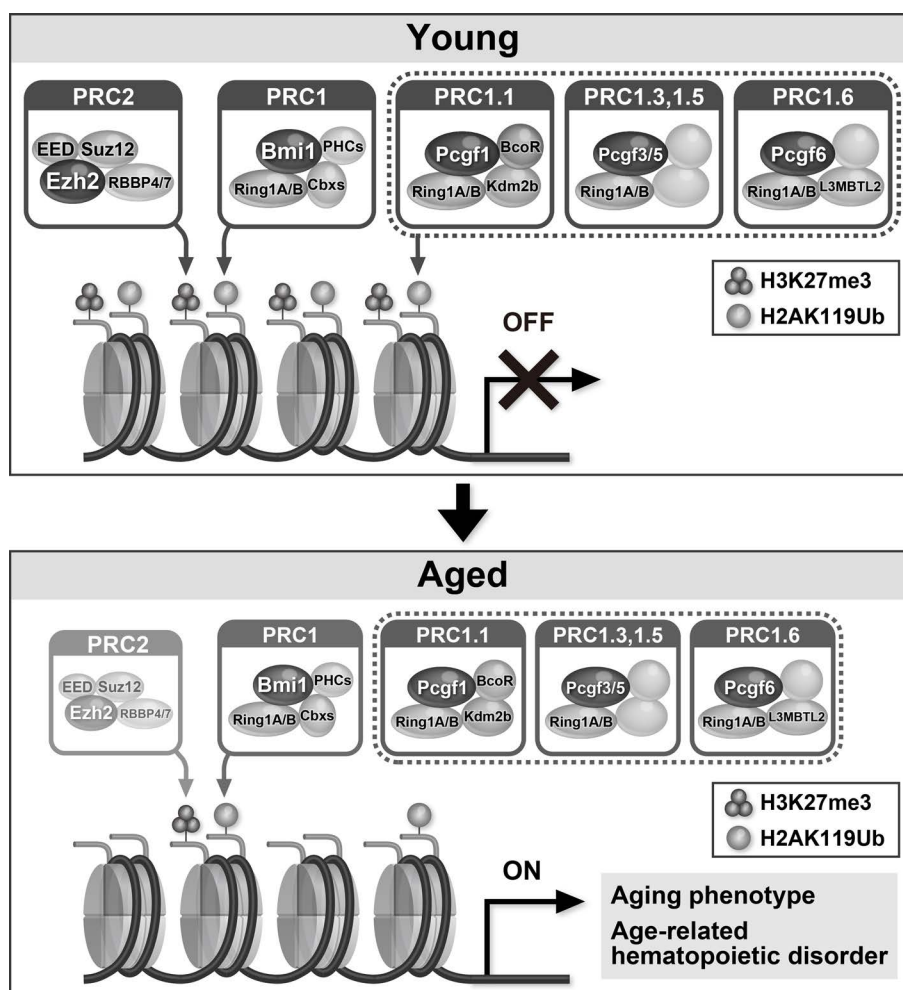
mRNA 搭載ナノミセルを用いた一過性全脳虚血の治療戦略



造血幹細胞は加齢に伴い、様々な表現系の変化を示すとともに、骨髓球系腫瘍の温床となる。その過程でエピゲノムも様々に変化することが想定されているが、未だその詳細は不明である。

そこで本研究では、マウス造血幹細胞の加齢に伴う生理的なエピゲノム変化の網羅的な解析と、高齢者に高頻度に見られる骨髓異形性症候群（myelodysplastic syndrome: MDS）のマウスモデル（DNA 脱メチル化と H3K27me3 修飾を介した負の転写制御に関わる、Tet2 及び Ezh2 の変異をもつ）のエピゲノム変化についての比較検証を行った。造血幹細胞を用いた RNA-seq と、H3K27me3 の ChIP-seq を行った結果、ポリコーム群複合体（Polycomb repressive complex）PRC2 の活性が、加齢に伴い減弱しており、遺伝子の発現が一部脱抑制していることが明らかになった。またその一部は、MDS マウスモデルのエピゲノム変化と遺伝子発現変動、MDS 患者の遺伝子発現変動と一致することが明らかとなった。これらの結果から、加齢に伴う PRC2 の機能変化が、造血幹細胞の表現系の変化と骨髓球系腫瘍の発症において、重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

加齢に伴うポリコーム群複合体の機能変化

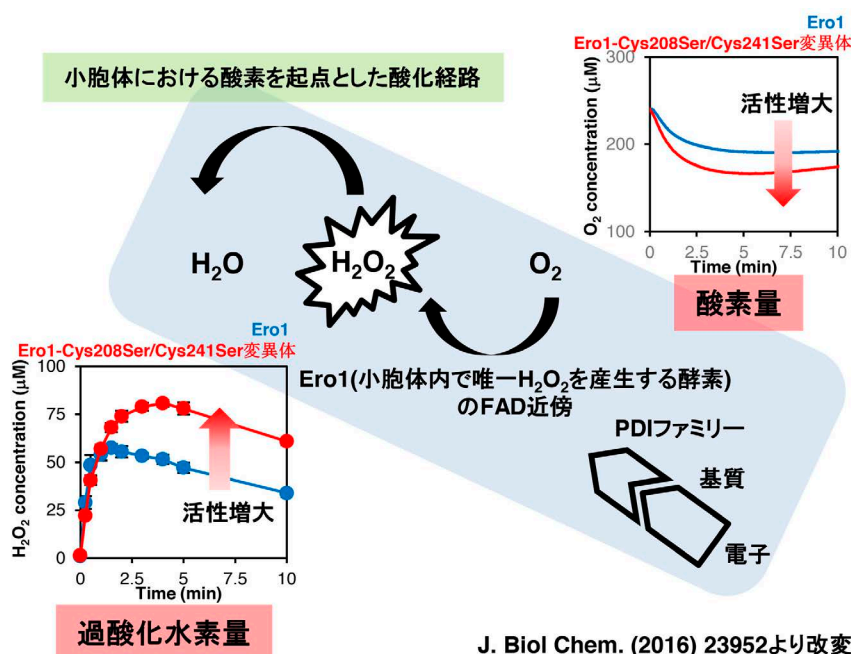


112 酸素を起点としたジスルフィド形成ネットワークの解明

奥村 正樹

哺乳動物細胞の小胞体には、酸素を起点としたジスルフィド結合形成ネットワークが存在する。Ero1 は酸素を消費し過酸化水素を産出する。その際酸化された Ero1 は Protein Disulfide Isomerase (PDI) を再酸化し、酸化型 PDI は免疫グロブリンやインスリンなど医学的・生物学的に重要な様々な基質に対してジスルフィド結合を導入する。したがって、我々生体におけるジスルフィド結合導入の起点となる Ero1 は、小胞体内の酸化還元環境に応じて4つのシステイン間でジスルフィド結合の架橋様式を変えることで自身の活性を厳密に制御する必要がある。今回、新たに Ero1 における Cys208 と Cys241 が厳密な活性制御に関わっていることを明らかにした。実際、Cys208 と Cys241 を置換した Ero1 変異体の PDI 酸化活性を測定したところ、野生型よりも高活性を示した。その際、酸素の消費速度が増大し、副生成物として過酸化水素の産出量が増大した。これら高活性型変異体を細胞に発現させた場合、過酸化水素によって生存率が低下することを見出した。したがって、小胞体内の酸素、過酸化水素量を調節し、インスリンなどの多くの基質にジスルフィド結合を導入する Ero1 の新たな活性制御機構を提唱した。

Ero1 の新規生理活性制御機構を示す酸素消費量と過酸化水素蓄積量



J. Biol Chem. (2016) 23952より改変

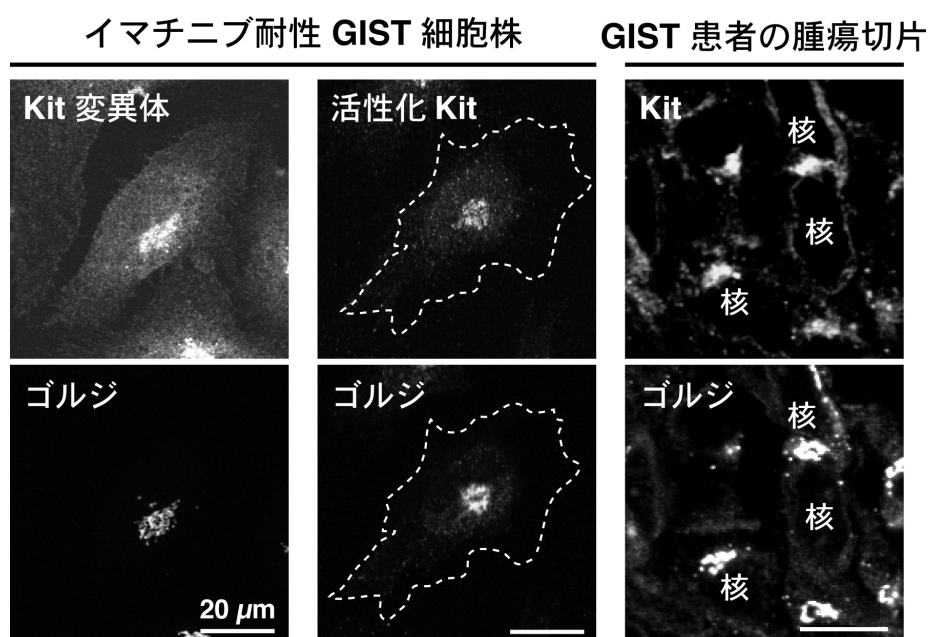
Ero1内Cys208-Cys241が機能制御に関与していることを発見

113 イマチニブ耐性 GIST での Kit シグナリングの新規阻害戦略

小幡 裕希

消化管間質細胞腫（gastrointestinal stromal tumor: GIST）の 85% のケースで Kit レセプターチロシンキナーゼの活性化変異が認められる。そのため、手術不能・再発症例では Kit 阻害剤イマチニブが投与され、患者の寿命は飛躍的に延びた。しかしながら、投与後 2 年半程度でイマチニブ抵抗型変異を獲得した Kit を発現するようになり、これが制圧できておらず、喫緊の課題となっている。また、そもそも Kit 変異体が GIST 細胞内で「いつ・どこで」シグナル伝達するかが不明である。本研究では GIST の増殖メカニズムの正確な理解および治療法開発を目的に、Kit 変異体の細胞内局在とシグナル伝達について解析した。興味深いことに、GIST の原発巣およびイマチニブ耐性症例の腫瘍切片・細胞株において、Kit は、これまで考えられてきた細胞膜ではなく、核近傍のゴルジ領域に異常に集積しており、そのみで活性化していた。Kit 変異体のゴルジ局在を抑制すると、Kit 下流の Akt キナーゼ, STAT5 転写因子の活性化が顕著に抑制された。すなわち、GIST における Kit は、ゴルジのみから細胞増殖シグナルを発信することが示唆された。Kit 変異体がゴルジ以外ではシグナルを発信できないことから、今後は、細胞内輸送マシナリーをターゲットとした新たな治療戦略の構築に展開させたい。

GIST における変異型 Kit の細胞内局在と Kit 活性の蛍光イメージング
(免疫染色と共焦点顕微鏡による局在解析)

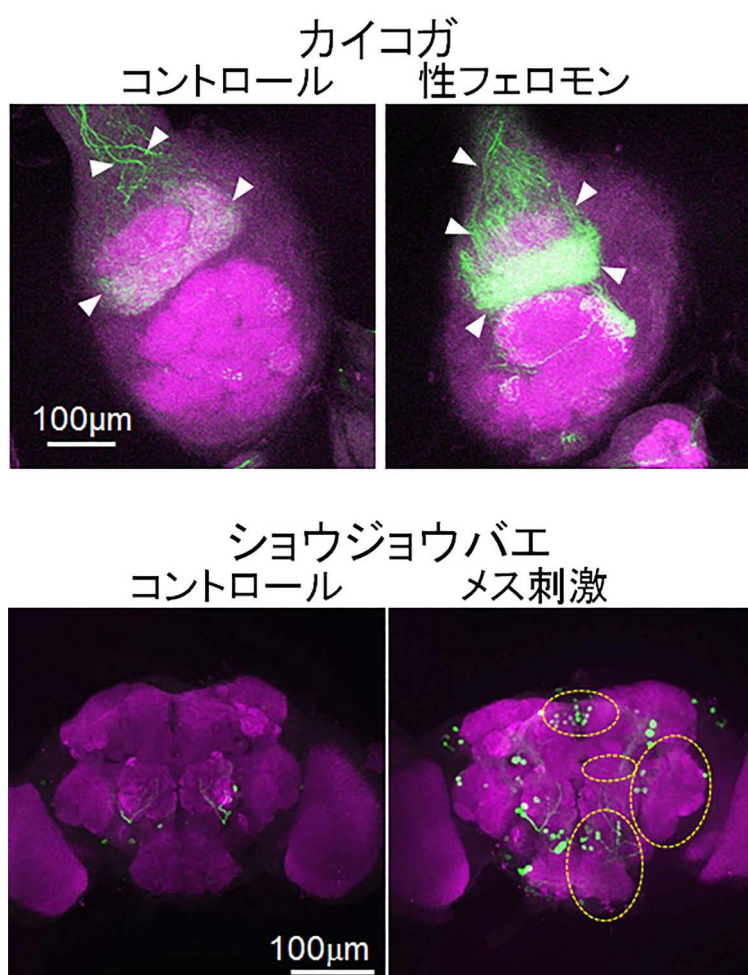


114 活動依存的な神経可視化による昆虫脳高次機能の解析

木矢 剛智

外界からの感覚情報に対し適切な行動によって反応することは、動物の生存や種の維持に重要である。昆虫の性フェロモン認識は、入力（感覚情報）と出力（性行動）が明確に対応しており、これらの関係を調べる目的に適している。本研究では神経活動に伴って発現量が増加する遺伝子（初期応答遺伝子）*Hr38*を利用することにより、性行動時に活動の起こった神経回路を可視化・機能操作し、本問題に取り組んだ。まず、カイコガにおいて新規な神経活動可視化法「NBREシステム」を確立した。本手法を用い、カイコガの脳において性フェロモンに反応して活動の起こった神経回路をGFPにより可視化することに成功した。次にショウジョウバエにおいても、*Hr38*の転写開始点に*GAL4*を挿入した系統を用いることで、活動の起こった神経細胞をGFPでラベル出来る手法を確立した。これを用い、性フェロモン情報の統合に関与すると考えられる脳領域を新規に明らかにした。*Hr38*は昆虫種間で高度に保存された初期応答遺伝子であり、本研究で構築した神経回路の可視化法・操作法は、様々な昆虫が示す興味深い生得的行動を研究する上でも強力なツールになると期待される。

カイコガとショウジョウバエの脳において、性フェロモンや神経活動に応じて活動した神経回路

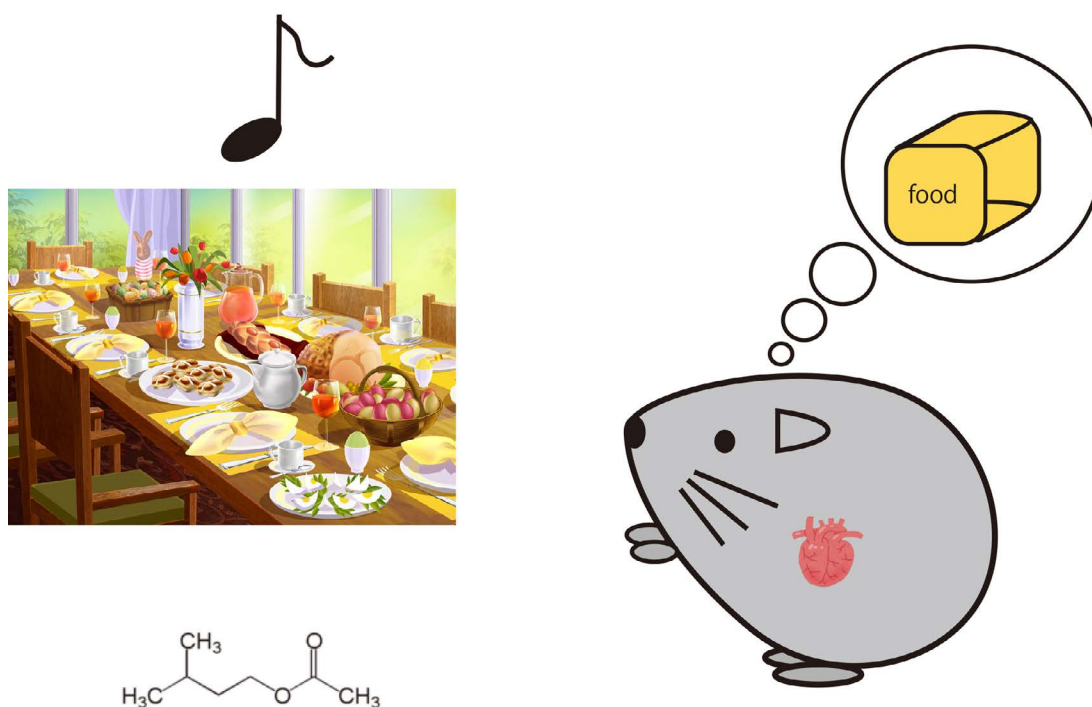


115 マウスの空腹状態依存的な食欲形成神経回路機構

楠本 郁恵

本研究では、マウスを用いた餌へのアプローチ行動の学習と発現をモデルシステムとし、その神経基盤と、空腹ドライブの神経メカニズムを明らかにすることを目標とした。特に、食欲の一部を表現していると考えられるアプローチ行動中に見られる神経活動だけでなく、心拍数の変動を観察することにより、全身で見られる食欲応答について観察することを目指した。10週齢以上のC57BL/6マウスを用いて、約1週間かけて餌を予測させる信号と餌の提供を関連付ける学習を行わせた。関連学習の成立は、予測信号中のアプローチ行動の表出をもって確認した。関連学習が成立したマウスに対し、心電図測定用の電極と送信機を埋め込む手術を行い、1週間の回復期間ののち、再度、アプローチ行動が見られることを確認した。そして、アプローチ行動表出と心電図の同時計測を行った。その結果、オペラントチャンバーにマウスを移動させた直後のアプローチ行動中よりも、都度オペラントチャンバーへの1時間の馴化を行ってからのアプローチ行動中のほうが、心拍数の変動を大きく検出できることが明らかになり、本研究実施の最適な条件を定めることができた。

食欲を作り出す因子と全身の反応のモデル図



116 雄性生殖細胞におけるヒストン脱メチル化の機能解析

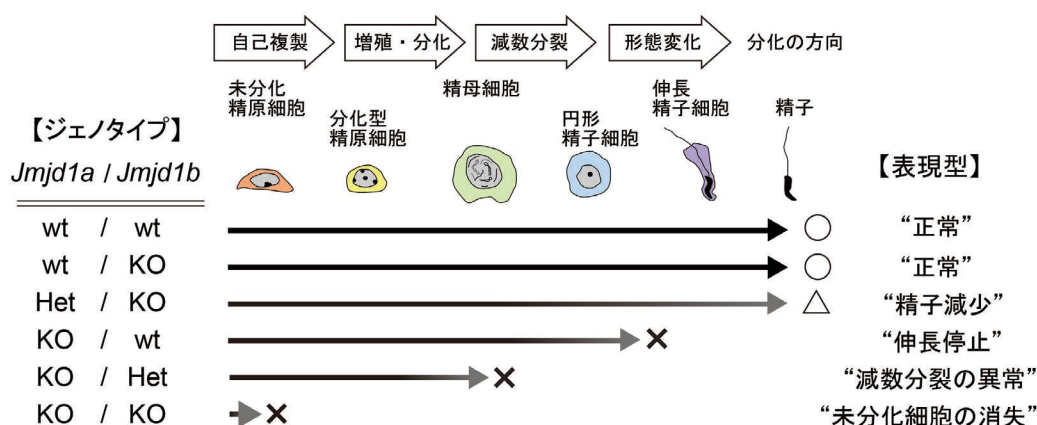
黒木 俊介

遺伝子の発現は、転写因子の機能とエピゲノムの状態変化によって規定される。ヒストン H3 の 9 番目リジン (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る。H3K9 メチル化は、メチル化酵素と脱メチル化酵素の働きによって、発生・分化段階に応じてダイナミックに変化することが明らかになってきている。我々はこれまでに、H3K9 のメチル化酵素が生殖細胞の分化に必須の役割をもつことを明らかにしてきた。しかし一方で、H3K9 の脱メチル化酵素の役割については、いまだ不明な点が多く残されている。

我々は H3K9 脱メチル化酵素である Jmjd1 ファミリーのうち、Jmjd1a と Jmjd1b が実際に酵素活性をもつことを見いだしていた。そこで、H3K9 脱メチル化酵素の役割を明らかにする目的で、生殖細胞特異的な *Jmjd1a* または *Jmjd1b* のコンディショナル欠損マウス (以降、ホモ欠損を KO・ヘテロ欠損を Het と表記) を作製した。

Jmjd1a -KO 雄マウスは精子細胞が伸長ステージで分化を停止し、不妊となった。一方で、*Jmjd1b* -KO 雄マウスに顕著な異常は観察されなかった。興味深いことに、*Jmjd1a*/*Jmjd1b* の二重欠損マウスの生殖細胞は、*Jmjd1* 遺伝子量に依存して、*Jmjd1a* -KO とは別の分化ステージで表現型を示した。すなわち、*Jmjd1a* -KO/*Jmjd1b* -Het 雄マウスの生殖細胞は減数分裂期で異常を呈した。さらに *Jmjd1a* -KO/*Jmjd1b* -KO 雄マウスは未分化細胞を含めた全ての生殖細胞が消失した。

本研究では、Jmjd1a と Jmjd1b が雄性生殖細胞の維持や分化の各ステージに必須の相乗的な役割をもつことを明らかにした。

生殖細胞特異的に *Jmjd1a*/*Jmjd1b* を欠損させたマウスの表現型

117 代謝物に着目した薬物性肝障害感受性マーカー探索

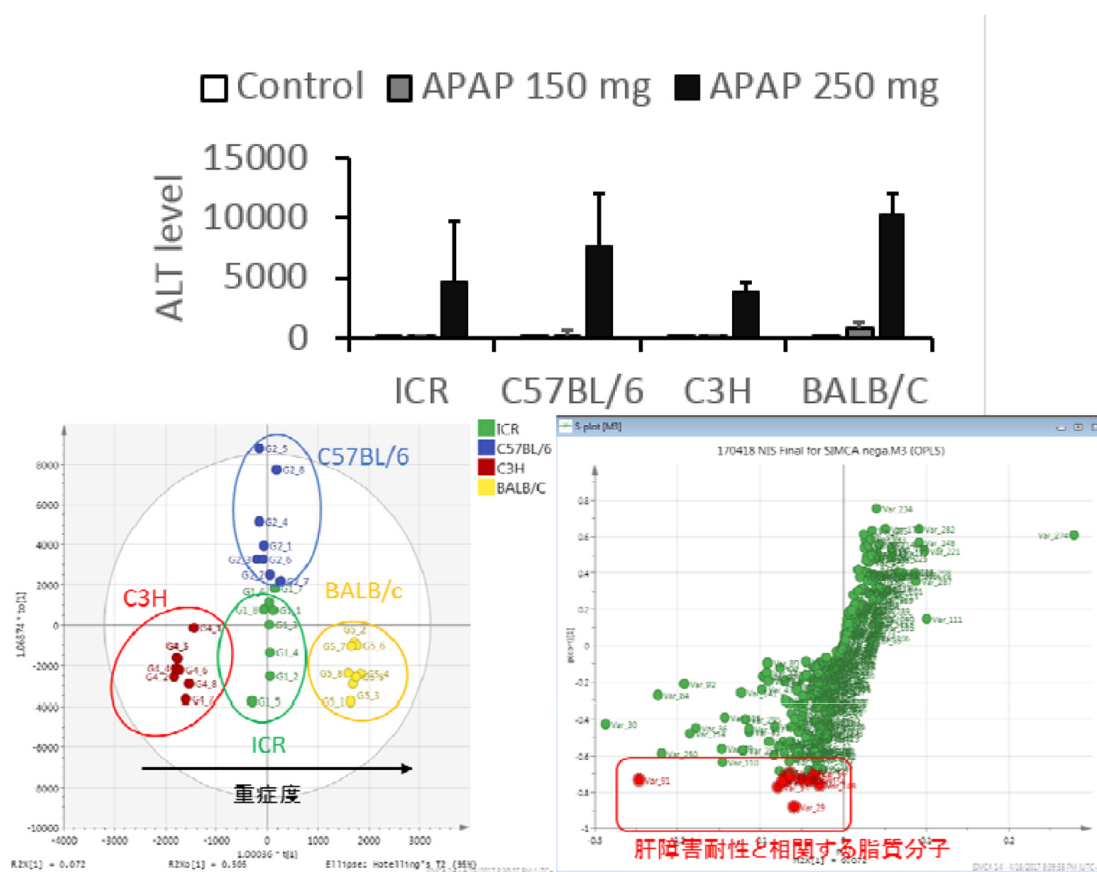
齊藤 公亮

【目的】医薬品による有害作用は、医療事故や医薬品の開発中止・市場撤退の大きな原因の一つである。そこで本研究では、医薬品服用前に薬物性肝障害の感受性を予測することを目的として、薬物性肝障害の感受性予測マーカーの探索を、脂質分子を網羅的に探索するリポミクス解析を用いて行った。

【方法】まず、4系統のマウス（ICR、C57BL/6、C3H、BALB/c）を用いて、マウス系統間のアセトアミノフェン（APAP）誘導性肝障害への感受性の差異を検討した。次に、全てのマウス系統について、週齢、給餌を合わせた際の血漿中脂質レベルをリポミクス解析を用いて網羅的に測定した。さらに、肝障害への感受性と関連する脂質分子を多変量解析によって探索した。

【結果】APAP 単回投与による肝障害の程度を ALT を用いて測定したところ、BALB/c で最も強い肝障害が認められ、C3H で最も弱い肝障害が認められた（図上部）。また、血中脂質レベルは各系統群間で異なっていることが明らかになった。OPLS 回帰を用いて、重症度と関連する血中脂質を探索したところ、10 分子が候補として見出された（図下部）。これらのうち 8 分子がリゾフォスファチジルコリンまたはフォスファチジルコリンであった。

APAP による肝障害及びその強度と血中脂質の関連解析



118 インフルエンザウイルス HA ストークの糖鎖機能の解明

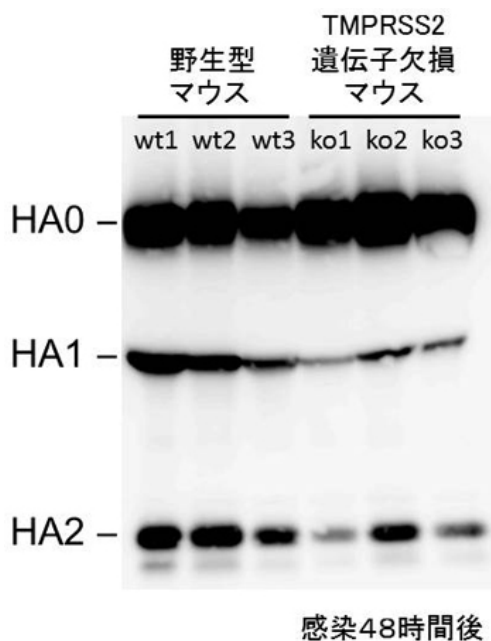
酒井 宏治

【目的】インフルエンザ A ウイルス (IAV) が感染性獲得するためには、ウイルス膜蛋白質の HA がプロテアーゼにより蛋白質分解性の修飾 (HA の開裂) を受け、膜融合活性を発現する必要がある。これまでに季節性 IAV H1N1 や H7N9 が、マウスで病原性を発現するためには、TMPRSS2 が必須の宿主プロテアーゼであることを明らかにした。本研究では、研究グループ間で TMPRSS2 依存性について異なる結果となっている季節性 IAV H3N2 について、HA ストーク領域の糖鎖欠損によるプロテアーゼ指向性の変化と HA ストーク糖鎖による共通抗原エピトープのシールド機能について解明を試みた。

【方法】(1) HA ストーク領域の糖鎖欠損によるプロテアーゼ指向性の変化の解析：野生型マウスと *TMPRSS2* 遺伝子欠損マウスの肺等への感染実験より、プロテアーゼ指向性について、糖鎖修飾の意義を解析した。(2) HA ストーク糖鎖による共通抗原エピトープのシールド機能の解析：HA ストーク糖鎖欠失ウイルス及び親株に対する抗血清を作製し、抗原性の異なるウイルスとの中和能解析により抗原性を解析した。

【結果】(1) H3N2 実験室株では、HA 開裂部位近傍のストーク領域 8 位糖鎖の欠失により、プロテアーゼ指向性に変化することが明らかとなった。(2) HA ストーク糖鎖欠失ウイルスの抗血清は、同一の抗原性ウイルスには高い中和能を示したが、抗原性の異なるウイルス株に対する中和能は認められなかった。

HA ストーク 8 位糖鎖欠失ウイルス感染肺での HA 開裂



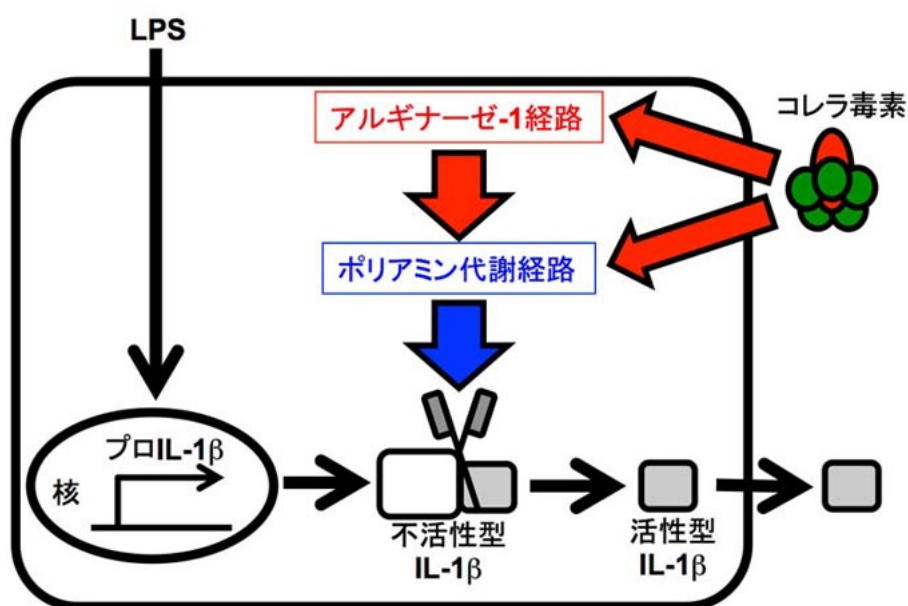
・ HAストーク領域の
8位糖鎖欠失により、
野生型マウスと同様に、
TMPRSS2遺伝子欠損
マウスにおいても、
HAが開裂し、病原性
を示した。

コレラ毒素 (Cholera toxin: CT) は強力な免疫アジュバントとして Th1、Th2、Th17 型免疫応答、免疫グロブリン産生を誘導することが知られている。しかし、その分子機構については不明な部分が多い。

我々は、マクロファージ細胞株を用いて、CT とリポ多糖 (Lipopolysaccharides: LPS) の共刺激により炎症性サイトカイン IL-1 β の産生が相乗的に誘導されることを見出した。また、CT の刺激によりアルギナーゼ-1 (Arginase 1: Arg1) を介したアルギニン代謝経路 (アルギナーゼ-1 経路) およびその下流のポリアミン代謝経路が活性化されることを明らかにした。そこで本研究では、これらの代謝経路が CT と LPS による IL-1 β 産生誘導に関与するかどうか、検討した。

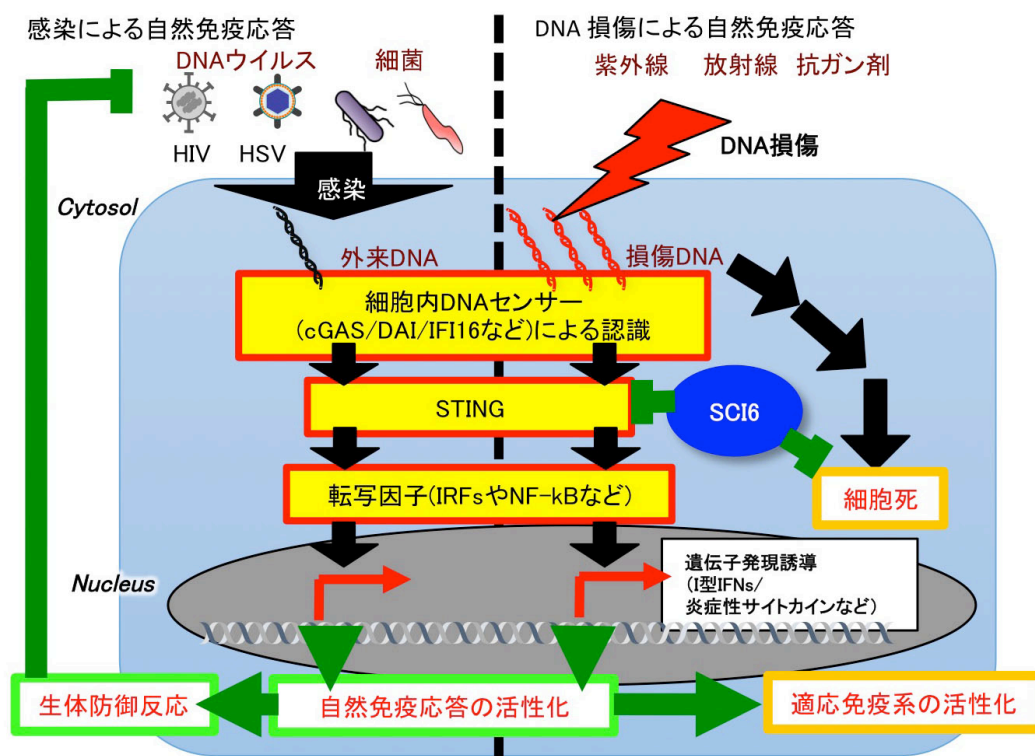
アルギナーゼ-1 経路およびポリアミン代謝経路に関与する機能分子の阻害剤の添加や siRNA の添加により、CT と LPS による IL-1 β 産生誘導が有意に障害された。これらの知見から、CT は直接マクロファージ細胞株に作用して細胞内のアルギナーゼ-1 経路およびポリアミン代謝経路を活性化させ、これらの代謝経路が IL-1 β 産生誘導を制御していることが示唆された。現在、これらの機能分子の遺伝子欠損マウスを作製し、生体内においてもこれらの代謝経路が IL-1 β 産生誘導に関与するかどうか、解析を進めている。

コレラ毒素による細胞内代謝経路依存的な IL-1 β 産生誘導機構



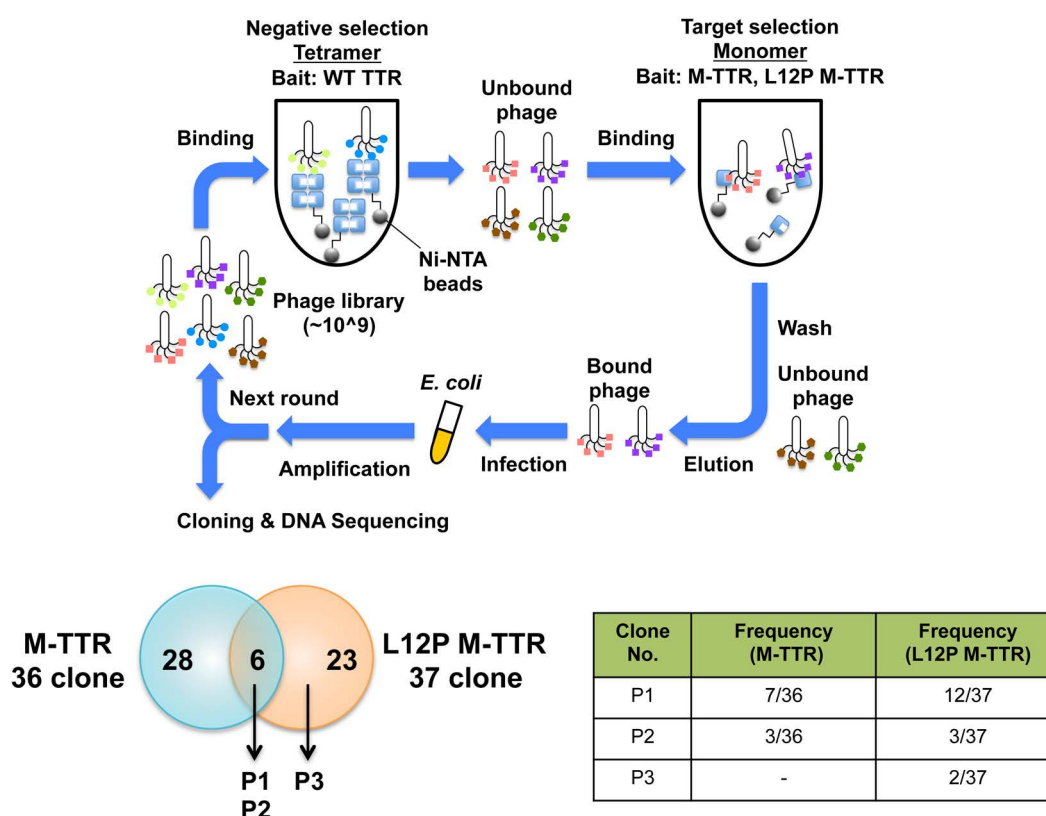
我々ヒトの体内には DNA 変異に対しての修復機構に加えて、DNA 損傷を引き起こした細胞を排除する免疫系の仕組みが備わっている。DNA の損傷を起こした細胞が排除される過程における認識のシステムやその制御因子については不明な点が多い。本研究では、自然免疫システム系シグナル分子 STING と結合するタンパク質群を Affinity 精製法と質量分析により同定した。そのタンパク質群の中で、SCI6 がガン細胞において、紫外線・放射線および抗ガン剤（エトポシド・ドキシソルビン）処理後の DNA 損傷時に顕著に発現誘導され、ガン細胞のアポトーシスや自然免疫応答に対して抑制的に働く見解を新規に示した。HSV などの DNA ウイルス感染によって、細胞内で SCI6 と STING が結合し、抗ウイルスシグナルが抑制された結果、細胞死が抑制されることも発見した。また肝臓特異的 SCI6 KO マウスを使用し、組織生体レベルにおいて SCI6 が抗ガン剤投与により誘導される肝障害を負に制御している因子であることを明らかとした。以上より、本研究において、SCI6 は DNA 損傷を感知する自然免疫応答に対して新規抑制因子であることが示唆された。

SCI6 は DNA 損傷刺激により誘導され、DNA に対する自然免疫系経路を負に制御する因子である



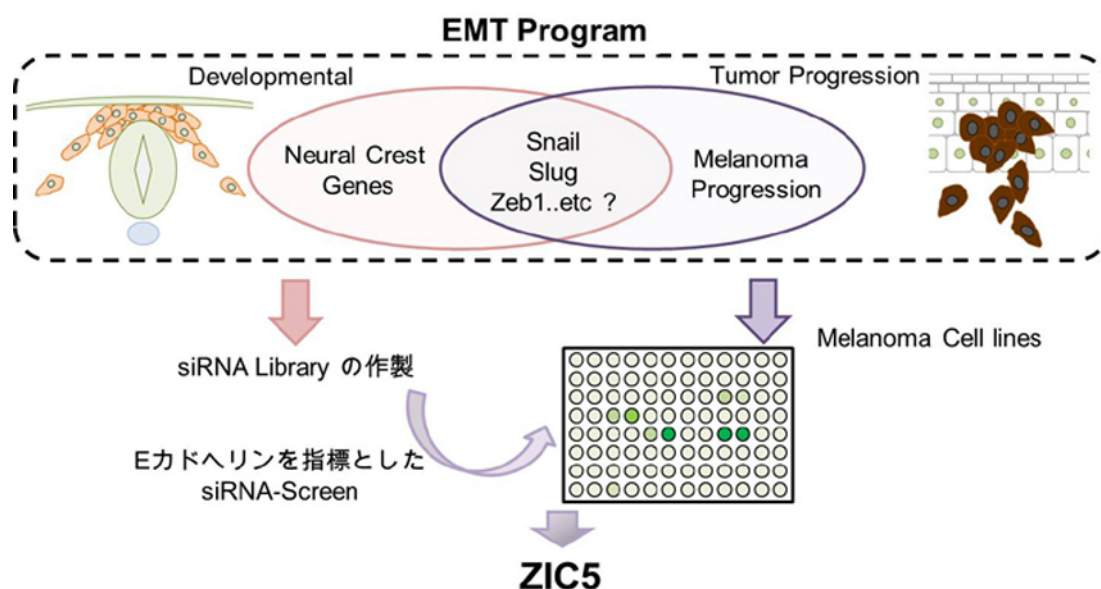
家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、血清タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) の変異体により形成されたアミロイド線維が神経を中心に全身諸臓器に沈着する予後不良の遺伝性疾患である。我々はこれまでの研究により小胞体のタンパク質品質管理機構による変異 TTR の分泌抑制が FAP の新たな治療標的となり得ることを見出しており、その候補化合物である TTR 四量体化阻害剤の創薬シーズの創出を目指している。本研究では、TTR のサブユニット界面に結合し、四量体化を阻害するペプチドをファージディスプレイ法により同定することを目的とした。サブユニット界面に結合するペプチドを効率的に取得するために四量体 TTR および単量体 TTR を用いた 2 段階スクリーニングによるバイオパニングを行い、ファージクローンの濃縮がみられた 3 種類のペプチドを同定した。これらペプチドが TTR の構造状態に及ぼす影響を Native PAGE により評価したところ、ペプチド添加により四量体および単量体 TTR の構造状態が変化することが明らかになった。さらに、これらペプチドは TTR のアンフォールド状態に結合し、TTR の四量体構造を不安定化することが示唆された。

ファージディスプレイを用いた TTR 結合ペプチドのスクリーニング法と結果



分子標的治療薬の開発が進み、がん治療に進展がみられているが、薬剤に対する耐性が生じ、がんの再増殖が起こることが治療の問題点である。薬剤耐性など、がん細胞の悪性形質の亢進は、上皮間葉形質転換（EMT）により引き起こされる。がん EMT には、初期発生の神経冠形成時に起こる EMT と類似した分子機構が存在することから、これまでに我々は、神経冠形成を促進する遺伝子群に対してスクリーニングを行い、メラノーマの薬剤耐性を亢進させる遺伝子として ZIC5 を同定している。ZIC5 の下流で薬剤耐性に寄与する分子を同定する為、マイクロアレイ解析を行ったところ、ZIC5 により PDGF の一種である PDGFD の発現が亢進することが明らかとなった。また、PDGFD の発現抑制により、メラノーマ細胞の増殖・移動能・薬剤耐性が抑制されることが明らかとなった。ZIC5 や PDGFD を抑制することにより、いくつかのがん細胞種において抗がん剤による細胞死誘導率が顕著に増加することから、ZIC5 や PDGFD はがん細胞の薬剤耐性を阻害する為の良い標的分子であると考えられる。

薬剤耐性に関わる神経冠遺伝子の同定



123 DNA 修復因子 PNKP の活性抑制による細胞死の誘導

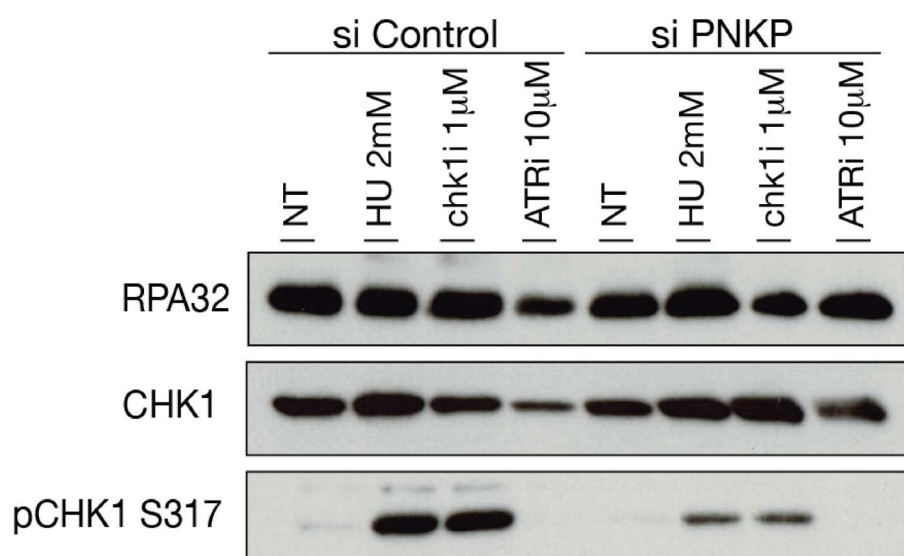
島田 幹男

細胞内のゲノム DNA は放射線、紫外線などの外的要因や、代謝により生じる酸化物質などの内的要因により常にストレス環境に晒されている。DNA 修復機構はそれらが原因で生じた DNA 損傷を迅速に修復する極めて精密かつダイナミックな分子機構である。

これまで PARP1 など DNA 修復に関する因子をターゲットにすることで様々な抗がん剤の開発が試みられてきたが、細胞周期やターゲットとなるがんの特異性が原因で効率良く細胞死を誘導することが困難であった。本研究では PNKP という DNA 損傷末端をリン酸化および脱リン酸化する酵素に着目し、その活性制御機構を解析することで高効率な抗がん剤の開発を目指した。

PNKP はこれまで DNA 二本鎖切断修復機構である非相同末端結合修復と一本鎖切断修復に関与することが報告されていたが、その他の修復機構への関与は不明な点が多い。本研究ではヒト骨肉腫細胞 U2OS において siRNA により PNKP をノックダウンした状態でヒドロキシウレア (Hydroxyurea: HU) 処理により DNA 複製ストレスをかけると細胞周期チェックポイント反応である Chk1 のリン酸化がコントロールと比較して減少していることが判明した。さらに Chk1 の阻害剤処理をすると DNA 複製ストレス反応の一つである RPA のリン酸化が観察されるが、PNKP のノックダウン細胞では RPA のリン酸化レベルも減少していることが判明した。以上の実験結果は PNKP が DNA 複製ストレス応答に関与している可能性を示唆している。今後さらに解析を進め、PNKP が DNA 複製ストレス応答における役割を明らかにしていきたい。

U2OS 細胞における PNKP ノックダウン条件下での DNA 複製ストレスに対する細胞周期チェックポイントタンパク質 Chk1 のリン酸化レベルの減少



124 食道扁平上皮癌の発癌メカニズムの解明

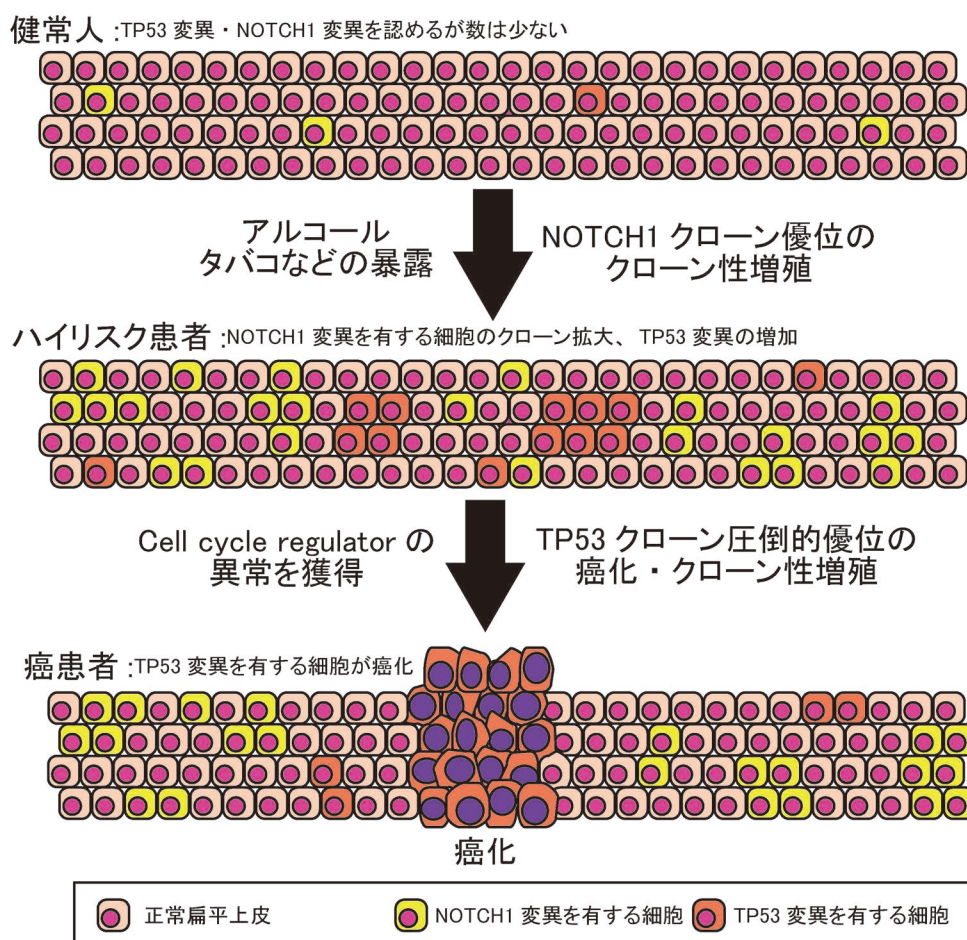
鈴木 啓道

【目的】 食道扁平上皮癌の発生には飲酒や喫煙などのリスク因子が強く関わりとされている。そのため、非癌部食道上皮から異形上皮を経て癌にいたるまでの各組織における遺伝子異常を解明することにより食道癌発生に至るメカニズムを解明する。

【方法】 13 例のマルチサンプリング症例、31 例の追加コホートにおいて遺伝子変異解析を行った。

【結果】 非癌部食道においても *TP53* 遺伝子および *NOTCH1* 遺伝子異常が高頻度に確認された。それぞれが食道扁平上皮においては癌部・非癌部とも、クローン性増殖が生じていることが明らかとなった。しかしながら癌部と非癌部において異なったクローン選択機構が生じていた。食道扁平上皮は *TP53* の biallelic inactivation に加え Cell cycle regulator の異常が生じることにより発生すると考えられた。

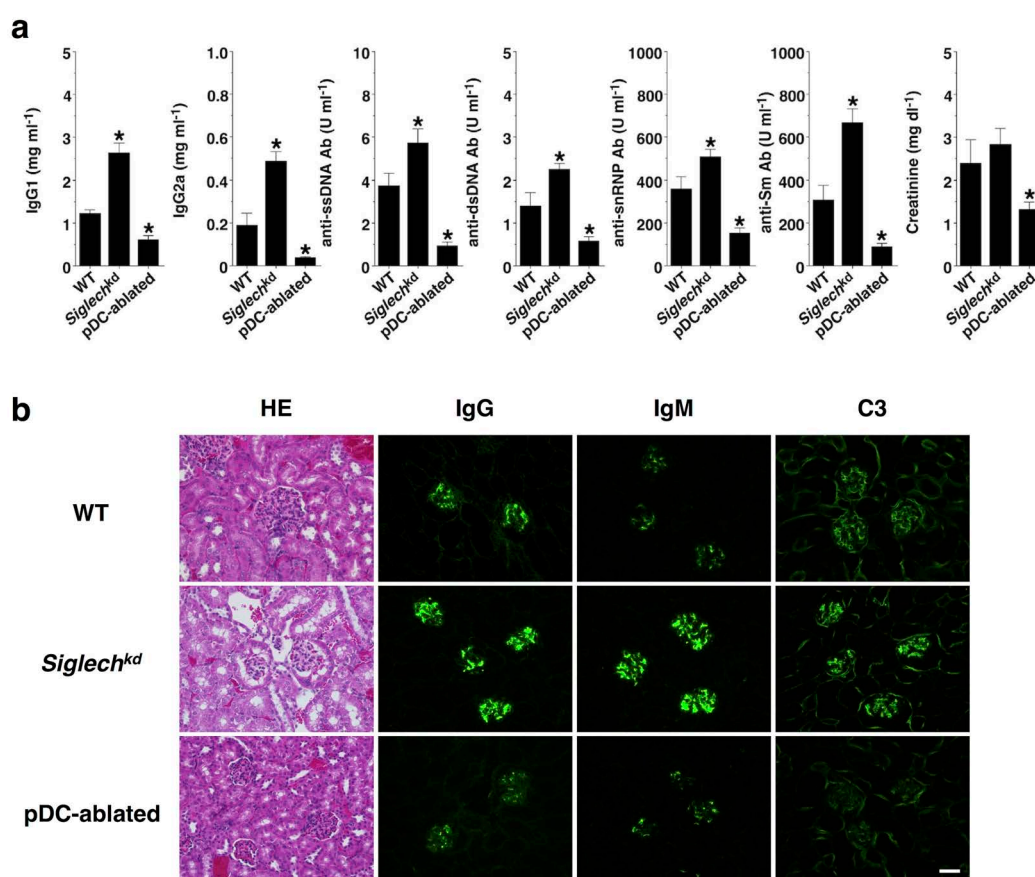
食道扁平上皮癌癌化メカニズムの概略



樹状細胞の一種である形質細胞様樹状細胞 (pDCs) は、病原体由来核酸を認識して多量の I 型インターフェロン (I 型 IFN) を産生する免疫細胞であり、抗ウイルス感染防御免疫応答に重要な役割を果たしている。一方、pDCs は自己細胞由来の核酸も認識して I 型 IFN を産生することから、全身性エリテマトーデス (SLE) 等の I 型 IFN 介在性自己免疫疾患への関与が示唆されていたが、これまでその詳細な病態発症機構については不明であった。本研究では、pDCs 特異的発現分子である Siglec-H 欠損 (*Siglech^{kd}*) マウスと pDCs 特異的消失マウス (pDC-ablated) を用いて、炎症の慢性化とこれによる免疫病態の形成における pDCs の役割について検討を行った。その結果、pDCs が TLR7 依存性全身性炎症反応の惹起や IFN-I 介在性自己免疫疾患の病態発症に寄与し、Siglec-H が pDCs の機能抑制分子であることが明らかとなった。

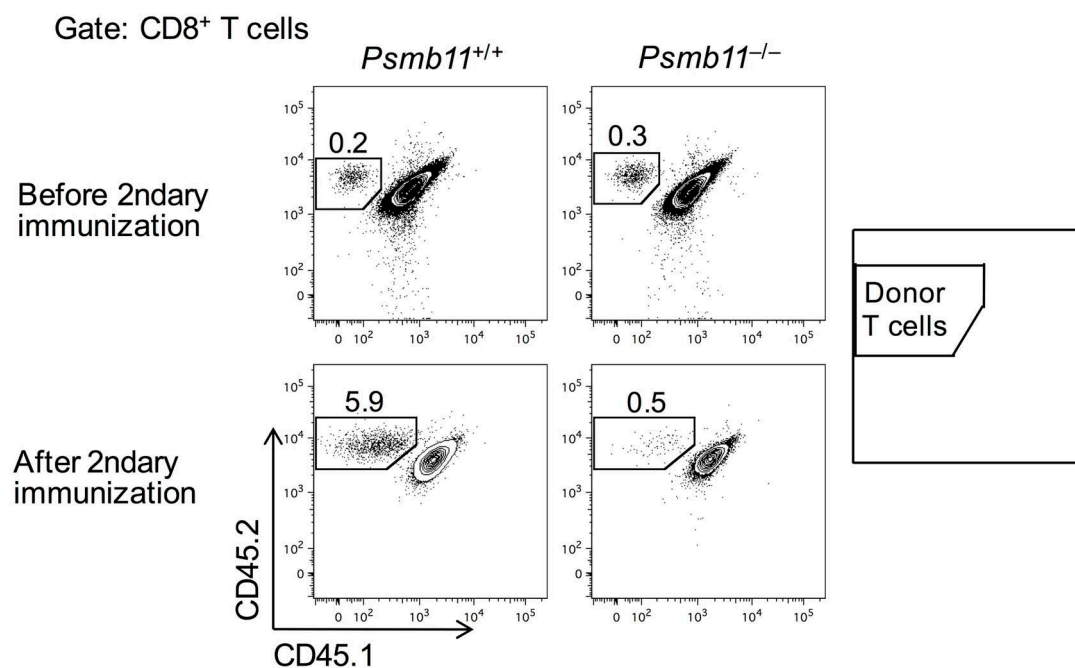
野生型、Siglec-H 欠損、pDCs 特異的消失マウスのループス様腎炎病態の比較

a) 血清中の抗体価とクレアチニン量、b) 腎臓の炎症像と免疫複合体沈着



T 細胞は抗原特異的な免疫応答を引き起こし、記憶を形成することで、生体防御に寄与する。胸腺では、幼若 T 細胞がもつ抗原受容体と抗原提示細胞上の自己ペプチドとの親和性に依存し、一部の T 細胞のみが選択されて成熟に至る。正の選択は、自己ペプチドに対して親和性の低い幼若 T 細胞が選択的に分化誘導される過程であり、生体に有用な抗原認識特異性レパトアを選別するための機構として理解されてきた。一方で、近年、胸腺プロテアソームをはじめとする胸腺固有のタンパク質分解機構が、正の選択を誘導する自己ペプチドの産生を担うことが明らかとなってきた。我々は最近、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択が、レパトア形成という既知の役割に加えて、個々の T 細胞の抗原応答性を規定する役割をもつことを報告した。本研究課題では、正の選択を介した T 細胞の機能的教育の意義を個体レベルで検討した。胸腺プロテアソーム非依存的に分化した T 細胞では、抗原応答の初期およびメモリー期において短命エフェクター細胞の軽度な分化亢進が認められた。さらに、メモリー期において、二次刺激に対する増殖応答に顕著な障害が認められた。このことから、正の選択は T 細胞の記憶形成能に影響する可能性が考えられた。

胸腺プロテアソーム欠損マウス (*Psmbl1*^{-/-}) および対照マウスから得られた
モノクローナル TCR 発現 CD8⁺ T 細胞の記憶応答

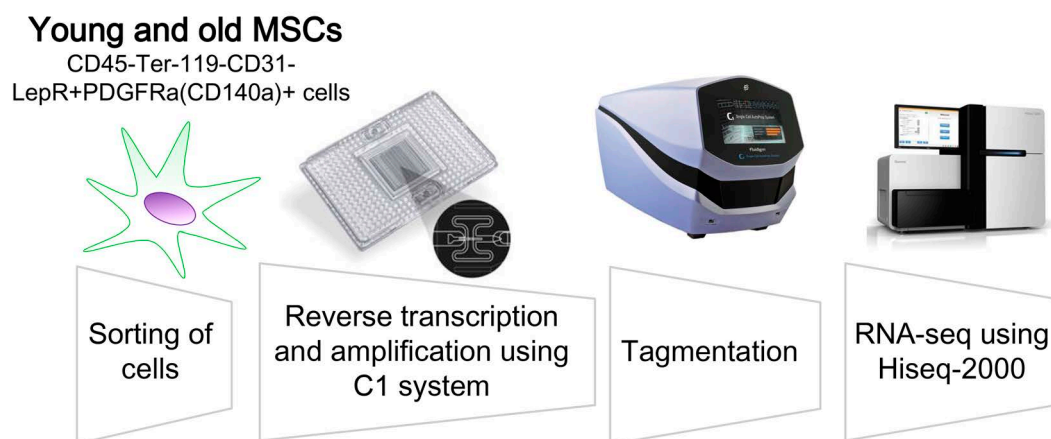


127 造血幹細胞ニッチ細胞の分類と特性解明

田久保 圭誉

造血幹細胞は全ての血液細胞を産生する臓器幹細胞で、自己複製能と多分化能を兼ね備える。哺乳類成体では造血幹細胞は骨髄の各種のニッチ細胞からサイトカインやケモカイン、接着分子などのニッチシグナルを受容して、これらの幹細胞活性を維持する。代表的な造血幹細胞のニッチ細胞は、間葉系前駆細胞である。間葉系前駆細胞は骨髄の血管近傍に存在し、間葉系系統への分化能を保持している。しかし、間葉系前駆細胞のすべてがニッチ細胞として機能するのは不明である。また、加齢に伴う造血系の変容の際に間葉系前駆細胞がどのように貢献しているかも不明である。本研究では間葉系前駆細胞の1細胞レベルのトランスクリプトーム解析からこれらの問題の解明を図り、間葉系前駆細胞の集団構成と、その加齢に伴う変容についての検討を行った。その結果、間葉系前駆細胞は比較的均質な細胞であるが、加齢に伴ってそのトランスクリプトームを変容させることが明らかとなった。

造血幹細胞ニッチ・間葉系前駆細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析

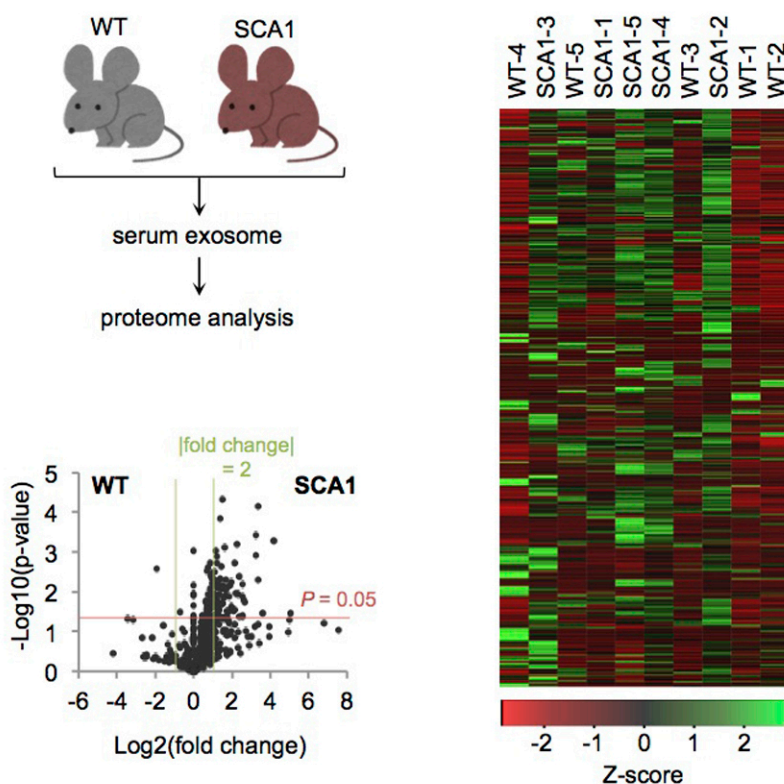


128 神経変性疾患に対する血液由来バイオマーカーの開発

武内 敏秀

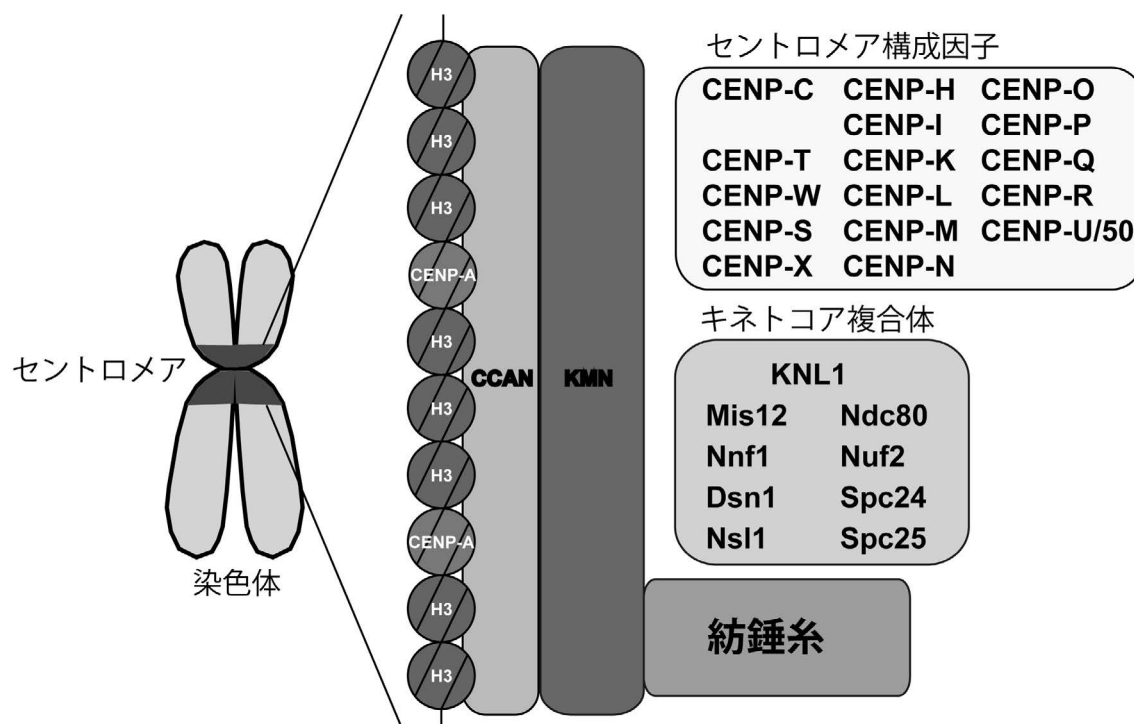
アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病 (PolyQ 病) などの多くの神経変性疾患は、タンパク質の凝集・蓄積を特徴とする疾患であるが、近年、このタンパク質凝集を引き起こす要因として、タンパク質の凝集を抑制する生体内防御機構 (プロテオスターシス維持機構) の機能低下が考えられている。これに関連して、以前著者らは、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞の一種が、生体内プロテオスターシスの維持に重要な役割を果たしていることを報告した。そこで本研究では、神経変性疾患におけるエクソソーム分泌の変容を明らかにするため、PolyQ 病のモデル細胞およびモデルマウスからエクソソームを採取し、その解析を行った。その結果、凝集性 PolyQ タンパク質を発現する細胞において、エクソソーム分泌が亢進していることが明らかとなった。また、PolyQ 病モデルマウスの解析から、発症後個体における血清中エクソソームプロテオームの変容が確認された。以上の結果は、PolyQ 病においてエクソソーム分泌が変容している可能性を示唆するものであり、今後エクソソームに注目した PolyQ 病の血液由来バイオマーカーの開発が期待される。

神経変性疾患モデルマウスの血清由来エクソソームのプロテオーム解析



真核生物のゲノム DNA は、クロマチンと呼ばれるタンパク質との複合体として細胞核に収納されている。クロマチンの基本単位は、4 種類のヒストンタンパク質からなるヒストン八量体に 150 塩基対の DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造であり、ヌクレオソームが数珠状に連なることでクロマチンが形成されている。細胞の分裂過程において、ゲノム DNA は S 期で複製され、M 期で染色体構造を形成して 2 つ娘細胞に均等に分配されていく。各染色体には両極から伸びてきた紡錘糸が結合し、引っ張るセントロメアと呼ばれる領域が存在する。セントロメア領域の確立および維持に重要な因子として、ヒストン H3 のバリエーションである CENP-A が同定されている。CENP-A がクロマチンに取り込まれることで、なぜ他の領域とは異なった特徴を持つクロマチンになるのかは明らかとなっていない。本研究では、セントロメアに形成される高次クロマチン構造の解析を行い、セントロメア領域の構築原理の解明を行うために、CENP-A ヌクレオソームを含むトリヌクレオソームの再構成系の確立を行った。

セントロメア領域の構成因子群



130 IFN γ 産生 T 細胞を誘導する腸内常在菌の探索

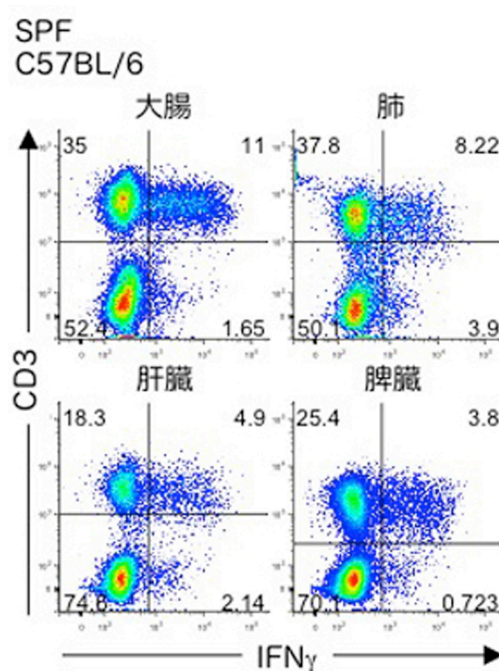
田之上 大

消化管には約 1,000 種類、およそ 100 兆個の腸内常在菌が生息していて、一種の生態系（腸内フローラ）を形成している。近年、そのバランスの破綻が様々な疾患の発症・増悪につながることが明らかになってきた。

消化管免疫系は腸内常在菌によって成熟・活性化することが知られている。これまでに、特定の免疫細胞を誘導する細菌種の同定・単離が成されてきたが、多くの消化管粘膜にユニークな免疫細胞について、未だその誘導メカニズム、とくに消化管常在菌との関係が未同定のままである。本研究では、消化管に集積している免疫細胞のうちいまだその誘導機構が不明である IFN- γ 産生細胞について解析した。

マウスの大腸、肺、肝臓、脾臓からリンパ球を調製し、50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate および 750 ng/mL ionomycin で 3.5 時間 37°C で刺激培養した。その後、細胞を回収し、死細胞染色および細胞表面細胞内サイトカインの染色を行った。フローサイトメトリーにて解析を行った。

その結果、大腸において IFN- γ 産生細胞が観察された。それらは CD3 陽性の $\alpha\beta$ 陽性 T 細胞であった。それらは MyD88 非依存的に誘導され、特定の抗生剤で集積が低かった。これらのことから、特定の腸内細菌種が IFN- γ 産生 T 細胞の誘導を担っていると考えられた。

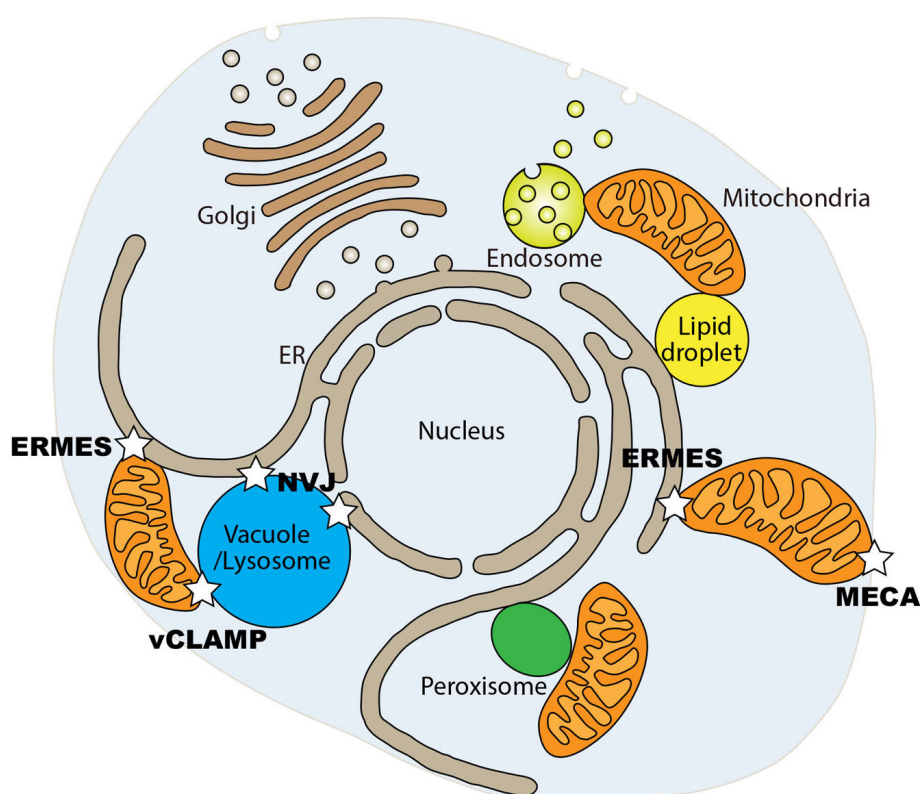
各臓器における IFN- γ 産生細胞（リンパ球のみ表示）

近年の研究により異なるオルガネラ同士がコンタクトサイトを形成し、互いに物質や情報をやりとりすることで、その正常な機能を維持することが急速に明らかになりつつある（図）。出芽酵母を用いた研究から、このようなオルガネラテザリング因子の欠損がミトコンドリア形態異常を引き起こすことがわかっているため、オルガネラテザリング因子の同定の足がかりとして、ミトコンドリア形態制御因子のスクリーニング法の条件検討や、オルガネラ間コンタクトを検出する実験系の確立を目指した。

これまで遺伝学スクリーニングでは、一倍体真核生物である出芽酵母が用いられてきた。しかしヒト一倍体培養細胞の樹立、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術や、次世代シーケンサー解析などによる遺伝子解析技術の発達により、これからはヒトの培養細胞を用いた遺伝学的スクリーニングが盛んに行われる時代に突入すると予測される。

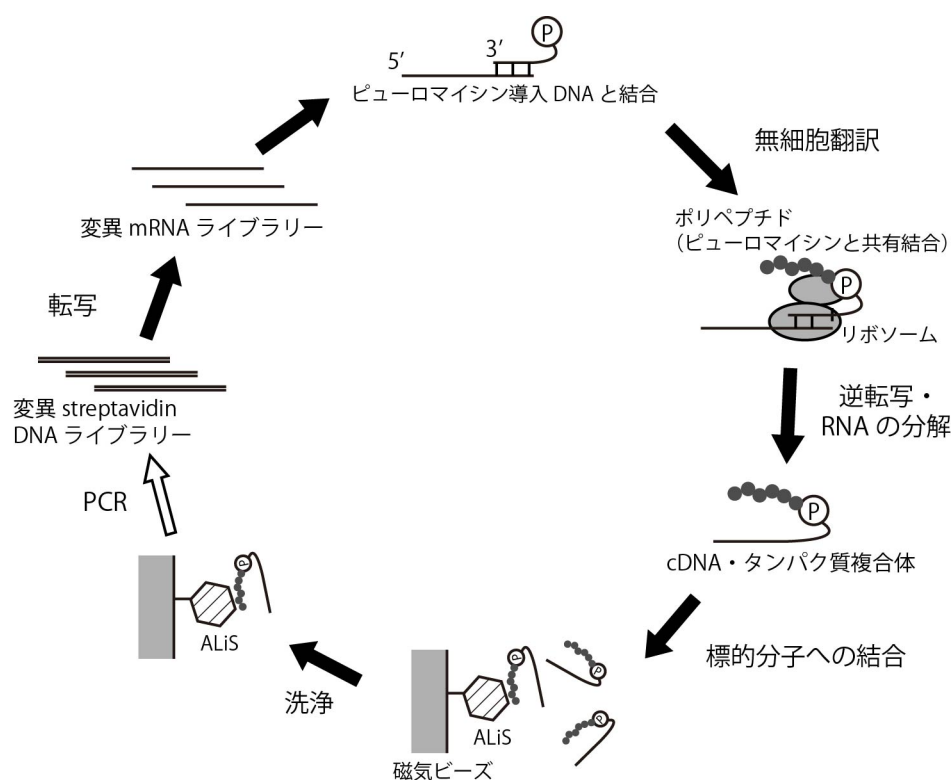
そこで本研究ではヒト一倍体培養細胞（Hap1 細胞）を用い、ヒト小胞体・ミトコンドリア結合因子の遺伝学スクリーニング方法、条件の検討を行った。現在、オルガネラテザリングにより同定には至っていないが、オルガネラ間結合因子をスクリーニングする際の指標となるオルガネラコンタクトサイトを split GFP を用いて可視化することに成功した。

オルガネラ間コンタクトサイト



細胞内タンパク質の活性を任意のタイミングで制御する技術の開発は、生命現象の理解や疾患の治療に繋がることから近年盛んに研究されている。我々は最近 streptavidin に対して可逆的に結合する新規リガンド ALiS を見出し、これを用いて標的タンパク質の細胞内局在を繰り返し変化させる系を構築した。しかし、天然の streptavidin は 4 量体である上、ALiS との結合能についても改善の余地がある。そこで本研究ではこの系を真に実用的なものとするべく、ALiS の誘導体合成ならびに分子進化工学的手法による streptavidin の改変研究を行った。タンパク質の改変においては、error-prone PCR によって monomeric streptavidin 変異ライブラリーを作製し、puromycin を用いた核酸・ペプチド対応付け技術である cDNA display 法により変異体タンパク質ライブラリーへと変換した。このように調製した分子を固相に固定化した ALiS 誘導体と反応させ、結合分子を回収して DNA を増幅する過程を繰り返した。更に、次世代シーケンサーを用いた配列解析によって変異に関する情報を取得した。

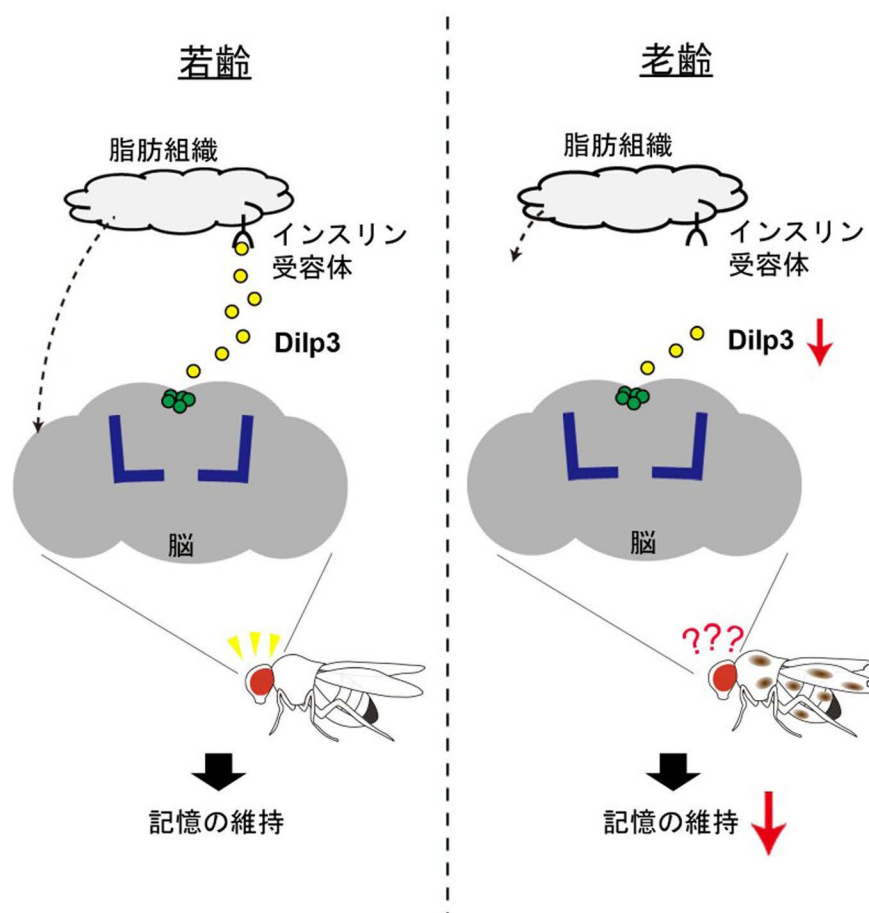
cDNA display 法による streptavidin 変異体の分子進化



老化に伴う代謝恒常性の破綻は糖尿病など多くの障害を引き起こすが、学習や記憶を担う脳機能の障害にも関連することが知られている。また、インスリンシグナル (IIS) の調節に異常がある糖尿病は、認知症など記憶障害の危険因子であることが示唆されている。しかし、IIS が学習や記憶にどのような役割を果たしているのか、また老化に伴う記憶低下への IIS の関与は、未だ解明されていない。本研究ではショウジョウバエの嗅覚記憶をモデルとして老化に伴う IIS の変化に着目し、老化に伴って記憶が低下するメカニズムの解明を目的とした。

様々な時期・組織で機能する IIS を遺伝学的に一過的に改変させることで、IIS の記憶への特異的な影響を検討した。その結果、インスリン産生細胞からのインスリン様ペプチド 3 (Dilp3) の分泌や脂肪細胞における IIS によって記憶の維持が調節されていることが明らかとなった。また Dilp3 の発現は老化にともなって特異的に低下することから、老化個体に Dilp3 を過剰に発現させたところ記憶が向上した。これらのことから、IIS の加齢に伴う変化が記憶低下の一因であることが示唆された。

老化に伴う記憶低下と記憶の維持に関するインスリンシグナルの概念図



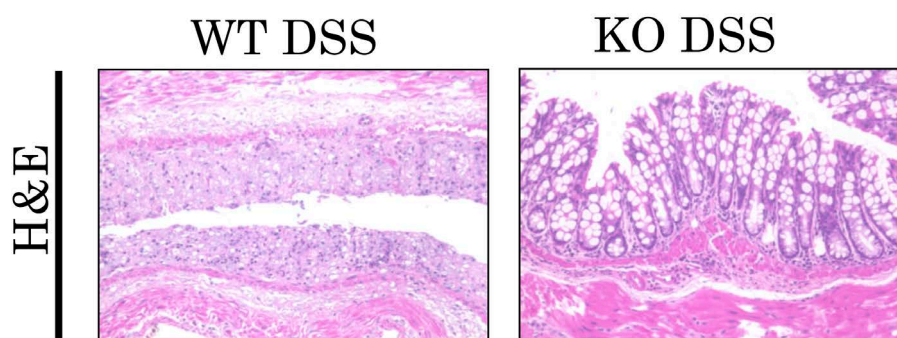
134 Pin1 を介した潰瘍性大腸炎発症機構の解明

中津 祐介

【目的】潰瘍性大腸炎は特定疾患治療研究事業対象疾患として難病指定されているように、完治させることが未だに困難な疾患であり、新規の治療法の開発が強く望まれている。我々が着目しているプロリン異性化酵素 Pin1 は様々な標的蛋白の pSer/pThr-Pro motif に結合し、プロリンのシス-トランス異性化を行うことにより標的蛋白の機能を調節するユニークな酵素である。我々は、潰瘍性大腸炎モデルマウスの腸管ではプロリン異性化酵素 Pin1 の発現量が 50 倍近くにも増加していることを見出し、Pin1 と潰瘍性大腸炎発症に関与している可能性を考え、検討を行った。

【方法及び結果】コントロールマウス及び Pin1 null マウスに 3%デキストラン硫酸ナトリウムを 1 週間負荷することで、潰瘍性大腸炎の誘発を行った。コントロールマウスでは、顕著な杯細胞の脱落やマクロファージの浸潤が認められるのに対し、Pin1 null マウスでは、これらの症状の改善が認められた。メカニズムとして、Pin1 は、特に炎症性サイトカインの発現誘導に重要であると考えられた。また、Pin1 阻害薬 Juglone をマウスに投与することで、潰瘍性大腸炎の軽減が認められた。

デキストラン硫酸ナトリウム負荷後の大腸組織の HE 染色



135 骨髄異形成症候群の新規責任遺伝子単離システムの構築

長町 安希子

骨髄異形成症候群 (MDS) のなかでも特に予後の悪い染色体異常として知られる 7 番染色体長腕欠損 (-7/7q-) に注目し、責任遺伝子候補の単離と遺伝子機能解析を進めた結果、染色体欠損により発症する MDS は、単一遺伝子ではなく複数のハプロ不全遺伝子が同時に片アレル欠損することが発症要因となるという新しい発症概念を示唆する結果を得た。そこで染色体研究の新ツールになり得るゲノム編集技術を駆使し、複数遺伝子同時欠損ヒト iPS 細胞の樹立を進め、これを造血細胞へ分化させて *in vitro* で MDS を再現する、造血細胞異形成評価システムの確立を目的として、本研究ではまず手技の確立を行った。CRISPR/Cas9 の切断効率と変異導入効率を HL60 細胞で検証したところ、約半数の細胞に微小欠失が認められ、さらに蛍光レポーター遺伝子と薬剤耐性遺伝子を組み込んだターゲットベクターを HL60 細胞に共導入し同様に検討したところ、両アレル変異挿入を中心に約 60% の細胞で組換えが認められ、効率的に変異導入細胞を単離できた。さらにマウス受精卵前核に crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質をマイクロインジェクションし同様に検討したところ、産仔 13 匹中 12 匹に変異が認められ、効率良く変異マウスを作出することができた。

CRISPR/Cas9 法の白血病細胞株 HL-60 細胞とマウス受精卵への変異導入効率

CRISPR/Cas9 KO plasmid and HDR plasmid transfection
of HL-60 cell line

Genotype	KI/KI : KI+ : +/+
number of clones	49 : 12 : 39

PN injection with crRNA/tracrRNA and Cas9 protein

Injected	two-cell /survived	pups /two-cell	GMO /pups	homo : hetero : wt
46	41 / 46 (89%)	13 / 41 (32%)	12 / 13 (92%)	6 : 6 : 1

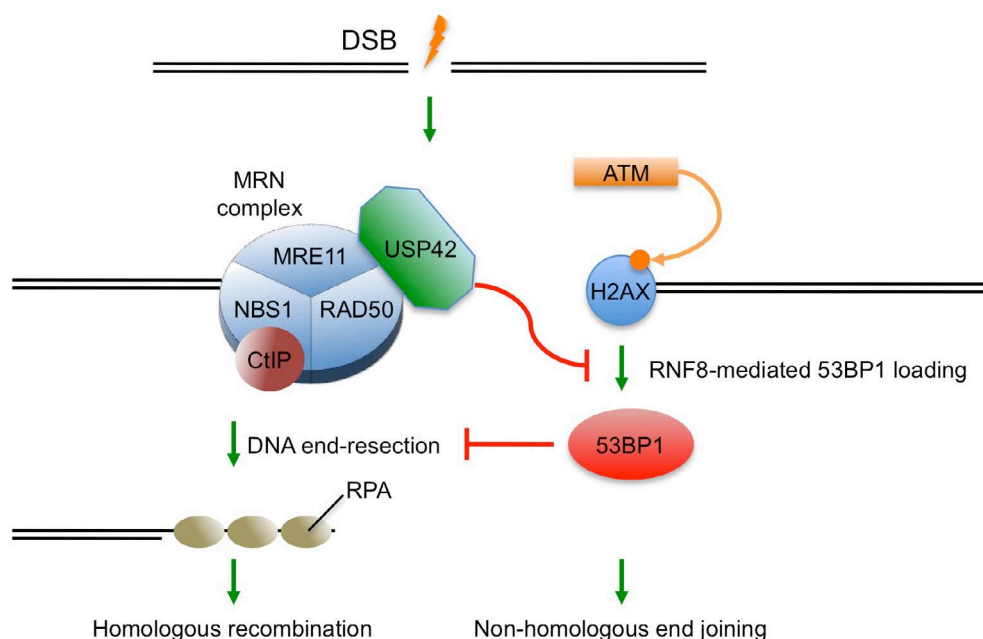
136 DSB 修復に伴う転写抑制における核内構造体の機能解明

西 良太郎

DNA 二重鎖切斷 (DNA double-strand breaks: DSBs) を適切な修復経路により修復することはゲノム恒常性を維持する上で不可欠である。現在までに、DSB 修復の分子機構はこれに関与するタンパク質の同定に始まり、エピジェネティックな制御を含むクロマチンレベルにおける制御が解明されてきた。一方、ゲノム DNA は核内において PML body 等の核内構造体と混在しており、これらの核内構造体が DSB 修復及び、応答に果たす役割には解明すべき点が多く残されている。本研究では nuclear speckle の新規構成因子として見出した脱ユビキチン化酵素 USP42 の機能解析により、nuclear speckle が DSB 修復及び、DSB 依存的な転写抑制に果たす役割の解明を目的とした。

USP42 は DSB 修復のうち相同組換え修復 (homologous recombination: HR) に寄与することを特異的なアッセイにより明らかにし、HR 因子である MRN 複合体 (MRE11-RAD50-NBS1) と複数のドメインにおいて相互作用することを見出した。さらに、USP42 のノックダウンは HR の初期反応である DNA end-resection に遅延をもたらした。また、USP42 の発現は転写レベルで細胞周期依存的に制御され、S 期後期から G2 期にかけてピークを示した。これらの結果から、USP42 が新たな HR 促進因子であることが示唆され、核内の局所に位置するゲノム領域が HR により優先的に修復される機構が示唆された。

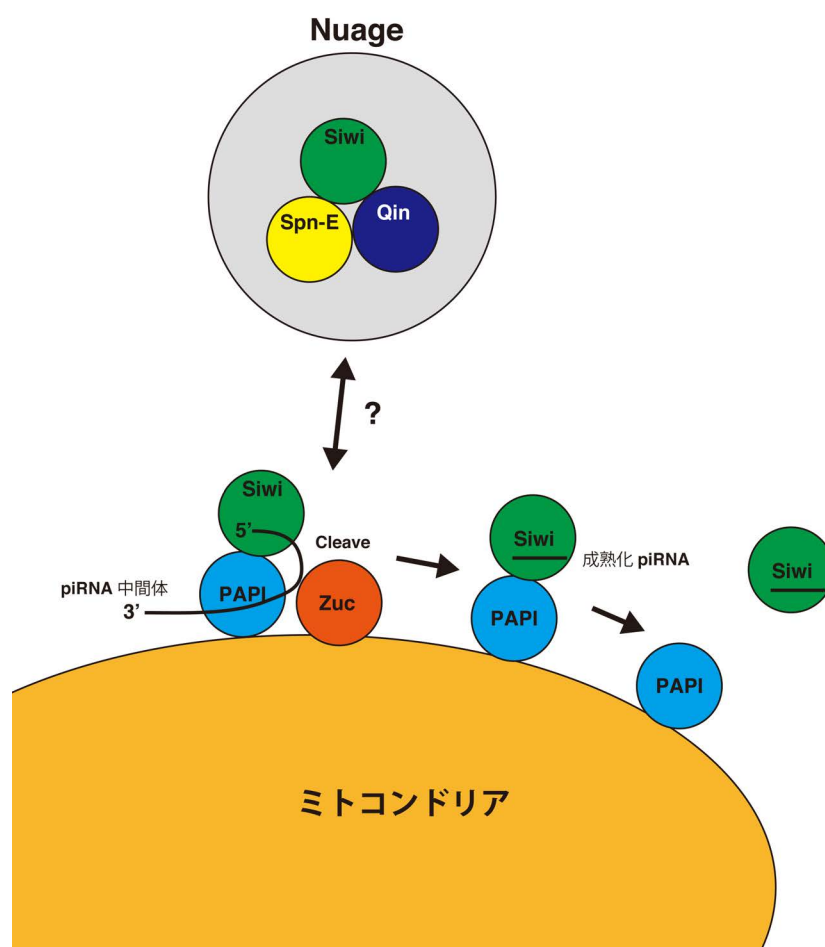
USP42 による DNA 二重鎖切斷修復制御機構



piRNA の生合成に関連する多くの因子が Nuage と呼ばれる顆粒体構造を形成しており、その顆粒体で piRNA 生合成が行われていると考えられている。しかし、piRNA の詳細な生成過程については未だ不明な点が多く存在する。

カイコ生殖細胞由来培養細胞株 BmN4 は、Siwi と BmAgo3 の 2 種類の PIWI タンパク質が発現しており、piRNA との結合も見られることから piRNA 生合成経路を解析する優れたツールである。Qin は、Zinc finger ドメインと TUDOR ドメインを有する piRNA 生合成関連因子である。Qin の TUDOR ドメインは PIWI 及び Spn-E との結合に必要な領域であるが、Qin が Nuage に局在するために必要なドメインは分かっていない。以前から、piRNA 生合成経路において Nuage とミトコンドリアに関連性があることが知られていた。しかし、ミトコンドリア上でどのように piRNA が生成されていくのかはよく分かっていないのが現状である。本研究では、piRNA 生合成経路における BmQin 及びミトコンドリア局在因子 BmPAPI について生化学的な解析を行うことで、piRNA 生合成経路の解明を試みた。BmQin 変異体を用いた解析から、BmQin が Nuage に局在するためには、両方のドメインが必要であることが判った。また、ミトコンドリア上の PAPI-Siwi 複合体には成熟型 piRNA ではなく piRNA 中間体が load されていた。さらに、ヌクレアーゼである Zuc をノックダウンすることにより、PAPI-Siwi 複合体の piRNA 中間体が蓄積することが判明した。これらの結果から、PAPI-Siwi 複合体に load された piRNA 中間体は、Zuc により成熟型 piRNA にプロセスされることが示唆された。

ミトコンドリア上での piRNA 生合成経路のモデル

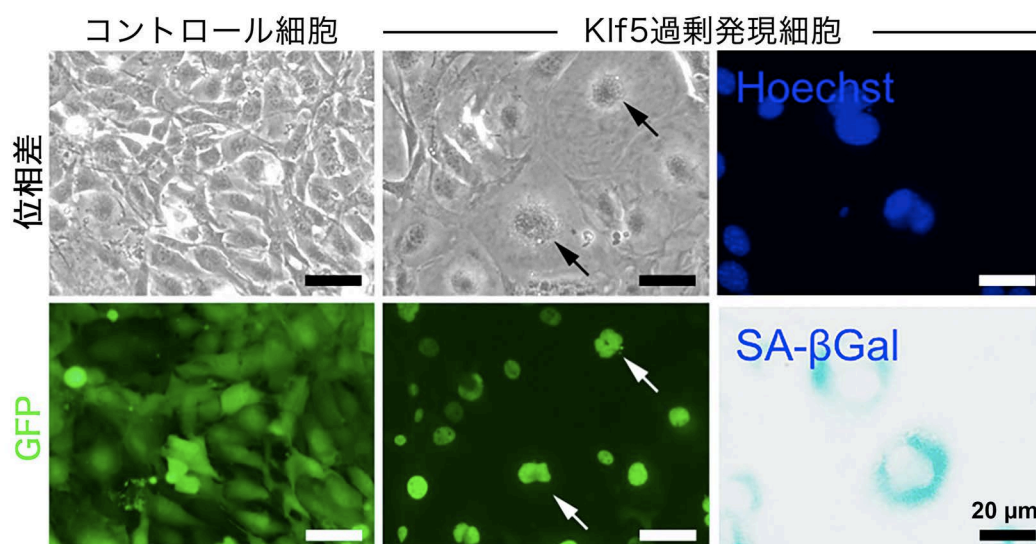


138 老化における筋衛星細胞数の減少メカニズムの解明

林 晋一郎

加齢に伴う退行性の骨格筋量・質の低下であるサルコペニアでは、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞数の減少が見られるが、そのメカニズムは明らかではない。これまでに著者は転写因子 Klf5 が筋分化・再生過程で転写因子 MyoD と協調して筋特異的な因子の発現を促進することを明らかにした。一方、Klf5 を過剰発現した筋芽細胞では、細胞増殖の停止が起こることを新たに見出した。そこで本研究では、加齢に伴う Klf5 の発現制御異常が筋衛星細胞数の減少を引き起こす分子機構を解明することを試みた。骨格筋細胞株である C2C12 細胞にレトロウィルスベクターによって Klf5 を過剰発現させた。その結果、Klf5 過剰発現細胞では、細胞の巨大化・扁平化が観察され、SA-Gal 陽性となり、細胞老化の特徴を示した。細胞周期解析の結果、Klf5 の過剰発現により主に G2/M 期で細胞増殖を停止していることが明らかとなった。これらの細胞は、MyoD の発現が消失する一方で、ストレスファイバーを伴う α -Smooth Muscle Actin の発現が上昇したことから、筋細胞の特徴を失い、線維芽細胞様の特徴を獲得している事が示された。以上の結果から、加齢に伴い筋衛星細胞における Klf5 の発現が上昇し、細胞老化および線維芽細胞様の特徴を獲得した結果、筋衛星細胞数が減少することが示唆された。

Klf5 過剰発現 C2C12 細胞は細胞老化を起こす



139 がん化の理解を目指した追跡可能な染色体融合系の開発

林 眞理

がん化のごく初期の過程である CRISIS（又はテロメアクライシス）期には、細胞の性質を決定する染色体が不安定化し、腫瘍の悪性化や多様化に多大な影響を及ぼす。その分子メカニズムは、染色体末端を保護するテロメアの機能不全による染色体融合に端を発すると考えられているが、不明な点が多い。そこで染色体融合の運命を 1 細胞レベルで詳細に解析することを目的とし、比較的安定に染色体を保持しているがん細胞株である HCT116 において、X 染色体の短腕のテロメア近傍領域に特殊な DNA カセットを挿入した。この DNA カセットは、スプライシング配列によって分断された蛍光タンパク質（mCitrine）を保持しており、姉妹染色分体間の融合がおきた時にのみ mCitrine を発現するように設計した。このカセット内の特定の配列を配列特異的エンドヌクレアーゼである CRISPR/Cas9 で切断すると、ある一定の頻度で mCitrine を発現する細胞が現れることを確認した。さらに mCitrine 陽性細胞の染色体を解析したところ、姉妹染色分体の融合が引き起こされていることを確認した。この系を用いた解析により、姉妹染色分体の融合は、発生直後の細胞周期には目立った影響を与えないことが示唆された。

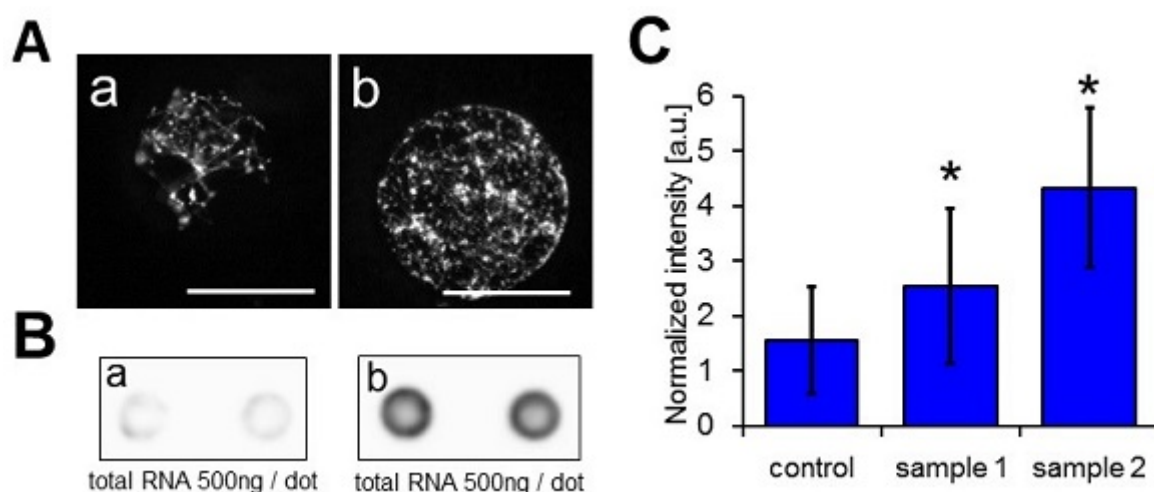
追跡可能な姉妹染色分体融合誘導系の概念図



140 核の大きさが転写制御に与える影響の解析

原 裕貴

多細胞生物を構成する細胞は、その種類や性質に合わせ細胞核のサイズ（大きさ）を様々に変化させている。しかし、この変化する細胞核の「サイズ」という空間的な情報が、核内部に存在する DNA の機能、特に転写制御にどのような影響を与えるかについては理解が進んでいない。本研究では、先行研究では理解されていなかった細胞核のサイズと転写制御の直接的な因果関係について解析を行った。特に、先行研究では存在しなかった、*in vitro* の条件下で細胞核のサイズを人為的に操作し転写制御への影響を解析可能な実験系の確立を目的とした。既存の細胞核の *in vitro* 無細胞再構築系においては、アフリカツメガエルの卵細胞質抽出液中で精子クロマチンを加えることで細胞核を *in vitro* で再構築することが可能である。さらに、そのサイズの増加速度を人為的に操作することが可能である一方で、材料として転写活性をもたない卵細胞を用いているため転写活性の解析には不向きな実験系であった。その問題点を克服するために、転写活性化の重要因子を従来の卵細胞質抽出液に加えることで、「改良型」の転写活性を有する細胞核の再構築実験系を確立した。さらに、この改良型実験系において、従来型と同様に細胞核の成長速度を変化させることに成功した。

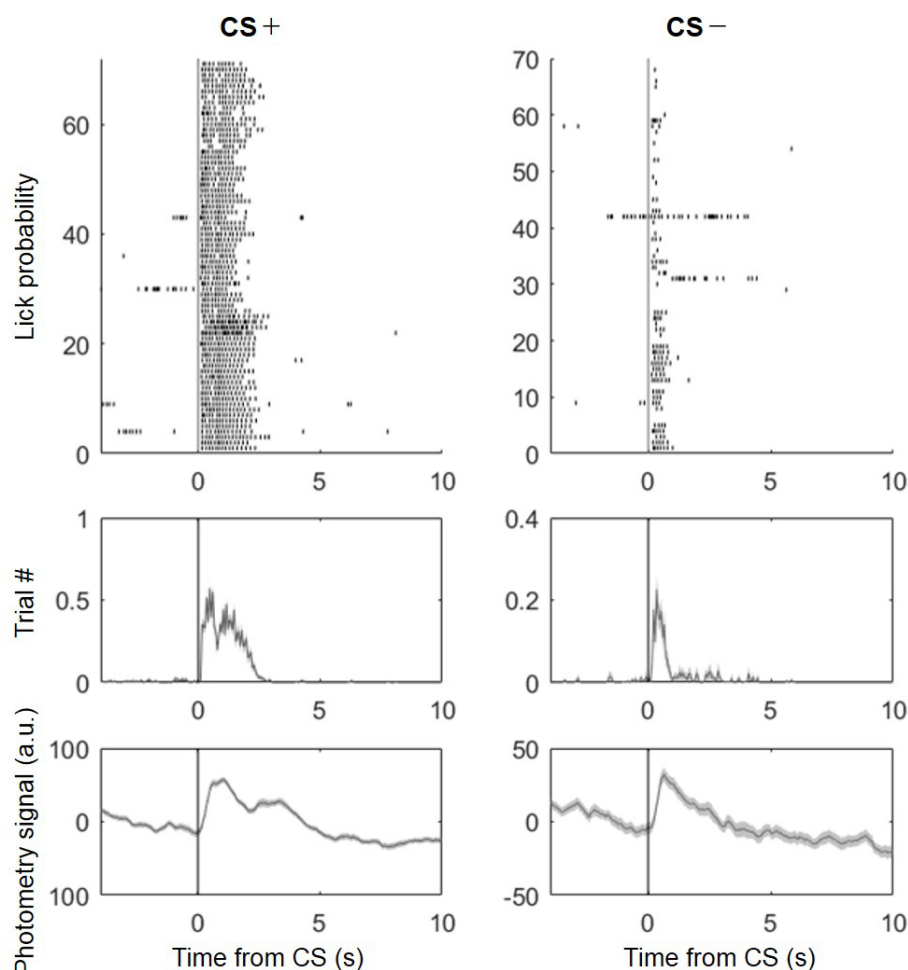
改良型 *in vitro* 無細胞再構築系による核の再構成と転写活性

141 快・不快を司る神経回路メカニズムの解明

人羅 菜津子

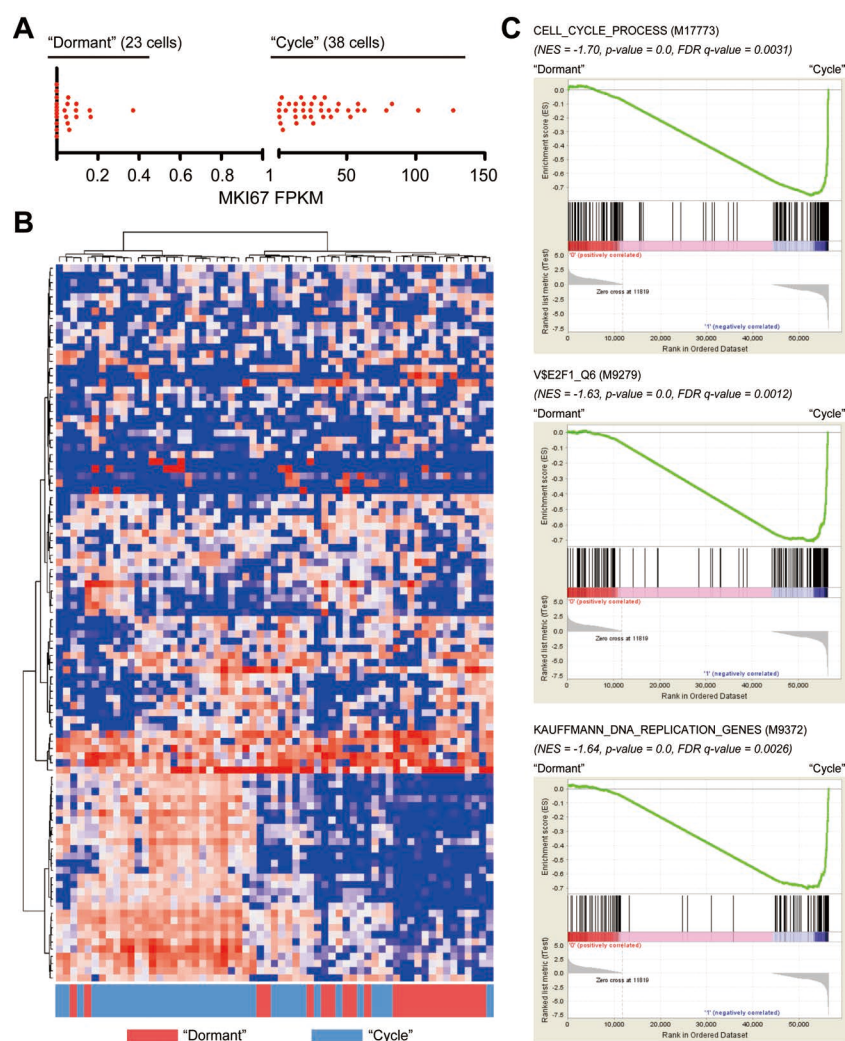
扁桃体外側基底核 (BLA) は情動に関わる情報伝達において重要な脳領域である。BLA は報酬学習にも嫌悪学習にも関与することが知られている。BLA 内の異なる細胞集団が快あるいは不快情動を担うことが示唆されているが、結論には至っていない。本研究は、報酬学習時の神経活動をリアルタイムで観察・解析し、BLA の神経活動がどのように変化するかを解明することを目的とした。報酬学習時の BLA 神経細胞のカルシウム活動をファイバーフォトメトリー法により観察したところ、手がかりとなる音 (CS+) 提示後に anticipatory licking (< 0.5 秒) および consummatory licking (> 0.5 秒) のタイミングと一致する 2 つのピークが認められた。さらに BLA-NAc 経路においても、CS+ に対して 2 つのピークが認められた。本研究から、報酬学習時に扁桃体が anticipatory licking および consummatory licking に対応した神経活動を示すことが示唆された。今後は、神経回路あるいは遺伝子発現パターンに基づいて細胞集団を区別し、学習時の神経活動を明らかにしていく予定である。

報酬学習時の licking 行動 (上、中段) および BLA 神経細胞のカルシウム活動 (下段)



本研究では脳組織特異的に休眠状態を呈するがん脳転移マウスモデルを作製し、がん細胞の休眠維持と破綻の機構を解明することを目標として実験を行った。まずは複数種類の肺がん・乳がん・悪性黒色腫細胞株に蛍光蛋白質とルシフェラーゼを発現させ、マウス心腔内接種によるがん全身転移誘導モデルのスクリーニングを行い、脳組織内にて休眠とそこからの離脱を呈する細胞株を見出した。このがん細胞の脳転移形成プロセスの経時的解析を行ったのち、脳組織よりがん細胞を抽出してシングルセルレベルでの遺伝子発現解析を行った。結果、これらの細胞は MKI67 発現量を指標とすることで"Dormant group"と"Cycle group"の2群に分離されることが明らかとなり、gene set enrichment analysis では"Cycle group"において細胞周期進行に係る遺伝子や転写因子 E2F の標的遺伝子、DNA 複製に係る遺伝子の発現上昇が認められ、本解析が目的に沿って進んでいることが示唆された。これらと同時に、脳転移がん細胞の休眠維持と離脱に係っていると考えられるシグナル経路および分子として、ある特定の 1. non-coding RNA、2. メチル化酵素、3. 分子シャペロンタンパク、4. 炎症メディエータ、の関与が示唆されており、現在更なる解析を進めている。

シングルセル RNA シーケンスによるがん細胞休眠シグナルの解析

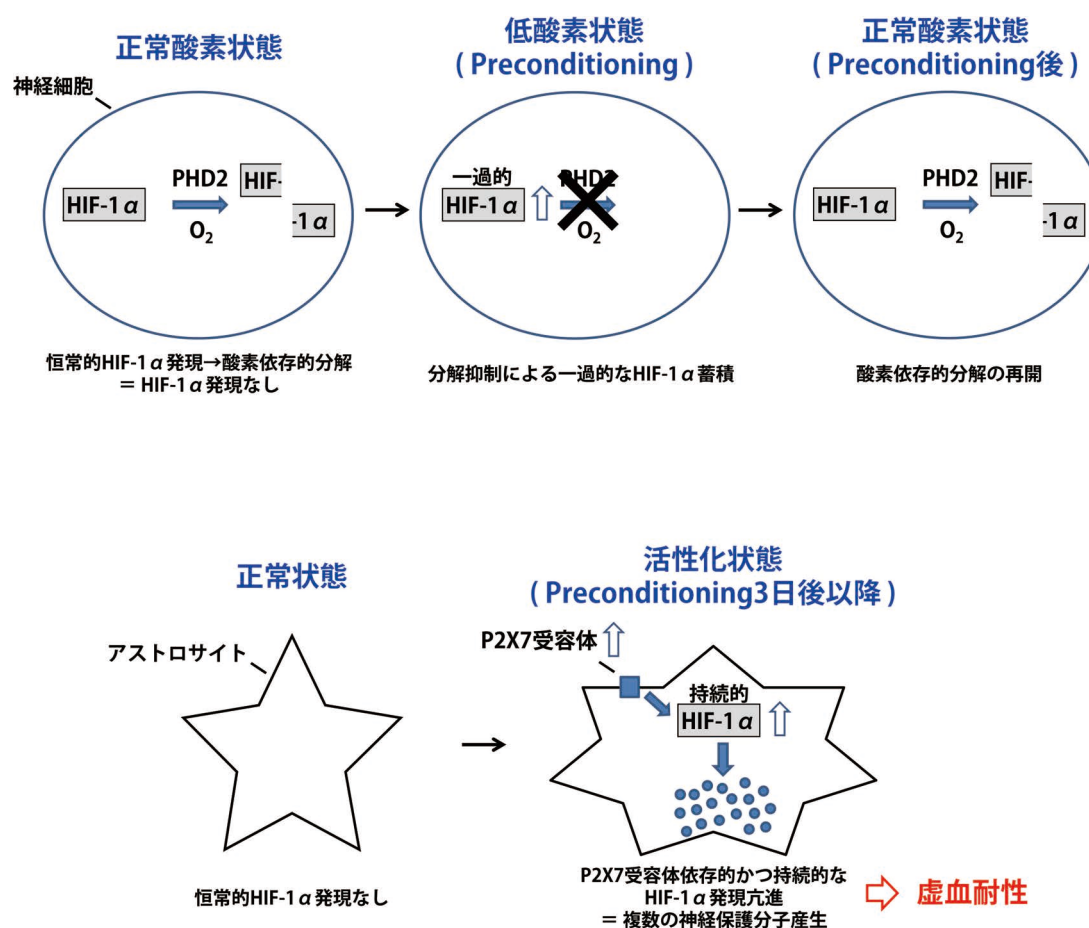


143 グリア細胞主導型の虚血耐性獲得メカニズムの解明

平山 友里

脳虚血耐性とは、あらかじめ非侵襲的虚血（Preconditioning: PC）を経験しておく、その後の侵襲的虚血に対する抵抗性が獲得される現象である。我々はこれまでに、PC後に活性化するアストロサイトが虚血耐性獲得に重要であること、その分子メカニズムに、酸素恒常性制御のマスター分子である HIF-1 α が必須であることを報告した。PC後の HIF-1 α 発現亢進は神経細胞とアストロサイトの両方で認められるが、なぜ神経細胞ではなく、アストロサイトの HIF-1 α が虚血耐性獲得に重要であるかは不明のままであった。今回、初代培養細胞を用いた *in vitro* 実験と中大脳動脈閉塞モデルを用いた *in vivo* 実験の検討により、神経細胞とアストロサイトでは HIF-1 α の発現メカニズムが全く異なること、これにより両者の HIF-1 α 上昇の経時的変化に違いが生じ、よってアストロサイト HIF-1 α のみが虚血耐性獲得に関与することを明らかにした。

アストロサイト P2X7 受容体を介する持続的な脳虚血耐性



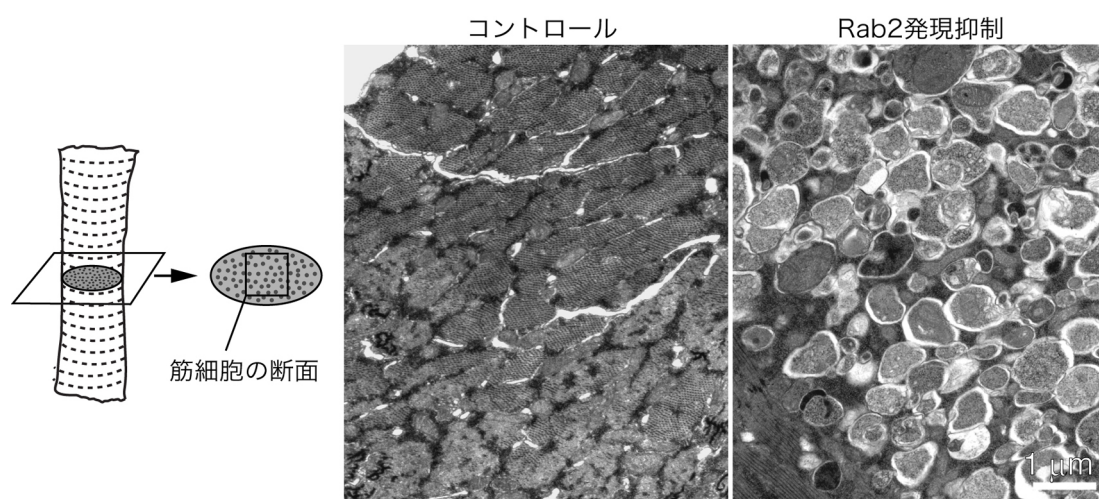
144 T管形成に関わる因子の同定と機能解析

藤田 尚信

筋細胞は高度に分化した細胞であり、筋原線維やT管などの特殊な細胞内構造を持つ。運動や加齢などの様々な要因により、筋細胞は恒常的に傷害を受けており、傷害を受けた際にはT管などの膜構造体も作り直され、細胞の恒常性が保たれている。しかし、筋細胞内の構造体が再構成される仕組みは、これまで十分に解明されていなかった。私たちは、ショウジョウバエの変態期に腹部筋細胞内のT管がほぼ完全に再構成される新たな現象を発見した。この現象をモデルに用いた解析から、T管の再構成に細胞内大規模分解機構であるオートファジーが重要であることを見出し、また、オートファゴソームとリソソームとの融合に関わる新分子としてRab2を同定した。筋細胞でRab2の働きを抑制すると、筋細胞内にオートファゴソームが異常に蓄積し、筋細胞の機能が失われた。本成果は、オートファジーがショウジョウバエの変態期に細胞死以外の機能を持つことを示した初めての報告であり、筋細胞再構成の理解に向けて良い解析モデルを提供すると期待される。

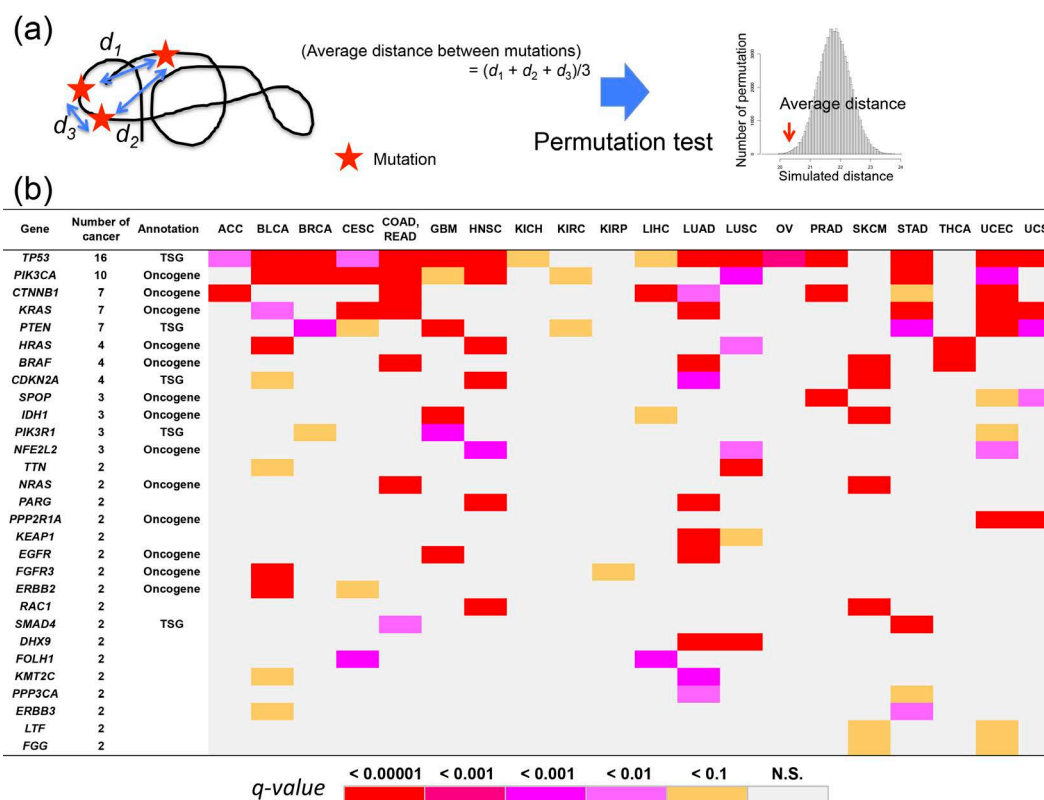
筋細胞断面の電子顕微鏡像

コントロールでは筋原線維の断面（小さな黒い点）やT管（白い線状の構造）が見られるのに対し、Rab2の発現を抑制した筋細胞では筋原線維やT管が失われ、多数のオートファゴソームが見られる。



がんは、ゲノムの変異が原因となって起こる疾患であると考えられており、変異の解析はがん研究において最も重要な課題の一つである。近年のシーケンス技術の発展により、全ゲノム、全エクソーム配列決定が可能となり、盛んに研究されている。がんの発生・進展において直接的に重要な役割を果たす遺伝子は、ドライバー遺伝子と呼ばれ、ドライバー遺伝子を検出することにより、発がんのメカニズムの解明や治療標的の発見に結びつく成果が得られると期待されている。一般に、ドライバー遺伝子は、変異数を統計的に検定することにより検出される。しかしながら、変異数に基づく解析では、低頻度のドライバー遺伝子の検出は困難であり、新たな解析法が必要となる。我々は、タンパク質の立体構造を考慮することにより、1次構造の解析では見逃されている変異の集積を検出できるのではないかと考え、立体構造を考慮する変異の集積を検定する方法（3D permutation法）を開発した。この手法を TCGA 計画（The Cancer Genome Atlas 計画）で公開された 21 がん種のデータに適用した。その結果、106 遺伝子に有意な変異クラスターが検出され、ドライバー遺伝子候補と考えられた。

3D permutation 法の概要と解析結果

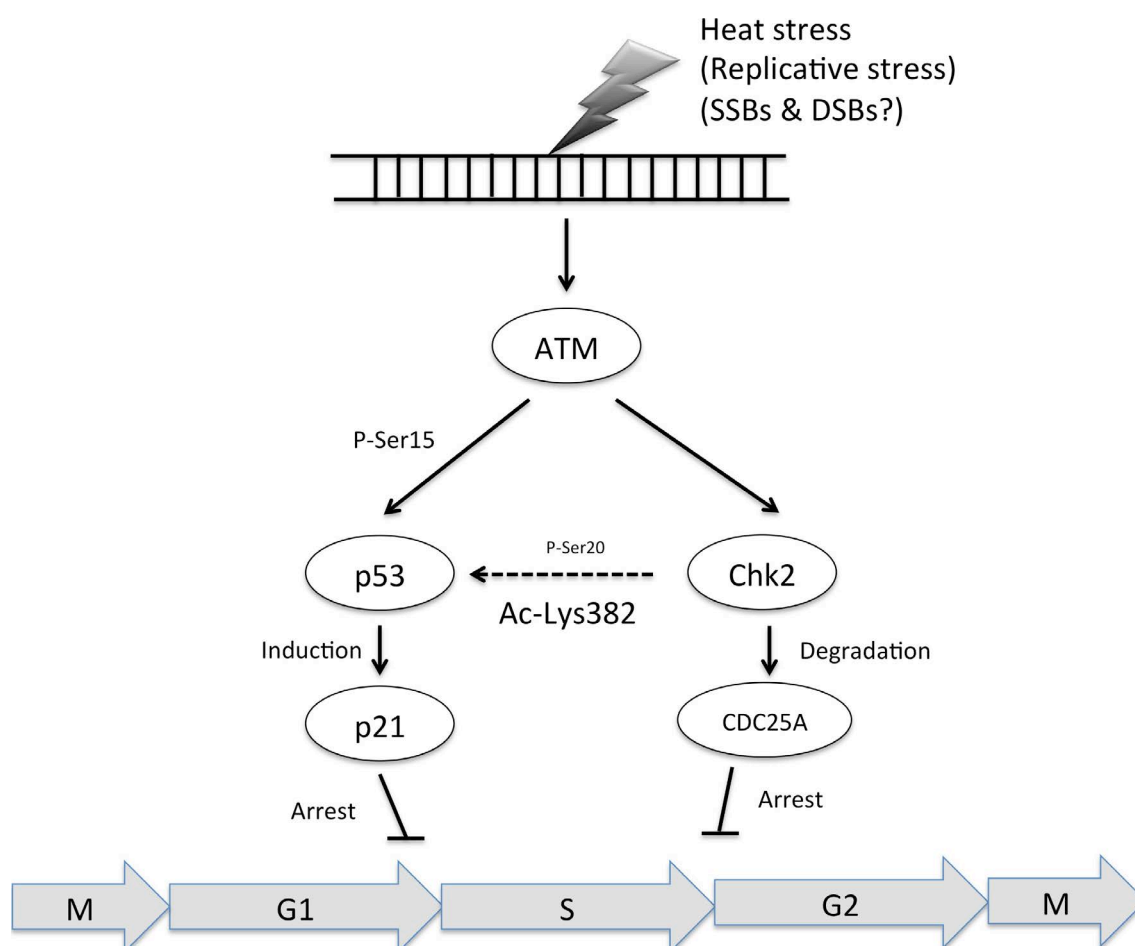


146 Chk2 による温熱誘発細胞死調節機構の解明

古澤 之裕

温熱ストレスによる温熱療法（ハイパーサーミア）は、癌細胞の増殖阻害や、細胞死の誘導を引き起こすことが知られている。これまで、我々は温熱により活性化するチェックポイントキナーゼ1が、温熱ストレス下の細胞において、細胞周期の停止や細胞生存に関与することを報告した。しかしながら、チェックポイントキナーゼ1（Chk1）の機能的アナログとして知られるチェックポイントキナーゼ2（Chk2）が、温熱処理した癌細胞においてどのような役割を担っているのかは不明であった。本研究では、野生型 p53 を発現する Molt-4 細胞（Molt-4/V）と、p53 をノックダウンした Molt-4 細胞株（Molt-4/shp53）を用いて、温熱処理下での Chk2 の機能を解析した。Chk2 阻害は、p53 の C 末端のアセチル化を阻害し、温熱による p53 標的遺伝子の発現を遅延させた。しかしながら、Chk2 の阻害は、Molt-4/V 細胞における温熱誘発細胞死に影響を及ぼさなかった。一方で、Chk2 阻害は Molt-4/shp53 細胞における細胞周期の停止を解除し、温熱誘発細胞死を増強した。すなわち、Chk2 阻害は p53 の機能が阻害されている癌細胞においてのみ、細胞死や細胞周期の停止に関与すると考えられた。p53 は半数以上の癌において変異や欠失がみられることから、Chk2 阻害は、ある種の癌細胞における選択的な温熱増感法になると期待される。

Schematic summary of the pathways involved in Chk2-induced cell cycle arrest under heat stress



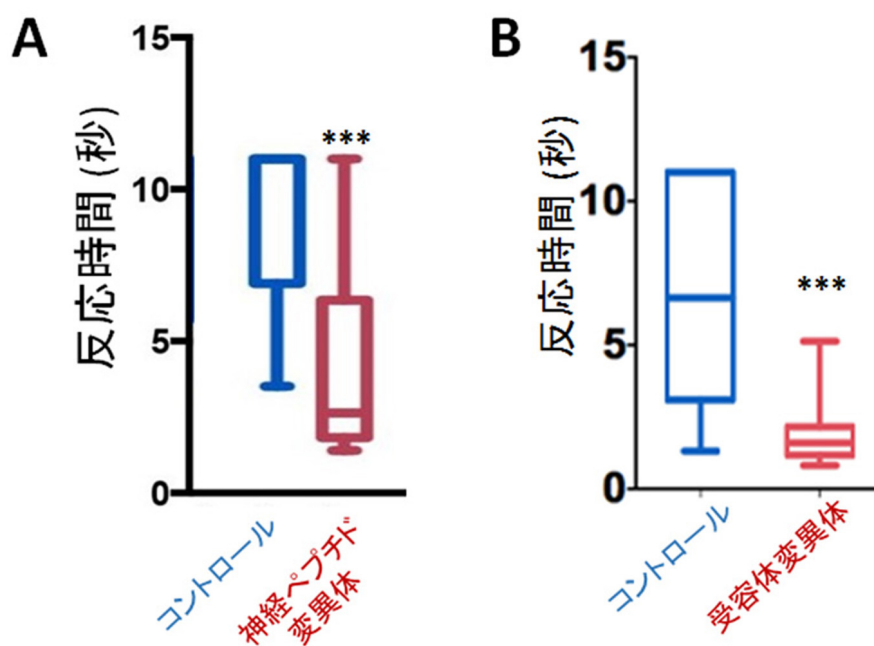
147 神経ペプチドシグナル網による痛覚シグナル調節機構

本庄 賢

神経細胞が分泌する短鎖ペプチドである神経ペプチドは、痛覚の重要な調節因子として注目され、過去数十年に渡り研究が進められてきた。しかし、神経ペプチドは神経伝達物質として近傍のニューロンに作用する一方、ホルモンとして血中に分泌され遠心性の作用も持ち、複数の組織で異なる生理機能調節に関わり得るなど非常に複雑である。こうした複雑な機能様式に阻まれ、痛覚修飾に関わる神経ペプチドがどれほど存在し、どの細胞に作用し、どのように相互作用しながら痛覚シグナルを調節しているのか、その生体内作用機序の理解はほとんど進んでいない。

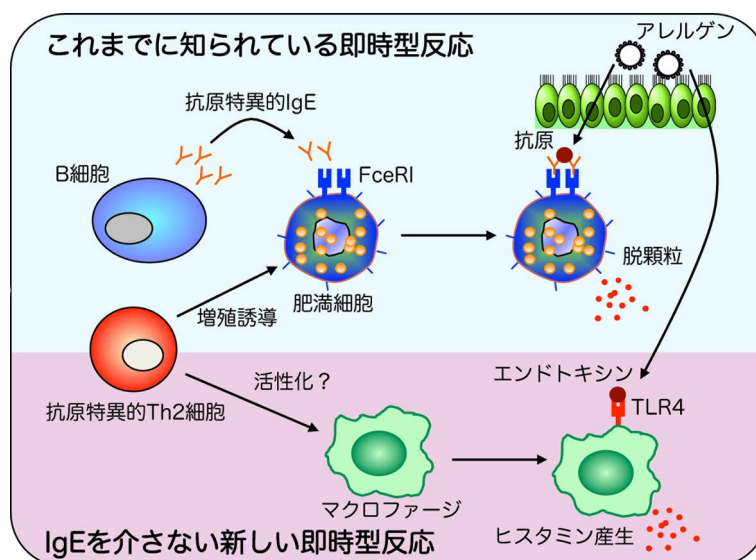
我々は生体内における遺伝学的解析手法に優れるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデルに用い、痛覚修飾に関わる神経ペプチドの網羅的同定と、その生体内作用機序の解明を目標として研究を進めている。これまでにを行ったノックアウト変異体を用いたスクリーニングからは、欠失した際に痛覚反応異常を生じる神経ペプチド遺伝子を複数同定した。スクリーニングで見出された神経ペプチドの生体内発現解析からは、ショウジョウバエ痛覚神経回路内に発現が見られるものも見つかっており、今後さらに詳細な生体内作用機序の解析を進めていく。

スクリーニングで見出された神経ペプチドとその受容体変異体の熱痛覚反応



抗原特異的 IgE を介した肥満細胞の活性化は、アレルギー性鼻炎をはじめとしたアレルギー疾患における即時型反応の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、鼻炎症状の引き金としては IgE 以外の関与も考えられ、また様々なアレルギー様症状を示す患者の中には抗原特異的 IgE がまったく検出されない場合も存在することが知られている。我々は抗原に含まれるエンドトキシンがこのような IgE 非依存性アレルギー様症状を誘導していることを見出した。マウスに卵白アルブミン (OVA) を免疫後、OVA を点鼻することで鼻炎症状が誘発できる。このとき、エンドトキシンを含まない OVA は IgE 受容体である $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ を欠損したマウスでは鼻炎症状を誘発できなかったのに対して、エンドトキシンを含む OVA は $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 欠損マウスでも野生型マウスと同等に鼻炎症状を誘導した。我々は OVA 特異的 Th2 細胞を移入するモデルを用いて本鼻炎症状の誘導機構の詳細を検討し、本鼻炎反応には鼻局所での Th2 細胞の活性化が必須であるが、鼻炎症状を惹起する引き金はエンドトキシンであることを見出した。さらに本反応には肥満細胞・好塩基球が関与せず、単球・マクロファージが関与する全く新しい I 型過敏症様症状であることを明らかにした。

アレルギー疾患における即時型反応の新規誘導機構



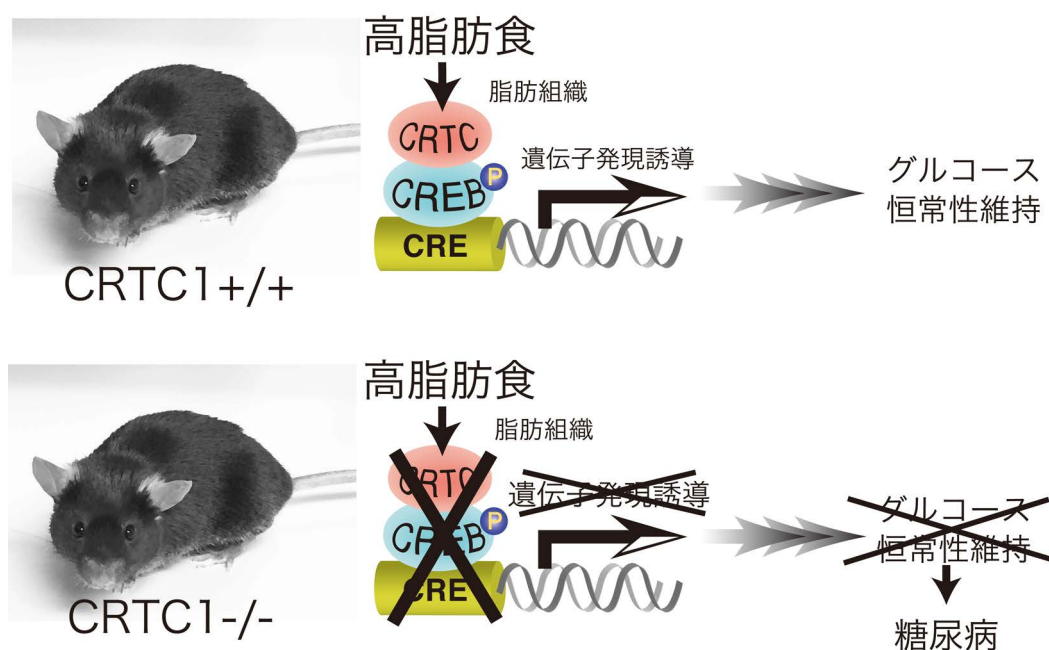
149 遺伝子転写因子 CRTC1 欠損による糖尿病発症機構の解明

松村 成暢

動物の体内では外的、内的ストレスに適応するために遺伝子の調節が積極的に行われている。この遺伝子発現調節に重要な役割を果たしているのが転写因子の一つである CREB およびその co-activator である CRTC である。このため CREB 活性の低下は多種多様な環境に適応するための遺伝子発現の低下を招き、様々な疾病の引き金となる。

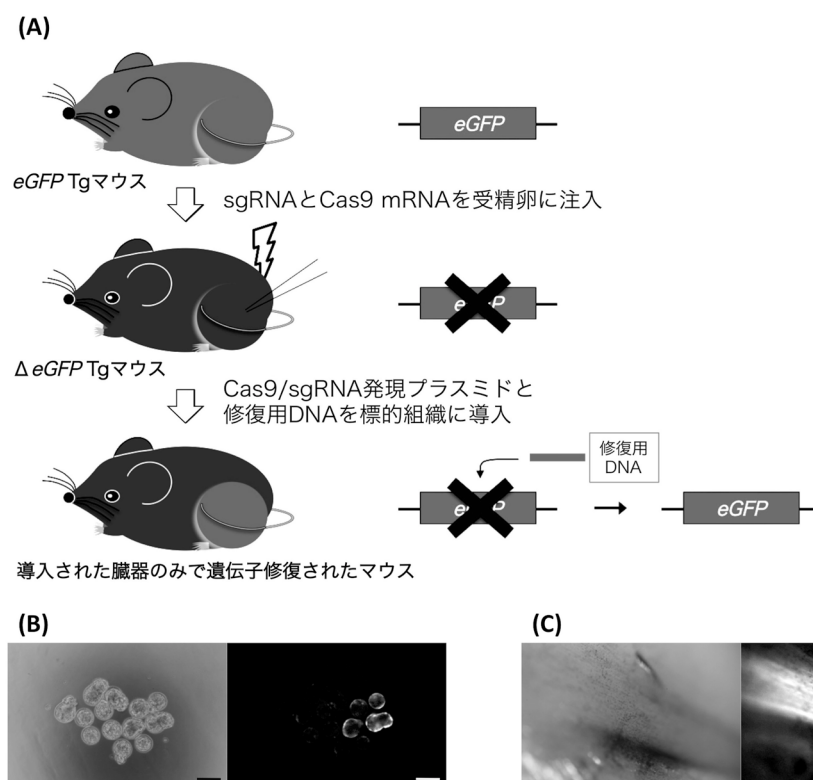
本研究では CRTC1 欠損マウスにおいてみられる糖尿病発症機構の解明に取り組んだ。CRTC1 欠損マウスに高脂肪食を与えると非常に短期間で重度の高血糖が観察され、インシュリン抵抗性が惹起された。さらに顕著な脂肪肝、内臓脂肪の萎縮、脂肪組織の炎症が観察された。CRTC1 は脳にのみ発現がみられると報告されている。しかしながら CRTC1 欠損マウスの脂肪組織で明らかな異常が起こっているため、解析したところ CRTC1 は脂肪組織にも強く発現がみられることが明らかとなった。さらに野生型マウスにおいて高脂肪食で CRTC1 の発現誘導が観察された。以上の結果より高脂肪食は脂肪組織における CRTC1 を活性化し、血糖の維持に重要な遺伝子を調節していることが示唆された。

CRTC1/CREB による遺伝子調節を介した血糖恒常性維持機構



遺伝子治療法を開発する上で、その治療効率を簡便に評価できる動物モデルは有用である。本研究では、ゲノム編集による遺伝子治療法の効率改善を目指した研究に有用なツールとなる動物モデル、すなわち、治療効率を蛍光で容易に確認可能なモデルマウスの開発を行った（図 A）。そのために、まず全身で *eGFP* を強発現する *eGFP* トランスジェニック（Tg）マウスの *eGFP* 遺伝子の一部を破壊し、 $\Delta eGFP$ Tg マウスを作製した。そのマウスは壊れた *eGFP* 遺伝子（ $\Delta eGFP$ 遺伝子）を有しているため蛍光を発しないが、ゲノム編集等により *eGFP* 遺伝子が修復された場合、その修復部位は蛍光を発するようになることを期待される。そこで次に、 $\Delta eGFP$ Tg マウスに CRISPR 系を用いて遺伝子修復を施し、実際に *eGFP* 遺伝子が正確に修復され蛍光が回復するか否かを確認した。これまでに、受精卵（図 B）、および成体マウス骨格筋（図 C）での遺伝子修復を試み、蛍光や遺伝子配列解析から修復に成功した結果を得ている。これにより、開発した一連のツールが期待通りに働くことを確認することができ、遺伝子治療法開発研究における評価系に使用できる可能性が示された。

遺伝子治療評価系モデルマウスの開発とその評価



151 iPS 細胞の遺伝子改変による心筋症発症機序の解明

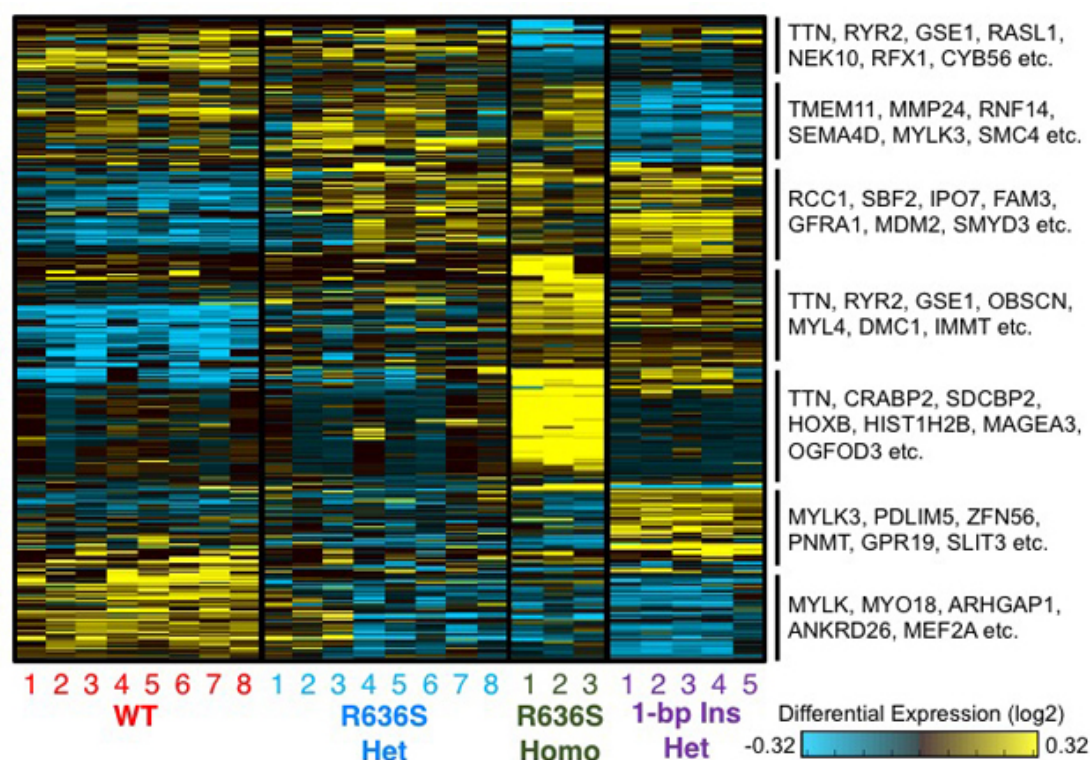
宮岡 佑一郎

近年、スプライシング因子である RBM20 の変異が、遺伝性心筋症の原因の 1 つであることが明らかとなった。さらに興味深いことに、多くの点変異が RBM20 の R634 から P638 アミノ酸残基に集中している。しかし、それら点変異による心筋症発症の分子機序は解明されていない。

本研究では、ゲノム編集により RBM20 の R636S 点変異、および機能欠失変異を、健常者由来 iPS 細胞に導入した。これらの iPS 細胞を心筋細胞へと分化させ、得られた遺伝的背景が同一の心筋細胞を用いて RNAseq を行い、RBM20 の変異がスプライシングにもたらす影響を詳細かつゲノムワイドに解析した。

その結果、RBM20 の R636S 点変異、および機能欠失変異がともに心筋機能に関わる多くの遺伝子のスプライシング異常を引き起こすことが明らかになった。さらに、R636S 点変異と機能欠失変異によって起こされるスプライシング異常のパターンが、大きく異なることも示された。これは、RBM20 の点変異が単純な機能欠失変異ではなく、ドミナントネガティブなどの特別な効果を有することを示唆しており、心筋症発症の分子機序解明の重要な手がかりである。

RBM20 の変異を持つ iPS 細胞由来心筋細胞のゲノムワイドなスプライシング様式

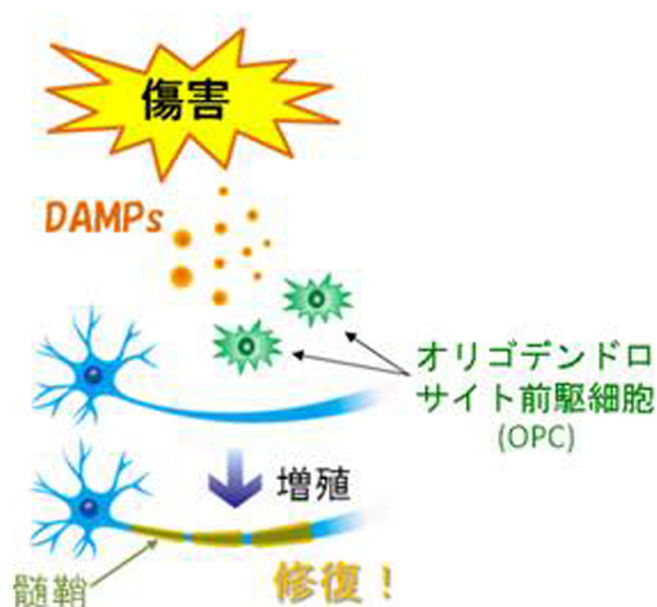


152 成体中枢神経系の内在性修復機構の解明

村松 里衣子

様々な疾患により、脳と脊髄からなる中枢神経系が傷つくと、傷ついた部位に応じて様々な症状があらわれる。症状は時間が経つにつれて自然に回復するが、その理由は、神経組織が自然に修復したためと理解されている。本研究では、傷害をうけた中枢神経系がいかにして修復するか、その分子メカニズムを探索することを目的として、特に病巣で観察される「細胞傷害」との関連に着目した。病巣での炎症反応や物理的な刺激により細胞が傷害されると、細胞内に含まれる物質が細胞外に漏れ出す。漏出する物質は damage associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれ、DAMPs の中には炎症反応を悪化させる作用を持つものなどが知られる。DAMPs が神経系に直接与える作用については明らかにされていないため、DAMPs を模擬する細胞抽出液を神経系細胞に暴露させ、神経組織の修復に関連する現象をスクリーニングした。その結果、細胞抽出液は *in vitro* で、髄鞘を構成するオリゴデンドロサイトの前駆細胞を増殖させる働きを持つことがわかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖は、髄鞘の修復を促進させる。そこで本研究では、細胞抽出液中の何が髄鞘の修復を促すか、その分子メカニズムの解明を試みた。

中枢神経傷害後の髄鞘修復を促す DAMPs を同定する

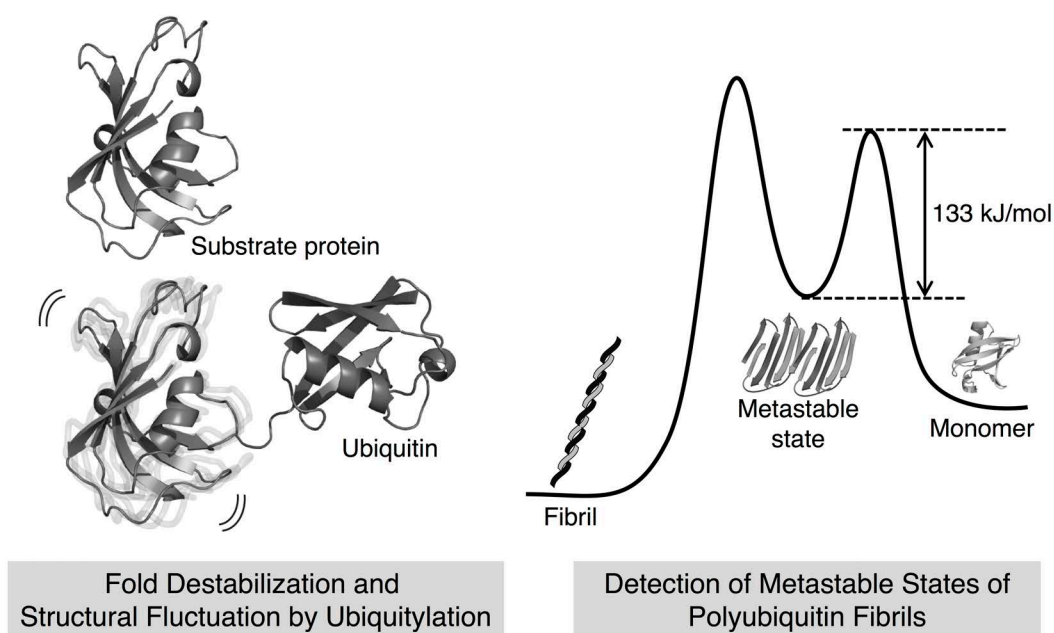


153 神経変性疾患の脳内異常タンパク質凝集体形成機構解明

森本 大智

高齢化社会の最も深刻な問題は、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患患者の増加である。長年、発症機構解明のため国内外で研究が行われているが不明な点が多く残されている。その中でも最大の不思議は、これらの疾患で共通して確認されるユビキチン陽性の脳内封入体（異常タンパク質凝集体）である。本研究では、如何にユビキチンが細胞内凝集体を形成するのかを解明すべく、核磁気共鳴法を用いて、ユビキチン化に伴う基質タンパク質の構造不安定化機構ならびに、線維（凝集体）形成機序の解明に取り組んだ。構造不安定化機構の解明において、ユビキチン化が基質タンパク質のマイクロ秒からミリ秒の範囲のダイナミクスを変化させ、熱力学的不安化を引き起こすことを見出した。また、線維形成機序の解明については、線維構造を反映する、水溶液に可溶で、核磁気共鳴法で解析可能な分子を作製することに成功した。この分子は熱力学的に準安定状態にあることが分かり、速度論的解析により、その熱力学的特性を定量化した。

The observed ubiquitylation-induced fold destabilization
and detected reaction intermediates of polyubiquitin fibrils

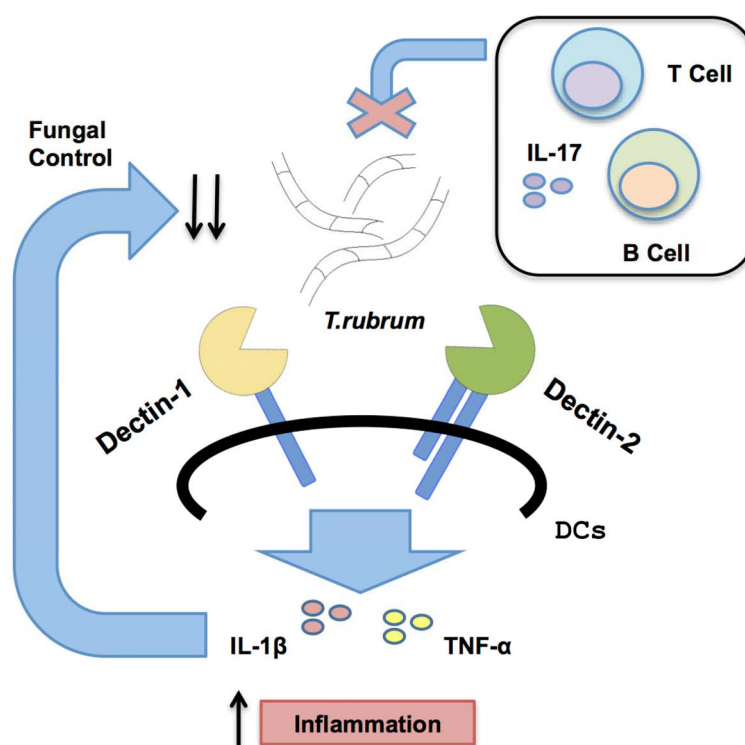


154 真菌感染現象における抑制性受容体の分子基盤

矢部 力朗

皮膚糸状菌症は、慢性真菌感染症のひとつで、白癬菌 *Trichophyton rubrum* が起因菌とされる。しかしながら、白癬菌に対する宿主感染防御機構は不明な部分が多かった。本研究では、C型レクチン受容体である Dectin-1 および Dectin-2 が *T. rubrum* に対する自然免疫応答の誘導および菌体の排除機構に重要な役割を果たすことを見出した。骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を *T. rubrum* で刺激した際、Dectin-1 および Dectin-2 欠損マウス由来では野生型に比べ炎症性サイトカインの産生量低下が認められた。また、*T. rubrum* をマウスに感染させた結果、Dectin-1 欠損および Dectin-2 欠損マウスでは *T. rubrum* を排除できず、炎症性サイトカインの産生も低下していた。一方、Rag2 欠損および IL-17A 欠損マウスは野生型マウスと同様に、*T. rubrum* を排除していた。これらの結果から、*T. rubrum* 感染に対して、Dectin-1 および Dectin-2 を介した自然免疫誘導機構が重要で、T細胞を介したあるいは IL-17 に依存した免疫誘導機構は必須でないことが示唆された。

C型レクチン受容体による白癬菌制御機構の解明

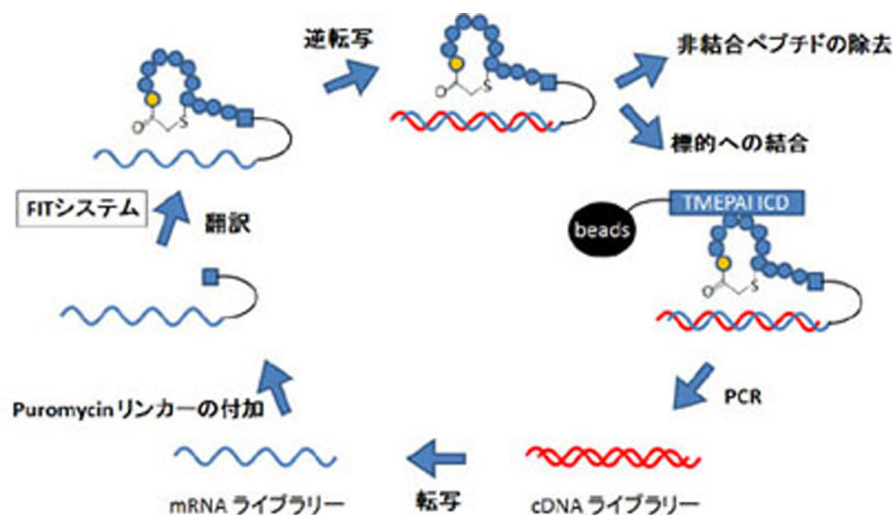


155 特殊環状ペプチドを用いた抗腫瘍薬の開発

渡邊 幸秀

がんを早期発見、治療することは健康生活の向上に非常に重要であり、がん細胞特異的な抗腫瘍薬の開発や感度の高い診断法の確立が望まれる。TMEPAI は様々ながん細胞において高発現し、TGF- β シグナルの制御に関与する膜タンパク質である。がん細胞で TMEPAI をノックダウンすると腫瘍形成能が著しく低下することから、TMEPAI は腫瘍形成に促進的に働いており、TMEPAI の機能阻害により抗腫瘍作用が期待できる。一方、非天然アミノ酸を含む特殊環状ペプチドは、ペプチダーゼ耐性の獲得や構造の安定化の特徴を持ち、標的タンパク質への特異性や結合性に優れ、タンパク質相互作用の抑制も可能なことから、次世代バイオ医薬品として注目されている。東京大学生物有機化学研究室では特殊環状ペプチドライブラリーとそのスクリーニング技術 (RaPID システム) が確立されており、標的タンパク質に高い結合能力を持つ特殊環状ペプチドの探索が行える。本研究では、がん細胞で発現している TMEPAI のアイソフォームの同定と TMEPAI に結合する特殊環状ペプチドの探索を行った。今後、TMEPAI 結合特殊環状ペプチドを用いて抗腫瘍作用の評価や組織染色法や ELISA 法を開発し、早期発見や再発の診断マーカーとしての有用性を検討する。

TMEPAI に結合する特殊環状ペプチドのスクリーニング

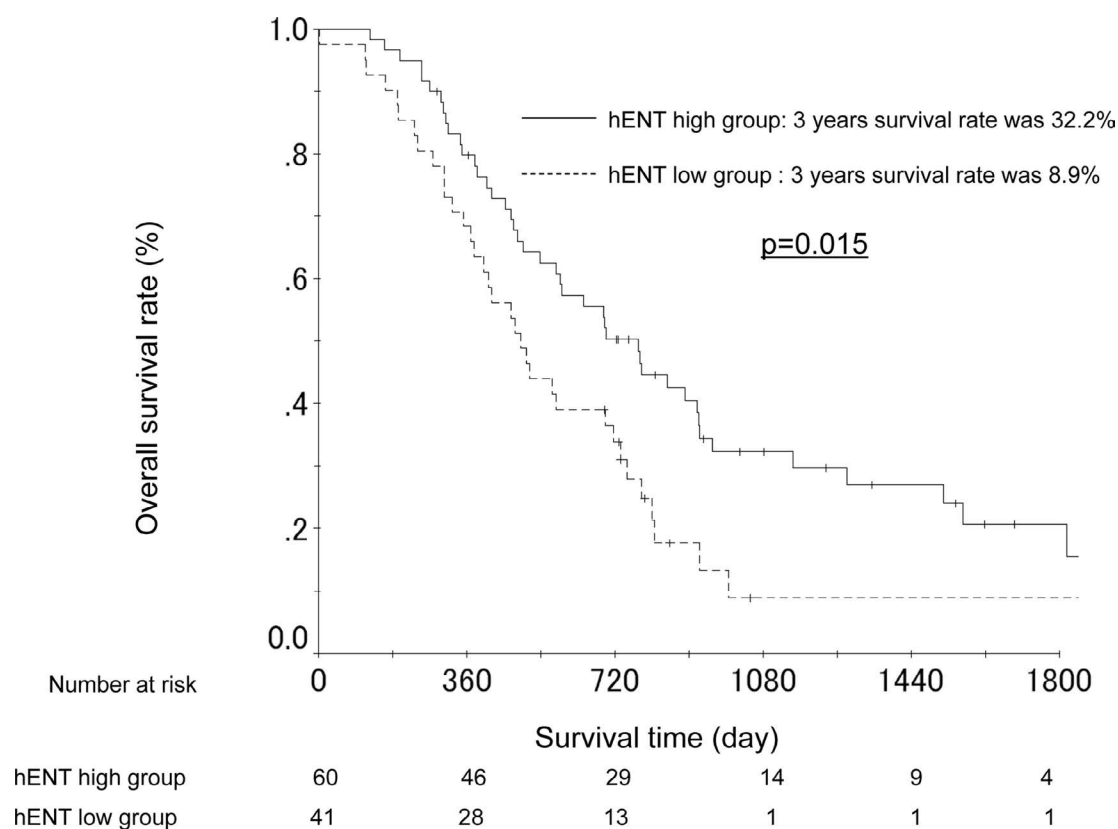


156 低酸素低栄養環境下の膵癌細胞での遺伝子変異の探索

青山 徹

ゲムシタビン（以下、GEM）を用いた膵癌術後補助化学療法施行例において human equilibrative transporter 1（以下、hENT）の発現と臨床病理学的な特徴と、治療効果及び生存への関連を検討した。2005年から2014年までの10年間に、神奈川県立がんセンター肝胆膵外科で治療切除され術後 GEM 補助療法施行膵癌症例 101 例を対象とした。hENT の発現解析結果と患者臨床情報、特に、GEM 術後補助化学療法の効果について統計学的な相関解析を実施した。対象の年齢の中央値は 66 歳（range: 40 - 78）、男性が 57 例/女性が 44 例、28 例が膵体尾部切除/70 例が膵頭十二指腸切除/3 例が膵全摘術をそれぞれ施行、85 例が R0 切除で 16 例が R1 切除であった。観察期間の中央値は 67.3 か月（range: 22.2 - 122.7 カ月）であった。hENT 陽性症例は、60 例（59.4%）であった。hENT 陽性群と hENT 陰性群で、年齢・性別・腫瘍の進行度などを比較検討すると、両群で明らかな差を認める因子はなかった。hENT の予後への影響を検討すると、3 年と 5 年の全生存率は hENT 陽性症例では 32.2%と 20.6%、hENT 陰性症例では 8.9%と 8.9%と有意な差を認めた。生存率に関わるリスク因子解析を施行し、hENT のステータス（陽性 vs 陰性、HR 比：1.740、P 値：0.019）は独立した危険因子となった。

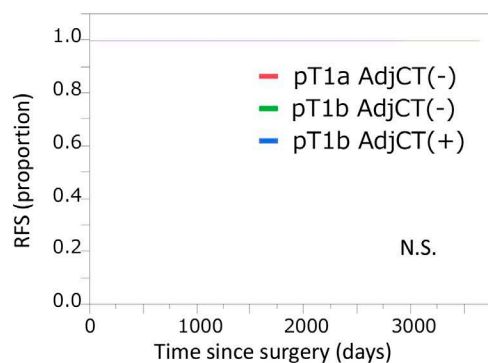
hENT 陽性群と陰性群での全生存期間の比較



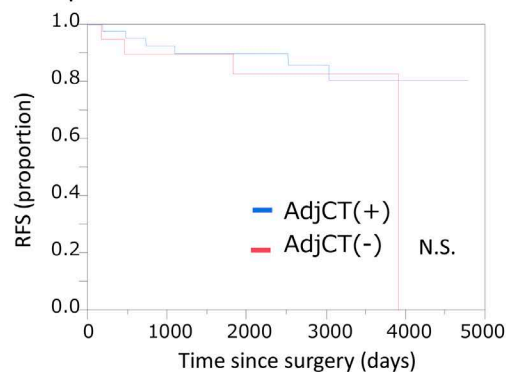
乳癌は、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) によって複数のサブタイプに分類され、それぞれのサブタイプに応じた周術期薬物療法を適切に施行することで予後が改善してきた。ER 陰性、PgR 陰性、HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は、悪性度が高く、予後不良である症例が少ない。これまでに特定の治療標的分子が同定されていないため、有効な治療法は化学療法しかない。そのため、腫瘍径が 1 cm より大きい TNBC に対しては再発リスク低減目的に術前・術後化学療法を施行することが推奨されている。一方、近年 TNBC そのものの多様性が報告されており、化学療法の適応を見直す必要があると考えられる。本研究では、TNBC に対する周術期化学療法の有用性と必要性について検討した。pT1aN0 は全例術後化学療法は施行されておらず再発は認めなかった。pT1bcN0、pStage II は、術後化学療法 (AdjCT) の有無により無再発生存率 (RFS)、全生存率 (OS) に有意差は認めなかった。pStage III のみが、術後化学療法施行群は非施行群に比較し、RFS、OS が有意に良好であった。また、術前化学療法後病理学的完全奏効 (pCR) が得られた症例は、pCR が得られなかった症例 (non-pCR) に比較し、RFS、OS ともに有意に良好であった。術後化学療法が推奨されている pT1cN0、pStage II においては、今回の解析では化学療法による予後改善効果は認められず、これらの症例に対しては術後化学療法の有効性と必要性を今後さらに検討する必要があると考えられた。また、NAC 後 non-pCR 群に対しては今後さらに新規治療法を検討する必要があると考えられた。

TNBC の病期別にみた術後化学療法 (AdjCT) の有無による
無再発生存率 (RFS: relapse-free survival) の比較

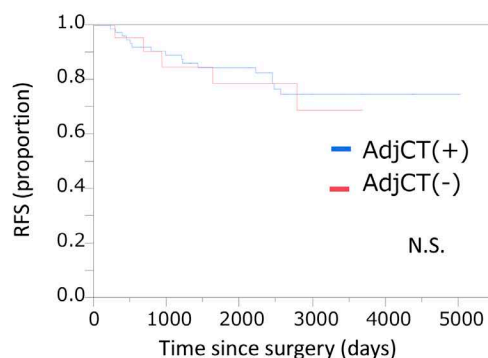
1) pT1aN0, pT1bN0におけるRFS



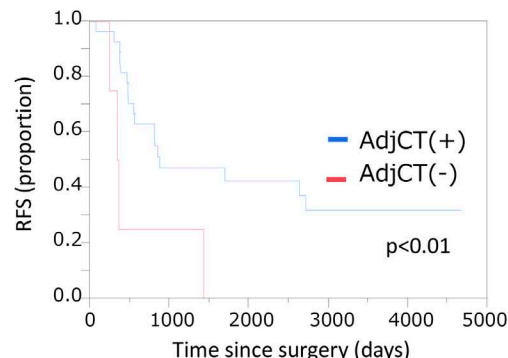
2) pT1cN0におけるRFS



3) pStage IIにおけるRFS



4) pStage IIIにおけるRFS

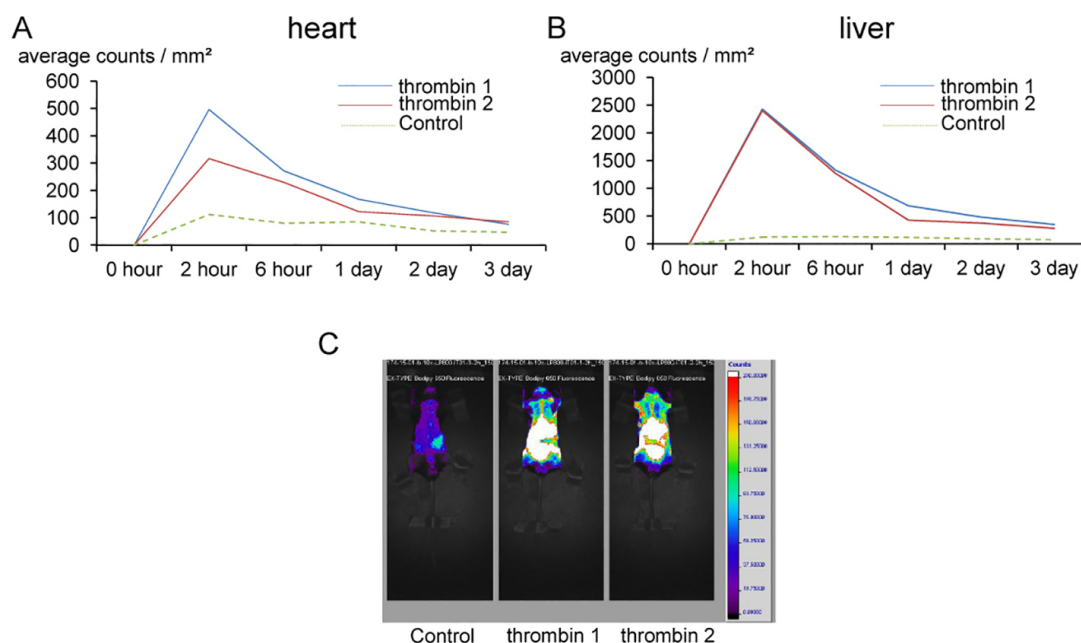


158 組織トロンビンの拡張型心筋症病態形成への関与

伊藤 敬一

血液凝固カスケードの最終産物であるトロンビンは protease activated receptor-1 を介して、胃の収縮、障害血管の修復、血小板凝集など様々な生理的作用を示すことが知られている。我々は心臓においても組織トロンビンが存在する事をヒトの剖検心を用いて免疫組織学的に証明した。一方、拡張型心筋症患者の血液では血液中のトロンビンが亢進している事が報告されている。我々は拡張型心筋症モデルマウス ($\Delta K210$ knock-in mice (B6; 129-Tnnt2 tm2Mmto)) を用いて組織トロンビンが拡張型心筋症の病態に関与している事を確認した。今回の研究では組織トロンビンの過剰発現が拡張型心筋症を引き起こす事が強く示唆されるために、心臓特異的プロトロンビン過剰発現マウスを作製した。また、実際にトロンビンが心臓組織に取り込まれている事を確認するため、トロンビンを HiLyte 647 にて蛍光標識し、トロンビンの動態を観察した。その結果、心臓特異的にプロトロンビンを過剰発現させても心重量、心機能に影響は出なかった。また、Wild type の心臓ではプロトロンビン mRNA は確認出来なかった。しかし、外来性にトロンビンを投与すると、心臓および肝臓に取り込まれた。以上より、組織トロンビンは血液由来であり、心臓組織では内因性プロトロンビンは存在しない事が分かった。

心臓における外来性トロンビンの動態 (A)、肝臓における外来性トロンビンの動態 (B)、
eXplore Optix Imaging System による全体のトロンビン動態 (投与後 2 時間) (C)



159 性ホルモンによる肥満制御機構の解明

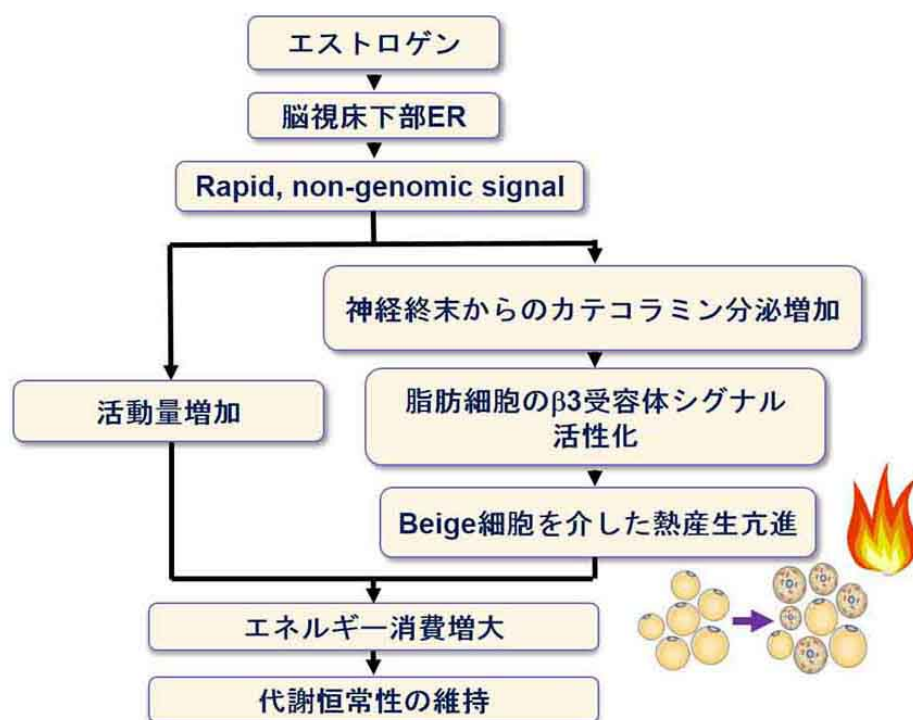
上田 和孝

【目的】閉経後女性において肥満や糖尿病等の代謝異常の発症頻度が増えることから、本研究は主要な女性ホルモンであるエストロゲンが代謝制御にどのように関わっているのかを解明することを目的とした。

【方法・結果】我々は、複数のエストロゲンのシグナル伝達経路の中から、rapid, non-genomic シグナル経路という、エストロゲン受容体 (ER) の核内移行を伴わないシグナル経路を特異的に無効化した変異 ER を構築し、それを内因性 ER と置き換えたマウス (KRRKI マウス) を樹立した。本マウスは体重増加と耐糖能異常を示した。食餌摂取量は野生型マウスと同等であり、熱産生能を比較すると、KRRKI マウスは野生型マウスに比し寒冷環境下での体温低下が顕著なことが分かった。熱産生を促進する脱共役タンパクである UCP1 は、主たる発現組織とされる褐色脂肪組織では発現に差がなかった一方で、白色脂肪組織では KRRKI マウスにおいて有意に発現が低下していた。KRRKI マウスでは、白色脂肪組織における CREB のリン酸化の低下など、交感神経刺激入力低下している可能性を示唆する結果を得たため、視床下部におけるシグナルを検討したところ、KRRKI マウスの視床下部において Akt、AMPK などの kinase のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。

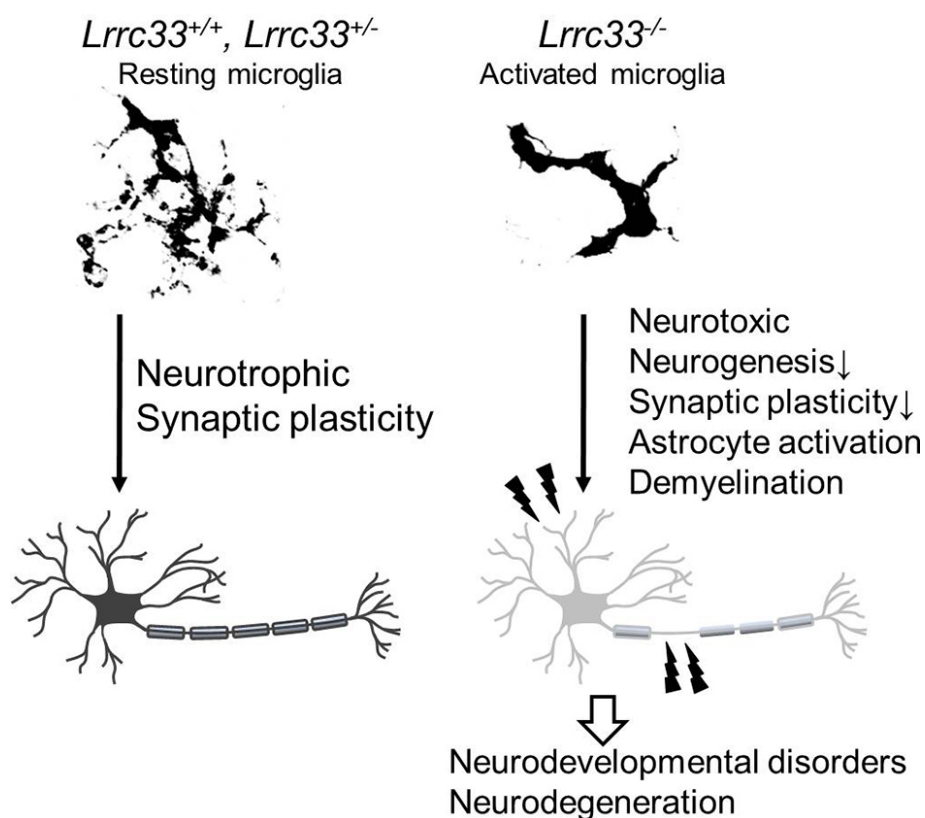
【まとめ】以上より、エストロゲン non-genomic シグナルの特異的欠損が代謝異常を招くことが明らかとなると共に、non-genomic シグナルは脳視床下部の kinase のリン酸化制御によって交感神経刺激を促進し、その結果白色脂肪組織の“褐色化”を介して熱産生能を促進して代謝恒常性を維持している可能性が示された。

エストロゲンは脳視床下部の rapid, non-genomic シグナルを介してエネルギー代謝を制御する



自閉症や統合失調症、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症など多くの精神神経疾患でマイクログリアの活性化所見が認められ、これら難病の発症とマイクログリアの機能異常との関連が推測されるが、未だ明確な証拠は存在しない。我々は新規の遺伝子 *Lrrc33* (*leucine-rich repeat containing-33*) の欠損マウスが外的刺激なしにマイクログリアの恒常的な活性化と精神病様の症状を呈することを見出した。*Lrrc33* 欠損マウスのマイクログリアは突起の複雑性が減少し、IL-1 β 、TNF α など炎症性サイトカインを対照の 100 倍程度に高発現していた。また同時に、社会性が低い、不安行動が少ない、巣作りや生殖行動を行わないなど精神病類似の症状、さらには生後 5 か月以降になると後肢の麻痺などの神経症状を呈し 10 か月以内に全例が死亡するという経過を辿ることが分かった。その組織学的基盤として、海馬歯状回の神経新生が低下し神経の配列の異常、dendritic spine の減少、大脳基底核の体積の減少などの所見を認めた。本研究により、マイクログリアの持続的な活性化が神経系の発達および変性に及ぼす影響の一側面を示すことができた。

マイクログリアの恒常的な活性化に伴う形態的变化とニューロンへの影響



161 腎機能の評価指標としての尿中 VEGF-A₁₆₅b 測定意義構築

菊地 良介

慢性腎臓病は、進行すると末期腎不全に至り、透析療法が必要となる。これまでに我々は、VEGF-A₁₆₅b が、生活習慣病や代謝障害を背景として発症する PAD や肥満症の病態進展に深く関与していることを報告してきた。

VEGF-A₁₆₅b は、糖尿病腎症でみられる炎症性サイトカインや酸化ストレス亢進によるグリコカリックスの傷害から、糸球体内皮細胞障害を防ぐ働きがあることなどが報告されていた。しかし、腎機能と VEGF-A₁₆₅b との関連性については未だ不明な点が多く、尿中 VEGF-A₁₆₅b 濃度を定量し、腎機能との関連性を評価した報告はなかった。そこで 我々は、尿中 VEGF-A₁₆₅b が腎機能をより早期に評価し、生活習慣の改善等で回復が見込める段階で治療を開始することができるバイオマーカーとなりうるかについて評価することを目的とし、尿中 VEGF-A₁₆₅b と各種腎機能評価指標との関連性について解析を行った。その結果、尿中 VEGF-A₁₆₅b 濃度が各種腎機能評価指標と有意に相関すること、さらに尿中の VEGF-A₁₆₅b 含有量の減少に従い、腎機能が低下していることを明らかにした。

尿中 VEGF-A₁₆₅b と各種腎機能評価指標の関連性

Variable	Urinary pan VEGF-A / Cre		Urinary VEGF-A ₁₆₅ b / Cre	
	(ng / gCr)		(ng / gCr)	
	r	P value	r	P value
Serum Creatinine	-0.251	0.016	-0.429	< 0.001
eGFR	0.277	0.007	0.427	< 0.001
Cystatin C	-0.210	0.045	-0.371	< 0.001
eGFRcys	0.198	0.058	0.340	< 0.001
mGFR	0.222	0.034	0.321	0.002

eGFR; estimated glomerular filtration rate.

mGFR; inulin renal clearance measurements for the accurate measurement of GFR.

162 胃癌オルガノイドを用いた抗癌剤耐性機序の解明

藏重 淳二

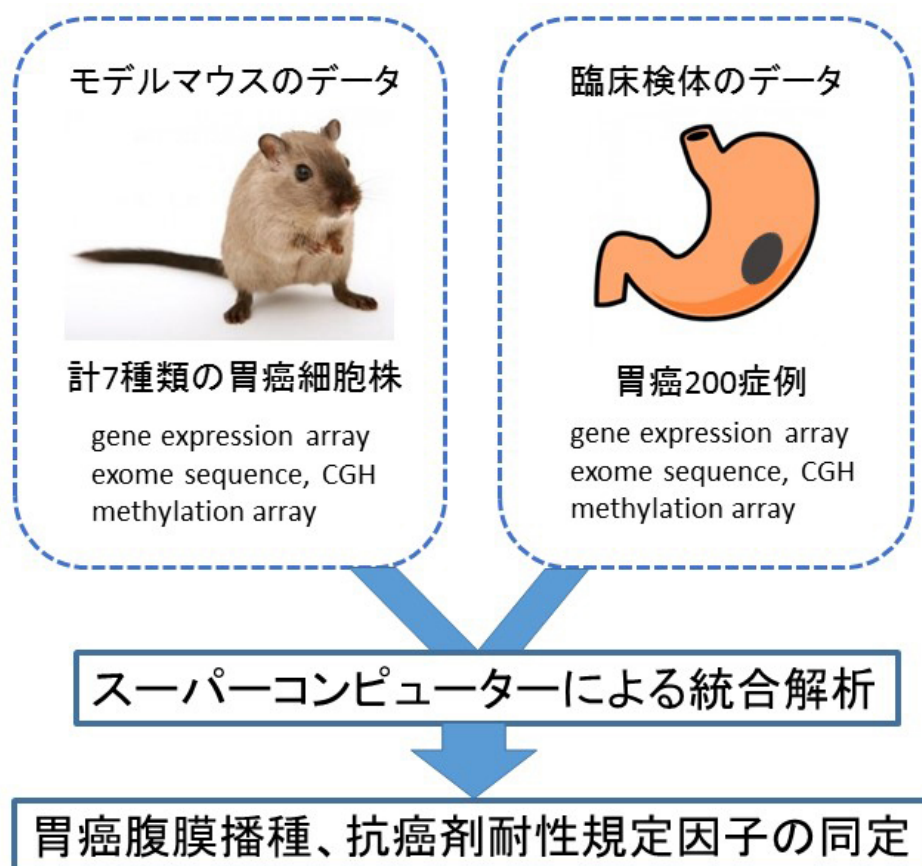
【目的】我々は、腹膜播種をはじめとする切除不能進行胃癌症例において、Conversion therapy を目指して化学療法を導入するにあたり、化学療法前の臨床検体を用いて化学療法感受性を規定する遺伝子を同定し、化学療法感受性や予後、Conversion therapy が可能な症例かどうかを予測できる新規バイオマーカーの検索と胃癌細胞の薬剤耐性獲得の機序を解明することを目指した。

【方法】腹膜播種モデルマウスに用いる腹膜播種性転移細胞株 4 種類およびそれぞれの親株 3 種類の gene array による遺伝子発現比較と胃癌臨床サンプル 200 例の遺伝子発現情報との統合解析を行い原因遺伝子について検索した。

【結果】それぞれの腹膜播種性転移細胞株と親株との比較のなかで、HSC-58 に比較して 58As9 において高発現する遺伝子で構成した遺伝子群が、胃癌臨床検体において腹膜播種陽性症例に高発現しており、予後不良因子であることが分かった。その中でも、*DDR2*, *PLOD2*, *SHERPINE2* に注目して研究を続けている。これらの遺伝子を抑制し、癌・癌微小環境の関係性を抑制することは今後の癌治療の新しい標的となる可能性がある。

【まとめ】腹膜播種性転移細胞の遺伝子発現は、胃癌臨床検体における遺伝子発現ならびに臨床情報を表現しており、胃癌腹膜播種のメカニズムを解く非常に有用なツールであると思われる。その中でも *DDR2*, *PLOD2*, *SHERPINE2* は、腹膜播種症例で高発現しており、抗癌剤耐性についても関係性がないか鋭意研究中である。

モデルマウスを用いた腹膜播種ならびに抗癌剤耐性規定因子の検討



163 Nano-lipogel を用いた T 細胞特異的な低分子化合物の開発

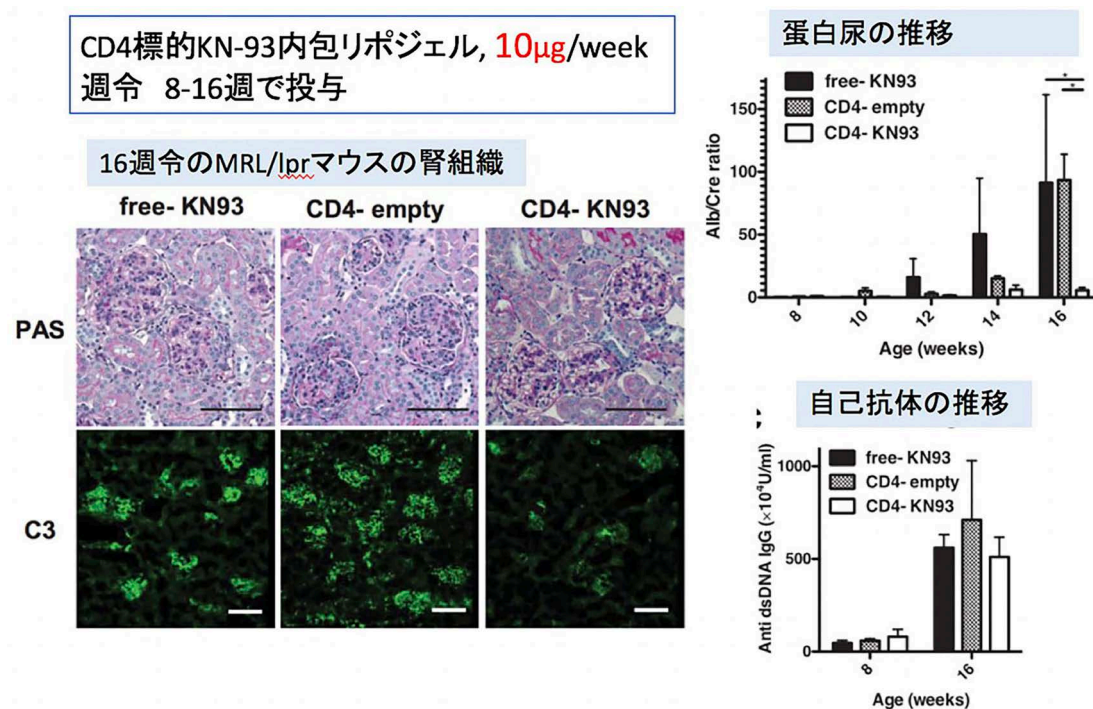
古賀 智裕

【目的】 CaMK4 は T 細胞の Th17 分化シグナルや制御性 T 細胞の機能に関連しており、SLE の治療標的となりうるが、臨床応用に際し目的の組織のみに到達する delivery system を構築する必要がある。nanoscale liposomal polymeric gels である nanolipogel (nLG) を用いた CaMK4 阻害剤 (KN-93) における CD4 陽性 T 細胞への供給システムの開発を試み、動物モデルでその効果を検討した。

【方法】 nLG に各種濃度の KN-93 を結合させ、MRL/lpr マウスに対して、抗体で標識されていない KN-93 が内包された nLG (Free nLG-KN93) と、各種抗体で標識された KN-93 含有 nLG (CD4 nLG-KN93) と、KN-93 が内包されていない nLG (Free nLG-empty、CD4 nLG-empty) を週 1 回、腹腔内投与し、薬剤の有効性と安全性を週齢 16 の時点での臨床所見、免疫組織学的所見、血清学的所見、T 細胞サブセット解析、T 細胞の機能により評価した。

【結果】 KN-93 が nLG に内包されていることを電子顕微鏡で確認し、抗 CD4 抗体で標識した nLG が組織に到達していることを確認した。抗 CD4 抗体で標識された KN-93 内包 nLG は、IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞の割合を減少させ、MRL/lpr マウスの SLE 様病態を改善した。nLG を用いた T 細胞を標的とした療法は自己免疫疾患の制御に有用である可能性が示唆された。

CD4 標的 KN-93 内包化リポジェルは MRL/lpr マウスを発症を抑制する



164 UCHL1-HIF-1 経路が化学放射線治療抵抗性を導く機序の解明

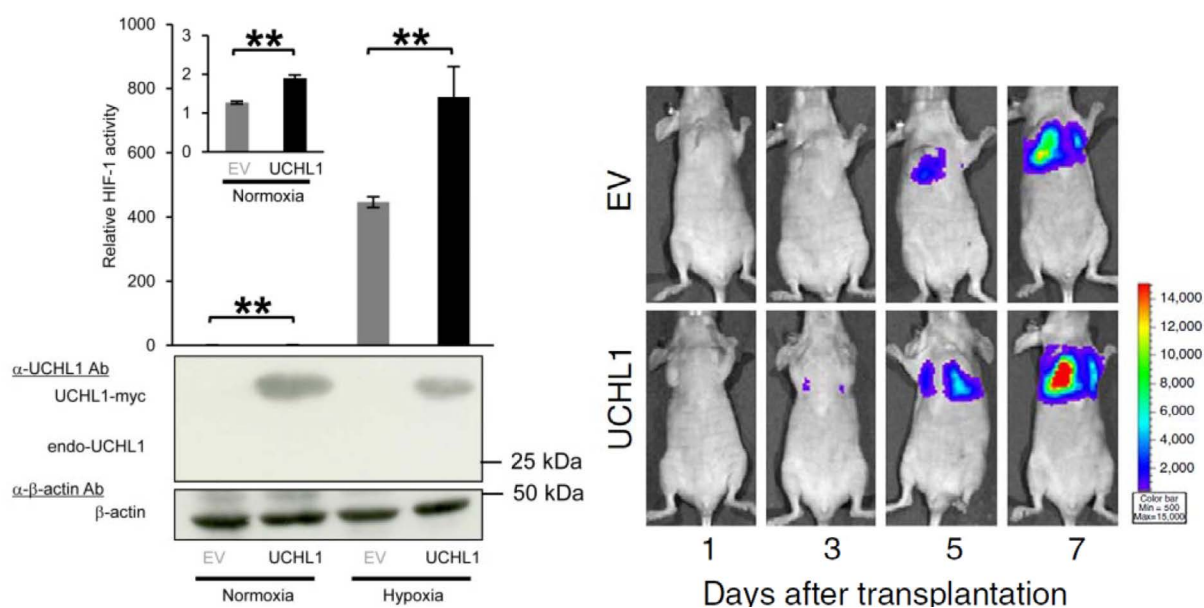
後藤 容子

固形腫瘍においては腫瘍の増殖速度と血管の形成速度が不均衡であり、血管から十分な酸素が供給されない低酸素領域が存在する。低酸素環境下のがん細胞は低酸素誘導性因子 (hypoxia inducible factor 1: HIF-1) を活性化し、血管新生、代謝のリプログラミング、転移・浸潤を来しがんの悪性化をもたらす。これまでに我々の研究室から HIF-1 が放射線治療後のがんの再発において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。また、様々ながん種において、HIF-1 高発現と放射線治療後の生命予後不良との相関が数多く報告されている。

我々は、悪性固形腫瘍内部で HIF-1 を活性化し、がんの悪性形質を亢進する新規遺伝子として Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1) を同定した (Goto *et al.* Nature Communications. 2015)。さらに UCHL1-HIF-1 経路ががんの遠隔転移を担い、がん患者の生命予後不良につながることを明らかにしてきた。

本研究では UCHL1-HIF-1 経路が、がんの遠隔転移形成を担うのみならず、化学放射線治療抵抗性にも寄与しているのではないかと仮説を立て、これを検証した。今回の研究結果から、UCHL1-HIF-1 経路は糖代謝のリプログラミングを起し、抗酸化物質である還元型グルタチオンの上昇をもたらすことで放射線治療抵抗を獲得することが示唆され、UCHL1-HIF-1 経路が有望な治療標的であることが示された。

UCHL1 は HIF-1 を活性化しがんの遠隔転移を亢進する



165 肉腫患者における免疫モニタリングによる新規治療開発

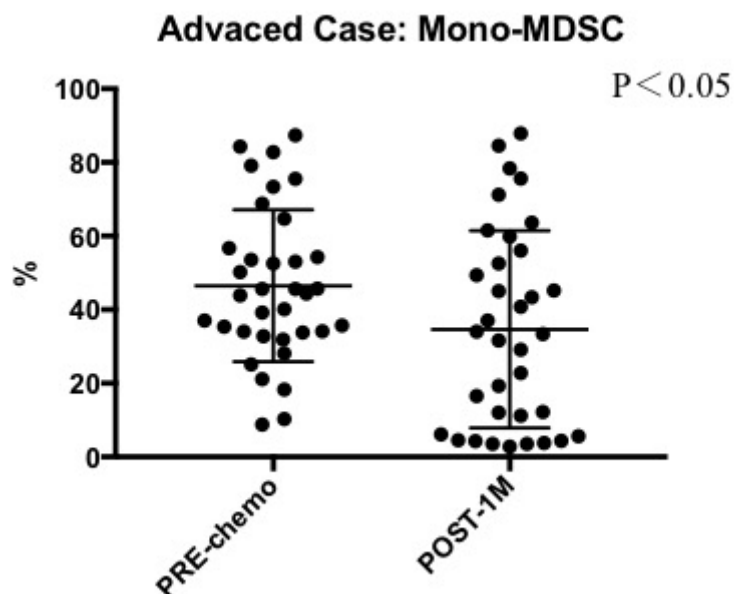
小林 英介

【目的】本研究は、肉腫（骨軟部腫瘍）領域において、標準治療として一般的に行われている手術や抗がん剤治療レジメンが、免疫機能にどのような影響を及ぼすかを解析することを目的とし計画した。免疫機能が受ける影響にレジメン間で差を認めたり、抗がん剤が免疫機能に与える影響に個体差があることが確認できれば、新たな視点による個別化医療開発や免疫療法との併用療法の開発、新規予後マーカーの開発にもつながることが期待される。

【方法】2015年4月に国立がん研究センター中央病院研究倫理審査委員会の承認を得た上で、悪性骨軟部腫瘍患者のうち、標準治療である1. 手術単独例、2. 新規術前化学療法導入例、3. 進行例に対する化学療法例の患者を対象に実地臨床に合わせて各3ポイントでの前向き採血を実施した。採取後、末梢血リンパ球（peripheral blood mononuclear cell: PBMC）を分離し、一部を凍結保存、一部をflow cytometryにてT細胞のフェノタイプ・活性化マーカー、各種免疫抑制細胞などの解析を予定した。

【結果】2017年3月までに105症例（1. 51例、2. 19例、3. 35例）に対して免疫モニタリング採血を施行した。疾患内訳は、脂肪肉腫28例、UPS15例、骨肉腫12例、粘液線維肉腫9例、デスモイド8例、軟骨肉腫7例、他26例であった。現在までに免疫抑制細胞骨髄由来免疫抑制細胞（Myeloid-derived suppressor cell: MDSC）サブセットである単球系MDSCと顆粒球系MDSC、及び樹状細胞（Dendritic Cell: DC）のサブセットであるmyeloid DCとplasmacytoid DCについて解析を行った。1. 手術単独例及び2. 新規術前化学療法例では加療前後でMDSC、樹状細胞で優位な差はみられなかったが、3. 進行例に対する化学療法例では加療前後で単球系MDSCが有意な減少を示した。

進行例に対する化学療法症例における加療前後単球系MDSC

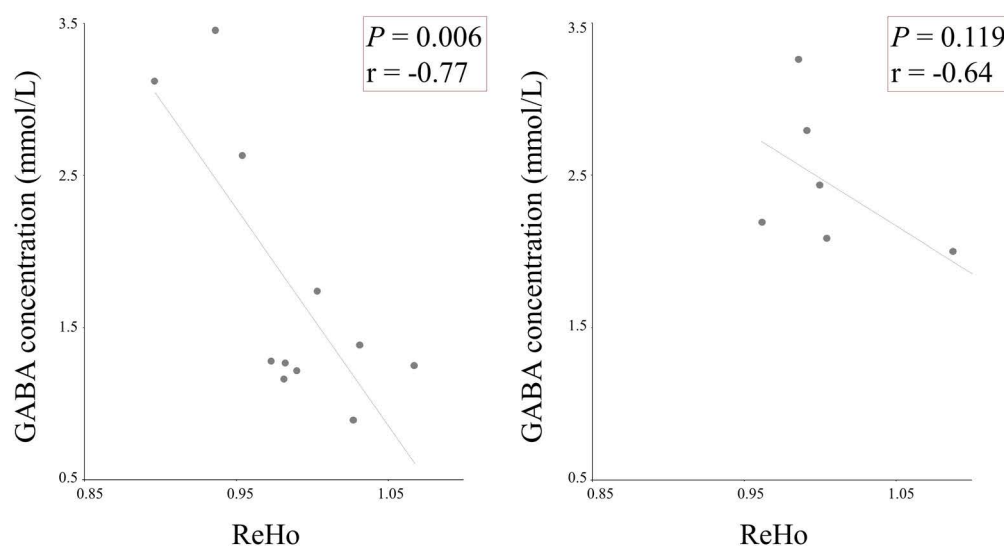


筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、予後不良な神経変性疾患である。改訂版 El Escorial 診断基準では、少なくとも一領域以上の上位・下位運動ニューロン徴候が必要とされるが、全経過にわたり下位運動ニューロン徴候しか呈さない ALS も存在する。上位運動ニューロン徴候を欠くために ALS と診断できない症例が少なからず存在することは、新薬の臨床治験の対象者の登録に支障を来す可能性がある。これらの問題を解決するためにも、上位運動ニューロン徴候に代わりうる中枢神経異常に基づいた新たな診断法の開発が求められている。

我々は、その代替法として γ -アミノ酪酸（GABA）とそれに関連する異常を想定している。magnetic resonance spectroscopy（MRS）を用いて、この抑制性神経伝達物質である GABA 濃度を補足運動野（SMA）で測定した。また、安静時の functional magnetic resonance imaging を用いて、安静時局所ネットワークを反映する regional homogeneity（ReHo）も算出した。

ALS 群と対照群の SMA における GABA 濃度を比較したところ、有意な差は認められなかったが、対照群に比べ ALS の GABA 濃度は低い傾向があった。有意差が見出せなかった原因として、ALS の GABA 濃度が二層化していたことが考えられる。比較的高値、低値の群それぞれのサブグループの持つ意義を今後見出す必要があり、さらなる症例の蓄積と解析を今後は行っていく予定である。また、GABA 濃度と ReHo 値には有意な負の相関が認められ、これは、GABA が ReHo を抑制しているためと考えられ、ReHo は局所ネットワークではなく、局所の神経活動性を表している可能性がある。

ALS 群（左）と対照群（右）の SMA における GABA 濃度と ReHo 値の相関解析



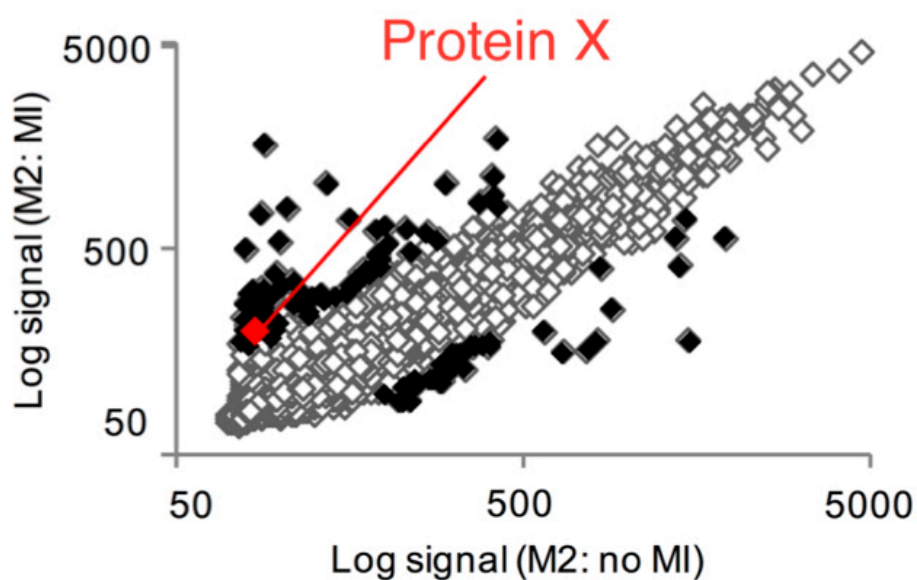
167 心筋梗塞修復メカニズムの解明と新規治療法の開発

白石 学

急性心筋梗塞は主に冠動脈の動脈硬化の進行に伴う粥腫の破綻が原因となり、冠動脈の血栓閉塞をきたすことで心筋の壊死が引き起こされる重篤な循環器緊急疾患である。心筋梗塞発症直後から虚血部位に集まるマクロファージは損傷部位の組織修復に関与することが注目されているが、詳細な組織修復に関する分子メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで我々はマクロファージが障害を受けた線維芽細胞の保護作用を有すると仮説をたて、これを検証した。

マウス心筋梗塞モデルを作製し、心筋梗塞発症後に炎症による細胞障害が引き起こされていることを蛍光免疫染色で確認した。次に正常心筋及び心筋梗塞後の心臓から回収したマクロファージの遺伝子発現を網羅的に解析し、心筋線維芽細胞への保護作用を有する液性因子 (Protein X) を同定し、*in vitro* で保護作用を確認した。

正常心筋及び心筋梗塞後の心臓から回収したマクロファージの遺伝子発現を網羅的に解析



168 肺癌における抗 PD-1 抗体効果予測因子の探索

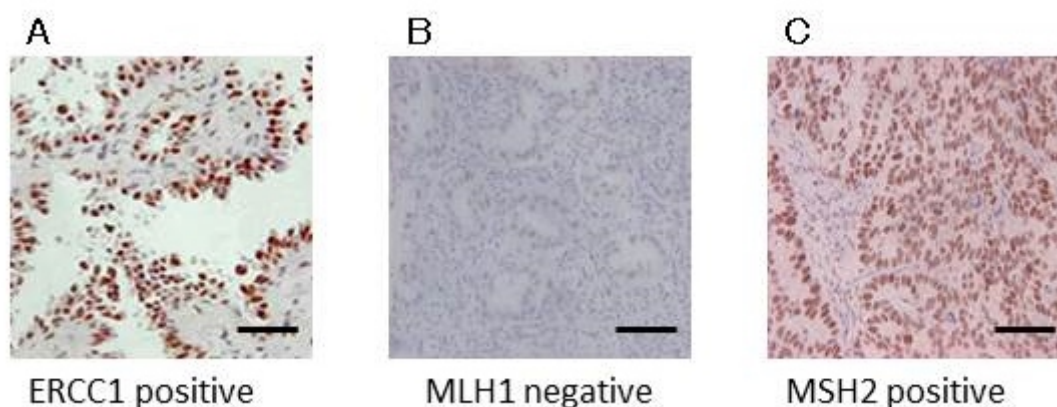
竹中 朋祐

【目的】抗 PD-1 抗体は非小細胞肺癌の治療薬として認可された薬剤である。先の臨床試験の結果より、抗 PD-1 抗体が全く効果を示さない患者群の存在が指摘されており、効果を予測するバイオマーカー研究の必要性が論じられている。本研究は、遺伝子修復蛋白に着目し、非小細胞肺癌に対する抗 PD-1 抗体の効果予測因子を探索することを目的とする。

【方法】抗 PD-1 抗体を使用する患者を対象として、腫瘍部における DNA 二重鎖切断修復にかかわる Rad51 蛋白発現、ヌクレオチド除去修復にかかわる ERCC1 蛋白発現、相同組み換え修復に関連する BRCA1 蛋白発現、ミスマッチ修復に関連する hMLH1、hMSH2 蛋白発現を免疫抗体染色法にて評価を行うとともに、これらの遺伝子修復関連蛋白と臨床病理学的因子、抗 PD-1 抗体の治療効果について解析を行う。

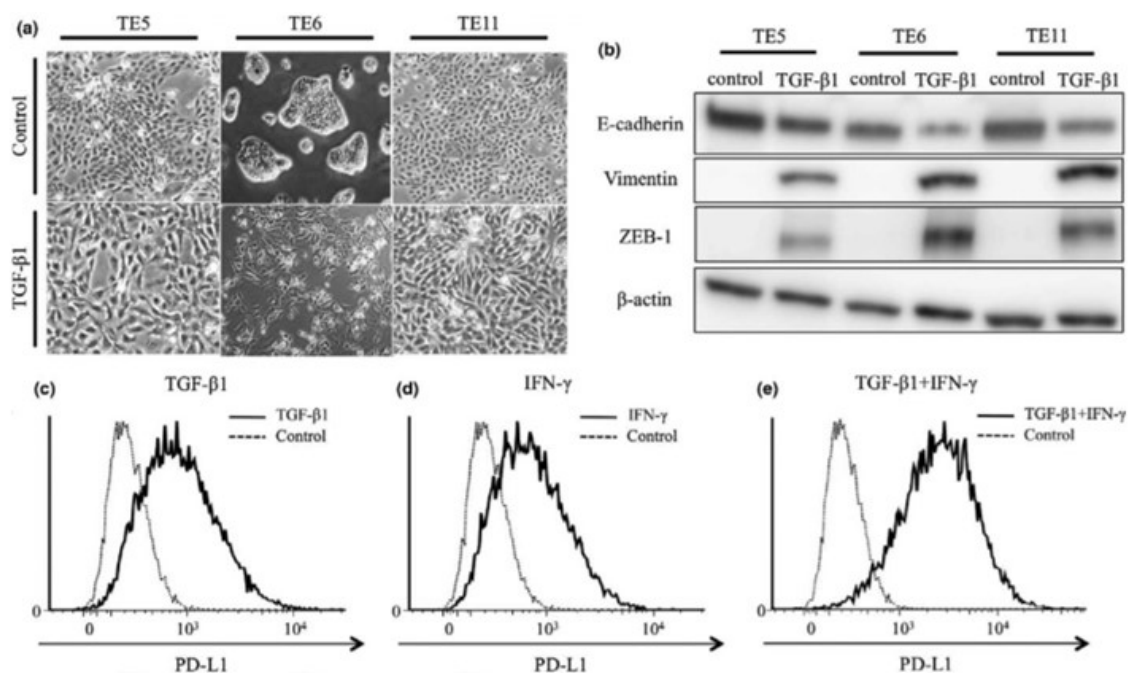
【結果】2017 年 3 月末までに 10 例を登録した。全症例の内訳は、年齢 45～75 歳（平均 67 歳）、性別は男性/女性：7/3 例、PS0/PS1/PS2：4/4/2 例、組織型は腺癌/扁平上皮癌/その他：8/1/1 例、喫煙歴はあり/なし：7/3 例であった。EGFR 遺伝子変異あり/なし：1/9 例、ALK 融合遺伝子あり/なし：0/10 例であった。全例抗 PD-1 抗体としてニボルマブが投与された。二次治療として投与された症例が 4 例、三次治療が 3 例、4 次治療以降が 3 例であった。投与回数は 1～14 回（平均 4.8 回）で、2 例が治療を継続中である。抗 PD-1 抗体の最大治療効果は PR1 例、SD2 例、PD6 例であった。免疫組織染化学染色は 8 例に対して施行した。Rad51 陽性/陰性：0 例/8 例、ERCC1 陽性/陰性：5 例/3 例、BRCA 陽性/陰性：5 例/3 例、MLH1 陽性/陰性：0 例/8 例、MSH2 陽性/陰性：8 例/0 例であった。今後も症例登録を進め、抗 PD-1 抗体の治療効果と遺伝子修復関連蛋白の発現を比較検討する予定である。

遺伝子修復蛋白発現
(免疫組織化学染色)



Programmed death-Ligand 1 (PD-L1) は癌細胞の宿主免疫回避機構に重要な役割を果たす。PD-L1 のプロモーター領域には Epithelial-mesenchymal transition (EMT: 上皮間葉移行) 転写因子である ZEB1 の結合領域が存在することから、両者の関連性が示唆される。本研究の目的は食道扁平上皮癌 (ESCC) における PD-L1 と EMT の関連性、その臨床学的意義を明らかにするものである。術前無治療の ESCC 手術症例 90 例を対象に免疫組織化学染色を行い、腫瘍先進部での PD-L1 と ZEB1 発現を解析し、臨床病理学的因子を検討した。また、EMT の性質を示す食道癌細胞株 TE8 において ZEB1 と PD-L1 発現を認め、siRNA を用いて ZEB1 発現をノックダウンした。EMT の性質を示さない食道癌細胞株 TE5、6、11 を用いて、TGF- β 1 の EMT 誘導と ZEB1、PD-L1 発現を検討した。腫瘍先進部において PD-L1 高発現症例では有意に腫瘍深達度が深く、EMT の性質が観察され、CD8 陽性リンパ球浸潤が低値であった。PD-L1 高発現症例は全生存と無再発生存において有意に予後不良であった。また PD-L1 と ZEB1 発現の間に正の相関を認めた。TE8 細胞株において siZEB1 が PD-L1 mRNA と PD-L1 蛋白発現を抑制し、E-cadherin mRNA と E-cadherin 蛋白発現を亢進させた。TE5、6、11 細胞株において TGF- β 1 は EMT を誘導し、さらに PD-L1 の膜発現も増強した。ESCC の腫瘍先進部における PD-L1 発現は ZEB-1 発現、EMT および悪性度に関与する。癌の浸潤過程において、腫瘍免疫回避機構と EMT が協調して作用することで、悪性度に寄与することが示唆された。

TGF- β 1 により誘導される ZEB1、PD-L1 発現と形態学的変化



【緒言】多くの要因により腎機能障害は進行するが共通経路として慢性炎症が存在することがわかっており、その意義が示されてきた。一方で慢性炎症の機序は不明であり自然免疫のシステムである Inflammasome に着目し検討を行っている。

【方法・結果】まず我々が着目したのは転写因子である Nrf2 (nuclear factor E2 p45-related factor 2) である。Nrf2 は自然免疫応答のシステムである Inflammasome 活性化に必須のタンパクとしても知られているが、その意義は不明であった。そこで「Nrf2 依存的 inflammasome 活性化が腎組織内炎症遷延及び線維化に重要である」という仮説のもと研究を行った。

炎症及び線維化を評価するため一側尿管結紮モデル (UUO) を用いて検討を行った。動物は C57B/6J (雄性、6-8 週齢) を使用した。最初に WT および *Nrf2* 遺伝子欠損マウス (*Nrf2* KO) に UUO を作製し、Day14 の組織を検討した。Masson 染色では継続的に (Day0, 3, 7, 14) 線維化の程度を評価しているが UUO 作製 Day3-7 では両群間に有意な変化は認めないものの、Day14 でその差は顕著であった。

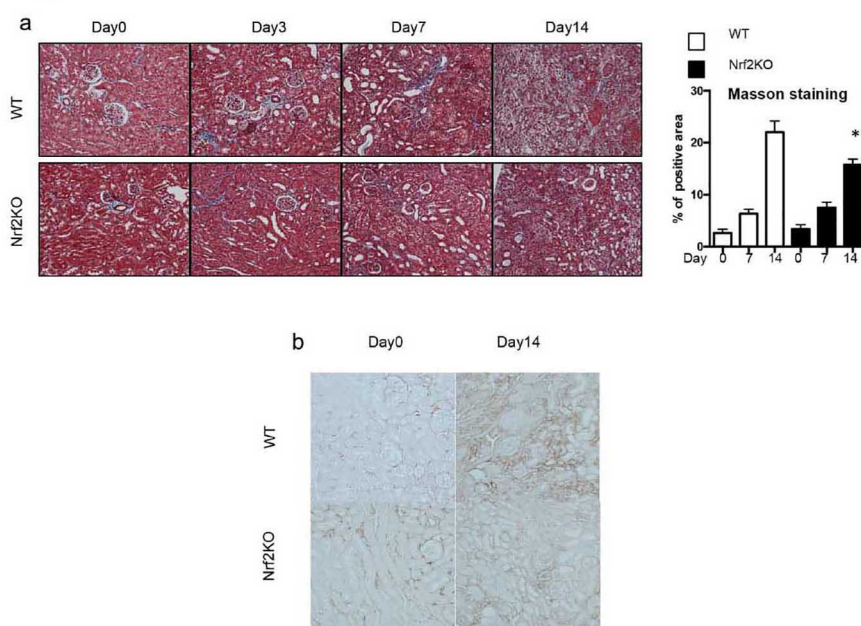
炎症関連遺伝子の評価を行っている。WT-UUO では Sham に比較し mRNA 発現が上昇しているものの、その変化は *Nrf2* KO で有意に抑制されていた。これらのことから Nrf2 はなんらかの機序で炎症拡大を抑制し結果として線維化が軽減されていた。

次に FACS にて M1 マクロファージおよび M2 マクロファージの検討を行った。継続的な M1-M2 マクロファージの変化を WT および *Nrf2* KO で評価を行った。*Nrf2* KO-UUO-Day14 では M1 population が WT-UUO-Day14 に比較して減少していた。以上のことから *Nrf2* 欠損状態では炎症拡大に必要な M1 マクロファージの浸潤が抑制されていることがわかった。

本研究結果より Nrf2 依存的 Inflammasome 活性化が腎障害の進展に重要であり、特に M1 マクロファージ浸潤の遷延化に影響していた。この結果は今まで不明であった慢性腎臓病の病態、特に炎症の遷延化の一端を解明することに大きく寄与した。上記結果は論文投稿中である。

Nrf2 遺伝子欠損マウスの腎組織線維化程度

Fig1

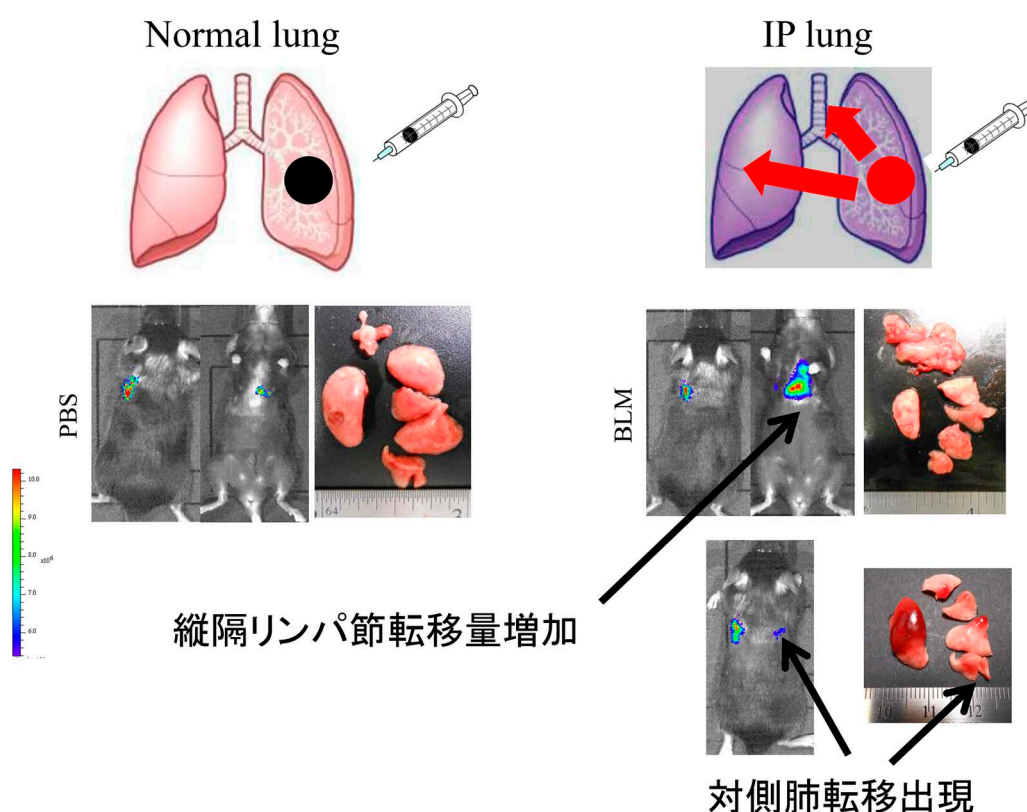


171 間質性肺炎合併肺癌に対する革新的治療法の構築

前田 亮

間質性肺炎合併肺癌患者に対してのがん治療は、その急性増悪という観点から、十分になされていないのが現状である。間質性肺炎合併肺癌患者に対する新たな治療戦略を構築することが本研究の目的であり、間質性肺炎の肺の微小環境自体が既存の肺癌の悪性度を高める因子として働いているのではないかと仮説を立て研究を開始した。マウスモデルにおいて、間質性肺炎における肺微小環境が、肺癌のリンパ節転移、対側肺転移を促進させることを示した。さらに、間質性肺炎合併肺癌の進展に対して、間質性肺炎治療薬である抗線維化薬ピルフェニドンが効果を示すことを立証した。抗線維化薬を投与し間質性肺炎を制御することが、間質性肺炎合併肺癌に対する新規治療戦略となり得る可能性が示唆された。

間質性肺炎における肺微小環境は、肺癌のリンパ節転移、対側肺転移を促進させる



172 骨肉腫の転移巣形成機序の解明と治療標的の探索

三輪 真嗣

GSK-3 β は、前立腺癌、大腸癌や膀胱癌などいくつかのがん細胞増殖に関与すると報告されている。本研究では、骨肉腫における GSK-3 β の発現や GSK-3 β 阻害薬の効果を評価することにより、新規治療薬としての GSK-3 β 阻害薬の有用性を検討した。

ヒト骨肉腫細胞株 HOS、MG63、143-B、Saos-2 を用い、コントロールとしてヒト骨芽細胞株 hFOB 1.19 における GSK-3 β の発現を比較したところ、骨肉腫細胞株において有意に高い発現が見られた。また、これらの細胞株を GSK-3 β 阻害薬 AR-A014418、SB-216763 で刺激したところ、骨肉腫細胞の増殖を有意に低下させた。次に、ヌードマウスの脛骨に 143-B 細胞を移植することにより骨肉腫の同所性モデルを作製し、GSK-3 β 阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) の腫瘍抑制効果を評価した。腫瘍体積の評価において、GSK-3 β 阻害薬は治療開始から 2 週以降で有意な腫瘍増殖抑制を示し、切除した腫瘍重量においても有意な抑制効果を認めた。また、明らかな副作用は見られなかった。

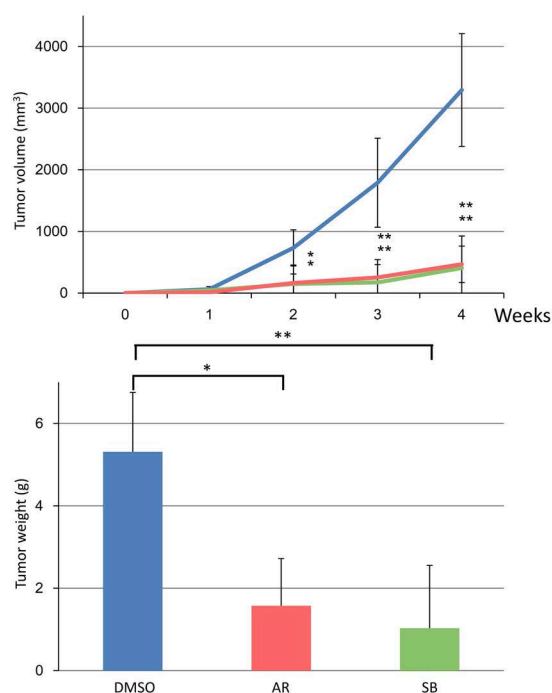
本研究の結果から、GSK-3 β は骨肉腫の新規治療標的となる可能性が示唆された。

GSK-3 β 阻害薬の抗腫瘍効果*In vivo*Tumor volume
($= 0.5 \times a^2 \times b$)

- DMSO
- AR-A014418
- SB-216763

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

Tumor weight



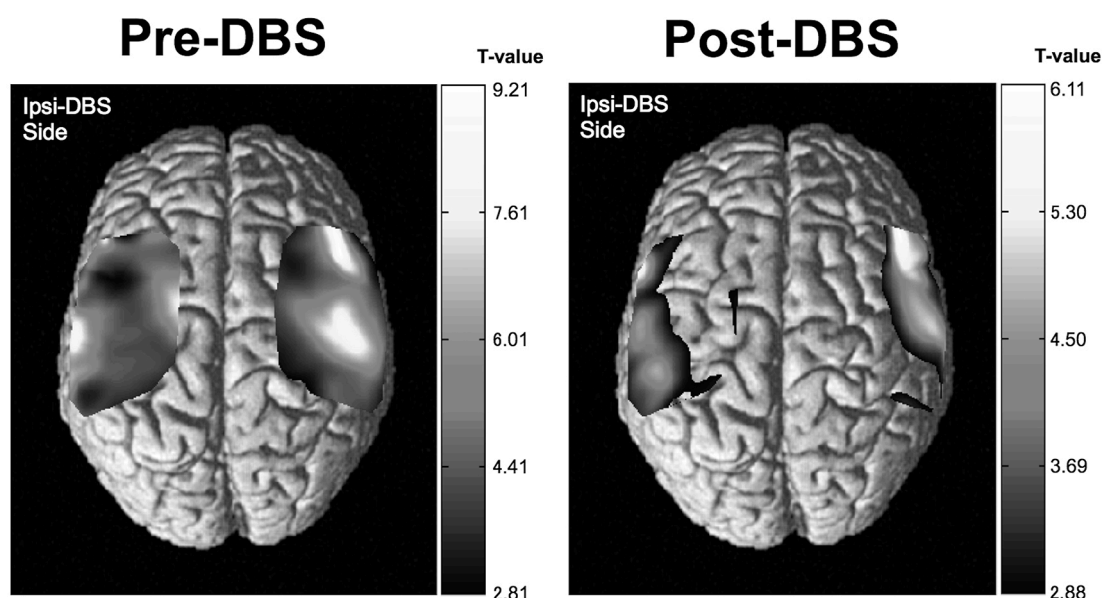
173 脳深部刺激による脳活動部位と電気生理学的変化の解明

森下 登史

パーキンソン病は神経伝達物質であるドーパミンが欠乏し、脳神経回路内の活動に異常を起こすことで寡動や固縮といった症状を引き起こし、時間の経過とともに症状が進行してゆくことが知られている。そのため、脳深部（特に基底核部）に電極を留置し、体内に埋め込んだ刺激装置より持続的に電流を流すことで脳神経回路内の異常活動を制御しようとする治療法である脳深部刺激療法が進行期パーキンソン病に対して用いられる。ただし、脳深部刺激療法がどのように脳神経回路内のネットワークに影響を及ぼすかについては依然として不明な部分が多い。本研究ではパーキンソン病の患者において脳深部刺激療法前後での脳活動変化を計測することを目的とした。脳深部刺激電極植込みを受けた6人の患者を対象とし、術前と手術後1ヶ月の時点で多チャンネル型の functional near infrared spectroscopy (fNIRS) を用いて手の開閉運動遂行時の脳活動を計測した。本研究により、運動に関連した脳活動が脳深部刺激療法によって変化することが fNIRS 実験によって明らかとなった。特に、一次運動野での活動上昇が認められた。

脳深部刺激療法前後での脳活性部位変化

脳深部刺激を行った側（ipsi-DBS side）で運動野の活性が術前よりも上昇している。

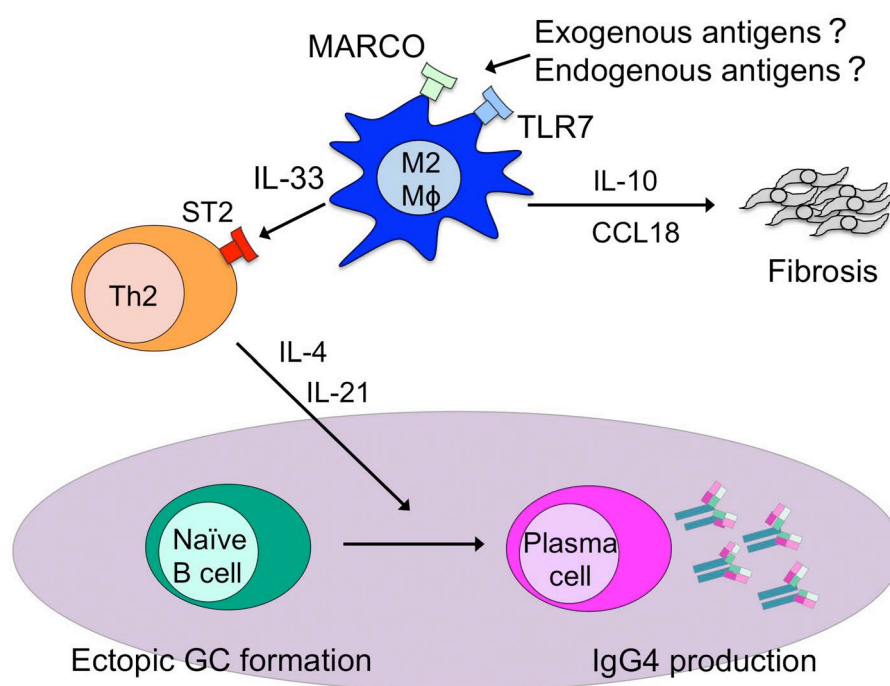


174 M2 マクロファージを標的とした IgG4 関連疾患の新規治療

森山 雅文

IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease: IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の浸潤を特徴とする全身性疾患であり、本邦から提唱された新規疾患概念である。その病因については新規疾患概念ということもあり、いまだ不明な点が多いが、われわれの研究により、M2 マクロファージ (MΦ) が病変局所で集積していることが明らかになった。そこで本研究では、IgG4 関連疾患の病態形成における M2 MΦ を含む自然免疫関連の分子に注目して、免疫学的検討を行った。まず、IgG4-RD 患者 (n = 3) と健常者 (n = 3) の顎下腺を用いて DNA マイクロアレイを行い、発現変動遺伝子の抽出および機能解析を行った。また、抽出した候補分子については、IgG4-RD 患者 (n = 7)、シェーグレン症候群患者 (n = 10) および健常者 (n = 10) の唾液腺を用いて validation を行った。その結果、IgG4-RD 群と健常者群の間には 1,182 個の発現変動遺伝子が抽出された。機能解析では、IgG4-RD は T/B 細胞活性化やケモタキシスなどの免疫反応に関する遺伝子群の発現増加を認め、その中でもコラーゲン様構造マクロファージ受容体 (MARCO) および TLR7 が著明に亢進していた。免疫組織化学染色では MARCO と TLR7 は、IgG4-RD 患者の唾液腺にのみリンパ濾胞周囲に強い発現を認め、M2 マクロファージ (CD163 陽性細胞) と局在がほぼ一致していた。最近の報告では、マウスのマクロファージでは TLR7 のアゴニストで刺激することで Th2 細胞のサイトカイン産生を誘導する IL-33 の産生が亢進することが明らかになっていることから、IL-33 と TLR ファミリーとの相関について検討を行ったところ、TLR7 のみに IL-33 と正の相関を認めた。

Schematic model of cytokine network in IgG4-RD

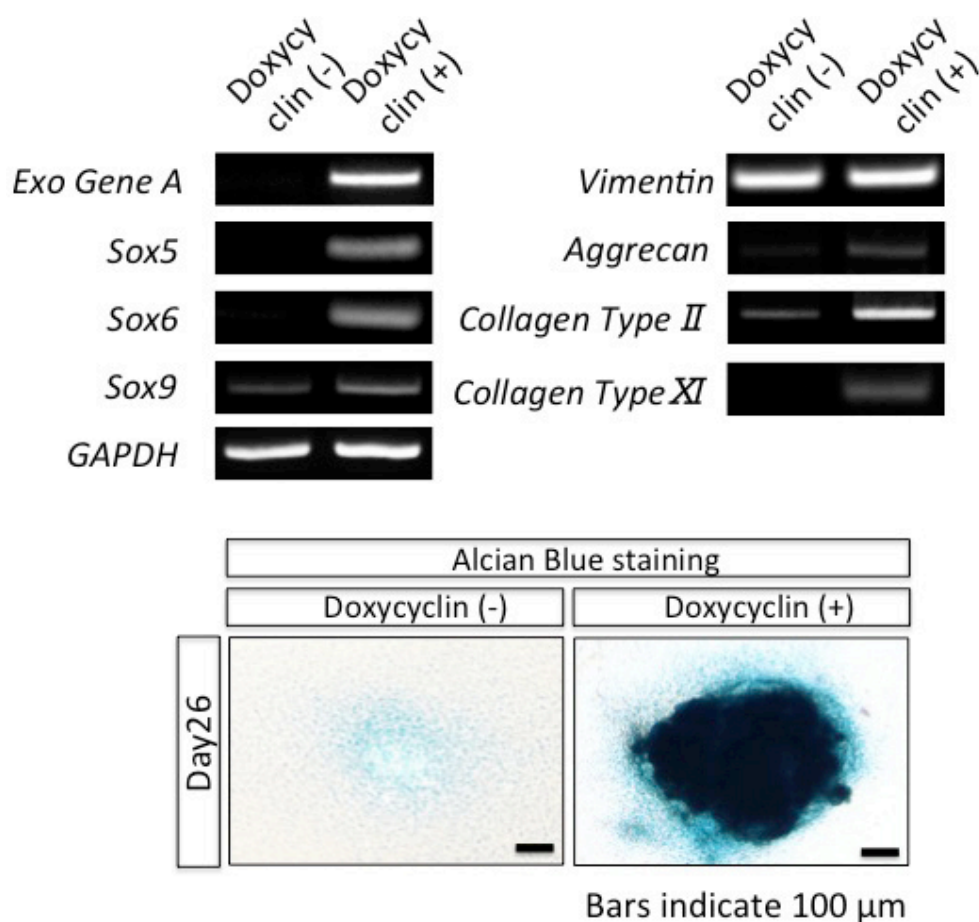


175 ヒト iPS 細胞を利用した次世代型気管再生技術の開発

吉江 進

甲状腺癌、炎症や外傷によって、気管の狭窄や破壊が引き起こり気管の一部を切除せざるを得ない場合がある。本研究は、ヒト iPS 細胞から分化誘導させた気管軟骨細胞により人工気管の枠組みを形成し、生体親和性の高いハイブリット型の人工気管を開発することで、気管欠損部位の再生を目的とする。まず、低分子化合物と成長因子を用いてヒト iPS 細胞から初期中胚葉へ高効率に分化誘導させた。次に、ヒト iPS 細胞由来初期中胚葉から軟骨細胞へ分化誘導させるために、軟骨細胞分化に関わる転写因子の発現を Tet-On システムを利用してコンディショナルに制御することで軟骨細胞へ分化させることができた。生体親和性のある人工材料とヒト iPS 細胞由来軟骨細胞を組み合わせたハイブリット型人工気管を気管欠損モデルラットに移植した結果、移植 2 週間後においてもラットの生存が確認されたことから、気管欠損部位の再生が示唆された。

ヒト iPS 細胞由来軟骨細胞の分化評価

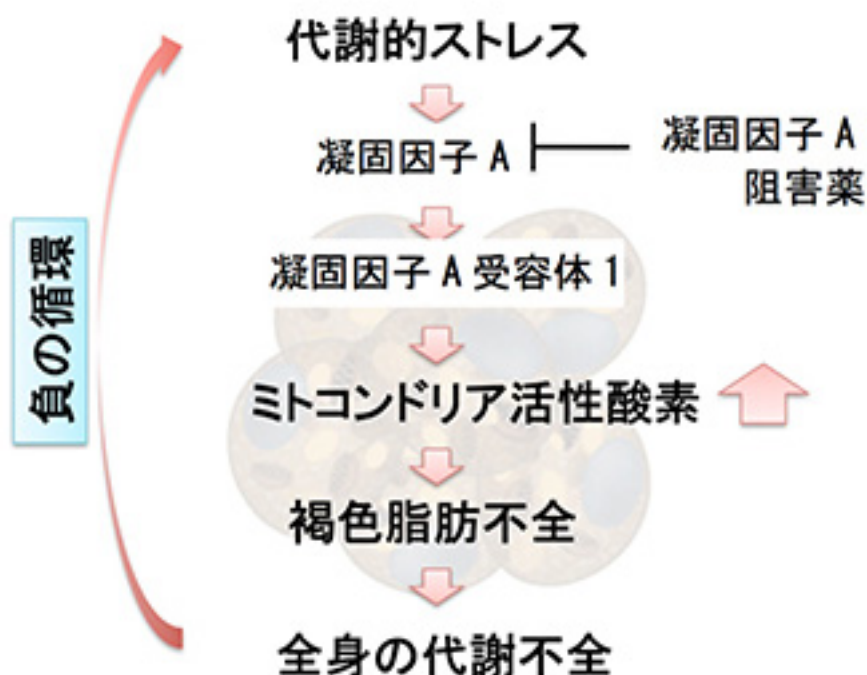


176 血液凝固因子を介した全身代謝制御機構の解明

吉田 陽子

肥満や糖尿病により動脈硬化性疾患が増加し全死亡率が上昇することから、肥満や糖尿病の病態を解明することは極めて重要である。褐色脂肪組織は今日では成人にも存在し、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ているが、肥満や糖尿病の病態における意義は殆どわかっていない。そこで本研究では凝固因子 A による生活習慣病、特に全身の代謝不全が生じる機序を解明することを目的として研究を行った。その結果、食餌誘導性肥満モデルマウスでは全身の糖代謝異常とともに褐色脂肪機能不全が生じ、また肥満ストレスにより褐色脂肪組織で凝固因子 A が活性化することを見出した。凝固因子 A は凝固因子 A 受容体に結合するが、褐色脂肪組織の凝固因子 A 受容体は肥満ストレスに伴い発現レベルが上昇することがわかった。凝固因子 A 阻害薬を投与し凝固因子 A-凝固因子 A 受容体 1 シグナルを抑制すると、全身の糖代謝異常とともに熱産生能などの褐色脂肪不全が抑制された。また凝固因子 A-凝固因子 A 受容体 1 シグナルの抑制により褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアの減少や活性酸素の増加が抑制されたことから、凝固因子 A→凝固因子 A 受容体 1→ミトコンドリア活性酸素上昇→褐色脂肪不全という経路により糖尿病が発症、進展する可能性が高いと考えられた。

凝固因子 A-凝固因子 A 受容体 1 シグナルを介した褐色脂肪不全による新たな糖尿病発症機序

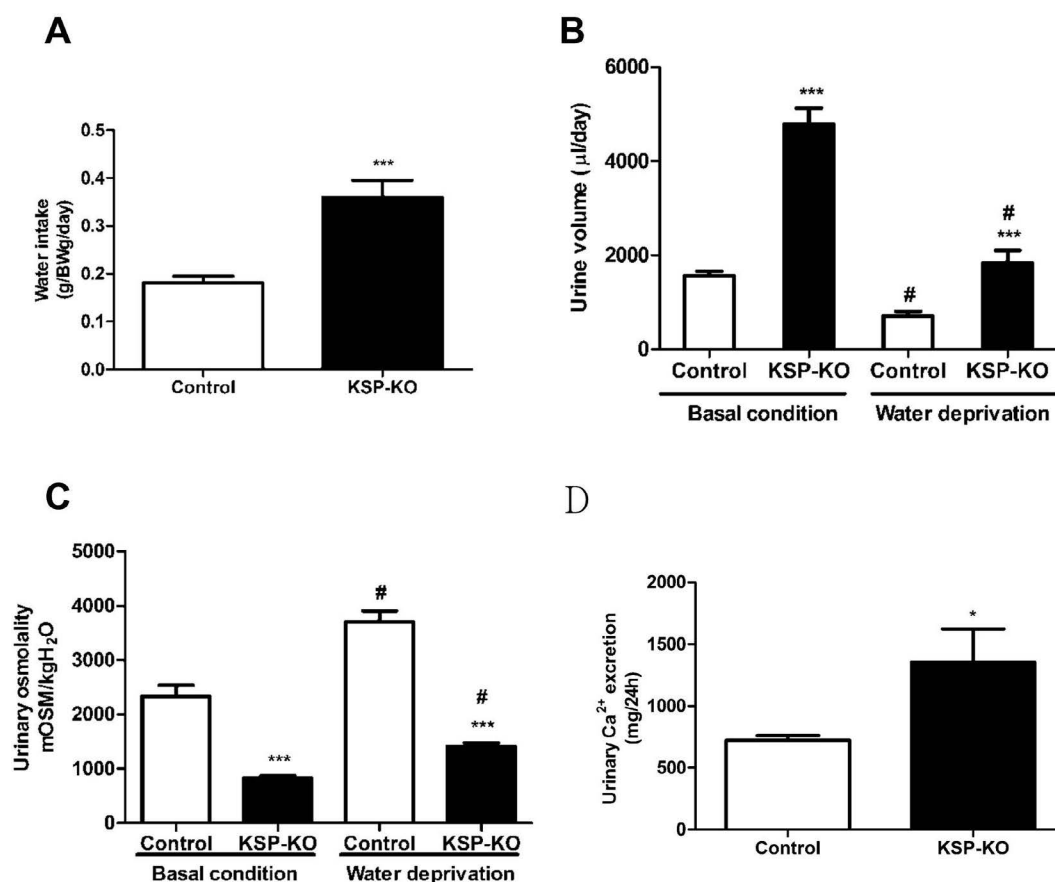


【目的】PMCA1は腎尿細管で高発現であるが、その病態生理学的意義についてはほとんど分かっていない。本研究では、腎障害モデル動物をもちいて腎PMCA1の発現調節を検討し、さらに、腎尿細管特異的PMCA1欠損マウスをもちいて、腎におけるPMCA1の機能的意義を明らかにした。

【方法】腎障害モデルマウスとして、慢性持続Angiotensin II投与マウス、5/6腎臓摘出マウス、および片側尿管結紮マウスを作製し、腎機能低下や蛋白尿の増加、血圧上昇および腎線維化の進展に伴う、腎でのPMCA1発現調節を対照群(Sham)と比較検討した。また、Cre-LoxPシステムをもちいて遠位尿細管～集合管特異的PMCA1欠損マウス(KSP-KO)を作製し、その表現型を正常マウスと比較検討した。

【結果】5/6腎摘出は糸球体濾過量の低下をもたらしたが、血圧および腎PMCA1発現には影響をあたえなかった。同様に、片側尿管結紮は腎線維化をもたらしたが、血圧および腎PMCA1発現には影響をあたえなかった。一方、慢性持続Angiotensin II投与により、血圧上昇およびアルブミン尿の増加とともに腎PMCA1発現量は増加した。KSP-KOでは、野生型マウスと比較して、腎機能や血圧は同等であるものの、高Ca尿症、多尿および尿濃縮力障害を認めた。飲水制限下でも同様の所見を認め、さらに、KSP-KOではバソプレッシンに対する反応性の低下、plasma membraneでのAQP2発現レベルが減少していた。

遠位尿細管でのPMCA1欠損による尿濃縮力障害および高カルシウム尿症



* $P < 0.05$ vs control, *** $P < 0.01$ vs control

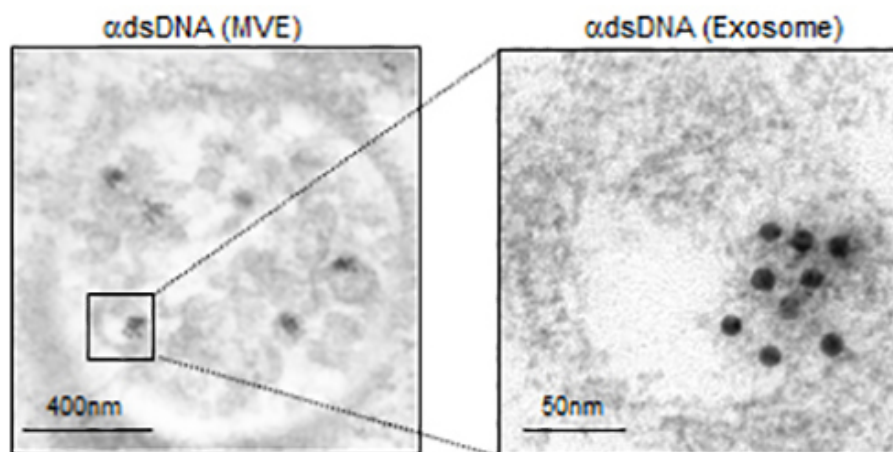
$P < 0.01$ vs basal condition

178 細胞老化における染色体不安定性誘導メカニズムの解明

高橋 暁子

細胞老化は細胞に加わるさまざまな発がんストレスによって誘導され、細胞の増殖を不可逆的に停止することでがん抑制機構として働いていることが知られている。その一方で、加齢に伴い体内に蓄積した老化細胞が炎症性蛋白質を高発現し、それらを細胞外へと分泌する SASP (Senescence associated secretory phenotype) という現象を起こすことで、周囲の組織に炎症や発がんを促す負の側面があることも近年明らかになってきた。私たちは、加齢に伴う発がん頻度の上昇には、炎症性蛋白質以外にも染色体不安定性を誘導する因子が関与している可能性があるのではないかと考え研究を行った。そして、さまざまな老化細胞分泌因子の解析を行った結果、通常はクロマチン構造をとり安定的に守られているはずのゲノム DNA が、老化細胞では断片化し、分泌膜小胞 (エクソソーム) に包まれて細胞外へと分泌していることを見出した。さらに、エクソソームに包まれて細胞外へと分泌された DNA 断片は、周囲の細胞に取り込まれることで DNA 損傷応答やインターフェロン応答を引き起こし、染色体不安定性を誘導する新たな SASP 因子として機能することが明らかとなった。

細胞質内の MVE (multi-vesicular endosomes) とエクソソームの免疫電子顕微鏡写真



脳マラリアは、*P.falciparum* 寄生虫によって引き起こされ、高確率で死亡や長期的な障害に至る痙攣や昏睡などの突発的臨床症状を特徴とする、ヒトにおけるマラリア感染の重篤な合併症である。脳マラリア初期においては特異的症候を示さないため、早期診断は容易ではなく、脳マラリアと診断できたときには、すでに治療の効果が得られない状態であることが多い。我々は最近、強力なイメージング技術である超高磁場 11.7T MRI と多光子顕微鏡を用いて、ネズミ脳マラリアの病態生理学および免疫学的機構の経時的空間的制御機構を明らかにした。我々の研究によって、驚くべきことに、脳マラリアを実験的に引き起こすと、高熱症状に続いて、嗅球が機能的に損傷し嗅覚を喪失することを明らかにした (Zhao ら, *Cell Host Microbe*, 2014)。早期の嗅覚喪失は脳マラリアの早期診断方法として有望であり、適切な治療を開始することが可能となることから、抗マラリア薬に対する補助療法選択肢を提供するために嗅球の状態を評価することを目指した。

脳マラリア病理において発見された嗅球の関与 (嗅覚喪失) はパーキンソン病などの他の神経変性疾患における病理機構と著しい類似性があることから、嗅球による介入戦略はより広い中枢神経系 (CNS) 障害に対する応用が期待される。

New intervention modalities for CNS disorders including cerebral malaria via olfactory bulb



Ultra-high field MRI of olfactory bulb during cerebral malaria
(Zhao et al., *Cell Host Microbe*, 2014)

Treatment of CNS disorders including cerebral malaria via olfactory bulb

Blocking chemokine/cytokine axis (CxCR3) by small compound delivery

Cerebral malaria is a severe complication of malaria infection in humans caused by *P. falciparum* parasites and characterized by sudden clinical symptoms such as convulsions and coma with high rates of death or long-term disabilities. Early diagnosis of cerebral malaria is not easy as it presents with non-specific symptoms, often resulting in the manifestation of disease at a time-point when cerebral malaria treatment is less effective. We have recently investigated the spatiotemporal regulation of pathophysiological and immunological mechanisms of murine cerebral malaria by using ultra high-field 11.7 T MRI and multi-photon microscopy combination, the two powerful imaging techniques. Our studies have surprisingly revealed that the olfactory bulb is the area damaged functionally (loss of smell), followed by high fever during experimental cerebral malaria (Zhao et al., *Cell Host Microbe*, 2014). Because the early smell loss could be an early diagnosis of cerebral malaria and thus would allow timely interventions, we aimed at possible evaluation of olfactory bulb as an intervention route for the adjunct therapy option to anti-malarials.

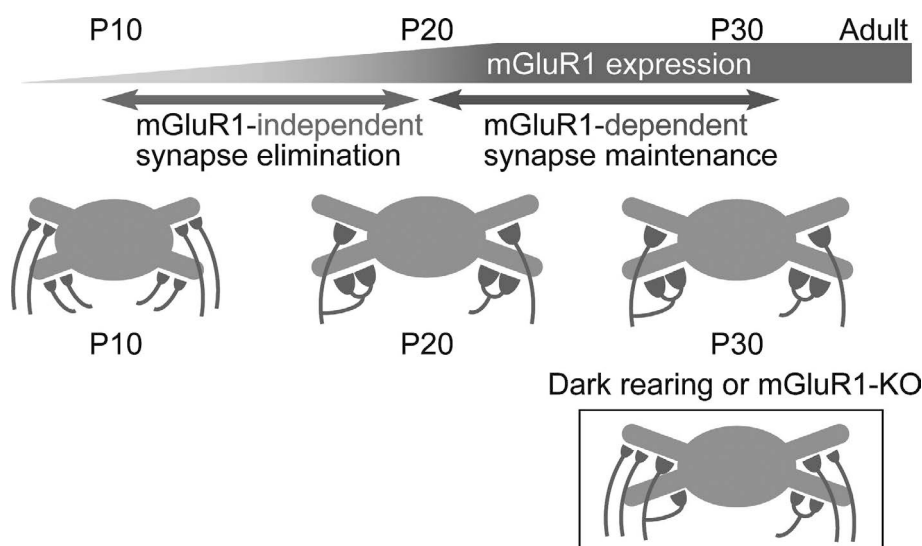
Given that the discovery of olfactory bulb involvement (olfaction loss) in cerebral malaria pathology has striking similarities to other neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, we hope that our interventions strategies *via* olfactory bulb would have broader applications for central nervous system (CNS) disorders.

180 発達期における経験依存的な神経回路維持の分子機構

宮田 麻理子

視覚視床である外側膝状体には網膜－外側膝状体（RG シナプス）間の興奮性シナプスが入力する。このシナプスは、回路形成が完成後に視覚経験依存的にその回路が維持されることが知られている。しかし、その分子機構はほぼ未解明であった。本研究では成熟後の dLGN に多く発現し、皮質視床シナプスの後膜側に多く存在する、代謝型グルタミン酸受容体 1 型（mGluR1）に注目し、この分子の経験依存的回路維持に対する役割を調べた。dLGN における mGluR1 の発現は開眼（生後 14 日頃）後から網膜－dLGN シナプスが成熟する生後 20 日頃にかけて急激に増加した。mGluR1 ノックアウト（KO）マウスでは、正常な成熟型の網膜－dLGN シナプスが完成した後、生後 28 日以降で視覚経験遮断時と同様にシナプスの異常な再形成が起き、神経回路が幼若型に退行した。野生型マウスの dLGN でシナプス成熟後に mGluR1 の機能阻害を行うと、同様に神経回路が幼若型に退行した。次に視覚経験の遮断中に mGluR1 を薬理的に活性化すると、成熟型神経回路が維持された。以上の結果から、生後 20 日以降の dLGN における mGluR1 の活性化が視覚経験依存的な成熟型の網膜－dLGN シナプスの維持に必要不可欠であることが示された。我々は、視床に極めて豊富に発現する代謝型グルタミン酸受容体 1 型（mGluR1）が RG シナプスの維持機構に必要であることを明らかにした。

代謝型グルタミン酸受容体 1 型欠損マウスにおける RG シナプスの維持機構破綻



181 増殖細胞特異的に Nrf2 と合成致死を示す因子の探索

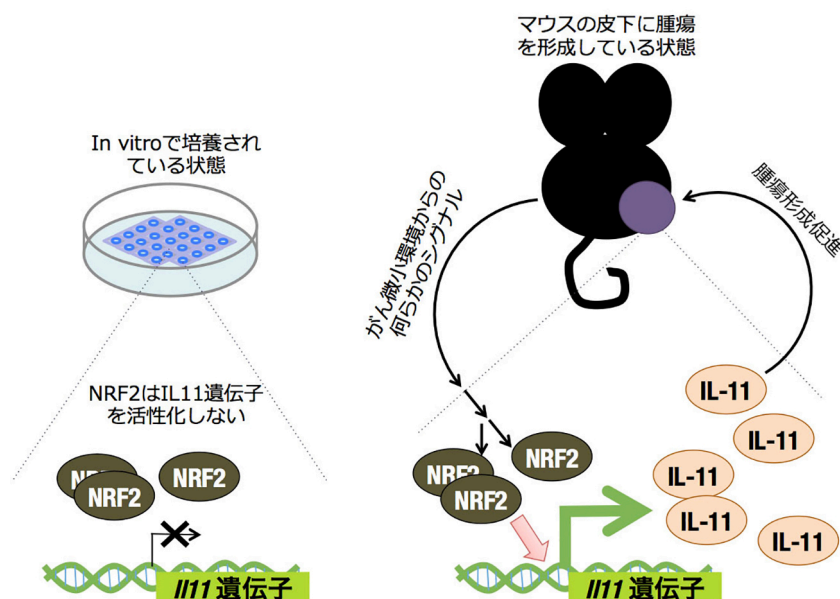
本橋 ほづみ

【目的】転写因子 NRF2 は、酸化ストレスからの生体防御に重要な役割を果たしている一方、多くのがん細胞で異常に活性化し、その悪性化をもたらしている。本研究では NRF2 陽性難治性がんの克服を目指し、がん細胞に特徴的な NRF2 機能の解明とがんにおいて NRF2 と合成致死を示す因子の同定を試みた。

【方法】がん細胞に特徴的な NRF2 機能の解析のために、マウスに同種移植が可能である NRF2 陽性がん細胞の作製を行った。得られた NRF2 陽性がん細胞モデルを用いて、がん特異的な NRF2 の下流因子の探索を行った。さらに、同定されたがん特異的な NRF2 下流因子のがんにおける機能評価を行った。

【結果】*Keap1* 遺伝子欠損マウスからマウス胎児線維芽細胞を樹立し、SV40 T 抗原と活性化型変異 HRAS を導入することで、NRF2 陽性のがん細胞モデルを作製することに成功した。当該細胞は、NRF2 依存的に C57BL/6 マウスの皮下に腫瘍を形成した。また、当該細胞では、腫瘍形成時特異的に NRF2 の下流で IL-11 の顕著な発現上昇が観察され、*Il11* 遺伝子を欠損させると腫瘍形成が著しく抑制された。乳がん患者の検体の検討からも、NRF2 陽性がんの多くが IL-11 陽性であり、乳がんでは NRF2 と IL-11 の連携ががんの悪性化をもたらしていることがわかった。以上のことから、NRF2 が活性化状態にあるがんの腫瘍形成は IL-11 に大きく依存する場合のあることが明らかになった。

NRF2 はがん微小環境からの何らかのシグナルを受けて *Il11* 遺伝子を活性化し腫瘍形成を促進する

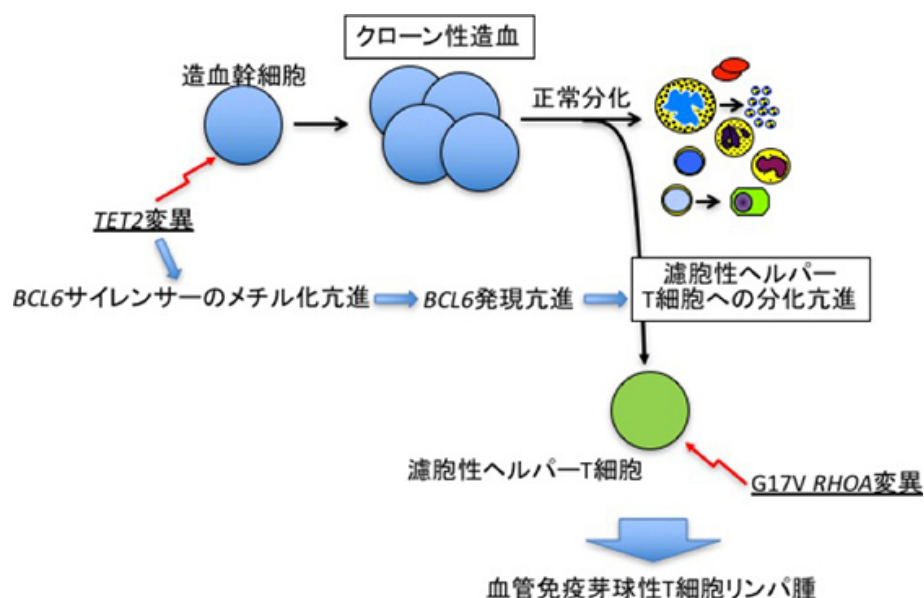


182 T細胞リンパ腫の分子基盤解明と新規治療法開発研究

千葉 滋

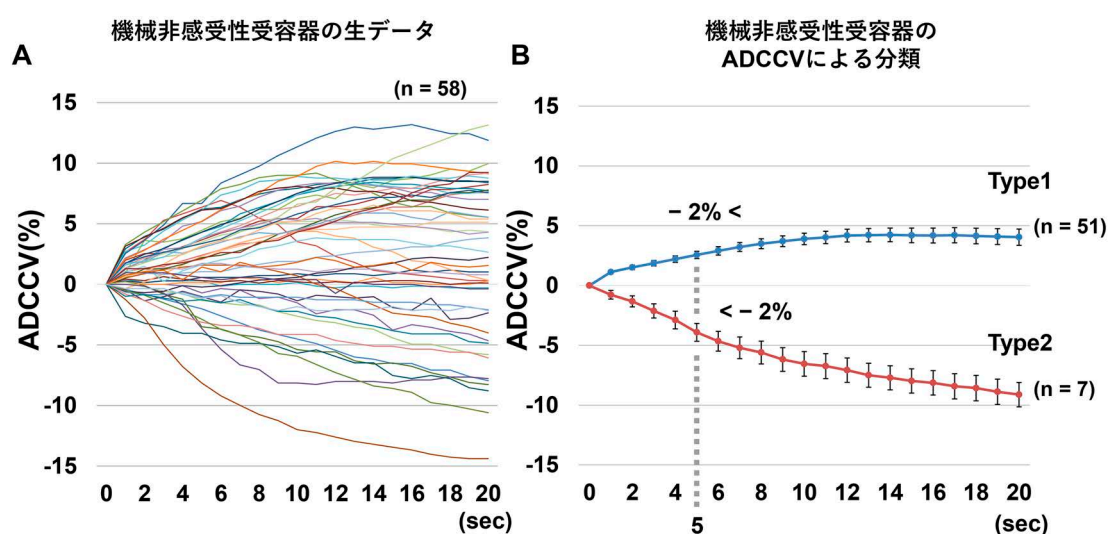
T細胞リンパ腫は悪性リンパ腫の10~20%と少ないが、一般に予後不良である。このうち血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（AITL）について分子病態解明を進め、新規治療法開発の基盤形成確立を目的として研究を行った。具体的には、多数のAITL患者検体について標的遺伝子シーケンスを行うとともに、本疾患で頻度の高い *Tet2* 遺伝子機能欠失変異および G17V RHOA 変異の意義を明らかにするため、マウスモデルを開発して解析した。その結果、AITL のゲノム異常の全体像を示すとともに、AITL の組織を構成する異なる細胞集団におけるゲノム異常を明らかにした。また、*Tet2* 遺伝子発現低下マウスの脾臓で濾胞性ヘルパー T（T_{fh}）細胞が増生し、加齢後に T_{fh} 細胞の形質をもつ腫瘍が発症することを明らかにした。その上で、TET2 機能低下によるエピゲノム制御異常を介して BCL6 発現が亢進し、これが腫瘍化に関わる可能性を示した。さらに、ヒト G17V 変異 RHOA を発現するトランスジェニックマウスと *Tet2* 遺伝子欠失マウスとの交配により、リンパ腫様腫瘍が発症することを見出した。

血管免疫芽球 T 細胞リンパ腫の発症機序



「非活動性侵害受容器」は正常時では機械刺激に対して反応性を示さず、病態時にはじめて反応性を持つ受容器であり、痛みの末梢神経機構を解明する上で重要である。しかし、骨格筋支配神経においてその存在は実証されていない。本研究では、*in vivo* 単一細径神経記録法により C 線維を記録し、正常ラット骨格筋の「非活動性侵害受容器」の軸索特性と侵害刺激に対する反応、感作物質筋注による反応性獲得の有無を調べた。その結果、これまで報告のある皮膚等他組織とは異なり、機械非感受性受容器のなかで交感神経と推定される神経の割合が非常に高く、一方で「非活動性侵害受容器」と推測される神経は機械非感受性受容器 58 本のうち 7 本であった。そのうちの 1 本において感作物質による機械感受性の出現が確認された。

機械非感受性受容器の特性



最近の研究により、癌細胞が転移する前に、癌が産生する因子によって転移先臓器において癌細胞が転移しやすい微小環境が形成されるという現象が報告され、その微小環境は「前転移ニッチ」と呼ばれている。脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、腫瘍の微小環境に作用し、癌の発育、転移を促進することが知られている。本研究では、乳癌による前転移ニッチ形成において、S1P とその産生酵素である SphK1 の役割を明らかにし、その分子機構を解明することを目的とする。前転移ニッチ形成実験として、SphK1 を過剰発現した E0771 乳癌細胞の細胞培養液をマウスに連日静脈内注射した後、E0771 細胞を尾静注した。また、マウスに高脂肪食を付加し、肥満マウスモデルを作製し、E0771 培養液による前転移ニッチ形成実験を行った。さらに、S1P1 型受容体の機能的阻害薬である FTY720 を用いて、前転移ニッチ形成の阻害について検討した。

SphK1 過剰発現細胞の培養液を予めマウスに投与すると、肺にマクロファージ等の炎症細胞を引き寄せ、TNF α や IL-6 の増加と癌転移の増加が認められた。高脂肪食による肥満は、前転移ニッチ形成を促進し、FTY720 は前転移ニッチ形成と乳癌の転移を抑制した。S1P は乳癌の転移を抑制する治療標的となる可能性がある。

乳癌による S1P 産生と肺における前転移ニッチ形成

